
改変大腸菌群簡易検出紙

使用法と評価の仕方

国際学院埼玉短期大学教授
医学博士 渡邊 昭 宣

 **サン**化学株式会社

改変大腸菌群簡易検出紙の使用法と評価

はじめに

食品、水及び環境などの衛生検査で糞便の汚染指標菌としての大腸菌群の検出は、食品衛生法による乳糖ブイヨン培地、BGLB培地及びデソキシコレート寒天培地等が、検体の種類と試験法により用いられている。しかしながら、これらの培地はいずれも、大腸菌群のもつ乳糖分解作用により、乳糖を分解して酸またはガスを産生させることで大腸菌群を陽性とするか、或はこの時生じる酸によりデソキシコール酸と中性紅が結合して生ずる赤色集落をもって陽性とし、更に確認試験を行って判定する為、E. coli、大腸菌群の同定までには3～5日間を要し迅速性に欠けていた。

最近になって、各種の発光基質を用いた培地が開発され、従来法のような細菌が産生する最終産物による反応を見るのではなく、E. coli及び大腸菌群が持つ特異酵素を利用した培地が開発され、より迅速で、経済的な検査が可能になってきた。

そこで、本簡易検出紙はフルオロカルト・ラウリル硫酸X-GAL培地を基礎とし、更に若干の改良を加えた改変培地組成をペーパーに吸着、乾燥し、滅菌したものである。

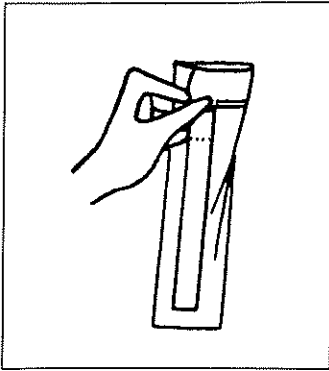
反応は、大腸菌群の持つ乳糖分解酵素の β -galactosidaseにより、X-GAL(5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside)を加水分解して青色の発色スポットを形成させ、更にE. coliの β -glucuronidaseという特異酵素がMUG(4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide)を加水分解して蛍光物質を産出することから、360nmの紫外線照射によりライトブルーの蛍光を発し、E. coli以外の大腸菌群との鑑別も可能となっている。

今回、この改変大腸菌群簡易検出紙を用いて、その検出感度と各種食品からの大腸菌群検出率について、その概要を説明する。

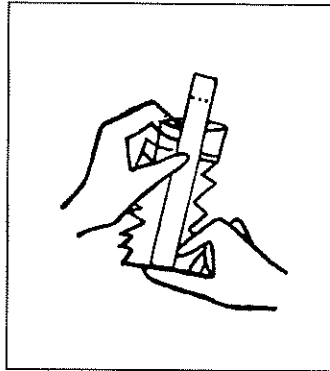
1. 簡易検出紙の使い方

- 1) 手を清潔にした後、まずサンパックのチャックをよじって口を開ける。
- 2) サンパック中のペーパーをパックの外側から押上げミシン目の部分を外に出す。
- 3) ミシン目の上の部分を指でつまんでペーパーを引き出す。
- 4) ミシン目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) ミシン目の部分がサンパックの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目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℃の恒温器に入れ培養する。
- 9) 夕方恒温器に入れて翌朝取り出し、ペーパーの表面および内部の青色集落をかぞえる。

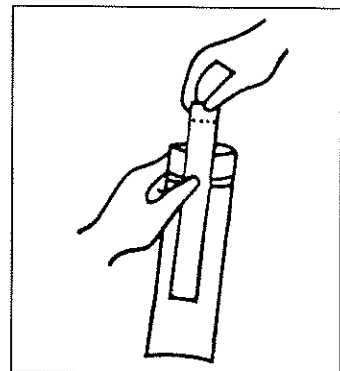
[サンコリ使用法]



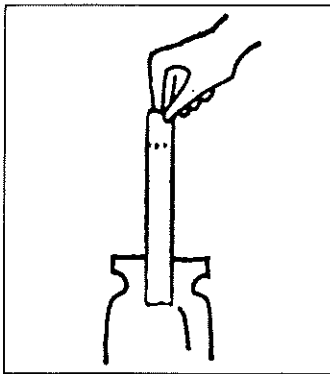
① サンパックのチャックをよじって口を開ける



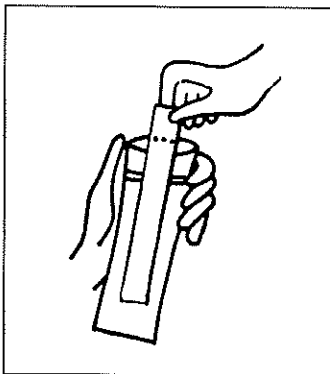
② 中のペーパーを押し上げミシン目の部分を外に出す



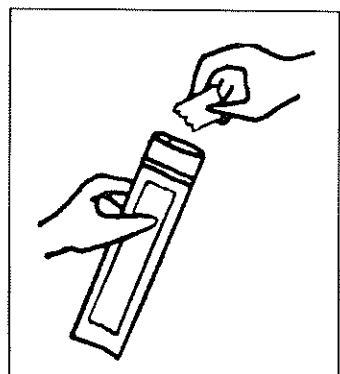
③ ミシン目の上の部分を指でつまんでペーパーを引き出す



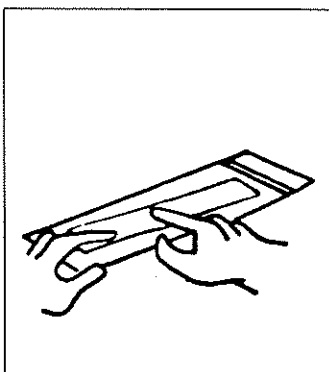
④ ミシン目より下の部分を検体に浸漬したらすぐに取り出し



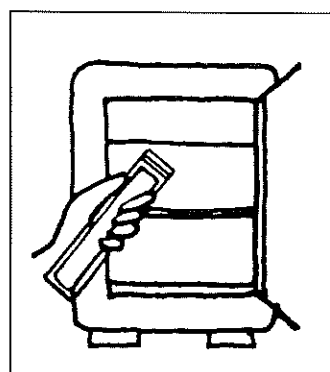
⑤ ミシン目の部分がチャックより下になるように入れる



⑥ ペーパーを袋の上から押えて、ミシン目の上の部分を指できりとる



⑦ 平らにおき指の腹でなぞ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℃の恒温器に入れる

2. 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、ミシン目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って袋とペーパーが密着するようにして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) 培養後の青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青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、内部のものまでがかぞえることができる。

3. 検出紙の性能試験

a) 供試菌株

大腸菌：Escherichia coli I型

大腸菌群：Citrobacter freundii.

Enterobacter aerogenes.

Klebsiella pneumonia.

その他の菌類：Salmonella typhimurium.

Proteus

Pseudomonas

b) 検査材料

井戸水及び使用水30検体，惣菜類135検体，豚，牛，鶏の生肉及びマグロ刺身

17検体，豆腐，生菓子，カット野菜等10検体，マナイタ，調理器具及び手指等のふき取り15検体の合計207検体について検査を行った。

c) 実験方法

供試菌株及び各種検体の希釈には，滅菌0.1%ペプトン加生理食塩水を用いた。本法の対照としたLB-BGLB発酵管法及びデソキシコレート寒天培地による試験法は食品衛生法に従った。また，検出紙の使用法については，従来の大腸菌群簡易検出紙の使い方と全く同様の方法で使用した。何れの培地及び試験紙とも35℃24時間培養後に判定した。

本試験紙の判定法は，試験紙上に発生した青色のスポットの数により(+)～(卍)で表わした。また，E. coliについては，青色スポットの発生試験紙について，紫外線ランプ(360nm)を照射し，ライトブルーの蛍光を発した集落数を持って(+)～(卍)で表わした。

判定表記	スポット数
+	1～10
++	10～100
+++	100以上または試験紙全体が青色

4. 実験結果

1) 試験菌液を用いた検出状況(表-1)

上記のE. coli，大腸菌群及び他の菌種の培養菌液を希釈し，生菌数1～10個から1000個以上になる希釈液を作り，その中に本試験紙を浸漬したのち，培養してスポットの発生数を調べた，結果は表1に示すとおり，E. coli及び大腸菌群は，各希釈液に応じたスポット数の発生が見られたが，他の菌種では全くスポットは見られなかった。また，これに紫外線を照射すると，E. coliを接種した試験紙上の青色スポットのみがライトブルーの蛍光を発し，大腸菌群及び他の菌種の試験紙は全く蛍光を発しなかった。

2) E. coliまたは大腸菌群と他の菌種の組合せによる検出状況

表2ではE. coliの菌量の $1 \sim 10^3$ と他の菌種の菌量の $1 \sim 10^4$ 以上の各菌液を作り、各々異なる菌量同志の混合液の組合せを作り、これに本試験紙を浸漬、培養したのち、青色スポットの検出状況を見た。E. coli菌量 $1 \sim 10$ 個の少量菌と他の菌種類の $1 \sim 10$ 個の少量菌から 10^4 以上の大量菌の組合せの場合でも、発生青色スポット数はE. coliの菌量に応じたスポット数のみが形成され、また、その逆の混合菌量であっても他の菌種の含有菌量に影響されることなくE. coliの菌量に応じたスポット数が形成された。

また、これに紫外線を照射したところ、青色スポットは全て蛍光を発生し、他菌種の存在に影響されることなく、E. coliのみが発育し、スポットを形成していたことが確認された。

表3では、E. coli以外の大腸菌群と他の菌種の含有菌量の異なる混合菌液の組合せを作り、E. coliと同様の方法で実験を行った結果、大腸菌群の発育青色スポットは、他菌種の含有菌量に影響されることなく、大腸菌群の各含有菌量に応じた青色スポットが形成された。またこの青色スポットの生じた試験紙に紫外線で照射したが、すべて蛍光を認めなかった。

以上のことから、本試験紙に発生する青色スポットはE. coli及び大腸菌群のみで、他の菌種には影響されず、更に紫外線を照射することにより、E. coliのみが特異的に蛍光発色することが確認された。

3) 各種検体における従来法との比較

まず、井戸水及び使用水についてLB、BGLB法で酸及びガス産生の陽性数と本試験紙上の青色スポット形成数を比較したところ表4—(1)にみられる結果となり、その一致率は93.3%であった。

つぎに、各種食品類については、デソキシコレート寒天培地上で赤色集落が形成されたものを陽性とし、同様に本試験紙上では青色スポットを形成したものを陽性として、両試験法の一致率を比較したところ、表4—(2)に示すとおり、惣菜類では一致率94.1%、生肉、生魚肉類では100%、豆腐、生菓子、カット野菜類では80%、また、マナイタ、その他の調理器具、手指などのふき取り試験では80%を示した。また表4—(3)ではこれらの検体の合計数に対する一致率を

示したもので207検体中，両試験法で一致したものは196検体で一致率は94.7%であった。

表1 試験菌の接種菌量と改変大腸菌群簡易検出紙の検出状況

供試菌の接種菌量 大腸菌群	改変大腸菌群簡易検出紙			
	1~10 (紫外線蛍光)	10~10 ² (紫外線蛍光)	10 ² ~10 ³ (紫外線蛍光)	≤10 ³ (紫外線蛍光)
E. coli	+(+)	+(+)	++(++)	+++(+++)
Citrobacter	+(-)	+(-)	++(-)	+++(-)
Klebsiella	+(-)	+(-)	++(-)	+++(-)
Enterobacter	+(-)	+(-)	++(-)	+++(-)
他種菌				
Salmonella	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Proteus	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Pseudomonas	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)

表2 E. coliと他の菌種の混合液での検出状況

他菌種の接種菌量	改変大腸菌群簡易検出紙 E. coliの接種菌量		
	1~10 (紫外線蛍光)	10~10 ² (紫外線蛍光)	10 ² ~10 ³ (紫外線蛍光)
1~10	+(+)	++(+++)	++(+++)
10~10 ²	+(+)	++(+++)	++(+++)
10 ² ~10 ³	+(+)	++(+++)	++(+++)
10 ³ ~10 ⁴	+(+)	++(+++)	++(+++)
≤10 ⁴	+(+)	++(+++)	++(+++)

表3 E. coli以外の大腸菌群と他菌種の混合液での検出状況

他菌種の接種菌量	改変大腸菌群簡易検出紙 E. coli以外の大腸菌群の接種菌量		
	1~10 (紫外線蛍光)	10~10 ² (紫外線蛍光)	10 ² ~10 ³ (紫外線蛍光)
1~10	+(-)	++(-)	++(-)
10~10 ²	+(-)	++(-)	++(-)
10 ² ~10 ³	+(-)	++(-)	++(-)
10 ³ ~10 ⁴	+(-)	++(-)	++(-)
≤10 ⁴	+(-)	++(-)	++(-)

表4 各種検体における従来検出法と改変大腸菌群簡易検出紙の検出率比較

1) 水 (30検体)

	陽性数(%)	陰性数(%)	一致率(%)
LB-BGLB発酵管	26(85.7)	4(18.3)	93.3
改変大腸菌群簡易検出紙	24(80.0)	6(20.0)	

2) 各種食品類

		陽性数(%)	陰性数(%)	一致率(%)
惣菜類 (135)	デソキシコレート	13(9.6)	122(90.4)	94.1
	寒天塩培地			
	改変大腸菌群簡易検出紙	21(15.6)	114(84.4)	
生肉・生魚類 (17)	デソキシコレート	17(100.0)	0(0)	100.0
	寒天塩培地			
	改変大腸菌群簡易検出紙	17(100.0)	0(0)	
豆腐・生菓子・ カット野菜 (10)	デソキシコレート	6(60.0)	4(40.0)	80.0
	寒天塩培地			
	改変大腸菌群簡易検出紙	6(60.0)	4(40.0)	
調理器具 (15)	デソキシコレート	3(20.0)	12(80.0)	80.0
	寒天塩培地			
	改変大腸菌群簡易検出紙	6(40.0)	9(60.0)	
3) 合計 (207)	従来検出培地	63(30.4)	144(69.6)	94.7
	改変大腸菌群簡易検出紙	74(35.7)	133(64.3)	

3) まとめ

従来の大腸菌及び大腸菌群の検出は乳糖からの酸とガスの産生によって判定されていたが、本試験法では乳糖分解酵素である β -ガラクトシダーゼの存在をX-GALの発色で示し、更に紫外線照射により、MUGの加水分解産物を蛍光発色させる特殊性を用いた検出紙で、その使用法も簡単で、かつ検出感度も良好であることが認められた。E. coli及び大腸菌群は10個以下の少量菌でも、他菌種の存在に影響されることなく、発色発育し、更に紫外線照射によって、E. coliのみが蛍光発色してライトブルーに光ることが認められた。

また、大腸菌群以外の試験菌種では 10^4 個/g以上の大量の菌の存在があっても、青色スポットを形成しないことが確認されたが大腸菌群以外に、Aeromonas, Plesimonas, Vibrio, さらに乳酸菌が β -ガラクトシダーゼを有するので、本試験紙を青色化させる。

従って、乳酸発酵を利用した食品（乳酸飲料、ヨーグルト、チーズ……等々）に応用する場合には、注意が必要である。

しかし、本試験紙の簡易性からみて、水関係で従来法との一致率が93.3%、食品関係ではデソキシレート寒天培地との一致率が92.7%等、有意性を持つものと考えられる。

また、本試験紙は培地中の色素による発色反応によってスポットの形成をみるのではないため、色素や還元剤が含まれないことから、保管中に試験紙が変色することがない。また、試験紙上の発色は酵素反応に基づくもので、反応の呈色は菌量に比例し、少量の菌量でも発色させることができる。更に、紫外線を照射することにより、E. coliのみを特異的なライトブルーに蛍光発色させ、他の大腸菌群との鑑別が容易である。使用方法も極めて簡易であることから、各企業が毎日行っている品質管理の為の検査に応用されることは、その検査業務の短縮性、迅速性、簡便性、公定法との高い相関性からみて、E. coli及び大腸菌群の検出に有用な簡易検出紙であることが認められる。