

Food Safety Department

微生物検査の細菌の動向と信頼性のある試験法
- ペトリフィルム™ 培地を用いた微生物検査法 -



Innovating to
Enable Food Safety
& Protect Public Health

第1回初級者用微生物講習会
1月25日 2013年
(社)日本冷凍食品協会

スリーエムヘルスケア株式会社
技術サービス部
守山 隆敏

3M

本日の内容

第一部 講義

- ・ 食の安全の最近の動向
- ・ 試験検査の役割と注意点
- ・ 信頼性のある試験法
- ・ 3Mペトリフィルム製品の説明および使用方法

第二部 実習

2

3M

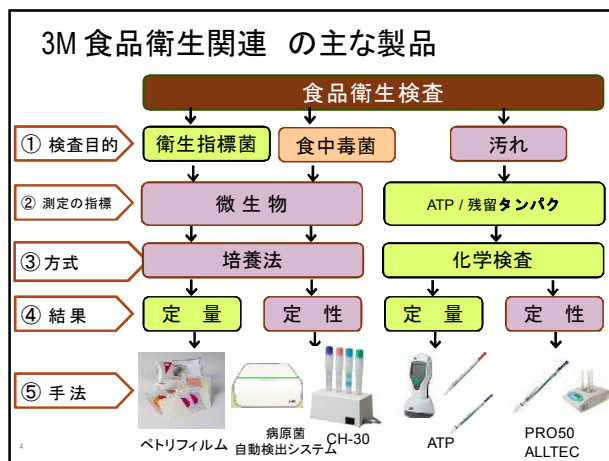
Food Safety Department

3M Food Safety Business Overview



Innovating to
Enable Food Safety
& Protect Public Health

3M



微生物試験の難しさ

- 試料検体についている菌の分布が均一でない
- 菌の種類が多彩であり、条件によっては増殖しにくい
- 試験方法が複雑で、熟練が必要である
- 加熱、冷凍など菌が損傷を受けている(一定でない)
- 試料検体の保存、調製、検査のやり方で結果が違う
- 検査担当者による測定誤差がある

5

3M

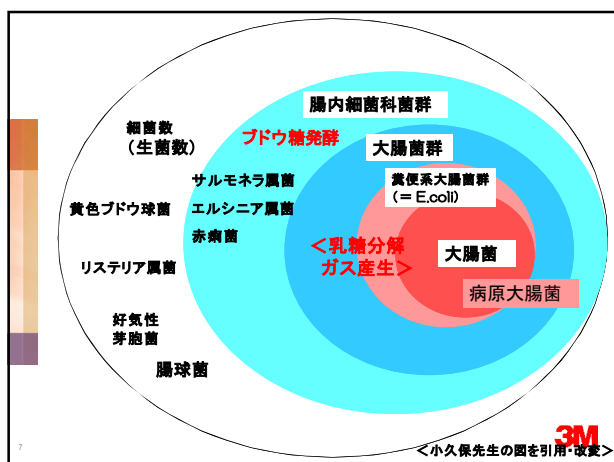
食品会社における微生物試験目的



- 品質:GMP
 - ・ 衛生指標菌
 - ・ 生菌数
 - ・ 大腸菌群、大腸菌
 - ・ カビ酵母
 - ・ 乳酸菌
 - ・ 黄色ブドウ球菌
 - ・ 腸内細菌科菌群
- 安全
 - ・ 食中毒菌
 - ・ サルモネラ属菌など

6

3M



衛生指標菌検査の一般的な役割	
生菌数	食品の消費期限の予測 食品の全般的な細菌汚染状況
大腸菌群 大腸菌群	非加熱食品の細菌汚染状況
腸内細菌科群	加熱処理工程等の有効性 設備や器具の衛生状態

市販流通食品よりも製造工程管理が重要

定量性のある簡易迅速法

参考: 日本食品分析センター 浅尾先生

食品衛生法 第三条 食品等事業者の責務

食品を供給する事業者は、自らの責任において販売食品等の安全性を確保するため、知識および技術の習得、原材料の安全性の確保、**自主検査の実施等の措置**を講ずるよう つとめなければなりません。

DS: 食品衛生法 3M

求められる自主検査における検査要件とは？

- 妥当性確認された方法 (信頼性)
 - 国際的に通用する方法
- 技量に左右されない方法 (簡便)
 - 操作性が良い
 - 測定誤差が少ない
- 時間的に短縮できる方法 (時短)

3M

試験法の考え方			
施設	目的	公定法	簡便法 (妥当性確認)
検疫所、登録検査機関、保健所、衛生試験所	行政としての試験 (食中毒など法的処置がからむ場合)	◎	X
登録検査機関、保健所、衛生試験所	食中毒の原因追及のための検査	◎	◎
保健所	モニタリング検査	◎	◎
登録検査機関	企業からのルーチン検査	◎	◎
食品事業者	ルーチン検査・自主検査	◎	◎

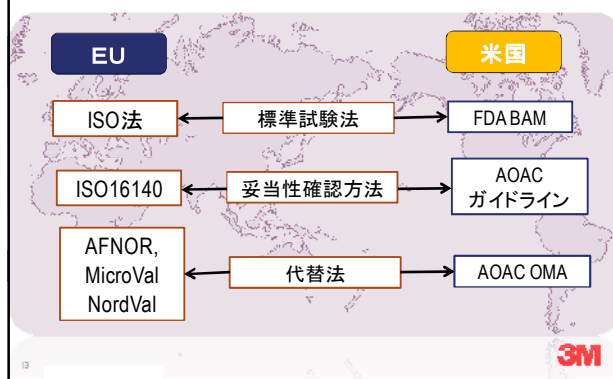
3M

妥当性確認(バリデーション)された試験法

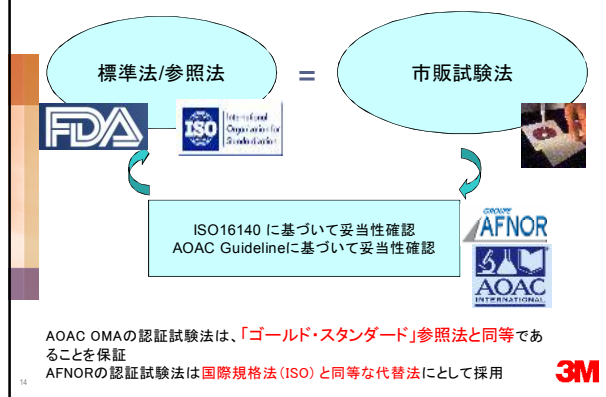
- 海外におけるバリデーションされた試験法の考え方
 - Standard Method: 標準法・参照法
 - US: FDA BAM
 - EU: ISO
 - ISO16140などバリデーション方法に基づいて検証
 - 代替法として採用

3M

世界での参照法/標準法と試験法認証機関



事例：海外における同等性



Petrifilm™ Status of Validation

Petrifilm Plate	対象菌種	AOAC OMA	AOAC RI	AFNOR	NordVal
AC Plate	好気生菌 (生菌数)	●		●	●
CC Plate	大腸菌群数	●		●	●
RCC Plate	大腸菌群数迅速測定	●		●	●
HSCC Plate	高感度大腸菌群数測定	●		●	●
EC Plate	<i>E. coli</i> および大腸菌群数測定	●		●	●
SEC Plate	<i>E. coli</i> 数測定用	●		●	●
EB Plate	腸内細菌数測定	●		●	●
STX Plate	黄色ブドウ球菌数測定用	●	●	●	●
EL Plate	リステリア環境測定用	●	●	●	●
YM Plate	カビ・酵母数測定用	●		●	●

15 3M

世界で200以上の承認推薦された方法



食品衛生検査指針収載 !!

- ペトリフィルム™培地 ACプレート : 生菌数測定用
- ペトリフィルム™培地 CCプレート : 大腸菌群数測定用
- ペトリフィルム™培地 RCCプレート : 大腸菌群数迅速測定用
- ペトリフィルム™培地 ECプレート : *E. coli*および大腸菌群数測定用
- ペトリフィルム™培地 STXプレート : 黄色ブドウ球菌エクスプレス測定用
- 17 3M

社団法人 日本冷凍食品協会様 「品質管理の手引き」

冷凍食品品質管理のための品質管理の手引き

(3) 簡易試験方法
一般に微生物の簡易試験法として採用されることが多い手法として、ペトリフィルムを用いた方法を例として紹介する。
3M ペトリフィルム培地は、国際法のAOAC (Association of Official Analytical Chemists) 法の中で、一番信頼性もあり権威のあるAOAC OMA (Official Method of Analysis) をはじめ、世界各国で承認され、世界50ヶ国以上で使用されている製品である。専用のプレートに培地がセットされており、試料液を分注してプレートについているシートで試料液を培地全体に伸ばす。恒溫器で培養すること、培地上のコロニーの色やガスが発生して判定する。
①ペトリフィルムACプレート (生菌数測定用)
ACプレートではコロニーが指示薬により赤く染色されるので判定が簡単である。
②ペトリフィルムCCプレート (大腸菌群数測定用)
大腸菌群数測定用CCプレートは、24時間、大腸菌群数を検査することができる。CCプレート上ではコロニーが指示薬により赤く染色され、上部フィルムによって大腸菌が産生したガスをとらえる。
ポイント：製品の微生物検査に際し、公定法ではなく簡易試験法で行うことは問題ないが、ランダムサンプリングを行い、均一化した試料で検査をすること、定期的に公定法と比較して精度を確認することが重要である。

(その他) 2001年: 日本乳業協会「飲用乳における出荷前自主検査ガイドライン」
1997年: 畜場法施行規則の一部を改正する省令施行等について など

18 3M

TM ペトリフィルム™ 培地

生菌数 大腸菌群数 E.coli および大腸菌群数 E.coli 数 黄色ブドウ球菌エクスプレス測定用

腸内細菌群数 カビ酵母数測定用 大腸菌群数迅速 リステリア環境試験用

2013年 1月現在

3M

TM ペトリフィルム™ とは？

ペトリフィルムとは

ポイント

- ✓ フィルム状の出来上がり培地
- ✓ 国際的にも承認、信頼されている培地

どのようなもの

ポイント

- 生産性の高い製品
- 結果の判定が容易
- スペースを取らない
- 経費削減につながる
- 国際的な信頼性がある(AOAC OMAなど)
- 食品衛生検査指針に収載(AC, CC, EC, RCC, STX)

誰でも簡単に使用可能

20 20

3M

TM ペトリフィルム™ 培地で解決する課題

- ◆ 検査時間が大幅に短縮
- ◆ 再現性のある正確な検査が可能
- ◆ 人件費を含めた検査コストが削減
- ◆ 在庫時・培養時のスペースが大幅に削減
- ◆ 培地の処分費用が大幅に削減
- ◆ 廃棄時のCO2排出を大幅に削減

21 21

3M

生菌数測定用およびカビ酵母用 ペトリフィルム™ 培地(AC, YMプレート)の基本構造

プラスチックフィルム
粘着剤+指示薬
冷水可溶性ゲル

標準培地+冷水可溶性ゲル
粘着剤
プラスチック塗布紙(グリッド印刷)

22

3M

大腸菌群数、黄色ブドウ球菌測定用 ペトリフィルム™ 培地(CC, STXプレート)の基本構造

プラスチックフィルム
粘着剤+指示薬
冷水可溶性ゲル

フォームタム
改良VRB培地(RCCはpH指示薬含有)
プラスチックフィルム(グリッド印刷)

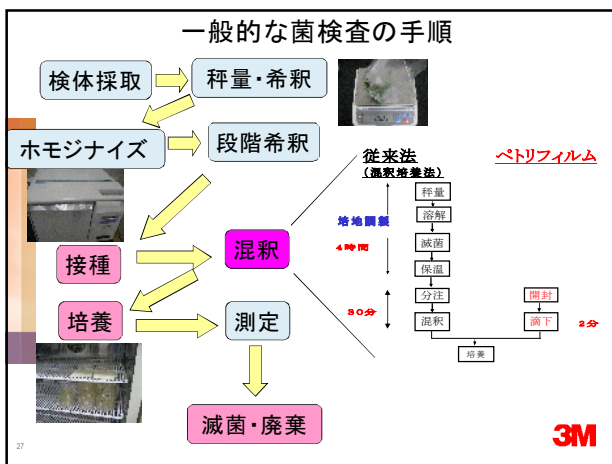
23

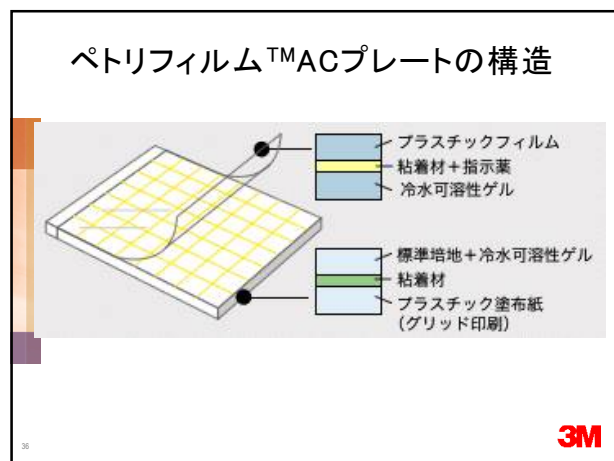
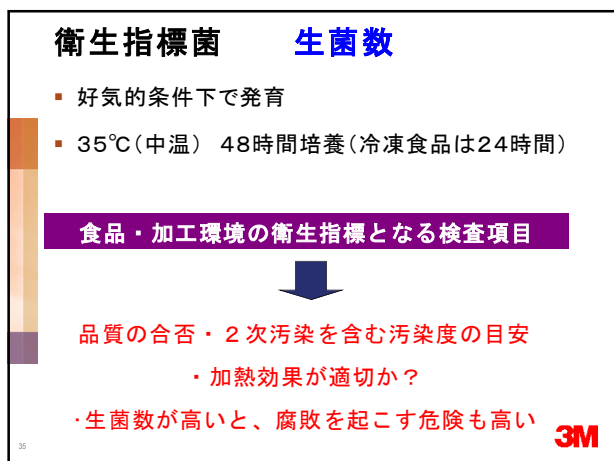
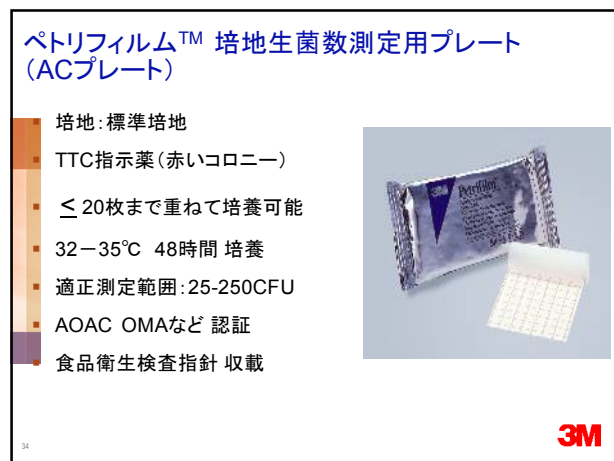
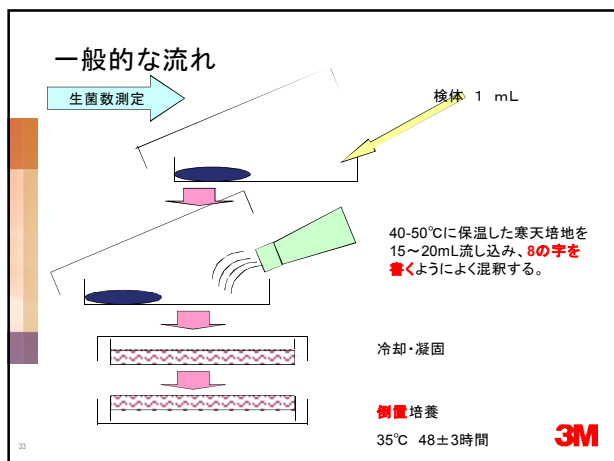
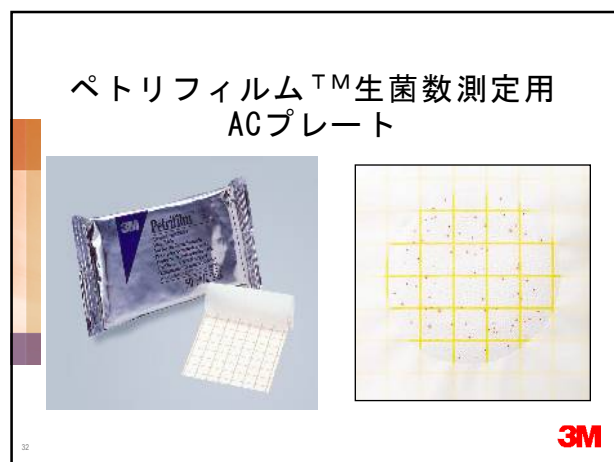
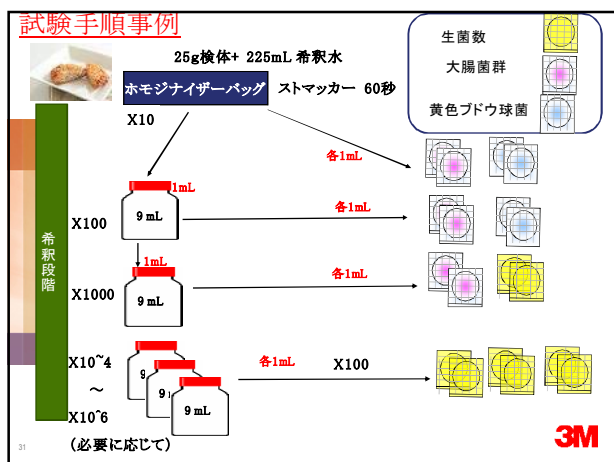
3M

TM ペトリフィルム™ 培地の使用方法

必要な培地(プレート)を準備する

• AOAC 方法 9211 食品微生物検査における迅速法、簡便法使用結果に関する報告





操作手順1 (ACプレート)

① 上部フィルムを持ち上げる

② ピペットを垂直に保ち、検体1μlを下部フィルムの中央に接種する

③ 上部フィルムから手を離しフィルムを自然に落とす

注意 ピペットはできるだけ垂直にたてること

注意 上部フィルムを落とす感覚でかぶせること。

37

操作手順2 (ACプレート)

④ 平面 凹面

⑤ スプレッダーの凹面を下側にし、上部フィルムの上に置く

⑥ スプレッダーを上から人差し指で軽く押して広げる

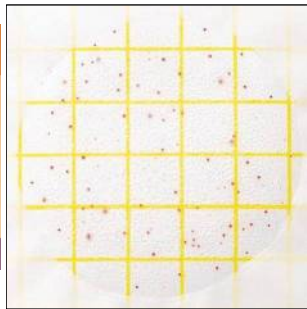
注意 中央部分を押しスプレッダーを滑らせないこと

注意 スプレッダーの凹面が下になっていることを確認すること。

スプレッダーを取り、1分間以上放置して固化させる

38

サイズや色の濃さに関係なく、赤いコロニーを全て数える



指示薬により、コロニーが赤色に染色されます。サイズや色の濃さに関係なく、赤いコロニーをすべて数えてください。

コロニー数の最適測定範囲：
25～250個

Point
開封前：冷蔵庫保管
開封後：室温保管
開封時に開封した日付をパウチに記入し、開封後は1ヶ月以内に使用する。

コロニー数：153コロニー

3M

ペトリフィルムの測定原理

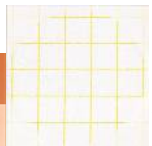
原理

- 標準培地（基礎培地）
 - 寒天の代わりにグアーガムを使用
- 指示薬TTC（トリフェニル・テトラゾリウム・クロライド）
 - 菌の持つ脱酸素酵素と結合
 - TTCが水素を受け取り還元される
 - TTCが還元され赤く発色する

注）脱酸素酵素を持たない菌（マイクロコッカス、乳酸菌の一部）ではコロニーが赤く発色されないことがある

3M

Petrifilm AC Plate

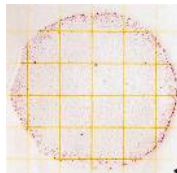
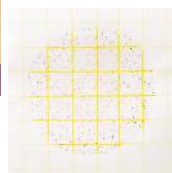


陰性コントロール用

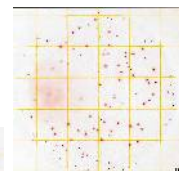
滅菌水または滅菌希釈液1mL接種

何が分かる？目的は？

- 判定時のブランクとして
- 希釈液のコンタミが無いかどうか？



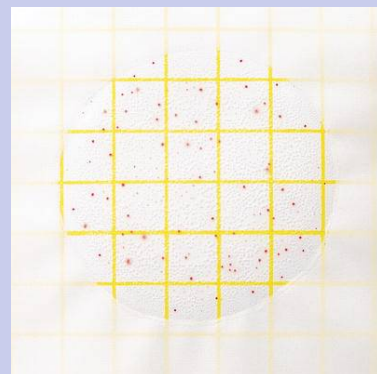
液状化事例



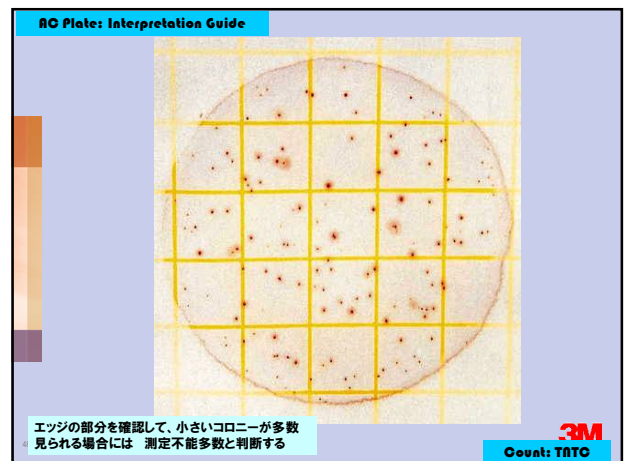
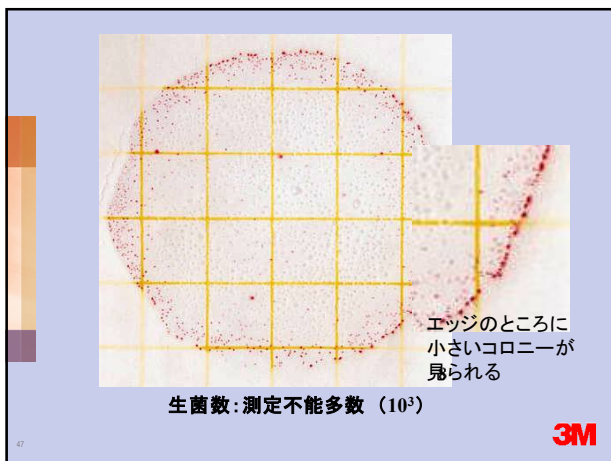
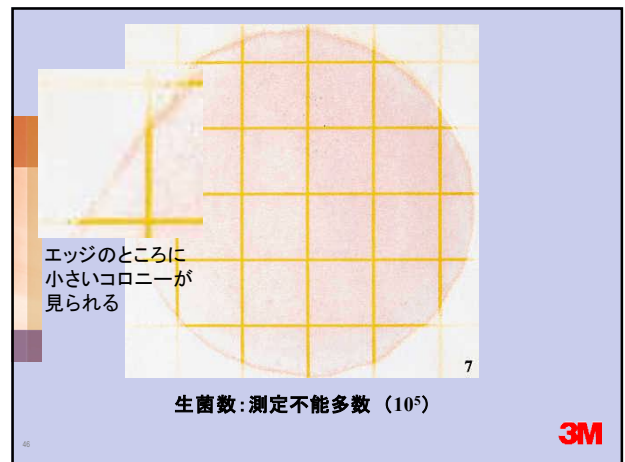
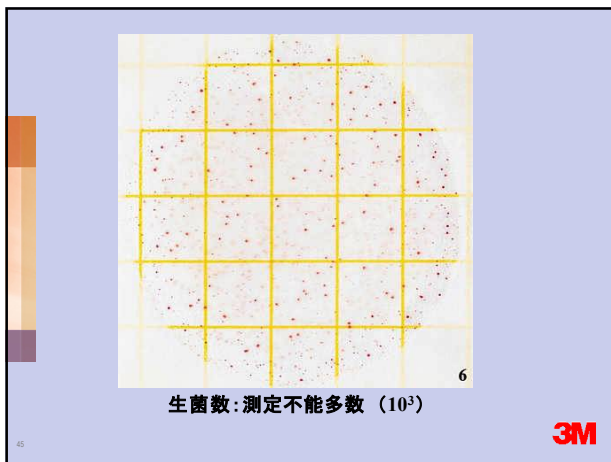
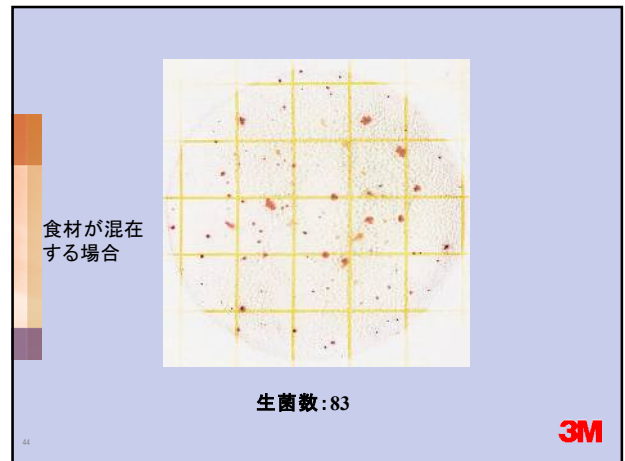
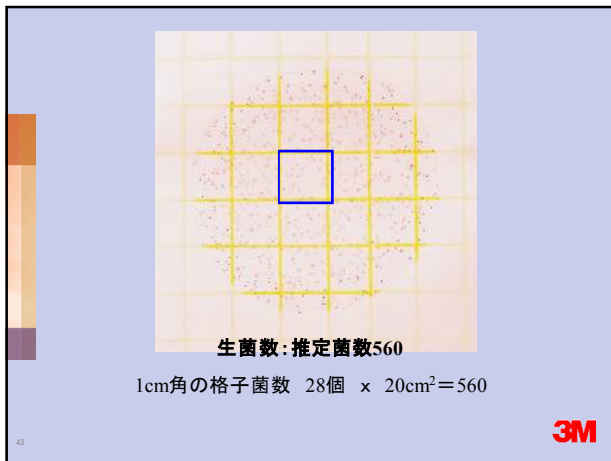
TNTC事例

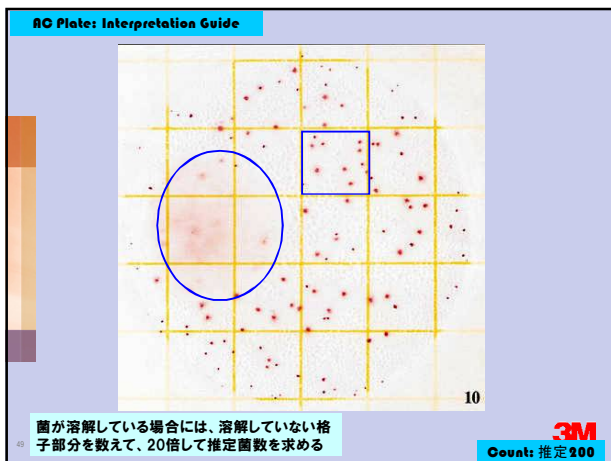
3M

AC Plate: Interpretation Guide



Count: 133





コロニーがゲル化している時のカウント方法

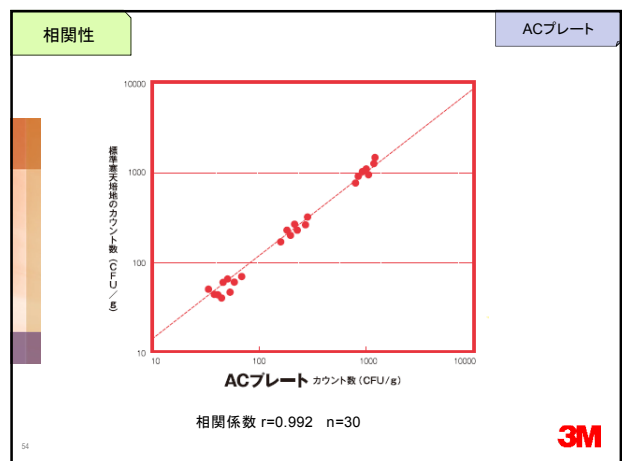
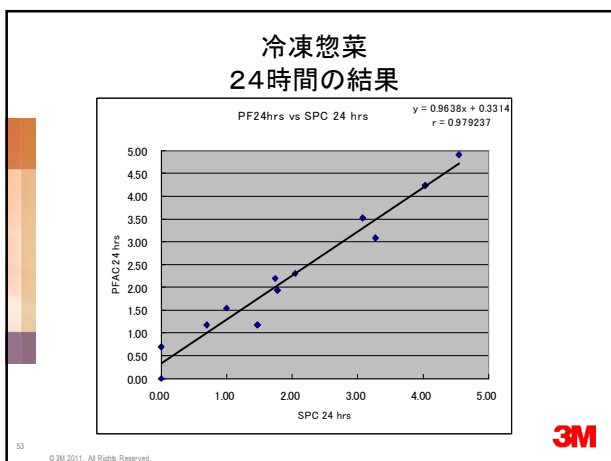
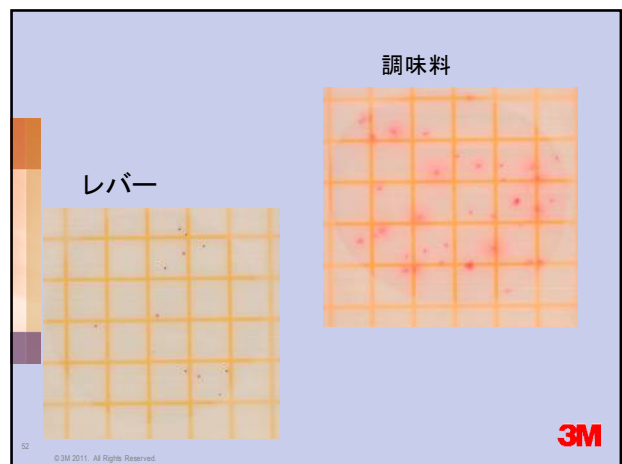
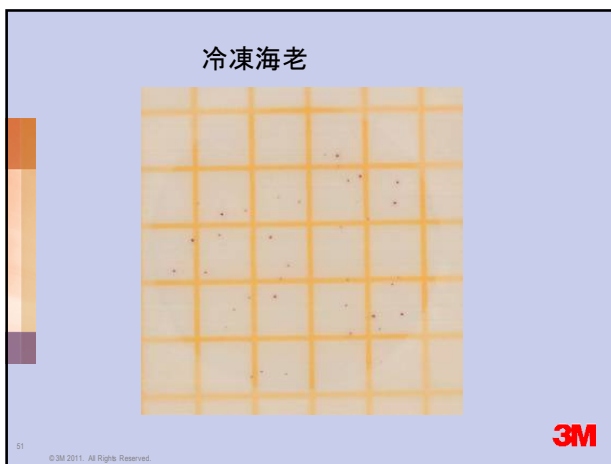
➤ 拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を計測する。

1. 他の集落がよく分散していて、拡散集落があっても計測に支障のないもの
2. 拡散集落の部分が平板の1/2以下の場合

➤ 次のような場合は、実験室内事故（L.A.）とする。

1. 拡散集落の部分が平板の1/2以上となり、集落数が測定できない場合。

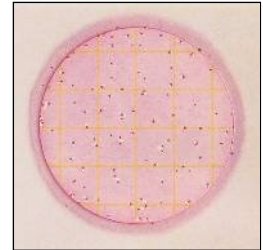
DS: 食品衛生検査指針 微生物編2004 P121



生菌数測定用プレート ACプレート ご質問？

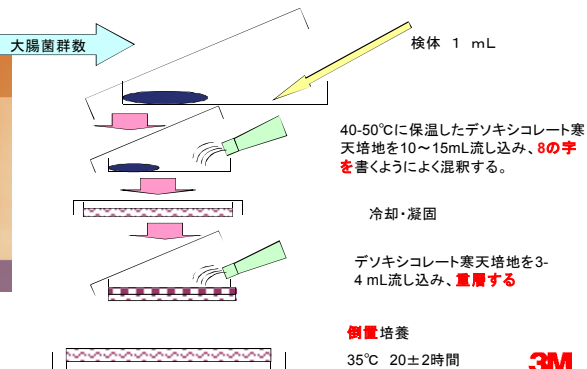
3M

ペトリフィルム大腸菌群数測定用 CCプレート



3M

一般的な流れ



ペトリフィルム™培地大腸菌群数測定用 (CCプレート)

- 培地：改良型VRB培地
- TTC指示薬
- 気泡を産生する**赤い**コロニー
- ≤ 20枚まで重ねて培養可能
- 24±2 時間培養
- 適正測定範囲 15-150CFU
- AOAC[®] OMAなど認証
- 食品衛生検査指針収載



3M

大腸菌群の定義

- グラム陰性の無芽胞桿菌で乳糖を分解して**酸とガス**を発生
[食品衛生検査指針、AOAC International、FDA Bacteriological Analytical Manual(BAM)]より
- CCプレート上で、**ガス発生**を伴う**赤い**コロニー
- イメージ（すべてのコロニーに対して）
デソキシコレート寒天培地+BGLB

3M

衛生指標菌 **大腸菌群数**

- 動物の腸管、自然界に広く分布
- 35°C(中温) 24時間培養

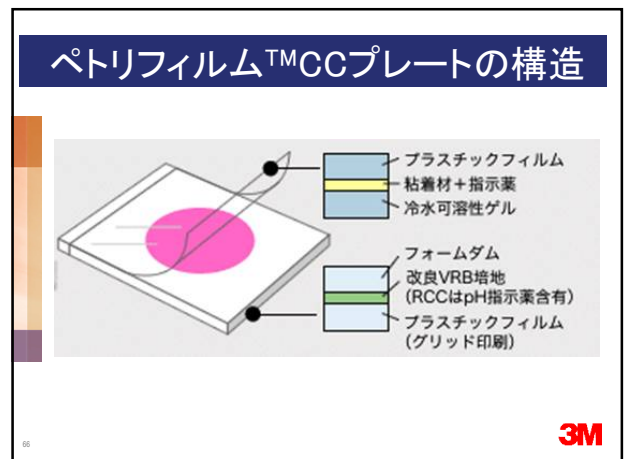
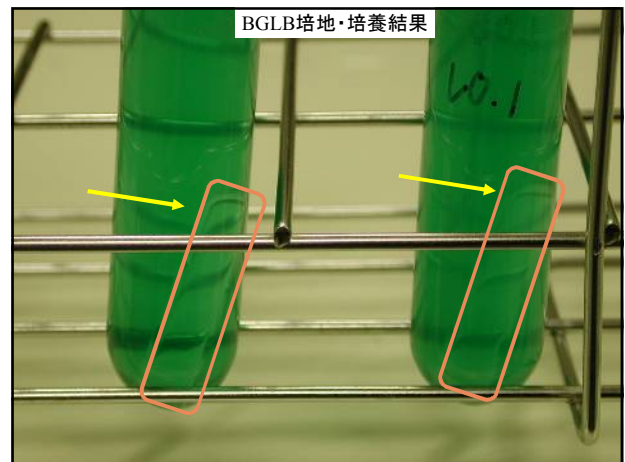
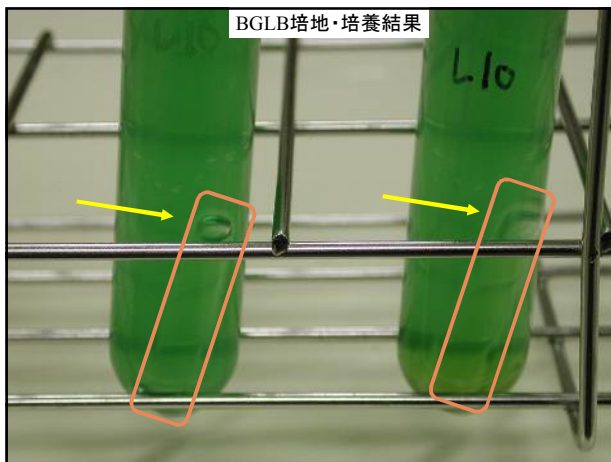
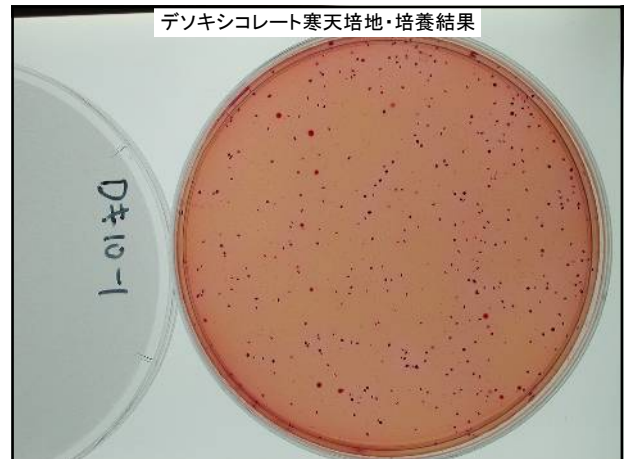
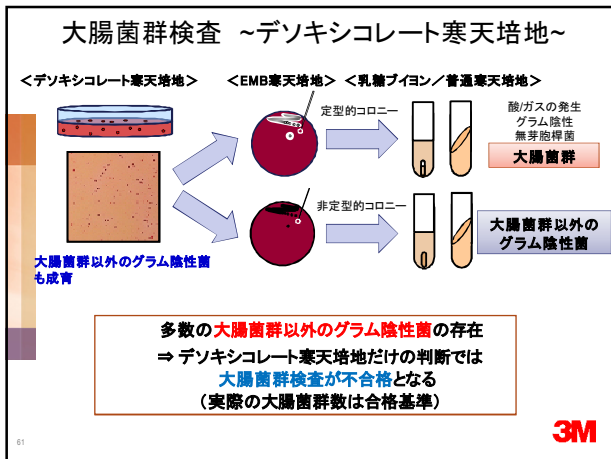
食品・加工環境の衛生指標となる検査項目

品質の可否・2次汚染を含む汚染度の目安

・加熱効果が適切か

・糞便や病原菌による汚染の可能性も

3M



操作手順1 (CCプレート)

① 上部フィルムを持ち上げる

注意 ピペットはできるだけ垂直にたてること

② ピペットを垂直に保ち、検体1μlを下部フィルムの中央に接種する

注意 上部フィルムを持ったまま、ゆっくりとかぶせること。

③ 気泡が入らないように注意してフィルムを持ったままゆっくりおろす

3M

操作手順2 (CCプレート)

④ スプレッダーの平らな面を下側に、上部フィルムの上に置く

注意 中央部分を押しスプレッダーを滑らせないこと

⑤ スプレッダーを上から人差し指で軽く押して広げる

注意 上部フィルムを上にしたまま培養すること。20枚以上重ねないこと。

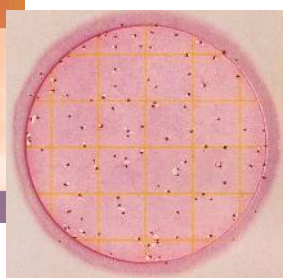
⑥ スプレッダーを取り、1分間以上放置して固化させる

注意 スプレッダーの平らな面を下にすること

3M

判定方法 (CCプレート)

ガスを発生する赤いコロニーを全て数える



指示薬により、コロニーが赤色に染色されます。サイズや色の濃さに関係なく、**ガス発生を伴う赤いコロニー**をすべて数えてください。
※ホームダムの上のコロニーは測定しません。

コロニー数の適正測定範囲：
15～150個

開封前：冷蔵庫保管

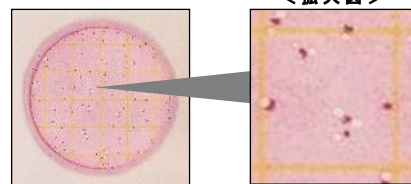
開封後：室温保管

開封時に開封した日付をパウチに記入し、**開封後は1ヶ月以内に使用してください。**

大腸菌群数：69コロニー

3M

CCプレート

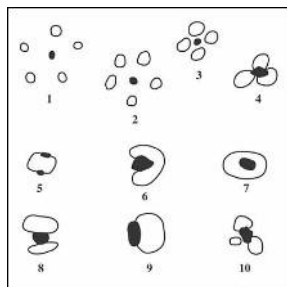


- 大腸菌群のガス発生まで1枚の培地で確認できる
- 大腸菌群のコロニー：周囲に気泡がある
⇒ 他のグラム陰性菌との識別が容易

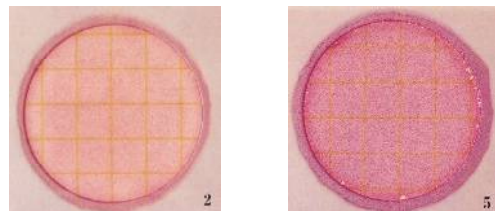
ガスを発生するコロニーの様々なパターンを以下に示します。コロニーとガスとの距離は、**コロニーの直径分の距離以内**にあること。さらに、ガスが放射状に見られる場合(1～3)、ガスがコロニーを分断する場合(5)、いずれの例も1個の大腸菌群として数えます。

大腸菌群として数える

大腸菌群として数えない



判定方法 (CCプレート)



コロニー数：菌の生育なし

- 大腸菌群数が多くなるにしたがって、ゲルの色調が濃くなる。

コロニー数：TNTC(測定不能多数)

- 多くのコロニーがあること
- 多くの気泡があること
- ゲルの色調が濃くなっていること

TNTCになった場合、ブランクよりもゲルの色調が濃くなります

3M

ガスが消える/出にくい大腸菌群
Chronobacter sakazakii

■ ペトリフィルム

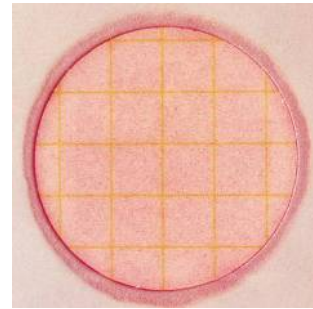
- ・ 24時間で産生したガスが48時間で消える

■ BGLB

- ・ 24-48時間ではガスが産生しない場合がある
- ・ 72時間で微量のガスを出す
- ・ 96時間試験管でようやく目に見える少量のガスを出す

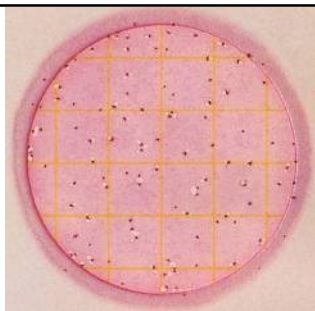
3M

コロニーの現れなかったCCプレート



大腸菌群数: 0コロニー

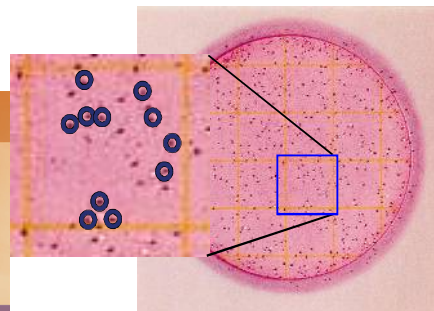
3M



大腸菌群数: 69コロニー

適正測定範囲内(ガスを伴うコロニー+ガスを伴わないコロニーの合計が15~150コロニー)にあるプレートから培養結果を得る

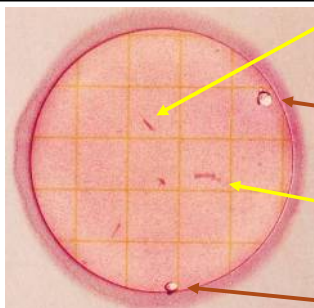
3M



大腸菌群数: 推定菌数 220

$11 \times 20 \text{cm}^2 = 220$

3M

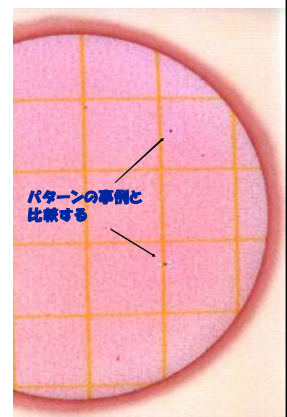
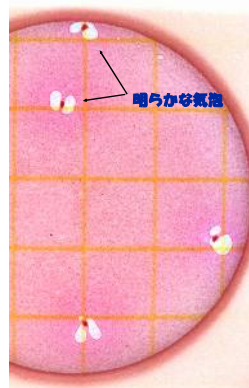


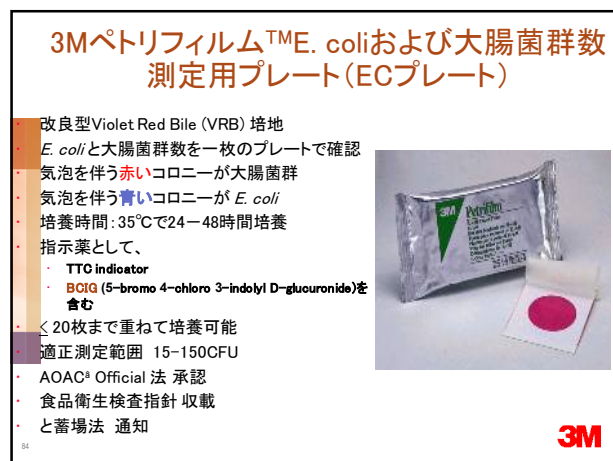
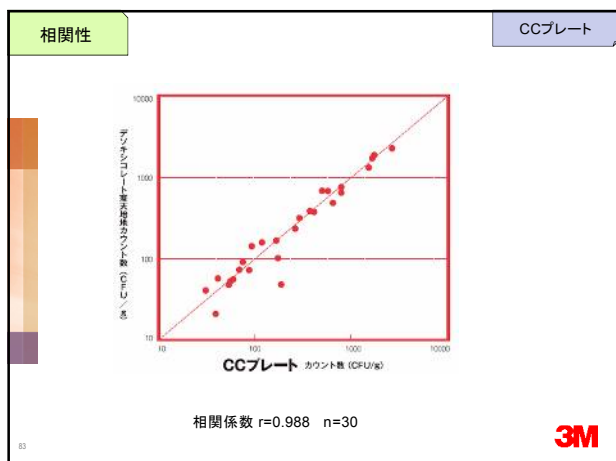
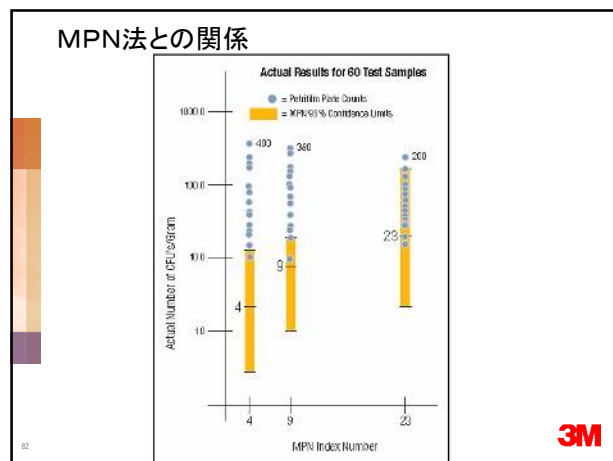
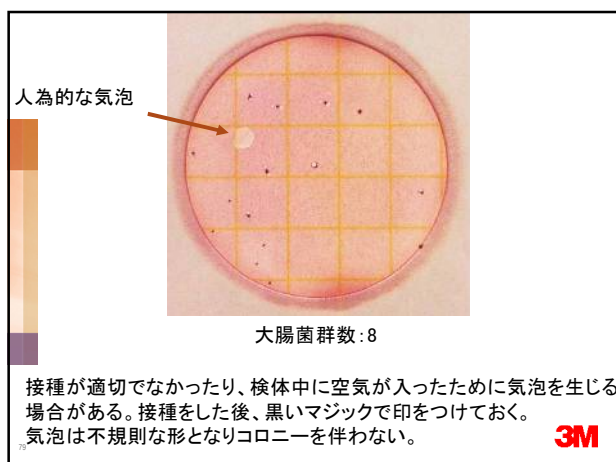
大腸菌群数: 2コロニー

食品残渣は形が不規則で気泡を伴わない
接種をした後、黒いマジックで印をつけておく

3M

気泡の出方の事例





E.coliおよび大腸菌群数測定用ECプレート

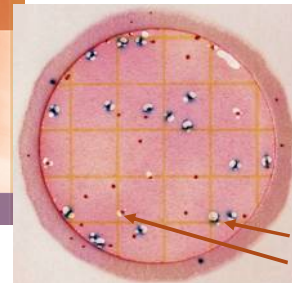
E.coliは、産生するグルクロニダーゼと指示薬が反応し青く染色される

AOAC法ではガス発生を伴う青いコロニーをE.coliとして1ml又は1g中のE.coliの菌数とする

残りのガス発生を伴う赤いコロニーはE.coli以外の大腸菌群である

3M

24時間培養後の大腸菌群の判定



全ての大腸菌群＝

24時間培養後、ガスを伴う赤いコロニー

＋

24時間培養後、ガスを伴う青いコロニー

E.coli(ガスを伴う青いコロニー)

E.coli以外の大腸菌群
(ガスを伴う赤いコロニー)

3M

E.coli(大腸菌)の菌数測定培養時間

24時間培養:

- 未加工の食肉、鶏肉、水産製品
(例:未加工の生の食肉、カットのみ行った食肉、解凍後素切りした魚、ボイルのみ行った食肉、枝肉のふき取り)
- 枝肉(鶏、水産含む)の拭き取り検査

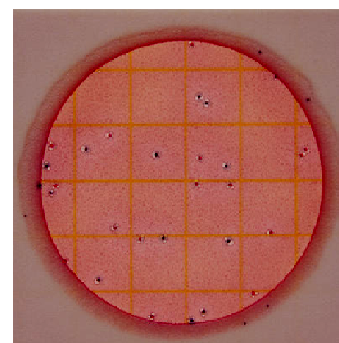
48時間培養:

- 食肉以外の素材を加えて加工した食肉、鶏肉、水産製品(例:ソースやスパイスで味付けした食肉、醤油や味噌で味付けした食肉、すじこ等)
- 食肉以外の全食品(そうざい、野菜、卵、乳製品等)

注意:24時間判定時にガスを伴う青いコロニーが見られ、規格値を超えている場合には、24時間にて判定終了としても可能

E.coli(ガスを伴う青いコロニー)

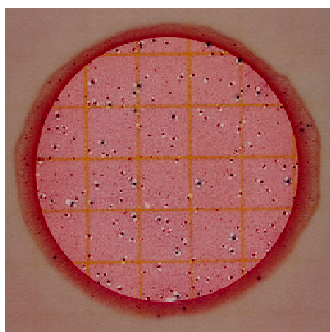
3M



E.coli 数:13

大腸菌群数:28

3M



E.coli 数:17

大腸菌群数:150

3M

ペトリフィルム
CC、EC
大腸菌群関連測定用
ご質問

3M

ペトリフィルム™ 黄色ブドウ球菌 エクスプレス測定用 STXプレート及びSTXディスク

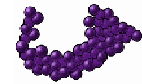


91

ペトリフィルム™黄色ブドウ球菌迅速測定用 STXプレート

プレート：
酵素基質 改良型 ペアード
パーカー 培地

DNase ディスク：
DNA トルイニド ブルー-O



3M

92

効率の向上【検査時間の短縮】

粉末培養法



ペトリフィルム
事前の準備なしに
すぐに検査が行える



※コアグララーゼ試験判定と同等

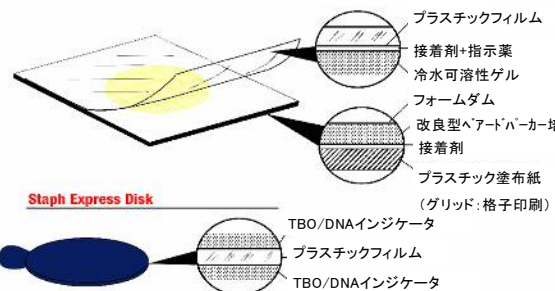
93

93

定性 vs 定量

3M

ペトリフィルム™ 黄色ブドウ球菌 エクスプレス測定用 STXプレート及びSTXディスク



94

3M

精度の高い検査

ペトリフィルム 黄色ブドウ球菌 エクスプレス測定用STXプレート

○コアグララーゼ確認試験と同等の結果が得られる

〔米国FDAのBAM (Bacteriological Analytical Manual)に記載されている
ペアード・パーカー寒天培地+コアグララーゼ試験の方法〕

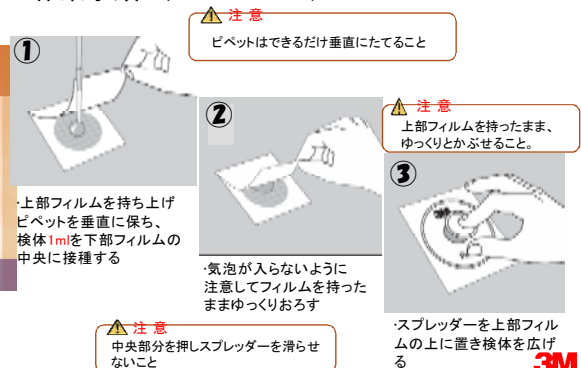
○検体量が1mLなので測定感度があがる
(塗抹法の場合: 検体量0.1mL)

○最短で約22時間で結果判定が可能
(培養温度が35℃または37℃で行えます)

95

3M

作業手順1 (STXプレート)



96

3M

作業手順2 (STXプレート)

④ 透明なフィルム面を上にし、20枚まで重ねて培養する。
35±1℃で24±2時間培養する

⑤ 24±2時間培養した後、コロニーが全く観察されない場合、コロニー数はゼロとなり、検査は終了となる

⑥ 赤紫色のコロニーを黄色ブドウ球菌として測定する

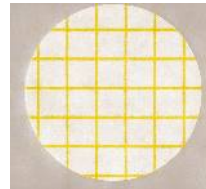
注意 上部フィルムを上にしたまま培養すること。20枚以上重ねないこと。

注意 コロニーが観察されない、または赤紫色のコロニーのみ観察される場合には、終了。赤紫色以外のコロニーが観察される場合には、ディスクを用いて次のステップを行う。

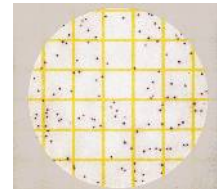
3M

ペトリフィルム 黄色ブドウ球菌 エクスプレス測定用STXプレート

測定事例



コロニーが見られない場合：
試験は終了



赤紫色のコロニーのみが見られる場合：赤紫色のコロニーを黄色ブドウ球菌として測定し、試験は終了

3M

判定方法 (STXプレート)



プレート上に赤紫色以外のコロニー(黒、青緑色コロニー)が見られる場合

- ① ディスクを装着する
- ② 35℃又は37℃で1～3時間培養する
- ③ ピンクのDNaseゾーンを黄色ブドウ球菌として測定する
(ピンクゾーンは*S.hyicus*や*S.intermedius*の場合もある)

3M

作業手順3 (STXディスク)

① ディスクを装着する

② 35℃又は37℃で1～3時間培養する

③ ピンクのDNaseゾーンを黄色ブドウ球菌として測定する

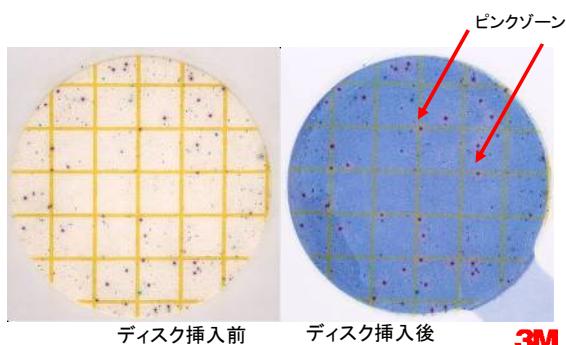
プレートの上部フィルムを持ち上げ、下部プレートにディスクを装着し、上部フィルムを戻す

35±1℃で1～3時間培養する。培養時間は最大で3時間までとする

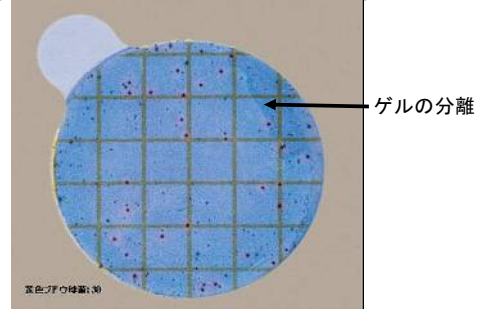
コロニーの存在に関係なく、全てのピンクゾーンを測定する

3M

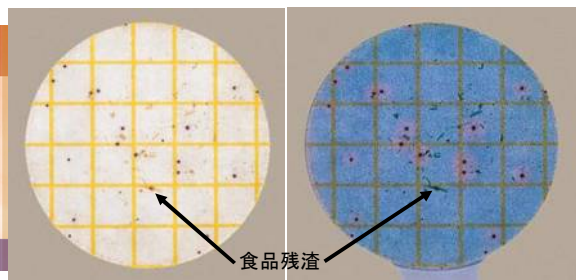
判定方法 (STXプレート)



ピンクゾーンを黄色ブドウ球菌として測定します。ゾーンの大きさは考慮しません。ディスクは表裏が無いため、上部フィルムを剥がした際に培地のゲルが割れても検査成績に影響はありません



食品残渣の形状は不定形である。ディスクを挿入すると、ゾーンと食品がより鮮明に識別されます



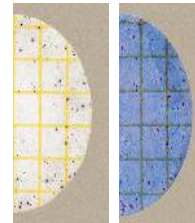
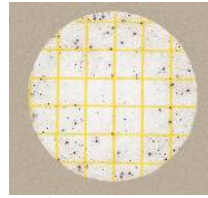
黄色ブドウ球菌数:18コロニー

3M

103

ペトリフィルム 黄色ブドウ球菌 エクスプレス測定用STXプレート

ディスクを装着する場合



- 赤紫色のコロニー以外の色のコロニーが見られる場合:
 - ディスクを装着します
 - 35°Cで1-3時間培養します。

- ピンクゾーンが見られれば黄色ブドウ球菌として測定します。

3M

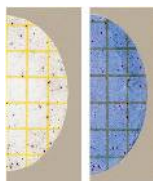
104

104

STXプレート / STXディスク

黄色ブドウ球菌の確認試験が簡単！

- STXプレート培養後、黄色ブドウ球菌が産生するDNA分解酵素(DNase)に反応するディスクを培地部分に挟み、1-3時間培養する
- 周囲にピンクハローが現れるコロニー⇒黄色ブドウ球菌

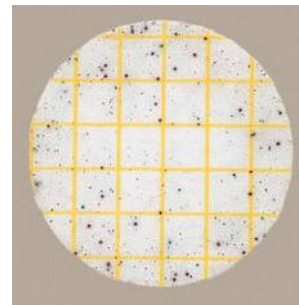


	コアグラゼ 産生	DNA分解酵素 産生
<i>S. aureus</i> 黄色ブドウ球菌	+	+
<i>S. epidermidis</i> 表皮ブドウ球菌	-	-
<i>S. hyicus</i>	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	+

3M

105

赤紫色以外のコロニーが見られる場合にはディスクを使用します
プレートのみで黄色ブドウ球菌の定量試験結果を判断しません



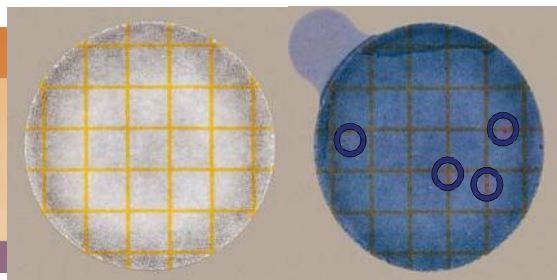
黄色ブドウ球菌数:ディスク必要事例

3M

106

106

背景フローラの細菌が多数の場合は、個々のコロニーを観察することは困難です。ディスクを挿入してピンクゾーンを測定します



黄色ブドウ球菌数:4コロニー

3M

107

107

卵黄加マンニット食塩培地

バチラスと黄色ブドウ球菌の識別が困難
⇒黄色ブドウ球菌のコロニーを見た経験が無い



これは『黄色ブドウ球菌』？



バチラスを黄色ブドウ球菌として誤って測定
⇒黄色ブドウ球菌検査が不合格となる(実際は合格基準)

廃棄する製品が増加 (合格製品の収率が低下)

3M

108

卵黄加マンニット食塩寒天培地の事例



3M

109



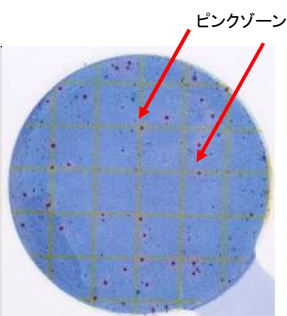
3M

110

判定方法 (STXプレート)



ディスク挿入前

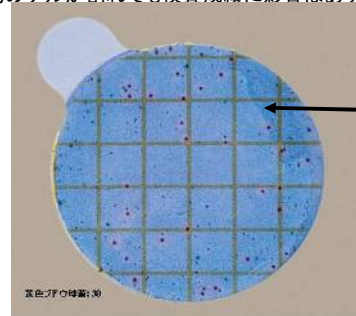


ディスク挿入後

3M

111

ピンクゾーンを黄色ブドウ球菌として測定します。ゾーンの大きさは考慮しません。ディスクは表裏が無いいため、上部フィルムを剥がした際に培地のゲルが割れても検査成績に影響はありません



ゲルの分離

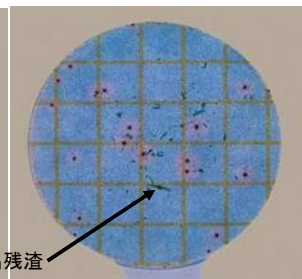
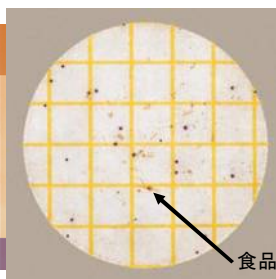
黄色ブドウ球菌:30

黄色ブドウ球菌数:30

3M

112

食品残渣の形状は不定形である。ディスクを挿入すると、ゾーンと食品がより鮮明に識別されます



食品残渣

黄色ブドウ球菌数:18コロニー

3M

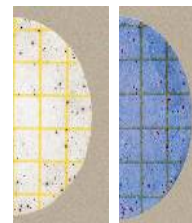
113

ペトリフィルム 黄色ブドウ球菌 エクスプレス測定用STXプレート

ディスクを装着する場合



- 赤紫色のコロニー以外の色のコロニーが見られる場合:
- ディスクを装着します
- 35°Cで1-3時間培養します。



- ピンクゾーンが見られれば黄色ブドウ球菌として測定します。

3M

114

STXプレート / STXディスク

【卵黄加マンニット食塩培地】 【ペトリフィルム™ 培地STXプレート】

1日目 **2日目~3日目**

24 ~ 48 h
35 ~ 37°C **判定**

1日目 **2日目**

24 ± 2 h
35 ± 1.0°C
(37 ± 1.0°C) **判定**

STXプレート: 培養24 ± 2時間後の結果判定

⇒ 必要に応じて確認試験/再試験を“速やかに”実施することが可能

3M

STXプレート / STXディスク

1日目 **2日目~3日目** **3日目~4日目** **4日目~5日目**

24 ~ 48 h
35 ~ 37°C 24 h
35 ~ 37°C 3, 6, 24 h
35 ± 1°C **判定**

1日目 **2日目**

24 ± 2 h
35 ± 1.0°C
(37 ± 1.0°C) 1 ~ 3 h
35 ± 1.0°C
(37 ± 1.0°C) **判定**

STX ディスク

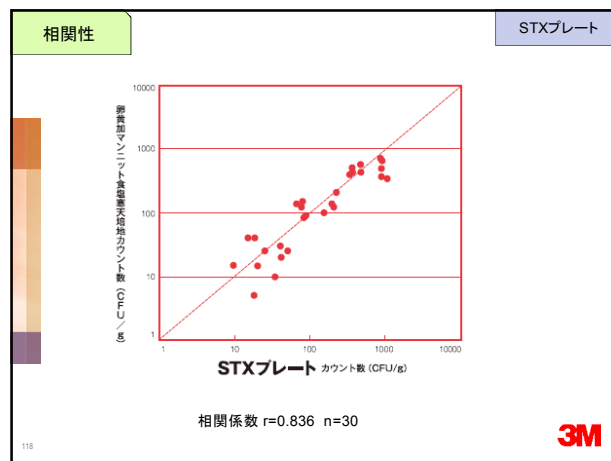
⇒ コアグラゼ試験と同等の判定が容易に実施可能

3M

黄色ブドウ球菌 利点まとめ

1. 感度: 従来法0.1 mL塗抹法に対して**1 mL**の接種(×10感度)
2. 時間: 48時間が**最短22時間**で確認まで可能
3. 精度: AOAC Official Method of Analysisなどにて承認
4. 信頼性: 食品衛生検査指針に収載
5. スペースの削減: 保管時、培養時、廃棄時における
スペース削減
6. 有効期限: 1-2 週間の有効期限が **18ヶ月**

3M



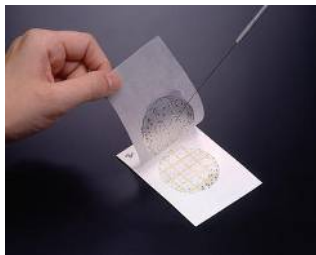
黄色ブドウ球菌STXプレート ご質問

3M

ペトリフィルム™ 培地の特徴

- (1) 培地調製が不要で**すぐに検査**ができる
- (2) 使用後の**廃棄が容易**である
- (3) 保管および培養時の**スペース**をとらない
- (4) スタンプ法や空中落下細菌の判定にも**応用**できる
- (5) 指示薬によりコロニーが染色され**数えやすい**
- (6) コピーが可能で**衛生指導、結果の保存**に有効である
- (7) コロニーを**釣菌**することができる

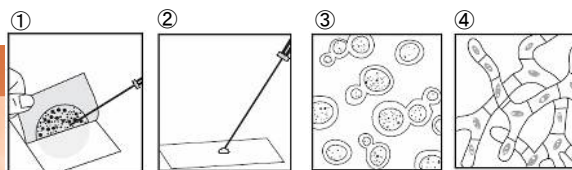
3M



ペトリフィルムはすべて釣菌が可能です。

3M

カビ酵母の事例：顕微鏡による見分け方



①
コロニーを釣菌する。

②
スライドガラスの上に滅菌水を1滴用意し、カバーガラスをかけ顕微鏡でカビ酵母を確認する。

③
酵母は卵型に見える。発芽しているものもある。

④
カビは繊維状に見える。

3M

ペトリフィルム™の保存方法と有効期限は？

製品	保存	有効期限 (製造日より)	開封後
AC	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
CC	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
EC	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
SEC	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
RCC	2-8℃	12ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
YM	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
STX	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
STX-D	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 6ヶ月以内
EL	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
EL-BPW	2-8℃	12ヶ月	N/A
EB	2-8℃	18ヶ月	25℃以下、相対湿度50%未満 1ヶ月以内
MRS	2-30℃	24ヶ月	

3M

ペトリフィルム™(培養温度と時間一覧)

製品	培養温度(℃)	培養時間(時間)	最適測定範囲	適正pH
ACプレート (生菌数測定用)	32±1 35±1	48±3	25-250	6.6-7.2
CCプレート (大腸菌数測定用)	32±1 35±1	24±2	15-150	6.6-7.2
ECプレート (E.coliおよび大腸菌数測定用)	35±1	24±2~48±3	15-150	6.5-7.5
SECプレート (大腸菌数測定用)	42±1	24±2	15-150	6.5-7.5
RCCプレート (大腸菌数測定用)	35±1	6~24±2	15-150	6.5-7.5
STXプレート (黄色ブドウ球菌数測定用)	35±1	24±2	<100	6.0-8.0
STXディスク (黄色ブドウ球菌確認用)	35±1	1-3		
EBプレート (腸内細菌数測定用)	35±1	24±2	15-100	6.5-7.5
YMプレート (酵母・菌数測定用)	20-25	3-5日	15-150	N/A

▲注意

CC, EC, EB : 菌コロニー数で15-180が適正範囲
STXディスク : 3時間を超えないこと

3M

ペトリフィルム™ 保管方法と廃棄方法

開封前



冷蔵庫保管 (8℃以下)

<有効期限>
AC, CC, EC, YM, STX : 製造より18ヶ月

▲注意

ロット表示 : 例
2012-04 KL : 2012年4月末まで有効

開封後



室温保管

テープ、クリップなどで止め 室温保管
(冷蔵庫には入れない)

▲注意

冷蔵庫に入れないこと。

<有効期限>



開封後 1ヶ月以内に使用する

: 各プレート

開封後 6ヶ月以内に使用する

: STXディスク

▲注意

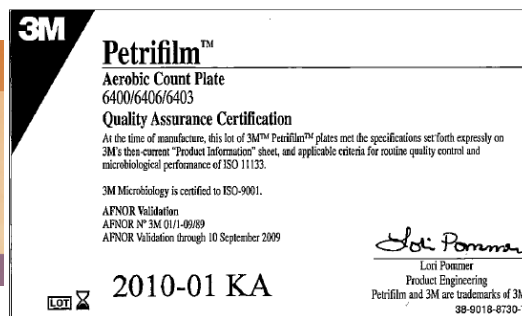
開封後は1ヶ月以内に使用すること。
STXディスクのみ、室温で6ヶ月有効

廃棄方法

必ず滅菌して廃棄すること。

3M

保証書(事例)



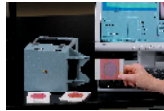
製品毎 ロット毎に品質保証書が箱・ケース毎に挿入

3M

ペトリフィルムプレートリーダー

PPRの特徴

- 1枚4秒で測定および記録可能
- 測定者間差誤差を低減させる一貫性のあるカウント方法
- AC(生菌数)、CC(大腸菌群数)、EC(E. coliおよび大腸菌群数)を測定
- データを自動的にExcelへ転送・データ保存
- 高精度: 目視と±10%の精度
- コロニーを数量と測定マークで画像表示
- 菌数は希釈倍率に応じて自動計算
- ユーザーID、パスワードによる管理が可能
- 結果の編集可能



ポイント

CCプレートは、気泡を伴うコロニーの測定が可能
ECプレートは、大腸菌群の赤い気泡を伴うコロニーおよびE. coliの青い気泡を伴うコロニーの測定が可能

3M

環境モニタリング

3M

なぜ拭き取り検査が必要なのでしょう？

1. CCP(重要管理点)の管理
 2. 原材料、工程中、最終製品の汚染確認
- ・ラインの洗浄消毒後の確認(洗浄の確認)
 - ・製造環境工程の汚染分布の分析
 - ・洗浄消毒の効果確認

3M

食中毒の発生要因(汚染要因)

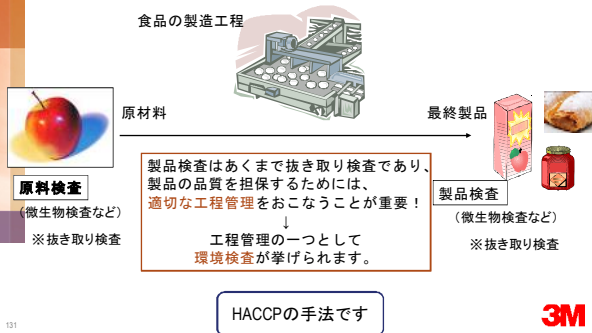
食中毒菌名	1位	2位	3位	4位	5位
サルモネラ (Salmonella)	原材料 (27.5%)	手指 (19.7%)	調理施設・器具 (16.2%)	二次汚染 (10.1%)	風塵・昆虫 (1.6%)
腸炎ビブリオ (Vibrio parahaemolyticus)	原材料 (30.6%)	二次汚染 (20.0%)	調理施設・器具 (18.4%)	手指 (4.5%)	使用水 (0.1%)
病原大腸菌 (Pathogenic Escherichia coli)	使用水 (18.5%)	調理施設・器具 (15.3%)	手指 (12.9%)	原材料 (12.9%)	二次汚染 (7.3%)
黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	手指 (51.3%)	調理施設・器具 (6.5%)	二次汚染 (3.6%)	原材料 (3.3%)	使用水 (0.1%)

環境からの汚染割合

参考: ISO 22000のための食品衛生7S実践講座 第2巻
「食の安全を極める食品衛生7S(洗浄・殺菌編)」日科技連

3M

食品製造環境の衛生管理 ～安全で品質の良い製品を作るために～



3M

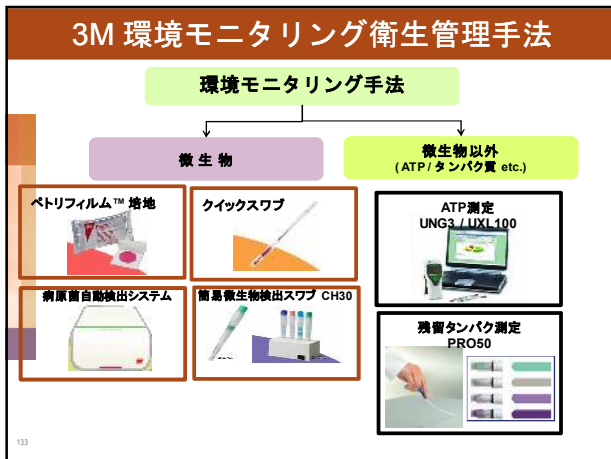
食品業界の見通し

一つの研究によると ...

環境中に微生物が発見されたら、食品中に**70%の確率で**混入している可能性があります。

IAFP Rome 2007

3M



拭き取り検査の規格(例):

コロニー数/100cm ²	汚染程度	措置・対策
100<	強度	再洗浄・殺菌
30~100	中程度	
0~30	軽度	

<引用>
弁当・調理・パン・惣菜製造者必携 改訂 自主衛生管理マニュアルの活用
財団法人東京顕微鏡院

134

食品工場の微生物管理基準:

日本建築学会環境基準: AIJES-A002-2005

表面付着菌数

コロニー数/25cm ²	基準となる場所
≦ 100	準清潔作業
≦ 30	清潔作業
≦ 5	クリーンルーム

落下菌数 cfu/20分

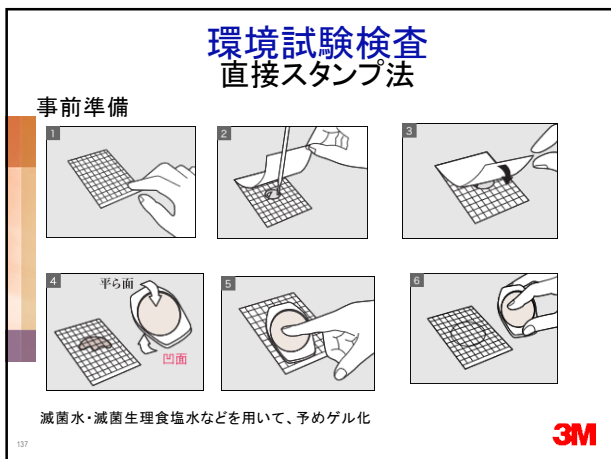
コロニー数/20min	基準となる場所
≦ 100	汚染作業
≦ 50	準清潔作業
≦ 30	清潔作業
≦ 3	クリーンルーム

135

海外の拭き取り検査の自主基準事例:

コロニー数/100cm ²	基準となる場所
1000<	原料保管場所
30~100	中間製品製造場所
0~30	最終製品製造場所

136



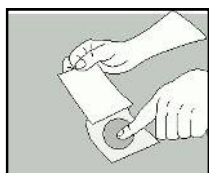
環境試験検査 直接スタンプ法

ゲル化時間	
AC:	30分
CC, EC, YM:	1-2時間
STX:	3日間(冷蔵)

ゲル化したプレートの保存	
密封容器に入れ2~8℃で冷蔵保存する	
有効保存期間	
AC:	2週間
CC, EC, YM, STX:	1週間

138

環境試験検査 直接スタンプ法



・測定結果
AC,CC,EC
コロニー数/20cm²
YM,STX
コロニー数/30cm²

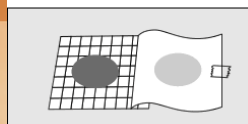
フィルムを開き、上部フィルムを検体に
付着させ、再びフィルムを閉じた後培養する

139 139

3M

環境試験検査 空中落下細菌

3 空中落下細菌測定



・測定結果
AC,CC,EC
コロニー数/40cm²
YM,STX
コロニー数/60cm²

1. クリップなどを用いてゲル化したペトリフィルム™培地をはさみ、両面テープで上部フィルムを固定します。
2. 約15分間広げたまま放置した後、培養します。

140

3M

ゾーニングの考え方

入り口: 取っ手、

非食品接触:
テーブルの足、床、壁

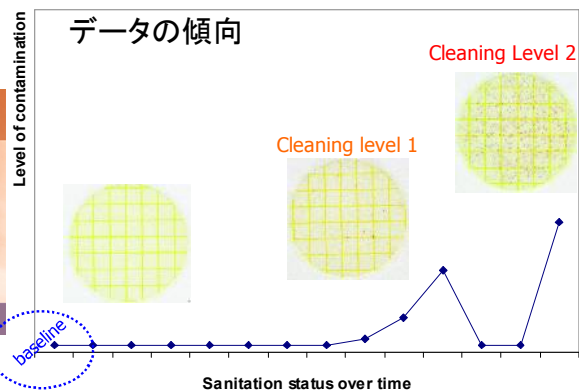
非食品接触:
装置のパネル、エプロン

食品が接触する:
道具、コンベア、
人など

141

3M

データの傾向



142

3M

管理基準の設定・運用

- ・製造品目や製造プロセスに応じて、管理基準を設定します。
- ・また、是正処置をあらかじめ明確にしておくことが大切です。

(参考)

日本べんとう工業協会編著、財団法人東京顕微鏡院発行『弁当・調理パン・惣菜製造者必携 改訂 自主衛生管理マニュアル』



コロニー数 /100cm ²	汚染程度	措置・対策
0~30	軽 度	-
30~100	中程度	-
100以上	強 度	再洗浄・殺菌

143

3M

3M™ 簡易微生物検出スワブ CH30



144

3M

3M™ 簡易微生物測定スワブ CH30



- 簡単** ふき取るだけの簡単操作。
- 迅速** 24時間の培養で判定。
- 正確** 選択培地を使用。

- 間違いが起きにくい簡単で安全な設計
- 初期投資が最小限(培養器のみ)
- 殺菌液も一体型のため現場で廃棄可能

3M

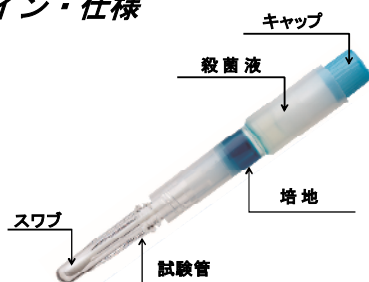
簡易微生物測定スワブCH30のメリット

- 事故を未然に防ぐ
- 個人差を最小限に抑える(色変化で定性判定)
- 持ち運びに便利(オールインワン)
- 短時間に結果が分かる
- 万一の際に迅速に対応が出来る
- 現場の衛生意識が高まる
- 廃棄が容易(高圧滅菌不要)



3M

デザイン・仕様

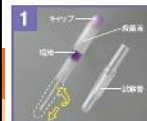


■仕様

- 輸送・保存方法 : 冷蔵(2~10℃)
- 有効期限 : 製造から12ヶ月 *箱の裏に記載
- 廃棄方法 : 殺菌後自治体の規定に従って廃棄する(プラスチック廃棄物)

3M

使用方法(1) ふき取り~培養



試験管を矢印の方向へ押し、はずします。



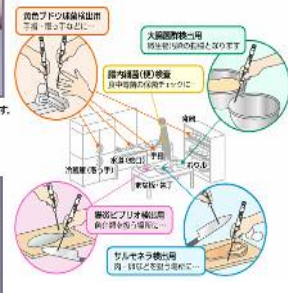
転棒の先で検査対象をふき取ります。この時、検査対象以外の部分に触れないように注意します。
*ラクトアイス専用の場合は、試験管を逆します。



試験管を矢印の方向へ押し上げながら培地が落ちるまで回します。(試験管は本体部分との境目がふさがれるまでしっかり押してください。)



培地が落ちたことを確認した後、恒温器で35℃、24時間培養します。
*スワブは押さず立てた状態で培養してください。



3M

使用方法(2) 判定~廃棄



培養終了後、培地の色の変化により判定します。判定は判定表にしたがって行います。



判定後、キャップを矢印の方向に1/4回転させます。



キャップの上部が止まるまで強く押し込みます。



殺菌液が落ちたことを確認した後、本体を軽く振り殺菌液と培地を混ぜます。

3M

判定 (24時間培養後)

	大腸菌群 CH30-CC	黄色ブドウ球菌 CH30-ST	サルモネラ CH30-SAL	腸炎ビブリオ CH30-VP	大腸菌群 ラクトアイス用 CH30-LCC
陰性					
陽性					

3M

ATP測定機器を利用した衛生管理

3M

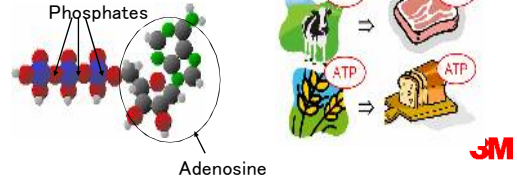
ATPふき取り検査とは？

■ ATPとは？

- ・ 生き物がエネルギーを蓄えるための物質です。
- ・ 動物や植物はもちろん、それらを加工した食品に含まれています。

■ ATPふき取り検査とは？

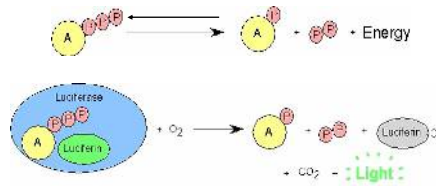
- ・ 目に見えない洗い残しを、ATPを指標として目に見える形にする、清浄度検査です。



3M

ルシフェリン・ルシフェラーゼ

細胞は、エネルギーを出すときに 1つあるいは2個のリンを放出する



ルシフェラーゼによって、エネルギーを出すときに光を出す

3M

ATP検査の目的

- ☑ 製造ラインの清掃状態を把握していますか？
- ☑ 従業員の手洗い効果を把握していますか？
- ☑ 見た目だけのきれいでは？

ATP検査によって疑問を解決します！

3M

3M™ クリーントレース ATP測定装置

使用方法



【3M ATP使用のメリット】

- 使用者によるバラつきを最小限にした設計
- データ管理と分析が用意なソフトウェア（無償）
- 最初から湿っており扱い易いスワブ
- その場で結果が分かり衛生指導に効果的

3M

ATPの基準値設定

- ① ふき取り箇所を選びます
- ② 洗浄前後の数値を測定します
- ③ 基準値(合格／不合格レベル)を決めます
- ④ 運用を始めます
(頻度、記録フォーム、不合格の場合の対応)
- ⑤ 長期的な傾向を見ます
- ⑥ 必要に応じて基準値の見直しをします

3M

クリーントレース™ タンパク残留測定スワブ

- 洗い残しの指標として、タンパク質を迅速に検出します。
- タンパク残留測定スワブ：PRO50
- タンパク残留測定スワブインスタント：CIT50
 - ・ 設備・器具のふき取り検査が手軽に行えます。測定装置は不要です。
- PRO50は10分後の色変化をもとに、半定量的な結果が得られます。
- CIT50は瞬時に結果が得られる他、PRO50に比べて安価です。



3M

158

ホームページのご案内

食品衛生管理製品



<http://www.mmm.co.jp/microbiology/>

ペトリフィルム

検索

3M

159

本日は 大変 お疲れ様でした！

今後ともよろしくお願いします。



<http://www.mmm.co.jp/microbiology/index.html>

3M

160

ワークショップ

3M

161

ペトリフィルムを使用する前の準備

実験台を消毒用アルコールなどで清拭する

検査を行う人の手、実験器具なども消毒する

目的とするペトリフィルムプレートの袋をハサミで開けて、必要枚数を取り出す。

油性ペンで必要事項をプレートに記入する

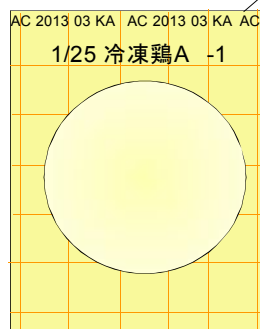
3M

162

© 3M 2011. All Rights Reserved.

生菌数測定用プレートの場合

AC : 生菌数用プレートを示します
2013 03 KA:
ロット番号と有効期限を示します。
この場合 2013年3月まで有効



日付
検体名
希釈倍率 などの情報を記入
希釈倍率の書き方
x10, -1 など

記入する場所:
約20 cm² の円が中心部にあ
ると想定して記入する。

3M

163

© 3M 2011. All Rights Reserved.

大腸菌数測定用プレートの場合

CC: 大腸菌数測定用プレートを示します
2013 03 KA: ロット番号と有効期限を示します。

CC 2013 03 KA CC 2013 03 KA CC

1/25 冷凍鶏A -1

日付
検体名
希釈倍率 などの情報を記入
希釈倍率の書き方
x10, -1 など

記入する場所:
白いフォームダムに記入する。

164 © 3M 2011. All Rights Reserved. 3M

3M™ 希釈水 9mL PBS (リン酸緩衝生理食塩水)

¥44/本

片手で簡単に開封できるワンタッチタイプなので、作業性が向上します。

- 1mL 刻みの目盛付き容器なので、正確に希釈できます。
- 口径が広いので、ピペット本体が容器に接触しにくいです。
- 自立できる安定した形状です。
- 20本単位毎にシュリンクパック包装なので、カートンから取り出しやすいです。

165 3M

3M™ 希釈水 9mL PBS (リン酸緩衝生理食塩水)

開封方法

166 3M

操作手順1 (ACプレート)

① 上部フィルムを持ち上げる

② ビペットを垂直に保ち、検体1mLを下部フィルムの中央に接種する

③ 上部フィルムから手を離しフィルムを自然に落とす

注意: ビペットはできるだけ垂直にたてること

注意: 上部フィルムを落とす感じでかぶせること。

167 3M

操作手順2 (ACプレート)

④ 平面 凹面

注意: 中央部分を押しスプレッダーを滑らせないこと

スプレッダーの凹面を下側にし、上部フィルムの上に置く

⑤ スプレッダーを上から人差し指で軽く押して広げる

⑥ スプレッダーを取り、1分間放置して固化させる

注意: スプレッダーの凹面が下になっていることを確認すること。

168 3M

操作手順1 (CCプレート)

① 上部フィルムを持ち上げる

② ビペットを垂直に保ち、検体1mLを下部フィルムの中央に接種する

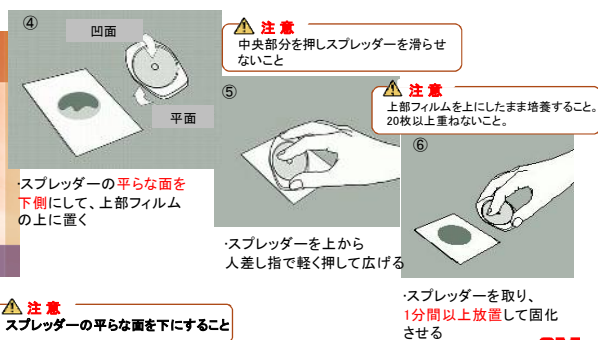
③ 気泡が入らないように注意してフィルムを持ったままゆっくりおろす

注意: ビペットはできるだけ垂直にたてること

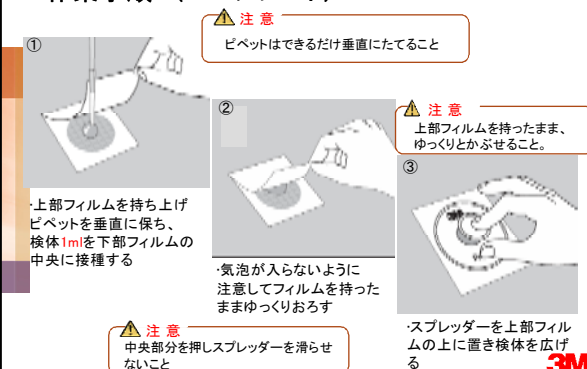
注意: 上部フィルムを持ったまま、ゆっくりとかぶせること。

169 3M

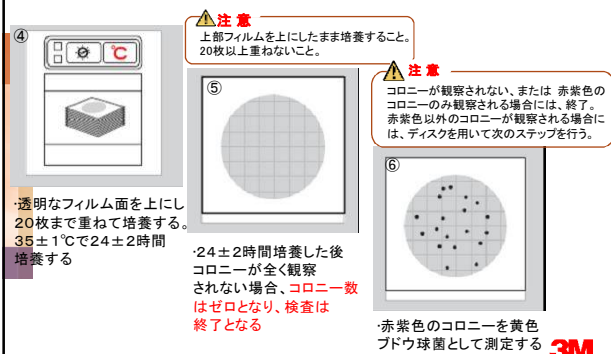
操作手順2 (CCプレート)



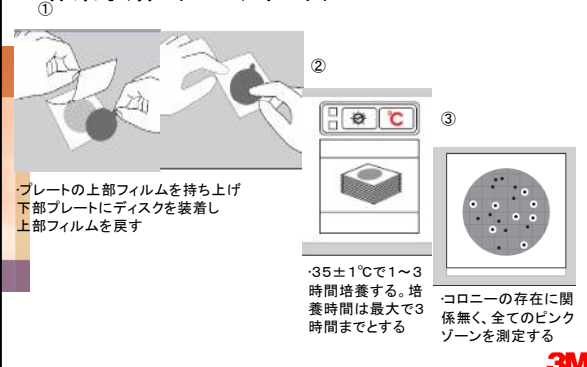
作業手順1 (STXプレート)



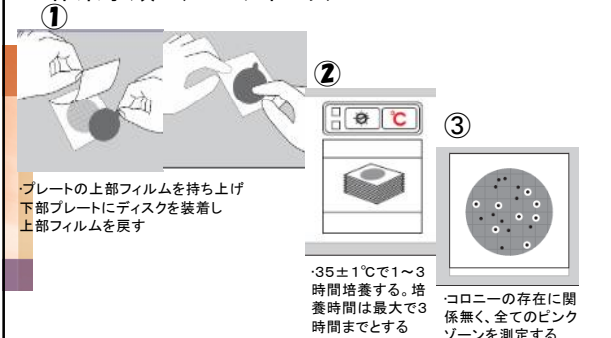
作業手順2 (STXプレート)



作業手順3 (STXディスク)




作業手順3 (STXディスク)



質疑応答

Photo from Yahoo

製造現場でのご提案例




■ **製造環境の菌検査**

ベトリフィルム 拭き取り、落下菌検査

CH30 現場でも簡単に作業可能

MDS 食中毒菌迅速検出 多検体処理

■ **現場衛生環境の汚れ確認**

ATP 洗浄レベル統一 データ管理と分析

PRO50 汚れの見える化

ALLTECH アレルゲンを含む汚れの見える化

■ **従業員への衛生指導**

ベトリフィルム スタンプ法

ふけ 汚れの見える化 指導重視

CH30 食中毒菌の検出

3M

176 © 3M 2011. All Rights Reserved. 海外拠点との規格統一化も容易です

Photo from Yahoo

品質管理室でのご提案例



■ **細菌検査**

ベトリフィルム 作業効率化 判定誤差の減少

ベトリフィルム プレートリーダー 検査員労力低減 判定誤差の縮小 効率化

MDS 食中毒菌自動検出

3M

177

Photo from Yahoo

店舗の衛生管理)

【従業員衛生意識向上】

ベトリフィルム スタンプ法 落下菌検査

ATP **PRO50/CIT50** 汚れの見える化 衛生指導

CH30 自主店舗衛生管理 食中毒リスク回避

【店舗衛生 食材管理】

ATP **PRO50/CIT50** データ見える化 データ管理 作業水準統一

ベトリフィルム **CH30** 菌の存在確認 モニタリング



3M

178 © 3M 2011. All Rights Reserved.

ご清聴いただきありがとうございました。

今後ともよろしくお願いいたします。



<http://www.mmm.co.jp/microbiology/index.html>

3M

179