
Bacteria Screening PCR Kit (Code.RR114A)

参 考 資 料

内 容

A. 応用データ集

1. ENT 及び BS プライマーの各種細菌に対する反応特異性の検討
2. ENT 及び BS プライマーの各種細菌に対する交差反応性の検討
3. 大腸菌、黄色ブドウ球菌及びセレウス菌の PCR による検出感度についての検討
4. 牛乳に添加された菌の検出
5. ハムに添加された細菌の検出
6. ゆでうどんに添加された細菌の検出
7. 検出確認食品例、検出困難な食品例

B. 参考資料 1 (各種規格基準)

1. 食品・添加物等の規格基準より抜粋
2. 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令より抜粋
3. 衛生規範より抜粋

C. 参考資料 2

ENT, BS 各プライマーの反応特異性の検討に使用した細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹

D. 参考文献

A. 応用データ集

1. ENT 及び BS プライマーの各種細菌に対する反応特異性の検討

< 実験 >

各種細菌のゲノム DNA 50pg(10⁴ コピー前後に相当)を鋳型とし、ENT プライマー、及び BS プライマーで PCR を行った。

PCR 条件 :

95	60sec	
95	30sec	} 30 cycles
59	30sec	
72	30sec	
72	60sec	
4		

PCR 反応後、2 µl の反応液をアガロース電気泳動にて解析した。

< 結果 >

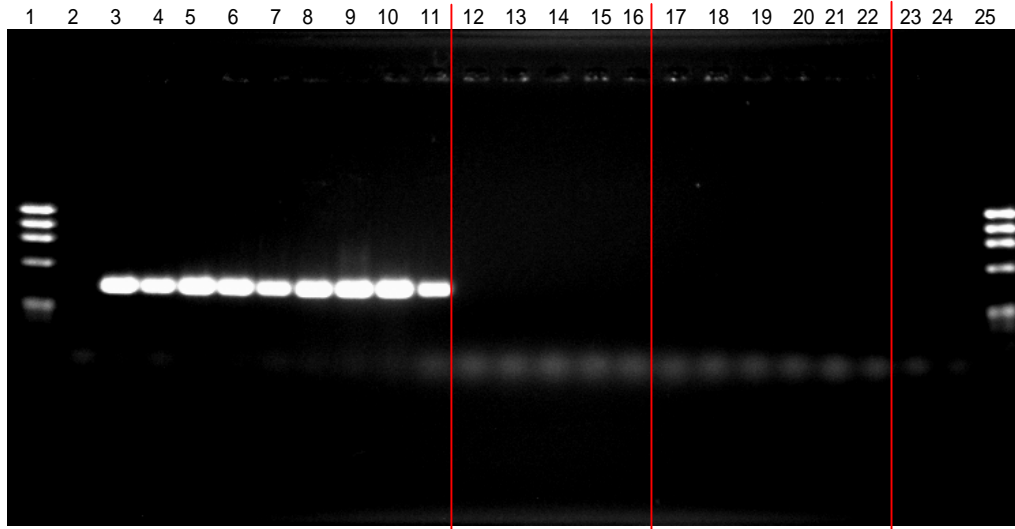
アガロースゲル電気泳動による解析結果の一例を図 1 に、反応特異性 (+/- で表示) を表 1 にそれぞれ示す。

(ENT プライマーは、腸内細菌科 (Proteus mirabilis を除く) 及びビブリオ科に属する細菌と反応する。BS プライマーは、バチルス属、スタフィロコッカス属及びエアロコッカス属に属する細菌と反応する。)

図 1 . ENT および BS プライマーでの PCR 結果 (電気泳動)

Lane 1: X174 Hae digest Marker	Lane 14: Campylobacter coli DNA
Lane 2: Negative Control (No Template DNA)	Lane 15: Flavobacterium johnsoniae DNA
Lane 3: Serratia ficaria DNA	Lane 16: Streptococcus mutans DNA
Lane 4: Klebsiella pneumoniae DNA	Lane 17: Staphylococcus epidermides DNA
Lane 5: Salmonella enteritidis DNA	Lane 18: Staphylococcus aureus DNA
Lane 6: Escherichia coli DNA	Lane 19: Bacillus subtilis DNA
Lane 7: Citrobacter freundii DNA	Lane 20: Bacillus megaterium DNA
Lane 8: Yersinia enterocolitica DNA	Lane 21: Bacillus cereus DNA
Lane 9: Vibrio vulnificus DNA	Lane 22: Aerococcus viridans DNA
Lane 10: Photobacterium leiognathi DNA	Lane 23: Enterococcus faecalis DNA
Lane 11: Aeromonas hydrophila DNA	Lane 24: Lactobacillus casei DNA
Lane 12: Pseudomonas aeruginosa DNA	Lane 25: X174 Hae digest Marker
Lane 13: Alcaligenes faecalis DNA	

(1) ENT プライマーでの結果



(2) BS プライマーでの結果

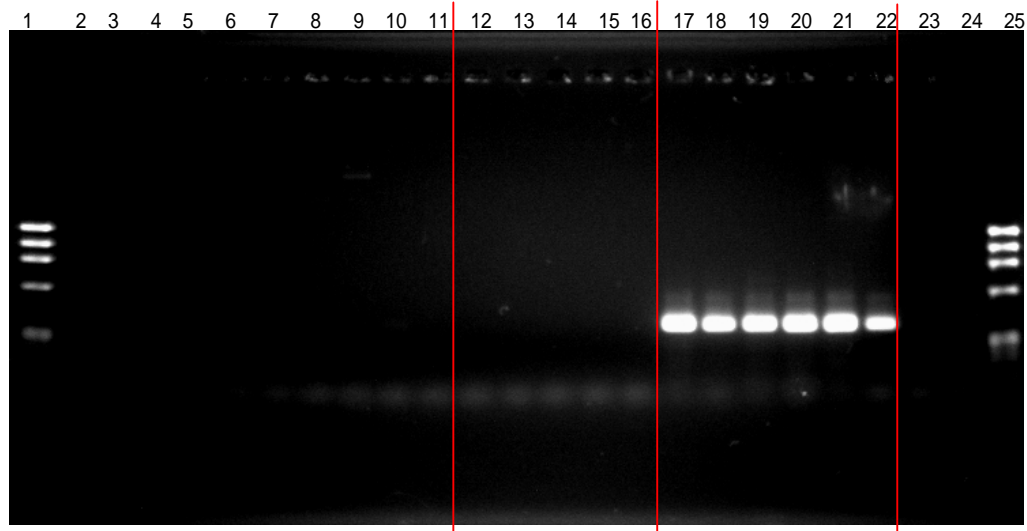


表1 . 検定した細菌とその反応特異性

科(family)	属(Genus)、種(Species)	菌株起源	ENT	BS
Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium radiobacte</i>	ATCC 19358 ^T	-	-
Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes faecalis</i>	JCM 1474 ^T	-	-
Neisseriaceae	<i>Chromobacterium violaceum</i>	JCM 1249 ^T	-	-
	<i>Neisseria meningitides</i>	ATCC 13077 ^T	-	-
Xanthomonadaceae	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	JCM 1975 ^T	-	-
Legionellaceae	<i>Legionella pneumophila</i>	JCM 7571 ^T	-	-
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27843 ^T	-	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	JCM 5963 ^T	-	-
Moraxellaceae	<i>Moraxella antipestifer</i>	JCM 9532 ^T	-	-
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	JCM 6841 ^T	-	-
Vibrionaceae	<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3725 ^T	+	-
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802 ^T	+	-
	<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25521 ^T	+	-
	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	ATCC 7966 ^T	+	-
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter agglomerans</i>	JCM 1236 ^T	+	-
	<i>Enterobacter cloacae</i>	JCM 1232 ^T	+	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	JCM 1657 ^T	+	-
	<i>Escherichia coli</i>	JCM 1649 ^T	+	-
	<i>Escherichia coli</i> JM109	(2)	+	-
	<i>Escherichia coli</i> HB101	(2)	+	-
	<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	(3)	+	-
	<i>Hafnia alvei</i>	JCM 1666 ^T	+	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JCM 1662 ^T	+	-
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC 14029 ^T	+	-
	<i>Proteus mirabilis</i>	JCM 1669 ^T	-	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	IFO 13245	+	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	IFO 14211	+	-
	<i>Salmonella enteritidis</i>	IFO 3313	+	-
	<i>Serratia ficaria</i>	JCM 1241 ^T	+	-
	<i>Serratia marcescens</i>	JCM 1239 ^T	+	-
	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 29903 ^T	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610 ^T	+	-	
Pasteurellaceae	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 33391 ^T	-	-
Campylobacteraceae	<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559 ^T	-	-
Helicobacteraceae	<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 43504 ^T	-	-
Clostridiaceae	<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290 ^T	-	-
Eubacteriaceae	<i>Eubacterium alactolyticum</i> (4)	JCM 6480 ^T	-	-
Acidaminococcaceae	<i>Veillonella alcalescens</i>	ATCC 27215	-	-
Bacillaceae	<i>Bacillus cereus</i>	IFO 15305 ^T	-	+
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11950	-	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	-	+
	<i>Bacillus licheniformis</i>	JCM 2505 ^T	-	±
	<i>Bacillus megaterium</i>	JCM 2506 ^T	-	+
	<i>Bacillus pumilus</i>	JCM 2508 ^T	-	+
	<i>Bacillus subtilis</i>	IFO 13719 ^T	-	+
Listeriaceae	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120 ^T	-	±
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	IFO 3060	-	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	JCM 2874	-	+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	JCM 2414 ^T	-	+
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus casei</i>	JCM 1134 ^T	-	-
	<i>Lactobacillus gasserii</i>	JCM 1131 ^T	-	-
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	JCM 1002 ^T	-	-

科(family)	属(Genus)、種(Species)	菌株起源	ENT	BS
Aerococcaceae	Aerococcus sp.	MRA1 (5)	-	+
	Aerococcus viridans	IFO 12219 ^T	-	+
Enterococcaceae	Enterococcus faecalis	MRA2 (5)	-	-
Streptococcaceae	Streptococcus mutans	JCM 5705 ^T	-	-
	Streptococcus salivarius	JCM 5707 ^T	-	-
	Streptococcus agalactiae	JCM 5671 ^T	-	-
Coriobacteriaceae	Collinsella aerofaciens	JCM 10188 ^T	-	-
Actinomycetaceae	Actinomyces naeslundii	JCM 8349 ^T	-	-
Micrococcaceae	Micrococcus luteus	JCM 1464 ^T	-	-
Microbacteriaceae	Microbacterium lacticum	JCM 1379	-	-
Corynebacteriaceae	Corynebacterium kutscheri	JCM 9385 ^T	-	-
	Corynebacterium xerosis	JCM 1971 ^T	-	-
Propionibacteriaceae	Propionibacterium acnes	JCM 6425 ^T	-	-
Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium longum	JCM 1217 ^T	-	-
	Bifidobacterium adolescentis	JCM 1275 ^T	-	-
Bacteroidaceae	Bacteroides vulgatus	JCM 5826 ^T	-	-
Porphyromonadaceae	Porphyromonas gingivalis	ATCC 33277 ^T	-	-
Prevotellaceae	Prevotella intermedia	ATCC 25611 ^T	-	-
Flavobacteriaceae	Flavobacterium johnsoniae	JCM 8514 ^T	-	-
Flexibacteraceae	Cytophaga arvensicola	JCM 2836 ^T	-	-
Fusobacteriaceae	Fusobacterium nucleatum	ATCC 25586 ^T	-	-

判定結果

- + : PCR 増幅産物を検出。
- ± : PCR 増幅産物を極々わずかに検出。
- : PCR 増幅産物が検出されない。

注)

(1): Aeromonas 属は Vibrionaceae 科に属するが、近年、新しい科 Aeromonadaceae 科への分類変更が提唱されている。

TAXONOMIC OUTLINE OF THE PROCARYOTE GENERA BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, SECOND EDITION
Release 1.0, April 2001

(2): 研究用市販細菌株

(3): DNA purchased from Nissui Co., Ltd. (Tokyo, Japan) (ATCC 43889 と ATCC 43890 の混合物)

(4): Pseudoramibacter alactolyticum に再分類された。 Clin Infect Dis 1997 Sep;25 Suppl 2:S78-87

(5): MRA1 及び MRA2 は日清食品(株)食品安全研究所分離同定株。

2 . ENT、BS プライマーの植物、動物、真菌類に対する交差反応性の検討

< 実験 >

表 2 に示す各種植物由来 DNA 及び各種生物由来 DNA を鋳型とし、ENT プライマー、及び BS プライマーで各々 PCR を行った。

PCR 条件 :

95	60sec	} 30 cycles
95	30sec	
59	30sec	
72	30sec	
72	60sec	
4		

PCR 反応後、2 μ l の反応液をアガロース電気泳動にて解析した。

< 結果 >

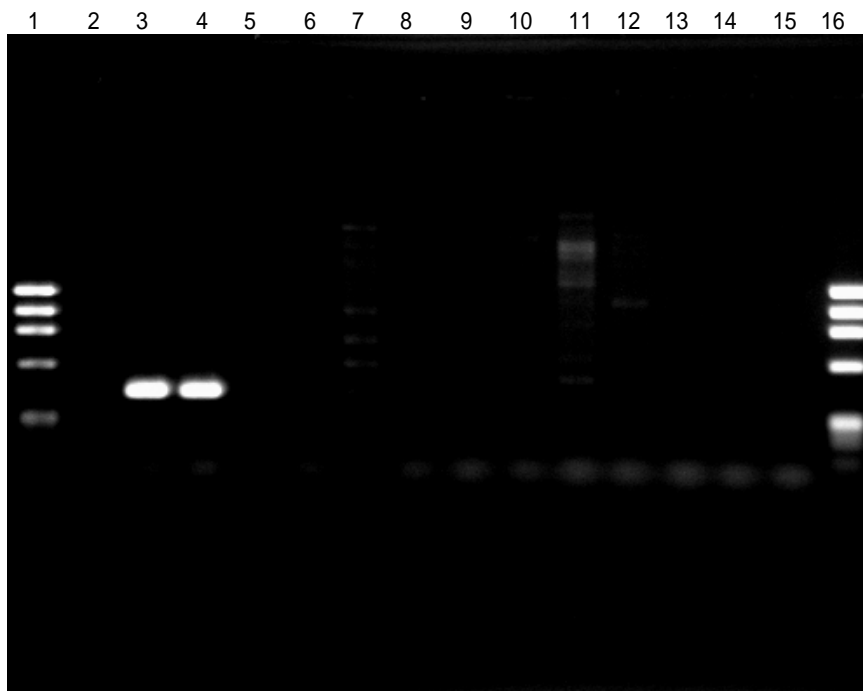
アガロース電気泳動の結果を図 2 に、反応特異性 (+/- で表示) を表 2 に示す。

ENT プライマー及び BS プライマーは、今回使用した植物由来 DNA 及び各種生物由来 DNA とは交差反応せず、これらのプライマーは、細菌遺伝子に特異的に反応することが示された。なお、BS プライマーにおいてコムギ ((2) lane7) が反応するが、バンドのサイズによって明確に区別できる。

図 2 . ENT 及び BS プライマーでの PCR 結果 : 電気泳動図

Lane 1:	X174 Hae digest Marker	
Lane 2:	Negative Control (No Template DNA)	
Lane 3:	Escherichia coli DNA	5 pg
Lane 4:	Salmonella typhimurium DNA	5 pg
Lane 5:	Staphylococcus aureus DNA	5 pg
Lane 6:	Bacillus cereus DNA	5 pg
Lane 7:	Triticum aestivum DNA (wheat/コムギ)	8 ng
Lane 8:	Zea mays DNA (maize/トウモロコシ)	3 ng
Lane 9:	Solanum tuberosum DNA (potato/ジャガイロ)	3 ng
Lane 10:	Brassica napus DNA (canola/ナタネ)	3 ng
Lane 11:	Bos taurus DNA (cattle/ウシ)	3 ng
Lane 12:	Gallus gallus DNA (chicken/ニワトリ)	3 ng
Lane 13:	Oncorhynchus sp. DNA (salmon/サケ)	1 ng
Lane 14:	Saccharomyces cerevisiae DNA	1 ng
Lane 15:	Aspergillus oryzae DNA	1 ng
Lane 16:	X174 Hae digest Marker	

(1) ENT プライマーでの結果



(2) BS プライマーでの結果

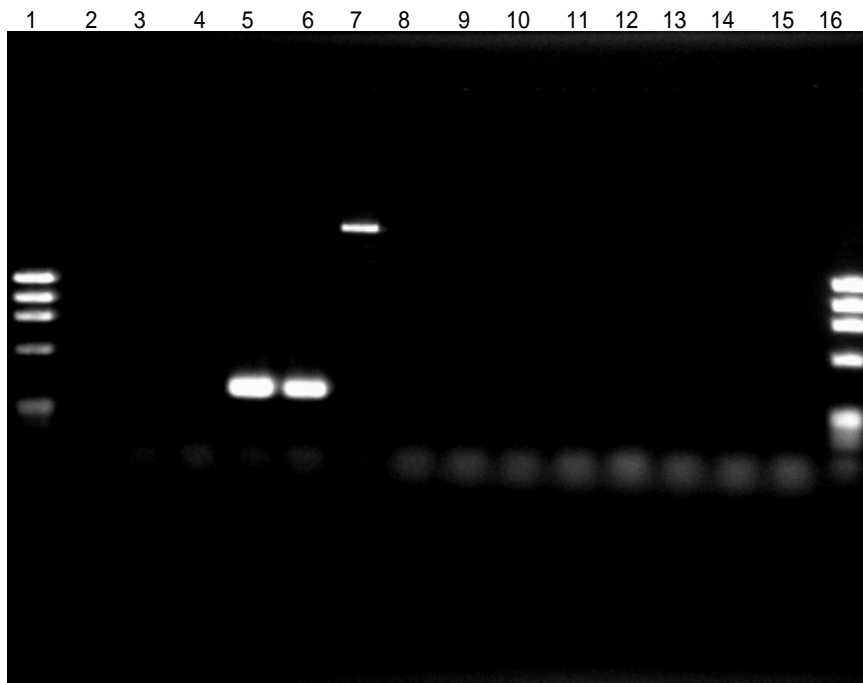


表 2 . 検定した各種生物由来 DNA とその反応性

一般名	科(family)	属(Genus)、種(Species)	ENT	BS	入手先等
コムギ (wheat)	Poaceae	Triticum aestivum	-	- (a)	業務用コムギ粉
トウモロコシ (maize)	Poaceae	Zea mays	-	-	業務用トウモロコシ
ジャガイモ (potato)	Solanaceae	Solanum tuberosum	-	-	市販品(男爵)
大豆 (soybean)	Fabaceae	Glycine max	-	-	業務用大豆
ナタネ (canola)	Brassicaceae	Brassica napus	-	-	業務用ナタネ
ダイコン (radish)	Brassicaceae	Raphanus sativus	-	-	市販品
ウシ (cattle)	Bovidae	Bos taurus	-	-	CeMines, LLC, CO., USA
ニワトリ (chicken)	Phasianidae	Gallus gallus	-	-	CeMines, LLC, CO., USA
サケ (salmon)	Salmonidae	Oncorhynchus sp.	-	-	BD Biosciences Clontech, Alto, CO., USA
baker's yeast	Saccharomycetaceae	Saccharomyces cerevisiae	-	-	IFO 0282
麹菌	Trichocomaceae	Aspergillus oryzae	-	-	IFO 4206

判定結果

- + : 目的サイズの PCR 増幅産物を検出。
- : 目的サイズの PCR 増幅産物が検出されない。
- (a) : 目的サイズと異なる PCR 増幅産物を検出。

3 . 大腸菌、黄色ブドウ球菌及びセレウス菌の PCR による検出感度についての検討

大腸菌 (*Escherichia coli*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 及びセレウス菌 (*Bacillus cereus*) のゲノム DNA を鋳型とし、大腸菌は ENT プライマー、セレウス菌と黄色ブドウ球菌は BS プライマーで PCR を行った結果、いずれの場合も少なくとも 1 pg で検出可能であった。

4 . 牛乳に添加された菌の検出

< 実験 >

市販牛乳 (130 2 秒殺菌、要冷蔵品) に大腸菌 (*Escherichia coli*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) もしくは、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) を 1~2 個/ml となるように添加し、約 10 ml をそのまま 35 で 4~7 時間振盪培養した。

各培養時間における牛乳培養液 1.0 ml を 12,000 rpm (約 13,000 G) で 3 分間遠心し、沈殿を 500 µl の TE buffer (10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA (pH 8.0) で再懸濁後、遠心分離して沈殿を洗浄した。

沈殿 (菌体を含む) を 100 µl のアクロモペプチダーゼ液 (250 U/ml, in TE buffer) に懸濁し、55 で 10 分間インキュベートしたのち、100 µl のキレックス液を添加して 99 で 5 分間加熱処理後、氷上で急冷した。

12,000 rpm (約 13,000 ×g) で 1 分間遠心した上清を PCR 用 DNA 試料液とした。

上記方法に従い DNA 試料液を調製し ENT プライマーもしくは BS プライマーによる PCR を実施した。

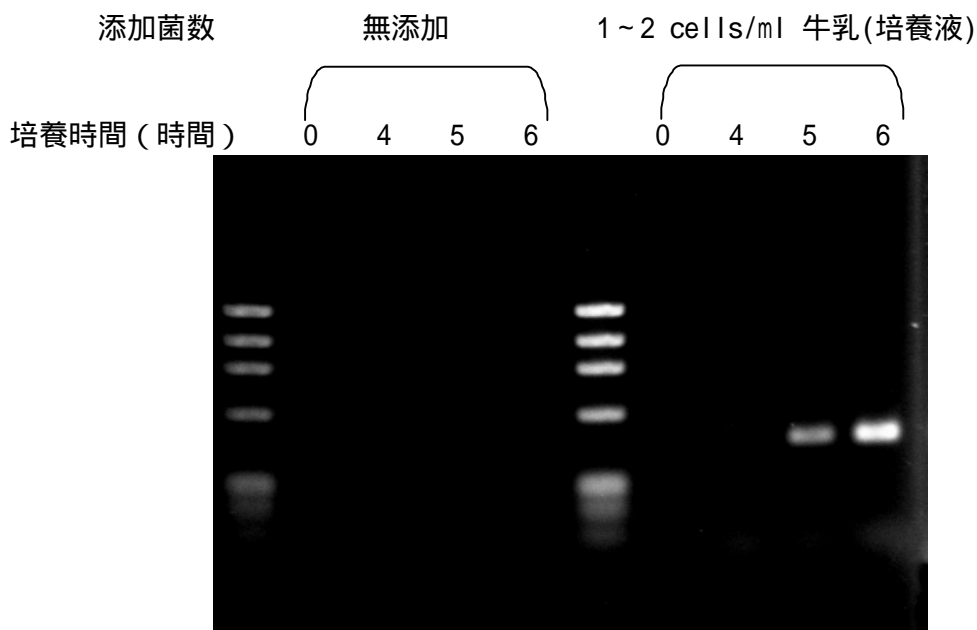
一方、各培養時間において、培養液を所定の培地プレートに播種し、生菌数を測定した。

<結果>

ENT および BS プライマーを用いた PCR によって、大腸菌、セレウス菌及び黄色ブドウ球菌は初発菌数 1~2 cells/ml であったものが、培養 5 時間ですべて検出可能であった（下記図参照）。

このように、短時間の増菌培養をおこなった後、PCR による菌遺伝子検出をおこなうことにより、死菌の遺伝子を検出することなく、生菌を選択的に検出できることが示された。

(1) 大腸菌：ENT プライマー使用

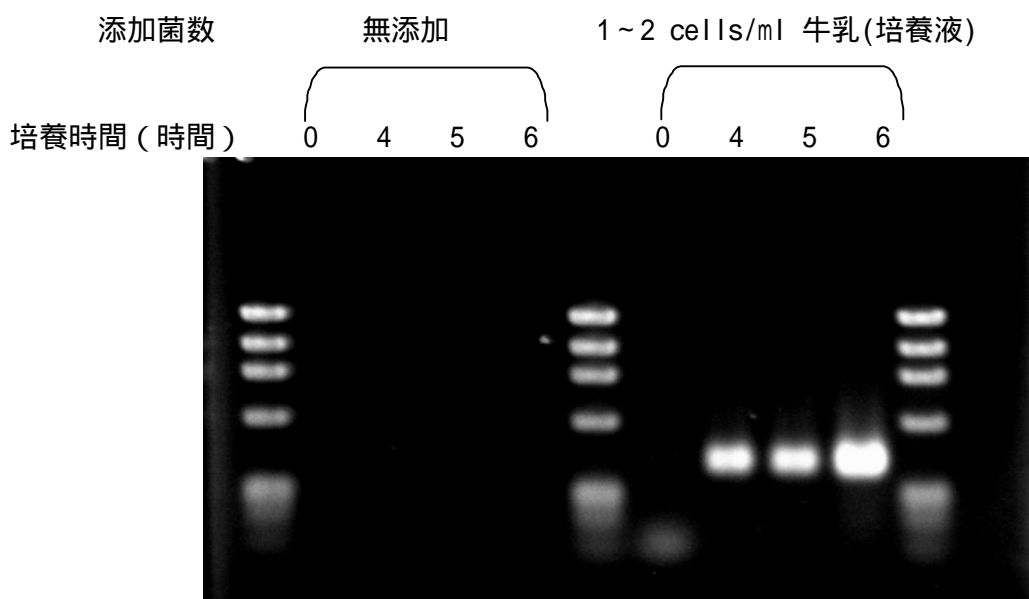


菌数測定(デゾキシコレート寒天培地で測定：cfu/ml 牛乳 培養液)

添加菌数	培養時間			
	0h	4h	5h	6h
無添加	陰性	陰性	陰性	陰性
1~2 cells/ml 牛乳	1.5	140	790	16000

[cfu/ml 牛乳 培養液]

(2) セレウス菌：BS プライマー使用

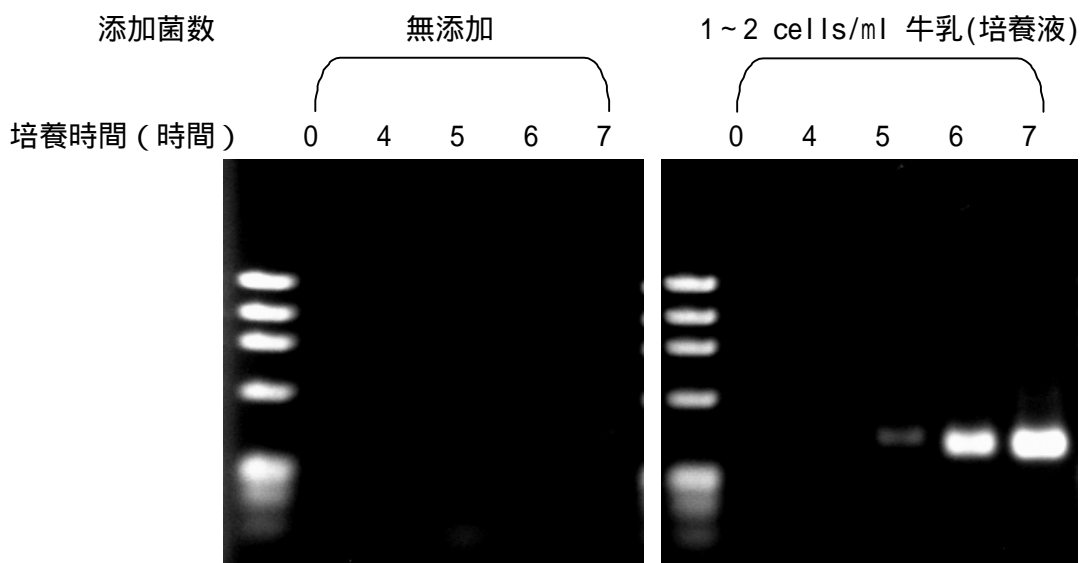


菌数測定(NGKG 寒天培地で測定：cfu/ml 牛乳 培養液)

添加菌数	培養時間			
	0h	4h	5h	6h
無添加	陰性	陰性	陰性	陰性
1~2 cells/ml 牛乳	0.5	1900	36000	940000

[cfu/ml 牛乳 培養液]

(3) 黄色ブドウ球菌：BS プライマー使用



菌数測定(マンニット卵黄含有寒天培地で測定：cfu/ml 牛乳 培養液)

添加菌数	培養時間					
	0h	4h	5h	6h	7h	
無添加	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
1~2 cells/ml 牛乳	0.5	150	1000	8600	44000	[cfu/ml 牛乳 培養液]

5 . ハムに添加された細菌の検出

< 実験 >

市販ハム(加熱後包装、要冷蔵品)に9倍量のBHI培地を加え、ストマッカーで破碎混合後、大腸菌(*Escherichia coli*)もしくは、サルモネラ菌(*Salmonella enteritidis*)を元の試料あたり10~20個/g(1~2個/ml培養液)となるように添加し、35℃で4~7時間振盪培養した(約10ml)。

各培養時間における培養液1.3mlを1,000rpm(約100×g)で1分間遠心して残渣を落とした後、その遠心上清の1.0~1.2mlを12,000rpm(約13,000×g)で3分間遠心した。沈殿を500μlのTE buffer(10mM Tris HCl, 0.1mM EDTA (pH 8.0))で再懸濁後、遠心分離して沈殿を洗浄した。

沈殿(菌体を含む)に200μlのキレックス液を添加して99℃で5分間加熱処理後、氷上で急冷した。

12,000rpm(約13,000×g)で1分間遠心した上清をPCR用DNA試料液とした。

上記方法に従い、調製したDNA試料液に対して、ENTプライマーによるPCRを実施した。

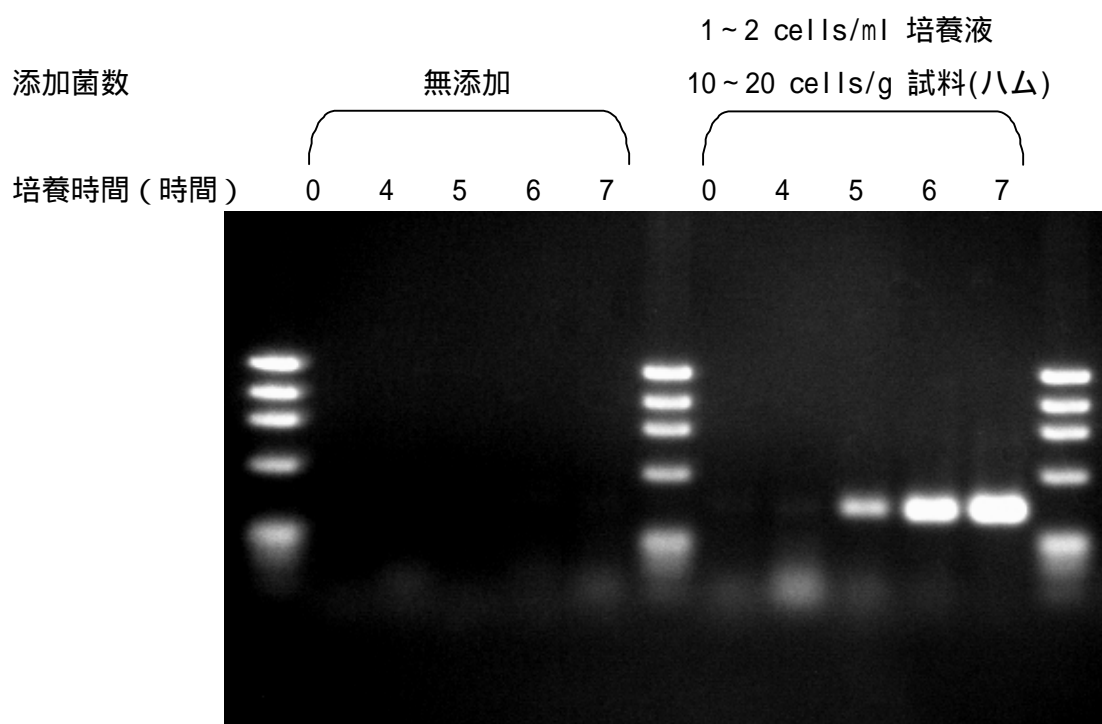
一方、各培養時間において、培養液を所定の培地プレートに播種し、生菌数を測定した。

< 結果 >

ENTプライマーを用いたPCRによって、大腸菌、サルモネラ菌は、初発菌数10~20cells/g検体であったものが、培養5時間で検出可能であった(下記図参照)。

このように、短時間培養後のPCRによる細菌遺伝子検出は、ハムのような固形検体の検査においても有用であることが示された。

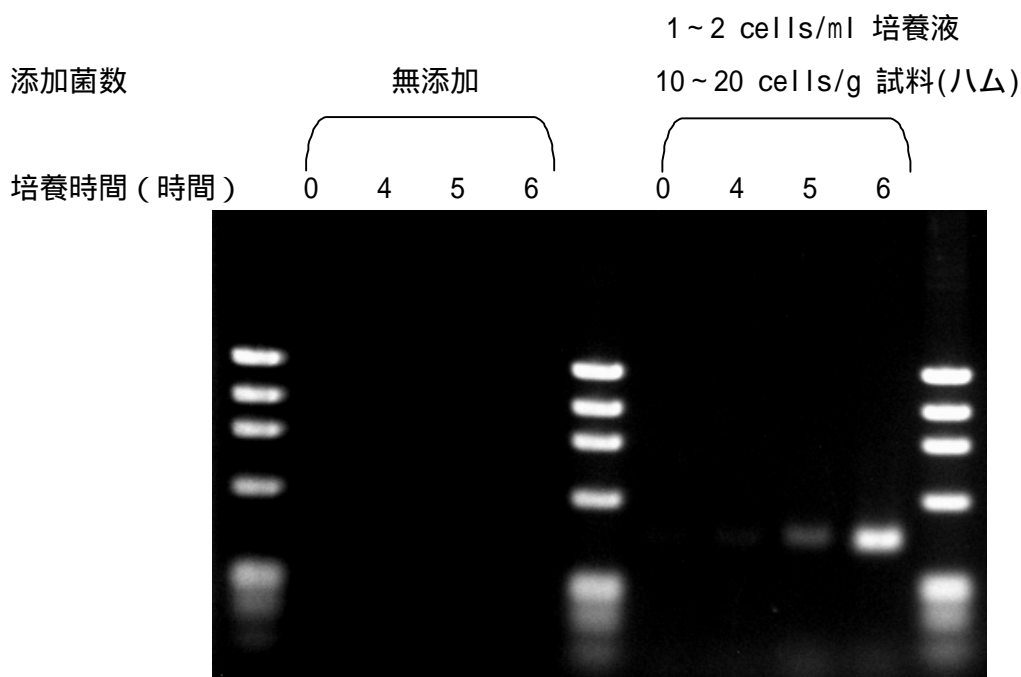
(1) 大腸菌：ENT プライマー



菌数測定 (デゾキシコレート寒天培地で測定：cfu/ml 培養液)

添加菌数	培養時間				
	0h	4h	5h	6h	7h
無添加	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
1~2 cells/ml 培養液	1.6	220	1300	12000	74000 [cfu/ml 培養液]

(2) サルモネラ菌：ENT プライマー



菌数測定 (DHL 寒天培地で測定：cfu/ml 培養液)

添加菌数	培養時間				[cfu/ml 培養液]
	0h	4h	5h	6h	
無添加	陰性	陰性	陰性	陰性	
1~2 cells/ml 培養液	1.8	120	570	3300	

6. ゆでうどんに添加された細菌の検出

< 実験 >

市販ゆでうどん(加熱処理麺、要冷蔵品)に9倍量のBHI培地を加え、ストマッカーで破碎混合後、大腸菌(*Escherichia coli*)を元の試料あたり10~20個/g(1~2個/ml培養液)となるように添加し、35℃で4~6時間振盪培養した(約10ml)。

各培養時間における培養液1.3mlを1,000rpm(約100×g)で1分間遠心して残渣を落とした後、その遠心上清の1.0~1.2mlを12,000rpm(約13,000×g)で3分間遠心した。沈殿を500μlのTE buffer(10mM Tris HCl, 0.1mM EDTA(pH 8.0))で再懸濁後、遠心分離して沈殿を洗浄した。

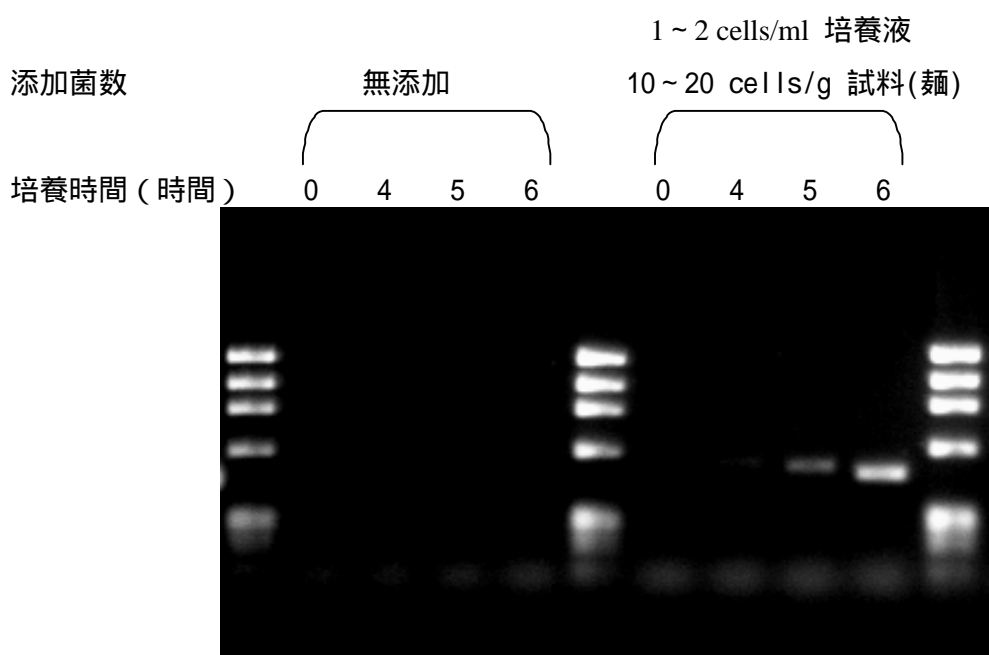
沈殿(菌体を含む)に200μlのキレックス液を添加して99℃で5分間加熱処理後、氷上で急冷した。

12,000 rpm (約 13,000 ×g) で1分間遠心した上清を PCR 用 DNA 試料液とした。
 上記方法に従い、調製した DNA 試料液に対して、ENT プライマーによる PCR を実施した。
 一方、各培養時間において、培養液を所定の培地プレートに播種し、生菌数を測定した。
 < 結果 >

ENT プライマーを用いた PCR によって、大腸菌は、初発菌数 10 ~ 20 cells/g 検体であったものが、培養 5 時間で検出可能であった (下記図参照)。

このように、短時間培養後の PCR による菌遺伝子検出は、ゆでうどんのような固形検体の検査においても有用であることが示された。

(1) 大腸菌 : ENT プライマー



菌数測定 (デゾキシコレート寒天培地で測定 : cfu/ml 培養液)

添加菌数	培養時間				
	0h	4h	5h	6h	
無添加	陰性	陰性	陰性	陰性	
1~2 cells/ml 培養液	0.5	200	1125	7500	[cfu/ml 培養液]

7. 検出確認食品例、検出困難な食品例

< 検出確認食品例 >

品目	菌添加回収試験			
	ENT プライマーにて検出		BS プライマーにて検出	
	大腸菌	サルモネラ菌	黄色ブドウ球菌	セレウス菌
牛乳(130 2秒殺菌、要冷蔵品)		NA		
バター(要冷蔵品)		NA		
生クリーム(要冷蔵品)		NA		
ハム(加熱後包装、要冷蔵品)				NA
ウインナー(包装後過熱、要冷蔵品)				NA
かまぼこ(要冷蔵品)				NA
ちくわ(要冷蔵品)				NA
シューマイ(要冷蔵品)				
プリン(要冷蔵品)				NA
だんご				NA
食パン	NA			NA
あんぱん	NA			NA
マヨネーズ	NA			NA

：適合確認(初期添加菌数：10 cfu/g 試料、培養時間：5～6時間)

NA：未実施

< 検出確認食品例 >

豆腐、ぎょうざ	菌の増殖は確認できるが、食品由来のPCR阻害物質の除去が、本法では困難。別のDNA精製方法が必要。
---------	---

* 香辛料を多く含む食品ではPCR阻害を生じる場合があります。この場合、より厳密なDNA精製方法(Gentra社：GENERATION Capture Column Kit, QIAGEN社：DNeasy Plant Kitなど)でDNA試料液を調整する必要があります。

* 死菌数が多すぎる食品では、死菌が検出される場合があります。

* 発酵食品では、BSプライマーの納豆菌との反応が予測されます。

B. 参考資料 1 各種規格基準

1. 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）より抜粋

食品名	細菌数	大腸菌群	大腸菌	腸炎 ビブリオ	その他
食肉製品					
乾燥食肉製品 非加熱食肉製品	-	-	陰性 100/g 以下		黄色ブドウ球菌 1000/g 以下 サルモネラ属菌陰性
特定加熱食肉製品	-	-	100/g 以下		クロストリジウム属菌 1000/g 以下 黄色ブドウ球菌 1000/g 以下 サルモネラ属菌陰性
加熱食肉製品 (包装後過熱殺菌)	-	陰性	-		クロストリジウム属菌 1000/g 以下
加熱食肉製品 (加熱殺菌後包装)	-	-	陰性		黄色ブドウ球菌 1000/g 以下 サルモネラ属菌陰性
魚肉ねり製品	-	陰性	-		
冷凍食品					
無加熱摂取冷凍食品	10 万/g 以下	陰性	-		
加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱)	10 万/g 以下	陰性	-		
加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱以外)	300 万/g 以下	-	陰性	<100/g	
生食用冷凍鮮魚介類	10 万/g 以下	陰性	-		
容器包装詰加圧加熱殺菌食品 (レトルト食品)	発生し得る微生物 陰性	-	-		
生食用鮮魚介類				<100/g	

2. 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(昭和26年12月27日厚生省令第52号)より抜粋

食品名	細菌数(総菌数または生菌数)	大腸菌群
生乳	細菌数 400 万/ml 以下(直接固体鏡検法)	
牛乳	5 万/ml 以下(標準寒天平板培養法)	陰性
脱脂乳	5 万/ml 以下(標準寒天平板培養法)	陰性
クリーム	10 万/ml 以下(標準寒天平板培養法)	陰性
バター		陰性
プロセスチーズ		陰性
アイスクリーム	10 万/ml 以下(標準寒天平板培養法)	陰性
脱脂粉乳	5 万/ml 以下(標準寒天平板培養法)	陰性
はっ酵乳	乳酸菌または酵母数 1 千万/ml 以上	陰性
乳酸菌飲料		
無脂固形成分 3%以上	乳酸菌または酵母数 1 千万/ml 以上	陰性
無脂固形成分 3%未満	乳酸菌または酵母数 100 万/ml 以上	
乳飲料	3 万/ml 以下(標準寒天平板培養法)	陰性

3. 衛生規範（厚生労働省通知）より抜粋

製品	細菌数 (生菌数)	大腸菌群	E. coli	カビ	酵母	黄色ブドウ球菌	腸炎ビブリオ
弁当、お惣菜 (* 1)							
1)卵焼、フライ等の加熱処理したもの	10 万/g 以下	陰性	-	-	陰性	-	-
2)サラダ、生野菜などの未加熱処理のもの	100 万/g 以下	-	-	-	-	-	-
未加熱処理漬物 (* 2)							
1)容器包装に充填後加熱殺菌したもの	-	-	-	陰性	1,000/g	-	-
2)一夜漬け	-	-	陰性	-	-	-	陰性
洋生菓子 (* 3)	10 万/g 以下	陰性*	-	-	-	陰性	-
セントラルキッチン、カミサリー・システム (* 4)	-	-	-	-	-	-	-
生めん類 (* 5)							
1)生めん	300 万/g 以下	-	陰性	-	-	陰性	-
2)ゆでめん	10 万/g 以下	陰性	-	-	-	陰性	-
3)具等							
(1)加熱処理したもの	10 万/g 以下	-	陰性	-	-	陰性	-
(2)未加熱処理のもの	300 万/g 以下	-	-	-	-	-	-

* 生鮮果実部を除く

厚生省（当時）環境衛生局食品衛生課長、生活衛生局食品保健課長
通知

（* 1）弁当及びそうざいの衛生規範について（昭和 54 年 6 月 29 日 環食第 161 号）

（* 2）漬物の衛生規範について（昭和 56 年 9 月 24 日 環食第 214 号）

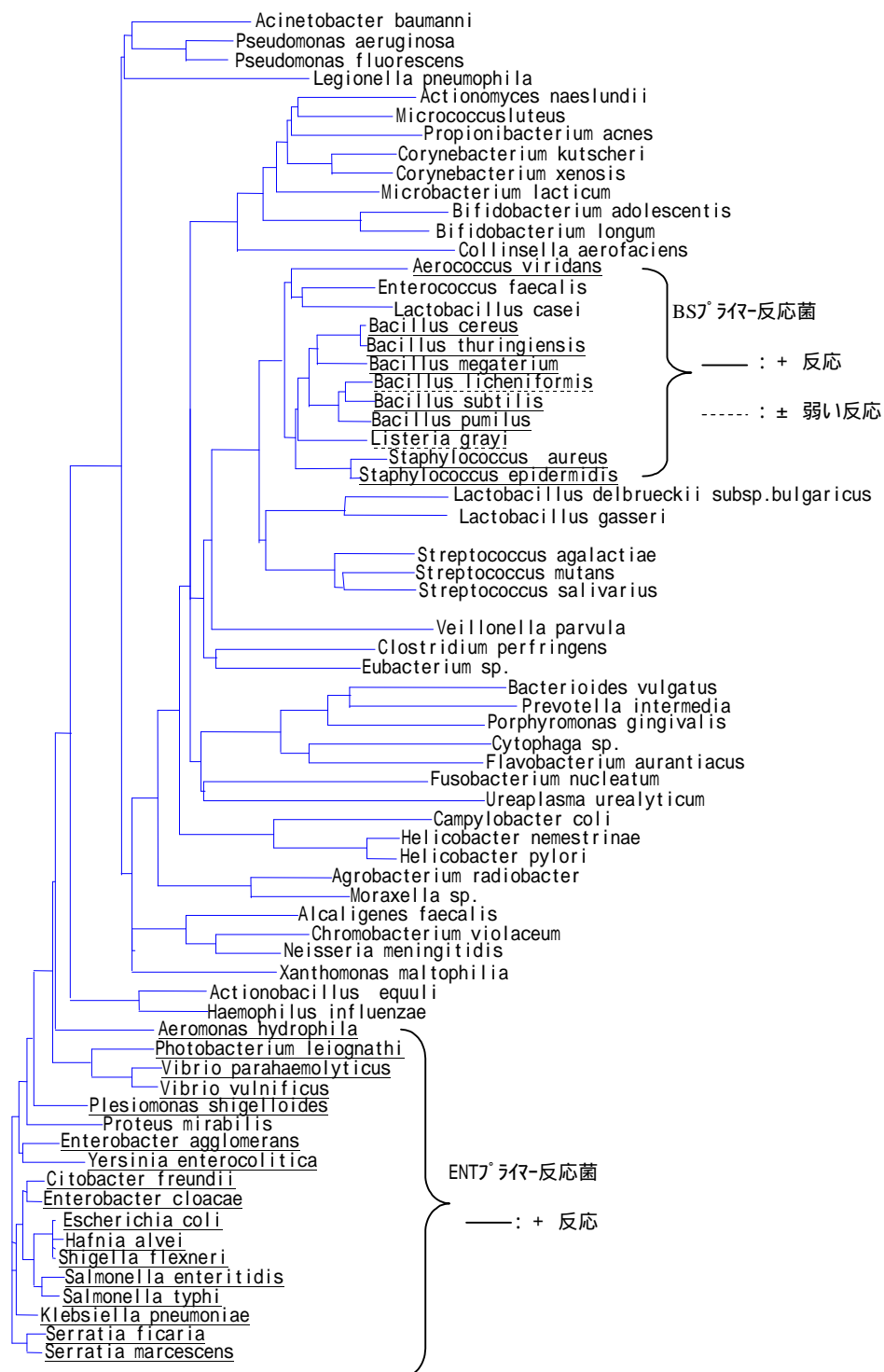
（* 3）洋生菓子の衛生規範について（昭和 58 年 3 月 31 日 環食 54）

（* 4）セントラルキッチン / カミサリー・システムの衛生規範について（昭和 62 年 1 月 20 日 衛食 6）

（* 5）生めん類の衛生規範等について（平成 3 年 4 月 25 日 衛食 61）

C. 参考資料 2

ENT,BS 各プライマーの反応特異性の検討に使用した細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹



D . 参考文献

- 船曳健一、仲野茂ら：(2001) 第 22 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 pp90.
船曳健一、仲野茂ら：(2002) 日本食品化学学会第 8 回総会学術大会講演要旨集 pp50.
小林徹、仲野茂ら：(2002) 日本食品化学学会第 8 回総会学術大会講演要旨集 pp51.
Kobayashi, K., Tagami, M. and Seko, K. (1994) Kansenshogaku Zasshi, 68, 1203-1210.
Rupf, S., Merte, K. and Eschrich, K. (1999) J. Dent. Res., 78, 850-856.
Wang, R.-F., Cao, W.-W. and Cerriglia, C.E. (1997) J. Appl. Microbiol., 83, 727-736.
山田 敏広：(2002) 食品と開発, 37 (No.10), pp7-9.

< 製品情報 >

コード番号：R R 1 1 4 A

製品名：Bacretia Screening PCR Kit

価格：6 5 , 0 0 0 円

1 0 0 反応 (ENT プライマー、BS プライマー、各 5 0 反応)

タカラバイオ株式会社