

食品中の微生物試験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
	上村 真理子	日本大学生物資源科学部
	吉川 夏未	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
	斉藤 瞳	日本大学生物資源科学部

研究要旨：セレウス菌 (*Bacillus cereus*) はグラム陽性の芽胞を形成する通性嫌気性の桿菌で、土壌や河川水などの自然環境に広く分布している。環境に分布する本菌は、農作物や食材等にも広く汚染が認められており、食品への汚染の機会も多いことが知られている。衛生的な取り扱いがなされなかった際には、食中毒を引き起こす可能性があり、その症状から嘔吐型と下痢型の2つに大別される。原因食品としては穀類及びその加工品が最も多く、特に米飯食品のチャーハン、ピラフ、焼き飯等の事例が多く報告されている。現在、わが国ではセレウス菌の試験法については複数の試験法が存在しており、これらの試験法では国際的に調和がはかられていない現状がある。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、日本で使用される試験法が国際的に科学的な根拠や信頼性がある標準試験法の策定を進めている。

本研究では、初年度にその一環として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、国内での標準的試験法を制定するにあたって必要となる事項について検討した。次年度にはセレウス菌の標準試験法として ISO (International Organization for Standardization) が定める国際規格の方法を中心に検討し、その実験の骨子となるフローチャートの作成と試験法で最も影響が勘案される *B. cereus* の選択培地について比較検討を行った。最終年度には策定されたセレウス菌標準試験法 (案) について、実際の食品 (マッシュポテトや炒飯) に *B. cereus* を接種し、これらの食品を用いて策定された試験法からの *B. cereus* 検出能についても検討並びに評価を行った。

## A. 研究目的

国際的な *B. cereus* の試験法としては、ISO が定める国際規格の方法が代表的なものであり、他に米国 FDA の公定法 (Bacteriological Analytical Manual ; BAM 法) 等がある。わが国では厚生労働省監修の食品衛生検査指針等が利用されている。

現在、国内ではセレウス菌の国際的に対応できる試験法は制定されておらず、これらの状況を踏まえて国際的に対応できる試験法の策定をする必要がある。

そこで本研究において国際的な試験法と互換性のある標準的な試験法として ISO 7932 : 2004 INTERNATIONAL STANDARDS を中心に他の試験法も参考に検討を行うこととした。

平成 26 年度は、実際に存在する各 *B. cereus* 試験法の比較を行うために、各方法の比較表を作成し、問題点や評価点を探究し、最も適切な試験法の検討を行うこととした。さらに ISO 法を基準に応用する際の問題点を検討し、試験法のフローチャートを作成し、検討を行った。

平成 27 年度は、前年度の検討結果より相違点や問題点を探究し、最も適切な試験法の選定を行い、引き続き ISO を基本に最適な検出方法のフローチャートの作成を検討した。特にセレウス菌標準試験法で使用される選択培地は、各試験法でそれぞれ独自の選択培地が存在し、検出の際に最も影響を及ぼすと思われることから選択培地について検討を行うこととなった。ISO 法では MYP 寒天培地、FDA 法では MYP 寒天培地及び BAKARA 寒天培地、そして食品衛生検査指針法では MYP 寒天培地、PEM 寒天培地、NGKG 寒天培地等が記載されおり、実際に使用されている培地である。日本で入手できるセレウス菌の選択培地等について標準菌株を用いて性能評価を行うこととなった。

最終の平成 28 年度では、国際的に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、前年度に引き続き、検討委員会の助言やアドバイスを踏まえ、最適と思われるフローチャートの検討を行った。さらにセレウス菌標準定量法・集落計数法(案)を提案した。提案したセレウス菌標準試験法については、食品に *B. cereus* を接種して MYP 寒天培地と NGKG 寒天培地、X-BC 寒天培地を選択し、検出能の比較並びに評価を行った。

## B. 研究方法

平成 26 年度

### (1) 各種試験法の比較検討

#### INTERNATIONAL STANDARD

① ISO 7932 : 2004, 「Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony count technique at 30 °C」

② ISO 21871 : 2006, 「Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* -- Most probable number technique and detection method」

③ Food and Drug Administration (FDA) の BAM 法 : *Bacillus cereus*, 2001; updated 2012, 「Bacteriological Analytical Manual Chapter 14 *Bacillus cereus*」

国際的な 3 方法と国内で利用されている厚生労働省監修の食品衛生検査指針・微生物編「10 セレウス菌」について検討し、それぞれの概略を記載した比較表を作成し、比較検討した。

### (2) セレウス菌標準試験法プロトコールの作成

食品からの微生物標準試験法検討委員会、第 48 回検討委員会に提出した比較表を審議

された報告を受け、ISO 7932:2004 の試験法を検討していくこととなった。そのため ISO 7932:2004 のセレウス菌標準試験法のプロトコールを作成した。第51回検討委員会の試験法委員会においてセレウス菌標準試験法のプロトコールの提案を行った。

### (3) 検討培地の入手と収集

セレウス菌標準試験法で重要な検出培地について文献等より情報を検討し、今後の検討のために日本において入手できる *B. cereus* 選択培地の収集を行った。

平成27年度

#### (1) セレウス菌標準試験法プロトコールの作成

本年度も国際的な3方法と国内で利用されている食品衛生検査指針・微生物編について引き続き比較検討した。これらの結果から、食品からの微生物標準試験法検討委員会、第56回試験法検討委員会においてセレウス菌標準試験法のプロトコールの提案を行った。

#### (2) セレウス菌標準試験法で用いられる選択培地の検討

日本において入手したセレウス菌標準試験法で用いられる *B. cereus* 選択培地について検討及び評価を行った。

方法：*B. cereus* を含めた *Bacillus* 14 菌株、グラム陽性菌 9 菌株、グラム陰性菌 19 菌株を用いた（平成27年度報告書：表1）。これらの菌株は TSB 培地を用いて、至適温度で2代継代培養を行い、実験に供した。

供試培地：MYP 寒天基礎培地（MYP 寒天培地；MERCK）、PEMBA 寒天培地（PEM 寒天培地；OXOID）、NGKG 寒天基礎培地（NGK 寒天培地；NISSUI）、X-BC 寒天培地（XBC 寒天培地；NISSUI）、CHROMagar *B. cereus*（CBC 寒天培地；CHROMagar）と非選択培地である TSA 培地を用いた。

培地評価の検討：2代継代培養した菌液を、適宜希釈して各選択培地の平板に塗抹し、30℃で培養した。培養後、各平板上の特徴を画像に記録した。写真は集落の特徴（色調や形状）をとらえるために最適と思われる接写距離での撮影を行った。平板に発育した典型的な集落を計測した。さらに選択培地に発育したグラム陽性菌については、集落の色調並びに集落の長辺と短辺（長辺 mm / 短辺 mm）についても計測した。

平成28年度

#### (1) セレウス菌標準試験法プロトコールの作成

本年度も引き続き ISO 7932:2004 の試験法を参考にプロトコールの検討を行い、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方法の検討を行った。

#### (2) セレウス菌標準試験法の評価検討

セレウス菌標準試験法は ISO 法を参考に標準試験法について策定を行った。次に、セレウス菌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。

方法：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℃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℃で40分間加熱処理を行って *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寒天培地と国産のNGKG寒天培地とX-BC寒天培地を用いた。

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菌株の*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食品に接種して調製した。この食品検体を用いて2回試験を行った。

さらに本実験では食品を炒飯に絞り、菌株は*B. cereus* ATCC 33019を用いて、予備実験と同様に食品検体を用いて行った。データ試験数は8回行った。

方法：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（50～100CFU/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300μL、300μL、400μLを接種塗抹し、これらを2組（複式）行った。さらに高濃度菌量（500～1000CFU/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100μLを接種塗抹（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℃、NGKG寒天培地・X-BC寒天培地では37℃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の評価を行った。

### (3) セレウス菌標準試験法・集落計数法の策定

食品からのセレウス菌を検出するための標準試験法をISO7932：2004の*B. cereus* 検出法と提言やアドバイスを参考にして、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

平成26年度

(1) ISO 7932：2004, ISO 21871：2006, FDAのBAM 2012法の比較検討

ISO 7932：2004, ISO 21871：2006, FDAのBAM 2012法と食品衛生検査指針について検討し、試験法の概略表を作成した。（平成26年度報告書：表1, 2）。

*B. cereus*の平板法の概略を表1に示した。平板法ではISO 7932：2004法、FDAのBAM 2012法、食品衛生検査指針(2014)法の要点等を記載した。相違点をみると検体の採取量がそれぞれ異なっている。また選択培地においてはISO7932:2004法がMYP寒天培地、BAM法ではMYP寒天培地とBAKARA寒天培地、検査指針法ではMYP寒天培地、PEMBA寒天培地、NGKG寒天培地が用いられており、培養条件は食品衛生検査指針が32℃で他が30℃である。集落判定もそれぞれ異なるがレシチナーゼ反応が主体で発色剤により集落の色合いが異なる傾向が認められる。各培地の確認試験はそれぞれ特徴がありISO 7932：2004法では溶血反応を、BAM法や検査指針法では比較的多くの性状で確認を行っている。

表2は*B. cereus*最確数法の概略を記載したものである。ここではISO 21871：2006法、BAM 2012法、食品衛生検査指針法（2014）を記載した。ISO 21871：2006法が前述の平板法と異なるものの、他の2方法は平板法と同様に記載されている方法である。相違点は平板法とほぼ同様で、検体の採取量、増菌培養、培養条件である温度、選択培地、集落判定、確認試験等が異なる。特にISO 21871：2006法ではMYP寒天培地のみでなくPEMBA寒天培地が追加され、培養温度も37℃で違いがみられる。各培地の確認試験はISO 21871：2006法では溶血反応を、BAM法や食品衛生検査

指針では比較的多くの性状で確認を行っている。

これらのセレウス菌試験の概略（表 1, 2）を食品からの微生物標準試験法検討委員会、第 48 回検討委員会に提案した結果、最確数法の ISO 21871 : 2006 法ではなく、平板計測法である ISO 7932 : 2004 法の試験法を中心に進めていくことになった。

委員会の結果を踏まえ、次に ISO 7932 : 2004 法のセレウス菌標準試験法（平板法）のプロトコールの作成を行った。（平成 26 年度報告書 : 図 1）

このプロトコールは、ISO 7932 : 2004 法をベースに作成したものである。内容としては、検体をストマッカーで 10 倍乳剤とした試料液を MYP 寒天培地で 30°C, 18~24 時間培養し、発育した定型集落（ピンクで大きく、マンニト非分解、卵黄反応陽性の集落を計測するもので、5 個の集落を純粋分離後、羊血液寒天培地で溶血反応を確認して、最終的に集落数を確定するものである。

このプロトコールは第 51 回検討委員会の試験法委員会に提出し、セレウス菌標準試験法のプロトコールとして提案を行った。審議の結果、確認試験の際には必要に応じてクリスタルトキシンの非産生を確認することを追加して、ISO 7932 : 2004 法のセレウス菌標準試験法を中心に検討を行うこととなった。

平成 27 年度

(1) セレウス菌標準試験法プロトコールの作成

ISO 7932 : 2004, ISO 21871 : 2006, FDA の BAM 2012 法と食品衛生検査指針について検討し、前年に引き続き各試験法の概略表から *B. cereus* プロトコールを作成した。このプロトコールは ISO 法を基本にセレウス菌標準試験法の概略を記載したものである。なお、*B. cereus* と *B. thuringiensis* の鑑別のためのクリ

スタルトキシンのについては状況に応じて使用できるように下段に記載した。このプロトコールは第 56 回の検討委員会の審議を踏まえて ISO 7932 : 2004 法のセレウス菌標準試験法を参考にして作成した（平成 27 年度報告書 : 図 1）。

試験法の流れは、検体と希釈水を加えてストマッカーで 10 倍乳剤とした試料液を MYP 寒天培地に接種し、30°C で 18~24 時間培養し、発育した定型的な集落（ピンクで大きく、マンニト非分解、卵黄反応陽性）を計測するもので、集落を純粋分離後、羊血液寒天培地で溶血反応を確認して、最終的に集落数を確定するものである。なお、必要に応じて *B. cereus* と *B. thuringiensis* の鑑別は、クリスタルトキシニン染色によりクリスタルトキシニン (*B. cereus* 非産生) の確認を行い半別する。

(2) セレウス菌標準試験法で用いられる選択培地の評価

*B. cereus* の標準菌株(表 1)を用いて、選択培地上の集落の形状や色調などの特徴を表 2 に、検出された集落数を表 3 に、集落の大きさを（長辺 mm / 短辺 mm）表 4 に示した。（平成 27 年度報告書 : 表 1~4, ）

*B. cereus* 4 菌株の MYP 寒天培地上での集落は、ラフ型で色調はピンク色を呈し、その周囲は混濁のハローを形成した。発育は良好で、集落数は  $6.94 \pm 0.08 \sim 8.04 \pm 0.05$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは（長辺 mm / 短辺 mm）で表示すると長辺  $4.06 \pm 0.38$  mm / 短辺  $2.95 \pm 0.15$  mm ~ 長辺  $7.84 \pm 0.36$  mm / 短辺  $6.88 \pm 0.50$  mm であった。

PEM 寒天培地上の集落は辺縁が鈍い鋸歯状で、色調はピーコックブルーを呈し、その周囲は混濁したハローを形成した。発育は良好で集落数は  $6.99 \pm 0.02$  CFU/ml ~  $8.08 \pm 0.02$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $8.50 \pm 1.03$  mm / 短辺  $6.77 \pm 0.33$  mm

～ 長辺  $21.78 \pm 1.65$  mm / 短辺  $10.87 \pm 0.14$  mm であった。

NGKG 寒天培地上の集落は、周縁不規則なラフ型で色調は白色～ピンク色を呈し、その周囲は混濁したハローを形成した。発育は良好で集落数は  $6.97 \pm 0.04$  CFU/ml ～  $8.11 \pm 0.06$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $2.99 \pm 0.67$  mm / 短辺  $2.24 \pm 0.65$  mm ～ 長辺  $5.85 \pm 0.31$  mm / 短辺  $4.69 \pm 0.30$  mm であった。

X-BC 寒天培地上の集落は、ラフ型で色調は青色を呈し、ハローは非形成である。発育は良好で、集落数は  $6.83 \pm 0.19$  CFU/ml ～  $7.97 \pm 0.07$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $3.58 \pm 0.16$  mm / 短辺  $3.54 \pm 0.10$  mm ～ 長辺  $5.08 \pm 0.39$  mm / 短辺  $4.95 \pm 0.27$  mm であった。

CBC 寒天培地上の集落は、ラフ型で色調は青色を呈し、白色のハローを形成する。発育は良好で、集落数は  $6.90 \pm 0.03$  CFU/ml ～  $8.04 \pm 0.07$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $2.25 \pm 0.93$  mm / 短辺  $1.68 \pm 0.37$  mm ～ 長辺  $14.55 \pm 2.32$  mm / 短辺  $10.48 \pm 0.97$  mm であった。

これらの選択培地の検出菌数の評価については、いずれも非選択培地の TSA 寒天培地と比較して菌数の差は認められなかった。なお、集落の形状や色調並びに集落の大きさについては各培地それぞれ異なる特徴を示した。

次に *Bacillus* 属 10 菌株 (*B. cereus* を除く) における選択培地上の集落形状や色調などの特徴を表 5 に、検出された集落数を表 6 に、集落の大きさを表 7 に示した。(平成 27 年度報告書: 表 5, 6, 7)

MYP 寒天培地上で *B. cereus* と同様の集落、すなわちラフ型でピンク色を呈し、混濁したハローを形成した *Bacillus* 属は、*B. thuringiensis* の 2 菌株のみで *B. cereus* と相違

は認められなかった。集落数は  $7.28 \pm 0.08$  CFU/ml ～  $7.72 \pm 0.04$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $4.65 \pm 0.02$  mm / 短辺  $4.09 \pm 0.10$  mm ～ 長辺  $6.89 \pm 0.51$  mm / 短辺  $5.51 \pm 0.06$  mm であった。*B. coagulans* ATCC 7050, *B. megaterium* ATCC 9885 は発育を示さなかった。他の *Bacillus* 6 菌株は培地上に集落を形成したものの、*B. cereus* と判定される集落や色調は認められなかった。

PEM 寒天培地上で *B. cereus* と同様の集落、すなわち辺縁が鈍い鋸歯状で、色調はピーコックブルーを呈し、周囲を混濁したハローを形成した *Bacillus* 属は、*B. thuringiensis* の 2 菌株であった。*B. cereus* と相違は認められなかった。集落数は  $7.23 \pm 0.16$  CFU/ml ～  $7.80 \pm 0.10$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $10.78 \pm 1.78$  mm / 短辺  $4.87 \pm 0.67$  mm ～ 長辺  $14.52 \pm 0.59$  mm / 短辺  $7.94 \pm 1.26$  mm であった。*B. coagulans* ATCC 7050, *B. megaterium* ATCC 9885 は集落を形成しなかった。他の *Bacillus* 6 菌株は集落を形成したものの、典型的な *B. cereus* と判定される集落や色調は認められなかった。

NGKG 寒天培地上で *B. cereus* と同様の集落、すなわち周縁が不規則のラフ型で白色～ピンク色の集落で周囲を混濁したハローを形成した *Bacillus* 属は、*B. thuringiensis* の 2 菌株であった。*B. cereus* と相違は認められなかった。集落数は  $7.11 \pm 0.12$  CFU/ml ～  $7.80 \pm 0.01$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $3.82 \pm 0.17$  mm / 短辺  $2.96 \pm 0.16$  mm ～ 長辺  $7.31 \pm 0.64$  mm / 短辺  $3.79 \pm 0.15$  mm であった。*B. circulans* ATCC 4516, *B. coagulans* ATCC 7050, *B. licheniformis* ATCC 12759, *B. megaterium* ATCC 9885 は集落を形成しなかった。他の *Bacillus* 4 菌株は集落を形成したものの、典型的な *B. cereus* の呈する集落や色調は認められなかった。

X-BC 寒天培地上で *B. cereus* と同様の集落、

すなわちラフ型で青色を呈した集落を形成した *Bacillus* 属は、*B. thuringiensis* の 2 菌株であった。この酵素基質培地でも *B. cereus* と *B. thuringiensis* 集落の相違は認められなかった。発育は良好で、集落数は  $7.18 \pm 0.20$  CFU/ml ~  $7.30 \pm 0.67$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $2.68 \pm 0.91$ mm / 短辺  $2.28 \pm 0.74$ mm ~ 長辺  $3.91 \pm 0.21$ mm / 短辺  $3.91 \pm 0.21$ mm の範囲であった。他の *Bacillus* 8 菌株の集落は認められなかった。

CBC 寒天培地上で *B. cereus* と同様の集落、すなわちラフ型の青色集落で白色のハローを形成する *Bacillus* 属は *B. thuringiensis* の 2 菌株であった。平板上の特徴は、この培地でも *B. cereus* と相違は認められなかった。集落数は  $7.26 \pm 0.22$  CFU/ml ~  $7.79 \pm 0.04$  CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺  $4.22 \pm 0.74$ mm / 短辺  $3.47 \pm 0.52$ mm ~ 長辺  $5.06 \pm 0.56$ mm / 短辺  $3.83 \pm 0.32$ mm であった。他の *Bacillus* 8 菌株は集落を形成しなかった。

次に *Bacillus* 属菌以外のグラム陽性菌 9 菌株における選択培地上の集落形状や色調などの特徴を表 8 に、検出された集落数を表 9 に示した。(平成 27 年度報告書 : 表 8, 9)

グラム陽性 9 菌株については、選択培地以上に *B. cereus* と同様の集落を形成した菌株は認められなかった。培地の MYP 寒天培地、PEM 寒天培地、NGKG 寒天培地に発育した菌種は 6 菌株で、検出菌数は非選択培地と同等であった。*L. fermentum* IFO 14513, *M. lacticum* IAM 1640, *P. pentosaceus* IAM 10073 は検出されなかった。酵素基質培地の XBC 寒天培地と CBC 寒天培地は *B. cereus* 以外の抑制効果が強く、両培地には 1 菌種ずつのみ発育が認められた。

最後にグラム陰性菌 19 菌株における選択培地上の集落形状や色調などの特徴を表 10 に、検出された集落数を表 11 に示した。(平成 27 年度報告書 : 表 10, 11)

MYP および PEM 寒天培地ではグラム陰性菌 19 菌株中 2 菌株 *E. cloacae* IFO 13535 と *P. vulgaris* ATCC 13315 のみに集落が形成され、検出された菌数は *E. cloacae* IFO 13535 で  $8.97 \pm 0.02$  CFU/ml と  $8.92 \pm 0.07$  CFU/ml であった。*P. vulgaris* ATCC 13315 では  $8.67 \pm 0.09$  CFU/ml と  $8.41 \pm 0.18$  CFU/ml あった。NGK 寒天培地では *E. cloacae* IFO 13535, *P. vulgaris* ATCC 13315, *P. alcalifaciens* RIDM 1656001 が検出され、各菌数は  $9.23 \pm 0.08$  CFU/ml,  $8.43 \pm 0.01$  CFU/ml,  $8.97 \pm 0.23$  CFU/ml であった。X-BC 寒天培地では供試菌株の発育が認められなかった。CBC 寒天培地では *P. alcalifaciens* RIDM 1656001 のみ検出され、その菌数は  $9.04 \pm 0.05$  CFU/ml であった。

いずれの菌株も各選択培地に検出された集落は微細で *B. cereus* と判定される集落や色調を示さなかった。さらに X-BC 寒天培地に関してはグラム陰性菌すべての発育が抑制された。

以上の結果、MYP, PEM, NGKG, X-BC, CBC 寒天培地上での発育は、*B. cereus* が良好な状態で発育し、各培地で示される典型的な集落を呈することが確認され、検出菌数も非選択培地と比較して劣るものは認められなかった。なお、*Bacillus* 属のなかで *B. cereus* と典型的な集落及び同等の特徴を示す菌種としては *B. thuringiensis* が確認された。これらの菌種間には生化学的な性状は似通っており、さらに遺伝子学的にも非常に近縁種であるため現在の選択培地では鑑別は困難であると思われる。この問題は *B. thuringiensis* がクリスタルトキシン産生することから、これらのトキシンを確認することで *B. cereus* と判別することが可能と思われた。他のグラム陽性及び陰性菌の供試菌株については、*B. cereus* 選択培地には典型的な集落を形成せず、確実に *B. cereus* の集落と判断できることが確認された。以上のことから、*B. cereus* 選択培地としていずれの

培地も有効であると推察された。

平成 28 年度

#### (1) セレウス菌標準試験法プロトコールの作成

前年度に引き続きセレウス菌標準試験法のプロトコールを検討した。これらは（平成 28 年度報告書：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が陽性であればセレウス菌陽性として記載された計算法に従って菌数を算出する方法である。なお、*B.thuringiensis* との判別は Parasporal crystals（副芽胞結晶；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

予備実験では 2 種類の食品、マッシュポテトと炒飯に *B. cereus* ATCC 10876 と *B. cereus* ATCC 33019 を接種して各選択培地より検出を行った結果を（平成 28 年度報告書：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、高濃度菌量では 500～750 CFU/g の範囲で検出され、設定された菌量内で検出された（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、低濃度菌量では 55～95 CFU/g、高濃度菌量では 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）。

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 寒天培地間にも顕著な差は見られなかった。

本実験では菌株に *B. cereus* ATCC 33019 を用い、食品では炒飯を選択した。予備実験の結果を参考に低濃度菌量及び高濃度菌量となるように接種して MYP 寒天培地を用いて行い、試験は 8 回の結果を（平成 28 年度報告書：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 寒天培地についても同様に検出を行った結果を（平成 28 年度報告書：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（平成 28 年度報告書：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 の範囲で検出された。

これらの結果を集計したものを（平成 28 年度報告書：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  $1.90 \pm 0.10$  CFU/g、NGKG 寒天培地で  $1.91 \pm 0.08$  CFU/g、X-BC 寒天培地で  $1.87 \pm 0.11$  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  $2.93 \pm 0.10$  CFU/g、NGKG 寒天培地で  $2.87 \pm 0.09$  CFU/g、X-BC 寒天培地で  $2.86 \pm 0.19$  CFU/g であった。

これらの検出菌数のデータについて、ANOVA 並びに多重比較検定を用いた統計処理を行った。その結果を（平成 28 年度報告書：表 9、図 2,3）に示した。さらに低濃度菌



量試験の結果を図2に、高濃度菌量試験の結果を図3に示した。

食品に接種された *B. cereus* の低濃度菌量及び高濃度菌量の結果からは、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、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) セレウス菌標準試験法・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試験法の作成を行った。(H28年度報告書：セレウス菌標準試験法・集落計数法 NIHSJ-28-ST-4 記載)

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。

### D. 結論

国際的に互換性のあるセレウス菌標準試験法として ISO 7932:2004 を基礎とする標準試験法案を作成した。さらに日本で入手可能な *B. cereus* の選択培地について、供試菌株 42 菌株を用いて選択培地の有効性及びに評価を行った。その結果、*B. cereus* 選択培地間には、*B. thuringiensis* 除き、他の供試菌株と *B. cereus* と明確な判別が可能なことから良好な選択性を有した。さらに検出菌数についても各選択

培地間に有意な差は認められなかった。これらの培地は特徴を理解して使用することにより *B. cereus* を有効に検出できるものと推察された。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、その評価を行った。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<sup>1)</sup>、上村真理子<sup>1)</sup>、吉川夏未<sup>1)</sup>、岡田由美子<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学生物資源科学部、

<sup>2)</sup>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

