

平成 29 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）

「食品微生物試験法の国際調和に関する研究」

分担研究報告書

Enterobacteriaceae の標準試験法に関する研究

研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	鈴木穂高	茨城大学農学部
	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部

研究要旨

食品からの *Enterobacteriaceae* 標準試験法について検討を行った。先行研究において、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」は *Enterobacteriaceae* の標準試験法（定性法及び定量法）を ISO 21528-1:2004 及び ISO 21528-2:2004 に準拠して作成し、NIHSJ-15 及び 16 とした。当該試験法は平成 23 年に生食用食肉中の腸内細菌科菌群検出試験法として、発出されている（食安発 0926 第 1 号）。しかしながら、ISO 21528-1 は 2017 年に改定され、増菌培養の省略、確認試験培地の変更等が行われた。EU 諸国では食肉や乳製品等の製造工程管理上の衛生指標菌として *Enterobacteriaceae* を用いている。一方、現在わが国において、食品中の微生物汚染の指標として、大腸菌群を規格基準として用いている食品種が数多く存在する。今年度の本研究では、ISO 21528-1:2017 に基づく NIHSJ-15 の改定について検討すると共に、その試験法を用いた腸内細菌科菌群汚染状況と、従来の衛生指標菌である大腸菌群の汚染状況を、市販の低温殺菌牛乳及びアイスクリーム類において調査した。

A. 研究目的

Enterobacteriaceae（腸内細菌科）は微生物分類においてプロテオバクテリア門ガンマプロテオバクテリア綱エンテロバクター目に属しており、通性嫌気性でブドウ糖を発酵してガスと酸を産生するグラム陰性桿菌である。2005 年に発行された Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria では腸内細菌科に 42 属の細菌が含まれているが、2008 年に *Enterobacter* 属から *Cronobacter* 属が独立するなど、現在では少なくとも 52 属が含まれている。その中には、人

に病原性を示す *Escherichia*、*Klebsiella*、*Salmonella* 等や、日和見感染の原因となる *Hafnia*、*Morganella*、*Rahnella* 等の他、植物や昆虫、魚類に病原性を示すものも含まれている。EU 諸国では食肉や乳製品等の製造工程管理上の衛生指標菌として *Enterobacteriaceae* を用いており、更に検体数や基準適合検体数を定めたサンプリングプランを設定している。本菌の国際的な標準試験法としては、International Organization for Standardization (ISO) が定める ISO 21528-1:2017（定性法及び MPN 法）、ISO 21528-2:2017（定量法）がある。現在日本国内では、

生食用食肉の成分規格として「腸内細菌科菌群が陰性でなければならない」としており、平成 23 年には当時の ISO 21528-1:2004 に準拠した標準試験法に基づく試験法を通知として発出した。しかしながら 2017 年には ISO 法の改訂が行われ、結果の判定までに要する時間が大幅に短縮されたことから、国内においても腸内細菌科菌群の標準試験法の改訂について、食品中の微生物の標準試験法を作成している「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に提案することとした。

また、現在日本においては、食品中の微生物汚染の指標として、大腸菌群を規格基準として用いている食品種が数多く存在する。大腸菌群とは、乳糖を分解して酸とガスを産生する、好気性または通性嫌気性のグラム陰性無芽胞形成の桿菌群を指すもので、*Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* 等の *Enterobacteriaceae* に属する菌が多く含まれている。一方、同属に属さない *Aeromonas* も含まれており、微生物学上の分類とは一致しない部分がある。これらについて、国際整合性に鑑み、腸内細菌科菌群を指標とした場合の食品中の微生物汚染実態を把握するための、乳製品について腸内細菌科菌群と大腸菌群の調査を行った。

B. 研究方法

1) ISO 21528-1 : 2017 の概要

2017 年に改定された ISO による腸内細菌科菌群試験法について、概要を作成した。また、2004 年に発行された前版との相違点について纏めた。

2) アイスクリーム等の汚染実態調査

市販のアイスクリーム等について、衛生指標

菌汚染実態を調査した。検体はアイスクリーム（乳固形分 15.0%以上、乳脂肪分 8.0%以上）6 検体、アイスマルク（乳固形分 10.0%以上、乳脂肪分 3.0%以上）15 検体、ラクトアイス（乳固形分 3.0%以上）5 検体、氷菓 4 検体を用いた。試験項目は、細菌数（生菌数）、腸内細菌科菌群及び大腸菌群とした。試験方法は、細菌数については「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」に示された試験法（以下乳等省令）腸内細菌科菌群は ISO 法、大腸菌群については乳等省令を用いた。腸内細菌科菌群は、選択分離寒天培地である VRBG 寒天について 3 つのメーカーの製品を用いた。また、大腸菌群については収去直後と 6 か月後の二度実施した。検出された大腸菌群は乳等省令の確認試験に加え、TSI 寒天及び LIM 培地での性状、尿素分解性、VP 試験、クエン酸利用能、マロン酸利用能、IPA 産生能及び酢酸塩利用能に関する生化学性状試験を行い、菌種の同定には API20E（バイオメリュー）を用いた。

3) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査

市販の低温殺菌牛乳等について、衛生指標菌汚染実態を調査した。検体は、低温保持殺菌牛乳（LTLT: 63 ~ 65、30 分）8 検体、高温短時間殺菌牛乳（HTST: 72 以上、15 秒以上）2 検体、高温保持殺菌牛乳（HTLT: 75 以上、15 分以上）1 検体、超高温瞬間殺菌牛乳（UHT: 120 ~ 150、1 秒~3 秒）3 検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群及び大腸菌群とした。試験方法は、細菌数については乳等省令及び ISO 法を用い、腸内細菌科菌群は ISO 法を、大腸菌群については乳等省令を用いた。検出された指標菌の菌種の同定には、RapiD 20E（バイオメリュー）を

用いた。

4) NIHSJ-15-ST1：2017 案及び NIHSJ-16-ST1：2017 案の作成

1)の概要を元に、腸内細菌科菌群の定性試験法として NIHSJ-15：2017 を、定量法として NIHSJ-16:2017 のステージ 1 案を作成し、第 65 回食品からの微生物標準試験法検討委員会に提出した。

C．研究結果

1) ISO 21528-1：2017 の概要

表 1 に ISO21528-1:2017 (定性法)の、表 2 に ISO21528-2:2017(定量法)の概要を示した。また、2004 年に発行された前版との相違点について纏めた(表 3)定性法における変更点は 2 次増菌培養の省略と、確認試験におけるグルコース発酵性試験の使用培地の変更であった。それにより、2004 年版で結果の判定までに 6 日間を要していたものが、5 日間での判定が可能となった。定量法においては、定性法と同様に確認試験の使用培地が変更されていた。定量法の所要日数は 2004 年版と同じ、4 日間であった。

2) アイスクリーム類の汚染実態

表 4 に、アイスクリーム等の細菌汚染実態調査の結果を示した。今回用いた検体で、微生物成分規格(アイスクリーム：細菌数 100,000cfu/g 以下、大腸菌群陰性、アイスマルク及びラクトアイス：細菌数 50,000 cfu/g 以下、大腸菌群陰性、氷菓：細菌数 10,000 cfu/mL (融解水)以下、大腸菌群陰性)に違反している検体はほとんどなかったが、ラクトアイスの 1 検体について、1 種の培地から腸内細菌科菌群が検出され、*Klebsiella oxytoca* と同

定された。この検体は 2017 年 7 月に大腸菌群試験を実施した際に 1.5×10^1 cfu/g を検出しており、ラクトアイスの成分規格不適合であったものの、収去 6 か月後の検査では大腸菌群は陰性であった。また、当該検体は、細菌数についても 30 検体中 2 番目に多い値を示していた。今回用いた試験法において、腸内細菌科菌群の試験結果を得るまでの所要時間は最長 4 日、大腸菌群試験の所要時間は最長 5 日であった。

3) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査

表 5 に、低温殺菌牛乳等の細菌汚染実態調査の結果を示した。今回用いた検体で、大腸菌群が陽性のものはなかったが、低温殺菌牛乳の 1 検体で腸内細菌科菌群が検出され、*Pantoea* spp.と同定された。本検体は大腸菌群試験では陰性と判定された。ほぼすべての検体で ISO 法を用いた細菌数が乳等省令の細菌数より高い結果を示していた。ISO 法を用いた細菌数をみると LTLT 牛乳では全 8 検体が 1 以上で最大は 10^3 cfu/ml であり、HTST 牛乳では 2 検体のうち 1 検体 10^2 cfu/ml、他の 1 検体は不検出であった。UHT 牛乳では 3 検体中 2 検体は細菌数が不検出であり、1 検体については試料原液を接種した 2 平板の一方から 1 集落が形成されたが、落下菌の可能性が高いと思われた。今回用いた試験法において、腸内細菌科菌群の試験結果を得るまでの所要時間は最長 5 日、大腸菌群試験の所要時間は最長 6 日であった。

4) NIHSJ-15-ST1：2017 案及び NIHSJ-16-ST1：2017 案の作成

改訂された ISO 21528 を元に、NIHSJ-15-ST1：2017 案及び NIHSJ-16-ST1：2017 案を作

成し（別添 1 及び 2）、第 65 回食品からの微生物標準試験法検討委員会に提出した。委員会での議論を経て、腸内細菌科菌群試験法の改訂に向けた検討を行うこと、前版と区別するために試験法番号に年号をつけること、及び ST1 案が承認された。

D. 考察

本研究により、アイスクリーム類 30 検体について昨年発行された ISO 21528-2（定量法）による腸内細菌科菌群試験及び乳等省令による大腸菌群試験を行ったところ、ラクトアイス 1 検体から腸内細菌科菌群が検出された。当該検体からは収去直後の検査において大腸菌群が検出されているものの、収去 6 か月後の検査では大腸菌群は陰性となっていたため、長期間の冷凍保存により損傷された菌が大腸菌群の試験法では増殖できず、腸内細菌科菌群試験法でのみ検出可能となった可能性が示唆された。また、低温殺菌牛乳等の検討でも、LTLT 牛乳 1 検体から腸内細菌科菌群が検出された。当該検体の細菌数は他の低温殺菌牛乳検体と比較して高くはなかったことから、細菌数と腸内細菌科菌群汚染との相関はないと思われた。

以上より、腸内細菌科菌群が乳製品の衛生指標として有用である可能性が示された。ISO 法の改訂に伴い、今後国内の腸内細菌科菌群の標準試験法についても、改訂に向けた検討が行われることとなった。次年度は、当該試験法案を用いた乳製品の汚染実態調査を継続すると共に、現在腸内細菌科菌群不検出が成分規格とされている生食用食肉を用いた試験法案のシングルラボバリデーションを実施する予定である。

E. 結論

ISO 21528-1：2017 の改定に伴い、先行研究で作成した腸内細菌科菌群の標準試験法 NIHSJ-15 及び 16 について、改訂に向けた検討が行われることが、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」で決定された。今年度の市販乳製品を用いた検討で、低温殺菌牛乳において大腸菌群陰性、腸内細菌科菌群陽性の検体が 1 検体見出された。また、ラクトアイスにおいては、大腸菌群陽性であった 1 検体が、6 か月の保存後に再検査をおこなったところ陰性となったものの、腸内細菌科菌群では陽性であったものがあり、腸内細菌科菌群が衛生指標として有用である可能性が示された。次年度は、当該試験法案を用いた乳製品の汚染実態調査を継続すると共に、腸内細菌科菌群が成分規格に用いられている生食用食肉を用いて、改定試験法案の検討を実施する。

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 . ISO21528-1:2017 (定性法) の概要

	試料調製	BPW で 10 倍乳剤作成、適宜希釈
	1 次増菌培養	37 18 時間 ± 2 時間
	2 次増菌培養	なし
	選択分離培養	VRBG 寒天平板、37 24 時間 ± 2 時間
	確認試験	オキシダーゼ試験 ブドウ糖発酵性

表 2 . ISO21528-2:2017 (定量法) の概要

	試料調製	液体の場合は原液を、その他の場合は ISO 6887-1、ISO 18593 に使われている希釈水を用いて 10 倍乳剤及び階段希釈液を作成
	分注	シャーレに試料原液 1mL を接種しする
	培地	44 ~ 47 の VRBG 寒天培地 15mL を加え、良く攪拌して固化する
	重層	44 ~ 47 の VRBG 寒天培地 5mL を重層し、固化する
	培養	37 ± 1 24 時間 ± 2 時間
	確認試験	オキシダーゼ試験 ブドウ糖発酵性

表3 . ISO 腸内細菌科菌群試験法 2003年版と2017年版の主な相違点

		定性法	
		ISO 21528-1:2004	ISO 21528-1:2017
	2次増菌培養	1次増菌液 1ml+EE プイヨン 10ml、 37 24時間 ± 2時間	なし
	確認試験 グルコース発酵 性試験で用いる培地	グルコース寒天培地	グルコース OF 培地

		定量法	
		ISO 21528-2:2004	ISO 21528-2:2017
	確認試験 グルコース発酵 性試験で用いる培地	グルコース寒天培地	グルコース OF 培地

表4. アイスクリーム等の汚染実態

検体 番号 a)	食品種	細菌数 (CFU/g) ^{b)}	大腸菌群 (CFU/g)	腸内細菌科菌群(CFU/g)			同定結果
		乳等省令	乳等省令	ISO 法			
				BD	Oxoid	Merck	
1	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
2	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
3	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
4	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
5	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
6	アイスクリーム	2.5 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	
7	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
8	アイスマイルク	1.5 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	
9	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
10	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
11	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
12	アイスマイルク	7.7 × 10 ²	<10	<10	<10	<10	
13	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
14	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
15	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
16	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
17	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
18	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
19	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
20	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
21	アイスマイルク	<10	<10	<10	<10	<10	
22	ラクトアイス	3.0 × 10 ¹	<10 ^{a)}	1.0 × 10 ¹	<10	<10	<i>Klebsiella oxytoca</i>
23	ラクトアイス	<10	<10	<10	<10	<10	
24	ラクトアイス	<10	<10	<10	<10	<10	
25	ラクトアイス	1.0 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	
26	ラクトアイス	<10	<10	<10	<10	<10	
27	氷菓	1.0 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	
28	氷菓	<10	<10	<10	<10	<10	
29	氷菓	<10	<10	<10	<10	<10	
30	氷菓	<10	<10	<10	<10	<10	

a) 1-27 は 2017.7, 28-30 は 2018.1 収去. 2018.1 実施.

b) 1-27 は 2017.7 実施

c) 2017.7 実施時は $1.5 \times$

10^1

表 5 . 低温殺菌牛乳等の汚染実態

検体番号	食品種	殺菌法	細菌数 (CFU/mL) ^{a)}		腸内細菌科菌群	大腸菌群	同定結果
			乳等省令	ISO 法	ISO 法	乳等省令	
1	LTLT	65 30分	1	76.5	陰性	陰性	
2	LTLT	66 30分	0	122.5	陰性	陰性	
3	LTLT	63 30分	16	315	陰性	陰性	
4	LTLT	65 30分	8	6.5	陰性	陰性	
5	LTLT	65 30分	6.5	77	陰性	陰性	
6	LTLT	63 30分	24.5	1045.5	陰性	陰性	
7	LTLT	65 30分	9.5	53.5	陽性	陰性	<i>Pantoea</i> spp.
8	LTLT	65 30分	2	5	陰性	陰性	
9	HTST	79 15秒	124.5	497	陰性	陰性	
10	HTST	74 15秒	0	0	陰性	陰性	
11	HTLT	75 15分	1.5	0.5	陰性	陰性	
12	UHT	130 2秒	0	0	陰性	陰性	
13	UHT	130 2秒	0	0	陰性	陰性	
14	UHT	130 2秒	0	0.5	陰性	陰性	

^{a)}平板 2 枚の平均値