

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	吉田麻利江	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	鈴木穂高	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	
	渡邊真弘	一般財団法人日本冷凍食品検査協会	

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。初年度は、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い、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。次年度は、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。そのため、本年度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、日常的な食品検査のための標準試験法としては ISO 10273 : 2003 法に基づく試験法を NIHSJ-27 として作成し、食中毒発生時の原因食品同定等を目的として BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法に基づく試験法を NIHSJ-30 として作成し、検出感度を示した。

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いる。EU ではカンピロバクター、サルモネラに次ぐ発生数第3位の食中毒であり、2014年にはドイツで約2500名、フランスで約570名の事例が報告されている。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）、平成25年の東京都の事例（患者数52名）等の発生が明らかとなっている。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、2015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。本研究では平成26年度から、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ったが、ISO 法の検出感度が検査指針の方法より感度が低い可能性が示されたため、豚タンへの添加回収試験を行い、検出感度の比較検討を行った。その結果から、エルシニアの標準試験法を、日常的な食品検査のための試験法として比較的迅速に結果が得られる ISO 法に基づく試験法と、食中毒原因究明のための試験法として培養日数が長いものの検出感度に優れる BAM 法及び検査指針の方法に基づく試験法の2種類の試験法を作出した。

## 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タンへの添加回収試験

市販豚タン 10 g を用い、研究室保有の *Y. enterocolitica* (血清型 O3) を添加した。ISO 法における添加菌数は 3、15、26、73、79、240、260、730 及び 2600 CFU/g であった。その内 15、79 及び 240 CFU/g を接種した試験では、検体数を 5 とした。その他の試験では、1 検体を用いた。BAM 法及び検査指針の方法における添加菌数は、3 CFU/g であった。ISO 法では、検体に 90 ml の PSB ブロスを加え、10 倍乳剤作成後、25°C 2 日間培養するものと (ISO ①法)、その 10 倍乳剤 10 ml に 90 ml の ITC ブロスを加えて 25°C 2 日間の増菌培養行うもの (ISO ②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* (CYE) 培地に塗布し、25-30°C 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 CYE 培地に接種した。BAM 法及び検査指針の方法では、検体に PMP ブロス 90 ml を加え、10 倍乳剤作成後、4 °C 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°C 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 CYE 培地に塗布した (指針法)。

2) ISO 10273 : 2003 におけるストマッカー処理時間が検出率に及ぼす影響の検討

ISO 10273 : 2003 で規定されている試験試料のストマッカー処理時間 2 分間が妥当であるか検討するため、市販豚タン 10 g を用い、

研究室保有の *Y. enterocolitica* (血清型 03) を添加した回収試験を行った。添加菌数は 460 CFU/g であった。ストマッカー処理時間は 30 秒、1 分及び 2 分とし、各群 3 検体を用いて検討した。

### 3) NIHSJ-27-ST4 案及び NIHSJ-30TS-ST4 案の作成

1) 及び 2) の検討結果を元に、日常的な食品検査のための標準試験法としては ISO 10273:2003 法に基づく試験法を NIHSJ-27 として作成し、食中毒発生時の原因食品同等を目的として BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法に基づく試験法を NIHSJ-30 としてステージ 4 案を作成した。

## 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タンへの添加回収試験

表 1 に、豚タンへの添加回収試験結果を示した。検査指針の方法では、3 cfu/g の添加により、増菌培養 1 週間で CIN 培地及び CYE 培地上に *Y. enterocolitica* の定型集落が認められ、CYE 培地上では増菌培養 2 週間でも定型集落が認められた。一方、PSB ブロスを用いて 25°C で増菌する ISO②法では、3 cfu/g、15 cfu/g 及び 26 cfu/g の添加では全ての培養条件で添加菌が回収されなかった。73 cfu/g の添加でアルカリ処理を行った場合に CIN 培地及び CYE 培地上に定型集落が認められ、79 cfu/g の添加では 5 検体のうち CYE 培地で 1 検体が陽性、4 検体が陰性となり、CIN 培地では 5 検体が陰性となった。240 cfu/g の添加では、CIN 培地で 5 検体中 1 検体が陽性、CYE 培地で 5 検体中 4 検体が陽性の結果を

示した。260 cfu/g 及び 730 cfu/g の添加では、CIN 培地で陰性、CYE 培地で陽性の結果を示し、2600 cfu/g の接種では、両培地で陽性の結果が得られた。一方、ISO②法でアルカリ処理を行わない場合、ITC ブロスを用いて 25°C で増菌する ISO①法では、添加した *Y. enterocolitica* の発育は見られなかった。

### 2) ISO 10273 : 2003 におけるストマッカー処理時間が検出率に及ぼす影響の検討

表 2 に、ISO 10273 : 2003 におけるストマッカー処理時間を 30 秒、1 分及び 2 分とした場合の検出率を比較した結果を示した。アルカリ処理を行わない場合は、ストマッキング時間 30 秒では CYE 培地上に定型集落が認められず、1~2 分で認められる結果となった。一方、アルカリ処理を行う場合は、ストマッキング処理時間が 30 秒でも検出率の低下は見られなかったため、ストマッキング時間を 1 分としても、アルカリ処理を行う場合、行わない場合の両方において、原法の 2 分と検出率が変わらないことが示された。

### 3) NIHSJ-27-ST4 案及び NIHSJ-30TS-ST4 案の作成

食品からの病原性エルシニア・エンテロコリチカ及びシュードツベルクロシスを検出するための標準試験法として、ISO 10273 : 2003 を基本として、試験法の定義、試験方法の概要、使用器具、装置、培地、試薬、選択培地、試験手順、試料の調製、塗抹および培養、集落の計測、確認試験等からなる NIHSJ-27 を作成した (別添 1)。また、作業部会において一部に独自の確認を行い、ストマッカー時間を 2 分から 1 分に変更すること、酵素基質培地として CHROMagar*Y. enterocolitica* を併用すること、

確認試験の使用培地の一部を国内で他の食中毒菌試験に用いられている培地に変更することとした。また、食中毒発生時の原因食品同定を目的とした参照法として、BAM法(2007年)及び検査指針(2004年)を基本としたNIHSJ-30TSを作成した(別添2)。

#### D. 考察

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法に基づく試験法NIHSJ-27と、BAM法及び食品衛生検査指針の方法に基づく試験法NIHSJ-30TSについて、豚タンを用いた添加回収試験を実施した結果、BAM法及び検査指針の方法では3 cfu/gの添加により、添加菌の回収が可能であった。一方、ISO法では、3 cfu/g、15 cfu/g及び26 cfu/gの添加では全ての培養条件で添加菌が回収されず、73 cfu/gまたはそれ以上の添加量で菌の回収が可能であった。5検体を用いた試験において、半数以上の検体で回収が可能であったのは240 cfu/g添加時であり、79 cfu/g添加時は5検体中1検体のみで回収が可能であったことから、本試験法のLevel of detection 50% (LOD<sub>50</sub>)は、両者の間にあると思われた。以上より、検出感度はNIHSJ-30TSがNIHSJ-27より優れていたが、前者は増菌培養時間が1~3週間と、日常的な食品検査に用いるには長いため、増菌培養日数が2日間である後者と、目的により使い分けるのが妥当であると思われた。

#### 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、初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、昨年度の検討により、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ブロスをを用いて4℃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、本試験法の検討をステージ1に戻し、再度検討した。その結果に基づき、日常的な食品検査のための試験法として比較的迅速に結果が得られるISO法に基づく標準試験法NIHSJ-27と、食中毒原因究明のための試験法として培養日数が長いものの検出感度に優れるBAM法及び検査指針の方法に基づく参照試験法NIHSJ-30TSの2種類の試験法を作出した。

#### 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. ISO 10273 : 2003 及び食品衛生検査指針の方法における食品接種試験による検出限界値測定

接種菌 : *Yersinia enterocolitica* O3

接種検体 : 豚タン

	ISO①法	ISO②法	
増菌培養液	ITC	PSB	
培養温度	25℃	25℃	
培養時間	2日	2日	
培養状態	静置	振盪	
アルカリ処理	なし	あり	なし

指針法
PMP
4℃
1~3週間
静置
あり

添加菌量(CFU/g)	選択分離培地					
	SSDC	CYE	CIN	CYE	CIN	CYE
3	-	-	-	-	-	-
15 (n=5)	ND	ND	(-)5	(-)5	(-)5	(-)5
26	-	-	-	-	-	-
73	-	-	+	+	-	-
79 (n=5)	ND	ND	(-)5	(+)1, (-)4	(-)5	(-)5
240 (n=5)	-	-	(+)1, (-)4	(+)4, (-)1	(-)5	(-)5
260	-	-	-	+	-	-
730	-	-	-	+	-	-
2600	-	-	+	+	-	-

添加菌量(CFU/g)	増菌培養	CIN	VYE	CYE
3	1w	+	-	+
	2w	-	-	+
	3w	-	-	-

SSDC: Salmonella/Shigella agar with sodium desoxycholate and calcium chloride

CYE: CHROMagar *Yersinia enterocolitica*

CIN: Cefsurodin, Irgasan and Novobiocin agar

VYE: virulent *Yersinia enterocolitica*



表 2. ストマッキング処理時間ごとの陽性検体数

供試検体：豚タン

接種菌：*Y.eneterocolitica*（血清型 O3）

接種菌量：420 CFU/g

各処理時間につき 3 検体実施

ストマッキング時間	CIN		CHROM agarYe	
	アルカリ処理		アルカリ処理	
	無	有	無	有
30 sec	0/3	3/3	0/3	3/3
1 min	0/3	2/3	1/3	2/3
2 min	0/3	2/3	2/3	1/3

