

外部検証微生物試験における自動生菌数測定装置を用いた代替法の検討

豊橋市食肉衛生検査所 ○縣 舞、平井 真弓、森本 賢治*
松本 圭、塚田 真樹、河合 浩二
※ 現 保健所生活衛生課

はじめに

外部検証微生物試験の開始に伴って業務量の増加が見込まれることから、検査の効率化を目的として、自動生菌数測定装置 TEMPO (ビオメリュー・ジャパン) の導入を検討した。TEMPO は MPN 法に基づく自動測定装置であり [1]、TEMPO を用いた試験法 (以下、TEMPO 法) は厚労省外部検証通知 (令和 2 年 5 月 28 日付生食発 0528 第 1 号) に記載されたその他の代替法に該当する。TEMPO 法は、前処理における希釀工程の削減やコロニーカウント作業の省略が可能であり、大量の検体を効率的に検査できるという利便性を有している。

本研究は、当所で以前から採用していたペトリフィルム™ (NEOGEN) を用いる試験法 (以下、ペトリ法) 及び TEMPO 法について、一般細菌数 (以下、AC) 及び腸内細菌科菌群数 (以下、EB) の測定結果の比較、また前処理及び測定に要する時間の比較を行い、TEMPO 法の有用性を検討することを目的とした。

材料及び方法

検査には、牛削り取り検体 85 検体 (令和 2 年 8 ~ 9 月と畜)、豚削り取り検体 115 検体 (令和 2 年 8 ~ 10 月と畜)、鶏首皮 60 検体 (令和 6 年 8 月 ~ 令和 7 年 3 月処理) を供した。

検体は外部検証通知に基づき前調整した。滅菌希釀液にはリン酸緩衝液を使用した。製品の取扱説明書に従って以下の条件で培養した。

ペトリ法 AC : 35°C 48 時間培養 EB : 35°C 24 時間培養

TEMPO 法 AC : 30°C 48 時間培養 (以下 AC48H)、35°C 24 時間培養 (以下 AC24H)

EB : 35°C 24 時間培養

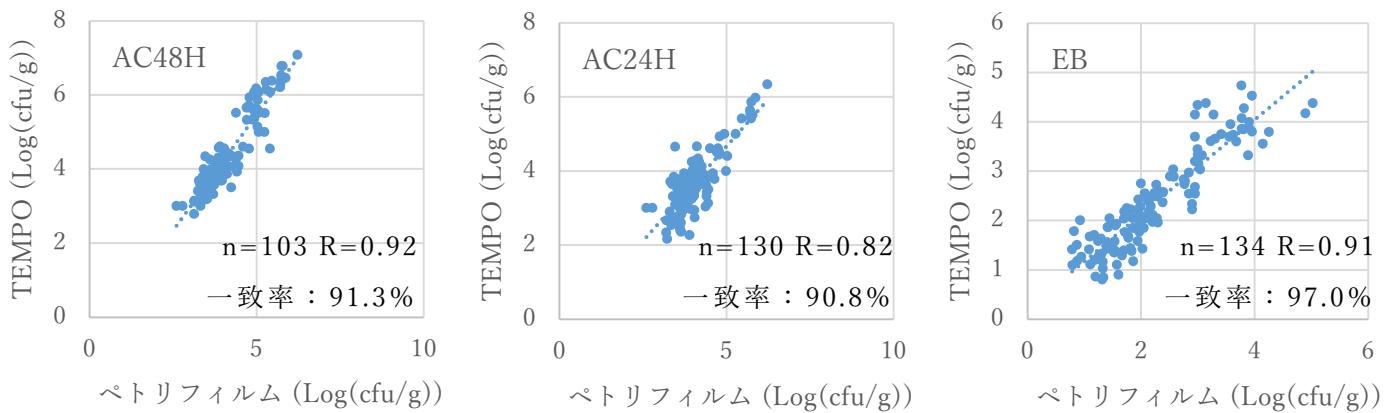
結果は、ペトリ法群と TEMPO 法群で相関係数を計算した。また、イギリスの評価機関 Campden の基準に基づき、対数値差 (DIFFLOG) の絶対値が 1 以下の場合を一致と定義し、一致率を計算した。一致率が 95% 以上であれば両試験法は差がないと判断した [2]。

作業に要する時間については、鶏検体検査時に前処理から培養までの作業時間と測定時の作業時間を計測した。

成績

すべての検体について、培養条件ごとの相関係数及び一致率を図 1 に示した。

動物種及び培養条件ごとの一致率を表 1 に示した。



【図1: 培養条件による TEMPO 法とペトリ法の菌数の相関】 n: 有効検体数 R: 相関係数

【表1: 各検体による TEMPO 法とペトリ法の一一致率】

全検体	有効検体	(Log cfu/g)	レンジ					一致率		
			D < -1	-1 ≤ D ≤ 0	0 < D ≤ 1	1 < D	Log(ペトリ)-Log(TEMPO)[D]			
ペトリ AC vs TEMPO AC48H										
牛	30	30	3.17	-	5.14	0	13	17	0	100.0%
豚	30	30	2.79	-	5.72	0	24	6	0	100.0%
鶏	45	43	2.60	-	7.08	9	27	7	0	79.1%
ペトリ AC vs TEMPO AC24H										
牛	55	51	2.16	-	5.02	0	1	41	9	82.4%
豚	55	55	2.36	-	4.61	0	17	36	2	96.4%
鶏	30	24	2.60	-	6.34	1	11	12	0	95.8%
ペトリ EB vs TEMPO EB										
牛	70	34	0.79	-	3.66	1	24	9	0	97.1%
豚	70	59	0.87	-	2.89	0	35	24	0	100.0%
鶏	45	41	2.00	-	5.03	2	26	13	0	95.1%

* レンジ欄にはペトリ法または TEMPO 法の最大値・最小値を記載

なお、いずれかの方法において菌数が測定範囲外の場合は有効検体から除外した[3]。

作業時間を計測したところ、作業に当たる人員を1人と仮定し各前処理工程の作業時間を積算すると、ペトリ法では180分、TEMPO法では110分となった。実際の作業は1～2人の検査員が分担して行っており、ペトリ法では約2時間を要するところ、TEMPO法では約1時間となった。菌数測定時間はペトリ法が積算60分になるのに対し、TEMPO法では10分であった。

考察

【培養条件による TEMPO 法とペトリ法の菌数の相関】EBについて、一致率は95%以上であったため、ペトリ法と TEMPO 法に差がないと判断した。一方で、AC48H、AC24Hについて一致率が95%未満を示し、両試験法に差がないとは判断できない結果であった。

【各検体による TEMPO 法とペトリ法の一一致率】一致率が不十分であった培養条件は、検体の動物種によって一致率に差があることがわかった。牛検体については AC48H、豚検体については全条件、鶏検体については AC24H の培養条件で、ペトリ法と TEMPO 法に差がないと判断した。

MPN 法は確率論を用いて推定菌数を算出するもので、低濃度の菌数測定に対して優れている[4]が、鶏検体の AC は菌数が非常に多かったため (2.06-7.08 Log CFU/g)、誤差が大きくなり、鶏検体 AC48H について一致率が 95% に満たなかったと考えられた。

全検体について、方法による菌数の大小の傾向は認められなかった。一方で牛検体 AC24H についてのみ、98% の検体でペトリ法の菌数が多かった。ペトリ法の培養時間が 48 時間であるのに対し、AC24H では 24 時間であるため、発育の遅い菌や損傷菌が存在していた場合に、推定菌数と実測菌数に誤差が生まれる可能性がある。損傷菌の影響を少なくするため、希釈液を従来使用していたリン酸緩衝液からペプトン加生理食塩水に変更するなど再度検討を行いたい[5]。

TEMPO 法導入により、作業時間は約 1 時間減少した。またコロニーカウントを必要としないことから測定時間も大幅に縮小され、作業者の熟練度によるばらつきも抑制できると考えられた。

まとめ

当所では、外部検証開始に伴って微生物試験の作業効率を向上させるため、従来のペトリ法から、TEMPO 法への変更を検討した。検証の結果、TEMPO 法は牛検体、鶏検体において AC の一部の培養条件、豚検体 AC の全培養条件、及び全検体の EB の測定においてペトリ法と測定結果に差がないことが判明した。一方で、一致率の不十分な培養条件が確認できたため、今回の比較検証は有意義であった。

TEMPO 法では、前処理時間及びコロニーカウントの時間を大幅に短縮することができた。また鶏検体では、AC48H より AC24H の方がペトリ法との一致率が高く 95% 以上を示したため、培養時間が 48 時間から 24 時間へと短縮され、事業者に対する迅速なフィードバックが可能となった。

当所における外部検証微生物試験において、検査精度が十分であり、検体数の増加にも対応できることから、TEMPO 法を導入することは有用であると結論付けた。

TEMPO 法はカンピロバクターの測定も可能であり、多項目の効率的な検査を実現できる可能性がある。今後もよりよい手法を検討し、当市内食肉衛生へのさらなる貢献を目指していきたい。

参考文献

- [1] 黒瀬直孝：食品微生物検査における自動生菌数測定装置, IPEJ Journal Vol. 22 No. 9
- [2] Campden & Chorleywood Food Research Association Group : Guidelines for Establishing the Suitability of Food Microbiology Methods, Guideline No. 29 (2001)
- [3] 小林亜珠香ら：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, Jpn. J. Food Microbiol., 25(3), 120-126, 2008
- [4] 第十八改正日本薬局方（令和 3 年 6 月 7 日厚生労働省告示第 220 号）
- [5] 公益社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針微生物編改定第 2 版, 2018