

平成 26-28 年度 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

*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	
	百瀬愛佳	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。平成 26 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 法を中心に検討を行うこととした。しかしながら、平成 27 年度にステージ 2 案作成のため実施した、豚ひき肉及び豚タンへの *Y. enterocolitica* 添加回収試験の結果、ISO 10273 : 2003 法は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、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における討議により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 として検出感度を示し、2 つの試験法の最終案作成を行った。

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、ペストの原因菌である *Yersinia pestis* を発見した Yersin にちなんで命名さ

れた。人に病原性を示すのは *Y. pestis* の他に、食品等により媒介される *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* 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おり、日本国内でも数年ごとの集団事例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り、平成 26 年度から平成 28 年度まで本研究を実施した。

## B. 研究方法

### 1) 国際的試験法と食品衛生検査指針 (2004) の比較検討

ISO 10273 : 2003 と BAM 法 (2007 年)、USDA FSIS の試験法 (1998 年) について、概要を翻訳した。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。食品衛生検査指針 (2004) の方法を含

めた 4 つの試験法に関して、増菌培養の温度及び時間、使用培地等についてその内容を比較検討し、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」においてステージ 1 の提案を行った。

### 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°C 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°C 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°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 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°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 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°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 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°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 CHROMagarY.enterocolitica 培地に塗布した（検査指針①法）。

3) 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 225 ml を加え、10 倍乳剤作成後、4℃1、2 及び 3 週間培養した（BAM ③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 225 ml 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。

4) 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。

5) 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℃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℃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 (CYE) 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 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℃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 CYE 培地に塗布した（指針法）。

6) 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 O3）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。

7) 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 としてステージ 4 案を作成した。

## C. 研究結果

### 1) 国際的試験法と食品衛生検査指針 (2004) の比較検討

平成 26 年度報告書図 1～4 に、ISO 10273:2003 (以下 ISO 法) と BAM 法 (2007 年)、USDA FSIS の試験法 (1998 年、以下 USDA 法) 及び食品衛生検査指針 (2004) の方法 (以下検査指針) についての概要を示した。また、各試験法で使用される培地を平成 26 年度報告書表 1 に示した。各試験法の試験対象は、ISO 法が食品及び動物用飼料、検査指針が食品・環境ふき取り・水・糞便、USDA 法が食肉及び食鳥肉製品であった。BAM 法は対象を規定していなかった。希釈水は、BAM 法と検査指針では Phosphate Buffered Saline (PBS) を、USDA 法では 0.01M PBS を、ISO 法では Peptone Sorbitol Bile salts broth (PSBB) を用いていた。増菌培養前の選択分離培養は、BAM 法と検査指針で行われていた。増菌培養は BAM 法が 10°C10 日、USDA 法が希釈水を ITC ブロスに接種して 25°C2 日間培養するもの、希釈水上清を TSB に接種して 25°C24 時間培養後に、更に BOS に接種して 25°C3 日間培養する 2 段階増菌、及び希釈水の残りを 4°C14 日間培養する 3 通りの増菌培養を用いていた。ISO 法では希釈水を ITC ブロスに接種し 25°C 48 時間培養と、希釈水を 22～25°C2～3 日振盪培養 (あるいは 5 日間静置培養) する 2 通りの増菌培養を用いていた。検査指針の方法

では、希釈水を 4～9°Cで 3～4 週間培養し、1 週間ごとにその一部をアルカリ処理して分離培養を行う低温培養法を用いていた。いずれの試験方法でも、検体希釈液或いは増菌培養液について、アルカリ処理を行うものを行わないものの両方を選択分離培養に用いることとされていた。選択分離培地は BAM 法が Cefsulodin, Irgasan and novobiocin (CIN) 寒天培地とマッコンキー寒天培地を、USDA 法が CIN 寒天培地と *Salmonella/Shigella* agar with sodium desoxycholate and calcium chloride (SSDC) 培地を、ISO 法が CIN 寒天培地と SSDC 培地を、検査指針が IN 寒天培地 (CIN 寒天培地から Cefsulodin を除いたもの) 及びエスクリン加 IN 寒天培地を用いていた。選択分離培地の培養時間は、BAM 法が 30°C1～2 日、USDA 法が SSDC 培地の培養温度が 30°C24 時間、CIN 培地が 32°C18 時間であった。ISO 法は CIN 培地、SSDC 培地共に 30°C 24～48 時間、検査指針では IN 培地とエスクリン加 IN 培地の双方で 30°C24 時間の培養時間であった。確認試験については、4 つの試験法すべてで尿素分解性を確認することとしていた。それ以外には、BAM 法では Lysine arginine iron agar (LAIA) 斜面培地を用いてリジン及びアルギニンの脱炭酸性状、ガス非産生、硫化水素非産生を確認すると共に、Bile esculin agar を用いてエスクリン非分解の確認を行うものであった。USDA 法では、シモンズクエン酸培地を用いてクエン酸陰性を、クリグラー鉄寒天を用いてブドウ糖の発酵とガス及び硫化水素の非産生を確認するとされていた。ISO 法ではクリグラー鉄寒天を用いると共に、オキシダーゼ陰性を確認することとなっていた。検査指針の方法では、グラム染色、オキシダーゼ陰性、オルニチン

及びラムノースの分解を確認することとしていた。

各試験法での、分離培養で定型集落を得るまでの最長所要時間は、BAM 法が 11~12 日間、USDA 法が 15 日間、ISO 法が 7 日間、検査指針の方法が 4 週間 1 日であった。

## 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ひき肉への添加回収試験

平成 27 年度報告書表 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°C で増菌する ISO①法、ITC ブロスを用いて 25°C で増菌する ISO②法、PSB ブロスを用いて 10°C で培養する BAM①法、PMP ブロスを用いて 10°C で培養する BAM②法、PBS を用いて 4°C 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、BAM ①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、ISO ①法でアルカリ処理後の CIN 培地から、BAM ①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、従来のもものと新製品を用いたが、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。

## 3) 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

平成 27 年度報告書表 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°C 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°C 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 ブロスをもちいて 4°C 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°C 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。

## 4) 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℃で 48 時間培養した集落の形態を平成 27 年度報告書表 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た。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。

#### 5) 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

平成 28 年度報告書表 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℃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℃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。

#### 6) 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

平成 28 年度報告書表 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。

#### 7) 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ー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 CHROMagarY.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 法の Level of detection 50% (LOD<sub>50</sub>)は、79 cfu/g と 240 cfu/g 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、目的により両者を使い分けるのが適当であると思われた。また、本研究の検討により、両試験法共にストマッカー処理時間は 1 分間とすること、各試験法で定められた選択分離寒天培地に加え、酵素基質培地として CHROMagarY.enterocolitica を併用することとし、より実効性の高い試験法とした。

#### 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、平成 26 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、平成 27 年度に実施した豚肉への添加回収試験の結果、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 (病原性エルシニア・エンテロコリチカの試験法)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参照試験法 NIHSJ-30TS (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の試験法)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

