

201426033A

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の開発及び
その実効性・妥当性評価に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H26-食品-一般-003)

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27(2015)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の開発及び
その実効性・妥当性評価に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H26-食品-一般-003)

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27(2015)年3月

目 次

I. 平成 26 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. セレウス菌標準試験法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

荻原博和、岡田由美子、五十君静信

2. *Yersinia* の標準試験法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

岡田由美子、百瀬愛佳、吉田麻利江、下島優香子、井田美樹、石塚理恵

3. 衛生指標菌試験法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47

伊豫田淳、五十君静信、齋藤利江、吉田信一郎、森曜子

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 81

松岡英明、五十君静信

論文

5. セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法の検討・・・・・・・・・・ 91

鎌田洋一、白藤由紀子、梶田弘子、松田りえ子、森曜子

藤田和弘、福沢栄太、後藤浩文、齋藤利江

日本冷凍食品検査協会、日本食品分析センター

平成 26 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の開発及びその実効性・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、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法の作成を行う。これまでの研究班の成果である標準試験法作成方針に従い、セレウス菌、エルシニア・エンテロコリチカ、セレウリドなど食中毒起因菌毒素、衛生指標菌などの標準試験法を作成する。今後リスク評価の結果を受けて作成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、作成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。

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 20 名程度からなる“標準法検討委員会”を組織し、これまでの研究班により作成された標準試験法作成方針に従い、微生物標準試験法の作成を行ったが、国際的にもまだ確立していない検討結果の統計処理方法とその評価方法については、実際の試験法作成の検討データを基に検討した。これらの試験法作成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作成は、それぞれ作業部会を組織し本研究班の代表、分担、協力研究者が標準法の妥当性確認に必要と思われるデータの作成にあたった。各作業部会は、4つのステージからなる“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。各作業部会の標準試験法作成は、初年度に原案作成と作業部会案の検討（ステージ1～2）を始め、3年目にはコラボ案作成及びコラボを実施（ステージ3～4）、標準法とする予定である。

平成 26 年度は、セレウス菌試験法、エルシニア試験法、セレウリド試験法について、原案作成と作業部会案の検討（ステージ1～2）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標準試験法検討委員会へ提案した。衛生試験法については、集落計数法の検討を開始した。また、ISO 法と従来国内の公定法との試験結果の相違について検証を行った。他の研究班により進められているウェルシュ菌標準試験法については、新たな定性試験法作成に協力した。

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

鎌田洋一：岩手大学農学部

岡田由美子：国立医薬品食品衛生研究所

伊豫田淳：国立感染症研究所

A. 研究目的

食品が国際的に流通していることから、食品の微生物制御は各国間で共通であることが重要であり、微生物汚染状況を確認する微生物試験法は国際的に共通性があることが重要である。ISO 法はその標準的な方法として示されている。ただ、それぞれの国の食品事情は異なっており、必ずしも国際的に統一した試験法のみを用いているわけではなく、多くの国ではその国のリスクマネジメントに適する試験法を採用している。異なる試験法の妥当性確認を行うために、ISO16140 では試験法の妥当性を評価する方法について示されており、これに従い科学的根拠のある妥当性確認が行われた試験法が作られている。

わが国の微生物試験法は、これまで行われた厚生労働科学研究班の“食中毒起因細菌の標準となる試験法がどの様にあるべきか”の議論により、国際的なレベルで妥当性確認された標準試験法を作成する手順が示され、それに従い標準試験法が作成されてきた。本研究班もその方針を引き継ぎ、早急に対応が必要と思われる微生物の標準試験法の策定を行う。厚労省が報告を義務づけている食中毒菌のうち、セレウス菌、エルシニア・エンテロコリチカ、加えて食中毒起因菌の産生する毒素、さらには食品の工程管理に利用される衛生指標菌試験法などについて標準試験法の策定を試みる

標準法検討委員会では、“食品からの微生物標準試験法作成方針”を作成し、試験法作成手順についてはほぼ確立している。一方、作成された試験法の妥当性の確認方法については、国際的にも現在まだ議論が続いている状況であり更なる検討を必要としている。従って、本研究班では妥当性確認の適用方法を中心に議論を進める予定である。妥当性確認に必要とされるデータ数と統計手法の選択、

統計値の解釈、コロボスタディの規模、微生物標準品をどうするかなどを検討する予定である。加えて標準法が整備された後、食品における微生物試験を行うにあたり標準試験法をどのように導入し、また試験精度を担保していくかに関して研究を行う予定である。

B. 研究方法

約 20 人の食品微生物の専門家で構成する“標準法検討委員会”（親委員会）を組織する。この親委員では、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従って、作業部会から提案される試験法のプロトコル案の検討・評価を行う。当該微生物の試験法案の提案は、作業部会が行う。作業部会は、4つのステージに従い試験法の作成を進める。

ステージ1：当該微生物の試験法に関する情報収集を行い、海外の試験法との互換性を考慮すると共に、今後検討の必要が必要と思われる箇所を指摘したプロトコル原案を作成する。ステージ2：公開による意見などを考慮し、原案の検討事項について整理し、具体的なデータを基に試験法のプロトコルの妥当性を検討し、検討データを付けて作業部会案として親委員会に改良した試験法プロトコルを提出する。ステージ3：作業部会案は一定の期間の評価を受けた後、指摘された問題点等については、追加実験を行い修正または確認を行った上で、“コラボ案”とする。コラボ案では、試験法を SOP 化し、用いる培地等の調査を行い、その組成表を作成する。親委員会では初年度に検討した“メソッドバリデーションの手法”を基に、具体的なコラボの実施方法につき明らかにし、コラボ案として公開する。ステージ4：コラボ案の公開と共に、コラボ参加希望機関を募り、最終的には 15 カ所程度の試験・検査機関、地方衛生研究所、検疫所、大学などに協力していただき、プロトコル

の実行性を評価するコラボスタディを行う。コラボの結果は、コラボ作業部会で統計的な検討を行う。親委員会は、コラボの結果と作業の進行が作成方針に従って行われているかの確認を行った後、標準法として公開する。

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。H26年度の試験法の策定は、原案の作成と作業部会案の検討（ステージ1～2）を行った。

研究分担は、研究総括と標準法検討委員会運営は五十君が担当した。検討委員会の事務局は岡田が担当した。妥当性評価は松岡が担当し、五十君も協力した。試験法プロトコルの作成は、セレウス菌（荻原が担当）、食中毒菌毒素セレウリド試験法（鎌田が担当）、エルシニア・エンテロコリチカ（岡田が担当）、衛生指標菌（伊豫田淳が担当、五十君が協力）衛生指標菌は集落計数法の作業部会を組織した。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、試験法作成を進める。4つのステージで検討を進めるが、それぞれのプロトコル案は、国立医薬品食品衛生研究所のホームページ上に公開し、広く意見を求める。H26年度に、ステージ1～2まで進めた。

これに対応し“標準試験法検討委員会”はH26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、ガイドライン原案の検討を開始した。

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26年度は、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、定性法について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21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。セレウス菌（荻原、岡田、五十君）、エルシニア（岡田）、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）、事務局（岡田）と共に試験法の検討を進めた。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、岡田が担当し、21名の専門家委員と2名の行政官で構成した。平成26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ウェルシュ菌標準試験法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。

セレウス菌試験法作業部会(荻原担当)は、ISO 7932:2004を中心に検討を進めた。米国FDAからは、BAM法として試験法が示されている。国内の一般的な方法も含め、各試験法の比較を行うために、各方法の比較表の作成を行った。問題点や評価点を探究し、最も適切な試験法の検討を行うこととした。最終的にはISOを基準に方法のフローチャートを作成し、検討を行った。本年度は原案を公開し、検討を行った。

エルシニア試験法作業部会(岡田担当)では、原案の策定を行った。現在日本国内では、食品から本菌を検出するための告示法、通知法等が定められていないため、国際的な試験法と互換性のある、食品からエルシニアを分離するための標準試験法を策定する必要がある。ISO 10273:2003法を中心にステージ1としての検討を行うことを決定した。

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を進めた。

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。セレウス菌等、4種類の微生物及び微生物由来毒素の各標準試験法の作成に際して、妥当性確認ガイドラインに基づき検討を進めた。またガイドラインの基となったISO 16140の改訂も予想され、その動向を分析した。ウェルシュ菌標準試験法の評価を行った。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。微生物試験法の合理的な妥当性確認のために重要な、オンサイト調製型の生菌標準物質に関しては、広範囲の菌種に適用できる見通しを得た。また生菌標準物質に関する成果を、J. AOAC Int.誌に掲載するとともに、AOAC INTERNATIONALの年次大会でシンポジウムを実施した。

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。セレウス菌、エルシニア、ウェルシュ菌試験法などの標準試験法の策定を進めた。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。微生物試験法の合理的な妥当性確認のために重要な、オンサイト調製型の生菌標準物質に関しては、広範囲の菌種に適用できる見通しを得た。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

1. 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)
2. 五十君静信。食品微生物管理の国際ハーモナイゼーションを推進。月刊フードケミカル。358巻:2-3。2015.2
3. 五十君静信。食品検査とは。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
4. 五十君静信、松岡英明。試験法の妥当性確認と性能検証。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
5. 丹野憲二、田中廣行、五十君静信、斎藤明美。微生物試験における検体の取扱い。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
6. 浅尾努、小久保彌太郎。衛生指標菌。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
7. 百瀬愛佳、五十君静信。カンピロバクター。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
8. 岡田由美子、仲真晶子。リステリア。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
9. 鎌田洋一。ボツリヌス菌。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
10. 門間千枝、伊藤武。ウェルシュ菌。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協会。2015.3
11. 荻原博和、岡田由美子。クロノバクター属菌。食品衛生検査指針（微生物編）公益社団法人日本食品衛生協

会。2015.3

学会発表

1. Matsuoka H.: Made-to-order SMVM prepared in situ applicable to broad spectrum of strains. 128th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Boca Raton (2014.9.10).
2. Saito M., A. Mariogani, T. Yoshida, N. Takatani, S. Igimi, H. Matsuoka: Application of made-to-order standard material of viable microbial cells (SMVM) to the evaluation of agar media. 128th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Boca Raton, USA (2014.9.10)
3. Igimi S, Momose Y, Okada Y, Ekawa T, Asakura H, Masuda K, and Matsuoka H. Evaluation of the NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of Campylobacter in chicken. 128th AOAC Annual Meeting and Exposition, Boca Raton. Florida USA. (2014.9.9)
4. 吉田智紀、高谷周督、小川廣幸、斉藤美佳子、五十君静信、松岡英明：傷害菌の定量的指標の提言－傷害菌調製条件の検討－. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.25)
5. 高谷周督、吉田智紀、Alvin Mariogani, 斉藤美佳子、五十君静信、松岡英明：傷害菌の定量的指標の提言－傷害修復培地成分の性能評価－. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014.9.25)
6. 斉藤美佳子、A. Mariogani、高谷周督、吉田智紀、小川廣幸、松岡英明：オンサイト調製型標準生菌を利用した寒天培地性能の定量的評価. 第41

回日本防菌防黴学会年次大会、東京
(2014. 9. 25)

7. 守山隆敏, 平井誠恵, 島原義臣, 斎藤健太, 中島和英, 吉田智紀, 高谷周督, 斉藤美佳子, 松岡英明: オンサイト調製型標準生菌を用いたサルモネラ単一生菌検出による簡易迅速法サルモネラ属菌測定用システムの性能評価. 第41回日本防菌防黴学会年次大会、東京 (2014. 9. 25)
8. 多田 敦子、杉本 直樹、秋山 卓美、伊藤 裕才、五十君 静信、佐藤恭子、河村葉子、山崎 壮、穉山 浩。食品添加物酵素の公定書微生物限度試験法の検討。全国衛生化学技術協議会 2014. 11 別府

講演・研修会等

1. 五十君静信。食品製造における衛生管理に適した試験法選択の考え方～数的指標を導入した規格基準の解説～。第14回食品安全戦略研究会。正しい検査と微生物制御。2014. 8. 23. 石川県立大学。金沢

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

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の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究

平成26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
鎌田 洋一 岩手大学 農学部
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部

セレウス菌試験法作業部会

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
五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

エルシニア・エンテロコリチカ試験法作業部会

研究分担者 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 百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
吉田麻利江 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
下島優香子 東京都健康安全研究センター 微生物部
井田美樹 東京都健康安全研究センター 微生物部
石塚理恵 東京都健康安全研究センター 微生物部

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 齋藤 利江 一般財団法人日本冷凍食品検査協会
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 認定センター

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 |
| | 吉田信一郎 | 一般財団法人日本食品分析センター |
| | 齋藤 利江 | 一般財団法人日本冷凍食品検査協会 |
| | 吉田 朋高 | 財団法人食品分析開発センター SUNATEC |
| | 守山 隆敏 | スリーエム ヘルスケア株式会社 |
| | 小林 武 | シスメックス・ビオメリュー株式会社 |
| | 山本 詩織 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 |
| | 西田 直樹 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 |

セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法作業部会

| | | |
|-------|--------|---------------------|
| 研究分担者 | 鎌田 洋一 | 岩手大学農学部 共同獣医学科 |
| 研究協力者 | 白藤 由紀子 | 岩手大学農学部 共同獣医学科 |
| | 梶田 弘子 | 岩手県環境保健研究センター 衛生科学部 |
| | 松田 りえ子 | 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 |
| | 森 曜子 | 日本適合性認定協会 |
| | 藤田 和弘 | 日本食品分析センター 彩都研究所 |
| | 福沢 栄太 | 日本食品分析センター 彩都研究所 |
| | 後藤 浩文 | 日本食品分析センター 彩都研究所 |
| | 齋藤 利江 | 日本冷凍食品協会 横浜試験センター |

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 |
| 澤田 薫 | 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 | 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 |
| | 春日 文子 | 国衛研・食品衛生管理部 |
| | 鎌田 洋一 | 岩手大学（作業部会） |
| | 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 |
| | 小高 秀正 | 公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所 |
| | 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 |
| | 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 | 仲川 玲 | 厚労省・基準審査課 |
| | 梅田 浩史 | 厚労省・監視安全課 |

平成 26 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 48 回検討委員会： 2014 年 7 月 23 日開催

第 49 回検討委員会： 2014 年 8 月 26 日開催

第 50 回検討委員会： 2014 年 10 月 27 日開催

第 51 回検討委員会： 2014 年 12 月 3 日開催

第 52 回検討委員会： 2015 年 2 月 18 日開催

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 48 回議事録概要

2014 年 7 月 23 日開催

1. 委員長より挨拶。
2. 行政より、リステリア及びサルモネラの規格基準の進捗状況について説明が行われ、サルモネラ試験法については、告示の改正が進められていると報告があった。
3. 配布資料と第 47 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 47 回議事録概要案の確認を行い、修正箇所はなく、読みにくい部分等は事務局で訂正することで承認された。
4. 議事次第の「4. 討論 ④クロノバクター属菌試験法について」を「4. 討論 ④セレウス菌試験法について (ST1)」に変更した。
5. 腸炎ビブリオ試験法コラボデータ及びクロノバクター属菌試験法 (ST4) に関する検討は次回以降に行う。

リステリア試験法の修正について

6. 岡田委員より、リステリア・モノサイトゲネス標準試験法の修正案の説明があった。
7. ISO 11290-1:2004 を基に作成しており、その旨を明記している。
8. 試験試料は、定性法では 25 g、定量法では X g としている。
9. シャーレは国内で一般的なサイズのものとし、それに応じて、寒天平板の厚さに関する記述を、「1 枚あたり 18 mL」から「1 枚あたり 12 mL」に変更した。
10. 第一選択分離寒天培地（酵素基質培地）は、ISO 法で規定されている ALOA 培地と、作業部会において同等性が確認された CHROMagar™ Listeria を用いてよい、とした。
11. CHROMagar™ Listeria について、NIHSJ 法では商標名を用いたままにする。
12. 第二選択分離寒天培地については、ISO 法と同様である。
13. トリプトソイ酵母エキス寒天培地 (TSYEA) について、リステリア作業部会においてトリプトソイ寒天培地 (TSA) を代替として使用できると確認した。
14. 「これらは 4 日以上の培養期間で検出される。これらの株のうちいくつかは病原性を持つ可能性がある。」を削除する。また、「…ハローがとても弱い株があるので留意すること。」を、「…ハローが弱い株も存在する。」に変更する。
15. 作業部会において、CAMP 法の代替法としてβリジンディスク法を用いることが可能かを検討・確認し、その旨を記載した。
16. 「CAMP 法、βリジンディスク法のいずれも、溶血の弱い *L. monocytogenes* 株が存在しているため、判定には注意が必要である。」を「*L. monocytogenes* には、溶血の弱い株が存在する。」に変更する。
17. 培地組成については、ISO 法と同様の記述とした。
18. CHROMagar™ Listeria 寒天培地について、組成が公表されていないため、一部を「酵素基質」と記述した。
19. 試験法の内部精度管理として必要であることから、「注：メーカーの品質証明を取ると共に、既知の菌株を用いて性能評価を行う。」と記述した。
20. 粉末培地 (Blood Agar Base No. 2 等) について、ISO 法に記載はなかったが、肉ペプ

トンの入手が容易ではないため、この培地の記述も追加した。

21. 「図 2. フロー図」を「図 3. フロー図」に変更する。
22. 「15 分間液が寒天に吸収されるまで放置」という記述について、「液が寒天に吸収されるまで、15 分程度放置」と修正する。また、「37°C 18~24 時間又は十分増殖するまで」の記述は、「37°C 18~24 時間」に変更する。本文中で、これに該当する箇所も、同様に修正する。
23. 検討委員会で指摘された箇所を訂正し、メールにより各委員の確認後、web 上に公開する予定である。

セレウリド試験法について (ST1)

24. 鎌田委員より、セレウス菌嘔吐毒素 (セレウリド) 試験法の ST1 案について、説明が行われた。
25. 前回、五十君委員長より指摘があった、国際機関 (ISO・FDA 等) によって定められたセレウリド試験法が存在するかどうかという点については、現時点で公的な試験法は見当たらなかった。
26. 2004~2013 年のセレウス菌食中毒発生事例の原因食として、ご飯類が最も多かった。
27. 対象食品として市販パックライスを用い、LC/MS/MS によりセレウリドの検出定量を行った。
28. この試料は、ホモジナイズすると糊化して扱いづらいため、水量を変えてみたところ、試料：水=1:1 の割合が一番取り扱いやすく、均質化されていた。
29. セレウリドの抽出にはメタノールを用い、抽出物を濃縮して、LC/MS/MS にかける場合、水とメタノールの比率は統一して行う。
30. 「質量分析器」を「質量分析測定装置」に変更する。
31. 材料、試薬、機器の「250 mL 比色管」を、「250 mL 比色管又はメスフラスコ」に変更する。また、「ろうと」の記述も必要である。
32. 試料の均質化と抽出の減圧濃縮に関して、もう少し具体的に記述をするべきであると指摘された。
33. フロー図に「濃縮」の記述を加え、カラムの操作の詳細に記述する。
34. 示した方法を参考として、各機関で最適化してもらう。
35. 今回の ST1 案の検討は、実質的に ST2 案の検討であるため、承認を得られた案は ST2 として公開し、次回以降は ST3 としてコラボ案の検討を行っていく。
36. 鎌田委員より、10 月より LC/MS/MS が入る予定だったが、LC/MS になってしまったと報告があり、今後、LC/MS/MS を検討してもらえないか、探すことにした。
37. 助勢の候補の検査機関として、日本食品分析センター (吉田信一郎委員) に、検討を依頼した。
38. LC/MS/MS だけでなく、シングル MS でもできるか否かを検討した方がよいと判断され、今後、検討していく。

ウェルシュ菌試験法について (ST2)

39. 伊藤委員より、ウェルシュ菌試験法の ST2 案について、説明があった。
40. ウェルシュ菌の分離培地として、ISO・FDA では TSC agar を用いるのに対し、日本では卵黄加 CW 寒天培地が主流である。作業部会の検討では、TSC 寒天培地の方がウェルシュ菌の抑制力が低く、優れていると判断した。
41. ISO・FDA のウェルシュ菌確認試験では、レシナーゼ検査が行われていないが、日本の検査法は採用しているため、今後、作業部会で、検査に必要な項目を検討する。
42. ST1 原案がすでに公開されており、それを作業部会案の ST2 とすることが承認され、ST3 のコラボ案について検討を行った。
43. コラボスタディをフルコラボとして行うためには、集落計数法の場合、8 箇所以上で行う必要がある。したがって、コラボスタディの条件として、4+1 箇所を実施、実施回数 2 回、総検体数 48 検体で行うことが提案された。
44. コラボスタディで用いるウェルシュ菌はエンテロトキシン非産生菌を用い、近郊箇所において保冷剤を入れて郵送し、芽胞を用いることができれば、夏でも実施可能である。
45. コラボスタディを行う前に、接種菌数レベルに関する予備実験を行う必要がある。
46. 本検討を基にコラボ実施案を修正し、性状確認に関する文章を追記する。
47. 各委員に承認された後、これをウェルシュ菌試験法の ST3 案とし、8 月の検討委員会で議論を進める予定である。
48. ST2 案は、内容を再度確認した後、公開する予定である。

セレウス菌試験法 (ST1) について

49. 荻原委員がセレウス菌試験法を担当し、セレウス菌試験法の ST1 案の説明が行われた。
50. 選択培地に関して、食品衛生検査指針では NGKG 培地を主に使用しており、MYP 培地はあまり使用されていない。また、BAKARA 培地については未だ検討していない。
51. 食品衛生検査指針の培養温度及び時間は、ISO・FDA と異なっている。
52. セレウス菌試験法は、ISO 法を中心として、検討を進めていく予定である。
53. 今回の資料をセレウス菌試験法の ST1 案とする。最確数法 (MPN 法) は ST1 を公開する。
54. 今後、作業部会で ST2 案をまとめ、次回以降に議論を進める予定である。

腸炎ビブリオ試験法コラボデータについて

55. 五十君委員長より、腸炎ビブリオ試験法コラボデータの説明が行われた。
56. 各機関に LOD₅₀ (POD₅₀) を出してもらおう方針でコラボスタディを行った結果、腸炎ビブリオの接種群による違いは見られたが、比較的きれいな結果となった。
57. このデータを論文としてまとめ、Journal of AOAC に投稿する予定で、甲斐委員と五十君委員長で、内容を相談していく。
58. これをまとめて腸炎ビブリオ試験法の最終案を作成し、8 月の検討委員会において甲斐委員より提出される予定である。

事務連絡その他

59. 次回の検討委員会は、8月26日（火）14時から11号館3階の講堂で行う。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 49 回議事録概要

2014 年 8 月 26 日開催

1. 委員長より挨拶。本日より、小高委員にご参加いただきます。また、セレウリド試験法について、アドバイザーとして松田先生に参加いただきます。
2. 配布資料の確認・第 48 回議事抄録案及び読み上げによる議事録概要案の確認を行い、一部文言の修正後、承認された。

リステリア試験法の修正について

3. 岡田委員より、リステリア・モノサイトゲネス標準試験法の定性法および集落計数法最終案の説明があった。
4. 前回の検討委員会の後、各委員より様々なご意見をいただいた箇所について作業部会で検討を行い、いくつかの検討事項を採用し、その他は ISO の原案に準じることとした。
5. 定性法について、ALOA 培地に⊙を入れて記載した。
6. 「冷水」という記述について、この後にオートクレーブをかけるのに何故冷水を用いる必要があるのか、という指摘があったが、ISO 原本に従い、変更しないことにした。
7. 「あらかじめ 47℃に維持した基礎培地に…」について、50℃でもよいのではと指摘があったが、血液が溶血してしまう可能性を考慮し、ISO 原本に従って 47℃のままとした。
8. CAMP 試験について、ISO 原本では「β 溶血を示す *S. aureus*」となっているが、学術的に間違っていると判断されたため、「β-haemolysin 産生性の *S. aureus*」に修正した。
9. 集落計数法について、定性法と同一の部分は、同様に修正した。
10. 「試験試料を階段希釈したものを塗布した平板の集落数を用いる場合には、集落数に希釈倍率をかけて検体 1 g (又は ml) あたりの菌数を算出する。」を追記した。
11. その他、細かい表現の変更を修正した。
12. 「接触しないように 1 から 2 mm ずつ離して画線する。」がわかりにくいとの指摘を受け、記述を変更した。
13. 「あらかじめ 47℃に維持した基礎培地に…」を「47±0℃」とした方がよいのでは、という指摘が出たが、ISO 原本に従い、「47℃に安定させたウォーターバスにあらかじめ入れて」という記述に変更する。
14. 「スライドグラス上に滴下した過酸化水素水中で…」を「スライドグラス上に滴下した 3%過酸化水素水中で…」に変更する。同時に、「3%過酸化水素水」を「最終濃度 3%過酸化水素水」に変更する。
15. 以上を再度修正し、NHISJ-8 及び NIHSJ-9 の最終試験法として公開する。

セレウリド試験法について (ST3)

16. 鎌田委員より、セレウリド試験法の ST2 案の説明があった。
17. 妥当性の評価では、チャーハンを用いている。その結果では、検量線は 0.01~10 ng/ml

で良好な直線性が得られ、定量下限は 0.01 ng/g となり、十分な定量下限であった。

18. 試料の調製法について、質量分析測定溶液作成のための前処理法を検討する必要がある。前処理法について、吉田委員・藤田先生に協力していただいた。
19. 資料 C について、フロー図で Total 250 ml 以上になっていたため、この箇所を訂正した。
20. フロー図は、前回記載していなかったため、今回、新たに詳細に追記した。
21. 食品の微生物検査では通常は試料 25 g であり、今回の案でも 25 g とした。量の設定について、厳密にし過ぎず、値の幅をもたせた方がよい。その方が、多様な試料に柔軟に対応できるようになる、とのコメントがあった。
22. 農薬の試験法に関しては、コラボスタディではなく 1 試験室でのシングルバリデーションで対応したが、今回のようにコラボで複数の場所で行う場合は、LC/MS/MS をあらかじめ最適化してもらい、それができる機関にお願いすることとなる。
23. 食品によって、プロトコルを変える必要がある。今回のプロトコルでは、お米用、とするべきかもしれない。この方向性については、作業部会で話し合う必要がある。
24. プロトコルを一本に統一することはできないと考えられるため、質量分析装置を統一して、コラボで行うという提案がされた。
25. 食品分析センターの協力の下で行った測定の条件について、LC/MS/MS はどの機種を使用したのか、という質問が出たが、今回は質量分析を行っておらず、その前処理操作の部分のみを行った。
26. 食中毒の原因食品として米飯が多いことから、米飯をベースとして行うこととする。
27. 測定装置 (LC/MS/MS) について、装置名やカラムを事前にチェックすべきである。
28. いくつかの研究室で、異なる機種を用いて、コラボスタディとして行うべきではないかと提案されたことから、とりあえず、現在の 2 つの機関で前処理法を統一して、2 つの異なる機種で質量分析を行って結果を出し、そのデータから、どのくらいのスケールでコラボスタディをやるべきかを検討すべきである。(フルコラボで行う必要はないと考えられる。)
29. この点については、作業部会で意見を纏めて、検討委員会で議論すべきである。
30. 純品で試験を行うと検量線がきれいに出るが、マトリックスが入ると、挙動が変わってきてしまう。
31. セレウリドを定量する意味について、確認した。(セレウリドは食品の有害要因物質であるため。食品中にこの物質が残っていることにより食中毒が発生してしまうため、これについてチェックする必要がある。)
32. セレウリド試験法は、ST3 に入る。シングルラボでデータを出して、コラボスタディをどの程度やるべきかを検討することにする。
33. まずは、いくつかのラボでいくつかの機種を用いて、データを出すこととする。

ウェルシュ菌試験法について (ST3)

34. 伊藤委員より、ウェルシュ菌試験法の ST3 案の説明があった。
35. コラボ案について、前回の検討委員会におけるアドバイスにより、実施予定機関数や

実施回数を変更した。

36. 作業部会において、どこを結論とするかが判断できなかったため、ISO 法のプロトコールの代替法として評価するか、それとも全く新しい方法をバリデートするのかを議論した。
37. ウェルシュ菌の定性法は、ISO 法にはない。
38. 定性法から行うべきと考えられたが、規格基準にクロストリジウム属菌の定性法がないことから、定量法を先に始めるべきと考えられる。
39. 定性法が必要であれば、POD を求める形式にして試験法のバリデーションを行ってはどうかと提案された。
40. 伊藤委員より、菌数よりも、菌が存在するか否かの判定が必要であるため、定性法が必要であるとの考えが述べられた。
41. 定量法は、すでに ST2 で検証を行っているため、ISO 法をそのまま起こす方針とし、次回試験法案を ST4 として提案する。
42. 検査機関への依頼のほとんどが定性法であり、定量法はほとんどないと発言があった。
43. 定性法の必要性について議論した結果、ウェルシュ菌の定性法を、新しい番号をつけて作成することとする。まずは増菌培地について検討し、LOD₅₀ 等で試験法を評価する。
44. 定性法は、次回の検討委員会で、新たに ST1 として提案していただく。

ビブリオ試験法 (ST4) について

45. 小西先生より、腸炎ビブリオ標準試験法の ST4 案の説明があった。
46. 腸炎ビブリオの定性法の最終案として、纏めた。
47. TCBS 寒天培地について、企業によって組成が異なっているため、基礎培地組成を記述した。なお、各企業による組成成分を、資料の最終頁に記載した。
48. 酵素基質培地については、コラボスタディによって、同等であることを証明した。
49. 耐塩性試験について、0%という記述がわかりにくいため削除するようにのご意見を頂戴したが、作業部会では返って分かり難くなると判断し、削除せずにそのまま記述を残した。
50. フロー図の選択分離培地について、TCBS 寒天、TSAT 寒天の 2 つのうち、いずれか一つを使う旨を追記する。
51. 提案された試験法が最終案であるという確認をしていただき、他の標準試験法と同様な形式に整えたものを、事務局より各委員へファイルで配布し確認をお願いする。
52. 次回の検討委員会で、詳細な記述等について修正していく予定である。
53. 今回の定性法に合わせて、現在の通知法案（定量法）を再度見直し・検討する必要があると思われるため、この点につき作業部会で議論し、次回以降の検討委員会で報告する。

事務連絡その他

54. 次回の検討委員会はまだ確定していませんが、10～11 月で予定しています。日程調整