

Lausannensis JCM16469 株の 3 株であったが、増殖への影響は軽微であった。

(5) 研究室保有菌株の再分類

初年度 ISO/TS22964 に基づく試験法の検討に使用した旧分類による研究室保有 *E. sakazakii* 20 菌株について、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 (平成 24 年度報告書表 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°C 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 菌株見られた。

(6) 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平成 25 年度報告書表 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。中濃度接種群では一方の試験機関で 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、それぞれ 0.634、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 (平成 25 年度報告書図 1)。

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。

(7) 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 (平成 25 年度報告書別添 2)。

(8) 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、平成 24 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。

D. 考察

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、現在入手可能な酵素基質培地の同等性について、標準菌株、食品由来株及び近縁菌の純培養菌を用いた接種試験を実施し、検討した。その結果、大半の標準菌株については 5 種の酵素基質培地上での発育に大きな差は認められなかったが、*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、食品由来株については、ISO 法に基づいて分離された試験機関の菌株は全て、5 種の酵素基質培地で良好な発育を示したものの、腸内細菌科菌群の分離法に基づいて分離された試験機関の菌株では、半数が ISO 法の増菌条件での増殖が低下していた。

そのため、次年度にそれらの株の分類学的再検討を行ったところ、2008 年の新分類以前に分離された研究室保有菌株の内、本試験法で増殖しなかった菌株の多くが *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* 属菌標準菌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。しかしながら、ISO 法改訂についての情報を収集した結果、当面改定の見込みがないことが明らかとなったため、今回作成した試験法を NIHSJ-22 として国内標準試験法にすることを「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に提案した。その乳児用調製粉乳から LOD50 値を算出し、0.505-0.634CFU/25g とした。また、*Cronobacter* 属菌の菌種間に実験動物の体内への移行性に差が見られなかったことから、これらの菌種に病原性の差がない可能性が示された。今後 ISO 法が改訂され、新分類の *Cronobacter* 属菌試験法となった際には、国内標準試験法についても見直しを行う必要があると思われる。

E. 結論

国際的に互換性のある食品からの

Cronobacter spp. 試験法として、2006 年に策定された *E. sakazakii* の試験法である ISO/TS22964 を基礎とした標準試験法案を作成した。現在入手可能な酵素基質培地の性能について検討した結果、基本的に培地間の差は認められなかった。また、新分類で *Cronobacter* 属菌に属さない研究室保有株の増殖が抑制され、本試験法が他菌との分離性能に優れていることが示された。一方で、一部の標準菌株では ISO 法の増菌培養条件での増殖が困難であるなど、本試験法の問題点が明らかにされた。また、新分類の *Cronobacter* 属菌の各菌種に病原性の差がない可能性が示された。現時点では、近日中に ISO 法が改定される見込みがないことから、今回作成した試験法を日本国内の標準試験法とし、ISO 法改訂時に見直しを行うことを提案した。ミニラボ試験により算出された本試験法による乳児用調製粉乳からの LOD50 値は 0.505-0.634CFU/25g であった。

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

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

平成 23-25 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
工藤由紀子 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
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ブイオンおよび 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った。これらの結果から、増菌培地として 2%NaCl 加アルカリペプトン水、選択分離培地として TCBS 寒天および酵素基質培地を採用することの妥当性が評価された。

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確立することを目的として、培養温度、培養時間、確認培地の塩分濃度、酵素基質培地の有用性等について検討してきた。そしてこれらの結果を踏まえて、新しい検査法の提案を行った（提案法、図 1）。提案法を腸炎ビブリオの標準試験法とするためには複数検査機関による評価（collaborative study）が必要である。そこで、以下の検討を実施し、collaborative

study による評価を行った。

(1) collaborative study を実施するための試料の作成方法および冷蔵輸送における菌の死滅状況の検討、(2) collaborative study に供試する食品検体の検討、(3) ISO 法との比較実験、特に増菌培養法と選択分離培地について、(4) collaborative study の実施と評価である。

B. 研究方法

1. 腸炎ビブリオ自然汚染検体に関する検

討

東京都内で市販されている国産アオヤギ（むき身）16検体、アカガイ（殻付き）6検体を購入し、無菌的に25gをサンプリングした。サンプリングした検体にアルカリペプトン水225mlを加えて袋の外側から軽く押しつぶし35~37°Cで18時間培養した。培養後はCHROMagar Vibrio寒天培地に塗抹培養して腸炎ビブリオの検出を試みた。更に、血清型O3:K6菌を分離するために、腸炎ビブリオK6抗原に対する免疫磁気ビーズ法を行った。発育した腸炎ビブリオ様集落については、生化学的性状試験を行い菌の同定を行うとともに、*tdh*遺伝子の検出試験を実施した。

(2) collaborative studyを実施するための試料の作成方法および冷蔵輸送における菌の死滅状況の検討

供試した菌株の血清型はO1:K56, O3:K6, O4:K8の3血清型菌である。市販のゆでだこ、あさりのむき身、むきエビの各25gに耐熱性溶血毒(TDH)産生性の腸炎ビブリオを高菌数群($10^3\sim 10^4$ 個/g)および低菌数群(数個~10個/g)となるように接種した。腸炎ビブリオを接種した食品は4°Cで24時間または48時間冷蔵保存後、腸炎ビブリオ菌数の測定をMPN法で求めると共に、定性試験を実施した(図2)。

(3) ISO法との比較試験

市販の「あさりのむき身」に腸炎ビブリオを接種した検体を対象に、ISO法と提案法で腸炎ビブリオの検出を行い、検出率の比較を行った。用いた増菌培地は、食塩ポリミキシンプイオン(ISO法)と3%NaCl加アルカリペプトン水(ISO法)および2%NaCl加アルカリペプトン水(提案法)であ

る。また、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)培地(ISO法)と酵素基質培地(提案法)として市販されているCHROMagar Vibrio寒天(関東化学), ESビブリオ寒天(栄研化学), X-VP寒天(日水)の8種類を用いた。(図3)。

(4) collaborative studyの実施

提案法を複数検査機関で評価するために、collaborative studyを実施した。

検査実施機関は15箇所、各検査機関には、あさりのむき身に腸炎ビブリオ(O3:K6, TDH産生株)を接種した模擬検体、すなわち高菌数接種群(10^1 個/25g), 中菌数接種群(10^0 /25g), 低菌数接種群(10^{-1} 個/25g), 未接種群を各4検体ずつ送付した。腸炎ビブリオの検出は、食品に2%NaCl加アルカリペプトン水を225ml加え30秒間ストマッキング後、37°Cで16~18時間培養した。培養後、エーゼ($10\mu\text{l}$)を用いてTCBS寒天, TSAT培地, CHROMagar Vibrio, ESビブリオ, X-VP寒天の5種類の選択分離培地に画線分離し、出現した集落について腸炎ビブリオであることを確認した(図4)。

C. 研究結果

1) 腸炎ビブリオ自然汚染検体に関する検討

供試したアオヤギ16検体、アカガイ6検体およびイワガキ6検体の全てから腸炎ビブリオが分離された(表1)。このうちアオヤギ2検体(宮城県および千葉県産)およびアカガイ2検体(青森県および三重県産)から分離された腸炎ビブリオはTRH陽性であった。TDH産生株は検出されなかつ

た。TRH 陽性株は、食品 4 検体から 19 株検出され、その血清型は O10 : KUT (12 株), O4 : K12 (2 株), O4 : KUT (2 株), O1 : K32, O1 : KUT, O11 : KUT (各 1 株) であった (表 1)

2) collaborative study を実施するための試料の作成方法および冷蔵輸送における菌の死滅状況の検討

(1) ゆでだこ

高菌数接種群では 24 時間までに 1~2 オーダーの菌数が減少したが、低菌数群では大きな変化は認められなかった。高菌数接種群の O3 : K6 株および O4 : K8 株で減少幅が大きかった。

(2) あさりのむき身

あさりに血清型 O1 : K56 株を接種した時の菌数は、高菌数接種群および低菌数接種群のいずれも、24 時間保存と 48 時間保存で大きな変化は認められなかった。血清型 O3 : K6 株および O4 : K8 株の高菌数接種群では、24 時間までに 1~2 オーダーの菌数が減少したが、48 時間では、更なる減少は認められなかった。低菌数接種群では、いずれの血清型株も大きな変化は認められなかった。

(3) むきエビ

高菌数接種群、低菌数接種群ともに菌数の減少が認められた。

(4) 大量培養検体からの検出

大量培養法では、食品の種類、血清型の違いや保存時間に関わらず、全ての検体から腸炎ビブリオを検出することができた。

(5) 食品の種類と接種菌の血清型

模擬検体からの腸炎ビブリオの検出において、食品の種類による差や接種菌の血清型による大きな差は認められなかった。

3) ISO 法との比較試験

(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検出

食塩ポリミキシンプイオンで増菌培養後の腸炎ビブリオ検出状況を表 2 に示した。

低菌数接種群の短時間 (7~8 時間) 培養では、TSAT 培地および酵素基質培地では 6 検体中 5 検体で検出されたが、TCBS 寒天では検出率が低かった。長時間 (16~18 時間) 培養では、低菌数接種群の 1 検体で検出されなかったが、中、高菌数接種群では、いずれの培地でも検出することができた。

(2) 2%および 3%NaCl 加アルカリペプトン水

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できた (表 3)。

4) collaborative study の実施結果

(1) 腸炎ビブリオ検出率

collaborative study は 15 施設で 2 回行った。接種菌数別に腸炎ビブリオ陽性率をみると、第 1 回目は高菌数接種群 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 (表 4)。

第 2 回目の接種菌別陽性率は、高菌数接種群で 100%, 中菌数接種群で 78.3%, 低菌数接種群 51.7%, 未接種群 0%であった。第 1 回、第 2 回共に、接種菌数を低くすると検出率は低下した。

(2) 分離培地による検出率

第 1 回目および第 2 回目合わせると高菌数接種群の TSAT 培地および CHROMagar Vibrio でそれぞれ 2 検体が陰性であった以

外全ての培地の検出状況は同じであった(表5)。中菌数接種群および低菌数接種群では、分離平板による差は認められなかった。

D. 考察

提案法を日本の標準法とするためには、ISO法との比較試験を行い、最終的には collaborative study により腸炎ビブリオ検出率が 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。

最初に collaborative study で使用する魚介類を選定するために、腸炎ビブリオの汚染状況を調査し、適切な検体について検討した。検体は腸炎ビブリオの汚染が報告されている二枚貝を対象に、特に生食によって消費されるものを考慮し、アオヤギ、アカガイおよびイワガキを選定した。検体購入時期が6月～8月と海水温が高い時期であったため、全ての検体から腸炎ビブリオが検出された。模擬検体に用いる試料として夏場に購入した検体では困難であることが確認できた。海水温の低い時期に購入するなどの検討が必要であった。その後の検討で、模擬検体作成用の食品としては、むきあさり(冷凍品を解凍して使用)を用いることとした。

collaborative study では、模擬検体として食品に腸炎ビブリオを接種したものを、冷蔵状態で各検査機関に送付し、検査を実施する。しかし腸炎ビブリオは低温状態に非常に弱いので、接種した菌が死滅してしまう可能性が考えられる。そこで低温状態でどの程度腸炎ビブリオが減少するのかを把握するために接種・保存実験を行った。4℃で24時間保存後では1～2オーダーの

菌数減少が認められたが、48時間ではさらに大きな菌数の変化は認められなかった。このことから、模擬検体を作成し冷蔵輸送することで collaborative study が実施可能であることが明らかとなった。尚、血清型による差は認められなかったため、接種菌には O3 : K6 株を使用することとした。

次に、増菌培養法と使用する分離培地の種類について、ISO法と提案法での比較を行った。食塩ポリミキシンブイオンでは、短時間培養で検出できない検体が認められた。一方、2%NaCl加アルカリペプトン水(提案法)および3%NaCl加アルカリペプトン水(ISO法)では短時間培養、長時間培養共に全ての検体から腸炎ビブリオを検出することができた。これらの結果から提案法の増菌培地2%NaCl加アルカリペプトン水は、ISO法と同等あるいは同等以上の増菌効果のあることが確認できた。

ISO法で決められている選択分離培地である TSAT 寒天は、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。そのため提案法では TSAT 寒天の代わりに、酵素基質培地の使用を検討した。酵素基質培地は、pH 指示薬による色調変化を指標としていないため、長時間培養しても集落の色が変化しないというメリットもある。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を示すため、他のビブリオ属菌との鑑別能が非常に明瞭であると考えられた。

これらの基礎的実験をもとに、15検査機関で collaborative study を実施した。その結果、提案法では、食品25g中に腸炎ビブリオが10個程度存在すれば100%検出できることが明らかとなった。選択分離培地別

に検出状況をもみても、酵素基質培地は TSAT 寒天と同等以上の腸炎ビブリオの検出が可能であった。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意見が出された。塗抹分離した平板を室温に置いておき、夕方から培養する等、培養時間を調節することも考える必要がある。

E. 結論

1) 6月～8月に購入したアオヤギ、アカガイ、イワガキ、合計 28 検体全てから、腸炎ビブリオが検出された。そのため collaborative study を行う際の模擬検体作成には問題のあることが示された。

2) 3 種類の食品に腸炎ビブリオを接種し、4℃で 24～48 時間保存した場合、いずれも大量培養法で検出可能であったことから、今回実施した方法で冷蔵・輸送することで collaborative study が実施可能であることが明らかとなった。

3) ISO 法と提案法の比較を 1 施設で行った結果、提案法の増菌培地、培養時間および選択分離培地において、ISO 法と同等、あるいはそれ以上の検出率であることが確認された。

4) 15 検査施設において collaborative study を実施して提案法の評価を行った結果、食品 25 g 中に腸炎ビブリオ菌数が 10 個程度存在すれば 100%検出することができた。分離平板としては、糖の分解を指標とする TCBS 寒天培地と酵素基質培地を併用することが適当である。

5) 提案法は、食品を対象とした腸炎ビブリオの標準試験法として適当であることが確

認できた。

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.

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

図1. 腸炎ビブリオ試験法(定性法)

《提案法》

《ISO8914法》

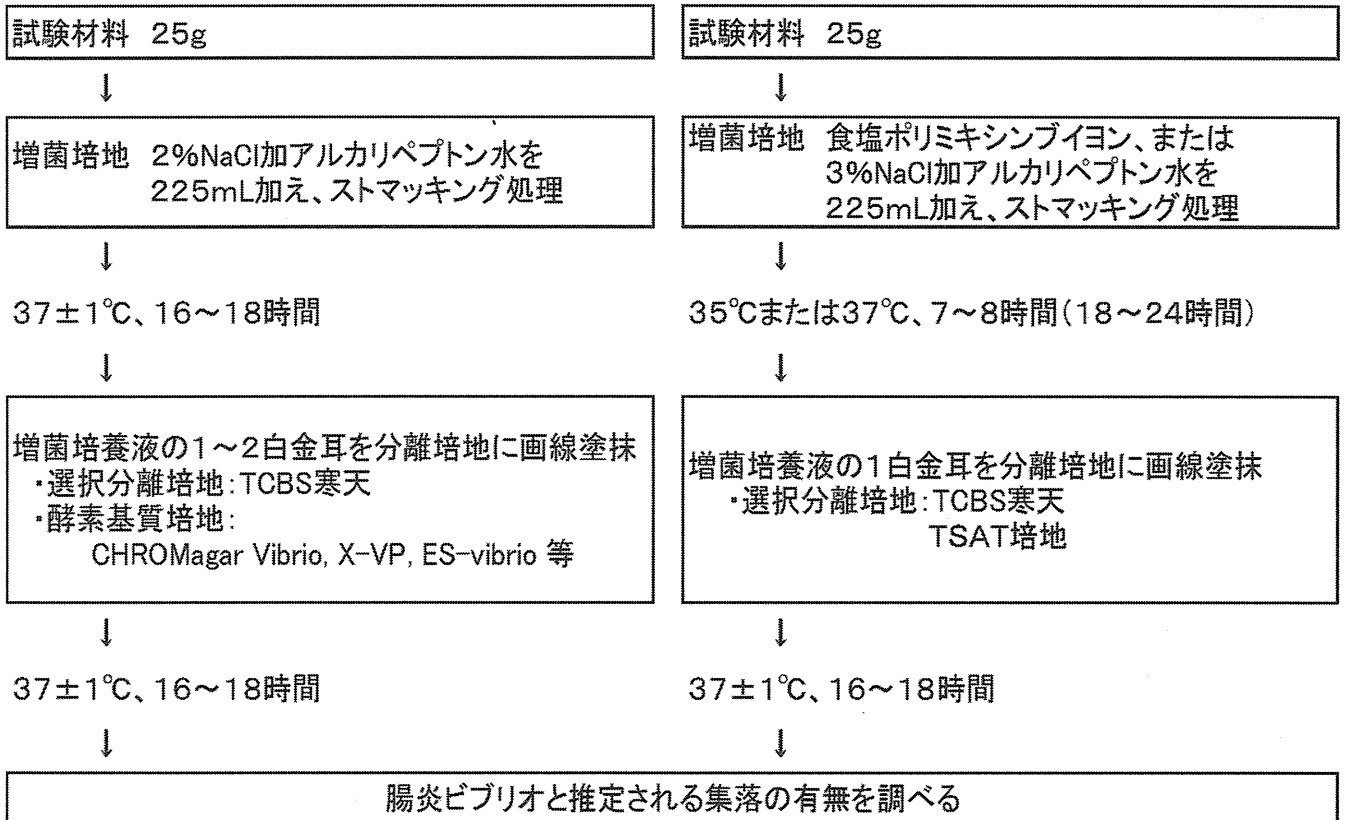


図2. 冷蔵保存後の食品検体からの腸炎ビブリオ検出法

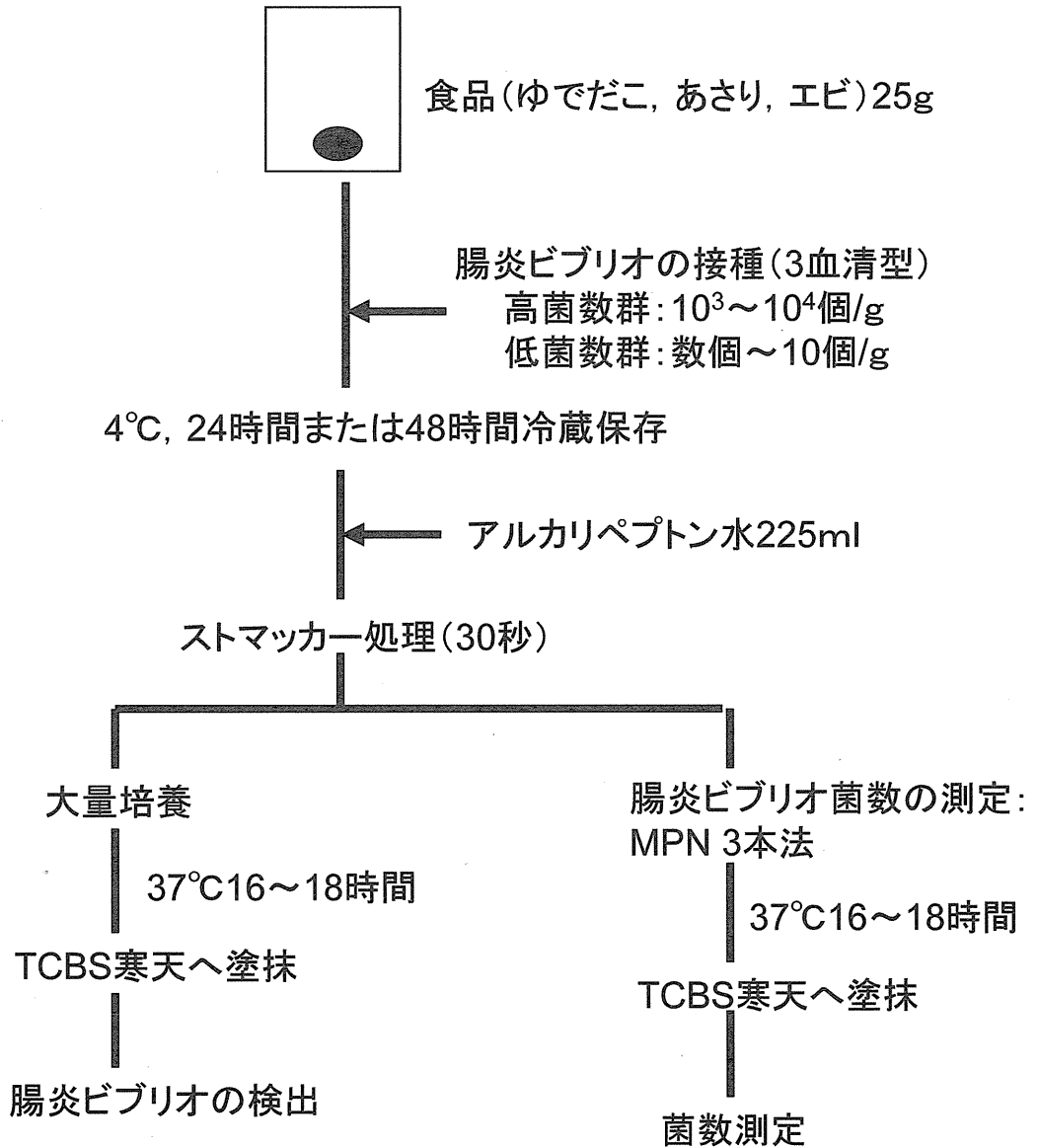


図3. 食品を対象とした腸炎ビブリオ試験法の検討

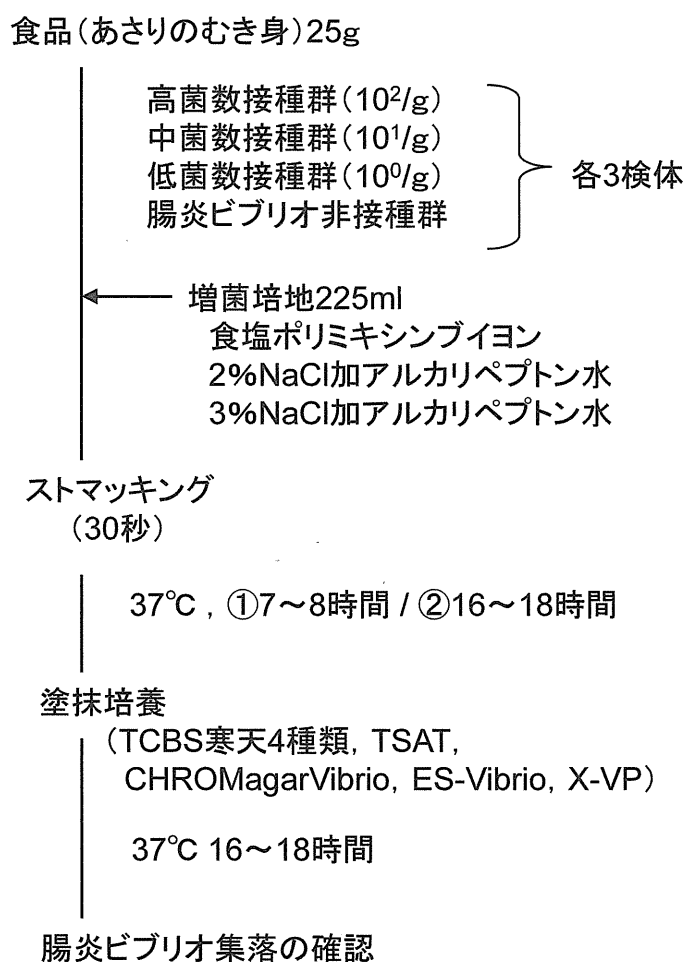


図4. 腸炎ビブリオ試験法(collaborative study 用)

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(10^1 /25g) × 4検体
 中濃度(10^0 /25g) × 4検体
 低濃度(10^0 /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. 市販食品からの腸炎ビブリオ検出状況

| 供試食品 | 供試数 | V.p検出 (%) | tdh産生菌 | | trh産生株 | |
|------|-----|--------------|--------|------|---|--|
| | | | 検出数 | 分離株数 | 血清型 | |
| アオヤギ | 16 | 16 (100%) | 2 | 4 | O4:K12(2株) O1:KUT(1株) O4:KUT(1株) | |
| アカガイ | 6 | 6 (100%) | 2 | 15 | O4:KUT(1株) O10:KUT(12株) O1:K32(1株) O11:KUT(1株) | |
| イワガキ | 6 | 6 (100%) | 0 | 0 | | |

表2. 食塩ポリミキシンプ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:10⁰個/g, 中菌数:10¹個/g, 高菌数:10²/g

** 検出数/供試数

表3. アルカリペプトン水(2%, 3%NaCl添加)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

表4. 新しい腸炎ビブリオ試験法のためのcollaborative study 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5. 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) |

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) |

平成 23-25 年度厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究

分担研究報告書

衛生指標菌試験法に関する研究

分担研究者 伊豫田淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

協力（委託）研究者 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）

齋藤 利江（一般財団法人日本冷凍食品検査協会）

森 曜子（公益財団法人 日本適合性認定協会認定センター）

研究要旨

わが国の食品衛生法では食品(種)ごとに細菌数(生菌数)、大腸菌群、E. coli(糞便系大腸菌群)等の規格基準が規定されており、それぞれ個別に試験法が定められている。しかし、これらの試験法間では同様な試験工程においても整合性が取れない操作・手順のあることや、ISO(国際標準化機構)が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法(Bacteriological Analytical Manual ; BAM 法)との調和が計られていない現状が指摘されている。これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会における討議・検討の結果、今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認されている。本研究では、生菌数試験法の ISO 法と従来法を比較し、一般生菌数計数法案の基礎データを収集した。さらに、ISO 16649-2 : 2001 (β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌) 試験法の和訳を行い、実行性を検討したところ、当該試験法はわが国の標準法として導入可能であると判断された。当該試験法に記述されている損傷菌を対象とした培養条件の有効性を 2 種類の大腸菌に対して、加熱処理、酸処理及び凍結処理の 3 通りのストレス処理を行い、損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討した。その結果、いずれのストレス処理条件においても、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は 1.9 以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。さらに、いくつかの食品種ごとの解析では、損傷菌(凍結処理)に対する前培養の有効性は認められなかった。培養時間が 24 時間を超えた場合の大腸菌数は 18~24 時間培養後の大腸菌数と差は認められなかったが、大腸菌以外の集落が増加した試料が認められたことから、大腸菌集落の誤判定を避けるためにも、規定された培養時間を守る必要があると考えられた。さらに、本研究で用いた食品のように TBX 寒天培地(44±1 °C, 18~24 時間培養)に生育する大腸菌以外の菌が多数共存する試料では、ISO 16649-2 : 2001 に規定された計数・計算方法どおりには大腸菌数の算出ができない可能性があるため、このような場合の計数・計算方法についても今後検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

わが国の食品衛生法では「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」(昭和 26 年, 厚生省令第 52 号)及び「食品, 添加物等の規格基準」(昭和 34 年, 厚生省告示第 370 号)の中で, 食品(種)ごとに細菌数(生菌数), 大腸菌群, *E. coli*(糞便系大腸菌群)等の規格基準が規定されており, それぞれ個別に試験法が定められている。しかし, これらの試験法間では同様な試験工程においても整合性が取れない操作・手順のあることや, ISO(国際標準化機構)が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法(Bacteriological Analytical Manual; BAM 法)との調和が計られていない現状が指摘されている。

これらの現状を改善するために, 「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会における討議・検討の結果, 今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として, ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認された。これまで Enterobacteriaceae (腸内細菌科菌群), Presumptive *Escherichia coli* (推定大腸菌)及び Coliforms (大腸菌群)に関する標準法の策定作業を進めてきたが, 今後は Microorganisms(一般生菌数)及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌)の試験法並びに試験結果の算定法を確立することを検討課題とすることとした。

B. 研究方法

1. 一般生菌数試験法について

3つの食品群(食肉製品, 魚加工品, 乳製品)に *B. subtilis* の芽胞菌液を希釈し, 秤量した試料に添加した。添加区として低濃度添加区(1,000 cfu/g)および高濃度添加区(100,000 cfu/g)を設定した。それぞれの

試料について ISO 試験法と従来試験法に従い, 実施数 $n=3$ (1食品群: 2法 \times 2濃度 \times n_3 +試薬 BL=13検体)で試験を実施し, それぞれの試験法で得られた結果を比較した。それぞれの食品群については, 食肉製品として鶏唐揚げ, 魚加工品としてサバの水煮, 乳製品として牛乳を用いた。

また, 2つの食品群(食肉製品, 魚加工品)においては自然汚染食品についてのデータを収集するため, 食肉製品としてミンチ肉, 魚加工品としてシシャモ一夜干しおよび生タラフィレを用い ISO 試験法および従来の国内試験法にて試験を実施, 結果を比較した(資料 1-3 参照)。

算定法: IS07218 を用いた。今回の検討では各希釈段階で 2 枚の平板を使用しているため, ΣC を 2 つの連続した希釈からなるシャーレ各 2 枚の合計とした。

IS07218 の算定法の要約を次に示す。

コロニーカウント

全コロニー, 典型コロニー, 推定コロニーについて, 基本的に 300 未満 (<300) のコロニーを含むシャーレ中のコロニーをカウントする。

1) 一般的な場合

$$N = \Sigma C / (V \times 2.2 \times d)$$

N: 菌数

ΣC : 最少 10 コロニーを含む 2 つの連続した希釈からなるシャーレ中のコロニー数の合計

V: それぞれのシャーレに接種した試料液の量 (mL)

d: 一番目の希釈段階に対応する希釈係数
計算結果は上位 3 桁目を四捨五入し, 有効数字 2 桁で表記した。

2) コロニー数が少ない場合

最も低い希釈段階のシャーレ中のコロニー

数が 10 未満 (<10) の場合

●4~9 の場合

$$N = \Sigma C / (V \times 2.2 \times d)$$

●1~3 の場合

微生物は存在しているが < (4×d) / g

10 倍希釈で 1~3 個の場合 → < 40/g

3) コロニー数が 0 の場合

< 1/d (10 倍希釈から始めた場合 → < 10/g)

2. β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌試験法について

ISO が制定する衛生指標菌試験法のうち、以下の示す β-glucuronidase-positive *Escherichia coli* (β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌) 試験法の内容を精査し、実行性を検討した。また、当該試験法(以下参照)について和訳を行った。

ISO 16649-2 : Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2 : Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolylβ-D-glucuronide (2001)

3. 損傷菌を対象とした培養条件の有効性の解析実験

1) 研究概要

ISO 16649-2 : 2001 では、TBX 寒天培地の培養条件を「44±1 °C, 18~24 時間」と規定しているが、ストレスを受けた大腸菌(損傷菌)の存在が疑われる場合は、「37±1 °C, 4 時間」の前培養を行った後に「44±1 °C, 18~24 時間」するよう規定している。損傷菌に対する前培養の有効性を確認するために、ストレス処理(加熱処理、酸処理及び凍結処理)を行った大腸菌の菌液について、TBX 寒天培

地を用いて 2 通りの培養条件(前培養「なし」及び前培養「あり」)により大腸菌数を測定し、得られた結果を比較・評価した。

2) 試験菌液の調製

Escherichia coli NBRC 15034(大腸菌①)及び *Escherichia coli* NBRC 3972(大腸菌②)を試験菌とし、それぞれトリプトソイブイオンに接種して 37±1 °C で 18~24 時間培養して試験菌液①とした。また、試験菌液①の 1 ml を 0.1 %ペプトン加生理食塩水 9 ml に加えて試験菌液②とした。

3) 試験菌液のストレス処理

調製した試験菌液について、次の 3 通りのストレス処理を行った。

① 加熱処理

0.1 %ペプトン加生理食塩水 (pH 7.0) 10 ml 入りの試験管 3 本を恒温水槽に浸し、55 °C に保持した。これらの試験管に試験菌液②を 0.1 ml ずつ滴下、混合して試料液とした。5 分、10 分及び 15 分後に試験管を恒温水槽から取り出し、冷水中で急冷して加熱処理後の試料液とした。

なお、本処理は繰り返し 3 回行った。

② 酸処理

pH 2.0 に調整した 0.1 %ペプトン加生理食塩水 10 ml を入れた試験管 3 本を恒温水槽に浸し、37 °C に保持した。これらの試験管に試験菌液②を 0.1 ml ずつ滴下、混合して試料液とした。10 分、30 分及び 60 分後に試験管を恒温水槽から取り出し、水酸化ナトリウム溶液を用いて試料液の pH を 6.0~7.0 に調整し、酸処理後の試料液とした。

なお、本処理は繰り返し 3 回行った。

③ 凍結処理

試験菌液①の 0.2 ml を 0.1 %ペプトン加生理食塩水 (pH 7.0) 200 ml に滴下、混合して試料液とした。試料液を 50 ml ずつ滅菌ポリ容器 (100 ml 容) 3 個に小分けした後、それぞ

れを-10℃、-20℃及び-30℃に設定した冷凍庫内に保存した。2日後に滅菌ポリ容器を冷凍庫から取り出し、室温で2～3時間解凍して凍結処理後の試料液とした。

なお、本処理は繰り返し3回行った。

4) ストレス処理後の試料液中の大腸菌数の測定

加熱処理、酸性処理及び凍結処理後の試料液中の大腸菌数を、TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法により測定した。なお、培養は以下の2条件とした。

条件1: 44±1℃、18～24時間(前培養「なし」)

条件2: 37±1℃、4時間後に44±1℃、18～24時間(前培養「あり」)

4. ストレス処理(凍結処理)を行った食品の大腸菌数測定における前培養の有効性

1) ストレス処理(凍結処理)

-20℃に設定した冷凍庫内に食品を2～3日間保存したものをストレス処理(凍結処理)試料とした。

2) 試料液の調製

ストレス処理後の試料を10gずつ無菌的に秤量し、滅菌ペプトン加生理食塩水90mlを加えた後、ストマッカーを用いて1分間攪拌・混合して試料原液とした。また、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて試料原液の10倍段階希釈液を調製した。

3) 大腸菌数の測定

TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法により試料の大腸菌数を測定した。なお、以下に示した2条件により培養し、生育した大腸菌の典型集落数を計測し、試料1g当たりの大腸菌数を算出した。ただし、ISO 16649-2:2001では「典型集落数が150

個未満かつ総集落数が300個未満の平板の典型集落数を計数する」とあるが、1平板の総集落数が300個以上の場合でも典型集落数が150個未満であった場合は大腸菌数の数値として採用した。

条件1: 44±1℃、18～24時間(前培養「なし」)

条件2: 37±1℃、4時間後に44±1℃、18～24時間(前培養「あり」)

5. 培養時間が24時間を超えた場合の大腸菌数測定結果への影響

1) 試料液の調製

試料(食品)を10gずつ無菌的に秤量し、滅菌ペプトン加生理食塩水90mlを加えた後、ストマッカーを用いて1分間攪拌・混合して試料原液とした。また、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて試料原液の10倍段階希釈液を調製した。

2) 大腸菌数の測定

TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法により試料の大腸菌数を測定した。なお、44±1℃、18～24時間培養し、大腸菌の典型集落数を計測した後、速やかに44±1℃の恒温器に入れ、さらに24時間培養し、生育した典型集落数を計測した。典型集落数から試料1g当たりの大腸菌数を算出した。ただし、ISO 16649-2:2001では「典型集落数が150個未満かつ総集落数が300個未満の平板の典型集落数を計数する」とあるが、1平板の総集落数が300個以上の場合でも典型集落数が150個未満であった場合は大腸菌数の数値として採用した。

C. 研究結果及び考察

1. 一般生菌数試験法におけるISO法と従来法の比較

ISO 法、従来法の試験工程の差異は培養時間と培養温度であり、これらの要因が両試験法の結果に差異をもたらすことが予想された(資料 3)。

資料 4 にある通り、添加回収試験においては ISO 法、従来法ともに得られる結果はほぼ同じであった。これは、添加した *B.subtilis* がどちらの試験法の培養温度でも発育可能であるため差は生じなかったと推測される。しかし自然汚染食品では、ISO 法と従来法では結果に差が見られ、最も大きなものでは約 100 倍の差を生じた食品があった。食肉製品の「ミンチ」は菌叢を形成している細菌の多くが哺乳類由来の腸内細菌と推測されるため、前述の *B.subtilis* と同様にどちらの試験法でも発育可能であり、結果に差は生じなかったと推測される。

一方、魚加工品の「生タラフィレ」は、菌叢中に低温細菌の存在が考えられるため、培養温度がより至適発育温度に近い ISO 法で値が高く検出されたと推測される。したがって、食品中の菌叢が異なると ISO 法と従来法による結果が大きく異なる可能性が示唆された。

また、両試験法では算定に供するシャーレのコロニー数の範囲だけが異なる。算定方法の違いにより結果に差異が生ずるか確認するために、ISO 法で試験して得られたコロニー数から ISO 法と食品衛生検査指針法により結果を算出したところ、両者の結果の比(指針法 / ISO 法)は 0.92~1.03 となり、算定方法による結果に大きな違いは認められなかった。

今後は、様々な菌種を用いた添加回収試験の実施や自然汚染食品への調査を拡大することで試験法の互換性がより一層明確になるといえる。

2. β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌試験法

それぞれの和訳は資料 5 の通りである。ISO 16649-2:2001 の内容を精査し、実行性を検討した結果、わが国の標準法として導入可能であると判断された。

3. 損傷菌を対象とした培養条件の有効性の解析実験

加熱処理後の試料液中の大腸菌数測定結果は資料 6 の通りである。酸処理後の試料液中の大腸菌数測定結果を資料 7、凍結処理後の試料液中の大腸菌数測定結果を資料 8 に示した。

1) 加熱処理した試料液の大腸菌数測定における前培養の有効性

前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあり、55℃、15 分間の加熱処理条件では、大腸菌 2 種類の繰り返し 3 回測定すべてにおいて、前培養「あり」のほうが高い値であった。また、各測定値を常用対数に変換した後、対応のある 2 群の平均の差の t 検定を行った結果、得られた t_0 値は 3.15 であり、有意水準 1% で「有意差あり」と判定された。ただし、資料 6 に示したとおり、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は 1.5 以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。

2) 酸処理した試料液の大腸菌数測定における前培養の有効性

pH 2.0、15 分間の酸処理条件では、前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあったが、その他の酸処理条件では、顕著な傾向は認められなかった。また、各測定値を常用対数に変換した後、対応のある 2 群の平均の差の t 検定を行った結果、得られた t_0 値は 2.43 であり、有意水準 1% では「有意差なし」と判定された。

なお、資料 7 に示したとおり、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は 1.7 以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。