

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 58 回議事録概要

平成 27 年 6 月 8 日開催

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 57 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 57 回議事録概要案の確認を行った。

セレウス菌試験法・定量法：集落計数法について (NIHSJ-28-ST2)

3. 荻原委員より、セレウス菌試験法の ST2 案の説明があった。
4. 前回は MYP 寒天培地以外の選択培地による比較検討を行い、その結果に基づいて ST2 の文章及びフローチャートを作成した。
5. 「セレウス菌試験法・集落計数法」を「セレウス菌試験法・定量法：集落計数法」に訂正する。
6. 定義に関する文章を追記することとした。
7. ISO 法原案では、試料原液 0.1 mL を MYP 寒天培地 2 枚に塗抹するが、試料中の菌数が低いことが予測される場合は試料原液 1 mL を MYP 寒天培地 3 枚に塗抹すると記述されている。これは、推測される試料原液中の汚染菌量により、どちらかの方法を選択するということであるため、本文を「試験目的に合わせて検体の状態からどちらか一方の方法を選択する」旨の記述に変更する。
8. セレウス菌数の算定について、塗抹量 0.1 mL と 1 mL の場合で表現方法が変わってしまうため、液体試料と固体試料の場合で別々に記述することとする。また、その結果の記載方法、1g あたりの菌量（検出されない場合）についても、再度確認を行う。
9. これまでの試験法と、記述様式を統一させる。
10. 今回議論された内容を反映して修正し、ST2 案とする。

クロノバクター属菌試験法定性法について (NIHSJ-22-ST4)

11. 岡田委員より、クロノバクター試験法定性法の ST4 案の説明があった。
12. ISO 22964:2006 は *Enterobacter sakazakii* によるものであるため、今回はエンテロバクター・サカザキの試験法を作成する。これに伴い、題名を「エンテロバクター・サカザキ試験法 定性試験法」に訂正し、*Cronobacter* spp. を全て *Enterobacter sakazakii* に修正する。定義についても、同様に修正する。
13. 本試験法は Standard ではなく technical specification とするため、NIHSJ-22 の後に何らかの記号を付記することとする。
14. 「生化学性状確認培地及び試薬」について、中試験管を小試験管に訂正し、培地量を 2 ~ 3 mL に変更する。
15. その他、文言の修正及びフローチャートの修正を行い、次回の検討委員会に提出する。

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

16. 甲斐委員より、腸炎ビブリオ試験法の ST4 案の説明があった。
17. 本試験法を通知法等とするかについては、今までの試験法よりも検出率が高く、結果に大きな差が出るのではないかという点が危惧されるため、そこを考慮しなければならない。
18. 定性法について、選択分離培地の培養時間は 16～18 時間としていたが、培地メーカーからの指摘に伴い、「TCBS 寒天培地では 16～18 時間、TSAT 寒天および酵素基質培地では 18～24 時間」に変更した。
19. 「酵素基質培地の組成について、培地メーカー名を削除した。
20. 文言の修正及びフローチャートの修正を行った。
21. 定義について、この試験法は ISO に準じていないにもかかわらず ISO で定義してよいのかという意見が出たため、「はじめに」の項目について「以下の試験法で同定されたものを腸炎ビブリオとする。」旨の記述に変更する。
22. 定量法についても、定性法と同様の修正を行った。
23. 試験法の概要について、「…無菌的にとりわけ、希釈水または 2%塩化ナトリウム含有…」に訂正した。

ウェルシュ菌試験法定性法について (NIHSJ-29-ST2)

24. 森哲也委員より、ウェルシュ菌試験法定性法の ST2 案の説明があった。
25. 試料の調整～選択分離試験について、作業部会で議論し合意を得られている。
26. 添加菌量の検討では、低菌量が 5 検体中 2～3 検体が陽性となり、添加回収には低菌量がちょうど良い結果であると考えられた。
27. 定義及び文言の修正を行った。
28. 添加菌数の調整が難しいのではないかとの意見が出たため、菌数の範囲をもう少し広げることとする。芽胞での検討を勧める意見も出たが、芽胞は菌株によるバラつきが大きくなるため、菌株が限定されてしまうのではないかと懸念された。作業部会で最適な方法を検討する。

その他

29. エルシニアについて、ISO 法の検討がうまくいかなかった点から、ステージ 1 に戻して BAM 法を中心に検討を行いたいと考えている。これについて取りまとめ、次回以降の検討委員会で提案する予定である。
30. セレウリドについて、別の機会に関係者の先生方と方向性を含めて打ち合わせをする予定である。その内容について、次回の検討委員会で報告する。
31. バリデーションガイドラインについて、ISO 16140 を中心に議論が行われており、こ

の内容を吟味して作業部会で検討した後、検討委員会に提案する予定である。

32. 衛生指標菌について、国内法と ISO 法で相関性が見られるが、一部で大きな差が認められる。これまでの内容をまとめ、検討する予定である。

事務連絡

33. ISO TC34/SC9 について、日本はオブザーバーから P メンバーという投票権を持つ立場に変わった。これに伴い、専門家のコメントをまとめるプールオブエキスパートを集める必要がある。また、来年の 6 月に日本で総会が行われるため、その準備委員会も立ち上げる必要がある。これらについて、検討委員会から何名か選出する。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 59 回議事録概要

平成 28 年 8 月 25 日開催

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 58 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 58 回議事録概要案の確認を行い、語尾の統一等文言の修正を行った。

ウエルシュ菌試験法・定性法について (NIHSJ-29-ST2)

3. 森哲也委員より、ウエルシュ菌試験法定性法の ST2 案の説明があった。
4. ウエルシュ菌定性試験法は ISO 法がないため、50%程度の検出感度となる菌量を用いた独自の試験法を作出する。作業部会における結果より、中菌量および低菌量を用いたコラボ案を作成することとなる。
5. 嫌気性菌であるウエルシュ菌において、ストマッカー処理時間 1 分は長いのではないかとの意見が出たが、定量法の場合は 1~2 分間と定めており、問題ないと考えられたが、作業部会で手もみ等での均一化とストマッカー1分による均一化の間で、検出率に差が生じるかを検討する。また、可能であれば、菌株による差についても検討する。
6. 培地組成の文言として、初めから含まれているものは「…含有…」、後から加えるものは「…加…」と統一する。
7. 次回は ST3 案として、予備実験で使った菌株を用いたミニコラボ案を企画・提案していただく。
8. ウエルシュ菌試験法は ISO のスタンダードがないため、Technical Specification (TS) として扱うこととする。

エルシニア試験法定性法 (NIHSJ-27-ST1 及び NIHSJ-30TS-ST1)

9. 岡田委員より、エルシニア試験法定性法の ST1 案の説明があった。
10. 作業部会において、国際的な試験法のうち最も培養時間が短い ISO 法を基とした試験法を NIHSJ-27 として作成することとなった。一方で、培養時間が長いものの分離成績が優れている検査指針の試験法 (BAM 法の *Yersinia pseudotuberculosis* の試験法と同様のもの) についても、Technical Specification として検討することとした。
11. 本試験法は Standard ではなく Technical specification とするため、NIHSJ-30 の後に TS 等の記号を付記することとする。
12. ISO 法は検査指針の方法に比べ培養温度が高いため、夾雑菌が増えてエルシニアの検出感度が下がると考えられる。ISO 法の検出限界値については、今後作業部会で検討する予定である。
13. エルシニア試験法について了承が得られたため、次回から、NIHSJ-27 は ST2 又は ST3

とし、NIHSJ-30TS はプロトコールを作成して ST2 とする。

セレウス菌試験法集落計数法について (NIHSJ-28-ST2)

14. 荻原委員より、セレウス菌試験法集落計数法の ST2 案の説明があった。
15. 文言の修正及び集落非形成の場合の表記について、訂正を行うこととした。
16. フロー図について、「試料液」という記述だと液体か固体か分からず混乱を生じる可能性があり、菌数の算定段階で誤解を生じる恐れもある。そのため、液体と固体を分けて記述する必要がある。
17. 黄色ブドウ球菌試験法と同様の形式で固体試料の場合の文章・フロー図を作成し、液体試料の場合を追記することとする。
18. 本試験法の培養温度は 30℃となっており、できれば 37℃で培養できないかとの意見が出たが、ISO 法で規定されている MYP 培地の培養温度が 30℃培養であるため、変更するのは難しい。
19. 今回提出されたプロトコールを修正し、それを基に作業部会で検証データを出すこととする。なお、フルコラボではなく、シングルラボで行う予定である。
20. セレウス菌試験法は集落計数法であるため、低菌量では検出できない可能性があり、添加菌量の設定に気を付けるべきである。適切な添加菌量を把握するため、定量限界を明らかにしたほうが良いとの意見と、使用培地の平板において実際にカウントしやすい集落数を調べたほうが良いのではとの意見が出た。

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

21. 甲斐委員より、腸炎ビブリオ試験法の ST4 案の説明があった。
22. 前回指摘された部分の修正を行うと共に、「4. 試験手順」中の「定型集落 5 個ずつ」を「定型集落 3 個ずつ」に訂正した。
23. 最終案として確認・承認されたため、今後 web 上にアップする。

食品微生物試験法バリデーションガイドラインについて

24. 松岡委員より、食品微生物試験法バリデーションガイドライン (案) の説明があった。
25. 6 月 15 日付で ISO 16140 が新しくなり、それと同時に、作業部会で翻訳を行った。今回、ISO 16140-2 について、その概要・目的と全体の流れ、そして全体の方針を決めるための議論を行いたい。
26. 項目毎に注釈をまとめており、注釈は用語の説明等となっている。
27. ISO 16140-1 は用語に関するものであり、今後、森曜子委員が担当して行う予定である。
28. 文言について、これまで検討した試験法と統一するようにすべきとの意見も出た。最終的に、細菌学会の用語集を中心に参考とし、その他検査指針や今までの試験法について

も参考とする。

29. バリデーションガイドラインの存在意義についての質疑があり、これに対して、「バリデーションガイドラインは NIHSJ 法を作るためのバリデート方法の軸となるもの」であり、web 上でもその旨の説明を加えることとする。

その他

30. 鎌田委員が欠席のため、五十君委員長より、セレウリドに関する進捗状況の報告があった。現在行われている検討の後、検討委員会で報告したいと考えている旨が説明された。

事務連絡

31. 次回の第 60 回検討委員会は、10 月 31 日に開催予定である。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 60 回議事抄録

平成 28 年 10 月 31 日（月）開催

はじめに

- ・五十君委員長より挨拶。

配布資料の確認・第 59 回議事抄録案及び読み上げによる議事録概要案の確認

- ・配布資料の確認、第 59 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 59 回議事録概要案の確認を行い、承認を得られた。
- ・これまで作成された試験法における言葉使いが統一されていないため、検討委員会で統一した用語のリスト集を作成してほしいとの意見が出た（用語集とは別となる）。この件は事務局が対応することとし、作業部会を通して今後の検討委員会に提出することとする。

ウエルシュ菌試験法・定性法について（NIHSJ-29-ST3）

- ・森哲也委員より、ウエルシュ菌試験法定性法の ST3 案の説明があった。
- ・前回の検討委員会において、嫌気性菌を対象としているのに 1 分間もストマッキングをして支障ないのかという議論が出たため、今回はストマッカー処理によるウエルシュ菌生残への影響について検討を行った。その結果、ストマッカー処理 30 秒又は 60 秒下における回収率はほぼ 9 割であり、作業部会ではストマッカー処理による影響はないと考えた。
- ・今回は培地のみでの検討であり、食品検体が含まれる時と状況が異なるのではとの意見が出た。食品からの検出効率を考慮して再度検討を行う旨の案も出たが、今回は添加菌が酸素に十分に暴露される状態においてのストマッカーによる影響を考察したデータとして取扱うことで、次に議論を進めることとした。
- ・ストマッカー処理時間について、この点はこれまでの試験法案では記述されていなかったが、今回は嫌気性菌ということを考慮した上で、1 分間と記述することとする。
- ・コラボ実施案の供試食品検体として五目煮を選択した理由について、ウエルシュ菌食中毒は調理済み食品から検出されることが多いため、当該食品を選択した旨の説明があった。しかし、含まれている食品種によって不均一になるのではないかと意見が出たため、実験としてよりシンプルなものに変更することとなった。
- ・検体の条件も安定させたほうが良いため、均一性を求めて、それに対応できるような食材を選ぶこととなった。この件について、ウエルシュ菌食中毒発生食材を順位づけして、そこから選択すべきとの意見が出た。食肉製品による発生が多いが、食肉は酸化還元電位を下げる効果がある。欧米と日本では発生食材に差が生じるため、国内の食品であったとしても、海外からも認識しやすい食品が望ましい。従って、シチュー当たりが妥当ではないかとの意見が出た。
- ・供試食品検体のみをコラボ施設へ送り、各施設で菌の接種を行ってもらう予定である旨が

説明された。この点について、安定化したデータを得るのは難しいかもしれないとの意見が出た。

- ・コラボで用いる菌株は JCM1290 株とする。
- ・接種菌数について、食品検体 25g に 1 個入れれば確実に検出される接種菌数となっている。高濃度では菌数が高すぎるため、0.5 ないし 0.7 くらいとし、この 10 倍量を高濃度群とする。また、検体数は各 8 検体ずつに変更とする。
- ・確認試験について、作業部会で実効性を考えた上で本検討委員会に提出しているが、この点については ISO のプロトコールを起こしていることから、あまり変えないほうがいいとの意見が出た。しかし、NIHSJ-24 の ISO 法はそのまま訳しており、その確認試験とは相互している。今回の確認試験の概念を考慮した際に、本試験法と ISO 法では差異が生じると考えられる。
- ・ガスについて、NIHSJ-24 の確認試験 A ではなく確認試験 B の方法であればよいとの意見が出たため、確認試験 B における内容を採用することとする。確認試験 B におけるゼラチン液化については、レシチナーゼ反応で代替とする。確認試験 A におけるダーラム管 4 分の 1 については、作業部会で複数の菌株を用いて検討していただく。NIHSJ-24 の確認試験 A と B は、今回の NIHSJ-29 の確認試験と統合することとする。
- ・この方法でミニコラボとして進めることとし、了承を得られた。

セレウス菌試験法集落計数法について (NIHSJ-28-ST3)

- ・荻原委員が欠席のため、代わりに岡田委員より、セレウス菌試験法集落計数法の ST3 案の説明があった。
- ・前回の検討委員会で指摘された箇所を訂正し、液体検体と固体検体の記述方法を修正した。フロー図は、主に固体検体を対象とした形式になっており、液体検体の場合は注釈として記述してある。
- ・段落番号が途中から間違っているため、正しく修正する。
- ・ストマッキング処理時間の「30 秒から 1 分間」を、上述と同様に「1 分間」に統一する。
- ・「3. 塗抹および培養」中の、「…選択培地 3 枚に接種したものを…」を「…選択培地 3 枚に分けて接種したものを…」とする。また、「…試料原液○ mL を…」を「…試料原液○ mL ずつを…」とし、フロー図でも同様に訂正する。
- ・「6. セレウス菌数の算定」中の、「ISO 7218:1998/Amd.1:2001」は 2007 年に新しいものが出ているはずであるとの意見が出た。そのため、その存在を確認し、新しいバージョンに変更する。また、「…検体を 3 枚に塗布…」を「…検体試料原液 1 mL を 3 枚に塗布…」に訂正する。
- ・フロー図の「固体検体」を「固形検体」に修正する。
- ・記述表現は、黄色ブドウ球菌標準試験法と統一することとする。
- ・修正後、ST2 案として公開し、ST3 に関する議論として進める予定である。

・ST3 案と接種菌数について、今回は直接塗抹を行うことから、高菌量は少し高めの数値に設定したとの説明があった。

・固形検体は 10 倍希釈されてしまう点を考慮し、低菌量を 50~100 CFU/g、高菌量を 500~1000 CFU/g に設定し直すこととする。また、この場合、低菌量では 1 mL を 3 枚に撒き、高菌量では 0.1 mL を 2 枚に撒く。

・予備試験では、案に記述されている食品検体 2 種類及び 2 菌株を用いて、菌の定量を行う。

・コラボでは食品検体 1 種類及び 1 菌株とし、高菌量と低菌量で手法を分け、それぞれ n=8 とし、未接種では n=3 で行うこととする。

エルシニア試験法定性法について (NIHSJ-27-ST2 及び NIHSJ-30TS-ST2)

・岡田委員より、エルシニア試験法定性法の ST2 案の説明があった。

・前回の検討委員会で課題となった ISO 法の検出限界値について、検討を行った。しかし、n=1 であることから、今後は菌数を増やして検討を行う必要があると指摘された。

・各試験法において規定されている分離培地を用いて検討しており、クロモアガーのみはどの試験法においても規定されていないため、今回行った全ての試験法で用いた。この点に関して、菌株によってうまく単離できない菌株もあることから、他の分離培地の検討も行ってみる必要があるのではないかと意見が出た。しかし、CIN と IN ではセフスロジンの添加の有無が異なるだけであり、指針と BAM の比較は可能である旨が説明された。

・今回の検出限界値では検出可否が分かれる部分であったことから、このあたりを目安として ST3 で議論を進めればよいのではとの意見が出た。

・培養時間が長くなるほど夾雑物等により影響され、3 週間培養では検出できなくなることがある。一方、3 週間で検出できることもあるため、1 週間毎に判定して最大 3 週間培養する必要はある。

・都健安研の井田先生より、夾雑菌による菌叢等の影響で大きく変化することがあるため、現時点では BAM 法と検査指針の方法のアルカリ処理のどちらが良いと一概には言えないとの意見が出た。

・次回の検討委員会では、ST2 案としてプロトコールの提案をしていただく。

食品微生物試験法バリデーションガイドラインについて

・今年度、ISO 16140-1:2016 及び ISO 16140-2:2016 が出た。ISO 16140-1:2016 の用語集について、今回は原案とその和訳の資料を準備したため、その内容を検討する。ISO 16140-2:2016 のガイドライン案について、まだ作業部会で検討中である。

・森曜子委員より、ISO 16140-1:2016 の用語集について、説明があった。

・資料内容を委員が各自で確認し、次回の検討委員会で議論を行う。

・当用語集は、今後 web 上に公開する予定である。

- ・ ISO 16140-2:2016 については、次回以降に文章を出して検討する予定である。
- ・ 来年度以降に ISO オリジナルのサンプリング版が出てくる予定であるため、用語集の和訳を早めに出していただくと有難いとの意見が出た。

その他

- ・ セレウリド試験法について、実際の分析について日本食品分析センターと日本冷凍食品検査協会に委託研究を依頼する予定である旨が報告された。

事務連絡

- ・ 次回の第 61 回検討委員会は 12 月 26 日（月）に開催予定である。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 61 回議事録概要（案）

平成 28 年 12 月 26 日開催

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 60 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 60 回議事録概要案の確認を行い、いくつかの修正を経て承認を得た。

ウエルシュ菌試験法・定性法について (NIHSJ-29-ST3)

3. 森哲也委員より、ウエルシュ菌試験法定性法の ST3 案の説明があった。
4. 前回の検討委員会で、食品検体としての均一性や海外からのわかりやすさを考えてシチューやカレーが妥当であるとされたため、固形物を除いたカレーを供試食品としたが、スパイスの生残性への影響が心配されたため、予備試験を行うこととした。
5. 影響が確認された場合は、シチューを用いる。
6. 接種菌数について、低濃度群の菌数範囲が、前回議事録概要 (0.5-0.7) と今回のコラボ実施案 (0.1-0.5) で差異があるが、あくまで暫定的なものであり、予備検討後に菌数範囲の決定を行うこととした。

エルシニア試験法定性法 (NIHSJ-27-ST1 及び NIHSJ-30TS-ST1)

7. 岡田委員より、エルシニア試験法定性法の ST2 案の説明があった。
8. NIHSJ-27-ST2 案の標記「エルシニア試験法・定性法」について、エルシニア全体に対する試験法であるのか、病原株に対する試験法であるのか不明確であるとの指摘が挙げられた。
9. 本試験法がエンテロコリチカを対象とした試験法であるため、標記を「エルシニア・エンテロコリチカ試験法・定性法」とした。
10. ストマッキング処理時間について、ISO 原本では 2 分間のストマッキング処理を施すが、他の試験では 30 秒から 1 分間のストマッキングとされているため、ストマッキング処理時間 30 秒、1 分間、2 分間による比較検討を行うこととした。
11. PS プロス、PSB、PSB プロス等試験法内で書き方に統一性が得られていないため、修正を行う。
12. 確認試験について、血清型別試験は ISO のプロトコールには明記されていないため、血清型試験においては注記とすることとした。
13. 生化学的性状表について、ISO 原本に合わせた生化学的性状表に修正することとした。
14. NIHSJ-30TS-ST2 案の標記「エルシニア試験法・定性法」について、「エルシニア (エンテロコリチカ/シュードツベルコロシス) 試験法・定性法」にすることとした。
15. NIHSJ-30TS-ST2 案の確認試験について、フロー上の生化学性状試験とテーブルの生化学的性状表に統一性がないため、次回作業部会までに修正することとした。

セレウス菌嘔吐毒素（セレウリド）の試験法（NIHSJ-26-ST3）について

16. 鎌田委員およびアドバイザーの藤田先生より、セレウリド試験法、抽出効率の検討及び性能評価について説明があった。
17. 作業部会において、MS スペクトルの改善のための移動相 B のアンモニウム濃度の検討、溶出時間改善のためのグラジエント条件の検討がなされていたが、移動相 B 液への 10mmol/L のギ酸アンモニウムの存在、グラジエント条件の再検討により、安定した MS スペクトルが確認された。
18. 日本食品分析センターおよび日本冷凍食品検査協会による n=2×5 日間の添加回収試験の結果、真度および精度においてコーデックスの手続きマニュアルおよび農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの範囲を満たしており、HORRATr による精度の評価範囲も満たしていた。
19. 試料量 25g は毒素試験として多いのではないかと指摘があったが、現状、食品中のセレウリド含有量が不明のため、他の微生物試験と同様の 25g に合わせている。
20. LC-MS/MS は選択性が高く測定に優れているが、導入されていない機関では LC-MS での対応は可能かの質問があったが、各試験所において性能評価を行い、精度が HORRATr で 2 以下のものならば対応可能であるとした。
21. 本試験の適用範囲は米飯であり、油分の多い他食品に適用できるのかとの意見が挙げられたが、現状では不明であり、本試験でのプロトコールは今後のリスク評価基準としての土台となるプロトコールであり、今後プロトコールを改変していく旨が伝えられた。

行政から

22. 井河専門官より、今後について意見が挙げられた。

事務連絡

23. 次回の第 62 回検討委員会は平成 29 年 1 月 27 日（金）に開催予定である。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 62 回議事録概要

平成 29 年 1 月 27 日開催

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 61 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 61 回議事録概要案の確認を行い、いくつかの文言の修正を経て承認を得た。

エルシニア試験法定性法 (NIHSJ-27-ST2 及び NIHSJ-30TS-ST2)

3. 岡田委員より、エルシニア試験法定性法の ST2 案の説明があった。
4. 前回指摘された箇所は修正し、「病原性エルシニア・エンテロコリチカ」という記述に変更した。
5. アルカリ処理方法の記述について、詳細な処理条件が記入されていないため、記述することとした。
6. ・NIHSJ-27-ST2 確認試験において、他試験項目と同様 TSI、LIM 培地を用いた確認試験へ変更してはどうかとの提案があった。H₂S の産生性は用いる培地により感度が異なるため、データ比較が必要かもしれないとの意見が挙げられた。
7. NIHSJ-27-ST2 および NIHSJ-30TS-ST2 において、対象菌の定義を 2 試験法間で統一し、エルシニア・エンテロコリチカの定義については *presumptive Yersinia enterocolitica* とする。
8. 別表. 確認試験について、記入順を変更するとともに、TSI および LIM 培地の項目を追記する。
9. ストマッカー処理時間について、30 秒、1 分及び 2 分の試験成績には差がなかったため、他の試験と同様に 1 分とする。
10. 本試験法はコラボを行わず、次回以降 ST4 として検討を行う。

セレウス菌嘔吐毒素 (セレウリド) の試験法 (NIHSJ-26-ST3) について

11. 鎌田委員より、セレウリド試験法 ST3 案の説明があった。
12. セレウリド試験を行う各機関は導入時検証を行い、試験室での妥当性が確認されてから使用する旨を追記する。
13. 本プロトコルが米飯を用いての検証であるので、他検体の試験を実施する前に検証を行う旨を追記する。
14. 精度および真度の検証として、検出感度が担保できるように試験を行う旨を追記する。
15. セレウリド標準液について、海外産のものを用いる場合、表示と実際の組成が異なる可能性があるため、注釈として「現在、和光純薬工業製と林純薬製のもの確認されている。」旨の記述を追記する。
16. 今回提出された内容を ST4 案として文章化し、次回検討委員会で最終確認を行う。

用語集について

17. 森委員より、用語集について説明があった。
18. 全般において、各委員に内容を確認していただき、今後はこの用語集をベースとしてガイドラインの作成を行うこととする。
19. 和訳を 1 つに絞ることが難しい用語があることから、カタカナ表記で示す案が出された。カタカナ表記とした場合、和訳や注釈をつけることとする。

バリデーションガイドラインについて

20. 松岡委員より、バリデーションガイドラインの説明があった。
21. 和訳を決めきれない部分については、英語表記を残しておいた方がよいとの意見が出た。
22. 「Target strain」は「標的菌」ではなく、「対象菌」とする。
23. 「菌レベル」は濃度の話であり、記述を再考すべきであるとの意見が挙がった。
24. NDt 及び PDt について、絶対値か否かとの質問が挙がったが、原文にも記述がない旨の返答があった。
25. 各委員に本資料のワードファイルをメールでお送りし、各自確認していただいた後、事務局へご連絡いただき、その他の修正は作業部会で行っていく。

その他

26. 欠席の荻原委員の代理で、岡田委員よりセレウス菌試験法の ST2 案 (NIHSJ-28 ST-2) の説明があった。
27. セレウス菌試験法の進行状況に係る資料が配布され、各委員に内容の確認をしていただくこととした。

行政より

28. 井河専門官より、来年度以降について、現在検討が保留または進行中のものについて検討していただくことが必要であること、ISO/TC34/SC9 の P メンバーとなったので、国内外での情報の収集・発信を進めてほしいこと、今後衛生指標菌についても議論を行っていきたい旨の挨拶があった。

事務連絡その他

29. 次回の検討委員会は、今クールの最終回となる。分担研究者には、現段階での内容をまとめていただきたい。
30. 次回の第 63 回検討委員会は平成 29 年 2 月 15 日（水）に開催予定である。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 63 回議事抄録

平成 29 年 2 月 15 日（水）開催

配布資料の確認・第 61 回議事抄録案及び読み上げによる議事録概要案の確認

・配布資料の確認、第 62 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 62 回議事録概要案の確認を行い、いくつかの文言の修正（24 は ND_T-PD_T とする。議事概要を公表するので 28 の行政意見は削除、セレウス菌嘔吐毒素（セレウリド）の試験法は NIHSJ-26-TS-ST4 である、「・」が余分についている部分の削除など）を経て、承認を得た。

ウェルシュ菌試験法（定性法）（NIHSJ-29-ST3）

・作業部会の 1 機関で実施した予備試験の結果を、資料 B を用いて説明した。

・カレーとシチューを検体候補として、*Clostridium perfringens* ATCC1290 を非接種、低濃度および高濃度の 3 段階の濃度で 25 g の検体に加え、225 mL の TGC 培地を添加後、1 分間ストマッカー処理し、37℃で 18±24 時間培養後、1 白金耳を卵黄加 TSC 寒天培地に塗布し、37℃で 18±24 時間培養したところ、カレーもシチューもほぼ同じ感度であったが、カレーでは 5 回の繰り返し試験のうち、高濃度の 1 検体で分離できなかったため、コラボスタディでは、シチューを検体として実施することとした。

・コラボスタディの試験方法（資料 C）について特に異論・修正意見は出なかったが、予備試験の試験内容が資料 B では理解しにくかった（図中の +9.1 cfu は意味合いが異なる、何に還元剤が入っているのか不明など）ので、実際の試験内容について確認した。

セレウリド試験法（NIHSJ-26TS-ST4）

・当該試験法は、公定法ではなく、技術文書（TS）であり、実際の試験は、各試験機関がセレウリド標準液を用いて性能を評価した上で行うものであると確認した上で試験法について議論をお願いしたい。

・過去の食品中のセレウリド試験は不純物を含んだ標準品が使用されていたため、試験結果が正確でなく、また、規格基準を作成する研究事業も実施されなかった。しかし、現在、和光純薬工業と林純薬工業からセレウリドから高純度標準品を入手することが可能となっている。そこで、高速液体クロマトグラフ・ダンデム質量分析装置（LC-MS/MS）を用いた試験法を作成し、2 か所の試験所でその性能を評価した。その結果、真度 94%、平行精度 0.8~3.7%、室内精度 2.0~8.6%、定量限界 0.9~4.0 ng/g という性能が推定された。なお、この試験の評価法は、「食品中の有害物質等に関する分析法確認ガイドライン」に従って実施した。

・資料 E にある国内で発生したセレウス食中毒事例における原因食品中のセレウリド量が 70~700 ng/g ぐらいであること、また、この資料以外の試験を見ても、この定量限界であれば問題なく、妥当な試験法であると考えられる。

- ・ 今後は、実際に多くの試験所で実施していただき、データを蓄積するのが望ましい、との意見が挙げられた。
- ・ 本試験の結果については、食品衛生学会で発表予定である。
- ・ 本試験法は、LC-MS/MS を使うため、微生物担当者だけでなく、理化学担当者と協力して行わないと実施できないかもしれない。
- ・ すでに多くの試験所では、協力の上行っていると思われる。

セレウス菌試験法・集落計数法 (NIHSJ-28-ST4)

- ・ 予備試験として、*Bacillus cereus* 2 株 (ATCC10876 および ATCC33019) をそれぞれ低濃度及び高濃度に調整したものをマッシュポテトまたは米飯に添加し、10 倍に希釈したものをストマック処理し、1 mL と 0.1 mL を 3 種類 (MYP、NGKG および X-BC) の寒天培地を塗布し集落数を計測した (試験数は各 2 検体)。その結果、マッシュポテトでも米飯でも、3 種類の寒天培地で結果に違いは見られなかった。そこで、本実験は、米飯を検体、添加菌を AT33019 として、試験数を 8 回にして実施した。その結果も良好な成績であった。ISO 法では、寒天培地として MYP 寒天培地が記載されているが、国産の NGKG 寒天培地と X-BC 寒天培地でも遜色ない検出性能を有していると思われる。
- ・ この試験では、*B. cereus* を芽胞にしたものを用いたのかという質問が上がり、芽胞を用いたとの回答があった。
- ・ 試験結果の表の見方について質問があり、「1 枚目、2 枚目というのは、菌数を計測するためにシャーレ 2 枚を使い、その平均値を算出菌数としている。ただし、低菌量では、シャーレ 1 枚に 1 mL を塗布することができないため、1 mL を 3 枚のシャーレに塗布しているが、便宜上、これを 1 枚と表現している」との回答があった。
- ・ 菌数の計測は、通常シャーレ 1 枚当たり、集落が 30 個程度形成される希釈液で行うが、今回の試験結果ではそのような範囲に入っていない。しかし、本試験法の場合、そのような範囲内で行うことが現実的ではなく、また、過去の黄色ブドウ球菌の試験法でも同様な結果であったが、試験結果としては信頼できた。今回の試験でも、集落数は少ないもののばらつきが小さいので、信頼できると考えらえる。
- ・ 試験法案については、語句の修正 (典型→定型、試料法→試験法、培地→寒天培地) を含め、黄色ブドウ球菌の試験法などを参考に体裁を整えることにする。
- ・ 選択培地の調整法については、シャーレに分注する際の温度など、あまり細かく規定すると作業が難しくなる。細かく規定する必要がない部分は、ISO で規定されていても本試験法では規定しないしてほしい、とのコメントが挙げられた。
- ・ クリスタルトキシンという表現は、クリスタルボディ、クリスタル結晶体、結晶タンパク質などの表現の方がよいのでは、とのコメントが挙げられた。
- ・ バージイズ鑑別細菌学マニュアルの記載をカタカナ表記にするなど、再度表現を考えたい。

・代替選択寒天培地の X-BC 寒天培地の組成をみると、選択剤と発色酵素基質の詳細が記載されていないので、自作できない。このような場合は、公定法にすることができるのか。

・詳細を明らかにできない場合、ISO 法では採用されず、同様に公定法では採用できない。標準化委員会の試験法の段階で記載しておき、公定法にする際に削除することになる。製造業者にこのことを伝えて公開できないか検討していただくこととする。

・羊血液寒天培地を使用することとなっているが、国内では馬血液をよく使うため、羊血液の入手は難しい。馬血液と羊血液で試験結果に大きな影響がないと思う、とのコメントが挙げられたが、ISO 法で決まっているので変更は難しいと思われた。

・代替寒天培地の培養条件が、一部予備試験および本試験の条件と異なっている。温度条件は試験結果に合わせた方がよいと思うが、培地の性能について最もデータを有していると思われる培地製造業者の指示（添付文書）に従うべきとの結論となった。

・セレウス菌の算定法について、ISO 番号を記載するだけでよいのではないかと、とのコメントが挙げられたが、具体的な試験法の記載がなければ、各使用者がその ISO 法を購入する必要があることや、計測法の理解を促進するためには記載してあった方がよいとの意見もあった。この部分については、議論を継続することとする。

バリデーションガイドラインについて

・前回いただいたコメントを参考に修正を行ったが、日本語にない単語や概念を無理に和訳すると却って意味が分からなくなると思われた部分は、カタカナ表記にした。必要であれば、別に定義を記載する方が親切であると考え。また、修正意見があったが、類似の表現で全く別の意味を持つ単語があるものについては、修正しなかったものもある。例えば、「定量化の限界」について「定量限界」への修正意見があったが、「Limit of quantification」の定義は、日本語の定量限界と少し意味合いが異なる。

・タイトルの「食品微生物試験法妥当性確認ガイドライン」は「食品微生物試験法バリデーションガイドライン」、「study」は「スタディ」に変更する。また、「選択」は「選定」、「純菌液」は「純培養菌液」、「対象菌株」は「対象菌」、「植菌」は「接種」の方が受け入れやすいと考える。

・「植菌」は「接種」に修正するが、「対象菌株」については、原文に strain とあるので、「株」があった方がよいと考える。

・「0」と「無菌」という記述が見受けられるため、統一すべきであるとの意見が出た。

・修正版を配布するので、各委員で再度ご検討いただきたい。

用語集について

・日本語にない単語や概念を無理に和訳すると却って意味が分からなくなると思われた部分（黄色欄）はカタカナ表記にしてある。

・類似の表現で全く別の意味を持つ単語については、和訳に加えて英語表記も残す方がよいとの意見が出た。

・「 β -ETI」は「 β -期待値許容区間」とする。

・これ以上、長く議論して無理に日本語にしていくより、この用語集を使っていきながら、カタカナ用語が定着するならそれでよいし、適当な日本語が出てくれば変更することとしたい。

その他

・エルシニア試験法については、各委員へのメールにてご確認いただく。

・今回の会議が、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）の最後の会議であるが、来年度以降、新たな研究事業が立ち上がった際には、よりよい試験法の開発を推進するために、引き続きご協力をお願いしたい。

以上