シンポジウムI 食品微生物検査法の最近の動向と簡易迅速化

● Recent Trends and Rapid-Simple Methods on Food Microbiological Testing

衛生指標菌に何を求めるのか

Strong Demand to Use Alternative Method for Food Microbiological Indicator Testing

浅尾 努[†]

(一般財団法人 日本食品分析センター)

Tsutomu ASAO

(Japan Food Research Laboratories, 3-1 Toyotsu-cho, Suita-shi, Osaka 564-0061)

1. はじめに

日本の公定法となっている食品微生物試験法は、生菌数、大腸菌群、E. coli (糞便系大腸菌群)などの衛生指標菌を対象としたものが圧倒的に多いが、これらは、いかにも古めかしくて迅速性に乏しい。科学技術の進歩に伴い、より簡便で迅速な優れた衛生指標菌試験法が次々と開発されてきた。食品の衛生管理や検査業務などに携わる関係者が、簡易迅速試験法の速やかな導入を切望していることは論をまたない。企業が開発販売しているキット類など、簡易迅速試験法の種類は多岐にわたるが、そのうち第三者機関により“標準的な試験法と同等である”ことが認証されたものは、「代替法」とも呼ばれている。本稿では、代替法を導入する際のネックとなっている日本の規格・基準の不都合を紹介するとともに、欧米の代替法導入システムについても簡単に触れる。最後に、“黄色ブドウ球菌は指標菌的な食中毒菌である”との考えを、筆者が遭遇した実例を示しながら紹介する。

2. 規格・基準違反と回収

昭和27年の乳等省令の施行に際して、「市乳（現在の牛乳）の大腸菌群は、消化器系汚物による汚染度を示すものであるので、常時従業員の衛生教育に努められたいこと。」と通知された。当時は10万人近くの赤痢患者が発生し、約2万人が死亡していた時代であり、衛生状態の劣悪さを反映した措置であったと思われる。このような通知が契機となって、大腸菌群は糞便汚染の指標菌であるとの概念が一般化し、以降のさまざまな食品の規格・基準に汎用（乱用?）されたものと考えられる^{2,4,5)}。

もはや不必要な食品の規格・基準が、漫然と残っている可能性があることは、成分規格違反食品を回収する際

の行政の報道発表に如実に表れている。食品回収事例の大半は大腸菌群陽性や生菌数オーバーであり、行政からは大抵の場合、「現在までに当該食品にかかわる健康被害の報告はありません。」とコメントされる。当然と言えば当然であるが、回収食品に関連する健康被害があったという事実は、筆者の知る限りない。成分規格違反食品と健康被害を関連づけるデータがないために、行政からは判で押したような曖昧なコメントしか出せないと思われる。あえていうならば、現行の成分規格に違反した食品を市場から回収するという考えは、科学的根拠に乏しく無理があることになる。大腸菌群や糞便系大腸菌群のような衛生指標菌に対して、最近では糞便汚染の指標であるという固定概念がしだいに薄れてきた。

3. 衛生指標菌の試験法の種類

1) 腸内細菌科菌群

ISO 21528-1¹⁰⁾に準じて作成された腸内細菌科菌群試験法は、BPW培地⇒EE培地⇒VRBG培地⇒OF培地・オキシダーゼ試験という多くの手順を踏むので、最終判定までに長時間を要するのが欠点である^{1,2)}。ISOのワーキンググループでは、ISO 21528の欠点を是正するための修正作業を進めており、次版ではEE培地を削除することで合意されている。食品からの微生物標準試験法検討委員会で、適切ではないと判断されたブドウ糖寒天培地も、次版ではOF培地に変更される予定である。断るまでもなく、ISO 21528が正式に改正されれば、日本の試験法も速やかに変更しなければならない。

北欧の食品分析委員会(NMKL)からは、ISO 21528法のOF試験を省略して、オキシダーゼ試験のみで腸内細菌科菌群を同定するNMKL 144法が出版されている。NordValのバリデーションにより、NMKL 144法はISO 21528法と同等であると評価されたので、より迅速簡便なNMKL法を使用しても大きな問題はなさそうである^{1,2)}。

2) 大腸菌群と糞便系大腸菌群

生食用かきの製造基準に使用されている大腸菌群試験

[†] 連絡先

*1 564-0061 吹田市豊津町3-1

法は、推定試験 (LB培地)⇒確定試験 (BGLB培地) のみで最終判定するので、「推定大腸菌群試験法: 筆者の仮称」として、大腸菌群試験法と区別するのがより正確な表現である。

日本の行政用語である *E. coli* は、大腸菌ではなくて糞便系大腸菌群 (Fecal coliforms) であることは、2009年の本誌でも紹介した。しかし、糞便系大腸菌群といえるのは、冷凍食品などの試験法のように、推定試験 (EC培地)⇒確定試験 (EMB培地)⇒完全試験まで行って最終判定する菌群に限られる。生食用かきの試験法では、推定試験 (EC培地) のみで最終判定するので、「推定糞便系大腸菌群: 筆者の仮称」として、糞便系大腸菌群と区別するのがより正確な表現である。推定糞便系大腸菌群試験法では、大腸菌群に該当しない嫌気性のウェルシュ菌でも、EC培地でガスを産生することがある。

3) 大腸菌

食品衛生学的大腸菌試験法で検出される大腸菌は、分類学上の大腸菌とは必ずしも一致しない。大腸菌群の簡易鑑別システムである IMViC 法は、1930年代に考案された古典的なものであるが、現在でも継続して使用されている。本法で、「++—」のパターンを示す生物型 I の大腸菌は、generic *E. coli* とも呼ばれている。*Escherichia* 属の、*E. hermannii*、*E. fergusonii* および、下痢原因菌として最近注目されている *E. albertii* も、IMViC 法では generic *E. coli* と同定される確率が高い。

ISO 7251 の推定大腸菌 (Presumptive *E. coli*) 試験法¹¹⁾には、LST培地⇒EC培地⇒ペプトン水 (インドール試験) の手順が示されている。この試験法の特徴は、元来は純培養菌で実施するインドール試験 (IMViC 試験のキー性状) を、混合菌が発育した状態のペプトン水で直接実施して、より簡便迅速に大腸菌の存在を推定することにある。推定大腸菌や generic *E. coli* 試験法は、下記のような大腸菌の簡易迅速試験法の登場により、その役割は終えたものと筆者は考えている。EU の統一食品微生物規準 (Microbiological criteria for foodstuffs)⁷⁾ には、推定大腸菌にかかわる規準はなく、大腸菌が汎用されている。

大腸菌は特異的に β -グルクロニダーゼを産生するので、この酵素を標的として、大腸菌を簡便迅速に検出する種々の発色酵素基質培地が開発されてきた。発色酵素基質培地上に発育する約95%の大腸菌は、酵素基質の分解に伴う特有の発色集落を形成する。例外的に、赤痢菌とサルモネラの一部の菌も大腸菌と同様の発色集落を形成するが、 β -グルクロニダーゼ活性がない腸管出血性大腸菌 O157 の集落は発色しない。発色酵素基質培地には、大腸菌のすべては検出できないなどのわずかな欠点はあるが、現時点では最も優れた培養法と思われる。EU の統一食品微生物規準⁷⁾には、大腸菌用の発色酵素基質培地の一種である、TBX 培地を 44℃ で培養する方法が採用されている。

図1. 食品微生物試験法とバリデーション

BAM: Bacterial Analytical Manual, USDA: U.S. Department of Agriculture, FSIS: Food Safety and Inspection Service, MLG: Microbiology Laboratory Guidebook, ISO: International Organization for Standard, IS: International Standard, AOACI: Association of Official Analytical Chemists International

4. 簡易迅速試験法 (プロプライエタリ法) と代替法

簡易迅速試験法という用語には、試験法本体だけを意図するようなイメージがあるが、実際にはサンプル採取から結果を報告するまでのすべての段階を含むと考えられる。例えば、試料の自動秤量と希釈液の分注装置、ストマッカーのような食品をホモジナイズする装置、自動混釈装置、菌数などを自動的に読み取って記憶・プリントアウトする装置なども含まれる。ある特定の研究室あるいは個人が開発した試験法に対して、これは非常に簡易迅速であると自己主張しても、多くの研究者の賛同を得られるとは限らない。同様のことは、培地、キット類、機器を開発販売している企業にも当てはまる。企業等が開発した試験法は、プロプライエタリ法 (Proprietary method) と称されており、「知的財産権を有する試験法」と和訳できる。より具体的には、企業が販売している商標登録されたもので、試験法の一部が公開されていないような、例えば ELISA や PCR 法などをベースとした種々の形式のキットや機器がプロプライエタリ法となる。

プロプライエタリ法のうち、ISO 16140⁹⁾ などのバリデーション・プロトコルに従って、AFNOR, MicroVal, NMKL/NordVal, AOACI などで認証された試験法が、国際的には代替法 (Alternative method) として有効になる (図1)。裏を返せば、本質的にいくら優れたプロプライエタリ法であっても、上述のような国際的な機関でバリデートされていない商品は、世界市場では戦っていけないことになる。

公的な試験法を論ずる場合、簡易迅速試験法の用語を、安易に使用すべきではないというのが、筆者の私見である。公的なあるいは共通の規準への適合性の検査に使用する試験法には、簡易迅速試験法に代わる用語とし

表1. 完全試験用のLB培地の組成

対象食品	組成 (／L)	滅菌方法	判定
①乳および乳製品	普通ブイヨン＋0.5%乳糖	間欠滅菌	ガス産生
②保存用氷雪 ^{a)} および氷雪	普通ブイヨン (肉エキス5 g, ペプトン10 g)＋0.5%乳糖	高圧滅菌または 間欠滅菌	ガス産生 ガス産生
③食肉製品	肉エキス3 g, ペプトン5 g, 乳糖5 g, BTB 24 mg	滅菌	ガスおよび 酸産生
④清涼飲料水 ^{b)}	②と同様の組成	高圧滅菌または 間欠滅菌	ガス産生
⑤氷菓	組成不明, ②の組成と推定		ガス産生
⑥冷凍食品	組成不明, 氷菓の試験法に従う		ガス産生

^{a)} 飲食の用に供する氷雪以外の氷雪を直接接触させることにより食品を保存する場合

^{b)} 清涼飲料水: 推定試験用BTB加LB培地のBTB濃度は不明
生食用かきの加工基準: 推定試験用のLB培地の組成は不明

て、代替法の呼称がふさわしい。EUでは主としてISO法、米国ではFDA/BAM法やUSDA/FSIS/MLG法などを参照法(Reference method)として、AFNORやAOACIなどの国際的な機関でバリデートされた試験法のみが代替法として認められている。参照法とは、各国の公的機関から公開された方法であり、公開法(Open access method)あるいは非プロプライエタリ法ともいえる。日本では、「省令法」、「告示法」、「通知法」が参照法に該当するが、これら試験法の代替法の使用は全く認められていない。代替法となるようなプロプライエタリ法を日本に導入する場合には、規格・基準や食品区分ごとに異なる試験法とともに、試験法そのものが古典的かつ不明確であることが大きな障壁となる。

5. 代替法導入の最大の障壁となる規格・基準

日本の食品微生物試験法の多くは、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令および、食品、添加物等の規格・基準に組み込まれている。大腸菌群などの衛生指標菌試験法は、培地に接種する試料量や試験管数を変えることにより、陰性・陽性という定性的な規格・基準に半定量的な意味合いを持たせている。このような半定量的な試験法と細菌学的な規格が紐付きとなり一体化しているので、試験法だけを単独では変更できない^{4,5)}。

代替法を導入する際には、いわゆる公定法との同等性を評価するためのバリデーションを実施する必要がある。食品の種類ごとに異なる衛生指標菌試験法を個々にバリデートすることは、時間や経費がかかりすぎて現実的ではない。試験法を効率よくバリデートするには、ISO試験法のような、組成の異なる食品を横断的に試験できるHorizontal methodを作成することが必須となる。Horizontal methodを公定法として広く利用するためには、衛生指標菌が陰性・陽性という現行の規格・基準を、数的規制値に変更しなければならない。

6. 試験法にも適用される食品衛生法第11条違反

1) プラスチックシャーレの面積

プラスチックシャーレの規格を定めた、JIS K 0950の

適用範囲には、「この規格はバイオテクノロジー関連分野において、組織培養、細胞培養、微生物培養に用いるプラスチック製滅菌シャーレのうち使い捨てのものについて規定する。」と記されている。JIS規格とは別に、食品微生物試験で使用するシャーレの大きさは、成分規格等により内径9～10 cmで高さが1.5 cmと規定されている。以前に使用されていたガラス製の90 mmシャーレに対応する、プラスチックシャーレの規格は90Aシャーレで、蓋の外径が90±4 mm、全体の高さが15±2 mmと定められている。実際には、内径が最大でも87 mm (JIS規格には適合している) 程度のものしか市販されていない。内径が小さいシャーレを使用した検査は、規格・基準違反(第11条違反)であるのみならず、菌数計測法に影響する可能性がある。このような状況は、経済産業省と厚生労働省の縦割り行政のあおりを受けた一つの事例である。

2) 不明確な乳糖ブイヨン発酵管(LB培地)の組成

同じLB培地という名称であっても、組成や滅菌方法が成分規格に明記されているものがある一方で、氷菓と冷凍食品の試験法のように、LB培地の組成すら記載されていないものもある(表1)。食肉製品等の規格検査には、pH指示薬として0.024%のBTBが添加されたLB培地が指定されているが、清涼飲料水等の推定試験用のLB培地に加えるBTB濃度は示されていない。規格・基準検査には、組成や滅菌方法が異なるLB培地を、検査対象食品群ごとに使い分けなければならないという、目を疑うような不都合がある。

乳及び乳製品の検査に使用するLB培地は、間欠滅菌することになっている。より新しく制定された“飲食の用に供する氷雪以外の氷雪”の試験法では、LB培地を「高圧滅菌し、すみやかに冷却する。間欠滅菌法を採用しても良い。」と記載されている。LB培地を間欠滅菌する代わりに高圧蒸気滅菌しても、試験結果を左右することはなさそうではある。しかし、法令遵守というならば、乳及び乳製品の大腸菌群試験用のLB培地は、間欠滅菌しなければならない。

表2. 腸炎ビブリオの成分規格がある食品の均質化法

食品	腸炎ビブリオ	細菌数	大腸菌群	均質化
a) (非冷凍) ゆでだこ	定性	なし	なし	S
b) 冷凍ゆでだこ	定性	あり	あり	H + S
喫食時に加熱不要の				
a) (非冷凍) ゆでがに	定性	なし	なし	S
b) 冷凍ゆでがに	定性	あり	あり	H + S
a) 生食用鮮魚介類	MPN	なし	なし	S
b) むき身にした生食用かき	MPN	あり	あり	H + S
b) 生食用冷凍鮮魚介類	MPN	あり	E. coli	H + S

a) 平成13年に成分規格が新設

b) 平成13年以前に既存の成分規格があった（冷凍食品など）

H: ホモジナイザー, S: ストマッカー

3) 乳糖ブイヨン発酵管 (LB培地) の性能が異なる

組成が明らかな2種類のLB培地を用いて、大腸菌群の完全試験の結果の差異を種々の食品で検討した（須田ら、第33回学術総会講演要旨集）。栄養分が少ないLB培地でのみガスを産生する株はなかったが、栄養分が豊富なLB培地でのみガスを産生する株は、344株中43株（12.5%）もあった。EMB培地上の集落の形状や色調が異なる12株は、以下のような異なる8菌種に同定された。*Pantoea* sp.: 3株, *Enterobacter cloacae*: 2株, *Raoultella terrigena*: 2株で, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter sakazakii*, *Klebsiella pneumonia*, *Leclercia adecarboxylata*がそれぞれ1株ずつであった。この実験データは、LB培地の性能差を明らかにした最初の報告であり、完全試験にいかなる組成のLB培地を選択するかによって、成分規格への適否に大きな影響を与える危険性があることを注意喚起するものである。LB培地の組成の違いや不明確さは、食品衛生法の規格・基準違反にも問われかねない重要な問題である。

4) 実際的ではない試料の採取法と均質化法

食肉製品、鯨肉製品および魚肉ねり製品では、「切断すべき表面をアルコール綿でよくふいた後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から25gを無菌的に採り試料とする。」となっている。食品衛生上問題となる細菌汚染は、食肉製品などの表面付近では無視してもよく、中央部付近だけが重要であるとは考えられない。大腸菌群検査の意義は、中心部が63℃で30分間以上加熱されたことの指標であるとされているので、中央部の検体採取が必須であるという理由があるかもしれない。たとえそのような理由があったとしても、平天や竹輪の中央部から試料を採取することは、事実上不可能である。「中央部から採取」の表現を「中央部を含む部分から採取」と変更しても、大腸菌群検査の目的は達せられるはずである。

食品試料の希釈液として、生理食塩水、リン酸緩衝液、ペプトン加生理食塩水を使い分ける必要がある^{2, 5)}。多くの固形食品では、乳剤作製用にホモジナイザーが指定されているが、平成13年に告示された腸炎ビブリオ

試験法ではストマッカーを使用することになっている（表2）。「冷凍ゆでだこ」や「生食用生鮮魚介類」などでは、平成13年以前から大腸菌群陰性等の規格・基準が告示されており、これに腸炎ビブリオ陰性の成分規格が追加された。既存の試験法（成分規格）を修正しないままで、新たな試験法を追加した弊害により、ホモジナイザーとストマッカーを使い分けて、同一食品から2種類の方法で10倍乳剤を調製しなければならない不都合が生じてしまった。

5) 国や地方自治体等での検査は？

日本の食品微生物試験法の複雑さや不明確さは、検査員に無用のストレスを与え、結果的に検査ミスを誘発しかねない。国や地方自治体の機関においても、食品の違法性（11条違反）を、違法な試験法（11条違反）で検査している可能性は否定できない。違法な試験法が原因となり、規格・基準違反と認定された食品が、実際には規格・基準適の可能性があるし、その逆のことも起こりうる。違法な検査結果に基づいて、元来は規格・基準適の食品が、回収・廃棄されるようなことになれば、それに伴う資源やエネルギーの無駄遣いになる。最悪の場合には、会社の倒産という危機にもつながりかねない事態は、看過できない。

7. 衛生指標菌として何が適切か

大腸菌群とは、乳糖を分解してガスを産生する菌群と定義されているが、同一菌種であってもガス非産生株や乳糖非分解・乳糖遅分解株が存在する。例えば、大腸菌の約5%は乳糖非分解で、*Pantoea agglomerans*では約40%しか乳糖を分解できない。乳糖分解酵素は保有するが、膜移送酵素が欠落しているために、表現型が乳糖非分解となる菌も存在する。指標菌の元来の目的を考えれば、これらの菌を乳糖分解性の大腸菌群と区別する理由がない。乳糖の分解に伴うガス産生性をダーラム管で観察する際に、微量のガスを見逃す可能性もある。

衛生指標菌として、大腸菌群よりも腸内細菌科菌群がより適切であることは食中毒事例から説明できる。その一つは、サルモネラ食中毒の原因食品であったイカ菓子から、大腸菌群数に比べてサルモネラが約10倍も多く

表3. イカ菓子の衛生指標菌とサルモネラ

検体	生菌数 (cfu/g)	大腸菌群 (cfu/g)	サルモネラ (cfu/g)
1	1.7×10^8	5.2×10^2	9.4×10^3
2	5.5×10^7	7.0×10^3	9.7×10^4
3	1.7×10^7	1.0×10	1.0×10^2
4	8.0×10^6	1.9×10^2	6.0×10^2
5	7.0×10^7	2.6×10^3	7.7×10^4
6	2.3×10^7	1.7×10^2	1.6×10^3

千葉県衛生研究所のデータを改変して引用

検出された報告¹³⁾である(表3)。大腸菌群が検出されなかったアイスクリームが、サルモネラ食中毒の原因食品となった事例もある。腸内細菌科菌群を指標菌とすれば、このような食品からでも、サルモネラや赤痢菌などの乳糖非分解菌も、指標菌として同時に検出できると考えられる^{1,2)}。

糞便系大腸菌群とは、大腸菌群のうちで44～45.5℃の高温域でも発育可能な菌群である。元来の標的である大腸菌以外にも、自然界に常在するクレブジェラ、エンテロバクター、サイトロバクターなどが、44℃以上の高温条件下でも発育可能である。したがって、糞便系大腸菌群は、必ずしも糞便汚染の最適な指標菌であるとはいえない。糞便系大腸菌群の問題を論じた、「Closing the door on the fecal coliform assay」というタイトルの、興味深い米国の研究者の報告がある⁸⁾。米国のマスメディアは、レストランで出された紅茶に高濃度の糞便系大腸菌群が検出されたのは、紅茶に糞便が混入したことを意味すると報道した。しかし、実際に紅茶から分離されたのは、クレブシエラとエンテロバクターであり、大腸菌は検出されなかったことから、紅茶が糞便汚染されたとはいえないと反論した。同時に、レストランで出されたアイスティーの64%から、 10^3 cfu/ml以上の糞便系大腸菌群が検出されたが、食中毒事例の報告はなかったことも付け加えた。論文の著者は、糞便系大腸菌群の検査は長年多くの誤解を招いてきたので、その有用性はすでに失われたと論評している。古い規格・基準に矛盾があっても、問題点を容易には変更しないという姿勢は、日本だけではなさそうである。

大腸菌群や糞便系大腸菌群試験法では、同一菌種であっても乳糖からのガス産生性が異なることは前述のとおりである。一方、分類学的な位置づけが明確な大腸菌は、約95%の菌株がβ-グルクロニダーゼを産生する。腸内細菌科菌群は例外なしにブドウ糖を発酵し、プレシオモナス・シゲロイデス以外のすべての菌はオキシダーゼ反応が陰性である。大腸菌と腸内細菌科菌群の例外の少ない生化学的性状は、代替法を開発する際にも、安定した科学的評価が得られやすい。大腸菌をヒトや動物の糞便汚染の指標菌とし、腸内細菌科菌群は、環境汚染や加熱の指標とするのが、今のところはベストマッチと考えられる。

8. 黄色ブドウ球菌は、食中毒菌？ 衛生指標菌？

黄色ブドウ球菌は食中毒の原因となりますか？と問えば、今更何を聞くのかと訝りながら、イエスと答える人が多いと推察される。この答えは間違いではないが、正解でもない。ブドウ球菌食中毒の場合、菌が食品中で増殖する際に産生するエンテロトキシンが病原因子であり、菌の存否は食中毒の発症とは無関係である⁶⁾。黄色ブドウ球菌の汚染を受けた食品が、常温に長時間放置されても、その調理方法や細菌汚染状況によっては、食中毒の原因となる場合と、ならない場合がある。このような現象を、食中毒の推定原因食品を使用して実証した事例を紹介する。食品内毒素型食中毒の診断は、菌ではなくて毒素の検査で原因食品を特定する必要がある³⁾ことを示す一例でもある。

ブドウ球菌食中毒が疑われた事例で、患者の食べ残し食品はなかったが、同時に調理した3種類のハモ料理が冷蔵庫に保管されていた。すべてのハモ料理から黄色ブドウ球菌を約 10^3 cfu/g検出したが、いずれもエンテロトキシンは陰性であったので、原因食品とは判定できなかった。ハモ料理の調理状況、生菌数、水分活性は以下のとおりであった。

①ハモチリ用ハモ：生菌数 10^6 cfu/g、水分活性0.992

ハモを熱湯で湯通し⇒冷風で冷却⇒冷蔵保存

②湯葉揚げハモ：生菌数 10^9 cfu/g、水分活性0.987

生のハモに小麦粉を付け⇒切り湯葉をまぶす⇒冷蔵保存

③寿司用焼きハモ：生菌数 10^6 cfu/g、水分活性0.972

ハモに薄い塩をふりかけて両面を素焼き⇒醤油と味噌をかけながら両面を焼く⇒冷風で冷却⇒冷蔵保存

3種類のハモ料理が何らかの手違いで、夏期(8月)に長時間室温に放置(従業員は否定)されていた可能性がある。これらの食品を35℃で保存して菌数とエンテロトキシンの消長を調べた(図2)。①のハモチリ用ハモでは、黄色ブドウ球菌が同時汚染菌と競合した結果、エンテロトキシンを産生する菌数までは増殖できなかった。②の湯葉揚げハモは同時汚染菌数が非常に多かった(10^9 cfu/g)ので、黄色ブドウ球菌は全く増殖できなかった。③の寿司用焼きハモでは、黄色ブドウ球菌は他の同時汚染細菌よりも発育が速く、12時間後には菌数が 10^8 cfu/gオーダーに達し、エンテロトキシンも検出された。寿司用焼きハモを喫食しなかった人は食中毒を発症しなかったという疫学情報も得られた。①のハモチリ用ハモと③の寿司用焼きハモは、汚染細菌数や黄色ブドウ球菌数に差はなかったが、③の寿司用焼きハモでのみエンテロトキシンが産生された。この要因として、味付けに使用された調味料に含まれる塩類や糖類により、寿司用焼きハモの水分活性が低下(0.972)したことが挙げられる。水分活性の低下により、同時汚染菌の発育が抑制され、結果的に黄色ブドウ球菌にとって都合

図2. 3種類のハモ料理を35℃で保温後の菌数と毒素
実線, 黄色ブドウ球菌数; 点線, 生菌数; ●, 寿司
用ハモ; ▲, ハモチリ; x, 湯葉揚げハモ

のよい増殖環境が整ったことになる。

以上のように、大量の黄色ブドウ球菌が食品に付着し、たとえ発育至適条件下に長時間放置されたとしても、食品の特性や状態によってはエンテロトキシンを産生しないこともある。したがって、黄色ブドウ球菌は、食品中のエンテロトキシンの存否を推定するための、指標菌的な細菌と位置づけるのが妥当である。

コアグラゼ陽性ブドウ球菌（黄色ブドウ球菌を含む）は、EUの統一食品微生物規準では加工衛生規準 (Process hygiene criteria) に使用されており、食品から 10^5 cfu/g 未満のコアグラゼ陽性ブドウ球菌が検出されても違反とはならない⁷⁾。リコールの対象となる食品安全規準違反 (Food safety criteria) は、菌数の許容限界値ではなくて、あくまでも食品中のエンテロトキシンの存否で決定されている。米国農務省の試験法 (MLG) は2011年に改訂され、そこでは、黄色ブドウ球菌は、生菌数、大腸菌、腸内細菌科菌群などとともに、衛生指標菌として取扱われている¹²⁾。

9. 最後 に

日本の食品微生物にかかわる規格・基準と試験法は、長年にわたり見直されないままのものが多く、国際動向から取り残された感否めない。試験検査に携わる人たちの多くが、微生物試験法の守旧性や無用な煩雑さに疑問を持っていることは容易に推察できる。衛生指標菌の代替法の導入を促進するためには、今までに告示・通知された細菌学的規格と試験法を個々に見直すのではなく、グランドデザインを明確にしたうえで、抜本的かつ系統的に改正することが大前提になると考える。

“公定法を改善しなければ” という使命感に基づき、2007年に国立医薬品食品衛生研究所内に設置された、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」での議論が進展して、食品微生物試験法が根本的に変わろうとしている。本委員会では、バリデーション・プロトコールに基づいた、いわゆる公定法の代替法としての、プロプラ

イエタリ法承認システムの構築も視野に入れている。稿を終えるにあたり、国内外の企業により開発された市販キット、装置、培地類のような、いわゆるプロプライエタリ法が、一刻も早く日本の食品微生物検査にも使用可能となることを祈ってやまない。

文 献

- 1) 浅尾 努: 腸内細菌科菌群の試験法. 月刊フードケミカル, **28**, 23-27 (2012).
- 2) 浅尾 努: 食品微生物検査の現状とこれから—衛生指標菌を考える. 食品工業, **55**, 46-56 (2012).
- 3) 浅尾 努, 木股裕子: 行政検査. 食品由来感染症と食品微生物. 仲西寿男, 丸山 務編, p. 58-67, 中央法規出版, 東京 (2009).
- 4) 浅尾 努: 衛生指標菌と規格基準の現状と今後—国際動向を踏まえて—このままで良いのか. 日本の食品細菌試験法—. 月刊 HACCP, **14**, 20-30 (2008).
- 5) 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).
- 6) Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H. and Kozaki, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiol. Infect., **130**, 33-40 (2003).
- 7) Commission Regulation (EU) No. 1141/2007, Amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of European Union.
- 8) Doyle, M. P. and Erickson, M. C.: Closing the door on the fecal coliform assay. Microbes, **1**, 162-163 (2006).
- 9) International Organization for Standardization, ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for validation of alternative methods. Geneva, Switzerland (2003).
- 10) International Organization for Standardization, 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. Geneva, Switzerland (2004).
- 11) International Organization for Standardization, ISO 7251. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*—Most probable number technique. Geneva, Switzerland (2005).
- 12) United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science: Quantitative Analysis of Bacteria in Foods as Sanitary Indicators, MLG 3.01 (2011).
- 13) 依田清江, 小岩井健司: イカ菓子由来の *Salmolletella* Oranienburg および *Salmonella* Chester による食中毒の集団発生. 千葉県衛生研究所研究報告, **23**, 20-22 (1999).