

201131047A

厚生労働科学研究費補助金

食品の 安全確保推進研究事業

食品中の微生物試験法及び
その妥当性評価に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H23-食品-一般-010)

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24(2012)年5月

厚生労働科学研究費補助金

食品の 安全確保推進研究事業

食品中の微生物試験法及び
その妥当性評価に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H23-食品-一般-010)

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24(2012)年5月

目 次

I. 平成 23 年度総括研究報告書	
食品中の微生物試験法及びその妥当性評価に関する研究	1
研究代表者 五十君 静信	
研究組織、委員会開催状況	
検討委員会議事録概要	9
II. 分担研究報告書	
1. <i>Cronobacter</i> spp.の標準試験法に関する研究	19
荻原博和、岡田由美子	
2. 腸炎ビブリオ試験法	33
甲斐明美、工藤由起子	
3. 衛生指標菌試験法に関する研究	47
伊豫田淳	
日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会	
4. 試験法の妥当性確認に関する研究	55
松岡英明	

著作権の問題により、以下は web へは非公開

別添 1. <i>Cronobacter</i> spp.の標準試験法	65
別添 2. β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌試験法	85

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品中の微生物試験法及びその妥当性評価に関する研究

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の作成を行う。これまでの研究班の成果である標準試験法作成方針に従い、ビブリオ属菌、クロノバクター属菌、衛生指標菌などの標準試験法を作成する。今後リスク評価の結果を受けて策定される食品の微生物基準に利用可能な試験法となるように国際的に互換性のある試験法を提供する。さらに、作成された標準試験法を精度高く実施するために必要な導入時の検証、微生物標準品の設定、試験精度の管理に関する基礎的研究を行う。食中毒起因細菌の試験法に関する専門家 23 名からなる“標準法検討委員会”を組織し、統一した方針に沿って具体的に微生物標準試験法の策定を進めた。試験法作成状況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案作成および必要なデータ収集は、それぞれの作業部会が担当し、本研究班の代表、分担、協力研究者がその作業にあたった。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。平成 23 年度は、原案作成と作業部会案の検討（ステージ 1～2）を行った。試験法のバリデーション（妥当性確認）に関しては、ISO 16140 を基にしたガイドライン作成を目的とし、海外の第三者認証機関に関する情報収集およびそれぞれの機関の妥当性確認のプロトコールに関する検討を進めた。他の研究班により進められているカンピロバクター標準試験法については、コラボ試験に協力し、得られたデータを用いて妥当性確認を実際に試みた。

研究分担者：

松岡英明：東京農工大学大学院
荻原博和：日本大学生物資源科学部
甲斐明美：東京都健康安全研究センター
工藤由起子：国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部
岡田由美子：国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
伊豫田淳：国立感染症研究所細菌第一部

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を行う。これまでの研究班の成果である標準試験法作成方針に従い、ビブリオ属菌、クロノバクター属菌、並びに衛生指標菌などの衛生指標菌の標準試験法を作成する。今後リスク評価の結果を受けて作成される食品の微生物基準に利用可能な試験法となるように国際的に互換性のある試験法を提供する。さらに、作成された標準試験法を精度高く実施するために必要な妥当性確認の方法論の提供、導入時の検証、微生物標準品の設定、試験精度

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

の管理に関する基礎的研究を行う。

B. 研究方法

食中毒起因細菌や衛生指標菌の試験法に関する専門家、約 23 名程度からなる“標準法検討委員会”を組織し、H22 年度までの研究班により作成された標準試験法作成ガイドラインに従い、微生物標準試験法の作成を行うが、国際的にもまだ確立していない検討結果の統計処理方法とその評価方法については、実際の試験法作成の検討データを基に検討する。これらの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、一般にも広く意見を求めた。

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、H23 年度は原案の公開及び作業部会案の検討（ステージ 1～2）を行った。これに対応し“標準法検討委員会”は H23 年度年間 5 回開催し、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妥当性確認の手法を ISO 16140 を基に検討した。

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した。平成 23 年度は、カンピロバクター研究班の依頼を受けて、コラボ試験に関する提案と、コラボ試験の結果を基に妥当性確認を行った。

C. 研究結果

食品微生物の専門家 23 名で構成する“標準試験法検討委員会”を組織した。

この委員会は試験法案を検討し標準試験法策定にあたった。汚染指標菌の標準試験法は、大腸菌試験法について検討し、国際的な標準法である ISO 法の導入を決めた。衛生指標菌・バリデーション合同作業部会から提出された資料を基に妥当性確認に関する方法論に関する議論を進めた。

それぞれの標準試験法案プロトコールの作成は、作業部会単位で進めた。クロノバクター属菌（荻原、岡田）、腸炎ビブリオ（甲斐、工藤）、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）の試験法案について各作業部会で検討を行った。その検討内容については各作業部会の分担研究報告書を確認していただきたい。検討委員会は“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）。妥当性確認に関する検討（松岡、五十君）は作業部会を年度内に 5 回開催し、海外の第三者機関による妥当性確認の実状について調査した。

標準試験法検討委員会の事務局は、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。平成 23 年度 5 回の検討委員会を開催した。標準試験法作成方針に従い試験法の作成を進めた。各作業部会が機能し、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カンピロバクター標準試験法についても諮問を受け評価した。これらの試験法の検討状況を web へ公開した。それぞれの検討委員会の議事録概要版は、本報告書に資料として示した。

クロノバクター属菌試験法作業部会（荻原・岡田担当）は、2 機関 4 名の専門家から構成した。ISO 法には、ISO/TS22964:2006 にエンテロバクター・サカザキとしての試験法が示されている。米国 FDA からは、BAM 法としてエンテロバクター・サカザキの MPN3 本法による定量試験法が示されている。2008 年に

エンテロバクター・サカザキは、再分類によりクロノバクター属菌に分類され、対象となる菌種に関してかなり混乱しているのが実状である。従って、標準試験法では、ISO/TS22964:2006 の定義に従って、クロノバクター属菌試験法を検討することにした。本年度は ISO 法を基に原案を公開し、作業部会案作成に必要なデータを出した。

ビブリオ試験法作業部会（甲斐・工藤担当）は、2 機関 6 名の専門家で構成した。腸炎ビブリオ標準試験法は、現在の公定法を基に検討し、作業部会案を公開した。試験法の検討は、ゆでだこ、あさりのむき身、むきエビなどに添加回収実験を行い、コラボ試験の基礎データ作りを進めた。

衛生指標菌作業部会（伊豫田担当）は、財団法人日本食品分析センターと財団法人日本冷凍食品検査協会に協力の下、検討を行った。衛生指標菌・菌群としては、酵素基質培地による大腸菌定量法と、菌数計数法を対象として、ISO 試験法を基に検討した。

試験法バリデーション作業部会（松岡・五十君担当）は 10 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カンピロバクター標準試験法コラボ試験の評価を行った。海外の第三者機関による妥当性確認のガイドラインを比較検討し、ISO 16140 を基に妥当性確認に必要な内容をまとめた。

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妥当性確認の手法を検討し、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ル作成の方法論に従い、クロノバクター属菌、ビブリオ、並びに大腸菌など衛生指標菌の標準試験法を検

討を開始した。海外の第三者機関のガイドラインを比較検討し、妥当性確認に関する考え方を整理し、必要な内容をまとめた。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

1. Saito E, Yoshida N, Kawano J, Shimizu A, Igimi S. Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw fish in relation with culture methods. J. Vet. Med. Sci 73(3):287-292. (2011)
2. 五十君静信。食品微生物迅速検出法の近況と課題。ジャパンプードサイエンス。2011年4月号(2011)
3. 五十君静信。リステリア・モノサイトゲネスの微生物基準とその試験法。月刊フードケミカル、2011年 No.7:67-70. (2011)
4. 五十君静信。生食用食肉の規格基準と腸内細菌科菌群試験法。食品衛生研究。61巻12月号:15-20. (2011)
5. 五十君静信。指標菌の考え方と国際整合性。月刊フードケミカル、2012年5月号 325:19-22. (2012)

学会発表

1. 五十君静信。損傷菌の VNC と再活性化。第 84 回日本生化学会大会。2011.9 (京都)
2. 百瀬愛佳、江川智哉、岡田由美子、朝倉宏、春日文子、五十君静信。食品からのサルモネラ属菌標準試験法：NIHSJ-01 法と ISO 6579:2002 の同等性確認。日本食品衛生学会。2011.9 (秋田)
3. 五十君静信。標準試験法導入により食品の微生物検査はどのようにかわるのか。第 32 回日本食品微生物学会

学術総会。2011.10（東京）

4. 五十君静信。生食肉の規格基準とその科学的背景。日本防菌防黴学会微生物制御研究部会公開講座。2012.2（名古屋）
5. Shigeki Yamamoto, Fumiko Kasuga, Shizunobu Igimi, Hiroshi Asakura. New Standard for raw meat in Japan. (日本の生肉に対する新基準) . 11th International symposium on toxic microorganisms, "Risk Control and Food Safety", UJNR. 2012.3. Tokyo
6. 五十君静信。カンピロバクター検出のための標準試験法の検討。日本細菌学会技術講習会“話題微生物の分離・同定法と最新事情”。2012.3（長崎）

講演・研修会等

1. 五十君静信：グローバルな食品群の期限表示設定のための微生物試験法に係わる諸問題。Ifia Japan 2011 食の安全・科学フォーラム第10回セミナー。2011.5（東京）
2. 五十君静信。試験検査の重要性と検査方法の国際的整合性について。生食用食肉の規格・基準と検査に関する講習会。2011.11（東京）
3. 五十君静信。食品中の微生物標準試験法の検討とその目指すもの。平成23年度食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者等研修会。2011.11（東京）
4. 五十君静信。生食肉の基準に取り上げられた Enterobacteriaceae（腸内細菌科菌群）試験法—その背景と試験法解説—。食の安全を確保するための微生物検査協議会。2011.11（東京）

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 安全確保推進研究事業
食品中の微生物試験法及びその妥当性評価に関する研究班

平成23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	松岡 英明	東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻
	荻原 博和	日本大学 生物資源科学部
	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	工藤 由起子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部

クロノバクター試験法作業部会

研究分担者	荻原 博和	日本大学 生物資源科学部
	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	福田 典子	日本大学生物資源科学部食品生命学科
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

ビブリオ試験法作業部会

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	工藤 由起子	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究協力者	小西 典子	東京都健康安全研究センター
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
	下島 優香子	東京都健康安全研究センター
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター

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	財団法人日本適合性認定協会
	田中 誠	財団法人日本冷凍食品検査協会

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	森 曜子	公益財団法人日本適合性認定協会
	田中 廣行	財団法人日本食品分析センター
	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・ビオメリユール株式会社
	守山 隆敏	スリーエム ヘルスケア株式会社
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	江川 智哉	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

事務および経理担当者

吉岡 宏美	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
木下 富子	国立医薬品食品衛生研究所	総務部

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	日本食品微生物学会
	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）
	荻原 博和	日本大学（作業部会）
	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
	鎌田 洋一	国衛研・衛生微生物部
	工藤由起子	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
	齋藤 利江	財団法人日本冷凍食品検査協会
	品川 邦汎	岩手大学
	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）
	森 曜子	公益財団法人日本適合性認定協会（作業部会）
行政から	浦上 憲治	厚労省・基準審査課
	松岡 隆介	厚労省・監視安全課

平成23年度食品からの微生物標準試験法の検討委員会開催状況

第33回検討委員会：2011年6月2日

第34回検討委員会：2011年9月13日

第35回検討委員会：2011年10月31日

第36回検討委員会：2011年11月22日

第37回検討委員会：2012年2月9日

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 33 回議事録概要(2011.6.2)

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 32 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 32 回議事録概要案の確認を行い、3 箇所を修正し承認された。
3. MPN 表は今後 ISO 7218 に示されている表を用いる。
4. NIHSJ 法として ISO 法を採用する場合、培地の追加の手順についてリステリアの検討例で確認した。
5. 衛生指標菌試験法については、ステージ 1 で NIHSJ 法として試験法概要を示し、それぞれの ISO 法の和訳は終了していることを確認した。

腸管出血性大腸菌試験法について (報告)

6. 小西委員より、緊急対応として策定した腸管出血性大腸菌 O111 および O104 試験法について説明があった。
7. O104 試験法のプライマー配列はヨーロッパで分離された株の配列を採用している
8. O111 試験法は実態調査の目的で、O104 試験法はモニタリングでの検出の目的で策定したが、本委員会では標準法として策定する場合には、腸管出血性大腸菌として一斉分析法が確立された後、再検討していく必要がある。

クロノバクター属菌試験法について (ステージ 1)

9. 荻原委員より、クロノバクター属菌試験法の概略について説明があった。

(定性試験法について)

10. ISO/TS 22964:2006 および IDF/RM 210:2006 を基に試験法を検討する。
 11. 検体量は Xg 秤量のままとするか、25 g とするか、検討する。
 12. 増菌培地でバンコマイシンを使用することの正当性について確認、了承された。
 13. 酵素基質培地は、ISO 法で採用されている ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) 寒天培地以外にも、国内で入手可能な市販培地があれば検討する。
 14. 培養温度に±値が入っていないので、ISO 本文を確認し記載すると共に、酵素基質培地での発色に問題のない培養温度を作業部会にて検討する。
 15. フロー図の中で *C. sakazakii* の判定箇所は示されていないので判定箇所についても検討する。
 16. 定性試験法は、本案をもってステージ 1(NIHSJ-22-ST1)を終了し、ステージ 2 として作業を進める。

(定量試験法について)

17. ISO 法には定量試験法がないので、BAM 法を基に検討を行う予定である。
18. BAM 法は ISO の定性試験法と使用培地及び培養温度が異なる問題点がある。
19. 作業部会では BAM 法にある前培養で使用している滅菌蒸留水を BPW にし、VRBG 培地は、定性法の中で使用する酵素基質培地を使用することを検討する。

20. 作業部会では定量試験法についても作業を進めるが、ステージ1のままとし、標準法とする場合には改めて提案する。

(クロノバクター属菌試験法として)

21. 35-37℃の培養温度帯は同等と考え、定性試験法・定量試験法で規定温度を統一する。

22. 定性試験法に絞って ISO 法で検討を行うのか、増菌過程のみ ISO 法を導入した定量試験法も検討するののかについて引き続き議論を行う。

23. 定性法の中に定量法を組み込み、一つの試験法とすることについても検討する。

サルモネラ属菌試験法コラボ結果報告

24. 百瀬参考人より、コラボ試験によって NIHSJ-01 法を ISO 6579:2002 法の代替法として性能評価した際の結果報告があった。

25. 外れ値を含めた検定等、種々の検定の結果、性能は同等であると結論付けられた。

26. NIHSJ-01 法は、ISO6579:2002 法を参照法として妥当性確認された。

黄色ブドウ球菌試験法の前処理検討ミニコラボの結果報告

27. 江川参考人より、黄色ブドウ球菌試験法を食肉製品に適用した場合の集落計数法について検討した結果の報告があった。

28. 試験結果についてはバリデーション作業部会で統計処理を行い、本委員会で報告する予定である。

その他、事務連絡等

29. 本検討委員会は厚労研究費に採択され本年度から3年間継続することになった。

30. 検討する微生物標準試験法は、クロノバクター属、ビブリオ属、衛生指標菌を予定している。

31. 従来どおり、外部からの依頼がある試験法に関しても検討課題とする。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 34 回議事録概要(2011.9.13)

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 33 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 33 回議事録概要案の確認を行い、4 箇所を修正し承認された。
3. ISO 法では基準となる培養温度を 35～37℃の標記から、37℃に統一しているので標準試験法でも同様にすることを確認（しばらくは、35℃と 37℃は同等として扱う）。
4. 議事録概要案の“サルモネラ試験法”を“サルモネラ属菌試験法”と修正。
5. 腸内細菌科菌群の検出試験法 NIHSJ-15-ST4（増菌培養法）案の培地に関する記載を 6 に示す 3 カ所について修正した。
6. 「ISO 21528-1:2004 で示されている組成は以下のようなものである。」を「ISO 21528-1:2004 で示されている組成は以下である。」に、「動物組織の酵素消化物」を「カゼインの酵素消化物」に、「獣肉ペプトンなど」を「カゼインペプトンなど」に修正した。

生食用食肉の規格基準について（報告）

7. 生食用食肉の規格基準が、9 月 12 日付の官報により告示された。
8. 試験法と検体採取については通知に盛り込まれる予定で、10 月 1 日施行の予定。

Enterobacteriaceae（腸内細菌科菌群）試験法について

9. 田中委員より資料を用いて作業部会での検討の経緯について説明があった。
10. 検討委員会では ISO 21528-1:2004 の内容を定性法（NIHSJ-15-ST1）、MPN による定量法（NIHSJ-17-ST1）に分けて標準試験法として検討していた。
11. 作業部会では ISO21528-1:2004 に忠実な和訳版も作成しており、研究報告書にまとめている。
12. 腸内細菌科菌群の検出試験法 NIHSJ-15-ST4（増菌培養法）（案）は、NIHSJ-15-ST1 と ISO 21528-1:2004 の和訳を参考に作成した。
13. 「腸内細菌科菌群の定義」は、ISO21528-1:2004 の定義と同一とした。
14. NIHSJ-15-ST1 の「ペプトン」の表記を「動物組織の酵素消化物」と変更し、注釈を追加した。
15. シャーレの大きさは、日本で汎用されているサイズが含まれるように、直径 85～100mm とした。
16. ブドウ糖発酵性試験用培地は、ISO21528-1:2004 の示す組成の市販品が入手困難なため、ブドウ糖発酵性が判定出来る国内で入手可能な培地を代用可能とした。
17. 基準となる培養温度は、恒温器の性能を 37±1℃として培養温度の管理幅を規定し、試験法の本文中では 37℃とした。
18. 「試験手順」では、NIHSJ-15-ST1 で典型的集落のみを確定試験に供するとしていたものを、典型的集落がない場合には非典型集落を確定試験に供すると変更した。
19. 以下は検討委員会での討論により変更や確認を行った箇所。
20. 概要およびフローチャートに記載された「ブドウ糖分解性」を「ブドウ糖発酵性」

と修正する。

21. 「緩衝ブリリアントグリーン胆汁ブドウ糖培地」は「緩衝ブリリアントグリーン胆汁ブドウ糖ブイヨン」とする。
22. 普通寒天培地とは、グルコース不含の培地である旨の注釈を追記する。
23. ブドウ糖発酵性試験用培地について、代用可能な市販培地についても例示する。
24. オキシダーゼ試験において、鉄成分を含むニクロム線を用いた場合、偽陽性が認められることがあるので、白金耳にはニクロム線を用いないように注意喚起する。
25. オキシダーゼ反応試験用濾紙やブドウ糖発酵性試験用培地など、市販品を使用する場合は、使用説明書に従う旨を記載する。
26. その他意見のあった箇所については、事務局で取りまとめ、作業部会で内容を修正・確認した後、検討委員会委員の確認を経て、NIHSJ-15-ST4として公開する。

その他、事務連絡等

27. 通知法については、NIHSJ-15-ST4を基に示される予定。
28. 通知法の公開まで時間が限られているため、その他の修正意見については事務局が速やかに対応し、作業部会で検討する。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 35 回議事録概要(2011.10.31)

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 34 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 34 回議事録概要案の確認を行い、承認された。

カンピロバクター・ジェジュニ/コリ試験法コラボ試験実行案(NIHSJ-02-ST3)

3. 五十君委員より、プレコラボの検討結果を基に作成したカンピロバクター・ジェジュニ/コリ試験法コラボ試験実行案の説明があった。
4. プレコラボにより、ボルトン培地による増菌と mCCDA 培地の組合せでは、拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌(ESBL)の影響により、カンピロバクターの分離が困難であるという結果が示されていると報告された。
5. ISO 法では菌種をジェジュニ/コリと定義していないが、日本では行政の区分でジェジュニ/コリとなっているので、試験法名は行政の定義に従った。
6. 定性試験なので、コラボ試験の試験機関数は最低 10 ヶ所以上が必要で、最大 15 ヶ所程度で実施予定。
7. ISO 法における、ボルトン培地での前増菌培養 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 、4 時間については、培地を「事前に 37°C に保温した状態で」使用する旨を注記する。
8. プレストン培地での増菌培養時の温度について、コラボ案はプレコラボでも採用した $42\pm 1^\circ\text{C}$ としているが、ISO 法は菌の定義も培養温度も $41.5\pm 1^\circ\text{C}$ となっているため、再度 FDA の BAM 法などの温度を確認する。(→BAM は 42°C)
9. 本コラボ試験では、ボルトン培地は $41.5\pm 1^\circ\text{C}$ 、プレストン培地は $42\pm 1^\circ\text{C}$ で、別の孵卵器を用いて培養する。
10. プレコラボにより、NIHSJ-02-ST3 のプレストン培地を用いた方法は良好な結果が得られているので、コラボ試験で、ボルトン培地を用いる ISO 法との妥当性確認ができれば標準試験法として採用する。
11. 微好気培養に関し、通気性のない材質の容器をシーラー等で密閉して使用する方法は、今回の標準試験法における微好気培養法としては採用しない。
12. コラボ試験での選択分離培地は、バツラーおよび mCCDA を採用する。
13. 試験法案 1. 「ISO 10272」を「ISO 10272-1:2006」に修正する (2 箇所)。
14. 同 3. ③「微好気培養のできる孵卵器 ($37\pm 1^\circ\text{C}$)」を「微好気培養のできる孵卵器 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 、 $42\pm 1^\circ\text{C}$ ($41.5\pm 1^\circ\text{C}$)」に修正する。
15. 同 3. ⑬「滅菌シャーレ (90 mm)」を「滅菌シャーレ (直径 85~100 mm)」に修正する。
16. コラボ試験最終案を委員に回し、事務局でコメントを取りまとめた後、カンピロバクターリファレンスセンターで確認をとり公開する。

その他、事務連絡等

腸管出血性大腸菌試験法について

17. 工藤委員から腸管出血性大腸菌 O26, O111, O157 の検査法に関するコラボ試験(案)について資料を用いて説明があった。
18. 6ヶ所のプレラボで、ノボビオシン加/不含 mEC 培地 + 36°C/42°C で試験を行ったところ、食品種によっては一部の血清型でノボビオシン加 mEC の方が良い成績が得られたものの、他の血清型・食品種ではノボビオシン不含 mEC 培地の成績が良かった事から、コラボ試験はノボビオシン不含 mEC 培地 + 42°C で実施する予定。
19. 「検査法」はサンプリングプランも含めた意味となるので、「腸管出血性大腸菌検査法」は、「腸管出血性大腸菌試験法」という表現の方が良いという意見があった。
20. O26 と O111 に関しては標準試験法がないが、O157 については ISO に試験法が設定されているので、ISO 法を参照法として妥当性確認を行ってはどうかという意見があった。
21. 培養温度は他の試験法に合わせて 37°C に統一してはどうかという意見があった。
22. コラボを実施する当該試験法は、標準試験法ではないため規格基準に組み込む事は出来ないが、コラボ試験結果の評価がなされた後、厚生労働省から通知として示される予定。

クロノバクター試験法について

23. 荻原委員から *Cronobacter* spp. 試験法で使用する酵素基質培地の性能試験採用を予定している培地 5 種類の選定に関する報告があった。
24. 評価は *Cronobacter* spp. 標準菌株、*Cronobacter* spp. 食品分離株などについて行う予定で、ISO 法で定義されている再分類前の *Enterobacter sakazakii* を網羅することが可能である。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 36 回議事録概要(2011.11.22)

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 35 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 35 回議事録概要案の確認を行い、4 箇所の表現の変更と 1 箇所の内容確認が行われ、承認された。

バリデーションガイドラインについて

3. 五十君委員より、バリデーション作業部会で検討された背景や検討内容に関する概要についての説明があった。
4. 欧米においては、第三者認証機関による公の妥当性確認システムが確立されており、評価の尺度となる試験方法の確認および評価の適切な基準についてどのように運用されているか調査中である。
5. 調査結果を受け、作業部会ではガイドラインに必要な項目の選定を進める。
6. 作業部会では、コーデックスが求めるバリデーションの基となる ISO 16140 に従いフルラボ対応のバリデーションガイドの作成を進めた後、その後代替法のバリデーションについても検討する予定である。
7. 松岡委員より、欧米における第三者認証機関に関する報告書の概要について説明があった。
8. AFNOR、MicroVal、AOACI は民間で運営している。
9. AFNOR と MicroVal では ISO 法（第一選択）および CEN 法（第二選択）を参照法としている。
10. NordVal は、政府機関が事務局であり、参照法とし NMKL 法も用いている。
11. 本委員会で作成する標準試験法 NIHSJ は、各作業部会においてステージ 1 で情報収集を行い、参照となる試験法とその試験方法について複数検討している。
12. 作成した試験法(NIHSJ 法)は、バリデーション作業部会で評価しているが、今後どのように評価していくか運営方法や予算などについて検討していく。
13. 試験の対象となる病原体が決まっている試験法は、妥当性確認を適切に行えば、代替法として使用できる。
14. 衛生指標菌試験法の代替試験法をバリデートすることは容易ではない。
15. 公定法作成にあたり必要となる妥当性確認を行うガイドラインを策定していくことが了承された。
16. ISO 16140 の和訳版は一通り終了しているが、現在見直し作業を進めている。
17. 2012 年の年初の検討委員会で、15 のガイドラインに関して議論を行う。

その他、事務連絡等

腸管出血性大腸菌試験法について

18. 第一回目のコラボ試験は終了し、第二回目を行う予定で、本委員会で結果を報告する予定である。
19. 次回 12 月 20 日の検討委員会は、ビブリオ試験法を検討の予定であるが、準備状況

によっては日程を変更する。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 37 回議事録概要(2011.2.9)

1. 委員長より挨拶。
2. 改訂作業が進められている食品衛生検査指針（微生物編）に本委員会で検討中の試験法の妥当性確認に関する事項および目的にあった試験法の選び方について記載する予定である。
3. 配布資料と第 36 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 36 回議事録概要案の確認を行い、承認された。

バリデーションガイドラインについて

4. 五十君委員より、バリデーション作業部会で作成した資料「わが国における「試験法の妥当性確認」の区分 (Rev.1.1)」の説明があった。
5. 区分 1 (NIHSJ 標準法) の妥当性確認については、基本的には ISO 16140 に妥当性確認のガイドラインに従って行う。
6. 区分 1 (NIHSJ 標準法) 目的 1 のガイドラインは、ISO 法が存在する試験法で ISO 法と同等性が認められるかを示すものになる。
7. 区分 1 (NIHSJ 標準法) 目的 2 のガイドラインは、参照法となる ISO 法がないもので、信頼に足る試験法であるかどうかフルコラボで妥当性評価を行うものになり、そのためには、検討委員会で示した Stage1→4 の流れのどこでどのようなデータを揃えれば良いかを示す必要がある。
8. 区分 2 (公定法や標準法を試験所が一部改変した方法) のガイドラインは、これまでの試験法に記載されている「厚生労働省が示した公定法と同等の試験」に対して、「同等とは何か」の回答を示す実用性の高いガイドラインとなると考えられる。
9. 区分 3 (代替法) のガイドラインは、ISO 16140:2003 の直訳したものが使えるのではないかと考えられる
10. 区分 3 (代替法) の妥当性確認については、ガイドラインのみの評価は困難で、海外では専門家集団である第三者認証機関が承認するようになっている。
11. 公定法を、ISO と妥当性確認がとれたものとすれば、海外で妥当性確認された代替試験法の導入も比較的容易になると思われる。
12. 日本にも妥当性確認の第三者認証機関が必要と思われるので、どのような可能性があるか議論が必要。
13. 海外の第三者認証システムは様々なものが存在し、それぞれの機関の特徴について情報整理が必要である。。
14. 作業部会では、まず、区分 1 および区分 2 のガイドラインを作成し、厚労省へ提案してゆく。
15. 松岡委員から ISO 16140: 2003 の和訳状況について報告があった
16. 訳語に関してはその分野で合意がとれていればよく、適した訳がないものについては意識として新たに提案しても問題ないとの回答を ISO 事務局から得た。
17. 意識箇所については、経緯および理由を明記した理由書を付け、規格協会の確認を求める。