シンポジウム ■ わが国の食品微生物検査の展望

● Prospects for food microbiological testing in Japan

日本の衛生指標菌試験法のあるべき姿

An Ideal Examination Method of Indicator Bacteria in Japan

浅尾 努[†]

(日本食品分析センター, 元大阪府立公衆衛生研究所)

Tsutomu ASAO

(Japan Food Research Laboratories, Saito Laboratory)

1. はじめに

日常の食品微生物検査では、一般生菌数あるいは生菌数（食品衛生法上は細菌数）とともに、大腸菌群や“E. coli”のようないわゆる衛生指標菌といわれる菌群を対象にすることが多い。ところが、乳等省令（乳及び乳製品の成分規格などに関する省令）に示された衛生指標菌試験法に至っては、日本が連合国総司令部 (GHQ) の統治下にあった昭和 26 年に制定された当時の姿をとめている。乳等省令に加えて、昭和 34 年に告示された氷雪や冷凍食品等の衛生指標菌試験法も長年改正されていないため、当然のことながら多くの弊害が生じている。たとえば、同一の菌（群）を対象とした試験法でも希釈液や使用培地が異なることであるが、最大の弊害は、近年急速に開発が進んでいる迅速化・簡易化された機器や培地がわが国の規格試験には使用できないことである。さらに食品流通の国際化が進む中で、国際標準法とのすり合わせができていない日本の衛生指標菌試験法が、商取引上のトラブルの原因の一つになることは想像に難くない。

食品検査の信頼性確保を目的として導入された食品 GLP (Good Laboratory Practice) に規定されている SOP (Standard Operation Program: 標準作業手順書) を作成する際には、食品衛生法の成分規格等に記載された試験法に従わなければならない。食品 GLP は優れたシステムであると考えられるが、その根幹となる試験法には少なからず問題があるのは明白である。本講演では、まず日本の食品微生物試験法の問題点を要約し、米国 (FDA/BAM: Food and Drug Administration/Bacterial Analytical Manual, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>) や ISO (International Organization of Standardization) の衛生指標菌試験法を比

較解説するとともに、2005 年の EU 官報²⁾ に記載され、2006 年から施行されたヨーロッパ連合 (EU) の新しい食品の微生物規準 (Microbiological Criteria for Food-stuffs) の概要を紹介した。

2. 衛生指標菌名の整理の必要性

わが国の食品衛生法では、腸管系病原菌に対する衛生指標菌として、主に大腸菌群と“E. coli”の 2 種類が使用されているだけで、欧米のような大腸菌に対する規格基準はない。食品衛生法に記載されている“E. coli”がローマン体になっているのは、細菌分類学上の大腸菌（イタリック体の *E. coli* で表記しなければならない）と区別するための手段であると思われる。平成 10 年の「生食用食肉などの安全性確保について」の通知で、厚生労働省は初めて糞便系大腸菌群の用語を使用し、これは食肉製品などの成分規格に使用されている“E. coli”と同じものであると定義した。しかし、“E. coli”を大腸菌と読むのはごく自然であるため、試験検査現場のみならず行政文書でも混乱が生じているようである。たとえば、弁当およびそうざいの衛生規範には、「冷凍食品の規格基準で定められた E. coli の試験法により、大腸菌は陰性であること」というような難解な文章が存在する。“E. coli”の試験法では大腸菌を同定できないため、ここに記載された大腸菌は実際には糞便系大腸菌群であると解釈される。“E. coli”は日本独特の用語であるが、米国 FDA/BAM などで使用されている fecal coliforms とは同等の菌群であると考えられる。検査の依頼主が“E. coli”を意図しながら“大腸菌”試験を指定すれば、試験実施機関では IMViC 試験まで行う場合もあるし、一方では糞便系大腸菌群試験を実施するという異なった試験法が実施されることも想定される。平成 19 年に通知された汚染実態調査では、「食品、添加物などの規格基準」において大腸菌に係る成分規格が設定されている食品については、当該規格に係る試験検査法を実施することが記載されている。ところが、実際にはそのような成分規

[†] 連絡先

☎567-0085 茨木市彩都あさぎ 7-4-41

格がある食品は存在しないので、ここで大腸菌とは“E. coli”（糞便系大腸菌群）を意味すると思われる。大腸菌以外の名称は、食品衛生学あるいは環境衛生学領域で使用されている用語であり、細菌学の分類に基づくものではない。

EU の新しい食品の微生物規準²⁾の施行に伴い、大腸菌群に代わる衛生指標菌として細菌分類学上の用語である *Enterobacteriaceae* が多用されている。*Enterobacteriaceae* は単に腸内細菌と呼ばれることもあるが、ヒトや動物の腸内に生息している細菌という意味の腸内細菌と混同されることがある。このような事態を回避するため、より正確な用語である Members of Family *Enterobacteriaceae*（腸内細菌科に属する菌群）の日本語訳を腸内細菌科菌群とした。大腸菌群や糞便系大腸菌群との用語の統一性を図り、かつ一定の形態学および生化学的性状を有する複数の菌を含む菌群であることを明確にする意味でも、腸内細菌科菌群は適切な日本語訳であると考えている。

3. 食品細菌検査の手順

食品細菌検査の最初の段階は検体の抜き取り（方法、数量）と運搬である。適切に採取された検体の細菌学的状態を規定された試験法により調べ、得られた試験結果を規格基準と照合することにより食品やその原材料などの良否が決定される（図 1）。乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）に規定された食品には、曖昧ではあるが検体を抜き取る方法、数量、搬送条件が記載されている。乳および乳製品以外のほとんどの食品の抜き取り方法などの記載はないが、通常は 1 検体を採取後

に冷蔵して検査施設まで搬送する。試験検査施設に搬入された検体は、成分規格などに示された試験法に則り作成された SOP に従って試験を行う。試験報告書には、検体、試験法、結果に関する情報を記載しなければならない。場合によっては、試験結果の解釈などが理解できるように説明を加えることも必要である。

食品細菌検査の一連の工程の中で、細菌試験法は検体の規格基準への適合性を確認することを仲介する道具であるといえる。食品の規格基準を緩和あるいは厳格化することに関する細菌学的な知見は少ないが、道具である試験法の昨今の進歩は目覚ましい。規格基準への適合性の検査には、いわゆる公定法しか使用できないが、試験検査機関の規模や設備などに応じた費用対効果に優れた幅広い試験法が早急に利用できるようになることが切望される。

4. わが国の衛生指標菌試験法の現状¹⁾

わが国の衛生指標菌試験法は、培地に接種する食品の量を変えることにより、陰性・陽性という定性的な規格基準に軽重の差をつけている（表 1）。このような定性的（半定量的）な試験法では、食品ごとに試料の希釈倍率や推定試験に使用する試験管数を増減しなければならないので、試験法は必然的に複雑にならざるを得ない。定性的な試験法は、製造工程での衛生管理や、最終製品を評価するための菌数のモニタリングには適していない。

衛生指標菌試験法の最大の問題点は、単なる指標菌試験であるにもかかわらず迅速性や簡便性に乏しいことである。このような欠点を補う目的で開発されてきた迅速化、簡便化、自動化された優れた細菌試験用機器や培地が、わが国の食品衛生法に基づく規格基準試験の代替法としては使用できない。現在、このような状況を改善すべく、国立医薬品食品衛生研究所を中心として、食品の微生物標準試験法検討委員会が定期的に開催されている（本シンポジウムの五十君静信先生の項を参照）。

食品の微生物規格基準を設定するにあたり、ICMSF（国際食品微生物規格委員会：International Commission on Microbiological Specifications for Foods）が提唱しているサンプリングプランの理論が国際的なガイドラインとなっている。しかし、日本の食品検査で ICMSF のサンプリングプランが採用されているのは、食肉製品の微生物指導基準、自家製ソーセージの微生物規格（指導要領）、液卵の微生物指導基準についてだけである。サンプリングプランの具体的な内容は、ICMSF のメンバーである春日文子先生の本シンポジウム「ICMSF による微生物規格基準設定の考え方」を参照されたい。

5. 欧米と日本の汚染指標菌試験法の相違点

本文中に記載した培地名などの略語は表 2 に示したので、詳細は各メーカーの説明書を参考にされたい。

図 1. 食品細菌検査の手順

図 3. FDA/BAM の衛生指標菌試験法 (MPN 法)

図 4. ISO の大腸菌群試験法 (MPN 法)

1) 大腸菌群および糞便系大腸菌群試験法

米国 (FDA/BAM) と ISO^{7~9)} の大腸菌群や糞便系大腸菌群試験法では、わが国の半定量的な方法とは異なり、MPN 法による定量的な方法が採用されている。わが国の推定試験に使用する液体培地は BGLB 培地、BTB-LB 培地、EC 培地を使い分ける必要があるが (図 2)、FDA/BAM や ISO では LST 培地にほぼ一本化されている (図 3, 4)。FDA/BAM の大腸菌群 MPN 試験

図 5. ISO の *E. coli* 試験法 (平板法)

図6. FDA/BAMの*E. coli*試験法(平板法)

法ではガス陽性の LST 培地から BGLB 培地へ、糞便系大腸菌群 MPN 試験法ではガス陽性の LST 培地から EC 培地へ移植培養して MPN 値を算出する。

大腸菌群試験の推定試験に使用する平板培地は、わが国ではデソキシコレート寒天培地であるが、FDA/BAM法やISO法ではいずれもVRBA培地が指定されている。わが国のようなEMB培地での確定試験と、それに続くグラム染色やLB培地での判定という完全試験がないので、より簡便化、迅速化された試験法といえる。

2) 大腸菌試験法

図7. 腸内細菌科菌群の試験法 (ISO)

わが国には、食品衛生法上は米国やEUのような大腸菌試験法はない。ISO³⁾とFDA/BAMの平板法には、酵素基質培地であるTBX培地とVRBA-MUG培地がそれぞれ指定されている(図5, 6)。米国のMPN法は、LST培地からEC培地へ、次にEMB培地へとガス産生性を指標として移植する。EMB培地で大腸菌様集落が発生すれば、再度LST培地でのガス産生性、グラム染色性およびIMViC試験により大腸菌を同定するという迅速性に乏しい方法である。ISO法⁶⁾は、MMG培地で培養(1日)後、TBX培地に画線培養(1日)するという迅速性に優れた方法である。

3) 腸内細菌科菌群試験法

ISOの腸内細菌科菌群の分離培地には、大腸菌群用のVRBA培地の乳糖をブドウ糖に置き換えたVRBG培地が使用されており、平板法⁵⁾では発生した集落のうちブドウ糖を分解し、かつオキシダーゼ陰性の菌を腸内細菌科菌群とする。MPN法⁴⁾では、まず選択剤を含まないBPWで前培養し、EE培地による選択増菌培養後にVRBG培地へ画線培養する(図7)。

6. EUの食品の微生物規準²⁾

2006年1月1日から施行されたEUの新しい食品の微生物規格基準は、市販食品の安全基準(Food Safety Criteria)と、HACCPに対応可能な製造工程での衛生管理基準(Process Hygiene Criteria)から成り立っている。安全基準とは、食品のロット・バッチの微生物基準への適合性を定義づけるもので、最終製品・市場流通食品に適用され、不適合食品は回収しなければならない。衛生管理基準は製造工程が正常に機能していることを示す規準であって、市場流通食品には適用されない。衛生指標菌には腸内細菌科菌群あるいは大腸菌が使用されている。これに不適合な場合は製造工程の衛生管理の改善や、原材料を見直すなどの措置が講じられることになる。ほとんどの市販食品の安全規準は、サルモネラやリステリアのような病原菌、ブドウ球菌エンテロトキシン

ン、ヒスタミンで規制されており、衛生指標菌が使用されているのは生食用貝類に対する大腸菌の規準のみである。合計28の食品カテゴリーの衛生管理規準うち、7カテゴリーで腸内細菌科菌群、8カテゴリーで大腸菌が採用されている。ちなみに細菌数(SPC: Standard Plate Counts)が適用されている食品は4カテゴリーのみにとどまる。このように、EUの微生物規準には大腸菌群と糞便系大腸菌群による規制がない。米国でも糞便系大腸菌群を標的とした試験は、糞便汚染の指標性が低いとの考えから近年減少傾向にあるようである。

細菌試験法には参照法(Reference Method)としてISO法などが規定されているが、ISO法との同等性がAOAC InternationalやAFNOR(フランス規格協会)などの認証機関でバリデートされた方法も使用可能である。

7. ま と め

わが国の食品の成分規格には、一般生菌数や大腸菌群のような、いわゆる衛生指標菌が圧倒的に多く使用されている。しかし、衛生指標菌に対する成分規格設定の目的が、食品の安全確保のためか、品質確保のためなのか、さらには、そのような規格基準の必要性すら科学的に妥当かは明確でないというのが現状ではなかろうか。

今までに告示あるいは通知された試験法を個々に見直すのではなく、抜本的かつ系統的に改正することによってのみ、調和のとれた試験検査法が構築できるのではないかと考える。食品微生物試験法をこのまま放置すると、わが国は試験法を改良する意志はあるが、変える能力がないと諸外国から疑われることも危惧される。

文 献

- 1) 浅尾 努, 河合高生, 久米田裕子, 寺本忠司, 石黒 厚, 梅迫誠一, 小笠原 準, 高須一重, 美野朋隆, 日野亮一, 齋藤利江, 小崎俊司, 山本茂貴: 食品の細菌学的試験法の現状と問題点(日本食品微生物学会 食品の細菌検査法問題検討委員会報告). 日食微誌, 24, 134-143 (2007).
- 2) EC (European Commission): Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of European Union (2005).
- 3) ISO 16649-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*—Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (2001).
- 4) ISO 21528-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*—Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment (2004).
- 5) ISO 21528-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of *Enterobacteriaceae*—Part 2: Colony count method (2004).

- 6) ISO 16649-3: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*—Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (2005).
- 7) ISO 7251: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of presumptive *Escherichia coli*—Most probable number technique (2005).
- 8) ISO 4831: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms—Most probable number technique (2006).
- 9) ISO 4832: Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of coliforms—Colony-count technique (2006).