

35. ISO法については定性法・定量法を記載し、ISOの番号を入れる。著作権の問題があり、概要しか示していないが、すべてを公開できない理由についても表示しておく。
36. 将来、プロトコールの英訳版をwebで公開し海外からも閲覧できるようにする。
37. バリデーション・衛生指標菌合同作業部会では、試験法のバリデーションのチェックをしている。また、「第三者認証機関で承認された検査キットのリスト」は合同作業部会でデータベース化した。
38. 次回の開催は、来年2月を予定している。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 47 回議事録概要案(2014.2.24)

1. 委員長より挨拶。
2. 2013 年 12 月 9 日にご逝去された田中廣行委員のご冥福をお祈りするため、黙とうを捧げた。
3. 行政から、本委員会で策定したサルモネラ属菌試験法および黄色ブドウ球菌試験法は、食品安全委員会でのリスク評価後に通知として出す予定で進める予定と報告があった。
4. 配布資料と第 46 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 46 回議事録概要案の確認を行い、2 カ所の確認と修正後、承認された。

腸炎ビブリオ試験法コラボ結果について (ST3)

5. 欠席の甲斐委員に代り五十君委員長より、腸炎ビブリオ試験のコラボスタディ結果の報告が行われた。
6. コラボスタディは、冷凍あさりのむき身に高濃度、中濃度、低濃度で菌を接種し、選択分離培地の同等性を評価した。
7. 今回配付した資料は、二回行われたコラボ試験のそれぞれの結果の集計表である。
8. 一回目と二回目の集計表の結果をバリデーション作業部会（松岡委員）が取りまとめ、LOD₅₀を算出する。
9. 集計表のみでも明らかに選択分離培地の同等性に明白な違いが認められないことが確認できるので、ステージ 4 へ移行しても問題はない。
10. ステージ 3 では、標準的な培地組成を示しているが、ステージ 4 の最終案の培地組成の表記については、各メーカーの培地組成について比較確認する。
11. カンピロバクターコラボスタディの接種菌数は、高濃度群、低濃度群とも理論値ではなく接種菌数を記載しているので、作業部会に中濃度群と低濃度群の菌数値の算出方法について確認し、次回の委員会で報告していただく。
12. 腸炎ビブリオの定義については、他の試験法の表記に合わせて記載する。
13. ステージ 3 の 1.試験法の「・・・上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または酵素基質培地に塗抹し、」をステージ 4 では、「・・・上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または TCBS 寒天培地と同等以上の性能確認された酵素基質培地に塗抹し、」に修正し、同等性が確認されたものは、TSAT、CHROMagar vibrio、X-VP、ES vibrio である旨を記載する。
14. 今回のコラボ結果は、投稿論文にまとめ公開する予定で検討する。
15. 培地の同等性評価には、どのくらいのデータ出しが必要かについて、今後バリデーション作業部会で検討する。
16. 培地に添加する塩化ナトリウムの濃度について、0%および 8%加えたものと記載している箇所の 0%を削除する。
17. 1~2%と記載している箇所と、2%と記載している箇所があるので、統一する。
18. 次回の検討委員会で、ステージ 4 最終案を確認する。

クロノバクター属菌試験法について (ST3)

19. 岡田委員より、クロノバクター属菌試験法のミニラボ試験の結果が示された。
20. 再分類されたクロノバクター属を対象とした試験法は未だないので、ISO/TS22964を採用し、LOD50の確認をシングルラボ2箇所で行った。
21. 検体が調製粉乳のため、低濃度の接種菌数を POD0.25-0.75 の範囲に調製するのは難しかった。
22. AOAC のガイドラインに沿ってデータを検討した。
23. 今回の検討では、試料として用いた調製粉乳から一般生菌は認められなかった。
24. 接種菌量の中濃度群の表記について、測定値なのか理論値なのかを確認し、25g 当たりの菌量の表記にする。
25. 次回、ISO 和訳版の表現及び語句をチェックをしたプロトコル案を示し、ステージ4として検討する。

妥当性評価に係わる微生物試験法の標準品について

26. 松岡委員より妥当性評価に係わる微生物試験法の標準品について報告があった。
27. セルソーターを用い、生菌 100 個以下を培地に添加する方法を検討した論文が Journal of AOAC に採択された。
28. これに関連したテーマが、9月に開催される AOAC のサイエンスセッションシンポジウムの議題に採択されたことが報告された。
29. 本方法を用いることにより、培地の性能比較が可能になることが期待され、バリデーション時に活用することが期待される。
30. バリデーション時、どのような形でセルソーターを使用するか、今後の検討課題になる。

セレウリド試験法

31. セレウリド試験法については、鎌田委員が作成し、松田先生と森委員に確認していただいた原案を ST1 として公開する予定である。
32. セレウス菌嘔吐毒素 (セレウリド) を検出する質量分析計が現在使用できない状況のため、次回以降に検討する。

ウェルシュ菌試験法

33. ウェルシュ菌試験法について、伊藤委員より、コラボスタディ案を検討中との説明があった。
34. 試験結果より、ISO 法で使用されている TSC 寒天培地よりも、国内でよく使用されているカナマイシン加卵黄 CW 寒天培地の方が、夾雑菌や損傷菌に対して選択性が強いことが示された。
35. 国際ハーモナイゼーションを尊重し、ISO 法を採用しても問題がないので、まずは、食品に接種した場合の TSC 寒天培地とカナマイシン加卵黄 CW 寒天培地の同等性

評価を行い、その後、策定すべき試験法の方向性について検討する。

36. 検体の希釈水について問い合わせがあるが、検討委員会では緩衝ペプトン水 (BPW) に統一しており、ビブリオ試験法は例外で、BPW に食塩を添加している。

その他、事務連絡等

37. 田中委員が検討していた酵素基質培地による大腸菌試験法については、バリデーシ
ョン・衛生指標菌合同作業部会で森委員と齋藤委員に引き継いで検討を行う。
38. 研究班としては最終年度なので、次の研究班が立ち上がれば、検討委員会を再開す
る。

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
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
	鈴木穂高	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	百瀬愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	吉田朋高	一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC

研究要旨

クロノバクター属菌は2008年の再分類により *Enterobacter sakazakii* から *Cronobacter* spp. に変更され、現在7菌種3亜種が存在している。本菌による人の感染症は未熟児等の髄膜炎、敗血症及び壊死性腸炎を主な症状とし、その原因食品として知られている乳児用調製粉乳にはCodex委員会による微生物規格が定められている。現在日本国内では、食品から本菌を検出するための告示法、通知法等が定められていないため、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。本研究では本菌の標準試験法としてISO/TS22964法を中心に検討を行っており、人工的に *C. sakazakii* を接種した乳児用調製粉乳からの検出による検討試験法の50%検出限界値（LOD50）の算出を行った。その結果、LOD50値は0.505-0.634CFU/25gであることが示された。また、クロノバクター属菌の各菌種における病原性の差異について検討を行った。

A. 研究目的

従来 *Enterobacter sakazakii* とされていたクロノバクター属菌は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. condimenti* 及び *C. universalis* の7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。各菌種の病原性の差異はまだ明らかとなっていない。本菌感染症はこれまでに、未熟児等の新生児や成人に髄膜炎や敗血症、壊死性腸炎を引き起こした例が報告されている。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。

現在、国内では本菌の公的試験法は制定されておらず、本研究班において平成 23 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。その結果、国内で入手可能な培地の性能に大きな差がないこと、クロノバクター属菌の一部の種は現行の ISO 法での培養が抑制される傾向があること並びに増殖制御要因を明らかにした。今年度は、人工的に *C. sakazakii* を接種した乳児用調製粉乳からの検出による 50% 検出限界値 (LOD50) の算出を行った。

B. 研究方法

1) ミニコラボ試験による ISO/TS22964 (2006) における LOD50 値の算出

ISO/TS22964 (2006) における LOD50 値の算出するためのミニコロボ試験は、2 か所の試験機関において AOAC International のシングルラボバリデーションのガイドラインに則って実施した。別添 1 にその概要を示す。試験機関 1 において、乳児用調製粉乳 25g を滅菌ストマッカー袋に分封し、人工的に *C. sakazakii* ATCC29544 株を 3 種類の菌濃度群に設定し、各 50 μ l を接種した。接種後は各ストマッカー袋を 2 分間手でよく揉み、菌液が粉乳内で塊を形成しないようにした。各検体はコロボ試験実施時の輸送時間を想定し、72 時間の冷蔵後 (試験機関 2 への輸送時間を

含む) に、ISO/TS22964 (2006) による定性的試験を実施した。接種菌濃度は高濃度、中濃度、低濃度及び未接種の 4 段階を設定し、高濃度は 10¹CFU/25g、中濃度は 1CFU/25g、低濃度は 0.1CFU/25g の接種レベルを目標とした。検体数は、高濃度及び未接種は 5 検体、中濃度及び低濃度は 20 検体を用いた。前増菌培地には Buffered peptone water (BPW・メルク) を用い、増菌培地には mLST/vancomycin 培地 (オキシド) を用いた。選択分離培地にはクロモカルトエンテロバクターサカザキ寒天培地 (メルク) と XM-sakazakii 寒天平板 (日水) を用い、44°C で培養後の平板上の定型集落の有無により判定した。LOD50 値の算出は、AOAC International のウェブサイトより入手した計算シートを用いて行った。また、乳児用調製粉乳の細菌汚染状況を調べるため、前増菌培養後に一部検体を Trypticase soy agar (TSA) 平板に塗布し、37°C 18 時間培養を行った。

2) 2 機関によるミニコロボ試験結果の統計解析

2 機関で実施したミニコロボ試験の試験結果について、試験室間に有意な差が見られたかを検定するため、一元配置分散分析を行った。

3) クロノバクター属菌標準菌株を用いた病原性評価

昨年度の本研究で、クロノバクター属菌の一部の種において ISO/TS22964 の培養条件での増殖が抑制される傾向にあることが明らかにされたため、クロノバクター属菌の標準菌株 5 菌種 3 亜種について、病原性の比較検討

を行った。菌株は *C. sakazakii* ATCC29544 株、*C. muytjensii* ATCC51329 株、*C. turicensis* DSM18703 株、*C. malonaticus* DSM18702 株、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468 株及び *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* DSM18706 株の 7 菌株を用いた。

病原性試験は、自家繁殖のスナネズミ WGB のオス 3 か月齢に、ラット用ゾンデを用いて各菌株を 0.5ml 経口投与し、投与後 3 日目に安楽死後腸間膜リンパ節を摘出し、全量を滅菌生理食塩水に懸濁して 2 枚の TSA 平板に塗布した。平板を 37°C 24 時間培養後、形成された集落数を計数した。

C. 研究結果

1) ミニコラボ試験による ISO/TS22964 (2006) における LOD50 値の算出

2 試験機関におけるミニコロボ試験結果を表 1 に示した。各レベルの接種菌数は、高濃度が検体 25g 当たり 38CFU、中濃度が 2.8CFU、低濃度が 0.4CFU であった。高濃度接種群における試験結果は両試験機関で 5 検体中 5 検体陽性 (100%) であった。中濃度接種群では 1 試験機関で 20 検体中 16 検体陽性 (80%)、他方で 20 検体中 14 検体陽性 (70%) であり、平均 75% となった。低濃度接種群では両試験機関とも 20 検体中 1 検体陽性 (0.5%) で、未接種群では両機関とも 5 検体全てが陰性であった。AOAC Intertional の計算シートを用いて算出した LOD50 値は、試験機関 1 では 0.634、試験機関 2 では 0.505 となり、両試験機関の合計の成績では 0.567 となった。また、今回の試験の POD50 は 2.8CFU/25g で 70-80% であることが示された。試験成績の

プロットからは、本試験方法の分離成績が直線ではなく、極端な S 字状カーブを示すことが明らかとなった (図 2)。

使用した乳児用調製粉乳中の細菌汚染状況を調べるために、BPW による前増菌培養終了後の培養液を各濃度について 2 検体ずつ TSA 平板に塗布したところ、人工的に接種した *C. sakazakii* 以外の菌株の発育は見られなかった。

2) 2 機関によるミニコロボ試験結果の統計解析

ミニコロボ試験結果について、2 か所の試験機関の間で試験成績に差があったか否かを検定するため、2 か所の試験結果が同一でなかった中濃度の結果について一元配置分散分析を行った。その結果、試験機関間の成績に有意な差は見られなかった (別添 2)。

3) クロノバクター属菌各菌種の病原性評価
スナネズミ腸間膜リンパ節から回収された菌数は、昨年度の本研究で他のクロノバクター属菌よりも ISO/TS22964 での増殖性が低かった *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* においても他の菌種と同様であり、スナネズミの体内移行性に差がないことが示された (表 2)。

D. 考察

クロノバクター試験法作業部会では一昨年度より、国際的に整合性のある食品からの *Cronobacter* spp. 試験法として ISO/TS22964 法を基礎とした国内標準試験法原案を作成し、諸条件の検討を行ってきた。その結果、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が、食品からの *Cronobacter* 属菌の近縁他種からの分離同定には有効であった。また、*Cronobacter* 属菌各菌種間の病原性に差がない可能性が示された。また、ISO 法の改訂に携わる海外の研究者より、今後の改訂が当面行われないと情報が得られた。以上から、ISO/TS22964 を基にした NIHSJ-22 を現時点での国内標準試験法として設定していくことを「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に提案し、その LOD50 値が乳児用調製粉乳検体 25g 当たり 0.505-0.634CFU であることを示した。将来的に ISO 法が新分類に合わせて改定された場合には、国内標準試験法についても見直しが必要になると思われる。

E. 結論

一昨年度より、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・検討するとともに、ISO 法改訂についての情報を収集した結果、現時点での国内標準試験法として NIHSJ-22 を提案し、その乳児用調製粉乳から LOD50 値を 0.505-0.634CFU /25g とした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

Y. Okada, H. Suzuki, H. Ogihara, S. Monden, Y. Momose, N. Fukuda, S. Igimi

Characterization of Growth and Pathogenicities of *Cronobacter sakazakii* and Related Species. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013)

Y. Okada, H. Suzuki, H. Ogihara, S. Monden, Y. Momose, N. Fukuda, S. Igimi

Pathogenicity Determination of *Cronobacter* spp. The 3rd Asia Pacific International Conference on Food Safety

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 謝辞

本研究のデータ解析についてご協力いただいた東京農工大学工学部松岡英明教授をはじめとする本研究班バリデーション作業部会の皆様に深謝いたします。

別添 1. クロノバクター属菌 ミニコラボ試験概要

目的：ISO/TS22964 法 (*Enterobacter sakazakii* の検出法) における Level of Detection of 50% (LOD₅₀) の算出

参加施設：日本大学生物資源科学部、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

使用菌株：*Cronobacter sakazakii* ATCC29554

使用検体：乳児用調製粉乳 各 25g

接種菌量：①高濃度 38 CFU/25g

②中間濃度 2.8 CFU/25g

③低濃度 0.4 CFU/25g

④未接種

実施数(1施設あたり)：①高濃度 5 検体

②中間濃度 20 検体

③低濃度 20 検体

④未接種 5 検体

試験内容：

①粉乳 25g をストマッカー袋に秤量し、菌液 50 μ l を接種後、手で袋を 2 分間揉む

②5°C に保管または冷蔵状態で輸送

③72 時間後に試験開始

④各ストマッカー袋に BPW225ml を加え、1 分間ストマッキング後、37°C 18 時間培養

⑤増菌培地 10ml に前増菌液 100 μ l を接種し、44°C 24 時間培養

⑥選択分離培地に 10 μ l をコンラージ棒で塗布

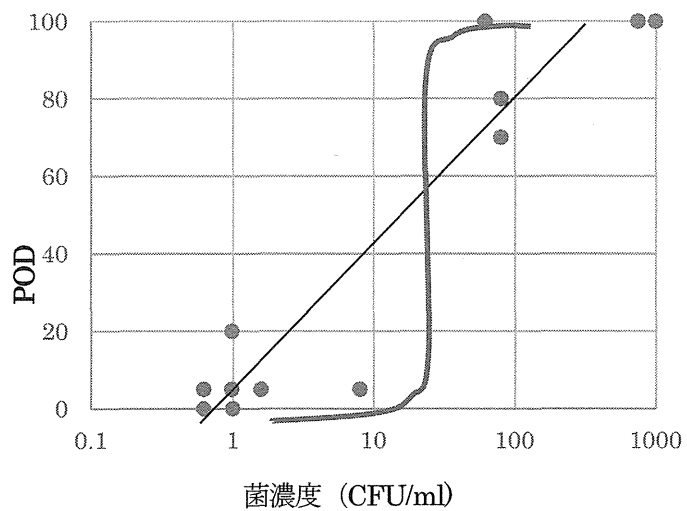
⑦44°C 24 時間培養

⑧発育の有無で陽性/陰性の判定

表 1. ミニコロボ試験結果及び LOD50 値

接種レベル	菌数濃度 (CFU/25g)	陽性検体数/試験検体数 (%)		
		試験機関1	試験機関2	合計
高濃度	38.00	5/5(100)	5/5(100)	10/10(100)
中間濃度	2.80	16/20(80)	14/20(70)	30/40(75)
低濃度	0.40	1/20(5)	1/20(5)	2/40(5)
LOD50 値		0.643	0.505	0.567

図1. ミニラボ試験観測値のプロット図 (東京農工大学 松岡英明教授 作成)



別添 2. ミニラボ試験結果の一元配置分散分析結果

$\alpha=0.05$

2-1. 結果の集計

菌数濃度 (CFU/25g)	検体数	陽性検体数		
		試験機関 1	試験機関 2	合計
38	5	5	5	10
2.8	20	16	14	30
0.4	20	1	1	2

2-2. 概要

グループ	標本数	合計	平均	分散
列 1	3	22	7.33333333	60.3333333
列 2	3	20	6.66666667	44.3333333

2-3. 分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	0.666667	1	0.66666667	0.01273885	0.915574	7.708647
グループ内	209.3333	4	52.3333333			
合計	210	5				

2-4. 結果

観測された分散比 F 境界値
 0.012738854 < 7.70864742 ⇒ 有意差なし

表2. スナネズミにおける *Cronobacter* spp.各菌種の病原性

腸間膜リンパ 節への移行	菌種							
	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. dublinensis</i> supsp. <i>dublinensis</i>	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C.</i> <i>malonaticus</i>	<i>C. turisensis</i>	<i>C. muytjensii</i>
+	5	10	9	3	7	4	3	8
-	5	0	1	6	3	4	6	1

平成 25 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

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の標準試験法を作成することを目的として、15 検査機関で腸炎ビブリオの検出を試み、提案法の評価を行った（コラボレイティブ・スタディ）。今回のコラボレイティブ・スタディでは、食品 25 g 中腸炎ビブリオ菌数が 10 個台であれば 100%検出することができた。また接種菌数を少なくすると検出率も低下した。

今回使用した分離平板は、糖の分解性を指標とした培地（2 種類）と酵素基質培地（3 種類）の 5 種類であった。それぞれ抑制力や目的とする菌の色調に特徴があるため、糖の分解性を指標とした培地と酵素基質培地との併用が望ましいと考えられた。

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ことを目的として、これまでに増菌培地や確認培地等に添加する食塩濃度、培養温度、培養時間、また選択分離培地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（提案法）。

一方、食品を対象とした国際的な試験法として ISO 法が示されている。提案法を日本の標準法とするためには ISO 法と同等あるいはそれ以上の精度であることを確認する必要がある。前年度は、提案法と ISO 法で腸炎ビブリオ検出率の比較実験を行った。

その結果、提案法での腸炎ビブリオ検出率は ISO 法と同等、あるいは同等以上であることが確認できた。今年度は、模擬検体を用いて複数検査機関で腸炎ビブリオの検出を試み、提案法の評価を行った（コラボレイティブ・スタディ）。

B. 研究方法

1. 検査実施機関

地方衛生研究所をはじめとした食品検査実施機関合計 15 箇所で検査を 2 回に分けて実施した。第 1 回目は 2013 年 12 月 16 日～20 日、第 2 回目は 2014 年 1 月 20～24 日に実施した。

2. 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, V12-10) を供試した。食品は、市販の「あさりのむき身 (冷凍品)」を用いた。

3. 模擬検体の作製法

「あさりのむき身」は、解凍後、流水で 1 回洗浄して滅菌済みストマッカー袋に 25 g ずつ秤量した。

食品へ接種するための腸炎ビブリオは、2%NaCl 加アルカリペプトン水で 2 回継代培養後、滅菌生理食塩水で 10^{-6} 倍希釈 (高菌数群), 10^{-7} 倍希釈 (中菌数群), 10^{-7} 倍希釈液をさらに 2 倍希釈 (低菌数群) し、食品 25 g にそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつ接種し、模擬検体を作製した。

4. 検体の送付

1 検査機関につき、高菌数群、中菌数群、低菌数群および未接種群を各 4 検体ずつ、合計 16 検体を送付した。ストマッカー袋に入れた模擬検体は、さらにバイオパウチ袋に入れ、発砲スチロールの容器に冷媒、温度記録計と共に梱包、ジュラルミンケースに入れて各検査機関へ送付した (写真 1)。

5. 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} 倍希釈液、 10^{-7} 倍希釈液および 10^{-7} 倍希釈液をさらに 2 倍希釈した菌液を、3%NaCl 加普通寒天培地に $100 \mu\text{l}$ ずつ各 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。

6. 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 1 に示した。

1) 増菌培地

増菌培地は、2%NaCl 加アルカリペプトン水 (栄研化学) を用いた。ストマッカー袋に入れた模擬検体 (腸炎ビブリオを接種した食品) に、増菌培地を 225ml 加え 30 秒間ストマッキングし、 37°C で 16~18 時間培養後、選択分離培地に塗抹した。

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 (栄研化学), ISO 法で使っている 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 (栄研化学), X-VP 寒天 (日水) の 5 種類を用いた。

各増菌培養液を白金耳 ($10 \mu\text{l}$) 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について確認培地 (2% NaCl 加 TSI 寒天, 2%NaCl 加 LIM 培地, 0%NaCl 加ペプトン水) に接種し、腸炎ビブリオであることを確認した。

C. 研究結果

1. 接種菌数

「あさりのむき身」25 g に接種した腸炎ビブリオ菌数は、高菌数接種群で 20.4 個および 14.4 個、中菌数接種群では 2.0 個および 1.3 個、低菌数接種群では 1.4 個および 1.0 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 1 回目 3.2×10^3 個 /g, 2 回目は 300 個以下 /g であった。

3. 検体搬送時の温度変化

検体搬送時の温度記録計を解析した結果、全ての施設において、検体送付から到着時

の梱包開封時までの間は 10℃以下に保たれていた。

4. 腸炎ビブリオ検出状況

1) 第 1 回目コラボレイティブ・スタディ
15 施設で実施したコラボレイティブ・スタディの実施結果を表 1 に示した。菌数接種群別に腸炎ビブリオ陽性検体数および陽性率をみると、高菌数接種群は 60 検体中 60 検体 (100%)、中菌数接種群 51 検体 (85%)、低菌数接種群 31 検体 (51.7%)、未接種群 0 検体であった。

分離培地により検出率に差が認められたのは 1 施設のみであり、15 施設中 14 施設は、腸炎ビブリオ陽性検体であれば、いずれの分離培地からも検出されていた。1 施設では、高菌数接種群 2 検体で分離培地による差が認められた。すなわち、TSAT 寒天培地で腸炎ビブリオ陰性が 1 検体、CHROMagarVibrio で陰性が 2 検体であった。(表 2)。

2) 第 2 回目コラボレイティブ・スタディ
菌数接種群別に腸炎ビブリオ陽性検体数および陽性率をみると、高菌数接種群は 60 検体中 60 検体 (100%)、中菌数接種群 47 検体 (78.3%)、低菌数接種群 31 検体 (51.7%)、未接種群 0 検体であった。

分離培地による検出率の差が認められたのは 1 施設のみであり、高菌数接種群の TSAT 寒天のみが、腸炎ビブリオ陰性であった(表 3)。尚、分離培地による検出率に差が認められた各 1 施設は、1 回目と 2 回目でそれぞれ異なっていた。

D. 考察

今回、食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を確立するために、15 施設でコラ

ボレイティブ・スタディを実施した。高菌数を接種した群では、いずれの回も 100% の検出率、未接種群では検出されなかった。中菌数接種群の検出率は 85% および 78.3%、低菌数接種群の検出率は、いずれも 51.7% であった。提案法では、食品 25 g 中に腸炎ビブリオが 10 個台存在すれば 100% 検出できることが明らかとなった。

分離培地別検出状況をみると TCBS 寒天、X-VP 寒天、ES ビブリオ寒天はいずれの菌量でも腸炎ビブリオの検出が可能であった。

一方、TSAT 寒天および CHROMagarVibrio では、高菌数接種群で分離できなかった検体が各 2 検体ずつ認められた。これは TSAT 寒天および CHROMagarVibrio の抑制力が弱く、腸炎ビブリオ以外の菌が多く発育してしまったためと考えられた。今回使用した分離培地では X-VP 寒天の抑制が最も強く、微小な集落はまったく発育しなかった。

提案法に関するコラボレイティブ・スタディ参加機関からの意見で多かったのは、培地の選択性が実感できたということであった。また、分離平板へ塗抹した後の培養時間について、16~18 時間培養では勤務時間外になってしまうため、プログラムインキュベーターが必要であるとの指摘があった。作業手順として、塗抹分離した平板を室温に置いておき、夕方から培養すること等も考える必要がある。

E. 結論

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、複数機関で検査を実施し提案法の評価を行った。今回のコラボレイティブ・スタディでは、食品 25 g 中腸

炎ビブリオ菌数が10個台であれば100%検出することができた。また接種菌数を少なくすると検出率も低下した。

今回使用した分離平板は、糖の分解性を指標とした培地（2種類）と酵素基質培地（3種類）の5種類であった。それぞれ抑制力や目的とする菌の色調に特徴があるため、糖の分解性を指標とした培地と酵素基質培地との併用が望ましいと考えられた。

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（2）.第47回腸炎ビブリオシンポジウム，広島県，2013.11.

H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

写真. 検体の送付方法



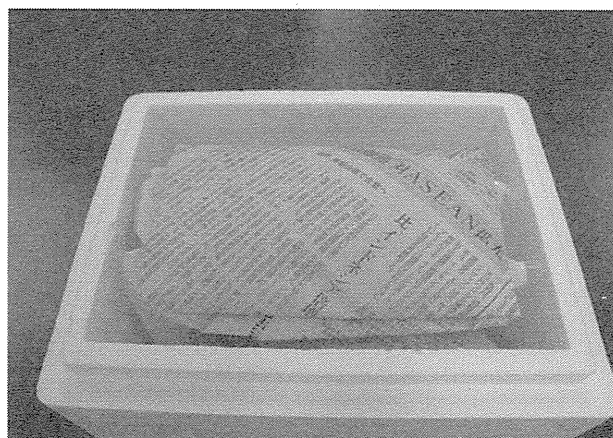
- ① バイオパウチに食品検体(25g×8袋)を入れてシールする。



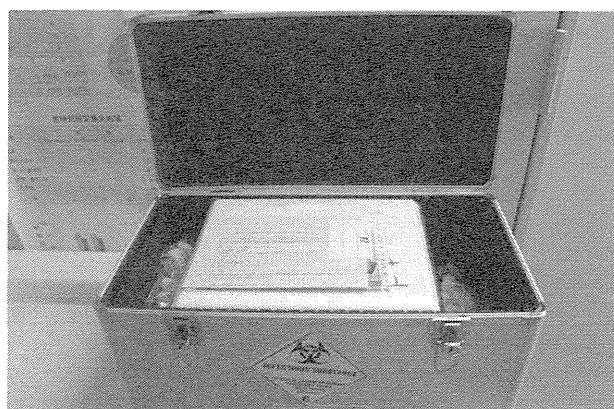
- ② バイオパウチ2袋(8検体×2袋)を発泡スチロール箱に入れ、両サイド面に冷媒を入れる。



- ③ バイオパウチ袋の間に温度記録計を入れる。



- ④ 更に上にも冷媒を入れる。



- ⑤ 検体の入った発砲スチロールをジュラルミンケースに入れて送付。

図1. 腸炎ビブリオ試験法・定性法(コラボレイティブ・スタディ用)

供試食品 : あさりのむき身

菌株 : 1株(血清型O3:K6, TDH産生株)

接種菌数 : 高濃度(101オーダー/25g) × 4検体
中濃度(101オーダー/25g) × 4検体
低濃度(10-1オーダー/25g) × 4検体
未接種 × 4検体 } 16検体 × 2回実施

方法

模擬検体(食品25g)



増菌培地 2%NaCl加アルカリペプトン水 225ml 添加
スタマッキング処理



37°C±1°C, 16~18時間



増菌培養液の1~2白金耳を分離培地に画線塗抹

- ・選択分離培地: TCBS寒天, TSAT寒天
- ・酵素基質培地: CHROMagar Vibrio, X-VP, ES vibrio,



37°C±1°C, 16~18時間



腸炎ビブリオと推定される集落について生化学的性状試験

- ・2%NaCl加TSI寒天
- ・2%NaCl加LIM培地
- ・0%NaCl加ペプトン水

表1 . 新しい腸炎ビブリオ検査法のためのコロレイティブ・スタディ実施結果

	接種菌数	供試数	施設数	
			V.p 陽性(%)	V.p 陰性(%)
1回目	高菌数	60	60 (100)	0 (0)
	中菌数	60	51 (85)	9 (15)
	低菌数	60	31 (51.7)	29 (48.3)
	未接種	60	0 (0)	60 (100)
2回目	高菌数	60	60 (100)	0 (0)
	中菌数	60	47 (78.3)	13 (21.7)
	低菌数	60	31 (51.7)	29 (48.3)
	未接種	60	0 (0)	60 (100)

検査実施 : 15施設
 高菌数接種群: 10¹個 /25g
 中菌数接種群: 10⁰個 /25g
 低菌数接種群: 10⁰個 / 25g

表2. 分離培地別検出状況(1回目)

接種菌数	陽性数	V.p検出数(%)				
		TCBS	TSAT	CHROMagar	X-VP	ES vibrio
高菌数	60	60 (100)	59 (98.3)	58 (96.7)	60 (100)	60 (100)
中菌数	51	51 (100)	51 (100)	51 (100)	51 (100)	51 (100)
低菌数	31	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)

表3. 分離培地別検出状況(2回目)

接種菌数	陽性数	V.p検出数(%)				
		TCBS	TSAT	CHROMagar	X-VP	ES vibrio
高菌数	60	60 (100)	59 (98.3)	60 (100)	60 (100)	60 (100)
中菌数	47	47 (100)	47 (100)	47 (100)	47 (100)	47 (100)
低菌数	31	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)