

## 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

21. 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。
22. 定性法の作業部会案ステージ2の修正版が示された。
23. 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。
24. 食品としては“あさりのむき身”25gを用いて人工接種し比較した。
25. ISO法の増菌培地である食塩ポリミキシンブイヨン、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。
26. 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。
27. 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。
28. 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。
29. 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コラボの前に検討しておく。
30. 接種菌数を「1g」を「1/25g」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。
31. 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℃±1℃、16~18時間、検体数8で行う。
32. 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

33. 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。
34. 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。
35. 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

36. 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、最終プロトコー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、混釈法である 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願いたいと思います、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 5 g で、農薬の試験では、試料を 20 g 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 25 g 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。
35. ISO 法については定性法・定量法を記載し、ISO の番号を入れる。著作権の問題があり、概要しか示していないが、すべてを公開できない理由についても表示しておく。
36. 将来、プロトコルの英訳版を web で公開し海外からも閲覧できるようにする。
37. バリデーション・衛生指標菌合同作業部会では、試験法のバリデーションのチェックをしている。また、「第三者認証機関で承認された検査キットのリスト」は合同作業部会でデータベース化した。
38. 次回開催は、来年 2 月を予定している。

以上

## 食品からの微生物標準試験法検討委員会第 47 回議事録概要案(2014.2.24)

1. 委員長より挨拶。
2. 2013 年 12 月 9 日にご逝去された田中廣行委員のご冥福をお祈りするため、黙とうを捧げた。
3. 行政から、本委員会で策定したサルモネラ属菌試験法および黄色ブドウ球菌試験法は、食品安全委員会でのリスク評価後に通知として出す予定で進める予定と報告があった。
4. 配布資料と第 46 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 46 回議事録概要案の確認を行い、2 カ所の確認と修正後、承認された。

### 腸炎ビブリオ試験法コラボ結果について (ST3)

5. 欠席の甲斐委員に代り五十君委員長より、腸炎ビブリオ試験のコラボスタディ結果の報告が行われた。
6. コラボスタディは、冷凍あさりのむき身に高濃度、中濃度、低濃度で菌を接種し、選択分離培地の同等性を評価した。
7. 今回配付した資料は、二回行われたコラボ試験のそれぞれの結果の集計表である。
8. 一回目と二回目の集計表の結果をバリデーション作業部会（松岡委員）が取りまとめ、LOD<sub>50</sub>を算出する。
9. 集計表のみでも明らかに選択分離培地の同等性に明白な違いが認められないことが確認できるので、ステージ 4 へ移行しても問題はない。
10. ステージ 3 では、標準的な培地組成を示しているが、ステージ 4 の最終案の培地組成の表記については、各メーカーの培地組成について比較確認する。
11. カンピロバクターコラボスタディの接種菌数は、高濃度群、低濃度群とも理論値ではなく接種菌数を記載しているので、作業部会に中濃度群と低濃度群の菌数値の算出方法について確認し、次回の委員会で報告していただく。
12. 腸炎ビブリオの定義については、他の試験法の表記に合わせて記載する。
13. ステージ 3 の 1.試験法の「・・・上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または酵素基質培地に塗抹し、」をステージ 4 では、「・・・上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または TCBS 寒天培地と同等以上の性能確認された酵素基質培地に塗抹し、」に修正し、同等性が確認されたものは、TSAT、CHROMagar vibrio、X-VP、ES vibrio である旨を記載する。
14. 今回のコラボ結果は、投稿論文にまとめ公開する予定で検討する。
15. 培地の同等性評価には、どのくらいのデータ出しが必要かについて、今後バリデーション作業部会で検討する。
16. 培地に添加する塩化ナトリウムの濃度について、0%および 8%加えたものと記載している箇所の 0%を削除する。
17. 1~2%と記載している箇所と、2%と記載している箇所があるので、統一する。

18. 次回の検討委員会で、ステージ4最終案を確認する。

#### クロノバクター属菌試験法について (ST3)

19. 岡田委員より、クロノバクター属菌試験法のミニラボ試験の結果が示された。
20. 再分類されたクロノバクター属を対象とした試験法は未だないので、ISO/TS22964を採用し、LOD50の確認をシングルラボ2箇所で行った。
21. 検体が調製粉乳のため、低濃度の接種菌数を POD0.25-0.75 の範囲に調製するのは難しかった。
22. AOAC のガイドラインに沿ってデータを検討した。
23. 今回の検討では、試料として用いた調製粉乳から一般生菌は認められなかった。
24. 接種菌量の中濃度群の表記について、測定値なのか理論値なのかを確認し、25g 当たりの菌量の表記にする。
25. 次回、ISO 和訳版の表現及び語句をチェックをしたプロトコール案を示し、ステージ4として検討する。

#### 妥当性評価に係わる微生物試験法の標準品について

26. 松岡委員より妥当性評価に係わる微生物試験法の標準品について報告があった。
27. セルソーターを用い、生菌 100 個以下を培地に添加する方法を検討した論文が Journal of AOAC に採択された。
28. これに関連したテーマが、9月に開催される AOAC のサイエンスセッションシンポジウムの議題に採択されたことが報告された。
29. 本方法を用いることにより、培地の性能比較が可能になることが期待され、バリデーション時に活用することが期待される。
30. バリデーション時、どのような形でセルソーターを使用するか、今後の検討課題になる。

#### セレウリド試験法

31. セレウリド試験法については、鎌田委員が作成し、松田先生と森委員に確認していただいた原案を ST1 として公開する予定である。
32. セレウス菌嘔吐毒素（セレウリド）を検出する質量分析計が現在使用できない状況のため、次回以降に検討する。

#### ウェルシュ菌試験法

33. ウェルシュ菌試験法について、伊藤委員より、コラボスタディ案を検討中との説明があった。
34. 試験結果より、ISO 法で使用されている TSC 寒天培地よりも、国内でよく使用されているカナマイシン加卵黄 CW 寒天培地の方が、夾雑菌や損傷菌に対して選択性が強いことが示された。

- 35. 国際ハーモナイゼーションを尊重し、ISO法を採用しても問題がないので、まずは、食品に接種した場合の TSC 寒天培地とカナマイシン加卵黄 CW 寒天培地の同等性評価を行い、その後、策定すべき試験法の方向性について検討する。
- 36. 検体の希釈水について問い合わせがあるが、検討委員会では緩衝ペプトン水 (BPW) に統一しており、ビブリオ試験法は例外で、BPW に食塩を添加している。

#### その他、事務連絡等

- 37. 田中委員が検討していた酵素基質培地による大腸菌試験法については、バリデーション・衛生指標菌合同作業部会で森委員と齋藤委員に引き継いで検討を行う。
- 38. 研究班としては最終年度なので、次の研究班が立ち上がれば、検討委員会を再開する。

以上