

[食品科学部]

病原菌迅速検出キット Food System の評価

仲里 尚子¹⁾、屋比久 善昭¹⁾、金城 高子¹⁾
 福村 圭介¹⁾、児玉 千恵²⁾、中川 弘¹⁾

1) (財) 沖縄県環境科学センター 2) (株) ベリタス

1. はじめに

食品衛生法に示された食品の規格基準の検査は、公定法として採用されている食品衛生法や食品衛生検査指針（微生物編）に準拠して行わなければならない。しかし、食品製造メーカーなどの社内の自主検査では公定法に固執することなく、検査結果を直ちに現場にフィードバックすることが可能な簡易迅速法でも十分対応することができる^{1), 2)}。

Food Systemは食品中に存在する *Salmonella* spp, *Citrobacter* spp, *Proteus/Providencia* spp, *Pseudomonas* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria* spp, *Yeast/Moulds* など一枚のマイクロプレートで検出する簡易迅速同定キットである。今回は *Salmonella* Enteritidis, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* を用いて、本キットの検出感度および食材を用いた実用性の検討を行ったので報告する。

2. 材料および方法

1 使用菌株

Salmonella Enteritidis 3株 (IFO755、IFO 761、IFO 732)、*E. coli* IFO 13500、*Staphylococcus aureus* JCM 5962、*Pseudomonas aeruginosa* JCM 2413 の計6株を用いた。

2 使用キット

(株) ベリタス社の Food System を用い

た。本キットは増菌を行うための Inoculation solution 及び 12 種類の基質の入った試薬プレートで構成されている（写真 1）。使用方法は食品を 10g または 25g 採取し、9 倍量のペプトン水あるいはリンゲル溶液に加えてホモジネートし、その 2ml を Inoculation solution に加え、パラフィルムで蓋をして $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 4～6 時間培養する。増菌培養後、試薬プレートの 12 種類の基質が固相されている各ウェルに $200 \mu\text{l}$ ずつ添加し、No1、2、3 のウェルにワセリンを 2 滴加え、蓋をして $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18～24 時間培養したのち、各ウェルの色調の変化を目視により観察して判定を行う。

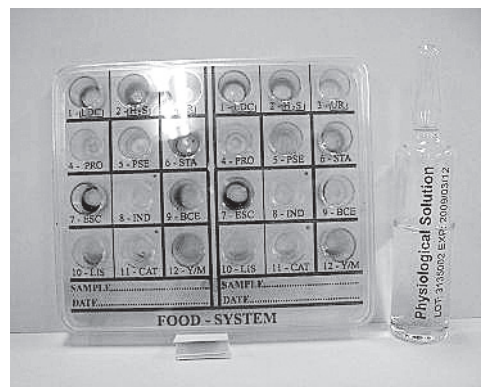


写真 1 試薬プレート(左)とInoculation solution(右)

3 検出感度試験

Food System の検出感度を調べるため、*S. Enteritidis* 3株、*E. coli*、*S. aureus*、*P. aeruginosa* 各 1 株の計 6 株を用いて検討を行った。それぞれの菌株を普通ブイヨン培地（栄研化学）を用いて 35°C で 24 時間、2 回継代培養

を行った後、滅菌リン酸緩衝液を用いて $10^3 \sim 10^7$ cfu/ml に調整し、Food System の試薬プレート
の各反応ウェルに $200 \mu\text{L}$ ずつ滴下して 35°C
で 18 時間培養した後、判定は使用方法に従って
色調による目視で行った（図 1）。なお、同一株
は 3 プレートについて実施した。

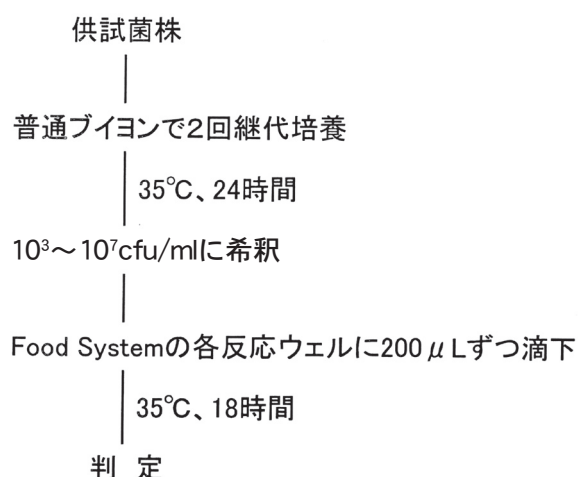


図1 検出感度試験方法

4 接種菌量の確認

各試験において、接種した菌数の確認を行った。
接種菌液をそれぞれ $100 \mu\text{L}$ ずつ 10 枚の標準寒
天平板に塗抹し、 35°C で 24 時間培養したのち出
現した集落を計数し、その平均値を接種菌量とし
た。

5 食品への接種試験

実際の食品からの検出感度を調べるために、
食品へ菌を接種し検討を行った。供試菌株は *S.*
Enteritidis、*E. coli*、*S. aureus* 各 1 株の計 3 株
を用い、供試試料は鶏肉、豚肉、生野菜、ギョウ
ザ、弁当の市販の 5 食材を用いた。試験品の調
製は、試料 10g に滅菌リン酸緩衝液 90ml を加え、
普通ブイヨン培地（栄研化学）を用いて 35°C
で 24 時間前培養した *S. Enteritidis*、*E. coli*、
S. aureus をそれぞれ $50 \sim 100$ cfu/g となるよ
うに接種し、30 秒間ストマッキングしたのち

Innoculation solution に 2ml 分注し、 35°C で 4
時間インキュベーションを行った。所定時間培養
後、試薬プレートの各反応ウェルに培養した調製
菌液を $200 \mu\text{L}$ 滴下し、以下検出感度試験と同
様に培養し、判定を行った（図 2）。また、供試
試料の一般生菌数、大腸菌群数、サルモネラ、大
腸菌及び黄色ブドウ球菌の測定も併せて行った。

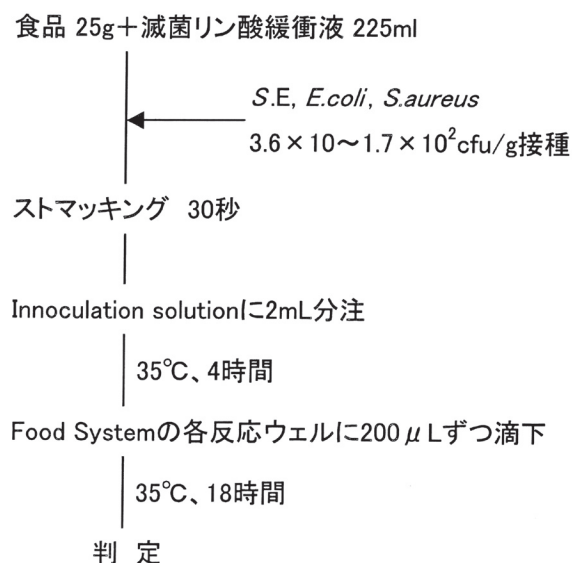


図2 食品への接種試験方法

6 菌培養時間の検討

供試菌株は *S. Enteritidis* 及び *S. aureus* の計
2 株を用い、供試試料は鶏肉、豚肉、弁当の市
販の 3 食材を用いて、Innoculation solution に
おける増菌培養時間による検出率の違いを検討
した。試料 25g に滅菌リン酸緩衝液 225ml を
加え、普通ブイヨン培地（栄研化学）を用いて
 35°C で 24 時間前培養した *S. Enteritidis* 及び
S. aureus を、それぞれ $1.5 \sim 5.0 \times 10^3$ cfu/g
となるように接種して 30 秒間ストマッキング
したのち Innoculation solution に 2ml 分注
し、4 時間、5 時間及び 6 時間のインキュベ
ーションを行った。これらを試薬プレートの各反
応ウェルに $200 \mu\text{L}$ 滴下し、以下検出感度試験と
同様に培養し、判定を行った。また、増菌後の

Innoculation solution を希釈し、*S. Enteritidis* は DHL 寒天培地（栄研化学）上に、*S. aureus* は卵黄加マンニット食塩寒天培地（栄研化学）上に 0.1ml 塗抹培養し、増菌後の推定菌量の確認を行った（図 3）。食品への接種試験と同様、供試試料の一般生菌数、大腸菌群数、サルモネラ、大腸菌及び黄色ブドウ球菌の測定も併せて行った。

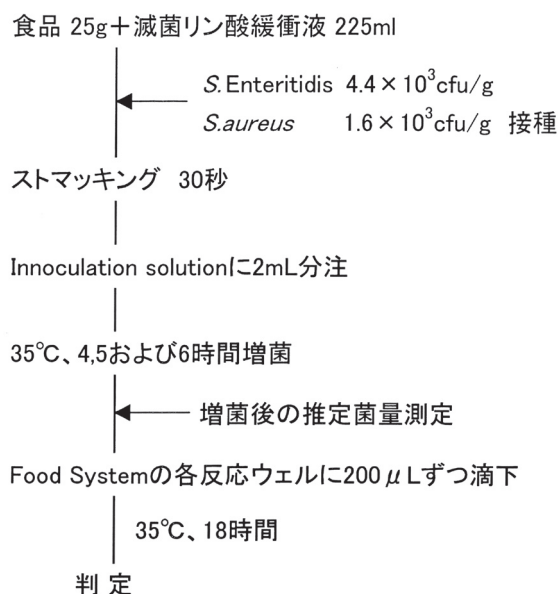


図3 増菌培養時間の検討試験方法

3. 結果

1 検出感度試験

S. Enteritidis は 3 株で試験を行った。その結果、*S. Enteritidis* IFO 755 は 10^3 cfu/200 μ l では 0/3、 10^5 cfu/200 μ l で 1/3、 10^7 cfu/200 μ l では 3/3、*S. Enteritidis* IFO 761 は 10^5 cfu/200 μ l では 0/3、 10^6 及び 10^7 cfu/200 μ l ではいずれも 3/3 がサルモネラと判定された。一方、*S. Enteritidis* IFO 762 は 10^5 cfu/200 μ l で 1/3、 10^6 及び 10^7 cfu/200 μ l ではいずれも 0/3 であった。

E. coli は 10^3 、 10^5 、 10^7 cfu/200 μ l でいずれも 3/3、*S. aureus* は 10^4 及び 10^5 cfu/200 μ l で 3/3、 10^6 cfu/200 μ l で 2/2 が陽性と判定された。*P. aeruginosa* は 10^3 cfu/200 μ l で 0/3、 10^5 及び 10^7 cfu/200 μ l で 3/3 が陽性と判定された（表 1）。

表 1 供試菌の検出感度

	添加菌量 (cfu/200 μ L)				
	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3
<i>S. Enteritidis</i> IFO 755	3/3	●	1/3	●	0/3
<i>S. Enteritidis</i> IFO 761	3/3	3/3	0/3	●	●
<i>S. Enteritidis</i> IFO 762	0/3	0/3	1/3	●	●
<i>E. coli</i> IFO 13500	3/3	●	3/3	●	3/3
<i>S. aureus</i> JCM 5962	●	3/3	3/3	2/2	●
<i>P. aeruginosa</i> JCM 2413	3/3	●	3/3	●	0/3

（陽性数／試験数）

2 食品への接種試験

食材1g当たり *S. Enteritidis* は 1.7×10^2 cfu、*E. coli* は 9.0×10 cfu、*S. aureus* は 3.6×10 cfu を接種した結果、所定の培養時間後の判定は *E.*

coli は 13/13、*S. aureus* は 4/6 が陽性と判定されたが、*S. Enteritidis* は 0/3 であった（表2）。表3に供試した食材の細菌検査の結果を示した。

表2 食品への接種試験における検出数

接種菌量 (cfu/g)	<i>S. Enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	一般生菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)
	1.7×10^2	9.0×10	3.6×10		
とり肉	0/3	3/3	2/2	3.5×10^4	2.0×10
豚肉	0/3	3/3	2/2	1.7×10^4	2.0×10
生野菜	0/3	3/3	●	2.4×10^4	1.0×10
ギョウザ	0/3	3/3	0/2	<300	<10
弁当	0/3	1/1	●	<300	<10
計	0/15	13/13	4/6		

(陽性数／試験数)

表3 食品への接種試験に用いた供試試料の細菌検査結果

	生菌数 (/g)	大腸菌群数 (/g)	サルモネラ	大腸菌	黄色ブドウ 球菌
とり肉	3.5×10^4	2.0×10	陰性	陰性	陰性
豚肉	1.7×10^4	2.0×10	陰性	陰性	陰性
生野菜	2.4×10^4	1.0×10	陰性	陰性	陰性
ギョウザ	<300	<10	陰性	陰性	陰性
弁当	<300	<10	陰性	陰性	陰性

3 増菌培養時間の検討

食材 1g 当たり *S. Enteritidis* を 4.4×10^3 cfu、*S. aureus* を 1.6×10^3 cfu 接種し、増菌培養時間と

検出率の比較を行った結果、培養時間が 4 ～ 6 時間では著しい差は見られなかった（表 6）。

表4 増菌培養時間と検出率の比較

		<i>S. Enteritidis</i>		<i>S. aureus</i>	
		増菌後の推定菌量 (cfu/mL)	検出結果	増菌後の推定菌量 (cfu/mL)	検出結果
とり肉	4hr	4.2×10^4	0/3	1.6×10^3	1/3
	5hr	8.7×10^4	0/3	6.1×10^3	0/3
	6hr	9.5×10^5	1/3	1.4×10^4	1/3
豚肉	4hr	8.7×10^3	0/3	8.0×10^2	1/3
	5hr	3.1×10^4	0/3	4.2×10^3	0/3
	6hr	4.7×10^4	1/3	3.1×10^4	2/3
弁当	4hr	3.6×10^3	1/3	1.7×10^3	3/3
	5hr	5.7×10^3	0/3	5.3×10^3	0/3
	6hr	3.6×10^5	1/3	2.9×10^4	0/3
試料中の初期菌量		4.4×10^3 cfu/g		1.6×10^3 cfu/g	

4. 考察

一般的な簡易・迅速キットの検出感度は、食品での汚染菌量が極めて少ないとされるサルモネラや O157 であっても、概ね 10^4 cfu/ml 程度である³⁾ ことから、本キットはこれらと同等の感度を示すといえる。特に *E. coli* については 10^3 cfu/ml で 100% の検出率を示し、今回試験した中では最も感度が良好であった。

しかし、食品への接種試験においては、*E. coli* は 100%、*S. aureus* は 66.7% が陽性を示したが、*S. Enteritidis* は陽性を示さなかった。これは、サルモネラ検出のための基質に対して食品由来の油分等が阻害物質として作用しているか、菌の活性低下の可能性があり、これらの原因によって目的菌が検出限界以上まで増菌されず不検出になったことも考えられる⁴⁾。本キットは色調変化により判定するキットである。すなわち *Salmonella* 属菌は No. 1、2、3 の 3 つのウェルの色調変化で

判定するが、リジンの脱炭酸による黄色から赤色への変化が、色の出方が弱い場合には淡黄色から淡橙色となること、No. 2 のウェルにおける硫化水素の産生が弱い場合に淡灰色となることなど、この 3 つのウェルで鑑別する *Citrobacter* や *Proteus/Providencia* spp との区別が困難となり、サルモネラが検出できなかったものと考えられる。本キットの検出率の向上には、より効果的な増菌培地を用いて目的菌を検出可能な菌数にまで増菌させることや、発色を確実にし同定が容易かつ的確にできるよう改良を加えるなど、今後さらに検討する余地があると考えられる。

今回の評価試験で Food System の検出感度は *E. coli* は 10^3 cfu/ml、*S. aureus* は 10^4 cfu/ml、*S. Enteritidis* 及び *P. aeruginosa* は 10^5 cfu/ml の菌量が存在すれば検出される結果が得られ、また Food System は、12 のウェルに凍結乾燥させた種々の培地及び反応試薬が入っており、煩雑な

操作を必要とせず、18～24時間培養した後の色調の変化を確認することで、他の簡易迅速法とは異なり同時に種々の細菌類を迅速に検出、簡易同定できることから、本キットは原材料および食品の製造・衛生管理スクリーニングに有効であると考えられる。

5. まとめ

1 Food System の検出感度について

E. coli は 10^3 cfu/ml、*S. aureus* は 10^4 cfu/ml、*S. Enteritidis* 及び *P. aeruginosa* は 10^5 cfu/ml で検出可能であった。

2 食品への接種試験について

E. coli は接種菌量が 9.0×10 cfu/g で 13/13、*S. aureus* は 3.6×10 cfu/g で 4/6 が陽性と判定され、*S. Enteritidis* は接種した菌株や食材によって差が認められた。

3 増菌培養時間について

S. Enteritidis、*S. aureus* とも、Innoculation solution における増菌時間は 4～6 時間では著しい差は認められなかった。

なお、本研究は平成 17 年 11 月、第 26 回日本食品微生物学会にて発表した。

参考文献

- 1) 中川 弘：食品微生物検査施設の GLP と簡易・迅速検査法の現状と課題．食品機械装置 2005 年 1 月号 45-55
- 2) 中川 弘：食品衛生及び公衆衛生における微生物迅速検出法の課題．食品工業 Vol.46 No.16
- 3) 伊藤 武、中川 弘：迅速・簡易化が進む食中毒検査の最新動向．食品と開発 Vol.34 No.5 9-11
- 4) 中川 弘、星川理恵、岩田朋子、鈴木貴子、池戸正成、小沼博隆、坂井千三：ラピッド Escherichia coli O157（栄研）の評価．日本食品微生物学会雑誌 16（1）,39-42,1999
- 5) 伊藤 武、中川 弘：食品病原菌の迅速測定法の細菌の進歩－免疫学的検出法を中心として－．乳業技術 2001 Vol.51 77-88