

表 5 選択培地上の *Bacillus* 属菌・集落の特徴 (*B. cereus* 以外)

Test strains	MYP		PEM		NGK		XBC		CBC	
	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4516		黄色 × —		白色 × —						
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 12759		黄色 × —		白色 × —						
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580		白色 × —		緑色 × —		透明 × —				
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884		黄色 × —		白色 × —		白色 × —				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774		黄色 × —		白色 × —		透明 × —				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051		白色 × —		白色 × —		白色 × —				
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792		白色 ○ 混濁桃色		白色 ○ 青色		白色 ○ 混濁桃色		淡青色 — —		青色 ○ 白色
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679		白色 ○ 混濁桃色		白色 ○ 青色		白色 ○ 混濁桃色		青色 — —		青色 ○ 白色

上段・・・集落色

中段・・・ハロー有無 (有：○，無：×)

下段・・・ハロー色

表 6 選択培地上のグラム陽性菌の検出菌数 (*B. cereus* 以外)

Test strains	Viable counts (log ₁₀ CFU/ml)					
	TSA	MYP	PEM	NGK	XBC	CBC
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4516	7.49±0.05	7.11±0.02	6.28±0.14			
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050						
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 12759	7.77±0.06	7.94±0.09	8.02±0.18			
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	8.30±0.08	7.94±0.06	8.38±0.03	7.64±0.12		
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 9885	6.26±0.19					
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	8.46±0.04	8.30±0.05	8.62±0.03	8.95±0.04		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774	8.20±0.13	8.43±0.07	8.30±0.11	7.49±0.06		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	7.85±0.13	7.74±0.07	7.86±0.04	7.40±0.29		
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792	7.15±0.09	7.28±0.08	7.23±0.16	7.11±0.12	7.18±0.20	7.26±0.22
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679	7.72±0.01	7.72±0.04	7.80±0.10	7.80±0.01	7.30±0.67	7.79±0.04

対数平均値±標準偏差 (n=3)

表 7 選択培地上のグラム陽性菌・集落の特徴 (*B. cereus* 以外)

Test strains	TSA		MYP		PEM		NGK		XBC		CBC	
	発育 径	長辺(mm) 短辺(mm)	発育 径	長辺(mm) 短辺(mm)	発育 径	長辺(mm) 短辺(mm)	発育 径	長辺(mm) 短辺(mm)	発育 径	長辺(mm) 短辺(mm)	発育 径	長辺(mm) 短辺(mm)
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4516	+	1.66±0.02 1.66±0.02	+	0.85±0.06 0.85±0.06	+	1.32±0.05 1.32±0.05	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	-		-		-		-		-		-	
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 12759	+	3.80±0.46 3.38±0.42	+	4.58±0.09 3.13±0.11	+	5.55±0.31 4.39±0.32	-		-		-	
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	+	1.06±0.20 1.00±0.16	+	1.10±0.10 1.10±0.10	+	2.56±0.13 2.13±0.25	+	0.32±0.02 0.32±0.02	-		-	
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 9885	+	3.62±0.30 3.62±0.30	-		-		-		-		-	
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	+	3.25±0.18 3.14±0.18	+	1.86±0.25 1.81±0.17	+	2.53±0.87 2.43±0.76	+	1.01±0.07 1.01±0.07	-		-	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 11774	+	4.54±0.01 4.32±0.11	+	1.31±0.10 1.31±0.10	+	2.84±0.75 2.73±0.64	+	1.01±0.07 1.01±0.07	-		-	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	+	5.23±0.43 5.06±0.34	+	2.00±0.33 2.00±0.33	+	4.85±0.45 4.48±0.33	+	0.45±0.04 0.45±0.04	-		-	
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792	+	5.42±0.13 5.42±0.13	+	6.89±0.51 5.51±0.06	+	10.78±1.78 4.87±0.67	+	7.31±0.64 3.79±0.15	+	3.91±0.21 3.91±0.21	+	5.06±0.56 3.83±0.32
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679	+	6.49±0.39 6.35±0.41	+	4.65±0.02 4.09±0.10	+	14.52±0.59 7.94±1.26	+	3.82±0.17 2.96±0.16	+	2.68±0.91 2.28±0.74	+	4.22±0.74 3.47±0.52

対数平均値±標準偏差 (n=3)

表 8 選択培地上のグラム陽性菌・集落の特徴

Test strains	MYP		PEM		NGK		XBC		CBC	
	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴
<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 12007		白色 × —		白色 × —		白色 × —				透明 × —
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 49594		白色 × —		白色 × —		白色 × —				
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115		白色 × —		白色 × —		白色 × —				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		白色 × —		白色 × —		白色 × —				
<i>Staphylococcus warneri</i> JCM 2415		白色 × —		白色 × —		白色 × —				
<i>Streptococcus faecalis</i> CSJ 1212		白色 × —		白色 × —		白色 × —		透明 × —		

上段・・・集落色

中段・・・ハロー有無 (有：○，無：×)

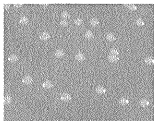
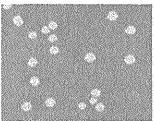
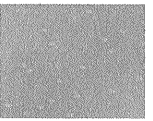
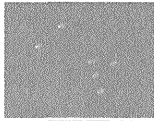
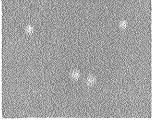
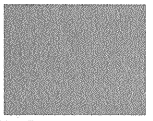

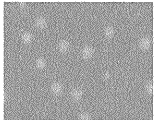
下段・・・ハロー色

表 9 選択培地上のグラム陽性菌の検出菌数

Test strains	Viable counts (log ₁₀ CFU/ml)					
	TSA	MYP	PEM	NGK	XBC	CBC
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 14513	8.18±0.06					
<i>Lactococcus lactis</i> NBRC 12007	8.41±0.04	8.57±0.07	8.96±0.34	8.41±0.13		8.66±0.06
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 49594	9.23±0.07	9.34±0.01	9.30±0.01	9.30±0.03		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	9.26±0.04	9.32±0.02	9.36±0.00	9.30±0.03		
<i>Microbacterium lacticum</i> IAM 1640	9.15±0.09					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> IAM 10073						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9.04±0.04	9.08±0.04	9.15±0.08	8.98±0.06		
<i>Staphylococcus warneri</i> JCM 2415	9.00±0.03	8.94±0.03	9.00±0.06	8.23±0.07		
<i>Streptococcus faecalis</i> CSJ 1212	9.20±0.05	9.20±0.03	9.23±0.02	9.20±0.03	9.20±0.06	

対数平均値±標準偏差 (n=3)

表 10 選択培地上のグラム陰性菌・集落の特徴

Test strains	MYP		PEM		NGK		XBC		CBC	
	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴	写真	特徴
<i>Enterobacter cloacae</i> IFO 13535		白色 × —		黄色 × —		透明 × —				
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315		白色 × —		白色 × —		白色 × —				
<i>Providencia alcalifaciens</i> RIDM 1656001						透明 × —				白色 × —

上段・・・集落色

中段・・・ハロー有無 (有：○，無：×)

下段・・・ハロー色

表 11 選択培地上に発育したグラム陰性菌の検出菌数

Test strains	Viable counts (log ₁₀ CFU/ml)					
	TSA	MYP	PEM	NGK	XBC	CBC
<i>Cronobacter muytjensii</i> ATCC 51329	8.82±0.05					
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	9.08±0.06					
<i>Cronobacter turicensis</i> DSM 18703	9.18±0.05					
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 1235	9.11±0.02					
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO 13534	9.18±0.05					
<i>Enterobacter cloacae</i> IFO 13535	9.23±0.06	8.97±0.02	8.92±0.07	9.23±0.08		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9.18±0.04					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	9.08±0.04					
<i>Kluyvera ascorbata</i> JCM 1681	7.64±0.09					
<i>Morganella morganii</i> NBRC 3168	9.11±0.11					
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	8.45±0.05	8.67±0.09	8.41±0.18	8.43±0.01		
<i>Providencia alcalifaciens</i> RIDM 1656001	9.18±0.02			8.97±0.23		9.04±0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 106052	8.88±0.03					
<i>Pseudomonas putida</i> IFO 14164	9.18±0.06					
<i>Raoultella ornithinolytica</i> NBRC 105723	8.93±0.04					
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis IFO 3313	9.20±0.10					
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 7823	9.11±0.02					
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium IID 1000	9.20±0.06					
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	8.11±0.40					

対数平均値±標準偏差 (n=3)

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

Yersinia の標準試験法に関する研究

研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	第三室長
研究協力者	百瀬愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	主任研究官
	吉田麻利江	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部	
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部	
	福井理恵	東京都健康安全研究センター微生物部	

研究要旨

食品からのエルシニア標準試験法について検討を行った。食品媒介エルシニア症の原因菌は *Yersinia enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の 2 菌種あり、国際的な標準試験法においては *Y. enterocolitica* のみを対象としているものと、両者の試験法を定めているものがある。前年度の本研究では、エルシニア標準試験法検討のステージ 1 として、現在海外で用いられている標準的な本菌の試験方法である BAM 法、USDA FSIS 法及び ISO 法と、国内で用いられてきた食品衛生検査指針（2004 年）に記載された方法の比較検討を行った。その結果、最も培養日数の少ない ISO 10273:2003 法を中心に以後の検討を行うこととした。今年度は、ステージ 2 案作成のため、ISO 法に基づいて豚ひき肉及び豚タンへの *Y. enterocolitica* 添加回収試験を実施したところ、食品由来の夾雑菌の増殖が抑制されず、添加菌の回収が困難であることが示された。一方、研究協力者らの検討において、BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法と食品衛生検査指針（2004 年）に記載されたエルシニア属試験法がほぼ同一の試験法であり、食品からの *Y. enterocolitica* 添加回収試験において好成績を示すことが明らかとなった。以上の結果を示し、食品からの微生物標準試験法検討委員会において本菌試験法をステージ 1 に戻し、今後は BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法に基づく試験法を標準試験法として検討していくこととなった。

A. 研究目的

Yersinia 属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、人に病原性を示すのはペストの原因菌である *Y. pestis* の他に、食品による媒介が知られている *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の 2 菌種である。食中毒と

してのエルシニア症の原因食品としては、生あるいは加熱不十分な豚肉や乳製品、本菌を保有するげっ歯類の糞便等に汚染された水等が知られている。本菌による人の感染症は下痢、腹痛、発熱等を主な症状とする。エルシニア症の集団事例は、北米、EU 諸国、中

東、オーストラリア等世界各国で報告されており、日本国内でも、平成3年の青森県での事例（推定患者数732名）や平成9年の徳島県での事例（患者数66名）等、発生が知られている。本菌は、4℃以下でも増殖が可能な低温増殖菌であり、冷蔵庫内で保存している食品内で増殖する可能性がある。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 10273 : 2003) と、アメリカ合衆国の Food and Drug Administration (FDA)による BAM 法 (2007年)、同じく米国の USDA FSIS の試験法 (1998年) がある。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おらず、2004年に発行された食品衛生検査指針において独自の方法が紹介されている。そのため、国際的な試験法と互換性のある、食品からエルシニアを分離するための標準試験法を策定する必要がある。昨年度の本研究では、国際的標準試験法の中から最も培養時間の短い ISO 法を中心に検討を行うこととした。今年度の本研究では、ISO 法及びその他の試験法の実効性を確認することを目的として、食品媒介エルシニア症の原因食品となることが知られている豚肉への添加回収試験により、試験法の比較検討を行った。

B. 研究方法

1) ISO 10273 : 2003、BAM 法 (2007年) 及び検査指針 (2004年) の試験法を用いた豚ひき肉への添加回収試験

市販豚挽き肉 25 g を用い、*Y. enterocolitica* JCM7577 株 (血清型 O8) を添加した。添加菌数は1回目が 340CFU/g、2回目が 4800CFU/g、3回目が 63CFU/g であった。ISO 法では、

検体に 225 ml の PSB ブロスを加え、10 倍乳剤作成後、25℃2 日間培養するものと (ISO①法)、1 g の検体に 99 ml の ITC ブロスを加えて 25℃ 2 日間の増菌培養行うもの (ISO②法) の 2 種の増菌培養を行った。培養後の PSB ブロスは一部をそのまま、一部をアルカリ処理後に、CIN 培地と CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に塗布し、25-30℃で培養して定型集落の発育を確認した。ITC ブロスによる培養では、SSDC 培地及び CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に接種した。BAM 法では、検体に PSB ブロス 225 ml を加え、10 倍乳剤作成後、10℃10 日間培養し、アルカリ処理又は生理食塩水処理後 CIN 培地、マッコンキー培地及び CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に塗布した (BAM①法)。また、検体に PMP ブロス 225 ml を加え、10 倍乳剤作成後、10℃10 日間培養し、アルカリ処理又は生理食塩水処理後 CIN 培地、マッコンキー培地及び CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に塗布した (BAM②法)。検査指針の方法では、検体に PBS を 225 ml 加え、10 倍乳剤作成後、4℃で 3 週間増菌培養し、アルカリ処理後に IN 培地、VYE 培地及び 10 倍乳剤作成後、10℃10 日間培養し、アルカリ処理又は生理食塩水処理後 CIN 培地、マッコンキー培地及び CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に塗布した (検査指針①法)。

2) ISO 10273 : 2003、BAM 法 (2007年) 及び検査指針 (2004年) の試験法を用いた豚タンへの添加回収試験

市販豚タン 25 g を用い、研究室保有の *Y. enterocolitica* (血清型 O3 2 株、O5 1 株、O8 1 株、O9 1 株) 及び *Y. pseudotuberculosis* 1 株を添加した回収試験を各菌株につき 2 回行

った。添加菌数は6~15CFU/gであった。ISO法では、前述のISO①法を行った。BAM法では、検体にPMPブロス225mlを加え、10倍乳剤作成後、4℃1、2及び3週間培養した（BAM③法）。検査指針の方法では、上記の検査指針①法と共に、検体にPMPブロスを225ml加え、10倍乳剤作成後、4℃で1、2及び3週間増菌培養する方法（検査指針②法）を行った。

3) 純培養菌を用いた選択分離培地の検討

Y. enterocolitica JCM7577株（血清型O8）を今回検討した試験法で用いられている選択分離培地であるCIN培地、IN培地、CHROMagarY.enterocolitica、マッコンキー培地、SSDC培地及びVYE培地に塗布し、25-30℃で培養して集落の発育を確認した。

C. 研究結果

1) ISO 10273 : 2003、BAM法（2007年）及び検査指針（2004年）の試験法を用いた豚ひき肉への添加回収試験

表1に、豚ひき肉への添加回収試験結果を示した。PSBブロスを用いて25℃で増菌するISO①法、ITCブロスを用いて25℃で増菌するISO②法、PSBブロスを用いて10℃で培養するBAM①法、PMPブロスを用いて10℃で培養するBAM②法、PBSを用いて4℃で培養する検査指針①法のいずれにおいても、添加した*Y. enterocolitica*の発育は見られなかった。1回目の試験において、ISO①法でアルカリ処理後のCIN培地から、BAM①法で生理食塩水処理後のCHROMagarY.enterocoliticaから、BAM②法でアルカリ処理後のCIN培地から、検査指針①法でアルカリ処理後のIN培地及びVYE培地から、疑わしい集落が観察された。また、2回目の試験でもISO①法でアル

カリ処理なし及び処理後のCIN培地から、ISO②法でアルカリ処理なしのCHROMagarY.enterocoliticaから、BAM①法でアルカリ処理及び生理食塩水処理後のCHROMagarY.enterocoliticaから、BAM②法でアルカリ処理及び生理食塩水処理後のCHROMagarY.enterocoliticaから、疑わしい集落が観察された。同様に3回目の試験でも、ISO①法でアルカリ処理後のCIN培地から、BAM①法の生理食塩水処理後のアルカリ処理及び生理食塩水処理後のCHROMagarY.enterocoliticaから、BAM②法でアルカリ処理後のアルカリ処理及び生理食塩水処理後のCHROMagarY.enterocolitica及びCIN培地から、疑わしい集落が観察された。しかしながら、生化学性状確認試験において、これらの集落は全て接種菌でないことが確認された。なお、3回目の試験時のみCHROMagarY.enterocoliticaの培地組成が変更され、従来のもとの新製品を用いたが、疑わしい集落は新製品の平板で観察された。いずれの方法でも、定型集落と異なる夾雑菌の集落が多く形成された。

2) ISO 10273 : 2003、BAM法（2007年）及び検査指針（2004年）の試験法を用いた豚タン肉への添加回収試験

表2に、豚タンへの添加回収試験の結果を示した。PSBブロスを用いて25℃で増菌するISO①法では血清型O3の1菌株のみが検出された。PMPブロスを用いて4℃で培養するBAM③法では、1週間では添加菌の回収は見られなかったが、2週間及び3週間の培養では大半の菌が回収された。PMPブロスを用いて4℃で培養する検査指針②法では、1~3週間において半数以上の菌株が回収された。一方、PBSを用いて4℃で培養する検査指針

①法では、2週間の培養が最も好成績であったが、1/3の菌株が回収されたのみであった。BAM③法と検査指針②法は、使用培地及び条件は同じであり、アルカリ処理の方法のみが異なっており、BAM法では水酸化カリウムの終濃度が0.45%で5~10秒の処理であるのに対し、検査指針の方法では水酸化カリウムの終濃度が0.375%で処理時間が30秒であった。

3) 純培養菌を用いた選択分離培地の検討

各試験法で使用された選択分離培地に、*Y. enterocolitica* JCM7577株(血清型O8)を画線塗抹し、25°Cで48時間培養した集落の形態を表3に示した。CIN培地及びIN培地ではピンクから赤色で中心に色の濃い部分がある集落であった。CHROMagar*Y. enterocolitica*では集落密集部位では白色を呈し、単一集落を形成した部位では藤色の集落を形成した。これは、集落密集部位では各集落に酵素基質が十分にいきわたらないためと思われる。マッコンキー培地ではエルシニア属菌は乳糖発酵が遅く、無色で小型の集落を形成していた。SSDC培地では橙赤色の集落を形成した。VYE培地では*Y. enterocolitica*はエスクリンを分解しないため黒色ハローのないピンク色の集落を形成し、エスクリン産生菌の中から集落を見つけるのは困難であった。

D. 考察

前年度の検討に基づき、国際的に整合性のある食品からの*Yersinia*標準試験法として検討することになったISO法を中心に、BAM法及び食品衛生検査指針の方法も加え、本菌の汚染率が高いことで知られる豚肉を用い

た添加回収試験を実施した結果、豚ひき肉では夾雑菌の多さから、いずれの試験法においても添加回収が出来なかった。一方、研究協力機関で行われた豚タンを用いた添加回収試験では、PMPブロスを用いて4°Cで培養するBAM③法と検査指針②法では、多くの菌株において添加回収が可能であった。データは示していないが、これらの方法においても夾雑菌がより多い豚ひき肉を用いた添加回収試験では、添加菌の回収が困難であった。以上の結果から、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の討議を経て、今年度の検討で最も実効性の高かったBAM③法及び検査指針②法を基として、ステージ2案を検討することとなった。また、選択分離培地はCIN培地 或いは IN培地とCHROMagar*Y. enterocolitica*の併用が現時点で最も本菌の分離がしやすいと思われた。一方で、本試験方法では増菌培養時間が1~3週間という、一般的な微生物試験より長時間を要するものであった。今後、ISO法やBAM法等の改正について継続的に情報を収集し、より効率の良い試験法について模索していく必要があると思われた。

E. 結論

国際的標準試験法と互換性のある食品からの*Yersinia*試験法として、昨年度の検討で最も所要時間が短かったISO 10273:2003を基礎とした標準試験法案を作成・検討することとしたが、今年度の検討により、ISO法では夾雑菌の多い豚ひき肉検体においても、豚ひき肉に比べ夾雑菌が少ない豚タン検体においても、添加回収試験による添加菌の回収が困難であった。研究協力機関による検討から、PMPブロスを用いて4°Cで培養する*Y.*

pseudotuberculosis の試験法として BAM に記されている方法 (2004 年版食品衛生検査指針にも記されている方法) が最も分離率が優れていたため、本試験法でステージ 2 案を作成することとなった。選択分離培地としては、CIN 培地或いは IN 培地と CHROMagarY.*enterocolitica* の併用が、現時点で最も本菌の分離がしやすいと思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 豚ひき肉への添加回収試験結果

<試験条件まとめ>

	ISO ①		ISO ②	BAM ①		BAM ②		指針
希釈水	PSB		ITC	PSB		PMP		PBS
培養温度	25℃振とう		25℃	10℃		10℃		4℃
培養時間	3日		2日	10日		10日		3週間
アルカリ処理	有り	無し	無し	有り	/	有り	/	有り
生理食塩水処理	/	/	/	/	有り	/	有り	/
使用培地	CIN クロモアガーエルシニアエン テロコリティカ(CAY)		SSDC CAY	CIN マッコンキー寒天 CAY		CIN マッコンキー寒天 CAY		IN VYE CAY

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

<結果>

	添加菌量 (cfu/g)	ISO ①		ISO ②	BAM ①		BAM ②		指針
1回目	340	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2回目	4800	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3回目	63	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: non
detected

表 2. 豚タンへの添加回収試験結果

<試験条件まとめ>

	ISO ①	BAM③			指針①			指針②		
希釈水	PSB	PMP			PBS			PMP		
培養温度	25℃振とう	4℃			4℃			4℃		
培養時間	2日	1w	2w	3w	1w	2w	3w	1w	2w	3w
アルカリ処理	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り
使用培地	CIN CAY	CIN CAY	CIN CAY	CIN CAY	CIN CAY	CIN CAY	CIN CAY	CIN CAY	CIN CAY	CIN CAY

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

<結果> ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

使用菌株	ISO ①	BAM③			指針①			指針②		
O3(生物型 3) 1回目	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND
O3(生物型 3) 2回目	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
O3(生物型 4) 1回目	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
O3(生物型 4) 2回目	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	+	+	+
O5 1回目	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
O5 2回目	ND	ND	+	+	ND	+	ND	ND	ND	+
O8 1回目	ND	ND	+	+	ND	+	+	+	+	+
O8 2回目	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
O9 1回目	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	+	+	ND
O9 2回目	ND	ND	+	ND	ND	+	+	+	ND	ND
Yp 1回目	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	+	+	ND
Yp 2回目	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	+

ND: non detected

表 3. 選択分離培地の比較

培地名	定形集落	備考
SSDC	橙赤色で少し乳白色あり	保存性が悪く、4-10℃の低温保存により培地内に結晶を生じる
CHROMagarY.enterocolitica	藤色	集落密集部位では白色を呈し、単一集落を形成した部位では藤色の集落を形成した
CIN	暗いピンク～赤色 または無色 中心部が発色	
IN	暗いピンク～赤色 または無色 中心部が発色	
MC	無色コロニー、直径小さい	エルシニアは乳糖発酵が遅く、通常存在する他の腸内細菌科菌群と比較して発育も遅いため、直径が小さい無色コロニーを夾雑菌の中から判別するのは困難
VYE	<i>Y. enterocolitica</i> : エスクリン陰性、ピンクコロニー	エスクリン産生菌の中から集落を見つけるのは困難
	<i>Y. pseudotuberculosis</i> : エスクリン陽性、黒色コロニー	

平成 27 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の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究

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）

五十君 静信（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）

協力（委託）研究者： 齋藤 利江（一般財団法人日本冷凍食品検査協会）

吉田 信一郎（一般財団法人日本食品分析センター）

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)との整合性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 の試験法を基礎と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。

本年度は、衛生指標菌について、市販食品の同一検体を用いて、国内の公定法として従来行われている方法と、それに相当すると思われる ISO 法で検査を行い、その試験結果にどの程度差異があるかについて検討した。

一般財団法人日本食品分析センターでは、市販の食品について ISO 標準法及び我が国で一般に用いられている試験法により一般生菌数を測定し、測定結果を比較した。また、市販の食品について、ISO 標準法により、Enterobacteriaceae 及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* を測定し、検出状況を調査した。一般財団法人日本冷凍食品検査協会では、農産物の基礎データ収集を行った。対象とする衛生指標菌として、大腸菌群、腸内細菌科菌群、大腸菌および生菌数を測定した。大腸菌群試験で国内において広く用いられているデソキシコレート寒天培地と ISO 法で採用されているバイオレット・レッド胆汁酸塩寒天培地 (ISO 4832 : 2006) の比較を行うとともに、衛生指標菌として腸内細菌科菌群 (バイオレット・レッド胆汁酸ブドウ糖寒天培地 (ISO 21528-2 : 2004))、大腸菌 (トリプトン胆汁酸 X グルクロニド寒天培地 (ISO 16649-2:2001))、生菌数 (標準寒天培地 (国内法)) の新試験法策定に必要なデータを収集した。

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 の試験法を基礎と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。

一般財団法人日本食品分析センターでは, 市販の食品について ISO 標準法及び我が国で一般に用いられている試験法により一般生菌数を測定し, 測定結果を比較した。また, 市販の食品について, ISO 標準法により, Enterobacteriaceae 及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* を測定し, 検出状況を調査した。

一般財団法人日本冷凍食品検査協会では, 農産物の基礎データ収集を行った。対象とする衛生指標菌として, 大腸菌群, 腸内細菌科菌群, 大腸菌および生菌数を測定した。大腸菌群試験で国内において広く用いられているデソキシコレート寒天培地と ISO 法で採用されているバイオレット・レッド胆汁酸塩寒天培地 (ISO 4832 : 2006) の比較を行うとともに, 衛生指標菌として腸内細菌科菌群 (バイオレット・レッド胆汁酸ブドウ糖寒天培地 (ISO 21528-2 : 2004))、大腸菌 (トリプトン胆汁酸 X グルクロニド寒天培地 (ISO 16649-2:2001))、生菌数 (標準寒天培地 (国内法)) の新試験法策定に必要なデータを収集した。

これらの結果を基に, 日常的に用いられることの多い衛生指標菌試験法を, ISO 法へ移行した場合の問題点がどのようなところにあるかを明らかにすることにした。衛生指標菌作業部会で ISO 微生物試験法に移行した場合に現行の公定法で行った結果との差異がどの程度生じるかについて現状をまとめ, 今後の検討課題とすることにした。

B. 研究方法

- 1) ISO 微生物試験法における衛生指標菌試験法には, ISO 21528-2 (腸内細菌科菌群), ISO 4832 (2006;大腸菌群)について試験法を和訳し標準試験法とした。
- 2) 市販の食品 30 検体について ISO 標準法及び我が国で一般に用いられている試験法により一般生菌数を測定し, 測定結果を比較した。また, 市販の食品について, ISO 標準法により, Enterobacteriaceae 及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* を測定し, 検出状況を調査した。
- 3) 市販野菜, 果物およびその加工品 (カット等) 41 試料について, 大腸菌群試験

で国内において広く用いられているデソキシコレート寒天培地と ISO 法で採用されているバイオレット・レッド胆汁酸塩寒天培地 (ISO 4832:2006) の比較を行うとともに、衛生指標菌として腸内細菌科菌群 (バイオレット・レッド胆汁酸ブドウ糖寒天培地 (ISO 21528-2:2004))、大腸菌 (トリプトン胆汁酸 X グルクロニド寒天培地 (ISO 16649-2:2001))、生菌数 (標準寒天培地 (国内法)) で実際に検査を行い、国内の従来法と ISO 法の検査結果を比較した。

C. 研究結果及び考察

1) ISO 微生物試験法における衛生指標菌試験法を、NIHSJ 法として公開している。ISO 21528-2 は、NIHSJ-16 (腸内細菌科菌群集落計数法)、ISO 4832:2006 は、NIHSJ-13 (大腸菌群) が標準試験法である。

一般生菌数試験法については、使用する培地は共通であるが ISO 4833-1:2013 (混釈法) では、培養温度 30℃、37℃選択可能で、72 時間±3 時間で判定するが、国内の従来法では、35℃-37℃で、48 時間±3 時間で判定する。詳しい試験法の詳細については、それぞれの研究報告書を参考にしていきたい。

2) 市販の食品 30 試料: 一般生菌数については、すべての食品群において、国内法 (37℃培養)、国内法 (35℃培養)、ISO 法の順に一般生菌数が高くなる傾向が認められた。この傾向は魚介類において特に顕著であった。全検体の一般生菌数測定値 (対数値) について、対応のある 2 群の平均の差の t 検定を行い、試験法間の比較を行ったところ、いずれの試験法間についても有意水準 5% で「有意差あり」と判定された。また、食品群ごとの測定値についても同様に有意水準 5% で「有意差あり」と判定された。これは、国内法 (37℃

培養)、国内法 (35℃培養)、ISO 法の順に一般生菌数が高くなる傾向が影響していると考えられた。

腸内細菌科菌群は食肉類では 8 検体、内臓肉類では 10 検体、魚介類では 3 検体で検出された。また、大腸菌は食肉類では 1 検体、内臓肉類では 8 検体で検出されたが、魚介類では検出されなかった。

3) 市販野菜、果物およびその加工品 (カット等) 41 試料: ISO 法の TBX 培地を用いた大腸菌測定において、全ての試料から大腸菌は検出されなかった。大腸菌群の測定では、国内法の DESO 培地では検出されないが、ISO 法の VRBL 培地で検出する事例がいくつかの試料で認められた。腸内細菌科菌群は、その中に大腸菌群も含まれるため、大腸菌群より測定値は高くなると予測した。DESO 培地と VRBG 培地の測定値 (対数) の差を比較したところ、測定値の差が 1Log CFU/g の範囲を超えたのは 30℃培養で 12 試料、37℃培養で 8 試料であり、この試料には大腸菌群以外の菌種の存在が推測された。

一般生菌数では、ISO 法には培養温度条件が 30℃と 37℃の 2 種類あり目的によって選択できる。市販野菜、果物およびその加工品 (カット等) の測定においては 30℃の方が概ね高い測定値となる傾向がみられた。これには 37℃より 30℃での培養がより発育を促される菌の存在が示唆された。

D. 結論

衛生指標菌試験法を、NIHSJ 法として公開している。ISO 21528-2 は、NIHSJ-16 (腸内細菌科菌群集落計数法)、ISO 4832:2006 は、NIHSJ-13 (大腸菌群) が標準試験法である。一般生菌数試験法については、使用する培地は共通であるが ISO 4833-1:2013 (混釈法) では、培養温度 30℃、37℃選択可能で、72 時間±3 時間で判定するが、国内の従来法では、35℃-37℃で、48 時間±3 時間で判定する。

ISO法には培養温度条件が30℃と37℃の2種類あり目的によって選択できる。市販野菜、果物およびその加工品（カット等）の測定においては30℃の方が概ね高い測定値となる傾向がみられた。

大腸菌群試験は国内において広く用いられているDESO培地とISO法で採用されているVRBL培地の比較を行った結果、一部の食品で相違が認められた。市販野菜、果物およびその加工品（カット等）の大腸菌群の試験法としてVRBL培地を採用した際には、その測定値は概ね同程度または高くなることが推測された。

腸内細菌科菌群は食肉類では8/10検体、内臓肉類では10/10検体、魚介類では3/10検体で検出された。一方、大腸菌は食肉類では1/10検体、内臓肉類では8/10検体で検出されたが、魚介類では10検体とも検出されなかった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

衛生指標菌試験法の標準法策定の検討

一般財団法人日本食品分析センター

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)との調和が図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, 「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における会議及び衛生指標菌作業部会において検討を行った結果, 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, 食品からの衛生指標菌試験法の標準法策定のための基礎的データを収集することを目的とした。市販の食品について ISO 標準法及び我が国で一般に用いられている試験法により一般生菌数を測定し, 測定結果を比較した。また, 市販の食品について, ISO 標準法により, Enterobacteriaceae 及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* を測定し, 検出状況を調査した。

B 研究方法

1) 研究概要

市販の食肉類, 内臓肉類及び魚介類各 10 検体ずつ合計 30 検体を購入し, 試験に供した。各検体について ISO 標準法(以下「ISO 法」という。)及び我が国で一般に用いられている試験法(以下「国内法」という。)により一般生菌数を測定した。なお, 国内法の培養温度は 35 °C 及び 37 °C とした。

また, これら検体について, ISO 法により, Enterobacteriaceae(以下「腸内細菌科菌群」という。)及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(以下「大腸菌」という。)を測定した。試験方法を表-1 に示した。

表-1 試験項目及び試験方法

試験項目	試験方法	培地	培養条件
一般生菌数	ISO 4833-1:2013(混釈法)	標準寒天培地	30 °C, 72±3時間
	国内法(混釈法)	標準寒天培地	35 °C, 48±3時間
		標準寒天培地	37 °C, 48±3時間
腸内細菌科菌群	ISO 21528-2:2004	VRBG寒天培地	37 °C, 24±2時間
大腸菌	ISO 16649-2:2001	TBX培地	44 °C, 18~24時間