

平成 28 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 東京農業大学 応用生物科学部

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、3年目の平成 28 年にはコラボ案作成及び最終試験法の検討（ステージ 3～4）、標準試験法とした。

平成 28 年度は、セレウス菌試験法(NIHSJ-28)、エルシニア試験法(NIHSJ-27、NIHSJ30TS)、セレウリド試験法(NIHSJ-26TS)について、コラボ案及び最終案の検討（ステージ 3～4）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、標準試験法の妥当性確認ガイドライン案を標準試験法検討委員会で検討した。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(NIHSJ-29)についても、定性試験法策定を行った。

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。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。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も検討を行う。

## 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た。

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。H28年度の試験法の策定は、作業部会案の検討及び最終試験法の検討（ステージ3～4）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。H28年度に、ステージ4まで進めた。

これに対応し“標準試験法検討委員会”はH28年度に6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28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、定性法について作業部会案からコラボ案作成（ステージ3）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、標準試験法のバリデーショングイドライン案を作成した。

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28年度6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。

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(NIHSJ-28)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る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、ISO 10273とハーモナイズした定性法(NIHSJ-27)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、研究協力機関による検討から、PMPブross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、NIHSJ-30TSとして推奨試験法を策定した。

衛生指標菌作業部会（伊豫田担当）では、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の検討を行った。ISO試験法と国内の従来法について、バリデーショ作業部会と合同で検討を進めた。

バリデーショ作業部会（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が改訂されたことから、その和訳を作成し分析した。ウェルシュ菌標準試験法の評価を行い、NIHSJ-29をステージ3とした。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、標準試験法のバリデーショングイドライン案を作成した。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。パリで開催された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 (NIHSJ-28)、エルシニア (NIHSJ-27、NIHSJ-30TS)、ウェルシュ菌試験法 (NIHSJ-29-ST3) 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

なし

学会発表

1. 荻原博和, 上村真理子, 吉川夏未, 岡田由美子。 *Bacillus cereus* の選択培地における比較検討。日本食品衛生学会第112回 日本食品衛生学会学術講演会。平成28年10月(北海道函館市)
2. 斉藤美佳子、高谷周督、五十君静信、松岡英明：生菌標準物質をオフサイトで利用するための一時保存法。第43回日本防菌防黴学会年次大会、東京(2016.9.26)

書籍

1. 食品衛生検査指針 微生物編 2015。公益社団法人日本食品衛生協会

講演・研修会等

- 五十君静信。食品の微生物試験法の標準化。JASIS セミナー 2015.9.4 幕張メッセ
- 五十君静信。食品衛生検査指針 微生物編改定と今後の工程管理に適した試験法の選び方。食品開発記念セミナー 2015.10.8 東京ビックサイト
- 五十君静信。2015年に改訂された食品衛生検査指針の方向性と HACCP 義務化へ向けての検査体制の考え方。日水 2015年度食品衛生検査セミナー。2015.10.9 東京

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

