

(別添)

生食用食肉の腸内細菌科菌群(Enterobacteriaceae)検出試験法

1 はじめに

本試験法でいう腸内細菌科菌群(Enterobacteriaceae)とは、バイオレットレッド胆汁ブドウ糖(VRBG)寒天培地上で特徴的な集落を形成し、ブドウ糖を発酵するオキシダーゼ反応陰性の細菌をいう。

2 試験法の概要

生食用食肉試料 25 g を秤量し、緩衝ペプトン水 225 ml を加えホモジナイザーを用いて攪拌混合した後、37 °C で 18 ± 2 時間培養後、VRBG 寒天培地に画線塗抹する。37 °C で 24 ± 2 時間培養後、形成された腸内細菌科菌群の定型集落を釣菌し、オキシダーゼ反応及びブドウ糖発酵性を確認し、腸内細菌科菌群の有無を判定する。

3 培地及び試薬

1) 緩衝ペプトン水(Buffered Peptone Water; BPW) : 増菌培地

各培地成分又は乾燥培地を溶解して 121 °C, 15 分間高圧蒸気滅菌して使用する。必要であれば、滅菌後に 25 °C での pH が 7.0 ± 0.2 となるように調整する。密栓した容器に入れ 5 ± 3 °C で 6 か月間保存可能である。

動物組織の酵素消化物*	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二ナトリウム (12 水和物)	9.0 g
リン酸二水素カリウム	1.5 g
精製水	1,000 ml

* カゼイン酵素消化物など

2) バイオレットレッド胆汁ブドウ糖寒天培地(Violet Red Bile Glucose Agar ; VRBG 寒天培地) : 選択分離培地

各培地成分又は乾燥培地を加温溶解し、必要であれば、25 °C での pH が 7.4 ± 0.2 となるように調整する。本培地を滅菌してはならない。溶解した培地は調整後 4 時間以内に使用する。少なくとも 3 mm の厚さになるように、直径 85 ~ 100 mm のシャーレに分注し、固める。

動物組織の酵素消化物*	7.0 g
酵母エキス	3.0 g
胆汁酸塩 No. 3	1.5 g
ブドウ糖	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
ニュートラルレッド	0.03 g
クリスタルバイオレット	0.002 g
寒天	9 g ~ 18 g **
精製水	1,000 ml

* 獣肉ペプトンなど

** 寒天のゲル強度による

3) 普通寒天培地(Nutrient Agar)

各培地成分又は乾燥培地を、加温溶解して 121 °C、15 分間高圧蒸気滅菌後、寒天平板として使用する。必要であれば、滅菌後に 25 °Cでの pH が 7.0±0.2 となるように調整する。
注：オキシダーゼ反応には糖不含の培地を使用する。糖を含有する培地に発育した集落は酸性になるので、オキシダーゼ反応を誤判定する可能性がある。

肉エキス	3.0 g
動物組織の酵素消化物*	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
寒天	9 g~18 g **
精製水	1,000 ml

* 獣肉ペプトンなど

** 寒天のゲル強度による

4) グルコース OF 培地

各培地成分又は乾燥培地を加温溶解して 121 °C、15 分間高圧蒸気滅菌する。必要であれば、滅菌後に 25 °Cでの pH が 6.8±0.2 となるように調整する。この培地は 5 ± 3 °Cで 4 週間保存可能である。使用時には酸素を除去するために、熱湯か蒸気で 15 分間加熱し、速やかに培養温度に冷やして使用する。

動物組織の酵素消化物*	2.0 g
リン酸水素二カリウム	0.3 g
ブドウ糖	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
プロモチモールブルー	0.08 g
寒天	3 g~4 g **
精製水	1,000 ml

* カゼインペプトンなど

** 寒天のゲル強度による。

5) オキシダーゼ試薬

用時調製して使用する。市販のオキシダーゼ試験用ろ紙を用いても良い。

<i>N, N, N', N'</i> -テトラメチル- <i>p</i> -フェニレンジアミン・ジヒドロクロライド	1.0 g
精製水	100 ml

6) ミネラルオイル

乾熱滅菌器で 170~180°Cで 1~2 時間滅菌したものを使用する。

4 機械及び器具

- 1) 滅菌ハサミ
- 2) 滅菌ピンセット
- 3) ホモジナイザー：蠕動式(可能であれば速度及び時間を調整できる機種；ストマッカー)又は回転式(ブレンダー)のもの
- 4) ストマッカー用袋(ストマフィルター使用可)
- 5) フラスコ
- 6) 天秤
- 7) pHメーター
- 8) 滅菌ピペット：10 ml, 1 ml, 0.1 ml が計量できるもの

- 9) メスシリンダー
- 10) ビーカー
- 11) 試験管：ブドウ糖発酵性試験用
- 12) 試験管立て
- 13) 白金耳，白金線
- 14) 高圧蒸気滅菌器(オートクレーブ)：少なくとも 121 °C(湿熱)を保持できるもの
- 15) 乾熱滅菌器：170～180 °C(乾熱)を保持できるもの
- 16) 恒温器：37±1 °Cを保持できるもの
- 17) 恒温水槽：44～47 °Cを保持できるもの
- 18) 滅菌シャーレ：ガラス製又はプラスチック製で直径 85～100 mm のもの
- 19) スターラー及びスターラーバー
- 20) ろ過滅菌用器具（シリンジフィルター及び注射筒）

5 試験手順

- 1) 試料の調製
生食用食肉の生食部位から採取した検体の全体を無菌的に細切，混和した後，その 25 g をストマッカー用袋等に秤量して試料とする。
- 2) 増菌培養
秤量した試料に，BPW 225 ml を加えホモジナイザーを用いて 1～2 分間攪拌混合した後，37 °C で 18±2 時間培養する。
- 3) 選択分離培養
培養後の BPW から 1 白金耳量を取り，VRBG 寒天培地に画線塗抹した後，37 °C で 24±2 時間培養する。
- 4) 定型集落の確認及び継代培養
 - ① 培養後の寒天培地上に腸内細菌科菌群の定型集落（淡紅色～赤色又は紫色を呈する集落）が形成されているかを判定する。定型集落が認められた場合は，任意に単離集落を選定する。ある種の腸内細菌科菌群は集落又は培地の脱色を引き起こすことがある。従って，特徴的な集落が存在しない場合，白みがかった集落を確認試験のために選定すること。形状の異なる複数の定型集落が認められた場合は，それぞれに単離集落を選定する。
 - ② 選定した集落をそれぞれ釣菌し，普通寒天培地に画線塗抹する。37 °C で 24±2 時間培養後，単離集落を選定して次の確認試験を実施する。
- 5) 確認試験
培養後の普通寒天培地上に形成された単離集落について，オキシダーゼ試験及びブドウ糖発酵性試験を実施する。
 - ① オキシダーゼ試験
白金耳，白金線又はガラス棒等を用いて単離集落の一部を取り，オキシダーゼ試薬を含ませたる紙又は市販のオキシダーゼ試験用ろ紙の上に塗抹する。なお，ニクロム線を用いて塗抹してはならない。10 秒以内でろ紙が暗青色化しない場合，オキシダーゼ反応は陰性と判定する。また，市販のオキシダーゼ試験用ろ紙を使用する場合，製造業者の使用説明書に従って判定する。
 - ② ブドウ糖発酵性試験
白金線等を用いて，オキシダーゼ反応が陰性の集落をグルコース OF 培地に穿刺し，表面にミネラルオイルを 1 cm の高さで重層した後，37 °C で 24±2 時間培養する。培

養後、培地全体の色調が黄色に変色した場合、ブドウ糖発酵性は陽性と判定する。また、市販の培地を使用する場合には、製造業者の使用説明書に従って判定する。

③ 腸内細菌科菌群の確定

オキシダーゼ反応が陰性、かつブドウ糖発酵性が陽性と判定された集落を腸内細菌科菌群と確定する。

6) 結果表示

腸内細菌科菌群が検出された場合は陽性/25 g と表示する。また、腸内細菌科菌群が検出されなかった場合は陰性/25 g と表示する。

6 参考文献

NIHSJ-15-2020, 腸内細菌科菌群の検出試験法 (定性法)

腸内細菌科菌群の検出試験法(増菌培養法)フローチャート

