

図-1 大腸菌集落数の測定結果
(大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエ試験菌液混合液)

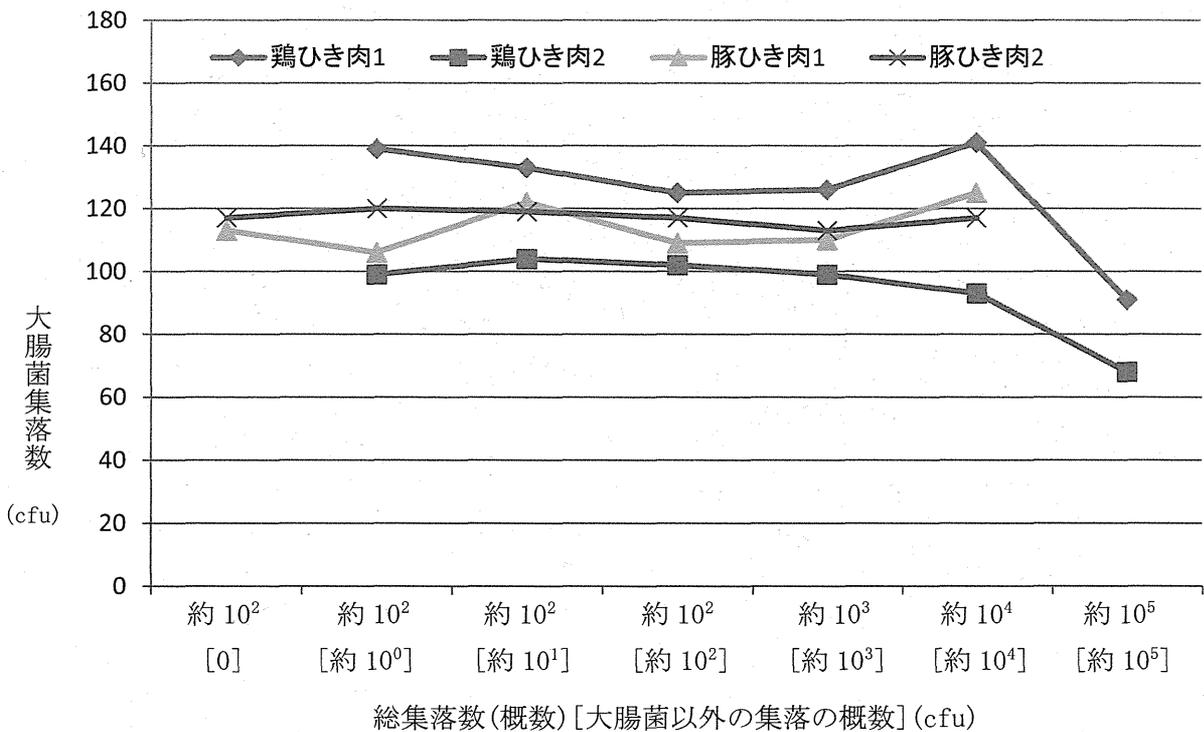


図-2 大腸菌集落数の測定結果
(大腸菌試験菌液及び試料希釈液混合液)

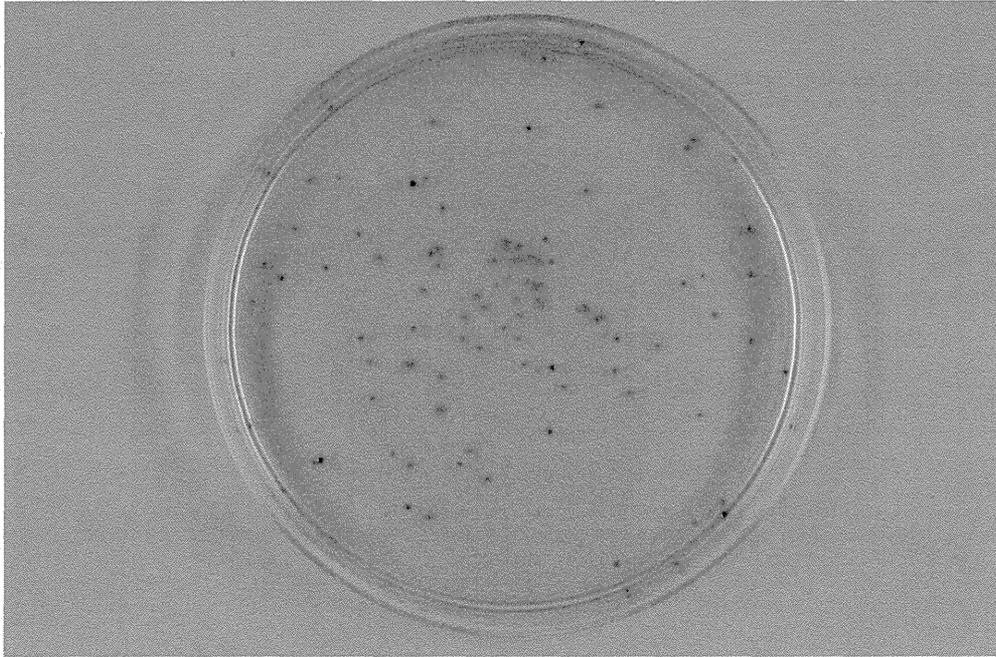


写真-1 大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌混合菌液(測定1)
[大腸菌：約 10^2 cfu, クレブシエラ ニューモニアエ：約 10^6 cfu]

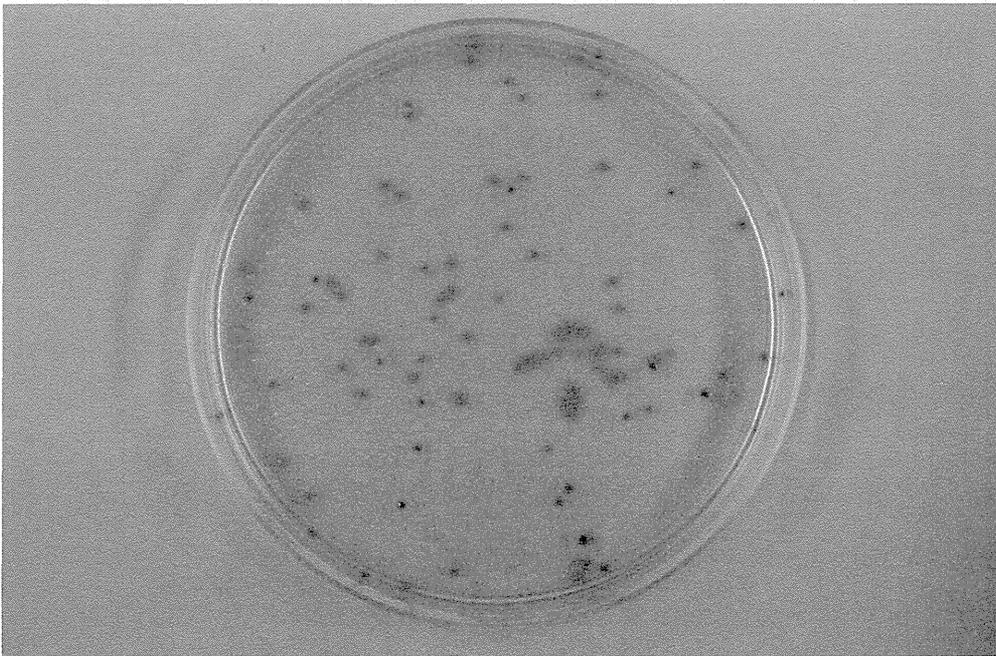


写真-2 大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌混合菌液(測定1)
[大腸菌：約 10^2 cfu, クレブシエラ ニューモニアエ：約 10^5 cfu]

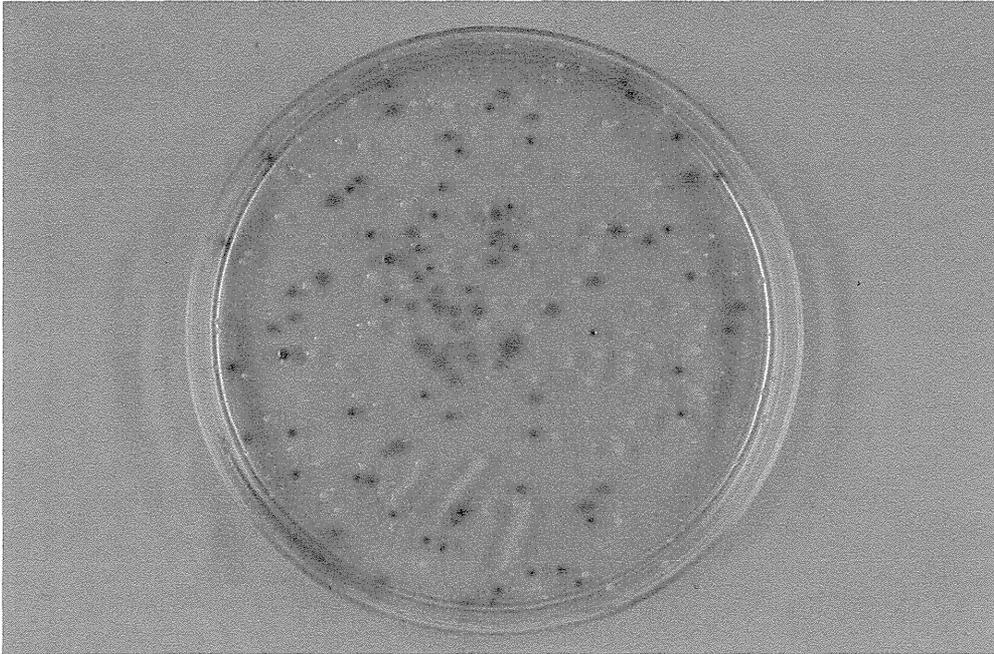


写真-3 大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌混合菌液(測定1)
[大腸菌：約 10^2 cfu, クレブシエラ ニューモニアエ：約 10^4 cfu]

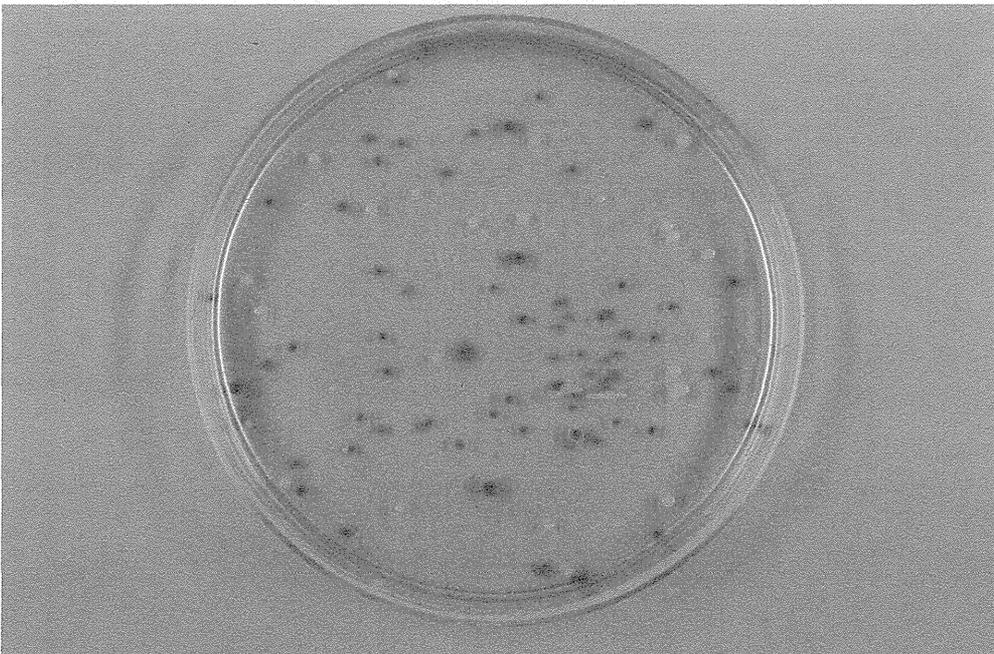


写真-4 大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌混合菌液(測定1)
[大腸菌：約 10^2 cfu, クレブシエラ ニューモニアエ：約 10^3 cfu]

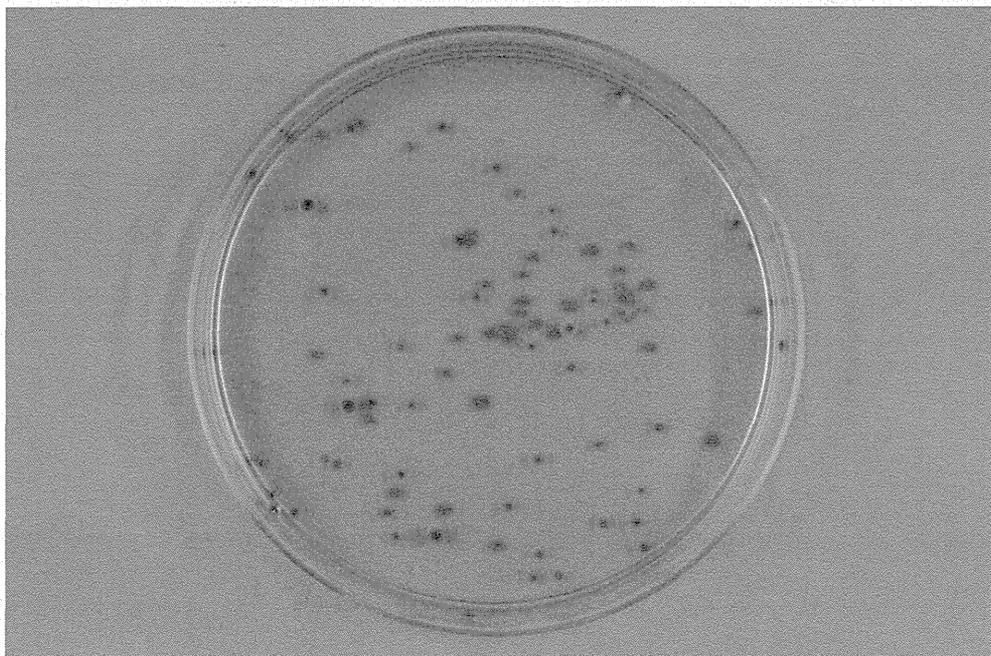


写真-5 大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌混合菌液(測定1)
[大腸菌：約 10^2 cfu, クレブシエラ ニューモニアエ：約 10^2 cfu]

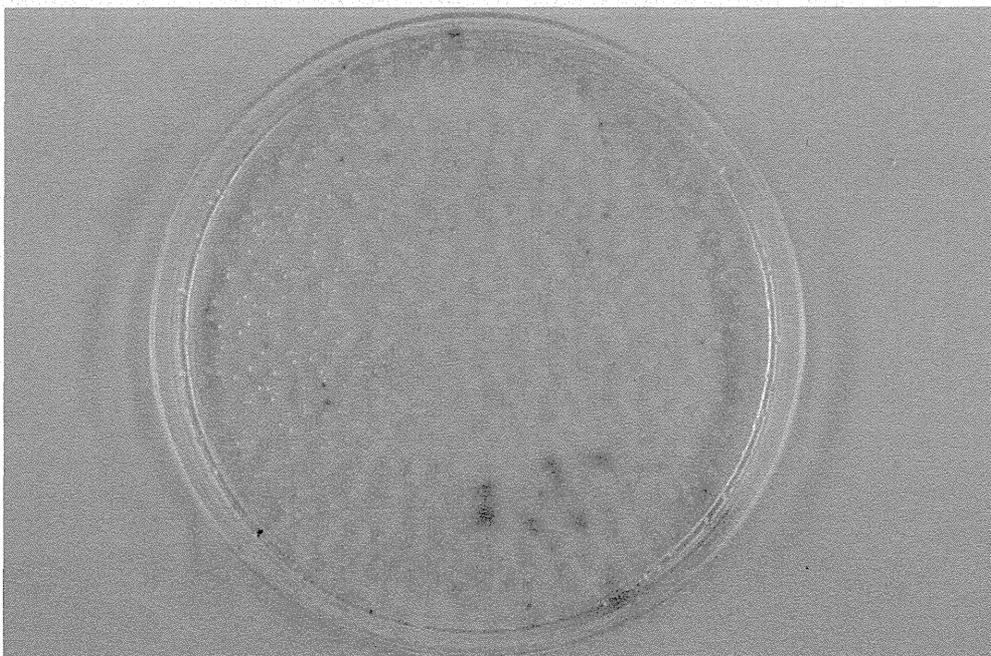


写真-6 大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌混合菌液(測定2)
[大腸菌：約 10^2 cfu, クレブシエラ ニューモニアエ：約 10^6 cfu]

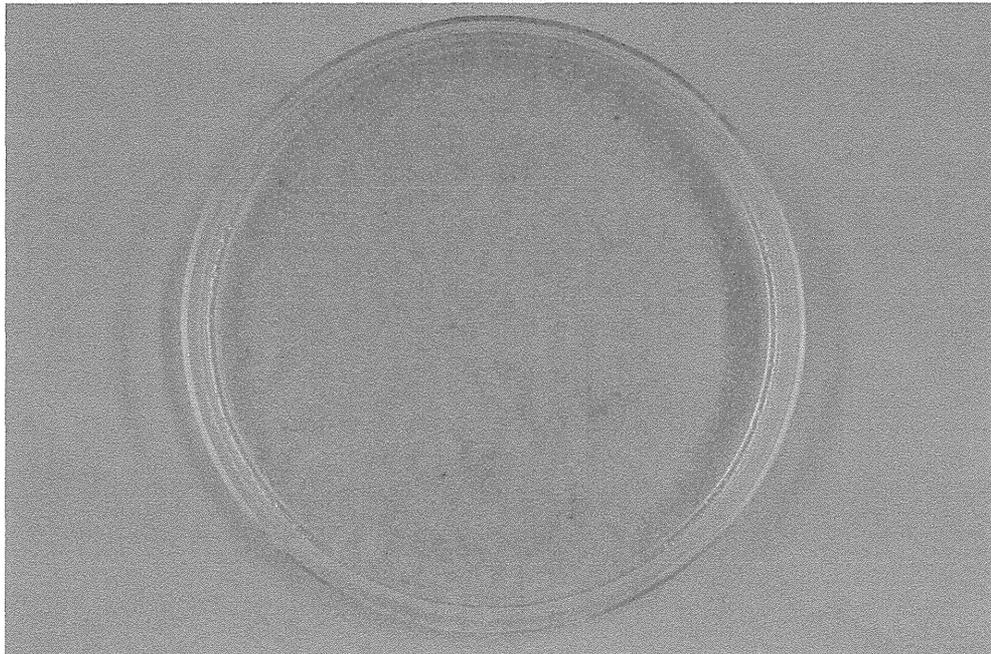


写真-7 大腸菌及びクレブシエラ ニューモニアエの試験菌混合菌液(測定2)
[大腸菌：約 10^2 cfu, クレブシエラ ニューモニアエ：約 10^5 cfu]

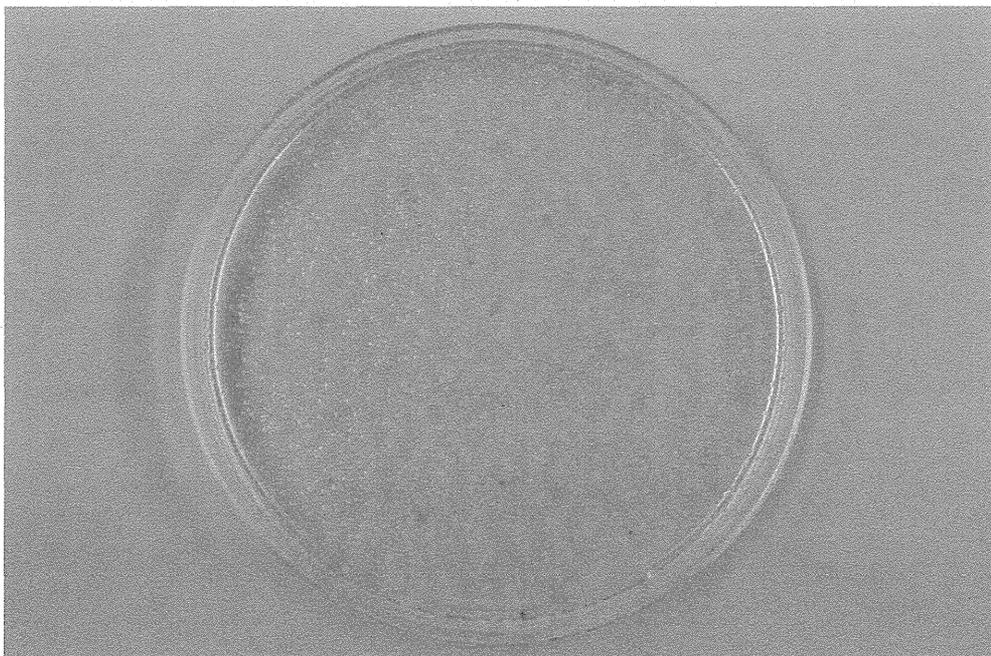


写真-8 鶏ひき肉[10^1 倍希釈液]
[総集落数：約 10^5 cfu(大腸菌集落：約 10^2 cfu, その他：約 10^5 cfu)]

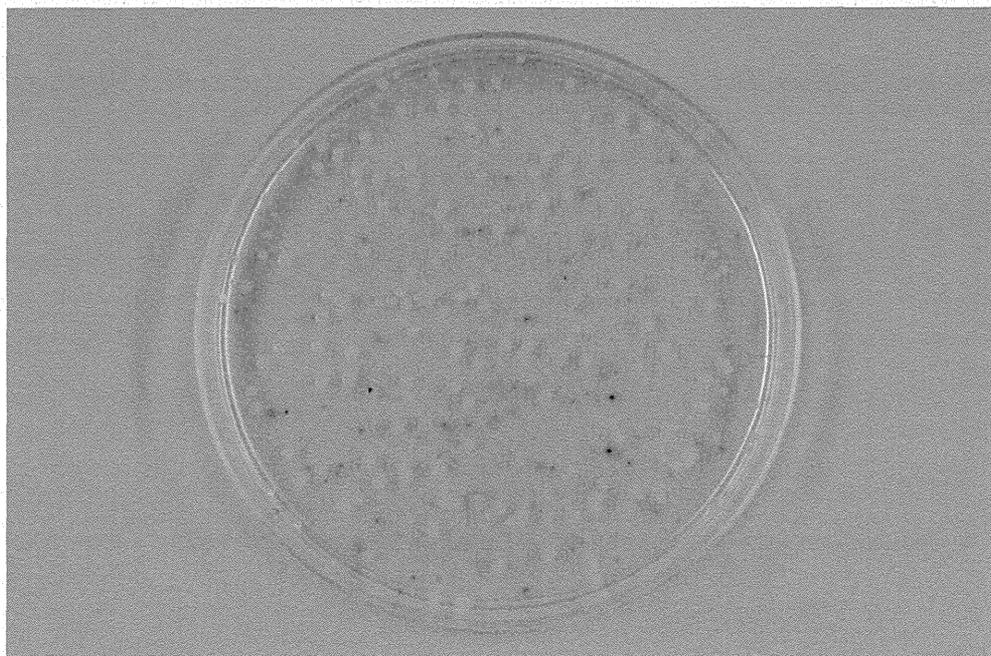


写真-9 鶏ひき肉[10^2 倍希釈液]
[総集落数：約 10^4 cfu(大腸菌：約 10^2 cfu, その他：約 10^4 cfu)]

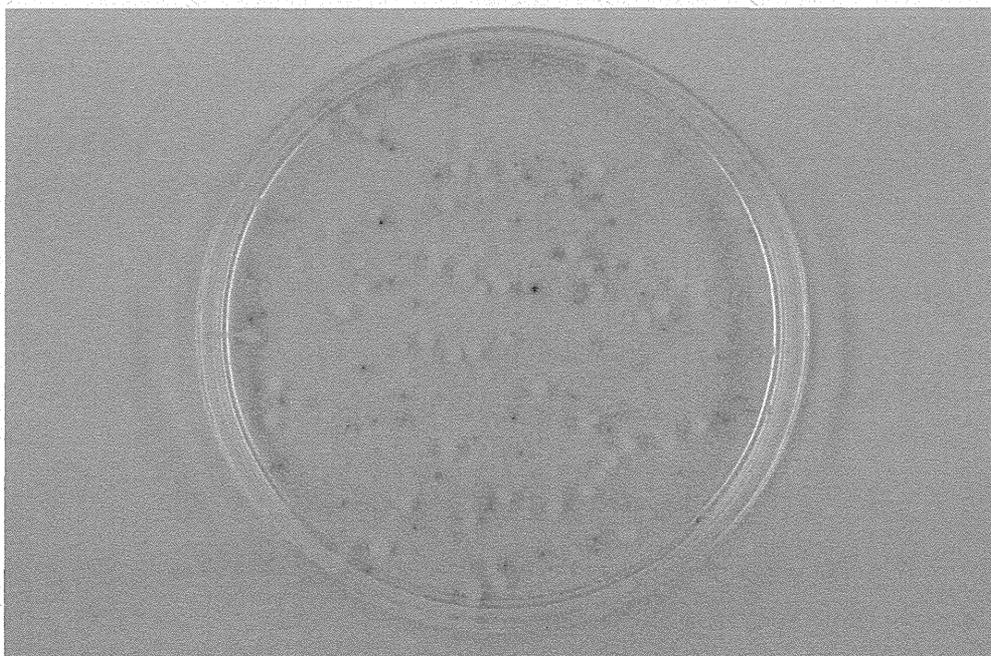


写真-10 鶏ひき肉[10^3 倍希釈液]
[総集落数：約 10^3 cfu(大腸菌：約 10^2 cfu, その他：約 10^3 cfu)]

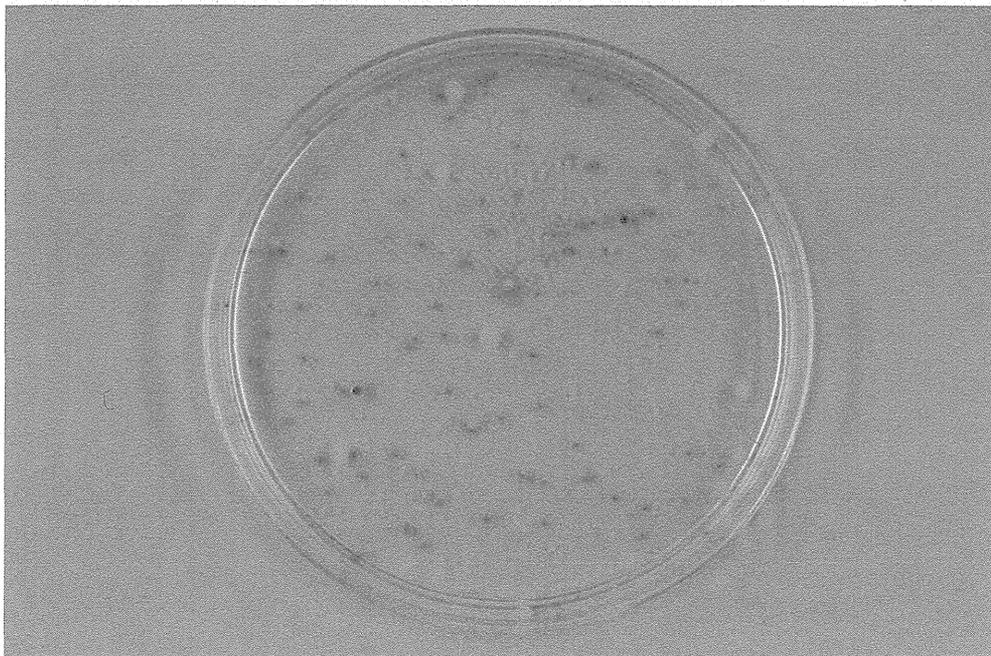


写真-11 鶏ひき肉[10⁴倍希釈液]

[総集落数：約10² cfu(大腸菌：約10² cfu, その他：約10² cfu)]

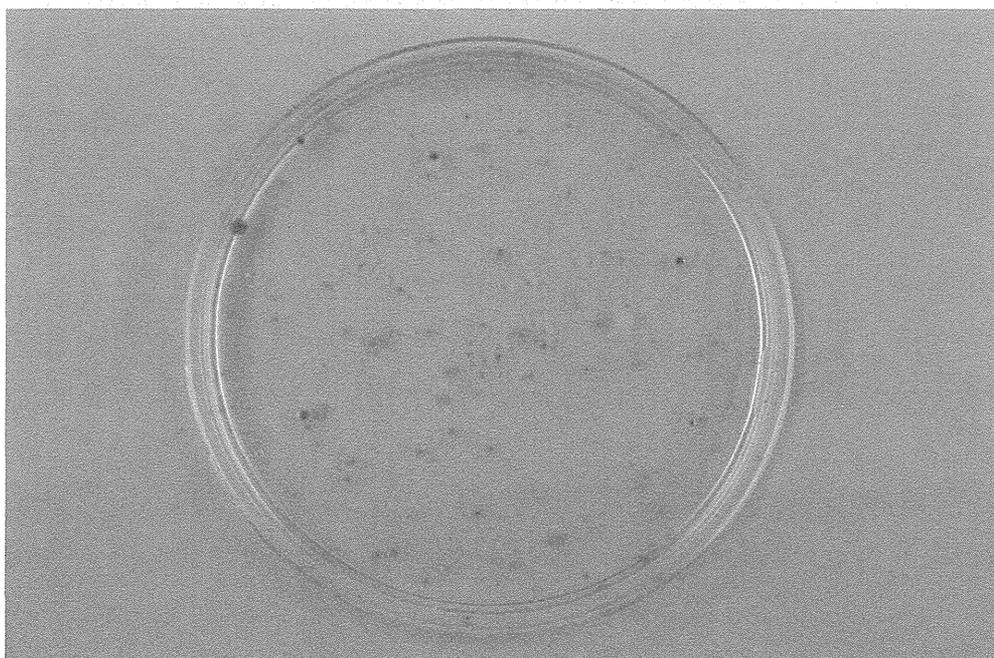


写真-12 鶏ひき肉[10⁵倍希釈液]

[総集落数：約10² cfu(大腸菌：約10² cfu, その他：約10¹ cfu)]

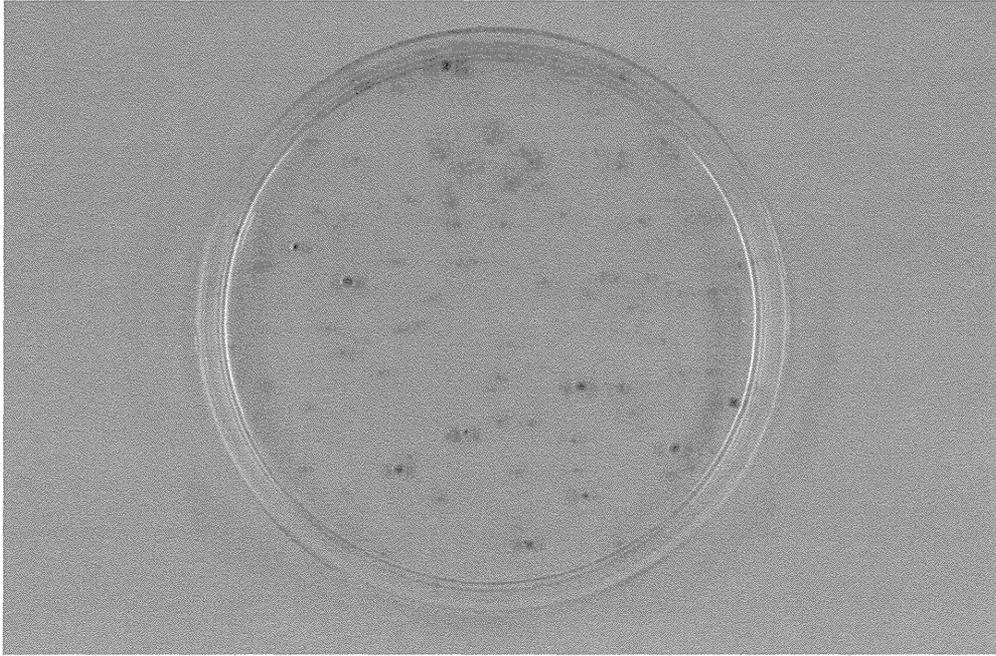


写真-13 鶏ひき肉[10^6 倍希釈液]
[総集落数：約 10^2 cfu(大腸菌：約 10^2 cfu, その他：約 10^0 cfu)]

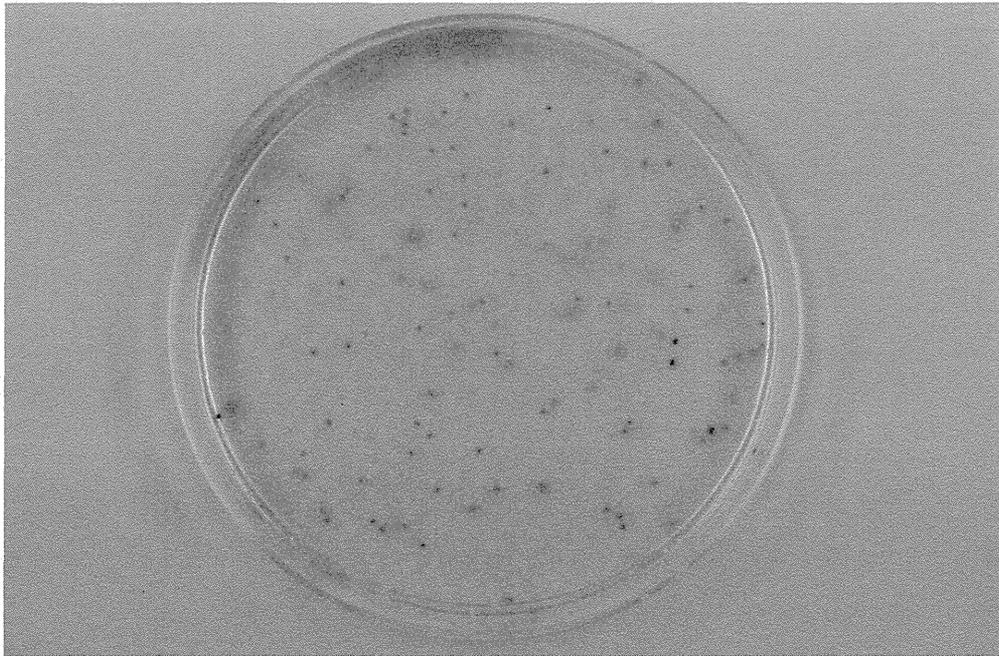


写真-14 豚ひき肉[10^1 倍希釈液]
[総集落数：約 10^4 cfu(大腸菌：約 10^2 cfu, その他：約 10^4 cfu)]

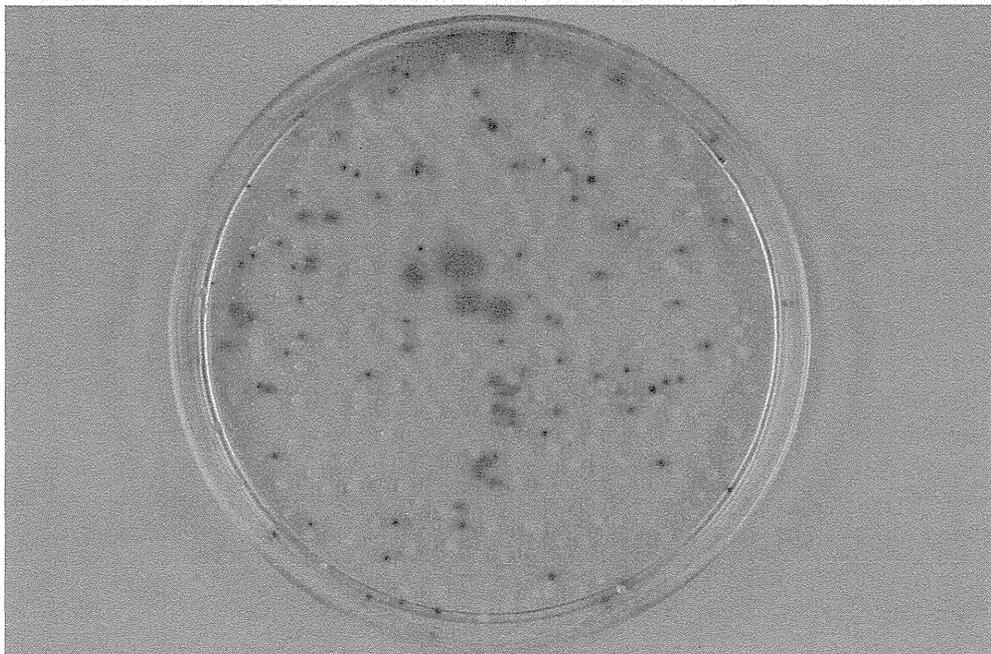


写真-15 豚ひき肉[10^2 倍希釈液]

[総集落数：約 10^3 cfu(大腸菌：約 10^2 cfu, その他：約 10^3 cfu)]

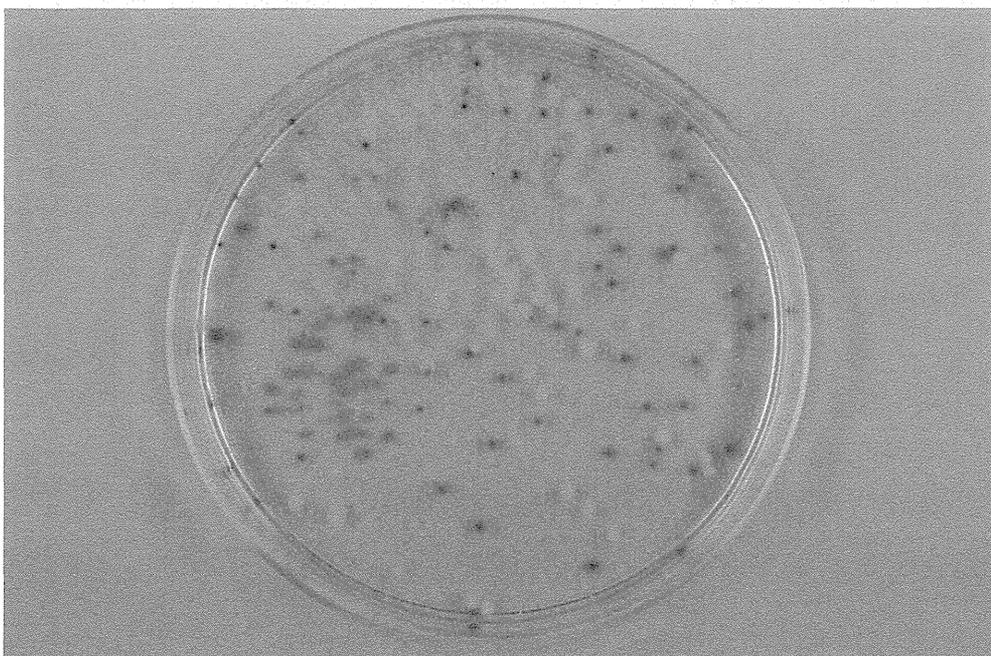


写真-16 豚ひき肉[10^3 倍希釈液]

[総集落数：約 10^2 cfu(大腸菌：約 10^2 cfu, その他：約 10^2 cfu)]



写真-17 豚ひき肉[10^4 倍希釈液]
[総集落数：約 10^2 cfu(大腸菌：約 10^2 cfu, その他：約 10^1 cfu)]

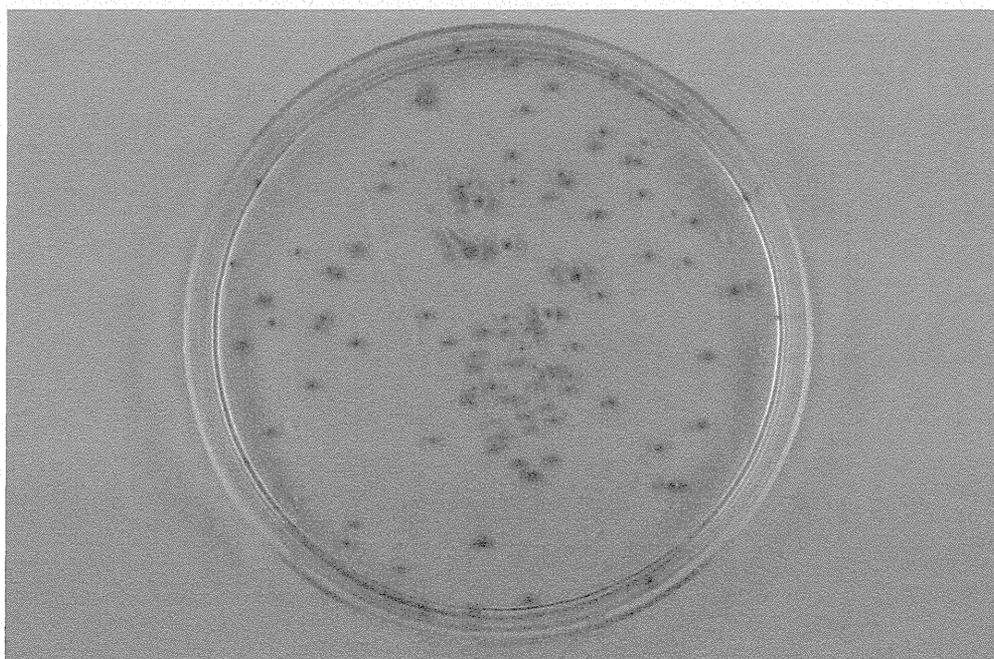


写真-18 豚ひき肉[10^5 倍希釈液]
[総集落数：約 10^2 cfu(大腸菌：約 10^2 cfu, その他：約 10^0 cfu)]

以 上

「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」

における衛生指標菌試験法の標準法策定の検討報告書

A. 研究目的

本事業は、国立医薬品食品衛生研究所の「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における衛生指標菌試験法案作成のための基礎的データを収集することを目的とした。今年度は、食品から検出される菌種について、食品の加工による菌の損傷も視野に入れ、国内で広く用いられている一般細菌数（生菌数）試験法（以下従来法）と ISO4833：2013（一般生菌数計数法）法（以下 ISO 法）により生菌数測定を行い、結果の評価を行った。

B. 研究方法

1) 研究概要

食品の加工によって損傷をうけた菌として、菌液に加熱や凍結のストレス処理を与えたのち一般細菌数を計測した。国内で広く用いられている従来法の培養条件は「 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 24 ± 2 時間」（冷凍食品の成分規格等）と「 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 48 ± 3 時間」（乳及び乳製品の成分規格等）である。これらの培養条件と、ISO 法の培養条件「 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 72 ± 3 時間」との結果の差異を評価するために、試験菌液を 30°C と 35°C の 2 温度で 24、48、72 時間培養し一般生菌数を計測した。

2) 試験菌

環境に広く分布し、食品（乳製品、肉製品、魚）からも検出される以下の菌を選択した。

Bacillus subtilis (ATCC6633)

Citrobacter freundii (ATCC8090)

Listeria innocua (ATCC33090)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC9027)

Staphylococcus epidermidis (ATCC13518)

3) 試験菌液の調製

それぞれの試験菌を普通ブイヨンにて $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養後、0.1ml を 0.1% ペプトン加生理食塩水 10ml に加え試験菌液とした。

4) 試験菌のストレス処理

① 加熱処理

55℃の恒温水槽で0.1%ペプトン加生理食塩水 10 ml 入り試験管をあらかじめ保温し、この試験管に試験菌原液を 0.1ml 加え、1 分間加熱後に取り出し、冷水にて急冷し試料液とした。

② 凍結処理

0.1%ペプトン加生理食塩水 50 ml 入り滅菌ポリ瓶（100 ml 容）に試験菌液 0.5 ml を加え-20℃の冷凍庫にて 48 時間保持した後、室温で 4 時間解凍し試料液とした。

5) 試験方法

試料液を 0.1%ペプトン加生理食塩水にて段階希釈した。各段階希釈液を 2 枚のシャーレに 1ml ずつ分注し、滅菌後 45℃に保温しておいた標準寒天培地を約 15ml 添加し、固化後 30℃及び 35℃で培養し、24 時間毎に最大 72 時間まで培養後発育した菌数を測定した。

6) 菌数算定法

菌数の算定は ISO 7218:2007Amd1:2013 に従った。すなわち連続する 2 段階の希釈で各希釈段階につきシャーレ 2 枚の場合の菌数算定を以下の式でおこなった。

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

$\sum C$: 各平板の集落数の合計

n_1 : 希釈が低い方の算定対象シャーレ枚数

n_2 : 希釈が高い方の算定対象シャーレ枚数

d : 希釈が低い方の希釈倍数

C. 研究結果

1) 測定結果

別紙参照

2) 測定値の差

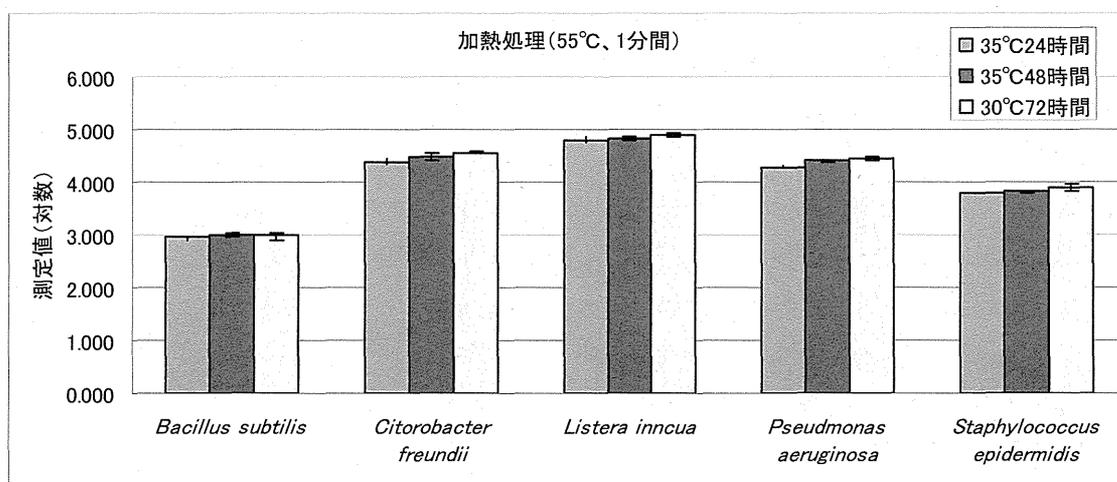
培養条件間による測定値の差の傾向を見るために、測定値の対数を取り、差を算出した。

表 1 加熱処理した試料の測定値の差

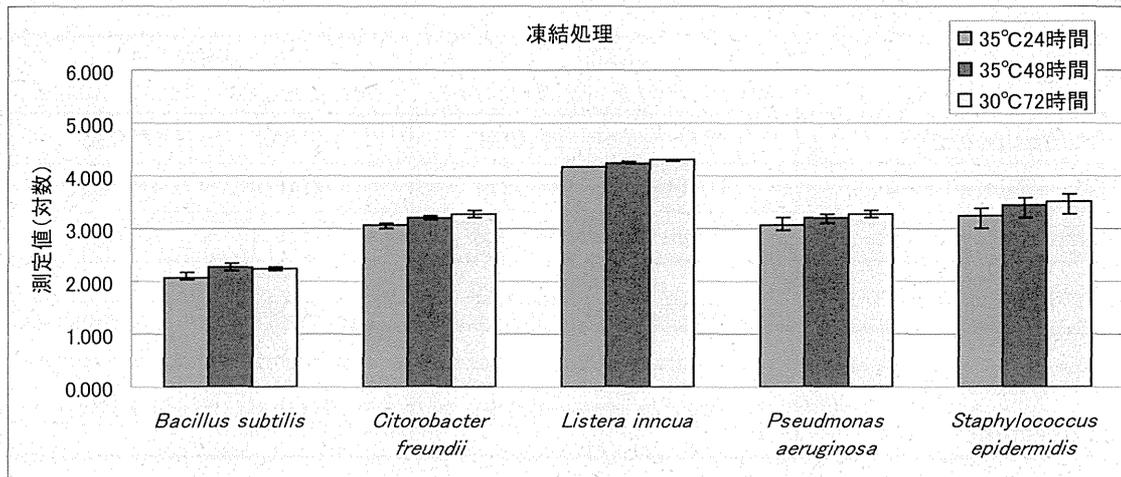
菌の種類	範囲	範囲
	30°C72 時間培養-35°C24 時間培養	30°C72 時間培養-35°C48 時間培養
<i>Bacillus subtilis</i>	-0.005 ~ +0.068	-0.061 ~ +0.020
<i>Citorobacter freundii</i>	+0.115 ~ +0.209	+0.028 ~ +0.131
<i>Listera innqua</i>	+0.061 ~ +0.138	+0.054 ~ +0.065
<i>Pseudmonas aeruginosa</i>	+0.142 ~ +0.187	+0.021 ~ +0.082
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+0.061 ~ +0.156	+0.006 ~ +0.134

表 2 凍結処理した試料の測定値の差

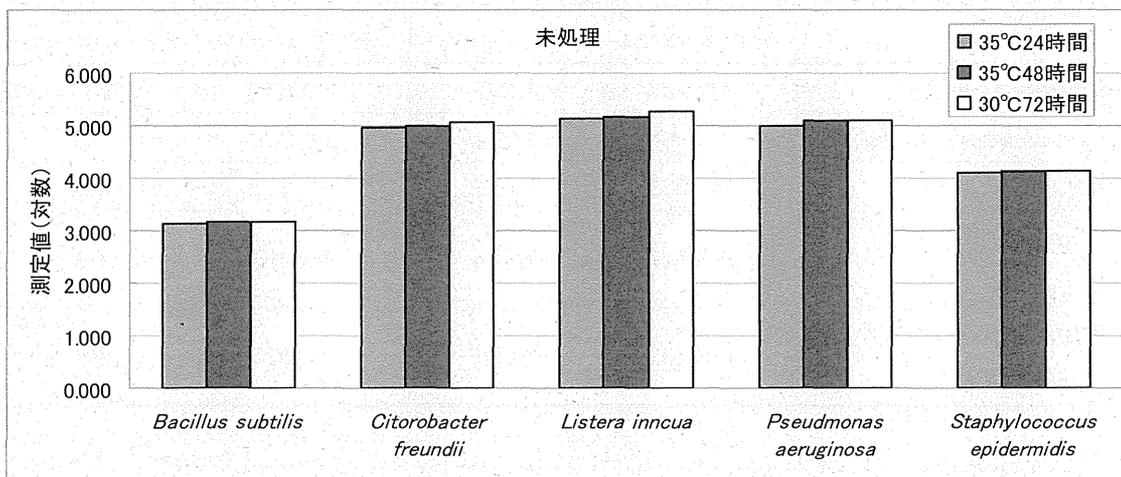
菌の種類	範囲	範囲
	30°C72 時間培養-35°C24 時間培養	30°C72 時間培養-35°C48 時間培養
<i>Bacillus subtilis</i>	+0.126 ~ +0.190	-0.040 ~ -0.002
<i>Citorobacter freundii</i>	+0.168 ~ +0.274	+0.022 ~ +0.103
<i>Listera innqua</i>	+0.096 ~ +0.138	+0.012 ~ +0.050
<i>Pseudmonas aeruginosa</i>	+0.149 ~ +0.235	+0.065 ~ +0.104
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+0.207 ~ +0.299	+0.037 ~ +0.088



グラフ 1 加熱処理した試料の測定値 (対数)



グラフ 2 凍結処理した試料の測定値 (対数)



グラフ 3 ストレス処理なし試料の測定値 (対数)

D. 考察

従来法と ISO 法の培養条件の違いが、加熱処理及び凍結処理のストレスを与えた 5 種類の菌に対して与える影響を評価した。その測定結果は、30°C、72 時間培養で高くなる傾向(グラフ 1、2)があったが、全ての測定値において 1Log CFU/g の範囲内 (表 1、2) であり、極端な相違は認められなかった。*Bacillus subtilis* では、30°C、72 時間培養が最も高くない測定値となったのは、発育してくるコロニーが大きく、培養時間の経過により近隣のコロニーと重なりあったためである。

培養条件による 5 種類の菌の測定値 (対数) の差は、ストレス処理を行い培養時間が短いほど差を生じた。

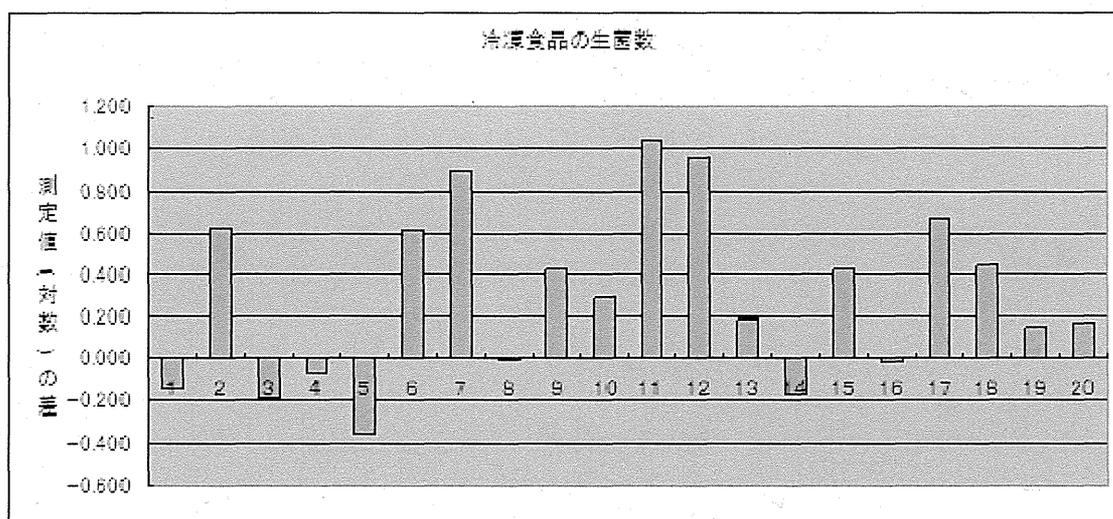
ストレス処理 (凍結) と従来法で培養時間が短い成分規格 (35°C、24 時間) の対象食品として「冷凍食品」があげられる。「冷凍食品」において ISO 法の培養条件 (30°C、72 時間) にて生菌数を測定した場合は、その測定値は概ね高くなることが推測された。

「冷凍食品」20 検体を「冷凍食品の成分規格」の方法および ISO 法で測定した過去の結果では、20 検体において 1Log CFU/g の範囲を超えたのは 1 検体のみ（グラフ 4）であり、極端な相違はなかった。また 13 検体において ISO 法の測定値が高かった。さらに「冷凍食品の成分規格」の方法は、ISO 法と使用する希釈水の種類の違うこと、および食品マトリックスの存在など培養条件以外にも測定値に影響を及ぼす要因がある。（表 3）

ISO 法測定値が、従来法より高くなるのは、低い温度で長い時間培養することで損傷菌の回復に働く可能性が示唆された。

表 3 培養温度と培養時間

試験法	希釈水	培養温度	培養時間
標準寒天平板培養法 （食品衛生検査指針 2004）	0.1%ペプトン加 生理食塩水	35±1℃	48±3 時間
冷凍食品の成分規格	リン酸緩衝液	35±1℃	24±2 時間
氷菓の成分規格	生理食塩水	35±1℃	48±3 時間
乳及び乳製品の成分規格	生理食塩水	32～35℃	48±3 時間
ISO 4833:2003	0.1%ペプトン加 生理食塩水	30±1℃	72±3 時間



グラフ 4 冷凍食品の測定値の差 (ISO 法－冷凍食品の成分規格) (対数)

以上

別紙：測定結果一覧

1) 加熱処理

No.	菌種	従来法(35°C24 時間培養)		従来法(35°C48 時間培養)		ISO 法(30°C72 時間培養)		測定値の差 ① (c)-(a)	測定値の差 ② (c)-(b)
		菌数 (CFU/g)	菌数(a) (log ₁₀ CFU/ g)	菌数 (CFU/g)	菌数(b) (log ₁₀ CFU/ g)	菌数 (CFU/g)	菌数(c) (log ₁₀ CFU/ g)		
1	<i>Bacillus subtilis</i>	818	2.913	932	2.969	809	2.908	-0.005	-0.061
2	<i>Bacillus subtilis</i>	941	2.974	964	2.984	1009	3.004	0.030	0.020
3	<i>Bacillus subtilis</i>	955	2.980	1091	3.038	1118	3.048	0.068	0.011
4	<i>Citorobacter freundii</i>	29050	4.463	35500	4.550	37900	4.579	0.115	0.028
5	<i>Citorobacter freundii</i>	24400	4.387	30950	4.491	35300	4.548	0.160	0.057
6	<i>Citorobacter freundii</i>	21650	4.335	25900	4.413	35050	4.545	0.209	0.131
7	<i>Listera inncua</i>	63500	4.803	64500	4.810	73000	4.863	0.061	0.054
8	<i>Listera inncua</i>	57500	4.760	68000	4.833	79000	4.898	0.138	0.065
9	<i>Listera inncua</i>	73500	4.866	75500	4.878	86500	4.937	0.071	0.059
10	<i>Pseudmonas aeruginosa</i>	19850	4.298	26250	4.419	27550	4.440	0.142	0.021
11	<i>Pseudmonas aeruginosa</i>	19100	4.281	24050	4.381	26500	4.423	0.142	0.042
12	<i>Pseudmonas aeruginosa</i>	19550	4.291	24900	4.396	30050	4.478	0.187	0.082
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6045	3.781	6864	3.837	6955	3.842	0.061	0.006
14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6227	3.794	6545	3.816	8909	3.950	0.156	0.134
15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6136	3.788	6409	3.807	8364	3.922	0.135	0.116

2) 凍結処理

No.	菌種	従来法(35°C24 時間培養)		従来法(35°C48 時間培養)		ISO 法(30°C72 時間培養)		測定値の差 ① (c)-(a)	測定値の差 ② (c)-(b)
		菌数 (CFU/g)	菌数(a) (log ₁₀ CFU/ g)	菌数 (CFU/g)	菌数(b) (log ₁₀ CFU/ g)	菌数 (CFU/g)	菌数(c) (log ₁₀ CFU/ g)		
16	<i>Bacillus subtilis</i>	146	2.164	214	2.330	195	2.290	0.126	-0.040
17	<i>Bacillus subtilis</i>	105	2.021	165	2.217	155	2.190	0.169	-0.027
18	<i>Bacillus subtilis</i>	115	2.061	179	2.253	178	2.250	0.190	-0.002
19	<i>Citrobacter freundii</i>	1182	3.073	1754	3.244	2222	3.347	0.274	0.103
20	<i>Citrobacter freundii</i>	1009	3.004	1500	3.176	1577	3.198	0.194	0.022
21	<i>Citrobacter freundii</i>	1305	3.116	1754	3.244	1923	3.284	0.168	0.040
22	<i>Listera innocua</i>	15000	4.176	18227	4.261	18727	4.272	0.096	0.012
23	<i>Listera innocua</i>	15410	4.188	17772	4.250	19955	4.300	0.112	0.050
24	<i>Listera innocua</i>	14818	4.171	18181	4.260	20364	4.309	0.138	0.049
25	<i>Pseudmonas aeruginosa</i>	936	2.971	1263	3.101	1605	3.205	0.234	0.104
26	<i>Pseudmonas aeruginosa</i>	1555	3.192	1886	3.276	2191	3.341	0.149	0.065
27	<i>Pseudmonas aeruginosa</i>	1114	3.047	1568	3.195	1914	3.282	0.235	0.087
28	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2455	3.390	3636	3.561	3955	3.597	0.207	0.037
29	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1032	3.014	1586	3.200	1941	3.288	0.274	0.088
30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2259	3.354	3954	3.597	4500	3.653	0.299	0.056

3) ストレス処理なし

No.	菌種	従来法(35°C24 時間培養)		従来法(35°C48 時間培養)		ISO 法(30°C72 時間培養)		測定値の差 ① (c)-(a)	測定値の差 ② (c)-(b)
		菌数 (CFU/g)	菌数(a) (log ₁₀ CFU/ g)	菌数 (CFU/g)	菌数(b) (log ₁₀ CFU/ g)	菌数 (CFU/g)	菌数(c) (log ₁₀ CFU/ g)		
31	<i>Bacillus subtilis</i>	1336	3.126	1459	3.164	1483	3.171	0.045	0.007
32	<i>Citrobacter freundii</i>	90500	4.957	101000	5.004	114000	5.057	0.100	0.053
33	<i>Listera innocua</i>	135000	5.130	150000	5.176	189500	5.278	0.147	0.102
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96500	4.985	130000	5.114	125500	5.099	0.114	-0.015
35	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12409	4.094	13818	4.140	14045	4.148	0.054	0.007

4) 冷凍食品

No.	冷凍食品品名	従来法(35°C24 時間培養)		ISO 法(30°C72 時間培養)		測定値の差 ① (c)-(a)
		菌数 (CFU/g)	菌数(a) (log ₁₀ CFU/ g)	菌数 (CFU/g)	菌数(c) (log ₁₀ CFU/ g)	
36	グリーンピース	13200	4.121	9500	3.978	-0.143
37	鮭フレーク	5800	3.763	24681	4.392	0.629
38	ベビーほたて	800	2.903	515	2.712	-0.191
39	枝豆	650	2.813	555	2.744	-0.069
40	いんげん	1800	3.255	800	2.903	-0.352

41	シーフードミックス	96000	4.982	400000	5.602	0.620
42	冷凍ほうれん草	3950	3.597	30600	4.486	0.889
43	冷凍ごぼう	2550	3.407	2500	3.398	-0.009
44	エビフライ	5950	3.775	15681	4.195	0.421
45	まぐろオニオンフライ	43500	4.638	85000	4.929	0.291
46	パエリア	202500	5.306	2205000	6.343	1.037
47	ハウレンソウ	30200	4.480	273636	5.437	0.957
48	卵の花	1000	3.000	1527	3.184	0.184
49	エビフライ	35500	4.550	24000	4.380	-0.170
50	むきエビ IQF	25550	4.407	67000	4.826	0.419
51	むきエビ IQF	12900	4.111	12409	4.094	-0.017
52	ロブスターむき身	252000	5.401	1160000	6.064	0.663
53	さば切り身	23600	4.373	64500	4.810	0.437
54	むき枝豆	1760000	6.246	2505000	6.399	0.153
55	豆腐皮	1315000	6.119	1955000	6.291	0.172

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分担研究
報告書

試験法の妥当性評価に関する研究

研究代表者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部長
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学研究院 特任教授

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意見を述べた。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。

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。さらに食品添加の実例として、サルモネラ生菌 1 細胞を食肉及びエビに添加し、標準試験法で検出できることが示した。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。

A. 研究目的

我国から発信する微生物試験法を国際的に通用するものにするには、国際的に認証されたスキームによって妥当性確認（バリデーション）しなければならない。一方、バリデーションされた試験法を事業者等が導入する際には、それが確実に実施できることを検証（ベリフィケーション）しなければならない。いずれの場合も、基本となるのは国際的に認証されたスキームである。従来から、そのモデルとして AOAC: 2012.2 版ガイドライン、ISO16140: 2003 等を精査してきたが、その最新改訂動向を反映させた最新版ガイドライン案を、昨年度の報告書としてまとめた。同報告書では、実施に際しての懸案事項を併記した。本年度は、この懸案事項について議論し、通知文書として公開するために残された課題を整理することとした。これが第一の目的である。

一方、妥当性確認においては、従来から、生菌標準物質が限られた少数菌株についてしか得られないことがボトルネックとなっていた。昨年度はその問題の解

決に向けた大きな成果を挙げ、論文投稿と国際会議でのサイエンス・セッションの企画提案を行ったが、本年度は、その両者の実現を目指すこととした。これが第二の目的である。特に、当該の方法論で、食品マトリクス中に、たった一個の生菌しか含まれていない標準汚染食品が調整できること、またそれを用いたバリデーションができること、具体的にサルモネラについて実証することとした。

B. 研究方法

(1) バリデーション・ガイドラインを通知文書として公開する際の懸案事項に関する議論

昨年度、ガイドライン案をまとめるのに際して、2012 年 2 月に公開された AOAC のガイドラインと ISO16140: 2003 の内容に異なる点があること、その理由が必ずしも明確ではないこと、したがって、単に国際動向に従うのみではなく、自ら合理的と思われる考え方を示し、国内外に発信していくことが重要と提起し