

食肉の大腸菌群検査における酵素基質培地の検討

福井 理恵^a, 下島 優香子^a, 西野 由香里^a, 黒田 寿美代^a, 山崎 華恵子^a,
畠山 薫^a, 鈴木 淳^a, 貞升 健志^b

デソキシコーレイト寒天培地を用いた食品の公定法に準じた検査法（従来法）と、XM-G寒天培地を用いた検査法（酵素基質法）を食肉の大腸菌群検査において比較した。食品由来大腸菌群5株を用い、純培養希釈液を両寒天培地で混積培養して比較した結果、各培地で発育コロニー数に差は認められなかったが、発育したコロニーの大きさや色は菌株ごとに差が認められ、XM-G寒天培地の方が判定し易かった。さらに、食肉107検体を用いて2種類の検査法を比較した結果、従来法の陽性率は55.1%、酵素基質法の陽性率は65.4%であった（有意差なし）。両法において陽性であった57検体の大腸菌群数には正の相関がみられ、酵素基質法の大腸菌群数の方が1.4~2.8倍多く定量された。この理由として、XM-G寒天培地には損傷菌を回復させるピルビン酸が含まれること、及び酵素基質法で定義される大腸菌群が従来法よりも多くの菌種を含むことが要因と考える。酵素基質法は、従来法と同等の陽性率で、検査が簡易かつ迅速になるため、食肉の大腸菌群検査法として有用と考えられる。

キーワード：食肉、大腸菌群、酵素基質培地、XM-G寒天培地、デソキシコーレイト寒天培地

はじめに

わが国では、食品衛生法に基づく「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」や「食品、添加物等の規格基準」において、主に加熱処理された食品で大腸菌群の成分規格が定められ、基準適合性検査は規定された公定法に従って実施している。原料の食肉には成分規格はなく、大腸菌群検査は環境衛生管理に有用な衛生指標として広く実施されている。しかし、公定法に準じた検査¹⁾（以下、従来法）はデソキシコーレイト寒天培地（以下、Deso）による推定試験、EMB培地による確定試験、乳糖ブイヨン発酵管及びグラム染色による完全試験を実施するため、検査に4~5日間を要し、技術的な操作や判定で難しい場合がある。

近年、食品微生物検査の分野において、酵素基質を用いた培地が広く使用されるようになっており、大腸菌・大腸菌群用の酵素基質培地を用いた検査法（以下、酵素基質法）は、食品衛生検査指針のその他の検査法に、簡易・迅速試験法として記載されている¹⁾。酵素基質培地の一種であるXM-G寒天培地（以下、XMG）には、2種類の合成酵素基質が含まれている。特異酵素β-グルクロニダーゼを保有・産生する大腸菌は青色コロニーになり、特異酵素β-ガラクトシダーゼを保有・産生する大腸菌群は赤色コロニーになり簡易に判定可能である。そのため、検査日数は2日間と短い。これまでの報告で、そうざいや加工食品についての酵素基質法はおおむね有用であるとされているが^{2,3,4)}、食肉についての検討は少ない^{3,5)}。今回、Desoを用いた従来法とXMGを用いた酵素基質法を比較し、食肉の大腸菌群検査における酵素基質培地の有用性を検討した。

実験方法

1. 菌株を用いた比較

1) 使用培地

パールコア®デソオキシコーレイト培地（栄研化学）及び、酵素基質培地のXM-G寒天培地「ニッスイ」（日水製薬）を使用した。

2) 供試菌株

当センターで分離された食品由来大腸菌群5株として、*Escherichia coli* (X19-15), *Enterobacter* spp. (X18-12, X19-2, X19-25), *Raoultella ornithinolytica* (X19-16)を供試菌株とした。

3) 平板の比較方法

供試菌株をブレインハートインフュージョン液体培地（日本BD）に接種し、35°Cで2代継代培養後、ペプトン食塩緩衝液（日水製薬）で10⁷倍希釈し、接種用菌液とした。接種用菌液を1 mLずつ滅菌シャーレ4枚に接種し、その滅菌シャーレ2枚にDeso、2枚にXMGを約15 mLずつ加え混積し、室温で凝固させた。凝固後、同培地約5 mLを重層し、凝固後35°Cで20時間培養した。培養後、菌数を測定し、各菌株について培地の種類ごとに2枚の平均値を算出し比較した。また、発育したコロニーの大きさと色を観察し比較した。コロニーの大きさは、撮影した平板の画像をペイントのルーラー機能により測定した。

2. 食肉を用いた比較

1) 供試検体

2019年及び2020年の5月から6月までに東京都に流通した

^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

表1. 食品由来大腸菌群株を用いたデソキシコーレイト寒天培地 (Deso) 及びXM-G寒天培地 (XMG) におけるコロニーの数, 大きさ, 色の比較

培地	比較項目	(n=2)				
		<i>Escherichia coli</i> (X19-15)	<i>Enterobacter</i> spp. (X18-12)	<i>Enterobacter</i> spp. (X19-2)	<i>Enterobacter</i> spp. (X19-25)	<i>Raoultella</i> <i>ornithinolytica</i> (X19-16)
Deso	コロニー数(CFU)	232.5	170.5	178.5	225	95
	大きさ(mm)	1.2	0.4	0.3	1.0	0.2
	色	濃い赤	赤	赤	濃い赤	赤
XMG	コロニー数(CFU)	243	190.5	227	227	98.5
	大きさ(mm)	1.8	1.7	1.3	1.0	0.8
	色	青	赤	赤	赤	薄ピンク

食肉107検体を供試検体とした。内訳は牛肉18検体（正肉16検体, 内臓肉2検体）, 豚肉38検体（正肉36検体, 内臓肉2検体）, 鶏肉50検体（正肉35検体, 内臓肉15検体）, 牛豚合挽き生ハンバーグ1検体であった。

2) 大腸菌群数の測定

大腸菌群の検査法は食品衛生検査指針収載の寒天培地による方法に従い行った。すなわち, 検体25 gにペプトン食塩緩衝液225 mLを加え, 均質化したものを試料液とした。試料液は10倍段階希釈し, Deso及びXMGで混釈, 重層し, 35°Cで20時間培養した。培養後, Desoは赤色コロニーを推定大腸菌群として大きさ別に区分して菌数測定した。区分ごとに確定試験, 完全試験を行い, 陽性になったコロニーの割合から大腸菌群数を求めた。XMGは青色, 赤色, ピンク色を呈したコロニー数を測定し, 大腸菌群数を求めた。

3) MALDI-TOF MS法による大腸菌群の同定

Deso及びXMGに発育したコロニーを大きさや色別に1~3個釣菌し, EMB培地に画線塗抹し35°Cで24時間培養したコロニーを用いた。セルスマ法により前処理を行い, Microflex LT (Bruker Daltonics) を使用し質量分析, 解析ソフトウェアBiotyper ver3.1 を使用し菌種同定を行った。

4) 統計処理

従来法と酵素基質法の陽性率に差はないとしてカイ二乗検定 (有意水準5%) を行った。従来法の菌数及び酵素基質法の菌数について対数値に変換し, 相関係数, 従来法及び酵素基質法の大腸菌群数を推定する回帰式を算出して比較した。その際, 従来法, 酵素基質法あるいは両法において陰性であった検体の大腸菌群数は解析から除外した。

結 果

1. 菌株を用いた平板の比較

食品由来大腸菌群株の純培養希釈液を用い, 従来法で用いるDeso及び酵素基質法で用いるXMGにおいて菌の検出能力を比較した結果, 今回用いた5株については, 平板ごとの菌数に差が認められなかったが, 各培地に発育したコロニーの大きさや色に差が認められた (表1)。従来法では, *E. coli* 及び*Enterobacter* spp. の1株は赤色で大きな定

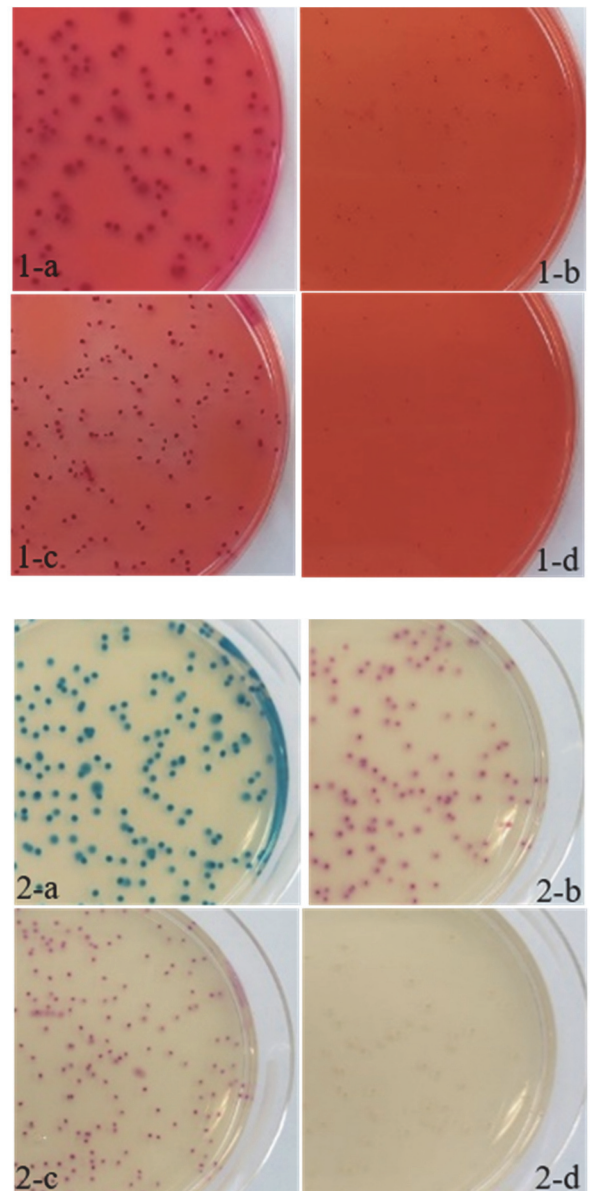


写真1. デソキシコーレイト寒天培地 (Deso) 及びXM-G寒天培地 (XMG) に発育した大腸菌群 1: Deso 2: XMG a: *Escherichia coli* (X19-15) b: *Enterobacter* spp. (X18-12) c: *Enterobacter* spp. (X19-25) d: *Raoultella ornithinolytica* (X19-16)

型コロニーを形成したが、他の株は測定困難な微小コロニーであった。酵素基質法では、*E. coli* は青色、*Enterobacter spp.* の3株は赤色、*R. ornithinolytica* は薄ピンク色を示し、いずれも定型コロニーを形成した（写真1）。

2. 食肉を用いた検査法の比較

食肉107検体を用いて、従来法及び酵素基質法による大腸菌群検査を行った結果、両法において陽性が57検体、従来法のみ陽性が2検体、酵素基質法のみ陽性が13検体、両法において陰性が35検体であった（表2）。従来法の陽性率は55.1%、酵素基質法の陽性率は65.4%になり、酵素基質法が10.3%高かったが、カイ二乗検定の結果は0.124となり、有意な差とは認められなかった。

Desoに発育した推定大腸菌群のコロニーは大小、赤色の濃淡が様々であったが、完全試験で大腸菌群と判定されたものは形状や色での識別はできなかった。またXMGに発育した大腸菌群のコロニーも青、赤、ピンク及び薄ピンクと様々であった。

両法において大腸菌群が陽性であった57検体について統計処理を行った結果、大腸菌群数の相関係数（ r ）は0.866となり、従来法と酵素基質法における大腸菌群数に正の相関がみられた（回帰式 $y=0.9246x+0.5148$ ）（図1）。

検出された大腸菌群について、MALDI-TOF MS法を用いて同定した結果、*E. coli*、*E. cloacae* 等のエンテロバクター属菌、*Klebsiella pneumoniae* 等のクレブシエラ属菌、*Citrobacter freundii* 等のサイトロバクター属菌、*R. ornithinolytica* 等のラウルテラ属菌、*Serratia liquefaciens* 等のセラチア属菌、*Ewingella Americana*、*Rahnella aquatilis*、*Hafnia alvei*、*Buttiauxella agrestis*、*Pantoea agglomerans* 等であった。そのうち、従来法では陰性になり、酵素基質法で陽性になった菌種は、*E. americana*、*S. fonticola*、*P. agglomerans* 等であった。

考 察

従来法と酵素基質法では、大腸菌群の定義に違いがある。従来法は、乳糖を分解してガスを発生するグラム陰性通性嫌気性及び好気性桿菌を大腸菌群と定義している。乳糖分解には乳糖分解酵素とともに細胞膜透過酵素の関与が必要であるため、乳糖分解酵素である β -ガラクトシダーゼは産生するが、細胞膜透過酵素を欠く菌は大腸菌群に含まれない。その一方で、酵素基質法では大腸菌群の特異酵素である β -ガラクトシダーゼを産生する菌を大腸菌群としていることから、2法の大腸菌群は必ずしも一致するわけではなく、酵素基質法で定義される大腸菌群の方が多くの菌種を含むことになる。今回使用したXMGは、 β -グルクロニダーゼにより分解される酵素基質も含まれている。 β -グルクロニダーゼは、D-グルコン酸のグルクロニド結合を加水分解する酵素で、腸内細菌科の細菌のうち、大腸菌と赤痢菌が特異的に保有している⁶⁾。したがって、 β -グルク

表2. 食肉における従来法及び酵素基質法による大腸菌群検査結果の比較

	酵素基質法 (XM-G寒天培地)		
	陽性数	陰性数	計 (%)
陽性数	57	2	59 (55.1)
従来法*	陰性数	13	35 (44.9)
計 (%)	70 (65.4)	37 (34.6)	107 (100)

*デソキシコーレイト寒天培地による推定試験、EMB培地による確定試験、LB培地・グラム染色による完全試験

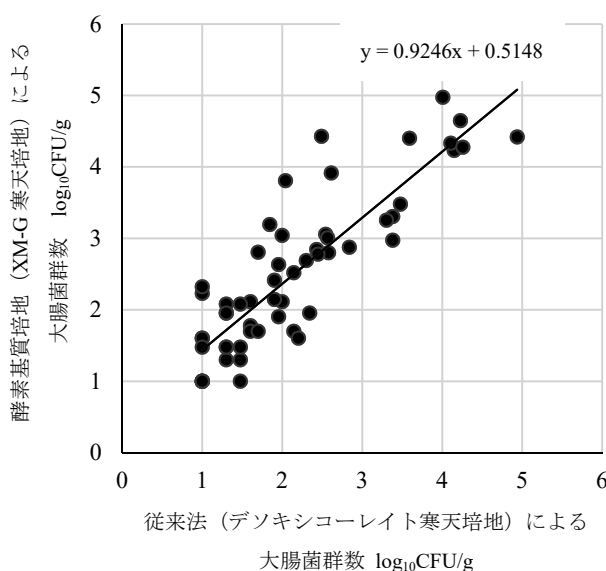


図1. 従来法及び酵素基質法の大腸菌群数を推定する直線回帰式

ロニダーゼを保有する大腸菌は青色コロニーになり、 β -ガラクトシダーゼを保有する大腸菌群は赤色コロニーになる。大腸菌は大腸菌群に含まれるため、青色コロニーも大腸菌群数として計測する。

菌株を用いた比較において、供試した5菌株では培地ごとの発育コロニー数に差はなかったが、従来法で用いるDeso及び酵素基質法で用いるXMGに発育したコロニーの形状や色に差が認められた。また、食肉を用いた比較においても、Deso及びXMGに発育したコロニーの形状や色は様々であった。このことから、Desoについては確定試験及び完全試験において判定するが、XMGはそのコロニー形状や色のみで直接大腸菌群か否かを判断するため、簡易であるがゆえに、検査者の精度管理が重要と考えられた。

食肉を用いた比較において、従来法の陽性率は55.1%、酵素基質法の陽性率は65.4%であった。酵素基質法の方が10.3%高かったが、カイ二乗検定の結果は2法の陽性率に有意差はなかった。このような酵素基質法の陽性率が従来法よりやや高くなる傾向は、市販野菜サラダ等の報告にもある^{2,4)}。

両法で大腸菌群が陽性であった57検体の大腸菌群数につ

いて統計処理した結果、正の相関関係にあった。得られた回帰直線によると、大腸菌群数が $10^1 \sim 10^5$ cfu/gの範囲では酵素基質法は従来法より1.4倍～2.8倍程度多く検出されることが示唆された。この理由として、XMGに添加されているピルビン酸ナトリウム等の活性酸素捕捉剤は損傷菌に対して回復効果があると報告⁷⁾されており、それにより食肉に存在する損傷菌が全体的にDesoよりも多く検出された可能性が考えられた。

また、検出された大腸菌群について、MALDI-TOF MS法を用いて同定した結果、*E. americana*, *S. fonticola*, *P. agglomerans* 等が従来法では陰性、酵素基質法では陽性であり、この差が数として表れたことが判明した。*E. americana* は酵素基質法で追加される菌種であるが、*S. fonticola*, *P. agglomerans* 等の菌種は、従来法において大腸菌群陽性になるとの報告がある⁸⁾。*S. fonticola*, *P. agglomerans* 等の菌種が従来法で陽性になる理由として、同菌種であっても菌株により乳糖分解能に違いがある場合が考えられるが、MALDI-TOF MS法による*E. cloacae* 類縁菌の菌種同定の難しさが原因である可能性も考えられた⁹⁾。

以上のことから、食肉の大腸菌群検査法として酵素基質法は有用であり、従来法では検出できなかった大腸菌群が検出できるため、さらなる衛生管理への利用が可能になると考えられた。ただし、XMG等酵素基質培地に発育する大腸菌群の様々なコロニー形状や色を把握し、菌数測定時の数え漏れがないよう注意を要する。

ま と め

Deso及びXMGにおいて食品由来大腸菌群株を用い、混積培養した平板を比較した結果、各培地の発育コロニー数に差は認められなかったが、コロニーの大きさや色は菌株ごとに差が認められた。食肉を用いて検査法を比較した結果、従来法の陽性率は55.1%、酵素基質法の陽性率は65.4%であり、有意な差は認められなかった。両法において陽性であった57検体の大腸菌群数には正の相関がみられ、酵素基質法の大腸菌群数の方が多く定量された。酵素基質法は、従来法と同等の陽性率で、検査が簡易かつ迅速になるため、食肉の大腸菌群検査法として有用であると考えられた。

文 献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針・微生物編 2018, 174-187, 2018, 日本食品衛生協会, 東京.
- 2) 村上和保, 石橋 弥：日食微誌, **14**, 149-154, 1997.
- 3) 荻原博和, 古川壮一, 山崎真狩：日本食品科学工学会誌, **50**, 145-148, 2003.
- 4) 遠 牧子, 内川輝美, 森末裕希, 他：日本調理科学会誌, **41**, 344-347, 2008.
- 5) 寺村 哉, 水落慎吾, 小高秀正：日食微誌, **21**, 201-206, 2004.
- 6) 日本食品微生物学会監修：食品微生物学辞典, 226,

2010, 中央法規, 東京.

- 7) 土戸哲明：日本食品化学工学会誌, **46**(1), 1-8, 1999.
- 8) 寺本忠司：食品と微生物, **9**, 211-216, 1993.
- 9) 上原さとみ, 高橋由美, 小林真紀子, 他：東京健安研セ 年報, **68**, 101-108, 2017.

The Evaluation of the Chromogenic Enzyme Substrate Medium for Enumerating Coliforms in Meat Samples

Rie FUKUI^a, Yukako SHIMOJIMA^a, Yukari NISHINO^a, Sumiyo KURODA^a, Kaeko YAMAZAKI^a
Kaoru HATAKEYAMA^a, Jun SUZUKI^a, and Kenji SADAMASU^a

The chromogenic enzyme substrate medium XM-G was compared with a conventional desoxycholate agar medium to identify and quantify the coliforms in raw meat samples. The experiment used 5 strains of coliforms from food and the same number of colonies in XM-G and desoxycholate agar. However, colonies were found to vary in color and size. The experiment used 107 raw meat samples. There was no significant difference between the positive rate for the conventional method, at 55.1%, and the chromogenic enzyme substrate medium, at 65.4%. There was a correlation between the coliform counts in the 57 samples that tested positive by both methods. The number of coliforms in the chromogenic enzyme substrate method was 1.4 to 2.8 times higher than that in the conventional method. The coliforms defined in the chromogenic enzyme substrate method may contain more species of bacteria than the conventional method. Also, the XM-G medium contains pyruvate, which restores the damaged bacteria. This study indicates that the chromogenic enzyme substrate method helps determine the number of coliforms in meat samples.

Keywords: raw meat, coliforms, the chromogenic enzyme substrate medium, XM-G, desoxycholate agar

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