

大腸菌群簡易検出紙

使い方と その応用

国立衛生試験所衛生微生物部細菌第2室長

鈴木 昭

社団法人 日本食品衛生協会発行

本冊子は(社)日本食品衛生協会制定「器具および容器包装等検査基準—大腸菌群簡易検出紙の部」の使用基準および解説を詳述したものである。

目 次

この冊子は、検査しようとする検体（食品その他）の、その項だけを読めば大腸菌群簡易検出紙の「使い方とその応用の仕方」の手技と方法が理解できるように編まれております。したがって目次は、そのまま索引としてご利用下さい。

| | |
|---|----|
| はじめに | 1 |
| 1 簡易検出紙の使用目的と特長 | 2 |
| 2 簡易検出紙の使い方 | 3 |
| 3 使用上の注意 | 4 |
| I 基礎試験 | 5 |
| 1 簡易検出紙の試料吸収量 | 5 |
| 2 牛乳を用いての簡易検出紙の性能試験 | 6 |
| 3 大腸菌群簡易検出紙とデソ寒天法のメカニズムの相違 | 7 |
| II 応用試験 | 8 |
| 1. 保健所の試験室，またはそれと同等以上の試験室で行う場合 | 8 |
| A 牛乳，アイスクリーム等の大腸菌群の有無を定期的，または定性的に測定する場合 | 8 |
| 1) 未殺菌牛乳に応用する場合 | 8 |
| 定量試験 | 8 |
| 2) 生乳に応用する場合 | 8 |
| 定性試験 | 8 |
| 3) 殺菌牛乳（市乳）に応用する場合 | 9 |
| 定量または定性試験 | 9 |
| 4) 殺菌工程（製造工程）中の牛乳に応用する場合 | 9 |
| 5) アイスクリーム類に応用する場合 | 10 |
| 6) 氷菓子類およびジュース類に応用する場合 | 10 |
| B 飲料水（井戸水等）や食品製造上に直接関係のある使用水， | |

| | |
|--|----|
| またはプール，海水浴場，公衆浴場，下水道水中の大腸菌群 の有無を定量的，定性的に測定する場合 | 11 |
| 1) 飲料水（井戸水）等に応用する場合 | 11 |
| 2) 食品製造上に直接関係のある使用水（たとえば豆腐の漬水， ゆでめんの漬水）に応用する場合 | 11 |
| i 豆腐の漬水 | 11 |
| ii ゆでめんの漬水 | 12 |
| iii 缶詰または包装食品の加熱後の冷却水 | 12 |
| 3) プール水，海水浴場等に応用する場合 | 12 |
| 4) 公衆浴場水に応用する場合 | 13 |
| 5) 下水（河川水）等に応用する場合 | 13 |
| C 一般食品（魚介類，豆腐，菓子類，めん類）等の大腸菌群の 有無を定量的，定性的に測定する場合 | 14 |
| 1) 魚介類，特にサシミ，生カキ等に応用する場合 | 14 |
| 2) 豆腐に応用する場合 | 14 |
| 3) 菓子類，特にアン類，生クリーム等に応用する場合 | 15 |
| 4) めん類に応用する場合 | 15 |
| D 冷凍食品等の大腸菌群の有無を定量的，定性的に測定 する場合 | 15 |
| 1) シューマイ類，ぎょうざ類に応用する場合 | 16 |
| 2) コロッケ，ハンバーグ，フライ類に応用する場合 | 17 |
| 3) 茶わんむし，シチュー類に応用する場合 | 17 |
| 4) その他の冷凍食品に応用する場合 | 18 |
| E 食器，庖丁，マナイタ類，フキン，手指の大腸菌群の有無を定量的， 定性的に測定する場合 | 18 |
| 1) 食器類に応用する場合 | 18 |
| 2) 庖丁，マナイタ，フキン類および手指に応用する場合 | 19 |
| 2. 簡単な試験室でフラン器程度のものしかないとこで行う場合 | 19 |

| | |
|--|----|
| Ⅲ 結果の評価の仕方 | 21 |
| 1) 牛乳，乳製品等に対する評価の仕方 | 22 |
| 2) アイスクリーム，アイスクリーム類，氷菓子類に対する 評価の仕方 | 23 |
| 3) 一般食品に対する評価の仕方 | 23 |
| 4) 冷凍食品に対する評価の仕方 | 24 |
| 5) 食品，庖丁，マナイタ，フキン，手指などに対する評価 の仕方 | 24 |
| 6) プール水，海水浴場に対する評価の仕方 | 24 |
| 現場検査における評価の仕方 | 25 |
| Ⅳ あとがき | 26 |
| 「付」質疑応答 | 28 |
| 質問 1. 簡易検出紙の原理について？ | 28 |
| 質問 2. 公定法との関連性について？ | 28 |
| 質問 3. 定量判定はできないか？ | 28 |
| 質問 4. 簡易検出紙による衛生かんりの方法について？ | 29 |
| 質問 5. どんな検体でも浸漬時間は3秒くらいでよいか？ | 29 |
| 質問 6. 試料にペーパーを浸漬した後，元のユニパックに戻して 指の腹でなでるようにして空気を抜いた場合，ペーパー 中の試料がにじみ出る結果に影響はないか？ | 30 |
| 質問 7. ユニパック内に空気が入ったまま培養するとどんな影響 があるか？ | 30 |
| 質問 8. 大腸菌群数を数える場合，ペーパーの表裏を数えるか？ | 30 |
| 質問 9. 赤色班が大小検出されるのはどんな原因か，またぼん やりした赤色班がでることがあるか？ | 30 |
| 質問10. ペーパーが全面赤色となるのはどんな原因か？ | 30 |
| 質問11. 24時間以内に赤色班が検出されないままフラン器放置 し，3日後に取り出したところ，赤色班が検出されたが， | |

| | | |
|-------|---|----|
| | どのようにすべきか？…………… | 31 |
| 質問2. | 培養時間は8～12時間で十分か？…………… | 31 |
| 質問13. | 1検体に対してサンコリテップはなん枚を使用したら よいか？…………… | 31 |
| 質問14. | 大腸菌以外の細菌が検出されることはないか？…………… | 31 |
| 質問15. | ユニパックからペーパーを取り出したりする時、手指から 大腸菌群がペーパーに移行することはないか？…………… | 32 |
| 質問16. | ペーパーを太陽や蛍光灯のあたる場所においても影響はな いか？…………… | 32 |
| 質問17. | 検出されたペーパーを資料として保存する場合の乾燥はど のようにすればよいか？…………… | 32 |
| 質問18. | 生理食塩液をつくるのが困難な場合は、蒸溜水でよ いか？…………… | 32 |
| 質問19. | 100倍液, 1000倍液……で調べる, または100倍液, 1000倍液 で赤色スポットが認められなければよい, などとあるが100倍 液, 1000倍液のつくり方, その意味について説明してほしい… | 32 |
| 質問20. | 大腸菌群数の出し方についてもう一度説明してほしい…………… | 33 |

(大腸菌群簡易検出紙)

使い方とその応用及び評価の仕方

国立衛生試験所

細菌第二室長 医学博士 鈴木 昭

はじめに

細菌検査に際して各種のディスク、たとえばビオテストなどと称して一定量の試薬を吸着乾燥させた試験紙を使用して、細菌の生化学的な反応をみる方法が簡単に、しかも迅速に行われるものが市販されている。牛乳や乳製品、食品、水などを対象とする検査においても、簡易検査法が種々開発され、検査用器材もガス滅菌の開発によって、プラスチックなどの合成樹脂製のペトリ皿、ピペットなどが出現し従来のガラス製品をしのぐ勢で利用されつつある。

このような情勢のなかで、極めて画期的なものと考えられるものに1955年ドイツのFörgによって開発されたものに、大腸菌群検出紙ペーパーストリップ(バクトストリップ)がある。

当時わが国においても、このペーパーストリップについて種々検討され、特に牛乳、乳製品の品質管理面で行なう現場検査法として十分利用しうる性能もっているものであることが報告され、実用的に一部においてかなり利用されたが、コスト高であるところから、一般にはそれほどの普及をみることなく今日では、市場からまったく姿を消してしまった。ところが、最近国内の某社がペーパーストリップに類似した製品の大腸菌群検出紙を開発し市販することになった。

このたび市販された大腸菌群簡易検出紙(検出紙)の基礎的な検討の結果と、

牛乳、乳製品、水（汚水）、一般食品から食器類にいたるまで各種の検査材料を対象にして、その実用性を検討した結果、その性能が実用的に優れた性能をもっているものであることを知ったので、その結果の一部を紹介すると同時に実際に使用する場合の検査法とその結果の評価の仕方について述べることにする。実際使用する場合の参考資料としていろいろの方が、それぞれに応じて利用できるように、できるだけ分りやすく説明するために、いくつかの具体的な事例について説明した。したがって本文中には同様のことが幾度か述べられているが、それは求める対象の項だけを読めば、その方法と手技が理解できるようにしたためであることを御了解願いたい。

1. 簡易検出紙の使用目的と特長

検出紙は極めて簡便に大腸菌群を検出する試験紙で、スクリーニングテストとして定性検査を目的に開発されたものである。

牛乳、乳製品、水や一般食品から食器類にいたるまで大腸菌群の検査を行うのは、この菌群が糞便のなかにしか基本的に存在しない菌であることから、これらの菌群が検出されることは、その検体が不潔な取扱いをうけたことを意味することから、これら検査の対象になったものが、衛生的に取扱われていたか、どうかを知ることができる。大腸菌群が検出されても、必ずしも危険であるとはいえないが、この菌群と関係のある赤痢菌などの存在が疑われることもあるから、大腸菌群の有無、その数の多寡は、衛生管理の尺度となるものである。

しかし従来の公定法は多額の設備費と複雑な工程と相当な技術を要し、自衛的にも、行政的にも、不遍的にもこれらの方法を応用して検査を行うには種々の困難な問題があるが、検出紙は品質管理で平常要求される定性検査を簡易、迅速に、しかも僅かな経費で行うことができる。

検出紙は従来の標準法で用いる培養基や試薬がペーパー中に含有されているために、平板培養法に欠くことのできない培養基の準備やペトリ皿、試験管、ピペットなどの資材は一切必要なく、このペーパーだけで簡単に定性検査ができる。また検体の種類や操作の熟達によってある程度の定量的な測定も可能である。

簡易検出紙法は、検体中にこのペーパーを浸漬する操作で菌の検出（赤色集落）ができるので、極めて簡便で、人件費、器材費等が節約できる。

この方法は、従来の方法にくらべ菌の培養に要する時間がはるかに短縮できる。

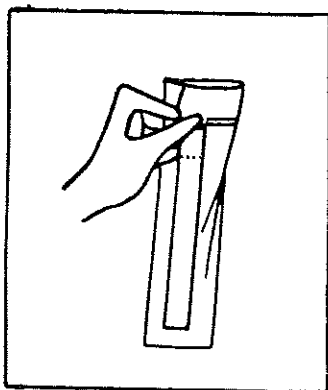
検出紙は、ユニパックとも滅菌されているので細菌学的に完全に無菌であり、開封、密封も簡便である。

従来の平板法では、平板そのものをそのまま保存できないが、検出紙は検出済みのペーパーを60℃前後で乾燥すると赤いコロニーを残し、大腸菌群は殺菌されて定着するから、後日の資料として保存でき、大腸菌群の有無、数を現実のまま示すことができるので、特に現場検査の場合には教育資料として利用することができる。

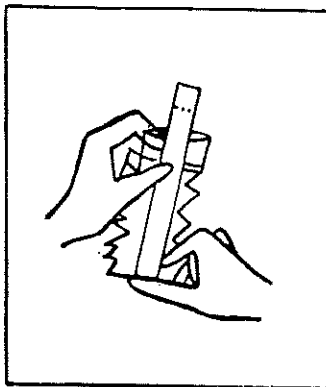
2. 簡易検出紙の使い方

- 1) 手を清潔にした後、まずユニパックのチャックをよじって口を開ける。
- 2) ユニパック中のペーパーをパックの外側から押上げミシンの部分を外に出す。
- 3) ミシンの上の部分を指でつまんでペーパーを引き出す。
- 4) ミシンより下の部分を別に用意した検体中にそのまま浸漬し、すぐ取り出し、余分の滴を落とす。（浸漬する場合、一気に試料中に浸漬するのがコツ）
- 5) ミシンの部分がチャックより下になるように入れる。
- 6) ペーパーを袋の上から押さえてミシンの上の部分を指できりとる。
- 7) そのまま平らにおき、指の腹で押しなでるように空気をぬき、ペーパーと袋を密着させて、チャックを閉じる。
- 8) 密封したペーパーを35℃～37℃のフラン器に入れ培養する。
- 9) 夕方フラン器に入れて翌朝取り出し、ペーパーの表面および内部の赤色集落をかぞえる。

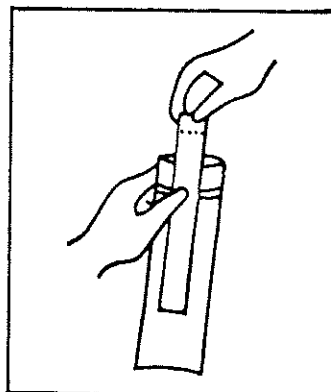
〔サンコリテップ使用法〕



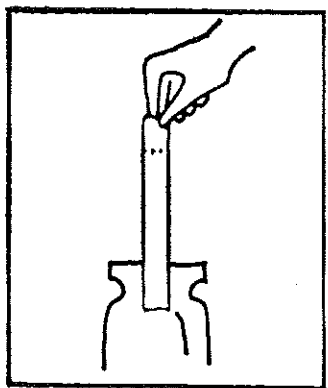
①ユニパックのチャックをよじって口を開ける



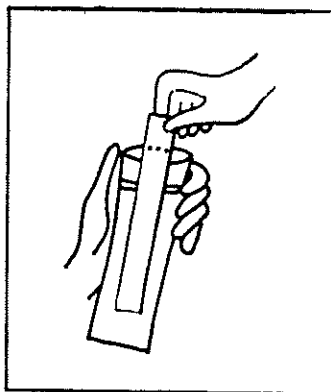
②中のペーパーを押し上げ、ミシンの部分を外に出す



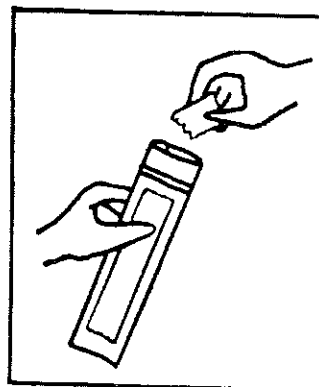
③ミシンの上の部分を指でつまんでペーパーを引き出す



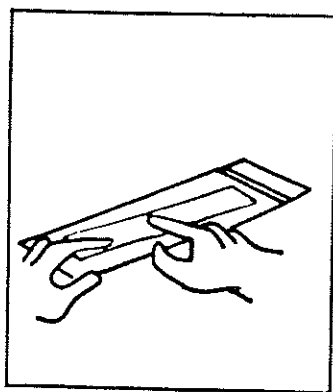
④ミシンより下の部分を検体に浸漬したらすぐ取り出し



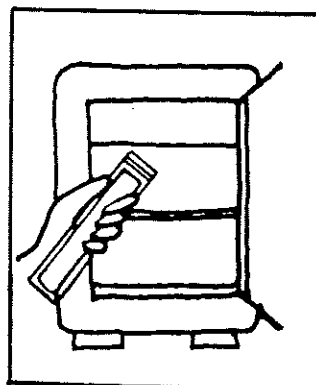
⑤ミシンの部分がチャックより下になるように入れる



⑥ペーパーを袋の上から押さえて、ミシンの上の部分を指できり取る



⑦平らにおき指の腹でなせるように空気をぬきペーパーと袋を密着させてチャックを閉じる



⑧密封したペーパーを35～37℃の孵卵器に入れる

3. 使用上の注意

- 1) 検出紙を操作するときは指先をよく洗った後、アルコール綿などでよく消毒すること。
- 2) ペーパーは完全無菌（滅菌）になっているので、ミシンの上部以外には直接手を触れないこと。
- 3) 検体中にペーパーを浸漬したら、検体の滴を自然によく落すこと。
- 4) 元の袋にペーパーを入れて、指の腹で袋の上から軽くおさえるようになでて袋とペーパーが密着するように、中の空気をぬくこと。この場合あまり強く押してペーパー中の検体がおし出されて袋に出ることのないように注意すること。
- 5) 培養後の赤色集落をかぞえる場合は、袋にペーパーを入れたまま上からマジックインキで赤色集落の上にしるしをつけながらかぞえる。その場合ペーパー中の内部にある集落をかぞえる場合は、光線にすかしながらかぞえると、内部のものまでかぞえることができる。

I 基礎試験

1. 検出紙の試料吸収量

検出紙は検体試料が1 mlまたは1 g吸収されるように工夫されているが、実際にどの程度の試料が吸収されているかを検討した。まず直示上皿天秤（誤差10mg）でユニパック中のペーパーのミシン部を切り取り、袋入のまま重量を測定し、取出した後、牛乳中に浸漬し、余滴をおとし、再びユニパックに納め、そのまま重量を測定し、その差を求め、試料の吸収量とした。42ロット420枚の平均をみると1.2gで、もともと1g吸収されるように工夫されているものが約20%近く余分に吸収されているものであることが判明し、後述の性能試験の結果が平板法に比較して20%近く菌数が多く検出されることを相殺して考えてみると、両者は比較的よく一致していることがわかる。

検出紙の大腸菌群検出のための性能が従来の平板法（デソキシコール酸塩寒天

以下デソ寒天)と比較して、大腸菌群の出方がどのように相違するかを検討する場合には、次のような方法による。

2. 牛乳を用いての検出紙の性能試験

まず牛乳 180mℓを滅菌し無菌にした後、別に普通ブイヨンに 18 時間培養した大腸菌 (E. coli) を、食塩水で 10 万倍 (10^5) に希釈したもの 1 ml を先の牛乳中に入れ、よく攪拌した後試料とする (この牛乳中に含まれる大腸菌の数は大体 30~100 ケ/ml となる。)

調整した資料は、先に滅菌したものであるから接種した大腸菌しか検出されないようになっている。これに前述の「検出紙の使い方」に示した方法に従って牛乳中にペーパーをミシン線のところまで浸漬し、取出して余分の滴を静かによく落とす。その後、元の袋にペーパーを納入した後、袋の上から軽く押さえ空気をぬいて密封し、フラン器の中で一夜培養し、翌日取り出して赤色集落をかぞえる。成績は同一ロットのペーパー 10 枚の平均値であらわす。

検出紙による方法と同時に大腸菌群検出用の平板培地 (デソ寒天) を用いて検体 1 ml ずつを 10 枚のペトリー皿にそれぞれとり、別に用意した上記培地を流し込みよく混釈して平板とする。一夜培養後平板に認められる赤色集落をかぞえる。この場合も平板 10 枚の平均値であらわし、両者の成績を比較する。多くの場合ペーパー値とデソ寒天とではペーパー値の方が菌数は多く検出される。それはデソ寒天培地の方が大腸菌以外の菌の発育を抑制する物質が、ペーパーの場合よりも多く含まれているため、大腸菌の発育抑制もより強いためと、前述の試料吸収量の相違である。日本食品衛生協会では検出紙の検査合格基準としてデソ値と比較して、同一結果から 2 倍の菌数までのものを合格とし、もともとこの種の方法が検体中に含まれる細菌数の多寡により本質的にバラツキの多いものであることから、この基準にはずれる成績のものがある場合でも、ペーパーの 5 % 以下の場合には合格としている。われわれが多数のペーパーについてロット別に検討したところ、研究開発途上にあつた当時のペーパーについては、培養試験の結果がデソ寒天値と比較して非常にバラツキがあり、実用上にも多少影響をおよぼすのではないかと考えられるようなペーパーが認めら

れたが、その後の製品は 95 % 以上が合格している。

3. 大腸菌群簡易検出紙とデソ寒天法のメカニズムの相違

大腸菌群簡易検出紙とデソ寒天法とでは大腸菌の純培養で試験する限りではよく一致した成績を示すが、大腸菌以外の細菌が含有するような実際の検体では、赤変菌数が相違することがしばしばある。これは両者のメカニズムの相違によるもので、デソ寒天法では培地中に発育した大腸菌群が、培地中の乳糖を分解した結果、できた乳酸が培地中のデソオキシコール酸ナトリウムからデソオキシコール酸を遊離し、これと培地中の中性紅が結合して、集落に沈着発赤するのに、検出紙では、デソオキシコール酸ナトリウムはグラム陽性菌の発育を阻止するに止まり、乳糖はここでは単に細菌の栄養源として利用されるのみで、両者の関連はなく、したがってデソオキシコール酸ナトリウムの阻止作用を受けないグラム陰性の菌はペーパー上に発育し、これらの細菌のもつコハク酸脱水素酵素によって還元される T T C (2, 3, 5, Triphenyl - Tetrazolium Chloride の略) の試薬により、集落が赤色となるという機構を利用したもので、両法は全く異った機構をもとに考案されたものであるから、したがって検体中にデソオキシコール酸ナトリウムに抵抗する細菌が存在すれば、それらの菌がペーパー上で発育し、大腸菌群がかりに存在しない場合でも赤色スポットの発現をみる場合がある。そのような菌が大腸菌群と共存すればデソ寒天値より大きい値を示すことにもなるわけである。しかし検出紙による方法は、デソ寒天法がかなりオーソドックスな方法であるのに対して、あくまでも推定試験の範囲にとどまるスクリーニング法として、宿命的性格をもつ以上止むをえないものと考えられる。このメカニズムの相違から実際一般食品などに用いた場合両法の成績に相違することがしばしば認められるが、T T C 試薬により赤色スポットを呈する菌群は、いずれも衛生的取扱をうけなかった場合に認められるもので、広い意味では、大腸菌群の存在するような種々の汚染をうけているような検体からはよく検出されることから、デソ法赤変菌も、T T C で赤色スポットを呈する菌も同じような意味をもつものであると考えられる。このことから、結果に対して同じような考え方を導入することも現場検査としては、定性

的には許されてもよからう。

Ⅱ 応 用 試 験

1. 保険所の試験室，またはそれと同等以上の試験室で行う場合

A 牛乳，アイスクリーム等の，大腸菌群の有無を定量的，または定性的に測定する場合

1) 未殺菌牛乳に応用する場合

定 量 試 験

集乳場，またはタンクローリーで運ばれてきた牛乳を，牛乳処理場等で受入検査などを行なうような場合に，検出紙で大腸菌群の定量試験を行う場合は次のような方法で行う。

まず適当な容器に無菌的に採取した牛乳を原液，10 倍液，100 倍液，1000 倍液（必要によりさらに高希釈をするが，多くの場合 3～4 オーダーで十分）を生理食塩液でそれぞれ調整し，その各液（10ml 程度をペトリ皿に入れるとペーパーを浸漬しやすく便利である。この場合ピペットでペーパーに 1 ml 滴下する方法はあまり効果的でない）に検出紙を浸漬し，各オーダーで，それぞれ 2 枚のペーパーを使用する。試料を調整したら，その後の検査方法は前述の，「……の使い方」に従い，赤色スポットが 30～50 程度検出されるところを選んでかぞえ，その希釈倍率を換算して牛乳 1 ml 中の大腸菌群の数とする。通常生乳を検査すると，デソ寒天値とペーパー値とでは後者の方が相当多くの赤色スポットが認められる。われわれの経験では 5 倍から 10 倍程度ペーパー値の方が多い。これは，前述したように大腸菌群以外のいわゆる低温菌に属するような菌群が含まれている場合が多いからである。

2) 生乳に応用する場合

定 性 試 験

生乳の大腸菌群の有無を定性的に検べる場合は，適当の容器に牛乳を採取し

てくるか、直接牛乳かんの牛乳中に 2 枚以上のペーパーを浸漬し、以後は、「……………使い方」に従う。結果の判定は赤色スポットがペーパー面に拡がり、菌数測定ができないようなものを卍とし、30 ケ以下を+とし、その中間の値を示すものを卍とする。またその時の事情により尺度を設定して爾後の成績と比較する。

3) 殺菌牛乳に応用する場合

定量または定性試験

市販のビン装乳中の大腸菌群検出のために検出紙を応用する場合は、フード・キャップを無菌的に取りはずした後、牛乳中に 2 枚のペーパーを浸漬し、「……………使い方」に従って検査を行った後、キャップを元にもどして密栓し、35°~37℃のフラン器に 4 時間静置し、再度前述同様の検査を行う。この場合は通常、牛乳そのままのみの検査を行い 10 倍液以上の稀釈は原則して必要ない。結果の判定は増菌前のもので菌数測定ができるものでは、それぞれ定量値を求めるか、あるいは定性的な判定でもよい。この場合、増菌後の成績では、デソ寒天法では赤変菌が認められないのにペーパー法では赤色スポットが認められることがあり、デソ値との比較では相違する場合もあるが、これはいわゆる低温菌などの汚染によるもので、その有無を検べることもできる。

4) 殺菌工程（製造工程）中の牛乳に応用する場合

牛乳処理工場等で、製造工程中、特に殺菌工程以降の牛乳の大腸菌群検出の有無を品質かんり上行う場合は、製造工程順に従って無菌的に適当な容器に試料を採取した後、ビン装中の牛乳と同様な方法で検査を行う。この場合は直接増菌前に検査するよりも、採取した試料を直ちにフラン器内に静置して増菌、（4 時間）した後、検査するのがよい。殺菌牛乳では大腸菌群は陰性であることが法的に要求されていることから、定量的測定を行う必要はない。したがって増菌後の試料で定性的測定をするだけでよい。もし増菌後でも極くわずかな大腸菌群しか検出されないようなときには、同様のテストを爾後行う場合検出紙を 1 検体に対して数枚以上使用し、検出紙何枚中何枚が陽性というように判定することにより大体の傾向を知ることができる。

5) アイスクリームに応用する場合

アイスクリーム類の大腸菌群の検出に検出紙を応用する場合、これも法的には大腸菌群陰性と規定されているため定量的に測定する必要はなく、したがって原液（10倍液）についてのみ行えばよい。まずカップに入っているアイスクリームは、そのまま室温に放置し、ほどよく溶解（滅菌スプーンまたはピペットで採取できる程度）した後、1gまたは1mlを取り、9mlの生理食塩液中に投入し、よく攪拌して原液とし、それに検出紙を浸漬する。その後は「……使い方」に従う。アイスクリームの場合は稀釈しないで、そのままのものを溶解してペーパーを浸漬しても、試料がペーパー中に浸透せず、表面に塗抹されたようになるだけで、結果の判定ができない。この場合も事情によっては、検体そのものを、そのままフラン器に4時間程度放置し、増菌後検査すれば効果的に測定できる。

定性的でよいので2枚以上のペーパーを使用して赤色スポットの有無をみればよい。

6) 氷菓子類およびジュース類に応用する場合

氷菓子類およびジュース類も法的には大腸菌陰性と規定されているため定性的に大腸菌群の有無を検べればよい。氷菓子類の場合は、検体そのものを室温に適当に放置し、完全に溶解して水様にした後、検出紙をその中に浸漬し、その後は「……使い方」に従う。この場合も定性的測定であるので、1試料2枚のペーパーを使用し、大腸菌群の有無を検べればよい。この場合氷菓子またはジュース類に赤色の食用色素を使用している場合には、その色素によって結果の判定が困難の場合があるのでよく注意して判定するか、生理食塩液の10倍液で検査するような工夫が必要である。

その他、上述した食品類に類似のものは、検体が液状のものであれば、検体そのものにペーパーを浸漬するか、生理食塩液で10倍液（1gまたは1ml:9ml）を作製し、それにペーパーを浸漬し、その後は「……使い方」に従って行い、定量的測定をするか、定性的測定に留めるかは、その時に選択し、法的規定のあるものは定性的測定でよい。この場合、その結果をできるだけ正

確に求めようとするならば、検出紙の枚数をできるだけ多くし、できうれば1試料5枚以上使用することがのぞましい。

B 飲料水（井戸水等）や食品製造上に直接関係のある使用水、またはプール、海水浴場、公衆浴場、下水等の大腸菌群の有無を定量的、定性的に測定する場合

1) 飲料水（井戸水）等に応用する場合

飲料水（井戸水）等の大腸菌群の有無を測定する場合も、法的に大腸菌群陰性と規定されているため定性試験でよい。ただしこの場合1 ml 中に陰性でなく、50ml中陰性とあるため本来ならばペーパー50枚を1試料に用いなければならないが、大体の傾向を知る目的であれば10枚程度使用することにより目的をある程度達することができる。この場合は試料の調整は必要なく、滅菌した適当な容器または後述の滅菌ユニパックに無菌的に採取したものの中にペーパーをそのまま浸漬し、その後は「……………使い方」に従う。

飲料水でも浄水場等で浄化前の原水等について検査する場合や、明らかに汚水等の混入のおそれのある井戸水等では大腸菌群陽性の可能性が高いため、ペーパーの数は1試料2～5枚程度で結果を判定することができる。

もし大腸菌群の汚染が高く、定性的検査の結果、再度定量値を求める必要がある場合は10倍、100倍と適宜希釈して、（この場合も滅菌ユニパックは便利である）赤色スポットが30～50前後認められるペーパーを測定し、換算すればよい。

2) 食品製造上に直接関係のある使用水（たとえば豆腐の漬水、ゆでめんの漬水）等に応用する場合

1) 豆腐の漬水

普通の豆腐が水中に静置されたまま市販されているような場合、その漬水中の大腸菌群を測定する場合は、通常は原液だけの試料で定性試験または定量値まで求めることができる。しかし、その保存の状態、漬水の換流の有無、容器の材質、取扱の良否、食品残渣の混入状態等により、その汚染状態は異なり、汚染状態を定量的に知る必要がある場合は適宜10倍、100倍と希釈して、それぞれ各希釈液について2枚以上のペーパーを使用する。各液にペーパーを浸漬

した後は「……………使い方」に従う。

豆腐の漬水にも大腸菌群以外でTTC試薬で赤色スポットを呈する菌群が含まれていることがしばしばあり、清水の取扱が不良であればあるほど、その傾向は大きく、したがってデソ寒天法と比較すると、その差は大きく、ペーパー値の方がはるかに菌数の多い場合がある。しかし前述したように、赤色スポットが大腸菌群でなくても、このような菌群が多く認められることは衛生的に決して好ましい状態でないことから、この種の簡易検査法の目的には十分答えるものであると思う。

Ⅱ ゆでめんの漬水

夏場好んで食べるもりそば等から、大腸菌群が検出されることが想像以上に多い。これは、その製造中のゆでめんの冷却水が大腸菌群によって汚染をうけ、それがめん類に移行すると、容器の取扱不良（洗滌等）により大腸菌群が汚染し、それらがめん類に移行するためといわれている。そこで冷却水の大腸菌群を検べることがある。これに検出紙を応用する場合は大体豆腐の漬水に従えばよい。

Ⅲ 缶詰または包装食品等の加熱後の冷却水

缶詰食品または包装食品（包装豆腐）などの製造工程中、加熱後の製品を冷却水中で冷却する場合、この衛生かんりの良否が製品の保存性等を大きく左右することがある。この場合は冷却水中の細菌が製品の巻締め、あるいは結紮不良等で、その製品中に逆流したためによるものが多い。もし大腸菌群の検出されるような冷却水であれば、消毒を完全ににするとか、いろいろ防止策を講じなければならない。そのような心配が十分考えられるか否かを検討するために検出紙を応用する場合は、飲料水、豆腐の漬水等の方法に従えばよい。この場合も大腸菌以外のTTC陽性菌が認められることがあるが、冷却水中の細菌はどのような細菌であっても品質への影響は同じであるから赤色スポットが大腸菌群であろうとなかろうと同一視した考え方で処理してよい。

3) プール水、海水浴場等に应用する場合

学校や遊園地のプールの汚染状態を知るのに大腸菌群の有無（菌数）を検べ

るのが一般的である。海水浴場における汚染状況の指標も同様で海水浴場の遊泳禁止の条件は、海水 1 ml 中 5 万以上と規定されている。

学校のプール水の大腸菌群数を測定する場合は、プール水のなかにそのままペーパーを浸漬し、その後は「……の使い方」に従う。プールは汚染の程度によっても異なるが、通常 1 試料につき 2～5 枚のペーパーを用いて行えばよい。海水浴場の場合、規定以下であるか、以上であるかを知る必要がある時は適宜 10 倍、100 倍、1000 倍と希釈して、それぞれについて 2 枚のペーパーを用いて測定し、30～50 程度赤色スポットの認められるものをかぞえ、換算して海水 1 ml 中の大腸菌群の数を出す。またプール水では消毒薬の効果を大腸菌群の有無を測定することにより知ることができる。その場合できるだけ多数のペーパー（10 枚以上）を用いて測定するのが理想的である。

4) 公衆浴場水に応用する場合

公衆浴場水の大腸菌群検出のために検出紙を応用する場合は、飲料水中の大腸菌群の測定法に従えばよい。この場合、浴場水は採取するまでかなり高温で保持されているため、菌が熱の作用をうけ発育を阻害されていることから培養時間は他の場合よりも長くする方がよく、牛乳等は 15 時間程度で十分測定でき、あまり長時間培養するとかえって赤色スポットが拡がり過ぎて測定に不適当な場合があるが、浴場水は 20 時間以上培養する方がよい。この場合も汚染の程度によって異なるが、より正確に大腸菌群数を測定しようとする場合は、10 枚程度のペーパーを使用するのが理想的であるが、スクリーニング程度なら 2 枚程度で測定し、結果によって爾後の検査のとき枚数をふやすようにすればよい。

5) 下水（河川水）等に応用する場合

下水または海水浴場附近の河川水（貝類の養殖海域附近の河川）の大腸菌群を測定する場合は、その汚染が一般的には高いため、原水そのものの測定だけで、定量値が求められるような場合は非常に少ない。特に下水の場合等はその傾向が著しく、10 倍、100 倍、1000 倍希釈液程度まで測定してみる必要がある。それぞれの試料にペーパーを浸漬した後は「……使い方」に従う。

稀釈には後述滅菌ユニパックが便利である。

この場合は、大腸菌群以外の菌でTTCの試薬に反応して赤色スポットを呈する菌群が相当存在することがあるため、デソ寒天値とペーパー値に相当の差違のあることがしばしばある。

C 一般食品（魚介類、豆腐、菓子類、めん類）等の大腸菌群の有無を定量的、定性的に測定する場合

1) 魚介類、特にサシミ、生カキ等に応用する場合

魚介類とくにサシミの大腸菌群の測定に検出紙を応用して、定量的測定をする場合は、まずサシミの適当量を収去し、その10gを秤量し、生理食塩液の中に入れ、全量を100mlとし、ホモジナイザーでよく細砕するか、または10gを滅菌乳体で適当量の生理食塩液で乳剤様によく細砕した後、生理食塩液をそれに追加して全量を100mlとして、これを原液（10倍液）とする。必要によりさらに100倍、1000倍液とし、それぞれの液に2枚のペーパーを浸漬し、その後は「……使い方」に従う。定性的に測定を行う場合は、サシミ10gを滅菌容器中の90mlの生理食塩液中に投入し、細砕することなくそのままよく攪拌し、その液中にペーパーを浸漬する。この場合、正確な値を出すことは無理であるが、必要により10倍、100倍、1000倍と稀釈液をつくって、それぞれに2枚のペーパーを浸漬する。サシミの場合10倍液以下ではペーパー中に無数の赤色スポットが出る場合が非常に多いので、それ以上の100倍液から1000倍液程度のものを検べるのがよい。この場合もデソ寒天値と相違する菌数を示すことがサシミ中の細菌の様相によって認められるので注意が肝要である。

生カキの場合もサシミに準じた方法で行えばよい。

2) 豆腐に応用する場合

豆腐中の大腸菌群の有無を定量的に測定する場合は、やはり検体10gを無菌的に採取し、適当な容器中の滅菌食塩液の中に入れ、全量を100mlとした後、よくホモジナイズして原液とし、要に応じて、100倍、1000倍液と稀釈して、それぞれ2枚のペーパーを用いて測定する。

定量的測定の必要のない時は、豆腐中に滅菌したスパーテル等で切り込みを

つくり、その間にペーパーを挿入して検体を吸収させるか、または豆腐 10g を滅菌生理食塩液 100ml 中に投入し容器ごとよく振盪して内容物を細碎した後、その中に 2 枚のペーパーを浸漬する。この場合も多くのは多数の大腸菌群が検出されることから、原液（10 倍液）だけでなく、さらに高希釈のものについても行う方が効果的である。

3) 菓子類、特にアン類、生クリーム等に応用する場合

この場合も前述の豆腐に応用する場合と同様に検体 10g を滅菌生理食塩液に投入し、全量を 100ml とし、容器ごとよく振盪してホモチナイズした後、要に応じ 100 倍、1000 倍液に希釈して、それぞれの液に 2 枚のペーパーを浸漬して以後「……………使い方」に従う。

4) めん類に応用する場合

めん類に応用する場合も、基本的には他の食品に応用する場合に準ずればよいが、アン類と異なり容器ごと振盪しただけでは、内容物がホモチナイズされないために、検体 10g を滅菌生理食塩液に投入し、全量を 100ml とした後、ホモチナイザーにかけて均一化し原液とした後、要に応じ希釈して、それぞれに 2 枚のペーパーを使用する。この場合ホモチナイザーにかけて均一化することができない場合は、アン類のごとく、容器ごと強く振盪して内容物をよく洗い出すようにした後、行えばよい。

以上代表的な一般食品について述べたが、液状（たとえばジュース類等）の食品の場合を除いては、ほとんど 10 倍液（検体 10g を生理食塩液に投入し、全量 100ml とする）を造り、それを原液として、その中にペーパーを浸漬する方法について述べたが、食品によっては容器ごと振盪することにより均一化するものもあれば、またホモチナイザーか乳鉢を使用して均一化しなければならないものもあり、いずれも食品そのものに直接ペーパーを浸漬するだけで測定できるものは非常に少なく、ほとんどの食品が、少なくとも 10 倍希釈をしたものを均一化した後、ペーパーを浸漬する方法を採用することがのぞましい。

D 調理加工、加熱、冷凍食品等の大腸菌群の有無を定量的、定性的に測定する場合

ここで対象とする冷凍食品とは、前処理を施した後、急速冷凍を行ない、摂食前に簡単な加熱や調理により食ぜんに供されるものであって、消費者にわたる直前まで凍結され保蔵されるもので、しかも容器包装に入れられたものである。

1) シューマイ類ぎょうざ類に応用する場合

最近デパート、スーパーマーケット等で購入後簡単な加熱（蒸すかまたは油で揚げる）をすることによりそのまま食べれるように味付け加工したものを凍結したものが売られている。これらの食品の消費は時代とともに盛んになり、製造も消費の増大にみあって盛んになってくると考えられる。そこでいくつかの代表的な食品をとりあげて、それらについて大腸菌群の測定に検出紙を応用して、定量的測定をする場合、まず包装されたままのシューマイ類（ぎょうざ）を室温に出し、そのまましばらく放置して解凍し、中心部に若干凍結部分が残っている程度までになったら、滅菌したメス、ハサミ等で検体を細碎しその適当量を収去し、その10gを秤量し、生理食塩液の中に入れ、全量を100mlとし、ホモジナイザーでよく細碎するか、または滅菌乳鉢で適当量の生理食塩液で乳剤様によく細碎した後、生理食塩液をそれに追加して全量を100mlとして、これを原液とする。必要によりさらに100倍、1000倍液とし、それぞれの液に2枚のペーパーを浸漬し、その後は「……………使い方」に従う。定性的に測定を行う場合は、シューマイ類10gを滅菌容器中の90mlの生理食塩液中に投入し、そのまま強く攪拌してできるだけこまかく砕いた液をつくる。この場合セット中に添付されている滅菌ユニパックを用いる場合は、パックの外側を指でおさえるようにして細碎し強く振盪すれば効果的である。そのようにして作った原液中にペーパーを浸漬する。この場合、正確な値を出すことは無理であるが、必要によって適当に稀釈したものについても、それぞれ2枚のペーパーを浸漬する。冷凍食品のなかには製造時に加熱をうけたものもあれば、素材の一部は加熱をうけたものが含まれていても、全体としては未加熱のもの、または全く未加熱のもの等々があり、大腸菌群の出方もそれぞれ加熱の程度や有無によって

大きく異なるので、原液で無数に赤色スポットが出現するようなものにあつては、さらに稀釈したもので行なうのがよい。シュウマイ、ぎょうざ類でも、製造時に加熱をうけたものと、生のものとは、大腸菌群の出方が異なり、前者は原液で検査をすればよいが、後者の場合は100倍から1000倍程度の稀釈のものがよい。

2) コロッケ、ハンバーグ、フライ類に応用する場合

コロッケ類、ハンバーグの場合は、シュウマイ類（とくに素材の一部が加熱され、その他のものは生のもの）のある製品と同一の取扱い、検査方法をとればよいが、フライ類の場合は、検体採取の場合、外側いわゆるコロモの部分と中の食品とわけて採取し、検査をするとよい。この場合は、それぞれ10gを滅菌容器に採取し、生理食塩液の中に入れ、全量を100mlとし、ホモジナイザーでよく細碎するか、滅菌乳鉢で適量の生理食塩液で乳剤様によく細碎した後、生理食塩液をそれに追加して全量を100mlとして、これを原液とする。必要によりさらに100倍、1000倍液とし、それぞれの液に2枚のペーパーを浸漬し、その後は「……使い方」に従う。定性的の場合は、シュウマイの項に準ずればよい。

3) 茶わんむし、シチュー類に応用する場合

包装（時に紙製カップ入り）のまま室温で解凍し、糊状に溶解したものを、滅菌スプーンでよく攪拌した後、10gを滅菌容器に採取し、生理食塩液の中に入れ、全量を100mlとした後よく振盪し、均質液ができた場合はそのまま原液（10倍液）とするが、もし固型の食肉類、きのこ、野菜類が混合されている場合は、ホモジナイザーにかけてよく細碎して原液とする。茶わんむしの場合は卵成分は未加熱（中の食肉類は加熱味付けをしてある）の場合が殆んどであるが、シチュー類の場合は殆んど加熱したものであるので、前者の場合は必要によっては100倍、1000倍程度の稀釈液をつくって、それぞれについて検査をするのがよいが、後者の場合は原液についてのみ行なえばよい。（但しシチューの殆んどが未加熱の場合は前者に準ずる。）それぞれの液について2枚のペーパーを浸漬し、その後は「……使い方」に従う。定性的な場合は滅菌スプ

ーンでよく攪拌した後 10g を滅菌容器（滅菌ユニパック）にとりそれに 90ml の生理食塩液を加えて 10 倍液をつくり原液とし，それについて 2 枚のペーパーを浸漬して行なえばよい。卵成分が生未加熱の場合は大腸菌群以外の赤色スポットがペーパーに出る場合があるので注意が肝要である。

4) その他の冷凍食品に応用する場合

素材に魚介類や食肉加工品，野菜，果物等をいろいろに工夫してつくられたものなどその種類は非常に多くなってきているが，包装（容器）のまま解凍し，それぞれについてできるだけまんべんなく検体を採取するように心がけ，検体が固型のものであれば，ホモジナイザーを用いて均質とし，もし糊状，液状のものであれば，適当な方法で攪拌して均一液をつくる工夫をした後で試料を調製すればよい。もし原液 10 倍に稀釈した後でも，その試料が糊状でペーパーに十分試料がしみこまないような場合は，さらに稀釈して 100 倍液をつくるように工夫するのがよい。また解凍後粘度の低い液状のものである場合，試料の採取はピペット（適当に先端をカットしたもの）で採取してもよい。それぞれの稀釈液中に浸漬するペーパーは 2 枚程度でよい。

E 食器，包丁，マナイタ類，フキン，手指の大腸菌群の有無を定量的，定性的に測定する場合

1) 食器類に応用する場合

前述の各種食品中の大腸菌群の測定は検体自身に含有する細菌を測定する方法を採用したが，食器類等では，そのものの一部を培養する方法でなく，それらに附着している大腸菌群を滅菌綿棒または，滅菌ガーゼを滅菌ピンセットにまきつけ，できるだけふきとり，ふき取ったものを 10ml の滅菌生理食塩液に投入し，よく振盪して，その汚れを洗い出し，その液を測定することにより，食器類に付着している大腸菌群数を測定する方法を採用したが，拭取には後述のユニパック入り滅菌綿棒の使用が便利である。一般の食器のように 10 ml 程度以上の滅菌生理食塩液が入るものであれば，調べようとした食器中に入れその液を使用して，滅菌綿棒またはガーゼでよく食器の内側をふきとり，その汚れをその液で洗いだし，その液中にペーパーを浸漬すればよい。特殊の場合

を除いては、それ以上高希釈する必要はない。この場合は1検体につき5枚程度のペーパーを用うるのがよい。結果の評価は5枚中何枚陽性とするか、または大腸菌群数の出方によっては実測値を求めてもよい。

2) 包丁, マナイタ, フキンおよび手指に应用する場合

この場合も、基本的には食器類と同じ「ふき取り法 (Swab 法)」で、その汚れをふき取ったものを10mlの生理食塩液に洗い出し、その液を測定することには変りないが、とくにマナイタの場合は「ふき取る」範囲を5cm四方 (25平方cm)と定めて行うのが通例である。このために予め5cm四方に硫酸紙などで中を切り取ったものを用意しておき、要に望みその枠内をふき取るか、滅菌できるような金属性の5cm四方の枠をいくつか用意しておくとも便利である。もっとも、正確な値を求めるのであれば、だいたいその程度の範囲をふき取ればよい。マナイタ等の場合にはその汚染の程度によっては、さらに希釈して測定する場合があります、それぞれ2枚のペーパーを用いればよい。包丁の場合は、刃の部分と柄の部分とにわけて「ふき取り法」でふき取ったものを測定する方がよい。手指の場合は指先だけでなく掌全体をよく拭とり、とくに爪の部分はよく拭とることが大切である。包丁の場合のペーパーは食器に準ずればよい。

フキンの場合は適当なカ所を5cm四方 (25平方cm)に切りとり、それを10mlの生理食塩液に入れ、よく洗い出し、その液について測定する。乾燥している場合はそれに2枚のペーパーを浸漬すればよいが、使用中または湿っている場合は必要によって100倍、1000倍液をつくり、それにペーパーを浸漬する。

使用中の食器類, 包丁, マナイタ, フキン等の検査の場合「ふき取り法」によらず直接そのものにペーパーを接着させてやる方法が一番簡便であるが、種々検討してみたところ、現在のところ「ふき取り法」でふき取ったガーゼ, 綿棒の汚れを生理食塩液にふるい出した試料について行う方が多少の煩わしさはまぬがれないが、大腸菌群汚染の状態を適格に知ることができる。

2. 簡単な試験室でフラン器程度のものしかないところで行う場合

保健所の試験室のような種々の設備がないところで、この種の検査を行うの

は、主として小さな食品製造メーカー等が自衛的に行う場合や、小中学校のプール水の衛生かんりにこの種の試験を行う場合等が考えられる。学校のプールの大腸菌群の汚染状態を、使用中に要に応じて検べることは、児童の健康かんり上大切なことなので、ぜひ行ってほしいことであるが、この場合は試料が水であるため、そのままペーパーを浸漬した後、培養する適当な小型のフラン器（ペーパー専用のものが開発されている）があればどこでも簡単にできる。

しかし一般食品や食器類等の汚染を検べる場合は、かならず試料の調製（固型の食品は10倍量の生理食塩液で稀釈して、いわゆる原液をつくるか、または「ふきとり法」に使用する生理食塩液入りの滅菌綿棒、またはガーゼを作成し、汚れをふき取った係、生理食塩液でよく汚れをふるい出す）をすることが必要になり、その程度の準備のできる設備、すなわち滅菌器（フカシ釜）、試験管、綿棒またはガーゼ、ピンセット、食塩、蒸留水等が欲しいものである。

しかし滅菌した試験管や生理食塩液がない場合は現場でコップまたは茶わん等を熱湯消毒した後ピンセット等で取出し、よく水切りした後、熱湯を冷ました湯を一定量その容器に入れ、それに消毒済みのガーゼまたは脱脂綿をピンセットの先にはさんでひたした後（湯ざましにしておく）マナイタ等の表面をよく拭き取ったらそれをコップの中の湯の中でよくゆすぎ、その試料の中にペーパーを浸漬する等工夫することにより、ある程度測定することは可能であると考える。この場合、自分の手についている大腸菌群を試料の中に混入させたり、使用するピンセットなど器具類が完全に消毒されていないと、もし大腸菌群が検出されても、それがどこからの大腸菌群であるか区別がつかなくなるので、十分注意することが大切である。

この種の試験がいろいろの食品や食器類又は飲料水、プールなどに応用されしかも現場や店頭で迅速にこのペーパー法が応用されるようになってきたため、現場検査をより容易にするために簡易セット（ユニパック、綿棒、生理食塩液計量棒）がつくられ、ペーパーと一式にセットされているためこれらの利用は実用的に便利であり、この利用によりある程度の知識と訓練を得ることにより「どこでも誰にでも」できるようになってきた。

Ⅲ 結果の評価の仕方 (結果の読み方)

大腸菌群の簡易検出紙の使い方とその応用の仕方について、牛乳、乳製品から各種の食品にいたるまで、または、それら食品の製造などに用いられる飲料水、使用水についても、検査法を中心にして述べたが、この種の簡易検出紙が一般に普及し、現場検査法としてその優秀性が認められ始めてから約9年の年月を経て今日にいたっているが、その間各種の検査機関はいうにおよばず、一般飲食店にいたるまで、非常に多数の検査結果が集計されているが、最も問題になっていたのが、これによって得られた結果の意義づけ、評価の仕方をどのようにしたらよいかということである。

この方法は既述したように、公定法として国で定められている方法（デソ寒天法）と基本的に異なる方法（培養基中の組成はよく類似しているが）、すなわち公定法は大腸菌群が選択的に発育されしかも赤変した集落をつくるように工夫されているのに、ペーパー法は同じように赤変菌が検出されるようになっているとはいえ、大腸菌群でなくても、それに類縁の菌群（同じような酵素をもっていれば）は赤変するような仕組みになっているために、公定法の成績と比較した場合、くい違いを生じ易く、一見ペーパー法の成績の信頼性をうたがわれるような結果も少なくない。しかしこの相違は両法のメカニズムが異なることから、当然予知できていた点であって、これらの相違点は、それぞれに対応した尺度と評価の仕方をもつことにより是正できる問題であろう。

もう一つの点は、ペーパー法が簡単であるだけに、結果の再現性が公定法に比べてやや劣り、結果にバラツキを生じ易い点である。しかしこの点は公定法を十分マスターした技術者が、それにふさわしい施設で検査を行なった場合と、簡単な知識、技術を身につけた程度の人が行なった場合とでは、明らかに再現性に差があり、前者は均一な成績を得ることが比較的容易であるのに比べ、後者ではそのバラツキはその方法の宿命をはるかに超えてバラツキのある成績を出す例が多い。

しかしこの点は、このペーパー法を訓練と経験をつむことにより或程度マスタ

一することはさして困難ではない。従来とかくこの方法の評価や応用の仕方に問題があったことは、前述の宿命的相違によるものよりも、むしろ公定法で得た結果と簡易法で得た結果を同じ尺度で評価しようとしたところにあっただのではないか、ある食品が法的に大腸菌群が陰性でなければならないと定められている場合は、必ずその測定方法も同時に定められているものであって、方法と評価の仕方（結果の読み方）は表裏一体のものである。それを公定法で使用している培地組成とペーパーにしみこませた培地の組成がよく似ているからといって、本質的にメカニズムの異なった仕組によって作られたものである限り同一視することは所詮無理である。このペーパー法の活用は性能がゆるされる範囲にとどめるべきものであり、それなりの特長、アイデアを有効に生かした尺度をつくって評価し、その結果をもとに、問題を解決するために、その結果を利用するというこの簡易法の開発本来の目的にかなった評価をすべきである。

そこで具体的にこの簡易検出紙のための結果の評価の仕方について述べることにする。

1) 牛乳、乳製品等に対する評価の仕方

牛乳、乳製品に対しては、公定法による法的規制があり、いずれも大腸菌群陰性でなければならないとされているので、製造後まもない一般家庭に配達されたもので、このペーパーにより赤色スポットの認められるものは、まず存在しないと考えられるが、時に冷蔵庫などに保存中のもので、赤色スポットの認められるものがあった場合は、低温細菌の増殖が考えられるもので、この場合は赤色スポットが大腸菌群であろうとなかろうと保存が適当でなく、早く処置すべきものであると判断するがよい。その場合、飲用の可否は100倍以上の稀釈でも赤色スポットが認められるようなものは飲用しない方がよい。

牛乳、乳製品メーカーが製造時、その工程中の衛生管理の良否を現場で迅速に判断するために、このペーパー法を利用する場合は、特に殺菌工程後によく注意し、この場合は比較的きびしい判定をすべきである。なぜならば、赤色スポットが大腸菌群であろうとなかろうと、TTC還元菌は殺菌後の牛乳、乳製品には存在しないはずであるし、現在のメーカーの衛生管理水準では、皆無で

あることを期待してもよい。また若しメーカーが製造時工程中のいずれかで、赤色スポットが認められるような牛乳が生産されている場合は、殺菌後の再汚染の可能性ありと判断して、きびしく衛生管理を指導、検討すべきである。

学校給食などで、児童の飲用する牛乳のビンの外側の大腸菌群汚染の有無を問題にする傾向がまま見うけられるが、キャップのかぶさっている口のところ以外は検査をしてみたところで、余り衛生的意味がないが、もしそれなりの衛生的意義ありとして検査した場合は、赤色スポットがペーパー一面に数えられない程でない限り余り問題にしなくてよい。

2) アイスクリーム、アイスクリーム類、氷菓子類に対する評価の仕方

アイスクリーム、アイスクリーム類、氷菓子類は、法的に大腸菌群が陰性でなければならぬと規制されているもので、いわゆるメーカー品と評されているものから赤色スポットが認められることはまず存在しないが、世に謂うソフトクリーム（店頭でフリーザーを通してソフトクリームを自動的に作り、客にそのまま提供するもの）の中には、赤色スポットの認められるものがある。この場合、明らかに大腸菌群の存在によるものと、それ以外のTTC環元菌（低温菌）の存在によるものとが混在し、まま赤色スポットを大腸菌群とみなす判断をするとあやまちをおこし、トラブルをおこしかねないので、この場合は10倍稀釈液でペーパー一面に赤色スポットが認められるような時には、一度公定法と比較して検討し、その結果により再評価するがよい。

3) 一般食品に対する評価の仕方

一般食品のうち、生鮮魚介類をこのペーパー法で検討した場合は、大腸菌群と低温菌により赤色スポットが無数に検出されることがあり、この場合は大腸菌群によるものよりも低温菌によるものの方がはるかに多いことをよく認識し、少なくとも1000倍以上の稀釈液でペーパーに赤色スポットが認められた時に問題視すればよい。

豆腐の場合（普通のもめん、きぬごし豆腐）や漬水の場合は100倍稀釈液でペーパーに赤色スポットが認められない限り、現状で問題視することは苛酷であろう。

しかし包装豆腐（包装後加熱殺菌したもの）については原液で赤色スポットが認められたような場合は、赤色スポットが大腸菌群であろうとなかろうと、加熱不足や製造後の再汚染を意味するために少しきびしく評価してもよいだろう。

その他の一般食品については、製造時に加熱工程があり、その後の汚染が考えられない場合は、包装豆腐なみに考えればよいが、その後の再汚染がさげられない場合は普通の豆腐なみに評価すればよい。

4) 冷凍食品に対する評価の仕方

冷凍食品のうち、シュウマイ、ぎょうざ類の場合、完全に加熱、調理加工したものである。原液でペーパー面に赤色スポットが認められない限り、また半製品のものは100倍稀釈液で、全くの未加熱のものはその素材に用いたそれぞれの一般食品に準ずるか、1000倍でペーパー面に赤色スポットが認められなければまずよいとせざるを得ないであろう。

5) 食器、包丁、マナイタ、フキン、手指などに対する評価の仕方

食器の場合は10倍稀釈液で、包丁の刃の場合は10倍液で、赤色スポットが10個以下マナイタの場合は1000倍稀釈液で赤色スポットがペーパー面に認められなければよいとする。

6) プール水、海水浴場に対する評価の仕方

プール水の場合は、そのまま浸漬したペーパー面に赤色スポットが認められなければまずよい。海水浴場の場合は1000倍稀釈液で無数に赤色スポットが認められなければよい。

以上代表的なものについて、その評価の目安について述べたが、これは私達が過去2～3年いろいろの検体について、公定法との比較や大腸菌群の存在の有無と赤色スポットとの相関性などを検討した結果と、このペーパー法による実態調査の結果から前述の目安に合格するようなものが、大体世間なみのものであるという意味から示したものである。

従って、検体によっては、大腸菌群が殆んど存在しないのに赤色スポットが一面に認められたり、また公定法とよく一致するなどさまざまの結果がこの方

法では認められ、評価の仕方によっては判断をあやまることがあることもよく承知の上、十分使い方、浸漬の仕方などについて訓練と研修をして使ってほしいものである。

現場検査における評価の仕方

この簡易検出紙による大腸菌群の検査は、そもそも工場や店頭の現場で誰にでも簡単に出来、しかも迅速に結果を出すことが出来ること、さらには検出紙そのものを保存しておいて、後日の検査成績とそのまま比較することができるところに特長がある。したがって、この方法による結果の評価の仕方は、公定法や研究室などで行なっている標準的な方法と同じような評価は本来すべきではない。

すなわち簡易検出紙法による結果と公定法による結果とを比較（これを横の比較、または物差しを横に使うと仮にいう）するような評価の仕方ではなく、またある食品の結果と、他の食品の結果とを比較する（この場合も物差しを横に使うという）ような使い方でもなく、同一食品でもA店とB店とを比較する（この場合も物差しを横に使うという）ような使い方ではなく、あくまでも自分のところの製品の今日の成績と、その成績のおしえるところに従って、検討して製造した明日の成績とを比較し（これを縦の比較、または物差しを縦に使うと仮にいう）するように使うべきである。例えば、ある豆腐屋さんで、この検出紙により、大腸菌群の検査をしたとする。その結果、漬水や、豆腐からペーパー一面に赤色スポットが認められたとする。検査の結果、漬水の汚染は水の換流の不十分や、容器の不潔さにあったためだと原因がわかり、清潔にし水の換流を十分にして、再検査したところ、赤色スポットが認められなくなったとか、赤色スポットの数が非常に少なくなったとか、このように比較して、その結果を評価し、この検出紙の開発の意義と、特長を十分に生かすべきである。なお、日本食品衛生協会では、簡易検出紙を使った場合の評価の目安として、次のように定めている。

日本食品衛生協会判定目安

1. 原液（ふき取った液そのもの）または使用水そのものに赤変菌が認められ

た場合不良とみなすもの

食器類、手指、包丁の刃、かわいたふきん、調理・製造に使う水

2. 10倍にうすめたものに赤変菌が認められた場合不良とみなすもの

牛乳、アイスクリームなど

3. 1000倍にうすめたものに赤変菌が認められた場合不良とみなすもの

まな板、包丁の柄、使用中または使用直後（水にぬれている状態）のふきん
(筆者注 これはあくまでも世間並の結果から考えられたもので、この目安に合格するだけで安心してはいけない。目安まで達していない時には、目安まで、……目安を達成したらさらにうすめない試料でも赤変菌が出ないように努力すべきである。)

〔稀釈の仕方〕

まず原液に相当するものを作ったら、その1 ml を滅菌した試験管または袋にとり、それに別に用意した滅菌した生理食塩液または水を9 ml 入れる（ $1 + 9 = 10$ ）となる。そのようにして作った稀釈液の中にペーパーを入れて検査をした結果が、それぞれの目安となっているものである。

IV あとがき

大腸菌群の検査に従来のデソ寒天培養法と大体同一組成の培養基、試薬を特殊な濾紙に吸着させ、乾燥、滅菌した大腸菌群簡易検出紙が開発されるに及び、その使い方を述べ、とくにその検出紙の性能が従来の平板培養法（デソ寒天法）と、どのような相関関係にあるかを検討してみた。その結果、牛乳、水等を検体とし、標準菌を接種して行った定量試験では、従来法に比較して性能にはなんら遜色のないもので、使用方法の如何によっては、その簡便で迅速にできる長所を十分生かすことのできる大腸菌群用検出紙であることが確認できた。しかしこの検出紙と、従来の培養法とは全く異ったメカニズムの上に立って成立しているため、検体中の細菌の様相によっては両者に相当の相違のある場合のあることも考えられるが、検出紙中に含まれる試薬に対する態度から、それら試

薬に反応する菌群は大腸菌群と同様の見方、すなわち衛生的良否の判断の指標（汚染源の有無）となることから、スクリーニングテストの方法としては非常にユニークなものであると考えられる。そこで、検出紙を用いて種々の検体、すなわち牛乳、乳製品類、氷菓子、飲料水等から一般食品や食器、マナイタ類にいたるまで、その応用の仕方について、ある程度定量的に行う場合から、全くの定性試験の場合まで幾つかの例に分類して、その具体的方法について述べた。

またこの検出紙によって検査したいろいろの食品などの大腸菌群（大腸菌群以外の赤変菌をも含む）の汚染状態の大体の様相（世間並みの汚染状態）についても述べた。

この方法は、あくまで簡単に現場で、誰にでも出来る方法であるだけに、この方法なりの評価、もの差しのあて方を考え、この方法の開発された意義や、特長を生かした使い方、すなわち今日の製品より、明日の製品をより良くするため、製造工程中の問題点を工程順に調べて、その原因を見つけ出すなどをして、あなたの店から大腸菌群が検出されるような不潔な食品を追放するためにあなた自身がみずからのために役立たせてほしいものである。

『付』 質疑応答

参考資料として、すでに検出紙について検討していただいた各保健所の試験室などから、使用結果とともに質問が幾つか連絡があったので、それにお答えしたものを掲載する。

質問 1 検出紙の原理について？

答 試料中に大腸菌群が存在すると試料と共にペーパー中に吸着され、濾紙中の培養基を利用して大腸菌群が発育し、いわゆる集落を形成する。この大腸菌群はコハク酸脱水素酵素を生産し、これによってTTCが還元され集落の部分が赤色を示す。

質問 2 公定法との関連性について？

答 公定法はあくまで法律に基づいた試験法で、同法では日常の検査や検査設備のない業者においては不便なため、それを簡便化することにより誰でも衛生かんりができるようにしたのが検出紙である。

また一部の食品の公定法として定められているデソ寒天法と比較すると基礎試験の結果ではよく一致するが、両者のメカニズムが全然異なるため（本文7P参照）もし試料中に大腸菌群以外のTTC反応（赤変）陽性の菌群（グラム陰性菌）が存在するような試料の場合は、検出紙の方が菌数は多く出ることがあり、本法はスクリーニングテストとして実用的であり、あくまでも推定試験の域を超えない。

質問 3 定量判定はできないか？

答 本法は前述した通り定性的推定試験として簡便であるが、検体の様相と試料の調整により、ある程度定量的な測定は可能であるが、成績のバラツキ、メカニズムの相違を考えれば公定法と同一視した定量判定は無理であるが、本法の結果同志を比較検討する場合等には、そのような判定もある程度許されると思う。

しかし食品衛生法に定められている食品については、ほとんどが陰性と定められているので、定性的に迅速、簡便に行えることで十分と思われる。

質問 4 検出紙による衛生かんりの方法について

答 従来行われている大腸菌群検査には 1) 製品検査, 2) 汚染源追究検査の二つがあるが, 一番重要視されているのは汚染源追究である。すなわち製品検査において大腸菌群が検出されたとき, どこに原因があったのか, 単に取扱上の不手際なのか, 製造工程中に問題があったのかを追究し, 問題の所を清潔にすることにより製品の品質保証ができる。

検出紙は従来の方法のように特殊な設備や資材などの必要がなく, 簡便に行なえることから, 使い方を工夫することにより衛生かんりが多角的に行なえると同時に, 製造現場での衛生教育の資料や直接そのものをみせて指導するためのよい資料となる。

また検査方法として……

1) 検査設備のある会社などでは

- a) 現在実施している公定法としてのデソ寒天法との平行実施, または全面切替による方法
- b) 1週間のうち5日を本法で, 他の2日を公定法による等の組合せによる方法など

2) 検査設備のない会社などでは

- a) 1検体に対して5~10枚(要に応じ増減)の検出紙を用いて検査を行い, ペーパーに現われた赤変の状態から大腸菌群の状態を判断し, たとえば, 当初5枚全部陽性であれば, 次回は3枚陽性, さらには全部陰性というような具合になるように管理する。
- b) 日常の検査で, あまり赤変班が認められなかったのに突然無数の赤変班が認められたり, 陽性枚数が多くなった場合は, 当然汚染源の原因究明と同時に, 精密検査のため最寄の保健所に相談されるのがよい。

質問 5 どんな検体でも浸漬時間は3秒くらいでよいか?

答 試料中に浸漬する時間は3秒前後で十分試料が吸着されればよい。ただし浸漬した後ペーパーから余分の滴を静かによく落すこと。ペーパーを試料中に浸漬する「コツ」は一気に試料中に浸漬することで, ゆっくり浸漬しては

いけない。

質問 6 試料にペーパーを浸漬した後、元のユニパックに戻して指の腹でなでるようにして空気を抜いた場合、ペーパー中の試料がにじみ出るが結果に影響はないか？

答 指の腹であまり強くなでると、そのようなことが起き、ペーパー中の試料にバラツキが生じ、結果がバラツクことが当然予想されるので、柔らかくなくて空気を抜くこと。

質問 7 ユニパック内に空気が入ったまま培養すると、どんな影響があるか？

答 ペーパーとユニパックが完全に密着されていないと、直接指示薬が空気にふれるため、酸化して一面が赤変することがあるので、菌の検出状態をみる場合、誤りやすくなるから注意することが大切である。

質問 8 大腸菌群数を数える場合、ペーパーの表裏を数えるか？

答 ペーパー全体に試料が吸着されているため、ペーパー全体に赤色班がばらまかれたように見える。したがって表裏から赤色班をかぞえ、同一の集落（赤色班）であるか否かは、光線にすかしてみればよくわかる。ペーパーの内部に集落ができている場合は光線にすかしてみても、はじめてかぞえられるものがあるので、かならず明かるいところをかぞえるのがよい。

質問 9 赤色班が大小検出されるのはどのような原因か、またぼんやりした赤色班がでることがあるか？

答 一般の公定法の平板法の場合でも集落に大小が認められるように、主として大腸菌群の活性度の相違により、そのような現象が起る。

ぼんやりした赤色班の場合も同様で、活性のよい元気な菌ほど鮮明な赤色班を呈するが、活性度の弱い菌はうすくぼんやりした赤色班で現れる。

質問 10 ペーパーが全面赤色となるのはどんな原因か？

答 この場合二つのことが考えられる。まず試験中に大腸菌群が無数に存在したために赤色班が多数認められ、お互いに重なり合っているため全面が赤変した場合（この場合は班点の濃淡により大体見当がつく）かペーパーの端から試料をしみ込ませたような浸漬の仕方をした場合はそのようになり易い、

また取扱いが悪く日光や空気に長時間曝したものを使用したか、しかもそのまま密封しないで長時間置いたような場合にはそのような現象は起る。

質問 1 1 24時間以内に赤色班が検出されないままフラン器に放置し、3日後に取り出したところ、赤色班が検出されたが、どのように判断すべきか？

答 デソ寒天培地でも起ることがあるが、そのような場合多くは大腸菌群でなく、他のグラム陰性菌と思われるが、実際上の検査では24時間で培養を打ち切ること。

質問 1 2 培養時間は8～12時間で十分か？

答 質問 10 で述べたように、大腸菌群のなかには、菌によって活性度の違うものがあるので、牛乳のような栄養源の豊かな検体中のものは培養後5時間くらいで検出される場合もあり、水や浴場水のような栄養源の乏しい検体中の菌は20時間ぐらいかかって検出される場合がある。しかし一般的には一夜培養（15～18時間）が最も良好であり、18時間前後の培養では培養時間の長短による培養結果にそれほど相違はないが、培養時間をあまり長くすると集落が大きくなり、赤色班が拡散することがあるから注意する必要がある。

質問 1 3 1検体に対して検出紙はなん枚を使用したらよいか？

答 試料中に含まれている大腸菌群の数が多い場合には2枚のペーパーを使用し、その平均値で目的を達することができるが、菌数の少ないと思われる場合には5枚程度のペーパーを使用し、その平均を求めるとか、あるいは5枚中何枚陽性かをみることにより目的を達することができる。

質問 1 4 大腸菌群以外の細菌が検出されることはないか？

答 ペーパー中に吸着されているデソキシコール酸によって大腸菌群以外の雑菌（とくにグラム陽性球菌等）は、検出されない仕組みになっているが、実際にはグラム陰性桿菌では検出されるものがあり、前述したようにTTC試薬陽性菌が検出され、ためにデソ寒天法の値と異なる場合があるが、これらの菌群も大腸菌群同様非衛生的な場合や、好ましくない状態の時に検出されることを考えると、この種の試験では同様な意味をもつと考えて大きな誤は

ないと思う。

質問15 ユニパックからペーパーを取り出したりするとき、手指から大腸菌群がペーパーに移行することはないか？

答 本法を行う前には必ず手指を逆性石けん水かアルコールでよく消毒してから行うこと。消毒が不完全だと特にペーパーの出し入れの際手指の大腸菌群が汚染してペーパー中に検出されることがありうる。しかし一般的には、よく注意して行えばそれほどの影響はないものと考えられる。

質問16 検出紙を太陽や蛍光灯のあたる場所においても影響はないか？

答 使用中に蛍光灯に当てる程度なら影響はないが、太陽の直射はさける。また保存は冷蔵庫でなくともよいが、なるべく冷暗所に保管する。

質問17 検出されたペーパーを資料として保存する場合の乾燥はどのようにすればよいか？

答 乾燥するときには、かならず袋からペーパーを取出し60°C以上で乾燥すると大腸菌群も同時に殺菌され数分で乾く、乾燥器がない場合はペーパーを布か紙の間にはさみ、その上からアイロンでプレスすればよい。フランドル器で乾燥するのは不可。

質問18 生理食塩液をつくるのが困難な場合は、蒸留水でよいか？

答 蒸留水でもよいが必ず殺菌すること、(100°C 5-10分加熱)蒸留水が入手できないときは、一般の飲料水を殺菌(100°C 5-10分)して使用するがよい。

この場合、最も実用的な方法はヤカンの水を煮沸し(5分以上)、そのまま湯ざましとしたものを使う。

質問19 100倍液, 1000倍液……で調べろ, または100倍液, 1000倍液で赤変スポットが認められなければよい, などとあるが, 100倍液, 1000倍液のつくり方, その意味について説明してほしい。

答 まず固型の一般の食品はその10gをはかりで取り, それを90mlの生理食塩液の中に入れて, よく振盪するかそれをホモジナイズ(均一)する。そうすると全量100ml(10g + 90ml)の中には, 検体が10g入っているため,

検体が10倍希釈されたことになる。

これを原液と呼んでいるが、その液を1mlとって新しい生理食塩液9mlに入
れると10倍液がさらに10倍希釈されたことになるので100倍液となる。

このようにして作った試料の中にペーパーを浸漬して培養して、赤色スポッ
トが認められた場合は、100倍液で陽性であったと読む。同じように100倍
液を1mlとって、新しい生理食塩水9mlに入れてよく振盪したものは1000
倍液（100倍液をさらに10倍希釈したため）となる。

調べようとした食品10gをはかって生理食塩液90mlに入れそれぞれ希釈し
ていった場合の生理食塩液中の食品の量は原液（10倍液）の1ml中には0.1g
入っていることになり、食品が1/10入っていることは液の方からみれば、
10倍に希釈したことになる。100倍液1ml中には食品が1/100入ってい
ることになり、100倍液と呼ぶわけである。それぞれの液に浸漬したペー
パーに赤色スポットが出来た場合………倍液陽性というわけである。

質問20 大腸菌群数の出し方についても一度説明してほしい。

答 飲料水などのように検体そのものを希釈しないでペーパーに浸漬した場合
は、ペーパーに出た赤色班の数がそのまま飲料水1ml中の数になるが、稀
釈した場合は、ペーパーに出た数にその希釈した倍数をかける。

そうするともとの検体1ml中の大腸菌群の数となる。

例えば、食品の10倍液を浸漬した場合、そのペーパーに5コの赤色班が
出た場合は $5 \times 10 = 50$ となり、もとの食品1g中には50コの大腸菌群があ
ったことになる。

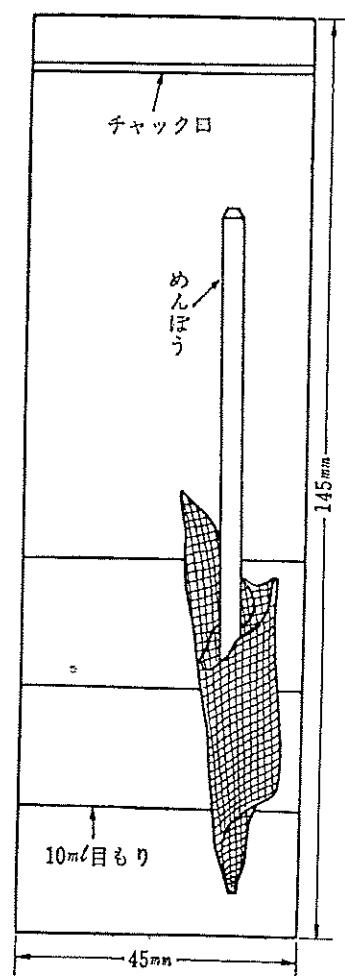
拭取綿棒と滅菌ユニパックの使用方法

最近「検出紙」を現場検査で使用する場合、とくにふき取り法で食器類、手指等の汚れをふき取る場合、滅菌綿棒、滅菌容器を用意する必要のないように滅菌ユニパックに滅菌綿棒を入れ、ユニパック自体は滅菌容器となり、しかも生理食塩液（または殺菌水）を所定の量入れることができるように目盛り（1目盛10ml）のしてあるものが開発された。

また目盛り滅菌ユニパックは飲料水、プール水、海水等の試料を入れる容器の代用となり、それを利用すると、より現場検査が簡便にできるので紹介する。

〔綿棒の使用方法〕

- 1 綿棒入り袋（ユニパック）の口を開いた後、生理食塩液または滅菌水（以下水という）10～20ml（袋の1目盛りは10ml）を綿棒の柄の上部にかからないように静かに入れる。
- 2 綿棒を少し持ちあげて、水に浸ったガーゼを袋の外から指で押してガーゼの水を絞る。
- 3 絞った綿棒を袋から取出す。
- 4 取出した綿棒のガーゼ部分で検体の面をよく拭取る。
- 5 拭取った綿棒を元の袋に入れ、すでに入っている水で袋の外からガーゼの部分を指で押出すようにして検体をすすぎ出す。
- 6 よくすすぎ出したら、綿棒を袋の外から絞って取出す（綿棒は1回毎に捨てる）
- 7 綿棒を取出したあとの袋にペーパー（検出紙）を入れ、袋の口のところを、人指ゆびと中ゆびで両面からはさむようにして、水を傾け、ペーパーを浸漬させて静かに取出し、検出紙の使い方に従い検査を行う。



- 8 袋の水は口を封じ，口の部分を立掛けて上にしておけばこぼれないから，また次のペーパーを入れて，二回以上の操作をする。

手指拭取の場合

- 1 前記1と同じ
- 2 水に浸った綿棒を取出し，棒先の接着部からガーゼをはがして手指と掌をよく拭き取り。
- 3 ガーゼを元の袋に入れ，すでに入っている水でガーゼをよくすすぎ出し。
- 4 ガーゼは袋に入れたままで，その水にペーパーを浸漬して検査する。

〔滅菌ユニパックの使用法〕

コリテップはおおむね検体を持ちかえることなく，そのまま現場で検査ができるが，たとえば海水浴場水や下水のようなものは持ち帰って後稀釈するような場合がおこる。このことは不便であるとともに，その時に経過する時間中に菌の増減が考えられる。そこで滅菌ユニパックを次のように使用することにより現場で検査ができる。

- 1 ユニパックの目盛（1目盛10 ml）に生理食塩液を入れ，市販の滅菌スポイト（1 ml，2 mlの目盛入り）で，海水1 ml（または下水）1 mlをその中に入れて，よく振って平均化した後，（これで海水が10倍に稀釈されたことになる）必要なればさらに稀釈して試料をつくる。そして，
- 2 検出紙の使い方に従い検査を行う。