

食品の食中毒細菌による汚染実態調査について (IV)

— PL 法と細菌管理業務 —

三 好 康 之・池 辺 瑞 枝*

An Investigation of the Seasonal Production of Food Poisons by Bacteria, with Special Emphasis on the Periods of High Poison Production (IV)

— The Law of Product Liability and the Daily Sanitation Control of Foods —

Yasutaka Miyoshi and Mizue Ikebe

平成6年12月の食品衛生法の一部改正により、食品等の表示基準の改正、これにともなう乳等省令関係、栄養改善法施行規則関係の日付表示、保存方法の表示、品質保持期限の表示が改正され、平成7年4月1日から施行された¹⁾。

1. 弁当や豆腐などのように品質が急速に変化しやすく、製造後製造日を含め概ね五日以内に消費しなければ衛生上の危害が発生する恐れのある食品には消費期限を年月日で表示する。
2. 調味料やハム、ソーセージ、食用油など、1. 以外の日持ちの比較的長い加工食品には、賞味期限または品質保持期限を年月日で表示することとする。ただし、製造から賞味期限までの期間が三月を越える食品は日を省略して年月で表示してもよい。
3. 原則として保存方法についても表示することが義務づけられる。
4. 輸入食品についても、製造年月日表示や輸入年月日表示に換えて、期限表示が導入される。

さらに、平成7年7月1日からは製造物責任法 (PL 法) が施行された²⁾。この法律では、製造物の欠陥により被害を被った者に対し、今までの法律に比べより正当で公正な処置がなされるよう、消費者保護の視点が強調されている。

PL 法では、製品の欠陥により発生した、消費者の生命、身体、財産にかかわる被害に対し、被害を受けた側からは今までよりもメーカーの損害賠償を受けやすくなっている。その理由は1. 製品に欠陥があること、2. その欠陥により、生命、身体、財産に被害が発生したこと、3. その被害は欠陥から生じたものであるという因果関係があること、以上この三点を証明すれば救済を受けられるとされているからである。

これらの法律の施行に対し、食品業界では特に PL 法対策に重点的に取り組み、食品衛生法で定められた食品衛生上の表示のみならず、消費者の食品の保存不手際や容器それ自体の身体危害回避のための表示や対策が検討され、既にその対応がなされている。

品質保証の例としては、食品製造工場は原料納入卸元に対するその品質保証を求め、食品卸問屋はその食品製造工場に対し品質管理の徹底を求め、スーパー等小売は問屋に今までより厳しい品質管理と保証を求めてきている。それに対応して、万一の食品事故補償のために、原料納入、製造、卸売、小売それぞれの流通段階でそれぞれの食品事故補償保険に加入している。

* 山陽コカ・コーラ(株)食品開発センター

PL法の施行によって、食品製造業者はその加工食品の品質管理の徹底を強いられてきているようである。これは消費者にとっては歓迎されるものであるが、安全確保のための品質管理部門への過大な投資により、小規模経営の多い食品製造業者にとっては大きな負担になるものと思われ、食品製造業の寡占化につながる可能性も否定できない。

本学生活科学科バイオテクノロジーコースでは、食品科学技術認定証書取得をめざす学生に対し、食品関連企業に就職した場合を想定し、食品学、生化学、応用微生物学、食品衛生微生物学、食品加工・貯蔵学、植物バイオテクノロジー関係の基礎理論と実験・実習に習熟することを必須事項とし指導している。このためもあってか、就職先では、品質管理業務に就いているものが多いことは心強い限りである。

今報では、PL法対策として加工食品の日常品質管理特に食品衛生微生物の検査のマニュアル化を検討し、それにしたがって実施した結果を報告する。

実験方法及び結果

細菌検査は、食品衛生法を基に³⁾、ニチレイマニュアル⁴⁾およびニッスイマニュアル⁵⁾を参考にして行なった。

細菌検査実験に用いた食品材料(牛、豚、鶏の挽肉)は広島市内のスーパー(A店、B店)から購入した。食品の希釈は滅菌生理食塩水(0.85%)、又は滅菌リン酸緩衝液(PH 7.2)を用い、培地及び試薬はほぼ日水製薬製品を使用した。

食品の希釈法

食品の生菌数のみならず、主要細菌の同時検査のための希釈と接種の基本操作手順を図1のように進めると、その食品の総合的な細菌データがえられる。

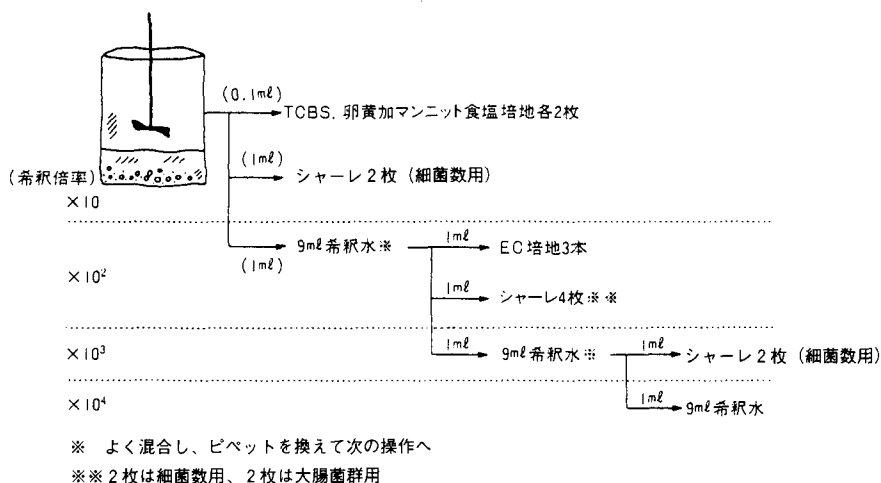


図1 食品の細菌検査手順

生菌数測定

食品衛生法による加工食品等の食品衛生細菌として、食品中に存在する全ての微生物(カビ、

食品の食中毒細菌による汚染実態調査について (IV)

酵母, 細菌) 数を生菌数として規制している。そのため, 加工食品等の生菌数測定が日常の業務として実施され, 独自のマニュアル化も進んでいる。今回は試料調整法と培養法の概要についてのみ表 1 に示す。

表 1 食品衛生法に基づく細菌検査のための試料量, 希釈液量, 希釈液, 培養温度, 培養時間

食品名	試料量	希釈液量	希 釈 液	培養温度	培養時間
粉末清涼飲料	10 g	90 ml	滅菌リン酸緩衝液	35°C	48時間
氷雪	1 ml	9 ml	滅菌リン酸緩衝液※	35°C	24時間
氷菓	10 ml	90 ml	滅菌生理食塩水	35°C	48時間
アイスクリーム類	10 g	90 ml	滅菌生理食塩水	32~35°C	48時間
乳及び乳製品原液	10 g	90 ml	滅菌生理食塩水	32~35°C	48時間
食肉製品及び鯨肉製品	25 g	225 ml	滅菌ペプトン加生理食塩水	35°C	24時間
魚肉練り製品	25 g	225 ml	滅菌ペプトン加生理食塩水	35°C	24時間
冷凍ゆでだこ	25 g	225 ml	滅菌リン酸緩衝液	35°C	24時間
生食用冷凍鮮魚介類	25 g	225 ml	滅菌リン酸緩衝液	35°C	24時間
生食用かき	200 g	200 ml	滅菌リン酸緩衝液	35°C	24時間
冷凍食品	25 g	225 ml	滅菌リン酸緩衝液	35°C	24時間
ミネラルウォーターの原水 ¹⁾	100 ml	希釈なし		35°C	24時間
容器包装詰加熱殺菌食品 ²⁾	25 g	225 ml	滅菌リン酸緩衝液	35°C	48時間
砂糖, 澱粉, 香辛料 ³⁾	5 g	95 ml	滅菌ペプトン加生理食塩水	35°C	48時間

注: ¹⁾メンブランフィルター法 ²⁾殺菌試験/使用培地: チオグリコレート培地 ³⁾芽胞数測定
※法律上の指定はない

大腸菌群及び糞便系大腸菌の検査

大腸菌群検査

[推定試験培地]

デソキシコーレート培地: 冷凍食品, ゆでだこ, 水, 牛乳, 乳酸菌飲料, アイスクリーム類
その他の食品材料からの検出と菌数計算

LB 培地: 氷雪, 清涼飲料水, 粉末清涼飲料等の検査

BGLB 培地: 水, 乳及び乳製品 (アイスクリーム類, 発酵乳, 乳酸菌飲料等を除く), 食肉製品 (包装後加熱) の推定及び確定試験

[分離及び確認培養培地]

EMB 培地: 水, 食品の確定試験

デソキシコーレート寒天培地検査法

[推定試験操作]

菌数測定同様に, 一般には食品検査材料 10 g に滅菌リン酸緩衝液 90 ml を加え, ホモジナイズし, 1/10 1/100, ……希釈液をつくる。

- ①各希釈試料液 1 ml を 2 枚の滅菌シャーレに接種する。
- ②予め、加温溶解後 50°C に保温したデソキシコレート培地を無菌的に分注混合し、冷却後 35±1°C, 20±2 時間、倒置培養する。
- ③形の整った赤色の典型集落（直径 0.5 mm 以上）が 2 枚の平板に 1 枚でも発育した場合推定陽性とする。
- ④大腸菌群数を計測、計算する。

[確認試験操作]

- ①デソキシコレート培地上の典型集落を白金耳で釣菌し、EMB 培地上にそれぞれ一白金線画線塗抹する。
- ②35±1°C, 24±2 時間培養し、EMB 培地平板上の金属光沢を持つ赤紫色の典型集落を形成した場合を陽性とし、完全試験を行う。

[完全試験操作]

- ①EMB 培地上に発育したコロニーを 2～3 釣菌し、乳糖ブイヨン発酵管及び普通寒天斜面培地に移植する。
- ②35±1°C, 48±3 時間培養し、乳糖ブイヨン発酵管でガスの発生を認め、これに対応する普通寒天斜面培地上の菌がグラム陰性、無芽胞桿菌であれば、大腸菌群陽性とする。

BGLB 培地接種法

[推定試験操作]

- ①生菌数測定同様に調整した希釈（10倍希釈）試料液 10 ml を 3 本のダーラム管つきの滅菌倍濃度 BGLB（10 ml）培地に接種し、35±1°C, 48±3 時間培養する。
- ②ダーラム管の高さの1/10以上のガス発生試験管を、推定試験陽性とする。

[確認試験操作]

- ①ガス発生を認めた BGLB 培地から白金耳で釣菌し、EMB 培地上にそれぞれ一白金線画線塗抹する。
- ②35±1°C, 24±2 時間培養し、EMB 培地平板上の金属光沢を持つ赤紫色の典型集落を形成した場合を陽性とし、完全試験を行う。

[完全試験操作]

- ①EMB 培地上に発育したコロニーを 2～3 釣菌し、乳糖ブイヨン発酵管及び普通寒天斜面培地に移植する。
- ②35±1°C, 48±3 時間培養し、乳糖ブイヨン発酵管にガス発生を認め、これに対応する普通寒天斜面培地上の菌がグラム陰性、無芽胞桿菌であれば、大腸菌群陽性とする。

LB 培地接種法

[推定試験操作]

- ①氷雪は融解水、清涼飲料水は原液、粉末清涼飲料水は粉末 10 g に滅菌リン酸緩衝液を加えて 100 ml とした希釈試料液 10 ml を 3 本のダーラム管つきの滅菌倍濃度 LB（10 ml）培地に接種し、35±1°C, 48±3 時間培養する。

- ②ダーラム管の高さの1/10以上ガス発生試験管を、推定試験陽性とする。

[確認試験操作]

①ガス発生を認めた LB 培地から白金耳で釣菌し、遠藤培地又は EMB 培地上に一白金線画線塗抹する (BGLB 培地に移植してもよい)。

② $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 24 ± 2 時間培養し、遠藤培地、EMB 培地上に典型集落を形成した場合を陽性とし、紛らわしいコロニーが発生した場合には完全試験を行う。

[完全試験操作]

①遠藤培地、EMB 培地上に発育した紛らわしいコロニーを 2～3 釣菌し、普通寒天斜面培地に移植する。

②乳糖ブイヨン発酵管でガスの発生を認め、これに対応する普通寒天斜面培地上の菌がグラム陰性、無芽胞桿菌であれば、大腸菌群陽性とする。

MPN による大腸菌群数の測定

BGLB 培地、LB 培地あるいは EC 培地検査法では、デソキシコレイト寒天培地検査法のように、大腸菌群数または大腸菌数を測定することができる。

BGLB 培地接種法

①生菌数測定同様に調整した 3 連続 10 倍希釈試料液 1 ml を、それぞれ 3 本のダーラム管つきの滅菌 BGLB (10 ml) 培地に接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 48 ± 3 時間培養する。

②ダーラム管の高さの 1/10 以上のガス発生試験管を、推定試験陽性とする。

③最確数表により、大腸菌群数 (MPN/g) を計算する。

ここまでの実験結果をまとめて表 2 に示す。

表 2 大腸菌群検出状況

	試料	デソキシコレイト培地 (1 g 中)	BGLB 培地 (MPN/g)
1	牛挽肉	60	930
2	若鶏ササミ	160	93
3	若鶏挽肉	300	93
4	豚挽肉	110	43

LB 培地接種法

①氷雪は融解水、清涼飲料水は原液、粉末清涼飲料水は粉末 10 g に滅菌リン酸緩衝液を加えて 100 ml とした希釈試料液 10 ml を 3 本のダーラム管つきの滅菌倍濃度 LB (10 ml) 培地に、その 1 ml, 0.1 ml, 0.01 ml ……を普通濃度 LB (10 ml) 培地にそれぞれ接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 48 ± 3 時間培養する。

②ダーラム管の高さの 1/10 以上ガス発生試験管を、推定試験陽性とする。

③最確数表により、大腸菌群数 (MPN/100 ml) を計算する。

EC 培地接種法

① 3 連続10倍希釈試料液 1 ml をそれぞれ 3 本の滅菌 EC (10 ml) 培地に接種し、37°C、24時間培養する。

② ダーラム管ガス発生試験管を、推定試験陽性とする。

③ 最確数表により、大腸菌数 (MPN/g) を計算する。

糞便系大腸菌の検査

大腸菌群の中には土壌、水、野菜、穀物等にも広く分布している菌種も含まれるため、カキ等非加熱摂取水産食品の衛生指標細菌として自然界に分布が少ないと推定される糞便系大腸菌による汚染を調べる。

推定試験培地：デソキシコーレート培地、BGLB 培地

確認及び分離培養培地

EC 培地：水産食品の大腸菌数測定及び大腸菌群中の糞便由来大腸菌の確認

EMB 培地：大腸菌の分離と確認

EC テストによる大腸菌検査

[推定試験操作]

① 生菌数測定同様に調整した希釈 (10倍、100倍希釈) 試料液 各 1 ml を 3 本のダーラム管つきの滅菌 EC (10 ml) 培地に接種し、恒温水槽で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養する。

② ダーラム管の高さの1/10以上のガス発生試験管を、推定試験陽性とする。

[確認試験操作]

① ガス発生を認めた EC 培地から白金耳で釣菌し、EMB 培地上にそれぞれ一白金線画線塗抹する。

② $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養し、EMB 培地平板上の金属光沢を持つ赤紫色の典型集落を形成した場合を陽性とし、完全試験を行う。

[完全試験操作 (IMViC 生化学的試験)]

① 日常の検査には、EMB 培地上に発育した典型コロニーを 2～3 釣菌し、TSI 培地、SIM 培地、SC 培地、VP-MR 培地 (2 本) に移植し、それぞれ $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養し試験に供する。厳密には先に分離培養した、普通寒天斜面培地上の菌を使用する。

② 培養後、IMViC 試験項目についてそれぞれ判定する。判定の基準はそれぞれの培地マニュアルを参照するとともに、初心者は熟練者の指導を受けるとよい。

表 3 に食品から分離した大腸菌群の IMViC 試験の結果とその同定結果を示す。

MPN (最確数法) による大腸菌検査

生食用カキ、食肉製品 (包装後加熱製品を除く)、魚肉ねり製品等の検査

[推定試験操作]

① 原則として生菌数測定同様に調整した、10倍希釈試料液 10 ml ずつをダーラム管入りの EC 培地 (倍濃度、10 ml 入り) 5 本に、同じ10倍希釈試料液 1 ml ずつをダーラム管入りの EC 培地 (普通濃度、10 ml 入り) 5 本に、同じく100倍希釈試料液 各 1 ml を 5 本のダーラム管つきの EC (普通濃度、10 ml 入り) 培地に接種し、恒温水槽で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培

食品の食中毒細菌による汚染実態調査について (IV)

表3 鑑別培地上における分離大腸菌の性状

	TSI				SIM			SC	VP-MP		EC	判 定	
	乳 糖	ブ ド ウ 糖	ガ ス	硫 化 水 素	イ ン ド ー ル	運 動 性	硫 化 水 素	I P A	ク エ ン 酸	V P	M R		44 °C 発 育
1-1 牛挽肉	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	<i>C. freundii I</i>
-2 牛挽肉	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	
2-1 若鶏ササミ挽肉	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>E. coli I</i>
-2 若鶏ササミ挽肉	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>E. coli I</i>
3-1 若鶏挽肉	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>E. coli I</i>
-2 若鶏挽肉	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>E. coli I</i>
-3 若鶏挽肉	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>E. coli I</i>
-4 若鶏挽肉	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	—
4-1 豚挽肉	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>K. aerogenes I</i>
-2 豚挽肉	+	-	-	-	-	-	-	-	±	-	+	-	<i>C. freundii I</i>

養する。

②ダーラム管中のガス発生試験管の本数を調べ、最確数 (MPN) 表から、大腸菌数を算出する。

食品衛生法では検査試料の調整法がそれぞれの対象食品について、それぞれ決められている。

食肉製品 (非加熱食肉製品, 特定加熱食肉製品, 加熱食肉製品 (包装後加熱製品を除く), 乾燥食肉, 魚肉ねり製品, 鯨肉製品の検査

[推定試験操作]

①原則として生菌数測定同様に調整した、10倍希釈試料液 1 ml ずつをダーラム管入りの EC 培地 (普通濃度, 10 ml 入り) 5 本に、同じく100倍希釈試料液 各 1 ml を 5 本のダーラム管つきの EC (普通濃度, 10 ml 入り) 培地に接種し、恒温水槽で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 24 ± 2 時間培養する。

②ダーラム管中のガス発生を認めないものは大腸菌陰性とする。ガス発生を認めた場合大腸菌推定陽性とする。

食品衛生法では検査試料の調整法がそれぞれの対象食品について、それぞれ決められている。

[確認試験操作]

①ガス発生を認めた EC 培地から白金耳で釣菌し、EMB 培地上にそれぞれ一白金線画線塗抹する。

② $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 24 ± 2 時間培養し、EMB 培地平板上の金属光沢を持つ赤紫色の典型集落を形成した場合を陽性とし、完全試験を行う。

[完全試験操作]

① EMB 培地上に発育したコロニーを 2 ~ 3 釣菌し、ダーラム管入り乳糖ブイヨン発酵管及び普通寒天斜面培地に移植する。

② $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 48 ± 3 時間培養し、乳糖ブイヨン発酵管でガスの発生を認め、これに対応する

普通寒天斜面培地上の菌がグラム陰性、無芽胞桿菌であれば、大腸菌陽性とする。

ブドウ球菌検査

[分離・確認試験操作]

①食品検査材料 10 g に滅菌リン酸緩衝液 90 ml を加え、ホモジナイズし、1/10, 1/100……をつくる。

②各希釈試料液 0.1 ml を、表面を乾燥した 2 枚の食塩卵黄寒天培地、ブドウ球菌培地に無菌的に採り、ターンテーブル上でコンラッジ棒で塗抹し、順に 37±1°C, 24~48時間, 37±1°C, 43時間正確に倒置培養する。

③ブドウ球菌培地は黄色のコロニーを、食塩卵黄寒天培地は目玉焼状のそれを釣菌し、さらに純化し、普通寒天斜面培地上に培養し、グラム染色陽性を確かめる。

④GF 培地（最終的に 37±1°C, 7 日間培養）でブドウ糖発酵性試験をおこない、ブドウ糖発酵性の *Staphylococcus* 属と非発酵性の *Micrococcus* 属に分類する。

⑤ウサギプラズマを用いるコアグララーゼ試験により、陽性株を選択する。

⑥以上の結果、黄色ブドウ球菌と疑われる球菌について、N-ID テスト・sp-18 を用いて同定する。

以上の実験結果をまとめて、表 4、表 5、表 6 に示す。

表 4 ブドウ球菌検出状況 (/g)

	ブドウ球菌培地	マンニット食塩寒天培地	食塩卵黄寒天培地
1 牛挽肉	3.0×10 ²	0	0
2 若鶏ササミ挽肉	2.0×10 ²	4.0×10 ²	0
3 若鶏挽肉	3.5×10 ³	5.0×10 ²	6.0×10 ³
4 豚挽肉	2.6×10 ³	5.5×10 ³	5.8×10 ³

表 5 分離ブドウ球菌の生化学試験と ID テスト結果

	牛挽肉 1			若鶏ササミ 2			若鶏挽肉 3				豚挽肉 4				
	3	4	5	3	4	5	5	6	7	8	3	4	5	6	7
glucose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Coagulase	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	-		-	-	+	+	+	+	+		+			+
Lactose	+	+		+	-	+	+	-	+	+		+			+
Trehalose	+	+		+	+	+	+	-	+	+		+			+
Maltose	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+			+
Sucrose	+	-		+	-	+	+	+	+	+		+			+
Raffinose	-	-		-	-	-	-	-	-	-		-			-
X-A	-	-		-	-	-	-	-	-	-		+			-
Turanose	+	-		+	-	+	+	-	+	+		+			+
NAG	+	-		+	-	+	+	-	+	+		+			+
Ribose	-	-		-	+	-	-	+	+	+		+			-
Mannit	-	-		+	-	+	+	+	+	-		-			+

食品の食中毒細菌による汚染実態調査について (IV)

Fructose	+	-		+	+	+	+	+	+	+			+			+
PHO	-	-		-	-			-					-			-
VP		+		+		-		+		+			-			-
NIT	+	+		+				+		+			+			-
Urea		-			-	-	-	-		+						
ADH	-	-		-	-	+	-	-		+			-			+
β GL	-	+		+	-	+	+	-		+			-			-

表6 分離ブドウ球菌の ID テスト結果

	コード番号	同定菌名	絶対確率	異常項目
1-3 牛挽肉	736461	<i>S. warneri</i> B	0.000029	MAN
4 牛挽肉	610064	<i>S. caseolyticus</i>	0.000406	
2-3 若鶏ササミ挽肉	636665	<i>S. warneri</i> B	0.007387	
4 若鶏ササミ挽肉	410560	<i>S. cohnii</i> A	0.004093	
5 若鶏ササミ挽肉	736656	<i>S. aureus</i>	0.001185	VP, URE
3-5 若鶏挽肉	736674	<i>S. aureus</i>	0.002406	URE, ADH
6 若鶏挽肉	130760	<i>S. capitis</i>	0.001001	RIB
7 若鶏挽肉	736767	<i>S. aureus</i>	0.001098	PHO
8 若鶏挽肉	736561	<i>S. warneri</i> B	0.007387	
4-4 豚挽肉	737541	---		
7 豚挽肉	736603	---		

腸炎ビブリオ検査

増菌試験法

[推定試験操作]

①試料 10 g をホモジナイザーカップに採り、食塩ポリミキシン培地 90 ml を加え、ホモジナイズし、その 10 ml を滅菌試験管数本に採り、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 18 ± 2 時間増菌培養する。

② TCBS 寒天培地又はビブリオ寒天培地平板に 1 白金耳画線塗抹し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 18 ± 2 時間分離培養する。

③ TCBS 培地上の青緑色のコロニー又はビブリオ寒天培地上の紫色のそれを推定陽性とする。

[確認試験操作]

①推定陽性のコロニーを白金線で釣菌し、2%食塩を加えた TSI 寒天培地 (斜面半高層) に移植し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $18 \sim 24$ 時間培養する。

②斜面が赤色、高層が黄色、硫化水素産性なし、ガス発生なしの試験管から下記の試験管に 1 白金耳移植し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ でそれぞれ所定の時間培養し、判定する。

培地名	判定	
・ 2% NaCl 添加 Talor のリジン培地	(+)	} 18~24時間培養
・ 0% NaCl 添加ペプトン水	(-)	
・ 3% NaCl 添加ペプトン水	(+)	
・ 8% NaCl 添加ペプトン水	(+)	
・ 10% NaCl 添加ペプトン水	(-)	

・MOF 培地—サッカロース	非発酵	} 24±2 時間培養
・MOF 培地—ズルシット	非発酵	
・MOF 培地—ラムノース	非発酵	
・MOF 培地—イノシット	非発酵	
・2% NaCl 添加普通寒天斜面	グラム染色 (—)	
	血清型判別 (K 型)	
・VP (2% NaCl 添加) 反応	(—)	

直接試験法

[推定試験操作]

- ①試料 25 g をホモジナイザーカップに採り、滅菌ペプトン添加生理食塩水 225 ml を加え、ホモジナイズし、その 1 ml ずつを食塩ポリミキシンプイオン培地 5 本に接種し、35±1°C、18±2 時間培養する。
- ②TCBS 寒天培地平板に 1 白金耳画線塗抹し、35±1°C、18±2 時間培養する。
- ③TCBS 培地上の青緑色のコロニーを推定陽性とする。

[確認試験操作]

- ①推定陽性のコロニーを白金線で釣菌し、オキシダーゼ試験を行ない、陽性のものを腸炎ビブリオ陽性とする。
- なお、5 本のポリミキシンプイオンの内、陽性試験管が 4 本以上あればこの検体試料は不良と判断する。

サルモネラ属菌検査

[推定試験操作]

- ①食品検査材料 25 g を EEM プイオン 225 ml に混和、ホモジナイズし、35±1°C、18±2 時間前培養する。サルモネラ属菌を確実に増菌するためには、緩衝ペプトン—水 (Pep と略す) を併用することが望ましい。
- ②培養液 1 ml を、ハーナーのテトラチオン酸塩培地、(又はセレナイトブリリアントグリーン培地、セレナイトシスチン培地) の 15 ml に接種し、43±1°C、20±2 時間増菌培養する。卵の検査では、EEM プイオンの代わりに SBG スルファー培地を用いる。
- ③MLCB 培地及び DHL 培地平板に 1 白金耳画線塗抹し、35±1°C、24±2 時間培養する。
- ④培地平板上の隆起性のある全体が黒色、又は中心が黒色のコロニーを推定陽性とする。

[確認試験操作]

- ①MLCB 培地又は DHL 培地平板から典型的コロニーを白金線で釣菌し、TSI 培地、LIM 培地、及びシモンズのクエン酸培地に移植し、35±1°C、24±2 時間培養する。
- ②これらの培地上で、表 7 に示すサルモネラ属菌の性状を示したものを陽性とする。経験上推定陽性コロニー数の約 2 割が陽性となる。
- ③さらに血清型を同定する場合には、サルモネラ血清検査が必要となる。

表 7 に今回分離のサルモネラ属菌の性状を示す。

食品の食中毒細菌による汚染実態調査について (Ⅳ)

表7 鑑別培地上における分離サルモネラ属菌の性状

	増菌培地	MLCBの集落色	TSI				LIM			シモンズクエン酸	菌名
			高層部	斜面部	硫化水素	ガス	リジン	インドール	運動性		
1-4 牛挽肉	SBS	白	黒	黄	+	+	-	-	-	+	サルモネラ 大腸菌群 サルモネラ 大腸菌群
5 牛挽肉	SBS	黒	黒黄	赤	+	+	-	-	+	-	
6 牛挽肉	Pep	青	黒	黄	+	+	-	-	-	+	
7 牛挽肉	Pep	青	黒	黄	+	+	+	+	-	+	
2-6 若鶏ササミ挽肉	SBS	青	黄	黄	-	+	-	-	-	+	
7 若鶏ササミ挽肉	SBS	白	黄	赤	-	-	-	-	-	+	
8 若鶏ササミ挽肉	EEM	青	黄	赤	-	+	-	-	+	-	
9 若鶏ササミ挽肉	Pep	黒	黒	黄	+	+	-	-	+	-	
10 若鶏ササミ挽肉	Pep	白	黄	黄	-	+	-	-	-	+	
3-5 若鶏挽肉	SBS	青	黒	赤	+	+	+	-	+	-	
6 若鶏挽肉	Pep	青	黄	黄	-	+	-	+	-	+	
7 若鶏挽肉	Pep	黒	黒	赤	+	+	+	-	+	-	
4-6 豚挽肉	SBS	青	黄	黄	-	+	-	-	-	+	
7 豚挽肉	Pep	青	黄	黄	-	+	-	-	-	+	
8 豚挽肉	Pep	青	黄	黄	-	+	+	+	+	-	

セレウス菌検査

[推定試験操作]

- ①食品検査材料 10 g に滅菌リン酸緩衝液 90 ml を加え、ホモジナイズし、1/10希釈液をつくる。
- ②希釈試料液 0.1 ml を、2 枚の表面を乾燥した NGKG 寒天平板上に接種し、ターンテーブル上、コンラッジ棒で塗抹する。
- ③30±1°C, 20±2 時間培養する。
- ④培地平板上のコロニーの周囲にピンクのハレーションを伴うものを確定陽性とし、コロニー数を計測する。(セレウス菌のコロニーは比較的大きな偏平な灰白色のコロニーで、その周囲にレシチナーゼの作用による混濁したピンク色のハレーションを伴う卵黄反応が認められる。)

クロストリジウム属菌検査

[推定試験操作]

加熱済み食品 (特定加熱食肉製品)

- ①食品検査材料 10 g に滅菌ペプトン添加生理食塩水 90 ml を加え、ホモジナイズし、1/10、さらに希釈して1/100希釈液をつくる。
- ②各試料液を 10 ml ずつ 2 枚の市販滅菌パウチにとる。
- ③あらかじめ加温して溶かし、約 50°C に保温しておいたクロストリジア測定用培地を約 15 ml ずつ加え、よく混合して熱シールし、冷却凝固させる。これを 35±1°C, 24±2 時間培養する。対照として、希釈に用いた滅菌ペプトン添加生理食塩水 10 ml を同じ培地に混合し、同様

に培養し、操作の完全性を確かめる。

- ④培地中の黒色典型コロニーを計測する。

非加熱食品

①食品検査材料 10 g に滅菌ペプトン添加生理食塩水 90 ml を加え、ホモジナイズし、1/10 希釈液をつくる。

②希釈液を約 20 ml を中型試験管に採り、70°C 湯浴中20分間加熱後冷却する。

③この試料液 0.1 ml ずつを、2 枚のあらかじめ加温して溶かし固化したクロストリジア測定用培地に接種し、コンラッジ棒で塗抹する。嫌気ジャーに入れ、35±1°C, 48±3 時間培養する。対照として、希釈に用いた滅菌ペプトン添加生理食塩水 20 ml を同様に操作し、操作の完全性を確かめる。

- ④培地上の黒色典型コロニーを計測する。

乳酸菌検査

[食品衛生法による試験操作]

①食品検査材料 10 g に滅菌生理食塩水 90 ml を加え、ホモジナイズし、1/10、1/100、1/1000等の希釈液をつくる。

②試料液 1 ml を、2 枚の滅菌シャーレにいれ、BCP 添加プレートカウント寒天培地約 15 ml を分注し、混釈する。

③35±1°C, 72±3 時間培養する。

- ④紫色培地の色を黄色に変色させたコロニーを計測する。

考 察

日常の品質管理業務の実際とマニュアル化

微生物試験では、試料採取中や希釈試料液接種中などに、空気中や手指、培地、希釈水、使用器具等から、試料中に存在する微生物以外の微生物が混入することを防止することが基本である。また、試料の無菌的採取及び試料液の希釈法、試料液接種法等については食品衛生検査指針等に詳述してあるが、初期研修では習熟した指導者に指導を受け、食品衛生法に準じた操作手順のマニュアル化が必要である。

大腸菌群及び糞便系大腸菌の検査

大腸菌群 (coliforms) とは、グラム陰性の無芽胞桿菌で、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一群をいう。この内、44.5°C で発育して乳糖を分解して酸とガスを産生する菌群を糞便系大腸菌 (Fecal coliforms) という。大腸菌群は動物の糞便中に主に存在するが、自然界にも多く存在する。食品衛生法上大腸菌群は食品の衛生指標細菌として重要で、加熱加工された食品からそれらが検出されることは、その食品が不衛生的に製造されたことになり、その販売を規制している。

糞便由来大腸菌の検査は水産食品特に生食用カキ、冷凍食品の一部に義務付けられている検査法の一つである。

食品の一般検査により検出された大腸菌群の鑑別を実施し特定することは、それら汚染経路の特定が可能となり、またその菌が糞便由来の大腸菌と同定された場合は大腸菌群と同定され

た場合よりより一層不潔な取扱いをされたと推定される。

ブドウ球菌の検査

ヒトや動物の化膿性疾患，食中毒の原因菌で健康者の鼻腔，咽喉，皮膚あるいは環境に広く分布している。

黄色ブドウ球菌は，全てに病原性があるのではなく，毒素エンテロトキシン産性能を有する株のみが病原性を有する。この毒素産性能試験は複雑であるので，コアグララーゼ試験で代用されている。コアグララーゼ陽性株の全てがエンテロトキシン産性株ではないが，その疑いが強いなどから，そのマニュアル化は必要であると考えた。

腸炎ビブリオ属菌の検査

Vibrionaceae はグラム陰性，通性嫌気性，無芽胞性の湾曲した桿菌で，ブドウ糖を発酵し，ほとんどのものはオキシダーゼ陰性である。ビブリオ属はほとんど海水細菌で増殖には塩分を必要とする。日本における細菌性食中毒原因菌の第一位である。

サルモネラ属菌の検査

温，冷血動物の腸管内保菌，その大便から飼料，さらに食品の汚染へとつながり，世界中で食中毒を引き起こしている。近年の世界的な規模の食品流通ではサルモネラ食中毒の大規模化と大地域化が著しい。欧米諸国では昔から畜産食品，特に鶏肉鶏卵の喫食によって頻繁に起こる食中毒菌であるが，近年わが国でも鶏卵等によるこの食中毒が多発している。

サルモネラ属菌の同定は，TSI 寒天培地の斜面部の鮮やかな赤色の確認とシモンズのクエン酸培地陽性を確認することが大切である。また，LIM 培地のリジンは培地の高層部が紫色になったものを陽性とし，上層部のみ紫色のものは陰性とする。ここまでで，おおむねサルモネラ属菌と推定できるが，必要であれば，血清学的テストを行う。

セレウス菌の検査

セレウス菌は土壌，植物，空気中等自然界に広く分布している，芽胞形成好気性の腐敗長桿菌である。野菜穀物などの食品原料内ではおもに芽胞状態で存在しているが加工された食品中では発芽し，旺盛に増殖し腐敗を起こすことが知られているので，食品中のセレウス菌検査は食品の衛生・品質管理上重要な項目である。

クロストリジウム属菌の検査

一般に芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌といわれ，ヒトの腸管や土壌中に分布しているので，食品からも頻繁に検出される。たいていはグラム陽性菌で，芽胞を形成する。この属には食中毒に関連の深いウエルシュ菌やボツリヌス菌が含まれる。

乳酸菌の検査

乳酸菌はグラム陽性，非運動性，カタラーゼ陰性の球菌又は単桿菌で，糖類を発酵して乳酸を産生する菌の総称で，ビヒドバクテリウム，ラクトバシルス，ストレプトコッカス等の有用菌から腐敗菌まで様々で，土壌，動植物に広く分布している。

なおこの菌は腐敗等の汚染指標としての検査と発酵乳，乳酸飲料などの品質管理のための検査とがある。

食品材料の汚染

表3, 6, 7からわかるように, 今回細菌検査に用いた食品材料の内, 牛及び豚の挽肉は大腸菌, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ属菌の汚染がなかったが, 鶏の挽肉は大腸菌, 黄色ブドウ球菌, 及びサルモネラ属菌(鶏ササミを除く)に汚染されていた。A・Bスーパーの清潔さの違いは見られず, 鶏肉の汚染が特に気になった。

要 約

1. PL法施行にともない, 食品工場等で日常必要とされる食品の細菌検査の内, 食品衛生法で定められている, あるいは定められていないが自主的にデータを採る必要があると考えられる細菌について, その検査マニュアル化を試みた。
2. 作成したマニュアルにしたがって, 実地に市販食品の細菌検査を行なった。
3. 鶏肉から大腸菌, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ属菌等を分離した。これらの菌による食品の汚染は予想以上であり, またこのマニュアルで食品の日常細菌検査が実施できることがわかった。

謝辞

この研究を行うにあたり, 研修の機会を与え下さり, 終始適切な指針をいただきました, 山陽コカ・コーラ(株)食品開発センター稗田福二所長に深く感謝致します。

参考及び引用文献

- 1) 寺野重造他: 特集新しい食品表示(食品表示, 日付表示, 健康表示, 食事療法表示, 乳幼児食品表示), 食の科学, 207号, PP 25~PP 45 ('95)
- 2) 加藤勇治: 製造物責任と食品の安全対策, 食品と科学, 37, PP 32~PP 37 ('95)
- 3) 厚生省生活衛生局監修: 食品衛生検査指針, 微生物編, 日本食品衛生協会 ('92)
- 4) 石川 宏: 細菌検査の手引, (株)ニチレイ 環境保全・品質保証推進部 ('94)
- 5) 坂崎利一: 細菌・真菌・原虫用培地マニュアル, 日水製薬(株) ('87)

—平成7年10月14日 受理—