

食品中の微生物試験法及びその妥当性評価に関する研究

分担研究報告書

セレウス菌標準試験法に関する研究

研究分担者 荻原 博和 日本大学 生物資源科学部
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所
五十君静信 東京農業大学 応用生物科学部
研究協力者 鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所
斎藤 瞳 日本大学 生物資源科学部
大坪 愛実 日本大学 生物資源科学部

研究要旨:セレウス菌 (*Bacillus cereus*) は環境に広く分布するグラム陽性の芽胞形成菌で、食品を媒介とする病原細菌である。食中毒の発生件数は、年間数件から十数件程度の発生頻度で、発生数や患者数は他の食中毒菌と比較して少なく散発的である。セレウス菌食中毒は嘔吐型が大半を占め、下痢型は少ない。原因食品としては穀類や複合調理食品によるものが大部分を占め、特に米飯、炒飯、スパゲティによるものが多くを占めている。わが国において代表的な *B. cereus* の試験法としては、食品衛生検査指針が利用されているが、これらの試験法は国際的に評価されていない。そのため ISO (International Organization for Standardization) が制定する試験法や FDA (Food and Drug Administration) 法などと調和や整合性がとれていない可能性が指摘されている。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」においてセレウス菌標準試験法の検討が行われている。

本研究では、国際的に用いられているセレウス菌の試験法を比較検討し、国内での標準試験法を定めるにあたって必要となる事項について継続して検討を行ってきた。その結果、*B. cereus* の標準試験法として ISO が定める国際規格の方法について継続して検討を行い、国内での標準試験法の策定のための検討を行った。特にセレウス菌標準試験法による選択培地の問題については、ISO 法の推奨される MYP 寒天培地と国産の NGKG 寒天培地および X-BC 寒天培地についてデータの構築を行い、その検出能の総合的な評価を行った。

A. 研究目的

現在、わが国ではセレウス菌の検出法は国際的な ISO 法や FDA 法との調和が十分取れていない状況が存在している。これらの現状を解決するために「食品からの微生物標準試験法検討委員会」においてセレウス菌標準試験法の検討を行うこととなった。そこで国際法として実績のある ISO 法を基本としたセレウス菌試験法を確立することを目的に検討が行われている。特に試験法については ISO (7932)、ISO(21871)、FDA (BAM ; Bacteriological Analytical Manual) , 食品衛生検査指針等があり、それぞれの特徴と用途により採用されている。現在日本においては国際法に準ずる方法はなく、国内法では食品衛生検査指針が用いられている。

本研究では、国際的整合性のあるセレウス菌標準試験法について ISO 法を参考に検討を続けている。前年度は各試験法の比較検討を行い、最適と思われるフローチャーを作成した。特にセレウス菌の検出に重要な選択培地等についても *B. cereus* 標準菌株を用いて性能評価を行った。本年度は作成されたセレウス菌標準試験法について、実際の食品に *B. cereus* を接種した検体を用いて検出能の評価を行った。

B. 研究方法

(1)セレウス菌試験法プロトコールの作成

前年度に引き続き ISO 7932:2004 の試験法を参考にプロトコールを作成し、食品からの微生物標準試験法検討委員会に提案して意見やアドバイスを取り入れながら検討

を行った。

(2)セレウス菌標準試験法の評価検討

セレウス菌試験法のプロトコールを参考に作成された標準試験法について、*B. cereus* を接種した食品を用いてこれらの標準試験法における評価を行った。

供試食品は市販のマッシュポテトと炒飯を用い、供試菌株は *B. cereus* ATCC 10876 と *B. cereus* ATCC 33019 を用いた。

B. cereus 芽胞懸濁液の調製は、TSB 培地にて 2 代継代培養した後に、芽胞形成培地に塗抹して 30°C で 10 日間培養した。培地に発育した集落をかきとり滅菌精製水に懸濁した。懸濁液は遠心分離を行い、上澄みを除去した後、再び同様の操作を行った。これらの懸濁液は 70°C で 40 分間加熱処理を行い *B. cereus* 芽胞懸濁液を調製した。芽胞懸濁液は適宜希釈を行って食品中の接種菌量が検出される低濃度菌量として 50~100 CFU/g と高濃度菌量として 500~1000 CFU/g になるように食品に接種した。

検討するセレウス菌の選択培地は ISO 推奨培地の MYP 寒天培地 (MERCK) と国産の NGKG 寒天培地 (NISSUI) と X-BC 寒天培地 (NISSUI) を用いた。

予備実験として 2 種類の食品 (マッシュポテトと炒飯) に 2 種類の *B. cereus* ATCC 10876 と *B. cereus* ATCC 33019 を低濃度菌量 (50~100CFU/g) と高濃度菌量 (500~1000CFU/g) が検出されるように各食品に接種して調製した。この食品検体を用いて試験を 2 回行った。

本実験としては食品を炒飯と *B. cereus* ATCC 33019 に絞り、予備実験と同様に調製

された食品検体を使用して、試験数を8回行った。

すなわち検出については、*B.cereus* 接種食品検体 25g を無菌的に採取し、225mL の BPW を入れ、1 分間のストマッキング処理を行った。

低濃度菌量 (50~100 CFU/g) の接種食品からの検出では、ストマッキング処理された 10 倍懸濁液の 1mL を 3 枚の各選択培地に 300 μ L, 300 μ L, 400 μ L を接種し、これらを 2 組 (複式) 行った。さらに高濃度菌量 (500~1000 CFU/g) の接種食品からの検出では、10 倍懸濁液の 0.1mL を 2 枚の各選択培地に 100 μ L を接種 (複式) した。選択培地は、予備実験と本実験とも MYP 寒天培地では 30 $^{\circ}$ C、NGKG 寒天培地・X-BC 寒天培地では 37 $^{\circ}$ C で培養を行い、発育した定型的な集落を計測した。これらの結果から検出能評価を行った。

(3) セレウス菌試験法・集落計数法の作成

食品からのセレウス菌を検出するための標準試験法を作成するにあたり ISO7932 : 2004 の *B.cereus* 検出法を参考にして、試験法の定義、試験方法の概要、使用器具、装置、培地、試薬、選択培地、試験手順、試料の調製、塗抹および培養、集落の計測、確認試験、菌数の算定等について試験法を作成した。

C. 結果及び考察

(1) セレウス菌標準試験法プロトコールの作成

ISO ISO (7932)、ISO(21871)、FDA 法、食品衛生検査指針等の試験法を比較検討し

た。前年度検討委員会から得た助言やアドバイスを参考にセレウス菌標準法のプロトコールを作成した。これらは図 1 に示した。食品中の *B.cereus* を検出するための集落計数法は、平板法では検出限度である 1mL を 3 枚の選択培地に塗抹して菌数を計測することから、食品中 10 個/g 以上から検出が可能である。さらに選択培地から検出された定型集落数を計測し、その 5 菌株を純粋培養し、これらの菌株の溶血反応を利用して陽性であればセレウス菌陽性としてとして算出法に準じて菌数を算出する方法である。

なお、*B. thuringiensis* との判別は Parasporal crystals (芽胞周辺にある結晶；クリスタルトキシン)を確認して判定する。

(2) セレウス菌標準試験法の評価検討

① 予備実験

食品のマッシュポテトと炒飯に *B.cereus* ATCC 10876 と *B.cereus* ATCC 33019 をそれぞれ接種して各選択培地より検出を行った結果を表 1~4 に示した。

マッシュポテトに *B.cereus* ATCC 10876 を接種して検出を試みたところ、低濃度菌量では 35~85 CFU/g、高菌濃度量では 500~750 CFU/g の範囲で検出され、設定された菌量の範囲で検出された (表 1)。

同様に炒飯に *B.cereus* ATCC 10876 を接種して検出を行ったところ、低菌濃度菌量では 55~95 CFU/g、高菌濃度菌量では 300~1000 CFU/g の範囲で検出された (表 2)。

次に菌株を *B.cereus* ATCC 33019 に変更してマッシュポテトに接種して検出を行ったところ、低濃度菌量では 60~100 CFU/g、高濃度菌量では 450~1050 CFU/g の範囲で

検出された (表 3)。

同様に *B.cereus* ATCC 33019 を炒飯に接種して検出を行ったところ、低濃度菌量では 60~110 CFU/g、高濃度菌量では 800~1050 CFU/g の範囲で検出された (表 4)。

以上、食品から *B.cereus* の検出を試みた結果、検出された菌数には食品の違いや *B.cereus* 菌株による著しい相違は認められなかった。さらに MYP 寒天培地、NGKG 寒天培地、X-BC 寒天培地間についても顕著な差は見られなかった。

②本実験

本実験では予備実験の結果を踏まえて *B.cereus* ATCC 33019 を、食品では炒飯を選択した。予備実験と同様に低濃度菌量及び高濃度菌量となるように接種した炒飯を用いて MYP 寒天培地での検討を行った。試験数は 8 回行った結果を表 5 に示した。低濃度菌量では 60~130 CFU/g、高濃度菌量では 550~1100 CFU/g の範囲で検出された。次に、国内で入手できる NGKG 寒天培地について同様に検出を行った結果を表 6 に示した。低濃度菌量では 65~115 CFU/g、高濃度菌量では 600~1050 CFU/g の範囲で検出された。さらに X-BC 寒天培地での結果を表 7 に示した。低濃度菌量では 50~105 CFU/g、高濃度菌量では 350~1350 CFU/g の範囲で検出され、ややばらつきが認められた。

これらの供試 3 選択培地の結果を表 8 に示した。低濃度菌量接種による *B.cereus* の平均検出菌数は、MYP 寒天培地で 1.90 ± 0.10 CFU/g、NGKG 寒天培地で 1.91 ± 0.08 CFU/g、X-BC 寒天培地で 1.87 ± 0.11 CFU/g であった。高濃度菌量接種による *B.cereus*

の検出では、MYP 寒天培地で 2.93 ± 0.10 CFU/g、NGKG 寒天培地で 2.87 ± 0.09 CFU/g、X-BC 寒天培地で 2.86 ± 0.19 CFU/g であった。

次に、検出菌数のデータを ANOVA 並びに多重比較検定を用いた統計処理を行った結果を表 9 に示した。さらに低濃度菌量試験の結果を図 2 に、高濃度菌量試験結果を図 3 に示した。

以上の結果、食品に接種された *B.cereus* の低濃度菌量及び高濃度菌量の検出結果からは、ISO 法で使用される MYP 寒天培地と比較して、いずれの選択培地でも危険率 5% 基準で有意差が認められなかった。

したがって、今回検討した NGKG 寒天培地と X-BC 寒天培地は ISO 推奨の MYP 寒天培地と検出能には顕著な差が認められず代替培地としても有効と判断された。

(3) セレウス菌試験法・集落計数法

セレウス菌標準試験法を策定するために ISO7932 : 2004 を参考に、日本での重要な事情や要件について試験法検討委員会で議論しながら標準試験法の作成を行った。セレウス菌 (*B.cereus*) の定義、試験方法の概要、使用器具、装置、培地、試薬、選択培地、試験手順、試料の調製、塗抹および培養、集落の計測、確認試験、菌数の算定等について日本での使用を考慮して作成した。

(資料：セレウス菌標準試験法・集落計数法 NIHSJ-28-ST-4 を添付した)。

まとめ

(1)セレウス菌検出のためのプロトコールを作成した。

(2)セレウス菌標準試験法の評価

セレウス菌標準試験法の検討を行ったところ、低濃度菌量と高濃度菌量の *B.cereus* を接種した食品から検出を試みた結果、予備実験に関して *B.cereus* の検出には問題がみられなかった。さらに本実験では試験数を 8 に増やして検討したところ、予備実験と同様、本実験でも良好な検出結果が得られた。さらに ISO 推奨の MYP 培地と国産の NGKG 培地及び X-BC 培地を比較検討した結果、いずれの選択培地を用いても検出菌数の平均値や統計的な観点からも遜色ない検出性能を有しているものと思われた。

(3)セレウス菌標準試験法・集落計数法（定量法：集落計数法）NIHSJ-28-ST-4（案）を作成した。

D. 結論

国際的に互換性のある食品からのセレウス菌標準試験法として ISO 法の *B.cereus* 検出法を参考にした標準試験法(案)を作成した。セレウス菌標準試験法について作成されたプロトコールと試験法の評価を行った。その結果、概ね ISO を参考にした標準試験法には問題は見られなかった。さらに MYP 寒天培地と国産の NGKG 寒天培地と X-BC 寒天培地を検討した結果、これらの選択培地間に有意差は認められず、MYP 寒天培地の代替培地として NGKG 寒天培地と X-BC 寒天培地も有効に利用できるものと考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

日本食品衛生学会第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会

期日：平成 28 年 10 月 27 日～28 日

会場：函館国際ホテル（北海道函館市）

題目：*Bacillus cereus* の選択培地における比較検討（ポスター発表）

発表者：○荻原博和¹⁾、上村真理子¹⁾、吉川夏未¹⁾、岡田由美子²⁾

¹⁾日本大学生物資源科学部、

²⁾国立医薬品食品衛生研究所

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 セレウス菌標準試験法・集落計数法 NIHSJ-28
フローチャート

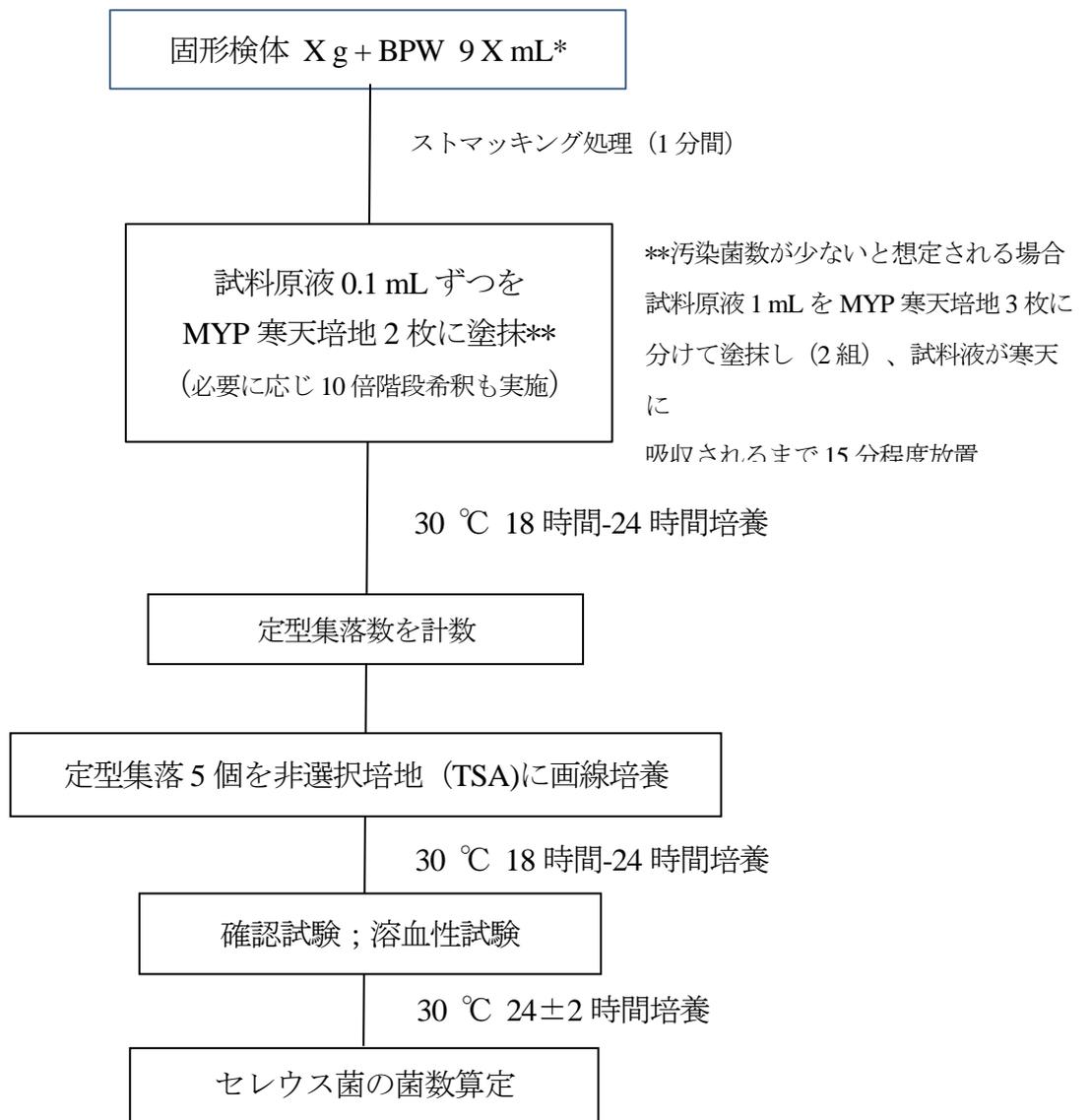


表1 *B. cereus* ATCC 10876 を接種したマッシュポテトからの検出結果

供試培地	試験 No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
			平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
MYP	1	1	4 ^a	35 ^b	8 ^c	750 ^d
		2	3		7	
寒天培地	2	1	3	40	4	550
		2	5		7	
NGKG	1	1	8	85	6	550
		2	9		5	
寒天培地	2	1	6	45	5	600
		2	3		7	
X-BC	1	1	7	45	9	750
		2	2		6	
寒天培地	2	1	6	50	2	500
		2	4		8	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表2 *B. cereus* ATCC 10876を接種した炒飯からの検出結果

供試培地	試験 No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
			平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
MYP	1	1	7 ^a	65 ^b	3 ^c	350 ^d
		2	6		4	
寒天培地	2	1	8	60	5	400
		2	4		3	
NGKG	1	1	8	80	7	600
		2	8		5	
寒天培地	2	1	8	70	8	550
		2	6		3	
X-BC	1	1	7	55	9	1000
		2	4		11	
寒天培地	2	1	10	95	3	300
		2	9		3	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表3 *B. cereus* ATCC 33019 を接種したマッシュポテトからの検出結果

供試培地	試験 No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
			平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
MYP	1	1	4 ^a	65 ^b	5 ^c	450 ^d
		2	9		4	
寒天培地	2	1	8	80	7	800
		2	8		9	
NGKG	1	1	11	95	9	1050
		2	8		12	
寒天培地	2	1	8	65	10	950
		2	5		9	
X-BC	1	1	6	60	6	500
		2	6		4	
寒天培地	2	1	11	100	5	450
		2	9		4	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表4 *B. cereus* ATCC 33019を接種した炒飯からの検出結果

供試培地	試験 No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
			平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
MYP	1	1	9 ^a	70 ^b	9 ^c	800 ^d
		2	5		7	
寒天培地	2	1	11	110	9	800
		2	11		7	
NGKG	1	1	9	90	10	1050
		2	9		11	
寒天培地	2	1	6	60	9	1000
		2	6		11	
X-BC	1	1	7	85	9	850
		2	10		8	
寒天培地	2	1	6	50	8	900
		2	4		10	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表5 *B. cereus* ATCC 33019を接種した炒飯からMYP寒天培地を用いて検出された菌数結果

試験No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
		平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
1	1	9 ^a	85 ^b	11 ^c	1000 ^d
	2	8		9	
2	1	9	75	5	900
	2	6		13	
3	1	7	65	14	1000
	2	6		6	
4	1	7	85	8	650
	2	10		5	
5	1	7	70	6	850
	2	7		11	
6	1	7	60	10	950
	2	5		9	
7	1	7	90	5	550
	2	11		6	
8	1	11	130	8	1100
	2	15		14	
Blank(1)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(2)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(3)	1	0		0	
	2	0		0	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表6 *B.cereus* ATCC 33019を接種した炒飯からNGKG寒天培地を用いて検出された菌数結果

試験No.	平板 複式.	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
		平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
1	1	10 ^a	115 ^b	5 ^c	650 ^d
	2	13		8	
2	1	8	85	7	750
	2	9		8	
3	1	6	65	9	700
	2	7		5	
4	1	8	70	6	650
	2	6		7	
5	1	8	70	6	650
	2	6		7	
6	1	11	95	6	600
	2	8		6	
7	1	9	70	12	1050
	2	5		9	
8	1	10	85	9	950
	2	7		10	
Blank(1)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(2)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(3)	1	0		0	
	2	0		0	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表7 *B. cereus* ATCC 33019を接種した炒飯からX-BC寒天培地を用いて検出された菌数結果

試験No.	平板 複式.	低菌量(1000 μ L)		高菌量(100 μ L)	
		平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
1	1	12 ^a	80 ^b	11 ^c	750 ^d
	2	4		4	
2	1	7	85	14	1350
	2	10		13	
3	1	7	70	6	500
	2	7		4	
4	1	10	85	8	600
	2	7		4	
5	1	5	55	3	350
	2	6		4	
6	1	5	50	8	750
	2	5		7	
7	1	7	80	3	750
	2	9		12	
8	1	10	105	13	1250
	2	11		12	
Blank(1)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(2)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(3)	1	0		0	
	2	0		0	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表8 MYP寒天培地、NGKG寒天培地、X-BC寒天培地において検出された*B.cereus*の対数値

低濃度 菌量	対数 CFU/g			高濃度 菌量	対数 CFU/g		
	MYP寒天 培地	NGKG寒天 培地	X-BC寒天 培地		MYP寒天 培地	NGKG寒天 培地	X-BC寒天 培地
L1	1.929	2.061	1.903	H1	3.000	2.813	2.875
L2	1.875	1.929	1.929	H2	2.954	2.875	3.130
L3	1.813	1.813	1.845	H3	3.000	2.845	2.699
L4	1.929	1.845	1.929	H4	2.813	2.813	2.778
L5	1.845	1.845	1.740	H5	2.929	2.813	2.544
L6	1.778	1.978	1.699	H6	2.978	2.778	2.875
L7	1.954	1.845	1.903	H7	2.740	3.021	2.875
L8	2.114	1.929	2.021	H8	3.041	2.978	3.097
Ave.	1.90	1.91	1.87	Ave.	2.93	2.87	2.86
S.D.	0.10	0.08	0.11	S.D.	0.10	0.09	0.19

表9 *B.cereus* 選択培地における検出菌数の統計処理値の比較

菌数対数値	パラメトリック p 値	MYP寒天培地 vs NGKG寒天培地	MYP寒天培地 vs X-BC寒天培地
低濃度菌量・対数値	0.6200	p > 0.05	p > 0.05
高濃度菌量・対数値	0.4601	p > 0.05	p > 0.05

パラメトリック：Repeated Measure ANOVA

多重比較：Dunnnett Multiple Comparisons Test

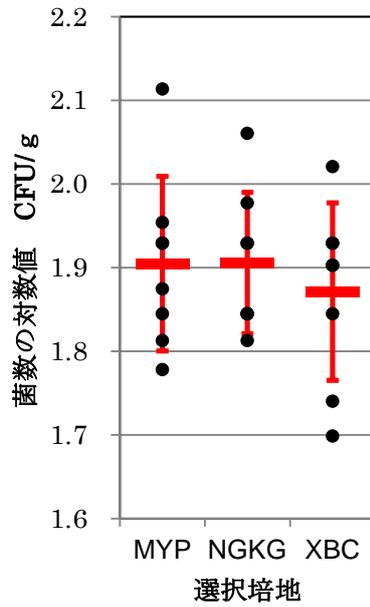


図2 低濃度菌量における MYP 寒天培地、NGKG 寒天培地、X-BC 寒天培地の対数値分布

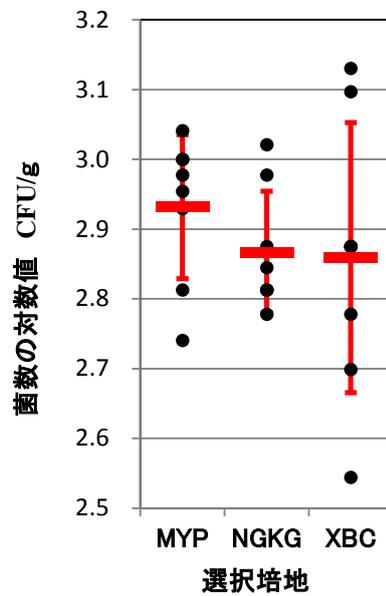


図3 高濃度菌量における MYP 寒天培地、NGKG 寒天培地、X-BC 寒天培地の対数値分布