

201327008A

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25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26(2014)年3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25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26(2014)年3月

## 目 次

I. 平成 25 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 . . . . .	7
検討委員会議事録概要 . . . . .	11
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 . . . . .	23
荻原博和、岡田由美子、福田典子、鈴木穂高、百瀬愛佳、吉田朋高	
2. 腸炎ビブリオ試験法 . . . . .	33
甲斐明美、小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、仲真晶子	
3. 衛生指標菌試験法に関する研究 . . . . .	41
伊豫田淳、田中廣行、吉田信一郎、齋藤利江、五十君静信 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 . . . . .	65
松岡英明、五十君静信	

平成 25 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、統一した方向性をもって、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法の策定を進めた。これまでの研究班の成果である食品からの微生物標準試験法作成方針に従い、腸炎ビブリオ、クロノバクター属菌、衛生指標菌などの標準試験法の策定を進めた。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ことが重要である。さらに、策定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った。

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。試験法策定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、“食品からの微生物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 25 年度は、コラボ案の作成と検討および最終試験法の検討（ステージ 3～4）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、AOAC から出されたバリデーションに関する新しい文書や海外の第三者認証機関の妥当性確認のプロトコールなどを参考に検討を進め、ガイドライン原案を作成した。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、その成果を原著論文として発表した。

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  
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を行う。これまでの研究班の成果である食品からの微生物標準試験法作成方針に従い、腸炎ビブリオ、クロノバクター属菌、並びに衛生指標菌などの標準試験法を策定する。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、科学的根拠のある試験法作成に必要な妥当性確

認の方法論の提供、策定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。

## 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 名からなる“標準試験法検討委員会”を組織し、これまでの研究班の成果として作成された“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い、微生物標準試験法の策定を行うが、検討に必要なデータの統計処理方法は国際的にまだ統一されていないため、データの評価方法については、実際の試験法策定の検討データ毎に相当と思われる手法により検討する。これらの試験法策定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策定は、それぞれの作業部会を組織し進めた。本研究班の代表、分担、協力研究者が、作業部会を組織し具体的な標準法策定の作業にあたった。各作業部会は、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い“標準試験法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。H25 年度の試験法の策定は、コラボ案の作成と検討および最終試験法の検討（ステージ 3～4）を行った。これに対応し“標準試験法検討委員会”は H25 年度に 5 回開催し、それぞれの標準試験法策定が適切に行われていることを確認すると共に、微生物試験法の妥当性確認の手法を ISO 16140 を基に AOAC のバリデーションガイドライン、海外の第三者認証機関が示しているプロトコルなどを参考とし検討し、ガイドライン原案を作成した。

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“食品からの微生物標準試験法作成方針”を基に“標準試験法検討委員会”

が標準試験法の作成の方向性を示した。平成 25 年度は、カンピロバクターレファレンスセンターを中心とする研究班の依頼を受けて、コラボ試験の結果を基に妥当性確認を行った。また、特定非営利活動法人食の安全を確保するための微生物検査協議会が中心となって進めるウェルシュ菌試験法については、原案から作業部会案作成の検討を行った。

## C. 研究結果

食品微生物の専門家約 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、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い標準試験法策定にあたった。汚染指標菌の標準試験法は、ISO 法の酵素基質培地を用いた大腸菌試験法について検討し、その試験法案の作成を行った。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）、衛生指標菌（伊豫田、五十君、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。標準試験法検討委員会は“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い、試験法策定を進めた（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）は衛生指標菌作業部会との合同作業部会を年度内に 5 回開催し、AOAC インターナショナルの示したガイドラインや海外の第三者機関による妥当性確認に関する文書を参考に議論を進め、バリデーションガイドライン原案を作成した。

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 25 年度 5 回の検討委員会を開催した。各作業部会が機能し、標準法策定が順調に行われているかを評価した。他の研究班等で検討中のカンピロバクター標準試験法のコラボ試験について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 3 本法の MPN 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/TS 22964:2006 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 法を基に作業部会案を公開し、作業部会案の問題点についてデータを示し、コラボ案から最終試験法策定を行った。また、ウェルシュ菌試験法については、原案から作業部会案作成の検討を行った。

腸炎ビブリオ試験法作業部会（甲斐担当）は、コラボ案の検討とコラボ試験、最終試験法策定まで行った。腸炎ビブリオ標準試験法は、現在の公定法を基に検討した。試験法の検討は、ISO 法との比較を行い、あさりのむき身を用いてコラボ試験を行った。

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の協力の下、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 試験法を基にバリデーション作業部会と合同で検討

した。

バリデーション作業部会（松岡・五十君担当）は衛生指標菌作業部会と合同で検討した。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、AOAC インターナショナルが新規に提案したガイドラインと ISO 16140 を比較しながら妥当性確認に必要な内容をまとめ、バリデーションガイドライン原案を作成した。

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標準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ール作成を進めた。クロノバクター属菌、腸炎ビブリオ、並びに酵素基質培地を用いた大腸菌試験法などの標準試験法を策定した。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、妥当性確認ガイドライン原案をまとめた。

#### E. 健康危害情報

該当なし。

#### F. 研究発表

論文発表

1. Matsuoka H., Shigetomi T., Funabashi H., Saito M., Igimi S.: Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. *J. Microbiol. Methods* 93: 49-51 (2013).
2. Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama

- K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R, Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K, Yahiro S, Fujita M, Igimi S. Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: Collaborative study. J AOAC Int. 96:991-997. (2013)
3. Matsuoka H, Nakano K, Takatani N, Yoshida T, Igimi S, Saito M. Flow cytometric method for in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. J AOAC Int. 97(2):479-483. (2014)
  4. 五十君静信。食品の微生物試験法の国際対応と、現場における試験法選定の考え方～生食肉の規格基準のもたらしたもの～。月刊食品と開発。5月号。48(5):5-8 (2013)
- 学会発表
1. Matsuoka H. Global thinking of validation in Japan. Korea Food and Drug Administration Symposium: Establishing System of Microbiological Testing Procedures, Cheongwon, Korea. 2013. 4.
  2. 吉田智紀, 高谷周督, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明。保存安定性を考慮した生菌標準物質の調製。AOAC インターナショナルジャパンセクション総会。2013.6
  3. 高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明。少数生菌汚染標準食品の調製。AOAC インターナショナルジャパンセクション総会。2013.6.
  4. Y. Okada, H. Suzuki, H. Ogihara, S. Monden, Y. Momose, N. Fukuda, S. Igimi. Characterization of Growth and Pathogenicities of *Cronobacter sakazakii* and Related Species. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013). 2013.7.
  5. Hideaki Matsuoka, Tomonori Yoshida, Norimasa Takatani, Mikako Saito, Shizunobu Igimi. In Situ Preparation of Standard Material of Viable Single-cells for Innovative Validation of Microbiological Methods. 127th AOAC Annual Meeting and Exposition, Chicago. 2013.8.
  6. 松岡英明: 微生物分析法の妥当性確認におけるボトルネック—生菌標準物質。JASIS コンファレンス、幕張 2013.9.
  7. 福田典子, 藤原翠, 伊東悠志, 石塚理恵, 荻原博和, 五十君静信。各種食品における *Cronobacter* spp. の汚染実態。食品微生物学会。2013.9.
  8. 吉田智紀、高谷周督、Alvin Mariogani、斉藤美佳子、五十君静信、松岡英明: 生菌標準物質の保存安定性。第40回日本防菌防黴学会年次大会。2013.9.
  9. 高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明: FACS を利用した生菌ソーティング法による標準低汚染飲料の調製条件の検討。第40回日本防菌防黴学会年次大会。2013.9.
  10. Yumiko Okada, Hodaka Suzuki, Hirokazu Ogihara, Shuko Monden, Yoshika Momose, Noriko Fukuda, Shizunobu Igimi. Pathogenicity Determination of *Cronobacter* spp. The 3rd Asia Pacific International Conference on Food Safety (Taipei, Taiwan) 2013.10.
  11. 多田 敦子、杉本 直樹、伊藤 裕才、

- 秋山 卓美、五十君 静信、山崎 壮、  
 穂山 浩。増粘安定剤の食品添加物公  
 定書微生物限度試験法の検討。第 50  
 回全国衛生化学技術協議会年会。  
 2013. 11.
12. 小西典子, 尾畑浩魅, 高橋正樹, 下  
 島優香子, 仲真晶子, 工藤由起子,  
 甲斐明美: 食品を対象とした腸炎ビ  
 ブリオ試験法作成のための基礎的検  
 討(2)。第 47 回腸炎ビブリオシンポ  
 ジウム, 広島県, 2013. 11.
13. Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa  
 T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama  
 K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R,  
 Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K,  
 Yahiro S, Fujita M, and Igimi S.  
 Evaluation of the culture method  
 NIHSJ-02 alternative to ISO  
 10272-1 1: 2006 for the detection  
 of *Campylobacter jejuni* and  
*Campylobacter coli* in chicken:  
 Collaborative study. UJNR-48th  
 Toxic Microorganisms Joint Panel  
 Meeting. 2014. 1. Tokyo
- 演会。2013. 9.
5. 五十君静信。食品衛生における国際  
 ハーモナイゼーションの重要性。日  
 本食品工業倶楽部品質保証懇話会。  
 2013. 11.
6. 五十君静信。食品に関わる規格基準  
 の現状解説と、HACCP (工程管理) の  
 重要性。第 38 回沖縄県食肉衛生技術  
 研修会。2014. 2.
7. 五十君静信。魚肉練り製品の成分規  
 格—微生物規格の背景、検査方法の  
 現状及び今後の動向—。第四回魚肉  
 ねり製品の成分規格に関する勉強会。  
 2014. 2.
8. 五十君静信。今後の微生物試験法を  
 行う上での妥当性確認の重要性と進  
 め方。食品産業戦略研究所教育セミ  
 ナー。2014. 2.
9. 五十君静信。微生物のリスクプロフ  
 ァイルについて—数的指標を導入し  
 た規格基準の解説と平成 25 年度のト  
 ピックス—。平成 25 年度第 1 回  
 HACCP 指導者養成研修会。2014. 3.

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

#### 講演・研修会等

1. 五十君静信。数的指標の考え方に基  
 づく規格基準策定に於いてどのよう  
 な科学的データのサポートが求めら  
 れたか。フードフォーラムつくば。  
 2013. 4
2. Igimi S. Collaborative study for  
 validation of the *Campylobacter*  
 detection method from chicken.  
 Meeting with Ministry of Food and  
 Drug Safety of Korea. 2013. 4.
3. 五十君静信。生食用食肉の微生物基  
 準の背景とリステリアの微生物基準  
 の策定状況について。埼玉県・さい  
 たま市・川越市合同研修会。2013. 8.
4. 五十君静信。生食肉の微生物規準の  
 背景と基準のもたらしたもの。平成  
 25 年度静岡市環境保健研究所技術講

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25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  
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  
鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
吉田 朋高 一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC

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

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 一般財団法人日本食品分析センター  
吉田信一郎 一般財団法人日本食品分析センター  
森 曜子 公益財団法人日本適合性認定協会  
齋藤 利江 一般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・バイ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
矢野健太郎	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	五十君 静信	国衛研・食品衛生管理部
副委員長	寺嶋 淳	国衛研・衛生微生物部
事務局	岡田 由美子	国衛研・食品衛生管理部（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）
	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	岩手大学
	工藤 由起子	国衛研・衛生微生物部
	小久保彌太郎	公益社団法人日本食品衛生協会
	小崎 俊司	大阪府立大学
	齋藤 利江	一般財団法人日本冷凍食品検査協会（作業部会）
	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）
	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）	
吉田 信一郎	一般財団法人日本冷凍食品検査協会（作業部会）	
行政から	新谷 英樹	厚労省・基準審査課
	仲川 玲	厚労省・基準審査課
	三木 朗	厚労省・監視安全課
	梅田 浩史	厚労省・監視安全課

平成 25 年度 食品からの微生物標準試験法検討委員会開催状況

第 43 回検討委員会： 2013 年 6 月 18 日開催

第 44 回検討委員会： 2013 年 7 月 31 日開催

第 45 回検討委員会： 2013 年 10 月 16 日開催

第 46 回検討委員会： 2013 年 12 月 5 日開催

第 47 回検討委員会： 2014 年 2 月 24 日開催

## 食品からの微生物標準試験法検討委員会第 43 回議事録概要(2013.6.18)

1. 事務局から、正副委員長の退職に伴い、本日の検討委員会は事務局が進行する。
2. 新谷専門官から、本事業は厚生労働科学研究費補助金であり、成果を社会に還元できるようにしたいと考えている。
3. 配布資料と第 42 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 42 回議事録概要案の確認を行い、4 か所について表現の修正を行い承認された。
4. 現在検討中の試験法は、今年度中に最終案とする予定で進める。
5. 食品からの微生物標準試験法検討委員会のホームページは、今後ホームページ作成業者に依頼して中身を整理していく予定である。

### 菌数計数法について

6. ISO における現状について、田中委員からバリデーション・衛生指標菌合同作業部会で整理した情報を基に説明が行われた。
7. ISO 微生物試験法における菌数算定法は、大きく 4 つに区分することができ、運用は複雑である。
8. 区分 A では、各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている。
9. 区分 B では、各微生物試験法の中に菌数算定法の記載はなく、ISO 7218 を参照するように記述されている。
10. 区分 B は、引用先から、さらに 3 つに細分できる。
11. B1 は、ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照する。
12. B2 は、ISO 7218:1996/Amd.1:2001 を参照する。
13. B3 は、ISO 7218:1996 を参照する。
14. 上述の区分は、それぞれ菌数算定法が異なっており、統一されていないのが現状である。
15. ISO において、一般生菌数試験は、1996 年版参照になっているが、現在改定中で、今後は最新版の 2007 年版参照になると思われる。
16. ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）では、集落数採用範囲が、従来の 15～300cfu が、10～300cfu となっている。また、ISO 17025（試験所認定）に準拠しているかどうかで、各希釈段階での使用するペトリ皿の枚数が異なり、採用される菌数算定式が異なる。
17. 昨年度の委託研究である国内の法的試験法による計数と ISO 法による計数の比較について、斎藤委員から解説があった。
18. 「Ready to eat 食品」では有意差はなかったが、「成分規格対象食品」及び「魚及び魚製品」では、ISO 法の方が国内の法的試験法よりも検出率が高かった。
19. 国内の法的試験法で行い、集落計数を国内の法的試験法と ISO 法を比較すると、ISO 法の集落計数法を用いて計算した方が、数値が低くなる結果を示した。
20. 一般生菌数については、次回以降の検討委員会で議論していきたい。

### 腸炎ビブリオ試験法について

- 2 1. 甲斐委員より、腸炎ビブリオ試験法の検討状況の報告が行われた。
- 2 2. 定性法の作業部会案ステージ 2 の修正版が示された。
- 2 3. 提案法と ISO 8914 の比較データについて検討結果が示された。
- 2 4. 食品としては“あさりのむき身” 25 g を用いて人工接種し比較した。
- 2 5. ISO 法の増菌培地である食塩ポリミキシンプイヨン、及び 3%NaCl 加アルカリペプトン水と提案法の 2%NaCl 加アルカリペプトン水を比較検討した。
- 2 6. ISO 法の選択分離培地である TCBS 寒天と TSAT 培地および提案法の酵素基質培地を比較検討した。
- 2 7. 結果として、提案法の 2%NaCl 加アルカリペプトン水は、ISO 法と同等あるいはそれ以上の増菌効果が確認できた。
- 2 8. 選択分離培地として、酵素基質培地は ISO 法で採用されている TSAT 培地の代わりに採用できると思われ、TCBS 寒天および酵素基質培地の組み合わせが有効であることが示唆された。
- 2 9. 予め、どれぐらいの菌量を接種し保存すれば検討範囲内に収まるかラボの前に検討しておく。
- 3 0. 接種菌数を「/g」を「/25g」として 3 菌量を接種し、検体輸送時と同様の冷蔵状態で 24 時間、48 時間保存した場合の 25g 中の菌数についてデータを出しておく。
- 3 1. コラボ には、分離培地として、TSAT 培地、TCBS 培地、酵素基質培地を用い、増菌時間を  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、16~18 時間、検体数 8 で行う。
- 3 2. コラボ参加機関は、事務局が募集する。

### 微生物少数生菌標準物質の開発について

- 3 3. 松岡委員より、フローサイトメトリー法を用いた微生物少数生菌標準物質の開発についての検討結果の報告があった。
- 3 4. 本方法は、集落形成途中に集落をカウントすることが可能で、迅速化に繋がる、と考えている。
- 3 5. 前年度は平板培地へ添加していたが、今年度は、食品への添加方法について検討する予定である。

### その他、事務連絡等

- 3 6. 次回は、7 月 31 日に検討委員会を開催する。

以上

## 食品からの微生物標準試験法検討委員会第 44 回議事録概要(2013.7.31)

1. 委員長から挨拶。
2. 前回の検討委員会では、委員長、副委員長は未定でしたが、今後の運営は、委員長は食品衛生管理部長の五十君が務め、副委員長は衛生微生物部長の寺嶋が務めます。
3. 配布資料と第 43 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 43 回議事録概要案の確認を行い、4 か所について修正を行い承認された。

### 菌数計数法について

4. 森委員より、ISO 7218:2007 の目次などの資料を用いて情報提供が行われた。
5. ISO 法では、ISO/IEC 17025 の原則に従った品質管理がされている検査施設とされていない試験室で、使用すべきシャーレの枚数が異なる。
6. 検出限界を下げ感度を上げるために、大型シャーレを用いる、あるいは小型シャーレ 3 枚を使用する場合がある。
7. 培養終了後、集落計数までに、インキュベーターのプログラム制御で 5°C48 時間までは保持しても良いとされている。
8. 一般的な集落算定法は加重平均をとっており、算術平均ではない。
9. 採用するコロニー数は、10 個以上 300 個未満となっているが、採用範囲に迷う場合は、専門家の判断に委ねるとしている。
10. 成分規格において、海外はどのように ISO 7218 を適用しているのか、今後作業部会で調査していく。
11. ISO7218 のように、新版と旧版が混在しているものについては、今後最新版に集約されていく。
12. 菌数計数法については、具体的な事例を盛り込みながら検討していく必要があると考えられ、必要に応じて実際に試験を行っている試験所にヒアリングを行う。
13. 現在の基準が、菌数計数法によって値が異なってくるか考慮し、今後の方針を次回以降議論していく必要がある。

### 微生物試験法に係わる標準品について

14. 松岡委員によるフローサイトメトリー法を用いた微生物少数生菌標準物質の開発の進捗状況について報告があった
15. 芽胞ではなく栄養体を用いて検討を行っている。
16. ソーティングゲートには菌種特有のホットスポットがあるので、今後、データベースを構築していくことが必要であると考えられる。
17. 腸炎ビブリオは CFDA 染色で染まり難く、蛍光標識グルコースでは染色できるがコロニー形成能が良好ではない。
18. 今後、標準物質を試験法のガイドラインにどのように盛り込んでいくか作業部会で検討していく。

#### 腸炎ビブリオ試験法について

19. 甲斐委員より、資料を用いて腸炎ビブリオ試験法のコラボスタディのための保存実験の検討結果について報告があった。
20. 冷凍あさりのむき身に菌を接種し、検体送付時と同じ条件で検体を保存した場合の検出率について検討した結果が報告された。
21. 0.3~30 個/25g の接種菌量で 48 時間までの冷蔵保存で、検出率 100%となる群と 100%以下となる群が得られるというデータが示された。
22. コラボで使用する培地は、生培地を予定している。
23. 選択分離培地は、TCBS 寒天培地 (2 社) と TSAT 寒天培地を全 15 機関で比較検討する。
24. 酵素基質培地は、CHROMagar Vibrio、X-VP、chromID Vibrio を各 5 機関で検討する。
25. 十分な試料数を揃えるために、あさりのむき身は冷凍品を用いる。
26. 本日 7/31 付の実行案を web 上にアップし、意見を求めるとともに、コラボ参加機関を募集する。
27. コラボ参加機関は東京から 48 時間以内に検体を届けられる機関を優先的に選択する。

#### その他、事務連絡等

28. バリデーション作業部会では、第三者認証機関で承認された検査キットのリスト作製を行っている。
29. 今後、データベース化し、微生物標準試験法検討委員会のホームページで公開する予定で、ISO との validation の過程でとった data 情報のウェブサイト情報も載せる。
30. 厚生労働省に EU 向けの食品における試験法の選択に関する問い合わせがあり、監視安全課は、ISO、ISO と harmonize している AOAC-OMA、BAM 法と validate している AOAC-OMA、およびこれらの試験法とバリデート済みの方法、ISO 法と同等以上と評価した第三者認証機関の方法を用いても問題ない旨を示した。
31. 次回の委員会で、計数法について検討する。
32. 鎌田委員から、毒素についても本委員会で検討していただきたいとの要望があり、次回の委員会で資料を基に検討が可能かを含め議論する。
33. 研究班は今年度が最終年度なので、各作業部会は、最終プロトコルやガイドラインの作成を進めてください。
34. 次回は、9月または10月に開催予定。

以上

## 食品からの微生物標準試験法検討委員会第 45 回議事録概要(2013.10.16)

1. 委員長から挨拶。
2. 今後の標準法検討委員会は、委員長は食品衛生管理部長の五十君が務め、副委員長は衛生微生物部長の寺嶋が務めます。
3. 今回は、毒素の試験法が検討されますので、アドバイザーとして元食品部長の松田先生に参加していただきます。
4. 副委員長から挨拶。
5. 行政から、本年度は研究事業としては最終年度ですが、引き続き研究班が継続できるように試験法の検討を進めてください。
6. 配布資料と第 44 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 44 回議事録概要案の確認を行い、7 か所について確認・修正を行い承認された。

### 菌数計数法について(ST1)

7. 田中委員より、バリデーション・衛生指標菌合同作業部会で作成した資料「主な国際規格の改訂状況」を用いて ISO における菌数計数法の状況説明が行われた。
8. ISO 4833 は一般生菌数試験法で菌数計数法に関係がある。今回、混積法である ISO 4833-1:2013 が改訂され、新たに塗抹法が ISO 4833-2:2013 として設定されている。
9. ISO 7218 の中にある菌数算定法が全面差替えとなり、ISO 7218-2007/Amd.1:2013 となっており、ISO 17025 認証機関に関する記載がなくなり、GLP を実施している施設に関する記載が登場している。
10. ISO 7218-2007/Amd.1:2013 では、シャーレの枚数や菌数算定方法が記載されており、90 mm よりも大きいシャーレは面積比から集落数を算出するようになっている。また、MPN 法は整備され、自動計算ソフトがウェブ上で公開されている。
11. ウェブ上で公開されている MPN 法の計算ソフトは、計算式がわからないので、今までの計算式との比較データを出しておいた方がよい。
12. 腸内細菌科菌群の試験法の ISO 21528-1 は、committee draft の段階であり、数年後には改訂されると思われるので、注視していかなければならない。
13. ISO 7218 は改訂版の内容を確認してから議論した方がよいので、和訳を準備する予定である。
14. 一般生菌数試験の計数法として ISO 法を採用すると、様々な規格基準の適/不適に影響を与える可能性があるため、行政も慎重に検討していく必要がある。
15. 衛生指標菌試験法は ISO 法とバリデートする方法で評価できないので、ISO 法を採用する方針で検討する。
16. 衛生指標菌の作業部会で ISO 7218-2007/Amd.1:2013 を和訳し内容を確認し、本委員会へ報告する。

### ウェルシュ菌試験法について(ST2)

17. 伊藤委員よりウェルシュ菌試験法について 4 種類の選択分離培地を比較検討した結

果が示された。

18. 各培地とも選択性が強いことが示され、変法 GAM 寒天培地での生育が一番よく、KM 加卵黄 CW 寒天培地においては若干の発育抑制が認められた。
19. KM 加卵黄 CW 寒天培地は国内に二つの製品があるので、それらについても比較検討する。
20. 日本において、ウェルシュ菌の規格基準はないので、今後、どのようなデータ出しが必要になってくるか検討していく。

#### セレウリド試験法について

21. 毒素試験法の検討方法の参考として、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」の策定に関わった松田先生から意見をいただいた。
22. 毒素の試験法の作成方針は新たに設けず、微生物標準試験法の作成方針 ST1 から ST4 に準じて検討していく。
23. 鎌田委員からセレウス菌嘔吐毒素(セレウリド)の試験法確立に関する計画案の説明が行われた。
24. 全食品を対象とする場合は、農薬の場合は 10 食品ぐらいを検討するが、対象食品を決めておけば、その食品での検討となる。
25. 毒素の検出は、使用する装置や検知器によって違ってくるので、コラボスタディによる評価は難しい。
26. 試料は、不均一分布を避ける十分な量を取得することが重要である
27. 食品ごとに脂の含有量が違うので、予め評価は必要で、試料ごとに抽出試薬を検討し、前処理条件のプロトコールを確立する。
28. シングルラボでデータを出し 10 回の検証を行う。これらのデータを本検討委員会に報告してもらい、その後、機器間の評価を 4 カ所で行う。
29. 作成するプロトコールは、松田先生と森委員に確認をお願いする。
30. 2つのメーカーから販売している標準品があるので、同等かどうか確認しておく。

#### その他、事務連絡等

31. NIHSJ のカンピロバクター試験法が Journal of AOAC の投稿論文として採択され公開されました。
32. ISO のカンピロバクター試験法は現在改訂作業中で、冷凍していない鶏肉にはプレストン培地を用いるよう検討されている模様で、本検討委員会のデータが有用になると思われます。
33. 腸炎ビブリオ試験のコラボスタディ参加機関は 9ヶ所決まっております。残り 6ヶ所を予定しており、今までのコラボ参加機関に声をかけています。委員の皆様のご協力をお願いいたします。
34. 腸炎ビブリオのコラボスタディは、12月頃に実施します。
35. 次回開催は、12月5日を予定で、オブザーバーも募集しております。

以上

## 食品からの微生物標準試験法検討委員会第 46 回議事録概要(2013.12.5)

1. 委員長から挨拶。
2. 本研究事業のさらなる検討をお願いしたいので、今年度はもう一回検討委員会を開催する。
3. 毒素の試験法を検討するので、今回もアドバイザーとして元食品部長の松田先生に参加していただく。
4. 行政から、本研究事業は今年が最終年度であり、研究報告書の作成をよろしくお願いいいたします、と挨拶。
5. 配布資料と第 45 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 45 回議事録概要案の確認を行い、修正事項はなかった。
6. ISO 7218-2007/Amd.1:2013 で MPN 法は整備され、自動計算ソフトがウェブ上で公開されている。現在、田中委員が、今までの計算式と自動計算ソフトでのデータを比較検討しているので、今後、結果をお示しする予定である。

### クロノバクター属菌試験法について(ST3)

7. クロノバクター属菌試験法は ISO/TS22964 (Enterobacter sakazakii の検出法) 法を導入するが、LOD50 の確認をシングルラボ 2 箇所で行うことにした。
8. 岡田委員から AOAC のガイドラインを基に作成したミニラボ試験概要案の説明があった。
9. 検討に使用する菌株は、ATCC より購入した Cronobacter sakazakii ATCC29554 とする。
10. 乳児用調製粉乳に C. sakazakii を接種し、前増菌培養後、増菌培養を行い、選択分離培地に 10  $\square$ L 滴下して定型集落を確認する。
11. C. sakazakii だけではなく、試料の乳児用調製粉乳に含まれる一般生菌数についても確認をしておく。
12. 今回の案をステージ 3 (案) として採択する。

### ウェルシュ菌試験法について(ST2)

13. 伊藤委員より、ウェルシュ菌の選択分離培地を比較検討した結果が示された。
14. ISO 法や BAM 法で使用されている TSC 寒天培地より、今回検討した KM 加卵黄 CW 寒天培地の方が、検出率が低いことが示された。
15. KM 加卵黄 CW 寒天培地においてメーカー間で差が認められた。
16. TSC 寒天培地はシクロセリン含有で、KM 加卵黄 CW 寒天培地はカナマイシン含有である。
17. 糞便の検査では、選択性の強い KM 加卵黄 CW 寒天培地を使用するが、本検討委員会は、食中毒検査ではなく、食品衛生検査を対象とするので、選択性の低い培地を使用した方が検出率の高くなる可能性があると思われる。
18. 今後、損傷菌対応も考え、カナマイシンを含まない卵黄 CW 寒天培地についても比

較する。

19. *Clostridium perfringens* は菌株の芽胞形成能により、熱耐性が異なるので、これらについてもデータを出していく予定である。
20. 今後は食品に接種した場合について検討を行う予定である。

#### セレウリド試験法について(ST1)

21. 鎌田委員から「セレウス菌嘔吐毒素「セレウリド」の検出法確立に関する研究報告」の説明が行われた。
22. セレウリドの最少発症量は、1□g/人であるが、試料をどれだけ採取すればよいか考えなければならない。
23. 今回検討した試料は5gで、農薬の試験では、試料を20g採取する。菌が毒素を産生することから、菌を均一に採取可能な量や通常の細菌検査を考慮し、セレウス菌嘔吐毒素試験の試料は25gとする。
24. 検体を一晩放置し、毒素が内部に入った状態においても検討する。
25. 今回検討した冷凍チャーハンは、油を含有していたので、前処理で問題はなかった、と考えられる。油を含まない米飯での前処理法についても検討を行っていく。
26. セレウス菌食中毒の原因食品は、主に米飯類だが、パスタやあんこからの食中毒事例も認められている。過去の食中毒事例を調査し、今後、食中毒の上位を占める食品について検討を行う。
27. 前処理で使用する溶媒によって、セレウリドの回収率に差が出るので、まずは、基礎データを取り、方向性を決めていく。
28. 来年度以降、セレウス菌の試験法を検討するので、菌とセレウリドと一緒に検討していく。
29. 食品に毒素を添加した時と、菌を添加した場合の毒素の回収率について、標準曲線を示す。
30. 作成するプロトコールは、松田先生と森委員が確認し、ステージ1としてウェブ上に公開する。

#### その他、事務連絡等

31. 腸炎ビブリオ試験のコラボスタディは15機関で12月16日、1月20日に実施する予定。プロトコールは公開しているもので行い、次回の検討委員会で結果を報告する。
32. 標準試験法検討委員会の新しいホームページが完成したので、本日検討委員に内容を確認していただいた。
33. 工程管理などに、第三者認証を受けた試験法を活用してもらうため、「第三者認証機関で承認された検査キットのリスト」を参照できるようにした。リンク先をWeb上に貼り付ける許可を得たものから公開する。
34. 33で述べたリストは、食品の輸入の適・不適を判断するものではない旨を記載しておく。