

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
令和6年度分担研究報告書

クロストリジウム属菌試験法の標準化に向けた研究

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
	百瀬愛佳	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究協力者（クロストリジウム属菌試験法作業部会）

小田俊一*	一般財団法人日本食品分析センター
小久保彌太郎*	公益社団法人日本食品衛生協会
澤田千尋*	一般財団法人日本食品検査
下島優香子*	東洋大学
西野由香里	東京都健康安全研究センター
森哲也*	一般財団法人東京顕微鏡院
門間千枝*	十文字学園女子大学
山崎栄樹	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

（五十音順; *は食品からの微生物標準試験法検討委員会委員）

研究要旨

日本の食品の微生物規格では、特定加熱食肉製品および加熱食肉製品にクロストリジウム属菌の成分規格が設定されており、微生物学的品質評価のための衛生指標菌として用いられている。本分担研究では、食品の衛生管理における国際調和を目指し、クロストリジウム属菌の標準試験法について検討を行った。昨年度本研究では、国際的な標準試験法であるISO 15213-1:2023 に準拠した標準試験法 NIHSJ-42 を策定すると共に、国内現行法であるパウチ法との同等性を評価し、確認された場合にはパウチ法を Annex として付記する方針が定められた。今年度の本研究では、パウチ法と ISO 15213-1:2023 の比較の予備検討を実施すると共に、作業部会において多くの食品検体と各研究室の保有するクロストリジウム属菌菌株を用いた添加回収試験をプレスタディとして実施するためのプレスタディ案を作成した。

A. 研究目的

本研究班は、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」（以下、検討委員会）での議論を通じ、国際調和を重視した標準試験法、技術仕様書及びガイドラインの整備を行っ

ている。

日本の食品の微生物規格では、特定加熱食肉製品および加熱食肉製品にクロストリジウム属菌の成分規格が設定されており、微生物学的品質評価のための衛生指標菌と

して用いられている。クロストリジウム属菌の公定法としては、嫌気培養を必要としないパウチ法が特定加熱食肉製品および加熱食肉製品の成分規格試験法となっているが、当該試験法の国際整合性は現在確認されていない。

本分担研究では、食品の衛生管理における試験法の国際調和を目指し、クロストリジウム属菌の標準試験法について検討をおこなっている。昨年度の本研究では、国際的な標準試験法である ISO 法、BAM 法等と公定法を比較し、検討委員会での議論を通じて、今後の標準試験法として ISO 15213-1:2023 に準拠したものを NIHSJ-42 として作成することが決定された（ステージ 1）。また、現行の公定法と ISO 法との間で科学的根拠に基づいた妥当性評価を実施し、同等性が確認された場合には現行法を Annex として標準試験法の一部に記載することとなった（図 1）。本年度の本研究では、公定法と ISO 法の比較検討を行うための予備検討と、多検体での検討を行うプレスタディ案の作成を行った。

B. 研究方法

1) 予備検討 1

食肉製品の規格基準適合性を調べるための公定法（以下パウチ法）と、ISO 15213-1:2023 の比較のための予備検討を、当該菌が自然汚染している可能性の高い食品検体を用いて実施した。食品は、鶏生レバー及び冷凍生ソーセージ各 10g を用いた。検体希釈液には滅菌したペプトン加生理食塩水を用い、ストマッカーで 2 分間懸濁後、必要に応じて滅菌 PBS を用いて階段希釈した。パウチ法には検体希釈液を 10mL、ISO 法には 1m

L を分注し、50℃に加温した選択分離培地を規定量加えて混和した。ISO 法では固化後に同じ培地で重層を行った。パウチ法は固化後に口をシールして好気条件下で 35℃にて 24 時間、ISO 法はアネロパックを用いた嫌気条件下で 37℃にて 48 時間培養し、形成された黒色集落を 6 コロニー釣菌してそれぞれ 2 枚の血液寒天に画線塗抹し、好気培養と嫌気培養を行うことで確認試験を行った。

2) 予備検討 2

パウチ法と ISO 法の比較を、食品への菌添加回収試験により実施した。接種菌は *Clostridium perfringens* NCTC8237 株を用い、TGC 培地に接種した純培養菌を適宜階段希釈し 3 段階（目標値は低菌量 200 CFU/g、中菌量 1000 CFU/g、高菌量 5000 CFU/g）の菌液濃度としたものを、食品は鶏肉を原料とする加熱食肉製品を用いた。検体希釈液の調製及び培地への接種は、予備検討 1 と同様に行った。各接種濃度につき 2 枚の培地（またはパウチ）を用いて菌数を測定した。接種菌液の菌数測定はパウチ法を用いて行った。

3) 検討委員会での討議

第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、クロストリジウム属菌試験法作業部会案について予備検討結果を示して討議を行った。

4) 培地における排他性の検討

培地の排他性試験として、NIHSJ-42 において使用する 2 種類の培地にクロストリジウム属菌以外の細菌を接種し、黒色集落の形成性について検討した。細菌は、*Proteus mirabilis* 2 株、*Citrobacter youngae*、*Citrobacter werkmanii*、*Salmonella* 属菌、大

腸菌及び黄色ブドウ球菌の野外分離株を用いた。各菌株は SCD ブイヨンで 35℃1 日培養後に 10⁸ cfu/mL の菌液から階段希釈液を調製した。クロストリジウム培地については、パウチ又はシャーレに 1mL の菌液を接種し、培地作成時に水分量を通常と同じ濃度になるように調節して作製した。シャーレでの培養は、アネロパックを用いた嫌気培養で行い、パウチ法は好気培養を行った。菌数は、35℃24 時間培養後に測定した。

5) プレスタディ案の作成

予備検討及び検討委員会での議論の結果を踏まえ、作業部会内で多検体での検討を行うプレスタディ案を作成した。

C. 研究結果

1) 予備検討 1

鶏生レバーを用いた検討と冷凍生ソーセージを用いた検討を各 1 回実施した(表 1)。その結果得られた黒色集落を血液寒天培地に画線塗抹して好気培養と嫌気培養を実施したところ、全て好気培養で発育が見られ、今回使用した食品検体における自然汚染菌である黒色集落がクロストリジウム属菌ではないことが確認された。

2) 予備検討 2

鶏肉を用いた加熱食肉製品に *C. perfringens* NCTC8237 株を接種した添加回収試験を行ったところ、表 2 の結果を示した。接種菌量の実測値は、低菌量で 244 CFU/g、中菌量で 1220 CFU/g、高菌量で 6100 CFU/g であった。パウチ法と ISO 法のいずれも理論値よりも菌数がやや高い傾向が見られたが、おおむね同等の結果が得られた。

3) 検討委員会での討議

第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、クロストリジウム属菌試験法作業部会案について予備検討 2 の結果を示して討議を行った。予備検討 1 は、*Clostridium* の自然汚染検体が得られなかったため、検討委員会では示さなかった。委員より、判定時に採用するコロニー数として 10-100 個を提案している理由について質問があり、当該菌では集落が大きいいため、通常生菌数等で用いられている 30—300 個の集落数では計測が難しいことが説明された。また、パウチの使用方法について、培地をパウチに封入した後にパウチの口を下にする事で凝固水を下に貯める様にして培養するとスウォーミングを防止することが可能であるとの助言があり、今後作業部会にて検討することとなった。今後作業部会でプレスタディによる試行を重ねたのちに ISO 16140 シリーズに基づく同等性の評価を行うことが確認された。

4) 培地における排他性の検討

クロストリジウム属菌以外の細菌を、NIHSJ-42 において使用する培地に接種し、黒色集落の形成性について検討した結果、クロストリジウム培地では *Proteus mirabilis*、*Citrobacter youngae*、*Citrobacter werkmanii*、*Salmonella* 属菌及び大腸菌で黒色集落を形成した(表 3)。一方、ISA 培地では *Proteus mirabilis* は用いなかったものの、*Salmonella* 属菌で黒色集落の形成が見られた。

5) プレスタディ案の作成

予備検討及び検討委員会での議論の結果を踏まえ、作業部会内でのメール討議を通じて、来年度に作業部会で実施する多検体での検討を行うプレスタディ案を作成した。

(表 4)。

D. 考察

昨年度の本研究で、NIHSJ-42 として策定する方針となったクロストリジウム属菌標準試験法について、現在の公定法であるパウチ法との同等性を確認することで、パウチ法 Annex として付記し、今後も使用可能とするための予備検討を今年度研究として実施した。鶏肉を用いた加熱食肉製品に 3 段階の濃度の *C. perfringens* 菌液を接種したところ、ISO 法とパウチ法で大きな差は見られなかった。一方、特にパウチ法では理論上の接種菌量を上回る集落数が計測されたことから、次年度に行うプレスタディではばらつきの範囲を計測する目的で、1 検体当たり 3 枚の平板又はパウチに接種することとなった。また、現在の食品成分規格でクロストリジウム属菌を設定している食品群は一部の食肉製品であるが、レトルト包装に類似した形態をとりつつレトルト殺菌を行っていない製品のチルド品としての流通が増加している。そのため、これらの食品の保存温度の逸脱によっては、クロストリジウム属菌等の芽胞形成菌が食品内で増殖しうることが懸念される。そのため、NIHSJ-42 は標準試験法として食品種を加熱食肉製品に限定せず、プレスタディでは作業部会メンバーのこれまでの経験からクロストリジウム属菌汚染が起こりうると思われる魚肉練り製品、食品内で生残している可能性が高いレトルト類似食品、香辛料等の幅広い食品群を用いて添加回収試験を行うことと

した。特に、パウチ法は容器をシールして密封することで好気培養を可能にしているが、食品検体に糖が多く含まれる場合、培養中にガスの産生が起こるため、パウチの膨潤が起こりうることから、これまでパウチ法が用いられていない様々な食品を用いた検討が必要と考えられる。来年度はプレスタディでの結果を確認してステージ 2 案を作成し、更にコラボラティブスタディを実施して NIHSJ-42 の策定をおこなう予定である。

E. 結論

昨年度の本研究でクロストリジウム属菌の標準試験法として検討することとなった ISO 15213-1:2023 と、現行法であるパウチ法との同等性確認を実施するための予備検討を実施したところ、*C. perfringens* NCTC8237 株を用いた添加回収試験において、ほぼ同等の結果が示された。また、多検体を用いたプレスタディを作業部会内で行うためのプレスタディ案を作成した。次年度には、様々な食品や菌株を用いて 2 つの試験法の同等性を確認するプレスタディを行い、その後コラボスタディを実施する予定である。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

・パウチ法

検体 x g+ペプトン加生食 9x mL

↓

ストマッキング

↓

必要に応じて階段希釈

↓

各希釈液を2枚のパウチに10 mL 分注し、

45～50℃に保持したクロストリジウム培地 15 mL を加え、混和後シールして固化

↓

35℃±1℃、24 時間±2 時間、好気培養

↓

黒色集落の計数

・ISO 15213:2023

検体 x g+ペプトン加生食 9x mL

↓

ストマッキング

↓芽胞を計測する場合は 80℃10 分

必要に応じて階段希釈

↓

各希釈液を2枚のシャーレに1 mL 分注し、

45～50℃に保持した ISA 培地 12～15 mL を加えて混和し、固化後に 7 mL を重層

↓

37℃±1℃、48 時間±2 時間、嫌気培養

↓

黒色、黄色がかった茶色、灰色集落の計数

↓

確認試験（好気/嫌気培養）

図 1. 現行法（パウチ法）と ISO 15213-1：2023 のプロトコール

表 1. 予備検討 1 の結果（食品を用いた検討：未接種）

	試験法	公定法	ISO 法
	培地	クロストリジウム培地	Iron Sulfite Agar (ISA)
	容器	パウチ	シャーレ
	気相	好気	嫌気
	試料液量	10 mL	1 mL
実験 1	食品検体	鶏生レバー	
	測定菌数	420	30
	好気培養	+	+
	嫌気培養	+	+
実験 2	食品検体	冷凍生ソーセージ	
	測定菌数	600	80
	好気培養	+	+
	嫌気培養	+	+

表 2. 予備検討 2 の結果（食品を用いた検討： *C. perfringens* NCTC8273 株の添加）

試験法	公定法	ISO 法
培地	クロストリジウム 培地	Iron Sulfite Agar (ISA)
容器	パウチ	シャーレ
気相	好気培養	嫌気培養
平均菌数 (cfu/g)		
低菌量 (接種菌量：244 cfu/g)	615	350
中菌量 (接種菌量：1220 cfu/g)	3050	1915
高菌量 (接種菌量：6100 cfu/g)	11400	9800

表 3. クロストリジウム属菌以外の細菌による黒色集落の形成性

菌株	標準寒天 培地	クロストリジウム培地		ISA 培地
		パウチ	混釈	
<i>Proteus mirabilis</i>	48×10^8	40×10^8	NT	NT
<i>Proteus mirabilis</i>	26×10^8	26×10^8	NT	NT
<i>Citrobacter youngae</i>	31×10^8	31×10^8	23×10^8	21×10^8
<i>Citrobacter werkmanii</i>	37×10^8	42×10^8	35×10^8	41×10^8
<i>Salmonella</i>	18×10^8	20×10^8	22×10^8	17×10^8
<i>Escherichia coli</i>	16×10^8	17×10^8	18×10^8	12×10^8
<i>Staphylococcus aureus</i>	23×10^8	$<1 \times 10^8$	$<1 \times 10^8$	$<1 \times 10^8$

塗りつぶし部分は黒色集落を形成したもの

表 4. プレスタディ案

項目	内容
検体	食肉製品、魚肉練り製品、レトルトパウチ及び類似形態の食品、ジャム等
前処理方法	検体 25g+ペプトン加生食 225mL
供試菌株	各研究室保有のクロストリジウム菌株
目標添加菌量	低菌量＝10 倍乳剤 1 mL あたり 20CFU 中菌量＝10 倍乳剤 1 mL あたり 100CFU 高菌量＝10 倍乳剤 1 mL あたり 600CFU 未接種
使用培地	クロストリジウム培地 Iron Sulfite Agar
接種菌量の測定	クロストリジア測定用培地に接種し、パウチで 35℃24 時間培養
接種菌液の調製	TGC 培地に接種し、嫌気培養で 35℃一夜培養

