

食の安全と品質保証のための  
月刊 **HACCP**  
HAZARD ANALYSIS AND CRITICAL CONTROL POINT

2018 Vol.24

1



**特集**

HACCP制度化における微生物検査の意義と体制構築

**企画特集**

シリーズ:PRPの底力!  
ペストコントロールを中心とした現場の異物対策とデータ活用

Challenge the Future  
~未来への架け橋~

妥協のない内部監査と教育活動の強化・充実に尽力、  
「現場の衛生レベル向上」と「従事者の意識改革」に劇的な効果!

●株式会社サプリメントジャパン(東京都)

# 公定法の大腸菌・大腸菌群の 新しい迅速・簡便な検査法 ～浮上するダーラム管と全自動検出装置～

株式会社協和医療器  
技術開発部 部長  
宮下光良

## 浮上するダーラム管

食品会社で製造された製品について、公定法で定められた大腸菌群検査や糞便系大腸菌群検査の推定試験では、BGLB培地、EC培地などの液体培地にφ6～7mmのガラス製ダーラム管(発酵管)を入れて、ガス産生の有無を目視判定する方法が用いられています(写真1)。

培地の入った試験管に検体液を接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーターまたは $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ の恒温水槽で $24 \sim 48 \pm 3$ 時間培養します。検体中に大

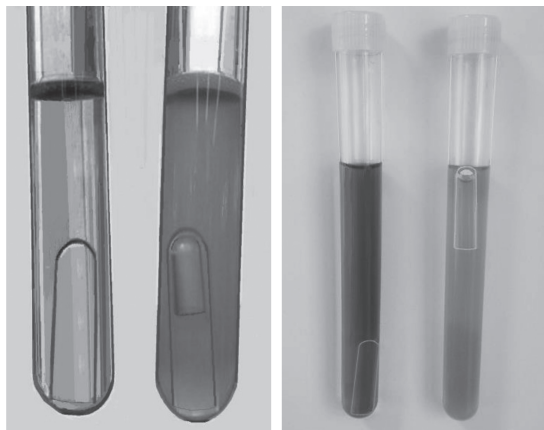


写真1 ガラス製のダーラム管 写真2 ポリスチレン製のダーラム管

腸菌群・大腸菌が存在している場合には、菌より産生されたガスがダーラム管に溜まり、気泡が生じ、大腸菌群の存在を確認することが可能となります。ガラス製のダーラム管は安価に製造することは難しく、検査を行う事業者はダーラム管を洗浄し再利用することで検査コストの上昇を抑えています。

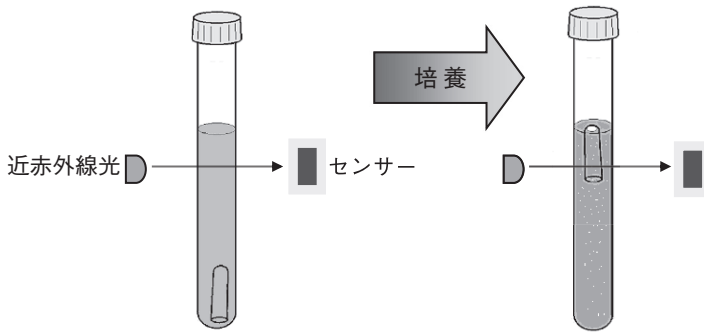
しかし、ガラス製のダーラム管は、牛乳などの濁った検体の場合は、ガス産生の有無を目視判定することが難しくなり、誤判定をってしまうリスクが考えられます。

今回開発した「浮上するダーラム管(PSダーラム管)」は、合成樹脂の中で液体培地に沈む最も軽いポリスチレン樹脂(比重1.06)で作られており、微少のガスでダーラム管が浮き上がる(写真2)ので、ガス産生菌の存在を判定するシグナルを2つ提示することができることで、誤判定のリスクがなくなります。

## 自動検出装置「バイオプティ」の測定原理

微生物の存在を検出する方法として、液体培地の濁度を測定することは、信頼性の高い方法として広く採用されています。

本PSダーラム管の自動検出装置「バイオプ



ティ」では、この濁度とダーラム管の浮上を検出要素としており、試験管に液体培地とPSダーラム管を一緒に封入した滅菌済みの使い捨て検査キットに試料を添加し、キャップを締めてインキュベーターで培養するだけで、高感度で確実な大腸菌群・大腸菌検査ができます。

乳糖分解菌は乳糖非分解菌に比べ、激しく濁り、ダーラム管の浮上を検出するので、濁度の波形を確認することで、乳糖分解菌と乳糖非分解菌の分類ができます(図1)。使用されている近赤外線光は、生体透過性が高いことから、牛乳などの濁った検体でも測定が可能となります(図2)。

乳糖分解菌および乳糖非分解菌の汚染がある場合、コブ状の濁りが発生し、乳糖分解菌のみがダーラム管の浮上を検出しますので、濁度の波形を確認することで、乳糖分解菌と乳糖非分解菌の分類もできます。

牛乳中の大腸菌群検査は、BGLB培地またはデソキシコレート寒天培地のいずれかが使

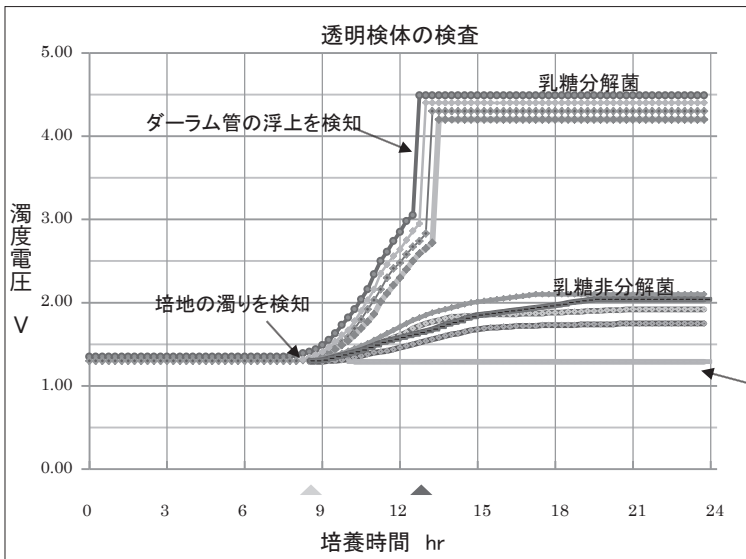


図1

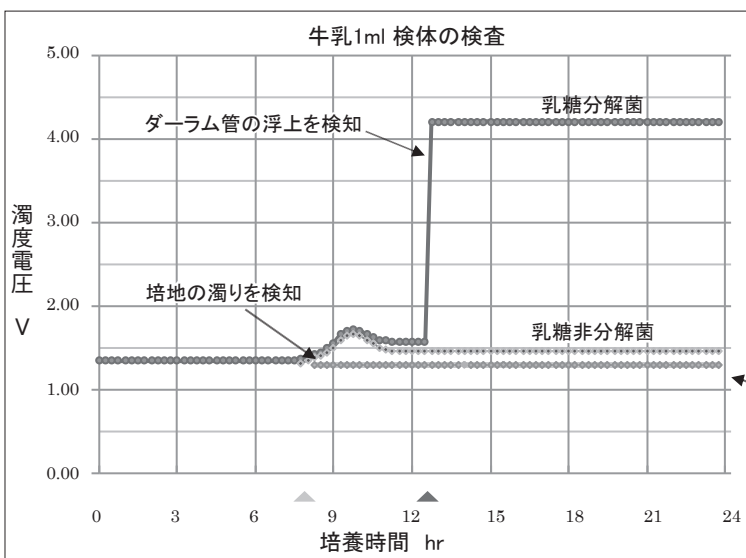


図2

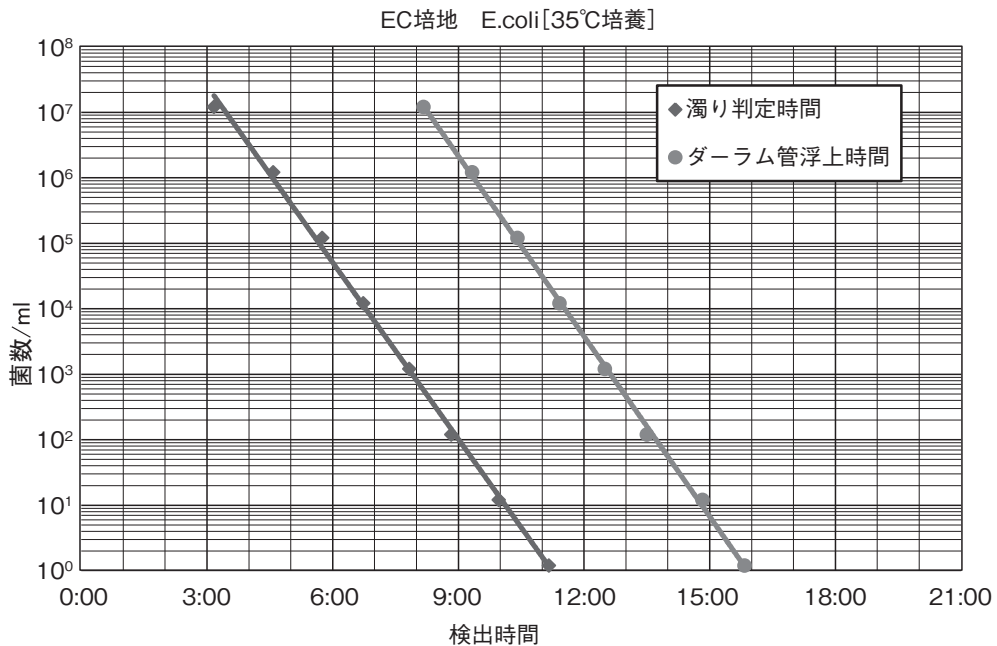


図3

用されますが、ガラス製ダーラム管では気泡を目視で判定することは困難なため、デソキシコレート寒天培地で検査することが多いです。一方、デソキシコレート寒天培地は、加温溶解での培地作成、シャーレへの牛乳検体接種、混釈作業、寒天固化と、多くの作業工程（時間）を要します。

今回のPSダーラム管を使用した自動検査システムを使用すれば、試験管内に検体を接種し、装置に差し込むだけでなので、大幅な作業軽減と正確で迅速な検査ができます。

さらに、検査結果も自動ファイリングしますので、培地の目視検査時間と結果の入力作業もなく

することができます。

### 大腸菌群の検出時間

大腸菌 *Escherichia coli* を  $10^7$ 、 $10^6$ …… $10^1$  と希釈液を作成し、PSダーラム管に1 ml 接種、自動検出装置（バイオプティ）にて35°C培養すると、菌濃度に応じて直線的な反応時間となります。大腸菌の世代時間を20分とすると、65～70分で10倍になりますが、その時間と反応時間には一致が見られます（図3）。

ダーラム管の浮上は、培地の濁り判定時間より



写真3 ダーラム管自動検出装置「Biopti S-60」

#### 特徴

- ・専用のPSダーラム試験管培地を使用します。
- ・オイルバスによる温度制御で、±0.2°Cの安定したインキュベーションが可能。
- ・最大60検体を測定でき、検体ごとに個別の時間設定が可能。
- ・微量ガスを捕集したPSダーラム管が浮上、光センサが検知し、陽性を自動判定する。
- ・検査結果は画面上で確認でき、陽性判定の場合は携帯電話に警報通知も可能。

も5時間遅れで浮上することがわかります。

テストに使用した腸内細菌

- ・乳糖分解菌: *Citrobacter*、*Escherichia*、*Enterobacter*、*Klebsiella*
- ・乳糖非分解菌: *Salmonella*、*Serratia*、*Proteus*、*Hafnia*

テストした8菌は、いずれの菌も濁り判定では13.5時間以内に検出し、乳糖分解菌は19時間以内にダーラム管の浮上を検知します。一方、乳糖非分解菌は24時間以上の培養でもダーラム管の浮上はありません。大腸菌群の20 ± 2時間判定に何ら問題なく検出されます。

当該システムを用いることで、微生物や微生物検査に関する専門的な知識や経験がなくても、公定法に沿った大腸菌群・糞便系大腸菌の検査を、ヒューマンエラーの可能性を排除して行うことができます。

今回は開発したシステムは、光センサー技術と

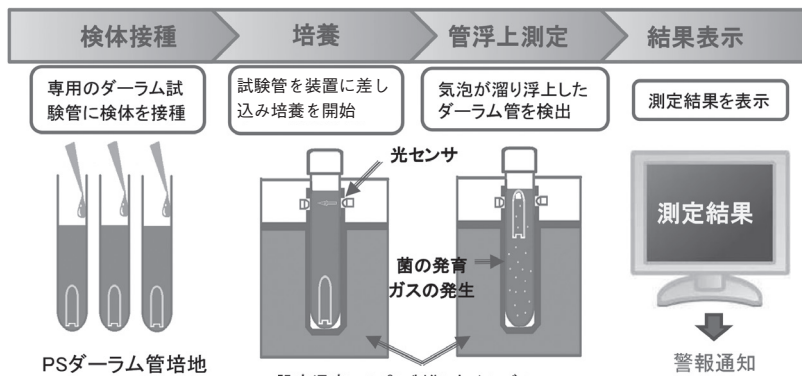


図4 システムフロー

検査用具に使用される材質変更を組み合わせることで、大腸菌・大腸菌群の公定法検査を自動化することができました。

この装置で得られた菌の増殖データを解析することで、従来、目視検査ではできなかった乳糖分解菌・非分解菌の分類もできるようになり、他の

検査への応用も期待できます。本検査システムは、公定法検査の迅速かつ確実な自動検出装置として、今後、広く利用されることが期待されます。

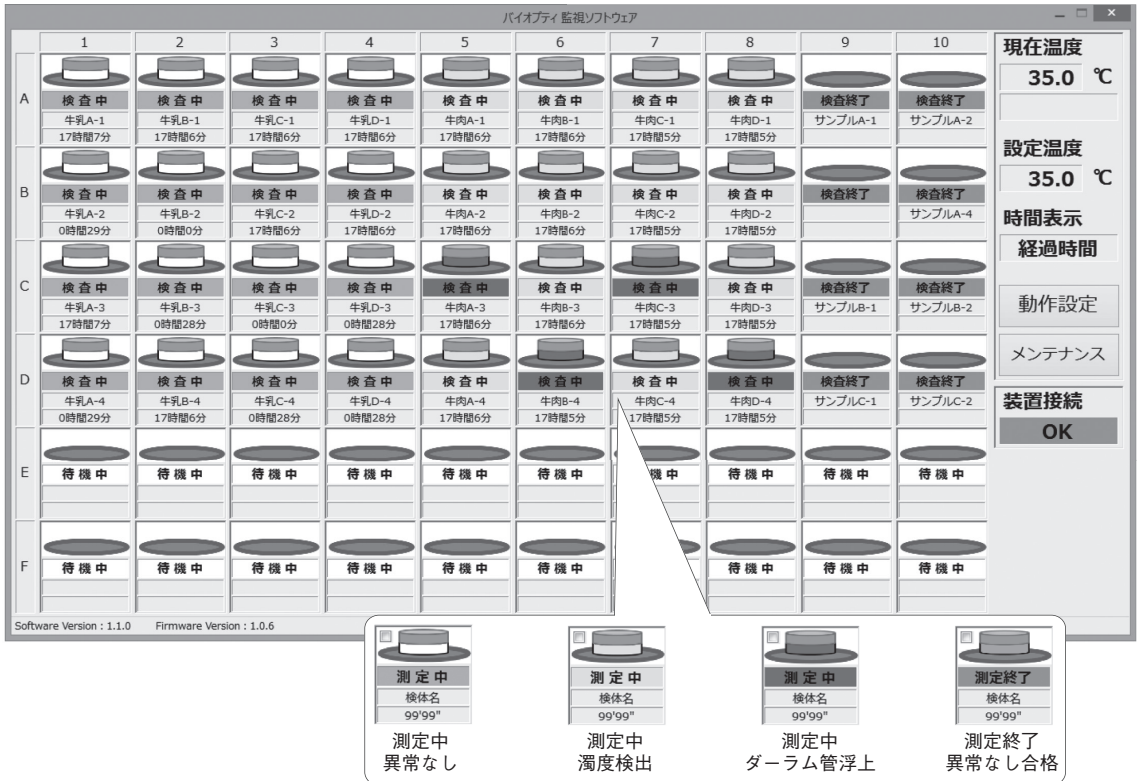


図5 表示パネルは、検査状況や結果が直感的に一目でわかるようにデザインされている。

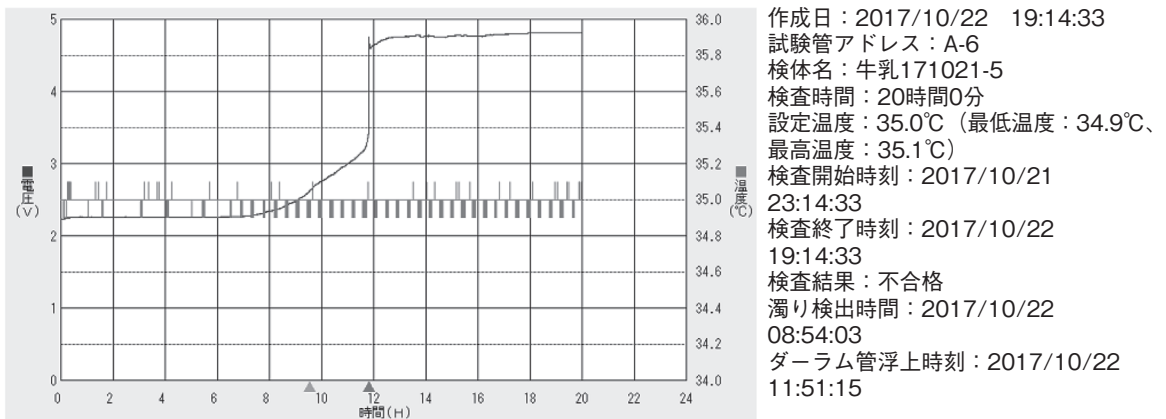
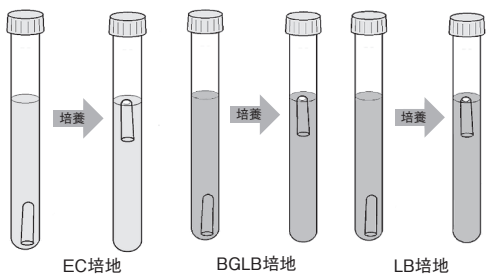
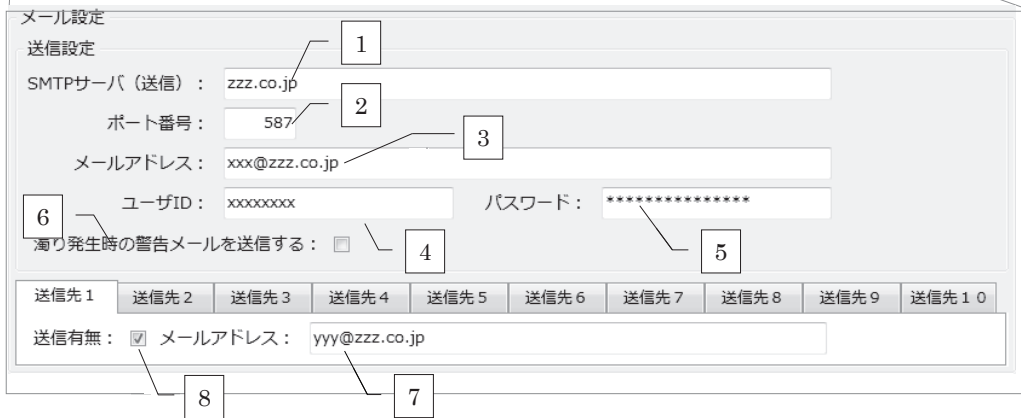
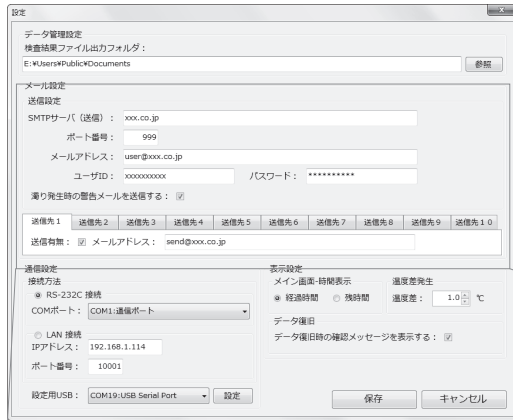


図6 判定結果の自動保存が可能。すべての検査結果がPDFで保存されるので、面倒な入力作業がなくせる。



加温方式	オイルバスヒーティング方式	品番	品名	品番
培養温度範囲	室温+5℃~50℃	LM003	EC培地 (糞便系大腸菌用)	200本
温度調節精度	±0.2℃(マイコンPID制御)	LM004	BGLB培地 (大腸菌群用)	200本
センサー	RTD:測温抵抗対CA	LM005	BTB加LB培地 (大腸菌群用)	200本
電源	AC100V 50/60Hz	LM006	LST培地 (大腸菌群用)	200本
消費電力	200VA			
外形寸法	約W470×D420×H276mm			
重量	30kg			

図7 装置の仕様と用具



No.	項目	説明
1	SMTP サーバ(送信)	SMTP サーバのホスト名を設定します。
2	ポート番号	SMTP サーバのポート番号を設定します。
3	メールアドレス	送信元メールアドレスを設定します。
4	ユーザ ID	送信元ユーザ ID を設定します。
5	パスワード	送信元パスワードを設定します。
6	濁り発生時の警告メールを送信する	濁り発生時に警告メールを送信するかどうか設定します。チェックを付けると警告メールを送信します。
7	メールアドレス	送信先メールアドレスを設定します。
8	送信有無	対象のメールアドレスに対して警告メールの送信有無を設定します。

図8 警告メールは最大10個のメールアドレスに送信できる。判定だけのために夜勤勤務や休日出勤することをなくすることができる（警報通知があった時だけ）。