

THE CHEMICAL TIMES

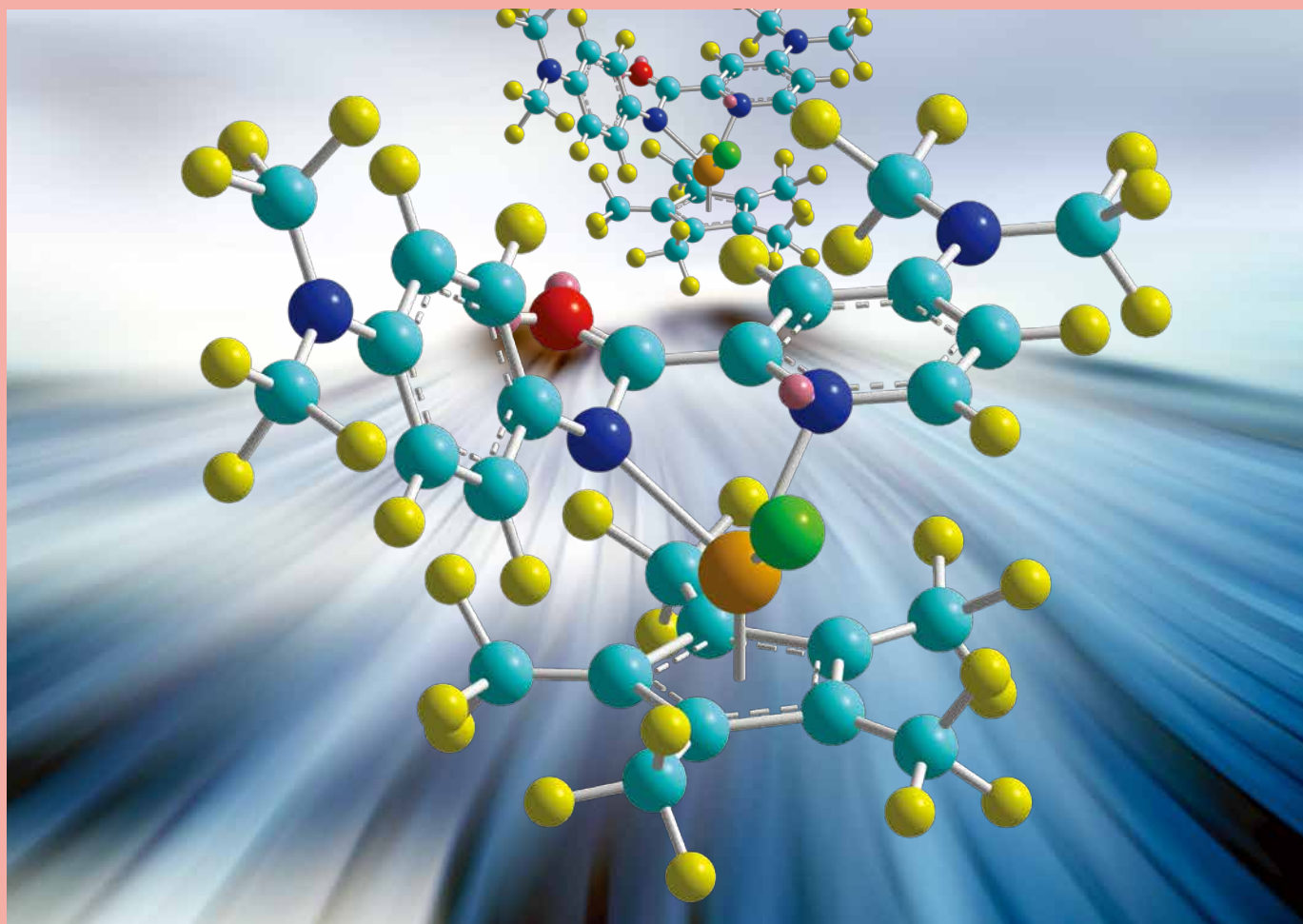
2017 No.2 (通巻244号)

ISSN 0285-2446

特集

食品衛生関係

- 食の安全と検査—細菌性食中毒を中心に— ————— 伊藤 武 02
- 国内の食品微生物試験法とISO法とのハーモナイゼーション ————— 五十君 静信 10
- 腸管出血性大腸菌感染症の発生状況と検査法の変遷 —酵素基質培地の導入— — 甲斐 明美 14
- 微生物を色で見る—酵素基質培地— ————— 金子 孝昌 20



食の安全と検査

ー細菌性食中毒を中心にー

Food safety and inspection
for microbial foodborne disease in Japan

一般財団法人 東京顕微鏡院 食と環境の科学センター 名誉所長 **伊藤 武**

Takeshi Ito (Emeritus Director)

Incorporated Foundation Tokyo Kenbikyo-in, Institute for Food and Environmental sciences.



キーワード

健康被害、微生物検査、HACCP

01

まえがき

国内における食品による健康被害はヒスタミン、トランス脂肪酸、N-ニトロソアミンなどの食品成分に起因する有害化学物質や農薬混入事件などによる症例も危惧されるが、毎年繰り返し発生している症例は微生物を原因とする健康被害である。従って、食の安全確保は微生物の制御に重点がおかれ、衛生管理の国際基準であるHACCPシステムも焦点は病原微生物対策である。本稿では、国内で多発している食中毒のうち重要なサルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌O157、カンピロバクター属菌および腸炎ビブリオの各病原菌のこれまでの安全性対策とその効果および問題点について述べる。また、食品企業が実施する衛生管理対策としての細菌検査についてもふれたいと思う。

02

食品による微生物学的健康被害

1) 食品媒介微生物

現在国内で問題とされている飲食物媒介感染症食中毒の病原体はウイルス、細菌、原虫、寄生虫である(表1)。

ウイルス:

ノロウイルスは発生例が最も多く、重視されている病原体である。その他に、A、E型肝炎ウイルスがある。

細菌:

グラム陰性、陽性、通性嫌気性、偏性嫌気性など各種の病原体があり、それぞれ病原性や分布などに特徴が認められる。食中毒の予防の観点や発生機序から感染型と毒素型に分類されている。毒素型は黄色ブドウ球菌、嘔吐型セレウス菌、ボツリヌス菌の3つであり、これら細菌は食品中で増殖し、増殖に伴って産生された各種の毒素により人の健康を傷害する。毒素型以外の細菌は感染型に分類されている。感染型のグループには病原大腸菌(腸管出血性大腸菌、毒素原性大腸菌、組織侵入性大

表1 食品媒介微生物

病原体	主な感染源	主な媒介食品
ウイルス		
ノロウイルス	人	カキ、その他食品
A型肝炎ウイルス	人	カキ
E型肝炎ウイルス	豚、猪など	肝臓、豚肉
細菌		
病原大腸菌		
腸管出血性大腸菌	牛、山羊、羊	食肉およびその加工品、野菜
その他の病原大腸菌	人	食品
チフス菌、パラチフス菌	人	飲料水、食品
一般のサルモネラ属菌	動物、環境	食肉、鶏卵、野菜など
カンピロバクター	鶏、牛、豚など	食肉、肝臓など
腸炎ビブリオ	海とその泥土	魚介類、浅漬
コレラ菌	人	魚介類、その他食品
その他の病原ビブリオ	海	魚介類
赤痢菌	人	食品
連鎖球菌	人	卵サンドイッチ
リステリア	牛、豚、鶏	ナチュラルチーズ、生ハム、食肉製品など
ウェルシュ菌	鶏、牛、豚、土壌	加熱調理食品、惣菜
ボツリヌス菌	土壌(海、湖、耕地)	いずし、真空包装食品、レトルト類似食品
黄色ブドウ球菌	人、家畜、環境	弁当、お握り、和洋菓子
嘔吐型セレウス菌	穀類、土壌	焼飯、チャーハン
原虫		
クリプトスポリジウム	動物	飲料水、プール水
寄生虫		
アニサキス	魚類	新鮮な魚さしみ
クドア	ヒラメ	新鮮なヒラメさしみ
サルコシステス	馬	馬刺し

腸菌、腸管付着性大腸菌など)、サルモネラ属菌、カンピロバクター属菌、腸炎ビブリオなど各種の細菌が含まれ、食品に汚染した菌や増殖した菌が飲食物と共に経口的に摂取され、腸管で病原性を発揮する。

原虫:

ジアルジア原虫やトキソプラズマもあるが、国内ではクリプトスポリジウムが話題となる。

寄生虫:

広く魚類に寄生するアニサキス、ヒラメに寄生するクドア、馬に寄生するサルコシスティスが重要である。

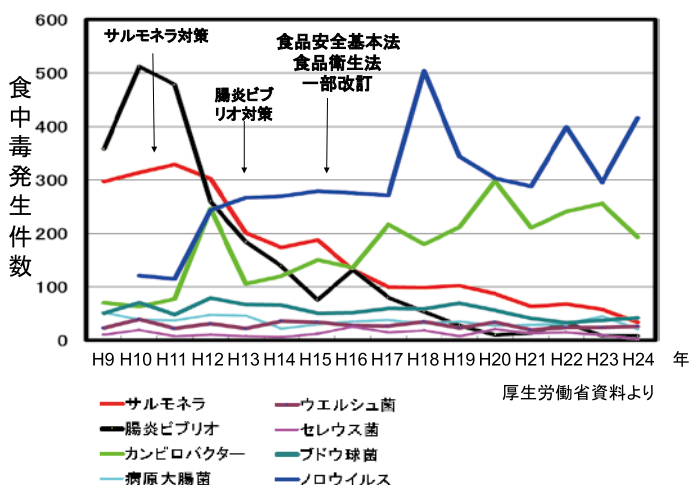


図1 主な微生物による食中毒の発生件数(患者数2名以上の事例)

2) 主な細菌性食中毒の発生状況(図1)¹⁾

国内における食中毒は法的規制や行政からの指導および食品事業者の自主衛生管理の推進などにより大きく変動してきました。現在でも増加傾向のある細菌性食中毒はカンピロバクター属菌、衛生管理の推進により著しく減少してきたのはサルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、ブドウ球菌、発生例は多くないが10件以下に減少してきたセレウス菌、大きく変動しないが毎年発生が認められるウェルシュ菌、数例の発生報告があるエルシニア・エンテロコリチカ、希な発生がボツリヌス菌、赤痢菌などである²⁾³⁾。

サルモネラ食中毒:

平成元年9月頃からサルモネラ食中毒が増加し、平成8年では約300件の発生、患者数が約15,000名にもなった。この増加したサルモネラ食中毒の殆どが鶏卵を原因とする食中毒であった。その後、養鶏場、GPセンター（洗卵・格付け）、集団給食施設、飲食店での対策が徹底され、サルモネラ食中毒は減少してきた(図2)。

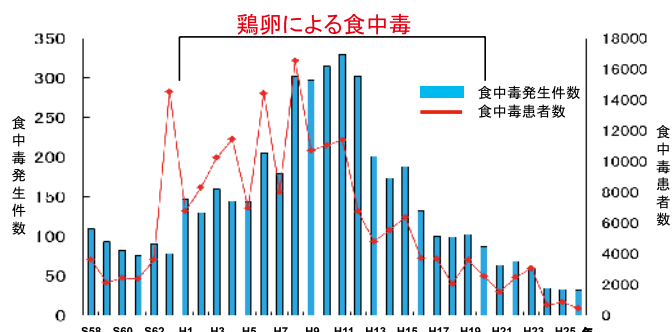


図2 サルモネラ属菌食中毒の発生状況

腸管出血性大腸菌食中毒⁴⁾

国内においては昭和59年頃からO157による散発例が確認されてきた。平成2年にはO157による水系感染により保育園児319名が発症、2名が死亡した。それ以降O157による集団感染例が継続的に観察され、平成8年には全国的な大流行（25事例の集団例、1万名以上の患者）となり社会問題にもなった。これに伴い元厚生省は、大量調理施設衛生管理マニュアルなど新しい予防対策を施行した。また、文部科学省は学校給食による食中毒対策と学校給食衛生管理基準を制定して指導を行ってきた。それでもO157による食中毒は飲食店を中心に毎年発生を繰り返しており、平成12-27年の間に322件（患者数5,017名、死亡者26名）が報告されている(図3)。ただし、学校給食によるO157食中毒は平成9年以降発生していない。

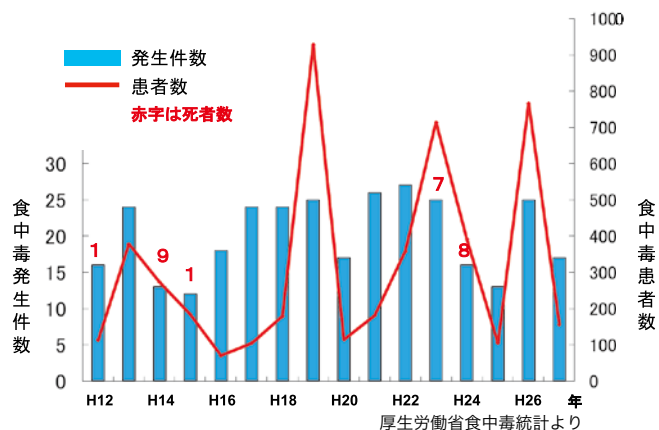


図3 腸管出血性大腸菌食中毒の発生状況

カンピロバクター食中毒:

本食中毒は各種の対策が議論されてはいるが、毎年多数の患者が報告されている(図4)。原因食品(推定を含む)を表2に示す。原因が判明した事例の約半数が鶏刺し、ササミ、鶏レバーなどの生食であり、提供側も消費者も鶏肉の生食によるリスクを殆ど無視していると思われる。カンピロバクター属菌は100個以下の少量菌で感染が成立することから、これまでも厚生労働省(厚労省)や各自治体からは鶏肉の生食を避ける啓発活動が推進されてきたが、この風潮を止めることができていない。

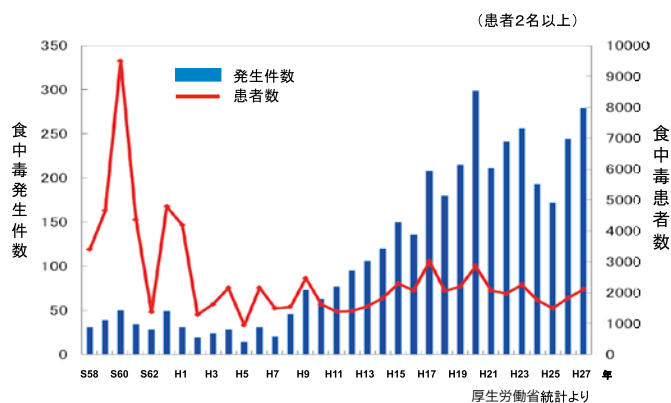


図4 カンピロバクター食中毒の発生件数及び患者数

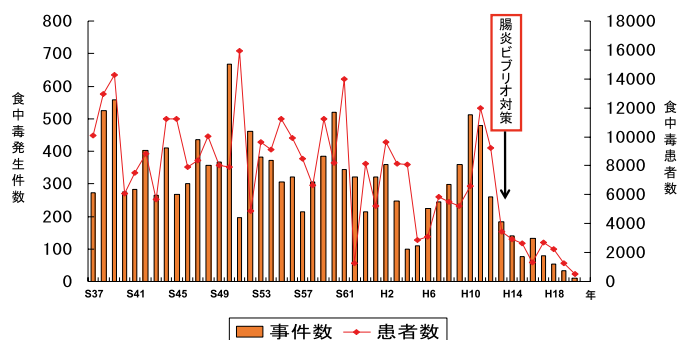


図5 腸炎ビブリオ食中毒の発生状況

表2 カンピロバクター食中毒の推定原因食品

原因食品	平成22-24年	平成25-27年
鶏肉料理	27	20
鶏刺し、たたき、ささみ	72	124
鶏レバー	18	26
牛レバー	29	1
豚レバー	1	1
焼鳥	19	12
焼肉	10	4
レバー刺し	10	-
バーベキュー	6	2
その他*	8	3
小計	200(22.5)	193(29.4)
不明	689(77.5)	464(70.6)

*飲料水、麦茶、親子丼、生食肉、牛肉、牛乳
(厚生労働省の報告から推定)



平成13年6月通知、厚生省資料より

図6 腸炎ビブリオ食中毒の減少理由

腸炎ビブリオ食中毒:

腸炎ビブリオ食中毒は昭和40年代から60年代では事件数が約400件、患者数が約1万名で、国内の主要な食中毒であった。しかし、平成13年以降の腸炎ビブリオ食中毒は劇的に減少し、平成27年の報告では発生件数3件、患者数224名である(図5)。腸炎ビブリオ食中毒が減少してきた理由は下記のごとく考えられる。

厚生省は平成13年に腸炎ビブリオ食中毒防止のため、これまでの細菌学的基礎調査を踏まえて法的規制による対策を施行した。腸炎ビブリオ対策の要点は、①腸炎ビブリオ汚染魚介類の低減化、②腸炎ビブリオの増殖防止であり、図6のごとく、魚市場での洗浄水は滅菌海水ないし飲用適の水により二次汚染防止対策が図られ、加工過程では生食する魚介類の腸炎ビブリオ菌数が1g当たり100個以下、ボイルしたタコなどは腸炎ビブリオ陰性でなければならない規制、リテールでは二次汚染防止、あらゆる工程では腸炎ビブリオの増殖を防止するために低温(10℃以下)保存とされた⁵⁾。これらの対策が適切に実施さ

れたことにより劇的に減少したと考えられる。

国内で猛威を振るってきた腸炎ビブリオ食中毒をこれほどにまでに減少させたことは、我が国の食品衛生管理の推進成果として世界に誇れることである。

03 | 主な病原微生物による食品汚染と問題点

1) サルモネラ属菌

人に感染するサルモネラ属菌は主に *Salmonella enterica* 亜種 *enterica* で、保有する動物は牛、豚、山羊、羊などの家畜、鶏、七面鳥、ウズラなどの家禽であるが(図7)、これら以外にイヌ、ネコ、カメなどの愛玩動物、キツネなどの野生動物、ネズミ、カラス、鳩などの野生鳥類、蛇、トカゲなどは虫類である。ただし、は虫類や冷血動物が保菌するサルモネラ属菌は殆どが人への感染が否定されている *Salmonella enterica* 亜種 *diarizonae* や亜種 *indica* などである。

家畜:

家畜がサルモネラ属菌を保菌していることは120年前から知られていたが、酪農が大規模化されるに従い、新たに家畜の飼料汚染が大きな問題となってきた。国内においても飼料の原料には廃棄された家畜・家禽・魚のくず肉や血液、骨が使用され、飼

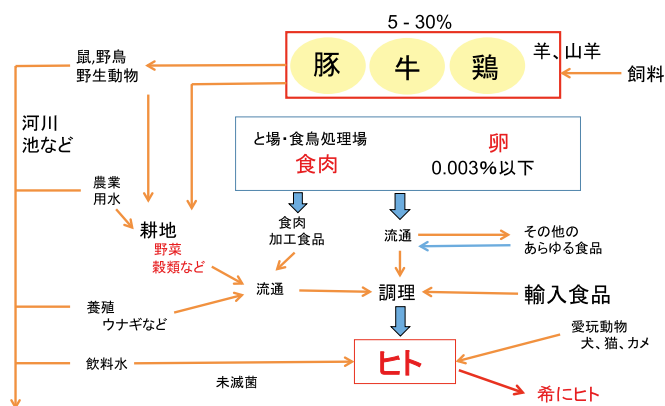


図7 サルモネラ属菌の汚染

料のサルモネラ汚染率が20%であった時代もある。飼料を介して家畜がサルモネラ属菌に感染し、感染動物のくず肉などが飼料とされることから家畜・飼料・家畜間にメリーゴランド状態が作られる。WHOはその対策の一つとして飼料対策を推進していた。現在では飼料のサルモネラ汚染は著しく減少し、0.1%以下である。それでもネズミや飼育環境（敷料やハエなど）がサルモネラ属菌に汚染されていることから、農場のサルモネラ汚染は数%から10%程度となっている。しかし、と場の衛生管理（腸管の結紮、刀の殺菌など）が推進され、市販食肉のサルモネラ汚染率は5%以下となってきた（図8）。

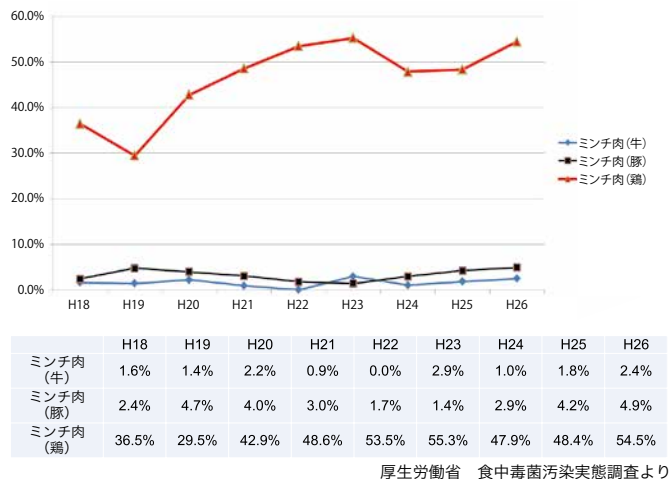


図8 流通食肉（ミンチ肉）からのサルモネラ属菌検出

家禽:

鶏のサルモネラ属菌保菌もかなり以前から知られており、卵殻に汚染したサルモネラ属菌が卵内へ侵入することも時々起きていた。ところが昭和61年頃から米国や欧州において産卵養鶏にS. Enteritidis (SE) 保菌が蔓延し、しかも卵巣などにSEが侵入したことにより新鮮な鶏卵内部からSEが検出される事態となった。

国内においても平成元年頃から鶏卵内へのSE汚染が起き、鶏卵を原因食品とする爆発的なサルモネラ食中毒が発生した（図2）。その後約20年間をかけて厚労省や農林水産省（農水省）の指導、自主衛生管理の推進、農場における積極的なSE対策

（洗浄・消毒、ネズミ撲滅、SEワクチンの接種など）⁶⁾、GPセンターでの消毒による洗卵、低温管理、飲食店での鶏卵の低温保管や卵料理の加熱の徹底などが実施された。また、養鶏場ではSE動向の把握のために、積極的にサルモネラ検査が実施されてきた。現在では採卵養鶏でのSE清浄化が進み、併せて鶏卵内のSE汚染も減少してきている。また、リテールにおけるSE対策も確実に効果を上げ、SE食中毒が著しく減少した。

しかしS. Infantis、S. Montevideo、S. Typhimuriumなどのサルモネラ属菌が肉用鶏（ブロイラー）に浸潤し、また、食鳥処理場では二次汚染の温床となっており、流通する鶏肉のサルモネラ汚染率の現状は50%以上ある（図8）。と畜場での衛生管理は向上したが、今後は食鳥処理場の衛生管理、例えば注目されている過酢酸による消毒などを導入したHACCPシステムの構築が重要である。

サルモネラ属菌は環境抵抗性が高いことから、家畜の堆肥や農業用水などを介して栽培農場が汚染され、最終的に農産物の種子や野菜へのサルモネラ汚染が生じてきた。厚労省の流通生食野菜の検査ではこれまでにスプラウト、トマト、キュウリなどからサルモネラ属菌が検出されている。米国においては、生鮮農産物以外に各種の流通加工食品などのサルモネラ属菌検出の実態が報告され、広範囲な食品にサルモネラ属菌汚染が拡大してきていることを注目しなければならない。

2) 腸管出血性大腸菌

昭和58年にハンバーグによる腸管出血性大腸菌O157食中毒が米国で発生し、研究の当初から世界各国で牛農場のO157汚染状況や牛の保菌が調査されてきた（図9）。

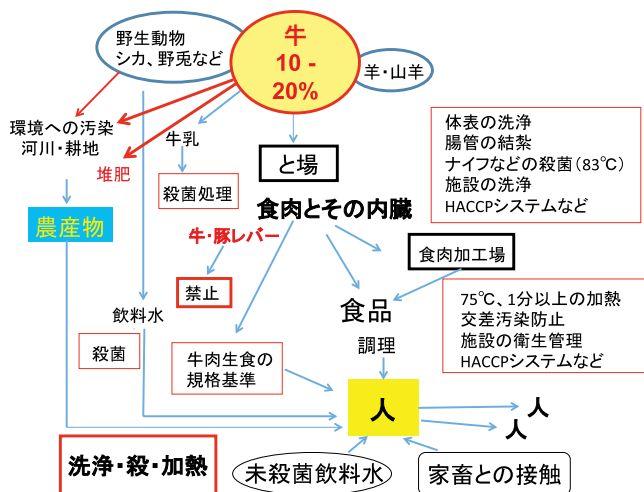


図9 腸管出血性大腸菌O157の感染と予防の概略

国内でも農水省の事業により全国的肉用牛農場406件のうちO157が27.1%の農場、O26が2.0%の農場から検出され、国内の牛の腸管出血性大腸菌汚染が明らかにされた⁷⁾。市販牛挽肉からもO157が検出され、O157の原因食品は牛肉や内臓肉、肝臓などが主体であることが明らかにされた。厚労省はユッケによるO157やO111による食中毒事例が多発していることから生牛肉の安全性評価法を見直し、最も厳しい成分規格を制定し、適合しないユッケなどの生食用牛肉の販売を禁止した。また、牛レバーのO157汚染率は数%であり、牛の生レバーによる

○157食中毒も継続して発生していることから牛生レバーの提供も禁止とした。

白菜、キムチ、キュウリなどの浅漬けによる○157食中毒も認められ、牛の堆肥を介して野菜やスプラウトなどの農産物への○157汚染も危惧される。野菜の腸管出血性大腸菌汚染は大きな課題である。

国内における腸管出血性大腸菌感染症の血清型は○157以外に○26、○111、○103、○145など各種の血清型による流行が認められている。米国農務省では牛挽肉による腸管出血性大腸菌食中毒が頻発していることから、牛挽肉の○157検査が大々的に実施され、2015年の報告では○157が0.06%、非○157(○26、○45、○103、○111、○121、○145)が1.01%に検出されている。腸管出血性大腸菌食中毒対策には牛生産農場、と場、リテールの各工程での衛生対策の推進が求められている。

3)カンピロバクター属菌

カンピロバクター属菌もサルモネラ属菌と同様に家畜や家禽、野鳥の保菌率が極めて高い。しかし、サルモネラ属菌と異なり、大気に暴露されると死滅し、乾燥に極めて弱いことから、サルモネラ属菌のように環境汚染はそれほど高くない。牛や豚もカンピロバクター属菌を保菌しているが、と場施設でと殺直後のと体表面からはカンピロバクター属菌が多数検出されるが、と体表面を冷気で一晩処理された後のカンピロバクター属菌検出率は数%となり、乾燥により多くが死滅したと考えられる。従って市販牛肉や豚肉からのカンピロバクター属菌検出率は極めて低い。

ブロイラー農場に導入された雛にはカンピロバクター属菌汚染が見られないが、肥育1-2週間後からカンピロバクター属菌保菌鶏が認められ、養鶏場ごとに陽性率が異なる。殆どの養鶏場の鶏がカンピロバクター属菌を保菌し、市場に出荷される6ヶ月から1年ぐらいいは鶏腸管内で常在細菌化している⁸⁾。高頻度に汚染を受けている肉用鶏が食鳥処理場でと殺後、解体されると、鶏肉からのカンピロバクター属菌汚染率が30-50%となる。特に次亜塩素酸塩による殺菌がほどこされている冷却工程からカンピロバクター属菌が高率に検出されているため、水による冷却工程を改善し、空冷による処理方法や消毒法などの検討が必要である。

鶏のカンピロバクター属菌感染症の特徴として感染初期には菌血症となるが、1日ぐらいいでクリアランスがかり、血液からはカンピロバクター属菌が排除される⁹⁾。しかし鶏の肝臓内にカンピロバクター属菌が保有されることが多く、市販の鶏の肝臓の検査では50%以上からカンピロバクター属菌が検出される。牛、豚の肝臓の生食は禁止されているが、鶏についても検討が必要であろう。

4)腸炎ビブリオ

病原性腸炎ビブリオは耐熱性溶血毒(TDH)あるいは類似溶血毒(TRH)を産生する菌であるが、海産物の魚介類に広く分布する腸炎ビブリオの殆どがこれらの毒素非産生株(病原性のない腸炎ビブリオ)である。一部、病原性腸炎ビブリオが汽水域の海泥や海水から検出されることから、水温が約20℃以上になるとこれらの環境で腸炎ビブリオが増殖し、プランクトンを介して、魚介類が病原性腸炎ビブリオに汚染されると考えられている。

腸炎ビブリオ食中毒は殆どが魚介類の生食(刺身、すし、海鮮盛合せなど)であり、病原性腸炎ビブリオに汚染した魚介類を介した感染である。魚介類の生食は国民の食習慣として定着していることから生食の禁止は不可能である。しかし本菌は、①海産物にのみ分布、②食塩がない食品中では増殖しない、③10℃以上で増殖(魚介類中)、④感染菌量が1,000個以上であるという特徴から対策が構築された。前述のごとく、これらの基礎データを踏まえた対策により、腸炎ビブリオ食中毒は激減した。

04 | 食の安全確保のための 食品微生物検査

食の安全を確保するため、微生物による食中毒防止のためのリスク評価を実施する食品安全委員会の設置、食品衛生法の改訂や法規制、自治体からの指導、食品企業の自主的な衛生管理の向上および農水省の生産段階におけるリスク低減対策の推進などの積極的な制御対策が実施されてきた。

1)成分規格のある食品の検査

加工食品については食品衛生法に規定された食品を対象に安全性確保のための成分規格、加工基準および保存基準が定められている。これらの食品については最終製品の安全性の確認のための検査が義務づけられている。規格基準のある食品については法を遵守しなければならないが、安全性の高い食品を加工・製造するためには最終製品以外にも製造工程や原料についても微生物検査が必要となる。

規格基準のある製品の細菌検査は、食品衛生法により、牛乳や乳製品、清涼飲料水、食肉製品、魚肉練り製品、生食用かき、冷凍食品、容器包装詰加圧加熱殺菌食品などの食品の安全性を確保するために出荷製品の検査が義務付けられている。製品の種類と管理すべき細菌は表3および表4のごとくである。病原菌は一部の食品、例えば食鳥卵の成分規格にはサルモネラ属菌、食肉製品には黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌、生食用生鮮魚介類には腸炎ビブリオが定められており、それらの試験法が公定法として通知されている。殆どが食品の成分規格としては一般細菌数、大腸菌群、大腸菌などの衛生指標菌が指定されており、その試験法が食品衛生法に記載されている¹⁰⁾。衛生指標菌検査は食品衛生法に従って実施され、規格違反の食品は販売してはいけないし、市場に流通している場合には回収しなければならないことにより食品の安全性評価に大きく貢献してきた。また、前述のごとく生食やボイルされた魚介類の腸炎ビブリオの定性・定量検査は腸炎ビブリオ対策に有効な検査であったと評価できる。また、生食用牛肉の安全性評価に導入された腸内細菌科菌群はユッケなど生食牛肉の○157食中毒防止の衛生指標菌として効果を上げてきた¹¹⁾。

最終製品の微生物規格を厳守するためには、工程での衛生管理や細菌学的検査が重要であり、さらにHACCPの導入により科学的根拠による確実な衛生管理が推進できるであろう。

2)成分規格のない食品の検査

惣菜や弁当など多くの食品には成分規格が示されていない。ただし、安全な食品を販売するため、衛生規範により弁当、漬物、洋生菓子、生めん類については生菌数、大腸菌群、大腸

表3 乳および乳製品等の成分規格に定められた試験法

対象食品
1) 乳および乳製品
2) アイスcream類
3) パター及びバターオイル
4) プロセスチーズ及び濃縮ホエイ
5) 発酵乳及び乳酸菌飲料
試験法
細菌数(生菌数)測定法
大腸菌群測定法
乳酸菌数測定法

表4 食品、添加物等の規格基準(成分規格)に定められた食品と試験項目

①	清涼飲料	大腸菌群
	ミネラルウォーター類 原水	腸球菌、緑膿菌、腸球菌、芽胞形成嫌気性菌
②	粉末清涼飲料 乳酸菌なし	大腸菌群、細菌数
	乳酸菌あり	大腸菌群、細菌数(乳酸菌を除く)
③	冰雪、氷菓	大腸菌群、細菌数
④	ゆでたこ、ゆでかに	腸炎ビブリオ(定性)
	冷凍品	大腸菌群、細菌数
⑤	生食用生鮮魚介類	腸炎ビブリオ(定量)
⑥	生食用かき	細菌数、E. coli
	むき身生食用かき	腸炎ビブリオ
⑦	冷凍食品	
	無加熱摂取冷凍食品、加熱後摂取冷凍食品(凍結直前に加熱)	大腸菌群、細菌数
	加熱後摂取冷凍食品で上記以外	E. coli、細菌数
	生食用冷凍生鮮魚介類	生菌数、大腸菌群、腸炎ビブリオ(定量)
⑧	容器包装詰加圧加熱殺菌食品	恒温試験、細菌試験(無菌試験)
⑨	食肉製品	細菌数、大腸菌群、E. coli、芽胞数、クロストリジウム属菌、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌
⑩	ナチュラルチーズ	リステリア・モノサイトゲネス
⑪	非加熱食肉製品	リステリア・モノサイトゲネス
⑫	生食用食肉(馬肉)	糞便系大腸菌群、サルモネラ属菌
⑬	食鳥卵	細菌数、サルモネラ属菌
⑭	生食用牛肉	腸内細菌科菌群
・乳等		ブドウ球菌のエンテロトキシン
・食品(規格はない)		腸管出血性大腸菌O157、O26、O111、O103、O121、O145
・食品(規格はない)		赤痢菌
・魚介類(規格はない)		コレラ菌
・二枚貝(規格はない)		ノロウイルス、A型肝炎ウイルス

菌、黄色ブドウ球菌、カビなどの検査と管理基準が示されており、これらを参考に各食品製造業では自主的に検査を実施しなければならない。

成分規格の有無にかかわらず、原材料から洗浄、加工・調理、保管などの各工程における衛生管理を推進していくための細菌検査、検証としての細菌検査が重要である。また、HACCPシステムを導入する際に必要な重要管理点(CCP)の管理基準の設定やモニタリングには、従来からの慣習に頼らずに科学的根拠に基づく管理が要求される。納入される原材料については安全性の高い食材を要求し、各事業者が自主的に微生物による管理基準を設定すべきである。これらの自主的な細菌検査は公定法に拘泥せず、バリデーションされた(表5)各種の迅速・簡便な検査法を導入して実施することも可能である。

3) 食品以外の細菌検査

飲食店や集団給食施設では細菌性食中毒が頻発しており、最も高い衛生管理が要求される業種である。これらの施設で発生した細菌性食中毒の発生要因は手洗いの不備、包丁・まな板

などの洗浄不足、冷蔵庫や冷凍庫の不適切な管理など二次汚染防止対策が不完全であることが指摘されている。二次汚染を防止するために各種の一般的衛生管理が推進されているが、衛生管理が適切であるのか否かの検証には細菌検査の実施と得られたデータの解析が重要であろう(表6)。また、一般集団給食施設に対しては厚労省からの通知による大量調理施設衛生管理マニュアル、学校給食については文科省から学校給食衛生管理基準に従った衛生管理と従事者の糞便検査が通知されている。

表5 食品企業が実施する試験法

国内に出荷する最終製品	
規格基準のある食品	公定法
規格基準のない食品	標準法やそれに準じる方法またはバリデーションされた代替試験法
外国に輸出する食品	
国際的な試験法	ISO法またはISO法との同等性がバリデーションされた代替試験法
食品製造・調理の工程管理に関するモニタリング試験や環境試験など	
簡易・迅速性が求められることから公定法や標準法に拘らずにバリデーションされたあるいは外国で承認された簡易・迅速法	
法律上の問題となった食品	
公定法	
苦情食品などの検査	
考えられるあらゆる試験法のうちから目的に適した試験法	

表6 食品製造や調理環境の衛生管理のための培養検査とATPふき取り検査

検査法	操作	判定までの時間	特徴	問題点
拭き取り培養法	やや煩雑	2日以上	・同一試料から各種の寒天培地に塗抹できる。 ・定量値が得られ、精度が高いことからHACCPの検証に活用できる	・判定に長時間かかる
スタンプ法&スタンプスプレッド法	簡便	2日以上	・食品従事者の教育として活用できる ・ほぼ定性試験であり、限定した試験である。	・判定に長時間かかる ・深部の細菌の検査は不可能 ・精度の高い定量値の検査でない
ATPふき取り検査	簡便	数分以内	・目で確認できない食品残渣も同時に検出するので、清浄度検査になる ・迅速に定量値が得られるので、HACCPの検証に活用できる ・直ちに改善対策が可能	・測定機器が必要 ・細菌数の検査ができない

05

まとめ

食品の安全性確保は輸出入にかかわらず食品事業者の責務であり、国際基準であるHACCPの導入が求められているし、国の政策として義務化の検討も進められている。工程の衛生管理を重視するHACCPシステムでは原則である重要管理点、管理基準、モニタリング、検証などを構築する際、あるいは実施していく際には細菌検査が重要となる。検査すべき箇所、検査頻度、検査法などの検討が必要であるし、検査室の整備と検査精度の維持により一定の基準をクリアしていかなければならない。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課、食品衛生研究、**66**(9), 90-182, 2016.
- 2) 渡邊治雄, 日本食品微生物学会誌 **33**(3), 107-113 2016.
- 3) 伊藤武, 明日の食品産業 **4**, 8-15 2015.
- 4) 寺島淳, 伊豫田淳, 泉谷秀昌, 齊藤剛仁, 三戸部治郎, 石原朋子, 大西真, 日本食品微生物学会誌 **29**(2), 88-93 2012.
- 5) 工藤由起子, 日本食品微生物学会誌 **30**(4), 177-185 2013.
- 6) 稲垣永恵, 村上晋一, 安井正, 鶏病研究会報 **40**(1), 20-26 2004.
- 7) Y. Sasaki, Y. Tsujiyama, M. Kusukawa, M. Murakami, S. Katayama, Y. Yamada, *Vet. Microbiol.* **150**(1-2), 140-145 2011.
- 8) 伊藤武, 高橋正樹, 斎藤香彦, 高野伊知郎, 甲斐明美, 大橋誠, 福山正文, 上村知雄, 感染症学雑誌 **59**(2), 86-93 1985.
- 9) 柳川義勢, 伊藤武, 斎藤香彦, 高橋正樹, 中村明子, 鈴木健之, 藤原徹, 栗原金治, 工藤泰雄, 大橋誠, 東京都立衛生研究所研究年報 **40**, 6-11 1989.
- 10) 食品衛生検査指針 微生物編 2015 (日本食品衛生協会, 東京, 2015).
- 11) 山本茂貴, 春日文子, 五十君静信, 岡田由美子, 百瀬愛佳, 朝倉宏, 日本食品微生物学会誌 **29**(2), 98-100 2012.

国内の食品微生物試験法とISO法との ハーモナイゼーション

Japanese Methods for the Microbiological Examination of Foods should be harmonized with ISO methods

東京農業大学 教授 **五十君 静信**

Shizunobu Igimi (Professor)
Tokyo University of Agriculture



キーワード

微生物試験法、国際整合性、妥当性確認

01 | はじめに

2011年10月に生食用食肉の微生物基準が施行されたことにより、我が国も食品の微生物基準の策定に、コーデックス (Codex Alimentarius Commission; CAC) の求める数値的指標 (Metrics) を導入した。このような方向性が決まったことから、国内の食品の微生物基準策定は、コーデックスにより2007年に示された微生物学的リスクマネジメント方法に関するガイドラインCAC/GL 63-2007¹⁾に則り、行われていくものと思われる。

我が国のこのような食品微生物のリスクマネジメント方法の国際対応に合わせて、食品の微生物検査では現実的に最も影響を受けるとされる試験法についても、国際整合性のある試験法への移行が進められている。2015年3月に出版された食品衛生検査指針(微生物編2015)²⁾では、試験法の妥当性確認(バリデーション)という考え方が大幅に取り入れられている。また、従来の基準や通知で示されていた試験法も、ISO法とのハーモナイゼーションが進められており、平成27年(2016年)には黄色ブドウ球菌やサルモネラ属菌の試験法についてもコーデックスが採用している標準法である国際標準化機構 (International Organization for Standardization ; ISO) 法と整合性のある試験法に変更されている。

一方、厚生労働省並びに農林水産省では食品の衛生に関して、食品の工程管理の制度化、特にコーデックスが標準としている危害要因分析重要管理点 (Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP) の導入の検討が進められている。昨年2016年12月には、9回にわたり開催された厚生労働省の“食品衛生管理の国際標準化に関する検討会”の最終とりまとめの文書が公開された。この文書では、国内のHACCPの制度化に向けての方向性を示している。このように、わが国の食品衛生をとりまく環境は、大きく変わりつつあり、食品における微生物試験法にも国際整合性が強く求められている。今後食品衛生における微生物試験法にどのように対応していく必要があるかについて考えてみたい。

02 | 食品微生物の リスクマネジメントの国際基準

まず食品のリスクマネジメントを取り巻く国際情勢であるが、食品は国際的に流通しているため、各国が独自のマネジメント方法を持ち微生物基準を決めるということは避けるべきで、原則としては食品の国際標準を決めるコーデックスの基準やガイドラインに従うことが求められている。コーデックスの示す基準に拘束力があるわけではないが、コーデックス基準に従っていない場合には、非関税障壁として貿易相手国から世界貿易機関 (World Trade Organization; WTO) に提訴される可能性がある。それ故、食品におけるコーデックス基準は実質的に拘束力のあるものとなっている。コーデックスが食品微生物の国際基準を決めるうえで、科学的根拠を尊重するという考え方は、食品のリスクマネジメントにおいて根幹となる考え方で、それを支えているのはリスク評価であり、その結果から数値的指標を設定しマネジメントを行うことになる。

各国の事情により、コーデックス基準とは異なった微生物基準の設定が必要な場合や、そもそもコーデックスに基準の無い食品とハザードの組み合わせに、その国の食習慣に合った微生物基準の策定とリスクマネジメントを行う必要があることがある。例えば、我が国が策定した生食用食肉の微生物基準のように、その国に固有と思われるような食習慣により独自の基準設定が必要となる場合には、コーデックスのガイドラインであるCAC/GL 63-2007に従い、リスク評価を基に科学的根拠のある微生物基準の策定が求められるようになっている。

このような場合、CAC/GL 63-2007では、摂食時安全目標値 (Food Safety Objectives; FSO)、達成目標値 (Performance Objectives; PO)、達成基準 (Performance Criteria; PC) などの数値的指標 (Metrics) を数値として示すことを求めている。また、FSOは、適切な衛生健康保護水準 (Appropriate Level of Protection ; ALOP) との関係で設定することが求められている。このような手順を経て、微生物学的基準 (Microbiological Criteria; MC) を決めることになる。

MCは、コーデックスの別のガイドラインCAC/GL 21-1997³⁾で、食品製品あるいはあるロットの可否を規定するもの

で、特定の試験法とサンプリングプランの使用条件下で認められる微生物濃度と汚染頻度と定義されており、微生物(毒素)、サンプリングプラン、検査単位、試験法およびフードチェーンにおいて適用される箇所の5つの要素から構成される。数的指標で示された微生物濃度などの数値を検証する目的があるため、検証に用いることの出来る試験法は、その性能の評価が科学的根拠のある妥当性確認(バリデーション)されていることが必須である。コーデックスの基準における標準試験法は、ISO法と指定されており、それによらない場合は、科学的根拠のある妥当性確認された試験法を採用することとされている。

03 | 微生物学的基準(MC)で求められる試験法

コーデックス基準に採用されている標準試験法はISO法であり、MCの検証に用いることの出来る試験法はISO法または、科学的根拠のある妥当性確認された試験法である。MCでは、上述のように数的指標で示された微生物濃度などの数値を検証する必要があるため、用いる試験法は、あらかじめ妥当性確認されていることが求められている。すなわち、今後我が国が新たに微生物基準を設定する場合に用いることが可能な試験法は、ISO法または科学的根拠のある妥当性確認が行われた試験法であることが求められることになる。ISO 16140:2003⁴⁾には、代替試験法の妥当性確認の方法が示されているので、このガイドラインに従った妥当性確認が科学的根拠の目安となる。試験法にも数学的、統計学的なバックグラウンドを求めている。このガイドラインは、2016年に改訂され、ISO 16140-2:2016⁵⁾として発行されており妥当性確認に関する手法が更に細かく整理・記載されている。

このような要求に応える試験法の整備は、国立医薬品食品衛生研究所で進められており、標準試験法検討委員会により標準試験法(National Institute of Health Sciences Japan - The Methods for the Microbiological Examination of Foods ; NIHSJ-MMEF)として公開されている (<http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html>)。NIHSJ-MMEFを略してNIHSJ法と呼び、NIHSJ-(番号)で各試験法が示されている。NIHSJ法はISO 16140に従って、当該微生物に関するISO法を参照法として、妥当性確認が行われており、コラボ試験により妥当性確認(いわゆるフルバリデート)された試験法である。すなわち国家レベルの公定法として利用することを想定し検討された試験法である。2017年1月現在、既に30の試験法が検討され、17の試験法については検討が終了し、標準試験法としてwebで公開されている。生食用食肉の基準に採用された腸内細菌科菌群試験法(NIHSJ-15)、リステリアの基準に採用されたリステリアの定性法(NIHSJ-08)、及び定量法(NIHSJ-09)、食品、添加物等の規格基準のサルモネラ属菌試験法(NIHSJ-01)、黄色ブドウ球菌試験法(NIHSJ-03)、サーベイランスのためのカンピロバクター試験法(NIHSJ-02)などが、公定法として活用されている。

04 | 培養による試験法の意義

これまで述べてきた試験法は、公定法として利用する目的で示されている試験法である。国家基準などの評価に用いる公定法には、いわゆるフルバリデートされた培養による標準試験法を用いる必要がある。食品の微生物基準適合性を公的に判断するような目的で使われることを想定しており、裁判などに耐え得るような科学的根拠のある試験法である。従って、食品の基準適合性を判断するような目的の検査においては、このような試験法を用いることが求められる。これらの試験法は、通常培養法であるが、その理由は培養法が現在のところ食品中の微生物を評価する最も信頼性の高い方法であると考えられているためである。

培養法では、検体から微生物を分離する場合、前処理方法の検討が必要となる。例えば、食品や土壌などから病原微生物を分離する場合には、食品や土壌など、検体の種類に合わせた前処理が必要となる。微生物の菌数が少ない場合は、選択的な増菌が必要で、検体の種類により対象とする微生物を選択的に増殖させる適当な増菌培地を選択する。食品や環境からの分離では、損傷菌対策が重要であり、損傷菌が回復し増殖可能となる条件設定が菌の分離に影響を与える。また、分離する菌の性質に合わせて、培養温度、気相(嫌気条件、微好気条件、好気条件や二酸化炭素分圧など)、培養時間などの条件設定を行う。用いる培地の選択と、前増菌、選択的増菌、選択的分離培養などを組み合わせ菌の分離を試みるが、培地上に形成された集落から、目的の菌を選択するには検査を行う者の経験と熟練を必要とする。

培養法は、このように、検査を行う者の知識や培養経験と専門的な技術を必要とすることから、試験結果は実施者の経験や技術力に影響を受けやすい。培養法の欠点は、検査を行う者が微生物に関する情報に精通し手技に熟練を要することと、検査結果が得られるまでに時間がかかることである。経験を積んだ熟練者が行えば、検査の正確さに関しては培養法が最も優れた試験法と言える。

05 | 迅速法の意義

培養法は正しく行われるならば最も信頼性のある結果が得られるが、前述のような熟練を要求し手技が煩雑であることや、検査結果を得るまでに時間がかかるといった欠点を考えると、検査の目的によっては他の試験法を選択する方がよいことがある。培養法の欠点を克服する方法として、さまざまな迅速法あるいは簡易法と呼ばれる方法が開発されている。ここでは、このような迅速法や簡易法を含めて、迅速法と呼ぶことにする。

培地等による培養法が確立されていない微生物では、培養法を利用することができない。この場合は、微生物の特徴が明らかになれば、その性質を利用して当該微生物の存在を示すことになり、その方法が当該菌を特異的に検出可能であれば、試験法として利用可能となる。これらには、資化性、形態、代謝物、特徴的な構造、酵素、毒素などが利用可能である。

遺伝子配列を利用した方法は、現在最も有用な方法として多

くの微生物の検査に利用されている迅速法である。遺伝子配列を利用した方法は、培養のできない微生物を評価することもできる。PCRなどの技術により理論値で1個の微生物の検出が可能である。多数の微生物が共存していても検出することが可能であり、リアルタイムPCRを用いれば定量的な評価が可能である。遺伝子配列を利用した方法では、微生物が生きているかを判断することは難しいとされていたが、RNAを標的とする、あるいは微生物の膜の健全性と組み合わせる手法など新しい技術の開発によりこの欠点を克服しつつある。メタゲノム解析などでは、菌の集団を網羅的に評価することが可能である。

抗原性を標的とした免疫学的方法も迅速法としてしばしば利用されている。抗体を利用した方法は、一般的に安価に迅速な検査をすることができ、その利用価値は高いと評価できる。免疫学的方法には、対象を微生物やその産生物を抗原とし特異的な抗体を利用する方法と、病原体に対する抗体を標的として評価する方法があり、後者は臨床診断に用いられることが多い。

ATP測定法は、微生物を評価するというよりも汚れを含めて清浄度を評価するというコンセプトの全く異なる検査方法で、培養法とは単純に比較のできない方法であるが、薬品や食品の製造工程の洗浄度を評価する目的で有用な試験法として広く利用されている迅速法である。その他、いろいろな原理で開発された迅速法が存在し、研究段階の方法を含めて、多様な迅速試験法の開発が試みられている。

06 | 試験法の妥当性確認を行う 第三者機関

基準適合性の評価には公定法を用いるべきであるが、それ以外の微生物検査では、その検査の目的に合わせて十分な信頼性がある試験法であれば用いることが可能である。特に今後HACCPが制度化され、その検証として用いる試験法は公定法などの培養法を採用するよりもむしろ信頼性のある迅速法を用いる方が現実的である。多種・多様な試験法からどの試験法を選んだら良いか判断する場合、その試験法が妥当性確認されているかどうかによって選ぶことが良い。試験法の妥当性確認に関して総合的にまとめた書籍は、サイエンスフォーラム社から発行されている“最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック⁶⁾”が推薦できる。食品の評価に用いるためには、妥当性確認済みの試験法であるかは最低限考慮されるべきである。“十分な信頼性”を判断するときに参考となるのが、妥当性確認である。従って、信頼性のある試験法を開発するためには妥当性確認に関して知識がないと、“十分な信頼性”のある試験法を開発できない。どのレベルで妥当性確認が行われているかによって、対象となる試験法がどの程度の信頼性を持っているかを評価することが可能である。

現在国内の公定法は国際的な標準法であるISO法と整合性を重視して置き換えられている。その主な理由は国際整合性をもたせることであるが、海外の第三者機関による妥当性確認を活用できるようになるということも重要である。国内の公定法がISO法と妥当性確認されていると、今後はISO法を参照法として妥当性確認により評価されている試験法の性能を判断することが可能となる。妥当性確認されている方法であれば、代替法として迅速法の性能を評価することができる。

まだ国内には、試験法の妥当性確認を行う評価機関(第三者機関)はないが、ヨーロッパでは、ISO法を参照法として代替法の妥当性確認を行う第三者機関が機能している。フランスのAFNOR、オランダのMicroVal、ノルウェーのNordValといった第三者機関は、ISO法を参照法として代替試験法を評価しており、その評価を受けた試験法は、信頼できる方法として広く活用されている。アメリカでは、既にISO法との整合性に力を入れているが、AOAC INTERNATIONALという第三者機関により、公定法であるFDA-BAM法やAOAC-OMAといった標準試験法との妥当性確認が行われている。

微生物試験法では、化学物質の試験法のように適切な標準物質を設定することが難しく、ガイドラインなどに基き誰もが妥当性確認を行うという状況ではない。そこで、微生物試験法の妥当性確認は、上述のような第三者機関による妥当性確認を活用する必要がある。図1に、標準試験法(NIHSJ法)を介した国内の公定法、ISO法、アメリカのFDA-BAM法との関係についてまとめた。このようなネットワークにより、第三者機関により妥当性確認された試験法が評価可能であることが理解できるものと思う。

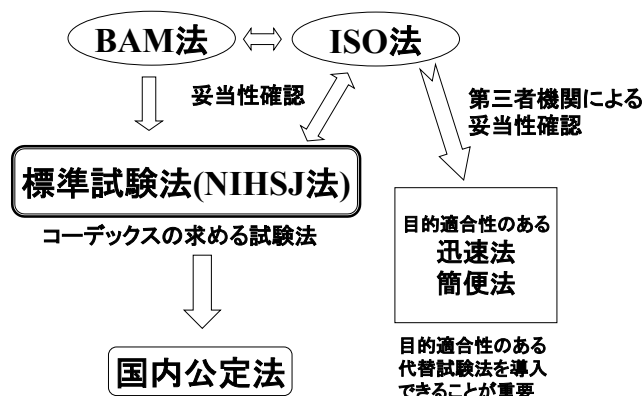


図1 標準試験法と主な試験法との連携

07 | 腸内細菌科菌群試験法が 登場したのは必然

2011年に導入された生食肉の微生物基準の腸内細菌科菌群試験法は、いわゆる国際スタンダードであるISOの試験法をそのまま導入したものである。これまで国内での使用実績の全くない試験法である腸内細菌科菌群試験法はなぜ、採用されたのか?実は、コーデックスのガイドラインCAC/GL 63-2007¹⁾に従ってMCを設定しようとする、その検証としての試験法はISO法を採用する必要があった。使用する培地が異なる衛生指標菌試験法をISO 16140に従い該当すると思われるISO法と妥当性確認することは難しいため、コーデックスの標準法とされているISO法をそのまま導入することになった。

腸内細菌科菌群試験法は、ヨーロッパでは広く使われている衛生指標である。国内の公定法が採用しているDESO培地を用いた大腸菌群試験法を使っている国は現在ほとんどなく、国際整合性の立場から基準値を評価する試験法として採用することは困難であった。衛生指標は、多種・多様な菌が混在しているため、妥当性確認により性能評価することは容易ではない。衛生指標については国際標準法をそのまま採用していくこと

が重要であると思われる。特定の培地による菌の集団をとらえるという考え方から、分類学的な集団を衛生指標とするべきであるという考え方がISO法で定着しつつある。今回の選択は、このような方向性を持つISO法を採用することにより、今後食品の検査も遺伝子診断などが主流となっていくであろうということも考慮されていると言える。

08 | 目的に合わせた試験法の選択

図1に示したネットワークを活用すると、第三者機関などで評価された多くの代替法が利用可能となってくる。つまり、目的に合わせて試験法を選択する幅が広がるということになる。検査の目的によって採用する微生物試験法は異なる。例えば、サーベイランス、問題の程度、実態を把握するための調査に使う試験法は、公定法ほどのスペックは要求されない。工程の管理のモニタリングの試験法についても同様である。つまり、微生物試験法はその目的によって、十分な性能が期待できる試験法であればそれを採用すれば良く、選択肢は様々である。性能はある程度担保しながら、目的に最も適合した試験法を選択することが重要である。どのレベルで検査を行うことが出来るかがわかる試験法を選ぶことが重要で、自分の目的に合っている性能かを判断する根拠とできるのが、その試験法がどのレベルで妥当性確認をされているかによって判断すればよい。

微生物試験の選択肢を増やすために、現在我々は標準試験法の整備を進めており、他の代替試験法を評価するための尺度に使えるような標準試験法となることを期待している。標準試験法を尺度としてほかの試験法を妥当性確認により評価し、当該の代替法はどの目的なら使えるという判断ができるようになることを期待している。国内にはまだ、海外で機能しているような第三者機関は存在しないため、当面はISO法を参照法として評価している海外の第三者機関の評価を参考とすることになる。代替法である“迅速簡便法”などが試験法としてどの程度の性能なのかを明確にできるような考え方も整備することが必要である。

09 | おわりに

検証の信頼性を確保するためには、信頼性の高い試験法を採用していく必要がある。公定法で検討された妥当性確認はあくまでも法的根拠のある体系であり、国家基準の適合性判断に用いられる試験法は公定法である。一方、今後は食品の微生物制御は、工程管理すなわちHACCPの制度化に向かっている。食品の工程管理の検証には、必ずしも公定法を用いる必要はなく、信頼できる必要とする性能を持った迅速簡便法を利用するなど、目的にあった十分な性能が担保できる試験法を上手く使うことが求められる。微生物の試験法の妥当性確認は、欧米では第三者機関により行われている。特にヨーロッパには三か所の第三者機関が機能しており、ISO法を参照法として妥当性確認された試験法のリストを示している。アメリカではAOACインターナショナルによる妥当性確認が行われており、このような第三者機関の評価を受けている代替試験法を用いていくことが大切であるといえる。

参考文献

- 1) *PRINCIPLES AND GUIDELINES FOR THE CONDUCT OF MICROBIOLOGICAL RISK MANAGEMENT (MRM)* (Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 63-2007).
- 2) 食品衛生検査指針 微生物編2015 (日本食品衛生協会, 東京, 2015).
- 3) *PRINCIPLES AND GUIDELINES FOR THE ESTABLISHMENT AND APPLICATION OF MICROBIOLOGICAL CRITERIA RELATED TO FOODS* (Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 21-1997).
- 4) *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods* (International Organization for Standardization, ISO 16140, 2003).
- 5) *Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method* (International Organization for Standardization, ISO 16140-2, 2016).
- 6) 最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 安井明美, 五十君静信, 後藤哲久, 丹野憲二, 湯川剛一郎編. (サイエンスフォーラム, 千葉, 2010).

腸管出血性大腸菌感染症の発生状況と検査法の変遷 —酵素基質培地の導入—

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections in Japan and the progress for the successful detection of EHEC in food - Usefulness of chromogenic culture media-

東京医科大学 微生物学分野 兼任教授 甲斐 明美

Akemi Kai, PhD. (Concurrent Professor)

Department of Microbiology, Tokyo Medical University



キーワード

腸管出血性大腸菌, 検査法, 酵素基質培地

01 はじめに

腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)は、ベロ毒素(Verotoxin, VT)/志賀毒素(Shiga toxin, Stx)を産生することで特徴付けられることから、本菌はベロ毒素産生性大腸菌(Verotoxin-producing *E. coli*, VTEC)、あるいは志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC)と呼ばれる。「腸管出血性大腸菌」という呼称は、本菌の発見となった1982年の初発事例¹⁾において、患者の症状が激しい出血性下痢(all blood and no stool)であったという臨床症状に照らして与えられた。現在、本菌による感染症・食中毒は腸管出血性大腸菌感染症・食中毒と称されることが多い。

病原大腸菌(下痢原性大腸菌)の検査では、飲用水から下痢原性大腸菌を分離することはできても、食品からの分離はまず不可能と考えられていた。しかし、O157の検査を契機に検査法は著しく進展し、現在では食品からEHECを分離することが求められる状況となっている。その進歩の3本柱は、PCR法、免疫磁気ビーズ法、そして酵素基質培地の導入である。本稿では、EHECの歴史を振り返りながら、進歩して来た検査の過程について分離培地を中心に辿ってみたい。

02 わが国における腸管出血性大腸菌O157感染症の発生状況

1. 腸管出血性大腸菌O157の発見とわが国での状況

1982年に米国でビーフハンバーガーを原因とした出血性下痢(hemorrhagic colitis)の集団事例が2件発生し、その原因菌として大腸菌の稀な血清型であるO157が報告¹⁾された。続いてカナダでも2件の集団事例²⁾が発生、その後欧米を中心に本菌による下痢症が発生したことから非常に注目された。本菌に関する研究も活発に行われるようになり、1987年にはカナダのトロントで本菌に関する最初の国際学会(An International Symposium and Workshop on

Verocytotoxin-(Shiga-like Toxin) Producing *Escherichia coli* (VTEC) Infections)が開催された。

一方、わが国における本菌下痢症の最初の報告は、1984年に東京都内の小学校で発生した血清型O145:NMによる集団下痢症事例(患者100名)³⁾である。さらに、1986年には愛媛県の乳児院で血清型O111:NMによる集団事例(患者22名、死者1名)⁴⁾が発生した。

O157の最初の分離は、1984年に大阪で発生した兄弟感染事例であることが小林ら⁵⁾による「さかのぼり」調査により明らかにされた。それ以降もO157の分離例は地方衛生研究所(地研)等から報告され、1979年～1990年までの12年間に散発あるいは家族内感染事例として少なくともO157が36件、O157以外のEHECが26件(O26:11件、O111:10件、O128:3件、O143:1件、OUT:1件)報告されている(表1)。

表1 わが国における散発事例および家族内感染事例からのVTEC 検出状況

年	検出 事例数	血清型				
		O157:H7/-	O26:H11/-	O111:H-	O128:H2	その他
1979-83	3	-	-	3	-	-
1984	6	2	2	1	1	-
1985	8	6	1	-	1	-
1986	3	2	-	-	-	1(OUT)
1987	15	9	4	2	-	-
1988	5	1	-	2	1	1(O143)
1989	5	3	2	-	-	-
1990	17	13	2	2	-	-
計	62	36	11	10	3	2

しかし、本菌感染症が我が国で広く知られる様になったのは、1990年に埼玉県浦和市の幼稚園で発生したO157集団事例⁶⁾であろう。この事例では、患者319名、入院52名が確認され、2名の園児が死亡した。この事例を契機に、国立感染症研究所(感染研)は地研からEHEC/VTEC検出情報を収集し、1991年1月からその情報を、感染研が月報として発行する病原微生物検出情報(IASR)に掲載するようになった。1991年には大阪市(保育園:患者161名)、1993年には東京(小学校:患者165名)、1994年には奈良県(小学校:患者250名)で大規模なO157集団事例が発生し、危機感を覚える関係者も増えて

いた。

そして、1996年5月に岡山県邑久町(小学校・幼稚園)、6月に岐阜市(小学校)、広島県東城町(小学校)、岡山県新見市(小学校・中学校)、東京都(会社)、7月に群馬県境町(小学校)で相次いで患者100人以上のO157による大規模集団事例^{7,8)}が発生した。さらに大阪府堺市で、学校給食を原因として患者8,000人(死者3名)にも及ぶこれまでに類を見ない大規模なO157集団食中毒が発生したことで、大きな社会問題となった。厚生省は同年8月6日に「腸管出血性大腸菌感染症」を伝染病予防法に基づく指定伝染病に指定した。また1997年食品衛生法施行規則の一部改正も行われ、病因物質の種別において、「腸管出血性大腸菌」として「その他の病原大腸菌」と分けて分類されることになった。この様な経過の中で、本菌に関する調査・研究が一挙に重要性を増し、活発に行われるようになった。

2. 腸管出血性大腸菌感染症・食中毒の発生状況

1996年以降のEHEC感染症報告数を図1に示した。最近の報告数は、2013年4,045件、2014年4,156件、2015年3,565件で、2000年以降3,500件を上回る状況が続いている。一方、厚生労働省(厚労省)に報告された食中毒事件数は、2013年13件、2014年25件、2015年17件で、感染症報告数に比べて非常に少ないことが分かる(図2)。

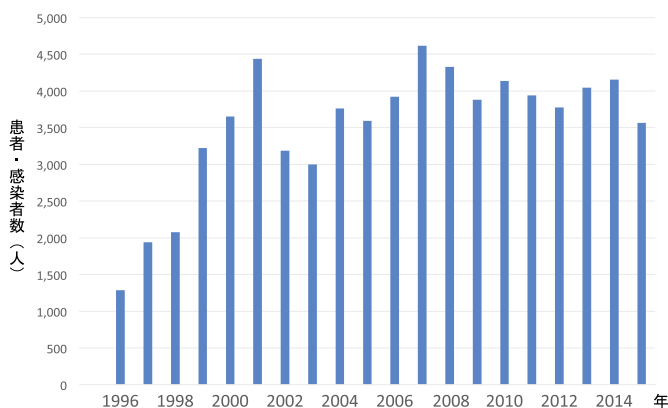


図1 腸管出血性大腸菌感染症の患者及び感染者報告数
1999年3月31日までは伝染病統計(厚生省)
1999年4月1日以降は感染症発生動向調査
(国立感染症研究所)から作成

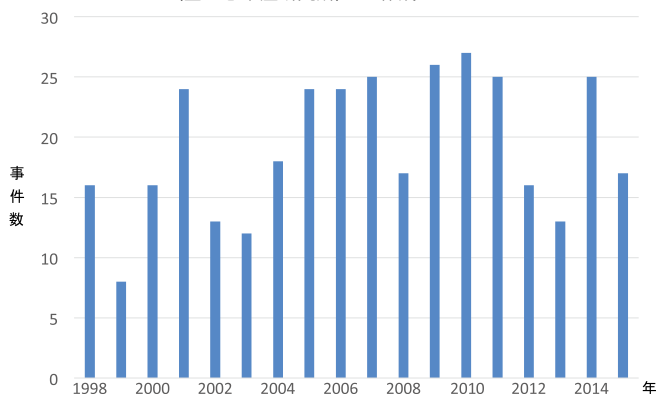


図2 腸管出血性大腸菌による食中毒事件数(全国)
食中毒発生状況(厚生労働省)から作成

この要因の一つは、EHECの感染形態が「食品媒介」と、食品を介さない、いわゆる「感染症(ヒト-ヒト感染)」の両面を持つことである。表2に、2013年～2015年の3年間に発生したEHEC感染症集団事例(菌陽性者10名以上の事例)^{9,10,11)}の感染形態を血清群ごとに示した。

表2 腸管出血性大腸菌感染症集団事例とその感染形態
(2013年～2015年に発生した菌陽性者10名以上の事例)

血清群	事例数	感染形態			
		ヒト-ヒト感染	食品媒介	動物由来	不明
O157	18	6	10	1	1
O26	28*	26*	1		1
O111	3	3			
O76	1	1			
O103	4*	4*			
O121	1	1			
O145	3	3			
計	56(100%)	42(75.0%)	11(19.6%)	1(1.8%)	2(3.6%)

* 内2事例は、O26とO103の混合感染事例
病原微生物検出情報(国立感染症研究所)から作成

56事例中ヒト-ヒト感染症事例が42事例(75.0%)、食品媒介事例は11例(19.6%)、動物由来1事例(1.8%)、不明2事例(3.6%)である。菌陽性者10名以上の中規模事例では食品を介さない「感染症」事例が非常に多いことが分かる。なかでも、O157による事例では食品媒介事例が55.6%、感染症事例が33.3%と両者によるものが認められるが、血清群O26による事例は保育所などで発生する「感染症事例」が非常に多い。

一方、2013年～2015年の3年間に55件の食中毒事例が厚生労働省に報告されているが、患者数からみた発生規模では、患者数10名未満の事例が43件(78.2%)、10～30名が8件(14.5%)、51～100名が3件(5.5%)、100名以上が1件(1.8%)である(表3)。

表3 腸管出血性大腸菌による食中毒の患者規模(2013年～2015年)

発生年	事例数	患者数からみた規模別事例数				
		< 10*	10 - 30	31 - 50	51 - 100	> 100
2013年	13	10	3			
2014年	25	19	3		2	1
2015年	17	14	2		1	
計	55	43	8		3	1
(%)	(100)	(78.2)	(14.5)		(5.5)	(1.8)

* 患者数

EHECの食品媒介事例(食中毒)では、大きな集団事例も発生しているが、全体的には患者数10名以下の小規模事例が多い。また、感染源が特定できないまま、感染事例として報告された例も数多く存在すると推定される。

3. 分離される腸管出血性大腸菌の血清群

2013年～2015年に分離されたEHECの血清群^{9,10,11)}を表4にまとめた(分離株の血清群が報告された事例の集計であるため、感染症報告数とは一致しない)。

表4 ヒトから分離された腸管出血性大腸菌の血清群(2013年～2015年)

血清群	分離数(%)						
	2013年		2014年		2015年		計
O157	1,077	(51.7)	1,355	(59.2)	1,040	(60.9)	3,472 (57.1)
O26	529	(25.4)	502	(21.9)	363	(21.2)	1,394 (22.9)
O111	151	(7.2)	78	(3.4)	52	(3.0)	281 (4.6)
O103	98	(4.7)	93	(4.1)	71	(4.2)	262 (4.3)
O121	91	(4.4)	67	(2.9)	33	(1.9)	191 (3.2)
O145	49	(2.3)	94	(4.1)	23	(1.3)	166 (2.7)
O91	23	(1.1)	15	(0.7)	30	(3.0)	68 (1.1)
その他*	49	(2.3)	60	(2.6)	67	(3.9)	176 (2.9)
型別不能	19	(0.9)	25	(1.1)	30	(1.8)	74 (1.2)
計	2,086	(100)	2,289	(100)	1,709	(100)	6,084 (100)

* O1, O5, O6, O8, O15, O18, O19, O25, O28, O43, O51, O55, O57, O63, O65, O69, O71, O74, O76, O78, O79, O82, O84, O98, O100, O101, O109, O110, O113, O115, O119, O128, O136, O142, O146, O152, O156, O159, O163, O165, O168, O172, O175, O176, O177, O181, O183

病原微生物検出情報(国立感染症研究所)から作成

3年間に分離された6,084株中O157が全体の50～60%を占め、次いでO26が20～25%で、この2血清群で全体の77～82%を占めている。これら以外の血清群はいずれも10%未満で、O111、O103、O121、O145、O91などである。その他、1%未満の報告である血清群は47種類に及んでいる。

03 | 腸管出血性大腸菌の検査と分離培地

大腸菌の分離には、わが国ではDHL寒天培地やマッコンキー寒天培地が使われている。しかし、EHEC O157が発見され、その検査用の分離培地として新たな機序に基づく酵素基質培地が導入されるなど分離培地は大きく進展してきた。

1. 初期のEHEC検査法

糞便を対象にしたEHEC O157の検査では、DHL寒天培地やマッコンキー寒天培地を使って分離された菌について同定を行い、血清学的試験によりO157であることを確認後、vero細胞を使った培養細胞法で毒素(VT, Stx)産生性を調べていた。著者らは、1984年に東京で発生したO145による集団下痢症事例の解明に続き、Vero毒素の簡易迅速検査法としてラテックス(Latex)凝集反応法を開発¹²⁾し、その後、市販診断薬(VTEC-RPLA, デンカ生研)として広く使われるようになった。そして、1990年の浦和市の幼稚園でのO157集団事例を契機に、本菌の迅速診断法の標準化と普及を図ることが急務となった。1991年に国立予防衛生研究所(現在の感染研)が中心となり、「腸管出血性大腸菌迅速検査法技術研修会」が全国の地研の職員を対象に開催され、Vero毒素検査法として、PCR法やLatex法の研修が行われ、その成果は1996年のO157大流行時に十分に生かされた。すなわち、菌の産生するVT/Stxの検査法は、培養細胞法に始まり、Latex法、PCR法、イムノクロマト(IC)法と発展・普及してきた。

2. 腸管出血性大腸菌の分離培地の進展

1) マッコンキー寒天培地を基本にした分離培地

最初に発見されたEHEC O157がソルビトール非・遅分解であったことが米国CDC(Centers for Disease Control and Prevention)の研究者¹³⁾により明らかにされたことから、大腸菌の分離に使われていたマッコンキー寒天培地組成中の乳糖をソルビトールに代えたソルビトール・マッコンキー(SMAC)寒天培地がO157の分離培地¹⁴⁾として推奨された。

ソルビトール・マッコンキー寒天培地(OXOID)の組成は、培地1L当たり、ペプトン20.0g、ソルビトール10.0g、胆汁酸塩(No3)1.5g、塩化ナトリウム5.0g、中性紅0.03g、クリスタルバ イオレット0.001g、寒天15.0g、pH7.1±0.2である。この組成は、メーカーにより多少異なる。この培地上で大腸菌の93%はソルビトールを分解¹⁵⁾して生ずる酸のため、中性紅の黄色は赤色に変化する。さらに胆汁酸塩から不溶性の胆汁酸が析出し中性紅と強く結合するので集落は鮮明なレンガ色となる。一方、SMAC寒天培地上でO157は、ソルビトール非・遅分解であるため、18-20時間の培養で半透明の集落となる。

このソルビトール非・遅分解性に着目した分離培地として、日本ではSIB(Sorbitol IPA Bile salts)寒天培地(極東製薬)、

DHL-ソルビトール寒天培地なども考案された。

また、選択性を増強するために、CT選択剤(セフィキシム 0.05mg/Lおよび亜テルル酸カリウム 2.5mg/L)を添加したCT-SMAC寒天培地が広く使われるようになった。

その後、血清型O157のみではなく、O26 やO111の分離も要求される様になり、O157のソルビトール非・遅分解と同じ原理に基づき、O26ではマッコンキー寒天培地の乳糖をラムノースに代えたラムノース・マッコンキー(RMAC)寒天培地、O111ではソルボースに代えたソルボース・マッコンキー(SBMAC)寒天培地が使われるようになった(表5)。

表5 マッコンキー寒天培地を基礎にした分離培地

培地名	対象菌	集落の色			
		O157	O26	O111	腸内細菌
ソルビトール・マッコンキー(SMAC)寒天	O157	白色・透明	赤色	赤色	赤色
ラムノース・マッコンキー(RMAC)寒天	O26	赤色	白色・透明	赤色	赤色
ソルボース・マッコンキー(SBMAC)寒天	O111	赤色	赤色	白色・透明	赤色
ソルビトール-IPA-Bile salts(SIB)寒天*	O157	白色・透明	赤色	赤色	赤色

* 極東製薬

また、CT選択剤を添加したCT-RMAC寒天培地やCT-SBMAC寒天培地も使われる。しかし、RMAC寒天培地上のO26集落やSBMAC寒天培地上のO111集落の特徴は、SMAC寒天培地上でのO157集落の特徴ほど優れたものではなく、類似菌が多数発育すること多いため、より判別力の優れた選択培地が求められる結果となった。

2) 酵素基質培地の登場

酵素基質培地は、菌の産生するβ-ガラクトシダーゼやβ-グルコニダーゼに特異的な酵素発色基質(ガラクトシド誘導体、グルクロニド誘導体)等を分離培地に添加することで、対象とする菌をその色調から識別できるように考案された培地である。さらに目的以外の菌の発育を抑制するためにセフィキシム、亜テルル酸塩、セフスロジン等が添加されている。しかし、酵素基質培地の組成の詳細はメーカー側から公表されていない。

3) 酵素基質培地の特徴

酵素基質培地は、SMAC寒天培地等とは対象集落の発色機構が異なる。EHEC O157 はCT-SMAC寒天培地上では透明の集落であるのに対して、酵素基質培地上ではそれぞれの培地により異なるが、藤色や青色などと色彩に富む集落となり判別し易い。また、所定の時間培養して出現した集落の色は、その後室温に放置して時間が経過しても大きく変化しないのも利点である。

問題は価格がDHL寒天培地やマッコンキー寒天培地の2倍以上と高いことである。しかし、食品の検査においてはEHECをはじめとした下痢原性大腸菌の分離が糞便に比べて非常に難しく、酵素基質培地は非常に有効である。そのため、酵素基質培地は糞便の検査より食品の検査で採用され、広く普及してきた。

酵素基質培地を使う上での主な注意点は、以下のとおりである。

- ① 粉末培地から作製する時には加温溶解が必要であるが、特に過度の加熱を避けることである(オートクレーブは不可)。溶けにくい、時々混ぜて十分に溶解する必要がある。

- ② 作製した培地は、遮光して冷蔵保存する。保存期間が長くなると発色が悪くなる。
- ③ 粉末培地の状態でも保存期間が長くなると発色が悪くなる。
- ④ 集落が密集した培地上では、その色調からEHECの存在が示されることもあるが、説明書どおりの色調を示さないこともあるので、この様な場合には必ず再分離が必要である。
- ⑤ 酵素基質培地で示された色調の集落全てがEHECとは限らないので、菌の同定とVT(Stx)産生性の確認は不可欠である。

04 | 食品の腸管出血性大腸菌検査の歩み

1. 血清群 O157 以外のEHEC への対応

1996年(平成8年)のO157大流行当時の検査は、O157を中心に行われていた。1997年当時に使われていた酵素基質培地には、クロモアガーO157(CRHOMagar:関東化

学)、レインボーアガーO157(Biolog:グンゼ産業)、BCM O157(Biosynth:栄研、Merk)、COLI ID寒天培地(バイオメリュー・バイテック)、フルオロカルトE.coli O157:H7寒天培地(Merk)などがあった。

その後、O157の次に分離頻度の高いO26の検査が行われる様になり、クロモアガーO26/O157、Vi RX O26寒天培地などが開発・市販された。さらにO111を始め多くの血清群を分離できるという目的で、クロモアガーSTEC、CIX寒天培地、Vi EHEC寒天培地、XM-EHEC寒天培地などが登場した(表6)。それぞれの培地でのEHECの色調等は異なっているが、クロモアガーでは、対象菌の色は基本的に藤色として調製されているので、使用者は覚えやすいというメリットがある。

2. 厚労省通知法に基づく食品からのEHEC分離法

これまで厚労省は、食品からのEHEC分離法について、多くの通知を発出してきた(表7)。平成8年(1996年)7月のO157の大流行に伴い急遽出された「病原大腸菌O-157に係る食品等

表6 EHEC分離用の主な酵素基質培地

酵素基質培地*	対象菌	O157	O26	O111	製造元(販売元)
レインボーアガー O157培地	O157	黒色～灰色			Biolog社(セントラル科学貿易)
クロモアガー O157培地	O157	藤色	青色	青色	CHROMagar社(関東化学)
クロモアガー O157TAM	O157	藤色	青色	青色	CHROMagar社(関東化学)
BCM O157寒天培地	O157	黒～濃青色	緑色	緑色	栄研化学
O157:H7 ID 寒天培地	O157	青緑色	紫色	紫色	日本バイオメリュー
Coli ID 寒天培地	O157他	灰色～青色	ピンク～赤紫色	ピンク～赤紫色	日本バイオメリュー
クロモアガー O26/O157培地	O26,O157	赤色	緑色		CHROMagar社(関東化学)
Vi RX O26寒天	O26	黄緑～青緑	青紫～黒色	黄緑～青緑	栄研化学
クロモアガー STEC培地	EHEC	藤色	藤色	藤色	CHROMagar社(関東化学)
CIX寒天培地	EHEC	青色～青緑色	群青色～濃紫色	群青色～濃紫色	極東製薬
Vi EHEC寒天培地	EHEC	無色・中心部褐色	緑色	えんじ色	栄研化学
XM-EHEC寒天培地	EHEC	赤紫～紫色	青紫色	白濁した赤紫～紫色	日水製薬

* 培地 1,000mL 当たり,CT(セフィキシム0.05mg,亜テリル酸カリウム2.5mg)を添加して使う場合もある。

表7 食品からの腸管出血性大腸菌の検査法に関する厚生労働省通知と分離培地

通 知			分離培地
平成8年7月18日	衛食第195号・衛乳第174号	病原大腸菌 O-157に係る食品等の汚染実態調査の実施について	SIB寒天 または SMAC寒天
平成9年7月4日	衛食第207号・衛乳第199号	腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について	・CT-SMAC ・酵素基質添加培地2種類(BCM O157, レインボーアガーO157, クロモアガーO157) ・(SMAC, DHS または SIB も使用することが望ましい)
平成9年7月17日	厚生省生活衛生局食品保健課・乳肉衛生課 事務連絡	腸管出血性大腸菌 O157の検査法の解説について	
平成18年11月2日	食安監発第1102004号	腸管出血性大腸菌 O157及び O26の検査法について	O157用: CT-SMAC, 酵素基質培地1種類(BCM O157, クロモアガーO157, クロモアガーO157TAM, CT-O157:H7 ID寒天, レインボーアガーO157) O26用: CT-RMAC, 大腸菌分離培地1種類(CT-Vi RX O26, ST-SMAC, CT-ColiID)
平成21年6月18日 (平成21年7月15日)	食安輸発第0618002号 (食安輸発0715第1号最終改正)	食品衛生法第26条第3項に基づく検査命令の実施について (フランス産ソフト及びセミソフトタイプのナチュラルチーズの腸管出血性大腸菌O103)	SMAC 又は Vi RX O26
平成23年6月3日	食安監発0603第2号	腸管出血性大腸菌 O111 の検査法について (食肉からの腸管出血性大腸菌 O111 の検査法)	・CT-SBMAC 又は CT-SMAC ・酵素基質培地1種類(クロモアガーSTEC, CIX寒天, Vi EHEC, XM-EHEC寒天)
平成23年6月14日	食安輸発0614第1号	腸管出血性大腸菌 O104 の検査法について	SMAC と CT-SMAC, 又は Vi RX O26 と VT-Vi RX O26
平成23年10月3日	食安監発1003号第1号	腸管出血性大腸菌 O111 の検査法について (食品からの腸管出血性大腸菌 O111 の検査法)	・CT-SBMAC 又は CT-SMAC ・酵素基質培地1種類(クロモアガーSTEC, CIX寒天, Vi EHEC, XM-EHEC寒天)
平成24年5月15日	食安監発0515第1号	腸管出血性大腸菌 O26, O111及び O157 の検査法について	O26用: CT-RMAC, O26用酵素基質培地1種類(CT-Vi RX O26, CT-クロモアガーO26/O157, CT-ColiID寒天) または CT-SMAC O111用: CT-SBMAC 又は CT-SMAC, O111用酵素基質培地1種類(クロモアガーSTEC, CIX寒天, Vi EHEC, XM-EHEC等)
平成24年12月17日	食安監発1217第1号	腸管出血性大腸菌O26, O111 及び O157の検査法について	O157用: CT-SMAC, O157用酵素基質培地1種類(BCM O157, クロモアガーO157, クロモアガーO157TAM, CT-O157:H7 ID寒天, レインボーアガーO157)
平成24年12月18日	食安輸発1218第4号	腸管出血性大腸菌 O103 の検査法について (チーズからの腸管出血性大腸菌 O103 の検査法について)	SMAC 又は Vi RX O26
平成24年12月18日	食安輸発1218第5号	腸管出血性大腸菌 O104 の検査法について	SMAC と CT-SMAC, 又は Vi RX O26 と CT-Vi RX O26
平成26年11月20日	食安監発1120第1号	腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157の検査法について	・CT-SMAC(O26ではCT-RMAC, O111ではCT-SBMACも可) ・EHEC分離用酵素基質培地1種類(CT-クロモアガーSTEC, CIX, XM-EHEC, Vi EHEC, CT-クロモアガーO26/O157, CT-クロモアガーO157, CT-BCM O157, CT-Vi RXO26, CT-レインボーアガーO157)
平成27年3月24日	厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 事務連絡	食品からの腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145及び O157 の検査法	

の汚染実態調査の実施」では、分離培地として、SIB寒天培地またはSMAC寒天培地が使われたが、翌年の平成9年7月に発出された「腸管出血性大腸菌O157の検査法について」では、CT-SMAC寒天培地と酵素基質添加培地2種類を使うように指示されている。この時の酵素基質添加培地として、BCM O157、レインボーアガーO157、クロモアガーO157が記載されている。この通知が、酵素基質培地について明記された最初の通知ではないだろうか。それ以降、食品からEHECを分離するための培地としては、①マッコンキー寒天培地を基礎とした培地と②酵素基質培地の併用が採用されている。

その後、血清群O26の感染事例が増加したことから、平成18年11月にO26の検査が追加された。また、平成23年4月に富山県を中心に牛ユッケを原因とした大規模食中毒事件¹⁶⁾が発生し、患者数181名、死者5名、HUS発症者32名と多数の重症者

が確認された。この事例の病因物質がEHEC O111及びEHEC O157であったことから、平成23年6月に「腸管出血性大腸菌O111の検査法について」が発出された。この通知では、分離培地として①CT-SBMAC寒天培地またはCT-SMAC寒天培地、そして②酵素基質培地1種類(クロモアガーSTEC、CIX寒天培地、Vi EHEC、XM-EHEC寒天培地など)が使われている。

さらに、平成26年11月には「腸管出血性大腸菌O26、O103、O111、O121、O145、O157の検査法について」が発出された。わが国で分離頻度の高い6血清群についての検査法¹⁷⁾を示したものである。ここでは、①CT-SMAC寒天培地と②EHEC分離用酵素基質培地1種類の2系統で分離することを求めている。それぞれの培地の長所・短所を補完する目的と考えられる。直近の検査法の概略を図3に示した。

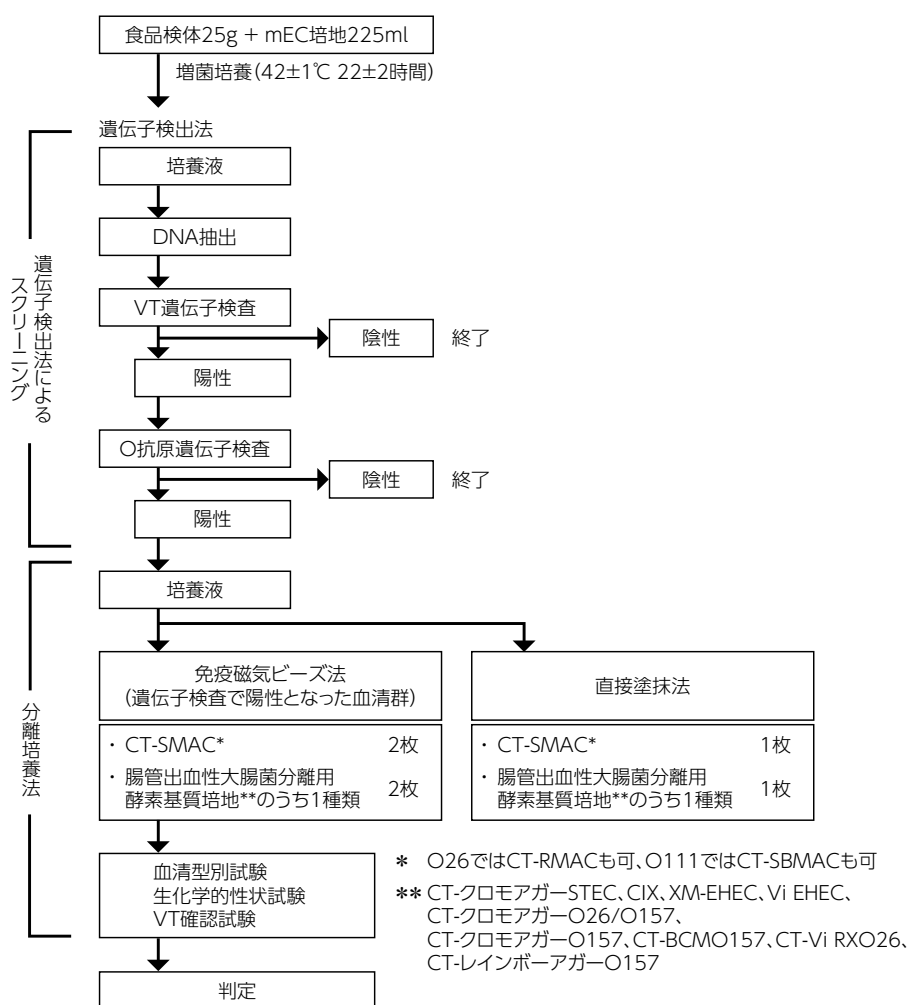


図3 食品からの腸管出血性大腸菌検査法 (O26, O103, O111, O121, O145 及び O157)
(厚労省通知 食安監発1120第1号, 平成26年11月20日)

表8 腸管出血性大腸菌による集団事例: 2000年以降の推定原因食品(焼肉, レバ刺し以外)が判明した主な事例, 日本

発生年月		発生地	発生施設	推定原因食品	患者数	死者数	原因菌
2011年	5月	山形県他	菓子製造業者	だんご, 柏餅	287	1	O157
2011年	6月	富山県・石川県	仕出し屋	千切りキャベツ(仕出し弁当)	19	-	O26:H11
2011年	7月	長野県	小学校	飲用水	15+	-	O103, O121, O145
2011年	8月	日光市	老人保健施設	ナスと大葉のみみ漬け	15	-	O157, O145
2011年	8月	千葉市	高齢者福祉施設	卵サンドの具	14	1	O157:H7
2012年	7-8月	北海道	高齢者施設・ホテル	白菜の浅漬け	169	8	O157:H7
2014年	4月	福島県他	飲食店・家庭等	馬刺し	88	-	O157:H7
2014年	7月	静岡県	花火大会の出店	冷やしキュウリ	510	-	O157:H7
2015年	5月	福岡県	飲食店・家庭(3グループ)	馬刺し	9	-	O157
2016年	7-8月	沖縄県	飲食店	サトウキビジュース	22	-	O157
2016年	8月	千葉県	老人ホーム(2か所)	きゅうりのゆかり和え*	52	5	O157:H7
2016年	8月	東京都	老人ホーム	きゅうりのゆかり和え*	32	5	O157:H7
2016年	11月	神奈川県, 千葉県他	家庭(Diffuse outbreak)	冷凍メンチカツ	58	-	O157:H7

*) 同一の給食事業者が提供

3. 食品からのEHEC検査の進展

食品からのEHECの検査では、試料(食品)に増菌培地(液体)を加えて増菌後、その増菌培養液中に目的とするEHECが存在するか否かを、EHECが保有するVT(*stx*)遺伝子を対象としたPCR法でスクリーニング試験を行う。PCRで陽性となった培養液について、免疫磁気ビーズ法を用いて対象菌を濃縮する。そして、この濃縮液を選択分離用の寒天培地に塗抹して、EHECを分離するという手法で行われる。この様な検査法の進展によって、食品からEHECを分離できた事例、特に、肉類以外の食品を原因食品と推定できた食中毒事例も増えてきた。2011年以降に発生したEHEC食中毒事例で肉類(焼肉、レバ刺し)以外の食品が原因と推定された主な事例を表8にまとめた。この様に、肉類以外の食品でもEHEC食中毒の原因となっていることが分かり、その対策が急がれている。

05 | おわりに

SMAC寒天培地やCT-SMAC寒天培地などのマッコンキー寒天培地を基礎とした培地、および各種の酵素基質培地が開発された。特に、酵素基質培地は、免疫磁気ビーズ法やPCR法と併せて、食品からの病原菌分離法の進歩に大きく寄与した。そして、これらの検査法は、食品検査を通して広く普及してきた。しかし、糞便の検査においては、酵素基質培地が高価であるために、食品検査ほど使われていない。糞便検査において、O157を対象とする場合にはCT-SMAC寒天培地でかなり効率良く菌を分離することができる。しかし、O157以外の血清群のEHEC検査では、EHEC分離用の酵素基質培地はかなり有効であると考えている。

昨今、細菌検査分野においても遺伝子レベルの検査が進んでいる。しかし、多くの情報を正確に与えてくれる病原菌の分離は不可欠である。それに欠くことのできない分離培地については、その特性をしっかりと把握して有効に使うことが重要である。

参考文献

- 1) L. W. Riley, R. S. Remis, S. D. Helgeson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, M. L. Cohen, *N. Engl. J. Med.* **308**(12), 681-685 (1983).
- 2) W. M. Johnson, H. Lior, G. S. Bezanson, *Lancet* **321**(8314-8315), 76 (1983).
- 3) 伊藤武, 甲斐明美, 齊藤香彦, 柳川義勢, 稲葉美佐子, 高橋正樹, 高野伊知郎, 松下秀, 工藤泰雄, 寺山武, 大橋誠, 唐木一守, 山下征洋, 池上重明, 佐藤穂積, 関友次, 加藤喜市, 弘岡淑夫, 山田幸正, 秋山博, 大関哲也, 大芝豊, 山之内淳, 土谷啓文, 綱川敏夫, 田崎達明, 東京衛研年報 **36**, 16-22 (1985).
- 4) 田中博, 大瀬戸光明, 山下育孝, 篠原信之, 井上博雄, 佐々木嘉忠, 柿原良俊, 塚本定三, 湯通堂隆, 奥祐一, 武田美文, 感染症学雑誌 **63**(10), 1187-1194 (1989).
- 5) 小林一寛, 原田七寛, 中務光人, 神野逸郎, 石井経康, 下辻常介, 田村和満, 坂崎利一, 感染症学雑誌 **59**(11), 1056-1060 (1985).
- 6) 城宏輔, 臨床と微生物 **18**(4), 457-465 (1991).
- 7) 国立予防衛生研究所, 病原微生物検出情報(IASR) **17**(8), 1-11 (1996).
- 8) 国立感染症研究所, 病原微生物検出情報(IASR) **19**(6), 1-2 (1998).
- 9) 国立感染症研究所, 病原微生物検出情報(IASR) **35**(5), 1-4 (2014).
- 10) 国立感染症研究所, 病原微生物検出情報(IASR) **36**(5), 1-4 (2015).
- 11) 国立感染症研究所, 病原微生物検出情報(IASR) **37**(5), 1-4 (2016).
- 12) 甲斐明美, 尾畑浩魅, 畠山薫, 五十嵐英夫, 伊藤武, 工藤泰雄, 感染症学雑誌 **71**(3), 248-254 (1997).
- 13) J. G. Wells, B. R. Davis, I. K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow, G. R. Morris, *J. Clin. Microbiol.* **18**(3), 512-520 (1983).
- 14) S. B. March, S. Ratnam, *J. Clin. Microbiol.* **23**(5), 869-872 (1986).
- 15) P. R. Edwards, W. H. Ewing, in *Identification of Enterobacteriaceae*, 3rd ed. (Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1972), pp. 67-72.
- 16) M. Watahiki, J. Isobe, K. Kimata, T. Shima, J. Kanatani, M. Shimizu, A. Nagata, K. Kawakami, M. Yamada, H. Izumiya, S. Iyoda, T. Morita-Ishihara, J. Mitobe, J. Terajima, M. Ohnishi, T. Sata, *J. Clin. Microbiol.* **52**(8), 2757-2763 (2014).
- 17) 工藤由起子, 食品衛生研究 **65**(3), 13-20 (2015).

微生物を色で見る

— 酵素基質培地 —

Chemistry-based colony color observation of target microorganisms — chromogenic culture media —

関東化学株式会社 試薬技術部 / 帝京大学 医真菌研究センター 課長 / 研究員 **金子 孝昌**

Takamasa Kaneko, PhD (Manager)

Reagent Development Dept, Kanto Chemical / Teikyo University Institute of Medical Mycology



キーワード

特異酵素、特異基質、酵素基質培地

01 | はじめに

1881年に、ドイツのRobert Kochによって開発された寒天培地による分離培養技術は、その後の約130年の間に様々な種類が各微生物の分離培養用として開発・改良されてきた。近年ではマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(質量分析法)、遺伝学的検査法、免疫学的検査法などが利用できるようになったが、今もなお微生物検査における分離培養は重要な位置を占め、“生きた生物”として“微生物”を捕らえる手法はこれからも続くと考えられる。

培地そのものも従来から様相を変え、目的の微生物の検出法として、様々な選択物質が報告され、目的に応じた選択分離培地が利用できるようになっている。しかしながら、臨床、公衆衛生、食品衛生の分野を問わず、微生物検査の最大の問題点は1)検出までに時間のかかること、2)分離鑑別に熟練を要することである。分離培養の時点で目的とする微生物を推定同定できる分離培地の開発は微生物検査を簡便化し、ひいては迅速化につながると考えられる。

1970年代にフランスのパスツール研究所で最先端の診断技術を研究していた、Dr. Alain Rambachは、各種微生物の特異的な代謝を利用した鑑別手法を考案し、酵素基質培地の先駆者となったことは有名な話である。現在、同博士の研究成果はCHROMagar™シリーズ製品として、世界的に活用(社会貢献)されるようになった。本稿では、酵素基質培地の成り立ちと原理、利用、そして今後の展望について概説したい。

02 | 古典的な鑑別・分離培養

様々な微生物が存在する検体から目的とする微生物を分離培養する方法は古くから考案されてきたが、方法論として大きく二つに分けられる。

1) 選択剤を培地に加えた選択分離培養

目的とする微生物を優先的に発育させる方法で、腸内細菌科細菌の分離培地に添加される胆汁酸塩や色素、ブドウ球菌の分離培地に添加されるフェニルアルコールや高濃度の塩などが挙げられる。さらに目的の微生物を絞り込むため、抗生物質を添加するケースもある。例えば、腸管出血性大腸菌O157に用いられるセフィキシムやノボビオシンであったり、カンピロバクターに用いられるバンコマイシンやトリメトプリム、アンフォテリシンBなどである。

2) 発育コロニーの色調や形態による鑑別分離培養

目的とする微生物を鑑別する方法で、卵黄反応や亜テルル酸の還元、特定の糖分解をpH指示薬で鑑別する方法、硫化水素産生による硫化鉄の形成、溶血性、エスクリン分解能、テトラゾリウム塩類の還元などが用いられてきた(図1)。

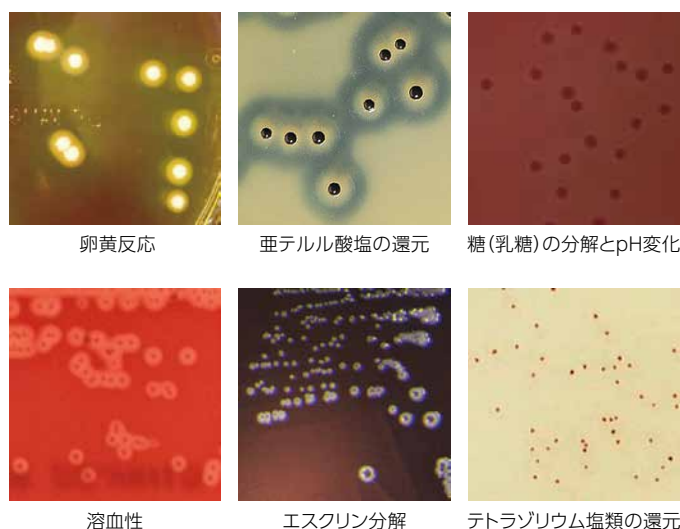
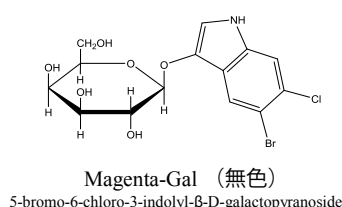
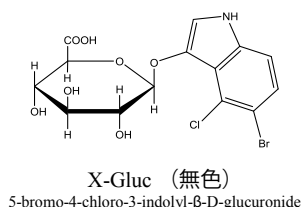


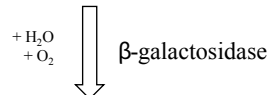
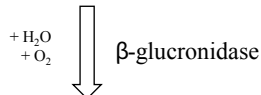
図1 典型的な培養所見(発育コロニーの色調や形態)

本手法による分離には、前述1)による目的微生物以外の発育阻害も応用されるが、特異性の高い鑑別を行なうことは難しいものであった。例えば糖の分解をpH指示薬で確認する方法

【特異酵素基質】



加水分解



【縮合した色原体】

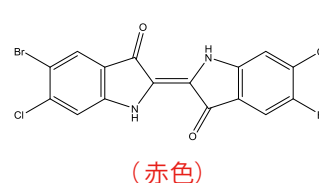
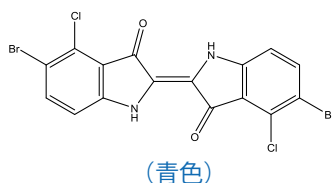


図2 代表的な発色原理

では、pH変化の影響が培地全体に広がり、近接するコロニーは明瞭な変化が確認できないからである。

03 | 酵素基質培地の原理

酵素基質培地とは、目的とする微生物が特異的に代謝する基質に色原体(発色もしくは発光物質)を標識した特異酵素基質を含ませた培地をさす。微生物が特異酵素基質を取り込んで代謝すると色原体が解離し、縮合し、発色して微生物を染めるという原理に基づくものである(図2)。特異酵素基質は無色であるが、目的の微生物が産生する特異酵素により加水分解されると、解離した色原体が縮合し発色する単純な反応原理である。図3では大腸菌の産生するβ-glucuronidase(特異酵素)がX-Gluc(特異酵素基質)を加水分解し、縮合したBromochlorindigoが青色の産物として菌体を染めるといった酵素基質培地のイメージを示す。

特異酵素基質には各種のものが用意できるが、一般的には糖もしくは脂質の酵素基質に対してnitrophenol、indoxyl誘導体および4-methylumbelliferoneが、アミドおよびアミノ酸に対してはnitroanilineおよびnaphthylamineが色原体として利用される。なかでもindoxyl誘導体による発色は拡散性が低く、青系や赤系色といった色調を示すことから、固形(寒天)培地でのコロニーの呈色に利用されている。

このような反応は単純であるが、微生物が利用する基質は多数あり、最も重要なことは目的とする微生物に選択的な特異性の高い基質を作る、もしくは選ぶことである。さらに、簡単に想像されることであるが、大腸菌群のような一群をまとめて検出する場合には、群に共通する特異的な基質が必要となる。

例えば、大腸菌・大腸菌群用酵素基質培地は食品企業の品質管理の簡易・迅速化の流れから広く利用され始めている。従来法とは異なり、推定試験、確定試験および完全試験のステップがなく、特異酵素であるβ-glucuronidase活性(大腸菌)ならびにβ-galactosidase活性(大腸菌群)を指標として同定するものである。これにより、煩雑な鑑別検査工程が軽減され、ひいては検査時間を短縮することができる(図4)。

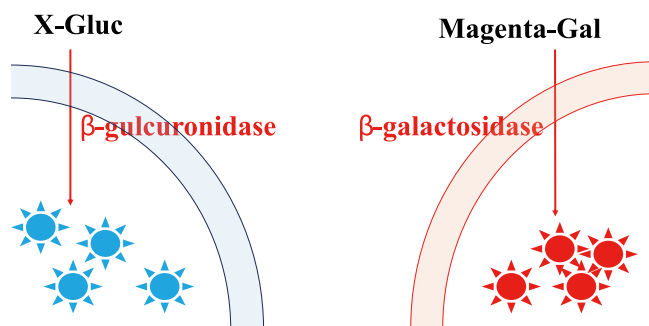


図3 酵素基質培地の原理(イメージ)

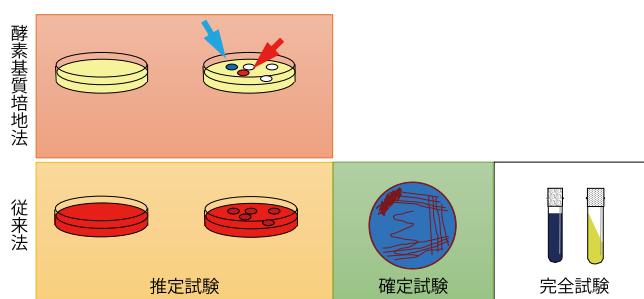


図4 検査の流れ

現在、大腸菌・大腸菌群以外にも多くの研究が展開され、各種微生物の特徴となる特異酵素と特異酵素基質が報告されている(表1)。なお、例えば色原体である4-methylumbelliferone(M)をindoxyl(X)などに替えることもでき、目的の微生物を適切な色調に呈色させることが可能である。これら特異酵素基質を含有した培地は、推定同定用のスクリーニング培地として臨床、公衆衛生、食品衛生の分野で広く活用されるに至った。さらに、これら特異酵素基質と選択物質を組み合わせることにより、薬剤耐性菌のスクリーニングも可能な酵素基質培地が開発され^{18, 19)}、薬剤耐性菌の感染管理が最重要課題である臨床分野で利用され始めた。

表1 発色・発光酵素基質誘導体(例)

菌種・菌群	特殊酵素	特異基質
<i>Streptococcus pyogenes</i>	L-pyrrolidonyl aminopeptidase ¹⁾	L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide
<i>Enterococcus</i> spp.	L-pyrrolidonyl aminopeptidase ¹⁾	L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide
	β -glucosidase (esculinase) ^{1, 2)}	M- β -glucopyranoside
<i>Staphylococcus aureus</i>	L-leucine aminopeptidase ³⁾	L-leucine- β -naphthylamide
	acid phosphatase	X-phosphate
<i>Neisseria</i> spp.	DNase	X-thymidine-5'-phosphate
	γ -glutamyl aminopeptidase ⁴⁾	γ -glutamyl β -naphthylamide
	β -galactosidase	M- β -galactopyranoside
<i>Branhamella catarrhalis</i>	hydroxyproline aminopeptidase	L-hydroxyproline- β -naphthylamide
	butyrate esterase ^{5, 6)}	M-butyrate
Coliform	β -galactosidase ^{7, 12)}	M- β -galactopyranoside
<i>Escherichia coli</i>	β -glucuronidase ^{7, 8, 12)}	M- β -glucuronide
<i>Salmonella</i> spp.	L-pyrrolidonyl aminopeptidase ⁹⁾	L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide
	caprylate esterase ¹⁰⁾	M-caprylate
<i>Klebsiella, Enterobacter</i>	β -xylosidase ^{11, 12)}	M- β -xylopyranoside
<i>Proteus, Providencia, Morganella</i>	L-tryptophane deaminase ¹²⁾	L-tryptophane
<i>Listeria monocytogenes</i>	β -cellobiosidase	M- β -cellobioside
	alanine aminopeptidase ^{13, 14)}	DL-alanine- β -naphthylamide
<i>Clostridium difficile</i>	L-Proline aminopeptidase ¹⁵⁾	L-Proline- β -naphthylamide
<i>Candida albicans</i>	L-Proline aminopeptidase ¹⁶⁾	L-Proline- β -naphthylamide
	β -galactosaminidase ^{16, 17)}	M- β -Galactosaminide

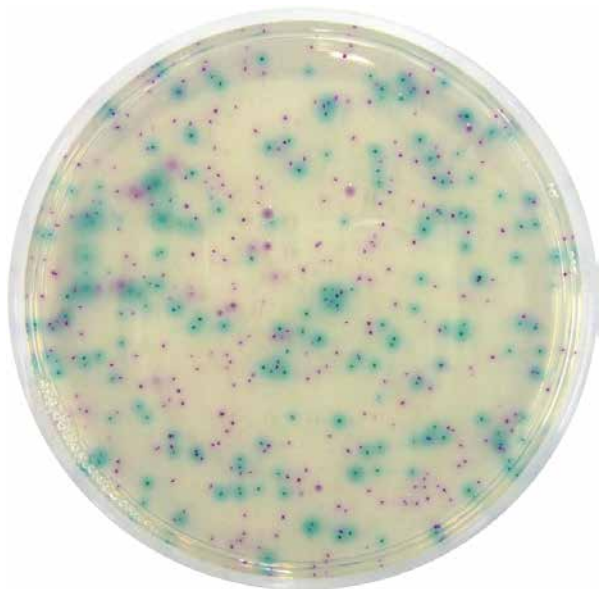


図5 コロニーの呈色所見(クロモアガーECC)

04

酵素基質培地の利点と課題

呈色所見を図5に示すが、利点としては以下のようなことが挙げられる。

- 1) 発色による鑑別になるため、客観性に優れる。
- 2) 培地とコロニーのコントラストが良く判別しやすい。
- 3) 反応が特異的である。
- 4) 酵素による代謝反応は主に菌体内で生じるため、色素の拡散や近接するコロニーの影響がほとんどない。
- 5) 特異酵素基質を組み合わせることにより、一枚の培地で複数の微生物が推定同定できる。
- 6) 機械による自動判別・菌数計測が可能となり、全自動判定のシステム化ができる²⁰⁾。

課題としては以下のようなことが挙げられる。

- 1) 培地自体の価格はやや高価となる(採用している検査法に関わる全ての試薬コストや時間を考えれば利用価値は高い)。
- 2) 従来の培地と検出法が異なるため、まれに結果の合わないことがある。

05

おわりに

微生物検査の迅速化は時代の要望であり、質量分析法、遺伝学的検査法、免疫学的検査法などの近代的手法によって微生物検査の簡易・迅速化は発展してきている。とはいえ、従来どおりの分離培養検査も重要な位置を占め、それ自身が簡易・迅速でなければならない。これからの微生物検査は、特異性の高い酵素基質培地の応用が必要不可欠であり、増々、応用できる微生物の範囲を広げていくべきである。今後の同定細菌学の研究が発展することに期待したい。

参考文献

- 1) R. R. Facklam, L. G. Thacker, B. Fox, L. Eriquez, *J. Clin. Microbiol.* **15**(6), 987-990 (1982).
- 2) K. J. Panosian, S. C. Edberg, *J. Clin. Microbiol.* **27**(8), 1719-1722 (1989).
- 3) R. Facklam, N. Pigott, R. Franklin, J. Elliott, *J. Clin. Microbiol.* **33**(4), 885-887 (1995).
- 4) R. F. D'Amato, L. A. Eriquez, K. M. Tomfohrde, E. Singerman, *J. Clin. Microbiol.* **7**(1), 77-81 (1978).
- 5) M. Vaneechoutte, G. Verschraegen, G. Claeys, P. Flamen, *J. Clin. Microbiol.* **26**(6), 1227-1228 (1988).
- 6) S. F. Dealler, M. Abbott, M. J. Croughan, P. M. Hawkey, *J. Clin. Microbiol.* **27**(6), 1390-1391 (1989).
- 7) S. C. Edberg, M. J. Allen, D. B. Smith, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(6), 1595-1601 (1988).
- 8) M. Kilian, P. Bülow, *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. B.* **84B**(5), 245-251 (1976).
- 9) M. Mulczyk, A. Szewczuk, *J. Gen. Microbiol.* **61**(1), 9-13 (1970).
- 10) M. Olsson, A. Syk, R. Wollin, *J. Clin. Microbiol.* **29**(11), 2631-2632 (1991).
- 11) J. L. Sepúlveda, C. E. Stager, J. R. Davis, *J. Clin. Microbiol.* **28**(2), 177-181 (1990).
- 12) M. Manafi, M. L. Rotter, *Int. J. Food Microbiol.* **14**(2), 127-134 (1991).
- 13) P. Kämpfer, *J. Clin. Microbiol.* **30**(5), 1067-1071 (1992).
- 14) A. G. Clark, J. McLaughlin, *J. Clin. Microbiol.* **35**(8), 2155-2156 (1997).
- 15) D. P. Fedorko, E. C. Williams, *J. Clin. Microbiol.* **35**(5), 1258-1259 (1997).
- 16) J. L. Perry, G. R. Miller, D. L. Carr, *J. Clin. Microbiol.* **28**(3), 614-615 (1990).
- 17) J. L. Perry, G. R. Miller, *J. Clin. Microbiol.* **25**(12), 2424-2425 (1987).
- 18) J. Merlino, M. Leroi, R. Bradbury, D. Veal, C. Harbour, *J. Clin. Microbiol.* **38**(6), 2378-2380 (2000).
- 19) P. Nordmann, D. Girlich, L. Poirel, *J. Clin. Microbiol.* **50**(8), 2761-2766 (2012).
- 20) M. L. Faron, B. W. Buchan, C. Vismara, C. Lacchini, A. Bielli, G. Gesu, T. Liebrechts, A. van Bree, A. Jansz, G. Soucy, J. Korver, N. A. Ledebroer, *J. Clin. Microbiol.* **54**(3), 620-624 (2016).



キーワード解説

公定法

公定法には告示法、通知法等があり、行政から示された告示や通知に示された試験法をさす。

NIHSJ(標準試験法)法

国際的な食品の規準を決めるコーデックス委員会では、食品の微生物試験法に関して、ISO法またはISO法と科学的な妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。NIHSJ法とは、食品微生物分野の専門家で構成された『食品からの微生物標準試験法検討委員会』により、ISO法と科学的な妥当性の確認を行った試験法である。本試験法と比較することで各種簡易・迅速法の性能を評価することが可能となる。

ISO法

ISO(国際標準化機構)が定めた微生物試験法であり、一般生菌数等の汚染指標菌からサルモネラ等の食中毒菌まで対象菌毎に試験法が定められている。コーデックス委員会における食品の微生物基準の判定に用いられ、欧州をはじめ様々な国で採用されている。

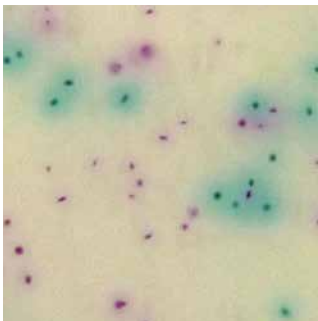
簡易・迅速法

簡易・迅速法には従来の培養法を簡易化する酵素基質培地やシート培地、さらに培養法に代わる簡易・迅速法としてATP測定法、免疫学的検査法、遺伝学的検査法などがある。

検査の迅速・簡易化に!!

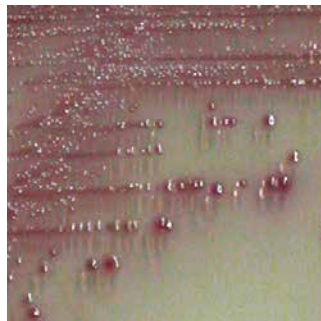
関東化学の酵素基質培地 クロモアガー シリーズ

大腸菌・大腸菌群検査用



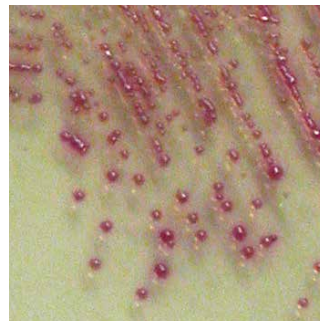
クロモアガー ECC

サルモネラ検査用



クロモアガー サルモネラ

黄色ブドウ球菌検査用



クロモアガー スタッファウルウス

リステリア検査用



クロモアガー リステリア

特長

発色による鑑別のため客観性に優れる

培地とコロニーのコントラストが良く判別しやすい

微生物特有の酵素による反応を利用しているため特異性が高い

色素の拡散が少なく、近接するコロニーの影響がほとんどない

*各種培地のパンフレットをご要望の方はご連絡ください。

※無断転載および複製を禁じます。



関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

室町東三井ビルディング

電話 (03) 6214-1090 FAX (03) 3241-1047

HP <http://www.kanto.co.jp/times/>

E-mail: chemiti-info@gms.kanto.co.jp 編集責任者: 猪瀬真人

平成 29 年 4 月発行