

国内の食品微生物試験法とISO法との ハーモナイゼーション

Japanese Methods for the Microbiological Examination of Foods should be harmonized with ISO methods

東京農業大学 教授 **五十君 静信**

Shizunobu Igimi (Professor)
Tokyo University of Agriculture



キーワード

微生物試験法、国際整合性、妥当性確認

01 | はじめに

2011年10月に生食用食肉の微生物基準が施行されたことにより、我が国も食品の微生物基準の策定に、コーデックス(Codex Alimentarius Commission;CAC)の求める数値的指標(Metrics)を導入した。このような方向性が決まったことから、国内の食品の微生物基準策定は、コーデックスにより2007年に示された微生物学的リスクマネジメント方法に関するガイドラインCAC/GL 63-2007¹⁾に則り、行われていくものと思われる。

我が国のこのような食品微生物のリスクマネジメント方法の国際対応に合わせて、食品の微生物検査では現実的に最も影響を受けるとされる試験法についても、国際整合性のある試験法への移行が進められている。2015年3月に出版された食品衛生検査指針(微生物編2015)²⁾では、試験法の妥当性確認(バリデーション)という考え方が大幅に取り入れられている。また、従来の基準や通知で示されていた試験法も、ISO法とのハーモナイゼーションが進められており、平成27年(2016年)には黄色ブドウ球菌やサルモネラ属菌の試験法についてもコーデックスが採用している標準法である国際標準化機構(International Organization for Standardization ;ISO)法と整合性のある試験法に変更されている。

一方、厚生労働省並びに農林水産省では食品の衛生に関して、食品の工程管理の制度化、特にコーデックスが標準としている危害要因分析重要管理点(Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP)の導入の検討が進められている。昨年2016年12月には、9回にわたり開催された厚生労働省の“食品衛生管理の国際標準化に関する検討会”の最終とりまとめの文書が公開された。この文書では、国内のHACCPの制度化に向けての方向性を示している。このように、わが国の食品衛生をとりまく環境は、大きく変わりつつあり、食品における微生物試験法にも国際整合性が強く求められている。今後食品衛生における微生物試験法にどのように対応していく必要があるかについて考えてみたい。

02 | 食品微生物の リスクマネジメントの国際基準

まず食品のリスクマネジメントを取り巻く国際情勢であるが、食品は国際的に流通しているため、各国が独自のマネジメント方法を持ち微生物基準を決めるということは避けるべきで、原則としては食品の国際標準を決めるコーデックスの基準やガイドラインに従うことが求められている。コーデックスの示す基準に拘束力があるわけではないが、コーデックス基準に従っていない場合には、非関税障壁として貿易相手国から世界貿易機関(World Trade Organization;WTO)に提訴される可能性がある。それ故、食品におけるコーデックス基準は実質的に拘束力のあるものとなっている。コーデックスが食品微生物の国際基準を決めるうえで、科学的根拠を尊重するという考え方は、食品のリスクマネジメントにおいて根幹となる考え方で、それを支えているのはリスク評価であり、その結果から数値的指標を設定しマネジメントを行うことになる。

各国の事情により、コーデックス基準とは異なった微生物基準の設定が必要な場合や、そもそもコーデックスに基準の無い食品とハザードの組み合わせに、その国の食習慣に合った微生物基準の策定とリスクマネジメントを行う必要があることがある。例えば、我が国が策定した生食用食肉の微生物基準のように、その国に固有と思われるような食習慣により独自の基準設定が必要となる場合には、コーデックスのガイドラインであるCAC/GL 63-2007に従い、リスク評価を基に科学的根拠のある微生物基準の策定が求められるようになっていく。

このような場合、CAC/GL 63-2007では、摂食時安全目標値(Food Safety Objectives;FSO)、達成目標値(Performance Objectives;PO)、達成基準(Performance Criteria;PC)などの数値的指標(Metrics)を数値として示すことを求めている。また、FSOは、適切な衛生健康保護水準(Appropriate Level of Protection ;ALOP)との関係で設定することが求められている。このような手順を経て、微生物学的基準(Microbiological Criteria;MC)を決めることになる。

MCは、コーデックスの別のガイドラインCAC/GL 21-1997³⁾で、食品製品あるいはあるロットの合否を規定するもの

で、特定の試験法とサンプリングプランの使用条件下で認められる微生物濃度と汚染頻度と定義されており、微生物(毒素)、サンプリングプラン、検査単位、試験法およびフードチェーンにおいて適用される箇所の5つの要素から構成される。数的指標で示された微生物濃度などの数値を検証する目的があるため、検証に用いることの出来る試験法は、その性能の評価が科学的根拠のある妥当性確認(バリデーション)されていることが必須である。コーデックスの基準における標準試験法は、ISO法と指定されており、それによらない場合は、科学的根拠のある妥当性確認された試験法を採用することとされている。

03 | 微生物学的基準(MC)で求められる試験法

コーデックス基準に採用されている標準試験法はISO法であり、MCの検証に用いることの出来る試験法はISO法または、科学的根拠のある妥当性確認された試験法である。MCでは、上述のように数的指標で示された微生物濃度などの数値を検証する必要があるため、用いる試験法は、あらかじめ妥当性確認されていることが求められている。すなわち、今後我が国が新たに微生物基準を設定する場合に用いることが可能な試験法は、ISO法または科学的根拠のある妥当性確認が行われた試験法であることが求められることになる。ISO 16140:2003⁴⁾には、代替試験法の妥当性確認の方法が示されているので、このガイドラインに従った妥当性確認が科学的根拠の目安となる。試験法にも数学的、統計学的なバックグラウンドを求めている。このガイドラインは、2016年に改訂され、ISO 16140-2:2016⁵⁾として発行されており妥当性確認に関する手法が更に細かく整理・記載されている。

このような要求に応える試験法の整備は、国立医薬品食品衛生研究所で進められており、標準試験法検討委員会により標準試験法(National Institute of Health Sciences Japan - The Methods for the Microbiological Examination of Foods ; NIHSJ-MMEF)として公開されている (<http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html>)。NIHSJ-MMEFを略してNIHSJ法と呼び、NIHSJ-(番号)で各試験法が示されている。NIHSJ法はISO 16140に従って、当該微生物に関するISO法を参照法として、妥当性確認が行われており、コロバ試験により妥当性確認(いわゆるフルバリデート)された試験法である。すなわち国家レベルの公定法として利用することを想定し検討された試験法である。2017年1月現在、既に30の試験法が検討され、17の試験法については検討が終了し、標準試験法としてwebで公開されている。生食用食肉の基準に採用された腸内細菌科菌群試験法(NIHSJ-15)、リステリアの基準に採用されたリステリアの定性法(NIHSJ-08)、及び定量法(NIHSJ-09)、食品、添加物等の規格基準のサルモネラ属菌試験法(NIHSJ-01)、黄色ブドウ球菌試験法(NIHSJ-03)、サーベイランスのためのカンピロバクター試験法(NIHSJ-02)などが、公定法として活用されている。

04 | 培養による試験法の意義

これまで述べてきた試験法は、公定法として利用する目的で示されている試験法である。国家基準などの評価に用いる公定法には、いわゆるフルバリデートされた培養による標準試験法を用いる必要がある。食品の微生物基準適合性を公的に判断するような目的で使われることを想定しており、裁判などに耐え得るような科学的根拠のある試験法である。従って、食品の基準適合性を判断するような目的の検査においては、このような試験法を用いることが求められる。これらの試験法は、通常培養法であるが、その理由は培養法が現在のところ食品中の微生物を評価する最も信頼性の高い方法であると考えられているためである。

培養法では、検体から微生物を分離する場合、前処理方法の検討が必要となる。例えば、食品や土壌などから病原微生物を分離する場合には、食品や土壌など、検体の種類に合わせた前処理が必要となる。微生物の菌数が少ない場合は、選択的な増菌が必要で、検体の種類により対象とする微生物を選択的に増殖させる適当な増菌培地を選択する。食品や環境からの分離では、損傷菌対策が重要であり、損傷菌が回復し増殖可能となる条件設定が菌の分離に影響を与える。また、分離する菌の性質に合わせて、培養温度、気相(嫌気条件、微好気条件、好気条件や二酸化炭素分圧など)、培養時間などの条件設定を行う。用いる培地の選択と、前増菌、選択的増菌、選択的分離培養などを組み合わせ菌の分離を試みるが、培地上に形成された集落から、目的の菌を選択するには検査を行う者の経験と熟練を必要とする。

培養法は、このように、検査を行う者の知識や培養経験と専門的な技術を必要とすることから、試験結果は実施者の経験や技術力に影響を受けやすい。培養法の欠点は、検査を行う者が微生物に関する情報に精通し手技に熟練を要することと、検査結果が得られるまでに時間がかかることである。経験を積んだ熟練者が行えば、検査の正確さに関しては培養法が最も優れた試験法と言える。

05 | 迅速法の意義

培養法は正しく行われるならば最も信頼性のある結果が得られるが、前述のような熟練を要求し手技が煩雑であることや、検査結果を得るまでに時間がかかるといった欠点を考えると、検査の目的によっては他の試験法を選択する方がよいことがある。培養法の欠点を克服する方法として、さまざまな迅速法あるいは簡易法と呼ばれる方法が開発されている。ここでは、このような迅速法や簡易法を含めて、迅速法と呼ぶことにする。

培地等による培養法が確立されていない微生物では、培養法を利用することができない。この場合は、微生物の特徴が明らかになれば、その性質を利用して当該微生物の存在を示すことになり、その方法が当該菌を特異的に検出可能であれば、試験法として利用可能となる。これらには、資化性、形態、代謝物、特徴的な構造、酵素、毒素などが利用可能である。

遺伝子配列を利用した方法は、現在最も有用な方法として多

くの微生物の検査に利用されている迅速法である。遺伝子配列を利用した方法は、培養のできない微生物を評価することもできる。PCRなどの技術により理論値で1個の微生物の検出が可能である。多数の微生物が共存していても検出することが可能であり、リアルタイムPCRを用いれば定量的な評価が可能である。遺伝子配列を利用した方法では、微生物が生きているかを判断することは難しいとされていたが、RNAを標的とする、あるいは微生物の膜の健全性と組み合わせる手法など新しい技術の開発によりこの欠点を克服しつつある。メタゲノム解析などでは、菌の集団を網羅的に評価することが可能である。

抗原性を標的とした免疫学的方法も迅速法としてしばしば利用されている。抗体を利用した方法は、一般的に安価に迅速な検査をすることができ、その利用価値は高いと評価できる。免疫学的方法には、対象を微生物やその産生物を抗原とし特異的な抗体を利用する方法と、病原体に対する抗体を標的として評価する方法があり、後者は臨床診断に用いられることが多い。

ATP測定法は、微生物を評価するというよりも汚れを含めて清浄度を評価するというコンセプトの全く異なる検査方法で、培養法とは単純に比較のできない方法であるが、薬品や食品の製造工程の洗浄度を評価する目的で有用な試験法として広く利用されている迅速法である。その他、いろいろな原理で開発された迅速法が存在し、研究段階の方法を含めて、多様な迅速試験法の開発が試みられている。

06 | 試験法の妥当性確認を行う 第三者機関

基準適合性の評価には公定法を用いるべきであるが、それ以外の微生物検査では、その検査の目的に合わせて十分な信頼性がある試験法であれば用いることが可能である。特に今後HACCPが制度化され、その検証として用いる試験法は公定法などの培養法を採用するよりもむしろ信頼性のある迅速法を用いる方が現実的である。多種・多様な試験法からどの試験法を選んだら良いか判断する場合、その試験法が妥当性確認されているかどうかによって選ぶことが良い。試験法の妥当性確認に関して総合的にまとめた書籍は、サイエンスフォーラム社から発行されている“最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック⁶⁾”が推薦できる。食品の評価に用いるためには、妥当性確認済みの試験法であるかは最低限考慮されるべきである。“十分な信頼性”を判断するとき参考となるのが、妥当性確認である。従って、信頼性のある試験法を開発するためには妥当性確認に関して知識がないと、“十分な信頼性”のある試験法を開発できない。どのレベルで妥当性確認が行われているかによって、対象となる試験法がどの程度の信頼性を持っているかを評価することが可能である。

現在国内の公定法は国際的な標準法であるISO法と整合性を重視して置き換えられている。その主な理由は国際整合性をもたせることであるが、海外の第三者機関による妥当性確認を活用できるようになるということも重要である。国内の公定法がISO法と妥当性確認されていると、今後はISO法を参照法として妥当性確認により評価されている試験法の性能を判断することが可能となる。妥当性確認されている方法であれば、代替法として迅速法の性能を評価することができる。

まだ国内には、試験法の妥当性確認を行う評価機関(第三者機関)はないが、ヨーロッパでは、ISO法を参照法として代替法の妥当性確認を行う第三者機関が機能している。フランスのAFNOR、オランダのMicroVal、ノルウェーのNordValといった第三者機関は、ISO法を参照法として代替試験法を評価しており、その評価を受けた試験法は、信頼できる方法として広く活用されている。アメリカでは、既にISO法との整合性に力を入れているが、AOAC INTERNATIONALという第三者機関により、公定法であるFDA-BAM法やAOAC-OMAといった標準試験法との妥当性確認が行われている。

微生物試験法では、化学物質の試験法のように適切な標準物質を設定することが難しく、ガイドラインなどにに基づき誰もが妥当性確認を行うという状況ではない。そこで、微生物試験法の妥当性確認は、上述のような第三者機関による妥当性確認を活用する必要がある。図1に、標準試験法(NIHSJ法)を介した国内の公定法、ISO法、アメリカのFDA-BAM法との関係についてまとめた。このようなネットワークにより、第三者機関により妥当性確認された試験法が評価可能であることが理解できるものと思う。

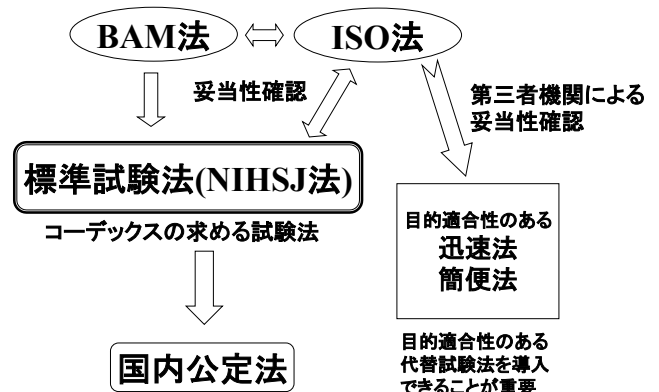


図1 標準試験法と主な試験法との連携

07 | 腸内細菌科菌群試験法が 登場したのは必然

2011年に導入された生食肉の微生物基準の腸内細菌科菌群試験法は、いわゆる国際スタンダードであるISOの試験法をそのまま導入したものである。これまで国内での使用実績の全くない試験法である腸内細菌科菌群試験法はなぜ、採用されたのか?実は、コーデックスのガイドラインCAC/GL 63-2007¹⁾に従ってMCを設定しようとする、その検証としての試験法はISO法を採用する必要があった。使用する培地が異なる衛生指標菌試験法をISO 16140に従い該当すると思われるISO法と妥当性確認することは難しいため、コーデックスの標準法とされているISO法をそのまま導入することになった。

腸内細菌科菌群試験法は、ヨーロッパでは広く使われている衛生指標である。国内の公定法が採用しているDESO培地を用いた大腸菌群試験法を使っている国は現在ほとんどなく、国際整合性の立場から基準値を評価する試験法として採用することは困難であった。衛生指標は、多種・多様な菌が混在しているため、妥当性確認により性能評価することは容易ではない。衛生指標については国際標準法をそのまま採用していくこと

が重要であると思われる。特定の培地による菌の集団をとらえるという考え方から、分類学的な集団を衛生指標とするべきであるという考え方がISO法で定着しつつある。今回の選択は、このような方向性を持つISO法を採用することにより、今後食品の検査も遺伝子診断などが主流となっていくであろうということも考慮されていると言える。

08 | 目的に合わせた試験法の選択

図1に示したネットワークを活用すると、第三者機関などで評価された多くの代替法が利用可能となってくる。つまり、目的に合わせて試験法を選択する幅が広がるということになる。検査の目的によって採用する微生物試験法は異なる。例えば、サーベイランス、問題の程度、実態を把握するための調査に使う試験法は、公定法ほどのスペックは要求されない。工程の管理のモニタリングの試験法についても同様である。つまり、微生物試験法はその目的によって、十分な性能が期待できる試験法であればそれを採用すれば良く、選択肢は様々である。性能はある程度担保しながら、目的に最も適合した試験法を選択することが重要である。どのレベルで検査を行うことが出来るかがわかる試験法を選ぶことが重要で、自分の目的に合っている性能かを判断する根拠とできるのが、その試験法がどのレベルで妥当性確認をされているかによって判断すればよい。

微生物試験の選択肢を増やすために、現在我々は標準試験法の整備を進めており、他の代替試験法を評価するための尺度に使えるような標準試験法となることを期待している。標準試験法を尺度としてほかの試験法を妥当性確認により評価し、当該の代替法はどの目的なら使えるという判断ができるようになることを期待している。国内にはまだ、海外で機能しているような第三者機関は存在しないため、当面はISO法を参照法として評価している海外の第三者機関の評価を参考とすることになる。代替法である“迅速簡便法”などが試験法としてどの程度の性能なのかを明確にできるような考え方も整備することが必要である。

09 | おわりに

検証の信頼性を確保するためには、信頼性の高い試験法を採用していく必要がある。公定法で検討された妥当性確認はあくまでも法的根拠のある体系であり、国家基準の適合性判断に用いられる試験法は公定法である。一方、今後は食品の微生物制御は、工程管理すなわちHACCPの制度化に向かっている。食品の工程管理の検証には、必ずしも公定法を用いる必要はなく、信頼できる必要とする性能を持った迅速簡便法を利用するなど、目的にあった十分な性能が担保できる試験法を上手く使うことが求められる。微生物の試験法の妥当性確認は、欧米では第三者機関により行われている。特にヨーロッパには三か所の第三者機関が機能しており、ISO法を参照法として妥当性確認された試験法のリストを示している。アメリカではAOACインターナショナルによる妥当性確認が行われており、このような第三者機関の評価を受けている代替試験法を用いていくことが大切であるといえる。

参考文献

- 1) *PRINCIPLES AND GUIDELINES FOR THE CONDUCT OF MICROBIOLOGICAL RISK MANAGEMENT (MRM)* (Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 63-2007).
- 2) 食品衛生検査指針 微生物編2015 (日本食品衛生協会, 東京, 2015).
- 3) *PRINCIPLES AND GUIDELINES FOR THE ESTABLISHMENT AND APPLICATION OF MICROBIOLOGICAL CRITERIA RELATED TO FOODS* (Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 21-1997).
- 4) *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods* (International Organization for Standardization, ISO 16140, 2003).
- 5) *Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method* (International Organization for Standardization, ISO 16140-2, 2016).
- 6) 最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 安井明美, 五十君静信, 後藤哲久, 丹野憲二, 湯川剛一郎編. (サイエンスフォーラム, 千葉, 2010).