



微生物検査簡易法導入のメリット

本稿はキッコーマンバイオケミファ株式会社主催の第1回「微生物検査コロセミナー」において、一般財団法人日本食品検査の澤田千尋氏が行った講演の要旨である。

同財団では微生物の受託検査などで、公定法や標準法による検査だけでなく、目的に応じて簡便・迅速な代替法も使用している。講演では、微生物検査において簡便・迅速法を導入するメリットや、その導入前に考慮すべき点、および同法人が微生物検査用フィルム培地「Easy Plate」を導入する前に実施した検証作業の概要などの解説が行われた。

Presenter

一般財団法人日本食品検査
事業本部 事業開発部門
上席技術専門役
澤田 千尋氏



Introduction

一般財団法人日本食品検査(JFIC)では、お客様の要望に応じて細菌検査や理化学検査、調査や指導など、さまざまなサービスを提供しています。そのうち微生物検査や衛生検査に関しては、以下の3つのサービスを提供しています。

①輸入食品検査

食品衛生法に基づく輸入食品の検査で、食品別の規格基準に定められた衛生指標菌や病原菌が検査対象になります。法で定められた検査なので、検査法は公定法を用いる必要があります。

②依頼検査

食品事業者が自主衛生管理や品質管理などの目的で依頼する検査を受託しています。検査項目や検査法は様々ですが、基本的には依頼者が指定した検査を実施します。

③店頭商品の収去検査、店舗衛生調査など

店頭で購入した商品を検査したり、スーパーや飲食店などの店舗を訪問してふき取り検査を行うこともあります。これらも、依頼者が指定する方法で検査を実施します。

Contents

■ 微生物検査に対する意識の変化	02
■ HACCPにおける微生物検査の役割	02
■ 簡便・迅速法の導入メリット	03
■ Easy Plateの原理と特徴	04
■ Easy Plateの導入前検証の事例	06

1. 微生物検査に対する意識の変化

依頼者が指定する検査法は、以前であれば圧倒的に公定法または標準法が多かったのですが、最近では検査法に関する要望に変化が見られています。

(1) 以前の主流：公定法と標準法

食品事業者が、委託検査の際に公定法や標準法を要望する理由としては、「保健所などの収去検査と同じ方法で検査しておきたい」という心理が大きいと思います、「何となくお墨付きのありそうな方法を選びたい」という心理も作用しているようです。

以下に、公定法と標準法の位置づけを簡単に説明します。

①公定法とは

公定法とは、食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準」の検査法、および乳等省令に基づく乳および乳製品の検査法を指します。

ただし、公定法は対象となる食品が限られているので、多くの食品には公定法が存在しません。また、公定法の多くは、推定試験、確認試験、血清試験などを行うので、検査に時間がかかります。

②標準法とは

標準法とは「食品衛生検査指針 微生物編」に収載された検査法

を指すことが多いです。ただし、同指針の2015年版が発行された後は、公定法、ISO法、FDA(米国食品医薬品局)のBAM法、AOAC法といった国際標準法が主流となっており、指針独自の方法はなくなりつつあります。

(2) 最近の主流：製品検査から 工程管理の検証の検査へ

2018年に改正食品衛生法が公布され、2020年からHACCP制度化が施行されました。これによって微生物検査の目的にも変化が生じてきていると感じます。

HACCP制度化の前は、微生物検査の主な目的は出荷時の合否判定でした。ロットごとに検体を抜き取り、その結果によってロット全体の衛生状態を推定していました。しかし、抜き取り検査には「抜き取った製品が必ずしもロット全体の衛生状態を表すわけではない」という側面があります。

一方、HACCP制度化以降は、微生物検査は「HACCPシステムを有効に運用するための手段」として位置づけられるようになってきています。検査の目的が「HACCPを適切に運用していることの検証」となったことで、以前のような「保健所と同じ試験法を採用しておきたい」という意識から、「目的に合った検査方法でよい」という意識に変化しているようです。

2. HACCPにおける微生物検査の役割

HACCPプログラムは一般的衛生管理プログラムという全般的な衛生管理の上に構築されます(図1)。微生物検査は、この2つのプログラムに対して活用されます。

(1) HACCPにおける微生物検査の活用

HACCPプログラムでは、例えば加熱工程をCCPとして管理する場合、CCPの管理基準(加熱時間や温度など)で確実に危害微生物を殺菌できるかどうかを検証する必要があります。そうした検証の際に微生物検査は用いられます。

また、食品の製造過程で不適合品が出た場合、リワーク(手直し)の実施、原材料としての再利用などを行うことが一般的ですが、「どのような条件であれば、どのようなリワークが可能か」などのルールを決める際にも微生物検査は用いられます。

そして、HACCPが正常に機能していることを確認するために、定



図1 HACCPと一般的衛生管理プログラムの関係

期的な最終製品の微生物検査が実際に用いられる場合もあります。

(2) 一般的衛生管理プログラムにおける微生物検査の活用

一般的衛生管理プログラムでは、「施設の清掃方法、装置や器具の洗浄方法などが、効果的に微生物を除去できているか」などを、ふき取り検査によって確認することがあります。

(3) 検査法を選定する際の考え方

最近、検査法の選定基準として、検査を委託する側、受託する側の双方で「検査法に『妥当性確認(validation)』と『性能検証(verification)』が必要である」「検査法の妥当性確認と性能検証が済んでいれば、その検査結果は信頼できる」という考え方を共有す

る下地が醸成されつつあるようです。

以下に、妥当性確認と性能検証の意味を説明します。

①妥当性確認

妥当性確認(validation)とは、検査法が要求される性能基準を満たしているか確認することです。簡易法の妥当性確認では「すでに確立された国際規格などと比較して、同等の性能を有しているか」を評価します。

ただし、こうした評価は、個々の食品企業などの検査室で行うのは困難です。そのため、AOACやMicroValなどの第三者機関によって妥当性確認された検査法を選ぶことが一般的です。

②性能検証

性能検証(verification)とは、その検査法を実際に自身の検査室に導入したときに適切な結果が得られるかを評価することです。

当法人の場合、微生物検査用フィルム培地「Easy Plate」を導入する際に性能検証を実施しています。その概要については後述します。

3. 簡便・迅速法の導入メリット

(1) 簡便・迅速法の選定時の注意点

簡便・迅速法とは、従来の微生物検査法よりも少ない手順や短い時間で検査結果を得ることのできる方法全般を指します。

検査法を選ぶ際に重視したい点は、①妥当性確認(validation)されていること、②従来の培地法との整合性があること、③多種の食品に適用できること、④専用の設備・機器を必要としないこと、という4点が挙げられます。

④に関しては、専用の設備や機器が必要な場合、メンテナンスに想定外のコストがかかったり、メーカーの保守が終了した場合は他の機器に乗り換えなければならないといった事態も想定されます。

以上の要素を総合的に勘案して「導入のしやすさ」を考えると、私は第一候補は「乾式培地(フィルム培地)」であると考えています。

(2) フィルム培地のメリット

従来の寒天培地や液体培地をフィルム培地に置き換えた場合のメリットとして、①培地の作製と確認検査が不要で、検査に係る時間を短縮できる、②作業時間を短縮でき、コスト低減につながる、③検査に関する記録を簡素化して記録を取る作業が軽減できる、という3点が挙げられます。

①培地調製の時間や器具が不要

フィルム培地によって軽減できるコストのイメージを(図2)で表現しています。従来法では、培地を作製するためのガラス器具、滅菌のためのオートクレーブ、滅菌した寒天培地を保温しておく水槽などが必要ですが、フィルム培地ではこれらが不要です。また、これらの機器は定期的なメンテナンスや校正が必要で、そういった手間やコストも考慮する必要があります。

培地・試薬は従来法の方が安価です。シャーレと粉末培地を用いた従来法は、コストはフィルム培地の半分程度で済むので、消耗品についてはフィルム培地は割高となります。ただし、フィルム培地を使用するコスト面のメリットは「時間の短縮による人件費の低減」にあります。フィルム培地は、培地の作製や機器のメンテナンス、検査の記録を取る時間を短縮につながるため、人件費の面でのメリットは大きいといえます。

そうしてフィルム培地の導入によって浮いた時間は、製造現場の衛生管理の高度化にあてることができそうです。

ただし、検査項目の一部でも従来法を実施する場合、オートクレーブや恒温水槽などの機器が必要です。「フィルム培地で置き換えられない検査項目があるか?」「従来法とフィルム培地を併用する場合、フィルム培地の導入によるコスト効果はどの程度か?」といった点は、導入前に十分に考慮する必要があります。

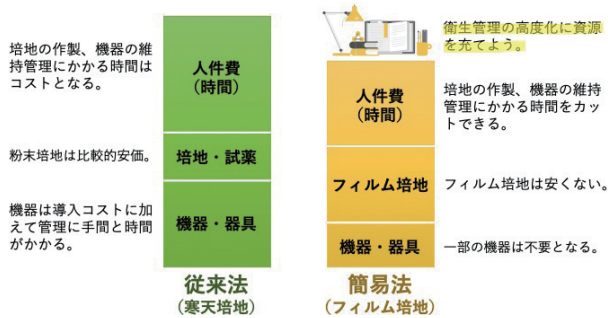


図2 フィルム培地を導入した際のコスト削減のイメージ

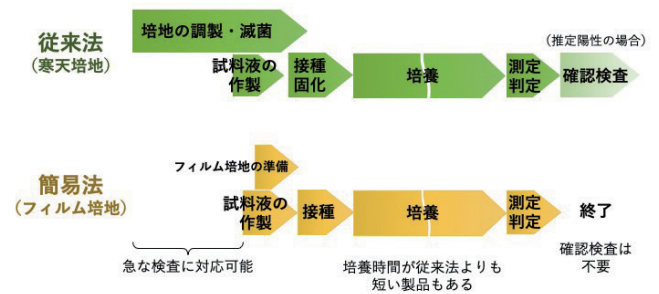


図3 フィルム培地を導入した際の時間短縮のイメージ

②検査時間の短縮、検査開始までの時間の短縮

フィルム培地によって短縮できる時間は、大きく①検査に着手するまでの時間と、②推定陽性の結果が出た場合に行う確認検査の時間、という2点です(図3)。

例えば、従来法では、夕方にルーチン検査が終わり、残った培地を捨ててしまった後にクレーム品の検査が入った場合、寒天培地の作製から着手しなくてはなりません。一方、フィルム培地の場合は、培地調製が不要なので、すぐに検査に取り掛かることができます。

また、フィルム培地上にコロニーが発育した場合、基本的に確認検査は不要です。公定法の確認検査は短くとも1〜3日程度は必要なので、フィルム培地を用いることで大幅な時間短縮が可能となります。

急な検査に即座に対応できることと、検査の終了までの時間が延びることがない(検査に必要な日数が予測しやすい)ことは、フィルム培地の大きなメリットです。

③記録に関する作業の簡素化

最近では、ISO/IEC 17025認定を取得する検査室が増えていきます。ISO/IEC 17025では、検査工程の記録を取ることが重要な要素になっています。また、認定を取得していない検査室でも、検査結果が正しいことを後から検証できるよう、記録をしっかり取ることを取引先と約束している場合も多いと思います。

検査の記録に求められる要素として「遡及性」と「反復性」があります。「遡及性」とは、検査結果から遡って、インキュベーターの温度や使用時間、使用した培地や希釈水のロットとるように、記録同士が連鎖していることです。「反復性」とは、同じ検査を繰り返し実施できるよう、記録に基づいて、できるだけ近い条件で検査できるようにしておくことです。

この2つの要素を満たした記録を取らなければなりません。従来法では「検査の工程が多い」「使用する機器や器具が多い」などの理由から、非常に手間のかかる作業となっていました。フィルム培地であれば、そうした工程は簡略化されます。また、フィルム培地で必要な記録は限られているので(例えば、使用したキットのロット番号など)、検査記録を簡素化することにもつながります。

4. Easy Plateの原理と特徴

ここでは当法人が使用している微生物検査用フィルム培地「Easy Plate」の特徴や、検証活動の事例を紹介します。

(1) 一般生菌: Easy Plate AC

①一般生菌とは

一般生菌は、一般的にすべての細菌を指す用語と捉えられがちですが、正しくは好気性または通性嫌気性の中温菌を指します。

標準寒天を用いた場合、寒天培地中の細菌は1ヶ所から移動できずに同じ場所で増殖し、およそ24〜48時間でコロニーを形成します。コロニーは白色〜乳白色や黄色の場合が多いです(写真1)。比較的、食品の色調に近いので、試料液に食品残渣が混入した場合は、拡大鏡を使うなどしてコロニーと残渣を区別する必要があります。

②Easy Plate ACのコロニー

一方、Easy Plate ACでは、細菌のコロニーは赤色を呈するので、食品残渣との区別は比較的容易です(写真1)。

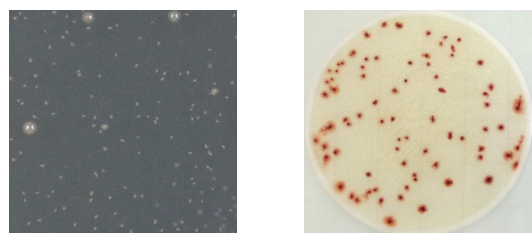


写真1 一般生菌のコロニー(左:標準寒天培地、右:Easy Plate AC)

(2)大腸菌群:Easy Plate CC/ Easy Plate EC

①大腸菌群とは

大腸菌群は、ヒトや動物の糞便だけでなく、土壌、水、埃などに幅広く分布する細菌です。そのため、手指などを介した糞便汚染や、環境全般からの汚染の状況を推測できる指標菌として扱われています。

②Easy Plate CCの測定原理

Easy Plate CC は、酵素基質法を採用しており、培地に含まれる発色基質が、大腸菌群の乳糖分解酵素によって分解されると、その分解物が発色し、青色を呈します(写真2)。

酵素基質法は確実性の高い検査法で、青色のコロニーが発育した場合は確認検査をせずに陽性と判定することができます。

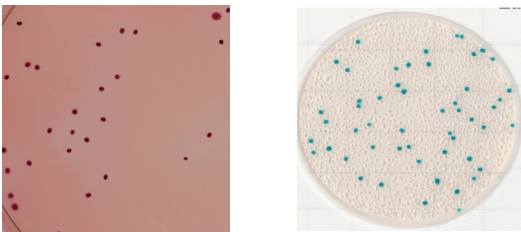


写真2 大腸菌群のコロニー
(左:デソキシコレート培地、右:Easy Plate CC)

③なぜ確認検査が不要か

デソキシコレート培地の場合、大腸菌群は培地に含まれる乳糖を細胞膜にあるラクトース輸送体から取り込み、 β -ガラクトシダーゼという酵素によってガラクトースとグルコースに分解します。生成したグルコースが、さらに複雑な化学反応を経てピルビン酸や乳酸に分解され、これらの酸によって培地が酸性になり、pH指示薬が赤色を呈します(写真2)。このため推定陽性の場合、確認検査が必要です。

一方、Easy Plate ECの場合、培地に含まれる発色基質(Magenta-Gal)が細胞内に取り込まれた後、乳糖と同じように酵素で分解されてガラクトースとプロモクロロインジゴという赤紫色を呈する色素になります(図4)。そういう意味では、Easy Plate ECは「 β -ガラクトシダーゼを持つという大腸菌群の特徴をより直接的に反映している」といえます。

以上のように、Easy Plateは呈色までのステップが短く、細菌以外の要因によってコロニーの色が変わる可能性が低いため、確認検査が不要です。

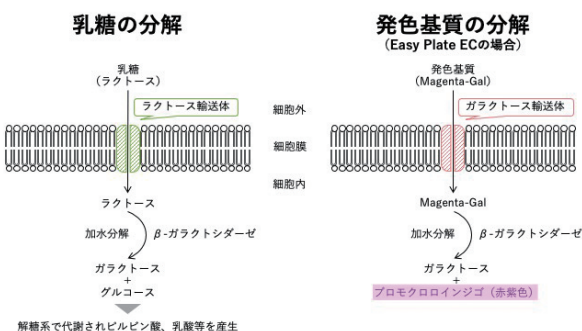


図4 大腸菌群による乳糖および発色基質の分解

(3)大腸菌:Easy Plate EC

①従来法による大腸菌検査

大腸菌の検査は、従来法ではEC発酵管培地という液体培地で検査することが多いです。ただし、従来法では44.5°Cで発育可能かどうかで大腸菌群と大腸菌(糞便系大腸菌を含む)を区別するので、培養時の温度管理が重要になります(公定法では44.5±0.2°Cというシビアな管理が要求されます)。

②Easy Plate ECの測定原理

Easy Plate ECは、発育可能温度ではなく、特定の酵素を持っているかどうかで大腸菌か大腸菌群かを判別するので、従来法のようなシビアな温度管理は必要ありません。また、大腸菌群と大腸菌を1枚のフィルム培地上で判別できるので、従来法のように2種類の培地を使い分ける必要はありません。

細菌の細胞内に取り込まれた発色基質が、大腸菌特有の酵素である β -グルクロニダーゼによって分解され、青色のプロモクロロインジゴが生成されます(写真3、図5)。この β -グルクロニダーゼは、大腸菌のうち約95%が持っているといわれています。



写真3
Easy Plate ECのコロニー

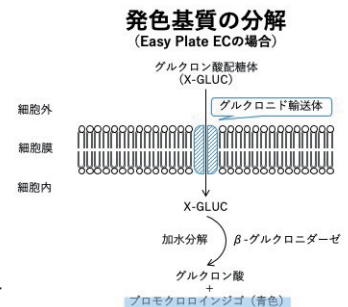


図5 Easy Plate(酵素基質法)は大腸菌特有の酵素の働きを利用している

③大腸菌・大腸菌群の結果は、従来法とEasy Plateで一致するか?

大腸菌群の中には、ラクトース輸送体を持っていないものがあります。このような大腸菌群を「潜在的乳糖発酵菌」と呼びます。潜在的乳糖発酵菌は、乳糖を分解する酵素は持っていますが、乳糖を細胞内に取り込むことができないので、デソキシコレート培地上で赤色のコロニーを形成しません。一方で、発色酵素基質であるX-Galは細胞内に取り込めるので、X-Galを分解してEasy Plate CC 上に青色のコロニーを形成します。

では、このような結果の違いをどう解釈すべきでしょうか。大腸菌・大腸菌群の結果は、従来法と酵素基質法(Easy Plateなど)で一致するのでしょうか?

実は、潜在的乳糖発酵菌の大部分はヒトや動物の糞便からも検出されるものなので、大腸菌群の本来の意味である「糞便、土壌および環境全般からの汚染指標」と合致します。つまり、潜在的乳糖発酵菌が検出されたということは、通常の大腸菌群が検出されたのと同じように「食品が汚染されており、衛生対策が必要」という状況

を意味するのです。

先ほど、 β -グルクロニダーゼは大腸菌に特有の酵素(大腸菌のうち約95%が β -グルクロニダーゼを持つ)と説明しましたが、言い換えれば約5%の大腸菌は β -グルクロニダーゼを持たないので、酵素基質法では検出できないことになります。これは問題になることでしょうか？

大腸菌は大腸菌群の一部ですから、基本的には乳糖を発酵します。しかし、大腸菌のうち10%は乳糖の発酵が遅く、検査法の培養時間内ではデソキシコレート培地に赤いコロニーを作ったり、EC発酵管培地の中でガスを産生することができません。このように、従来法

でも酵素基質法でも「大腸菌として検出されない大腸菌」は存在します。どちらかと言えば、酵素基質法の方が例外が少なく、大腸菌を的確に検出できます。

また、大腸菌群や大腸菌のような汚染指標菌は、特定の細菌を指すのではなく、土壌や糞便から検出される細菌とおおむね一致する性質を持つことを考慮すると、従来法と酵素基質法で検出される菌が完全に一致しなくても、食品の衛生管理の目的では問題にならないと考えられます。

5. Easy Plateの導入前検証の事例

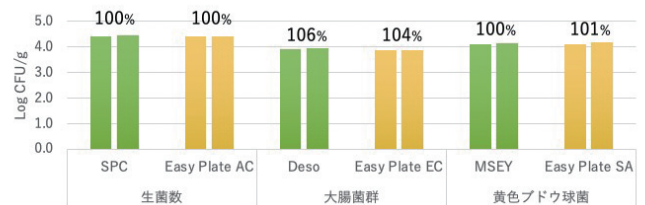
当法人が現在、年間契約を結んで細菌検査を受託している外食産業、スーパー、コンビニエンスストアチェーン34社のうち、24社分で簡易法を用いています。また、この24社のうち12社分でEasy Plateを用いて検査を行っています(首都圏事業所、2021年度)。これらの受託検査を導入する前に実施した、検査法の性能検証(validation)の概要を紹介します。

Easy PlateはAOACによる妥当性確認(validation)が行われた培地で、Performance Tested Method (PTM) 認証を取得しています。そこで当法人では、この実際の食品で利用した場合に正しい結果が得られるかを確認するために、以下の2種類の導入時検証を行いました。

(1) 基本性能の評価

まず製品の基本的な性能検証のため、標準試料を用いた測定を行いました。当法人は国内の検査室を対象に技能評価試験を提供しているので、本検証では技能評価試験用に調製された検体(複数の菌種を含む、均質で安定な試料)を使用しました。なお、評価用試料は牛乳を基材とした試料を用いました。牛乳は基材の影響がほとんどないため、培地や測定キットの基本的な性能評価に適しています。

従来法とEasy Plateで評価用試料の菌数を2回ずつ測定し、得られた菌数を対数化し、評価用試料の付与値に対する比率を算出しました。評価用試料の付与値は、生菌数が 2.5×10^4 、大腸菌群が 5.2×10^3 、黄色ブドウ球菌が 1.3×10^4 でした(図6)。棒グラフ上のパーセンテージは回収率(評価用試料の付与値に対する測定値の割合)です。どの項目も従来法とEasy Plateはほぼ同じ回収率でした。



SPC: 標準寒天培地、Deso: デソキシコレート寒天培地、MSEY: 卵黄加マノンニット食塩寒天培地

図4 基本性能の検証結果

(2) 食品成分が結果に及ぼす影響の評価

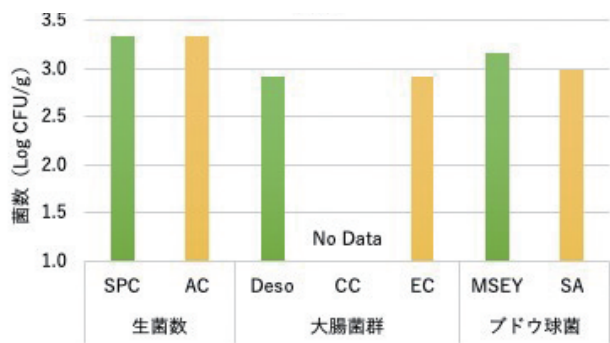
各種の生鮮食品に疑似的な汚染試料(基本性能の検証で使用した評価用の標準試料)を添加して回収率を算出しました。実は、Easy Plateは加工食品では問題なく使えることをすでに検証済みでしたので、今回は生鮮食品での評価を行いました。

「従来法による菌数の対数値」と「Easy Plateによる菌数の対数値」を比較して、その差が $-0.3 \sim +0.3$ の範囲内に収まっていれば「従来法と同等程度の結果が得られている」と判断しました。ちなみに、 $-0.3 \sim +0.3$ の範囲であれば、「Easy Plateの菌数」の「従来法の菌数」に対する比率はおおむね50~200%に相当します。

① 生食用馬肉の評価結果

図7は生食用馬肉の結果です。どの項目においても従来法とEasy Plateの測定値は同程度でした。

酵素基質法では、食品由来の成分の影響を受ける可能性があります。生鮮食品(特に動物性の食品)には酵素が多く含まれるので、酵素基質法であるEasy Plate ECの結果に影響が出る可能性を想定していましたが、コロニーの発色には影響はありませんでした。



SPC: 標準寒天培地、Deso: デソキシコレート寒天培地、MSEY: 卵黄加マンニト食塩寒天培地、AC・CC・EC・SA: Easy Plate AC・CC・EC・SA (データはすべて2回測定の平均値)

図7 生食用馬肉における従来法とEasy Plateによる菌数の比較

②その他の生鮮食品での評価結果

その他、植物性、動物性の生鮮食品で検証を行いました。Easy Plate AC・CC・SAではおおむね従来法と同程度の測定値が得られ、コロニーの色調への影響もほぼないという結果になりました(図8)。

ただし、Easy Plate ECによる大腸菌群の測定では、イカ、スズキ、鶏肉で対数の差が0.3を超えていました。特に鶏肉ではデソキシコレート培地とEasy Plate ECでは1.13という大きな差が見られました。この理由については、イカとスズキについてはグリコシダーゼの影響があるのではないかと推測しています。鶏肉については、ももとの菌数が高く、潜在的乳糖発酵菌が存在していたためではないかと推測しています。

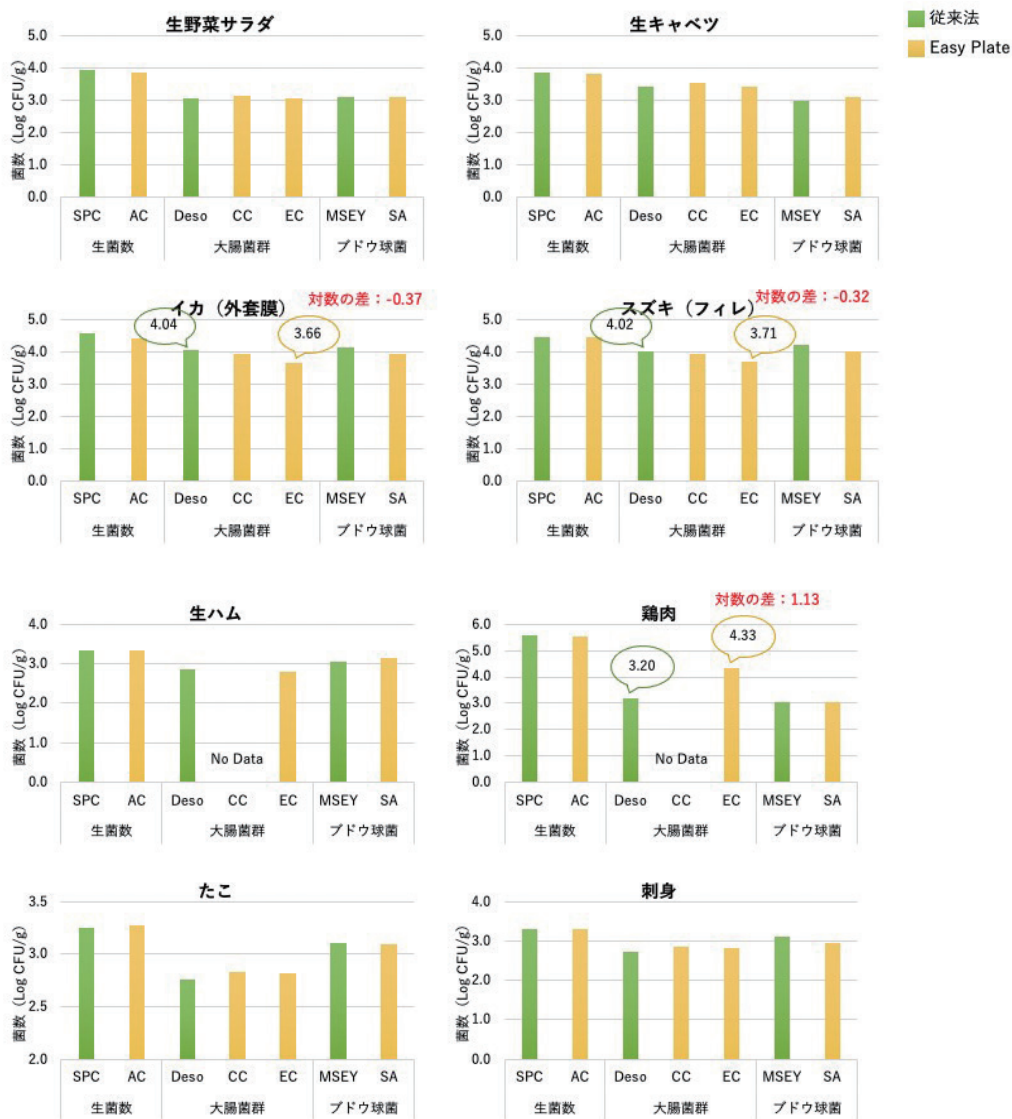


図8 野菜・魚介類・畜肉における従来法とEasy Plateによる菌数の比較

③導入前検証から導き出した結論

以上の結果と考察を踏まえ、当法人ではEasy Plateの導入に関して、すべての加工食品と生鮮野菜で適用可能と判断しました。

ただし、動物性の生鮮食品では、Easy Plate ECによる大腸菌群測

定で若干の影響が見られたことから、当面は従来法を併行して、さらなる知見を蓄積していく予定です。



キッコーマンバイオケミファ株式会社

〒105-0003 東京都港区西新橋2-1-1

E-mail : biochemifa@mail.kikkoman.co.jp

URL : <https://biochemifa.kikkoman.co.jp>