

## A 研究目的

ポリ臭素化シヘンノ・*p*ンオキシシン (PBDDs) およびポリ臭素化シヘンソフラン (PBDFs) は、内装用繊維や家電用プラスチックなどに使用されている臭素化難燃剤の不純物として含まれており、また、これらの器材の熱処理過程で多量に生成される。PBDD/Fs は塩素化ダイオキシシン類 (PCDD/Fs) と同様程度の毒性を有すると考えられており、臭素化難燃剤の使用増加に伴って環境汚染やヒトへの健康影響が懸念されている。PBDD/Fs の分析法は複雑であり、市販されている標準物質も少ないことから環境中での汚染状況やヒトへの曝露および健康影響などに関してほとんど明らかになっていない。今後、PBDD/Fs の汚染実態調査など大規模なモニタリング試験が実施される場合には、正規の測定法と期待されるガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) を補完する簡便法の開発が重要となる。

我々は平成 11~13 年度の厚生科学研究費補助金研究において生体試料中 PCDD/Fs の酵素免疫測定法 (ELISA) を開発したことから、その研究基盤をもとに生体試料中 PBDD/Fs の ELISA の開発を目指した。昨年度は、PBDD ハプテン 3 種、免疫原および酵素標識ハプテンを合成し、PBDD/Fs に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリトーマ 5 種を作製した。

本年度は得られたハイブリトーマの産生する抗体について臭素化、塩素化、臭素 塩素混合ダイオキシシン類との交差性を調べ、最適なモノクローナル抗体を選択して PBDD/Fs の

ELISA を構築することとした。さらに、生体試料の簡便な精製法を検討した。

## B 研究方法

### 1 試薬と器材

PCDD/Fs Wellington Laboratories

PBDD/Fs, PXDD, BDE-47 Cambridge

Isotope Laboratories

セラチン ナカライテスク

Triton X 100、 $\sigma$ フェニレンシアミン二塩酸塩 Sigma

アフィニティー精製ウサギ抗マウス IgG+IgM 抗体 (第二抗体) Jackson ImmunoResearch Laboratories

Protein G カラム Amersham Pharmacia Biotech

有機溶媒 (ダイオキシシン類分析用) 和光純薬工業

ELISA 用マイクロタイタープレート Costar プレセノプ<sup>®</sup>フタロンアニン固定化シリカゲル (Wakogel P-29) カラム、化学修飾シリカゲルカラム Type III 和光純薬工業

その他の塩類 試薬特級

### 2 機器

ELISA プレータリーダー (BL 312e) Bio-Tek Instruments

### 3 ELISA

#### 1) 緩衝液と基質溶液

Buffer A 0.05 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{HPO}_4$  緩衝液 (pH 7.3)

Buffer B 0.9% NaCl を含む buffer A

Buffer C 0.1% セラチンを含む buffer B

基質溶液 0.05%  $\sigma$ -Phenylenediamine HCl および 0.01% 過酸化水素を含む 50 mmol/L ク

エン酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)

## 2) 第二抗体固定化プレートの調製

96 穴 ELISA 用マイクロタイタープレート  
の各ウェルに、第二抗体の buffer B 溶液 (2  
μg/mL) を分注 (100 μL/well) して、4°C で一  
夜放置した。BSA (1.5%) の buffer B 溶液  
(50 μL/well) をウェルに分注して、室温で 2  
~3 時間放置した。溶液を吸引除去したのち、  
buffer B でウェルを 3 回洗浄して第二抗体固  
定化プレートを作製した。

## 3) 操作法

ダイオキシン標準液または試料溶液に試料  
溶解液を添加して溶媒を乾固後、buffer B に  
再溶解し (100 μL)、適宜希釈したハイブリ  
トーマ培養液または Protein G カラムでマウ  
ス腹水から精製した IgG の buffer C 溶液  
100 μL を加えて室温で 30 分間静置した。次  
いで、酵素標識ダイオキシン (TB-3 HRP)  
50 μL 加えて 15 分間水冷し、その 100 μL を  
第二抗体固定化プレートに添加して 4°C で 2  
時間放置した。溶液を吸引除去したのち、  
buffer B でウェルを 3 回洗浄し、基質溶液を  
添加して (100 μL/well)、室温で 30 分間放置  
した。3 mol/L 硫酸 (50 μL/well) を加えて酵  
素反応を停止し、490 nm の吸光度をプレ  
ートリーダーにより測定した (図 1)。

## 4 脂質からの ELISA 試料調製法

ハター 25 g にエタノール 250 mL および  
10 mol/L KOH 25 mL を加えて約 40°C で 2 時  
間攪拌し、室温で一晩放置した。*n*-ヘキサ  
ン 100 mL および水 250 mL を加えて室温で 5 分  
間振とうして静置後、ヘキサソル層をナス型フ  
ラスコに分取した。水層を *n*-ヘキサソル 100  
mL で更に 2 回抽出し、ロータリーエハポレ

ーターでヘキサソルを約 25 mL に濃縮してカラ  
ス遠心管に移した。この遠心管に濃硫酸 2.5  
mL を加えて室温で 2 分間振とう後、遠心分  
離 (3000 rpm、室温 3 分) して硫酸を除去し  
た。このヘキサソル層を化学修飾シリカゲルカ  
ラムに負荷し、*n*-ヘキサソル 20 mL でダイオ  
キシン類を溶出した。次いで、フルオロヘン  
セン 1 mL、エタノール 1 mL、アセトン 3  
mL および *n*-ヘキサソル 3 mL で順次洗浄した  
wakogel P-29 カートリッジカラムに先のヘキ  
ソル溶出液を約 1 mL に濃縮して負荷し、*n*-  
ヘキサソル 3 mL およびフルオロヘンセン/*n*-  
ヘキサソル (1:9) 1 mL でカラムを洗浄後、  
フルオロヘンセン 1 mL でダイオキシン類を  
溶出した。溶出液に DMSO 10 μL を添加し  
て ELISA 用試料とした (図 2)。

## C D 研究結果および考察

### 1 PBDD/Fs の ELISA に用いるモノクロー ナル抗体の選定

2,3,7,8-TeCDD に最も親和性の高いモノク  
ローナル抗体 D9 36 と、本研究で作製したモ  
ノクローナル抗体 B2 1、B2-30、B2-31、B6  
11 および B6-44 について PBDD/Fs に対する  
反応性を比較した。

2,3,7,8 TeCDD、PBDD/Fs のなかで毒性か  
強いと考えられる 2,3,7,8-TeBDD と  
2,3,4,7,8-PeBDD および生体や環境試料中に  
高濃度で検出される 2,3,7,8 TeBDF の標準曲  
線をそれぞれの抗体を用いた ELISA により  
作成した。

B2-1、B2 30 および B2 31 はいずれの  
PBDD/Fs に対しても親和性が低かった。一

方、B6 11 は 2,3,7,8 TeCDD に対しては D9 36 に及ばなかったものの、2,3,7,8-TeBDD および 2,3,7,8-TeBDF には D9-36 と同等の反応性を示し、2,3,4,7,8-PeBDD に対しては D9 36 より親和性が高かった。B6 44 はいずれの PBDD/Fs においても B6-11 に及ばなかった (図 3、4、5、6)。

以上の結果より、PBDD/Fs の ELISA に最適な抗体として B6-11 を選定した。

## 2 モノクローナル抗体 B6 11 を用いた ELISA における試料溶解液の選定

疎水性のダイオキシン類を水系である ELISA に供するためには、有機溶媒や界面活性剤など試料溶解液の選定が重要になる。

前研究での知見に基づいて Triton X-100 と DMSO について検討したところ、5~20%の DMSO が優れており (図 7)、吸光度の低下か少ない 10%DMSO を試料溶解液とした。

## 3 モノクローナル抗体 B6-11 を用いた ELISA の測定感度

モノクローナル抗体 B6-11 (精製 IgG) を用いて ELISA を最適化した。IgG 濃度 50 ng/mL、TB-3-HRP 濃度 1 μg/mL で試料溶解液を 10%DMSO として標準曲線を作成した。標準曲線 B<sub>0</sub> の吸光度の 2 SD からもとめた定量限界は 2,3,7,8 TeBDD 1pg/assay であった (図 8)。

## 4 モノクローナル抗体 B6 11 の交差反応性

モノクローナル抗体 B6 11 の 2,3,7,8-TeCDD に対する反応性を 1 としたときのダイオキシン類およびコプラナーPCB の交差反

応性をそれぞれ表 1 および表 2 に示した。

交差性が高かったのは四または五塩素化、臭素化、塩素 臭素混合型ダイオキシンと 1,2,3,4,7,8-HxCDD であった。臭素系難燃剤のなかで最も高レベルで生体および環境試料中に検出される BDE-47 とはほとんど交差反応性を示さなかった。一方、コプラナーPCB については、片方のヘンゼン環炭素骨格のパラおよびメタ位 (3,4、4,5、3',4'または 4',5') に 2 個の塩素がある場合のみ、弱い交差性 (0.02~0.05) を示した。

B6-11 は毒性が強いと考えられている四または五塩素化、臭素化、塩素・臭素混合型 PBDD/Fs と反応性が高いことから、本抗体を用いる ELISA はダイオキシン毒性の簡便なスクリーニング法またはモニタリング法として使用できることが示された。

## 5 ハターに添加した PBDD/Fs の回収

ハター15 g 分の抽出液に 2,3,7,8-TeBDD、1,2,3,7,8-PeBDD、2,3,7,8-TeBDF および 2,3,4,7,8-PeBDF それぞれ 50 pg ずつを添加し、10%硝酸銀シリカゲル 1 g と 55%硫酸シリカゲル 1 g を重層した化学修飾シリカゲルカラムおよび Wakogel P-29 カラムで精製して ELISA で測定したところ、2,3,7,8-TeBDD、1,2,3,7,8-PeBDD、2,3,7,8 TeBDF および 2,3,4,7,8-PeBDF の回収率はそれぞれ 83%、82%、80%および 78%であった (表 3)。脂質に添加した PBDD/Fs はほぼ定量的に回収されたことから、本精製法は生体試料の ELISA の前処理法として適用できることが示された。

## E 結論

昨年度に作製したモノクローナル抗体について塩素化、臭素化および塩素・臭素混合ダイオキシン同族体との交差反応性を調べて最適な抗体を選択し、臭素化ダイオキシンの ELISA を確立した。選択したモノクローナル抗体 B6 11 は毒性が強いと考えられている四または五塩素化、臭素化、塩素・臭素混合型 PBDD/Fs と反応性が高いことから、本抗体を用いる ELISA は塩素系および臭素系を合わせたダイオキシン毒性の簡便なスクリーニング法およびモニタリング法として期待される。また、化学修飾シリカゲルおよび Wakogel P-29 カラムを用いる簡便な ELISA 試料調整法は、生体試料のみならず食品や環境試料にも広く適用できる可能性がある。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

なし

### 2 学会発表

なし

## H 知的所有権の取得状況

### 1 特許取得

なし

### 2 実用新案登録

なし

### 3 その他

なし

表 1 モノクローナル抗体 B6-11 のPXDD/Fs、BDEに対する交差反応性

	Compound	TEF (1997 WHO)	Cross rate
PCDD	2,3,7,8-TeCDD	1 0	1 0
	1,2,3,7,8-PeCDD	1 0	0 56
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0 1	0 51
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0 1	0 03
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0 1	0 01
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0 01	0 004
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	0 0001	0 0002
PCDF	2,3,7,8-TeCDF	0 1	0 35
	1,2,3,7,8-PeCDF	0 05	0 01
	2,3,4,7,8-PeCDF	0 5	0 30
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0 1	0 03
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0 1	0 01
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0 1	0 01
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0 1	0 01
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0 01	0 002
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0 01	0 003
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	0 0001	0 0002	
PBDD	2,3,7,8-TeBDD		0 69
	1,2,3,7,8-PeBDD		0 58
	1,2,3,6,7,8-HxBDD		0 004
	1,2,3,4,6,7,8,9-OBDD		0 0002
PBDF	2,3,7,8-TeBDF		0 57
	2,3,4,7,8-PeBDF		0 55
PXDD	2-B-3,7,8-TrCDD		0 81
	1-B-2,3,7,8-TeCDD		0 75
BDE	2,2',4,4'-TeBDE(BDE-47)	-	<0 0001

表 2 モノクローナル抗体 B6-11 のCo-PCB に対する交差反応性

	Compound	TEF (1997 WHO)	Cross rate
Non-ortho	3,3',4,4'-TeCB (PCB-77)	0 0001	0 03
	3,4,4',5-TeCB (PCB-81)	0 0001	0 02
	3,3',4,4',5-PeCB (PCB-126)	0 1	0 05
	3,3',4,4',5,5'-PeCB (PCB-169)	0 01	0 0002
Mono-ortho	2,3,3',4,4'-PeCB (PCB-105)	0 0001	0 02
	2,3,4,4',5-PeCB (PCB-114)	0 0005	0 02
	2,3',4,4',5-PeCB (PCB-118)	0 0001	0 03
	2',3,4,4',5-PeCB (PCB-123)	0 0001	0 001
	2,3,3',4,4',5-HxCB (PCB-156)	0 0005	0 02
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (PCB-157)	0 0005	0 0002
	2,3',4,4',5,5'-HxCB (PCB-167)	0 00001	0 0002
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (PCB-189)	0 0001	0 0002
Di-ortho	2,2',3,3',4,4',5-HpCB (PCB-170)	-	0 0002
	2,2',3,4,4',5,5'-HpCB (PCB-180)	-	0 0003

表 3 バターに添加した PBDD/Fs の回収率

PBDD/Fs	Added (pg)	Measured (2,3,7,8-TeBDD pg eq)		Recovery* (%)
		Control	Butter**	SD
Blank	0		3.1	—
			3.4	
			2.3	
mean			2.9	
2,3,7,8-TeBDD	50	50.8	38.8	74.4
		46.7	43.2	83.6
		47.2	46.4	90.2
		mean	48.2	42.8
1,2,3,7,8-PeBDD	50	42.2	32.3	73.3
		37.5	40.0	92.4
		40.7	34.9	79.7
		mean	40.1	35.7
2,3,7,8-TeBDF	50	38.7	30.3	71.0
		40.1	33.6	79.5
		37.0	37.1	88.6
		mean	38.6	33.7
2,3,4,7,8-PeBDF	50	37.8	36.4	86.6
		40.8	31.7	74.5
		37.4	31.0	72.7
		mean	38.7	33.0

\* (Butter - Blank) / Control × 100

\*\* バター 1.5 g 分の抽出液に PBDD/Fs を添加し、化学修飾シリカゲルカラムおよび Wakogel P-29 で精製後、ELISA で測定した。

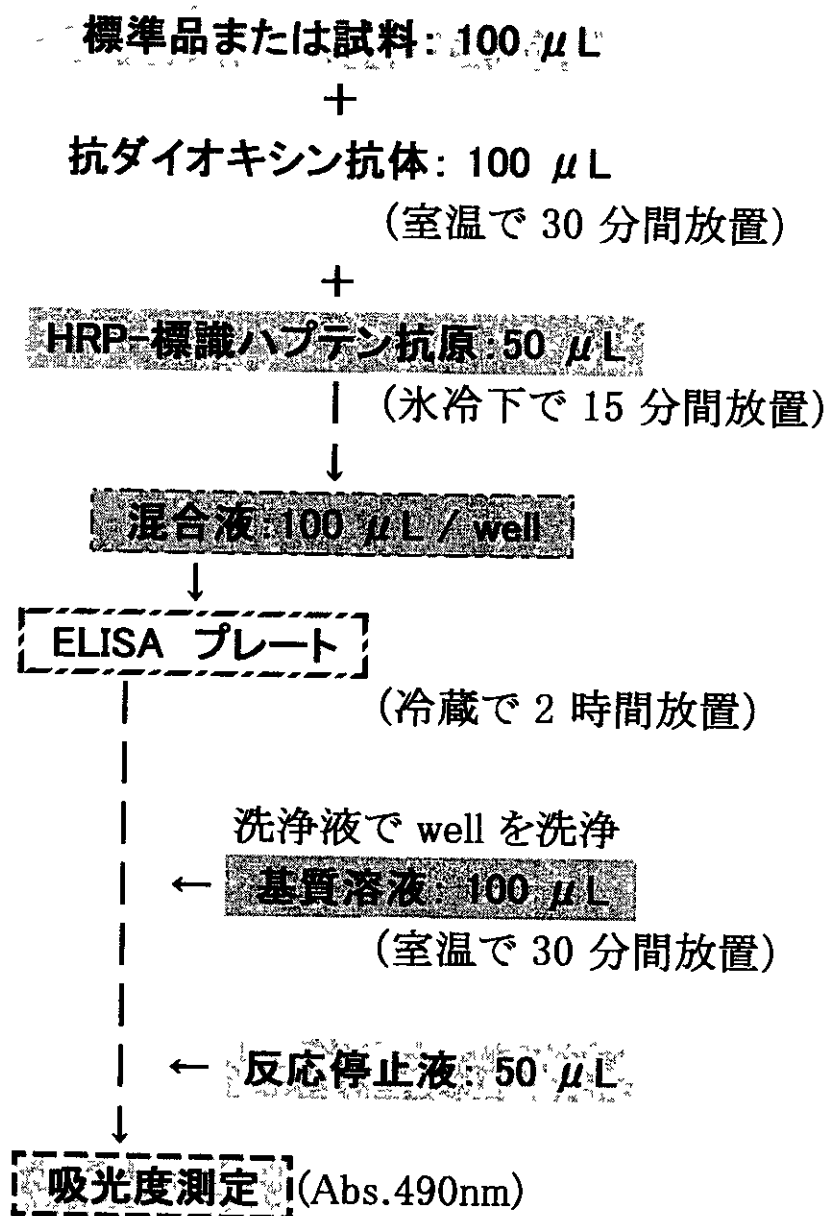


図 1 ELISA の操作手順



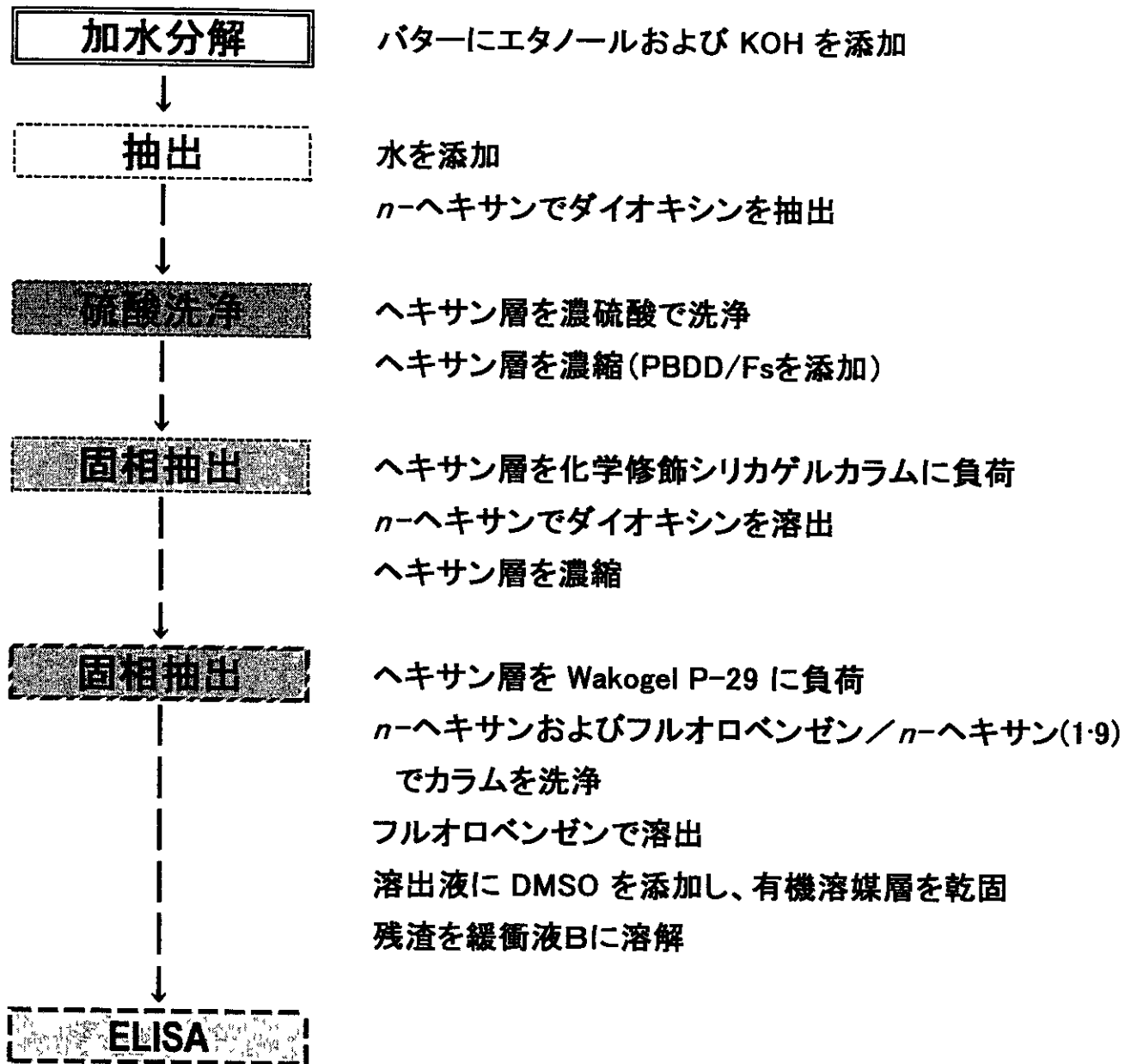


図 2 ダイオキシシシ ELISA 試料の調製法

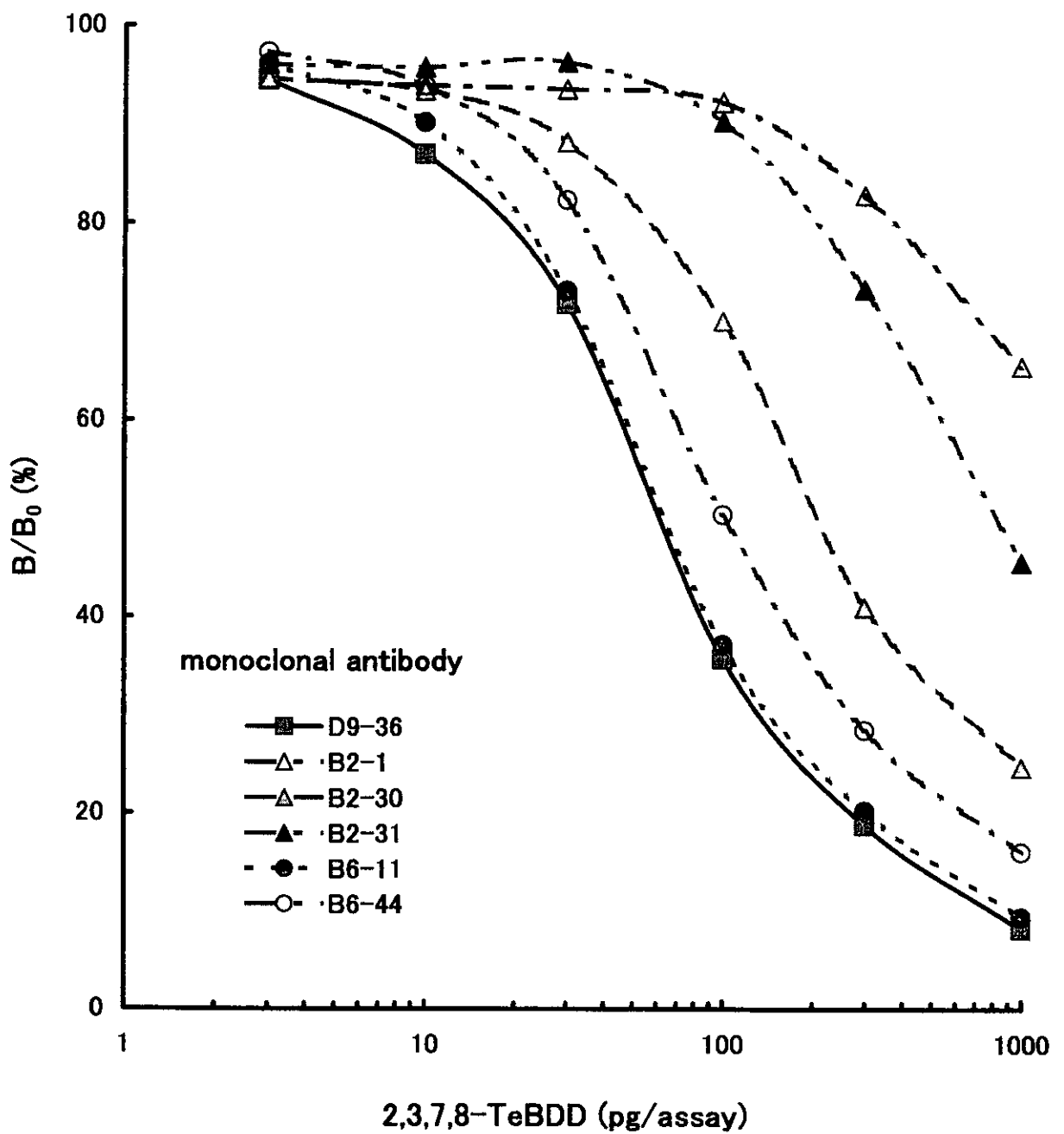


図 3 モノクローナル抗体を用いた ELISA による 2,3,7,8-TeBDD の標準曲線

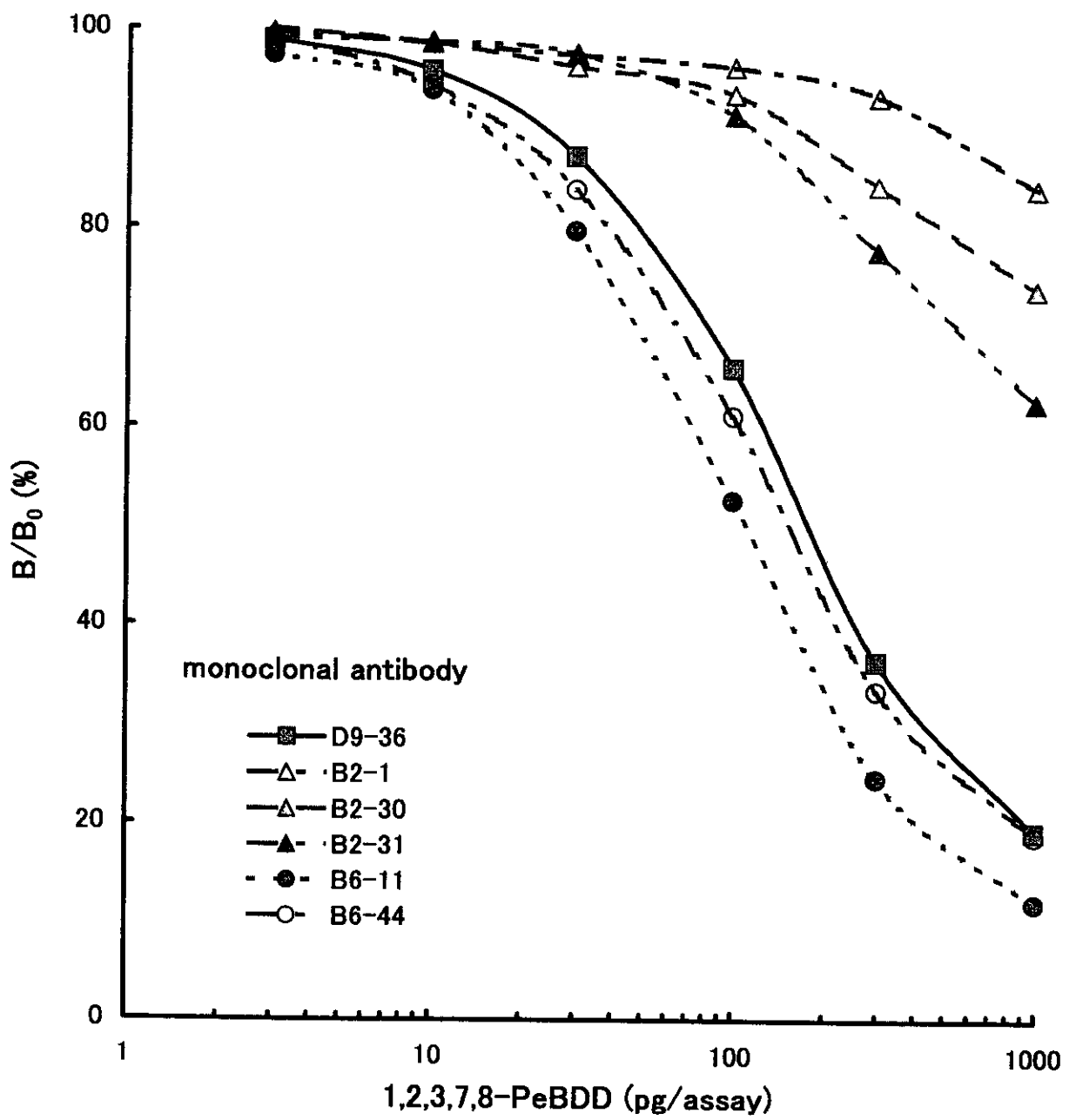


図 4 モノクローナル抗体を用いた ELISA による 1,2,3,7,8-PeBDD の標準曲線

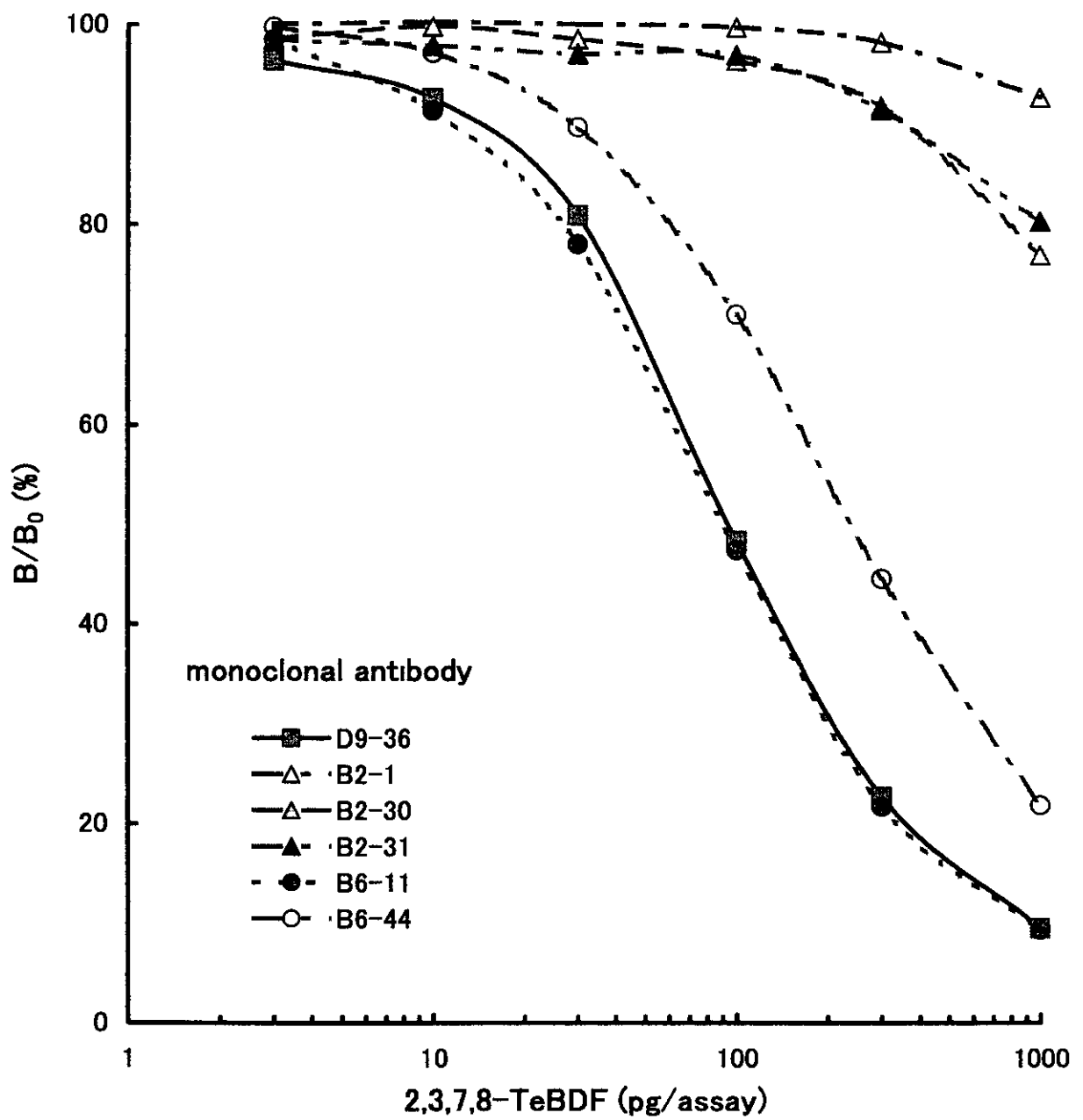


図 5 モノクローナル抗体を用いた ELISA による 2,3,7,8-TeBDF の標準曲線

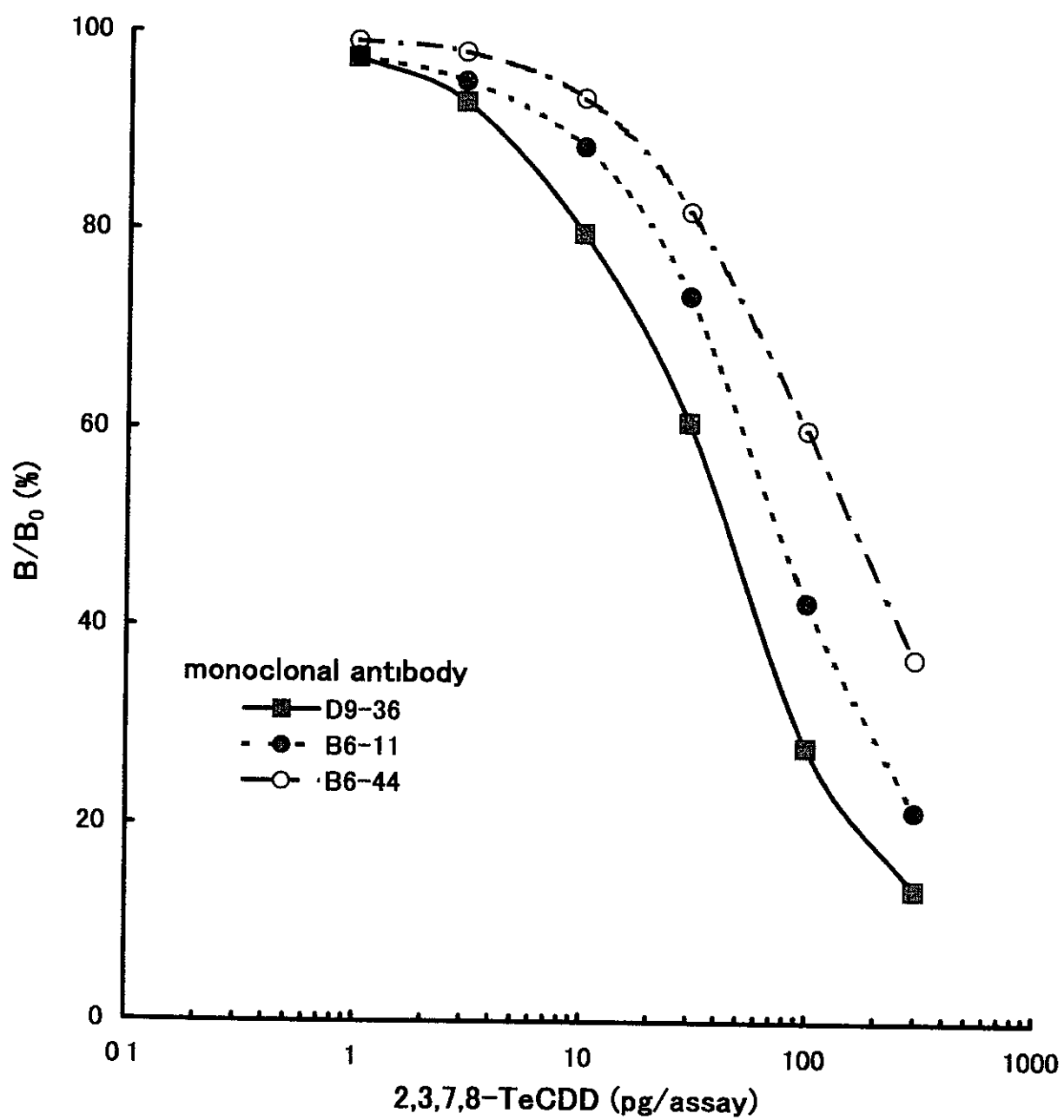


図 6 モノクローナル抗体を用いた ELISA による 2,3,7,8-TeCDD の標準曲線

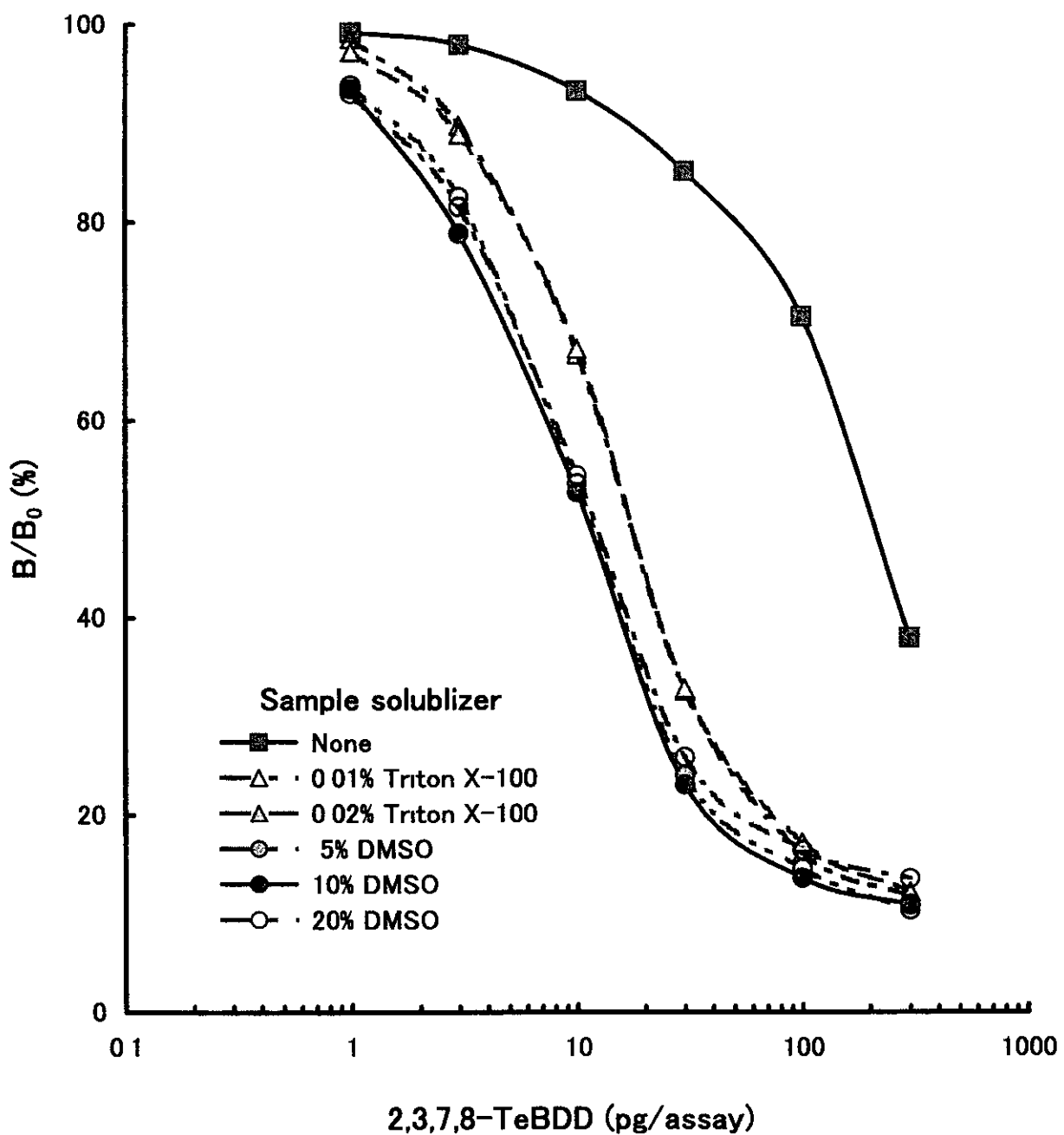


図 7 モノクローナル抗体 B6-11を用いた ELISA における試料溶解液の影響

B6-11 50 ng/mL, TB-3-HRP 1 μg/mL

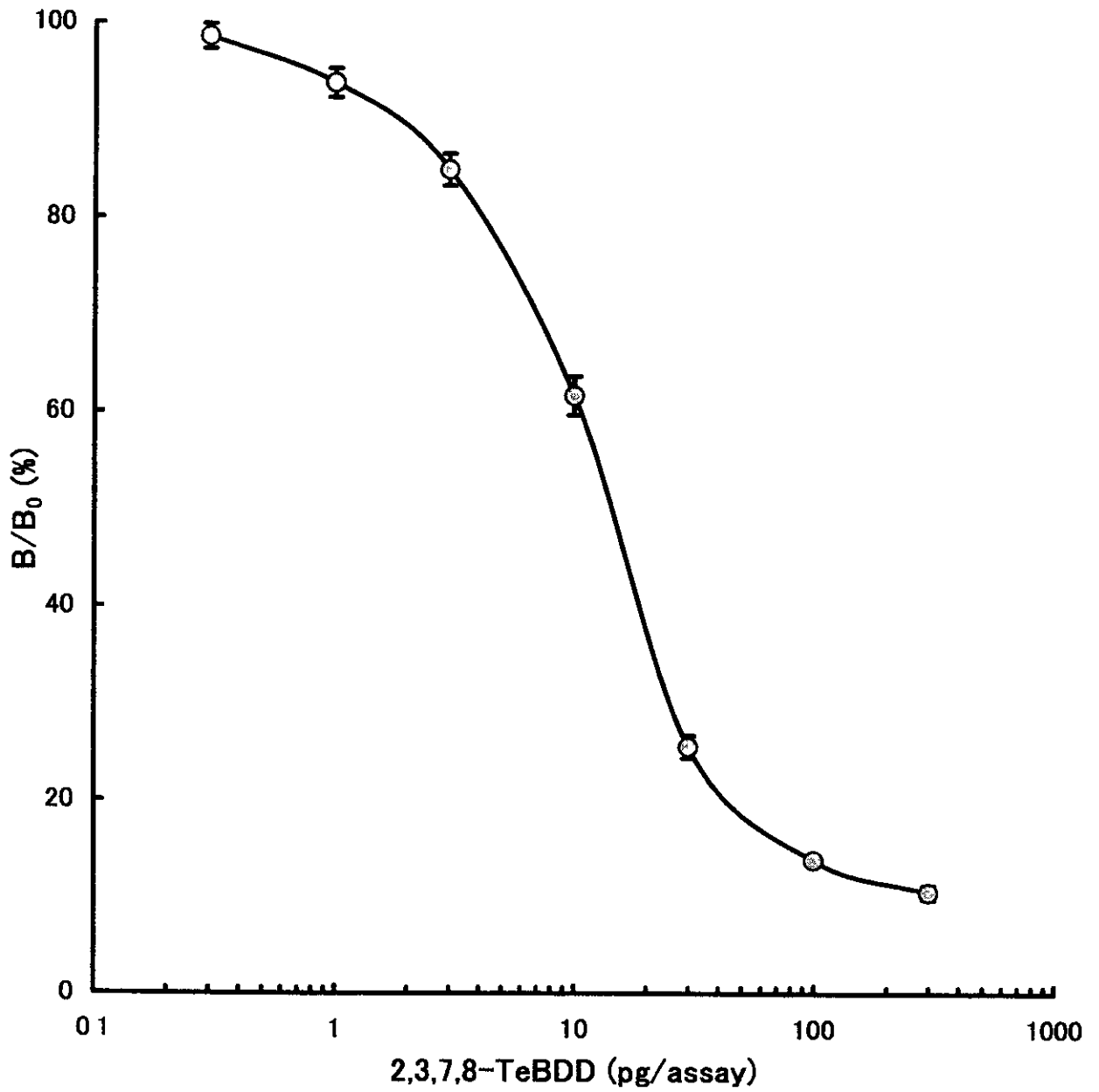


図 8 モノクローナル抗体 B6-11を用いた ELISA による  
2,3,7,8-TeBDDの標準曲線

B6-11 50 ng/mL, TB-3-HRP 1  $\mu$ g/mL  
試料溶解液 10% DMSO

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と  
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および  
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査精度管理調査における  
適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その 3）  
—大腸菌同定検査における標準菌株の選定の検討—

主任研究者 柳澤 健一郎 (財)食品薬品安全センター 理事長  
分担研究者 松木 容彦 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 副所長  
協力研究者 大島 赴夫 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 室長  
鈴木 達也 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員  
大隅 昇 文部科学省統計数理研究所 教授

#### 研究要旨

大腸菌検査（公定法）では EC 培地による選択増菌培養（ $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間培養によるガス産生の判定）が推定試験として第一に実施されるが、使用する試験菌株によって外部精度管理調査成績に大きな影響が生じる。試験菌 10 株を用いて大腸菌の検査手順に従い EC 培地  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間で選択増菌培養し、菌株毎のガス産生能について比較検討した。増殖並びにガス産生に影響を与える原因として培養温度による障害、培養時間の不足などが考えられ、培養時間を 48 時間まで延長すると多くの菌株が判定条件（ガス産生）を満たす結果であった。しかしながら、温度障害を受けやすい性状の菌株は、本条件下で発育増殖を認めなかった。検査方法の優劣に関する考察は別として、多くの検査施設で採用されている公定法（ $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間培養によるガス産生の判定）による検査方法で検査を実施した場合、大腸菌は菌株によって 1) EC 培地で十分な増殖を示しガス産生を明らかにみとめる Type I、2) EC 培地で増殖を示すがガス産生を認めない Type II、3) EC 培地で増殖せずガス産生も示さない Type III に大別された。したがって、外部精度管理調査試料の作製に当たっては、目的によってこれら Type の菌株を使い分ける必要があると考える。

#### A 研究の目的

食品衛生外部精度管理調査（大腸菌同定検査）試料の作製にあたって特に考慮しなければならない事項として「基材の開発」と「試験菌株の選択」が上げられる。これまでマツ

シュポテトを主材料とした基材の開発と基材中での試験菌株の安定性について検討を行い、調査試料として比較的安定で試験菌の死滅変動の少ない調査試料の作製が可能となり、食材のカテゴリー（見立て食材）を提



示して調査試料を提供してきた。しかしながら、選択された検査方法によっては検出可能な生菌数を試料中に含んでいるにも係らず、多くの施設で大腸菌の検出が困難であるとの検査成績を認めた。この原因の一つには、EC培地  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間での選択増菌培養とその判定基準(24 時間培養後のガス産生)に問題があるのではないかと推測する結果に至っている。日常の検査では、様々な環境に置かれた食材を対象に大腸菌検査がなされており、食材中に存在する大腸菌も単一の性状を示すもののみが検査対象にはなっていないと考えられる。したがって、EC培地  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間での選択増菌培養で 24 時間培養後のガス産生を第一の判定基準とした場合にどのような性状の大腸菌を試験菌株として採用するかによって調査結果に大きな影響が出ることは容易に想像される。

今年度は、上記の問題点を踏まえ、これまで主に採用されている検査法(公定法)で菌株間にどのような挙動の差が認められるかを検討し、外部精度管理調査試料に用いる標準菌株としての基礎検討とその(試験菌株)選定を目的として検討を行った。

## B 研究方法

### 1 試験菌株

試験菌株は、秦野研究所保存の以下の 10 種を用いた。

*Escherichia coli* HIC12014

*Escherichia coli* NIHJ

*Escherichia coli* DH-1

*Escherichia coli* IFO3139

*Escherichia coli* NHL u5/41

*Escherichia coli* NCTC9001

*Escherichia coli* HIC1203

*Escherichia coli* HIC1207

*Escherichia coli* HIC2211

*Escherichia coli* ATCC8739

### 2 大腸菌の培養条件によるガス産生の比較

大腸菌の培養は、大腸菌検査の公定法で採用されている EC 培地並びに大腸菌の一般検査で汎用される BGLB 培地の 2 種を用いて、各培地 9mL に試験菌液 1mL を加え、EC 培地は  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、BGLB 培地は  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で 48 時間まで培養し、一次判定基準であるガス産生に付いて比較検討した。なお、各試験菌は、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)培地を用いて  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約  $10 \sim 100$  cfu/mL となるように調製したものを接種菌液とした。

### 3 大腸菌の培養条件による生菌数確認

EC 培地 ( $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  培養)、及び BGLB 培地 ( $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  培養) で 24 時間、並びに 48 時間培養後の各試験菌株の増殖能を生菌数測定により比較した。なお、試験菌の接種量は培地 (9mL) あたり  $10 \sim 100$  個とした。

### 4 大腸菌の培養における経時的生菌数の変化とガス産生の確認

*E. coli* HIC2211 を用いて、大腸菌の接種濃度と大腸菌の発育増殖並びにガス産生について検討した。

試験菌液は、SCD 培地を用いて  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約  $10^1 \sim 10^3$  cfu/mL となるように調製した。また、EC 培地および BGLB 培地の 2 種を用いて実施した。

培養条件は、各培地 9mL に菌液 1mL 加え、EC 培地は  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、BGLB 培地は  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で 48 時間まで培養し、菌液接種直後、3 時間、6 時間、24 時間、30 時間、48 時間後の生菌数測定を行い、生菌数測定とガス産生能を観察した。

## 5 大腸菌検査における培養温度の発育およびガス産生への影響

これまでの結果よりガス産生の異なる3種の大腸菌〔ガス高度産生株 *E. coli* HIC12014、ガス中程度産生株 *E. coli* HIC 2211、ガス弱産生株 *E. coli* ATCC8739〕を選択し、培養温度による発育及びガス産生の影響を検討した。

試験菌液は、SCD 培地を用いて  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で24時間前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約  $10 \sim 100$  cfu/mL となるように調製した。

EC 培地 9mL に菌液 1mL を加え、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で24時間培養して試験菌の発育とガス産生を判定した後、ガス産生を認めない菌株については  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  でさらに24時間培養して試験菌の発育並びにガス産生を観察した。

### C 結果

試験結果は、表 1. 4 に示した。

秦野研究所保存の大腸菌 10 株について異なる培養条件(2条件 EC 培地で  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  培養、BGLB 培地で  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  培養)におけるガス産生能を比較した結果、試験菌株によってガス産生能が大きく異なる結果を得た(表 1)。公定法として示されている EC 培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養による推定試験の判定結果では 10 株中 5 株にガス産生を認めず、48 時間培養後で全体の 6 割がガス産生を示す結果であった。一方、BGLB 培地、 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、24 時間培養では 10 株中 8 株にガス産生をみとめ、48 時間培養後で全体の 9 割がガス産生を示した。

各培地における 24 時間、並びに 48 時間後の生菌数を測定した結果、いずれの培地でも 24 時間培養でガス産生を示す場合は、少なくとも  $10^7$  cfu/mL 以上の生菌数を認めていた(表 2)。しかし発育は十分認めるもののガ

ス産生に至っていない菌株も存在した。ガス産生を認めない菌株は、接種菌の発育を認めないか、増殖してもガス産生に至るまで十分増殖していないものであった。

大腸菌 (HIC2211) の各培地中での増殖の経時的変化とガス産生を比較すると、ガス産生は約  $10^5$  cfu/mL 以下では認められず  $10^7 \sim 8$  cfu/mL 以上で認められていた(表 3)。

これまでの結果から、ガス産生能を指標とした場合に大腸菌は大きく 3 グループに別けられた(表 4)。即ち、EC 培地  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養で明らかにガス産生を示す (Type I)、EC 培地でガス産生を示さないが BGLB 培地  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、24 時間培養ではガス産生を示す (Type II)、いずれの培地でもガス産生を認めない (Type III) ものである。Type III は、全く増殖を示さない菌株も含まれる。

### D 考察

模擬食材(試験菌を含むマッシュポテト基材)に検査情報として食材のカテゴリ(加熱後摂取冷凍食品(凍結直前加熱以外)や非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品など)を付け調査試料とした場合、これまでの調査結果では多くの検査施設で採用される検査方法として「推定試験に EC 培地を用い、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で  $24 \pm 2$  時間培養してガス産生を指標に判定する試験方法(公定法)」が採用されている。この方法を採用した場合に、試験菌として調査試料に添加される試験菌株は、どのような菌を標準菌株として採用するかは非常に大きな問題となる。ここに示したように、培養条件によって、試験対象となる大腸菌は 3 グループに大別され、採用される検査手順によっては大腸菌が存在していても陰性と報告する結果がありうる。ガス産生については、まず培地中で一定菌数(約  $10^7 \sim 8$  cfu/mL 以上)にまで増殖することが必要で

あり、対数増殖期には主に乳糖分解により得られたブドウ糖をエネルギー利用として一定菌数にまで増殖し、その後解糖系（ピルビン酸の生成）の進行に伴う糖の発酵からガスの産生が生じていると推測する（大腸菌はブドウ糖発酵菌であることによる）。従って対数増殖期から静止期 衰退期へと移行する段階で発生したガスが判定に十分な量蓄積されるものと考えられる。従って培地中での菌数が一定数以上に達しないとガス産生による判定が困難となる。これは表3の結果からも示唆される。

日常の検査において加熱後摂取冷凍食品（凍結直前加熱以外）や非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品などを被験物質として取り扱う場合、様々な保存環境下に置かれた検査試料を対象とすることから、様々な性状を持つ大腸菌が検査対象になることが想像される。すなわち、汚染している大腸菌の食材中での存在様式、食材の保存条件、大腸菌自身の性状など様々な要因によって、汚染大腸菌は EC 培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間培養で十分な発育増殖がないかぎりガス産生が陰性となりうる可能性が考えられる。

今回得られた結果を踏まえ、標準菌株として確実に検出されるものをまず優先して選択することが必要であるものと考えられる。日常の食品検査では様々な性状を持つ大腸菌が、検査対象となっているのも事実であり、試験菌株の選択に付いては外部精度管理調査の目的によって使い分けることが必要であると考えられる。

## E 結論

食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり均一で安定な調査試料の作製を主眼としてこれまで検討してきたが、マッシュポテトを基材とする場合は比較的安定な調査試料の提供が可能となった。しかしながら、試験

菌として採用する標準菌株をどのように選択するかが試験成績に大きな影響を及ぼす事が新たな問題として浮上した。標準菌株に付いてはかねてより重要な検討事項として認識していたが、食品衛生外部精度管理調査（大腸菌同定検査）が回を重ねることによって、その調査結果から、「検査方法と試験菌の検出率」に大きな関係があることが明らかとなってきた。

食品衛生外部精度管理調査（大腸菌同定検査）試料に対する検査は、見立て食材を加熱後摂取冷凍食品（凍結直前加熱以外）とした場合、公定法（各施設の SOP として整備されている検査方法とした）が検査方法として採用されることが多い。例示すると、大腸菌検査の検査方法は EC 培地を用いた  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養によるガス産生が推定試験として実施されることになる。しかしながら、大腸菌が高濃度に添加された調査試料を配布しているのにも係らず参加施設からの回答中には、公定法の採用により大腸菌の検出が陰性と示される場合がある。ここには、様々な要因が存在するが、一つはどのような性状の大腸菌を標準菌株とするかにある。EC 培地で  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  による培養は、糞便性大腸菌の選択培養に対して選択性の高い培養方法ではあるが、食材中に存在する大腸菌の履歴によっては検出できない（増殖できない）場合も推測される。事実、今回の検討結果より EC 培地で  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  による培養でガス産生を判定基準とした場合、大腸菌は少なくとも3つの Type に別けることができた。すなわち、ガス産生を指標にする場合は、24 時間以内に十分な菌の増殖を認めない限りガス産生にまで移行しないことが明らかとなった。

標準菌株として採用する場合には、どのような性状の菌株を用いる事が適切なのかは、検査の目的によって様々な考え方ができる。

しかしながら、検査方法の不備によって、特定の性状をもつ試験菌のみしか検出できない場合もありうる。検査方法の優劣を別にすれば、これまでの外部精度管理調査で多くの施設が採用している公定法「EC 培地、44.5 ± 0.2°C、24 時間培養によるガス産生の判定」で判定基準を満たす菌株を第一に選択することが適切かと考える。

今後の食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、「指定された特定微生物に対する検査方法の適正とその検査方法の検証」、「標準菌株の選択と採用検査方法による特定微生物の検出の検証」など様々な局面から詳細な検討を加え、外部精度管理調査の目的に応じて適切な標準菌株の選択と調査試料の提供が必要ではないかと思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

関連する内容の一部を以下に発表した  
大島赴夫、鈴木達也、山田健一、高野恵美、山本奈々美、川崎 勝、松木容彦 (2003) 食品衛生外部精度管理調査の概要－大腸菌検査に係る検査方法と調査成績について－

食品衛生研究、第 53 巻 (7)、39-47

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし