

という考えが支配的であったからだと思う。そういう状況に立たされた当事者にしてみれば、極めて不条理なことを強いられることになり、「国は何をしている!」という憤懣になる。しかし、国の立場で考えれば、特別のケースとして、限られた場合のみに対応すれば済むものを、組織的に対処せんがために、理屈では過去に構築されてきた膨大な試験法の全てを基本から見直さなければならぬ、ということにもなりかねない。とすれば、そのことの方が、コスト的にも時間的にも、はるかに厳しい話である。

国際的ハーモナイゼーションといっても、最終的には我が国の国益に叶うようなものでなければ

ば、全く意味がない。そのためには、国際的ハーモナイゼーションの中味を、我が国自身が先導していくことが重要である。「今度ISOでこうなったから、我が国でも、早速対応しなければ・・・」式の受動的対応は、労多くして益少なし、である。そうではなくて、試験法の哲学から始まって、試験法の科学、技術、さらに食品文化に至るまで、国際基準は斯くあるべし、と提言し続け、それによってイニシアチブを採っていくことが重要であると思われる。一見科学的な議論であっても、実は、科学的には決して結論を出せない部分が少なからずあるからである。

3 厚労省科学研究費補助金による「検査法バリデーションシステムの構築」を目指す第一歩

厚労省は、上記の観点での重要性に、漸く重い腰を上げ始めている。平成17年度より始まった、厚労省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」がそれである。平成19年度までの3年間のプロジェクトであり、実施計画を議論する過程で、具体的課題が

- (A)「食品からの微生物検査標準法検討委員会」運営
- (B) サルモネラ検査法の検討
- (C) 腸炎ピブリオ検査法の検討
- (D) 黄色ブドウ球菌検査法の検討

の4分担研究課題に絞り込まれた。(A)では図1に示す委員会を構成し、国立医薬品食品衛生研究所・

食品衛生管理部を事務局として、これまでに9回の委員会(H17年度4回、H18年度5回)を行ってきた(<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>)。この委員会での議論内容は、上記Webで公開されているが、その目的は、サルモネラ、腸炎ピブリオ、黄色ブドウ球菌について、培養法を見直し、標準法としてのプロトコルを提案すること、およびそのプロトコルにしたがってバリデーションする仕組みを構築することである。標準法として提案するためには、これまでに実施されてきた検査法についての情報調査、および実験的検討が必要であり、菌種毎にそれを行うために設置された課題が(B)～(D)である。

委員長	山本 茂貴 (国衛研・食品衛生管理部)
副委員長	高島 浩介 (国衛研・衛生微生物部)
委員	浅尾 努 (大阪府立公衆衛生研究所・日本食品微生物学会)
	荒川 英二 (国立感染症・細菌第一部) 作業部会
	五十君 輝信 (国衛研・食品衛生管理部) 事務局、作業部会
	伊藤 武 (財団法人東京顕微鏡院)
	甲斐 明美 (東京都健康安全研究センター) 作業部会
	春日 文子 (国衛研・食品衛生管理部)
	小久保 彌太郎 (社団法人日本食品衛生協会)
	小崎 俊司 (大阪府立大学 農学部)
	品川 邦弘 (岩手大学 農学部)
	清水 晃 (神戸大学・農学部) 作業部会
	田中 廣行 (財団法人日本食品分析センター)
	塚本 定三 (大阪府立公衆衛生研究所) 作業部会
	藤井 建夫 (東京海洋大学 海洋科学部)
	松岡 英明 (AOAC International Japan Section)
	丸山 務 (社団法人日本食品衛生協会)
	宮原 美知子 (国衛研・衛生微生物部) 作業部会
	森 曜子 (財団法人日本冷凍食品検査協会)
	渡辺 治雄 (国立感染症・副所長)
行政から	道野 英司 (厚労省・監視安全課)
	近藤 卓也 (厚労省・基準審査課)

図1. 食品からの微生物検査標準法検討委員会の構成

また、硫化水素の産生により判定する培地としては、MLCB、ESサルモネラ、DHL、XLD、Bismuth sulfate agar、XLT4などから1種、と表記されているが、この「など」としている点にご注目いただきたい。このことは硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地の場合も同様であり、培地の種類を限定していない。

35±1℃、22±2時間、培地選択上の自由度、などプロトコルには条件に幅がある。化学分析においてもプロトコルに幅のある条件が無いわけではないが、微生物検査の場合は、はるかにこの幅が大きい。硫化水素産生により判定する培地としてはMLCBが圧倒的に多いのだが*Citrobacter*との区別が難しい、という見解、あるいはまた、硫化水素非産生でもサルモネラと判定できる培地としてはクロモアガーが圧倒的に良いと思う、といった意見、などなど。こうした議論は、目の前に与えられた試料に対して、どの培地を選択したらよいか?についての判断は、結局は、試験者の「コロニーを観る目」に依存せざるを得ないことを物語っている。試験者の技量認定の目標は、本来、このようなところにおくべきと思うのだが……。付言すれば、我が国では、こうした経験に培われた判断力にプライドを持ち、またそれに対して十分に敬意を払ってきた文化があったと思うが、残念ながら、「国際的に通用」させるためには、そうした文化とは無縁な社会の水準に合わせなければならない。かくて、技術認定はすべからず定量的に表現できる指標に限られることとなっている。

5 生菌標準物質および生菌マニピュレーション技術

1990年より、英国のCentral Science Laboratory (CSL) は、食品マトリクス中の標準物質の開発および普及に努めてきた。特定の化学物質を特定の食品マトリクスに所定量を加えた缶詰などを製造し、これを複数の希望者に有料で頒布している。それを購入した試験研究所では分析結果をCSLに報告する。CSLはその結果を集積して実施者にフィードバックする。それによって分析技術の評価や確認が客観的にできることになる。化学試験についての、このような仕組みをFood Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS)、微生物試験についてはFood Examination Performance Assessment Scheme for Microbiological Proficiency Assessment (FEPAS)とよんでいる。

一方、米国においては、古くからNational Institute of Standards and Technology (NIST) (1901年設立)が種々の標準物質を開発してきた。その対象は食品に限らず人の血液や尿、動物組織、植物組織、環境試料(土壌、大気)などによぶ。しかし、微生物試験用の標準物質については未開発である。

2003年のAOAC INTERNATIONAL Annual Meeting (Atlanta, Sept. 15-18, 2003)で、微生物標準試料についての興味ある成果がオーストラリア、BTF社によって発表された。大腸菌などの微生物生菌を、フローサイトメトリーとフリーズドライ技術を利用して、少数の生菌を計り取り、ボール状の凍結乾燥品にして小さなバイアルに入れたものであり、これをBioBallと称していた。標準品は30±2個という極めて少ない数の生菌を正確に含んでいることを保証している。2004年には、大腸菌の他、サルモネラ、リステリア、スタフィロコッカス、バチラスなどの菌種のBioBallも開発されている。BioBallは今日では「Easy QA Ball」という商品名で我が国に導入されている。

微生物を含む標準試料開発は益々重要になってくると思われるが、そのためにはさらに次のような要素技術が必要であろう。

(1) 単一細胞のマニピュレーション技術:①単一生菌の選定と把取、②生菌を損傷しないように固体マトリクス上へ静置、あるいは液体マトリクス中へ懸濁、③個々の単一生菌の状態が変動しないように①-②の操作を迅速に、④マトリクス中の菌の分布の制御と検証、特に粉体、ペースト、固体の試料の場合が技術的にもチャレンジング。

(2) 生菌含有試料の保存技術:①保存中の増殖を防ぐために冷蔵保存、あるいは冷凍保存、②冷凍保存の場合は、凍結、解凍による菌の損傷の影響評価が重要、③病原性微生物の場合は移送に対する法的規制の問題を回避する必要。

6 将来展望

冒頭にも述べたように、微生物試験の信頼性確保のためには4点セット、すなわちMV、PC、LA、SMが不可欠であるが、それらは国際的に通用する内容でなければならない。しかも、それは追従型ではなく、あくまで先導型でなければならない。それを実現するためには、次のような段階を踏んでいく必要があるだろう。

(1) 微生物標準法(培養法)の策定。

(2) コラボスタディーによるバリデーションスキームの策定、コラボスタディーの規模、評価委員会の構成、評価基準の策定など、の活動の中で、AOAC方式を参考に、具体的なコラボスタディーの設計も一部実施。

(3) 微生物標準法(培養法)のコラボスタディーによるバリデーション。

(4) 微生物標準法(培養法)に対する変法、あるいは代替法のコラボスタディーによるバリデーションスキームの設計。

前述の、「食品からの微生物検査標準法検討委員会」は、(1)～(3)の実施を目標にしている。その実現に向けた不断の努力が要請される。

解 説

微生物の迅速検出法

齊藤美佳子・松岡 英明

1. はじめに

微生物検出法の基本は培養法であるが、培養時間が長く、その時間の調整も難しい。特に測定対象が食品の場合、食品を微生物汚染から守り、食品の安全性を確保するためには、微生物の迅速検出法が重要である、との認識が高まってきている。

微生物菌数を迅速に測定するために種々の蛍光色素が利用されている。これらの蛍光色素によって蛍光を発するようになった細胞は、顕微計測やフローサイトメトリーで細胞単位での計数が可能である。また、細胞懸濁液の蛍光計測によって細胞集団の蛍光強度測定も容易にできる。蛍光計測の成否はいかにしてバックグラウンドを低く抑えるか、にかかっている。環境から採取した試料や食品試料中には、種々の固形物、色素、タンパク質、脂質などが含まれており、これらが共存した状態で染色操作すると、菌体以外のもので蛍光色素に染まるものが多々見られる。これがバックグラウンドとなる。例えば、生菌染色用の色素で染まる物質が含まれていれば、仮に菌体がいなかったとしても、「菌がいる」という結果になってしまう。こうした問題を防ぐ方法は、試料の精製に尽きる。そこで本稿では、迅速な生菌検出法である蛍光計測について、その原理、測定例について、さらに非培養法の鍵になるであろう、前処理技術について紹介する。

2. 微生物生死菌判別技術の動向

微生物検出は、生死菌判別と特定菌の同定に分けて考えられる。殺菌処理の適不適を判断するためには生死菌判別による。菌の種類を問わず確実に殺菌されていることを保障することが必要であるから、非特異的な検出原理でなければならない。

一般細菌用寒天培地でコロニー形成を調べる方法が依然として最も信頼できる方法とされている。確かに、分裂増殖してくる細胞が生細胞である、ということは誰もが認めることである。しかし、環境中には増殖しにくい菌が多数いるので、コロニーができなかったからといって、生菌がいなしきとは言い切れない。それが「偽陰性」である。また、一般細菌用培地と言っても、メーカーによって成分が同じとは限らない。この点も気になるところである。実用的には、コロニー形成まで1日以上以上の時間を要する点が問題であり、これに代わる迅速法の要請は極めて大きい。迅速法には、非培養法、細胞成長顕微解析法、マイクロコロニー法、などがある(表1)¹⁻¹³⁾。培養法と非培養法では、同一試料でも、生菌数が一致するとは限らない。その原理から予想されるように、培養法の方が少なめになる傾向がある。その傾向を概念的に示したものが図1(神戸大学、大澤 朗教授より供与いただいた図を改変)である。ストレスを印加し続けると、細胞が弱っていくが、その結果、増殖能が失われても細胞として死んでしまったわけではない。生きてはいるが増殖できない菌ということで、Viable but non-culturable cellsと呼んでいる。図2は、同一試料中の大腸菌を、培養法と非培養法で実測した例である。この例でも、

表1. 生菌検出法

迅速性	培養・非培養の別	原理・指標	検出・計測法	文献
通常培養法	培養法	細胞分裂、増殖を繰り返し肉眼で検知できる大きさのコロニー形成を待ち、これを計数。	寒天培地コロニー計数法	
		細胞分裂、増殖した菌体量を濁度、あるいは重量で計測。	フィルム、不織布などのシート状培地でのコロニー計数法 液体培地培養法	
迅速法	マイクロコロニー法（培養法）	細胞分裂、増殖を繰り返すが、通常のコロニーよりはるかに小さなコロニーの状態、これを計数。	蛍光染色法、顕微計数	[1]
	細胞成長顕微解析法（培養法）	細胞成長に伴う形状変化を直接顕微解析。	菌糸伸長速度計測法	[2,3]
			酵母出芽形状解析法	[4]
	非培養法	色素分子に対する細胞膜透過性の有無によって生死判別。生細胞では透過性無。色素分子の受動的取込。	蛍光染色法（PI, DAPI など） レドックス色素を利用した電気化学測定法	[5,6]
		細胞内エステラーゼ活性。生細胞で活性。	エステル型蛍光色素（FDA, CFDA など）を細胞内導入	[7,8]
		栄養基質取込活性。生細胞は能動的取込。	蛍光基質法（2NBDG, NBD-Gly など）	[9,10]
		生細胞が持つ還元力を直接、あるいは適当なメディエーターを介して計測。	蛍光色素法	
			NAD法（テトラゾリウム塩の利用など） 電気化学的方法	
		呼吸活性。分子状酸素を電子受容体とした還元力。	酸素電極法、走査型電気化学顕微鏡	[11,12]
		生細胞では高エネルギー分子の生成。	ATP法（ルシフェリン・ルシフェラーゼ系）	[13]
		生細胞では生体高分子（DNA, RNA, タンパク, etc.）合成。	タンパク質定量法	
		生細胞では遺伝子発現。	GFPなどのレポーター遺伝子を利用して遺伝子発現を可視化	

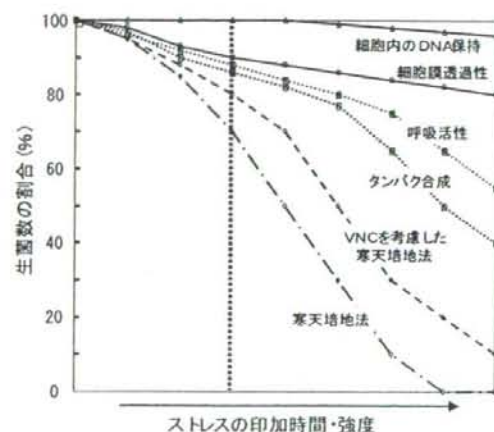


図1. 生死菌判別の指標の違いによる生菌率の相違

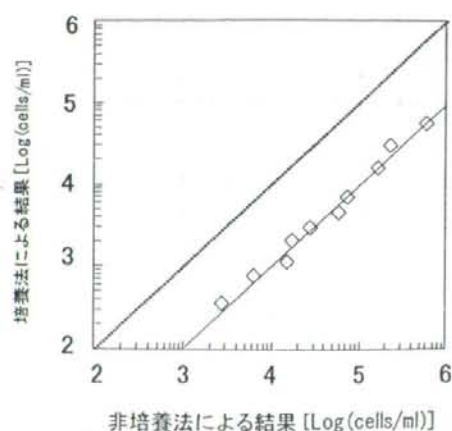


図2. 培養法と同一の結果を出力する非培養法

確かに、培養法の方が生菌数が少なくなっている。上述のように、培養法と非培養法と同じ結果になるとは限らないが、迅速法の結果を補正して、両者の値が等しくなれば良しと考えられる。

3. 一般生菌数測定に利用される蛍光色素

3.1 細胞内酵素によって直接蛍光分子に変換される色素

フルオレッセインジアセテート (FDA), カルセイン AM などは蛍光を発しないが、疎水性の分子であるため細胞膜を透過する。細胞内で、エステラーゼによってエステル部分が切られフルオレッセインになると蛍光分子に変わる (図3 (A))。しかし、死細胞では細胞内のエステラーゼが失活しているため FDA のままである。したがって、生細胞のみ蛍光を発する。この原理の色素で上市されているものは、ほとんどフルオレッセイン誘導体である。酵素活性が低かったり、細胞ごとに様でなかったりする場合の問題解決が実用化の鍵になる。

3.2 DNA と反応して蛍光を発する色素の利用

プロピジウムイオダイド (PI) (図3 (B)), エチジウムブロマイド (EB), DAPI, SYTO BC (Invitrogen) など多数知られている。これらのうち、PI や EB はイオン性分子のため細胞膜は透過できないが、死細胞では細胞膜が損傷され、色素が細胞内に拡散して核に達して DNA と結合して蛍光を発する。その結果、死細胞のみが蛍光を発する。一方、DAPI, SYTO BC は疎水的な

分子のため、生細胞の細胞膜も透過し、生細胞、死細胞共に蛍光を示す。従って、この2種の蛍光色素、例えば DAPI と PI で二重染色すれば、顕微画像上で、DAPI 染色像と PI 染色像の解析により、生細胞数が求められる。細胞以外の共存物質で蛍光を発するものを如何に減らすかに工夫が必要である。

3.3 蛍光修飾した栄養基質分子

グルコースは大抵の細胞が栄養源として取り込む基質である。このグルコースに蛍光標識した 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose) が微生物によって取り込まれ濃縮され、菌体が強い蛍光を示すようになる (図3 (C))。能動的に取り込まれるので、取り込み速度は速い。2-NBDG は、細胞内に取り込まれてから蛍光分子に変わる FDA とは異なり、元々蛍光分子であるが、細胞内に濃縮されるので、細胞は外液に比べて相対的に強い蛍光を発するようになる (図4)。従って、そのままでも蛍光細胞を識別できるが、実用的には 2-NBDG を取り込ませた後、細胞を濾過、または遠心分離によって分離した後、顕微計測する。最近、第二の蛍光基質である NBD-アミノ酸が合成され、2-NBDG と併用することで多くの食中毒菌等が蛍光計数できることが分かった (図5, 表2)。上記のエステラーゼの場合と同様、菌種の違い、同一菌種でも細胞ごとに取り込み活性が一樣ではないことが実用化にむけて解決すべき課題

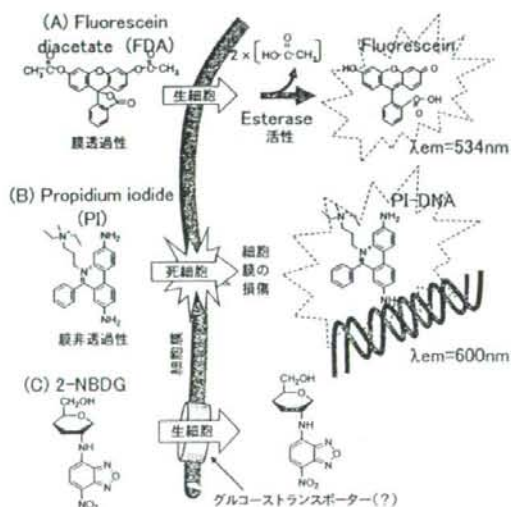


図3. 一般生菌数計測に利用される蛍光色素の例

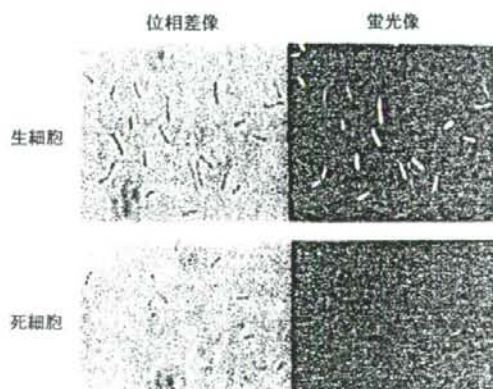


図4. 2-NBDG を用いて生きている大腸菌を検出

である。

3.4 その他の蛍光法あるいは発色法で用いる色素

基質を取り込むと細胞内に還元力が生成する。適当な酸化還元色素を加えると、その還元力を細胞外の色素に導くことができる。テトラゾリウム

(TZ) はその例である。例えばフェナジンメトサルフェート (PNS) を介して還元された TZ は発色し、その吸光度変化によって生細胞の存在を確認できる。

細胞が死ぬと細胞内酵素が溶出する。この酵素の一つ (指標酵素) を検出すれば死細胞の検出ができる。アルコールで殺菌処理することによって、

表 2. 蛍光基質取込結果

分類	菌 名	由来食品	蛍光基質							
			2-NBDG	NBD-Gly	NBD-Ala	NBD-Ile	NBD-Ser	NBD-Leu	NBD-Gln	NBD-Asn
大腸菌	<i>Escherichia coli</i> K-12		○	—	○	○	×	○	○	○
	<i>Escherichia coli</i> HB101		○	—	○	○	○	×	×	×
	<i>Escherichia coli</i> JM109		○	—	×	×	○	×	×	×
	<i>Escherichia coli</i> MCR5 α		○	—	○	×	×	×	×	×
	<i>Escherichia coli</i> BL21		○	—	○	○	○	○	×	○
	<i>Escherichia coli</i> AW539		×	○	×	○	○	○	○	×
	<i>Escherichia coli</i> O55		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Escherichia coli</i> O91		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Escherichia coli</i> O126		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Escherichia coli</i> ATCC8739		×	×	×	○	○	○	○	○
	<i>Escherichia coli</i>	ポテトサラダ	○	—	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	肉団子	○	—	—	—	—	—	—	—	
食品由来大腸菌群	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	中華サラダ	○	—	○	○	○	○	○	○
	<i>Enterobacter cloacae</i>	マカロニサラダ	○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ポテトサラダ	○	—	×	○	×	×	×	×
	<i>Citrobacter freundii</i>	シーフードサラダ	○	—	○	×	○	×	○	×
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	ポテトサラダ	○	—	×	○	○	×	○	×
	<i>Serratia liquefaciens</i>	マカロニサラダ	○	—	○	○	○	○	○	×
	<i>Serratia marcescens</i>	ポテトサラダ	○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	玉子とうふ	○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Citrobacter freundii</i>	シェーキ	○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Hafnia alvei</i>	シェーキ	○	—	○	×	×	×	×	○
	<i>Enterobacter cloacae</i>	シェーキ	○	—	—	—	—	—	—	—
<i>Serratia liquefaciens</i>	フレンチサラダ	○	—	—	—	—	—	—	—	
食中毒菌とその他の微生物	<i>Salmonella enteritidis</i> PT4		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Salmonella typhimurium</i> PT49		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Listeria monocytogenes</i> Y 7		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC		○	—	—	—	—	—	—	—
	MRSA SA111		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> T6		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TU17		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Citrobacter</i> N1		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Morganella morganii</i> N5		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Yersinia enterocolitica</i> Te-20		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Aeromonas hydrophila</i>		×	○	—	—	—	—	—	—
	<i>Vibrio mimicus</i>		×	○	—	—	—	—	—	—
	<i>Plesiomonas shigelloides</i> NP321		×	○	—	—	—	—	—	—
	<i>Bacillus cereus</i>		×	○	—	—	—	—	—	—
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> N19		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Streptococcus agalactiae</i> NCTC11360		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC14508		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Bacillus</i> sp. B-2		○	—	×	○	×	○	○	○
	<i>Micrococcus luteus</i> 12708		○	—	○	○	○	○	○	○
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC15442		○	—	×	×	×	×	×	×
	<i>Staphylococcus aureus</i> IFO12732		○	—	×	×	○	×	○	○

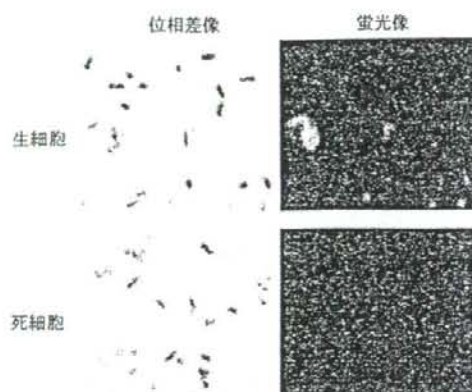


図5. NBD-Ileを用いて生きている大腸菌を検出

指標酵素が検出されれば、そこに生細胞がいたことがわかる。グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) や乳酸脱水素酵素 (LDH) はそのような指標酵素の例である。脱水素酵素では NAD (H) を用いる測定法 (吸光度, あるいは蛍光測定) 一般的であるが, G6PDH ではレゾルフィンを利用する方法 (蛍光測定) もある。

4. 前処理技術として重要な生菌分離

非培養法の信頼性の鍵は前処理技術にある。食品試料中には多数の妨害物質が含まれていたとしても、これらを速やかに分離除去でき、菌だけを単離できるならば、その後の非培養迅速法の精度は格段に向上するはずである。化学分析では、例えばカラムクロマトグラフィーにかける前には、十分試料を精製することが常識である。ところが、微生物検出では、菌を分離しなくても、そのまま寒天培地に播けば良し、とすることがあったためか、従来は、試料の前処理条件に余り注意が払われてこなかったように思われる。菌がきれいに単離できれば、生菌検出の場合に止まらず、特定菌検出における遺伝子解析や免疫分析においても著しく精度が向上すると期待される。その結果、特定菌検出に際して要請されていた「前処理としての培養」も必要なくなるかもしれない。

生菌分離の原理と方法には図6に示したものが挙げられる。濾過法に関しては精度のよい簡便な分離機器が既に開発されている¹⁴⁾。また、遠心



図6. 生菌分離の原理と方法



図7. 生菌分離の目的

分離法に関しても、密度勾配遠心分離後の簡便で精度のよい分取装置の開発が進められている¹⁵⁾。特定菌を選択回収するために、抗体固定化微粒子を用いた生菌分離方法を導入したキットも開発されている。密度の違いを利用した超音波分離法は、ルント大学の T. Laurell らによって展開され¹⁶⁾、既に血液中の血球と脂肪球の分離が試みられているが、さらに生菌分離への応用が検討されている。

生菌分離では、菌を「生かしたまま」分離することが重要である。非培養で迅速に検出した後、さらに菌種同定あるいは確認のために、その菌を増殖させて増やす必要が想定されるからである。信頼性の点では多少不安でも、とにかく迅速に結果を出すことが先決であり、その後、さらに念を押す必要があれば、始めに観察した、まさにその菌を増菌して、十分量の遺伝子や抗原を得て、詳細な解析を行うようにする¹⁷⁾、という趣旨であ

る(図7)。

5. おわりに

生菌数の簡便迅速計測法が実用的に重要であることは言うまでもないが、その鍵となるのは前処理技術である。現在、非培養法の開発と平行して、菌体を分離精製するための前処理技術開発が精力的に進められている。この場合、化学分析の場合と異なり、微生物細胞を生かしたまま分離する必要があるため、有機溶媒や強い界面活性剤は使用できない。基本は、上述のように濾過、遠心分離、密度勾配遠心分離、細胞電気泳動、誘電電気泳動、フローサイトメトリー、などである。試料の物性だけでなく、処理すべき容量も、分離技術開発上の重要な要件となる。

さらに、微生物の試験法の実用化を目指すためには、研究室レベルで、試験法の原理を開発する段階とは、明らかに異なる価値観で対処しなければならない点がある。例えば、新規の試験法開発の場合は、他の人が実施した試験法は、独創性の点で全く意味を待たない。しかし、バリデーションでは、他の人が実施した試験法を、全く同じ手順で実施して、同じ結果を出してこそ意味がある。また、試験法は誰が何のために使用するかが重要である。そこに、行政、国際通商、更に歴史的背景、文化、生活習慣などが密接に関わってくる。こうしたことを、総合的に理解したうえで試験法の国際的ハーモナイゼーションを進めることが重要であろう。

参 考 文 献

- 1) Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., Nasu, M., (2006) Simultaneous enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. Within three hours by multicolor fluorescence in situ hybridization with vital staining. *J. Microbiol. Methods*, 65, 623–627.
- 2) 呉 基鳳, 松岡英明 (1996) バイオセルトレーサーによる細胞センシング, 信学技報, CPM96-32 (6), 25–30.
- 3) 飯田泰広, 米村博貴, 呉 基鳳, 斉藤美佳子, 松岡英明 (1999) バイオセルトレーサーを用いた生葉アセトン抽出物中の抗真菌活性物質の高感度スクリーニング, 薬学雑誌, 119, 964–971.
- 4) Oh, K.-B., Chen, Y. S., Matsuoka, H., Yamamoto, A., Kurata, H., (1996) Morphological Recognition of Fungal Spore Germination by a Computer-aided Image Analysis and Application to Antifungal Activity Evaluation. *J. Biotechnol.*, 45, 71–79.
- 5) Bank, H. L., (1988) Rapid Assessment of Islet Viability with Acridine Orange and Propidium Iodide. *In Vitro Cell and Devel. Biol.*, 24, 266–275.
- 6) Frankfurt, O. S., (1983) Assessment of Cell Viability by Flow Cytometric Analysis using DNase Exclusion. *Exp. Cell Res.*, 144, 478–482.
- 7) Ingham, E. R., Klein, D. A., (1984) Relationships between Hyphal Activity and Staining with Fluorescein Diacetate. *Soil Biol. Biochem.*, 16, 273–278.
- 8) Wierda, W. G., Mehr, D. S., Kim, T. B., (1989) Comparison of Fluorochrom-labeled and ⁵¹Cr-labeled Targets for Natural Killer Cytotoxicity Assay. *J. Immunol. Meth.*, 122, 15–25.
- 9) Oh, K.-B., Matsuoka, H., (2002) Rapid Viability Assessment of Yeast cells Using Vital Staining with 2-NBDG, a Fluorescent Derivative of Glucose. *Intern. J. Food Microbiol.*, 76, 47–53.
- 10) Matsuoka, H., Oishi, K., Watanabe, M., Kozono, I., Saito, M., Igimi, S., (2003) Viable Cell Detection by the Combined Use of Fluorescent Glucose and Fluorescent Glycine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2459–2462.
- 11) Yasukawa, T., Glidle, A., Cooper, J. M., Matsue, T., (2002) Electroanalysis of Metabolic Flux from Single Cells in Picolitre-Volume Microsystems. *Anal. Chem.*, 74, 5001–5008.
- 12) Kaya, T., Nishizawa, M., Yasukawa, T., Nishiguchi, M., Onouchi, T., Matsue, T., (2001) A Microbial-Chip Combined with Scanning Electrochemical Microscopy. *Biotech. Bioeng.*, 76, 391–394.

- 13) 高橋寿洋, 中北保一, 奈良泰信, 上原昭弘, 門司佳夫, 渡 淳二, 篠塚 健 (1999) 自動化 MicroStar-RMDS-SPS (ATP-バイオルミネッセンス法) のビール工場における製品検査への応用. 日本防菌防黴学会誌, 27, 759-764.
- 14) Shimakita, T., Tashiro, Y., Katsuya, A., Saito, M., Matsuoka, H., (2006) Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit. *J. Food Prot.*, 69, 170-176.
- 15) Nayak, B. B., Kamiya, E., Nishino T. (2006) Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting. *FEMS Microbiol. Eco.*, 51, 179-186.
- 16) Nilsson, A., Petersson, F., Joensson, H., Laurell, T., (2004) Acoustic control of suspended particles in micro fluidic chips. *Lab Chip.*, 4, 131-135.
- 17) Fujioka, K., Geis, P., Saito, M., Matsuoka, H., (2007) Visualization of yeast single-cells on fabric surface with a fluorescent glucose and their isolation for culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 685-688.

大阪府立公衆衛生研究所 浅尾 努、河合 高生

7

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濁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

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. 衛生指標菌名の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、弁当及びそうじの衛生規範には、「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な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)=(Buffered brilliant green bile glucose)
MMGA(Minerals- modified glutamate)
BPW(Buffered peptone water)
【寒天培地】
EMB(Eosin methylene blue)
VRBA(Violet red bile agar)
VRBG(Violet red bile glucose)
TBX(Tryptone bile X-GLUC)
MYP(Mannitol egg yolk polymyxin)
【酵素基質】
MUG(4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide)

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	デノ寒天	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 リン酸緩衝液	35±1.0℃	11.1ml 1.11g
冷凍食品	デノ寒天 EC	リン酸緩衝液	35±1.0℃ 44.5±0.2℃	0.02 g 0.03 g
食肉製品等	BGLB EC	ペプトン加 生理食塩水	35±1.0℃ 44.5±0.2℃	3.0 g 0.5(0.55)g
	4種類	3種類		100倍以上の希

●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培地に画線培養する。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。

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、サルモネラリスチアのような病原菌、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ヶ月未満)乾

違反結果の是正措置	
腸内細菌科菌群	コアグラゼ陰性ブドウ球菌
製造工程の熱処理能力や、二次汚染をチェックする	衛生管理の改訂菌数が10 ⁵ /gを超えた場合は、エンテロトキシン試験を実施

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、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、ロットの可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、ロットの可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

現在 同研究所感染症部細菌課の主任研究員。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毒素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ュ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(一般細菌数)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が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		

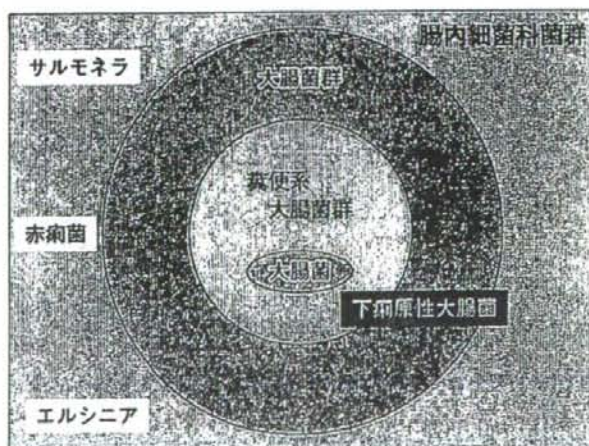


図1

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な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。かくいう筆者自身も、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	E. coli (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ままに、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

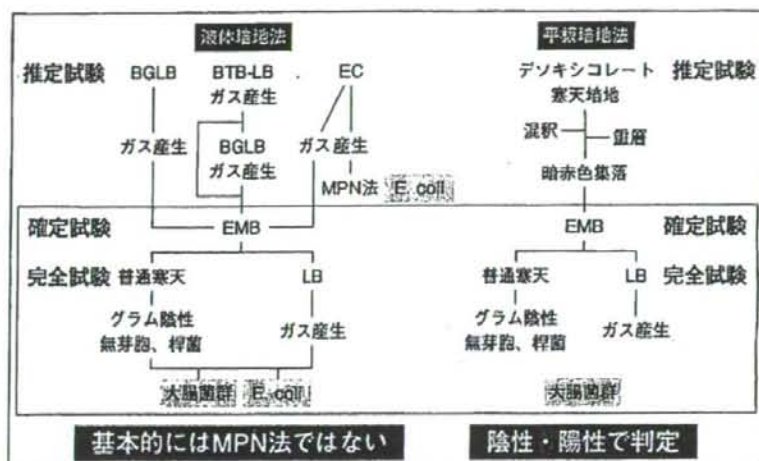


図2 日本の衛生指標菌試験法の概略図

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℃	0.222g
バター アイス類等	デソ寒天	生理食塩水	32～35℃	0.2g
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 (1.11g)
冷凍食品等	デソ寒天 EC	リン酸緩衝液	35±1.0℃ 44.5±0.2℃	0.02g 0.03g
食肉製品等	BGLB EC	ペプトン加生食	35±1.0℃ 44.5±0.2℃	3.0g 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枚のデソキシコレート寒天培地で混濁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

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培地と試料液の混濁培養法である。TBX培地で混濁

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、後に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。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培地で混濁した後、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

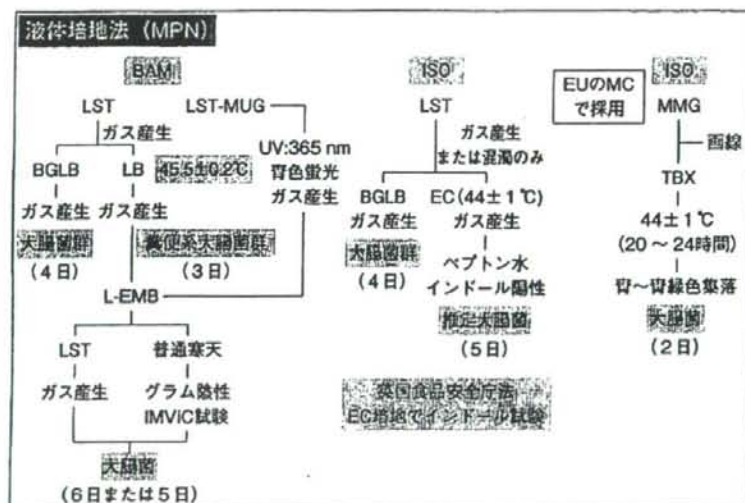


図3 大腸菌群、糞便系大腸菌群、大腸菌の試験法

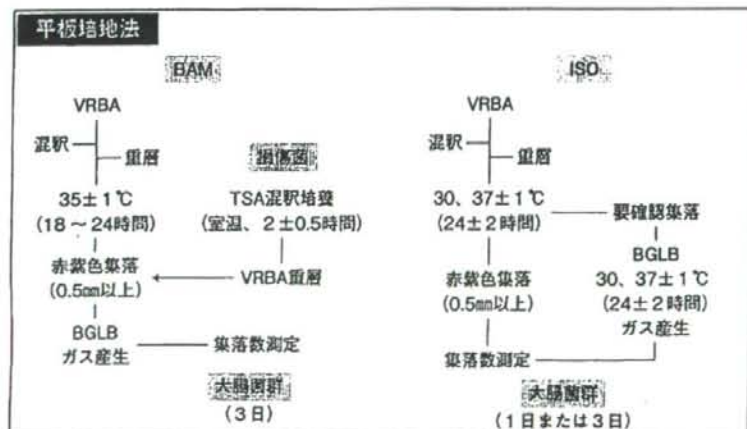


図4 大腸菌群試験法