

令和元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）

分担研究報告書

衛生指標菌及び食中毒菌の標準試験法作成及び改訂に関する研究

研究代表者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
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	下島 優香子	東京都健康安全研究センター微生物部
	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター微生物部
	松岡 英明	東京農工大学
	森 曜子	公益社団法人日本食品衛生協会
	泉谷 秀昌	国立感染症研究所細菌第一部
	品川 邦汎	岩手大学
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

乳等省令に示される生乳受入れ時の総菌数試験法について、これまでの検討結果に基づき、染色液の同等性を判断するための評価検討を行った。バリデーション作業部会での検討及び検討委員会での審議を経て、最終的に技術仕様書 NIHSJ-33TS:2020 を作成した。また、これ迄に上記委員会で策定された標準試験法(NIHSJ法)のうち、リステリア・モノサイトゲネス試験法(NIHSJ-08 及び 09) 及び腸内細菌科菌群試験法(NIHSJ-15 および 16) について現状の実態に即した改訂を行った。このほか、本年度はカンピロバクターの定量試験法作成に関する検討を開始し、ST2 案の提示に至った。更に、標準試験法の表記方法を統一するための表記法規則を作成した。これらの成果は各種食品微生物試験法の通知法作成や改訂等へ波及することが期待される。

A. 研究目的

現在国内では、「乳および乳製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)」において、直接個体鏡検法に基づいて、生乳の微生物基準を400万以下/mLとする旨が規定されており、食品原料である生乳の衛生試験法として広く用いられている。当該試験法では、従来ニューマン染色液を用いるとされているが、その成分には1,1,2,2-テトラクロロエタンが含まれている。同物質は、平成22年に施行された「特定化学物質の環境への排出量の把握

等及び管理の改善の促進に関する法律(化管法)」に規定する「第二種指定化学物質」の指定を受けたほか、平成26年に施行された「労働安全衛生法」に規定される「特定化学物質等障害予防規則の特定化学物質：第二類物質」に指定されており、ニューマン染色液の使用にあたっては、使用・管理場所の制限や健康管理への対応等が厳密に求められる状況となっている。そのため、代替染色液の必要性が高まり、先行研究において、数種の染色液の性能が検討された。しかしながら、それら

の代替染色液としての有効性については評価がなされていなかったことを受け、本研究では、食品微生物試験法の妥当性評価の観点からニューマン染色液の代替となりうる染色液候補のデータ解析を行い、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」及びバリデーション作業部会において議論を行うこととした。

また、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」では、これまでにリステリア・モノサイトゲネス及び腸内細菌科菌群標準試験法を作成し、これらはともに厚生労働省の通知法の根拠として活用されている。今般、これらの試験法のうち、より実行可能性が高く、かつ食品微生物分野において既に関連情報が集積されている一部内容について改訂を行うべきとの意見が挙げられたことを踏まえ、改訂作業を行い、同委員会での審議を経て、最終案の作成に至った。このほか、同委員会では本年度新たにカンピロバクター定量試験法の検討を開始し、コラボスタディに向けた基礎データの収集等を行ったので、あわせて報告する。

B. 研究方法

1) 生乳受入れ時の総菌数試験についての技術仕様書の作成

同一生乳検体塗抹標本にニューマン染色液と、代替候補となる2種の染色液を用いた場合の総菌数について、作業部会を構成し、統計解析を行うこととした。先行研究では、4試験機関で各2検体を3種の染色液を用いた直接鏡検法により総菌数を求めていた。これらの測定値について、チューキーのHSD検定(Tukey Honestly Significant Difference test)を用いた多重比較検定により評価した。

2) 標準試験法(NIHSJ法)表記法規則作成
令和元年度の時点で、NIHSJ法は9種の試験法が最終ステージを経て最終版としてホームページ上で公開されている。これらの多くは試薬等(ペプトン等)の表記方法が必ずしも統一されていなかったことを踏まえNIHSJ法について再度見直しを行うこととした。また、単位の記載方法や段落番号等にも統一の必要性があることから、表記法規則案を作成し、バリデーション作業部会及び検討委員会に提案を行った。

3) リステリア・モノサイトゲネス標準試験法(NIHSJ-08及び09)の改訂

NIHSJ-08及び-09はリステリア通知法の基礎となる試験法として2014年に作成された。現状の実態に即して、改訂が必要と思われる事項が同試験法に複数見受けられたことから、本年度は同試験法の改訂作業を行うこととした。

4) 腸内細菌科菌群標準試験法(NIHSJ-15及び16)の改訂

腸内細菌科菌群標準試験法についても同じく現状の実態に即した改訂が必要と思われる事項が含まれていたことを受け、衛生指標菌バリデーション作業部会及び検討委員会での改訂の討議を経て、上記の表記規則に基づいた最終版の作成にあたった。

5) カンピロバクター定量試験法(NIHSJ-35-ST2案)の作成

本年度より鶏肉及び食鳥と体を対象としたカンピロバクター定量試験法を作成することとした。作業部会を構成し、検討委員会が出た意見について協議を行い、ST2案を作

成した。

C. 研究結果

1) 生乳受入れ時の総菌数試験に関する技術仕様書作成

先行研究で得られた同一生乳検体塗抹標本にニューマン染色液と、代替候補となる2種の染色液を用いた場合の総菌数データを基に、チューキーのHSD検定(Tukey honestly significant difference test)を用いた多重比較検定を行った。ブロードハーストパーレイ染色液ではニューマン染色液と比較して調整済みp値(adjusted p-value)が0.002となり、統計学的有意差が見られたが、ブロードハーストパーレイ改良染色液はニューマン染色液に比べ調整済みp値が0.191と明確な相違が見られず、代替染色液として許容できるレベルにあると考えられた。以上の点を踏まえて、検討委員会に統計解析結果を報告した。その後の検討委員会、バリデーション作業部会における審議並びに新たな検討内容については松岡らの分担研究報告書に記載したので、適宜参照されたい。

2) 標準試験法(NIHSJ法)表記法規則の作成

第38回バリデーション作業部会及び第69回検討委員会において承認を得、標準試験法表記法規則を作成した(別添2)。試験法のフォーマットはISO方式を採用し、基本的に段落番号にピリオドで枝番を付することとした。フォントは日本語を游明朝、英数字をTimes New Romanにすることとした。単位はSI単位系を基本とするが、大桁数字はコンマ区切りとし、SI及びISOで用いられている小数点を起点として3桁ごとに半角1文字分のスペースを空ける方式は採用しなかった。培地組成に用いられる「酵素分解産物」は「酵

素消化物」に統一した。ペプトン類の記載は、ISO法に準拠している試験法はISO原文を基本としつつ、国内で流通している当該培地の組成を参考に、注釈として「カゼインペプトン等」などの記載を加えることとした。また、最終案が確定した試験法名からST4の文言を削除すること及び各試験法の末尾に改訂履歴を付することとした。

3) リステリア・モノサイトゲネス標準試験法の改訂

NIHSJ-08:2014(リステリア・モノサイトゲネス定性試験法)では、half Fraser brothでの前増菌培養を24時間±2時間と、Fraser brothでの増菌培養を48時間としている。現在、一般的な微生物試験としてFraser brothを用いた増菌培養時間は24時間で行われる実態もあるとの意見が出たため、増菌培養時間を短縮した際の影響を主な検討項目とした。また、第二選択分離培地の選択肢に挙げられるOxford寒天培地にはシクロヘキシミド(抗真菌剤)が含まれているが、現在同剤は発がん毒性が示されているため、代替に関する検討を行うこととした。

NIHSJ-09:2014(定量試験法)では乳剤調製後に蘇生培養後に酵素基質培地への直接塗抹を行っているが、その有効性についても検討項目とした。

文献検索を通じ、以下の論文で、half Fraser brothを用いた前増菌培養後には十分量の増菌がなし得ていることが報告されたことを受け、同知見を基盤とする原案を作成し、検討委員会に提出した。

参考文献: Besse et al. Int J Food Microbiol. 2019. 288: 13-21.

また、定量試験法における蘇生培養に関しては、以下の論文において、蘇生を行わない

場合にも十分量のリステリアを検出できたとの報告があったことから、同知見を基盤とする原案を作成し、検討委員会に提出した。

参考文献: Rollier et al. *Int J Food Microbiol.* 2019. 288: 22-31.

このほか、Oxford 寒天培地に含まれる抗真菌剤については、市販生培地の多くでは既にシクロヘキサミドの代替としてアンホテリシン B を採用している実態を確認したため、これを検討委員会に提出した。

以上の状況確認を踏まえ、検討委員会委員間でのメール討議の結果、前増菌培養時間の短縮や蘇生培養の削除等から成る改訂案が了承され、変更履歴を末尾に示す形で NIHSJ-08:2020 及び NIHSJ-09:2020 として改訂された。(別添 3 及び 4)。

4) 腸内細菌科菌群試験法の改訂

生食用食肉の成分規格に関わる試験法である腸内細菌科菌群試験法(定性法)については、前増菌・増菌・選択分離の3段階の培養工程が含まれ、衛生指標菌試験としては比較的時間を要する。そこで、本研究では表記方法の変更のほか、以下の内容を主な論点として検討を行った。概要を以下に示す。

・緩衝プリリアントグリーン胆汁ブドウ糖ブイヨン(EE ブイヨン)中での増菌培養を削除:BPW 中での前増菌培養が行われていることから、EE ブイヨン中での増菌培養の必要性について疑義が生じた。文献検索を通じ、以下の論文では EE ブイヨンを用いた増菌培養の有無は腸内細菌科菌群の定性検出結果に大きく影響しないとの報告があったことから、同知見とあわせて検討委員会に意見を求め、削除することについて了承を得た。

参考文献: Biesta-Peters et al. *Int J Food Microbiol.* 2019. 288: 75-81.

また、定量試験法についてはこれまで公定法としての採用履歴はないが、国際的には主に乳肉食品の製造工程管理や成分規格等にも採用されており、国際調和の観点からは速やかに現在の状況にあったものを作成すべきとの観点から、過去に検討委員会で作成された同試験法を基に改訂を行うこととした。検討の結果、表記方法の統一に関する修正等を経て、検討委員会に提出し、審議を経て、了承を得た。

最終的に変更履歴を末尾に示す形で、NIHSJ-15:2020 及び NIHSJ-16:2020 として改訂された(別添 5 及び 6)。

5) カンピロバクター定量試験法の作成

第 70 回検討委員会において、カンピロバクター定量試験法の作成を議題として取り上げ、了承された(ST1)。その後、作業部会を構成した上で ST2 原案の作成を行い、第 71 回検討委員会に提示を行った。その際に出た意見を踏まえ、以下の項目について整理及び検討を行った。

(1) 試料の採材部位及び試料懸濁液の調整について

コラボスタディ実施に向け、市販鶏肉(n=25, 10g)を対象に、皮・肉部位間での菌数を比較検討した。その結果、対象菌の検出菌数は皮部分が肉部分に比べて高い傾向を示した(図 1)。

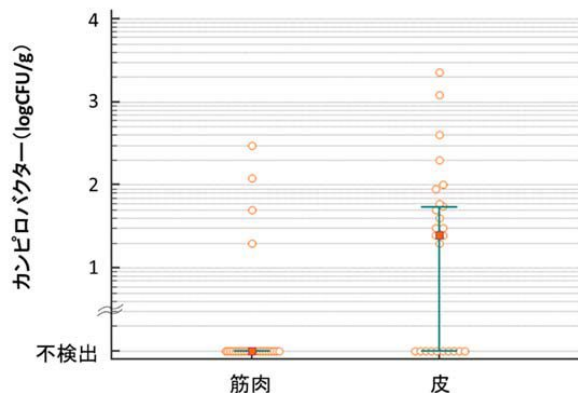


図 1. 市販鶏肉試料からのカンピロバクター検出菌数の比較（採材部位）

試料懸濁液の調整について、NIHSJ-02 で採用されている 5 倍乳剤の適切性を ISO 10272-2:2017 で採用されている 10 倍乳剤と比較検討した。NIHSJ-02（定性試験）によりカンピロバクター陽性が確認された市販鶏肉皮試料（n=30）を対象とした比較試験を行ったところ、5 倍乳剤調整群で対象菌が 20CFU/g 未満検出された試料では 10 倍乳剤調整群は不検出となり、5 倍乳剤を用いる有意性が示された（図 2）。

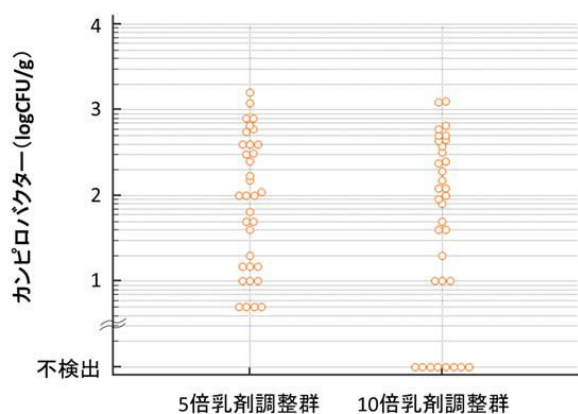


図 2. 鶏皮試料からのカンピロバクター検出菌数の比較（乳剤希釈倍率）

なお、夾雑菌の出現については、両群間で

明らかな差異は認められなかった（夾雑菌出現試料数は 5 倍・10 倍乳剤調整群でそれぞれ 14 及び 12 試料）。

以上よりコラボスタディでは鶏皮を用いて 5 倍乳剤を調整する方法が適切と判断された。

(2) 試料懸濁液の選択分離培地への塗抹量について

ISO法では試料懸濁液 1ml をシャーレ 3 枚に塗抹するとされるほか、USDA-FSIS 法では試料懸濁液 1ml をシャーレ 4 枚に塗抹する等が示されている。対象菌は乾燥や大気中の酸素ストレスに抵抗性が弱く、塗抹開始から微好気培養に至る時間経過は試験成績に大きく影響するものと考えられた。そこで、国内での実行可能性及び科学的妥当性を有する塗抹量に関する知見を創出するため、予めカンピロバクター陰性・ESBL 産生大腸菌陽性が確認された鶏皮試料 25g（n = 10）に対し、約 2.3×10^3 CFU/g の *C. jejuni* NCTC 11168 株を接種し、5 倍検体懸濁液 1mL を異なる枚数の mCCDA 平板培地に塗抹し、微好気培養後の対象菌及び夾雑菌の発育状況を比較した。結果として、シャーレ 1 枚あたり 200 μ l ~ 250 μ l の塗抹量とした場合、対象菌の発育及び夾雑菌による判定不能例は 10 試料中 1 試料以下であった（表 1）。一方、シャーレ 1 枚あたり 333 μ l 以上の塗抹量とした場合には、対象菌・夾雑菌両者の滑走を招き、判定不能となる検体が半数以上で認められた（表 1）。

表 1. 試料（市販鶏皮）5 倍乳剤の塗抹量の違いによる、選択分離培地（mCCDA 培地）上での対象菌及び夾雑菌の発育状況の比較

塗抹液量 (使用枚数)	判定可能 試料数	対象菌数 (平均 CFU/g)	対象菌遊走を認 めた試料数	夾雑菌遊走を認 めた試料数
200 μ l (5 枚)	10	1.6×10^2	1	0
250 μ l (4 枚)	9	1.3×10^2	2	1
333 μ l (3 枚)	4	8.1×10^1	5	7
500 μ l (2 枚)	0	-	6	8

以上の結果を踏まえ、選択分離培地の使用枚数は4枚から5枚(塗抹量としてシャーレ1枚あたり200~250 μ L)が適切と考えられた。

D. 考察

本研究では、乳等省令で示される「生乳受入れ時の総菌数試験法」で用いられるニューマン染色液が健康被害の懸念から使用制限が大きい実態を鑑み、代替染色液の妥当性を統計解析を通じて評価した上で、食品からの微生物標準試験法検討委員会での審議を経て、同試験法に関する技術仕様書を作成した。

一般的に、技術仕様書は標準試験法とは異なる位置づけにあり、要求事項や指針になりうるものとして扱われる。NIHSJ法は元来培養法を基本としており、直接鏡検法である本試験法は技術仕様書として作成することが妥当と考えられたことが今回の検討背景である。

また、本年度はこれまでに作出された標準試験法の表記方法の整合性を確保するため、表記方法の手順書を作成した。今後作成される試験法についてはこれに準拠した形での提出を求めることとなった。本仕様の作成は同一の食品検体から複数の微生物試験を平行実施する際の利便性の向上や、培地等調製時の参照の容易さ等に反映されることが期待される。

また、リステリア・モノサイトゲネス試験法、及び腸内細菌科菌群試験法について改訂を行い、結果的に試験所要時間が短縮されることと

なった。食品微生物試験では迅速性も重要な要素であることは周知のとおりであり、本改訂法は多くの利用者にとって大きな利点となるものと考えられ、通知法等への反映が望まれる。

なお、今回のようなNIHSJ法の定期的な見直しや改訂は国際的な技術の発展に応じて適宜行うことが国際調和の進展及び更なる安全性確保に際して、必要且つ有効な事項と思われる。引き続き、国際調和の流れに沿った食品の微生物リスク管理の発展に寄与するため、これらの活動を継続することは必須の課題と考えられる。

E. 結論

本年度の研究では、乳等省令の「生乳受入れ時の総菌数試験法」で用いられるニューマン染色液の代替染色液として、ブロードハーストパーレイ改良染色液を用いる妥当性を統計解析を通じて評価することができた。また、現時点の微生物試験に関わる国際動向を踏まえ、リステリア・モノサイトゲネス標準試験法、腸内細菌科菌群標準試験法を改訂し、より実行可能性の高い試験法を作成することができた。このほか、食肉食品等で社会的影響の大きなカンピロバクター定量試験法の検討を開始し、試験法設定にあたって必要となる事項の整理と検討を行い、試験法原案を作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学術論文、著書等

1) 朝倉宏 . カンピロバクター感染症の疫学、病原性および診断治療 . 感染制御と予防衛生 . 3(2): 87-93. 2019.

2. 学会発表

1) 朝倉宏 . シンポジウム「低温微生物の生態とその予防」～食中毒細菌 . 日本防菌防黴学会 46 回年次大会 . 令和元年 9 月 25 日 大阪府 .

2) 朝倉宏 . 食品微生物検査法の概要と国際調和に向けた検討について . 令和元年度食品衛生登録検査機関協会研修会 . 令和元年 12 月 6 日 . 東京都 .

3) 中山達哉、岡田由美子、朝倉宏 . シンポジウム「微生物試験法：製造現場において必要な微生物試験法・測定法」～衛生管理のために用いるべき、試験法の動向について . 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会 . 令和元年 9 月 25 日 . 大阪府 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

