

と比較した。各遺伝子における3つの subtype 間の相同性は 83-99%であった。他の遺伝子と比較して ha33 遺伝子の相同性が低かった (表 1)。

2. B 型毒素遺伝子 C 末端領域の塩基配列を用いた分子系統解析

B 型毒素 subtype 間の多様性は毒素 C 末端領域において最も顕著であった。そこで、その他の供試菌株について毒素遺伝子 C 末端領域の塩基配列 (400 bp) を決定し、既知の I 群 B 型菌の配列とともに分子系統解析を行った (図 1)。その結果、毒素遺伝子全長からの分子系統解析と同様、毒素遺伝子は 3 つのクラスター (subtype B1, B2 および Osaka05) に分類された。供試した米国での乳児ボツリヌス症由来株はすべて B1 に属しており、わが国の同症由来株とは subtype が異なっていた。食品由来株は B1 に属する株と B2 に属する株とに分かれた。

3. Multiplex-PCR 法による B 型毒素遺伝子 subtyping

各 B 型毒素 subtype (B1, B2 および Osaka05) の遺伝子を識別する Multiplex-PCR 法を検討した。PCR には 4 種類の混合プライマーを用いた。Okra 株、111 株、Osaka05 株を用いて PCR を実施した結果、それぞれの subtype に特異的なフラグメントが増幅された (図 2)。その他の供試菌株においても、PCR の結果それぞれ毒素遺伝子の系統解析から決定した subtype に特異的なフラグメントの増幅を確認することができた。

4. PFGE 型別

PFGE 型別の結果、すべての供試菌株は異なるパターンに分類された (図 3)。供試菌株間の similarity (%) は 25-90% であった。わが国で発生した乳児ボツリヌス症由来株 3 株は互いに低い similarity (25-54%) を示したため、事例間の疫学的な関連性はないと考えられた。

D. 考察

わが国の乳児ボツリヌス症の発生は世界的にみても少ないものの欧米とは異なる神経毒素を産生する菌であることが従前から明らかになっていた。2005 年と 2006 年に大阪で発生した乳児ボツリヌス症分離菌の毒素遺伝子を解析した結果、Osaka06 株は B2 subtype と同定された。一方 Osaka05 株は神経毒素遺伝子の系統解析から B1 あるいは B2 サブタイプとは異なる新規のサブタイプである可能性が示唆された。

各サブタイプのアミノ酸残基の違いは神経毒素 C 末端領域の Hcc サブドメインに多く認められることから、この領域の変異を利用した PCR 法によるサブタイプの識別方法を確立した。B2 サブタイプはわが国の分離株の他、韓国の土壌やヨーロッパの食中毒事例の分離株に認められ、米国の分離株とは明確に異なることがわかった。新規のサブタイプと考えられる Osaka05 株の疫学的な位置づけは明確ではないが、今回開発した PCR 法は少なくとも B 型ボツリヌス症を診断するために有用な方法であると考えられる。

E. 結論

わが国における乳児ボツリヌス症の原因菌は米国の分離菌と較べて特異な

性状を有する毒素を産生する。特に B 型による乳児ボツリヌス症は 3 事例のみ発生しているにすぎないが、その中で、2 事例が B2 サブタイプに属する菌が原因であり、さらに 1 事例は新規のサブタイプに分類が可能な菌であることがわかった。最近、B2 サブタイプは韓国および欧州に分布していることが次第に明らかになってきており、本研究で開発した PCR 法を含む一連の成果は、今後のボツリヌス症の診断に有効な手段となることが期待できる。

F. 健康危険情報

G. 参考文献

- 1) Hill, K. K., T. J. Smith, et al. (2007). Genetic diversity among *Botulinum neurotoxin* producing *Clostridial* strains. *J. Bacteriol.* 189(3):818-832.
- 2) Ihara, H., T. Kohda, et al. (2003). Sequence of the gene for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism, expression of the C-terminal half of heavy chain and its binding activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1625(1): 19-26.
- 3) Kozaki, S., Y. Kamata, et al. (1998). Characterization of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan. *Infect. Immun.*

66(10): 4811-4816.

H. 研究発表

論文発表

- Umeda, K., Y. Seto, T. Kohda, M. Mukamoto and S. Kozaki (2009). Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. (投稿中)

学会発表

- Umeda, K., T. Kohda, Y. Seto, M. Mukamoto and S. Kozaki. A new BoNT/B subtype detected from infant botulism in Japan. The 6th International Conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins, イタリア ピエモンテ州 (2008.6.12-14)
- 梅田 薫、小笠原 準、幸田知子、勢戸祥介、向本雅郁、小崎俊司. わが国で発生した A 型ボツリヌス症分離株の分子疫学的解析. 第 61 回日本細菌学会関西支部総会、京都市 (2008.11.8)
- 梅田 薫、小笠原 準、幸田知子、勢戸祥介、向本雅郁、小崎俊司. わが国で発生した A 型乳児ボツリヌス症分離株の分子疫学的解析. 第 29 回日本食品微生物学会学術総会、広島市 (2008.11.12-13)

表1. Osaka05株およびB1(Okra株)、B2(111株)のボツリヌス毒素遺伝子および無毒成分遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列の比較

	ha70	ha17	ha33	p21	ntnh	neurotoxin		
						light chain	heavy chain	holotoxin
BoNT Osaka05 vs								
B1	99.6 / 99	99.3 / 97.9	95.2 / 90.1	98.5 / 97.2	97.9 / 96.7	99.5 / 99.5	97.1 / 94.5	97.9 / 96.2
B2	99.1 / 98.4	98.6 / 100	92.3 / 83.6	99.4 / 98.9	99.6 / 99.3	99.9 / 100	98.6 / 97.6	99 / 98.5
B1 vs B2	98.9 / 98.1	98 / 97.9	93.1 / 84.9	98.3 / 96.6	97.8 / 96.4	99.5 / 99.5	96.6 / 93.6	97.6 / 95.7

% identity (nucleotide / amino acid)

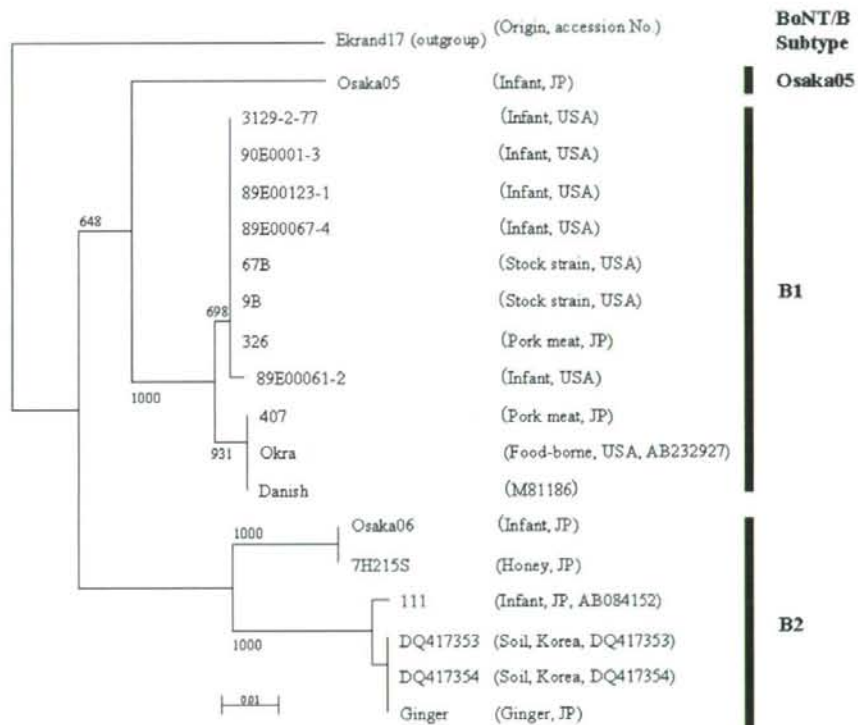


図1. B型毒素遺伝子C末端領域塩基配列(400bp)を用いた系統解析

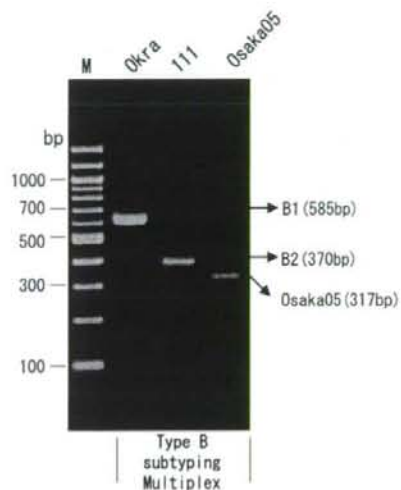


図 2. 混合プライマーを用いた B 型毒素遺伝子 subtyping PCR 結果

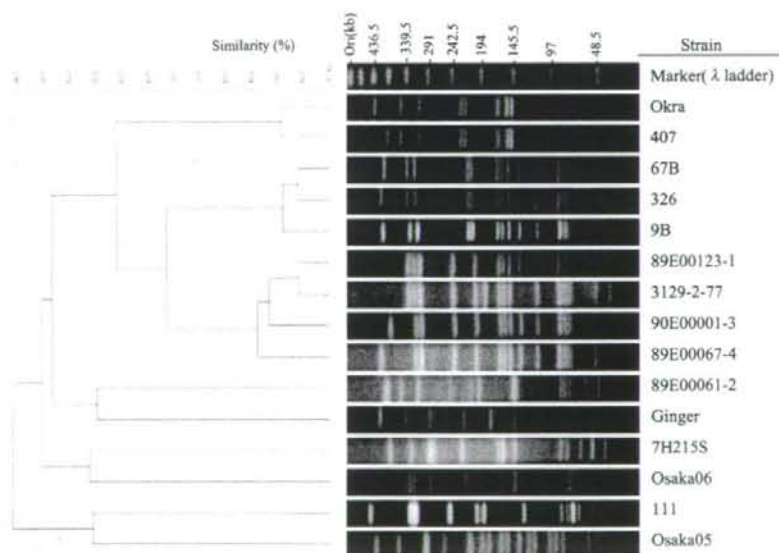


図 3. B 型菌 PFGE 型別およびデンドログラム

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（食の安心安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究
生菌数および汚染指標細菌等の簡易迅速試験法の検討

分担研究者 浅尾 努（大阪府立公衆衛生研究所）

研究協力者 河合高生、久米田裕子（大阪府立公衆衛生研究所）

小笠原 準（大阪市立環境科学研究所）

木村 凡（東京海洋大学）

山田和子、井上由和、黒瀬直孝（㈱生活品質科学研究所）

研究要旨

食品中の汚染指標細菌の簡易迅速試験法の有用性を検討するために、バイオシータ社の DOX-30F (DOX) とピオメリュー社の TEMPO (テンポ) を選択した。DOX は、酸素電極法により細菌の発育にともなう酸素消費量から生菌数を自動計測する試験システムである。テンポは、3 段階希釈の 16 本法（計 48 本）の MPN 法をカード化した自動菌数測定装置で、AFNOR と AOAC の認証を得た試験システムである。迅速試験法と従来法（平板培養法）の同等性を評価する方法として、理想的には汚染菌数の異なる各種の自然汚染食品を大量に用意する必要がある。これは、現実的には不可能であるので、自然汚染食品の代替となる食品が必要となる。

より自然汚染に近い指標菌汚染食品を作製する方法として、動物・環境由来菌液を無菌食品に添加することを考えた。今年度は、ウシおよびブタ糞便から抽出した菌液の食品への接種試験を行い、それぞれの食品試料液中の一般生菌、大腸菌群、大腸菌、*Enterobacteriaceae*（仮約：腸内細菌科菌群）数を、DOX およびテンポと従来法とで比較検討した。糞便菌液を直接測定したときと同様に食品への接種試験においても、DOX およびテンポで測定した菌数と、平板培養法で測定した菌数との間には高い相関関係があることがわかった。テンポについては自然汚染食品を用いた平板培養法との比較試験も実施し、テンポによる菌数測定法は平板培養法と同等の性能を有すると考えられた。

A. 研究目的

近年、細菌試験法の技術は長足の進歩を遂げており、新しい原理や考えに基づく斬新な培地や細菌数測定機器も開発され、一部では実際の食品検査現場で利用されている。食品の衛生管理体制を維持するために、製造ラインでの中間製品と出荷前の製品の安全性や品質の良否をモニタリングできる迅速・簡便な汚染指標菌試験法を開発し評価することは、食品の製造コストや流通コストの削減にも寄与することが期待される。

本年度は動物糞便から抽出した菌の食品への接種試験を行い、バイオシータ社の食品細菌検査装置 DOX-30F (DOX) とピオメリュー社の自動生菌数測定装置 TEMPO (テンポ) を用いた菌数測定法を、従来から実施されている平板培養法による汚染指標菌の試験法と比較検討した。テンポについては、惣菜および生鮮食品を用いた平板培養法との比較試験も実施した。

B. 研究方法

1. 使用機器

ピオメリュー社の自動生菌数測定装置 TEMPO (テンポ) とバイオシータ社の食品細菌検査装置 DOX-30F (DOX) は各販売会社のご厚意により借用した。

2. テンポの基本操作

1) 試料 10 g をストマッカー袋 (フィルター付き) に入れ、希釈液 90 ml を加えてストマッキングする。試料に含まれる菌数に応じて、凍結乾燥された培地の入ったバイアルに滅菌精製水を 3 ml (最終希釈倍率 40 倍) あるいは 3.9 ml

(最終希釈倍率 400 倍) を分注する。

- 2) 試料 1 ml あるいは 0.1 ml を上記の培地バイアルに入れボルテックスで混合する。
- 3) 専用パソコンで培地バイアルのバーコードを読み取らせ、検体名を入力する。続いて TEMPO カードのバーコードを読み取らせる。
- 4) 試料を加えた培地バイアルおよび TEMPO カードを充填ラックに入れ、これを TEMPO フィーダーにセットする。培地がカードに充填されると、カードのトランスファーチューブが自動的に切断・シールされる。
- 5) TEMPO カードを読み取りラックに移し替え、速やかに所定の温度に設定された培養器に入れる。
- 6) パソコンに表示された、所定の培養時間内にある TEMPO カードを選択し、TEMPO リーダーにセットして読み取らせる。
- 7) あらかじめ入力した検体名に対応した菌数 (MPN 値) がパソコンに保存される。

3. DOX の基本操作

- 1) 試料 10 g をストマッカー袋 (フィルター付き) に入れ、希釈液 90 ml を加えてストマッキングする。
- 2) 装置専用培地 (生菌数測定用液体培地、大腸菌群定量・大腸菌定性用培地) と試料を等量混合して、電極付きセルへ分注する。
- 3) 電極付きセルを DOX 本体へセットし、所定の温度で培養する。
- 4) 波形を読み、一般生菌数では 3 分間連続で閾値 (300 nA) を下回る時間を判定基準とする。大腸菌群では、3 分間連続で閾値 (1,500 nA) を上回る時間を判定基準とする。この場合、電流値が一旦低下した後を上昇するのが特徴で

ある。このステップは実際の使用に際しては自動測定される。

5) 菌数はあらかじめ設定した標準曲線から自動的に計算される。

4. 菌液作製用糞便の採取

ウシ、ブタ糞便は、各3頭分ずつを屠畜場で解体されたウシとブタの腸内から直接採取し、一夜冷蔵保存したものを翌日に実験に供した。

5. ウシ、ブタ糞便からの抽出菌液（糞便菌液）の作製

1) 3頭分の糞便から1頭分あたり5gずつ、計15gの糞便を無菌プラスチック容器に秤量した。

2) 4倍量の滅菌ペプトン加生理食塩水を加えて激しく混和した。

3) 混合液を滅菌フィルター付きストマッカー袋に移し、ピペットで30mlのろ過液を50mlの滅菌遠心管に採取した。

4) ろ過液を3000回転、20分間、4℃で遠心した。

5) 上清を捨て、沈殿物をペプトン加生理食塩水（約30ml）に懸濁し、ボルテックスで混合した。

6) 3000回転、20分間、4℃で遠心し、上清を捨て、5)と6)の操作を二回繰り返した。

7) 上清を捨て、沈殿物を10mlのペプトン加生理食塩水に懸濁し、接種試験に供するまで4℃で保存した。

8) 作製当日に、抽出した菌液中の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数を平板培養法で測定した。

6. 動物糞便菌液の食品への接種試験

6-1. 食品

牛乳（市販品、成分無調整）、牛肉ブロック（市販品）を試験に供した。牛乳は無菌的に開封後、9mlずつを滅菌15mlチューブに採取した後に使用した。牛肉ブロックは以下の方法により10倍乳剤とした後に使用した。

6-2. 牛肉10倍乳剤の作製

1) 5枚重ねたアルミホイル表面をアルコールで消毒した後、バーナーで火炎殺菌した。この上に牛肉ブロックを置き、全体にアルコールを噴霧して牛肉ブロック表面を火炎殺菌した。次に、牛肉ブロックを裏返し、裏面部分を同様の方法で火炎殺菌した。

2) 牛肉ブロック表面を再度火炎殺菌した後、表面部分を滅菌した包丁で除去した。滅菌したピンセットとハサミを使用して、削除面から中心部分を無菌的に100g採取し細切した。細切した牛肉20gずつを滅菌フィルター付きストマッカー袋に秤量し、9倍量のペプトン加生理食塩水を加えて1分間ストマッキングした。

3) ろ過液を滅菌した1,000mlコルベンにピペットで採取して混合した後、滅菌15mlチューブに9mlずつ採取し、使用直前まで-30℃で保存した。

6-3. 糞便菌液の接種

ウシ、ブタ糞便菌液の原液1mlを9mlの牛乳および牛肉10倍乳剤でそれぞれ10倍階段希釈し、各汚染指標菌の菌数が 10^1 – 10^4 cfu/mlオーダーの試料原液を作製した。なお、菌数のオーダーが同一の試料原液を3検体ずつ作製するため、糞便原液からの10倍階段希釈は計3回実施した。

6-4. 菌数測定

各試料原液中の生菌数、大腸菌群数、大腸菌

数および腸内細菌科菌群数をテンポ法および平板培養法で測定した。なお、菌数が各測定法の測定範囲内に収まらない場合には、試料原液を適宜ペプトン加生理食塩水で10倍階段希釈して試験に供した。生菌数および大腸菌群数については、試料原液を用いてDOXによる測定を行った。

7. 自然汚染食品を用いたテンポ法の評価

7-1. 供試材料

加熱惣菜類 49 検体、未加熱惣菜類 39 検体、寿司類 11 検体、和菓子類 12 検体、生肉類 35 検体、刺身類 18 検体、麺・豆腐類 11 検体の合計 175 検体を試験に供した。

7-2. 菌数測定

無菌的にフィルター付きストマッカー袋に採取した食品10 gに、9倍量の滅菌リン酸緩衝生理食塩水を加えてストマッキングし、そのフィルターろ過液を試料原液とした。試料原液およびその10倍階段希釈液を用いて、生菌数、大腸菌群数および腸内細菌科菌群数をテンポ法および平板培養法で測定した。

テンポ法では40倍、400倍、4,000倍の希釈倍率を使用するので10~4,900,000 cfu/gを測定レンジとし、平板培養法では、ISO 7218 記載に基づき、集落数測定可能範囲を生菌数では8~334/平板、大腸菌群と腸内細菌科菌群では8~167/平板を測定レンジとした。

7-3. 試験法の評価

テンポ法と平板培養法で測定した菌数の対数値について回帰式と相関係数(R)の2乗値(R²)を求めた。2つの試験方法の比較には、イギリスのCampdenの評価基準を引用した。こ

の評価方法では、比較する二つの方法での菌数の対数値差が±1以下のものを同等とし、同等の検体数の占める割合である一致率が95%以上であれば比較した二つの方法は同等の性能を有すると判断する。

7-4. 追加試験

テンポ法と平板培養法で測定した生菌数の対数値差が±1より大きくなった惣菜とほぼ同一の惣菜である白身魚の甘酢あんかけ15検体、鶏龍田南蛮漬け13検体、スモークサーモンマリネ9検体を用いて、テンポ法と平板培養法で生菌数を測定した。

8. 使用培地

生菌数測定用には標準寒天培地(日水製薬)を使用した。大腸菌群数測定用にはデソキシコレート寒天培地(栄研化学)、VRBL培地(Difco)、X-GAL寒天培地(酵素基質培地:日水製薬)を使用した。大腸菌数測定用にはXM-G寒天培地(酵素基質培地:日水製薬)を、腸内細菌科菌群数測定用にはVRBG培地(Difco)を使用した。それぞれの培地は各メーカーの仕様に従い加温溶解するか、あるいはオートクレーブで滅菌した。平板培地は、培地20 mlをプラスチックシャーレに分注後、室温で固化させた。培地表面の余分な水分を取り除くため、35℃の培養器の中で約1時間乾燥させた。

9. 希釈液

9-1. ペプトン加生理食塩水

ペプトン(BACTO Peptone, Difco) 1.0 g および塩化ナトリウム 8.5 g を精製水 1,000 ml に溶解後に、121℃で15分間オートクレーブした(pHは7.0±0.1)。

9-2. リン酸緩衝生理食塩水

無水リン酸二水素カリウム 34 g を精製水 500 ml に溶解し、1N 水酸化ナトリウム溶液約 175 ml と精製水を加えて全量を 1,000 ml (pH7.2 に修正) とした (原液)。この原液 1.25 ml と塩化ナトリウム 8.5 g を精製水 1,000 ml に溶解後、121℃で 15 分間オートクレーブした。

10. 寒天培地での培養

標準寒天培地は、試料原液あるいは希釈液 (ペプトン加生理食塩水) で 10 倍階段希釈した試料 1ml を 50℃の恒温水槽で保存した培地 20 ml により混釈し、室温で固化させた。その他の寒天培地は 15 ml の培地により混釈し、室温で固化させた後に 5 ml の同培地を重層後に固化させた。

平板塗抹培養は、試料原液あるいは 10 倍階段希釈した試料 0.1 ml を各平板培地にコンラージ棒で塗抹した。混釈培養および塗抹培養はいずれも 35±1.0℃で所定の時間実施した。

C. 研究結果

1. 糞便菌液中の汚染指標菌の菌数測定

ウシ、ブタ糞便菌液中の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数をそれぞれ平板培養法で測定した。糞便菌液 1 ml 中の生菌数は 10^7 ~ 10^8 のオーダーで、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数はいずれも 10^6 オーダーであった (表 1)。

2. 糞便菌液の食品への接種試験

2-1. テンポによる菌数測定法の評価

接種試験に供した牛乳および牛肉 10 倍乳剤はあらかじめ、標準寒天培地を用いた混釈培養を行い、集落が形成されないことを確認した。

さらに BPW を用いた増菌培養を行い、菌が発育しないことを確認した。

糞便菌液作製直後の各種汚染指標菌の菌数を参考にして、測定対象の汚染指標菌の接種菌数が 10^1 ~ 10^4 cfu/ml オーダーになるように、牛乳および牛肉 10 倍乳剤でウシ、ブタ糞便菌液をそれぞれ 10 倍階段希釈し、接種試験用の試料原液とした。試料原液ごとに汚染指標菌の菌数を平板培養法とテンポ法で測定し、平板培養法で測定した菌数の対数値を X 軸に、テンポ法で測定した菌数の対数値を Y 軸にプロットし、回帰直線と R^2 値を求めた。試験に供した糞便の動物種や糞便菌液を接種した食品の種類に関係なくいずれの汚染指標菌についても、テンポ法で測定した菌数の対数値と平板培養法で測定した菌数の対数値の R^2 値は 0.929~0.989 の範囲であった (図 1A-E、図 2A-E、図 3A-E、図 4A-E)。回帰直線の傾きはいずれも 0.915~1.13 の範囲であった。

2-2. DOX による菌数測定法の評価

DOX ではその測定原理から、試料液の初期菌数を推定するにはあらかじめ測定対象となる菌を用いて、DOX による検出時間から菌数を推定するための検量線を作成する必要がある。そこで、ウシおよびブタ糞便菌液を接種した牛乳や牛肉 10 倍乳剤を用いて検量線が作成できるかどうか検討した。ウシおよびブタ糞便菌液を牛乳および牛肉 10 倍乳剤でそれぞれ 10 倍階段希釈し、生菌数や大腸菌群数が 10^1 ~ 10^4 cfu/ml のオーダーとなるように試料原液を作製した。各試料原液と一般生菌および大腸菌群用の培地をそれぞれ電極付きセル内で混合し、DOX で電流値の経時変化を調べた。X 軸に平板培養法

で測定した試料原液の菌数の対数値を、Y軸にDOXによる生菌数あるいは大腸菌群数の検出時間をプロットし、回帰直線と R^2 値を求めた。ウシおよびブタの糞便菌液のいずれを接種した場合においても、DOXでの検出時間と生菌数の対数値とは高い相関性を示し、平板培養法で測定した生菌数の対数値とDOXによる生菌数の検出時間の R^2 値は0.942-0.957の範囲であった(図5A、図6A、図7A、図8A)。大腸菌群数の対数値とDOXによる大腸菌群数の検出時間の R^2 値は、ウシ糞便菌液の接種試験では0.935-0.946(図5B、5C、図6B、6C)、ブタ糞便菌液の接種試験では0.835-0.863であった(図7B、7C、図8B、8C)。

ウシ糞便菌液を接種した牛乳では10-13 cfu/mlの生菌数をDOXで検出するのに要した時間は467-515分であったが、 8.5×10^3 - 1.5×10^4 cfu/mlでは179-235分と短くなった。牛肉10倍乳剤に接種した場合、8-15 cfu/mlでは421-436分であったが、 1.2×10^3 - 2.6×10^3 cfu/mlでは243-256分であった。ブタ糞便菌液を接種した牛乳では48-67 cfu/mlの生菌数をDOXで検出するのに要した時間は483-511分であったが、 4.3×10^4 - 7.5×10^4 cfu/mlでは257-280分と短くなった。牛肉10倍乳剤に接種した場合、15-35 cfu/mlでは473-518分であったが、 2.5×10^4 - 6.0×10^4 cfu/mlでは281-295分と短くなった。

ウシ糞便菌液を接種した牛乳では25-73 cfu/mlの大腸菌群をDOXで検出するのに要した時間は354-380分であったが、 4.1×10^4 - 7.3×10^4 cfu/mlでは205-222分と短くなった。牛肉10倍乳剤に接種した場合、30-70 cfu/ml

では376-394分であったが、 1.8×10^4 - 2.8×10^4 cfu/mlでは210-234分と短くなった。ブタ糞便菌液を接種した牛乳では40-60 cfu/mlの大腸菌群を検出するのに要した時間は450-549分であったが、 3.1×10^4 - 4.1×10^4 cfu/mlでは231-290分と短くなった。牛肉10倍乳剤に接種した場合、25-30 cfu/mlでは455-580分、 1.8×10^4 - 2.4×10^4 cfu/mlでは237-291分というように、菌数の増加に従い検出時間は短くなった。

3. 自然汚染食品を用いたテンポ法の評価

3-1. 市販惣菜および生鮮食品の菌数測定結果

市販惣菜および生鮮食品をテンポ法と平板培養法で測定したときの回帰式と R^2 値を図9に示した。 R^2 値は生菌数で0.901(図9A)、大腸菌群数で0.848(図9B)、腸内細菌科菌群数で0.880であり(図9C)、いずれも高い相関性が認められた。

生菌数、大腸菌群数、腸内細菌科菌群数の試験結果を加熱惣菜類、刺身類、寿司類、生肉類、未加熱惣菜類、麺・豆腐類、和菓子類に分類し、各分類での汚染状況と一致率を表2に示した。

生菌数の試験では、加熱惣菜類は43検体中41検体が菌数の対数値差が ± 1 以下、すなわち、Campdenの評価基準による「同等」であった。このときの一致率は95.3%であった。刺身類は7検体中7検体が同等となり一致率は100%、寿司類は7検体中7検体が同等となり一致率は100%、生肉類は15検体中15検体が同等となり一致率は100%、未加熱惣菜類は30検体中29検体が同等となり一致率は96.7%、麺・豆

腐類は10検体中10検体が同等となり一致率は100%、和菓子類では9検体中9検体が同等となり一致率は100%であった(表2-1)。

大腸菌群数の試験では、加熱惣菜類は4検体中4検体が同等となり一致率は100%、刺身類は5検体中5検体が同等となり一致率は100%、寿司類は2検体中1検体が同等となり一致率は50%、生肉類は9検体中9検体が同等となり一致率は100%、未加熱惣菜類は6検体中6検体が同等となり一致率は100%、麺・豆腐類は1検体中1検体が同等となり一致率は100%、和菓子類は1検体中1検体が同等で一致率は100%であった(表2-2)。

腸内細菌科菌群数の試験では、加熱惣菜類は2検体中2検体が同等となり一致率は100%、刺身類は6検体中6検体が同等となり一致率は100%、寿司類は2検体中2検体が同等となり一致率は100%、生肉類は11検体中11検体が同等となり一致率は100%、未加熱惣菜類は3検体中3検体が同等となり一致率は100%、和菓子類は2検体中2検体が同等となり一致率は100%であった(表2-3)。

市販惣菜および生鮮食品の試験結果を項目別にまとめた(表2-4)。生菌数、大腸菌群数および腸内細菌科菌群数の一致率はそれぞれ97.5%(121検体中118検体が同等)、96.4%(28検体中27検体が同等)、100%(26検体中26検体が同等)であった。

3-2. 生菌数の対数値差が±1より大きかった惣菜の追加試験結果

生菌数の対数値差が±1より大きかったのは、アジの南蛮漬け、イカの南蛮漬け、スモークサーモンマリネであった。アジの南蛮漬けは

テンポ TVC で 4.34 log だが標準寒天培地で 2.85 log、イカの南蛮漬けはテンポ TVC で 4.40 log だが標準寒天培地で 5.72 log、スモークサーモンマリネはテンポ TVC で 3.46 log だが標準寒天培地で 4.53 log であった。この試験結果の再現性を検討するため、菌数の対数値差が±1より大きかった惣菜とほぼ同一の食品 37 検体を用いて追加試験を実施した(図 9D、表 2-5)。前回の試験結果と異なり、テンポ法と平板培養法で測定した生菌数の対数値差はすべて±1以下となった。一致率も 100%を示し、 R^2 値は 0.943 であった。

D. 考察

ウシおよびブタ糞便から抽出した菌液の牛乳、牛肉 10 倍乳剤への接種試験を行い、テンポによる菌数測定法と平板培養法による菌数測定法を比較した。生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数のいずれの場合においても、テンポ法と平板培養法で測定した菌数の R^2 値は 0.929~0.989 の範囲を示し、テンポ法と平板培養法で測定した菌数には高い相関性があることがわかった。接種試験における R^2 値は、昨年度実施したウシおよびブタの糞便菌液を用いてのテンポ法と平板培養法との比較試験で得られた R^2 値 (0.964~0.986) とほぼ同一であった。以上の結果、テンポ法は種々の汚染指標菌が混在した牛乳や牛肉 10 倍剤から従来法と高い相関性をもって確実に対象とする汚染指標菌数を測定できると考えられた。

生菌数測定用のテンポ TVC と大腸菌測定用のテンポ EC は、培地中に含まれる酵素基質

4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide が菌の増殖にともなう特異的酵素基質反応により分解されて、蛍光性の 4-methylumbelliferone が生じることを利用した検出システムである。このため、食品中に含まれる内因性の β -D-glucuronidase や食品および培地中の pH により測定結果が影響されることが知られている。本研究の接種試験では、牛肉 10 倍乳剤中の 10^1 オーダーの生菌数と牛乳中の 10^1 オーダーの大腸菌数を最終 4 倍希釈と 40 倍希釈で測定した。生菌数の測定では、40 倍希釈で 10^1 オーダーの測定値が得られたが、理論上 1 cfu の菌数を測定できる 4 倍希釈で 6 検体中 6 検体が測定上限値の 4,900 を超えた（データは示さず）。菌液接種前の牛肉 10 倍乳剤をテンポ法で測定したときも同様の結果を示したことから、牛肉 10 倍乳剤の 4 倍希釈では牛肉中に含まれる β -D-glucuronidase が反応して異常値を示したと考えられた。大腸菌の測定では、40 倍希釈で測定値は得られたが 4 倍希釈で 6 検体中 5 検体の菌数が 1 未満となった（データは示さず）。牛乳に大腸菌が 10^1 オーダーとなるように糞便菌液を接種した場合、 10^2 オーダーの一般生菌に加えて、乳酸菌などの他の夾雑菌も存在することが予測される。牛乳中には乳糖が 4.5% 程度も含まれることから、夾雑菌の中に乳糖利用性の菌が多く存在したために、時間の経過とともに培地中の pH が低下して菌由来の β -D-glucuronidase 活性が阻害されて菌数が 1 未満になったと考えられた。テンポ法では、赤身の生くず肉、軟体動物の生肉、クルミなど内因性の β -D-glucuronidase 活性の強い食品を測定することは推奨されておらず、塩漬け食

品などの一部の食品についてもテンポ法の有用性確認が必要とされている。本研究でも、テンポ法で良好な結果を得るためには、食品の特性を考慮した適切な使用方法を行うことが重要であると示された。

市販惣菜および生鮮食品の自然汚染食品を用いた試験では、テンポ法と平板培養法で測定した生菌数、大腸菌群数、腸内細菌科菌群数の一致率はそれぞれ 97.5%、96.4%、100%であった。一致率がいずれも 95%以上を示したことから、Campden の評価基準により、テンポ法は平板培養法と同等の性能を有すると考えられた。

生菌数の対数値差が ± 1 を超えた惣菜のうち、対数値差はアジの南蛮漬けの 1.49 が最も大きく、次いでイカの南蛮漬けの 1.32、スモークサーモンマリネの 1.07 であった。これらの惣菜とほぼ同一の惣菜 37 検体を用いた追加試験では、生菌数の対数値差はすべて ± 1 以下となり、一致率も 100%であった。追加試験で菌数の対数値差が ± 1 を超えなかった理由として、供試検体が全くの同一でなかったことが原因の一つと考えられた。しかし、原因を特定することができなかつたため、今後も調査を継続する予定である。

DOX による、ウシおよびブタ糞便菌液を接種した牛乳や牛肉 10 倍乳剤中の生菌数と大腸菌群数の検出可能な時間は、いずれの菌群でも 10^1 ~ 10^2 cfu/ml では 6~10 時間であったが、菌数が 10^3 ~ 10^4 cfu/ml オーダーになると 3~5 時間で測定可能であった。菌数と電流値が閾値に達するまでの時間（検出時間）の R^2 値は、ウシ糞便菌液の接種試験では、一般生菌と大腸

菌群のいずれにおいても 0.935-0.957 の範囲であった。しかし、ブタ糞便菌液の接種試験では、生菌数と検出時間の R^2 値は 0.942 以上であったのに対し、大腸菌群数と検出時間の R^2 値は 0.835-0.863 と生菌数の値と比較して約 0.1 低かった。この場合、牛乳中の 10^1 オーダーの大腸菌群を 3 点測定したときの 2 点の検出時間は、それぞれ 450 分、475 分であったのに対し他の 1 点は 549 分であった。食肉 10 倍乳剤中の 10^1 オーダーの大腸菌群を測定したときでは、2 点の検出時間がそれぞれ 455 分、492 分であったが他の 1 点は 580 分であった。549 分、580 分をそれぞれ 470 分に変更して R^2 値を求めると、牛乳への接種試験では 0.913-0.932、牛肉 10 倍乳剤への接種試験では 0.916-0.934 と R^2 値が 0.9 を超える。以上のことから、 R^2 値が約 0.1 低くなったのは、何らかの原因により 3 点中 1 点の検出時間が他の 2 点の検出時間と大きく異なったためと考えられた。

ウシおよびブタの糞便菌液中の生菌数、大腸菌群数と DOX による検出時間の R^2 値は 0.96-0.97 であった（平成 19 年度報告）。今回の接種試験における生菌数、大腸菌群数と DOX による検出時間の R^2 値は、ブタ糞便菌液を接種した食品中の大腸菌群数の測定を除いたすべての場合で、0.935 以上であった。以上の結果より、DOX は種々の汚染指標菌が混在した牛乳や牛肉 10 倍乳剤から従来法と高い相関性をもって生菌数と大腸菌群数を測定できると考えられた。

迅速試験法と平板培養法の同等性を評価する試験には、理想的には汚染菌数の異なる各種の自然汚染食品を大量に用意する必要がある。こ

れは現実的には不可能であるため、自然汚染食品の代替となる食品が必要となる。現行では、測定対象となる菌を食品に接種する方法や食品検体を培養（温度虐待）して測定対象の菌を増殖させる方法により、食品中の菌数が調整されている。本研究では、指標菌汚染食品を作製する方法として動物糞便菌液を無菌食品に添加する方法を考案・実践した。糞便菌液中には、通常の食品に多く存在しない大腸菌を含め、各種汚染指標菌数が 10^6 cfu/ml オーダー以上存在する。このため、糞便菌液を希釈して食品に接種することにより汚染菌数の異なる指標菌汚染食品を容易に作製することができる。食品の微生物汚染源は、食品の原材料となる動物や環境に由来することからも、糞便菌液を使用する方法は従来方法よりも自然汚染に近い汚染食品を作製するのに適した方法であると考えられる。さらに、糞便中には大腸菌群、大腸菌、腸内細菌科菌群以外の夾雑菌も存在することから、種々の菌が混在する中から測定対象となる汚染指標菌を迅速試験法で選択的に検出できるかどうか検討できる。自然汚染食品および従来方法で作製された指標菌汚染食品を用いて AFNOR と AOAC の認証を得たテンゴは、糞便菌液を添加した無菌食品中の各種汚染指標菌の菌数を平板培養法と高い相関性をもって測定できた。動物糞便菌液を無菌食品に添加する方法は、迅速試験法と平板培養法の同等性評価試験に必要な指標菌汚染食品の作製法の 1 つとして利用可能であると考えられた。

E. 結論

1. ウシおよびブタ糞便菌液を接種した牛乳お

よび牛肉 10 倍乳剤中の生菌数、大腸菌群数、大腸菌数および腸内細菌科菌群数の菌数測定の結果、テンポ法と平板培養法とで測定した菌数には高い相関関係が認められた。DOX で測定した生菌数と大腸菌群数電流値が閾値に達するまでの時間（検出時間）と、平板培養法で測定した菌数との間にも高い相関関係が認められた。

2. 市販惣菜および生鮮食品中の生菌数、大腸菌群数および腸内細菌科菌群数の菌数測定の結果、テンポ法と平板培養法とで測定した菌数には高い相関関係が認められた。いずれの菌群についても 2 つの測定法で得られた菌数の一致率は 95%以上を示し、Campden の評価基準よりテンポ法は平板培養法と同等の性能を有すると考えられた。

3. 動物糞便菌液を食品に接種する方法は、汚染指標菌の迅速試験法と従来法（平板培養法）の同等性を評価する試験に必要な指標菌汚染食品の作製法に利用できると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 参考文献

- 1) 厚生労働省生活衛生局（2006）食品衛生小六法、平成 18 年度版、新日本法規、東京
- 2) 厚生労働省監修（2004）食品衛生検査指針微生物編、日本食品衛協会、東京
- 3) ISO 7218 : 2007, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.
- 4) ISO 16140 : 2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.
- 5) CCFRA, 2001, Guidelines for establishing the suitability of food microbiology methods.

H. 研究発表

- 1) 浅尾 努、河合高生（2008）特集 微生物検査の国際規格への対応 食品の衛生指標菌試験法の現状と今後、食品と開発、43 : 7-10.
- 2) 浅尾 努（2008）特集 検査態勢の無駄を見直す ～微生物検査とアレルギー管理～ 衛生指標菌と規格基準の現状と今後—国際動向を踏まえて
～このままで良いのか、日本の食品細菌試験法～、月刊 HACCP、14 : 20-30.

表 1. 作製直後のウシ、ブタ糞便菌液中の汚染指標菌数 (cfu/ml)

	ウシ	ブタ
生菌数	1.2×10^7	2.1×10^8
大腸菌群数(デソキシコレート寒天)	3.9×10^6	1.0×10^6
大腸菌群数(VRBA)	4.5×10^6	1.7×10^6
大腸菌数(XM-G寒天)	2.9×10^6	1.2×10^6
腸内細菌科菌群数(VRBG)	5.2×10^6	5.1×10^6

表 2-1. 市販惣菜および生鮮食品の一般生菌数の分類別汚染状況と一致率

食品	検体数	対数値	菌数の対数値差 ^{*1}		一致率 ^{*2} (%)
			≤1.0	>1.0	
加熱惣菜類	43	2.00~6.96	41	2	95.3
刺身類	7	3.64~5.38	7	0	100
寿司類	7	2.52~6.18	7	0	100
生肉類	15	3.34~6.38	15	0	100
未加熱惣菜類	30	2.32~7.67	29	1	96.7
麺・豆腐類	10	3.26~5.82	10	0	100
和菓子類	9	3.21~7.18	9	0	100
合計	121	2.00~7.67	118	3	97.5

*1 絶対値 *2 菌数の対数値差が±1以下の検体の割合

表 2-2. 市販惣菜および生鮮食品の大腸菌群の分類別汚染状況と一致率

食品	検体数	対数值	菌数の対数值差* ¹		一致率* ² (%)
			≤1.0	>1.0	
加熱惣菜類	4	1.95~5.18	4	0	100
刺身類	5	3.00~4.91	5	0	100
寿司類	2	2.56~4.04	1	1	50.0
生肉類	9	2.15~5.41	9	0	100
未加熱惣菜類	6	2.11~6.04	6	0	100
麺・豆腐類	1	4.20~4.36	1	0	100
和菓子類	1	2.00~2.60	1	0	100
合計	24	1.95~6.04	23	1	95.8

*¹ 絶対値 *² 菌数の対数值差が±1以下の検体の割合

表 2-3. 市販惣菜および生鮮食品の腸内細菌科菌群の分類別汚染状況と一致率

食品	検体数	対数值	菌数の対数值差* ¹		一致率* ² (%)
			≤1.0	>1.0	
加熱惣菜類	2	2.76~5.11	2	0	100
刺身類	6	3.00~4.87	6	0	100
寿司類	2	2.51~3.32	2	0	100
生肉類	11	1.85~5.65	11	0	100
未加熱惣菜類	3	2.52~6.32	3	0	100
和菓子類	2	2.30~5.36	2	0	100
合計	26	1.85~6.32	26	0	100

*¹ 絶対値 *² 菌数の対数值差が±1以下の検体の割合

表 2-4. 市販惣菜および生鮮食品の項目別汚染状況と一致率

品名	検体数	対数值	菌数の対数值差 ^{*1}		一致率 ^{*2} (%)
			≤1.0	>1.0	
白身魚の甘酢あんかけ	15	3.08~6.83	15	0	100
鶏龍田南蛮漬け	13	2.65~5.08	13	0	100
スモークサーモンマリネ	9	2.52~4.49	9	0	100
合計	37	2.52~6.83	37	0	100

*1 絶対値 *2 菌数の対数值差が±1以下の検体の割合

表 2-5. 菌数の対数值差が±1より大きくなった惣菜の一般生菌数測定結果

測定項目	検体数	対数值	菌数の対数值差 ^{*1}		一致率 ^{*2} (%)
			≤1.0	>1.0	
一般生菌数	121	2.00~7.67	118	3	97.5
大腸菌群	28	1.95~6.04	27	1	96.4
腸内細菌科菌群	26	2.51~3.32	26	0	100
総合計	175	1.85~6.32	171	4	97.7

*1 絶対値 *2 菌数の対数值差が±1以下の検体の割合

生菌数(牛乳、ウシ糞便菌液)

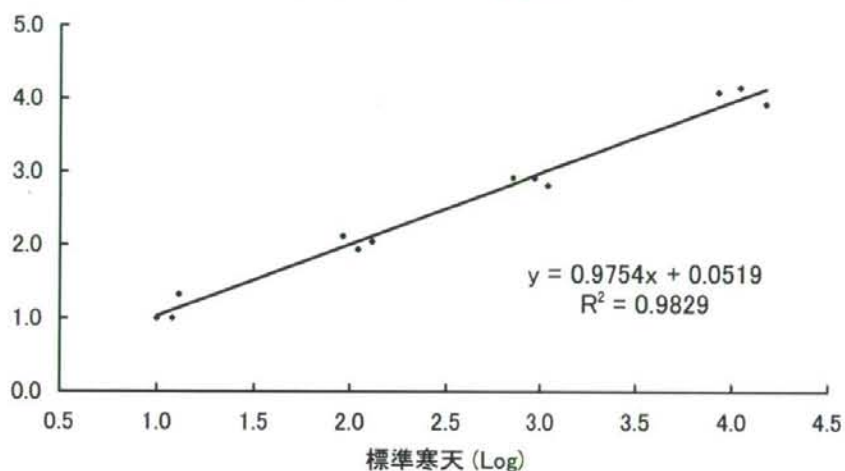


図 1A ウシ糞便菌液を接種した牛乳中の一般生菌をテンポ法と平板培養法で測定した菌数の相関性

大腸菌群(牛乳、ウシ糞便菌液)

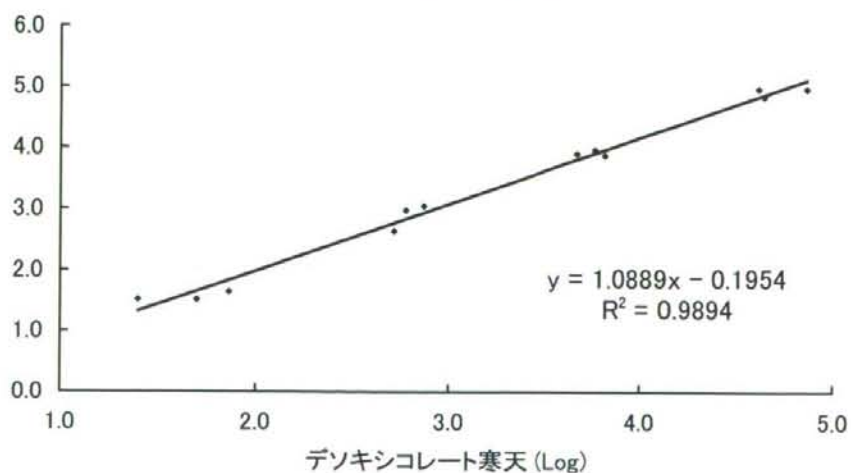


図 1B ウシ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌群をテンポ法と平板培養法 (デソキシコレート寒天) で測定した菌数の相関性

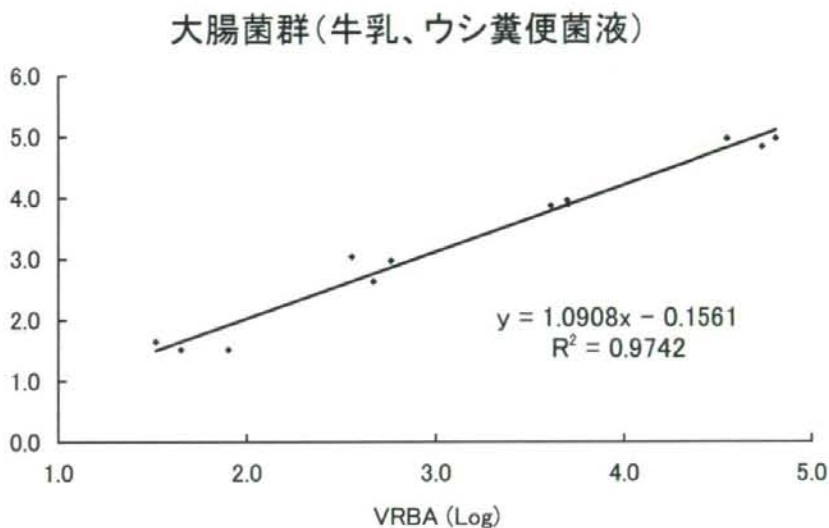


図 1C ウシ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌群をテンポ法と平板培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

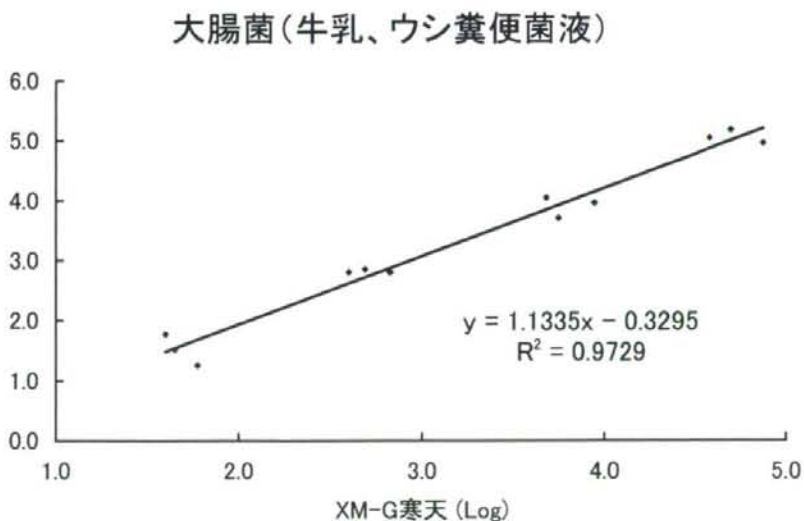


図 1D ウシ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌をテンポ法と平板培養法 (XM-G寒天) で測定した菌数の相関性

腸内細菌科菌群(牛乳、ウシ糞便菌液)

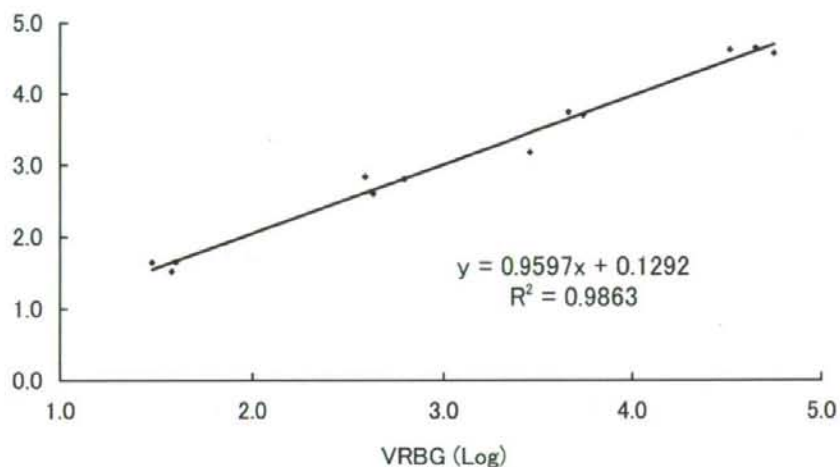


図 1E ウシ糞便菌液を接種した牛乳中の腸内細菌科菌群をテンポ法と平板培養法 (VRBG) で測定した菌数の相関性

生菌数(牛肉10倍乳剤、ウシ糞便菌液)

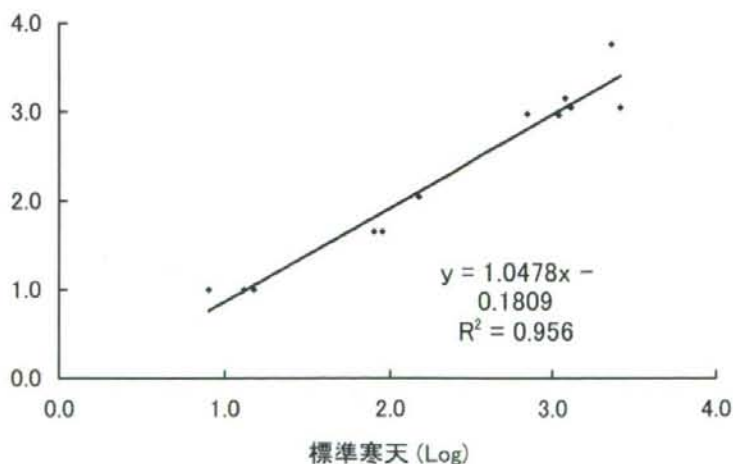


図 2A ウシ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の一般生菌をテンポ法と平板培養法で測定した菌数の相関性