

Table 2. Biochemical and virulence-associated characteristics of minor serogroup STEC isolated from human in Osaka Prefecture

Serotype	Number of strains	Biochemical characteristics <sup>a)</sup>						Toxin type(s)		<i>eae</i>	Intimin type	Hemolytic activity <sup>b)</sup>	<i>ehxA</i>
		LDC	Gas	GUR	Rhamnose	Sorbitol	Xylose	RPLA	PCR-RFLP				
O28:H20	1	+ <sup>c)</sup>	+	+	+	+	+	2	2+2c	-		+	+
O63:H6	4	+	+	+	+	-	+	2	2f	+	$\alpha$	-	-
O65:NM <sup>d)</sup>	5	+	-	(+)	(+)	+	+	1+2	1+2	+	$\beta$	+	+
O91:H14	1	+	+	+	+	+	+	1	1	-		+	+
O103:H2	6	+	+	+	d	+	+	1	1	+	$\epsilon$	+	+
O103:H11	1	+	+	+	-	+	+	1	1	+	$\beta$	+	+
O119:H4	1	+	+	+	+	+	-	1	1	-		-	-
O119:[H25] <sup>e)</sup>	3	-	+	+	+	-	(+)	1	1	+	$\zeta$	+	+
O121:H19	4	+	+	+	+	+	d	2	2	+	$\epsilon$	+	+
O126:H8	1	+	+	+	+	+	+	1	1	-		-	-
O165:[HUT] <sup>f)</sup>	5	-	-	+	-	d	-	2	2+2c, 2 <sup>g)</sup>	+	$\epsilon$	-	+
O177:[HUT]	1	-	-	+	-	-	+	2	2	+	$\epsilon$	-	+
OUT <sup>h)</sup> :H2	1	+	+	+	+	+	+	1	1	-		+	+
OUT:H14	1	+	+	+	+	-	+	1	1	-		-	+
OUT:H25	1	-	+	+	+	-	+	1	1	+	$\zeta$	+	+
OUT:[HUT]	1	-	-	+	-	+	+	2	2+2c	+	$\epsilon$	-	+

a) LDC; lysine decarboxylase, Gas; gas production from glucose, GUR;  $\beta$ -glucuronidase.

b) Enterohemolytic activity observed on enterohemolysin agar plate only.

c) +; positive within 1 day, (+); positive after 2days, -; no reaction in 3days, d; different reactions.

d) Nonmotile and negative in the *fliC*-specific PCR.

e) An H type in brackets indicates the presence of non-motile (NM) strains, which were analysed for their *fliC* type by PCR-RFLP.

f) HUT means untypeable with PCR-RFLP of *fliC*.

g) Three isolates have *stx2* and *stx2c*. Two isolates have only *stx2*.

h) OUT means untypeable with antisera specific for O1 to O181.

**Growth on CT-SMAC and MIC of potassium tellurite:** In 11 strains of 7 serotypes (O28:H20, O91:H14, O126:H8, O165:[HUT], O177:[HUT], OUT:H2, and OUT:[HUT]), there were few colonies on CT-SMAC that was used as a selective agar plate for STEC O157. MICs of potassium tellurite for these strains were shown to be below 1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Table 3).

**Antimicrobial resistance:** Antimicrobial resistance patterns are shown in Table 4. Fifteen (40.5%) of the strains showed resistance to one or more antibiotics. The 5 strains belonging to serotype O65:NM that were isolated from 2 individual families showed identical resistance patterns. On the other hand, in one family case, the strain O103:H2 isolated from a patient showed multiple resistance, but the other strains from the family members were susceptible. There were no strains resistant to fosfomycin or ciprofloxacin (Table 4).

**PFGE:** A dendrogram of the *Xba*I digest pattern is shown in Fig. 1 for discrimination of the strains within the same serotype isolated from independent cases. The strains isolated from family cases were closely related (96% to 100% similarity) within the respective family. In the cluster of O65:NM the similarity of the strains isolated from Family B and Family C was 97%. In sporadic cases, the two O121:H19 strains isolated in 2003 showed the identical PFGE profile, and the two O63:H6 strains isolated in 2003 and 2004 showed 97% similarity as high as the strains of Family D. In the cluster of O165:[HUT], five strains were heterogeneous but three strains isolated in 2006 were related

Table 3. Growth on CT-SMAC and MIC of potassium tellurite of minor serogroup STEC isolates

Growth on CT-SMAC	Serotype	Number of strains	MIC of potassium tellurite (mg/ml)
+	O63:H6	4	5
	O65:NM	5	>20
	O103:H2	6	>20
	O103:H11	1	>20
	O119:H4	1	5
	O119:[H25] <sup>a)</sup>	3	>20
	O121:H19	4	5
	OUT <sup>b)</sup> :H14	1	5
	OUT:H25	1	>20
-	O28:H20	1	$\leq 1.25$
	O91:H14	1	$\leq 1.25$
	O126:H8	1	$\leq 1.25$
	O165:[HUT] <sup>c)</sup>	5	$\leq 1.25$
	O177:[HUT]	1	$\leq 1.25$
	OUT:H2	1	$\leq 1.25$
	OUT:[HUT]	1	$\leq 1.25$

a) An H type in brackets indicates the presence of non-motile (NM) strains, which were analysed for their *fliC* type by PCR-RFLP.

b) OUT means untypeable with antisera specific for O1 to O181.

c) HUT means untypeable with PCR-RFLP of *fliC*.

(93% similarity). The strains with the identical patterns by *Xba*I digestion revealed also high similarity by *Bln*I digestion (data not shown).

Table 4. Antimicrobial resistance pattern of minor serogroup STEC isolates

Resistance pattern <sup>a)</sup>	Number of strains	Serotype
SM, TC, CP	1	O103:H2
SM, TC, KM	1	O119:H4
ABPC, SM	1	O103:H11
SM, KM	1	O103:H2
SM, TC	6	O65:NM(5) <sup>b</sup> , O165:[HUT] <sup>c)</sup>
TC, CP	1	O165:[HUT]
CP	2	O121:H19, OUT <sup>d)</sup> :[HUT]
SM	1	O165:[HUT]
TC	1	O126:H8
Total	15 (40.5%)	

a) SM; streptomycin, TC; tetracycline, CP; chloramphenicol, KM; kanamycin, ABPC; ampicillin.

b) Number in parentheses are number of isolates.

c) HUT in brackets means untypeable with PCR-RFLP of *fliC* of non-motile strains.

d) OUT means untypeable with antisera specific for O1 to O181.

## DISCUSSION

Reports of STEC isolation from PHIs to IDSC have totalled 12,477 since 2000. Although O157 was the predominant serogroup, over 100 strains belonging to serogroups O103 or O121 that were untypeable with commercially available antisera until August 2005 were isolated [20]. In Osaka Prefecture, STEC O103 and STEC O121 were sometimes isolated, but the STEC identified as rare serogroups such as O65, O165, and O177, were found among clinical isolates. O177 is a new serogroup that was designated in 2004 [38]. The earliest clinical isolate of serotype O177:NM was *stx2*, *eae*, and *ehxA* positive and was provided from CDC in USA in 1998. The first STEC O177 isolate in Osaka Prefecture was isolated from a girl (4-years-old) who complicated with HUS following bloody diarrhea in July 2003, and it was also *stx2*, *eae*, and *ehxA* positive. Another O177 was isolated from a HUS patient (2-years-old) living in Osaka City in same month, but these two isolates showed different PFGE patterns [40]. Since the 5 isolates of STEC O65:NM used in this study were only reported to IDSC, they were isolated from five individuals of two families eating together at a *yaki-niku* restaurant. STEC O65:NM strains were isolated from swine feces in North America [9, 12]. The strains from humans in Osaka Prefecture were widely different from swine isolates, because the human isolates had *stx1*, *stx2*, and *eae* (intimin  $\beta$ ) although most of swine isolates were *stx2e* positive [12], and *eae* negative [25]. STEC O165:[HUT] was isolated from two children in 1998 and 2001 who presented complicated HUS and three children in 2006 who presented diarrhea or bloody diarrhea. It became easier to detect *E. coli* O165 because seven antiserum, including O165 antiserum, came onto the market in August in 2005. STEC belonging to serotypes O165:NM, O165:H19, and O165:H25 were isolated in Europe and Australia [13, 37]. The PCR-RFLP

patterns of *fliC* of STEC O165 isolated in Osaka Prefecture was identical to the patterns of neither H19 nor H25, whereas they were the same with those of O177 and OUT isolated from HUS patients. It is of interest whether any strain of nonmotile STEC reported to IDSC shows the same pattern. Although ten isolations of STEC O63:H6 were reported from 2000 to 2006 in Japan, there are no reports of isolation of O63 from other countries [37]. The four O63:H6 strains in Osaka Prefecture produced *Stx2*, and had *stx2f* and intimin  $\alpha$  genes. STEC O128 strains harboring *stx2f* were isolated from pigeons and infant patients [14, 21, 39]. In addition, intimin  $\alpha$  was found frequently in enteropathogenic *E. coli* (EPEC) [33] and it was detected in only two STEC O177:H7 isolates in Germany [5]. In this study, we isolated and characterized the unique STEC O63:H6 harboring the *stx2f* and intimin  $\alpha$  genes.

It is probable that rhamnose, sorbitol, or xylose can be used as a discriminative marker, because 80% of *E. coli* fermented these carbohydrates [11]. The serotypes O63:H6, O119:[H25], OUT:H14, OUT:H25, and O103:H11 can be detected on CT-SMAC or CT-RMAC used as selective medium for STEC O157 or STEC O26, because they were sorbitol- or rhamnose-negative and resistant to potassium tellurite. We attempted to prepare medium without potassium tellurite to detect STEC O165:[HUT], O177:[HUT], and OUT:[HUT] that did not ferment sorbitol and/or rhamnose, because these serotypes were susceptible to the compound. Since it is impossible to detect all minor serogroup STEC by using one media, we should pick up sorbitol-fermenting colonies on CT-SMAC, and use the medium without CT supplements, for example desoxycholate-hydrogen sulfide-lactose (DHL). When public health agencies investigate follow-up cultures, MacConkey agar base (Becton, Dickinson and Company) and DHL agar base (Nihon Pharmaceutical, Osaka, Japan) supplemented with a discriminative carbohydrate are useful. It is widely known that enteroinvasive *E. coli* reveal characteristics similar to *Shigella*. Since some of the minor serogroup STEC produced a negative reaction for lysine decarboxylase and gas production from glucose, we performed Stx examination of the atypical *E. coli*.

It was reported previously that enterohemolysin agar plates were useful as screening media for detection of non-O157 STEC [4]. In this study the serogroups O103 and O121 that were reported to IDSC frequently showed enterohemolytic activity, but 14 strains of 7 serotypes including isolates from HUS patients were negative. In addition, *ehxA* was not associated with disease severity [10], so that it is suggested that enterohemolysin agar plates are not suitable to detect minor serogroup STEC.

The National Veterinary Assay Laboratory reported that antimicrobial resistance was more frequent in serogroups O26 and O145 than serogroup O157 among bovine STEC strains [25]. Similar results were found in our study, where the resistance rate to antibiotics of minor serogroup STEC (40.5%) was higher than STEC O157 (10.8%) isolated in Osaka Prefecture in 2006. Although there were no strains

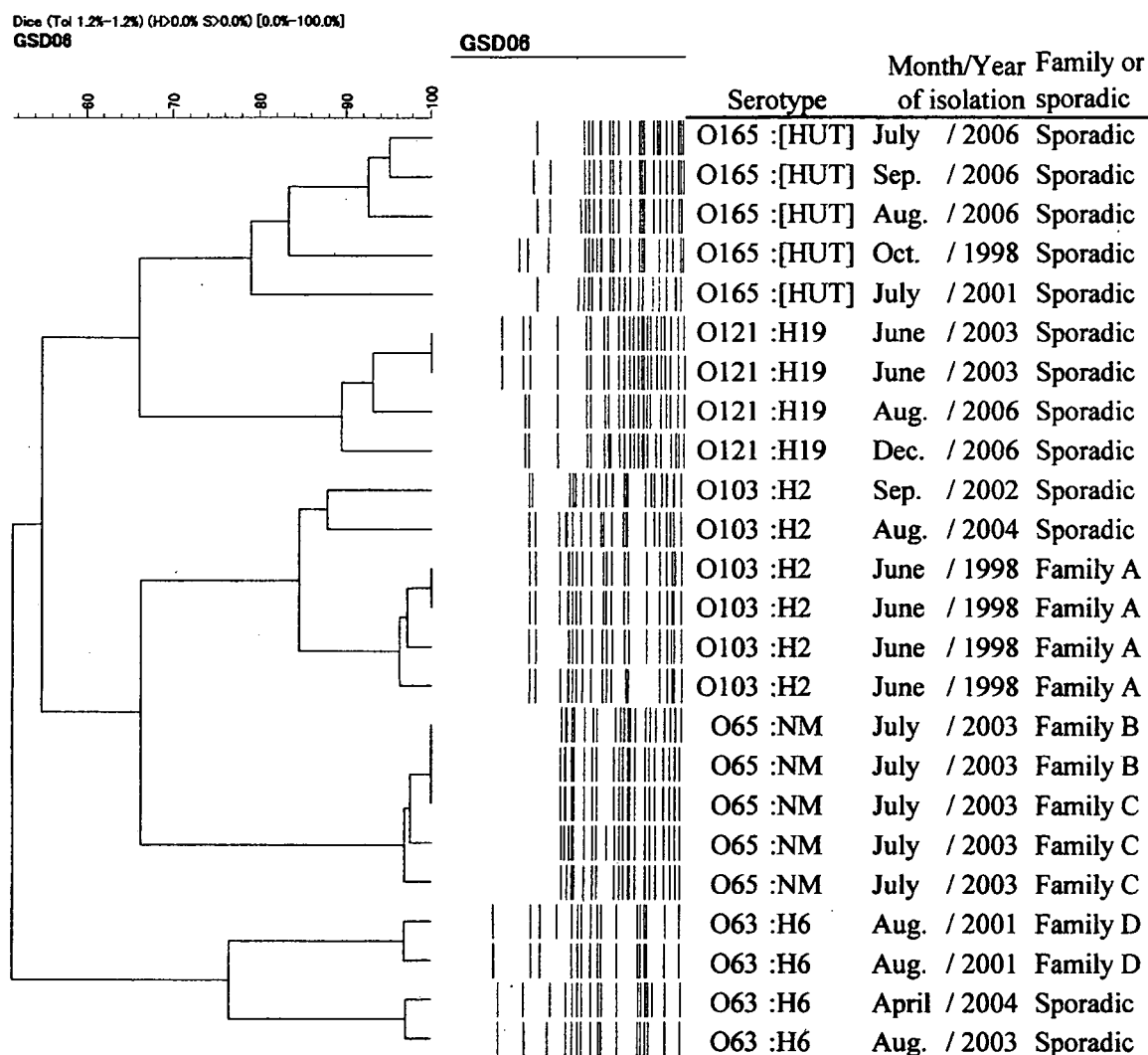


Fig. 1. Dendrogram of *Xba*I-digested PFGE profiles of STEC O63:H6, O65:NM, O103:H2, O121:H19, and O165:[HUT] strains. Fingerprinting II Version 3 (Bio-Rad Laboratories) was used for calculating the Dice similarity indices (tolerance 1.2%, unweighted pair group method using arithmetic averages) in the cluster analysis. The serotype of the strain, month and year of isolation, and whether the strain was isolated from a family case or sporadic case was indicated on the right.

resistant to the drugs for therapy of STEC infection, an outbreak due to multiple-drug resistant O26:H11 and the isolation of O26:H11 producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase have been reported in Japan [17, 27], so that the careful monitoring of antimicrobial resistance of minor serogroup STEC should be continued.

PFGE analysis revealed that all of the O65:NM strains isolated from Family B and Family C were closely related, which confirmed epidemiologically and genotypically that they had been exposed to the same infectious source. In sporadic cases, the PFGE profiles of some strains suggested a genomic relationship, but there was no epidemiological information to support these relationships. Since high

diversity was shown in O63:H6, O103:H2, and O165:[HUT], the PFGE profiles of these strains should be compared with the strains of the domestic PFGE network.

An epidemiological study for 6 years in Denmark indicated that risk factors for HUS were the combined presence of *stx2* and *eae* rather than serogroup O157 [10]. The present study shows that the strains isolated from HUS patients were harboring both *stx2* and *eae*. Ten of 13 strains isolated from asymptomatic carriers were Stx1-positive and Stx2-negative, whereas 10 of 14 strains isolated from patients with bloody diarrhea produced Stx2, supporting the previous reports that Stx2 was associated with severity of disease [7, 10].

The current methods for the detection of STEC have been developed to isolate serogroups O157 and O26. We should consider that some of minor serogroup STEC strains present atypical phenotypes and form no colonies on CT-SMAC. In addition, only 50 serogroups are typeable with commercially available antiserum, while there are over 130 serogroups reported as STEC [37]. Our results indicate that it is important to examine Stx production of all isolates on selective agar plates with and without CT supplement for the detection of various serogroups of STEC.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We are grateful to Dr. Sunao Iyoda, Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases (Japan), for typing of the strains untypeable with commercially available diagnostic *E. coli* antiserum. We also thank Dr. Teizo Tsukamoto for his helpful advice, and all of the investigators throughout Osaka Prefecture for providing us with samples and information. The PFGE standard strain *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 was obtained from PulseNet program, Enteric Diseases Laboratory Branch, Centers for Disease Control and Prevention, USA through National Institute of Infectious Diseases (Japan). This study was supported by a grant-in-aid from Ministry of Health, Labour, and Welfare for Research on Emerging and Re-emerging infectious Diseases (H18-Shinkou-Ippan-16).

#### REFERENCES

1. Akiba, Y., Kimura, T., Takagi, M., Akimoto, T., Mitsui, Y., Ogasawara, Y. and Omichi, M. 2005. Outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O121 among school children exposed to cattle in a ranch for public education on dairy farming. *Jpn. J. Infect. Dis.* **58**: 190–192.
2. Bastian, S. N., Carle, I. and Grimont, F. 1998. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **149**: 457–472.
3. Belongia, E. A., Osterholm, M. T., Soler, J. T., Ammend, D. A., Braun, J. E., MacDonald, K. L. 1993. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *JAMA* **269**: 883–888.
4. Beutin, L., Zimmermann, S. and Gleier, K. 1996. Rapid detection and isolation of a Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2812–2814.
5. Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S. and Gleier, K. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1099–1108.
6. Beutin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S. and Stephan, R. 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strain of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2559–2564.
7. Boerlin, P., McEwen, S. A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J. B., Johnson, R. P. and Gyles, C. L. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 497–503.
8. Centers for Disease Control and Prevention. 2001. University outbreak of calicivirus infection mistakenly attributed to shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 - Virginia. 2000. *MMWR* **50**: 489–491.
9. DesRosiers, A., Fairbrother, J. M., Johnson, R. P., Desautels, C., Letellier, A. and Quessey, S. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* verotoxin-producing isolates from human and pigs. *J. Food Prot.* **64**: 1904–1911.
10. Ethelberg, S., Olsen, K. E. P., Scheutz, F., Jensen, C., Schiellerup, P., Enberg, J., Petersen, A. M., Olsen, B., Gerner-Smidt, P. and Molbak, K. 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 842–847.
11. Ewing, W. H. 1986. The Genus *Escherichia*. pp. 93–134. In: Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. (Ewing, W. H. and Edwards, P. R. eds.), Elsevier Science Publishing, New York.
12. Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Bush, E. J. and Solow, B. T. 2004. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the national animal health monitoring system's swine 2000 study. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7173–7178.
13. Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczus, T., Ammon, A. and Karch, H. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and associated with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* **185**: 74–84.
14. Gannon, V. P., Teerling, C., Marsi, S. A. and Gyles, C. L. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1125–1135.
15. Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verwey, H. M. and Zimmerhackl, L. B. 2002. Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997–2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J. Infect. Dis.* **186**: 493–500.
16. Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M. and Miyazaki, Y. 2002. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 922–925.
17. Hiruta, N., Murase, T. and Okamura, N. 2000. An outbreak of diarrhoea due to multiple antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 in a nursery. *Epidemiol. Infect.* **127**: 221–227.
18. Holland, J. L., Louie, L., Simor, A. E. and Louie, M. 2000. PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4108–4113.
19. Hunter, S. B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M. A., Van Duyne, M. S., Kubota, K., Graves, L., Wringley, D., Barrett, T. and Ribot, E. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 1045–1050.
20. Infectious Disease Surveillance Center [database on the Internet]. Japan: Isolation of bacteria in the past years. [updated 2007 Jan 28; cited 2007 Feb 10]. Available from: <http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/pbacteria-e.html>
21. Isobe, J., Kimata K., Shimojima, M., Hosorogi, S., Tanaka, D. and Gyobu, Y. 2004. Isolation of *Escherichia coli* O128:HNM harboring *stx2f* genes from diarrhea patients. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* **78**: 1000–1005 (in Japanese).
22. Jorgensen, J. H. and Turnidge, J.D. 2003. Susceptibility test

- methods: dilution and disk diffusion methods. pp. 1108–1127. *In: Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. (Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C. and Tenover, R. H. eds.), ASM Press, Washington, DC.
23. Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M. and Schmidt, H. 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **34**: 229–243.
  24. Kehl, K. S., Havens, P., Behnke, C. E., Acheson, D. W. K. 1997. Evaluation of the Premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2051–2054.
  25. Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Kojima, A., Morioka, A., Nagata, R., Kawanishi, M., Nakazawa, M., Tamura, Y. and Takahashi, T. 2005. A national surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food-producing animals in Japan. *J. Vet. Med.* **B52**: 230–237.
  26. Kobayashi, K., Seto, K., Yatsuyanagi, J., Saito, S., Terao, M., Kaneko, M., Serizawa, T., Kuramoto, S., Fujisawa, T., Suzuki, R., Yamazaki, M., Hayashi, K., Matsune, W., Yasuoka, T., Horikawa, K., Murakami, K., Kawano, K., Yamada, T. and Ito, K. 2002. Presence of the genes regarding adherence factors of *Escherichia coli* isolates and a consideration of the procedure for detection of diarrheagenic strain. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* **76**: 911–920 (in Japanese).
  27. Kon, M., Kurazono, T., Ohshima, M., Yamaguchi, M., Morita, K., Watanabe, N., Kanamori, M. and Matsushita, S. 2005. Cefotaxime-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 isolated from a patient with diarrhea. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* **79**: 161–168 (in Japanese).
  28. Machado, J., Grimont, F. and Grimont, P. A. 2000. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res. Microbiol.* **151**: 535–546.
  29. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 7th ed. NCCLS Document M2-A7, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.
  30. NIID (National Institute of Infectious Diseases) and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. 2006. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of May 2006. *Infect. Agents Surv. Rep.* **27**: 141–143.
  31. NIID (National Institute of Infectious Diseases) and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. 2000. The status of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan, 1998–March 2000. *Infect. Agents Surv. Rep.* **21**: 92–93.
  32. Orskov, F. and Orskov, I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. pp. 43–112. *In: Methods Microbiol.* Vol. 14 (Bergan, T. ed.), Academic Press, London.
  33. Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O. and Caprioli, A. 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* **68**: 64–71.
  34. Park, C. H., Kim, H. J., Hixon, D. L. and Bubert, A. 2003. Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of shiga toxins in cultures of human stools. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2650–2653.
  35. Paton, A. W. and Paton, J. C. 1998. Detection and characterization Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb<sub>O111</sub>*, and *rfb<sub>O157</sub>*. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 598–602.
  36. Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M. and Swerdlow, D. L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 603–609.
  37. Scheutz, F. and Strockbine, N. A. 2005. Genus I. *Escherichia*. pp. 607–624. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2, Part B (Garrity, G. M., Brenner, D. J., Kreis, N. R. and Staley, J. T. eds.), Springer-Verlag, New York.
  38. Scheutz, F., Cheasty, T., Woodward, D. and Smith, H. R. 2004. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180, O181. *APMIS* **112**: 569–584.
  39. Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. H. and Karch, H. 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1205–1208.
  40. Takahara, T., Iyoda, S., Asada, J., Mizumoto, H., Uematsu, A., Hata, A., Watanabe, H., Tamura, K. and Hata, D. 2005. A case of haemolytic uremic syndrome preceded by only one day of mild diarrhea without bloody stool due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O177:NM. *J. Jpn. Pediatr. Soc.* **109**: 54–57 (in Japanese).
  41. Tanaka, H., Yatsuyanagi, J., Uchimura, M., Saito, M., Kobayashi, K., Horikawa, K. and Mori, R. 1999. Evaluation of sorbose MacConkey medium containing cefixime and tellurite for isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111. *J. Jpn. Clin. Microbiol.* **9**: 48–50 (in Japanese).
  42. Terajima, J., Izumiya, H., Wada, A., Tamura, K. and Watanabe, H. 1999. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 301–302.
  43. Terajima, J., Izumiya, H. and Watanabe, H. 2004. Identification in bacterial strain levels: subtyping of enteric bacterium by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Intest. Microbiol.* **18**: 117–122 (in Japanese).
  44. Zhang, W.L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S. and Schmidt, H. 2002. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4486–4492.

# 講座

## 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法<sup>②</sup>

### 大腸菌群, 糞便系大腸菌群, 大腸菌

浅尾 努

#### 〈掲載予定内容, 著者, 掲載巻号〉

- 1. 細菌数 佐藤 善博 (35-5)
- 2. 大腸菌群, 糞便系大腸菌群, 大腸菌 浅尾 努 (35-6)
- 3. 腸球菌 石崎 直人・金子 誠二
- 4. 芽胞形成菌 石村 勝之
- 5. 病原性大腸菌 (下痢原性大腸菌) 甲斐 明美
- 6. サルモネラ 塚本 定三・宮原美知子
- 7. エルシニア 金子 誠二
- 8. 腸炎ビブリオおよびその類縁菌 沖津 忠行
- 9. カンピロバクター 横山 敬子
- 10. 黄色ブドウ球菌 尾上 洋一
- 11. リステリア 仲真 晶子
- 12. セレウス菌 上田 成子
- 13. ボツリヌス菌 林 賢一
- 14. ウェルシュ菌 門間 千枝
- 15. 赤痢菌 小沼 博隆
- 16. チフス菌・パラチフスA菌 内村真佐子・依田 清江
- 17. コレラ菌および *Vibrio cholerae* O139 五十君 静信
- 18. 低温細菌 平井 昭彦
- 19. 乳酸菌 金子 精一
- 20. 食中毒発生時の暴露時点推定と  
マスターテーブルによる原因食品の追及 金子 精一
- 21. 食中毒事例を集めたデータベースからする  
病因物質, 原因食品, 原因施設などの推定 高橋 正弘

(注) 本講座は, 納期以降のものについては受付順に掲載する。

#### 1. はじめに

食品の細菌学的な安全性を評価するもっとも確実な方法は, 当該食品に関係する食中毒菌を直接検査することである。しかし, すべての食中毒菌を検査対象にするのは, 経済的, 時間的, 技術的な制約のために現実的には不可能である。食中毒菌のうちで, 赤痢菌, コレラ菌, サルモネラなどの腸管系食中毒菌と由来や挙動を共にする可能性が高いとされる菌群は, 衛生指標菌あるいは汚染指標菌と呼ばれている。衛生指標菌の代表として大腸菌群 (coliforms), 糞便系大腸菌群 (fecal coliforms), 大腸菌 (*Escherichia coli*) があり, いずれも食品の衛生的な取り扱いの良否や, 食品への腸管系食中毒菌汚染の有無を推定するためのツールとして世界的に広く利用されている。わが国でも, 衛生指標菌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。

本稿では, まず衛生指標菌試験法に関する日本の現状や問題点などについて説明する。次に試験法の国際的な調和が求められている現状に即して, 日本の告示法・通知法とともに, 米国FDA/BAM (Bacterial Analytical Manual) 法やISO (International Organization for Standardization) 法などの衛生指標菌試験法の概要を紹介する。なお実際の手技については食品衛生検査指針などの成書に譲ることとした。

## 2. 日本の衛生指標菌試験法の現状と問題点

食品衛生法には乳等省令の28種類の食品（表1）と、それ以外の18種類の一般食品（表2）に対して、大腸菌群陰性あるいは E. coli 陰性（一部で MPN 限界値や菌数限界値）の成分規格が定められている。食品の規格基準への適否の判定は、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（いわゆる乳等省令）、氷雪の成分規格、冷凍食品の成分規格に記載された試験法などに従わなければならない。しかし、これらの試験法は長年改訂されていないために、国際的な趨勢から取り残された感は否めない。国内的にも、既存の衛生指標菌試験法が見直されないままに新たな試験法が告示・通知されてきた弊害により、例えば以下のような問題点が生じている。

- ①食品の希釈液が統一されていない。告示された時期が古い試験法では希釈液に生理食塩水が指定されたが、その後はリン酸緩衝液になり、最近ではペプトン加生理食塩水へと変遷してきた（表1、表2）。ペプトンは食品中の損傷菌の回復に効果があるといわれている。
- ②培養温度の表示方法が統一されていない。告示時期の新しい一般食品では、35±1℃の厳密な培養条件が設定されているが、告示時期の古い乳等省令関連の食品に対しては、32～35℃と幅のある培養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±1℃あるいは32±1℃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25g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

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 保存する氷雪(保存基準)	BTB-LB	
32 氷雪	BTB-LB	規定なし
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

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10gに希釈液を90ml加えるが、他の食品では希釈液を加えて100ml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、25gの検体に225ml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の衛生指標菌試験法では、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。[参考1]に乳糖分解により酸とガスが産生される機序を示した。

以上のように、日本の衛生指標菌試験法 (告示法) には実効性に欠ける記述があるだけでなく、試験法の国内的な調和すらとられていないことも明白である。一貫性のない試験法は検査員に無用のストレスを与え、結果として検査ミスを誘発する要因にもなりかねない。

### 3. 衛生指標菌名の混乱

日本の食品衛生法では、腸管系病原菌に対する衛生指標菌として、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

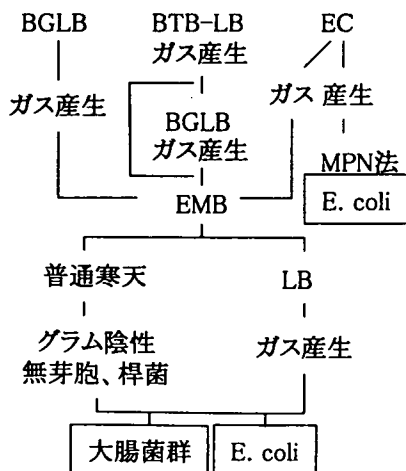


図1. 日本の汚染指標菌試験法の概略図 (液体培地法)



thermotrophic coliforms がより相応しいとの考え方もある。

#### 4. 日本の告示法・通知法, FDA/BAM, ISO の衛生指標菌試験法の比較

日本のほとんどの衛生指標菌試験法では、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。

##### 4-1. 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られているようである（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（参考1、参考2を参照）。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。

わが国の衛生指標菌試験法は、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10ml ずつを3本の BGLB 培地に接種する（3g）。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 1ml ずつを3本の EC 培地に接種する（0.03g）。アイス

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-glucuronic acid) またはX-GLUC
MUG (4-methylumbeliferoyl-beta-D-glucuronide)

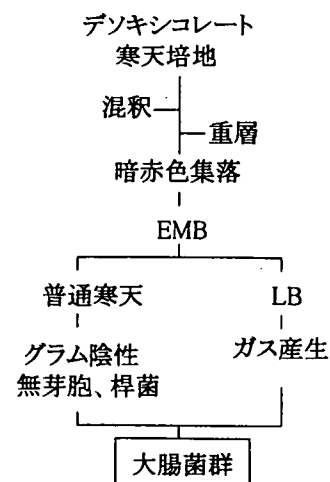


図2. 日本の大腸菌群試験法の概略図（平板法）

クリーム類では10倍乳剤を1 ml (0.1g) ずつ、冷凍食品では100倍乳剤を1 ml (0.01g) 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、わが国の衛生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、

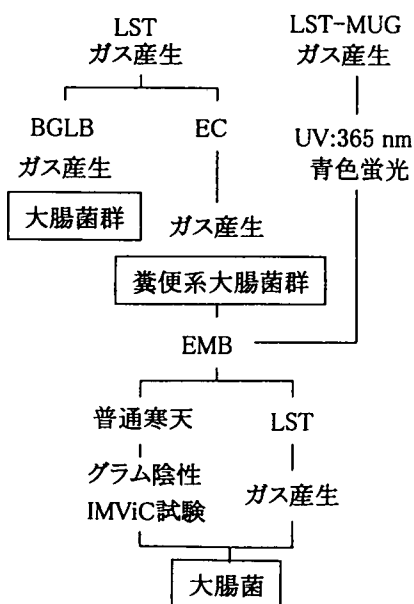


図3. FDA/BAM の汚染指標菌試験法の概略図 (MPN法)

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 1 N 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±0.2°C, FDA/BAM 法: 貝類は44.5±0.2°Cでその他の食品では45.5±0.2°C, ISO 法: 44±1.0°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0.5mm 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

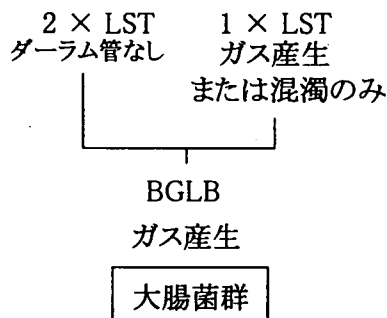


図4. ISO の大腸菌群試験法概略図 (MPN 法)

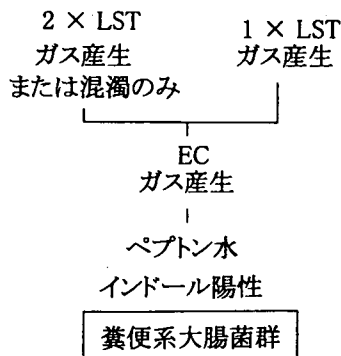


図5. ISO の糞便系大腸菌群試験法概略図 (MPN 法)

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0.5mm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、ヒトや動物由来の衛生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。

4-2. 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

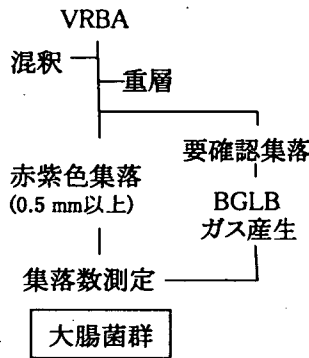


図6. ISOの大腸菌群試験法の概略図(平板法)

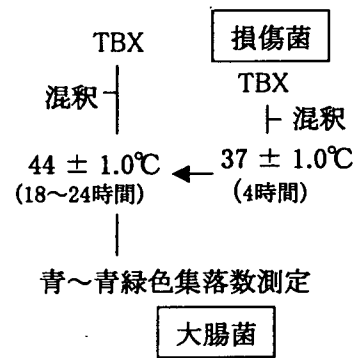


図8. ISOのE. coli試験法概略図(平板法)

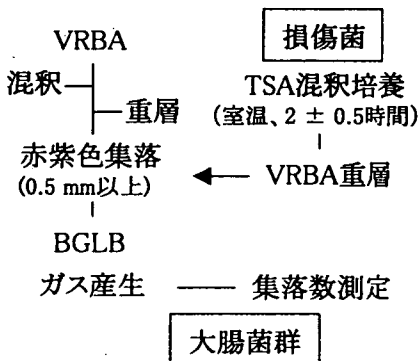


図7. FDA/BAMの大腸菌群試験法の概略図(平板法)

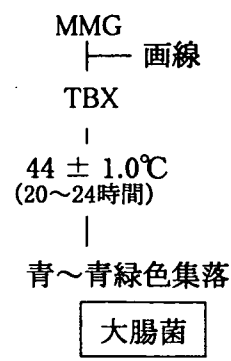


図9. ISOのE. coli試験法概略図(MPN法)

試験により大腸菌を同定する（参考3を参照）。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365nm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。

4-3. *Enterobacteriaceae*（仮訳：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衛生指標菌といえる。衛生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”（参考4で説明した新しい欧州連合の食品規格）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±1℃あるいは30±1℃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個ないしは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

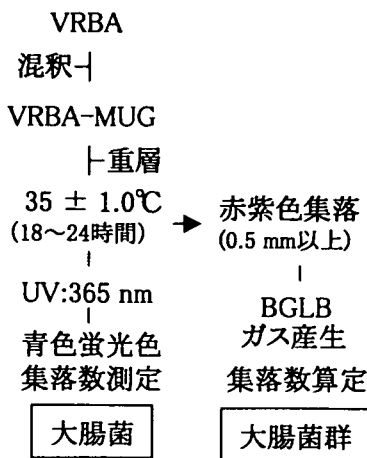


図10. FDA/BAMのE. coli試験法概略図（平板法）

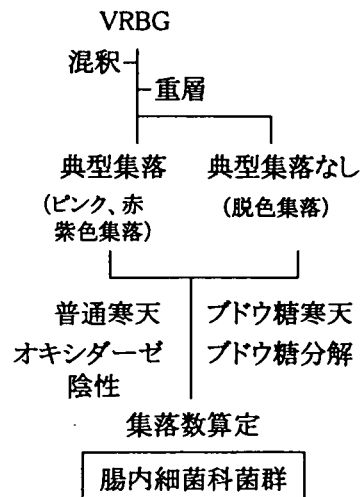


図11. ISOの腸内細菌科菌群試験法概略図（平板法）

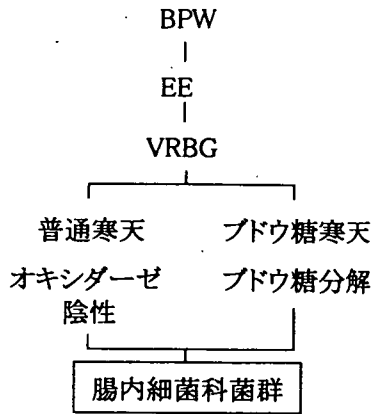


図12. ISOの腸内細菌科菌群試験法概略図 (MPN法)

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。

#### 4-4. 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群の回復をはかり、その後VRBA培地を重層して35°C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。

#### 4-5. 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・算定法を紹介する。集落数が15~150/平板の範囲内であれば図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>1.5×10<sup>4</sup>/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。

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

ΣC: 各平板の集落数の合計

n<sub>1</sub>: 低希釈の算定対象ペトリ皿数

n<sub>2</sub>: 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

#### 【参考1】乳糖分解によるガス産生機構

乳糖はβ-ガラクトシダーゼによりグルコースとガラクトースに加水分解される。グルコースが発酵するとピルビン酸からギ酸等の有機酸が生成し、これがギ酸ヒドロゲンリアーゼにより分解されると酸と二酸化炭素(ガス)が発生する。液体培地では発生したガスをダーラム管でトラップして判定する。

【参考2】大腸菌群がデソキシコレート寒天培地で赤変する機構

乳糖分解によって生じた酸は集落周辺部の pH を低下させ、その結果デソキシコール酸ナトリウムから不溶性のデソキシコール酸が析出する。デソキシコール酸は酸性下で赤変した中性紅と強く結合し、乳糖分解菌の集落を混濁赤変させる。この変化は可逆的であるため、発生した集落数が多くなるか、乳糖分解菌の発育が速い場合には、一旦赤色になった集落が時間の経過とともに脱色されてしまう。脱色化の原因は、菌が乳糖を消費し尽くして窒素源を利用し始めると、生成されるアンモニアにより培地の pH が上昇に転じ、その結果デソキシコール酸は再び可溶化するとともに脱色された中性紅が遊離することによる。培地を重層するのは、空気と遮断することにより培地表面に発生する菌の発育（乳糖の消費）を遅らせて、規定の培養時間内（20±2時間）での集落の脱色化を防止するためである。

#### 【参考3】IMViC 試験

IMViC 試験とはインドール試験、MR 試験、VP 試験、クエン酸利用性試験の頭文字を並べたもので、44℃あるいは44.5℃での発育性やゼラチン液化性試験との組み合わせにより大腸菌群の同定をするためのシステムである。このシステムは、まだ腸内細菌科の分類が確立されていなかった時代に提唱された簡易的な方法である。今日では種々の腸内細菌科の同定キットが市販されていることや、発色酵素基質を用いて大腸菌群や大腸菌を迅速に鑑別できる培地が開発されたことから、時間のかかる IMViC 試験はその役目はほぼ終えたものと考えられる。

【参考4】大腸菌群と糞便系大腸菌群がヨーロッパ連合の微生物規格から消えた

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、衛生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。

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、元来の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 (酵素基質培地法) が確立されたためである。

## 5. おわりに

近年、酵素基質培地を初めとして、培養法と組み合わせた簡便・迅速な細菌測定機器が食品試験

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	1:1	$3.0 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$	1
2	235	31	1:1.3	$2.7 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	1.13
3	290	52	1:1.8	$4.1 \times 10^3$	$3.4 \times 10^3$	1.21
4	300	60	1:2	$4.5 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	1.36
5	150	30	1:2	$2.3 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	1.43

有効な集落測定範囲を30~300/平板とする

用に開発されてきたが、日本の食品衛生法上承認された方法は残念ながら未だに皆無である。食品衛生法とは対照的に、上水の大腸菌群試験法には最新の手法が採用された結果、特に試験法の迅速性が飛躍的に向上した。

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。日々新しい細菌試験技術が開発されている今日、試験検査に携わる人達の多くが、わが国の試験法の守旧性や無用な煩雑さに疑問を持っていることは容易に推察できる。本稿では、米国やヨーロッパ連合の衛生指標菌の試験法の概略を紹介すると同時に、わが国の試験法（告示法）が一刻でも早く改善されるように期待を込めて、あえて問題点を指摘することに重点を置いた。

## 6. 参考資料

- 個々の引用文献は割愛し、参考とした代表的なものを抜粋して示した。なお International Organization for Standardization 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  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -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  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -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.html>.
  - 12) Health Protection Agency (2004) Enumeration of coliforms and presumptive *Escherichia coli* by the Most Probable Number (MPN) Technique. National Standard Method. [http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.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

=資料=

## 食品の細菌学的試験法の現状と問題点

(日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告)

浅尾 努<sup>\*1,†</sup>・河合高生<sup>\*1</sup>・久米田裕子<sup>\*1</sup>・寺本忠司<sup>\*2</sup>  
石黒 厚<sup>\*3</sup>・梅迫誠一<sup>\*4</sup>・小笠原 準<sup>\*5</sup>・高須一重<sup>\*6</sup>  
美野朋隆<sup>\*7</sup>・日野亮一<sup>\*8</sup>・斉藤利江<sup>\*9</sup>  
小崎俊司<sup>\*10</sup>・山本茂貴<sup>\*11</sup>

(\*1 大阪府立公衆衛生研究所, \*2 (株)ファルコライフサイエンス, \*3 (株)ドンク, \*4 奈良県桜井保健所,  
\*5 大阪市立環境科学研究所, \*6 (財)日本食品分析センター大阪支所, \*7 大阪いずみ市民生活協同組合,  
\*8 生活協同組合連合会コープきんき事業連合, \*9 日本冷凍食品検査協会,  
\*10 大阪府立大学, \*11 国立医薬品食品衛生研究所)

(受付 平成 19 年 8 月 28 日)

(受理 平成 19 年 9 月 10 日)

The current state and problems of microbiological examination  
methods of food (Japanese Society for Food Microbiology:  
A report from the working group concerning  
microbiological examination methods of food)

Tsutomu ASAO,<sup>\*1,†</sup> Takao KAWAI,<sup>\*1</sup> Yuko KUMEDA,<sup>\*1</sup> Tadashi TERAMOTO,<sup>\*2</sup>  
Atsushi ISHIGURO,<sup>\*3</sup> Seiichi UMESAKO,<sup>\*4</sup> Jun OGASAWARA,<sup>\*5</sup>  
Kazushige TAKASU,<sup>\*6</sup> Tomotaka MINO,<sup>\*7</sup> Ryoichi HINO,<sup>\*8</sup>  
Rie SAITO,<sup>\*9</sup> Shunji KOZAKI<sup>\*10</sup> and Shigeki YAMAMOTO<sup>\*11</sup>

(\*1 Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi, Higashinari-ku,  
Osaka 537-0025; † Corresponding author)

(\*2 FALCO Life Science, 63-2 Higashi-takeyamachi, Kawabatahigashi-iru,  
Higashi-takeyamachi-dori, Sakyo-ku, Kyoto 606-8393)

(\*3 Donq Co., Ltd., 5-4 Koyo-cho Nishi, Higashinada-ku,  
Kobe, Hyogo 658-0033)

(\*4 Nara Prefectural Sakurai Health Center, Ohdono, Sakurai, Nara 633-0062)

(\*5 Osaka City Institute of Public Health and Environmental Science,  
8-34 Tojo-cho, Tennoji, Osaka 543-0026)

(\*6 Japan Food Research Laboratories Osaka Branch, 3-1 Toyotsu-cho,  
Suita, Osaka 564-0051)

(\*7 Osaka Izumi Cooperative Society Mozuakahata-cho, Kita-ku,  
Sakai, Osaka 1-24-1)

(\*8 Consumer Cooperative Kinki, 13-9 Nishinakajima, Yudogawa-ku, Osaka 532-0011)

(\*9 JAPAN FROZEN FOODS INSPECTION CORPORATION, Minatojimaminamimachi,  
Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047)

(\*10 Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531)

(\*11 National Institute of Health Science, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8510)

† 連絡先

\*1 ☎537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69



### 1. 食品の細菌検査法問題検討委員会発足の背景

食品衛生検査指針の前書きには、『試験法としての信頼性が高く、しかも調和がとれていることが求められます。また、学問と技術の発展に伴い、迅速かつ適切に改訂されていくことが必要であります。』と書かれている。しかし、実際には大多数の食品の細菌試験法は、改訂が容易ではない食品衛生法の成分規格に組み入れられているので、古い試験法でも告示された当時そのままの姿をとどめているものが多い。例えば、昭和27年に告示された氷雪の規格基準や、昭和28年に改訂された乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（いわゆる乳等省令）に記載された試験法がその代表である。平成10年に通知された未殺菌液卵の細菌試験法においてすら、今から50年以上も前に告示された氷雪の試験法に従い実施するように指示されている。最近数多く開発・販売されるようになった発酵酵素基質培地が、従来の培養法に比べて大幅な試験時間の短縮が可能であるにもかかわらず、法改正しない限りは細菌学的規格検査に使用できない。

以上の事実で代表されるような閉塞感のある日本の食品細菌試験法の現実と、検査指針に掲げられた『迅速かつ適切に改訂』や『調和がとれていること』というごく常識的な理念との間に大きな隔りがあるのは明白である。このような状況に対応するため、日本食品微生物学会（理事長 齋藤文一）の組織活動の一環として、検査法担当部会（担当理事 山本茂貴、浅尾 努）が新たに発足し、これに伴い「食品の細菌検査法問題検討委員会」を立ち上げた。この委員会の主たる目的は、日本で実施されている食品の細菌検査に関わる種々の問題点を、官民それぞれの立場から検証することである。平成17年7月に国立医薬品食品衛生研究所において発足した、食品からの微生物検査標準法検討委員会（委員長 山本茂貴）への提言のための役割も視野に入れた組織でもある。なお本委員会に関する情報は国立医薬品食品衛生研究所のホームページ (<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>) から入手できる。

### 2. 食品の細菌試験法の現状

昭和40年当時に細菌学的規格検査の対象とされた食品等の区分は30種類（乳等省令だけで23種類）であったが、現在では乳等省令35種類を含めて2倍以上の65種類にも達している。当初の検査対象菌(群)は汚染指標菌に限定されていたが、その後に腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌を標的とした“指標菌的食中毒菌”の検査や、リステリア モノサイトゲネスを含む食中毒菌を直接検査する方法も加わった。この中にはサルモネラ試験法のように、食品ごとに異なる試験法が次々と無秩序に通知されてきたものもある。腸炎ビブリオ試験法では、後述する食肉製品の規格基準の改訂の理念に反し、試験法が成分規格に含まれて告示された。

近年急速に普及したPCR法やそれを応用した機器に

よる遺伝子診断法やイムノクロマト法等が、迅速性に乏しい培養法の補助試験法の一つとして利用されつつある。このような試験項目の増加や、何らかの措置を講じない限り、今後さらに複雑化することが危惧される試験法の記述上の問題は、単に培養器や遺伝子診断等に必要な器具機材の整備のための経済的な負担を強いるだけでなく、検査ミスを誘発する可能性を高める要因の一つにもなりかねない。

グローバル化している食品流通の現状から、日本国内のみならずAOAC International (AOAC), International Organization for Standardization (ISO), U.S. Food and Drug Administration (米国FDA) のような国際機関の試験法との調和も重要な課題となっているが、残念ながら日本国内においては細菌試験法の基本的な調和がとられていないのが実情であると言わざるを得ない。

### 3. 委員会の活動状況

列挙したような状況に対する危機感から、平成17年9月以降合計5回の「食品の細菌検査法問題検討委員会」を開催した。本委員会の作業として、①AOAC, ISO, 米国FDA/BAM (Bacterial Analytical Manual) をはじめとした諸外国の細菌試験法に関する情報の収集・解析や、②日本の食品の成分規格の現状分析と整理を開始した。より具体的な問題点として、③最確数測定法や最確数表の問題点、④細菌数測定・算出法の問題点、⑤汚染指標菌試験法の問題点を取り上げており、現在これらの作業は同時並行的に進行している。今までに得られた成果として、乳及び乳製品（乳等省令）や冷凍食品をはじめとする各種食品に対する規格基準・試験法に対応した希釈液、培養温度、培地等を最大限に簡略化した一覧表を作成した。

わが国の食品細菌試験法は積み上げ方式になっているために新旧の試験法が混在しているが、その典型的な例としてサルモネラ試験法を、さらには腸炎ビブリオ試験法の現状とその問題点を第2回食品からの微生物検査標準法検討委員会（平成17年10月25日開催）へ文書をもって提起した。

### 4. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表の説明

乳等省令に含まれる35種類の乳製品（表1）、冷凍食品など18の食品等（表2）、比較的新しく告示・通知された食肉製品（表3）、ミネラルウォーター類（表4）、食鳥卵（表5）、および腸炎ビブリオの成分規格に関連する魚介類等（表6）の規格基準と試験法のうち、試験現場に必要な最小限の項目を一覧表にした。筆者らが食品細菌検査の際に、検査ミスをなくす手段の一つとして以前から使用してきた一覧表に追加・修正を加えたものである。手元に常備し、試験法等を確認する資料として使用して頂ければ幸いである。

表 1. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表 (乳及び乳製品)

食品	規格		培養		試料の作製	
	細菌数	大腸菌群	温度 (°C)	培地 (時間)	試料の希釈倍率と培地の数	試料原液 (希釈液)
1 牛乳						
2 殺菌山羊乳						
3 加工乳						
4 成分調整牛乳	5 万/ml 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3) BGLB (48±3)	×1, ×10, ×100; 1 ml×2 本	希釈液の規定なし
5 低脂肪牛乳						
6 無脂肪牛乳						
7 特別牛乳	3 万/ml 以下					
8 濃縮乳	10 万/g 以下	/	32~35	PC (48±3)	10 g: up to 100 ml (S)	
9 脱脂濃縮乳						
10 加糖れん乳						
11 加糖脱脂れん乳						
12 全粉乳						
13 脱脂粉乳						
14 クリームパウダー	5 万/g 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3) BGLB (48±3)	×1, ×10, ×100; 1 ml×2 本	10 g: up to 100 ml (S)
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 無糖れん乳	0/g	/	32~35	PC (48±3)	×10; 2 ml×5 枚	10 g: up to 100 ml (S)
21 無糖脱脂れん乳						
22 バター						
23 バターオイル		陰性 (DS)	32~35	DS (20±2)	×10; 1 ml×2 枚	融解 (45°C 未満, 15 分以内, 恒温槽で) 10 g: up to 40°C の 100 ml (S)
24 プロセスチーズ						
25 濃縮ホエイ						
26 クリーム	10 万/ml 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3)	希釈液の規定なし	
27 乳飲料	3 万/ml 以下	陰性 (BGLB)				
28 生乳	400 万/ml 以下 <sup>1)</sup>	/				
29 山羊乳	400 万/ml 以下 <sup>1)</sup>	/				
アイスクリーム類 <sup>2)</sup>						
30 アイスクリーム	10 万/g 以下					融解 (40°C 以下, 短時間)
31 アイスクルク	5 万/g 以下	陰性 (DS)	32~35	PC (48±3) DS (20±2)	×10; 1 ml×2 枚	10 g+90 ml (S)
32 ラクトアイス	5 万/g 以下					
33 発酵乳 <sup>3)</sup>	1,000 万/ml 以上					
乳酸菌飲料 <sup>3)</sup>						
34 無脂肪固形分 3% 以上	1,000 万/ml 以上 <sup>4)</sup>	陰性 (DS)	35~37	BCP (72±3)	×10; 1 ml×2 枚	10 g (ml): up to 100 ml (S)
35 無脂肪固形分 3% 未満	100 万/ml 以上	陰性 (DS)	32~35	DS (20±2)		(凍結状態のものは 40°C 以下, 短時間で融解した 10 g)

S: 滅菌生理食塩水, PC: 標準寒天培地, BCP: BCP 加プレートカウント寒天培地, DS: デンシココレート寒天培地

<sup>1)</sup> 総菌数, <sup>2)</sup> 発酵乳又は乳酸菌飲料を原料にしたものは, 乳酸菌又は酵母以外の細菌数, <sup>3)</sup> 乳酸菌数又は酵母数 (BCP 加プレートカウント寒天培地), <sup>4)</sup> 発酵させた後において, 75°C 以上 15 分間加熱するか又はこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌したものはこの限りでない。

注) 牛乳, 成分調整牛乳, 低脂肪牛乳, 無脂肪牛乳, 加工乳又は乳飲料の常温保存可能品は, 上記規格以外に 30±1°C で 14 日間あるいは 55±1°C で 7 日間保存後の生菌数が 0/ml

乳及び乳製品のリス  
テリア汚染防止等に  
ついて  
乳, 乳製品中のリス  
テリア検査手順  
(IDF 標準法)

検体 25 g (ml)  
+  
選択培養培地  
EB 培地 225 ml  
↓  
培養 30°C, 48 時間  
↓  
選択分離培地  
Oxford 又は  
バルカム寒天培地  
↓  
培養 30~35°C,  
24~48 時間  
↓  
純培養  
TSYEA 培地  
↓  
培養 30°C, 48 時間  
↓  
集落観察 斜光法  
↓  
確認培養  
CAMP 試験他  
↓  
同 定  
↓  
血清型別

ソフト及びゼミソフ  
トタイプのナチュレ  
ルチーズでリステリ  
アを検出したものは  
食品衛生法第 6 条に  
違反

表2. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表 (冷凍食品等)

食品	規格		培養		試験の調整	
	細菌数	E. coli	温度(°C)	培地(時間)	試験の希釈倍率と培地の数	試験量および希釈液等
36 冷無加熱採取	10万/g以下	/	35±1.0(PC, DS)	PC(24±2)	×100; 1 ml×2枚	25 g + 225 ml (PB) → ×10 ↓ 10 ml
37 凍加熱後採取 (凍結直前加熱)	10万/g以下	/	35±1.0(PC, DS)	DS(20±2)	×100; 1 ml×2枚	
38 食加熱後採取 (凍結直前非加熱)	300万/g以下	陰性(BC)	44.5±0.2(EC)	EC(24±2)	×100; 1 ml×3本	90 ml (PB) → (×100) 試験原液
39 食用冷凍鮮魚(類) <sup>1)</sup>	10万/g以下	/				
40 冷凍ゆで <sup>2)</sup>	10万/g以下	/	35±1.0	PC(24±2)	×100; 1 ml×2枚	冷凍食品と同じ
41 冷凍ゆで <sup>3)</sup>	10万/g以下	/	35±1.0	DS(20±2)	×100; 1 ml×2枚	
42 鯨肉製品	/	/	35±1.0	BGLB(48±3)	×10; 10 ml×3本	25 g + 225 ml (SP)
43 魚肉ねり製品	/	/	35±1.0	BGLB(48±3)	×10; 10 ml×3本	25 g + 225 ml (SP)
44 食肉、鯨肉、魚肉製品に使用する砂糖、でん粉、香辛料(製造基準)	1,000/g以下	/	35.0±1.0	PC(48±3) (芽胞数)	×200; ×2,000; 1 ml×2枚	5 g: up to 100 ml (SP) → ×20 その20 mlを10分間煮沸急冷 40°C以下、短時間で融解
45 水菓	1万/ml以下 <sup>2)</sup>	/	35±1.0	PC(48±3) DS(20±2)	×10; 1 ml×2枚 (EC 5 本法のMPN)	10 ml + 90 ml (S)
46 生食用かきおよびむき身にした生食用かき <sup>1)</sup>	5万/g以下	230/100 g以下 (MPN値)	35±1.0(PC) 44.5±0.2(EC) (恒温水槽)	PC(24±2) EC(24±2)	(×2; 2 ml, ×10; 1 ml, ×100; 1 ml)×5本 ガス発生管数を計測し、 最確数の係数を10倍	200 g以上+等量のPB → ×2 ↓ 20 ml 80 ml (PB) → ×10 ↓ 10 ml 90 ml (PB) → ×100
47 生食用かきの原料生産海域海水(加工基準)	/	70/100 ml以下	35±1.0	LB(24±2, 48±3)	(LB 5 本法のMPN) (×1; 10 ml, 1 ml, 0.1 ml)×5本	25 g + 225 ml (PB) → ×10 ↓ 1 ml
48 容器包装詰加圧加熱殺菌食品	無菌試験陰性	/	35.0±1.0	恒温試験(35.0± 1.0°Cで14日保存) TGC(48±3)	×100; 1 ml×5本	9 ml (PB) → ×100
49 直接食品に接触させて食品を保存する水管	/	陰性 (BTB-LB)	35±1.0	BTB-LB (24±2, 48±3)	×1; 10 ml, 1 mlおよび ×10, ×100, ×1,000; 1 ml	滅菌蒸留水で洗浄後、室温または 40°C以下の温湯中で融解(原液), ×1,000まで10倍階段希釈
50 水雪	100/ml以下	陰性 (BTB-LB)	35±1.0	BTB-LBは同上 PC(24±2)	BTB-LBは同上 ×1, ×10, ×100, ×1,000; 1 ml×2枚	同上、希釈液の規定なし (上も同様)
51 清涼飲料水	/	陰性 (BTB-LB)	35±1.0	BTB-LB (24±2, 48±3)	×1; 10 ml, 1 ml, ×10; 1 ml	含CO <sub>2</sub> 飲料は脱気、希釈液の 規定なし
52 粉末清涼飲料(乳酸菌不含)	3,000/g以下	陰性 (BTB-LB)	35±1.0	PC(24±2) BTB-LB (24±2, 48±3)	×10; ×100, ×1,000, ×10,000; 1 ml×2枚 ×10; 10 ml, 1 ml, ×100; 1 ml	10 g: up to 100 ml (PB) → ×10 10,000倍まで10倍階段希釈
53 粉末清涼飲料(乳酸菌加)	3,000/g以下 <sup>3)</sup>	陰性 (BTB-LB)	35±1.0	1 μg/ml(PGK <sup>4)</sup> 加ブドウ糖 加寒天培地(24±2) 4%NaCl加BCP(24±2) 細菌数は上記2種類の 培地の菌数の合計	×10, ×100, ×1,000, ×10,000; 1 ml×2枚 ×10; 10 ml, 1 ml, ×100; 1 ml	10 g: up to 100 ml (PB) → ×10 ×10,000まで10倍階段希釈

S: 滅菌生理食塩水, PB: 滅菌リン酸緩衝液, SP: 滅菌ペプトン加生理食塩水, <sup>1)</sup> 腸炎ヒブリオの規格および試験法は別途記載, <sup>2)</sup> 発酵乳又は乳酸菌飲料を原料にしたものは乳酸菌又は酵母以外の細菌数, <sup>3)</sup> 乳酸菌を除いた菌数, <sup>4)</sup> PGK: ペニシリンGカリウム

表3. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表(食肉製品)

食品	大腸菌群	E. coli	クロストリジウム属菌	黄色ブドウ球菌	サルモネラ属菌
54 食品製品	非加熱	/	100/g 以下 <sup>1)</sup>	/	1,000/g 以下
55	特定加熱	/	100/g 以下 <sup>1)</sup>	1,000/g 以下	1,000/g 以下
56	包装後加熱殺菌	陰性 (BGLB)	/	1,000/g 以下	/
57	加熱殺菌後包装	/	陰性 (EC) <sup>2)</sup>	/	1,000/g 以下
58	乾燥	/	陰性 (EC) <sup>2)</sup>	/	/

検査項目	培養		試料の調整	
	温度 (°C)	培地 (時間)	希釈倍率と培地の数	試料量および希釈液等
大腸菌群	35.0±1.0	BGLB (48±3)	×10; 10 ml×3 本	25 g+225 ml (SP)
E. coli	44.5±0.2	EC (24±2)	×10, ×100; 1 ml×5 本 <sup>1)</sup> ×10; 1 ml×5 本 <sup>2)</sup>	
黄色ブドウ球菌	35.0±1.0	卵黄加マンニット食塩寒天培地 (48±3) コアグラゼ試験陽性を確認	×10; 0.1 ml×2 枚	
クロストリジウム属菌	35.0±1.0	クロストリジウム培地 (24±2)	×10, ×100; 10 ml×2 枚	
	35.0±1.0	EEM (18±2)		25 g+225 ml (EEM)
サルモネラ属菌	43.0±1.0 又は 35.0±1.0	SBG, セレナイト, TT のいずれか一つ (20±2)		EEM の 1 ml
	35.0±1.0	MLCB 又は DHL (24±2) 記載なし TSI/LIM (24±2) OPNG 試験陽性を確認		1 白金耳

<sup>1)</sup> EC の陽性率が ×10 で 3/5 以下のときは 10/g 以下, ×100 で 3/5 以下のときは 100/g 以下, SP: 滅菌ペプトン加生理食塩水

<sup>2)</sup> 加熱殺菌後包装食肉製品および乾燥食肉製品の試験法

表4. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表(ミネラルウォーター類)

食品	大腸菌群	腸球菌	緑膿菌
59 ミネラルウォーター類 (容器包装内の CO <sub>2</sub> 圧力が 20°C で 98 kPa 未満であって、 かつ、殺菌又は除菌を行わないもの)	陰性 (BTB-LB)	陰性 (AC)	陰性 (AB)

検査項目	培養		試料の調整	
	温度 (°C)	培地 (時間)	試料の希釈倍率等	
推定試験	35.0±1.0	AC, 10 ml (48±3)	×1; 10 ml, 1 ml	
腸球	確定試験	45.0±1.0	AC, 10 ml (48±3)	
菌	完全試験	35.0±1.0	ブドウ糖寒天 (24±2)	
		35.0±1.0	ブドウ糖ブイヨン (24±2)	
		35.0±1.0	6.5%NaCl 加ブドウ糖ブイヨン (48±3)	
		35.0±1.0	ブドウ糖寒天斜面 (24±2) カタラーゼ試験陰性・グラム陽性球菌	
推定試験	35.0±1.0	AB, 10 ml (24±2, 48±3) UV (365 nm) での蛍光及び混濁		
緑膿	確定試験	35.0±1.0	セトリミド寒天 (48±3)	
菌	完全試験	41.5±0.5	普通寒天斜面 (24±2) オキシダーゼ試験陽性・グラム陰性無芽胞桿菌	

AB: アスペラギンブイヨン

これら試験法のうち、食肉製品と食鳥卵の試験法は通知法である。魚介類等の腸炎ビブリオ試験法の本体は告示法(平成13年6月7日)であるが、告示直後の平成13年6月29日に「腸炎ビブリオ試験法について」が通知された。この通知には告示された試験法に追加して、

「同定方法」および「同等以上の性能を有すると認められる試験法」が示された。また、ミネラルウォーター類については市販製品として検査対象となる可能性があるもののみを示したが、原水と製造直後のミネラルウォーター類には別途試験法がある。