

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）

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究報告書

食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング

研究分担者 小西 良子 麻布大学 生命・環境科学部

研究協力者 石崎 直人 麻布大学 生命・環境科学部

食中毒の 80%以上が食中毒細菌を原因となっていてしていることから、食品の病原性微生物検査は、食中毒予防の観点から、もっとも重要な衛生管理方法である。衛生管理の検査のために採取する検体は、母集団の汚染を出来るだけ正確に反映するもので無ければならない。現在 The International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF) やコーデックスおよび EU 諸国では、統計的な根拠に基づいた、衛生管理における微生物のサンプリングプランを作成し、提唱している。日本では厚労省が輸入食品などを対象に独自に微生物のサンプリングプランを作成している。

本研究では、国際的なサンプリングプランと比べて、日本でのサンプリングプランの妥当性の有無を検討することを目的とする。検討には、食中毒起因微生物の汚染の不均一さを推測できるモデルを構築した。病原微生物の代替として蛍光ラテックスビーズ（ $10\ \mu\text{m}$ ）を用い、1ロットから採取する検体 1kg（バッチという）に一定量を塗布し、食品内での微生物の存在の不均一性がバッチ全体の汚染検出率にどのように反映するかを評価した。また、このモデルを用い、1バッチ（1kg）から 1 検体 25g を何個採取すれば、ロット全体の汚染を反映できるかを考察した。

その結果、蛍光ラテックスビーズをリステリア属菌の代替として用いるモデリングは、微生物汚染のサンプリングプランのモデルとして使用可能であることがわかった。また、局在して 4.5×10^5 個 / 1kg の微生物汚染があった場合では 1 検体 25g とし $n = 6$ 以上は採取しなければ検出出来ないことも示された。現在、我が国で行われている $n = 1$ のサンプリングプランでは、低濃度汚染の病原微生物の検出は、困難であることを示唆しており、今後のサンプリングプランの構築に重要な知見となる。

A. 研究目的

食品の衛生管理を目的として行う微生物検査において、母集団の汚染を正しく反映するサンプリングプランが必要である。衛生管理における微生物のサンプリングプランでは、The International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF) が提唱した 2 階級プランと 3 階級プランが一般的に使われている。2 階級プランとは基準値よって、

基準値以下は合格、基準値を超える場合は流通させないとする方法である。3 階級プランとは、サンプル単位内の微生物濃度に応じて、製品の品質が 3 つの階級に分類できる場合に考え出されたプランである。ICMSF の提案している微生物規格の基本的な特徴は、微生物の危害度および食品の取り扱い条件による危害度の両者を考慮した微生物の危害度分類を行い、それに対応したサンプリング法が設定されていることである¹⁾。

コーデックス規格、EU諸国におけるサンプリングプランは、原則 ICMSF の考え方を基に作られており、種々の食品、又は食中毒起因微生物の違いによって、サンプリングプランが設定されている。近年米国食品安全検査局 (FSIS) では、このようなサンプリングプランの国際化にあわせ非加熱食肉製品のリストテリアのサンプルに関して、サンプリング数を3から5に変更し、検査所で行う検査時の量を25g 5個 (12g) に変更することになった²⁾。

一方日本では、厚労省が行っている微生物のサンプリングプランでは、1ロットからランダムにバッチ (1kg) を採取し、そこから25g を $n=1$ で検査する方法が取られている。もし、この検査で食中毒起因菌が検出された場合は食品衛生法第6条違反となる。しかし、この方法で母集団の汚染が正確に反映できているかについては科学的根拠がない。

そこで、本研究では、食中毒起因微生物が食品に汚染している場合に、汚染の不均一さを考慮に入れ、汚染量とサンプル数 (n 数) にどのような関係があるかを、食中毒起因微生物汚染検体のモデルを用いて検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. 蛍光ラテックスビーズ (F-LB) の検出限界の検討

Latex beads amine-modified polystyrene, fluorescent yellow-green ($1.0\mu\text{m } \phi$, MKBK3507, 4.5×10^7 /ml, sigma) を食中毒起因微生物として使用した。食品検体として、牛肉を用いた。最適な励起波長 Ex および蛍光波長 Em を決定し、 $10\mu\text{L}$ の F-LB を緩衝ペプトン水 (BPW)、肉エキス、Milli Q のそれぞれ4 mL を希釈液として4倍希釈し、景況強度の検出限界を求めた。

2. F-LB の検体への塗布量の検討

牛ミンチ肉 25g に 0, 1, 2.5, $12.5\mu\text{L}$ を塗布し、各々ストマッカー袋に入れ、1袋につき BPW 225 mL 入れ、ストマッキングし、 4°C 3,000 rpm で遠心分離した。その中間層を、注射針を用いて採取し、蛍光強度を測定した。

3. F-LB 分布の不均一性の検討

牛ブロック肉 1 kg を 4 ブロック用い、3 ブロックに F-LB の塗布箇所数を変えて塗布した。1 ブロック肉は対照とした。 $10\mu\text{L}$ を 1 箇所塗布したものを低汚染検体とした

(4.5×10^5 F-LB/kg)。 $10\mu\text{L}$ を 2 箇所塗布したものを中汚染検体とした (9.0×10^5 F-LB/kg)。 $10\mu\text{L}$ を 5 箇所塗布したものを、高汚染検体とした (2.0×10^6 F-LB/kg)。それぞれをミンチ製造機でミンチ状にし、ストマッカー袋に 25g ずつ分注し、使用するまで -20°C で保存した。25g につき、BPW 225 mL 入れ、ストマッキングした。 4°C 3,000rpm 15 分で遠心分離した後、その中間層 1mL を MilliQ 4 mL で希釈し、蛍光光度 Ex 480nm, Em 479nm で測定した。非汚染牛ブロック肉は対照とし、同様の作業を行った。

C. 研究結果

1. 蛍光ラテックスビーズ (F-LB) の検出限界

本実験で用いた F-LB の最適蛍光波長は Ex 480nm、 Em 479nm であった。この波長における蛍光強度の検出限界は BPW で希釈した場合は 256 倍、牛肉エキスで希釈した場合は 64 倍、MilliQ での検出限界は 1,024 倍であり、MilliQ で希釈して測定する方法が最も感度高く測定出来ることが分かった。以後、蛍光強度の測定には、検体をストマッキングした液を MilliQ で希釈することとした。

2. F-LB の検体への塗布量の決定

牛挽肉 25g に、F-LB を種々の濃度で塗布した結果、 $1\mu\text{L}$ の濃度でも蛍光強度は検出出来ることが分かった (表 1)。この結果から F-LB の個数が 4.5×10^5 になるように $10\mu\text{L}$ を塗布量と決定した。

3. F-LB 分布の不均一性

F-LB で 1-3 箇所点汚染させた牛ブロック肉をミンチ状にして、手ごねした後、25g ずつ分配し、それぞれをストマッカー袋に入れた。対照検体では 31 検体、低汚染検体では 36 検体、中汚染検体では 32 検体、高汚染検体では 35 検体となった。対照検体の蛍光強度は、最小値 190、最大値 750.8、平均値 561.8 であった。このことから、最大値以上の 800 から F-LB 特異的蛍光強度と評価することにした。低汚染検体から得られた 36 検体の測定結果を図 2 に示した。赤で示した蛍光強度 1000 以上は 2 検体、黄色で示した 900 以上 1000 未満は 1 検体、青色で示した 800 以上 900 未満は 3 検体の、計 6 検体が陽性であった。中汚染検体から得られた 32 検体の測定結果を図 3 に示した。1000 以上は 3 検体、900 以上 1000 未満は 3 検体、800 以上 900 未満は 1 検体

の、計7検体が陽性であった。高汚染検体では、図4に示したように、1000以上は6検体、900以上1000未満は4検体、800以上900未満は1検体の、計12検体であった。検体中での汚染の不均一性を、表2に示した。低汚染検体では、蛍光強度800以上の値が全体の16%、900以上は8%、1000以上は5%であった。中汚染検体では、800以上が22%、900以上が18%、1000以上が9%であった。高汚染検体は、800以上が31%、900以上が28%、1000以上が17%であった。

蛍光強度800から1000まで差がみられたのは、採取した25g中に混入するF-LBの混入個数の違いによるものと考えられた。このモデルは微生物を汚染物質としていることから、検査には培養の工程が含まれる。そのため、少量でも微生物が検体に混入していれば、検出可能と考えられた。すなわち、たとえ蛍光強度が低くても培養すれば検出可能であるため、蛍光強度800以上の検体を陽性検体と判断し、汚染率を算出した。

陽性検出率は汚染濃度に従って増加し、汚染量が多いと検出率も高くなることが示された(表2)。蛍光強度が1000以上の検体は、低汚染、中汚染ではあまり検出されないが、高汚染になると高くなる傾向があったが、蛍光強度が800以上の検体は汚染量にほぼ比例して検出率が高くなる傾向があった(図5)。

この汚染率から、最小採取検体数を推定した結果、低汚染検体1kgからは25g $n=6.2$ 、中汚染検体1kgからは $n=4.5$ 、高汚染検体1kgからは $n=3.2$ となった。

D. 考察

主要な食中毒起因微生物は食品中の基準値は国際的にはコーデックス委員会により、規格設定されている。基準値とともに、サンプリングプランも設定されており、ICMSFの考え方を基に設定されている。一方、日本では、微生物検査のためのサンプリングプランは、1ロットから1kgをとり、その中から25g1検体を採取し、培養法を用いて検査をするものである。しかし、25gの1検体が母集団を代表するサンプリングプランであるかは疑問の余地がある。

そのため、本研究では培養法による検査を行うことを踏まえ、微生物の代替に細菌と同じ大きさのF-LBを用いて、汚染検体のモデルを作成した。食中毒起因微生物はヒトに病

原性を有するため、実際の菌を使用して実験を行うにはバイオハザードなどの特殊な設備や専門知識をもつ技術者の手技が必要である。しかし、今回構築したモデルを用いれば、簡単に汚染率やその不均一さを確かめることが可能となる。*Listeria monocytogenes*や腸管出血性大腸菌などの食中毒起因微生物の場合、食品にまんべんなく汚染することはない。多くの場合少量の菌数で食中毒が発生することから、衛生管理に用いる検体の不均一性を把握することも必要である。

本実験で用いたF-LBは、Ex 480nm、Em 479nmでの蛍光強度が牛肉の自然蛍光と区別ができたことから、F-LB特異的蛍光強度を測れることが可能であった。さらに希釈液にMilli Qを用いることによって、検出限界を低くすることが出来た。実際に日本で行われている1ロットから1kgのバッチをとるサンプリングプランを想定して、1kgの牛肉にF-LBを塗布して微生物汚染モデルを作成した。塗布濃度は、低汚染検体では 4.5×10^5 個の微生物の局所的汚染を、中汚染では2箇所の汚染、高汚染では5箇所の汚染をモデルとした。対照としては非汚染牛肉を用いた。それぞれ1kgを25gずつ検体としてわけ、すべての蛍光強度を測定した。対照よりも高い蛍光強度を示した検体を、すべて陽性とした。少しでも蛍光強度が検出されれば、増菌培養で菌が増殖することから、強度800以上の検体数からは検出が可能とした場合、汚染量が最も少ない検体(1点汚染)からは16%、汚染量が中程度の検体(2点汚染)は22%、汚染量が最も多い検体(5点汚染)は31%が陽性検体とみなされた。汚染量が最も少ない検体(1点汚染)は $n=6$ 、汚染量が中程度の検体(2点汚染)は $n=5$ 、汚染量が最も多い検体(5点汚染)は $n=3$ を検査しなければ陽性の結果を得ることはできないと考えられた。

本研究において、蛍光ラテックスビーズを食中毒起因微生物の代替として用い、微生物汚染のサンプリングプランのモデルとして使用可能であることがわかった。また、少なくとも 4.5×10^5 個/1kgの汚染があった場合ではサンプリングプランとして $n=6$ は採取しなければならないことも示された。これらの結果は、現在、我が国で行われている $n=1$ のサンプリングプランでは、低濃度の食中毒起因微生物の検出は、不可能であることを示唆しており、今後複数の検体を採取することを視野にいたしたサンプリングプランの構築を考える必要があるだろう。

さらに諸外国の動向として、複数サンプルを用いた場合の培養法についても検討が行われている。EU諸国では、複数の検体をまとめて前培養するよりも、25g 1検体として複数前培養したのち、培養液をまとめて培地に塗布し検出する方法のほうが検出率が高いことが報告されている³⁾⁻⁵⁾。

今後、複数の検体の培養法についても検討する必要がある。

E. まとめ

食品の食中毒起因菌汚染は、食の安全を脅かす重大な危害である。予防のため、衛生管理として食中毒起因菌の検査が有効であるが、母集団を反映する検体の採取方法を行う必要がある。国際機関や諸外国などでサンプリングプランが設定されているが、日本のサンプリングプランが国際的にハーモナイゼーションがとれているものであるかは検討する必要がある。

本研究では、食中毒起因微生物の食品汚染のモデルを、食中毒起因微生物の代替に蛍光ラテックスビーズを使うことによって構築した。このモデルにより少量かつ局在汚染した微生物が、検体処理で混合した後、どの程度汚染に不均一性があるかに、それが陽性検出率にどのように反映するかを推定することが可能となった。

本研究では牛肉ブロックを用いたモデルに応用し、少なくとも 4.5×10^5 個/1kgの汚染があった場合では検体数として $n = 6$ は採取しなければならないことが示され、複数検体数の必要性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

G. 参考文献

1. 食品安全管理における微生物学的検査 基準と設定の考え方 ICMSF/編 春日文字 / 監訳 小久保彌太郎 / 監訳 島原義臣 / 監訳 中央法規出版

2. <http://www.thepoultrysite.com/poultry-news/26906/fsis-guidance-for-listeria-sampling>

3. EUROPEAN UNION REFERENE LABORATORY FOR SALMONELLA Vol.18 No.1 April, 2012 Continuation of Newsletter Community Reference Laboratory for *Salmonella* ISSN 1572-3836

4. SCIENTIFIC OPINION Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy This scientific output, published on 6 March 2012, replaces the earlier version published on 15 November 2011 7.2.2. Pooling of samples

5. W. R. PRICE, R. A. OLSEN, and J. E. HUNTER APPLIED MICROBIOLOGY, Apr. 1972, p. 679-682 Vol. 23, No. 4 Salmonella Testing of Pre-enrichment Broth Cultures for Screening Multiple Food Samples

表 1. 牛肉への汚染濃度と蛍光強度

F-LB塗布濃度 ^{a)}	1回目	2回目	平均
0 μ l	0	0	0
1 μ l	+ 1194	+ 1186	+ 1190
2.5 μ l	+ 1359	+ 1327	+ 1343
12.5 μ l	+ 1380	+ 1351	+ 1365

^{a)} 牛肉ミンチ 25 g に種々の濃度のF-LBを塗布した。

蛍光強度	>800	> 900	> 1000	推定最少検体数
低汚染検体 (1点汚染)	6/36 (16%)	3/36 (8%)	2/36(5%)	n=6
中汚染検体 (2点汚染)	7/32(22%)	6/32(18%)	3/32(9%)	n=4.5
高汚染検体 (5点汚染)	11/35(31%)	10/35(28%)	6/35(17%)	n=3.2

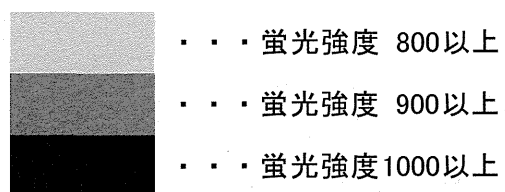
表2. F-LB汚染牛肉ブロック (1 k g) 中の蛍光強度別の陽性率および
推定最少検体数

321	325	190	184.7	220.8	238.8
316.3	482.5	308.3	421.8	591.6	458.3
750.8	551.2	740	567.3	590.3	675.3
491.6	501.6	475.8	530.3	440.5	471.3
571.4	556	434.6	499.4	604.8	510.5
530.6					

図1. 対照肉の検体ごとの蛍光強度 (n=31)

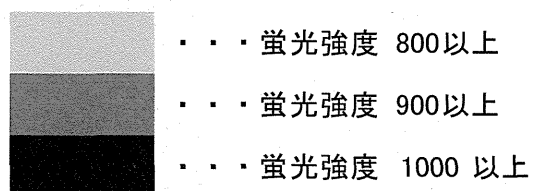
778.4	766.3	592.8	406.7	475.5	681
361.9	617.9	677.2	674.5	237.8	282.8
477.4	352.7	213.6	257.6	476.4	491.2
879.5	871.3	424.6	979.3	559.1	812.2
793.9	330.3	1112	721.7	309.2	413.2
250.8	723.5	483.3	624.3	468.2	1005

図2. 低汚染検体（10 μ l, 1点汚染）の検体ごとの蛍光強度（n=36）



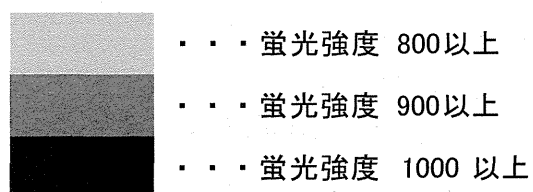
588.7	584.8	924.5	502.5	564.9	558.2
707.1	709.7	1101	1147	492.9	480.5
756.1	752.9	861.9	1066	469.8	395.9
663.2	746.7	698.4	708.7	663.7	677.9
680.4	668.7	994.7	956.5	583.7	563.9
581	577.2				

図3. 中汚染検体（10 μ l、2点汚染）の検体ごとの蛍光強度（n=32）



580.5	655.7	632.9	646	560.2	481.9
628.2	547.8	598.2	612.3	657.1	776.9
765.1	1047	936.2	582.2	1316	563.4
791.1	1055	1158	1181	721.8	1063
937.3	775.7	566.8	604.4	624.4	996.3
648.3	895.7	717.4	926.2	708.3	

図4. 高汚染検体（10 μ l、5点汚染）の検体ごとの蛍光強度（n=35）



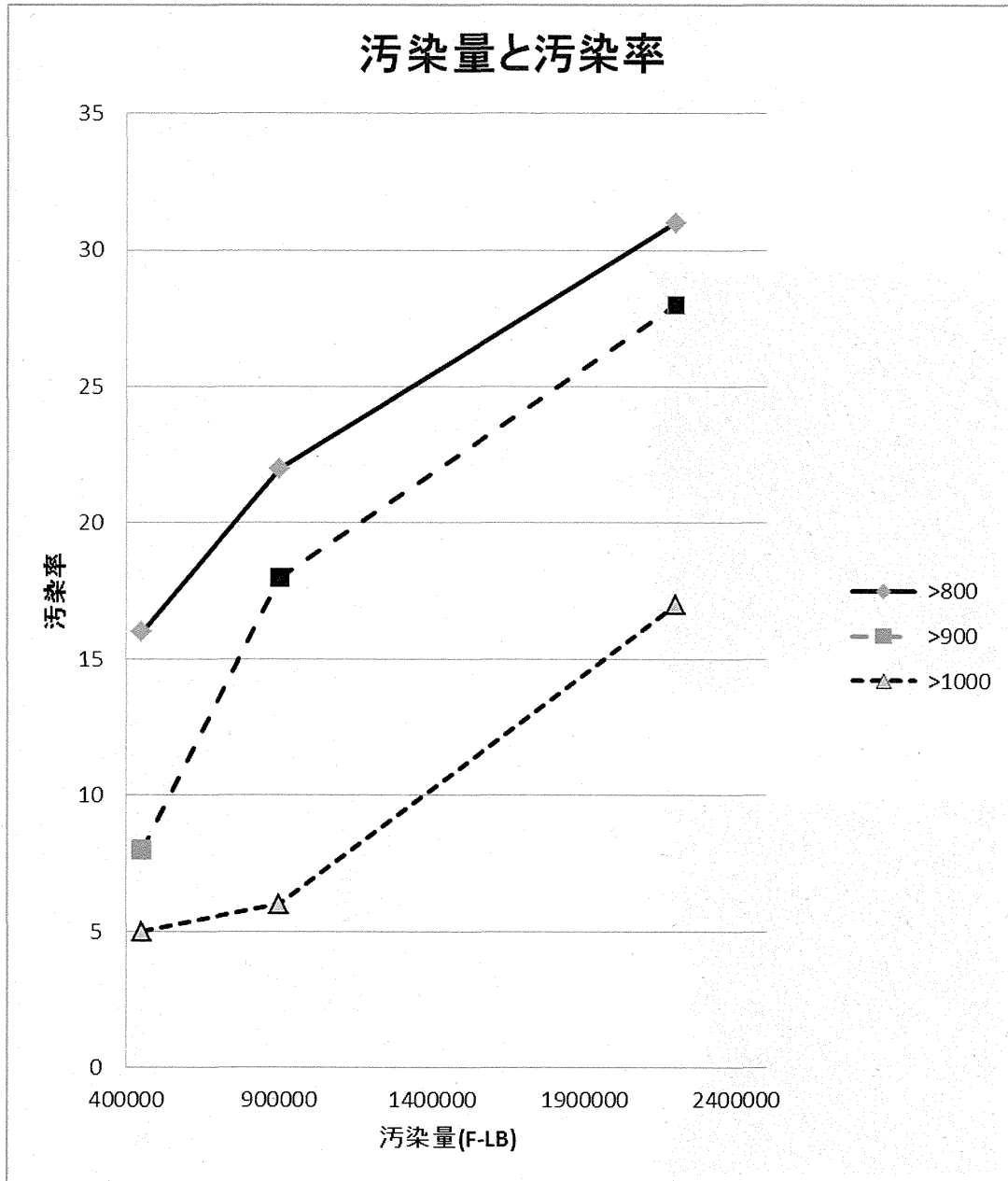
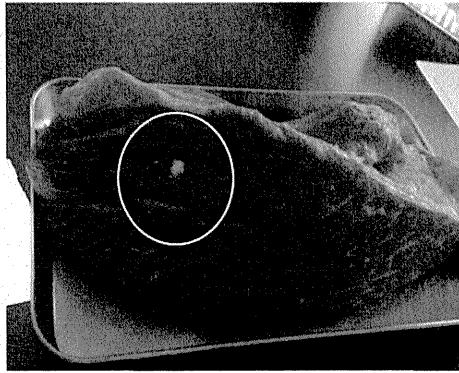


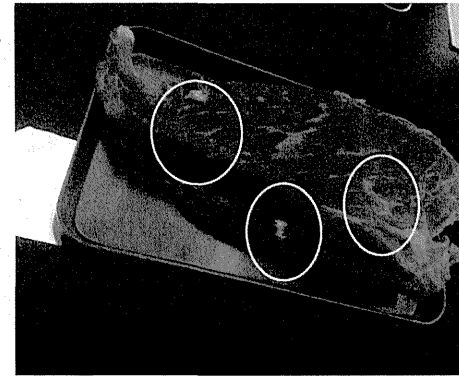
図5 F-LBの汚染量と汚染率



1箇所 塗布



2箇所 塗布



表に3箇所裏に2箇所

対照

ミンチにする

25g/BPW225ml × 40

スタマッキング

遠心分離 4°C 3000rpm 15min、上清後、測定

スケール. 1

分 担 研 究 報 告 書

食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプラン
-欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法についての情報収集-

久米田 裕子

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）

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプラン

—欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法についての情報収集—

研究分担者 久米田 裕子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

研究協力者 川津 健太郎（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

細菌性食中毒を発生させない、すなわち微生物学的に安全な食品を国民に提供するためには、輸入食品の検疫時に十分な衛生規制を実施する必要がある。現在、検疫時の検査はわが国の食品衛生法の微生物規格基準に基づき実施されているが、今後、国際社会との協調・調和を進めるために、わが国の食品微生物規格のあり方を再検討することも必要である。今年度は食中毒起因微生物を中心に、欧米の微生物規格とサンプリングプランについて情報収集した。EU もアメリカも規格基準には二階級法のサンプリングプランと試験法が設定されていた。また、n 数が多い検査にサンプル・プーリングの採用が検討されていた。サンプル・プーリング法にはドライ・プーリング（dry pooling）とウェット・プーリング（wet pooling）という 2 種類の方法があった。どちらの方法であってもプーリング法は試験法の検出感度に影響を与えるため、プールするサンプル数がどこまで可能か検討するなど、必ずそのプロトコールの妥当性を評価する必要がある。サンプルをプールし、サンプルを扱いやすい数に減らすことは、労力的にも経済的にも合理的である。ドライ・プーリングとウェット・プーリングは妥当性評価を試みるだけの価値が十分存在すると考えられた。

はじめに

平成 24 年度のカロリーベースにおける日本の食料自給率は 39%であり¹⁾、食料の多くを輸入食品に依存している状況にある。また、現在交渉中の TPP 経済連携協定が締結

されれば、諸外国からの輸入食品がさらに増加すると予測される。食中毒を発生させない、すなわち微生物学的に安全でかつ高品質な食品を国民に提供するためには、輸入食品の検疫時に十分な衛生規制を実施す

る必要がある。現在、検疫時の検査はわが国の食品衛生法の微生物規格基準に基づき実施されているが、今後、国際社会との協調・調和を進めるためには、わが国の食品の微生物規格のあり方を再検討することも必要である²⁾。今年度は食中毒起因微生物を中心に、欧米の微生物規格とサンプリングプランについて情報収集したので報告する。また、EUにおいて、n数が多い検査にサンプル・プーリング法の採用を検討していたので、併せて報告する。

A. 物規格の国際動向

1996年に採択されたWTO（世界貿易機関）の衛生植物検疫措置の適用に関する協定（Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary, 通称SPS協定）により、WTO加盟国が、輸入食品に対し自国内での食品の安全のためにとる措置については、「科学的見地から行われたリスク評価の結果作られた国際規格」に基づいて行わなければならないとされている。この「科学的見地から行われたリスク評価の結果作られた国際規格」とは、すなわち「コーデックス規格」であり、従って、WTO加盟国はコーデックス委員会が作成する微生物リスク評価のガイドラインに従ってリスク評価を行い、自国の微生物規格を策定しなければならないということになる^{3), 4)}。

しかし、わが国の食品衛生法では、食中毒起因微生物に関しては、規格基準のないものが多く、調理済み（ready-to-eat, RTE）食品から検出された場合のみ、6条違反で対応しているのが現状である。また、欧米ではロットあるいはバッチの検査を実施する際には、いわゆるサンプリングプランが取り入れられている。サンプリングプランは、International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) が提唱する考え方が基本になっており、HACCP やFSO (Food Safety Objective, 摂取時安全目標) などのリスク管理の手法を取り入れ、統計学的解析に基づいて設定されている^{5), 6)}。コーデックス規格にも採用されているが、わが国では平成24年に作成された生食用食肉の規格基準で初めて採用されたばかりでまだまだ実績が浅い（表1）。

そこで、諸外国の現状を把握するため、特にEUとアメリカを対象に、食中毒起因細菌の微生物規格について情報収集を行った。

B. EUとアメリカの微生物規格基準

食中毒起因細菌の代表として、サルモネラ、リステリア・モノサイトゲネス、腸管出血性大腸菌 (STEC) のEUとアメリカの規格基準を調査したので、一例を示す（表2、表3）。

EUは上述のコーデックス委員会が作成するガイドラインに従って科学的根拠に基づくリ

スク評価^{8), 9), 10)}を実施し、製品やロットの可否を判定されるものとして規格基準を作成している^{11), 12), 13)}。規格基準にはサンプリングプランと試験法が規定されている。食中毒起因細菌の場合のサンプリングプランは通常、二階級法(two-class sampling plan)が採用され、 n , c , m で規定されている。 n は1ロットからランダムに採取される検体の数、 c はロットを合格と判定するのに許容される不良検体の数(n のうち、 m を超えてもよい検体の数)、 m は1検体に許容される微生物濃度(基準値)を示す。数的指標に基づくリスク管理がベースとなっているので、摂取するヒトの年齢等により病原菌に対するリスクが異なる事実が反映され、同じサルモネラやリステリア・モノサイトゲネスであっても、乳幼児用食品は規格基準が厳しく設定されている。また、その食品中で菌が増殖するのかもしれないのかにより食品が分類され、さらに、その規格基準をフードチェーンのどこに設定するかも(製造者の管理から離れる時点か、店頭販売時なのかなど)規定されている。

アメリカのFDAとFSIS(United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science)もEUと同様に規格基準あるいはガイドラインにはサンプリングプランと試験法が規定されている^{14), 15), 16), 17), 18), 19), 20), 21)}。EU同様、

摂取するヒトのリスクと食品の種類(消費までの間に殺菌工程があるか否か、菌が増殖する食品であるか否かなど)によって、カテゴリーが分けられ、規格基準が設定されている。食中毒起因細菌の場合のサンプリングプランは二階級法が採用され、EUと異なり、リステリアであっても検査単位で「陰性」、つまりゼロトレランス(zero tolerance)方式が採用されている。

FDAの場合、実際の検査においては、 $25\text{g} \times 15 = 375\text{g}$ 、 375g を1サブサンプルとする方法で実施している。すなわち、サルモネラを例にとると、カテゴリーIの $n=60$ の場合、15サンプルを混合し、 375g にする(1サブサンプル)。それに前増菌培養液を9倍量加えて培養して検査する。それを4サブサンプル実施することで、 $n=60$ としている。

C. サンプリングプランにおいてサンプル数 n の意味すること²²⁾

通常、前増菌培養を取り入れた試験法では、サンプル中に1個の菌が存在すれば(発育阻害物質の影響や損傷菌・競合菌の影響を考慮に入れない場合)、理論的には検出可能である。その結果、低い汚染レベルにおいては、検出確率は、試験するサンプル単位(例えば、 25g)の数に依存する。図1は、サンプル数が $n=5$, $n=25$, $n=80$ の時の菌の病原菌汚染レベル(25g

中の汚染率で表示) と欠陥 (陽性) ロットの
見逃し確率の関係を示したものである (ICMSF
のサンプリングプラン二階級法に基づく)。こ
の関係は、25 g あるいは 50 g のサンプルが、
十分に混和されたロットから採取されたもの
でロットを代表するものという前提にたつ。
過去に発生した発芽野菜が原因のサルモネ
ラ・ハバナの集団食中毒では最大でも種子 1
kg 中 4 cfu の汚染濃度 (0.1 個/25 g) であつ
た。図 1 の青線 (n=5, 25 g) と赤線 (n=25, 25
g) に示したように、n=5 と n=25 のサンプリ
ングプラン (それぞれ 125 g と 625 g) に基づく
と、「サルモネラ陽性である」種子のロットの
合格率 (サルモネラ陰性となる) はそれぞれ
理論上、約 60% と約 7% となる。n 数が多いほ
ど、検査結果の信頼度が高くなるため、わが
国の n=1, c=0, m=0/25 g ではロットの合否判
定として信頼度が低いということになる。

D. サンプリングプランにおけるサンプル・ プーリング法の実用性

1 ロットあるいは 1 バッチの食品中に存在
する病原微生物は、かなり低い濃度で、かつ
不均一に分布しているものと考えられる。そ
のため、食品中から病原菌を検出するため
には、一般的に多くのサンプルを試験する必
要がある。しかし、リスク評価に基づくサン
プリングプランで理論的に n=60 が必要とされ

ても、実際の検査を実施するには多大な費用
と労力が課されることになる。そこで、サン
プル・プーリングという方法が検討されてい
るので紹介する。

サンプル・プーリング法にはドライ・プー
リング (dry pooling) とウェット・プーリン
グ (wet pooling) という 2 種類の方法がある²⁾。
ドライ・プーリングとは、試験前にサン
プル単位を混合する方法である。例えば、25 g
ずつ 10 サンプルの試験を行うところを、サン
プルを混合し、250 g を 1 サンプルとして試
験を行う方法を指す。ウェット・プーリン
グとは、例えば、25 g の個々のサンプルに 225 ml
の前増菌培地 (サルモネラであれば buffered
pepton water, BPW) を加えて一晩培養し、そ
の後、それぞれのサンプルから少量 (5 ml)
の増菌液を採取して混合し、その後は 1 サ
ンプルとして以降の試験を行う方法である。

アメリカで採用している 25 g×15=375 g をサ
ブサンプルとして検査する方法は、このドラ
イ・プーリングに当たる。さらに、FSIS の “Beef
Trimnings for Shiga Toxin-Producing Escherichia
coli (STEC)” のガイドラインでは、ウェット・
プーリングについても次のとおりに言及され
ている。「検査費用を節約するため、多検体を
増菌培養後、‘プール’してもよい。しかし、
その場合は、陽性検体の増菌培養液が陰性検
体の増菌培養液で希釈されるため、ウェット・プ

ーリング法を実施してもSTECの検出感度を低下させないということを保証する必要がある。」

EUでも最近、以下のとおり、サンプル・プーリング法が注目されている。EU Regulation No 2073/2005では、鶏肉中のサルモネラは陰性と規定された。新しい規格基準によると、25 gの鶏肉を5検体検査し、サルモネラ・ティフィムリウム（一相monophasic含む）とサルモネラ・エンテリティディスが陰性でなくてはならないとされた。その規格が設定された後、複数のEUの食品検査機関から、5検体のサンプルをひとつずつ検査するのではなく、ひとつにまとめて検査できないかという問い合わせがEU Member States (DG-Sanco)にあった²³⁾。残念ながら、鶏肉をプーリングした場合のサルモネラの検出感度を調べた報告はなかったため、EURL for Salmonellaの研究室でこの実験に取りかかることとなった。この実験は統計に関するISOワーキンググループが作成したサンプル・プーリングのドラフトプロトコール(ISO/TC34/SC9 WG2 (Statistics))に基づいて実施された。実験の詳細²⁴⁾は参考資料として付録に示す。

Priceら(1972年)²⁵⁾は粉ミルク、卵白、ココア、小麦を用いたサルモネラ試験においては、ウェット・プーリングの方がドライ・プーリングより検出率が高かったと報告している(詳細は付録に示す)。ドライ・プーリングとウェット・プーリングの検出率の相違は、

標的病原菌の汚染レベルが低く、バックグラウンド菌叢の汚染レベルが高い場合に大きくなることが予想される。一般的に病原菌の汚染は均一ではなく、25g中に1個しか病原菌が存在しない可能性もある。もし、このサンプルと病原菌がない残りの9サンプルを混合した場合、病原菌は「10倍希釈」されるだけではなく、バックグラウンド菌叢が「10倍増加」する。両方の影響により、特に損傷している病原菌の場合は発育が難しくなり、蘇生に長時間かかる。つまり、これが、多量のサンプルから汚染レベルが低い病原菌を検出するのが困難となる理由である。以上を考えると、ウェット・プーリングの方が代替法として適しているかもしれない。この方法の場合は、サンプル量は少ないままであるので、病原菌は前増菌培地の中で検出可能なレベルまで発育することができる。その前増菌培養した培地をプールした場合、病原菌はすでに十分発育しているので混合しても検出しやすい。さらに、ウェット・プーリングでは前増菌培養した個々のサンプルを冷蔵庫に保存できるので、プールした増菌培地から病原菌を検出した場合、必要があれば前の段階にもどって再試験することもできる。

プーリング法は以上のように試験法の検出感度に影響を与えるため、プールするサンプル数がどこまで可能か等を検討し、必ずその

プロトコルの妥当性を評価する必要がある。しかし、サンプルをプールし、サンプルを扱いやすい数に減らすことは、労力的にも経済的にも合理的である。ドライ・プーリングとウェット・プーリングは妥当性評価を試みるだけの価値が十分存在すると考えられた。

【参考資料1】2011年 EURL-*Salmonella* の取り組み²⁹⁾

このプロトコルでは、ドライ・プーリング（サンプル単位のプール）とウェット・プーリング（前増菌培養液のプール）の二種類の 방법이記載されている。ドライ・プーリングでは、25 g の鶏肉に損傷したサルモネラ株を5個/25 g 接種した。

<実験材料と方法>

1. 使用菌株

- *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076
- *Salmonella* Enteritidis from poultry
- *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028
- *Salmonella* Typhimurium from poultry
- STM-like 4, 5, 12:i:- of typing study (TRO) 2010
- STM-like 4, 5, 12:i:- of culture collection typing department (LIS)

2. サルモネラ損傷菌の作成

・1株につき3種類のストレスをかける (50 °C で15分、-20 °C で72時間、5 °C で1~数週間保存) (duplicateで実施)。

・スパイクプロトコル (annex D in draft ISO 16140-2) を使用。

・損傷菌の測定方法として、選択培地と非選択培地 (XLDとNA) を使用して菌数測定する。それらの相違 (NA-XLD) が0.5 log cfu 以上であれば損傷菌とする。

・接種菌数は1~10個/25 g

3. 検体として、4種類の食鳥肉を使用した (皮なし鶏ムネ肉、皮付き鶏ムネ肉、皮なし七面鳥ムネ肉、皮付き七面鳥ムネ肉)。1種類の鶏肉につき、6サンプル (それぞれ異なる由来の食鳥肉サンプル) を使用した。
4. それぞれドライ・プーリングとウェット・プーリングを組み合わせた。
5. それぞれの食鳥肉のバックグラウンドの菌叢を調べた (一般生菌数と腸内細菌科菌群数)。
6. サンプル・プーリングの方法は図2のとおり。

7-1. ドライ・プーリング

1~10個のサルモネラを接種した食鳥肉25 g に未接種 (非汚染) 食鳥肉100 g (25 g×4) を混合し、1, 125 mLのBPWを加えて、37°Cで18時間培養した。その後、培養液0.1 mLずつをMSRVと10 mL RVSに、また培養液1 mLを10 mL MKTTnに接種し、それぞれ41.5°Cと37°Cで24時間培養した。増菌

培養後はそれぞれ平板培地に塗布し、培養後、確認試験を実施した。

7-2. ウェット・プーリング

1～10個のサルモネラを接種した25 g食鳥肉1検体と25 g未接種（非汚染）食鳥肉4検体用意し、それぞれに225 mLのBPWを加えて、37°Cで18時間培養した。培養後、それぞれの検体からBPW液を5 mLずつ採取し、混合して25 mL（5 mL×5）とした。そのBPW液を0.1 mLずつをMSRVと10 mL RVSに、また培養液1 mLを10 mL MKTTnに接種し、それぞれ41.5°Cと37°Cで24時間培養した。増菌培養後はそれぞれ平板培地に塗布し、培養後、確認試験を実施した。

<結果>

発表されている一部の結果を以下に示す。

1. 4種類の食鳥肉におけるバックグラウンド菌叢の菌数測定結果（表4）

表4に示したとおり、一般生菌数においては、「皮付き」肉が「皮なし」肉より明らかに高かった。腸内細菌科菌群数においては、鶏肉では差異が見られなかったが、七面鳥肉では「皮付き」肉が有意に高かった。つまり、バックグラウンド菌叢の菌数では、「皮なし」鶏肉が平均して一番低く、「皮付き」七面鳥肉が平均して一番高い結果であった。

2. 接種サルモネラ株の損傷菌の作製結果（表5）

6種類のサルモネラ株にそれぞれ3種類のストレ（50°Cで15分、-20°Cで3～14日間、4°Cで3～8週間保存）をかけた結果、表5に示したとおり、50°C、15分の加熱処理がもっとも効果的に損傷菌を作製できることがわかった。

3. プーリング実験結果（図3、図4、図5）

もっともバックグラウンド菌叢の菌数が少ない「皮なし」鶏肉では、ドライ・プーリングの陽性率（34/36）とウェット・プーリングの陽性率（34/36）は対照（34/36）と同率であった（図3）。もっともバックグラウンド菌叢の菌数が多い「皮付き」七面鳥肉においても、ドライ・プーリングの陽性率（36/48）とウェット・プーリングの陽性率（36/48）は対照（37/48）とほぼ同等であった（図4）。4種類の食鳥肉を合計した結果、対照が142/156（91%）の陽性率であったのに対し、ドライ・プーリングは138/156（88%）で、ウェット・プーリング140/156（90%）であった（図5）。

サルモネラ陽性率はMSRV、RVS、MKTTnの3種類の選択増菌培地により、かなりがあった。MSRVはもっとも検出感度がよく、これを使用することにより対照と同等の検体陽性率を確保できた。3種類の選択増菌培地は、バックグラウンド菌叢の菌数が少ない「皮なし」鶏肉の対照においては検出率にほとんど差がなかったが、バックグラウンド菌叢の菌数が多い「皮付き」七面