

201234023A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

(課題番号： H23 - 食品 - 一般 - 010)

研究代表者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成25(2013)年5月

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H23-食品-一般-010)

研究代表者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成25(2013)年5月

目 次

I. 平成 24 年度総括研究報告書

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 1

研究代表者 五十君 静信

研究組織、委員会開催状況

II. 分担研究報告書

1. *Cronobacter* spp. の標準試験法に関する研究 11

荻原博和、岡田由美子

2. 腸炎ビブリオ試験法 25

甲斐明美、小西良子

3. 試験法の妥当性確認に関する研究 37

松岡英明、五十君静信

4. 衛生指標菌試験法に関する研究 49

伊豫田淳

日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会

5. 委託事業報告書 61

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
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

総括研究報告書

研究代表者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

本研究では、食品における微生物試験法のメソッドバリデーションの手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法の策定を進めた。これまでの研究班の成果である食品からの微生物標準試験法作成方針に従い、腸炎ビブリオ、クロノバクター属菌、衛生指標菌などの標準試験法の策定を進めた。今後リスク評価の結果を受けて策定される食品の微生物基準に利用可能な試験法となるように国際的に互換性のある試験法を提供することが重要である。さらに、策定された標準試験法を精度高く実施するために必要な導入時の検証、微生物標準品の設定、試験精度の管理に関する基礎的研究を行った。

食中毒起因細菌の試験法に関する専門家 23 名からなる“標準法検討委員会”を組織し、統一した方針に沿って具体的に微生物標準試験法の策定を進めた。試験法策定状況は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ上に公開し広く意見を求めた。研究班の行う当該微生物の試験法案作成および必要なデータ収集は、それぞれの作業部会が担当し、本研究班の代表、分担、協力研究者がその作業にあたった。各作業部会は、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い“標準法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。平成 24 年度は、作業部会案作成とデータに基づく作業部会案の修正、コラボ案の検討（ステージ 2～3）を行った。試験法のバリデーション（妥当性確認）に関しては、ISO 16140 を基にしたガイドライン作成を目的とし、AOAC から出されたバリデーションに関する新しい文書や海外の第三者認証機関の妥当性確認のプロトコルなどを参考に検討を進めた。他の研究班により進められているカンピロバクター標準試験法については、コラボ試験に協力し、得られたデータを用いて妥当性確認を実際に試み、その成果を論文として投稿した。

研究分担者：

松岡英明：東京農工大学大学院

荻原博和：日本大学生物資源科学部

甲斐明美：東京都健康安全研究センター

小西良子：国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部

岡田由美子：国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部

伊豫田淳：国立感染症研究所細菌第一部

食品における微生物試験法のメソッドバリデーションの手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法プロトコル作成を行う。これまでの研究班の成果である食品からの微生物標準試験法作成方針に従い、腸炎ビブリオ、クロノバクター属菌、並びに衛生指標菌などの標準試験法を策定する。今後リスク評価の結果を受けて策定される食品の微生物基準に利用可能な試験法となるように国際的に互換性の

A. 研究目的

ある試験法を提供する。さらに、科学的根拠のある試験法作成に必要な妥当性確認の方法論の提供、策定された標準試験法を精度高く実施するために必要な導入時の検証、微生物標準品の設定、試験精度の管理に関する基礎的研究を行う。

B. 研究方法

食中毒起因細菌や衛生指標菌の試験法に関する専門家、約 23 名からなる“標準試験法検討委員会”を組織し、H22 年度までの研究班の成果として作成された“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い、微生物標準試験法の策定を行うが、検討に必要なデータの統計処理方法は国際的にまだ統一されていないため、データの評価方法については、実際の試験法策定の検討データ毎に相当と思われる手法により検討する。これらの試験法策定過程は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ上に公開し、一般にも広く意見を求めた。

研究班の行う当該微生物の試験法策定は、それぞれの作業部会を組織し進めた。本研究班の代表、分担、協力研究者が、作業部会を組織し具体的な標準法案策定の作業にあたった。各作業部会は、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い“標準試験法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。平成 24 年度の試験法の策定は、作業部会案の公開及び作業部会案のデータによる検討、コラボ案の作成（ステージ 2～3）を行った。これに対応し“標準試験法検討委員会”は平成 24 年度に 5 回開催し、それぞれの標準試験法策定が適切に行われていることを確認すると共に、微生物試験法の妥当性確認の手法を ISO 16140 を基に AOAC のバリデーションガイドライン、海外の第三者認証機関が示しているプロトコルなどを参考とし検討した。

他の研究班で食品微生物に関する試験法の作成を行う場合は、その研究班と協

力し“食品からの微生物標準試験法作成方針”を基に“標準試験法検討委員会”が標準試験法の作成の方向性を示した。平成 24 年度は、カンピロバクターレファレンスセンターを中心とする研究班の依頼を受けて、コラボ試験の結果を基に妥当性確認を行った。

C. 研究結果

食品微生物の専門家約 23 名で構成する“標準試験法検討委員会”を組織した。この委員会は試験法案を検討し、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い標準試験法策定にあたった。汚染指標菌の標準試験法は、ISO 法の酵素基質培地を用いた大腸菌試験法について検討し、その導入を決めた。衛生指標菌・バリデーション合同作業部会から提出された資料を基に妥当性確認に関する方法論に関する議論を進めた。

それぞれの標準試験法案プロトコルの作成は、作業部会単位で進めた。クロノバクター属菌（荻原、岡田）、腸炎ビブリオ（甲斐、小西）、衛生指標菌（伊豫田、五十君、日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会）の試験法案について各作業部会で検討を行った。その検討内容については各作業部会の分担研究報告書を確認していただきたい。標準試験法検討委員会は“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い、試験法策定を進めた（五十君は総括および検討委員会運営）。妥当性確認に関する検討（松岡、五十君）は衛生指標菌作業部会との合同作業部会を年度内に 5 回開催し、AOAC インターナショナルの示したガイドラインや海外の第三者機関による妥当性確認に関する文書を参考に議論を進めた。

標準試験法検討委員会の事務局は、五十君が担当し、23 名の専門家委員と 2 名の行政官で構成した。平成 24 年度 5 回の検討委員会を開催した。各作業部会が機能し、標準法策定が順調に行われている

かを評価した。他の研究班等で検討中のカンピロバクター標準試験法のコラボ試験について諮問を受け評価した。これらの試験法の検討状況を web へ公開した。それぞれの検討委員会の議事録概要版は、国立医薬品食品衛生研究所ホームページに公開しているので、以下を参照していただきたい。

<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>

クロノバクター属菌試験法作業部会（荻原・岡田担当）は、2 機関 4 名の専門家から構成した。ISO 法には、ISO/TS22964:2006 にエンテロバクター・サカザキとしての試験法が示されている。米国 FDA からは、BAM 法としてエンテロバクター・サカザキの 3 本法の MPN による定量試験法が示されている。2008 年にエンテロバクター・サカザキは、再分類によりクロノバクター属菌に分類され、対象となる菌種に関してかなり混乱しているのが実状である。従って、標準試験法では、ISO/TS 22964:2006 の定義に従って、クロノバクター属菌試験法を検討することにした。本年度は ISO 法を基に作業部会案を公開し、作業部会案の問題点についてデータを示し、コラボ案作成を行った。

腸炎ビブリオ試験法作業部会（甲斐・小西担当）は、2 機関 6 名の専門家で構成した。腸炎ビブリオ標準試験法は、現在の公定法を基に検討し、作業部会案を公開した。試験法の検討は、ISO 法との比較を行い、あさりのむき身などの食品を用いて添加回収実験を行い、コラボ試験の基礎データ作りを進めた。

衛生指標菌作業部会（伊豫田担当）は、財団法人日本食品分析センターと財団法人日本冷凍食品検査協会の協力の下、検討を行った。衛生指標菌・菌群としては、酵素基質培地による大腸菌定量法と、菌数計数法を対象として、ISO 試験法を基にバリデーション作業部会と合同で検討

した。

バリデーション作業部会（松岡・五十君担当）は衛生指標菌作業部会と合同で検討した。標準試験法のバリデーション手法の検討とカンピロバクター標準試験法コラボ試験の評価を行った。海外の第三者機関による妥当性確認のガイドラインを比較検討し、AOAC インターナショナルが新規に提案したガイドラインと ISO 16140 を比較しながら妥当性確認に必要な内容をまとめた。

これらの試験法に関する情報提供を、学会等のシンポジウムや講演会及び関連雑誌の総説で行った。

D. 結論

食品における微生物標準試験法の妥当性確認の手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法プロトコール作成を進めた。クロノバクター属菌、腸炎ビブリオ、並びに酵素基質培地を用いた大腸菌試験法などの検討を進めた。海外の第三者機関のガイドラインを比較検討し、妥当性確認に関する考え方を整理し、妥当性確認に必要な内容をまとめた。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

1. Matsuoka H, Shigetomi T, Funabashi H, Saito M, Igimi S: Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. J. Microbiol. Methods 93(1), 49-51 (2013).
2. Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R, Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K,

Yahiro S, Fujita M, Igimi S. Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: Collaborative study. J. AOAC International. in press.

3. 五十君静信。指標菌の考え方と国際整合性。月刊フードケミカル、2012年5月号 325:19-22. (2012)
4. 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。生食用食肉の規格基準の考え方。日本食品微生物学会雑誌。29:98-100 (2012)
5. 五十君静信。病原微生物のリスクプロファイルから数値的指標を導入した規格基準策定まで。食品と科学。54(7):59-64. (2012. 6)
6. 五十君静信。標準試験法の検討と生食用食肉の規格基準への採用。月刊フードケミカル 12月号。332:61-64. (2012. 12)
7. 松岡英明：AOAC法による微生物試験・評価法。日本防菌防黴学会誌、40(5)、279-288 (2012)。
8. 五十君静信。食品の微生物試験法の国際対応と、現場における試験法選定の考え方～生食肉の規格基準のもたらしたもの～。月刊食品と開発。5月号。48(5):5-8 (2013. 5)

学会発表

1. 小西典子、尾畑浩魅、高橋正樹、下島優香子、仲真晶子、工藤由起子、甲斐明美：食品を対象とした腸炎ビブリオ試験法作成のための基礎的検討。第46回腸炎ビブリオシンポジウム、大分県、2012. 11.
2. 岡田由美子、門田修子、鈴木穂高、荻原博和、福田典子、五十君静信。ISO/TS22964に基づく *Cronobacter*

spp. 試験法の検討。第154回日本獣医学会

3. 中納広一郎、高谷周督、吉田智紀、舟橋久景、斉藤美佳子、松岡英明、五十君静信：FACSを利用した微生物生菌標準物質の「その場」調製法。第39回日本防菌防黴学会年次大会、東京(2012. 9. 11)
4. 高谷周督、吉田智紀、斉藤美佳子、松岡英明、五十君静信：微好気性細菌を好気条件で定量ソーティングするための条件検討。第39回日本防菌防黴学会年次大会、東京(2012. 9. 11)
5. 松岡英明：微生物試験法の合理的バリデーションの鍵となる生菌標準物質。日本微生物資源学会第19回大会、シンポジウム「標準微生物とカルチャーコレクション」、木更津(2012. 6. 29)
6. 松岡英明：微生物試験法バリデーションの国際動向—AOACと公定法との今後の関係。メルクミリポア・マイクロバイオロジーセミナー2012、東京(2012. 7. 11)、大阪(2012. 7. 13)
7. 松岡英明：微生物試験法の妥当性確認の新ガイドライン。JASISコンファレンス「国際化に対応する分析値の質の向上とAOACの新しい分析法妥当性確認」、幕張(2012. 9. 7)
8. Momose Y, Okada Y, Ekawa T, Kazuya Masuda, Hiroshi Asakura, Shizunobu Igimi. Collaborative study on a standard method for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from foods in Japan. AOACI. 2012. 10. Las Vegas.
9. 五十君静信。カンピロバクター標準試験法策定の概要と本菌の制御に関する課題を考える。第5回日本カンピロバクター研究会特別講演。大阪府立大学。2012. 12. 1
10. Yoshika Momose, Tomoya Ekawa, Kazuya Masuda, Hiroshi Asakura,

Yumiko Okada, Shigeki Yamamoto and Shizunobu Igimi. Evaluation of the culture method alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: Collaborative study. UJNR. 2013.1

11. 松岡英明：食品微生物試験法の不確かさと標準物質．統計数理研究所リスク解析戦略研究センター・ワークショップ「食品の安全性科学と統計科学」（2013.3.14）

講演・研修会等

- 1.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業
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班

平成 24 年度 研究組織

研究代表者	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究分担者	松岡 英明	東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻
	荻原 博和	日本大学 生物資源科学部
	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	小西 良子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部

クロノバクター試験法作業部会

研究分担者	荻原 博和	日本大学 生物資源科学部
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
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
	門田 修子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

ビブリオ試験法作業部会

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	小西 良子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
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
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター

衛生指標菌試験法作業部会

研究分担者	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究協力者	田中 廣行	財団法人日本食品分析センター
	森 曜子	財団法人日本適合性認定協会
	井上 誠	財団法人日本冷凍食品検査協会

バリデーション作業部会

研究分担者	松岡 英明	東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻
	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究協力者	森 曜子	公益財団法人日本適合性認定協会
	田中 廣行	財団法人日本食品分析センター
	吉田 朋高	財団法人食品分析開発センター SUNATEC
	内田 和之	シスメックス・バイオメリュー株式会社
	守山 隆敏	スリーエム ヘルスケア株式会社
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	江川 智哉	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

事務および経理担当者

吉岡 宏美	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
木下 富子	国立医薬品食品衛生研究所	総務部

食品からの微生物標準試験法検討委員会

委員長	山本 茂貴	国衛研・食品衛生管理部
副委員長	小西 良子	国衛研・衛生微生物部
事務局	五十君 静信	国衛研・食品衛生管理部（研究代表、作業部会）
委員	浅尾 努	日本食品微生物学会
	泉谷 秀昌	国立感染研
	伊藤 武	財団法人東京顕微鏡院
	伊豫田 淳	国立感染研（作業部会）
	岡田 由美子	国衛研・食品衛生管理部（作業部会）
	荻原 博和	日本大学（作業部会）
	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター（作業部会）
	春日 文子	国衛研・食品衛生管理部
	鎌田 洋一	国衛研・衛生微生物部
	工藤由起子	国衛研・衛生微生物部
	小久保彌太郎	社団法人日本食品衛生協会
	小崎 俊司	大阪府立大学
	小沼 博隆	東海大学
	齋藤 利江	財団法人日本冷凍食品検査協会
	品川 邦汎	岩手大学
	田中 廣行	財団法人日本食品分析センター（作業部会）
	丹野 憲二	ISO/TC34/SC9 国内対策委員会
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター（作業部会）
	松岡 英明	AOAC International Japan Section（作業部会）
	森 曜子	公益財団法人日本適合性認定協会（作業部会）
行政から	新谷 英樹	厚労省・基準審査課
	三木 朗	厚労省・監視安全課

平成 24 年度 食品からの微生物標準試験法の検討委員会開催状況

第 38 回検討委員会：2012 年 6 月 1 日

第 39 回検討委員会：2012 年 7 月 31 日

第 40 回検討委員会：2012 年 10 月 30 日

第 41 回検討委員会：2012 年 12 月 6 日

第 42 回検討委員会：2013 年 2 月 19 日

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
門田修子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

2008年の再分類で *Enterobacter sakazakii* から *Cronobacter* spp. に変更されたクロノバクター属菌は、現在8菌種とされている。本菌による人の感染症は主に、乳児用調製粉乳を介した未熟児等の髄膜炎、敗血症及び壊死性腸炎が知られている。そのため乳児用調製粉乳には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、昨年度から本菌の標準試験法として ISO 法を中心に検討し、標準菌株及び研究室保有株を用いた解析を行うことにより、*Enterobacter sakazakii* を対象とする試験法を新分類の *Cronobacter* spp. に適用する際の問題点を明らかにした。

A. 研究目的

クロノバクター属菌は、未熟児等の新生児に髄膜炎や敗血症、壊死性腸炎を引き起こした例が海外で報告されている。従来 *Enterobacter sakazakii* とされていた本菌は、2008年に学術的に再分類され、*Cronobacter* spp. に変更された。現時点で *C. sakazakii*、*C. muytjensii*、*C. malonaticus*、*C. turicensis*、*C. dublinensis*、*C. genomespecies1*、*C. condimenti*及び *C. universalis* の8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。本菌は乾燥に強く、粉乳や乾燥野菜等

の食品から分離され、乳児感染症の主な感染源は、主に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とされている。乳児用調製粉乳からの本菌の国際的な標準試験法としては、International Standard Organization (ISO) が定める定性的試験法 (ISO/TS22964:2006) と、アメリカ合衆国の Food and Drug Administration (FDA) による BAM 法 (定量法) があるが、いずれも2008年の再分類以前の試験法であり、*Enterobacter sakazakii* を対象としている。

現在、国内では本菌の公的試験法は制定されておらず、本研究班において昨年度より国際的試験法と互換性のある標準的な *Cronobacter* spp. 試験法として ISO/TS22964 (2006) を中心に検討を行った。今年度は、昨年度の結果を基に当該試験法の本菌の増殖を阻害しうる要因について詳細に検討を行い、旧分類である *Enterobacter sakazakii* を対象とする試験法を新分類の *Cronobacter* spp. に適用する際の問題点を明らかにした。

B. 研究方法

1) ISO/TS22964 (2006) に基づく *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* 標準株の増殖性の検討

別添 1 に ISO/TS22964 (2006) の概要を示した。本研究の昨年度の検討において、分担研究機関 2 か所における増殖結果に大きな違いが見られた *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* について、再度 ISO/TS22964 (2006) による増殖性の検討を実施した。菌株は *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株及び *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* DSM18706 株を用いた。試験方法としては、TSB を用いて 37°C にて 24 時間二代継代培養した菌液を、BPW (MERCK 社) を用いて適宜希釈し、各選択培地に塗抹し、インキュベータにて 44°C・24h で培養したのち、集落数を計測した。試験機関 A では、対照群として *C. sakazakii* ATCC29544 株、*C. mytjensii* ATCC51329 株、*C. turicensis* DSM18703 株、*C. malonicus* DSM18702 株、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468 株も用いた。

2) ISO/TS22964 (2006) の増殖制御要因の検討

別添 2 に、ISO/TS22964 (2006) における *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* の増殖制御要因となりうる点について示した。それらについて複数の条件を設定し、*Cronobacter* spp. の標準株を用いた増殖性の検討を実施した。

①増菌培地の組成の検討

基礎培地である変法ラウリル硫酸トリプトースブロス (LST) のみ、LST に食塩を 3.4% 添加したもの、LST にバンコマイシンを添加したもの並びに LST に食塩及びバンコマイシンを添加した完全培地の 4 種と、コントロールとして TSB を用いた。菌株は、*C. sakazakii* ATCC29544 株と *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株及び *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* DSM18706 株を用いた。試験方法としては、菌株を 37°C で 24 時間、二代継代培養後に各組成の培地に 100 μ l 接種し、44°C もしくは 37°C にて 24 時間増菌培養後に PCA で混釈培養して 37°C 24 時間後に集落数を計測した。

②増菌培地における食塩濃度の検討

LST にバンコマイシンを添加した培地に食塩を 0.5 から 5% の濃度で添加した培地を作成し、増殖を制御する食塩濃度について調べた。菌株は、*C. sakazakii* ATCC29544 株、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468 株、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株及び *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* DSM18706 株を用いた。試験方法としては、菌株を 37°C で 24 時間、二代継代培養後に各 NaCl 濃度の LST - vancomycin 培地に 100 μ l 接種し、44°C 24 時間増菌培養後に PCA で混釈培養して 37°C 24 時間後に集落数を計測した。

③増菌時の培養温度の検討

増菌段階における培養温度の影響を調べる

ため、完全培地に接種した菌を 37、40、42 及び 44℃において増菌した。菌株は、*C. sakazakii* ATCC29544 株、ATCC29004 株及び ATCC12868 株、*C. mytjensii* ATCC51329 株、*C. turicensis* DSM18703 株、*C. malonaticus* DSM18702 株、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468 株、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株及び *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* DSM18706 株を用いた。試験法としては、菌株を 37℃で 24 時間、二代継代培養後に mLST - vancomycin 培地に 100 μ l 接種し、各温度で 24 時間増菌培養後に PCA で混釈培養して 37℃24 時間後に集落数を計測した。

3) 研究室保有株の再分類

昨年度 ISO/TS22964 に基づく試験法検討に使用した研究室保有の旧分類による *Enterobacter sakazakii* 20 株について、新分類に基づく dulcitol 分解、indole 産生、malonate 分解及び aminoglycoside 分解の 4 種の生化学性状検査を実施し、分類学的再検討を行った。菌株は、平成 23 年度の本研究報告書表 6 に示したものをを用いた。

C. 研究結果

1) ISO/TS22964 に基づく *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* 標準株の増殖性の検討

本研究の昨年度の検討において、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* について、分担研究機関 2 か所における増殖結果に大きな違いが見られた。その理由について、本来同一の由来とされる DSM18706 株と JCM16469 株のクローンの変異が疑われたため、それぞれの機関において両者を用いて ISO/TS22964 (2006) による増殖性の検討を実施した。その結果、使用

した 5 種の培地の大半で両株の増殖結果に大きな差が見られず、1 種の酵素基質培地でのみ JCM 株の増殖が見られなかった (表 1、表 2)。一方で、今回の結果においても機関による増殖の差が見られたことから、それぞれの機関における培養条件について詳細に検討した結果、ふらん器内での培養方法に違いが見られることが判明した。表 1 の結果はふらん器内で集落の発育のムラを防ぐために断熱材を使用して得られたものであり、実際の培養温度が 44℃よりもわずかに低くなっていると思われ、培養温度の微小な差が両機関における集落数の差の原因となっている可能性が高いことが示された。

2) ISO/TS22964 の増殖制御要因の検討

①増菌培地の組成の検討

1) の結果を受け、ISO/TS22964 が新分類における標準株の一部の増殖を抑制する可能性が示されたため、当該試験法における *Cronobacter* spp. の増殖制御要因となりうる点について検討を行った。その結果、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株は 44℃での培養時に食塩が添加された培地中での増殖が低下する傾向が示された (表 3)。一方、37℃の培養においては同株の増殖抑制は 44℃の時よりは軽微であった (表 4)。一方、バンコマイシン添加の有無はこれらの株の増殖性に影響しないことが示された。

②増菌培地における食塩濃度の検討

増菌培地中の食塩濃度の影響をさらに詳細に調べたところ、試験した 5 株の全てにおいて 5%の食塩濃度では増殖が著しく抑制され、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株と *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* DSM18706 株については 4%で、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株においては 3%で増殖が抑制されることが明らかとなった

(表 5)。

③増菌時の培養温度の検討

Cronobacter spp. の標準株 10 株について、増菌培養時の温度が増殖に及ぼす影響を検討した結果、44℃では *C. sakazakii* ATCC12868 株以外の 9 株が 37℃よりも増殖が低下していた(表 6)。特に *C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468 株、*C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株の 3 株は、著しい増殖の低下を示した。42℃では、*C. mytjensii* ATCC51329 株、*C. turicensis* DSM18703 株、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株及び *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株の増殖が低下していた。40℃においても増殖の低下を示したのは、*C. turicensis* DSM18703 株、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株及び *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469 株の 3 株であったが、増殖への影響は軽微であった。

3) 研究室保有株の再分類

昨年度 ISO/TS22964 に基づく試験法の検討に使用した旧分類による研究室保有 *E. sakazakii* 20 株について、新分類に基づく生化学性状検査を実施したところ、9 株が新分類における *Cronobacter* 属菌ではないと判定された(表 7)。これらは昨年度の検討において増菌培地での発育が不良であるか、あるいは 44℃における増殖性が著しく低かったものであり、ISO/TS22964 の試験法では分離されない可能性が高いものであった。また、*Cronobacter* 属菌の可能性が高いものの性状検査の一部が不一致であった株が 3 株見られた。

D. 考察

昨年度より、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、標準株及び研究室保有株を用いた検討を実施したところ、*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、その原因が主に培養温度のわずかな違いに起因していた可能性が示された。そのため、ISO 法において本菌の増殖を抑制しうる要因について詳細な検討を行った結果、増菌培養の段階では 40℃を超える培養温度で増殖が抑制される標準株が見られ、ISO 法で規定されている 44℃では *C. sakazakii* を除くほとんどの菌種において増殖性の低下が見られた。また、増菌培地中の食塩濃度も影響を与えることが明らかとなり、4%の添加で *C. dublinensis* の発育が低下を示し、ISO 法で規定されている 5%の添加では *C. sakazakii* においても増殖性が低下していた。これらの結果から、現行の *E. sakazakii* を対象とした ISO 法では、新分類の *Cronobacter* 属菌の中で検出困難な菌種があることが示された。一方で、腸内細菌科菌群の分離法に基づいて分離された研究室保有の食品由来株については、昨年度の解析において半数が ISO 法の増菌条件での増殖が低下していたが、今年度実施した生化学性状試験の結果から、それらの大半が分類学的に *Cronobacter* spp. ではない可能性が示唆された。従って、ISO 法が食品からの *Cronobacter* 属菌の近縁の他菌からの分離同定にある程度有効であることが示された。来年度は、近いうちに行われると思われる ISO 法の改訂について情報を収集し、前回の ISO 法設定後に分類が変更された *Cronobacter* spp. に適した試験法を検討していく必要があると思われる。

E. 結論

昨年度より、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・検討したところ、2008 年の新分類以前に分離された研究室保有株の内、本試験法で増殖しなかった株の多くが *Cronobacter* 属菌ではない可能性が示唆され、本試験法が本菌の分離に有効であることが示された。一方で、新分類の *Cronobacter* 属菌標準株の中で本試験法の培養条件では増殖が抑制される株が存在することから、新分類以前に制定された ISO/TS22964 の培養条件では食品等から分離できない *Cronobacter* 属菌がある可能性が示された。今後は ISO 法の改訂等に関する情報を収集し、国際的な動向を把握しつつ更に検討を重ねる予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

岡田由美子、門田修子、鈴木穂高、荻原博和、福田典子、五十君静信. ISO/TS22964 に基づく *Cronobacter* spp. 試験法の検討. 第 154 回日本獣医学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別添 1. ISO/TS 性能確認試験

前増菌液調製

TSA 平板上に単一集落を形成させた株を TSB に接種する

↓

37°C で 24±2 時間培養する

↓

増菌した菌液を TSB に 1 白金耳接種し、37°C で 24±2 時間培養する

↓

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

↓

44°C で 24±2 時間培養する

↓

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

↓

44°C で 24±2 時間培養する

別添2. ISO/TS の増殖抑制要因

検体調製・前増菌

xg の試料を秤量し、9 倍量 (9x mL) の BPW に加える

↓

37°C で 18 ± 2 時間培養

↓

mLST/バンコマイシン培地での選択増菌

mLST/バンコマイシン培地に前増菌液を接種

↓

44°C で 24 ± 2 時間培養

↓

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

↓

44°C で 24 ± 2 時間培養

↓

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

↓

25°C で 48 ± 4 時間培養する

↓

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

↓

結果の解釈

増殖抑制要因 検討した条件

増菌培地の組成 食塩濃度 → 0.5, 1, 2, 3, 4, 5%
抗生物質 → +/-

培養温度 → 37、40、42、44°C

酵素基質培地の種類 酵素基質培地 4 種

表 1. TSB 培養による *Cronobacter* spp. を用いた発色酵素基質培地による検出

Test strains (<i>Cronobacter</i> spp.)	Viable counts (log ₁₀ CFU/ml)				
	①XMSA	②ESIA	③CESA	④CAEA	TSA
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	8.8±0.2	8.9±0.2	8.8±0.2	8.9±0.1	8.9±0.2
<i>C. mytjensii</i> ATCC 51329	8.8±0.2	8.8±0.2	8.7±0.2	8.8±0.2	8.9±0.2
<i>C. dublinensis</i> subs. <i>dublinensis</i> JCM 16467	8.9±0.1	8.6±0.3	8.5±0.1	8.9±0.2	8.9±0.1
<i>C. dublinensis</i> subs. <i>lactaridi</i> JCM 16468	8.7±0.2	8.8±0.3	8.7±0.2	8.9±0.2	8.7±0.3
<i>C. dublinensis</i> subs. <i>lausannensis</i> JCM 16469	8.7±0.3	8.9±0.1	8.8±0.2	8.8±0.2	8.9±0.1
<i>C. dublinensis</i> subs. <i>lausannensis</i> DSM 18706	8.9±0.2	9.1±0.1	9.0±0.1	9.1±0.2	9.1±0.1
<i>C. malonaticus</i> DSM 18702	8.9±0.0	8.9±0.1	8.9±0.1	9.0±0.0	9.0±0.0
<i>C. turicensis</i> DSM18703	9.0±0.2	9.1±0.1	9.0±0.2	9.0±0.3	9.0±0.1