

食品添加物の微生物限度試験法 ～ JECFA 規格について～

はじめに

食品添加物には保存料，甘味料，着色料，香料などがあり，我が国では食品衛生法にその定義が定められ，食品添加物公定書（食添公定書）にはこれら食品添加物の具体的な規格基準や試験法が収載されています。一方，国際的な食品添加物の基準としては，国連食糧農業機関/世界保健機関合同食品添加物専門家会議（通称：JECFA）が定める JECFA 規格があります。現在行われている食添公定書の第 9 版へ向けての改定作業は，国際的な整合性に配慮して，基本的に JECFA 規格に準拠する方向で進められていますので，今回は JECFA の微生物規格及び試験法についてご紹介します。

JECFA と食添公定書

JECFA の微生物規格は，増粘安定剤の場合は主に生菌数，酵母及びカビ数，大腸菌（又は大腸菌群），サルモネラの 4 項目が，酵素の場合はサルモネラ，大腸菌群，大腸菌の 3 項目が設定されています。試験法は WEB 上に公開されており，FDA が定める BAM 法（Bacteriological Analytical Manual）とほぼ同じです。

現行の第 8 版食添公定書の微生物限度規格は，増粘安定剤 27 品目，酵素 4 品目を対象として主に細菌数，大腸菌の 2 項目が設定されており，試験法は第十五改正（第一追補改正前）日本薬局方に準拠しています。このうち，アルギン酸アンモニウム，アルギン酸カリウム及びアルギン酸カルシウムについては，国際的整合性を鑑み，JECFA 規格を参考にして細菌数，真菌（かび及び酵母）数，大腸菌群の規格が設定（サルモネラは不要と判断）されていますが，試験法は前述のとおり日本薬局方に準拠しています。

JECFA における微生物規格及び試験法

1) 生菌数 Total (Aerobic) Plate Count（図-1 参照）

多くの増粘安定剤の生菌数の JECFA 規格は「5,000 以下 cfu/g」となっています。

試験法には 10 倍段階希釈により試料の $10^2 \sim 10^4$ 倍希釈液を調製するところから記載されており，10 倍希釈液の調製方法は各条規格にあります。多くの増粘安定剤では 50 g の試料を 450 ml のリン酸緩衝液に加えることとなっていますが，実際には試料の粘性により調製できないものが多くあります。また，試料液の混和方法や，分注前に試料液を 3 分間以上放置した場合は再度混和するなど，操作上の注意点が詳細に記載されています。

培養後は 1 平板当たり 25～250 の出現集落数をもつ平板から生菌数を算出します。すべての希釈倍率で菌が生育しない場合は，使用した最も低い希釈倍率の 1 倍未満とします（試料 10 倍希釈液の集落数が 0 の場合は「10 未満 cfu/g」）。なお，25～250 の範囲を逸脱した場合は推定値であることを示しておくこととなっています。

2) 酵母及びカビ数 Enumeration of Yeasts and Moulds (図-1 参照)

多くの増粘安定剤の酵母及びカビ数の JECFA 規格は「500 以下 cfu/g」となっています。

測定法は平板混釈法と表面塗抹法の 2 法があります。平板混釈法ではジクロラン 18%グリセロール (DG18) 培地を使用します。表面塗抹法の場合はジクロラン・ローズベンガル・クロラムフェニコール (DRBC) 培地を使用しますが、試料の水分活性が 0.95 未満の場合は平板混釈法と同じく DG18 培地が推奨されています。また、平板混釈法の操作上の注意点として、最初の試料液の調製から最後の混釈までを短時間 (10~20 分以内) ですばやく行うこと、培養時の平板は倒置せず 3 枚以上積み重ねないこと、カビ孢子からの 2 次増殖を避けるため培養期間中 (5 日間) に菌数の計測はしないこと、などが記載されています。

培養後は 1 平板当たり 10~150 の出現集落数をもつ平板から酵母及びカビ数を算出します。数値は有効数字 2 桁に丸めますが、3 桁目が 6 以上であれば切り上げ (456→460)、4 以下であれば切り捨て (454→450)、5 であれば最初の 2 桁が偶数の場合は切り捨て (445→440)、奇数の場合は切り上げ (455→460) と、丸め方にも詳細なルールがあります。すべての希釈倍率で菌が生育しない場合は、使用した最も低い希釈倍率の 1 倍未満とします (試料 10 倍希釈液の集落数が 0 の場合は「10 未満 cfu/g」)。

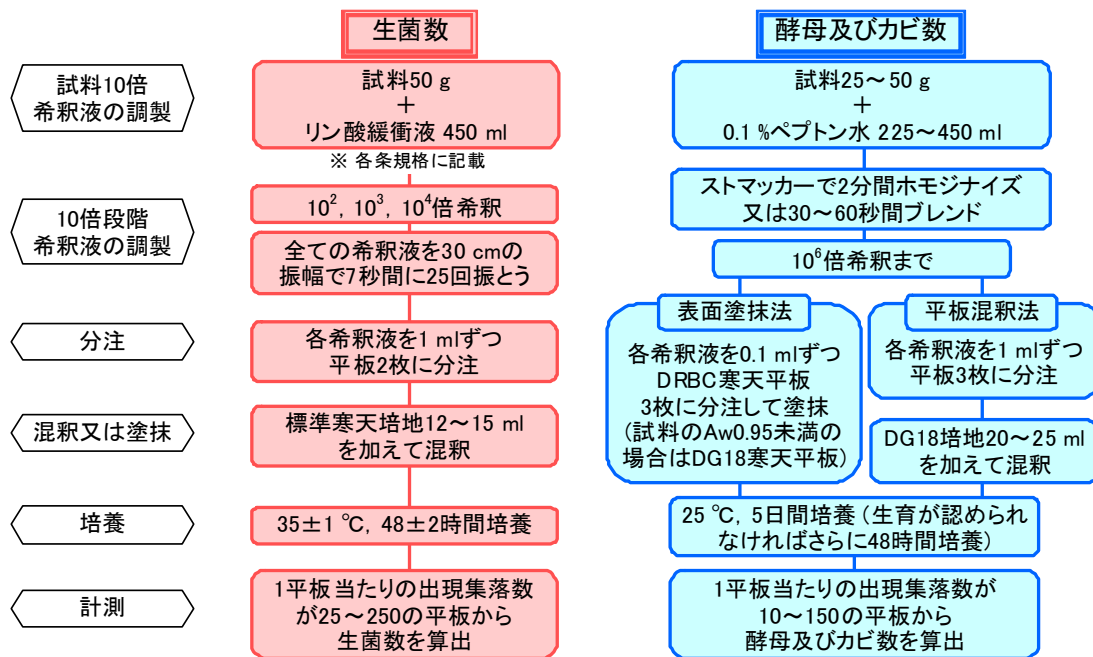


図-1 生菌数, 酵母及びカビ数試験の手順

3) 大腸菌群及び大腸菌 Coliforms and *E. coli* (図-2 参照)

多くの増粘安定剤の JECFA 規格は大腸菌群「陰性/test」又は大腸菌「陰性/1 g」、酵素の場合は大腸菌群「30 以下/g」及び大腸菌「陰性/25 g」となっています。試験法は MPN (最確数) 法で、大腸菌群及び大腸菌の推定試験は 2 項目共通でラウリル硫酸ブイオン発酵管 (LST) を用います。ガス発生を認めた LST から、大腸菌群の場合は BGLB 発酵管、大腸菌の場合は EC 発酵管に接種し、さらにガス発生の有無を確認します。その際、EC 培地の培養温度は、国内の試験法では 44.5±0.2 °C であることが多いですが、JECFA 法では 1 °C 高い 45.5±0.2 °C です。

また、MPN 法においては試料の 10, 100, 1000 倍希釈液 1 mL をそれぞれ 3 本ずつ分注した試験管で、いずれもガス発生を認めない場合の大腸菌群又は大腸菌の結果は「<3/g」となります。

この時の試験量は試料 0.333 g に相当するため、「陰性/0.333 g」となりますが、多くの大腸菌の規格は「陰性/1 g」又は「陰性/25 g」となっているため、規格と試験法が整合していないという問題があります。

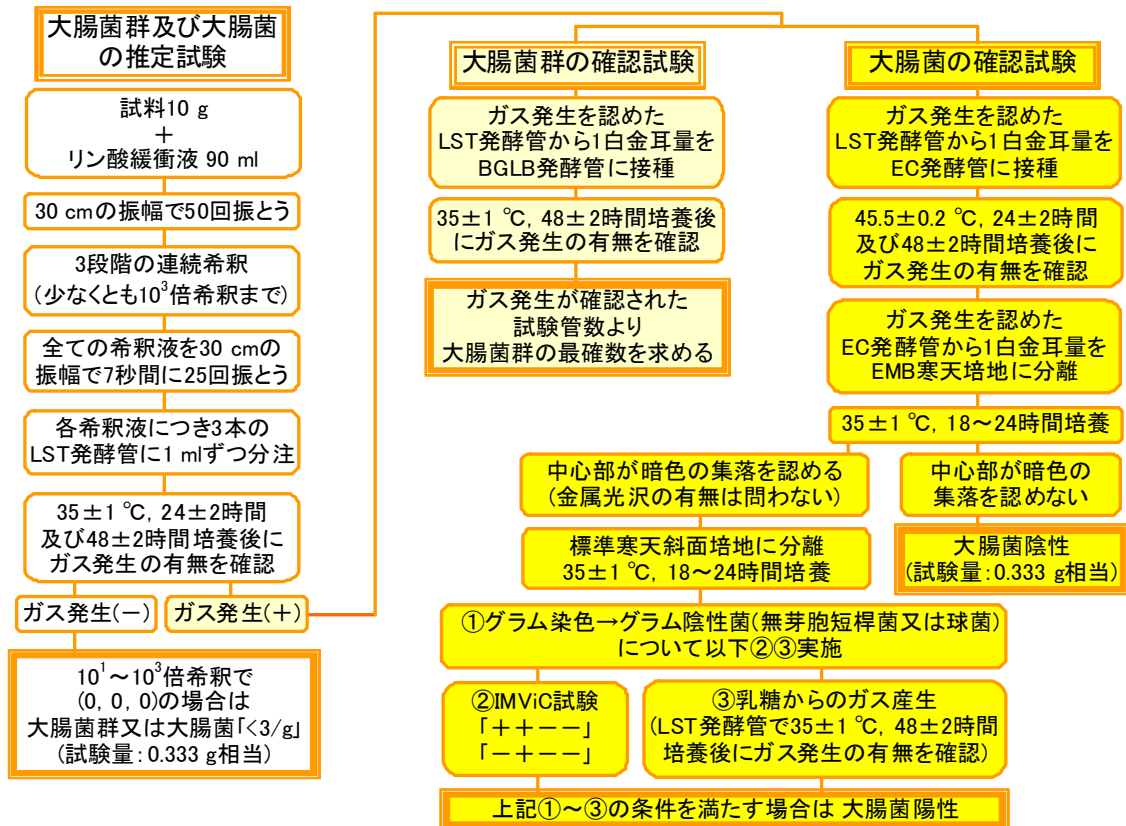


図-2 大腸菌群及び大腸菌試験の手順

4) サルモネラ *Salmonella* (図-3 参照)

多くの増粘安定剤のサルモネラの JECFA 規格は「陰性/test (陰性/25 g)」, 酵素の場合も「陰性/25 g」となっています。図-3 に示したように、試料と培地を混和する際の注意事項や、特定の増粘安定剤についての注意事項が試験法に盛り込まれています。また、サルモネラの菌種及び亜種には 2500 種類以上の血清型があるため、より広範囲の血清型を検出できるよう複数の培地を試験に使用します。選択増菌培地は 2 種、選択分離培地は 3 種です。選択増菌培地の培養温度は、ラポポート・バシリアジス液体培地が 42 ± 0.2 °C、テトラチオネート液体培地では試料の菌量によって 43 ± 0.2 °C 又は 35 ± 2 °C となっています。42 °C 及び 43 °C の培養はいずれも恒温水槽を使用するため、試験の際は水槽が最低 2 台必要となります。なお、カロブブーイングム及びグァーガムの試験に用いるセレナイトシスチン液体培地は毒物である亜セレン酸ナトリウムを含みます。また、3 種の選択分離培地上にサルモネラの定型的集落や疑わしい集落が認められない場合は、非定型集落についてもさらなる確認を行うこととされています。

5) 培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

第 8 版食添公定書には培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験が定められていますが、JECFA の微生物試験法には培地性能試験の記載はありません。また、一般情報においては全ての試験法に対し、ラボで初めて試験を行う場合は適切なバリデーションを行うべきとあります

が、こちらにも具体的な確認方法の記載はありません。特に酵素については菌の発育を抑制するものもありますので、適切な方法で抗菌活性の有無を確認することが必要です。

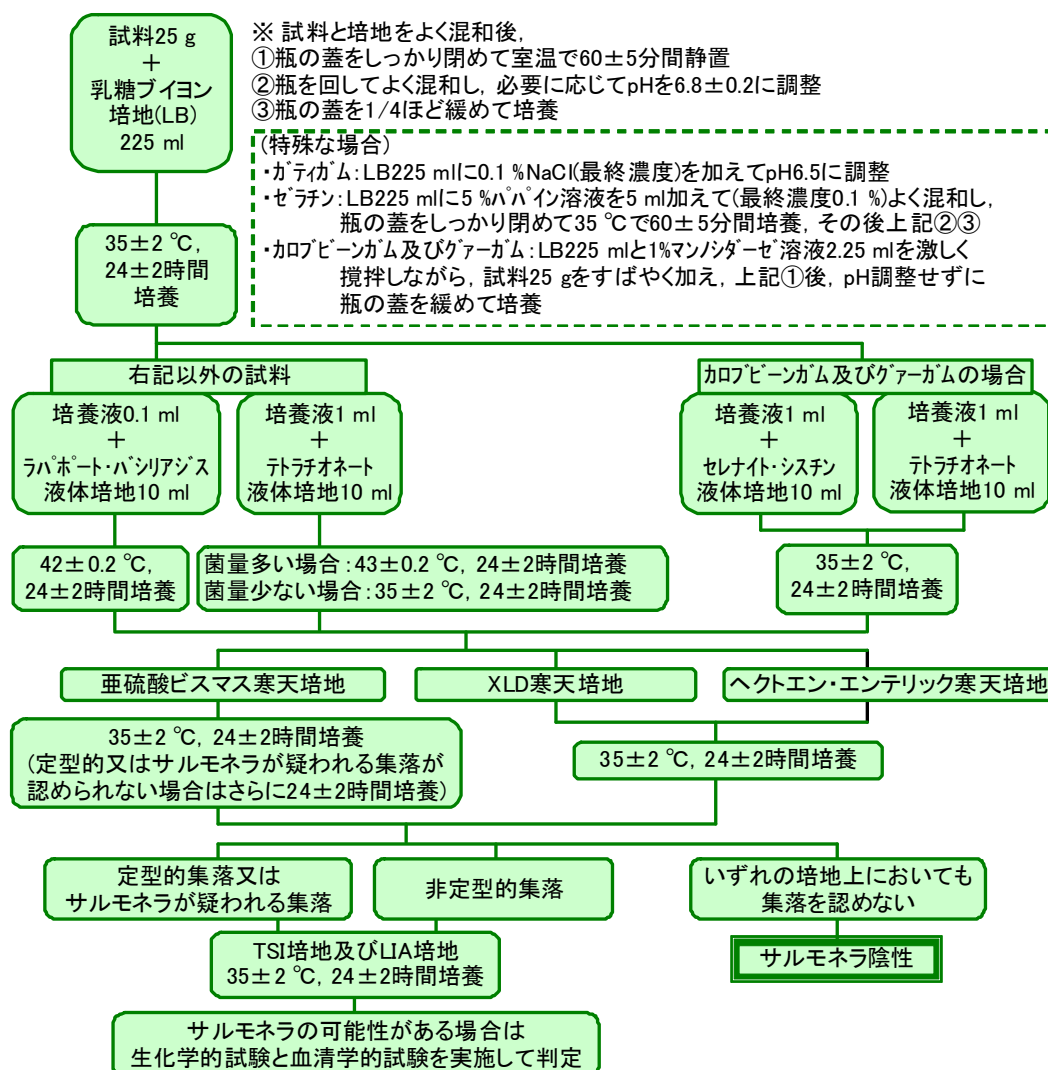


図-3 サルモネラ試験の手順

おわりに

以上のように JECFA 法には様々な問題点や煩雑な操作が散見されますが、第9版食添公定書の改正においては、これらの問題点を解消し、国際調和も達成すべく検討中です。

また、私どもでは食添公定書及び JECFA 法による各種試験を受託しております。なお、JECFA の微生物試験については、事前に試験法や結果表記についてご相談させていただきます。ご不明な点がございましたらお気軽にお問い合わせ下さい。

参考資料

- 1) 第8版食品添加物公定書：日本食品添加物協会（2007）.
- 2) Online Edition: "Combined Compendium of Food Additive Specifications" Volume 4 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2006)
<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>
- 3) Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998.
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>