

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和4年度研究分担報告書

試験法及び分析法の開発

～真菌数試験法の比較検討～

研究分担者 渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究要旨 食品添加物公定書（公定書）の微生物限度試験における真菌数試験で規定されたジクロラン・グリセリン（DG-18）寒天培地による混積培養法では、真菌種によっては生育効率が低いとされる。そこで、公定書での培地の性能試験を参照して試験条件を設定し、集落の生育性を評価した。DG-18寒天、ポテト・デキストロース寒天またはサブロー・ブドウ糖寒天を用い、混積培養法または塗抹培養法にて培養を行った。培養期間は3～5日間、接種菌液濃度は20または100 cfu/mLとした。培養に用いた菌種は、規定法として用いられる *Candida albicans* および *Aspergillus brasiliensis* の他、普遍的な環境菌の3菌種を用いた。25±1℃で培養後、集落数を計測した。検討の結果、いずれの試験条件でも、培養5日後で小さな集落（直径1.5 cm以下）が生育する性質の *Ca. albicans*、*Cladosporium sphaerospermum* および *Penicillium citrinum* では集落数計測は可能であった。一方で集落生育が比較的早くかつ大きい *A. brasiliensis* および *Mucor hiemalis* では、100 cfu/mLの接種菌液では、培養5日後でいずれの試験条件でも集落は密集し、数の計測は困難であった。これに対し、20 cfu/mLの接種菌液を使用する、または培養期間を規定法より短くすることで、集落数計測が可能となった。

研究協力者

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 室長
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 部長
多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 室長
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 主任研究官
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 主任研究官
中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 短時間非常勤職員
船江元子 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 短時間非常勤職員

規格基準及び試験法がまとめられている。食品添加物では、微生物汚染がしばしば起こることが知られており、安全性を担保するため微生物試験を行うことが重要である。公定書では一般試験法の一つとして微生物限度試験法が収載されており、第9版公定書では、微生物限度試験法のもと、真菌（酵母及びカビ）数試験の方法が規定されている。そこでの培地の性能及び試験法の適合性試験として、試験菌として酵母である *Candida albicans* NBRC 1594 およびカビである *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9544 の計2菌種各1菌株を用いること、1 mLあたりの出現集落数が100以下となるように調整した試験菌液を使用すること、ジクロラン・グリセリン（DG-18）寒天培地15～20 mLと試験菌液1 mLを使用しての混積培養を行うこと、25±1℃で5日間以内で培養するとき十分な増殖及び接種菌液の回収があること、といった試験法の規定がされている。混積培養法には、塗抹培養法と

A. 研究目的

我が国では、食品添加物の安全性を確保する目的で、食品添加物公定書（以下、公定書）に

比較して大量の試験液を1枚の平板で試験できるため、少ない平板数で評価が可能、カビ集落が大きく発育しないため正確な計測がしやすい、などといった実験上のメリットがある。一方で、試料中の菌が熱の影響を受ける可能性があること、完全な好气的条件での培養にはならないため特に好气的な真菌の発育性に影響することなどのデメリットもある。またこの影響の程度は、菌種によって様々であるとされ、このことについての十分な研究報告は無い。これに対して、食品等の一般的な試験法として汎用される菌数測定法として、塗抹培養法¹⁾がある。本培養法のメリットとしては、試料中の菌は熱の影響を受けないことがある。デメリットとしては、1枚の平板で試験できる試験液が混釈培養法より少ないため、多くの希釈列を作製し、多くの平板数を用いての試験をする必要がある。特にカビ集落が大きく発育するため、試料中の菌濃度が高く1枚の平板に多数の集落が発育した場合、正確な計測が不可能となりやすいことがあるとされる。

培養法に関する真菌集落の発育性に対する以上の特徴をふまえると、公定書で規定された試験法の、DG-18寒天培地による混釈培養法では、真菌種によっては生育効率が低い可能性がある。加えて、公定法での接種菌液の濃度や培養日数では、生育の早い真菌種などでは集落数計測が難しい可能性がある。しかし現在のところ、これらの培養法による真菌集落の生育性や集落数の計測効率の違いについて、十分に評価されていない。

そこで本研究では、公定書の微生物限度試験の参考に資するために、添加物公定書での「培地の性能及び試験法の適合性」を参照した試験条件をその他試験条件と比較し、集落の生育性をもって真菌数計測の正確性と効率を評価する目的で、検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 供試菌

比較した供試菌としては、添加物公定法で規定された *Ca. albicans* NBRC 1594 および *A. brasiliensis* の2種に加えて、規定の試験菌種に

は含まれないが環境中に分布頻度や濃度が高いことがしばしばある *Cladosporium sphaerospermum* NIHS 0378、*Penicillium citrinum* NIHS 0222 および *Mucor hiemalis* NIHS 0886 の3種、計5種各1菌株を供試した (Figure 1)。

B-2) 比較した培養条件

比較した培養条件としては、培養法については、規定法である混釈培養法およびその比較対象として塗抹培養法の2種類、寒天培地種類については、規定法である DG-18寒天培地、およびその比較対象として食品等の一般的な試験法として汎用されるポテト・デキストロース寒天 (PDA) 培地¹⁾と日本薬局方の一般試験法微生物限度試験法 (4.05) で規定されるサブロー・ブドウ糖カンテン (サブロー寒天) 培地²⁾の3種類を検討に加えた。また、菌濃度が濃かった場合の集落数計測の難易度についても評価するため、接種する菌液の濃度として、1 mLあたり40または100 cfuの濃度で作製した。平板1枚あたりの接種菌液体積は、混釈培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mLとした。B-1)の菌株およびこれらの培養法・寒天培地の種類・接種菌濃度をそれぞれ1種類ずつ組み合わせで1試験条件を設定して、培養3から6日目 (培養2晩から5晩) で毎日集落数を計測し、測定集落数や実験効率を比較した。1試験条件では平板3枚で実験を行い、得られた測定集落数の平均値を算出した。以上の培養のセットを最大3回繰り返し、結果を比較評価した。

C. 結果及び考察

C-1) 添加物公定書での培養条件における各種真菌の培養結果の比較

公定書に既定の最大濃度である100 cfu/mLの接種菌液を接種し、最大培養期間である5日間 (4晩目) 培養を行った後での、供試5菌種の培養結果を比較した。Figure 2に、培養像の代表として、公定法である DG-18寒天を用いた混釈培養法での集落像を示した。本表では、集落の発育性について、5菌種のうち、「培養5日後で小さな集落を形成する3菌種」をAとし、「集落生育が早く大きな集落を形成する2菌種」を

Bと分類し表記した。

集落の発育性がタイプ A の *Ca. albicans*、*Cl. sphaerospermum* および *P. citrinum* の 3 菌種では、比較した結果、今回試験したいずれの培地種類および培養法の組み合わせでも、集落は目視で観察可能な大きさとなり、いずれの培養法・寒天培地の組み合わせで集落数計測が可能であった。ただし、特に *Ca. albicans* および *Cl. sphaerospermum* では、4 晩目の集落大きさは目視で確認できるギリギリの大きさであったものも有り、計測には注意が必要と考えられた。

集落の発育性がタイプ B の *A. brasiliensis* と *M. hiemalis* では、集落は密集し数の計測は困難となった。したがって、集落の発育性のタイプ B、すなわち早く大きな集落を形成する菌種では、公定法に既定の培養条件の組み合わせで集落数計測が困難となったため、これらの菌種では、培養法、培地種類、接種菌液濃度、培養日数の組み合わせを変え、集落数計測が可能となる方法の検討が必要ということが確認された。

C-2) 小さな集落を形成する菌種における真菌数計測結果の比較

C-1) において集落の発育性がタイプ A 菌種 (小さな集落を形成 ; *Ca. albicans*、*Cl. sphaerospermum* および *P. citrinum*) で 100 cfu/mL の接種菌液を用いての真菌数計測結果を、各培養条件間で比較した (Figure 3)。混釈培養または塗抹培養と、DG-18 培地・PDA 培地・サブロー寒天培地の 3 種類の寒天培地の、それぞれ 1 種類ずつを組み合わせで培養条件を設定した。3 菌種それぞれの結果から、DG-18 寒天培地では、他の種類の培地と比べて、混釈・塗抹ともに集落形成が遅く、グラフがプラトーに達するまで、つまり十分な集落数が形成されるまでに 5 晩以上の培養が必要であることが示された。一方で、PDA およびサブロー寒天培地では、混釈・塗抹ともに集落形成が早く、ほぼ 3 晩の培養で十分な集落数の計測が可能であったことが示された。公定書の微生物限度試験法における真菌数試験法 培地の性能及び試験法の適合性試験では、5 日間 (4 晩) 以内で培養するとき「十分な増殖及び接種菌液の回収がある」こと

を適切な試験法と規定している。本研究の結果から、*Ca. albicans* では DG-18 寒天培地を用いた混釈培養法で 4 晩目で菌数の測定値がプラトーに達しておらず、その時接種した最大の菌数が出現していない状態であったと思われたが、既定の培養 4 晩目でも接種した菌数の 80% 以上は回収できていた (Figure 3)。日本薬局方の一般試験法微生物限度試験法 (4.05)²⁾ では、出現集落数は接種菌液から予想される菌数の 1/2 から 2 倍以内が適当と判断できると規定されていることから、今回の結果では十分な菌数が得られたものと判断した。しかし日本薬局方で使用される寒天培地の種類はサブロー寒天であり、培養法も平板塗抹法であることから、今後、DG-18 寒天培地による混釈培養法での検討回数を増やし、評価を確実なものとする必要がある。

C-3) 大きな集落を形成する菌種における真菌数計測結果の比較

C-1) において集落の発育性がタイプ A (大きな集落を形成 ; *A. brasiliensis* および *M. hiemalis*) で 40 cfu/mL の接種菌液を用いての真菌数計測結果を、各培養条件間で比較した (Figure 4)。また、その際の集落培養像を比較した (Figure 5)。混釈培養または塗抹培養と、DG-18 培地・PDA 培地・サブロー寒天培地の 3 種類の寒天培地の、それぞれ 1 種類ずつを組み合わせで培養条件を設定した。Figure 4 において点線の折れ線グラフは、培養 2 晩目の時点では集落数の計測が可能であったが、翌日以降は集落が大きく広がりすぎ、数の計測が不可能となったためデータが取得できなかったことを表す。今回の比較検討の結果から、混釈・塗抹の両培養法で共通して DG-18 寒天培地では集落形成が遅く、グラフがプラトーに達するまで、つまり十分な集落数が形成されるまでに最短でも 4 晩の培養が必要であることが確認された (Figure 4)。同時に、Figure 5 の培養像で示したとおり、DG-18 寒天培地では集落発育が他の 2 種類の培地と比較して小さく、集落数が計測しやすい結果となった。一方で、PDA 培地では、*M. hiemalis* では 2 晩目培養時点で集落の十分な発育が得られたが、*A. brasiliensis* では 3 晩以上の培養が必要であった

(Figure 4)。集落数は集落が広がり比較的計測しづらいが、菌数が多い場合は密接せず真菌数計測が可能であった (Figure 5)。サブロー寒天培地では、菌量が平板 1 枚あたり 20 cfu と少ない塗抹培養でも、集落数測定期間最短の 2 晩の培養でもすでに集落の発育は過剰となって集落が密集しており、数の計測が不可能となった (Figure 4)。以上のことから、*A. brasiliensis* や *M. hiemalis* では、DG-18 寒天または PDA 寒天培地を用いて、3~4 晩以上の培養期間をみるといった注意が必要であると考えられた。

これらの発育性の異なる真菌群は両方とも環境中に高い頻度で分布するため、食品添加物に混入することは十分に考えられた。添加物公定書では、規定法と同等以上の検出感度および精度を有する場合には、代替法の適用も可能であるとされているため、検出が予測される菌種によっては、代替法として寒天培地の種類の変更や、接種試験液の一層の希釈、培養日数の短縮も検討する必要がある。

D. 結論

公定書の微生物限度試験の参考に資するために、公定書で規定の試験条件をその他試験条件と比較し、集落の生育性をもって真菌数計測の正確性と効率を評価した。その結果、公定書で規定の DG-18 寒天培地を用いて、規定の菌濃度を接種し 4 晩の培養後、集落の発育が過剰となり集落数の計測が不可能となる真菌群があった。ここには公定法に記載された *A. brasiliensis* も含まれた。また同条件の培養条件で、発育速度が遅く小さな集落が発育するため最低 5 晩の培養が必要となる真菌群もあった。ここには公定法に記載された *Ca. albicans* も含まれた。これらの群は両方とも環境中に高い頻度で分布するため、食品添加物に混入することは十分に考えられた。添加物公定書では、規定法と同等以上の検出感度および精度を有する場合には、代替法の適用も可能であるとされているため、検出が予測される菌種によっては、代替法として寒天培地の種類の変更や、接種試験液の一層の希釈、培養日数の短縮も検討する必要がある。

E. 参考文献

- 1) 公益社団法人日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 微生物編 改定第二版. 2018, p. 519-524.
- 2) 厚生労働省. 第十八改正日本薬局方. 2021, p.122-130.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 渡辺麻衣子, 吉成知也, 西崎雄三, 増本直子, 多田敦子, 工藤由起子, 杉本直樹. 食品添加物の微生物限度試験における真菌数試験法の比較検討. 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月 (オンライン開催)
- 2) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. MALDI-ToF MS を用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月 (オンライン開催)

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Shouhei Hirose, Maiko Watanabe, Atsuko Tada, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato, Yukiko Hara-Kudo. Evaluation on suitability of culture broth and conditions for *Escherichia coli* growth and gas production test of food additives. *Food Hygiene and Safety Science*. In press.
- 2) Tomoya Yoshinari, Aoi Sekine, Naoki Kobayashi, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Yukiko Hara-Kudo, Maiko Watanabe. Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. *Food Additives & Contaminants: Part A*. Submitted.

2-2. 総説

なし

2-3. 単行本

なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

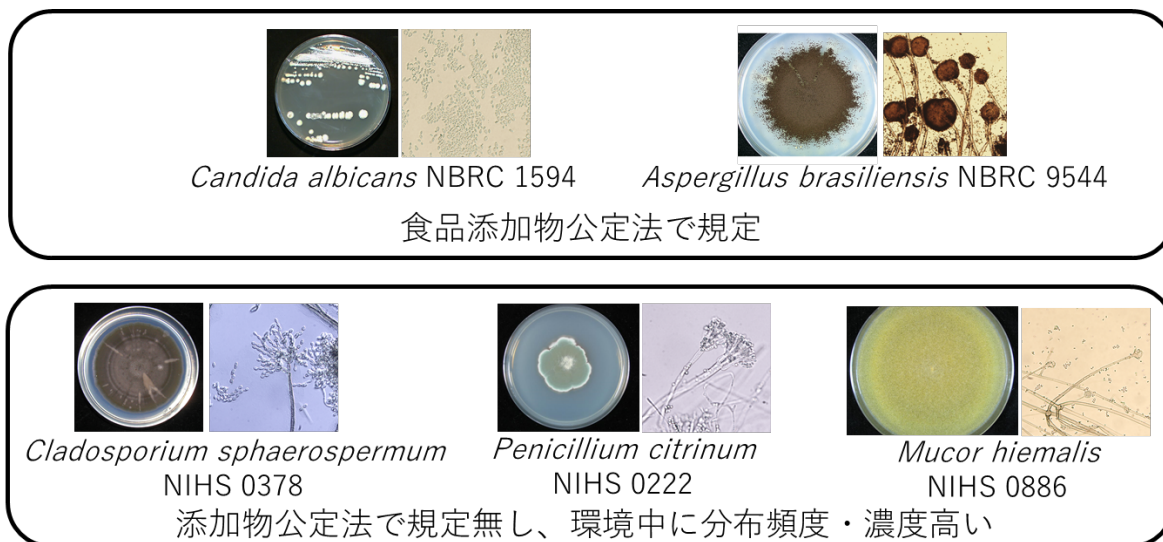


Figure 1. 供試菌株

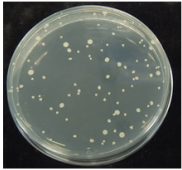
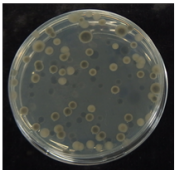

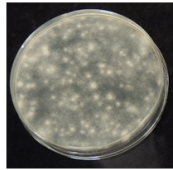
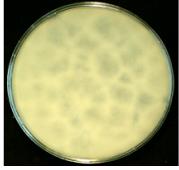
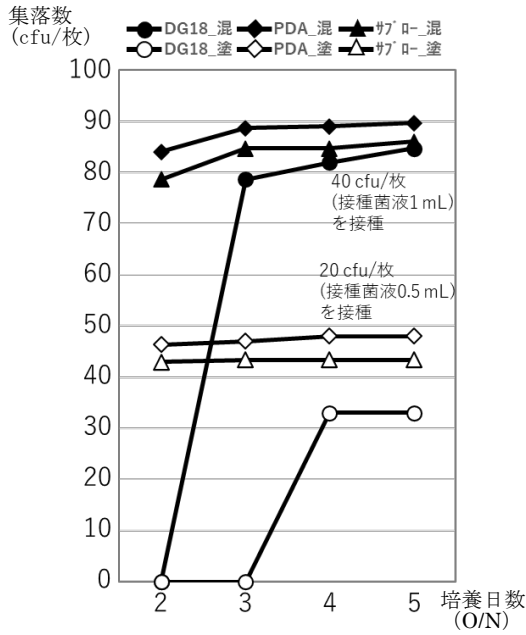
Species	<i>Ca. albicans</i>	<i>Cl. sphaerospermum</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>M. hiemalis</i>
公定法規定種	○	×	×	○	×
集落の発育性*	A	A	A	B	B
公定法 (混積培養・ ジクロラン グリセリン 寒天)での 集落像					
集落数計測の 可・不可	いずれの培地種類・培養法でも集落数は計測可能			いずれの培地種類・培養法でも集落は 密集し数の計測は困難	

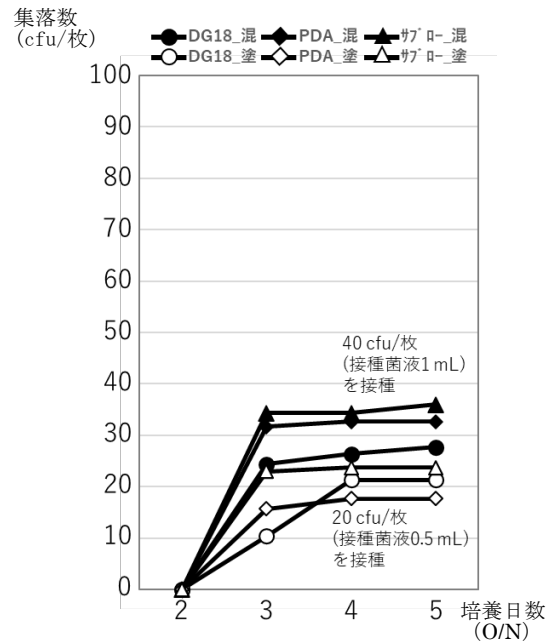
Figure 2. 公定法である DG-18 寒天を用いた混積培養法での集落像
および集落の発育状況

試験菌液の濃度は 100 cfu/mL に設定し接種した。培養 4 晩後の集落像を示した。集落の発育性 A : 培養 4 晩後で小さな集落 (直径 1.5 cm 以下) を形成する菌種、集落の発育性 B : A より生育が早く大きな集落を形成する菌種。

A. *Ca. albicans*



B. *Cl. sphaerospermum*



C. *P. citrinum*

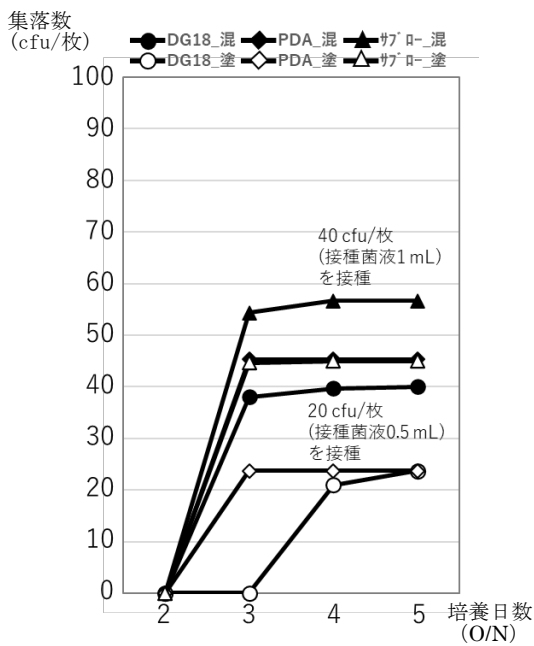


Figure 3. 小さな集落を形成する3菌種を用いた各培養条件間での真菌数計測結果の比較

混積培養または塗抹培養と、DG-18 培地・PDA 培地・サブロー寒天培地の3種類の寒天培地の、それぞれ1種類ずつを組み合わせる培養条件を設定した。接種菌液は1 mLあたり100 cfuの濃度で作製し、これを平板1枚あたり、混積培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mL接種した。3平板×3回繰り返し実験の集落数測定結果の平均値をプロットした。

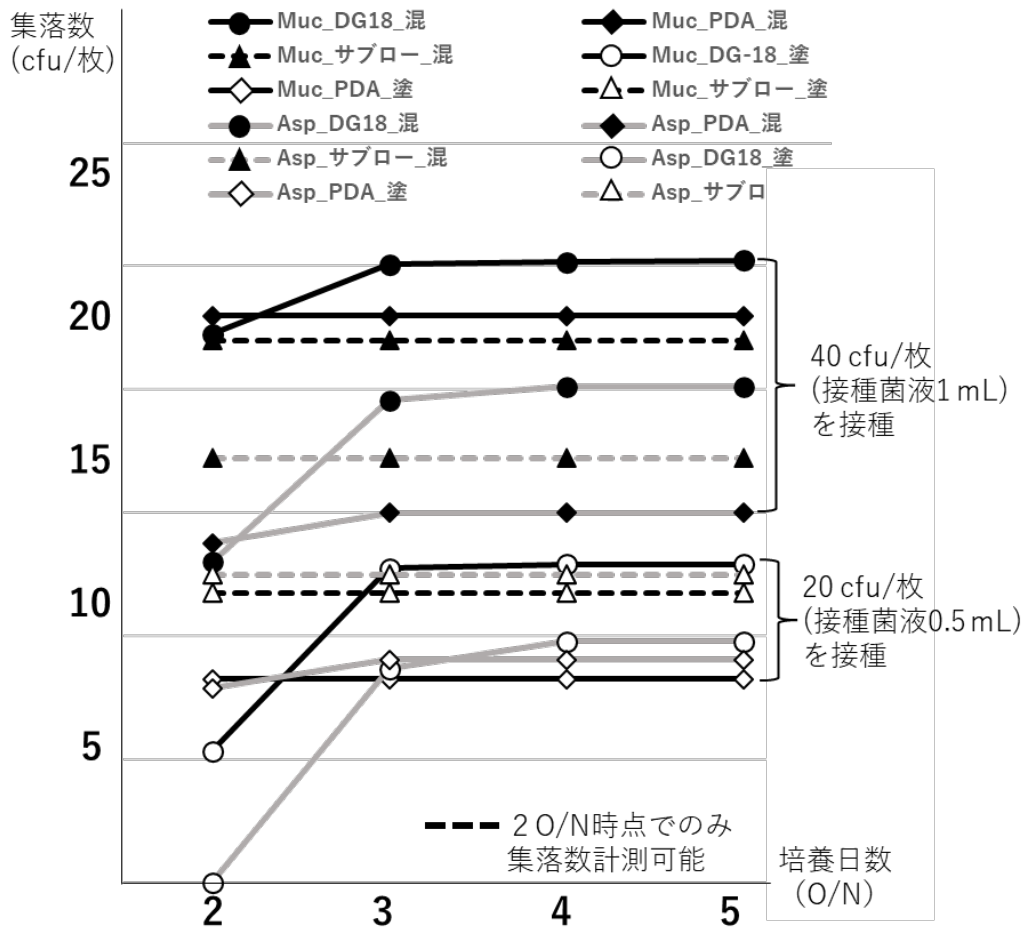


Figure 4. 大きな集落を形成する 3 菌種を用いた各培養条件間での真菌数計測結果の比較

混積培養または塗抹培養と、DG-18 培地・PDA 培地・サブロー寒天培地の 3 種類の寒天培地の、それぞれ 1 種類ずつを組み合わせる培養条件を設定した。接種菌液は 1 mL あたり 40 cfu の濃度で作製し、これを平板 1 枚あたり、混積培養法では 1 mL、塗抹平板法では 0.5 mL 接種した。3 平板×3 回繰り返し実験の集落数測定結果の平均値をプロットした。破線の折れ線グラフは、培養 2 晩目の時点では集落数の計測が可能であったが、翌日以降は集落が大きくなりすぎ、数の計測が不可能となったためデータが取得できなかったことを表す。

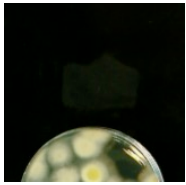
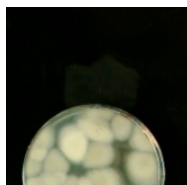
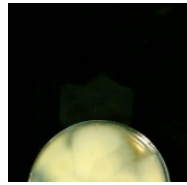
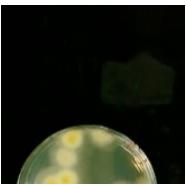
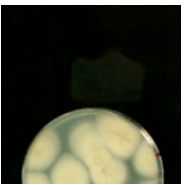
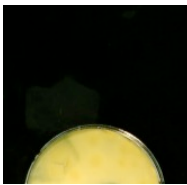


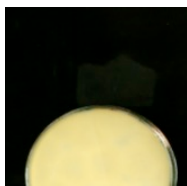
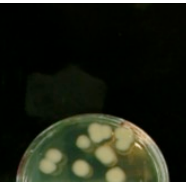


接種菌種	<i>A. brasiliensis</i> (5O/Nでの培養像)		
培地種類	DG-18	PDA	サブロー寒天
混積培養			
塗抹培養			
	<i>M. hiemalis</i> (5O/Nでの培養像)		
混積培養			
塗抹培養			
集落計測 の可・不可	集落数計測 しやすい	集落は密集し数の計測は培養期間 が5O/Nに近づくほど困難	

Figure 5. 大きな集落を形成する2菌種を用いた各培養条件間での集落発育状況の比較

混積培養または塗抹培養と、DG-18培地・PDA培地・サブロー寒天培地の3種類の寒天培地の、それぞれ1種類ずつを組み合わせることで培養条件を設定した。接種菌液は1 mLあたり40 cfuの濃度で作製し、これを平板1枚あたり、混積培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mL接種し、5晩培養後の培養像を示す。