

図 1 . コロニー形成率 (mean±sd, n=3)

K. pneumoniae

E. coli K-12

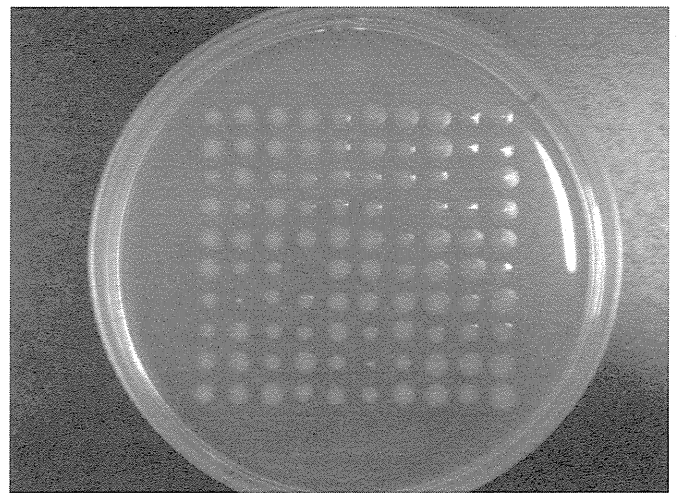
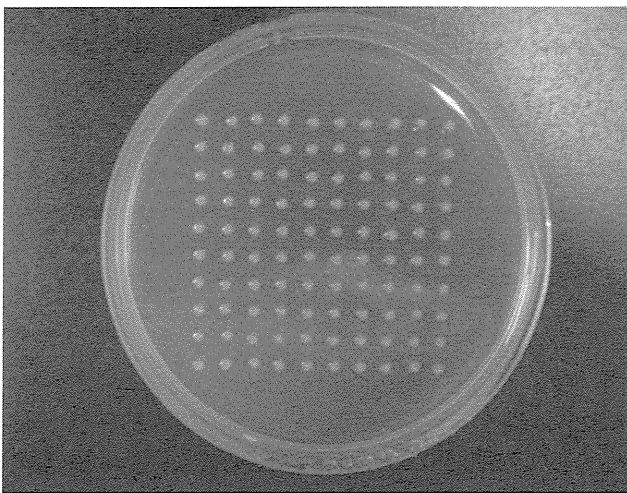


図 2 . コロニー形成パターンの例

AOAC2012 版ガイドラインと ISO16140 の比較検討結果

1. AOAC2012 版 Table 1 に示された PTM と OMA のハーモナイゼーション

AOACプログラム	必要とされる試験	AOAC2012版での章節番号		
		定性試験	定量試験	同一性の確認試験 ^{*)}
PTM	開発者の自主バリデーション	4.1	5.1	6.1
	外部委託バリデーション	4.2	5.2	6.2
OMA	単一試験所でのバリデーション、あるいはプレコラボ	4.1	5.1	6.1
	外部委託バリデーション	4.2	5.2	6.2
	コラボスタディ	4.3	5.3	6.3
PTM→OMA	開発者の自主バリデーション	4.1	5.1	6.1
	外部委託バリデーション	4.2	5.2	6.2
	コラボスタディ	4.3	5.3	6.3

*)標的菌の同一性を確認することだけが目的の試験法。バイオテロ関連が具体的標的。

バリデーションの基本的ステップは表 1 のように整理されている。PTM を OMA の前段として位置づける考え方は以前から実施されていたが、今回の改訂ではより明確に示されている。付記された章の番号からわかるように、ガイドラインの中での記述の順番からして PTM が先に来ている。このガイドラインで定義されている用語に従えば、PTM は、最初が試験法開発者自身によるバリデーション (Method developer validation study、自主バリデーション) で、次が外部の単一試験所によるバリデーション (Independent validation study、外部委託バリデーション) であり、それで終わる。一方、OMA では、自主バリデーションは当然あるはずであり、かつては、その次に共同試験のための予備的バリデーション (Precollaborative validation study、プレコラボ) がきて、最後に共同試験 (Collaborative study、コラボスタディ) であった。しかし 2012 版では、自主バリデーションとプレコラボが一緒になり、コラボの前に、外部委託バリデーションがくる。明らかに、PTM バリデーションスキームでの用語とのハーモナイゼーションであろう。SLV は従来コラボスタディに対する単一試験所バリデーションであり、外部の試験所に依頼して実施されるものと理解されていた (はずである) が、ここでは、自主バリデーションと同等としている。外部委託の場合は単一の試験所の場合でも、SLV とは表記しないようになっている。

2. 定性試験、定量試験の中の項目の順序

ISO 16140 では、

- (1) 相対精確さ、相対特異性、相対感度、
- (2) 相対的検出濃度範囲

(3) 包含性と排他性

の順に記載されている。もちろんすべて、参照法と代替法の両方で実施することになっている。しかし、AOAC2012 版では、包含性と排他性は candidate method だけで実施すればよく、参照法は必要ないように読み取れる。項目の順番も

(1) 包含性と排他性 (参照法では行わない?)

(2) マトリクス試験 (もちろん参照法でも実施)

となっている。項目の順番としては、こちらの方が自然かと思う。

試験法によっては、意外に対応する「参照法」がない場合があるのかもしれない。結果報告で「参照法が無い場合の結果の解析と報告」(4.1.3.13.6)、(4.3.12.8) (ただし定性試験の場合) をわざわざ項目に挙げていることも、それを裏付けているようである。

なお、ISO 16140 では代替法 (Alternative method) と表記されているものが、AOAC2012 では、候補法 (Candidate method) と表記されている。しかしここでは、「代替法」で統一しておく。

3. 定性試験での食品マトリクスの選定

適用できる食品は、最初の段階の自主バリデーション (PTM の場合)、あるいはプレコラボ (OMA の場合) で試験したものだけに限る、として、matrix extension を認めない方針を打ち出している。どの程度までを「同一種類の食品マトリクス」と考えるか、という議論は残るが、考え方としては合理的だと思われる。

4. 定性試験における試料の数の比較

ISO 16140 では $1 \text{ 食品} \times 20 \text{ 試料数} / \text{食品} \times 2 \text{ 試験法の数} = 120 \rightarrow$ 「精確さ、特異性、感度」

$1 \text{ 食品} \times 5 \text{ 濃度} \times 5 \text{ 試料数} / \text{濃度} \times 6 \text{ 繰り返し数} \times 2 \text{ 試験法の数} = 300 \rightarrow$ 「検出レベル」

AOAC2012 では $\text{POD} = 0, 0.25 \sim 0.75$ から 1 以上 (ここでは 2 とする)、1.0 で 4 通りの濃度、繰り返し数は濃度によって異なる。POD 0, 中間値、1 に対してそれぞれ、5, 20, 5 なので、次のようになる。

$1 \text{ 食品} \times (5 + 20 + 20 + 5) \text{ 繰り返し数} \times 2 \text{ 試験法の数} = 100 \rightarrow$ 各濃度における POD_R , POD_A

ただし、AOAC2012 版の付録 Appendix X-D に掲載された事例では、高濃度用試料、無菌試料の場合も繰り返し数は 5 ではなく、20 になっている。5 以上であれば問題ないというだけであって、実際に試験する場合はむしろ、無用な混乱を避けるために、全て 20 としたのかも知れない。

5. 定性試験における評価指標

ISO 16140 では、「精確さ、特異性、感度」、および「検出レベル」が評価指標であった。「精確さ、特異性、感度」を求める試験においては、菌濃度は「陽性率が 50% 程度になるように」規定されているので、予め適当な菌濃度を定める試験をしておかなければならないことになっている。また、「検出レベル」を求める試験では、検出閾値 (理論的に検出可能な菌数) を求めておかなければならない。そうした煩雑さはあるが、評価項目の意味するところは明快である。すなわち、「精確さ、特異性、感度」では擬陽性や擬

陰性の程度についての性能、「検出レベル」ではどこまで低濃度を検出できるかという性能である。

一方、POD は (陽性数 x) / (試験数 N) で、参照法(R)、代替法(A)でそれぞれ求める。これは試行数 N 、二項分布統計であり、 N が十分大きい場合は正規分布近似ができて、等価な平均値は $pN=x$ 、標準偏差は $\sigma=\sqrt{Np(1-p)}$ となる。95% の信頼性区間は $LCL=x-1.96\sigma$ から $UCL=x+1.96\sigma$ までの区間となる。しかし、AOAC2012 の付録 X-C では、

$$LCL = \frac{x + 1.9207 - 1.9600 \sqrt{x - \frac{x^2}{N} + 0.9604}}{N + 3.8415} \qquad UCL = \frac{x + 1.9207 + 1.9600 \sqrt{x - \frac{x^2}{N} + 0.9604}}{N + 3.8415}$$

どこかで見たことがあるような式ではあるが・・・

6. 定性試験コラボスタディでの試験所の数

10 とされていたが、AOAC2012 版では、プロトコール通りに結果が得られない試験所があるかも知れないリスクを考え、最初から、食品マトリクスごとに 12 にすべきである、と明記されている。規則通りではなかなか上手くいかない、というこれまでの「実績」に基づき、どうせ余裕を見て行う場合がほとんどであるなら、むしろそのように明記しておくべきであろう、ということが背景にあるのかもしれない。

7. 定性試験コラボスタディでの食品マトリクスの選定

従来はプレコラボで試験した食品の中から 1 種類選べばよかった。ISO16140 でも 1 種類。しかし、AOAC2012 版では、「最低 1 種類」という表記になっている。場合によって、2 種類以上の食品マトリクスでの試験も要求されるということである。そして、最初の 1 種類を選ぶのも、matrix extension をどこまで認めるか、を決めるのも、AOACI 本部で決められるジェネラルレフェリーであり、コラボスタディディレクターと相談して決める、としている。試料調製に際して振らなければならない条件としては、試験試料のサイズ、増菌培養で使用する培地の種類や培養条件、希釈容量、ホモジナイザーの種類、などが挙げられているが、具体的なことは記載されていないので、ケースバイケースで議論して決めなければならない。実際、コラボだけでなく、プレコラボなどの前段階での結果と合わせて、どの食品マトリクスまで認めるかの最終判断は、結局は、ジェネラルレフェリー、統計学アドバイザー、コラボスタディプロトコールのレビューアー、が下すとしている。

8. 定性試験外部委託バリデーションでの食品マトリクスの選定

試験すべき食品マトリクスは最低 1 種類。しかし、適用したいマトリクス 5 種に対してその中の 1 種について実施すること。ただし、その食品の選択は、コラボの場合と同様、ジェネラルレフェリーが、コラボスタディディレクターと相談して決める、となっている。

9. 定性試験コラボスタディでの菌濃度と繰返し数

高濃度、中間濃度、無菌の 3 レベルで行う、としており、繰返し数は、何れの濃度に対しても同じく 12 としている。ISO 16140 の定性試験では 3 レベル (0, 3, 30 cell/d/25g)

であることは同じであるが、繰り返し数は何れの濃度も 8 であった。

1 0. 定量試験での包含性、排他性試験

適用する場合は、菌種菌株の規定は定性試験の場合と同様ではあるが、適用対象は選択的あるいは差分定量法の場合であって、一般生菌などには適用しないとしている。当たり前のことではあるが、定性試験の項には、その当たり前の記載がない。

1 1. 定量試験における食品の選定

Matrix extension を認めないことは、定性試験の場合と同様。

1 2. 定量試験における菌濃度と繰り返し数

菌濃度は高、中、低の 3 通り、それに無菌条件が加わる。低レベルとは検出限度 (Limit of detection) 近傍、中濃度と高濃度は、適用範囲を十分カバーするように決める。ただし、適用範囲が 10^4 以上である場合は、中間レベルを加えることができる。繰り返し数は各濃度レベルで 5 となっている。

ISO16140 でも、この条件はほぼ同じ。すなわち、0(ネガコン)、中間値 1、中央値、中間値 2、最大値、例えば 0, 0.5LOD, 1.0LOD, 1.5LOD, 2.0LOD と設定し、各濃度で繰り返し数は 5~10。

1 3. 定量試験コラボスタディでの試験所数

最低 8 か所である。しかし、最初から 10-12 試験所で実施した方が良いのではないかと記載されている。余裕を見て試験所の数を増やしておくように、という点では定性試験の場合と同じではあるが、原文のニュアンスは大分違う。定性試験の場合は「At least 12 laboratories per matrix should be included due to potential failure to follow protocol.」と言い切っているのに対して、定量試験では「It is suggested that at least 10-12 laboratories begin the analysis.」という弱い表現になっている。定性試験に比べれば定量試験の方が厄介なので、実施計画をより慎重にするためのエネルギーを費やした分、試験所数はできるだけ少なくしたい、という思いが反映されているのでかも知れない。

1 4. 定量試験コラボスタディでの食品マトリクスの選定

定性試験の場合と同様

1 5. 定量試験コラボスタディでの菌濃度と繰り返し数

菌濃度は上記の注 11) と同様であるが、繰り返し数は 2。これらの条件は ISO16140 とほぼ同じ。

注 意

これ以降の標準試験法プロトコールについては、著作権の関係から、webへは非公開です

別添 1 :

ISO/TS 22964:2006

IDF/RM 210:2006

乳及び乳製品 *Enterobacter sakazakii* の検出

目次

緒言

- 1 狙い
- 2 引用規格
- 3 用語と定義
- 4 原則 (Annex A 参照)
 - 4.1 非選択液体培地中での前増菌
 - 4.2 選択液体培地中での増菌
 - 4.3 平板への塗布と同定
 - 4.4 確認
- 5 培地と試薬
 - 5.1 概要
 - 5.2 培地
- 6 器具とガラス器具
- 7 サンプリング
- 8 試験検体の調製
- 9 手順 (Annex A のフロー図参照)
 - 9.1 試料
 - 9.2 前増菌
 - 9.3 選択増菌
 - 9.4 推定 *Enterobacter sakazakii* の分離
 - 9.5 確認
 - 9.6 確認試験の結果の解釈
- 10 標準菌株
- 11 結果の表記
- 12 試験報告

Annex A (情報提供) 試験法フロー図

参考文献

緒言

ISO（国際標準化機構）は、各国の標準化機関（ISO加盟団体）の国際的な連合体である。通常、国際規格の策定作業はISO専門委員会を通じて行われる。専門委員会が設置されている特定の課題に関心のある各加盟団体は、その委員会に代表を派遣する権利を有する。国際機関も、政府機関であれ非政府機関であれ、ISOと連携して作業に参加することができる。ISOは、電気技術の標準化に関するあらゆる問題について、国際電気標準会議（IEC）と密接に協力する。

国際規格の原案は、ISO/IEC指令パート2に規定された規則に従って作成される。

専門委員会の主な業務は、国際規格を策定することである。専門委員会が採択した国際規格案は、投票のため各加盟団体に配布される。国際規格として公布されるには、投票する加盟団体の少なくとも75%による承認を要する。

他の状況、とりわけこのような文書に対する市場の緊急な要求がある場合は、専門委員会は別の種類の引用規格の発行を決めることができる。

ISO Publicly Available Specification (ISO/PAS)は、ISOワーキンググループの技術的専門家の中での合意を表明し、親委員会の選挙でメンバーの50%の承認が得られれば、出版することが出来る。

ISO Technical Specification (ISO/TS)は、技術的専門家の中での合意を表明し、委員会の選挙でメンバーの2/3の承認が得られれば、出版することが出来る。

ISO/PAS 或いは ISO/TS は、3年ごとに見直され、その先3年間継続するか、International Standard となるよう改定されるか、或いは取り下げられるか決定される。もし継続されれば、更に3年後に再び審査され、International Standard として移植されるか、取り下げられるかを定められる。

本国際規格の一部の要素は特許権の対象となる可能性があるという点に注意すること。ISOは、そのような特許権の一部又はすべてを特定する義務を負わない。

ISO/TS 22964/IDF/RM 210 は、ISO/TC34 専門委員会（食品）、副委員会 SC5（乳及び乳製品）及び IDF によって作成された。本文書は、ISO と IDF の共同出版である。

緒言

IDF (the International Dairy Federation) は世界規模の、各メンバー国委員の乳業部門の連盟である。各国委員は、IDF 常設委員会に技術的作業を実施するよう申し立てる権利を有する。IDF は ISO と協力して乳及び乳製品の分析とサンプリングの標準試験法の策定を行う。

専門委員会の主要な職務は、国際的規格を作成することである。国際規格案は、Action Team により採択され、常設委員会が投票のために各国委員に配布する。国際規格としての発行は、IDF 各国委員の行う投票で少なくとも 50% の承認が必要とされる。

他の状況、とりわけこのような文書に対する市場の緊急な要求がある場合は、常設委員会は IDF において reviewed method と呼ばれる別の種類の引用規格の発行を決めることができる。このような試験法は、常設委員会メンバーの合意により提示され、発行には各国委員による投票で少なくとも 50% の承認が必要となる。reviewed method は ISO/PAS 及び ISO/TS と同等であり、ISO と共同出版される。

本国際規格の一部の要素は特許権の対象となる可能性があるという点に注意すること。IDF は、そのような特許権の一部又はすべてを特定する義務を負わない。

ISO/TS 22964/IDF/RM 210 は、IDF 及び ISO/TC34 専門委員会 (食品)、副委員会 SC5 (乳及び乳製品) によって作成された。本文書は、ISO と IDF の共同出版である。

全ての作業は ISO-IDF 合同アクションチームハーモナイゼーション部門、微生物学的分析法常設委員会により、D. J. C. van den Berg (NL) と H. Joosten (CH) の監督の下で行われた。

1. 狙い

この技術的仕様書 (specification) は、粉乳と乳児用調製粉乳中の *Enterobacter sakazakii* の検出方法を規定している。

本試験法は、粉乳及び乳児用調製粉乳工場から集められた環境由来検体にも適用可能である。

2. 引用規格

下記の引用規格は本試験法の実施に不可欠である。日付が明記された規格として、今回挙げられた版のみが利用可能である。日付のない規格については、最新の版が(あらゆる修正を含む)が適用される。

ISO8261/IDF122 乳及び乳製品 微生物学的試験のための、試験検体、10 倍乳剤及び 10 倍階段希釈調製の一般的指針

ISO7218 食品及び動物飼料の微生物学—微生物学的試験のための一般的必要事項及び指針

3. 用語と定義

この試験法においては、下記の用語と定義を用いる。

3.1 推定 *Enterobacter sakazakii*

この技術的仕様書に記載された試験を実施したときに、酵素基質分離培地上で典型集落を形成する微生物

3.2 *Enterobacter sakazakii*

酵素基質分離培地上で典型集落を形成し、トリプトンソーヤ寒天平板上で黄色集落を形成し、この技術的仕様書に従って試験を実施したときに、記載された生化学性状を示す微生物

4. 原則(Annex A 参照)

4.1 非選択液体培地での前増菌

試験検体を接種した前増菌培地は、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 16 から 20 時間培養する。

4.2 選択液体培地での増菌

4.1 で得られた培養液を接種した選択増菌培地は $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 22 から 26 時間培養する。

4.3 平板への塗布と同定

4.2 で得られた増菌培養液を酵素基質培地に接種し、 $44 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 から 26 時間培養する。

4.4 確認

酵素基質培地から典型集落を選択し、トリプトンソーヤ寒天平板上で黄色色素を産生する株について、生化学性状を調べる。

5. 培地と試薬

5.1 全般

試薬類は、他の規定がなければ、分析用グレードのものと確認されたもののみを使用し、蒸留又は脱イオン水或いは同等の純度の水を用いる。水は、この技術的仕様書に規定された試験条件下で、微生物の発育を阻害する可能性のある物質を含まないものでなくてはならない。ISO6887-1 及び ISO8261/IDF122 を参照。

結果の再現性を向上させるため、培地には乾燥基礎培地又は乾燥完全培地を使用することを推奨する。その

場合、製造者の仕様書に厳密に従うこと。IS06887-1 参照。

pH の値は温度 25°Cでの値とする。調整が必要な場合には、1 モルの塩酸又は 1 モルの水酸化ナトリウム溶液を加えて行う。

直ちに使用しない場合には、作製した培地及び試薬は成分に変化が起こらない条件下で、遮光し 0 から 5°C で、1 ヶ月を超えない範囲で保存する。

5.2 培地

5.2.1 緩衝ペプトン水 (BPW)

5.2.1.1 組成

カゼイン酵素分解産物	10.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸水素二ナトリウム・12水和物	9.0g
リン酸二水素カリウム	1.5g
精製水	1000mL

5.2.1.2 調製法

各試薬を精製水に溶解し、必要なら加温する。必要に応じてpHを25°Cで7.0±0.2に調整する。分析上の必要性に応じてフラスコまたは試験管に分注し、121°C15分滅菌する。

5.2.2 変法ラウリル硫酸トリプトースブロス (mLST) /バンコマイシン培地

5.2.2.1 変法ラウリル硫酸トリプトースブロス (mLST)

5.2.2.1.1 組成

塩化ナトリウム	34.0g
動物及び植物組織の酵素分解産物	20.0g
乳糖	5.0g
リン酸二水素カリウム	2.75g
リン酸水素二カリウム	2.75g
ラウリル硫酸ナトリウム	0.1g
精製水	1000mL

5.2.2.1.2 調製

各組成を精製水に溶解する。必要ならば加温する。

必要ならばpHを6.8±0.2に調製する。18mm×160mmの試験管に10mLのmLSTを分注する。

121°C15分滅菌する。

5.2.2.2 バンコマイシン溶液

5.2.2.2.1 組成

バンコマイシン	10mg
精製水	10mL

5.2.2.2.2 調製

バンコマイシンを精製水に溶解する。混和し、濾過滅菌する。
バンコマイシン溶液は0から5°Cで15日間保存可能である。

5.2.2.3 mLST/バンコマイシン培地

10mLのmLST溶液(5.2.2.1.2)に0.1mLのバンコマイシン溶液(5.2.2.2.2)を加え、バンコマイシンの終濃度をmLST1mLあたり10 μ gとする。

最終的なmLST/バンコマイシン培地は0から5°Cで1日間保存可能である。

5.2.3 *Enterobacter sakazakii*分離寒天 (ESIA)

5.2.3.1 組成

カゼインペプトン (パンクレアティック)	7.0g
イーストエクストラクト	3.0g
塩化ナトリウム	5.0g
デオキシコール酸ナトリウム	0.6g
5-ブromo-4-クロロ-3-インドール α -D-グルコピラノシド	0.15g
クリスタルバイオレット	2mg
寒天	12.0から18.0g
精製水	1000mL

5.2.3.2 調製

各組成を沸騰水中で溶解する。必要に応じてpHを7.0 \pm 0.2(25°C)に調整する。
121°Cで15分間滅菌する。44から47°Cに冷却する。空の滅菌シャーレに15mLのESIATM培地を分注し、涼しく平らな面に固まるまで放置する。

培地は0から5°Cで14日間保存可能である。

5.2.4 トリプトンソーヤ寒天 (TSA)

5.2.4.1 組成

カゼイン酵素分解産物	15.0g
大豆酵素分解産物	5.0g
塩化ナトリウム	5.0g
寒天	9.0から18.0g
精製水	1000mL

5.2.4.2 調製

各組成を沸騰水中で溶解する。必要に応じてpHを7.3 \pm 0.2(25°C)に調整する。121°Cで15分間滅菌する。
44から47°Cに冷却する。空の滅菌シャーレに15mL分注し、涼しく平らな面に固まるまで放置する。

5.2.5 生化学性状のための培地と試薬

5.2.5.1 オキシダーゼ検出のための試薬

5.2.5.1.1 組成

<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチル- <i>p</i> -フェニレンジアミンジハイドロクロライド	1.0 g
精製水	100mL

5.2.5.1.2 調製

使用直前に組成を水に溶解する。

5.2.5.2 L-リジン脱炭酸試験培地

5.2.5.2.1 組成

L-リジンモノハイドロクロライド	5.0g
イーストエクストラクト	3.0g
ブドウ糖	1.0g
プロモクレゾールパープル	0.015g
精製水	1000mL

5.2.5.2.2 調製

各組成を精製水に溶解する。必要に応じて加温する。必要に応じ、滅菌後のpHが6.8±0.2 (25℃) となるよう調整する。5mLのリジン脱炭酸試験培地を18mm×160mmの試験管に分注する。121℃で15分間滅菌する。

5.2.5.3 L-オルニチン脱炭酸培地

5.2.5.3.1 組成

L-オルニチンモノハイドロクロライド	5.0g
イーストエクストラクト	3.0g
ブドウ糖	1.0g
プロモクレゾールパープル	0.015g
精製水	1000mL

5.2.5.3.2 調製

各組成を精製水に溶解する。必要に応じて加温する。必要に応じ、滅菌後のpHが6.8±0.2 (25℃) となるよう調整する。5mLのリジン脱炭酸試験培地を18mm×160mmの試験管に分注する。121℃で15分間滅菌する。

5.2.5.4 L-アルギニン脱水素試験培地

5.2.5.4.1 組成

L-アルギニンモノハイドロクロライド	5.0g
イーストエクストラクト	3.0g
ブドウ糖	1.0g
プロモクレゾールパープル	0.015g
精製水	1000mL

5.2.5.4.2 調製

各組成を精製水に溶解する。必要に応じて加温する。必要に応じて滅菌後のpHが 6.8 ± 0.2 (25°C) となるよう調整する。18mm×160mmの試験管に5mLのL-アルギニン脱水素試験培地を分注する。121°Cで15分間滅菌する。

5.2.5.5 炭水化物分解試験用培地 (フェノールレッド、D-ソルビトール、L-ラムノース、ショ糖、D-メリビオース及びアミグダリン)

5.2.5.5.1 基礎培地

5.2.5.5.1.1 組成

カゼイン酵素分解産物	10g
塩化ナトリウム	5g
フェノールレッド	0.02g
精製水	1000mL

5.2.5.5.1.2 調製

各組成を精製水に溶解する。必要に応じて加温する。必要に応じて滅菌後のpHが 6.8 ± 0.2 (25°C) となるよう調整する。

基礎培地を、適した容量のフラスコに分注する。121°Cで15分間滅菌する。

5.2.5.5.2 炭水化物溶液 (D-ソルビトール、L-ラムノース、ショ糖、D-メリビオース及びアミグダリン) 80mg/mL

5.2.5.5.2.1 組成

炭水化物	8g
精製水	100mL

5.2.5.5.2.2 調製

それぞれの炭水化物を別々に精製水に溶解し、4種類の炭水化物溶液を作製する。濾過滅菌する。

5.2.5.5.3 炭水化物分解試験用最終培地

5.2.5.5.3.1 組成

基礎培地 (5.2.5.5.1)	875mL
炭水化物溶液(5.2.5.5.2)	125mL

5.2.5.5.3.2 調製

各炭水化物につき、炭水化物溶液(5.2.5.5.2)を無菌的に基礎培地(5.2.5.5.1)に加え、混和する。18mm×

160mm の試験管に各完全培地 10mL を無菌的に分注する。

5.2.5.6 シモンズクエン酸培地

5.2.5.6.1 組成

クエン酸ナトリウム	2.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸水素二カリウム	1.0g
リン酸二水素アンモニウム	1.0g
硫酸マグネシウム	0.2g
プロモチモールブルー	0.08g
寒天	8.0 から 18.0g
精製水	1000mL

5.2.5.6.2 調製

各組成又は粉末培地を沸騰水中で溶解する。必要に応じて滅菌後の pH が 6.8 ± 0.2 (25°C) となるよう調整する。18mm×160mm の試験管 (6.7) にシモンズクエン酸培地を 10mL ずつ分注する。121°C で 15 分間滅菌する。

試験管立てを、2.5cm の高さの斜面となるよう斜めに置く。

6. 器具とガラス製品

使い捨てガラス器具は、再利用に適したものであれば再利用するガラス器具に変更が可能である。

通常の微生物学的試験器具は下記のものである。

6.1 乾熱滅菌及び湿熱滅菌

IS07218 参照。

6.2 先端目盛り式ピペット 1ml 目盛りのもの

6.3 恒温水槽 $44 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ を維持できるもの

6.4 シャーレ ガラスもしくはプラスチック製、直径 90 から 100mm のもの

6.5 恒温器 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で運転できるもの

6.6 白金耳 プラチナ/イリジウム又はクロムニッケル製、直径約 3mm のもの、或いは使い捨てのもの

6.7 試験管 直径 18mm 長さ 160mm のもの、栓又はスクリューキャップがついているもの

6.8 pH メーター $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 0.1 の精度を持つもの

7. サンプリング

試験室は、真に試験検体を代表する検体を受け取り、その検体が輸送及び保管中に損傷或いは変質していないことが重要である。

サンプリングはこの技術仕様書に特有の方法ではない。推奨されるサンプリング方法は、ISO707/IDF50に記載されている。

8. 試験検体の調製

試験検体の調製は、ISO8261/IDF122 にしたがって行う。

9. 試験手順 (Annex A の図を参照)

9.1 試験区分

試料原液の調製には、 x g の試験検体を、この試験法で定められた比率である 9 倍量 (9x mL) の前増菌培地 (5.2) に加える。

乾燥した検体を、液体中でかき混ぜずに拡散させる。もし 30 分経過しても検体が溶解しない場合には、静かに混ぜる。

9.2 前増菌

検体を接種した前増菌培地 (9.1) は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18 ± 2 時間培養する。

9.3 選択増菌

検体を接種した前増菌培地の培養後、得られた培養液 (9.2) のうち 0.1 mL を 10 mL の mLST/vancomycin 培地に接種する。 $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養する。

最高温度 (44.5°C) を超えないために、恒温水槽 (6.3) 又は空気循環式恒温器の使用を推奨する。

9.4 推定 *Enterobacter sakazakii* の分離

接種された mLST/vancomycin 培地 (9.3) の培養後、1 白金耳 (約 $10 \mu\text{l}$) を *Enterobacter sakazakii* 分離寒天平板 (5.2.3.2) 上に塗布する。 $44 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養する。

培養後、酵素基質培地上に推定 *Enterobacter sakazakii* の典型集落が見られるか調べる。

注：典型集落は、小から中サイズ (1 から 3 mm) の緑から青緑色の集落である。非典型集落は、しばしばわずかに透明がかり、紫色をしている。

9.5 確認

9.5.1 黄色色素の産生

9.5.1.1 集落の選択

培養した酵素基質培地 (9.4) から、推定 *Enterobacter sakazakii* の典型集落を 1 から 5 個選ぶ。

9.5.1.2 培養

培養後に単離された集落を観察できるように、選択した集落 (9.5.1.1) を TSA 平板 (5.2.4.2) に画線する。平板を $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 44 から 48 時間培養する。培養後、TSA 平板上に黄色色素を示す集落の存在を確認する。

1 個の集落のみが選択され (9.5.1.1)、TSA 寒天平板に接種し、黄色色素を呈する集落が見られなかった場合、更に 4 集落を選択し (9.5.1.1)、9.5.1.2 の操作を行う。もし典型集落が 5 個より少なかった場合、全集落を選択する。

注意：*Enterobacter sakazakii* のいくつかの例外的な株は、この技術仕様書で定められた試験条件で黄色色素を形成しない、或いは継代培養中に色素が失われることがある。そのような場合には、この試験法の使用時にそれらの株を見落とすことがありうる。

9.5.2 生化学的確認試験

9.5.2.1 概要

現時点で市販されており、*Enterobacter sakazakii* の同定に用いることが認められている、簡略化された生化学性状同定キットを使うことができる。

9.5.2.2 集落の選択

黄色色素を呈する集落を各 TSA 平板 (9.5.1.2) から 1 つずつ選択し、9.5.2.3 から 9.5.2.8 にしたがって生化学性状を調べる。

9.5.2.3 オキシダーゼ

ガラス棒か使い捨ての白金線を用いて、選択した各集落 (9.5.2.2) を一部採取する。

採取した集落をオキシダーゼ試薬 (5.2.5.1) で湿らせた濾紙或いは市販のディスクに接種する。クロムニッケルの白金耳や白金線は使用しないこと。

濾紙の色が 10 秒以内に薄紫、紫又は濃青色に変化しない場合は、陰性である。

9.5.2.4 L-リジン脱炭酸試験

白金耳、白金線またはガラス棒を用いて、L-リジン脱炭酸試験培地 (5.2.5.2) に各選択集落 (9.5.2.2) を液体培地の液面直下に接種する。 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養する。

培養後、紫色を呈するのが陽性反応である。黄色を呈するのは陰性である。

9.5.2.5 L-オルニチン脱炭酸試験

白金耳、白金線またはガラス棒を用いて、L-オルニチン脱炭酸試験培地 (5.2.5.3) に各選択集落 (9.5.2.2) を液体培地の液面直下に接種する。 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養する。

培養後、紫色を呈するのが陽性反応である。黄色を呈するのは陰性である。

9.5.2.6 L-アルギニン脱水素試験

白金耳、白金線またはガラス棒を用いて、L-アルギニン脱水素試験培地（5.2.5.4）に各選択集落（9.5.2.2）を液体培地の液面直下に接種する。30±1℃で24±2時間培養する。

培養後、紫色を呈するのが陽性反応である。黄色を呈するのは陰性である。

9.5.2.7 各種糖質の発酵

白金耳、白金線またはガラス棒を用いて各種炭水化物分解試験培地（5.2.5.5.3）に各選択集落（9.5.2.2）を液体培地の液面直下に接種する。30±1℃で24±2時間培養する。

培養後、黄色を呈するのが陽性反応である。赤色を呈するのは陰性である。

9.5.2.8 クエン酸利用能

白金耳、白金線またはガラス棒を用いてシモンズクエン酸培地（5.2.5.6）の斜面表面に各選択集落（9.5.2.2）を画線する。30±1℃で24±2時間培養する。

培地が青色を呈すれば、反応は陽性である。

9.6 確認試験の結果の解釈

結果は、表1に基づき解釈する。

表1 結果の解釈

確認試験	陽性又は陰性反応	反応を示す <i>E. sakazakii</i> 株の%
黄色色素の産生	+	>99
オキシダーゼ	-	>99
L-リジン脱炭酸	-	>99
L-オルニチン脱炭酸	+	±90
L-アルギニン脱水素	+	>99
発酵による糖産生	D-ソルビトール	-
	L-ラムノース	+
	D-シュクロース	+
	D-メリビオース	+
	アミグダリン	+
	クエン酸加水分解	+

10. 標準菌株

増菌培地及び分離培地における *Enterobacter sakazakii* の増殖をサポートする性能の確認のため、最近確認された *Enterobacter sakazakii* の標準菌株或いは確認された菌株保存センターから入手した標準菌株の低菌量を用いて、前増菌培地の入ったフラスコに接種する（9.2）。このフラスコを試験検体として用いて試験を

実施し、陽性コントロールとして回収できることを示す。

11. 結果の表記

試験結果 (9.4) の解釈に基づき、試料中に推定 *Enterobacter sakazakii* が存在しているかいないかを報告する。この場合、酵素基質培地上に見つかった推定 *Enterobacter sakazakii* の確認試験は実施されていない。

9.5 に記された方法での確認後、1 つ或いはそれ以上の、9.4 で得られた推定 *Enterobacter sakazakii* 集落については、試料中に *Enterobacter sakazakii* が存在しているかいないかを報告する。

分析した試験検体の、質量中 (g あたり) 或いは容積中 (ml あたり) の最終的な試験結果を特定する。

12. 試験報告

試験報告には、下記の内容を記載する。

- a) 検体を完全に同定するために必要な全ての情報
- b) もしわかれば、使用したサンプリング方法
- c) 本技術仕様書に基づき実施された試験方法
- d) 本技術仕様書に記載されていない全ての詳細、或いは試験結果に影響を及ぼしうる全ての要因の詳細を付け加えてもよい。
- e) 得られた試験結果

AnnexA (情報提供)

フロー図

検体調製・前増菌

xg の試料を秤量し、9 倍量 (9xmL) の BPW に加える (9.1)

↓

37°C で 18±2 時間培養する (9.2)

↓

mLST/バンコマイシン培地での選択増菌

10mL の mLST/バンコマイシン培地に 0.1mL の前増菌液を接種する (9.3)

↓

44°C で 24±2 時間培養する (9.3)

↓

選択酵素基質培地での分離

培養した増菌培地 (mLST/バンコマイシン培地) から 1 白金耳をシャーレ内の酵素基質培地に画線培養する (9.4)

↓

44°C で 24±2 時間培養する (9.4)

↓

確認試験：黄色色素の産生

5 個の典型集落を選択し、TSA 平板上に画線する (9.5.1)

↓

25°C で 48±4 時間培養する (9.5.1.2)

↓

確認試験：生化学性状

生化学性状試験のため、各 TSA 平板から 1 つの黄色集落を選択する (9.5.2)

↓

結果の解釈 (9.6)

↓

酵素基質培地上の典型集落は
推定 *Enterobacter sakazakii*
と考えられ、そのように報告される