

平成 25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）

五十君静信（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）

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）

吉田 信一郎（一般財団法人日本食品分析センター）

齋藤 利江（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ている。

今年度の本研究では、 β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の試験法である ISO 16649-2：2001 を大腸菌数の試験方法として採用する場合において、ストレス処理（凍結処理）を行った大腸菌自然汚染の食品種ごとに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の検討するとともに、培養時間が超過した場合の影響についても考察した。その結果、本研究において用いた食品種では、損傷菌（凍結処理）に対する前培養の有効性は認められなかった。また、培養時間が 24 時間を超えた場合の大腸菌数は 18～24 時間培養後の大腸菌数と差は認められなかったが、大腸菌以外の集落が増加した試料が認められたことから、大腸菌集落の誤判定を避けるためにも、規定された培養時間を守る必要があると考えられた。さらに、本研究で用いた食品のように TBX 寒天培地（ 44 ± 1 °C、18～24 時間培養）に生育する大腸菌以外の菌が多数共存する試料では、ISO 16649-2：2001 に規定された計数・計算方法どおりには大腸菌数の算出ができない可能性があるため、このような場合の計数・計算方法についても検討する必要があると考えられた。

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,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ため,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寒天培地を用いた大腸菌数の測定を実施した。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ったが,極端な相違は認められなかった。したがって,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。

今年度の本研究では,ストレス処理(凍結処理)を行った大腸菌自然汚染の食品について,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の検討を目的とするとともに,培養時間が超過した場合の影響についても考察することを目的とした。

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」培養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(凍結処理)を行った食品について,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,それぞれについて得られた結果を比較・評価した。

また,ISO 16649-2:2001では,TBX寒天培地の培養条件において,「培養時間は24時間を超えてはならない」と規定している。培養時間が24時間を超過した場合の影響を確認するため,18~24時間に加え,42~48時間培養後の大腸菌集落数も計測し,得られた結果を比較・評価した。

2) ストレス処理(凍結処理)を行った試料の大腸菌数測定における前培養の有効性

① ストレス処理(凍結処理)

-20 °Cに設定した冷凍庫内に食品を2~3日間保存したものをストレス処理(凍結処理)試料とした。

② 試料液の調製

ストレス処理後の試料を10 gずつ無菌的

に秤量し、滅菌ペプトン加生理食塩水 90 ml を加えた後、ストマッカーを用いて 1 分間攪拌・混合して試料原液とした。また、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて試料原液の 10 倍段階希釈液を調製した。

③大腸菌数の測定

TBX 寒天培地を用いた混釈平板培養法により試料の大腸菌数を測定した。なお、以下に示した 2 条件により培養し、生育した大腸菌の典型集落数を計測し、試料 1 g 当たり的大腸菌数を算出した。ただし、ISO 16649-2:2001 では「典型集落数が 150 個未満かつ総集落数が 300 個未満の平板の典型集落数を計数する」とあるが、1 平板の総集落数が 300 個以上の場合でも典型集落数が 150 個未満であった場合は大腸菌数の数値として採用した。

条件 1: 44±1 °C, 18~24 時間(前培養「なし」)

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

3) 培養時間が 24 時間を超えた場合の大腸菌数測定結果への影響

①試料液の調製

試料(食品)を 10 g ずつ無菌的に秤量し、滅菌ペプトン加生理食塩水 90 ml を加えた後、ストマッカーを用いて 1 分間攪拌・混合して試料原液とした。また、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて試料原液の 10 倍段階希釈液を調製した。

②大腸菌数の測定

TBX 寒天培地を用いた混釈平板培養法により試料の大腸菌数を測定した。なお、44±1 °C, 18~24 時間培養し、大腸菌の典型集落数を計測した後、速やかに 44±1 °C の恒温器に入れ、さらに 24 時間培養し、生育した典型集落数を計測した。典型集落数から試料 1 g 当たり的大腸菌数を算出した。ただし、ISO 16649-2:2001

では「典型集落数が 150 個未満かつ総集落数が 300 個未満の平板の典型集落数を計数する」とあるが、1 平板の総集落数が 300 個以上の場合でも典型集落数が 150 個未満であった場合は大腸菌数の数値として採用した。

C. 研究結果及び考察

1) ストレス処理(凍結処理)を行った試料の大腸菌数測定における前培養の有効性
ストレス処理を行った試料の大腸菌数測定結果を表-1 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-1~4 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 に示した。前培養「なし」と前培養「あり」の大腸菌数においては、11 試料中 8 試料で前培養「なし」の大腸菌数が高い値であったが、表-1 に示したとおり、その比は 2.0 以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。また、各測定値を対数に変換した後、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 0.26 であり、有意水準 1% で「有意差なし」と判定された。

2) 培養時間が 24 時間を超えた場合の大腸菌数測定結果への影響

試料の大腸菌数測定結果を表-2 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-5~8 に示した。

培養 18~24 時間及び培養 42~48 時間において大腸菌集落数の差はまったく認められず、培養 42~48 時間後でも大腸菌集落の判定に支障はなかった。しかし、培養 42~48 時間後では大腸菌(青色)以外の集落が大きくなることや新たな大腸菌以外の集落が出現した試料も認められた。

D. 結論

ストレス処理(凍結処理)を行った食品に対して、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、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数において明らかな差は認められず、対応のある2群の平均の差のt検定においても、有意水準1%で「有意差なし」と判定された。したがって、本研究において用いた食品では、損傷菌(凍結処理)に対する前培養の有効性は認められなかった。

また、本研究において用いた食品では、培養時間が24時間を超えた場合の大腸菌数は18~24時間培養後の大腸菌数と差は認められなかったが、大腸菌以外の集落が増加した試料が認められたことから、夾雑菌の種類によっては24時間を超える培養で典型集落の判別に影響が出る可能性もあると考えられた。

以上のことから、前培養の有効性は大腸菌が受けたストレスや食品群によって異なると考えられ、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することが重要と考えられた。また、大腸菌集落の誤判定を避けるためにも、規定された培養時間を守る必要があると考えられた。なお、本研究で用いた食品のようにTBX寒天培地(44±1℃, 18~24時間培養)に生育する大腸菌以外の菌が多数共存する試料では、ISO 16649-2:2001に規定された計数・計算方法どおりには大腸菌数の算出ができない可能性があるため、このような場合の計数・計算方法についても検討する必要があると考えられた。

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

表-1 試料の大腸菌数測定結果

食品	試料1 g当たりの大腸菌数 ^{*1}		B/A
	ストレス処理あり		
	前培養「なし」(A) ^{*2}	前培養「あり」(B) ^{*3}	
牛小間肉	1.6×10^2	1.5×10^2	0.94
豚ひき肉	8.3×10^3 ^{*4}	6.8×10^3 ^{*5}	0.82
鶏むねひき肉	2.4×10^2	2.3×10^2	0.96
鶏ももひき肉	1.4×10^5	1.2×10^5	0.86
鶏つみれ	2.2×10^2	1.9×10^2	0.86
鶏レバー	1.0×10^5	1.1×10^5	1.10
鶏きも	5.6×10^5	4.8×10^5	0.86

いとより	1.2×10^2 ^{*6}	1.1×10^2 ^{*7}	0.92

鶏味付きつみれ	30	60	2.00
メンチカツ	1.5×10^2	1.6×10^2	1.07
コロッケ	1.0×10^2	80	0.80

*1 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*2 44±1 °C, 18~24時間

*3 37±1 °C, 4時間後に44±1 °C, 18~24時間

*4 写真-1

*5 写真-2

*6 写真-3

*7 写真-4

表-2 試料の大腸菌数測定結果

食品	試料1 g当たりの大腸菌数*1, *2	
	培養18~24時間 *3	培養42~48時間 *4
牛小間肉	2.7×10 ³ (約10 ⁴ ~10 ⁵)	2.7×10 ³ (約10 ⁴ ~10 ⁵)
豚ひき肉	1.5×10 ⁴ *5 (約10 ⁴ ~10 ⁵)	1.5×10 ⁴ *6 (約10 ⁵)
鶏むねひき肉	4.1×10 ² (約10 ⁵)	4.1×10 ² (約10 ⁵)
鶏ももひき肉	1.1×10 ⁵ (約10 ⁵ ~10 ⁶)	1.1×10 ⁵ (約10 ⁵ ~10 ⁶)
鶏つみれ	2.1×10 ² (10未満)	2.1×10 ² (50)
鶏レバー	4.6×10 ⁵ (約10 ⁴ ~10 ⁵)	4.6×10 ⁵ (約10 ⁵)
鶏きも	4.1×10 ⁵ (約10 ⁵)	4.1×10 ⁵ (約10 ⁵)
いとより	1.5×10 ² *7 (約10 ²)	1.5×10 ² *8 (約10 ²)
鶏味付きつみれ	40 (約10 ⁵)	40 (約10 ⁵)
メンチカツ	60 (約10 ⁵)	60 (約10 ⁵)
コロッケ	5.8×10 ² (約10 ³)	5.8×10 ² (約10 ⁴)

*1 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*2 括弧内に試料1 g当たりの大腸菌以外の菌の概数を示した。

*3 44±1 °C, 18~24時間

*4 44±1 °C, 42~48時間

*5 写真-5

*6 写真-6

*7 写真-7

*8 写真-8

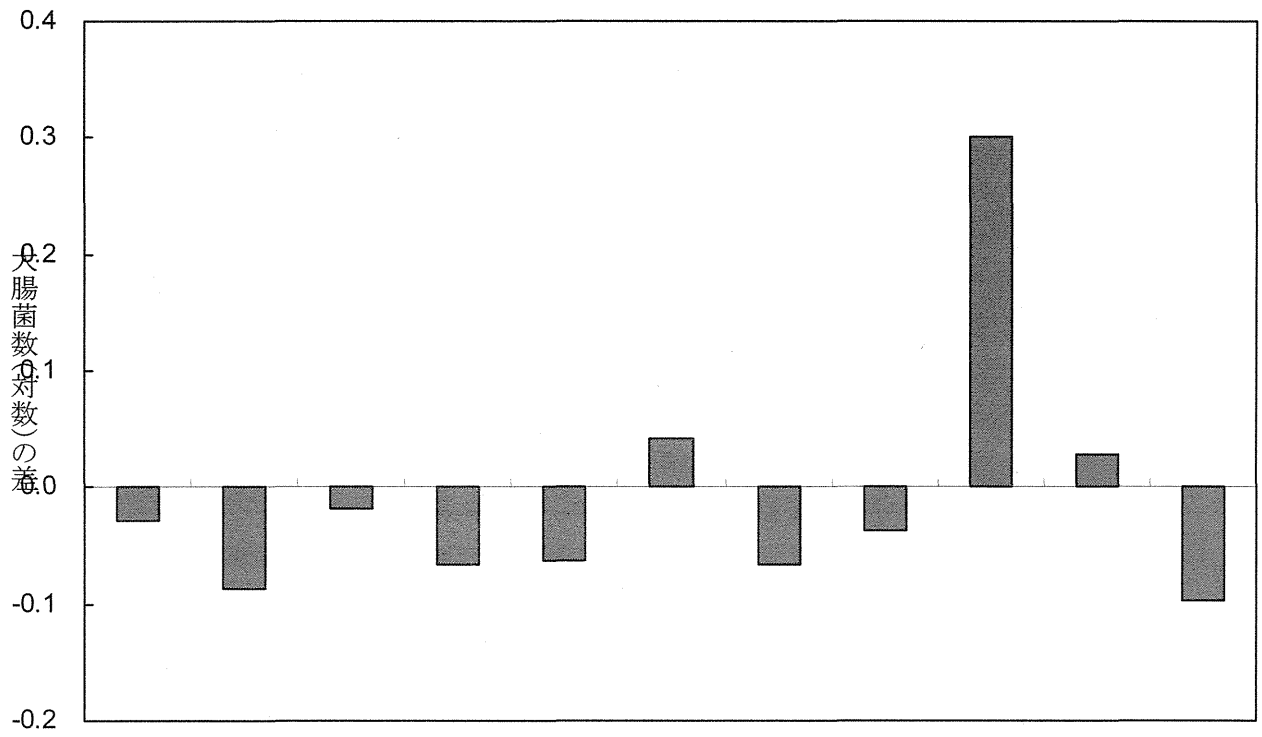


図-1 前培養「なし」(A)及び「あり」(B)で培養した大腸菌数(対数)の差(B-A)

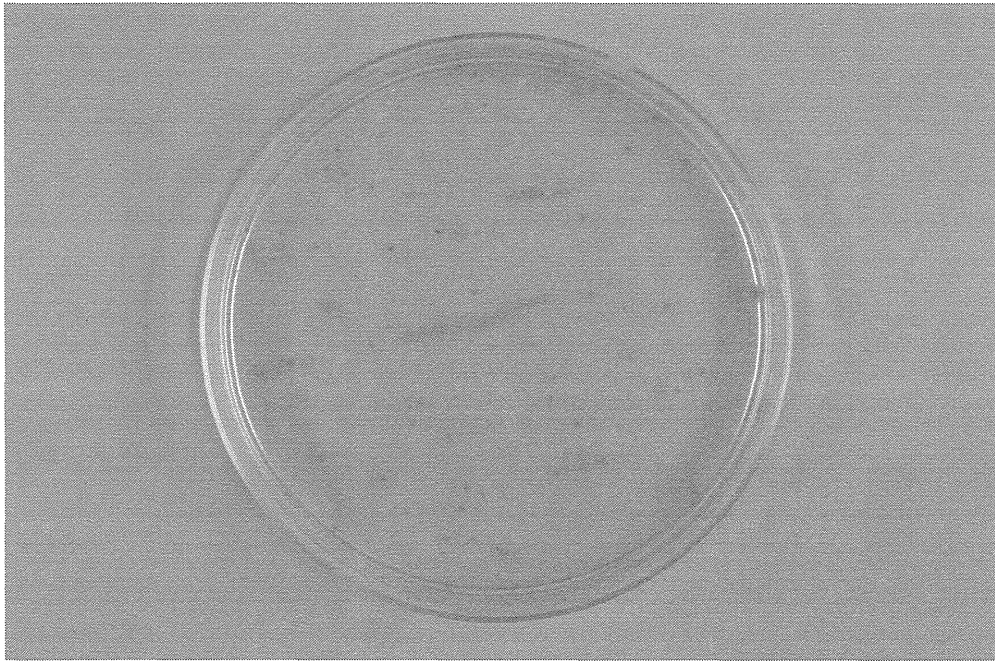


写真-1 豚ひき肉 ストレス処理あり 前培養「なし」
18～24時間培養 [100倍希釈液]

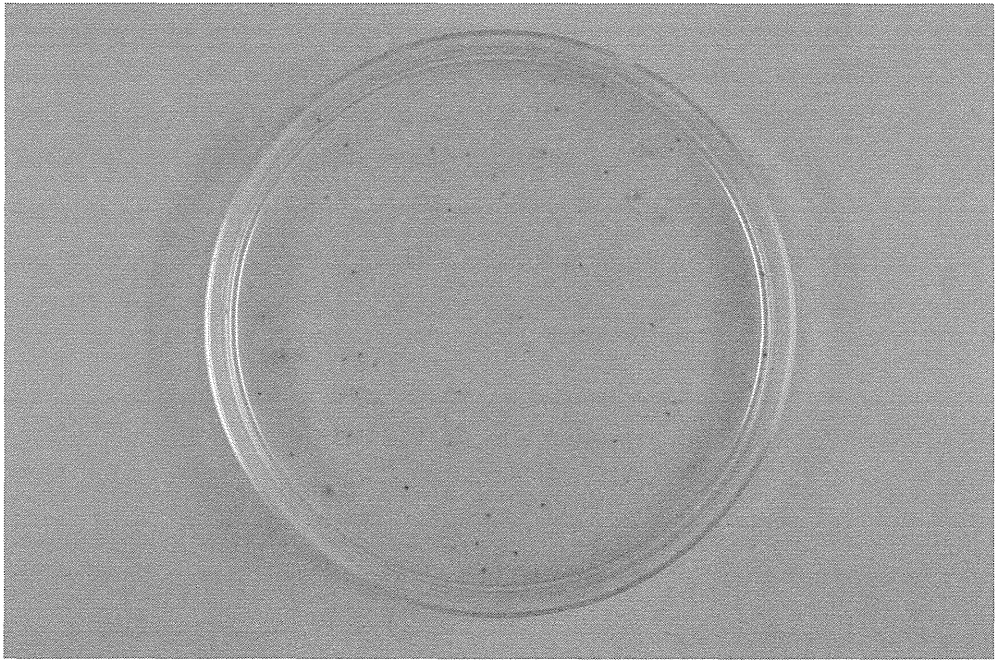


写真-2 豚ひき肉 ストレス処理あり 前培養「あり」
18～24時間培養 [100倍希釈液]

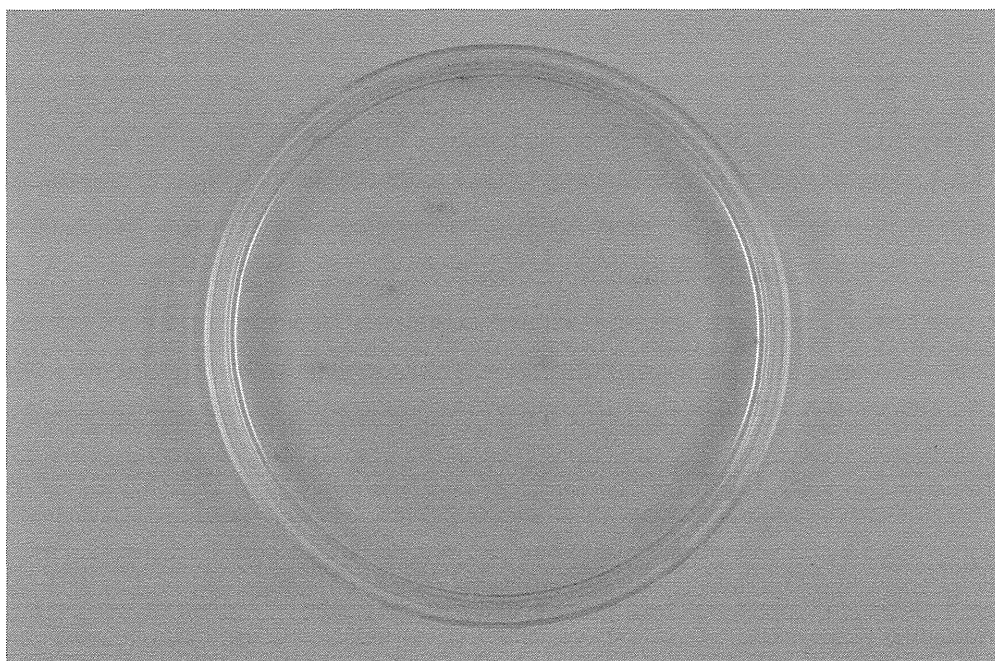


写真-3 いとより ストレス処理あり 前培養「なし」
18～24時間培養 [10倍希釈液]

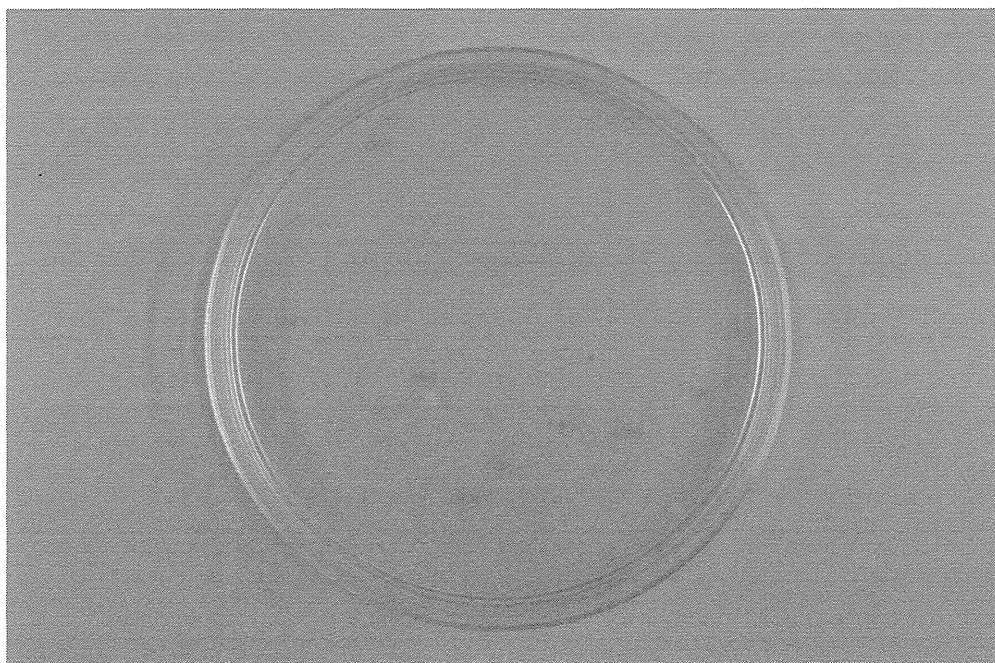


写真-4 いとより ストレス処理あり 前培養「あり」
18～24時間培養 [10倍希釈液]

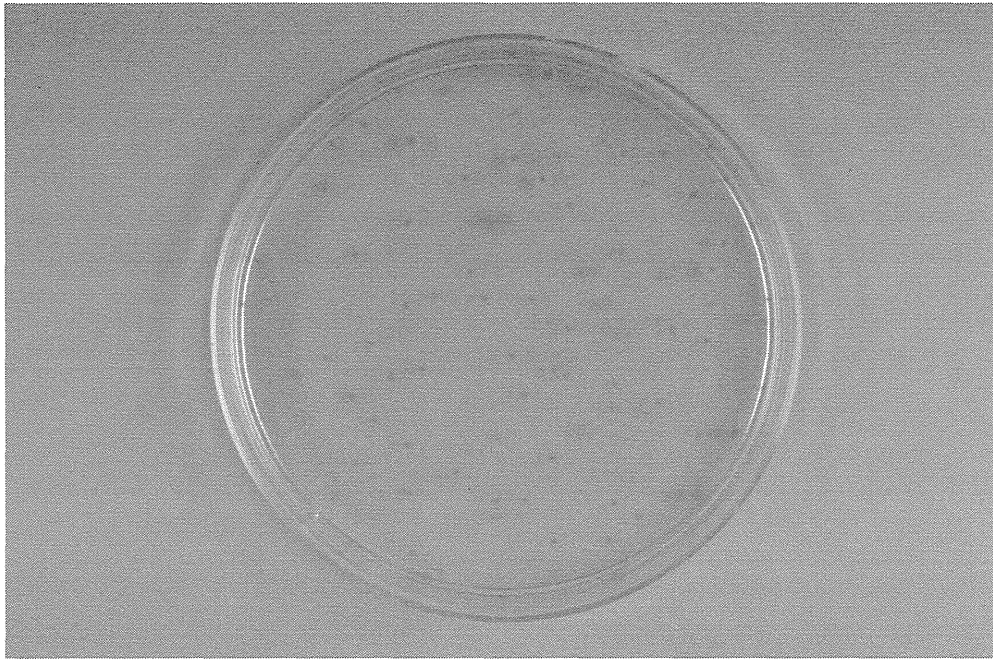


写真-5 豚ひき肉 18～24時間培養 [100倍希釈液]

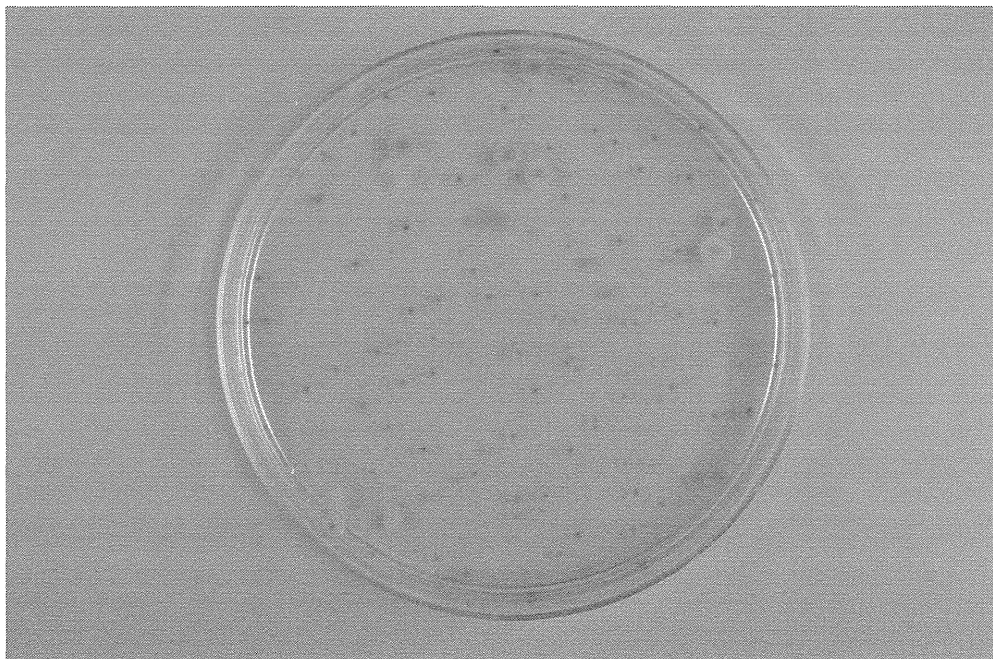


写真-6 豚ひき肉 42～48時間培養 [100倍希釈液]

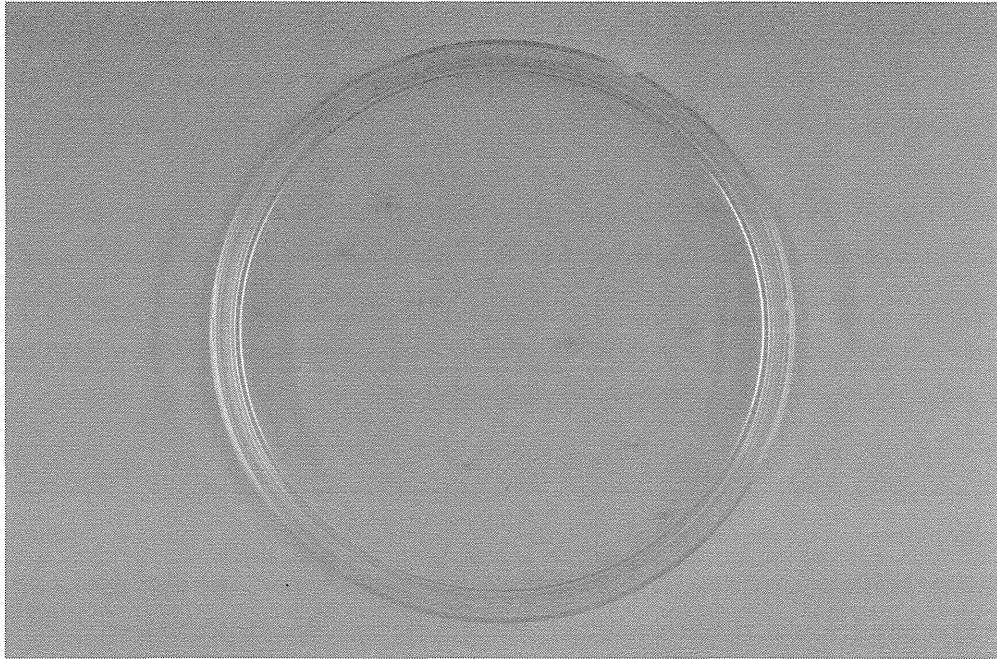


写真-7 いとより 18~24時間培養 [10倍希釈液]

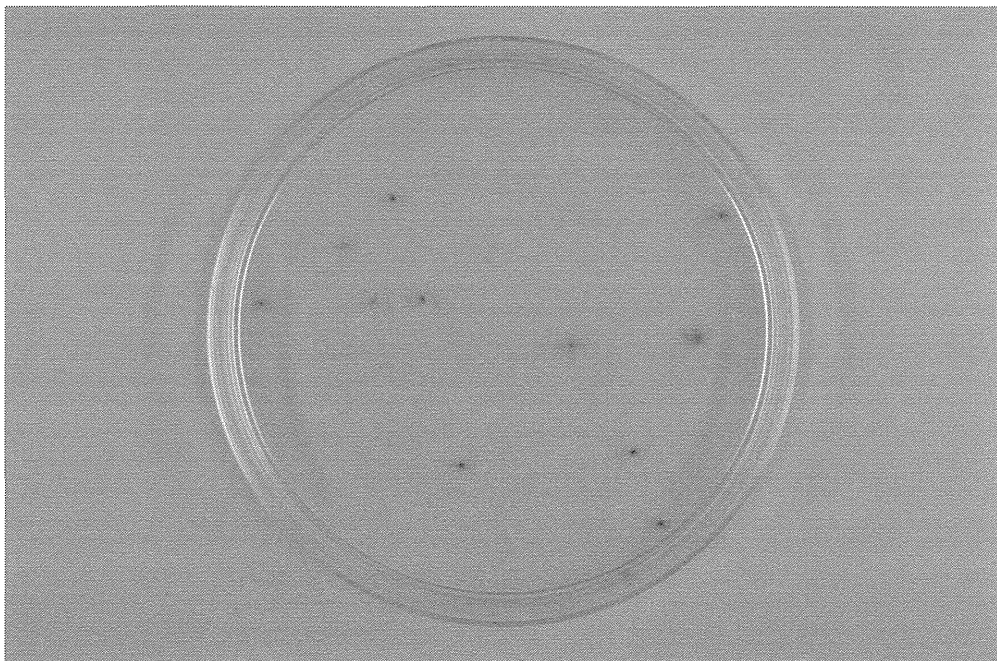


写真-8 いとより 42~48時間培養 [10倍希釈液]

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算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。今年度は ISO 標準法に個別規格のある食品分類から「肉及び肉製品」を選択した。

2. 方法

「肉及び肉製品」に該当する牛肉、鶏肉、豚肉について 3 つの加工形態（ブロック、スライス・カット、ミンチ）の生食肉の市販品を購入し、本検討に供した。

購入した食品について、我が国で一般的に用いられている従来法として食品衛生検査指針 2004 に記載のある標準寒天平板培養法を、ISO 標準法として ISO 4833-1:2013（混積法）及び ISO 4833-2:2013（平板塗抹法）を採用し、3 試験法で一般細菌数の測定を行った。測定で得られた菌数の差及び相関について考察するとともに、菌数の差が 1Log CFU/g 以上の食品についてコロニーを分離し菌種の同定を行った。

食品分類及び検体数は表 1 のとおり。

試験方法、食品分類及び検体数

表 1 検体数

	スライス・カット	ブロック	ミンチ
牛肉	7	7	7
鶏肉	7	7	7
豚肉	7	7	7
合計	21	21	21

総合計 63 検体

表 2 試験方法

従来法	ISO 標準法	
標準寒天平板培養法	ISO 4833-1:2013 (混釈法)	ISO 4833-2:2013 (塗抹法)
食品衛生検査指針 2004	試料調製は ISO 6887-2:1999 による	

測定値の算定法は ISO 7218:2007Amd1:2013 に従った。すなわち連続する 2 段階の希釈で各希釈段階につきシャーレ 2 枚の場合の菌数算定を以下の式でおこなった。

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

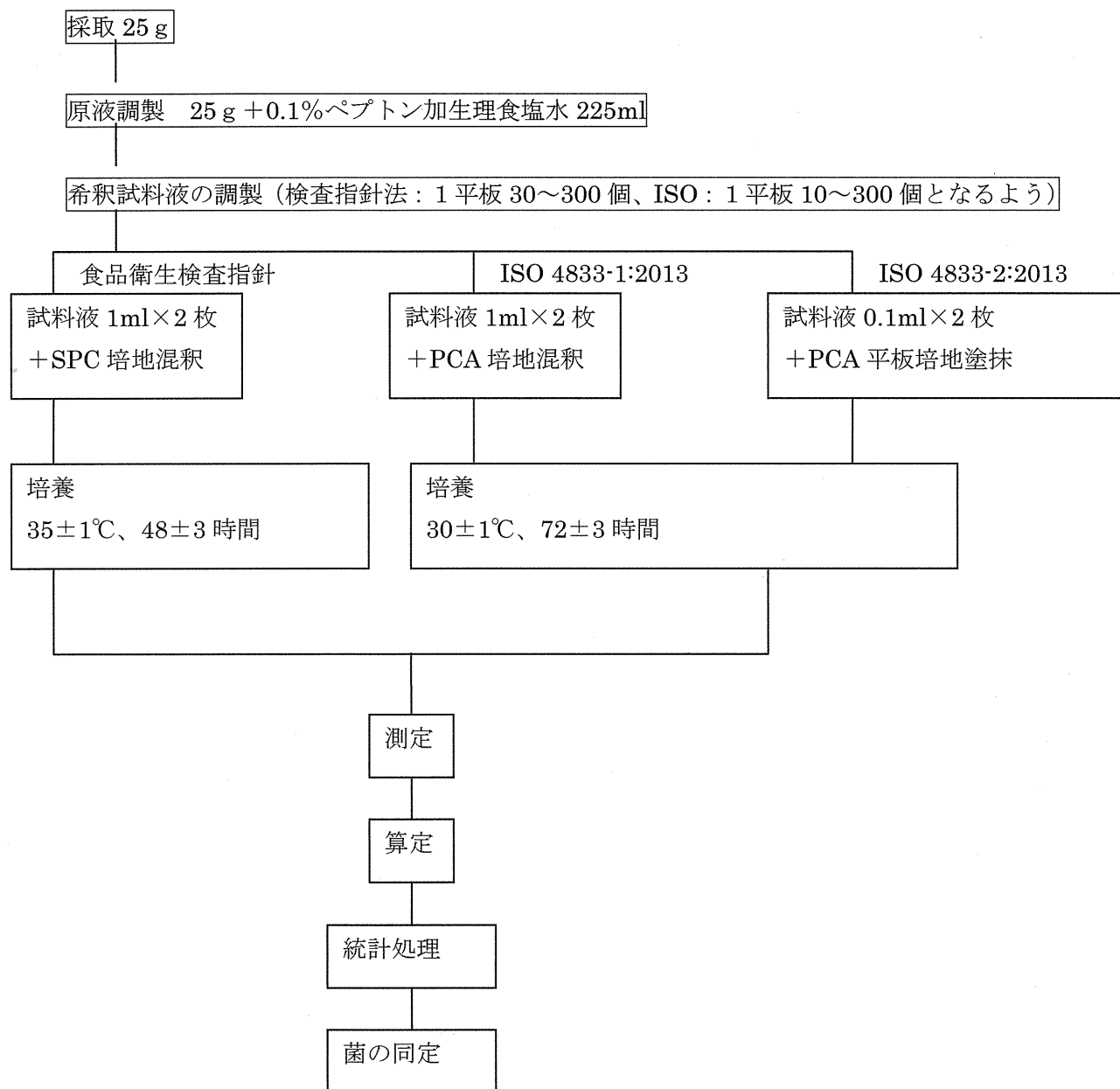
$\sum C$: 各平板の集落数の合計

n_1 : 希釈が低い方の算定対象シャーレ枚数

n_2 : 希釈が高い方の算定対象シャーレ枚数

d : 希釈が低い方の希釈倍数

試験フロー



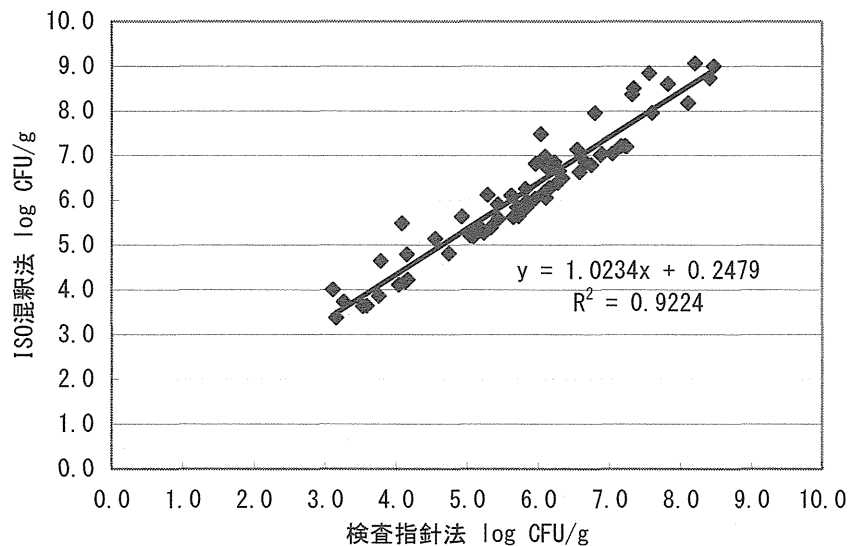
3. 結果

(1) 測定結果

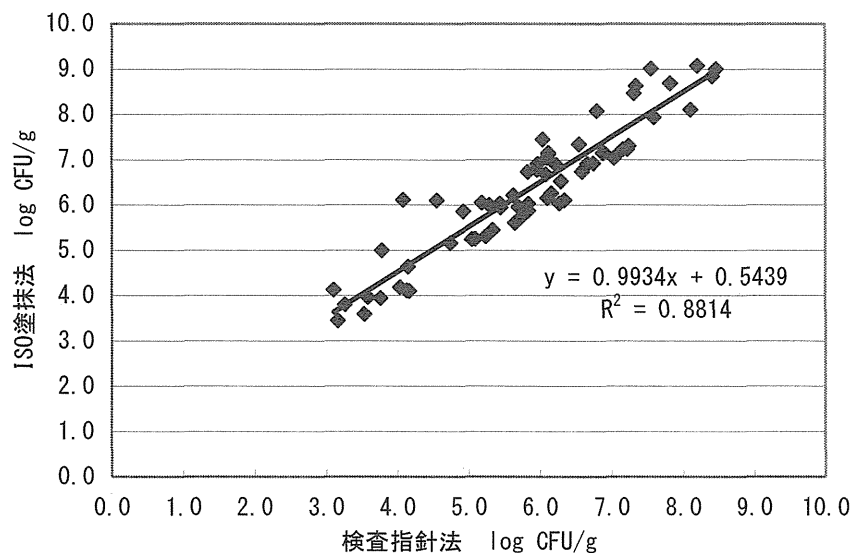
別紙参照。

(2) 測定値の相関

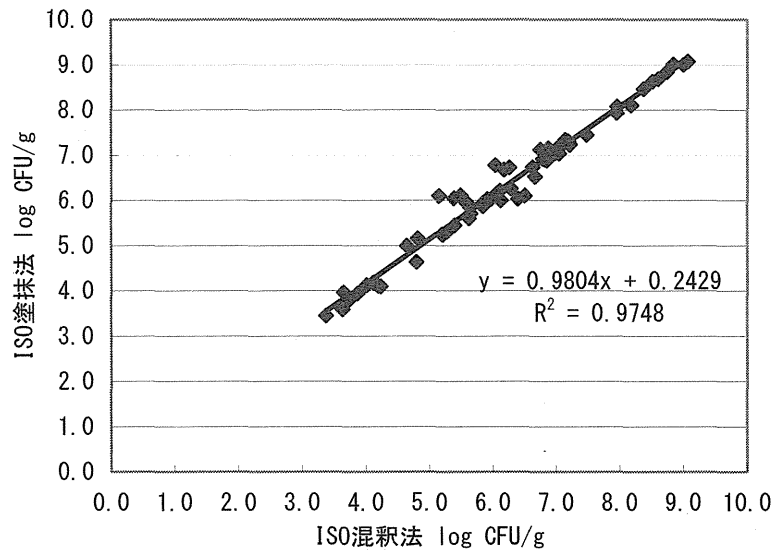
各試験法による測定値の相関を見るために、測定値の対数をグラフにプロットし、回帰式および相関係数を算出した。



グラフ 1 : ISO 混釈法と検査指針法による測定値の相関



グラフ 2 : ISO 塗抹法と検査指針法による測定値の相関



グラフ 3 : ISO 混釈法と ISO 塗抹法による測定値の相関

(3) 測定値の差

各試験法による測定値の差の傾向を見るために、測定値の対数を取り、差を算出した。

表 3 肉の種類ごとの測定値の差 (Log CFU/g (ISO混釈法) - Log CFU/g (検査指針法))

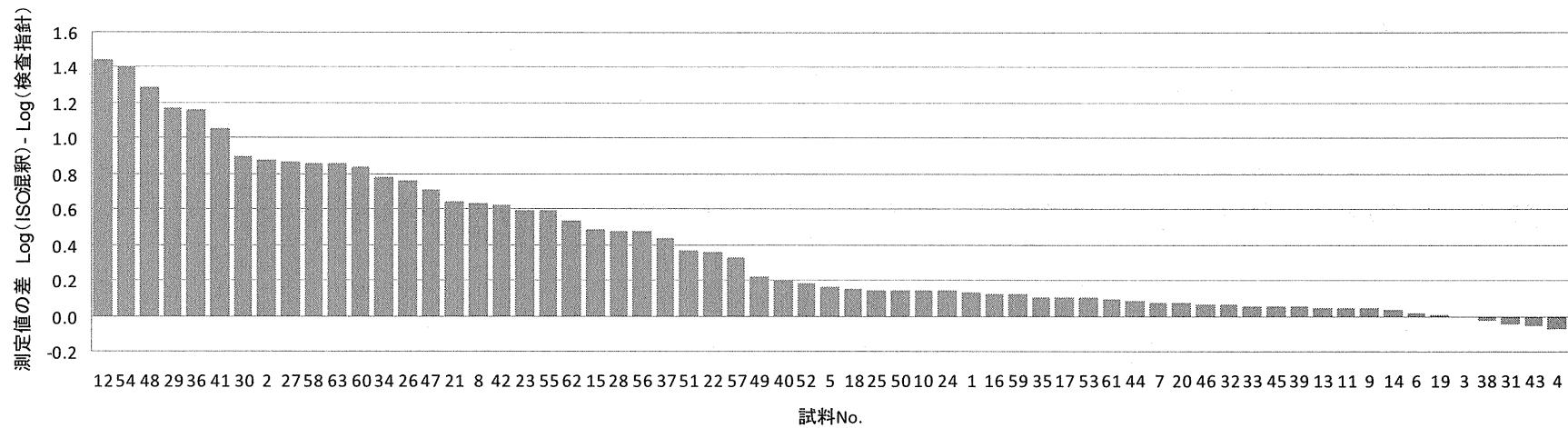
肉の種類	範囲	1.0 超過の検体数
牛肉	-0.076 ~ +1.440	1 / 21
鶏肉	-0.048 ~ +1.166	3 / 21
豚肉	-0.049 ~ +1.406	2 / 21

表 4 加工の種類ごとの測定値の差 (Log CFU/g (ISO混釈法) - Log CFU/g (検査指針法))

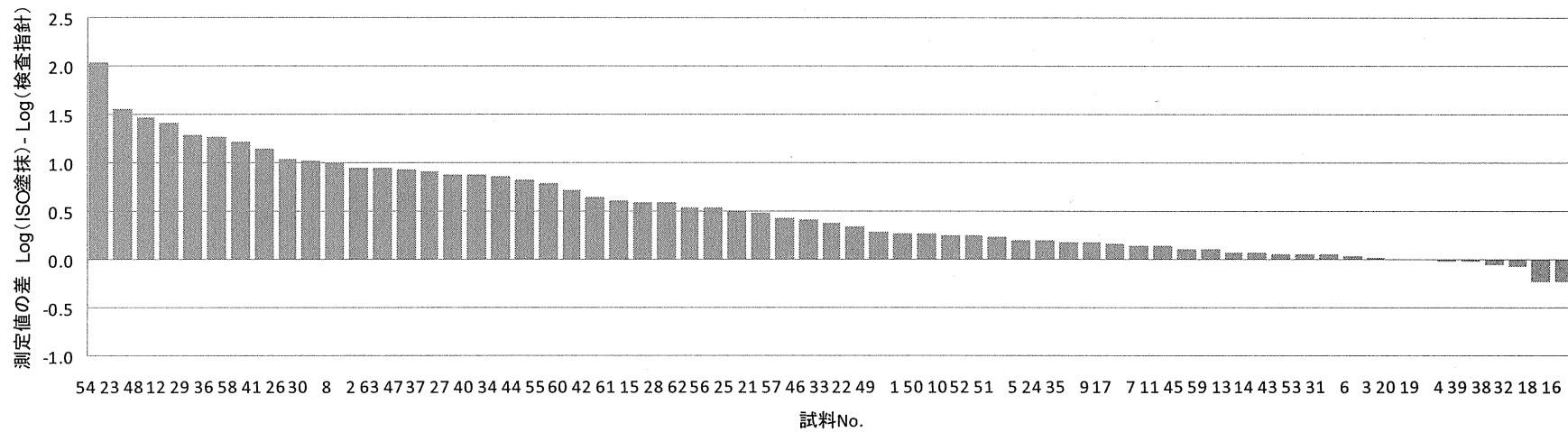
加工の種類	範囲	1.0 超過の検体数
スライス	-0.076 ~ +1.283	1 / 21
ブロック	-0.048 ~ +1.440	3 / 21
ミンチ	-0.025 ~ +1.155	2 / 21

表5 (Log CFU/g (ISO法)–Log CFU/g (従来法)) の差1.0超過の検体

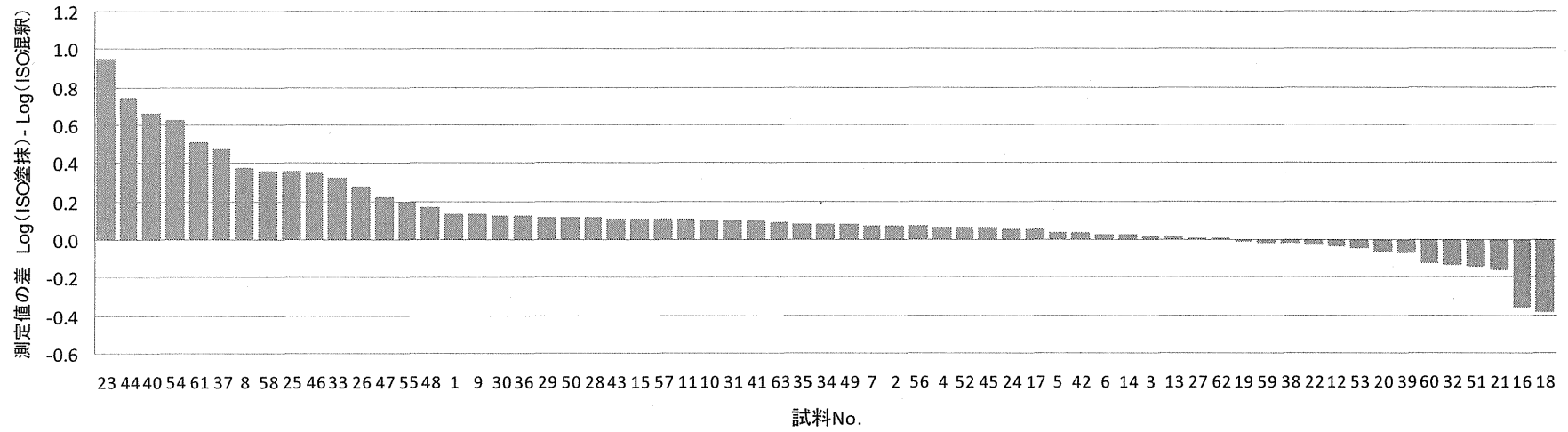
No.	肉の種類	加工の種類	ISO 混釈法 菌数 (a) (Log CFU/g)	検査指針法 菌数 (b) (Log CFU/g)	測定値の差 (a)–(b)
12	牛肉	ブロック	7.4797	6.0394	1.440
54	豚肉	ブロック	5.4837	4.0774	1.406
48	豚肉	スライス	8.8394	7.5563	1.283
29	鶏肉	ブロック	8.5085	7.3424	1.166
36	鶏肉	ミンチ	7.9542	6.7993	1.155
41	鶏肉	ミンチ	8.3677	7.3170	1.051



グラフ 4 : $\text{Log}(\text{ISO混釈})$ と $\text{Log}(\text{検査指針})$ の差



グラフ 5 : $\text{Log}(\text{ISO塗抹})$ と $\text{Log}(\text{検査指針})$ の差



グラフ 6 : $\text{Log}(\text{ISO 混釈})$ と $\text{Log}(\text{ISO 塗抹})$ の差

(4) 菌の同定

ISO混釈法と食品衛生検査指針法について、測定値の対数の差が1.0を超過した検体から3菌株を分離し、菌種の同定をおこなった。

表6 菌の同定

No.	肉の種類	加工の種類	ISO 混釈法	検査指針法
12	牛肉	ブロック	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Bacillus circulans</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> 同定不可
54	豚肉	ブロック	<i>Hafnia alvei</i> (<i>Enterobacter hafniae</i>) <i>Hafnia alvei</i> (<i>Enterobacter hafniae</i>) <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Micrococcus luteus</i>
48	豚肉	スライス	<i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus circulans</i> 同定不可	<i>Bacillus circulans</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> Group
29	鶏肉	ブロック	<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)
36	鶏肉	ミンチ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>) <i>Serratia marcescens</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Chromobacterium violaceum</i>
41	鶏肉	ミンチ	Misc.Gram Negative Bacilli Misc.Gram Negative Bacilli Misc.Gram Negative Bacilli	Misc.Gram Negative Bacilli Misc.Gram Negative Bacilli <i>Pseudomonas fluorescens</i>

BBLクリスタル E/NF および GP による同定結果。

4. 考察

ISO 混釈法と従来法（食品衛生検査指針法）の測定結果の相関係数(R²)は、0.9224 と高い相関が認められた（グラフ1）。昨年度同事業で検討した「肉及び肉製品」以外の食品群においても2つの試験法は、高い相関（相関係数 0.9048）が認められたことからISO 混釈法と従来法は、ISO6881にある4つの食品群においては高い相関を示す。本年