簡易法による生菌数，腸内細菌数（大腸菌群数） およびカビ・酵母数の推定

金子精一*・佐藤善博*・峯尾光*
光崎研一**・赤堀文昭**

Simple-methods of estimation of standard plate count, count of enterobacteriaceae (coliform count) and count of yeasts and molds.

Seiichi KANEKO¹⁾, Yoshihiro SATO¹⁾, Hikaru MINEO, Ken-ichi KOHZAKI²⁾
and Fumiaki AKAHORI²⁾

- 1) Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories, 52-2 Nakao-cho Asahi-ku, Yokohama-shi, 241
- 2) Azabu University, 1-17-71, Fuchinobe, Sagamihara-shi, Kanagawa 229

Summary

We attempted to statistically evaluate the reliability of plate count estimation using the Hygicult method, a simple plate counting kit, in comparison with the standard method. The data for standard plate count, Enterobacteriaceae count and yeast and mold counts obtained using the Hygicult method and the standard method were converted to Log_{10} values to evaluate the relationship between data from the two methods.

Correlation coefficients and of degree of fit of the regression line suggested that both plate counts were statistically significant at the 1% level, proving the reliability of estimation using the regression line model. The regression lines obtained were as follows.

Standard plate count	$\hat{y} = -5.3403 + 3.5198x$
Enterobacteriaceae count	$\hat{y} = 2.1849 + 1.6616x$
Yeast and mold count	$\hat{y} = 2.2628 + 0.9086x$

The correlation coefficients were considerably high and correlated well with those measured by standard analysis; 0.90 for the standard plate count, 0.80 for the Enterobacteriaceae count and 0.91 for the yeast and mold count. These results suggest that the Hygicult method as well as the standard method are applicable to plate count estimation.

* 神奈川県衛生研究所
〒241 横浜市旭区中尾町52-2
** 麻布大学
〒229 相模原市淵野辺1-17-71

公定法（衛生検査指針）²⁹⁾による生菌数，腸内菌数（衛生検査指針では大腸菌群数），カビ・酵母数の測定は，多くの希釈液，ピペット，シャーレ等を必要とし，操作も複雑でかなりの時間を要する。したが

って、公的規格基準に基づく検査以外は、公的機関においても簡易法を用いることが多くなってきた。

菌数の簡易検査法としては、培地を用いた培養法の他に、生化学反応の強さ^{1,7)}、染色鏡検^{8,13)}、電気抵抗(伝導)度^{14,18)}、吸光度^{19,20)}、発熱量^{21,24)}、取り込みアイソトープ量^{25,28)}等から菌数を推定する方法等があるが、培地を用いる検査法以外はいずれも高価な機器を必要とし、何処の検査室でも容易に用いるわけには行かない。

いっぽう、培地を用いる方法は特別な設備を必要とせず、現場検査に向いている反面、余りに簡易なために、精度面で不安感が持たれている。しかし、検査法によっては、精度の良い検査法もあり、公定法との相関が高ければ、公定法の推定法として、機器分析法同様に用いることができる。本報では、簡易キット(ハイジカルト法)について、統計学的手法を用い、公定法で得られる菌数を推定することの可能性について検討を試みた。

材料および方法

1. 実験材料

神奈川県内で市販されていた豚肉96検体を、食肉販売店より買い求め、購入後1時間以内に菌数測定に供した。

2. 簡易法(ハイジカルト; Hygicult)による菌数測定

ハイジカルト(Hygicult)はOrion Diagnostica(フィンランド)の製品で、第一化学薬品(株)から販売されている食品専用のキットである。両面に同一培地の張り付けられた平板が円筒容器中に収められている。この培地を液状食品に浸漬し、あるいは固形食品の表面に直接接触させ、表面に発育したコロニー発生密度から、微生物汚染状況をいくつかのランクに分け、衛生評価しようとするものである。目的別に、生菌数用のTPC(Total plate count)、腸内細菌用のE(Enterobacteriaceae)、酵母・カビ数用のY and F(Yeast and fungi)がある。本法の利点は、スクリュウ・キャップ付き蓋の気密性がよく、簡易法にしては中の培地の水分蒸散が遅く、かなり長期間培地が保存できる点と、そのために精度の良い検査ができる点である。

菌数測定法は、まずキャップを外し、キャップに装着された培地付プラスチック板を取り外し、板面の培地表面全体を豚肉の表面に一樣に強く圧した後、これを元のように同筒容器に収め、フタをしっかり

締めて、ふ卵器に収め培養した。一つの容器には表裏同種類の培地が張り付いているので、豚肉との接触は一つの検体について表裏両面(2面)の接触を行なった。生菌数は35℃・2日、腸内細菌数は35℃・1日、カビ・酵母数は30℃・5日培養し、それぞれの菌数は表裏2枚の培地に発育した菌数の幾何平均を求め、培地1枚(片面)あたりの菌数で表わした。

菌数計測に当っては、培地上に発生した集落を白金耳で一つ一つ傷をつけながら計数し、培地一面当たり最大1000個まで数えた。

3. 公定法による生菌数、腸内細菌数(大腸菌群数)及びカビ・酵母数の測定

菌数測定の方法は、ほぼ厚生省監修の「食品衛生検査指針Ⅰ」²⁹⁾に従った。試料25gを225mlの0.1%ペプトン水³⁰⁾と合せ、ストマッカーで均等化し、原液を得た。以後所定のとおりの0.1%ペプトン水で10倍希釈系列を作り、それぞれの希釈ごとに2枚のシャーレに希釈試料を注加して、混釈培養法で菌数測定を行なった。各培地の培養温度・時間は、上記ハイジカルト法と同じで、菌数は食品衛生検査指針の方法に従って1g当たりの値を算出した。

使用培地は次のとおりである。生菌数(TPC)…標準寒天培地
腸内細菌数(E)…1%グルコース加デソキシコレート寒天培地
酵母・カビ数(Y and F)…マルト寒天(Malt Agar)培地

以上いずれも国産のものを用いた。使用培地でハイジカルト法と異なる点は、腸内細菌(大腸菌群)数測定用培地で、ハイジカルト法では1%グルコース加Violet Red Bile Agarを用いているが、我が国の公定法では腸内細菌数の測定が規定外であることから、代りに大腸菌群数の測定用培地として市販されているデソキシコレート寒天培地を用いた。そのほかのものはいずれも、両法同じ組成の培地である。

4. 統計処理

豚肉(市販品)96件について生菌数、腸内細菌数、酵母・カビ数を公定法、ハイジカルト法による方法で同時に測定し、得られた菌数(ハイジカルト法では精肉に接触した一面当たりの菌数、公定法では精肉1g当たりの菌数)は対数変換すれば、正規分布すると想定して次のように変換し、変換した x_i^* について、各種の統計解析を行なった。

$$x_i^* = \log_{10} x_i \quad (x_i \text{は原データ})$$

また、統計計算は上限値以上(ハイジカルト法で

は計測最大値 $>1,000$ 、対数で >3.0000)および下限値以下(公定法では <300 、対数で <2.4771)のデータは除いて行なった。

統計手法はいずれも成書³¹⁾に従い、計算は自作プログラムを用い、シャープ(株)のパーソナルコンピュータ MZ-2000を用いて行なった。

結 果

公定法、ハイジカルト法の基礎統計量は表1のとおりである。菌数は公定法が1 g 当たり、ハイジカルト法が培地一面当たりで算出したので、当然前者の方が大きい値を示している。念のため行なった平均値の差の検定(対応のある二つのデータの差の検定)結果も1%の危険率で、いずれも有意となり、平均値に差のあることを示した。

バラツキを変動係数の大きさで見ると、生菌数では公定法、腸内細菌数および酵母・カビ数ではハイジカルト法の方が大きい値を示した。

以上のように、検定の結果、二法の平均値には有意差が認められたので、当然のことではあるが、ハイジカルトの培地一面に生じた集落数をそのまま公定法の菌数と考えるわけにはいかないので、次にハイジカルトの値から公定法の菌数を予測することを考えた。

まず、公定法とハイジカルト法の関連の深さをみるため、両者の相関係数を求め、無相関の検定を行なったところ、生菌数、腸内細菌数及び酵母・カビ数における相関係数 r 、無相関の検定の t_0 値は表2のとおりであった。無相関の検定ではいずれも1%の危険率で有意、すなわち「相関係数は0ではない」→「相関はなくはない」と判定された。また、相関係数は腸内細菌数がやや低い値を示したほかは、いずれもかなり高い値を示した。

以上で公定法とハイジカルト法の間に相関のあることが証明されたので、次にハイジカルト法の値から公定法の値を推定する回帰式を求めた。その結果は表2のとおりであった。表中、 x はハイジカルト法の菌数の常用対数値、 $\hat{y}$ は公定法の菌数の常用対数値である。従って公定法の菌数の真値は $10^{\hat{y}}$ である。

つぎに回帰式の有用性について検定を試みた。回帰式が用いて有効である、すなわち使いものになるか否かの検定は、回帰式を、

$$\hat{y} = a + b x$$

としたとき、 $a = 0$ および $b = 0$ の帰無仮説を棄却

できるか否かを調べれば良い。もちろん棄却できれば、 a あるいは b は0以外の数値をもつので、式は意味のあるものとなり、有用と判定される。ここでは $b = 0$ の検定について、検討した。結果は表2のとおりで、いずれも1%の危険率で有意、すなわち式の成立することが証明された。

以上のように、これらの式は使用に耐えるものであり、この式を用いて簡易法から公定法への菌数の読み替えが可能と判定された。ただし、その範囲はハイジカルト法で測定可能な培地一面当たり1000までの範囲である。

公定法とハイジカルト法の関連の様様、すなわち散布図は図1～図3のとおりである。

図1 公定法と Hygicult 法の相関図(生菌数)

図2 公定法と Hygicult 法の相関図(腸内細菌数)

図3 公定法と Hygicult 法の相関図(酵母・カビ数)

考 察

公定法とハイジカルト法の基本的な比較は、平均値と変動係数で行なえるが、平均値については研究方法で述べたように、表記菌数の単位が異なるため直接比較することはできない。変動係数は、表1のように、生菌数では公定法(15.94%)が、腸内細菌数および酵母・カビ数ではハイジカルト法(それぞれ37.65, 36.91%)が大きい値を示し、バラツキの大きいことを示している。一般に同一ロットあるいは同一検体についての解析では変動係数の小さいものほど精度が良い、いかにすれば再現性の高い検査法であると判断されるが、ここで求めた変動係数は、検体、ロットが異なるため、食品の持つバラツキを含んでいる。したがって、この値の大小によって直ちに公定法とハイジカルト法の優劣を比較することはできない。しかし、一般にこの値の特に大きな検査法は、手法のもつバラツキが大きく、あまりよい検査法とは言えないと判断される。この場合は、両法とも特異データは除いてバラツキを算出しているので、どちらがより優れているのか判断は安易に結論を下すわけにいかないが、変動係数の最高値が37.65で特に大きい値ではないので、精度面ではいずれも問題となることはないと考えられる。

つぎに簡易法から公定法への推定の問題が論議的となる。本研究の結果、無相関の検定、有用性の検定においてともに公定法による値を推定する回帰式が使用に耐えるものであることが証明されたが、回帰式による推定の精度そのものは、相関係数の大きさに判断する必要がある。その理由は、検査すべき食肉の数を漸次増してゆくと、0.20のような小さ

表1. 公定法とハイジカルト法の基礎統計量

項 目	公 定 法	ハイジカルト法
生菌数		
平均	4.4931	2.7937
標準偏差	0.7156	0.1765
変動係数 (%)	15.94	6.32
腸内細菌数		
平均	4.0692	1.1340
標準偏差	0.8883	0.4270
変動係数 (%)	21.83	37.65
酵母・カビ数		
平均	4.2234	2.0662
標準偏差	0.7965	0.7627
変動係数 (%)	18.86	36.91

な相関係数の値でも相関の検定および有用性の検定結果が有意になってしまうからである。

両法間の相関係数は、表2のように、生菌数0.90、腸内細菌数0.80、酵母・カビ数0.91で、いずれもかなり高い値を示している。われわれは、はっきりした基準、考え方があるわけではないが、この種の推定には、相関係数の値ができれば0.80を超えたものについて回帰式を求めるべきで、それが実用上有意義と考えている³¹⁾。この基準に従えば、生菌数、腸内細菌数、酵母・カビとも回帰式で推定してよいことになる。これらのうちでは、腸内細菌数がかろうじて相関係数0.80を保っている(正確には四捨五入で)、これは公定法とハイジカルト法で培地の種類が異なるためで、両法の本質的な食い違いではないと推定される。機会があれば、デソキシコレート寒天培地の代りに1%グルコース加 Violet Red Bile Agar を用いて再度両者の関係について解析を試みてみたい。

以上述べたように、相関係数の大きさは回帰式の推定精度を示すと考えられるため、相関係数の大きさに注目して他の簡易菌数測定法と比較してみると、Membrane filtration- Epifluorescent microscopy (蛍光顕微鏡使用)⁹⁾で、生菌数の場合、0.91という相関係数を示し、ハイジカルト法と大差のない成績を示している。したがって、高価な機器を使用しなくても簡単なハイジカルト法でかなり精度よく公定法の推定が出来ることが証明された。ただし、多数の検体について短時間内に結果を求める場合には、培養法によらない機器分析を用いるべきと考える。

表2. 公定法とハイジカルト法の相関係数・無相関の検定、ハイジカルト法から公定法の菌数を推定する回帰式、回帰式の有用性の検定結果

相関係数、無相関の検定結果

生菌数：

$$r = 0.898 \quad t_0 = 13.540^{**}$$

腸内細菌数：

$$r = 0.799 \quad t_0 = 12.395^{**}$$

酵母・カビ数：

$$r = 0.909 \quad t_0 = 20.107^{**}$$

回帰式

$$\text{生菌数} : \hat{y} = -5.3403 + 3.5198x$$

$$\text{腸内細菌数} : \hat{y} = 2.1849 + 1.6616x$$

$$\text{酵母・カビ数} : \hat{y} = 2.2628 + 0.9086x$$

回帰式の有用性の検定結果

生菌数：

$$t_0 = 13.538 > t(60, 0.01) \approx 2.66$$

腸内細菌数：

$$t_0 = 12.394 > t(87, 0.01) \approx 2.64$$

酵母・カビ数：

$$t_0 = 20.105 > t(85, 0.01) \approx 2.64$$

公定法は操作が大変複雑である。同じ時間、費用を投資するなら、ハイジカルトのような簡易法により、同一検体の二か所、三か所、あるいはそれ以上の場所の検査を行ない、複数の検査データを求め、その幾何平均を出したほうが良いと考えられる。微生物汚染のバラツキの大きい点を考慮すれば、公定法で一か所の検査をするよりは、簡易法で複数の個所の検査を行なったほうがより正確な微生物汚染の状況を把握することができる。したがって、公的機関で規格基準に適合するか否かの検査を行う以外は、ハイジカルト法のような簡易法をさらに積極的に用いることの意義を評価すべきと考える。

文 献

- 1) 金井興美：Tetrazorium 塩の還元反応による結核菌液の生菌量測定。日細誌，9(1)，27-31，1954
- 2) 兵庫裕：色素還元試験とアルコールテストの汚染乳検出能について。日獣会誌，12，481-485，1959
- 3) Garrison, E. R. and Patrick, T. E. : A simple quantitative test for catalase in milk. J. Dairy sci., 49,442-448,1966
- 4) Janzen, J. J. and Cook, W. C. A simple quantitative catalase procedure for abnormal milk. J. Milk Food Technol., 30(7)，205-207，1967
- 5) Dabbah, R. and Moats, W. A. Evaluation of the resazurin reduction one-hour test for grading milk intended for manufacturing purposes. J. Milk Food Technol., 32(2)，44-48，1968
- 6) 大塚義一：生乳の色素還元試験法，特にレザズリン試験紙と生菌数との関係，日獣会誌，21(10)，423-430，1968
- 7) 田中錠太郎，海沼勝，飯島義章，秋山陽，山田満，前田明，大竹昇：生乳の細菌数測定方式の検討，日獣会誌，23(6)，376-380，1970
- 8) Hobbie, J. E., Daley, R. J. and Jasper, S. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol., 33(12)，1225-1228，1977
- 9) Pettipher, G. M., Mansell, R., McKinnon, C. H. and Cousins, C. M. : Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. Appl. Environ. Microbiol., 39(2)，423-429，1980
- 10) Baumgart, J., Fricke, K. and Huy, C. : Quick determination of surface bacterial content of fresh meat using a bioluminescence method to determine adenosine triphosphate(ATP). Fleischwirtsch., 60(2)，266-270，1980
- 11) Thore, A., Lundin, A. and Ansehn, S. : Firefly luciferase ATP assay as a screening method for bacteriuria. J. Clin. Microbiol., 17，218-224，1982
- 12) Nichols, W. W., Curtis, G. D. W. and Johnston, H. H. : Detection of bacteriuria by bioluminescence : effect of pre-analysis centrifugation of specimens. J. Appl. Bacteriol., 56,247-257,1984
- 13) Tse, K-M and Lewis, C. M. : Membrane filter staining method : Bacterial plate counts in 24H. Appl. Environ. Microbiol., 48(2),433-434,1984
- 14) Ar, A. and Brown, D.F.J. : Impedance monitoring of bacterial activity. J. Med. Microbiol., 8,19-28,1975

- 15) Zafari, Y. and Martin, W. J. : Comparison of the BACTOMETER microbial monitoring system with conventional methods for detection of microorganisms in urine specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 5,545-547,1977
- 16) Hardy, D., Kraeger, S. J., Dufour, S. W. and Cady, P. : Rapid detection of microbial contamination frozen vegetables by automated impedance measurements. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34,14-17,1977
- 17) Cady, P., Hardy, D., Martins, S., Dufour, W. and Kraeger, S. T. : Automated impedance measurements for rapid screening of milk microbial content. *J. Food Protect.*, 41,277-283,1978
- 18) 佐竹幸子：インピーダンス法, p.46-50 [春田三佐夫, 坂崎利一, 森地敏樹：食品微生物検査の簡易化, 自動化, 迅速化, サイエンス・フォーラム, 東京, 1985]
- 19) Fujita, T. and Nunomura, K. : New turbidimetric device for measuring cell concentrations in thick microbial suspensions. *Appl. Microbiol.*, 16,212-215, 1968
- 20) Merek, E. C. : Estimating the size and concentration of unicellular microorganisms by light scattering. *Appl. Microbiol.*, 17,219-223, 1969
- 21) Takahashi, K. : Design of a calorimeter for the continuous study of heat production during anaerobic microbial growth. *Agr. Biol. Chem.*, 37(12),2743-2747,1973
- 22) Berridge, N. T., Cousins, C. M. and Cliffe, A. J. : Microcalorimetry applied to certain species of bacteria growing in sterilized separated milk. *J. Dairy Res.*, 41,203-215,1974
- 23) 宮川金二郎：食品腐敗の熱測定, 日食工誌, 27(11), 569-572, 1980
- 24) 木村郁夫, 杉本昌明, 藤田孝夫：DSCによる魚肉鮮度の測定, 熱測定, 14(1), 37-38, 1987
- 25) MacLeod, R. A., Light, M., White, L. A. and Currie, J. F. : Sensitive rapid detection method for viable bacterial cells. *Appl. Microbiol.*, 14(6),979-984,1966
- 26) Waters, J. R. : Sensitivity of the $^{14}\text{CO}_2$ radiometric method for bacterial detection. *Appl. Microbiol.*, 23(1),198-199,1972
- 27) Previte, J. J. : Radiometric detection of some food-borne bacteria. *Appl. Microbiol.*, 24,535-537,1972
- 28) Rowley, D. B., Previte, J. J. and Srinivasa, H. P. : A radiometric method for rapid screening of cooked foods for microbial acceptability. *J. Food sci.*, 43(6),1720-1722,1978
- 29) 厚生省環境衛生局：食品衛生検査指針 I 検査法別, 日本食品衛生協会, 東京, 1973
- 30) Oblinger, J. L. and Kennedy, J. E., Jr. : Evaluation of diluents used for total counts. *J. Milk Food technol.*, 39(2),114-116,1976
- 31) 金子精一：微生物検査データの統計処理, 衛生技術会, 東京1983

要 約

簡易菌数測定キット（ハイジカルト法）で得られた菌数から、公定法で得られる菌数を統計的に推定することの可能性について検討を試みた。ハイジカルト法、公定法で得られた生菌数、腸内細菌数（大腸菌群数）、酵母・カビ数を常用対数値に変換し、両法の菌数の関連を調べた。無相関の検定、回帰式の有用性の検定結果はいずれの菌数についても危険率1%で有意であり、回帰式による推定の妥当性が証明された。得られた回帰式はつぎのとおりであった。

$$\text{生菌数} \quad \hat{y} = -5.3403 + 3.5198x$$

$$\text{腸内細菌数} \quad \hat{y} = 2.1849 + 1.6616x$$

$$\text{酵母・カビ数} \quad \hat{y} = 2.2628 + 0.9086x \quad \text{ただし,} \\ x = \log_{10} x$$

相関係数は生菌数 0.90, 腸内細菌数 0.80, 酵母・カビ数 0.91で、いずれもかなり高い値を示し、機器分析法と比較し遜色のない結果を示した。したがって、本法で得られた菌数から、公定法で得られる菌数を推定することが可能と思われる。