

ルミノメータを使った簡易・迅速微生物検査 ～MicroSnap の有用性検証～

川越信幸^{*1}，佐々木愛澄^{*1}

^{*1} ニッタ株式会社

1. 簡便・迅速な微生物検査キットの有用性

① HACCP 制度化がもたらす変化～最終製品検査から工程管理を重視する流れに～

2020 年より HACCP 制度化などを含む改正食品衛生法が施行されることに伴い、微生物検査の考え方についても、大きなパラダイムシフトが求められている。これまで日本の食品微生物検査は「最終製品を公定法で検査した結果」が重視される傾向にあった。しかし、HACCP では、原料の受入れから加工、出荷に至るまでの各工程の「工程管理」を適正に行わなければならない。すなわち、「工程管理が確実に行われているか？」を検証するための検査が求められる。

米国では、90 年代から水産加工品や食肉製品、ジュース製品など、品目ごとに HACCP が義務化されてきたが、2011 年の FSMA（米国食品安全強化法）の公布に伴い、実質的にすべての食品製造業を対象に HACCP が義務化された。EU では 2004 年にすべての食品事業者を対象に HACCP 制度化が公布された（2006 年より施行）。すでに「工程管理の制度化」はグローバルな潮流である。日本でも「最終製品の検査結果が合格＝安全な製品」という固定観念からの脱却が求められている。

② 自主検査は必ずしも公定法で行う必要はない

そうした背景から、微生物の自主検査に取り組む食品企業が増加することが予測される。しかし、公定法は培地調製などの手間がかかる、手順が煩雑（特別な手技が要求される）、培養に時間がかかる、などの困難さも指摘されている。また、公定法で得られた結果を対外的に信頼してもらうためには、検査室や検査員の質の管理（すなわち内部精度管理および外部精度管理の実施）も求められる。一般の食品企業の検査室、あるいはこれから自主検査を始めようとする検査室が、そうした困難さを克服し、精度管理まで行うのは、現実的には困難な場合も多いと考えられる。

そこで注目されているのが簡便・迅速な微生物検査である。自主管理としての検査（原材料の検査、中間製品や最終製品の検査、環境の検査、工程管理の状況を検証するための検査など）は、必ずしも公定法で行う必要はない。自社の状況に応じて、自社で設定した「検査の目的」に応じて、検査法を選定することになる。

ただし、顧客に対して検査結果を提出した際に、「この検査結果は信頼できる」と受け入れてもらうためには、「どのような検査法を採用したか？」が問われる。「国際市場で信頼される自主検査の方法」とは、ISO 法、あるいは、ISO 法との整合性が確認されているキット化された代替法（簡便・迅速法）などである。後者は、具体的には、第三者機関（AOAC インターナショナル、NordVal、MicroVal、AFNOR）によって妥当性確認が行われた検査法ということになる。

自主検査としての微生物検査は、これら「第三者機関による妥当性確認をされたキットを用いた検査」（以下、代替試験法）を行い、必要に応じて（例えば年 1 回といった頻度で）専門の検査機関に「正しい試験が実施できているか？」という評価をしてもらうことで（例えば外部精度管理への参加するなどに取り組むことで）、「信頼できる検査体制」を整備することができるであろう。

編注： 日本では、国立医薬品食品衛生研究所を中心に設置された「食品からの微生物標準試験法検討委員会」が策定した「標準試験法」（通称 NIHSJ 法、National Institute of Health Sciences Japan - The Methods for the Microbiological Examination of Foods）が、ISO 法との整合性が確認された、妥当性確認が行われた「信頼できる検査法」として認識されている。

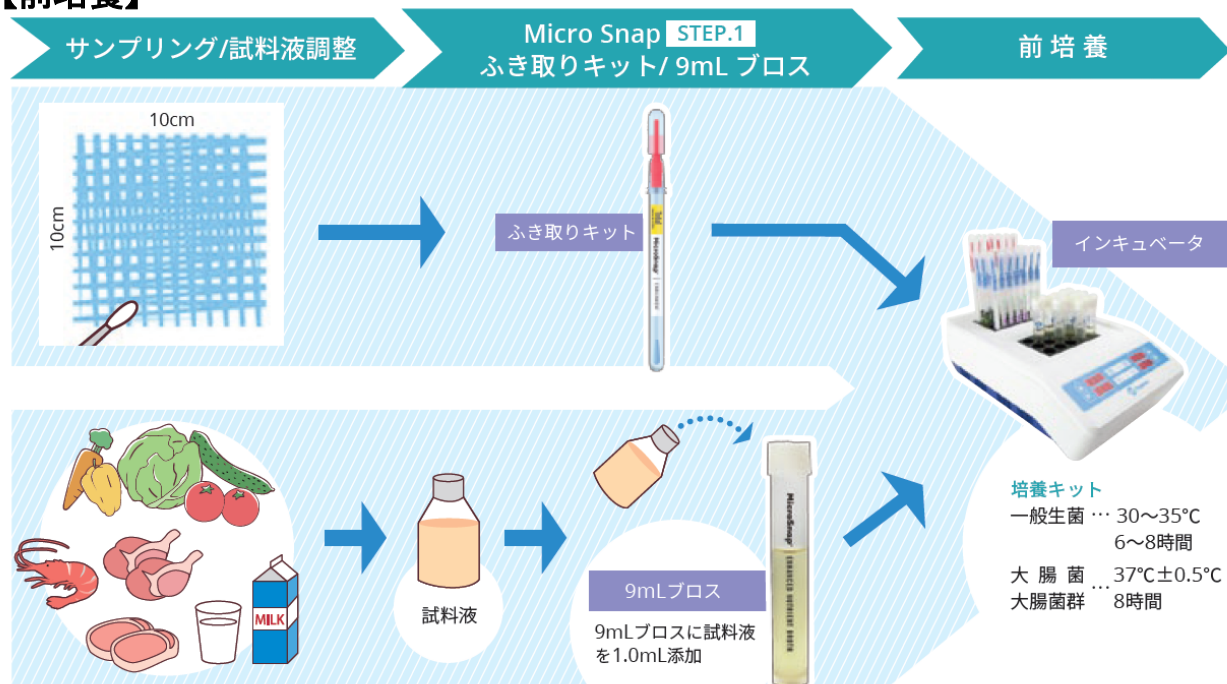
2. MicroSnap の有用性

① 検査キットに求められる「迅速性」「簡便性」「信頼性」

自主検査でキットを選択する際に求められるキーワードは「迅速性」「簡便性」「信頼性」である。そこで注目されている検査キットの一つが、英国・hygiena 社の迅速微生物検査キット「MicroSnap」シリーズである。

- 1) 迅速性： 一般的に公定法などの培養法では、検査結果が得られるまでに数日を要する場合がある。そのため、日配品などでは、「検査結果が出た時には、すでに喫食されている」という場合もある。また、検査結果が出るまで、製品を倉庫などに留め置く場合、（検査結果が出るまでは）倉庫のスペースなどが必要になる。MicroSnap は短時間の培養で判定可能（図 1 参照）なので、そうした課題の解消に効果が期待される。
- 2) 簡便性： MicroSnap は検体を調製するだけで、誰でも簡単に、特別な教育・訓練を受けていなくても、特別な装置がなくても、正確な検査ができる。少人数であっても、多検体を取り扱うことができる。また、現場に検査キットを持ち込むことができるので、検査室など特別なスペースも不要である。培地調製が不要で、培養時間を短縮できるので、検査に要する人員や時間の負担が大幅に軽減できる。
最近は人手不足が深刻な問題となっており、「検査業務に割り当てられる人員が限られている」「検査担当者に十分な教育・訓練を行う時間が確保できない」などの課題を抱えている企業は少なくないが、MicroSnap を活用することで、そうした人手不足への対策として貢献するだけでなく、総労働時間の短縮など“働き方改革”にもつながることが期待される。
また、緊急の検査の要請があった場合でも、検査担当者が不在の状況でも迅速な対応できるようになる。
- 3) 信頼性： MicroSnap は AOAC-RI PTM 認証を取得しているので、その検査結果は国際市場において十分に信頼される。輸出をしている（あるいは検討している）企業の自主管理ツールとしても有効な選択肢として期待される。

【前培養】



【検出・測定】

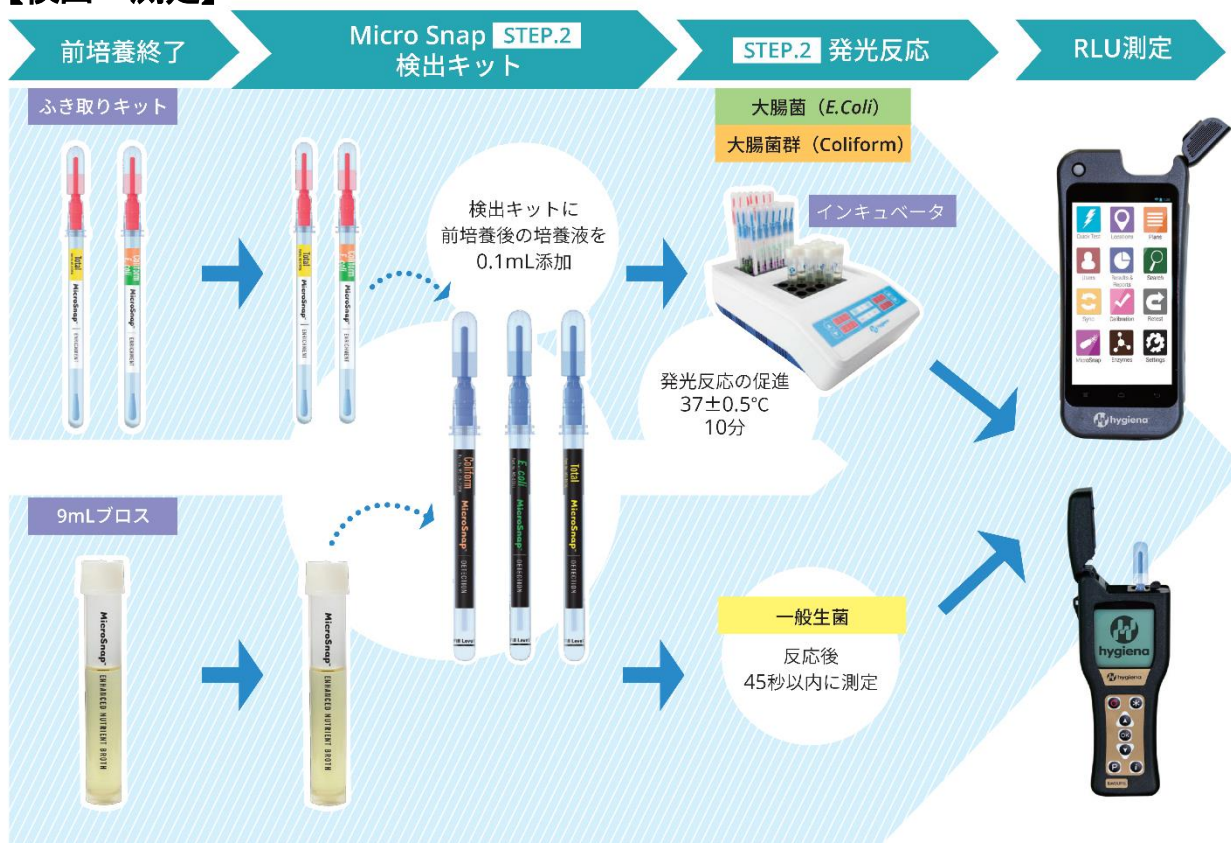


図1 MicroSnapの基本的な操作手順

② MicroSnap の性能検証

MicroSnap は、一般生菌、大腸菌、大腸菌群の検査を簡便・迅速に行うことができる。そこで、ニッタ・クリーンエンジニアリング事業部ではグラム陰性桿菌として大腸菌 (*Escherichia coli*)、グラム陽性球菌として黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の菌液を用いて、MicroSnap の性能検証を行った。

実際の食品検査では、食品に含まれる成分等が検査結果に影響を及ぼす場合が多い。実際に本キットを採用する前には、(実際の食材を用いた) 検証が必要である。そうした検証の際は、以下に示す実験を、自社の食品を用いて行うことを推奨する。

1) MicroSnap : Step1 (培養キット) の増殖速度 (検出時間) の検証

MicroSnap の基本的な操作手順を図 1 に示す。検体は、環境検査の場合はふき取り検体、食品検査の場合は食材を前処理 (段階希釈など) したものをを用いることができる。MicroSnap の 9 mL 培養キットで 35℃ならびに 30℃培養を行った結果を表 1.1~1.4 に示す。なお、一般生菌の検査では、日本の公定法では 35℃培養、ISO 法などでは 30℃培養を行うことになっている。

大腸菌、黄色ブドウ球菌ともに、初発菌数が 10^2 CFU/mL レベルでは 7 時間以内、 10^3 CFU/mL レベルではさらに短い時間の培養で、菌の存在が確認できることがわかった。また、30℃培養より、35℃培養の方が、検出までに要する時間は短縮できることもわかった。つまり、初発菌数が 10^2 CFU/mL 以上の汚染が存在する検体であれば、午前中に MicroSnap で検査を行えば、夕方には「汚染リスクがある」という結果が出てくる。

表 1.1 ルミノメータ測定値 (*Escherichia coli*)

	培養温度 (℃)	培養時間 (時間)	添加菌数レベル (CFU/mL)			
			10^2	10^3	10^4	10^5
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	30	添加菌数実測値	7.1×10^1	7.1×10^2	7.1×10^3	7.1×10^4
		7	23	301	2914	9108
		8	109	1258	8342	OVER
		14	OVER	OVER	OVER	OVER
	35	添加菌数実測値	7.1×10^1	7.1×10^2	7.1×10^3	7.1×10^4
		7	251	4084	9627	OVER
		8	1965	9192	OVER	OVER
		14	OVER	OVER	OVER	OVER

(RLU)

表 1.2 生菌数測定値 (*Escherichia coli*)

	培養温度 (℃)	培養時間 (時間)	添加菌数レベル (CFU/mL)			
			10^2	10^3	10^4	10^5
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	30	添加菌数実測値	7.1×10^1	7.1×10^2	7.1×10^3	7.1×10^4
		7	2.4×10^4	2.1×10^5	2.4×10^6	1.7×10^7
		8	8.6×10^4	1.2×10^6	8.8×10^5	5.9×10^7
		14	3.3×10^8	3.5×10^8	4.0×10^8	3.2×10^8
	35	添加菌数実測値	7.1×10^1	7.1×10^2	7.1×10^3	7.1×10^4
		7	1.1×10^5	4.5×10^6	4.4×10^7	1.9×10^8
		8	9.6×10^5	1.7×10^7	1.7×10^8	2.4×10^8
		14	3.7×10^8	4.1×10^8	3.4×10^8	4.3×10^8

(CFU/mL)

表 1.3 ルミノメータ測定値 (*Staphylococcus aureus*)

	培養温度 (°C)	培養時間 (時間)	添加菌数レベル (CFU/mL)			
			10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	30	添加菌数実測値	1.1×10 ²	1.1×10 ³	1.1×10 ⁴	1.1×10 ⁵
		7	13	142	1161	8746
		8	49	466	4268	OVER
		14	OVER	OVER	OVER	OVER
	35	添加菌数実測値	1.1×10 ²	1.1×10 ³	1.1×10 ⁴	1.1×10 ⁵
		7	516	6917	OVER	OVER
		8	3492	9104	OVER	OVER
		14	OVER	OVER	OVER	OVER

(RLU)

表 1.4 生菌数測定値 (*Staphylococcus aureus*)

	培養温度 (°C)	培養時間 (時間)	添加菌数レベル (CFU/mL)			
			10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	30	添加菌数実測値	1.1×10 ²	1.1×10 ³	1.1×10 ⁴	1.1×10 ⁵
		7	5.4×10 ⁴	7.1×10 ⁵	4.8×10 ⁶	4.4×10 ⁷
		8	3.2×10 ⁵	2.8×10 ⁶	2.3×10 ⁷	1.1×10 ⁸
		14	3.0×10 ⁸	4.8×10 ⁸	4.6×10 ⁸	4.3×10 ⁸
	35	添加菌数実測値	1.1×10 ²	1.1×10 ³	1.1×10 ⁴	1.1×10 ⁵
		7	2.1×10 ⁶	2.3×10 ⁷	1.1×10 ⁸	3.3×10 ⁸
		8	4.3×10 ⁶	5.2×10 ⁷	2.2×10 ⁸	4.4×10 ⁸
		14	3.5×10 ⁸	3.5×10 ⁸	5.0×10 ⁸	4.2×10 ⁸

(CFU/mL)

2) MicroSnap : Step2 (検出キット) の反応性の検証

また、初発菌数が 10⁴ 以上の検体について、室温の Step1 試薬で 1 時間静置した後（培養工程を経ずに）、Step2 試薬で反応させ、ルミノメータで測定した結果を表 2 に示す。いずれもルミノメータで検出可能であった。

表 2 Step2 (検出キット) の反応性

	添加菌数レベル (CFU/mL)				
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	8.9×10 ³	8.9×10 ⁴	8.9×10 ⁵	8.9×10 ⁶	8.9×10 ⁷
	1	9	72	834	6672
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	9.2×10 ³	9.2×10 ⁴	9.2×10 ⁵	9.2×10 ⁶	9.2×10 ⁷
	0	4	30	362	4327

(RLU)

補足：MC-Media Padと公定法の比較

上記の検査と同一の検体を用いて MC-Media Pad と公定法を比較したところ、**表 3** の通り高い相関性が確認できた。

表 3 MC-Media Pad と公定法の比較

		添加菌数レベル (CFU/mL)			
		10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	公定法	7.7×10 ¹	7.7×10 ²	7.7×10 ³	7.7×10 ⁴
	MC-Media Pad	6.7×10 ¹	6.4×10 ²	7.1×10 ³	6.5×10 ⁴
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	公定法	1.2×10 ²	1.2×10 ³	1.2×10 ⁴	1.2×10 ⁵
	MC-Media Pad	1.2×10 ²	1.2×10 ³	1.0×10 ⁴	1.4×10 ⁵

(CFU/mL)

3. 最後に

以上のように、自主検査に MicroSnap を用いることで、迅速・簡便・高信頼で「食の安全・安心」を確保できることが確認された。自主検査計画の一例としては、例えば生菌数の測定を行う際、スクリーニング検査として検体の 6 時間培養を行い、基準値（自主的に設定した RLU 値）を超えた場合は、「加熱食品では大腸菌群、非加熱食品では大腸菌の定性検査（MicroSnap の Step2 による検査）を行う」「追加的な試験として、同定検査や公定法検査などを行う」などの検査計画の組み方も有効と考えられる。また、シート培地と MicroSnap を併用することで自主検査であっても、公定法を念頭に置いたより精度の高い微生物検査体制が確立できる。

さらに、従来の培養法では、インキュベータ内に培地の保管スペースが必要だが、MicroSnap ではそのスペースが格段に削減できる。また、廃棄物量も減るなど、環境負荷の低減にもつながる。環境への配慮、SDGs（Sustainable Development Goals, 持続可能な開発目標）への取り組みなどを課題とする企業においても、極めて魅力的な選択肢といえる。

今後は第三者機関による妥当性確認を受けた MicroSnap の様な迅速法が自主検査のスタンダードになるだろう。迅速で簡便な代替法の幅広い普及が、食品事業者のより安全で安心な食品の提供に繋がることを期待する。

謝辞

この評価試験にご協力戴くとともに有益なご助言を賜りました一般財団法人 東京顕微鏡院 森哲也先生に感謝の意を表する。

参考

- ATP・迅速検査研究会 第 28 回定例講演会 講演資料「食品の微生物試験法の国際対応と、現場における試験法選定の考え方」, 五十君静信
- ATP・迅速検査研究会 第 34 回定例講演会 講演資料「標準法から通知法に採用された試験法（サルモネラ属菌, 黄色ブドウ球菌）解説と HACCP 義務化へ向けての検査体制構築の考え方」, 五十君静信
- ATP・迅速検査研究会 第 41 回定例講演会 講演資料「食中毒や微生物検査に見る日本と世界の違い」, 木村凡