

- 6) H. Takahashi, S. Handa, B. Kimura, M. Sato, A. Yokoi, S. Goto, I. Watanabe, T. Koda, K. Hisa, and T. Fujii: Development of Multilocus Single Strand Conformational Polymorphism (MLSSCP) Analysis of Virulence Genes of *Listeria monocytogenes* and Comparison with Whole Genome DNA Typing *Int. J. Food Microbiol.* 118 (2007) 274–284
- 7) Y. Tanaka, B. Kimura, H. Takahashi, T. Watanabe, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii: Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *J. Appl. Microbiol.* in press (2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03652.x)
- 8) B. Kimura, R. Kimura, T. Fukaya, K. Sakuma, S. Miya, and T. Fujii: Growth and toxin production of proteolytic *Clostridium botulinum* in aseptic steamed rice products at pH 4.6–6.8 packed under modified atmosphere using a deoxidant pack. *J. Food Prot.* 71, (2008), 468–472.
- 9) H. Takahashi, B. Kimura, Y. Tanaka, M. Mori, A. Yokoi, and T. Fujii: Use of single-strand conformation polymorphism of amplified 16S rDNA for grouping of bacteria isolated from foods. *J. Food Prot.* 71 (2008) 839–844.
- 10) B. Kimura, Y. Sekine, H. Takahashi, Y. Tanaka, H. Obata, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii: Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Meth.* 72 (2008) 313-320.
- 11) K. Fujioka, P. Geis, M. Saito, H. Matsuoka: Visualization of Yeast Single-cells on Fabric Surface with a Fluorescent Glucose and Their Isolation for Culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 685-688 (2007).
- 12) K. Fujioka, I. Kozono, M. Saito, H. Matsuoka: Automatic mapping of viable microbial cells distributed in the surface layer of cotton fabrics. *Biocontrol Science*, 12, 31-34 (2007)
- 13) K. Yamada, M. Saito, H. Matsuoka, N. Inagaki: A Real-time Method of Imaging Glucose Uptake in Single, Living Mammalian Cells. *Nat. Prot.* 2, 753-762 (2007)
- 14) H. Kodaka, S. Mizuochi, M. Saito, H. Matsuoka: Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Japanese surface waters. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1112-1118(2007).
- 15) Y. Yamada, N. Yamaguchi, M. Ozaki, Y. Shinozaki, M. Saito, H. Matsuoka: An instant Cell Recognition System Using Microfabricated Coordinate Standard Chip Useful for Combinable Cell Observation with Multiple Microscopic Apparatus. *Microsc. Microanal.* 14, 1-7 (2008)
- 16) N. Iritani, T. Seto, H. Hattori, K. Natori, N. Takeda, H. Kubo, T. Yamano, M. Ayata, H. Ogura, Y. Seto.: Humoral immune responses against Norovirus infection of children. *J. Med. Virol.* 79:1187-1193.(2007)
- 17) 松岡英明：微生物検査法のバリデーションの概略 “食品分析法の妥当性確認ハンドブック” (永田忠博、後藤哲久、丹野憲二、安井明美、湯川剛一郎、編) 第4章1節、サイエンスフォーラム (2007) pp189-198.
- 18) 松岡英明：技能試験の必要性と標準化の動向. *NISSUI TECHNOMEDIA* 7, 2-7 (2007).

19) 齊藤美佳子、松岡英明：微生物の迅速検出法。日本防菌防黴学会誌 36, 99-105 (2008).

平成 20 年度

- 1) 浅尾 努、河合高生 (2008) 特集 微生物検査の国際規格への対応 食品の衛生指標菌試験法の現状と今後、食品と開発、43 : 7-10.
- 2) 浅尾 努 (2008) 特集 検査態勢の無駄を見直す ～微生物検査とアレルギー管理～ 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
- 3) Y. Tanaka, B. Kimura, H. Takahashi, T. Watanabe, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii. Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 1283-1293.
- 4) B. Kimura, R. Kimura, T. Fukaya, K. Sakuma, S. Miya, and T. Fujii. Growth and toxin production of proteolytic *Clostridium botulinum* in aseptic steamed rice products at pH 4.6 – 6.8 packed under modified atmosphere using a deoxidant pack. *J. Food Prot.* 71 (2008) 468-72.
- 5) H. Takahashi, B. Kimura, Y. Tanaka, M. Mori, A. Yokoi, and T. Fujii. Use of single-strand conformation polymorphism of amplified 16S rDNA for grouping of bacteria isolated from foods. *J. Food Prot.* 71 (2008) 839-842.
- 6) B. Kimura, Y. Sekine, H. Takahashi, Y. Tanaka, H. Obata, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii: Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Meth.* 72 (2008) 313-320
- 7) B. Kimura, H. Takahashi, S. Hokimoto, Y. Tanaka, and T. Fujii. Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formally *P. histaminum*) at low pH. *J. Appl. Microbiol.* In press (2009).
- 8) H. Takahashi, S. Miya, B. Kimura, K. Yamane, Y. Arakawa, and T. Fujii. Difference of Genotypic and Phenotypic Characteristics and Pathogenicity Potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between Clinical and Environmental Isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis*, 45 (2008) 150-158.
- 9) S. Miya, B. Kimura, M. Sato, H. Takahashi, T. Ishikawa, T. Suda, C. Takakura, T. Fujii and M. Wiedmann. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (2008) 239-249.
- 10) K. Honjoh, K. Fujihara, T. Haraguchi, Y. Ono, H. Kobayashi, H. Hiwaki, H. Kamikado, S. S. Jang, S. Ryu, and T. Miyamoto, (2008) Subtyping of *Listeria monocytogenes* based on nucleotide polymorphism in the *clpC*, *inlA*, *hlyA*, and *plcA* genes and rapid

- identification of *L. monocytogenes* genetically similar to clinical isolates. *Food Science and Technology Research*, 14(6): 557-564
- 11) Hansman GS, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N: Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams, *J Food Protect*, 71, 1689-1695 (2008)
- 12) 有田知子、木村博一、野田 衛、西尾 治: パンに含まれるノロウイルスの回収法の検討, *感染症学雑誌*, 82, 473-475 (2008)
- 13) 野田 衛: ウイルス性食中毒の検査, *臨床と微生物*, 585-591 (2008)
- 14) 五十君静信: 微生物試験法の国際規格にどう対応していくか, *食品と開発*, 43, 4-6 (2008)
- 15) 五十君静信: 食品からの微生物検査標準法の検討~これまでの経緯とこれからの展望~, *月刊フードケミカル*, 24, 51-54 (2008)
- 16) 五十君静信: 食品の微生物試験法を国際規格にどの様に対応していくか, *月刊 HACCP*, 14, 20-29 (2008)
- 17) E. Araki, K. Takayama, M. Saito, H. Matsuoka, "Separation of Viable Histamine-Producing Bacteria from Yellowtail Meat Components by Density Gradient Centrifugation." *Biocontrol Sci.* 14, 31-34 (2009)
- 18) 斉藤美佳子、松岡英明 "微生物の迅速検出法" *日本防菌防黴学会誌* 36, 99-105 (2008)
- 19) 斉藤美佳子、松岡英明 "微生物の迅速検出法" *クリーンテクノロジー* 18 (11), 1-5 (2008)
- 20) 島北寛仁、斉藤美佳子、松岡英明 "微生物迅速検査装置「バイオプローラ」" *食品工業* 51(16), 34-42 (2008)
- 21) 荒川英二、甲斐明美: 腸炎ビブリオの標準試験法作成へ向けての検討, *月刊フードケミカル*, 2008-7, 2008.
- 22) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *J Virol.* 82(15):7336-7345 (2008)
- 23) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y. Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *J Clin Microbiol.* 46:2406-2409 (2008)
- 24) 秋場哲哉、田中達也、新井輝義、林志直、森功次、野口やよい、永野美由紀、吉田靖子、矢野一好: 細菌添加培養処理によるカキ等からのノロウイルス検出率の向上, *食品衛生学雑誌*. 2008, 49, 6, 407-410.
- 25) 秋場哲哉、尾畑浩魅、林志直、森功次、野口やよい、永野美由紀、仲真晶子、甲斐明美、矢野一好: 細菌の生物活性を利用したカキからのノロウイルス検査法の改良, *東京都健康安全研究センター年報*. 2008, 59, 57-61.



# 食品の衛生指標菌試験法の現状と今後

大阪府立公衆衛生研究所 浅尾 努、河合 高生

## 1. 衛生指標菌とは

衛生指標菌は安全指標菌 (Safety indicators) と品質指標菌 (Quality indicators) とに大別することができるが、細菌数 (一般細菌数) のように必ずしも明確に区別できないものもある。安全指標の範疇に入る菌群として、わが国では大腸菌群と“E. coli” (糞便系大腸菌群) が、欧米では大腸菌や *Enterobacteriaceae* (仮訳: 腸内細菌科菌群) などが利用されている。品質指標菌とは食品を直接的に腐敗・変腐させるような菌で、例えば *Pectinatus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* などが挙げられる。カビや酵母も食品の品質指標微生物として重要である。ここでは糞便汚染や環境汚染のような安全性に関わる指標菌を中心に述べる。

## 2. わが国の微生物規格基準の現状

食品衛生法で微生物規格が設けられている食品は、乳および乳製品の成分規格等に関する省令 (いわゆる乳等省令) で35種類、一般食品で29種類の合計64種類にも達する。乳等省令の食品には、細菌数 (26種類)、大腸菌群 (28種類)、総菌数 (2種類)、乳酸菌数 (3種類) を対象とした成分規格がある (表1)。ところが、乳製品の食文化が発達したEUの Microbiological Criteria for Foodstuffs (食品の微生物基準) ですら、わが国の乳等省令ほどは細かく分類されていない (表2)。わが国のように細菌数と大腸菌群の二重の衛生指標菌による成分規格が定められた食品 (25種類) は、EUの食品の微生物基準にはない。また、細菌数や大腸菌群による規制もなく、低温殺菌乳など9種類の乳製品で腸内細菌科

菌群、加熱処理乳から製造されたチーズなど3種類の乳製品で大腸菌に対する基準が設けられているだけである。食肉製品や冷凍食品などの一般食品29種類には、細菌数 (12種類)、大腸菌群 (14種類)、“E. coli” (7種類)、黄色ブドウ球菌 (3種類)、サルモネラ (4種類)、腸炎ビブリオ (7種類)、その他

表1 日本の乳等省令の成分規格

食品		成分規格	
1	牛乳、殺菌山羊乳、加工乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加糖れん乳、加糖脱脂れん乳、全粉乳、脱脂粉乳、クリームパウダー、ホエイパウダー、たんぱく質濃縮ホエイパウダー、バターミルクパウダー、加糖粉乳、調整粉乳、アイスマイルク、ラクトアイス (合計18品目)	細菌数 5万/ml以下	大腸菌群陰性
2	クリーム、アイスクリーム	細菌数 10万/ml以下	大腸菌群陰性
3	乳飲料	細菌数 3万/ml以下	大腸菌群陰性
4	特別牛乳	細菌数 3万/ml以下	大腸菌群陰性
5	濃縮乳、脱脂濃縮乳	細菌数 10万/ml以下	
6	無糖れん乳、無糖脱脂れん乳	細菌数 0/ml	
7	バター、バターオイル、プロセスチーズ、濃縮ホエイ		大腸菌群陰性
8	生牛乳、生山羊乳	総菌数 400万/ml以下	
9	発酵乳、乳酸菌飲料 (2種類)	乳酸菌数 1,000万/ml 又は 100万/ml以上	大腸菌群陰性

表2 EUの乳および乳製品の微生物基準 (Microbiological criteria)

食品	原料	食品安全基準	衛生管理基準
1	ミルクおよび液状乳製品 (低温殺菌製品)		腸内細菌科菌群
2	チーズ	加熱処理されたミルク、ホエイ	大腸菌
3	生ミルク	ブドウ球菌エンテロトキシン、サルモネラ	コアグララーゼ陽性ブドウ球菌
4	熟成チーズ	低温殺菌温度以下で加熱処理されたミルク	コアグララーゼ陽性ブドウ球菌
5		低温殺菌温度以上で加熱処理されたミルクあるいはホエイ	ブドウ球菌エンテロトキシン
6	未熟成のソフトチーズ (フレッシュチーズ)	低温殺菌温度以上で加熱処理されたミルクあるいはホエイ	ブドウ球菌エンテロトキシン
7	バター、クリーム	生ミルクあるいは低温殺菌温度以下で加熱処理されたミルク	サルモネラ
8	粉乳、ホエイパウダー		ブドウ球菌エンテロトキシン、サルモネラ
9	アイスクリーム*		サルモネラ
10	冷凍デザート		腸内細菌科菌群
11	乳児用乾燥食品と6ヶ月未満の乳児用食事療法用乾燥食品		サルモネラ、エンテロバクター・サカザキ
12	乳児用 (4ヶ月以上) 乾燥栄養補助食品		サルモネラ
13	乳児用および食事療法用のready-to-eat食品		リステリア・モノサイトゲネス

\*サルモネラのリスクが低い製造工程で製造されたか、あるいはサルモネラのリスクがある成分を含まないアイスクリーム (例外) ブドウ球菌エンテロトキシンは総菌数

の菌(5種類)を対象とした成分規格が設けられている。この詳細については日本食品微生物学会雑誌24巻第3号p134~143(2007)を参照されたい。成分規格以外にも、ソフトタイプおよびセミソフトタイプのナチュラルチーズや生ハムからリステリア・モノサイトゲネスが検出されたものは、食品衛生法第六条違反により回収しなければならないことが通知された。このように、わが国の食品の成分規格には、細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ことが明らかである。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。

### 3. わが国の微生物試験法の現状

わが国の衛生指標菌試験法は、定性的な成分規格に軽重の差をつけるために、培地に接種する試料量を変えている(表3)。例えば、食肉製品では10倍乳剤10mlずつを3本のBGLB培地に接種する(3g)。牛乳では原液、10倍および100倍希釈液1mlずつを、それぞれ2本のBGLB培地に接種する(2.22ml)。冷凍食品では100倍乳剤1mlずつを3本のEC培地に接種する(0.03g)。アイスクリーム類では10倍乳剤を1ml(0.1g)ずつ、冷凍食品では100倍乳剤を1ml(0.01g)ずつ、それぞれ2枚のデソキシコレート寒天培地で混積培養するようになっている。このような食品ごとに異なる試料の希釈倍率や、推定試験に使用する試験管数の相違が、わが国の衛生指標菌試験法を複雑にしている大きな原因の一つでもある。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。なお本文中に記載した培地の略語の説明を表4に示した。

昭和26年に制

表3 食品別の衛生指標菌試験法の比較

食品	推定試験用の培地	希釈液	培養温度(℃)	培地接種量
牛乳類	BGLB	規定なし	32~35℃	2.22ml
れん乳・粉乳等	BGLB	生理食塩水	32~35℃	0.222g
アイスクリーム類 (バター等)	デソ寒天	生理食塩水	32~35℃	0.2g
清涼飲料水等 粉末清涼飲料	BTB-LB	規定なし	35±1.0℃	11.1ml
		リン酸緩衝液		1.11g
冷凍食品	デソ寒天	リン酸緩衝液	35±1.0℃	0.02g
	EC		44.5±0.2℃	0.03g
食肉製品等	BGLB	ペプトン加生理食塩水	35±1.0℃	3.0g
	EC		44.5±0.2℃	0.5(0.55)g
				4種類
				3種類
				100倍以上の発

定された乳等省令に代表されるように、試験法を含む基本的な成分規格は長年改正されることなく現在に至っているため、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というジレンマに陥っている。

### 4. 衛生指標菌名は誤解を招く恐れがある

わが国の食品衛生法では、安全指標菌として、おもに大腸菌群と“E. coli”(日本独特の用語)の2種類が使用されているだけである。平成10年の「生食用食肉等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、これは食肉製品等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、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り、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。実際に、弁当及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」というような誤解を招きかねない文章も存在する。“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“E. coli”であると解釈される。“E. coli”(糞便系大腸菌群)とは、大腸菌群のうち44~45.5℃の高温域でも発育可能な菌群であるという、単なる培養手技上の名称である。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このような培養条件でも発育するので、糞便系大腸菌群は必ずしも糞便汚染の最適指標菌とはいえない。

### 5. 米国(FDA/BAM)とEU(ISO)の衛生指標菌試験法

#### ●大腸菌群および糞便系大腸菌群試験法

米国FDA/BAM(U. S. Food and Drug Administration/Bacterial Analytical Manual)とISO(International Organization for Standardization: 国際標準化機構)の大腸菌群および糞便系大腸菌群試験法は、わが国の方法とは異なり、推定試験に使用する液体培地はLST培地にはほぼ一本化されている。FDA/BAMの大腸菌群MPN試験法ではガス陽性の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培地へ移植し、いずれも一定時間培養後にガスの産生が認められた試験管を陽性としてMPN値を算出する。ISOではさらにEC培地からペプトン水培地後にインドール試験を実施する。

大腸菌群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法とISO法ではいずれもVRBA培地が指定されている。日本の告示法・通知法のようなEMB培地での確定試験と、それに続くグラム染色やLB培地での完全試験がないので、より簡便・迅速化された試験法といえる。

表4 本文中に記載した培地名などの略語

【液体培地】
EC(Escherichia coli)
BGLB(Brilliant green lactose bile)
LB(Lactose broth)
LST(Lauryl sulfate tryptose)
EE(Enterobacteriaceae enrichment)= (Bufferd brilliant green bile glucose)
MMGA(Minerals-modified glutamate)
BPW(Bufferd peptone water)
【寒天培地】
EMB(Eosin methylene blue)
VRBA(Violet red bile agar)
VRBG(Violet red bile glucose)
TBX(Tryptose bile X-GLUC)
MYP(Mannitol egg yolk polymyxin)
【酵素基質】
MUG(4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide)



## ●大腸菌試験法

ISOの平板法は、酵素基質培地であるTBX培地と試料液の混釈培養法である。TBX培地で混釈後に37℃で4時間前培養して損傷菌の回復をはかり、その後所定の培養温度である44℃まで上昇させる方法も示されている。ISOのMPN法は、MMGA培地で培養後TBX培地に面線培養する。FDA/BAM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、および普通寒天培地で発育した菌のグラム染色性およびIMViC試験により大腸菌を同定する。FDA/BAMの平板法は、試料をVRBA培地で混釈した後、酵素基質培地であるVRBA-MUG培地を重層して培養する。

## ●腸内細菌科菌群試験法(ISO)

ブドウ糖分解性を指標とする腸内細菌科菌群は、乳糖分解性を指標とする大腸菌群よりもより広い腸管系食中毒菌をカバーできる衛生指標菌である。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培地が使用されている。VRBG培地で混釈・重層し、培養後に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培地に面線培養する。発生した集落のうち、ブドウ糖を分解しオキシダーゼ陰性の菌を腸内細菌科菌群と同定する。

## 6. EUの新しい食品の微生物基準

2006年1月1日から施行されたEUの新しい食品の微生物基準は、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基

表5 EUの衛生管理基準の抜粋

食品区分	微生物	サンプリングプラン		菌数限界値		参照試験法	適用場所
		n	c	m	M		
粉乳およびホエイパウダー	腸内細菌科菌群	5	0	10cfu/g		ISO21528-1	最終製品
	コアグラールゼ陰性ブドウ球菌	5	2	10cfu/g	100cfu/g	EN/ISO6881-1 or-2	最終製品

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、原材料を見直す等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基準は、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、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基準のみである。合計28の食品カテゴリーの衛生管理基準うち、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の微生物基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。

上述のEUの食品微生物基準は、施行されて約2年後の2007年12月5日には早くも一部改正された。Dried follow-on formula(乳児用乾燥栄養補助食品)の食品安全基準にサルモネラが、衛生管理基準に腸内細菌科菌群が新たに追加されたこと、乳児用(6ヶ月齢未満)乾燥食品および食事療法用乾燥食品に推定セレウス菌(Presumptive *Bacillus cereus*)が衛生管理基準に採用されたことが大きな改正点である。推定セレウス菌とは、MYP寒天培地上でマンニトール非分解かつ卵黄反応陽性の集落を、他の類似菌と鑑別試験なしに同定するものである。この改正に際して、欧州食品安全機関(European Food Safety Authority: EFSA)は、腸内細菌科菌群をサルモネラと *Enterobacter sakazakii* の指標菌として利用できるかについて検討した。最終的には、乳児用(6ヶ月齢未満)乾

燥食品および食事療法用乾燥食品からサルモネラが分離されることは希なため、腸内細菌科菌群とサルモネラを関連できるデータがなく、*E. sakazakii*とも普遍的な関連性がないという結論を得た。これを受けて、「検体から腸内細菌科菌群が検出された場合にはサルモネラと *E. sakazakii* の検査をしなければならない」との脚注が、「個々の工場で腸内細菌科菌群と *E. sakazakii* を平行して検査しなければならない」に変更された。

細菌試験法には参照方法(Reference method)としてISO法等が規定されているが、ISO法との同等性がAOAC INTERNATIONALやAFNOR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. ICMSFのサンプリングプラン

サンプリングプランとは、ハザードとリスクの要因に基づくプランであり、①食品を汚染する微生物や毒素により起こる病気の重篤度や拡散性、②食品を媒介とする感染や中毒がある限定された消費者(乳幼児、基礎疾患のある患者等)に感受性があるか、③微生物や毒素が製造工程、流通、調理の過程で生残、増加、破壊されるか、の三要素で規定されており、ロットの合否を判定する手段として開発された。

EUでは日本のような単品検査ではなく、ICMSF(International Commission on Microbiological Specifications for Foods: 国際食品微生物規格委員会)のサンプリングプランに基づいた試験用の検体数が規定されている。衛生管理基準の一部を抜粋して表5に示した。サンプリングプランは15のケースとそれに付随するプランが二次元グリッドに配置されており、ロットの合否を判定するための検査

に供する検体数と菌数限界値を組み合わせたものである。1ロットからランダムに採取すべき検体数 $n$ 、合否判定の基準となる菌数 $m$ 、 $n$ 個中 $m$ を超えても許容される検体数 $c$ の組み合わせで示されているのが二階級法であり、この場合 $m$ は通常0である。三階級法では、 $m$ よりも多い最大菌数 $M$ を超える検体が1個でもあれば不合格とするが、菌数が $m \sim M$ 個の範囲内の検体数が $c$ 個以内なら条件付きの合格となる。

## 8. 食品の微生物基準と試験法のあるべき姿

微生物基準と試験法のあるべき姿として、①食品に関連した新興感染症の出現や細菌試験法の進歩、あるいは食品製造技術の進歩に連動しながら、

微生物基準と試験法を定期的に見直すこと、②基準となる病原菌、衛生指標菌などと食品との明確な関連性があり、消費者保護に必要であることを前提とし、しかも実現可能な規格基準を設定すること、③試験法は検査費用やマンパワーも考慮して作成することが求められる。具体的には、妥当性が確認され、しかも国際調和が計られた標準的な試験法(Reference method)を策定することが重要である。国際的に通用する標準法が作成されると、これを基準とした代替法・迅速法の開発が促進され、同時に試験現場への導入も容易になることが期待される。最終的には、生産者、製造業者、卸売業者、監督官庁が、決められた規格基準や試験法に対して共通の認識と理解をも

つことが重要である。

### 〈著者略歴〉

浅尾 勇(あさお つとむ)  
72年 大阪府立大学農学部獣医学科卒  
72年 大阪府立公衆衛生研究所入所  
72年 同研究所感染症部細菌部の主任研究員。  
現在 日本食品微生物学会の理事(検査法担当)および食品からの微生物検査標準法検討委員(国立医薬品食品衛生研究所)として日本の食品微生物試験法の問題点に焦点をあて、そのあるべき姿を検討している。厚生労働科学研究では汚染指標菌の迅速試験法を担当している。  
農学博士

河合 高生(かわい たかお)  
92年 大阪府立大学農学部獣医学科卒  
92年 大阪府立公衆衛生研究所に入所  
現在 食品の細菌検査や食中毒菌の試験検査を行っている。ブドウ球菌、ボツリヌス菌、セレウス菌、ウェルシュ菌のような芽胞産生菌を対象とした研究を行っている。厚生労働科学研究では汚染指標菌の迅速試験法を担当している。

特集 検査体制の無駄を見直す！～微生物検査とアレルギー管理～

## 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～

(株)エルメックス主催「第14回食品衛生検査セミナー」講演要旨より

大阪府立公衆衛生研究所 **浅尾 努氏**



特集 [検査体制の無駄を見直す!~微生物検査とアレルギー管理~]

## 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~

(株)エルメックス主催「第14回食品衛生検査セミナー」講演要旨より

大阪府立公衆衛生研究所

浅尾 努氏

本稿は(株)エルメックス(東京都新宿区市谷砂土原町)が2月20日に神戸会場(神戸国際会議場)、3月17日に東京会場(タワーホール船堀)において開催した「第14回食品衛生検査セミナー」において、大阪府立公衆衛生研究所の浅尾努氏が行った開催要旨より引用したものである。

(編集部)

### 食品衛生法の成分規格と試験対象菌

衛生指標菌(汚染指標菌)の代表的なものとして、生菌数(細菌数)、大腸菌群(coliforms)、糞便系大腸菌群(fecal coliforms)、大腸菌(*Escherichia coli*)、および近年EUで多用されるようになった腸内細菌科菌群(*Enterobacteriaceae*の仮訳)がある。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、ミネラルウォーター類の腸球菌と緑膿菌以外は、大腸菌群と“E. coli”(分類学上の大腸菌ではないのでローマン体)の2種類を標的とした成分規格などが告示・通知されてきた。

わが国の食品の成分規格に使用されている病原

菌は、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌の3種類の食中毒菌である。しかし、エンテロトキシンを産生しない黄色ブドウ球菌、TDH(Thermostable direct hemolysin:耐熱性溶血毒)あるいはTRH(TDH-related hemolysin:耐熱性溶血毒類似毒)を産生しない腸炎ビブリオは、たとえ食品中に大量に存在したとしても単なる雑菌にすぎない。嘔吐毒を産生しないセレウス菌やエンテロトキシンを産生しないウエルシ菌などについても同様である。毒素産生性が試験されない場合、このような菌は、サルモネラや赤痢菌のような健康被害を発生させ得る食中毒菌と、直接の健康被害はないかあるいは少ない衛生指標菌との間に位置する“指標菌の食中毒菌”といえる。広義に解釈すれば、大腸菌群などよりは少しリスクの高い衛生指標菌ともいえる。指標菌の食中毒菌としては、黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオが食肉製品あるいは魚介類の成分規格に採用されている。食中毒菌を分離同定する際には正確性が求められるのは当然のことであるが、直接の健康被害はないかあるいは少ない衛生指標菌については、正確性を多少は犠牲にしても迅速性を優先するこ

とは許容されるであろう (表1)。

本稿では、わが国の食品微生物試験法の現状と問題点を述べると同時に、腸管系病原菌に対する衛生指標菌試験法を欧米と比較解説し、最近実施されたEUの食品に対するMicrobiological criteria (微生物基準) の概略についても紹介する。細菌数 (一般生菌数) の計測・算定方法の問題点にも少し触れたい。

最後に、食品の微生物基準や衛生指標菌試験法のあるべき姿などについて、私見を交えながら考えてみたい。

## 衛生指標菌の歴史的な背景

1850年代には、コレラ患者やチフス患者の発生が水道水と関連すると考えられていたが、実際にチフス菌 (Eberth, 1880年) やコレラ菌 (Koch, 1883年) が発見されたのは約30年後のことであった。

1885年には、大腸菌がヒトの腸管の常在菌であることがEscherichにより報告され、Schardinger (1892年) はコレラ菌などの水系感染症菌よりも迅速に分離同定可能な大腸菌を糞便汚染の指標菌として使用することを提案した。

翌年には大腸菌と類似した集落を形成する菌群として大腸菌群の用語が作り出された (Blachstein, 1893年)。大腸菌群は、食品衛生学上あるいは環境衛生学上の用語であり、好気性あるいは通性嫌気性のグラム陰性の無芽胞桿菌で、乳糖を分解して48時間以内に酸とガスを産生する菌群と定義されている。1904年には、Eijkmanにより大腸菌群よりもより糞便汚染の指標性が高いとされ、EC培地で44.5～45.5℃培養で48時間以内に乳糖を分解して酸とガスを産生する菌群である糞便系大腸菌群が提唱された。

Seeliger (1952年) はミルクやアイスクリームの加熱指標菌として腸内細菌科菌群を使用できることを提唱した。腸内細菌科菌群とは、ブドウ糖を発酵して酸を産生す

るチトクロームオキシダーゼ陰性のグラム陰性の無芽胞桿菌である。腸内細菌科菌群は、大腸菌、大腸菌群、糞便系大腸菌群、および重要な食中毒菌である乳糖非分解性のサルモネラ、赤痢菌、エルシニアなどを包括する菌群であり、EUでは製造工程での環境汚染の指標菌として使用されている (図1)。

以上のような衛生指標菌の歴史的な変遷を考えれば、大腸菌群や糞便系大腸菌群はあくまでも大腸菌の代替菌群であることが理解できる。100年以上前の細菌学の黎明期とは異なり、細菌試験技術が飛躍的に向上した現在では、大腸菌を分離同定することは容易であるため、腸管系病原菌 (糞便汚染) の指標菌としては大腸菌が最も適

表1 衛生指標菌と食中毒菌と“指標的食中毒菌”

迅速性 ←		→ 正確性
衛生指標菌	“指標的食中毒菌”	食中毒菌
生菌数	黄色ブドウ球菌	SE産生菌
大腸菌群	腸炎ビブリオ	TDH、TRH産生菌
糞便系大腸菌群		リステリア
大腸菌	リステリア	モノサイトゲネス
腸内細菌科菌群		サルモネラ
腸球菌	セレウス菌	セレウリド産生菌
緑膿菌	ウェルシュ菌	ET産生菌
クロストリジア		ボツリヌス菌
耐熱性芽胞菌		

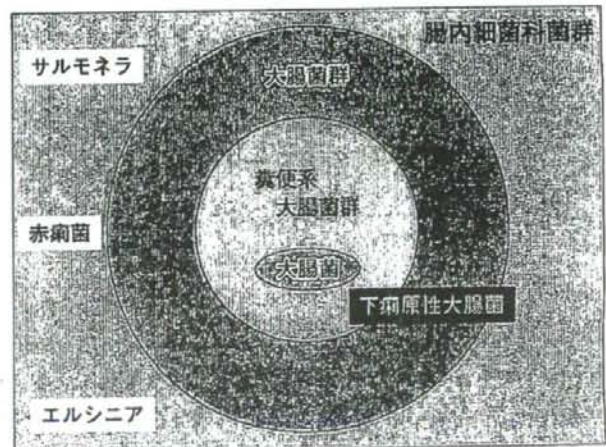


図1



切であることになる。大腸菌が特異的に産生するβ-glucuronidase活性(約95%保有)を利用した増菌・分離培地が開発された結果、大腸菌の試験は糞便系大腸菌群よりはむしろ迅速・簡便になったといえる。

## 衛生指標菌名は混乱と誤解を招く恐れがある

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、諸外国のような大腸菌を対象とした規格基準はない。平成10年の「生食用食肉等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、これは食肉製品等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、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。実際に、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(不適切)な文章も存在する。“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“E. coli”であると解釈される。“E. coli”は日本独特の用語であり、米国FDA

／BAMなどで使用されているfecal coliformsとは、試験法から推測して同等の菌群であると考えられる。類似した用語として、欧州で使用されているpresumptive *E. coli* (ISO:推定大腸菌)は、LST培地→EC培地(糞便系大腸菌群:陽性)→インドール試験(陽性)の手順で判定される菌群である。大腸菌以外の名称は食品衛生学領域でのみ使用される用語であり、細菌学の分類に基づくものではない(表2)。

近年、わが国でも使用されるようになってきた糞便系大腸菌群の用語は、大腸菌よりも糞便汚染の可能性がより高いことを示す指標菌のような間違ったイメージを与えかねない。糞便系大腸菌群とは、大腸菌群のうち44℃～45.5℃の高温域でも発育可能な菌群であるという、単なる培養手技上の名称である。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このような培養条件でも発育するので、糞便系大腸菌群は必ずしも糞便汚染の最適指標菌とはいえない。糞便系大腸菌群に代わる用語として、thermotolerant coliforms(耐熱性大腸菌群)が、さらにはthermotrophic coliforms(高温性大腸菌群:仮訳)がよりふさわしいとの考え方もある。

マスコミ報道された場合にも、糞便系大腸菌群よりは“高温性大腸菌群”のほうが、少なくとも現実の問題以上の悪いイメージを与えることだけは避けられるように思われる。“E. coli”の代わりに“高温性大腸菌群”の用語を使用すれば、

“E. coli”を大腸菌と誤解されることもなくなる。

食品から“E. coli”や大腸菌群が検出された場合、それぞれの食品衛生学上の意義を、一般消費者やマスコミは当然としても、食品製造等に携わる関係者ですら理解・説明するのは困難であると推察される。かくいう演者自身も、このような衛生指標菌を使い分ける根拠を明確に説明できない。

表2 衛生指標菌の用語の混乱

日本	<i>E. coli</i> (大腸菌ではない) = 糞便系大腸菌群 培養温度: 44.5 ± 0.2℃
米国	Fecal coliforms (糞便系大腸菌群) 培養温度: 45.5 ± 0.2℃または44.5 ± 0.2℃
EU	Thermotolerant coliforms (耐熱性大腸菌群) Fecal coliforms (糞便系大腸菌群) 培養温度: 44 ± 1℃ Presumptive <i>E. coli</i> (推定大腸菌): インドール陽性
糞便系大腸菌群の用語は一般消費者に誤解を招く恐れ	
◎ Thermotrophic coliforms (“高温性大腸菌群”)	



## 食品細菌試験法の現状

食品衛生法には乳等省令の35種類の食品のうち、細菌数は26種類、大腸菌群は28種類、総菌数は2種類、乳酸菌数は3種類の食品を対象とした成分規格が設けられている。成分規格以外にも、ソフトタイプおよびセミソフトタイプのナチュラルチーズや生ハムからリステリア・モノサイトゲネスが検出されたものは、食品衛生法第6条違反により回収しなければならないことが通知された。一般食品29種類のうち、細菌数：12種類、大腸菌群：14種類、E. coli：7種類、黄色ブドウ球菌：3種類、サルモネラ：4種類、腸炎ビブリオ：7種類、その他の菌：5種類の食品を対象とした成分規格が設けられている。

既存の衛生指標菌試験法が見直されないうちに、新たな試験法が告示・通知されてきた弊害により多くの問題点が生じている。例えば、①食品の10倍乳剤作製法やそれに使用する希釈液が統一されていない、②培養温度が統一されていない（一般食品：35±1℃、乳製品：32～35℃）、③食肉製品や魚肉ねり製品等の試料採取法が非現実的である、④乳等省令には“検体採取後4時間以内に試験に供しなければならない”との規定がある。

わが国の衛生指標菌試験法（図2）は、定性的な成分規格に軽重の差をつけるために、培地に接種する試料量を変えている。例えば、食肉製品では10倍乳剤10mlずつを3本のBGLB培地に接種する（3g）。牛乳では原液、10倍および100倍希釈液1mlずつを、それぞれ2本のBGLB培地に接種

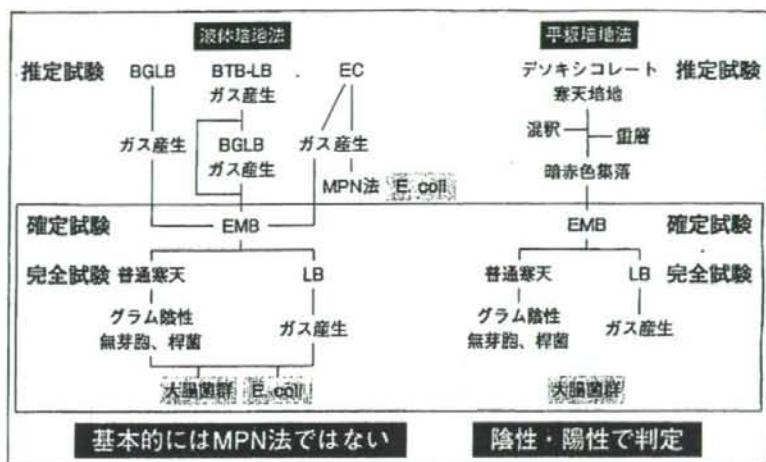


図2 日本の衛生指標菌試験法の概略図

表3 食品別の衛生指標菌試験法の比較

食品	培地 (推定試験)	希釈液	培養温度	実質の試料量
牛乳類	BGLB	規定なし	32～35℃	2.22ml
れん乳・粉乳等	BGLB	生理食塩水	32～35℃	0.222 g
バター アイス類等	デゾ寒天	生理食塩水	32～35℃	0.2 g
清涼飲料水等 (粉末)	BTB-LB	規定なし (リン酸緩衝液)	35±1.0℃	11.1ml (1.11 g)
冷凍食品等	デゾ寒天	リン酸緩衝液	35±1.0℃	0.02 g
	EC		44.5±0.2℃	0.03 g
食肉製品等	BGLB	ペプトン加生食	35±1.0℃	3.0 g
	EC		44.5±0.2℃	0.5g (0.55g)
	4種類	3種類		100倍以上の差

する (2.22ml)。冷凍食品では100倍乳剤1mlずつを3本のEC培地に接種する (0.03g)。アイスクリーム類では10倍乳剤を1ml (0.1g) ずつ、冷凍食品では100倍乳剤を1ml (0.01g) ずつ、それぞれ2枚のデンキシコロート寒天培地で混釈培養するようになっている。

このような食品ごとに異なる試料の希釈倍率や、推定試験に使用する試験管数の相違が、わが国の衛生指標菌試験法を複雑にしている大きな原因の一つでもある (表3)。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。

## 米国 (FDA / BAM) とEU (ISO) の衛生指標菌試験法

### 1 大腸菌群および糞便系大腸菌群試験法

FDA / BAMとISOの大腸菌群および糞便系大腸菌群試験法は、わが国の方法とは異なり、推定試験に使用する液体培地はLST培地にはほぼ一本化されている (図3)。FDA / BAMの大腸菌群MPN試験法ではガス陽性の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培地へ移植し、いずれも一定時間培養後にガスの産生が認められた試験管を陽性としてMPN値を算出する。ISOではインドール

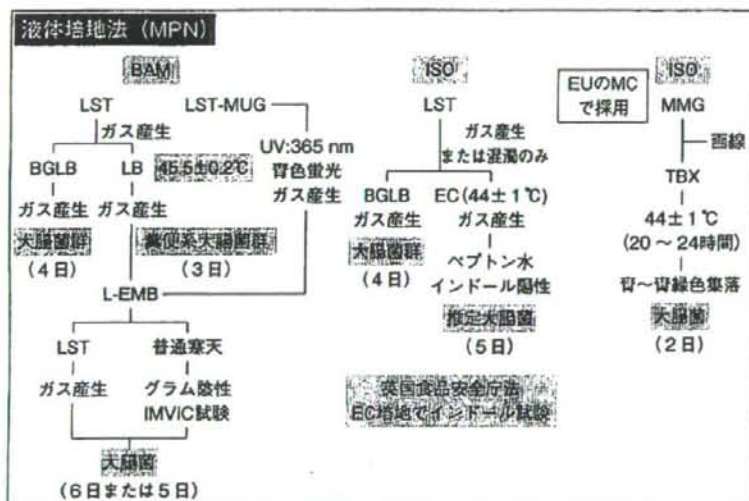


図3 大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌の試験法

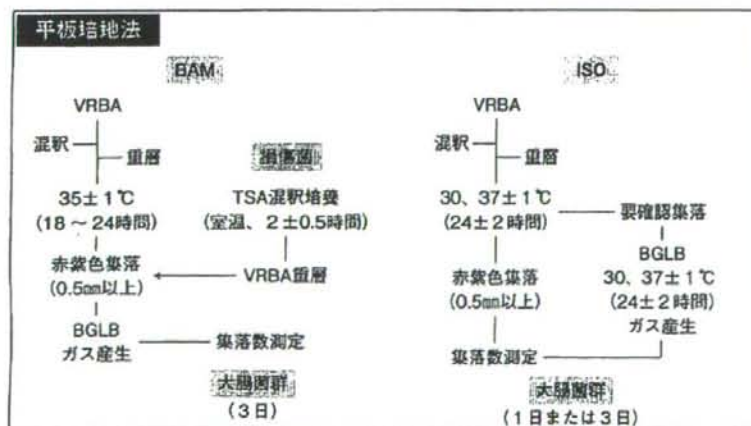


図4 大腸菌群試験法

試験を実施するためのペプトン水培養が追加されている。

大腸菌群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法とISO法ではいずれもVRBA培地が指定されている (図4)。日本の告示法・通知法のようなEMB培地での確定試験と、それに続くグラム染色やLB培地での完全試験がないので、より簡便・迅速化された試験法といえる。

### 2 大腸菌試験法

ISOの平板法は、酵素基質培地であるTBX培地と試料液の混釈培養法である。TBX培地で混釈後に37°Cで4時間前培養して損傷菌の回復をはかり、その後、に所定の培養温度である44°Cまで上昇させる方法も示されている。FDA/BAM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、および普通寒天培地で发育した菌のグラム染色性およびIMViC試験により大腸菌を同定する。FDA / BAMの平板法は、試料をVRBA培地で混釈した後、VRBA-MUG培地を重層して培養する (図5)。

### 3 Enterobacteriaceae

(仮訳: 腸内細菌科菌群)

試験法 (ISO)

ブドウ糖分解性を指標とする腸内細菌科菌群は、乳糖分解性を指標とする大腸菌群よりもより広い腸管系食中毒菌をカバーできる衛生指標菌である。

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培地が使用されている。VRBG培地で混釈・重層し、培養後に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。発生した集落のうち、ブドウ糖を分解しオキシダーゼ陰性の菌を腸内細菌科菌群と同定する(図6)。

### EUの新しい微生物基準

2006年1月1日から施行されたCommission Regulation (EC) No 2073/2005 on Microbiological Criteria for foodstuffsでは、大腸菌群と糞便系大腸菌群による規制が微生物基準から消えた。この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(表5)。

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基準であって、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、原材料を見直す等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基準は、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、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

用具類に対する大腸菌の基準のみである。合計28の食品カテゴリーの衛生管理基準うち、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。ちなみに生菌数(SPC: standard plate counts)が適用されている食品は4カテゴリーのみに留まる。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。

上述のEUの食品微生物基準は、施行されて約2年後の2007年12月5日には早くも一部改正された。Dried follow-on formula(乳児用乾燥栄養補助食品: 乳児用調製粉乳)の食品安全基準にサル

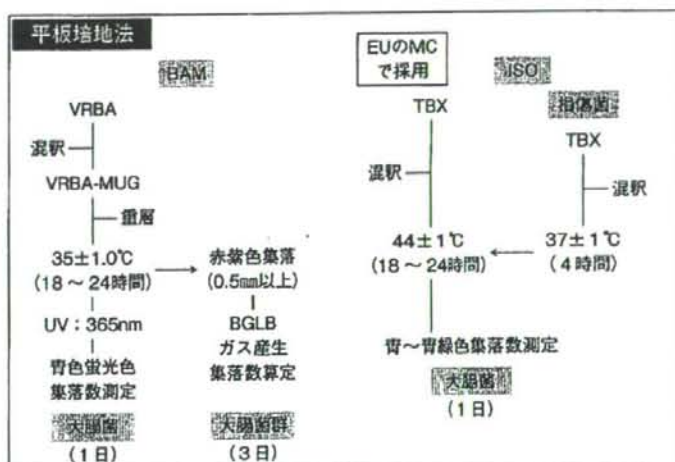


図5 酵素基質培地による大腸菌試験法

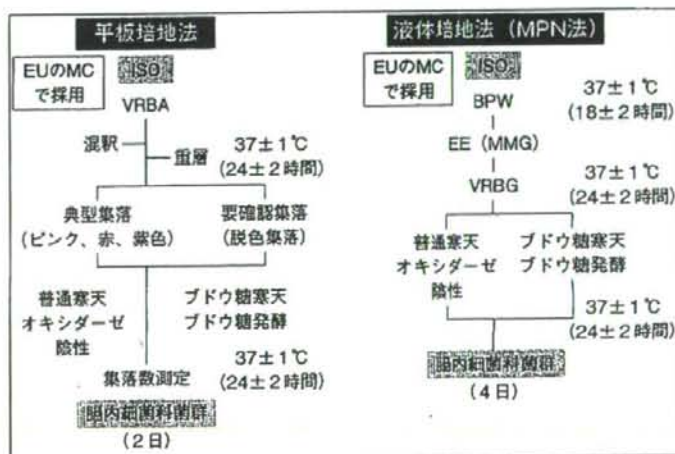


図6 腸内細菌科菌群試験法



モネラが、衛生管理基準に腸内細菌科菌群が新たに追加されたこと、乳児用および食事療法用乾燥食品に推定セレウス菌 (Presumptive *B. cereus*) が衛生管理基準に採用されたことが大きな改正点である。推定セレウス菌とは、MYP (Mannitol Egg York Polymyxin Agar) 培地上でマンニトール非分解かつ卵黄反応陽性の集落を、他の類似菌と鑑別試験なしに同定するものである。

この改正に際して、欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority: EFSA) は、腸内細菌科菌群をサルモネラと *Enterobacter sakazakii* の指標菌として利用できるかについて検討した。結果的には、サルモネラが分離されることは稀なため、腸内細菌科菌群とサルモネラを関

連できるデータがないという理由から、乳児用および食事療法用乾燥食品に対する衛生管理基準に腸内細菌科菌群を指標とすることが見送られた。

## ICMSFのサンプリングプラン

サンプリングプランとは、ハザードとリスクの要因に基づくプランであり、①食品を汚染する微生物や毒素により起こる病気の重篤度や拡散性、②食品を媒介とする感染や中毒が、ある限定された消費者 (乳幼児、基礎疾患のある患者等) に感受性があるか、③微生物や毒素が製造工程、流通、調理の過程で生残、増加、破壊されるか、の3要素で規定されており、ロットの合否を判定する手段として開発された。詳細については、Microorganisms in foods 7, Microbiological testing in food safety management, ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods: 国際食品微生物規格委員会) を参照されたい。なお、日本語訳が中央法規出版から販売される予定である。

EUでは日本のような単品検査ではなく、ICMSFのサンプリングプランに基づいた試験用の検体数が規定されている。サンプリングプランは15のケースとそれに不随するプランが二次元グリッドに配置されており、ロットの合否を判定するための検査に供するサンプル数と菌数限界値を組み合わせたものである (表6)。

1ロットからランダムに採取するべき検体数  $n$ 、合否判定の基準となる菌数  $m$ 、 $n$  個中  $m$  を超えても許容される検体数  $c$  の組み合わせで示されているのが二階級法である。二階級法では、 $m$  は通常0である。三階級法では、 $m$  よりも多い最大菌数  $M$  を超える検体が1

表4 日本の衛生指標菌試験法と国際標準法との比較

方法	培養温度		推定試験用培地	
	一般食品	乳および乳製品	液体	寒天
BAM	35±1.0°C	32±1.0°C	*LST	VRBA
ISO	37±1.0°C	30±1.0°C	LST	VRBA
日本	35±1.0°C	32~35°C	EC, LB BGLB	Deso.

LST-MUGやVRBA-MUGも使用される。  
腸内細菌科菌群用にMMG (液体培地) がある。  
\*貝類ではLBまたはLSTになっている。

表5 EUにおける規制対象食品と微生物 (2006年1月1日)

<b>食品安全基準</b>		
Ready-to-eat 製品等 (26種類)		
<i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. coli</i> , Staphylococcal enterotoxins, Histamine		
<b>衛生管理基準</b>		↑ 生の二枚貝等での MPN法のみ
肉および肉加工品 (8種類)		
SPC, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>		
牛乳および乳製品 (9種類)		
<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>E. coli</i> , Coagulase-positive staphylococci		
卵加工品 (1種類)		
<i>Enterobacteriaceae</i>		SPC : 4 <i>Enterobacteriaceae</i> : 7 <i>E. coli</i> : 8
水産加工品 (1種類)		
<i>E. coli</i> , Coagulase-positive staphylococci		
野菜、果物とその加工品 (2種類)		
<i>E. coli</i>		

個でもあれば不合格とするが、菌数が $m \sim M$ 個の範囲内の検体数が $c$ 個以内なら条件付きの合格とされている(図7、表7-1、表7-2)。

例えば、カット野菜のEUの衛生管理基準(Process hygiene criteria)には大腸菌に対する微生物基準がある( $n=5$ 、 $c=2$ 、 $m=10^2/g$ 、 $M=10^3/g$ )。これは1ロット5検体をランダムに採取し、 $10^3/g$ を超える大腸菌を検出した検体が1個でもあれば不合格であり、 $10^2/g$ を超える不良品がない場合は合格、 $10^2/g \sim 10^3/g$ の範囲内の検体が2個以内なら条件付きの合格ということになる。大腸菌試験法に使用する参照方法(Reference method)はISO16649-1または-2と規定されているが、ISO法との同等性がAOACインターナショナルやAFNOR(フランス規格協会)などの認証機関でバリエートされた方法も使用可能であるとされている。

わが国でICMSFのサンプリングプランが採用されている食品として「食肉製品の流通および販売の微生物指導基準」、「加熱殺菌液卵と無殺菌液卵の微生物基準」がある。これらの食品の微生物基準には「E. coli」(糞便系大腸菌群)、黄色ブドウ球菌、クロストリジアで二階級法が、生菌数で三階級法が採用されている。

## 菌数計測法の問題点

生菌数とは生きている菌を表現する用語であり、食品衛生小六法の成分規格の項では細菌数、試験法の項では細菌数(生菌数)が使用されている。生菌数(好気性あるいは通性嫌気性の中温菌)の測定方法は、一般的には混釈による標準平板菌数測定法(standard plate count: SPC)が広く使用されているが、これ以外にも表面塗抹平板法、乾式培地法、メン

ブレンフィルター法やスパイラルプレート法などがある。生菌数は一般生菌数などとも呼ばれることもあり、諸外国でもaerobic plate counts (APC)、standard plate counts (SPC)、aerobic colony counts (ACC)、total viable counts (TVC)、total colony counts (TCC)など、さまざまな呼び方がされている。

生菌数とは正確には食品中に存在する菌数ではなく、限定された一定の条件下(培地、培養温度、培養時間、酸素濃度等)で寒天平板上(中)に見える集落の形成が可能な菌といえる。食品に含まれる発育抑制成分、発育促進成分、食品の希釈液が生菌数の測定に影響を与える。菌の発育抑制成分として、卵白のリゾチーム、ガーリックのアリシン、タイムのチモール、マスタード・ワサビのアリルイソチアネート、バニラのバニリン、

表6 ICMSFが推奨するサンプリングプラン

ハザードの程度	検査後のリスクの変化		
	減少	無変化	増大
直接被害なし	ケース1 $n=5, c=3$	ケース2 $n=5, c=2$	ケース3 $n=5, c=1$
被害: 低	ケース4 $n=5, c=3$	ケース5 $n=5, c=2$	ケース6 $n=5, c=1$
被害: 中	ケース7 $n=5, c=2$	ケース8 $n=5, c=1$	ケース9 $n=10, c=1$
被害: 高	ケース10 $n=5, c=0$	ケース11 $n=10, c=0$	ケース12 $n=20, c=0$
被害: 甚大	ケース13 $n=15, c=0$	ケース14 $n=30, c=0$	ケース15 $n=60, c=0$

□ 三階級法

■ 二階級法

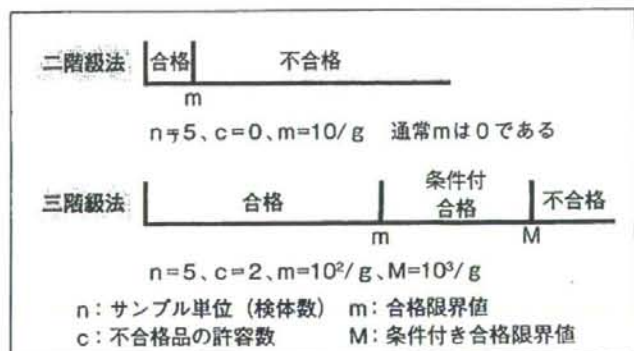


図7 二階級法と三階級法の比較



緑茶やココアに含まれるポリフェノールなどが知られている。一方、乳成分が大腸菌群（正確には乳糖非分解性のエンテロバクター）の発育を促進

（支持）したことも経験した（表8）。

わが国では、生菌数の測定・計算方法は食品衛生小六法に記載されているが、定量的な成分規格

がない大腸菌群の測定方法は示されていない。FDA/BAM法では、集落数の計測可能範囲を、生菌数測定法と大腸菌群ともに25～250/平板としている。生菌数を計測する場合の1平板当たりの集落数は、APHA法では25～250/平板、ISO法では15～300/平板と異なるが、大腸菌群ではいずれも15～150/平板となっている。ISO法やFDA/BAM法には同一の菌数算定用の計算式が示されており（食品衛生検査指針にも紹介されている）、この方法で計算した菌数は、食品衛生小六法と同じか少なくなる。したがって、使用する生菌数の計算方法の違いによって、成分規格への適否に影響することもある（表9～11）。

### 食品の微生物基準と試験法のあるべき姿

微生物基準と試験法のあるべき姿として、①食品に関連した新興感染症の出現や細菌試験法の進歩、あるいは食品製造技術の進歩に連動しながら、微生物基準と試験法を定期的に見直すこと、②基準となる病原菌、衛生指標菌などと食品との明確な関連性があり、消費者保護に必要であることを前提とし、しかも実現可能な規格基準を設定すること、③試験法は検査費用やマンパワーも考慮して作成することが求められる。

具体的には、妥当性が確認さ

表7-1 EUにおける食品安全基準の例

第1章 食品安全基準							
食品区分	微生物/毒素代謝物	サンプリングプラン		菌数限界値		参照試験法	適用場所
		n	c	m	M		
粉ミルク ホエイ パウダー	サルモネラ	5	0	陰性/25g		EN/ISO 6579	保存期限内の市販品
違反した場合							
回収またはリコールし、小売り前の食品はハザードを除く処理をする。この処理は小売りレベルではなくて、製造業者のみが実施する。							
製造業者は、公衆衛生や動物衛生に危害を及ぼさず、しかも規制当局によって認可されたHACCPとGHPの原理に基づき最初の製品以外のものに再加工するために使用する。							

表7-2 EUにおける衛生管理基準の例

第2章 衛生安全基準							
食品区分	微生物/毒素代謝物	サンプリングプラン		菌数限界値		参照試験法	適用場所
		n	c	m	M		
粉ミルク	腸内細菌科菌群	5	0	10cfu/g		ISO 21528-1	最終製品
ホエイ パウダー	コアグラゼ陽性ブドウ球菌	5	2	10cfu/g	100cfu/g	EN/ISO 6888-1 または-2	最終製品
違反結果の是正措置							
腸内細菌科菌群				コアグラゼ陽性ブドウ球菌			
熱処理能力や二次汚染をチェックする				衛生管理の改善 菌数が10 <sup>5</sup> cfu/gを超えた場合は、エンテロトキシン試験を実施する			

表8 乳成分が大腸菌群の発育を促進した（混釈）

希釈液	加工乳		リン酸緩衝液	
	×10	×100	×10	×100
VRBA	112	18	10	0
VRBG	143	18	10	0
酵素基質	210	16	62	0

リン酸緩衝液：

VRBAとVRBGでは菌数が1/10以下に減少



れ、しかも国際調和が計られた標準的な試験法 (Reference method) を策定することが重要である。国際的に通用する標準法が作成されると、これを基準とした代替法・迅速法の開発が促進され、同時に試験現場への導入も容易になることが期待される。標準法策定を目標とした「食品からの微生物検査標準法検討委員会」が平成17年7月に国立医薬品食品衛生研究所内で発足し、その情報は同研究所のホームページ (<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>) に公開されている。

最終的には、生産者、製造業者、卸売業者、監督官庁が、決められた規格基準や試験法に対して共通の認識と理解を持つことが重要な要因となる。

### 食品衛生法 (成分規格) がハザードでは?

わが国の食品細菌試験法の多くは食品衛生法の成分規格に組み込まれているため、法改正の手続きを取らない限り改正できない。このため、酵素基質培地を始めとして、培養法と組み合わせた簡便・迅速な細菌数測定機器が食品試験用に開発されてきたが、日本の食品衛生法上承認された方法は残念ながら未だに皆無である。日々新しい細菌試験技術が開発されている今日、試験検査に携わる人たちの多くが、わが国の成分規格 (規格基準・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。

その最たる例が、乳製品の製造技術が飛躍的に向上したにもかかわらず、昭和26年に施行されて60年近くも基本部分は当時のままの姿を留めている、いわゆる「乳等省令」である。高度に製造管理された牛乳製品を販売する場合でも、迅速性に乏しい試験法で、しかも消費者保護のための必要性が不明

表9 菌数計算法

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

$$N = \left\{ \frac{A+B}{2 d_1} + \frac{C+D}{2 d_2} \right\} / 2$$

$\Sigma C$ : 各平板の集落数の合計  
 $n_1$ : 低希釈の算定対象ペトリ皿数  
 $n_2$ : 高希釈の算定対象ペトリ皿数  
 $d$ : 希釈が低いほうの希釈倍率

$A, B$ : 低希釈の集落数  
 $C, D$ : 高希釈の集落数  
 $d_1$ : 希釈が低いほうの希釈倍率  
 $d_2$ : 希釈が高いほうの希釈倍率

ISO, BAM法

↓

小六法

$$CFU/ml = \frac{\text{各平板の集落数の合計}}{\text{各ペトリ皿に分注した試料の実量 (ml)}}$$

表10 計算方法の違いによる生菌数の差異

試料番号	集落数 1:10	集落数 1:100	希釈率を考慮した集落数の比	小六法 (A)	ISO, BAM (B)	A/B
1	300	30	1 : 1	$3.0 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$	1
2	235	31	1 : 1.3	$2.7 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	1.13
3	290	52	1 : 1.8	$4.1 \times 10^3$	$3.4 \times 10^3$	1.21
4	300	60	1 : 2	$4.5 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	1.36
5	150	30	1 : 2	$2.3 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	1.43

有効な集落測定範囲を30~300/平板とする

小六法 ≧ ISO, BAM

表11 生菌数の計算方法の違いによる成分規格への適否の影響

粉末清涼飲料、乳飲料、特別牛乳の成分規格  
3万以下/ml (g)

集落数

100倍希釈 (295, 285/平板)

1,000倍希釈 (32, 34/平板)

小六法 (告示法)

$$\frac{(295+285)}{2 \times 10^{-2}} + \frac{(32+34)}{2 \times 10^{-3}} \div 2$$

=  $3.1 \times 10^4$  不適

ISO, BAM法

$$\frac{295+285+32+34}{[2 + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}}$$

=  $2.9 \times 10^4$  適

冷凍食品 (300万/g) でも同様のことが起こり得る

確な検査を実施しなければならない。制定当時はいくら優れた法律であっても、これだけ長期間経過すれば、骨董品的な価値は認められても、有用性に疑問符が付くのは当然の成り行きである。

「不祥事はなぜ繰り返されるのか—日本人のためのリスク・マネジメント—」(武井勲著、扶桑社新書、2007年11月刊行)の中の言葉を借りれば、

食中毒菌とともに食品衛生法そのものがハザードではないかとすら思える。食品衛生法ハザードのリスクとして、元来は安全性や品質に問題がないかもしれない食品の廃棄とそれに伴う資源やエネルギーの無駄遣いが挙げられる。これに付随する食品価格の上昇は消費者リスクとなり、生産者リスクとしては会社の倒産という危機にもつなが

りかねない。経済的な損失や正当な経済活動に対するリスクを軽減するためにも、科学的根拠に基づいた合理的な規格基準とその試験法の策定が切望される(図8)。

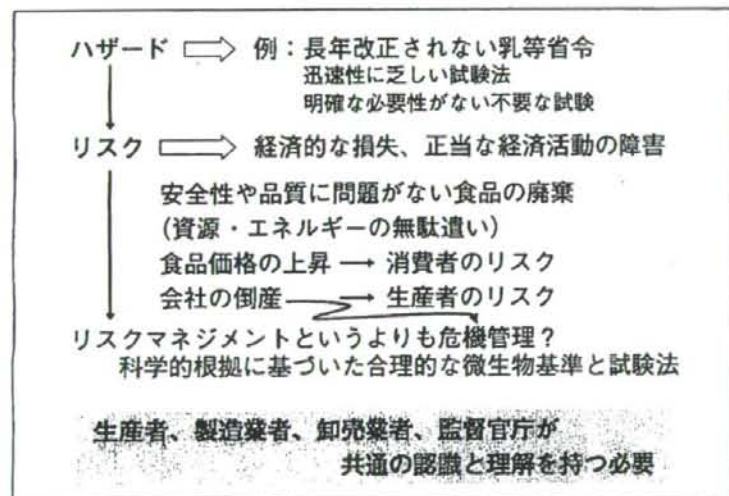
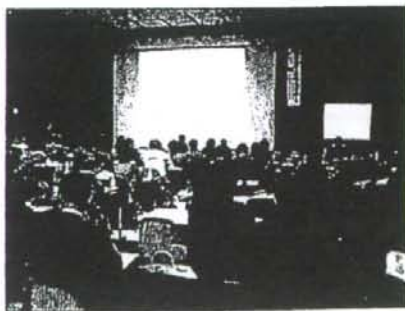


図8 食品衛生法の成分規格(細菌試験法)がハザードでは？

(株)エルメックス主催の第14回「食品衛生検査セミナー」は2月20日に神戸会場(神戸国際会議場)、3月17日に東京会場(タワーホール船堀)の2会場で開催された(写真は神戸会場の様子)。

セミナーでは本稿にて講演要旨を掲載した大阪府立公衆衛生研究所の浅尾努氏をはじめ、(株)山武の渡辺勉氏が「トレーサビリティ、HACCP、GMP、GAPだけでは食のリスクは回避できない～人を中心とした食のリスク管理の提言～」、伊藤ハム(株)の大澤頼人氏が「食品衛生技術と企業価値～品質管理を高めるための企業内のさまざまなソフトの折り合いの重要性と10年間携わってきた中国食品企業との連携生き残り競争について紹介～」、大阪大学大学院の那須正夫氏が「微生物を迅速・高精度に検出する～食の安全と安心を保証する新技術～」と題して、それぞれ講演した。

また、会場付設のエリアでは食品衛生関連資材の展示会も併催され、参加者の関心を集めた。





## ORIGINAL ARTICLE

**Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance**Y. Tanaka<sup>1</sup>, B. Kimura<sup>1</sup>, H. Takahashi<sup>1</sup>, T. Watanabe<sup>1</sup>, H. Obata<sup>2</sup>, A. Kai<sup>2</sup>, S. Morozumi<sup>2</sup> and T. Fujii<sup>1</sup><sup>1</sup> Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo, Japan<sup>2</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Shinjuku, Tokyo, Japan**Keywords**

acid tolerance, food, genes, lysine decarboxylase, regulation, stress response.

**Correspondence**

Bon Kimura, Department of Food Science and Technology, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato, Tokyo 108-8477, Japan. E-mail: kimubo@kaiyodai.ac.jp

2007/1232: received 3 August 2007, revised 22 September 2007 and accepted 5 October 2007

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03652.x

**Abstract****Aim:** The aim of this study was to investigate the detailed mechanisms of acid resistance in *Vibrio parahaemolyticus*.**Methods and Results:** All 11 strains of *V. parahaemolyticus* survived lethal acidic conditions following acid adaptation, and accumulation of cadaverine was detected. The addition of lysine improved survival, suggesting that lysine decarboxylase plays a role in the adaptive acid tolerance response. Two open reading frames (ORF) in *V. parahaemolyticus*, which are separated by a non-coding region, were found to be highly homologous to bacterial lysine decarboxylase (*cadA*) and lysine/cadaverine antiporter (*cadB*) genes. Transcriptional analyses of this operon revealed acid induction and enhanced induction by external lysine. The relative expression ratio of each transcript was found to follow the trend of *cadA* mRNA > *cadB* mRNA > *cadBA* bi-cistronic mRNA. A mutated strain, with a disrupted *cadA* gene, showed attenuated acid survival.**Conclusions:** We identified the lysine decarboxylase gene operon of *V. parahaemolyticus*. Expression of this operon was induced under acidic conditions. The *cadA*-mutated strain constructed in this study showed weaker tolerance to acidic conditions than the wild-type strain.**Significance and Impact of the Study:** *Vibrio parahaemolyticus* utilizes the lysine decarboxylation pathway for survival in acidic conditions.**Introduction***Vibrio parahaemolyticus*, a ubiquitous marine pathogen found in seafood, causes human diarrhoea, especially through the consumption of raw fish and shellfish. *Vibrio parahaemolyticus* is a gram-negative halophilic bacterium, which is distributed worldwide in estuarine environments (Joseph *et al.* 1982). The virulent factors of this pathogen, mainly thermostable direct haemolysin (TDH) and TDH-related haemolysin (TRH), show haemolytic, cytotoxic, enterotoxic, and cardiotoxic activities against mammalian hosts (Honda and Iida 1993; Raimondi *et al.* 2000; Shimada and Arakawa 2000; Naim *et al.* 2001). While it is well established that fresh seafood generally contains *V. parahaemolyticus*, only a small fraction of bacteria carries these virulent genes (Wagatsuma 1974; DePaola *et al.* 1990; Kaysner *et al.* 1990). Over 400 casesof food poisonings caused by *V. parahaemolyticus* have been reported in Japan in 2000, illustrating the extent of this public health problem. Furthermore, the pandemic spread of *V. parahaemolyticus* serotype O3:K6, which has emerged since 1996, is a new topic in the control of this pathogen (Matsumoto *et al.* 2000). Bacteriophage f237, which is unique to the newly isolated O3:K6 clones, has been reported (Nasu *et al.* 2000), and some virulence-associated characteristics seem to be enhanced in O3:K6 clones. This newly emerging clone has also been implicated in a number of outbreaks in Japan and other countries.*Vibrio parahaemolyticus* and other Vibrionaceae are generally thought to be more sensitive to low pH than other bacteria (Nishikawa *et al.* 1993; Waterman and Small 1998). Therefore, the infective dose (ID) of these pathogens is not low (Sanyal and Sen 1974; Bennis