

の結果から得られる直線性のパラメータなどの結果は、それほど影響受けることはない、ということであろうか。そう考えれば、定性試験にだけ POD を導入しようとした AOAC の意図が理解できないことはない。

我が国のガイドライン作成の観点からは、上記の推察が的を得たものとなっているかどうかはともかく、定性試験には POD を導入する、という方針でよいと考えられる。

(ホ) コラボスタディの条件

菌濃度の種類、同一条件試料の繰返し数、試験所の数、などはコラボスタディの実施規模に直結する。定性試験では菌濃度は ISO、AOAC とも 3 種類 (blank, low, high) である。繰返し数は ISO では 8 に対して AOAC では 12 (従来は 6) である。何故一気に 2 倍になったのか？関係者に確認しても定かではないが、必要とする試験結果の数としては (繰返し数) × (試験所数) が一定以上得られれば良い、ということだが・・・という程度で、結局はどのような議論を経て、決定されたのか未だに要領を得ないまま良くわからない。このようなことに対しては、やはり統計学的考察に基づいて合理的に決めなければならないし、それを、我国から発信することによって先導しなければならないと思われる。

試験所の数に関しては ISO では 8 であるが AOAC では 12 (従来は 10) となっている。AOAC の意図は、試験結果を 12 カ所分必要としているのではなく、試験結果が思わしくなかった試験所があるといけないので、それを見越して、10 カ所以上の結果を担保するために、最初から 12 カ所で実施せよ、ということである。いわゆるリスクヘッジということである。このようなことを挿入した AOAC の気持ちが変わらないわけではないが、果たして、それは、ガイドラインに入れるこ

とであろうか？AOAC のセンスを疑う。ガイドラインはあくまでも、要求事項を示すものであろう。言うまでもなく、我国のガイドラインでは、要求事項 10 試験所、とすべきである。

定量試験では、菌濃度は AOAC では 4 種類 (blank, low, intermediate, high)、ISO では 5 種類 (blank, intermediate1, central, intermediate2, max) である。繰返し数はいずれも 2 である。また試験所数も ISO、AOAC ともに 8 である。この点に関しては、特に問題はない。

(2) 少数生菌標準物質の開発結果

16 株すべてにおいて、良好な結果が得られた。すなわち、 $10 \times 10 = 100$ 個の CFDA 陽性細胞を 1 個ずつ滴下して、コロニー形成率を調べたところ、全てにおいて 95 以上のコロニーが形成することが確かめられた (図 4 (1))。

また、図 4 (2) に示すように、(A) *E. coli* ATCC8739、(B) *C. freundii*、(C) *K. pneumonia*、(D) *M. morgani* で、それぞれ 100 個のコロニーの大きさが均一であった。ソーティングされた 100 個の細胞が均質であることの証左である。何れのコロニーも共通の培養条件で、 37°C 、18 h で観察したが、その結果、コロニー径が異なったのは、増殖速度が異なるからである。(A)、(B)、(C)、(D) で各々 3、3、2、1 mm であった。

これに対して、(E) *M. luteus*、(F) *B. subtilis* の場合は、コロニー径が必ずしも均一ではなかった。すなわち、100 個の細胞は均質ではなかったことを示している。

次に、複数プレート用ホルダー (図 5 (1)) を新規に作製し、複数のプレートに同時にソーティングできるようにした。この方法により、B、C、D のプレートに食品マトリクスを入れておくことによって、一定数の少数生菌で汚染された標準汚染食品を調製できることが分かった。また、それが 1 週間程度保存可能であれ

ば、コラボスタディに直接利用でき、その際、標準汚染食品のロットごとに精確な添加菌数を保証できることが期待される(図5(2))。

食品マトリクス、あるいは添加物などが生菌のバイアビリティに及ぼす影響を調べておくことは、そうした標準汚染食品の保存安定性を担保するために必須である。そこで、飲料の場合について調査した。すなわち、飲料含有寒天上に生菌(*E. coli* ATCC 8739)をソーティングし、一定時間インキュベーションした後、TSA寒天培地に重層してコロニー形成率を調べた。その結果、例えばオレンジジュースやコーヒーでは、菌が高い確率で死滅することが分かった。これらの結果から、食品成分の影響を定量的に評価することができる見通しを得た。

D. 結論

我が国の事情を考慮し、かつ AOAC、ISO とのハーモナイゼーションの取れたガイドラインの作成のための基盤ができた。しかし、一方で、ガイドラインに従って妥当性確認を実施するためのシステム作りが不可欠である、ということが改めて強く認識された。

また、微生物生菌標準物質に関しては、多くの菌種に適用できる一般的方法としての見通しが得られた。合理的な妥当性確認のために、大いに寄与する技術であると結論された。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

(原著論文)

1. H. Matsuoka, T. Shigetomi, H. Funabashi, M. Saito, S. Igimi: Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. J. Microbiol.

Methods 93(1), 49-51 (2013).

(解説・総説等)

1. 松岡英明: AOAC 法による微生物試験・評価法. 日本防菌防黴学会誌、40(5), 279-288 (2012).

(国内学術集会)

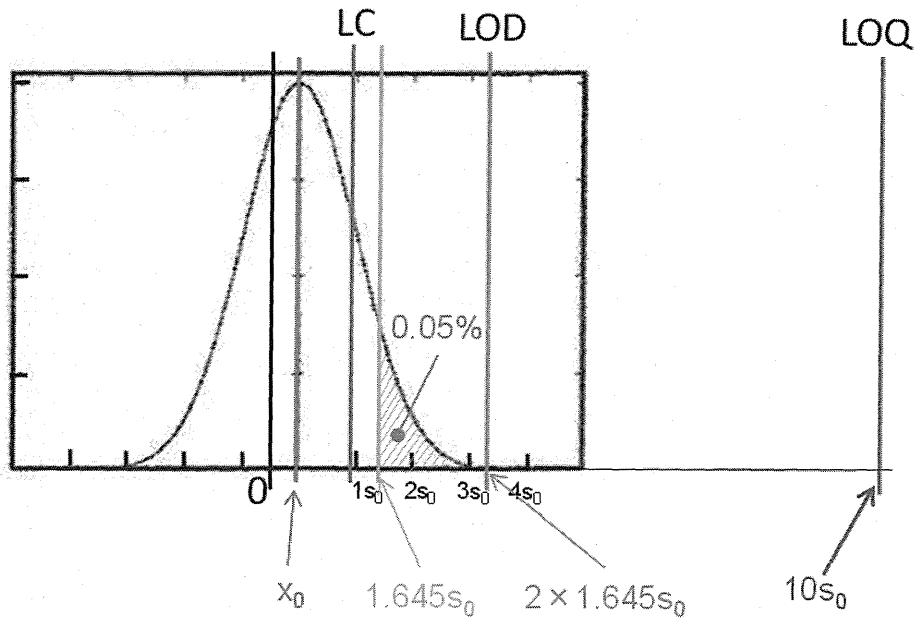
2. 中納広一郎、高谷周督、吉田智紀、舟橋久景、斉藤美佳子、松岡英明、五十君静信: FACS を利用した微生物生菌標準物質の「その場」調製法. 第 39 回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2012.9.11)
3. 高谷周督、吉田智紀、斉藤美佳子、松岡英明、五十君静信: 微好気性細菌を好気条件で定量ソーティングするための条件検討. 第 39 回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2012.9.11)
4. 松岡英明: 微生物試験法の合理的バリデーションの鍵となる生菌標準物質. 日本微生物資源学会第 19 回大会、シンポジウム「標準微生物とカルチャーコレクション」、木更津 (2012.6.29)
5. 松岡英明: 微生物試験法バリデーションの国際動向—AOAC と公定法との今後の関係. メルクミリポア・マイクロバイオロジーセミナー 2012、東京 (2012.7.11)、大阪 (2012.7.13)
6. 松岡英明: 微生物試験法の妥当性確認の新ガイドライン. JASIS コンファレンス「国際化に対応する分析値の質の向上と AOAC の新しい分析法妥当性確認」、幕張 (2012.9.7)
7. 松岡英明: 食品微生物試験法の不確かさと標準物質. 統計数理研究所リスク解析戦略研究センター・ワークショップ「食品の安全性科学と統計科学」 (2013.3.14)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

図1. LOD と PODの違い

(1) LODおよびLOQの定義



x_0, s_0 : mean and sd of blank

LOD (limit of detection) = $x_0 + 2 \times 1.645 \times s_0$

LOQ (limit of quantification) = $10 \times s_0$

ここで適用される「2」、「10」は実用的には妥当な値と思われるが、統計学的に厳密な根拠は？

(2) PODの定義

•For Single Laboratory Validation: $POD = \frac{x}{R}$

•For Collaborative Study: $LPOD = \frac{x}{N}$, $N=L \times R$

Where,
 X: number of positive results
 R: number of replicates
 L: number of labs.

図2. 食品マトリクス分類

(1) カテゴリー

Food categories in ISO 16140

①Meat products, ②Poultry, ③Fish and seafood products, ④Fruits and vegetable based products, ⑤Dairy products, ⑥Chocolate/bakery products, ⑦Other products, ⑧Animal feeds

Food categories in AOAC 2012ver

①Raw milk and dairy products, ②Heat processed milk and dairy products, ③Raw meat and ready-to-cook meat products (except poultry), ④Ready-to-eat ready-to-reheat meat products, ⑤Raw poultry and ready-to-cook poultry products, ⑥ Ready-to-eat ready-to-reheat poultry products, ⑦Eggs and derivatives, ⑧Raw and ready-to-cook fish and seafoods, ⑨ Ready-to-eat ready-to-reheat fishery products, ⑩Fresh products and fruits, ⑪Processed fruits and vegetables, ⑫Infant formula and infant cereals, ⑬Dried cereals, fruits, nuts, seeds and vegetables, ⑭Chocolate, bakery products and confectionary, ⑮Multi-component foods or meal components, ⑯Pet food and animal feed, ⑰Environmental samples (food or feed production), ⑱Primary production samples

(2) タイプ

Food types in ISO 16140

①Raw, ②Heat processed, ③Frozen, ④Fermented, ⑤Cured, ⑥Others

Food types in AOAC 2013

Raw milk and dairy products

- ①Raw milk and/or fermented/acidified milks (not heat treated),
- ②Raw milk based products, with high fat content and/or high background microflora

Heat processed milk and dairy products

- ①Pasteurized dairy products, ②Sterilized or UHT dairy products,
- ③Pasteurized milk based products, ④Dry

Ready-to-eat, ready-to-reheat meat products

- ①Cooked meat products, ②Fermented or dried meat products,
- ③Raw cured (smoked) (a.w.>0.92), ④Raw cured (smoked) (a.w.<0.92),
- ⑤Canned meat (ambient stable)

Others

図 3. 菌濃度と繰返し数

(1) 定性試験

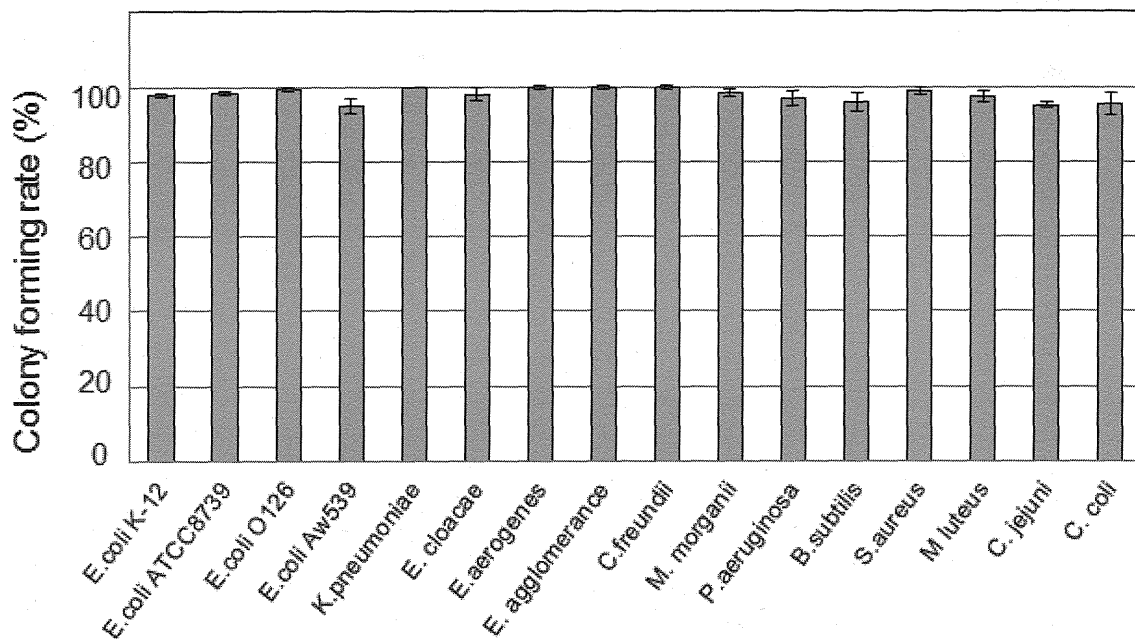
| Validation type | | With/without food | AOAC2012 | | ISO 16140 | |
|-----------------|-----|-------------------|---|--|---|--|
| Qualitative | SLV | without | Inclusivity, Exclusivity | POD=0.50 (100 times of LOD ₅₀) | Inclusivity, Exclusivity | 10~100 times of LOD |
| | | With | 95% Confidence interval of each POD | POD= 0, 0.25~0.75, 1.0 | Rel. accuracy, Rel. specificity, Rel. sensitivity | Positive rate 50% |
| | CS | With | Repeatability, Reproducibility, Mean of POD | blank, intermediate, high | Relative detection level | ≥3 levels (preferably ≥5 levels). ex. L ₀ (mega cont), L ₁ (theo. detec. level; TD L), L ₂ (just above TDL), L ₃ (≈3×L ₂), L ₄ (≈3×L ₃) |
| | | | | | Accuracy, Specificity, Sensitivity | 3 levels ex. 0, 3, 30 cells/25g) |

(2) 定量試験

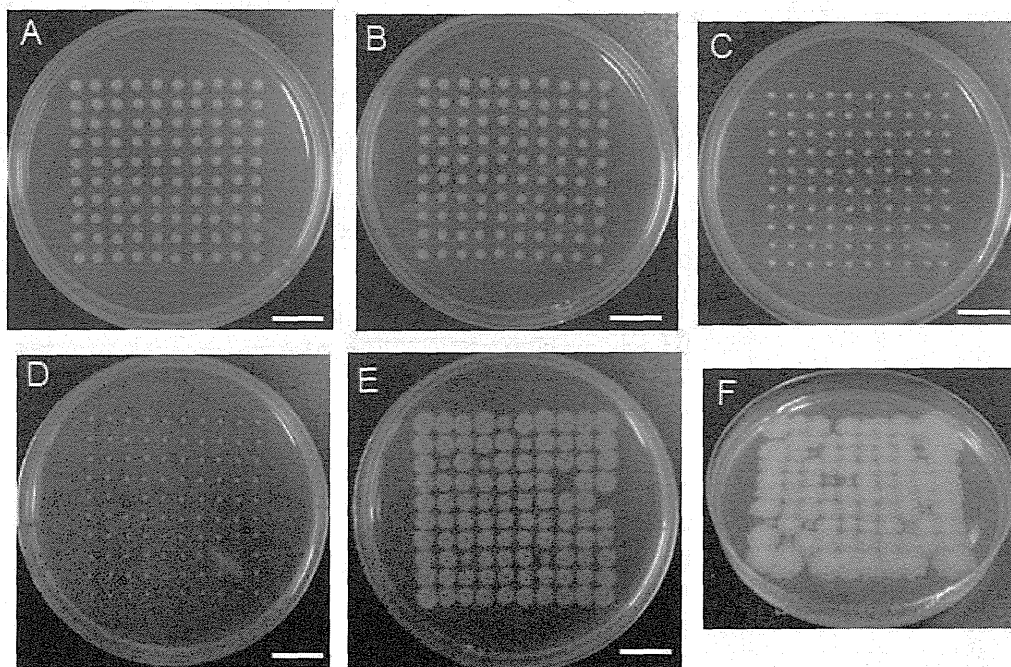
| Validation type | | With /without food | AOAC2012 | | ISO 16140 | |
|-------------------|-----|--------------------|--------------------------------|---|--------------------------|---|
| Quantitative test | SLV | With | Linearity, Repeatability | blank, low (near LOD), intermediate, high | Linearity, Rel. accuracy | 0, intermediate1, central, intermediate2, max (ex. max=10×LOD→0, 2.5×LOD, 5×LOD, 7.5×LOD, 10×LOD) |
| | | | | | LOD, LOQ | 6×blank→s ₀ , LOD=x ₀ +3.3×s ₀ , LOQ=10×s ₀ |
| | CS | With | Repeatability, Reproducibility | blank, low (near LOD), intermediate, high | Reproducibility | 0, intermediate1, central, intermediate2, max |

図4. 定量ソーティングの結果

(1) コロニー形成率



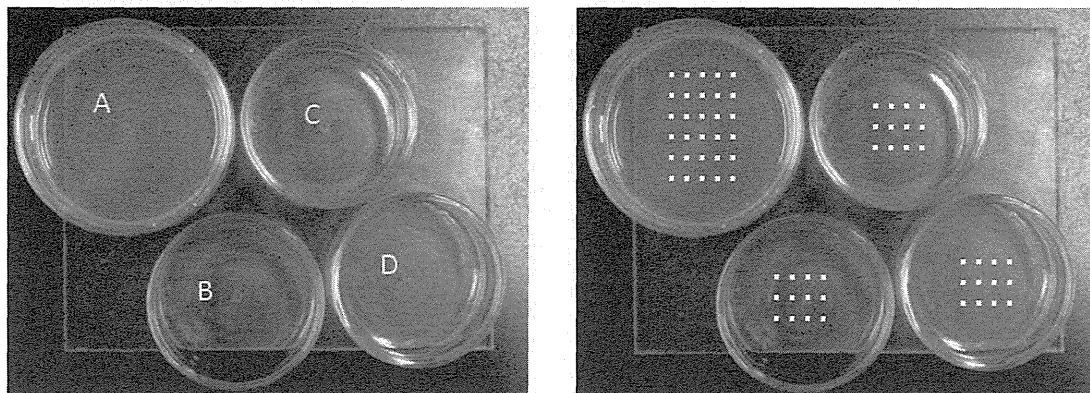
(2) コロニー形状



(A) *E. coli* ATCC8739, (B) *C. freundii*, (C) *K. pneumoniae*, (D) *M. morganii*, (E) *M. luteus*, (F) *B. subtilis*. Bar indicates 15 mm

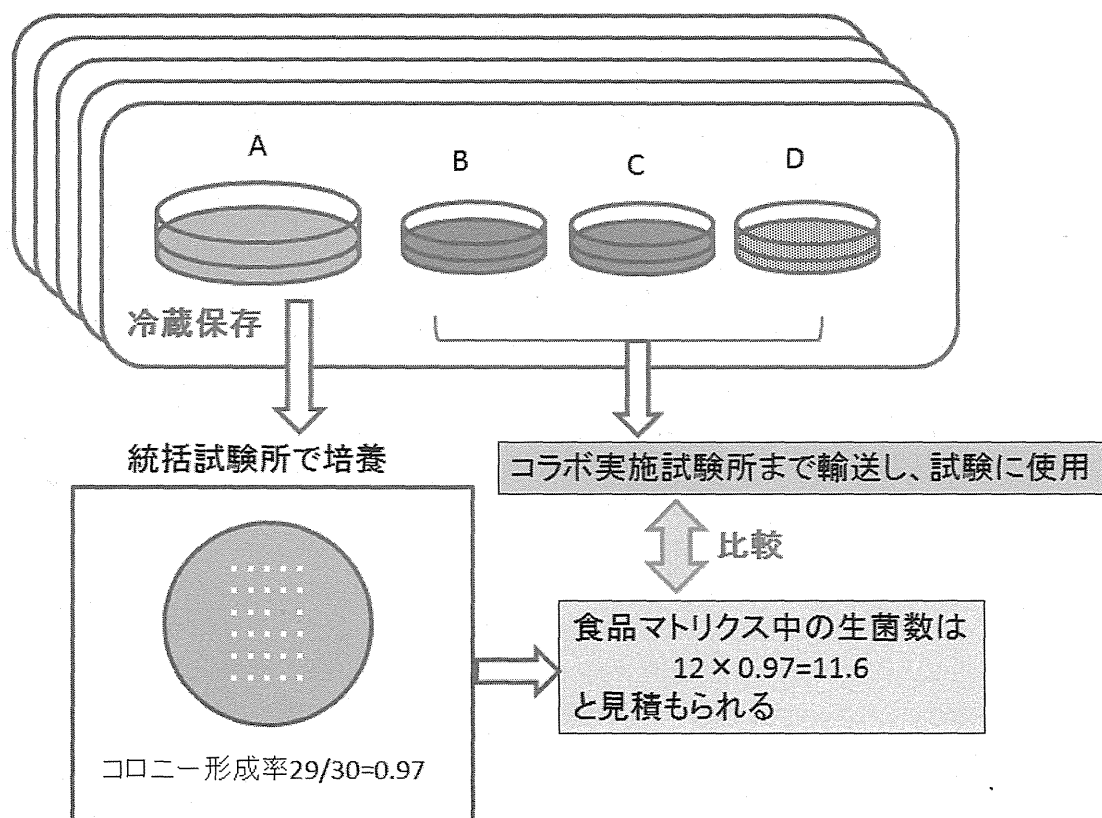
図5. 標準汚染食品を利用したコラボスタディの概念図

(1) 標準汚染食品の調製用マルチプレートホルダー



AはTSA, B~Dは食品マトリクス用ディッシュ(液体、ペースト、粉末用)。この例ではAには $N_0=30$ cells、B~Dには、各々12cells添加。

(2) 配布された標準汚染食品中の実菌数の推定



平成 24年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の微生物試験法及びその妥当性評価に関する研究

分担研究報告書

「衛生指標菌試験法の標準法策定の検討」

分担研究者： 伊豫田淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

協力（委託）研究者： 田中廣行（一般財団法人 日本食品分析センター 微生物部）

森曜子（公益財団法人 日本適合性認定協会 認定センター）

井上誠（一般財団法人 日本冷凍食品検査協会）

研究要旨

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）等の規格基準が規定されている。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，ISO(国際標準化機構)が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法(BAM 法)との調和が計ら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、今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認されている。昨年度の本研究では，ISO の β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌)試験法である ISO 16649-2:2001 を和訳し，わが国の標準法として導入可能であるかを検討した。その結果，当該試験法はわが国の標準法として導入可能であると判断された。今年度の本研究では，当該試験法に記述されている損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討することを目的し，2種類の大腸菌に対して，加熱処理，酸処理及び凍結処理の3通りのストレス処理を行い，損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討した。その結果，加熱処理及び凍結処理においては，前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあり，対応のある2群の平均の差のt検定において，有意水準1%で「有意差あり」と判定された。ただし，いずれのストレス処理条件においても，前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は1.9以内であり，極端な大腸菌数の相違は認められなかった。以上のことから，ISO 16649-2:2001 を大腸菌数の試験方法として採用する場合は，食品群ごとに前培養の有効性を比較・評価し，前培養を行う必要があるのかを検討しなければならないと考えられた。

A. 研究目的

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，食品(種)ごとに細菌数(生菌数)，大腸菌群，

E. coli(糞便系大腸菌群)等の規格基準が規定されており、それぞれ個別に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、ISO(国際標準化機構)が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法(Bacteriological Analytical Manual ; BAM 法)との調和が計ら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ける討議・検討の結果、今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認された。これまで Enterobacteriaceae(腸内細菌科菌群)、Presumptive *Escherichia coli*(推定大腸菌)及び Coliforms(大腸菌群)に関する標準法の策定作業を進めてきたが、今後は Microorganisms(一般生菌数)及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌)の試験法並びに試験結果の算定法を確立することを検討課題とすることとした。

昨年度の本研究では、ISO の β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌)試験法である ISO 16649-2 : 2001 を和訳し、わが国の標準法として導入可能であるかを検討した。その結果、当該試験法はわが国の標準法として導入可能であると判断された。

今年度の本研究では、当該試験法に記述されている損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討することを目的とする。

B. 研究方法

1) 研究概要

ISO 16649-2 : 2001 では、TBX 寒天培地の培養条件を「 44 ± 1 °C、18~24 時間」と規定

しているが、ストレスを受けた大腸菌(損傷菌)の存在が疑われる場合は、「 37 ± 1 °C、4 時間」の前培養を行った後に「 44 ± 1 °C、18~24 時間」するよう規定している。損傷菌に対する前培養の有効性を確認するために、ストレス処理(加熱処理、酸処理及び凍結処理)を行った大腸菌の菌液について、TBX 寒天培地を用いて 2 通りの培養条件(前培養「なし」及び前培養「あり」)により大腸菌数を測定し、得られた結果を比較・評価した。

2) 試験菌液の調製

Escherichia coli NBRC 15034(大腸菌①)及び *Escherichia coli* NBRC 3972(大腸菌②)を試験菌とし、それぞれトリプトソイブイオンに接種して 37 ± 1 °C で 18~24 時間培養して試験菌液①とした。また、試験菌液①の 1 ml を 0.1 %ペプトン加生理食塩水 9 ml に加えて試験菌液②とした。

3) 試験菌液のストレス処理

調製した試験菌液について、次の 3 通りのストレス処理を行った。

① 加熱処理

0.1 %ペプトン加生理食塩水(pH 7.0) 10 ml 入りの試験管 3 本を恒温水槽に浸し、55 °C に保持した。これらの試験管に試験菌液②を 0.1 ml ずつ滴下、混合して試料液とした。5 分、10 分及び 15 分後に試験管を恒温水槽から取り出し、冷水中で急冷して加熱処理後の試料液とした。

なお、本処理は繰り返し 3 回行った。

② 酸処理

pH 2.0 に調整した 0.1 %ペプトン加生理食塩水 10 ml を入れた試験管 3 本を恒温水槽に浸し、37 °C に保持した。これらの試験管に試験菌液②を 0.1 ml ずつ滴下、混合して試料液とした。10 分、30 分及び 60 分後に試験管を恒温水槽から取り出し、水酸化ナトリウム溶液を用いて試料液の pH を 6.0~7.0 に調

整し、酸処理後の試料液とした。

なお、本処理は繰り返し3回行った。

③ 凍結処理

試験菌液①の0.2 mlを0.1%ペプトン加生理食塩水(pH 7.0)200 mlに滴下、混合して試料液とした。試料液を50 mlずつ滅菌ポリ容器(100 ml容)3個に小分けした後、それぞれを-10℃、-20℃及び-30℃に設定した冷凍庫内に保存した。2日後に滅菌ポリ容器を冷凍庫から取り出し、室温で2~3時間解凍して凍結処理後の試料液とした。

なお、本処理は繰り返し3回行った。

4) ストレス処理後の試料液中の大腸菌数の測定

加熱処理、酸性処理及び凍結処理後の試料液中の大腸菌数を、TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法により測定した。なお、培養は以下の2条件とした。

条件1: 44±1℃, 18~24時間(前培養「なし」)

条件2: 37±1℃, 4時間後に44±1℃, 18~24時間(前培養「あり」)

C. 研究結果及び考察

加熱処理後の試料液中の大腸菌数測定結果を表-1、酸処理後の試料液中の大腸菌数測定結果を表-2、凍結処理後の試料液中の大腸菌数測定結果を表-3に示した。

なお、大腸菌数を測定したTBX寒天培地の一例を写真-1~6に示した。また、前培養「あり」の大腸菌数(対数)から前培養「なし」の大腸菌数(対数)を引いた値を図1~3に示した。

1) 加熱処理した試料液の大腸菌数測定における前培養の有効性

前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあり、55℃、15分間の加熱処理条件では、大腸菌2種類の繰り返し3回測定すべてにおいて、

前培養「あり」のほうが高い値であった。また、各測定値を常用対数に変換した後、対応のある2群の平均の差のt検定を行った結果、得られた t_0 値は3.15であり、有意水準1%で「有意差あり」と判定された。ただし、表-1に示したとおり、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は1.5以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。

2) 酸処理した試料液の大腸菌数測定における前培養の有効性

pH 2.0、15分間の酸処理条件では、前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあったが、その他の酸処理条件では、顕著な傾向は認められなかった。また、各測定値を常用対数に変換した後、対応のある2群の平均の差のt検定を行った結果、得られた t_0 値は2.43であり、有意水準1%では「有意差なし」と判定された。

なお、表-2に示したとおり、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は1.7以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。

3) 凍結処理した試料液の大腸菌数測定における前培養の有効性

前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあり、-10℃、2日間及び-30℃、2日間の凍結処理条件では、大腸菌2種類の繰り返し3回測定すべてにおいて、前培養「あり」のほうが高い値であった。また、各測定値を常用対数に変換した後、対応のある2群の平均の差のt検定を行った結果、得られた t_0 値は4.66であり、有意水準1%で「有意差あり」と判定された。ただし、表-3に示したとおり、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は1.9以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。

D. 結論

本研究では、2種類の大腸菌に対して、加熱処理、酸処理及び凍結処理の3通りのストレス処理を行い、損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討した。その結果、加熱処理及び凍結処理においては、前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあり、対応のある2群の平均の差のt検定において、有意水準1%で「有意差あり」と判定された。ただし、いずれのストレス処理条件においても、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数の比は1.9以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。

以上のことから、ISO 16649-2:2001を大腸菌数の試験方法として採用する場合は、食品群ごとに前培養の有効性を比較・評価し、前培養を行う必要があるのかを検討しなければならないと考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

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-1 加熱処理後の試料液中の大腸菌数測定結果

| 加熱処理条件 | 試験菌*1 | 試料液1 ml当たり的大腸菌数*2 | | B/A |
|-------------|-------|----------------------|----------------------|------|
| | | 前培養「なし」(A)*3 | 前培養「あり」(B)*4 | |
| 55 °C, 5分間 | ① | 1.5×10^4 | 1.7×10^4 | 1.13 |
| | | 3.4×10^3 | 3.5×10^3 | 1.03 |
| | | 3.2×10^3 | 3.0×10^3 | 0.94 |
| | ② | 1.0×10^5 | 1.2×10^5 | 1.20 |
| | | 1.5×10^5 | 1.5×10^5 | 1.00 |
| | | 1.5×10^5 | 1.9×10^5 | 1.27 |
| 55 °C, 10分間 | ① | 5.5×10^3 | 5.4×10^3 | 0.98 |
| | | 7.6×10^3 | 8.0×10^3 | 1.05 |
| | | 1.5×10^3 | 1.1×10^3 | 0.73 |
| | ② | 1.1×10^5 | 1.2×10^5 | 1.09 |
| | | 9.7×10^4 | 1.2×10^5 | 1.24 |
| | | 1.5×10^5 | 1.9×10^5 | 1.27 |
| 55 °C, 15分間 | ① | 4.3×10^3 | 4.8×10^3 | 1.12 |
| | | 3.0×10^3 | 3.7×10^3 | 1.23 |
| | | 2.7×10^3 | 3.6×10^3 | 1.33 |
| | ② | 6.5×10^4 *5 | 8.6×10^4 *6 | 1.32 |
| | | 5.4×10^4 | 7.6×10^4 | 1.41 |
| | | 1.0×10^5 | 1.1×10^5 | 1.10 |

*1 試験菌① : *Escherichia coli* NBRC 15034, 試験菌② : *Escherichia coli* NBRC 3972

*2 TBX寒天培地を用いた混積平板培養法

*3 44 ± 1 °C, 18~24時間

*4 37 ± 1 °C, 4時間後に 44 ± 1 °C, 18~24時間

*5 写真-1

*6 写真-2

表-2 酸処理後の試料液中の大腸菌数測定結果

| 酸処理条件 | 試験菌*1 | 試料液1 ml当たり的大腸菌数*2 | | B/A |
|--------------|-------|------------------------|------------------------|------|
| | | 前培養「なし」(A)*3 | 前培養「あり」(B)*4 | |
| pH2.0, 15 分間 | ① | 5.5×10 ⁴ | 5.4×10 ⁴ | 0.98 |
| | | 5.9×10 ⁴ | 7.0×10 ⁴ | 1.19 |
| | | 2.6×10 ⁴ | 3.8×10 ⁴ | 1.46 |
| | ② | 3.3×10 ⁴ | 4.4×10 ⁴ | 1.33 |
| | | 2.0×10 ⁴ | 2.0×10 ⁴ | 1.00 |
| | | 6.5×10 ³ *5 | 1.1×10 ⁴ *6 | 1.69 |
| pH2.0, 30 分間 | ① | 2.6×10 ⁴ | 3.3×10 ⁴ | 1.27 |
| | | 3.1×10 ⁴ | 2.8×10 ⁴ | 0.90 |
| | | 1.1×10 ⁴ | 1.2×10 ⁴ | 1.09 |
| | ② | 2.2×10 ⁴ | 2.3×10 ⁴ | 1.05 |
| | | 1.7×10 ⁴ | 1.5×10 ⁴ | 0.88 |
| | | 1.1×10 ⁴ | 1.4×10 ⁴ | 1.27 |
| pH2.0, 60 分間 | ① | 1.4×10 ⁴ | 1.3×10 ⁴ | 0.93 |
| | | 1.8×10 ⁴ | 1.8×10 ⁴ | 1.00 |
| | | 7.2×10 ³ | 7.6×10 ³ | 1.06 |
| | ② | 1.9×10 ⁴ | 2.0×10 ⁴ | 1.05 |
| | | 2.5×10 ⁴ | 2.9×10 ⁴ | 1.16 |
| | | 2.6×10 ⁴ | 2.4×10 ⁴ | 0.92 |

*1 試験菌① : *Escherichia coli* NBRC 15034, 試験菌② : *Escherichia coli* NBRC 3972

*2 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*3 44±1 °C, 18~24時間

*4 37±1 °C, 4時間後に44±1 °C, 18~24時間

*5 写真-3

*6 写真-4

表-3 凍結処理後の試料液中の大腸菌数測定結果

| 凍結処理条件 | 試験菌*1 | 試料液1 ml当たり的大腸菌数*2 | | B/A |
|-------------|-------|------------------------|------------------------|------|
| | | 前培養「なし」(A)*3 | 前培養「あり」(B)*4 | |
| -10 °C, 2日間 | ① | 4.2×10 ⁵ | 5.7×10 ⁵ | 1.36 |
| | | 3.7×10 ⁵ | 4.2×10 ⁵ | 1.14 |
| | | 4.9×10 ⁵ | 5.0×10 ⁵ | 1.02 |
| | ② | 2.4×10 ⁴ | 2.6×10 ⁴ | 1.08 |
| | | 2.0×10 ⁴ | 2.6×10 ⁴ | 1.30 |
| | | 2.0×10 ⁴ | 2.6×10 ⁴ | 1.30 |
| -20 °C, 2日間 | ① | 3.1×10 ⁴ | 2.9×10 ⁴ | 0.94 |
| | | 2.8×10 ⁴ | 3.6×10 ⁴ | 1.29 |
| | | 3.0×10 ⁴ | 3.5×10 ⁴ | 1.17 |
| | ② | 4 | 5 | 1.25 |
| | | 7 | 13 | 1.86 |
| | | 12 | 11 | 0.92 |
| -30 °C, 2日間 | ① | 1.0×10 ⁵ | 1.2×10 ⁵ | 1.20 |
| | | 9.4×10 ⁴ | 1.1×10 ⁵ | 1.17 |
| | | 1.1×10 ⁵ | 1.2×10 ⁵ | 1.09 |
| | ② | 1.2×10 ³ | 2.2×10 ³ | 1.83 |
| | | 1.8×10 ³ *5 | 2.9×10 ³ *6 | 1.61 |
| | | 1.9×10 ³ | 2.4×10 ³ | 1.26 |

*1 試験菌① : *Escherichia coli* NBRC 15034, 試験菌② : *Escherichia coli* NBRC 3972

*2 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*3 44±1 °C, 18~24時間

*4 37±1 °C, 4時間後に44±1 °C, 18~24時間

*5 写真-5

*6 写真-6

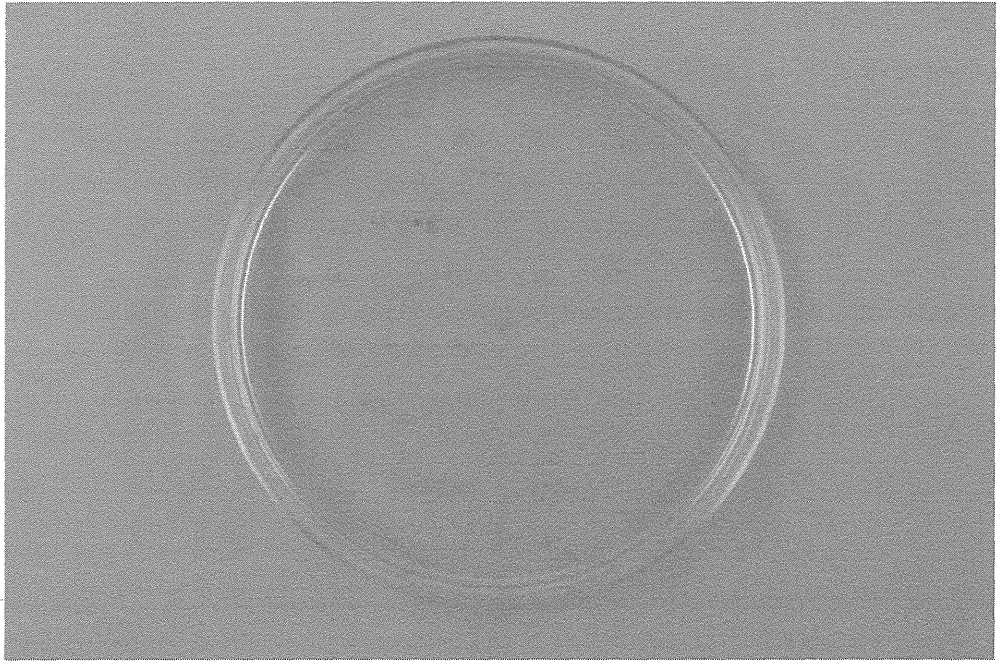


写真-1 加熱処理(55 °C 15分間) 前培養「なし」
[試験菌② 1000倍希釈液]

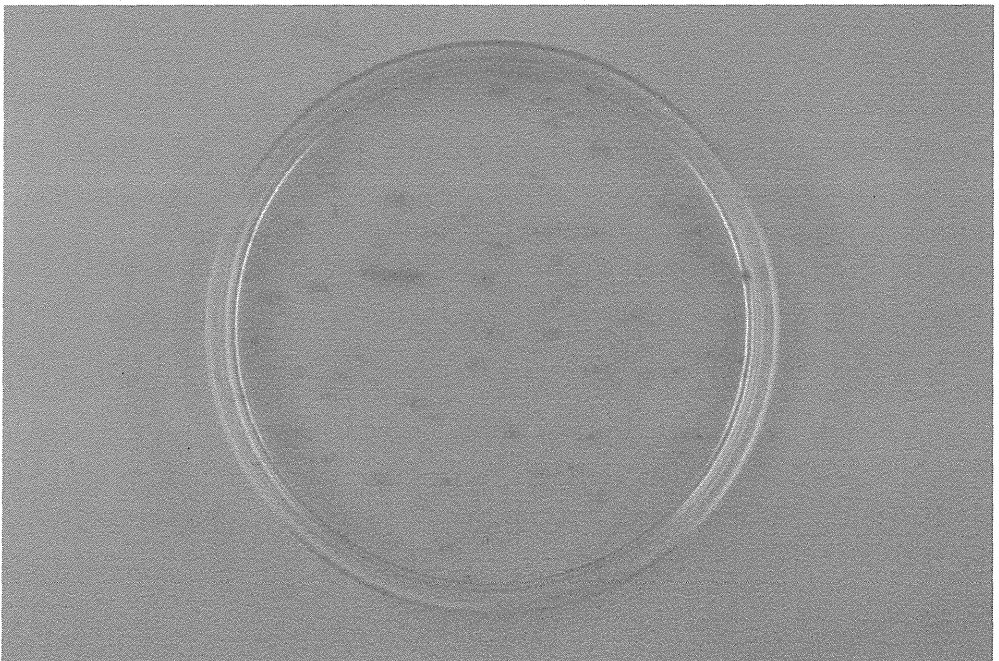


写真-2 加熱処理(55 °C 15分間) 前培養「あり」
[試験菌② 1000倍希釈液]

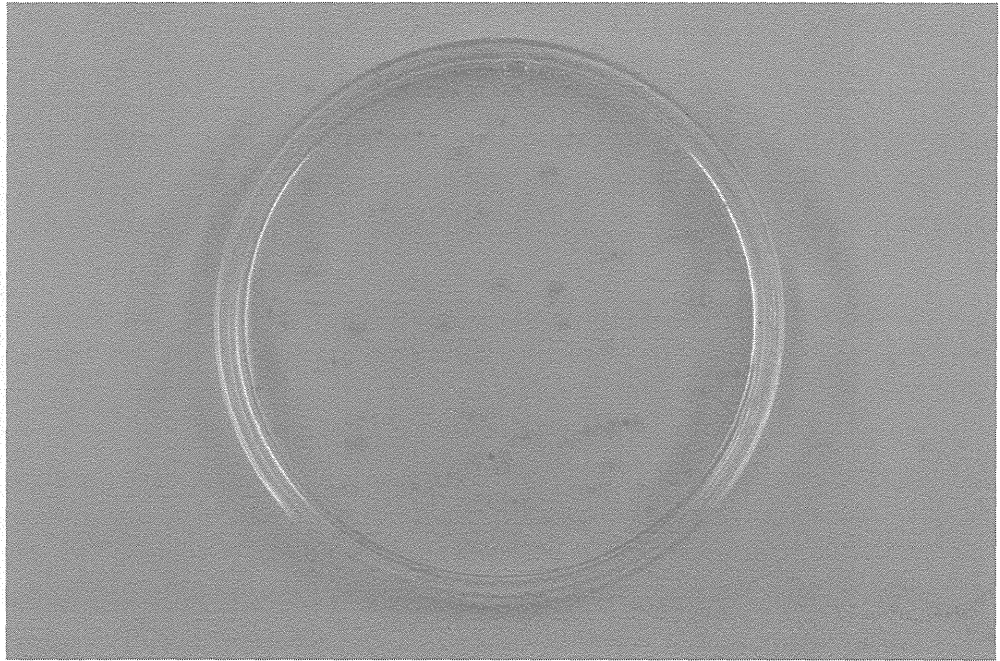


写真-3 酸処理(pH 2.0, 15分間) 前培養「なし」
[試験菌② 100倍希釈液]

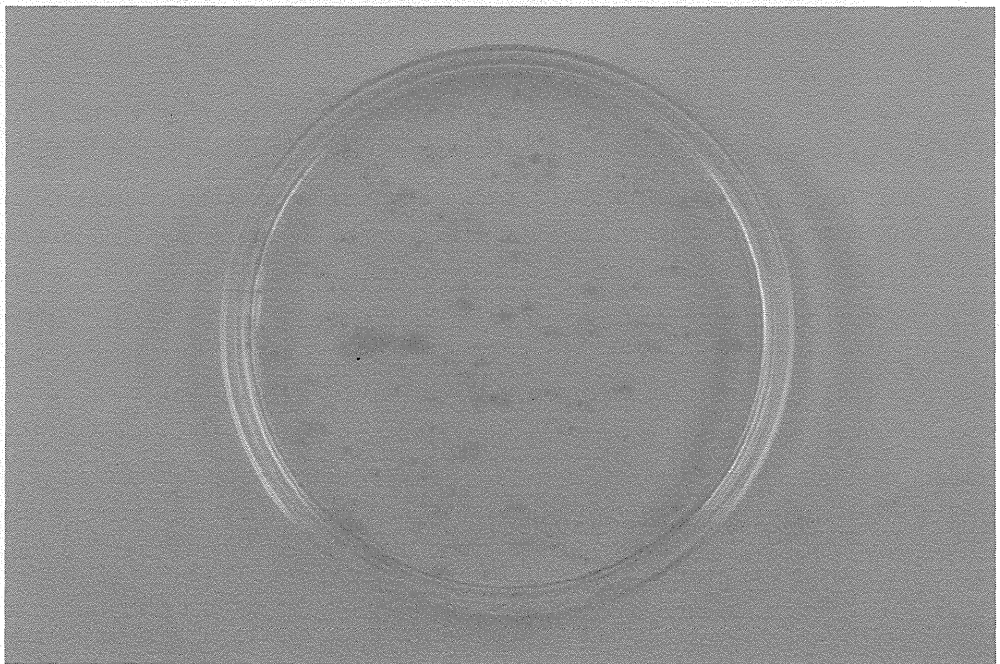


写真-4 酸処理(pH 2.0, 15分間) 前培養「あり」
[試験菌② 100倍希釈液]

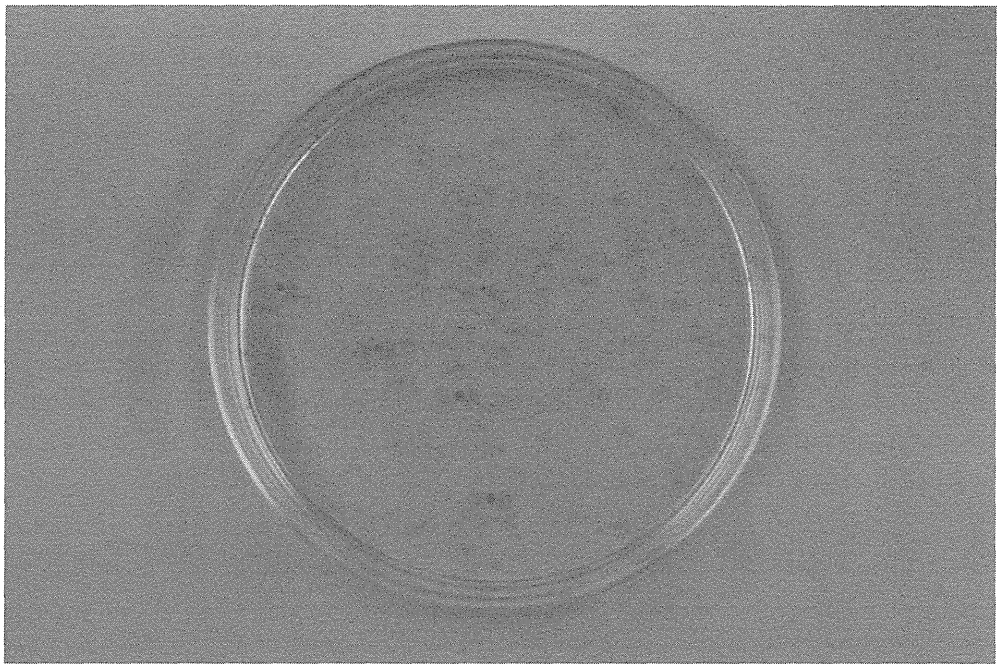


写真-5 凍結処理(-30 °C, 2日間) 前培養「なし」
[試験菌② 10倍希釈液]

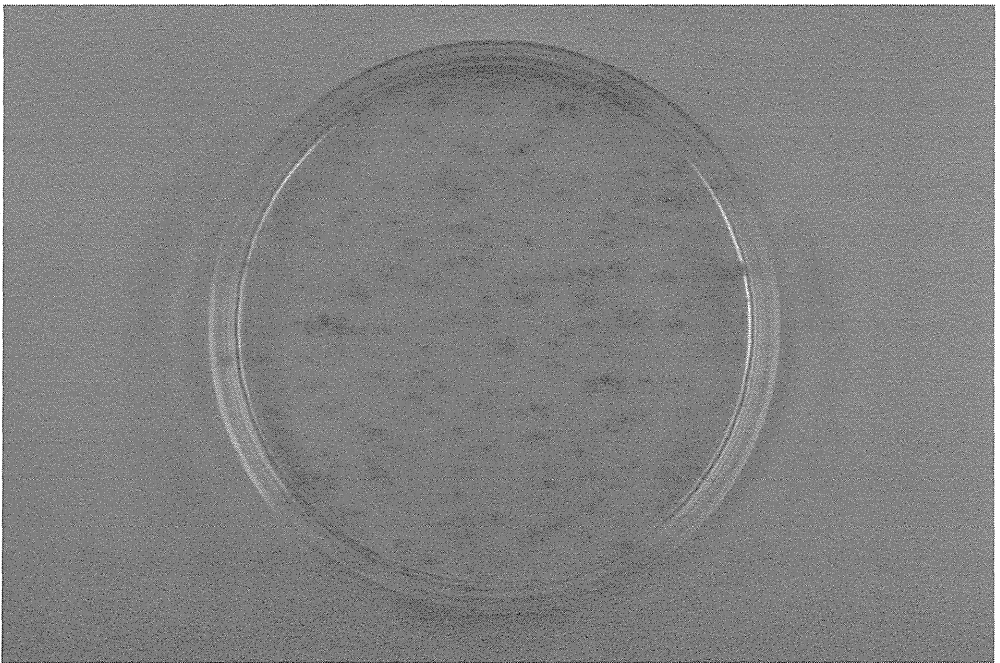


写真-6 凍結処理(-30 °C, 2日間) 前培養「あり」
[試験菌② 10倍希釈液]

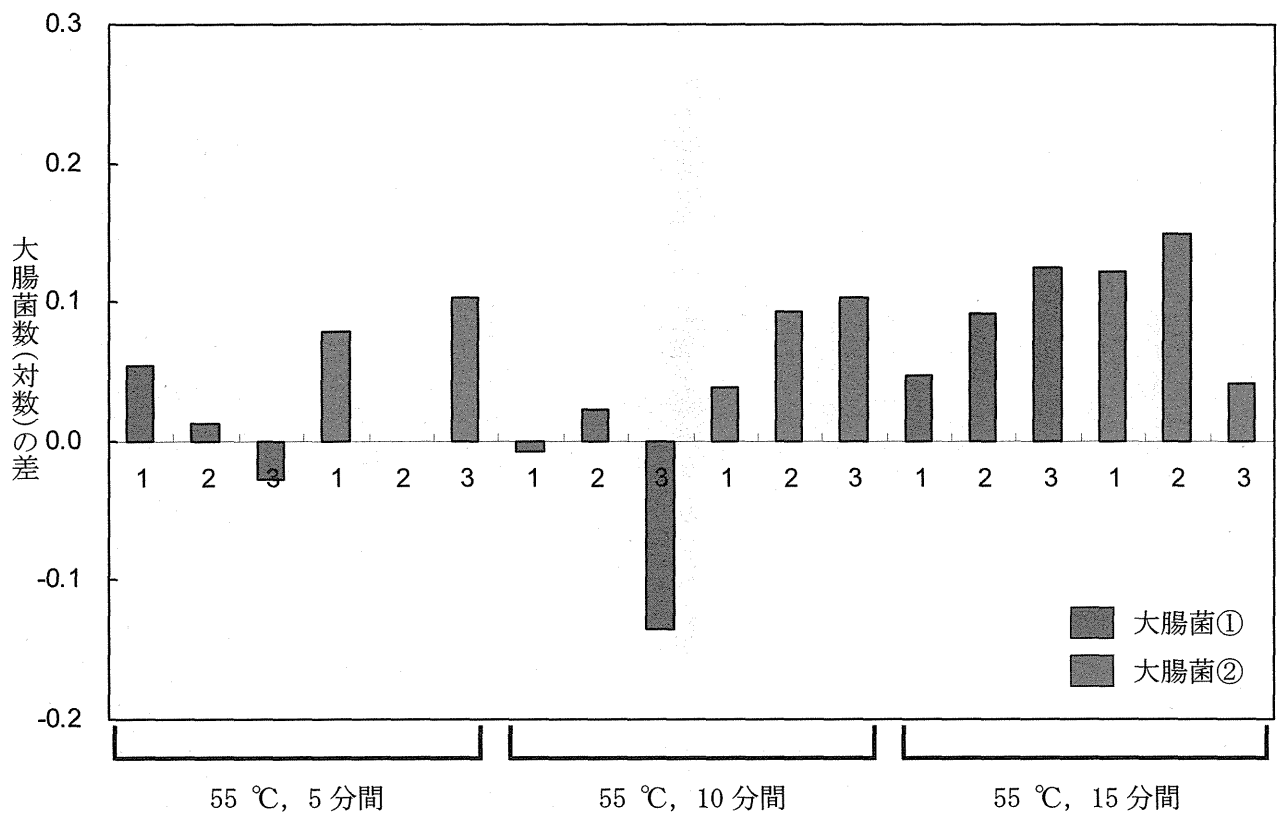


図-1 2条件(前培養「あり」及び「なし」)で培養した大腸菌数(対数)の差[加熱処理]

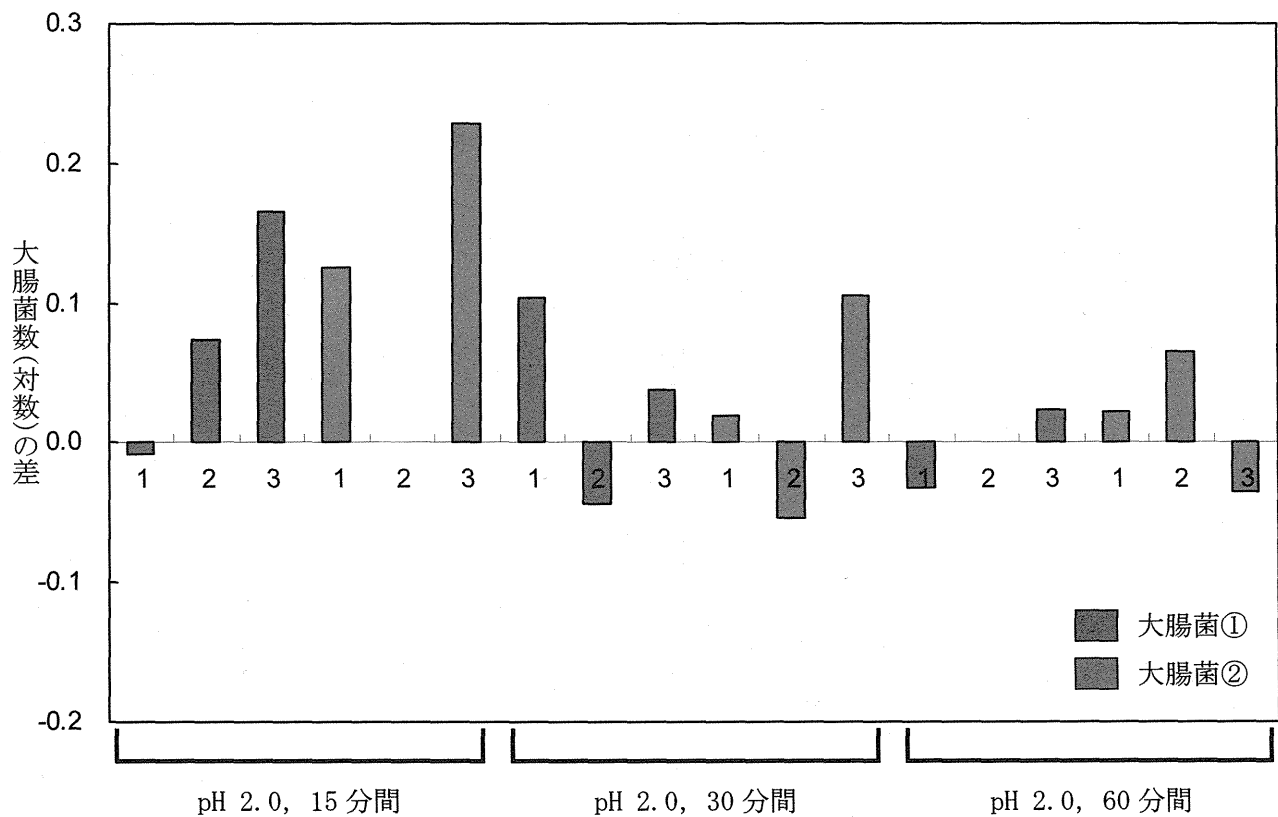


図-2 2条件(前培養「あり」及び「なし」)で培養した大腸菌数(対数)の差[酸処理]

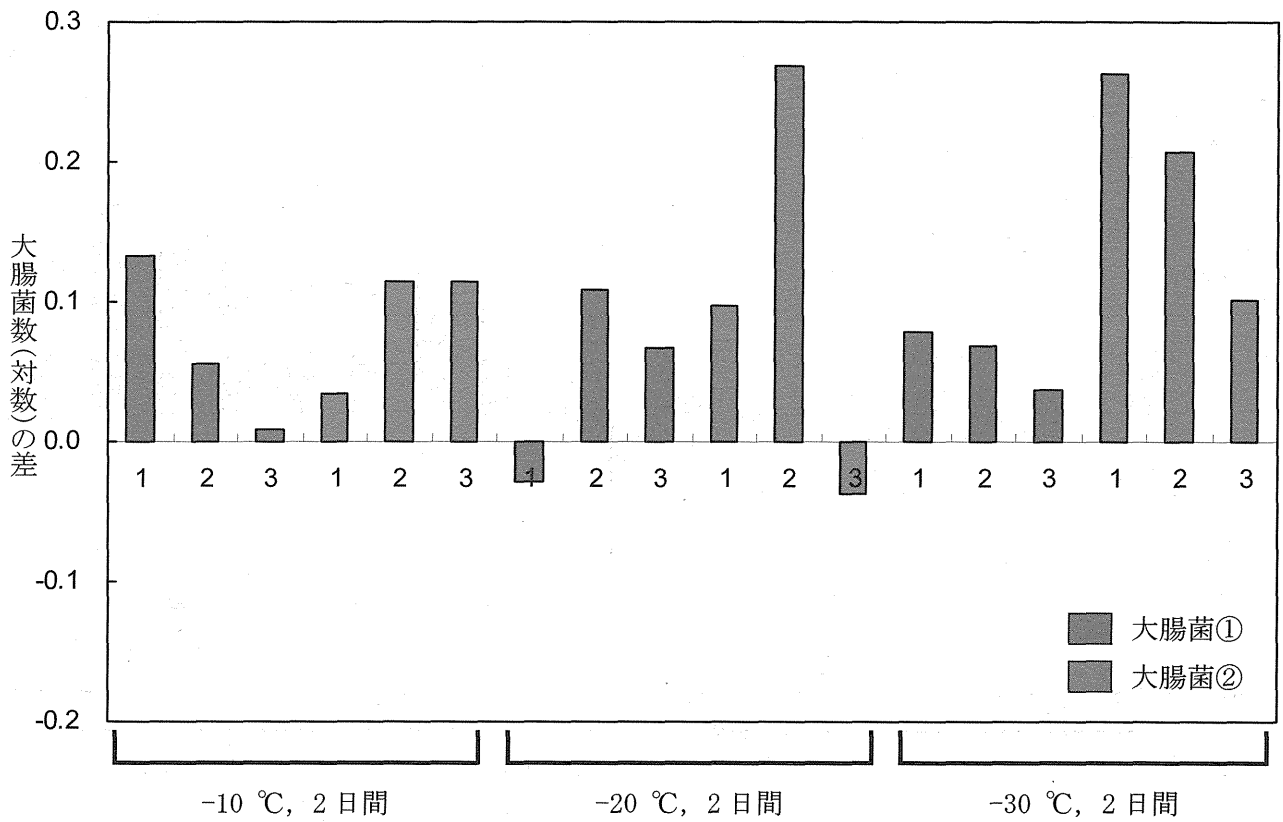


図-3 2条件(前培養「あり」及び「なし」)で培養した大腸菌数(対数)の差[凍結処理]

以 上

1. 目的

本事業は、国立医薬品食品衛生研究所の「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における衛生指標菌試験法案作成の基礎的データを収集することを目的とした。我が国で一般に用いられている細菌数（生菌数）試験法と ISO 標準法に基づく一般生菌数計数法により市販食品の生菌数測定を行い、結果の差異の確認と、その原因についての考察を行った。

2. 方法

厚生労働省令または告示に成分規格のある食品（以下、成分規格対象食品）と、ISO 標準法に個別規格のある食品分類から「牛乳及び乳製品、肉及び肉製品、並びに魚及び魚製品以外の製品（以下、Ready to eat 食品*）」及び「魚及び魚製品」に該当する食品 72 検体を購入し、本検討に供した。

購入した食品について、ISO 標準法及び日本国内で適用される試験法（以下、従来法）により生菌数の測定を行った。試験方法、食品分類及び検体数は表 1 のとおり。

*：喫食前に加熱を要しない調理済み食品

表 1 試験方法、食品分類及び検体数

| 食品分類 | | 検体数 | 試験法 | |
|-----------------|-----------------------|-----|--|--|
| 大分類 | 小分類 | | 従来法 | ISO 標準法 |
| Ready to eat 食品 | 惣菜、洋菓子、和菓子、漬物、青果物、水産物 | 34 | 標準寒天平板培養法 (食品衛生検査指針 2004) | ISO 4833:2003 試料調製は ISO 6887-1:1999 及び ISO 6887-4:2003 による |
| 成分規格対象食品 | 冷凍食品 | 20 | 厚生労働省告示第 370 号 食品、添加物等の規格基準 冷凍食品の成分規格 | ISO 4833:2003 試料調製は ISO 6887-1:1999 及び ISO 6887-4:2003 による |
| | 氷菓 | 3 | 厚生労働省告示第 370 号 食品、添加物等の規格基準 氷菓の成分規格 | ISO 4833:2003 試料調製は ISO 6887-1:1999 及び ISO 6887-4:2003 による |
| | 生食用かき | 3 | 厚生労働省告示第 370 号 食品、添加物等の規格基準 生食用かきの成分規格 | ISO 4833:2003 試料調製は ISO 6887-1:1999 及び ISO 6887-3:2003 による |
| | 飲用乳 アイスクリーム類 | 2 | 乳及び乳製品の成分規格等 に関する省令 乳及び乳製品の成分規格 | ISO 4833:2003 試料調製は ISO 6887-1:1999 及び ISO 6887-5:2010 による |