乳・乳製品の損傷大腸菌群の検出法

(昭和 50 年 11 月 12 日受理)

松 本 昌 雄* 神 保 勝 彦*
村 上 一* 春 田 三佐夫*Detection Method for Injured Coliform Organisms
in Milk and Dairy ProductsMasao MATSUMOTO, Katsuhiko JINBO, Hajime MURAKAMI
and Misao HARUTA(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
24-1, Hyakunin-cho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo)

Coliform organisms have been widely used in assessing the sanitary quality of foods. However, when a population of coliforms in food is exposed to some environmental strains, a part of the cells may become injured. In this case, the use of the conventional selective media is often unsuited to detect injured coliforms. Thus, an appropriate method to resuscitate the injured cells is required. In this study, suspensions of *Escherichia coli* ($10^8 \sim 10^9/\text{ml}$) were treated by heating at 63°C for 10 min or freezing at -70°C for 5 min, and were used for the experiment. A comparison of the recovery of the organism was made on tryptic soy agar (TSA), violet red bile agar (VRBA), desoxycholate agar (DA), VRBA with TSA and DA with TSA. Consequently, among the selective media used, VRBA or DA with TSA gave higher counts than the VRBA or the DA alone. In addition to this, when 5 samples of commercial ice cream were studied, generally VRBA or DA with TSA have yielded a higher number of coliforms. Therefore, the surface-overlay with VRBA or DA on TSA plate was found to be a useful method for the recovery and enumeration of injured coliforms.

(Received November 12, 1975)

近年、我が国の乳・乳製品は乳質改善、施設の近代化、衛生管理、ならびに低温流通の徹底などによって細菌学的品質が著しく向上し、大腸菌群、黄色ブドウ球菌はもちろんのこと生菌数さえも 1 ml 当たり 10 以下のものが多く、他の一般食品とは比較にならないほどきわめて衛生的な安全性の高い食品である。

このように衛生水準が向上し、しかも製造・加工・保存の技術が複雑多様化してくると従来ほとんど食品衛生の分野では注目されなかった各種損傷因子、例えば加熱、乾燥、凍結、化学薬品などによる損傷菌の食品中での復活増殖が懸念されている。

そこで、仮にそれら損傷菌が伝染病原菌や食中毒起因

菌で回復増殖することがあるとすれば、予防衛生上あるいは品質管理上等閑視できない問題である。

しかしながら、従来から衛生細菌学の分野で採用されている検査法は、開発に当たって一応、非損傷菌を対象として検討されたものであると考えられる。そこで、損傷菌の回復に対処する意味で、損傷菌の復活を図るための検査法の開発が必要である。

現に国際酪農連盟¹⁾はすでにこの点を考慮して粉乳中の黄色ブドウ球菌検索用培地として損傷ブドウ球菌の検出率の高い ETGPA 培地を推奨している。

今回、著者らは汚染指標菌である大腸菌群の検索用培地として日常衛生管理に広く使用されているデソオキシコレート寒天と国際酪農連盟²⁾が推奨している violet red bile agar を対象に加熱あるいは凍結損傷大腸菌の

* 東京都立衛生研究所生活科学部：新宿区百人町 3-24-1

発育態度の比較検討, さらには損傷菌の修復剤として知られているトリプトン^{8)~9)}を応用しての検査法を開発し, 本法が従来法と比較して損傷大腸菌の検出率が高くなることを確認したので, その成績について報告する.

実験方法

1. 損傷菌

供試菌株は乳・乳製品から検出分離した *Escherichia coli* I 型および II 型の 2 株である. 損傷菌の調製に際してまず保存菌株をそれぞれ 35°, 24 時間ずつ 3 代にわたりハートインフュージョンブローに継代培養して 3 代目の 24 時間 (あるいは 48 時間) 培養菌液を 3,000 rpm, 20 分間遠沈して集菌し, これを滅菌生理食塩水で 3 回洗浄した後, これを滅菌蒸留水 1 ml 当たり $10^8 \sim 10^9$ 程度含有するように添加したものを供試菌液とした.

加熱損傷菌は, 上記供試菌液を $63 \pm 1^\circ$ に保持した恒温水槽に収めて 10 分間加熱した後, 水道水で室温程度に急冷して調製した. 一方, 凍結損傷菌は上記供試菌液をドライアイス・アセトン溶液で 5 分間急速凍結した後, 直ちに $10 \pm 1^\circ$ に保持した恒温水槽水に収めて解凍して調製した.

2. 培地および培養

榮研製のデソオキシコレート寒天 (DA), Difco 製の violet red bile agar (VRBA), tryptic soy agar (TSA) などを用いての直接混釈培養, ならびに下記の重層混釈培養を行った. すなわち, 径 9 cm のペトリ皿にあらかじめ TSA を 6~7 ml 注入して薄い寒天平板を作成しておき, その基層の上に試料と選択培地を定法どおり混釈して培養する方法である. TSA を基層とする DA および VRBA をそれぞれ TSA·DA, TSA·VRBA と略記する.

なお, 培養試料のうち, 加熱損傷菌の場合は前記の加熱供試菌液の原液 1 ml を, 凍結損傷菌の場合は前記の凍結・解凍供試菌液の 10^{-4} 希釈液 1 ml をそれぞれ検液とした.

損傷菌に対する各培地および培養法の比較は, 検液 1 ml ずつを 10 枚のペトリ皿に採り 35°, 20 ± 2 時間培養後測定した菌数の平均値で行った.

3. アイスクリームの大腸菌群検査

公定法⁹⁾に準拠しながら DA, VRBA, TSA·DA, TSA·VRBA の比較を試みた. これら 4 者間の比較は, 検液 1 ml ずつを 10 枚のペトリ皿に採り, 35°, 18 時間培養後, 測定した菌数の平均値で行った.

実験結果

E. coli I 型および II 型の非損傷菌, 加熱損傷菌, 凍結損傷菌について, それぞれの TSA による平均測定値を指数 100 として各培地による平均測定値を指数として Fig. 1~3 に示した.

1. 非損傷菌

E. coli I 型の TSA, DA, VRBA, TSA·DA, TSA·

Fig. 1. Effect of plating media on the colony count of untreated *E. coli*.

□, TSA; ■, DA; ▨, VRBA;
▤, DA with TSA; ▧, VRBA with TSA.

VRBA の測定値の平均は, それぞれ 103 (測定値の範囲 90~114, 以下カッコ内に測定値の範囲を示す), 72 (61~84), 77 (65~83), 94 (75~114), 88 (77~121) で, それらの換算指数は Fig. 1 に示したように 100, 70, 74, 91, 85 であった.

TSA と各培地の測定値間の有意差 ($p=0.05$, 以下同じ) について検討した結果, TSA·DA 以外は, 各培地とも有意差が認められた. 一方, DA と VRBA の両選択培地間に有意差は認められなかった.

DA と TSA·DA あるいは VRBA と TSA·VRBA の測定値間には, それぞれ有意差が認められた. これは, すなわち DA あるいは VRBA を単一で使用するよりも TSA を基層として, それらの培地を使用した方が, より高い測定値が得られることを示唆するものである.

E. coli II 型の TSA, DA, VRBA, TSA·DA, TSA·VRBA の測定値の平均は, それぞれ 84 (67~104), 45 (30~61), 80 (69~84), 82 (66~97), 86 (72~100) で, それらの換算指数は Fig. 1 に示したように 100, 53, 95, 97, 100 であり, TSA 測定値との間に有意差の認められた培地は DA のみであった. DA と VRBA, DA と TSA·DA の測定値間にそれぞれ有意差が認められたが, VRBA と TSA·VRBA 測定値間に有意差は認められなかった. なお, TSA·DA 測定値が DA 測定値の 2 倍を示したことは注目される.

2. 加熱損傷菌

E. coli I 型加熱損傷菌の TSA, DA, VRBA, TSA·DA, TSA·VRBA の測定値の平均は, それぞれ 55 (49~64), 22 (15~30), 21 (13~36), 36 (32~50), 31 (22~40) で, それらの換算指数は Fig. 2 に示したように 100, 40, 38, 65, 56 であった. TSA に対する DA および VRBA の測定値は共に 40% 程度であったが, TSA を基層として DA あるいは VRBA を使用すると, その割合が約 20% 上昇して TSA 測定値の 60% 程度となり, これらの間にはいずれも有意差が認められた.

Fig. 2. Effect of plating media on the colony count of heat-injured *E. coli*.

E. coli II 型加熱損傷菌の TSA, DA, VRBA, TSA·DA, TSA·VRBA の測定値の平均は、それぞれ 34 (27~39), 17 (13~22), 21 (13~33), 38 (34~43), 34 (27~39) で、それらの換算指数は Fig. 2 に示したように 100, 50, 61, 100, 100 であった。加熱損傷 *E. coli* II 型菌の各培地相互間の発育パターンは非損傷菌におけるパターンと同一傾向を示し、TSA に対する DA や VRBA などの測定値が 50~60% であったのに対して TSA·DA や TSA·VRBA などの測定値は 100%, すなわち TSA 測定値と同一であった。

3. 凍結損傷菌

E. coli I 型凍結損傷菌の TSA, DA, VRBA, TSA·DA, TSA·VRBA の測定値の平均は、それぞれ 127 (107~141), 3 (1~6), 5 (1~8), 32 (23~43), 27 (18~41) で、それらの換算指数は Fig. 3 に示したように 100, 3, 4, 25, 21 で非選択培地、選択培地、両培地の組み合わせ培地の 3 者間に顕著な差異が現れた。*E. coli* II 型 (24 時間培養供試菌) 凍結損傷菌も同様の傾向を示し、TSA, DA, VRBA, TSA·DA, TSA·VRBA の測定値の平均は、それぞれ 190 (158~209), 33 (25~44), 12 (9~22), 38 (26~46), 26 (13~36) で、それらの換算指数は 100, 17, 6, 20, 14 であった。同 48 時間培養供試菌の凍結損傷菌では、DA および VRBA の測定値の平均が 0.1 (0~0.1), 1.1 (0~4) であったのに対して TSA, TSA·DA, TSA·VRBA のそれはそれぞれ 247 (201~282), 214 (176~248), 262 (225~304) を

Fig. 3. Effect of plating media on the colony count of freeze-injured *E. coli*.

Fig. 4. Effect of selective media on the colony count of coliform bacteria in several ice cream.

示して、各損傷菌のうちでも培地相互間の差が最も顕著であった。すなわち、DA や VRBA などでは、ほとんど菌が検出されなかったのに対して TSA·DA や TSA·VRBA では 10^2 の桁の菌数が検出され、しかも非選択培地の TSA の測定値と同一であった。

4. アイスcreamの大腸菌群

アイスクリーム A~E の 5 検体について大腸菌群の検出を DA, VRBA, TSA·DA, TSA·VRBA などの培地を用いて行つて、その結果 DA 測定値の平均を、指数 100 として各培地による平均測定値を指数として Fig. 4 に示した。その結果、A~D の各検体の大腸菌群は、いずれも選択培地を単一で使用するよりも TSA を基層として使用した場合に多くなる傾向を示し、B, C, D 検体では 1~3 倍程度、A 検体では 10 倍多い菌数が測定された。しかし、E 検体では培地相互間の有意差は認められなかった。

考 察

乳・乳製品の製造には、冷蔵、加熱、時には乾燥あるいは冷凍などの処理が行われている。これらの処理により一部の細菌は死滅し、他の一部の細菌は非致死の損傷を被ることは当然予測される。これら物理的因子による損傷菌の出現および復活などについては、すでに数多くの基礎的研究がなされている。もし仮に、これら損傷菌が食中毒起因菌あるいは経口伝染病原菌ならば食品衛生上留意すべきことである。したがって、非損傷菌を対象として開発された従来の検査法で実施して得られた成績から食品の安全性を予測することは不十分と思われるので、損傷菌の存在を考慮した検査法の開発が必要と考えられる。

細菌学的品質管理を行うための参考資料の一つに大腸菌あるいは大腸菌群があり、本菌は一般に糞便あるいは環境汚染指標として広範に採用されている。従来、これらの検出培地として DA あるいは VRBA などが、日常一般に使用されているが、損傷大腸菌群の検出率は低

いといわれている^{7)~9)}。事実、今回行った実験からも損傷菌はもちろんのこと、*E. coli* I および II 型の非損傷菌でさえ非選択培地の50~70%しか検出できず、加熱あるいは凍結損傷菌に至っては、損傷の程度によって検出率は異なるが非選択培地の40~0.04%しか検出できなかった。

この事実ならびに損傷菌の食品中での復活などを考え合わせると従来の公定法⁹⁾に基づいて細菌学的品質および衛生管理を行ってはいは、指標菌そのものの意義すら失われがちであり、製品の安全性を絶対の自信をもって保証することはできない。特に乳・乳製品が乳幼児や病弱者の主食になっていることを認識するならば、一般食品以上にこの点を考慮して衛生管理を実施すべきであると考えられる。

そこで、著者らは損傷菌の検出率を高める実験の一端として損傷大腸菌に対する選択培地の影響並びに回復法の実用化について検討を行った。その結果、選択培地を単一で使用するよりも TSA を基層として使用すると非損傷菌では50~70%から90%以上に、加熱あるいは凍結損傷菌では損傷の割合によって異なるが、40~0.04%から100~25%に検出率がそれぞれ増加した。これは、損傷大腸菌に対して tryptic soy が修復物質あるいは修復促進物質として作用しているためと考えられる。

続いて、この TSA を基層とする混釈培養法の実用性について、加熱・凍結などの損傷菌の存在が予測されるアイスクリームを対象として大腸菌群の検出実験を試みた。その結果、一般に TSA を基層とする混釈培養法が公定法に比べて大腸菌群の検出率を高める傾向を示した。TSA の損傷修復効果は各アイスクリームによってそれぞれ異なり、TSA を基層とする混釈培養法による測定菌数が、公定法のそれよりも1けた高くなる場合もあれば、ほとんど変わらない場合もあるなど、その結果はさまざまであった。これは、アイスクリーム中の損傷大腸菌群の菌種による抵抗性ならびに損傷の軽重に起因しているものと考えられる。

このように、損傷修復効果が基礎実験におけるほど顕著にアイスクリーム全般に認められなかったのは、恐らくアイスクリームに含まれる乳成分自体の損傷保護ならびに修復あるいは修復促進効果に起因しているためと考えられる。いずれにしても、TSA を基層とする混釈法は公定法と比較して損傷大腸菌群の検出率が同等あるいはそれ以上、時には数オーダー高いレベルの菌数が得られることなどから考えて、乳・乳製品の衛生管理上、本法は十分に利用性があると考えられる。

なお、供試した5種のアイスクリームの生菌数は1ml当たり350~17,000であった。今回実験成績として示さなかった検体のうち、生菌数が1ml当たり10万以上を示し、しかも DA や VRBA 上にきわめて多数の白色

集落が発育して培地全体が変色しているものでは、TSA を基層とした DA や VRBA 培地での大腸菌群集落の識別はきわめて困難であった。

すなわち、大腸菌群集落の典型的な赤色（あるいは紫紅色）が退色したり、または集落の中心部がかすかに赤色（あるいは紫紅色）で周囲が帯黄白色（あるいは白色）を呈したからである。このように、TSA を基層とすることによって大腸菌群集落の識別が困難となるようでは、たとえ損傷大腸菌群の検出率が増加しても実用性に欠けるように思われる。しかし、我が国の乳・乳製品の細菌学的品質の現状から考えて、このように細菌汚染の著しい製品は、むしろまれであり、ほとんどのものは生菌数がきわめて少ないのが普通である。

また、食品衛生上、損傷大腸菌群の検出が問題となるからには、当然汚染菌数の少ない食品が対象となるはずである。

これらの観点から、TSA を基層とする選択培地の混釈培養法は、乳・乳製品の大腸菌群検査法として十分に利用価値があり、実用性に富むものと考えられる。

要 約

E. coli I 型および II 型の非損傷菌、加熱損傷菌および凍結損傷菌を用いて、DA、VRBA に対する発育態度ならびに TSA を基層とする選択培地の混釈培養法について検討を行った。その結果、TSA を基層とする培養法は、DA あるいは VRBA を単一に使用する従来法に比べて損傷菌の検出率が高く、従来法の数倍から数千倍を示した。

さらに、アイスクリームを対象に TSA を基層とする培養法の実用性について検討を試みた。その結果、基礎実験と同様に大腸菌群の検出率が、公定法に比べて高くなる傾向を示した。

これらのことから、TSA を基層とする DA（あるいは VRBA）の培養法は、乳・乳製品の大腸菌群検査に大いに利用性があると考えられる。

文 献

- 1) IDF: E-Doc-5 (1970).
- 2) IDF: E-Doc-52 (1974).
- 3) Nelson, F.E.: J. Bacteriol., 48, 473 (1944).
- 4) Dabbah, R., Moats, W.A., Mattick, J.F.: J. Dairy Sci., 52, 608 (1969).
- 5) 森地敏樹, 矢野信礼: 食衛誌. 13, 29 (1972).
- 6) 厚生省: 食品衛生小六法, 49年版, p. 119 (1974) 東京.
- 7) Maxey, R.B.: J. Milk Food Technol., 33, 445 (1970).
- 8) Scheusner, D.L., Busta, F.F., Speck, M.L.: Appl. Microbiol., 21, 3, 46 (1971).
- 9) 矢野信礼, 森地敏樹: 食衛誌. 12, 408 (1971).