

食品細菌自動検査システムDOXを用いた簡易・迅速試験法の検討

下島 優香子^a, 森田 加奈^a, 福井 理恵^a, 黒田 寿美代^a, 井田 美樹^a, 平井 昭彦^a, 鈴木 淳^a, 貞升 健志^b

食品細菌自動検査システムDOXは、酸素電極法により一般生菌数、大腸菌群等を定量する簡易・迅速な検査機器である。レトルト食品及び生理食塩水に供試菌を接種し、DOX及び公定法により、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラの定量値を比較した。その結果、大腸菌群及び黄色ブドウ球菌のDOXによる定量は良好であったが、サルモネラでは困難であった。また、実際の食品及びふき取り検体を対象に、定量値を比較した結果、DOXによる一般生菌数の測定では、公定法の定量値より2オーダー以上低値を示した検体が30%に認められた。大腸菌群では12検体のうち11検体はDOXの方が高値に定量され、大腸菌群以外の菌種による混合汚染が認められた場合に、DOXによる定量値が高くなると推察された。さらに、一つの検体をDOXで3回測定したところ、サルモネラを除き、一般生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌は同等に定量され、測定値の再現性が確認された。本研究において、DOXはいくつかの注意点をふまえることで、利用可能な簡易・迅速試験法であると考えられた。

キーワード：食品、簡易・迅速試験法、AOAC PTM、DOX、衛生指標菌、一般生菌数、大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ

はじめに

食品の適正な衛生管理のために、国内では成分規格として微生物基準が定められている^{1,2)}。微生物基準は一般生菌数、大腸菌群等の衛生指標菌が中心で、試験は培養法を主体とした公定法によって行われる^{1,2)}。成分規格が定められていない食品においても、公定法に準じて衛生指標菌の検査が行われ、衛生状態が評価されている。

公定法による試験は正確性が高いが、手技が煩雑で検査に日数を要する場合があります。食品衛生の現場では工程管理等の目的に応じ、より実効性を重視した簡易・迅速試験法が求められている。

一方、簡易・迅速試験法はAOAC International (AOAC)のガイドライン³⁾やInternational Organization for Standardization (ISO)のISO 16140⁴⁾に基づいた妥当性確認が世界的に行われ、国際的なバリデーション機関であるAOACのOfficial Methods of Analysis (AOAC OMA、公定分析法)や、AFNOR、MicroVal、NordValによる認証を受けた試験法は、公定法と同等の試験法とされている。

食品細菌自動検査システムDOX (Bio-Theta) は、菌が増殖して培地中の溶存酸素が減少した際の電流変化から菌数を定量する「酸素電極法」により、一般生菌数、大腸菌群、大腸菌 (定性)、黄色ブドウ球菌、サルモネラの定量が可能な簡易・迅速試験法の機器である⁵⁻⁸⁾。本法はAOACにより、AOAC Performance Tested Methods (AOAC PTM、性能検証済み試験法)の認証を受けており、我が国においても自主検査法として使用可能とされる。本システムの特徴としては、専用セルに食品検体 (10倍希釈液) と付属の培地を加えて機器にセットすることで、20時間以内に定量

値が得られる。

今回、DOXを用いた食品中の衛生指標菌の簡易・迅速測定を行い、公定法による測定との比較検討を試み、知見を得たのでその概要を報告する。

実験方法

1. 供試検体

1) 接種試験

レトルト食品2検体 (ごはん、カレー)、生理食塩水1検体 (ふき取り検体として見立てた) に供試菌株を接種し、DOX及び公定法により大腸菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラの測定を行った。

2) 市販食品等の測定

(1) DOX及び公定法の比較 市販食品41検体 (食肉21検体、魚介類5検体、凍結惣菜半製品15検体) 及びふき取り (乳製品製造業) 5検体、計46検体を供試し、DOX及び公定法により一般生菌数を測定した。そのうち食肉17検体、魚介類4検体、凍結惣菜半製品15検体、ふき取り2検体、計38検体は大腸菌群の測定を行い、更に33検体については大腸菌定性試験を行った。

(2) DOXによるばらつき度の検証 DOXによる測定値のばらつき度を検証するための検体として市販食肉1検体 (鶏むね肉) を供試した。

2. 供試菌株

当センターの保存菌株を供試した。大腸菌群として *Enterobacter cloacae* (X16-9)、黄色ブドウ球菌として *Staphylococcus aureus* (X12-20)、黄色ブドウ球菌類縁菌

^a 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

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

として*S. epidermidis* (X10-81), サルモネラまたは大腸菌群類縁菌として*Salmonella* *Infantis* (2017-42), *S. Schwarzengrund* (2017-38), サルモネラ類縁菌として*Proteus mirabilis* (X09-39) を接種する菌として用いた。

3. 大腸菌群, 黄色ブドウ球菌, サルモネラの接種

各供試菌株をトリプトソイブイオン (TSB, BD) で35℃, 20時間培養し, 段階希釈し, 下記のようにレトルト食品 (ごはん, カレー) 及び生理食塩水 (ふき取り検体見立て) に接種した。想定菌数はTSB培養液を段階希釈した希釈液を標準寒天培地に100 µL塗抹して35℃, 48 時間培養し, 発育した集落を計測することで算出した。

1) 大腸菌群検査用検体

レトルト食品に*E. cloacae*を想定菌数 10^0 - 10^5 /gになるよう接種した6検体, *S. Infantis* 10^5 /gの1検体, 生理食塩水に*E. cloacae*を 10^{-1} - 10^4 /mLの6検体, *S. Infantis* 10^4 /mLの1検体, *S. Schwarzengrund* 10^4 /mLの1検体を作製した。

2) 黄色ブドウ球菌検査用検体

レトルト食品に*S. aureus*を 10^0 - 10^5 /gの6検体, *S. epidermidis* 10^5 /gの1検体, 生理食塩水に*S. aureus*を 10^{-1} - 10^4 /mLの6検体, *S. epidermidis* 10^4 /mLの1検体を作製した。

3) サルモネラ検査用検体

レトルト食品に*S. Infantis*を 10^0 - 10^5 /gの6検体, *P. mirabilis* 10^5 /gの1検体, 生理食塩水に*S. Infantis*を 10^{-1} - 10^4 /mLの6検体, *P. mirabilis* 10^4 /mLの1検体を作製した。

4) 3回測定用検体

DOXで3回測定して測定値のばらつき度を検証するための検体として, レトルト食品 (ごはん) について, 大腸菌群として*E. cloacae*, 黄色ブドウ球菌として*S. aureus*, サルモネラとして*S. Infantis*を想定菌数 10^2 - 10^4 /gになるように接種し, 各菌種3検体ずつ作製した。

4. DOXによる定量・定性試験

DOXのマニュアルに従い, 一般生菌数, 大腸菌群, 黄色ブドウ球菌, サルモネラの定量試験, 大腸菌の定性試験を行った。すなわち, DOX専用セルに, 食品の生理食塩水を用いた10倍希釈液1 mLずつ及び検査項目ごとに付属の培地を加え, 機器にセットした。検査項目を設定し, 機器の測定を開始すると, 20時間以内に定量値が得られた。

大腸菌群は, 定量値が得られた後, 目視でβ-galactosidaseによるセルの黄変を確認した場合に陽性と判定し, システムで得られた数値を大腸菌群数とした。大腸菌は, 大腸菌群陽性に加えてセルに紫外線を照射してβ-glucuronidaseによる蛍光を確認した場合に陽性と判定し, 紫外線照射により蛍光を確認してもセルの黄変が認められない場合は陰性と判定した。DOXは, 食品の10倍希釈液を用いて試験することが想定されているため, 原液使用である生理食塩水 (ふき取り検体見立て) についてはDOX判定値から換算した。

5. 公定法による試験

一般生菌数の検査は乳及び乳製品の成分規格等に関する省令¹⁾による公定法に準じて, 試料液を標準寒天培地 (栄研化学) で混釈し, 35℃, 48時間培養により行い, 測定結果をDOXと比較した。大腸菌群及び黄色ブドウ球菌の定量, サルモネラの定性試験は, 食品, 添加物等の規格基準²⁾による公定法または食品衛生検査指針³⁾に従って行った。すなわち, 大腸菌群はデソキシコーレイト寒天 (栄研化学) で混釈し, 35℃, 20時間培養後, 集落計測及び確認試験を行った。黄色ブドウ球菌は卵黄加マンニット食塩培地 (日水) を用いた塗抹法により行い, 定型集落を計測した。サルモネラは緩衝ペプトン水 (ISO処方, Oxoid), RV培地 (Oxoid) による二段階増菌後, SS寒天培地 (栄研化学) に塗抹し, 定型集落について同定を行った。ただし大腸菌群の検査項目で, 公定法の測定値は生理食塩水の測定値を換算してレトルト食品に引用した。

6. DOXによるばらつき度の検証

1) 接種試験

3. 4)に示すように, レトルト食品 (ごはん) に大腸菌群, 黄色ブドウ球菌, サルモネラを接種した3回測定用検体を, DOXでそれぞれ3回ずつ測定し, 測定値のばらつき度及び再現性を検証した。また公定法により1回ずつ, 大腸菌群及び黄色ブドウ球菌は定量, サルモネラは定性にて測定した。

2) 市販食品

1. 2)に示すように, 市販食肉1検体 (鶏むね肉) を供試し, 一般生菌数, 大腸菌群, 大腸菌をDOXで3回測定し, 測定値のばらつき度及び再現性を検証した。また公定法により一般生菌数及び大腸菌群を1回定量した。

7. DOX及び公定法で一般生菌数がかい離した検体由来株の検討

DOXによる一般生菌数が公定法¹⁾と比較して2オーダー以上低値を示した検体のうち, ふき取り検体 (乳製品製造業) 3検体, 魚介類1検体 (エビ) において, 公定法で一般生菌数を測定した標準寒天培地 (栄研化学) から3株ずつ釣菌し, 質量分析計 (microflex LT, MALDI Biotyper, Bruker Daltonics) による解析または16S rRNAの解析により菌種の同定を行った。そのうち9菌株について, TSBを用いて35℃で20時間培養し, 生理食塩水を用いて希釈した試料液について, DOX及び培養法で一般生菌数を測定し結果を比較した。試料液を食品検体の10倍希釈液と見立てて, 食品検体の一般生菌数として換算した。

結果及び考察

1. 大腸菌群, 黄色ブドウ球菌, サルモネラの接種検体における定量結果の比較

レトルト食品2検体及び生理食塩水を用いて作製した, 大腸菌群, 黄色ブドウ球菌, サルモネラの各項目検査用検

表1. 接種試験におけるDOX及び公定法による大腸菌群, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ測定結果

検査項目	添加菌種	想定菌数(/g)	ごはん		カレー		生理食塩水 (ふき取り)		
			DOX	公定法	DOX	公定法	DOX	公定法	
			菌数(/g)	菌数(/g)***	菌数(/g)	菌数(/g)	菌数(/mL)	菌数(/mL)	菌数(/mL)
大腸菌群	<i>E. cloacae</i>	2.0×10^5	7.8×10^5	NT*	2.7×10^6	NT	2.0×10^4	2.4×10^4	NT
		2.0×10^4	4.7×10^5	NT	2.6×10^5	NT	2.0×10^3	1.3×10^4	NT
		2.0×10^3	5.4×10^4	2.0×10^3	4.4×10^4	2.0×10^3	2.0×10^2	1.6×10^3	2.0×10^2
		2.0×10^2	7.8×10^3	1.7×10^2	5.7×10^3	1.7×10^2	2.0×10^1	2.1×10^2	1.7×10^1
		2.0×10^1	4.5×10^2	1.0×10^1	1.1×10^2	1.0×10^1	2.0×10^0	3.3×10^0	1.0×10^0
		2.0×10^0	検出限界以下	<10	検出限界以下	<10	2.0×10^{-1}	検出限界以下	<1
	<i>S. Infantis</i>	2.7×10^5	$(1.5 \times 10^6)**$	<10	(9.1×10^5)	<10	2.7×10^4	(2.4×10^4)	<1
黄色ブドウ球菌	<i>S. Schwarzengrund</i>		NT	NT	NT	NT	1.6×10^4	(2.1×10^4)	<1
	<i>S. aureus</i>	2.9×10^5	5.7×10^4	NT	5.3×10^4	NT	2.9×10^4	4.1×10^3	NT
		2.9×10^4	4.7×10^3	1.4×10^4	7.8×10^3	2.5×10^4	2.9×10^3	4.2×10^2	1.3×10^3
		2.9×10^3	4.9×10^2	1.3×10^3	1.0×10^3	1.2×10^4	2.9×10^2	3.2×10^1	7.5×10^1
		2.9×10^2	6.0×10^1	6.0×10^2	1.1×10^2	1.5×10^2	2.9×10^1	3.1×10^0	<10
		2.9×10^1	検出限界以下	<100	検出限界以下	<100	2.9×10^0	2.3×10^{-1}	1.0×10^1
		2.9×10^0	検出限界以下	<100	検出限界以下	<100	2.9×10^{-1}	検出限界以下	<10
サルモネラ	<i>S. epidermidis</i>	5.2×10^4	検出限界以下	<100	検出限界以下	<100	5.2×10^3	検出限界以下	<10
	<i>S. Infantis</i>	1.1×10^5	2.5×10^4	NT	7.6×10^4	NT	1.1×10^4	1.6×10^3	NT
		1.1×10^4	2.5×10^5	NT	1.5×10^5	NT	1.1×10^3	2.4×10^1	NT
		1.1×10^3	4.9×10^1	NT	5.0×10^1	NT	1.1×10^2	2.6×10^0	NT
		1.1×10^2	1.0×10^5	(+)	3.7×10^1	(+)	1.1×10^1	1.0×10^5	(+)
		1.1×10^1	検出限界以下	(+)	1.1×10^1	(+)	1.1×10^0	検出限界以下	(+)
		1.1×10^0	検出限界以下	(+)	1.8×10^0	(+)	1.1×10^{-1}	検出限界以下	(+)
	<i>P. mirabilis</i>	2.4×10^5	検出限界以下	(-)	検出限界以下	(-)	2.4×10^4	検出限界以下	(-)

*NT : not tested, **() : 培地が黄変しないため陰性と判定, *** : サルモネラは定性試験(/25g)

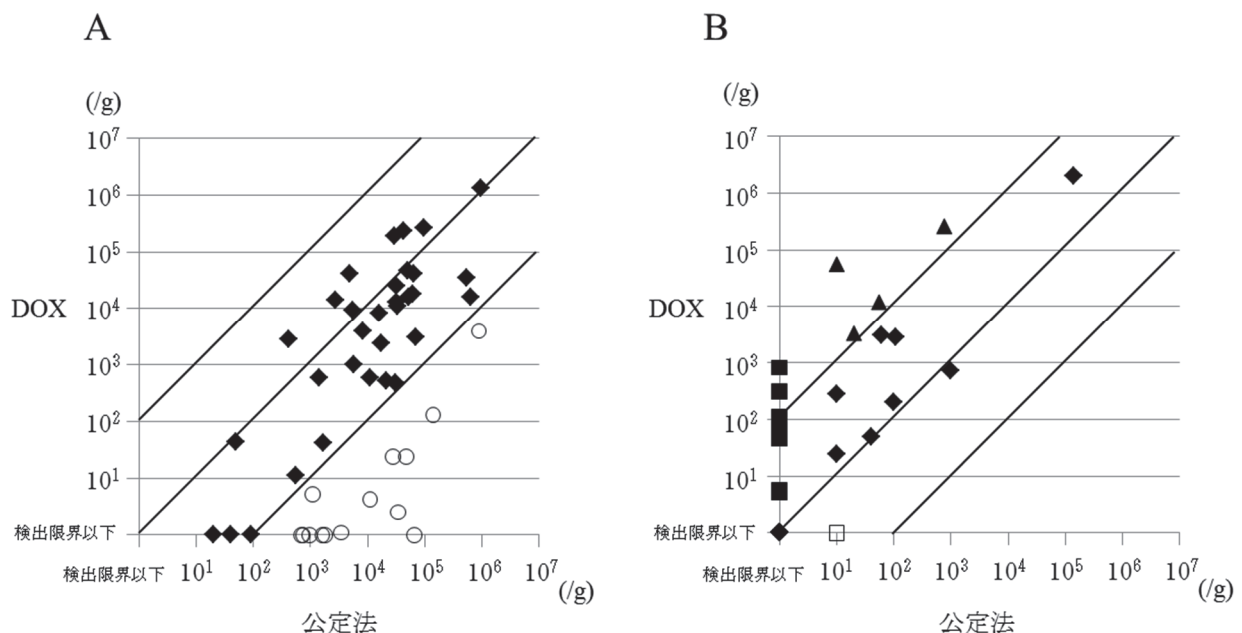


図1. DOX及び公定法による市販食品等の一般生菌数 (A) と大腸菌群 (B)

- ◆ : 1/100 一般生菌数または大腸菌群 (公定法) < 一般生菌数または大腸菌群 (DOX) < 100 一般生菌数または大腸菌群数 (公定法), ○ : 一般生菌数 (DOX) < 1/100 一般生菌数 (公定法), □ : 大腸菌群 (公定法) のみ検出, ■ : 大腸菌群 (DOX) のみ検出, ▲ : 100 大腸菌群 (公定法) < 大腸菌群 (DOX)

体について, DOX及び公定法で測定を行った結果, 大腸菌群は, 生理食塩水では両法の測定値は同等であったが, ごはん及びカレーではDOXは公定法より1オーダー程度高

く測定された (表1) . *S. Infantis*及び*S. Schwarzengrund*を接種した大腸菌群検査用検体では, DOXで測定値は得られたが, セルが黄変しないため大腸菌群陰性と判定した.

なお、*S. Schwarzengrund*接種検体ではセルが紫外線照射により蛍光を認めたが、セルが黄変しないため大腸菌陰性と判定した。DOXで、大腸菌の定性試験は β -glucuronidaseにより判定されるが、サルモネラや赤痢の一部の株は β -glucuronidase陽性であり、大腸菌群の判定基準である β -galactosidaseと併せて判定されるべきであると考えられた。

黄色ブドウ球菌検査用検体においては、全体的にDOXでは公定法よりもやや少なめに定量され、サルモネラ検査用検体ではDOXによる定量値は想定菌数と相関が認められなかった。サルモネラについては、DOXは一次増菌した培養液を使用する定性試験も可能であり、公定法は定性であるため、定量試験よりも定性試験として使用する選択肢もあり、検討課題と考えられた。

2. 市販食品等の一般生菌数、大腸菌群、大腸菌の測定結果の比較

一般生菌数は、供試した46検体中32検体（70%）は公定法とDOXで得られた測定値が2オーダー以内であったが、○で示した14検体（30%）はDOXの測定値が2オーダー以上低値であった（図1A）。その内訳は食肉2検体（9.5%）、魚介類2検体（40%）、凍結惣菜半製品6検体（40%）、ふき取り4検体（80%）であり、検体の種類によって、DOXと公定法による一般生菌数の同等性は異なる傾向が認められた。今回、DOXの設定において検体の種類は食品一般と指定したが、食品の種類によって異なる検量線を選択することで、より高精度な定量も可能となり、改善の可能性があると考えられた。

大腸菌群については、供試した38検体中12検体（32%）は公定法とDOXでいずれも検出、18検体（47%）はいずれも非検出であった（図1B）。公定法とDOXの両方で検

出された12検体のうち11検体はDOXの方が高値に定量され、▲で示した4検体は2オーダー以上高値であった。

DOXではシステムで測定値が得られた際に、セルを目視して黄変している場合はその測定値が大腸菌群数として定量され、黄変していない場合は大腸菌群検出限界以下と判定される。DOXで測定値が得られる大腸菌群以外の菌種及び大腸菌群による混合汚染を受けている検体においては、大腸菌群以外の菌種も大腸菌群として定量されてしまうために、高値に定量される可能性が考えられた。

また、公定法では検出されなかったが、DOXで検出された検体が■で示した7検体（食肉3検体、魚介類2検体、凍結惣菜半製品2検体）に認められた（図1B）。これは、DOXの液体培地が公定法に用いたデソキシコーレイト寒天培地よりも大腸菌群の増殖に優れている可能性、デソキシコーレイト寒天培地の混雑時における菌の熱損傷の可能性あるいは菌数が少ないことによる誤差の可能性が考えられた。一方、公定法で検出され、DOXで非検出の検体は、□で示した1検体（凍結惣菜半製品）のみであった（図1B）。この検体は、セルを目視した際に黄変が不十分なため、大腸菌群検出限界以下と判定した検体であったことから、セルが薄い黄色を示した場合の判定基準を定める必要があると考えられた。なお、DOXで大腸菌が検出された検体は5/33検体（15%）で、内訳は食肉4検体及び凍結惣菜半製品1検体であった。

3. DOXによるばらつき度の検証

1) 接種試験

レトルト食品（ごはん）に想定菌量を 10^2 - 10^4 /gとして各供試菌を接種した検体について、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラをDOXで3回測定した平均値の対数を図

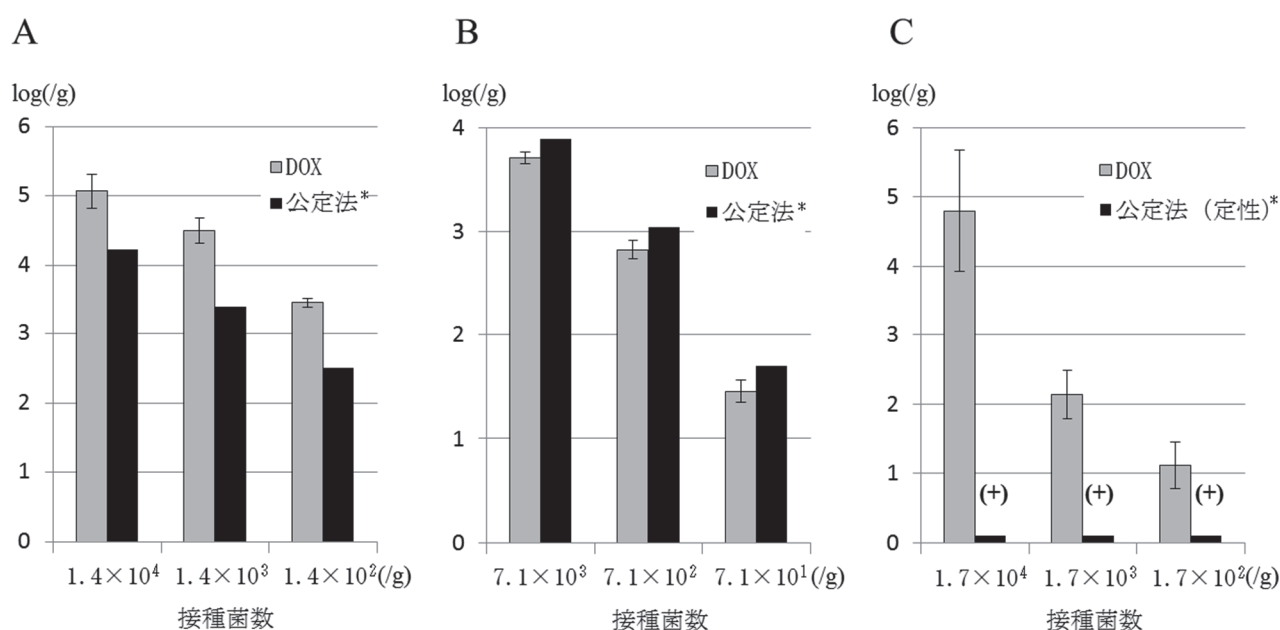


図2. 接種試験における大腸菌群 (A) , 黄色ブドウ球菌 (B) , サルモネラ (C) のDOX3回測定平均値

*公定法は大腸菌群、黄色ブドウ球菌で1回定量、サルモネラは1回定性にて測定

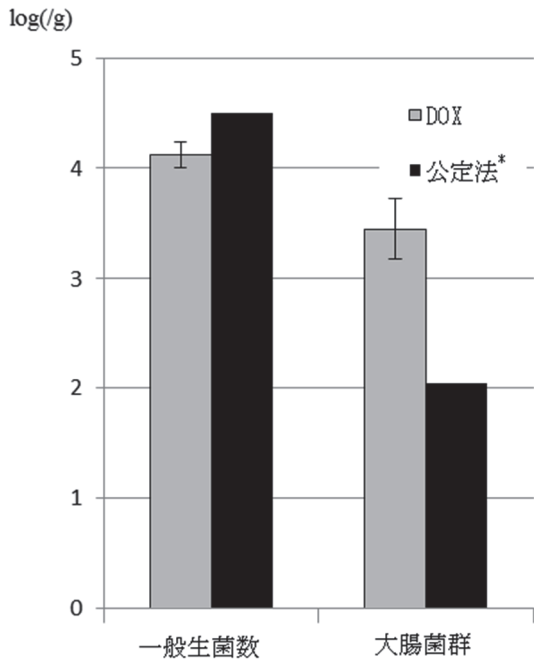


図3. 市販食品における一般生菌数, 大腸菌群
DOX3回測定平均値
*公定法は1回のみ測定

2に示した。大腸菌群及び黄色ブドウ球菌は公定法により1回測定した値も併せて示した(図2A, B)。大腸菌群及び黄色ブドウ球菌は3回とも同程度に定量され, 標準偏差は小さく, 良好な再現性が示唆された(図2A, B)。ただし, 大腸菌群はDOXで接種菌数及び公定法による測定値より1オーダー程度高く測定された(図2A)。サルモネラはDOXの測定値は3回で大きく異なり標準偏差は大きく, 接種菌数とも異なっていた(図2C)。

2) 市販食品

食肉1検体(鶏むね肉)について, 一般生菌数及び大腸菌群をDOXで3回測定した結果, 3回とも同程度に定量され, 標準偏差は小さく, 良好な再現性が示唆された(図3)。ただし, 大腸菌群はDOXで公定法による測定値より1オーダー程度高く測定された。なお, 大腸菌はDOXで3回とも陽性であり, 再現性が示された。

4. DOX及び公定法で一般生菌数がかい離した検体由来株の検討

DOXによる一般生菌数が公定法と比較して2オーダー以上低値を示した14検体のうち, ふき取り(乳製品製造業)2検体および魚介類(エビ)1検体において, 公定法により検出された菌種を同定した。その結果, ふき取り検体由来株は, *Kocuria palustris* (X17-23, X17-26), *Kocuria rhizophila* (X17-24), *Moraxella osloensis* (X17-25), *Staphylococcus equorum* (X17-27, X17-28)で, 魚介類由来株は, *Lactococcus* sp. (X18-1), *Psychrobacter phenylpyruvicus* (X18-2), *Pothia endophytica* (X18-3)で

表2. DOX及び公定法で一般生菌数がかい離した検体由来株の検出

菌種	由来	一般生菌数(/g)	
		DOX	公定法
<i>Kocuria palustris</i> strain 1	ふき取り (乳製品製造業)	検出限界以下	4.6×10^2
<i>Kocuria palustris</i> strain 2		検出限界以下	2.3×10^3
<i>Kocuria rhizophila</i>		検出限界以下	3.2×10^2
<i>Moraxella osloensis</i>		検出限界以下	1.3×10^3
<i>S. equorum</i> strain 1		検出限界以下	2.7×10^3
<i>S. equorum</i> strain 2	魚介類 (エビ)	検出限界以下	2.1×10^3
<i>Lactococcus</i> sp.		4.7×10^3	1.0×10^4
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		検出限界以下	7.0×10^3
<i>Pothia endophytica</i>		検出限界以下	4.7×10^2

あった。

その9菌株の菌液を食品検体の10倍希釈液に見立てて, DOX及び公定法で一般生菌数を測定した結果, 公定法による一般生菌数は $4.6 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^4$ /gであったが, DOXでは*Lactococcus* sp. 1株 (4.7×10^3 /g)を除き全て検出限界以下であった(表2)。*K. palustris*, *K. rhizophila*, *M. osloensis*, *S. equorum*, *P. phenylpyruvicus*, *P. endophytica* は, 公定法では一般生菌数として検出されるが, DOXでは検出されなかった。DOXと公定法はいずれも35℃で培養するが, 公定法の48時間に対して, DOXでは20時間以内であり, 上記の菌株は, 20時間の培養では検出可能な量まで増殖しない可能性が考えられた。培養時間を長くすることで公定法との相関が高くなると思われるが, DOXの培養時間は最大20時間である。よって, 上記の菌種が多い検体においては, DOXでは公定法よりも一般生菌数が低値と測定されることが示唆され, 注意が必要であると考えられた。

以上の検討より, 食品細菌自動検査システムDOXは, 一般生菌数が菌叢によっては公定法よりも低値に測定されること, 大腸菌群類縁菌及び大腸菌群による混合汚染を受けている検体においては, 大腸菌群が高値に定量されること等, いくつかの注意点をふまえることで, サルモネラの定量に関する課題はあるものの, 一般生菌数, 大腸菌群, 黄色ブドウ球菌の定量及び大腸菌の定性には十分に利用可能であることが示唆された。検査に要する時間について比較すると, 公定法では, 一般生菌数は2日, 大腸菌群は推定試験1日, 最終判定まで4日, 黄色ブドウ球菌は3日から4日, サルモネラは4日を要するが, DOXによる簡易・迅速試験では20時間で成績を得ることができ, 操作も簡便であり, 有用な簡易・迅速試験法と思われた。

2018年, 食品衛生法等の一部を改正する法律が公布され¹⁰⁾, HACCPに沿った衛生管理の制度化が盛り込まれた。DOXは, HACCPによる工程管理等にも有用で, 導入が可能であると考えられた。

ま と め

食品中の衛生指標菌の簡易・迅速測定機DOXにより,

レトルト食品及び生理食塩水に菌を接種して、大腸菌群、黄色ブドウ球菌、サルモネラの定量を行った結果、DOXによる定量は大腸菌群及び黄色ブドウ球菌では良好であったが、サルモネラでは困難であった。

実際の食品及びふき取り検体を対象に、一般生菌数及び大腸菌群の定量を行った結果、DOXによる一般生菌数の測定は良好であったが、公定法の定量値より2オーダー以上低値を示した検体が30%に認められた。大腸菌群がDOXと公定法でいずれも検出された12検体のうち11検体はDOXの方が高値に定量され、大腸菌群以外の菌種及び大腸菌群による混合汚染が認められた場合、DOXによる定量値が高くなることが判明した。

また、一つの検体を3回ずつ測定したところ、一般生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌は同等に定量され、DOXによる測定値は再現性があることが確認された。以上のことから、DOXはいくつかの注意点をふまえることで、ある程度有用な簡易・迅速試験法であると考えられた。

謝 辞

本論文の執筆に当たり、食品細菌自動検査システムDOXについてご協力いただきました食品監視課の寺村 渉氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省：昭和26年厚生省令第52号，乳及び乳製品の成分規格等に関する省令，1951.
- 2) 厚生省：昭和34年厚生省告示第370号，食品，添加物等の規格基準，1959.
- 3) AOAC International, AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces, 2012, Washington, DC., USA.
- 4) International Organization for Standardization, ISO 16140 Part 2, Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method, 2016, ISO, Geneva, Switzerland.
- 5) Tanaka, Y., Takahashi, H., Imai, A., *et al.*: *Food Control*, **21**, 1075-1079, 2010.
- 6) Kawasaki, S., Nazuka, E., Bari, M. L., *et al.*: *Food Sci. Technol.*, **9**, 304-308, 2003.
- 7) Tanno, S., Fukui, N., Utaka, Y., *et al.*: *Thai J. Vet. Med.*, **46**, 473-481, 2016.
- 8) Fukui, N., Tanno, S., Utaka, Y., *et al.*: *Food Preservation Science.*, **42**, 165-1721, 2016.
- 9) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針・微生物編，2004，日本食品衛生協会，東京．
- 10) 平成30年法律第46号，食品衛生法等の一部を改正する法律，2018.

Evaluation of the DOX system, a rapid alternative method for food microbiological testing

Yukako SHIMOJIMA^a, Kana MORITA^a, Rie FUKUI^a, Sumiyo KURODA^a, Miki IDA^a,
Akihiko HIRAI^a, Jun SUZUKI^a and Kenji SADAMASU^b

The DOX system is a rapid alternative method for food microbiological testing, which monitors dissolved oxygen to count general viable cells, coliforms, and other bacteria. We applied the system to determine levels of indicator contamination bacteria in food samples and compared these with measurements using conventional methods. The counts using the DOX system were good for foods inoculated with coliforms and *Staphylococcus aureus*, but the results were poor for foods inoculated with *Salmonella* sp. Counts of general viable cells in food and environmental samples by the DOX system showed a 2 log reduction compared with those using the conventional method for 30% of the samples. Conversely, the DOX system measured higher numbers of coliforms than the conventional method in 11 of 12 samples, presumed to be because the DOX measurement counted both coliforms and related organisms in the contaminated samples. Repeating measurements three times demonstrated the DOX system showed high reproducibility and reliability for counting general viable cells, coliforms, and *S. aureus* cells, indicating that it may provide a useful, rapid, and convenient method for the detection of indicator contamination bacteria in food samples.

Keywords: food, rapid alternative method, AOAC PTM, DOX, indicator bacteria, standard plate count, coliform, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

