

II-4 食品からの微生物検査標準法検討委員会

五十君静信

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成19年度 分担研究報告書

食品からの微生物検査標準法検討委員会

分担研究者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

昨年度に引き続き、食品からの微生物検査標準法検討委員会を開催し、“食品からの細菌検査標準法作成方針”に従い、それぞれの検査法作りの議論を行った。検討委員会では、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌の3菌種について作業部会を作り、作成方針に従った標準法作成を進めた。検討委員会はこれらの標準検査法の作成を行うと共に、現在研究班以外で行われている微生物の検査法についても、作成方針に従った手順で検査法が作られる様に働きかけることにし、他の研究班の作成しているカンピロバクター試験法についても、検討委員会での検討の対象とした。

検討委員会委員長

食品衛生管理部 山本 茂貴

副委員長

衛生微生物部 小西 良子

事務局

食品衛生管理部 五十君 静信

吉岡 宏美

石和 玲子

影山 亜紀子

A. 研究目的

食品からの微生物検査標準法検討委員会で、わが国における食品の細菌検査標準法はどうあるべきかを議論し、その方向性を示す。この方向性に沿った標準法作成の作成方針を作成し、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌の3菌種について標準法作成を試みる。

B. 研究方法

委員長、副委員長の他、これまでに、食

品衛生微生物の分野で中心となり微生物検査に関する実績のある研究者20名を“食品からの微生物検査標準法検討委員”とし、行政官2名が加わり、委員会を組織した（委員会名簿参照）。委員会では、これまでの微生物検査法にかかわる問題点を整理し、今後の検査法のあり方に関する議論を続けると共に、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌の3つの試験法について具体的な議論を進めた。本年度は、第十回から第十四回まで、5回の検討委員会を開催した。検討委員会は、一般からのオブザーバーとしての参加を受け付けると共に、議論の概要を国立医薬品食品衛生研究所のホームページに公開し、意見を求めた。作成した試験法案は、web上に公開すると共に関連団体に文書にて意見を求めた。

C. 研究結果

本年度は、第十回から第十四回まで、5

回の検討委員会を開催した。検討委員会の議事録概要は、本報告書後半に資料として示した。これまでに今後の標準法作成の基準となる“食品からの細菌検査標準法作成方針”を確定させ、これを基に、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌の3つの検査法について具体的な議論を進めた。サルモネラ検査法は最終ステージ、黄色ブドウ球菌検査法は、直接平板培養法とMPN菌数測定法をコラボ案(ステージ3)とし、コラボの実施を行った。腸炎ビブリオは、作業部会案(ステージ2)が確定し公開を行った。カンピロバクター研究班から意見を求められ、カンピロバクター試験法も本検討委員会の方向性で検査法作りを行うことを確認したので、検討委員会で検討を行い、作業部会案(ステージ2)として公開した。

検討委員会では、具体的な検査法作成を進めながら“標準法”作成に当たって守るべき重要な5項目を確認しこの方向性から逸脱しないよう検査法を検討した。

検討委員会自体の透明性を示すために、委員会の議事録概要は、国立医薬品食品衛生研究所のホームページに公開している。

(<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou/index.html>) 検討委員会を傍聴したいという要望が多かったため、昨年度同様オブザーバーとしての参加を認めた。

#### D. 考察

これまで国内の食品における微生物検査法は、作成段階では公開されておらず、実際に検査を行う立場の人の意見が反映されにくかった。検討委員会では、検査法作成の初期段階から広く意見をもとめ、国際的

なハーモニゼーションを重要視し、標準法は培養法をゴールドスタンダードとするという統一的な方向性を持って検査法作りを進めた。標準法作成にあたっては、それぞれの検査法が同一の方向性を持って作成されていることは重要であり、検討委員会で合意した“食品からの細菌検査標準法作成方針”に従い検査法作成が進められている。サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌の3菌種のそれぞれの作業部会は、実験データによる検証を行いながら、検査法作成を担当してきた。それぞれの作成ステージではそのステージで確認する項目を設定しているが、この確認を中心に行った。

原案作成のステージ1では、作業部会が文献調査や情報収集を行い、関連する国際的な標準法の比較表を作成し、国際的な互換性を尊重する。これらの準備された資料を基に委員会で原案を作成し、インターネットで一般に公開、文書で関連組織に公開する。ここでは検査法の大まかな方向性が多くの人に確認されるものと思われる。

ステージ2では、原案への意見や作業部会での議論から、作業部会に於いて実際に実験を行い、検査法としての細かいプロトコルの検討をおこなう。実験データに裏付けられた作業部会案が出来ることとなる。プロトコルとしては、ほぼ完成する。

ステージ3では、作業部会案に対して出された意見を検討し、委員会でコラボ実施案を作成する。この公開と共に、コラボスタディー協力者を募集する。実際にコラボに参加し、検査法案のプロトコルを体験することが可能である。

最終ステージは、コラボの結果を確認し、問題がなければ、標準法とする。

これらの各ステージで実際の検査法を作りながら問題点を検討して行き、“食品からの細菌検査標準法作成方針”の妥当性を検証してきた。最初と言うこともあり、ステージ1で提案される原案に対して、本来ステージ2で議論されるべき内容の議論が先行して行われなかなかステージを上げることが出来ない傾向があった。この辺をふまえて、ステージ1, 2, 3の各ステージでの検討項目の振り分けを明確にし、むしろステップアップを速やかに行えるような変更が必要と思われた。

#### E. 結論

昨年度に引き続き、食品からの微生物検査標準法検討委員会を開催し、わが国にお

ける食品の細菌検査標準法はどうあるべきかの議論を進めた。この方向性に沿った“食品からの細菌検査標準法作成方針”を基に、サルモネラ、腸炎ピブリオ、黄色ブドウ球菌の3菌種について標準法作成を進めた。外部の研究班から意見を求められたカンピロバクター検査法についても、検討委員会の方向性に従った試験法作成を進めた。サルモネラ試験法と黄色ブドウ球菌試験法についてはコラボまで終了し、試験法の提案が出来た。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

なし

平成19年度食品からの微生物検査標準法検討委員会名簿

委員長	山本 茂貴 (国衛研・食品衛生管理部)
副委員長	小西 良子 (国衛研・衛生微生物部)
研究班班長	宮原 美知子 (国衛研・衛生微生物部)、作業部会
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 (国立感染研・細菌第一部) 作業部会
	五十君 静信 (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)
	河野 潤一 (神戸大学・農学部) 作業部会
	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 邦汎 (岩手大学 農学部)
	高鳥 浩介 (東京農業大学)
	田口 真澄 (大阪府立公衆衛生研究所) 作業部会
	田中 廣行 (財団法人日本食品分析センター)
	丹野 憲二 (ISO/TC34/SC9 国内対策委員会)
	藤井 建夫 (山脇学園短期大学)
	松岡 英明 (AOAC International Japan Section)
	丸山 務 (社団法人日本食品衛生協会)
	森 曜子 (財団法人日本冷凍食品検査協会)
	渡辺 治雄 (国立感染研・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)
	江島 祐一郎 (厚労省・基準審査課) 人事異動により近藤後任

## 資料1. 食品からの微生物検査標準法検討委員会第十回議事録概要

1. 検討委員会委員の改正にともない、自己紹介を行う。
2. 配布資料の確認と第9回本委員会議事録案の確認を行い、議事録とする。
3. 第9回本委員会議事録概要案の読み上げによる確認と委員からの指摘箇所の訂正を行い、議事録概要とする。

### “検査法に対する一般からのご意見に関して”

4. 検討委員会ホームページに入りにくいという意見があり、アクセスしやすいよう工夫し、改善した。
5. 2007年3月以降に事務局宛寄せられた質問・意見について、その内容の報告と確認を行った。

### “サルモネラについての質問・意見”

6. サルモネラの釣菌コロニー数の本文と図の整合性に関する修正を行った。
7. サルモネラのTT培地の作成方法に関するコメントに対しては、作業部会から検討した製品について報告した。
8. サルモネラの培地の添加剤に関するコメントに、作業部会から日本ではこれまでの実績からスルファピリジンを添加するよう推奨したいと回答した。
9. 前増菌培地としてBPWを採用したのは、他の検査法と統一したことを確認した。
10. サルモネラの検査法で、同定に関する記述を加えて欲しいと要望があった。
11. サルモネラを選択増菌培地を可能な限り少なくして欲しいと要望があった。
12. サルモネラの培地に用いる有害化学物質の廃棄方法を示して欲しいという要望があった。

### “黄色ブドウ球菌についての質問・意見”

13. 黄色ブドウ球菌のコアグラゼ試験の時間短縮に関する意見が出されたが、標準法としてはこのままとする。
14. 黄色ブドウ球菌検査法で試料の接種量と方法に関する意見が寄せられた。
15. 微生物検査の試料調製法にする検討を行い、調製した試料から複数の検査を行えるよう検討して欲しいと要望があった。
16. 黄色ブドウ球菌の選択培地は、2つ示してあるが、国際的な培地一つに統一してはどうかという意見に対しては、今後検討してゆき最終案で結論を出すと回答する。

### “その他の質問・意見”

17. 検査法の対象とする食品種に関するコメントがあった。
18. 緩衝ペプトン水に関するコメントがあった。

“サルモネラ標準検査法について（ステージ3）”

19. 作業部会で4種類の培地について2種類の方法で検討した結果を報告した。
20. 作業部会でコラボの予備実験を進めており、6箇所でのコラボを予定している。
21. コラボは30 CFU サルモネラと大腸菌の市販の標準品をランダムに入れ、1/10希釈しスライスハムに接種し結果を出す予定。
22. ステージ3で主に議論すべき要点は、検査法プロトコールが手順書になっているかという点、検査法として本文及びフロー図に問題がないかの検討である。
23. 検査法における“同等”という表現につき、今後この言葉の定義をはっきりとした上で使わなければいけないことが確認された。
24. サルモネラの検査法の培地は、作業部会で検討したものを全て示してあるが、コラボの対象として行うものだけに絞ってコラボ案を作り直す。
25. 培地名を並べ“など”という表現は避け、検討した培地名のみをプロトコールには示す。
26. 「さらに詳しく生理生化学的性状を調べて」といった表現は避け、行う内容は具体的に示す。
27. H<sub>2</sub>S 非産生のものについてはフローチャートを付けるなどの工夫をし、プロトコールに具体的に示す。
28. 作業部会としては、XLD、BGS、MLCB とクロモアガーでコラボを行いたいと考えている。
29. 食品検査では、異なる選択性の培地により菌の検出がされやすくなるので、サルモネラでは複数の培地で検討を行う。
30. “疑わしい”という表現については、的確なわかりやすい表現にするか、具体例の注釈を付けるなどする。
31. 硫化水素非産生株の検出される頻度はまれであり、検出対象とすると検査法が複雑になってしまうが、今回の試験法検討では検出対象とすることを確認した。

“コラボスタディーの行い方について”

32. コラボの方法としては ISO16140 に述べられている内容を基に、C の資料を使い守山氏から解説が行われた。
33. コラボの目的は、標準法プロトコールの妥当性について検証することである。
34. プロトコール案の妥当性を検討するコラボでは、10箇所のうち有効データ8箇所以上になるようにする。
35. この数に満たない機関で検討する場合は、日にちを違えて行うという方法がある。

36. プレコラボの検討で、最低30種類の菌株の検証を行う。
37. プレコラボ時に各培地30株以上の評価は実際には厳しいが、培地メーカーにはある程度の検討データがあるので、このようなデータを利用することは可能である。
38. 本試験には3～5種類の株での検討で良いと思われる。
39. コラボの全ての生データは解析担当者が集め、統計解析を行うことが大切である。
40. H<sub>2</sub>S非産生も検討に用いる必要がある。
41. 無菌の食品検体にスパイクする場合は他菌を混合し、自然汚染菌がある食材にはブランクをとることで対応する。
42. コラボの方法についてはISOに従って整理したが、食品の検討ではAOACでは食材への適応性を最後に評価している。
43. バックグラウンドの菌が違うので食品のターゲットを決める必要があるが、今回は畜水産食品を想定する。
44. サルモネラの検査法は、コラボのやり方を考慮し、プロトコル案を修正の後、次回もステージ3で検討を行う。

#### “黄色ブドウ球菌標準検査法について（ステージ2）”

45. ステージ1での指摘点を考慮し作業部会案とする。
46. コラボ案までに二つの培地を使う必要があるかどうかを確定したい。
47. フロー図のラテックス凝集反応は、本文の記述に合わせ純培養の後に行うように訂正する。
48. Biard-Parker培地と卵黄加マンニット食塩寒天培地は、食品により向き不向きがあるので一概に一方が優れているとはいきれない。
49. 今回のプレコラボの結果からすると卵黄加マンニット食塩寒天培地はBiard-Parker培地に比べ損傷菌にはあまり対応できないと思われる。
50. 卵黄濃度については、作業部会で検討した市販品の3%濃度として公開するが、自家製については次のステージで濃度を検討する。
51. 黄色ブドウ球菌検査法は今回の検討委員会の内容を考慮し、プロトコルとして文章化したものを作業部会案（ステージ2）として公開する。
52. 黄次回の議論はステージ3として検討する。

#### “腸炎ビブリオ標準検査法について（ステージ1）”

53. 標準法としては、現行法を大きく改変するまでには到らなかった。
54. 変更は、BPWに食塩を1～2%添加し、培養時間を16～18時間とした。
55. 食塩濃度に1～2%と幅があるのは今後検討して、濃度を定める予定。
56. 定量のフローチャートは、3本がそれぞれ10×、1×、0.1×であるので、そのように修正する。

57. 検体量は、他の検査法と合わせて 25 g とした。
58. 腸炎ビブリオでは、経験的に食材によってはストマッカーの使用により、検出が異なる傾向が認められる。
59. 修正版は文章を付けたのち、メールで委員に送付して確認し、Web 上にステージ 1 で公開する。
60. 公開後の検討は、ステージ 2 で行う。

以上

## 資料2. 食品からの微生物検査標準法検討委員会第十一回議事録概要

1. 第10回本委員会議事録案の確認を行い、議事録とした。
2. 第10回本委員会議事録概要案の読み上げによる確認と委員からの指摘箇所7箇所の訂正を行い、議事録概要とした。
3. ウェブ上で議事録概要を公開する際は、菌種ごとに関連する記載を整理しまとめる。

### “サルモネラ標準検査法について（ステージ3）”

4. 前回、コラボに使用する培地が決定できなかったため、作業部会で検討したデータを資料として示し、説明を行った。
5. 作業部会では、4種類の菌と8種類の培地を用いて、ミスラ法により増殖能力と接種実験による識別能力について検討済みである。
6. 増殖能力については、BS以外の培地では、培地間の差は認められなかった。
7. BSでは典型的なコロニーができるまでに24時間以上の培養が必要で、一部の株を除き他の培地と同じ培養時間では比較できなかった。
8. 識別能力については、今回の検討では硫化水素産生性で判定する培地ではMLCBが最も判別しやすいという結果で、DHLとXLDは、ほぼ同等の識別能力であった。
9. 雑菌が多い鶏肉からの検出では、BSがMLCBに次いで判別しやすかった。
10. 硫化水素非産生株でも判定できる培地としては、クロモアガーサルモネラ、ESII、BGSが、SM2は同程度で十分使用可能であった。
11. 作業部会で行った一斉検査（プレコラボ）は、PCRを行う以外は予定しているコラボの手法にほぼ近い手順で行った。
12. QAボールを使って、3CFU/25gとして接種し、60検体中59検体が正解を得た。
13. 不正解の1検体についてはPCRによる検証結果から、接種に失敗していたことが示唆された。
14. 一斉検査は、培地2種類を使用し、食品種はスライスハムとし、6箇所で行った。
15. 作業部会では、PCRを除く今回と同じ手法を用いてコラボを考えており、一斉検査の6機関で足りなければ更に加えて10機関で実施したい。
16. コラボ実施のためには、コラボのスケジュールを具体的に示し、検査手法はSOPとして示していただき、検討してゆく必要がある。

### “サルモネラのコラボ実施案について”

17. サルモネラ作業部会が考えるコラボについて、資料を基に解説が行われた。
18. 今回は作業部会から本会へコラボ案が上がってきたが、今後コラボを実施するのは、作業部会ということになるか、それとも本会か？
19. コラボのデータ整理をどこで行うかを決めて欲しい。

20. 作業部会は、検査法案の作成および提案といった予備的なことを行う。
21. 本会は作業部会の検査法案を検討し、コラボ実施を決定し、実際のコラボ実施は作業部会が行う。
22. データの確認と評価は本会が行うが、実際の評価作業は「評価作業部会」を新たに設置すべきであると提案された。
23. コラボスケジュール案はわかりやすいが、検査プロトコルは、SOP 化し具体的に記述して欲しい。
24. コラボ後に検査法を修正するのではなく、コラボ案の段階で標準法プロトコルのSOP 化を行う。
25. これまでのステージで公開された検査法は、全体の流れの概要とフローチャートを示したが、コラボ案では、具体的な手取り足取りの検査法とする。
26. 作業を行う現場で各人がそれぞれに工夫する余地ができてしまわないよう、できるだけ検査法を詳細に具体的に記述する。
27. 稀である H2S 非産生菌を検査法に加えることに関し、確認が行われ、含めることが確認された。
28. 作業部会から、コラボで4種類の培地を検討、実際の検査法の最終案では H2S 産生性で検出する培地 1 種類と H2S 非産生でも検出できる培地 1 種類の計 2 種類を選択できるようにしたいと提案があった。
29. 検査で重要であるのは適用範囲をはっきりと定めること、食品全般、といった広い範囲にすると適用できない食品も出てしまう。
30. 培地の名前や組成などは、メーカー毎にばらつきがあるが、検査法としては代表例を組成で示す。
31. 「陽性」の判定基準も明確に規定し、「陽性」「陰性」の定義や判定法を曖昧にしない。
32. 培養時間は、 $22 \pm 2$  時間で、今後も基本的に統一することを確認。
33. 今回食品の適用範囲は畜水産物を対象とするが、検査法作成を優先し、マトリックスが強く影響するものについては、後に個別に別途処理法を検討する方針を確認。
34. 温度、時間については過去に検討済みで、海外との整合性も含めた形で決定、サンプル量は全て 25g を基本とすることを確認。
35. 培地の成分については、市販の培地は同一の商品でも時折成分が変わってしまうことがあり、ある程度のばらつきは認めざるをえないのが現状。
36. 培地は既製品が入手できなければ自作の培地を用意することもあり、そのためには成分表は載せておくべきである。
37. 市販の培地は会社が責任を持つが、自作の培地については、今後何らかの形で評価できるようにするべきと思われる。
38. 培地のバリデーションをするなら、その為に使用する標準株や、その為の方法論が必要である。

39. 今回のコラボ案では、各ラボで菌を接種することになっているが、ブラインド性の確保上、問題があるので、菌を接種済みのサンプルを配ることを検討する必要がある。
40. QA ボールを使うのは、菌数が厳密である上、配布もしやすいという利点がある。

#### “データの分析評価について”

41. データの分析評価は客観的に行われなければならない、コラボで H2S 非産生菌についてのデータなしに評価は難しいと思われる。
42. コラボデータから評価を行う「コラボ評価部会」という作業部会を作る。
43. メンバーはサルモネラについては宮原、松岡、五十君、田中、森、丹野各委員の6名とする。
44. コラボ評価部会の中にプロトコール作業部会と評価作業部会を設け、サルモネラ作業部会を担当している宮原委員は評価作業部会には加わらない。

#### “コラボ案の作成について”

45. コラボ案は今後どのプロトコールについても同じような形式に揃えて、「手順書」のスタイルで作成してほしい。
46. 化学物質の場合、AOAC ではプロトコール作成と実施は必ず別人であること、データの評価（統計処理）も別人が行うべきとしているので、将来的には独立させてゆくべきである。
47. プロトコール作成者がコラボに参加するとなると、ブラインド性の確保が必要である。
48. 作業部会の検討データを見ると、MLCB が推奨と受け取れ、クロモアガーが他と変わらないのであれば、MLCB とクロモアガーの2種類を対象としたコラボで良いと思われる。
49. SOP を目指すなら、現在のプロトコール案よりもっと精密な条件指定が必要で、プロトコール作業部会の案をサルモネラ作業部会が検討し、プロトコール作業部会に戻して再度検討する。
50. H2S 非産生菌についての記述や、サルモネラの定義などの明文化も必要。
51. 予定が遅れておりますので、メールで全員に送って各委員による吟味検討は事前に行っていただきたい。
52. 次回コラボ案が決定すれば、メソッドをウェブ上で公開してコラボ先を募集する予定。

#### “黄色ブドウ球菌標準検査法”

53. 資料 E のように、前回提出した案を基に若干の変更修正。
54. 指摘の点を修正して、ステージ2としてウェブ上で公開し、作業部会最終案とする。
55. 次回以降、プロトコール案を作成する。

“その他”

56. 協議を予定していた腸炎ビブリオ標準検査法については、担当の甲斐先生が欠席のため、次回に延期。
57. 毒素産生細菌の検査法については、品川先生が欠席のため、次回以降に協議予定。
58. 次回委員会の開催は10月30日を予定しております。

以上

資料3. 食品からの微生物検査標準法検討委員会第十二回議事録概要

1. 第11回本委員会議事録案の確認を行い、議事録とした。
2. 第11回本委員会議事録概要案の読み上げによる確認と委員からの指摘箇所7箇所の訂正を行い、議事録概要とした。

“サルモネラ標準検査法について（ステージ3）”

3. サルモネラのコラボ案につき、内容確認とその要点につき事務局が解説した。
4. 生化学的性状、非定型菌の確認の時の但し書き部分に普通寒天培地に関する記載は省略する。
5. フローチャートのSIM培地は、外す。
6. プロトコルで採用する温度については議論済みの基本となる培養温度は「 $35 \pm 1$ 」を用い、より厳しく管理が必要な場合は、「 $42.0 \pm 0.5$ 」などと小数点以下を入れて記載。
7. RVの組成については、基準となる組成を示し、それに相当する市販品なら使用可能とする。
8. RVの基準となる組成はISOを採用し、ペプトンはソイペプトンで示す。
9. テトラチオネート(TT)培地は、ISOには相当する培地がなく、BAMを基本とした組成を示す。
10. 分離寒天平板培地については、これまでの国内における使用実績と、作業部会での“プレコロラボ”のような予備実験による検討を尊重し、フローチャートに示した培地を同列に使えることとして、各グループから1種類の培地を選択し、コラボを実施する。
11. コラボで採用する主な項目の整理  
使用検体：生食肉（1種類）  
使用菌株：H<sub>2</sub>S産生菌、非産生菌、それぞれ1株ずつ  
菌数レベル：各菌株2濃度 + 非接種（合計5グループ）  
配布条件：冷蔵  
使用培地：MLCB, BGS  
釣菌数：3
12. コラボは、作業部会の“プレコロラボ”に参加した6ラボのうち、2ラボでサンプルを用意し、残る4ラボがコラボに参加する。
13. 10ラボ以上となるように、検査実績のある機関に打診、あるいはホームページからの公募を行う。
14. 今後、検討するプロトコルは「試験法」という表記に統一する。  
“その他”
15. 黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ標準試験法については、次回。
16. 次回委員会の開催は12月を予定、日程調整後確定

以上

#### 資料4. 食品からの微生物検査標準法検討委員会第十三回議事録概要

1. 行政から、担当者の変更にもなう後任の挨拶として、食品からの微生物検査標準法は重要な項目として引き継ぎを受けた旨述べられた。
2. 第12回本委員会議事録案の確認を行い、議事録とした。
3. 第12回本委員会議事録概要案の読み上げによる確認と委員からの指摘箇所2箇所の訂正を行い、議事録概要とした。

#### “サルモネラ標準検査法について（ステージ3）”

4. コラボ案のその後について、プロトコール作業部会から報告。
5. 12月13日にプロトコール作業部会を開催し、コラボに関する具体的かつ細部の条件の検討を行った。
6. 菌株はH<sub>2</sub>S産生型、非産生型それぞれ1株ずつ用いる。
7. スパイクは、従来通りの希釈菌液を用いるが、接種菌数の検証を行う必要がある。これを受け、サルモネラ作業部会では、予め菌液を同時に10プレートに蒔き、出現コロニーをカウントし、想定のばらつきの範囲に収まるか検証を行った。
8. コラボの参加機関数を10以上とし、公募を行い、結果として14機関を決定した。コラボの公募状況から、今後は、検査の実績や技術レベルなど、より具体的な条件を明示した上で募集を行うべきであるとした。
9. 今回のコラボでは、食品としては生の食肉を用いることとした。
10. リファレンスとなる既存の手法があり、それと比較検証することがバリデーションであるが、今回はリファレンスメソッド自体を作成する段階でのバリデーションであることを確認した。
11. サルモネラ作業部会から、コラボは1月21日から検査開始の予定で、試料の準備および輸送の手配を開始したと報告があった。
12. ウェブ上で公開しているコラボ案の修正：「試験法の性能を明らかにすることを目的にする」、と変更する。
13. ウェブ上で公開しているコラボ案の修正：保存の温度は2～8℃を、「7℃以下（2～7℃）、冷蔵輸送とし、到着後は試料の保存はせず、すみやかに試験を実施する」と変更する。
14. コラボの結果の解析方法は、検討が必要であるが、当面米国AOACのアドバイスを受け進める予定である。

#### “黄色ブドウ球菌コラボ実行案について”

15. 黄色ブドウ球菌のコラボ案が作業部会から提案され、予め配布されていたコラボスタディー実行案を読み上げ、説明した。
16. サンプル量については、国内の規格基準で規定されているため、この規格に対応し

0.1ml ずつ 2 枚の平板に接種する。

17. 選択培地は、国際的ハーモニゼーションから、Baird-Parker 培地を用いているが、国内での使用実績はほとんどない。
18. 作業部会による加熱損傷菌を用いた検討で、Baird-Parker 培地を使うと検出頻度は高くなることを既に示している。
19. 検討委員会の以前の検討では、実際の食品検査における両培地の性能比較では、食品に共存する他の菌の影響のほうが重要で、検出感度については、ほとんど差がないと思われるとされた。
20. 検討委員会では国外スタンダード Baird-Parker と国内のマニット食塩培地はほぼ同列と判断してよいとし、両培地を選択可能とすることにした。
21. 「段階希釈」と「階段希釈」という表現は、今後情報収集してどちらかの結論を出す。
22. コラボ案の接種菌数のレベルは検討すべきである。
23. 作業部会はコラボ案に従ったプレラボを行う必要がある。
24. 黄色ブドウ球菌を定量する必要があるのか、議論する必要がある。
25. コラボで検出精度を検証するなら、スパイクの菌数はなるべく低く設定する。
26. 今の規格基準には平板法に関する規定しかないが、作業部会は MPN 法を全国調査などに用いて欲しいという意図で提案した。
27. 検体量に関し ISO では 25g という表現ではなく、X g に 9 倍量の培地を加え、10x 乳剤とするという表現なので、この表現も検討する。
28. ISO の方法に従っているとしても、国内で作成したプロトコールにつき自らの検証を行うことは必要である。
29. BPW で乳剤を作ったあと、検体の希釈は何を用いるか示した方がよい。BPW か生理食塩水。
30. 今後、菌数の測定については、BAM の規定に合わせるのか、生菌数の算出などについての方法はどうかについては、国際的ハーモニゼーションからは ISO に従いたい、今後検討が必要と思われる。
31. 菌数測定に関し、非典型的コロニーの扱いは ISO に従うが、コラボ実施までに判定のマニュアル化を行う。
32. 日本で使われている CFU の算出は、今後 ISO、BAM で採用している方式に変えてゆべきであるが、まだ議論が必要。
33. 提案された別添 2 は外し、試験法としては別添 1, 3 を残す。MPN 法は残す。
34. 予備実験として、作業部会でプロトコールに従ったプレラボを行ってこれを基にコラボ案を決める。
35. 試験法名は「コアグラゼ陽性ブドウ球菌」が適当ではないかという意見が出たが、これについては、しばらく現行のまま様子を見て今後の検討項目とする。
36. 卵黄液の調製法については、次回までに作成方法を用意する。

“腸炎ビブリオ試験法案について”

37. 提案の試験法は、従来法に比べほとんど変更がない。
38. 迅速法の提案については、この検討会の趣旨とは異なるが、遺伝子を用いる方法を検討中であることが腸炎ビブリオ作業部会から述べられた。
39. 遺伝子による方法では、*V. parahaemolyticus* を特異的に検出する遺伝子決定には至っていない。
40. 今回示された試験法プロトコールを、作業部会案とし、ステージ2としてウェブ上で公開することにする。
41. TCBS 寒天培地の組成は、報告により異なっており、どの様に記載するか検討する。
42. これまでは、培地組成の統一規格や一括した品質管理の規格については、問題として認識されてこなかったようであるので、今後どの様にしてゆくか検討が必要である。
43. 次回は、黄色ブドウ球菌の試験法のラボ案についての最終結論、腸炎ビブリオの扱いについて、結論を出す方向で検討する。

以上

### III 研究成果に刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（H19年度）

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
宮原美知子、田口真澄、久米田裕子、神吉政史、郡司明彦、森田友美、太田順司、高山正彦、高須一重、木股裕子、塚本定三	食品からのサルモネラ新検出法の検討と鶏挽肉および未殺菌液卵でのサルモネラ検出	日本食品微生物学会誌	投稿中		
宮原美知子、荒川英二	食品からの腸炎ビブリオ迅速検出法の検討	防菌防黴誌	投稿中		
Masashi Kanki, Junko Sakata, Masumi Taguchi, Yuko Kumeda, Masanori Ishibashi, Takao Kawai, Kentaro Kawatsu, Wataru Yamasaki, Kiyoshi Inoue, and Michiko Miyahara	Performance of PCR-based detection of Salmonella enterica in poultry meat at the broth pre-enrichment step.	<i>J. Food Protect.</i>	投稿中		
宮原美知子、宮原誠	塩漬け野菜保存での腸管出血性大腸菌O157の生残性	防菌防黴誌	35, No.12	779-783	2007
塚本定三、宮原美知子	食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 サルモネラ	防菌防黴誌	35, No.8	527-535	2007
宮原美知子	サルモネラ、黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオの食品における標準検査法の検討	日食微誌	25, No. 1		2008
藤尾公輔、清水 晃、松村浩介、河野潤一、北川 浩、五十君静信	市販食肉、健康人、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤耐性	日食微誌	24 (2)	100-106	2007
清水 晃、市場智子、河野潤一、五十君静信	調理済み食品における黄色ブドウ球菌の汚染実態	食衛誌	48 (5)	J341-344	2007