

- ・希釈ビン：10 倍希釈用；中試験管で代替できる
- ・ふ卵器：35 ± 1 °C
- ・恒温水槽：45 ～ 50 °C
- ・ペトリ皿：深型滅菌プラスチック製
- ・培地ビン：300、500、1,000 ml などの硬質ガラス製
- ・コロニーカウンター

(2) 希釈水

通常、次のいずれかを使用する。

- ・ペプトン加生理食塩水

| | |
|--------------|----------|
| 組成：ペプトン | 1 g |
| 塩化ナトリウム | 8.5 g |
| 精製水 | 1,000 ml |
| pH 7.0 ± 0.1 | |

121 °C で 15 分間滅菌後に使用する

- ・リン酸緩衝生理食塩水

組成及び調製法：リン酸二水素カリウム（無水）34 g を精製水 500 ml に溶解後に 1N 水酸化ナトリウム溶液約 175 ml を加え、さらに精製水を加えて全量を 1,000ml として pH7.2 に修正したものを原液とする。この原液 1.25 ml を生理食塩水（塩化ナトリウム 8.5g を精製水 1,000ml に溶解したもの）1,000ml に加えて 121 °C で 15 分間滅菌後に使用する。

- ・生理食塩水

(3) 培地

標準寒天培地：市販の粉末培地を使用し、処方にしたがって調製する。

2) 検体の採取と試料の調製

あらゆる食品ならびにそれらの食品が取り扱われる環境材料（容器、まな板など）が検査対象になる。検体の採取と試料の調製法は、一般の細菌検査法の場合に共通している。すなわち、検査室に搬入された検体はできるだけ速やかに処理し、採取時に二次汚染の起こらないように無菌的な取り扱いをする。

次に、搬入された検査対象物からの供試検体採取法について述べる。

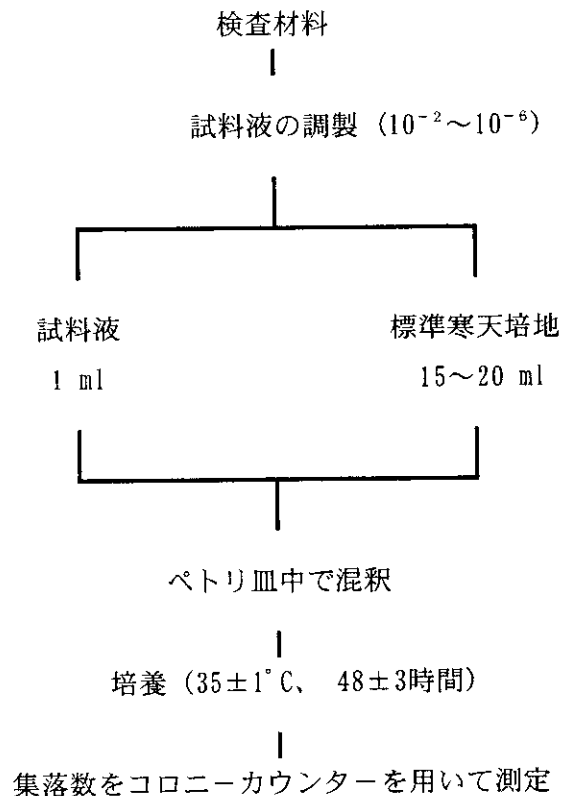
- ・液状のもの：通常はそのまま試料原液になるので、試料を採取前に振盪などにより、均一にしなければならない。容器のまま搬入されたものについては無菌的に開封し、滅菌ピペットにより一定量を採取する。
- ・粘度の高い半流動状のもの：(1)と同じく、容器を無菌的に開封し、次いで滅菌スプーンなどでよく攪拌してから、その一定量を採取する。

- ・粉末状のもの：滅菌スプーンなどで内容物をよくかき混ぜ、均一にしてから採取する。
- ・固形状のもの：滅菌したピンセット、ハサミなどでできるだけ細かく切断した後、一定量を採取する。この際、特に表面部や中心部を区別して検査する必要がある場合は、他の部分からの污染がないように注意する。また、弁当類の検体採取に当たっては、取り扱い上あるいは原料からの細菌污染が疑われるもの、食中毒などのかかり合いが考慮される食品類、さらに腐敗・変敗しやすい食品類を中心に試料を採取する。なお、弁当の個々の材料についての調査が必要な場合は、製造所で個々の材料を無菌的に採取して検査に供する。

これらの採取検体量は原則として 25g (ml) とするが、細菌の分布が均一と思われるものでは 10g(ml) でもよい。秤量した試料は滅菌したブレンダーカップあるいはストマッカーのビニール袋に移して、9 倍量の希釈水を加えて均質化したものを試料原液とする。試料原液は必要に応じて、希釈水で 10 倍段階希釈して希釈試料液を調製する。

- ・拭き取り材料：拭き取りガーゼ・タンポンなどを一定量の希釈水で洗い出したものを試料原液とする。通常、使用するガーゼ・タンポンは 5cm² 大の薬局方ガーゼを六折りにして中央部を糸で結び、希釈水 1ml を湿らせて滅菌したものを使用する。

3) 検査手順



(1) 培養

通常、試料原液を 10⁶ 倍まで 10 倍段階希釈して試料液を調製する。この希釈列から、

一平板に 30 ～ 300 個の集落が得られる希釈液を選択するが、この選択に当たっては過去の検査データを参考にして $10^2 \sim 10^4$ 、 $10^3 \sim 10^5$ というように希釈段階を省略できる。

各希釈段階毎に 2 枚のペトリ皿を用い、試料希釈液を 1ml ずつ分注する。次いで、予め高圧滅菌後 45 ～ 50 °C に保温しておいた標準寒天培地 15 ～ 20ml を無菌的に各ペトリ皿に注ぎ、直ちに試料と培地とがよく混ざるように静かに混合する。この際、用いた希釈水、培地、ペトリ皿、ピペットなどが無菌であることを確かめるために、試料の代わりに使用した希釈水 1ml をペトリ皿に取り、寒天培地を加えて混合したものを対照として置く。試料液をペトリ皿に分注してから培地と混合するまでの操作は 20 分以内に終了し、ペトリ皿に希釈試料を接種したまま長時間放置してはならない。

寒天培地が完全に凝固したら、ペトリ皿を倒置して、 35 ± 1 °C で 48 ± 3 時間培養する。

(2) 集落数の算定

次の要領にしたがって、発生した集落数をコロニーカウンターを用いて測定する。

- a. 一平板に 30 ～ 300 個の集落数がある場合は、その平板から算出する。
 - ・ 1 希釈にのみ 30 ～ 300 個の集落数が得られた場合：得られた集落数の算術平均を求める。
 - ・ 連続した 2 段階の希釈に 30 ～ 300 個の集落数が得られた場合：各希釈ごとに算術平均を算定し、両者の比を求める。
 - ・ 両者の比が 2 倍未満のときは連続する 2 段階の希釈平板の集落数から次の計算式により求める。

$$N = \frac{OC}{(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

OC：各平板の集落数の合計

n_1 ：希釈が低い方の算定対象ペトリ皿数

n_2 ：希釈が高い方の算定対象ペトリ皿数

d：希釈が低い方の希釈倍数

例えば、 10^2 希釈で集落数が 188 と 235、 10^3 希釈で 31 と 40 であったとすれば、

$$N = \frac{188 + 235 + 31 + 40}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{494}{0.022} = 22,455$$

- ・ 両者の比が 2 倍を越えたときは希釈段階の低い方の集落数の算術平均を求める。

- b. 全平板が 300 個を越えた集落数であった場合。

最も希釈倍率の高いものについて、 1cm^2 の区画のある計算板を用いた密集集落平板測定法にしたがって計測する。

- ・ 1cm^2 の区画に 10 個以下の集落数の場合：中心を通過する縦に 6 箇所、これに直角に 6 箇所の計 12 箇所の区画中の集落数を数え、 1cm^2 区画の平均集落数を求め、これにペトリ皿の面積を乗じて一平板当たりの集落数を算出する。

- ・ 1cm^2 の区画に 10 個以上の集落数の場合：前記と同様にして 4 ～ 5 箇所区画の集落数から 1cm^2 区画の平均集落数を求め、ペトリ皿の面積を乗じて一平板当たりの集落数を算出する。
- c. 全平板が 30 個未満の場合：最も低い希釈倍数に 30 を乗じて、例えば固形試料の場合は試料原液の 10 倍希釈では 300 未満とする。
- d. 拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を計測する。
 - ・ 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの。
 - ・ 拡散集落の部分が平板の $1/2$ 以下の場合
- e. 次のような場合は実験室内事故（Laboratory Accident、L.A.）とする。
 - ・ 集落の発生が認められない場合。但し滅菌した製品やそれに相当する加工あるいは加熱処理がなされた食品はこの限りでない。
 - ・ 拡散集落の部分が平板の $1/2$ 以上を超え、集落数が測定できない場合。なお、アルコール綿などにより寒天平板上をていねいに拭って拡散集落を除去し、発生集落数を計測することにより細菌数を推定できる。
 - ・ 対照とした平板に集落が認められ、汚染されたことが明らかな場合。
 - ・ その他不相当と思われる場合。

④結果の表示

算定対象とした平板の集落数に希釈倍数を乗じ、さらに得られた数字の上位 3 桁目を四捨五入して、上位 2 桁を有効数字とする。細菌数は食品 1g (1ml) 当たりとして求め、例えば、 $22 \times 10^2 / \text{g(ml)}$ と記載する。なお、最低希釈平板の集落発生数が 30 未満の場合も、必要があれば測定値をそのまま記載しておく。

2. 国際的検査法

国際的に広く採用されている検査法としては米国の FDA 法、AOAC 法、ISO 法があり、さらに乳・乳製品については IDF 法がある。以下にそれらの概要を示す。

1) FDA 法 (2001)

従来法としての寒天平板法及びスパイラルプレート法が規定されており、それぞれ後述の AOAC 法 966.23 及び 977.27 と適合している。

(1) 寒天平板法

基本的手順は、前項で述べた一般的検査法と同じである。

滅菌ペトリ皿中で、試料液（試料の 10 倍段階希釈試料液）1ml を予め滅菌後 $45 \pm 1^\circ\text{C}$ に溶解した培地（プレートカウント寒天）12 ～ 15ml と混合し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ （乳の場合は $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ）で 48 ± 2 時間の好気培養により、発生したコロニー数から食品 1ml または 1g 中の微生物数（細菌、酵母、カビ）を算定する。なお、各段階希釈試料液について、各 2 枚

のペトリ皿を使用し、通常 25 ～ 250 のコロニー数を有する平板を計数の対象とする。

使用培地の組成（プレートカウント寒天）

| | |
|-------------|----------|
| 酵母エキス | 2.5g |
| トリプトン | 5.0g |
| ブドウ糖 | 1.0g |
| 寒天 | 12 ～ 18g |
| 蒸留水 | 1,000ml |
| pH7.0 ± 0.1 | |

(2) スパイラルプレート法

この方法は従来の寒天平板法を機械化及び自動化したもので、寒天一枚で理論的には 500 ～ 500,000 個の菌数が測定でき、あらゆる食品について本方法で得られる菌数は従来の寒天平板法と極めて相関性の高いことが証明されている。

試料液は、スパイラルプレーターにより寒天培地表面の中心部には試料が大量に塗抹され、周辺部にいくに従い等比級数的に減少しながら自動的に塗抹される。一平板の各区画ごとの塗抹量はそれぞれ予め定められている。したがって、中心部には多数の密な集落が形成されるが、周辺部ではそれぞれ分離独立した集落が形成される。

この方法を実施するための主な装置として、スパイラルプレーター及びスパイラルコロニーカウンター（コロニーピュアあるいはレザーコロニー・カウンター）が必要である。

検査法の詳細は、食品衛生検査指針 微生物編 p47 ～ 49（厚生省生活衛生局監修：日本食品衛生協会 1990）、食品微生物検査の簡易・迅速・自動化最新技術 p34～48（和田正道：春田三佐雄・森地敏樹編 工業技術会 1995）を参照のこと。

2) AOAC 法

(1) 966.23：微生物試験法

食品の微生物検査法（好気性平板菌数、大腸菌群数、大腸菌、黄色ブドウ球菌）について、培地及び試薬、試料の調製及び特に好気性平板菌数の測定条件を規定。

本法の基本的手順は、前項で述べた一般的検査法と同じである。但し、発生コロニー数が 35 ～ 300 の平板を計数の対象。

(2) 乾式フィルム法（ペトリフィルム法）：後述

986.33：乳中の細菌数及び大腸菌群

989.10：乳製品中の細菌数及び大腸菌群

990.12：食品中の好気性平板菌数

(3) 977.27：食品及び化粧品中の細菌数：スパイラルプレート法：前述

(4) 986.32：食品中の好気性平板菌数：hydrophobic grid membrans filter (HGMF) 法
メンブランフィルター（孔径 0.45µm）に疎水性のパラフィンワックスを格子状に加工

した特殊な疎水性格子膜メンブランフィルター（HGMF）とプレフィルター（孔径 5 μ m のステンレス製ワイヤクロス）を組み合わせることにより、食品乳剤を濾過して捕集されて菌数を測定することができる。濾過が困難な試料についてはトリプシン、アミラーゼなどの酵素液で処理してから濾過する。先ずプレフィルターにより試料液 10ml を濾過し、次いで HGMF で濾過する。HGMF を寒天培地表面にかぶせ、32 ~ 35 °C で 48 ~ 72 時間培養して発生したコロニーを計測する。HGMF 表面は縦横各 40 列の 1,600 の区画（1 区画は 1mm 角程度）に分割されており、コロニーはこの格子を乗り越えて拡大することはできないため、1 枚のフィルターで 1,600 個の菌数まで測定できる。

検査法の詳細は、食品衛生検査指針 微生物編 p45 ~ 47（厚生省生活衛生局監修：日本食品衛生協会 1990）、食品微生物検査の簡易・迅速・自動化最新技術 p125 ~ 135（鈴木俊一：春田三佐夫・森地敏樹編 工業技術会 1995）を参照のこと。

(5)988.18：好気性平板菌数：pectin gel 法

プレートカウント寒天培地の寒天の代わりにペクチンを用いた菌数平板測定法である。酪農製品では、32 ± 1 °C で 48 ± 3 時間、一般食品では 35 ± 1 °C で 48 ± 2 時間培養後に発生コロニー数から菌数を算定する。

3) ISO 法

微生物の菌数測定のための一般的指針：30 °C による集落計測法(ISO 4833：1991)

基本的手順は一般的検査法と同じである。すなわち、滅菌ペトリ皿中で、試料液（試料の 10 倍段階希釈試料液）1ml を予め滅菌後 45 ± 0.5 °C に溶解した培地（プレートカウント寒天）12 ~ 15ml と混合し、30 ± 1 °C で 72 ± 3 時間の好気培養により、発生したコロニー数から食品 1ml または 1g 中の微生物数（細菌、酵母、カビ）を算定する。なお、各段階希釈試料液について、各 2 枚のペトリ皿を使用し、15 ~ 300 のコロニー数を有する平板を計数の対象とする。また、拡散集落の発生が予想される場合は、寒天培地表面に寒天のみの培地 4ml を重層する。

4) IDF 法

(1)プレート・ループ法を使用した生乳中の 30 °C 培養による菌数測定法

（暫定 IDF Standard 131：1985）

一定の大きさの針金の輪（ループ：直径 0.4mm のプラチナ、プラチナ・ロジウムまたはプラチナ・イリジウムの針金で作られた丸い輪で、原乳 0.001ml が採取できるようになっている）で試料を採取して、ペトリ皿中で滅菌希釈液 1ml で洗い流した後、予め滅菌後 45 ± 1 °C に溶解した培地 10 ~ 12ml と混合する。30 ± 1 °C で 72 ± 2 時間好氣的に培養し、発生したコロニーを数えて原乳 1ml あたりの微生物数を算定する。一平板あたりのコロニー数を 1,000 倍した数が原乳 1ml 当たりの菌数である。

| | |
|-------------|---------|
| 使用培地：酵母エキス | 2.5g |
| トリプトン | 5.0g |
| ブドウ糖 | 1.0g |
| 脱脂粉乳 | 1.0g |
| 寒天 | 12～18g |
| 蒸留水 | 1,000ml |
| pH6.9 ± 0.1 | |

(2)乳・乳製品中の 30℃ 培養による菌数測定法

(IDF Standard 100B : 1991)

基本的手順は一般的検査法と同じである。すなわち、滅菌ペトリ皿中で、乳・乳製品試料液（試料の 10 倍段階希釈試料液）1ml を予め滅菌後 45±1℃ に溶解した培地 12～15ml と混合し、30 ± 1℃ で 72±2 時間の好気培養により、発生したコロニー数から乳・乳製品 1ml または 1g 中の微生物数を算定する。なお、各段階希釈試料液について、各 2 枚のペトリ皿を使用し、10～300 個のコロニー数を有する平板を計数の対象とする。

| | |
|-------------|---------|
| 使用培地：酵母エキス | 2.5g |
| トリプトン | 5.0g |
| ブドウ糖 | 1.0g |
| 脱脂粉乳 | 1.0g |
| 寒天 | 12～15g |
| 蒸留水 | 1,000ml |
| pH6.9 ± 0.1 | |

3. 簡易・迅速法市販キット

生菌数の測定を目的として、わが国で市販されている主な簡易・迅速キット類を一覧にして示したが、これらはその手法により、スタンプ法、乾式培地法、試験紙法、ATP 法に大別される。

| 製品名 | 製造メーカー | 販売元 | 測定原理 | 測定時間 |
|-------------------|--------|-------|------------------------------|--------|
| [スタンプ法] | | | | |
| フードスタンプ「ニッスイ」 | 日水製薬 | 日水製薬 | アガー・スタンプ法 標準寒天 | 1～2日 |
| クリーンスタンプ「ニッスイ」 | 日水製薬 | 日水製薬 | アガー・スタンプ法 SCD 寒天、SCDLP 寒天 | 1～2日 |
| クリーンスタンプ 25「ニッスイ」 | 日水製薬 | 日水製薬 | アガー・スタンプ法 SCD 寒天、SCDLP 寒天 | 1～2日 |
| D.D チェッカー「生研」 | デンカ生研 | デンカ生研 | スタンプ法 D.D 培地 | 8～24時間 |

| | | | | |
|------------------------------------|----------------|--------------------|-----------------------------------|---------|
| べたんチェック | 栄研器材 | 栄研器材 | スタンプ法 標準寒天、SCD 寒天、 SCDLP 寒天 | 1～2日 |
| べたんチェック 25 | 栄研器材 | 栄研器材 | スタンプ法 標準寒天、SCD 寒天、 SCDLP 寒天 | 1～2日 |
| ロダックプレート | BD BBL | 日本ベクトン・デ イッキンソン | ロダック法によるスタンプ 標準寒天 | 1～2日 |
| サンアイパイオチ ェッカー-FC | 三愛石油 | 三愛石油 | スタンプ法 | 48時間 |
| メルク・スタンプ培 地 | 独メルク社 | メルク・ジャパン | スタンプ法 標準寒天、CASO 寒天 | 1～2日 |
| メルクエンパイロ チェックコンタク トスライドYM(S) | 独メルク社 | メルク・ジャパン | スタンプスライド法 | 1～2日 |
| フィルムスタンプ チェック | 日研生物医学研 究所 | 日研生物医学研 究所 | スタンプ法(表面付着菌測定) | 1～2日 |
| パームスタンプチ ェック | 日研生物医学研 究所 | 日研生物医学研 究所 | スタンプ法(手指付着菌測定) | 1～2日 |
| バイオスタンプチ ェック | 日研生物医学研 究所 | 日研生物医学研 究所 | スタンプ法(表面付着菌測定) | 1～2日 |
| コンタクトスライ ド | 独バイオテスト | グンゼ産業 | スタンプ法(表面付着菌測定) | 1～2日 |
| カウントタクト | ピオメリュ社 | 日本ピオメリュ | スタンプ法 | 1～2日 |
| ピオスタンプ | タイショーテク ノス | タイショーテク ノス | スタンプ法(手指付着菌測定) | 1～2日 |
| スタンプマン | 関東化学 | 関東化学 | スタンプ法 標準寒天、SCDLP 寒天 | 24時間 |
| [乾式培地] | | | | |
| ベトリフィルム | 米スリーエム | スリーエムヘル スケア | 乾式培地 ACプレート | 2日 |
| コンパクトドライ 「ニッスイ」TC | 日水製薬 | 日水製薬 | 不織布を備えたシート状乾 燥培地 | 2日 |
| サニ太くん | チッソ | チッソ アズマックス | 不織布を備えたシート状乾 燥培地 | 24時間 |
| シンプレート | BioControl | グンゼ産業 | 特定酵素気質乾燥培地法 | 20～48時間 |
| [試験紙法] | | | | |
| サンコリ | サン化学 | サン化学,チッソ アズマックス | 試験紙法 | 24時間 |
| 一般細菌試験紙 | 柴田科学 | 柴田科学 | 培地を特殊処理した試験紙 | 1～2日 |
| [ATP法] | | | | |
| ルーマックシステ ム | セルシス | グンゼ産業 | ATP法 | 20秒間 |
| ルーマット ミニルーマット | ワラックベルト ールド | ワラックベルト ールドジャパン | ホタルルシフェラーゼ 菌以外のATPを消去 | 約10秒間 |
| ルシフェール 250 グラス | キッコーマン | キッコーマン | ATP法 | 30分間 |
| サーフェイスモニ タリングユニット | ラボ・システムズ | 大日本製薬 | ATP検出用機器試薬 | 数秒間 |
| イージーライト | ラボ・システムズ | 大日本製薬 | ATP検出用機器試薬 | 数秒間 |
| コンシュマブルキ ット | 東亜電波工業 | 大日本製薬 | ATP検出用機器試薬 | 数秒間 |
| ATP アナライザー AF-100 | 東亜電波工業 | 東亜電波工業 | ATP法 | 数分間 |

| | | | | |
|--------------------------|--------------|--------------|---------------------------|------------|
| 菌士郎一般生菌数 検出キット | 東洋インキ製造 | 東洋ビーネット | ATP 法 | 15 ～ 30 分間 |
| [その他] | | | | |
| アイソグリップ システム | | ゲンゼ産業 | HGMF 法 | 2 日 |
| MicroFossTVC テス トバイアル | FossElectric | フォス・ジャパ ン | 細菌の代謝に由来する培地 内の化学的特性変化 | 4 ～ 24 時間 |

これらのうち、特に乾式培地法に分類されるペトリフィルムは、AOAC Official 法に採用されるなど国際的にも高い評価を受けている。

ペトリフィルムには生菌数測定用以外に大腸菌群、大腸菌などの測定用培地があり、生菌数測定用の製品は「AC プレート」の名称が付いており、標準寒天平板法と同様の条件で使用できる。ACプレートはプラスチックフィルムに 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) 指示薬と冷水可溶性ゲル化剤をコーティングした上部フィルム、及びプラスチック塗布紙に標準培地とゲル化剤をコーティングした下部フィルムの 2 層から構成された乾式フィルム培地である。

菌数測定は次の手順で行う。

- (1) 上部フィルムを持ち上げて、1ml の試料液を下部フィルムの中心に接種。
- (2) 上部フィルムをかぶせ、専用のプラスチックスプレダーで軽く上部から押さえ、試料液を均一に広げる。
- (3) 約 1 分間放置してゲル化させる。
- (4) 32 ～ 35 ℃（乳・乳製品：32±1 ℃、その他の食品：35±1 ℃）で 48±3 時間培養。
- (5) TTC 指示薬により赤変したコロニーを数え、試料 1ml または 1g 中の菌数を求める。

測定可能コロニー数は 30 ～ 300 個であるが、300 個以上のコロニー数が多い場合は、フィルムに印刷された 1cm 角の平均コロニー数を 20 倍することにより、総コロニー数が推定できる。

また、最近では標準寒天培地の栄養素を基本とした成分が不織布に乾燥状態で均一にコートされたシート状培地（コンパクトドライ：日水製薬）が開発されている。プレート上の培地に試料液 1ml を滴下すると、試料はプレート全面に自然と拡散する。それを 48 時間培養し、培地に含まれる TTC 指示薬により赤変した集落数を数える。

大腸菌および大腸菌群

1) FDA Standard 法 (1998)

従来法 大腸菌群：推定試験

確認試験

固形培地法

糞便系大腸菌群および大腸菌：EC プイヨン法

迅速法 貝類養殖海水中の糞便系大腸菌群：A-1 培地法

大腸菌：LST-MUG 法

大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌：hydrophobic grid membrans filter 法

2) AOAC Official 法

966.24：tree nut meats 中の大腸菌および大腸菌群

978.23：貝類養殖海水中の糞便系大腸菌群：A-1 培地法

991.15：水中の大腸菌群および大腸菌：Colilert 法

983.25：食品中の大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌：hydrophobic grid membrans filter 法

988.19：冷蔵および冷凍食品中の大腸菌：glucuronidase による蛍光発色法

990.11：食品中の大腸菌群、大腸菌：hydrophobic grid membrans filter/MUG 法

991.14：食品中の大腸菌群、大腸菌：乾式フィルム法 (petrifilm 法)

3) ISO Standard 法

大腸菌群の菌数測定のための一般的指針：集落計測法

乳・乳製品の大腸菌群の菌数測定

Part 1 30℃による集落計測法

Part 2 30℃によるMPN法

食品中の推定大腸菌の菌数測定

Part 1 Membranes と酵素基質を使用した 44℃による集落計測法

cellulose acetate 被せた Mineral modified Glutamate Agar 上に試料を接種

37℃ (または 30℃) で 4 時間前培養

cellulose acetate を上記平板上に移動し、44℃で 18 ~ 24 時間培養

Part 2 MUG を使用した 44℃による集落計測法

Tryptone Bile Glucuronide Agar

(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide：XGLUC 添加)

44℃で 18 ~ 24 時間培養

E. coli : β -glucuronidase により青色集落

4) IDF Standard 法

乳・乳製品の大腸菌群の菌数測定

Part 1 30℃による集落計測法

Part 2 30℃によるMPN法

わが国と ISO/IDF 標準法における乳・乳製品の大腸菌群試験の比較

| 試験法 | 乳等省令法 | ISO/IDF 標準法 |
|---------------------------|-----------------------|-------------|
| 寒天培地法 | 培養温度： 32 ~ 35℃ | 30±1℃ |
| | 選択培地： デソキシコレート寒天 | VRBL 寒天 |
| | 確認手順： [2段階] | [1段階] |
| | EMB 寒天→乳糖ブイヨン 普通寒天 | BGLB ブイヨン |
| 確認性状： グラム(-)桿菌・酸(+）・ガス(+) | ガス(+) | |
| 液体培地法 | 培養温度： 32 ~ 35℃ | 30±1℃ |
| | 選択培地： BGLB ブイヨン | LST ブイヨン |
| | 確認手順： [2段階] | [1段階] |
| | EMB 寒天→乳糖ブイヨン 普通寒天 | BGLB ブイヨン |
| 確認性状： グラム(-)桿菌・酸(+）・ガス(+) | ガス(+) | |

注) VRBL : Crystal Violet Neutral Red Bile Lactose LST : Lauryl Sulfate Tryptose

乳・乳製品の推定大腸菌の菌数測定

Part 1 MPN法 (少量菌の汚染検体)

Lauryl Sulfate Tryptose broth 37℃で 24 ~ 48 時間培養

EC broth 44℃で 24 ~ 48 時間培養

Tryptone Water 44℃で 24 ~ 48 時間培養後インドール反応

Part 2 MUG を使用したMPN法 (少量菌の汚染検体)

Modified Lauryl Sulfate Tryptose Broth

(4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide : MUG 添加)

30 °C で 24 ~ 48 時間培養後インドール反応

E. coli : β -glucuronidase により蛍光、インドール反応 (+)

Part 3 Membranes を使用した 44 °C による集落計測法 (大量菌の汚染検体)

cellulose acetate 被せた Mineral modified Glutamate Agar 平板上に試料を接種

37 °C で 4 時間前培養

cellulose acetate を Tryptone Bile Agar 平板上に移動し、44 °C で 18 ~ 24 時間培養

インドール反応 (+)

I. 細菌性食中毒の予防を目的とした検査マニュアルの作成と関連情報の収集

[2] 糞便汚染指標菌 ー特に大腸菌群および大腸菌ー

研究協力者：寺本 忠司
株式会社 ファルコライフサイエンス

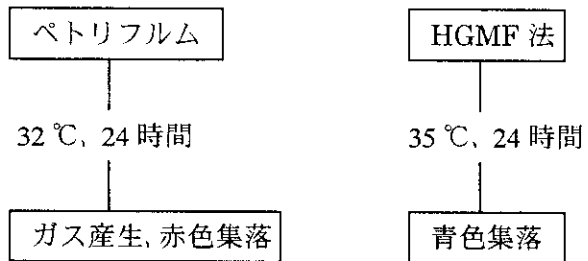
[糞便汚染指標菌] - 特に大腸菌群及び大腸菌

レジメ

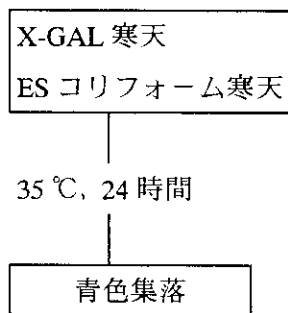
大腸菌群・大腸菌の検査法

1. 大腸菌群検査法

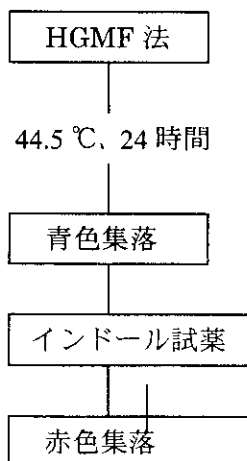
1) 従来法



2) 発色酵素基質法

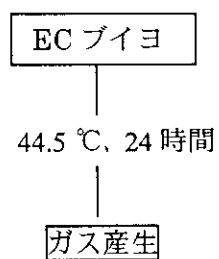


2. 糞便性大腸菌群検査法

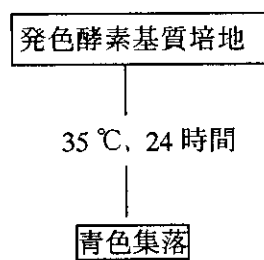


3. 大腸菌検査法

1) 従来法



2) 発色酵素基質法



[2] 糞便汚染指標菌—特に大腸菌群および大腸菌—

1. 大腸菌群検査法

1) 大腸菌群の定義

食品の大腸菌群は、ヒトの大便汚染指標菌として用いられ、国際的に「乳糖を分解して酸およびガスを産生するグラム陰性通性嫌気性無芽胞桿菌」と定義付けられ、この定義に基づいた検査法が世界各国の食品および環境衛生検査に広く採用されている。

2) 大腸菌群の区分

1949年当時、国際委員会が腸内細菌として採用した菌群は16菌種であった。これらのうち、Coli-Aerogenes Subcommitteeによって大腸菌群の区分をIMViCシステムのパターンに当てはめたものが表1である。

3) 従来の一般的検査法（公定法）

わが国および欧米における食品の大腸菌群検査法は表2のとおりである。特に、食品の大腸菌群数測定にデソキシコレート寒天を採用しているのはわが国とタイ国だけであり、その他の諸外国では大腸菌群数測定にVRB寒天（Violet Red Bile agar）を採用している。

（1）日本の検査法

わが国の大腸菌群検査法は、大腸菌群の定義に基づいた乳糖からのガス産生を3段階検査すなわち推定、確定および完全検査の順で実施される。その公定法は、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」および「食品、添加物等の規格基準の省令」であり、その中に検体採取、秤量、希釈液、使用培地、培養温度および培養時間などが詳細に記載されている。

大腸菌群検査のうち推定試験に使用される培地は、食品別によってBGLB、乳糖ブイヨンおよびデソキシコレート寒天と指定されているが、それ以外の食品ではこれらの培地を用いて公定法に準じて行う。（図1）

推定試験でガス産生の場合は、確定試験のEMB寒天に塗抹し、35℃、24時間培養後、定型的集落を1コ、定型的集落のない場合には非定型的集落を2コ以上を釣菌し、完全試験の普通寒天および乳糖ブイヨンに接種し、35℃でそれぞれ24および48時間培養後、グラム染色によってグラム陰性桿菌でガス産生を認めたものを大腸菌群陽性とする。したがって、大腸菌群検査の合否判定は4～5日を要する。しかも、この大腸菌群の公定法は50年間も改定されることなく従来どおり続けられている。しかし、最近では酵素培地の出現など簡易・迅速検査法がつつぎと開発され、市販されている背景から、今後食品現場ではこれらの手法を導入した方法の採用が必要である。

公定法において、BGLB、乳糖ブイヨンおよびデソキシコレート寒天各培地を使用した場合の手順の概要を述べる。

① BGLB【牛乳、加工乳、乳製品、鯨肉製品および魚肉ねり製品】

試料原液、10および100倍希釈液の各1mlを2本のBGLBに加え、35℃、48時間培

養後、ガス産生を認めた場合は確定および完全試験を行う。

②乳糖ブイヨン【清涼飲料水、粉末清涼飲料水およびミネラルウォーター類】

原液 10ml、1ml および 10 倍希釈液の各 1ml を 2 本の乳糖ブイヨンに加え、35℃、48 時間培養後、ガス産生を認めた場合に確定試験および完全試験を実施する。

③デソキシコレート寒天【氷菓、アイスクリーム類、はつ酵乳、乳酸菌飲料、バター、バターオイル、プロセスチーズ、加熱食肉製品、冷凍食品およびゆでたこ】

試料原液（10 倍希釈液）および 100 倍希釈液の各 1ml をシャーレに接種し、デソキシコレート寒天 10～15ml を加えて混釈し、凝固後、その表面にデソキシコレート寒天 3～4ml を重層し、35℃、20 時間培養後、発育した赤色集落をカウントし、その集落について確定および完全試験を行う。

（2）諸外国の大腸菌群検査法

国際的に、食品の大腸菌群検査法は、FDA 法、ISO 法あるいは AOAC 法のいずれかが採用されている。

① FDA(Food and Drug Administration)法

食品 50 g に Butterfield's Phosphate-Buffered dilution water または 0.1 % ペプトン水 450ml を加え、25 回以上強く振ったものを試料原液とする。

VRB 寒天混釈法：

試料原液および 100 倍希釈液の各 1ml をシャーレに接種し、VRB 寒天 10ml を加えて混釈し、凝固後、その表面に VRB 寒天 5ml を重層し 18～24 時間培養後、1 平板当たり 25～250 コの発育寒天平板を選び、赤紫集落（0.5mm 以上）をカウントする。その集落を BGLB に接種し、35℃、48 時間培養後、ガス産生を大腸菌群陽性とする。

MPN 法：

原液 10ml、1 ml ならびに 10 倍段階希釈液の 1 ml を各 5 本のラウリル硫酸ブイヨン（LST ブイヨン）に接種し、35℃、48 時間培養後、ガス産生のブイヨン液から 1 白金耳を BGLB に接種し、35℃、48 時間培養後、ガス産生の試験管本数から大腸菌群の最確数を求める。

② ISO (International Organization for Standardization) 法

VRBL 寒天混釈法：

試料原液および 100 倍希釈液の各 1 ml をシャーレに接種し、crystal violet neutral red bile lactose agar (VRBL 寒天) 15ml を加えて混釈し、30℃、24 時間培養後、赤紫色集落（0.5mm 以上）をカウントする。その集落を lactose bile brilliant green broth に接種し、30℃、24 時間培養後、ガス産生を認めたものを大腸菌群数とする。なお、VRBL 寒天は VRB 寒天、また lactose bile brilliant green broth は BGLB と同じ培地である。

MPN 法：

試料原液 10ml、1 ml ならびに 10 倍段階希釈液の 1ml ずつを各 5 本のラウリル硫酸トリ

プトースブイオンに接種し、30℃、24時間培養後、ガス産生の試験管本数から大腸菌群の最確数を求める。なお、ラウリル硫酸トリプトースブイオンはLSTブイオンと同じである。

③ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 法

AOAC法は新しく開発された食品細菌検査関連の機器、器具・器材、各種培地、同定キット製品などを15研究機関で評価実験で認定されたものを公表する。

ペトリフィルム法 (Petrifilm 法) :

ペトリフィルムによる大腸菌群検査法は、American Public Health Association (APHA) の公定法に採用された。ペトリフィルム CC は大腸菌群の乳糖からのガス産生を1日で観察できるので大腸菌群の確認および完全試験作業を省略できる。ペトリフィルムは2枚のフィルムで構成され、上部はポリプロピレンフィルムに2, 3, 5-トリフェニール・テトラゾリウム塩酸塩 (TTC) 指示薬を含む冷水可溶性ゲル化剤であり、下部のフィルムにVRB寒天と冷水可溶性ゲル化剤が塗布され、その上にポリエチレンフォームを重ね合わせたものである。

試料原液および100倍希釈液の各1mlをペトリフィルムCCに接種し、32℃、24時間培養後、乳糖分解の赤色集落にガス産生を認めたものを大腸菌群数としてカウントとする。

HGMF 法 (Hydrophobic Grid Membrane Filter) :

疎水性格子メンブランフィルターを使用した大腸菌群検査法であり、乳糖からの酸産生を指標とし、ガス産生は調べない。また、メンブランフィルターと異なる点はフィルターの表面に疎水性樹脂で1,600コの格子状に区画されたものである。

試料原液および100倍段階希釈液の各10mlを別々にHGMF装置でろ過したフィルターをm-FC寒天平板上に乗せ、35℃、24時間培養後、フィルター上に発育した青色集落を大腸菌群数としてカウントする。

4) 自動・簡易検査法

食品を大量に製造する企業の品質検査室ではロット毎の大量検査と検査経費の節減のために迅速法として自動測定機器を必要とする。また小規模の食品細菌検査室では簡易および迅速法の導入が急務である。

(1) 自動菌数測定法

① バクトメータ (Bactometer) 法

バクトメータ法は食品の大腸菌群菌数測定にインピーダンス法を応用した自動細菌数測定機器である。原乳、牛乳、クリームおよびアイスクリームの大腸菌群数測定にバクトメータ法はAPHAの公定法に採用された。試料原液とバクトメータ法の大腸菌群検査用培地をBactometer機器のウェルに接種し、それを機器にセットすれば自動的に検知時間を測定される。求められた検知時間からキャリブレーションカーブを用いて食品中の大腸菌群数を計測する。したがって、集落形成を必要としないので原乳などの細菌汚染がひどい食品ほど大腸菌

群の合否判定は短時間で行われる。

② スパイラル法

検査方法の概要は生菌数の項で述べたとおりであり、使用培地はデソキシコレート寒天である。

(2) 簡易検査法

① HGMF 法

上記のとおりである。

② ペトリフィルム法

上記のとおりである。

5) 大腸菌群検査法の国際化

食品の大腸菌群数測定において、わが国では寒天培地を用いる場合はデソキシコレート寒天混釈法が採用されている。一方、諸外国の大腸菌群数測定は VRB 寒天混釈法を用いている。したがって、わが国でも食品の国際流通化に伴って世界的に整合性のある VRB 寒天混釈法を採用すべきである。また、最近では酵素基質培地の使用が広く採用されるようになってきた。すなわち、食品の発色酵素基質法による大腸菌群検出は、公定法と同じ操作作業でありながら 1 日で判定できるので迅速性に優れ、発育集落の色調で大腸菌群をカウントできるので有用な検査法である。以下に、その概要を述べる。

(1) 発色酵素基質法における大腸菌群の定義

発色酵素基質法の大腸菌群定義は、従来の定義である乳糖からのガス産生グラム陰性桿菌と異なり、特異酵素 $\hat{\alpha}$ -galactosidase 産生のグラム陰性桿菌である。

乳糖はブドウ糖とガラクトースの結合した複糖であり、乳糖分解には乳糖分解酵素とともに細胞膜透過酵素の関与が必要である。また、細胞膜透過酵素が欠けると乳糖分解酵素が存在しても乳糖は分解されない。したがって、乳糖非分解菌であっても $\hat{\alpha}$ -galactosidase 産生菌は細胞膜透過酵素を欠くので潜在的な乳糖分解菌となり、本質的には乳糖分解からのガス産生による従来法と $\hat{\alpha}$ -galactosidase 産生による発色酵素基質法の大腸菌群は 100 % に相関しないが、むしろ発色酵素基質法のほうがより確実に大腸菌群として潜在的な乳糖分解菌まで検出できることは、従来法に比べて大腸菌群陽性率は当然高くなる。

(2) $\hat{\alpha}$ -ガラクトシダーゼ産生菌種

発色酵素基質法における大腸菌群の定義に属する菌種は表 3 のとおりである。

(3) 合成酵素基質の種類

大腸菌群検出に利用される合成酵素基質は 6 種類である。

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\hat{\alpha}$ -D-galactopyranoside (X-GAL)

6-bromo-5-chloro-3-indolyl- $\hat{\alpha}$ -D-galactopyranoside (Magenta-GAL)

6-chloro-3-indolyl- $\hat{\alpha}$ -D-galactopyranoside (Salmon-GAL)

- p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (PNPG)
- o-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (ONPG)
- 4-methylumbelliferyl- α -D-galactopyranoside (M-GAL)

(4) 合成酵素基質の反応

食品の大腸菌群検出に利用される合成酵素基質 X-GAL は無色であるが、大腸菌群の産生する特異酵素 β -galactosidase によって結合部が切断され、 α -D-galactose と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (青色) に分けられる。(図2)

(5) 食品の大腸菌群検査法

食品の大腸菌群検査における発色酵素基質法はすでに食品衛生検査指針に採用された(1996年)。食品の大腸菌群を発色酵素基質法で検出するには、従来の大腸菌群検査培地に発色酵素基質を加えたものあるいは新たに開発された発色酵素基質培地を用いる。その検査作業および操作は従来の寒天混釈法と同じであり、35℃、24時間培養後、発育した青色あるいは赤紫色の集落を大腸菌群としてカウントする。

試料原液の1mlをシャーレに接種し、市販発色酵素基質培地のX-GAL寒天あるいはESコリフォーム寒天20mlを加え混釈し、35℃、24時間培養後、発育した青色集落を大腸菌群としてカウントする。

(6) 発色酵素基質法の問題点

食品の大腸菌群・大腸菌検出による発色酵素基質法は簡易および迅速性に優れているが、いくつかの問題点がある。発色酵素基質法による大腸菌群は寒天平板上の集落色調で判定されるが、培養時間によって色調の変化が見られる。したがって、使用培地ごとに培養時間を正確にする必要がある。また、食肉や生鮮魚介類検査における発色酵素基質加液体培地の使用は偽陽性反応に注意する。

● 大腸菌群検査法のまとめ

○ 従来法

| | | |
|------------|----------------|------|
| ペトリフィルム CC | 32 ~ 35℃、24 時間 | 赤色集落 |
| | | ガス産生 |
| HGMF 法 | 35℃、24 時間 | 青色集落 |

- ① ペトリフィルム CC は大腸菌群の定義「乳糖分解によって酸・ガス産生するグラム陰性桿菌」に基づいた検査法である。
- ② HGMF 法は大腸菌群定義の乳糖からのガス産生と異なる乳糖からの酸産生菌をカウントする。