

表2. 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. dublinensis</i> subs. <i>lausannensis</i> JCM 16469	3.2	3.8	3.2	3.3	3.4
<i>C. dublinensis</i> subs. <i>lausannensis</i> DSM 18706	3.5	2.1	集落なし	4.0	3.6

表3. 増菌培地 (mLST-vancomycin) の成分が *C. dublinensis* の発育に及ぼす影響

Test strains	LST+NaCl+Van	LST	LST+NaCl	LST+Van	TSB
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	8.0±0.0	7.4±1.0	8.0±0.1	7.5±0.9	7.1±0.9
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> JCM 16469	6.9±0.1	8.1±0.0	6.9±0.1	8.1±0.1	6.4±0.3
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> DSM 18706	7.8±0.1	8.1±0.2	7.8±0.1	8.0±0.2	7.7±0.7

恒温槽にて 44°C 培養時の菌数

Van : Vancomycin

表4. 増菌培地 (mLST-vancomycin) の成分が *C. dublinensis* の発育に及ぼす影響

Test strains	LST+NaCl+Van	LST	LST+NaCl	LST+Van	TSB
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	8.5±0.3	8.2±0.4	8.4±0.3	8.2±0.3	9.0±0.1
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> JCM 16469	8.0±0.2	8.7±0.1	7.9±0.0	8.6±0.1	9.0±0.0
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> DSM 18706	8.1±0.2	8.5±0.2	8.1±0.1	8.5±0.3	9.0±0.1

恒温槽にて 37°C 培養時の菌数

表 5. 増菌培地(LST-vancomycin) 添加 NaCl 濃度が *C. dublinensis* の発育に及ぼす影響

Test strains	NaCl concentration (%)					
	Control (0.5%)	1%	2%	3%	4%	5%
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	8.7	8.7	8.9	8.6	8.6	6.9
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i> JCM 16467	8.7	8.6	9.2	8.9	6.3	5.2
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i> JCM 16468	9.0	9.1	9.0	8.1	7.8	5.1
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> JCM 16469	8.9	8.9	8.2	7.3	6.9	4.8
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> DSM 18706	9.2	9.3	9.2	9.0	7.4	6.2

Control : LST-vancomycin

表 6. 培養温度が *Cronobacterspp.* の発育に及ぼす影響

Test strains	Incubation temperature (°C)			
	37°C	40°C	42°C	44°C
1. <i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	8.1	8.3	8.3	8.1
2. <i>C. sakazakii</i> ATCC 29004	8.3	8.2	8.3	7.9
3. <i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	8.4	8.1	8.1	7.7
4. <i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	9.0	8.8	7.6	7.3
5. <i>C. malonaticus</i> DSM 18702	8.5	8.4	8.3	7.7
6. <i>C. turicensis</i> DSM 18703	7.9	7.6	7.4	7.4
7. <i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i> JCM 16467	8.0	7.6	7.7	6.0
8. <i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i> JCM 16468	7.9	7.8	8.1	6.3
9. <i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> JCM 16469	7.9	7.5	7.7	6.6
10. <i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> DSM 18706	8.2	8.2	8.0	7.8

表 7. 研究室保有株の再分類

菌株名	Dulcitol	Indole	Malonate	アミノグリコシド 酸産生、ガス産生	ISO/TS における増殖性	再分類
HT1	+	-	-	+, -	温度感受性	×
HT2	+	-	-	+, -	酵素基質培地での増殖不良	×
HT3	-	-	-	+, +	増殖正常	Cs
HT4	-	-	-	+, +	増殖正常	Cs
HT5	+	-	-	-, -	増菌培地での発育不良	×
HT6	-	-	-	+, -	増殖正常	Cs
HT7	-	-	-	-, -	増殖正常	×
HT8	-	+	-	+, +	増菌培地での発育やや不良	Cd
HT9	+	-	-	+, -	増菌培地での発育不良	×
HT10	+	-	-	+, +	増殖正常	Ct?
HT11	+	+	-	+, -	増菌培地での発育不良	×
HT12	-	-	-	+, -	酵素基質培地での増殖不良	Cs?
HT13	+	-	-	+, -	温度感受性	×
HT14	+	-	-	+, -	温度感受性	×
HT15	+	-	-	+, +	温度感受性	×
HT16	-	-	-	+, +	増殖正常	Cs
HT17	-	-	-	+, +	増殖正常	Cs
HT18	-	-	-	+, +	増殖正常	Cs
HT19	-	-	+	+, +	増殖正常	Cmal
HT20	-	-	-	+, -	酵素基質培地での増殖不良	Cs?
<i>C. sakazakii</i>	-	-	-	+, +		
<i>C. turicensis</i>	+	-	+	+, +		
<i>C. malonaticus</i>	-	-	+	+, +		
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	-	+	-	+, +		
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	-	+	-	+, +		
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	-	+	-	+, -		
<i>C. mytjensii</i>	+	+	+	-, -		

Cs: *C. sakazakii*, Cd: *C. dublinensis*, Cmal: *C. malonaticus*, Ct: *C. turicensis*, ?: 一部不一致があるもの

平成 24 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
食品中の微生物試験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
小西 良子 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
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の国際的な試験法として ISO 法が示されている。今回、ISO 法で示されている増菌培地である食塩ポリミキシンプイオン、および 3%NaCl 加アルカリペプトン水と、提案法の 2%NaCl 加アルカリペプトン水、また、ISO 法の選択分離培地である TCBS 寒天と TSAT 培地および提案法の酵素基質培地の比較検討を行った。その結果、提案法の増菌培地 2%NaCl 加アルカリペプトン水では、ISO 法と同等あるいはそれ以上の増菌効果が確認できた。また、選択分離培地として、酵素基質培地は ISO 法で採用されている TSAT 培地の代わりに採用できることが明らかになり、TCBS 寒天および酵素基質培地の組み合わせが非常に有効であることが示唆された。

A. 研究目的

食品を対象とした腸炎ビブリオの標準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。そしてこれらの結果を踏まえ、新しい試験法の提案を行った。

一方、食品を対象とした国際的な検査法として ISO 法が示されている。今回提案した新しい方法（提案法）を日本の標準法とするためには ISO 法との比較試験を実施し、腸炎ビブリオの検出率が ISO 法と同等あるいはそれ以上であることを確認する必要がある。そこで今回、ISO 法で示されている

増菌培地である食塩ポリミキシンプイオン、および 3%NaCl 加アルカリペプトン水と、提案法の 2%NaCl 加アルカリペプトン水、ISO 法の選択分離培地である TCBS 寒天と TSAT 培地および提案法の酵素基質培地の比較検討を行った（図 1）。

B. 研究方法

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 1 株（血清型 O3 : K6, V10-48）を供試した。食品は、市販の「あさりのむき身」を用いた。

2. 腸炎ビブリオ接種検体の作製法

「あさりのむき身」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、滅菌生理食塩水で 2 倍希釈後、 10^{-4} 倍希釈（高菌数群）、 10^{-5} 倍希釈（中菌数群）、 10^{-6} 倍希釈（低菌数群）し、希釈した菌液を食品 25 g に $100 \mu\text{L}$ ずつ接種した。接種後 1 時間程度室温で放置し、食品と菌液を馴染ませた後、増菌培地を加えた。1 種類の増菌培養法について、高菌数接種群、中菌数接種群、低菌数接種群、腸炎ビブリオ非接種群各 3 検体の合計 12 検体を供試した。

添加回収実験は、各増菌培地とも 2 回実施した。

3. 腸炎ビブリオ接種菌数測定方法

接種菌数を測定するために、 10^{-6} 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菌液を延ばす程度に軽く塗抹した。接種菌数は、出現した集落数から算出して求めた。

4. 食品からの腸炎ビブリオ検出方法

食品からの腸炎ビブリオ検出方法を図 2 に示した。培地の組成は別紙のとおりである。

1) 増菌培地

増菌培地は、食塩ポリミキシンプイオン（自家製）、2%NaCl 加アルカリペプトン水（自家製）および 3%NaCl 加アルカリペプトン水（自家製）の 3 種類を用いた。腸炎ビブリオを接種した食品に、各増菌培地を 225ml 加え 30 秒間ストマッキング後、 37°C で培養した。培養後、選択分離培地への塗抹は、7~8 時間（短時間培養）および 16

~18 時間（長時間培養）の 2 回実施した。

2) 分離培地

選択分離培地は、糖の分解性を指標とする TCBS 寒天（栄研、極東、日水、Difco）、Triphenyltetrazolium chloride soya trypton agar（TSAT、自家製）および酵素基質培地である CHROMagar Vibrio（関東化学）、ES ビブリオ寒天（栄研）、X-VP 寒天（日水）の 8 種類を用いた。

各増菌培養液を $10 \mu\text{L}$ の白金耳で一定量塗抹分離後、 37°C で 16~18 時間培養し、腸炎ビブリオ様集落を確認した。

C. 研究結果

1. 接種菌数

高菌数接種群の腸炎ビブリオ菌数は食品 1 g 当たり 10^2 個、中菌数接種群では 10^1 個、低菌数接種群では 10^0 個であった。

2. 食品の生菌数

供試した「あさりのむき身」の生菌数は $7.6 \times 10^3/\text{g}$ であった。

3. 腸炎ビブリオ検出状況

1) 食塩ポリミキシンプイオン培養液からの腸炎ビブリオの検出

ISO 法で示されている増菌培地の 1 つである食塩ポリミキシンプイオンで増菌培養後、各選択分離培地に塗抹分離し、腸炎ビブリオの検出を行なった。その結果を表 1 に示した。短時間培養の低菌数接種群では TSAT 培地および酵素基質培地では 6 検体中 5 検体で検出された。一方、TCBS 寒天ではメーカーによる差が認められたものの、6 検体中 0 検体~2 検体の検出であった。

中菌数接種群では TSAT 培地、酵素基質培地および TCBS 寒天（A 社）で 6 検体中 6 検体から検出されたのに対し、TCBS 寒

天 (B 社) では 5 検体, TCBS 寒天 (C, D 社) では検出されなかった。

高菌数接種群でも TSAT 培地, 酵素基質培地, TCBS 寒天 (A, B 社) で全てから検出されたが, TCBS 寒天 (C 社) は 1 件のみ, TCBS 寒天 (D 社) では検出されなかった。

一方, 長時間培養では, 低菌数接種群でいずれの分離培地においても, 6 検体中 5 検体から検出され, 中菌数接種群および高菌数接種群では, いずれの選択分離培地でも 6 検体全てから検出することができた。

2) 2%NaCl 加アルカリペプトン水増菌培養液からの腸炎ビブリオの検出

短時間培養および長時間培養のいずれも, 全ての検体から腸炎ビブリオを検出することが可能であった。(表 2)。

3) 3%NaCl 加アルカリペプトン水増菌培養液からの腸炎ビブリオの検出

短時間培養および長時間培養のいずれも, 全ての検体から腸炎ビブリオを検出することが可能であった。(表 3)。

4) 分離培地上での発育

異なる 3 種類の増菌培地 7~8 時間培養した後, 10 μ L 白金耳で各選択分離培地に塗抹分離し, 出現した集落の写真を示した(写真 1, 2)。

2%および 3%NaCl 加アルカリペプトン水で増菌した場合, 短時間 (7~8 時間) 培養でも十分に腸炎ビブリオが増菌されることが確認できた。

一方, 食塩ポリミキシムイオンで増菌した後の分離平板をみると, アルカリペプトン水で増菌した場合と比較し, 平板上の腸炎ビブリオ菌数は非常に少なかった。このことから, 食塩ポリミキシムイオン短

時間培養では, 腸炎ビブリオを検出できない可能性があることが示唆された。

食塩ポリミキシムイオン長時間 (16~18 時間) 培養では, アルカリペプトン水で増菌した場合と同等の結果であった。

5) 選択分離培地上の腸炎ビブリオ発育状況

ISO 法で示されている選択分離培地である TSAT 培地上の腸炎ビブリオ集落は, 赤色の大きな集落である(写真 2)。しかし, 腸炎ビブリオ以外の菌でも赤色集落を示すことがあるため, 生化学的性状検査は必ず行なう必要がある。酵素基質培地は, それぞれ腸炎ビブリオに特徴的な色調になるため, 腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌との区別がつき易く, 非常に見易い培地であった。

D. 考察

食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法(提案法)が, 国際的にも妥当性のある検査法であるかを確認するために, 国際的な試験法である ISO 法との比較を行なった。その結果, 提案法である 2%NaCl 加アルカリペプトン水で増菌培養した場合は, 短時間培養, 長時間培養ともに腸炎ビブリオの検出率は高かった。ISO 法で示されている 3%NaCl 加アルカリペプトン水で増菌した場合も短時間培養, 長時間培養共に同様の成績であったが, 食塩ポリミキシムイオンで増菌培養した場合の短時間培養では, 低菌数接種群で腸炎ビブリオが検出できない検体が認められた。これらの結果から, 提案法の増菌培地は, ISO 法と同等あるいはそれ以上の増菌効果が確認できた。

ISO 法で示されている選択分離培地は, TCBS 寒天と TSAT 培地である。TCBS 寒

天は、メーカーによって多少の発育差あり、種類によっては腸炎ビブリオ集落がやや小さめの集落を示ことや、微小集落を示す菌が多く発育してしまう等の差が認められた。また糖の分解性を指標としているため、長時間培養では集落の色調が変化してしまうという欠点がある。しかし従来から広く使用されており、安価で入手し易いこと等を考慮して、提案法では使用する選択分離培地の1つとして入れることとした。

一方、TSAT 培地は、日本ではほとんど使用されておらず、また市販品もないため自家調製が基本となることから、提案法からは除くこととした。TSAT 培地に代わる分離平板として、近年各社で開発され使用されている酵素基質培地を採用した。酵素基質培地は、糖の分解性と pH 指示薬の色調変化を指標としていないため、長時間培養しても色調が変化しにくいメリットがある。また目的とする腸炎ビブリオ集落は、各酵素基質培地で特徴的な色調を示すため、他のビブリオ属菌との識別能に非常に優れている。

今回の結果から提案法は、国際的な標準法である ISO 法と同等あるいはそれ以上の検査法であることを確認することができた。今後、複数機関による Collaborative study を実施する予定である。

E. 結論

食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法（提案法）が、国際的にも妥当性のある検査法であるかを確認するために、国際的な試験法である ISO 法との比較を行なった。その結果、提案法の増菌培地は、ISO 法と同等あるいはそれ以上の増菌効果が確認で

きた。

選択分離培地は TCBS 寒天および酵素基質培地の組み合わせが非常に優れていた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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.

H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

《提案法》

《ISO8914法》

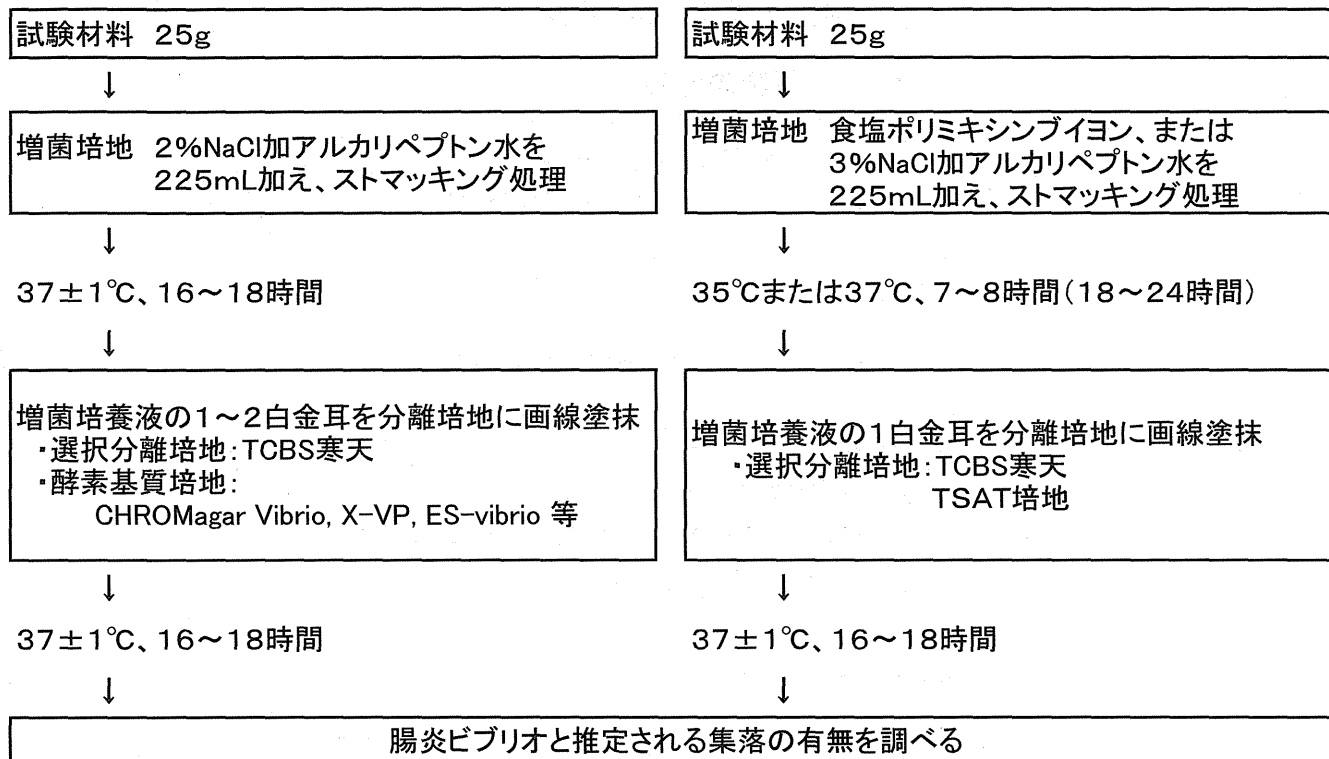


図1. 腸炎ビブリオ試験法(定性法)

食品(あさりのむき身)25g

高菌数接種群(10²/g)
中菌数接種群(10¹/g)
低菌数接種群(10⁰/g)
腸炎ビブリオ非接種群

各3検体

← 増菌培地225ml
食塩ポリミキシムブイオン
2%NaCl加アルカリペプトン水
3%NaCl加アルカリペプトン水

ストマッキング
(30秒)

37°C, ①7~8時間 / ②16~18時間

塗抹培養

(TCBS寒天4種類, TSAT,
CHROMagarVibrio, ES-Vibrio, X-VP)

37°C 16~18時間

腸炎ビブリオ集落の確認

図2. 食品を対象とした腸炎ビブリオ試験法

別紙

● 食塩ポリミキシンブイオン

Peptone	10.0g
Yeast extract	3g
NaCl	20.0g
D.W.	1000ml
	(pH 7.4)

Polymyxin B 100,000 IU を, D.W. 100mlに溶解後, ろ過滅菌して
上記培地 900mlに加える。

● 2%NaCl加アルカリペプトン水 (市販品のアルカリペプトン水「ニッスイ」に, NaClを追加)

Peptone	10.0g
NaCl	20.0g
D.W.	1000ml
	(pH 8.8)

● 3%NaCl加アルカリペプトン水

Peptone	20.0g
NaCl	30.0g
D.W.	1000ml
	(pH 8.6)

● Triphenyltetrazolium chloride soya tryptone agar (TSAT)

Tryptone	15.0g
Soya peptone	5.0g
Sodium chloride	30.0g
Sucrose	20.0g
Bile salt	0.5g
Agar	15.0g
D.W.	1000ml

上記基礎培地に, ろ過滅菌した
1% triphenyltetrazolium chloride solution 3mlを添加する。

表1. 食塩ポリミキシンブイオンで培養後の腸炎ビブリオ検出状況

培養時間	接種菌数*	TSAT	TCBS寒天				酵素基質培地		
			A	B	C	D	CHROM	ES	X-VP
7~8時間	低菌数	5/6**	2/6	0/6	0/6	0/6	5/6	5/6	5/6
	中菌数	6/6	6/6	5/6	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6
	高菌数	6/6	6/6	6/6	1/6	0/6	6/6	6/6	6/6
	未接種	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
16~18時間	低菌数	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6
	中菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	高菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	未接種	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

* 低菌数: 10^0 個/g, 中菌数: 10^1 個/g, 高菌数: 10^2 /g

** 検出数/供試数

表2. 2%NaCl加アルカリペプトン水で培養後の腸炎ビブリオ検出状況

培養時間	接種菌数*	TSAT	TCBS寒天				酵素基質培地		
			A	B	C	D	CHROM	ES	X-VP
7~8時間	低菌数	6/6**	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	中菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	高菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	未接種	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
16~18時間	低菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	中菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	高菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	未接種	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

* 低菌数: 10^0 個/g, 中菌数: 10^1 個/g, 高菌数: 10^2 /g

** 検出数/供試数

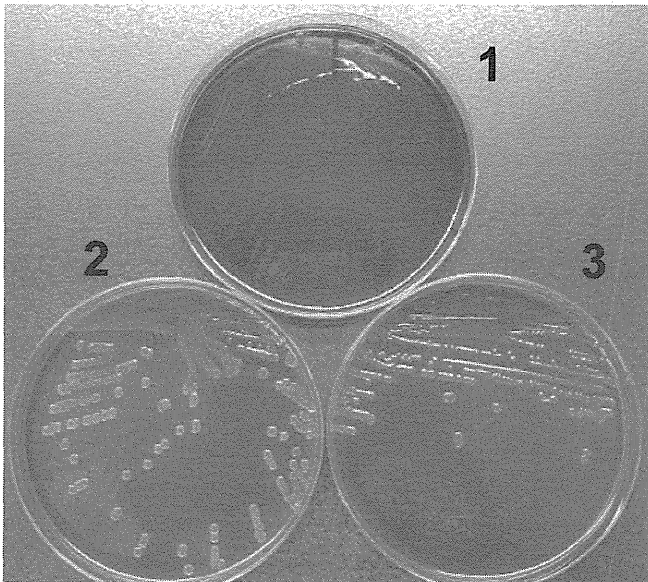
表3. 3%NaCl加アルカリペプトン水で培養後の腸炎ビブリオ検出状況

培養時間	接種菌数	TSAT	TCBS寒天				酵素基質培地		
			A	B	C	D	CHROM	ES	X-VP
7～8時間	低菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	中菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	高菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	未接種	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
16～18時間	低菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	中菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	高菌数	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	未接種	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

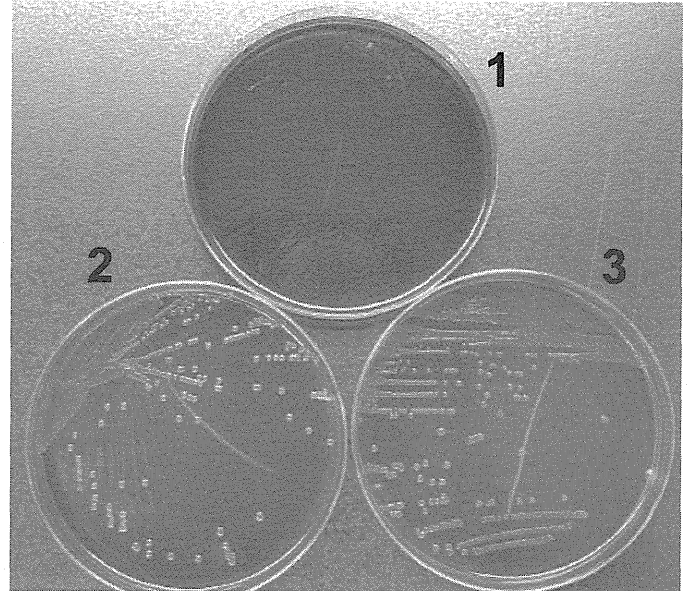
* 低菌数:10⁰個/g, 中菌数:10¹個/g, 高菌数:10²/g

** 検出数/供試数

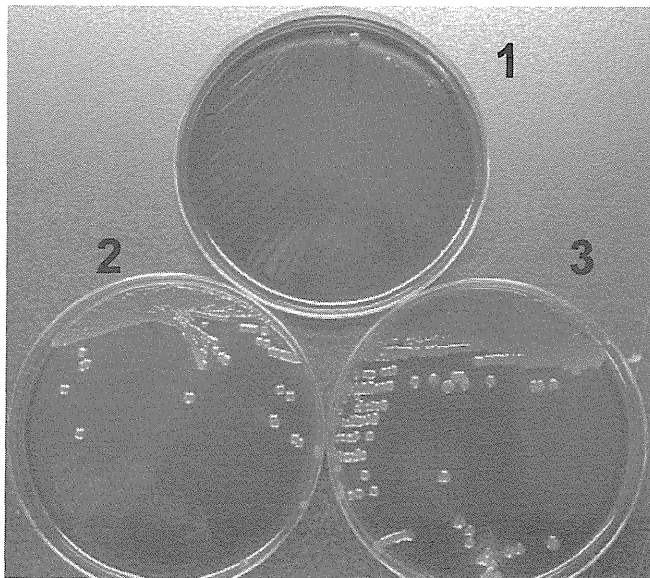
A社



B社



C社



D社

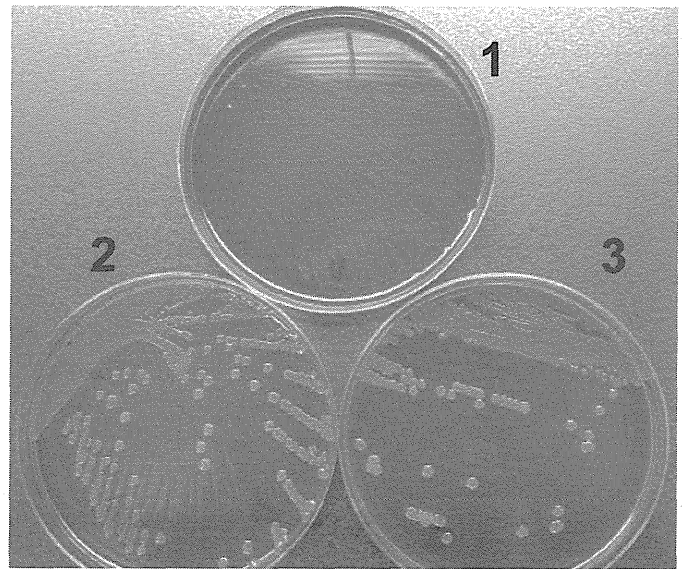
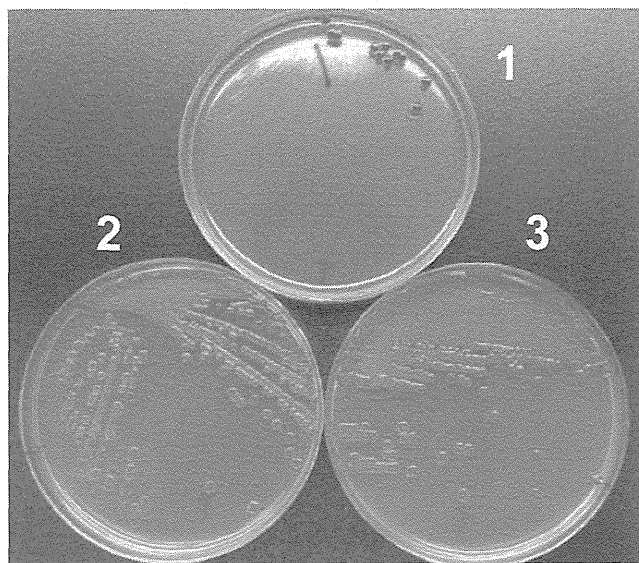


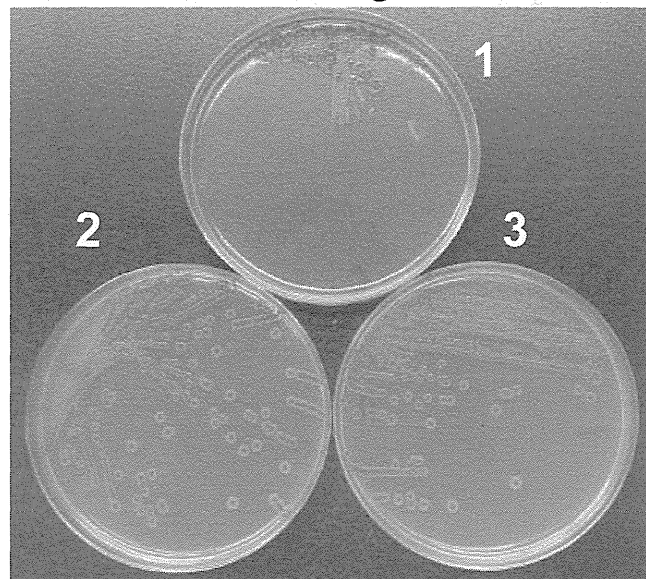
写真1. 増菌培養(7~8時間)後の各分離培地(TCBS寒天)における腸炎ビブリオ検出状況

1. 食塩ポリミキシムブイオン
2. 2%NaCl加アルカリペプトン水
3. 3%NaCl加アルカリペプトン水

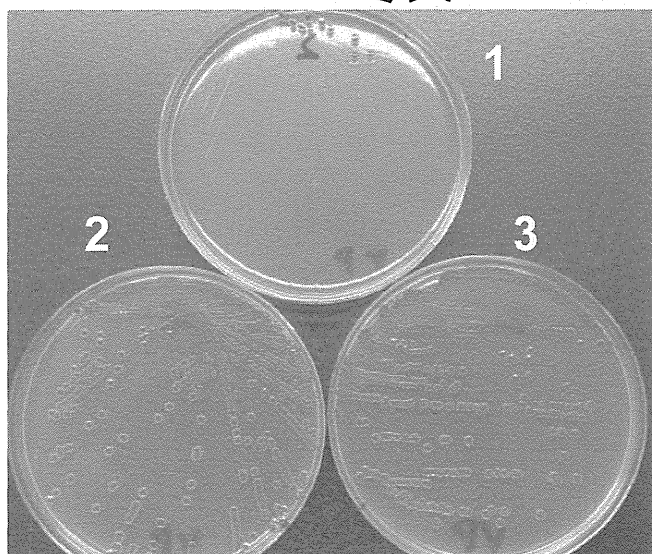
TSAT培地



CHROMagar Vibrio



X-VP寒天



ESビブリオ

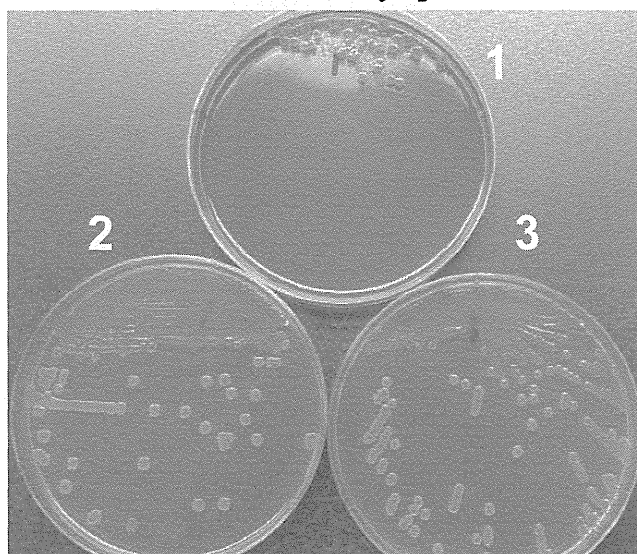


写真2. 増菌培養(7~8時間)後の各分離培地(TSAT寒天, 酵素基質培地)における腸炎ビブリオ検出状況

1. 食塩ポリミキシμβイオン
2. 2%NaCl加アルカリペプトン水
3. 3%NaCl加アルカリペプトン水

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
分担研究報告書

妥当性評価

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 室長
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学研究院 教授

研究要旨

我国の公定法と国際的に認知された参照法とのハーモナイゼーションを図りつつ、主要な菌種について、順次、標準法が開発されている。本研究は、この標準法及びこれを参照法とする代替法の妥当性確認ガイドラインの作成を第一の目的としている。そこで、AOAC:2012.2 版ガイドラインと ISO16140:2003、及びそれらの最新改訂内容を検証した。特に、種々のパラメータの規定に際して、上記の文書間で差異がある場合は、その理由を可能な限り分析した。第二の目的は、少数生菌標準物質のその場調製法の開発である。前年度に引き続き適用可能株数が 16 に増加した。また、標準汚染食品の調製などへの応用展開の可能性を示した。これによって国内外の微生物試験法妥当性確認における技術的ボトルネックを解決できる可能性がある。

A. 研究目的

我国における微生物試験法の公定法は、必ずしも国際的に認知された参照法となっていない。そのため我国の公定法、AOAC 法、ISO 法などの比較調査結果に基づき、国際的ハーモナイズした標準試験法を、主要な菌種ごとに順次開発しつつある。それに伴って、開発した標準法のみならず、それを参照法とする簡便迅速法（代替法と総称）の妥当性確認が必要となる。すでに、妥当性確認の具体的プロトコールについては、AOAC と ISO からそれぞれ AOAC: 2012.2 版ガイドライン、ISO16140: 2003、及びそれらの最新改訂文書が出されているが、種々の点で異なっている。本研究は、そうした差異の根拠を出来るだけ詳しく分析し、合理的なガイドライン作成の基盤を作ることを第一の目的としている。

一方、妥当性確認において、従来からボトルネックとなっていた生菌標準物質については、昨年度、セルソーターを利用するその場調製法が有効であるとの見

通しを得ていた。本研究は、その成果を発展させ、適用可能な菌種を増加することによって、一般的な方法としての要件を精査すること、さらに標準汚染食品調製などへの適用の可能性を検証することを第二の目的としている。

B. 研究方法

(1) AOAC、ISO 文書の相違点の精査

2012 年 2 月に公開された AOAC のガイドラインには、それまでのガイドラインに比べて、いくつかの重要な変更点があった。昨年度の報告書では、その主な点につき、取りあえず結果のみを記すに留めた。しかし、ガイドラインを作成するに当たっては、それらの変更が「何故か？」ということを理解することが、不可欠である。すなわち具体的数値が AOAC と ISO で、微妙に、あるいは明確に異なる場合に、どちらの値を採るべきか、より合理的な判断をしなければならないからである。同様の問題は、AOAC と ISO との間ばかりでなく、我国におい

て公定法として使われてきた試験法との間でも同様に起こる問題である。そこで、以下の「研究結果」においては、AOAC2012 版と ISO16140 を比較して、主な相違点の「何故か？」について論述した。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

昨年度報告した、セルソーターを利用する、少数生菌標準物質のその場調製法の適用範囲を広げるための実験を行った。

(イ) 菌株

標準菌株として、昨年度実施した 10 株に、さらに 6 株を加えた。

- ・ *Escherichia coli* K-12 (NBRC 3301)
- ・ *Escherichia coli* ATCC 8739
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC 12689)
- ・ *Bacillus subtilis* (NBRC 3009)
- ・ *Klebsiella pneumoniae* (NBRC3318)
- ・ *Enterobacter aerogenes* (NBRC 12010)
- ・ *Staphylococcus aureus* (NBRC 102135)
- ・ *Escherichia coli* O126 (isolate from food)
- ・ *Micrococcus luteus* (NBRC 12708)
- ・ *Enterobacter cloacae* (isolate from food)
- ・ *Enterobacter agglomerans* (isolate from food)
- ・ *Citrobacter freundii* (isolate from food)
- ・ *Morganella morganii* (provided by T. Fujii)
- ・ *Escherichia coli* AW539 (obtained from Nagoya University)
- ・ *Campylobacter jejuni* (National Institute of Health Sciences)
- ・ *Campylobacter coli* (National Institute of Health Sciences)

(ロ) 生菌識別用蛍光色素

生菌を死菌と区別して染色する蛍光色素には、その原理の違いによって数種類あるが、色素の安定性や蛍光強度の観点から最適なものとして、カルボキシフルオレッセインジアセテート (CFDA) を

選定した。生細胞のみが細胞内エステラーゼ活性を保持している、という性質に基づいている。

(ハ) セルソーター : Aria (BD)

専用オートステージを設置して、通常の円形プレート (86mm^φ) の寒天培地上に、等間隔で 10×10 の位置に自動的に滴下するための専用プレートアダプター、及び、複数のプレートに同時にソーティングするためのアダプターを作製した。

(ニ) 培地

生菌であることの証明はコロニーの形成である。セルソーターで分配される単一細胞を受ける培地として、Tryptic soy agar (TSA)を用いた。

C. 研究結果

(1) AOAC、ISO 文書の相違点の分析結果

(イ) 標的菌の定義

試験法の議論で最初に決めるべき項目である。例えば「*Salmonella* sp.」、「*E. coli* O157」、・・・などのように、何の菌種を対象にする試験法であるかを明確に定義しなければならない。この項目では、検出すべき菌種と検出してはいけない菌種の仕切りを厳密に規定しなければならない。

例えば、サルモネラ試験法では硫化水素産生菌のみを検出すればよし、としていた試験法と、硫化水素非産生菌も含めて検出しなければならないとする試験法では、プロトコルが異なる。因みに、標準法検討委員会で開発してきたサルモネラ試験法(NIHSJ-01)は、当初から硫化水素非産生菌も検出する試験法として作成された。硫化水素非産生菌も含める理由は、頻度は低いもののそうした菌が事故を起こす例があったからである。すなわち試験法作成の目的は、その標的菌による食中毒事故があったからである。

事故例では食品の種類も具体的に示されるので、妥当性確認に際して、どの食品を選ぶかは当にこの事故例に即して決めるのが妥当な考えである。実際、AOACでもISOでも、食品マトリクスと菌種の組合せ例を明示しているのは、そうした背景からである。このことから、我国特有の食品マトリクスでの事故が起こった、あるいは起こる可能性が高い、というものがあれば、妥当性確認ではその食品を是非加えなければならない。

菌種の側も、実際に事故の原因となった菌種を含んでいなければならない。新たに性質が違う菌種あるいは亜種に因る事故が発生すれば、直ちに、その菌を検出できる試験法になっていなければならないので、直ちに試験法改訂が要請されることになる。

標的とする菌種を含め、どの程度の類縁菌までを検出できるか、という概念が「包含性 Inclusivity」である。逆に、類縁菌といえども、検出されてはいけない菌種は何か、という概念を「排他性 Exclusivity」という。この2つの特性は定性試験でも定量試験でも実施するように記載されている。ここで議論すべき点は、その場合の菌濃度である。

ISOでは定性試験では「10 times to 100 times greater than the minimum relative detection level of the alternative method」、定量試験では「more than 100 times the limit of detection」となっている。ここで、「limit of detection (LOD)」はきちんと定義されている(図1(1))。すなわち、 $LOD = Average(blank) + z \times s_0(blank)$ 、で $z = 2 \times 1.645$ 。これに対して、「relative detection level」とは「一点の濃度」ではなくて、50%検出率となるような濃度を含む適当な「濃度範囲」である。したがって、その「minimum」であれば、検出確率が50%より若干下回るような濃度ということになる。そのような曖昧な濃度を基準にして、さらに10~100倍以上

の濃度、ということになるので、結局100×LODよりも大きいのか小さいのか、直ちには判断できない。

ISOの定性試験では、次のステップで相対精確さ、相対感度、相対特異性を調べることになっているが、その場合の各試料の菌濃度に関して、「50%陽性率となるような」濃度が望ましいとしている。したがって、ISOではこの「50%陽性率となるような」濃度の方が違和感がないのかも知れない。しかし、実際に試験を行う場合には、この濃度を確かめるためには十分な予備試験をしなければならないことは、容易に理解されよう。一方、定量試験でのLODも、やはり十分な予備試験によって確認しておかなければならない、という点ではおなじであるが、概念はRelative detection levelより明確である。

この点に関して、AOACでは定性試験に対して100×LOD₅₀と規定している。ここでLOD₅₀は検出確率50%と定義されている。ISOのRelative detection levelと同じような概念であるが、「濃度範囲」ではなく、きちっと陽性率50%となるような「濃度」のことである。AOACでは定量試験でも全く同じ濃度100×LOD₅₀と規定している。

以上、基準となる濃度のことを詳しく述べてきたが、最終的に実施する際の濃度は検出率100%となるような十分高い濃度であるので、それを考えると単に「検出率95%以上が得られるような十分高い濃度」と規定しておけばよいようにも思われる。

(ロ) 食品マトリクスの適用範囲

試験法を適用できる食品の範囲は、従来、ISO16140のAnnex Bの分類表に従って規定された。最大5つのカテゴリーの食品で確認すれば、全ての食品に対して「妥当性確認済」として認める内容であった。無数にある食品のすべてについて

確認することが不可能に近いとの考えから、ある程度整理された形であり、実用的には妥当な考え方であると思われた。しかし、実験的に確認できていない食品に対して「確認済」とすることは、やはり問題であろう。それ故、従来から「Matrix extension」といって絶えず議論されてきたわけである。

これに対して AOAC2012 版では、この「Matrix extension」は一切認めない方針を出した。すなわち、適用しようとする食品については全て、単一試験所での妥当性確認 (Single laboratory validation; SLV) の段階で確認しておくこととしている。その上で、共同試験 (Collaborative study; CS) では 1 種以上の食品について確認することとしている。そして、最初の 1 種類を選ぶのも、それ以外のどの食品を何種類選ぶのかも、AOAC International 本部から任命された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、としている。こうした専門家による判断が必須としている点は、重要な点である。すなわち、我国のガイドラインを作成する場合に、この点については我が国自身のそうした専門家の組織が必要であることを意味している。

食品の分類に関しては、2013 年に入ってから、AOAC から新しい分類表が公開された。それによると、従来の分類よりも生か熱処理したものか、というような処理方法と組み合わせた分類となっている (図 2 (1))。処理方法の違いは従来「食品タイプ」としていたが、タイプの種類によっては、タイプの異なるものは食品のカテゴリーとしても全く別物、という考え方が強くなったと考えられる。同時に、食品タイプの分類自体についても、以前よりきめ細かい分類になっている (図 2 (2))。Matrix extension を認めなくなったことで、それならば、どこまでが「同一の食品マトリクス」とみなせるのか、ということが問題になるはずで、

その議論の結果がこうした分類の見直しになったと思われる。

こうしたことを背景に、我国におけるガイドラインに対しては、我国独特の食品を考慮した分類表を新たに作成することが必要であろう。

(ハ) 定性試験における菌濃度の種類

ISO では LOD を基準として 2~4 レベル+blank の濃度での実施を規定している (図 3 (1))。これに対して AOAC では検出確率 (Probability of detection; POD) の概念が示されており (図 1 (2))、POD = 0、0.25~0.75、1.0 の濃度で実施するように規定している。濃度の具体的値としては LOD に基づいて決めるよりは比較的狭い範囲の値に収まるような気がする。

そのことを反映してか、AOAC2012 版には、POD=0.25~0.75 (原文では fractional POD range となっているが、文脈から 0.25~0.75 とした) となるような菌濃度として 0.2~2 cfu/test portion、POD=1.00 となるような菌濃度として、約 5 cfu/test portion と具体的な数値を記載している。なお、test portion がどの程度の容量かは記載していないが、1~5 mL 程度と考えておけばよからう。

(ニ) 定量試験における菌濃度の種類

定量試験では AOAC でも、ISO 同様、LOD を基準とした濃度設定となっており、以前と変わらない (図 3 (2))。定性試験で導入された POD の考え方が、何故定量試験には適用されないのか。理解に苦しむのはこのような点である。敢えて推察するならば、定性試験では、結果が陽性か陰性か、という二値の結果で判断するので、設定される菌濃度はできる限り厳密に定義することが重要であろう、それに対して、定量試験では、ある濃度範囲で、例えば直線性を調べたりするので、個々の濃度が多少変動しても、全体