

201327008B

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23 - 25年度 総合研究報告書

(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26 (2014) 年3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23-25年度 総合研究報告書

(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26(2014)年3月

目 次

I. 平成 23-25 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	9
II. 分担研究報告書	
1. <i>Cronobacter</i> spp.の標準試験法に関する研究	13
荻原博和、岡田由美子	
2. 腸炎ビブリオ試験法	23
甲斐明美	
3. 衛生指標菌試験法に関する研究	35
伊豫田淳	
日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会	
4. 試験法の妥当性確認に関する研究	63
松岡英明	
III. 論文別刷等	81

平成 23-25 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

総合研究報告書

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、統一した方向性をもって、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 20 数名からなる“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 23 年度は、原案作成から作業部会案の検討（ステージ 1～2）、平成 24 年度は、作業部会案の作成からコラボ案の検討（ステージ 2～3）、平成 25 年度は、コラボ案の作成と検討および最終試験法の検討（ステージ 3～4）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ールなどを参考に検討を進め、ガイドライン原案を作成した。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、試験法を策定した、その成果は原著論文として発表した。ウェルシュ菌試験法については、作業部会案の検討まで進めることができた。

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
工藤由起子：国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部
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

A. 研究目的

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ール作成を行う。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、これ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適切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 23 年度は、原案作成から作業部会案の検討（ステージ 1～2）、平成 24 年度は、作業部会案の作成からコラボ案の検討（ステージ 2～3）、平成 25 年度は、コラボ案の作成と検討および最終試験法の検討（ステー

ジ 3～4）を行った。これに対応し“標準試験法検討委員会”は平成 23 年度に 5 回、平成 24 年度に 5 回、平成 25 年度に 5 回の合計 15 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ールなどを参考とし検討し、ガイドライン原案を作成した。

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 25 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。また、特定非営利活動法人食の安全を確保するための微生物検査協議会が中心となって進めるウェルシュ菌試験法については、原案から作業部会案作成の検討を行った。

C. 研究結果

食品微生物の専門家 20 数名で構成する“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、その試験法案の作成を行った。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ールの作成は、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、工藤、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各年度に5～6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、バリデーションガイドライン原案を作成した。

標準試験法検討委員会の事務局は、五十君が担当し、各年度23名の専門家委員と2名の行政官で構成した。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、本報告書に資料として示した。

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。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、コラボ案から最終試験法策定を行った。また、ウェルシュ菌試験法については、外部の研究班からの

協力依頼があり、検討を行った。原案から作業部会案作成の検討を行った。

腸炎ビブリオ試験法作業部会（甲斐、工藤、小西担当）は、作業部会案を基にコラボ案の検討とコラボ試験、最終試験法策定まで行った。腸炎ビブリオ標準試験法は、現在の公定法を基に検討した。試験法の検討は、ISO法との比較を行い、あさりのむき身を用いてコラボ試験を行った。

衛生指標菌作業部会（伊豫田、五十君担当）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、バリデーションガイドライン原案を作成した。

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標準試験法を策定した。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

当性確認ガイドライン原案をまとめた。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

1. Saito E, Yoshida N, Kawano J, Shimizu A, Igimi S. Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw fish in relation with culture methods. J. Vet. Med. Sci 73(3):287-292. (2011)
2. 五十君静信。食品微生物迅速検出法の近況と課題。ジャパンプードサイエンス。2011年4月号(2011)
3. 五十君静信。リステリア・モノサイトゲネスの微生物基準とその試験法。月刊フードケミカル、2011年No.7:67-70。(2011)
4. 五十君静信。生食用食肉の規格基準と腸内細菌科菌群試験法。食品衛生研究。61巻12月号:15-20。(2011)
5. 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)
6. 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)
7. 五十君静信。病原微生物のリスクプロファイルから数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)
8. 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)
9. 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)。
10. 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: 49-51 (2013).
11. 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 Int. 96:991-997. (2013)
12. Matsuoka H, Nakano K, Takatani N, Yoshida T, Igimi S, Saito M. Flow cytometric method for in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. J AOAC Int. 97(2):479-483. (2014)
13. 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～生食用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)

学会発表

1. 五十君静信。損傷菌のVNCと再活性化。第84回日本生化学会大会。2011.9(京都)
2. 百瀬愛佳、江川智哉、岡田由美子、朝倉宏、春日文子、五十君静信。食品からのサルモネラ属菌標準試験法：NIHSJ-01法とISO 6579:2002の同等性確認。日本食品衛生学会。2011.9(秋田)

3. 五十君静信。標準試験法導入により食品の微生物検査はどのようにかわるのか。第32回日本食品微生物学会学術総会。2011.10(東京)
4. 五十君静信。生食肉の規格基準とその科学的背景。日本防菌防黴学会微生物制御研究部会公開講座。2012.2(名古屋)
5. Shigeki Yamamoto, Fumiko Kasuga, Shizunobu Igimi, Hiroshi Asakura. New Standard for raw meat in Japan. (日本の生肉に対する新基準). 11th International symposium on toxic microorganisms, "Risk Control and Food Safety", UJNR. 2012.3. Tokyo
6. 五十君静信。カンピロバクター検出のための標準試験法の検討。日本細菌学会技術講習会“話題微生物の分離・同定法と最新事情”。2012.3(長崎)
7. 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.
8. 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
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. 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)
14. 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.
15. 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
16. 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
17. 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)
18. Matsuoka H. Global thinking of validation in Japan. Korea Food and

- Drug Administration Symposium: Establishing System of Microbiological Testing Procedures, Cheongwon, Korea. 2013. 4.
19. 吉田智紀, 高谷周督, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明。保存安定性を考慮した生菌標準物質の調製。AOAC インターナショナルジャパンセクション総会。2013. 6
20. 高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明。少数生菌汚染標準食品の調製。AOAC インターナショナルジャパンセクション総会。2013. 6.
21. 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). 2013. 7.
22. Hideaki Matsuoka, Tomonori Yoshida, Norimasa Takatani, Mikako Saito, Shizunobu Igimi. In Situ Preparation of Standard Material of Viable Single-cells for Innovative Validation of Microbiological Methods. 127th AOAC Annual Meeting and Exposition, Chicago. 2013. 8.
23. 松岡英明: 微生物分析法の妥当性確認におけるボトルネック—生菌標準物質。JASIS コンファレンス、幕張 2013. 9.
24. 福田典子, 藤原翠, 伊東悠志, 石塚理恵, 荻原博和, 五十君静信。各種食品における *Cronobacter* spp. の汚染実態。食品微生物学会。2013. 9.
25. 吉田智紀、高谷周督、Alvin Mariogani、斉藤美佳子、五十君静信、松岡英明: 生菌標準物質の保存安定性。第 40 回日本防菌防黴学会年次大会。2013. 9.
26. 高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明: FACS を利用した生菌ソーティング法による標準低汚染飲料の調製条件の検討。第 40 回日本防菌防黴学会年次大会。2013. 9.
27. Yumiko Okada, Hodaka Suzuki, Hirokazu Ogihara, Shuko Monden, Yoshika Momose, Noriko Fukuda, Shizunobu Igimi. Pathogenicity Determination of *Cronobacter* spp. The 3rd Asia Pacific International Conference on Food Safety (Taipei, Taiwan) 2013. 10.
28. 多田 敦子、杉本 直樹、伊藤 裕才、秋山 卓美、五十君 静信、山崎 壮、穂山 浩。増粘安定剤の食品添加物公定書微生物限度試験法の検討。第 50 回全国衛生化学技術協議会年会。2013. 11.
29. 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.
30. 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, and Igimi S. Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1 1: 2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: Collaborative study. UJNR-48th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting. 2014. 1. Tokyo
- 講演・研修会等
1. 五十君静信: グローバルな食品群の

期限表示設定のための微生物試験法に係わる諸問題。Ifia Japan 2011 食の安全・科学フォーラム第10回セミナー。2011.5（東京）

2. 五十君静信。試験検査の重要性と検査方法の国際的整合性について。生食用食肉の規格・基準と検査に関する講習会。2011.11（東京）
3. 五十君静信。食品中の微生物標準試験法の検討とその目指すもの。平成23年度食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者等研修会。2011.11（東京）
4. 五十君静信。生食肉の基準に取り上げられた Enterobacteriaceae（腸内細菌科菌群）試験法－その背景と試験法解説－。食の安全を確保するための微生物検査協議会。2011.11（東京）
5. 318. 五十君静信。微生物のリスクプロファイルについて、数的指標を導入した規格基準の解説と平成24年度のトピックス。平成24年度 HACCP 指導者養成研修会。2013.3.
6. 五十君静信。数的指標の考え方に基づく規格基準策定に於いてどのような科学的データのサポートが求められたか。フードフォーラムつくば。2013.4
7. Igimi S. Collaborative study for validation of the *Campylobacter* detection method from chicken. Meeting with Ministry of Food and Drug Safety of Korea. 2013.4.
8. 五十君静信。生食用食肉の微生物基準の背景とリステリアの微生物基準の策定状況について。埼玉県・さいたま市・川越市合同研修会。2013.8.
9. 五十君静信。生食肉の微生物規準の背景と基準のもたらしたもの。平成25年度静岡市環境保健研究所技術講演会。2013.9.
10. 五十君静信。食品衛生における国際ハーモナイゼーションの重要性。日

本食品工業倶楽部品質保証懇話会。2013.11.

11. 五十君静信。食品に関わる規格基準の現状解説と、HACCP（工程管理）の重要性。第38回沖縄県食肉衛生技術研修会。2014.2.
12. 五十君静信。魚肉練り製品の成分規格－微生物規格の背景、検査方法の現状及び今後の動向－。第四回魚肉ねり製品の成分規格に関する勉強会。2014.2.
13. 五十君静信。今後の微生物試験法を行う上での妥当性確認の重要性と進め方。食品産業戦略研究所教育セミナー。2014.2.
14. 五十君静信。微生物のリスクプロファイルについて－数的指標を導入した規格基準の解説と平成25年度のトピックス－。平成25年度第1回 HACCP 指導者養成研修会。2014.3.

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23-25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
	工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
	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
	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

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
	工藤 由起子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
	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
	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

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	一般財団法人日本食品分析センター
	吉田信一郎	一般財団法人日本食品分析センター
	森 曜子	公益財団法人日本適合性認定協会
	田中 誠	一般財団法人日本冷凍食品検査協会
	齋藤 利江	一般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・ビ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
	矢野健太郎	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（平成 23-24 年度）
	五十君 静信	国衛研・食品衛生管理部（平成 25 年度）
副委員長	小西 良子	国衛研・衛生微生物部（平成 23-24 年度）
	寺嶋 淳	国衛研・衛生微生物部（平成 25 年度）
事務局	五十君 静信	国衛研・食品衛生管理部（平成 23-24 年度）
	岡田 由美子	国衛研・食品衛生管理部（平成 25 年度）
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）
	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	岩手大学
	工藤 由起子	国衛研・衛生微生物部
	小久保彌太郎	公益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	一般財団法人日本冷凍食品検査協会（作業部会）
	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）	
吉田 信一郎	一般財団法人日本冷凍食品検査協会（作業部会）	
行政から	浦上 憲治	厚労省・基準審査課
	新谷 英樹	厚労省・基準審査課
	仲川 玲	厚労省・基準審査課
	松岡 隆介	厚労省・監視安全課
	三木 朗	厚労省・監視安全課
	梅田 浩史	厚労省・監視安全課

平成 23-25 年度 食品からの微生物標準試験法検討委員会開催状況

第 33 回検討委員会： 2011 年 6 月 2 日

第 34 回検討委員会： 2011 年 9 月 13 日

第 35 回検討委員会： 2011 年 10 月 31 日

第 36 回検討委員会： 2011 年 11 月 22 日

第 37 回検討委員会： 2012 年 2 月 9 日

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

第 43 回検討委員会： 2013 年 6 月 18 日

第 44 回検討委員会： 2013 年 7 月 31 日

第 45 回検討委員会： 2013 年 10 月 16 日

第 46 回検討委員会： 2013 年 12 月 5 日

第 47 回検討委員会： 2014 年 2 月 24 日

厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総合分担研究報告書

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
	門田修子	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

Cronobacter spp. は、従来 *Enterobacter sakazakii* と呼ばれていたグラム陰性菌で、現在は *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter* 属の 7 菌種 3 亜種が存在している。本菌は乾燥に強く、粉乳や乾燥野菜、小麦粉等から分離される。健康成人に疾病を起こすことはまれだと考えられているが、未熟児等の新生児が暴露した場合には、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。その感染源は主に乳児用調製粉乳が疑われ、それについて Codex 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公的試験法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中の *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、初年度に国際的に用いられている本菌の試験法を比較検討し、国内での標準試験法を定めるにあたって必要となる事項を検討した。その結果、*Cronobacter* spp. の標準試験法として ISO 法を中心に検討していくこととし、その過程において幾つかの問題点を明らかにした。次年度には、標準菌株及び研究室保有菌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。最終年度には、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検討試験法の 50% 検出限界値 (LOD50) の算出を行い、0.505-0.634CFU/25 g であることを示した。また、*Cronobacter* spp. 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

2008 年に学術的に再分類され、*Enterobacter sakazakii* から *Cronobacter* spp. に変更されたクロノバクター属には、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これまで明らかになっていない。*Cronobacter* spp. が健康成人に疾病を起こすことはまれだが、未熟児等の新生児が暴露した場合には、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、小麦粉等から分離され、乳児感染症の主な感染源としては、乳児用調製粉乳が疑われている。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が求められており、その証明を行う試験法として International Standard Organization (ISO) が定める試験法 (ISO/TS22964:2006) を用いることとしている。現在、国際的に用いられている乳児用調製粉乳からの本菌の試験法としては、他にアメリカ合衆国の Food and Drug Administration (FDA) による BAM 法があり、PCR 法によるスクリーニング法が取り入れられている。

現在、日本国内で流通している乳児用調製粉乳は全て国内メーカーにより製造されたもので、その製造工程を厚生労働省が把握しており、衛生管理が十分なされていると考えられる。また、現在国内では主に乳業メーカーの自主管理としてアメリカの公定法である BAM 法が採用されている。しかしながら、将来的に海外から当該食品が輸入される事態を想定し、国際的試験法と互換性のある標準的 *Cronobacter* spp. 試験法を作成する必要がある。本研究の初年度には、国際的に用いられている *Cronobacter* spp. 試験法について ISO/TS22964 を中心に検討した。次年度は初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。最終年度は、本試験法の検出感度を明らかにする目的で、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。また、*Cronobacter* spp. の標準菌株の病原性について比較検討を行った。

B. 研究方法

(1) 国際的試験法の検討

ISO/TS22964 (2006 年) と BAM 法 (2002 年) について、全文を逐語訳した。微生物試験に関連した専門用語の翻訳は、本研究班の別の分担研究である「バリデーション作業部会」による用語集に則って行った。その内容を比較検討し、ISO/TS22964 に基づいた試験法について食品からの微生物検査標準試験法検討委員会におけるステージ 1 としての提案を行った。

(2) 酵素基質培地の比較検討

分担研究機関 2 か所において、ISO/TS22964 に基づき、*Cronobacter* spp. の標準菌株、研究室保有の食品分離株及び *Enterobacteriaceae* に属する菌株で *Cronobacter* spp. 以外のものを用い、現在入手可能な *Cronobacter* 用の酵素基質培地 5 種 (平成 23 年度報告書表 8) について性能比較を行い、同時に非選択培地である Trypticase Soy Agar (以下 TSA, Difco) 平板へも接種を行った。

比較試験の詳細については、平成 23 年度報告書図 1 に示した。

前増菌培地である TSB ブイヨンから増菌培地である mLST/vancomycin プロスへ接種した際に、660nm での吸光度を測定、記録し、44°C での 24 時間の増菌培養後にも同様に測定することで、

各菌株の増殖の程度を推定し、段階希釈の希釈度を決定した。酵素基質培地の培養は基本的に44℃で実施し、メーカーの指定する培養温度範囲に44℃を含まない1種の培地（平成23年度報告書表1から7の⑤）のみ、37℃で培養した。

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

（2）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℃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℃・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. malonaticus* DSM18702 株、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468 株も用いた。

（4）ISO/TS22964（2006）の増殖制御要因の検討

平成24年度報告書別添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. の標準菌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及び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℃で24時間、二代継代培養後に各組成の培地に100μl接種し、44℃もしくは37℃にて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。

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製し、増殖を抑制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℃で24時間、二代継代培養後に各NaCl濃度のLST-vancomycin培地に100μl接種し、44℃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°C 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°C 24 時間後に集落数を計測した。

(5) 研究室保有菌株の再分類

初年度 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 菌株について、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。

(6) 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 か所の分担研究実施機関において 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。平成 25 年度報告書別添 1 にその概要を示した。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 TSA 平板に塗布し、37°C 18 時間培養を行った。

(7) 2 機関によるミニコロボ試験結果の統計解析

平成 25 年度に 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。

(8) クロノバクター属菌標準菌株を用いた病原性評価

平成 24 年度の研究で、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) 国際的試験法の検討

ISO/TS22964 (2006 年) と BAM 法 (2002 年) について作成した逐語訳を、平成 23 年度報告書別添 1 及び 2 に示した。その内容について比較検討し、国際的な標準試験法である ISO 法に基づいたステージ 1 の試験法について、食品からの微生物検査標準試験法検討委員会に提案した。また、2008 年の微生物学的な再分類に伴い、2006 年に作成された ISO/TS22964 が近い将来に改正される可能性が高いことを踏まえ、ISO 法改正時には国内の標準試験法も見直しをすることとした。

(2) 酵素基質培地の比較検討

分担研究機関 A での比較検討結果を平成 23 年度報告書表 1、2、3 及び 4 に示した。*Cronobacter* spp. の標準菌株 9 株を用いた酵素基質培地の比較検討試験では、各菌株の菌数は、5 種の酵素基質培地間で大きな差は見られなかった (平成 23 年度報告書表 1)。しかしながら、菌株間の菌数差がある程度観察され、*C. dublinensis* の 3 亜種、特に *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* の菌数が低いことが示された。また、食品から分離された *C. sakazakii* 29 菌株を用いた比較検討試験においても、各菌株の菌数は 5 種の酵素基質培地間で

大きな差は見られず、4 菌株ですべての培地において菌数が低い傾向がみられた (平成 23 年度報告書表 2)。食品から分離された *C. mytjensii* 9 株についても同様の結果がみられ、1 菌株ですべての培地において菌数が低い傾向がみられた (平成 23 年度報告書表 3)。*Cronobacter* spp. 以外の腸内細菌科に属する菌 22 種 30 株を用いた酵素基質培地の比較検討試験では、すべての株で *Cronobacter* spp. 用の酵素基質培地上での増殖が見られない、あるいは弱い増殖のみ見られる結果を示した (平成 23 年度報告書表 4)。しかしながら、他方の試験機関で実施した同様の試験の結果では、標準菌株 10 株のうち *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* が増菌培地中での濁度が上昇せず、5 種の酵素基質培地及び非選択培地である TSA 上での菌数が少ない結果がみられた (平成 23 年度報告書表 5)。また、*Enterobacter sakazakii* として提供されている標準菌株 3 株のうち 1 菌株については、3 種の酵素基質培地及び TSA 上で少ない菌数を示し、2 種の酵素基質培地上では集落形成が見られなかった。*Enterobacter sakazakii* として提供されている標準菌株 3 株のうち別の 1 菌株については、2 種の酵素基質培地及び TSA 上では他の菌株と同様の増殖を示したが、3 種の酵素基質培地上では集落形成が見られなかった。食品から分離された *Cronobacter* spp. 20 菌株を用いた比較検討試験においては、そのうち 10 菌株の菌数は 5 種の酵素基質培地間及び TSA 上で大きな差は見られなかった (平成 23 年度報告書表 6)。しかしながら、他の 10 株においては集落形成が見られない培地があり、集落を形成している培地上においても菌数が少ない結果を示していた。これらの菌株については、増菌培養後の菌液に濁度の上昇がほとんど見られなかった。

Cronobacter spp. 以外の *Enterobacteriaceae* の、酵素基質培地上での増殖は、全ての菌でいずれかの培地上で見られたが、典型集落と鑑別困難な集落を形成するものは少なく、④の培地でのみ見られた（平成 23 年度報告書表 7）。

（3）ISO/TS22964 に基づく *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* 標準菌株の増殖性の検討
初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菌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（平成 24 年度報告書表 1 及び 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、インキュベータ内での培養方法に違いが見られることが判明した。この結果はインキュベータ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る、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。

（4）ISO/TS22964 の増殖制御要因の検討

①増菌培地の組成の検討

（3）の結果を受け、ISO/TS22964 が新分類における標準菌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（平成 24 年度報告書表 3）。一方、37℃の培養においては同菌株の増殖抑制は 44℃の時よりは軽微であった（平成 24 年度報告書表 4）。一方、バンコマイシン添加の有無はこれらの菌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 菌株の全てにおいて 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（平成 24 年度報告書表 5）。

③増菌時の培養温度の検討

Cronobacter spp. の標準菌株 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（平成 24 年度報告書表 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.