

bacteriaceae (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。

本研究では、Enterobacteriaceae (腸内細菌科)、Presumptive *Escherichia coli* (推定大腸菌)、Coliforms (大腸菌群) の試験法に対応する ISO 法の逐語和訳版を作製した。さらに、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比較を行った。

## B. 研究方法

### 1. ISO 法の逐語和訳版の作製

腸内細菌科の試験法として、ISO 21528-1 および ISO 21528-2(いずれも 2004 年版)、推定大腸菌の試験法として ISO 7251(2005 年版)、大腸菌群の試験法として ISO\_4831 および ISO\_4831(いずれも 2006 年版)を採用し、これらの逐語和訳を行った。

### 2. 培地の比較

#### 1) 概要

市販食品 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

##### ・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

##### ・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
- ⑪-⑳ 検体 A-J

・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。

・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、 $35 \pm 1$  °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、 $37 \pm 1$  °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、 $37 \pm 1$  °C で  $24 \pm 2$  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。

C. 研究結果及び考察

1. ISO 法の逐語和訳版の作製

それぞれの和訳は H22 年度報告書に添付の試料 1-5 の通りである。各 ISO 文書に参照するように指示されている ISO 7218, ISO/TS 11133-1 及び ISO/TS 11133-2, ISO 8261, ISO 6887-1, -2, -3, -4 などの各文書についても今後、逐語和訳し、その内容について確認する必要があると考えられた。

2. 培地の比較

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、それぞれの寒天平板の写真を H21 年度報告書に添付の写真 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、ほぼ同程度の集落数であった。

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 培地では一部の検体（ハンバーグ、人参スティック、カシラ）を除いての集落の形態に顕著な差は認められなかった。

## D. 結論

### 1. ISO 法の逐語和訳版の作製

ISO 21528-1 および ISO 21528-2（いずれも 2004 年版）、ISO 7251（2005 年版）、ISO\_4831 および ISO\_4831（いずれも 2006 年版）逐語和訳版を作製した。

### 2. 培地の比較

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、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。

## C. 研究結果及び考察

それぞれの和訳は下記の試料 1-5 の通りである。各 ISO 文書に参照するように指示されている ISO 7218, ISO/TS 11133-1 及び ISO/TS 11133-2, ISO 8261, ISO 6887-1, -2, -3, -4 などの各文書についても今後、逐語和訳し、その内容について確認する必要があると考えられた。

## D. 結論

ISO 21528-1 および ISO 21528-2（いずれも 2004 年版）、ISO 7251（2005 年版）、ISO\_4831 および ISO\_4831（いずれも 2006 年版）逐語和訳版を作製した。

## 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

# 注 意

これ以降のバリデーションガイドについては、著作権の関係から、web へは非公開です

201033011B

以降は前ページの注記により公開することができません。



