

た。具体的な懸案事項は昨年度の報告書に注記の形でまとめられているので、その解説と議論を重ねた。

(2) 微生物生菌標準物質を用いた標準汚染食品の調製とその応用

(イ) 標準汚染食品の調製

昨年度までに確立した生菌標準物質のオンサイト調製法により、サルモネラ4株(H₂S産生菌2株、H₂S非産生菌2株)について、最適調製条件を求めた。この中から各1株

Salmonella Typhimurium FSD 287 (H₂S+)

Salmonella Westhampton FSD 347 (H₂S-)

を選び、食品マトリクス(冷凍エビ、牛肉)に少数生菌を添加した。添加した生菌のコロニー計数能は、食品マトリクスへの添加の前後に、Tryptic Soy Agar (TSA)プレートに10×10の生菌を添加し、このプレートに形成されたコロニー数で較正した。

(ロ) サルモネラ菌定性試験法の検証

本プロジェクトで開発されたサルモネラ定性試験法、及び本実験実施協力企業が開発した迅速法とで、上記のサルモネラ汚染食品中のサルモネラの検出を試みた。

(ハ) サイエンス・セッション

米国フロリダ州ボカラトンで開催された、第回 AOAC INTERNATIONAL 年次大会で、「生菌標準物質(Standard Material of Viable Microbial Cells)」と題するサイエンス・セッションを実施し、司会を務めると共に、自ら、講演者の一人として、これまでの研究成果を報告した。

C. 研究結果

(1) バリデーション・ガイドラインを通知文書として公開する際の懸案事項に関する議論

懸案事項の第一は、バリデーションの計画、実施、評価等を統括する組織が、我が国にはまだ存在しないことであった。ガイドラインの中には具体的な試験法の

計画に際して、菌種と食品マトリクスの選定が必要になるが、これを決めるのが、その統括組織より任命された委員等である。第二は、海外のガイドラインは絶えず改訂されていくが、その改訂のタイミングに合わせて、必要に応じて国内版を改訂していくために仕組みが無いことである。現在までに開発されてきた標準試験法も、対応する ISO 法などが改訂されるたびに、その内容を検討しなければならない。しかも、その改訂内容は必ずしも合理的な内容とは限らない。それに対して反論あるいは代替案の提案という作業が必要になると考えられる。

以上のような一連の作業は、現在の研究班が部分的に行っているところであるが、それを組織的に行う仕組みを早急に構築することが望まれる。

(2) 微生物生菌標準物質を用いた標準汚染食品の調製とその応用

(イ) 標準汚染食品の調製

食品マトリクスにサルモネラ生菌を、1個、5個、10個を各々添加した試料を調製した。同一生菌試料で、フローサイトグラム上の同一のゲート条件で選定した生菌を、図1に示すように、較正用の TSA プレートと食品マトリクスとに連続してソーティングした。

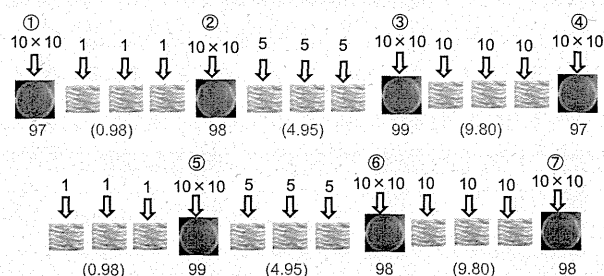


図1. 較正用 TSA プレートと食品マトリクスへの生菌連続ソーティング

例えば較正用プレート①、②ではソーティングした菌100個中97個、98個がコロニーを形成したので、平均は97.5%と

なる。したがって、①と②の間でソーティングされた生菌の個数は 1 個 × 97.5% = 0.98 個と推定される。実用的には 0.95 個以上を「1 個添加されたこと」の基準値とした。

(ロ) サルモネラ菌定性試験法の検証

FSD287(H₂S+)及び FSD347(H₂S-)を各々、冷凍エビ、牛肉各 25g に 1 個、5 個、10 個添加した試料(繰返し数 3)を用いて、標準法(NIHSJ-01-ST4)及び迅速法(3M™ Petrifilm™ SALX)で試験した結果、生菌 1 個を添加した試料でも検出できることが検証された。この成果は、次項のサイエンス・セッションでも紹介し、また国内学会でも研究発表した。現在、論文投稿準備中である。

(ハ) サイエンス・セッション

本部役員でもある Ronald Johnson (bioMérieux, Inc.) との共同企画で実施した。最初に Erin Crowley (Q Laboratories, Inc.) が ISO/IEC 17025:2005 におけるバリデーションとベリフィケーションの要求事項について概説し、それに応えるためには SMVM が重要であると述べた。そして SMVM の性能として①安定性、②国際的に認められ入手可能、③使い易い、④より長い保存可能期間、⑤異なる試験法間で同等に使用可能、を挙げた。続いて Hari Dwivedi (bioMérieux, Inc.) が Erin の提起に応える形で BioBall の開発の経緯と現状を紹介した。高々 30 個という少数生菌のコロニー形成能を確実に維持することは今なお難しい。それを克服するための技術的ノウハウの一端を垣間見ることができた。松岡は、その場で調製する SMVM (made-to-order SMVM) のアイデアと実績を紹介した。長期保存性は求めず、むしろ全ての菌株に適用できることが主眼である。実際、試みた 20 株全てに適用できることを示した。特にたった 1 個の *Salmonella* 細胞を添加した食品から、10⁵ 個以上の雑菌が共存する中で、

POD=1 で *Salmonella* を検出できた結果は大きなインパクトを与えたと思われる。さらに、ポスター発表から「測定不確かさ」に関する内容の Anli Gao (University of Guelph, Canada) のショートプレゼンテーションを加え、最後に John Mills (bioMérieux, Inc.) の司会で総合討論を行った。

D. 結論

微生物試験法ガイドラインを通知文書として公表することを想定して、昨年度作成したガイドライン案で提起された懸案事項について議論した。その結果、バリデーションの計画・実施・評価を統括する仕組みの構築が緊急に必要であるとの強い意見が出された。しかし、同時に、その実現には種々の問題があることも指摘された。

生菌標準物質に関しては、オンサイトで調製する方法で、標準汚染食品の調製も可能であることが示され、大きな進展と評価している。今後は事例を集積して、国際的なバリデーションスキームに導入されるようになることが望まれる。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

(原著論文)

H. Matsuoka, K. Nakano, N. Takatani, T. Yoshida, S. Igimi, M. Saito: A flow cytometric method for the in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. J. AOAC Int. 97 (2014) 479-483.

(国際学術集会)

H. Matsuoka: Made-to-order SMVM prepared in situ applicable to broad spectrum of strains. 128th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Boca Raton (2014.9.10).

M. Saito, A. Mariogani, T. Yoshida, N. Takatani, S. Igimi, H. Matsuoka: Application of made-to-order standard material of viable microbial cells (SMVM) to the evaluation of agar media. 128th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Boca Raton, USA (2014.9.10)

(国内学術集会)

吉田智紀、高谷周督、小川廣幸、齊藤美佳子、五十君静信、松岡英明: 傷害菌の定量的指標の提言－傷害菌調製条件の検討－. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.25)

高谷周督、吉田智紀、Alvin Mariogani, 齊藤美佳子、五十君静信、松岡英明: 傷害菌の定量的指標の提言－傷害修復培地成分の性能評価－. 第41回日本防菌

防黴学会年次大会、東京 (2014.9.25)
齊藤美佳子、A. Mariogani、高谷周督、吉田智紀、小川廣幸、松岡英明: オンサイト調製型標準生菌を利用した寒天培地性能の定量的評価. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.25)
守山隆敏、平井誠恵、島原義臣、齋藤健太、中島和英、吉田智紀、高谷周督、齊藤美佳子、松岡英明: オンサイト調製型標準生菌を用いたサルモネラ単一生菌検出による簡易迅速法サルモネラ属菌測定用システムの性能評価. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.25)

G. 知的所有権の取得状況
該当なし。

FOOD BIOLOGICAL CONTAMINANTS

Flow Cytometric Method for in situ Preparation of Standard Materials of a Small Defined Number of Microbial Cells with Colony-Forming Potentiality

HIDEAKI MATSUOKA, KOICHIRO NAKANO, NORIMASA TAKATANI, and TOMONORI YOSHIDA

Tokyo University of Agriculture and Technology, Department of Biotechnology and Life Science, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

SHIZUNOBU IGIMI

National Institute of Health Sciences, Division of Biomedical Food Research, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

MIKAKO SAITO

Tokyo University of Agriculture and Technology, Department of Biotechnology and Life Science, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

Standard materials of a small defined number of cells with colony-forming potentiality are essential for the rational validation of food microbiological methods. An in situ flow cytometric method using viable staining with 6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and tryptic soy agar (TSA) was previously proposed and its feasibility was demonstrated with five strains. In this study, this method was applied to 16 strains to support its broad applicability. The cell sorting gate was previously determined based on the CFDA stainability alone. Now the structural properties of cells designated by forward and side-scattering intensities have been introduced as the second gating criteria. Under the optimum gate condition, 100 cells have been selected and sorted on TSA. Consequently, a 95% or higher colony-forming rate has been attained for every strain. A successful application to microaerophilic *Campylobacter* spp. is especially of great importance because it suggests further broader applicability.

All standard and reference methods for determining microbial cells in food are based on colony counting methods using appropriate agar media. The number of colonies that appear on agar media is usually expressed in terms of CFUs. A CFU is usually a single cell but may represent a pair, a cluster, or a chain of cells that can be formed by a cell population. However, another concept concerning a single cell is necessary, and for this concept we have introduced the term colony-forming potentiality (CFP), which is a single cell that can grow to form a colony with a visible size. Thus, a CFP is not just a viable cell but is one that can replicate to form a visible colony. Injured cells are typical of viable cells that may not necessarily maintain CFP (1, 2), and thus might cause a reduction in viable cell count. Count loss is also caused by the presence of microcolonies; the formation of colonies provides evidence of viable cells, but it is well-known that microcolonies can hardly be observed by manual colony counting (3). The

reduction in cell count due to these causes is a critical issue even in the absence of food matrixes.

On the other hand, in common test samples containing food matrixes, the problem of false signals is more serious because the distinction between microbial colonies and nonbiological particles is difficult. To date, various methods for the continuous or time-lapse measurement of the colony-forming process have been developed (4, 5) and may effectively reduce the number of false signals. However, it still remains difficult to approve the results as accurate values unless the methods have been well validated separately.

In this context, the development of standard materials of cells maintaining CFP is an urgent requirement. Certified reference materials (CRMs) for microbiological analysis provided by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) in Belgium are thought to be feasible tools for this purpose. The CRMs comprise gelatin capsules containing milk powder contaminated with a spray containing bacterial cells of a target strain. For instance, BCR-528 is a CRM for *Bacillus cereus* American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) 9139. According to its certificate of analysis, the number of colony-forming particles is 53.4 ± 0.9 per capsule (mean \pm SD, $n = 11$) (6). To date, however, the number of CRMs available is only six strains.

BioBall[®] developed in 2003 is a useful standard material containing a few cells (7, 8). This standard material enables the preparation of an exact number of 30 ± 2 colonies simply by plating the small cotton-like ball on an agar plate. On the basis of this technology, IRMM developed two BioBall strains: *Escherichia coli* O157 (NTCT 12900) (9) and *Salmonella enteritidis* (NCTC 12694) (10). However, the number of BioBalls developed so far is only 10 strains.

These standard materials can be preserved, and their performance after storage has been validated. Nevertheless, the number of standard strains available is very small, and the development of new ones is still difficult because of high costs, long preparation times, and variations in strain-specific properties. Therefore, an alternative approach to standard materials is urgently required. An in situ preparation method using a flow cytometric cell sorter (FCCS) was considered. Originally, FCCS was applied to animal cells greater than 10–20 μm , but recently it has been applied successfully to

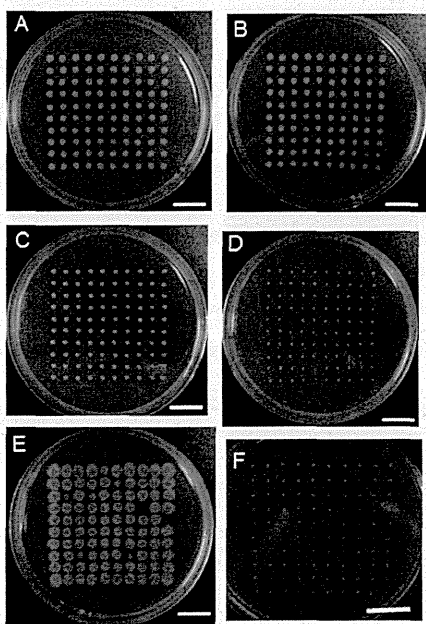


Figure 1. Colony formation patterns (A) *E. coli* ATCC 8739; (B) *C. freundii*; (C) *K. pneumoniae*; (D) *M. morgani*; (E) *M. luteus*; and (F) *C. coli*. A bar indicates 15 mm.

smaller bacterial cells (11, 12) and is used for the production of BioBalls.

In a previous study (13), we found that staining target cells with 6-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and sorting of the CFDA stainable cells on tryptic soy agar (TSA) plates was effective for two strains of *E. coli*, and one strain each of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. CFDA is well-known as a probe for viable cells (14, 15), and the CFDA stainability of each cell is displayed as a histogram of fluorescence intensity versus number of cells. Therefore, a sorting gate can be set on this histogram as a definite range of fluorescence intensity. Sorting based on the CFDA stainability alone, however, was not sufficient for broader application. Therefore, we have introduced the second sorting gate based on structural properties of cells. The structural properties of each cell are plotted on a panel of forward scatter intensity (FSC) versus side scatter intensity (SSC). FSC is an indicator of cell size while SSC indicates the complexity of intracellular structure. This second sorting gate can be set on the FSC-SSC panel as a definite area. In this study, we intended to find an optimum gate condition in the FSC-SSC panel by trial and error for each of 16 strains including the microaerophilic strains of *Campylobacter*.

Experimental

Microorganisms

E. coli K-12 (NBRC 3301), *Klebsiella pneumoniae* (NBRC 3318), *Enterobacter aerogenes* (NBRC 12010), *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC 12689), *B. subtilis* (NBRC 3009), *S. aureus* (NBRC 102135), and *Micrococcus luteus* (NBRC 12708) were obtained from the National Institute of Technology and Evaluation-Biological Resource Center (NBRC; Kisarazu, Chiba, Japan). *Escherichia coli* ATCC 8739

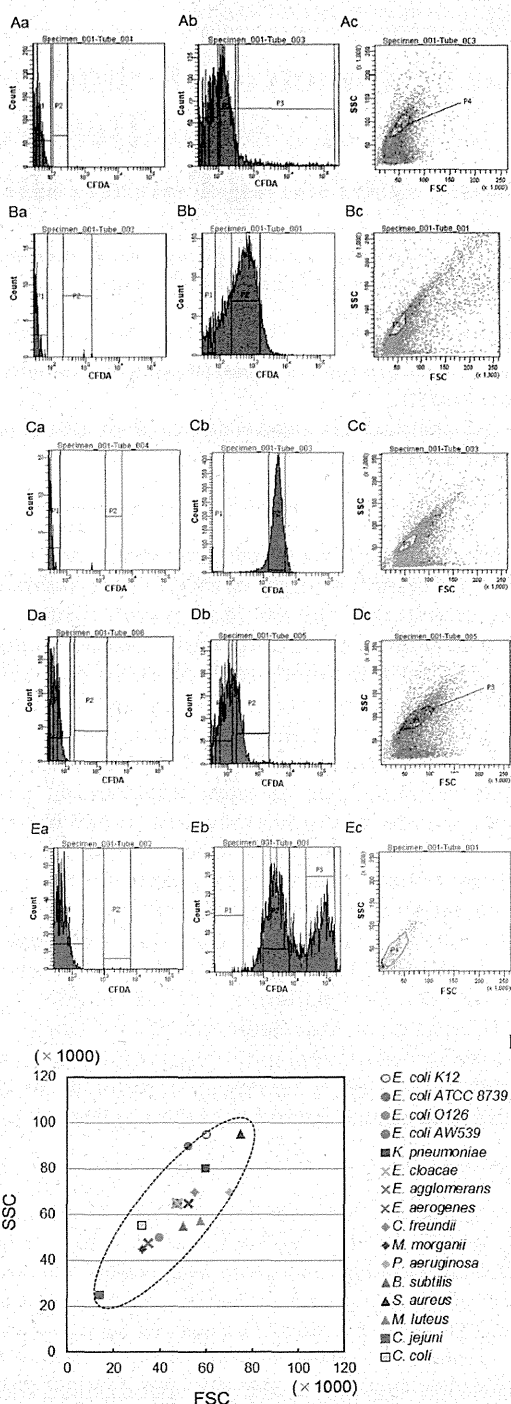


Figure 2. Flow cytograms of microbial cells (A) *E. coli* ATCC 8739; (B) *C. freundii*; (C) *M. luteus*; (D) *S. aureus*; (E) *E. agglomerans*: (a) Fluorescence intensity profile before staining with CFDA; (b) fluorescence intensity profile after staining with CFDA; (c) particle distribution pattern. Sorting gates are P2&P4 (A, E) or P2&P3 (B, C, D). Particles in these gates are indicated as yellow points; (F) center points of the optimum sorting gate.

was obtained from ATCC. *E. coli* O126, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, and *Citrobacter freundii* were isolated from food. *Morganella morgani* is a histamine-producing bacteria and was kindly provided by T. Fujii (Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan). *E. coli* AW539 is an aspartate taxis mutant and was obtained

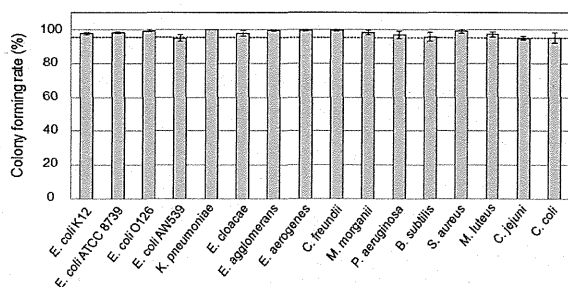


Figure 3. CFRs of the strains tested. Data are mean \pm SD ($n = 3$). A broken line indicates the 95% criteria.

from Nagoya University (Nagoya, Japan). *Campylobacter jejuni* (NCTC 11168) and *C. coli* (JCM 2529) were obtained from National Institute of Health Sciences (Tokyo, Japan).

Culture and Fluorescent Staining

Every strain except *C. jejuni* and *C. coli* was precultured in tryptic soy broth, and its cell suspension was plated on TSA. After culture at 37°C for 18 h, the resulting colonies were picked up and suspended in phosphate buffer solution (PBS), 0.1 M, pH 7.0. The cell concentration was adjusted at 10^8 cells/mL. A 1 mL aliquot of this cell suspension was transferred to a microtube; then CFDA (Sigma, St. Louis, MO) was added to the microtube at 150 ppm. After the reaction with CFDA for 30 min, the cell suspension was diluted 100-fold with PBS and then transferred into a 5 mL polystyrene round-bottom tube (BD Falcon, 352235; Becton Dickinson Co., Cockeysville, MD) through a strainer cap attached to the tube. The mesh size of the strainer was 35 μ m.

C. jejuni and *C. coli* stored at -80°C were placed on Müller-Hinton agar containing vancomycin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated at 37°C for 48 h under a microaerophilic atmosphere (O_2 6–12%, CO_2 5–8%) maintained with AnaeroPack in a 2.5 L rectangular jar (Mitsubishi Gas Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan). The surface of resulting cells was swabbed with a cotton chip and the cells were suspended in Müller-Hinton broth. After incubation at 37°C for 13 h, the cell concentration was adjusted to 10^8 cells/mL by diluting with PBS. A 1 mL aliquot of this suspension was transferred to a microtube; then CFDA was added to the microtube at 150 ppm. Successive procedure for CFDA staining was performed as described above under aerobic condition because air exposure for no longer than 1 h caused no inhibition effect on their CFP.

Cell Sorting

The CFDA-stained cells were applied to a fluorescence-activated cell sorter (FACSaria II; BD Co.). The CFDA-stained cells were excited by a blue laser at 488 nm. The cell sorting gate was searched for by repeating trial and error based on the two criteria: structural properties and CFDA stainability. The structural properties of each cell were automatically plotted on an FSC-SSC flow cytogram, while CFDA stainability of each cell was displayed as a histogram of fluorescent intensity versus number of cells. A cell population within a region indicated on these two flow cytograms was selected and sorted on a TSA plate of 86 mm in diameter. The TSA plate was set on an

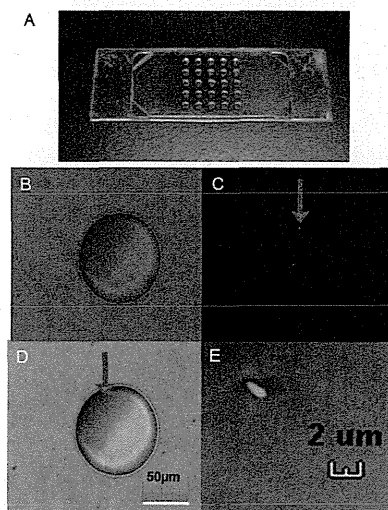


Figure 4. Detection of a single cell immediately after sorting. (A) 5 \times 5-well plate devised on a slide glass (2.5 \times 7.5 cm^2); (B) microscopic view of a droplet; (C) fluorescent microscopic view of the droplet; (D) merge of B and C; and (E) magnified image of a single cell. A fluorescent point was found at the arrow in (C) and (D).

automatic stage installed in the cell sorter. The automatic stage was driven so that 100 cells could be sorted into a 10 \times 10 grid pattern of spots at 1 cell/spot. After sorting, the TSA plate of every strain except *Campylobacter* spp. was incubated at 37°C in an incubator (SLI 600ND, Tokyo Rika Kikai Co. Ltd, Tokyo, Japan). *C. jejuni* and *C. coli* were incubated at 37°C under a microaerophilic atmosphere, described above. After incubation, the number of colonies was counted. The colony-forming rate (CFR) was determined by the following equation:

$$\text{CFR} = 100 \times N/N_0 (\%)$$

where N_0 was the number of sorted cells and N was the number of colonies. In this study, N_0 was 100 and, therefore, $\text{CFR} = N (\%)$. Experiments were repeated three times for respective conditions.

Results

Colony-Forming Pattern

Single-cell sorting was performed on a grid of 10 \times 10 spots on a TSA plate for each strain. In many cases, the colony size within each plate was uniform, which might indicate that single-cells with uniform properties were sorted at every spot. The culture time was 18 h for every strain except the following three strains: culture times for *B. subtilis* and two strains of *Campylobacter* spp. were 12 h and 48 h, respectively. Typical examples of colony-forming pattern are depicted in Figure 1.

Optimum Sorting Gates for Respective Strains

E. coli ATCC 8739 cells emitted slight fluorescence without staining (Figure 2Aa) that was thought to be intrinsic fluorescence; this fraction was designated as P1. After CFDA staining, the cells emitted much more intense fluorescence (Figure 2Ab). The fluorescence intensity range was divided

into P1, P2, and P3 fractions. The cells in the P2 fraction were regarded as properly stained cells, and the first gate for cell sorting was set as P2. A narrow area in the FSC-SSC flow cytogram was defined by a closed circle and set as the second gate, designated as P4. The P2 and P4 combined gate condition was optimized so that CFR could be 95% or higher. Under the optimized condition (yellow points in P4 in Figure 2Ac), CFR exceeded 95%. The relative number of yellow points in this P2 and P4 combined gate was only 4.9% among all sorted cells. However, this small population was thought to be a uniform cell group with uniform CFP. *E. coli* K-12, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, and *C. coli* showed similar flow cytograms to that of *E. coli* ATCC 8739. The optimum combined gates for these strains could be determined in the same way.

Figure 2B–E depict the results of *C. freundii*, *M. luteus*, *S. aureus*, and *Enterobacter agglomerans*, respectively. Their flow cytograms of CFDA stainability (Figure 2Bb, Cb, Db, and Eb) were different from that of *E. coli* ATCC 8739. However, the optimum condition of the second gate designated as P3 (in Figure 2Bb, Cb, and Db) or P4 (in Figure 2Eb) could be determined so that CFR was 95% or higher.

In summary, the center points of the optimum sorting gate for respective strains are plotted in Figure 2F. These center points are localized inside an oval leaning about 40 degrees versus the FSC intensity axis. This result suggests that the center points of the optimum sorting gate for any strains might also be located inside this oval. Therefore, it is recommended to start a search for the optimum sorting gate for any other strains from this oval area.

Colony-Forming Rates

The CFR of every strain attained under the optimum gate condition is shown in Figure 3. Every CFR value became 95% or higher levels. In the case of *E. coli* ATCC 8739, for instance, the colony count data were 99, 98, and 98 colonies/100 spots. Therefore, the CFR was $98.3 \pm 0.6\%$. In the case of *K. pneumoniae*, the colony count data were 100, 100, and 100 colonies/100 spots. Therefore, the CFR was $100 \pm 0\%$.

Discussion

The number of cells sorted at a single spot was assumed to be one or zero. This performance level of the cell sorter is thought to be a matter of course; however, the sorted matter is actually a single particle and not two or more particles by accident. Therefore, we checked the sorted particle(s) by microscopy immediately after sorting.

A 5×5 -well plate was devised for this purpose (Figure 4A), and a single droplet was sorted into each well. Shortly after sorting, each droplet was observed with a fluorescence microscope. The droplet size was about 100 μm in diameter (Figure 4B). In each droplet, a single fluorescent point could be detected (Figure 4C and D); this point was recognized as a rod-like cell (Figure 4E). Among all the droplets checked in this way, every one contained a single fluorescent particle of a similar size and shape. Therefore, single-cell sorting was performed as expected.

In this study, CFDA was used as a probe for viable cells. The cell membrane is permeable to CFDA. Only in viable cells, CFDA is hydrolyzed to generate a fluorescent derivative,

6-carboxyfluorescein (CF), by intracellular esterase. Both CFDA and CF are nontoxic to the cell (11); therefore, viable cells may be stained without loss of cell viability. However, the intensity of CFDA stainability was different among strains (Figure 2). There was also an occasion that a single strain such as *Enterobacter agglomerans* showed two peaks of fluorescent intensity (Figure 2E). We investigated the dependence of CFDA stainability intensity on CFR, but no clear relationship was found. Consequently, the optimum gate for CFDA stainability was determined empirically, although there was no limitation of CFDA application in the strains used here.

We expect that CFDA can be applied to many other strains. However, to develop a general platform for whatever strains it should be necessary to find other fluorescent probes. From this viewpoint, a fluorescent glucose such as 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2NBDG) is promising. It can be taken up only by viable cells of microorganisms (16, 17) and animals (18), supposedly via glucose transporters. The use of 2NBDG alone or in combination with its antipode, 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-L-glucose (2NBDLG; 19) or its derivative of different fluorescent color would be feasible for the viable or dead distinction by a different principle from that of CFDA.

From the viewpoint of broad applicability, the successful application to *Campylobacter* spp. was exciting. This supports the usefulness of TSA, which is a nonselective medium and can therefore support the repair processes of injured cells. *Campylobacter* cells partially injured by air exposure stress and hydrodynamic shear stress during cell sorting might be repaired by TSA. These suggest a possibility of further extension to other bacteria more susceptible to aerobic conditions. Moreover, it may possibly be extended to anaerobic bacteria by facilitating the CFDA attaining and cell sorting procedures. This should be a future challenge.

Finally, we emphasize that the present flow cytometric method may provide an experimental clue to study about one of the most substantial subjects in microbiology: the homogeneity and heterogeneity of colonies.

Acknowledgments

Hideaki Matsuoka and Shizunobu Igimi acknowledge support from Grant-in-aid for Scientific Research for the Promotion of Safety and Security of Foods on the subject, "Microbiological Methods in Foods and Their Validation" (H23-Food-General-010), The Ministry of Health, Labour, and Welfare, Tokyo, Japan.

References

- (1) Jasson, V., Rajkovic, A., Baert, L., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2009) *J. Food Prot.* **72**, 1862–1868
- (2) Back, K.H., Kim, S.O., Park, K.H., Chung, M.S., & Kang, D.H. (2012) *J. Food Prot.* **75**, 1867–1872. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-512>
- (3) Wang, X., Yamaguchi, N., Someya, T., & Nasu, M. (2007) *J. Microbiol. Methods* **71**, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.019>
- (4) Clarke, M.L., Burton, R.L., Hill, A.N., Litorja, M., Nahm, M.H., & Hwang, J. (2010) *Cytometry A* **77**, 790–797. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20864>

- (5) Ogawa, H., Nasu, S., Takeshige, M., Funabashi, H., Saito, M., & Matsuoka, H. (2012) *J. Microbiol. Methods* **91**, 420–428. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.028>
- (6) IRMM (2007) Certified reference material BCR-528. <http://www.lgcstandards.com/WebRoot/Store/Shops/LGC/FilePathPartDocuments/ST-WB-CERT-1074749-1-1-1.PDF>
- (7) Morgan, C.A., Bigeni, P., Herman, N., Gauci, M., White, P.A., & Vesey, G. (2004) *Cytometry A* **62**, 162–168. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20075>
- (8) Wohlsen, T., Bates, J., Vesey, G., Robinson, W.A., & Katouli, M. (2006) *Let. Appl. Microbiol.* **42**, 350–356. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01854.x>
- (9) De Baets, L., Van Iwaarden, P., Bremser, W., Meeus, N., Philipp, W., & Schimmel, H. (2008) *Eur. Com., JRC Sci. Tech. Rep.* <http://dx.doi: 10.2787/84342>
- (10) De Baets, L., Van Iwaarden, P., Bremser, W., Meeus, N., Philipp, W., & Schimmel, H. (2008) *Eur. Com., JRC Sci. Tech. Rep.* <http://dx.doi: 10.2787/85196>
- (11) Bunthof, C.J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F.M., & Abee, T. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2326–2335. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.5.2326-2335.2001>
- (12) Van Dijk, M.A., Gregori, G., Hoogveld, H.L., Rijkeboer, M., Denis, M., Malkassian, A., & Gons, H.J. (2010) *Cytometry A* **77**, 911–924. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20946>
- (13) Matsuoka, H., Shigetomi, T., Funabashi, H., Saito, M., & Igimi, S. (2013) *J. Microbiol. Methods* **93**, 49–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.021>
- (14) De Clerck, L.S., Bridts, C.H., Mertens, A.M., Moens, M.M., & Stevens, W.J. (1994) *J. Immunol. Methods* **172**, 115–124. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90384-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)90384-0)
- (15) Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., & Attfield, P.V. (2000) *J. Immunol. Methods* **243**, 191–210. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00234-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00234-9)
- (16) Yoshioka, K., Takahashi, H., Homma, T., Saito, M., Oh, K.-B., Nemoto, Y., & Matsuoka, H. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1289**, 5–9. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165\(95\)00153-0](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(95)00153-0)
- (17) Matsuoka, H., Oishi, K., Watanabe, M., Kozono, I., Saito, M., & Igimi, S. (2003) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2459–2462. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.67.2459>
- (18) Yamada, K., Saito, M., Matsuoka, H., & Inagaki, N. (2007) *Nat. Protoc.* **2**, 753–762. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.76>
- (19) Yamamoto, T., Nishiuchi, Y., Teshima, T., Matsuoka, H., & Yamada, K. (2008) *Tetrahedron Lett.* **49**, 6867–6878

平成26年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の微生物試験法の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究

研究代表者 五十君 静信（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）

分担研究報告書

食中毒毒素試験法の検討：セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法の検討

分担研究者 鎌田 洋一 （岩手大学農学部 共同獣医学科）
協力研究者 白藤 由紀子 （岩手大学農学部 共同獣医学科）
梶田 弘子 （岩手県環境保健研究センター 衛生科学部）
松田 りえ子 （国立医薬品食品衛生研究所 食品部）
森 曜子 （日本適合性認定協会）
藤田 和弘 （日本食品分析センター 彩都研究所）
福沢 栄太 （日本食品分析センター 彩都研究所）
後藤 浩文 （日本食品分析センター 彩都研究所）
齋藤 利江 （日本冷凍食品協会 横浜試験センター）

細菌が産生する食中毒毒素の試験法にはいまだ妥当性評価がなされたものがない。その原因に、安定した標準物の供給がないことがあげられる。最近、国内の試薬メーカーから、セレウス菌の嘔吐毒素であるセレウリドが販売された。同製品は、化学合成されており、物性が安定している可能性がある。同化学合成セレウリドを用いて、細菌毒素試験法の一つとして、セレウリド試験法の確立を検討した。試験法として、メタノールによる抽出、濃縮、カートリッジカラムによるクリーンアップ、LC/MS/MSによるセレウリドの検出と定量を試みた。その結果、合成セレウリドはLC/MS/MS上、安定した物性と優れた定量性を示した。市販パックライスへのセレウリド添加回収実験を行ったところ、40%弱から85%程度の回収率で、全体として低かった。室内精度も27%と精度不足だった。以上の検討から、メーカーが提供する合成セレウリドは、今後も標準物として使用可能であること、食品からセレウリドを抽出、濃縮、クリーンアップする過程で、改良が必要であることが明らかになり、次年度に検討することとした。

A. 研究目的

セレウス菌はグラム陽性の好気性桿菌で、嘔吐を引き起こす毒素を食品内に産生する。同毒素はセレウリドと呼称される。セレウリドは分子量 1,153 の耐熱性デプシ酸ペプチドで、食品加工中の加熱で失活しない。従って、一度産生されたセレウリドは、軽減減弱することなく食品中に残存する。

セレウリドの検出方法には、動物や細胞を用いたバイオアッセイ、質量分析装置を用いた機器分析法がある¹⁾。セレウリドの毒性を試験する方法論としては、その毒性である嘔吐症状を観察するのが病因論的には最も優れている。しかし、嘔吐現象はヒト、およびサルで観察されるもので、実験小動物ではスunks (ジャコウネズミ、*Suncus murinus*) に限定される。スunksも一部の研究機関に限定して保有され、まったく普及していない。セレウリドで処理を受けた HEp-2 細胞では、細胞質内に空胞が形成されることが示されていて、この空胞変性は、セレウリド特異的であることが証明されている^{1, 2)}。しかしながら、セレウリドの Hep-2 細胞への影響は細胞内のミトコンドリアが作用点となっていて、空胞化につながるが、同細胞における空胞変性が嘔吐現象に直接関連しないことも事実で、HEp-2 細胞における試験法の意義は一定のレベルで留まる。

機器分析技術が格段に進歩した現在、

質量分析装置は、各種の物質の試験法に幅広く応用され、多くの成果を上げている。セレウリドは、4種類のデプシ酸およびアミノ酸が、3回繰り返して直列に配置され、かつ、それが環状構造をとっている³⁾。この単純でかつ複雑なセレウリドの構造が、セレウリドの有機化学合成を困難にしてきたが、最近、2社の化学試薬メーカーがその合成を成功させ、さらに、市販し、標準物として永続的に供給されるようになった。標準セレウリドは、和光純薬工業株式会社、および、林純薬工業株式会社から販売されている。標準セレウリドの安定的供給があれば、質量分析装置を用いてのセレウリド試験法の策定とその妥当性評価が可能となる。

日本で発生したセレウス菌食中毒の原因食品は、米飯およびチャーハン・ピラフといった米飯関連食品がほとんどを占める⁴⁾。本分担研究では、市販パックライスを検体として、上記の合成セレウリドを標準物として、質量分析装置を用いてのセレウス菌嘔吐毒素の試験法確立を目的とする。

B. 研究方法

B-1. セレウリド、パックライス

セレウリドは、林純薬工業株式会社および和光純薬工業株式会社から購入した。

パックライスは、炊飯済み室温保存の市販品を用いた。

B-2. パックライスへのセレウリド接種と抽出

パックライスを薬餌でよく攪拌した後、25 g 秤量し、ホモジナイザーカップに移した。メタノールに溶解したセレウリド (125 ng/mL) を 1 mL (5 ng セレウリド/ g パックライス)、パックライスに数か所ドロップした。暗所で 60 分放置した。

B-3. セレウリドの抽出と濃縮

【試行 1】

セレウリド接種パックライスが 25 g 入ったホモジナイザーカップに、25 mL の蒸留水を加え、10,000 rpm、1 分間均質化した。メタノール 100 mL を加え、材料をホモジナイザーで 10,000 rpm、1 分間攪拌した。検体を 3000 rpm で 5 分間遠心分離した。

上清をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ過液を 250 mL の定容メスシリンダー (あるいはメスフラスコ) に回収した。残留物に 50 mL のメタノールを加え、薬餌で攪拌した後、3000 rpm 5 分間遠心分離した。遠心上清をガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液を上述の定容器に回収した。残留物にメタノール 50 mL を加え、薬餌で攪拌した後、上述と同様にろ過し、ろ液を回収した。メタノールを加え、全量を 250 mL とした。

抽出液の 25 mL を 100 mL 容量のナスフラスコにとり、ロータリーエバポレータ

ーで、液量が 1 mL 程度になるまで減圧濃縮した。濃縮時の温度は 40°C 以下を保った。濃縮物にメタノール 1 mL を加え、次の、HLB カートリッジカラム (Oasis、Waters) を用いたクリーンアップの材料とした。

HLB カートリッジにメタノール 3 mL、ついで 50%メタノール 3 mL を加え、カラムを平衡化した。上記の濃縮物をカラムに負荷し、流出液を捨てた。カラムを 70%メタノール 3 mL で洗浄し、その後、セレウリドを、95%メタノール 3 mL で溶出させた。

水浴温度を 50°C に設定した恒温器を用いて、窒素気流下で溶媒を蒸発させ、サンプルを濃縮した。その後残留物にメタノール 2 mL を加えて溶解し、メンブレンフィルターでろ過後、質量分析装置における測定のための材料とした。

【試行 2】

上記の工程のうち、抽出液と抽出残渣との分離については、一部遠心分離機のみを使用した。

B-4. 質量分析装置によるセレウリドの検出と定量

【試行 1】

LC/MS/MS によるセレウリドの検出と定量を行った。HPLC は AQUITY UPLC (ウオーターズ社)、質量分析装置は Quatro Premier XE (ウオーターズ社)、他を用い

た。

LC条件およびMS条件の詳細は添付資料に記載した（（一財）日本冷凍食品検査協会報告書）。

【試行2】

HPLCにはMightysil RP-18 GP（関東化学製）、質量分析装置にはXevo TQ（ウオーターズ社）を用いた。

LC条件およびMS条件の詳細は添付資料に記載した（日本食品分析センター報告書）。

C. 研究結果

C-1 標準セレウリドの検証

【試行1】

和光純薬工業株式会社が供給するセレウリド（以下和光製）を、LC/MS/MSで測定し、定性イオンとして m/z 171.7、および定量イオンとして m/z 1126.0はSN比10以上の良好なクロマトグラムが得られた。 m/z 356.8は不十分なSN比のクロマトグラムを示した。林純薬工業株式会社のセレウリド（以下林製）も、同様の結果を示した（添付資料1）。

和光製および林製のセレウリド、それぞれについて、メタノールで0.01~10 ng/mLに希釈し、LC/MS/MSで測定、ピーク面積から絶対検量線を作製した。いずれのメーカーのセレウリドの検量線も、 $r^2 \geq 0.9999$ と良好な直線性を示した（添

付資料1）。

ピーク面積から、各メーカーのセレウリドを比較したところ、和光製のものが15%程度大きかった（添付資料1）。

【試行2】

和光製セレウリドを検証した。定量イオンに m/z 1126、定性イオン（確認イオン）に m/z 357および m/z 314を選択した。これらはマススペクトラム上に良好な分離を示した（添付資料2）。

セレウリドの絶対検量線について完投した。0.05~10 ng/mLの濃度範囲で良好な直線性が得られた（添付資料2）。

セレウリドをパックライスに添加せず、抽出、濃縮、カートリッジカラムによるクリーンアップを行った検体を、LC/MS/MSで分析したところ、クロマトグラム上に、セレウリドに対する妨害ピークは観察されなかった（添付資料2）。

C-2. パックライスへのセレウリド添加回収試験

5 ng/gになるようにセレウリドをパックライスに添加し、静置後抽出、カートリッジカラムによるクリーンアップを行ったのち、LC/MS/MSによるセレウリドの定量を行った。

【試行1】

添加回収試験を分析者1名、 $n=2$ で5日間実施した。その結果を表1に示す。ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨

害するピークは見られなかった（添付資料1）。回収率は38.7%～87.1%であり、真度は67.8%であった（表1）。一元配置の分散分析による解析を行った結果、併行精度4.0%（RSD）、室内精度27.7%（RSD）であった。マトリックス添加標準溶液のピーク面積を溶媒標準溶液のピーク面積で除した値は0.99であり、顕著なマトリックス効果は確認されなかった。

【試行2】

3回のセレウリド添加回収実験を行った。定量イオンにおける分析値は2.66～2.80 ng/g、回収率は53.1～55.9%であった（表2、3）。

D. 考察

セレウス菌嘔吐毒素であるセレウリドは、デプシ酸およびアミノ酸各2種類が連結して4ペプチドとなり、それが3回繰り返えされて直列に連結し、さらに環状に閉鎖する構造をとっている。この複雑な構造のため、長く化学合成されてこなかったが、最近、国内2社から合成セレウリドが市販された。これらは、セレウリドを試験する際の標準物として用いることが出来る可能性がある。セレウリドは動物を用いてのバイオアッセイに困難があり、細胞を用いての方法が一般的になっているものの、セレウリド本来の症状である嘔吐症状と細胞毒性における変化に距離があり、完全に適切な試験法

とは言い難い。

昨今の分析機器の進歩は目覚ましく、質量分析装置の優秀化と低価格化が進んでいる。本分担研究では、質量分析装置、特にLC/MS/MSを用いてのセレウリド試験法の策定を検討した。試験法には大きく2つのステップがあり、一つは食品の前処理と機器による分析に分かれる。市販パッケージを材料に添加回収実験を行い、前処理からデータ解析までの過程を、2つの検査機関の協力の基に実施した（試行1および2）。

セレウリドのパッケージからの抽出にメタノールを用いた。残渣と抽出液との分離に、ガラス繊維ろ紙によるろ過あるいは、高速の遠心分離を行ったが、濃縮前のメタノール抽出液中には、ろ過や遠心分離で除ききれない微粒子が確認された。この抽出液を濃縮すると白濁した。同濃縮液をカートリッジカラムに負荷したが、溶媒の自然落下によってではカラムのフィルターが目詰まりした。吸引マニホールドを使用したところ、カラムの洗浄やセレウリドの溶出は可能となったが、一定の流速が得られなかった。前処理法については、抽出液中の非溶解物が問題を起こしていると考えられた。

今回試行した前処理法では、エバポレーターで抽出液を1 mL程度まで濃縮した。試験ごとに圧力値や濃縮時間が異なることが原因で、毎回同じ液量まで濃縮することが困難であった。濃縮後、抽出液に

メタノール 1 mL を加え、混合物をカートリッジカラムに負荷した。抽出液を濃縮しすぎた場合、加えるメタノールの液量を 1mL と固定していることから、結果的にメタノール含有率が高くなる。一方、カートリッジカラムは 50%メタノールで平衡化しているため、メタノール含有量が高いサンプルを負荷したカラムの保持が弱くなると考えられる。

標準物質としての市販セレウリドの LC/MS/MS における安定性を検討した。一部例外のイオンはあったものの、セレウリド定性（確認）および定量について、良好な分離とシグナルを示すイオンが確認された。

セレウリド測定について絶対検量線およびマトリックス検量線を検討したところ、2 回の試行、ともに、良好な直線性を示した。これらの結果は、セレウリド 2 種は安定した物性を示し、今後のセレウリド試験法の確立にあたって、標準物としての健全性が担保されていると考えられる。

市販のパックライスへのセレウリド添加回収試験を実施した結果は、試行 1 では室内精度が悪く、回収率は 40 %を下回ることもあった。試行 2 においても、53 ~56%の回収率を示した。これらの結果は、このたび試行した試験法では確実性に劣ることを示す。LC/MS/MS は分析機器、およびその技術としても高度に安定している。このたびの低い室内精度と回収率

のばらつき、また回収率の低さは、LC/MS/MS 以外の部分に原因があると推察する。上述したように、抽出物の濃縮時に適切な液量にまで濃縮できず、50%メタノールであるカラムの平衡状態と、カラムに負荷した濃縮液のメタノール濃度が一致しない可能性が考えられる。このため、セレウリドのカラム保持が悪く、その率も試行時ごとに異なり、結果的に回収率の減少、またばらつきが生じたものと推察される。今後、抽出液中に非溶解性のものが混入しないようにする、また、濃縮後からカラム添加の工程で、カラム付加物のメタノール濃度がカラムのそれと同一にするなどの工夫を施す必要がある。

E. 参考文献

- 1) 獣医公衆衛生学教育研修協議会 編
「獣医公衆衛生学 I」セレウス菌、
pp. 157-159. 文永堂出版、東京、2014.
- 2) Kamata, Y., Kanno, S., Mizutani, N.,
Agata, N., Kawakami, H., Sugiyama K.,
Sugita-Konishi, Y. Sensitivity of
Hep G2 cells to *Bacillus cereus*
emetic toxin. *J Vet Med Sci.*
74:1333-6. 2012.
- 3) Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S,
Ohtani I, Isobe M. A novel
dodecadepsi-peptide, cereulide,
isolated from *Bacillus cereus*

causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol Lett. 121:31-34. 1994. -

- 4) 山中英明、藤井建夫、塩見一夫。食品衛生学第三版、恒星社厚生閣、東京、2012.

F. 研究発表

なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案取得

なし。

3. その他

なし。

表1 添加回収試験結果（添加量 5 ng/g 相当）

	1 日目		2 日目		3 日目		4 日目		5 日目	
	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②
定量値 (ng/g)	4.0851	4.3417	4.2972	4.3560	2.9823	2.8705	3.3398	3.4817	2.2201	1.9329
回収率(%)	81.7	86.8	85.9	87.1	59.6	57.4	66.8	69.6	44.4	38.7

表-2 設定質量数ごとの分析値(定量用は m/z 1171→1126、その他は確認用)

	1171→1126 (m/z)	1171→357 (m/z)	1171→314 (m/z)	1171→172 (m/z)
無添加 NC	ピーク検出せず	ピーク検出せず	ピーク検出せず	ピーク検出せず
添加回収 N=1	2.80	3.36	3.38	3.47
添加回収 N=2	2.66	2.99	2.96	3.03
添加回収 N=3	2.72	3.07	3.06	3.13

* 単位 : ng/g

定量法 : 絶対検量線法 検量線(0.2~10 ng/mL を使用)

表-3 設定質量数ごとの回収率(定量用は m/z 1171→1126、その他は確認用)

	1171→1126 (m/z)	1171→357 (m/z)	1171→314 (m/z)	1171→172 (m/z)
無添加 NC	—	—	—	—
添加回収 N=1	55.9	67.2	67.6	69.4
添加回収 N=2	53.1	59.8	59.2	60.6
添加回収 N=3	54.4	61.4	61.1	62.6

* 単位(%)

2) 測定条件

HPLC ウォーターズ社 ACQUITY UPLC	
カラム	Zorbax Eclipse XDB-C18 (内径 2.1 mm、長さ 50 mm、粒子径 3.5 μm)
移動相流速 (mL/min)	0.20
注入量 (μL)	10
カラム温度 (°C)	50
移動相	A 液 : 0.1 vol% ギ酸 + 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 B 液 : メタノール
グラジエント条件	0 min (A:B=20:80) → 2~10 min (A:B=5:95) → 10.01 ~ 13 min (A:B=80:20) → 13.01 ~ 16 min (A:B=20:80)
MS ウォーターズ社 Quattro Premier XE	
測定モード	SRM
イオン化モード	ESI (+)
キャピラリ電圧 (kV)	0.3
ソース温度 (°C)	150
脱溶媒温度 (°C)	400
脱溶媒ガス	窒素、800 L/Hr
コーンガス	窒素、50 L/Hr
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン (m/z)	MS/MS: 1170.4→1126.0 [56 (V)、42 (eV)]
定性イオン (m/z)	MS/MS: 1170.4→171.7 [56 (V)、96 (eV)]
	MS/MS: 1170.4→356.8 [56 (V)、65 (eV)]

3) 測定結果

和光純薬工業社製 (Lot: AWF1724、純度 49.2~50.8 μg/mL) のセレウリド標準品をメタノールで希釈し、標準溶液を調製した。0.01 ng/mL の標準溶液を LC-MS/MS で測定し得られたクロマトグラムを図 1 に示す。0.01 ng/mL の標準溶液の測定において、定性イオンである m/z 1170.4→356.8 では良好な SN 比は得られなかったが、他の 2 イオンに関しては SN 比 10 以上のクロマトグラムが得られた。

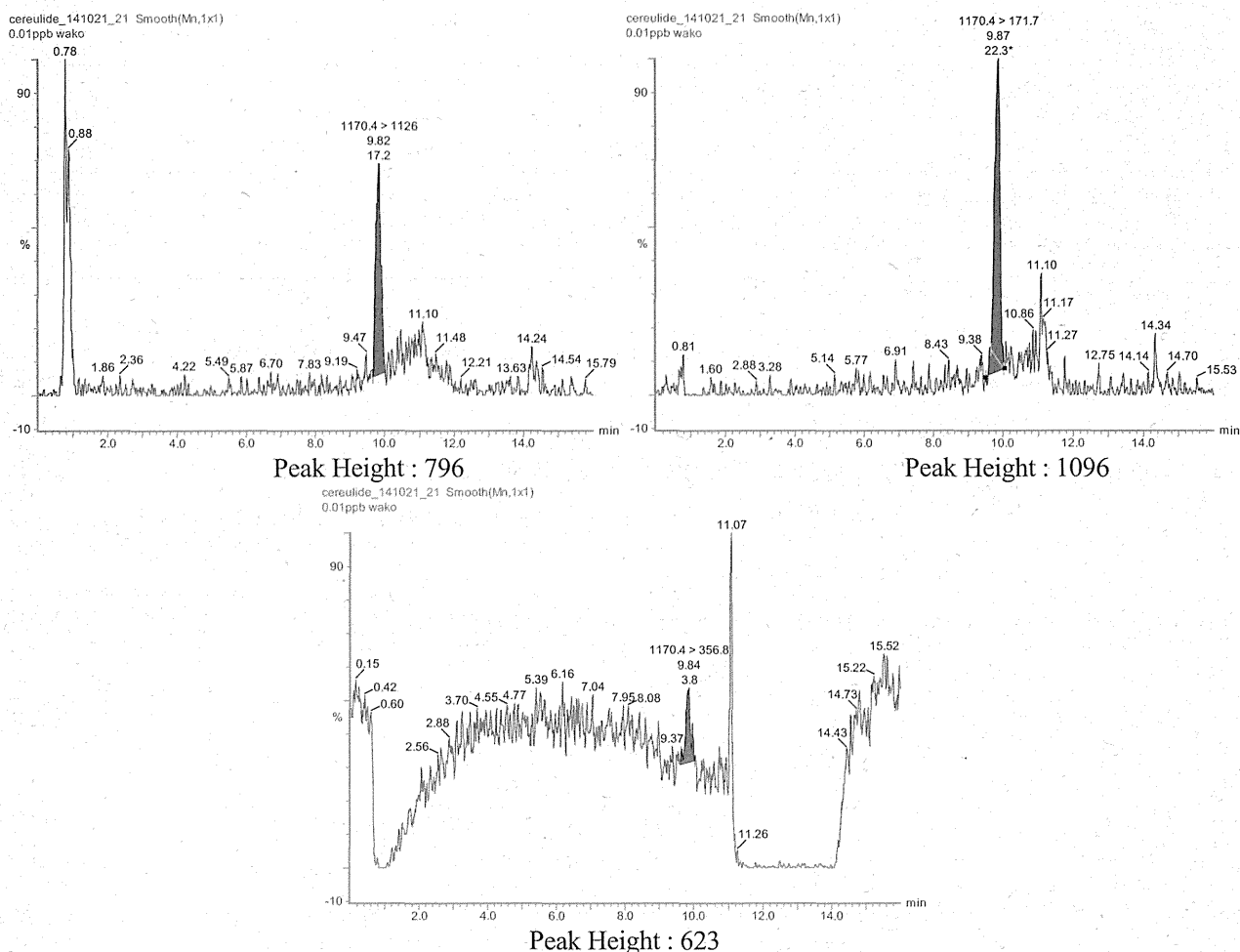


図1 和光純薬工業社の標準品で作成した 0.01 ng/mL の標準溶液を 10 μ L 注入した SRM クロマトグラム
 左上 : m/z 1170.4 \rightarrow 1126.0、右上 : m/z 1170.4 \rightarrow 171.7、下 : m/z 1170.4 \rightarrow 356.8

2. 標準品のメーカー間差

1) SN 比

1. で使用した和光純薬工業社のセレウリド標準品と、別途入手した林純薬工業社のセレウリド標準品 (Lot : J130603001、純度記載なし) をメタノールで希釈して標準溶液を調製した。各標準溶液を測定し、SN 比を比較した。林純薬工業社のセレウリド標準品から調製した 0.01 ng/mL の標準溶液を LC-MS/MS で測定し得られたクロマトグラムから算出した SN 比を表 1 に示す。

標準溶液のクロマトグラムから得られた SN 比に関しては、両メーカーとも同等の結果であった。SN 比はウォーターズ社のソフトウェア Masslynx を用いて算出した。

表 1 各メーカーの標準品から調製した 0.01 ng/mL 標準溶液を測定して得られた SN 比

	m/z 1170.4 \rightarrow 1126.0	m/z 1170.4 \rightarrow 171.7	m/z 1170.4 \rightarrow 356.8
和光純薬工業株式会社製	17.2	22.6	3.6
林純薬工業株式会社製	19.3	21.3	4.4