食品の細菌数測定法としてのスパイラル・ プレーティング法の評価

(昭和 61 年 11 月 25 日受理)

和田正道^{*1} 斎藤文一^{*2} 武政二郎^{*3}
真野 覚^{*4} 水谷 宏^{*5} 五十嵐英夫^{*6}
小沼博隆^{*7}

Evaluation of the Spiral Plating Method for Bacterial Determination in Foods

Masamichi WADA^{*1}, Bunichi SAITO^{*2}, Niro TAKEMASA^{*3}, Satoru MANO^{*4},
Hiroshi MIZUTANI^{*5}, Hideo IGARASHI^{*6} and Hirotaka KONUMA^{*7}

(^{*1}Nagano Research Institute for Health and Pollution: 1978, Komemura, Amori, Nagano, Japan; ^{*2}Japan Food Research Laboratories Osaka: 3-1, Toyotsu-cho, Suita-shi, Osaka, Japan; ^{*3}Japan Oilstuff Inspectors Corporation, General Testing Research: 1-10-4, Mikagezukamachi, Higashinada-ku, Kobe, Japan; ^{*4}Rokko Bio-scientific Research Laboratory Co., Ltd.: 730-5, Turugasone, Yashio-shi, Saitama, Japan; ^{*5}Laboratory of Q.P. Corporation: 5-2, Sengawa-cho, Chofu-shi, Tokyo, Japan; ^{*6}Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan; ^{*7}Department of Microbiology, National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

The spiral plating method and the pour plate method were compared in 7 laboratories for determining standard plate counts and numbers of coliforms in 5 samples each from the following 6 commercial foods; liquefied egg, pate for use with hamburger steaks, peeled shrimp, macaroni salad, minced pork, and rice ball. The 210 pooled pairs of data (as log₁₀ CFU/g) from the 7 laboratories were used to determine the standard plate counts and numbers of coliforms.

In determining standard plate counts, the regression line of data obtained by the pour

^{*1} 長野県衛生公害研究所: 長野県長野市大字安茂里字米村 1978

^{*2} 日本食品分析センター大阪支所: 大阪府吹田市豊津町 3-1

^{*3} 日本油料検定協会: 神戸市東灘区御影塚町 1-10-4

^{*4} 鹿光生物科学研究所: 埼玉県八潮市鶴ヶ曾根 730-5

^{*5} キューピー株式会社: 東京都調布市仙川町 2-5

^{*6} 東京都立衛生研究所: 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*7} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

plate method versus the spiral plating method was given by $Y=1.004X+0.025$, close to the theoretical line of equality. The correlation coefficient (r) also showed the relatively high value of 0.956. The replicate variances of both methods were not significantly different at the 5% level.

In determining numbers of coliforms, the regression line of data obtained by the pour plate method versus the spiral plating method was given by $Y=0.657X+0.973$ and the correlation coefficient (r) was 0.751. The replicate variances of both methods were not significantly different at the 5% level.

Although standard plate counts and numbers of coliforms were determined by the same procedure, the result of the latter was less satisfactory than that of the former, because the counted numbers of red colonies on desoxycholate agar plates were dependent on each worker's subjective judgement.

This study indicates that the spiral plating method can be used in place of the pour plate method in determining the number of bacteria in commercial foods.

(Received November 25, 1986)

Key words: スパイラル・プレーティング法 spiral plating method; 一般生菌数 standard plate counts; 大腸菌群数 number of coliforms; 混釈法 pour plate method; 相関分析 correlation analysis; 回帰分析 regression analysis; F 検定 F-test

緒 言

近年、医学領域の臨床検査などにおける自動化の影響を受け、微生物検査の自動化も盛んに試みられている。食品の細菌数の測定についても、検査の迅速化、省力化及び検査器具、器材などの節約を目的とした新しい測定方法の開発が盛んに行われている^{1),2)}。米国のFood and Drug Administration (FDA, 食品・医薬品局)で開発されたスパイラル・プレーティング法³⁾もその一つである。この方法は従来の混釈法や表面塗抹法による細菌数測定法を考え方の基礎として、簡易化、迅速化、省力化、自動化及び検査成績の精度の向上を目的として開発されたものである。

この細菌数測定法は、米国及び英国においては、すでに評価され実用化され始めている³⁾⁻¹⁶⁾。我が国においても、すでに相当数の装置が輸入され、食品関係を主とする研究及び検査機関などで使用されるようになった。しかし、我が国においては、この方法についての情報の多くは販売会社側からの提供によるもので、このスパイラル・プレーティング法を使用する側による評価¹⁷⁾⁻²¹⁾は十分にはなされていないのが現状である。

そこで今回、著者らは食品中の細菌数測定法としてのスパイラル・プレーティング法の評価を行うことを目的に、7か所の検査機関で、6種類の同一食品を試料として、一般生菌数と大腸菌群数をスパイラル・プレーティング法と混釈法で測定し、両方法で測定した値の一致性を検討した。また、スパイラル・プレーティング法の精度管理的な考え方から各機関で測定した値のばらつきについても比較検討したので報告する。

実験方法

1. 実験に参加した検査機関

長野県衛生公害研究所

日本食品分析センター大阪支所

日本油料検定協会

鹿光生物科学研究所

キュービー株式会社

東京都立衛生研究所

国立衛生試験所

2. 実験の時期

1984年10月

3. 装置、器材及び培地

1) スパイラル・プレーター

スパイラル・プレーター (Spiral Systems, Inc. 製)

は各検査機関に備えられている装置を用いた。今回の実験には、モデル B-250 型1台、C 型2台、D 型4台が使用された。

2) カウンティング・グリッド付コロニービュア

コロニービュア (Spiral Systems, Inc. 製) は各検査機関に備えられている器機を使用した。

3) ストマッカー 400

ストマッカー 400 (A. J. Seward Co. 製) は各検査機関に備えられている器機を使用し、食品粉碎用のポリ袋は Konuma ら¹⁸⁾の考案したフィルター付ストマッカー袋 (ストマフィルター: グンゼ産業製) を用いた。

4) チップ交換式マイクロピペット

試料の希釈を行うため、各検査機関に備えられている任意のチップ交換式マイクロピペットを使用した。

5) 滅菌プラスチックシャーレ

滅菌プラスチックシャーレは各検査機関で常用しているメーカーの製品を使用した。

6) 標準寒天培地及びデオキシコレイト寒天培地

供試した標準寒天及びデオキシコレイト寒天培地はそれぞれ同一メーカーの同一ロット（栄研化学製）の製品を用いた。

4. スパイラル・プレーティング法に使用する平板の調製

標準寒天培地は 121°, 15 分間、高圧滅菌後、デオキシコレイト寒天培地は加熱溶解後、その 20 ml ずつを滅菌プラスチックシャーレに分注して平板とし、表面を乾燥させてから使用した。

5. 供試食品

液卵、ハンバーガー用パティ、むきエビ、マカロニサラダ、豚挽肉及びおにぎりの 6 品目を用いた。

液卵とハンバーガー用パティ以外の各食品は均一になるように無菌的に十分混和後、滅菌ポリ袋に均等に分割し、シール包装して凍結した。各試料はドライアイスで冷凍した状態で各検査機関へ送付し、実験を行うまで -20° 以下のフリーザー内に保存した。

6. 細菌数の測定

供試食品は包装したまま流水で解凍後、直ちに無菌的に開封して実験に供した。各食品は Konuma ら¹⁸⁾の考案したフィルター付ストマッカー袋に 10 g ずつ秤量し、1 種類の食品から 5 検体を調製し、6 種類の食品で計 30 個の検体を調製した。秤量した各検体に滅菌生理食塩水 90 ml を加え、ストマッカーで処理し、10 倍希釈懸濁液を調製した。この懸濁液について、一般生菌数と大腸菌群数の測定を、スパイラル・プレーティング法と混釈法を用いて行った。

1) スパイラル・プレーティング法による細菌数の測定

食品の 10 倍希釈懸濁液と 1,000 倍希釈懸濁液の 2 種類を用いた。1,000 倍希釈懸濁液は、10 倍希釈懸濁液から、チップ交換式マイクロピペットで 100 μ l を分取し、10 ml の滅菌生理食塩水に加えて調製した。調製した食品の 10 倍及び 1,000 倍希釈懸濁液を、あらかじめ作製した各 3 枚の標準寒天平板及びデオキシコレイト寒天平板にプレーティングした。デオキシコレイト寒天平板では、プレーティング後、あらかじめ加熱溶解し、55° に保温した同培地を約 5 ml 重層した。

培養は標準寒天平板は 35°, 40 時間、デオキシコレイト寒天平板は 35°, 24 時間行った。

細菌数の測定はカウンティング・グリッドを備えたコロニービューを用い、集落数を肉眼で測定し、その集落数とスパイラル・プレーティング法による試料の塗布量から細菌数を算出する方法により行った。

2) 混釈法による細菌数の測定

各 10 倍希釈懸濁液を 10⁵ 倍まで 10 倍連続希釈し、各希釈段階の試料 1 ml ずつを 4 枚のシャーレに注加し、2 枚をあらかじめ高圧滅菌し 55° に保温した標準寒天培地で、残りの 2 枚をあらかじめ加熱溶解し 55° に保温し

たデオキシコレイト寒天培地で混釈した。固化後、両混釈平板共、調製後 55° に保温した同種類の培地をそれぞれ 5 ml ずつ重層した。

培養は標準寒天平板は 35°, 48 時間、デオキシコレイト寒天平板は 35°, 24 時間行った。

細菌数の測定は常法により行った。

7. 解析方法

解析は 1 検査機関当たり 30 検体の成績を 7 か所分集計した 210 検体の成績について行った。一般生菌数と大腸菌群数の成績に分けて、各成績ごとに、対応するスパイラル・プレーティング法と混釈法について、相関係数、スパイラル・プレーティング法から混釈法の成績を推定する回帰式、散布図にプロットした検査成績の 95% 以上が含まれる 95% 信頼区間及び両方法の分散を算出して比較検討した。大腸菌群数の場合、平板上に集落が検出できなかった検体の検査成績は解析から外した。細菌数はすべて常用対数に変換して解析を行った。

スパイラル・プレーティング法により測定された各平板の細菌数は次に述べる 2 方法によって検体の細菌数に計算され、混釈法との関連が別々に解析された。

第 1 の方法は検体ごとに得られた 10 倍及び 1,000 倍の希釈段階の各 3 平板のうち、細菌数の測定に適当な希釈段階の 3 平板の測定値を算術平均して各検体の細菌数とした。この細菌数を用いる解析は、スパイラル・プレーティング法を用いて、同一検体を 3 回検査して得られた結果の平均をとり、混釈法との関連を求めることを意味している。しかし、実際に日常業務としてスパイラル・プレーティング法を用いる場合は、1 枚の平板による検査が行われているので、このことを想定して混釈法との関連を求めたものが第 2 の方法である。すなわち、210 検体について、希釈が細菌数の測定に適当な 3 平板の測定値から、コンピューターを用いて、ランダムに 1 測定値を選択して、その検体の細菌数とした。得られた細菌数について第 1 の方法と同様の解析を行い、混釈法との関連を解析した。しかし、この方法はランダムに測定値を選択するため、算出される解析結果にばらつきを生じる。このばらつきの程度を調べるため、コンピューターで同じ操作を 1,000 回繰り返えし、各解析値の平均値及び 99% 信頼区間値を算出し、比較検討した。

混釈法による各検体の細菌数は、常法どおり、細菌数の測定に適当な希釈段階の 2 平板の測定値を算術平均した値とした。

実験結果

1. スパイラル・プレーティング法と混釈法との関連

横軸にスパイラル・プレーティング法の細菌数を、縦軸に混釈法の細菌数をとった一般生菌数の散布図を Fig. 1 に示した。同図には、データ数、相関係数 (r) 及びスパイラル・プレーティング法から混釈法のデータを推定する回帰式、回帰直線及び 95% 信頼限界を併記した。

Table 3. The Relation between Spiral Plating Method and Pour Plate Method in Determining Numbers of Coliforms

	Mean	99% Confidence interval
Correlation coefficient (r)	0.7457	0.7449~0.7465
Regression line (Y=aX+b): a	0.6274	0.6262~0.6285
: b	1.0959	1.0913~1.1004
95% Confidence interval of Y value	±0.7415	±0.7404~ ±0.7426
Variance	0.4433	0.4419~0.4446
F-ratio (calculated)	1.4162*	1.4117* ~1.4207*

*: Significance at the 5% level

One plate was selected at random from three spiral plates, and number of the colonies was counted.

The work was repeated thousand times for each sample, and the results were compared with those of pour plate method.

一般生菌数について、3平板の各測定値から、ランダムに1測定値を選択した場合のスパイラル・プレーティング法と混釈法との関連を、コンピューターで1,000回繰り返して算出した、各解析値の平均値と99%信頼限界をTable 2に示した。

Fig. 1に示した3平板の測定値の算術平均値を用いて解析した場合に比べて、相関係数、回帰式及び95%信頼限界には大きな変動は認められなかった。また、分散についても大きな変動は認められず、同様にF値の検定を行った結果、両方法の分散には有意差が認められなかった。

大腸菌群数について、3平板の各測定値から、ランダムに1測定値を選択した場合のスパイラル・プレーティング法と混釈法との関連を、コンピューターで1,000回繰り返して算出した、各解析値の平均値と99%信頼限界をTable 3に示した。

Fig. 2に示した3平板の測定値の算術平均値を用いて解析した場合に比べて、相関係数、回帰式及び95%信頼限界には大きな変動は認められなかった。しかし、分散については約10%の変動が認められ、F値の検定を行った結果、両方法の分散には有意差が認められた。

考 察

一般生菌数の測定については、スパイラル・プレーティング法を1検体につき3枚の平板を用いて行い、平均をとった場合に得られる混釈法との相関は、統計的な一般的基準からみて、相当高いと考えられる。さらに、回帰式は $Y=X$ に近接していると考えられる。以上の二点から、スパイラル・プレーティング法と混釈法によ

て得られる測定値は統計的にみて同一とみなせると考える。また、3平板の測定値から1測定値をランダムに選択した解析から、スパイラル・プレーティング法を平板1枚で行っても、混釈法と同一とみなせる測定値が得られると考えられる。両方法の精度の比較については、分散の検討において、スパイラル・プレーティング法の平均をとった場合と1測定値をランダムに選択した場合は共に、混釈法との間に有意差を認めないことから、スパイラル・プレーティング法と混釈法には差がないと認められる。

大腸菌群数の測定については、スパイラル・プレーティング法の3平板の測定値の平均をとった場合と3平板の測定値からランダムに1測定値を選択した場合は共に、混釈法の測定値との間に差が認められた。また、精度に関しても、3平板の測定値からランダムに1測定値を選択した場合には、混釈法の測定値との間に差が認められた。両方法の測定値に差が生じた理由は、大腸菌群数の測定の場合、デオキシコレイト寒天平板に発育した赤色集落のみを選択して数えるが、そのとき、集落の大きさ及び色調の違いに対する検査者の主観によって、大腸菌群として数えたり、数えなかったりすることに起因すると考えられる。この現象は、スパイラル・プレーティング法と混釈法で、同等に起り得ると考えられる。従って、それを補正するためには、あらかじめ集落の大きさ及び色調などの判定基準を決めて、検査者をトレーニングしておけば、より良い成績が得られると思われるが、根本的には、検査者の主観が入らないようにするため、発育した集落をすべて大腸菌群として数えられるような培地の積極的な開発が必要であると考えている。

以上の成績から、スパイラル・プレーティング法は、本質的に、混釈法の測定値と高い一致性が認められ、精度についても、混釈法との間で有意差が認められないと考えられる。

また、今回の実験は7か所の検査機関で、それぞれ異なった検査環境のもとで、異なった機種のスパイラル・プレーターを用いて検査した成績を比較検討したが、機種の違いによる影響は認められず、混釈法と同一とみなせる測定値が得られたことは、細菌数測定における、スパイラル・プレーティング法の再現性の高さを示すものである。

著者らの成績以外にも、菌液^{(3), (12)~(14), (17), (20)}、乳及び乳製品^{(3), (4), (7), (8), (14), (16)}、化粧品⁽⁶⁾及び一般の食品^{(6), (7), (11), (13), (14), (16)~(19)}などについて、スパイラル・プレーティング法と混釈法などによる細菌数の一致性を証明した成績が、数多くの研究者によって、報告されている。また、精度についても、混釈法などとの間に差が認められない成績^{(3), (4), (7), (8), (14)~(20)}が多数報告されている。

従って、スパイラル・プレーティング法が広く普及しても、混釈法に比べて、検査成績の差異や、精度の低下

が起るとは考えられず、将来、全国的規模で、食品の細菌数検査が実施されるようなことが生じたとき、混釈法に比べて、迅速性、省力性及び省資材性に優れる^{4), 7), 14), 18), 20)} スパイラル・プレーティング法は非常に有効になってくるように思われる。

著者らの7検査機関の検査成績はその可能性を示唆しているものと考えている。

要 約

7か所の検査機関において、6種類の食品の一般生菌数と大腸菌群数の測定を、スパイラル・プレーティング法と混釈法を用いて行い、その成績を統計的に比較検討した。

一般生菌数については、両方法の測定値及び精度には有意差は認められない。

大腸菌群数については、両方法の測定値及び精度には有意差が認められた。この原因は、デオキシコレイト寒天培地を用いる集落数の測定に、検査者の主観が入ることに起因すると考えられる。この現象は両方法で同等に起ると考えられる。

これらの成績から、スパイラル・プレーティング法は、本質的に、混釈法の測定値と高い一致性が認められ、精度については、混釈法との間に有意差が認められないと考えられる。

実験は、7か所の検査機関で、それぞれ異なった機器を用いて行われたが、混釈法と同一とみなせる測定値が得られた。このことは、スパイラル・プレーティング法の再現性の高さを示すと考えられる。

以上の成績及び考察に、これまでに報告された迅速性、省力性及び省資材性に優れる点を加えると、将来、スパイラル・プレーティング法は非常に有効になってくると思われる。

本報告の要旨は日本食品衛生学会第49回学術講演会(1985年5月、東京)において発表した。また、本研究は「昭和59年度厚生科学研究費補助金」の交付を受けて行った。

謝 辞

本研究を行うに当たり、ハンバーグ用のパティを頂いた埼玉県衛生研究所 徳丸雅一先生、並びに、御協力頂いたグンゼ産業(株)理化学機器部の皆様に深謝します。

文 献

- 1) 森地敏樹: 食品衛生研究 **34**, 23~38 (1984).
- 2) 春田三佐夫, 坂崎利一, 森地敏樹編: “食品微生物検査の簡易化, 自動化, 迅速化” (1984) サイエンスフォーラム.
- 3) Gilchrist, J. E., Campbell, J. E., Donnelly, C.

- B., Peeler, J. T., Delaney, J. M.: Appl. Microbiol. **25**, 244~252 (1973).
- 4) Donnelly, C. B., Gilchrist, J. E., Peeler, J. T., Campbell, J. E.: Appl. Environ. Microbiol. **32**, 21~27 (1976).
- 5) Assoc. Off. Anal. Chem.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **60**, 493~494 (1977).
- 6) Gilchrist, J. E., Donnelly, C. B., Peeler, J. T., Campbell, J. E.: *ibid.* **60**, 807~812 (1977).
- 7) Jarvis, B., Lach, V. H., Wood, J. M.: J. Appl. Bacteriol. **43**, 149~157 (1977).
- 8) Peeler, J. T., Gilchrist, J. E., Donnelly, C. B., Campbell, J. E.: J. Food Protect. **40**, 462~464 (1977).
- 9) American Public Health Association: “Standard Methods for the Examination of Dairy Products 14th ed.” p. 317~324 (1978).
- 10) Food and Drug Administration, Division of Microbiology: “Bacteriological Analytical Manual for Foods 5th ed.” p. IV-5~IV-9 (1978).
- 11) Baumgart, J.: Fleischwirtschaft **58**, 465~466 (1978).
- 12) Hedges, A. J., Shannon, R., Hobbs, R. P.: J. Appl. Bacteriol. **45**, 57~65 (1978).
- 13) Gerats, G. E., Snijders, J. M. A.: Fleischwirtschaft **59**, 256~258 (1979).
- 14) Kramer, J. M., Kendall, M., Gilbert, R. J.: European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **6**, 289~299 (1979).
- 15) Griffiths, M. W., Phillips, J. D., Muir, D. D.: J. Soci. Dairy Technol. **33**, 8~10 (1980).
- 16) Zipkes, M. R., Gilchrist, J. E., Peeler, J. T.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **64**, 1465~1469 (1981).
- 17) 五十嵐英夫: メディアサークル **27**, 98~111 (1982).
- 18) Konuma, H., Suzuki, A., Kurata, H.: Appl. Environ. Microbiol. **44**, 765~769 (1982).
- 19) 和田正道, 村松紘一, 小林正人, 笹井貞雄: 食品と微生物 **1**, 137~142 (1984).
- 20) 小沼博隆, 尾上洋一, 倉田 浩: 衛生試験. **102**, 49~54 (1984).
- 21) 春田三佐夫, 坂崎利一, 森地敏樹編: “食品微生物検査の簡易化, 自動化, 迅速化” p. 27~36 (1984) サイエンスフォーラム.