

食品に腸炎ビブリオを接種して擬似検体を作成し冷蔵輸送することで、collaborative study が実施可能であることが明らかとなった。

(2) 腸炎ビブリオ自然汚染検体に関する研究

食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を作成するための、複数検査機関における collaborative study を実施するにあたり、試験検体の魚介類を選定するために腸炎ビブリオの汚染状況を調査し、適切な検体について検討した。

本研究では、腸炎ビブリオの汚染が報告されている二枚貝を対象に、特に生食によって消費されるものを考慮し、アオヤギ、アカガイおよびイワガキを選定した。東京都内で市販されているものを入手し、いずれも国内産とし、産地は北海道、東北、関東、近畿、四国にまたがる広い地域のものであったが、近年の温暖化の影響を受けアオヤギの産地は北海道が主となっていたため、半数以上のアオヤギ検体は北海道産であった。しかし、検体購入が6から8月であったためか、比較的気温・海水温が低い北海道産のアオヤギでも、いずれの検体も腸炎ビブリオ陽性であった。アカガイおよびイワガキにおいても、産地が東北のものでも全て腸炎ビブリオ陽性であり、腸炎ビブリオ接種検体を作製するには使用できないことが判明した。しかし、自然汚染検体としての試験供試の可能性が示唆された。貝の個体間の腸炎ビブリオ汚染レベルの幅や汚染頻度など、検体として選定するにはさらに汚染状況を確認する必要があるが、腸炎ビブリオの人工培地中と環境中での生理状態の違いを考慮すると、自

然汚染検体の方がより現実的な検出法の評価と言えるのかもしれない。腸炎ビブリオと同時に存在する細菌も現実の試験検体で腸炎ビブリオを検出する際には検出法に影響するため、このことも含めて collaborative study を行うことの意義は高いと考えられる。また、腸炎ビブリオ非汚染二枚貝に菌を接種して検体を作製する場合には、6月以降の初夏では産地に関わらず二枚貝の腸炎ビブリオ汚染があることが考えられるため、気温海水温が低下し本菌の汚染が極度に低い冬季の二枚貝を使用することによって試験に適切な検体が設定できると考えられる。

E. 結論

(1) 腸炎ビブリオ接種検体の作製に関する研究

各食品に腸炎ビブリオを接種、冷蔵保存24時間後の菌数変化をみると、いずれの食品、血清型菌でも高濃度接種群では1~2オーダーの菌数減少が認められた。低菌数接種群ではいずれも菌数は比較的安定していた。48時間保存後でも、24時間保存とほぼ同程度の菌数を維持していた。食品の種類による差や血清型による大きな差は認められなかった。また、大量培養法では、全ての検体から腸炎ビブリオが検出された。以上の結果から、今回実施した方法で食品に腸炎ビブリオを接種し、冷蔵・輸送することで、collaborative study が実施可能であることが明らかとなった。

(2) 腸炎ビブリオ自然汚染検体に関する研究

食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を作成するための複数検査機関にお

ける collaborative study の実施に、試験した検体の全てから腸炎ビブリオが検出された6から8月のアオヤギ、アカガイ、イワガキが腸炎ビブリオ自然汚染検体として使用できることが示された。今後、貝の個体間の腸炎ビブリオ汚染レベルの幅や汚染頻度など、検体として選定するにはさらに汚染状況を確認する必要があるが、自然汚染検体の方がより現実的な検出法の評価と言えるのかもしれない。また、腸炎ビブリオ非汚染二枚貝に菌を接種して検体を作製する場合は、6月以降の初夏では産地に関わらず二枚貝の腸炎ビブリオ汚染があることが考えられるため、気温・海水温が低下し本菌の汚染が極度に低い冬季の二枚貝を使用することによって試験に適切な検体が設定できると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

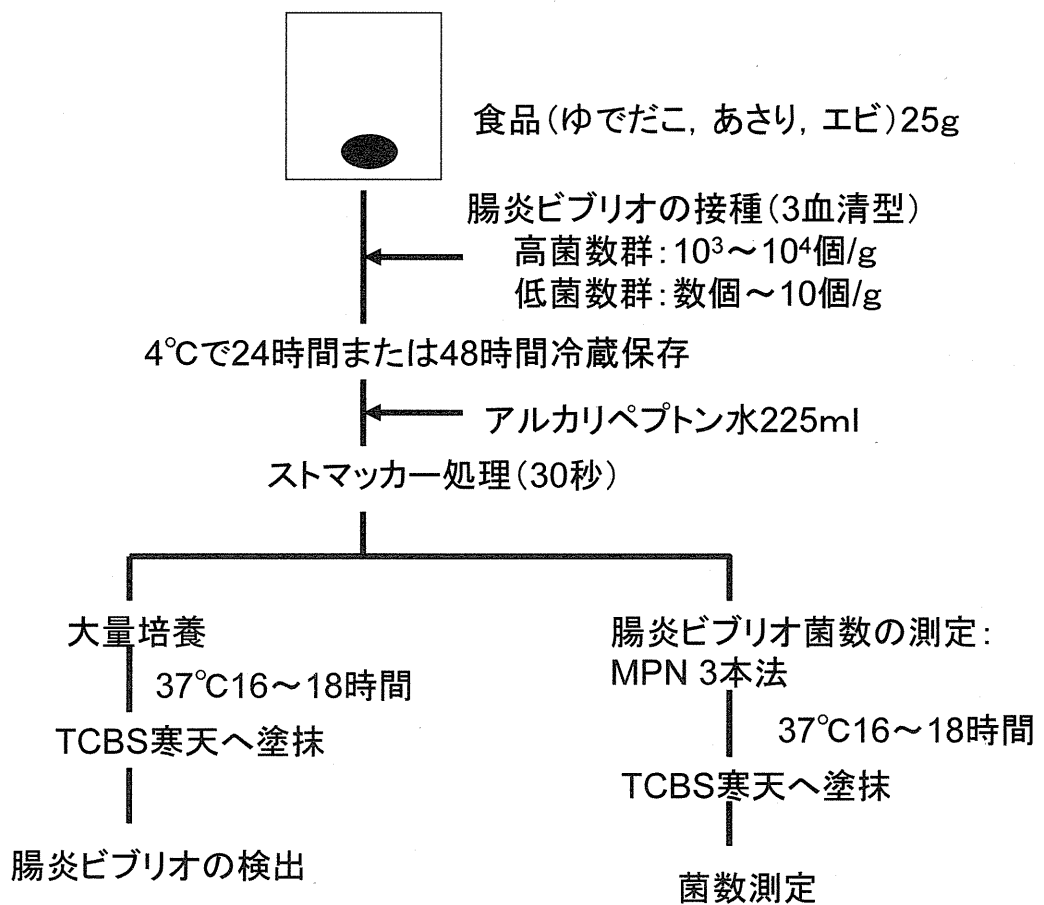


図1 腸炎ビブリオ添加擬似検体の作成法と冷蔵保存後の検体からの腸炎ビブリオの検出法

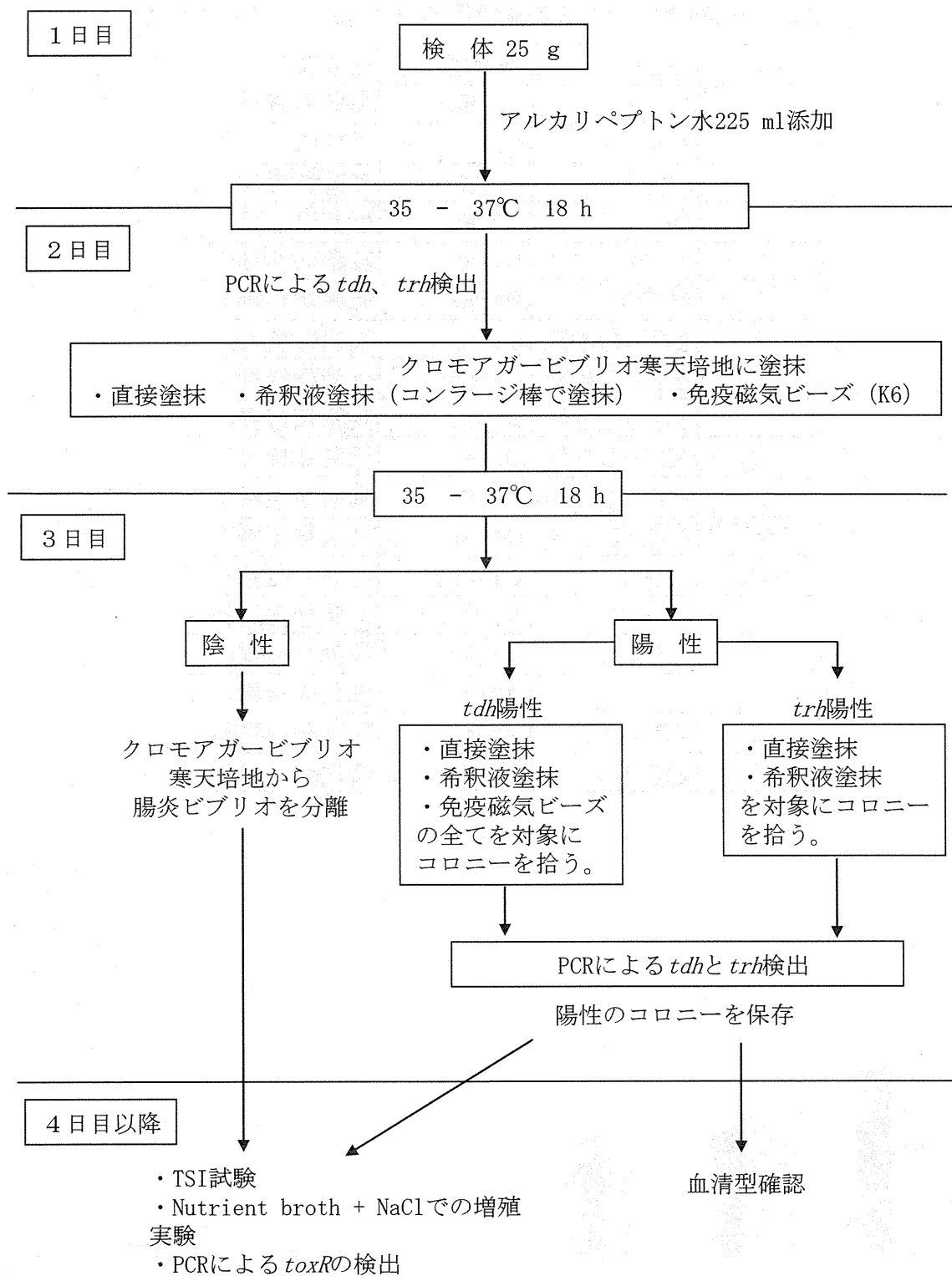
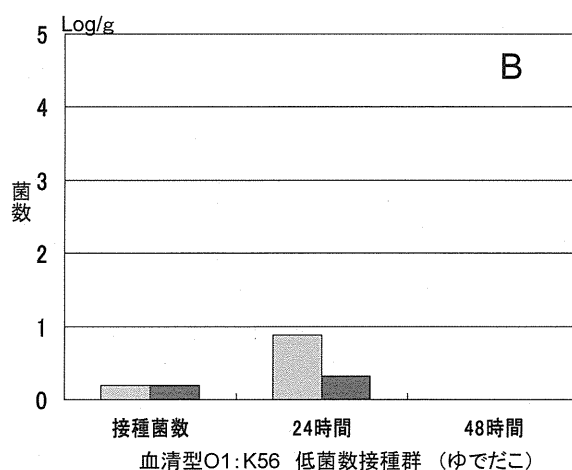
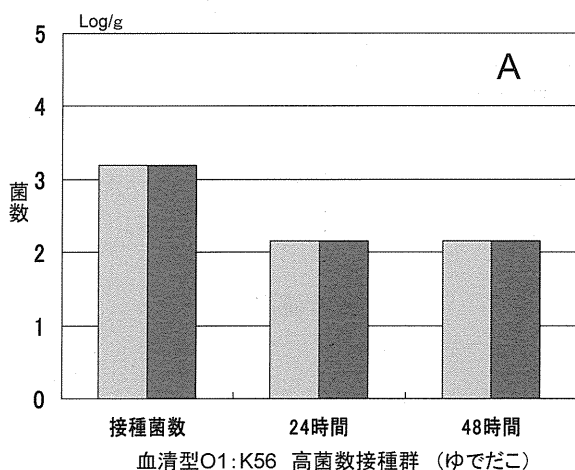
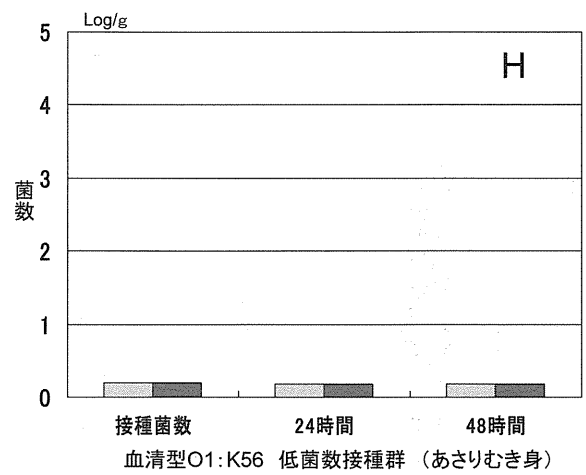
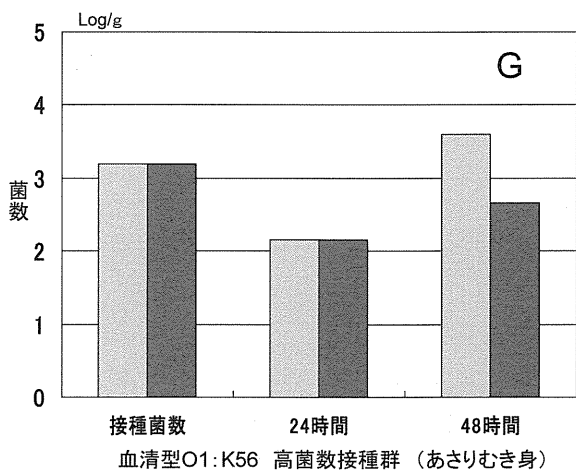
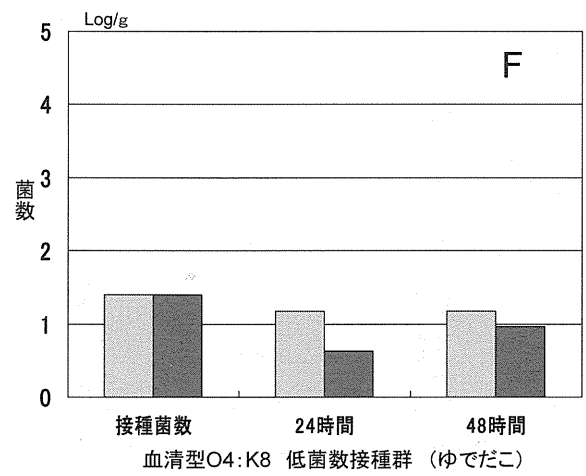
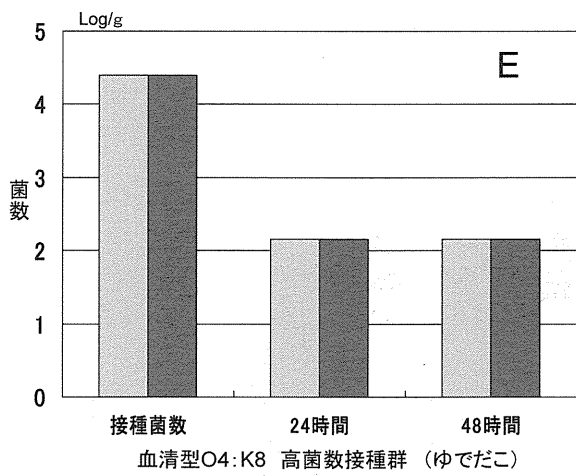
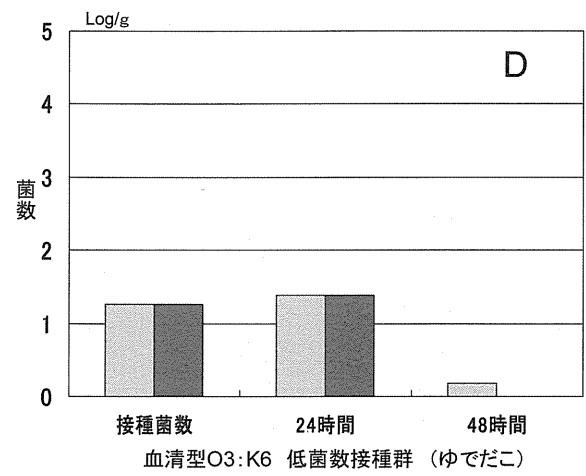
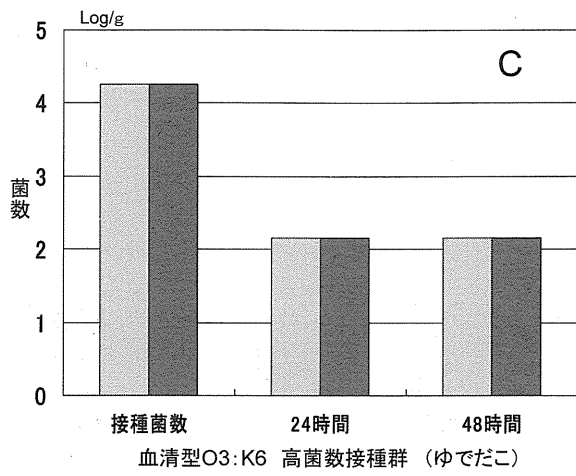


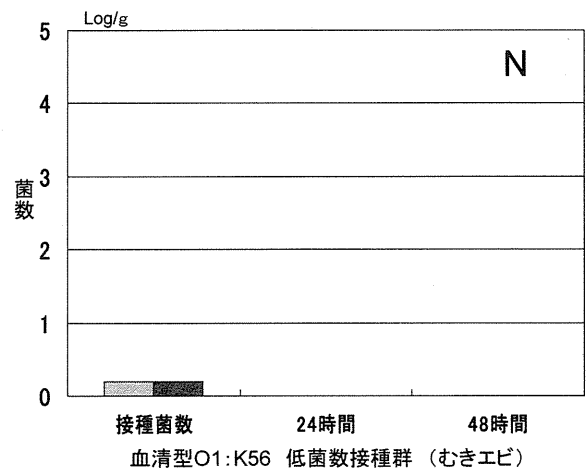
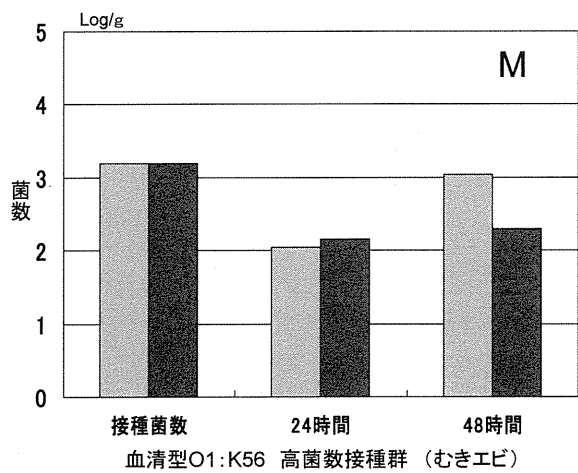
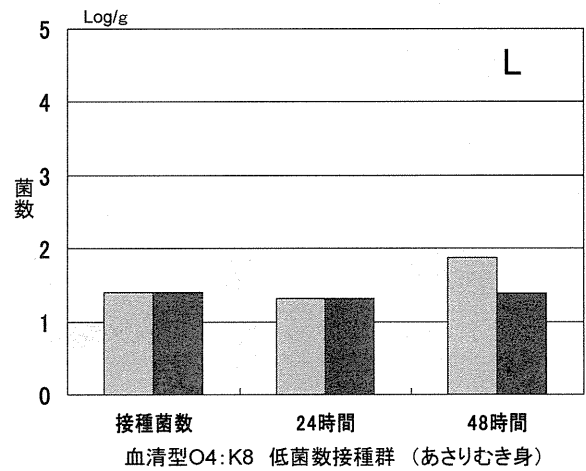
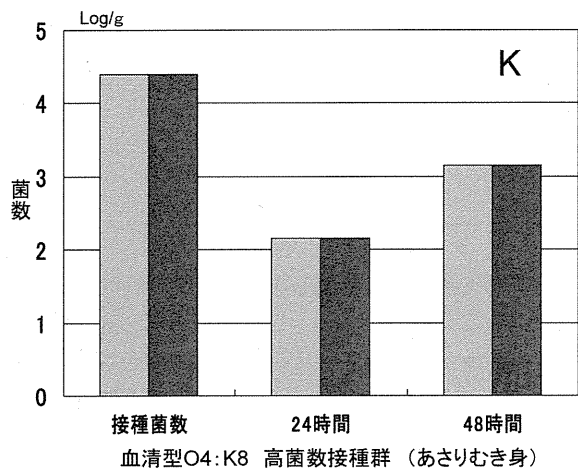
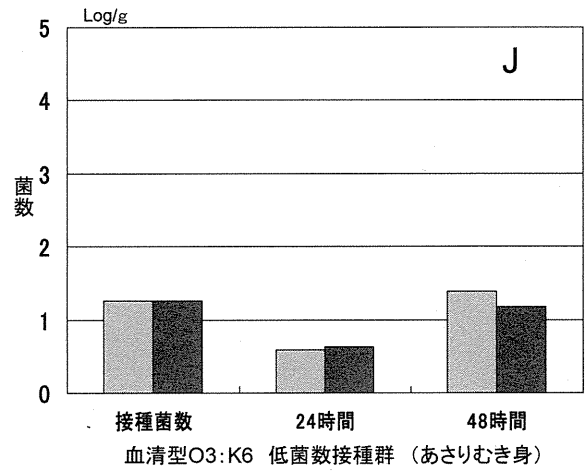
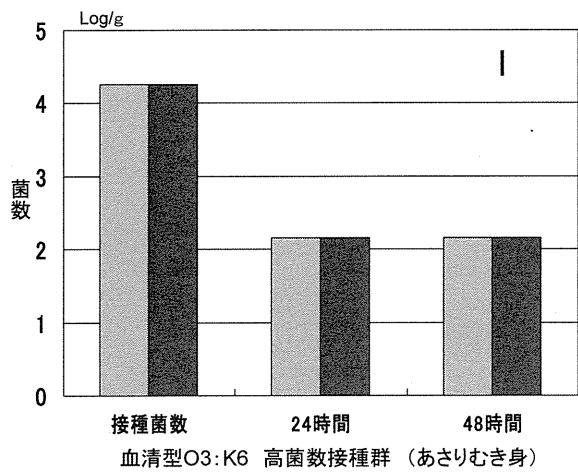
図2 腸炎ビブリオ検出方法の流れ

図3 4°Cで24時間および48時間保存後の腸炎ビブリオ菌数

No	食品	血清型	接種菌数
A	ゆでだこ	O1:K56	高菌数接種群
B	ゆでだこ	O1:K56	低菌数接種群
C	ゆでだこ	O3:K6	高菌数接種群
D	ゆでだこ	O3:K6	低菌数接種群
E	ゆでだこ	O4:K8	高菌数接種群
F	ゆでだこ	O4:K8	低菌数接種群
G	あさりむき身	O1:K56	高菌数接種群
H	あさりむき身	O1:K56	低菌数接種群
I	あさりむき身	O3:K6	高菌数接種群
J	あさりむき身	O3:K6	低菌数接種群
K	あさりむき身	O4:K8	高菌数接種群
L	あさりむき身	O4:K8	低菌数接種群
M	むきエビ	O1:K56	高菌数接種群
N	むきエビ	O1:K56	低菌数接種群
O	むきエビ	O3:K6	高菌数接種群
P	むきエビ	O3:K6	低菌数接種群
Q	むきエビ	O4:K8	高菌数接種群
R	むきエビ	O4:K8	低菌数接種群







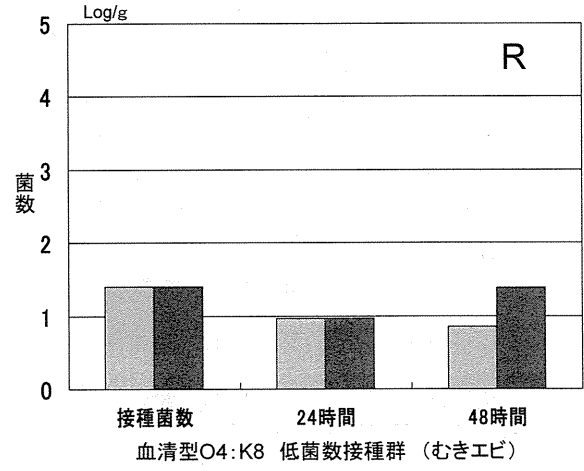
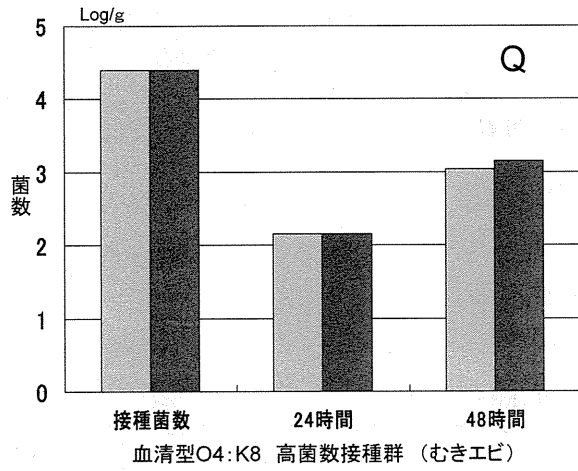
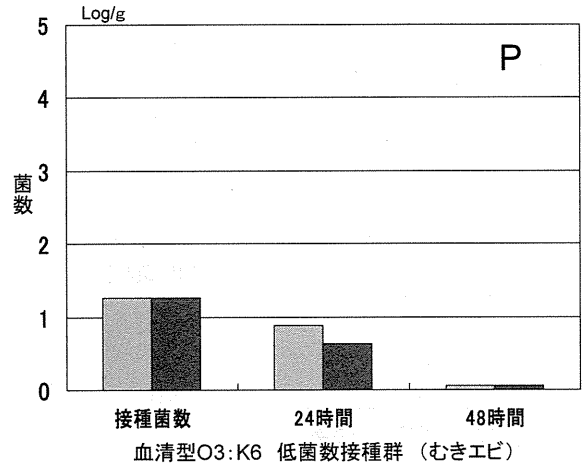
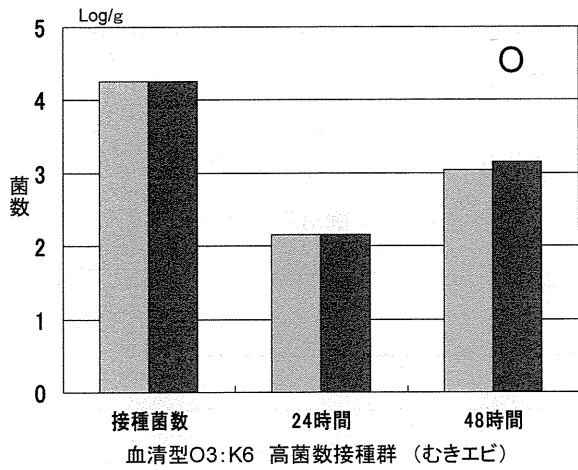


表 1 腸炎ビブリオの分離結果

検体	アオヤギ	アカガイ	イワガキ	合計
産地 (検体数)				
	北海道 (9)	青森県 (3)	福井県 (2)	
	千葉県 (3)	宮城県 (2)	徳島県 (2)	
	東京都 (3)	三重県 (1)	秋田県 (1)	
	宮城県 (1)		石川県 (1)	
小計	16	6	6	28
腸炎ビブリオ分離				
	16/16*	6/6	6/6	28/28
病原因子遺伝子				
tdh	0/16	0/6	0/6	0/28
trh	2/16	2/6	0/6	3/28
trh陽性検体	検体 1 (宮城県)	検体 1 (青森県)		
からの分離株の	04:K12 (2)	04:KUT (1)	なし	
血清型 (株数)		010:KUT (12)		
	検体 2 (千葉県)	検体 2 (三重県)		
	01:KUT (1)	01:K32 (1)		
	04:KUT (1)	011:KUT (1)		

* 陽性検体 / 試験検体数

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

分担研究報告書

衛生指標菌試験法に関する研究

分担研究者： 伊豫田淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

協力（委託）研究者： 田中廣行（財団法人 日本食品分析センター 微生物部）

森曜子（公益財団法人 日本適合性認定協会 認定センター）

研究要旨

わが国の食品衛生法では衛生指標菌として主に細菌数（生菌数），大腸菌群，*E. coli*（糞便系大腸菌群）等が採用されている。食品衛生法における衛生指標菌の試験法は告示・通知等により公定法として示されているが、これらの試験法間では同様な試験工程においても整合性が取れない操作・手順のあることや、ISO が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法(Bacteriological Analytical Manual ; BAM 法)との調和が計られていない現状が指摘されている。

これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における会議及び衛生指標菌作業部会において検討を行った結果、今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認された。これまで Enterobacteriaceae(腸内細菌科菌群)、Presumptive *Escherichia coli*(推定大腸菌)及び Coliforms(大腸菌群)に関する標準法の策定作業を進めてきたが、今後は Microorganisms(一般生菌数)及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌)の試験法並びに試験結果の算定法を確立することを検討課題とすることとした。今年度は、生菌数試験法の ISO 法と従来法を比較し、一般生菌数計数法案の基礎データを収集した。さらに、ISO の β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌)試験法の内容を精査し、実行性を検討した。また、当該試験法について和訳を行った。

A. 研究目的

欧州では、食品に係わる微生物基準として「COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs」が制定されており、食品安全に係わる基準 (Food safety criteria) と製造工程上の衛生に係わる基準 (Process

hygiene criteria) に大別されている。これらの基準では、衛生指標菌として Aerobic colony count (好気性集落数)，Enterobacteriaceae (腸内細菌科) 及び *E. coli* (大腸菌) が採用されているとともに、試験法としては ISO (International Organization for Standardization) が定める国際規格の方法が

Analytical reference method (参照試験法) として指定されている。

一方、わが国の食品衛生法では「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」(昭和26年、厚生省令第52号)及び「食品、添加物等の規格基準」(昭和34年、厚生省告示第370号)の中で、個々の食品中における細菌数(一般生菌数)、大腸菌群、*E. coli*(糞便系大腸菌群)等の菌数限度基準または陰性基準が規定されており、個別の試験法が定められている。しかし、これらの試験法間では同様な試験工程においても整合性が取れない操作・手順のあることや、国際的な標準法であるISO法や米国FDAのBAM(Bacteriological Analytical Manual)法との調和が計れていない現状が指摘されている。これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における会議及び衛生指標菌作業部会において検討を行った結果、今後規格が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、ISO法を土台にしたEnterobacteriaceae(腸内細菌科)、Presumptive *Escherichia coli*(推定大腸菌)、Coliforms(大腸菌群)の試験法を確立することをこれまでの検討課題としてきた。国内の公定法のうち、*E. coli*(糞便系大腸菌群)に相当するのがPresumptive *Escherichia coli*(推定大腸菌)であるが、この方法では最終結果が得られるまでに約1週間を要する。そこで今年度は、これらに相当し、酵素基質培地を用いた簡便法である、ISOのβ-glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β-グルクロニダーゼ陽性大腸菌)試験法を和訳し、この試験法がわが国の標準法として導入可能であるかどうかを検討した。

さらに、従来の一般生菌数試験法をISO法と比較し、一般生菌数計数法案の基礎データを収集した。

B. 研究方法

1. 一般生菌数試験法について

3つの食品群(食肉製品、魚加工品、乳製品)に*B. subtilis*の芽胞菌液を希釈し、秤量した試料に添加した。添加区として低濃度添加区(1,000 cfu/g)および高濃度添加区(100,000 cfu/g)を設定した。それぞれの試料についてISO試験法と従来試験法に従い、実施数n=3(1食品群:2法×2濃度×n3+試薬BL=13検体)で試験を実施し、それぞれの試験法で得られた結果を比較した。それぞれの食品群については、食肉製品として鶏唐揚げ、魚加工品としてサバの水煮、乳製品として牛乳を用いた。また、2つの食品群(食肉製品、魚加工品)においては自然汚染食品についてのデータを収集するため、食肉製品としてミンチ肉、魚加工品としてシシャモ一夜干しおよび生タラフィレを用いISO試験法および従来の国内試験法にて試験を実施、結果を比較した(資料1-3参照)。

算定法: IS07218を用いた。今回の検討では各希釈段階で2枚の平板を使用しているので、ΣCを2つの連続した希釈からなるシャーレ各2枚の合計とした。

IS07218の算定法の要約を次に示す。

コロニーカウント

全コロニー、典型コロニー、推定コロニーについて、基本的に300未満(<300)のコロニーを含むシャーレ中のコロニーをカウントする。

① 一般的な場合

$$N = \Sigma C / (V \times 2.2 \times d)$$

N: 菌数

ΣC: 最少10コロニーを含む2つの連続した希釈からなるシャーレ中のコロニー数の合計

V: それぞれのシャーレに接種した試料液の量(mL)

d: 一番目の希釈段階に対応する希釈係数
計算結果は上位3桁目を四捨五入し、有効数

字 2 桁で表記した。

② コロニー数が少ない場合

②-1 最も低い希釈段階のシャーレ中のコロニー数が 10 未満 (<10) の場合

●4~9 の場合

$$N = \Sigma C / (V \times 2.2 \times d)$$

●1~3 の場合

微生物は存在しているが $(4 \times d) / g$

10 倍希釈で 1~3 個の場合 $\rightarrow < 40 / g$

③ コロニー数が 0 の場合

$< 1 / d$ (10 倍希釈から始めた場合 $\rightarrow < 10 / g$)

2. β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌試験法について

ISO が制定する衛生指標菌試験法のうち、以下の示す β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* (β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌) 試験法の内容を精査し、実行性を検討した。また、当該試験法 (以下参照) について和訳を行った。

ISO 16649-2 : Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2 : Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (2001)

C. 研究結果及び考察

1. 一般生菌数試験法における ISO 法と従来法の比較

ISO 法、従来法の試験工程の差異は培養時間と培養温度であり、これらの要因が両試験法の結果に差異をもたらすことが予想された (資料 3)。

資料 4 にある通り、添加回収試験においては ISO 法、従来法ともに得られる結果はほぼ同じであった。これは、添加した *B. subtilis*

がどちらの試験法の培養温度でも発育可能であるため差は生じなかったと推測される。

しかし自然汚染食品では、ISO法と従来法では結果に差が見られ、最も大きなものでは約100倍の差を生じた食品があった。食肉製品の「ミンチ」は菌叢を形成している細菌の多くが哺乳類由来の腸内細菌と推測されるため、前述の*B. subtilis*と同様にどちらの試験法でも発育可能であり、結果に差は生じなかったと推測される。

一方、魚加工品の「生タラフィレ」は、菌叢中に低温細菌の存在が考えられるため、培養温度がより至適発育温度に近いISO法で値が高く検出されたと推測される。したがって、食品中の菌叢が異なるとISO法と従来法による結果が大きく異なる可能性が示唆された。

また、両試験法では算定に供するシャーレのコロニー数の範囲だけが異なる。算定方法の違いにより結果に差異が生ずるか確認するために、ISO法で試験して得られたコロニー数からISO法と食品衛生検査指針法により結果を算出したところ、両者の結果の比 (指針法 / ISO法) は0.92~1.03となり、算定方法による結果に大きな違いは認められなかった。

今後は、様々な菌種を用いた添加回収試験の実施や自然汚染食品への調査を拡大することで試験法の互換性がより一層明確になるといえる。

2. β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌試験法

それぞれの和訳は別添2. 資料5の通りである。ISO 16649-2 : 2001の内容を精査し、実行性を検討した結果、わが国の標準法として導入可能であると判断された。

D. 結論

・一般生菌数におけるISO法と食品衛生検査指針法では算定方法による結果に大きな違いは認められなかった。

・ISO 16649-2:2001 逐語和訳版を作製した。
わが国の標準法として導入可能であると判断された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

資料.

資料 1：一般生菌数測定のための ISO 試験法

食肉製品	魚加工品	乳製品
ISO4833：2003 食品及び動物飼料の微生物学 -微生物の計数のための一般試験法-30℃における集落計数法		
ISO6887-1：1999 食品及び動物飼料の微生物学 -微生物試験のための試料，初期懸濁液及び 10 進希釈液の調製- 第 1 部：初期懸濁液及び 10 進希釈液の調製		
ISO6887-2：2003 食肉製品の試料調製	ISO6887-3：2003 鮮魚及び魚加工品の試料 調製	ISO6887-5：2010 乳製品の試料調製
ISO7218：2007 食品及び動物飼料の微生物学 -微生物試験の一般要求事項及び手引き-		

資料 2：国内における従来試験法

食肉製品	魚加工品	乳製品
食品衛生検査指針 微生物編 2004	食品衛生検査指針 微生物編 2004	乳および乳製品の成分規格

資料 3：食品群別試料量、希釈水、培地、培養温度、培養時間一覧表

①食肉製品および魚加工品

	試料量	希釈水	培地	培養温度	培養時間
ISO 試験法	25 g	0.1%ペプトン加 生理食塩水	標準寒天	30±1℃	72±3 時間
従来試験法			標準寒天	35±1℃	48±3 時間

②乳製品

	試料量	希釈水	培地	培養温度	培養時間
ISO 試験法	原液	0.1%ペプトン加 生理食塩水	標準寒天	30±1℃	72±3 時間
従来試験法					

資料 4 :

食品ごとの一般生菌数測定結果

① 食肉製品 (鶏唐揚げ)

(1) 添加試験

	添加濃度 (cfu/g)	添加濃度 (対数 cfu/g)
高濃度添加区	1.4×10^5	5.15
低濃度添加区	1.4×10^3	3.15

A : ISO 試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^5	78	5.04	98
②	9.5×10^4	68	4.98	97
③	1.1×10^5	76	5.03	98

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^3	78	3.04	97
②	1.1×10^3	76	3.03	96
③	9.6×10^2	69	2.98	95

B : 従来試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.2×10^5	87	5.09	99
②	1.1×10^5	80	5.05	98
③	1.1×10^5	80	5.05	98

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^3	80	3.05	97
②	1.2×10^3	87	3.09	98
③	1.2×10^3	82	3.06	97

(2) 自然汚染食品 (ミンチ肉)

	従来試験法		ISO 試験法	
	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)
①	2.2×10^7	7.34	3.1×10^7	7.48
②	2.2×10^7	7.33	2.4×10^7	7.39
③	2.4×10^7	7.37	3.5×10^7	7.54

② 魚加工品 (サバ缶)

(1) 添加試験

	添加濃度 (cfu/g)	添加濃度 (対数 cfu/g)
高濃度添加区	1.5×10^5	5.18
低濃度添加区	1.5×10^3	3.18

A : ISO 試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^5	73	5.05	97
②	1.2×10^5	81	5.09	98
③	1.2×10^5	79	5.08	98

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.3×10^3	86	3.12	98
②	1.5×10^3	100	3.18	100
③	1.1×10^3	73	3.05	96

B : 従来試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.2×10^5	79	5.08	98
②	1.1×10^5	71	5.04	97
③	1.2×10^5	81	5.09	98

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.3×10^3	82	3.10	97
②	1.4×10^3	91	3.14	99
③	1.0×10^3	67	3.01	94

(2) 自然汚染食品

シシャモ一夜干し

	従来試験法		ISO 試験法	
	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)
①	1.3×10^2	2.11	2.6×10^3	3.41
②	1.1×10^2	2.02	5.9×10^3	3.77
③	3.2×10^2	2.50	1.6×10^3	3.20

生タラフィレ

	従来試験法		ISO 試験法	
	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)	実測結果 (cfu/g)	対数結果 (cfu/g)
①	8.8×10^5	5.94	1.7×10^7	7.24
②	4.2×10^5	5.62	2.7×10^6	6.44
③	4.7×10^5	5.67	8.3×10^6	6.92

③ 乳製品 (牛乳)

(1) 添加試験

	添加濃度 (cfu/g)	添加濃度 (対数 cfu/g)
高濃度添加区	1.1×10^5	5.02
低濃度添加区	1.1×10^3	3.04

A : ISO 試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.1×10^5	101	5.03	100
②	1.2×10^5	111	5.07	101
③	1.2×10^5	112	5.07	101

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.4×10^3	129	3.15	104
②	1.4×10^3	131	3.16	104
③	1.4×10^3	125	3.14	103

B : 従来試験法

高濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	9.9×10^4	94	5.00	99
②	1.1×10^5	104	5.04	100
③	1.0×10^5	95	5.00	100

低濃度添加区

	実測結果 (cfu/g)	回収率 (%)	対数結果 (cfu/g)	回収率 (対数%)
①	1.2×10^3	111	3.09	102
②	1.3×10^3	116	3.10	102
③	1.2×10^3	111	3.08	101

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
分担研究報告書

妥当性評価

分担研究者 松岡英明 東京農工大学 大学院工学研究院 教授
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 室長

研究要旨

国際的ハーモナイゼーションを図りつつ、我国における微生物試験標準法の作成が進められている。本研究は、その試験法の妥当性確認方法のガイドライン作成を目指し、作業を進めた。特に、妥当性確認の実行組織について調査した結果、公的システムとして北欧食品分析委員会（NMKL）が参考になるとの結論を得た。一方、妥当性確認における技術的ボトルネックになると考えられる生菌標準物質に関しては、10種類の菌株について、95-100個の生菌を精確にソーティングできることが実証できた。国際的に初めての成果であり、国際シンポジウム等で発表した。

A. 研究目的

国際的にハーモナイゼーションを図りつつ、我国における微生物試験標準法を作成するために、AOAC、ISO など国際的に妥当性確認（バリデーション）された試験法の内容を詳しく調査してきた。その結果、Salmonella 試験法を筆頭に、新規の標準法を作成し、公表してきた。そして、その一部についてはコラボスタディで妥当性確認を実施した。

次に、これらの試験法のみならず、今後新たに開発される試験法も含め、妥当性確認の実施法についてのガイドラインを作成するための作業に取り組んできた。すなわち、雛型となる AOAC のガイドラインや ISO16140 などについて詳しく調査し、必要に応じて邦訳を実施してきた。それに基づいて、ガイドライン原案を作成してきた。しかし、この原案の段階から、公開に至るまでに検討しなければならない問題は、複雑で困難である。

例えば、既報の国際的ガイドラインに示された具体的数値が必ずしも一致してはいない。また、食品マトリクス分類

の考え方も国内への適用に際しては検討が必要と考えられる。そして、そうした問題に対する解は、自ら妥当性確認をすることが「急がば回れ」ではあるが、予算も人員も限られているので、現実的ではない。そうした制約のもとで、国際的のみならず国内状況とのハーモナイゼーションを図りつつ、妥当性確認のガイドラインを作成することが、本研究の第一の目的である。

一方、妥当性確認に際してボトルネックとなっている課題の一つが、微生物汚染食品標準物質であった。既に、フリーズドライ型の生菌標準物質として、BioBall が開発されているが、開発済の数株以外は難しく、多数の菌種・株に対して適用できる方法が要請されていた。

これに対して、セルソーターを利用することによって、生菌の標準物質を「その場調製」できる方法について検討が進められてきた。その結果、ソーティング条件の最適化によって、ある程度可能性が示されていた。そこで、この方法の可能性を検証することを、本研究の第二の

目的とした。

B. 研究方法

(1) 妥当性確認のガイドライン作成

試験法の妥当性確認のガイドライン作成に際して、予め整理しておかなければならない事項について議論した。例えば、「微生物試験法の選定」のガイドラインである。具体的事例として、「食品等事業者が実施する自主検査における微生物試験法」が挙げられ、これに即して選定の考え方について議論した。

次に、妥当性確認を実施する組織についての議論を行った。ガイドラインに記述されている内容だけでは実際に妥当性確認を実施することは難しい。随所に、専門的事項について判断しなければならない箇所がある。そのため、実施に際して指導、助言、さらに評価などの業務を担当する組織が必要となる。そのような組織で既に海外にある例を調査した。

(2) 微生物生菌標準物質

標準菌株から調製した生菌の蛍光染色と、セルソーターによる単一細胞の分配、それを受ける最適培地、から構成されるシステムの可能性を検討した。

(イ) 菌株

標準菌株として以下の10株を選び、それぞれ、(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部・生物遺伝資源部門(NBRC)、あるいは American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。

- *Escherichia coli* K-12 (NBRC 3301)
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC 12689)
- *Bacillus subtilis* (NBRC 3009)
- *Klebsiella pneumoniae* (NBRC3318)
- *Enterobacter aerogenes* (NBRC 12010)
- *Staphylococcus aureus* (NBRC 102135)
- *Escherichia coli* O126
- *Citrobacter freundii* (F-18)
- *Micrococcus luteus* 12708

(ロ) 生菌識別用蛍光色素

生菌を死菌と区別して染色する蛍光色素には、その原理の違いによって数種類あるが、色素の安定性や蛍光強度の観点から最適なものとして、カルボキシフルオレッセインジアセテート (CFDA) を第一に選定した。生細胞のみが細胞内エステラーゼ活性を保持している、という性質に基づいている。

(ハ) セルソーター : Aria (BD)

専用オートステージを設置して、通常の円形プレート (86mm^φ) の寒天培地上に、等間隔で 10×10 の位置に自動的に滴下するための専用プレートアダプターを作製した。

(ニ) 培地

生菌であることの証明はコロニーの形成である。セルソーターで分配される単一細胞を受ける培地として、第一に標準寒天培地を使用した。しかし、菌の種類によっては、十分なコロニー形成率が得られない可能性がある。そのような場合には、より高いコロニー形成率が得られる培地を検討した。

C. 研究結果

(1) 妥当性確認のガイドライン作成

微生物試験法の選定に関しては、既に妥当性確認がなされている参照法や標準法と、簡略型の妥当性確認がなされていない参考法、全く妥当性確認が行われていない暫定法の、何れかを採用するのかは、その目的による。例として挙げた、「食品等事業者が実施する自主検査における微生物試験法」においては、自ら試行してみても有効であると判断されれば、例え参考法であっても、採用することができる。これはベリフィケーションである。しかし、公的に性能を保証するためには、参照法あるいは標準法と同等であることが

必須である。したがって、作成目的のガイドラインは、新規に作成された試験法を参照法あるいは標準法とするために必要な手続き、および既に妥当性確認が済んだ試験法を部分的に変更する場合に必要な手続き、についてまとめることになる。そのために、詳細な数値の扱いや食品マトリクス選定法など、本格的な議論がなされた。これらの数値や考え方は国際的な動向も考慮しながら決めていく必要がある。2012年2月に公表されたAOACの改訂版ガイドラインもその観点から重要な情報であり、ISO6140との比較検討を行った。その概要を添付資料1に示す。さらに、こうした海外動向に対して我が国から積極的に発信していくことも重要であり、その際、統計学の専門家の協力が必須との意見も出された。

また、妥当性確認を実施する組織としては、AFNOR、MicroVal、NordVal、AOACIなどがあり、その事務局体制（事務局と認証機関）、さらに妥当性確認に際して採用している参照法の種類、その手順、等について改めて情報を整理した。その結果、特にNordValの認証機関である北欧食品分析委員会(NMKL)が公的な組織として参考になるとの結論を得た。

(2) 微生物生菌標準物質

Tryptic Soy Brothで培養した後、Tryptic Soy 寒天培地に分注する方法により、適用した10株すべてにおいて、良好な結果が得られた。すなわち、 $10 \times 10 = 100$ 個のCFDA陽性細胞を1個ずつ滴下して、コロニー形成率を調べたところ、全てにおいて95以上のコロニーが形成することが確かめられた(図1)。特に*K. pneumoniae*の場合は3回の試行で全て100個のコロニーが形成された(図2)。

D. 結論

新規の微生物試験法、及び参照法・標準法を一部改変した試験法の妥当性確認

をするためのガイドライン作成作業は、詳細な数値の扱いや食品マトリクス選定法など、本格的な議論がなされた。

微生物生菌標準物質に関しては、技術的に可能であることが実証され、今後、適用菌株の数を増やすと共に、好気性条件では増殖できない菌種についての検討も行い、さらに適用範囲を広げることとした。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

(国際会議)

H. Matsuoka (Symposium organizer): Symposium (AM-2) "Towards rapid and reliable methods for microbial cell", International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011), Sapporo, September 6, 2011.

H. Matsuoka (Invited): Struggles towards rapid, reliable, and reasonable methods. IUMS 2011, Sapporo, September 6, 2011.

H. Matsuoka, T. Shigetomi, K. Nakano, H. Funabashi, M. Saito: In situ preparation of microbial cell standard material containing exact small number of viable cells. IUMS 2011, Sapporo, September 7, 2011.

H. Matsuoka, T. Shigetomi, K. Nakano, H. Funabashi, M. Saito: Feasibility of single-cell sorting for the in situ preparation of definite small number of viable microbial cells. 125th AOAC Annual Meeting and Exposition, New Orleans, September 19, 2011.

(国内学会)

中納広一郎、重富知也、舟橋久景、斉藤美佳子、松岡英明：少数生菌の定量的ソーティング。第38回日本防菌防黴学会年次大会、東京、2011年8月30日。

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。