



食品の大腸菌群検査法

株式会社ファルコライフサイエンス 寺本忠司

近年になって、細菌検査の簡易・迅速化は自動細菌測定機、発色酵素基質培地、各種同定キットや検査器具・器材の開発など広範囲に及んでいる。しかし、食品の大腸菌群検査は50年間公定法で行われている現状をふまえて、わが国におよび欧米における食品の大腸菌群検査法、検査用培地ならびに大腸菌群検査の問題点などについて述べる。

1. 大腸菌群の定義

食品衛生学および環境衛生学上で用いられる大腸菌群の定義は、国際的に「乳糖を発酵して酸とガスを産生するグラム陰性通性嫌気性桿菌」と決められた。食品の大腸菌群検査は、食品の汚染をしらべるのには *Escherichia coli* を含む大腸菌群を指標菌とすることが便利であるので世界のほとんどの国で衛生検査に適用されている。

2. 大腸菌群の区分

応用細菌学という大腸菌群は、国際委員会 (Coliform Subcommittee) で採用した菌群を、1956年当時の細菌分類学に合わせて Coli-Aerogenes Subcommittee) で適用された。

大腸菌群の区分は、IMViCシステム (インドール反応、メチルレッド反応、VP反応、クエン酸塩利用性) のパターンによって *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* および *Erwinia carotovora* 群に分けられた。

3. 大腸菌群の *E. coli* と医学細菌学の *E. coli*

食品の大腸菌群における *E. coli* は、臨床医学や細菌分類学で用いられる *E. coli* と必ずしも同じでなく、IMViCシステムで ++-- および +-+- のパターンを示すものである。また糞便性大腸菌はインドール反応陽性で、44.5°Cで発育する *E. coli* である。一方、医学および細菌分類学における *E. coli* は、「グラム陰性通性嫌気性桿菌、運動性、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、糖を発酵的に分解、ガス産生、クエン酸塩陰性」の生化学的性状を示すものである。

4. 食品の大腸菌群検査法

A. 欧米における食品の大腸菌群検査法

欧米各国における食品の大腸菌群検査法はFDA法 (Food and Drug Administration) またはISO法 (International Organization for Standardization) のいずれかを採用している。(表1)

1) FDA法

(i) 試料調整: 食品50gにButterfield's phosphate-buffered dilution waterまたは0.1%ペプトン水450mlを加え、25回以上強く振ったものを試料原液とする。

(ii) 寒天混釈法: 試料原液および100倍希釈液の各1mlをシャーレに接種し、バイオレット・レッド胆汁酸塩寒天 (VRB寒天) 10mLを加え、凝固後、その表面にVRB寒天5mLを重層し、18~24時間培養後、1平板当たり25~250個に発育した赤色集落 (0.5mm以上) をカウントする。その集落をBGLBに接種し、35°C、48時間培養後にガス産生を大腸菌群陽性とする。

る。

(iii)MPN法:原液10mL、1mLならびに10倍希釈液1mLをラウリル硫酸ブイオン(LSTブイオン)3本に接種し、35℃、48時間培養後、ガス産生のブイオンからBGLBに接種し、35℃、48時間培養後、ガス産生の本数から大腸菌群の最確数を求める。

2)ISO法

(i)寒天混釈法:試料原液および希釈液の1mLをシャーレに接種し、crystal violet neutral red bile lactose agar(VRBL寒天)15mLを加え、30℃、24時間培養後、赤紫色集落(0.5mm以上)をカウントする。その集落をlactose bile brilliant green broth(LBBGブイオン)に接種し、30℃、24時間培養後、ガス産生を大腸菌群陽性とする。なお、VRBL寒天はVRB寒天、LBBGブイオンはBGLBと同じ培地である。

(ii)MPN法:原液10mL、1mLおよび10倍希釈液の1mLをラウリル硫酸トリプトースブイオン3本に接種し、30℃、24時間培養後、ガス産生から大腸菌群の最確数を求める。ラウリル硫酸トリプトースブイオンはLSTブイオンと同じ培地である。

B. わが国の大腸菌群検査法(公定法)

わが国における食品の大腸菌群検査法は、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」および「食品、添加物等の規格基準の省令」に基づいて、乳糖からのガス産生を推定試験、確定試験および完全試験の手順にしたがって行われる。しかも、推定試験では食品別に使用される検査培地は異なっているが、確定試験および完全試験ではそれぞれEMB寒天および乳糖ブイオン(LB)と決められている。(表1)

1)定性試験

(i)BGLB:牛乳、加工乳、乳製品、鯨肉製品および魚肉ねり製品

原液、10倍および100倍希釈液の各1mLをBGLB2本に加え、35℃、48時間培養後、ガス産生のものについて確定試験を行う。

(ii)乳糖ブイオン:清涼飲料水、ミネラルウォーター類および粉末清涼飲料水

原液10mL、1mLならびに10倍希釈液の1mLをLB2本に加え、35℃、48時間後、ガス産生のものについて確定試験を行う。

2)定量試験

(i)デソキシコレート寒天:氷菓、アイスクリーム類、はっ酵乳、乳酸菌飲料、バター、バターオイル、プロセスチーズ、加熱食肉製品、冷凍食品およびゆでだこ

試料原液および100倍希釈液の各1mLをシャーレに接種し、デソキシコレート寒天10~15mLを加え、凝固後、その表面にデソキシコレート寒天3~4mLを重層し、35℃、20時間培養後、赤色集落をカウントして確定試験を行う。

(ii)MPN法:食品の大腸菌群数測定にMPN法を用いられるものはないが、生食用かきのE. coli数測定にMPN法が用いられる。

5. 大腸菌群検査用培地

食品の大腸菌群検査培地は、主にBGLB、乳糖ブイオン、デソキシコレート寒天およびEMB寒天である。これらの培地の原理、組成、使用方法などについて栄研マニュアルを参照されたい。

1)VRB寒天:乳製品の大腸菌群数測定にAPHA(American Public Health Association)ではVRB寒天が採用されている。

培地に含まれる胆汁塩はグラム陰性菌に選択的に作用し、クリスタルバイオレットはグラム陽性菌の発育を抑制する。また乳糖分解菌はpHの酸性化と指示薬ニュートラルレッドによって

赤色集落になる。

- 2) LSTブイオン: 培地中のラウリル硫酸ナトリウムは大腸菌群以外の細菌を抑制し、リン酸カリウムは緩衝性を高め、塩化ナトリウムは浸透圧を維持する。(表2)

6. 大腸菌群検査培地の性能比較

外国のほとんどの国で食品の大腸菌群数測定にVRB寒天を採用しているが、わが国とタイ国ではデソキシコレート寒天を用いている。

食品319例からの大腸菌群検出をデソキシコレート寒天とVRB寒天で比較した。(表3)デソキシコレート寒天およびVRB寒天による大腸菌群検出はそれぞれ129(40.4%)および157例(49.2%)であった。しかも、デソキシコレート寒天で大腸菌群陰性となった検体のうちVRB寒天で大腸菌群陽性になったものは28例であった。またVRB寒天上の大腸菌群は明確な集落を形成し、大腸菌群以外の菌種を抑制した。これらのことから、食品の大腸菌群検査に国際的整合性のあるVRB寒天を推奨する。

7. 大腸菌群検査の諸問題

食品の大腸菌群検査に関する問題点は次のとおりである。

- 1) 定義: ブドウ糖発酵菌とすれば腸内細菌群を対象にブドウ糖加VRB寒天で測定できる。また乳糖発酵菌とすれば、 β -galactosidase産生菌を発色酵素基質法で検出できる。
- 2) 大腸菌群の区分: 腸内細菌は100菌種以上であり、IMViCシステムによるパターンで区分することは困難である。
- 3) 簡易・迅速性: 従来法の大腸菌群検査は4~5日かかるが、1日で判定できる発色酵素基質法を採用する。
- 4) 乳糖非分解菌: 大腸菌群陰性の食品中にまれにサルモネラや*E. coli*の存在が認められる。
- 5) 国際共通の検査法: 諸外国と整合性のある大腸菌群検査にデソキシコレート寒天に代えてVRB寒天の採用を検討する。

表1 食品の大腸菌群検査法

	秤量	定性試験	定量試験
FDA法	50g	LSTブイオン → BGLB	VRB寒天 → BGLB
ISO法	10g	LSTブイオン	VRBL寒天 → LBBG
公定法	10g	BGLB → EMB → LB LB ↗	デソキシコレート寒天 → EMB → LB

表2 各種培地組成(g/L)

VRB寒天	LSTブイオン
ペプトン……………7g	トリプトース……………20g
酵母エキス……………3g	乳糖……………5g
乳糖……………10g	塩化ナトリウム……………5g
塩化ナトリウム……………5g	ラウリル硫酸ナトリウム……………0.1g
胆汁酸塩……………1.5g	リン酸1水素カリウム……………2.75g
ニュートラルレッド……………0.03g	リン酸2水素カリウム……………2.75g
クリスタルバイオレット……………0.002g	
寒天……………13g	

表3 食品からの大腸菌群検出におけるデソキシコレート寒天とVRB寒天の比較

大腸菌群	デソキシコレート寒天		計
	陽性数	陰性数	
VRB寒天	陽性数	28	157
	陰性数	161	162
計	130	189	319