

18. 食品の分野の用語は多いので、関連組織の用語辞典などの情報収集を集め、用語集を作成する予定である。
19. ISO 16140 の訳を検討委員会で authorize するのか、外部の機関に委ねるのかについては、未定である。
20. ISO 16140 の訳は、作業部会において JIS データベースおよび実例から訳語リストを作成し、語句の統一（JIS 化された他の文書との用語の整合性など）が完了した時点で訳文を委員に回覧し、意見を募る予定である。
21. ISO 16140 は、JIS ではなく ISO の和訳として公表する。

腸炎ビブリオ試験法について

22. 成分規格設定後、腸炎ビブリオの食中毒は劇的に減少している。
23. 甲斐委員より、腸炎ビブリオ試験法について説明があり、標準試験法作成のためのコラボスタディに対する提案がなされた。
24. 作業部会案（ステージ 2）の培養温度 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ は、全て $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ に統一する。
25. 作業部会案では、増菌培養時間を 16-18 時間とし、参照法とする ISO 8914 に規定されている 7 時間との比較を行う。
26. 作業部会案では、TCBS 寒天培地と酵素基質培地を使用し、ISO 8914 の TSBS 寒天培地と TSAT 寒天培地との比較を行う。
27. TCBS 寒天培地はメーカーにより組成に細かい違いがあるため、複数のメーカーの培地を評価する必要がある。
28. 食材は、MPN 法ではむき身を用い、定性試験にはゆでだこを用いる予定である。
29. コラボスタディで多数の食材を扱うことは難しく、作業部会においてプレコラボにより食材の検討を行い、コラボで使用する食材は一品目に絞る。
30. ビブリオは冷蔵で死滅しやすく、MPN 3 本法で 100/g 以下にあわせるのが困難なため、各試験室で菌液を調整して接種してもらうなどの検討が必要。
31. TCBS 寒天培地の組成については、ISO 法の組成を確認する。
32. 酵素基質培地の組成は、公開可能な培地については記載し、非公開の場合には作業部会で比較検討を行う。
33. TCBS 寒天培地のみを規定して酵素基質培地は同等な代替培地とするのか、酵素基質培地も入れたものをプロトコールとするのかについて検討する。
34. 耐塩性試験で用いる 8% 塩化ナトリウムについては、(w/v) または (v/v) を記載する、もしくは 1L 中に溶解する g 数を記載する。
35. TCBS 寒天培地の ISO 組成および耐塩性試験の記載を更新し、次回、作業部会で決定したフルコラボ案を提出する。

その他、事務連絡等

36. 他の作業部会の進行状況確認

以上

厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

Cronobacter spp. の標準試験法に関する研究

研究分担者 荻原博和 日本大学生物資源科学部食品生命学科 教授
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 主任研究官
研究協力者 福田典子 日本大学生物資源科学部食品生命学科
百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 研究員

研究要旨

Cronobacter spp. は、従来 *Enterobacter sakazakii* と呼ばれていたグラム陰性菌で、現在は *Enterobacteriaceae*、*Cronobacter* 属の 6 菌種が主体となっている。乾燥に強く、粉乳や乾燥野菜、小麦粉等から分離される本菌は、健康成人に疾病を引き起こすことはまれだと考えられているが、未熟児等の新生児が暴露した場合には、髄膜炎や敗血症、壊死性腸炎を引き起こした例が海外で報告されている。その感染源は主に乳児用調製粉乳が疑われ、それについて国際食品規格委員会による微生物規格が定められている。現在国内では、本菌を検出するための告示法、通知法等が定められておらず、国際的な試験法と互換性のある食品からの *Cronobacter* spp. を分離する標準試験法を策定する必要がある。本研究では、現在国際的に用いられている本菌の試験法を比較検討し、国内での標準的試験法を定めるにあたって必要となる事項を検討した。その結果、*Cronobacter* spp. の標準試験法として ISO 法を中心に検討していくこととし、その過程において幾つかの問題点を明らかにした。

A. 研究目的

2008 年に学術的に再分類され、*Enterobacter sakazakii* から *Cronobacter* spp. に変更されたクロノバクター属には、*C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. genomespecies1* の 6 菌種が属しており、更に *C. dublinensis* には *C. dublinensis* subsp. *dublinensis*、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* 及び *C. dublinensis* subsp. *lactaridi* の 3 亜種が属している。本菌は、健康成人に疾病を引き起こすことはまれだと考えられているが、未熟児等の新生児が暴露した場合には、髄膜炎や敗血症、

壊死性腸炎を引き起こした例が海外で報告されている。本菌は乾燥に強く、粉乳や乾燥野菜、小麦粉等から分離され、乳児感染症の主な感染源としては、乳児用調製粉乳が疑われている。FAO と WHO の合同機関である国際食品規格委員会 (Codex 委員会) が本菌について定めた国際規格では、1 ロットの乳児用調製粉乳について、10 グラムの検体 30 個について、すべて陰性であることが求められており、その証明を行う試験法として International Standard Organization (ISO) が定める試験法 (ISO/TS22964:2006) を用いることとしている。現在、国際的に用いられている乳児用調製粉乳

からの本菌の試験法としては、他にアメリカ合衆国の Food and Drug Administration (FDA) による BAM 法が挙げられるが、いずれも 2008 年の再分類以前の試験法であり、*Enterobacter sakazakii* の分離を目的としている。

現在、日本国内で流通している乳児用調製粉乳は全て国内メーカーにより製造されたもので、その製造工程を厚生労働省が把握しており、衛生管理が十分なされていると考えられる。また、現在国内では主に乳業メーカーの自主管理としてアメリカの公定法である BAM 法が採用されている。しかしながら、将来的に海外から当該食品が輸入される事態を想定し、国際的試験法と互換性のある標準的 *Cronobacter* spp. 試験法を作成する必要がある。本研究では、国際的に用いられている *Cronobacter* spp. 試験法について検討した。

B. 研究方法

(1) 国際的試験法の検討

ISO/TS22964 (2006 年) と BAM 法 (2002 年) について、全文を逐語訳した。微生物試験に関連した専門用語の翻訳は、本研究班の別の分担研究である「バリデーション作業部会」による用語集に則って行った。その内容を比較検討し、ISO/TS22964 に基づいた試験法について食品からの微生物検査標準試験法検討委員会におけるステージ 1 としての提案を行った。

(2) 酵素基質培地の比較検討

分担研究機関 2 か所において、ISO/TS22964 に基づき、*Cronobacter* spp. の標準菌株、研究室保有の食品分離株及び *Enterobacteriaceae* に属する菌株で *Cronobacter* spp. 以外のものを用い、現在入手可能な *Cronobacter* 用の酵素基質培地 5 種 (表 8) について性能比較を行い、

同時に非選択培地である Trypticase Soy Agar (Difco) へも接種を行った。

比較試験の詳細については、図 1 に示した。前増菌培地である TSB ブイヨンから増菌培地である mLST/vancomycin ブロスへ接種した際に、660nm での吸光度を測定、記録し、44°C での 24 時間の増菌培養後にも同様に測定することで、各菌株の増殖の程度を推定し、段階希釈の希釈度を決定した。酵素基質培地の培養は基本的に 44°C で実施し、メーカーの指定する培養温度範囲に 44°C を含まない 1 種の培地 (表 1 から 7 の⑤) のみ、37°C で培養した。

C. 研究結果

(1) 国際的試験法の検討

ISO/TS22964 (2006 年) と BAM 法 (2002 年) について作成した逐語訳を、別添 1 及び 2 に示す。その内容について比較検討し、国際的な標準試験法である ISO 法に基づいたステージ 1 の試験法について、食品からの微生物検査標準試験法検討委員会に提案した。また、2008 年の微生物学的な再分類に伴い、2006 年に作成された ISO/TS22964 が近い将来に改正される可能性が高いことを踏まえ、ISO 法改正時には国内の標準試験法も見直しをすることとした。

(2) 酵素基質培地の比較検討

分担研究機関 A での比較検討結果を表 1、2、3 及び 4 に示す。*Cronobacter* spp. の標準菌株 9 株を用いた酵素基質培地の比較検討試験では、各菌株の菌数は、5 種の酵素基質培地間で大きな差は見られなかった (表 1)。しかしながら、菌株間の菌数差がある程度観察され、*C. dublinensis* の 3 亜種、特に *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* の菌数が低いことが示された。また、食品から分離された *C. sakazakii* 29 菌株を用いた比較検討試験におい

ても、各菌株の菌数は5種の酵素基質培地間で大きな差は見られず、4菌株ですべての培地において菌数が低い傾向がみられた(表2)。食品から分離された *C. muytjensii* 9株についても同様の結果がみられ、1菌株ですべての培地において菌数が低い傾向がみられた(表3)。*Cronobacter* spp. 以外の腸内細菌科に属する菌22種30株を用いた酵素基質培地の比較検討試験では、すべての株で *Cronobacter* spp. 用の酵素基質培地上での増殖が見られない、あるいは弱い増殖のみ見られる結果を示した(表4)。一方、機関Bで実施した同様の試験の結果では、標準菌株10株のうち *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* が増菌培地中での濁度が上昇せず、5種の酵素基質培地及び非選択培地であるTSA上での菌数が少ない結果がみられた(表5)。また、*Enterobacter sakazakii* として提供されている標準菌株3株のうち1菌株については、3種の酵素基質培地及びTSA上で少ない菌数を示し、2種の酵素基質培地上では集落形成が見られなかった。*Enterobacter sakazakii* として提供されている標準菌株3株のうち別の1菌株については、2種の酵素基質培地及びTSA上では他の菌株と同様の増殖を示したが、3種の酵素基質培地上では集落形成が見られなかった。食品から分離された *Cronobacter* spp. 20菌株を用いた比較検討試験においては、そのうち10菌株の菌数は5種の酵素基質培地間及びTSA上で大きな差は見られなかった(表6)。しかしながら、他の10株においては集落形成が見られない培地があり、集落を形成している培地上においても菌数が少ない結果を示していた。これらの菌株については、増菌培養後の菌液に濁度の上昇がほとんど見られなかった。*Cronobacter* spp. 以外の *Enterobacteriaceae* の、酵素基質培地上での増殖は、全ての菌でい

ずれかの培地上で見られたが、典型集落と鑑別困難な集落を形成するものは少なく、④の培地でのみ見られた(表7)。

D. 考察

国際的に整合性のある食品からの *Cronobacter* spp. 試験法として、ISO法を基礎とした国内標準試験法原案を作成し、現在入手可能な酵素基質培地の同等性について、標準菌株、食品由来株及び近縁菌の純培養菌を用いた接種試験を実施し、検討した。その結果、大半の標準菌株については5種の酵素基質培地上での発育に大きな差は認められなかったが、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* がISO法に定められた増菌条件での増殖が著しく低い結果を示した。また、食品由来株については、ISO法に基づいて分離された機関Aの菌株は全て、5種の酵素基質培地で良好な発育を示したものの、腸内細菌科菌群の分離法に基づいて分離された機関Bの菌株では、半数がISO法の増菌条件での増殖が低下していた。また、機関Aの *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* であるJCM16469株と、機関Bの同種菌株であるDSM18706株のISO法における増菌培地での増殖菌数が大きく異なる結果を示したため、JCMとDSMの提供菌株が異なるクローンとなっている可能性があり、次年度以降に分類学的な再試験を行う必要があることが示された(表1及び表5)。以上の結果から、2006年に規定されたISO法による *Enterobacter sakazakii* 試験法では、2008年の再分類で提唱された *Cronobacter* spp. の一部の増殖が困難となる可能性が示唆された。しかしながら、ISO法では約5年に1度、試験法の見直しが行なわれることとなっており、前回の設定後に分類が変更された *Cronobacter* spp. についても、近年中に試験法

の改定がなされると思われる。次年度以降は、今年度の研究において低い増殖を示した菌群について、16S リボソーム DNA 塩基配列の解析や糖分解等の生化学性状試験を実施し、分類学上の位置づけを明らかにするとともに、温度ならびに増菌培地組成等の個々の増菌培養条件における主な増殖制御要因を明らかにしていく必要があると思われる。

E. 結論

国際的に互換性のある食品からの *Cronobacter* spp. 試験法として ISO/TS22964 を基礎とした標準試験法案を作成した。現在入手可能な酵素基質培地の性能について検討した結果、基本的に培地間の差は認められなかった。しかしながら、一部の菌株では ISO 法の増菌培養条件での

増菌が困難であるなど、本試験法の問題点が明らかにされた。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1 標準菌株 *Cronobacter* spp. を用いた酵素基質培地の検出評価(機関A)

	Test strains (<i>Cronobacter</i> spp.)	Viable counts (log ₁₀ CFU/ml)					TSA
		①	②	③	④	⑤	
1	<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	7.9±0.1	7.7±0.1	7.8±0.0	7.8±0.1	7.6±0.1	7.9±0.0
2	<i>C. sakazakii</i> ATCC 29004	7.8±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.8±0.1	7.2±0.1	7.7±0.2
3	<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	7.3±0.3	7.4±0.1	7.6±0.1	7.9±0.4	6.5±0.2	7.3±0.1
4	<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	7.0±0.2	6.7±0.1	6.7±0.1	6.8±0.0	6.9±0.3	6.9±0.2
5	<i>C. dublinensis</i> JCM 16467	6.8±0.2	6.9±0.0	6.8±0.1	6.9±0.0	6.6±0.0	6.7±0.1
6	<i>C. dublinensis</i> JCM 16468	6.9±0.0	7.0±0.1	6.9±0.0	7.0±0.0	6.8±0.1	7.0±0.1
7	<i>C. dublinensis</i> JCM 16469	5.1±0.5	5.6±0.3	5.7±0.1	4.7±0.4	5.5±0.1	5.7±0.1
8	<i>C. malonaticus</i> DSM 18702	7.4±0.1	7.4±0.0	7.4±0.1	7.5±0.1	7.3±0.0	7.6±0.1
9	<i>C. turicensis</i> DSM18703	7.1±0.0	7.0±0.0	7.0±0.1	7.0±0.2	6.9±0.1	7.0±0.1

TSA: Tryptic Soy Agar

Table 2 食品検体から検出された*C. sakazakii* を用いた酵素基質培地の検出評価 (No.1) (機関A)

Test strains	Viable counts (log ₁₀ CFU/ml)					
	①	②	③	④	⑤	TSA
1 NFH 0905006	7.3±0.2	7.7±0.1	7.6±0.0	7.8±0.0	7.4±0.2	7.6±0.1
2 NFH 0905206	7.4±0.1	7.3±0.1	7.3±0.1	7.3±0.0	7.3±0.0	7.3±0.0
3 NFH 0905406	7.5±0.0	7.7±0.0	7.7±0.1	7.7±0.1	7.5±0.0	7.7±0.1
4 NFH 0906206	7.6±0.2	7.7±0.0	7.7±0.1	7.7±0.1	7.4±0.1	7.5±0.1
5 NFH 0906311	7.4±0.2	7.4±0.2	7.3±0.1	7.3±0.1	7.4±0.0	7.5±0.0
6 NFH 0906605	8.0±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1	7.7±0.1	7.9±0.2
7 NFH 0907106	7.5±0.1	7.4±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1	7.5±0.1
8 NFH 0907111	7.6±0.1	7.7±0.1	7.8±0.2	7.8±0.3	7.4±0.2	7.6±0.1
9 NFH 0907406	7.8±0.2	7.8±0.1	7.8±0.1	7.6±0.1	7.6±0.0	7.8±0.1
10 NFH 0907411	6.8±0.1	6.8±0.0	6.9±0.1	6.7±0.1	6.5±0.1	6.8±0.1
11 NFH 0907412	7.2±0.1	7.0±0.1	7.2±0.1	7.2±0.2	7.1±0.1	7.3±0.0
12 NFH 0907706	7.6±0.2	7.2±0.2	7.6±0.0	7.2±0.4	7.7±0.0	7.8±0.0
13 NFH 0907806	7.9±0.1	7.8±0.1	7.8±0.1	7.9±0.0	7.6±0.1	7.8±0.1
14 NFH 0908102	6.6±0.1	6.4±0.2	6.5±0.2	6.0±0.2	6.7±0.1	6.7±0.1
15 NFH 0908106	7.6±0.1	7.6±0.1	7.7±0.1	7.6±0.0	7.6±0.0	7.7±0.1

略語はTable 1 を参照

Table 2 食品検体から検出された*C. sakazakii* を用いた酵素基質培地の検出評価 (No.2) (機関A)

Test strains	Viable counts (log ₁₀ CFU/ml)					
	①	②	③	④	⑤	TSA
16 NFH 0908307	8.0±0.1	8.0±0.1	7.7±0.4	8.0±0.1	7.7±0.2	7.9±0.1
17 NFH 0908808	7.2±0.1	7.0±0.0	7.1±0.0	7.0±0.0	6.9±0.1	7.1±0.1
18 NFH 0909407	7.7±0.1	7.3±0.2	7.4±0.1	7.1±0.1	6.9±0.1	7.4±0.1
19 NFH 0909611	7.9±0.0	7.8±0.1	7.8±0.0	7.8±0.0	7.7±0.0	7.7±0.1
20 NFH 0909612	7.3±0.1	7.6±0.1	7.6±0.1	7.6±0.1	7.6±0.1	7.6±0.1
21 NFH 1002408	7.7±0.1	7.6±0.1	7.8±0.1	7.7±0.1	7.2±0.2	7.6±0.0
22 NFH 1004106	7.1±0.2	7.1±0.1	7.1±0.1	7.0±0.1	6.8±0.0	7.0±0.1
23 NFH 1006207	6.4±0.1	6.5±0.1	6.6±0.0	6.2±0.2	6.4±0.1	6.4±0.1
24 NFH 1006306	7.7±0.1	7.7±0.1	7.7±0.1	7.6±0.1	7.6±0.1	7.8±0.1
25 NFH 1006702	6.6±0.0	6.7±0.1	6.7±0.0	6.6±0.1	6.4±0.1	6.6±0.1
26 NFH 1006707	7.5±0.2	7.4±0.0	7.6±0.0	7.5±0.1	7.4±0.0	7.4±0.0
27 NFH 1006806	7.7±0.1	7.9±0.0	7.8±0.0	7.9±0.1	7.7±0.0	7.8±0.1
28 NFH 1006807	7.2±0.0	7.2±0.1	7.3±0.0	7.1±0.1	7.1±0.0	7.3±0.1
29 NFH 1007006	7.3±0.2	7.4±0.1	7.6±0.1	7.2±0.1	7.1±0.1	7.4±0.0

略語はTable 1 を参照

Table 3 食品検体から検出された*C. muytjensii* を用いた酵素基質培地の検出評価 (機関A)

Test strains	Viable counts (log ₁₀ CFU/ml)					
	①	②	③	④	⑤	TSA
1 NFH 0906309	6.4±0.1	6.4±0.0	6.4±0.1	6.4±0.1	6.3±0.0	6.4±0.0
2 NFH 0906404	7.0±0.4	7.1±0.1	6.9±0.1	6.9±0.4	6.8±0.1	6.9±0.1
3 NFH 0906407	7.4±0.0	7.0±0.1	7.1±0.0	7.0±0.2	6.9±0.1	7.2±0.0
4 NFH 0906408	7.3±0.2	7.2±0.0	7.2±0.1	6.9±0.2	7.0±0.0	7.2±0.1
5 NFH 0906409	6.9±0.1	6.9±0.1	7.1±0.1	7.0±0.1	6.7±0.1	6.9±0.1
6 NFH 0906410	7.2±0.1	7.0±0.1	7.0±0.1	6.8±0.1	6.7±0.1	7.3±0.3
7 NFH 0906606	7.1±0.5	7.1±0.1	7.2±0.1	7.0±0.0	6.8±0.0	7.3±0.0
8 NFH 0906607	7.2±0.0	7.1±0.1	7.1±0.0	7.0±0.1	6.8±0.0	7.2±0.1
9 NFH 1016706	7.2±0.1	7.2±0.0	7.2±0.1	7.3±0.1	7.0±0.0	7.1±0.1

略語はTable 1を参照

Table 4 非Cronobacter 菌株における酵素基質培地の選択性の評価 (機関A)

Test strains	①		②		③		④		⑤		TSA
	発育	色	発育	色	発育	色	発育	色	発育	色	発育
1 <i>Cedecaea neteri</i> ATCC 33855	-	-	-	-	-	-	-	-	±	黄緑	-
2 <i>Citrobacter diversus</i> JCM 1658	±	赤紫	-	-	±	白	-	-	±	淡黄色	+
3 <i>Escherichia coli</i> JCM 5491	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
4 <i>E. coli</i> ATCC 43889	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
5 <i>E. coli</i> ATCC 35150	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
6 <i>Enterobacter cloacae</i> NBRC 3320	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	緑	+
7 <i>E. cloacae</i> IAM 12349	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
8 <i>E. gergoviae</i> ATCC 33028	-	-	-	-	-	-	-	-	±	薄青灰	+
9 <i>Hafnia alvei</i> NBRC 3731	-	-	-	-	-	-	-	-	±	淡黄色	-
10 <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
11 <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-	-	-	-	±	薄青灰	±	淡黄色	+
12 <i>K. planticola</i> IFO 14939	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
13 <i>Kluyvera ascorbata</i> JCM 1681	-	-	-	-	±	白	-	-	±	黄緑	+
14 <i>Leclercia adecarboxylate</i> JCM 1667	±	淡黄色	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	黄	+
15 <i>Pantoea agglomerans</i> JCM 1236	-	-	-	-	-	-	-	-	±	淡黄色	-
16 <i>P. agglomerans</i> IFO12686	-	-	-	-	-	-	-	-	±	黄緑	-
17 <i>Proteus mirabilis</i> NBRC 13300	±	淡黄色	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
18 <i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	±	薄茶	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	黄	+
19 <i>Providencia rettgeri</i> NBRC 13501	±	赤紫	-	-	±	白	-	-	±	淡黄色	+
20 <i>Plesiomonas shigelloides</i> ATCC 14029	±	淡黄色	-	-	±	白	-	-	-	-	+
21 <i>Rahnella aquatilis</i> JCM 1683	-	-	-	-	-	-	-	-	+	灰青	-
22 <i>Raoultella planticola</i> NBRC 14939	±	淡黄色	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	黄緑	+
23 <i>Salmonella</i> Enteritidis IFO 3313	±	淡黄色	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	黄	+
24 <i>S. Vellore</i> ATCC 15611	±	淡黄色	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
25 <i>S. Typhimurium</i> ATCC 7823	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+
26 <i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	±	淡黄色	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	白	+
27 <i>S. liquefaciens</i> IFO 12979	±	淡黄色	-	-	±	白	-	-	±	淡黄色	+
28 <i>S. rubidaea</i> JCM 1240	±	赤紫	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	クリーム	+
29 <i>S. rubidaea</i> NBRC 12973	-	-	-	-	±	白	-	-	±	淡黄色	+
30 <i>Yersinia intermedia</i> JCM 7579	±	淡黄色	±	薄青灰	±	白	±	薄青灰	±	淡黄色	+

-: 発育なし

Table 5. 標準菌株 *Cronobacter* spp.を用いた酵素基質培地の検出評価(機関B)

Test strains (<i>Cronobacter</i> spp.)		Viable counts (\log_{10} CFU/ml)					
		①	②	③	④	⑤	⑥
<i>C. sakazakii</i>	DSM4485 (ATCC29544)	7.2±0.0	8.1±0.2	8.1±0.1	8.1±0.1	8.2±0.1	8.0±0.1
<i>C. muytjensii</i>	DSM21870 (ATCC51329)	8.0±0.2	7.9±0.2	7.9±0.0	8.2±0.1	7.9±0.1	8.0±0.0
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	DSM18705 (JCM16467)	5.5±0.1	6.5±0.0	6.4±0.1	6.7±0.2	6.6±0.1	6.5±0.1
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	DSM18707 (JCM16468)	7.1±0.2	7.2±0.1	7.1±0.1	5.8±0.4	7.1±0.1	7.0±0.1
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	DSM18706 (JCM16469)	1.2±0.3	2.6±0.2	1.1±0.9	2.5±0.3	3.2±0.2	3.2±0.1
<i>C. malonaticus</i>	DSM18702	7.7±0.1	7.7±0.1	8.2±0.6	7.7±0.1	7.7±0.1	7.7±0.1
<i>C. tulisensis</i>	DSM18703	6.6±0.0	6.6±0.1	6.5±0.1	6.6±0.1	6.5±0.0	6.5±0.1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	NIH800 (JCM24136)	2.0±0.2	0	0.9±0.9	0	2.8±0.1	1.6±0.7
<i>E. sakazakii</i>	NIH503 (JCM24135)	6.0±0.3	0	0	0	6.3±0.1	6.2±0.1
<i>E. sakazakii</i>	NIH185-80 (JCM24133)	6.2±0.2	6.4±0.0	6.2±0.2	6.5±0.1	6.6±0.1	6.5±0.1

Table 6. 食品検体から検出された *Cronobacter* spp.を用いた酵素基質培地の検出評価(機関B)

	Test strains (<i>Cronobacter</i> spp.)	Viable counts (\log_{10} CFU/ml)					
		①	②	③	④	⑤	⑥
1	NIHS1	0	0	0	0	1.5±0.3	0
2	NIHS2	0	0	3.1±0.2	0	3.0±0.1	2.2+
3	NIHS3	7.3±0.0	7.3±0.0	7.3±0.1	7.0±0.2	7.3±0.1	7.2±0.1
4	NIHS4	7.2±0.1	7.0±0.3	7.3±0.1	7.0±0.1	7.2±0.1	7.3±0.1
5	NIHS5	0	0	0	0	0	0
6	NIHS6	7.9±0.1	8.0±0.1	8.9±0.0	8.0±0.1	8.0±0.1	7.9±0.1
7	NIHS7	7.3±0.1	7.5±0.2	7.6±0.1	7.5±0.1	7.6±0.0	7.6±0.0
8	NIHS8	4.3±0.1	4.3±0.1	4.3±0.1	4.3±0.2	4.3±0.2	4.4+0.0
9	NIHS9	0	0	0	0	0	0
10	NIHS10	7.3±0.0	7.1±0.3	7.3±0.1	7.3±0.0	7.3±0.1	7.3±0.1
11	NIHS11	0	0	0	0	0	0
12	NIHS12	0	0	0	0	2.4±0.1	2.4±0.1
13	NIHS13	0	0	0	0	3.1±0.1	0
14	NIHS14	0	0	0	0	2.8±0.1	0
15	NIHS15	0	0	0	0	3.8±0.1	0
16	NIHS16	7.2±0.0	7.2±0.0	7.1±0.1	7.2±0.0	7.2±0.0	7.2±0.0
17	NIHS17	7.6±0.1	7.6±0.1	7.4±0.1	7.6±0.1	7.5±0.1	7.6±0.1
18	NIHS18	6.9±0.1	6.9±0.0	6.9±0.0	6.8±0.1	6.9±0.1	6.9±0.1
19	NIHS19	6.4±0.1	6.9±0.1	7.0±0.2	6.8±0.1	7.1±0.2	7.2±0.1
20	NIHS20	2.3±0.1	0	0	0	2.8±0.1	3.2±0.1

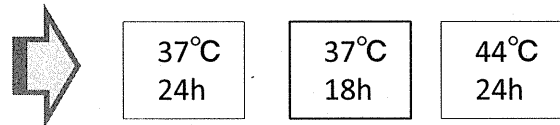
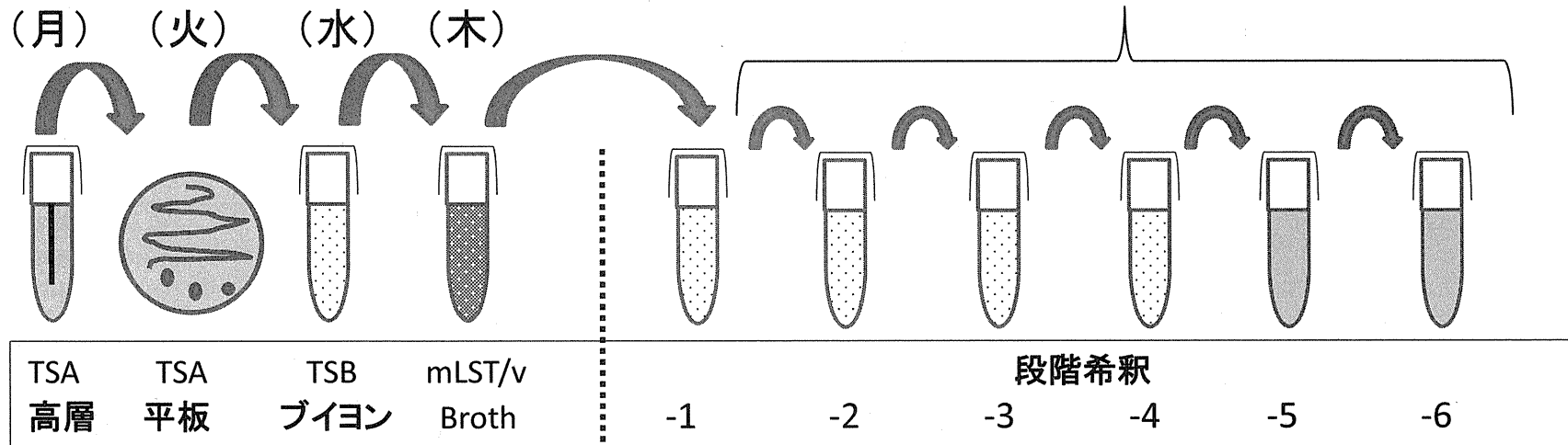
Table 7 非 *Cronobacter* 菌株における酵素基質培地の選択性の評価 (機関B)

Test strain			①		②		③		④		⑤		⑥
			発育	色	発育	色	発育	色	発育	色	発育	色	発育
1	<i>Escherichia coli</i>	JCM1964	+	紫	+	薄紫	+	白	+	薄紫	+	白	+
2	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	JCM1667	-		±	薄紫	±	白	-		+	青	-
3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	TU16	-		-		±	白	-		+	白	-
4	<i>Pseudomonas diminuta</i>	IFO12697	-		-		-		-		+	白	-
5	<i>Escherichia coli</i>	MC1061	+	白	+	薄紫	+	白	+	薄紫	+	白	+
6	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LT2	+	白	+	薄紫	+	白	+	薄紫	+	白	+
7	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	JCM5490	-		-		-		±	薄紫	+	赤	-
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TU13	+	紫	+	薄紫	+	白	+	薄紫	+	黄	+
9	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC23355	-		-		-		-		+	白	-
10	<i>Proteus mirabilis</i>	TU15	+	茶	+	灰	+	白	+	灰	+	赤	+

Table8 各酵素基質培地の特性

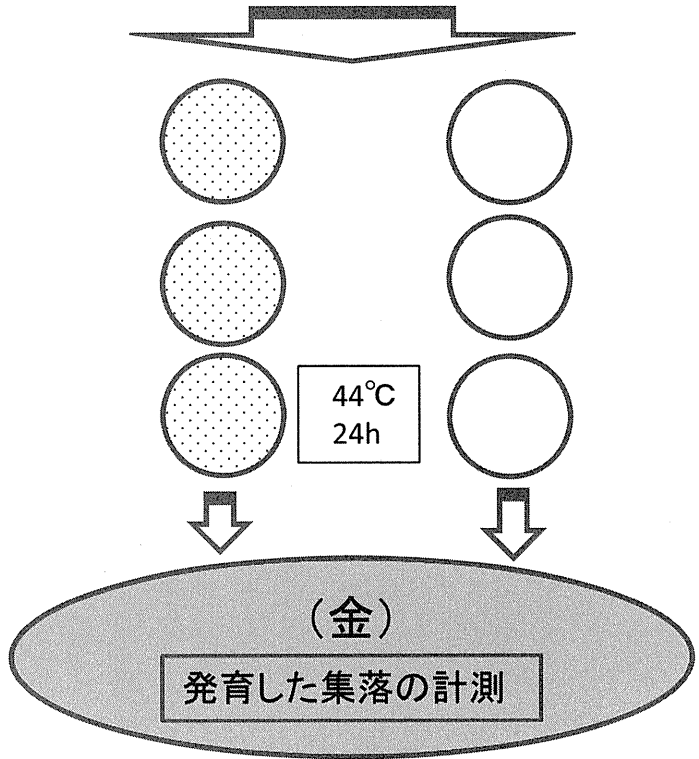
	①		②		③		④		⑤
g/l	45.4		27.75		24.6		30.7		生培地
組成	ペプトン	15	ペプトン	7	ペプトン	6	ペプトン	7	
	酵母エキス	5	酵母エキス	3	酵母エキス	3	酵母エキス	3	
	塩化ナトリウム	5	塩化ナトリウム	5	塩化ナトリウム	5	塩化ナトリウム	5	
	リン酸1水素ナトリウム	2	デオキシコール酸ナトリウム	0.6	胆汁酸塩混合物	1.5	デオキシコール酸ナトリウム	0.6	
	硝酸カリウム	1							
	ピルビン酸ナトリウム	1							
	トリプトファン	1							
	ラウリル硫酸ナトリウム	0.15	5-bromo-4-chloro-3-indolyl α-D-glucopyranoside	0.15	X-α-D-glucoside	0.1	5-bromo-4-chloro-3-indolyl α-D-glucopyranoside	0.15	
	発色酵素基質混合物	0.2	クリスタルバイオレット	0.002			クリスタルバイオレット	0.002	
	寒天	15	寒天	12~18	寒天	12	寒天	15	
pH	7.0±0.2		7.0±0.2		7.0±0.2		7.0±0.2		
培養温度(℃)	33~45		44		44		44		37または41.5
典型集落	青~紺色		青~青緑		青~青緑		青~青緑		灰青~黒青、緑~黒

図1. ISO/TS22964:2006 酵素基質培地の性能試験プロトコール



検討菌株
 ○*Cronobacter* spp. 標準菌株10菌株程度
 ○*Cronobacter* spp. 食品分離株40菌株程度
 ○*Cronobacter* spp. 以外近縁種菌株30菌株

酵素基質培地 : 培養温度
 ① 33-45°C
 ② 44°C
 ③ 44°C
 ④ 44°C
 ⑤ 37 & 41.5°C
 ⑥ 44°C



平成 23 年度 厚生労働省食品の安全確保推進研究事業
食品中の微生物試験法及びその妥当性評価に関する研究

分担研究報告書

分担課題名 腸炎ビブリオ試験法

研究分担者：甲斐 明美 東京都健康安全研究センター
工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者：小西 典子 東京都健康安全研究センター
尾畑 浩魅 東京都健康安全研究センター
下島優香子 東京都健康安全研究センター
仲真 晶子 東京都健康安全研究センター

研究要旨：

食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を作成するためには、複数機関における collaborative study を実施する必要がある。今年度はその試料に関して、(1) 腸炎ビブリオ接種検体の作製に関する研究、(2) 腸炎ビブリオ自然汚染検体に関する研究の 2 課題を行った。(1) 食品(ゆでだこ、あさりのむき身、むきエビ)に腸炎ビブリオを接種、4℃で、24 時間および 48 時間保存後、腸炎ビブリオ菌数の測定を行なった。冷蔵保存 24 時間後の菌数変化をみると、いずれの食品、血清型菌(3 血清型 3 株)でも高濃度接種群では 1~2 オーダーの菌数減少が認められた。低菌数接種群ではいずれも菌数は比較的安定していた。48 時間保存後でも、24 時間保存とほぼ同程度の菌数を維持していた。食品の種類による差や血清型による大きな差は認められなかった。また、大量培養法では、全ての検体から腸炎ビブリオが検出された。以上の結果から、今回実施した方法で食品に腸炎ビブリオを接種し、各検査機関に冷蔵輸送することで、collaborative study が実施可能であることが明らかとなった。(2) 試験した全検体から腸炎ビブリオが検出された 6 から 8 月のアオヤギ、アカガイ、イワガキが腸炎ビブリオ自然汚染検体として使用できることが示された。今後、貝の個体間の腸炎ビブリオ汚染レベルの幅や汚染頻度など、検体として選定するにはさらに汚染状況を確認する必要があるが、自然汚染検体の方がより現実的な検出法の評価と言えるのかもしれない。また、腸炎ビブリオ非汚染二枚貝に菌を接種して検体を作製する場合は、6 月以降の初夏では産地に関わらず二枚貝の腸炎ビブリオ汚染があることが考えられるため、気温・海水温が低下し本菌の汚染が極度に低い冬季の二枚貝を使用することによって試験に適切な検体が設定できると考えられる。

A. 研究目的

(1) 食品を対象とした腸炎ビブリオ標準検試験法を作成するために、これまで増菌培地や確認培地等に添加する食塩濃度の検討や培養時間、培養温度等に関する事項について検討を行ってきた。前回までに確定した事項は、①腸炎ビブリオを対象とした検査法であるが、コレラ菌等のビブリオ属菌も考慮に入れること。②培養時間は16~18時間が妥当であること。③増菌培地および確認培地の塩分濃度は1~2%とすること。④分離培地としてはTCBS寒天平板の他、酵素基質培地も有用であること等である。

これら決定事項を含めた新しい試験法が、実際の食品検査で有効か否かを検討するためには、複数検査機関における collaborative study を実施する必要がある。その試料は、食品に腸炎ビブリオを接種後、冷蔵状態で各検査機関に送付する。

今年度は collaborative study を実施するための試料の作成方法および冷蔵輸送における菌の死滅状況の検討を行なった。

(2) 食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を作成するために、複数検査機関における collaborative study を実施する必要がある。その試験では、腸炎ビブリオ汚染食品を検体として使用するが、腸炎ビブリオの汚染の可能性のある魚介類であり一般的に生食で消費され食中毒の機会の考えられるものが検体として適当と思われる。これまでに二枚貝では腸炎ビブリオ汚染が報告されているため、特に、一般に生食する二枚貝を対象とすることが適切と考えた。腸炎ビブリオに

汚染されていない検体に実験室内で培養した腸炎ビブリオを接種して汚染検体を作製するか、高い腸炎ビブリオ汚染率の検体を確保して汚染を均一化した検体とするなどが考えられる。このため、輸入品に比べて産地が明らかであり流通の影響がより少ないと考えられる国内産の市販二枚貝について、腸炎ビブリオの汚染率、加えて耐熱性溶血毒 (TDH) 遺伝子 (*tdh*) および TDH 類似性溶血毒 (TRH) 遺伝子 (*trh*) 陽性腸炎ビブリオ汚染率を明らかにし、collaborative study に供試する検体種の検討を行った。

B. 研究方法

(1) 腸炎ビブリオ接種検体の作製に関する研究

1. 供試菌株および食品

食中毒患者から分離された病原毒素である耐熱性溶血毒 (TDH) 産生性の腸炎ビブリオ 3 株を供試した。血清型は、01:K56 (V10-7)、03:K6 (V10-48)、04:K8 (V08-13) である。

2. 供試食品

市販品のゆでだこ、あさりのむき身、むきエビを用いた。これらの食品については、生菌数の測定を実施後、あらかじめ腸炎ビブリオが存在しないことを確認して用いた。

3. 食品への接種および保存方法

各食品は、滅菌済みストマッカー袋に 25 g ずつ秤量した。

2%NaCl 加アルカリペプトン水で 2 回継代培養した腸炎ビブリオ菌液を、 10^{-3} 倍希釈 (高菌数) および 10^{-6} 倍希釈 (低菌数) した後、食品 25 g に $500 \mu\text{l}$ ずつ接種した。腸炎ビブリオを接種した食品

は、4°Cで24時間および48時間冷蔵保存した。それぞれの条件について、2サンプルずつ試験を実施した。

接種菌数を測定するために、 10^{-7} 倍希釈した菌液を、3%NaCl加普通寒天培地に $100\mu\text{l}$ ずつ10枚の平板に滴下し、コンラージ棒を用いて平板全体に塗抹した。接種菌数は、出現した集落数から算出して求めた。

4. 冷蔵保存後の腸炎ビブリオ検出方法および菌数の測定

冷蔵保存後の食品に、あらかじめ室温以上に温めておいたアルカリペプトン水225mlを加え、ストマッカーで30秒間ホモジナイズした。食品中の腸炎ビブリオ菌数の測定は、試料の10倍段階希釈液を用いたMPN3本法で実施した。MPN測定には、中試験管に2%NaCl加アルカリペプトン水を 10ml ずつ分注後滅菌したものを用いた。また、試料の入ったストマッカー袋に2%NaCl加アルカリペプトン水を加えた検体（大量培養）およびMPN用試験管は、37°C、16~18時間培養後、TCBS寒天に塗抹分離し、腸炎ビブリオの出現を確認した（図1）。

（2）腸炎ビブリオ自然汚染検体に関する研究

1. 供試検体

東京都内で市販されている国産アオヤギ（むき身）16検体、アカガイ（殻付き）6検体およびイワガキ（殻付き）6検体を手し、実験室までは保冷剤を入れた発泡スチロールケースを使用して2時間以内に研究室に移動した。殻付きの貝は身を取りだし、消毒はさみで細断し25gを1検体とした。一個が25g以上の場合、一個しかなければその一個まるごと、もし

複数を一検体として購入した場合は多少細かく切って、そこから25gを採った。

2. 培養方法

検体をストマッカー袋に入れ、アルカリペプトン水（日水）225mlを加えて袋の外側から検体を軽く押しつぶし、35~37°Cで18時間培養した（図2）。培養液をクロモアガー・ビブリオ寒天培地（クロモアガー社）に直接塗抹（10mlエーゼで画線）し、35~37°Cで18時間培養した。また、培養液の希釈段（ 10^{-1} ~ 10^{-6} ）をPBS+2%NaClで作製しクロモアガー・ビブリオ寒天培地に0.1ml接種しコンラージ棒で塗抹した（各希釈段ごと2枚ずつ）。これを35~37°Cで18時間培養した。また、培養液を検体としてK6抗原に対する免疫磁気ビーズ法を行った。各検体2枚のクロモアガー・ビブリオ寒天培地に10ml接種して画線し、35~37°Cで18時間培養した。平板から腸炎ビブリオの分離を行い、TSI（オキシド）、塩耐性試験、*toxR*などで確定した。また、*tdh*陽性検体については、K6免疫磁気ビーズ（デンカ生研）法、直接塗抹法、段階希釈液塗抹法にて生育したコロニーを対象に*tdh*陽性菌を分離した。*trh*陽性検体については直接塗抹法、段階希釈液塗抹法にて生育したコロニーを対象に*trh*陽性菌を分離した。

3. *tdh*および*trh*検出

培養液から以下のアルカリ熱抽出法によってDNAを抽出した。培養液0.1mlを $10,000\times g$ 10分間遠心し、沈殿に50mM NaOHを0.1mlを添加して再浮遊させ、100°C10分間加熱し、冷却後、1M Tris-HCl (pH 7.0)を16 μl 添加して中和した。10,000 $\times g$ 10分間遠心した上清をDNA抽出液とした。

tdh および *trh* の検出は PCR 法にて以下の方法で行った。1 検体あたり DNA 抽出液 5 μ l を 45 μ l の反応液 (腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用 Primer Set VPD-1 & 2、腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 (*trh1&2*) 検出用 Primer Set VPR-1&2、タカラバイオ) に加え合計 50 μ l の系で行った。

4. 分離株の性状試験

分離した *tdh* および *trh* 陰性、*tdh* および *trh* 陽性コロニーについて、TSI 試験、0、3、7、10%NaCl 加 Nutrient broth (オキソイド) での食塩生育性試験、PCR による腸炎ビブリオ特異的 *toxR* の検出 (Kim, et al. 1999. J. Clin. Microbiol. 37:1173-1177) を行った。TSI 試験、食塩生育試験は 37 $^{\circ}$ C、20-24 時間培養した。また、*tdh* または *trh* 陽性コロニーの血清型を確認した。

C. 研究結果

(1) 腸炎ビブリオ接種検体の作製に関する研究

1. 接種菌数

高菌数接種群の腸炎ビブリオ菌数は、食品 1g あたり 10^3 個 \sim 10^4 個、低菌数接種群では数個 \sim 10 個であった。

2. 食品の生菌数

供試した食品の生菌数は、ゆでだこが 4.0×10^2 個/g、あさりのむき身 9.0×10^3 個/g、むきえび 8.0×10^3 個/g であった。食品中に腸炎ビブリオは存在していなかったが、TCBS 寒天平板上で黄色い集落あるいは微小集落を形成する菌が存在した。

2. 冷蔵保存検体からの腸炎ビブリオ検出

食品に腸炎ビブリオを接種後、4 $^{\circ}$ C で 24

時間および 48 時間保存した時の腸炎ビブリオ菌数の変化を図 3 に示した。それぞれの条件について、2 サンプルの菌数をグラフに示した。

1) ゆでだこ

ゆでだこの高菌数接種群では、24 時間までに 1 \sim 2 オーダー菌数が減少したが、その後 48 時間ではさらにやや減少は認められなかった。血清型 03 : K6 株および 04 : K8 株で減少幅が大きかった。

低菌数群は、菌数にばらつきが認められたが、大きな変化は認められなかった。血清型 01 : K56 株 48 時間保存では 1g 当たり 0.3 個以下と 0.9 個であったが、大量培養法ではいずれの検体からも検出された。血清型による差は認められなかった。

2) あさりのむき身

あさりに血清型 01 : K56 株を接種した時の菌数は、高菌数接種群および低菌数接種群のいずれも、24 時間と 48 時間で大きな変化は認められなかった。血清型 03 : K6 株および 04 : K8 株の高菌数接種群では、24 時間までに 1 \sim 2 オーダーの菌数が減少したが、48 時間では、さらなる減少は認められなかった。低菌数接種群では、いずれの血清型株も大きな変化は認められなかった。

3) むきエビ

ゆでだこ、あさりのむき身に接種した場合と同様に、高菌数接種群では 24 時間までに 1 \sim 2 オーダーの菌数減少が認められた。

低菌数接種群では、血清型 01 : K56 株では 1g あたり 1.6 個であったのが、24 時間で 0.3 個以下まで減少した。血清型 03 : K6 株でも接種直後は 1g あたり 1.8

×10⁴個であったのが、24時間で5.9個、48時間で0.9個まで減少していた。いずれも大量培養法で、腸炎ビブリオは検出された。

4) 大量培養検体からの検出

大量培養法では、食品の種類、血清型の違いや保存時間に係らず、全ての検体から腸炎ビブリオを検出することができた。

(2) 腸炎ビブリオ自然汚染検体に関する研究

供試したアオヤギ16検体、アカガイ6検体およびイワガキ6検体の全てから腸炎ビブリオが分離された(表1)。また、そのうちアオヤギ2検体(宮城県および千葉県産)およびアカガイ2検体(青森県および三重県産)は *trh* 陽性であった。しかし、全検体とも *tdh* は陰性であった。

trh 陽性であった計4検体の全てから *trh* 陽性腸炎ビブリオを分離した。アオヤギの1検体(宮城県産)からは血清型04:K12が2株、他の1検体(千葉県産)からは血清型01:KUT1株および04:KUT1株が分離された。アカガイの1検体(青森県産)からは04:KUT1株および010:KUT12株が分離され、他の1検体(三重県産)からは01:K321株および011:KUT1株が分離された。合計19株の *trh* 陽性株が分離されたが0血清群としては04が最も多く3検体から4株、01が2検体から2株が分離された。

D. 考察

(1) 腸炎ビブリオ接種検体の作製に関する研究

食品からの腸炎ビブリオ標準試験法を新たに作成するためには、最終的に複数

検査機関で行なう collaborative study を実施する必要がある。collaborative study では、擬似検体として食品に腸炎ビブリオを接種したものを各検査機関へ送付し、検査を実施する。菌を接種した食品は冷蔵状態で各検査機関へ送付することとなるが、腸炎ビブリオは低温状態に非常に弱いため、菌が死滅してしまう可能性も考えられる。そこで低温状態でどの程度腸炎ビブリオが減少するのか、接種菌数をどの程度にすれば実施可能であるのか把握するために、食品に腸炎ビブリオを接種し、低温条件で保存後の腸炎ビブリオ菌数の変化を調べた。

今回使用した食品は3種類(ゆでだこ、あさりのむき身、むきエビ)、接種菌の血清型は3種類(01:K56、03:K6、04:K8、いずれもTDH産生株)、保存温度は4℃、保存時間は24時間および48時間である。接種菌数は高菌数接種群として食品1gあたり10³~10⁴個、低菌数接種群としては食品1gあたり数個~10個程度とした。

冷蔵保存24時間後の菌数変化をみると、いずれの食品、血清型菌でも高菌数接種群では1~2オーダーの菌数減少が認められた。特に血清型03:K6株のゆでだこあさりのむき身では菌数の減少幅が2オーダーと大きかった。血清型01:K56株は比較的安定していた。低菌数接種群では、いずれも菌数は比較的安定していた。48時間保存後でも、大きな菌数の変化は認められず、24時間保存と、ほぼ同程度の菌数を維持していた。食品の種類による差や血清型による大きな差は認められなかった。また、大量培養法でも全ての検体から腸炎ビブリオが検出された。

以上の結果から、今回実施した方法で