

図4. バリレーション実施機関の概念

POE: 専門家データベース (Pool of experts), WGE: 専門家作業グループ (Working group of experts)

考えたら、個人ベースで対応し切れるものではない。基本的な考え方から、具体的な数値に至るまで、現時点での規格が完璧ではない以上、より合理的な方法を目指すための論点はいろいろあると思う。それに関する提言や議論をどんどん発信していくことが重要であると思う。そうした活動のプラットフォームとして我国の第三者認証機関が必要なのである。海外ではよく「イニシアチブ」ということばを使うようであるが、日本語では品良く言えば「先導」、多少俗に言えばさしずめ「早く言ったもの勝ち」ということであろう。

12. おわりに

微生物試験は化学分析と違って結果に対する変動要因が格段に多い。培地成分の複雑さはその最たるものであるが、迅速法ではさらに複雑な要素が加わる。それ故に、可能な限り高い信頼性を確保できるバリレーションを行っておくことが肝要である。繰返しになるが、CSはそうした発想の結果生み出されたものである。しかし、そのCSが決して完成された形のものではないことも、上に述べてきたとおりである。願わくは、それらの問題に先導的に取り組むことによって、我が国がバリレーション先進国となっていくことを願うものである。

文 献

- Bunthof C.J., et al.: Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2326–2335 (2001).
- Matsuoka H., et al.: Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2459–2462 (2003).
- Shimakita T., et al.: Rapid separation and count of viable microbial cells in foods by non-culture method with a bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit. *J. Food Prot.* 69, 145–151 (2006).
- Fujioka K., et al.: Visualization of yeast single-cells on fabric surface with a fluorescent glucose and their isolation for culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 685–688 (2007).
- Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL 第19版 Appendix J “AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces” 2012.
- International standard ISO 16140 “Microbiology of food and animal feed – Protocol for the validation of alternative methods” 2003.5.1.
- Morgan C.A., et al.: Production of precise microbiology standards using flow cytometry and freeze drying. *Cytometry Part A* 62A, 162–168 (2004).
- Wohlsen T., et al.: Evaluation of the methods for enumerating coliform bacteria from water samples using precise reference standards. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 350–356 (2006).
- De Baets L., et al.: Certification of a reference material with *Escherichia coli* O157 (NTCT 12900) at a level of 4 colony forming units per material sphere, IRMM-351. *Eur. Comm., JRC Sci. Tech. Rep.* (2008) doi: 10.2787/84342.
- De Baets L., et al.: Certification of a reference material with *Salmonella enteritidis* (NCTC 12694) at a level of 5 colony forming units on nutrient agar and 4 colony forming units on xylose lysine deoxycholate agar, IRMM-352. *Eur. Comm., JRC Sci. Tech. Rep.* (2008) doi: 10.2787/85196.
- Matsuoka H., et al.: Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. *J. Microbiol. Methods* 93, 49–51 (2013).
- Matsuoka H. et al.: 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, 479–483 (2014).
- 守山隆敏, 他: 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).
- 斉藤美佳子, 他: 傷害菌の定量的指標の開発. 第109回日本食品衛生学会学術講演会, 東京, (2015. 5. 15).
- London R., et al.: An automated system for rapid non-destructive enumeration of growing microbes. *PLoS ONE* 5, e8609 (2010).
- Ogawa H., et al.: Noise-free accurate count of microbial colonies by time-lapse shadow image analysis. *J. Microbiol. Methods* 91, 420–428 (2012).
- Ogawa H., et al.: Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. *Sci. Rep.* 5, doi:10.1038/srep10061.



日本セクションとは？

—AOACI 日本セクションの設立経緯と役割—

東京農工大学 名誉教授

松岡 英明

1. はじめに

日本セクション設立の立役者は何と云っても倉田浩先生(当時、東京顕微鏡院、元国立衛生試験所衛生微生物部長)である。その経緯は、日本セクションが設立された直後に、倉田先生と筆者の共著で月刊フードケミカル(1998年11月号, p.62~64)に寄稿させて頂いた。今回、新たに稿を起こすことになり、改めて読み直してみると、当時の高揚した思いが率直に述べられているように感じた。「日本セクション設立に向けて」「日本セクション設立へのハードル」そして「日本セクションの課題」という構成になっている。それから17年経ったが、最後の節で強調されていた「課題」が、果たしてどの程度達成されたのであろうか。そうしたことを考えながら、改めて過去を振り返り、今後を展望することとする。

2. 日本セクション設立の機運

AOACを知るに至ったきっかけは人によってさまざまであろう。しかし例外なく社会に出てから、そして食品分析に関する仕事に就いてから、ということと言える。小中高はおろか理科系の大学でさえ、先ず講義には出てくることはなかったろう。食品分析に関する業務が実施されているのは、食品検査に関する行政担当部署、そしてそれを支える公

的研究機関、指定検査機関、検疫所、試験法や検査キットの開発企業、食品メーカー、流通・販売企業などである。筆者は大学に所属していたが、試験法やキットの開発企業と同じ立場であった。潜在的には少なからぬ人がAOACの必要性を感じていたはずである。

倉田先生がAOACについて初めて耳にしたのは昭和30年頃であったという。それが、昭和50年頃から米国の本部(AOAC INTERNATIONAL, 以後AOACI)よりしばしば日本の研究者グループに対して日本セクション設立の要望が寄せられるようになったとのことである。しかし、本格的に設立に向けて動き出すのは倉田先生が国の機関を離れてからであった。1996年10月、札幌で開かれた食品微生物学会で公定試験法の設定に関する特別講演を行った際に、議論が高まり、その暮れも押し迫った12月27日有志11名が、世田谷区用賀の倉田邸に会した。年が明けて、スリーエムヘルスケア(現スリーエムジャパン)のご尽力で招いていただいたAOACIのDr. Wher氏の講演会(1997年1月27日)、およびグンゼ産業(現GSIクレオス)のご尽力で招いていただいたバイオコントロールシステムズ社のDr. Feldsine氏の講演会(同年5月29日)などを通じて、米国の本部の活動に通じた人々との意見交換が積極的に進められた。

1997年9月、米国カリフォルニア州サン・ディエゴで開かれた第111回AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition (以下、AOACI年次大会)で、日本から参加したメンバー数名が、セクション設立に関して本部の事務局長であるRonald Christensen氏らと面談する機会を得て、日本セクション設立に関する情勢について率直な意見交換をした。その際、セクション設立のガイドラインを手渡された。結果的に、面談した者が日本人会員代表として本部から資料を得たことになってしまったのである。そこで、セクション設立の意志の如何も含め、事の次第を他の日本人会員に報告する義務があると考えた。そこで、小沼博隆(国立医薬品食品衛生研究所)、倉田浩、荒木恵美子(日本食品分析センター)の3氏、それに筆者の計4名が第一次世話人として、会員諸氏に、セクション設立準備検討会を呼びかけた。10月17日に行われた同会の参加者33名、欠席ではあるがメッセージを寄せて頂いた方15名であり、概ね設立の必要性にご賛同いただけるご意見であったが、同時に考慮すべき問題点も提起された。その問題点の主なものを紹介する。

- ・厚生省(現厚生労働省)としての支援は難しいだろう。日本における組織のあり方は他の学会との関わり方を考慮し、整理していく必要がある。
- ・日本でのAOACのあり方について、AOACの支部か、日本独自の組織とするか検討の余地がある。例えばイギリスには検査法のバリデーションの審査施設が2つあり、それぞれ食品会社が会員となって支えている。これらの施設で承認されれば公定法となり、会員会社はその方法を使うことができる。
- ・セクションの設立に際して、コストと信頼性の妥協点を求めることが必要。そのため組織的な研究が必要。またCODEXなど

との整合性を図っていくことも必要。

- ・学会や研究会としてなら直ぐできるが、メソッドバリデーションとして活動するのは任意団体としては荷が重い。また米国のAOACで認可された分析手法はそのまま日本では使えないものが多い。例えば穀類の分析手法の中に米についてのものは入っていない。
- ・海外と日本では分析検査の手法が根本的に違う。海外では日常の検査業務はロボットやパートが行っているが、日本では人の健康・生命に関わるものという意識からドクタークラスも検査している。国際整合性は必ずしも欧米の分析手法を取り入れることではないと思う。海外からの見学者は分析現場を見ると必ずこれなら大丈夫という。AOACのバリデーションが本当に必要なのだろうか。
- ・現状、AOAC、ISO、コーデックスに関する情報は全くといっていいほど日本に流れていない。AOACの分析手法はコラボレーションによるスタディなどのバリデーションが大変なのではっきり言って古い。日本なりのリーズナブルな方法を作りそれを取りまとめてAOACやISOに持っていく場とするならよいが。

こうした問題点を考慮しつつ、あまり無理せず地道に勉強していくために、日本セクションの設立を目指そうということで合意した。そして8名からなる、設立準備研究会を設けた。その8名は最終的には設立準備委員を経て、初代の執行役員となった。

3. 日本セクションの組織づくり

1997年12月10日、翌98年1月14日の設立準備研究会を経て、事務局の設置場所、運営形態など、基本的事項の原案を作成した。さらに、3月9日に議論を重ね、4月17日に経過報告書をまとめた。作業上の便宜を考え日本語訳版を作成しての作業であったが、最

終的には日本語版のセクション規則も作成しなければならぬので、主要な用語の日本語訳についての議論も行った。

最初の重要事項は事務局の設置場所である。できれば官に置ければよいが、ということで、第1候補として国立医薬品食品衛生研究所を考えた(4月8日齊藤副所長と面談、4月14日元同研究所長で早くからレギュラトリーサイエンスの重要性を提唱されていた内山充先生と面談)。しかし、残念ながら、というより予想通り受け入れては頂けなかった。設立準備検討会でのコメント通り「厚生省の支援は難しい」ので、その直轄研究所への設置も無理のようであった。次の候補としては指定検査機関を考え、複数の機関にご検討頂いた。幸い前向きのご回答を頂いたが、今度は逆に選択で悩むことになった。「お願いする立場」と「選ぶ立場」の微妙なバランスを考えなければならなかった。結論は4月17日の経過報告書以降に持ち越された。その後、思案の挙句、それでは、ということで、倉田先生のご自宅にしては如何か、というアイデアが出された。時期的にも、初代の役員候補者を決めなければならない時期になっていたが、倉田先生は、当初からずっと日本セクション設立運動を主導されてきたので、是非、初代会長をお願いしようとの考えがあった。一見奇想天外とも思えるが、日本セクションを象徴する最良のアイデアではないか、ということですんなりこの案で決着した。

次の重要課題は役員の種類と数である。ガイドラインでは、執行委員は会長、次期会長、庶務幹事、会計幹事各1名と規定されている。それに代議員が数名加わって役員会を構成する。しかし、セクションとしての業務は、例え勉強会が主体とはいえ、一つの学会を運営することと同じレベルのことは考えておく必要があるだろう。とりわけ本部とのやり取りは英語なので、日本語の場合の何倍もの時間がかかることを覚悟しなければならぬ

い。しかし想定される役員候補者はいずれ劣らぬご多忙の方ばかりで、各役職1人体制では負担が大きすぎないか、と不安を感じるようになった。もちろん、他の会員による分担は可能であるが、分担する以上は外向けにも役職名が必要になるだろう。どなたがその任に当たられようと、単なるボランティアとして少なからぬ時間を使える立場の方はいらっしやらない。多くの学会では色々な役員や委員は、通常、ダブルキャストにして、任期2年の場合は毎年、半数交代にしているのが普通である。日本セクションの場合も当然そうすべきであると考えた。それに対して、高々数十名の会員に対して役員が多すぎ、組織として“頭でっかち”になってしまわないか、との懸念もあったが、やはり役員数が少ないことによる不都合の方がはるかに大きいであろうという結論になった。具体的な数の決定は6月3日の経過報告会以降に持ち越されたが、最終的には、会長、次期会長は各1名で変更なし、庶務幹事は4名、会計幹事は2名、事務局長1名を新設、そして代議員は最大20名という案をセクション規則に盛り込み、本部に了解を求めることとなった。

設立準備研究会は6月3日に経過報告会を開き、前年の10月以来7カ月ほどの間の活動概要とセクション規則案について報告した。まだ、上記の課題も含め、結論に至っていない事項はあったが、基本的な考え方や具体的な方針については了承された。そして、これ以降、メンバーは変わらないが、同研究会は設立準備委員会と改称して、引き続きセクション規則の完成を急ぐこととなった。8月26日に、本部より概ね了解との回答が得られた。しかし、その時点でなお、役員数を増加する件は認められない、とのことであったので、直ちに再度の説得を試みた。しかし、9月3日付の回答でも依然、認められないままであった。モンテリオールで開かれる第112回AOACI年次大会が、すでに11日後の9月

14日に迫っていたのに、である。承認を得るための本部の理事会は、その前日の9月13日であるので厳密に言えば10日しか残されていなかった。ガイドライン通りの数を受け入れるか、あくまで当初の数字を主張するか、という判断を迫られた。しかし、日本セクションの円滑な運営のためには不可欠との思いは強く、意を決して、再々度の説得のメールを Muri Dueppen さん (Director, Marketing and Membership) に送った。幸いなことに、最終的には「わかった!」という回答を頂いた。それを受け取った時の何とも言えない感慨は、2015年の今日に至るまでの経験の中で最も印象深いものであった。その後は、直ちに正式な書類としての体裁を整えたが、間際に見つかった些細な誤植の修正も含め、書類が完成したのは9月12日にモントリオール入りしてからであった。理事会の直前まで他の日本側委員と共にバタバタしていた。Dueppen さんは、「日本の考えを理解した。仮に反論が出てでも必ず説得する。」と言い切って下さった。うれしかった。

9月14日のオープニングセレモニーの中で、日本セクション設立が紹介され、日本セクション初代会長の倉田先生に、Paul Beljaars AOACI 会長から小槌 (Gavel) を受け渡された。この時の倉田先生はわずか2カ月ほど前にかんの手術をしたばかりにもかかわらず、長年の悲願であったセクション設立の記念すべき大会ということで、無理をおして奥様の介護を受けながら出席されていたのである。因みに、小槌というのは、裁判所で裁判長が判決を告知する時などにカチーン! と叩くもので、試験法の妥当性を判断する、という AOAC の使命を象徴するものである。この小槌は代々、日本セクション会長が引き継いで保管していたが、現在は、事務局で保管されている。日本セクションでも、会長が交代する際には、セクションの年次大会で小槌の伝達のセレモニーを行っている。

9月15日の夕方、会議場の一室で、日本セクションとしての初めての Business Meeting を開いた。その会に、Beljaars 会長や倉田先生の旧知の Albert Paul さんら本部役員もこられ祝意の言葉を述べられた。特に Beljaars 会長の次の言葉は単純明快、ありきたりの社会貢献云々よりもはるかにストレートに胸に響いた。「あなた方は AOAC に貢献できることを誇りに思うに違いありません (You must be proud of being able to contribute to AOAC.)」。

4. 日本セクションの使命

第1期の執行役員は、会長として倉田浩、次期会長として荒木恵美子、庶務幹事として松田りえ子 (国立医薬品食品衛生研究所)、森田 裕 (チッソ)、阿部吉邦 (ゲンゼ産業)、後藤哲久 (食品総合研究所)、会計幹事として守山隆敏 (スリーエムヘルスケア)、吉田英治 (アヅマックス) の各氏、それに事務局長として筆者が選出された。また代議員としては5名を選出した。最初の頃は役員会といっても執行役員のみが出席するこぢんまりした会であったが、第2期になって代議員を10名に増やし、役員会もその代議員の多くの出席を得るなど、活動が本格化していった。

日本セクションは、当初、次のような使命を掲げていた。

- ①分析法バリデーションに関する国際的議論の場で、責任ある発言ができるような基盤を作る。
- ②行政の立場から公定法を決定するのではなく、個々の分析法自体の信頼性を如何にして確保するか、という技術的視点での活動をする。
- ③公平な技術評価の方法論についての議論の場を提供する。
- ④分析技術者の意識改革を促し、コラボスタディの実質的な責任者を目指す技術者を支援する。

これらの内容は、現在でも基本的には変わらない。具体的には、総会・シンポジウム(2013年以降は年次大会)、ワークショップやシンポジウム(iffa, JASISなど)、展示(iffa, 食品開発展, 食品微生物学会, 食品衛生学会など)、本部でのJapan Section Meeting, Asian Sections Meetingなどへの出席、ニュースレターの発行などを実施してきた。予想通り、というより予想以上に忙しい活動を続けてきた。この間、役員としてご尽力されてきた方々のご努力には本当に頭が下がる。その地道で献身的な活動によって、我が国におけるAOACの認知度は、10年前に比べて飛躍的に大きくなったと思う。同時に、これまでの勉強会の範疇から、バリデーションの実施、あるいはそのコンサルティングを要望する声も寄せられるようになってきている。日本セクションの中には、役員であるか否かを問わず、AOACに関する豊富な知識とバリデーションに関するノウハウを有する方が少なからずいる。そうした方々が専任スタッフあるいは専門家集団(Pool of experts)として活躍できるような仕組みをつくるのが、今まさに望まれているのだと思う。

日本セクションは、その準備段階の最初から「厚労省の支援を受けることは難しい」と宣告されたのにも関わらず、事務局の設置場所の相談、本部AOAC役員が来日した際の厚労省訪問、総会・シンポジウムでの厚労・農水・経産各省の方の招待講演など、何度となく「官主導体制」に向けた呼び水活動をしてきたが、なかなかその先へは進まなかった。日本セクションより遅れてセクションを設立した中国や台湾などの官主導体制を横目で見るにつけ、切歯扼腕の思いであった。現在の本部にならない、一気に民主導体制で行くことも選択肢の一つかも知れないのだが、我が国の社会的状況を考えれば、やはり官主導が先にあることが重要であろうと思う。微生物

物試験法に関して現在進められている標準法開発の動向はその証左と思う。

現在、国立医薬品食品衛生研究所、食品衛生管理部の五十君静信部長(日本セクションの前庶務幹事、現代議員)のご尽力で、厚生労働省科学研究費による微生物試験標準法の開発が進められている。その目的とするところは、我が国の微生物試験法を国際的に通用する内容にすることである。具体的には現在の国内法をAOAC法やISO法などとの比較、検証を経て標準法として公開している。それが今後の公定法に深く関わっていくものであるが故に、関連機関、企業などの関心は極めて高い。単なる科学研究であったら、なかなかこのように高い関心と呼ぶことは難しかったであろう。

AOACを学ぶことのゴールは、設立準備開始時に提起された問題点の中にも見受けられたが、バリデーションは絶対ではないことを理解すること、であると筆者も思う。ある段階までは確かに科学的議論が進むが、その後は、便宜的に決めざるを得ないことが多々ある。便宜的なので、監督する側やユーザー側の事情が変われば、それに伴って変わることもあり得る。国際的なルールとしてみるならば、そうした変更が、利害の対立を生み、厄介な国際問題にも発展しかねない。我が国の事情に適した内容への変更を、絶えず発信していくことは、国益を守るために極めて重要である。官主導にこだわる理由はそこにある。

しかし、無いものねだりをしている余裕はない。科学的に検討すべき課題は益々多様化している。そうした課題の解の一つでも多く、自ら発信していけるようにしたい。それが、国際的にイニシアチブを発揮する近道に違いない。そのような観点から、筆者の立場から見た今後の戦略課題として考えるべきキーワードは、サンプリングプランと標準物質、そして両者に密接に関わる統計学の妥当

性である。さらに、肝心のコロバスタディの実施システムとしても、従来型の試料を配布する方式ではなく、一か所に設置したマルチラボシステムで行うような新しい方式が可能なのではないか、と思われる。コロバスタディで検証すべき本来の問題を考える際に、条件を定めにくい試料の輸送中の問題などは、できれば避けたいと思うからである。日本セクションはこれまで、情報発信の要として大きな成果を挙げてきたが、今後は、その発信先を積極的に海外にも向けて欲しいと思う。上記の課題は国際的にも共通の重要課題であると思うし、別の切り口の重要課題は少なくない。そうした課題に対する見解や提言を発信し続けることは、官の支援もいらず、それでいて、我が国としての発言力が増すことにつながると思うからである。



まつおか・ひであき

東京農工大学 名誉教授

1972年4月、東京大学工学部原子力工学科卒業。1972～75年、富士電機製造株式会社。1981年3月、東京工業大学大学院総合理工学研究科博士課程修了、工学博士。1981～84年、東京工業大学資源化学研究所助手、1984～89年、東京農工大学工学部工業化学科助教授、1989～95年、東京農工大学工学部物質生物工学科教授、1995～2004年、東京農工大学工学部生命工学科教授、2004～2014年、東京農工大学大学院工学研究院教授、2014～2015年3月、同上 特任教授。2015年4月より現職。

論文

- 1) H. Ogawa, et al. (2015) Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. *Sci. Rep.*, 5, doi:10.1038/srep10061.
 - 2) H. Matsuoka, et al. (2014) 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, 479-483.
 - 3) H. Matsuoka, et al. (2013) Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. *J. Microbiol. Methods* 93, 49-51.
- ほか。

著書

- 1) 松岡英明, ほか: 微生物試験法におけるバリデーションの課題. 日本防菌防黴学会誌, 43 (8), 361-367 (2015)
 - 2) 五十君静信, ほか: 第1章4. 試験法の妥当性確認と性能試験. “食品衛生検査指針 微生物編2015”, 日本食品衛生協会, 39-48, (2015)
- ほか。

平成27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）
	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）

セレウリドはセレウス菌が食品内に産生するペプチドで嘔吐毒性があり、食中毒危害性を有する。平成26年度より、細菌毒素初の、試験法確立をセレウリドに対して試みている。セレウリドの検出定量には質量分析装置を用いるが、LC/MS/MSではすでに有効な測定法を確立した。LC/MSも低価格のため、セレウリド試験法の普及に貢献すると考えセレウリド試験法に適應できるか検討した。LC部分の、メタノールグラディエントを変更し、溶出されるセレウリドのリテンションタイムを適正化した。今後、マススペクトルの安定性を検討する。

添加回収実験において、セレウリドのパックライスからのメタノールによる抽出後、濃縮し、前処理カラムに添加するが、カラム添加時のメタノール濃度が一定でないことが想定されたので、濃縮後の水溶液量を定量し50%メタノール濃度を保つ、あるいは、濃縮し乾固後、メタノールで溶解、その後水を加えて50%メタノールとしてカラムに添加することが、安定な添加セレウリドの回収に寄与する試験結果が得られた。次年度は改良した濃縮法で、LC/MSおよびLC/MS/MSによる添加回収試験および妥当性評価を行う。

A. 研究目的

厚生労働省のセレウス菌食中毒は、我が国では年間10件程度の発生をしている。同食中毒の発生は統計が始まって以来連続して発生しているだけでなく、2010年には死者が報告されている^{1, 2)}。

世界的にみるとセレウス菌食中毒には2つの型がある^{3, 4)}。下痢を示すものと、嘔吐が主症状になっている型の2種類で、我が国では後者のみ発生すると認識されている。嘔吐型のセレウス菌食中毒は、同菌が産生する低分子ペプチドが、直接の原因物質になっている。同ペプチドはセレウリドと呼称される。セレウリドはセレウス菌が食品内で増殖する際に産生される。セレウリドには耐熱性という特徴がある。100℃のみならず、オートクレーブ処理においても失活しない。セレウリドの分子量は1,153で、上述したように、食品内で増殖したセレウス菌が合成、分泌する。食中毒が起こった際には、食品内のセレウリドを検出する必要がある。また、食品中のセレウス菌食中毒危害性を評価する場合も同様である。セレウリドの検出法には数種ある。毒性学的に最も適切なのは、その嘔吐毒性を検知することである。嘔吐は特殊な現象で、ヒトや霊長類では容易に観察されるものである。一方、検査・実験に用いやすい、ラットやマウスなど、普及している実験動物は嘔吐を示さない。例外は、スunksで、学名が *Suncus mirinum*、ジャコウネズ

ミの別名がある。残念なことにスunksは実験動物会社から購入するほど普及しておらず、試験法に用いるには不適切状態にある。

セレウリドがセレウス菌培養液から精製可能になったきっかけは、細胞を用いた検討により、HEp-2細胞に空胞を誘導する能力がセレウリドのあったことである。オートクレーブしたセレウリド食中毒事例分離セレウス菌培養液中に、空胞化誘導活性が特異的に見られる⁵⁾。セレウリド処理して誘導されたHEp-2細胞中の空胞を検出するには、高度な観察経験が必要で、HEp-2細胞を試験法に適応するのは難しい。セレウリドを分析するその他の方法として、質量分析装置を用いたものがある。イオン化したセレウリドを検出する方法であり、物質同定の手法としては、非常に優秀な方法だであるが、機器が高価であることと、標準物質が必ず必要なため、培養液から精製しているセレウリドでは、その適応を可能にできなかった。

セレウリドは、デプシ酸およびアミノ酸4種類が3回繰り返され、かつ、閉鎖した環状構造をとっている。このため、セレウリドは長く有機化学合成がされてこなかったが、最近、試薬企業から市販されるようになった。この状況から、本分担研究において、昨年度は、2社のセレウリドが標準物質として適応可能かどうか、LS/MS/MSを用いて検証し、その有用性を確認した。

バックライスを検査対象食品として構築した、セレウリド試験法の概要を図1に示す。LC/MS/MS 部分は別記する。本法で、添加回収実験を行った。その結果、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（平成 26 年度報告書）。原因を考察した結果、メタノールによる、バックライスからのセレウリドの抽出後の濃縮過程において、不均一な試験条件になっていることが想定された。すなわち、濃縮の程度が一定せず、また、濃縮物の溶解に用いる溶媒の状態が、セレウリドの回収に影響していることが考えられた。

物質を分離する方法として、LC があり、分画された物質をイオン化し、その質量を分析するのが LC/MS で、最近は、一度の質量分析後の物質を分解して発生するイオンをもう一度質量解析する LC/MS/MS が、高度物質同定法として一部に普及している。高額の機器のため、普及に限界がある。一方、質量分析能力は劣るが、安価のため、LC/MS は導入しやすい利点がある。

質量分析装置を用いてのセレウリド試験法の確立を目的として、本年度は、セレウリド抽出物を濃縮した分画の溶解方法、および、LC/MS を用いての添加回収実験を行った。

B. 研究方法

B-1. セレウリド、バックライス

セレウリドは、光純薬工業株式会社から購入した。バックライスは、炊飯済み室温保存の市販品を用いた。

B-2. バックライスへのセレウリド接種と抽出

平成 26 年度と同様に、バックライスを 25 g 秤量し、ホモジナイザーカップに移した。メタノール溶解セレウリド(125 ng/mL)を 1 mL、バックライスに数か所ドロップした。暗所で 60 分放置した。この添加により 5 ng セレウリド/g バックライスが形成される。

B-3. セレウリドの抽出

昨年度と同様に抽出操作を行った。セレウリド接種バックライスが 25 g 入ったホモジナイザーカップに、25 mL の蒸留水を加えた。ホモジナイザーで 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。その後ガラス繊維ろ紙（GFF、ワットマン）でろ過し、ろ過液を 250 mL の定容メスシリンダーに回収した。ろ過残留物に 50 mL のメタノールを加えた。薬餌で攪拌した後、5 分間静置しその後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、ろ液を回収しメタノールを加え、

全量を 250 mL とした。

B-3. セレウリドの濃縮

【試行 1】

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濃縮した。蒸発するメタノールを観察しておき、その蒸発が終了した時点で濃縮を停止した。残量を回収し、定量した。この分画は、初めに添加した水と、パックライスからくる水分の合算したものになる。定量した水と同量のメタノールを加え、メタノール濃度が 50% になるよう調整した。

【試行 2】

上記同様、抽出液 25 mL を 100 mL のなすフラスコにとり、ロータリーエバポレーターで、蒸発乾固させた。濃縮物に 1 mL のメタノールを加えて溶解し、別容器に回収した。その後、1 mL の水を加えた。

【試行 3】

上記同様に、25 mL の抽出液を濃縮乾固し、2 mL の 50%メタノールを加えて溶解した。

濃縮条件と LC/MS あるいは LC/MS/MS への適応状態を表 1 にまとめた。

B-4. HLB カラムによる前処理

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材料とした。

B-5 質量分析装置によるセレウリドの検出と定量

LC/MS によるセレウリドの定量を行った。HPLC は AQUITY UPLC (ウオーターズ社)、質量分析装置は Quatro Premier XE、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 (日本食品分析センター報告書)。

LC においては、メタノール濃度のグラディエントをかけている。平成 26 年度で採用したグラディエント条件を一部変更し、セレウリドの溶出率テンションタイムの検討を加えた。

LC/MS/MS によるセレウリドの定量を行った。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 LC/MS によるセレウリドの検出と定量

平成 26 年度に実施した LC/MS 分析において、セレウリドの溶出状態を解析したところ、LC の溶媒グラディエントが終了した後にセレウリドの溶出が見られていた (図 2-1 および 2-1)。

本条件においてのマススペクトルを図 2-3 および 2-4 に示した。セレウリドにおいては、溶媒のメタノールにみられない、 $m/z=1170$ の明瞭なシグナルが観察された。

LC におけるセレウリド溶出が一般的でないことを除き、適正にセレウリドが検出されたことから、LC/MS によるセレウリド添加回収実験を行った。この際の濃縮条件は、【試行 1】によった。

表 2 に示すように、【試行 1】の濃縮条件および LC/MS の使用においては、回収率 81.2 から 90% を示した。本成績を基に、その妥当性を検証した。結果を表 3 に示す。回収率、真度、平行および室内精度を計算したところ、いずれも目標値内の値を示した。

C-2 LC/MS における LC 条件の最適化

LC においては、溶媒グラディエント中に、目的分子を溶出し検出するのが一般的であるので、グラディエント条件を検

討した。図 2-3 に変更したグラディエント条件を示す。図の下部には溶出され、検出されたセレウリドのピークを示す。一回の測定にかかわる時間は 5 分程度延長したが、セレウリドは変更したグラディエント条件内に検出された。

セレウリドが溶出されたリテンションタイム 11 分におけるマススペクトルを図 4-1 および 4-2 に示す。溶媒のメタノールを注入した際のマススペクトルでは、アンモニウムイオン付加状態のセレウリドの $m/z=1170$ 付近に物質は検出されなかった。一方、セレウリド注入時には、 $m/z=1171$ のイオンシグナルが観察された。

C-3. LC/MS におけるセレウリドの検量線

検討した新しいグラディエント条件で、セレウリドの検量線を LC/MS で作製した (図 4-5)。1.0 から 10 ng/ml の範囲で、 $R^2=0.996$ の直線性を示した。

D. 考察

合成セレウリドが市販され、標準物として供給されることとなった。セレウリドには各種の試験法があるが、もっとも安定的な方法は質量分析装置を用いてのものであったが、これまでセレウリド標準品がなく、応用に限界があった。標準品が入手でき、質量分析装置におけるセレウリド試験法の確立が可能となった。平成 26 年度の検討から、以下の 2 点が、

試験法を確立する上での問題点として認識された。

1：LC/MS と LC/MS/MS の 2 試験法について

2つの手法があるのは、試験法を広めるのにあたって有利となる。LC/MS/MS における物質同定の有用性は非常に高いものの、機器が高額である点には普及に限定が想像される。一方、物質同定力は劣るものの、機器の価格としては普及しやすいのが LC/MS で、本分担研究では、両方の機器を用いて、試験法普及に役立てようと考えた。

2：添加回収実験における回収率について

平成 26 年度に、LC/MS/MS を用いて、図 1 のフローチャートに従って添加回収実験をおこなったところ、40%から 80%と回収率が低かった。図 1 に示したフローチャートの各ステップを検討した際、セレウリド抽出物を濃縮し、その後溶解させる際に、不均一になる傾向が観察された。

上記の問題設定において、1 においては、LC/MS におけるセレウリド試験法確立のための条件を検討した。昨年度に用いた LC におけるグラディエント条件では、セレウリドの溶出リテンションタイムが、グラディエント終了後であったので、グラディエント条件を変更した。その結果、溶出リテンションタイムがグラディエント内にあり、LC として、条件の改善をす

ることができた。LC/MS は、物質同定には LC/MS/MS に劣るものの、汎用性・普及性はあるため、セレウリドの試験法への応用に、今後も検討を続ける価値があると判断された。

前処理用である HBL カラムは、50%のメタノールで平衡化されている。このため、カラムに付加する検体、すなわち、ロータリーエバポレーター濃縮物の溶解液中のメタノールが、50%濃度になっている状態が、もっとも有効なカラム性能、すなわち、カラムへのセレウリドの吸着が期待される。平成 26 年度の検討では、濃縮物を溶解した際のメタノール濃度が、50%を維持しているがどうか疑問が生じていた。これを検証するため、これまでの方法を改良し、水分を含んだ層をまず回収し、それに 50%になるようにメタノールを加える方法を試行 1、濃縮物を乾固させ、メタノールで乾固物を溶解させ、そののち水を添加し 50%メタノールとする方法を試行 2、さらに、同乾固物を 50%メタノールで溶解させる方法を試行 3 として、それぞれの回収率を検討した。その結果、試行 1 および 2 は良好な回収率を示したのに対し、50%メタノールで、セレウリドを含んだ乾固物を溶解させた場合、非常に低い回収率を呈した。本検討から、HBL カラムに添加する検体は、50%メタノール濃度であることが必須であることと、濃縮物中のセレウリドを溶解するには、濃度の高いメタノールが必

須で、その後カラムへの添加のための条件を整えばよいことが明らかになった。

我が国に普及する微生物試験の標準法に、細菌毒素を対象としたものはなく、セレウリドがその初めての試みとなる。平成 26 および 27 年度の検討から、セレウリド抽出物を濃縮後、前処理カラムへの添加のための検体調整法を検討することが、試験法確立の条件と推察された。また、LC/MS/MS だけでなく、LC/MS による試験法の策定も、今後検討する価値があると判断され、次年度において、その確立を目指す。

E. 参考文献

- 3) 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.
- 5) Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, 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.
- 2) Shiota M, Saitou K, Mizumoto H, Matsusaka M, Agata N, Nakayama M,

Kage M, Tatsumi S, Okamoto A, Yamaguchi S, Ohta M, Hata D. Rapid detoxification of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. Pediatrics. 125:e951-5. 2010

- 1) 厚生労働省 食中毒統計
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisaku_nitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html

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

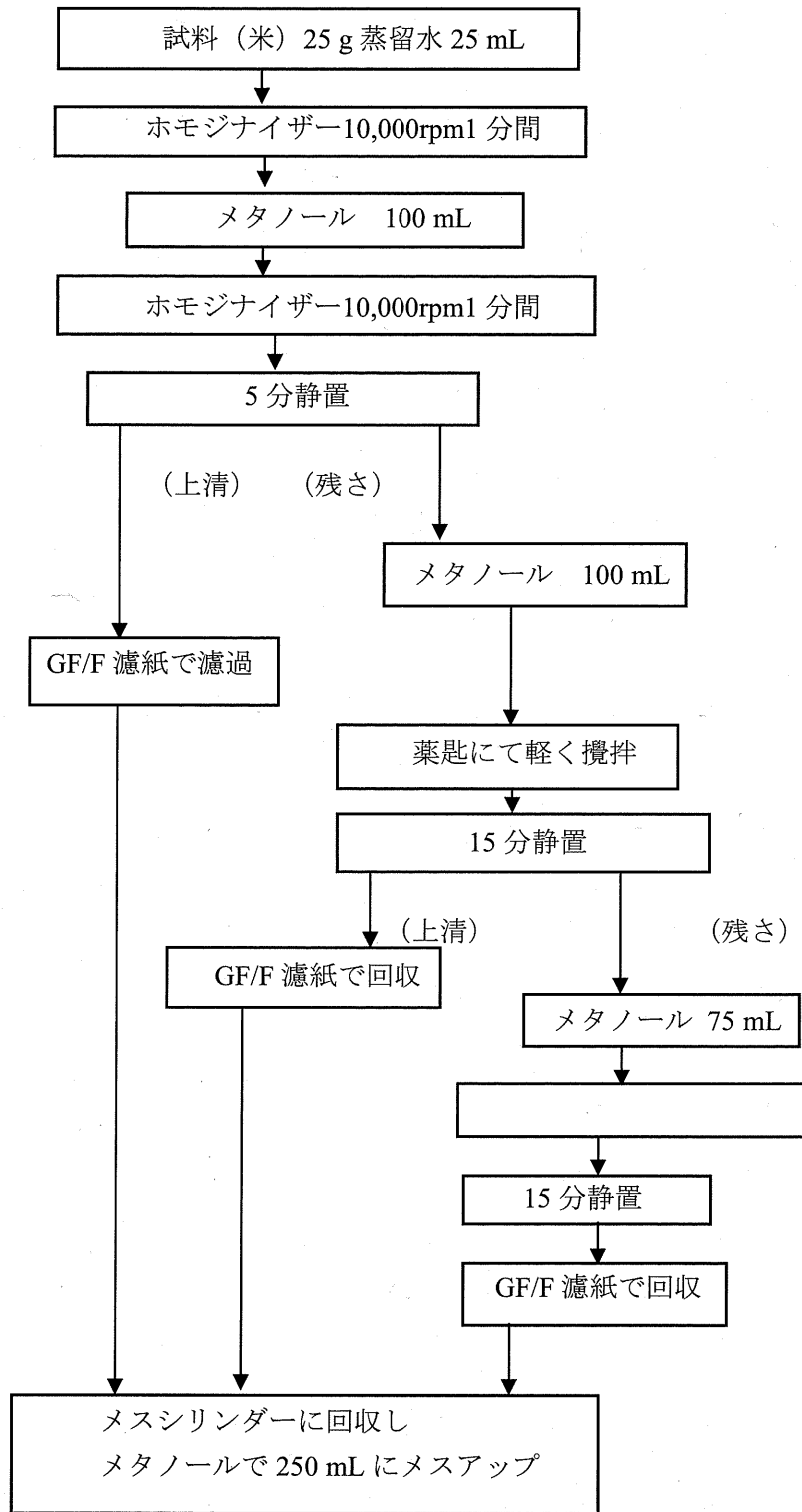
なし。

3. その他

なし。

図1 フローチャート

1: 抽出



薬匙にて軽く攪拌

2: 濃縮、前処理カラムによる試料のクリーンアップ LC/MS および LC/MS/MS

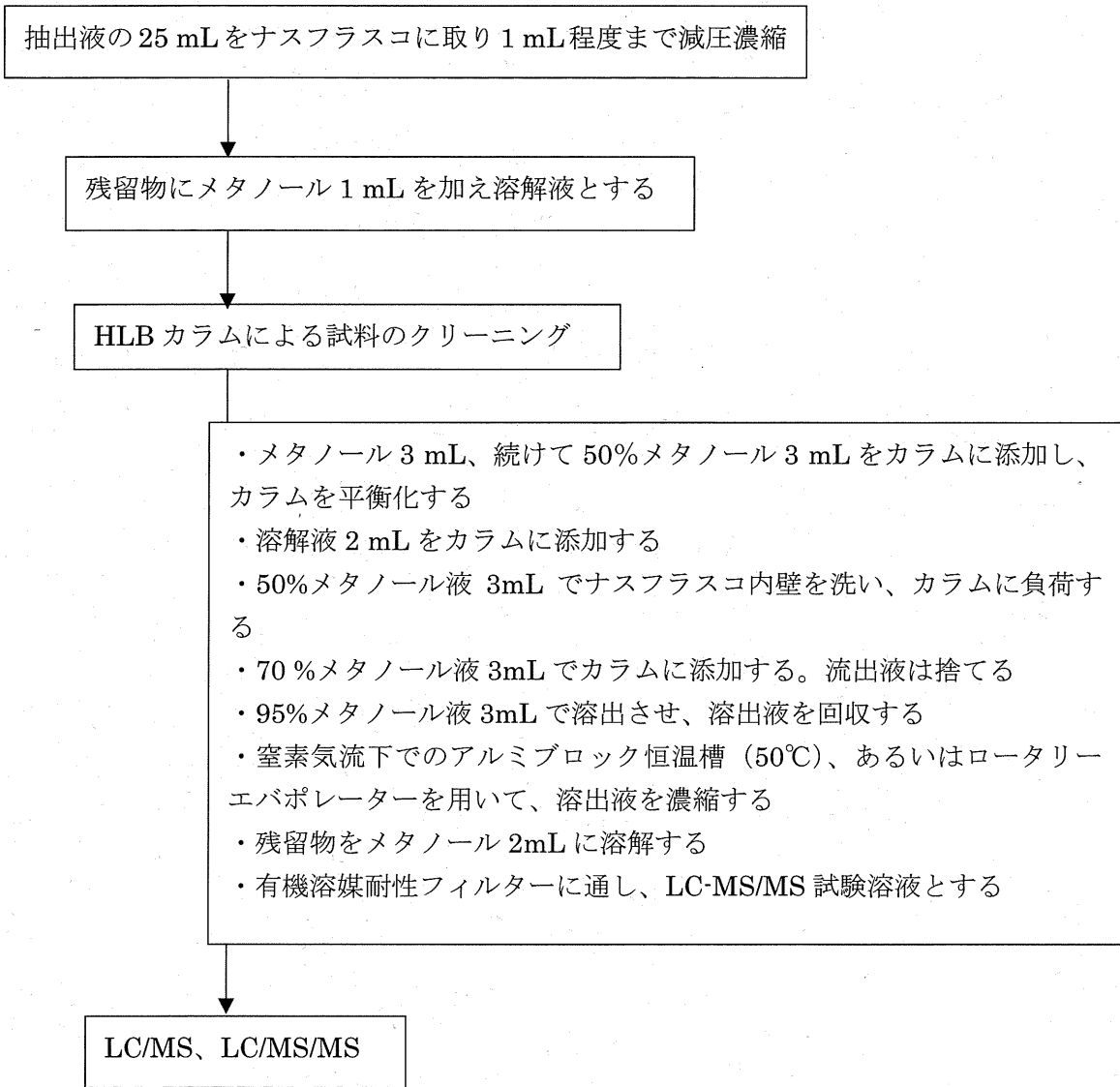


図 2-1 グラジエント

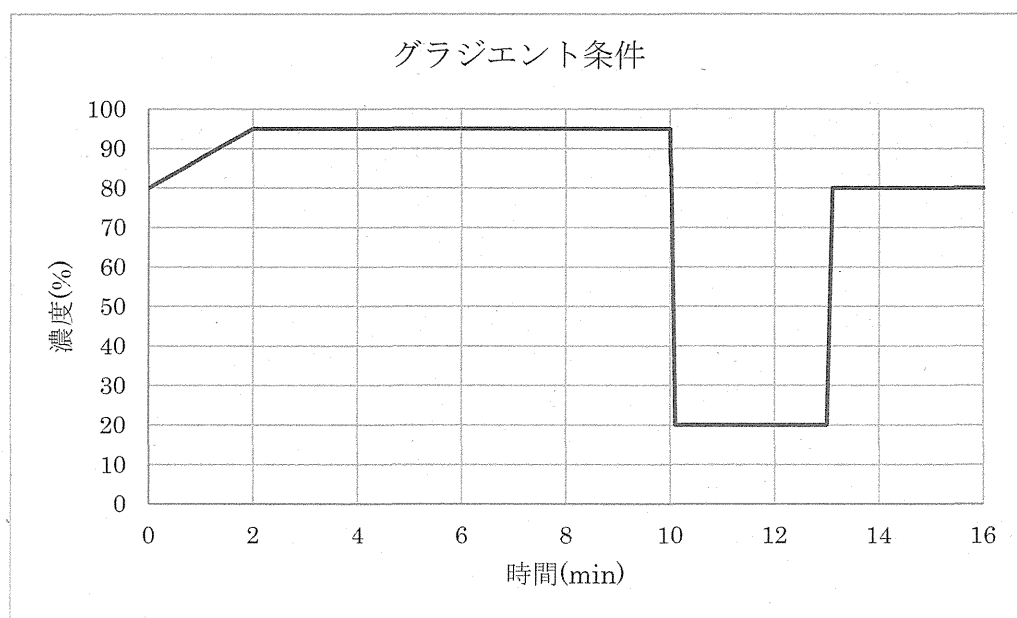


図 2-2 クロマトグラム

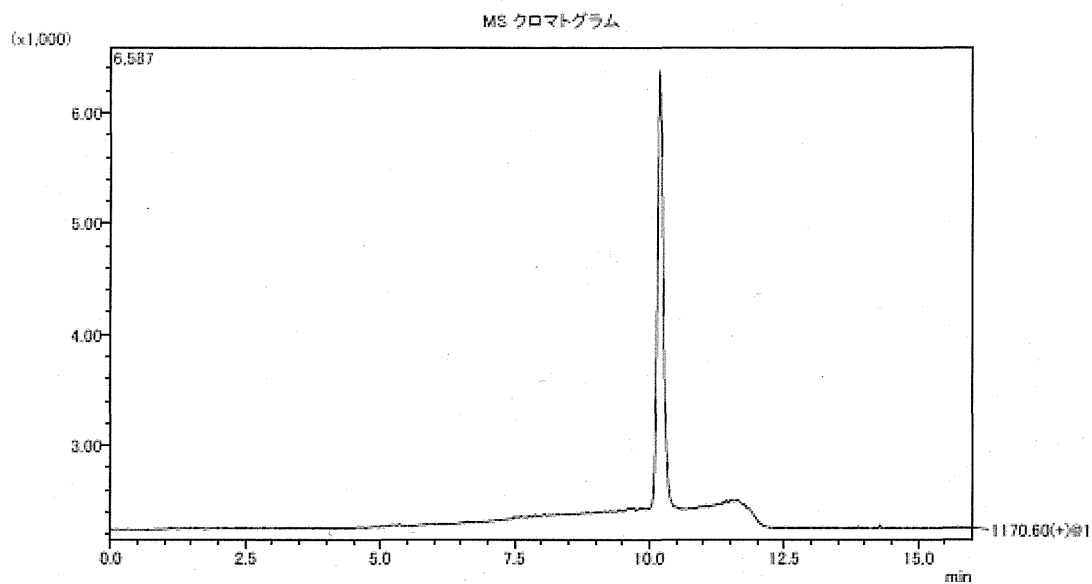


図 2-3 MS スペクトル (メタノール)

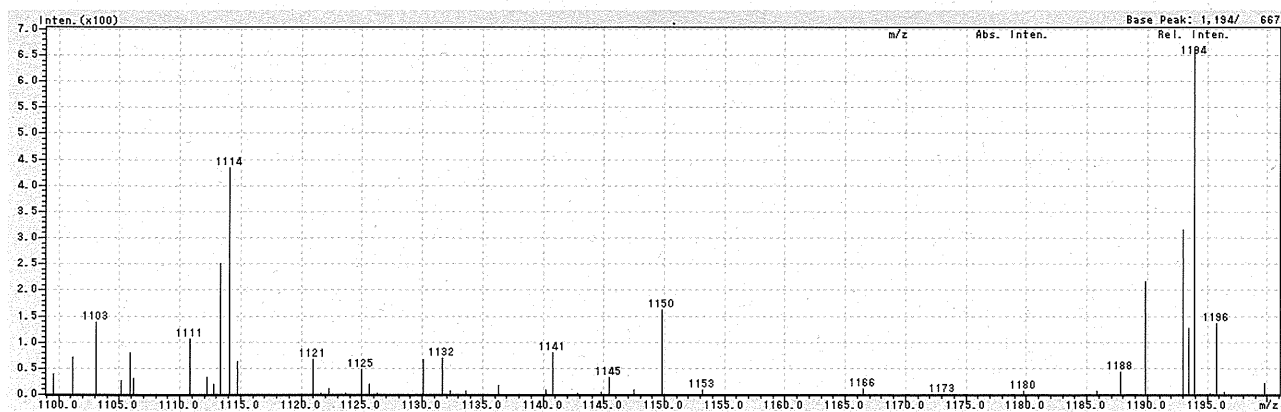


図 2-4 MS スペクトル (標準セレウリド)

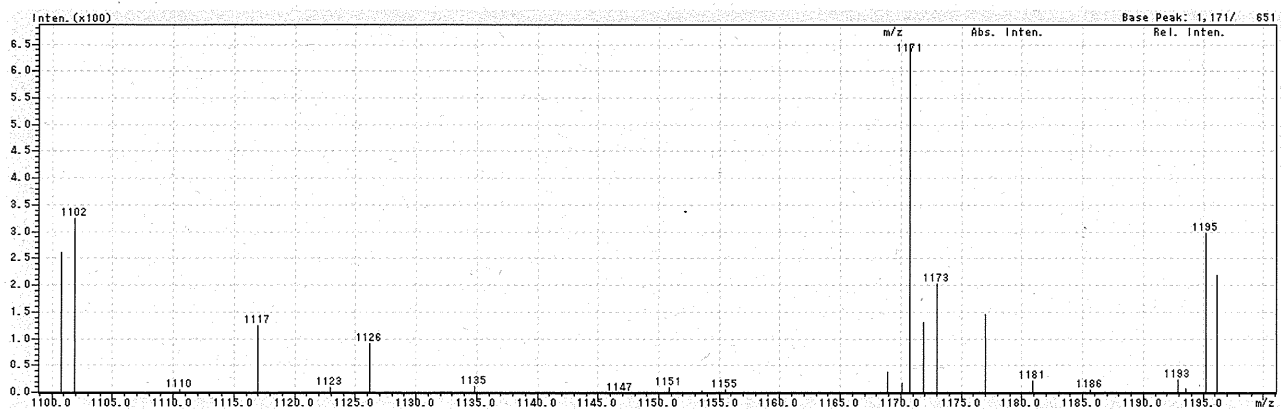


図3 LC/MSにおけるグラジエント条件の検討 変更後

移動相 B (有機溶媒系: メタノール)

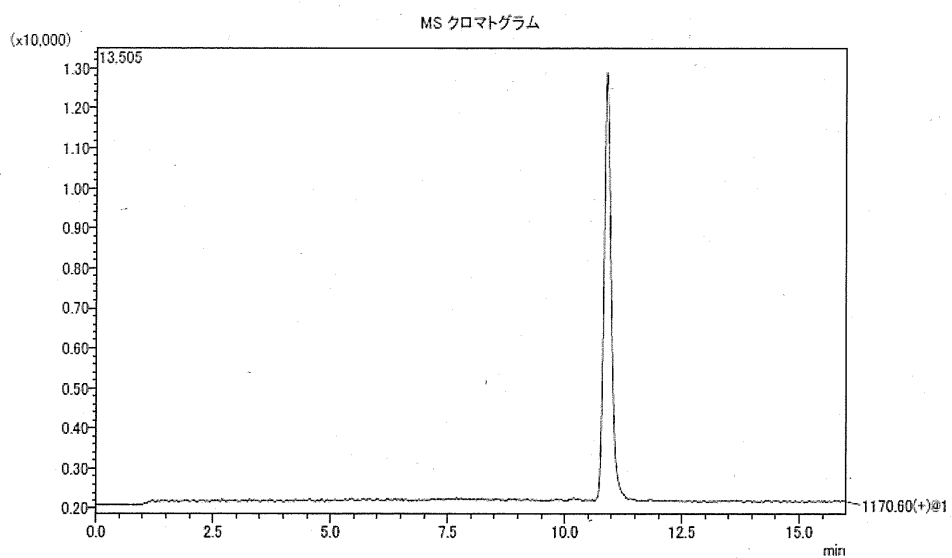
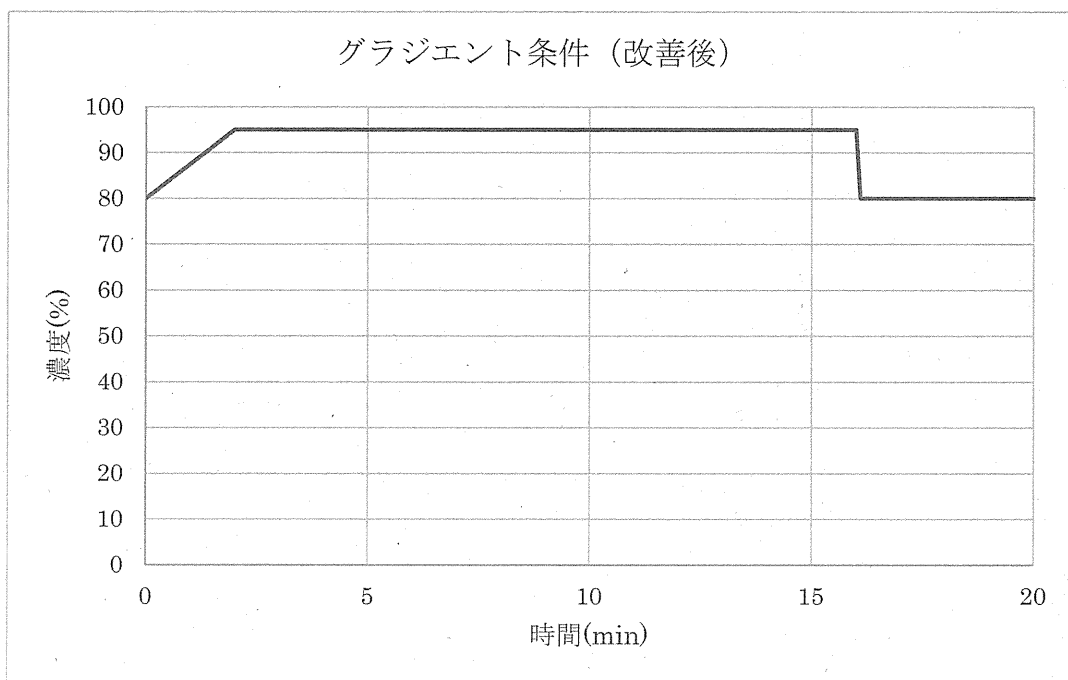
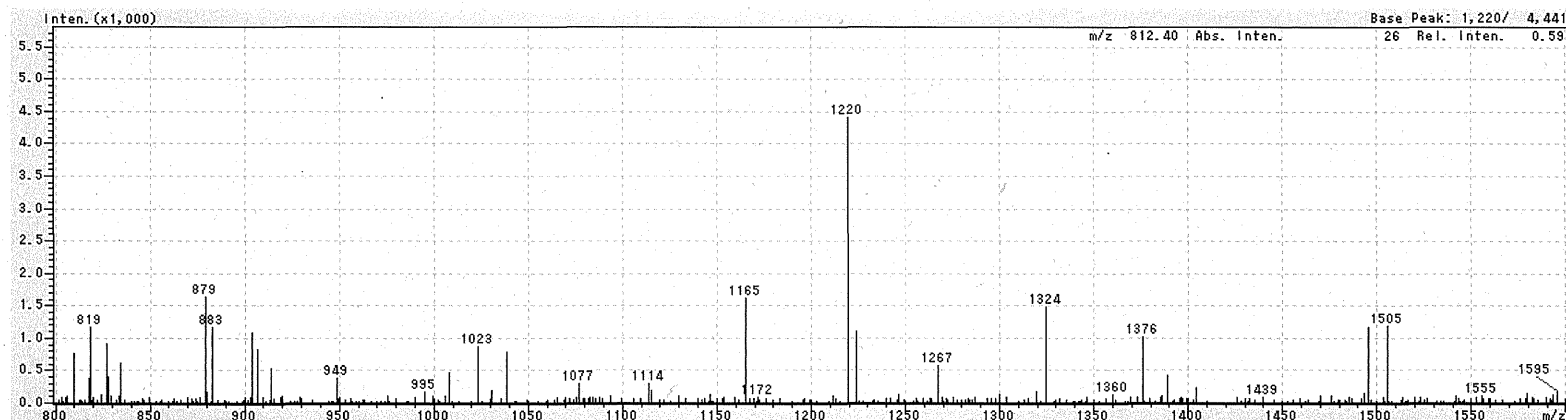
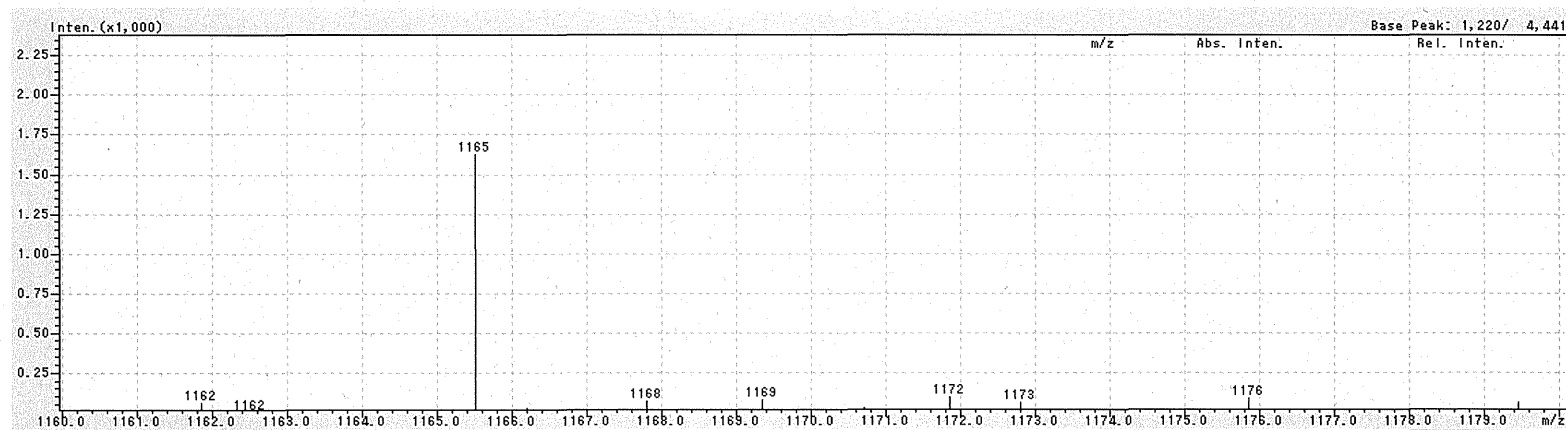


図 4-1 リテンションタイムにおけるマススペクトル (メタノール溶液注入時、 m/z 800~1600 の範囲でスキャン)



リテンションタイム 11 分におけるマススペクトル



リテンションタイム 11 分におけるマススペクトル (拡大)

図 4-2 リテンションタイムにおけるマススペクトル (セレウリド標準溶液注入時、 m/z 800~1600 の範囲でスキャン)