



図12. ISOの腸内細菌科菌群試験法概略図 (MPN法)

BPW で前培養し、EE 培地による選択増菌培養後に VRBG 培地へ画線培養する。発生した集落のうち、ブドウ糖を分解しオキシダーゼ試験陰性の菌を腸内細菌科菌群と同定する。FDA/BAM には腸内細菌科菌群の試験法は記載されていない。

4-4. 損傷菌の培養法

食品中の細菌は、製造・加工工程中に高温、低温、乾燥、高浸透圧のような物理的ストレスや、酸、保存料、消毒剤の化学的ストレスを受ける。したがって食品中で生残している菌でも何らかの損傷を受けていると考えるのが自然である。食品の安全性の評価や品質劣化の防止などを目的とした検査では、このような損傷菌の存在は無視できない。損傷菌を検出するための種々の培養法が考案されており、食品の希釈液にペプトン加生理食塩水を使用するのもその対策のひとつである。培地にピルビン酸やカタラーゼを添加すると損傷菌の回復を助ける効果があるといわれている。ISO 法 (図8) では、TBX 培地で混釈後に37℃で4時間前培養して損傷大腸菌の回復をはかり、その後所定の培養温度である44℃まで上昇させる方法が示されている。FDA/BAM の大腸菌群試験法 (図7) では、発育阻害剤を含まない TSA 寒天培地で混釈後、室温で 2 ± 0.5 時間培養することにより損傷大腸菌群の回復をはかり、その後 VRBA 培地を重層して35℃で培養する方法をとっている。なお American Public Health Association (APHA; 米国公衆衛生協会) の乳製品試験法では、2倍濃度の VRBA 培地を重層することを推奨している。

4-5. 菌数計測法

わが国には大腸菌群の菌数限界値による定量的な成分規格はないので、食品衛生小六法には菌数測定・算定法は記載されていない。FDA/BAM 法では平板1枚当たりの集落数の計測可能範囲を、生菌数測定法と同様に25~250/平板としている。APHA の乳製品試験法や ISO 法では、生菌数 (25~250/平板, 15~300/平板) よりも少ない15~150/平板となっている。ここでは ISO 16649-2 に記載された大腸菌の菌数測定・算定法を紹介する。集落数が15~150/平板の範囲内であれば図13の計算式に従って菌数を算定する。最低希釈段階 (例えば10倍) で集落が発生しなければ $<10/g$ とし、最高希釈段階 (例えば100倍) で $>150/g$ の集落が発生すれば $>1.5 \times 10^4/g$ とする。食品衛生小六法に記載された生菌数の計算方法では、ISO 法で計算した菌数と同じか、あるいはそれ以上の菌数になる。有効な集落数測定範囲を30~300/平板とした場合の計算例を表4に示したが、ISO 法が理論的には正しい菌数計算法であると思われる。

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

ΣC : 各平板の集落数の合計

n_1 : 低希釈の算定対象ペトリ皿数

n_2 : 高希釈の算定対象ペトリ皿数

d : 希釈が低いほうの希釈倍率

V : ペトリ皿への接種量 (ml)

図13. 菌数の計算式

【参考1】乳糖分解によるガス産生機構

乳糖は β -ガラクトシダーゼによりグルコースとガラクトースに加水分解される。グルコースが発酵するとピルビン酸からギ酸等の有機酸が生成し、これがギ酸ヒドロゲンリアーゼにより分解されると酸と二酸化炭素 (ガス) が発生する。液体培地では発生したガスをダーラム管でトラップして判定する。

【参考2】大腸菌群がデソキシコレート寒天培地で赤変する機構

乳糖分解によって生じた酸は集落周辺部の pH を低下させ、その結果デソキシコール酸ナトリウムから不溶性のデソキシコール酸が析出する。デソキシコール酸は酸性下で赤変した中性紅と強く結合し、乳糖分解菌の集落を混濁赤変させる。この変化は可逆的であるため、発生した集落数が多くなるか、乳糖分解菌の発育が速い場合には、一旦赤色になった集落が時間の経過とともに脱色されてしまう。脱色化の原因は、菌が乳糖を消費し尽くして窒素源を利用し始めると、生成されるアンモニアにより培地の pH が上昇に転じ、その結果デソキシコール酸は再び可溶化するとともに脱色された中性紅が遊離することによる。培地を重層するのは、空気と遮断することにより培地表面に発生する菌の発育（乳糖の消費）を遅らせて、規定の培養時間内（20±2時間）での集落の脱色化を防止するためである。

【参考3】IMViC 試験

IMViC 試験とはインドール試験、MR 試験、VP 試験、クエン酸利用性試験の頭文字を並べたもので、44℃あるいは44.5℃での発育性やゼラチン液化性試験との組み合わせにより大腸菌群の同定をするためのシステムである。このシステムは、まだ腸内細菌科の分類が確立されていなかった時代に提唱された簡易的な方法である。今日では種々の腸内細菌科の同定キットが市販されていることや、発色酵素基質を用いて大腸菌群や大腸菌を迅速に鑑別できる培地が開発されたことから、時間のかかる IMViC 試験はその役目はほぼ終わったものと考えられる。

【参考4】大腸菌群と糞便系大腸菌群がヨーロッパ連合の微生物規格から消えた
ヨーロッパ連合での食品の微生物規格の改正に

ともない、2006年1月1日から施行された Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on Microbiological Criteria for foodstuffs では、大腸菌群と糞便系大腸菌群による規制が微生物規格から消えた。この規格は市販食品の安全規格 (Food safety criteria) と、HACCP に対応可能な製造工程での衛生管理規格 (Process hygiene criteria) から成り立っている。ほとんどの市販食品の安全規格は、サルモネラやリステリアのような病原菌、ブドウ球菌エンテロトキシン、ヒスタミンで規制されており、衛生指標菌が使用されているのは生食用貝類に対する大腸菌の規格のみである。

2006年1月1日以前は、市販製品としての殺菌牛乳、バター、滅菌したソフトチーズ等の乳製品に対して大腸菌群の規制があったが、これら乳製品の微生物規格には腸内細菌科菌群あるいは大腸菌が採用された。生の二枚貝に対する糞便系大腸菌群の規格や、調理済み甲殻類と貝類の thermotolerant coliforms (糞便系大腸菌群と同義語) の規格がなくなり、いずれも大腸菌のみの規格になった。

ちなみに日本の水質基準に関する省令 (平成5年5月) でも、大腸菌群の検査項目が大腸菌に変更された。これは大腸菌群が大腸菌に比べて、元来の目的である糞便汚染に対する指標性が低いこと、迅速・簡便な大腸菌の試験法 (酵素基質培地法) が確立されたためである。

5. おわりに

近年、酵素基質培地を初めとして、培養法と組み合わせた簡便・迅速な細菌測定機器が食品試験

表4. 計算方法の違いによる生菌数の差異

試料 番号	各希釈の集落数		希釈率を考慮した 集落数の比	小六法 (A)	ISO, BAM (B)	A/B
	1:10	1:100				
1	300	30	1:1	3.0×10^4	3.0×10^3	1
2	235	31	1:1.3	2.7×10^4	2.4×10^3	1.13
3	290	52	1:1.8	4.1×10^4	3.4×10^3	1.21
4	300	60	1:2	4.5×10^4	3.3×10^3	1.36
5	150	30	1:2	2.3×10^4	1.6×10^3	1.43

有効な集落測定範囲を30~300/平板とする

用に開発されてきたが、日本の食品衛生法上承認された方法は残念ながら未だに皆無である。食品衛生法とは対照的に、上水の大腸菌群試験法には最新の手法が採用された結果、特に試験法の迅速性が飛躍的に向上した。

公的な機関が食品衛生法に従って実施する行政検査は、一部の例外（通知法）を除いて成分規格に含まれる試験法（告示法）に従って実施しなければならない。日々新しい細菌試験技術が開発されている今日、試験検査に携わる人達の多くが、わが国の試験法の守旧性や無用な煩雑さに疑問を持っていることは容易に推察できる。本稿では、米国やヨーロッパ連合の衛生指標菌の試験法の概略を紹介すると同時に、わが国の試験法（告示法）が一刻でも早く改善されるように期待を込めて、あえて問題点を指摘することに重点を置いた。

6. 参考資料

個々の引用文献は割愛し、参考とした代表的なものを抜粋して示した。なお International Organization for Standardization は ISO として記載した。

- 1) ISO 16649-2 (2001) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide.
- 2) ISO 21528-1 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment.
- 3) ISO 21528-2 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony count method.
- 4) ISO 16649-3 (2005) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide..
- 5) ISO 7251 (2005) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique.
- 6) ISO 4831 (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique.
- 7) ISO 4832 (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique.
- 8) EC (European Commission) (2005) Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of European Union.
- 9) American Public Health Association (2004) Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th ed. APHA, Washington, DC.
- 10) American Public Health Association (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. APHA, Washington, DC.
- 11) U.S. Food and Drug Administration (2001) Bacteria Analytical Manual Online, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>.
- 12) Health Protection Agency (2004) Enumeration of coliforms and presumptive *Escherichia coli* by the Most Probable Number (MPN) Technique. National Standard Method. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
- 13) 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
- 14) 厚生労働省監修 (2004) 食品衛生検査指針微生物編、日本食品衛生協会、東京

=資料=

食品の細菌学的試験法の現状と問題点

(日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告)

浅尾 努^{*1,†}・河合高生^{*1}・久米田裕子^{*1}・寺本忠司^{*2}
石黒 厚^{*3}・梅迫誠一^{*4}・小笠原 準^{*5}・高須一重^{*6}
美野朋隆^{*7}・日野亮一^{*8}・斉藤利江^{*9}
小崎俊司^{*10}・山本茂貴^{*11}

(^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所, ^{*2} (株)ファルコライフサイエンス, ^{*3} (株)ドンク, ^{*4} 奈良県桜井保健所,

^{*5} 大阪市立環境科学研究所, ^{*6} (財)日本食品分析センター大阪支所, ^{*7} 大阪いずる市民生活協同組合,

^{*8} 生活協同組合連合会コープきんき事業連合, ^{*9} 日本冷凍食品検査協会,

^{*10} 大阪府立大学, ^{*11} 国立医薬品食品衛生研究所)

(受付 平成19年8月28日)

(受理 平成19年9月10日)

The current state and problems of microbiological examination
methods of food (Japanese Society for Food Microbiology:
A report from the working group concerning
microbiological examination methods of food)

Tsutomu ASAO,^{*1,†} Takao KAWAI,^{*1} Yuko KUMEDA, ^{*1} Tadashi TERAMOTO,^{*2}
Atsushi ISHIGURO,^{*3} Seiichi UMESAKO,^{*4} Jun OGASAWARA,^{*5}
Kazushige TAKASU,^{*6} Tomotaka MINO,^{*7} Ryoichi HINO,^{*8}
Rie SAITO,^{*9} Shunji KOZAKI^{*10} and Shigeki YAMAMOTO^{*11}

(^{*1} Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi, Higashinari-ku,
Osaka 537-0025; [†] Corresponding author)

(^{*2} FALCO Life Science, 63-2 Higashi-takeyamachi, Kawabatahigashi-iru,
Higashi-takeyamachi-dori, Sakyo-ku, Kyoto 606-8393)

(^{*3} Donq Co., Ltd., 5-4 Koyo-cho Nishi, Higashinada-ku,
Kobe, Hyogo 658-0033)

(^{*4} Nara Prefectural Sakurai Health Center, Ohdono, Sakurai, Nara 633-0062)

(^{*5} Osaka City Institute of Public Health and Environmental Science,
8-34 Tojo-cho, Tennoji, Osaka 543-0026)

(^{*6} Japan Food Research Laboratories Osaka Branch, 3-1 Toyotsu-cho,
Suita, Osaka 564-0051)

(^{*7} Osaka Izumi Cooperative Society Mozuakahata-cho, Kita-ku,
Sakai, Osaka 1-24-1)

(^{*8} Consumer Cooperative Kinki, 13-9 Nishinakajima, Yudogawa-ku, Osaka 532-0011)

(^{*9} JAPAN FROZEN FOODS INSPECTION CORPORATION, Minatojimaminamimachi,
Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047)

(^{*10} Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531)

(^{*11} National Institute of Health Science, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8510)

[†] 連絡先

^{*1} ☎537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

1. 食品の細菌検査法問題検討委員会発足の背景

食品衛生検査指針の前書きには、『試験法としての信頼性が高く、しかも調和がとれていることが求められます。また、学問と技術の発展に伴い、迅速かつ適切に改訂されていくことが必要であります。』と書かれている。しかし、実際には大多数の食品の細菌試験法は、改訂が容易ではない食品衛生法の成分規格に組み入れられているので、古い試験法でも告示された当時のままの姿をとどめているものが多い。例えば、昭和27年に告示された氷雪の規格基準や、昭和28年に改訂された乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（いわゆる乳等省令）に記載された試験法がその代表である。平成10年に通知された未殺菌液卵の細菌試験法においてすら、今から50年以上も前に告示された氷雪の試験法に従い実施するように指示されている。最近数多く開発・販売されるようになった発色酵素基質培地が、従来の培養法に比べて大幅な試験時間の短縮が可能であるにもかかわらず、法改正しない限りは細菌学的規格検査に使用できない。

以上の事実で代表されるような閉塞感のある日本の食品細菌試験法の現実と、検査指針に掲げられた『迅速かつ適切に改訂』や『調和がとれていること』というごく常識的な理念との間に大きな隔りがあるのは明白である。このような状況に対応するため、日本食品微生物学会（理事長 齋藤文一）の組織活動の一環として、検査法担当部会（担当理事 山本茂貴、浅尾 努）が新たに発足し、これに伴い「食品の細菌検査法問題検討委員会」を立ち上げた。この委員会の主たる目的は、日本で実施されている食品の細菌検査に関わる種々の問題点を、官民それぞれの立場から検証することである。平成17年7月に国立医薬品食品衛生研究所において発足した、食品からの微生物検査標準法検討委員会（委員長 山本茂貴）への提言のための役割も視野に入れた組織でもある。なお本委員会に関する情報は国立医薬品食品衛生研究所のホームページ（<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>）から入手できる。

2. 食品の細菌試験法の現状

昭和40年当時に細菌学的規格検査の対象とされた食品等の区分は30種類（乳等省令だけで23種類）であったが、現在では乳等省令35種類を含めて2倍以上の65種類にも達している。当初の検査対象菌（群）は汚染指標菌に限定されていたが、その後に腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌を標的とした“指標菌の食中毒菌”の検査や、リステリア モノサイトゲネスを含む食中毒菌を直接検査する方法も加わった。この中にはサルモネラ試験法のように、食品ごとに異なる試験法が次々と無秩序に通知されてきたものもある。腸炎ビブリオ試験法では、後述する食肉製品の規格基準の改訂の理念に反し、試験法が成分規格に含まれて告示された。

近年急速に普及したPCR法やそれを応用した機器に

よる遺伝子診断法やイムノクロマト法等が、迅速性に乏しい培養法の補助試験法の一つとして利用されつつある。このような試験項目の増加や、何らかの措置を講じない限り、今後さらに複雑化することが危惧される試験法の記述上の問題は、単に培養器や遺伝子診断等に必要器具機材の整備のための経済的な負担を強いるだけでなく、検査ミスを誘発する可能性を高める要因の一つにもなりかねない。

グローバル化している食品流通の現状から、日本国内のみならずAOAC International (AOAC), International Organization for Standardization (ISO), U.S. Food and Drug Administration (米国FDA) のような国際機関の試験法との調和も重要な課題となっているが、残念ながら日本国内においては細菌試験法の基本的な調和がとられていないのが実情であると言わざるを得ない。

3. 委員会の活動状況

列挙したような状況に対する危機感から、平成17年9月以降合計5回の「食品の細菌検査法問題検討委員会」を開催した。本委員会の作業として、①AOAC, ISO, 米国FDA/BAM (Bacterial Analytical Manual) をはじめとした諸外国の細菌試験法に関する情報の収集・解析や、②日本の食品の成分規格の現状分析と整理を開始した。より具体的な問題点として、③最確数測定法や最確数表の問題点、④細菌数測定・算出法の問題点、⑤汚染指標菌試験法の問題点を取り上げており、現在これらの作業は同時並行的に進行している。今までに得られた成果として、乳及び乳製品（乳等省令）や冷凍食品をはじめとする各種食品に対する規格基準・試験法に対応した希釈液、培養温度、培地等を最大限に簡略化した一覧表を作成した。

わが国の食品細菌試験法は積み上げ方式になっているために新旧の試験法が混在しているが、その典型的な例としてサルモネラ試験法を、さらには腸炎ビブリオ試験法の現状とその問題点を第2回食品からの微生物検査標準法検討委員会（平成17年10月25日開催）へ文書をもって提起した。

4. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表の説明

乳等省令に含まれる35種類の乳製品（表1）、冷凍食品など18の食品等（表2）、比較的新しく告示・通知された食肉製品（表3）、ミネラルウォーター類（表4）、食鳥卵（表5）、および腸炎ビブリオの成分規格に関連する魚介類等（表6）の規格基準と試験法のうち、試験現場に必要な最小限の項目を一覧表にした。筆者らが食品細菌検査の際に、検査ミスをなくす手段の一つとして以前から使用してきた一覧表に追加・修正を加えたものである。手元に常備し、試験法等を確認する資料として使用して頂ければ幸いである。

表 1. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表 (乳及び乳製品)

食品	規格		培養		試験の作製	
	細菌数	大腸菌群	温度 (°C)	培地 (時間)	試験の希釈倍率と培地の数	試験原液 (希釈液)
1 牛乳						
2 殺菌山羊乳						
3 加工乳						
4 成分調整牛乳	5 万/ml 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3) BGLB (48±3)	×1, ×10, ×100; 1 ml×2 本	希釈液の規定なし
5 低脂肪牛乳						
6 無脂肪牛乳						
7 特別牛乳	3 万/ml 以下					
8 濃縮乳	10 万/g 以下	/	32~35	PC (48±3)	10 g; up to 100 ml (S)	
9 脱脂濃縮乳						
10 加糖れん乳						
11 加糖脱脂れん乳						
12 全粉乳						
13 脱脂粉乳						
14 クリームパウダー	5 万/g 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3) BGLB (48±3)	×1, ×10, ×100; 1 ml×2 本	10 g; up to 100 ml (S)
15 ホエイパウダー						
16 たんぱく質濃縮ホエイパウダー						
17 バターミルクパウダー						
18 加糖粉乳						
19 調整粉乳						
20 無糖れん乳	0/g	/	32~35	PC (48±3)	×10; 2 ml×5 枚	10 g; up to 100 ml (S)
21 無糖脱脂れん乳						
22 バター						
23 バターオイル						
24 プロセスチーズ	/	陰性 (DS)	32~35	DS (20±2)	×10; 1 ml×2 枚	融解 (45°C 未満, 15 分以内, 恒温槽で) 10 g; up to 40°C の 100 ml (S)
25 濃縮ホエイ						
26 クリーム	10 万/ml 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3)		希釈液の規定なし
27 乳飲料	3 万/ml 以下	陰性 (BGLB)	32~35	BGLB (48±3)	×1, ×10, ×100; 1 ml×2 本	
28 生乳	400 万/ml 以下 ¹⁾	/				
29 生山羊乳	400 万/ml 以下 ¹⁾	/				
アイスクリーム類 ²⁾						
30 アイスクリーム	10 万/g 以下					融解 (40°C 以下, 短時間) 10 g + 90 ml (S)
31 アイスマイルク	5 万/g 以下	陰性 (DS)	32~35	DS (20±2)	×10; 1 ml×2 枚	
32 ラクトアイス	5 万/g 以下					
33 発酵乳 ³⁾	1,000 万/ml 以上					
乳飲料 ³⁾						
34 無脂肪固形分 3% 以上	1,000 万/ml 以上 ⁴⁾	陰性 (DS)	35~37	BCP (72±3)	×10; 1 ml×2 枚	10 g (ml); up to 100 ml (S) (凍結状態のものは 40°C 以下, 短時間で融解した 10 g)
35 無脂肪固形分 3% 未満	100 万/ml 以上					

S: 滅菌生理食塩水, PC: 標準寒天培地, BCP: BCP 加プレートカウント寒天培地, DS: デンキシニコレット寒天培地

¹⁾ 総菌数, ²⁾ 発酵乳又は乳酸菌飲料を原料にしたものは, 乳酸菌又は酵母以外の細菌数, ³⁾ 乳酸菌数又は酵母数 (BCP 加プレートカウント寒天培地),

⁴⁾ 発酵させた後において, 75°C 以上 15 分間加熱するか又はこれと同量以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌したものはこの限りでない。

①) 牛乳, 成分調整牛乳, 無脂肪牛乳, 加工乳又は乳飲料の常温保存可能品は, 上記規格以外に 30±1°C で 14 日間あるいは 55±1°C で 7 日間保存後の生菌数が 0/ml

乳及び乳製品のリス
テリア汚染防止等に
ついて
乳, 乳製品中のリス
テリア検査手順
(IDF 標準法)

検体 25 g (ml)
+
選択増菌培地
EB 培地 225 ml
↓
培養 30°C, 48 時間
↓
選択分離培地
Oxford 又は
バカルム寒天培地
↓
培養 30~35°C,
24~48 時間
↓
純培養
TSYEA 培地
↓
培養 30°C, 48 時間
↓
集落観察 斜光法
↓
確認培養
CAMP 試験他
↓
同定
↓
血清型別

ソフト及びセミソフト
タイプのナチュラ
ルチーズでリステリ
アを検出したものは
食品衛生法第 6 条に
違反

表2. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表 (冷凍食品等)

食品	規格			培養			試験の調整	
	細菌数	大腸菌群	E. coli	温度(°C)	培地(時間)	試験の希釈倍率と培地の数	試験量および希釈液等	
36 冷無加熱採取	10万/g以下	陰性(DS)	/	35±1.0(PC, DS)	PC(24±2)	×100; 1 ml×2枚	25g+225 ml(PB)×10	
37 凍加熱後採取(凍結直前加熱)	10万/g以下	陰性(DS)	/	44.5±0.2(EC)	DS(20±2)	×100; 1 ml×3本	↓10 ml	
38 食加熱後採取(凍結直前非加熱)	300万/g以下	陰性(DS)	/		EC(24±2)		90 ml(PB)×(×100) 試料原液	
39 食品生食用冷凍鮮魚介類 ¹⁾	10万/g以下	陰性(DS)	/					
40 冷凍ゆでたこ ¹⁾	10万/g以下	陰性(DS)	/	35±1.0	PC(24±2)	×100; 1 ml×2枚	冷凍食品と同じ	
41 冷凍ゆでかに ¹⁾	10万/g以下	陰性(DS)	/	35±1.0	DS(20±2)			
42 鶏肉製品	/	陰性(BGLB)	/	35±1.0	BGLB(48±3)	×10; 10 ml×3本	25g+225 ml(SF)	
43 食肉・鶏肉・魚肉製品に使用する砂糖、てん粉、香辛料(製造基準)	1,000/g以下	/	/	35.0±1.0	PC(48±3) (芽胞数)	×200; ×2,000; 1 ml×2枚	5g up to 100 ml(SF)×20 その20 mlを10分間煮沸急冷	
44 水菓	1万/ml以下 ²⁾	陰性(DS)	/	35±1.0	PC(48±3) DS(20±2)	×10; 1 ml×2枚	40°C以下、短時間で融解	
45 生食用かきおよびびき身にした生食用かき ¹⁾	5万/g以下	/	230/100 g以下(MPN値)	35±1.0(PC) 44.5±0.2(EC) (恒温水槽)	PC(24±2) EC(24±2)	×2; 2 ml, ×10; 1 ml, ×100; 1 ml)×5本	200 g以上+等量のPB×2	
46 生食用かきの原料生産海域海水(加工基準)	/	/	70/100 ml以下	35±1.0	LB(24±2, 48±3)	×10; 1 ml×2枚 (EC5本法のMPN)	10 ml+90 ml(S)	
47 容器包装結加圧加熱殺菌食品	無菌試験陰性	/	/	35.0±1.0	恒温試験(35.0±1.0°Cで14日保存) TGC(48±3)	×100; 1 ml×5本	25g+225 ml(PB)×10	
48 直接食品に接触させて食品を保存する氷雪	/	陰性(BTB-LB)	/	35±1.0	BTB-LB (24±2, 48±3)	×1; 10 ml, 1 mlおよび ×10, ×100, ×1,000; 1 ml	9 ml(PB)×100 滅菌蒸留水で洗浄後、室温または40°C以下の温湯中で融解(原液), ×1,000まで10段階希釈	
49 氷雪	100/ml以下	陰性(BTB-LB)	/	35±1.0	BTB-LBは同上	BTB-LBは同上	同上、希釈液の規定なし	
50 清涼飲料水	/	陰性(BTB-LB)	/	35±1.0	PC(24±2)	×1, ×10, ×100, ×1,000; 1 ml×2枚	(上も同様)	
51 粉末清涼飲料(乳酸菌不含)	3,000/g以下	陰性(BTB-LB)	/	35±1.0	BTB-LB (24±2, 48±3)	×1; 10 ml, 1 ml, ×10; 1 ml	含CO ₂ 飲料は脱気、希釈液の規定なし	
52 粉末清涼飲料(乳酸菌加)	3,000/g以下 ³⁾	陰性(BTB-LB)	/	35±1.0	PC(24±2) BTB-LB (24±2, 48±3)	×10, ×100, ×1,000, ×10,000; 1 ml×2枚 ×10; 10 ml, 1 ml, ×100; 1 ml	10 g: up to 100 ml(PB)×10 10,000倍まで10段階希釈	
53 粉末清涼飲料(乳酸菌加)	3,000/g以下 ³⁾	陰性(BTB-LB)	/	35±1.0	BTB-LB (24±2, 48±3)	×10; 10 ml, 1 ml, ×100; 1 ml	10 g: up to 100 ml(PB)×10 ×10,000; 1 ml×2枚 ×10,000まで10段階希釈	

S: 滅菌生理食塩水, PB: 滅菌リン酸緩衝液, SP: 滅菌ベプトン加生理食塩水, 1) 腸炎ビブリオの規格および試験法は別途記載, 2) 発酵乳又は乳酸菌飲料を原料にしたものは乳酸菌又は酵母以外の細菌数, 3) 乳酸菌を除いた菌数, 4) PGK: ペニシリンGカリウム

表3. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表(食肉製品)

食品	大腸菌群	E. coli	クロストリジウム属菌	黄色ブドウ球菌	サルモネラ属菌
54 食品製品	/	100/g 以下 ¹⁾	/	1,000/g 以下	陰性/25 g
55	/	100/g 以下 ¹⁾	1,000/g 以下	1,000/g 以下	陰性/25 g
56	陰性 (BGLB)	/	1,000/g 以下	/	/
57	/	陰性 (EC) ²⁾	/	1,000/g 以下	陰性/25 g
58	/	陰性 (EC) ²⁾	/	/	/

検査項目	培養		試料の調整	
	温度 (°C)	培地 (時間)	希釈倍率と培地の数	試料量および希釈液等
大腸菌群	35.0±1.0	BGLB (48±3)	×10; 10 ml×3 本	25 g+225 ml (SP)
E. coli	44.5±0.2	EC (24±2)	×10, ×100; 1 ml×5 本 ¹⁾ ×10; 1 ml×5 本 ²⁾	
黄色ブドウ球菌	35.0±1.0	卵黄加マンニット食塩寒天培地 (48±3) コアグラゼ試験陽性を確認	×10; 0.1 ml×2 枚	
クロストリジウム属菌	35.0±1.0	クロストリジウム培地 (24±2)	×10, ×100; 10 ml×2 枚	
	35.0±1.0	EEM (18±2)		25 g+225 ml (EEM)
サルモネラ属菌	43.0±1.0 又は 35.0±1.0	SBG, セレナイト, TT のいずれか一つ (20±2)		EEM の 1 ml
	35.0±1.0	MLCB 又は DHL (24±2) 記載なし TSI/LIM (24±2) OPNG 試験陽性を確認		1 白金耳

¹⁾ EC の陽性率が ×10 で 3/5 以下のときは 10/g 以下, ×100 で 3/5 以下のときは 100/g 以下, SP: 滅菌ペプトン加生理食塩水

²⁾ 加熱殺菌後包装食肉製品および乾燥食肉製品の試験法

表4. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表(ミネラルウォーター類)

食品	大腸菌群	腸球菌	緑膿菌
59 ミネラルウォーター類 (容器包装内の CO ₂ 圧力が 20°C で 98 kPa 未満であって、 かつ、殺菌又は除菌を行わないもの)	陰性 (BTB-LB)	陰性 (AC)	陰性 (AB)

検査項目	培養		試料の調整	
	温度 (°C)	培地 (時間)	試料の希釈倍率等	
推定試験	35.0±1.0	AC, 10 ml (48±3)	×1; 10 ml, 1 ml	
腸球菌	45.0±1.0	AC, 10 ml (48±3)	1 白金耳	
完全試験	35.0±1.0	ブドウ糖寒天 (24±2)	1 白金耳	
	35.0±1.0	ブドウ糖ブイヨン (24±2)		
	35.0±1.0	6.5%NaCl 加ブドウ糖ブイヨン (48±3)		
	35.0±1.0	ブドウ糖寒天斜面 (24±2) カタラーゼ試験陰性・グラム陽性球菌		
推定試験	35.0±1.0	AB, 10 ml (24±2, 48±3) UV (365 nm) での蛍光及び混濁	×1; 10 ml, 1 ml	
緑膿菌	35.0±1.0	セトリミド寒天 (48±3)	1 白金耳	
完全試験	41.5±0.5	普通寒天斜面 (24±2) オキシダーゼ試験陽性・グラム陰性無芽胞桿菌	類緑色又は赤褐色集落	

AB: アスバラギンブイヨン

これら試験法のうち、食肉製品と食鳥卵の試験法は通知法である。魚介類等の腸炎ビブリオ試験法の本体は告示法(平成13年6月7日)であるが、告示直後の平成13年6月29日に「腸炎ビブリオ試験法について」が通知された。この通知には告示された試験法に追加して、

「同定方法」および「同等以上の性能を有すると認められる試験法」が示された。また、ミネラルウォーター類については市販製品として検査対象となる可能性があるもののみを示したが、原水と製造直後のミネラルウォーター類には別途試験法がある。

表5. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表(食鳥卵)

食品	サルモネラ属菌	細菌数
60 食鳥卵 未殺菌液卵 (殺菌液卵以外の鶏の液卵)	/	100万/g以下
61 食鳥卵 殺菌液卵 (鶏の液卵を殺菌したもの)	陰性/25g	/

検査項目	培 養		試料の調整	
	温度(°C)	培地(時間)	試料の希釈倍率と培地の数	希釈液
細菌数	35±1.0	PC(24±2)	×1, ×10, ×100, ×1,000; 1ml×2枚 ⁴⁾	希釈液の規定なし
サルモネラ属菌	36±1	mBPW ¹⁾ (22±2)	25g+225ml(mBPW)	
	42±0.5	TT, 10ml(22±2)	mBPWの0.5ml	
		RV, 10ml(22±2)		
	36±1	MLCB ²⁾ (18~24)	TT, RVの各1エーゼ	
	36±1	BGS ³⁾ (18~24)		
	TSI, LIMあるいはLIA(18~24) 血清学的試験および生化学的試験を行い同定する(同定キットも使用可)			

¹⁾ mBPW: L-システイン0.2g/l又はFeSO₄·7H₂Oを64mg/lに添加したBPW

²⁾ 硫化水素産生により判定する培地でMLCB, DHL, XLD等

³⁾ 硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地でBGS, BGM(改良BGA), ランバック培地, SMID等

⁴⁾ 氷雪と同様に実施することが指示されている。そのまま解釈すれば採取試料量は原液(1ml)からとなる。

表6. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表(ゆでだこ等の腸炎ビブリオ)

食品	細菌数	大腸菌群	腸炎ビブリオ(定性)	腸炎ビブリオ(MPN)
62(非冷凍)ゆでだこ	/	/	陰性	/
40 冷凍ゆでだこ	10万/g以下	陰性(DS)	陰性	/
喫食時に加熱を要しない				
63(非冷凍)ゆでがに	/	/	陰性	/
41 冷凍ゆでがに	10万/g以下	陰性(DS)	陰性	/
喫食時に加熱を要す ¹⁾				
64 冷凍ゆでがに	10万/g以下	陰性(DS)	/	/
65 生食用鮮魚介類 ²⁾	/	/	/	100/g以下
46 むき身にした生食用かき	5万/g以下	E. coli, 230/100g以下	/	100/g以下
39 生食用冷凍鮮魚介類	10万/g以下	陰性(DS)	/	100/g以下

検査項目	培 養		試料の調整	
	温度(°C)	培地(時間)	試料の希釈倍率と培地の数	
腸炎ビブリオ(定性)	37	2%NaCl加AP(一夜培養)	25g+225ml	
	37	TCBS(一夜培養)	1白金耳	
腸炎ビブリオ(MPN)	37	2%NaCl加AP, 10ml(一夜培養)	25g+225ml(3%NaCl加PB)×10 ↓1ml	
			9ml(3%NaCl加PB)×100 (×10; 1ml, ×100; 1ml, 0.1ml)×3本	
	37	TCBS(一夜培養)	1白金耳	
	集落を同定し判定			

AP: アルカリペプトン水(pH 8.6), 3%NaCl加PB: 生食用かきの検査に用いるPBに3%のNaClを加えたもの。

¹⁾ 喫食時に加熱を要す(非冷凍)ゆでがにには規格はない。

²⁾ 生食用鮮魚介類: 切り身又はむき身にした鮮魚介類(生かきを除く)であって、生食用のもの(凍結させたものを除く)に限る。

³⁾ 定性試験の培養及び判定, MPN試験における最確数の算定については、同等以上の性能を有すると認められる方法で行うことが認められた。なお、冷凍ゆでだこ、冷凍ゆでがに、生食用冷凍鮮魚介類の細菌数および大腸菌群の試験法、むき身にした生食用かきの細菌数およびE. coliの試験法は別途記載している。

平成5年の食肉製品の規格基準の改訂に際して、成分規格から微生物規格に係る試験法が削除された。これは「微生物試験について日々新しい試験方法が開発されていることに鑑み、新たに開発される試験方法に柔軟に対応するためである」と説明された。実際に平成10年の殺菌液卵の成分規格が告示された際も、サルモネラ試験法の成分規格から除外された。ところが腸炎ビブリオ試験法の規格基準の一部改正(平成13年6月7日)では、上述の理念に反して告示法として成分規格に含まれてしまった。また昭和38年に通知された「病原性好塩菌食中毒検査要項」に記載された腸炎ビブリオ試験法は今でも効力は失われていないのも奇異である。

一覧表から明白なように、試験法的全体的な問題点としては以下のものが挙げられる。①標準寒天培地の培養温度が、乳等省令では32~35℃と幅があるのに対し、その他の食品では35±1.0℃と厳密に規定されている。ところが、両方の温度条件を満たす温度帯がわずかに異なるため、これらの食品を同一培養器では試験できない。②4種類の希釈液を使い分けて食品乳剤を作製しなければならないが、その一方では希釈液が指定されていない食品もある(番号1~7の牛乳類、26のクリーム、27の乳飲料、49~51の氷雪等と清涼飲料水、60の未殺菌液卵)。このような複雑な希釈液の使い分けは、検査者に無用のストレスを与え、検査ミスを誘発する一因にならないとは限らない。③食品の10倍乳剤を作製する際、ほとんどの場合10g(ml)の食品に希釈液を加えて100mlにするが、アイスクリーム類や氷菓では90mlの希釈液を加えることになっている。冷凍食品では食品25gに希釈液を225ml、カキでは200g以上を採取して等量の希釈液を加えることになっている。④これ以外にも、混積培養する際の培地の温度は43~45℃に保持すると規定されているが、この温度では培地が凝固してしまうために事実上実施不可能である。

5. 検体の採取と試料原液作製の問題点

上記試験法の前段階として、検体の採取・運搬法も細かく規定されている。検体を秤量し決められた希釈液を加えた後にホモジナイズする方法として、手で振る、細砕する、ストマッカー処理等を行うことが食品ごとに厳密に定められている。これらの作業手順は食品衛生小六法で確認する必要があるが、代表的なものを抜粋して原文のまま記載した。

5.1 乳及び乳製品

牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム及び乳飲料: 容器包装のまま採取するか、又はその成分規格に適合するかしないかを判断できる数量を滅菌採取器具を用いて無菌的に滅菌採取瓶に採る。濃縮乳及び脱脂濃縮乳は約200gを採取する。この場合4度以下の温度で保持し運搬する。検体はその後4時間以内に試験に供しなくてはなら

ない。4時間を越えた場合には、その旨を成績書に付記しなければならない。

濃縮乳及び脱脂濃縮乳にあっては滅菌採取瓶のまま、25回以上よく振り、滅菌スプーンで検体10gを共栓三角フラスコ(栓を除いて重量85g以下で100mlのところにかく線を有するもの)に採り、滅菌生理食塩水を加え100mlとして10倍希釈液をつくり、以下牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリームおよび乳飲料と同様に希釈液をつくる。

5.2 冷凍食品

冷凍したまま容器包装の表面をアルコール綿でよくふき、滅菌した器具を用いて開封し、その内容の全体を細切りした後無作為に25gを無菌的にホモジナイザーに採り、滅菌リン酸緩衝希釈水225mlを加えて細砕する。

5.3 食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品

微生物試験に供する試料の調整は、製品(スライスハム等細切された製品は除く)の切断すべき表面をアルコール綿でよくふいた後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から25gを無菌的に採り試料とする。試料に滅菌ペプトン加生理食塩水225mlを加えて細砕し、試料液とする。

スライスハム等細切された製品にあっては25gを無菌的に切断して採り試料とする。試料に滅菌ペプトン加生理食塩水225mlを加えて細砕し、試料液とする。

これらは食品衛生法の成分規格に記載された試験法の一部であるが、例えば以下のように現実には対応することが困難な記載もある。①食肉・魚肉ねり製品等では25gを中心部から採取するという、他の食品にはない特別な採取法を指定している。中心部から採取しなければならない理由が明確ではなく、しかも平天や竹輪では事実上不可能である。これは実際に問題となった事例である。②現在ほとんどの検査所(室)・研究所で使用しているのはホモジナイザーではなくストマッカーである。

③乳および乳製品や氷菓は検体採取後4時間以内に検査することになっているが、実行が困難な場合が多い。④冷凍食品を冷凍したままその全量を細砕するのは困難かつ苛酷な作業である。⑤濃縮乳及び脱脂濃縮乳を採取する際に、重量などを厳密に規定した共栓三角フラスコに採取しなければならない理由が明確でない。

6. 混乱しているサルモネラ試験法

既述のような平成5年の食肉製品の規格基準の改訂の方針に従い、平成10年に殺菌液卵の規格基準が告示された際には、サルモネラ試験法は成分規格から除外され別途通知された。しかし、過去の試験法との調和が計られることはなく、それ以外にも2種類のサルモネラ試験法が通知された(表7)。この表で最も注目されるのは、生食用食肉と殺菌液卵のサルモネラ試験法はいずれも平成10年に通知されたにもかかわらず根本的に異な

表7. 食品ごとに異なるサルモネラ試験法

	食肉製品 (H5 年) 生食用食肉 (H10 年)	接種量/ 培地量	殺菌液卵 (H10 年)	接種量/ 培地量	汚染実態調査 (H15 年)	接種量/ 培地量
試料	食肉製品: 中心部より 25g 採り細切 生食用食肉: 表面を 5×5×1cm を削り取り, そのうちの 25g を 1 検体 とする		25g を混和		25g をストマッカー処理 15 秒間 または揉み洗いを 20 回程度 (ホモジナイザー処理不可)	
1 次増菌	EEM 225 ml (35.0±1.0℃, 18±2 時間)		mBPW ¹⁾ 225 ml (36±1℃, 22±2 時間)		BPW 225 ml (36±1℃, 20~24 時間)	
2 次増菌	SBG, セレナイトまたは TT (43.0±1.0℃ または 35.0±1.0℃, 20±2 時間)	1 ml/ 15 ml	TT (42±0.5℃, 22±2 時間) RV (42±0.5℃, 22±2 時間)	0.5 ml/ 10 ml 0.5 ml/ 10 ml	TT (42±0.5℃, 20~24 時間) RV (42±0.5℃, 20~24 時間)	0.5 ml/ 10 ml 0.1 ml/ 10 ml
分離培養	MLCB または DHL (35.0±1.0℃, 24±2 時間)	1 白金耳	MLCB 等 ²⁾ (36±1℃, 18~24 時間) BGS 等 ³⁾ (36±1℃, 18~24 時間)	1 エーゼ	MLCB 等 ⁴⁾ (36±1℃, 18~24 時間) BGS 等 ⁵⁾ (36±1℃, 18~24 時間)	1 白金耳
確認培養	TSI, LIM (24±2 時間) 培養温度の記載なし		TSI, LIM または LIA 等 (36±1℃, 18~24 時間)		TSI, LIM または LIA 等 (36±1℃, 20~24 時間)	
確認試験	ONPG 試験陽性		血清学的, 生化学的試験 (同定キット可)		血清学的, 生化学的試験 (同定キット可)	

¹⁾ mBPW: レシステイン 0.2g/l または FeSO₄·7H₂O を 64 mg/l に添加した BPW

²⁾ 硫化水素産生により判定する培地で MLCB, DHL, XLD 等

³⁾ 硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地で BGS, BGM (改良 BGA), ランバック培地, SMID 等

⁴⁾ 硫化水素産生により判定する培地: MLCB, DHL, XLD, Rainbow Salmonella, ES サルモネラ培地

⁵⁾ 硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地: BGS, BGM (改良 BGA), ランバック培地,

クロモアガーサルモネラ, SMID, ES サルモネラ II

汚染実態調査では, 可食部分の外側 (キャベツ, レタス, ネギ, タマネギ等), なるべく皮を含む外側 (ダイコン, ニンジン, トマト, キュウリ等) を採取

ることである。例えば一次増菌用培地として、殺菌液卵ではレシステインあるいは FeSO₄·7H₂O を加えた BPW 培地を、生食用食肉では EEM 培地を使用することになっている。一方、殺菌液卵と汚染実態調査の試験法は基本的には同じであるが、一次増菌用培地 (BPW) へのレシステイン等の添加の有無、RV 培地に接種する一次増菌培地量 (0.5 ml と 0.1 ml) や培養時間の表示が異なる。このようなサルモネラ試験法の現状は、日本の食品細菌試験法の統一性 (調和) のなさを象徴しているといっても過言ではない。なお平成 19 年に通知された汚染実態調査の試験法では、一次増菌培地から TT 培地への接種量が 1.0 ml に変更された。ついでながら、本通知には大腸菌 (*E. coli*) 試験法も示されている。この中で、「食品、添加物等の規格基準」において大腸菌に係る成分規格が設定されている食品については、当該規格に係る試験検査法を実施すると記載されているが、実際にはそのような成分規格がある食品は存在しない。本記述は不必要であるだけでなく、日本には当該の成分規格があるとの誤解を招きかねない。ちなみに日本の食品の成分規格に採用されているのは *E. coli* (いわゆる糞便系大腸菌群) である。

7. 腸炎ビブリオ試験法の問題点

平成 13 年の規格基準の一部改正 (平成 13 年 6 月 7 日) では、生食用鮮魚類、生食用冷凍鮮魚類、むき身にした生食用かき、ゆでがに、ゆでだこに腸炎ビブリオに関する成分規格が設けられた。食肉製品の規格基準改訂時の理念に反して、告示された成分規格に試験法が含まれてしまった (表 8-1)。同時に、告示法と比べて「同等以上の性能を有すると認められる方法により行う」ことも記載された。「同等以上の性能を有する試験法」とは、告示において示された試験法と比較し、特異性および検出感度等において同等または優れている試験法のことであるとされた。この法律が告示されたわずか 22 日後 (平成 13 年 6 月 29 日) に、同等以上の性能が認められる試験法が通知された (表 8-2)。

告示法で示された 5% ペプトン含 TCBS 培地は市販されていない (市販培地はすべて 10% ペプトン含)。同等以上の性能が認められる試験法として 10% ペプトン含 TCBS 培地が示されたが、ペプトン以外の組成も微妙に異なるため市販品にはこれに該当するものがない。このため法律を正確に解釈すれば、TCBS 培地は自作しなければならぬことになる。同定に使用される TSI 培地、メラーの基礎培地と VP 半流動培地は市販品でもよ

表 8-1. 腸炎ビブリオ試験法 (告示法と通知法の比較)

検査項目	告示法			同等以上の性能を有すると認められる試験法 (通知法)
	温度 (°C)	培 養	試料の調整	
腸炎ビブリオ (定性)	37	2%NaCl 加 AP (一夜培養)	25 g + 225 ml	○培養温度を 37°C に代えて、35°C 以上 37°C 未満で培養する方法 ○TCBS のペプトン量を 5 g から 10 g に変更した培地、あるいは酵素基質添加培地 (クロモアガービブリオ、CHROMagar 社) を使用する ○希釈水にリン酸緩衝生理食塩水 ¹⁾ を使用する方法 ○希釈別法 10 ml (×10) + 2% NaCl 加 AP 90 ml → ×100 (×100; 10 ml そのまま, 1 ml, 0.1 ml / 10 ml 2% NaCl 加 AP) ×3 本
	37	TCBS (一夜培養) 集落を同定し判定	1 白金耳	
腸炎ビブリオ (MPN)	37	2%NaCl 加 AP, 10 ml (一夜培養)	25 g + 225 ml (3%NaCl 加 PB) → ×10 ↓ 1 ml 9 ml (3%NaCl 加 PB) → ×100 (×10; 1 ml, ×100; 1 ml, 0.1 ml) ×3 本	
	37	TCBS (一夜培養) 集落を同定し判定	1 白金耳	

¹⁾ リン酸緩衝生理食塩水: PB 原液 1.25 ml に生理食塩水を加えて 1,000 ml に調製

表 8-2. 腸炎ビブリオ同定法 (通知法)

	温度 (°C)	時 間	判 定
1%NaCl 加 TSI ¹⁾	35~37	18~24	R/Y, H ₂ S (-), ガス (-)
耐塩性試験 ²⁾	35~37	18	0% (-), 3% (+), 7 又は 8% (+), 10% (-)
1%NaCl 加 VP ¹⁾	35~37	18~24	VP (-)
リシン脱炭酸試験 ³⁾	35~37	1~4日	リシン (+)

¹⁾ 市販の培地に NaCl を最終濃度 1% に加えたものの使用が認められている。

²⁾ 0, 3, 8, 10% NaCl 加 NB 又は LLB, 又は 0, 3, 7, 8, 10% NaCl 加ペプトン水又はトリプトン水 (1% 濃度, pH 7.2). NB: Nutrient Broth (Difco, Merck, BBL), LLB: Lab-Lemco Broth (Oxoid)

³⁾ メラーの基礎培地 (Difco, BBL 他) 又は LIM 基礎培地に、1% NaCl と 1% L-リシン塩酸基を加えたものを使用。LIM 基礎培地は市販培地 (栄研, 日水) と異なる組成が記載されている。菌接種後、滅菌流動パラフィンを 4~5 mm の厚さに重層して培養。LIM 培地では重層しなくてもよい。

いとなっているが、LIM 培地はそうになっていない。LIM 培地も TCBS 培地と同様の理由で自作しなければならない。

告示あるいは通知された多くの細菌試験法では、培養温度は例えば 35±1°C、培養時間は 20±2 時間などと表記されている。ところが、告示で示された腸炎ビブリオ試験法では、アルカリペプトン水や TCBS 培地の培養条件は、37°C で一夜培養となっている。また同等以上の性能が認められる試験法として 35°C 以上 37°C 未満で一夜培養する方法も追加された。同定方法で示された TSI 培地と VP 半流動培地の培養時間は 18~24 時間と幅があるが、耐塩性試験では 18 時間となっており、培養温度は 35~37°C となっている。35~37°C は 36±1°C と表記できるが、35°C 以上 37°C 未満では 36±1°C と表記できないし、37°C という限定された培養温度では恒温槽の性能が考慮されていないため GLP に対応できない。腸炎ビブリオ試験法の記述上の統一性のなさは、地方衛生研究所や登録検査機関等で実施されている GLP システム構築のための SOP 作成に支障をきたすことになる。

最近「同等あるいはそれ以上の性能を有すると認めら

れる試験法」という用語が頻繁に使用されるようになってきた。ところが日本の食品細菌試験法には同等性を評価する方法が示されていない。腸炎ビブリオ試験法が告示された直後に、「同等以上の性能を有すると認められる試験法」が通知されたが、そのデータ等は示されていない。通知法が告示法よりも「同等以上の性能を有すると認められる試験法」であるならば、告示された試験法で成分規格適の食品 (腸炎ビブリオが 25 g 中陰性や最確数で 100/g 以下) が、検出感度が優れている試験法では不適となる場合も理論的には起こり得る。化学分析法では、感度が優れた (検出限界値がより低い) 試験法を採用すれば検査精度が上昇するのは明らかで、成分規格への適否も数値で容易に判定できる。しかし、細菌試験法では、厳密に言えば試験法の感度は同等でなければ成分規格への適否に影響を与えることになる。

8. 試験法のキャンセルとリプレイスの必要性

サルモネラ試験法の統一性が欠如しているために生ずる弊害の一つとして、2 種類の食品を同時に検査する場合には異なる培地により異なる培養温度等に対応しなければならないことが挙げられる。例えば食肉製品と殺菌

液卵の一次増菌等はそれぞれ $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ と $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (温度表示法が不統一) で培養することになっているので、わずか 1°C の差であっても、異なる温度設定の培養器が2台必要になる。ほとんどの乳製品の試験法の培養温度は $32 \sim 35^\circ\text{C}$ となっているので、乳製品も同時に検査するならば3台の培養器が必要になる。このような煩雑さを避けるためにも、新しい試験法を検討する場合には過去の試験法も同時に見直し、必要に応じてISOのように試験法のキャンセルとリプレイスを明確にすれば検査現場での混乱を防ぐことができると思われる。地方衛生研究所や登録検査機関では告示および通知された試験法に従いSOPを作成し、いわゆるGLPシステムで検査を行っている。この現状を十分に留意して、統一性(調和)のある試験法を作成することが必要であると考えられる。より調和のとれた試験法は、GLPに対してよりシンプルに対応が可能であり、結果として、単純な検査ミスをなくすることにも寄与するものと思われる。

最終的には、今までに告示あるいは通知された試験法を個々に見直すのではなく、抜本的かつ系統的に改正することによってのみ、調和のとれた試験検査法が構築できるのではないかと考える。

9. 最後 に

本稿では食品の細菌試験法の現状とその現実的な問題点に焦点を絞ったが、根本的には成分規格そのものの妥当性を議論することが重要である。日本の食品衛生法では、腸管系食中毒菌に対する汚染指標菌として大腸菌群と *E. coli* (糞便系大腸菌群) が使用されている。ところが、2006年から施行されたヨーロッパ連合の食品に対する微生物基準から大腸菌群と糞便系大腸菌群がなくなり、大腸菌と *Enterobacteriaceae* (仮訳: 腸内細菌科菌群) に置き換えられた。これらの指標菌は最終製品(市販食品)ではなく、HACCPに対応可能な製造工程での衛生管理基準に使用されており、市販食品の安全基準には食中毒菌そのものが使用されている。米国でも糞便系大腸菌群の検査頻度は低下しているようである。また、食品の良否を判定する方法として、日本のような単品の抜き取り検査ではなく、ICMSF(国際食品微生物規格委員会)のサンプリングプランに従ったロット検査が実施されている。

このような食品の試験検査法の国際動向を視野に入れながら、日本の食品衛生のあるべき姿を追い求めることは、日本食品微生物学会の重要な課題の一つであると考えられる。

Original

Quantitative Duplex PCR of *Clostridium botulinum* Types A and B Neurotoxin Genes

(Received August 31, 2006)

Yoshiaki KASAI, Bon KIMURA*, Yosuke TAJIMA and Tateo FUJII

Department of Food Science and Technology, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7, Koran, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan;

* Corresponding author

A duplex quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay for *Clostridium botulinum* types A and B was developed. The sensitivity and specificity of the assay were verified by using 6 strains of type A, 7 strains of type B, and 14 genera of 42 non-*C. botulinum* types A and B strains, including *C. botulinum* types C, D, E, F, and G. In pure culture, the detection limit was 10^2 CFU/mL for type A and 10^3 CFU/mL for type B. In mushroom broth, increases in the amounts of *C. botulinum* types A and B could be monitored separately (the quantifiable range was 10^2 to 10^6 for type A and 10^2 to 10^7 for type B) from each sample that contained a large number of background bacteria, and toxin could be detected much earlier than with mouse assay. These results suggest that duplex quantitative PCR methods are useful to detect and quantify *C. botulinum* types A and/or B toxin genes.

Key words: *Clostridium botulinum*; quantitative PCR; duplex; TaqMan

Introduction

Clostridium botulinum is a spore-forming obligative anaerobic bacterium that is well known to produce the most potent neurotoxins, designated A to G¹. Types A, B, and E usually cause human botulism². The main human pathogens are found in group I, which consists of proteolytic types A, B, and F, and in group II, which consists of nonproteolytic types B, E, and F. These two groups are completely different in their physiological aspects, not only regarding proteolysis, but also fermentation of sugars, metabolic acids, growth temperature, and heat resistance^{3,4}.

Human foodborne botulism of types A and B generally occurs in temperate zones in the western United States, Argentina, Brazil, and China for type A and in Poland, Czechoslovakia, Hungary, Yugoslavia, Germany, Belgium, France, Italy, Spain, and Portugal for type B⁵. Occasionally, both types have been implicated in the same incident⁶. Some types can produce both kinds of toxins. Franciosa reported that 42 of 79 strains of *C. botulinum* type A isolated in the United States were encoding both *botA* and *botB*^{6,7}.

Detection of *C. botulinum* cells or their neurotoxins in foods is the first step in risk analysis or risk assessment of foodborne botulism. Currently, mouse bioassay is still the major detection method for *C. botulinum* because of its sensitivity and reliability. In spite of these advantages, the assay is costly, time-consuming, laborious, and requires handling of laboratory animals. Thus,

only a limited number of samples can be analyzed at one time using the mouse bioassay. To improve this situation, some rapid alternative detecting methods have been developed. Currently, together with the mouse assay, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is most widely used for food analysis⁸. However, ELISA has several deficiencies, including sensitivity, complexity in handling, and accuracy. However, an ELISA that is sensitive for type B has been described⁹ as being more sensitive than the mouse bioassay, and seems to have overcome these deficiencies. Immuno-PCR is another rapid and sensitive detecting system^{10,11} in which a reporter DNA molecule is used instead of an enzyme conjugated to an antibody. The sensitivity of immuno-PCR for detecting type A neurotoxin is 10^3 -fold to 10^5 -fold higher than that of traditional ELISA^{10,11}. Multiple alternative methods should be developed and evaluated for performance, cost, and suitability for automation in the food industry.

Amplification by PCR has become an important method for rapidly, sensitively and specifically assaying a target gene. Many authors have reported the detection of *C. botulinum* in foods not only by simplex PCR, but also by multiplex PCR^{12,22}. However, all of these studies required electrophoresis. Electrophoresis is time-consuming, has a risk of cross-contamination when caps are reopened, requires the handling of carcinogenic chemicals to stain the gel, and must be judged visually from the gel image. The approach to risk analysis or risk assessment of botulism should be simpler and the data should be more easily obtainable

Tel./Fax: 03-5463-0603, E-mail: kimubo@s.kaiyodai.ac.jp

for prompt access.

Recently, real-time PCR has become widely used for the detection and/or quantification of bacterial genes. Some researchers have reported the detection and/or quantification of *C. botulinum* neurotoxin genes for type A²³⁾, for types A, B, and E²⁴⁾,²⁵⁾, for types A and B²⁶⁾, and for type E²⁷⁾. Other real-time PCR approaches, which involve quantification of RNA expression, were reported for types A and E²⁸⁾, for type B²⁹⁾,³⁰⁾, and for type D³¹⁾. These representative studies did not use duplex PCR quantification methods.

In this paper, we describe the detection and quantification of *C. botulinum* types A and B by means of a quantitative duplex PCR method. We also describe the estimation of *C. botulinum* types A and B in mushroom broth with both simplex and duplex PCR methods.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions

The clostridium and non-clostridium strains tested in this study are listed in Table 1. The clostridium strains were cultured anaerobically in GAM (Gifu anaerobic medium, Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan) broth in an anaerobic chamber (Hirayama type J or BBL Gaspak system) equipped with a deoxidizer (Anaeropack Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Co., Tokyo, Japan). Non-clostridium strains were cultured aerobically in TSB (trypticase soy broth, Difco, Sparks, MD, USA). All cultures were incubated at 30°C or 37°C.

C. botulinum types A and B spore preparation

The *C. botulinum* types A and B strains were pre-cultured anaerobically with cooked meat medium or GAM broth at 37°C overnight. Spores of each strain were produced in a modified Gibbs's TPY (trypticase peptone yeast extract)³²⁾ broth (pH 7.0), consisting of 5.0% trypticase peptone (Difco), 0.5% bacto-peptone (Difco), and 0.1% bacto yeast extract (Difco), at 37°C over 7 days. Spores were checked for the dominance of refractile spores (>90%) with a phase-contrast microscope (BX50, Olympus Co., Tokyo, Japan) before harvesting. Spore crops of each strain were centrifuged at 21,480 × g for 10 min at 4°C (high-speed refrigerated centrifuge SRX-201, Tomy Seiko Co., Tokyo, Japan). The pellets were washed five times with ice-cooled sterile distilled water. Each crop was resuspended in sterile distilled water and stored at -20°C or 5°C before use. Spores of each strain were counted in clostridia count agar (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) medium by the pouch method³⁷⁾, after heat-shock treatment (80°C for 10 min, then rapid cooling). Primers and probes were designed for *C. botulinum* *botA* (X52066) and *botB* (M81186) from the DDBJ (DNA Data Bank of Japan) database (DDBJ, 2004).

Primers and probes

Selection of primers and probes allowed for adjustment of the melting temperatures to those optimal for the ABI 7700 sequence detection system (Applied

Biosystems division of Perkin-Elmer Co., Foster City, CA, USA). A 180-bp gene for type A and a 195-bp gene for type B were selected for specific amplification after the nucleotide sequences of *botA*, *botB*, *botC*, *botD*, *botE*, *botF*, *botG*, and *tet* (X52066, M81186, D49440, D38442, AB082519, M92906, X74162, and X06214, respectively) were aligned using Clustal W software, version 1.74³⁸⁾. The sequences for type A and type B primers are listed in Table 2.

Quantitative PCR for types A and B

Each 50-μL PCR reaction mix contained: 1X TaqMan buffer A; 200 mM each dATP, dCTP, and dGTP; 400 mM dUTP; 200 nM primers (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan), and 100 nM probe (Qiagen, K. K.) for type A or 100 nM primers (Funakoshi) and 100 nM probe (Qiagen) for type B; 5.0 mM MgCl₂; 0.5 U of uracil-N-glycosidase (Amp Erase UNG; Applied Biosystems); 1.25 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems); and 5 μL as a template. The reporter fluorescence dye FAM was used for both types A and B and the quencher used was TAMRA.

Reactions were run on an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) under the following conditions: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C and 50 cycles of 15 sec at 95°C, and 60 sec at 63°C for both types A and B.

Quantitative duplex PCR

Each 50-μL duplex PCR reaction mix contained: 1X TaqMan buffer A; 200 mM each dATP, dCTP, and dGTP; 400 mM dUTP; 100 nM primers (Funakoshi) and 100 nM probe (Qiagen) for type A, 400 nM primers (Funakoshi) and 200 nM probe (Qiagen) for type B; and 5 μL of template. The reporter fluorescence dye used for type A probe was FAM and that for type B was VIC. TAMRA was used as a quencher dye for both types A and B.

Reactions were run on the same equipment using the same quantitative PCR conditions for both types A and B.

Standard curve and PCR efficiency

The standard curve was constructed following Kimura's method²⁷⁾. All PCR efficiency measurements were made in triplicate.

Detection limit from pure culture

The detection limit was calculated with 56A and Okra from pure culture by both simplex and duplex PCR methods. The genomic DNA was extracted by the guanidine isothiocyanate method²⁷⁾,³¹⁾. The detection limit was also tested in triplicate.

Growth curve of *C. botulinum* in pure culture

Dilutions of overnight culture (final concentration was 8.0 CFU/mL) of *C. botulinum* type A (56A) or type B (QC: group II) were inoculated into Erlenmeyer flasks containing 800 mL of GAM broth and incubated at 37°C

Table 1. Strains tested by the quantitative PCR method

Species	Type	Strain	Source ^a	PCR		
				Type A	Type B	
<i>Clostridium botulinum</i>	A	56A	SCHU	-	-	
		62A	SCNII	-	-	
		97A	SCNII	+	-	
	A (silent B) B	Hall	SCHU	-	-	
		Kyoto F	SCHU	+	-	
		Renkon-1	SCHU	-	-	
		9B	SCNII	-	-	
		213B	SCHU	-	+	
		407-1	SCHU	-	-	
		Fukuyama	SCHU	-	+	
		Okra	SCNII	-	+	
		Karashi	SCHU	-	+	
		QC	SCHU	-	+	
		003-9	SCHU	-	-	
		D	Karugamo	SCHU	-	-
		E	164-1	SCHU	-	-
	5545		SCHU	-	-	
	F	Iwanai	SCHU	-	-	
		Tenno2	SCHU	-	-	
		35296	SCHU	-	-	
		Biwako	SCHU	-	-	
		4257	SCHU	-	-	
		9H-01F	SCHU	-	-	
Cardella		SCHU	-	-		
G	Langeland	SCHU	-	-		
	Yaeyama	SCHU	-	-		
	G2734	SCHU	-	-		
	G2741	SCHU	-	-		
<i>Clostridium butylicum</i>		1443	SCHU	-	-	
<i>Clostridium perfringens</i>		BBC 2401	BBC	-	-	
<i>Clostridium sporogenes</i>		IFO 13950	IFO	-	-	
<i>Clostridium subterminale</i>		Meat		-	-	
<i>Bacillus cereus</i>		IFO13494	IFO	-	-	
<i>Bacillus coagulans</i>		IFO12583	IFO	-	-	
<i>Bacillus licheniformis</i>		IFO12200	IFO	-	-	
<i>Bacillus subtilis</i>		IFO13719	IFO	-	-	
<i>Campylobacter coli</i>		ATCC36887	ATCC	-	-	
<i>Campylobacter jejuni</i>		ATCC33560	ATCC	-	-	
<i>Escherichia coli</i>		ATCC11775	ATCC	-	-	
<i>Listeria monocytogenes</i>		ATCC7644	ATCC	-	-	
<i>Listeria innocua</i>		ATCC33070	ATCC	-	-	
<i>Morganella morganii</i>		ATCC25830	ATCC	-	-	
		JCM1672	JCM	-	-	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		IFO14160	IFO	-	-	
<i>Raoultella planticola</i>		ATCC43176	ATCC	-	-	
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		IFO13245	IFO	-	-	
<i>Serratia marcescens</i>		Fish		-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC12600	ATCC	-	-	
<i>Tetragenococcus muraticus</i>		JCM10006	JCM	-	-	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		IFO 12711	IFO	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>		ATCC9610	ATCC	-	-	

^a SCHII: G. Sakaguchi's Collection at National Institute of Health, Japan (given by S. Igimi); SCHU: G. Sakaguchi's Collection at Hiroshima University, Hiroshima, Japan; ATCC: American Type Culture Collection, T. Manassas, Va.; BBC: Japanese Association of Veterinary Biologics; JCM: Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan; IFO: Institute for Fermentation, Osaka, Japan.

Table 2. Primer and fluorogenic probe sequences for *botA* and *botB* detection

Name	Target gene	Sequence	
CbA 591-617F	<i>botA</i>	5'-GGAGTCACTTGAAGTTGATACAAATCC-3'	This study
CbA 770-744R	<i>botA</i>	5'-TCTAACCCACTCATTTTCATAATAGGCA-3'	This study
CbA 669-727	<i>botA</i>	5'-F-TAGGTGCAGGCAAATTTGCTACAGATCCA-Q-3'	This study
boNB100	<i>botB</i>	5'-AGACGTGTTCCACTCGAAGAGTTT-3'	This Study
boNB600R	<i>botB</i>	5'-GCCTCCCTTGATGCAAAATG-3'	Christensen <i>et al.</i> ¹²
BP-4050	<i>botB</i>	5'-F-TCAGTAATCCAGGAGAAGTGGAGCGAA-Q-3'	This study
BP-4050V	<i>botB</i>	5'-V-TCAGTAATCCAGGAGAAGTGGAGCGAA-Q-3'	This study

F: reporter dye (FAM), Q: quencher dye (TAMRA), V: reporter dye (VIC).

for type A and at 30°C for type B for 24 hr. The number of *C. botulinum* cells during growth was determined by Kimura's method²⁷.

Growth in GAM broth with mushrooms

Mushrooms (*Agaricus bisporus*) purchased at a local retail store were cut in half (total 80 g). One half was incubated in 720 mL of GAM broth with eight strains [four strains of type A (56A, 62A, 97A, and Hall) and four strains of type B (9B, 213B, 407-1, and Okra)] of *C. botulinum* spores and the other was incubated in 720 mL of GAM broth without inoculation. The inoculum contained 8×10^4 CFU of each strain. The inoculum was heatshocked at 80°C for 10 min and cooled rapidly in ice water. After the heatshock treatment, 1 mL of the mixture was inoculated into 800 mL of GAM broth with mushrooms. The final concentration of *C. botulinum* was about 1×10^3 CFU/mL. The cultures were incubated anaerobically at 37°C in an anaerobic chamber equipped with a deoxidizer. The sampling was carried out every 2 hours from time 0 to 24 hr. Viable anaerobic cell count was determined at every sampling time by serial dilution and pour method using GAM agar, and about 13 mL of culture was also stored at -20°C every sampling time for the TaqMan PCR and mouse assays.

Neurotoxin assay

Frozen cultures were thawed and mixed sufficiently. The culture samples were centrifuged at $2,190 \times g$ for 10 min. Toxicity was assayed by intraperitoneally injecting the supernatant (0.5 mL) into each of two mice (body weight: about 20 g). Samples were judged to be toxic if both mice died over the 48-hr observation period³⁵. The neurotoxin detected in samples was tested for serum type by inoculation into A and/or B antiserum-protected mice (2 mice for each treatment; total, 6 mice). Antiserum protection was established with an intraperitoneal injection of 0.5 mL of a mixture of 2 U/mL adjusted types A and/or B antiserum and the same volume of sample incubated for 1 hr at room temperature. If the A antiserum-protected mice died and the B antiserum-protected mice lived during the 48-hr observation, the serum type was judged to be B. If only B antiserum-protected mice died and the A antiserum-protected mice lived, the serum type was considered to be A. If only A and B double-protected mice

lived and the others died, the serum type was judged to be both A and B.

Results

Specificity of primers and probes for *C. botulinum* types A and B

The specificity of primers and probes is shown in Table 1. All six type A strains (56A, 62A, 97A, Hall, Kyoto F, and Renkon-1) were positive with the type A primers and probe set, and all seven type B strains (9B, 213B, 407-1, Fukuyama, Okra, Karashi, and QC) were positive with the type B primers and probe set. Only the Renkon-1 strain (A, silent B; type B toxin genes are coded for, but are nonfunctional) was positive with both type A and type B primers and probe sets, while other positive strains were distinguishable by only one type-specific primer and probe set. These samples gave Ct values of <25. All of the 14 genera of 42 non-*C. botulinum* types A and B strains, including *C. botulinum* types C, D, E, F, and G, were nonreactive to the probes with Ct values of >50 cycles, confirming the species-specific nature of the assay (Table 1).

PCR amplification efficiency

Amplification efficiency of each *C. botulinum* strain was calculated from each standard curve with six strains of type A (56A, 62A, 97A, Hall, Renkon-1 with silent B, and the infant botulism strain Kyoto F) and six strains of type B (9B, 407-1, Fukuyama, Okra, non-proteolytic Karashi, and nonproteolytic QC) (Table 3). Both the type A (56A) and type B (QC) PCR amplification plots are shown in Fig. 1. The silent B strain was also checked for amplification efficiency of the *botB* gene (Table 3). The amplification efficiency using duplex PCR was also calculated for representative strains (56A, Renkon-1, and Okra) (Table 3).

Detection limit from pure culture

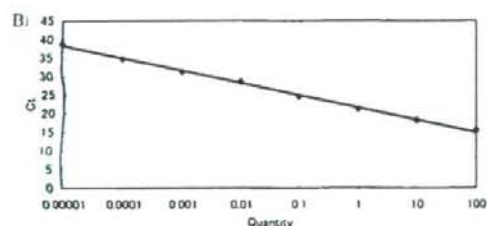
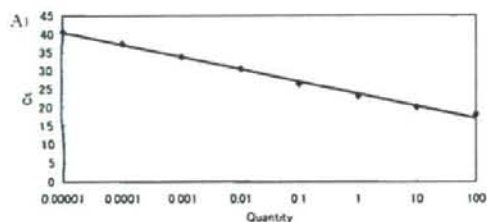
The detection limit of *C. botulinum* 56A (type A) was found to be 2.8×10^1 CFU/mL by both simplex PCR and duplex PCR. That of Okra (type B) was found to be 4.7×10^1 CFU/mL by simplex PCR and 4.7×10^2 CFU/mL by duplex PCR.

Evaluation of cell growth by the quantitative PCR method and pouch method in pure culture

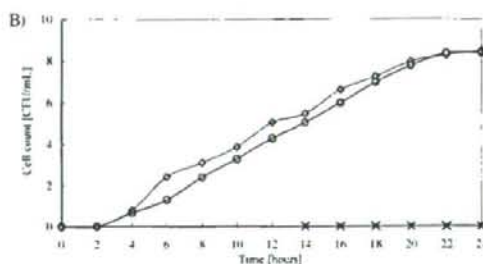
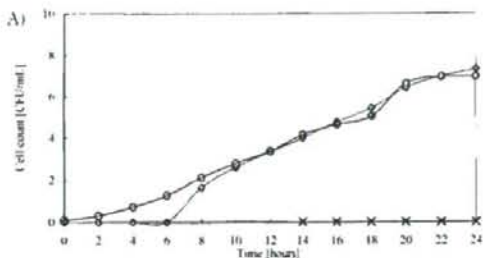
Evaluation of cell growth by the quantitative PCR

Table 3. PCR amplification efficiency

Organism	Type	Primers and probes	Strain	Reporter	Efficiency	Detection limit [fg]
<i>Clostridium botulinum</i>	A	A	56A	FAM	0.92	50
	A	A	62A	FAM	0.97	50
	A	A	97A	FAM	0.94	50
	A	A	Hall	FAM	0.97	50
	A	A	Kyoto F	FAM	0.99	50
	A (silent B)	A	Renkon-1	FAM	0.93	50
	B	B	9B	FAM	0.94	50
	B	B	407-1	FAM	0.94	50
	B	B	Fukuyama	FAM	0.94	50
	B	B	Okra	FAM	0.94	50
	B	B	Karashi (non proteolytic)	FAM	0.95	50
	B	B	QC (non proteolytic)	FAM	0.91	50
	A (silent B)	B	Renkon-1	FAM	0.91	50
	A	A and B	56A	FAM	0.88	50
	A (silent B)	A and B	Renkon-1	FAM	0.83	50
	A (silent B)	A and B	Renkon-1	VIC	0.87	50
	B	A and B	Okra	VIC	0.81	500

Fig. 1. Standard curve of *C. botulinum* neurotoxin genes by simplex PCRA) Strain 56A (*botA*), B) Strain QC (*botB*).

method and by the conventional pouch method was made. Similar growth curves were obtained with both the quantitative PCR and culture methods for both type A (56A) and type B (QC) cultures (Fig. 2). Neurotoxin was detected by mouse assay after 16-hr incubation of both types and the viable cell count at that time was about 10^5 CFU/mL for type A (56A) and 10^6 CFU/mL for type B (QC) (Fig. 2). These results indicate that quantitative PCR could be used instead of the conventional culture method for monitoring *C. botulinum* growth. Also, it was clear that the quantitative PCR method was more sensitive than the mouse assay.

Fig. 2. Growth curve of *C. botulinum* in GAM broth with a pure culture. A) Strain 56A (type A) incubated at 37°C. B) Strain QC (type B) incubated at 30°C.

◇, quantified by quantitative PCR; ○, quantified by culture method. Solid symbols denote the samples detected with neurotoxin by mouse assay. X, carrying mouse assay.

Botulin growth in GAM with mushroom broth

When eight strains of *C. botulinum* (type A: 56A, 62A, 97A, and Hall; type B: 9B, 213B, 407-1, and Okra) were inoculated into mushroom broth, *C. botulinum* was detected and type A and B genes could be distinguished at the same time from all extracted samples by the quantitative duplex PCR method, while no signals were

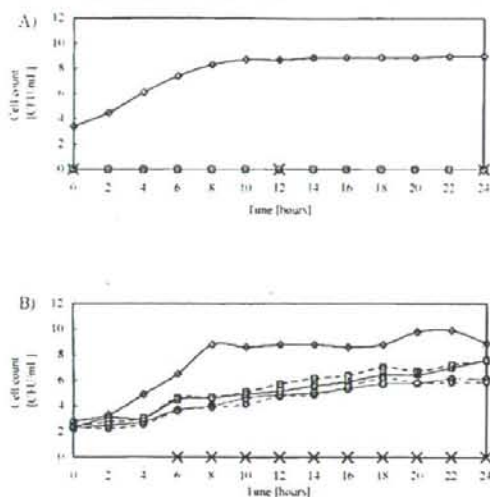


Fig. 3. Cell count of *C. botulinum* in mushroom broth

No inoculation (A). Inoculation of *C. botulinum* types A (56A, 62A, 97A, and Hall) and B (9B, 213B, 407-1, and Okra) (B).

○, anaerobic count by GAM agar; □, estimation of cell number of type A by quantitative simplex PCR (dashed line) and by quantitative duplex PCR (solid line); ▢, estimation of cell number of type B by quantitative simplex PCR (dashed line) and by quantitative duplex PCR (solid line); X, mouse assay. Solid symbols denote the samples in which neurotoxin was detected with mouse assay.

obtained from uninoculated samples throughout the experiment (Fig. 3). The background anaerobic cell count checked by GAM agar was from 4.0×10^0 to 1.6×10^1 CFU/mL in inoculated broth and from 2.5×10^3 to 1.0×10^9 CFU/mL in uninoculated broth. The toxin was detected from only inoculated samples by mouse assay. The first detection of the toxin was 14 h after the inoculation as type B toxin. After 16-hr incubation, type A toxin was also detected (Fig. 3). It was clear that the quantitative duplex PCR method was also more sensitive than the mouse assay.

Discussion

Detection of *C. botulinum* neurotoxin genes by conventional PCR and agarose gel electrophoresis has been reported by many researchers, using not only simplex PCR, but also multiplex PCR^{6,7,12,17,19,22,36-40}. Real-time PCR detection of neurotoxin genes was also reported²³⁻²⁷. Among these studies, quantitation for type A was reported by Yoon *et al.*²³ and quantitation for type E was described by Kimura *et al.*²⁷ Real-time quantitative PCR has a number of advantages as compared to conventional assays for the detection or quantification of foodborne bacteria. The results are shown as fluorescence intensity, and the absence of electrophoresis eliminated the need for reopening of the reaction

tubes, thus limiting the risk of carry-over contamination.

We developed quantitative simplex PCR for *C. botulinum* type A/B and quantitative duplex PCR for *C. botulinum* types A and B. The order of the detection limit was 10^1 CFU/mL by both simplex and duplex PCR for type A and simplex PCR for type B, and 10^2 CFU/mL by duplex PCR for type B. The sensitivity of the simplex PCR is the same as that of duplex PCR for type A, but for type B, it was almost 10 times higher than that of duplex PCR in our results. This suggests that the type A primers and probe set may inhibit amplification of the target region of the type B set.

Actually, quantifying neurotoxin DNA is not quantifying the neurotoxin itself. Some researchers have evaluated the mRNA expression of the neurotoxin gene by competitive reverse transcription (RT)-PCR¹¹ and real time RT-PCR²⁸⁻³¹.

Quantifying mRNA is more appropriate for risk assessment of *C. botulinum* compared with quantifying neurotoxin DNA²⁷. However, the handling of DNA is simpler than the handling of mRNA. It is also known that *C. botulinum* neurotoxin is generally detected in the late exponential phase in pure culture¹¹. An increase in neurotoxin mRNA reflects a potential risk of neurotoxin production. Detection and quantitation of neurotoxins have been performed by ELISA assay^{8,9,13-16}, immuno-PCR assay^{10,11}, and liposome-PCR (LPCR) assay¹⁹. The ELISA assay has several deficiencies, including sensitivity, complexity in handling, and accuracy. The sensitivity of immuno-PCR for detecting type A neurotoxin is reportedly 10^4 -fold to 10^5 -fold higher than that of traditional ELISA^{10,11}. The most sensitive method is LPCR, for which the detection threshold is 0.02 fg/mL compared with that of the mouse bioassay of 9 pg/mL¹⁹. However, those highly sensitive methods were performed *in vitro*, not with foods or environmental samples, which would contain bacteria themselves, bacterial metabolites, and debris from foods or the environment. It is still unclear how useful these methods are for evaluating foods or environmental samples.

Mushroom is a secondary decomposer, which means that bacteria and other fungi have to break down raw materials before *Agaricus* can grow, so the mushroom needs to grow in compost. Further, production of the fruiting body requires *Pseudomonas putida*⁵⁰. So, the mushroom would contain *Pseudomonas* spp. and other bacteria, such as heat-resistant spore formers, derived from the raw materials of compost (maturing compost can reach a temperature of up to 80°C). Actually, *C. botulinum* has been identified in mushroom^{51,52}. Fresh mushrooms consume oxygen and produce carbon dioxide through respiration when they are packaged with plastic film. In these circumstances, *C. botulinum* can grow and form toxin⁵². With both our simplex and duplex PCR methods, the growth of *C. botulinum* types A and B could be detected and quantified in mushroom broth containing a large number of background bacte-

ria derived from the mushroom. Dezfulian reported that *Clostridium botulinum* isolation (CBI) medium is useful for detecting *C. botulinum*³⁰. However, the viable cell count on CBI medium was at least 100 times lower than that on Clostridia medium in pure culture (data not shown), because CBI medium is a selective medium and Clostridia medium is not. It is, therefore, useless to estimate the viable cell count of *C. botulinum* with CBI medium. Our method would be useful and effective for estimating the viable cell count of *C. botulinum* types A and B in samples that contain large numbers of background bacteria.

In conclusion, the quantitative duplex PCR method could be a significant development for the quantification of *C. botulinum* types A and B toxin genes from pure culture and mushroom broth. The efficiency of the quantitative simplex PCR method was higher than that of the duplex method, but a good correlation was found between the results of the simplex and duplex PCR methods in mushroom broth. This suggests that the quantitative duplex PCR method could be useful for determining the numbers of *C. botulinum* types A and B in foods.

Acknowledgements

This research was supported by Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (15580179).

References

- Dasgupta, B. R. Structure and biological activity of botulinum neurotoxin. *J. Physiol.* **84**, 220-228 (1990).
- Shapiro, R. L., Hatheway, C., Swerlow, D. L. Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review. *Ann. Intern. Med.* **129**, 221-228 (1998).
- Hatheway, C. L. Toxicogenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 66-98 (1990).
- Hatheway, C. L. "*Clostridium botulinum* ecology and control in foods". Hauschild, A. H. W., Dodds, K. L. ed., New York, Marcel Dekker, 1993, p. 3-20. (ISBN 0-8247-8748-X)
- Hauschild, A. H. W. "*Clostridium botulinum* ecology and control in foods". Hauschild, A. H. W., Dodds, K. L. ed., New York, Marcel Dekker, 1993, p. 69-104. (ISBN 0-8247-8748-X)
- Fransiosa, G., Ferreira, J. L., Hatheway, C. L. Detection of type A, B, and E botulinum neurotoxin genes in *Clostridium botulinum* and other *Clostridium* species by PCR: evidence of unexpressed type B toxin genes in type A toxigenic organisms. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1911-1917 (1994).
- Fransiosa, G., Hatheway, C. L., Aureli, P. The detection of a deletion in the type B neurotoxin gene of *Clostridium botulinum* A(B) strains by a two-step PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 442-446 (1998).
- Doellgast, G. J., Triscott, M. X., Beard, G. A., Bottoms, J. D., Cheng, T., Roh, B. H., Roman, M. G., Hall, P. A., Brown, J. E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2402-2409 (1993).
- Wictome, M., Newton, K., Jameson, K., Hallis, B., Dunnigan, P., Mackay, E., Clarke, S., Taylor, R., Gaze, J., Foster, K., Shone, C. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3787-3792 (1999).
- Wu, H. C., Huang, Y. L., Lai, S. C., Huang, Y. Y., Shiao, M. F. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**, 321-325 (2001).
- Chao, H., Wang, Y., Tang, S., Liu, H. A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Toxicon* **43**, 27-34 (2004).
- Craven, K. E., Ferreira, J. L., Harrison, M. A., Edmonds, P. Specific detection of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F using the polymerase chain reaction. *J. AOAC Int.* **85**, 1025-1028 (2002).
- Ferreira, J. L., Baumstark, B. R., Hamdy, M. K., Mccay, S. G. Polymerase chain reaction for detection of type A *Clostridium botulinum* in foods. *J. Food Prot.* **56**, 18-20 (1993).
- Fach, P., Hauser, D., Guillou, J. P., Popoff, M. R. Polymerase chain reaction for the rapid identification of *Clostridium botulinum* type A strains and detection in food samples. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 234-239 (1993).
- Fach, P., Gibert, M., Giriffais, R., Guillou, J. P., Popoff, M. R. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F- and G-producing clostridium spp. and evaluation in food samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 389-392 (1995).
- Takeshi, K., Fujinaga, Y., Inoue, K., Nakajima, H., Oguma, K., Ueno, T., Sunagawa, H., Ohyama, T. Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* **40**, 5-11 (1996).
- Lindstrom, M., Keto, R., Markkula, A., Nevas, M., Hielm, S., Korkeala, H. Multiplex PCR assay for detection and identification *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5694-5699 (2001).
- Gauthier, M., Cadieux, B., Austin, J. W., Blais, B. W. Cloth-based hybridization array system for the detection of *Clostridium botulinum* type A, B, E, and F neurotoxin genes. *J. Food Prot.* **68**, 1477-1483 (2005).
- Nevas, M., Hielm, S., Lindstrom, M., Horn, H., Koivulehto, K., Korkeala, H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 45-52 (2002).
- Nevas, M., Lindström, M., Virtanen, A., Hielm, S., Kuusi, M., Arnon, S. S., Vuori, E., Korkeala, H. Infant botulism acquired from household dust presenting as sudden infant death syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 511-513 (2005).
- Nevas, M., Lindström, M., Hautamaki, K., Puoskari, S., Korkeala, H. Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. *Int. J. Food Microbiol.* **105**, 145-151 (2005).
- Nevas, M., Lindstrom, M., Horman, A., Keto-Timonen, R., Korkeala, H. Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. *Environ. Microbiol.* **8**, 1085-1094 (2006).
- Yoon, S., Chung, G. T., Kang, D., Ryu, C., Yoo, C., Seong,