

細胞の種類によらず、グルコースを栄養源として取り込む細胞は多い。生細胞のみに見られる性質である。このグルコースのアナログ分子である 2NBDG が細胞に取り込まれると細胞内濃度が高くなって顕微画像として識別できるようになる、この性質を利用する方法である。

(ハ) セルソーター : Aria (BD)

専用オートステージを設置して、96 ウェルプレートの各ウェルの中心に、所定の個数の液滴（実際は1個の細胞を含む液滴1個）を、自動的に滴下できるようにした（図1）。また、通常の円形プレート（86mm^φ）の寒天培地上に、等間隔で10×10の位置に所定の個数の液滴を自動的に滴下するための専用プレートアダプターも作製し、併用した（図2）。

(ニ) 培地

生菌であることの証明はコロニーの形成である。セルソーターで分配される単一細胞を受ける培地として、第一に標準寒天培地を使用した。しかし、菌の種類によっては、十分なコロニー形成率が得られない可能性がある。そのような場合には、より高いコロニー形成率が得られる培地を検討した。同一菌株でも、培地の種類によってコロニー形成能が異なることは予想されたが、本システムでは、確実に生菌が供給されたことを示すことが重要である。したがって、どの菌株に対しても、高いコロニー形成率（目標値95%以上）を示す培地が用意できることが必須である。本研究では、以上の要請に応えられる見通しを得ることを目標としている。

C. 研究結果

標準寒天培地を充填した96ウェルプレートに、CFDAで染色した微生物細胞を1個ずつ分配した。その後、37°Cで18時間培養後、各ウェル中のコロニーの有

無を調べた。同様にして2NBDGで染色した場合についても微生物細胞を1個ずつ分配した。その結果、表1のような結果を得た。*E. coli* ATCC 8739の場合の一例を図3に示す。

CFDAの場合、*E. coli*では2株とも90%以上のコロニー出現率であったが、他の菌については80%以下であり、特に*P. aeruginosa*は低い値であった。一方、2NBDGの場合は、*E. coli* ATCC 8739株では55%に留まった。しかし、*E. coli* NBRC 3301では97%であった。因みに、ATCC 8739株は、従来、2NBDGをほとんど取り込まない株として知られていたものであったが、セルソーターの光学系が高感度であるため、取り込み量が少なくても、ある程度、生菌識別ができたものと推定される。

コロニー形成率を向上させるために、特に成績の低かった*P. aeruginosa*について、他の培地を検討した。CFDA処理自体がデリケートな細胞に対してはストレスになる可能性がある。そのためCFDAによる処理後、蛍光強度の違う細胞分画を取り、そのコロニー形成率を比較した。また、一連の操作の間に細胞温度が低下することの影響も調べた。しかし、いずれの場合も特に有効な手掛かりを得るには至らなかった。次に、傷害を受けている可能性を想定して、それを修復できるような培地として知られている、Tryptic Soy 寒天培地を用いた。その結果、標準寒天培地の場合（15%）に比べて、25%に向上した。さらに、ソーティングする前の培養を、標準寒天培地からTryptic Soy Brothによる21~24時間培養に変えた。その結果、極めて顕著な効果が得られ、コロニー形成率が92%にまで向上した。

そこで、再度、5種類の菌株について、Tryptic Soy Brothで培養した後、Tryptic Soy 寒天培地上にソーティングしたところ、全ての菌株において、97%以上の

コロニー形成率が得られた。すなわち、目標値である 95%以上のコロニー形成率が達成された(表 2)。E. coli NBRC 3301 の場合の一例を図 4 に示す。

D. 結論

微生物細胞を確実に 1 細胞ずつ分配することができることが示され、かつ、それが生菌であることを保証する染色条件と培地条件を決めることができた。本研究では 5 菌株のみについての結果を示しただけであるが、元々培養法で用いる培地でのコロニー形成率が基本であるので、本質的な問題はないと考えられる。また、セルソーターで処理する過程で、若干、傷害を受けるか、あるいは休止状態になってしまうなどの影響が考えられる。したがって、その問題解決法があるか、という点が重要である。本研究では、傷害の可能性がある場合に対して Tryptic Soy Broth が有効であるとの結果を得ている。この効果は一般性が高いと考えられ、今後、他の多くの菌株に対しても、同様の発想で有効な方法が見いだせるのではないかと考えられる。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

○シンポジウム等

- ・松岡英明 “微生物試験の妥当性確認の進め方と不確かさの推定”、食品産業戦略研究所主催セミナー、東京、(2011 年 3 月 10 日)
- ・松岡英明 “食品微生物試験法のバリデーションの国際動向”、第 77 回 化学センサ研究会、東京、(2011 年 1 月 21 日)
- ・松岡英明 “微生物試験法における培養法と非培養法の相互補間”、日本防菌防黴学会学術講演会 2010、西宮 (2010 年 5 月 26 日)

○解説・総説等

- ・後藤哲久、安井明美、五十君静信、松岡英明：妥当性確認の要求事項 “最新版—食品分析法の妥当性確認ハンドブック” (安井明美、五十君静信、後藤哲久、丹野憲二、湯川剛一郎、編) 第 2 章 1 -I 節、サイエンスフォーラム (2010) pp10-27.
- ・松岡英明：微生物試験法の妥当性確認と不確かさの推定 “最新版—食品分析法の妥当性確認ハンドブック” (安井明美、五十君静信、後藤哲久、丹野憲二、湯川剛一郎、編) 第 7 章 1 節、サイエンスフォーラム (2010) pp223-231.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

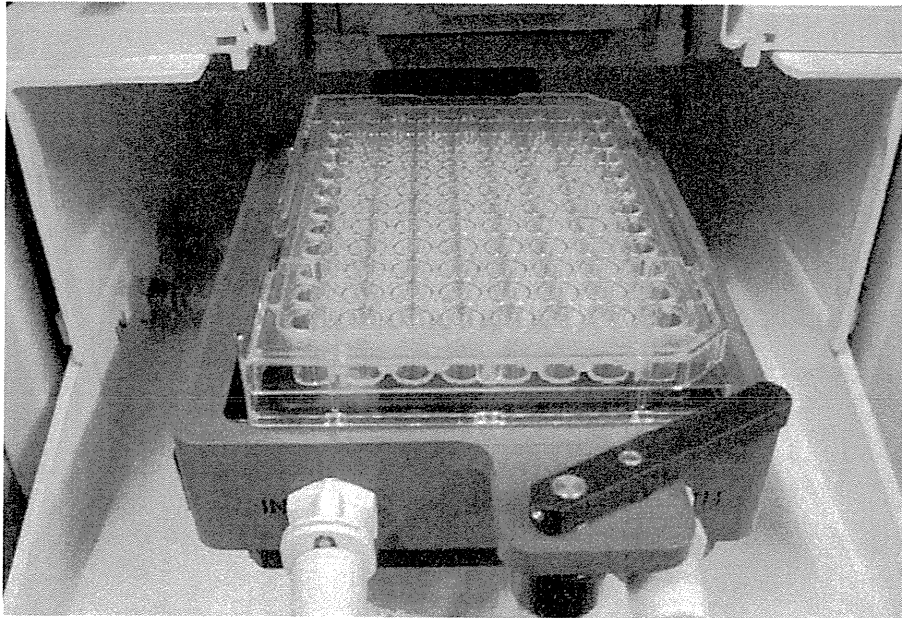


図1. 96ウェル用オートステージ

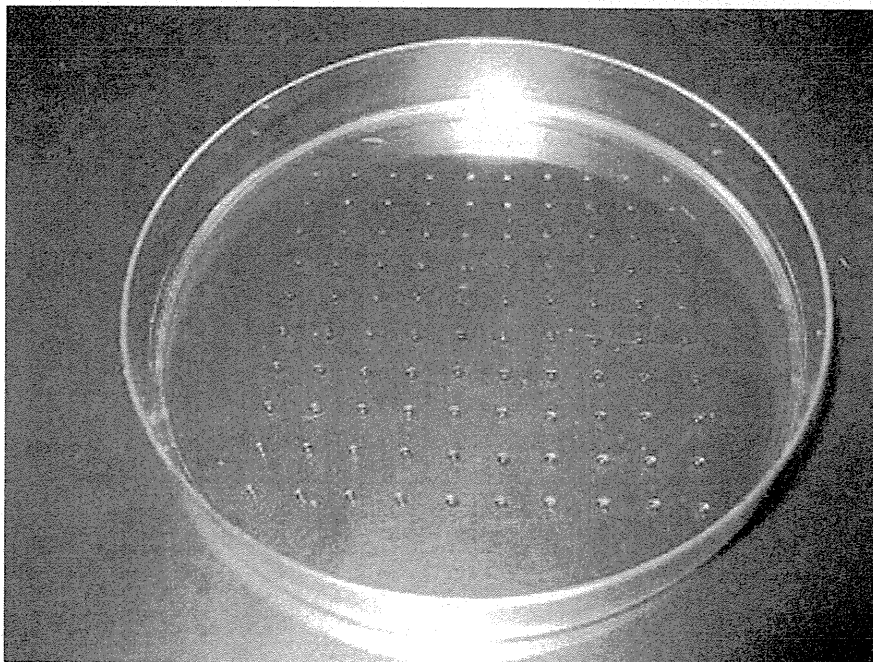


図2. 円形プレートへの10×10滴下パターン

表1. 標準寒天培地で受け t 倍のコロニー形成率

菌種			CFDA				2-NBDG			
			n1	n2	n3	平均(%)*1)	n1	n2	n3	平均(%)*1)
NBRC 3009	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草菌	72	82	75	80	76	78	75	80
NBRC 3301	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	92	93	92	96	95	93	91	97
NBRC 12689	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	緑膿菌	14	12	9	12	5	8	9	8
NBRC 102135*2)	<i>Staphylococcus aureus</i>	黄色ブドウ球菌	81	72	77	80	57	39	42	48
ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	91	87	88	92	50	56	53	55
*1) $100 \times \{(n1+n2+n3)/3\}/96$ (%)										
*2) 37°C、48h 培養。他は37°C、18h培養。										

表2 Tryptic Soy Brothを用いた場合のコロニー形成率

菌種			CFDA				培養条件	
			n1	n2	n3	平均(%)*1)	温度(°C)	時間(h)
NBRC 3009	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草菌	99	99	98	99	37	16
NBRC 3301	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	100	96	96	97	37	16
NBRC 12689	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	緑膿菌	99	98	100	99	37	21
NBRC 102135	<i>Staphylococcus aureus</i>	黄色ブドウ球菌	99	99	98	99	37	24
ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	100	100	98	99	37	16
*1) $100 \times \{(n1+n2+n3)/3\}/100$ (%)								

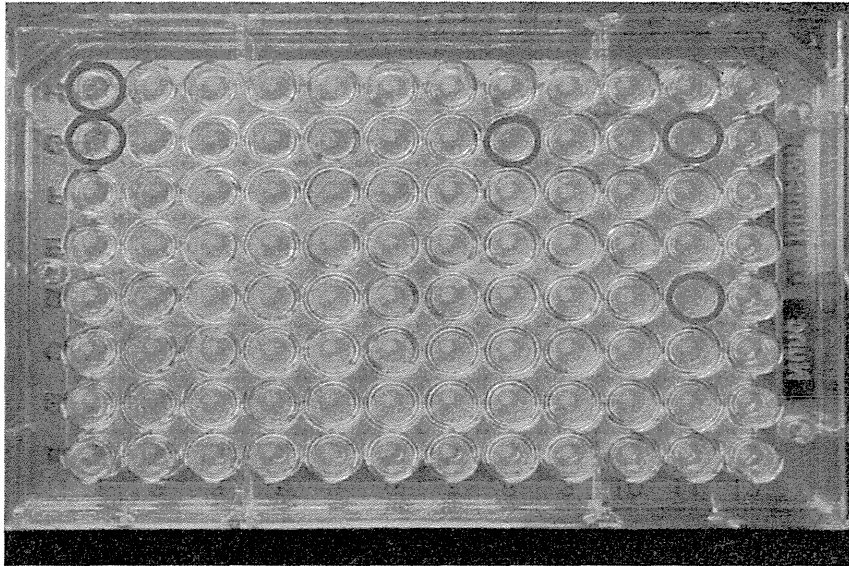


図3. *E. coli* ATCC 8739 CFDA陽性細胞を分配開いた場合の例。
朱記のウェルにはコロニーが認められない。91/96でコロニーが形成。

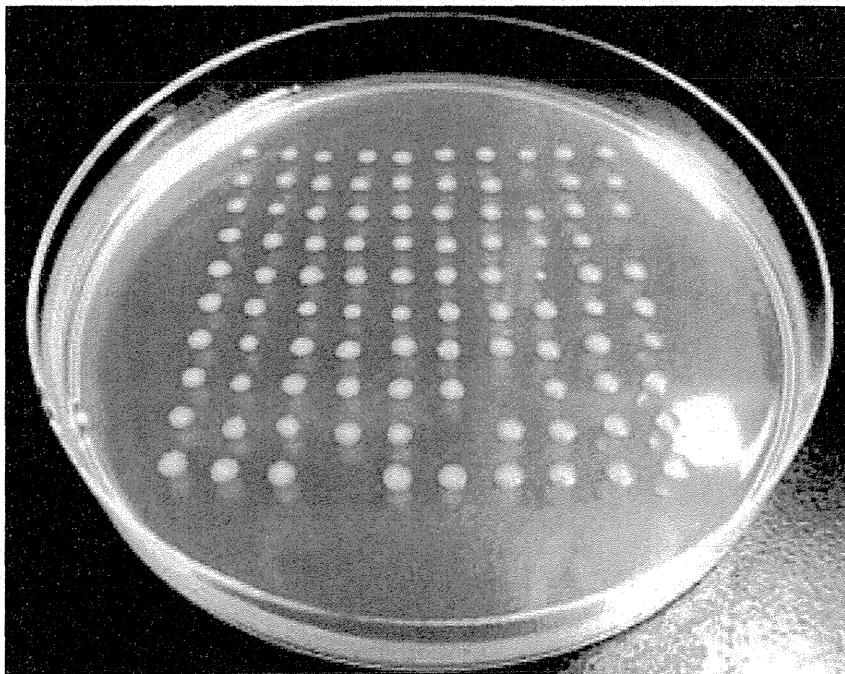


図4. *E. coli* NBRC 3301 CFDA陽性細胞を分配した場合の例
95/100でコロニーが形成。

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

「食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究」

分担研究報告書

毒素性細菌の試験法：セレウス菌の市販米飯食品への接種実験及び
毒素性細菌の検査法に関する考察

研究分担者 鎌田 洋一 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 室長

研究協力者 西川 禎一 大阪市立大学大学院生活科学研究科 教授

研究協力者 池田 高紀 帝塚山学院大学人間科学部 助手

研究要旨：嘔吐毒素産生性セレウス菌を、室温流通している市販のパック米飯に接種し、生菌数、芽胞数、および嘔吐毒素産生量の経時的変化を測定した。パック米飯に4 cfu/gの菌量で接種し、夏期を想定した30°Cで米飯を保存した。接種後12時間後には 1×10^5 cfu/gの生菌数を示し、以後急速に菌数が増加、48時間後には 1×10^7 cfu/gに達した。嘔吐毒素も12時間後から検出され、すでに発症毒素濃度に達していた。芽胞形成も24時間後には認められた。以上の結果は、市販パック米飯はセレウス菌の汚染を受けると、速やかに嘔吐を誘発する濃度にまで毒素産生させる食品であること、汚染米飯の処理を適切にしないと、新たな汚染の機会を産むことを示唆する。食品中における菌増殖と毒素産生の推移をふまえ、毒素産生食中毒細菌の試験法について考察した。また、毒素の耐熱性等の性状や、リスクに関する情報の充実さに基づき、試験法の項目について考察した。耐熱性毒素の場合は、細菌検査による生菌数の把握だけでなく毒素の測定が望ましいこと、また、人への危害性や科学的情報の少ない毒素の場合も、菌数と毒素の両方が試験項目であることが適切であると考えられた。ボツリヌス菌については、生菌検出の難しさから、毒素を試験することを第一義的に行い、補完的に毒素遺伝子の存在を試験すると効率的であると考えられる。

研究の背景と目的

食中毒を誘発する細菌は、その症状誘発様式から二つに大別される¹⁾。一つは食品とともに人体に取り込まれた後、消化器官に定着、増殖し、炎症を誘起して、腹痛、下痢、発熱などの症状を誘発するもので、サルモネラ、腸炎ビブリオ、カンピロバクターがこの範疇にはいる。定着、増殖、感染、炎症誘発という過程を経るため、潜伏期が長い事の特徴とする。一方、下痢や嘔吐と言った食中毒特異的な症状を、短い潜伏期で惹起させる食中毒細菌群がある。細菌によって産生された毒性物質がある場合で、前者を感染型食中毒細菌、後者を毒型食中毒細菌と呼ぶ。毒素が直接に人体組織を攻撃するため、短時間で毒素作用が現れる。細菌が産生する毒素は、食品内で産生される場合と、一旦細菌が人体内で増殖し、毒素が人体内で産生される場合の2群に分かれる。前者は食品内毒素型食中毒細菌と呼ばれ、後者の、毒素が生体内で産生される細菌は、生体内毒素型と称される。食品内毒素型食中毒細菌には、ブドウ球菌、ボツリヌス菌、一部のセレウス菌が属し、生体内毒素型食中毒細菌にはウエルシュ菌、一部のセレウス菌、一部の病原性大腸菌が含まれる。

生体内毒素型細菌による食中毒の発生条件として明確になっていることがある。患者喫食物に毒素産生する当該菌が、感染が成立する以上の生菌数が必要である。例えばウエルシュ菌食中毒では、食品1gあたり 10^6 cfu以上の菌数で、かつ毒素遺伝

子を持つウエルシュ菌が必要とされている。腸管内でウエルシュ菌が増殖すれば、便中には 10^9 cfu/gに近い菌数と、 μ g/gレベルのエンテロトキシンが検出されるのが常で、エンテロトキシンが腸管上皮細胞を攻撃し、下痢を誘発する。従って、ウエルシュ菌のような生体内毒素型に属する毒素産生食中毒細菌は、感染型の食中毒細菌と同様に、食品中の生菌、特に毒素産生能を持つ生菌を試験することが重要になる。

食品内毒素型の食中毒細菌が産生する毒素には多様性が認められる。ボツリヌス菌の産生する毒素は、分子量の大きなタンパク質性毒素で、食品中では300 KDa以上の大きさで産生される。非常に毒性の高いことが特徴で、食品中の菌数が少なくとも、すでに症状を誘発するだけの毒素が産生されていて、毒素が検出されているにもかかわらず、食品からの菌分離が困難なことが多い。ボツリヌス毒素の構造や作用機構は詳しく研究されている。ボツリヌス毒素は致死毒性の高い毒素ではあるが、馬抗血清を用いての治療法は確立している。食品と患者材料中の毒素の検出と血清型の決定がなされれば、治療が可能である。

ブドウ球菌は、約10年前に世界最大規模の食中毒を起している。菌の食品内での増殖に伴って毒素、エンテロトキシン、が産生される。エンテロトキシンは嘔吐を誘発する。分子量が約30 KDaのタンパク質性の毒素で、耐熱性を示すことが大きな特徴である。タンパク質性であるにもかかわらずブドウ球菌エンテロトキシンが示す

耐熱性は、食品の安全性を考える上で重要となる。易熱性の毒素が加工調理時の加熱で失活するのに対し、耐熱性毒素は、食品中で一度菌が増殖して毒素が産生されれば、当該食品が人の口に入る段階でも毒素がその毒性を保持している。加工食品の場合、加熱や殺菌があると、細菌検査を行ってもブドウ球菌は検出されず、細菌検査の結果はブドウ球菌陰性であるにもかかわらず、したがって、安全な食品と判定されるにもかかわらず、毒素による症状の誘発、食中毒事件の発生という結果が生じる。ブドウ球菌エンテロトキシンに関する研究もその成果に多くの蓄積がある。人に嘔吐を引き起こすエンテロトキシンの量は、200 ng/人と考えられていて、その危害性に一定の理解が成立している。

食品内毒素産生食中毒細菌のなかで、我が国に独特であるにもかかわらず、危害性が明瞭に把握できていない細菌と毒素がある。セレウス菌の一部には嘔吐を引き起こす毒素を産生するものがある。嘔吐毒素は1995年に分離同定された²⁾。化学的にはドデカデプシペプチドと呼ばれ、アミノ酸およびデプシ酸合計12個からなり、それらが環状に閉じている。オートクレーブ処理にも失活しない、極めて高い安定性を示す。毒素の検査法は種々開発されているが、試験法としては多くの問題点を有する。最も大きな問題点は、標準毒素が我が国に普及していないことだろう。嘔吐毒素は分子内にカリウムイオンを保持するときに毒性を発揮することが細胞毒性を示すことが明らかになっているが、カリウムイオ

ンの保持性が嘔吐毒素としての毒性に必要なかは不明である。嘔吐毒素がアンモニウムイオンを保持した場合、細胞毒性が消失するとされているが³⁾、嘔吐毒性との関連性は研究されていない。食品中から嘔吐毒素の検出がなされても、標準毒素が無いため、実量が表現できない。食品中での毒素の挙動、すなわちその産生量や、共存する食品成分と毒素との反応があるかどうか不明である。嘔吐毒素の作用機構は解明されているとは言い難い。カビ毒のような分子の安定性があるため、慢性毒性も考える必要もある。総体として、セレウス菌嘔吐毒素は、その危害性が明瞭でない毒素と位置づけられる。

本分担研究の大きな目的は、毒素産生食中毒細菌の食品からの試験法を策定する際の、考慮点や指針を考えるとところにある。本分担研究では、市販食品に毒素産生食中毒細菌を接種する実験を行い、食品中における細菌の増殖および毒素産生の推移を把握する。具体的には嘔吐毒素を産生するセレウス菌を、常温流通している炊飯済みのパック米飯に接種し、生菌数、芽胞数、および嘔吐毒素濃度を測定する。

接種実験の結果から、典型的な食品内での毒素産生細菌およびその毒素の挙動を理論的に設定し、毒素産生食中毒細菌の試験法、とくに試験項目について考察する。毒素についての毒性学的食中毒学的情報の多寡と、試験法の妥当性について考察する。

セレウス菌を接種した米飯における菌数、芽胞数、嘔吐毒素量の経時的変化

A. 実験の目的

セレウス菌 *Bacillus cereus* はグラム陽性の芽胞形成菌で、環境中に広く分布している。その多くはヒトに対して非病原性であるとされているが、一部の菌は病原性を持っており、食中毒の原因となる。本菌の食中毒のタイプには下痢型と嘔吐型がある。前者は腸管内毒素産生型で、食品と共に摂取された菌が、ヒトの腸管内で増殖する際にエンテロトキシンを産生し下痢を引き起こす。セレウス菌性生菌を含んだ食品を摂取してから発症するまでの時間はおおよそ6~22時間である。対して後者は食品内毒素産生型であり、菌が食品中で増殖する際に嘔吐毒素を産生し、食品と共にその毒素を摂取、毒素が直接嘔吐反応を引き起こす。毒素摂取から発症までの時間はおおよそ1~6時間である。原因となる食品は、下痢型では肉類や乳製品、野菜等様々であるのに対し、嘔吐型では米飯やその調理品であるところの焼き飯、ピラフ等が多い。日本におけるセレウス菌食中毒は嘔吐型で、明瞭な下痢型セレウス菌食中毒の発生があったとの認識がなされていない。

嘔吐毒素産生型セレウス菌の検査方法は、平板培養法による菌数ならびに芽胞数の測定と、培養細胞である HEp-2 細胞に対する空胞化変性活性を判定することによって嘔吐毒素を検定する方法が汎用されている。また近年、液体クロマトグラフータンデム型質量分析計 (LC/MS/MS)

によるセレウリド量の定量法や⁴⁾、Polymerase Chain Reaction (PCR)を用いた嘔吐毒素合成酵素 (CRS) 遺伝子の検出法が報告されている^{5,6)}。このように、種々の検査法が開発されてきているが、食品中におけるセレウス菌の菌数、芽胞数と嘔吐毒素量の経時的挙動とその相関性についての知見は少ない。食品中でのセレウス菌の挙動や毒素産生の推移を把握することは、セレウス菌、ひいては食品内毒素産生性細菌の試験法を考える上で非常に重要となる。

B. 実験方法

1. 供試食品

室温流通保存の炊飯済み米飯 (サトウのごはん 宮城県産ひとめぼれ (佐藤食品工業 (株), 新潟))。以下、パック米飯と記載する。

2. 供試菌株

セレウス菌 03-137-1 株 は、大阪市で発生したセレウス菌食中毒事例から分離した。同菌株を Brain Heat Infusion 培地およびスキムミルク培地に接種すると、嘔吐毒素が産生されることが確かめられている。

3. セレウス菌培養用培地

以下の培地および試薬を用いた。

- ・トリプトソーヤ寒天培地 (日水製薬 (株), 東京)。以下 TSA 培地。
- ・Brain Heart Infusion broth (日本 BD (株), 東京)。以下 BHI。
- ・食品希釈用 Phosphate Buffered Saline (pH 7.2)。以下食品希釈用 PBS。
- ・NGKG 寒天培地 (日水製薬 (株), 東

京)。以下 NGKG 培地。

4. 細胞培養

- ・ HEp-2 細胞 (ヒューマンサイエンス財団より購入)

- ・ 10% Fetal Bovine Serum (以下 FBS) 添加 EMEM 培地。以下 10% FBS+EMEM 培地。

- ・ 2%FBS 添加 EMEM 培地。以下 2% FBS+EMEM 培地。

- ・ 1% FBS および 10 µg/ml ゲンタマイシン塩酸塩添加 EMEM 培地。以下 1% FBS+GM EMEM。

- ・ トリプシン-EDTA 液

- ・ 細胞培養用 Phosphate Buffered Saline (pH7.2)。以下細胞培養用 PBS。

- ・ 培養

: 10% FBS+EMEM 培地、および 2% FBS+EMEM 培地を用いて、25 ml 容細胞培養用フラスコにて 3×10^7 cells/フラスコ程度の細胞数となるよう HEp-2 細胞を前培養し、以下の空胞化変性試験に用いた。

5. 市販パック米飯へのセレウス菌接種

- ・ 菌液の調整

TSA 培地にセレウス菌 03-137-1 株を表面塗抹し 30°C で 15 時間培養した後、シングルコロニーを白金耳で釣菌し、BHI に接種して 30°C で 12 時間前培養した。前培養した菌液を、食品希釈用 PBS で 10^6 倍希釈したものを接種用セレウス菌液とした。接種用セレウス菌液の菌数は、 1.60×10^2 cfu/ml であった。

- ・ パック米飯へのセレウス菌液の接種

安全キャビネット内にてパック米飯の蓋をはがし、接種用 BC 菌液を 5 ml、米飯上に均一に散布した。散布には 1 ml 用チップを装着したピペットマンを用いた。チ

ップ内に菌液を吸入した後、チップの先端に菌液のドロップを作り、米飯の表面に滴下した。滴下する部位を順次移動させ、表面全体に菌液を滴下した。その後、蓋をシールし、30°C のインキュベーターに入れた。接種後 12、24、48、72 時間後の菌数、芽胞数、および嘔吐毒素量の測定を行った。接種 0 時間は、接種に用いた菌液の菌数から算出した。

- ・ セレウス菌接種後のパック米飯中の菌数、および芽胞数の測定

試料 25 g をストマッカー用袋にとり、225 ml の食品希釈用 PBS を加えた後、ストマッカーにて 1 分間ホモジナイズしたものを 10 倍希釈試料とした。

10 倍希釈試料をさらに食品希釈用 PBS にて $10^2 \sim 10^3$ の範囲で 10 倍ずつ段階希釈した後、 10^{n-2} 、 10^{n-1} 、 10^n 倍希釈液を、100 µl ずつ各 2 枚の NGKG 寒天培地上に接種し、コンラージにて表面塗抹した。30°C で 24 時間培養した後、コロニー数をカウントし、平均して元の試料 1 g あたりの菌数を算出した。

検体ホモジネート、すなわち 10 倍希釈試料を 75°C で 30 分加熱したものを、PBS にて $10^2 \sim 10^3$ の範囲で 10 倍ずつ段階希釈した。 10^{n-2} 、 10^{n-1} 、 10^n 倍希釈液を、100 µl ずつ各 2 枚の NGKG 寒天培地上に接種し、コンラージにて表面塗抹した。30°C で 24 時間培養した後、コロニー数をカウントし平均して元の試料 1 g あたりの芽胞数を算出した。

6. HEp-2 細胞空胞化変性試験による米飯中の嘔吐毒素量の測定

・ 精製嘔吐毒素標準品

(有) バイオコントロール研究所(三重)。
1 mg/ml の濃度で 70%メタノールに溶解
されている。

・ 嘔吐毒素の陽性コントロールの調製

米飯を約 5 g 精秤し、シャーレにとり、
嘔吐毒素量が米飯 1 g あたり 20 μ g にな
るように精製セレウリド標準品を添加し
たものを陽性コントロールとした。

・ 陽性コントロールおよびセレウス菌接種
米飯からの嘔吐毒素の抽出

セレウリド抽出は梶田らの方法に準じ
て行った⁴⁾。すなわち、121°C、15 分オ
ートクレーブにて滅菌処理した試料ある
いは PC 約 5 g を精秤し、ポッター型ガラ
スホモジナイザーにとった。蒸留水を等
量加え、ホモミキサーにてホモジナイズ
(250 rpm、室温、1 分) した。ホモジナイ
ズ後、5.0 g を精秤し、50 ml 容ポリプロ
ピレン遠沈管に採取した。100%メタノー
ル 20 ml を加え、振とう抽出 (200 rpm、
室温、10 分) した。抽出後、遠心分離
(3,000 rpm、室温、10 分) し、上清を全量
ナス型フラスコに採取した。同じ試料あ
るいは陽性コントロールに対してこの抽
出操作を 2 回行った。その後、回収した
上清を 40°C で減圧濃縮し、メタノールを
留去した。乾固したものは、50%メタノ
ールを 2 ml 添加し、超音波処理により溶
解して回収した。同じ試料ならびに PC
に対してこの回収操作を 2 回行った。水
分等残留物が残った場合は、メタノール
を等量混合し回収した後、さらに 50%メ
タノールを 2 ml 加えて回収した。回収液

は直接、洗浄済みの Oasis HLB (Waters)
に負荷した。試料を負荷した Oasis HLB
を、50%メタノール 3 ml、80%メタノール
3 ml で順次洗浄した。その後、95%メタ
ノール 3 ml で溶出した。溶出液を 50°C、
窒素気流下で濃縮し、95%メタノールで 1
ml に定容した。これを嘔吐毒素抽出試料
ならびに嘔吐毒素抽出陽性コントロール
とし、HEp-2 細胞空胞化試験に供した。

・ HEp-2 細胞空胞化変性試験

HEp-2 細胞空胞化変性試験は、食品
衛生検査指針 微生物編 2004 年に記載さ
れている方法に準じて行った⁷⁾。すなわ
ち、細胞培養用 PBS で 5~10,240 倍の範
囲の 2 倍ずつ段階希釈した嘔吐毒素抽出
試料ならびに嘔吐毒素抽出陽性コントロ
ールを、組織培養用マイクロプレートの
各ウェルに 25 μ l ずつ接種し、1%
FBS+GM EMEM 中での HEp-2 細胞浮遊液
(3×10^5 cells/ml) を 100 μ l ずつ加え、蓋を
して CO₂ インキュベーターにて 37°C で 48
時間培養した。培養後、ギムザ染色法に
て染色したものを倒立顕微鏡下で観察し、
細胞空胞化変性の有無を確認した。判定
は 1 個の細胞質内に 10 個以上空胞を持つ
細胞が 1 ウェルに 30%以上占めるものを
陽性とした。嘔吐毒素抽出陽性コントロ
ールにおける空胞化陽性最終希釈倍率を
示したウェルの嘔吐毒素量を算出し、そ
の値から、元の試料 1 g あたりの嘔吐毒素
量を算出した。

C. 結果

1. セレウス菌接種パック米飯中の菌数と

芽胞数、並びに嘔吐毒素産生量

試料 1 g 中の菌数ならびに芽胞数を図 1 ならびに表 1 に示した。接種直後は接種に用いた菌液からの算出で 4 cfu/g となった。接種後の米飯中のセレウス菌の菌数は、12 時間後では 1.23×10^5 cfu/g、24 時間後では 6.73×10^6 cfu/g、48 時間後では 6.14×10^7 cfu/g、72 時間後では 6.26×10^7 cfu/g となった。芽胞数は、接種直後および 12 時間後では検出されなかった。24 時間後では 9.84×10^4 cfu/g、48 時間後では 1.59×10^6 cfu/g、72 時間後では 5.79×10^6 cfu/g となった。

試料 1 g 中の嘔吐毒素量を表 1 に示した。嘔吐毒素量は、接種直後は検出されなかった。12 時間後には $0.7 \sim 1.5 \mu\text{g/g}$ となり、その後はほぼ横ばいとなった。

D. 考察

米飯にセレウリド産生型セレウスを初期菌数が 4 cfu/g となるように接種して 30°C で保存したところ、12 時間後には 10^5 オーダーの菌数となり、嘔吐毒素量も $0.7 \sim 1.5 \mu\text{g/g}$ と催吐活性を發揮するのに十分な量が産生されていた。疫学的研究より、嘔吐型セレウスの発症菌数は $10^5 \sim 10^8$ cfu/g とされていることから^{4,8,9)}、今回の実験における菌数とセレウリド量の相関性は妥当であると考えられる。

E. 結論

常温で流通され、保存されている炊飯済みのパック米飯に、嘔吐毒素産生能があるセレウス菌を、低濃度接種した。その後 30°C に保持し、嘔吐毒素の産生と、セレウス菌生菌数および芽胞数の相関を検討し

た。パック米飯を試験対象に選択した理由は、セレウス菌食中毒の原因食品に米飯が多い事による。以下の成績を得た。

- 1) 市販の、常温で長期保存可能な米飯製品が、セレウス菌（生菌）の汚染を受けると、夏場を想定した場合には、セ菌の増殖と、芽胞産生と、嘔吐毒素産生が 12 時間以降に起こる。
- 2) セ菌生菌の増殖、芽胞の産生、および嘔吐毒素産生は、速やかに増加する。さとうのご飯は、セレウス菌増殖、嘔吐毒素産生に適した食材で、換言すれば、食中毒を起しやすい食品と判断される。
- 3) 食中毒事例から推察される発症菌数、および発症毒素濃度に 12 時間あれば達する。
- 4) 菌の増殖後は生菌数、芽胞数、毒素のいずれも、高い値を保つ。
- 5) 嘔吐毒素の耐熱性が証明されていることから、汚染を受けたパック米飯はセレウス菌食中毒発生の危険性を保持しつづける。

以上の知見は、食品中に産生された耐熱性の毒素による食中毒については、その耐熱性毒素がもつ危害の持続性から、生菌数を測定するだけでなく、毒素そのものの把握が必要である事を示唆する。

毒素産生性食中毒細菌の試験法に関する考察

- 1 : 毒素の熱感受性の観点から食品内での毒素産生食中毒細菌の菌数

の変遷と、毒素濃度の関係を図2に示した。毒素には易熱性毒素と耐熱性のそれがあるので、食品の加工時、あるいは調理時の加熱という要因も付加した図となっている。セレウス菌で汚染を受けたパック米飯のように、毒素産生を支持する食品では、耐熱性毒素は一度産生されれば、その実量は加熱で変化せず、常に喫食者に危害を与える危険性がある。耐熱性毒素を産生する細菌の試験を実施し、調理や加工時の食品への加熱処理によって当該細菌が検出されない、あるいは著しく少ない菌数となる場合が考えられる。細菌試験結果からは安全であると判断され、毒素の危険性を見逃してしまうことになる。食品の安全性確保という観点からは、毒素産生食中毒細菌の食品からの試験法には、耐熱性毒素産生細菌の場合、培養による細菌検査だけでは不十分で、その毒素も試験しなければならない必然性が示唆される。

一方、易熱性毒素を産生する食中毒細菌においては、加工・調理によって細菌も毒素も殺菌・失活することになる。毒素産生が生菌数の増加の後におこり、生菌数の増加と毒素産生量の増加が、時期をずらしての並行性がある場合、細菌数を試験すればその後の毒素産生の把握も予測できることとなる。易熱性毒素によって症状が誘発される場合には、ボツリヌス菌を例外に、細菌検査による生菌数の把握が妥当と考えられる。

ボツリヌス菌は食品中に易熱性毒素を産生する。ボツリヌス食中毒は、非常に低濃度の毒素量で発生してしまう。患者の示

す症状からボツリヌス中毒が疑われて、推定食品を調査した際、毒素は検出されるのに、原因菌が分離されない事例が多い。毒素の毒性が極めて強いため、少数の菌の増加に伴って産生された毒素によって症状が出現してしまう。毒素は検出可能なのに、原因菌の分離が難しい。「ボツリヌス菌による汚染があるか、ボツリヌス食中毒発生の危険性が当該食品にないのか」を試験するには、特殊な考え方が必要だと考える。生菌数の把握よりも、毒素の検出が第一義的に行うべき試験項目と考える。菌分離が難しい場合の補完的手段として、毒素遺伝子の検出が有望だろう。食品中での毒素の有無と、毒素遺伝子検出の有無が一致すれば、試験結果の信頼性は高いと考える。

2：産生される毒素の危険性が明瞭な細菌について

ブドウ球菌食中毒は、発症毒素が把握されていて、原因食品が限定されており、細菌数の増加と毒素産生量の並行性が証明されていて、多くの事例の解析が行われている。すなわち、ブドウ球菌は、毒素の危険性が明瞭な毒素産生食中毒菌と位置付けられる。毒素産生と生菌数の関係が明瞭である場合、生菌数を試験項目とすることが妥当であろう。細菌検査は一般の試験機関で既に安定的に実行されており、毒素産生と生菌数との関係が明瞭であるならば、生菌数検査のみで十分に食品の安全性を示すことが可能と考える。

生菌数が一定以上、例えば毒素産生が開始される菌数や、発症毒素濃度に達する菌

数の10分の1以上に達していたら、毒素の検出を追加の試験項目とする事を提案する。菌数が一定以上に増加している場合、毒素産生が危惧され、食中毒発生の危険性が示唆される。現に確立している生菌数検査に加え、一定の条件を示した検体に、効率よく毒素の試験を追加し、安全性を確保するという考え方である。

一方、毒素産生細菌であっても、症状を誘発する、すなわち、真の病原体は毒素であるので、菌検査は必要なく、毒素の検出のみを試験項目とする考え方もある。毒素を検出できる感度、試験が容易か否か、経費、検査法の妥当性などが解決解消された場合、生菌数に代わって毒素検査が、食品の安全性を評価する試験項目になる可能性は考えられるが、細菌検査を第1とする考えが主流を占めると推察される。

図2に、既に述べた接種実験に基づき、食品中の毒素産生細菌の菌数と産生される毒素量の推移を模式化した。ブドウ球菌、セレウス菌、ウェルシュ菌など、広く環境に分布し、食品を汚染する機会のある毒素産生食中毒細菌については、この菌増殖、毒素産生推移を基に考える事となる。

3 : 産生される毒素の危険性が不明の細菌について

今後発見されるかも知れない食中毒菌が、毒素を産生せず、感染性の食中毒菌であるかどうかは不明である。毒素を検出・測定できるようになっても、毒素の実態や人への毒性が不明瞭なセレウス菌など、危害が不明の細菌については、やはり、食品の

試験項目としては、生菌数と毒素の濃度の把握が望ましい。食品の検査を通じて、科学的情報が蓄積され、危険性が明瞭化してゆくと考える。

F. 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、 p. 15-63、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京（2007）
- 2) Agata N, Ohta M., Mori M., Isobe M., A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*, FEMS Microbiol. Lett. 129, 17-20 (1995)
- 3) Pitchayawasin S., Kuse M., Kga K., Isobe M., Agata N., Ohta M. Complexation of cyclic dodecadepsipeptide, cereulide with ammonium salts, Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 3507-3512 (2003)
- 4) Bjarne M.H., Niels B. H., Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. Appl. Environ. Microbiol., 67 (1), 185-189 (2001)
- 5) Fricker M., Messelhaüßer U., Busch U., Scherer S., Ehling-Schulz M., Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. Appl. Environ. Microbiol., 73, 1892-1898 (2007)
- 6) 松岡由美子、新屋拓郎、藤井幸三、あん入り餅を原因とする嘔吐型セレウス菌による食中毒事例 IASR, 23, 93-94

(2002)

- 7) 食品衛生検査指針 微生物編 2004
(社)日本食品衛生協会, 277-280 (2004)
- 8) 上田成子, セレウス菌、食中毒予防必携
第2版 (社)日本食品衛生協会, p113-123
(2007)
- 9) 松岡 由美子、新屋拓郎、藤井幸三、
あん入り餅を原因とする嘔吐型セレウ
ス菌による食中毒事例 IASR, 23, 93-94
(2002)

G. 研究発表

H. 知的所有権の取得状況

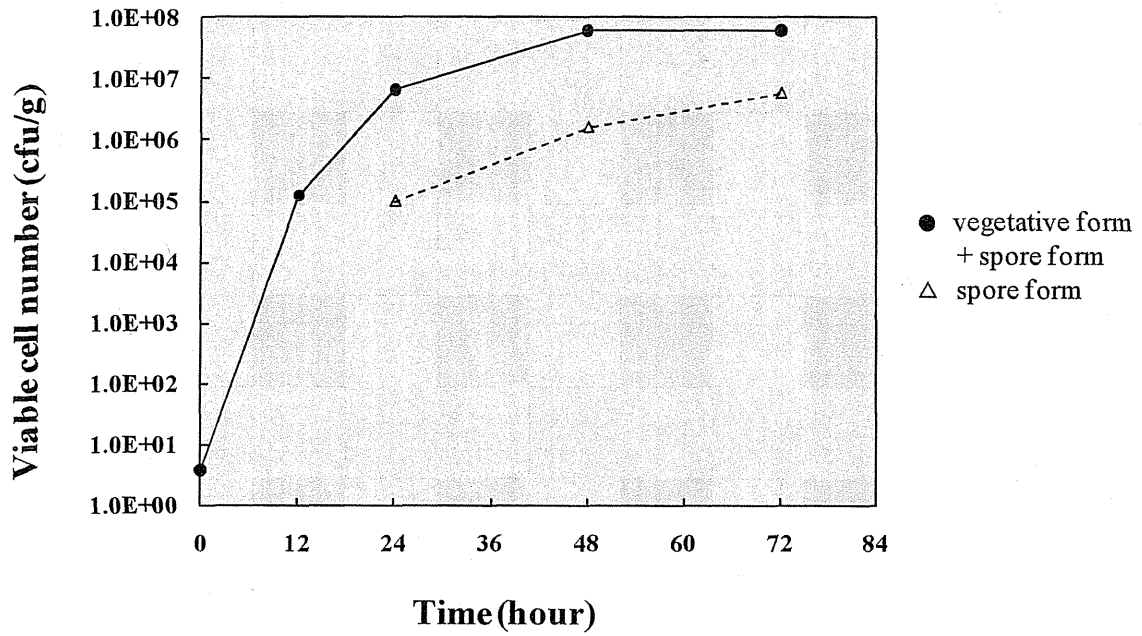


図1 常温保存可能市販パック米飯中のセレウス菌、嘔吐毒素の挙動

表1 常温流通保存市販パック米飯中でのセレウス菌嘔吐毒素産生の推移

保存時間 (hr)	嘔吐毒素 ($\mu\text{g/g}$) ^{a)}
0	-b)
12	0.7 - 1.5
24	0.7 - 1.5
48	0.8 - 1.5
72	0.8 - 1.5

a) 5検体の範囲を示す。

b) 検出されず

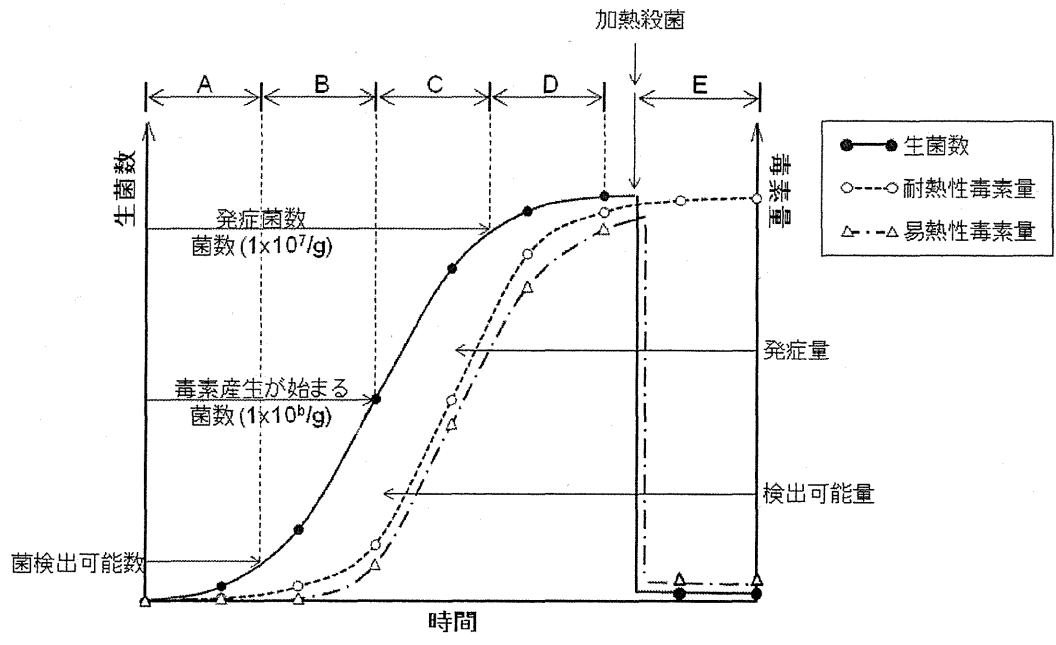


図2 毒素産生菌の食品内挙動概念図

平成 22 年度厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究

分担研究報告書

衛生指標菌試験法に関する研究

分担研究者 伊豫田淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

協力研究者 田中廣行，諸藤圭（日本食品分析センター 微生物部）

森曜子（日本適合性認定協会 認定センター）

井上誠、齋藤利江（日本冷凍食品検査協会）

研究要旨

欧州における食品の微生物基準（COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs）では、衛生指標菌として Aerobic colony count（好気性集落数），Enterobacteriaceae（腸内細菌科）及び *E. coli*（大腸菌）が採用されており、試験法としては ISO が定める国際規格の方法（ISO 法）が Analytical reference method（参照試験法）として指定されている。

一方、わが国の食品衛生法では衛生指標菌として主に細菌数（生菌数），大腸菌群，*E. coli*（糞便系大腸菌群）等が採用されている。食品衛生法における衛生指標菌の試験法は告示・通知等により公定法として示されているが、これら試験法の中には長年改正されていないために実際の試験にそぐわないものや、試験法間で整合性の取れない操作・手順のあることなどが指摘されている。さらに、国際的な標準法（ISO 法や FDA/BAM 法）との調和が取られていないことから、食品の輸出入に係わる企業や試験を行う試験所等において混乱を生じることが少なくない。これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会において引き続き検討を行った。その結果、今後規格が制定・改正される食品の衛生指標菌試験法として、基本的には ISO 法をそのまま移行した Enterobacteriaceae（腸内細菌科），Presumptive *Escherichia coli*（推定大腸菌），Coliforms（大腸菌群）の試験法を確立することとした。今年度の本研究では、上記の試験法に対応する ISO 法の逐語和訳版を作製した。

A. 研究目的

欧州では、食品に係わる微生物基準として「COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs」が制定されており、食品安全に係わる基準（Food safety criteria）と製造工程上の衛生に係わる基準（Process

hygiene criteria）に大別されている。これらの基準では、衛生指標菌として Aerobic colony count（好気性集落数），Enterobacteriaceae（腸内細菌科）及び *E. coli*（大腸菌）が採用されているとともに、試験法としては ISO（International Organization for Standardization）が定める国際規格の方法が

Analytical reference method (参照試験法) として指定されている。

なお、ISO では主に TC34/SC9 (食品専門委員会/微生物分科委員会) が食品微生物試験に係わる標準試験法等の策定・改正作業を行っている。現在、30 以上の微生物試験法が制定されているが、定期的に試験法の見直しが実施されている。

一方、わが国の食品衛生法では「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」(昭和 26 年、厚生省令第 52 号) 及び「食品、添加物等の規格基準」(昭和 34 年、厚生省告示第 370 号) の中で、個々の食品中における細菌数(生菌数)、大腸菌群、E. coli (糞便系大腸菌群) 等の菌数限度基準または陰性基準が規定されており、個別の試験法が定められている。しかし、これらの試験法間では同様な試験工程においても整合性が取れない操作・手順のあることや、国際的な標準法である ISO 法や米国 FDA の BAM (Bacteriological Analytical Manual) 法との調和が計れていない現状が指摘されている。これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会において検討を行った結果、今後規格が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、ISO 法を土台にした Enterobacteriaceae (腸内細菌科)、Presumptive *Escherichia coli* (推定大腸菌)、Coliforms (大腸菌群) の試験法を確立することを今後の検討課題とすることとした。

今年度の本研究では、Enterobacteriaceae (腸内細菌科)、Presumptive *Escherichia coli* (推定大腸菌)、Coliforms (大腸菌群) の試験法に対応する ISO 法の和訳版を作製した。

B. 研究方法

腸内細菌科の試験法として、ISO 21528-1 および ISO 21528-2 (いずれも 2004 年版)、推

定大腸菌の試験法として ISO 7251 (2005 年版)、大腸菌群の試験法として ISO_4831 および ISO_4831 (いずれも 2006 年版) を採用し、これらの逐語和訳を行った。

C. 研究結果及び考察

それぞれの和訳は下記の資料 1-5 の通りである。各 ISO 文書に参照するように指示されている ISO 7218, ISO/TS 11133-1 及び ISO/TS 11133-2, ISO 8261, ISO 6887-1, -2, -3, -4 などの各文書についても今後、逐語和訳し、その内容について確認する必要があると考えられた。

D. 結論

ISO 21528-1 および ISO 21528-2 (いずれも 2004 年版)、ISO 7251 (2005 年版)、ISO_4831 および ISO_4831 (いずれも 2006 年版) 逐語和訳版を作製した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし