

平成31年3月26日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：2802

スプラウト原料種子の検査手法の確立

研究期間：平成28年度～平成30年度（3年間）

研究総括者名：伊藤 武

試験研究機関名：一般財団法人東京顕微鏡院

1 研究目的

多くのスプラウトは生で喫食されることから、生産から消費までのフーズチェーンを通じた衛生管理に取り組む必要がある。海外で発生したスプラウトによる腸管出血性大腸菌やサルモネラ属菌の食中毒事例では、スプラウトの原料種子の汚染が原因となった可能性が指摘されていることから、生産段階の衛生管理の一環として、生産に使用するスプラウト原料種子の安全確保が重要となる。

本研究ではスプラウト原料種子の有害微生物による汚染を迅速に予測し、スプラウト生産現場への有害微生物の侵入を防止するために、適切な衛生指標菌を選定し、迅速・簡便な検査法を確立する。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題1：原料種子に付着した衛生指標菌の選定

スプラウト種子の検査の対象として適切な衛生指標菌を決定するために、種子の微生物叢(microbiome)の解析や各種微生物の汚染状況及び保管種子における有害微生物や衛生指標菌の生存性を明らかにする。

・小課題1：培養法による種子からの微生物の検出

カイワレ大根やブロッコリーの原料種子の微生物叢の実態を明らかにするために、有害微生物及び衛生指標菌について、培養法による検査を行い、種子中の微生物を効率よく検出するための粉碎や浸漬等の試料の調製条件を検討する。

・小課題2：遺伝子技術による種子の微生物叢の解析

次世代シーケンサーを利用した遺伝子手法により種子の微生物叢(microbiome)を解析し、培養できない菌(VNC)や損傷菌、死菌も含めた微生物実態を明らかにする。

・小課題3：種子における衛生指標菌や有害微生物の生存性の検証

スプラウト原料種子は、収穫後に調製、保管及び輸送され、国内の生産者が入手・使用するまでに数か月単位の期間を要する。これらの工程における有害微生物

物（腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス）及び衛生指標菌の生存性を明らかにする。

2) 中課題2：各種微生物の高感度、迅速・簡便な試験法の確立

衛生指標菌及び有害微生物について、種子の汚染率や汚染の程度が著しく低いと考えられることから、検出感度の向上を図るとともに、一般的な食品等の検査法より迅速・簡便な手法を検討する。

・小課題1：原料種子の前処理方法の開発

種子中に存在する微生物を高感度に検出するための前処理方法を検討する。

・小課題2：培養法による試験法の開発

食品等に用いられる試験法（培養法）を基に、試験法の簡便化等の改良を図る。

・小課題3：遺伝子手法による試験法の開発

遺伝子手法を用い、感度や迅速・簡便性の面で試験法の改良を図る。

3) 中課題3：安全性評価のためのサンプリング法の開発

原料種子の生産・流通実態も踏まえ、実行可能かつ適切なサンプリング法を開発する。

・小課題1：農場で活用できるサンプリング法の開発

ICMSF（国際食品微生物規格委員会）の示す考え方等を基に、スプラウトの生産現場における実行性も考慮しながら、サンプリングプランを検討する。

・小課題2：試料の調製法と検証実験

本研究事業を通して導かれた一連の検査法について、スプラウト生産現場における実行性を検証する。

(2) 年次計画

項目	平成 2 8 年度	平成 2 9 年度	平成 3 0 年度
1. 原料種子に付着した衛生指標菌の選定			
(1) 培養法による種子からの微生物の検出	← 原料種子の汚染調査 →		
(2) 遺伝子技術による種子の微生物叢の解析	← 微生物叢の解析 →		
(3) 種子における衛生指標菌や有害微生物の生存性の検討	← 各種細菌の生存性試験 →		
2. 各種微生物の高感度、迅速・簡便な試験法の確立			
(1) 原料種子の前処理方法の開発		← 前処理方法の検討 →	
(2) 培養法による試験法の開発		← 培養法を検討 →	
(3) 簡易な遺伝子試験法の開発		← 遺伝子検査法の検討 →	
3. 安全性評価のためのサンプリング法の開発			
(1) 農場で活用できるサンプリング法の開発			サンプリング方法の検討 ← →
(2) 試料の調製法と検証実験			検証実験 ← →
所要経費（合計）	7,000 千円	7,000 千円	6,419 千円

(3) 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者		エフオート (%)
研究総括者	(一財) 東京顕微鏡院	伊藤 武		10
1. 原料種子に付着した衛生 指標菌の選定	(一財) 東京顕微鏡院	○	和田真太郎	30
(1) 培養法による種子からの 微生物の検出		△	森 哲也	15
(2) 遺伝子技術による種子の 微生物叢の解析		△	鄒 碧珍	10
(3) 種子における衛生指標菌や 有害微生物の生存性の検討		△	難波豊彦	5
2. 各種微生物の高感度、迅速・ 簡便な試験法の確立		○	森 哲也	前出
(1) 原料種子の前処理方法の 開発		△	和田真太郎	前出
(2) 培養法による試験法の検討		△	森 哲也	前出
(3) 簡易な遺伝子検査法の開発		△	和田真太郎	前出
3. 安全性評価のための サンプリング法		○	本間耕一	5
(1) 農場でのサンプリング法の 開発		△	本間耕一	前出
(2) 試料の調製法と検証実験		△	和田真太郎	前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

3 研究推進会議の開催状況

別紙の(1)のとおり

4 研究成果の概要

(1) 主要な成果

ア 成果の内容（別紙の（2）参照）

（ア）種子の糞便系汚染の指標としての大腸菌の有効性

原料種子の収穫から国内のスプラウト生産者に使用されるまでの期間は3～12ヶ月であったため、サルモネラ等の有害微生物と大腸菌を人為的に種子に汚染させ、種子における生存性を検討した。その結果、微生物種により減少率は異なるものの、長期（12か月後）にわたり大腸菌の残存が確認でき、原料種子が糞便により微生物汚染を受けた場合、種子の有害微生物汚染の指標として、大腸菌検査を用いる有効性が示された。（p24～27）

（イ）種子の微生物検査における発芽処理の有効性

原料種子の検査における検出感度を向上させるため、人為的にわずかに微生物汚染させた種子を用いて、有効な試料の前処理を検討した。その結果、大腸菌および腸管出血性大腸菌 0157 では24時間以上、サルモネラでは48時間以上の発芽処理を行うことで、検出感度が著しく向上することが示された。（p32～36）

（ウ）生産農場における原料種子のサンプリングプラン

ICMSF（国際食品微生物規格委員会）が示す食品安全管理における微生物検査に関する考え方を基に、微生物に汚染された（有害微生物による食中毒が発症する恐れのある）種子を排除するために必要なサンプル（袋の開梱）数を検討した。その結果、スプラウト生産施設における実行性も考慮した上で、原料種子1ロットに対して4点（袋）を必要数として示した。（p45～47）

イ 成果の活用（別紙の（2）参照）

無し

(2) 各研究課題の成果

ア 中課題1（原料種子に付着した衛生指標菌の選定）の研究成果

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①培養法を用いて、スプラウト原料種子の微生物実態を明らかにする（小課題１関連）。 （平成２８、２９年度） ↓
②遺伝子技術を用いて、スプラウト原料種子の微生物叢の解析を行い、培養できない菌も含めた微生物実態を明らかにする（小課題２関連）。（平成２８、２９年度） ↓
③上記研究を踏まえた衛生指標菌の候補および有害微生物（腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌等）をスプラウト原料種子にそれぞれ添加し、温度や湿度の複数条件にて保存試験を行い、菌の消長を調査する（小課題３関連）。（平成２８、２９、３０年度）
成果目標：スプラウト原料種子における適切な衛生指標菌の選定とその科学的根拠を示す。

(イ) 各工程の進捗状況および成果

【工程表の①】

１．有害微生物及び衛生指標菌の定性検査（平成２８年度）

【目的】

有害微生物及び食品検査等で一般に衛生指標菌として用いられる大腸菌及び腸球菌について、種子中での実態を把握する。

【方法】

（１）供試した種子

- ① 種子Ａ：アメリカ（US）産カイワレ大根
- ② 種子Ｂ：ニュージーランド（NZ）産カイワレ大根
- ③ 種子Ｃ：アメリカ（US）産ブロッコリー

各種子について、有害微生物は N=5、衛生指標菌は N=1 で検査を実施。

（２）操作手順

① 腸管出血性大腸菌

種子 25g に mEC 培地 225mL を加え、ストマッカーにて 1 分間混合し、試料液を作成した。その試料液を 42℃22 時間培養後、アルカリ熱抽出法及び DNeasy Blood & Tissue Kit 【QIAGEN】を用いて DNA を抽出し、EHEC (VT gene) PCR Screening Set 【タカラバイオ】を用いて VT 遺伝子の増幅を行った。PCR の条件は 94℃ 1 分、55℃ 1 分及び 72℃ 1 分を 35 サイクル行った後に 72℃10 分の反応を行った。PCR 後の試料は 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動後、Gel Doc システム 【Bio-Rad】にて結果の観察及び撮影を行った。

② サルモネラ

種子 25 g に緩衝ペプトン水 225mL を加え、ストマッカーにて 1 分間混合し、試料液を作成した。その試料液を 37℃22 時間培養後、RV 培地及び TT 培地を用い、42℃22 時間培養した。各培養液を DHL 寒天培地及びクロモアガーサルモネラ培地に塗抹し、37℃22 時間培養後、サルモネラの定型的集落の有無を確認した。

③ リステリア・モノサイトゲネス

種子 25 g にハーフフレーザーブイオン培地 225mL を加え、ストマッカーにて 1 分間混合し、試料液を作成した。その試料液を 30℃24 時間培養後、フレーザーブイオン培地に接種し 37℃48 時間選択増菌培養を行った。その培養液をクロモアガーリステリア培地に塗抹し、37℃48 時間培養後、リステリア・モノサイトゲネスの定型的集落の有無を確認した。

④ 大腸菌

種子 10 g に EC 培地 90mL を加え、ストマッカーにて 1 分間混合し、試料液を作成した。その試料液を 44℃24 時間培養後、EMB 寒天培地に塗抹し、37℃24 時間培養後、糞便系大腸菌群の定型的な集落を釣菌し、さらに IMViC 試験にて大腸菌であることを確認した。

⑤ 腸球菌

種子 10 g にエンテロコッカセルブロス 90mL を加え、ストマッカーにて 1 分間混合し、試料液とした。その試料液を 37℃24 時間培養後、EF 培地に塗抹し、37℃24

時間培養後、腸球菌の定型的集落を釣菌し、血液寒天培地に塗抹し、45℃24 時間培養後、菌の発育の有無を確認した。

【結果及び考察】

有害微生物については、各種子とも 5 検体全て陰性であった。衛生指標菌については、大腸菌（糞便系大腸菌群）は各種子とも陰性であったが、腸球菌は種子 C で陽性となった。（表 1－1）

表 1－1．有害微生物及び衛生指標菌の定性検査結果 （陽性数 / 試験数）

	種子 A	種子 B	種子 C
腸管出血性大腸菌	0/5	0/5	0/5
サルモネラ属菌	0/5	0/5	0/5
リステリア・モノサイトゲネス	0/5	0/5	0/5
大腸菌	0/1	0/1	0/1
腸球菌	0/1	0/1	1/1

2. 衛生指標菌の定量検査（平成 28 年度）

【目的】

食品微生物検査で一般に衛生指標菌として用いられる一般生菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群及び大腸菌について、種子中での実態を把握する。

【方法】

（1）供試した種子

1. と同じ種子 A～C を用いた。各種子について、N=5 で検査を実施。

（2）種子の前処理法

乾燥種子の表面だけでなく、内部に存在する細菌を考慮し、前処理を行った。

① ふりだし処理：種子表面に付着する細菌のみを抽出

種子 25g に緩衝ペプトン水 225mL を加え、手で 1 分間振とうさせ、その上澄みを試

料液とした。

② ストマッカー処理：種子を破碎し表面と内部、両方の細菌を抽出

種子 25g に緩衝ペプトン水 225mL を加え、ストマッカーにて 1 分間混合し、試料液とした。

③ 2 時間浸漬処理：種子表面及び内部を軟化させ、②よりさらに抽出しやすくした

種子 25g に緩衝ペプトン水 225mL を加え、5℃2 時間浸漬後、ストマッカーにて 1 分間混合し、試料液とした。

④ 4 時間浸漬処理：③と同様

③と同様の処理を、浸漬時間を 4 時間にして行い、試料液とした。

(3) 操作手順

① 一般生菌数

各試料液について、緩衝ペプトン水で 10 倍階段希釈を行い、寒天平板に 0.1mL 滴下後、コンラージ棒にて塗抹し、35℃48 時間培養後、発育した集落を計測し、1g 当たりの菌数を算出した。乾燥種子に付着した細菌は環境ストレスにさらされ、損傷化していることも考慮し、寒天培地は以下の 4 種類を使用した。

i) 標準寒天 (SA) 培地

ii) トリプチケースソイ寒天 (TSA) 培地

iii) 1%ピルビン酸含有標準寒天 (p SA) 培地

iv) 1%ピルビン酸含有トリプチケースソイ寒天 (p TSA) 培地。

② 腸内細菌科菌群

①と同様に各試料液を VRBG 寒天培地に塗抹し、35℃24 時間培養後、腸内細菌科菌群の定型的な集落を計測し、1g 当たりの菌数を算出した。

③ 大腸菌群及び大腸菌

①と同様に各試料液を ES コリマーク寒天培地【栄研化学】に塗抹し、35℃24 時間培養後、大腸菌は青色集落を計測、大腸菌群は青色集落及び赤色集落を計測し、1g 当たりの菌数を算出した。

【結果】

(1) 一般生菌数 (図 1-1-1)

① 培地間の比較

有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

② 前処理間の比較

標準寒天培地における結果を比較した。種子 A ではストマッカー処理がふりだし、2 時間浸漬、4 時間浸漬の処理に比べて菌数が高く有意差が認められた ($p < 0.05$)。種子 B ではふりだしが他の前処理よりも菌数が低く有意差が認められた ($p < 0.05$)。種子 C ではふりだしと他の前処理で有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

③ 種子ロット間の比較

種子 A は汚染菌数が低く、ふりだし、2 時間浸漬、4 時間浸漬の試料で全て 10^2 CFU/g 以下であった。種子 B は全体的に菌数も高く、大部分が 10^4 CFU/g 以上であった。種子 C は全て $10^3 \sim 10^4$ CFU/g の間であった。

(2) 腸内細菌科菌群、大腸菌群及び大腸菌 (図 1-1-2)

腸内細菌科菌群は全ての種子から、大腸菌群は種子 B 及び C から検出された。大腸菌はいずれの種子からも検出されなかった。

【考察】

前処理間の比較から、ふりだし処理の試料は他の処理法と比較して菌数が低く、種子表面に細菌が固着している可能性や種子内部にも細菌が存在する可能性が示唆された。

腸内細菌科菌群は、全ての種子から検出されており、恒常的に付着している常在菌である可能性が考えられた。

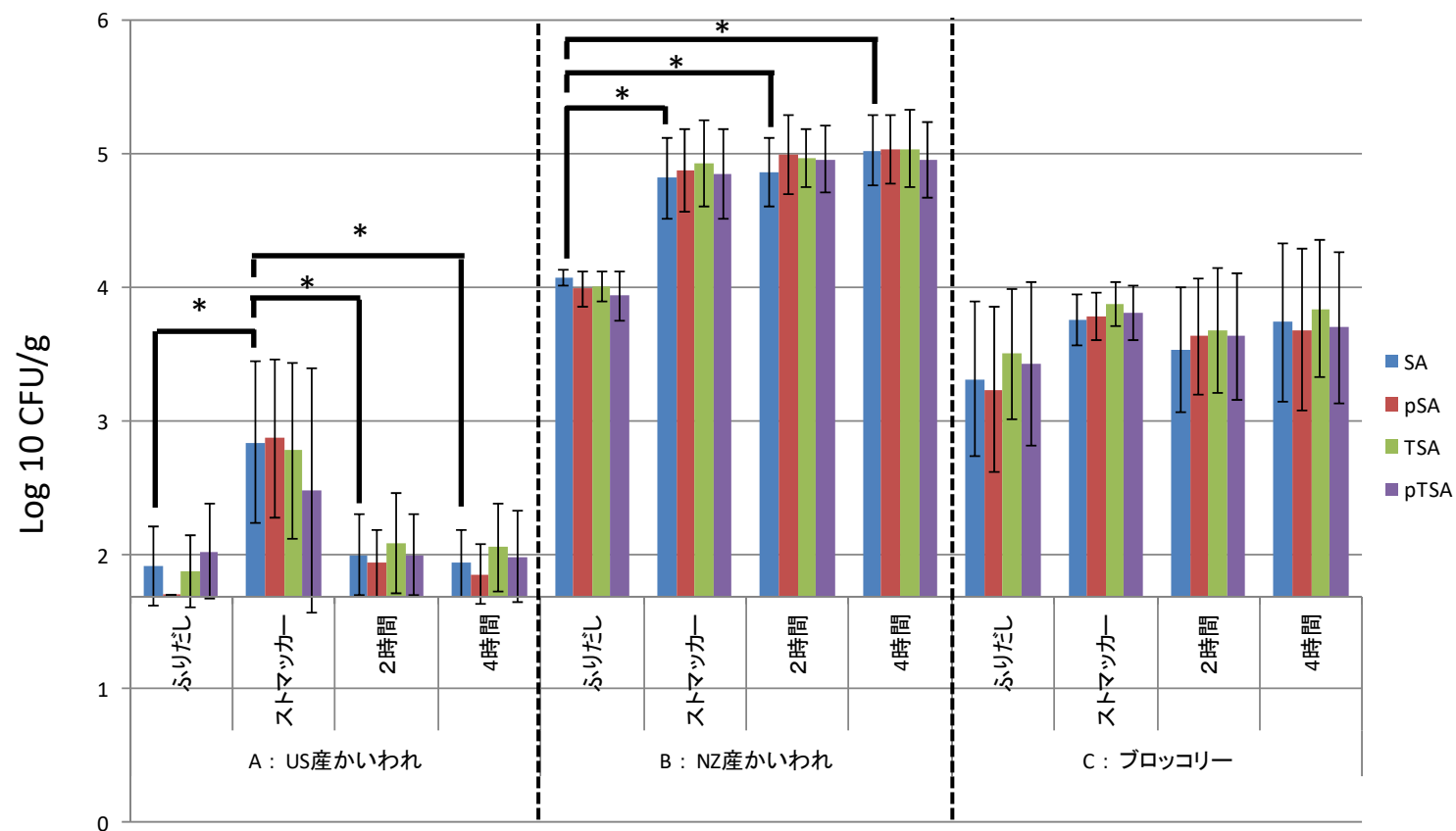


図 1 - 1 - 1 . 一般生菌数の定量検査結果

SA : 標準寒天培地、pSA : 1%ピルビン酸 標準寒天培地、TSA : トリプチケースソイ寒天培地、
pTSA : 1%ピルビン酸トリプチケースソイ寒天培地、* : 有意差有り ($p < 0.05$: t 検定)

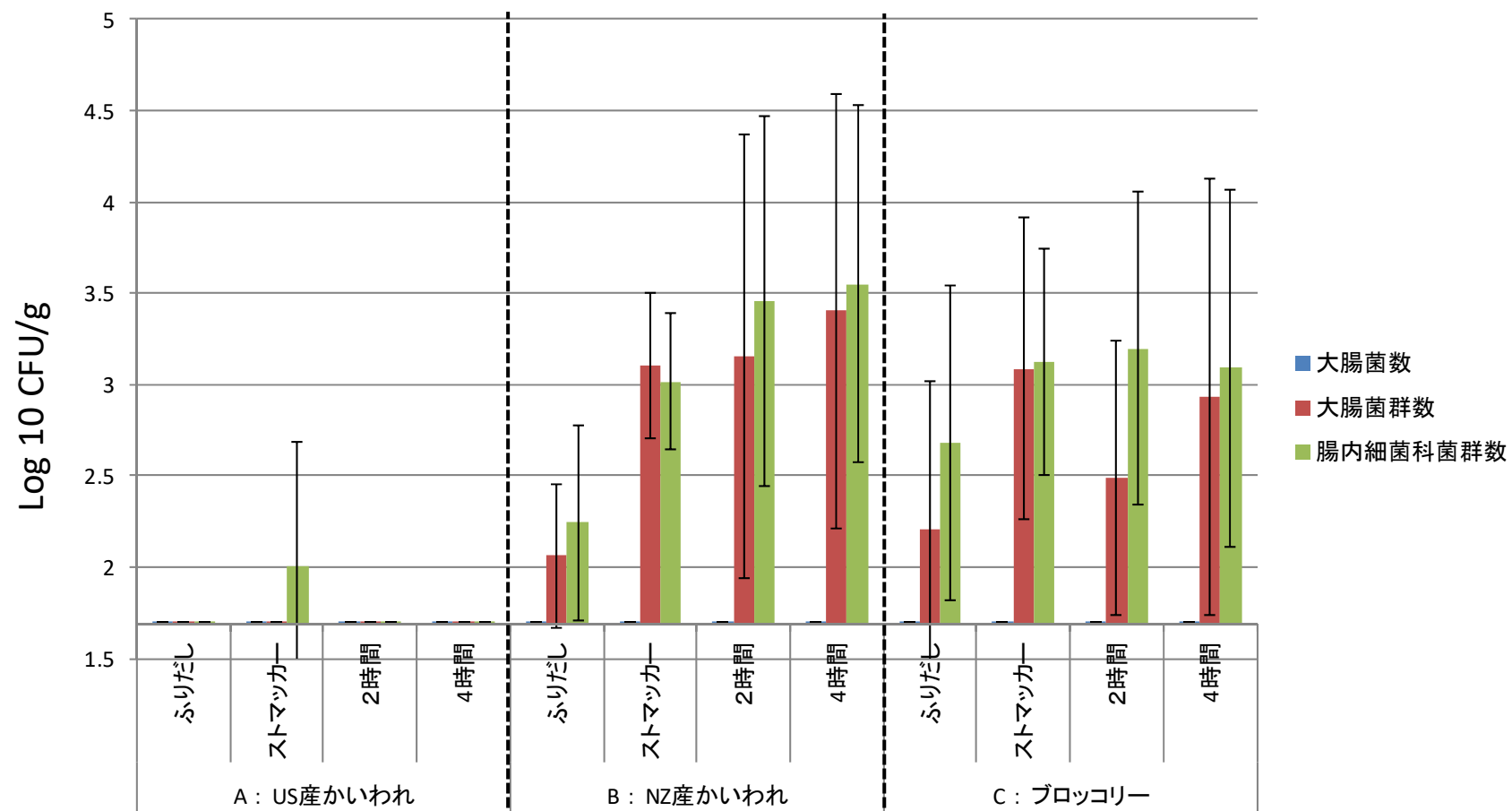


図 1 - 1 - 2. 大腸菌数、大腸菌群数及び腸内細菌科菌群数の定量結果

3. 発芽させた種子からの衛生指標菌の検査（平成29年度）

【目的】

1 及び 2 で使用した原料種子より、土等の混入状況から汚染の可能性が高いと考えられる原料種子を選択し、微生物（衛生指標菌）実態を把握する。

【方法】

（1）供試した種子

カイワレ大根種子 10 ロット（アメリカ産 2 ロット、ニュージーランド産 8 ロット）。
各種子について、N=5 で実施。

（2）種子の前処理

海外のスプラウトの衛生管理に関するガイドライン等では、原料種子ではなく、発芽後一定期間経過したものからの検査を推奨していることから、発芽処理を新たに加えた。

① ストマッカー処理

② 24 時間発芽処理

300g の種子を滅菌容器に採取し、種子が浸る量の滅菌蒸留水にて 25℃、4 時間浸漬後、水分を除去し 25℃で 24 時間静置、発芽させる。発芽させた種子に①の処理を行い、試料液とした。

③ 48 時間発芽処理

②の静置時間を 48 時間としたもの。

（3）対象微生物の絞り込み

一般生菌数とともに、糞便汚染と関連性が高いと考えられる検査項目として、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、糞便系大腸菌群、腸球菌を対象とした。

（4）操作手順

未処理（ストマッカー処理のみ）又は発芽処理を行った試料に対し、各微生物の定量又は定性検査を実施した（検査方法は図 1-1-3 を参照）。なお、未処理の状態から菌数の多い一般生菌及び腸内細菌科菌群については、発芽処理後の定量試験は実施しなかった。

① ストマッカー処理を行った試料

・ 定量検査：一般生菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数

- ・定性検査：糞便系大腸菌群、腸球菌

② 24 時間及び 48 時間発芽処理を行った種子

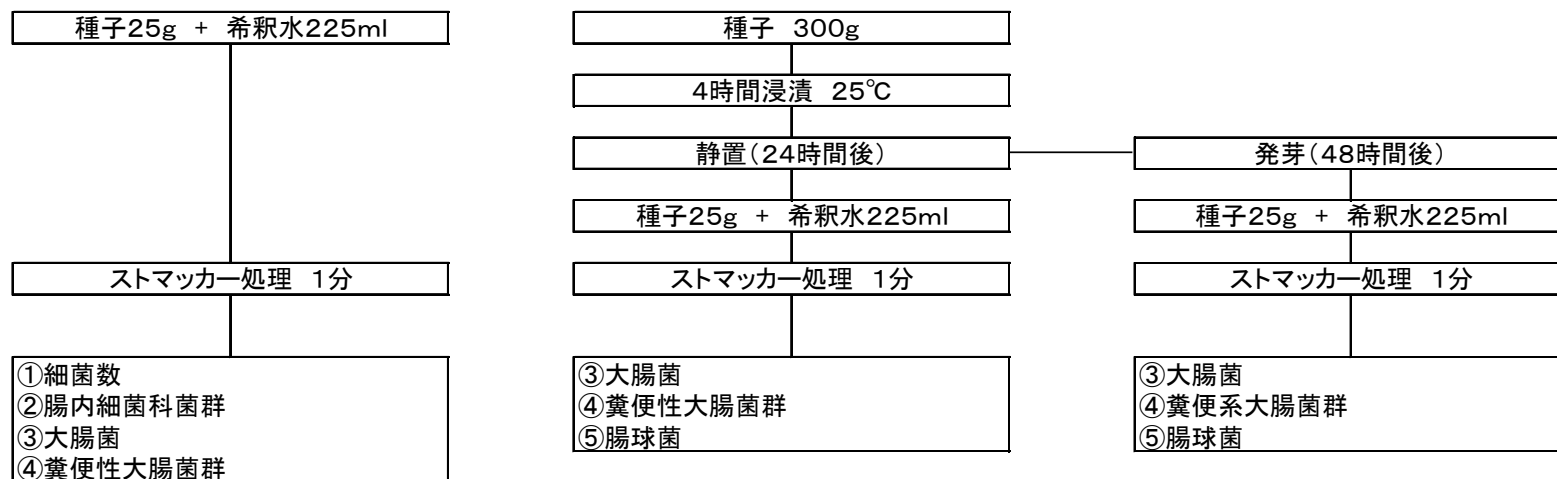
- ・定量検査：大腸菌数
- ・定性検査：糞便系大腸菌群及び腸球菌

【結果】

一般生菌は 10 ロット全ての種子から検出され、菌数は $10^2 \sim 10^4$ CFU/g の間であった。腸内細菌科菌群は 10 ロット中 7 ロットから検出され、菌数は 10^3 CFU/g 以下であった。大腸菌及び糞便系大腸菌群は全ての試料で検出されなかった。腸球菌は 10 ロットのうち、ストマッカー処理の試料では 1 ロットのみ陽性が見られたが、24 時間発芽後及び 48 時間発芽後では 7 ロットで陽性が見られた（図 1-1-5 及び表 1-1-1）。

【考察】

腸内細菌科菌群は高い割合（7/10）で検出され、腸球菌は発芽処理を行わない試料ではほとんど検出されていないものの、24 時間及び 48 時間発芽後の試料から高い割合（7/10）で検出されたことから、ともにカイワレ大根の種子に常在している可能性が示唆された。



項目	使用培地	培養温度	培養時間	出典
①細菌数	標準寒天培地	35℃	48時間	食品衛生法(公定法)
②腸内細菌科菌群	VRBG培地	37℃	24時間	ISO 21528-2
③大腸菌	TBX培地	44℃	24時間	ISO 16649-2
④糞便性大腸菌群	EC培地	44. 5℃	24時間	食品衛生法(公定法)
	EMB培地	35℃	24時間	
	IMViC試験	35℃	24時間	
⑤腸球菌	AC培地	35℃	48時間	食品衛生法 (ミネラルウォーター)
	AC培地	45℃	48時間	
	ブドウ糖寒天	35℃	24時間	
	確認試験			

図 1 - 1 - 3 衛生指標菌の検査方法

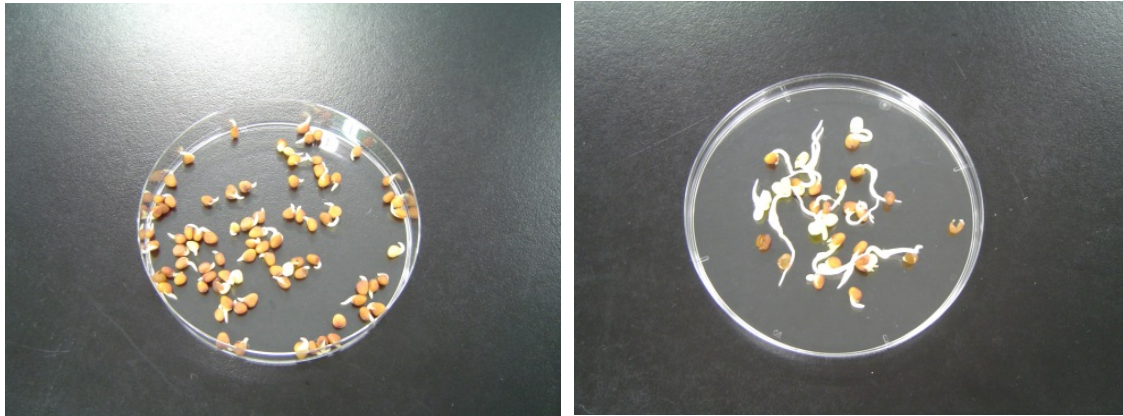


図 1 - 1 - 4 カイワレ大根種子の 24 時間及び 48 時間発芽後の状態

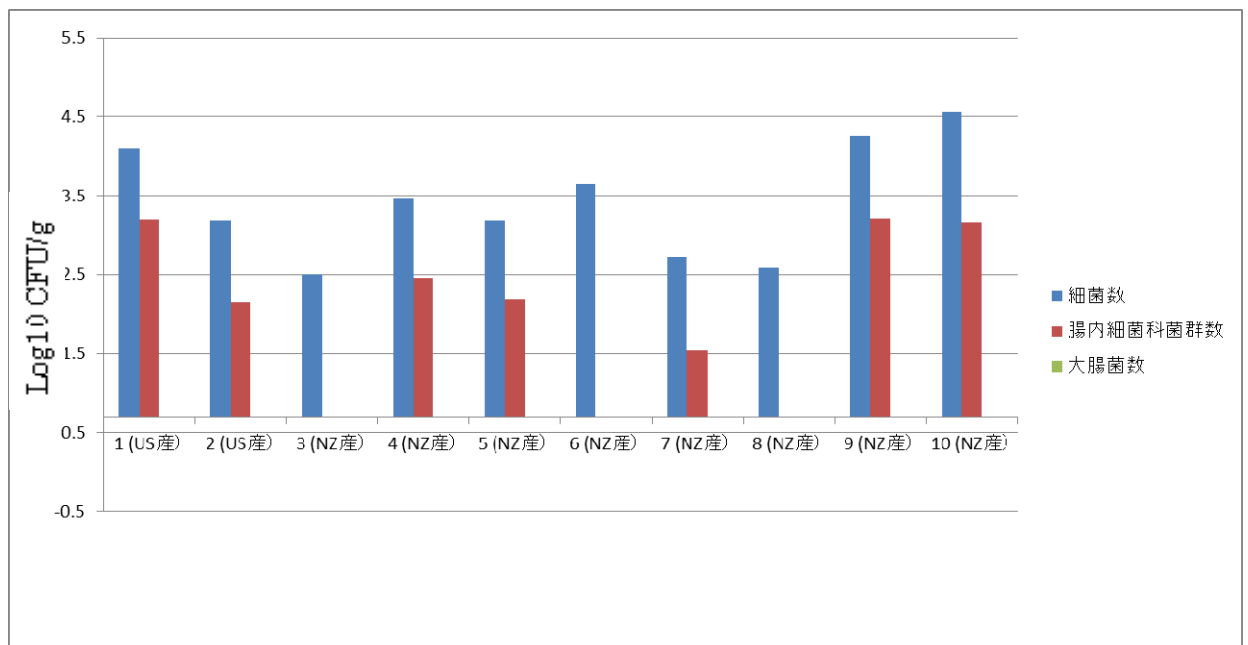


図 1 - 1 - 5 カイワレ大根種子からの衛生指標菌の定量検査結果

表 1-1-1 衛生指標菌の検査結果

カイレ 種子	前処理	一般生菌数 (CFU/g)	腸内細菌科 (CFU/g)	大腸菌 (CFU/g)	糞便系 大腸菌群	腸球 菌
1 Lot. AC206G US 産	0h	1.3×10^4	1.6×10^3	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	4/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	5/5
2 Lot. BH226W US 産	0h	1.6×10^3	1.4×10^2	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	5/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	5/5
3 Lot. 727W NZ 産	0h	3.0×10^2	<5	ND	0/5	1/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	5/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	5/5
4 Lot. 728W NZ 産	0h	2.4×10^3	2.8×10^2	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	4/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	5/5
5 Lot. 729W NZ 産	0h	1.6×10^3	1.5×10^2	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	5/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	5/5
6 Lot. 3014MG NZ 産	0h	4.5×10^3	<5	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	0/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	0/5
7 Lot. 3620MW NZ 産	0h	5.3×10^2	3.5×10^2	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	0/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	0/5
8 Lot. PM869 NZ 産	0h	3.8×10^2	<5	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	0/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	0/5
9 Lot. PP828G NZ 産	0h	1.8×10^4	1.6×10^4	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	4/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	2/5
10 Lot. PP829G NZ 産	0h	3.6×10^4	1.5×10^4	ND	0/5	0/5
	24h	NT	NT	ND	0/5	4/5
	48h	NT	NT	ND	0/5	5/5

NT: not test , ND : not detect (検出せず)

【工程表の②】

遺伝子技術による種子の微生物叢の解析（平成29年度）

【目的】

種子には培養法では検出できない細菌（培養条件に合わない細菌、損傷していて培養が困難な細菌等）や細菌の死骸が存在し、それらを解析することで、有害微生物や糞便による汚染の痕跡を見つけられる可能性がある。本検討では、種子の細菌叢を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。

【方法】

（1）供試した種子

【工程表①】の1. と同じ種子A～Cを用いた。

（2）試料液の調製

種子 50 g を BPW 200 mL に 4℃ 4 時間浸漬した後、ふりだし処理またはストマッカー処理を行い、試料液とした。

（3）DNA 抽出

それぞれの処理を行った試料液 50 mL を 10,000rpm 20 分間遠心し、回収した沈査から、NucleoSpin Soil を用いて DNA の抽出を行った。

（4）解析

DNA 抽出液について、16S rRNA 領域特異的プライマー（V3-V4 領域）の次世代シーケンサーによる細菌叢の解析を行い、16S rRNA の塩基配列を基にした菌名のデータベースを取得した。このデータベース情報を基に各種子の細菌叢について門レベル及び属レベルで解析を行った。

【結果及び考察】

（1）門（Phylum）レベルでの菌叢

いずれの種子も、Proteobacteria 門の菌種が最も多く、種子 B は Proteobacteria 門の次に Bacteroidetes 門が多く、種子 C は Proteobacteria 門の次に Firmicutes 門が多く含まれていた。（図 1-2-1）

Proteobacteria 門は真正細菌の巨大な分類群で、リポ多糖からなる外膜構造を持つグラム陰性菌のグループである。大腸菌、サルモネラ、ビブリオ、カンピロバクター、シュードモナスなどの多種多様な有害微生物や土壤に分布する化学合成無機栄養細菌や窒素固定細菌などが含まれる。Bacteroidetes 門は、Proteobacteria 門に次いで一般的なグラム陰性菌のグループで、ヒトや動物の腸内細菌叢（ほとんどが非病原性）の主要な構成菌の他、水系や土壤などに広く分布する細菌も含まれる。Firmicutes 門は、グラム陽性細菌門で、グラム陽性低 GC 含量細菌とも呼ばれる。200 近くの属を含み、真正細菌の中では Proteobacteria 門に次ぐ多様性を持ち、*Bacillus* 属や *Clostridium* 属など土壤細菌が含まれる。Actinomycetes 門は放線菌類を意味するグラム陽性の真正細菌で、抗酸菌や *Corynebacterium* などの桿菌や球菌も放線菌に含め

られ、多くは絶対好気性で土壤中に広く棲息する。

(2) 属 (Genus) レベルでの菌叢

いずれの種子も優占する属がほぼ共通しており、ふりだし処理とストマッカー処理間で菌種組成に大きな違いは見られなかった (図 1-2-2、表 1-2-1)。

最も多く検出された *Sphingomonas* 属は、グラム陰性無芽胞好気性桿菌であるが細胞壁がリポ多糖を含まずスフィンゴ糖脂質を持ち、水系や土壌などの環境中に広く分布する。

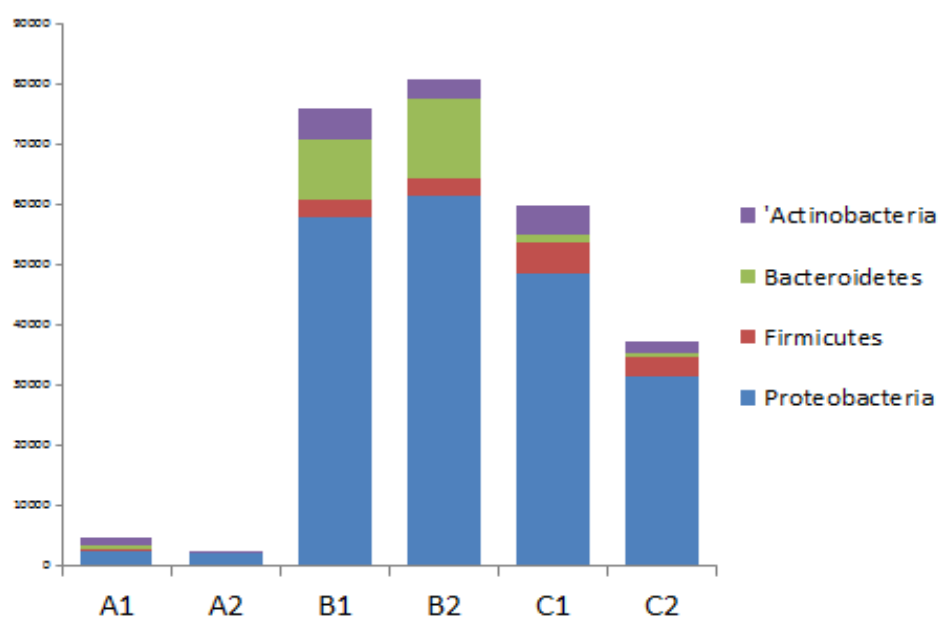
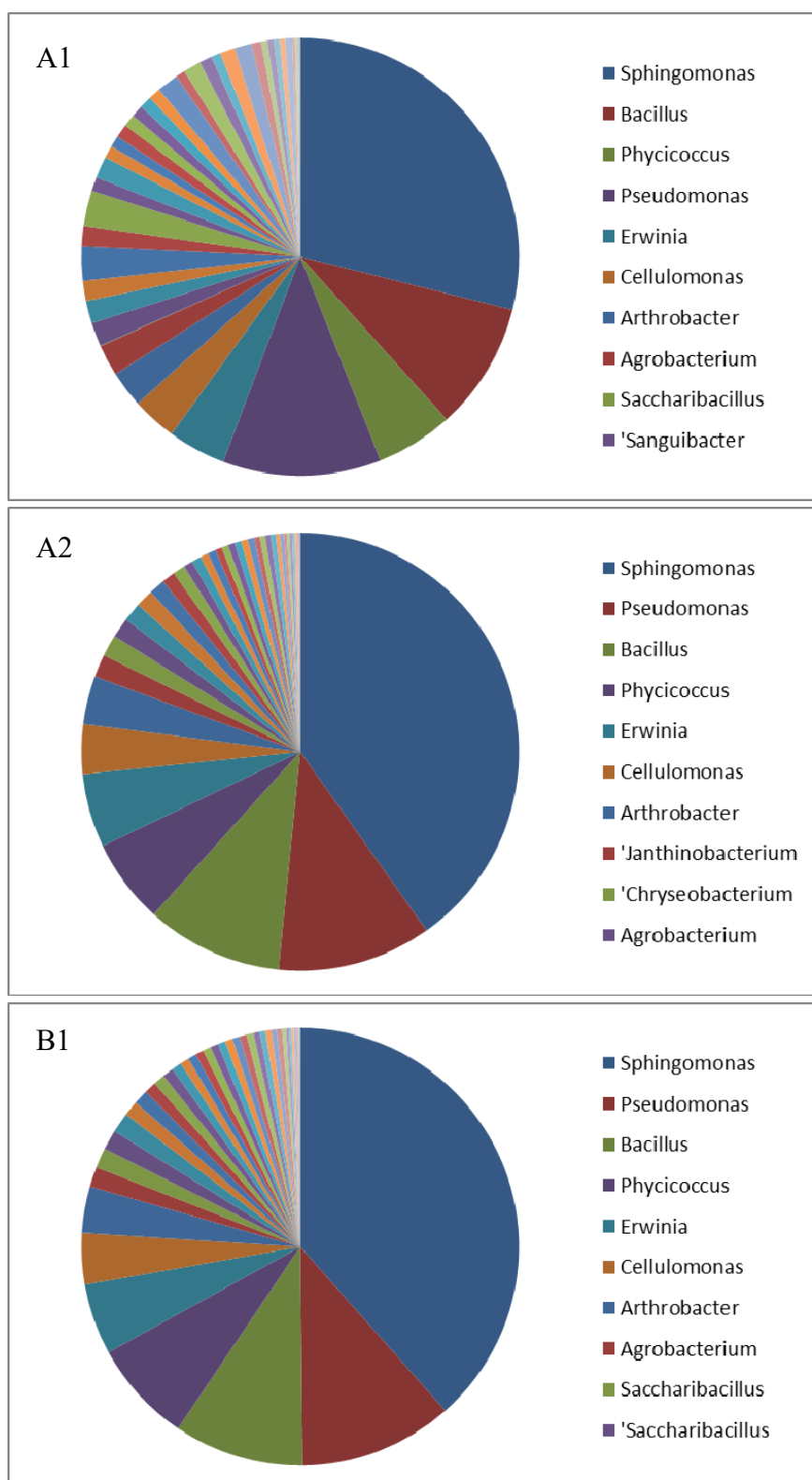


図 1-2-1. 6 試料の各 OUT(Operational Taxonomy Unit)に帰属するリード数を基に作成した門についての群集構造。試料のアルファベットは種子ロットに、数字は前処理 (1 : ふりだし、2 : ストマッカー) に対応。



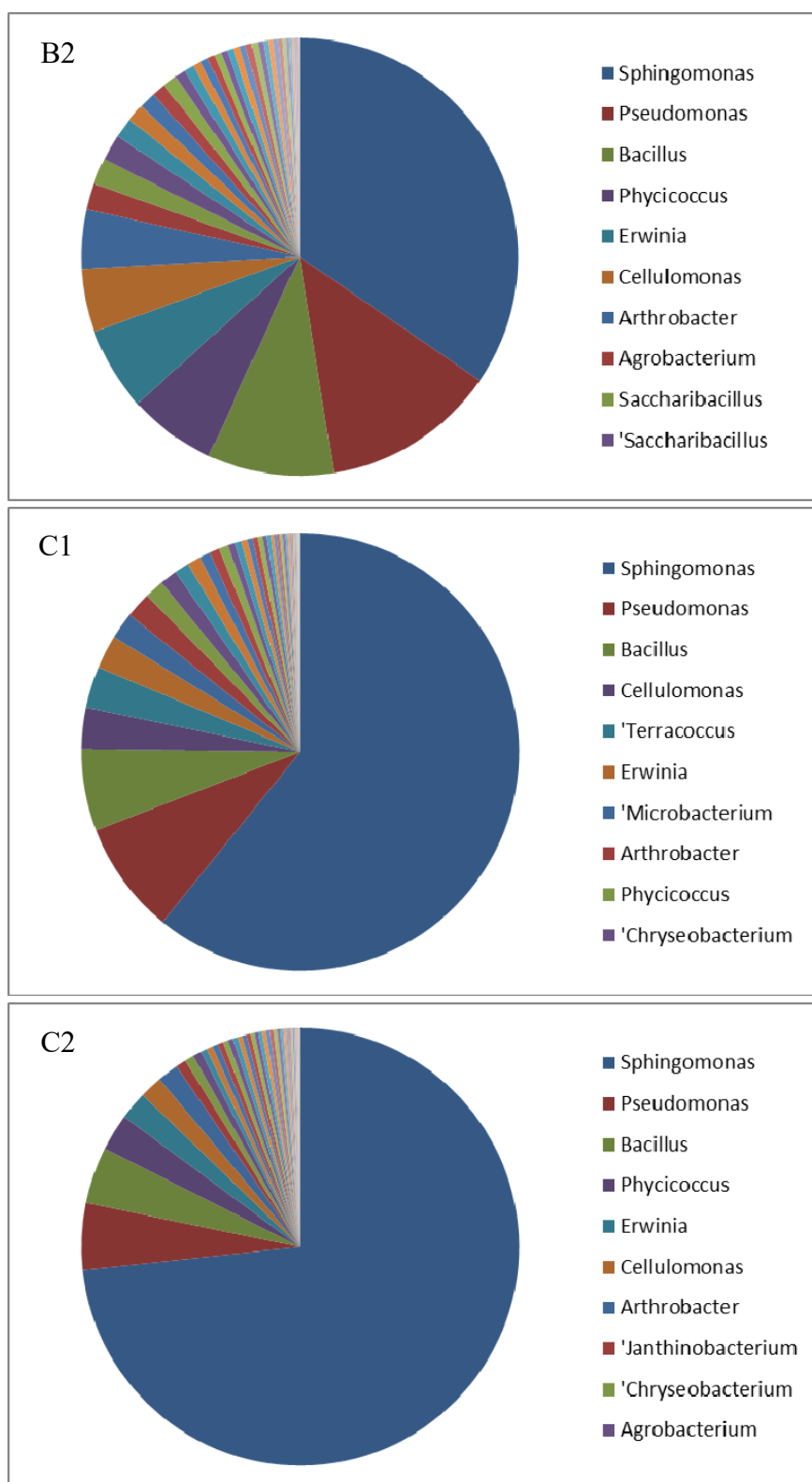


図 1 - 2 - 2 . 6 試料の属レベルの菌種組成。試料のアルファベットは種子ロットに、数字は前処理（1：ふりだし、2：ストマッカー）に対応。

表 1－2－1．各供試試料の Read count に対する属レベルの菌種組成

Taxonomy	Read count						
Genus	A1	A2	B1	B2	C1	C2	Total
'Sphingomonas	839	406	13291	11410	12429	10723	49098
'Bacillus	274	102	3313	3073	1231	612	8605
'Phycococcus	165	63	2615	2144	290	398	5675
'Pseudomonas	340	115	3927	4275	1703	720	11080
'Erwinia	124	55	1807	2024	508	303	51970
'Cellulomonas	96	37	1312	1542	626	245	3858
'Arthrobacter	78	36	1181	1444	385	227	1071
'Agrobacterium	67	15	512	643	218	94	3232
'Sanguibacter	51	14	367	399	74	67	2937
'Methylobacterium	48	13	307	345	153	60	926
'Terracoccus	43	12	279	337	624	55	50
'Chryseobacterium	73	16	390	427	262	98	1266
'Kaistobacter	44	10	257	245	101	56	713
'Janthinobacterium	76	17	507	498	202	112	1412
'Microbacterium	30	7	217	205	403	44	906
'Rhodococcus	46	9	290	261	79	67	752
'Rathayibacter	27	6	202	161	163	40	599
'Paenisporosarcina	24	5	190	157	93	40	509
'Segetibacter	29	6	206	170	43	46	500
'Exiguobacterium	26	5	193	160	29	41	454
'Kineococcus	26	5	193	149	22	41	436
'Geodermatophilus	26	4	176	143	16	40	405
'Sphingobacterium	26	4	182	147	45	41	445
'Paenibacillus	46	5	226	189	140	63	5
'Demequina	20	4	148	125	35	29	361
'Nocardioides	38	7	206	168	61	52	532
'Mycobacterium	27	5	157	125	42	36	392
'Streptomyces	20	3	136	106	60	29	354
'Pedobacter	32	4	137	122	81	46	422
'Hymenobacter	37	5	150	135	103	49	479
'Adhaeribacter	21	3	104	93	42	31	294
'Actinoplanes	13	2	61	55	46	19	196
'Planococcus	14	2	73	67	34	20	210
'Rickettsia	12	2	56	50	17	18	155
'Caulobacter	12	2	55	49	13	18	149
'Lactobacillus	15	2	62	56	24	22	181
'Staphylococcus	6	1	20	17	17	8	69
'Serratia	6	1	17	15	5	8	52
'Clostridium	2	0	6	5	1	3	17
'Enterococcus	2	0	5	5	0	3	15
'Saccharibacillus	1	0	508	637	6	2	1114

【工程表の③】

大腸菌及び有害微生物を添加した種子の保存試験（平成29～30年度）

【目的】

スプラウト原料種子は、収穫後に調製、保管及び輸送、国内の生産者が入手し、スプラウトの生産に使用するまでに数か月単位の期間を要する。また、種子を輸入している種苗会社等からの情報によると、原料種子の生産において、収穫時に土壌が混入しうる方法で行われているため、主な種子の汚染経路として、土壌を介した、未熟な堆肥やほ場に侵入した動物の糞による汚染が想定された。

そこで、大腸菌及び有害微生物を人為的に添加した種子の保存試験を行い、種子中のそれらの微生物の消長を明らかにした。

【材料と方法】

（１）供試した種子

アメリカ産カイワレ大根（Lot. HB125W）

（２）供試菌株

以下の表の通り。

表1－3－1．供試菌株一覧

微生物	使用株
大腸菌	① <i>E. coli</i> ATCC 8739
	② スプラウト由来株（B-31）
サルモネラ	① <i>S. Abony</i> NCTC 6017
	② 鶏肉由来株（ <i>S. Montevideo</i> ）
リステリア・モノサイトゲネス	① <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644
	② 野菜由来株
腸管出血性大腸菌 O157	① TKF- <i>E. coli</i> O157BE-3 分与株
	② 牛肉由来株

（３）試料菌液の調製

各供試菌株をTSB培地に接種し、35℃24時間培養した後、滅菌リン酸緩衝希釈水を用いて 10^5 CFU/mLになるように希釈したものを試料菌液とした。

（４）種子への試料菌液の添加

種子10gを滅菌シャーレに入れ、試料菌液1mLをできる限り多くの種子上に滴下し、菌液が種子に万遍なく接触するよう、滅菌コンラージ棒を用いて攪拌した。その後、安全キャビネット内でシャーレのフタを開けた状態で1時間風乾した。その後、フタを閉め、恒温器内で保存した。

（５）保存条件

温度：15℃及び25℃。湿度：20～60%。

(6) 菌数の測定

菌数の測定は、風乾直後と保存開始から 15 日、1 ヶ月、3 ヶ月、5 ヶ月、7 ヶ月、9 ヶ月及び 12 ヶ月後に、各微生物について N=3 で実施した。

シャーレ内の種子全量を、TSB 培地 90mL を使用してストマッカー用袋に移し入れ、ストマッカーにて 1 分間混合を行い、試料液とした。試料液を空の試験管 3 本にそれぞれ 10mL、TSB 培地 10mL が入った試験管 3 本にそれぞれ 1mL、TSB 培地 10mL が入った試験管 3 本にそれぞれ 0.1mL 接種し、37℃18 時間培養した。

各微生物について、以下の手順で菌数を測定した。

① 大腸菌

各試験管内の試料液を TBX 培地に塗抹し、37℃24 時間培養後、定型的集落を認めた場合を陽性とし、10g 当たりの MPN 値を算出した。

② サルモネラ

各試験管内の試料液を TT 培地 10mL に接種し、42℃22 時間培養後、クロモアガーサルモネラ培地に塗抹し、37℃22 時間培養。定型的集落を認めた場合を陽性とし、10g 当たりの MPN 値を算出した。

③ リステリア・モノサイトジェネス

各試験管内の試料液をハーフプレーザー培地 10mL に接種し、30℃26 時間培養後、クロモアガーリステリア培地に塗抹し、37℃48 時間培養。定型的集落を認めた場合を陽性とし、10g 当たりの MPN 値を算出した。

④ 腸管出血性大腸菌 O157

各試験管内の試料液を mEC 培地 10mL に接種し、42℃22 時間培養後、クロモアガーO157 培地に塗抹し、37℃24 時間培養後、定型的集落を認めた場合を陽性とし、10g 当たりの MPN 値を算出した。

【結果】

各微生物（菌株）について、保存期間と生存菌数の関係をグラフに示した（図 1－3－1～8）。

いずれの微生物も時間の経過とともに菌数が減少したが、微生物間で比較すると、サルモネラはやや減少が緩やかな傾向が見られた。また、15℃と 25℃では、15℃（低温）下の方がより長期間生存する傾向が見られた。

実際の保存条件に近い 15℃保存において、大腸菌及び有害微生物ともに、12 ヶ月以上生存する株があった。リステリアについては、供試した 2 株とも、12 ヶ月経過した時点で不検出となった。

【考察】

国内のスプラウト生産者によると、原料種子の収穫から生産者が入手するまでの期間は、およそ 3 か月～12 か月であった。さらに、種子を汚染する糞便中には有害微生物より大腸菌の方がより多く含まれることを考慮すると、収穫時に種子が糞便による

汚染を受けた場合、大腸菌を有害微生物による汚染の指標として利用できると考えられた。

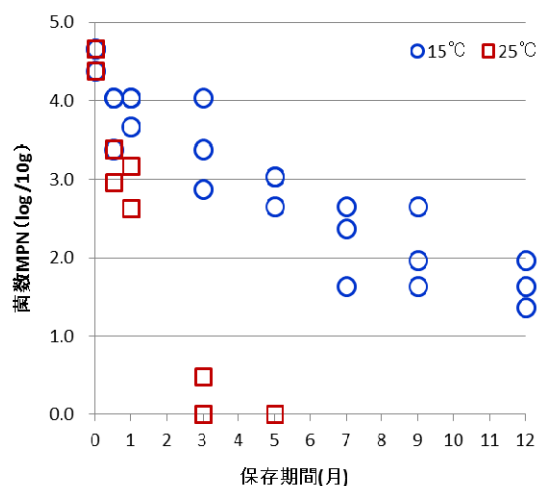


図 1-3-1. 大腸菌①（標準株）の消長

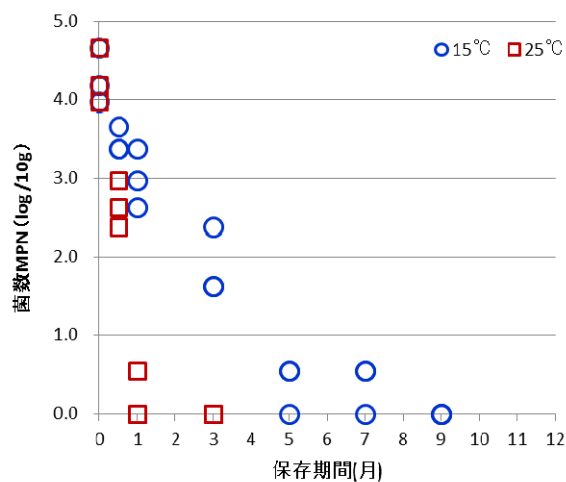


図 1-3-2. 大腸菌②（スプラウト由来株）の消長

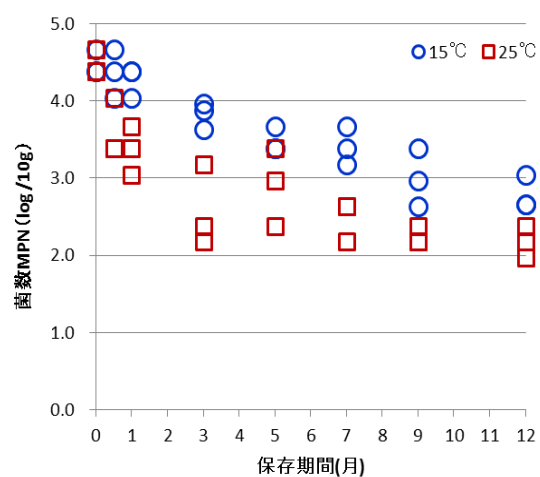


図 1-3-3. サルモネラ①（標準株）の消長

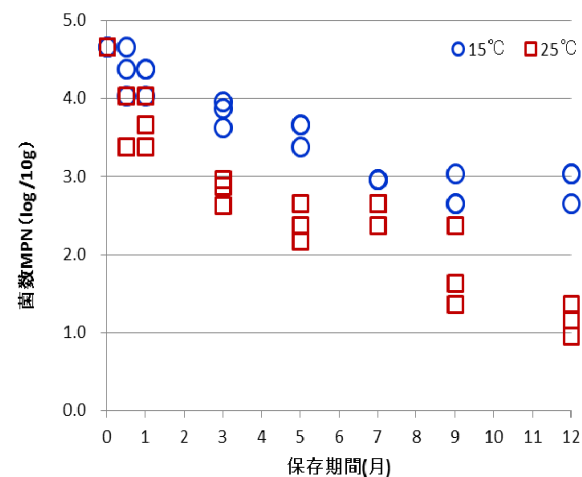


図 1-3-4. サルモネラ②（鶏肉由来株）の消長

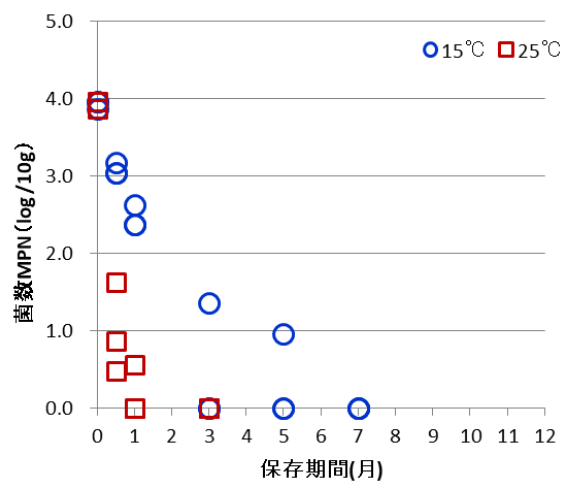


図 1－3－5. 腸管出血性大腸菌 0157①(分与株) の消長

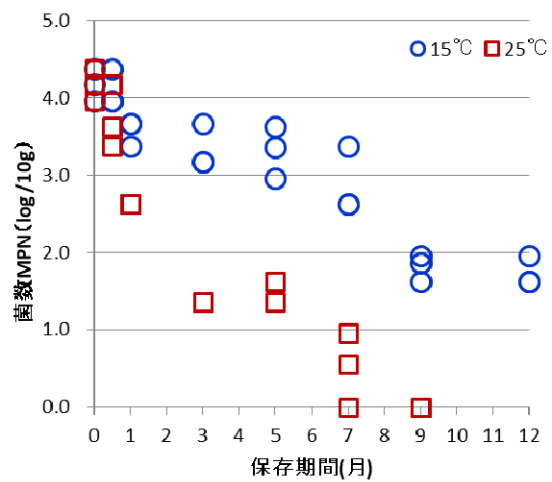


図 1－3－6. 腸管出血性大腸菌 0157②(牛肉由来株) の消長

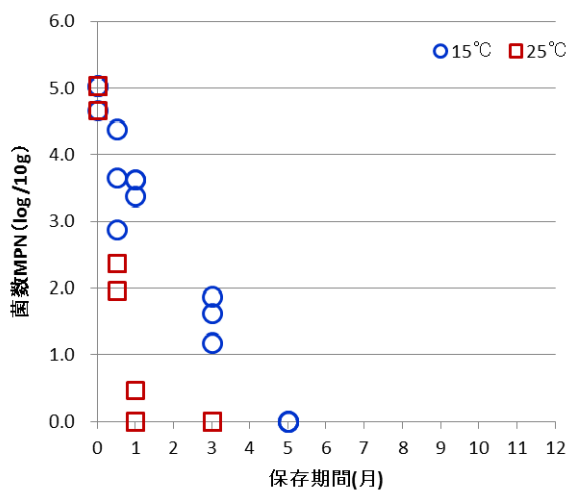


図 1－3－7. リステリア①(標準株) の消長

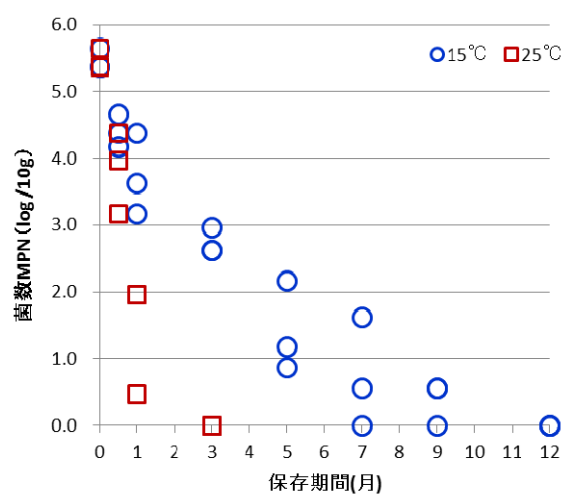


図 1－3－8. リステリア②(野菜由来株) の消長

(ウ) 成果目標に対する達成状況

原料種子の収穫時の糞便系汚染を想定した場合、国内における検査において、大腸菌の指標としての妥当性が示された。

イ 中課題2（衛生指標菌の迅速・簡便な試験法の開発）の研究成果

（ア）工程管理及び成果目標

工程表
①スプラウト原料種子中の衛生指標菌及び有害微生物を高感度に検出するための前処理方法を検討する（小課題1関係）。（平成29、30年度） ↓
②発芽処理後の増菌培養の省略や遺伝子検査導入による迅速・簡便な検査法を検討する（小課題2及び3関係）。（平成30年度）
成果目標： 種子中の微生物を高感度かつ迅速・簡便に検出し、スプラウトの生産者が利用可能な検査法を示す。

（イ）各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

1. 原料種子中の微生物を高感度に検出するための前処理方法の検討（平成29、30年度）

【目的】

中課題1の結果や原料種子の微生物汚染実態に関する国内外の知見から、有害微生物及び大腸菌による種子の汚染率は低く、また、汚染された場合にも、種子の保管条件において微生物は低減する性質が示された。

そこで、糞便による汚染を受けた種子について、検出力を高めるための種子試料の前処理方法の検討を行った。

【方法】

（1）供試菌株

本課題に着手する時点で、中課題1の結果から、大腸菌の有無だけで有害微生物による汚染の有無を判断することは困難であったため、指標菌に加えて有害微生物についても対象とした。

① 大腸菌：ATCC8739

② サルモネラ：NCTC6017（*S. Abony*）

③ 腸管出血性大腸菌 0157：TKF-E. coli0157BE-3 分与株

（2）試料菌液の調製

各供試菌株をTSB培地に接種し、37℃20時間培養後、10倍段階希釈し、A： 10^{-4} 倍希釈液（サルモネラは 10^{-5} 倍）、B： 10^{-5} 倍希釈液（サルモネラは 10^{-6} 倍）およびC： 10^{-6} 倍希釈液（サルモネラは 10^{-7} 倍）の3通りの試料菌液を作成した。

また、汚染菌数の推定を行うために、希釈前の培養液は、別途、標準寒天培地への塗抹培養法により菌数を測定した。

（3）種子への試料菌液の添加

種子 10g を滅菌シャーレに入れ、試料菌液 0.5mL をできる限り多くの種子上に滴下し、菌液が種子に万遍なく接触するよう、滅菌コンラージ棒を用いて攪拌した。その後、安全キャビネット内でシャーレのフタを開けた状態で 1 時間風乾した後、フタを閉め、25℃ で 3 日間静置した。

(4) 前処理

FDA 等の海外の衛生規範では、発芽から 48 時間経過させ、菌数が最大になると考えられるタイミングでの検査を求めていることから、前処理として一定時間の発芽処理の効果を検証することとした。それぞれの前処理は N=5 で実施し、具体的な操作は以下の通り。

① 前処理ア：無処理（対象区）

種子 10g 全量をストマッカー用袋に移し、各種培地（大腸菌：EC 培地、O157:mEC 培地、サルモネラ：BPW 培地）にて 100g にメスアップ後、ストマッカーを行い試料液とした。

② 前処理イ：4 時間浸漬処理

種子 10g に滅菌蒸留水を 20mL 加え 4 時間 25℃にて静置した。その後、種子 10g および加えた 20mL の滅菌蒸留水全量をストマッカー用袋に移し、各種培地にて 100g にメスアップした後、ストマッカーを行い試料液とした。

③ 前処理ウ：4 時間浸漬＋24 時間発芽処理

種子 10g に滅菌蒸留水を 20mL 加え 4 時間 25℃にて静置した。その後、滅菌蒸留水をスポイトにて除去し、アルミホイルにて遮光して 25℃24 時間発芽処理を行った。発芽後の種子全量をストマッカー用袋に移し、各種培地にて 100g にメスアップした後、ストマッカーを行い試料液とした。

④ 前処理エ：4 時間浸漬＋48 時間発芽処理

ウと同じ処理を、発芽処理の時間を 48 時間に変えて行った。

(5) 菌数の測定

① 大腸菌

試料液を空の滅菌中試験管 3 本にそれぞれ 10mL、EC 培地 10mL が入った試験管 3 本に 1mL、および EC 培地 10mL が入った試験管 3 本に 0.1mL 接種した。各試験管を 44.5℃にて 24 時間培養後、ガスの発生を認めた試験管に対して TBX 培地へ画線塗抹し、37℃24 時間培養後、大腸菌の定型的な集落の有無を確認した。大腸菌が検出された試験管から最確数表をもとに種子 10g 当たりの最確数を算出した。

② 腸管出血性大腸菌 O157

試料液を空の滅菌中試験管 3 本にそれぞれ 10mL、mEC 培地 10mL が入った試験管 3 本に 1mL、および mEC 培地 10mL が入った試験管 3 本に 0.1mL 接種した。各試験管を 42℃24 時間培養後、クロモアガー O157 培地へ画線塗抹し、37℃24 時間培養後、腸

管出血性大腸菌 0157 の定型的な集落の有無を確認した。腸管出血性大腸菌 0157 が検出された試験管から最確数表をもとに種子 10g 当たりの最確数を算出した。

③ サルモネラ

試料液を空の滅菌中試験管 3 本にそれぞれ 10mL、BPW 培地 10mL が入った試験管 3 本に 1mL、および BPW 培地 10mL が入った試験管 3 本に 0.1mL 接種した。各試験管を 42℃24 時間培養後、クロモアガーサルモネラ培地へ画線塗抹し、37℃24 時間培養後、サルモネラの定型的な集落の有無を確認した。サルモネラ が検出された試験管から最確数表をもとに種子 10g 当たりの最確数を算出した。

また、各菌種において、3 段階の希釈列では >1,100 という結果となった一部の試料について、さらに希釈を繰り返し、最確数法により具体的な菌数を算出した。

【結果】

菌の接種に用いた培養液中の菌数は以下の通り。

(1) 大腸菌 : 1.7×10^8 CFU/mL

(種子 10g 当たりの汚染菌量は A : 8.5×10^3 CFU、B : 8.5×10^2 CFU、C : 8.5×10^1 CFU)

(2) 腸管出血性大腸菌 0157 : 3.8×10^8 CFU/mL

(種子 10g 当たりの汚染菌量は A : 1.9×10^4 CFU、B : 1.9×10^3 CFU、C : 1.9×10^2 CFU)

(3) サルモネラ : 8.1×10^8 CFU/mL

(種子 10g 当たりの汚染菌量は A : 4.1×10^3 CFU、B : 4.1×10^2 CFU、C : 4.1×10^1 CFU)

最確数法によって算出した菌数を表 2-1-3～5 に示した。

発芽処理を行ったウ及びエの試料では汚染菌量に関わらず全ての試料で検出上限値以上の菌数の増加が確認された。ただし、サルモネラの C 試料では、発芽処理を行ったウやエでも <3 となるものが見られた。

表 2-1-3. 大腸菌の定量結果 (MPN/10g)

前処理	汚染菌量	①	②	③	④	⑤
ア 無処理	A	23	93	21	93	15
	B	3.6	3.6	3.6	<3	3.6
	C	<3	<3	<3	<3	<3
イ 4 時間浸漬処理	A	23	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100
	B	23	93	23	1,100	15
	C	9.2	43	<3	<3	3.6
ウ 4 時間浸漬後 24 時間発芽	A	>1,100 ^{*1}	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100
	B	>1,100 ^{*2}	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100
	C	>1,100 ^{*3}	>1,100	>1,100	>1,100	>1,100

エ 4 時間浸漬後 48 時間発芽	A	$>1,100^{*4}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$
	B	$>1,100^{*5}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$
	C	$>1,100^{*6}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$

算出した菌数 = $*1 : 9.3 \times 10^6$ 、 $*2 : 2.4 \times 10^7$ 、 $*3 : 2.4 \times 10^6$ 、 $*4 : 4.3 \times 10^8$ 、 $*5 : 1.5 \times 10^7$ 、 $*6 : 9.3 \times 10^6$

表 2-1-4. 0157 の定量結果 (MPN/10g)

前処理	汚染 菌量	①	②	③	④	⑤
ア 無処理	A	43	9.1	150	43	9.1
	B	<3	3.6	<3	9.1	3.6
	C	<3	<3	<3	<3	<3
イ 4 時間浸漬処理	A	$>1,100$	$>1,100$	240	23	150
	B	43	43	23	3.6	23
	C	<3	<3	<3	3.6	<3
ウ 4 時間浸漬後 24 時間発芽	A	$>1,100^{*1}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$
	B	$>1,100^{*2}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$
	C	$>1,100^{*3}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$
エ 4 時間浸漬後 48 時間発芽	A	$>1,100^{*4}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$
	B	$>1,100^{*5}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$
	C	$>1,100^{*6}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$

算出した菌数 = $*1 : 2.3 \times 10^7$ 、 $*2 : 4.3 \times 10^5$ 、 $*3 : 4.3 \times 10^6$ 、 $*4 : 9.3 \times 10^6$ 、 $*5 : 7.5 \times 10^6$ 、 $*6 : 1.5 \times 10^7$

表 2-1-5. サルモネラの定量結果 (MPN/10g)

前処理	汚染 菌量	①	②	③	④	⑤
ア 無処理	A	15	43	75	23	43
	B	3.6	3.6	3.6	<3	3.6
	C	<3	<3	<3	<3	<3
イ 4 時間浸漬処理	A	43	43	75	75	460
	B	7.3	9.1	9.1	<3	9.1
	C	23	15	3.6	<3	3.6
ウ 4 時間浸漬後	A	$>1,100^{*1}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$
	B	$>1,100^{*2}$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$	$>1,100$

24 時間発芽	C	<3	>1, 100* ³	<3	<3	<3
エ 4 時間浸漬後	A	>1, 100* ⁴	>1, 100	>1, 100	>1, 100	>1, 100
	B	>1, 100* ⁵	>1, 100	>1, 100	>1, 100	>1, 100
48 時間発芽	C	<3	>1, 100* ⁶	<3	>1, 100* ⁷	<3

算出した菌数 = *1 : 1.5×10^8 、*2 : 9.3×10^6 、*3 : 2.4×10^7 、*4 : 1.1×10^9 、*5 : 1.5×10^8 、*6 : 2.4×10^8 、*7 : 2.4×10^8

【考察】

前処理間で結果を比較すると、アおよびイに比べ、ウおよびエでは大幅に菌数の増加が認められ、特に低菌量汚染の試料では、アやイの処理では検出できなくてもウおよびエでは高濃度で検出され、発芽処理の有効性が明らかとなった。

なお、サルモネラの C 試料における結果については、種子重量に対して汚染菌量が他の微生物と比べても少ないことから、操作による汚染のむらが生じ、菌が適切に汚染できた試料は >1, 100 となり、できなかった試料は <3 となったと考えられる。

2. 発芽処理の時間に応じた菌数増加の効果の検証（平成 30 年度）

【目的】

1. の結果から、24 時間および 48 時間の発芽処理により、大幅な菌数の増加が期待できることが明らかとなった。そこで、次の検討として、発芽処理の時間に対する菌数の変化を定量検査によって明らかにし、最適な発芽処理時間の検討を試みた。

【方法】

一連の条件や操作については、1. と同様に実施した。

異なる点としては、

- 種子に接種した試料菌液は、低濃度と高濃度の 2 通りのみ用いた。
- 各微生物、各濃度について、N=3 で実施した。
- 前処理として、発芽処理の時間を 6, 12, 72 及び 96 時間にしたものを追加した。

【結果】

種子の汚染に用いた菌液の濃度は以下の通り。

(1) 大腸菌

低濃度 : 2.9×10^2 CFU/10g、高濃度 : 2.9×10^3 CFU/10g

(2) 腸管出血性大腸菌 0157

低濃度 : 4.3×10^2 CFU/10g、高濃度 : 4.3×10^3 CFU/10g

(3) サルモネラ

低濃度 : 5.0×10^1 CFU/10g、高濃度 : 5.0×10^2 CFU/10g

各微生物の発芽処理の時間に対する菌数変化を散布図に示した（図 2－1－1～3）。

大腸菌の菌数は発芽処理 6 時間および 12 時間では増加過程であったが、24 時間を過ぎると横ばいもしくは減少傾向であった

腸管出血性大腸菌 0157 の菌数は発芽処理 6 時間および 12 時間では増加過程であったが、24 時間を過ぎると横ばいもしくは緩やかな増加傾向であった

サルモネラの菌数は発芽処理 6 時間から 24 時間までは増加過程であったが、48 時間を過ぎると横ばい傾向であった。

【考察】

大腸菌および腸管出血性大腸菌 0157 は発芽処理後 24 時間までが活発に増殖が認められる対数増殖期、それ以降は横ばいの定常期（静止期）になっていると示唆された。サルモネラは発芽処理後 48 時間まで対数増殖期、それ以降は定常期となっていると示唆された。したがって、原料種子由来の微生物を検出するためには、48 時間以上の発芽処理を行ったものを検査材料とすることが効果的であると考えられた。

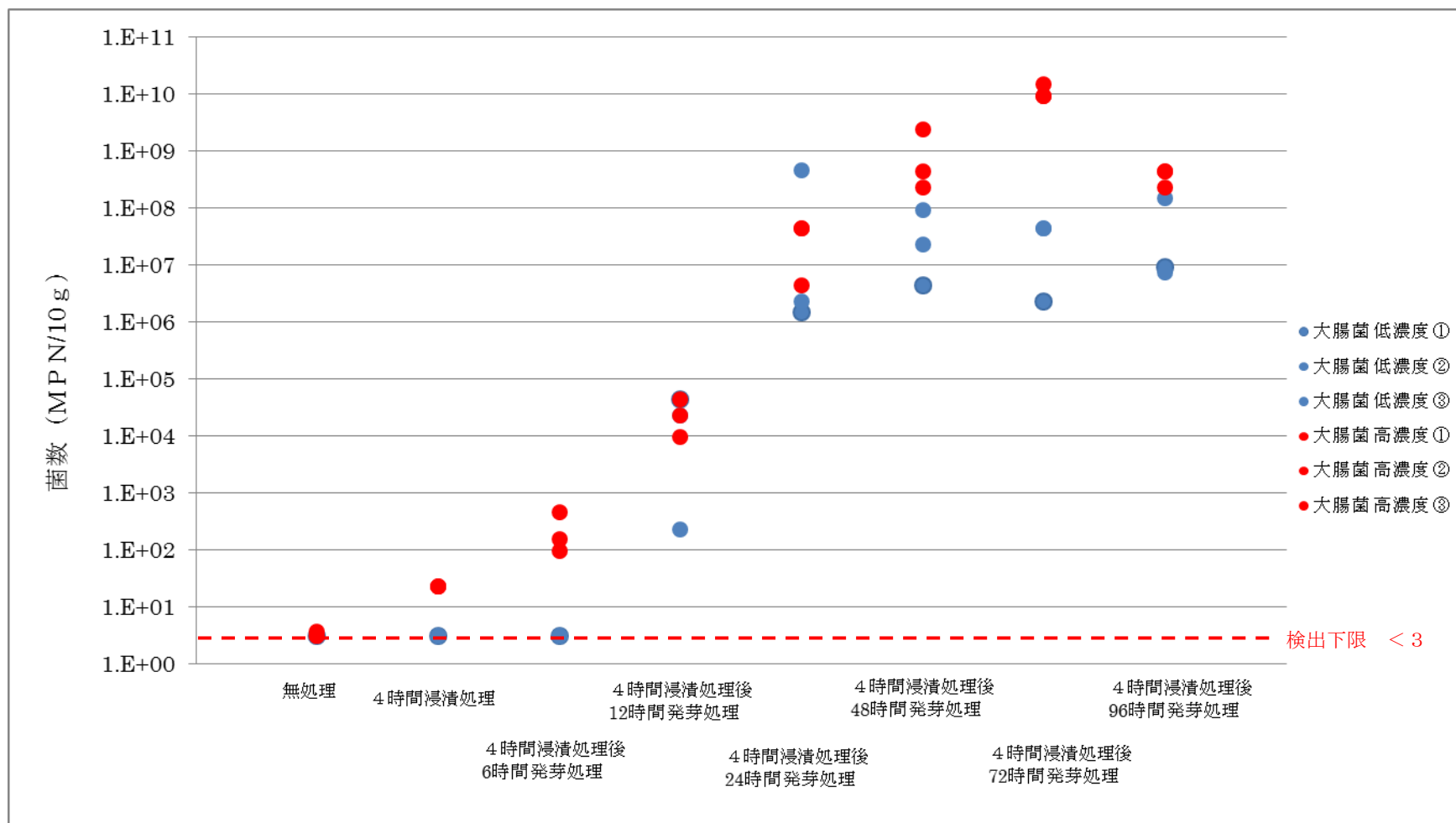


図 2 - 1 - 1 大腸菌の発芽時間の経過による増殖結果

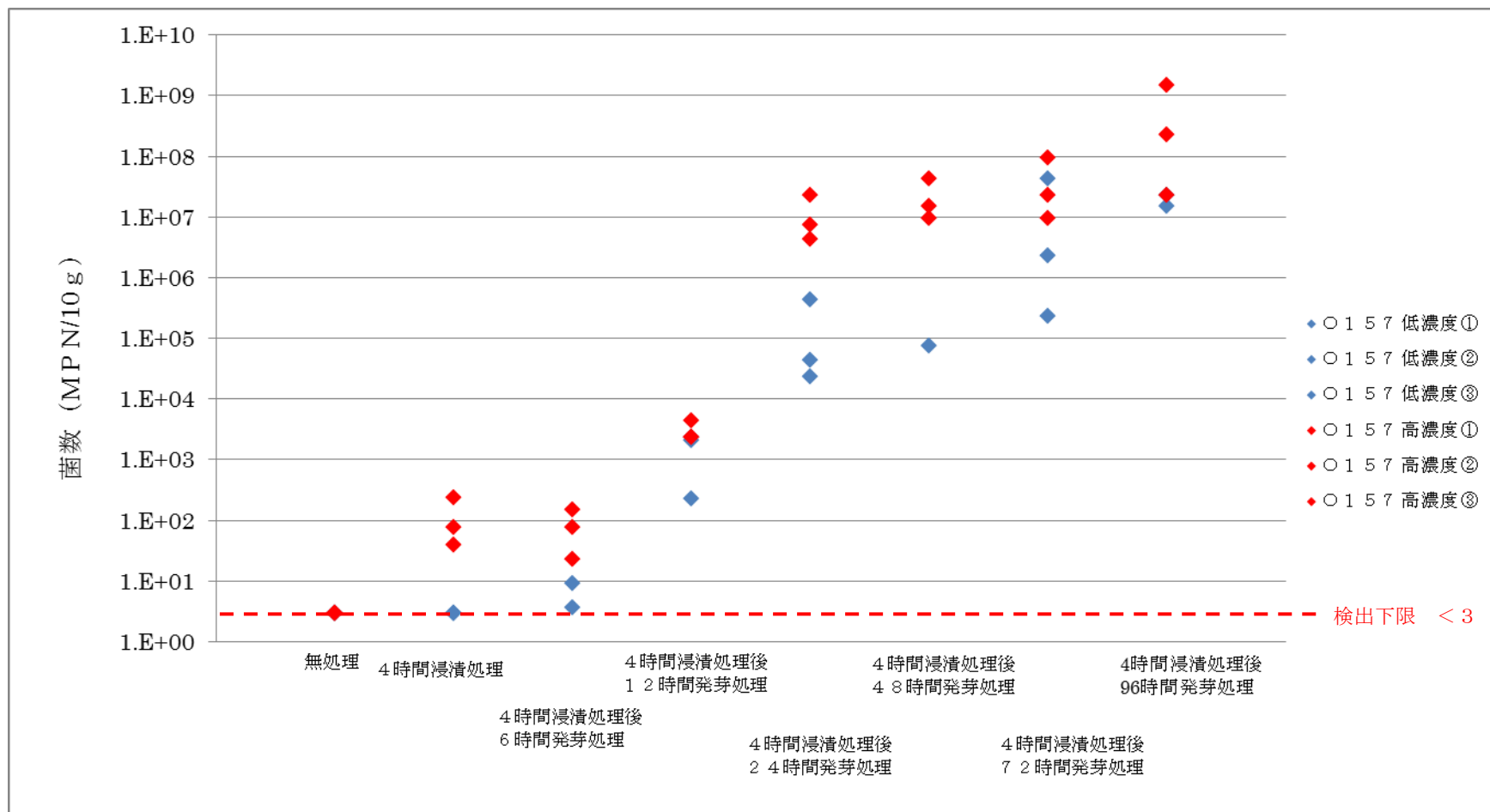


図 2 - 1 - 2 腸管出血性大腸菌 0157 の発芽時間の経過による増殖結果

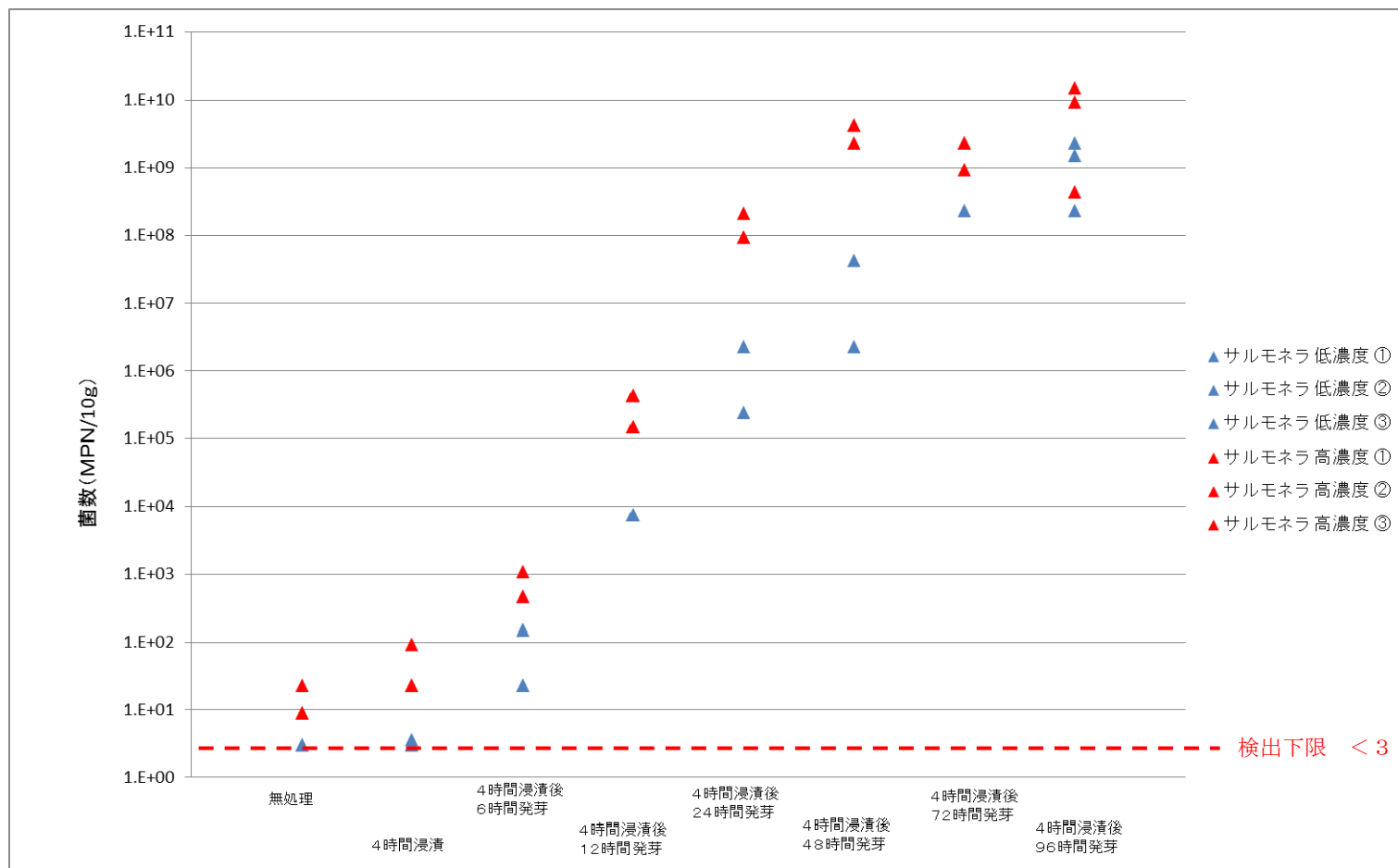


図 2 - 1 - 3 サルモネラの発芽時間の経過による増殖結果

【工程表の②】

1. 発芽処理後の増菌培養の省略及び遺伝子試験法による迅速・簡便化の検討（平成30年度）

【目的】

食品からの大腸菌および有害微生物の検査法では増菌培養が一般に行われるが、これは食品を汚染しているであろう対象微生物の菌数が少量であることを想定しているためである。一方、【工程表の①】の結果から、24時間または48時間の発芽処理により、菌数が $10^4 \sim 10^5/10\text{ g}$ 以上に増加することが示唆されたことから、増菌培養をせずに、直接、これらの微生物を試料から検出することができれば、検査の迅速化、手順の簡略化につながることを考えられた。

そこで、発芽処理後の種子を対象に、増菌培養の有無による検出結果の違いを明らかにし、増菌培養の必要性を検討した。また、培養法よりも検査の迅速・簡便化、検出感度の向上が期待される遺伝子検査法（PCR法）についても、同時に検討を行った。

【方法】

（1）汚染種子試料の作成

【工程表の①】と同様の方法で汚染種子試料を作成した。各微生物について、2種類の濃度、2種類の前処理（無処理および48時間発芽処理）の組合せをN=10ずつ作成した。

（2）培養法による分析

① 直接法

汚染種子試料の全量をストマッカー用袋に移し、滅菌生理食塩水を10mL加え、ストマッカーにて混合し、試料液とした。

この試料液を大腸菌はTBX培地、サルモネラはクロモアガーサルモネラに画線塗抹し、37℃24時間培養後、定型的集落の有無を確認した。腸管出血性大腸菌0157は試料液を1mL滅菌チューブに取り、免疫磁気ビーズ法にて濃縮後、クロモアガー0157に画線塗抹し、37℃24時間培養後、定型的集落の有無を確認した。

② 増菌培養法

直接法で作成した試料液に対して、9倍量の増菌培養液を加え、増菌培養後、画線塗抹培養を行った。各微生物について、条件は以下の通り。

i) 大腸菌

EC培地を加え、44.5℃24時間増菌培養後、TBX培地に画線塗抹し、37℃24時間培養後、定型的集落の有無を確認した。

ii) サルモネラ

BPWを加え、37℃24時間増菌培養後、RV培地に増菌培養液を0.1mL加え、42℃24時間選択増菌培養後、クロモアガーサルモネラに画線塗抹し、37℃24時間培養後、定型的集落の有無を確認した。

iii) 腸管出血性大腸菌 0157

mEC 培地を加え、42℃24 時間増菌培養後、増菌培養液を 1mL 滅菌チューブに取り、免疫磁気ビーズ法にて濃縮後、クロモアガー0157 に画線塗抹し、37℃24 時間培養後、定型的集落の有無を確認した。

(3) PCR 法による分析

(2) の 1 の試料液または 2 の増菌培養液について、それぞれ 0.1 mL を滅菌した 1.5 mL チューブに入れ、14,000 rpm、2 分間遠心した後、上清を除去し、PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems) を 100 μ L 加え、よく混ぜた後、100℃で 10 分間加熱しテンプレートを作成した。

① 大腸菌

大腸菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子をコードする領域 (*E. coli* 16S rRNA) を検査対象とした。

反応液は、1 検体につき、HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen 5U/ μ L) 0.125 μ L、10 $\times$ PCR Buffer (Qiagen) 2.5 μ L、5 $\times$ Q-solution 5.0 μ L、2.5mM dNTPs (TaKaRa) 2.0 μ L、Primer (100 pmol/ μ L) Forward および Reverse 各 0.25 μ L (計 0.5 μ L) MgCl₂ (25mM) 2.0 μ L、Template DNA 1 μ L、蒸留水 11.875 μ L の合計 25 μ L とした。

PCR 法の反応条件は 95℃15 分の前加熱後、94℃45 秒及び 72℃45 秒を 1 サイクルとし、計 45 サイクル繰り返し、最後に 72℃2 分間の伸長反応を行った。増幅された *E. coli* 16S rRNA 遺伝子のサイズは 544 bp、その確認は通常の 2.0%アガロース電気泳動と EtBr 染色によって行った。

② 腸管出血性大腸菌 0157

VT 遺伝子をコードする領域を検査対象とした。

反応液は 1 検体につき、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems) 15.0 μ L、滅菌精製水 6.28 μ L、VT1 および VT2 の Forward および Reverse プライマー各 0.36 μ L (50pmol/ μ L)、16SrRNA の Forward および Reverse プライマー各 0.24 μ L (20pmol/ μ L)、プローブ各 0.6 μ L (5pmol/ μ L) に検体 DNA 5 μ L を加え合計 25 μ L とした。

リアルタイム PCR 法の反応条件は 95℃で 5 分、次いで 95℃で 1 分、57℃1 分、72℃1 分を 30 サイクル行い、最後に 72℃10 分の伸長反応を行った。得られた増幅曲線から判定を行った。

③ サルモネラ

invA 遺伝子をコードした領域を検査対象とした。

反応液は 1 検体につき、10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L、2.5mM dNTPs 2.0 μ L、Forward および Reverse プライマー各 1.2 μ L (10pmol/ μ L)、EX Taq polymerase 0.125 μ L、滅菌精製水 15.475 μ L に検体 DNA 2.5 μ L を加え合計 25 μ L とした。増幅されたサルモネラ

invA 遺伝子のサイズは 404 bp、その確認は通常の 2.0%アガロース電気泳動と EtBr 染色によって行った。

本検討で供試したプライマー及びプローブの塩基配列を表 2-2-1 に示した。

【結果】

種子の汚染に用いた菌液の濃度は以下の通り。

(1) 大腸菌

低濃度： 2.9×10^1 CFU/10g、高濃度： 2.9×10^2 CFU/10g

(2) 腸管出血性大腸菌 0157

低濃度： 3.6×10^2 CFU/10g、高濃度： 3.6×10^3 CFU/10g

(3) サルモネラ

低濃度： 6.5×10^0 CFU/10g、高濃度： 6.5×10^1 CFU/10g

各微生物の検出結果を表 2-2-2 に示した。

大腸菌及びサルモネラは、直接法と増菌培養法で結果に違いは認められなかった。一方、腸管出血性大腸菌 0157 の低濃度では直接法の分離培養法（10 試料中 3 試料陽性）及び PCR 法（10 試料中 5 試料陽性）と増菌培養法（10 試料中 7 試料陽性）、高濃度では直接法の分離培養法（10 試料中 6 試料陽性）と直接法の PCR 法、増菌培養法（10 試料中 8 試料陽性）で結果に差が認められた。

【考察】

大腸菌及びサルモネラでは、発芽処理後の直接法と増菌培養法では結果に差が認められず、発芽処理のみで十分な検出感度の向上効果を得られることが示唆された。一方、腸管出血性大腸菌 0157 では発芽処理を行った試料においては直接法と増菌法の結果を比較すると増菌法の検出率が高く、発芽処理に加えて増菌培養を行う方がより確実であると考えられた。

発芽処理後に増菌培養を行った場合、培養法と PCR 法で検出率に差は認められず、培養法に加え、PCR 法の利用の可能性が示された。

表 2-2-1. 供試したプライマー及びプローブの塩基配列

対象微生物	プライマー	塩基配列
大腸菌* ¹	ECA75F	5' -GGA AGA AGC TTG CTT CTT TGC TGA C- 3'
	ECR619R	5' -AGC CCG GGG ATT TCA CAT CTG ACT TA- 3'
腸管出血性 大腸菌 0157* ²	VT1-F	5' -GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C-3'
	VT1-R	5' -CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT-3'
	VT2-F	5' -GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA-3'
	VT2-R	5' -GAA AGT ATT TGT TGC CGT ATT AAC GA-3'
	16SrRNA-F	5' -CCT CTT GCC ATC GGA TGT G-3'

	16SrRNA-R	5' -GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC-3'
	VT1-P	5' -FAM-CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A-BHQ1-3'
	VT2-P	5' -FAM-ATG TCT ATC AGG CGC GTT TTG ACC ATC TT-BHQ1-3'
	16SrRNA-P	5' -HEX-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC-BHQ1-3'
サルモネラ* ³	invA F	5' -GTA TTG TTG ATT AAT GAG ATC CG-3'
	invA R	5' -ATA TTA CGC ACG GAA ACA CGT T-3'

*1: Sabat, G., P. Rose, W. J. Hickey j.M. Harkin. 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16SrRNA gene in soi. Appl. Environ. Microbiol. 66, p844-849.

*2: 食安監発 1120 第 1 号「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法について」(平成 26 年 11 月 20 日)

*3: Ranjbar, R., S. M. Mortazavi, A. Mehrabi Tavana, M. Sarshar, A. Najafi. R. Soruri Zanjani, Simultaneous molecular detection of Salmonella enterica serovars Typhi, Enteritidis, Infantis, and Typhimurium. Iran J. Public Health, 46, p103-111.

表 2-2-2 発芽処理後の直接法と増菌培養法の比較試験結果 (陽性試料数)

対象菌	添加濃度	発芽処理	直接法		増菌培養法	
			分離培養法	PCR 法	分離培養法	PCR 法
大腸菌	低濃度	無処理	0/10	0/10	0/10	0/10
		発芽後 48 時間	4/10	4/10	4/10	4/10
	高濃度	無処理	0/10	0/10	10/10	10/10
		発芽後 48 時間	10/10	10/10	10/10	10/10
腸管出血性大腸菌 0157	低濃度	無処理	0/10	0/10	0/10	0/10
		発芽後 48 時間	3/10	5/10	7/10	7/10
	高濃度	無処理	0/10	0/10	6/10	6/10
		発芽後 48 時間	6/10	8/10	8/10	8/10
サルモネラ	低濃度	無処理	0/10	0/10	0/10	0/10
		発芽後 48 時間	4/10	4/10	4/10	4/10
	高濃度	無処理	0/10	0/10	10/10	10/10
		発芽後 48 時間	10/10	10/10	10/10	10/10

(ウ) 成果目標に対する達成状況

スプラウト種子の前処理方法として発芽処理の有効性を明らかにし、各種微生物について最適な前処理条件を具体的に示した。また、増菌培養工程の省略による試験法の短縮に

については、検出感度の面で難しいという結果であったが、発芽処理後に通常の培養法に加え、遺伝子試験法を利用できる可能性を示した。

ウ 中課題3（安全性評価のためのサンプリング法の開発）の研究成果

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
①基礎情報として、実用化されているサンプリング手法及び原料種子の流通・保管実態等について調査する（小課題1関係）。（平成30年度）
↓
②原料種子の一つのロットから抜き取る数量および部位などを検討し、サンプリング方法を作成する（小課題1関係）。（平成30年度）
↓
③原料種子のサンプリング、前処理および開発した検査法を用いて、スプラウト生産現場で実施可能な方法であるか検証試験を行う（小課題2関係）。（平成30年度）
成果目標：適切なサンプリング方法を示し、生産現場での原料種子の安全性確保を行う手段の確立をする。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

サンプリングプランの考え方及び原料種子の流通・保管等に関する情報の整理（平成30年）

【目的】

サンプリングプランの検討に当たり、基礎となる情報の収集、整理を行った。

【方法と結果】

(1) 国内外のサンプリング手法に関する文献調査

国内外で食品等の検査に使用されているサンプリング手法やサンプリングプランの構築に関する情報を文献から収集した（表3-1-1）。

表3-1-1：参考文献一覧

1	Journal of food protection, Vol. 64, No. 8, 2001, p1240-1243
2	ICMSF: Microorganisms in Food, 2. Sampling for Microbiological Analysis, Principles and Specific Applications, 2nd Edition, 1986
3	春日文字: ICMSFによる微生物規格基準設定の考え方. 日食微誌 26 (3), 159 - 162 (2009)
4	食品衛生検査指針 I 検査法別, 1973 日本食品衛生協会
5	食品衛生検査指針 (微生物編), 2004 日本食品衛生協会
6	厚生省環境衛生局長通知 (昭和 47 年 11 月 6 日, 環食第 516 号, 最終改正平成 11 年 1 月 14 日付衛食第 43 号) 別記 (2)
7	平成 17 年度 厚生労働省科学研究費補助金 (食の安心・安全確保研究事業)

	「国際規格における分析サンプリング法の制定に関する研究」
8	スプラウト生産における衛生管理指針（平成 27 年 9 月 消費・安全局 農林水産省）
9	サンプリングに関するガイドライン（セクション 4-6）CAC/GL 50-2004
10	植物検疫措置に関する国際基準 ISPM No. 31 積荷のサンプリングに関する方法論（2009）
11	残留農薬の最大残留基準値（MRL）への適合を判定するための推奨サンプリング法 CAC/GL 33-1999
12	春日文字子、小久保彌太郎監訳．食品安全管理における微生物学的検査（基準の設定と検査の考え方），2013 中央法規出版
13	春日文字子、小久保彌太郎監訳．食品微生物の検査データと活用法（工程管理と製品評価のために） 中央法規出版
14	松田りえ子．サンプリングの重要性． http://www.jsac.or.jp/abstract/nousui2007/matsuda2007.pdf
15	安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法． https://www.mhlw.go.jp/content/000330908.pdf
16	FY 2014-2016 Microbiological Sampling Assignment Summary Report : Sprouts, (2017)
17	J.Bylund: A sample preparation method for microbiological analysis of seed Swedish University of Agricultural Sciences, 2013
18	藤川浩：食品検査におけるサンプリングプラン-1. 2018, vol. 59 No2 食品衛生学雑誌
19	藤川浩：食品検査におけるサンプリングプラン-2. 2018, vol. 59 No3 食品衛生学雑誌
20	藤川浩：食品検査におけるサンプリングプラン-3. 2018, vol. 59 No6 食品衛生学雑誌
21	生食用食肉の規格基準の考え方 29 (2), 98-100, 2012 日本食品微生物学会雑誌
22	計数値検査に対する抜取検査手順 JIS Z 9015- 0 : 1999, 日本規格協会
23	計数値検査に対する抜取検査手順 JIS Z 9015 - 1 : 1999, 日本規格協会
24	計数値検査に対する抜取検査手順 JIS Z 9015 - 2 : 1999, 日本規格協会
25	Statistical aspects of microbiological criteria related to foods : 2016
26	五十君静信：微生物試験の標準化・日本の状況と今後. 日食微誌, 26, 18-22 (2008).
27	Microbial Sampling plan Food Control 20, 967-979 (2009)
28	Microbial Risk Codex CAC/GL63-2007

29	Statistics Zwietering annurev-food-022814-015546
30	豊福肇：グローバル化と食品微生物規格の考え方. 日食微誌, 32, 124-130 (2015).
31	豊福肇：微生物規格基準設定の国際動向
32	小関成樹：予測微生物学の最新の展開. 日食微誌, 26, 1-6 (2009).
33	春日文字子、小久保彌太郎監訳. 食品安全管理における微生物学的検査（基準の設定と検査の考え方）, 第二版 第 17 章 中央法規出版
34	藤川浩：MPN 法を用いた定性的微生物学的試験データからの食品中微生物濃度の推定. 食品衛生学雑誌, 58, 4, 173-179 (2017)
35	Determining the concentration of microorganisms controlled by attributes sampling plans Food Control 12, 137-147 (2001)
36	山本勝彦ら：市販粒状落花生及びナッツ製品のアフラトキシン汚染調査のための小規模サンプリング計画について 1983, vol. 24 No4 食品衛生学雑誌
37	山本勝彦：OC-曲線による粒状農産物アフラトキシン検査のためのサンプリング法評価から見た理想と現実 2009, vol. 59 (2) Mycotoxins
38	山本勝彦：アフラトキシン検査の際のサンプリングの重要性とその基盤となる統計学的定量評価について 2012, 第 5 号 名古屋学芸大学健康・栄養研究所年報
39	S. Dahms: Approaches for deriving microbiological criteria from performance objectives and performance criteria 2005
40	ISO 16140: Protocol for the validation of alternative methods, 2003
41	春日文字子：国際的な微生物規格基準設定の考え方. 日食微誌, 25, 13-17 (2008)

(2) スプラウト種子の流通等に関する聴取調査

スプラウト種子を輸入している種苗会社及び日本スプラウト協会会員の 6 事業者から聴取調査を行い、以下の内容を得た。

- ① 収穫された種子はおよそ 25kg の単位で袋に小分けされる。
- ② 原料種子の生産地における保管及び日本への輸送中は室温（常温）条件。
- ③ 国内の倉庫での保管中は、多くは約 15℃条件。生産農場への配送時は常温条件。
- ④ スプラウト生産施設が種子を購入する際は、ロット差を少なくするため可能な限り大きなロットで購入するケースが多い。施設の規模により発注した種子の全量を一括して受け入れることが困難な場合は、種苗会社などに一時的に保管を依頼することもある。
- ⑤ 輸入される種子は作付け地ごとにロット管理がされている。1 ロット当たりの種子の量は 25kg の袋で最大 2,000 袋（約 50 t g）。

【工程表の②】

サンプリングプランの検討（平成30年）

【目的】

【工程表の①】で整理した情報をもとに、サンプリングプランの検討を行った。

【方法と結果】

国際的に認知されているサンプリング法との整合性や実行可能性の観点から、ICMSF（国際食品微生物規格委員会）の示すサンプリングプランの考え方にに基づき、排除すべき不適合ロットを汚染菌数と標準偏差から設定し、当該ロットを判別するために必要な検体数を導出した。

（1）条件設定

① 実際の食中毒事例において、原因となった種子ロット中のうち、有害微生物による推定される発症菌数（平均）が低濃度であるものを参考として、食中毒の原因とされる有害微生物の最低汚染菌数（平均）を 7.0×10^{-4} CFU/g ($-3.15 \log_{10}$ CFU/g) とした（文献1）。

② 原料種子の収穫時に土壌が混入する実態から、主な汚染経路として、未熟な堆肥やほ場に侵入した動物を由来とする土壌を介した糞便系汚染を想定した上で、糞便における情報※を参考に、汚染種子における有害微生物と大腸菌の存在比率を 1:100 と仮定し、不適合とすべき大腸菌の最低菌数（平均）を 7.0×10^{-2} CFU/g ($=-1.15 \log_{10}$ CFU/g) とした。

※ 米国 EPA の報告（Technical Support Document for Reduction of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, 1992）では、大腸菌を含む通性嫌気性菌の糞便中の菌数は 10^8 CFU/g 程度、サルモネラ等の有害微生物は 10^3 CFU/g を超えないとされている。

③ 種子ロット内の微生物の分布は、菌種によらず中心極限定理により対数正規分布するものとし、その標準偏差は、ICMSF が示す液体以外の不均一な食品を対象とした場合の最大の値である、 $1.2 \log_{10}$ CFU/g とした（文献2）。

（2）n 数（開袋数）の算出

条件設定で定めた不適合とすべき種子ロットを、種子 25g 中の大腸菌の検出／不検出により、危険率 5% (LQ5) で判別するために必要な n 数（原料種子袋の抜取開梱数）を、OC 曲線を作成して求めた結果、 $n=4$ となり、開梱数は 4（袋）以上と算出された（図 3-1）。

【考察】

国内のスプラウト生産者に聞き取りにて確認した結果、原料種子を入手する際は 10 袋～50 袋を扱うことから、4 袋以上の開梱は実行可能であると考えられた。

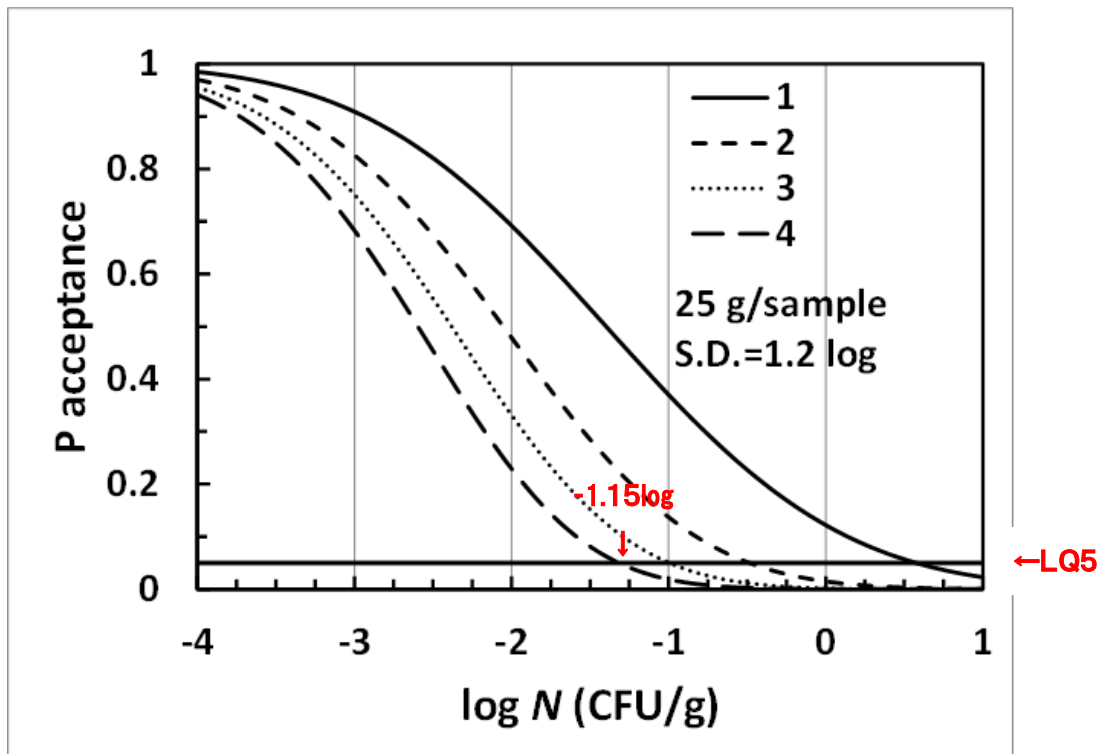


図 3-1 OC 曲線

下限値 $-1.15 \text{ Log}_{10}\text{CFU/g}$ 、 $LQ5$ ($P=0.05$) にした場合、最適な曲線は $n=4$ の曲線となる。

【工程表の③】

サンプリングプランの検証

今回、導出したサンプリングプランは、生産現場において実行可能な方法と考えられたため、実行性の検証は不要と判断し、実施しなかった。

(ウ) 成果目標に対する達成状況

有害微生物による食中毒が発症する恐れのある原料種子ロットを排除するためのサンプリング法について、生産現場において実行可能と考えられる方法を提案した。

5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中）の特許等を記述）

別紙の（3）～（8）のとおり

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

中課題 3 では、現時点で活用できる限定的な知見を基に、国際的なサンプリングプラン

に関する考え方に沿って、スプラウト原料種子のサンプリングプランの提案を行った。今後、より実態に合ったサンプリングプランの検討をするためには、種子の汚染率や汚染ロット内の汚染の偏りなどより詳細な汚染実態に関するデータの蓄積が必要と考えられる。

【付録】

中課題 2 【工程表の②】 関連

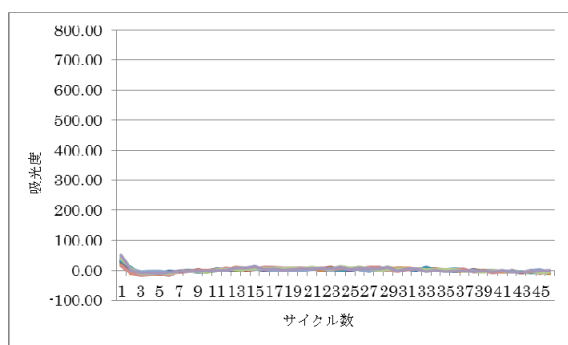


図 2-2-1. 0157 低濃度無処理直接法
リアルタイム PCR 結果 (N=10)

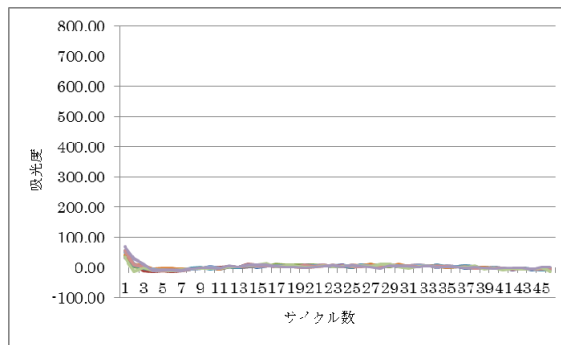


図 2-2-2. 0157 低濃度無処理増菌法
リアルタイム PCR 結果 (N=10)

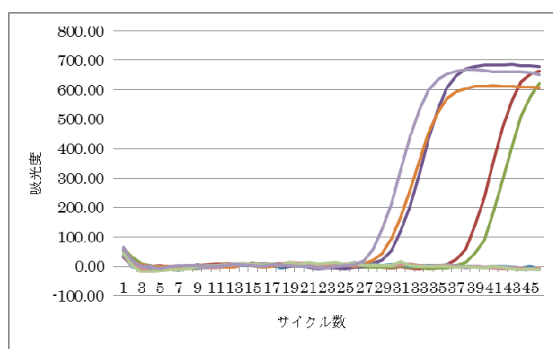


図 2-2-3. 0157 低濃度発芽処理直接法
リアルタイム PCR 結果 (N=10)

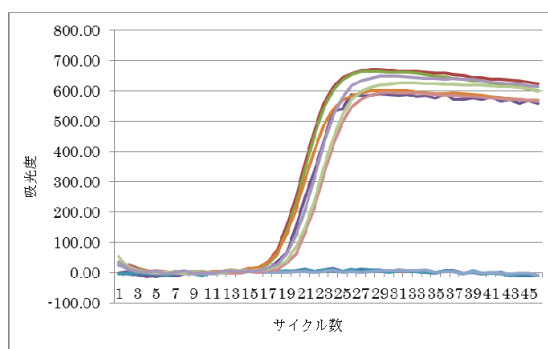


図 2-2-4. 0157 低濃度発芽処理増菌法
リアルタイム PCR 結果 (N=10)

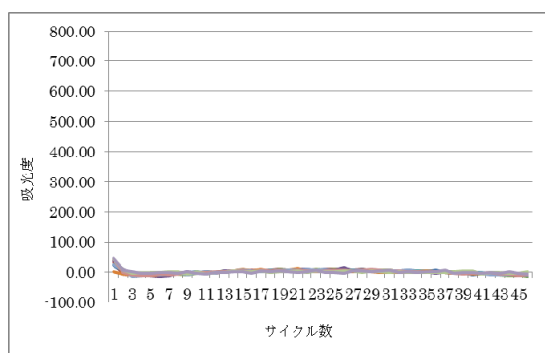


図 2-2-5. 0157 高濃度無処理直接法
リアルタイム PCR 結果 (N=10)

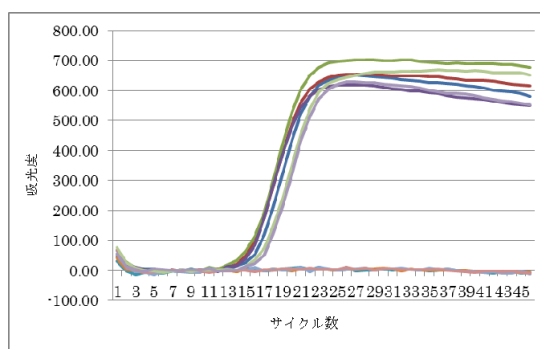


図 2-2-6. 0157 高濃度無処理増菌法
リアルタイム PCR 結果 (N=10)

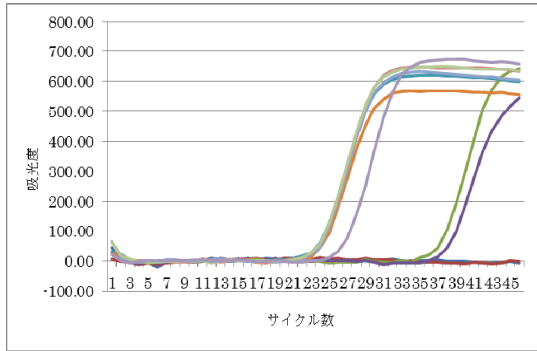


図 2－2－7．0157 高濃度発芽処理直接法
リアルタイム PCR 結果 (N=10)

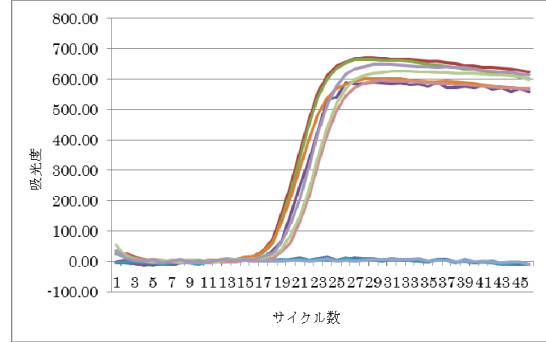


図 2－2－8．0157 高濃度発芽処理増菌法
リアルタイム PCR 結果 (N=10)

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

試験研究課題名	スプラウト原料種子の検査手法の確立
---------	-------------------

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用し うる成 果の有 無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
2802	7	有			1								無

(1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	平成28年度第1回推進会議	平成28年7月21日	東京顕微鏡院	11	有	研究計画について
①	平成28年度第2回推進会議	平成29年1月24日	東京顕微鏡院	13	有	研究成果と今後の計画について
②	生産現場見学	平成29年2月24日	三和農林(株)蓮田農場	3	無	生産現場見学(衛生管理、検査室の業務、発芽試験)
①	平成29年度第1回推進会議	平成29年6月2日	農林水産省	5	有	平成29年度の研究計画について
②	種子保存倉庫の見学	平成29年7月19日	(株)上組 神戸突堤倉庫	9	無	カイワレ大根種子の輸入直後の保管状況の見学
①	平成29年度第2回推進会議	平成30年2月20日	東京顕微鏡院	12	有	研究成果の報告と今後の計画について

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
②	種子の微生物検査における前処理方法として発芽処理の有効性	ガイドライン、調査事業	
②	生産農場における種子のサンプリングプラン	ガイドライン、調査事業	

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

(4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
カイワレ大根およびブロッコリー種子の細菌汚染実態の解析、○和田真太郎、森 哲也、鄒 碧珍、岸野かなえ、吉川百合、難波豊彦、伊藤 武、第38回日本食品微生物学会学術総会、平成29年10月	一財)東京顕微鏡院

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7) 国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考

(9)購入物品

品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		