

=資 料=

## 食品の細菌学的試験法の現状と問題点

(日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告)

浅尾 努<sup>\*1,†</sup>・河合高生<sup>\*1</sup>・久米田裕子<sup>\*1</sup>・寺本忠司<sup>\*2</sup>  
石黒 厚<sup>\*3</sup>・梅迫誠一<sup>\*4</sup>・小笠原 準<sup>\*5</sup>・高須一重<sup>\*6</sup>  
美野朋隆<sup>\*7</sup>・日野亮一<sup>\*8</sup>・斉藤利江<sup>\*9</sup>  
小崎俊司<sup>\*10</sup>・山本茂貴<sup>\*11</sup>

(<sup>\*1</sup> 大阪府立公衆衛生研究所, <sup>\*2</sup> (株)フェルコライフサイエンス, <sup>\*3</sup> (株)ドンク, <sup>\*4</sup> 奈良県桜井保健所,  
<sup>\*5</sup> 大阪市立環境科学研究所, <sup>\*6</sup> (財)日本食品分析センター大阪支所, <sup>\*7</sup> 大阪いずみ市民生活協同組合,  
<sup>\*8</sup> 生活協同組合連合会コープきんき事業連合, <sup>\*9</sup> 日本冷凍食品検査協会,  
<sup>\*10</sup> 大阪府立大学, <sup>\*11</sup> 国立医薬品食品衛生研究所)

(受付 平成 19 年 8 月 28 日)

(受理 平成 19 年 9 月 10 日)

The current state and problems of microbiological examination  
methods of food (Japanese Society for Food Microbiology:  
A report from the working group concerning  
microbiological examination methods of food)

Tsutomu ASAO,<sup>\*1,†</sup> Takao KAWAI,<sup>\*1</sup> Yuko KUMEDA,<sup>\*1</sup> Tadashi TERAMOTO,<sup>\*2</sup>  
Atsushi ISHIGURO,<sup>\*3</sup> Seiichi UMESAKO,<sup>\*4</sup> Jun OGASAWARA,<sup>\*5</sup>  
Kazushige TAKASU,<sup>\*6</sup> Tomotaka MINO,<sup>\*7</sup> Ryoichi HINO,<sup>\*8</sup>  
Rie SAITO,<sup>\*9</sup> Shunji KOZAKI<sup>\*10</sup> and Shigeki YAMAMOTO<sup>\*11</sup>

(<sup>\*1</sup> Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi, Higashinari-ku,  
Osaka 537-0025; † Corresponding author)

(<sup>\*2</sup> FALCO Life Science, 63-2 Higashi-takeyamachi, Kawabatahigashi-iru,  
Higashi-takeyamachi-dori, Sakyo-ku, Kyoto 606-8393)

(<sup>\*3</sup> Donq Co., Ltd., 5-4 Koyo-cho Nishi, Higashinada-ku,  
Kobe, Hyogo 658-0033)

(<sup>\*4</sup> Nara Prefectural Sakurai Health Center, Ohdono, Sakurai, Nara 633-0062)

(<sup>\*5</sup> Osaka City Institute of Public Health and Environmental Science,  
8-34 Tojo-cho, Tennoji, Osaka 543-0026)

(<sup>\*6</sup> Japan Food Research Laboratories Osaka Branch, 3-1 Toyotsu-cho,  
Suita, Osaka 564-0051)

(<sup>\*7</sup> Osaka Izumi Cooperative Society Mozuakahata-cho, Kita-ku,  
Sakai, Osaka 1-24-1)

(<sup>\*8</sup> Consumer Cooperative Kinki, 13-9 Nishinakajima, Yudogawa-ku, Osaka 532-0011)

(<sup>\*9</sup> JAPAN FROZEN FOODS INSPECTION CORPORATION, Minatojimaminamimachi,  
Chuou-ku, Kobe, Hyogo 650-0047)

(<sup>\*10</sup> Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531)

(<sup>\*11</sup> National Institute of Health Science, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8510)

---

† 連絡先

\*1 ☎537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

### 1. 食品の細菌検査法問題検討委員会発足の背景

食品衛生検査指針の前書きには、『試験法としての信頼性が高く、しかも調和がとれていることが求められます。また、学問と技術の発展に伴い、迅速かつ適切に改訂されていくことが必要であります。』と書かれている。しかし、実際には大多数の食品の細菌試験法は、改訂が容易ではない食品衛生法の成分規格に組み入れられているので、古い試験法でも告示された当時そのままの姿をとどめているものが多い。例えば、昭和27年に告示された氷雪の規格基準や、昭和28年に改訂された乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（いわゆる乳等省令）に記載された試験法がその代表である。平成10年に通知された未殺菌液卵の細菌試験法においてすら、今から50年以上も前に告示された氷雪の試験法に従い実施するように指示されている。最近数多く開発・販売されるようになった発色酵素基質培地が、従来の培養法に比べて大幅な試験時間の短縮が可能であるにもかかわらず、法改正しない限りは細菌学的規格検査に使用できない。

以上の事実で代表されるような閉塞感のある日本の食品細菌試験法の現実と、検査指針に掲げられた『迅速かつ適切に改訂』や『調和がとれていること』というごく常識的な理念との間に大きな隔りがあるのは明白である。このような状況に対応するため、日本食品微生物学会（理事長 齋藤文一）の組織活動の一環として、検査法担当部会（担当理事 山本茂貴、浅尾 努）が新たに発足し、これに伴い「食品の細菌検査法問題検討委員会」を立ち上げた。この委員会の主たる目的は、日本で実施されている食品の細菌検査に関わる種々の問題点を、官民それぞれの立場から検証することである。平成17年7月に国立医薬品食品衛生研究所において発足した、食品からの微生物検査標準法検討委員会（委員長 山本茂貴）への提言のための役割も視野に入れた組織でもある。なお本委員会に関する情報は国立医薬品食品衛生研究所のホームページ (<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>) から入手できる。

### 2. 食品の細菌試験法の現状

昭和40年当時に細菌学的規格検査の対象とされた食品等の区分は30種類（乳等省令だけで23種類）であったが、現在では乳等省令35種類を含めて2倍以上の65種類にも達している。当初の検査対象菌(群)は汚染指標菌に限定されていたが、その後腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌を標的とした“指標菌の食中毒菌”の検査や、リステリア モノサイトゲネスを含む食中毒菌を直接検査する方法も加わった。この中にはサルモネラ試験法のように、食品ごとに異なる試験法が次々と無秩序に通知されてきたものもある。腸炎ビブリオ試験法では、後述する食肉製品の規格基準の改訂の理念に反し、試験法が成分規格に含まれて告示された。

近年急速に普及したPCR法やそれを応用した機器に

よる遺伝子診断法やイムノクロマト法等が、迅速性に乏しい培養法の補助試験法の一つとして利用されつつある。このような試験項目の増加や、何らかの措置を講じない限り、今後さらに複雑化することが危惧される試験法の記述上の問題は、単に培養器や遺伝子診断等に必要な器具機材の整備のための経済的な負担を強いるだけでなく、検査ミスを生じさせる可能性を高める要因の一つにもなりかねない。

グローバル化している食品流通の現状から、日本国内のみならずAOAC International (AOAC), International Organization for Standardization (ISO), U.S. Food and Drug Administration (米国FDA) のような国際機関の試験法との調和も重要な課題となっているが、残念ながら日本国内においては細菌試験法の基本的な調和がとられていないのが実情であると言わざるを得ない。

### 3. 委員会の活動状況

列挙したような状況に対する危機感から、平成17年9月以降合計5回の「食品の細菌検査法問題検討委員会」を開催した。本委員会の作業として、①AOAC, ISO, 米国FDA/BAM (Bacterial Analytical Manual) をはじめとした諸外国の細菌試験法に関する情報の収集・解析や、②日本の食品の成分規格の現状分析と整理を開始した。より具体的な問題点として、③最確数測定法や最確数表の問題点、④細菌数測定・算出法の問題点、⑤汚染指標菌試験法の問題点を取り上げており、現在これらの作業は同時並行的に進行している。今までに得られた成果として、乳及び乳製品（乳等省令）や冷凍食品をはじめとする各種食品に対する規格基準・試験法に対応した希釈液、培養温度、培地等を最大限に簡略化した一覧表を作成した。

わが国の食品細菌試験法は積み上げ方式になっているために新旧の試験法が混在しているが、その典型的な例としてサルモネラ試験法を、さらには腸炎ビブリオ試験法の現状とその問題点を第2回食品からの微生物検査標準法検討委員会（平成17年10月25日開催）へ文書をもって提起した。

### 4. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表の説明

乳等省令に含まれる35種類の乳製品（表1）、冷凍食品など18の食品等（表2）、比較的新しく告示・通知された食肉製品（表3）、ミネラルウォーター類（表4）、食鳥卵（表5）、および腸炎ビブリオの成分規格に関連する魚介類等（表6）の規格基準と試験法のうち、試験現場で必要な最小限の項目を一覧表にした。筆者らが食品細菌検査の際に、検査ミスをなくす手段の一つとして以前から使用してきた一覧表に追加・修正を加えたものである。手元に常備し、試験法等を確認する資料として使用して頂ければ幸いである。

表 1. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表（乳及び乳製品）

食品	規格		培養		試料の作製	
	細菌数	大腸菌群	温度 (°C)	培地 (時間)	試料の希釈倍率と培地の数	試料原液 (希釈液)
1 牛乳						
2 殺菌山羊乳						
3 加工乳						
4 成分調整牛乳	5 万/ml 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3)	×1, ×10, ×100; 1 ml×2 本	希釈液の規定なし
5 低脂肪牛乳				BGLB (48±3)		
6 無脂肪牛乳						
7 特別牛乳	3 万/ml 以下					
8 濃縮乳	10 万/g 以下	/	32~35	PC (48±3)	10 g: up to 100 ml (S)	
9 脱脂濃縮乳						
10 加糖れん乳						
11 加糖脱脂れん乳						
12 全粉乳						
13 脱脂粉乳						
14 クリームパウダー	5 万/g 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3)	×1, ×10, ×100; 1 ml×2 本	
15 ホエイパウダー				BGLB (48±3)		
16 たんぱく質濃縮ホエイパウダー						
17 バターミルクパウダー						
18 加糖粉乳						
19 調整粉乳						
20 無糖れん乳	0/g	/	32~35	PC (48±3)	×10; 2 ml×5 枚	
21 無糖脱脂れん乳						
22 バター						
23 バターオイル						
24 プロセスチーズ	/	陰性 (DS)	32~35	DS (20±2)	×10; 1 ml×2 枚	融解 (45°C 未満, 15 分以内, 恒温槽で) 10 g: up to 40°C の 100 ml (S)
25 濃縮ホエイ						
26 クリーム	10 万/ml 以下	陰性 (BGLB)	32~35	PC (48±3)	×1, ×10, ×100; 1 ml×2 本	希釈液の規定なし
27 乳飲料	3 万/ml 以下	陰性 (BGLB)				
28 生乳	400 万/ml 以下 <sup>1)</sup>	/		直接固体鏡検法		
29 山羊乳	400 万/ml 以下 <sup>1)</sup>					
アイスクリーム類 <sup>2)</sup>						
30 アイスクリーム	10 万/g 以下	陰性 (DS)	32~35	PC (48±3)	×10; 1 ml×2 枚	融解 (40°C 以下, 短時間) 10 g+90 ml (S)
31 アイミルク	5 万/g 以下			DS (20±2)		
32 ラクトアイス	5 万/g 以下					
33 発酵乳 <sup>3)</sup>	1,000 万/ml 以上					
乳酸菌飲料 <sup>3)</sup>						
34 無脂肪固形分 3% 以上	1,000 万/ml 以上 <sup>4)</sup>	陰性 (DS)	35~37	BCP (72±3)	×10; 1 ml×2 枚	10 g (ml): up to 100 ml (S) (凍結状態のものは 40°C 以下, 短時間で融解した 10 g)
35 無脂肪固形分 3% 未満	100 万/ml 以上		32~35	DS (20±2)		

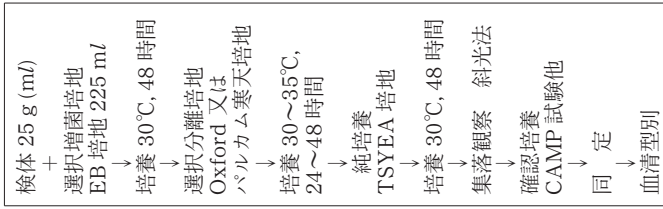
S: 滅菌生理食塩水, PC: 標準寒天培地, BCP: BCP 加プレートカウント寒天培地, DS: デンシコプレート寒天培地

<sup>1)</sup> 総菌数, <sup>2)</sup> 発酵乳又は乳酸菌飲料を原料にしたものは, 乳酸菌又は酵母以外の細菌数, <sup>3)</sup> 乳酸菌数又は酵母数 (BCP 加プレートカウント寒天培地),

<sup>4)</sup> 発酵させた後において, 75°C 以上 15 分間加熱するか又はこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌したものはこの限りでない。

注) 牛乳, 成分調整牛乳, 低脂肪牛乳, 無脂肪牛乳, 加工乳又は乳飲料の常温保存可能品は, 上記規格以外に 30±1°C で 14 日間あるいは 55±1°C で 7 日間保存後の生菌数が 0/ml

乳及び乳製品のリス  
テリア汚染防止等に  
ついて  
乳, 乳製品中のリス  
テリア検査手順  
(IDF 標準法)



ソフト及びセミソフト  
タイプのナチュラ  
ルチーズでリステリ  
アを検出したものは  
食品衛生法第 6 条に  
違反

表2. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表 (冷凍食品等)

食品	規格			培養		試験の調整	
	細菌数	大腸菌群	E. coli	温度 (°C)	培地 (時間)	試料の希釈倍率と培地の数	試料量および希釈液等
36 冷無加熟再取	10万/g以下	陰性(DS)	/	35±1.0(PC, DS)	PC(24±2)	×100; 1 ml×2枚	25g+225 ml(PB)→×10 ↓10 ml
37 凍加熟後再取 (凍結直前加熱)	10万/g以下	陰性(DS)	/	35±1.0(PC, DS)	DS(20±2)	×100; 1 ml×2枚	
38 食加熟後再取 (凍結直前非加熱)	300万/g以下	陰性(EC)	/	44.5±0.2(EC)	EC(24±2)	×100; 1 ml×3本	90 ml(PB)→(×100) 試料原液
39 食品生食用冷凍鮮魚(類)	10万/g以下	陰性(DS)	/				
40 冷凍ゆでだこ	10万/g以下	陰性(DS)	/	35±1.0	PC(24±2)	×100; 1 ml×2枚	冷凍食品と同じ
41 冷凍ゆでがに		陰性(DS)	/	35±1.0	DS(20±2)		
42 鯨肉製品	/	陰性(BGLB)	/	35±1.0	BGLB(48±3)	×10; 10 ml×3本	25g+225 ml(SP)
43 魚肉ねり製品							
44 食肉、鯨肉、魚肉製品に使用する砂糖、でん粉、香辛料(製造基準)	1,000/g以下	/	/	35.0±1.0	PC(48±3) (芽胞数)	×200; ×2,000; 1 ml×2枚	5g; up to 100 ml(SP)→×20 その20 mlを10分間煮沸急冷 40°C以下、短時間で融解
45 水菓	1万/ml以下 <sup>2)</sup>	陰性(DS)	/	35±1.0	PC(48±3) DS(20±2)	×10; 1 ml×2枚 (EC5 本法のMPN)	200g以上+等量のPB→×2 ↓20 ml 80 ml(PB)→×10 ↓10 ml ガス発生管数を計測し、 最確数の係数を10倍
46 生食用かきおよびむき身にした生食用かき	5万/g以下	/	230/100g以下 (MPN 値)	35±1.0(PC) 44.5±0.2(EC) (恒温水槽)	PC(24±2) EC(24±2)	×10; 1 ml×2枚 (LB5 本法のMPN) (×1; 10 ml, 1 ml, 0.1 ml)×5本	
47 生食用かきの原料生産海域海水 (加工基準)	/	/	70/100 ml以下	35±1.0	LB(24±2, 48±3)		
48 容器包装詰加圧加熱殺菌食品	無菌試験陰性	/	/	35.0±1.0	恒温試験 (35.0± 1.0°Cで14日保存) TGC(48±3)	×100; 1 ml×5本	25g+225 ml(PB)→×10 ↓1 ml 9 ml(PB)→×100
49 直接食品に接触させて食品を保存する氷雪	/	陰性 (BTB-LB)	/	35±1.0	BTB-LB (24±2, 48±3)	×1; 10 ml, 1 mlおよび ×10; ×100, ×1,000; 1 ml ×10; ×100, ×1,000; 1 ml ×1,000 まで10倍階段希釈	滅菌蒸留水で洗浄後、室温または 40°C以下の温湯中で融解(原液)、 ×1,000 まで10倍階段希釈
50 氷雪	100/ml以下	陰性 (BTB-LB)	/	35±1.0	BTB-LBは同上 PC(24±2)	BTB-LBは同上 ×1; ×10, ×100, ×1,000; 1 ml×2枚	同上、希釈液の規定なし (上も同様)
51 清涼飲料水	/	陰性 (BTB-LB)	/	35±1.0	BTB-LB (24±2, 48±3)	×1; 10 ml, 1 ml, ×10; 1 ml	含CO <sub>2</sub> 飲料は脱気、希釈液の 規定なし
52 粉末清涼飲料(乳酸菌不含)	3,000/g以下	陰性 (BTB-LB)	/	35±1.0	PC(24±2) BTB-LB (24±2, 48±3)	×10, ×100, ×1,000, ×10,000; 1 ml×2枚 ×10; 10 ml, 1 ml, ×100; 1 ml	10g; up to 100 ml(PB)→×10 10,000 倍まで10倍階段希釈
53 粉末清涼飲料(乳酸菌加)	3,000/g以下 <sup>3)</sup>	陰性 (BTB-LB)	/	35±1.0	1 μg/ml PGK <sup>4)</sup> 加ブドウ糖 加寒天培地(24±2) 4%NaCl加BCP(24±2) 細菌数は上記2種類の 培地の菌数の合計	×10, ×100, ×1,000, ×10,000; 1 ml×2枚 ×10; 10 ml, 1 ml, ×100; 1 ml	10g; up to 100 ml(PB)→×10 ×10,000 まで10倍階段希釈

S: 滅菌生理食塩水, PB: 滅菌リン酸緩衝液, SP: 滅菌ペプトン加生理食塩水, <sup>1)</sup> 腸炎ビブリオの規格および試験法は別途記載, <sup>2)</sup> 発酵乳又は乳酸菌飲料を原料にしたものは乳酸菌又は酵母以外の細菌数, <sup>3)</sup> 乳酸菌を除いた菌数, <sup>4)</sup> PGK: ペニシリンGカリウム

表 3. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表（食肉製品）

食品	大腸菌群	E. coli	クロストリジウム属菌	黄色ブドウ球菌	サルモネラ属菌
54 食品製品	/	100/g 以下 <sup>1)</sup>	/	1,000/g 以下	陰性/25 g
55 食品製品	/	100/g 以下 <sup>1)</sup>	1,000/g 以下	1,000/g 以下	陰性/25 g
56 食品製品	陰性 (BGLB)	/	1,000/g 以下	/	/
57 食品製品	/	陰性 (EC) <sup>2)</sup>	/	1,000/g 以下	陰性/25 g
58 食品製品	/	陰性 (EC) <sup>2)</sup>	/	/	/

検査項目	培 養		試料の調整	
	温度 (°C)	培地 (時間)	希釈倍率と培地の数	試料量および希釈液等
大腸菌群	35.0±1.0	BGLB (48±3)	×10; 10 ml×3 本	25 g + 225 ml (SP)
E. coli	44.5±0.2	EC (24±2)	×10, ×100; 1 ml×5 本 <sup>1)</sup> ×10; 1 ml×5 本 <sup>2)</sup>	
黄色ブドウ球菌	35.0±1.0	卵黄加マンニット食塩寒天培地 (48±3) コアグラージェ試験陽性を確認	×10; 0.1 ml×2 枚	
クロストリジウム属菌	35.0±1.0	クロストリジウム培地 (24±2)	×10, ×100; 10 ml×2 枚	
サルモネラ属菌	35.0±1.0	EEM (18±2)		25 g + 225 ml (EEM)
	43.0±1.0 又は 35.0±1.0	SBG, セレナイト, TT のいずれか一つ (20±2)		EEM の 1 ml
	35.0±1.0	MLCB 又は DHL (24±2) 記載なし TSI/LIM (24±2) OPNG 試験陽性を確認		1 白金耳

<sup>1)</sup> EC の陽性率が ×10 で 3/5 以下のときは 10/g 以下, ×100 で 3/5 以下のときは 100/g 以下, SP: 滅菌ペプトン加生理食塩水  
<sup>2)</sup> 加熱殺菌後包装食肉製品および乾燥食肉製品の試験法

表 4. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表（ミネラルウォーター類）

食品	大腸菌群	腸球菌	緑膿菌
59 ミネラルウォーター類 (容器包装内の CO <sub>2</sub> 圧力が 20°C で 98 kPa 未満であって、 かつ、殺菌又は除菌を行わないもの)	陰性 (BTB-LB)	陰性 (AC)	陰性 (AB)

検査項目	培 養		試料の調整
	温度 (°C)	培地 (時間)	試料の希釈倍率等
腸球菌	推定試験 35.0±1.0	AC, 10 ml (48±3)	×1; 10 ml, 1 ml
腸球菌	確定試験 45.0±1.0	AC, 10 ml (48±3)	1 白金耳
	完全試験 35.0±1.0	ブドウ糖寒天 (24±2)	1 白金耳
	35.0±1.0	ブドウ糖ブイヨン (24±2)	
	35.0±1.0	6.5%NaCl 加ブドウ糖ブイヨン (48±3)	
緑膿菌	35.0±1.0	ブドウ糖寒天斜面 (24±2)	
	35.0±1.0	カタラーゼ試験陰性・グラム陽性球菌	
	推定試験 35.0±1.0	AB, 10 ml (24±2, 48±3) UV (365 nm) での蛍光及び混濁	×1; 10 ml, 1 ml
緑膿菌	確定試験 35.0±1.0	セトリミド寒天 (48±3)	1 白金耳
	完全試験 41.5±0.5	普通寒天斜面 (24±2) オキンダーゼ試験陽性・グラム陰性無芽胞桿菌	類緑色又は赤褐色集落

AB: アスペラギンブイヨン

これら試験法のうち、食肉製品と食鳥卵の試験法は通知法である。魚介類等の腸炎ビブリオ試験法の本体は告示法（平成 13 年 6 月 7 日）であるが、告示直後の平成 13 年 6 月 29 日に「腸炎ビブリオ試験法について」が通知された。この通知には告示された試験法に追加して、

「同定方法」および「同等以上の性能を有すると認められる試験法」が示された。また、ミネラルウォーター類については市販製品として検査対象となる可能性があるもののみを示したが、原水と製造直後のミネラルウォーター類には別途試験法がある。

表 5. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表（食鳥卵）

検査項目	培 養		試料の調整	
	温度 (°C)	培地 (時間)	試料の希釈倍率と培地の数	希釈液
細菌数	35±1.0	PC (24±2)	×1, ×10, ×100, ×1,000; 1 ml×2 枚 <sup>4)</sup>	希釈液の規定なし
サルモネラ属菌	36±1	mBPW <sup>1)</sup> (22±2)	25 g+225 ml (mBPW)	
	42±0.5	TT, 10 ml (22±2)	mBPW の 0.5 ml	
		RV, 10 ml (22±2)		
	36±1	MLCB <sup>2)</sup> (18~24) BGS <sup>3)</sup> (18~24)	TT, RV の各 1 エーゼ	
36±1	TSI, LIM あるいは LIA (18~24) 血清学的試験および生化学的試験を行い同定する (同定キットも使用可)			

<sup>1)</sup> mBPW: L-システイン 0.2 g/l 又は FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を 64 mg/l に添加した BPW

<sup>2)</sup> 硫化水素産生により判定する培地で MLCB, DHL, XLD 等

<sup>3)</sup> 硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地で BGS, BGM (改良 BGA), ランバック培地, SMID 等

<sup>4)</sup> 氷雪と同様に実施することが指示されている。そのまま解釈すれば採取試料量は原液 (1 ml) からとなる。

表 6. 食品の細菌学的成分規格および試験法一覧表（ゆでだこ等の腸炎ビブリオ）

食品	細菌数	大腸菌群	腸炎ビブリオ (定性)	腸炎ビブリオ (MPN)
62 (非冷凍) ゆでだこ	/	/	陰性	/
40 冷凍ゆでだこ	10 万/g 以下	陰性 (DS)	陰性	/
喫食時に加熱を要しない				
63 (非冷凍) ゆでがに	/	/	陰性	/
41 冷凍ゆでがに	10 万/g 以下	陰性 (DS)	陰性	/
喫食時に加熱を要す <sup>1)</sup>				
64 冷凍ゆでがに	10 万/g 以下	陰性 (DS)	/	/
65 生食用鮮魚介類 <sup>2)</sup>	/	/	/	100/g 以下
46 むき身にした生食用かき	5 万/g 以下	E. coli, 230/100 g 以下	/	100/g 以下
39 生食用冷凍鮮魚介類	10 万/g 以下	陰性 (DS)	/	100/g 以下
検査項目	培 養		試料の調整	
	温度 (°C)	培地 (時間)	試料の希釈倍率と培地の数	
腸炎ビブリオ (定性)	37	2%NaCl 加 AP (一夜培養)	25 g+225 ml	
	37	TCBS (一夜培養) 集落を同定し判定	1 白金耳	
腸炎ビブリオ (MPN)	37	2%NaCl 加 AP, 10 ml (一夜培養)	25 g+225 ml (3%NaCl 加 PB)→×10 ↓ 1 ml	
	37	TCBS (一夜培養) 集落を同定し判定	9 ml (3%NaCl 加 PB)→×100 (×10; 1 ml, ×100; 1 ml, 0.1 ml)×3 本 1 白金耳	

AP: アルカリペプトン水 (pH 8.6), 3%NaCl 加 PB: 生食用かきの検査に用いる PB に 3% の NaCl を加えたもの。

<sup>1)</sup> 喫食時に加熱を要す (非冷凍) ゆでがにには規格はない。

<sup>2)</sup> 生食用鮮魚介類: 切り身又はむき身にした鮮魚介類 (生かきを除く) であって, 生食用のもの (凍結させたものを除く) に限る。

<sup>注)</sup> 定性試験の培養及び判定, MPN 試験における最確数の算定については, 同等以上の性能を有すると認められる方法で行うことが認められた。なお, 冷凍ゆでだこ, 冷凍ゆでがに, 生食用冷凍鮮魚介類の細菌数および大腸菌群の試験法, むき身にした生食用かきの細菌数および E. coli の試験法は別途記載している。

平成5年の食肉製品の規格基準の改訂に際して、成分規格から微生物規格に係る試験法が削除された。これは『微生物試験について日々新しい試験方法が開発されていることに鑑み、新たに開発される試験方法に柔軟に対応するためである』と説明された。実際に平成10年の殺菌液卵の成分規格が告示された際も、サルモネラ試験法は成分規格から除外された。ところが腸炎ビブリオ試験法の規格基準の一部改正(平成13年6月7日)では、上述の理念に反して告示法として成分規格に含まれてしまった。また昭和38年に通知された「病原性好塩菌食中毒検査要項」に記載された腸炎ビブリオ試験法は今でも効力は失われていないのも奇異である。

一覧表から明白なように、試験法の全体的な問題点としては以下のものが挙げられる。①標準寒地培地の培養温度が、乳等省令では32~35℃と幅があるのに対し、その他の食品では35±1.0℃と厳密に規定されている。ところが、両方の温度条件を満たす温度帯がわずかに異なるため、これらの食品を同一培養器では試験できない。②4種類の希釈液を使い分けて食品乳剤を作製しなければならないが、その一方では希釈液が指定されていない食品もある(番号1~7の牛乳類、26のクリーム、27の乳飲料、49~51の水雪等と清涼飲料水、60の未殺菌液卵)。このような複雑な希釈液の使い分けは、検査者に無用のストレスを与え、検査ミスを誘発する一因にならないとは限らない。③食品の10倍乳剤を作製する際、ほとんどの場合10g(ml)の食品に希釈液を加えて100mlにするが、アイスクリーム類や氷菓では90mlの希釈液を加えることになっている。冷凍食品では食品25gに希釈液を225ml、カキでは200g以上を採取して等量の希釈液を加えることになっている。④これ以外にも、混積培養する際の培地の温度は43~45℃に保持すると規定されているが、この温度では培地が凝固してしまうために事実上実施不可能である。

## 5. 検体の採取と試料原液作製の問題点

上記試験法の前段階として、検体の採取・運搬法も細かく規定されている。検体を秤量し決められた希釈液を加えた後にホモジナイズする方法として、手で振る、細砕する、ストマッカー処理等を行うことが食品ごとに厳密に定められている。これらの作業手順は食品衛生小六法で確認する必要はあるが、代表的なものを抜粋して原文のまま記載した。

### 5.1 乳及び乳製品

牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム及び乳飲料: 容器包装のまま採取するか、又はその成分規格に適合するかしないかを判断できる数量を滅菌採取器具を用いて無菌的に滅菌採取瓶に採る。濃縮乳及び脱脂濃縮乳は約200gを採取する。この場合4度以下の温度で保持し運搬する。検体はその後4時間以内に試験に供しなくてはなら

ない。4時間を超えた場合には、その旨を成績書に付記しなければならない。

濃縮乳及び脱脂濃縮乳にあっては滅菌採取瓶のまま、25回以上よく振り、滅菌スプーンで検体10gを共栓三角フラスコ(栓を除いて重量85g以下で100mlのところにかく線を有するもの)に採り、滅菌生理食塩水を加え100mlとして10倍希釈液をつくり、以下牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリームおよび乳飲料と同様に希釈液をつくる。

### 5.2 冷凍食品

冷凍したまま容器包装の表面をアルコール綿でよくふき、滅菌した器具を用いて開封し、その内容の全体を細切りした後無作為に25gを無菌的にホモジナイザーに採り、滅菌リン酸緩衝希釈水225mlを加えて細砕する。

### 5.3 食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品

微生物試験に供する試料の調整は、製品(スライスハム等細切された製品は除く)の切断すべき表面をアルコール綿でよくふいた後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から25gを無菌的に採り試料とする。試料に滅菌ペプトン加生理食塩水225mlを加えて細砕し、試料液とする。

スライスハム等細切された製品にあっては25gを無菌的に切断して採り試料とする。試料に滅菌ペプトン加生理食塩水225mlを加えて細砕し、試料液とする。

これらは食品衛生法の成分規格に記載された試験法の一部であるが、例えば以下のように現実には対応することが困難な記載もある。①食肉・魚肉ねり製品等では25gを中心部から採取するという、他の食品にはない特別な採取法を指定している。中心部から採取しなければならない理由が明確ではなく、しかも平天や竹輪では事実上不可能である。これは実際に問題となった事例である。②現在ほとんどの検査所(室)・研究所で使用しているのはホモジナイザーではなくストマッカーである。

③乳および乳製品や氷菓は検体採取後4時間以内に検査することになっているが、実行が困難な場合が多い。

④冷凍食品を冷凍したままその全量を細切するのは困難かつ苛酷な作業である。⑤濃縮乳及び脱脂濃縮乳を採取する際に、重量などを厳密に規定した共栓三角フラスコに採取しなければならない理由が明確でない。

## 6. 混乱しているサルモネラ試験法

既述のような平成5年の食肉製品の規格基準の改訂での方針に従い、平成10年に殺菌液卵の規格基準が告示された際には、サルモネラ試験法は成分規格から除外され別途通知された。しかし、過去の試験法との調和が計られることはなく、それ以外にも2種類のサルモネラ試験法が通知された(表7)。この表で最も注目されるのは、生食用食肉と殺菌液卵のサルモネラ試験法はいずれも平成10年に通知されたにもかかわらず根本的に異な

表7. 食品ごとに異なるサルモネラ試験法

	食肉製品 (H5 年) 生食用食肉 (H10 年)	接種量/ 培地量	殺菌液卵 (H10 年)	接種量/ 培地量	汚染実態調査 (H15 年)	接種量/ 培地量
試料	食肉製品: 中心部より 25 g 採り細切 生食用食肉: 表面を 5×5×1 cm を削り取り, そのうちの 25 g を 1 検体 とする		25 g を混和		25 g をストマッカー処理 15 秒間 または揉み洗いを 20 回程度 (ホモジナイザー処理不可)	
1 次増菌	EEM 225 ml (35.0±1.0°C, 18±2 時間)		mBPW <sup>1)</sup> 225 ml (36±1°C, 22±2 時間)		BPW 225 ml (36±1°C, 20~24 時間)	
2 次増菌	SBG, セレナイトまたは TT (43.0±1.0°C または 35.0±1.0°C, 20±2 時間)	1 ml/ 15 ml	TT (42±0.5°C, 22±2 時間) RV (42±0.5°C, 22±2 時間)	0.5 ml/ 10 ml 0.5 ml/ 10 ml	TT (42±0.5°C, 20~24 時間) RV (42±0.5°C, 20~24 時間)	0.5 ml/ 10 ml 0.1 ml/ 10 ml
分離培養	MLCB または DHL (35.0±1.0°C, 24±2 時間)	1 白金耳	MLCB 等 <sup>2)</sup> (36±1°C, 18~24 時間) BGS 等 <sup>3)</sup> (36±1°C, 18~24 時間)	1 エーゼ	MLCB 等 <sup>4)</sup> (36±1°C, 18~24 時間) BGS 等 <sup>5)</sup> (36±1°C, 18~24 時間)	1 白金耳
確認培養	TSI, LIM (24±2 時間) 培養温度の記載なし		TSI, LIM または LIA 等 (36±1°C, 18~24 時間)		TSI, LIM または LIA 等 (36±1°C, 20~24 時間)	
確認試験	ONPG 試験陽性		血清学的, 生化学的試験 (同定キット可)		血清学的, 生化学的試験 (同定キット可)	

<sup>1)</sup> mBPW: L-システイン 0.2 g/l または FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を 64 mg/l に添加した BPW

<sup>2)</sup> 硫化水素産生により判定する培地で MLCB, DHL, XLD 等

<sup>3)</sup> 硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地で BGS, BGM (改良 BGA), ランバック培地, SMID 等

<sup>4)</sup> 硫化水素産生により判定する培地: MLCB, DHL, XLD, Rainbow Salmonella, ES サルモネラ培地

<sup>5)</sup> 硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地: BGS, BGM (改良 BGA), ランバック培地, クロモアガーサルモネラ, SMID, ES サルモネラ II

汚染実態調査では, 可食部分の外側 (キャベツ, レタス, ネギ, タマネギ等), なるべく皮を含む外側 (ダイコン, ニンジン, トマト, キュウリ等) を採取

ることである。例えば一次増菌用培地として、殺菌液卵ではL-システインあるいはFeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>Oを加えたBPW培地を、生食用食肉ではEEM培地を使用することになっている。一方、殺菌液卵と汚染実態調査の試験法は基本的には同じであるが、一次増菌用培地 (BPW) へのL-システイン等の添加の有無、RV培地に接種する一次増菌培地量 (0.5 ml と 0.1 ml) や培養時間の表示が異なる。このようなサルモネラ試験法の現状は、日本の食品細菌試験法の統一性 (調和) のなさを象徴しているといっても過言ではない。なお平成19年に通知された汚染実態調査の試験法では、一次増菌培地からTT培地への接種量が1.0 mlに変更された。ついでながら、本通知には大腸菌 (*E. coli*) 試験法も示されている。この中で、「食品、添加物等の規格基準」において大腸菌に係る成分規格が設定されている食品については、当該規格に係る試験検査法を実施すると記載されているが、実際にはそのような成分規格がある食品は存在しない。本記述は不必要であるだけでなく、日本には当該の成分規格があるとの誤解を招きかねない。ちなみに日本の食品の成分規格に採用されているのは *E. coli* (いわゆる糞便系大腸菌群) である。

## 7. 腸炎ビブリオ試験法の問題点

平成13年の規格基準の一部改正 (平成13年6月7日) では、生食用鮮魚介類、生食用冷凍鮮魚介類、むき身にした生食用かき、ゆでがに、ゆでだこに腸炎ビブリオに関する成分規格が設けられた。食肉製品の規格基準改訂時の理念に反して、告示された成分規格に試験法が含まれてしまった (表8-1)。同時に、告示法と比べて『同等以上の性能を有すると認められる方法により行う』ことも記載された。“同等以上の性能を有する試験法”とは、告示において示された試験法と比較し、特異性および検出感度等において同等または優れている試験法のことであるとされた。この法律が告示されたわずか22日後 (平成13年6月29日) に、同等以上の性能が認められる試験法が通知された (表8-2)。

告示法で示された5%ペプトン含TCBS培地は市販されていない (市販培地はすべて10%ペプトン含)。同等以上の性能が認められる試験法として10%ペプトン含TCBS培地が示されたが、ペプトン以外の組成も微妙に異なるため市販品にはこれに該当するものがない。このため法律を正確に解釈すれば、TCBS培地は自作しなければならないことになる。同定に使用されるTSI培地、メラーの基礎培地とVP半流動培地は市販品でもよ



表 8-1. 腸炎ビブリオ試験法 (告示法と通知法の比較)

検査項目	告示法			同等以上の性能を有すると認められる試験法 (通知法)
	温度 (°C)	培 養 培地 (時間)	試料の調整 試料の希釈倍率と培地の数	
腸炎ビブリオ (定性)	37	2%NaCl 加 AP (一夜培養)	25 g+225 ml	○培養温度を 37°C に代えて、35°C 以上 37°C 未満で培養する方法 ○TCBS のペプトン量を 5 g から 10 g に変更した培地、あるいは酵素基質添加培地 (クロモアガービブリオ, CHROMagar 社) を使用する ○希釈水にリン酸緩衝生理食塩水 <sup>1)</sup> を使用する方法 ○希釈別法
	37	TCBS (一夜培養) 集落を同定し判定	1 白金耳	
腸炎ビブリオ (MPN)	37	2%NaCl 加 AP, 10 ml (一夜培養)	25 g+225 ml (3%NaCl 加 PB) × 10 ↓ 1 ml	○希釈水にリン酸緩衝生理食塩水 <sup>1)</sup> を使用する方法 ○希釈別法 10 ml (×10)+2%NaCl 加 AP 90 ml × 100 (×100; 10 ml そのまま, 1 ml, 0.1 ml/10 ml 2% NaCl 加 AP) × 3 本
		TCBS (一夜培養) 集落を同定し判定	1 白金耳	

<sup>1)</sup> リン酸緩衝生理食塩水: PB 原液 1.25 ml に 生理食塩水を加えて 1,000 ml に調製

表 8-2. 腸炎ビブリオ同定法 (通知法)

	温度 (°C)	時 間	判 定
1%NaCl 加 TSI <sup>1)</sup>	35~37	18~24	R/Y, H <sub>2</sub> S (-), ガス (-)
耐塩性試験 <sup>2)</sup>	35~37	18	0% (-), 3% (+), 7 又は 8% (+), 10% (-)
1%NaCl 加 VP <sup>1)</sup>	35~37	18~24	VP (-)
リシン脱炭酸試験 <sup>3)</sup>	35~37	1~4日	リシン (+)

<sup>1)</sup> 市販の培地に NaCl を最終濃度 1% に加えたものの使用が認められている。

<sup>2)</sup> 0, 3, 8, 10%NaCl 加 NB 又は LLB, 又は 0, 3, 7, 8, 10%NaCl 加ペプトン水又はトリプトン水 (1% 濃度, pH 7.2).  
NB: Nutrient Broth (Difco, Merck, BBL), LLB: Lab-Lemco Broth (Oxoid)

<sup>3)</sup> メラーの基礎培地 (Difco, BBL 他) 又は LIM 基礎培地に、1%NaCl と 1%L-リシン塩酸基を加えたものを使用。  
LIM 基礎培地は市販培地 (栄研, 日水) と異なる組成が記載されている。  
菌接種後、滅菌流動パラフィン を 4~5 mm の厚さに重層して培養。LIM 培地では重層しなくてもよい。

いとなっているが、LIM 培地はそのようになっていない。LIM 培地も TCBS 培地と同様の理由で自作しなければならない。

告示あるいは通知された多くの細菌試験法では、培養温度は例えば 35±1°C、培養時間は 20±2 時間などと表記されている。ところが、告示で示された腸炎ビブリオ試験法では、アルカリペプトン水や TCBS 培地の培養条件は、37°C で一夜培養となっている。また同等以上の性能が認められる試験法として 35°C 以上 37°C 未満で一夜培養する方法も追加された。同定方法で示された TSI 培地と VP 半流動培地の培養時間は 18~24 時間と幅があるが、耐塩性試験では 18 時間となっており、培養温度は 35~37°C となっている。35~37°C は 36±1°C と表記できるが、35°C 以上 37°C 未満では 36±1°C と表記できないし、37°C という限定された培養温度では恒温槽の性能が考慮されていないため GLP に対応できない。腸炎ビブリオ試験法の記述上の統一性のなさは、地方衛生研究所や登録検査機関等で実施されている GLP システム構築のための SOP 作成に支障をきたすことになる。

最近「同等あるいはそれ以上の性能を有すると認めら

れる試験法」という用語が頻繁に使用されるようになってきた。ところが日本の食品細菌試験法には同等性を評価する方法が示されていない。腸炎ビブリオ試験法が告示された直後に、「同等以上の性能を有すると認められる試験法」が通知されたが、そのデータ等は示されていない。通知法が告示法よりも「同等以上の性能を有すると認められる試験法」であるならば、告示された試験法で成分規格適の食品 (腸炎ビブリオが 25 g 中陰性や最確数で 100/g 以下) が、検出感度が優れている試験法では不適となる場合も理論的には起こり得る。化学分析法では、感度が優れた (検出限界値がより低い) 試験法を採用すれば検査精度が上昇するのは明らかで、成分規格への適否も数値で容易に判定できる。しかし、細菌試験法では、厳密に言えば試験法の感度は同等でなければ成分規格への適否に影響を与えることになる。

## 8. 試験法のキャンセルとリプレイスの必要性

サルモネラ試験法の統一性が欠如しているために生ずる弊害の一つとして、2 種類の食品を同時に検査する場合には異なる培地により異なる培養温度等で対応しなければならないことが挙げられる。例えば食肉製品と殺菌

液卵の一次増菌等はそれぞれ  $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  と  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  (温度表示法が不統一) で培養することになっているので、わずか  $1^\circ\text{C}$  の差であっても、異なる温度設定の培養器が2台必要になる。ほとんどの乳製品の試験法の培養温度は  $32 \sim 35^\circ\text{C}$  となっているので、乳製品も同時に検査するならば3台の培養器が必要になる。このような煩雑さを避けるためにも、新しい試験法を検討する場合には過去の試験法も同時に見直し、必要に応じてISOのように試験法のキャンセルとリプレースを明確にすれば検査現場での混乱を防ぐことができると思われる。地方衛生研究所や登録検査機関では告示および通知された試験法に従いSOPを作成し、いわゆるGLPシステムで検査を行っている。この現状を十分に留意して、統一性(調和)のある試験法を作成することが必要であると考えられる。より調和のとれた試験法は、GLPに対してよりシンプルに対応が可能であり、結果として、単純な検査ミスをなくすることにも寄与するものと思われる。

最終的には、今までに告示あるいは通知された試験法を個々に見直すのではなく、抜本的かつ系統的に改正することによってのみ、調和のとれた試験検査法が構築できるのではないかと考える。

## 9. 最後 に

本稿では食品の細菌試験法の現状とその現実的な問題点に焦点を絞ったが、根本的には成分規格そのものの妥当性を議論することが重要である。日本の食品衛生法では、腸管系食中毒菌に対する汚染指標菌として大腸菌群と *E. coli* (糞便系大腸菌群) が使用されている。ところが、2006年から施行されたヨーロッパ連合の食品に対する微生物基準から大腸菌群と糞便系大腸菌群がなくなり、大腸菌と *Enterobacteriaceae* (仮訳: 腸内細菌科菌群) に置き換えられた。これらの指標菌は最終製品(市販食品)ではなく、HACCPに対応可能な製造工程での衛生管理基準に使用されており、市販食品の安全基準には食中毒菌そのものが使用されている。米国でも糞便系大腸菌群の検査頻度は低下しているようである。また、食品の良否を判定する方法として、日本のような単品の抜き取り検査ではなく、ICMSF(国際食品微生物規格委員会)のサンプリングプランに従ったロット検査が実施されている。

このような食品の試験検査法の国際動向を視野に入れながら、日本の食品衛生のあるべき姿を追い求めることは、日本食品微生物学会の重要な課題の一つであると考えられる。