Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) による食品の衛生管理

千葉 隆 司

Management of Food Hygiene and Safety by Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)

Takashi Chiba

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health; 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan.

(Received August 3, 2021)

Advances in food production technology and newer distribution systems have made it easier to obtain fresh ingredients from both within and outside of Japan. Although convenient, mass distribution of food over wide areas involves the risk of expanding the health damage caused by foods. Comprehensive management from production to consumption, using systems, such as hazard analysis and critical control point (HACCP), is required to ensure the safety of foods. Improved inspection methods are also required to detect the effects of environmental changes on food. In this paper, we demonstrate the use of “Methods of Analysis in Health Science 2020” for food hygiene and safety management.

Key words——food hygiene; hazard analysis and critical control point; contamination source

はじめに

近年、グローバル化の進展に伴いわが国のライフスタイルは極めて多様になった。それに合わせて消費者が食に求めるニーズの幅は大きく広がり、現在の市場には優れた食味を保持しつつ、長期間保蔵できる食品が流通している。このような新しいタイプの食品の製造は、高い生産技術と品質管理の厳格化により成り立っており、原材料の受入れから製造、流通、販売に至る物流に加え、消費までの各段階で高いレベルの衛生管理が求められる。¹⁾

現在、食品の製造における代表的な衛生管理手法として hazard analysis and critical control point (HACCP) があり、わが国では昨年の法改正により、本手法の導入について義務化が図られた。HACCP では、各工程と最終製品について、試験検査等による安全性の評価を行う。

わが国での市販流通食品の微生物試験では、規格基準や規範が示されている項目では法令等に記載されたいわゆる「公定法」が用いられ、規格基準がな

い項目では、多くの場合で「食品衛生検査指針」や「衛生試験法・注解」、「ISO」等々に示された方法が参考にされる。公定法は、国内において公的に通用する確かな試験法である一方で、多くは検査に時間がかかる「培養法」が基本となっている。近年の食品流通は広域化が進んでおり、可能な限り迅速な検出法が求められる。これに加えて、企業での自主検査では簡便性やコストを低く抑えることも必要になる。このような課題に対し、近年、分子生物学的な手法を中心とした迅速な試験法が多く開発されている。

本稿では、食品の衛生管理に資する微生物試験の実応用例について、日本薬学会の環境・衛生部会が編さんする「衛生試験法・注解 2020」の内容を踏まえつつ解説をする。

1. 微生物による食品危害

東京都内の食品事情を見ると、製造量よりも消費量が圧倒的に多い。流通する食品の多くが海外を含めた流入品であることは、食品に関連した事故発生時の処理を複雑にする一因になっている。都が行う食の安全・安心に資する取り組みの中では、このような地域特性を踏まえた仕組みづくりが求められる。そこで、食品に関連する各種の調査等を行い、得られた結果はインターネット等を通じて随時提供

東京都健康安全研究センター (〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1)

e-mail: Takashi_Chiba@member.metro.tokyo.jp

本総説は、日本薬学会第 141 年会シンポジウム S41 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Causes of Food Complaints in Tokyo (2015-2019)

し、食の安全性確保の啓発を行っている。

具体例として、都内の保健所などに寄せられた食品の苦情を「苦情統計」として公開 (<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/kujou/index.html>) するとともに、発生頻度が高い事例は「食品安全アーカイブス」にまとめている (https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/foods_archives/publications/index.html)。

都内で発生した要因別食品苦情（過去5年間）を見ると、年間5000件程度の事案が発生している。この中で「カビの発生」として集計されている事案は、全体の2%に満たない (Fig. 1)。しかし実際には、異物や腐敗・変敗、異味・異臭、変色・変質などで届け出られた苦情事例の中に、試験によってカビ・酵母が原因とされる例が散見される (Fig. 2)。このような事例を踏まえれば、食品に対するカビ・酵母の危害性は無視できる数ではない。

2. 食品のカビ・酵母試験法

食品の微生物検査では、対象となる食品に対して危害性を有する菌を特定（同定）する作業が必要になる。¹⁾ この中で、カビ・酵母の試験は培養に続く形態観察、生理生化学性状を利用した「表現性状試験」と、遺伝子解析を中心とした「分子生物学的試験（迅速同定法）」に大別される。これらの試験法は、衛生試験法・注解2020の中ではそれぞれ「1.2.2 真菌」や「1.2.3.1 細菌および真菌の迅速同定法」としてまとめられている。

食品のカビ・酵母試験では、従来から表現性状試験が広く用いられてきた。しかし、長時間の培養や

Fig. 2. Deterioration of Food Caused by Fungi (Molds and Yeasts)

煩雑な操作を伴う本法は、日常的な衛生管理に用いる方法とは言い難く、加えて、実際には調理・加工等により試験品中の微生物が死滅・損傷し、培養試験が適用できないケースもある。²⁾ 近年、このような事例に対しては各種の分子生物学的な方法が利用され、以前では対応が難しかった食品苦情事例の解析が、積極的に行われるようになってきている。このような手法は食品中での微生物挙動の解明に加え、製造工場内等での汚染実態調査や菌叢解析にまで応用されており、得られた知見に基づいたさらに新しい食品衛生管理の開発・導入も期待されている。

3. 衛生管理での実例

カビ・酵母に関連した衛生管理の実応用例として、2つの事例（チルドゆで麺の異物、レトルト食品の異臭）で実施した対応を示す。

3-1. 表現性状の確認（衛生試験法・注解 2020「1.2.2 真菌」に準拠） チルドゆで麺の事例では、苦情部位を肉眼及び実体・光学顕微鏡下で観察（直接鏡検）した後、異物部分を無菌的に採取し、ポテトデキストロース寒天（PDA）培地（栄研化学）に接種した。また、生産工場内で採取した最終/中間製品、及びふき取り検体についても 10 倍乳剤等を PDA 培地へ接種した。それぞれの培地について 25℃、4-7 日間培養した後、発育した真菌について形態観察を行った。

また、レトルト食品の事例では食品全体を直接鏡検した後、10 倍乳剤を作製して PDA 培地で同様の培養を行った。

3-2. 分子生物学的試験（衛生試験法・注解 2020「1.2.3.1 細菌および真菌の迅速同定法」を応用）

3-2-1. サンプルからの DNA 抽出 ゆで麺の事例では、食品中に認められた異物と各検体からの分離株をサンプルとした。また、レトルト食品の事例では検体の 10 倍乳剤の一部（2 mL）をサンプルとし、それぞれアルカリ煮沸法²⁾で DNA を抽出した。

3-2-2. 遺伝子解析 rRNA 遺伝子（rDNA）中の LSU-D1/D2 及び ITS 領域に設定したプライマーを用いたダイレクトシーケンス法による塩基配列解析と分子系統解析²⁻⁵⁾を実施した。

3-3. 異臭生成の確認（スチレン生成試験）
〔衛生試験法・注解 2020「1.2.2 真菌」及び「4.1.1.3 理化学的試験、49）揮発性有機化合物、(1)-1 P&T-GC/MS による定量」を応用〕

3-3-1. 供試菌株 当センター保存株（*Candida zeylanoides*；食品由来等 8 株、*Saccharomyces cerevisiae*；食品由来 1 株）、に加え、独立行政法人製品評価技術基盤機構から購入した *Debaryomyces hansenii*/*Candida famata* (NBRC0083) 1 株を供試した。

3-3-2. スチレン生成試験 既報⁶⁾を参考に、GY 培地にケイ皮酸を加えた培地（0.01% GYC 培地）を用いた。また、市販焼き芋（滅菌及び未滅菌）の 10 倍乳剤を作製し、それぞれに被検菌を添加した。それぞれ、25℃で 4 日間培養した後、培養液の遠心上清を MillQ 水で 100 倍に希釈し、ページ & トラップ（P&T）GC/MS システム（P&T 部：AQUAPT 5000J PLUS（ジーエルサイエンス）、

Fig. 3. A Case of Foreign Material in Boiled Noodles (Dematiaceous Fungi)

GC/MS 部：7890A（アジレント）/JMS-Q1050（日本電子）を用いて揮発性成分の分析を行った。

事例 1 チルドゆで麺の黒色異物

本事例は、クレームの原因菌（起因菌）が自然界に広く分布する菌種と推定され、¹⁾汚染経路の特定においてより詳細な株レベルの識別が必要になった事例である。

チルドゆで麺中に黒色の異物が認められ、直接鏡検では黒色菌糸様部分が多数認められた（Fig. 3）。しかし、培養検査ではカビの発育が認められず、本品は包装後に蒸気殺菌工程があったことから、起因菌は既に死滅していたものと推定された。そこで、異物の一部について塩基配列解析を行った結果、同異物は *Cladosporium sphaerospermum* の菌塊であることが判明した。

クレームがあった製品が未開封であったことから、異物は製造工程のどこかで混入したものと推定された。そこで、異物（カビ）の混入経路を推定するために工場内で採取した中間製品と製造ラインからふき取り検体（計 15 検体）を採取した。培養検査により、11 検体から真菌が検出され、このうち 5 検体から *C. sphaerospermum* が分離された。

一方、*C. sphaerospermum* は食品を含めた環境

中から広く分離されるクロカビの一種であり、菌種を同定しただけでは混入（汚染）経路の推定には至らなかった。そこで、分離した5株に異物由来株を加えた計6株を用いた分子系統解析を行った。その結果、工場内で検出した *C. sphaerospermum* は大きく2つの系統に分かれることが判明し、異物由来株は製造ライン最上流部の給水管付着物（菌塊）から分離した株（130018）と同系統（ブートストラップ値 96%）であることが示された。

以上の結果から、本事例は食品製造ラインの清掃が不十分であったため、ライン上流部（給水管周辺）で *C. sphaerospermum* が繁殖の後に剥がれ落ち、混入したものと推定された。そこで、改めて細部配管を含む製造ライン（原材料から製品包装まで）を定期的に清掃・確認する対応を取った。

事例2 レトルト食品の異臭

本事例は、機器分析を含む試験検査を複合的に利用し、クレームの原因として微生物の関与を否定した事例である。

都内で発生する食品の苦情のうち、食品中でカビ・酵母が発する異臭による届け出事例が少なくない。⁷⁾ このうち、*Pichia anomala*（現在は *Wickerhamomyces anomalus* に菌名変更）に代表される酢酸エチル産生酵母による苦情（シンナー臭）の頻度が高い。^{1,2)} 一方、都内での発生頻度は多くないが、過去事例で特定の酵母が食品に含まれるケイ皮酸を分解し、スチレンを産生することで異臭（ガソリン/灯油/石油臭）を生じたケースが報告されている。⁶⁾ 本事例はレトルト製の焼き芋で開封時に強い石油様の異臭を認め、届け出時点では酵母の関与が疑われていた。クレーム品は外観に異常を認めず、培養検査でもカビ・酵母の発育が認められなかった。製造に加熱工程があったため、原因菌が死滅している可能性が疑われたため、食品からDNAを直接抽出し、塩基配列解析を行った。その結果、酵母の一種 *C. zeylanoides* のDNAが検出された。

同菌種については、スチレン産生が報告されていなかったことから、⁸⁾ 当所の保存株（8株）を対象にスチレン産生試験を実施した結果、すべての株でスチレンの産生は認められなかった（Figs. 4 and 5）。また、スチレン以外の異臭産生を確認するため、*C. zeylanoides* の市販焼き芋（滅菌/未滅菌）への接種試験を行った。その結果、臭気の異常はみられ

Fig. 4. Yeasts Growth in 0.01% GYC Medium
a) *D. hansenii*, b) *C. zeylanoides*, c) *S. cerevisiae*.

Fig. 5. Detection of Food Off-flavor (Styrene) Using Purge and Trap-GC/MS Method

ず、機器分析においても微量のアルコール産生以外は認めなかった。

以上の結果から、クレーム品で検出された *C. zeylanoides* による臭気産生の可能性は否定された。また、同時に行った理化学分析により異臭成分が灯油に類似していることが判明し、この結果を基に製造業者へ確認したところ、製品の加工に使用していた灯油が混入していた可能性が疑われ、工程を見直す対応を取った。

4. まとめ

本稿では、食品の安全性を微生物学的な側面から確保するための各種の試験検査について、実応用例を基に紹介した。食品の事故・苦情を低減していく過程では、個々の事例について試験検査を通じて原因を究明した上で、得られた知見を蓄積・共有し、衛生管理全体の底上げをすることが求められるが、実際の微生物試験では、起因菌の死滅や損傷、難培養な菌種等により培養法を中心とした表現性状試験が適用できない例が少なからず存在する。^{2,9)} そのよ

うな場合は分子生物学的な試験法が選択されるが、本法は迅速性や客観性にも優れていることもあり、ともすれば、すべて分子生物学的な試験法で賄えるとの見方もある。しかし、事例2でも示した通り、実態解明の最終段階では危害が発生した状態を確認するための「接種試験/再現試験」が必要になる例も存在する。さらに、衛生管理に資する多角的な事例解析の中では、過去の事例との菌株比較も求められ、各事例において可能な限り菌株を分離し、ストックしておくことも重要な作業になる。

上記に加え、実際の衛生管理においては、試験法の選択において幅広い視野を持つ必要がある。近年、試験検査の方法が大きく進展した結果、それぞれが専門特化している。結果として、試験を実施する際の参考成書は「微生物試験」と「理化学試験」のような形で分冊化され、内容についても細分化されている場合が多い。そのような中、「衛生試験法・注解」は微生物試験法について表現性状試験から分子生物学的な試験法までを解説している上、機器分析法、遺伝毒性試験法、放射能試験法などの一般試験法から飲食物、環境の試験法までを1冊で幅広く網羅した成書である。今回、衛生試験法・注解から食品事故の実態解明に資する試験法のヒントを得ることができた。このことから、改めて食品の衛生管理に携わる当学会の会員を中心に、同書の積極的な活用を期待したい。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Morozumi S., Fujikawa H., Wauke T., Chiba T., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H.*, **55**, 3–12 (2004).
- 2) Chiba T., Wauke T., Sadamasu K., Yano K., Morozumi S., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **48**, 1–7 (2007).
- 3) Kurtzman C. P., Robnett C. J., *J. Clin. Microb.*, **35**, 1216–1223 (1997).
- 4) White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., “PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications,” ed. by Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., Academic Press, San Diego, 1990, pp. 315–322.
- 5) Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 1596–1599 (2007).
- 6) Morozumi S., Wauke T., Tamura Y., Kudoh Y., *Jpn. J. Food Microbiol.*, **9**, 113–119 (1992).
- 7) Fujikawa H., Wauke T., Morozumi S., *Jpn. J. Food Microbiol.*, **22**, 24–28 (2005).
- 8) Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., “The Yeasts: A Taxonomic Study,” 5th ed., Elsevier, Amsterdam, 2011.
- 9) Takahashi Y., Chiba T., Inomata A., Wauke T., Kai A., Yano K., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H.*, **59**, 161–165 (2008).