

1 愛玩動物用飼料中の糞便系大腸菌群の検出法の開発

近藤 勝^{*1}, 齊木 雅一^{*1}, 井上 直^{*1}, 大島 慎司^{*2}, 野村 昌代^{*2}, 時田 佳奈^{*2}

Development of Fecal Coliform Detection Method for Pet Food

KONDO Masaru^{*1}, SAIKI Masakazu^{*1}, INOUE Tadashi^{*1}, OSHIMA Shinji^{*2},
NOMURA Masayo^{*2} and TOKITA Kana^{*2}

(*¹ Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),
^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have developed a detection method of fecal coliforms in pet food.

Having added 0.1 % (w/v) peptone salt solution to a sample, it was left at rest for 30 minutes. After the stomaching treatment for 5 minutes, 1 mL of the diluted solution was inoculated into five EC fermentation tubes respectively and cultured at 44.5 °C for 22 to 26 hours. One loop of the EC fermentation tube that produced gas was inoculated onto an EMB agar plate and cultured at a temperature range of 34 to 36 °C for 22 to 26 hours. One typical colony on the EMB agar plate was inoculated into a lactose fermentation tube, and cultured at the same temperature range for 24 to 48 hours. Similarly, the colony was also inoculated into a standard agar slant and cultured at the same temperature range for 22 to 26 hours. If the lactose fermentation tube exhibited yellowing and gas production, and the colonies on the standard agar slant were identified as gram-negative and non-spore-forming bacilli through gram staining, fecal coliforms were determined positive.

A bacterial inoculation test was conducted using *Escherichia coli* NCTC 9001. The *E. coli* was added at levels of 0.5 to 8 CFU/g (0.25 to 4 CFU/test portion) to six types of pet food, and three types of heated-processed meat products (packaged after heating) and three types of dry-processed meat products. Heated and dry-processed products are required to meet fecal coliform requirements specified in the Food Sanitation Law. The result of the bacterial inoculation test showed that the LOD₅₀ (level of detection at 50 % probability of detection) was calculated to be 0.41 to 0.54 CFU/test portion for pet foods and 0.45 to 0.90 CFU/test portion for meat products according to ISO 16140-2:2016. Thus both results are at comparable levels. The matrix effect of each sample was evaluated using the POD (possibility of detection) curve, which is indicated by the correlation between bacterial concentration *d* and POD, and no significant matrix effect on detection sensitivity was observed.

Key words: fecal coliform; pet food; LOD₅₀; ISO 16140-2:2016

キーワード：糞便系大腸菌群；愛玩動物用飼料；LOD₅₀；ISO 16140-2:2016

1 緒 言

愛玩動物用飼料の不十分な加熱乾燥及び衛生管理に起因すると考えられるサルモネラ汚染事例が報告されており、病原微生物による汚染防止のため愛玩動物用飼料の製造及び取扱いにおける衛生管理の徹底が求められている¹⁾。現在、微生物に関して愛玩動物用飼料等の検査法²⁾に記載されているのは、生菌数及び病原微生物のサルモネラの検出法のみであり、日常の衛生管理の指標に用いることができるような衛生指標菌の検出法の確立が求められている。

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

日本国内の食品分野では、食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準」³⁾において、食肉製品、冷凍食品等に糞便系大腸菌群の成分規格が定められている。食品衛生法上の糞便系大腸菌群は、グラム陰性の無芽胞桿菌で 48 時間以内に乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性又は通性嫌気性の一類（大腸菌群）のうち、44.5℃で発育する菌群とされている⁴⁾。大腸菌の多くが44.5℃で発育して乳糖を分解することから、煩雑な試験を行わずに大腸菌の存在を推定しようとする意図で考えられた菌群であり⁴⁾、環境衛生管理に有用な衛生指標菌として食品分野で広く用いられている。そこで、愛玩動物用飼料中の衛生指標菌の検出法を確立するため、一般財団法人東京顕微鏡院が実施した令和4年度生産資材安全確保対策委託事業（愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業）において報告⁵⁾された内容を参考に、食品衛生法に基づく加熱食肉製品（加熱後包装）及び乾燥食肉製品（以下「食肉製品」という。）の糞便系大腸菌群の試験法⁶⁾（以下「糞便系大腸菌群試験法」という。）が愛玩動物用飼料に適用できるか検討を行うこととした。

令和5年度は予備検討として、愛玩動物用飼料を用いて大腸菌添加試験を実施し、ISO 16140-3:2021⁸⁾に基づき、LOD₅₀（実施試験の50%が陽性となる菌量）を推定する estimated LOD₅₀（eLOD₅₀）を算出して評価した⁷⁾。その結果、eLOD₅₀はISO 16140-3:2021で規定する許容限界を満たしており、試験法に改良が必要な点は認められなかった。

今回、妥当性確認として、ISO 16140-2:2016⁹⁾に基づき愛玩動物用飼料及び食肉製品を用いた大腸菌添加試験を実施し、その結果から算出した愛玩動物用飼料及び食肉製品のLOD₅₀及びマトリックス効果を比較することにより、糞便系大腸菌群試験法の愛玩動物用飼料への適用及び愛玩動物用飼料等の検査法への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

市販の愛玩動物用飼料（ドライ製品、セミドライ製品、ウェット製品、成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ））及び比較対象として市販の食肉製品を用いた。なお、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー及び食肉製品については、あらかじめ滅菌済みのはさみを用いて無菌的に切断し、長さを20 mm以下としたものを分析用試料とした。その他の試料については、そのまま分析用試料として用いた。

なお、検討に用いた愛玩動物用飼料をTable 1に、食肉製品をTable 2に示した。

Table 1 Ingredients list of pet food used in the present study

Pet food types	Ingredients
Dry food for cats	Grains (corn, sweet flour, corn gluten meal, etc.), meats (meat meal, chicken liver powder, beef powder, etc.), beans (soy pulp, defatted soybeans, etc.), seafood (fish meal, fish extract, white fish extract, etc.), oils and fats (animal fats, etc.), beer yeast, eggs (egg powder), vitamins (A, D ₃ , E, K ₃ , B ₁ , B ₂ , pantothenic acid, niacin, B ₆ , folic acid, biotin, B ₁₂ , choline, inositol), minerals (Ca, P, Na, K, Cl, Fe, Co, Cu, Mn, Zn, I), amino acids (methionine, taurine), food color (food red no.102), antioxidants (rosemary extract, mixed tocopherols)
Semi dry food for dogs	Grains (wheat flour, etc.), meats (chicken meal, chicken extract, beef meal, etc.), sugars, potatoes (sweet potato, etc.), vegetables (carrot, pumpkin, spinach, etc.), propylene glycol, minerals (calcium phosphate, calcium carbonate, potassium chloride, magnesium sulfate, sodium chloride, iron sulfate, zinc carbonate, copper sulfate, manganese carbonate, calcium iodate), thickening stabilizer (glycerin), preservative (potassium sorbate), vitamins (choline, C, E, nicotinic acid, pantothenic acid, A, B ₆ , B ₁ , B ₂ , folic acid, B ₁₂ , D), pH adjuster, amino acids (L-lysine hydrochloride), antioxidants (sodium erythorbate, mixed tocopherols, rosemary extract), food colors (titanium dioxide, food yellow no.5, food red no.106, food yellow no.4, food blue no.1)
Wet food for cats	Fish (bonito, etc.), beef, vegetable oil, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , E, K, choline, niacin, pantothenic acid, biotin, folic acid), minerals (Ca, Cu, Fe, I, Mg, Mn, P, Zn), taurine, polysaccharide thickener, seasoning, EDTA-Na, color former (sodium nitrite)
Formed jerky for dogs	Meats (chicken, beef), rice bran, modified starch, wheat flour, propylene glycol, sorbitol, sucrose, salt, preservatives (potassium sorbate, sodium dehydroacetate), pH adjuster (sodium polyphosphate, citric acid), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite), food colors (titanium dioxide, food red no.106)
Dried jerky for dogs (hard type)	Beef
Dried jerky for dogs (soft type)	Chicken, glycerin, humectant (propylene glycol), sodium hexametaphosphate, salt, preservatives (potassium sorbate, sodium dehydroacetate, sodium nitrite), antioxidant (sodium erythorbate), binding agent (sodium polyphosphate)

Table 2 Ingredients list of processed meat products used in the present study

Processed meat product types	Ingredients
Ham (heated processed meat product (packaged after heating))	Pork, starch syrup, soy protein, salt, milk protein, protein hydrolysate, seasoning extract, casein sodium, polysaccharide thickener, phosphate, seasoning (amino acids, etc.), antioxidant (vitamin C), liquid smoke, color former (sodium nitrite), cochineal dye
Sausage (heated processed meat product (packaged after heating))	Pork, chicken, pork fat, binding materials (starch, soy protein), sugars (candy powder, sugar), salt, chicken extract, spices, modified starch, seasoning (amino acids, etc.), phosphate, preservative (sorbic acid), pH adjuster, antioxidant (vitamin C), color former (sodium sulfite), spice extract, cochineal dye, enzymes
Steamed chicken breast (heated processed meat product (packaged after heating))	Chicken, salt, seasoning (amino acids, etc.), pH adjuster, antioxidant (vitamin C), color former (sodium nitrite)
Hamburger steak (heated processed meat product (packaged after heating))	Meats, etc. (pork, pork tongue, beef heart, beef fat, beef, pork fat), onion, binder (breadcrumbs, powdered vegetable protein, egg, powdered egg white), granulated vegetable protein, sugar, onion extract, beef seasoning, spices, salt, vegetable oil, starch syrup, reduced starch syrup, kelp extract, soy sauce, fermented seasoning, protein decomposition product, modified starch, seasoning (organic acids, etc.), pH adjuster, phosphate (Na), caramel color, casein sodium, antioxidant (vitamin C), polysaccharide thickener, flavor, spice extract
Dried sausage (dried processed meat product)	Chicken, sugar (starch syrup, sugar), meats (pork, beef), pork fat, gelatin, soy protein, salt, spices, starch, collagen, yeast extract, seasoning (amino acids, etc.), liquid smoke, phosphate, antioxidant (vitamin C), monascus color, preservative (potassium sorbate), color former (sodium nitrite)
Beef jerky (dried processed meat product)	Beef, sugar, beef extract, salt, powdered soy sauce, yeast extract, protein hydrolysate, sorbitol, seasoning, antioxidant (vitamin C), polysaccharide thickener, caramel color, spice extract, color former (sodium nitrite), acidulant

2.2 試薬

- 1) 水は Milli-Q IX 7005 (メルク製) により精製した精製水又は AQUARIUS RFD240RA (東洋製作所製) により蒸留した蒸留水 (JIS K 0211 の 5213 に定義された蒸留水) を用い, 必要に応じて 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌し, 滅菌水として用いた. なお, 調製に用いた試薬は, 等級があるものは特級を用いた.
- 2) 0.1 % (w/v) ペプトン加生理食塩水 (以下「希釈液」という.) ペプトン 1 g 及び塩化ナトリウム 8.5 g を量って水 1000 mL に溶かし, 塩酸 (1 mol/L) 又は水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) で pH を 6.9~7.1 に調整した後, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 3) EC 発酵管 EC 培地 (パールコア EC 培地 “栄研”, 栄研化学製) 37 g を水 1000 mL に加え, 沸騰水浴中で加熱して溶かし, ダーラム管 (胴径 φ6 mm) を入れた中試験管に 10 mL ずつ分注した後, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した. 滅菌後, 直ちに流水で急冷し, ダーラム管に気泡が入っていないことを確認した.
- 4) EMB 寒天培地 EMB 培地 (パールコア EMB 培地 “栄研”, 栄研化学製) 40 g を水 1000

mLに加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。これをプラスチック製滅菌シャーレに一様に広がるように20 mL分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、35~37℃で1時間静置して培地表面を乾燥させた。

- 5) 乳糖ブイヨン発酵管 乳糖ブイヨン培地（パールコア乳糖ブイヨン培地“栄研”，栄研化学製）18 gを水1000 mLに加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、ダーラム管を入れた中試験管に10 mLずつ分注した後、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後、直ちに流水で急冷し、ダーラム管に気泡が入っていないことを確認した。
- 6) リン酸緩衝生理食塩水（以下「PBS」という。） PBS 粉末（アキュディア™ D-PBS（-）粉末，島津ダイアグノスティクス製）9.6 gを水1000 mLに溶かし、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。
- 7) 標準寒天斜面培地 標準寒天培地（パールコア標準寒天培地“栄研”，栄研化学製）23.5 gを水1000 mLに加え、沸騰水浴中で加熱して溶かした。これを中試験管に10 mLずつ分注した後、121℃で15分間高圧蒸気滅菌し、斜面に凝固させた。
- 8) グラム染色液 フェイバーG（島津ダイアグノスティクス製）の染色液 A（ビクトリアブルー），脱色液（ピクリン酸・エタノール液）及び染色液 B（サフラニン）。
- 9) 大腸菌添加液 BIOBALL HIGHDOSE 10K *Escherichia coli* NCTC 9001 株（ビオメリュー製，10320.0 CFU 及び 10004.0 CFU）1 個を菌濃度が 1000~1200 CFU/mL 程度となるよう PBS で溶解し、大腸菌添加原液とした。大腸菌添加原液を PBS でさらに希釈し、菌濃度が 200 CFU/mL，100 CFU/mL，50 CFU/mL，25 CFU/mL 及び 12.5 CFU/mL 程度となるよう大腸菌添加液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) ストマッカー：EXNIZER400 オルガノ製
- 2) ストマッカー袋：細菌検査用ポリ袋（400 mL） オルガノ製
- 3) 恒温水槽：NTT-2200 東京理化学器械製又は TRW-42TP アズワン製
- 4) インキュベーター：LTI-700E 又は LTI-1001ED 東京理化学器械製
- 5) その他：試験に用いた器具のうち、試料、培地及び菌液に接触するものは、それぞれ適切な方法で滅菌したものをを用いた。

2.4 試験方法

1) 試料液の調製

分析試料 25 g を量ってストマッカー袋に入れ、希釈液 225 mL を加えた後 30 分間静置した。これをストマッカー処理（200 rpm，5 分間）し、試料液とした。

2) EC 発酵管による培養

試料液 1 mL をメスピペットで 5 本の EC 発酵管にそれぞれ加え、恒温水槽中で 44.5℃（±0.2℃）で 22~26 時間培養した。培養後、5 本すべてにガス発生を認めない場合、糞便系大腸菌群陰性と判定した。

3) EMB 寒天培地による培養

EC 発酵管による培養後、ガス発生が認められた EC 発酵管から、その培養液を 1 白金耳量採取して EMB 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 34~36℃で 22~26 時間培養した。

4) 乳糖ブイヨン発酵管及び標準寒天斜面培地による培養

EMB 寒天培地で培養後、糞便系大腸菌群の定型的集落（黒色の金属光沢または暗紫赤色）を釣菌し、乳糖ブイヨン発酵管に接種及び標準寒天斜面培地に塗抹し、それぞれ 34~36 °C で 24~48 時間及び 34~36 °C で 22~26 時間培養した。

5) グラム染色

4)の標準寒天斜面培地上で発育した菌を釣菌し、スライドガラス上に滴下した滅菌水 10 µL と混和した。乾燥後、火炎固定した塗抹面に染色液 A を十分な量滴下し、1 分間静置した。染色液を流水で塗抹面に直接かからないように穏やかに水洗後、脱色液で染色液 A の青色が溶け出さなくなるまで脱色した。脱色液を同様に水洗後、塗抹面に染色液 B を十分な量滴下し、1 分間静置した。染色液を同様に水洗後、ろ紙で水気をふき取り、光学顕微鏡で観察した。なお、スライドガラスは、エタノールに一晩以上浸漬し、火炎で軽くあぶり、冷ましたものを用いた。

6) 糞便系大腸菌群の判定

乳糖ブイヨン発酵管による培養後、ガス発生が認められ、これに対応する標準寒天斜面培地上の菌がグラム陰性の無芽胞桿菌であった場合、糞便系大腸菌群陽性とし、その他の場合は陰性と判定した。

なお、試験方法の概要を Scheme 1 に示した。

Sample solution preparation

- weighed 25 g sample in bag for stomacher
- added 225 mL of 0.1 % (w/v) peptone salt solution and left at rest for 30 min
- shook for 5 min using stomacher (200 rpm)

EC fermentation tube

- inoculated each 1 mL of sample solution for 5 tubes of EC medium containing a Durham tube
- incubated for 22~26 h at 44.5 °C

EMB agar

- inoculated with a loop to a plate of EMB agar from EC fermentation tubes observed gas production
- incubated for 22~26 h at 34~36 °C

Standard agar slant

- inoculated a typical colonies with a wire to a plate of standard agar slant
- incubated for 22~26 h at 34~36 °C

Lactose fermentation tube

- inoculated a typical colonies with a wire to lactose fermentation tube
- incubated for 24~48 h at 34~36 °C

Gram staining

- performed gram staining and observed under a microscope

Gas production

Detection of fecal coliforms

Scheme 1 Analytical procedure of fecal coliforms in pet food inspection method

2.5 大腸菌添加試験

1) 試料液の調製

2.1 の分析試料 25 g を量ってストマッカー袋に入れ、試料中の菌濃度が 8, 4, 2, 1 及び 0.5 CFU/g (以下、菌濃度の高い方から d_1 ~ d_5 とする。) となるように 2.2 の 9) で調製した大腸菌添

加液をそれぞれ 1 mL 添加し、希釈液 225 mL を加えた後、30 分間静置した。これをストマック処理（200 rpm, 5 分間）し、EC 発酵管に接種する大腸菌添加試料液とした。併せて、大腸菌を添加しないブランク試料液も調製した。

なお、試料は希釈液で 10 倍に希釈されており、その 10 倍希釈した試料液 1 mL を 5 本の EC 発酵管に接種することから、培地に接種される試料（以下「試験部位」という。）中の菌濃度に換算（試料中菌濃度 ÷ 10 × 5）すると、 $d_1 \sim d_5$ はそれぞれ 4, 2, 1, 0.5 及び 0.25 CFU/試験部位となる。

2) EC 発酵管による培養から糞便系大腸菌群の判定

大腸菌添加試料液及びブランク試料液は、 $n = 6$ で試験を実施した。

なお、ブランク試料液を用いた EC 発酵管による培養において、ガスが産生しないことを確認できたため、大腸菌添加試料液は 2.4 の 2)まで実施し、EC 発酵管でのガス産生の有無により陰性及び陽性を判定した。また、念のため EC 発酵管でガスの産生が認められたものから各濃度 1 本を無作為に選び、2.4 の 3)~5)を実施し、糞便系大腸菌群の性状を示すことを確認した。

3) LOD₅₀ の算出

2)で陽性と判定された試料数から、ISO 16140-2:2016 における評価法により LOD₅₀ を算出した。具体的には、ISO 16140-2:2016 で示されているウェブサイト (<http://standards.iso.org/iso/16140>) よりダウンロードした LOD₅₀ 算出用のエクセルファイルに、大腸菌添加菌量、陽性数等を入力し算出した。

なお、LOD₅₀ の計算式は a)式が用いられている。これは、ポアソン分布の公式から導かれた陽性となる確率（probability of detection, POD）を求める b)式に POD = 0.5 を代入し、菌濃度 d を求める式に変形したものである。また、a)及び b)式中には、検出感度に影響を与える試料固有の値、すなわちマトリックス効果を現す値 F が導入されており、 $F = 1$ の時、検出感度へのマトリックスの影響はないということになる。 F は、菌添加試験における菌添加濃度 d_i での陽性数 y_i を c)の方程式に代入して求められる。

$$\text{a) } \text{LOD}_{50} = -\frac{\ln 0.5}{A_0 F}$$

$$\text{b) } \text{POD} = 1 - \exp(-A_0 F d)$$

$$\text{c) } \sum_{i=1}^5 \left(\frac{y_i d_i}{\exp(A_0 F d_i) - 1} - (6 - y_i) d_i \right) = 0$$

A_0 : 試料量, d : 菌濃度, y : 陽性試料数

4) マトリックス効果の評価

Wilrich らが報告¹⁰⁾している方法を参照し、3)の b)式で表される POD と菌濃度 d との相関から示される相関曲線（以下「POD 曲線」という。）を用いて、次のとおり、糞便系大腸菌群試験法における各試料のマトリックス効果の評価した。

3)の b)式を用いて、菌濃度 d に対して $1 - \exp(-A_0 F d)$ をプロットすることにより、各試料の POD 曲線を作成した。このときの F は、3)で得られたマトリックス効果 F を用いた。更に、

POD がマトリックスの影響を受けない理想的な状態 ($F = 1$) を仮定し、その場合の POD 曲線 (以下「理想的な POD 曲線」という。) の 95 %信頼区間を d)及び e)式を用いて算出した後、各試料の POD 曲線が当該 95 %信頼区間の範囲内かを確認した。なお、d)及び e)式における、マトリックス効果 F の対数変換値 f ($f = 0$) の標準偏差 SD の算出にあたっては、f)式を用いた。

$$d) \quad p(d)_{Lower} = 1 - \exp(-A_0 d \exp(f + 2SD))$$

$$e) \quad p(d)_{Upper} = 1 - \exp(-A_0 d \exp(f - 2SD))$$

$$f) \quad SD = \frac{1}{\sqrt{\sum_{i=1}^5 \frac{6(A_0 F d_i)^2}{\exp(A_0 F d_i) - 1}}}$$

f : マトリックス効果 F の対数変換値

$p(d)_{Lower}$: 理想的な状態における 95 %信頼区間の下限の POD

$p(d)_{Upper}$: 理想的な状態における 95 %信頼区間の上限の POD

3 結果及び考察

3.1 LOD₅₀による検討

2.5 の 1)及び 2)により大腸菌添加試験を実施し、2.5 の 3)により LOD₅₀ を算出した結果は Table 3 及び Table 4 のとおりであり、愛玩動物用飼料の LOD₅₀ は 0.41~0.54 CFU/試験部位、食肉製品の LOD₅₀ は 0.45~0.90 CFU/試験部位であった。

他の食品の事例として、千葉ら¹¹⁾は、冷凍食品の LOD₅₀ を 0.42~0.81 CFU/試験部位と報告している。本試験で得られた愛玩動物用飼料の LOD₅₀ は、食肉製品の LOD₅₀ 及び千葉らの報告と同程度の結果であった。

また、菌濃度 $d_1 = 4$ CFU/試験部位 (8 CFU/g) の時、全ての試料及び全ての反復で陽性 (陽性率 100 %) となり、これは愛玩動物用飼料及び食肉製品で同様の結果であった。

Table 3 Number of positive results and LOD₅₀ of the spiked test for the detection of fecal coliforms (pet food)

Pet food types	Positive rate per each inoculation level ^{a)}					Blank level	Matrix effect F	LOD ₅₀ (CFU/test portion)
	d_1	d_2	d_3	d_4	d_5			
Dry food for cats	6/6 ^{b)}	6/6	6/6	3/6	0/6	0/6	1.65	0.42
Semi dry food for dogs	6/6	5/6	4/6	4/6	4/6	0/6	1.52	0.46
Wet food for cats	6/6	6/6	4/6	3/6	2/6	0/6	1.46	0.48
Formed jerky for dogs	6/6	6/6	3/6	4/6	1/6	0/6	1.27	0.54
Dried jerky for dogs (hard type)	6/6	5/6	6/6	4/6	1/6	0/6	1.57	0.44
Dried jerky for dogs (soft type)	6/6	6/6	4/6	5/6	1/6	0/6	1.68	0.41

a) $d_1 = 4, d_2 = 2, d_3 = 1, d_4 = 0.5, d_5 = 0.25$ CFU/test portion

b) Number of positive results/Number of measurements at level d_i

Table 4 Number of positive results and LOD₅₀ of the spiked test for the detection of fecal coliforms (processed meat products)

Processed meat product types	Positive rate per each inoculation level ^{c)}					Blank level	Matrix effect <i>F</i>	LOD ₅₀ (CFU/test portion)
	<i>d</i> ₁	<i>d</i> ₂	<i>d</i> ₃	<i>d</i> ₄	<i>d</i> ₅			
Ham ^{a)}	6/6 ^{d)}	6/6	5/6	3/6	1/6	0/6	1.54	0.45
Sausage ^{a)}	6/6	5/6	3/6	2/6	0/6	0/6	0.77	0.90
Steamed chicken breast ^{a)}	6/6	6/6	4/6	4/6	0/6	0/6	1.33	0.52
Hamburger steak ^{a)}	6/6	6/6	3/6	3/6	1/6	0/6	1.13	0.62
Dried sausage ^{b)}	6/6	5/6	4/6	2/6	2/6	0/6	1.04	0.67
Beef jerky ^{b)}	6/6	6/6	3/6	2/6	1/6	0/6	1.01	0.69

a) Heated processed meat product (packaged after heating)

b) Dried processed meat product

c) $d_1 = 4, d_2 = 2, d_3 = 1, d_4 = 0.5, d_5 = 0.25$ CFU/test portion

d) Number of positive results/Number of measurements at level d_i

3.2 マトリックス効果の評価

2.5の4)により作成したPOD曲線はFig. 1のとおりであった。全てのPOD曲線が理想的なPOD曲線の95%信頼区間の範囲内であったことから、理想的な状態 ($F = 1$) の仮説は棄却されず、愛玩動物用飼料及び食肉製品の全試料において、検出感度への有意なマトリックスの影響はないと考えられた。

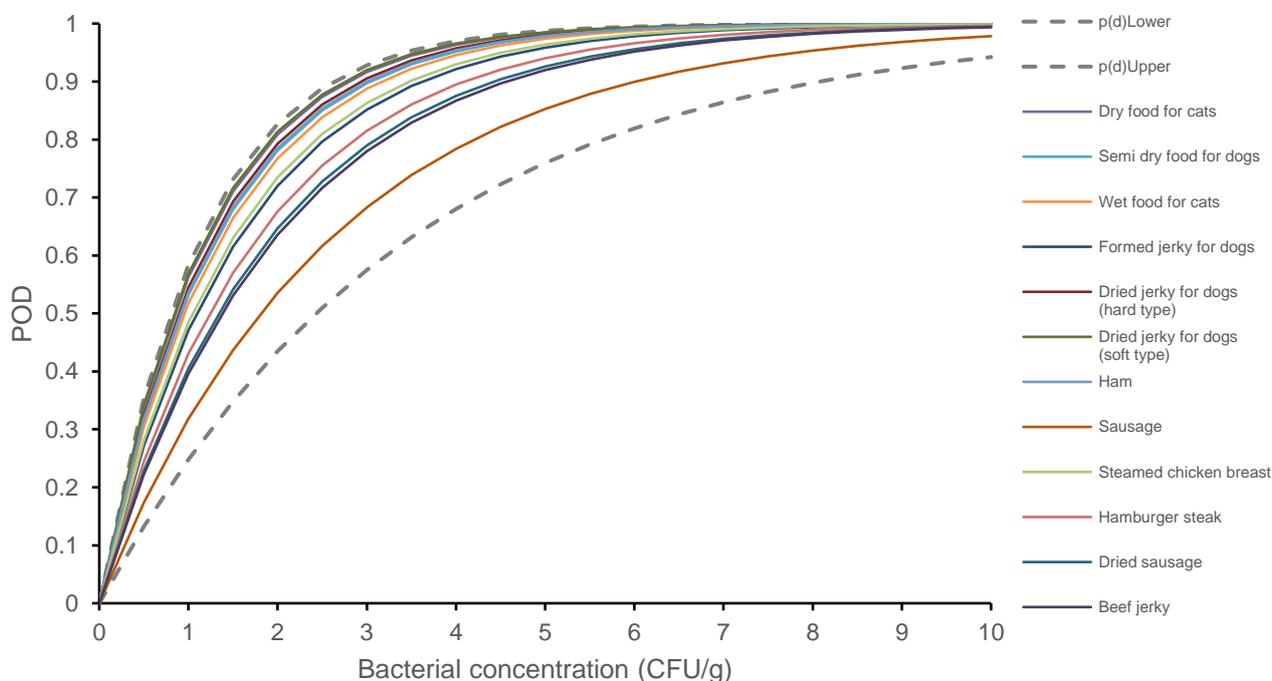


Fig. 1 Correlation between bacterial concentration and probability of detection for ideal condition and each matrix

4 まとめ

糞便系大腸菌群試験法により愛玩動物用飼料及び比較対象として食肉製品を用いて大腸菌添加試験を実施したところ、以下の結果が得られ、愛玩動物用飼料と食肉製品で異なる傾向はなく、検出感度への有意なマトリックスの影響も認められなかったことから、糞便系大腸菌群試験法の愛玩動物用飼料への適用及び愛玩動物用飼料等の検査法への収載が可能であると考えられた。

- 1) 愛玩動物用飼料及び食肉製品に、大腸菌を 0.25, 0.5, 1, 2 及び 4 CFU/試験部位となるように添加し試験した結果、愛玩動物用飼料の LOD₅₀ は 0.41~0.54 CFU/試験部位、食肉製品の LOD₅₀ は 0.45~0.90 CFU/試験部位であり、同程度であった。また、他の食品の報告例とも同程度であった。
- 2) 大腸菌添加試験の結果から得られた各試料の POD 曲線と理想的な POD 曲線を比較した結果、全ての POD 曲線が理想的な POD 曲線の 95 %信頼区間の範囲内であったことから、検出感度への有意なマトリックスの影響はないと考えられた。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知：ペットフードの病原微生物防止対策の徹底について、令和元年7月12日、元消安第1178号(2019)。
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について、平成21年9月1日(2009)。
- 3) 厚生省告示：食品、添加物等の規格基準、昭和34年12月28日、厚生省告示第370号(1959)。
- 4) 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 改訂第2版 2018, 174-175 (2018) (ISBN 978-4-889250-98-5)。
- 5) 一般財団法人東京顕微鏡院：令和4年度生産資材安全確保対策委託事業（愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業）調査報告書(2022)。
- 6) 厚生省生活衛生局長通知：食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について、平成5年3月17日、衛乳第54号(1993)。
- 7) 近藤 勝, 齊木 雅一, 平田 絵理香, 大島 慎司, 野崎 友春, 久保田 恵理：愛玩動物用飼料中の糞便系大腸菌群の検出法の検討, 飼料研究報告, 49, 28-37 (2024)
- 8) International Organization for Standardization : ISO 16140-3. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Geneva, Switzerland (2021).
- 9) International Organization for Standardization : ISO 16140-2. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva, Switzerland (2016).
- 10) Wilrich, C. Wilrich, P-T.: Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method. J. AOAC Int., 92, 1763-1772 (2009).
- 11) 千葉 雄介, 金井 美樹, 藤原 茜, 高瀬 冴子, 荒島 麻実, 土井 りえ, 島田 真一, 石井 里枝 : E. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定, 日本食品微生物学会雑誌, 39(4), 132-140 (2022).