

表4-1 標的菌と非標的菌の選択基準

| 評価項目                           | 試験すべき菌の種類の数                                           | 検出対象としたい菌のカテゴリーと、その場合の菌種の選び方                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 食品の種類         | 菌の濃度                                  |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------|
| <p>包含性試験<br/>(Inclusivity)</p> | <p>50 pure cultures (Salmonella)の場合30)</p> <p>標的菌</p> | <p>ある科 (Family, ex. Enterobacteriaceae) に対する検出法<br/>その科に属する属の範囲から50株、代表的な属を含むように。</p> <p>ある属 (Genus, ex. Salmonella, Pseudomonas, Listeria) に対する検出法<br/>その属に属する種の範囲から50株、可能なら、その属の全ての種を含むように。</p> <p>ある種 (Species, ex. Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli) に対する検出法<br/>その種に属する50株。株の定義は、Salmonella, Listeria では血清型、Listeria spp. ではファージ型も、将来は遺伝子型も。</p> <p>特定の株に対する検出法<br/>その株</p> | <p>食品は含まず</p> | <p>相対検出しレベル(最低検出しレベル)の10~100倍高い濃度</p> |
| <p>排他性試験<br/>(Exclusivity)</p> | <p>1(特に記載はないが)</p> <p>非標的菌</p>                        | <p>ある科 (Family, ex. Enterobacteriaceae) に対する検出法<br/>その科に属する複数の株を含まなければならない。</p> <p>ある属 (Genus, ex. Salmonella, Pseudomonas, Listeria) に対する検出法<br/>その属に似ている属の株を含まなければならない。</p> <p>ある種 (Species, ex. Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli) に対する検出法<br/>同じ属内の他の種を含まなければならない。</p> <p>特定の株に対する検出法<br/>同じ種の他の株を含まなければならない。</p>                                                             | <p>食品は含まず</p> | <p>予想される最大汚染レベル</p>                   |

表4-2 標的菌と非標的菌の検出試験結果

| 菌の種類  | 標準法 |      | 代替法 |      |
|-------|-----|------|-----|------|
|       | 予測  | 試験結果 | 予測  | 試験結果 |
| 標的菌1  |     |      |     |      |
| 標的菌2  |     |      |     |      |
| 標的菌3  |     |      |     |      |
| etc.  |     |      |     |      |
| 非標的菌1 |     |      |     |      |
| 非標的菌2 |     |      |     |      |
| 非標的菌3 |     |      |     |      |
| etc.  |     |      |     |      |

表5. 共同試験結果における相対精度、相対特異性、相対感度

| 試験室  | 汚染レベル          |      |                |       |
|------|----------------|------|----------------|-------|
|      | L <sub>0</sub> |      | L <sub>1</sub> |       |
|      | 標準法            | 代替法  | 標準法            | 代替法   |
| 試験室1 |                |      |                |       |
| 試験室2 |                |      |                |       |
| 試験室3 |                |      |                |       |
| etc. |                |      |                |       |
| 合計   | FP-R           | FP-A | TP1-R          | TP1-A |
|      |                |      | TP2-R          | TP2-A |

FP: 擬陽性  
 TP1: レベル1の陽性結果の総数  
 TP2: レベル2の陽性結果の総数  
 R: 標準法, A: 代替法

$$SP = (1 - (\frac{FP}{N_L})) \times 100\%$$

| 代替法 | 標準法            |                | 総数 |
|-----|----------------|----------------|----|
|     | +              | -              |    |
| +   | PA             | PD             |    |
| -   | ND             | NA             |    |
| 総数  | N <sub>+</sub> | N <sub>-</sub> | N  |

N<sub>L</sub>: L<sub>0</sub>の全測定結果数  
 FP: 擬陽性総数

$$SE = \frac{FP}{N_L} \times 100\%$$

N<sub>1</sub>, L<sub>1</sub>またはL<sub>2</sub>の全測定結果数  
 TP: L<sub>1</sub>またはL<sub>2</sub>での陽性結果の総数

N: レベルL<sub>0</sub>あるいは全てのレベルでの結果の総数  
 AC =  $\frac{(PA+NA)}{N} \times 100\%$

表6. 共同試験における1濃度レベルあたりの結果

| 試験室 (i) | 試験法 (k) と繰り返し回数 (r) |       |
|---------|---------------------|-------|
|         | 標準法                 | 代替法   |
| 1       | 繰り返し1               | 繰り返し2 |
| 2       | 繰り返し1               | 繰り返し2 |
| etc     |                     |       |
| (n)     |                     |       |

表7. 定性分析における試験試料数

| 試験法を適用させたい食品の種類 | 食品カテゴリーの数の数 | 食品タイプの数/食品カテゴリー | 試験試料数/食品タイプ | 試験試料数/食品カテゴリー (N) | 試験試料数/参照法 | 試験試料数/代替法 | 試験試料数/バリデーション |
|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-------------------|-----------|-----------|---------------|
| 全ての食品           | 5           | 3               | 20          | 60                | 300       | 300       | 600           |
| 特定の食品カテゴリーのみ    | 1           | 3               | 20          | 60                | 60        | 60        | 120           |

\*)食品カテゴリー、食品タイプの分類はAnnex Bによる

\*)試験試料調製法: 食品カテゴリーごとの60試験試料を、参照法での結果が50%程度陽性になるような菌濃度に調製

評価指標(相対精度、相対特異性、相対感度)

表8. 定性分析における試料数2

| 食品カテゴリー          | 食品タイプ/食品カテゴリー             | 菌濃度の種類          | 菌濃度                                                                | 検体数/参照法               | 検体数/代替法               | 検体総数/食品カテゴリー | 検体総数                |
|------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|---------------------|
| 1, 2, 3, 4, または5 | 1 (One food productという表記) | 5濃度が望ましいが、最低3以上 | L0(ネガコン)<br>L1(検出閾値)<br>L2(検出閾値の直ぐ上)<br>L3(L2の3倍以上)<br>L4(L3の3倍以上) | 6<br>6<br>6<br>6<br>6 | 6<br>6<br>6<br>6<br>6 | 60           | 300(食品カテゴリーの数が5の場合) |
|                  |                           | 4濃度で実施する場合      | L0(ネガコン)<br>L1(検出閾値)<br>L2(検出閾値の直ぐ上)<br>L3(L2の3倍以上)                | 6<br>6<br>6<br>6      | 6<br>6<br>6<br>6      | 48           | 240(食品カテゴリーの数が5の場合) |

表9. 定量分析における濃度レベル

| 試験法を適用させたい食品の種類 | 食品カテゴリーの食品数 | 食品タイプの数/食品カテゴリー | 菌濃度レベル   |                |                   |                   | 1食品あたり              |             |                   | 試験データ数/食品                        |               |
|-----------------|-------------|-----------------|----------|----------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------|-------------------|----------------------------------|---------------|
|                 |             |                 | 濃度設計の考え方 | 具体的な濃度の例       |                   |                   | サブ検体の10倍の希釈繰り返し数(n) | サブ検体数/菌濃度   | 試験データ数            |                                  |               |
|                 |             |                 |          | 狭い濃度範囲で線形目盛の場合 | 最大値 < 3 × LOD の場合 | 最大値 100 × LOD の場合 |                     |             |                   |                                  | 広濃度範囲で対数目盛の場合 |
| 全ての食品           | 5           | 1               | 0(ネガコン)  | 0              | 0                 | 0 × Log(LOD)      | 0.00                | 2以上、5-10を推奨 | 10以上(25-50推奨) × n | 10以上(25-50推奨) × n × 4 × 5 dishes |               |
|                 |             |                 | 中間値1     | 0.75 × LOD     | 2.5 × LOD         | 25 × LOD          | 0.75 × Log(LOD)     | 2.03        | 2以上、5-10を推奨       |                                  | 特に規定無し        |
|                 |             |                 | 中央値      | 1.5 × LOD      | 5 × LOD           | 50 × LOD          | 1.5 × Log(LOD)      | 4.05        | 2以上、5-10を推奨       |                                  |               |
|                 |             |                 | 中間値2     | 2.25 × LOD     | 7.5 × LOD         | 75 × LOD          | 2.25 × Log(LOD)     | 6.08        | 2以上、5-10を推奨       |                                  |               |
| 特定の食品カテゴリーのみ    | 1           | 1               | 最大値      | 3 × LOD        | 10 × LOD          | 100 × LOD         | 3 × Log(LOD)        | 8.10        | 2以上、5-10を推奨       | 同上                               | 同上            |

\*) LOD: Limit of Detection (検出下限) 予め見積もっておく必要がある。一方、最大値は、コンタミネーションレベルを考慮して決めなければならない。濃度範囲は0~最大値で、その間を均等に分割し、5濃度を定める。狭い範囲では線形スケール(例えば < 3LOD, 10LOD, or 100LODを最大値とする)、広い範囲では対数スケール(例えば > 3LODを最大値とする)で範囲を定める。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

「食品における衛生管理手法およびその精度管理に関する研究」

食品検体の処理手法の検討

分担研究者 宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室長  
腸炎ビブリオ検出検討

協力研究者 荒川英二 国立感染症研究所細菌第一部

研究要旨 昨年度に行った緩衝ペプトン水（BPW）を乳剤として使用する方法は細菌数等の検査や病原細菌の検出に良好な結果を示すことがわかった。今年度はさらにこの結果を一斉検出の方向に応用して検討を行った。BPWを培養液として、すでに検討済みであるサルモネラと腸管出血性大腸菌の他に、大腸菌とカンピロバクターについて接種実験での増殖検出を検討した。一斉増殖で普通の培養を行った場合、カンピロバクターでは菌株によって増殖せず死滅する場合も見られたが、その他の大腸菌とウェルシュ菌では増菌して、二段階培養により分離検出が可能であることがわかった。また、カンピロバクターの場合、微好気培養を採り入れたBPWによる増菌もボルトン培地での微好気培養と同等の増菌効果が得られた。

また、標準法のステージ2が示された腸炎ビブリオの定量法を使用して、二枚貝の実態調査を検討した。東京市販のアサリとハマグリについて、4月から10月までの7ヶ月間MPN測定と*tdh*と*trh*を測定した。腸炎ビブリオのMPNについては腸炎ビブリオ菌株分離まで行い、*tdh*と*trh*についてはPCRでのMPN判定とした。気象庁の海水温記録が20℃を超える頃より腸炎ビブリオMPNの上昇が見られ、腸炎ビブリオの菌数ピークは7-8月にみられた。*tdh*と*trh*のMPN検出は腸炎ビブリオ菌数MPNと一致してはいなかった。

#### A. 研究目的

液卵サルモネラの検査に使用される培養液BPWはISOなどの食品検査には希釈液として多く使用されている。このことから考えて、BPWを希

釈液とした前処理の可能性について前年度は細菌数への影響を中心に検討を行った。従来の希釈菌液と比較した場合にはBPWを希釈液としても細

菌数への影響は見られなかった。このため、BPW を希釈菌液として病原あるいは衛生細菌検出の検討を行った。特に、一斉増菌による定性的な検討を行った。すでにサルモネラ、腸管出血性大腸菌、リステリア、赤痢菌については一斉培養による検出が少量菌汚染 (約 10 個/25 g, リステリアについてのみ約 100 個/25 g) でも検出が可能であることをすでに報告した<sup>1)</sup>。今年度は、厚労省汚染実態調査で使われている、大腸菌とカンピロバクターの検査についてこの一斉培養法が可能であるかどうか検討を行った。

腸炎ビブリオ試験法については標準法検討委員会ですでに検査法について提案がなされている腸炎ビブリオ試験法の改良法を元に食品、特に2枚貝についての実態検査を行った。腸炎ビブリオについては1998年をピークとして、発生件数減少が続いていて、昨年は17件のみの発生件数であった。生鮮魚介類に対する衛生指導および成分規格や試験法の設定などが徹底して有効に働いていると考えられるが、実態について一部調査を行った。

## B. 実験方法

大腸菌については保存株をDNA抽出した後に設定プライマーでのPCR検出を検討した。用いた菌株は腸管出血性大腸菌 O157 1株および O26 1株、その他の大腸菌(食品より分離) 6株であった。その他の株として、*Shigella sonnei* 1株を使用した。

図1に示したBPWを希釈液とした一斉培養と2段階増菌について検討を行った。一斉増菌後には Multiplex PCR での病原あるいは衛生細菌の検出を行い、検出した細菌について選択培養による2段階増菌を行って分離を行った。大腸菌検出については、一

斉増菌後に大腸菌検出培地(クロモカルト コリフォーム アガー ES, MERCK) 塗抹により、分離・同定を行った。PCRにおける大腸菌検出については、 $\beta$ -グルクロニデースの遺伝子を標的とした。増幅産物は287 bpである。カンピロバクターについては、16S rRNA を標的とした。増幅産物は528 bpである。これらの検出PCRを検討するため検出菌それぞれ数株のDNAを分離して確認を行った。PCR試薬として、TaKaRa Multiplex PCR Assay kit を使用した。この Multiplex PCR にはサルモネラの Positive control template (PCT) をPCR液に添加した。このことにより、PCRが進行したかどうかを判定できることになった。今回の検討では、サルモネラ、大腸菌とカンピロバクターを中心に検討を行った。また、カンピロバクター属だけでは食中毒の原因菌とは判定できないことより、*C. jejuni* と *C. coli* の strain 判定を必要としている。このため、カンピロバクター地研協議会レファレンス委員会で使用している *C. jejuni* 検出増幅産物 159 bp と *C. coli* 検出増幅産物 500 bp のプライマーセットを strain 判定に用いた(写真1参照)。PCR試薬は TaKaRa Ex Taq を用いた。カンピロバクターについては、接種実験によって、図2に示したように検出感度の比較を行った。普通培養と微好気培養での比較、ボルトン培地とBPWの培地比較も行った。用いたカンピロバクターは *C. jejuni* 3株と *C. coli* 1株であった。

腸炎ビブリオについては、H17-19 厚労科学研究費「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」で検討した、腸炎ビブリオのPCRによる検出法をAPWでの定量法に併せて検討し

た。さらに腸炎ビブリオがこの検出系に PCT が加わり、検出結果がより明確な結果として得られるようになった。分離検出寒天培地として、酵素基質培地であるクロモアガービブリオ (CHV) を使用した。標準法検討委員会提案法を多少目的に合わせて修正した図 3 の方法を使って 2 枚貝についての検討を行った。4 月から 10 月までの 7 ヶ月間に検討を行った。

### C. 研究結果

PCR についての検討には写真 2 に示したように四種菌が 1 % 程度のアガロース濃度のゲルで区別できるバンドを示した。表 1 に検出できるバンドの一覧を示した。大腸菌の検出は保存株すべて設定したプライマーによる PCR で検出が可能であった。ただし、*Shigella* についても大腸菌と同様に検出された。鶏挽肉を対照とした一斉培養による検出調査においても、毎回大腸菌が検出分離できた。

カンピロバクター検出は接種実験によって、BPW による普通培養による一斉増菌では、菌株により増菌検出ができないことがわかった。このことから、BPW とボルトン培地での微好気培養による比較を中心に行ったところ、BPW による微好気培養でも、ボルトン培地での微好気培養と同様の増菌結果が得られることがわかった。ただし、培養液によっては検出しにくい結果が菌株により得られた。

腸炎ビブリオについては、腸炎ビブリオの MPN 菌数は 7・8 月にピークを迎えた。腸炎ビブリオ MPN 菌数が高い時に病原因子も高い結果を示すわけではなかった。病原因子を持った腸炎ビブリオが検出分離されたのは 3 検体のみであった。腸炎ビブリオの 1998 年ピーク時の流行血清型は

O3:K6 であったが、その血清型は検出することができなかった。*tdh* と *trh* の最高 MPN 値は 1.5 と 24 であった。

APW 培養液 660 検体について腸炎ビブリオ検出の PCR を行った。腸炎ビブリオの検出に関して、PCR 判定と培養での結果は 93% の確立で一致していた。しかし、APW の培養液で腸炎ビブリオ検出 PCR が + であっても、腸炎ビブリオを検出できなかった比率は、19% であった。

### D. 考察

大腸菌キットでは大腸菌と判定できない O157 株についても大腸菌として検出できた。このことは大腸菌キットによる判定よりも、より広範囲の大腸菌を検出できたことになる。O157 株中では  $\beta$ -グルクロニダーゼとしては有効に働いていないと考えられるが、設定したプライマーに相当する塩基配列は存在していることから PCR による検出が可能であると思われる。一方、結果に記載したが、*Shigella* についてはプライマーに相当する塩基配列が存在することで検出されてしまった。大腸菌キットで *Shigella* が検出されるかどうか検討はしていないが、 $\beta$ -グルクロニダーゼのみで検出しているキットの場合はこれでは検出されるが、 $\beta$ -ガラクトシダーゼも含めて、発色される場合には区別ができる検出系であるかもしれない。この報告で使用したキットは両方が含まれる検出系であったので、O157 は大腸菌群として検出されることになる。*Shigella* については O157 とは違った発色を示すことになる。

PCR 検証も含めた一斉増菌検査法はカンピロバクターのみ普通一斉培養では検出できなかったが、その他の菌については、サルモネラ、大腸菌に

については一斉培養で有効であると考えられた。すでに報告した、腸管出血性大腸菌、リステリア、赤痢菌、サルモネラそして今回検討した大腸菌については一斉増菌での PCR 判定後の選択増菌または塗抹で検出分離が可能である。また、カンピロバクターも BPW を希釈液として試料調整を一度に行った後で、一部を微好気培養により培養することで、検討した Multiplex PCR によって、一度に PCR 検出ができるので、上記の病原菌検体から必要な項目のみ選んで検討することにより、検出効率が良くなるのではないかと考える。以上の検討より、簡易検査法は一斉増菌ながら、カンピロバクターについては微好気培養となるが図 4 の検査法が提案できる検査法である。

CHV での塗抹検出の結果と腸炎ビブリオ検出 PCR の結果は一致率が 93%であったことから、PCR によって 1 日以上早く腸炎ビブリオの菌数が推定できるので、スクリーニングとして PCR は有効と考える。さらに簡単に腸炎ビブリオが検出できるキット等があれば、PCR の代わりに使用すればよいことになる。腸炎ビブリオの簡易検出キットの開発が望まれる。

#### E. 研究発表

##### (ア) 論文発表

宮原美知子、田口真澄、久米田裕子、神吉政史、郡司明彦、森田友美、太田順司、高山正彦、高須一重、木股裕子、塚本定三：食品からの改良サルモネラ検出法の検討と鶏挽肉および未殺菌液卵でのその評価

日本食品微生物学会誌, 26, No.2, 107-113 (2009)

##### (イ) 学会発表

宮原美知子、平井昭彦、小西典子、甲

斐明美、相川勝弘、黒木俊郎、林昭宏、小笠原邦敏、高井慎也：生肉からの大腸菌および腸管出血性大腸菌の簡易検出法の検討

日本防菌防黴学会第 36 回年次大会  
平成 21 年 9 月

Michiko Miyahara, Eiji Arakawa :  
Seasonal changes of number of isolates of *Vibrio parahaemolyticus* in bivalves purchased from retails in Tokyo

VIBRIO2009, 2009 年 11 月

宮原美知子、森亮平、荒川英二：東京で市販されているアサリとハマグリ  
の腸炎ビブリオ数と病原性因子 (tdh, trh) 変動の検討 (H21.4-10)

第 82 回日本細菌学会総会

平成 21 年 11 月

宮原美知子：Rapid PCR detection method for bacteria in food

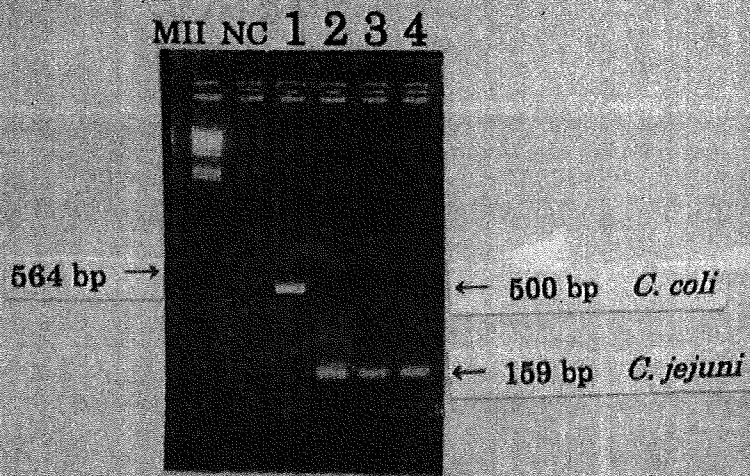
第 32 回日本分子生物学会年会、

平成 21 年 12 月

F. 知的財産権の出願・登録状況  
特に無し



## *Campylobacter* strain selection PCR



MII: Lambda DNA-HindIII  
23130, 9416, 6557, 4361,  
2322, 2027, 564 and 125

NC: Negative control

1: *C. coli*

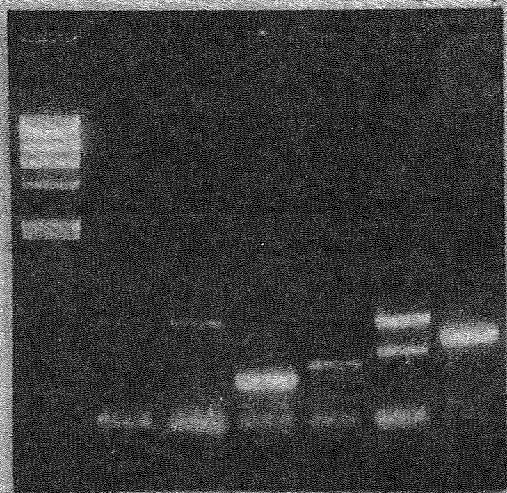
2: *C. jejuni* 1

3: *C. jejuni* 4

4: *C. jejuni* 7a

Multiplex PCR for *E.coli*, *Salmonella*,  
*cpe* (*Clostridium perfringens*), and *Campylobacter*

1 2 3 4 5 6 7



564 bp →

1% Agarose

1. Lambda DNA-HindIII digest (bp)  
 29130, 9416, 6557, 4361, 2322,  
 2027, 564, and 125

2. Negative control

3. Sample DNA (pathogen free)

4. *E. Coli* 287 bp

5. *Salmonella* 378

6. *cpe* (*Clostridium perfringens*) 456

7. *Campylobacter* 528

\*Positive control template for *Salmonella*

689

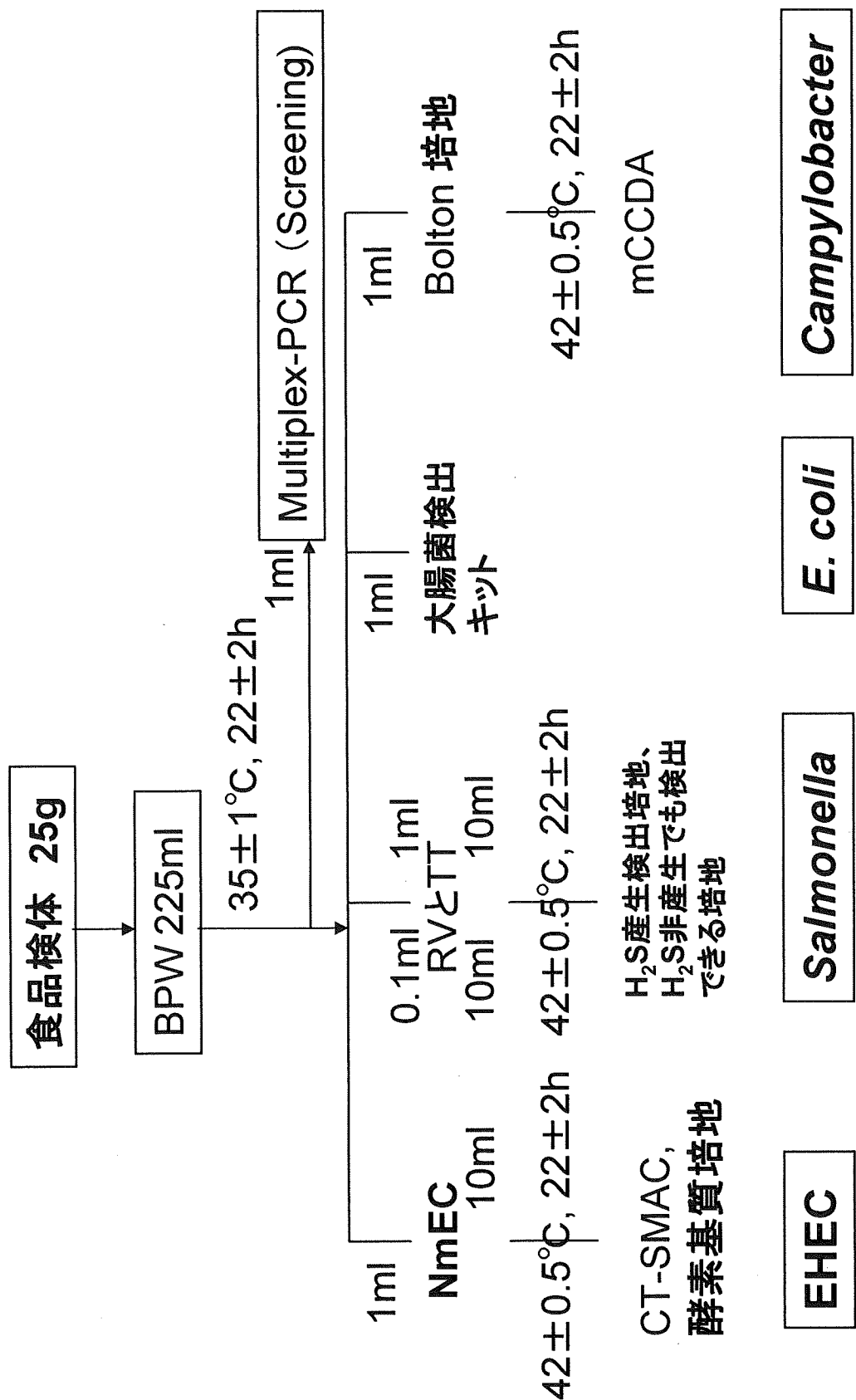


図1 効率のと考えられる一斉試験法(検討)

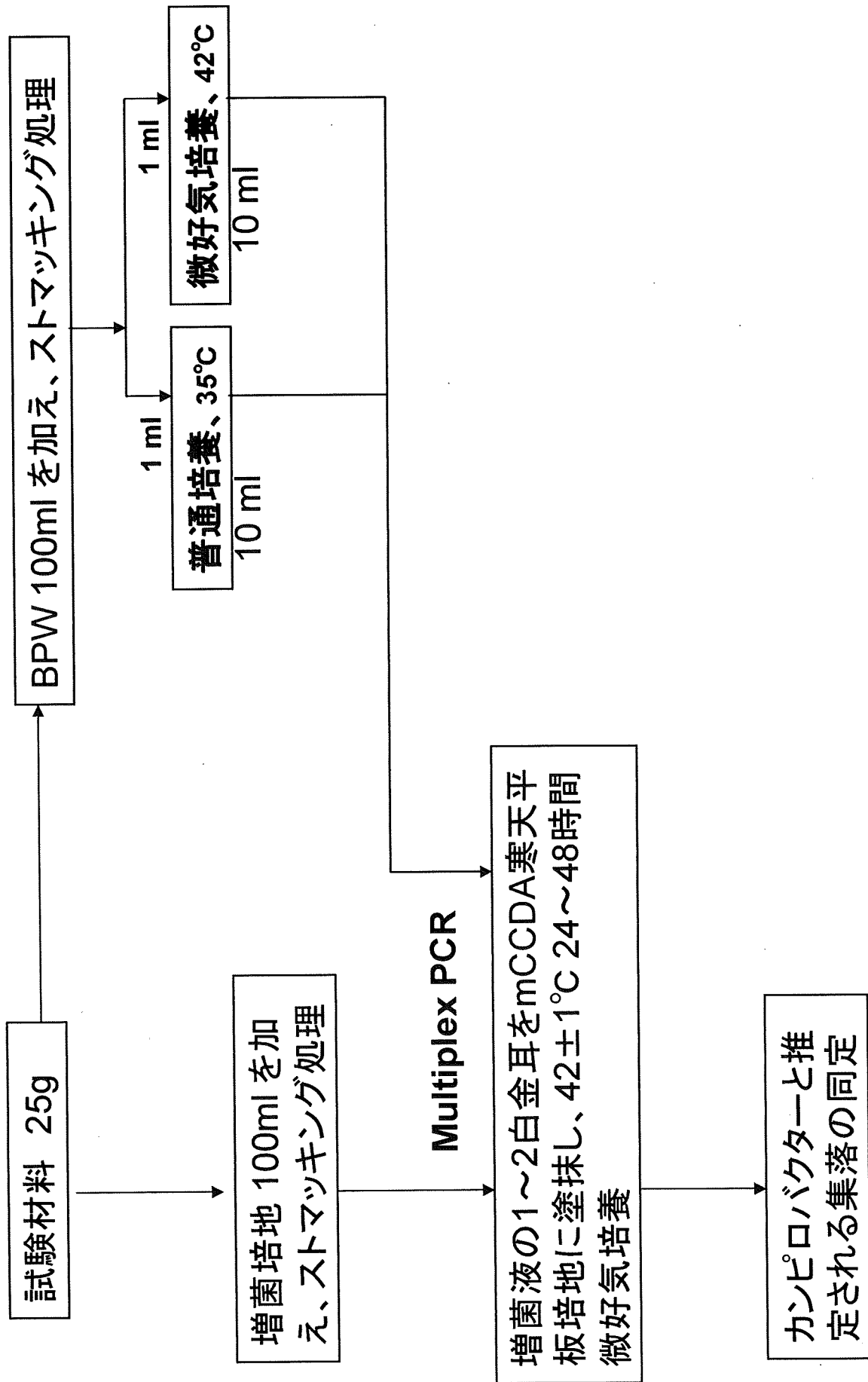


図2 食品中カンピロバクター試験法

検体 25g

APW (2%NaCl) 225 mlを加えて、よく攪拌

すべて培養

上記攪拌液 10ml, 3本試験管

X10 APW希釈 10ml, 3本試験管

X100 APW希釈 10ml, 3本試験管

推定菌濃度によりさらに希釈段階

35°C、18±2時間

CHV塗抹 袋1 μl, MPN試験管 10 μl

腸炎ビブリオPCR

35°C、18±2時間

+

藤色集落

TSI、LIM、インドール試験、

耐塩性試験、集落PCR

*tdh*、*trh* PCR

上記MPN

病原性因子PCR 腸炎ビブリオ分離

図3

Table 1 Amplicon of Multiplex PCR

| Bacteria or object    | Amplicon (bp) | Target gene |
|-----------------------|---------------|-------------|
| EHEC                  | 171           | VT          |
| <i>Salmonella</i>     | 378           | <i>invA</i> |
| <i>Listeria</i>       | 467           | <i>prfA</i> |
| <i>Shigella</i>       | 242           | <i>ipaH</i> |
| <i>E. coli</i>        | 287           | <i>uidA</i> |
| <i>Campylobacter</i>  | 528           | 16S rRNA    |
| <i>Salmonella</i> PCT | 689           |             |

平成 21 年度厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究

分担研究報告書

衛生指標菌試験法に関する研究

分担研究者：伊豫田淳（国立感染症研究所・細菌第一部）

協力研究者：諸角 聖（BMLフード・サイエンス）

中川 弘（BMLフード・サイエンス）

春被 ゆかり（BMLフード・サイエンス）

山縣 文夫（東京顕微鏡院）

遠山 一郎（東京顕微鏡院）

太田 建爾（町田予防衛生研究所）

今井 奏子（町田予防衛生研究所）

加藤 光徳（国立医薬品食品衛生研究所）

五十君 静信（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

欧州における食品の微生物基準（COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs）では、衛生指標菌として Aerobic colony count（好気性集落数）、Enterobacteriaceae（腸内細菌科）及び *E. coli*（大腸菌）が採用されており、試験法としては ISO が定める国際規格の方法が Analytical reference method（参照試験法）として指定されている。

一方、わが国の食品衛生法では衛生指標菌として主に細菌数（生菌数）、大腸菌群、*E. coli*（糞便系大腸菌群）等が採用されている。食品衛生法における衛生指標菌の試験法は告示・通知等により公定法として示されているが、これら試験法の中には長年改正されていないために実際の試験にそぐわないものや、試験法間で整合性の取れない操作・手順のあることなどが指摘されている。さらに、国際的な標準法（ISO 法や FDA/BAM 法）との調和が取られていないことから、食品の輸出入に係わる企業や試験を行う試験所等において混乱を生じることが少なくない。これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会において検討を行った結果、今後規格が制定・改正される食品の衛生指標菌試験法として、ISO 法を土台にした Enterobacteriaceae（腸内細菌科）、Presumptive *Escherichia coli*（推定大腸菌）、Coliforms（大腸菌群）の試験法を確立することを今後の検討課題とすることとした。

今年度の本研究では、大腸菌群測定用培地であるデソキシコーレイト寒天培地及びバイオレット・レッド胆汁酸塩寒天培地の比較を行った。また、腸内細菌科測定用培地であるバイオレット・レッド胆汁酸塩ブドウ糖寒天培地による生育集落の観察を行った。



## A. 研究目的

欧州では、食品に係わる微生物基準として「COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs」が制定されており、食品安全に係わる基準 (Food safety criteria) と製造工程上の衛生に係わる基準 (Process hygiene criteria) に大別されている。これらの基準では、衛生指標菌として Aerobic colony count (好気性集落数), Enterobacteriaceae (腸内細菌科) 及び *E. coli* (大腸菌) が採用されているとともに、試験法としては ISO (International Organization for Standardization) が定める国際規格の方法が Analytical reference method (参照試験法) として指定されている。

なお、ISO では主に TC34/SC9 (食品専門委員会/微生物分科委員会) が食品微生物試験に係わる標準試験法等の策定・改正作業を行っている。現在、30 以上の微生物試験法が制定されているが、定期的に試験法の見直しが実施されている。

一方、わが国の食品衛生法では「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」(昭和 26 年、厚生省令第 52 号) 及び「食品、添加物等の規格基準」(昭和 34 年、厚生省告示第 370 号) の中で、個々の食品中における細菌数 (生菌数), 大腸菌群, *E. coli* (糞便系大腸菌群) 等の菌数限度基準または陰性基準が規定されており、個別の試験法が定められている。しかし、これらの試験法間では同様な試験工程においても整合性が取れない操作・手順のあることや、国際的な標準法である ISO 法や米国 FDA の BAM (Bacteriological Analytical Manual) 法との調和が計れていない現状が指摘されている。これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会において検討を行った結果、今後規格が制定・改正される食品の

衛生指標菌の試験法として、ISO 法を土台にした Enterobacteriaceae (腸内細菌科), Presumptive *Escherichia coli* (推定大腸菌), Coliforms (大腸菌群) の試験法を確立することを今後の検討課題とすることとした。

今年度の本研究では、わが国で汎用されている大腸菌群測定用培地「デソキシコーレイト寒天培地」と、欧米の標準試験法に採用されている「バイオレット・レッド胆汁酸塩寒天培地」の比較を行うとともに、腸内細菌科測定用培地であるバイオレット・レッド胆汁酸塩ブドウ糖寒天培地による生育集落の観察を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 研究概要

市販食品 20 試料について、デソキシコーレイト寒天培地 (DCA), バイオレット・レッド胆汁酸塩寒天培地 (VRBA) 及びバイオレット・レッド胆汁酸塩ブドウ糖寒天培地 (VRBD) を用いて衛生指標菌を測定し、生育集落の形態観察を行った。また、得られた結果から培地間の比較を試みた。

### 2. 衛生指標菌の測定

#### 1) 対象とする衛生指標菌

DCA 培地, VRBA 培地及び VRBD 培地において測定対象とする衛生指標菌は以下のとおりである。

| 培地   | 対象    |
|------|-------|
| DCA  | 大腸菌群  |
| VRBA |       |
| VRBD | 腸内細菌科 |

#### 2) 試料の種類

試料は、野菜類, 魚介類, 畜肉類, 惣菜類, 菓子類から 20 試料を選択し、試験に供した。

① サーモン

② いくら醤油漬

③ 豚肉タレ焼き



- ④ いかめし
- ⑤ ハンバーグ生
- ⑥ 水菜
- ⑦ 人参スティック
- ⑧ カシラ
- ⑨ ウェディングケーキ
- ⑩ ホイップクリーム
- ⑪ 検体 A (豚肉)
- ⑫ 検体 B (巻き寿司)
- ⑬ 検体 C (豚肉)
- ⑭ 検体 D (サーモン刺身)
- ⑮ 検体 E (巻き寿司)
- ⑯ 検体 F (豚肉)
- ⑰ 検体 G (豚肉)
- ⑱ 検体 H (豚肉)
- ⑲ 検体 I (マグロ)
- ⑳ 検体 J (紅鮭塩焼き)

### 3) 試料の調製方法

試料全体を滅菌したハサミ等を用いて細切処理した後、試料を採取(計量)した。

### 4) 衛生指標菌の測定手順(試験方法)

#### ① 試料原液の調製

試料 10 g に滅菌リン酸緩衝生理食塩水 90 ml を加え、攪拌・混合したものを試料原液とした。

#### ② 段階希釈液の調製

試料原液 1 ml を滅菌リン酸緩衝生理食塩水 9 ml に加え攪拌して、試料原液の 10 倍希釈液を調製した。この操作を順次繰返して試料原液の 10 倍段階希釈液を調製した。

#### ③ 寒天培地の混釈・培養

##### a) DCA 培地

調製した試料原液及びその段階希釈液を 1 ml ずつ滅菌ペトリ皿に分注した後、DCA 培地を 10~15 ml ずつ注ぎ、試料液と混和(混釈)した。固化後、3~4 ml の同一培地で重層した。固化後、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  で  $20\pm 2$  時間培養した。

##### b) VRBA 培地

調製した試料原液及びその段階希釈液を 1 ml ずつ滅菌ペトリ皿に分注した後、VRBA 培地を 15 ml ずつ注ぎ、試料液と混和(混釈)した。固化後、4 ml の同一培地で重層した。固化後、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  で  $24\pm 2$  時間培養した。

##### c) VRBD 培地

調製した試料原液及びその段階希釈液を 1 ml ずつ滅菌ペトリ皿に分注した後、VRBD 培地を 10 ml ずつ注ぎ、試料液と混和(混釈)した。固化後、15 ml の同一培地で重層した。固化後、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  で  $24\pm 2$  時間培養した。

#### ④ 集落の計数と観察

定型、非定型に関わらず培養後の寒天平板培地に形成された赤色集落を計数した。ただし、無色の微小集落については計数しなかった。

#### ⑤ 写真撮影

培養後の寒天平板について写真撮影を行った。

### C. 研究結果及び考察

衛生指標菌を測定した各培地(DCA 培地、VRBA 培地及び VRBD 培地)と各検体(下記参照)を表に示した。また、それぞれの寒天平板の写真写真 1—写真 60 として示した。

#### 1. 大腸菌群の測定

大腸菌群を測定した DCA 培地及び VRBA 培地の生育集落数を比較した結果、ほぼ同程度の集落数であった。

生育した集落の形態については、VRBA 培地のほうが DCA 培地よりも全体的に明瞭な赤色集落を形成した。したがって、VRBA 培地の方が DCA 培地よりも赤色集落を視認しやすい傾向にあった。ただし、集落の大きさについては顕著な差は認められなかった。

#### 2. 大腸菌群と腸内細菌科との関連性

腸内細菌科は大腸菌群を含む菌群であるため、大腸菌群を対象とする DCA 培地及び

VRBA 培地よりも、腸内細菌科を対象とする VRBD 培地の方が、理論的には生育集落数が多くなると考えられた。しかし、今回の結果においては、そのような傾向は認められなかった。そのため、今回試験に供した試料においては、検出された腸内細菌科の多くが大腸菌群であったと考えられた。

なお、VRBD 培地に生育した集落の形態は、DCA 培地よりも赤色集落を視認しやすい傾向にあった。ただし、VRBA 培地と VRBD 培地を比較した場合、一部の検体（ハンバーグ、人参スティック）を除いて赤色集落の形態に顕著な差は認められなかった。

#### D. 結論

わが国で汎用されている大腸菌群測定用培地「DCA 培地」と、欧米の標準試験法に採用されている「VRBA 培地」の比較を行った結果、ほぼ同程度の集落数であったが、一部の検体（③豚肉タレ焼き）で生育した集落の形態に相違が認められた。また、VRBD 培地を用いて腸内細菌科の測定を行った結果、DCA 培地との比較においては、生育した集落数に大きな違いはなかったが、集落の形態に一部（③豚肉タレ焼き）相違が認められた。ただし、VRBA 培地との比較においては、一部の検体（⑤ハンバーグ、⑦人参スティック）を除いて顕著な相違は認められなかった。

わが国では、VRBA 培地を用いた大腸菌群の測定や、VRBD 培地を用いた腸内細菌科の測定はほとんど実施されていないのが現状である。今後規格が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、これらの培地が採用される際には、食品企業や試験所等に対して、適切に情報を提供することが重要と考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表. 衛生指標菌測定用培地の比較試験結果

| 試料         | 図中<br>写真番号 | 培地   |
|------------|------------|------|
| ①サーモン      | 1          | DCA  |
|            | 2          | VRBA |
|            | 3          | VRBD |
| ②いくら醤油漬け   | 4          | DCA  |
|            | 5          | VRBA |
|            | 6          | VRBD |
| ③豚肉タレ焼き    | 7          | DCA  |
|            | 8          | VRBA |
|            | 9          | VRBD |
| ④いかめし      | 10         | DCA  |
|            | 11         | VRBA |
|            | 12         | VRBD |
| ⑤ハンバーグ生    | 13         | DCA  |
|            | 14         | VRBA |
|            | 15         | VRBD |
| ⑥水菜        | 16         | DCA  |
|            | 17         | VRBA |
|            | 18         | VRBD |
| ⑦人参スティック   | 19         | DCA  |
|            | 20         | VRBA |
|            | 21         | VRBD |
| ⑧カシラ       | 22         | DCA  |
|            | 23         | VRBA |
|            | 24         | VRBD |
| ⑨ウェディングケーキ | 25         | DCA  |
|            | 26         | VRBA |
|            | 27         | VRBD |
| ⑩ホイップクリーム  | 28         | DCA  |
|            | 29         | VRBA |
|            | 30         | VRBD |
| ⑪検体 A      | 31         | DCA  |
|            | 32         | VRBA |
|            | 33         | VRBD |
| ⑫検体 B      | 34         | DCA  |

|       |    |      |
|-------|----|------|
|       | 35 | VRBA |
|       | 36 | VRBD |
| ⑬検体 C | 37 | DCA  |
|       | 38 | VRBA |
|       | 39 | VRBD |
| ⑭検体 D | 40 | DCA  |
|       | 41 | VRBA |
|       | 42 | VRBD |
| ⑮検体 E | 43 | DCA  |
|       | 44 | VRBA |
|       | 45 | VRBD |
| ⑯検体 F | 46 | DCA  |
|       | 47 | VRBA |
|       | 48 | VRBD |
| ⑰検体 G | 49 | DCA  |
|       | 50 | VRBA |
|       | 51 | VRBD |
| ⑱検体 H | 52 | DCA  |
|       | 53 | VRBA |
|       | 54 | VRBD |
| ⑲検体 I | 55 | DCA  |
|       | 56 | VRBA |
|       | 57 | VRBD |
| ⑳検体 J | 58 | DCA  |
|       | 59 | VRBA |
|       | 60 | VRBD |