シンポジウムI 食品微生物検査法の最近の動向と簡易迅速化

● Recent Trends and Rapid-Simple Methods on Food Microbiological Testing

食品のカンピロバクター標準試験法

The Qualitative Method for the Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Foods

百瀬 愛佳[†]

(国立医薬品食品衛生研究所)

Yoshika MOMOSE

(National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

1. はじめに

日本における食品の細菌学的試験は、規格基準が設けられているものについては厚生労働省より発出される告示・通知が公定法として用いられており、規格基準が設けられていない食品種・細菌については、日本食品衛生協会が刊行している食品衛生検査指針微生物編に則って試験が行われる場合が多いと考えられる。しかしながら、これらの試験法の多くはその策定過程が公開されておらず、また、定期的な見直しなどが必ずしもなされているわけではない。これらの背景より、信頼性および実効性の担保という双方の観点から、日本における食品の細菌学的試験法策定のガイドラインを示すことを目的として、2005年に「食品からの微生物標準試験法検討委員会」(標準試験法検討委員会)が立ち上げられた。同委員会は、委員長・副委員長・事務局各1名と、微生物学を専門とする20名の委員、厚生労働省基準審査課ならびに同省監視安全課の担当行政官によって構成され、厚生労働科学研究費補助金・食品の安全確保推進研究事業の研究班として運営されている。標準試験法検討委員会では、培養法を基準として、従来の試験法の見直しや統一も含め、また、食品流通経済のグローバル化にある現状を背景として国際的に広く認められている試験法との整合性も考慮しつつ、科学的根拠に基づいた評価がなされた試験法の策定に向けた取り組みを行うことを目的としている。活動の進捗状況は、事務局が置かれている国立医薬品食品衛生研究所のホームページ上で公開されている (<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>)。

2. 標準試験法の策定

標準試験法検討委員会における標準試験法の策定は、

試験法ごとに4段階のステージを踏んで進められる。ステージ1ではまず作業部会が立ち上げられ、国際的に認められている試験法に関する情報収集を行うとともに、それを基に標準試験法の原案を作成し、標準試験法検討委員会に提案する。提案された原案は、委員の議論・承認を経て試験法番号NIHSJ-xx (xxは各標準試験法に固有の番号) が付与される。この段階で、NIHSJ-xx-ST1としてホームページ上に公開し、意見を求めることとなっている。

ステージ2では、寄せられた意見も参考にしつつ原案NIHSJ-xx-ST1の検討箇所の洗い出しを行い、作業部会が中心となってデータ出しを行う。得られた実験データを基に、原案のプロトコルに修正を加え、作業部会案の作成を行う。作業部会案は標準試験法検討委員会に提案され、委員による議論を経て承認されると、NIHSJ-xx-ST2としてステージ1と同様ホームページ上に公開される。

ステージ3では、寄せられた意見を基に作業部会案NIHSJ-xx-ST2に修正を加えるとともに、最終案提案へ向けてプロトコルの妥当性評価を行うことを目的とし、国際的な標準法を参照法として、collaborative studyによりNIHSJ-xx-ST2の試験成績の評価を行う。Collaborative studyの手順を示したcollaborative study実施案NIHSJ-xx-ST3を標準試験法検討委員会に提案し、承認された後、ホームページ上に公開して意見を求めるとともに、協力機関を募り、collaborative studyを実施する。

最終ステージであるステージ4では、collaborative studyの結果を基に作業部会が最終案を作成し、標準試験法検討委員会での承認を経た後、最終案NIHSJ-xx-ST4として確定される。

現在までに、NIHSJ-01~NIHSJ-25のプロトコルが標準試験法検討委員会の議題として取り上げられ、それぞれの進捗状況が標準試験法検討委員会のホームページ上で公開されている。

[†] 連絡先

*1 ☎ 158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

3. カンピロバクター食中毒

厚生労働省の食中毒統計(http://www.mhlw.go.jp/sei-sakunitsu/sei/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syoku-chu/index.html)によると、日本における細菌性食中毒は、過去10年間で事件報告数は約半減、患者報告数も減少傾向が認められる。しかし、原因別に見ると、カンピロバクターによる食中毒は、事件数に減少傾向が認められるものの患者数は横ばい状態であり、細菌性食中毒の中では事件報告数で1位、患者報告数でも常に3位以内を占めている。また、食品安全委員会の試算¹²⁾では、年間に平均延べ約1.5億人がカンピロバクターに感染すると推定されており、優先的に低減対策を考えるべき対象である。

カンピロバクター属菌は、主に家畜や家禽の腸管内に棲息し、汚染された食鳥肉・食肉・内臓肉や飲料水等を介してヒトに感染する。カンピロバクター感染に伴う症状は、下痢・腹痛・発熱などが主で比較的軽症で経過するが多いが、主に症状緩解後に、急性の末梢神経障害であるギラン・バレー症候群などの合併症を続発する症例もあることが知られている。ギラン・バレー症候群は、急激な筋力低下を主徴とする末梢性の多発神経炎であるが、その発症に自己免疫との関連が指摘されており、多くの症例で神経症状発現前に感染症の徴候が認められる。*Campylobacter jejuni*、サイトメガロウイルス、Epstein-Barr ウイルス、*Mycoplasma pneumoniae*、*Haemophilus influenzae*などがその先行感染病原体と考えられており^{9, 11)}、なかでも最も頻度が高いのが*C. jejuni*であり、ギラン・バレー症候群患者の約3割に*C. jejuni*の先行感染が認められたとの報告もある⁹⁾。この観点からも、カンピロバクターによる感染リスクの低減は重要な課題であると言える。

4. 食品からのカンピロバクター・ジェジュニ/コリ検出のための標準試験法

上述のとおり、カンピロバクターは細菌性食中毒の事件報告数・患者報告数共に上位を占める原因菌であり、抜本的な対策が求められるところであるが、その試験法については、現在国内でカンピロバクターに関する食品の規格基準がないために、公定法に相当する試験法は規定されていない。また、カンピロバクターの分離培養にあっては試験法によって検出結果が影響を受けやすいことが知られており、信頼性の高い統一した標準試験法を策定する必要があると考えられる。こうした統一された試験法の整備は、食品における汚染実態をより正確に把握するにあたって必要であろう。そのため、全国7カ所の地方衛生研究所からなるカンピロバクター・レファレンスセンターが中心となって、国内で従来用いられてきた培地・培養条件、および国際的に広く認められている国際標準化機構 International Organization for Stand-

図1. ISO 10272-1: 2006の流れ

ardization (ISO)の試験法を基に、食品のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法案の検討が行われてきた。

(1) ISO 10272-1:2006導入における問題点

ISOのカンピロバクター属菌試験法には定性法(ISO 10272-1: 2006⁶⁾、定量法(ISO 10272-2: 2006⁷⁾、および半定量法(ISO 10272-3: 2010⁸⁾)があるが、カンピロバクター標準試験法の目的が検出・分離であることから、定性法であるISO 10272-1: 2006を参照した。定性試験法では、増菌培養・選択分離・確認試験という手順で対象となる菌の検出分離を行う(図1)。版権の問題から、詳細についてはISO 10272-1: 2006本文をご参照いただき、以下は概略にとどめる。

ISO 10272-1: 2006は、前版であるISO 10272: 1995⁵⁾から2006年に改訂されたカンピロバクター属菌の定性試験法である。特徴としては、損傷菌の回復を目的として増菌培地にボルトン培地を採用するとともに、37°Cで前増菌を行った後、夾雑菌の増殖を抑制する目的で41.5°Cへ温度シフトを行う増菌法が採用されている。ま

た、増菌培養後の菌液を2種類の選択分離培地に塗抹してカンピロバクターの分離を行うが、第一選択分離培地としてmodified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA)を規定し、第二選択分離培地は試験所または試験者の裁量で選択することとなっている。日本で用いる標準試験法として、国際的な標準法であるISO 10272-1: 2006をそのまま導入するという選択肢も考えられたが、近年、特に鶏肉で夾雑菌として基質拡張型β-ラクタマーゼ産生菌の検出率が増加していること^{2~4, 14)}、そしてボルトン培地と第一選択分離培地であるmCCDAがどちらもβ-ラクタム系抗生物質を主な選択剤としていることから、ボルトン培地とmCCDAの組合せによるカンピロバクター分離成績の低下が指摘されている¹⁰⁾。このことから、標準試験法検討委員会においては、増菌培地の比較を中心にプロトコルの検討を行った。

(2) NIHSJ-02案の作成

カンピロバクター・ジェジュニ／コリの標準試験法であるNIHSJ-02は、厚生労働科学研究費補助金の研究班（主任研究者：品川邦汎）¹³⁾においてカンピロバクター・レファレンスセンターを中心とするメンバーによって検討されてきた試験法が、標準試験法検討委員会において標準試験法として議論されることとなったものである。カンピロバクター属菌は、2010年現在で22菌種8亜種が報告されているが¹⁾、食中毒菌として指定されているものがカンピロバクター・ジェジュニおよびカンピロバクター・コリの2菌種であることから、NIHSJ-02での検出対象はこの2菌種とした。また、カンピロバクター食中毒の多くが非加熱もしくは加熱不十分の鶏肉・牛レバーおよびそれらの加工品に由来することから、プロトコルの検証は鶏肉を用いて行われた。将来的に通知として発出される際には、鶏肉等の汚染実態調査のためのプロトコルとして用いられることになるであろう。

上述のとおり、NIHSJ-02の策定に当たっては主に、増菌培地の選択を中心にプロトコルの検討が行われてきた。これまでにISOのカンピロバクター試験法に採用された実績のある増菌培地としては、プレストン培地・Park and Sanders broth・ボルトン培地が挙げられるが、Park and Sanders brothが製造中止となったため、ボルトン培地およびプレストン培地での増菌による鶏肉からのカンピロバクター分離成績の比較を中心にデータ出しが行われ、それをもとにプロトコル案の骨子が作成された。作業部会において作成されたNIHSJ-02案は、ISO 10272-1: 2006と同様、増菌培養・選択分離・確認試験という手順で当該菌の検出を行うが、増菌培地としてプレストン培地を採用している。流れ図を図2に示す。検体25 gを採取し、プレストン培地を用いて42℃にて24～48時間増菌した後、2種類の選択分離培地に画線塗抹してカンピロバクターと疑われる集落の分離を行う。選択分離培地については、第一選択分離培地をmC-

図2. NIHSJ-02の流れ

CDA、第二選択分離培地はISO 10272-1: 2006に倣って試験所または試験者の判断で採用できることとした。第二選択分離培地という呼称にはなじみが薄いと考えられたため、以下のような定義を付記した。第二選択分離培地とは、その試験法において共通に用いる、培地組成が明示された選択分離培地（NIHSJ-02ではmCCDAを指す）に追加することによって、当該微生物の分離を補助する効果が期待できるとされる選択分離培地であり、試験所または試験者が選択メカニズムなどの相違を考慮し選択することができるものである。例として、バツラー寒天培地、スキロー寒天培地、プレストン寒天培地、カルマリー寒天培地の4種を挙げているが、これら以外の選択分離培地の使用を妨げるものではない。選択分離培地上で42℃にて24～48時間培養後にカンピロバクターと思われる集落を分離し、プルセラ寒天培地のような血液不含の非選択寒天培地を用いて37℃にて24～48時間純培養した後、確認試験（菌形観察、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験）を行って鑑別する。得られた試験成績は、カンピロバクター・ジェジュニ／コリが検出された場合は「陽性／25 g」、検出されなかった場合には「陰性／25 g」と記載する。より詳細な手順や、判定に迷う場合・菌種同定まで実施する場合の追加試験など、プロトコルの詳細については、標準試験法検討委員会のホームページより最新版が入手可能である。

(3) NIHSJ-02案の妥当性評価

NIHSJ-02最終案を確定させるに当たり、国際整合性を担保することを目的として、15の協力機関による collaborative studyを実施し、その結果よりNIHSJ-02案の妥当性について考察を行った。自然汚染によるカンピロバクターの生菌レベルを下げる目的で市販の鶏挽肉を2回凍結融解した後、各25 gに試験菌を人工的に接種して、非接種・*C. jejuni* 低菌数接種(1~9 CFU/25 g)・*C. jejuni*高菌数接種(10~99 CFU/25 g)・*C. coli* 低菌数接種(1~9 CFU/25 g)の4群を調製した。1機関当たり各群12検体について、半数ずつをNIHSJ-02案もしくはISO 10272-1: 2006を用いてカンピロバクターの検出を行った。接種群ごとのカンピロバクター分離成績を比較した結果より、鶏肉からのカンピロバクター・ジェジュニ/コリの分離において、NIHSJ-02案はISO 10272-1: 2006と比較して同等もしくはそれ以上の性能を有すると考察された。

5. おわりに

これまでに標準試験法検討委員会で議論されてきた標準試験法では、現在、サルモネラ属菌の定性試験法(NIHSJ-01)、カンピロバクター・ジェジュニ/コリの定性試験法(NIHSJ-02)、黄色ブドウ球菌の定量試験法(NIHSJ-03・NIHSJ-05)、腸内細菌科菌群の定性試験法(NIHSJ-15)、リステリア・モノサイトゲネスの定性試験法(NIHSJ-08)・定量試験法(NIHSJ-09)などがステージ4の最終案まで進んでいる。2013年度にはこれらの標準試験法が通知として発出され、食品衛生検査指針微生物編の改定版にも掲載される予定であり、厚生労働科学研究費補助金の研究班として運営されてきた標準試験法検討委員会の活動が、成果として反映される見通しである。現在策定中のほかの標準試験法についても、最終案が確定した際には同様に、その成果が還元されていくことが期待される。

謝 辞

カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法の作成にご尽力下さいました研究機関の皆様、collaborative studyご協力機関、ならびに衛生指標菌・バリデーション合同作業部会の皆様に深謝いたします。

カンピロバクター標準試験法作成：秋田県健康環境センター、群馬県衛生環境研究所、埼玉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、広島市衛生研究所、山口県環境保健センター、熊本県保健環境科学研究所、国立医薬品食品衛生研究所

Collaborative studyご協力機関：北海道立衛生研究所、秋田県健康環境センター、群馬県食肉衛生検査所、東京都健康安全研究センター、神奈川県衛生研究所、愛知県衛生研究所、京都府保健環境研究所、大阪府立公衆

衛生研究所、広島市衛生研究所、山口県環境保健センター、熊本県保健環境科学研究所、一般社団法人食肉科学技術研究所、財団法人日本冷凍食品検査協会、財団法人食品分析開発センター SUNATEC、財団法人広島県環境保健協会

衛生指標菌・バリデーション合同作業部会：松岡英明、田中廣行、森 曜子、内田和之、守山隆敏、吉田朋高、伊豫田 淳、岡田由美子、江川智哉、五十君静信

文 献

- 1) Debruyne, L., Broman, T., Bergström, S., Olsen, B., On, S. L. W. and Vandamme, P.: *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **60**, 1870-1875 (2010).
- 2) Egea, P., López-Cerezo, L., Torres, E., Gómez-Sánchez, M.C., Serrano, L., Sánchez-Ortiz, M. D. N., Rodríguez-Bano, J. and Pascual, A.: Increased raw poultry colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. Int. J. Food Microbiol., **159**, 69-73 (2012).
- 3) Geser, N., Stephan, R. and Hächler, H.: Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet. Res., **8**, 21-29 (2012).
- 4) Hiroi, M., Yamazaki, F., Harada, T., Takahashi, N., Iida, N., Noda, Y., Yagi, M., Nishio, T., Kanda, T., Kawamori, F., Sugiyama, K., Masuda, T., Hara-Kudo, Y. and Ohashi, N.: Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. J. Vet. Med. Sci., **74**, 189-195 (2012).
- 5) International Organization for Standardization: ISO 10272: 1995, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter* (1995).
- 6) International Organization for Standardization: ISO 10272-1: 2006, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.—Part 1: Detection method (2006).
- 7) International Organization for Standardization: ISO/TS 10272-2: 2006, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.—Part 2: Colony-count technique (2006).
- 8) International Organization for Standardization: ISO/TS 10272-3: 2010, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.—Part 3: Semi-quantitative method (2010).
- 9) Jacobs, B. C., Rothbarth, P. H., van der Meché, F. G. A., Herbrink, P., Schmitz, P. I. M., de Klerk, M. A. and van Doorn, P. A.: The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. Neurology, **51**, 1110-1115 (1998).

- 10) Jasson, V., Sampers, I., Botteldoorn, N., López-Gálvez, F., Baert, L., Denayer, S., Rajkovic, A., Habib, I., De Zutter, L., Debevere, J. and Uyttendaele, M.: Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *Int. J. Food Microbiol.*, **135**, 248–253 (2009).
- 11) Mori, M., Kuwabara, S., Miyake, M., Noda, M., Kuroki, H., Kanno, H., Ogawara, K. and Hattori, T.: *Haemophilus influenzae* infection and Guillain-Barré syndrome. *Brain*, **123**, 2171–2178 (2000).
- 12) 内閣府食品安全委員会: 微生物・ウイルス評価書 鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ/コリ (2009).
- 13) 品川邦汎 (主任), 牧野壮一 (分担), 五十君静信 (分担): 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 (H19-食品-一般-014)「食品製造における食中毒菌汚染防止のための高度衛生管理に関する研究」(2007–2009).
- 14) Stuart, J. C., van den Munckhof, T., Voets, G., Scharringa, J., Fluit, A. and Hall, M. L.: Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *Int. J. Food Microbiol.*, **154**, 212–214 (2012).