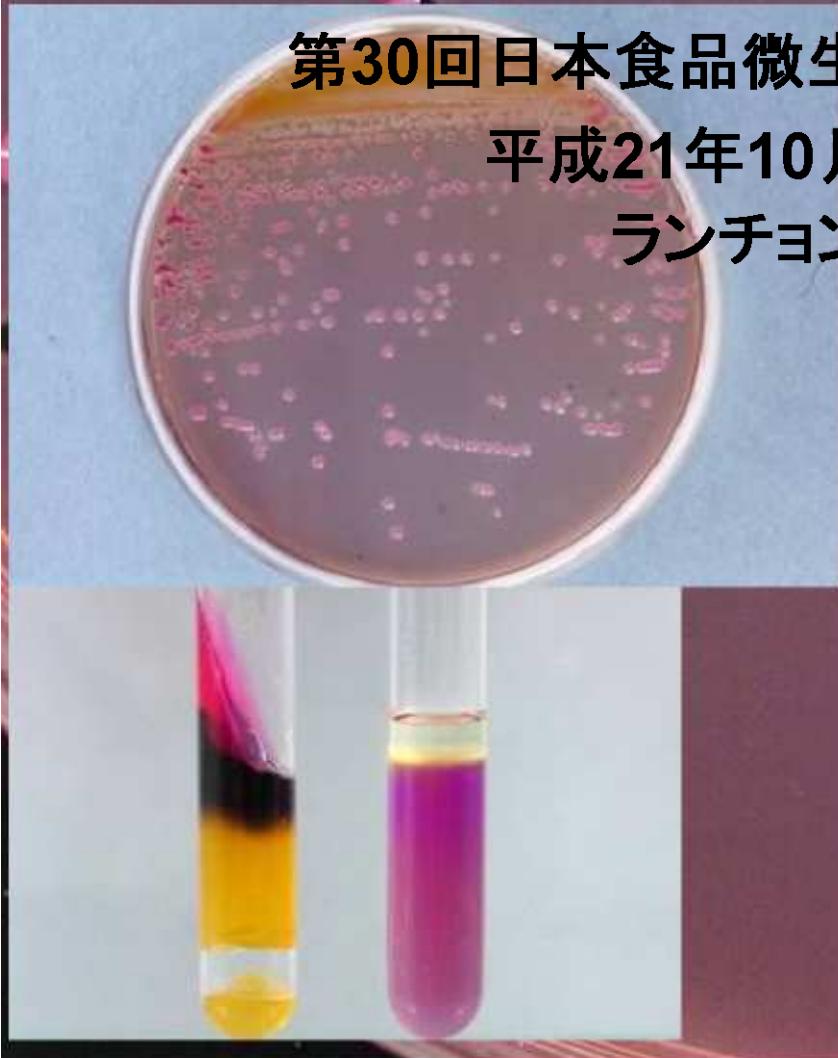


# 食品関係従事者の腸管系病原微生物検査の 意義と検査方法 Part I

第30回日本食品微生物学会学術総会(総会長:小崎俊司)  
平成21年10月19日~21日 タワーホール船堀  
ランチョンセミナー公演集



財団法人 東京顕微鏡院  
食と環境の科学センター  
麻布大学 客員教授

伊藤 武

# 食品従事者の食品媒介微生物検査の必要性

## 1. 食中毒発生のリスク低減対策

食品媒介病原微生物保菌者への対応

## 2. 安全性の高い食品の製造／加工、調理

## 3. HACCPシステムによる衛生管理

従事者の衛生管理

従事者の衛生意識の向上と持続

## 4. 検査データーの活用

食中毒や感染症の広域的発生の早期の探知

## 飲食店を原因とした細菌性赤痢の集団例 (岐阜県保健環境研究所)

発生年月日： 2002年5月20日～6月2日

患者数 : 24名(2次感染者5名)

原因食品 : 飲食店の食事(5月22日と23日と推定)

2次感染者4名は家族との接触か？ 1名は不明

感染ルート: 従業員1名が5月20日に発症

病院で受診したが、継続して勤務

担当業務:野菜洗浄、サンドイッチ、食器洗浄

原因菌 : *Shigella flexneri* 3a

# 調理従事者が汚染源と推定された赤痢菌食中毒

発生年月日	平成18年9月18日
原因施設	飲食店(回転寿司店)
患者数	10名
原因食品	寿司(15日、16日に提供)
病原物質	<i>Shigella sonnei</i>
汚染経路	<ul style="list-style-type: none"><li>①チェーン店4店舗あり、1店のみに発生、食材は共通</li><li>②原因食品は共通の寿司ねたではない</li><li>③セルフサービスで氷と水を利用できるが、利用していない人からも赤痢菌検出</li></ul>
<p>④調理従事者18名中3名から患者と同一赤痢菌が検出されている。</p>	

# O157保菌調理従事者が汚染源と推察される 腸管出血性大腸菌O157食中毒？？？

発生年月日

平成14年7月30日

発生場所

病院及び老人施設

患者数

123名(摂食者数 876名) 死亡者 9名

原因食品

給食(香味あえ?)

病因物質

腸管出血性大腸菌O157

汚染経路

- ① 調理従事者は4交替で勤務、病院調理室と老人保健施設調理室を入れ替えが行われていた。
- ② 調理従事者からはO157が検出されていないが、7月29日から下痢など体調不良者が6名いたことから、調理従事者の関与が考えられた。

# 食品従事者の腸管系病原微生物検査の根拠(1)

## 1. 感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律

(感染症法)による規制 平成10年制定、平成15年、平成19年改訂

### 3類感染症患者・保菌者の就業制限

食品の製造・加工、販売、調整又は取り扱い、調理の際に  
飲食物に直接接触する業務への就業制限

腸管出血性大腸菌感染症、赤痢、腸チフス、パラチフス、  
コレラなど

## 2. 食品衛生法の施行改訂 平成11年、改訂

3類感染症の病原体

## 3. 食品等事業者が「実施すべき管理運営基準に関する指針 平成16年

1) 検便の実施

2) 3類感染症の病原体保有者は、保菌していないことが判明するまで食品  
に直接接触する作業に従事させない

# 食品従事者の腸管系病原微生物検査の根拠(2)

4. 厚生労働省 (平成9年通知、最終改正平成20年)

## 大量調理施設の衛生管理マニュアル

1回300食以上、又は1日750食以上提供する調理施設

### Ⅲ 衛生管理体制

(8)責任者は調理従事者等に月1回以上の検便(赤痢菌、チフス菌、サルモネラ)を受けさせること。検便検査には腸管出性大腸菌(O157.26,111など)を含めること。

必要に応じて10から3月にはノロウイルスの検査を含めること。

(10)責任者は下痢又は嘔吐等の症状がある調理従事者等については、直ちに医療機関を受診させ、感染性疾患の有無を確認すること ノロウイルスと診断された調理従事者等はリアルタイムPCR等の高感度の検便検査により、ノロウイルス陰性が確認されるまで、食品に直接触れる作業を控えさせる。

(11)責任者はノロウイルスに感染機会があった可能性のある調理従事者には検便検査によりノロウイルス陰性が確認されるまで、食品に直接触れる作業を控えさせる。

# **大量調理施設衛生管理マニュアルの 趣旨を踏まえた衛生管理の徹底**

**同一メニューを300食以上 または 1日750食以上  
提供する調理室以外の中小規模施設への対応**

**中小規模調理施設における衛生管理の徹底**

**平成9年6月30日**

**児童福祉施設等における」衛生管理の改善充実  
及び食中毒発生予防について**

**平成9年6月30日**

# 食品従事者の腸管系病原微生物検査の根拠(3)

5. 文部科学省（平成9年に通知、学校給食の衛生管理の基準）

学校給食法：学校給食衛生管理基準

平成21年4月1日施行

第4 衛生管理体制に係る衛生管理基準

(2)学校給食従事者の健康管理

ニ 検便は赤痢菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌O157その他必要な細菌等について、毎月2回以上実施

三 食品に直接触れる作業を控えさせる

- ・ノロウイルスに感染した調理従事者
- ・ノロウイルスに感染する機会があった可能性のある調理従事者

高感度の検査法によりノロウイルス陰性であることが確認されるまで

# 飲食店従事者糞便からの赤痢菌検出状況(善養寺ら) 東京都

年	検査件数	赤痢菌陽性者	赤痢の集団発生	赤痢の患者数
1966	172,519	108(0.06)	81	4,289
1967	170,534	50(0.03)	23	1,113
1968	162,350	13(0.008)	17	454
1969	155,372	14(0.009)	19	1,003
1970	166,628	0	14	954
1971	141,391	3(0.002)	5	195
1972	132,574	2(0.002)	7	287
1973	131,200	1(0.001)	3	126
1974	143,687	4(0.002)	9	471
1975	99,409	1(0.001)	2	28

食品従事者の保菌者検査を実施し、赤痢菌保有者を隔離、治療したことにより、赤痢の流行が減少し、保菌者検査の有効性が証明された。

# 食品従事者からのサルモネラ及び腸管出血性大腸菌O157検出率

(財団法人:東京顕微鏡院)

年	サルモネラ	O157	年	サルモネラ	O157
1999	0.015	0.0003	2005	0.029	0.002
2000	0.016	0.0014	2006	0.025	0.0024
2001	0.015	0.0008	2007	0.022	0.0017
2002	0.016	0.0005	2008	0.027	0.0011
2003	0.014	0.0008	2009*	0.032	0.0028
2004	0.019	0.0005			

\*4~8月 腸管出血性大腸菌O26陽性率:0.0016

# サルモネラ陽性者の手指からの本菌検出

サルモネラ 排菌者 (排菌量 $10\sim10^8$ cfu)	検査 回数	手指からのサルモネラ検出	
		手洗い前	手洗い後
23名	43回	9	1 *

\*糞便のサルモネラ菌数 $10^6$ cfu

Pether J.V.S. & Scott R.J.D, J.Infec.5:1982

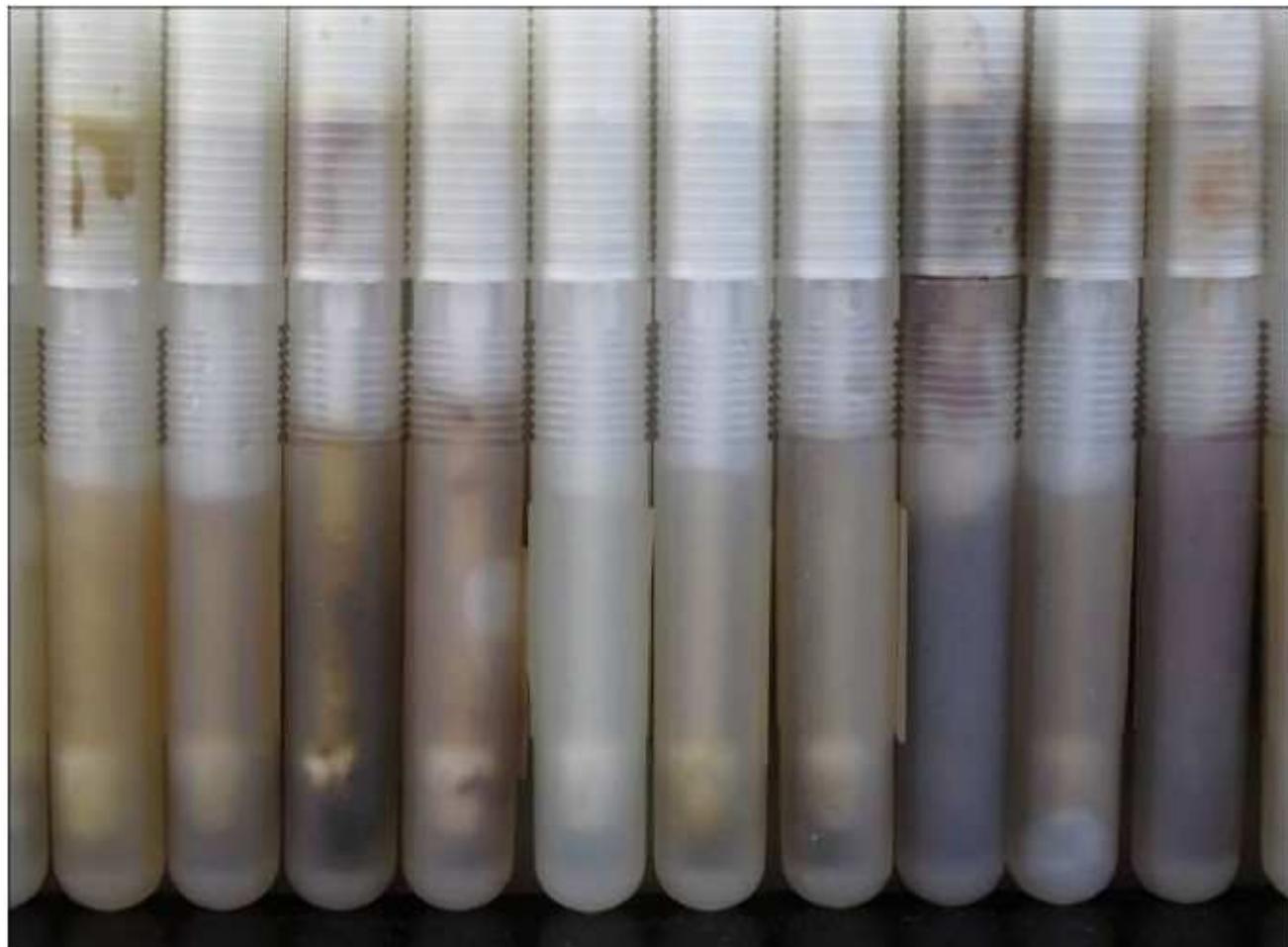
ふん便から手指へのサルモネラ汚染が証明されたし、手洗いにより手指のサルモネラを除去できるが、不十分な手洗いでは手指にサルモネラが残存する、

# 微生物の特性と糞便からの腸管系病原微生物検査

---

1. 細菌・真菌は温度／時間により増殖または死滅をする。  
検体の輸送・保管
2. 菌種ごとに集落の形成や形状、色調、発育性などが異なる。  
検査の目的、標的とする細菌により適切な分離培地を選択する
3. 粞便には目的菌以外の各種の微生物が含まれる。  
予期できない微生物による競合・拮抗作用がある。
4. 検査する糞便量が一定でない。

採取される糞便量が一定でない、糞便量を一定にして  
検査することは困難であり、現実的でない



# 微生物検査室における精度管理

---

- ・検査物の受け入れ
- ・検体の採取、秤量
- ・培地の保管管理・調整、性能・無菌性
- ・使用水の管理
- ・秤量天秤、pHメーター
- ・使用機器の管理(高圧滅菌器、乾熱滅菌器、恒温槽  
冷蔵庫、冷凍庫など)
- ・クリンーベンチ、安全キャビネット
- ・検査室(作業環境)
- ・菌株の保存、

# 精度を確保した試験法

## 1. 標準となる試験法

- ・公的な試験法は示されていないが、ガイドラインは多数の報告がある。
- ・**食品安全確保のための微生物検査協議会の指針**

## 2. 事業者の協力

- ・糞便の採取と提出
- ・検査結果の活用

## 3. 糞便検査における精度管理

# 臨床材料からの病原菌検査法のマニュアル

1. 厚生省監修 微生物検査必携(細菌・真菌検査)、  
1996年初版,1978年 2版,1987年 3版、日本公衆衛生協会
  - B.公衆衛生における細菌・真菌検査のあり方
  - D.各論1 経口感染症
2. 腸管系病原菌の検査法、善養寺 浩ら、1967年、初版、1979年 改訂、  
1985年 第4版、 医学書院
  - 腸管系病原菌と感染像、病原菌検索法(検査材料、検査体系、  
分離培地と特性、確認試験など)、各論
3. 医学細菌同定の手引き、坂崎利一、近代出版、1993年
4. Identificaton of Enterobacteriaceae,Edwarda,P.R.&Ewing  
W.H, Burgess Publishing Comp.1955

# 食の安全を確保するための微生物検査協議会

設立 平成14年11月1日

理事長 竹田 美文(理事:浅川 豊、伊藤 武、工藤泰雄、小沼博隆、  
坂井千三、寺山 武、丸山 努)

## 設立の主旨

我が国における食中毒は依然として猛威を振るっており、国民に多大の被害を与えている。～～ 食品の微生物検査は食の安全性の検証や評価の手段として重要な位置にあり、**検査機関はその責務として検査の精度の向上**は勿論、食品微生物検査法の確立～～～。保菌者検索では患者を対象とした臨床細菌検査とは異なり、対象者が健常人であるために病原微生物の排菌量も極めて少ないとから**精度の高い検査を実施**～～。

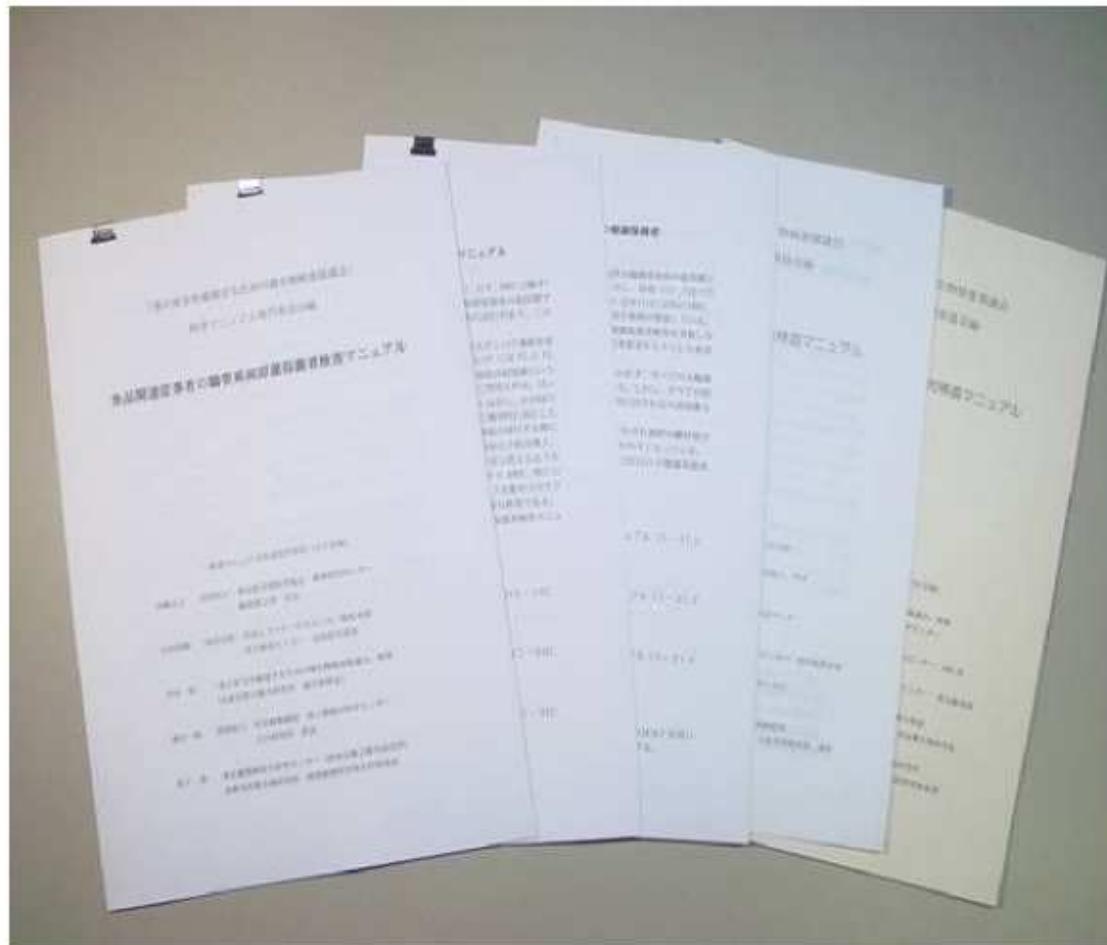
保菌者検査を食の安全を確保するための対策として十分に機能させるためには、**検査法の標準化、検査機関への検査技術の普及・啓発のみならず**  
**検査を依頼する立場にある食品関連企業への情報提供**～～～

- ①情報の提供、②教育研修、③検査マニュアルの作成、  
④検査技術の開発、

# 食の安全を確保するための微生物検査協議会

## 現在までに作成したマニュアル

(連絡先:FAX 042-529-6256)

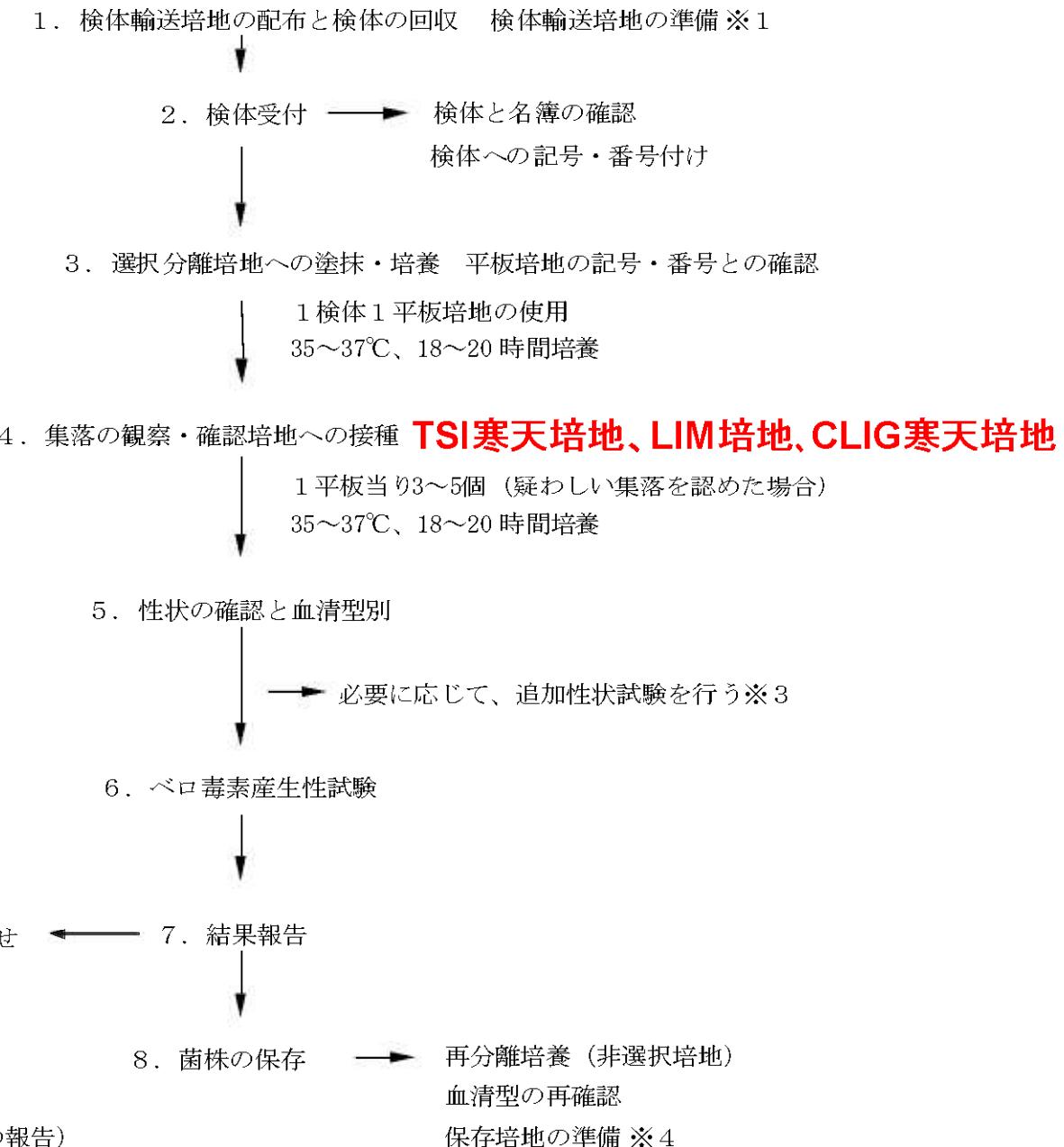


1. 赤痢菌 & サルモネラ  
2003年版
2. 腸管出血性大腸菌O157  
2003年版
3. 腸管出血性大腸菌  
O26&O111  
2004年版  
追補版(2010年)
4. 製造環境・調理施設の  
環境検査  
2009年版



## 赤痢菌及びサルモネラ属菌検査のフローチャート

**CT-SMAC培地  
酵素基質培地など  
内径80-90mm、  
1検体に付き1枚の平板**



**腸管出血性大腸菌O157検査のフローチャート**

# 糞便提出時の注意事項

1. 新鮮便を採取すること
2. 感冒などの感染症に罹患したことにより抗生物質(抗菌剤)を投与しているときは採便しないこと  
抗菌剤投与中止後48時間以降に採便する
3. 同一人糞便を分割して他人名義で提出しないこと

## 当財団で判明した事例

- ① A例 腸管出血性大腸菌O157 5名分
- ② B例 腸管出血性大腸菌O157 7名分
- ③ C例 サルモネラ 14名分
- ④ D例 腸管出血性大腸菌O157 3名分

## 病原菌陰性の事例

9例 5~42名に分けた。

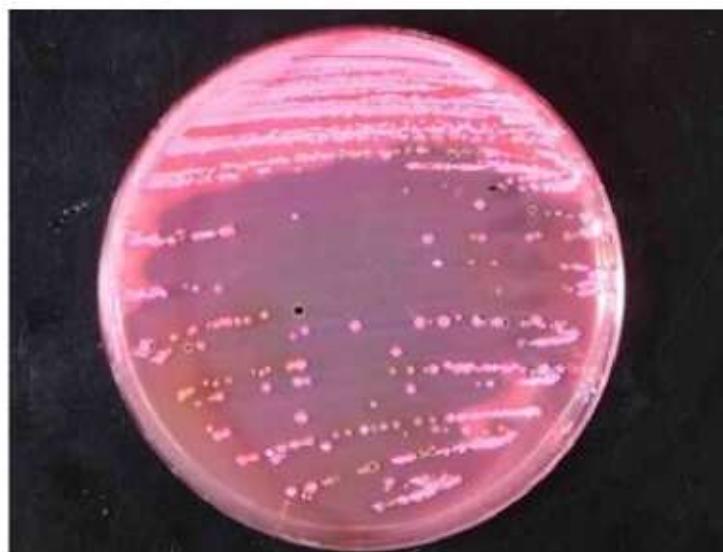
## 同一人の糞便を分けて他人の名前で提出例



A



C



B



D

# 使用培地の調整・無菌性、性能の試験

---

1. 培地購入時: 使用培地について既知菌株による発育性、色調、抑制性試験
2. 培地調整時の適性試験  
(秤量、精製水)
3. 検査時毎に既知菌株による発育性などの試験

# 糞便検査の内部精度管理

---

1. 既知菌株による菌種の同定、血清型別、  
毒素産生試験(同一担当者の繰り返し試験、  
担当者間のバラツキ試験)
2. 粪便に腸管系病原菌を添加し、回収試験  
(低レベル、高レベル、検出限界)
3. 腸管系病原菌と一般の腸内細菌および  
病原菌類似菌との鑑別試験

# 高圧滅菌器の管理

---

1. メーカーによる定期点検(耐圧・温度)
2. 機器の清掃
3. 滅菌操作の確認  
インジケーターによる確認  
(ケミカル・バイオロジカル)

# 恒温器の管理

孵卵器、恒温水槽、冷蔵庫、冷凍庫など

---

## 1. 温度記録

温度計の設置、自動温度記録計

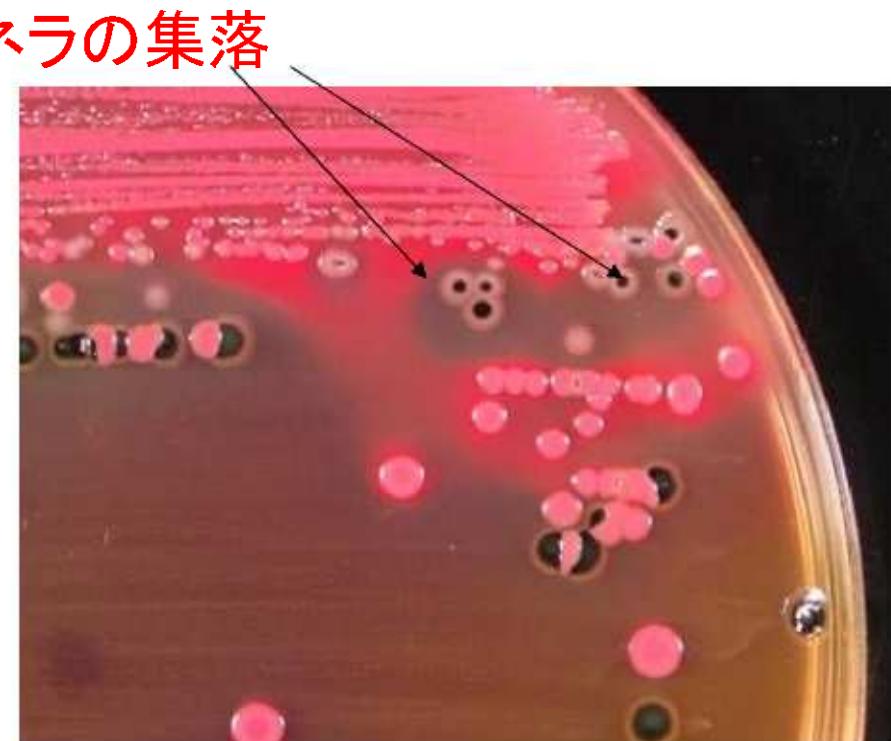
2. 温度計の校正・記録・保存
3. 孵卵室・冷蔵室に関しては部位による  
温度変動を把握すること
4. 培養温度と時間を厳守すること

## 精度管理: 培養温度と培養時間

### 1) SS寒天培地上のサルモネラの集落



37°C、12時間培養



37°C、24時間培養

培養時間が短いと典型的な集落を形成しない

## 精度管理

TSI寒天培地の反応 : *Salmonella*

TSI寒天培地の判定は18~24時間定



3時間



7時間



12時間



22時間



46時間

## 精度管理

LIM培地の反応: *Citrobacter*

LIM培地の判定は18~24時間



3時間



7時間



12時間



22時間



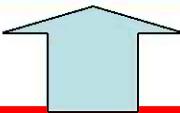
46時間

# 分離寒天平板のと抹面積

- 原則は一人につき1枚であるが、現在開発されている赤痢菌・サルモネラ属菌を対象とした平板はそれぞれの特徴ある集落を形成する。他の類似雑菌の発育を極力抑制する
- 現在のCT-SMAC寒天はO157 の特徴ある集落を形成するし、他の類似菌の発育を著しく抑制する。

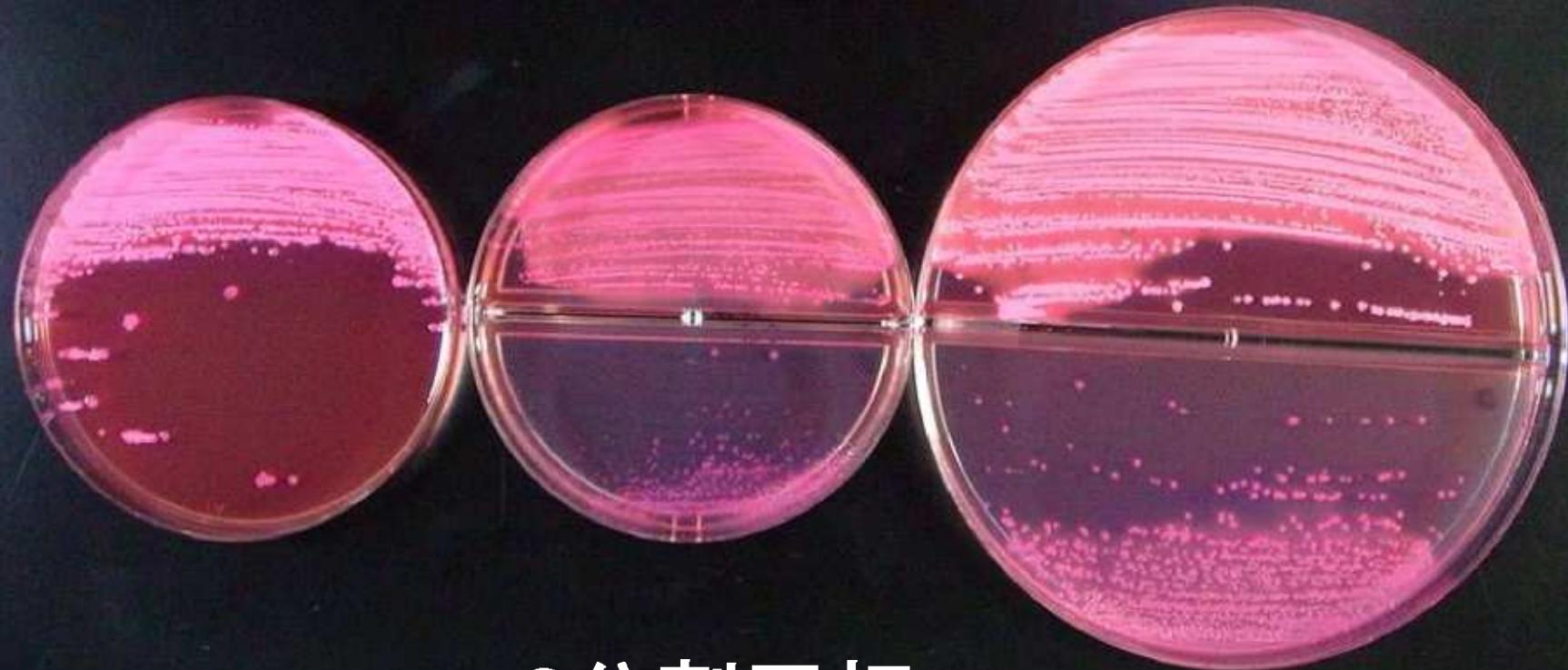
1枚の寒天を半分に分割してと抹することも可

ただし、これ以上の分割はと抹面が狭く、独立した集落形成が困難となることから、精度を高めた検査とはならない。



実施してはならない検査方法

# 分離寒天平板



内径90mm

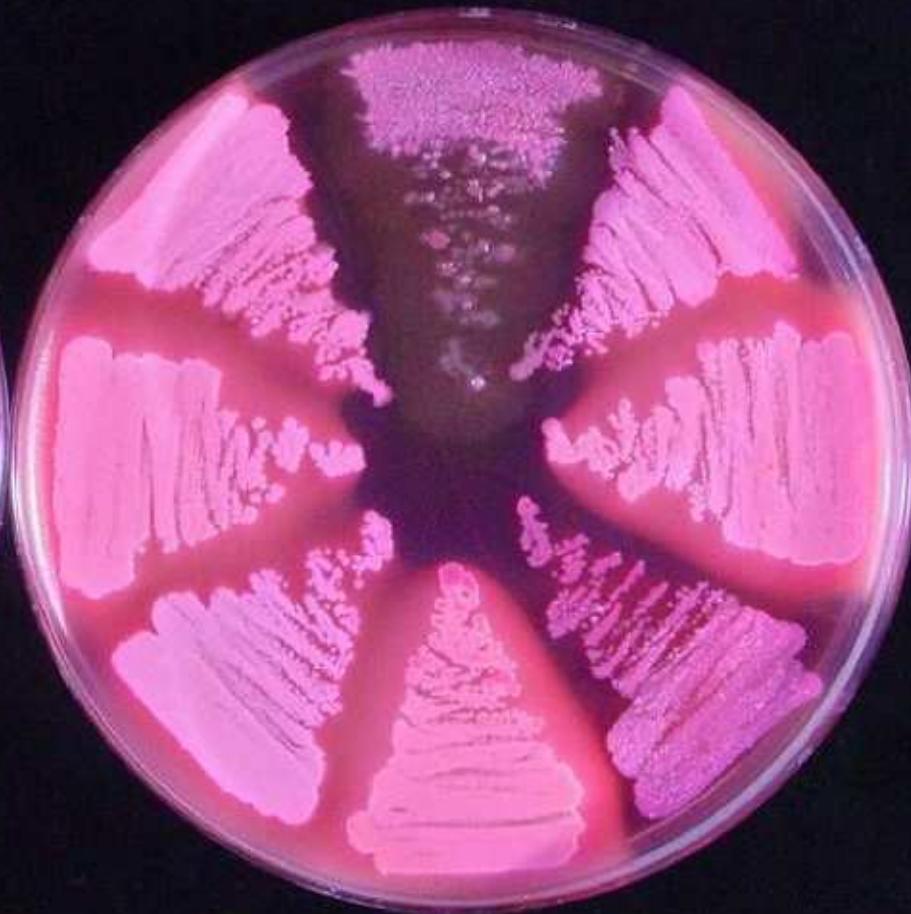
2分割平板

内径90mmと同一  
面積の2分割培地

# 絶対にやってはならない培養法



4分割



8分割

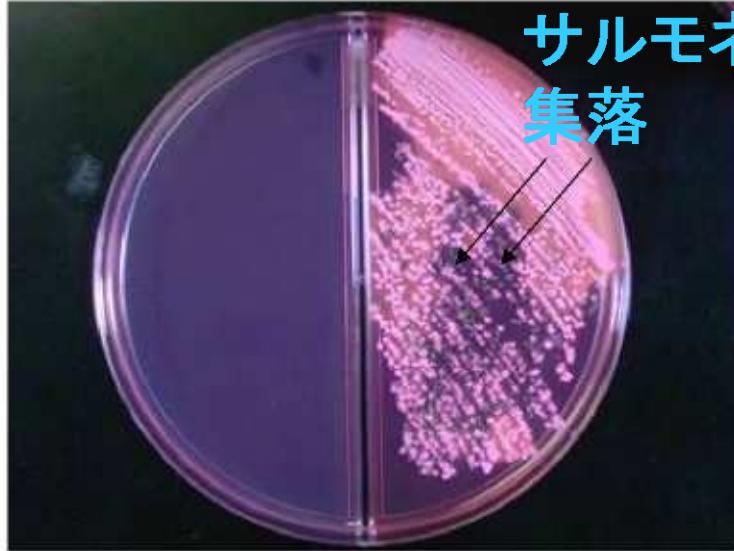
## 糞便を混合して寒天平板への塗沫

- ・糞便1件ごとに塗沫し、精度管理を重視すること
- ・糞便を混合して塗沫することは正しい試験法ではない。

精度管理を無視した試験法である

## サルモネラ陽性者糞便

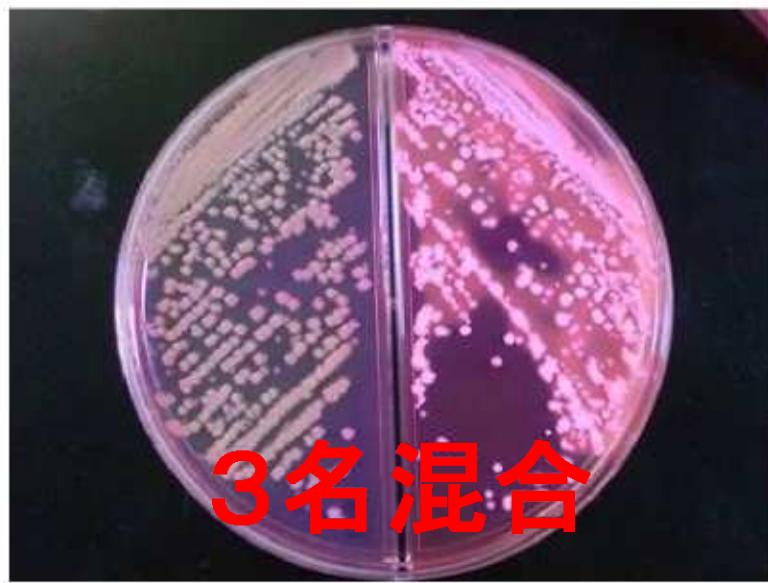
(画面が小さいため典型的な黒色集落が明確ではありません)



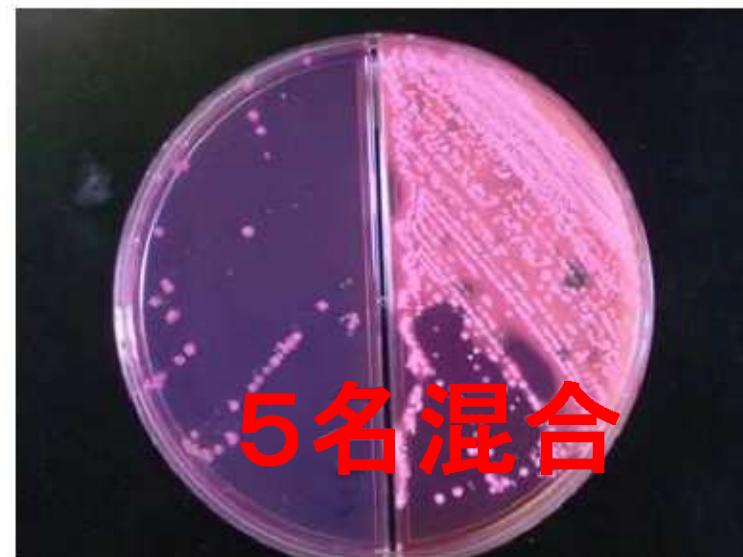
## サルモネラ陽性者ふん便に他のふん便1名を混合



ふん便を混合することによりふん便中に含まれる各種細菌数のバランスや、菌同士の拮抗などの影響によりに目的とするサルモネラが検出できない。



3名混合



5名混合

# 糞便からの病原菌検出のための遺伝子検査法①

遺伝子検査の目的：高い検査精度・迅速性

食品微生物検査への遺伝子検査の応用

- ①食品の増菌培養液からのスクリーニング試験、
- ②分離菌株の病原遺伝子検査、③ノロウイルスの検査

食品従事者糞便検査への遺伝子検査の応用

- ① **gold standard method**は培養法であることから、あくまでスクリーニング試験
- ② **迅速性**
- ③ **高感度**

## 糞便からの病原菌検出のための遺伝子②

遺伝子検査を低額で実施するために糞便を混合

- ①PCRなどの遺伝子検査は糞便に含まれる物質により増幅が阻害されることが多いので、内部標準を必ず入れなければならない。
- ②糞便中の菌量1g当たり $10^3$ 個が検出されなければならない。
- ③PCRなどは高感度ではあるが、紛らわしい類属反応が出現する
- ④陽性となった際には分離培養により病原菌の検出が必要なため、検査日数の短縮とはならない。

糞便を混ぜて検査することは正しい検査ではない。

# 糞便直接あるいは増菌培養後におけるPCR法によるベロ毒素産生大腸菌の検出

- 1.糞便中のPCR増幅阻害因子を考慮すること
- 2.糞便1件ごとのPCR検査が原則である
- 3.PCR反応には内部標品を入れること
- 4.増菌培養は目的菌以外の腸内細菌により大きな差があることから、多数の検体を混合することは正しい試験ではない
- 5.PCR陽性検体については必ず寒天培養試験により菌株を分離し確認すること。

# 食品従事者糞便の腸管系病原微生物 検査データーの活用

- ・全国的広域な検査を実施されていること
- ・分離菌の保存株があること



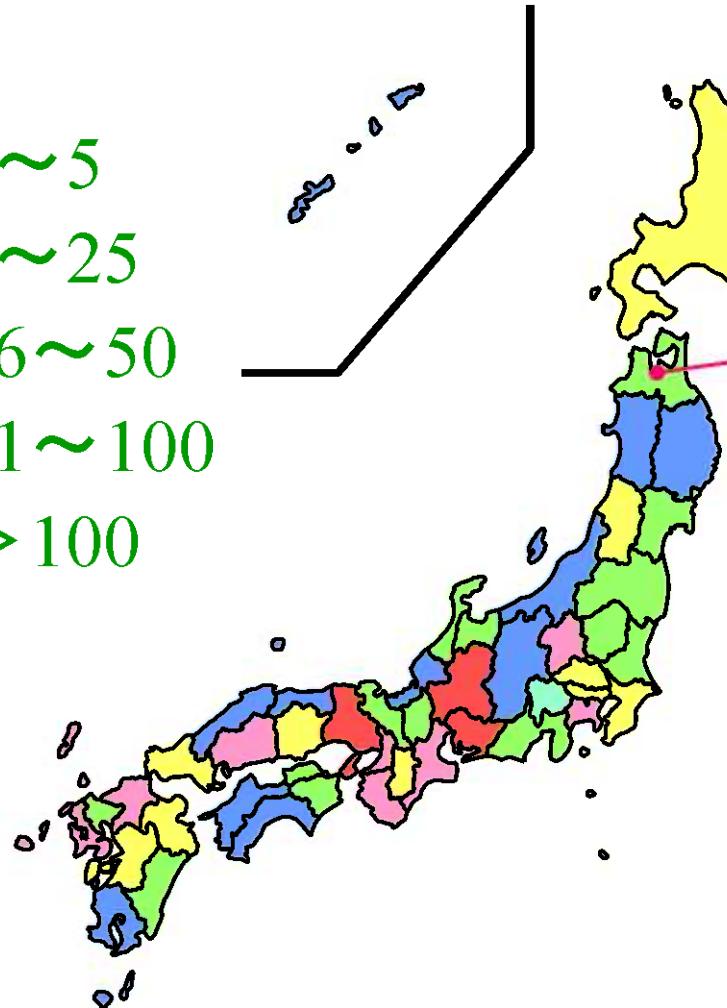
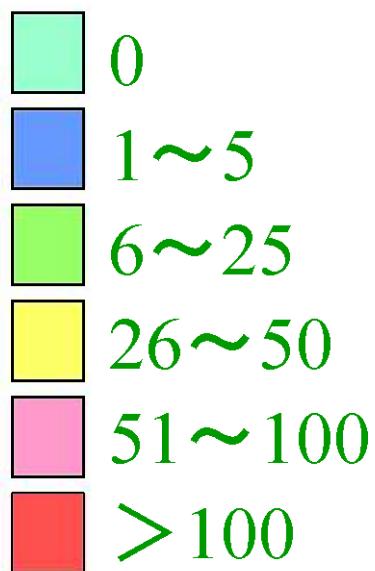
パルスフィルド電気泳動などによる解析



食中毒や感染症の広域的発生の探知

# 例 イカ加工品による*Salmonella* Oranienburg及び*S.Stanley*による食中毒(1999年1～5月)

届出患者数



丸松水産

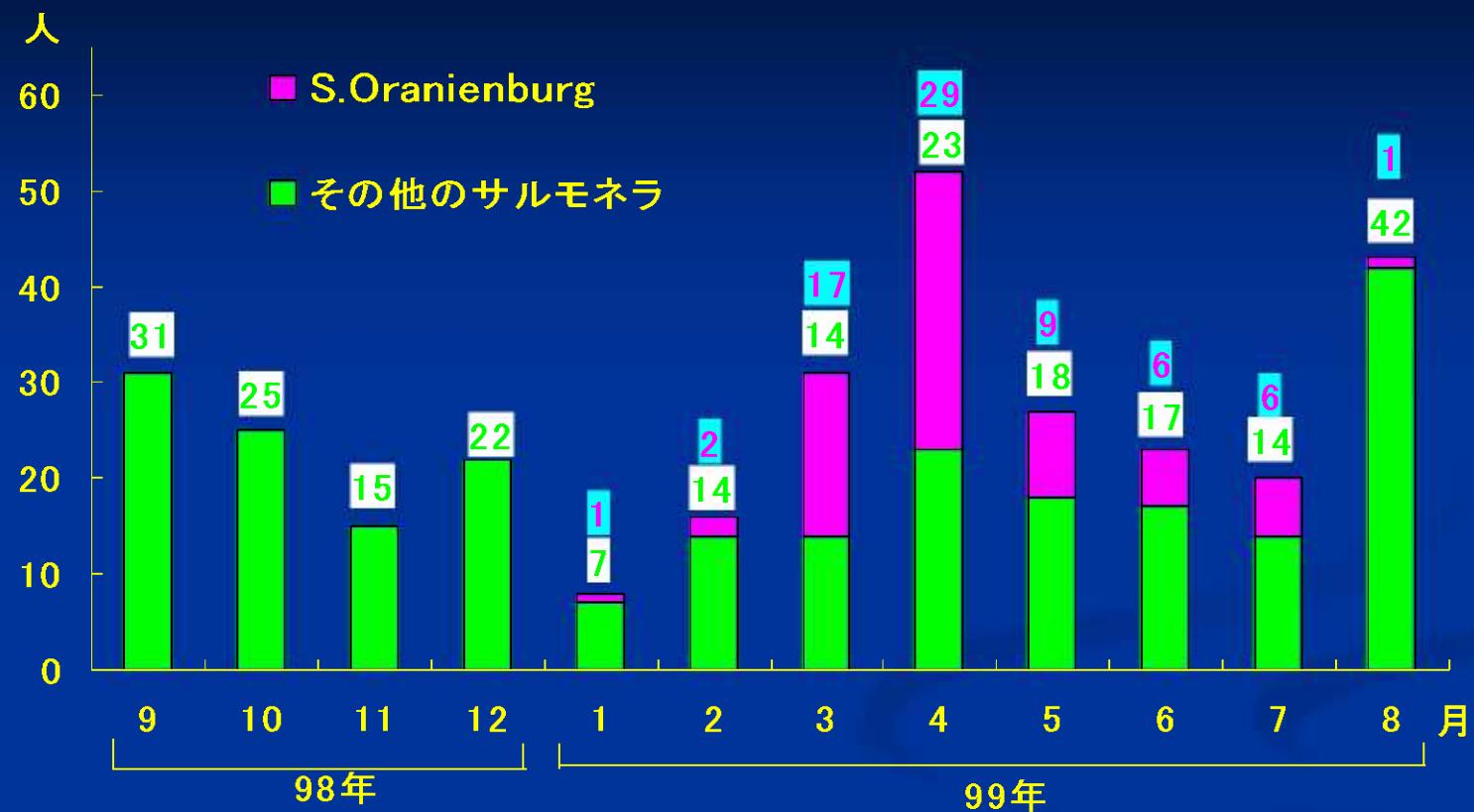
サルモネラの菌数: $<10^2 \sim 10^3$

製品

バリバリいか、イカそうめん、  
おやつちんみ、元祖おやつ  
ちんみ等 14品目

出荷業者: 112(9,712kg + α)

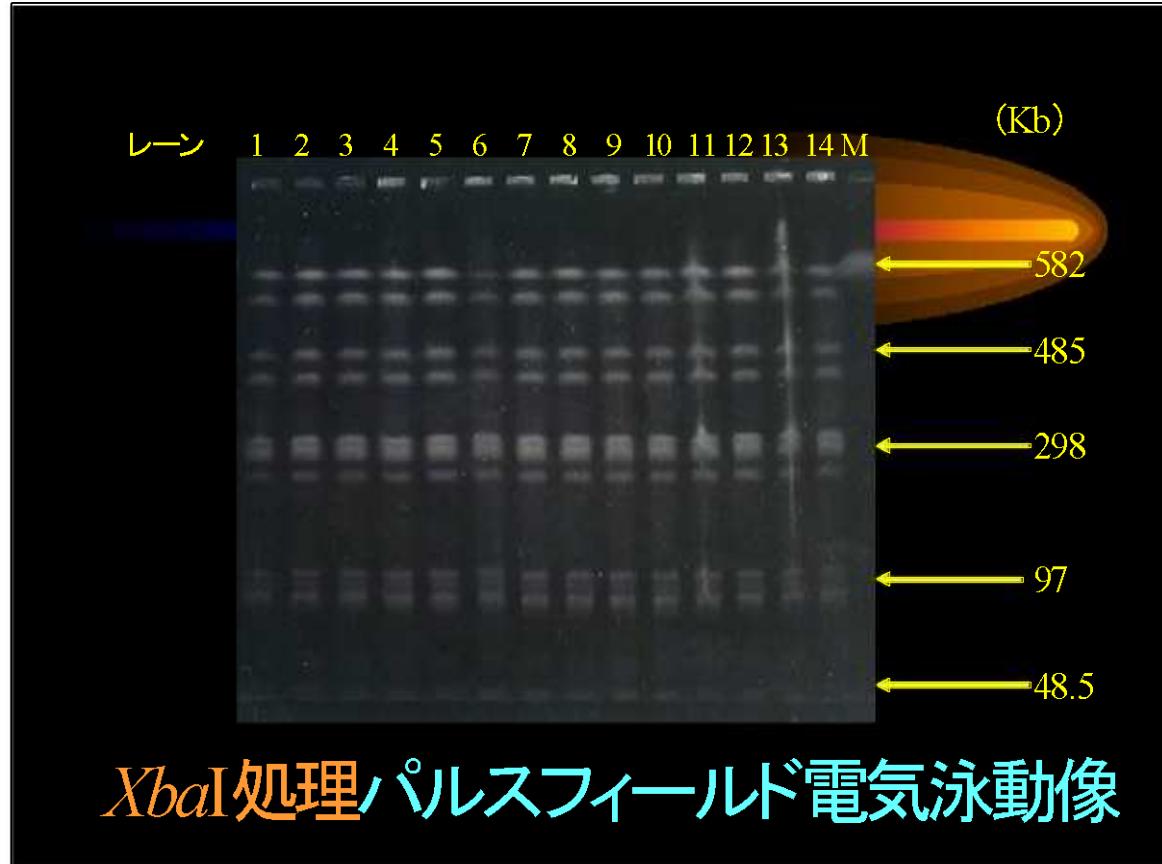
患者数: 1,505



## 食品関連従事者からのサルモネラ陽性者数 とS.Oranienburg検出数(財 東京顕微鏡院のデーター)

S.Oranienburgaの分離地域： 岩手、山形、新潟、栃木、茨城、山梨、千葉、  
神奈川、静岡、岐阜、愛知、三重、大阪、兵庫、広島、福岡、佐賀、長崎の18府県

# 分離されたS.Oranienburgのパルスフィールド電気泳動パターン



1~5:乾燥イカ分離株      6~10:保菌者由来分離株  
11: 乾燥イカ由来株、12~14: 患者由来株  
(11~14の菌株は元東京都立衛生研究所分離株)

同時期に保菌者から検出されたS.Oranienburg菌株は乾燥イカ製品と同一パターンであることから、本流行と密接な関わりがあったことが示唆される。また、陽性者の聞き取り調査では乾燥イカ製品の喫食が確認された人ものあった。

保菌者由来菌株から広域的流行の予測が可能であろう。

# マハトマ・ガンディのことば 7つの大罪

1. 原則なき政治
2. 道徳なき商業

とにかく儲ければいいという節操のなさ、  
精度を無視した検査、食品の偽装
3. 労働なき富
4. 人格なき教育
5. 人間性なき科学
6. 良心なき快樂
7. 犠牲なき宗教

# 腸管系病原菌検査成績書

No. —

会社名  
(施設名)

・太枠線内のみ記入して下さい。

事業所名  
(校・園名)

「ので、汚さずに必ず

No. 氏名



私たちが検査をしております

ご静聴有り難うございました。