

200939030A

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

食品における衛生管理手法及び
その精度管理に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H20-食品-一般-012)

研究代表者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成22(2010)年5月

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

食品における衛生管理手法及び
その精度管理に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H20-食品-一般-012)

研究代表者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成22(2010)年5月

目 次

| | |
|---|-----|
| I. 平成 21 年度総括研究報告書 | |
| 食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究 | 1 |
| 研究代表者 五十君 静信 | |
| 研究組織 | |
| 検討委員会議事録概要 | 9 |
| II. 分担研究報告書 | |
| 1. 食品からのボツリヌス菌検出法 | 21 |
| 浅尾努、高橋元秀 | |
| 2. <i>Listeria monocytogenes</i> の標準試験法に関する研究 | 39 |
| 仲真晶子、岡田 由美子 | |
| 3. 試験法のメソッドバリデーション | 49 |
| 松岡英明 | |
| 4. 食品検体の処理手法の検討 | 65 |
| 宮原美知子 | |
| 5. 衛生指標菌試験法に関する研究 | 75 |
| 伊豫田淳 | |
| 6. 衛生指標菌試験法に関する委託研究報告書 | |
| 財団法人日本食品分析センター | 101 |
| 財団法人日本冷凍食品検査協会 | 123 |

平成 21 年度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）
食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 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

本研究では、食品における微生物試験法のメソッドバリデーションの手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法プロトコール作成の方法論を提供し、ボツリヌス菌、リステリア・モノサイトゲネス、並びに大腸菌、大腸菌群などの衛生指標菌の標準試験法を作成すると共に、微生物試験法の技術的なレベルを検証するための精度管理システムの構築に関する基礎的研究を行うことを目的とし、研究を進めた。

食中毒起因細菌の試験法に関する専門家からなる“標準法検討委員会”を組織し、食中毒起因細菌の標準となる試験法がどの様にあるべきかの方向性を確認し、統一した方針に沿って具体的に標準微生物試験法の策定を進めた。試験法作成過程は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ上に公開し広く意見を求めた。

研究班の行う当該微生物の試験法作成は、それぞれの作業部会が行い、本研究班の代表、分担、協力研究者が具体的な標準法作成の作業にあたった。各作業部会は、“食品からの細菌標準試験法作成方針”に従い“標準法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。試験法作成は、H20 年度に原案作成と作業部会案の検討開始（ステージ 1～2）、H21 年度は試験法案の個々の問題点に関する検証データの蓄積を基に作業部会案及びコラボ案の作成（ステージ 2～3）を検討した。

研究分担者：

宮原美知子：国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部

松岡英明：東京農工大学大学院

高橋元秀：国立感染症研究所細菌第二部

浅尾努：大阪府立大学農学部

仲真晶子：東京都健康安全研究センター

岡田由美子：国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部

伊豫田淳：国立感染症研究所細菌第一部

A. 研究目的

食品における微生物試験法のメソッドバリデーションの手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法プロトコール作成の

方法論を提供し、ボツリヌス菌、リステリア・モノサイトゲネス、並びに大腸菌、大腸菌群などの衛生指標菌の標準試験法を作成すると共に、微生物試験法の技術的なレベルを検証するための精度管理システムの構築に関する基礎的研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

食中毒起因細菌の試験法に関する専門家からなる“標準法検討委員会”を組織し、食中毒起因細菌の標準となる試験法がどの様にあるべきかの方向性を確認し、統一した方針に沿って具体的に標準微生物試験法の策定を進める。試験法作成過程は国立医薬品食品衛生研究所ホームペ

ージ上に公開し広く意見を求める。

研究班の行う当該微生物の試験法作成は、それぞれの作業部会を組織し本研究班の代表、分担、協力研究者が具体的な標準法作成の作業にあたる。各作業部会は、“食品からの細菌標準試験法作成方針”に従い“標準法検討委員会”の評価を受けながら作業を進める。試験法作成は、H20年度に原案作成と作業部会案の検討開始(ステージ1~2)、H21年度は試験法案の個々の問題点に関する検証データの蓄積を基に作業部会案及びコラボ案の作成(ステージ2~3)、H22年度にコラボの実行と試験法の妥当性確認(ステージ4)を行う予定である。これに対応し“標準法検討委員会”は年間5回程度を目安に開催し、それぞれの試験法作成が適切に行われていることを確認すると共に、食品における微生物試験法のメソッドバリデーションの手法を検討しその手法の確立を行う。

他の研究班で食品微生物に関する試験法の作成を行う場合は、その研究班と協力し“食品からの細菌標準試験法作成方針”を基に“標準法検討委員会”が標準試験法の作成の方向性を示す。H21年度に研究協力をお願いした研究班は、“冷凍食品の規格に関する研究班”、“毒素産生細菌の試験法に関する研究班”、“高度衛生管理に適する試験法の検討班”などである。

C. 研究結果

平成21年度には、前年度に引き続き食品微生物の専門家23人で構成する“標準試験法検討委員会”を組織した。この委員会は年度中に6回開催し、標準試験法特に汚染指標菌試験法をどの様にするかについて重点的に議論を進めた。汚染指標菌の標準試験法は、国際的な標準法であるISO法の導入を検討した。メソッドバリデーションに関する情報収集を行うと共に、前研究班で検討されたサルモ

ネラ、黄色ブドウ球菌、カンピロバクター試験法のコラボ試験結果を基に、具体的な妥当性確認の方法論に関する議論を進めた。

それぞれの標準試験法プロトコールの作成は、作業部会単位で進めた。ボツリヌス菌(高橋、浅尾)、リステリア・モノサイトゲネス(仲真、岡田)、衛生指標菌(伊豫田、日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会)に関して作業部会の検討を進めた。各作業部会は“食品からの細菌標準試験法作成方針”に従い、試験法作成を進めた(五十君は総括および検討委員会運営)。標準試験法は、対象となる微生物毎の統一的な試験方法作成を優先していることから、検査対象となる食品種の前処理(宮原)、メソッドバリデーション(松岡)に関する検討も行った。

標準試験法検討委員会は、五十君が担当し、23名の専門家委員と2名の行政官で構成した。21年度6回の検討委員会を開催。標準試験法作成方針を決定し、それに従い試験法の作成を進めた。作業部会が機能し、標準法作成が順調に行われたかを評価した。他の研究班等で検討中の試験法についても諮問を受け評価した。NIHSJ-1から20まで、試験法の検討を進めて、状況をwebへ公開した。年度内に以下の6回の委員会を開催した。

2009年6月23日：第20回委員会

2009年8月20日：第21回委員会

2009年10月14日：第22回委員会

2009年11月18日：第23回委員会

2010年1月15日：第24回委員会

2010年2月16日：第25回委員会

それぞれの検討委員会の議事録概要版は、本報告書の後に資料として示した。

ボツリヌス作業部会(高橋・浅尾担当)は、10機関25名の専門家から構成した。海外の試験法は食中毒事例原因究明用で、ISO法にも食品の衛生検査用試験法はない。感染症法上特定2種病原体等であり、菌株等の移動などは困難である。定性試

験法と毒素評価法を作成し、原案について検討を進めた。

リステリア作業部会（仲真・岡田担当）は、7 機関 10 名の専門家で構成した。CODEX で RTE 食品のリスク評価に基づく微生物基準が 2009 年最終合意を得ており、その試験法は ISO 法である。そのため ISO 法に準じた試験方法について日本固有な食品を中心に検討した。定性試験法と定量試験法を作成、コラボ案を検討中である。

衛生指標菌作業部会（伊豫田・五十君担当）は、7 機関による検討を行った。衛生指標菌・菌群に関し、定性、定量法につき 8 種の ISO 試験法を検討した。ISO 法に準じた試験法と、従来の国内の公定法と比較のため、食品 40 検体を用いて、方法の違いによる試験結果を基にデータベースを作成した。120 枚の写真と形成された集落約 800 株について同定し、データベース化を進めた。

試験法バリデーション作業部会（松岡担当）は 8 名の専門家で検討した。標準試験法のバリデーション手法の検討とコラボ試験の評価を行った。“標準試験法と同等ないしはそれ以上”の評価方法のガイドライン作りを進めている。精度管理システムの構築に関する基礎的研究についても、検討している。

食品前処理作業部会（宮原担当）では、食品の前処理方法による試験法への影響を検討した。多種類の試験法を同時に行うことの可能な前処理方法を試行的に行い評価した。

これらの試験法に関する情報提供を、学会等のシンポジウムや講演会及び関連雑誌の総説で行った。

D. 結論

食品における微生物試験法のメソッドバリデーションの手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法プロトコール作成の

方法論を提供し、ボツリヌス菌、リステリア・モノサイトゲネス、並びに大腸菌・大腸菌群など衛生指標菌の標準試験法を検討すると共に、微生物試験法の技術的なレベルを検証するための精度管理システムの構築に関する基礎的研究を行った。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

1. Tanaka Y, Takahashi H, Imai A, Asao T, Kozaki S, Igimi S and Kimura B: Reconsideration of flexibility in verifying rapid alternative food microbiological methods. Food Control, 21:1075-1079 (2010)
2. 浅尾努：わが国の食品微生物検査の展望、－日本の衛生指標菌試験法のあるべき姿－、日本食品微生物学雑誌、26：163-167 (2009)
3. 浅尾努、河合高生：食品中の食中毒菌検査法 ボツリヌス菌、日本防菌防黴学会誌、印刷中
4. 松村浩介、清水晃、河野潤一、五十君静信：畜水産食品からの黄色ブドウ球菌検出のための選択分離培地および選択増菌培地の検討。日本食品微生物学会雑誌、26(1)、23-27、(2009)
5. 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：食品からの改良サルモネラ検出法の検討と鶏挽肉および未殺菌液卵でのその評価。日本食品微生物学会誌、26(No.2)、107-113 (2009)
6. 浅尾努：微生物検査の現状とこれから －衛生指標菌等について－、ソフト・ドリンク技術資料 158:191-206 (2009)

7. 五十君静信：わが国の食品微生物試験法と国際規格対応への動向。ジャパン・フードサイエンス, 48(No. 4) : 22-26, (2009)
8. 五十君静信：食品微生物試験法の国際的手法とのハーモニゼーション。ソフト・ドリンク技術資料, 2009年2号 No. 158:183-190, (2009)
- 9.

学会発表

1. Igimi S: Progress for setting up "Standard method" of "Committee to set up Standard method for food microbiology" in Japan. Workshop for method validation for food microbiology. 日本食品微生物学会, 2009.10
2. 井田美樹、金子誠二、仲真晶子、岡田由美子、樋脇弘、江渕寿美、中村寛海、大塚佳代子、竹村壘、長田共未、三山九美、吉田朋高、五十君静信：リステリア検査用酵素基質培地の検討。第30回日本食品微生物学会, 2009年10月
3. 河合高生、内田和之、山本千景、山田和子、小笠原準、久保田裕子、浅尾努、五十君静信、小崎俊司：自動菌数測定装置の精度評価法に関する研究－指標菌汚染食品の新規製造法の検討－。日本食品微生物学会, 2009.10
4. 宮原美知子、平井昭彦、小西典子、甲斐明美、相川勝弘、黒木俊郎、林昭宏、小笠原邦敏、高井慎也：生肉からの大腸菌および腸管出血性大腸菌の簡易検出法の検討。日本防菌防黴学会第36回年次大会, 2009年9月
5. 宮原美知子：Rapid PCR detection method for bacteria in food。第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月
6. 吉田朋高、岡田由美子、松岡英明、五十君静信：黄色ブドウ球菌標準試験法(直接平板法とMPN法)のコラボスタディデータの統計学的考察。第30回日本食品微生物学会, 2009.10

シンポジウム等講演

1. 五十君静信：微生物検査の標準法作成の進捗状況と国際整合性。ifia JAPAN 2009 食の安心科学フォーラム 第8回セミナー安心できる食品の規格と検査。東京。2009.5
2. 五十君静信：食の安心・安全を考える～食品と微生物の関係～。都民セミナー。東京。2009.8.
3. 松岡英明：迅速微生物検査技術の開発とバリデーション。日本食品衛生学会第97回学術講演会シンポジウム。東京。2009.5
4. 松岡英明：微生物検査・測定法とその適用の基本的考え方。日本防菌防黴学会第36回年次大会基礎講座。大阪。2009.9
5. 松岡英明：微生物試験における不確かさ。JAIMA コンファレンス「セミナー：分析法の妥当性確認 (Method Validation) の方法と実際」。幕張。2009.9
6. 松岡英明：微生物標準試験法の開発動向。AOACI 日本セクション・食品分析懇話会 2010 合同シンポジウム。熱海。2010.1

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

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
食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究研究班

平成21年度 研究組織

| | | |
|-------|--|--|
| 研究代表者 | 五十君 静信 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 |
| 研究分担者 | 宮原美知子 松岡 英明 高橋 元秀 浅尾 努 仲真 晶子 岡田由美子 伊豫田 淳 | 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻 国立感染症研究所 細菌第二部 大阪府立公衆衛生研究所 東京都健康安全研究センター 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 国立感染症研究所 細菌第一部 |

ボツリヌス試験法作業部会

| | | |
|-------|--|--|
| 研究分担者 | 高橋 元秀 浅尾 努 | 国立感染症研究所 細菌第二部 大阪府立大学/日本食品分析センター |
| 研究協力者 | 小崎 俊司 幸田 知子 河合 高生 見理 剛 吉田信一郎 木村由紀子 山口 聡子 岸田 一則 石村 勝之 小笠原 準 梅田 薫 鈴木 荘介 山口 卓 畠山 敬 林 賢一 堀川 和美 門間 千枝 | 大阪府立大学 大阪府立大学 大阪府立公衆衛生研究所 国立感染症研究所 日本食品分析センター 日本食品分析センター 日本食品分析センター 千葉県衛生研究所 広島市衛生研究所 大阪市立環境科学研究所 大阪市立環境科学研究所 日本冷凍食品検査協会 日本冷凍食品検査協会 宮城県保健環境センター 滋賀県衛生科学センター 福岡県保健環境研究所 東京都健康安全研究センター |

| | |
|-------|-------------|
| 八柳 潤 | 秋田県衛生科学研究所 |
| 石原ともえ | 神奈川県衛生研究所 |
| 相川 勝弘 | 神奈川県衛生研究所 |
| 岡野 洋 | 沖縄県衛生研究所 |
| 須釜久美子 | 福島県衛生研究所 |
| 鳥谷 竜哉 | 愛媛県立衛生環境研究所 |

リステリア試験法作業部会

| | | |
|-------|-------|------------------------|
| 研究分担者 | 仲真 晶子 | 東京都健康安全研究センター |
| | 岡田由美子 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 |
| 研究協力者 | 樋脇 弘 | 福岡市保健環境研究所保健科学課 |
| | 江洲寿美 | 福岡市保健環境研究所保健科学課 |
| | 中村寛海 | 大阪市立環境科学研究所 |
| | 大塚佳代子 | 埼玉県衛生研究所 |
| | 金子誠二 | 東京都健康安全研究センター微生物部 |
| | 下島優香子 | 東京都健康安全研究センター微生物部 |
| | 井田美樹 | 東京都健康安全研究センター微生物部 |
| | 三山九美 | 財団法人日本冷凍食品検査協会 東京事業所 |
| | 吉田朋高 | 財団法人食品分析開発センター SUNATEC |

バリデーション作業部会

| | | |
|-------|-------|------------------------|
| 研究分担者 | 松岡 英明 | 東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻 |
| | 五十君静信 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 |
| | 岡田由美子 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 |
| 研究協力者 | 田中 廣行 | 財団法人日本食品分析センター |
| | 森 曜子 | 財団法人日本冷凍食品検査協会 |
| | 吉田 朋高 | 財団法人食品分析開発センター SUNATEC |
| | 内田 和之 | シスメックス・ビオメリュー株式会社 |

食品前処理作業部会

| | | |
|-------|-------|---------------------|
| 研究分担者 | 宮原美知子 | 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 |
| 研究協力者 | 荒川 英二 | 国立感染症研究所 細菌第一部 |

衛生指標菌試験法作業部会

| | | |
|-------|-------|----------------------|
| 研究分担者 | 伊豫田 淳 | 国立感染症研究所 細菌第一部 |
| | 五十君静信 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 |
| 研究協力者 | 田中 廣行 | 財団法人日本食品分析センター |
| | 森 曜子 | 財団法人日本冷凍食品検査協会 |
| | 諸角 聖 | BMLフード・サイエンス |
| | 中川 弘 | BMLフード・サイエンス |
| | 春被ゆかり | BMLフード・サイエンス |
| | 山縣 文夫 | 東京顕微鏡院 |
| | 遠山 一郎 | 東京顕微鏡院 |
| | 太田 建爾 | 町田予防衛生研究所 |
| | 今井 奏子 | 町田予防衛生研究所 |
| | 加藤 光徳 | 国立医薬品食品衛生研究所 |

事務および経理担当者

| | | |
|-------|--------------|---------|
| 二瓶 幸一 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 総務部 |
| 吉岡 宏美 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 食品衛生管理部 |

食品からの微生物標準試験法検討委員会

| | | |
|------|--------|--|
| 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 |
| 事務局 | 五十君 静信 | 国衛研・食品衛生管理部（研究代表、作業部会） |
| 委員 | 浅尾 努 | 大阪府立大学（作業部会） |
| | 泉谷 秀昌 | 国立感染研 |
| | 伊藤 武 | 財団法人東京顕微鏡院 |
| | 伊豫田 淳 | 国立感染研（作業部会） |
| | 岡田 由美子 | 国衛研・食品衛生管理部（作業部会） |
| | 甲斐 明美 | 東京都健康安全研究センター |
| | 春日 文子 | 国衛研・食品衛生管理部 |
| | 鎌田 洋一 | 国衛研・衛生微生物部 |
| | 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 |
| | 小沼 博隆 | 東海大学 |
| | 品川 邦汎 | 岩手大学 |
| | 高橋 元秀 | 国立感染研（作業部会） |
| | 田中 廣行 | 財団法人日本食品分析センター（作業部会） |
| | 丹野 憲二 | ISO/TC34/SC9 国内対策委員会 |
| | 仲真 晶子 | 東京都健康安全研究センター（作業部会） |
| | 松岡 英明 | AOAC International Japan Section（作業部会） |
| | 宮原 美知子 | 国衛研・衛生微生物部（作業部会） |
| | 森 曜子 | 財団法人日本冷凍食品検査協会（作業部会） |
| | 渡辺 治雄 | 国立感染研・副所長 |
| 行政から | 俵木登美子 | 厚労省・基準審査課 |
| | 浦上 憲治 | 厚労省・基準審査課 |
| | 松岡 隆介 | 厚労省・監視安全課 |

食品からの微生物標準試験法検討委員会第20回議事録概要(2009.6.23)

1. 委員長より、2名の行政官の紹介と、簡単な挨拶があった。
2. 基準審査課から、サルモネラ試験法が最終ステージとなり、この試験法を通知法としたいと思っていると伝えられた。
3. 監視安全課から、国内での食中毒は減りつつあるが、カンピロ等まだまだ問題がたくさんあると挨拶があった。
4. 配布資料の確認・第19回議事抄録案の確認をした
5. 読み上げによる第19回議事録概要案の確認を行った。
6. 第19回議事録概要案の“ボツリヌス菌標準試験法について(ステージ1)”の9, 12, 15番の表現を「ボツリヌス菌」に統一した。

“サルモネラ試験法について(ステージ4)”

7. 事務局より、サルモネラ試験法について13箇所の言い回し等の修正について、提案があった。
8. 修正したものを、通知法として示す予定であることが述べられた。
9. 修正箇所6番「血清型別をO血清型別」を「O血清群別」に訂正した。
10. 修正箇所8番については、例外があるので修正しない。
11. 表題は、サルモネラ試験法としたらどうかと提案があった。
12. 検討した試験法はバリデートされたという意味で“標準試験法”とすべきであると意見が出された。
13. 試験法では、“注意を要する”という表現(訂正箇所8と9)があるが、これでは通知法とした場合、どのように対処して良いかわからないと指摘された。
14. 血清型別はO多価で評価し、サルモネラ陽性・陰性を決めて良いのではという意見が出された。
15. 同定は、生化学的性状で行うべきだという意見が出された。
16. ONPG陰性ならサルモネラ陽性。ONPG陽性ならばサルモネラ陰性などとして、「注意を要する」のくだりを削除してはどうかと提案された。
17. 多くの意見が出されたが、すべての意見を反映させるのは困難であり、ひとまず、“表現方法について修正が必要である”という意見があったと議事録に残すことにした。
18. 通知法と標準試験法とでは、性状をどこまで調べるかを変えてもいいのではないかと意見が出された。
19. O群別まで行う必要があるのかと意見が出された。
20. 地方衛研に夏季一斉取り締まり等の調査で本試験法を実施してもらっているが、特に問題は起こっていない。
21. 事務局から、出された意見をなるべく反映させた通知法としたいので、次回以降改めて検討を行うことにしたいと提案があった。

“黄色ブドウ球菌コラボのデータ解析”

- 2 2. 黄色ブドウ球菌試験法コラボスタディ解析結果について、財団法人食品分析開発センター (SUNATEC) 吉田氏より説明が行われた。
- 2 3. 統計解析は、ISO のガイドラインを基に、AOAC の実施例に従い解析を行った。
- 2 4. 直接平板法と MPN 法について統計解析を実施したところ、外れ値になった機関数は MPN 法に多く、培地では BP でのばらつきが少ないという結果が得られた。
- 2 5. これらの結果を基に、作業部会から次回以降最終案が提案される予定。
- 2 6. 評価方法について基準はあるのかとの質問に対し、微生物ではまだ明確な基準はないとの解答があった。
- 2 7. 外れ値が多い原因は、試験方法に起因するのかという質問に対して、MPN 法では添加菌量が少なく、ナチュラルコンタミの影響があり、そのため分散が大きくなったためと解析された。

“衛生指標菌検査法について (ステージ1)”

- 2 8. 作成した原案を資料として配付した。
- 2 9. Enterobacteriaceae(担当：田中委員), presumptive *E. coli*(担当：伊豫田委員) coliforms(担当：森委員)で、3つの菌や菌群を衛生指標菌として原案作成にあっている。
- 3 0. 一般生菌数については、今後検討していく予定。
- 3 1. ISO で試験法を構築するための課題としては、用語の統一化・菌数算定法・MPN 法が挙げられる。
- 3 2. ISO の現行と一世代前の方法に差があるため、今後検討し、最終的にはコラボ・再現性の確認・日本の食品で検出できることの確認をとることを目的とする。
- 3 3. Enterobacteriaceae は、日本にはない新しい方法なので慎重に行っていきたい。
- 3 4. 原案として HP で示す予定で、今後ステージ2で細かく検討を行っていく。
- 3 5. 用語統一などについては作業部会で検討する。

“その他”

- 3 6. 各作業部会の進行状況の確認をした。
- 3 7. リステリア作業部会は、酵素基質培地の性能評価を中心に進めている。
- 3 8. ボツリヌス菌は CDC や FDA よりマニュアルがでていますが、食品から検出する方法はないため、どのように検体から芽胞を濃縮するかを中心に検討している。
- 3 9. ボツリヌス毒素の血清型別用の血清については、行政を含め、今後どのように対処するか検討してゆく。
- 4 0. 検体処理作業部会では、希釈液を BPW に統一して問題がないか、検討中である。
- 4 1. バリデーション作業部会では、コラボのためのレファレンス菌の調製を検討している。
- 4 2. 品川班の分担研究で行われているカンピロバクター作業部会は 10 機関によるプレコラボを 2 月に実施し、そのデータ整理を進めている。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第21回議事録概要(2009.8.20)

1. 委員長より、議題がたくさんあるので効率よく検討をお願いしますと、簡単な挨拶があった。
2. 行政官から、サルモネラ試験法の検討が最終版に近づいており、行政に反映させたいと思いますのでよろしくご依頼致しますと伝えられた。
3. 配布資料の確認・第20回議事抄録案の発言者不明箇所の特定を試みた。
4. 読み上げによる第20回議事録概要案の確認を行った。
5. “バッファー”を“希釈液”に変更した。

“標準とする培養温度の統一について”

6. 事務局より、第19回検討委員会で標準とする培養温度の統一について提案を行ったが結論がまとまらなかったため、再度提案と説明。
7. 今後、検討した標準試験法が通知法として行政的に利用されることを想定すると、試験法毎に培養温度が統一されていないことは好ましくなく、これを機会に統一した方向性を示す必要があると思われる。
8. サルモネラ試験法が通知法となると、それ以降の調整は容易ではないと思われ、今回結論を出したい。
9. 試験法の精度の議論では統一した培養温度について結論を得ることが難しいと思われるので、通知法を想定した議論で現実的な結論を出したい。
10. 衛生指標菌はISOをそのまま取り入れる方針となったので、培養温度は37℃となるが、国内では従来食品からの検出は35℃が一般的である。
11. 事務局より、標準とする培養温度を統一することが望ましく、統一した場合の対応について3つのたたき台案が提案された。
12. 甲斐委員から、資料を使って試験法の培養温度の現況について解説が行われた。
13. 日本の場合は乳類が32~35℃、冷凍食品35℃、液卵36℃、食肉35℃、添加物30~35℃と幅広い温度帯となっている。
14. ISO法では、ほぼ37℃であるが、30℃、35℃の試験法もある。
15. ISOの黄色ブドウ球菌試験法では、35℃、37℃どちらでも良いとしている。
16. 標準試験法は、現実的には通知法を意識する必要もあり、それを想定すると培養温度はできる限り統一した方が良く、委員から意見が出された。
17. 経験的には、35℃と37℃では、試験精度にはほとんど影響ないと思われるが、もし影響がありそうな場合には培養温度を検討するとし、方針は統一しておいた方が良い。
18. 35℃で一度結論したサルモネラの“標準試験法”は、37℃で行った場合の試験結果については今後どの程度再評価するかは改めて議論したほうが良い。
19. ISOのサルモネラ試験法は、37℃培養を採用している。
20. 今回は通知法において基準となる温度を統一しておくべきであるかを決めたい。
21. 培養温度については、安全性評価は高い温度、品質性評価は低い温度。環境は30℃

などと方針を決め、考え方を示して統一すれば良い。

- 2 2. 国際的な協調を重視するのなら、ISO 法をそのまま取り入れるという考え方が良い。
- 2 3. 衛生指標菌については、検討委員会のこれまでの議論で ISO 法をそのまま取り入れようと結論している。
- 2 4. 国内の場合、歴史的には当初、病原菌は 37℃、品質管理では 30℃を採用し、その後、間をとって食品衛生では 35℃に落ち着いたという経緯がある。
- 2 5. 通知法では、温度と時間の論議は割り切るしかないなので、この委員会としては方向性をしっかりと決めるべきだ。
- 2 6. 病原菌については、35℃と 37℃、あるいは異なる培地を選択したとしても、実験により妥当性確認をすることが可能である。
- 2 7. 食品衛生法のなかに示されている試験法は今度見直すことが必要で、試験法は法律から外して定期的に見直せるように行政に働きかける必要がある。
- 2 8. BAM 法は 35℃をもちいているので、この方針で 35℃に統一という可能性もある。
- 2 9. 米国も試験法については codex で採用された ISO 法へシフトしつつあるので、ISO 法へ統一してゆくべきである。
- 3 0. 統一するとすれば、委員会としては ISO 法をもとにして検討してゆくという方針とする。
- 3 1. ISO4831 のコリフォーム試験法は改訂時に 35℃が削除され、ISO の中でも 35℃の培養温度はなくなる方向にある。
- 3 2. 事務局提案の選択肢のなかで、35℃と 37℃の培養温度を選択可能とするものについては、試験法の精度管理上好ましくないなので、どちらかの温度にすべきである。
- 3 3. 37℃に統一が委員会の基本姿勢とし、35℃でのバリデーションの終わっている試験法は当面 35℃も実行可能とし、最終的には試験法を 37℃に統一して行く。

“黄色ブドウ球菌試験法”について

- 3 4. 事務局より、前回の検討委員会で 2 回目のコラボの結果を示し、この結果を受けて最終案を作成したので検討願いたいと提案。
- 3 5. コラボ案からの変更箇所を示した資料を基に、最終案の提案がされた。
- 3 6. 主な修正箇所として、黄色ブドウ球菌の定義に記載していた分類学的考察は削除し、ISO の原文に忠実に直した。
- 3 7. 培地は、作業部会の検討結果とコラボの結果から、BP と MS を選択可能としたが、順位付けをし、BP を第一選択とし MS は代替品とした。
- 3 8. ラテックス凝集反応を必ず入れる表現であったが、これは削除した。試薬の記載も削除。
- 3 9. 定型集落の定義などを ISO 法にあわせた。
- 4 0. ISO、BAM はどのようになっているのか。どこまでが ISO でどこを変更したのかわからないので、資料を示して欲しい。
- 4 1. この検討はステージ 1～2 で既に議論しているので、急に資料として示すのは難しい、資料説明などは次回に持ち越し。

42. 温度が記載されていない箇所があるので、記入する。

“サルモネラ試験法について”

- 43. サルモネラ試験法について、現状の試験法との対照表を示し、通知法として生化学性状をどこまで調べなければならないかを確認した。
- 44. 最終プロトコールでは、非定型の場合は追加試験が必要となってしまう2段の試験となってしまうが、このままとする。
- 45. 硫化水素非産生の株も拾うので以前の試験法に比べ難しくなっているが、この方法が通知法となれば、一般・液卵・食肉が同一の試験法で行えるメリットがある。
- 46. 培地や温度が集約されるのは実施する立場ではメリットがある。
- 47. 試験法の標準となる培養温度を統一したことから、最初の通知法となるサルモネラについては培養温度を37℃とする理由をわかるように、前置きの文章を加える。
- 48. この場合、猶予、移行期間を設けて37℃に移行していく旨、文章化する。
- 49. 事務局で前置きの文章案を作成し、委員へ回覧し、文面を確認する。
- 50. ISOでは見直しが5年ごとにあるので、国内の通知法も試験法の見直しをおこなうなど意思を伝えるべきである。

“その他”

- 51. 食品微生物学会開催のアナウンスが行われた。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第22回議事録概要(2009.10.14)

1. 委員長より、簡単な挨拶があった。
2. 行政官から、試験法の検討は行政に反映できると思われ、委員会に参加することは有意義ですと挨拶があった。
3. 配布資料の確認・第21回議事抄録案及び、読み上げによる第21回議事録概要案の確認を行った。
4. 概要案の“汚染指標菌”を“衛生指標菌”に変更した。

“サルモネラ試験法について”

5. 培養温度は35°Cでも良いとする移行期を設け、最終的には標準となる培養温度を37°Cに統一する方針とした。
6. サルモネラについては、シングルラボバリデーションなどにより、37°Cの妥当性の検討を行う予定。
7. 通知法となる場合は、その出し方については厚労省で議論することになる。
8. 今回の試験法はあくまで食品試験法であって、食中毒の原因究明とは異なり、サルモネラを検出したかどうかを示し、O抗原まで報告する必要はない。
9. 標準試験法は、他の代替え法の評価に用いるのでサルモネラ検出で充分である。
10. 行政への要望：試験法は定期的な変更が可能ないように通知法で示して欲しい。

“黄色ブドウ球菌試験法”について

11. BAM法とISOの比較、これまでの検討履歴、コラボ試験の統計解析結果について資料を基に簡単に解説を行った。
12. 総合的に判断すると、選択培地としてはベアードパーカー(BP)培地がよい傾向だが、マンニト食塩(MS)培地を除外するほどの差は見られなかった。
13. 標準とする培養温度を37°Cに統一したので、フロー図の培養温度を、全て37°Cに修正した。
14. ISOの移植ならば、「黄色ブドウ球菌」ではなく、「コアグララーゼ陽性のグラム陽性球菌」であるが、法律上の定義を変えるのは容易ではないためこの表記とした。
15. 衛生検査では分類学ほどの厳密な性状確認は必要ないと思われ、コアグララーゼ試験までで良いと思われる。
16. 作業部会の検討結果から、BPを第一選択肢、MSも使用可能としたい。
17. BP及びMSの本文やフロー図への表現の仕方については次回再度検討し、決定する。
18. 現在ある黄色ブドウ球菌の規格は、平成5年の食肉製品の1000 cfu/gのみであるので、通知とする場合は直接平板測定法(NIHSJ-03)が通知法となる可能性がある。
19. 黄色ブドウ球菌の試験は、日常的衛生管理で頻繁に使われるので、通知法とする場合、食肉製品の試験にはBP、その他の衛生管理にはMSとするなど、検討する。

20. 直接平板測定法(NIHSJ-03)と ISO 法との相違点は、コロニーの計数法、卵黄液の調整法、コアグラゼ試験（一部 BAM 法を採用、判定は ISO 方式）などである。
21. MPN 法(NIHSJ-05)は、ISO 法で採用している GC 培地による増菌法は肉を用いた場合劣っていたため、BAM 方式を採用、更に食塩濃度を 7.5%に変更している。
22. 黄色ブドウ球菌試験法の検討を開始したのは前の研究班であり、ISO を基にしつつも BAM 法を取り入れさらに改良した形になった。
23. ISO7218 の計算法については、食品微生物学会で来日予定の ISO/TC34/SC9 議長の Dr. Lombard に確認する。
24. 試験法の本体については、菌数計算法とは切り離して議論を進めたい。
25. コロニー計数法については、次回以降検討を行う。

“<その他連絡等>”

26. カンピロバクター、リステリア試験法は次回の検討委員会で作業部会からの提案がある予定。
27. 食品のボツリヌス試験法はまだ世界に例がないので、世界に発信できる試験法を作っていたきたい。
28. 食品微生物学会開催のアナウンスが行われた。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 23 回議事録概要(2009.11.18)

1. 委員長および行政より挨拶
2. 配布資料の確認・第 22 回議事抄録案の確認ののち、読み上げによる第 22 回議事録概要案の確認を行い、2 箇所が訂正された。
3. 事務局より、討議は黄色ブドウ球菌試験法の最終案、通知法と標準試験法の議論を行い、カンピロバクター試験法は次回にすると討議内容の変更が伝えられた。

“黄色ブドウ球菌試験法について (ステージ 4)”

4. 事務局より、黄色ブドウ球菌コラボ案からの変更箇所について説明があった。
5. 基準となる培養温度を他の試験法と揃え、35℃から 37℃に変更。
6. “自家調製”と表記の修正をした。
7. 作業部会のステージ 2 の検討結果では、加熱損傷菌における検出結果では、ベアードパーカー培地(BP)培地が卵黄加マンニット食塩寒天培地(MS)培地より 2 桁ほど菌数が高く分離できていた。
8. BP 培地は、損傷菌対応型の培地であるが、高価で保存性はあまり良くなく、夾雑菌の影響を受けることがある。
9. MS 培地は、安価で保存性も良く国内での使用実績もあるが、損傷菌を検出する場合や *Bacillus* 属菌などが共存すると検出が難しくなる。
10. これまでの国内での検査実績や信頼性、コラボ試験の結果などから MS 培地は BP 培地とほぼ同等と見なすことが出来、代替え培地として使用可であると思われる。
11. 国際的整合性という観点から BP を標準培地とし、MS も使用できるものとする。
12. 成分規格のある食肉製品については国際的整合性の観点から BP 培地を用いることが望ましいので、成分規格の公定法として試験法を定める場合、考慮する必要があると思われる。
13. フロー図の BP 培地の★印後の文章は削除し、脚注の文章を“卵黄加マンニット食塩寒天培地を代替え培地とする。”に変更する。
14. 現行の食肉製品の規格基準である 1000 cfu/g については、そのままよいのかは今後検討される必要有り。
15. 食肉製品の成分規格の公定法を BP 培地だけすると、他の食品を分析するにあたって BP 培地を用いて分析することになりかねないため、通知の際には留意願いたい。
16. 試験法の本体は完成。平板上の集落計数法については ISO に基づく NIHSJ-18 を新たに作成し、この文書を引用することとする。
17. 以上で、黄色ブドウ球菌試験法 NIHSJ-03 および NIHSJ-05 は、ステージ 4 を終了しコラボ実施案から標準試験法とする。

“標準試験法と通知法の関係に関して”

18. 事務局から、資料を用いてこれまでの検討委員会の概要説明と標準法の作成は ISO の reference method 作成とほぼ同等のやり方で行われていることが示された。
19. 検討委員会で標準試験法を策定したときにこれをどのように行政に活用していくのかの意見交換を行った。
20. 成分規格の公定法が別途通知で示された際には、これがそれ以外の食品にも標準法のように認識されがちであり、検討委員会で策定した標準試験法の位置づけを何らかの形で、行政からも支持していただきたい。
21. あくまでもこの委員会では標準試験法を策定することを目的とし、策定された標準試験法についてはどう行政側で反映させていくのかは検討を要する。
22. 標準試験法は食品の前処理については考慮されておらず、食品の前処理等の検討が必要と思われ、標準試験法をそのまま成分規格の公定法としていくというものではない。
23. 一般の試験法に関する技術的な点についてはこの検討会で助言をする。

“リステリア試験法について (ステージ2)”

24. マグロすき身、ナチュラルチーズを用いて4カ所での添加回収試験を実施する予定で、その結果は次回の検討委員会で報告する。

“その他”

25. 各作業部会の進行状況を確認した。
26. 来日した ISO/TC34/SC9 (食品微生物規格機関) の議長との検討委員会委員との情報交換内容について報告があり、ISO 法策定への日本の積極的な関与が期待されていることが報告された。
27. 次回検討会は1月を予定。

以上