

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ラボ試験は、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  $\mu$ 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。各検体はミニラ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 10<sup>1</sup>CFU/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 (オキシイド) 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 機関によるミニラボ試験結果の統計解析

2 機関で実施したミニラ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. mytjensii* 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ラボ試験結果を表 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 機関によるミニラボ試験結果の統計解析

ミニラ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ナル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% (LOD<sub>50</sub>) 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施設当たり)：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  $\mu$  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  $\mu$  l を接種し、44°C 24 時間培養

⑥選択分離培地に 10  $\mu$  l をコンラージ棒で塗布

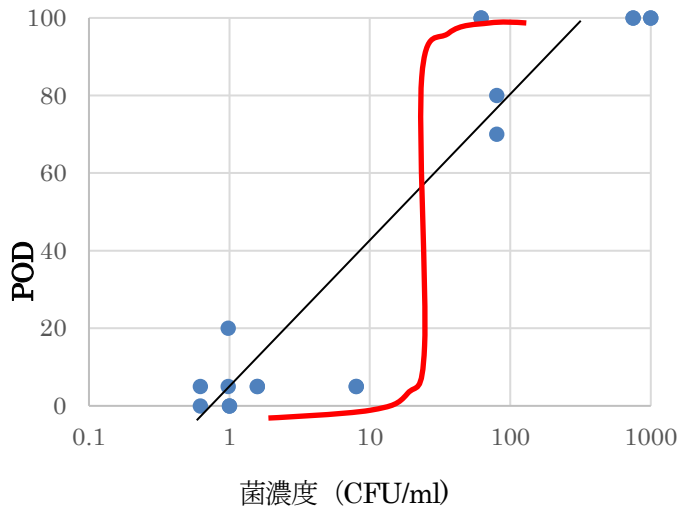
⑦44°C 24 時間培養

⑧発育の有無で陽性/陰性の判定

表 1. ミニラボ試験結果及び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