

Japan
Food
Research
Laboratories

第 09004930001-01 号
2010年(平成22年)03月05日

試験報告書

依頼者 国立医薬品食品衛生研究所



検 体 * * * * *

表 題 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
衛生指標菌試験法の標準法策定の検討

2009年(平成21年)09月15日に受託いたしました試験の結果は次のとおりです。

I 試験目的

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) 及び 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、わが国の大腸菌群試験法に汎用されている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。

II 試験方法

1 試験概要

食品10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、生育集落数の測定及び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。

DCA 培地及び VRBA 培地：大腸菌群, VRBD 培地：腸内細菌科

2) 試料の種類

試料は, 野菜類, 魚介類, 畜肉類, 惣菜類から 10 試料を選択し, 試験に供した。

- | | |
|------------------|------------------|
| ① カット野菜(千切りキャベツ) | ⑥ カットフルーツ |
| ② もやし | ⑦ キス開き |
| ③ 鶏肉 | ⑧ ワカサギ |
| ④ 牛肉 | ⑨ 惣菜(エビのマヨネーズ和え) |
| ⑤ 菓子(せんべい) | ⑩ 生餃子 |

3) 試料の調製方法

試料全体を滅菌したハサミ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, 35±1℃で 20±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, 37±1℃で 24±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、 37 ± 1 °C で 24 ± 2 時間培養した。

④ 集落の計数

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。

III 試験結果及び考察

衛生指標菌を測定した各培地(DCA 培地, VRBA 培地及び VRBD 培地)に生育した集落数及びその希釈倍率を表 1 に示した。また、それぞれの培養平板を写真 1~30 に示した。

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、10 試料中 8 試料ではほぼ同程度の集落数であった。また、カット野菜(千切りキャベツ)及びワカサギの 2 試料では、VRBA 培地のほうが DCA 培地よりも顕著に高い集落数であった。

なお、DCA 培地の集落数のほうが VRBA 培地よりも顕著に高い試料は認められなかったことから、集落数の差異は DCA 培地及び VRBA 培地の培地性能(対象菌に対する発育支持性能及び非対象菌に対する発育阻止性能)に起因すると推測された。

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 培地での集落の形態に顕著な差は認められなかった。

IV 要約

わが国の大腸菌群試験法に汎用されている 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、生育した集落数や集落の形態に一部相違が認められた。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、生育した集落数や集落の形態に一部相違が認められた。ただし、VRBA 培地との比較においては、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。

表 1 衛生指標菌測定用培地の比較試験結果

試料	培地	(集落数) × (希釈倍率)	写真
① カット野菜 (千切りキャベツ)	DCA	27×10^1	1
	VRBA	46×10^2	2
	VRBD	30×10^2	3
② もやし	DCA	87×10^4	4
	VRBA	68×10^4	5
	VRBD	65×10^4	6
③ 鶏肉	DCA	27×10^1	7
	VRBA	34×10^1	8
	VRBD	23×10^1	9
④ 牛肉	DCA	47×10^1	10
	VRBA	44×10^1	11
	VRBD	31×10^1	12
⑤ 菓子(せんべい)	DCA	40×10^2	13
	VRBA	40×10^2	14
	VRBD	64×10^2	15
⑥ カットフルーツ	DCA	166×10^1	16
	VRBA	222×10^1	17
	VRBD	163×10^1	18
⑦ キス開き	DCA	5×10^1	19
	VRBA	6×10^1	20
	VRBD	6×10^1	21
⑧ ワカサギ	DCA	66×10^1	22
	VRBA	194×10^1	23
	VRBD	121×10^1	24
⑨ 惣菜 (エビのマヨネーズ和え)	DCA	14×10^1	25
	VRBA	33×10^1	26
	VRBD	25×10^1	27
⑩ 生餃子	DCA	42×10^1	28
	VRBA	42×10^1	29
	VRBD	32×10^1	30

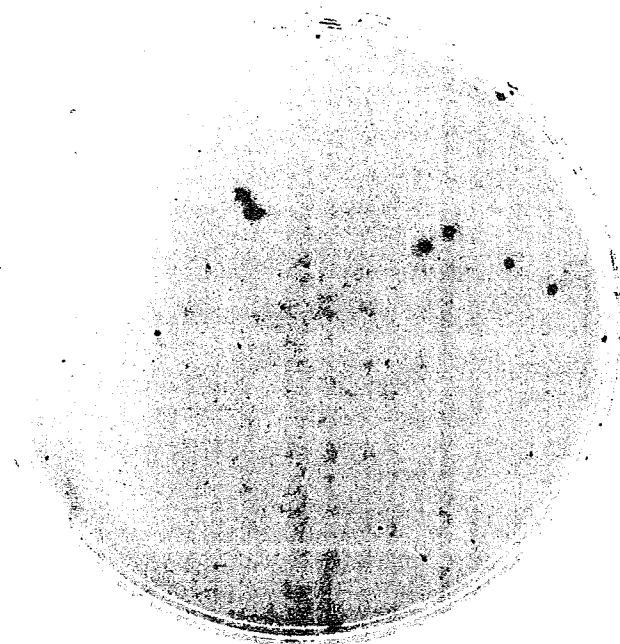


写真1 カット野菜(千切りキャベツ)の培養平板(DCA培地, 10^1 倍希釈)

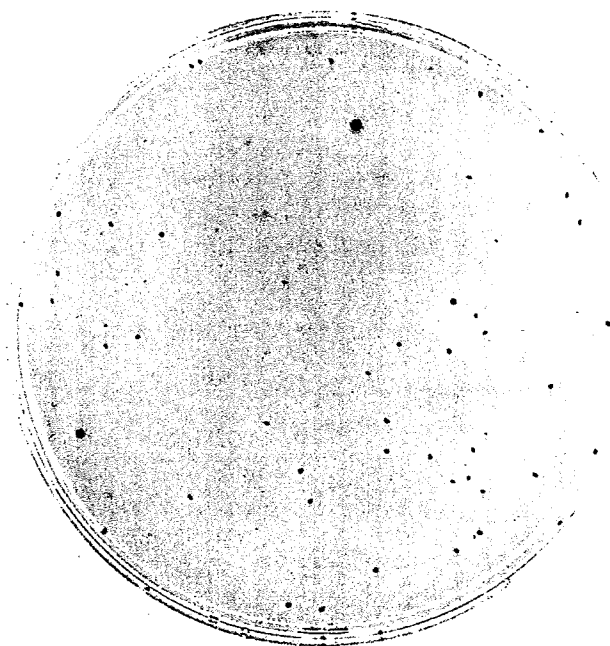


写真2 カット野菜(千切りキャベツ)の培養平板(VRBA培地, 10^2 倍希釈)

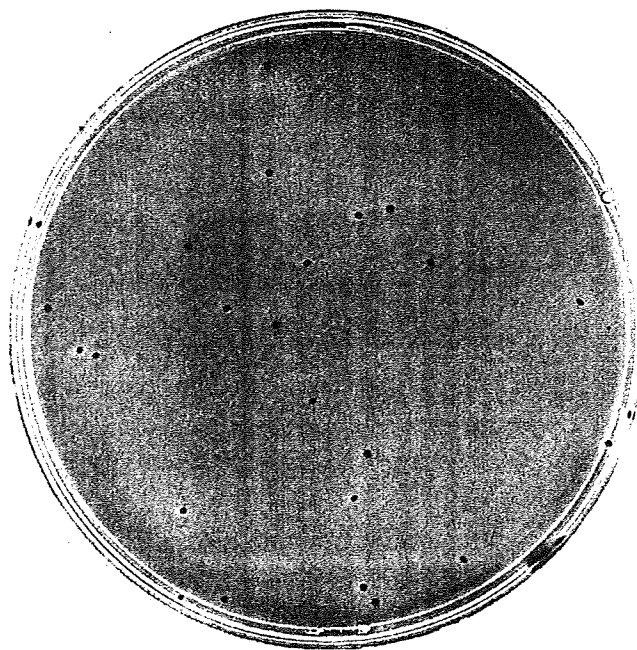


写真3 カット野菜(千切りキャベツ)の培養平板(VRBD 培地, 10^2 倍希釈)

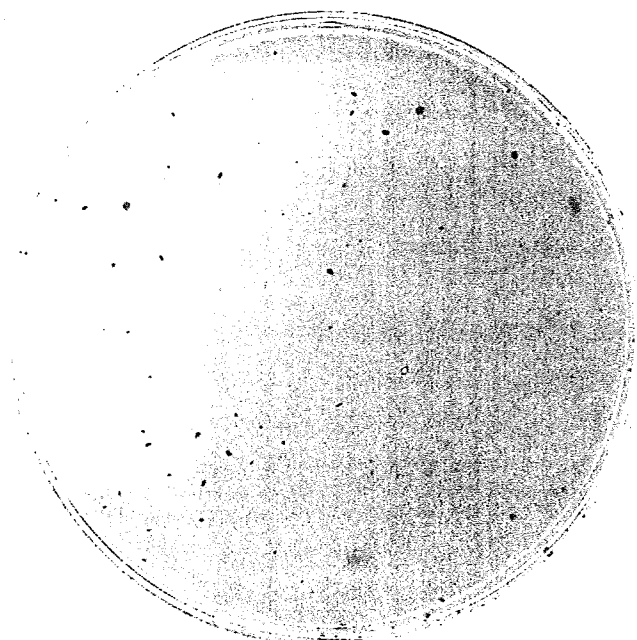


写真4 もやしの培養平板(DCA 培地, 10^4 倍希釈)

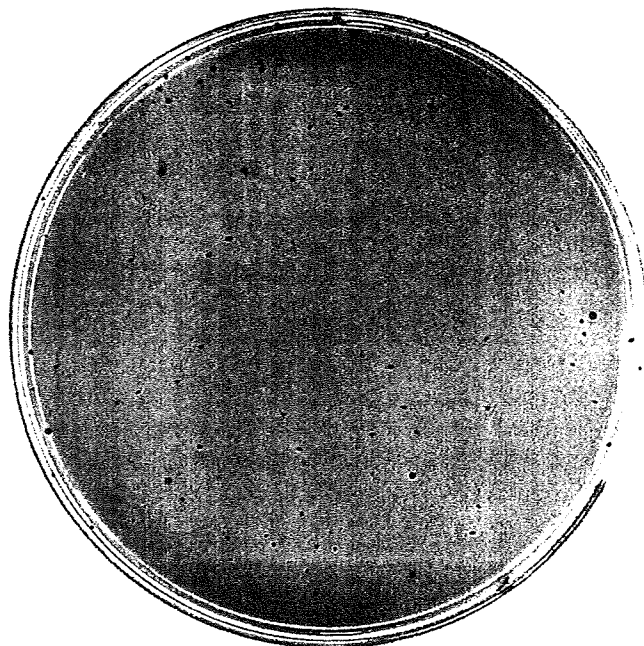


写真5 もやしの培養平板(VRBA 培地, 10^4 倍希釈)

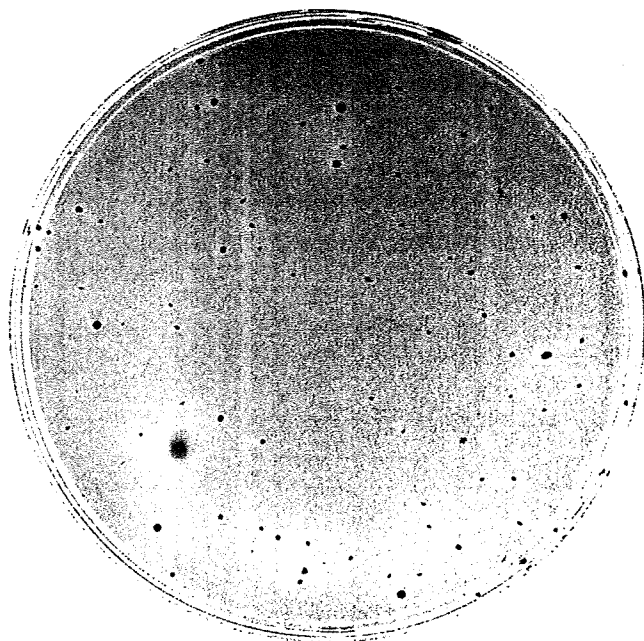


写真6 もやしの培養平板(VRBD 培地, 10^4 倍希釈)

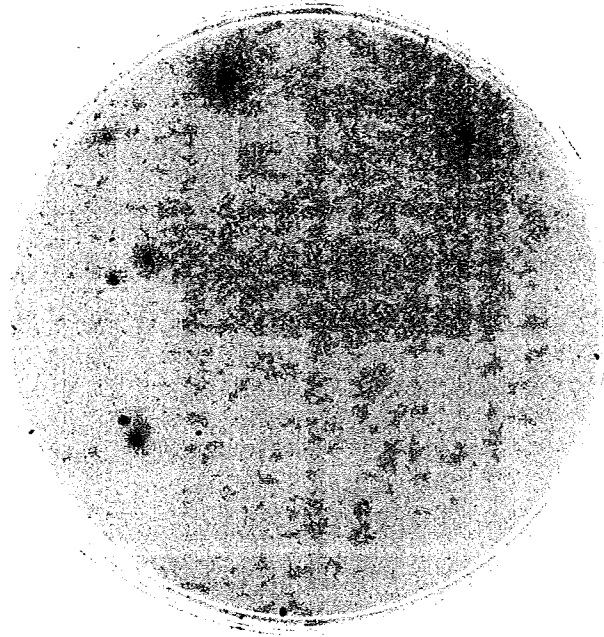


写真7 鶏肉の培養平板(DCA 培地, 10^1 倍希釈)

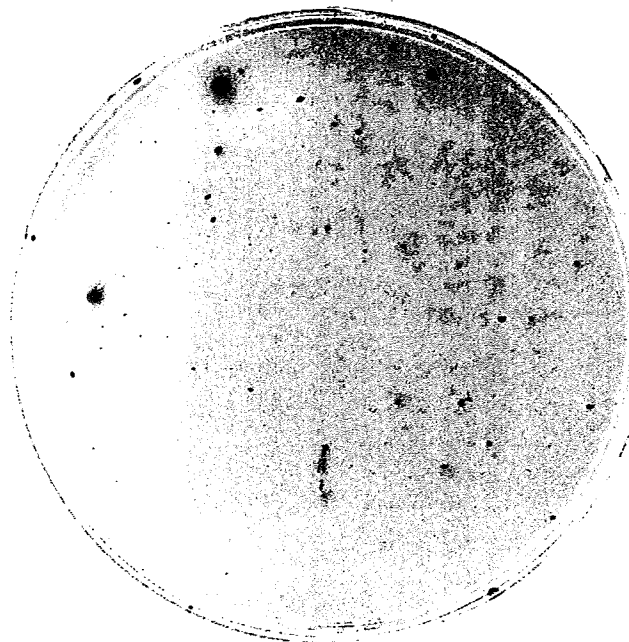


写真8 鶏肉の培養平板(VRBA 培地, 10^1 倍希釈)

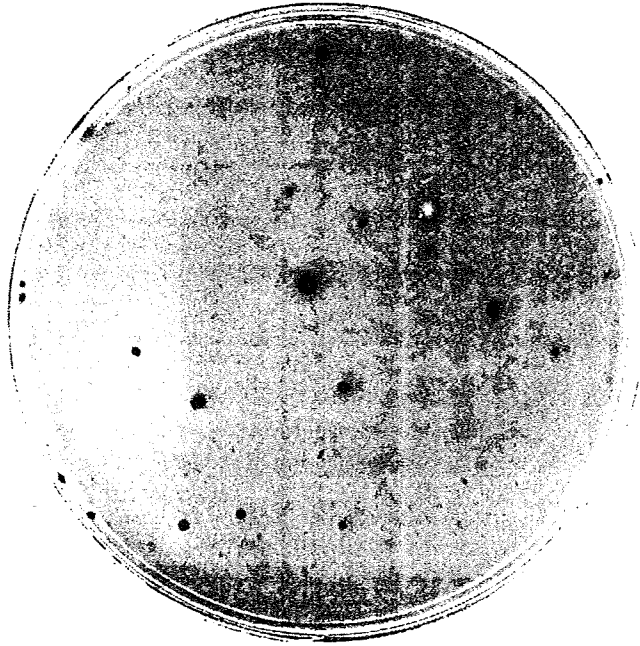


写真 9 鶏肉の培養平板 (VRBD 培地, 10^1 倍希釈)

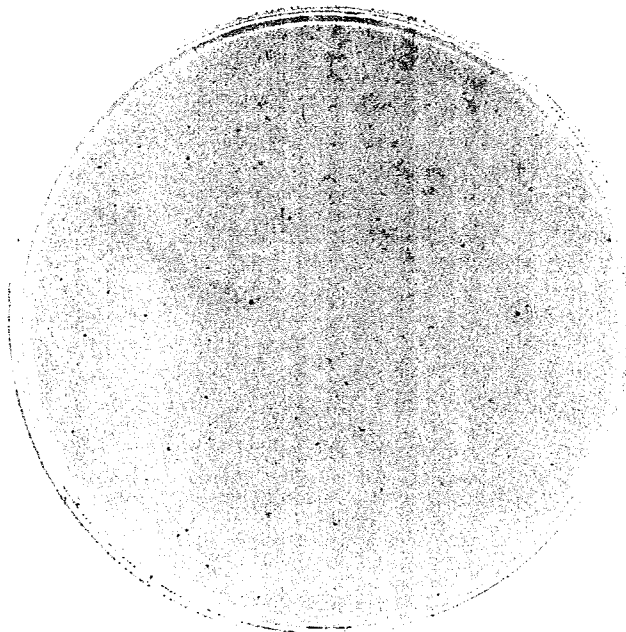


写真 10 牛肉の培養平板 (DCA 培地, 10^1 倍希釈)

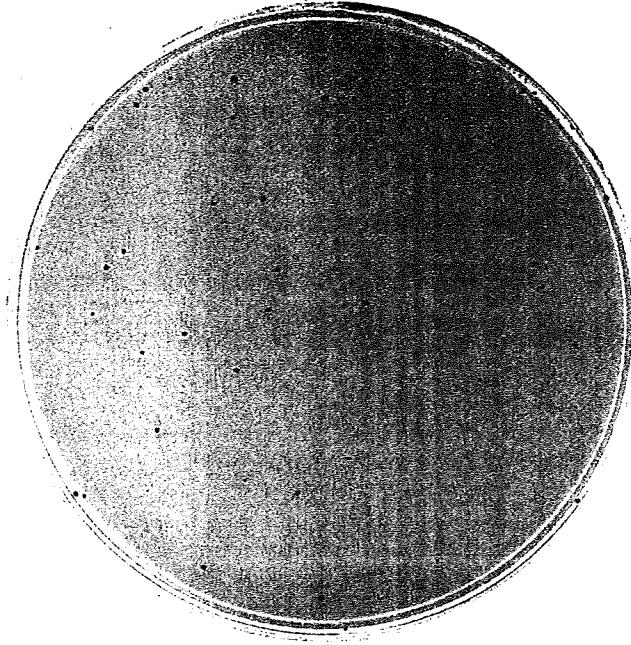


写真 11 牛肉の培養平板 (VRBA 培地, 10^1 倍希釈)

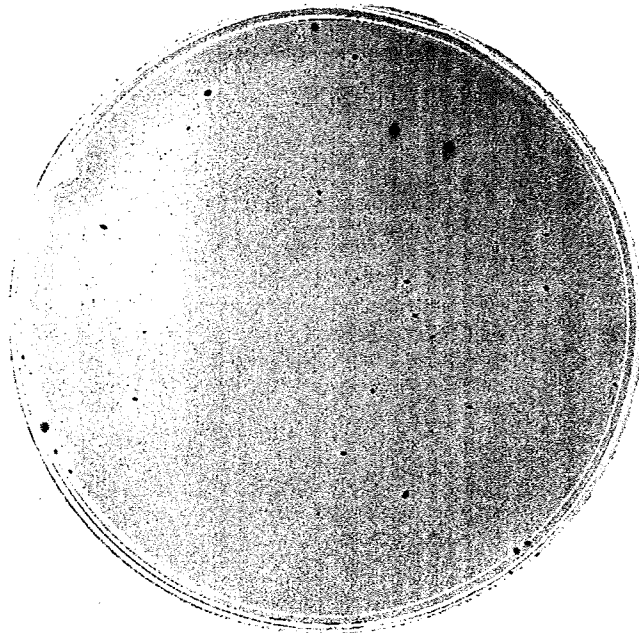


写真 12 牛肉の培養平板 (VRBD 培地, 10^1 倍希釈)

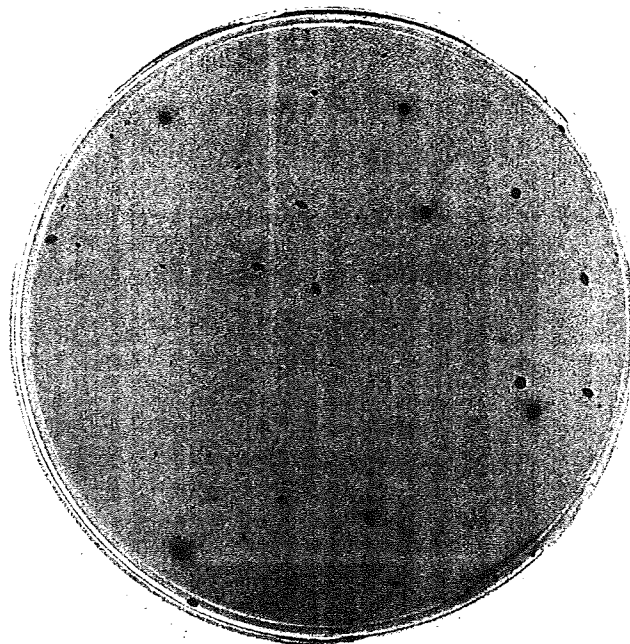


写真 13 菓子(せんべい)の培養平板(DCA 培地, 10^2 倍希釈)

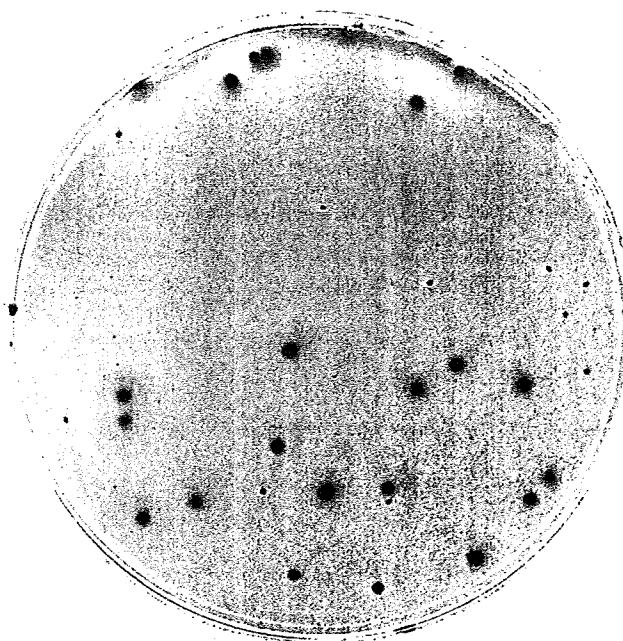


写真 14 菓子(せんべい)の培養平板(VRBA 培地, 10^2 倍希釈)

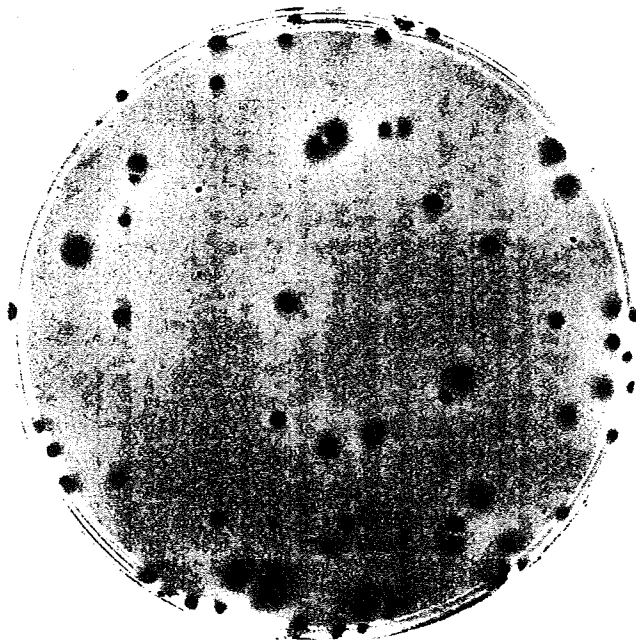


写真 15 菓子(せんべい)の培養平板(VRBD 培地, 10^2 倍希釈)

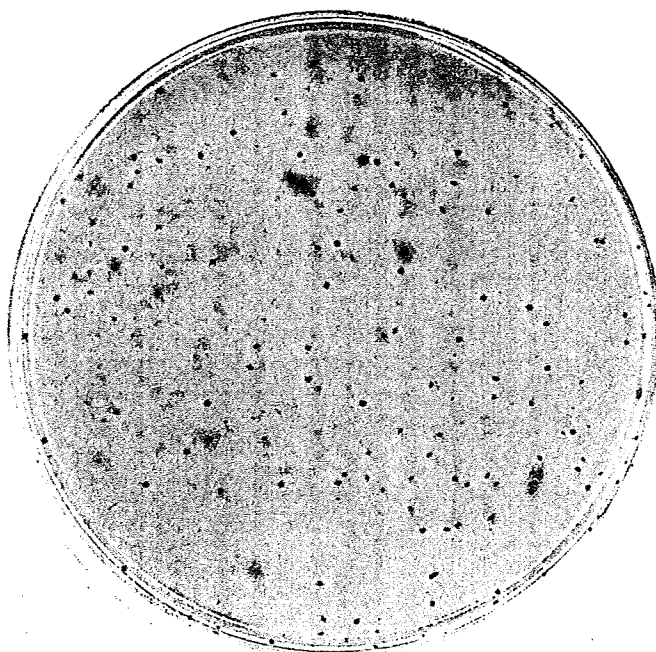


写真 16 カットフルーツの培養平板(DCA 培地, 10^1 倍希釈)

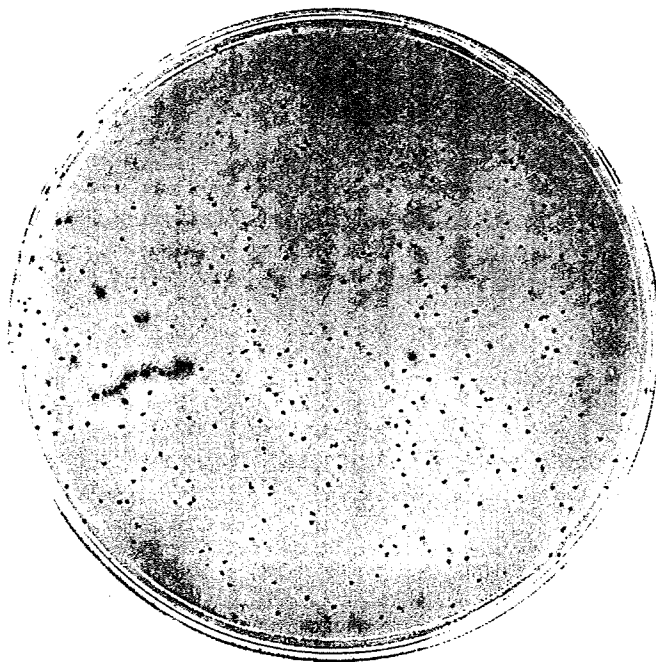


写真 17 カットフルーツの培養平板 (VRBA 培地, 10^1 倍希釈)

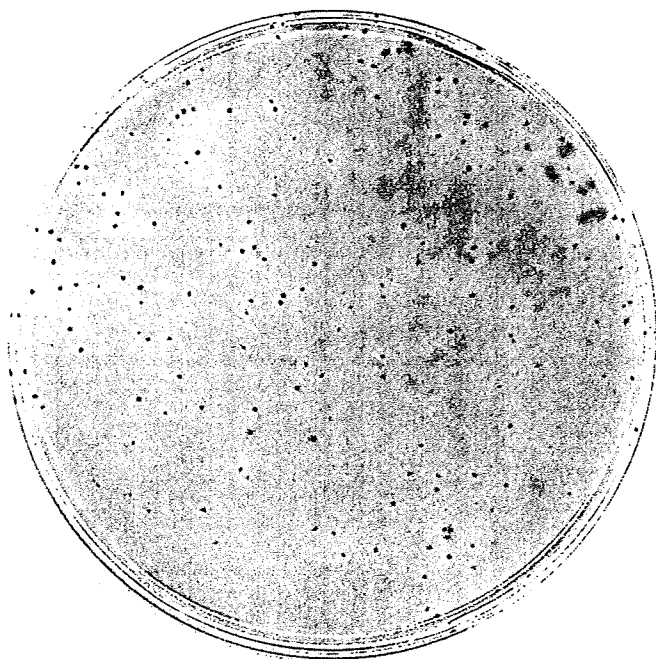


写真 18 カットフルーツの培養平板 (VRBD 培地, 10^1 倍希釈)

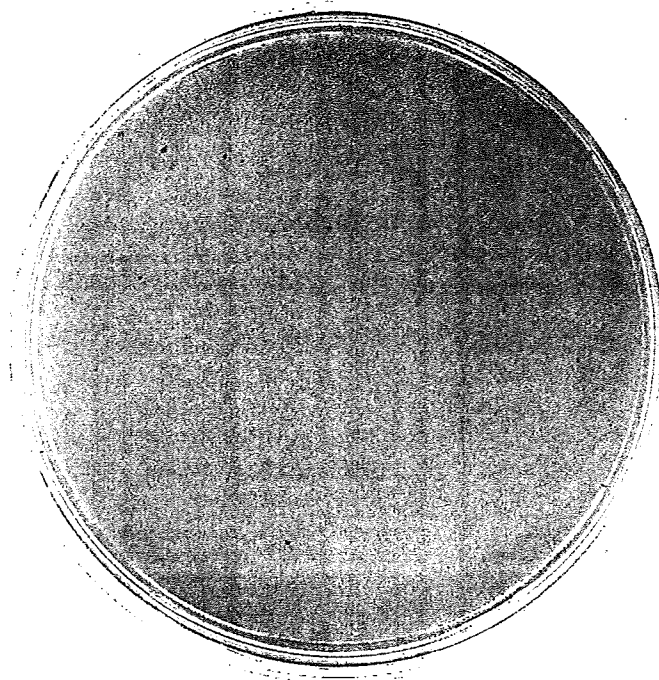


写真 19 キス開きの培養平板(DCA 培地, 10^1 倍希釈)

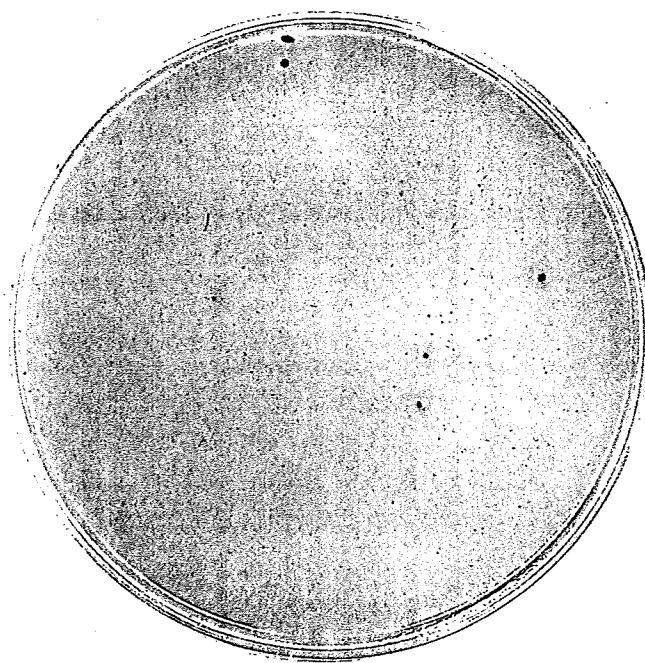


写真 20 キス開きの培養平板(VRBA 培地, 10^1 倍希釈)

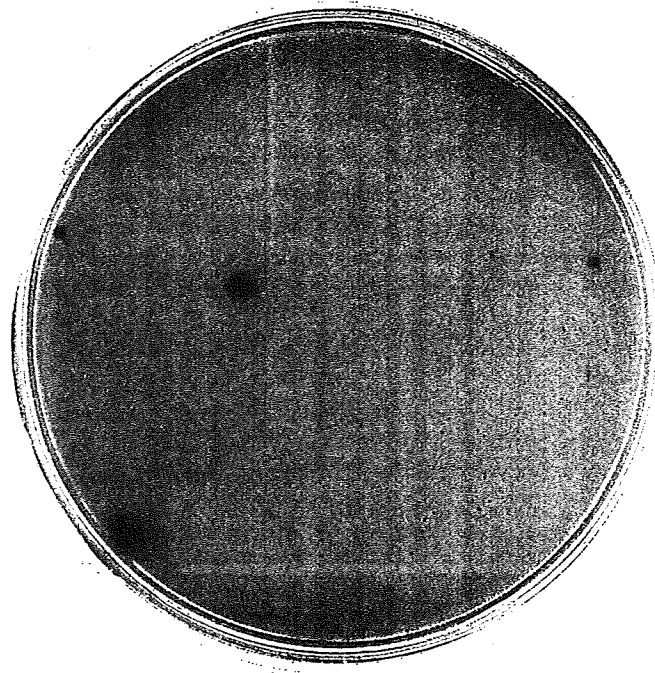


写真 21 キス開きの培養平板 (VRBD 培地, 10^1 倍希釈)

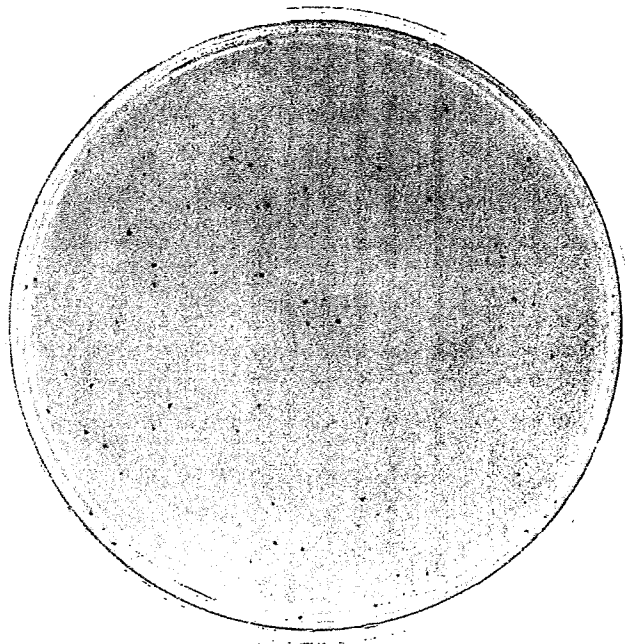


写真 22 ワカサギの培養平板 (DCA 培地, 10^1 倍希釈)

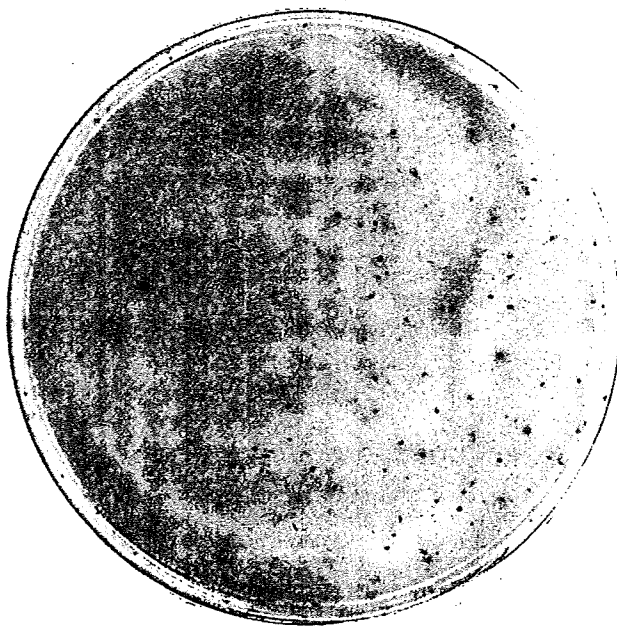


写真 23 ワカサギの培養平板 (VRBA 培地, 10^1 倍希釈)

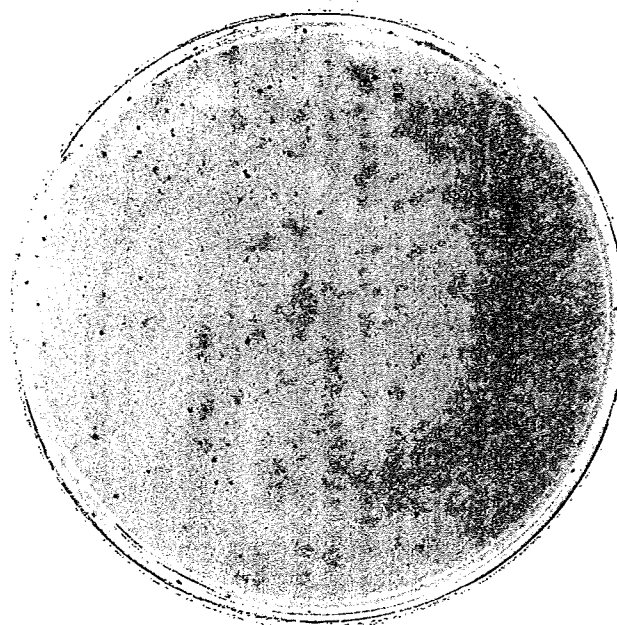


写真 24 ワカサギの培養平板 (VRBD 培地, 10^1 倍希釈)

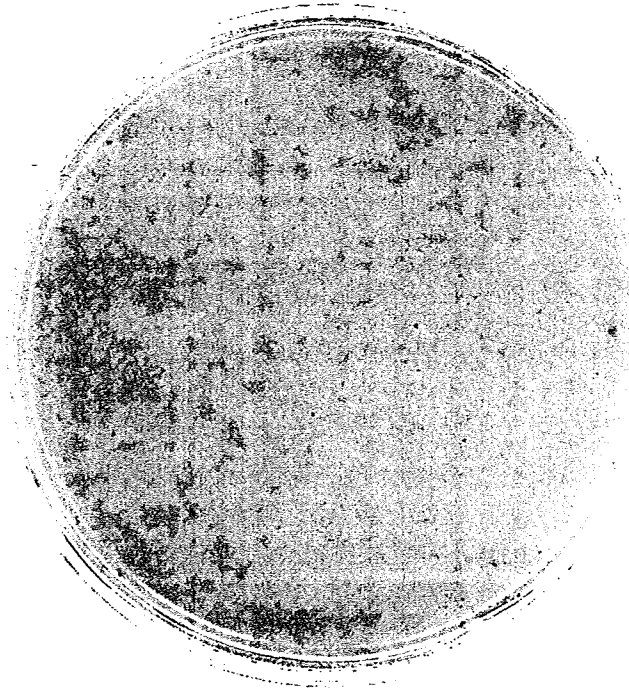


写真 25 惣菜(エビのマヨネーズ和え)の培養平板(DCA 培地, 10^1 倍希釈)

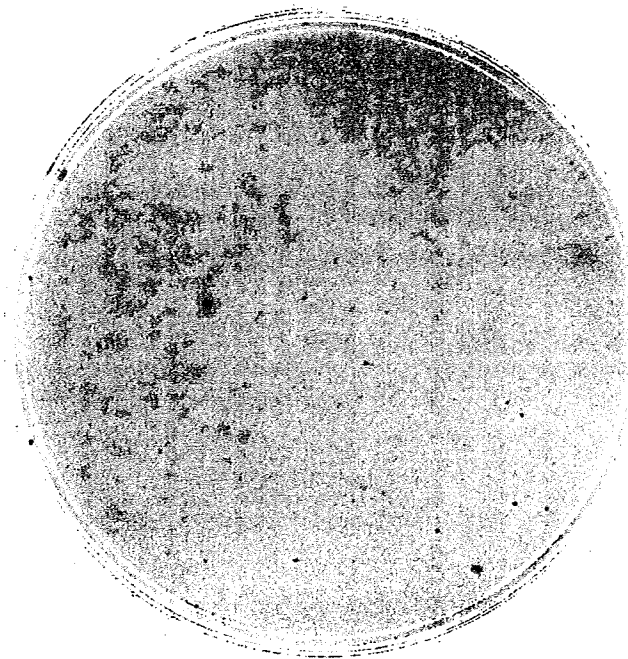


写真 26 惣菜(エビのマヨネーズ和え)の培養平板(VRBA 培地, 10^1 倍希釈)

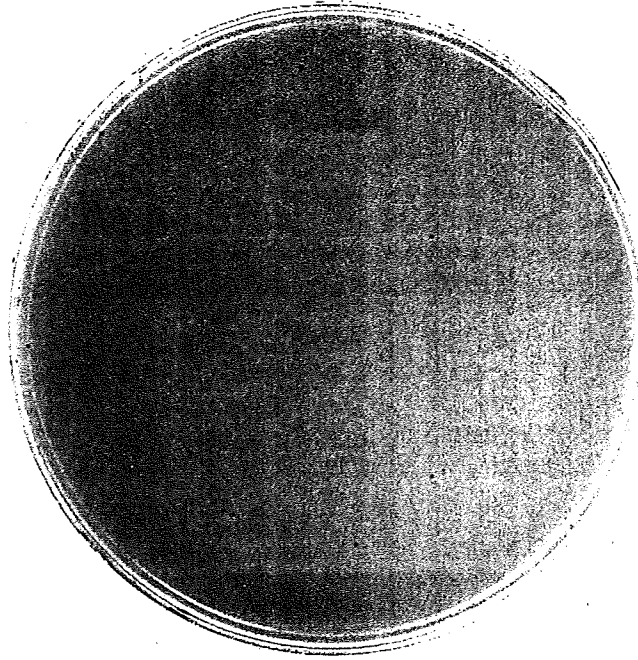


写真 27 惣菜(エビのマヨネーズ和え)の培養平板 (VRBD 培地, 10^1 倍希釈)

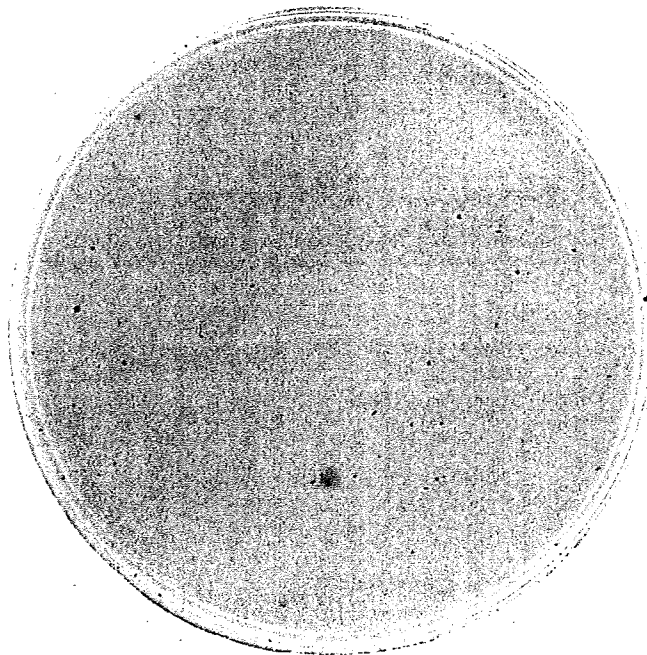


写真 28 生餃子の培養平板 (DCA 培地, 10^1 倍希釈)