

201522018A

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27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28(2016)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27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28(2016)年3月

目 次

I. 平成 27 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、上村真理子、吉川夏未	
2. <i>Yersinia</i> の標準試験法に関する研究	47
岡田由美子、百瀬愛佳、吉田麻利江、下島優香子、井田美樹、福井理恵	
3. 衛生指標菌試験法に関する研究	55
伊豫田淳、五十君静信、齋藤利江、吉田信一郎	
(一財) 日本食品分析センター	
(一財) 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. 食中毒毒素試験法の検討:	
セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法の検討	109
鎌田洋一、白藤由紀子、松田りえ子、森曜子	
藤田和弘、福沢栄太、後藤浩文、齋藤利江	
(一財) 日本冷凍食品検査協会、(一財) 日本食品分析センター	

平成 27 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 ISO 法などと互換性のある妥当性確認されていると認められ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策定を進めた。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、平成 26 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 年目の平成 28 年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 27 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、作業部会案の検討及びコラボ案の検討（ステージ 2～3）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、関連用語の整理、集落計数法、妥当性確認の方法について検討を進めた。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も、定性試験法策定に協力した。

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、コラボスタディの規模、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ついても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、プロトコー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。H27年度の試験法の策定は、作業部会案の検討及びコラボ案の検討(ステージ2～3)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。試験法プロトコールの作成は、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、(一財)食品分析センター、(一財)日本冷凍食品検査センターが協力)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ール案は、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。H27年度に、ステージ2～3まで進めた。

これに対応し“標準試験法検討委員会”はH27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19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。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、19名の専門家委員と2名の行政官で構成した。平成27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。国際的に互換性のあるセレウス菌試験法としてISO 7932:2004を基礎とする標準試験法案を作成した。さらに日本で入手可能な*B. cereus*の選択培地について、供試菌株42菌株を用いて選択培地の有効性並びに評価を行った。その結果、*B. cereus* 選択培地間には、*B. thuringiensis* 除き、他の供試菌株と*B. cereus*と明確な判別が可能なことから良好な選択性を有した。さらに検出菌数についても各選択培地間に有意な差は認められなかった。これらの培地は特徴を理解して使用することにより*B. cereus*を有効に検出できるものと推察された。

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。国際的標準試験法と互換性のある食品からの*Yersinia*試験法として、昨年度の検討で最も所要時間が短かったISO 10273:2003を基礎とした標準試験法案を作成・検討することとしたが、今年度の検討により、ISO法では夾雑菌の多い豚ひき肉検体においても、豚ひき肉に比べ夾雑菌が少ない豚タン検体においても、添加回収試験による添加菌の回収が困難であった。研究協力機関による検討から、PMPブロスを用いて4℃で培養する*Y. pseudotuberculosis*の試験法としてBAMに記されている方法(2004年版食品衛生検査指針にも記されている方法)が最も分離率が優れていたため、本試験法でステージ2案を作成することとなった。選択分離培地としては、CIN培地或いはIN培地とCHROMagar*Y. enterocolitica*の併用が、現時点で最も本菌の分離がしやすいと思われた。

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、一般生菌数と、大腸菌群、腸内細菌科菌群などを対象として、市販食品について国内の従来法と比較する検討を行った。ISO試験法と国内の従来法について、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。オランダで開催された ISO TC34/SC9 に参加し、ISO 策定の議論に加わった。また、米国で開催された AOAC INTERNATIONAL の年次大会に参加した。

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. H. Ogawa, S. Nasu, M. Takeshige, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. Sci. Rep., 5:10061 (2015) doi:10.1038/srep10061

2. 松岡英明、斉藤美佳子：微生物試験迅速法におけるバリデーションの課題。日本防菌防黴学会誌、43(8)、361-367 (2015)。
3. 松岡英明：日本セクションとは？～AOACI 日本セクションの設立経緯と役割～。月刊フードケミカル、(11) 96-101 (2015)。
4. 五十君静信。食品企業が信頼される微生物検査体制を構築するために、どのような試験法を選択したらよいか。月刊 HACCP2015 年 6 月号：20-25 (2015.6)
5. 五十君静信。食品の微生物基準に示された *Listeria monocytogenes* 試験法。月刊フードケミカル。371 巻 2016 年 3 月号：82-84
6. 五十君静信。サルモネラ属菌および黄色ブドウ球菌試験法の改正について—その背景にある国際整合性—。食品衛生研究。印刷中

学会発表

1. 松岡英明：微生物試験迅速法におけるバリデーションとデファクトスタンダードの課題：日本防菌防黴学会女性研究者の会、第 14 回学術講演会、東京 (2015.4.23)。
2. 五十君静信。リステリアの新しい基準の検査とその試験法について。食の安全を確保するための微生物検査協議会。2015.6.3. 中央区
3. 橘理人、吉村昌徳、山本詩織、春日文子、五十君静信、朝倉宏。衛生規範改正前後における市販浅漬け製品の指標菌数ならびに菌叢動態に関する比較検討。防菌防黴学会。2015.9.1-2。大阪
4. 須田貴之、吉村昌徳、有路由佳、橘理人、小西良子、春日文子、五十君静信、朝倉宏。充填豆腐製品における微生物汚染実態と保存試験を通じた芽胞菌の挙動に関する検討。日本

防菌防黴学会第42回年次大会。
(27年9月, 大阪)

5. 斉藤美佳子、吉田智紀、高谷周督、小川廣幸、松岡英明：浸透圧ストレスによって調製した傷害菌モデルの性質。第42回日本防菌防黴学会年次大会、大阪(2015.9.2)。
6. 小川廣幸、松岡英明、斉藤美佳子：タイムラプス影像解析法による寒天培地の性能評価。第42回日本防菌防黴学会年次大会、大阪(2015.9.2)。
7. H. Matsuoka: Key Technology for a More Rational Validation – Standard Material of Viable Microbial cells (SMVM) –. 1st Asia Pacific Food Microbiology Advisory Board Meeting, December 2-3, 2015, Seoul, Korea

講演・研修会等

1. 五十君静信。リステリアの規格基準設定と試験法について。平成27年度食品安全行政講習会。2015.5.21. 厚労省講堂
2. 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27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
	上村真理子	日本大学 生物資源科学部
	吉川夏未	日本大学 生物資源科学部

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
	福井理恵	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

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
	内田 和之	シスメックス・バイオメリユ株式会社
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	吉村 昌徳	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	須田 貴之	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	安河内 彩	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	森 篤志	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
	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	吉原 尚喜	厚生労働省・基準審査課
	井河 和仁	厚生労働省・基準審査課
	梅田 浩史	厚生労働省・監視安全課

平成 27 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 53 回検討委員会： 2015 年 5 月 26 日開催

第 54 回検討委員会： 2015 年 7 月 14 日開催

第 55 回検討委員会： 2015 年 10 月 6 日開催

第 56 回検討委員会： 2015 年 12 月 8 日開催

第 57 回検討委員会： 2016 年 2 月 3 日開催

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 53 回議事録概要

2015 年 5 月 26 日開催

委員長より挨拶。

2. 配布資料と第 52 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 52 回議事録概要案の確認を行い、3 箇所が修正された。委員名の誤記の訂正と、「有益微生物」を「生物農薬等の有益微生物」に修正し、「ISO の原文では 140mm シャーレ…、日本では一般的に 90mm シャーレを…」について、それぞれ「直径」を加筆することとした。

ウェルシュ菌試験法定量法について (ST4)

3. 伊藤委員より、ウェルシュ菌試験法：定量法 ST4 案について説明があった。
4. ST4 案は前回の検討委員会で指摘を受けた点を修正した。今回は最終ステージ案となるため、詳細な部分まで確認する。
5. 事務局より、全般的な章立てを ISO の形式に準じたものに統一する旨が提案され、了承を得た。初めに対象菌の定義を記載し、次に試験方法概要等を記載する。それに伴い、試験方法概要に相当する追加情報を、伊藤委員に提出してもらうこととなった。
6. 試験本文中の温度に関する記載は、ふ卵器のスペックとして「 $0^{\circ}\text{C}\pm 0^{\circ}\text{C}$ 」と記述し、以降は「 0°C 」と統一する。
7. 図 1 の「検体 25 g」を「検体 X g」に修正する。また、「0.1 %ペプトン加生理食塩水 225 mL」を「0.1 %ペプトン加生理食塩水 $9\times X$ mL」に修正する。
8. 培地のメーカー名に関して、本文中に記載すると必ずそのメーカーの培地を使用しなければならないと誤って認識される恐れがある。そのため、選択分離培地までは、ISO 法で示されている標準的な組成を示し、酵素基質培地の場合はメーカーによって組成を公表していないものがあるため例外としてきた。これに従い、本試験法の 3. 分離培養寒天培地について、ISO の標準的な組成をそのまま示すこととし、メーカー名を削除する。
9. TSC 寒天培地ではなく、ISO 法の SC 寒天培地の組成を示すこととし、ラブ・レムコ末を削除する。なお、SC 培地とほぼ同じ組成である TSC 培地で検証した結果、同等である旨の記述を加える。
10. トリプトンやペプトンについて、ISO 法ではカゼインの酵素消化物と記載されている。本試験法については、ISO 法に従って検証した培地での代替が可能である旨の記載をする。
11. 培地の同等性は、検証した結果を示す必要がある。しかし、その評価方法や品質保証に関してガイドラインがないため、現状では各メーカーの判断による。今後、培地の同等性の評価・品質保証について、検討を行う必要があるかもしれない。
12. 章立て及び培地等の表記に関しては、事務局で ISO の形式に準じたものに統一した後、各委員に確認をお願いする。

セレウス菌セレウリド試験法 (NIHSJ-26-ST3) の現状と対策

- 1 3. 鎌田委員が欠席のため、五十君委員長よりセレウス菌セレウリド試験法の現状とその対策について説明があった。
- 1 4. 前回の段階では、食品添加回収試験により、バラつきが大きく回収率が悪いという検討結果となった。また、クリーンアップ用のカラムの目詰まりも認められた。
- 1 5. 今後も、試験方法の検討が必要であると考えられるため、より安定したデータが得られた後に委員会にて検討を行いたい。
- 1 6. 森委員より、検量線の直線性があるにもかかわらずデータのバラつきが大きいということは、食品中のマトリクスが問題であると指摘された。松田先生からも同様のコメントが寄せられた。シングル MS では、試料の特性によっては目的の物質とマトリクスのピークが重なってしまうことがある。このため、シングル MS では検討が難しくなる。現在はシングル MS ではなく、MS/MS が主流であることから、どちらを用いるか、今後の方向性を検討すべきである。
- 1 7. 食品分析センターと冷凍食品検査協会による検討では MS/MS を使用していたが、試験成績が良好ではなかった。精製の段階で問題があったためと考えられる。
- 1 8. 食品製造の現場における衛生管理を目的とするのか、それとも食中毒発生時の原因究明を目的とするのか、本試験法の用途や目的を明らかにすべきとの意見が出た。前者では低濃度、後者では高濃度であることが予測されるため、その違いにより使用する機器や方法も異なってくる。
- 1 9. 機器分析に執着せずに、イムノアッセイ等、他の方法での検討も視野に入れるべきかもしれない。
- 2 0. 本試験法に関して、もし解決が難しいようであれば、ST2（作業部会案に戻って再検討する必要があると指摘された。
- 2 1. ISO には、標準試験法の他に、Technical Specification (TS) のステータスの試験法があり、セレウリド試験法を TS 扱いとするか議論してはどうかと提案された。
- 2 2. TS については、標準試験法となりにくいこと、またステータスを増やすのも混乱のもととなる可能性を考慮し、まだ避けるべきとの意見が出た。TS 扱いの試験法については課題として残しておくのは良いが、検討委員会の方針からは外れるとの意見も出た。

食品からの微生物標準試験法作成方針の修正について

- 2 3. 五十君委員長より、試験法検討案作成方針の改正について説明があった。
- 2 4. これまで改訂していなかったため、一度、作成方針の見直しを行いたい。ただし、内容に大幅な変更を加えるのではなく、語句を修正する程度である。
- 2 5. 「標準試験法」について、はじめに「食品からの微生物標準試験法 (NIHSJ 法)」と記述して、その後は「NIHSJ 法」と記述する。
- 2 6. 「細菌」は、「微生物」に変更する。
- 2 7. 食品衛生検査指針については 2015 年版が発刊されたが、「2004 年改訂」から「2015 年版」に変更すると「厚生労働省監修」という点で不都合が生じてしまう。そのため、「2004 年改訂の……という指針を示しているにすぎなかった。」に訂正する。

28. 検査指針に示されている方法を公定法と間違って認識している方が多いため、これらを整理したほうがよい。
29. コラボスタディの参加資格について何か基準があるかとの質問が出た。今までの検討では、作業部会に5~6ヶ所の機関が加わっており、それらと合わせて約15ヶ所が公募により参加しており、技術的に問題となることはなかった。また、該当組織が少ないため、選抜を行う必要がないと判断している。強いて言えば、菌株移送の際、航空便を使用せずに実施可能である機関が望ましいという側面があるかもしれない。
30. 「告示および通知法の…それを含めた食品に係わる微生物試験法が科学的根拠に基づき、国際整合性のある妥当性確認された標準試験法に改めて策定されることが急務である。」に変更する。
31. 以上の内容を反映し、web上も更新を行うことにした。

検討済み試験法の温度表示の修正について

32. 五十君委員長より、検討済み試験法の温度表示について説明があった。
33. 試験法本文中の温度に関する部分で、「 $^{\circ}\text{C}\pm^{\circ}\text{C}$ 」という記述を残している部分がある。ふ卵器のスペックに関しては別途記載があるため、本文中からは±以降を省略する。
34. 腸炎ビブリオ試験法(NIHSJ-07)について、 35°C を 37°C に修正する。最終案は、甲斐委員が現在作成中である。
35. リステリアの集落計数法について、今回提出された資料では「 $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 」と記述されているが、ISO原文では「 $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 」であるため、ISO原文に従いこのままとする。
36. ふ卵器のスペックの記述方法については、「 $0\pm 0^{\circ}\text{C}$ 」ではなく「 $0^{\circ}\text{C}\pm 0^{\circ}\text{C}$ 」という形式に統一する。また、%や時間などの単位については、数字とセットにするのが国際標準となっているため、同様に修正をする。
37. 以上について、本日付で該当する試験法の記載を統一して修正する。

各作業部会の進行状況

38. 松岡委員より、バリデーション作業部会の進行状況の説明があった。
39. 集落計数法について、現在ISO 7218のリバイスが進められているため、その動向に応じて検討を進めていく。
40. バリデーションガイドラインの原案が、2年前の報告書に提出されている。なお、web上では公開されておらず、公開には修正が必要である。このガイドライン原案はAOACバリデーションガイドラインとISO 16140が混合して作成されているため、ISO 16140を原案としたほうが良いのではないかと考えている。修正後、原案として再提出し、検討を行う。
41. 用語集について、検討委員会以外で既に出版されているものがあるため、これに関する情報を収集し、まとめていく予定である。
42. バリデートされた迅速検査法のリストについては、食品衛生検査指針に記載されて

いるが、web 上でも担当者が随時アップデートしていくこととする。

事務連絡その他

- 4 3. 今回は年度当初のため、交通費は次回にまとめて精算させていただきます。
- 4 4. 次回の検討委員会は、7月14日に開催予定です。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 54 回議事録概要

2015 年 7 月 14 日開催

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 53 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 53 回議事録概要案の確認を行い、3箇所が修正された。「…検量線でバラつきが大きいということは、…」を「…検量線の直線性があるにも関わらず、データのバラつきが大きいということは、…」に修正、「…ST2（作業部会案に戻って…）」を「…ST2（作業部会案）に戻って…」に修正、「…ISO 原文の機械のスペックでは…」を「…ISO 原文では…」に修正した。
3. 第 53 回議事録概要案の修正・確認について、国衛研のサーバーが復旧次第、再度行う。
4. 検討済み試験法の表記の修正について、前回の検討委員会付で修正としたが、本日付に変更する。すなわち、37. 「…、本日付で…」を「…、次回検討委員会の日付で…」に訂正する。

セレウス菌セレウリド試験法について (NIHSJ-26-ST3)

5. 鎌田委員より、セレウス菌セレウリド試験法の ST3 案の説明があった。
6. シングル MS でのセレウリドの検量線の検討を実施した結果、検量線は問題無いものが得られたと考えられた。
7. 検量線が原点を通っていない。この点については、アセトニトリル等他の溶媒も検討してみてもとの意見が出た。
8. 予備実験で、抽出条件とカラムの検討としてセレウリド添加パックライスを試料 (n=10) としたところ、回収率は 81~90%程度と良好であった。しかし、他機関における検討結果ではバラつきが見られた。
9. 問題点として、回収率のバラつきが大きいこと、カラムの目詰まり等が挙げられた。
10. メタノールを用いた抽出を行った際、検体試料の米の成分がメタノールの方に溶出していた。この成分をガラス繊維ろ紙で取り除こうとしたが、改善は認められなかった。
11. カラムのメタノール濃度が 50%であり、試料の濃度が同程度でなければカラムが平衡化されないことから、カラムの目詰まりが起こったと考えられる。
12. LC での問題点であるのか、または MS に原因があるのかは不明である。
13. 問題点がマトリクスによる影響なのか吸着に関する点なのか、出てきたデータのみでの判断は難しい。今後、専門分野の方に見てもらうべきであるとの意見が出た。なお、この点については、岩手県環境保健研究センターに相談を持ちかけるとのことであった。
14. 一番簡単な方法として、溶解液を希釈し、マトリクスの影響を小さくした検液で測定をしても良いのではないかと意見が出た。
15. 詳細な部分については、まずは作業部会で検討を行い、その後、検討委員会で再検討する。

腸炎ビブリオ試験法について (NIHSJ-06-ST4、NIHSJ-07-ST4)

16. 甲斐委員より、腸炎ビブリオ試験法定性法および定量法の ST4 案について、説明があった。
17. 前回の検討委員会において、指摘を受けた箇所の修正を行った。また、「1. 試験法の概要」と「4. 試験手順」の内容が不一致であったため、修正した。さらに、記述形式を統一するため、事務局でも修正を行った。
18. 試験法の概要の「…オキシダーゼ試験、TSI 寒天、LIM 培地、耐塩性試験、VP 反応を行い、…」を「…生化学的性状試験を行い、…」に訂正する。
19. 2 %塩化ナトリウム加アルカリペプトン水の組成中の pH 表記について、pH 8.6~8.8 に統一する。また、pH 値の幅がある方が精度管理時に扱いやすいのではないかと意見が出たが、製品に記載されている pH 値を根拠としているため、変更は行わないこととした。
20. 選択分離培地と酵素基質培地を項目別に分けて記載していたが、どちらも選択分離培地であることから、以下の記載方法に変更する。なお、フローチャートの修正はしない。
 - (2) 選択分離培地
 - (ア) 以下の 2 種類の選択分離培地から…
 - ①TCBS 寒天培地
 - ②TSAT 寒天培地
 - (イ) 以下の 3 種類の酵素基質培地から…
 - ①クロモアガービブリオ
 - ②X-VP 寒天培地
 - ③ES ビブリオ寒天培地
21. 「(4) 確認培地」を「(3) 生化学的性状試験に用いる培地」、「②TSI 寒天による試験」を「②TSI 寒天」、「LIM 培地による試験」を「LIM 培地」に修正する。この項目では、培地組成のみを記述することとし、これらの培地を用いた試験手順については、「4. 試験手順」の項目に記述する。
22. 「モル」の表記について、「mol/L」と修正する。
23. 「…の塩化ナトリウム濃度は、1%に下げることがも可能である。」について、平成 13 年の通知では塩化ナトリウム濃度が 1%とされている。しかし、今回は 1%または 2%で選択可能とする。また、「…の塩化ナトリウム濃度は、2%を 1%に下げることがも可能である。」に訂正する。
24. 「①普通寒天斜面培地」の組成に、「精製水 1,000 mL」を追記する。
25. オキシダーゼ試験について、現段階の通知法案に記載されていないが、ISO 法では記載されている。したがって、NIHSJ 法でも記載することとする。
26. 「なお、本試験で示した TCBS 寒天と同等以上の性能が確認された TCBS 寒天の市販品も使用可能である。また、TCBS 寒天と同等以上の性能が確認された…がある。」を「なお、本試験で示した TCBS 寒天と同等以上の性能が確認された市販品も使用可能

である。」に修正する。

27. 定性法で指摘された点は、定量法でも同様に変更する。
28. 腸炎ビブリオと推定される定型集落の特徴を、同定に関する記述に追記する(定性法も同様)。
29. 「…TCBS 寒天、TSAT 寒天、または酵素基質培地に塗抹し、…」を「…TCBS 寒天、TSAT 寒天、または酵素基質培地のうちの 1 種類に塗抹し、…」に訂正する。
30. フローチャート中の「残りを 37°C±1°C, …」を「残りを 37°C, …」に訂正する。また、「…選択分離培地(TCBS 寒天または TSAT 寒天)、または酵素基質培地に塗抹し…」を「…選択分離培地(TCBS 寒天または TSAT 寒天、または酵素基質培地)に塗抹し…」に訂正する。
31. フローチャート中の検査材料の重量の表記は、「mL」は記述せず、「g」のみとする(定性法も同様)。また、定性法では「試料」、定量法では「検査材料」となっているため、記述を統一する。
32. 最確数表の注「C…検体の 10 倍希釈液を…」を「C…検体の 100 倍希釈液を…」に訂正する。

ウェルシュ菌試験法：定性法について (NIHSJ-29-ST1)

33. 伊藤委員より、ウェルシュ菌試験法：定性法の ST1 案の説明があった。
34. 「培養：37°C、18±2 時間嫌気培養」を「培養：37°C、18 時間±2 時間 好気培養」に訂正する。
35. 惣菜類・野菜類ではいずれの培地でもウェルシュ菌の定型集落が確認できた。しかし、肉類(牛挽肉)ではクロモアガーにおいてウェルシュ菌以外の細菌の発育が多数見られたためウェルシュ菌の定型集落の確認が困難であったため、卵黄加 TSC 培地の使用が適当であると考えられた。
36. 分離用寒天培地について、ISO や BAM ではサイクロセリンを選択剤とした TSC 寒天培地が主流であるが、国内ではカナマイシン加 CW 寒天培地が用いられている。しかし、カナマイシン感受性ウェルシュ菌が原因の食中毒事例も報告されている。このことから、選択剤としてサイクロセリンを用いた卵黄加 CW 寒天培地の検討を行っている。
37. サイクロセリン加卵黄 CW 寒天培地の検討の結果、サイクロセリン濃度 400mg/L の培地では、ウェルシュ菌の生育が極めて悪く、原因として、サイクロセリンによる損傷が検鏡による観察から考えられた。そこで、サイクロセリン添加量と発育促進剤の添加の検討を行ったところサイクロセリン濃度 100mg/L+発育促進剤添加の培地ではウェルシュ菌の発育が良好であった一方で、夾雑菌の発育も認められ、サイクロセリン濃度 200mg/L+発育促進剤添加の培地では、ウェルシュ菌の発育が良好であり、かつ夾雑菌の発育が見られなかった。このことからウェルシュ菌の発育及び夾雑菌の抑制に効果的であるのはサイクロセリン濃度 200mg/L+発育促進剤添加の条件であると考えられた。
38. 次の検討として、サイクロセリン加卵黄 CW 寒天培地を用いた芽胞菌添加回収試験を