

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

平成26－28年度 総合・分担研究報告書

(課題番号：H26－食品－一般－003)

研究代表者 五十君 静信

東京農業大学 応用生物科学部

平成29(2017)年5月

目 次

I. 平成 26-28 年度総合研究報告書	
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	1
研究代表者 五十君 静信	
研究組織、検討委員会開催状況	9
II. 分担研究報告書	
1. セレウス菌標準試験法に関する研究	15
荻原博和	
2. <i>Yersinia</i> の標準試験法に関する研究	25
岡田由美子	
3. 衛生指標菌試験法に関する研究	33
伊豫田淳、五十君静信	
4. 試験法の妥当性確認に関する研究	37
松岡英明、五十君静信	
5. 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	43
鎌田洋一	

平成 26-28 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

総合研究報告書

研究代表者 五十君 静信 H26-27：国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
H28：東京農業大学 応用生物科学部

研究要旨

本研究では、食品における微生物試験法のメソッドバリデーションの手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法の作成を行う。これまでの研究班の成果である標準試験法作成方針に従い、セレウス菌、エルシニア・エンテロコリチカ、セレウリドなど食中毒起因菌毒素、衛生指標菌などの標準試験法を作成する。今後リスク評価の結果を受けて作成される食品の微生物基準に利用可能な試験法となるように ISO 法などと互換性のある妥当性確認されていると認められる試験法を提供する。さらに、作成された標準試験法を精度高く実施するために必要な導入時の検証、微生物標準品の設定、試験精度の管理に関する基礎的研究を行う。

食中毒起因細菌や衛生指標菌の試験法に関する専門家、約 20 名程度からなる“標準法検討委員会”を組織し、これまでの研究班により作成された標準試験法作成方針に従い、微生物標準試験法の作成を行った。平成 26 年度 5 回、27 年度 5 回、28 年度 6 回の合計 16 回の検討委員会を公開で開催した。国際的にもまだ確立していない検討結果の統計処理方法とその評価方法については、実際の試験法作成の検討データを基に策定を進めた。これらの試験法策定過程は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ上に公開し、一般にも広く意見を求めた。

研究班の行う当該微生物の試験法策定は、それぞれ作業部会を組織し本研究班の代表、分担、協力研究者が標準法の妥当性確認に必要と思われるデータの作成にあたった。各作業部会は、4 つのステージからなる“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い“標準法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。各作業部会の標準試験法作成は、3 年目の平成 28 年にはコラボ案作成及び最終試験法の検討（ステージ 3～4）、それぞれを標準試験法とした。

セレウス菌試験法(NIHSJ-28)、エルシニア試験法(NIHSJ-27、NIHSJ30TS)、セレウリド試験法(NIHSJ-26TS)について、ステージ 1 からステージ 3～4 までの検討を行った。試験法のバリデーション（妥当性確認）に関しては、ISO 16140 を基にしたガイドライン作成を目的とし、AOAC から出されたバリデーションに関する新しい文書や海外の第三者認証機関の妥当性確認のプロトコールなどを参考に検討を進め、標準試験法検討委員会で標準試験法の策定に有用となる妥当性確認ガイドライン案を作成した。衛生試験法については、関連用語の整理、集落計数法、妥当性確認の方法について検討を進めた。また、ISO 法と従来の国内の公定法との試験結果の相違について検証を行った。他の研究班により進められているウエルシュ菌標準試験法(NIHSJ-29)についても、定性試験法策定を行った。

研究分担者：

松岡英明：東京農工大学大学院

萩原博和：日本大学生物資源科学部

鎌田洋一：岩手大学農学部

岡田由美子：国立医薬品食品衛生研究所

伊豫田淳：国立感染症研究所

A. 研究目的

食品が国際的に流通していることから、食品の微生物制御は各国間で共通であることが重要であり、微生物汚染状況を確認する微生物試験法は国際的に共通性があることが重要である。ISO 法はその標準的な方法として示されている。ただ、それぞれの国の食品事情は異なっており、必ずしも国際的に統一した試験法のみを用いているわけではなく、多くの国ではその国のリスクマネジメントに適する試験法を採用している。異なる試験法の妥当性確認を行うために、ISO16140 では試験法の妥当性を評価する方法について示されており、これに従い科学的根拠のある妥当性確認が行われた試験法が作られている。

わが国の微生物試験法は、これまで行われた厚生労働科学研究班の“食中毒起因細菌の標準となる試験法がどの様にあるべきか”の議論により、国際的なレベルで妥当性確認された標準試験法を作成する手順が示され、これに従い標準試験法が作成されてきた。本研究班もその方針を引き継ぎ、早急に対応が必要と思われる微生物の標準試験法の策定を行うこととした。厚労省が報告を義務づけている食中毒菌のうち、セレウス菌、エルシニア・エンテロコリチカ、加えて食中毒起因菌の産生する毒素、さらには食品の工程管理に利用される衛生指標菌試験法などについて標準試験法の策定を試みた。

標準法検討委員会では、“食品からの微生物標準試験法作成方針”を作成し、試験法作成手順についてはほぼ確立している。一方、作成された試験法の妥当性

の確認方法については、国際的にも現在まだ議論が続いている状況であり更なる検討を必要としている。従って、本研究班では最新の ISO の動向に合わせて妥当性確認の適用方法を中心に議論を進める。妥当性確認に必要とされるデータ数と統計手法の選択、統計値の解釈、コラボスタディの規模、微生物標準品をどうするかなどを検討する。加えて標準法が整備された後、食品における微生物試験を行うにあたり標準試験法をどのように導入し、また試験精度を担保していくかについても検討を行う。

B. 研究方法

約 20 人の食品微生物の専門家で構成する“標準法検討委員会”（親委員会）を組織する。この親委員では、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従って、作業部会から提案される試験法のプロトコル案の検討・評価を行った。当該微生物の試験法案の提案は、作業部会が行った。それぞれの作業部会は、4つのステージに従い試験法の策定を進めた。

ステージ1：当該微生物の試験法に関する情報収集を行い、海外の試験法との互換性を考慮すると共に、今後検討の必要が必要と思われる箇所を指摘したプロトコル原案を作成する。

ステージ2：公開による意見などを考慮し、原案の検討事項について整理し、具体的なデータを基に試験法のプロトコルの妥当性を検討し、検討データを付けて作業部会案として親委員会に改良した試験法プロトコルを提出する。

ステージ3：作業部会案は一定の期間の評価を受けた後、指摘された問題点等については、追加実験を行い修正または確認を行った上で、“コラボ案”とする。コラボ案では、試験法を SOP 化し、用いる培地等の調査を行い、その組成表を作成する。親委員会では初年度に検討した“メソッドバリデーションの手法”を基

に、具体的なコラボの実施方法につき明らかにし、コラボ案として公開する。

ステージ4：コラボ案の公開と共に、コラボ参加希望機関を募り、最終的には15カ所程度の試験・検査機関、地方衛生研究所、検疫所、大学などに協力していただき、プロトコルの実行性を評価するコラボスタディを行う。コラボの結果は、コラボ作業部会で統計的な検討を行う。親委員会は、コラボの結果と作業の進行が作成方針に従って行われているかの確認を行った後、標準法として公開する。

これらの試験法策定過程は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ上に公開し、一般にも広く意見を求めた。

研究班の行う当該微生物の試験法策定は、本研究班の代表、分担、協力研究者が、作業部会を組織し具体的な標準法案策定の作業にあたった。各作業部会は、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い“標準試験法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。H26～H27年度はステージ1～2を、H28年度には、作業部会案の検討及び最終試験法の検討（ステージ3～4）を行った。

研究分担は、研究総括と標準法検討委員会運営は五十君が担当した。検討委員会の事務局は岡田が担当した。妥当性評価は松岡が担当し、五十君、伊豫田も協力した。試験法プロトコルの作成は、セレウス菌（荻原が担当）、食中毒菌毒素セレウリド試験法（鎌田が担当）、エルシニア・エンテロコリチカ（岡田が担当）、衛生指標菌（伊豫田が担当、五十君、（一財）食品分析センター、（一財）日本冷凍食品検査センターが協力）衛生指標菌は集落計数法の作業部会を組織した。各作業部会は“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い、試験法作成を進めた。4つのステージで検討を進めるが、それぞれのプロトコル案は、国立医薬品食品衛生研究所のホームページ上に公開し、

広く意見を求めた。

これに対応し“標準試験法検討委員会”はH26年度に5回、H27年度に5回、H28年度に6回、合計16回開催し、それぞれの標準試験法策定が適切に行われていることを確認すると共に、微生物試験法の妥当性確認の手法をISO 16140を基にAOACのバリデーションガイドライン、海外の第三者認証機関が示しているプロトコルなどを参考とし検討した。

他の研究班で食品微生物に関する試験法の作成を行う場合は、その研究班と協力し“食品からの微生物標準試験法作成方針”を基に“標準試験法検討委員会”が標準試験法の作成の方向性を示した。H26～28年度は、特定非営利活動法人食の安全を確保するための微生物検査協議会が中心となって進めるウェルシュ菌試験法の定性法について標準試験法を策定した。

C. 研究結果

食品微生物の専門家で構成する“標準試験法検討委員会”を組織した。この委員会は試験法案を検討し、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い標準試験法策定にあたった。汚染指標菌の標準試験法は、ISO法の酵素基質培地を用いた大腸菌試験法について検討し、その試験法案の策定を行った。衛生指標菌・バリデーション合同作業部会から提出された資料を基に妥当性確認に関する方法論に関する議論を進め、ISO 16140改訂版に準拠したガイドライン案を作成した。

それぞれの標準試験法案は、作業部会単位で進めた。セレウス菌（荻原、岡田、五十君）、エルシニア（岡田）、衛生指標菌（伊豫田、五十君、日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会）の試験法案について各作業部会で検討を行った。その検討内容については各作業部会の分担研究報告書を確認していただきたい。標準試験法検討委員会は“食品からの微

生物標準試験法作成方針”に従い、試験法策定を進めた（五十君は総括および検討委員会運営）、事務局（岡田）と共に標準試験法検討委員会で試験法の検討を進めた。妥当性確認に関する検討（松岡、五十君）は衛生指標菌作業部会との合同作業部会を組織し、AOAC インターナショナルの示したガイドラインや海外の第三者機関による妥当性確認に関する文書を参考に議論を進め、標準試験法のバリデーションガイドライン案を作成した。

標準試験法検討委員会の事務局は、岡田が担当し、19名の専門家委員と2名の行政官で構成した。H26年度5回、H27年度5回、H28年度6回の合計16回の標準試験法検討委員会を開催した。各作業部会が機能し、標準法策定が順調に行われているかを評価した。他の研究班等で検討中のウェルシュ菌標準試験法について諮問を受け評価した。これらの試験法の検討状況を web へ公開し策定を進めた。

セレウス菌試験法作業部会（荻原担当）は、ISO 7932 : 2004 を中心に検討を進めた。米国 FDA からは、BAM 法として試験法が示されている。国内の一般的な方法も含め、各試験法の比較を行うために、各方法の比較表の作成を行った。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。国際的に互換性のあるセレウス菌試験法として ISO 7932 : 2004 を基礎とする標準試験法 (NIHSJ-28) 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並びに評価を行った。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る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。

エルシニア試験法作業部会（岡田担当）では、ISO 10273 とハーモナイズした定性法 (NIHSJ-27) の策定を行った。現在日本国内では、食品から本菌を検出するための告示法、通知法等が定められていないため、国際的な試験法と互換性のある、食品からエルシニアを分離するための標準試験法を策定する必要がある。国際的標準試験法と互換性のある食品からの *Yersinia* 試験法として、H26～H27 年度の検討で最も試験に必要な所要時間が短かった ISO 10273 : 2003 を基礎とした標準試験法案を作成・検討することとしたが、研究協力機関による検討から、PMP ブロスを用いて 4℃ で培養する *Y. pseudotuberculosis* の試験法として BAM に記されている方法（2004 年版食品衛生検査指針にも記されている方法）が最も分離率が優れていたため、NIHSJ-30TS として推奨試験法を策定した。

衛生指標菌作業部会（伊豫田、五十君担当）では、衛生指標菌・菌群としては、一般生菌数と、大腸菌群、腸内細菌科菌群などの検討を行った。ISO 試験法と国内の従来法について、バリデーション作業部会と合同で検討を進めた。

バリデーション作業部会（松岡・五十君担当）は衛生指標菌作業部会と合同で検討を進めた。セレウス菌等、4 種類の微生物及び微生物由来毒素の各標準試験法の策定に際して、妥当性確認ガイドラインに基づき検討を進めた。またガイドラインの基となった ISO 16140 が改訂されたことから、作業部会にてその和訳を作成し分析した。海外の第三者機関による妥当性確認のガイドラインを比較検討し、AOAC インターナショナルが新規に提案したガイドラインと ISO 16140 を比較しながら妥当性確認に必要な内容をまとめ、標準試験法のバリデーションガイドライン案を作成した。微生物試験法の合理的な妥当性確認のために重要な、オンサイト調製型の生菌標準物質に関して

は、広範囲の菌種に適用できる見通しを得た。パリで開催された ISO TC34/SC9 に参加し、ISO 策定の議論に加わった。また、米国で開催された AOAC INTERNATIONAL の年次大会に参加した。

これらの試験法に関する情報提供を、学会等のシンポジウムや講演会及び関連雑誌の総説で行った。

D. 結論

食品における微生物標準試験法の妥当性確認の手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法プロトコール作成を進めた。セレウス菌 (NIHSJ-28)、エルシニア (NIHSJ-27、NIHSJ-30TS)、ウェルシュ菌試験法 (NIHSJ-29-ST3) などの標準試験法の策定を行った。海外の第三者機関のガイドラインを比較検討し、妥当性確認に関する考え方を整理し、標準試験法検討委員会で行う妥当性確認のためのガイドライン案をまとめた。微生物試験法の合理的な妥当性確認のために重要な、オンサイト調製型の生菌標準物質に関しては、広範囲の菌種に適用できる見通しを得た。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

1. Matsuoka H, Nakano K, Takatani N, Yoshida T, Igimi S, Saito M. Flow cytometric method for in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. J AOAC Int. 97(2):479-483. (2014)
2. 五十君静信。食品微生物管理の国際ハーモナイゼーションを推進。月刊フードケミカル。358 巻:2-3。2015.2
3. 五十君静信。食品検査とは。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
4. 五十君静信、松岡英明。試験法の妥当性確認と性能検証。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
5. 丹野憲二、田中廣行、五十君静信、斎藤明美。微生物試験における検体の取扱い。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
6. 浅尾努、小久保彌太郎。衛生指標菌。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
7. 百瀬愛佳、五十君静信。カンピロバクター。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
8. 岡田由美子、仲真晶子。リステリア。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
9. 鎌田洋一。ボツリヌス菌。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
10. 門間千枝、伊藤武。ウェルシュ菌。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
11. 荻原博和、岡田由美子。クロノバクター属菌。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
12. H. Ogawa, S. Nasu, M. Takeshige, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. Sci. Rep., 5:10061 (2015) doi:10.1038/srep10061
13. 松岡英明、斎藤美佳子：微生物試験迅速法におけるバリデーシヨンの課題。日本防菌防黴学会誌、43(8)、361-367 (2015)。
14. 松岡英明：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～. 月刊フードケミカル、(11) 96-101 (2015).

15. 五十君静信。食品企業が信頼される微生物検査体制を構築するために、どのような試験法を選択したらよいか。月刊 HACCP2015 年 6 月号：20-25 (2015. 6)
16. 五十君静信。食品の微生物基準に示された *Listeria monocytogenes* 試験法。月刊フードケミカル。371 巻 2016 年 3 月号：82-84
17. 五十君静信。サルモネラ属菌および黄色ブドウ球菌試験法の改正についてーその背景にある国際整合性ー。食品衛生研究。

学会発表

1. Matsuoka H.: 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).
2. Saito M., 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)
3. Igimi S, Momose Y, Okada Y, Ekawa T, Asakura H, Masuda K, and Matsuoka H. Evaluation of the NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter* in chicken. 128th AOAC Annual Meeting and Exposition, Boca Raton. Florida USA. (2014. 9. 9)
4. 吉田智紀、高谷周督、小川廣幸、斉藤美佳子、五十君静信、松岡英明：傷害菌の定量的指標の提言ー傷害菌調製条件の検討ー。第 41 回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014. 9. 25)
5. 高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明：傷害菌の定量的指標の提言ー傷害修復培地成分の性能評価ー。第 41 回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014. 9. 25)
6. 斉藤美佳子、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)
7. 守山隆敏, 平井誠恵, 島原義臣, 斎藤健太, 中島和英, 吉田智紀, 高谷周督, 斉藤美佳子, 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)
8. 多田 敦子、杉本 直樹、秋山 卓美、伊藤 裕才、五十君 静信、佐藤 恭子、河村 葉子、山崎 壮、穂山 浩。食品添加物酵素の公定書微生物限度試験法の検討。全国衛生化学技術協議会 2014. 11 別府
9. 松岡英明：微生物試験迅速法におけるバリデーションとデファクトスタンダードの課題：日本防菌防黴学会女性研究者の会、第 14 回学術講演会、東京 (2015. 4. 23)。
10. 五十君静信。リステリアの新しい基準の検査とその試験法について。食の安全を確保するための微生物検査協議会。2015. 6. 3. 中央区
11. 橋理人、吉村昌徳、山本詩織、春日文子、五十君静信、朝倉宏。衛生規範改正前後における市販浅漬け製品

の指標菌数ならびに菌叢動態に関する比較検討。防菌防黴学会。2015.9.1-2。大阪

12. 須田貴之, 吉村昌徳, 有路由佳, 橋理人, 小西良子, 春日文子, 五十君静信, 朝倉宏. 充填豆腐製品における微生物汚染実態と保存試験を通じた芽胞菌の挙動に関する検討. 日本防菌防黴学会第42回年次大会. (27年9月, 大阪)
13. 斉藤美佳子, 吉田智紀, 高谷周督, 小川廣幸, 松岡英明: 浸透圧ストレスによって調製した傷害菌モデルの性質. 第42回日本防菌防黴学会年次大会, 大阪 (2015.9.2).
14. 小川廣幸, 松岡英明, 斉藤美佳子: タイムラプス影像解析法による寒天培地の性能評価. 第42回日本防菌防黴学会年次大会, 大阪 (2015.9.2).
15. H. Matsuoka: Key Technology for a More Rational Validation – Standard Material of Viable Microbial cells (SMVM) –. 1st Asia Pacific Food Microbiology Advisory Board Meeting, December 2-3, 2015, Seoul, Korea
16. 荻原博和, 上村真理子, 吉川夏未, 岡田由美子. *Bacillus cereus* の選択培地における比較検討. 日本食品衛生学会第112回日本食品衛生学会学術講演会. 平成28年10月(北海道函館市)
17. 斉藤美佳子, 高谷周督, 五十君静信, 松岡英明: 生菌標準物質をオフサイトで利用するための一時保存法. 第43回日本防菌防黴学会年次大会, 東京 (2016.9.26)

書籍

1. 食品衛生検査指針 微生物編 2015. 公益社団法人日本食品衛生協会

講演・研修会等

1. 五十君静信. 食品製造における衛生管理に適した試験法選択の考え方～数的指標を導入した規格基準の解説～. 第14回食品安全戦略研究会. 正しい検査と微生物制御. 2014.8.23. 石川県立大学. 金沢
2. 五十君静信. リステリアの規格基準設定と試験法について. 平成27年度食品安全行政講習会. 2015.5.21. 厚労省講堂
3. 五十君静信. 食品製造における衛生管理に適した試験法選択の考え方～数的指標を導入した規格基準の解説～. 第14回食品安全戦略研究会. 正しい検査と微生物制御. 2014.8.23. 石川県立大学. 金沢
4. 五十君静信. 新しいリステリア・モノサイトゲネス微生物基準における試験法の国際整合性. 食品衛生登録検査機関協会業務管理研修会. 2015.2.9. 東京
5. 五十君静信. 食品の微生物基準をめぐる国際情勢と試験法の妥当性確認の重要性. 第1回微生物標準試験法セミナー. 2015.2.23. 東京
6. 五十君静信. 微生物試験法をめぐる行政動向と妥当性確認の重要性. 2015年度微生物試験法の妥当性確認実務者講習会. 2015.3.11. 東京
7. 五十君静信. 食品の微生物試験法の標準化. JASIS セミナー 2015.9.4 幕張メッセ
8. 五十君静信. 食品衛生検査指針 微生物編改定と今後の工程管理に適した試験法の選び方. 食品開発記念セミナー 2015.10.8 東京ビックサイト
9. 五十君静信. 2015年に改訂された食品衛生検査指針の方向性と HACCP 義務化へ向けての検査体制の考え方. 日水2015年度食品衛生検査セミナー. 2015.10.9 東京

G. 知的所有権の取得状況
該当なし。

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

研究組織

研究代表者	五十君 静信	東京農業大学 応用生物科学部 (H26, 27 : 国立医薬品食品衛生研究所)
研究分担者	松岡 英明 荻原 博和 鎌田 洋一 岡田由美子 伊豫田 淳	東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻 日本大学 生物資源科学部 岩手大学 農学部 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 国立感染症研究所 細菌第一部

セレウス菌試験法作業部会

研究分担者	荻原 博和 岡田 由美子 五十君 静信 上村 真理子 吉川 夏未 鈴木 穂高 斎藤 瞳 大坪 愛実	日本大学 生物資源科学部 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 東京農業大学 応用生物科学部 日本大学 生物資源科学部 日本大学 生物資源科学部 国立医薬品食品衛生研究所 日本大学 生物資源科学部 日本大学 生物資源科学部
-------	--	--

エルシニア・エンテロコリチカ試験法作業部会

研究分担者	岡田 由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究協力者	百瀬 愛佳 鈴木 穂高 吉田 麻利江 下島 優香子 井田 美樹 福井 理恵 石塚 理恵 渡邊 真弘	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 東京都健康安全研究センター 微生物部 東京都健康安全研究センター 微生物部 東京都健康安全研究センター 微生物部 東京都健康安全研究センター 微生物部 一般財団法人日本冷凍食品検査協会

バリデーション・衛生指標菌合同作業部会

研究分担者	松岡 英明	東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻
	五十君 静信	東京農業大学 応用生物科学部
	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究協力者	森 曜子	公益財団法人日本適合性認定協会
	吉田 信一郎	一般財団法人日本食品分析センター
	齋藤 利江	一般財団法人日本冷凍食品検査協会
	吉田 朋高	財団法人食品分析開発センター SUNATEC
	守山 隆敏	スリーエム ヘルスケア株式会社
	内田 和之	シスメックス・ビオメリユ株式会社
	小林 武	シスメックス・ビオメリユ株式会社
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	吉村 昌徳	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	須田 貴之	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	安河内 彩	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	森 篤志	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	西田 直樹	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法作業部会

研究分担者	鎌田 洋一	岩手大学農学部 共同獣医学科
研究協力者	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
	大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	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
	佐野 勇氣	日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター
	橘田 規	日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター

事務および経理担当者

吉岡 宏美	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
澤田 薫	国立医薬品食品衛生研究所	総務部
内山 貴満	東京農業大学	総合研究所

食品からの微生物標準試験法検討委員会

委員長	五十君 静信	東京農業大学・応用生物科学部
副委員長	寺嶋 淳	国衛研・衛生微生物部
事務局	岡田 由美子	国衛研・食品衛生管理部（作業部会）
委員	泉谷 秀昌	国立感染研
	伊藤 武	財団法人東京顕微鏡院
	伊豫田 淳	国立感染研（作業部会）
	荻原 博和	日本大学（作業部会）
	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	鎌田 洋一	岩手大学（作業部会）
	工藤 由起子	国衛研・衛生微生物部
	小久保彌太郎	公益社団法人日本食品衛生協会
	小崎 俊司	大阪府立大学
	小高 秀正	公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所
	齋藤 利江	一般財団法人日本冷凍食品検査協会（作業部会）
	品川 邦汎	岩手大学
	松岡 英明	AOAC International Japan Section（作業部会）
	森 曜子	公益財団法人日本適合性認定協会（作業部会）
	吉田 信一郎	一般財団法人日本冷凍食品検査協会（作業部会）
行政から	吉原 尚喜	厚生労働省・基準審査課
	井河 和仁	厚生労働省・基準審査課
	仲川 玲	厚労省・基準審査課
	梅田 浩史	厚生労働省・監視安全課

平成 26～28 年度 食品からの微生物標準試験法検討委員会開催状況

第 48 回検討委員会： 2014 年 7 月 23 日開催

第 49 回検討委員会： 2014 年 8 月 26 日開催

第 50 回検討委員会： 2014 年 10 月 27 日開催

第 51 回検討委員会： 2014 年 12 月 3 日開催

第 52 回検討委員会： 2015 年 2 月 18 日開催

第 53 回検討委員会： 2015 年 5 月 26 日開催

第 54 回検討委員会： 2015 年 7 月 14 日開催

第 55 回検討委員会： 2015 年 10 月 6 日開催

第 56 回検討委員会： 2015 年 12 月 8 日開催

第 57 回検討委員会： 2016 年 2 月 3 日開催

第 58 回検討委員会： 2016 年 6 月 8 日開催

第 59 回検討委員会： 2016 年 8 月 25 日開催

第 60 回検討委員会： 2016 年 10 月 31 日開催

第 61 回検討委員会： 2016 年 12 月 26 日開催

第 62 回検討委員会： 2017 年 1 月 27 日開催

第 63 回検討委員会： 2017 年 2 月 15 日開催

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°C 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°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 ± 0.38 mm / 短辺 2.95 ± 0.15 mm ~ 長辺 7.84 ± 0.36 mm / 短辺 6.88 ± 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 ± 0.02 CFU/ml ~ 8.08 ± 0.02 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 8.50 ± 1.03 mm / 短辺 6.77 ± 0.33 mm

～ 長辺 21.78 ± 1.65 mm / 短辺 10.87 ± 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 ± 0.04 CFU/ml ～ 8.11 ± 0.06 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 2.99 ± 0.67 mm / 短辺 2.24 ± 0.65 mm ～ 長辺 5.85 ± 0.31 mm / 短辺 4.69 ± 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 ± 0.19 CFU/ml ～ 7.97 ± 0.07 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 3.58 ± 0.16 mm / 短辺 3.54 ± 0.10 mm ～ 長辺 5.08 ± 0.39 mm / 短辺 4.95 ± 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 ± 0.03 CFU/ml ～ 8.04 ± 0.07 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 2.25 ± 0.93 mm / 短辺 1.68 ± 0.37 mm ～ 長辺 14.55 ± 2.32 mm / 短辺 10.48 ± 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 ± 0.08 CFU/ml ～ 7.72 ± 0.04 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 4.65 ± 0.02 mm / 短辺 4.09 ± 0.10 mm ～ 長辺 6.89 ± 0.51 mm / 短辺 5.51 ± 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 ± 0.16 CFU/ml ～ 7.80 ± 0.10 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 10.78 ± 1.78 mm / 短辺 4.87 ± 0.67 mm ～ 長辺 14.52 ± 0.59 mm / 短辺 7.94 ± 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 ± 0.12 CFU/ml ～ 7.80 ± 0.01 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 3.82 ± 0.17 mm / 短辺 2.96 ± 0.16 mm ～ 長辺 7.31 ± 0.64 mm / 短辺 3.79 ± 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 ± 0.20 CFU/ml ~ 7.30 ± 0.67 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 2.68 ± 0.91 mm / 短辺 2.28 ± 0.74 mm ~ 長辺 3.91 ± 0.21 mm / 短辺 3.91 ± 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 ± 0.22 CFU/ml ~ 7.79 ± 0.04 CFU/ml の範囲で検出された。集落の大きさは長辺 4.22 ± 0.74 mm / 短辺 3.47 ± 0.52 mm ~ 長辺 5.06 ± 0.56 mm / 短辺 3.83 ± 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 ± 0.02 CFU/ml と 8.92 ± 0.07 CFU/ml であった。*P. vulgaris* ATCC 13315 では 8.67 ± 0.09 CFU/ml と 8.41 ± 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 ± 0.08 CFU/ml, 8.43 ± 0.01 CFU/ml, 8.97 ± 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 ± 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 ± 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。

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ISO7932:2004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

平成 26-28 年度 厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総合分担研究報告書

Yersinia の標準試験法に関する研究

研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	第三室長
研究協力者	吉田麻利江	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	鈴木穂高	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	百瀬愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部	
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部	
	福井理恵	東京都健康安全研究センター微生物部	
	渡邊真弘	一般財団法人日本冷凍食品検査協会	

研究要旨

食品からのエルシニア標準試験法について検討を行った。食品媒介エルシニア症の原因菌は *Yersinia enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の 2 菌種あり、国際的な標準試験法においては *Y. enterocolitica* のみを対象としているものと、両者の試験法を定めているものがある。平成 26 年度は、エルシニア標準試験法検討のステージ 1 として、現在海外で用いられている標準的な本菌の試験方法である BAM 法、USDA FSIS 法及び ISO 法と、国内で用いられてきた食品衛生検査指針（2004 年）に記載された方法の比較検討を行い、最も培養日数の少ない ISO 10273 : 2003 法を中心に検討を行うこととした。しかしながら、平成 27 年度にステージ 2 案作成のため実施した、豚ひき肉及び豚タンへの *Y. enterocolitica* 添加回収試験の結果、ISO 10273 : 2003 法は食品由来の夾雑菌の増殖が抑制されず、添加菌の回収が困難であることが示された。一方、研究協力者らの検討において、BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法と食品衛生検査指針（2004 年）に記載されたエルシニア属試験法がほぼ同一の試験法であり、食品からの *Y. enterocolitica* 添加回収試験において好成績を示すことが明らかとなった。そのため、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における討議により本菌試験法をステージ 1 に戻し、日常的な食品検査のための標準試験法としては ISO 10273 : 2003 法に基づく試験法を NIHSJ-27 として作成し、食中毒発生時の原因食品同定等を目的として BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法に基づく試験法を NIHSJ-30 として検出感度を示し、2 つの試験法の最終案作成を行った。

A. 研究目的

Yersinia 属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、ペストの原因菌である *Yersinia pestis* を発見した Yersin にちなんで命名さ

れた。人に病原性を示すのは *Y. pestis* の他に、食品等により媒介される *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* である。食中毒としてのエルシニア症の原因食品としては、生あるいは

加熱不十分な豚肉や乳製品、本菌を保有するげっ歯類の糞便等に汚染された水等が知られている。本菌による人の感染症は下痢、腹痛、発熱等を主な症状とする。エルシニア症の集団事例は、北米、EU 諸国、中東、オーストラリア等世界各国で報告されている。EU ではカンピロバクター、サルモネラに次ぐ発生数第 3 位の食中毒であり、2014 年にはドイツで約 2500 名、フランスで約 570 名の事例が報告されており、日本国内でも数年ごとの集団事例の発生が明らかとなっている。本菌の国際的な標準試験法としては、International Standard Organization (ISO)が定める定性的試験法 (ISO 10273 : 2003) と、アメリカ合衆国の Food and Drug Administration (FDA)による BAM 法 (2007 年)、同じく米国の USDA FSIS の試験法 (1998 年) がある。現在日本国内では、食品から本菌を検出するための告示法、通知法等が定められておらず、2015 年に発行された食品衛生検査指針において独自の方法が紹介されている。そのため、国際的な試験法と互換性のある、食品からエルシニアを分離するための標準試験法を策定する必要があり、平成 26 年度から平成 28 年度まで本研究を実施した。

B. 研究方法

1) 国際的試験法と食品衛生検査指針 (2004) の比較検討

ISO 10273 : 2003 と BAM 法 (2007 年)、USDA FSIS の試験法 (1998 年) について、概要を翻訳した。微生物試験に関連した専門用語の翻訳は、本研究班の別の分担研究である「バリデーション作業部会」による用語集に則って行った。食品衛生検査指針 (2004) の方法を含

めた 4 つの試験法に関して、増菌培養の温度及び時間、使用培地等についてその内容を比較検討し、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」においてステージ 1 の提案を行った。

2) ISO 10273 : 2003、BAM 法 (2007 年) 及び検査指針 (2004 年) の試験法を用いた豚ひき肉への添加回収試験

市販豚挽き肉 25 g を用い、*Y. enterocolitica* JCM7577 株 (血清型 O8) を添加した。添加菌数は 1 回目が 340CFU/g、2 回目が 4800CFU/g、3 回目が 63CFU/g であった。ISO 法では、検体に 225 ml の PSB ブロスを加え、10 倍乳剤作成後、25°C 2 日間培養するものと (ISO①法)、1 g の検体に 99 ml の ITC ブロスを加えて 25°C 2 日間の増菌培養行うもの (ISO②法) の 2 種の増菌培養を行った。培養後の PSB ブロスは一部をそのまま、一部をアルカリ処理後に、CIN 培地と CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に塗布し、25-30°C で培養して定型集落の発育を確認した。ITC ブロスによる培養では、SSDC 培地及び CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に接種した。BAM 法では、検体に PSB ブロス 225 ml を加え、10 倍乳剤作成後、10°C 10 日間培養し、アルカリ処理又は生理食塩水処理後 CIN 培地、マッコンキー培地及び CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に塗布した (BAM①法)。また、検体に PMP ブロス 225mL を加え、10 倍乳剤作成後、10°C 10 日間培養し、アルカリ処理又は生理食塩水処理後 CIN 培地、マッコンキー培地及び CHROMagar*Y.enterocolitica* 培地に塗布した (BAM②法)。検査指針の方法では、検体に PBS を 225 ml 加え、10 倍乳剤作成後、4°C で 3 週間増菌培養し、アルカリ処理後に IN 培地、VYE 培地及び 10 倍乳剤作成後、10°C 10 日間培養し、

アルカリ処理又は生理食塩水処理後 CIN 培地、マッコンキー培地及び CHROMagarY.enterocolitica 培地に塗布した（検査指針①法）。

3) ISO 10273 : 2003、BAM 法（2007 年）及び検査指針（2004 年）の試験法を用いた豚タンへの添加回収試験

市販豚タン 25 g を用い、研究室保有の *Y. enterocolitica*（血清型 O3 2 株、O5 1 株、O8 1 株、O9 1 株）及び *Y. pseudotuberculosis* 1 株を添加した回収試験を各菌株につき 2 回行った。添加菌数は 6~15CFU/g であった。ISO 法では、前述の ISO①法を行った。BAM 法では、検体に PMP ブロス 225 ml を加え、10 倍乳剤作成後、4℃1、2 及び 3 週間培養した（BAM ③法）。検査指針の方法では、上記の検査指針①法と共に、検体に PMP ブロスを 225 ml 加え、10 倍乳剤作成後、4℃で 1、2 及び 3 週間増菌培養する方法（検査指針②法）を行った。

4) 純培養菌を用いた選択分離培地の検討

Y. enterocolitica JCM7577 株（血清型 O8）を今回検討した試験法で用いられている選択分離培地である CIN 培地、IN 培地、CHROMagarY.enterocolitica、マッコンキー培地、SSDC 培地及び VYE 培地に塗布し、25-30℃で培養して集落の発育を確認した。

5) ISO 10273 : 2003、BAM 法（2007 年）及び検査指針（2004 年）の試験法を用いた豚タンへの添加回収試験

市販豚タン 10 g を用い、研究室保有の *Y. enterocolitica*（血清型 O3）を添加した。ISO 法における添加菌数は 3、15、26、73、79、240、260、730 及び 2600 CFU/g であった。そ

の内 15、79 及び 240 CFU/g を接種した試験では、検体数を 5 とした。その他の試験では、1 検体を用いた。BAM 法及び検査指針の方法における添加菌数は、3 CFU/g であった。ISO 法では、検体に 90 ml の PSB ブロスを加え、10 倍乳剤作成後、25℃2 日間培養するものと（ISO ①法）、その 10 倍乳剤 10 ml に 90 ml の ITC ブロスを加えて 25℃2 日間の増菌培養行うもの（ISO②法）の 2 種の増菌培養を行った。培養後の PSB ブロスは一部をそのまま、一部をアルカリ処理後に、CIN 培地と CHROMagar™Y.enterocolitica (CYE) 培地に塗布し、25-30℃で培養して定型集落の発育を確認した。ITC ブロスによる培養では、SSDC 培地及び CYE 培地に接種した。BAM 法及び検査指針の方法では、検体に PMP ブロス 90 ml を加え、10 倍乳剤作成後、4℃で 3 週間増菌培養し、アルカリ処理後に IN 培地、VYE 培地及び 10 倍乳剤作成後、10℃10 日間培養し、アルカリ処理又は生理食塩水処理後 CIN 培地、マッコンキー培地及び CYE 培地に塗布した（指針法）。

6) ISO 10273 : 2003 におけるストマッカー処理時間が検出率に及ぼす影響の検討

ISO 10273 : 2003 で規定されている試験試料のストマッカー処理時間 2 分間が妥当であるか検討するため、市販豚タン 10 g を用い、研究室保有の *Y. enterocolitica*（血清型 O3）を添加した回収試験を行った。添加菌数は 460 CFU/g であった。ストマッカー処理時間は 30 秒、1 分及び 2 分とし、各群 3 検体を用いて検討した。

7) NIHSJ-27-ST4 案及び NIHSJ-30TS-ST4 案の作成

1) 及び 2) の検討結果を元に、日常的な食

品検査のための標準試験法としては ISO 10273:2003 法に基づく試験法を NIHSJ-27 として作成し、食中毒発生時の原因食品同定等を目的として BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法に基づく試験法を NIHSJ-30 としてステージ 4 案を作成した。

C. 研究結果

1) 国際的試験法と食品衛生検査指針 (2004) の比較検討

平成 26 年度報告書図 1～4 に、ISO 10273:2003 (以下 ISO 法) と BAM 法 (2007 年)、USDA FSIS の試験法 (1998 年、以下 USDA 法) 及び食品衛生検査指針 (2004) の方法 (以下検査指針) についての概要を示した。また、各試験法で使用される培地を平成 26 年度報告書表 1 に示した。各試験法の試験対象は、ISO 法が食品及び動物用飼料、検査指針が食品・環境ふき取り・水・糞便、USDA 法が食肉及び食鳥肉製品であった。BAM 法は対象を規定していなかった。希釈水は、BAM 法と検査指針では Phosphate Buffered Saline (PBS) を、USDA 法では 0.01M PBS を、ISO 法では Peptone Sorbitol Bile salts broth (PSBB) を用いていた。増菌培養前の選択分離培養は、BAM 法と検査指針で行われていた。増菌培養は BAM 法が 10°C10 日、USDA 法が希釈水を ITC ブロスに接種して 25°C2 日間培養するもの、希釈水上清を TSB に接種して 25°C24 時間培養後に、更に BOS に接種して 25°C3 日間培養する 2 段階増菌、及び希釈水の残りを 4°C14 日間培養する 3 通りの増菌培養を用いていた。ISO 法では希釈水を ITC ブロスに接種し 25°C 48 時間培養と、希釈水を 22～25°C2～3 日振盪培養 (あるいは 5 日間静置培養) する 2 通りの増菌培養を用いていた。検査指針の方法

では、希釈水を 4～9°Cで 3～4 週間培養し、1 週間ごとにその一部をアルカリ処理して分離培養を行う低温培養法を用いていた。いずれの試験方法でも、検体希釈液或いは増菌培養液について、アルカリ処理を行うものを行わないものの両方を選択分離培養に用いることとされていた。選択分離培地は BAM 法が Cefsulodin, Irgasan and novobiocin (CIN) 寒天培地とマッコンキー寒天培地を、USDA 法が CIN 寒天培地と *Salmonella/Shigella* agar with sodium desoxycholate and calcium chloride (SSDC) 培地を、ISO 法が CIN 寒天培地と SSDC 培地を、検査指針が IN 寒天培地 (CIN 寒天培地から Cefsulodin を除いたもの) 及びエスクリン加 IN 寒天培地を用いていた。選択分離培地の培養時間は、BAM 法が 30°C1～2 日、USDA 法が SSDC 培地の培養温度が 30°C24 時間、CIN 培地が 32°C18 時間であった。ISO 法は CIN 培地、SSDC 培地共に 30°C 24～48 時間、検査指針では IN 培地とエスクリン加 IN 培地の双方で 30°C24 時間の培養時間であった。確認試験については、4 つの試験法すべてで尿素分解性を確認することとされていた。それ以外には、BAM 法では Lysine arginine iron agar (LAIA) 斜面培地を用いてリジン及びアルギニンの脱炭酸性状、ガス非産生、硫化水素非産生を確認すると共に、Bile esculin agar を用いてエスクリン非分解の確認を行うものであった。USDA 法では、シモンズクエン酸培地を用いてクエン酸陰性を、クリグラー鉄寒天を用いてブドウ糖の発酵とガス及び硫化水素の非産生を確認するとされていた。ISO 法ではクリグラー鉄寒天を用いると共に、オキシダーゼ陰性を確認することとなっていた。検査指針の方法では、グラム染色、オキシダーゼ陰性、オルニチン

及びラムノースの分解を確認することとしていた。

各試験法での、分離培養で定型集落を得るまでの最長所要時間は、BAM 法が 11~12 日間、USDA 法が 15 日間、ISO 法が 7 日間、検査指針の方法が 4 週間 1 日であった。

2) ISO 10273 : 2003、BAM 法 (2007 年) 及び検査指針 (2004 年) の試験法を用いた豚ひき肉への添加回収試験

平成 27 年度報告書表 1 に、豚ひき肉への添加回収試験結果を示した。PSB ブロスを用いて 25°C で増菌する ISO①法、ITC ブロスを用いて 25°C で増菌する ISO②法、PSB ブロスを用いて 10°C で培養する BAM①法、PMP ブロスを用いて 10°C で培養する BAM②法、PBS を用いて 4°C で培養する検査指針①法のいずれにおいても、添加した *Y. enterocolitica* の発育は見られなかった。1 回目の試験において、ISO①法でアルカリ処理後の CIN 培地から、BAM ①法で生理食塩水処理後の CHROMagarY.enterocolitica から、BAM②法でアルカリ処理後の CIN 培地から、検査指針①法でアルカリ処理後の IN 培地及び VYE 培地から、疑わしい集落が観察された。また、2 回目の試験でも ISO①法でアルカリ処理なし及び処理後の CIN 培地から、ISO②法でアルカリ処理なしの CHROMagarY.enterocolitica から、BAM①法でアルカリ処理及び生理食塩水処理後の CHROMagarY.enterocolitica から、BAM②法でアルカリ処理及び生理食塩水処理後の CHROMagarY.enterocolitica から、疑わしい集落が観察された。同様に 3 回目の試験でも、ISO ①法でアルカリ処理後の CIN 培地から、BAM ①法の生理食塩水処理後のアルカリ処理及び生理食塩水処理後の CHROMagarY.enterocolitica

から、BAM②法でアルカリ処理後のアルカリ処理及び生理食塩水処理後の CHROMagarY.enterocolitica 及び CIN 培地から、疑わしい集落が観察された。しかしながら、生化学性状確認試験において、これらの集落は全て接種菌でないことが確認された。なお、3 回目の試験時のみ CHROMagarY.enterocolitica の培地組成が変更され、従来のもものと新製品を用いたが、疑わしい集落は新製品の平板で観察された。いずれの方法でも、定型集落と異なる夾雑菌の集落が多く形成された。

3) ISO 10273 : 2003、BAM 法 (2007 年) 及び検査指針 (2004 年) の試験法を用いた豚タン肉への添加回収試験

平成 27 年度報告書表 2 に、豚タンへの添加回収試験の結果を示した。PSB ブロスを用いて 25°C で増菌する ISO①法では血清型 O3 の 1 菌株のみが検出された。PMP ブロスを用いて 4°C で培養する BAM③法では、1 週間では添加菌の回収は見られなかったが、2 週間及び 3 週間の培養では大半の菌が回収された。PMP ブロスをもちいて 4°C で培養する検査指針②法では、1~3 週間において半数以上の菌株が回収された。一方、PBS を用いて 4°C で培養する検査指針①法では、2 週間の培養が最も好成績であったが、1/3 の菌株が回収されたのみであった。BAM③法と検査指針②法は、使用培地及び条件は同じであり、アルカリ処理の方法のみが異なっており、BAM 法では水酸化カリウムの終濃度が 0.45% で 5~10 秒の処理であるのに対し、検査指針の方法では水酸化カリウムの終濃度が 0.375% で処理時間が 30 秒であった。

4) 純培養菌を用いた選択分離培地の検討

各試験法で使用された選択分離培地に、*Y. enterocolitica* JCM7577 株（血清型 O8）を画線塗抹し、25℃で 48 時間培養した集落の形態を平成 27 年度報告書表 3 に示した。CIN 培地及び IN 培地ではピンクから赤色で中心に色の濃い部分がある集落であった。CHROMagar*Y. enterocolitica* では集落密集部位では白色を呈し、単一集落を形成した部位では藤色の集落を形成した。これは、集落密集部位では各集落に酵素基質が十分にいきわたらないためと思われた。マッコンキー培地ではエルシニア属菌は乳糖発酵が遅く、無色で小型の集落を形成していた。SSDC 培地では橙赤色の集落を形成した。VYE 培地では *Y. enterocolitica* はエスクリンを分解しないため黒色ハローのないピンク色の集落を形成し、エスクリン産生菌の中から集落を見つけるのは困難であった。

5) ISO 10273 : 2003、BAM 法（2007 年）及び検査指針（2004 年）の試験法を用いた豚タンへの添加回収試験

平成 28 年度報告書表 1 に、豚タンへの添加回収試験結果を示した。検査指針の方法では、3 cfu/g の添加により、増菌培養 1 週間で CIN 培地及び CYE 培地上に *Y. enterocolitica* の定型集落が認められ、CYE 培地上では増菌培養 2 週間でも定型集落が認められた。一方、PSB ブロスを用いて 25℃で増菌する ISO②法では、3 cfu/g、15 cfu/g 及び 26 cfu/g の添加では全ての培養条件で添加菌が回収されなかった。73 cfu/g の添加でアルカリ処理を行った場合に CIN 培地及び CYE 培地上に定型集落が認められ、79 cfu/g の添加では 5 検体のうち CYE 培地で 1 検体が陽性、4 検体が陰性となり、CIN 培地では 5 検体が陰性となっ

た。240 cfu/g の添加では、CIN 培地で 5 検体中 1 検体が陽性、CYE 培地で 5 検体中 4 検体が陽性の結果を示した。260 cfu/g 及び 730 cfu/g の添加では、CIN 培地で陰性、CYE 培地で陽性の結果を示し、2600 cfu/g の接種では、両培地で陽性の結果が得られた。一方、ISO②法でアルカリ処理を行わない場合、ITC ブロスを用いて 25℃で増菌する ISO①法では、添加した *Y. enterocolitica* の発育は見られなかった。

6) ISO 10273 : 2003 におけるストマッカー処理時間が検出率に及ぼす影響の検討

平成 28 年度報告書表 2 に、ISO 10273:2003 におけるストマッカー処理時間を 30 秒、1 分及び 2 分とした場合の検出率を比較した結果を示した。アルカリ処理を行わない場合は、ストマッキング時間 30 秒では CYE 培地上に定型集落が認められず、1~2 分で認められる結果となった。一方、アルカリ処理を行う場合は、ストマッキング処理時間が 30 秒でも検出率の低下は見られなかったため、ストマッキング時間を 1 分としても、アルカリ処理を行う場合、行わない場合の両方において、原法の 2 分と検出率が変わらないことが示された。

7) NIHSJ-27-ST4 案及び NIHSJ-30TS-ST4 案の作成

食品からの病原性エルシニア・エンテロコリチカ及びシュードツベルクローシスを検出するための標準試験法として、ISO 10273 : 2003 を基本として、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、確認試験等からなる NIHSJ-27 を作成した

(別添 1)。また、作業部会において一部に独自の確認を行い、ストマッカー時間を 2 分から 1 分に変更すること、酵素基質培地として CHROMagarY.enterocolitica を併用すること、確認試験の使用培地の一部を国内で他の食中毒菌試験に用いられている培地に変更することとした。また、食中毒発生時の原因食品同定を目的とした参照法として、BAM 法(2007 年)及び検査指針(2004 年)を基本とした NIHSJ-30TS を作成した(別添 2)。

D. 考察

国際的に整合性のある食品からの *Yersinia* 標準試験法として検討することになった ISO 法に基づく試験法 NIHSJ-27 と、BAM 法及び食品衛生検査指針の方法に基づく試験法 NIHSJ-30TS について、豚タンを用いた添加回収試験を実施した結果、BAM 法及び検査指針の方法では 3 cfu/g の添加により、添加菌の回収が可能であった。一方、ISO 法の Level of detection 50% (LOD₅₀)は、79 cfu/g と 240 cfu/g の間にあると思われた。以上より、検出感度は NIHSJ-30TS が NIHSJ-27 より優れていたが、前者は増菌培養時間が 1~3 週間と、日常的な食品検査に用いるには長いため、増菌培養日数が 2 日間である後者と、目的により両者を使い分けるのが適当であると思われた。また、本研究の検討により、両試験法共にストマッカー処理時間は 1 分間とすること、各試験法で定められた選択分離寒天培地に加え、酵素基質培地として CHROMagarY.enterocolitica を併用することとし、より実効性の高い試験法とした。

E. 結論

国際的標準試験法と互換性のある食品か

らの *Yersinia* 試験法として、平成 26 年度の検討で最も所要時間が短かった ISO 10273 : 2003 を基礎とした標準試験法案を作成・検討することとしたが、平成 27 年度に実施した豚肉への添加回収試験の結果、ISO 法では夾雑菌の多い豚ひき肉検体においても、豚ひき肉に比べ夾雑菌が少ない豚タン検体においても、添加回収試験による添加菌の回収が困難であった。研究協力機関による検討から、PMP ブロスを用いて 4°C で培養する *Y. pseudotuberculosis* の試験法として BAM に記されている方法(2004 年版食品衛生検査指針にも記されている方法)が最も分離率が優れていたため、本試験法の検討をステージ 1 に戻し、再度検討した。その結果に基づき、日常的な食品検査のための試験法として比較的迅速に結果が得られる ISO 法に基づく標準試験法 NIHSJ-27 (病原性エルシニア・エンテロコリチカの試験法)と、食中毒原因究明のための試験法として培養日数が長いものの検出感度に優れる BAM 法及び検査指針の方法に基づく参照試験法 NIHSJ-30TS (病原性エルシニア・エンテロコリチカ及びシュードツベルクロシスの試験法)の 2 種類の試験法を作出した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 26-28 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

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）

五十君 静信（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）

協力（委託）研究者： 齋藤 利江（一般財団法人日本冷凍食品検査協会）

吉田 信一郎（一般財団法人日本食品分析センター）

森 曜子（公益財団法人日本適合性認定協会 認定センター）

研究要旨

わが国の食品衛生法では食品(種)ごとに細菌数(生菌数)、大腸菌群、E. coli(糞便系大腸菌群)等の規格基準が規定されており、それぞれ個別に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、ISO(国際標準化機構)が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法(Bacteriological Analytical Manual ; BAM 法)との調和が計ら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ける討議・検討の結果、今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認されている。

ISO 微生物試験法における菌数算定法は大きく分けて 2 パターン存在し、各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と、各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく、ISO7218 を参照するように記述されている場合に分かれる。さらに後者は ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照するようになっている場合と、ISO 7218:1996/Amd.1:2001 または ISO 7218:1996 を参照するようになっている場合の 3 パターンに分かれる。ISO でも菌数算定法を統一する動きがあるが、本研究班でもこれらの問題点について検討を進めることとなった。

一般財団法人日本食品分析センターでは、H26～27 年度に TBX 寒天培地(44 °C, 18～24 時間培養)において、大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討を行った。一般財団法人日本冷凍食品検査協会では、H26～27 年度に食品から検出される菌種について、食品の加工による菌の損傷も視野に入れ、国内で広く用いられている一般細菌数(生菌数)試験法(以下従来法)と ISO4833:2013(一般生菌数計算法)法(以下 ISO 法)により、同一検体に対して生菌数測定を行い、試験法の違いによる結果の相違について検証した。これらの結果を基に、今後の菌数算定法について作業部会で方向性の検討を行った。H28 年度には、ISO 26140 の改正にあわせ、試験法の妥当性評価

手法を衛生指標においてどのように考えるかの検討を、妥当性評価作業部会と合同作業部会を組織し、検討を行った。

A. 研究目的

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, 食品(種)ごとに細菌数(生菌数), 大腸菌群, *E. coli*(糞便系大腸菌群)等の規格基準が規定されており, それぞれ個別に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, ISO(国際標準化機構)が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法(Bacteriological Analytical Manual ; BAM 法)との調和が計ら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ける討議・検討の結果, 今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として, ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認された。これまで Enterobacteriaceae(腸内細菌科菌群), Presumptive *Escherichia coli*(推定大腸菌)及び Coliforms(大腸菌群)に関する標準法の策定作業を進めてきたが, 今後は Microorganisms(一般生菌数)及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌)の試験法並びに試験結果の算定法を確立することを検討課題とすることとした。

一般財団法人日本食品分析センターでは, H26~27 年度に TBX 寒天培地(44 °C, 18~24 時間培養)において, 大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討を行った。

一般財団法人日本冷凍食品検査協会では, H26~27 年度に食品から検出される菌種について, 食品の加工による菌の損傷も視野に入れ, 国内で広く用いられている一般細菌数(生菌数)試験法(以下従来法)と ISO4833 : 2013(一般生菌数計数法)法(以下 ISO 法)により, 同一検体に対して生菌数測定を行い, 試験法の違いによる結果の相違について検証した。

これらの結果を基に, 国内の衛生指標菌と菌と国際標準である ISO 法との相違に関する知見を収集し検討した。また菌数算定法について, ISO 微生物試験法における菌数算定法について現状をまとめた。H28 年度には, 改定された妥当性確認ガイドライン ISO 14160 を, 妥当性確認作業部会と合同で検討した。

B. 研究方法

- 1) ISO 微生物試験法における菌数算定法
ISO 11290-2 (1998 年; リステリア・モノサイトゲネス), ISO 15214 (1998 年; 中温性乳酸菌), ISO 6888-1 (1999; コアグララーゼ陽性ブドウ球菌), ISO 16649-2 (2001 年; β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌), ISO 17410 (2001; 低温菌), ISO 4833 (2003; 一般生菌数), ISO 15213 (亜硫酸塩還元菌), ISO 7932 (2004; 推定セレウス菌), ISO 7937 (2004; ウエルシュ菌), ISO 21528-2 (腸内細菌科菌群), ISO 4832 (2006; 大腸菌群), ISO/TS 10272-2 (2006; カンピロバクター属菌), ISO 21527-1, 2 (2008; カビ・酵母)について菌数算定法を確認した。
- 2) ISO 7218 (2007 年版) の和訳を行った。
- 3) ISO 法における大腸菌試験法としてのの

TBX 寒天を用いた方法について、標準試験法の検討を行った。

4) 一般生菌数の試験法では、国内法と ISO 法で培養温度が異なることから、両者の相違について市販食品を用いて検証した。

C. 研究結果及び考察

1) 菌数算定法のまとめ

ISO 微生物試験法における菌数算定法は大きく分けて 2 パターン存在し、各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と、各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく、ISO 7218 を参照するように記述されている場合に分かれていた。後者は ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照するようになっている場合と、ISO 7218:1996/Amd. 1:2001 または ISO 7218:1996 を参照するようになっている場合の 3 パターンに分かれていた。

ISO 7218 (2007 年版) では、集落数採用範囲が従来の 15-300 cfu から 10-300 cfu に変更となっていた。さらに、使用するペトリ皿の枚数として、ISO 17025 に準拠した管理を行っている試験所では各希釈段階での使用ペトリ皿は 1 枚、ISO 17025 に準拠した管理を行っていない試験所では各希釈段階での使用ペトリ皿は 2 枚となっており、試験所認定を受けているかどうかで係数の方法が異なっていることが判明した。ISO 7218

(2007 年版) については和訳版がなかったため、和訳を行った。

2) ISO 7218 (2007 年版) の和訳

ISO 7218 (2007 年版) の和訳を行った。語句の統一を含めて作業を進めた。

3) TBX 寒天培地 (44 °C, 18~24 時間培養) において、大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討では、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^4 cfu 以下の平板においては、総(典型的及び非典型的)集落数の増加に伴い、大腸菌の集落が小さくなる傾向が認められた

が、回収率は 80%以上であり、大腸菌集落数の測定に大きな支障は認められなかった。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^3 ~ 10^4 cfu の平板においても、大腸菌数を推定することが可能と考えられた。一方、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^5 cfu 以上の平板においては、大腸菌がきわめて小さい集落を形成し、典型的集落の判定が困難となり、回収率が 60 %~70 %とやや低い事例も認められた。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^5 cfu 以上の平板においては、大腸菌数の推定が困難な場合があると考えられた。

4) 一般生菌数試験法では、国内の公定法である従来法と ISO 法の培養条件の違いが、加熱処理及び凍結処理のストレスを与えた 5 種類の菌に対して与える影響を評価した。その測定結果は、30°C、72 時間培養で高くなる傾向があったが、全ての測定値において 1Log CFU/g の範囲内であり、極端な相違は認められなかった。*Bacillus subtilis* では、30°C、72 時間培養が最も高くない測定値となったのは、発育してくるコロニーが大きく、培養時間の経過により近隣のコロニーと重なりあったためである。培養条件による 5 種類の菌の測定値(対数)の差は、ストレス処理を行い培養時間が短いほど差を生じた。

D. 結論

・ ISO 微生物試験法における菌数算定法は各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と、各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく、ISO 7218 を参照するように記述されている場合に分かれていた。

・ ISO 7218 を参照するように記述されている場合、ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照するようになっている場合と、ISO 7218:1996/Amd. 1:2001 または ISO 7218:1996 を参照するようになっている場合

の3パターンに分かれていた。

- ・ISO 7218 (2007年版)では、集落数採用範囲が変更になっている。

- ・ISOでは試験所認定を受けているか否かで係数の算定方法が異なっている。

- ・TBX寒天培地を用いるISO法は、大腸菌の菌数測定法として有用と思われ、その測定可能な範囲を確認することが出来た。

- ・国内の公定法である従来法とISO法の培養条件の違いが、加熱処理及び凍結処理のストレスを与えた菌に対して与える影響の検討により、ISO法の培養条件(30℃、72時間)にて生菌数を測定した場合は、その測定値は概ね高くなることが示された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

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

平成 H26-28 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分担研究
総合分担報告書

試験法の妥当性評価・衛生指標菌

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 部長
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授

微生物試験法の妥当性確認（バリデーション）あるいは検証（ベリフィケーション）に際しては、国際的に認証されたスキームで実施することが要請される。そのスキームの手本とされてきた ISO16140 の改訂版が 2016 年 6 月に出た。変更内容には、AOAC:2012.2 版ガイドラインの内容に合わせた、と推察される部分が少なからずあった。ISO16140:2016 Part1「用語」、Part2「代替法バリデーション」と改訂版では多くの Part に分かれた。確定試験（Confirmation）やペアード・アンペアードスタディ（paired/unpaired study）などの新しい概念が随所に加わっている。こうした国際動向を反映し、かつ我が国において実現可能なガイドラインとすべく、Part1 を参照しつつ、Part2 の章構成に合わせて妥当性ガイドライン案を作成した。本文は概ね完成した。一方、生菌標準物質の開発に関しては、これまで実用化を困難にしていた、オフサイトでの調製技術の見通しを立てることができた。すなわち、チミジン・ゼラチン重層法によって、セルソーターで調製した生菌が、1 週間の冷蔵保存後、95%以上のコロニー形成率を示した。1 週間は世界中に輸送するのに十分な時間である。我が国は、平成 24 年頃から食品の微生物試験法を担当する ISO TC34/SC9 の総会に積極的に参加し、平成 29 年総会の東京開催に向けて P メンバーとなる予定であるが、その活動に積極的に関わっている。

A. 研究目的

我国から発信する微生物試験法を国際的に通用するものにするには、国際的に認証されたスキームによって妥当性確認（バリデーション）しなければならない。一方、バリデーションされた試験法を事業者等が導入する際には、それが確実に実施できることを検証（ベリフィケーション）しなければならない。いずれの場合も、基本となるのは国際的に認証されたスキームである。従来から、そのモデルとして AOAC: 2012.2 版ガイドライン、ISO16140: 2003 等を精査してきたが、ISO16140 は 2016 年 6 月に大幅に改訂された。本研究では、こうした国際的な改訂動向を反映させた最新版ガイドライン

案を作成することを、第一の目的とした。また、同時に行われた、セレウス菌、セレウリド、エルシニア・エンテロコリチカ、衛生指標菌の標準法作成に際して、バリデーションの観点から専門的意見を述べた。

一方、妥当性確認において重要な生菌標準物質に関しては、既にフローサイトメトリーを利用したオンサイト調製法が開発されていたが、本研究では、これを実用化させるための諸課題を解決することを第二の目的とした。すなわち、食品中の少数生菌検出法のバリデーションに適用すること、実用上問題となっていた損傷菌の標準物質を調製すること、さらに世界中のどこへ移送しても利用できる

ようなオフサイト調整法を開発すること、などである。

B. 研究方法

(1) バリデーション・ガイドラインの作成

通知文書として公開する際の懸案事項に関して議論した。具体的に AOAC、ISO 文書の相違点の精査から始めた。2012 年 2 月に公開された AOAC のガイドラインには、それまでのガイドラインに比べて、いくつかの重要な変更点があった。例えば、定性試験を共同試験で行う場合に、各試験室で分析する検体の数、すなわち繰返し数が、従来の 6 から一挙に 2 倍の 12 となった。しかし、その理由はどこにも記載がないばかりか、AOAC の Board メンバーに直接訊ねても明確な答えが返ってこなかった。そこで、文献のみならず、AOAC や ISO/TC34/SC9 などの国際会議での議論を通じて、そのような世界動向を、調査分析した。さらに、ISO16140 は 2016 年 6 月に大幅な改定が行われ、ISO16140:2016 Part1「用語」、Part2「代替法バリデーション」となったので、Part1 の内容を参照しつつ、Part2 の章構成に合わせたガイドラインを作成した。

(2) 微生物生菌標準物質の実用化を目指す開発研究

(イ) 食品中の 1 細胞検出

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。次に、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。

(ロ) 冷凍食品などで問題になる損傷菌について、標準物質の調製の可能性を検討した。損傷菌はその生成の原因の違いによって状態が異なると思われる。本研究では、高濃度スクロースによる浸透圧

ストレスによって、損傷菌が起こる、との知見に基づき、その、コロニー形成過程に及ぼす影響を調べた。

(ハ) オフサイトでの生菌標準物質の調製

オフサイトでも利用するためには、国内外、何れの場所を想定しても 1 週間ほどの保存安定性があれば十分と考えた。そこで、生菌標準物質調製後 1 週間の一時保存法について検討した。すなわち、保存中の細胞分裂を抑制しつつ、かつ使用時にはコロニー形成能を抑制しない方法について検討した。

C. 研究結果

(1) バリデーション・ガイドラインの作成

当初、AOAC2012 版、及び想定される ISO 改訂版で示されている内容に沿って、ガイドライン原案を作成しながら、両方で異なる点を調査し、議論してきたが、2016 年 6 月の ISO16140 改訂版では、改めて大幅な内容変更があった。Part1 の別冊化に伴い、用語、訳語の整理に重点を置いた。例えば、キーワードである「validation」は、従来「妥当性確認」と訳してきたが、具体的な内容の理解の普及度を鑑み直接「バリデーション」というカタカナ表記にすることとした。また「study」も頻出する言葉であり、従来「研究」や「試験」と訳してきたが、他分野で使用されてきた研究や試験とは、内容や概念が非常に異なるので、これも直接「スタディ」とカタカナ表記にすることとした。これらの議論を経て、通知文書にできる形のバリデーション・ガイドラインの作成作業を進め、本文の部分について大略完成した。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

(イ) 食品中のサルモネラ 1 細胞の検出

サルモネラ定性試験法 (NIHSJ 標準法)

及び測定キットで行い、いずれの方法でも1細胞を添加した2種類の食品の両方法で、1細胞検出ができることが示された。その結果について、AOAC INTERNATIONALでのサイエンス・セッションで、「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。

(ロ) 損傷菌の標準物質

試験菌として *Escherichia coli* ATCC 8739 のコロニー形成過程を自動計測し、コロニー形成開始時間と最終的なコロニー形成率を調べた。その結果、スクロース20%処理細胞から出発して、最終的に傷害菌標準物質として利用できそうな画分を得ることができた。

(ハ) オフサイトでの生菌標準物質の調製

チミジン-ゼラチン重層法が有効であることを確認した。すなわち、予め10cmシャーレ内に調製しておいたTSA上にチミジン-ゼラチン重層を置き、常温で5min程度静置してチミジン-ゼラチン重層を液体状にした後、TSA上に広げた。この方法で、1週間保存中に細胞分裂はせず、保存後100%のコロニー形成率を示した。5個、10個を滴下した試料でも、各々85%、90%のコロニー形成率を示した。以上により、オフサイトで調製した生菌標準物質が遠隔地へ輸送して利用できる見通しを得た。

D. 結論

AOACの改訂(2012.2)、ISO 16140の改訂が進む中で、食品マトリクス分類の考え方や汚染食品菌濃度条件など、基本的事項が大幅に改訂される動向に対応して、我が国における妥当性確認ガイドラインの作成を進めてきた。作成されたガイドラインは、ISO 16140: 2016改訂版に基づいており、一連のNIHSJ標準法の妥当性の根拠ともなる内容である。

一方、生菌標準物質に関しては、サルモネラ単一生菌の食品添加試験での検出に成功し、汚染食品菌濃度の調製法における不確かさを、合理的かつ抜本的に解決できる見通しが得られた。また損傷菌標準物質の調製、オフサイトでの生菌標準物質の調製は、実用的見地から大きな成果である。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表(*は添付)

(原著論文)

1. *H. Ogawa, S. Nasu, M. Takeshige, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. *Sci. Rep.*, 5:10061 (2015) doi:10.1038/srep10061
2. *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(2), 479-483 (2014).

(国際学術集会)

1. H. Matsuoka: Key Technology for a More Rational Validation — Standard Material of Viable Microbial cells (SMVM)— . 1st Asia Pacific Food Microbiology Advisory Board Meeting organized by bioMérieux, December 2-3, 2015, Seoul, Korea.
2. H. Matsuoka, R. Johnson (Organizers): Standard Material of Viable Microbial Cells (SMVM). AOAC International 128th Annual Meeting

and Exposition, September 10, 2014, Boca Raton, USA.

3. H. Matsuoka: Order-made SMVM prepared in situ toward the application to broad spectrum of strains. AOAC International 128th Annual Meeting and Exposition, September 10, 2014, Boca Raton, USA.
4. M. Saito, T. Yoshida, N. Takatani, H. Ogawa, S. Igimi, H. Matsuoka: Application of made-to-order standard material of viable microbial cells (SMVM) to the evaluation of agar media. AOAC International 128th Annual Meeting and Exposition, September 10, 2014, Boca Raton, USA.

(国内学術集会)

1. 齊藤美佳子、高谷周督、五十君静信、松岡英明: 生菌標準物質をオフサイトで利用するための一時保存法. 第43回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2016.9.26).
2. 齊藤美佳子、吉田智紀、高谷周督、小川廣幸、松岡英明: 浸透圧ストレスによって調製した傷害菌モデルの性質. 第42回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2015.9.2).
3. 小川廣幸、松岡英明、齊藤美佳子: タイムラプス影像解析法による寒天培地の性能評価. 第42回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2015.9.2).
4. 松岡英明: 微生物試験迅速法におけるバリデーションとデファクトスタンダードの課題: 日本防菌防黴学会女性研究者の会、第14回学術講演会、東京 (2015.4.23).
5. 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).
6. 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 (2014.9.24).
7. 高谷周督、吉田智紀、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 (2014.9.24).
8. 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 (2014.9.24).
9. 松岡英明: AOACを中心とした微生物試験法バリデーションの最新情報. 日本防菌防黴学会第42回通常総会敷設講演会、大阪 (2014.5.28).

その他(アピールなど)

- (1) 我が国における微生物試験標準法の策定に際して、国内の公定法と国際的な参照法とのハーモナイゼーションは、大きな課題であったが、常に国際動向を注視しつつ議論を進めてきたことが、多くの NIHSJ 標準法の作成に繋がり大きな実績となった。間もなく完成する日本語版の妥当性確認ガイドラインは最新の ISO 16140 に基づくもので、行政的にも学術的にも、国際的視野に立った議論の規範となりえるもので、その意義は極めて大きい。
- (2) 生菌標準物質の開発研究の成果は、微生物学の根本的命題である「コロニーとは何か？」に対する答えを提

供できる可能性もある。食品微生物試験のバリデーション方法論の革新にとどまらず、微生物学や細胞生物学などの基礎科学に対しても大きな貢献を成すことが期待される。

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」

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 梶田 弘子 (岩手県環境保健研究センター 保健科学部)
松田 りえ子 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部)
森 曜子 (公益社団法人 日本食品衛生協会)
大城 直雅 (国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部)
藤田 和弘 (日本食品分析センター 多摩研究所)
福沢 栄太 (日本食品分析センター 彩都研究所)
佐藤 信彦 (日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター)
佐野 勇氣 (日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター)
橘田 規 (日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター)

研究要旨：セレウス菌は農産物を汚染し、米飯、チャーハン、焼き飯などが原因の嘔吐型食中毒を引き起こす。症状発現物質は耐熱性ドデカデブシペプチドであるセレウリドで、広く食中毒危害性を有する。加熱によって菌が死滅してもセレウリドは残存し、そのため、食品中の危害性を保持し続ける。標準セレウリドが市販流通、安定供給されるようになった。質量分析装置を用いてのセレウリド試験法の策定を試みた。パックライスからのメタノールによる抽出法、平衡化した前処理カラムと同一のメタノール濃度になるようにした検体のカラム添加、LCのグラディエント条件、およびMS/MSの条件を検討した。その結果、無添加パックライス中に妨害イオンが検出されず、優良な絶対検量線が得られた。試験法の性能評価を行った結果、十分に利用可能な試験法の策定が可能となった。今後、食品のセレウリドに対する安全性の検証やセレウス菌食中毒原因食品からのセレウリド検出に、本法が利用されることを望む。

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 の耐熱性デブシ酸ペプチドで、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。

セレウリドの試験方法には、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。我が国においてスunksは、一部の研究機関が限定的に保有しており、まったく普及していない。従って、セレウリドを試験する際、動物実験を適応することが出来ない。また、動物実験の特徴として、比較的高濃度・高容量の対象検体が必要であること、微量分析できないこと、動物の個体差が大きいことがあげられ、食品中のセレウリドを試験する方法に動物実験を応用することには、相当の疑問がある。

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^{1,2,3)}。セレウリドの Hep-2 細胞への影響

の作用点は細胞内のミトコンドリアであり、ミトコンドリアの膨化が細胞質内の空胞形成の本体であることも明らかになっている。一方、ミトコンドリアへの作用が嘔吐現象を誘発するものであるとは考えられず、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 細胞を用いてセレウリド試験法を策定するという観点からは、そ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種類のデブシ酸およびアミノ酸が、3回繰り返し直列に配置され、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、各種の試験法を精密化できる。その中で、物質同定力が非常に優秀な質量分析装置は、「標準物」の適応に最も大きな恩恵を受ける。

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^{1,2)}。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用い、質量分析装置によるセレウス菌嘔吐毒素セレウリドの試験法確立を目的とし、平成 26～28 年度にかけて検討した。最終的に性能が確認された試験法を策定した。

B . 実験方法

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

パックライスにメタノール、含水メタノールを加え、攪拌後、ガラスろ紙あるいは遠心分離法で液体を回収し、セレウリドを抽出した。抽出は数回反復した。

ロータリーエバポレーターあるいは窒素ガスの噴射で抽出液を濃縮した。

B-4. 質量分析装置 LC-MS/MS あるいは LC-MS によるセレウリドの検出と定量

LC-MS/MS による分析例を以下に挙げる。

測定条件例

・高速液体クロマトグラフ: UltiMate3000 [Thermo Scientific 製]

・タンデム型質量分析装置: QTRAP 4500 [SCIEX 製]

・カラム: オクタデシルシリル化シリカゲル (内径 2.1 mm、長さ 50 mm、粒子径 3.5 μm) (Zorbax Eclipse XDB-C18)

・カラム温度: 40

・流量: 0.2 mL/min

・移動相:

A ; 0.1 vol% ギ酸及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液

B ; 0.1 vol% ギ酸及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム含有メタノール溶液

・グラジエント条件 ; 0 ~2 min (A:B=20:80) 16 min

(A:B=5:95)

16.01 ~ 20 min (A:B=20:80)

・注入量: 1~10 μL

・イオン化モード: ESI (+)

・イオン源温度: 700

・イオン化電圧: 5.0 kV

・プリカーサーイオン: m/z 1171 (アンモニウム付加体)

・プロダクトイオン: m/z 172 (定量用)、 m/z 357、 m/z 314 (確認用)

LC-MS による分析例を以下に挙げる。

・機種: LC 部; Acquity UPLC [Waters 製]

・MS 部; Xevo TQ [Waters 製]

・カラム: Mightysil RP-18 GP, 2.0 mm

×50 mm, 3 μm[関東化学製]

・移動相:

A液; 0.1 vol%ギ酸及び10 mMギ酸アンモニウム溶液

B液; メタノール

・グラジエント:

A : B (20 : 80) 0 min

A : B (5:95) 2 min 10 min リニア

アグラジエント

A : B (80 : 20) 10.01 min

A : B (80 : 20) 10.01 min 13 min

A : B (20 : 80) 13.01 min

A : B (20 : 80) 13.01 min 16 min

保持

・カラム温度: 50

・流量: 0.2 mL/min

・注入量: 5 μL

・キャピラリー電圧: ESI(+); +3000 V

・イオン源温度: 150

・脱溶媒ガス温度: 600

・コーンガス流量: 窒素 50 L/Hr

・脱溶媒ガス流量: 窒素 1200 L/Hr

・コリジョンガス: アルゴン、0.15 mL/min

・設定質量数等:

プリカーサイト(m/z): 1171

プロダクトイオン(m/z): 1126, 172, 357, 314

B-5. 試験法の性能評価

LCのクロマト、およびMSのマススペクトルを解析し、試験法の適否を評価した。さらに、添加回収実験による性能評価を行った。

C. 結果

C-1. LC-MS/MSによるセレウリド試験法の検討

和光純薬工業株式会社が供給するセレウリドを、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/z356.8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製のセレウリドも、同様の結果を示した。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 0.9999と良好な直線性を示した

5 ng/gになるようにセレウリドをパッケージに添加し、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。3回実験を行った。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。

C-2. LC-MSによるセレウリド試験法の検討

セレウリドの検量線をLC-MSで作製した。1.0から10 ng/mlの範囲で、 $R^2=0.996$ の直線性を示した。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。しかしながら、夾雑イオンも多く検出され、セレウリドイオン検出は出来るものの、機器分析評価上は、疑問の残るところとなった。

$M/z=1171$ のシグナルを標的にセレウリドのバックライスへの添加回収実験を行った。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。真度（回収率）86.3%、併行精度 RSD 2.2 %、および室内精度 RAD 4.2% を示した。この結果は、標的イオンを対象にすれば、LC-MS を用いてセレウリドの検出が可能であることを示すが、上述のように、セレウリドイオンの周囲に検出される夾雑イオンの存在は、機器分析の評価上、問題であることは否定できない。

C-3. 改良した LC-MS/MS によるセレウリド試験法の検討

図 1 に改良したセレウリド試験法のフローチャートを示した。改良法では、バックライスからのメタノールによる抽出と、前処理カラムへの検体の添加条件、および、適正な LC グラディエント条件を検討した。バックライスから 100%メタノールによる抽出後、含水メタノール(70%)による 3 回の抽出法を選抜した。抽出液を濃縮することなく希釈して 50%メタノールで平衡化した前処理カラムに添加する方法を採用した。その後、LC-MS/MS 分析を行った。

セレウリドを添加しないバックライスを分析（1 日 2 回分析を 1 日実施）した。

無添加区からはセレウリドのピークは検出されず、選択性に問題はないと考えられた。

同一の添加試料（セレウリドを 5 ng/g の濃度で添加したバックライス）を、1 日 2 回分析を 5 日間繰り返した。元配置分散分析により解析し、真度、併行精度および室内精度を算出した。添加回収試験の結果、真度は 94.3% 及び 94.5% を示した。また、精度を $HORRAT_r$ で評価したところ、いずれも 2 以下であった。また、定量限界（室内精度の標準偏差に 10 を乗じたもの）0.9 ng/g ~ 4.0 ng/g の性能が推定された。

D. 考察と結論

LC/MS/MS を用いてのセレウリド試験法の確立を試みた。平成 26 年度に検討をしたものの、市販のバ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、室内精度が悪く、回収率は 40 % を下回ることもあった（平成 26 年度分担研究報告書）。

試験法の発展性も勘案し、LC-MS によるセレウリドの検出定量法を検討した。シングル MD ではあるが、セレウリドイオン特異的なシグナルは検出され、今後の LC-MS の利用の可能性はあるものの、セレウリドイオンの周辺に夾雑イオンが多数検出され、その制御が重要と判断された（平成 27 年度分担研究報告書）。周辺夾雑イオンの制御は機器管理で解決できることではあるものの、イオンの特異性という面では、MS/MS によるイオン検出原理の有

利性は非常に大きく、試験法への適合度から、MS/MS を試験法に用いることにした。

メタノール抽出条件、前処理カラムへの検体添加条件、LC-MS/MS の LC グラディエント条件を検討した。セレウリド無添加パックライスからは、妨害ピークは検出されなかった。LC クロマトではセレウリドの単一ピークが検出された。マススペクトルを検証したが、セレウリドイオン周辺に検出を妨害するイオンはなかった。この試験法の定量限界は 0.9 ng/g ~ 4.0 ng/g を示した。

改良した LC-MS/MS によるセレウリド試験法の性能評価を行った。添加回収試験の結果、真度は 94.3% 及び 94.5% とコーデックス委員会の手続きマニュアルの範囲 (10 ng/g : 60-115 %) 内だった。農薬等の妥当性評価ガイドラインの範囲 (70-120%) も満たしていた。精度を HORRAT_r で評価したところ、いずれも 2 以下であり、手続きマニュアルの範囲内であり、国内の農薬等の妥当性評価ガイドラインの範囲 (RSD_r : < 25 %, RSD_{rw} : < 30 %) も満たしていた。この分析結果から、本試験法は十二分に使用可能であることが示された。

嘔吐型セレウス食中毒の原因食のうち、米飯では数 10 ng/g 以上のセレウリドが検出されている⁴⁾。本法の定量限界は

0.9 ~ 4.0 ng/g だったので、食中毒事例品についても、本法の利用は可能だろう。

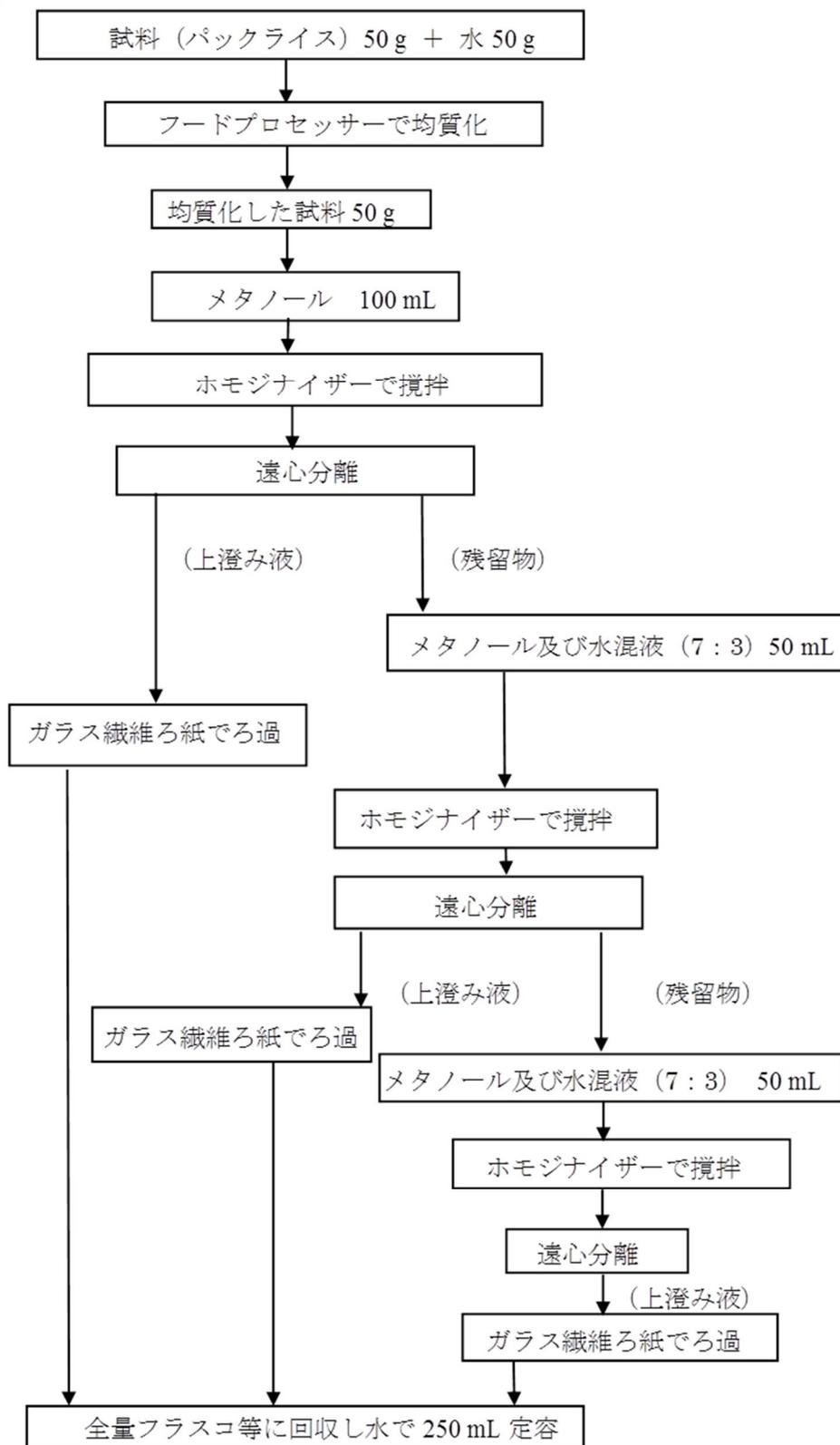
図 1 に改良した LC-MS/MS によるパックライス中のセレウリド試験法を示す。今後、本法が参考となり、パックライス以外の食品への適応、さらには、嘔吐型セレウス菌食中毒事例食品への応用を期待する。

E . 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) 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.
- 3) 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) Agata M, Ohta M, Yokoyama K.
Production of *Bacillus cereus*
emetic toxin (cereulide) in various
food. Inter. J. Food Microbiol. 73,
23-27, 2002.

セレウリド試験法 フローチャート

1 : 均質化及び抽出



2 : クリーンアップ

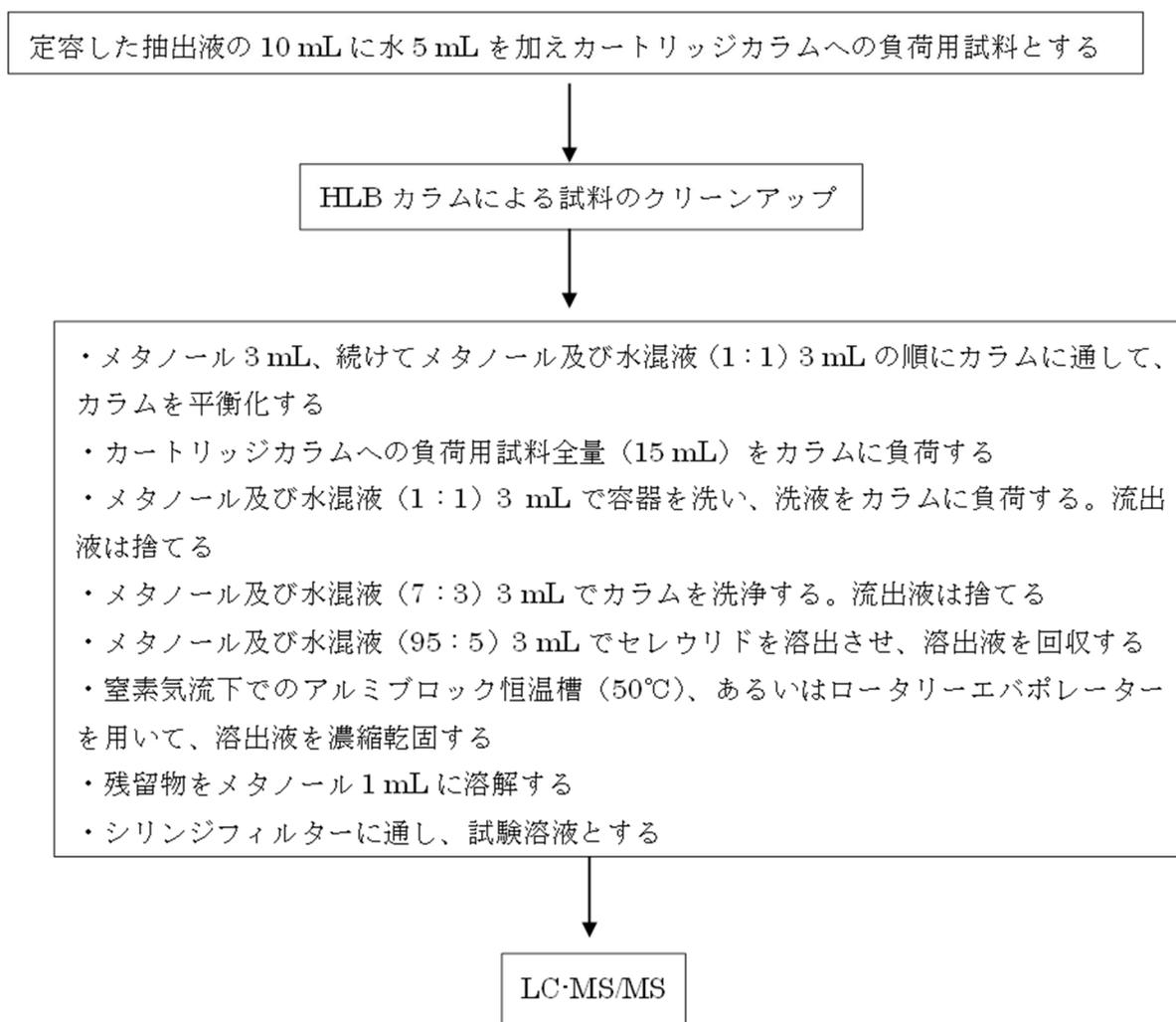


図1 セレウリド試験法のフローチャート

研究成果の刊行に関する一覧表

論文発表

1. Matsuoka H, Nakano K, Takatani N, Yoshida T, Igimi S, Saito M. Flow cytometric method for in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony- forming potentiality. *J AOAC Int.* 97(2):479-483. (2014)
2. Ogihara H, Kiribe Nami, Fukuda N, Furukawa S, Morinaga Y, Igimi S. *Cronobacter* spp. In commercially available dried food in Japan. *Biocontrol Sciences.* 19:209-213 (2014)
3. 五十君静信。 *Listeria monocytogenes* 規格および対策の国際動向と日本国内の規格設定の動き。月刊フードケミカル。2014年7月号:57-63。(2014.7)
4. Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S, Asakura H. Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. *J Food Safety.* doi: 10.1111/jfs.12195. (2015)
5. 五十君静信。食品微生物管理の国際ハーモナイゼーションを推進。月刊フードケミカル。358巻:2-3。(2015.2)
6. 五十君静信。食品検査とは。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
7. 五十君静信、松岡英明。試験法の妥当性確認と性能検証。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
8. 丹野憲二、田中廣行、五十君静信、斎藤明美。微生物試験における検体の取扱い。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
9. 浅尾努、小久保彌太郎。衛生指標菌。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
10. 百瀬愛佳、五十君静信。カンピロバクター。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
11. 岡田由美子、仲真晶子。リステリア。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
12. 鎌田洋一。ボツリヌス菌。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
13. 門間千枝、伊藤武。ウェルシュ菌。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
14. 荻原博和、岡田由美子。クロノバクター属菌。食品衛生検査指針(微生物編)公益社団法人日本食品衛生協会。(2015.3)
15. H. Ogawa, S. Nasu, M. Takeshige, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. *Sci. Rep.,*

5:10061 doi:10.1038/srep 10061, (2015)

16. 松岡英明、斉藤美佳子：微生物試験迅速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)。
17. 松岡英明：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～。月刊フードケミカル、(11) 96-101 (2015)。
18. 五十君静信。食品企業が信頼される微生物検査体制を構築するために、どのような試験法を選択したらよいか。月刊 HACCP2015 年 6 月号：20-25 (2015.6)
19. 五十君静信。食品の微生物基準に示された *Listeria monocytogenes* 試験法。月刊フードケミカル。371 巻 2016 年 3 月号：82-84 (2016.3) 103.
20. 五十君静信。サルモネラ属菌および黄色ブドウ球菌試験法の改正についてーその背景にある国際整合性ー。食品衛生研究。66 巻 No.4：7-10 (2016.4)
21. 五十君静信。微生物試験法におけるバリデーションの重要性と目的適合性のある試験法選択。月刊フードケミカル Vol.375:114-119(2016.7)

書籍

1. 食品衛生検査指針 微生物編 2015。公益社団法人日本食品衛生協会. 2015.3