=原 著=

特異的PCR法を用いた *Cronobacter* 属7菌種の同定および ISO/TS 22964で検出される偽陽性菌との鑑別

西原正晴^{*1,†}, 須藤朋子^{*2}, 宮本真理^{*1}, 石井 哲^{*1},
柳平修一^{*1}, 山本 孝^{*1}

(^{*1}雪印メグミルク株式会社 品質保証部 食品衛生研究所, ^{*2}雪印メグミルク株式会社 品質保証部 分析センター)
(受付: 平成28年 3月31日)
(受理: 平成28年11月 7日)

Identification of Seven Species of the Genus *Cronobacter* and Discrimination of a False-Positive Bacterium in ISO/TS 22964 by Genus- and Species-Specific PCR Assays

Masaharu NISHIHARA^{*1,†}, Tomoko SUDO^{*2}, Mari MIYAMOTO^{*1}, Satoshi ISHII^{*1},
Shuichi YANAHIRA^{*1} and Takashi YAMAMOTO^{*1}

(^{*1}Institute of Food Hygiene, Quality Assurance Department, Megmilk Snow Brand Co., Ltd.,
1-1-2 Minamidai, Kawagoe, Saitama 350-1165, Japan; Corresponding author

^{*2}Central Food Analysis Laboratory, Quality Assurance Department, Megmilk Snow Brand Co., Ltd.,
1-1-2 Minamidai, Kawagoe, Saitama 350-1165, Japan)

Cronobacter spp., formerly *Enterobacter sakazakii*, are regarded as pathogens that cause rare but severe cases of disease in neonates and infants, and several cases were linked to the consumption of contaminated powdered infant formula. There are very few reports regarding methods which can identify *Cronobacter* spp. rapidly and easily. Hence, we developed a new identification protocol that can distinguish seven species of *Cronobacter* by using genus-, species-specific PCR assays. In addition, this study revealed *Franconibacter pulveris* is a false-positive bacterium in ISO/TS 22964. As a result of validation tests, it was confirmed that the accurate identification of *Cronobacter* spp. was able to be achieved without misidentifying *F. pulveris* as *Cronobacter* by the protocol shown in this study.

Key words: *Cronobacter* spp., PCR assay, ISO/TS 22964, false-positive, powdered infant formula

緒 言

Cronobacter 属は、腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌であり、乳幼児クロノバクター感染症の原因となることが知られている⁷⁾。クロノバクター感染症は疫学調査の結果により、いくつかの事例において乳児用調製粉乳への微量汚染が関係していると報告されていることから^{5, 6)}、乳児用調製粉乳には *Cronobacter* 属に関するコーデックス規格が設定されている³⁾。 *Crono-*

bacter 属は2008年に新しい細菌属として、 *Enterobacter sakazakii* から *Cronobacter* 属7菌種3亜種に再編された^{9, 11, 13)}。 *Cronobacter* 属は、16S rDNAの配列解析における種間相同性が97.8~99.7%であり、非常に類似しているのが特徴である⁹⁾。特に *Cronobacter sakazakii* および *Cronobacter malonaticus* においては16S rDNA配列の解析では識別できないことが知られている¹⁷⁾。近年では *Cronobacter* 属7菌種を識別する手法として、Multilocus sequencing typing (MLST)が新たに提唱されている¹⁾。しかしながら、この手法は複数の遺伝子領域について配列解析を行うため、非常に煩雑な操作が要求される。製造現場での同定操作を想定した場合、同定

[†]連絡先 m-nishihara@meg-snow.com

^{*1, *2} ☎350-1165 埼玉県川越市南台1-1-2

Table 1. Bacterial strains used in this study, and results of ISO/TS 22964

Strain	Species	Source	ISO/TS 22964
JCM1233 ^T	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Child's throat	+
LMG23826 ^T	<i>Cronobacter malonaticus</i>	Breast abscess	+
LMG23827 ^T	<i>Cronobacter turicensis</i>	Human neonatal meningitis, blood culture	+
LMG26249 ^T	<i>Cronobacter universalis</i>	Fresh water	+
LMG26250 ^T	<i>Cronobacter condimenti</i>	Spiced meat	+
ATCC51329 ^T	<i>Cronobacter muytjensii</i>	Unknown	+
JCM16467 ^T	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	Milk powder manufacturing facility	+
JCM16468 ^T	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	Dried milk production facility	+
JCM16469 ^T	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	Basin of a water fountain	+
JCM16471 ^T	<i>Franconibacter pulveris</i>	Fruit powder	+
LMG24059	<i>Franconibacter pulveris</i>	Powdered infant formula	+
IFH2511	<i>Franconibacter pulveris</i>	Environment	+
IFH2247	<i>Franconibacter pulveris</i>	Environment	+
JCM16470 ^T	<i>Franconibacter helveticus</i>	fruit powder	—
IFH2967	<i>Franconibacter helveticus</i>	Environment	—
JCM16472 ^T	<i>Siccibacter turicensis</i>	Fruit powder	—
NBRC13534 ^T	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sputum	—
NBRC13535 ^T	<i>Enterobacter cloacae</i>	Spinal fluid	—
IFH2925	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Environment	—
JCM1649 ^T	<i>Escherichia coli</i>	Urine	—
IFH1187	<i>Escherichia hermannii</i>	Environment	—
NBRC102420 ^T	<i>Escherichia vulneris</i>	Human wound	—
NBRC14940 ^T	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Unknown	—
IFH95	<i>Citrobacter freundii</i>	Environment	—
IFH1937	<i>Pantoea</i> sp.	Environment	—
JCM 1669 ^T	<i>Proteus mirabilis</i>	unknown	—
NBRC14160 ^T	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pre-filter tanks	—
IFH2595	<i>Bacillus cereus</i> group	Powdered infant formula	—
IFH2593	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Powdered infant formula	—

JCM, Japan Collection of Microorganisms; LMG, Laboratorium voor Microbiologie; ATCC, American Type Culture Collection; NBRC, NITE Biological Resource Center; IFH, Institute of Food Hygiene.

法は、簡便かつ正確な結果が得られる手法が求められるが、これまでに *Cronobacter* 属 7 菌種を簡便に同定できる手法については報告されていない。

Cronobacter 属の検査法としては ISO/TS 22964: 2006 (ISO 法) や US FDA-BAM Chapter 29: 2012 が参照法として広く使用されている。また、このほかに種々の検出・同定法も提案されているが、これらの方法において一部の近縁種は偽陽性反応を示すことも報告されている^{10, 12, 14)}。微生物試験により得られる結果は、対象菌の製造環境における汚染分布を調べたり、原材料の品質管理を行ううえで非常に有益な情報を与えてくれる。それゆえに、正しい施策を実施するためにも、試験法が内包する偽陽性リスクを把握しておくことは極めて重要である。しかしながら、参照法を用いたときに偽陽性となる菌種については、詳細な報告が見当たらない。

本研究では、*Cronobacter* 属に特異的なプライマーを用いた PCR 法 (特異的 PCR 法) を組合せて、*Cronobacter* 属 7 菌種を簡便に同定できる手順を示した。また、この一連の同定法により、ISO 法における偽陽性菌を鑑別できるかについても検証した。

材料および方法

1. 供試菌株および培養条件

本研究に用いた供試菌株を Table 1 に示した。*Cronobacter* 属は 7 菌種 3 亜種、グラム陰性菌は 13 菌種 (*Cronobacter* 属に遺伝学的に近い *Franconibacter* 属 2 菌種、*Siccibacter* 属 1 菌種、*Enterobacter* 属 2 菌種、*Citrobacter* 属 1 菌種および *Escherichia* 属 3 菌種を含む) およびグラム陽性菌は 2 菌種 (*Bacillus* 属、*Enterococcus* 属) を用いた。各菌種はそれぞれ、トリプトソイ寒天培地 (Trypticase soy agar; TSA; MERCK) にて 37℃、24 時間培養した後、各種試験に用いた。

2. ISO 法および生化学性状試験

ISO 法は ISO/TS 22964: 2006 記載のプロトコルに従った⁸⁾ (Fig. 1)。ISO 法で指定されている各種生化学性状試験は、以下の方法で実施した。黄色色素 (YP) の産生は、TSA 上で 25℃、48 時間培養した後形成したコロニーにより判断した。オキシダーゼ (OX) の判定にはポアメディア オキシダーゼテスト (栄研化学) を用いた。リジンデカルボキシラーゼ (LDC)、オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC)、アルギニンジヒドロラーゼ (ADH) の有無および D-ソルビトール (SOL)、L-ラムノー

ス(RHA), D-スクロース(SUC)からの発酵による酸産生試験にはID32E (Biomerieux)を用いた。D-メリビオース(MEL)およびアミグダリン(AMY)からの酸産生, クエン酸塩(CIT)の資化性にはアピ20E (Biomerieux)を用いた。また, ID32Eの結果解析による菌種同定にはapi-web (Biomerieux)を利用した。

3. *Cronobacter* 属および種特異的PCR法

供試菌のコロニーから, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAは, 約15~40 ng/ μ lとなるように精製水を用いて調製した。

Table 2には, *Cronobacter* 属特異的PCRおよび種特異的PCRの反応条件を示した。*Cronobacter* 属特異的PCR法には, Lehnerらによる方法¹⁵⁾, Seoらによる方法¹⁸⁾, およびイージー・プライマー法(エーエムアール)を用いた。*Cronobacter* 属の種特異的PCRは, Car-

terらの方法(*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter universalis*)⁴⁾, Stoopらの方法(*Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis*)²¹⁾ およびLehnerらの方法(*Cronobacter condimenti*)¹⁶⁾により行った。PCR反応液の組成は以下のとおりとした。10 $\times$ PCR バッファーを2 μ l, 2.5 mM dNTP ミックスを1.6 μ l, 10 μ Mの各プライマーを0.4 μ l, TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (5 U/ μ l, TaKaRa Bio)を0.1 μ l, およびテンプレートDNA 1 μ lに精製水を加えて20 μ lに調製した。PCR反応は, Veriti サーマルサイクラー (Life Technologies)を用いて, 次の条件で実施した。94 $^{\circ}$ C, 2分間加熱した後, 94 $^{\circ}$ C, 30秒, Table 2に示すアニーリング温度にて30秒, 72 $^{\circ}$ C, 1分間を30サイクルし, その後72 $^{\circ}$ C, 5分間の反応を行った。ただし, Seoらの方法のみ40サイクル実施した。PCR産物の確認には, MultiNA (島津製作所)のDNA-1000キット(島津製作所)またはDNA-2500キット(島津製作所)を用いた。

結 果

1. ISO法における偽陽性菌

Cronobacter 属およびその他の供試菌29株について Fig. 1に示したISO法により検査した結果, *Franconibacter pulveris* のみが偽陽性反応を示すことが明らかとなった(Table 1)。

2. 生化学性状試験

生化学性状試験の結果をTable 3に示した。ISO法では, YP, OX, LDC, ODC, ADH, SOL, RHA, SUC, MEL, AMY, およびCITの11項目が確認試験として記載されている。*F. pulveris* (JCM16471^T, LMG24059, IFH2511, およびIFH2247)は, これらの11項目のうち, CITを除く10項目で*C. sakazakii* JCM1233^T, *C. turicensis* LMG23827^T, *C. condimenti* LMG26250^T, *C. muytjensii*

Fig. 1. Method flow scheme of ISO/TS 22964: 2006

Table 2. Target genes, primer sequences, and product size of genus-, species-specific PCR assays

Target	Gene	Primer sets	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)	Reference
<i>Cronobacter</i>	16S rDNA	Esak-f Esak-r	GCT YTG CTG ACG AGT GGC GG ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG	64	929	Lehner, A. et al., BMC Microbiol., 2004, 4: 43.
	<i>dna G</i>	Crono-F Crono-R	GGG ATA TTG TCC CCT GAA ACA G CGA GAA TAA GCC GCG CAT T	52	78	Seo, K. H. et al., J. Food Prot., 2005, 68: 59-63.
	<i>dna J</i>	EZ-Primer ^{a)}	—	65	479	—
	<i>cgcA</i>	Cmstu-825-F Csak-1317-R	GGT GGC SGG GTA TGA CAA AGA C GGC GGA CGA AGC CTC AGA GAG T	69	492	Carter, L. et al., Appl. Environ. Microbiol., 2013, 79: 734-737.
<i>C. sakazakii</i>		Cmal-1410-R	GGT GAC CAC ACC TTC AGG CAG A		585	
<i>C. malonaticus</i>		Ctur-1036-R	TCG CCA TCG AGT GCA GCG TAT		211	
<i>C. turicensis</i>		Cuni-1133-R	GAA ACA GGC TGT CCG GTC ACG		308	
<i>C. universalis</i>						
<i>C. condimenti</i>	<i>rpoB</i>	Ccon-f Ccon-r	AAC GCC AAG CCA ATC TCG GTA CCG CCA CGT TTT GCT	58	689	Lehner, A. et al., J. Med. Microbiol., 2012, 61: 1034-1035.
<i>C. muytjensii</i>	<i>rpoB</i>	Cmuy-f Cmuy-r	TGT CCG TGT ATG CGC AGA CC TGT TCG CAC CCA TCA ATG CG	69	289	Stoop, B. et al., Int. J. Food Microbiol., 2009, 136: 165-168.
<i>C. dublinensis</i>	<i>rpoB</i>	Cdubl-f Cdubl-r	GCA CAA GCG TCG TAT CTC C TTG GCG TCA TCG TGT TCC	69	418	Stoop, B. et al., Int. J. Food Microbiol., 2009, 136: 165-168.

^{a)} PCR was conducted according to the manufacture's protocols.

Table 3. Results of biochemical reactions and ID32E analysis

Species	Strain	Confirmation tests of ISO/TS 22964										ID32E analysis	
		YP	OX	LDC	ODC	ADH	SOL	RHA	SUC	MEL	AMY	CIT	Organism
<i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i> <i>C. turicensis</i> <i>C. universalis</i> <i>C. condimenti</i> <i>C. muytjensii</i> <i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i> <i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i> <i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i> <i>F. pulveris</i>	JCM1233 ^T	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	<i>Cronobacter sakazakii</i>	96.5%
	LMG23826 ^T	+	—	—	+	+	—	+	+	+	— ^{a)}	<i>Cronobacter malonaticus</i>	99.1%
	LMG23827 ^T	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	<i>Cronobacter sakazakii</i>	47.8%
	LMG26249 ^T	+	—	—	—	+	—	+	+	+	+	<i>Cronobacter turicensis</i>	66.9%
	LMG26250 ^T	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	<i>Cronobacter muytjensii</i>	90.5%
	ATCC51329 ^T	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	<i>Cronobacter muytjensii</i>	90.5%
	JCM16467 ^T	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	<i>Cronobacter muytjensii</i>	90.5%
	JCM16468 ^T	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	<i>Cronobacter muytjensii</i>	Unacceptable
	JCM16469 ^T	+	—	—	+	+	—	+	+	+	+	<i>Cronobacter dublinensis</i>	70.1%
	JCM16471 ^T	+	—	—	+	+	—	+	+	+	—	<i>Cronobacter sakazakii</i>	98.6%
<i>F. helveticus</i>	LMG24059	+	—	—	+	+	—	+	+	+	—	<i>Cronobacter sakazakii</i>	98.6%
	IFH2511	+	—	—	+	+	—	+	+	+	—	<i>Cronobacter sakazakii</i>	98.6%
	IFH2247	+	—	—	+	+	—	+	+	+	—	<i>Cronobacter sakazakii</i>	98.6%
	JCM16470 ^T	+	—	—	—	+	—	+	+	+	—	<i>Pantoea</i> spp.	82.7%
<i>S. turicensis</i>	IFH2967	+	—	—	—	—	—	+	—	+	—	<i>Pantoea</i> spp.	65.6%
	JCM16472 ^T	+ w	—	—	+	—	—	+	—	+	+	<i>Escherichia vulneris</i>	98.6%

^{a)} Negative for 24 hr at 37°C; positive for 72 hr at 37°C.

YP, production of a yellow pigment; OX, oxidase; LDC, L-Lysine decarboxylase; ODC, L-Ornithine decarboxylase; ADH, L-Arginine dihydrolase; SOL, fermentation of D-sorbitol; RHA, fermentation of L-rhamnose; SUC, fermentation of D-sucrose; MEL, fermentation of D-melibiose; AMY, fermentation of amygdaline; CIT, hydrolysis of citrate; +, positive; —, negative; + w, positive to weak reaction.

Fig. 2. Representative electrophoresis image of *Cronobacter* genus-specific PCR products by MultiNA, DNA-2500 (Shimadzu). M: DNA ladder markers. Lanes: (1) *Cronobacter sakazakii* JCM1233^T; (2) *Cronobacter malonaticus* LMG23826^T; (3) *Cronobacter turicensis* LMG23827^T; (4) *Cronobacter universalis* LMG26249^T; (5) *Cronobacter condimentii* LMG26250^T; (6) *Cronobacter muytjensii* ATCC51329^T; (7) *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467^T; (8) *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468^T; (9) *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469^T; (10) *Franconibacter pulveris* JCM16471^T; (11) *Franconibacter helveticus* JCM16470^T; (12) *Siccibacter turicensis* JCM16472^T; (13) *Enterobacter cloacae* NBRC13535^T; (14) *Escherichia coli* JCM1649^T. Template DNA was amplified with primers Esak-f/Esak-r (929 bp). Faint bands were detected in PCR products of some non-*Cronobacter* species.

ATCC51329^T, *C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467^T および *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469^T と一致した。また, *C. malonaticus* LMG23826^T に関しては, CIT の反応性が弱く, 37℃, 24時間では陰性と判定されるため, 11項目のすべてが *F. pulveris* と一致した。このほか, ID32E による同定では, *F. pulveris* 4株はいずれも *C. sakazakii* と同定された。

3. *Cronobacter* 属および種特異的PCR法による同定および偽陽性菌の鑑別

Cronobacter 属特異的PCR法では, Lehner らの方法および Seo らの方法を用いた場合, *Cronobacter* 属7菌種ともに特異的バンドが検出でき, かつそれら以外の菌種では陰性となった (Fig. 2)。*Cronobacter* 属以外の一部の菌種にて, 微小な非特異的バンドが認められたものの, 増幅が弱いので, *Cronobacter* 属由来のピークとの区別が容易であった。一方, イージー・プライマー法では *Cronobacter* 属以外の菌種に非特異的反応は認められなかったものの, *C. condimentii* では特異的なバンドが検出されず, ただし, アニーリング温度を 65 から 59℃ にまで下げることにより, 特異的なバンドが検出可能であった (Table 4)。また, *C. universalis* では本来検出されるバンド (514 bp) のほかに, エキストラバンド (240 bp) が検出された。

Cronobacter 種特異的PCR法を行った結果, *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. universalis*, および *C. condimentii* ではそれぞれ特異的なバンドが検出され, 対象菌種以外に非特異的反応は認められなかった。一方, *C. muytjensii* の特異的PCR法では, *C. muytjensii* の特異的バンドのほかに, *Siccibacter turicensis* および *Klebsiella pneumoniae* の偽陽性バンド (289 bp) が認められた。また, *C. dublinensis* の特異的PCR法では, *C. dublinensis* の特異的バンド以外に *Franconibacter pulveris*, *F. helveticus*, *S. turicensis*, *Enterobacter cloacae* complex, および *Escherichia vulneris* の偽陽性バン

ド (418 bp) が認められた (Fig. 3, Table 4)。

考 察

ISO 法の偽陽性に関しては, 情報が少なく不明であるところが多い。また, この試験法は *E. sakazakii* が *Cronobacter* 属に再編される以前に作られたものであるため, 陽性判定された検出菌が *Cronobacter* 属のどの菌種に該当するかを同定できない。近年では, *Cronobacter* 属7菌種を同定する手法として, MLST 法が提唱されているが, この方法では複数の遺伝子領域について配列解析を行う必要があり, 非常に煩雑な操作が要求される。そこで, われわれはPCR増幅産物のサイズの違いを確認するだけで, 簡便に同定できる特異的PCR法に注目し, *Cronobacter* 属7菌種の同定プロトコルを構築した。さらに, それにより, ISO 法の偽陽性菌を *Cronobacter* 属と区別できるかについても検証した。

2013年に Brady らにより, *Enterobacter pulveris*, *Enterobacter helveticus* および *Enterobacter turicensis* はそれぞれ *Cronobacter pulveris*, *Cronobacter helveticus*, *Cronobacter zurichensis* として新菌種として提案されたが, 承認には至らず²⁾, 2014年に Stephan らによって新たにそれぞれ *F. pulveris*, *F. helveticus*, *S. turicensis* として再提案されている²⁰⁾。これらの菌種は遺伝学的に *Cronobacter* 属に非常に近いため, 生化学性状が類似していると推測されるが, ISO 法による詳細な検討報告はほとんど見当たらない。そこで, ISO 法の確認試験の結果を比較したところ, *F. pulveris* は *Cronobacter* 属と非常に類似した生化学性状プロファイルを示すことが確認された (Table 3)。このほか, ID32E の解析結果では, 供試した *F. pulveris* 4株はいずれも *C. sakazakii* と判定されたことから, *F. pulveris* が特に *Cronobacter* 属に近い性状を有することが明らかとなった。また, *C. malonaticus* LMG23826^T のように CIT の反応性が弱い株は, *F. pulveris* との区別が困難である。それゆえに

Table 4. Specificity and exclusiveness of primer sets for *Cronobacter*

Species	Strain	Genus-specific				Species-specific									
		EZ-Primer		Crono-F/		Crono-R		Cmstu-825-F/		Cmstu-825-F/		Cmstu-825-F/		Cmstu-825-F/	
		Esak-r	Esak-f/	Esak-r	Esak-f/	Esak-r	Esak-f/	Esak-r	Esak-f/	Esak-r	Esak-f/	Esak-r	Esak-f/	Esak-r	Esak-f/
<i>C. sakazakii</i>	JCM1233 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. malondictus</i>	LMG23826 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. turicensis</i>	LMG23827 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. universalis</i>	LMG26249 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. condimenti</i>	LMG26250 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. muytjensii</i>	ATCC51329 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	JCM16467 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	JCM16468 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	JCM16469 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>F. pulveris</i>	JCM16471 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	LMG24059	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IFH2511	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IFH2247	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>F. helveticus</i>	JCM16470 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	IFH2967	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. turicensis</i>	JCM16472 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. aerogenes</i>	NBRC13534 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. cloacae</i>	NBRC13535 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. cloacae</i> complex	IFH2925	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i>	JCM1649 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. hermannii</i>	IFH1187	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. vulneris</i>	NBRC102420 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>K. pneumoniae</i>	NBRC14940 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. freundii</i>	IFH95	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. agglomerans</i>	IFH1937	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. mirabilis</i>	JCM 1669 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. fluorescens</i>	NBRC14160 ^T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cereus</i> group	IFH2595	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. casseliflavus</i>	IFH2593	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

^{a)} Expected amplicon (514 bp) and extra amplicon (240 bp) were detected.

^{b)} Annealing temperature described in the manufacture's protocols is 65°C, however expected amplicon was detected at annealing 59°C.

Fig. 3. Representative electrophoresis image of *Cronobacter* species-specific PCR products by MultiNA, DNA-1000 (Shimadzu).

M: DNA ladder markers. Lanes: (1) *Cronobacter sakazakii* JCM1233^T; (2) *Cronobacter malonaticus* LMG23826^T; (3) *Cronobacter turicensis* LMG23827^T; (4) *Cronobacter universalis* LMG26249^T; (5) *Cronobacter condimentii* LMG26250^T; (6) *Cronobacter muytjensii* ATCC51329^T; (7) *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467^T; (8) *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468^T; (9) *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* JCM16469^T. Template DNA was amplified with primers Cmstu-825-F/Csak-1317-R (492 bp), Cmstu-825-F/Cmal-1410-R (585 bp), Cmstu-825-F/Ctur-1036-R (211 bp), Cmstu-825-F/Cuni-1133-R (308 bp), Ccon-f/Ccon-r (689 bp), Cmuy-f/Cmuy-r (289 bp), and Cdubl-f/Cdubl-r (418 bp). A false-positive band was detected in PCR products (Cmuyf/Cmuyr) amplified from genomic DNA of *Siccibacter turicensis* JCM16472^T and *Klebsiella pneumoniae* NBRC14940^T, and PCR products (Cdubl-f/Cdubl-r) amplified from genomic DNA of *Franconibacter pulveris* JCM16471^T, *F. pulveris* LMG24059, *F. pulveris* IFH2511, *F. pulveris* IFH2247, *Franconibacter helveticus* JCM16470^T, *F. helveticus* IFH2967, *S. turicensis* JCM16472^T, *Enterobacter cloacae* complex IFH2925, and *Escherichia vulneris* NBRC102420^T.

生化学的性状による鑑別法は適切ではないと考えられた。*F. pulveris* の分布に関する情報は少ないが、*F. pulveris* LMG24059 は乳児用調製粉乳から分離されていることから¹⁹⁾、乳児用調製粉乳もしくはその製造環境から検出される可能性がある。乳児用調製粉乳の出荷検査に ISO 法を用いた場合、*F. pulveris* が *Cronobacter* 属と誤判定されるリスクは非常に高いと推測され、結果的に製品ロスを招く可能性がある。

Cronobacter 属特異的 PCR 法では、イージー・プライマー法のみは *C. universalis* および *C. condimentii* における特異性が低かった (Table 4)。*C. universalis* および *C. condimentii* はともに 2012 年に新菌種提案された菌種であるが¹³⁾、イージー・プライマー法は *Cronobacter* 再編前に開発され、そのプライマー配列が非公開であるために検証できないが、*C. condimentii* ではアニーリング温度を 65 から 59℃ に下げることで特異的なバンドが検出されたことから、対象遺伝子である *dnaJ* とプライマー配列のマッチングが不十分である可能性が考えられ

た。したがって、*Cronobacter* 属特異的 PCR 法には、Lehner らまたは Seo らの方法が適していると判断した。また、*Cronobacter* 種特異的 PCR 法においては、*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. universalis* および *C. condimentii* に関しては、*Cronobacter* 属以外に対する排他性に問題はなかったが、*C. muytjensii* 特異的 PCR 法および *C. dublinensis* 特異的 PCR 法は排他性が低く、*Cronobacter* 属以外の一部の菌種においても非特異的増幅が認められた (Table 4)。特に *C. dublinensis* 特異的 PCR 法は *F. pulveris* に対しても偽陽性バンドが検出されるため、ISO 法により *F. pulveris* が分離された場合、*C. dublinensis* と誤同定する危険性がある。それゆえに、*F. pulveris* を *C. dublinensis* と誤同定しないためには、まず、*Cronobacter* 属特異的 PCR 法を用いて *Cronobacter* 属陽性を確認したうえで、次に *Cronobacter* 種特異的 PCR 法の順に種別同定を行うのが最も効果的であると考えられた。

本研究結果により、ISO 法では *F. pulveris* が偽陽性となることが明らかとなった。また、*Cronobacter* 属、*Cronobacter* 種の順に特異的 PCR 法を行うことで、*F. pulveris* を *Cronobacter* と誤同定せず、かつ *Cronobacter* 7 菌種をそれぞれ同定できることを示した。これらの一連の同定法は、乳児用調製粉乳の品質管理の向上に貢献できるものと考えられる。

要 約

Cronobacter spp. は、乳幼児に対し、まれではあるが重篤な感染症を引き起こす病原菌であり、いくつかの事例では乳児用調製粉乳の微量汚染が関与していることが知られている。*Cronobacter* 属は 7 菌種 3 亜種から構成されているが、これらを簡便に同定できる手法はほとんど報告されていない。そこで、我々は *Cronobacter* 属および種に特異的な PCR 法を用いて、*Cronobacter* 属 7 菌種を簡便に同定できる手順を示した。また、本研究結果において、ISO/TS 22964: 2006 では *F. pulveris* が偽陽性反応を示すことが明らかとなった。一連の同定法を用いることにより、*F. pulveris* を *Cronobacter* と誤同定することなく、*Cronobacter* 属 7 菌種をそれぞれ同定可能であることが確認された。

文 献

- 1) Baldwin, A., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Kucerova, E., Manning, G., Dowson, C. and Forsythe, S.: Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. BMC Microbiol., 9, 223 (2009).
- 2) Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T. and De Vos, P.: Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. am-*

- nigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipresuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. Syst. Appl. Microbiol., **36**, 309–319 (2013).
- 3) CAC: Codex Alimentarius Commission code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children. CAC/RCP 66e2008 (2008).
 - 4) Carter, L., Lindsey, L. A., Grim, C. J., Sathyamoorthy, V., Jarvis, K. G. et al.: Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter*. Appl. Environ. Microbiol., **79**, 734–737 (2013).
 - 5) FAO/WHO: *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 6 (2004).
 - 6) FAO/WHO: *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 10 (2006).
 - 7) Holý, O. and Forsythe, S.: *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. J. Hosp. Infect., **86**, 169–177 (2014).
 - 8) International Organization for Standardization, Technical specification ISO/TS22964. Milk and milk products—Detection of *Enterobacter sakazakii*. ISO, Geneva, Switzerland (2006).
 - 9) Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R. and Joosten, H.: The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. BMC Evol. Biol., **7**, 64 (2007).
 - 10) Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R. and Joosten, H.: Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). J. Clin. Microbiol., **45**, 3814–3816 (2007).
 - 11) Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R. and Joosten, H.: *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **58**, 1442–1447 (2008).
 - 12) Jackson, E. E., Sonbol, H., Masood, N. and Forsythe, S. J.: Genotypic and phenotypic characteristics of *Cronobacter* species, with particular attention to the newly reclassified species *Cronobacter helveticus*, *Cronobacter pulveris*, and *Cronobacter zurichensis*. Food Microbiol., **44**, 226–235 (2014).
 - 13) Joseph, S., Cetinkaya, E., Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M. J. and Forsythe, S. J.: *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. Genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **62**, 1277–1283 (2012).
 - 14) Joseph, S. and Forsythe, S. J.: Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter* spp., generated by multilocus sequence typing and analysis. Front. Microbiol., **3**, 397 (2012).
 - 15) Lehner, A., Tasara, T. and Stephan, R.: 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. BMC Microbiol., **4**, 43 (2004).
 - 16) Lehner, A., Fricker-Feer, C. and Stephan, R.: Identification of the recently described *Cronobacter condimenti* by an *rpoB*-gene-based PCR system. J. Med. Microbiol., **61**, 1034–1035 (2012).
 - 17) Li, Y., Cao, L., Zhao, J., Cheng, Q., Lu, F., Bie, X. and Lu, Z.: Use of *rpoB* gene sequence analysis for phylogenetic identification of *Cronobacter* species. J. Microbiol. Methods., **88**, 316–318 (2012).
 - 18) Seo, K. H. and Brackett, R. E.: Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. J. Food Prot., **68**, 59–63 (2005).
 - 19) Stephan, R., Van Trappen, S., Cleenwerck, I., Iversen, C., Joosten, H., De Vos, P. and Lehner, A.: *Enterobacter pulveris* sp. nov., isolated from fruit powder, infant formula and an infant formula production environment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **58**, 237–241 (2008).
 - 20) Stephan, R., Grim, C. J., Gopinath, G. R., Mammel, M. K., Sathyamoorthy, V., Trach, L. H., Chase, H. R., Fanning, S. and Tall, B. D.: Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **64**, 3402–3410 (2014).
 - 21) Stoop, B., Lehner, A., Iversen, C., Fanning, S. and Stephan, R.: Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. Int. J. Food Microbiol., **136**, 165–168 (2009).