

用培地を入手し、当該試験法を用いた食肉への本菌の添加回収試験を実施し、夾雑菌の多い食肉等の検体からの回収効率等を確認して、その実効性を検証すると共に、国内で入手可能な培地との比較検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. Yersinia 試験法 使用培地の比較

試験法	BAM	USDA/FSIS	ISO10273	検査指針
希釈水	PSBB(Peptone Sorbitol and Bile salts broth) :カゼイン分解産物、ソルビトール、塩化ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、胆汁酸	0.01M PBS	PSBB	PBS(Phosphate buffered peptone)
増菌培地	PSBB	①BOS broth: リン酸水素二ナトリウム、シユウ酸ナトリウム、胆汁酸、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、ソルボース、アスパラギン、メチオニン、メタニルイエロー、イーストエキストラクト、ピルビン酸ナトリウム、イルガサン	①PSBB	PBS
		②ITC (Irugasan, ticarcillin and potassium chlorate) broth: カゼイン分解産物、イーストエキストラクト、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、マラカイトグリーン、イルガサン、チカルシリン、塩素酸カリウム	②ITC broth	
選択分離培地	①CIN (Cefsulodin, Irgasan and novobiocin) 寒天:ゼラチン分解産物、カゼイン及び動物組織の分解産物、イーストエキストラクト、マンニトール、ピルビン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、デソキシコール酸ナトリウム、ニュートラルレッド、クリスタルバイオレット	①CIN 寒天	①CIN 寒天	①IN 寒天培地: CIN 寒天培地から Cefsulodin を除いたもの
	②マッコンキー寒天:プロテオースペプトン、ペプトン、ラクトース、胆汁酸、塩化ナトリウム、ニュートラルレッド、クリスタルバイオレット	②SSDC (Salmonella/Shigella agar with sodium desoxycholate and calcium chloride) 寒天: イーストエキストラクト、肉エキス、動物組織の分解産物、ラクトース、胆汁酸、デソキシコール酸ナトリウム、塩化カルシウム、クエン酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、クエン酸鉄(Ⅲ)、ブリリアントグリーン、ニュートラルレッド	②SSDC 寒天	②エスクリン加 IN 寒天培地 (VYE 簡単培地の代用として): IN 寒天培地にエスクリンとクエン酸鉄アンモニウムを加えたもの

図1. BAM法 フローチャート

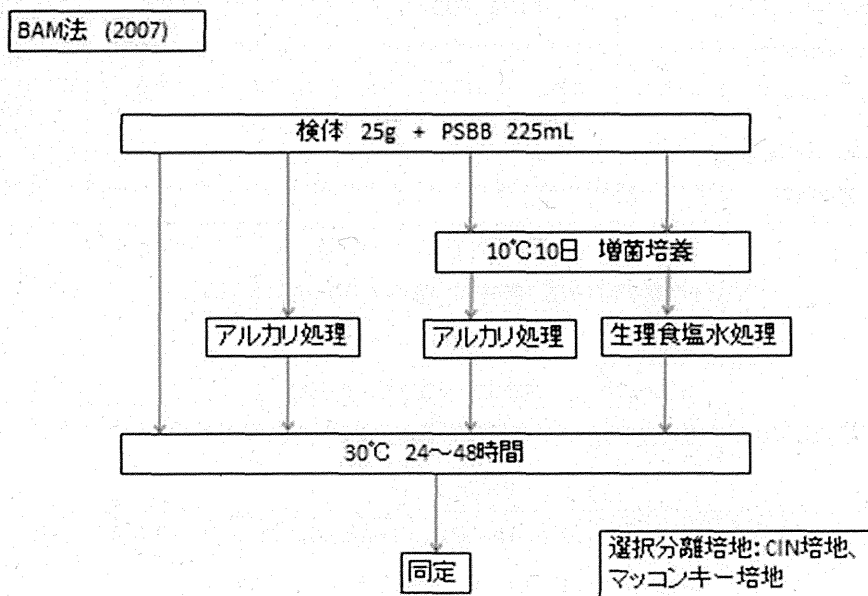


図 2. USDA/FSIS 法 フローチャート

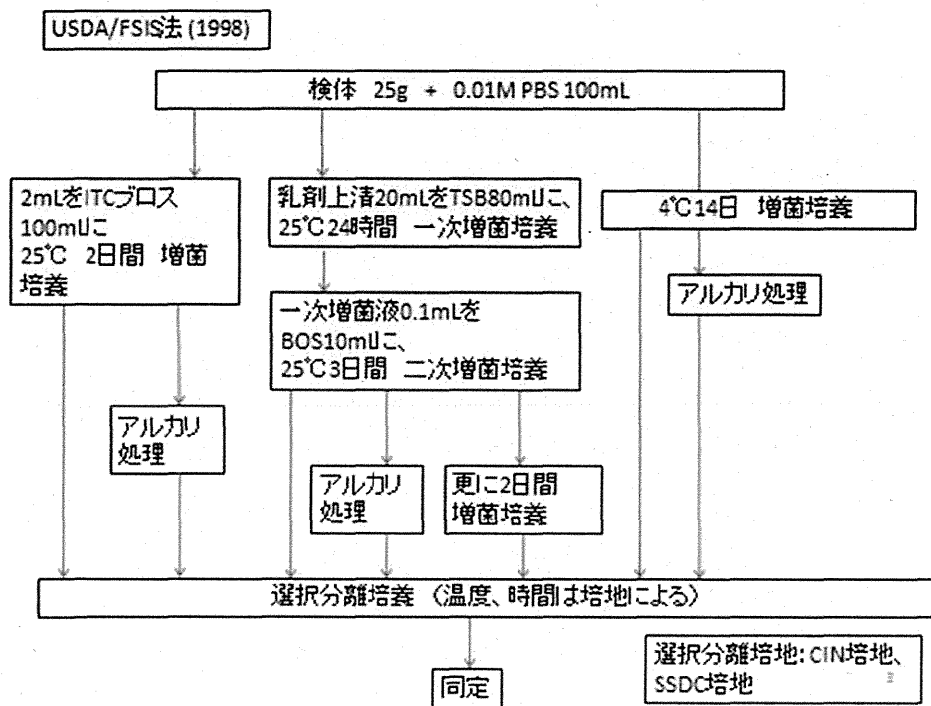


図 3. ISO 10273 フローチャート

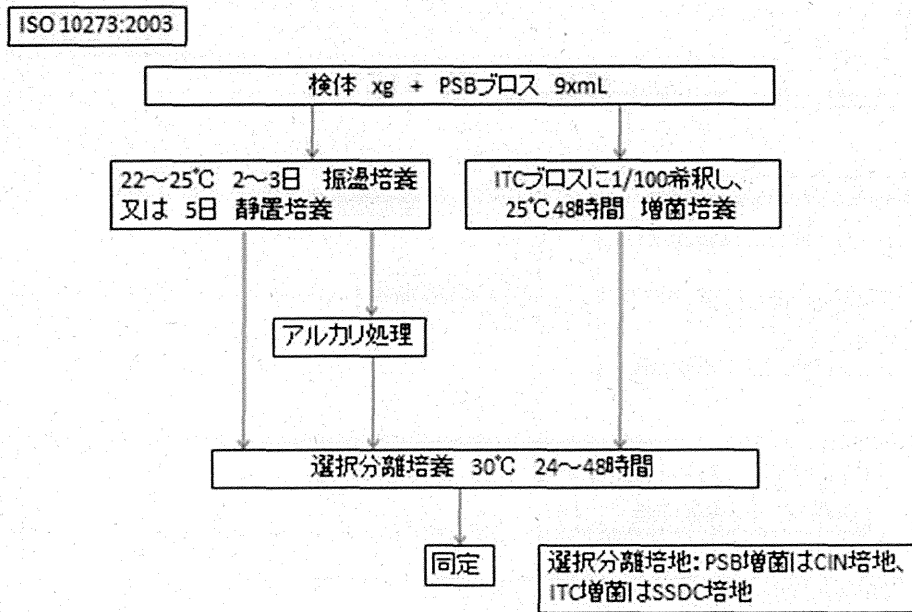
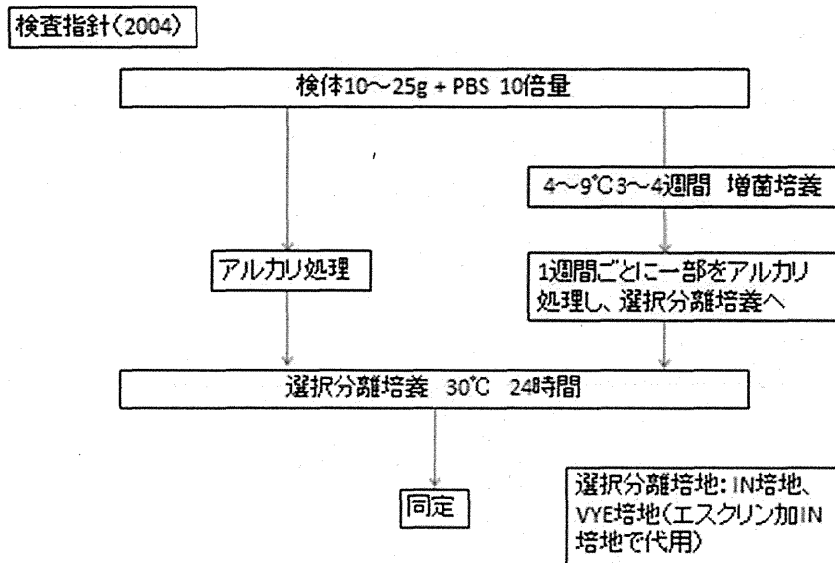


図 4. 食品衛生検査指針 (2004 年) の方法 フローチャート



平成 26 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の開発及びその実効性・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）

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： 齋藤 利江（一般財団法人日本冷凍食品検査協会）

吉田 信一郎（一般財団法人日本食品分析センター）

森 曜子（公益財団法人日本適合性認定協会 認定センター）

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。

ISO 微生物試験法における菌数算定法は大きく分けて 2 パターン存在し、各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と、各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく、ISO7218 を参照するように記述されている場合に分かれる。さらに後者は ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照するようになっている場合と、ISO 7218:1996/Amd.1:2001 または ISO 7218:1996 を参照するようになっている場合の 3 パターンに分かれる。ISO でも菌数算定法を統一する動きがあるが、本研究班でもこれらの問題点について検討を進めることとなった。

一般財団法人日本食品分析センターでは、TBX 寒天培地（44 °C，18～24 時間培養）において、大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討を行った。一般財団法人日本冷凍食品検査協会では、食品から検出される菌種について、食品の加工による菌の損傷も視野に入れ、国内で広く用いられている一般細菌数（生菌数）試験法（以下従来法）と ISO4833：2013（一般生菌数計数法）法（以下 ISO 法）により、同一検体に対して生菌数測定を行い、試験法の違いによる結果の相違について検証した。これらの結果を基に、今後の菌数算定法について作業部会で方向性の検討を行った。

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。

一般財団法人日本食品分析センターでは,TBX寒天培地(44℃,18~24時間培養)において,大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討を行った。

一般財団法人日本冷凍食品検査協会では,食品から検出される菌種について,食品の加工による菌の損傷も視野に入れ,国内で広く用いられている一般細菌数(生菌数)試験法

(以下従来法)とISO4833:2013(一般生菌数計算法)法(以下ISO法)により,同一検体に対して生菌数測定を行い,試験法の違いによる結果の相違について検証した。

これらの結果を基に,今後の菌数算定法について作業部会で方向性の検討を進めた。ISO微生物試験法における菌数算定法について現状をまとめ,今後の検討課題とすることにした。

B. 研究方法

1) ISO微生物試験法における菌数算定法
表1の通り,ISO11290-2(1998年;リステリア・モノサイトゲネス),ISO15214(1998年;中温性乳酸菌),ISO6888-1(1999;コアグラージェ陽性ブドウ球菌),ISO16649-2(2001年; β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌),ISO17410(2001;低温菌),ISO4833(2003;一般生菌数),ISO15213(亜硫酸塩還元菌),ISO7932(2004;推定セレウス菌),ISO7937(2004;ウエルシュ菌),ISO21528-2(腸内細菌科菌群),ISO4832(2006;大腸菌群),ISO/TS10272-2(2006;カンピロバクター属菌),ISO21527-1,2(2008;カビ・酵母)について菌数算定法を確認した。

2) ISO7218(2007年版)の和訳を進めた。

C. 研究結果及び考察

1) 菌数算定法のまとめ

ISO微生物試験法における菌数算定法は大きく分けて2パターン存在し,各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と,各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく,ISO7218を参照するように記述されている場合に分かれていた。後者はISO7218の最新版(現時点では2007年版)を参照するようになっている場合と,ISO7218:1996/Amd.1:2001またはISO7218:1996を参照するようになっている場合

の3パターンに分かれていた。

ISO 7218 (2007年版)では、集落数採用範囲が従来の15-300 cfuから10-300 cfuに変更となっていた。さらに、使用するペトリ皿の枚数として、ISO 17025に準拠した管理を行っている試験所では各希釈段階での使用ペトリ皿は1枚、ISO 17025に準拠した管理を行っていない試験所では各希釈段階での使用ペトリ皿は2枚となっており、試験所認定を受けているかどうかで係数の方法が異なっていることが判明した。ISO 7218 (2007年版)については和訳版がなかったため、和訳を行うことにした。

2) ISO 7218 (2007年版)の和訳

ISO 7218 (2007年版)の和訳を行った。語句の統一を含めて作業を進めた。

3) TBX 寒天培地(44 °C, 18~24 時間培養)において、大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討では、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^4 cfu 以下の平板においては、総(典型的及び非典型的)集落数の増加に伴い、大腸菌の集落が小さくなる傾向が認められたが、回収率は80%以上であり、大腸菌集落数の測定に大きな支障は認められなかった。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 $10^3 \sim 10^4$ cfu の平板においても、大腸菌数を推定することが可能と考えられた。一方、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^5 cfu 以上の平板においては、大腸菌がきわめて小さい集落を形成し、典型的集落の判定が困難となり、回収率が60%~70%とやや低い事例も認められた。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^5 cfu 以上の平板においては、大腸菌数の推定が困難な場合があると考えられた。

4) 国内の公定法である従来法とISO法の培養条件の違いが、加熱処理及び凍結処理のストレスを与えた5種類の菌に対して与える影響を評価した。その測定結果は、30°C、

72 時間培養で高くなる傾向があったが、全ての測定値において 1Log CFU/g の範囲内であり、極端な相違は認められなかった。

Bacillus subtilis では、30°C、72 時間培養が最も高くない測定値となったのは、発育してくるコロニーが大きく、培養時間の経過により近隣のコロニーと重なりあったためである。培養条件による5種類の菌の測定値(対数)の差は、ストレス処理を行い培養時間が短いほど差を生じた。

D. 結論

・ISO 微生物試験法における菌数算定法は各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と、各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく、ISO 7218 を参照するように記述されている場合に分かれていた。

・ISO 7218 を参照するように記述されている場合、ISO 7218 の最新版(現時点では2007年版)を参照するようになっている場合と、ISO 7218:1996/Amd.1:2001 または ISO 7218:1996 を参照するようになっている場合の3パターンに分かれていた。

・ISO 7218 (2007年版)では、集落数採用範囲が変更になっている。

・ISO では試験所認定を受けているか否かで係数の算定方法が異なっている。

・TBX 寒天培地を用いるISO法は、大腸菌の菌数測定法として有用と思われる、その測定可能な範囲を確認することが出来た。

・国内の公定法である従来法とISO法の培養条件の違いが、加熱処理及び凍結処理のストレスを与えた菌に対して与える影響の検討により、ISO法の培養条件(30°C、72時間)にて生菌数を測定した場合は、その測定値は概ね高くなることが示された。

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. ISO 微生物試験法における菌数算定法の現状

I ISO 微生物試験法における菌数算定法を以下の4パターンに区分する.

A 各微生物試験法の中に生菌数算定法が記述されているパターン

B 各微生物試験法の中に生菌数算定法の記述はなく, ISO 7218* を参照するように記述されているパターン

→ **B1** ISO 7218 の最新版(現時点での最新は2007年版), **B2** ISO 7218:1996/Amd.1:2001, **B3** ISO 7218:1996

II 主なISO 微生物試験法における生菌数算定法を上記パターンに従って整理した表を以下に示す.

No.	発行年	対象微生物	菌数算定法のパターン				コメント
			A	B1	B2	B3	
☆ISO 11290-2	1998	リステリア・モノサイトゲネス	○			△	A = B3 + 上乘セルール
ISO 15214	1998	中温性乳酸菌	○				A = B3
☆ISO 6888-1	1999	コアグラージェ陽性ブドウ球菌	○				
☆ISO 16649-2	2001	β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌	○				
ISO 17410	2001	低温菌	○	△			A ≠ B1
☆ISO 4833	2003	一般生菌数				○	
ISO 15213	2003	亜硫酸塩還元菌			○		
ISO 7932	2004	推定セレウス菌			○		
☆ISO 7937	2004	ウエルシュ菌		○			
☆ISO 21528-2	2004	腸内細菌科菌群			○		
☆ISO 4832	2006	大腸菌群		○			
ISO/TS 10272-2	2006	カンピロバクター属菌	○	△			特殊なケースは B1 を参照
ISO 21527-1,2	2008	カビ・酵母		○			

☆:NIHSJ法の参照試験法

* ISO 7218:2007 General requirements and guidance for microbiological examinations

10 Enumeration/10.3 Calculation and expression of results obtained with solid media/10.3.2 Expression of results/

10.3.2.2 Method of calculation: general case (counting of total colonies or typical colonies)

10.3.2.3 Method of calculation: after identification

10.3.2.4 Method of calculation: low counts

10.3.2.5 Method of calculation: special cases

Ⅲ ISO 7218:2007(最新版)の問題点

- 1) 集落数採用範囲の変更: 15~300 cfu → 10~300 cfu
- 2) 使用するペトリ皿の枚数の明記: ① ISO17025 に準拠した管理を行っている試験所では, 各段階希釈での使用ペトリ皿は 1 枚
② ISO17025 に準拠した管理を行っていない試験所では, 各段階希釈での使用ペトリ皿は 2 枚
- 3) 菌数算定式(一般規定)の変更: 各段階希釈での使用ペトリ皿を 1 枚に限定した式に変更, 2 枚使用する場合は ISO 8199 参照

ISO 7218:2007	ISO 7218:1996/Amd.1:2001	ISO 7218:1996	ISO 8199:2005
$N = \frac{\sum C_1}{V \times 1.1 \times d}$		$N = \frac{\sum C_2}{V \times (n_1 + 0.1 \times n_2) \times d}$	

N: 生菌数, $\sum C_1$: 連続 2 段階希釈の集落数の合計(どれか 1 枚は 10 cfu 以上), $\sum C_2$: 連続 2 段階希釈の集落数の合計(どれか 1 枚は 15 cfu 以上), V: ペトリ皿への試料液の分注量(ml), d: 連続 2 段階希釈の第一希釈の希釈度(10^{-n}), n_1 : 連続 2 段階希釈の第一希釈でのペトリ皿数, n_2 : 連続 2 段階希釈の第二希釈でのペトリ皿数

【菌数算定例】

<ISO 7218:2007>

希釈度	集落数	菌数算定 $N = (168 + 14) / (1 \times 1.1 \times 10^{-2}) = 16,545 \rightarrow 17,000 \text{ or } 1.7 \times 10^4 / \text{ml}(\text{g})$
10^{-2}	168	
10^{-3}	14	

<ISO 7218:1996/Amd.1:2001>

希釈度	集落数 1	集落数 2	菌数算定 $N = (168 + 215 + 14 + 25) / [1 \times (2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}] = 19,182 \rightarrow 19,000 \text{ or } 1.9 \times 10^4 / \text{ml}(\text{g})$
10^{-2}	168	215	
10^{-3}	14	25	

以 上

衛生指標菌作業部会

「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」 における衛生指標菌試験法の標準法策定の検討

平成26年度委託事業 一般財団法人日本食品分析センター

1 依頼者

国立医薬品食品衛生研究所

2 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。

平成 24 及び 25 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した。平成 24 年度の研究では, 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。平成 25 年度の研究では, 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, 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, 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, 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。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, 培養時間が 24 時間を超えた場合, 大腸菌以外の集落が増加した試料が認められ, 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。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。

今年度の本研究では、TBX 寒天培地(44 °C, 18~24 時間培養)において、大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響について考察する。

3 研究方法

1) 研究概要

ISO 16649-2 : 2001 では、指定時間培養した後、「典型的集落数が 150 個未満かつ総(典型的及び非典型的)集落数が 300 個未満の各ペトリ皿における、 β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の典型的集落を計数する」よう規定されている。昨年度の研究において用いた食品では、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したため、典型的集落数が 150 個未満であっても総(典型的及び非典型的)集落数が 300 個以上となる平板の典型的集落を計数し、大腸菌数を算出しなければならない事例が多数認められた。そこで、総(典型的及び非典型的)集落数が 300 個以上の平板における、 β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の典型的集落数測定への影響を検討するため、*Klebsiella pneumoniae*(クレブシエラ ニューモニアエ)と大腸菌の菌液を混合し、TBX 寒天培地を用いた混積平板培養法により大腸菌数を測定し、大腸菌集落数測定への影響を考察した。また、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存在する食品の希釈液と大腸菌の菌液を混合し、TBX 寒天培地を用いた混積平板培養法により大腸菌数を測定し、大腸菌集落数測定への影響を考察した。

2) クレブシエラ ニューモニアエの集落が大腸菌集落数測定に及ぼす影響の確認

大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌液混合液について、TBX寒天培地を用いた混積平板培養法により大腸菌数を測定した。本測定は繰り返し2回実施した。

① 試験菌

- a) *Escherichia coli* NBRC 15034(大腸菌)
- b) *Klebsiella pneumoniae* NBRC 13277(クレブシエラ ニューモニアエ)

② 試験菌液の調製

a) 大腸菌

試験菌をトリプトソイブイオンに接種して37±1 °Cで18~24時間培養後、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて、1 ml当たりの菌数が約 2×10^2 cfu/mlとなるように調製し、大腸菌の試験菌液とした。

b) クレブシエラ ニューモニアエ

試験菌をトリプトソイブイオンに接種して37±1 °Cで18~24時間培養後、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて、1 ml当たりの菌数が約 2×10^6 cfu/ml, 約 2×10^5 cfu/ml, 約 2×10^4 cfu/ml, 約 2×10^3 cfu/ml及び約 2×10^2 cfu/mlとなるように調製し、クレブシエラ ニューモニアエの試験菌液とした。

③ 大腸菌の試験菌液の菌数測定

大腸菌の試験菌液を0.5 mlずつ10枚のシャーレに接種して、TBX寒天培地をシャーレに加え、混合した。固化後、44±1 °Cで18～24時間培養し、生育した大腸菌の集落数を計測した。

④ クレブシエラ ニューモニアエの試験菌液の菌数測定

約 2×10^2 cfu/mlとなるように調製したクレブシエラ ニューモニアエの試験菌液を0.5mlずつ2枚のシャーレに接種して、TBX寒天培地をシャーレに加え、混合した。固化後、44±1 °Cで18～24時間培養後し、生育したクレブシエラ ニューモニアエの集落数を計測した。

⑤ 試験菌混合液のTBX寒天培地を用いた集落数の測定

各濃度に調製したクレブシエラ ニューモニアエの試験菌液をそれぞれ0.5 mlずつ3枚のシャーレに接種した。このシャーレに、さらに大腸菌の試験菌液を0.5 mlずつ接種し、クレブシエラ ニューモニアエの試験菌液と混合した。TBX寒天培地をシャーレに加え、混合し、固化後、44±1 °Cで18～24時間培養し、生育した大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの集落数を測定した。

3) 食品(試料)中の夾雑菌が大腸菌集落数測定に及ぼす影響の確認

大腸菌試験菌液及び食品(試料)の希釈液を混合し、TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法により大腸菌数を測定した。本測定は繰り返し2回実施した。

① 試験菌

Escherichia coli NBRC 15034(大腸菌)

② 試料

- a) 鶏ひき肉
- b) 豚ひき肉

なお、事前にTBX寒天培地を用いた混釈平板培養法により大腸菌数を測定し、大腸菌未検出の試料を試験に用いた。

③ 試験菌液の調製

試験菌をトリプトソイブイオンに接種して37±1 °Cで18～24時間培養後、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて、1 ml当たりの菌数が約 2×10^2 cfu/mlとなるように調製し、試験菌液とした。

④ 試料希釈液の調製

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。

⑤ 試験菌液の菌数測定

大腸菌の試験菌液を0.5 mlずつ10枚のシャーレに接種して、TBX寒天培地をシャーレに加えて混合した。固化後、 44 ± 1 °Cで18~24時間培養し、生育した大腸菌集落数を計測した。

⑥ 試料の菌数の測定

調製した試料の10倍段階希釈液を0.5 mlずつシャーレに接種して、TBX寒天培地をシャーレに加え、混合した。固化後、 44 ± 1 °Cで18~24時間培養後し、生育した集落数を測定した。

⑦ 試験菌液及び試料希釈液混合液のTBX寒天培地を用いた集落数の測定

調製した試料の10倍段階希釈液を0.5 mlずつ3枚のシャーレに接種した。このシャーレに、さらに試験菌液を0.5 mlずつ接種し、試料の10倍段階希釈液と混合した。TBX寒天培地をシャーレに加え、混合し、固化後、 44 ± 1 °Cで18~24時間培養し、生育した大腸菌及び大腸菌以外の集落数を測定した。

4 研究結果及び考察

1) クレブシエラ ニューモニアエの集落が大腸菌集落数測定に及ぼす影響の確認

大腸菌集落数測定結果を表-1及び図-1に示した。

なお、測定したTBX寒天平板の一例を写真-1~7に示した。

総集落(大腸菌集落 約 10^2 cfu とクレブシエラ ニューモニアエの合計集落)数が約 $10^2 \sim 10^6$ cfu の平板のいずれにおいても大腸菌の回収率は80%以上であったが、総集落数が約 10^3 cfu 以上の平板では総集落数の増加に伴い大腸菌の集落が小さくなる傾向が認められた。また、測定2の総集落数が約 10^5 及び 10^6 cfu の平板では、大腸菌の集落がきわめて小さく、典型的集落の判定が困難であった。

2) 食品(試料)中の夾雑菌が大腸菌集落数測定に及ぼす影響の確認

試料の大腸菌集落数測定結果を表-2, 3及び図-2に示した。

なお、測定したTBX寒天平板の一例を写真-8~18に示した。

鶏ひき肉では、総集落(大腸菌集落 約 10^2 cfu とその他の集落の合計集落)数が約 $10^2 \sim 10^4$ cfu の平板では回収率は80%以上であった。また、総集落数が約 10^3 及び 10^4 cfu の平板では総集落数の増加に伴い大腸菌の集落が小さくなる傾向が認められたが、大腸菌集落数の計測に支障はなかった。一方、総集落数が約 10^5 cfu の平板では大腸菌の集落がきわめて小さく、典型的集落の判定が困難であり、回収率が60~70%とやや低かった。

豚ひき肉では総集落(大腸菌集落 約 10^2 cfu とその他の集落の合計集落)数が約 $10^2 \sim 10^4$ cfu のいずれの平板においても回収率は99%以上であり、総集落数が約 10^3 及び 10^4 cfu の平板では総集落数の増加に伴い大腸菌の集落が小さくなる傾向が認められたが、集落数の計測に支障はなかった。

3) まとめ

TBX 寒天培地(44±1 °C, 18~24 時間培養)において、大腸菌以外の集落が多数生育した場合の大腸菌集落数測定への影響について検討した。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10⁴ cfu 以下の平板においては、総(典型的及び非典型的)集落数の増加に伴い、大腸菌の集落が小さくなる傾向が認められたが、回収率は 80%以上であり、大腸菌集落数の測定に大きな支障は認められなかった。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10³~10⁴ cfu の平板においても、大腸菌数を推定することが可能と考えられた。一方、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10⁵ cfu 以上の平板においては、大腸菌がきわめて小さい集落を形成し、典型的集落の判定が困難となり、回収率が 60 %~70 %とやや低い事例も認められた。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10⁵ cfu 以上の平板においては、大腸菌数の推定が困難な場合があると考えられた。

大腸菌に汚染された食品では、本研究に用いた食品(試料)のように TBX 寒天培地(44±1 °C, 18~24 時間培養)において生育する大腸菌以外の菌が多数共存する可能性が考えられる。このような食品では、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ず、特に TBX 寒天培地(44±1 °C, 18~24 時間培養)において集落を形成する大腸菌以外の菌の菌数が大腸菌数の 10000 倍を超える(採用平板に大腸菌以外の菌の集落が約 10⁵ cfu 以上存在する)場合には、測定平板上に大腸菌と大腸菌以外の菌の集落が混在し、大腸菌数の計測が困難となり、大腸菌数の推定ができない可能性がある。このような食品の場合には、試験法として ISO 16649-3 : 2005 に示された液体培地を用いた MPN 法の採用等を考慮する必要もあると考えられた。

表-1 大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌液混合液の大腸菌集落数測定結果

測定	接種菌数 (cfu)		総集落数*2 (cfu)	クレブシエラ ニューモニアエ 集落数 (cfu)	大腸菌 集落数 (cfu)	回収率*3 (%)
	大腸菌*1	クレブシエラ ニューモニアエ				
1	93	約10 ⁶ *4	約10 ⁶	約10 ⁶ *5	85*6	91.4
		約10 ⁵ *4	約10 ⁵	約10 ⁵ *5	82*7	88.2
		約10 ⁴ *4	約10 ⁴	約10 ⁴ *5	85*8	91.4
		約10 ³ *4	約10 ³	約10 ³ *5	83*9	89.2
		89*1	約10 ²	87	92*10	98.9
2	78	約10 ⁶ *4	約10 ⁶	約10 ⁶ *5	72*11	92.3
		約10 ⁵ *4	約10 ⁵	約10 ⁵ *5	79*12	101.3
		約10 ⁴ *4	約10 ⁴	約10 ⁴ *5	85	109.0
		約10 ³ *4	約10 ³	約10 ³ *5	92	117.9
		88*1	約10 ²	86	79	101.3

- *1 接種菌液の菌数測定 (TBX寒天培地：44 °C，18～24時間培養)結果から算出した値を示した。
- *2 総集落の概数を示した。
- *3 回収率 (%) = 大腸菌集落数 / 大腸菌の接種菌数 × 100
- *4 接種菌液の菌数測定 (TBX寒天培地：44 °C，18～24時間培養)結果から推定した値を示した。
- *5 クレブシエラ ニューモニアエの集落の概数を示した。
- *6 写真-1
- *7 写真-2
- *8 写真-3
- *9 写真-4
- *10 写真-5
- *11 写真-6 大腸菌集落は極めて小さく，計数が困難であった。
- *12 写真-7 大腸菌集落は極めて小さく，計数が困難であった。

表-2 大腸菌試験菌液及び試料希釈液混合液の大腸菌数測定結果(鶏ひき肉)

試料	大腸菌 接種菌数*1 (cfu)	試料 希釈倍数	総集落数*2 (cfu)	大腸菌以外 の集落数 (cfu)	大腸菌 集落数 (cfu)	回収率*3 (%)
1	131	10 ¹	約 10 ⁵	約 10 ⁵ *4	91*5	69.5
		10 ²	約 10 ⁴	約 10 ⁴ *4	141*6	107.6
		10 ³	約 10 ³	約 10 ³ *4	126*7	96.2
		10 ⁴	約 10 ²	234	125*8	95.4
		10 ⁵	約 10 ²	25	133*9	101.5
		10 ⁶	約 10 ²	4	139*10	106.1
2	111	10 ¹	約 10 ⁵	約 10 ⁵ *4	68	61.3
		10 ²	約 10 ⁴	約 10 ⁴ *4	93	83.8
		10 ³	約 10 ³	約 10 ³ *4	99	89.2
		10 ⁴	約 10 ²	438	102	91.9
		10 ⁵	約 10 ²	48	104	93.7
		10 ⁶	約 10 ²	5	99	89.2

*1 接種菌液の菌数測定(TBX寒天培地：44℃，18～24時間培養)結果から算出した値を示した。

*2 総集落の概数を示した。

*3 回収率(%) = 大腸菌集落数 / 大腸菌の接種菌数 × 100

*4 大腸菌以外の集落の概数を示した。

*5 写真-8

*6 写真-9

*7 写真-10

*8 写真-11

*9 写真-12

*10 写真-13

表-3 大腸菌試験菌液及び試料希釈液混合液の大腸菌数測定結果(豚ひき肉)

試料	大腸菌 接種菌数*1 (cfu)	試料 希釈倍数	総集落数*2 (cfu)	大腸菌以外 の集落数 (cfu)	大腸菌 集落数 (cfu)	回収率*3 (%)
1	107	10 ¹	約 10 ⁴	約 10 ⁴ *4	125*5	116.8
		10 ²	約 10 ³	約 10 ³ *4	110*6	102.8
		10 ³	約 10 ²	305	109*7	101.9
		10 ⁴	約 10 ²	33	122*8	114.0
		10 ⁵	約 10 ²	5	106*9	99.1
		10 ⁶	約 10 ²	0	113	105.6
2	107	10 ¹	約 10 ⁴	約 10 ⁴ *4	117	109.3
		10 ²	約 10 ³	約 10 ³ *4	113	105.6
		10 ³	約 10 ²	374	117	109.3
		10 ⁴	約 10 ²	41	119	111.2
		10 ⁵	約 10 ²	2	120	112.1
		10 ⁶	約 10 ²	0	117	109.3

*1 接種菌液の菌数測定(TBX寒天培地：44℃，18～24時間培養)結果から算出した値を示した。

*2 総集落の概数を示した。

*3 回収率(%) = 大腸菌集落数/大腸菌の接種菌数 × 100

*4 大腸菌以外の集落の概数を示した。

*5 写真-14

*6 写真-15

*7 写真-16

*8 写真-17

*9 写真-18