

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

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

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ンの手法を検討し、統一し

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適切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案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ー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）、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、
 穠山 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
 ピックスー。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
 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