

## 新たに導入された腸内細菌科菌群試験法の検討

下島 優香子<sup>a</sup>, 井田 美樹<sup>a</sup>, 石塚 理恵<sup>a</sup>, 猪股 光司<sup>a</sup>, 高野 智香<sup>a</sup>, 黒田 寿美代<sup>a</sup>,  
高橋 正樹<sup>a</sup>, 尾畑 浩魅<sup>a</sup>, 仲真 晶子<sup>a</sup>, 甲斐 明美<sup>b</sup>

2011年10月1日に生食用食肉（内臓肉を除く牛肉）の規格基準が新たに施行され、成分規格として「腸内細菌科菌群陰性」が設定された。腸内細菌科菌群は国内で初めて採用された指標菌であることから、規格基準案が示された際に腸内細菌科菌群試験を実務に対応させるために検討するとともに、食肉等を対象として試験を行い、従来の衛生指標菌との検出状況を比較した。

腸内細菌科菌群試験において、VRBG寒天培地上の集落は菌種や培地メーカーにより色調や形態に差異が認められたため、釣菌する集落の選択には注意が必要であると考えられた。また、ブドウ糖発酵試験では、一般的に使用されるOF培地と同様に、より安価で使いやすいアンドレード半流動培地を用いても明確な判定が可能であった。

食肉等69検体を供試して衛生指標菌の試験を行った結果、腸内細菌科菌群は65検体（94.2%）で陽性となった。腸内細菌科菌群陽性の65検体中23検体（35.4%）は、糞便系大腸菌群、大腸菌いずれも陰性であった。腸内細菌科菌群陰性の4検体は、他の指標菌も陰性であった。今回の結果から「腸内細菌科菌群陰性」は従来の衛生基準と比較し、より厳しい基準と考えられた。

**キーワード：**腸内細菌科菌群, Enterobacteriaceae, 生食用食肉, 衛生指標, 糞便系大腸菌群, fecal coliforms, 大腸菌, *Escherichia coli*, バイオレットレッド胆汁ブドウ糖寒天培地, VRBG寒天培地

### はじめに

食肉の生食のリスクを軽減するため、1998年に「生食用食肉等の安全性確保について」が厚生省から通知され、生食用食肉の衛生基準が示された<sup>1)</sup>。しかし、この通知は安全な食品を提供するためのガイドラインであり、基準に不適合であっても直ちに食品衛生法違反として処分されるものではなかった。その状況下で2011年4月、衛生基準が十分に遵守されずに提供されたユッケを原因とする大規模な腸管出血性大腸菌O111食中毒（死亡者5名）が発生した。この事例を契機に、同年9月に生食用食肉（牛肉であって内臓肉を除く）の規格基準が新たに設定（2011年10月1日施行）された<sup>2)</sup>。

この規格基準では、加工基準、調理基準のほか、「腸内細菌科菌群が陰性でなければならない」という成分規格が示された。腸内細菌科菌群は、コーデックスやEUで微生物基準に既に採用されている指標菌であり、その試験法はISO法として国際的に実績のある試験法である<sup>3)</sup>。本成分規格においては、生食用食肉の危害要因である腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌をコントロールする衛生指標として、腸内細菌科菌群が採用されている<sup>4)</sup>。しかし、腸内細菌科菌群試験は国内で初めて採用される試験法であることから、規格基準案<sup>5)</sup>が同年7月6日に厚生労働省の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒・乳肉水産食品部会で取りまとめられた直後に、実務に対応するための検討

を行った。さらに食肉等を対象として腸内細菌科菌群、従来の衛生指標菌（糞便系大腸菌群および大腸菌）、サルモネラ属菌および腸管出血性大腸菌の試験を行い、検出状況を比較した。これらの検討結果について報告する。

### 材料と方法

#### 1. 腸内細菌科菌群試験培地の検討

##### 1) バイオレットレッド胆汁ブドウ糖（VRBG）寒天培地

4社から市販されているVRBG寒天培地（A, B, C, D社）に、大腸菌, サルモネラ属菌, *Klebsiella*, *Acinetobacter* 各1菌株を画線塗抹して、形成された集落を観察した。

##### 2) ブドウ糖発酵試験

ブドウ糖発酵試験には、ブドウ糖非分解の菌（非分解菌）として *Stenotrophomonas maltophilia*, ブドウ糖を酸化的に分解する菌（酸化菌）として *Pseudomonas* および *Acinetobacter*, ブドウ糖を発酵的に分解する菌（発酵菌）として *E. coli* および *Klebsiella* を供試して、OF培地とアンドレード半流動培地を用いて比較検討した。OF培地はOF基礎培地（栄研化学）に1%ブドウ糖を添加して、アンドレード半流動培地はアンドレードペプトン水（OXOID）に1%ブドウ糖および0.3%寒天を添加して、それぞれ小試験管に3.5mLずつ分注して作製した。OF培地には供試菌1株

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

につきそれぞれ2本ずつ穿刺し、うち1本はそのまま培養（好気状態）、1本にはミネラルオイルを重層して（嫌気状態）培養した。アンドレード半流動培地は供試菌1株につき1本に穿刺して培養を行った。培養後、OF培地で供試菌のブドウ糖分解性を確認するとともに、アンドレード半流動培地での反応を観察した。

## 2. 衛生指標菌および食中毒菌の検出

### 1) 供試検体

2011年8月から9月に都内の小売店で購入したローストビーフ17検体、タタキ・ユッケ用食肉2検体、馬刺し用食肉2検体、牛レバー6検体、挽肉32検体（牛挽肉16検体、豚挽肉8検体、合挽き肉7検体、鶏挽肉1検体）、成型・結着肉9検体、牛カルビ1検体の計69検体を供試した。

### 2) 腸内細菌科菌群の検出

供試検体25 gに緩衝ペプトン水（BPW；OXOID）225 mLを加えて37°Cで20時間前増菌し、その培養液1 mLを緩衝ブリリアントグリーン胆汁ブドウ糖ブイヨン（EEブイヨン；A、B社）10 mLに植えつぎ、37°Cで22時間培養し

た。その培養液をVRBG寒天培地（A、B社）に分離培養した。赤またはピンク色の集落を、それらの集落がない場合は無色の集落を3集落釣菌し、オキシダーゼ試験陰性およびブドウ糖発酵試験陽性を確認して腸内細菌科菌群陽性<sup>3)</sup>とした。オキシダーゼ試験はチトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙（日水）を用いて、ブドウ糖発酵試験はアンドレード半流動培地を用いて行った。

なお供試検体のうち1検体（牛挽肉）については更にC社のVRBG寒天培地にも分離培養し、併せて形成された集落の観察を行った。

### 3) 糞便系大腸菌群の検出

供試検体25 gのペプトン食塩緩衝液による10倍乳剤を3本の2倍濃度EC培地発酵管（日水）10 mLに等量加えて44.5°Cで22時間培養した。ガスを産生した試験管の培養液をEMB培地に画線塗抹し35°Cで22時間培養後、赤色または金属様光沢を示したコロニーについて乳糖ブイヨン発酵管でのガス産生とグラム陰性桿菌であることを確認し、糞便系大腸菌群陽性とした<sup>1)</sup>。

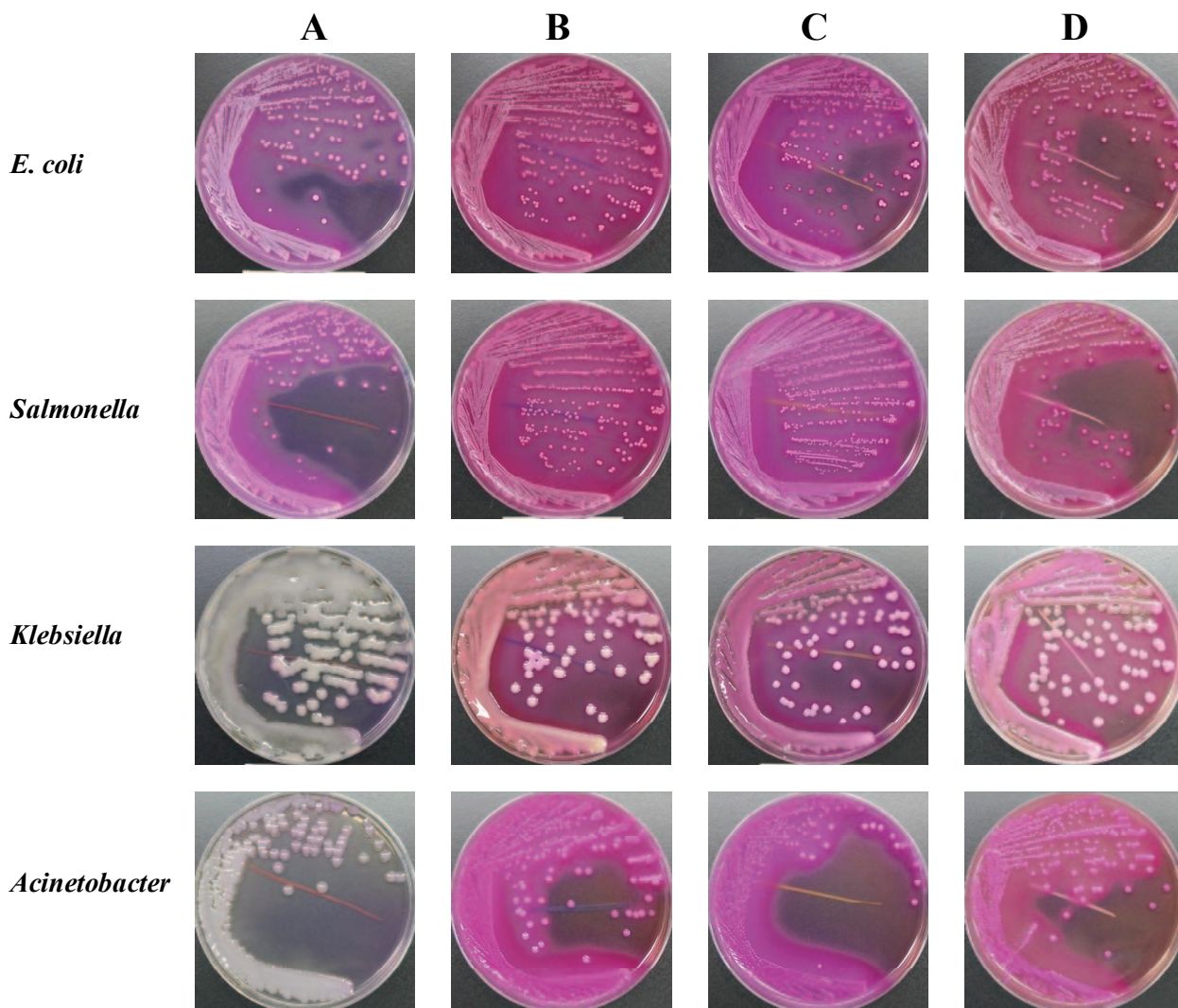


Fig. 1. Bacterial Colonies on Various VRBG Agar Plates

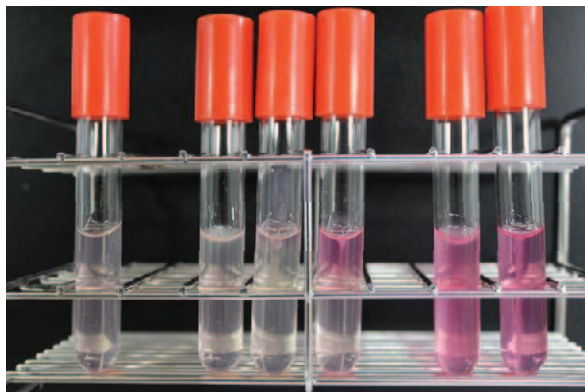
A- D: VRBG Agar produced by A, B, C, D Companies

#### 4) 大腸菌の検出

供試検体25 gのBPW培養液1 mLをEC培地発酵管10 mLに加えて44.5°Cで22時間培養した。ガスを産生した試験管の培養液をEMB培地に画線塗抹し35°Cで22時間培養後、赤色または金属様光沢を示した集落について乳糖ブイオン発酵管でのガス産生とグラム陰性桿菌であることを確認した後、IMViC試験でパターンが「+ + - -」であった場合に大腸菌陽性とした<sup>6)</sup>。

#### 5) サルモネラ属菌の検出

上記腸内細菌科菌群の検出に用いたBPW培養液0.1 mLをRappaport-Vassiliadis (RV) 培地10 mLに、1 mLをTetrathionate (TT) 培地10 mLに接種し、42°Cで20時間培養した。その培養液をSS寒天培地 (栄研化学)、DHL寒天



N 1 2 3 4 5

Fig. 2. Results of Glucose Fermentation Test using Andrade Peptone Water (OXOID) supplemented with Glucose (1%) and Agar (0.3%, w/v)

N: Not Inoculated

1: *Stenotrophomonas maltophilia*, Glucose not metabolized

2: *Pseudomonas*, Oxidative

3: *Acinetobacter*, Oxidative

4: *E. coli*, Fermentative

5: *Klebsiella*, Fermentative

Table 1 A. Detection of Enterobacteriaceae

Entero-bacteriaceae	No. of samples	Positive colonies /Tested colonies	No. of samples
Positive	65	3/3 <sup>a</sup> 1/3- 3/3 <sup>b</sup>	56 9
Negative	4	0/3 <sup>a</sup> - <sup>c</sup>	1 3
Total	69		69

<sup>a</sup> Same signs with all combinations of EE broth and VRBG agar

<sup>b</sup> Variable with combinations of EE broth and VRBG agar

<sup>c</sup> No colonies by all combinations of EE broth and VRBG agar

培地 (日水)、ESサルモネラ II 寒天培地 (栄研化学) に画線塗抹し、サルモネラ属菌の検出を行った<sup>6)</sup>。

#### 6) 腸管出血性大腸菌の検出

供試検体25 gにノボビオシン加mECブイオン (栄研化学) を225 mL加えて42°Cで20時間培養した。その培養液についてペロ毒素産生遺伝子を検出するリアルタイムPCRによるスクリーニングを行った。更にO157およびO26については免疫磁気ビーズで集菌し、分離培養を行った<sup>6,7)</sup>。

### 結果及び考察

#### 1. 腸内細菌科菌群試験培地の検討

##### 1) VRBG寒天培地上の集落

4社の培地メーカーのVRBG寒天培地上に発育した4菌種 (大腸菌, サルモネラ属菌, *Klebsiella*, *Acinetobacter*) の集落をFig. 1に示した。腸内細菌科である大腸菌とサルモネラ属菌はいずれのメーカーの培地においても赤からピンク色の固めの集落を形成した。*Klebsiella*は腸内細菌科であるが、ピンク色から薄いピンク色のムコイド状の集落を形成した。*Acinetobacter*は腸内細菌科ではなく、ブドウ糖を酸化的に分解する菌であるが、A社では薄いピンク色、他の3社では濃いピンク色を示し、腸内細菌科菌群と類似の色調であった。

VRBG寒天培地上で腸内細菌科菌群の典型集落は赤色からピンク色とされているが、形状の異なる複数の集落が認められた場合は、それぞれに独立集落を釣菌すること、特徴的な集落が存在しない場合、白みがかった集落を釣菌することが必要であると考えられた。

##### 2) ブドウ糖発酵試験

OF培地で、発酵菌は好気状態および嫌気状態のいずれの試験管においても下部まで黄変、酸化菌は好気状態で培地上部のみ黄変、嫌気状態では変化なし、非分解菌は好気状態で培地上部が青変、嫌気状態では変化なしの反応を確認した。

一方、アンドレードペプトン半流動培地においては、発酵菌は培地の下部まで赤変、酸化菌は培地上部のみ赤変、

Table 1 B. Positive rates of nine samples varied with combinations of EE broth and VRBG agar

Positive colonies /Tested colonies	No. of samples			
	A <sup>a</sup> →A <sup>b</sup>	A→B	B→A	B→B
3/3	8	6	6	3
2/3	1	3	3	4
1/3	0	0	0	2
Subtotal	9	9	9	9

Combination of EE broth (a) and VRBG agar (b)

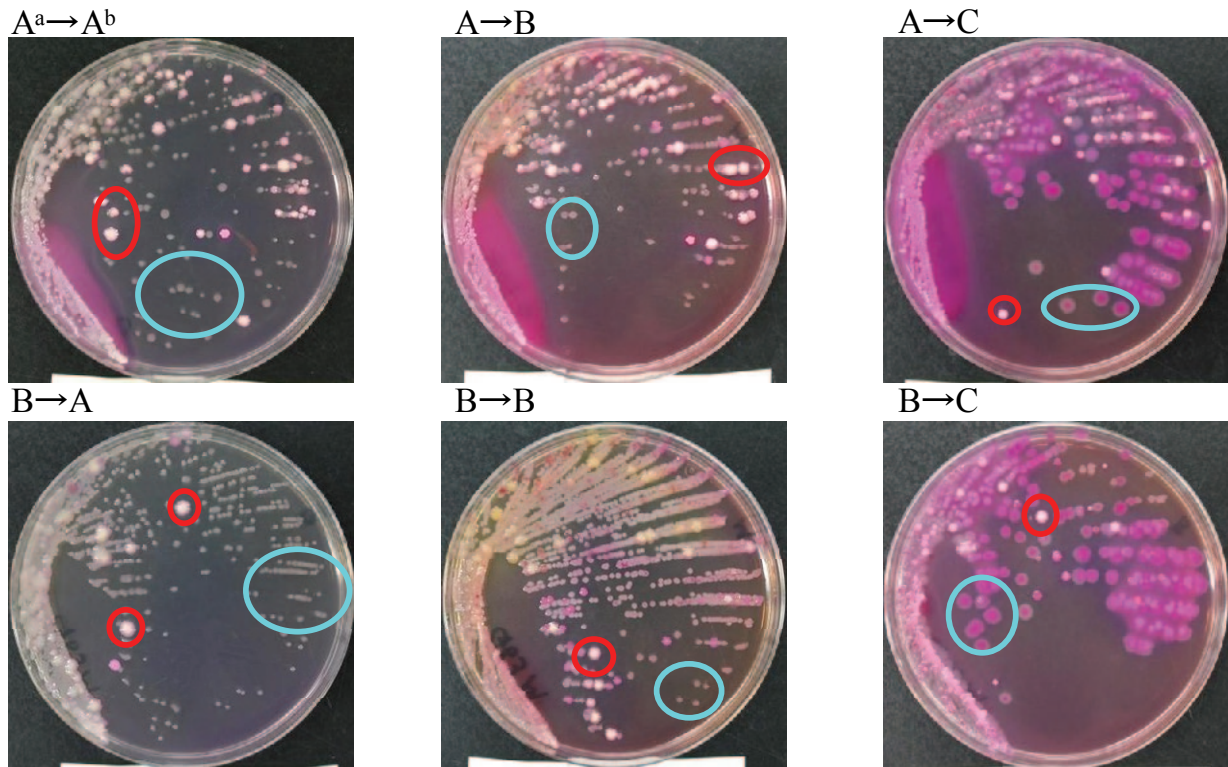


Fig. 3. Colonies on VRBG Agar after Enrichment of EE Broth,

Each Combinations of EE broth (a) and VRBG agar (b) are shown on the photograph  
A, B, C: Each companies products, Blue circle: *Pseudomonas*, Red circle: *Klebsiella*

非分解菌は変化なしであった (Fig. 2). それぞれ1本に穿刺してミネラルオイルを重層せずに試験をしたが、培地上部で好気状態、培地下部で嫌気状態の反応を見ることができた. アンドレード半流動培地はより安価で使いやすく、OF培地と同様に発酵菌、酸化菌、非分解菌が明確に判定可能であった. この検討結果により、本成分規格の試験法 (通知法) におけるブドウ糖発酵試験に使用する培地として、OF培地に加えてアンドレード半流動培地も採用された<sup>8)</sup>.

## 2. 腸内細菌科菌群検出状況

BPWで増菌した後、A社およびB社のEEブイヨンに植え継ぎ、その後それぞれA社およびB社のVRBG寒天培地に画線塗抹したが、いずれの組合せでも試験の成績は同一となり、69検体のうち65検体が陽性であった. しかし、組合せにより、釣菌した3集落の陽性率が異なった検体が9検体あった (Table 1 A). その9検体の内訳をTable 1 Bに示した. 今回の検討ではA社のEEブイヨンからA社のVRBG寒天培地に分離した場合が最も陽性率が高かった.

釣菌した集落のうち腸内細菌科菌群でなかった菌種は、*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*等であった.

今回の供試検体のうち1検体 (牛挽肉) については3社 (A, B, C社) のVRBG寒天培地に分離培養した. 形成された集落の写真をFig. 3に示した. いずれの培地においても腸内細菌科菌群は赤からピンク色の集落を形成するが、

*Klebsiella* (腸内細菌科) は白っぽいピンク色の集落を形成した. また、腸内細菌科ではない*Pseudomonas*は、A社およびB社の培地では無色の集落を形成したが、C社の培地では濃いピンク色の集落を示した. 以上のことから、VRBG寒天培地上の集落の選定には、使用する培地メーカーの特徴や各菌種の集落形状を事前に確認しておくことの必要性が示唆された.

## 3. 衛生指標菌検出状況

供試検体69検体の腸内細菌科菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌の検出状況をTable 2に示した. 腸内細菌科菌群は69検体のうち65検体 (94.2%) が陽性であった. 検体の種類ごとにみると、ローストビーフでは17検体中13検体 (76.5%) が陽性であったが、その他の52検体では全てが陽性となった. 特定加熱食肉製品であるローストビーフ、今回の規格基準の対象となるタタキ・ユッケ用食肉 (検査時は規格基準施行以前)、今回の規格基準の対象外であるが従来の生食用食肉の衛生基準の対象となる馬刺し用食肉のような、そのまま食べる食品においても、腸内細菌科菌群は高率に陽性となった.

一方、糞便系大腸菌群は、69検体中22検体 (31.9%) が陽性、大腸菌は38検体 (55.1%) が陽性であり、腸内細菌科菌群と比べて低い陽性率であった. そのまま食べる食肉等 (ローストビーフ、タタキ・ユッケ用食肉、馬刺し用食肉) において、糞便系大腸菌群陽性は21検体中2検体

Table 2. Detection of Indicator Organisms from Meets and Meet Products

	No. of samples examined	No. of positives (%)		
		Enterobacteriaceae	Fecal coliforms	<i>Escherichia coli</i>
Roast beef	17	13 (76.5)	1 (5.9)	0
Raw beef	2	2 (100)	1 (50.0)	0
Raw horse	2	2 (100)	0	0
Liver (beef)	6	6 (100)	4 (66.7)	6 (100)
Minced meat	32	32 (100)	15 (46.9)	26 (81.3)
Molding meat	9	9 (100)	1 (11.1)	6 (66.7)
Chuck rib (beef)	1	1 (100)	0	0
Total	69	65 (94.2)	22 (31.9)	38 (55.1)

(9.5%), 大腸菌陽性は0検体であり, いずれも低い検出状況であった。

糞便系大腸菌群の検出率 (31.9%) は大腸菌 (55.1%) よりも低かったが, この理由はそれぞれの試験方法の違いによるものと推定される。大腸菌の試験方法は検体25gが供試されるのに対して, 糞便系大腸菌群は10倍乳剤30 mL, すなわち検体3 g相当と, 実質供試される検体量が少ない試験法である。一方, 糞便系大腸菌群陽性で大腸菌陰性の検体が3検体 (ローストビーフ, ユッケ用食肉, 牛挽肉) あった。そのうち2検体 (ローストビーフ, ユッケ用食肉) は大腸菌の試験においてIMViC試験により陰性となり, 1検体 (牛挽肉) は雑菌が優勢で大腸菌が疑われる集落を釣菌することができなかった。

衛生指標菌検出状況の相互関係をTable 3に示した。69検体中腸内細菌科菌群が陽性で, 他の指標菌の両方あるいはいずれか一方が陽性の検体は42検体であった。しかし, 腸内細菌科菌群が陽性であっても, 他の指標菌がいずれも陰性となる検体が23検体あった。その内訳はローストビーフ12検体, 挽肉4検体, 成型・結着肉3検体, 馬刺し用食肉2検体, 牛タタキ用食肉1検体, 牛カルビ1検体であった。また, 腸内細菌科菌群陰性の4検体は, 他の指標菌もいずれも陰性であった。これらのことから, 腸内細菌科菌群が陰性であることは, 従来の衛生基準と比較してより厳しい基

Table 3. Comparison on the Detection of Indicator Organisms from Meets and Meet Products

Entero-bacteriaceae	Fecal coliforms	<i>Escherichia coli</i>	No. of samples	Subtotal
+	+	+	18	42
+	+	-	4	
+	-	+	20	
+	-	-	23	23
-	-	-	4	4

+: Positive, -: Negative

準であることが示唆された。

#### 4. 食中毒菌検出状況

サルモネラ属菌は鶏挽肉1検体から検出され, その検体は腸内細菌科菌群, 糞便系大腸菌群, 大腸菌の全ての汚染指標菌が陽性であった。

また, 腸管出血性大腸菌は69検体全て陰性であった。

今回は食中毒菌の検出が少なかったが, 少なくとも食中毒菌が陽性であった1検体は腸内細菌科菌群陽性であり, 腸内細菌科菌群の検査の目的 (腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌をコントロールする衛生指標) と一致した。

#### ま と め

1. 腸内細菌科菌群検査において, VRBG寒天培地上の集落は菌種や培地メーカーにより色調や形態に差異が認められたため, 釣菌する集落を選択する際に注意が必要であると考えられた。

2. ブドウ糖発酵試験は, より安価で使いやすいアンドレード半流動培地においてもOF培地と同様に明確な判定が可能であった。本検討により, 通知法のブドウ糖発酵試験に用いる培地としてOF培地に加えてアンドレード半流動培地も採用された。

3. 食肉および食肉製品69検体について腸内細菌科菌群, 糞便系大腸菌群, 大腸菌の衛生指標菌検査を行った。その結果, 腸内細菌科菌群陽性の65検体中23検体 (35.4%) は, 糞便系大腸菌群および大腸菌のいずれも陰性であった。また, 腸内細菌科菌群陰性の4検体は他の指標菌も陰性であった。「腸内細菌科菌群陰性」は従来の衛生基準と比較し, より厳しい基準と考えられた。

4. サルモネラ属菌が検出された1検体は, 腸内細菌科菌群, 糞便系大腸菌群, 大腸菌の衛生指標菌はいずれも陽性であった。

謝 辞 本調査を実施するにあたりご協力いただいた都・区保健所の皆様に深謝します。

## 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長：生衛発第1358号，生食用食肉等の安全性確保について（通知），1998.
- 2) 厚生労働省：告示第321号，食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件（告示），2011.
- 3) Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae- Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment (ISO 21528-1), 2004, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発0912第7号，食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について（通知），2011.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発0801第2号，生食用食肉等の安全性確保について（通知），2011.
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発0620第2号，平成23年度食品の食中毒菌汚染実態調査の実施について（通知），2011.
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全科長：食安監発第1102004号，腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について（通知），2006.
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発0926第1号，生食用食肉の腸内細菌科菌群の試験法について（通知），2011.

**Studies on the Examination of Newly Introduced Enterobacteriaceae Microbiological Standard in Japan**

Yukako SHIMOJIMA<sup>a</sup>, Miki IDA<sup>a</sup>, Rie ISHITSUKA<sup>a</sup>, Mitsushi INOMATA<sup>a</sup>, Chika TAKANO<sup>a</sup>, Sumiyo KURODA<sup>a</sup>,  
Masaki TAKAHASHI<sup>a</sup>, Hiromi OBATA<sup>a</sup>, Akiko NAKAMA<sup>a</sup> and Akemi KAI<sup>a</sup>

The microbiological standard “Enterobacteriaceae-negative” for raw meat came into effect as of October 1, 2011. Since Enterobacteriaceae had not used as an indicator organism in Japan, we studied the examination of Enterobacteriaceae.

The color and morphology of colonies of Enterobacteriaceae and other bacteria families on violet red bile glucose agar were varied. The Andrade peptone semisolid medium used in this study was suggested to be as convenient, economical, and useful as OF medium in the glucose fermentation test.

Indicator organisms; Enterobacteriaceae, fecal coliforms, and *Escherichia coli*, were examined in 69 meats and meat products. Enterobacteriaceae was isolated from 65 of the 69 samples. Twenty-three of the 65 Enterobacteriaceae-positive samples were negative for fecal coliforms and *E. coli*. The 4 Enterobacteriaceae-negative samples were also negative for the other indicator organisms.

This study suggests that “Enterobacteriaceae-negative” is a stricter standard than other conventional indicator organisms.

**Keywords:** Enterobacteriaceae, indicator organisms, fecal coliforms, *Escherichia coli*

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan