

平成 26-28 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

分担研究報告書

衛生指標菌試験法に関する研究

分担研究者： 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）

協力（委託）研究者： 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）

研究要旨

わが国の食品衛生法では食品（種）ごとに細菌数（生菌数）、大腸菌群、E. coli（糞便系大腸菌群）等の規格基準が規定されており、それぞれ個別に試験法が定められている。しかし、これらの試験法間では同様な試験工程においても整合性が取れない操作・手順のあることや、ISO（国際標準化機構）が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法（Bacteriological Analytical Manual ; BAM 法）との調和が計られていない現状が指摘されている。これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会における討議・検討の結果、今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として、ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認されている。

ISO 微生物試験法における菌数算定法は大きく分けて 2 パターン存在し、各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と、各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく、ISO7218 を参照するように記述されている場合に分かれる。さらに後者は ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照するようになっている場合と、ISO 7218:1996/Amd.1:2001 または ISO 7218:1996 を参照するようになっている場合の 3 パターンに分かれる。ISO でも菌数算定法を統一する動きがあるが、本研究班でもこれらの問題点について検討を進めることとなった。

一般財団法人日本食品分析センターでは、H26～27 年度に TBX 寒天培地（44 °C，18～24 時間培養）において、大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討を行った。一般財団法人日本冷凍食品検査協会では、H26～27 年度に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（一般生菌数計算法）法（以下 ISO 法）により、同一検体に対して生菌数測定を行い、試験法の違いによる結果の相違について検証した。これらの結果を基に、今後の菌数算定法について作業部会で方向性の検討を行った。H28 年度には、ISO 26140 の改正にあわせ、試験法の妥当性評価

手法を衛生指標においてどのように考えるかの検討を、妥当性評価作業部会と合同作業部会を組織し、検討を行った。

A. 研究目的

わが国の食品衛生法では「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」(昭和 26 年, 厚生省令第 52 号)及び「食品, 添加物等の規格基準」(昭和 34 年, 厚生省告示第 370 号)の中で, 食品(種)ごとに細菌数(生菌数), 大腸菌群, *E. coli*(糞便系大腸菌群)等の規格基準が規定されており, それぞれ個別に試験法が定められている。しかし, これらの試験法間では同様な試験工程においても整合性が取れない操作・手順のあることや, ISO(国際標準化機構)が制定する標準試験法や米国 FDA の公定法(Bacteriological Analytical Manual ; BAM 法)との調和が計られていない現状が指摘されている。

これらの現状を改善するために, 「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会における討議・検討の結果, 今後規格基準が制定・改正される食品の衛生指標菌の試験法として, ISO の試験法を土台にしたわが国の標準法を確立することの方向性が確認された。これまで Enterobacteriaceae(腸内細菌科菌群), Presumptive *Escherichia coli*(推定大腸菌)及び Coliforms(大腸菌群)に関する標準法の策定作業を進めてきたが, 今後は Microorganisms(一般生菌数)及び β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*(β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌)の試験法並びに試験結果の算定法を確立することを検討課題とすることとした。

一般財団法人日本食品分析センターでは, H26~27 年度に TBX 寒天培地(44 °C, 18~24 時間培養)において, 大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討を行った。

一般財団法人日本冷凍食品検査協会では, H26~27 年度に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, 同一検体に対して生菌数測定を行い, 試験法の違いによる結果の相違について検証した。

これらの結果を基に, 国内の衛生指標菌と菌と国際標準である ISO 法との相違に関する知見を収集し検討した。また菌数算定法について, ISO 微生物試験法における菌数算定法について現状をまとめた。H28 年度には, 改定された妥当性確認ガイドライン ISO 14160 を, 妥当性確認作業部会と合同で検討した。

B. 研究方法

- 1) ISO 微生物試験法における菌数算定法
ISO 11290-2 (1998 年; リステリア・モノサイトゲネス), ISO 15214 (1998 年; 中温性乳酸菌), ISO 6888-1 (1999; コアグララーゼ陽性ブドウ球菌), ISO 16649-2 (2001 年; β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌), ISO 17410 (2001; 低温菌), ISO 4833 (2003; 一般生菌数), ISO 15213 (亜硫酸塩還元菌), ISO 7932 (2004; 推定セレウス菌), ISO 7937 (2004; ウエルシュ菌), ISO 21528-2 (腸内細菌科菌群), ISO 4832 (2006; 大腸菌群), ISO/TS 10272-2 (2006; カンピロバクター属菌), ISO 21527-1, 2 (2008; カビ・酵母)について菌数算定法を確認した。
- 2) ISO 7218 (2007 年版) の和訳を行った。
- 3) ISO 法における大腸菌試験法としてのの

TBX 寒天を用いた方法について、標準試験法の検討を行った。

4) 一般生菌数の試験法では、国内法と ISO 法で培養温度が異なることから、両者の相違について市販食品を用いて検証した。

C. 研究結果及び考察

1) 菌数算定法のまとめ

ISO 微生物試験法における菌数算定法は大きく分けて 2 パターン存在し、各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と、各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく、ISO 7218 を参照するように記述されている場合に分かれていた。後者は ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照するようになっている場合と、ISO 7218:1996/Amd. 1:2001 または ISO 7218:1996 を参照するようになっている場合の 3 パターンに分かれていた。

ISO 7218 (2007 年版) では、集落数採用範囲が従来の 15-300 cfu から 10-300 cfu に変更となっていた。さらに、使用するペトリ皿の枚数として、ISO 17025 に準拠した管理を行っている試験所では各希釈段階での使用ペトリ皿は 1 枚、ISO 17025 に準拠した管理を行っていない試験所では各希釈段階での使用ペトリ皿は 2 枚となっており、試験所認定を受けているかどうかで係数の方法が異なっていることが判明した。ISO 7218

(2007 年版) については和訳版がなかったため、和訳を行った。

2) ISO 7218 (2007 年版) の和訳

ISO 7218 (2007 年版) の和訳を行った。語句の統一を含めて作業を進めた。

3) TBX 寒天培地 (44 °C, 18~24 時間培養) において、大腸菌集落以外の集落が多数存在した場合の大腸菌集落数計測への影響についての検討では、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^4 cfu 以下の平板においては、総(典型的及び非典型的)集落数の増加に伴い、大腸菌の集落が小さくなる傾向が認められた

が、回収率は 80%以上であり、大腸菌集落数の測定に大きな支障は認められなかった。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^3 ~ 10^4 cfu の平板においても、大腸菌数を推定することが可能と考えられた。一方、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^5 cfu 以上の平板においては、大腸菌がきわめて小さい集落を形成し、典型的集落の判定が困難となり、回収率が 60 %~70 %とやや低い事例も認められた。その結果、総(典型的及び非典型的)集落数が約 10^5 cfu 以上の平板においては、大腸菌数の推定が困難な場合があると考えられた。

4) 一般生菌数試験法では、国内の公定法である従来法と 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があったが、全ての測定値において 1Log CFU/g の範囲内であり、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。

D. 結論

・ ISO 微生物試験法における菌数算定法は各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている場合と、各微生物試験法の中に菌数算定法の記述はなく、ISO 7218 を参照するように記述されている場合に分かれていた。

・ ISO 7218 を参照するように記述されている場合、ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照するようになっている場合と、ISO 7218:1996/Amd. 1:2001 または ISO 7218:1996 を参照するようになっている場合

の3パターンに分かれていた。

- ・ISO 7218 (2007年版)では、集落数採用範囲が変更になっている。

- ・ISOでは試験所認定を受けているか否かで係数の算定方法が異なっている。

- ・TBX寒天培地を用いるISO法は、大腸菌の菌数測定法として有用と思われ、その測定可能な範囲を確認することが出来た。

- ・国内の公定法である従来法と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菌に対して与える影響の検討により、ISO法の培養条件(30℃、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示された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし