

技術解説

食品微生物検査における自動生菌数測定装置

Automated Enumeration System for Microorganism Inspection of Food

黒瀬 直孝
Kurose Naotaka

日本では食品中の微生物検査を公定法で定めているが、自主検査を目的として種々の迅速化、自動化された測定技術が多く開発されている。その中で、AOAC (Association of Analytical Community) の承認やISO規格に基づくバリデーションによる承認を受けた簡易測定法である自動生菌数測定装置「テンポ (TEMPO)」による測定法について解説する。

Official methods of microorganism inspection for food are decided in Japan. But various automatic measuring systems have been developed for the purpose of private inspection. "TEMPO" is one of the automatic enumeration system. It was approved by AOAC (Association of Analytical Community) and validated by ISO.

キーワード：食品微生物検査，自動生菌数測定装置，MPN法，テンポ法，TEMPO

1 はじめに

食品の微生物学的な安全性を確保するために、食品メーカーや食品検査機関では食品中の衛生指標菌や食中毒菌の検査を行っている。このような微生物検査法については、日本では公定法（食品衛生法による成分規格を定めている告示法や厚生労働省からの通知法など）があり、「食品衛生検査指針微生物編」などに詳しく記載されている。公定法（一部の通知法を除く）の微生物検査法には、シャーレ内で固めた寒天培地で微生物を培養する平板培養法と、試験管の液体培地を用いて1段階3本ないし5本ずつの3段階希釈接種によるMPN法（Most Probable Number法，最確数法：液体培地を用いて菌数を確率的に算出する方法）がある。

公定法に定められた微生物検査法の問題点として、作業が煩雑であることや日数を要することがあげられる。最近では、平板培養法を簡便化するための自動化装置や種々のツールが開発され、販売されている。

平板培養法を省力化する装置の例として、①寒天培地上に自動で試料液を塗布する装置、②寒天培地に生育したコロニー（微生物細胞が増殖してできる可視的な集塊）数を自動でカウントする装置、③寒天培地で短時間培養し、肉眼では見えない程度に生育した微小なコロニーをカメラで判定

して菌数をカウントする装置などが開発されている。さらに、培養省力化ツールとして培養工程での目的菌の選択性を高めた「酵素基質培地」や培地調製の省力化と培養スペースの効率化を目的とした「乾燥培地」が販売されている。

本稿では、平板培養法とは異なる原理での微生物検査の迅速化・自動化技術の開発例として、特にMPN法を自動化した自動生菌数測定装置「テンポ」について、その原理、平板培養法との相関性および微生物検査業務への導入効果などについて述べる。

2 微生物検査の迅速化・自動化技術

2.1 感度の高い迅速検査法

近年、自主検査を簡便に、かつ迅速に行える微生物検査技術が種々開発されている。培養を伴わずに迅速に微生物を検出できる方法として免疫学的検出法や遺伝子検出法が広く用いられるようになった。

遺伝子検出法では一般にはDNAを増幅させて目的微生物を検出するが、その方法にはPCR法（ポリメラーゼ連鎖反応によるDNA増幅法）とLAMP法（60～65℃の定温で反応が進行するDNA増幅法）がある。これらの遺伝子検出法は、腸管出血性大腸菌（O157及びO26）の検査法として厚生労働省から2006年に通知された。遺伝子の検出によって微生物検査を行う場合には、生菌以外に死菌も捉えてしまうという短所があり、他の検査方法の

結果と併用して判定が行われる。最近では、PCR反応を行う前に培養工程を加えることによって、生菌のみを検出する方法も考案されている。

2.2 生菌数測定のための迅速化技術

平板培養法とは異なる新しい原理で食品中の生菌数を迅速に検出する代表的な技術として、①蛍光色素で生菌を染色し、検出する蛍光染色法、②生菌中に含まれるアデノシン三リン酸 (ATP) の量を測定し、菌数を計測するATP法、③培地中に電極を設置し、微生物の代謝に伴う培地成分の変化を電気的に検出し、生菌数に換算するインピーダンス法、④微生物の増殖に伴う培地成分の変化を測定し、生菌数に換算する代謝物検出法、⑤微生物の増殖に伴って発生した微量の熱を観測し、微生物活性をリアルタイムに計測するマイクロカロリーメトリー法などが知られており、食品の製造工程における自主検査に使用されているものもある。

3 自動生菌数測定装置「テンポ」

3.1 「テンポ」とは

自動生菌数測定装置「テンポ」(シスメックス・ビオメリュウ製)は、日本の公定法にも定められているMPN法を自動化した装置である。テンポを用いた生菌数(一般生菌数、大腸菌群、大腸菌および腸内細菌科菌群)の測定法は、アメリカのAOAC (Association of Analytical Community)の承認を受けている。また、簡易代替試験法の妥当性確認プロトコールであるISO16140に基づいてフランスの認定機関であるフランス規格協会 (AFNOR)による承認も受けており、国際標準法であるISO法と同等であるとみなされている。

テンポシステムは、試料液を培養用カード(テ



ンポカード)に注入するテンポフィルターと培養後のテンポカードを読み取るテンポリーダーから構成されており、専用試薬としてテンポカードとボトル培地が販売されている。(写真1, 2)

測定可能な項目と培地名は、①一般生菌数(TVC培地)、②大腸菌群(TC培地、CC培地)、③大腸菌(EC培地)、④黄色ブドウ球菌(STA培地)、⑤腸内細菌科菌群(EB培地)、⑥乳酸菌(LAB培地)、⑦真菌(YM培地)である。各検査項目のテンポカードには3段階容量(225 μ l, 22.5 μ l, 2.25 μ l)で各16ずつウェル(試料液を注入する溝)が作られており、これは3段階希釈率の試料を、各希釈率において16本の試験管に接種したMPN法に相当する。

テンポ専用培地の特徴として、一般生菌数を測定するTVC培地や大腸菌用のEC培地には酵素基質4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルクロニドが添加されており、菌の増殖とともに β -D-グルクロニダーゼにより基質が分解され、蛍光性の物質である4-メチルウンベリフェロンが産生する。TC培地やEB培地では乳糖を分解する菌の増殖に伴い、代謝産物による培地のpH低下が起きる。これによって培地に添加されている4-メチルウンベリフェロンの蛍光性が失われる。したがって、TVC培地やEC培地では蛍光シグナルを発生するウェルを陽性、TC培地やEB培地では蛍光シグナルを発生しないウェルを陽性として認識し、その陽性ウェル数からコンピュータに内蔵した最確数表(統計学的データに基づいた菌数算出表)により自動的に菌数を算出する。

3.2 平板培養法との相関性

自動生菌数測定装置「テンポ」を用いて測定し



写真1 テンポシステム



写真2 ボトル培地 (左) とテンポカード (右)

た食品中の微生物生菌数と従来の平板培養法を用いて測定した生菌数との比較に関してはいくつかの報告がある¹⁾⁻³⁾。

山田³⁾は、日本の惣菜や生鮮食品を対象として、衛生指標菌検査について「テンポ」を使う方法(テンポ法)と平板培養法で生菌数測定値の相関を調べた。

(1) 試験方法

無菌的にフィルター付ストマッカーバッグ(試料を希釈液と混合して均一化するための袋)に採取した食品10gに、9倍量の滅菌リン酸緩衝生理食塩水を加えてストマッキングし、そのフィルターろ過液を試料原液として培養試験に供した。

- ① テンポ法では、専用試薬のTVC培地、TC培地、EB培地を使用し、それぞれの専用粉末培地入りのボトルに、希釈倍率に応じて滅菌精製水を分注した。食品の予想汚染菌数に応じて試料原液あるいはその希釈液を各ボトル培地に接種後、テンポフィルターによりテンポカードに試料液を充填した。試料と培地成分の混合液を充填後、TVCカードは35±1℃で40～48時間、TCカードは35±1℃で24～27時間、EBカードは35±1℃で22～27時間培養した。培養終了後にテンポリーダーで菌数を測定した。
- ② 平板培養法では混釈培養法(寒天培地中に試料液を混釈して培養する方法)で実施し、一般生菌数は「標準寒天培地」(日水製薬製)を用いて35±1℃で46～48時間、大腸菌群は「X-GAL寒天培地」(日水製薬製)を用いて35±1℃で18～20時間、腸内細菌科菌群は「VRBG寒天培地」(Difco製)を用いて35±1℃で20～22時間培養した。一般生菌数は寒天培地中に出現したコロニー数を、大腸菌群では出現したコ

ロニーのうち青色を呈するコロニー数を、腸内細菌科菌群では出現したコロニーのうち、ブドウ糖を分解し、かつオキシダーゼ活性が陰性である色調、形状のコロニー数を計測した。

(2) 試験結果

加熱惣菜類49検体、未加熱惣菜類39検体、寿司類11検体、和菓子類12検体、生肉類35検体、刺身類18検体、麺・豆腐類11検体の合計175検体を用いて、一般生菌数、大腸菌群数、腸内細菌科菌群数をテンポ法と平板培養法で比較した。

微生物項目別一致率を表1に、対数値の相関係数(R値)を図1に示した。一致率(菌数の対数値差が1以下の検体が占める割合)は、一般生菌数で97.5%(121検体中118検体)で、対数値のR値は0.949であった。大腸菌群での一致率は96.4%(28検体中27検体)で、対数値のR値は0.921であった。腸内細菌科菌群での一致率は100%(26検体中26検体)で、対数値のR値は0.938であった。

試験結果の比較は、テンポ法と平板培養法での菌数の対数値の相関係数を求めて比較する方法、およびイギリスの評価機関Campdenの基準を用いて実施した。Campdenの評価基準は、比較する二つの方法での菌数の対数値差が±1以下のものを同等とし、同等の検体数の占める割合である一致率が95%以上であれば比較した二つの方法は同等の性能を有するものとみなせるとしている。

上記試験結果から、いずれの試験項目においてもテンポ法と平板培養法で高い相関性が認められた。両測定法で得られた菌数の一致率は95%以上を示し、Campdenの評価基準によればテンポ法は平板培養法と同等の性能を有しているものと考えられる。

表1 微生物項目別一致率³⁾

	検体数	菌数の対数値差		一致率 [*] (%)
		≤ 1.0	> 1.0	
一般生菌数	121	118	3	97.5
大腸菌群	28	27	1	96.4
腸内細菌科菌群	26	26	0	100.0
合計	175	171	4	97.7

^{*}菌数の対数値差が1以下の検体が検対数に占める割合

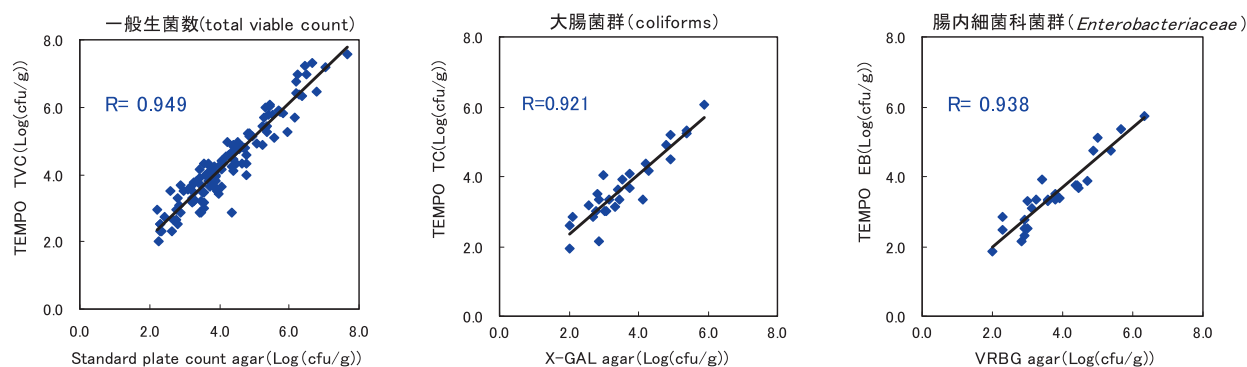


図1 テンポ法と平板培養法での菌数測定値の相関性³⁾

3.3 テンポ法導入の効果

毎日一定数以上の検体について微生物検査を行っている食品検査機関では、培地調製の作業が不要であることやコロニー数計測を行う必要がないことは作業効率面において大きなメリットとなる。

山田³⁾は、①テンポ法を導入することで検査員の残業時間が継続して減少し、人件費削減につながったこと、②テンポ法には培地調製やコロニー数計測、試料の多段階希釈が不要なので、検査員の経験や技能差による作業上の人為的ミスの解消をもたらしたこと、③テンポ法では検査工程が簡素化されているため、人為的な判定誤差が解消された。その結果、試験経験が浅い検査員が実施しても、いつも同じ結果が得られることになり、検査精度の維持に役立っていることなどを報告している。

また、テンポ装置の導入は環境面でもメリットがあり、1検体あたりのプラスチック廃棄物重量は、平板培養法に比べて約4分の1に減少した。

4 おわりに

我が国の食品微生物の試験法（公定法）は、長年にわたって見直されることなくそのまま使用されているものが多く、必ずしも妥当性確認が行われているとはいえない試験法も存在している。国際的には、日本の公定法はほとんど認知されておらず、海外の機関と試験データを議論する際には多くの労力を要する。このような現状から、国際的に通用する微生物標準試験法の策定が望まれており、2005年に国立医薬品食品衛生研究所において「食品からの微生物標準試験法検討委員会」が発足し、日本の食品微生物試験法はどうあるべきかの方向性を示すための議論が始まった。5年が経過した現在、サルモ

ネラ菌や黄色ブドウ球菌に関する標準試験法の検討が最終ステージに入っている。

近年、本稿で紹介したように公定法に定められた平板培養法やMPN法と組み合わせた簡便・迅速な微生物測定装置をはじめ、新しい原理での微生物生菌数測定装置が種々開発され、メーカーやユーザーにおいて試験法の妥当性確認が実施されている。我が国においても、試験法の妥当性を評価するための公的なガイドラインを早期に確立し、国際的に通用する微生物試験標準法またはその代替法として迅速化・自動化された精度の高い検査法が採用されることを期待するものである。

<引用文献>

- 1) 中川 弘：自動生菌数測定装置テンポ（TEMPO）の紹介，月刊フードケミカル，2006-12，104，2006
- 2) 小林亜珠香ほか：自動生菌数測定装置テンポによる食品中の微生物菌数測定の検討，日本食品微生物学会雑誌，25(3)，120，2008
- 3) 山田和子：自主検査での自動生菌数測定装置テンポ（TEMPO）の活用，月刊フードケミカル，2010-3，1，2010

<参考文献>

- 4) 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，2004
- 5) 伊藤武監修：食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった！，サイエンスフォーラム，2002

黒瀬 直孝（くろせ なおたか）
技術士（生物工学部門）

（株）生活品質科学研究所 主席研究員
農学博士
e-mail：n-kurose@riqi.co.jp

