

条件が許されている。しかし、両方の培養条件を満たす共通の温度帯がわずかに異なるため、これらの食品を1台の培養器で同時に試験できない。なお、欧米の乳製品試験法の培養温度は、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ あるいは $32 \pm 1^\circ\text{C}$ に設定されている。

- ③ 試料の採取法が非現実的である。食肉製品や魚肉ねり製品等は、“切断すべき表面をアルコール綿花でよくふいた後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から25 gを無菌的に採り試料とする”と指示されている。しかし、中心部のみを採取しなければならない理由が明確ではなく、しかも食品の形状によっては、この指示通りに試料を採取するのは困難であるか事実上不可能な場合もある。可食部である食品表面を除外した検査では、衛生指標菌検査の意味合いが希薄になると思われる。
- ④ 食品の10倍乳剤作製法が一様ではない。アイスクリーム類や氷菓等では、秤量した検体10 gに希釈液を90 ml加えるが、他の食品では希釈液を加えて100 mlまでメスアップすることになっている。冷凍食品や食肉製品等では、25 gの検体に225 mlの希釈液を加える。食品の乳剤作製機器として、古い告示法ではホモジナイザーが、最近ではストマッカーが指定されている。
- ⑤ 氷雪や清涼飲料水等の推定試験には、pH指示薬であるBTBを加えた乳糖ブイヨン（BTB-LB培地）を使用しなければならない（表2）。ところが完全試験では、

氷雪や清涼飲料水等も含むすべての食品に対してBTB不含の乳糖ブイヨン（LB培地）が指定されている（図1）。法律を忠実に遵守するならば、氷雪や清涼飲料水等の試験には2種類の乳糖ブイヨンを使い分けなければならない。なおFDA/BAMやISOの汚染指標菌試験法では、LB培地やBTB-LB培地は使われていない。

- ⑥ 乳等省令には“検体採取後4時間以内に試験に供しなければならない”との非現実的な規定がある。使用培地は、今では有名無実となった“間けつ滅菌”することになっている。
- ⑦ 試験遂行上の問題はないと思われるが、食品衛生法には2種類の異なる大腸菌群の定義が存在する。乳等省令では乳糖を分解して“ガス”を産生するものとされ、その他の一般食品では乳糖を分解して“酸とガス”を産生するものと定義されている。

2. 汚染指標菌名の混乱

日本の食品衛生法では、腸管系病原菌に対する汚染指標菌として、大腸菌群と“E. coli”（イタリックではない）の2種類のみが使用されているだけで、諸外国のような大腸菌を対象とした規格基準などはない。平成10年の「生食用食肉等の安全性確保について」の通知で、厚生労働省は初めて糞便系大腸菌群の用語を使用し、これは食肉製品等の成分規格に使用されているE. coliと同じものであると定義した。E. coliは日本の食品衛生法上の独特の用語であり、欧米で使用されているfecal coliforms（FDA/BAM：糞便系

大腸菌群)あるいはpresumptive *E. coli* (ISO:推定大腸菌)とは、試験法は異なるが性状は類似する菌群と考えられる。大腸菌以外の名称は食品衛生学領域でのみ使用される用語であり、細菌学の分類に基づくものではない。近年日本でも使用されるようになってきた糞便系大腸菌群の用語は、大腸菌よりも糞便汚染の可能性がより高いことを示す指標菌のような間違っただイメージを与えかねない。糞便系大腸菌群とは、大腸菌群のうち44℃～45.5℃の高温域でも発育可能な菌群であるという、単なる培養手技上の名称である。元来の標的である大腸菌以外にも、自然界に常在するクレブジェラ、エンテロバクター、サイトロバクターなどがこのような培養条件でも発育するので、糞便系大腸菌群は必ずしも糞便汚染の特異的な指標菌とはいえない。糞便系大腸菌群に代わる用語として、thermotolerant coliformsが、さらにはthermotrophic coliformsがより相応しいとの考え方もある。

3. 日本の告示法・通知法、FDA/BAM、

ISOの汚染指標菌試験法の比較

日本のほとんどの汚染指標菌試験法では、得られる結果は陰性か陽性かの定性的なものである。これに対して、FDA/BAM法およびISO法は、定量的な結果が得られるMPN法を採用している点で日本の試験法とは基本的に異なる。なお本文中に記載した培地名などの略語は表3に示したので、詳細は各メーカーの説明書を参考にされたい。

3-1. 大腸菌群および糞便系大腸菌群

(日本では*E. coli*) 試験法

① 日本の告示法・通知法

大腸菌群および*E. coli*試験法は、基本的には推定試験、確定試験、完全試験の3つのステップで構成されている。大腸菌群の推定試験にはBGLB培地、BTB-LB培地(図1)あるいはデソキシコレート寒天培地(図2)が、*E. coli*の推定試験にはEC培地が指定されている(図1)。BGLB培地は栄養素に富む牛乳類や食肉製品試験用に、BTB-LB培地は栄養素の少ない氷雪や清涼飲料水の試験用にと使い分けているようである(表1、表2)。氷雪や清涼飲料水のような貧栄養の食品中の大腸菌群は、飢餓ストレスを受けて損傷菌になっている可能性が高い。損傷菌の回復をはかる目的で、最初のステップに非選択性のBTB-LB培地を採用したと推察される。EC培地は生食用カキの*E. coli*のMPN法、冷凍食品や食肉製品の*E. coli*推定試験用に指定されている。

デソキシコレート寒天培地中に暗赤色集落が発生した場合、あるいはBGLB培地などの液体培地でガス産生が認められた場合は推定試験陽性と判定する。推定試験の培地は異なっても、次の確定試験では一律にEMB培地に画線培養を行う(図1、図2)。EMB培地に発生した大腸菌群あるいは*E. coli*様集落は、LB培地と普通寒天斜面培地へ移植して完全試験を実施する。LB培地でガスを産生し、かつ普通寒天培地上の菌がグラム陰性の無芽胞桿菌であることを確認すれば完全試験陽性と判定する(図1、図2)。MPN法では例外的に推定試験のEC培地の

みで最終判定し、ガス陽性の試験管数からMPN表を使用して菌数を算定する。

わが国の汚染指標菌試験法は、定性的な成分規格に軽重の差をつけるために、培地に接種する試料量を変えている。例えば、食肉製品では10倍乳剤10 mlずつを3本のBGLB培地に接種する(3 g)。牛乳では原液、10倍および100希釈液1mlずつを、それぞれ2本のBGLB培地に接種する(2.22 ml)。冷凍食品では100倍乳剤1 mlずつを3本のEC培地に接種する(0.03 g)。アイスクリーム類では10倍乳剤を1 ml(0.1 g)ずつ、冷凍食品では100倍乳剤を1 ml(0.01 g)ずつ、それぞれ2枚のデソキシコレート寒天培地で混積培養するようになっている。このような食品ごとに異なる試料の希釈倍率や、推定試験に使用する試験管数の相違が、わが国の汚染指標菌試験法を複雑にしている大きな原因の一つでもある。

② FDA/BAM法およびISO法との比較

FDA/BAMとISOの大腸菌群および糞便系大腸菌群試験法は、わが国の方法とは異なり、試験のスタート時に使用する液体培地はLST培地にほぼ一本化されている。FDA/BAMの大腸菌群試験法(図3)ではガス陽性のLST培地からBGLB培地へ、糞便系大腸菌群試験法(図3)ではガス陽性のLST培地からEC培地へ移植し、いずれも一定時間培養後にガスの産生が認められた試験管を陽性としてMPN値を算出する。ISOの大腸菌群試験法(図4)はFDA/BAM法と類似はするが、LST培地でガス産生が認められたものだけでなく、ガス産生なしに混濁

したものも推定試験陽性としてBGLB培地へ移植する。2倍濃度のLST培地にはダーラム管はいれないことも異なる。このため、ガス産生性とは関係なく、単に混濁したLST培地の培養液を次のステップのBGLB培地に移植することになる。

ISOの糞便系大腸菌群試験法(図5)には、FDA/BAM法にはないインドール試験を実施するためのペプトン水培養が追加されている。Health Protection Agency(英国食品安全庁)の糞便系大腸菌群(正確にはpresumptive *E. coli*)試験法は、ガス陽性のEC培地に1N NaOHを添加後にインドール試験を実施する。この便法はペプトン水培養を省略できるため、ISO法(図5)に比べて試験時間の大幅な短縮(48時間)が可能となる。なおEC培地の培養温度は、日本: $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、FDA/BAM法: 貝類は $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ でその他の食品では $45.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、ISO法: $44 \pm 1.0^\circ\text{C}$ と若干異なっている。EC培地は空調式恒温槽ではなく、厳密な温度制御が可能である恒温水槽で培養しなければならない。

大腸菌群試験に使用する平板培地は、日本ではデソキシコレート寒天培地であるが、FDA/BAM法とISO法ではいずれもVRBA培地が指定されている。ISO法(図6)では、ピンク・赤・紫色で直径が0.5 mm以上の大きさの典型集落は、集落の形態や色調だけで大腸菌群陽性菌と判定して菌数測定を行うが、非典型集落ではBGLB培地でガス産生性を確認することになっている。VRBA培地上の集落の大きさが0.5 mm以上という大

腸菌群陽性菌の基準は、一応の目安と考えるのが適切であろう。FDA/BAM法（図7）は、典型集落でもBGLB培地でガス産生性を確認して大腸菌群陽性菌と判定する。FDA/BAM法やISO法は、日本の告示法・通知法のようなEMB培地での確定試験と、それに続くグラム染色やLB培地での完全試験がないので、より簡便・迅速化された試験法といえる。

日本の告示法・通知法、FDA/BAM法、ISO法ともに、乳製品試験法の培養温度（32～35℃、32±1℃、30±1℃）は一般食品（35±1℃、ISO法のみ37±1℃）に比べて低く設定されている。ISO法では、ヒトや動物由来の汚染指標菌を標的とする場合は37±1℃培養を行い、製造工程での環境汚染や低温性菌を標的とする場合は30±1℃培養が採用されているようである。

3-2. 大腸菌試験法

わが国には大腸菌を標的とした規格基準がないので、当然大腸菌試験法に関する告示・通知法はない。ISOの平板法（図8）は、BCIG（酵素基質：X-GLUCと同一）を添加したTBX培地と試料液を混釈して、44±1℃で18～24時間培養する。ISOの液体法（図9）は、MMG培地を用いて37±1℃で24±2時間培養した後、乳糖分解により酸が産生された（pH指示薬で判定）培養液をTBX培地に画線培養する。TBX培地に大腸菌が発育すると、β-グルクロニダーゼ（大腸菌の約95%が保有）がBCIGを加水分解し、その結果生成される色素によって青～青緑色に着色された集落を形成する。ただし腸管出血

性大腸菌O157などはβ-グルクロニダーゼを保有せず、44℃の高温では発育もできない。FDA/BAMの液体法（図3）は、LST培地からEC培地へ、次にEMB培地へとガス産生性を指標として移植する。EMB培地で大腸菌様集落が発生すれば、再度LST培地でのガス産生性、および普通寒天培地で発育した菌のグラム染色性およびIMViC試験により大腸菌を同定する。IMViC試験のかわりにAPI20EやVITEKなどの簡易同定法も使用可能である。試験の最初のステップでLST培地の代わりに酵素基質MUGを添加したLST-MUG培地を使用すれば、EC培地を省略して直接EMB培地への画線培養が可能になる。貝類は内因性のβ-グルクロニダーゼ活性を有するため、疑陽性反応を起こす恐れのあるLST-MUG培地を最初のステップでは使用できない。まずLST培地で培養し、次のステップでEC-MUG培地を使用すれば疑陽性反応は防止できるとされている。FDA/BAMの平板法（図10）は、試料をVRBA培地で混釈した後、VRBA-MUG培地を重層して35±1℃で18～24時間培養する。本法では365 nmの長波長UVの照射下で青色蛍光色の集落を大腸菌として計測するが、可視光線下でのピンク・赤色・紫色の大腸菌群の同時測定も可能である。

3-3. *Enterobacteriaceae*（仮約：腸内細菌科菌群）試験法

腸内細菌科菌群とはグラム陰性の無芽胞桿菌で、ブドウ糖を分解して酸を産生し、オキシダーゼ反応陰性の通性嫌気性菌であると定義されている。腸内細菌科菌群を衛

生指標菌とした試験法では、乳糖非分解菌である赤痢菌、サルモネラ、エルシニアのような食品衛生上重要な腸管系食中毒菌も検出可能である。大腸菌や大腸菌群試験が陰性であったアイスクリームが、サルモネラ食中毒の原因となった事例が知られている。ブドウ糖分解性を指標とする腸内細菌科菌群は、乳糖分解性を指標とする大腸菌群よりもより広い腸管系食中毒菌をカバーできる汚染指標菌といえる。汚染指標菌として腸内細菌科菌群が大腸菌群よりも適切であるとの考え方は、米国よりはむしろ欧州で広く採用されてきたようである。2006年1月1日から効力を発揮している“New EU microbiological criteria”では、いくつかの食品の大腸菌群の規格が腸内細菌科菌群の規格へと移行した。

ISO法の腸内細菌科菌群の分離培地には、大腸菌群用のVRBA培地の乳糖をブドウ糖に置き換えたVRBG培地が使用されている。VRBG培地で混釈・重層し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ あるいは $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養後に発生した集落のうち、ブドウ糖を分解しかつオキシダーゼ陰性の菌を腸内細菌科菌群とする（図11）。水やそれに関連する食品には、元来は水系の常在菌であって糞便汚染とは関係がない、オキシダーゼ陽性のエロモナス属菌がしばしば存在する。オキシダーゼ試験は、本来の標的ではないエロモナス属菌を腸内細菌科菌群から容易に除外できる有力な武器である。腸内細菌科菌群は、VRBG培地で脱色された非典型集落を形成する場合もあるので、白色集落であっても典型的集落

と同様に5固ないしは10個の集落を選択して、ブドウ糖分解試験およびオキシダーゼ試験を実施することになっている。ISOの液体培地法（図12）では、まず選択剤を含まないBPWで前培養し、EE培地による選択増菌培養後にVRBG培地へ画線培養する。発生した集落のうち、ブドウ糖を分解しオキシダーゼ試験陰性の菌を腸内細菌科菌群と同定する。FDA/BAMには腸内細菌科菌群の試験法は記載されていない。

3.4. 損傷菌の培養法

食品中の細菌は、製造・加工工程中に高温、低温、乾燥、高浸透圧のような物理的ストレスや、酸、保存料、消毒剤の化学的ストレスを受ける。したがって食品中で生残している菌でも何らかの損傷を受けていると考えるのが自然である。食品の安全性の評価や品質劣化の防止などを目的とした検査では、このような損傷菌の存在は無視できない。損傷菌を検出するための種々の培養法が考案されており、食品の希釈液にペプトン加生理食塩水を使用するのもその対策のひとつである。培地にピルビン酸やカタラーゼを添加すると損傷菌の回復を助ける効果があるといわれている。ISO法（図8）では、TBX培地で混釈後に 37°C で4時間前培養して損傷大腸菌の回復をはかり、その後所定の培養温度である 44°C まで上昇させる方法が示されている。FDA/BAMの大腸菌群試験法（図7）では、発育阻害剤を含まないTSA寒天培地で混釈後、室温で 2 ± 0.5 時間培養することにより損傷大腸菌の回復をはかり、その後にVRBA培地を重層して

35℃で培養する方法をとっている。なお American Public Health Association (APHA；米国公衆衛生協会)の乳製品試験法では、2倍濃度のVRBA培地を重層することを推奨している。

3-5. 菌数計測法

わが国には大腸菌群の菌数限界値による定量的な成分規格はないので、食品衛生小六法には菌数測定・算定法は記載されていない。FDA/BAM法では平板1枚当たりの集落数の計測可能範囲を、生菌数測定法と同様に25～250/平板としている。APHAの乳製品試験法やISO法では、生菌数(25～250/平板、15～300/平板)よりも少ない15～150/平板となっている。ここではISO 16649-2に記載された大腸菌の菌数測定・算定法を示す。集落数が15～150/平板の範囲内にあれば図13の計算式に従って菌数を算定する。最低希釈段階(例えば10倍)で集落が発生しなければ $<10/g$ とし、最高希釈段階(例えば100倍)で $>150/$ 平板の集落が発生すれば $>1.5 \times 10^4/g$ とする。食品衛生小六法に記載された生菌数の計算方法では、ISO法で計算した菌数と同じか、あるいはそれ以上の菌数になる。有効な集落数測定範囲を30～300/平板とした場合の計算例を表4に示したが、ISO法が理論的には正しい菌数計算法であると思われる。

D. 考察

汚染指標菌の代表として大腸菌群、E. coli(糞便系大腸菌群)、大腸菌があり、わが国でも大腸菌群あるいはE. coliを標的と

した成分規格、加工基準、保存基準をはじめとして、衛生規範や指導基準などが告示・通知されてきた。公的な機関が食品衛生法に従って実施する行政検査は、一部の例外(通知法)を除いて成分規格に含まれる試験法(告示法)に従って実施しなければならない。企業内の自主検査であっても公的な機関の行政検査と同様に、汚染指標菌試験を告示法・通知法に基づいて実施するのが理想的であるが、これら試験法は最終結果を得るまでに日数がかかりすぎることや、判定に熟練を要するなどの問題を抱えている。このため、企業内の自主検査には、試験法の簡易迅速化を計る目的で開発された乾燥培地法、ATP法、合成酵素基質培地法、メンブランフィルター法、スパイラルプレーティング法、デジタル顕微鏡法、酸素電極法などの細菌試験法が使用されている。とりわけ合成酵素基質培地法は高額な機器が不要であること、24～48時間以内での集落の色調で容易に大腸菌群と大腸菌を判定できることから、食品関連企業での自主検査に広く使用され、検査時間の大幅な削減効果をもたらしていると考えられる。今回の調査結果でも、ISO法やFDA/BAM法の大腸菌試験法には合成酵素基質培地法が採用されていることがわかった。合成酵素基質培地法を利用した簡易試験法として、乾燥培地法やMPN法に基づいた自動細菌数測定装置法も開発市販されている。

合成酵素基質培地法による大腸菌試験法は、95%以上の大腸菌がβ-グルクロニダーゼを保有し、一部のサルモネラ、赤痢菌、

エルシニアにも存在するが、他の腸内細菌科の菌と比較してその保有率は圧倒的に高いという原理に基づいている。β-グルクロニダーゼを標的とした合成酵素基質培地法は、大腸菌以外の腸内細菌科に属する菌が検出されても問題はなく、むしろより本来の汚染指標菌検査の目的に合致しているとも言える。なお、カキなどの貝類には内因性にβ-グルクロニダーゼがあるので疑陽性反応が出る可能性が高いという欠点があり、食肉や魚肉も同様の理由で疑陽性反応が出る可能性が指摘されている。大腸菌群の乳糖発酵性に関与する酵素はβ-ガラクトシダーゼで、この酵素は乳糖発酵性のすべてのグラム陰性の桿菌が保有する。β-ガラクトシダーゼを保有している大腸菌群の菌でも、細胞膜透過性酵素が欠損した菌は従来法では乳糖非分解と判定されるため、合成酵素基質培地法では従来法よりも多くの菌が陽性と判定されることになる。合成酵素基質培地法は従来法と比較して同等あるいはそれ以上の検出感度を有する優れた大腸菌群試験法と言えるが、食品企業内の自主検査には使用できても、現在の食品衛生法に基づいた行政検査等には使用できないことは当然である。従来法で試験した食品は成分規格に適合しても、検出感度に優れている合成酵素基質培地法では不適と判定される可能性が否定できないからである。合成酵素基質培地法を食品検査に利用した場合の利点として、培地に基質を加えるだけで、検査員のある程度の熟練度を要する純培養の操作、一定の培養時間が必

要な生化学的性状試験を省略できること、特別な器具機材が不要であることなどが挙げられる。

汚染指標菌検査の元来の目的から言えば、糞便汚染の直接的な指標菌である大腸菌を検査するのがもっとも妥当であると考えられる。汚染指標菌の概念が提示された当時の細菌検査技術では、大腸菌を分離同定することは容易ではなかったもので、それに代わる大腸菌群の概念ができた。その後、より糞便汚染の可能性が高いことを示す指標菌である E. coli (糞便系大腸菌群) 試験法が開発されたという歴史的な背景がある。ところが、近年の合成酵素基質法の目覚ましい発展により、大腸菌を簡便・迅速に試験できるようになったので、大腸菌群や E. coli (糞便系大腸菌群) 検査の意味合いが少なくなったと言える。ちなみに日本の水質基準に関する省令(平成5年5月)でも、大腸菌群の検査項目が大腸菌に変更された。これは大腸菌群が大腸菌に比べて、元来的目的である糞便汚染に対する指標性が低いこと、迅速・簡便な大腸菌の試験法(合成酵素基質培地法)が確立されたためである。

ヨーロッパ連合での食品の微生物規格の改正にともない、2006年1月1日から施行された Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on Microbiological Criteria for foodstuffs では、大腸菌群と糞便系大腸菌群による規制が微生物規格から消え、大腸菌と腸内細菌科菌群のいずれかに変更された。この規格は市販食品の安全規格(Food safety criteria)と、HACCP に対応可能な製造工程

での衛生管理規格（Process hygiene criteria）から成り立っている。ほとんどの市販食品の安全規格は、サルモネラやリステリアのような病原菌、ブドウ球菌エンテロトキシン、ヒスタミンで規制されており、汚染指標菌が使用されているのは生食用貝類に対する大腸菌の規格のみである。2006年1月1日以前は、市販製品としての殺菌牛乳、バター、滅菌したソフトチーズ等の乳製品に対して大腸菌群の規制があったが、これら乳製品の微生物規格には腸内細菌科菌群あるいは大腸菌が採用された。生の二枚貝に対する糞便系大腸菌群の規格や、調理済み甲殻類と貝類の *thermotolerant coliforms*（糞便系大腸菌群と同義語）の規格がなくなり、いずれも大腸菌のみの規格になった。

汚染指標菌試験法は、検出される菌を種レベルまで同定するのではなく、菌群レベルでスクリーニング的に検査する方法である。食品の製造現場においては、最終製品、製造加工および保存中における食中毒菌の存在あるいは品質劣化などの衛生学的品質を、間接的ではあっても、より広い範囲で把握できるという利便性も付加されることが期待できる。このような汚染指標菌試験の元来の目的を達成するためには、迅速性や経済性を最優先するという考えは妥当であると思われる。汚染指標菌の簡易・迅速試験法が開発導入されれば、食品製造業では出荷を早めることができるので、保管料の軽減につながることで、規格違反製品を製造工程中でも素早く排除できる経済効果が期待できる。

E. 結論

日本の食品衛生小六法に記載された告示法と通知法、FDA/BAM法およびISO法の汚染指標菌試験法に関する国内外の情報を収集・解析した結果、以下の結論が得られた。

1. FDA/BAM法とヨーロッパのISO法は、培養温度等の細部では異なるが、使用培地を含む試験法の概要は互いに類似した部分が多いことがわかった。
2. 日本の告示法・通知法は、FDA/BAM法やISO法とは特に使用する培地が大きく異なっていた。例えば、日本では大腸菌群数測定用平板培地にはデソキシコレート寒天培地が指定されているが、FDA/BAM法とISO法ではVRBA培地が使用されている。汚染指標菌試験のスタート時に使用する液体培地は、FDA/BAM法とISO法ではLST培地にほぼ一本化されているが、日本ではBGLB培地、BTB加LB培地、EC培地を食品群別に使い分けることになっている。
3. FDA/BAM法には損傷大腸菌群試験法が、ISO法には損傷大腸菌試験法が示されているが、日本の告示法・通知法にはない。
4. ISO法にはFDA/BAM法や日本の告示法・通知法にはない *Enterobacteriaceae*（仮約：腸内細菌科菌群）試験法が記載されている。

5. FDA/BAM 法と ISO 法には酵素基質を利用した迅速培養法も採用されているが、日本では旧来の方法のみしか認められていない。
6. 日本の汚染指標菌試験法は迅速性が乏しいだけでなく、試験法の国際的な調和の視点からも好ましくない状況にあることが明確となった。

F. 参考文献

International Organization for Standard- ization は ISO として記載した。

- 1) ISO 16649-2 (2001) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide.
- 2) ISO 21528-1 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment.
- 3) ISO 21528-2 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony count method.
- 4) ISO 16649-3 (2005) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide..
- 5) ISO 7251 (2005) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique.
- 6) ISO 4831 (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique.
- 7) ISO 4832 (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique.
- 8) EC (European Commission) (2005) Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of European Union.
- 9) American Public Health Association (2004) Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th ed. APHA, Washington, DC.
- 10) American Public Health Association (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. APHA, Washington, DC.
- 11) U.S. Food and Drug Administration (2001) Bacteria Analytical Manual Online <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.htm>

ml.
12) Health Protection Agency (2004)
Enumeration of coliforms and presumptive
Escherichia coli by the Most Probable
Number (MPN) Technique. National
Standard Method.
http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.

13) 厚生労働省生活衛生局 (2006) 食
品衛生小六法、平成 18 年度版、新
日本法規、東京

14) 厚生労働省監修 (2004) 食品衛生
検査指針微生物編、日本食品衛生
協会、東京

G. 研究発表

1. 論文発表

浅尾 努、防菌防黴学雑誌 (2007) 食品の
微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法
—大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌—、
印刷中

表1. 食品別の規格試験法の比較（乳および乳製品）

食品	スタートの培地・培養条件
1 牛乳	
2 殺菌山羊乳	
3 加工乳	
4 成分調整牛乳	
5 低脂肪牛乳	
6 無脂肪牛乳	
7 特別牛乳	培地：BGLB
8 クリーム	培養温度：32～35℃
9 乳飲料	培養時間：24±2時間
10 加糖れん乳	および48±3時間
11 加糖脱脂れん乳	希釈液
12 全粉乳	1～9：規定なし
13 脱脂粉乳	10～19：生理食塩水
14 クリームパウダー	
15 ホエイパウダー	
16 たんぱく質濃縮ホエイパウダー	
17 バターミルクパウダー	
18 加糖粉乳	
19 調整粉乳	

20 バター	
21 バターオイル	
22 プロセスチーズ	培地：デソ寒天
23 濃縮ホエイ	培養温度：32～35℃
24 アイスクリーム	培養時間：20±2時間
25 アイスミルク	希釈液：生理食塩水
26 ラクトアイス	
27 発酵乳	
28 乳酸菌飲料	

表2. 食品別の規格試験法の比較（一般食品）

食品	スタートの培地	希釈液
29 氷菓	デソ寒天	生理食塩水
30 生食用かきの原料生産海域海水 (加工基準)	EC	希釈不要
31 直接食品に接触させて食品を 保存する冰雪（保存基準）	BTB-LB	規定なし
32 冰雪	BTB-LB	
33 清涼飲料水	BTB-LB	
冷凍食品		
34 無加熱摂取	デソ寒天	
35 加熱後摂取（凍結直前加熱）	デソ寒天	
36 生食用冷凍鮮魚介類	デソ寒天	
37 加熱後摂取（凍結直前非加熱）	EC	リン酸緩衝液
38 冷凍ゆでだこ	デソ寒天	
39 冷凍ゆでがに	デソ寒天	
40 生食用かき	EC	
41 粉末清涼飲料	BTB-LB	
42 鯨肉製品	BGLB	
43 魚肉ねり製品	BGLB	
食肉製品		
44 非加熱	EC	ペプトン加生理食塩水
45 特定加熱	EC	
46 包装後加熱	BGLB	
47 殺菌後包装	EC	
48 乾燥	EC	

デソ寒天（デソキシコレート寒天）：35±1.0℃、20±2時間

EC培地：44.5±0.2℃、24±2時間

BTB加LB培地：35±1.0℃、24±2時間および48±3時間

BGLB培地：35±1.0℃、24±2時間および48±3時間

表3 図表、本文中に記載した培地名などの略語

液体培地	
EC	(Escherichia coli)
BGLB	(Brilliant green lactose bile)
LB	(Lactose broth)
EE	(Enterobacteriaceae enrichment)
	またはBufferd brilliant green lactose bile glucose)
MMG	(Minerals Modified glutamate)
BPW	(Bufferd peptone water)
寒天培地	
TBG	(Tryptone bile glucuronic)
EMB	(Eosin methylene blue)
VRBA	(Violet red bile agar)
VRBG	(Violet red bile glucose)
TSA	(Tryptic soy agar)
酵素基質	
BCIG	(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-gluculonic acid)
	またはX-GLUC
MUG	(4-methylumbeliferyl-beta-D-glucuronide)

表4 計算方法の違いによる生菌数の差異

試料 番号	各希釈の集落数		希釈率を考慮した 集落数の比	小六法 (A)	ISO、BAM (B)	A/B
	1:10	1:100				
1	300	30	1:01	3.0×10^3	3.0×10^3	1
2	235	31	1:1.3	2.7×10^3	2.4×10^3	1.13
3	290	52	1:1.8	4.1×10^3	3.4×10^3	1.21
4	300	60	1:2	4.5×10^3	3.3×10^3	1.36
5	150	30	1:2	2.3×10^3	1.6×10^3	1.43

有効な集落測定範囲を30~300/平板とする

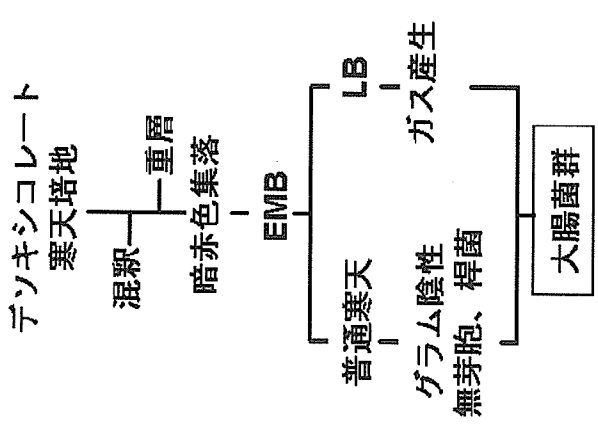


図2 日本の大腸菌群試験法の概略図(平板法)

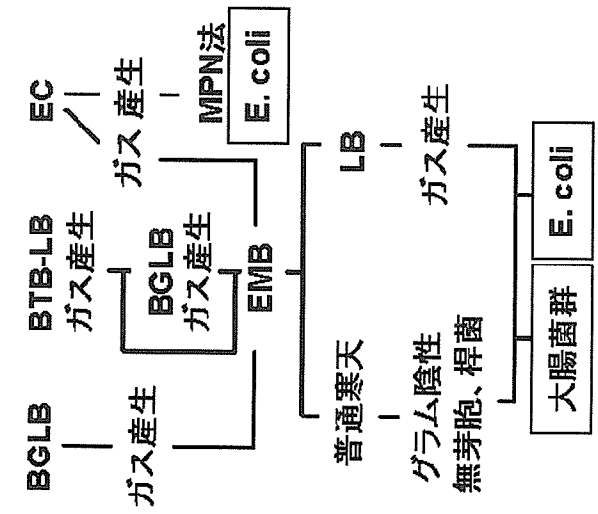


図1 日本の汚染指標菌試験法の概略図 液体培地法)

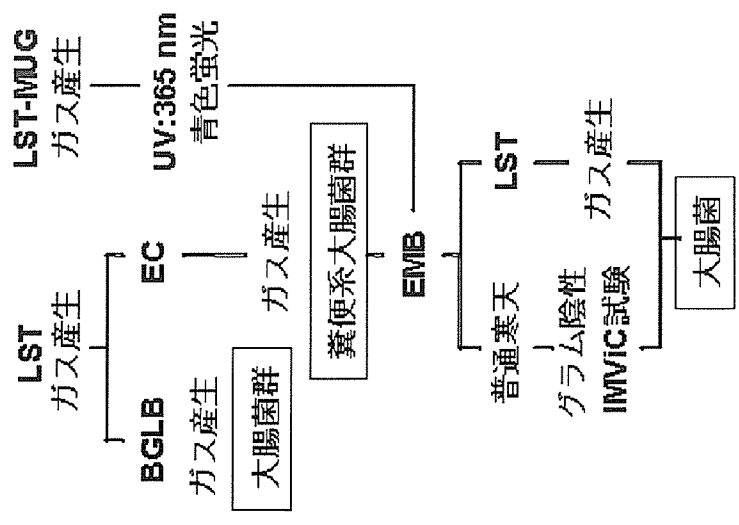


図3 FDA/BAMの汚染指標菌試験法の概略図 (MPN法)

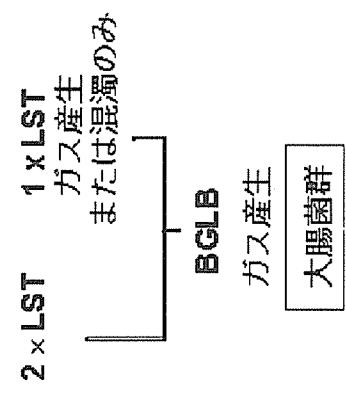


図4 ISOの大腸菌群試験法の概略図 (MPN法)

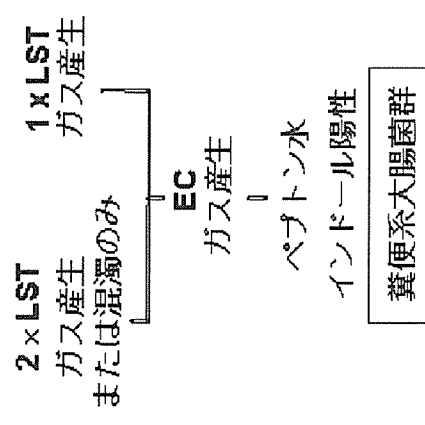


図5 ISOの糞便系大腸菌群試験法の概略図 (MPN法)

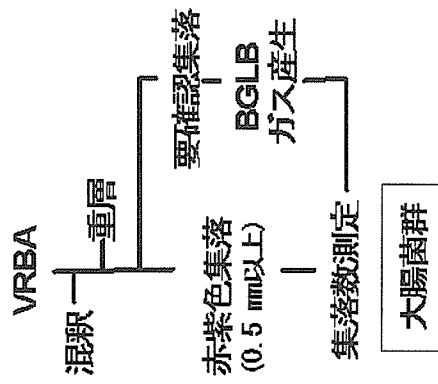


図6 ISOの大腸菌群試験法の概略図(平板法)

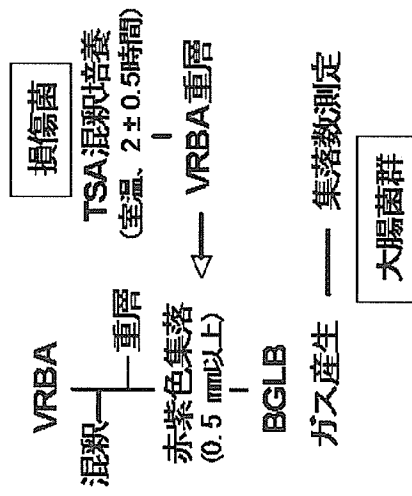
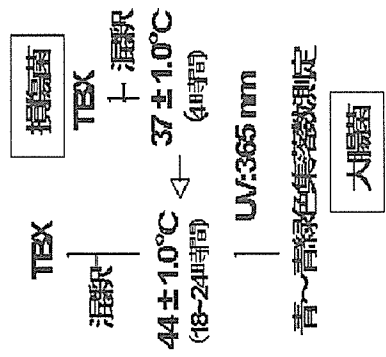
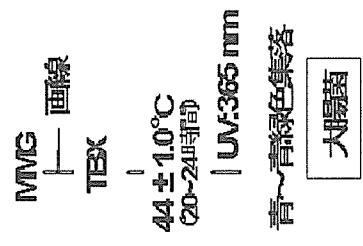


図7 FDA/BAMの大腸菌群試験法の概略図(平板法)



図B ISO のDE coli 計数法
 標本図 (平板法)



図D ISO のDE coli 計数法
 標本図 (MPN法)

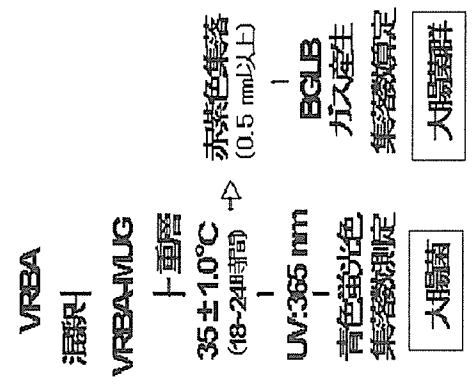


図10 FDA/BAM のE coli 計数法
 標本図 (平板法)

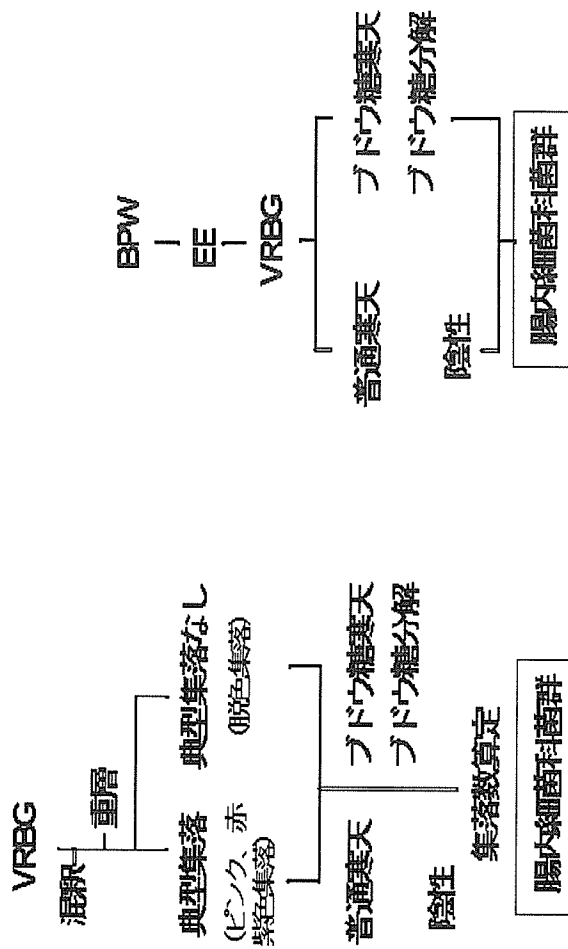


図11 ISOの腸内細菌科菌群
試験法概略図(平板法)

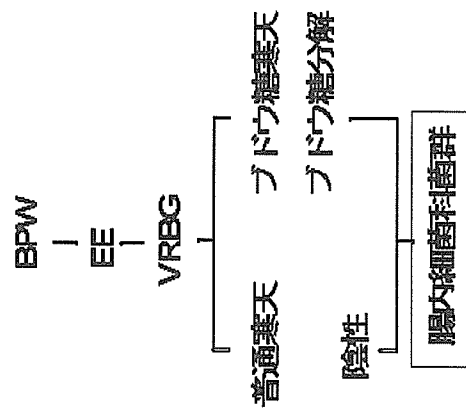


図12 ISOの腸内細菌科菌群
試験法概略図(MPN法)

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

ΣC: 各平板の集落数の合計

n₁: 低希釈の算定対象ペトリ皿数

n₂: 高希釈の算定対象ペトリ皿数

d: 希釈が低いほうの希釈倍率

V: ペトリ皿への接種量 (ml)

図13 菌数の計算式

食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究

一般生菌数や汚染指標細菌などを標的とした迅速法の検討

分担研究者 木村 凡 東京海洋大学 海洋科学部

研究協力者 浅尾 努 大阪府立公衆衛生研究所感染症部

高橋 肇 山脇学園短期大学

研究要旨

国内で市販されている一般生菌数や汚染指標細菌などを標的とした迅速法の実態調査を行った。また、これら迅速法の客観的な評価法に関する基礎情報をAOACによる評価法等を参考に収集し、今後、これらの方法を評価するために必要な項目の予備整理を行った。その上で、わが国の迅速キット評価に必須な項目の優先順位等について、今後の検討事項の抽出を行った。また、大腸菌の迅速判別手法を用いた評価試験を通じて、平成19年度以降の大腸菌および大腸菌群の迅速キットおよび装置の評価試験（コラボスタディー）へ向けての予備実験を実施した。

A. 研究目的

「食の安全」への要望が高まる中、食品微生物分野における検査技術および迅速性の向上が社会的に強く期待されている。食の安全性確保には、食品製造現場の作業工程において、病原微生物の管理が正当に行われているかを評価することが最も重要な課題の一つであるため、食品や環境中の一般生菌数測定や汚染指標菌の検出を行う必要がある。従来的一般生菌数や汚染指標細菌検査法では、信頼性の高い結果が得られるが、培養時間が必要なため、結果の判定までに長時間（24～48時間）を要するという問題点があった。

一方、食品微生物の検査技術は日進月歩であり、迅速性のニーズから、現在、わが

国の市場へさまざまな迅速測定キットや装置が開発され、供給され始めている。これらの迅速キットや装置を活用することで、検査機器に費やされる設備コストと、その使用に求められる専門的な学習時間を大幅に低減することができ、わが国の「食の安全」を促進することができるものと考えられる。

本研究ではこのような日常検査における食品の安全性を確保するための迅速・簡易検査法はどうあるべきか、満たすべき要件とその性能等について検討し、培養による“標準検査法”を尺度とした検査精度の評価システムの構築を試み、異なる仕様で開発され使用されている迅速検査法の評価を行うことの出来る環境を整備することを

目的とした。

B. 研究方法

1. 迅速法の実態調査

インターネット検索、メーカーからの情報、ならびに商業誌に記載された最近の総説等から、食品や環境中の一般生菌数測定や汚染指標菌の検出・定量キットや装置に関する情報を収集した。

2. 迅速法評価法に関する基礎情報収集

迅速法の客観的な評価法に関する基礎情報をAOACによる評価法等を参考に収集し、今後、これらの方法を評価するために必要な項目の予備整理を行った。

3. 国内評価法へむけての課題検討事項整理

上記調査結果を踏まえて、わが国の迅速キット評価に必須な項目の優先順位等の検討を行なった。

4. 次年度コラボ実験へ向けての予備実験

平成19年度は、バリデーションプログラムの設定（プロトタイプ）を行ない、申請企業、コラボラボ、レビュワー者でのバリデーションプロセスのロールプレイを通じて、問題点の洗い出しを予定している（図1）。そこで、平成18年度はそのための予備実験として、東京海洋大学食品微生物学研究室で開発した大腸菌の迅速判別法（コロニーダイレクトTaqMan PCR法）による迅速法鑑別法について、予備的に評価実験を実施した。

4.1 供試菌株

各種鑑別培地にコロニーを形成した *E.*

coli の本法の識別能について、腸内細菌科の細菌10種58株を直接試料としてTaqMan PCRに供試した。プライマー及びプローブは、*E. coli* が特異的に持つ *uid A* 遺伝子を標的としたものを用いた。

4.2. 判定法の性能評価

Salmonella Typhimurium, *Serratia marcescens* と *E. coli* 3株の前培養液を段階的に希釈後、混合し、各大腸菌鑑別培地に塗抹後37℃で培養した。その後、各種鑑別培地上に形成した *E. coli* の典型コロニーを10コロニー、同様にTaqMan PCRに供試し、共雑菌存在下における *E. coli* の判定を行った。

C. 結果

1. 迅速法の実態調査

現在国内に流通している市販キットや装置の主なものについて表1にまとめた。大別すると、概ね次の3群に分けられる。(A)コロニー計数法の自動化など、作業時間を短縮、効率化するもの (B)培養時間を短縮するもの (C)結果の判定を容易にするもの。概して、トータルの検査時間や培養時間の大幅な短縮には至っていないものも多いが、これらのキットや装置の導入により大幅な労力の削減が期待できるものが多い。

また、直接微生物数を計測する方法ではないが、食品製造工場等でのラインの清浄度のモニタリング手法としてのATP測定、その他のふき取りキットや装置等についても表2にまとめた。

2. 迅速法評価法に関する基礎情報収集

AOAC法を中心に評価法の調査を行い、わ