

### 3 愛玩動物用飼料中の糞便系大腸菌群の検出法の検討

近藤 勝<sup>\*1</sup>, 齊木 雅一<sup>\*1</sup>, 平田 絵理香<sup>\*2</sup>, 大島 慎司<sup>\*3</sup>, 野崎 友春<sup>\*3</sup>, 久保田 恵理<sup>\*4</sup>

#### Study of Fecal Coliform Detection Method for Pet Food

KONDO Masaru<sup>\*1</sup>, SAIKI Masakazu<sup>\*1</sup>, HIRATA Erika<sup>\*2</sup>, OSHIMA Shinji<sup>\*3</sup>,  
NOZAKI Tomoharu<sup>\*3</sup> and KUBOTA Eri<sup>\*4</sup>

(\*<sup>1</sup> Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

<sup>\*2</sup> Sapporo Regional Center, FAMIC (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of  
Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

<sup>\*3</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC, <sup>\*4</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC  
(Now Yokohama Office, FAMIC))

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

Having added 0.1 w/v% peptone salt solution to a sample and left at rest for 30 minutes, it was blended by a stomacher for 5 minutes. The diluted solution (1 mL) after stomacher treatment was inoculated into five EC fermentation tubes respectively and cultured at 44.5 °C for 24 hours. One loop of the EC fermentation tube that produced gas was inoculated into an EMB agar plate and cultured at 35 °C for 24 hours. One typical colony on the EMB agar plate was inoculated into a lactose fermentation tube and cultured at 35 °C for 24 to 48 hours. Similarly, it was also inoculated into a standard agar slant and cultured at 35 °C for 24 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 to be positive.

A bacterial inoculation test was conducted using *Escherichia coli* NCTC 9001. The *E. coli* was added at levels of 2, 6 and 18 CFU/g (1, 3 and 9 CFU/test portion) to six types of pet food. As the result of the bacterial inoculation test, the estimated LOD<sub>50</sub> (level of detection at 50 % probability of detection), was calculated to be 0.5 to 1.0 CFU/test portion based on ISO16140-3:2021. No needs of improvement were identified for this method.

Key words: fecal coliform; pet food; estimated LOD<sub>50</sub>; ISO16140-3:2021

キーワード：糞便系大腸菌群；愛玩動物用飼料；eLOD<sub>50</sub>；ISO16140-3:2021

## 1 緒 言

近年、愛玩動物用飼料の不十分な加熱乾燥や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<sup>1)</sup>。現在、微生物に関して愛玩動物用飼料等の検査法<sup>2)</sup>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。

<sup>\*1</sup> 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

<sup>\*2</sup> 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，現 農林水産省消費・安全局

<sup>\*3</sup> 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

<sup>\*4</sup> 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，現 横浜事務所

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」<sup>3)</sup>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群（大腸菌群）のうち、44.5 °C で発育する菌群とされている<sup>4)</sup>。大腸菌の多くが 44.5 °C 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<sup>4)</sup>、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。今回、食品衛生法に基づく加熱食肉製品及び乾燥食肉製品の糞便系大腸菌群の試験法<sup>5)</sup>（以下「糞便系大腸菌群試験法」という。）及び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）（以下「事業」という。）において報告<sup>6)</sup>された内容を基に、糞便系大腸菌群試験法の愛玩動物用飼料への適用の可否について検討を行ったので、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）を各 2 検体）を用いた。成型ジャーキー及び素材乾燥ジャーキーについては、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 に示した。

Table 1 Ingredients list of pet foods used in the present study (1)

| Pet food types           | Ingredients  |
|--------------------------|--|
| Dry food for dogs        | Lamb meal, wheat flour, sweet sorghum, chicken meal, chicken oil, corn, chicken extract, sugar beet pulp, poultry meat, sunflower oil, peas, carrot, pumpkin, tomato, vitamins (A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , D <sub>3</sub> , E, choline, niacin, pantothenic acid, folic acid), minerals (Zn, K, Cl, Se, Fe, Cu, Na, I), methionine, antioxidants (rosemary extract, tocopherol mixture, citric acid, BHA, BHT)  |
| Dry food for cats        | Meat meal, soybean meal, soy pulp, animal fat, cellulose, chicken meal, fish meal, fish powder, mature tuna, meat (chicken), oligosaccharide, modified starch, minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, zinc amino acid complex, Zn, I, Co), vitamins (A, D, E, K, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , pantothenic acid, niacin, B <sub>6</sub> , folic acid, biotin, choline), amino acids (methionine, taurine), antioxidants (rosemary extract, tocopherol mixture)  |
| Semi dry food for dogs 1 | Grains (wheat flour, etc.), meats (chicken meal, chicken extract, beef meal, etc.), sugars, potatoes (sweet potato, etc.), vegetables (carrot, pumpkin, spinach, propylene glycol, minerals (calcium phosphate, calcium carbonate, potassium chloride, magnesium sulfate, sodium chloride, iron sulfate, zinc carbonate, manganese carbonate, calcium iodate), thickening stabilizer (glycerine), preservative (potassium sorbate), vitamins (choline, C, E, nicotinic acid, pantothenic acid, A, B <sub>6</sub> , B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , folic acid, B <sub>12</sub> , D), pH adjuster, amino acids (L-lysine hydrochloride), antioxidants (sodium erythorbate, tocopherol mixture, rosemary extract), food colors (titanium dioxide, food yellow no.5, food red no.106, food yellow no.4, food blue no.1) |
| Semi dry food for dogs 2 | Grains (bread crumb, wheat flour, corn, etc.), meats (chicken meal, chicken extract, chicken breast powder, beef meal, pork meal), sugars (isomerized sugar, oligosaccharide), beans (defatted soybean, soy pulp powder), animal fat, beer yeast, herb, vegetables (carrot powder, pumpkin powder, spinach powder), seafood (dried small fish), propylene glycol, minerals (Ca, Cl, Cu, Fe, I, Na, P, Zn), emulsifier, preservative (potassium sorbate), pH adjuster, seasoning, food colors (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), vitamins (A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , D, E, K, choline, pantothenic acid), antioxidants (tocopherol mixture, herb extract)   |
| Wet food for dogs        | Meats (chicken, beef, poultry, lamb, pork, etc.), vegetables (carrot, spinach), vegetable protein, dietary fiber, vitamins (B <sub>1</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , D <sub>3</sub> , E, choline, pantothenic acid, folic acid), minerals (Ca, Cl, I, K, Mg, Mn, P, Se, Zn), polysaccharide thickener, EDTA-Ca • Na, color former (sodium nitrite)  |
| Wet food for cats        | Fishes (skipjack tuna, white fish, tuna extract, etc.), vegetable oil, vitamins (A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , E, K, choline, niacin, pantothenic acid, biotin, folic acid), minerals (Ca, Cu, Fe, I, Mg, Mn, Zn), taurine, polysaccharide thickener, seasoning, EDTA-Ca • Na, EDTA-Na   |

Table 1 Ingredients list of pet foods used in the present study (2)

| Pet food types                            | Ingredients  |
|---|--|
| Formed jerky for dogs 1                   | Meats (chicken, chicken breast), wheat flour, processed soybean products, bread crumbs, vegetable oil, sugars, defatted soybean, beer yeast, carrot, spinach, sorbitol, minerals (Ca, Na, Zn, Fe, Cu, I), propylene glycol, preservatives (sorbic acid, sodium dehydroacetate), vitamins (A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , C, D <sub>3</sub> , niacin, pantothenic acid), sodium polyphosphate, smoked liquid, baking powder, color former (sodium nitrite), food colors (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food blue no.1), pH adjuster |
| Formed jerky for dogs 2                   | Meats (chicken, beef), modified starch, soybean protein, wheat flour, glycerin, sucrose, spinach, carrot, propylene glycol, sorbitol, salt, glucono delta lactone, sodium polyphosphate, preservatives (potassium sorbate, sodium dehydroacetate), antioxidant (sodium erythorbate), color former (sodium nitrite), food color (food red no.106)   |
| Dried jerky for dogs (hard type)          | Deer meat  |
| Dried jerky for dogs and cats (hard type) | Cod, preservative (sodium dehydroacetate)  |
| Dried jerky for dogs (soft type) 1        | Chicken breast meat, glycerin, sorbitol, corn starch, mineral (NaCl), sodium phosphate, color former (sodium nitrite)  |
| Dried jerky for dogs (soft type) 2        | Meat (pork heart), salt, glucosamine, chondroitin, $\alpha$ -linolenic acid (derived from perilla oil), collagen, oligosaccharide, dextrin, glycerin, propylene glycol, antioxidant (vitamin C), color former (sodium nitrite)   |

## 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を用い、必要に応じ、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、加温しながら溶かし、ダーラム管を入れた中試験管に 10 mL ずつ分注した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後、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、加温しながら溶かし、121 °C 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、37 °C 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、加温しながら溶かし、ダーラム管を入れた中試験管に 10 mL ずつ分注した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後、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<sup>™</sup> D-PBS（一）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 °C 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，加温しながら溶かした。これを中試験管に 10 mL ずつ分注した後，121 °C で 20 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「ニッスイ」（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（ロット番号 8020, 10298.0 CFU，バイオメリュウ製）1 個を PBS 7.6 mL で溶解し，大腸菌添加原液とした。大腸菌添加原液を PBS で 3 倍，9 倍及び 27 倍に希釈し，菌濃度が 450 CFU/mL，150 CFU/mL 及び 50 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) 恒温水槽：NTT-2200　東京理化器械製
- 3) インキュベーター：LTI-700E　東京理化器械製
- 4) 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，滅菌済みのものを用いた。

### 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 を滅菌済みのメスピペットで 5 本の EC 発酵管にそれぞれ加え，恒温水槽中で 44.5 °C ( $\pm 0.2$  °C) で 22~26 時間培養した。培養後，5 本ともダーラム管にガス産生による気泡が認められないものは糞便系大腸菌群陰性とした。

#### 3) EMB 寒天培地による培養

EC 発酵管による培養後，ダーラム管にガス産生により気泡が認められた EC 発酵管から 1 白金耳量とり，EMB 寒天培地に画線塗抹し，倒置して 35 °C 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紫赤色）を釣菌し，乳糖ブイヨン発酵管及び標準寒天斜面培地でそれぞれ 35 °C で 24~48 時間及び 35 °C で 22~26 時間培養した。

#### 5) グラム染色

スライドグラスをエタノールに一晩以上浸漬し，バーナーで軽く焼き，冷ました。その上に滅菌水 10  $\mu$ L を添加し，4)の標準寒天斜面培地上で発育した菌を釣菌し，滅菌水中で塗抹した。乾燥後，火炎固定した塗抹面に染色液 A を十分添加し，1 分間静置した。染色液を水洗後，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。脱色液を水洗後，塗抹面に染色

液 B を十分添加し、1 分間静置した。染色液を水洗後、ろ紙で水気をふき取り、光学顕微鏡で観察した。

#### 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、ダーラム管にガス産生により気泡が認められ、酸産生により黄変したもの、かつ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 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 35 °C

#### Standard agar slant

- inoculated a typical colonies with a wire to a plate of standard agar slant
- incubated for 22~26 h at 35 °C

#### Lactose fermentation tube

- inoculated a typical colonies with a wire to lactose fermentation tube
- incubated for 24~48 h at 35 °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 を量って滅菌済みストマッカー袋に入れ、試料中の菌濃度が 2, 6 及び 18 CFU/g (以下、低濃度、中濃度及び高濃度とする。) となるように 2.2 の 9) で調製した 27 倍希釈、9 倍希釈及び 3 倍希釈の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。これをストマッカー処理 (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、試料を 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、低濃度、中濃度及び高濃度はそれぞれ 1, 3 及び 9 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

大腸菌添加試料液は低濃度  $n=4$ 、中濃度  $n=4$  及び高濃度  $n=1$ 、ブランク試料液は  $n=1$  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) estimated LOD<sub>50</sub> (eLOD<sub>50</sub>) の算出

2)で陽性と判定された試料数に応じて、ISO16140-3:2021<sup>7)</sup>から抜粋した Table 2 を基に eLOD<sub>50</sub> を算出した。

Table 2 Determination of estimated LOD<sub>50</sub> (eLOD<sub>50</sub>) based on the number of positive results per level of contamination (excerpt from ISO16140-3:2021)

| High inoculation level<br>(9×LOD <sub>50</sub> /<br>test portion) | Intermediate inoculation level<br>(3×LOD <sub>50</sub> /<br>test portion) | Low inoculation level<br>(1×LOD <sub>50</sub> /<br>test portion) | Blank level | eLOD <sub>50</sub><br>(CFU/test portion) |
|---|---|--|-------------|--|
| 1/1 <sup>a)</sup>   | 4/4   | 4/4  | 0/1         | <1.0×LIL <sup>b)</sup>                   |
| 1/1   | 4/4   | 3/4  | 0/1         | =0.5×LIL                                 |
| 1/1   | 4/4   | 2/4  | 0/1         | =0.7×LIL                                 |
| 1/1   | 4/4   | 1/4  | 0/1         | =1.0×LIL                                 |
| 1/1   | 4/4   | 0/4  | 0/1         | =1.5×LIL                                 |
| 1/1   | 3/4   | 4/4  | 0/1         | =0.7×LIL                                 |
| 1/1   | 3/4   | 3/4  | 0/1         | =1.0×LIL                                 |
| 1/1   | 3/4   | 2/4  | 0/1         | =1.3×LIL                                 |
| 1/1   | 3/4   | 1/4  | 0/1         | =1.7×LIL                                 |
| 1/1   | 3/4   | 0/4  | 0/1         | =2.3×LIL                                 |
| 1/1   | 2/4   | 4/4  | 0/1         | =1.1×LIL                                 |
| 1/1   | 2/4   | 3/4  | 0/1         | =1.5×LIL                                 |
| 1/1   | 2/4   | 2/4  | 0/1         | =1.9×LIL                                 |
| 1/1   | 2/4   | 1/4  | 0/1         | =2.6×LIL                                 |
| 1/1   | 2/4   | 0/4  | 0/1         | =3.7×LIL                                 |
| 1/1   | 1/4   | 4/4  | 0/1         | Unreliable MPN result                    |
| 1/1   | 1/4   | 3/4  | 0/1         | =2.1×LIL                                 |
| 1/1   | 1/4   | 2/4  | 0/1         | =2.8×LIL                                 |
| 1/1   | 1/4   | 1/4  | 0/1         | =4.0×LIL                                 |
| 1/1   | 1/4   | 0/4  | 0/1         | =6.3×LIL                                 |
| 1/1   | 0/4   | 4/4  | 0/1         | Unreliable MPN result                    |
| 1/1   | 0/4   | 3/4  | 0/1         | =3.0×LIL                                 |
| 1/1   | 0/4   | 2/4  | 0/1         | =4.3×LIL                                 |
| 1/1   | 0/4   | 1/4  | 0/1         | =6.7×LIL                                 |
| 1/1   | 0/4   | 0/4  | 0/1         | =14.0×LIL                                |

a) Number of positive results/number of measurement at level

b) LIL: Low inoculation level

### 3 結果及び考察

#### 3.1 試料液の調製方法

糞便系大腸菌群試験法を規定している通知において、試料液の調製方法は、試料 25 g に滅菌ペプトン加生理食塩水 225 mL を加えて細砕すると規定されており、一般的には、ブレンダー又はストマッカーを用いて均質化している<sup>8)</sup>。

本法の試料液の調製方法は、愛玩動物用飼料等の検査法収載の生菌数及びサルモネラの試験法と同様の方法を採用した。具体的には、ストマッカー処理の前に膨潤のため 30 分静置する時間を取り、ストマッカー処理の時間は 5 分間とした。また、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）のうち、切断できない試料は対象外とした。

#### 3.2 試験法の評価方法

一般に、定性試験の性能評価には検出下限値が使われるが、微生物試験においては試料中の微生物分布が均一でなく、採取部位に対象菌が含まれる確率が検出の可否を決めるため、確実に検出可能な下限値を求めるのは難しいとされている<sup>9)</sup>。ISO16140-2:2016<sup>10)</sup>及び ISO16140-3:2021 では、微生物定性試験法の性能評価の 1 つの指標として、実施試験の 50 %が陽性となる菌量である LOD<sub>50</sub> (Level of detection) が示されており、東京顕微鏡院はこれを参考に、事業において LOD<sub>50</sub> を試験法の評価に用いている。以上を踏まえ、本検討においても、LOD<sub>50</sub> を試験法の評価に用いることとした。

#### 3.3 単一試験室における検証（大腸菌添加試験）

ISO16140-3:2021 は、単一試験室における公定法、標準試験法等を導入する際の検証手順を定めたガイドラインであり、菌添加試験の結果から estimated LOD<sub>50</sub> (eLOD<sub>50</sub>) を算出して評価する手法が示されている。なお、LOD<sub>50</sub> の算出法と比べ、試料数が少ないことから eLOD<sub>50</sub> (推定された LOD<sub>50</sub>) と定義されている。

糞便系大腸菌群試験法の愛玩動物用飼料への適用に関する予備検討として、ISO16140-3:2021 に基づき 2.5 により大腸菌添加試験を実施した。なお、菌添加濃度は、低濃度で LOD<sub>50</sub> と同程度、中濃度で LOD<sub>50</sub> の 3 倍及び高濃度で LOD<sub>50</sub> の 9 倍となるように設定した。本検討に用いる糞便系大腸菌群試験法の LOD<sub>50</sub> は公表されていないことから、このときの LOD<sub>50</sub> は 1 CFU/試験部位とみなした。

結果は Table 3 のとおりであり、得られた eLOD<sub>50</sub> は 0.5~1.0 CFU/試験部位であった。

ISO16140-3:2021 では、算出された eLOD<sub>50</sub> が、LOD<sub>50</sub> の 4 倍以内であることを許容限界として規定している。本検討では LOD<sub>50</sub> を 1 CFU/試験部位とみなしていることから、eLOD<sub>50</sub> が 4 CFU/試験部位以下の場合に許容限界を満たしていることとなる。以上より、本試験により算出された eLOD<sub>50</sub> はこの許容限界を満たしていた。

Table 3 Number of positive results and eLOD<sub>50</sub> for the detection of fecal coliforms in pet foods

| Pet food types                            | Inoculation level of test portion <sup>a)</sup> |                                |                       | Blank level | eLOD <sub>50</sub><br>(CFU/test portion) |
|---|---|--------------------------------|-----------------------|-------------|--|
|   | High inoculation level                          | Intermediate inoculation level | Low inoculation level |             |  |
| Dry food for dogs                         | 1/1 <sup>b)</sup>                               | 4/4                            | 3/4                   | 0/1         | 0.5                                      |
| Dry food for cats                         | 1/1   | 4/4                            | 2/4                   | 0/1         | 0.7                                      |
| Semi dry food for dogs 1                  | 1/1   | 4/4                            | 2/4                   | 0/1         | 0.7                                      |
| Semi dry food for dogs 2                  | 1/1   | 4/4                            | 2/4                   | 0/1         | 0.7                                      |
| Wet food for dogs                         | 1/1   | 4/4                            | 1/4                   | 0/1         | 1.0                                      |
| Wet food for cats                         | 1/1   | 4/4                            | 1/4                   | 0/1         | 1.0                                      |
| Formed jerky for dogs 1                   | 1/1   | 4/4                            | 3/4                   | 0/1         | 0.5                                      |
| Formed jerky for dogs 2                   | 1/1   | 3/4                            | 3/4                   | 0/1         | 1.0                                      |
| Dried jerky for dogs (hard type)          | 1/1   | 4/4                            | 2/4                   | 0/1         | 0.7                                      |
| Dried jerky for dogs and cats (hard type) | 1/1   | 4/4                            | 2/4                   | 0/1         | 0.7                                      |
| Dried jerky for dogs (soft type) 1        | 1/1   | 4/4                            | 3/4                   | 0/1         | 0.5                                      |
| Dried jerky for dogs (soft type) 2        | 1/1   | 4/4                            | 3/4                   | 0/1         | 0.5                                      |

a) High inoculation level: 9 CFU/test portion, Intermediate inoculation level: 3 CFU/test portion, Low inoculation level: 1 CFU/test portion

b) Number of positive results/number of measurement at level

#### 4 まとめ

糞便系大腸菌群試験法の愛玩動物用飼料への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、検出法の改良が必要な点は認められなかった。

- 1) 試料液の調製方法は、愛玩動物用飼料等の検査法に記載されている生菌数及びサルモネラの試験法と同様の方法を採用した。また、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ）のうち、切断できない試料は対象外とした。
- 2) 愛玩動物用飼料に、大腸菌を 2, 6 及び 18 CFU/g (1, 3 及び 9 CFU/試験部位) となるように添加し試験した結果、eLOD<sub>50</sub> は 0.5~1.0 CFU/試験部位であり、ISO16140-3:2021 で規定する許容限界を満たしていた。

#### 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) 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).

- 6) 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）.
- 7) 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).
- 8) 栄研化学株式会社：食品微生物検査マニュアル 改訂第2版，128-129 (2009) (ISBN 978-4-990017-52-1).
- 9) 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).
- 10) 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).