



直接鏡検法 (ブリード氏法)

北海道酪農検定検査協会

直接鏡検法（ブリード氏法）とは？

- 生乳中の細菌数/体細胞数を顕微鏡で直接数える。
顕微鏡で数えた測定値と顕微鏡の視野面積との関係から、
試料中の体細胞数/細菌数を推定する。



- ✓ 細菌検査の迅速法として工場の受入検査で実施
- ✓ 乳等省令
...直接個体鏡検法で総菌数400万/ml以下



直接鏡検法（ブリード氏法）とは？

【利点】 ・ 細菌/体細胞の形状を確認できる。

...菌塊が多いのか？菌が全体に散らばっているのか？

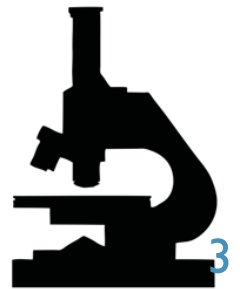
・ 作成したスライドガラスは保存可能



【欠点】 ・ 誤差が大きい

・ 生菌、死菌の区別がつかない

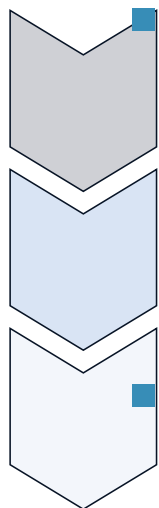
→総菌数（生菌+死菌）で結果報告



検査の準備

- マイクロピペット・チップ（10 μ l）
- 塗抹針
- ピンセット
- 手袋
- アルコールランプ
- 誘導版
- スライドガラス標本乾燥器
- 染色液
- 濾紙
- 水洗用ビーカー
- 光学顕微鏡
- 水平水準器
- エマージョンオイル
- カウンター

染色液について



■ ニューマン氏染色液

平成26年11月1日～厚生労働省より

特定化学物質障害予防規則などが改正

1,1,2,2-テトラクロロエタン

↳ 発がん性を踏まえた措置が義務化

■ ブロードハースト・パーレイ

武藤化学株式会社製

or

試験室で調製

実習ではこちらを使用

5

ブロードハースト・パーレイの調製法

1. メチレンブルー（メルク社製）2.0 g を70%の温エチルアルコール250m l に溶かす。
2. 塩基性フクシンのアルコール飽和溶液（10.0 g を95%エチルアルコール100m l に溶かす）3m l を加える。
3. アニリン5m l を加え、液が温かい間によく振り混ぜる。
4. 希硫酸（蒸留水95m l 中に濃硫酸5m l を加える）15m l を加えよく混合し加温、ろ過する。
5. ろ液100m l に対し熱蒸留水50m l を加えよく振り混ぜる。ただし希硫酸を加えた時、液が濃ちようになるようであれば、ろ過前に熱蒸留水を加える。
6. 冷暗所に保存する。 （社団法人 北海道生乳協会 昭和60年度事業成績書より）

6

検査の流れ

1. 試料塗抹
2. 乾燥
3. 試料染色
4. 乾燥
5. 水洗
6. 乾燥

塗抹染色
標本の作成

7. 鏡検
8. 測定値の換算



7

実施：塗抹染色標本の作製

I. 試料の塗抹

- ①誘導板の上にスライドグラス※1を重ねる

※1 塩酸アルコールなどでよく洗浄したもの

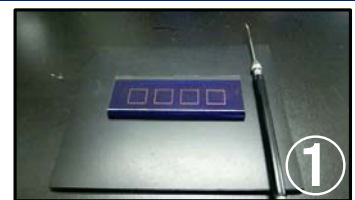
- ②試料をよく混和する（25回以上）

- ③マイクロピペットで10μl採取

- ④ピペットの外壁に付着した試料を清潔な紙で拭く

- ⑤スライドグラスに排出

- ⑥塗抹針で1cm²※2（1マス）に塗抹



①



⑥



※2

8

実施：塗抹染色標本の作製

2. 乾燥

- ・乾燥器の上で約5分乾燥させる
- ・乾燥器の温度は40～50℃
- ※乾燥器は水平に保つ

3. 試料染色 1分以上※3

- ・濾紙を準備しておく
- ・スライドグラスを立てて染色液から出す
- ・濾紙で余液を拭き取る



9

※3 試験室で調製する染色液の場合“染色液中に1分以上保持する”とされています

実施：塗抹染色標本の作製

4. 乾燥(BHPの場合は無し)

5. 水洗

余分な水分は濾紙で拭く

6. 乾燥

7. 鏡検

- ・対物レンズ100倍(油浸)、接眼レンズ(広角)を使用。
- ・生乳検査では視野の直径が0.206mmで使用。



10

実施：顕微鏡での計測手順

①標本の代表視野を計測し、一視野当りの平均値を求める。

→中心を通る一直線上の等間隔を16視野以上



②顕微鏡係数を乗じて1m^l中の総菌数を求める。

標本の代表的視野
(○印を読む)



実施：顕微鏡での計測

1視野の平均菌魂数	数える視野数 (視野の直径0.206mmの場合)
0~ 3	64
4~ 6	32
7~ 12	16
13~ 25	8
26~ 50	6
51~100	2
>100	1

実施：顕微鏡での計測（菌数の数え方）

✓ 個体計算法

(Individual Microscopic Count : IMC)

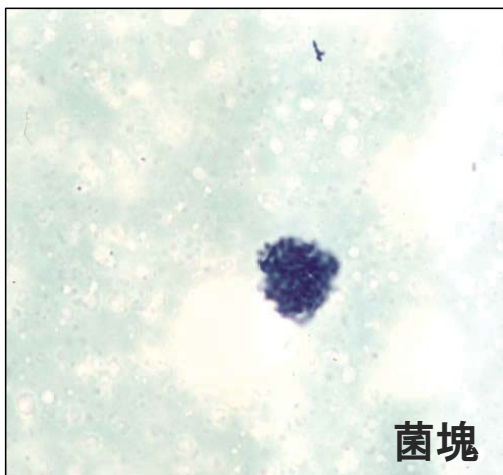
- ・ 双状・連鎖・菌塊を形成していても細菌を1個ずつ区別して数える。



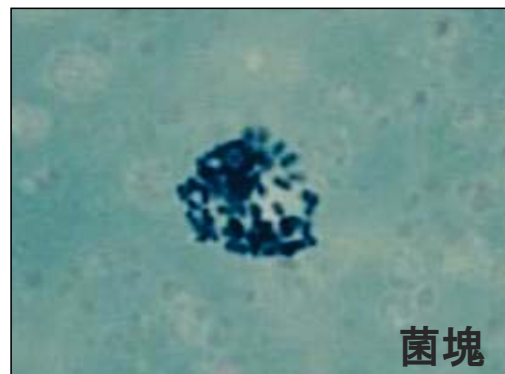
合計31

13

実施：顕微鏡での観察（細菌）



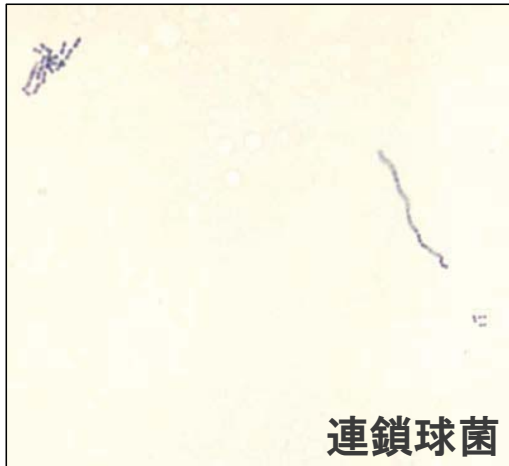
菌塊



菌塊

(ニューマン氏染色液) 14

実施：顕微鏡での観察（細菌）



連鎖球菌

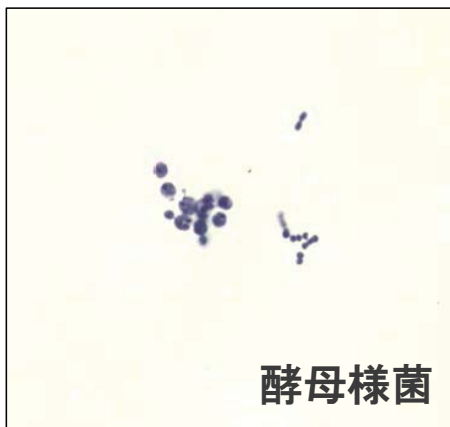


双桿菌

連鎖桿菌

(ニューマン氏染色液) 15

実施：顕微鏡での観察（細菌）



酵母様菌



桿菌



双球菌

(ニューマン氏染色液) 16

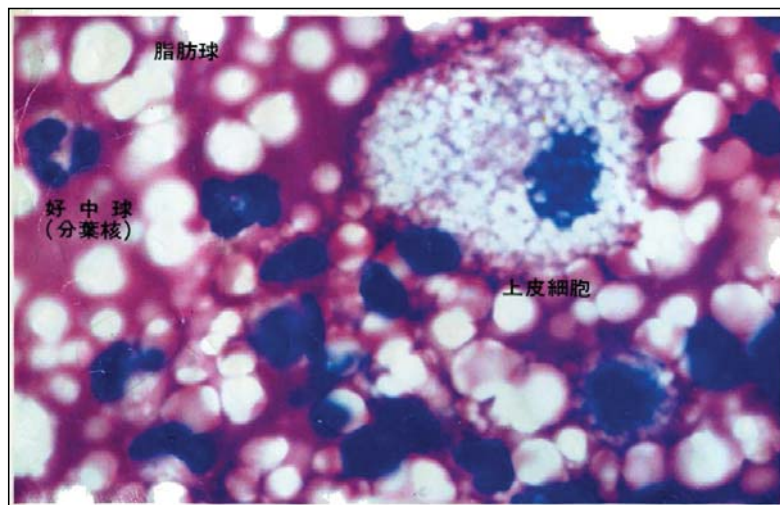
実施：顕微鏡での計測（体細胞の数え方）

✓計測対象：

- ①核の大きさが $5\mu\text{m}$ 以上の有核体細胞
- ②壊れた細胞は、50%以上復元できたもののみ数える
- ③上皮細胞の塊は核を基礎として数える
- ④視野上に50%以上入っているもの

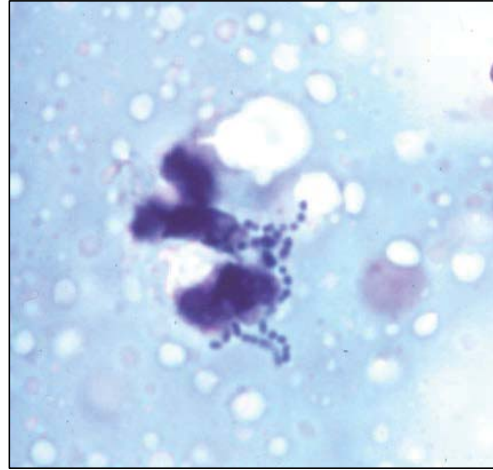
17

実施：顕微鏡での観察（体細胞）



（ブロードハースト・パーレイ染色液） 18

実施：顕微鏡での観察（細菌/体細胞）



（ニューマン氏染色液） 19

実施：顕微鏡での計測

✓ 顕微鏡係数算出方法

《顕微鏡係数》 | 視野の細菌や体細胞を 1ml 当りの菌数に換算する係数

※ 視野径はミクロメーターで測定

例) 視野径 0.206mm の場合

$$= \frac{\text{塗抹面積} \times 100}{\text{円周率} \times \text{視野半径}^2} = \frac{100\text{mm}^2 \times 100}{3.1416 \times (0.103\text{mm})^2} \doteq 300,000$$

実施：測定値の換算

例) 64視野カウントして、細菌が32個あった。

$$\frac{32}{64} \times 300,000 = 150,000/\text{ml}$$

※顕微鏡係数 300,000 で換算。

21

おわり



参考文献：生乳取扱技術必携
食品衛生検査指針 微生物編 2015

音声：音読さん <https://ondoku3.com/>

22