

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及び
その妥当性評価に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H23-食品-一般-010)

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26(2014)年3月

目 次

I. 平成 25 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. <i>Cronobacter</i> spp. の標準試験法に関する研究	23
荻原博和、岡田由美子、福田典子、鈴木穂高、百瀬愛佳、吉田朋高	
2. 腸炎ビブリオ試験法	33
甲斐明美、小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、仲真晶子	
3. 衛生指標菌試験法に関する研究	41
伊豫田淳、田中廣行、吉田信一郎、齋藤利江、五十君静信	
日本食品分析センター、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	65
松岡英明、五十君静信	

平成 25 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及びその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、統一した方向性をもって、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法の策定を進めた。これまでの研究班の成果である食品からの微生物標準試験法作成方針に従い、腸炎ビブリオ、クロノバクター属菌、衛生指標菌などの標準試験法の策定を進めた。今後リスク評価の結果を受けて策定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国際的に互換性のある試験法を提供することが重要である。さらに、策定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った。

食中毒起因細菌の試験法に関する専門家 23 名からなる“標準法検討委員会”を組織し、統一した方針に沿って具体的に微生物標準試験法の策定を進めた。試験法策定状況は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ上に公開し広く意見を求めた。研究班の行う当該微生物の試験法作成および必要なデータ収集は、それぞれの作業部会が担当し、本研究班の代表、分担、協力研究者がその作業にあたった。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“標準法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。平成 25 年度は、コラボ案の作成と検討および最終試験法の検討（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ルなどを参考に検討を進め、ガイドライン原案を作成した。他の研究班により進められているカンピロバクター標準試験法については、コラボ試験に協力し、得られたデータを用いて妥当性確認を実際に試み、その成果を原著論文として発表した。

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

甲斐明美：東京都健康安全研究センター

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

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ル作成を行う。これまでの研究班の成果である食品からの微生物標準試験法作成方針に従い、腸炎ビブリオ、クロノバクター属菌、並びに衛生指標菌などの標準試験法を策定する。今後リスク評価の結果を受けて策定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国際的に互換性のある試験法を提供する。さらに、科学的根拠のある試験法作成に必要な妥当性確

A. 研究目的

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

認の方法論の提供、策定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。

B. 研究方法

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 23 名からなる“標準試験法検討委員会”を組織し、これまでの研究班の成果として作成された“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い、微生物標準試験法の策定を行うが、検討に必要なデータの統計処理方法は国際的にまだ統一されていないため、データの評価方法については、実際の試験法策定の検討データ毎に適切と思われる手法により検討する。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。H25 年度の試験法の策定は、コラボ案の作成と検討および最終試験法の検討（ステージ 3～4）を行った。これに対応し“標準試験法検討委員会”は H25 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、ガイドライン原案を作成した。

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 25 年度は、カンピロバクターレファレンスセンターを中心とする研究班の依頼を受けて、コラボ試験の結果を基に妥当性確認を行った。また、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、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約 23 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。クロノバクター属菌（荻原、岡田）、腸炎ビブリオ（甲斐）、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）。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、五十君が担当し、23 名の専門家委員と 2 名

の行政官で構成した。平成 25 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カンピロバクター標準試験法のコラボ試験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。

クロノバクター属菌試験法作業部会（荻原・岡田担当）は、2 機関 4 名の専門家から構成した。ISO 法には、ISO/TS22964:2006 にエンテロバクター・サカザキとしての試験法が示されている。米国 FDA からは、BAM 法としてエンテロバクター・サカザキの 3 本法の MPN による定量試験法が示されている。2008 年にエンテロバクター・サカザキは、再分類によりクロノバクター属菌に分類され、対象となる菌種に関してかなり混乱しているのが実状である。従って、標準試験法では、ISO/TS 22964:2006 の定義に従って、クロノバクター属菌試験法を検討することにした。本年度は ISO 法を基に作業部会案を公開し、作業部会案の問題点についてデータを示し、コラボ案から最終試験法策定を行った。また、ウェルシュ菌試験法については、原案から作業部会案作成の検討を行った。

腸炎ビブリオ試験法作業部会（甲斐担当）は、コラボ案の検討とコラボ試験、最終試験法策定まで行った。腸炎ビブリオ標準試験法は、現在の公定法を基に検討した。試験法の検討は、ISO 法との比較を行い、あさりのむき身を用いてコラボ試験を行った。

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、酵素基質培地による大腸菌定量法と、菌数計数法を対象として、ISO 試験法を基にバリデーション作業部会と合同で検討

した。

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。標準試験法のバリデーション手法の検討とカンピロバクター標準試験法コラボ試験の評価を行った。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。

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。クロノバクター属菌、腸炎ビブリオ、並びに酵素基質培地を用いた大腸菌試験法などの標準試験法を策定した。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原案をまとめた。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

1. Matsuoka H., Shigetomi T., Funabashi H., Saito M., Igimi S.: Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. J. Microbiol. Methods 93: 49-51 (2013).
2. Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama

K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R, Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K, Yahiro S, Fujita M, Igimi S. Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: Collaborative study. J AOAC Int. 96:991-997. (2013)

3. Matsuoka H, Nakano K, Takatani N, Yoshida T, Igimi S, Saito M. Flow cytometric method for in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. J AOAC Int. 97(2):479-483. (2014)
4. 五十君静信。食品の微生物試験法の国際対応と、現場における試験法選定の考え方～生食肉の規格基準のもたらしたもの～。月刊食品と開発。5月号。48(5):5-8 (2013)

学会発表

1. Matsuoka H. Global thinking of validation in Japan. Korea Food and Drug Administration Symposium: Establishing System of Microbiological Testing Procedures, Cheongwon, Korea. 2013. 4.
2. 吉田智紀, 高谷周督, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明。保存安定性を考慮した生菌標準物質の調製。AOAC インターナショナルジャパンセクション総会。2013. 6
3. 高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明。少数生菌汚染標準食品の調製。AOAC インターナショナルジャパンセクション総会。2013. 6.
4. Y. Okada, H. Suzuki, H. Ogihara, S. Monden, Y. Momose, N. Fukuda, S. Igimi. Characterization of Growth and Pathogenicities of *Cronobacter sakazakii* and Related Species. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013). 2013. 7.
5. Hideaki Matsuoka, Tomonori Yoshida, Norimasa Takatani, Mikako Saito, Shizunobu Igimi. In Situ Preparation of Standard Material of Viable Single-cells for Innovative Validation of Microbiological Methods. 127th AOAC Annual Meeting and Exposition, Chicago. 2013. 8.
6. 松岡英明：微生物分析法の妥当性確認におけるボトルネック—生菌標準物質。JASIS コンファレンス、幕張 2013. 9.
7. 福田典子, 藤原翠, 伊東悠志, 石塚理恵, 荻原博和, 五十君静信。各種食品における *Cronobacter* spp. の汚染実態。食品微生物学会。2013. 9.
8. 吉田智紀、高谷周督、Alvin Mariogani、斉藤美佳子、五十君静信、松岡英明：生菌標準物質の保存安定性。第40回日本防菌防黴学会年次大会。2013. 9.
9. 高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明：FACS を利用した生菌ソーティング法による標準低汚染飲料の調製条件の検討。第40回日本防菌防黴学会年次大会。2013. 9.
10. Yumiko Okada, Hodaka Suzuki, Hirokazu Ogihara, Shuko Monden, Yoshika Momose, Noriko Fukuda, Shizunobu Igimi. Pathogenicity Determination of *Cronobacter* spp. The 3rd Asia Pacific International Conference on Food Safety (Taipei, Taiwan) 2013. 10.
11. 多田 敦子、杉本 直樹、伊藤 裕才、

- 秋山 卓美、五十君 静信、山崎 壮、
 穠山 浩。増粘安定剤の食品添加物公
 定書微生物限度試験法の検討。第 50
 回全国衛生化学技術協議会年会。
 2013. 11.
12. 小西典子, 尾畑浩魅, 高橋正樹, 下
 島優香子, 仲真晶子, 工藤由起子,
 甲斐明美: 食品を対象とした腸炎ビ
 ブリオ試験法作成のための基礎的検
 討 (2) . 第 47 回腸炎ビブリオシンポ
 ジウム, 広島県, 2013. 11.
 13. Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa
 T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama
 K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R,
 Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K,
 Yahiro S, Fujita M, and Igimi S.
 Evaluation of the culture method
 NIHSJ-02 alternative to ISO
 10272-1 1: 2006 for the detection
 of *Campylobacter jejuni* and
Campylobacter coli in chicken:
 Collaborative study. UJNR-48th
 Toxic Microorganisms Joint Panel
 Meeting. 2014. 1. Tokyo
- 演会。2013. 9.
5. 五十君静信。食品衛生における国際
 ハーモナイゼーションの重要性。日
 本食品工業倶楽部品質保証懇話会。
 2013. 11.
 6. 五十君静信。食品に関わる規格基準
 の現状解説と、HACCP (工程管理) の
 重要性。第 38 回沖縄県食肉衛生技術
 研修会。2014. 2.
 7. 五十君静信。魚肉練り製品の成分規
 格－微生物規格の背景、検査方法の
 現状及び今後の動向－。第四回魚肉
 ねり製品の成分規格に関する勉強会。
 2014. 2.
 8. 五十君静信。今後の微生物試験法を
 行う上での妥当性確認の重要性と進
 め方。食品産業戦略研究所教育セミ
 ナー。2014. 2.
 9. 五十君静信。微生物のリスクプロフ
 ァイルについて－数的指標を導入し
 た規格基準の解説と平成 25 年度のト
 ピックス－。平成 25 年度第 1 回
 HACCP 指導者養成研修会。2014. 3.

講演・研修会等

1. 五十君静信。数的指標の考え方に基づ
 づく規格基準策定に於いてどのような
 科学的データのサポートが求められ
 たか。フードフォーラムつくば。
 2013. 4
2. Igimi S. Collaborative study for
 validation of the *Campylobacter*
 detection method from chicken.
 Meeting with Ministry of Food and
 Drug Safety of Korea. 2013. 4.
3. 五十君静信。生食用食肉の微生物基
 準の背景とリステリアの微生物基準
 の策定状況について。埼玉県・さい
 たま市・川越市合同研修会。2013. 8.
4. 五十君静信。生食肉の微生物規準の
 背景と基準のもたらしたもの。平成
 25 年度静岡市環境保健研究所技術講

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及びその妥当性評価に関する研究班

平成25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
甲斐 明美 東京都健康安全研究センター
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

クロノバクター試験法作業部会

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
研究協力者 福田 典子 日本大学生物資源科学部食品生命学科
鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
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 朋高 一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC

ビブリオ試験法作業部会

研究分担者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター
研究協力者 小西 典子 東京都健康安全研究センター
尾畑 浩魅 東京都健康安全研究センター
下島優香子 東京都健康安全研究センター
仲真 晶子 東京都健康安全研究センター

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 田中 廣行 一般財団法人日本食品分析センター
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
齋藤 利江 一般財団法人日本冷凍食品検査協会

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
	田中 廣行	財団法人日本食品分析センター
	吉田 朋高	財団法人食品分析開発センター SUNATEC
	内田 和之	シスメックス・バイオメリユール株式会社
	守山 隆敏	スリーエムヘルスケア株式会社
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	江川 智哉	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

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
矢野健太郎	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	浅尾 努	日本食品微生物学会
	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（作業部会）
	春日 文子	国衛研・食品衛生管理部
	鎌田 洋一	岩手大学
	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
	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
	田中 廣行	財団法人日本食品分析センター（作業部会）
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター（作業部会）
	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	新谷 英樹	厚労省・基準審査課
	仲川 玲	厚労省・基準審査課
	三木 朗	厚労省・監視安全課
	梅田 浩史	厚労省・監視安全課

平成 25 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 43 回検討委員会： 2013 年 6 月 18 日開催

第 44 回検討委員会： 2013 年 7 月 31 日開催

第 45 回検討委員会： 2013 年 10 月 16 日開催

第 46 回検討委員会： 2013 年 12 月 5 日開催

第 47 回検討委員会： 2014 年 2 月 24 日開催

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 43 回議事録概要(2013.6.18)

1. 事務局から、正副委員長の退職に伴い、本日の検討委員会は事務局が進行する。
2. 新谷専門官から、本事業は厚生労働科学研究費補助金であり、成果を社会に還元できるようにしたいと考えている。
3. 配布資料と第 42 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 42 回議事録概要案の確認を行い、4 か所について表現の修正を行い承認された。
4. 現在検討中の試験法は、今年度中に最終案とする予定で進める。
5. 食品からの微生物標準試験法検討委員会のホームページは、今後ホームページ作成業者に依頼して中身を整理していく予定である。

菌数計数法について

6. ISO における現状について、田中委員からバリデーション・衛生指標菌合同作業部会で整理した情報を基に説明が行われた。
7. ISO 微生物試験法における菌数算定法は、大きく 4 つに区分することができ、運用は複雑である。
8. 区分 A では、各微生物試験法の中に菌数算定法が記述されている。
9. 区分 B では、各微生物試験法の中に菌数算定法の記載はなく、ISO 7218 を参照するように記述されている。
10. 区分 B は、引用先から、さらに 3 つに細分できる。
11. B1 は、ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）を参照する。
12. B2 は、ISO 7218:1996/Amd.1:2001 を参照する。
13. B3 は、ISO 7218:1996 を参照する。
14. 上述の区分は、それぞれ菌数算定法が異なっており、統一されていないのが現状である。
15. ISO において、一般生菌数試験は、1996 年版参照になっているが、現在改定中で、今後は最新版の 2007 年版参照になると思われる。
16. ISO 7218 の最新版（現時点では 2007 年版）では、集落数採用範囲が、従来の 15～300cfu が、10～300cfu となっている。また、ISO 17025（試験所認定）に準拠しているかどうかで、各希釈段階での使用するペトリ皿の枚数が異なり、採用される菌数算定式が異なる。
17. 昨年度の委託研究である国内の法的試験法による計数と ISO 法による計数の比較について、斎藤委員から解説があった。
18. 「Ready to eat 食品」では有意差はなかったが、「成分規格対象食品」及び「魚及び魚製品」では、ISO 法の方が国内の法的試験法よりも検出率が高かった。
19. 国内の法的試験法で行い、集落計数を国内の法的試験法と ISO 法を比較すると、ISO 法の集落計数法を用いて計算した方が、数値が低くなる結果を示した。
20. 一般生菌数については、次回以降の検討委員会で議論していきたい。

腸炎ビブリオ試験法について

21. 甲斐委員より、腸炎ビブリオ試験法の検討状況の報告が行われた。
22. 定性法の作業部会案ステージ2の修正版が示された。
23. 提案法とISO 8914の比較データについて検討結果が示された。
24. 食品としては“あさりのむき身”25gを用いて人工接種し比較した。
25. ISO法の増菌培地である食塩ポリミキシンブイヨン、及び3%NaCl加アルカリペプトン水と提案法の2%NaCl加アルカリペプトン水を比較検討した。
26. ISO法の選択分離培地であるTCBS寒天とTSAT培地および提案法の酵素基質培地を比較検討した。
27. 結果として、提案法の2%NaCl加アルカリペプトン水は、ISO法と同等あるいはそれ以上の増菌効果が確認できた。
28. 選択分離培地として、酵素基質培地はISO法で採用されているTSAT培地の代わりに採用できると思われ、TCBS寒天および酵素基質培地の組み合わせが有効であることが示唆された。
29. 予め、どれぐらいの菌量を接種し保存すれば検討範囲内に収まるかコラボの前に検討しておく。
30. 接種菌数を「1g」を「1/25g」として3菌量を接種し、検体輸送時と同様の冷蔵状態で24時間、48時間保存した場合の25g中の菌数についてデータを出しておく。
31. コラボには、分離培地として、TSAT培地、TCBS培地、酵素基質培地を用い、増菌時間を37℃±1℃、16~18時間、検体数8で行う。
32. コラボ参加機関は、事務局が募集する。

微生物少数生菌標準物質の開発について

33. 松岡委員より、フローサイトメトリー法を用いた微生物少数生菌標準物質の開発についての検討結果の報告があった。
34. 本方法は、集落形成途中に集落をカウントすることが可能で、迅速化に繋がる、と考えている。
35. 前年度は平板培地へ添加していたが、今年度は、食品への添加方法について検討する予定である。

その他、事務連絡等

36. 次回は、7月31日に検討委員会を開催する。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 44 回議事録概要(2013.7.31)

1. 委員長から挨拶。
2. 前回の検討委員会では、委員長、副委員長は未定でしたが、今後の運営は、委員長は食品衛生管理部長の五十君が務め、副委員長は衛生微生物部長の寺嶋が務めます。
3. 配布資料と第 43 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 43 回議事録概要案の確認を行い、4 か所について修正を行い承認された。

菌数計数法について

4. 森委員より、ISO 7218:2007 の目次などの資料を用いて情報提供が行われた。
5. ISO 法では、ISO/IEC 17025 の原則に従った品質管理がされている検査施設とされていない試験室で、使用すべきシャーレの枚数が異なる。
6. 検出限界を下げ感度を上げるために、大型シャーレを用いる、あるいは小型シャーレ 3 枚を使用する場合がある。
7. 培養終了後、集落計数までに、インキュベーターのプログラム制御で 5°C48 時間までは保持しても良いとされている。
8. 一般的な集落算定法は加重平均をとっており、算術平均ではない。
9. 採用するコロニー数は、10 個以上 300 個未満となっているが、採用範囲に迷う場合は、専門家の判断に委ねるとしている。
10. 成分規格において、海外はどのように ISO 7218 を適用しているのか、今後作業部会で調査していく。
11. ISO7218 のように、新版と旧版が混在しているものについては、今後最新版に集約されていく。
12. 菌数計数法については、具体的な事例を盛り込みながら検討していく必要があると考えられ、必要に応じて実際に試験を行っている試験所にヒアリングを行う。
13. 現在の基準が、菌数計数法によって値が異なってくるか考慮し、今後の方針を次回以降議論していく必要がある。

微生物試験法に係わる標準品について

14. 松岡委員によるフローサイトメトリー法を用いた微生物少数生菌標準物質の開発の進捗状況について報告があった
15. 芽胞ではなく栄養体を用いて検討を行っている。
16. ソーティングゲートには菌種特有のホットスポットがあるので、今後、データベースを構築していくことが必要であると考えられる。
17. 腸炎ビブリオは CFDA 染色で染まり難く、蛍光標識グルコースでは染色できるがコロニー形成能が良好ではない。
18. 今後、標準物質を試験法のガイドラインにどのように盛り込んでいくか作業部会で検討していく。

腸炎ビブリオ試験法について

19. 甲斐委員より、資料を用いて腸炎ビブリオ試験法のコラボスタディのための保存実験の検討結果について報告があった。
20. 冷凍あさりのむき身に菌を接種し、検体送付時と同じ条件で検体を保存した場合の検出率について検討した結果が報告された。
21. 0.3~30 個/25g の接種菌量で 48 時間までの冷蔵保存で、検出率 100%となる群と 100%以下となる群が得られるというデータが示された。
22. コラボで使用する培地は、生培地を予定している。
23. 選択分離培地は、TCBS 寒天培地（2 社）と TSAT 寒天培地を全 15 機関で比較検討する。
24. 酵素基質培地は、CHROMagar Vibrio、X-VP、chromID Vibrio を各 5 機関で検討する。
25. 十分な試料数を揃えるために、あさりのむき身は冷凍品を用いる。
26. 本日 7/31 付の実行案を web 上にアップし、意見を求めるとともに、コラボ参加機関を募集する。
27. コラボ参加機関は東京から 48 時間以内に検体を届けられる機関を優先的に選択する。

その他、事務連絡等

28. バリデーション作業部会では、第三者認証機関で承認された検査キットのリスト作製を行っている。
29. 今後、データベース化し、微生物標準試験法検討委員会のホームページで公開する予定で、ISO との validation の過程でとった data 情報のウェブサイト情報も載せる。
30. 厚生労働省に EU 向けの食品における試験法の選択に関する問い合わせがあり、監視安全課は、ISO、ISO と harmonize している AOAC-OMA、BAM 法と validate している AOAC-OMA、およびこれらの試験法とバリデート済みの方法、ISO 法と同等以上と評価した第三者認証機関の方法を用いても問題ない旨を示した。
31. 次回の委員会で、計数法について検討する。
32. 鎌田委員から、毒素についても本委員会で検討していただきたいとの要望があり、次回の委員会で資料を基に検討が可能かを含め議論する。
33. 研究班は今年度が最終年度なので、各作業部会は、最終プロトコールやガイドラインの作成を進めてください。
34. 次回は、9 月または 10 月に開催予定。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 45 回議事録概要(2013.10.16)

1. 委員長から挨拶。
2. 今後の標準法検討委員会は、委員長は食品衛生管理部長の五十君が務め、副委員長は衛生微生物部長の寺嶋が務めます。
3. 今回は、毒素の試験法が検討されますので、アドバイザーとして元食品部長の松田先生に参加していただきます。
4. 副委員長から挨拶。
5. 行政から、本年度は研究事業としては最終年度ですが、引き続き研究班が継続できるように試験法の検討を進めてください。
6. 配布資料と第 44 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 44 回議事録概要案の確認を行い、7 か所について確認・修正を行い承認された。

菌数計数法について(ST1)

7. 田中委員より、バリデーション・衛生指標菌合同作業部会で作成した資料「主な国際規格の改訂状況」を用いて ISO における菌数計数法の状況説明が行われた。
8. ISO 4833 は一般生菌数試験法で菌数計数法に関係がある。今回、混釈法である ISO 4833-1:2013 が改訂され、新たに塗抹法が ISO 4833-2:2013 として設定されている。
9. ISO 7218 の中にある菌数算定法が全面差替えとなり、ISO 7218-2007/Amd.1:2013 となっており、ISO 17025 認証機関に関する記載がなくなり、GLP を実施している施設に関する記載が登場している。
10. ISO 7218-2007/Amd.1:2013 では、シャーレの枚数や菌数算定方法が記載されており、90 mm よりも大きいシャーレは面積比から集落数を算出するようになっている。また、MPN 法は整備され、自動計算ソフトがウェブ上で公開されている。
11. ウェブ上で公開されている MPN 法の計算ソフトは、計算式がわからないので、今までの計算式との比較データを出しておいた方がよい。
12. 腸内細菌科菌群の試験法の ISO 21528-1 は、committee draft の段階であり、数年後には改訂されると思われるので、注視していかなければならない。
13. ISO 7218 は改訂版の内容を確認してから議論した方がよいので、和訳を準備する予定である。
14. 一般生菌数試験の計数法として ISO 法を採用すると、様々な規格基準の適/不適に影響を与える可能性があるため、行政も慎重に検討していく必要がある。
15. 衛生指標菌試験法は ISO 法とバリデートする方法で評価できないので、ISO 法を採用する方針で検討する。
16. 衛生指標菌の作業部会で ISO 7218-2007/Amd.1:2013 を和訳し内容を確認し、本委員会へ報告する。

ウェルシュ菌試験法について(ST2)

17. 伊藤委員よりウェルシュ菌試験法について4種類の選択分離培地を比較検討した結果が示された。
18. 各培地とも選択性が強いことが示され、変法 GAM 寒天培地での生育が一番よく、KM 加卵黄 CW 寒天培地においては若干の発育抑制が認められた。
19. KM 加卵黄 CW 寒天培地は国内に二つの製品があるので、それらについても比較検討する。
20. 日本において、ウェルシュ菌の規格基準はないので、今後、どのようなデータ出しが必要になってくるか検討していく。

セレウリド試験法について

21. 毒素試験法の検討方法の参考として、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」の策定に関わった松田先生から意見をいただいた。
22. 毒素の試験法の作成方針は新たに設けず、微生物標準試験法の作成方針 ST1 から ST4 に準じて検討していく。
23. 鎌田委員からセレウス菌嘔吐毒素(セレウリド)の試験法確立に関する計画案の説明が行われた。
24. 全食品を対象とする場合は、農薬の場合は10食品ぐらいを検討するが、対象食品を決めておけば、その食品での検討となる。
25. 毒素の検出は、使用する装置や検知器によって違ってくるので、コラボスタディによる評価は難しい。
26. 試料は、不均一分布を避ける十分な量を取得することが重要である
27. 食品ごとに脂の含有量が違うので、予め評価は必要で、試料ごとに抽出試薬を検討し、前処理条件のプロトコルを確立する。
28. シングルラボでデータを出し10回の検証を行う。これらのデータを本検討委員会に報告してもらい、その後、機器間の評価を4カ所で行う。
29. 作成するプロトコルは、松田先生と森委員に確認をお願いする。
30. 2つのメーカーから販売している標準品があるので、同等かどうか確認しておく。

その他、事務連絡等

31. NIHSJ のカンピロバクター試験法が Journal of AOAC の投稿論文として採択され公開されました。
32. ISO のカンピロバクター試験法は現在改訂作業中で、冷凍していない鶏肉にはプレストン培地を用いるよう検討されている模様で、本検討委員会のデータが有用になると思われます。
33. 腸炎ビブリオ試験のコラボスタディ参加機関は9ヶ所決まっております。残り6ヶ所を予定しており、今までのコラボ参加機関に声をかけています。委員の皆様のご協力をお願いいたします。
34. 腸炎ビブリオのコラボスタディは、12月頃に実施します。

35. 次回開催は、12月5日を予定で、オブザーバーも募集しております。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第46回議事録概要(2013.12.5)

1. 委員長から挨拶。
2. 本研究事業のさらなる検討をお願いしたいので、今年度はもう一回検討委員会を開催する。
3. 毒素の試験法を検討するので、今回もアドバイザーとして元食品部長の松田先生に参加していただく。
4. 行政から、本研究事業は今年が最終年度であり、研究報告書の作成をよろしく願いたいと思います、と挨拶。
5. 配布資料と第45回議事抄録案を確認、読み上げによる第45回議事録概要案の確認を行い、修正事項はなかった。
6. ISO 7218-2007/Amd.1:2013でMPN法は整備され、自動計算ソフトがウェブ上で公開されている。現在、田中委員が、今までの計算式と自動計算ソフトでのデータを比較検討しているので、今後、結果をお示しする予定である。

クロノバクター属菌試験法について(ST3)

7. クロノバクター属菌試験法はISO/TS22964(Enterobacter sakazakiiの検出法)法を導入するが、LOD50の確認をシングルラボ2箇所で行うことにした。
8. 岡田委員からAOACのガイドラインを基に作成したミニラボ試験概要案の説明があった。
9. 検討に使用する菌株は、ATCCより購入したCronobacter sakazakii ATCC29554とする。
10. 乳児用調製粉乳にC. sakazakiiを接種し、前増菌培養後、増菌培養を行い、選択分離培地に10 \square L滴下して定型集落を確認する。
11. C. sakazakiiだけでなく、試料の乳児用調製粉乳に含まれる一般生菌数についても確認をしておく。
12. 今回の案をステージ3(案)として採択する。

ウェルシュ菌試験法について(ST2)

13. 伊藤委員より、ウェルシュ菌の選択分離培地を比較検討した結果が示された。
14. ISO法やBAM法で使用されているTSC寒天培地より、今回検討したKM加卵黄CW寒天培地の方が、検出率が低いことが示された。
15. KM加卵黄CW寒天培地においてメーカー間で差が認められた。
16. TSC寒天培地はシクロセリン含有で、KM加卵黄CW寒天培地はカナマイシン含有である。
17. 糞便の検査では、選択性の強いKM加卵黄CW寒天培地を使用するが、本検討委員

会は、食中毒検査ではなく、食品衛生検査を対象とするので、選択性の低い培地を使用した方が検出率の高くなる可能性があると思われる。

18. 今後、損傷菌対応も考え、カナマイシンを含まない卵黄 CW 寒天培地についても比較する。
19. *Clostridium perfringens* は菌株の芽胞形成能により、熱耐性が異なるので、これらについてもデータを出していく予定である。
20. 今後は食品に接種した場合について検討を行う予定である。

セレウリド試験法について(ST1)

21. 鎌田委員から「セレウス菌嘔吐毒素「セレウリド」の検出法確立に関する研究報告」の説明が行われた。
22. セレウリドの最少発症量は、1□g/人であるが、試料をどれだけ採取すればよいか考えなければならない。
23. 今回検討した試料は 5 g で、農薬の試験では、試料を 20 g 採取する。菌が毒素を産生することから、菌を均一に採取可能な量や通常の細菌検査を考慮し、セレウス菌嘔吐毒素試験の試料は 25 g とする。
24. 検体を一晩放置し、毒素が内部に入った状態においても検討する。
25. 今回検討した冷凍チャーハンは、油を含有していたので、前処理で問題はなかった、と考えられる。油を含まない米飯での前処理法についても検討を行っていく。
26. セレウス菌食中毒の原因食品は、主に米飯類だが、パスタやあんこからの食中毒事例も認められている。過去の食中毒事例を調査し、今後、食中毒の上位を占める食品について検討を行う。
27. 前処理で使用する溶媒によって、セレウリドの回収率に差が出るので、まずは、基礎データを取り、方向性を決めていく。
28. 来年度以降、セレウス菌の試験法を検討するので、菌とセレウリドと一緒に検討していく。
29. 食品に毒素を添加した時と、菌を添加した場合の毒素の回収率について、標準曲線を示す。
30. 作成するプロトコールは、松田先生と森委員が確認し、ステージ 1 としてウェブ上に公開する。

その他、事務連絡等

31. 腸炎ビブリオ試験のコラボスタディは 15 機関で 12 月 16 日、1 月 20 日に実施する予定。プロトコールは公開しているもので行い、次回の検討委員会で結果を報告する。
32. 標準試験法検討委員会の新しいホームページが完成したので、本日検討委員に内容を確認していただいた。
33. 工程管理などに、第三者認証を受けた試験法を活用してもらうため、「第三者認証機

関で承認された検査キットのリスト」を参照できるようにした。リンク先を Web 上に貼り付ける許可を得たものから公開する。

34. 33 で述べたリストは、食品の輸入の適・不適を判断するものではない旨を記載しておく。
35. ISO 法については定性法・定量法を記載し、ISO の番号を入れる。著作権の問題があり、概要しか示していないが、すべてを公開できない理由についても表示しておく。
36. 将来、プロトコルの英訳版を web で公開し海外からも閲覧できるようにする。
37. バリデーション・衛生指標菌合同作業部会では、試験法のバリデーションのチェックをしている。また、「第三者認証機関で承認された検査キットのリスト」は合同作業部会でデータベース化した。
38. 次回開催は、来年 2 月を予定している。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 47 回議事録概要案(2014.2.24)

1. 委員長より挨拶。
2. 2013 年 12 月 9 日にご逝去された田中廣行委員のご冥福をお祈りするため、黙とうを捧げた。
3. 行政から、本委員会で策定したサルモネラ属菌試験法および黄色ブドウ球菌試験法は、食品安全委員会でのリスク評価後に通知として出す予定で進める予定と報告があった。
4. 配布資料と第 46 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 46 回議事録概要案の確認を行い、2 カ所の確認と修正後、承認された。

腸炎ビブリオ試験法コラボ結果について (ST3)

5. 欠席の甲斐委員に代り五十君委員長より、腸炎ビブリオ試験のコラボスタディ結果の報告が行われた。
6. コラボスタディは、冷凍あさりのむき身に高濃度、中濃度、低濃度で菌を接種し、選択分離培地の同等性を評価した。
7. 今回配付した資料は、二回行われたコラボ試験のそれぞれの結果の集計表である。
8. 一回目と二回目の集計表の結果をバリデーション作業部会（松岡委員）が取りまとめ、LOD₅₀を算出する。
9. 集計表のみでも明らかに選択分離培地の同等性に明白な違いが認められないことが確認できるので、ステージ 4 へ移行しても問題はない。
10. ステージ 3 では、標準的な培地組成を示しているが、ステージ 4 の最終案の培地組成の表記については、各メーカーの培地組成について比較確認する。
11. カンピロバクターコラボスタディの接種菌数は、高濃度群、低濃度群とも理論値ではなく接種菌数を記載しているので、作業部会に中濃度群と低濃度群の菌数値の算出方法について確認し、次回の委員会で報告していただく。
12. 腸炎ビブリオの定義については、他の試験法の表記に合わせて記載する。
13. ステージ 3 の 1.試験法の「・・・上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または酵素基質培地に塗抹し、」をステージ 4 では、「・・・上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または TCBS 寒天培地と同等以上の性能確認された酵素基質培地に塗抹し、」に修正し、同等性が確認されたものは、TSAT、CHROMagar vibrio、X-VP、ES vibrio である旨を記載する。
14. 今回のコラボ結果は、投稿論文にまとめ公開する予定で検討する。
15. 培地の同等性評価には、どのくらいのデータ出しが必要かについて、今後バリデーション作業部会で検討する。
16. 培地に添加する塩化ナトリウムの濃度について、0%および 8%加えたものと記載している箇所の 0%を削除する。
17. 1~2%と記載している箇所と、2%と記載している箇所があるので、統一する。

18. 次回の検討委員会で、ステージ4最終案を確認する。

クロノバクター属菌試験法について (ST3)

19. 岡田委員より、クロノバクター属菌試験法のミニラボ試験の結果が示された。
20. 再分類されたクロノバクター属を対象とした試験法は未だないので、ISO/TS22964を採用し、LOD50の確認をシングルラボ2箇所で行った。
21. 検体が調製粉乳のため、低濃度の接種菌数をPOD0.25-0.75の範囲に調製するのは難しかった。
22. AOACのガイドラインに沿ってデータを検討した。
23. 今回の検討では、試料として用いた調製粉乳から一般生菌は認められなかった。
24. 接種菌量の中濃度群の表記について、測定値なのか理論値なのかを確認し、25g当たりの菌量の表記にする。
25. 次回、ISO和訳版の表現及び語句をチェックをしたプロトコール案を示し、ステージ4として検討する。

妥当性評価に係わる微生物試験法の標準品について

26. 松岡委員より妥当性評価に係わる微生物試験法の標準品について報告があった。
27. セルソーターを用い、生菌100個以下を培地に添加する方法を検討した論文がJournal of AOACに採択された。
28. これに関連したテーマが、9月に開催されるAOACのサイエンスセッションシンポジウムの議題に採択されたことが報告された。
29. 本方法を用いることにより、培地の性能比較が可能になることが期待され、バリデーション時に活用することが期待される。
30. バリデーション時、どのような形でセルソーターを使用するか、今後の検討課題になる。

セレウリド試験法

31. セレウリド試験法については、鎌田委員が作成し、松田先生と森委員に確認していただいた原案をST1として公開する予定である。
32. セレウス菌嘔吐毒素(セレウリド)を検出する質量分析計が現在使用できない状況のため、次回以降に検討する。

ウェルシュ菌試験法

33. ウェルシュ菌試験法について、伊藤委員より、コラボスタディ案を検討中との説明があった。
34. 試験結果より、ISO法で使用されているTSC寒天培地よりも、国内でよく使用されているカナマイシン加卵黄CW寒天培地の方が、夾雑菌や損傷菌に対して選択性が強いことが示された。

- 35. 国際ハーモナイゼーションを尊重し、ISO法を採用しても問題がないので、まずは、食品に接種した場合の TSC 寒天培地とカナマイシン加卵黄 CW 寒天培地の同等性評価を行い、その後、策定すべき試験法の方向性について検討する。
- 36. 検体の希釈水について問い合わせがあるが、検討委員会では緩衝ペプトン水 (BPW) に統一しており、ビブリオ試験法は例外で、BPW に食塩を添加している。

その他、事務連絡等

- 37. 田中委員が検討していた酵素基質培地による大腸菌試験法については、バリデーション・衛生指標菌合同作業部会で森委員と齋藤委員に引き継いで検討を行う。
- 38. 研究班としては最終年度なので、次の研究班が立ち上がれば、検討委員会を再開する。

以上

厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Cronobacter spp. の標準試験法に関する研究

研究分担者	荻原博和	日本大学生物資源科学部食品生命学科 教授
	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	福田典子	日本大学生物資源科学部食品生命学科
	鈴木穂高	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	百瀬愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	吉田朋高	一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC

研究要旨

クロノバクター属菌は2008年の再分類により *Enterobacter sakazakii* から *Cronobacter* spp. に変更され、現在7菌種3亜種が存在している。本菌による人の感染症は未熟児等の髄膜炎、敗血症及び壊死性腸炎を主な症状とし、その原因食品として知られている乳児用調製粉乳にはCodex委員会による微生物規格が定められている。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の *Cronobacter* spp. を分離する標準試験法を策定する必要がある。本研究では本菌の標準試験法としてISO/TS22964法を中心に検討を行っており、人工的に *C. sakazakii* を接種した乳児用調製粉乳からの検出による検討試験法の50%検出限界値（LOD50）の算出を行った。その結果、LOD50値は0.505-0.634CFU/25gであることが示された。また、クロノバクター属菌の各菌種における病原性の差異について検討を行った。

A. 研究目的

従来 *Enterobacter sakazakii* とされていたクロノバクター属菌は2008年に学術的に再分類され、*Cronobacter* spp. に変更された。現時点で *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. condimenti* 及び *C. universalis* の7菌種が属しており、更に *C. dublinensis* には *C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* 及び *C. dublinensis* subsp.

lactaridi の3亜種が属している。各菌種の病原性の差異はまだ明らかとなっていない。本菌感染症はこれまでに、未熟児等の新生児や成人に髄膜炎や敗血症、壊死性腸炎を引き起こした例が報告されている。本菌は乾燥に強く、粉乳や乾燥野菜等の食品から分離され、乳児感染症の主な感染源は、主に乳児用調製粉乳が疑われている。FAOとWHOの合同機関であるCodex委員会が本菌について定めた国際規格では、1ロットの乳児用調製粉乳について、10グラムの検体30個について、す

べて陰性であることとされている。乳児用調製粉乳からの本菌の国際的な標準試験法としては、International Standard Organization (ISO) が定める定性的試験法 (ISO/TS22964:2006) と、アメリカ合衆国の Food and Drug Administration (FDA) による BAM 法 (定量法) がある。

現在、国内では本菌の公的試験法は制定されておらず、本研究班において平成 23 年度より国際的試験法と互換性のある標準的な *Cronobacter* spp. 試験法として ISO/TS22964 (2006) を中心に検討を行った。その結果、国内で入手可能な培地の性能に大きな差がないこと、クロノバクター属菌の一部の種は現行の ISO 法での培養が抑制される傾向があること並びに増殖制御要因を明らかにした。今年度は、人工的に *C. sakazakii* を接種した乳児用調製粉乳からの検出による 50% 検出限界値 (LOD50) の算出を行った。

B. 研究方法

1) ミニコラボ試験による ISO/TS22964 (2006) における LOD50 値の算出

ISO/TS22964 (2006) における LOD50 値の算出するためのミニラボ試験は、2 か所の試験機関において AOAC International のシングルラボバリデーションのガイドラインに則って実施した。別添 1 にその概要を示す。試験機関 1 において、乳児用調製粉乳 25g を滅菌ストマッカー袋に分封し、人工的に *C. sakazakii* ATCC29544 株を 3 種類の菌濃度群に設定し、各 50 μ l を接種した。接種後は各ストマッカー袋を 2 分間手でよく揉み、菌液が粉乳内で塊を形成しないようにした。各検体はミニラボ試験実施時の輸送時間を想定し、72 時間の冷蔵後 (試験機関 2 への輸送時間を

含む) に、ISO/TS22964 (2006) による定性的試験を実施した。接種菌濃度は高濃度、中濃度、低濃度及び未接種の 4 段階を設定し、高濃度は 10¹CFU/25g、中濃度は 1CFU/25g、低濃度は 0.1CFU/25g の接種レベルを目標とした。検体数は、高濃度及び未接種は 5 検体、中濃度及び低濃度は 20 検体を用いた。前増菌培地には Buffered peptone water (BPW・メルク) を用い、増菌培地には mLST/vancomycin 培地 (オキシイド) を用いた。選択分離培地にはクロモカルトエンテロバクターサカザキ寒天培地 (メルク) と XM-sakazakii 寒天平板 (日水) を用い、44°C で培養後の平板上の定型集落の有無により判定した。LOD50 値の算出は、AOAC International のウェブサイトより入手した計算シートを用いて行った。また、乳児用調製粉乳の細菌汚染状況を調べるため、前増菌培養後に一部検体を Trypticase soy agar (TSA) 平板に塗布し、37°C 18 時間培養を行った。

2) 2 機関によるミニラボ試験結果の統計解析

2 機関で実施したミニラボ試験の試験結果について、試験室間に有意な差が見られたかを検定するため、一元配置分散分析を行った。

3) クロノバクター属菌標準菌株を用いた病原性評価

昨年度の本研究で、クロノバクター属菌の一部の種において ISO/TS22964 の培養条件での増殖が抑制される傾向にあることが明らかにされたため、クロノバクター属菌の標準菌株 5 菌種 3 亜種について、病原性の比較検討

を行った。菌株は *C. sakazakii* ATCC29544 株、*C. mytjensii* ATCC51329 株、*C. turicensis* DSM18703 株、*C. malonaticus* DSM18702 株、*C. dublinensis* subsp. *dublinensis* JCM16467 株、*C. dublinensis* subsp. *lactaridi* JCM16468 株及び *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* DSM18706 株の 7 菌株を用いた。

病原性試験は、自家繁殖のスナネズミ WGB のオス 3 か月齢に、ラット用ゾンデを用いて各菌株を 0.5ml 経口投与し、投与後 3 日目に安楽死後腸間膜リンパ節を摘出し、全量を滅菌生理食塩水に懸濁して 2 枚の TSA 平板に塗布した。平板を 37°C 24 時間培養後、形成された集落数を計数した。

C. 研究結果

1) ミニコラボ試験による ISO/TS22964 (2006) における LOD50 値の算出

2 試験機関におけるミニラボ試験結果を表 1 に示した。各レベルの接種菌数は、高濃度が検体 25g 当たり 38CFU、中濃度が 2.8CFU、低濃度が 0.4CFU であった。高濃度接種群における試験結果は両試験機関で 5 検体中 5 検体陽性 (100%) であった。中濃度接種群では 1 試験機関で 20 検体中 16 検体陽性 (80%)、他方で 20 検体中 14 検体陽性 (70%) であり、平均 75% となった。低濃度接種群では両試験機関とも 20 検体中 1 検体陽性 (0.5%) で、未接種群では両機関とも 5 検体全てが陰性であった。AOAC Intertional の計算シートを用いて算出した LOD50 値は、試験機関 1 では 0.634、試験機関 2 では 0.505 となり、両試験機関の合計の成績では 0.567 となった。また、今回の試験の POD50 は 2.8CFU/25g で 70-80% であることが示された。試験成績の

プロットからは、本試験方法の分離成績が直線ではなく、極端な S 字状カーブを示すことが明らかとなった (図 2)。

使用した乳児用調製粉乳中の細菌汚染状況を調べるために、BPW による前増菌培養終了後の培養液を各濃度について 2 検体ずつ TSA 平板に塗布したところ、人工的に接種した *C. sakazakii* 以外の菌株の発育は見られなかった。

2) 2 機関によるミニラボ試験結果の統計解析

ミニラボ試験結果について、2 か所の試験機関の間で試験成績に差があったか否かを検定するため、2 か所の試験結果が同一でなかった中濃度の結果について一元配置分散分析を行った。その結果、試験機関間の成績に有意な差は見られなかった (別添 2)。

3) クロノバクター属菌各菌種の病原性評価

スナネズミ腸間膜リンパ節から回収された菌数は、昨年度の本研究で他のクロノバクター属菌よりも ISO/TS22964 での増殖性が低かった *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* においても他の菌種と同様であり、スナネズミの体内移行性に差がないことが示された (表 2)。

D. 考察

クロノバクター試験法作業部会では一昨年度より、国際的に整合性のある食品からの *Cronobacter* spp. 試験法として ISO/TS22964 法を基礎とした国内標準試験法原案を作成し、諸条件の検討を行ってきた。その結果、現行の *E. sakazakii* を対象とした ISO 法では、新分類の *Cronobacter* 属菌の中で検出困

難な菌種があることが示されたが、食品からの *Cronobacter* 属菌の近縁他種からの分離同定には有効であった。また、*Cronobacter* 属菌各菌種間の病原性に差がない可能性が示された。また、ISO 法の改訂に携わる海外の研究者より、今後の改訂が当面行われないと情報が得られた。以上から、ISO/TS22964 を基にした NIHSJ-22 を現時点での国内標準試験法として設定していくことを「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に提案し、その LOD50 値が乳児用調製粉乳検体 25g 当たり 0.505-0.634CFU であることを示した。将来的に ISO 法が新分類に合わせて改定された場合には、国内標準試験法についても見直しが必要になると思われる。

E. 結論

一昨年度より、国際的に互換性のある食品からの *Cronobacter* spp. 試験法として ISO/TS22964 を基礎とした標準試験法案を作成・検討するとともに、ISO 法改訂についての情報を収集した結果、現時点での国内標準試験法として NIHSJ-22 を提案し、その乳児用調製粉乳から LOD50 値を 0.505-0.634CFU /25g とした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

Y. Okada, H. Suzuki, H. Ogihara, S. Monden, Y. Momose, N. Fukuda, S. Igimi

Characterization of Growth and Pathogenicities of *Cronobacter sakazakii* and Related Species. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013)

Y. Okada, H. Suzuki, H. Ogihara, S. Monden, Y. Momose, N. Fukuda, S. Igimi

Pathogenicity Determination of *Cronobacter* spp. The 3rd Asia Pacific International Conference on Food Safety

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 謝辞

本研究のデータ解析についてご協力いただいた東京農工大学工学部松岡英明教授をはじめとする本研究班バリデーショナル作業部会の皆様に深謝いたします。

別添1. クロノバクター属菌 ミニラボ試験概要

目的：ISO/TS22964法（*Enterobacter sakazakii*の検出法）における Level of Detection of 50% (LOD₅₀) の算出

参加施設：日本大学生物資源科学部、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

使用菌株：*Cronobacter sakazakii* ATCC29554

使用検体：乳児用調製粉乳 各 25g

接種菌量：①高濃度 38 CFU/25g

②中間濃度 2.8 CFU/25g

③低濃度 0.4 CFU/25g

④未接種

実施数(1施設当たり)：①高濃度 5検体

②中間濃度 20検体

③低濃度 20検体

④未接種 5検体

試験内容：

①粉乳 25g をストマッカー袋に秤量し、菌液 50 μ l を接種後、手で袋を 2 分間揉む

②5°Cに保管または冷蔵状態で輸送

③72 時間後に試験開始

④各ストマッカー袋に BPW225ml を加え、1 分間ストマッキング後、37°C 18 時間培養

⑤増菌培地 10ml に前増菌液 100 μ l を接種し、44°C 24 時間培養

⑥選択分離培地に 10 μ l をコンラージ棒で塗布

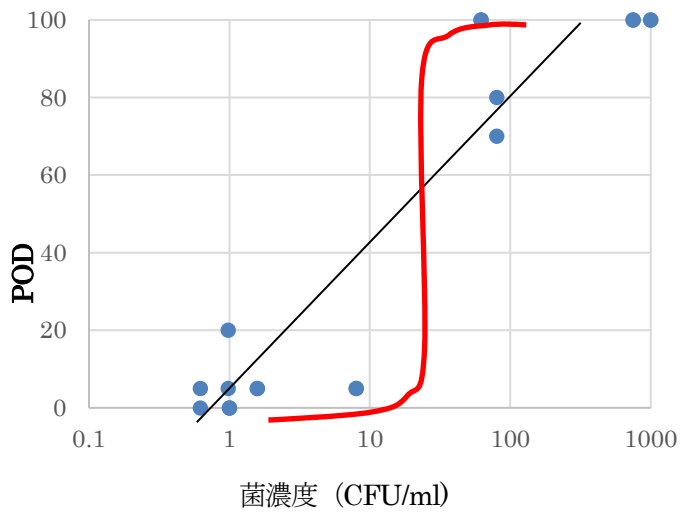
⑦44°C 24 時間培養

⑧発育の有無で陽性/陰性の判定

表 1. ミニラボ試験結果及びLOD50 値

接種レベル	菌数濃度 (CFU/25g)	陽性検体数/試験検体数 (%)		
		試験機関1	試験機関2	合計
高濃度	38.00	5/5(100)	5/5(100)	10/10(100)
中間濃度	2.80	16/20(80)	14/20(70)	30/40(75)
低濃度	0.40	1/20(5)	1/20(5)	2/40(5)
LOD50 値		0.643	0.505	0.567

図1. ミニラボ試験観測値のプロット図 (東京農工大学 松岡英明教授 作成)



別添 2. ミニラボ試験結果の一元配置分散分析結果

$\alpha=0.05$

2-1. 結果の集計

菌数濃度 (CFU/25g)	検体数	陽性検体数		
		試験機関 1	試験機関 2	合計
38	5	5	5	10
2.8	20	16	14	30
0.4	20	1	1	2

2-2. 概要

グループ	標本数	合計	平均	分散
列 1	3	22	7.33333333	60.3333333
列 2	3	20	6.66666667	44.3333333

2-3. 分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	0.666667	1	0.66666667	0.01273885	0.915574	7.708647
グループ内	209.3333	4	52.3333333			
合計	210	5				

2-4. 結果

観測された分散比 F 境界値
 0.012738854 < 7.70864742 ⇒ 有意差なし

表 2. スナネズミにおける *Cronobacter* spp.各菌種の病原性

腸間膜リンパ 節への移行	菌種							
	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. dublinensis</i> supsp. <i>dublinensis</i>	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	<i>C. dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C.</i> <i>malonaticus</i>	<i>C. turisensis</i>	<i>C. muytjensii</i>
+	5	10	9	3	7	4	3	8
-	5	0	1	6	3	4	6	1

平成 25 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
食品中の微生物試験及びその妥当性評価に関する研究

分担研究報告書

分担課題名 腸炎ビブリオ試験法

研究分担者：甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

研究協力者：小西 典子 東京都健康安全研究センター

尾畑 浩魅 東京都健康安全研究センター

下島 優香子 東京都健康安全研究センター

仲真 晶子 東京都健康安全研究センター

研究要旨：食品を対象とした腸炎ビブリオの標準試験法を作成することを目的として、15 検査機関で腸炎ビブリオの検出を試み、提案法の評価を行った（コラボレイティブ・スタディ）。今回のコラボレイティブ・スタディでは、食品 25 g 中腸炎ビブリオ菌数が 10 個台であれば 100%検出することができた。また接種菌数を少なくすると検出率も低下した。

今回使用した分離平板は、糖の分解性を指標とした培地（2 種類）と酵素基質培地（3 種類）の 5 種類であった。それぞれ抑制力や目的とする菌の色調に特徴があるため、糖の分解性を指標とした培地と酵素基質培地との併用が望ましいと考えられた。

A. 研究目的

食品を対象とした腸炎ビブリオの標準試験法を作成することを目的として、これまでに増菌培地や確認培地等に添加する食塩濃度、培養温度、培養時間、また選択分離培地等に関する事項について検討を行ってきた。そしてこれらの結果を踏まえ、新しい試験法の提案を行った（提案法）。

一方、食品を対象とした国際的な試験法として ISO 法が示されている。提案法を日本の標準法とするためには ISO 法と同等あるいはそれ以上の精度であることを確認する必要がある。前年度は、提案法と ISO 法で腸炎ビブリオ検出率の比較実験を行った。

その結果、提案法での腸炎ビブリオ検出率は ISO 法と同等、あるいは同等以上であることが確認できた。今年度は、模擬検体を用いて複数検査機関で腸炎ビブリオの検出を試み、提案法の評価を行った（コラボレイティブ・スタディ）。

B. 研究方法

1. 検査実施機関

地方衛生研究所をはじめとした食品検査実施機関合計 15 箇所を検査を 2 回に分けて実施した。第 1 回目は 2013 年 12 月 16 日～20 日、第 2 回目は 2014 年 1 月 20～24 日に実施した。

2. 供試菌株および食品

食中毒患者から分離された病原毒素である耐熱性溶血毒 (TDH) 産生性の腸炎ビブリオ 1 株 (血清型 O3 : K6, V12-10) を供試した。食品は、市販の「あさりのむき身 (冷凍品)」を用いた。

3. 模擬検体の作製法

「あさりのむき身」は、解凍後、流水で 1 回洗浄して滅菌済みストマッカー袋に 25 g ずつ秤量した。

食品へ接種するための腸炎ビブリオは、2%NaCl 加アルカリペプトン水で 2 回継代培養後、滅菌生理食塩水で 10^{-6} 倍希釈 (高菌数群), 10^{-7} 倍希釈 (中菌数群), 10^{-7} 倍希釈液をさらに 2 倍希釈 (低菌数群) し、食品 25 g にそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつ接種し、模擬検体を作製した。

4. 検体の送付

1 検査機関につき、高菌数群, 中菌数群, 低菌数群および未接種群を各 4 検体ずつ、合計 16 検体を送付した。ストマッカー袋に入れた模擬検体は、さらにバイオパウチ袋に入れ、発砲スチロールの容器に冷媒、温度記録計と共に梱包、ジュラルミンケースに入れて各検査機関へ送付した (写真 1)。

5. 腸炎ビブリオ接種菌数測定方法

接種菌数を測定するために、 10^{-6} 倍希釈液, 10^{-7} 倍希釈液および 10^{-7} 倍希釈液をさらに 2 倍希釈した菌液を、3%NaCl 加普通寒天培地に $100 \mu\text{l}$ ずつ各 10 枚の平板に滴下し、コンラージ棒を用いて平板全体に菌液を延ばす程度に軽く塗抹した。接種菌数は、出現した集落数から算出して求めた。

6. 食品からの腸炎ビブリオ検出方法

食品からの腸炎ビブリオ検出方法を図 1 に示した。

1) 増菌培地

増菌培地は、2%NaCl 加アルカリペプトン水 (栄研化学) を用いた。ストマッカー袋に入れた模擬検体 (腸炎ビブリオを接種した食品) に、増菌培地を 225ml 加え 30 秒間ストマッキングし、 37°C で 16~18 時間培養後、選択分離培地に塗抹した。

2) 分離培地

選択分離培地は、糖の分解性を指標とする TCBS 寒天 (栄研化学), ISO 法で使っている Triphenyltetrazolium chloride soya trypton agar (TSAT, 自家製), および酵素基質培地である CHROMagar Vibrio (関東化学), ES ビブリオ寒天 (栄研化学), X-VP 寒天 (日水) の 5 種類を用いた。

各増菌培養液を白金耳 ($10 \mu\text{l}$) で一定量塗抹分離後、 37°C で 16~18 時間培養し、腸炎ビブリオ様集落について確認培地 (2% NaCl 加 TSI 寒天, 2%NaCl 加 LIM 培地, 0%NaCl 加ペプトン水) に接種し、腸炎ビブリオであることを確認した。

C. 研究結果

1. 接種菌数

「あさりのむき身」25 g に接種した腸炎ビブリオ菌数は、高菌数接種群で 20.4 個および 14.4 個, 中菌数接種群では 2.0 個および 1.3 個, 低菌数接種群では 1.4 個および 1.0 個であった。

2. 食品の生菌数

供試した「あさりのむき身」の生菌数は 1 回目 3.2×10^3 個 /g, 2 回目は 300 個以下 /g であった。

3. 検体搬送時の温度変化

検体搬送時の温度記録計を解析した結果、全ての施設において、検体送付から到着時

の梱包開封時までの間は 10℃以下に保たれていた。

4. 腸炎ビブリオ検出状況

1) 第1回目コラボレイティブ・スタディ
15施設で実施したコラボレイティブ・スタディの実施結果を表1に示した。菌数接種群別に腸炎ビブリオ陽性検体数および陽性率をみると、高菌数接種群は60検体中60検体(100%)、中菌数接種群51検体(85%)、低菌数接種群31検体(51.7%)、未接種群0検体であった。

分離培地により検出率に差が認められたのは1施設のみであり、15施設中14施設は、腸炎ビブリオ陽性検体であれば、いずれの分離培地からも検出されていた。1施設では、高菌数接種群2検体で分離培地による差が認められた。すなわち、TSAT寒天培地で腸炎ビブリオ陰性が1検体、CHROMagarVibrioで陰性が2検体であった。(表2)。

2) 第2回目コラボレイティブ・スタディ
菌数接種群別に腸炎ビブリオ陽性検体数および陽性率をみると、高菌数接種群は60検体中60検体(100%)、中菌数接種群47検体(78.3%)、低菌数接種群31検体(51.7%)、未接種群0検体であった。

分離培地による検出率の差が認められたのは1施設のみであり、高菌数接種群のTSAT寒天のみが、腸炎ビブリオ陰性であった(表3)。尚、分離培地による検出率に差が認められた各1施設は、1回目と2回目でそれぞれ異なっていた。

D. 考察

今回、食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を確立するために、15施設でコラ

ボレイティブ・スタディを実施した。高菌数を接種した群では、いずれの回も100%の検出率、未接種群では検出されなかった。中菌数接種群の検出率は85%および78.3%、低菌数接種群の検出率は、いずれも51.7%であった。提案法では、食品25g中に腸炎ビブリオが10個台存在すれば100%検出できることが明らかとなった。

分離培地別検出状況をみるとTCBS寒天、X-VP寒天、ESビブリオ寒天はいずれの菌量でも腸炎ビブリオの検出が可能であった。

一方、TSAT寒天およびCHROMagarVibrioでは、高菌数接種群で分離できなかった検体が各2検体ずつ認められた。これはTSAT寒天およびCHROMagarVibrioの抑制力が弱く、腸炎ビブリオ以外の菌が多く発育してしまったためと考えられた。今回使用した分離培地ではX-VP寒天の抑制が最も強く、微小な集落はまったく発育しなかった。

提案法に関するコラボレイティブ・スタディ参加機関からの意見で多かったのは、培地の選択性が実感できたということであった。また、分離平板へ塗抹した後の培養時間について、16~18時間培養では勤務時間外になってしまうため、プログラムインキュベーターが必要であるとの指摘があった。作業手順として、塗抹分離した平板を室温に置いておき、夕方から培養すること等も考える必要がある。

E. 結論

食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を作成するために、複数機関で検査を実施し提案法の評価を行った。今回のコラボレイティブ・スタディでは、食品25g中腸

炎ビブリオ菌数が10個台であれば100%検出することができた。また接種菌数を少なくすると検出率も低下した。

今回使用した分離平板は、糖の分解性を指標とした培地（2種類）と酵素基質培地（3種類）の5種類であった。それぞれ抑制力や目的とする菌の色調に特徴があるため、糖の分解性を指標とした培地と酵素基質培地との併用が望ましいと考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

小西典子，尾畑浩魅，高橋正樹，下島優香子，仲真晶子，工藤由起子，甲斐明美：食品を対象とした腸炎ビブリオ試験法作成のための基礎的検討（2）.第47回腸炎ビブリオシンポジウム，広島県，2013.11.

H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

写真. 検体の送付方法



- ① バイオパウチに食品検体(25g×8袋)を入れてシールする。



- ② バイオパウチ2袋(8検体×2袋)を発泡スチロール箱に入れ、両サイド面に冷媒を入れる。



- ③ バイオパウチ袋の間に温度記録計を入れる。



- ④ 更に上にも冷媒を入れる。



- ⑤ 検体の入った発砲スチロールをジュラルミンケースに入れて送付。

図1. 腸炎ビブリオ試験法・定性法(コラボレイティブ・スタディ用)

供試食品 : あさりのむき身

菌株 : 1株(血清型O3:K6, TDH産生株)

接種菌数 : 高濃度(10¹オーダー/25g) × 4検体
中濃度(10¹オーダー/25g) × 4検体
低濃度(10⁻¹オーダー/25g) × 4検体
未接種 × 4検体 } 16検体 × 2回実施

方法

模擬検体(食品25g)



増菌培地 2%NaCl加アルカリペプトン水 225ml 添加
ストマッキング処理



37°C ± 1°C, 16~18時間



増菌培養液の1~2白金耳を分離培地に画線塗抹

- ・選択分離培地: TCBS寒天, TSAT寒天
- ・酵素基質培地: CHROMagar Vibrio, X-VP, ES vibrio,



37°C ± 1°C, 16~18時間



腸炎ビブリオと推定される集落について生化学的性状試験

- ・2%NaCl加TSI寒天
- ・2%NaCl加LIM培地
- ・0%NaCl加ペプトン水

表1 . 新しい腸炎ビブリオ検査法のためのコロレイティブ・スタディ実施結果

	接種菌数	供試数	施設数	
			V.p 陽性(%)	V.p 陰性(%)
1回目	高菌数	60	60 (100)	0 (0)
	中菌数	60	51 (85)	9 (15)
	低菌数	60	31 (51.7)	29 (48.3)
	未接種	60	0 (0)	60 (100)
2回目	高菌数	60	60 (100)	0 (0)
	中菌数	60	47 (78.3)	13 (21.7)
	低菌数	60	31 (51.7)	29 (48.3)
	未接種	60	0 (0)	60 (100)

検査実施 : 15施設
 高菌数接種群: 10¹個 /25g
 中菌数接種群: 10⁰個 /25g
 低菌数接種群: 10⁰個 / 25g

表2. 分離培地別検出状況(1回目)

接種菌数	陽性数	V.p検出数(%)				
		TCBS	TSAT	CHROMagar	X-VP	ES vibrio
高菌数	60	60 (100)	59 (98.3)	58 (96.7)	60 (100)	60 (100)
中菌数	51	51 (100)	51 (100)	51 (100)	51 (100)	51 (100)
低菌数	31	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)

表3. 分離培地別検出状況(2回目)

接種菌数	陽性数	V.p検出数(%)				
		TCBS	TSAT	CHROMagar	X-VP	ES vibrio
高菌数	60	60 (100)	59 (98.3)	60 (100)	60 (100)	60 (100)
中菌数	47	47 (100)	47 (100)	47 (100)	47 (100)	47 (100)
低菌数	31	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)

平成 25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及びその妥当性評価に関する研究

分担研究報告書

「衛生指標菌試験法の標準法策定の検討」

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： 田中 廣行（一般財団法人日本食品分析センター）

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）

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。

今年度の本研究では、 β -グルクロニダーゼ陽性大腸菌の試験法である ISO 16649-2 : 2001 を大腸菌数の試験方法として採用する場合において、ストレス処理（凍結処理）を行った大腸菌自然汚染の食品種ごとに当該試験法に記述されている損傷菌を対象とした培養条件の有効性の検討するとともに、培養時間が超過した場合の影響についても考察した。その結果、本研究において用いた食品種では、損傷菌（凍結処理）に対する前培養の有効性は認められなかった。また、培養時間が 24 時間を越えた場合の大腸菌数は 18～24 時間培養後の大腸菌数と差は認められなかったが、大腸菌以外の集落が増加した試料が認められたことから、大腸菌集落の誤判定を避けるためにも、規定された培養時間を守る必要があると考えられた。さらに、本研究で用いた食品のように TBX 寒天培地（ 44 ± 1 °C、18～24 時間培養）に生育する大腸菌以外の菌が多数共存する試料では、ISO 16649-2 : 2001 に規定された計数・計算方法どおりには大腸菌数の算出ができない可能性があるため、このような場合の計数・計算方法についても検討する必要があると考えられた。

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。

昨年度の本研究では,当該試験法に記述されている損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討するため,ストレス処理(加熱処理,酸処理及び凍結処理)を行った大腸菌の菌液についてTBX寒天培地を用いた大腸菌数の測定を実施した。その結果,加熱処理及び凍結処理においては,前培養「なし」の大腸菌数よりも前培養「あり」の大腸菌数のほうが高い傾向にあったが,極端な相違は認められなかった。したがって,ISO 16649-2:2001を大腸菌数の試験方法として採用する場合は,食品群ごとに前培養の有効性を比較・評価し,前培養を行う必要がある

のかを検討しなければならないと考えられた。

今年度の本研究では,ストレス処理(凍結処理)を行った大腸菌自然汚染の食品について,当該試験法に記述されている損傷菌を対象とした培養条件の有効性の検討を目的とするとともに,培養時間が超過した場合の影響についても考察することを目的とした。

B. 研究方法

1) 研究概要

ISO 16649-2:2001では,TBX寒天培地の培養条件を「 44 ± 1 °C, 18~24時間」と規定しているが,ストレスを受けた大腸菌(損傷菌)の存在が疑われる場合は,「 37 ± 1 °C, 4時間」の前培養を行った後に「 44 ± 1 °C, 18~24時間」培養するよう規定している。損傷菌に対する前培養の有効性を確認するために,ストレス処理(凍結処理)を行った食品について,TBX寒天培地を用いて2通りの培養条件(前培養「なし」及び前培養「あり」)により大腸菌数を測定し,それぞれについて得られた結果を比較・評価した。

また,ISO 16649-2:2001では,TBX寒天培地の培養条件において,「培養時間は24時間を超えてはならない」と規定している。培養時間が24時間を超過した場合の影響を確認するため,18~24時間に加え,42~48時間培養後の大腸菌集落数も計測し,得られた結果を比較・評価した。

2) ストレス処理(凍結処理)を行った試料の大腸菌数測定における前培養の有効性

① ストレス処理(凍結処理)

-20 °Cに設定した冷凍庫内に食品を2~3日間保存したものをストレス処理(凍結処理)試料とした。

② 試料液の調製

ストレス処理後の試料を10 gずつ無菌的

に秤量し、滅菌ペプトン加生理食塩水 90 ml を加えた後、ストマッカーを用いて 1 分間攪拌・混合して試料原液とした。また、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて試料原液の 10 倍段階希釈液を調製した。

③大腸菌数の測定

TBX 寒天培地を用いた混積平板培養法により試料の大腸菌数を測定した。なお、以下に示した 2 条件により培養し、生育した大腸菌の典型集落数を計測し、試料 1 g 当たりの大腸菌数を算出した。ただし、ISO 16649-2:2001 では「典型集落数が 150 個未満かつ総集落数が 300 個未満の平板の典型集落数を計数する」とあるが、1 平板の総集落数が 300 個以上の場合でも典型集落数が 150 個未満であった場合は大腸菌数の数値として採用した。

条件 1: 44±1 °C, 18~24 時間(前培養「なし」)

条件 2: 37±1 °C, 4 時間後に 44±1 °C, 18~24 時間(前培養「あり」)

3) 培養時間が 24 時間を超えた場合の大腸菌数測定結果への影響

①試料液の調製

試料(食品)を 10 g ずつ無菌的に秤量し、滅菌ペプトン加生理食塩水 90 ml を加えた後、ストマッカーを用いて 1 分間攪拌・混合して試料原液とした。また、滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて試料原液の 10 倍段階希釈液を調製した。

②大腸菌数の測定

TBX 寒天培地を用いた混積平板培養法により試料の大腸菌数を測定した。なお、44±1 °C, 18~24 時間培養し、大腸菌の典型集落数を計測した後、速やかに 44±1 °C の恒温器に入れ、さらに 24 時間培養し、生育した典型集落数を計測した。典型集落数から試料 1 g 当たりの大腸菌数を算出した。ただし、ISO 16649-2:2001

では「典型集落数が 150 個未満かつ総集落数が 300 個未満の平板の典型集落数を計数する」とあるが、1 平板の総集落数が 300 個以上の場合でも典型集落数が 150 個未満であった場合は大腸菌数の数値として採用した。

C. 研究結果及び考察

1) ストレス処理(凍結処理)を行った試料の大腸菌数測定における前培養の有効性
ストレス処理を行った試料の大腸菌数測定結果を表-1 に示した。

なお、大腸菌数を測定した TBX 寒天培地の一例を写真-1~4 に示した。また、前培養「あり」の大腸菌数(対数)から前培養「なし」の大腸菌数(対数)を引いた値を図-1 に示した。前培養「なし」と前培養「あり」の大腸菌数においては、11 試料中 8 試料で前培養「なし」の大腸菌数が高い値であったが、表-1 に示したとおり、その比は 2.0 以内であり、極端な大腸菌数の相違は認められなかった。また、各測定値を対数に変換した後、対応のある 2 群の平均の差の t 検定を行った結果、得られた t_0 値は 0.26 であり、有意水準 1% で「有意差なし」と判定された。

2) 培養時間が 24 時間を超えた場合の大腸菌数測定結果への影響

試料の大腸菌数測定結果を表-2 に示した。

なお、大腸菌数を測定した TBX 寒天培地の一例を写真-5~8 に示した。

培養 18~24 時間及び培養 42~48 時間において大腸菌集落数の差はまったく認められず、培養 42~48 時間後でも大腸菌集落の判定に支障はなかった。しかし、培養 42~48 時間後では大腸菌(青色)以外の集落が大きくなることや新たな大腸菌以外の集落が出現した試料も認められた。

D. 結論

ストレス処理(凍結処理)を行った食品に対して、損傷菌を対象とした培養条件の有効性について検討した。その結果、前培養「なし」の大腸菌数と前培養「あり」の大腸菌数において明らかな差は認められず、対応のある2群の平均の差のt検定においても、有意水準1%で「有意差なし」と判定された。したがって、本研究において用いた食品では、損傷菌(凍結処理)に対する前培養の有効性は認められなかった。

また、本研究において用いた食品では、培養時間が24時間を超えた場合の大腸菌数は18～24時間培養後の大腸菌数と差は認められなかったが、大腸菌以外の集落が増加した試料が認められたことから、夾雑菌の種類によっては24時間を超える培養で典型集落の判別に影響が出る可能性もあると考えられた。

以上のことから、前培養の有効性は大腸菌が受けたストレスや食品群によって異なると考えられ、ISO 16649-2:2001を大腸菌数の試験方法として採用する場合は、食品群ごとに前培養の有効性を比較・評価し、前培養を行う必要があるのかを検討することが重要と考えられた。また、大腸菌集落の誤判定を避けるためにも、規定された培養時間を守る必要があると考えられた。なお、本研究で用いた食品のようにTBX寒天培地(44±1℃, 18～24時間培養)に生育する大腸菌以外の菌が多数共存する試料では、ISO 16649-2:2001に規定された計数・計算方法どおりには大腸菌数の算出ができない可能性があるため、このような場合の計数・計算方法についても検討する必要があると考えられた。

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

表-1 試料の大腸菌数測定結果

食品	試料1 g当たり的大腸菌数 ^{*1}		B/A
	ストレス処理あり		
	前培養「なし」(A) ^{*2}	前培養「あり」(B) ^{*3}	
牛小間肉	1.6×10 ²	1.5×10 ²	0.94
豚ひき肉	8.3×10 ³ ^{*4}	6.8×10 ³ ^{*5}	0.82
鶏むねひき肉	2.4×10 ²	2.3×10 ²	0.96
鶏ももひき肉	1.4×10 ⁵	1.2×10 ⁵	0.86
鶏つみれ	2.2×10 ²	1.9×10 ²	0.86
鶏レバー	1.0×10 ⁵	1.1×10 ⁵	1.10
鶏きも	5.6×10 ⁵	4.8×10 ⁵	0.86
いとより	1.2×10 ² ^{*6}	1.1×10 ² ^{*7}	0.92
鶏味付きつみれ	30	60	2.00
メンチカツ	1.5×10 ²	1.6×10 ²	1.07
コロッケ	1.0×10 ²	80	0.80

*1 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*2 44±1℃, 18~24時間

*3 37±1℃, 4時間後に44±1℃, 18~24時間

*4 写真-1

*5 写真-2

*6 写真-3

*7 写真-4

表-2 試料の大腸菌数測定結果

食品	試料1 g当たりの大腸菌数 ^{*1, *2}	
	培養18～24時間 ^{*3}	培養42～48時間 ^{*4}
牛小間肉	2.7×10 ³ (約10 ⁴ ～10 ⁵)	2.7×10 ³ (約10 ⁴ ～10 ⁵)
豚ひき肉	1.5×10 ⁴ ^{*5} (約10 ⁴ ～10 ⁵)	1.5×10 ⁴ ^{*6} (約10 ⁵)
鶏むねひき肉	4.1×10 ² (約10 ⁵)	4.1×10 ² (約10 ⁵)
鶏ももひき肉	1.1×10 ⁵ (約10 ⁵ ～10 ⁶)	1.1×10 ⁵ (約10 ⁵ ～10 ⁶)
鶏つみれ	2.1×10 ² (10未満)	2.1×10 ² (50)
鶏レバー	4.6×10 ⁵ (約10 ⁴ ～10 ⁵)	4.6×10 ⁵ (約10 ⁵)
鶏きも	4.1×10 ⁵ (約10 ⁵)	4.1×10 ⁵ (約10 ⁵)
いとより	1.5×10 ² ^{*7} (約10 ²)	1.5×10 ² ^{*8} (約10 ²)
鶏味付きつみれ	40 (約10 ⁵)	40 (約10 ⁵)
メンチカツ	60 (約10 ⁵)	60 (約10 ⁵)
コロッケ	5.8×10 ² (約10 ³)	5.8×10 ² (約10 ⁴)

*1 TBX寒天培地を用いた混釈平板培養法

*2 括弧内に試料1 g当たりの大腸菌以外の菌の概数を示した。

*3 44±1℃, 18～24時間

*4 44±1℃, 42～48時間

*5 写真-5

*6 写真-6

*7 写真-7

*8 写真-8

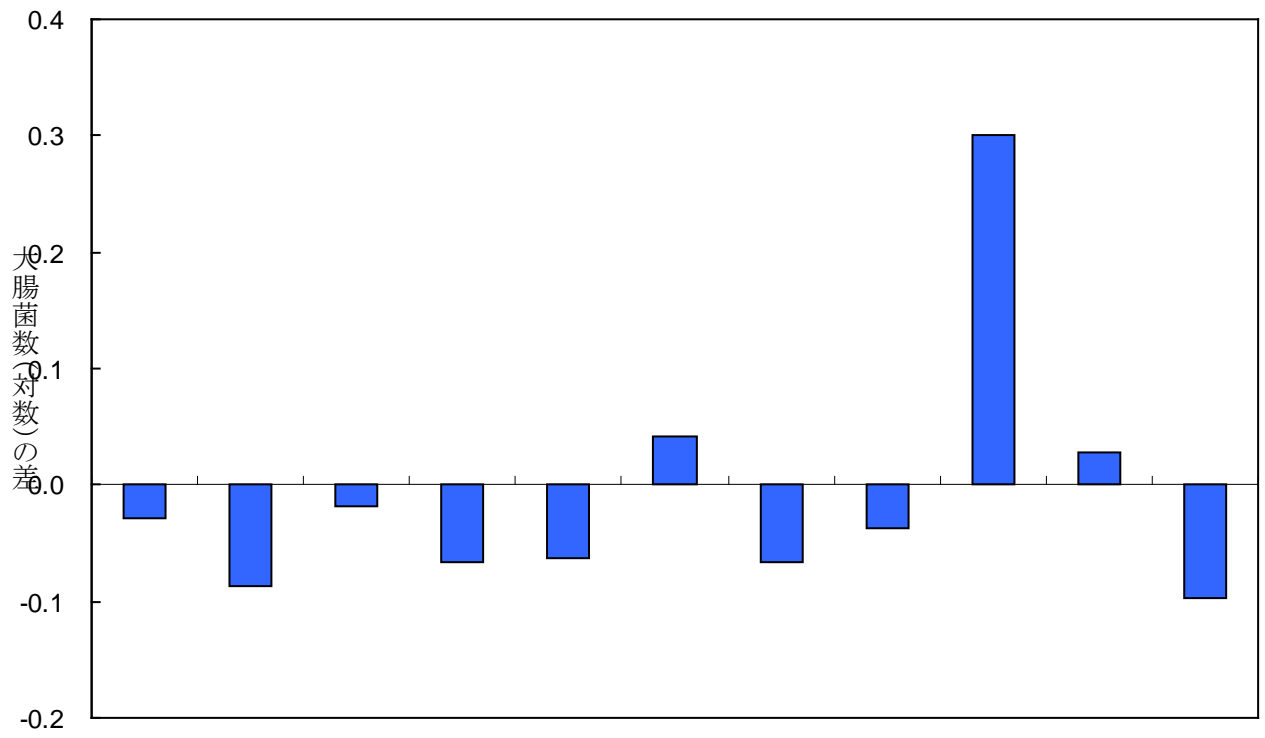


図-1 前培養「なし」(A)及び「あり」(B)で培養した大腸菌数(対数)の差(B-A)

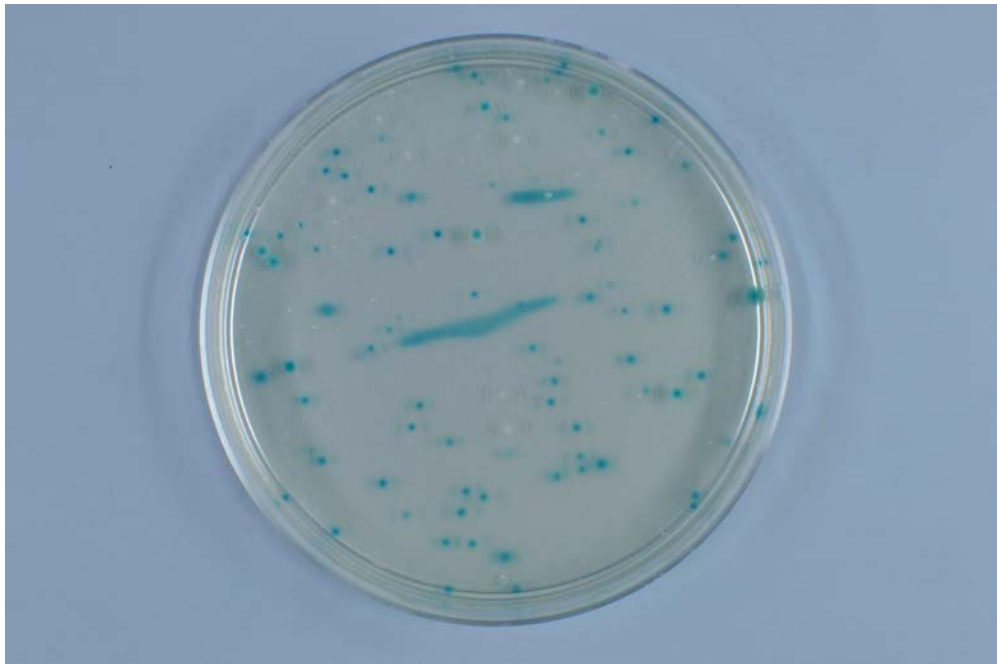


写真-1 豚ひき肉 ストレス処理あり 前培養「なし」
18～24時間培養 [100倍希釈液]

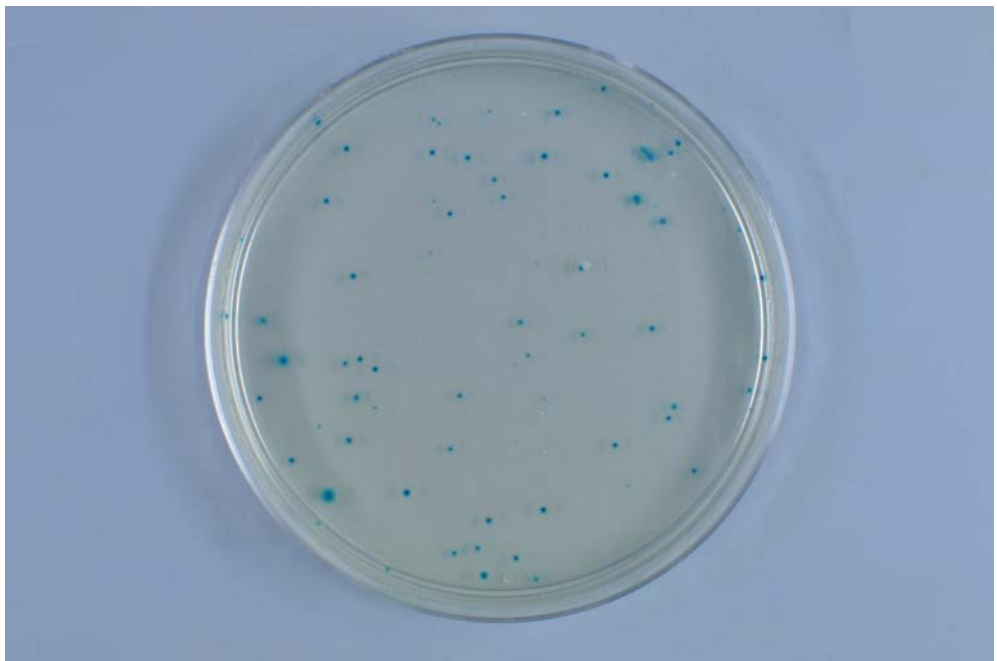


写真-2 豚ひき肉 ストレス処理あり 前培養「あり」
18～24時間培養 [100倍希釈液]

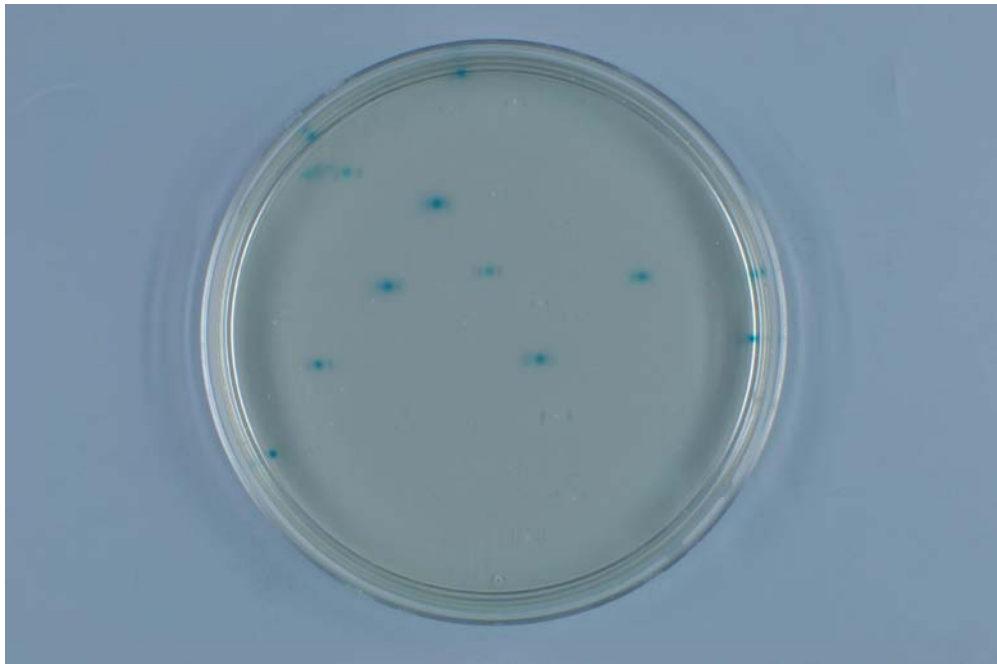


写真-3 いとより ストレス処理あり 前培養「なし」
18～24時間培養 [10倍希釈液]

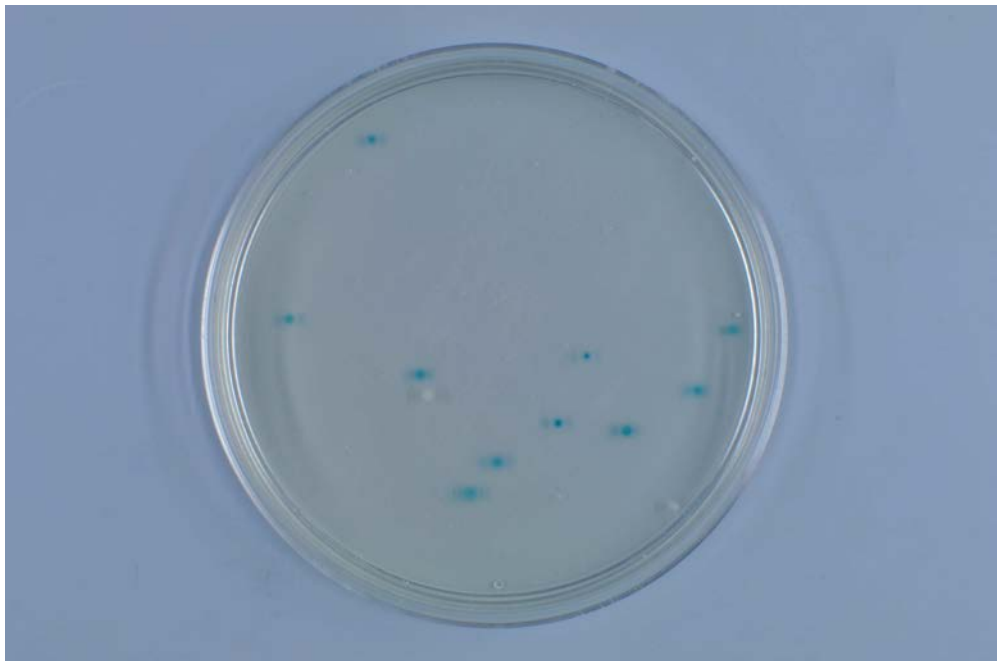


写真-4 いとより ストレス処理あり 前培養「あり」
18～24時間培養 [10倍希釈液]

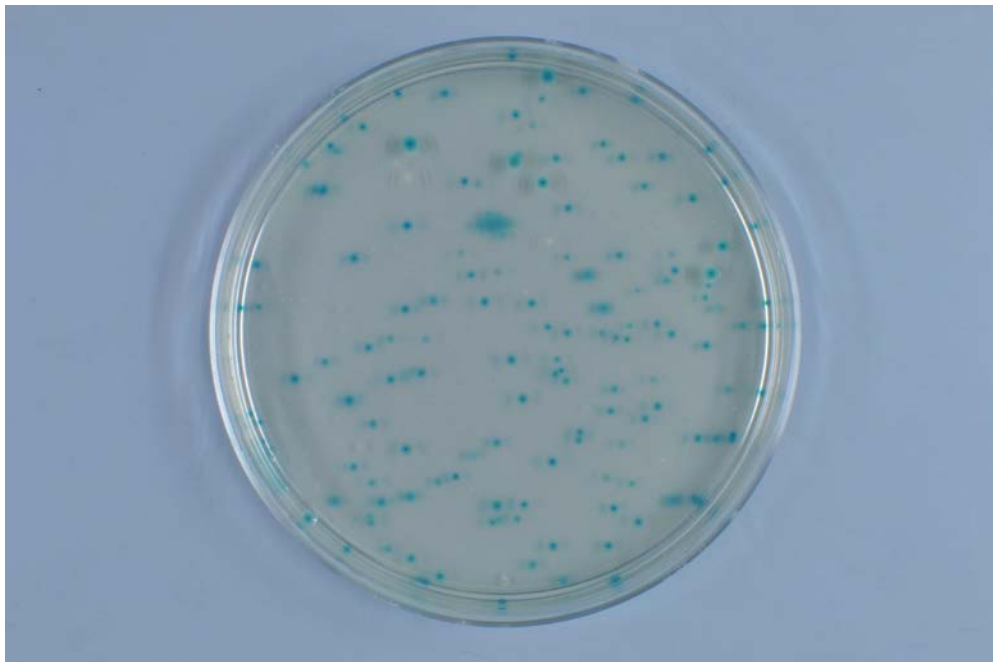


写真-5 豚ひき肉 18～24時間培養 [100倍希釈液]

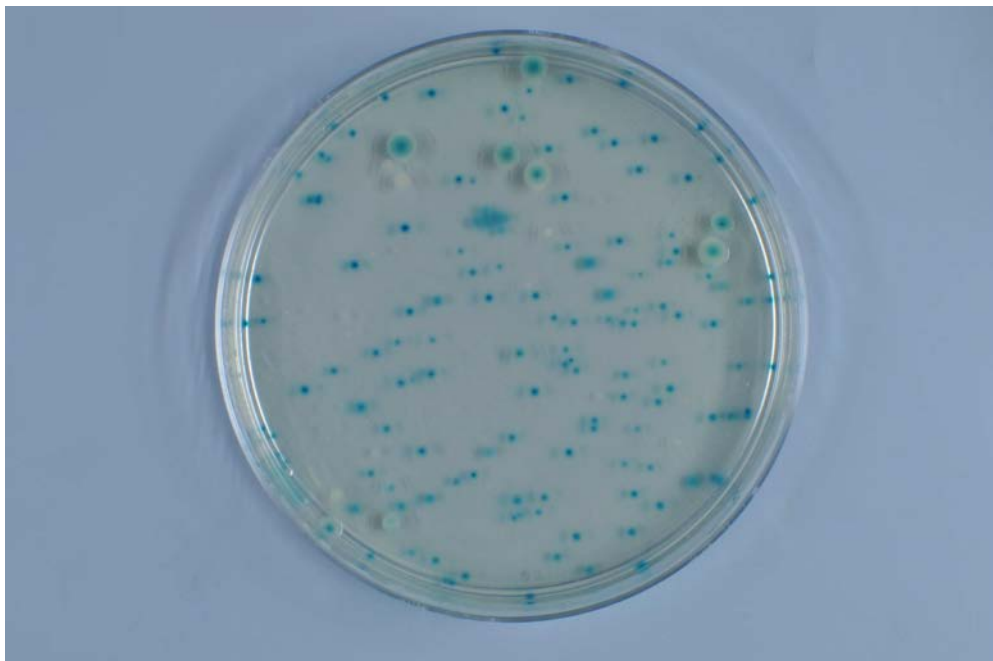


写真-6 豚ひき肉 42～48時間培養 [100倍希釈液]



写真-7 いとより 18～24時間培養 [10倍希釈液]

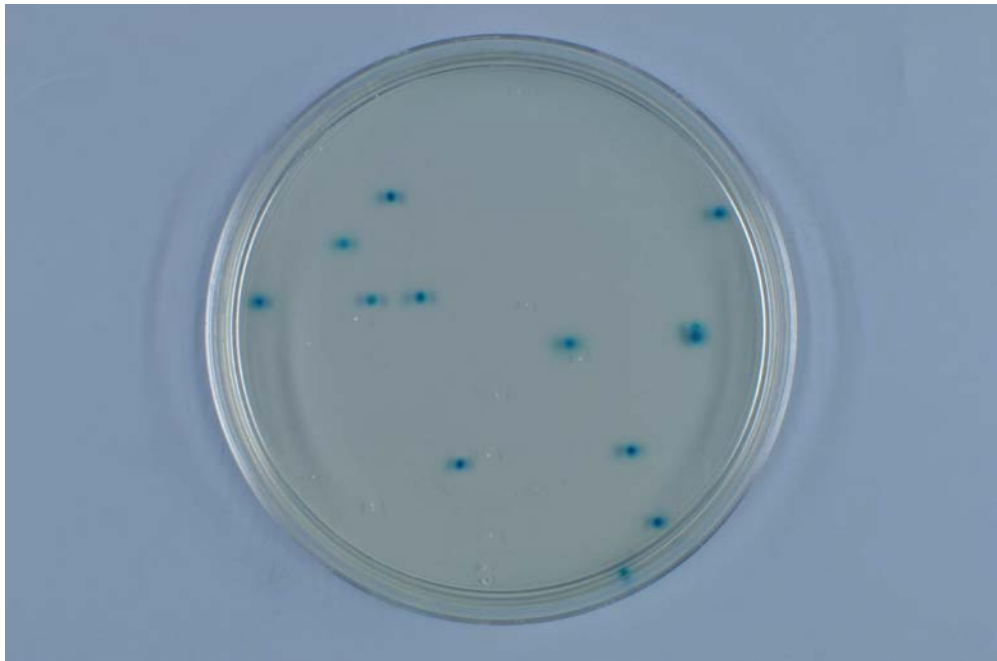


写真-8 いとより 42～48時間培養 [10倍希釈液]

以 上

1. 目的

本事業は、国立医薬品食品衛生研究所の「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における衛生指標菌試験法案作成の基礎的データを収集することを目的とした。我が国で一般に用いられている細菌数（生菌数）試験法と ISO 標準法に基づく一般生菌数計算法により市販食品の生菌数測定を行い、結果の差異の確認と、その原因についての考察を行った。今年度は ISO 標準法に個別規格のある食品分類から「肉及び肉製品」を選択した。

2. 方法

「肉及び肉製品」に該当する牛肉、鶏肉、豚肉について 3 つの加工形態（ブロック、スライス・カット、ミンチ）の生食肉の市販品を購入し、本検討に供した。

購入した食品について、我が国で一般的に用いられている従来法として食品衛生検査指針 2004 に記載のある標準寒天平板培養法を、ISO 標準法として ISO 4833-1:2013（混釈法）及び ISO 4833-2:2013（平板塗抹法）を採用し、3 試験法で一般細菌数の測定を行った。測定で得られた菌数の差及び相関について考察するとともに、菌数の差が 1Log CFU/g 以上の食品についてコロニーを分離し菌種の同定を行った。

食品分類及び検体数は表 1 のとおり。

試験方法、食品分類及び検体数

表 1 検体数

	スライス・カット	ブロック	ミンチ
牛肉	7	7	7
鶏肉	7	7	7
豚肉	7	7	7
合計	21	21	21

総合計 63 検体

表 2 試験方法

従来法	ISO 標準法	
標準寒天平板培養法	ISO 4833-1:2013 (混釈法)	ISO 4833-2:2013 (塗抹法)
食品衛生検査指針 2004	試料調製は ISO 6887-2:1999 による	

測定値の算定法は ISO 7218:2007Amd1:2013 に従った。すなわち連続する 2 段階の希釈で各希釈段階につきシャーレ 2 枚の場合の菌数算定を以下の式でおこなった。

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

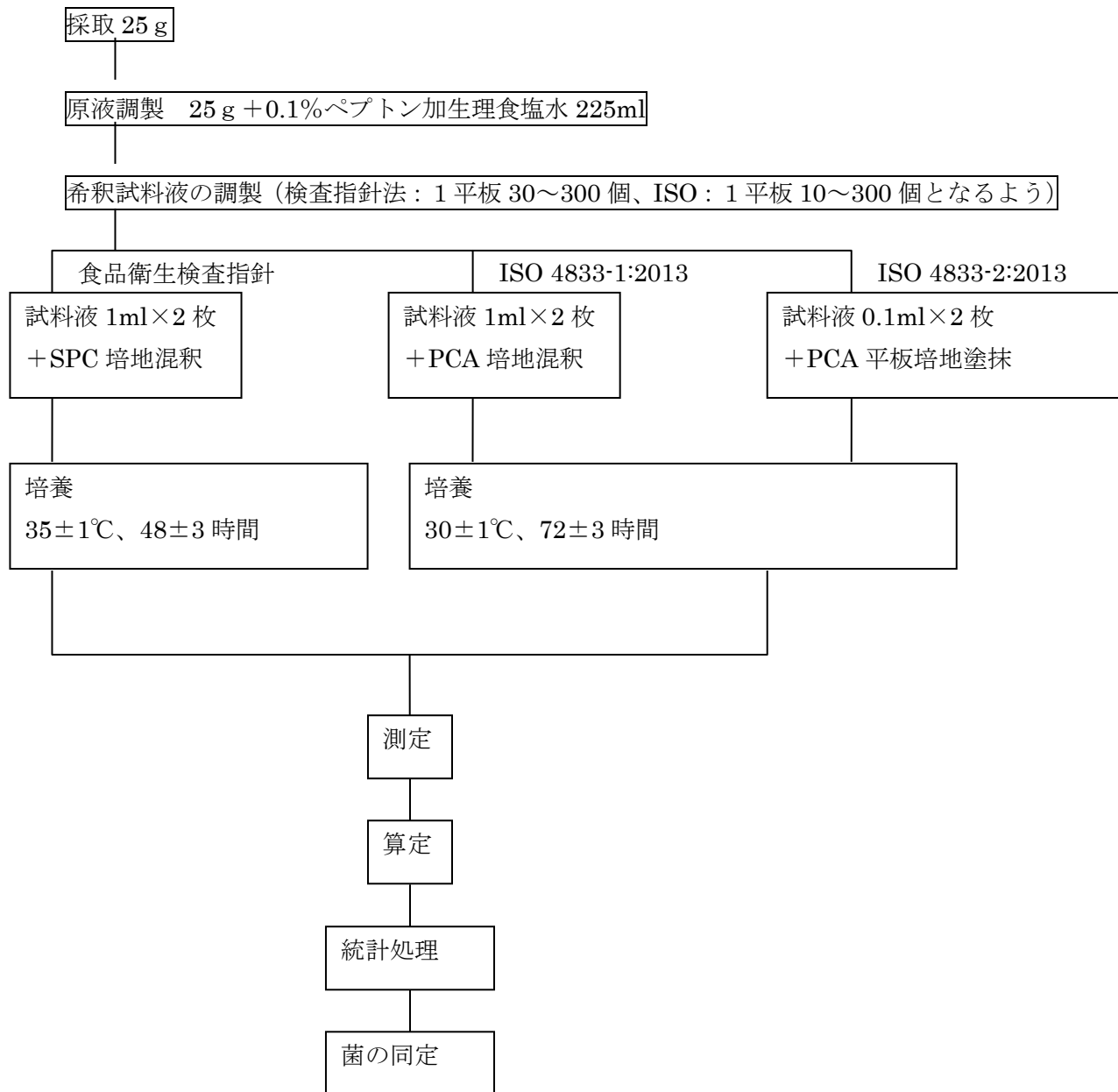
$\sum C$: 各平板の集落数の合計

n_1 : 希釈が低い方の算定対象シャーレ枚数

n_2 : 希釈が高い方の算定対象シャーレ枚数

d : 希釈が低い方の希釈倍数

試験フロー



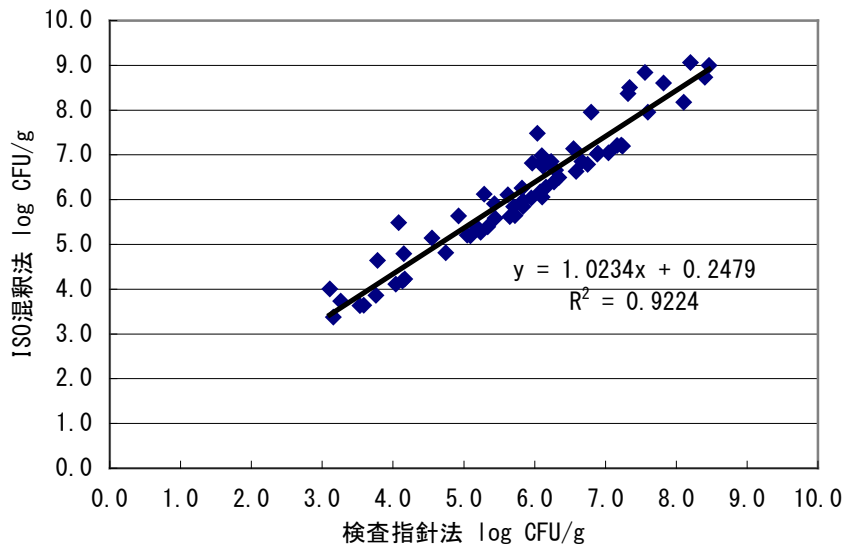
3. 結果

(1) 測定結果

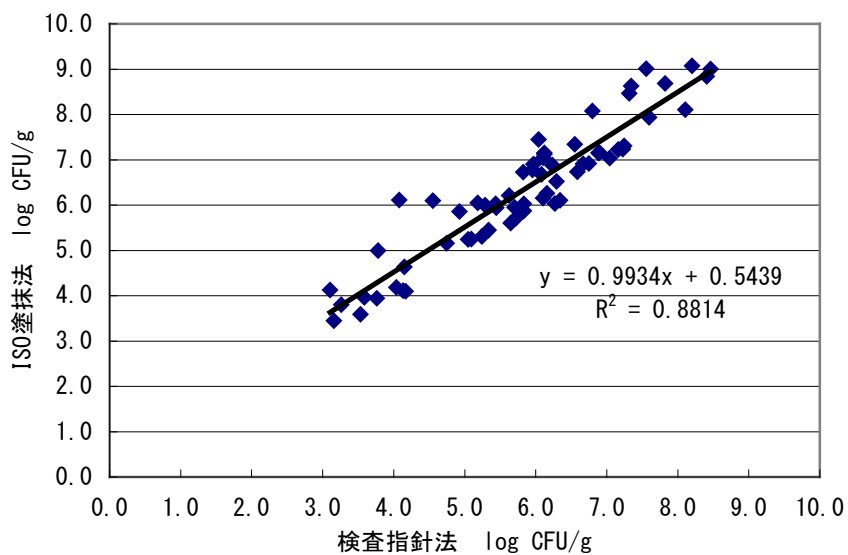
別紙参照。

(2) 測定値の相関

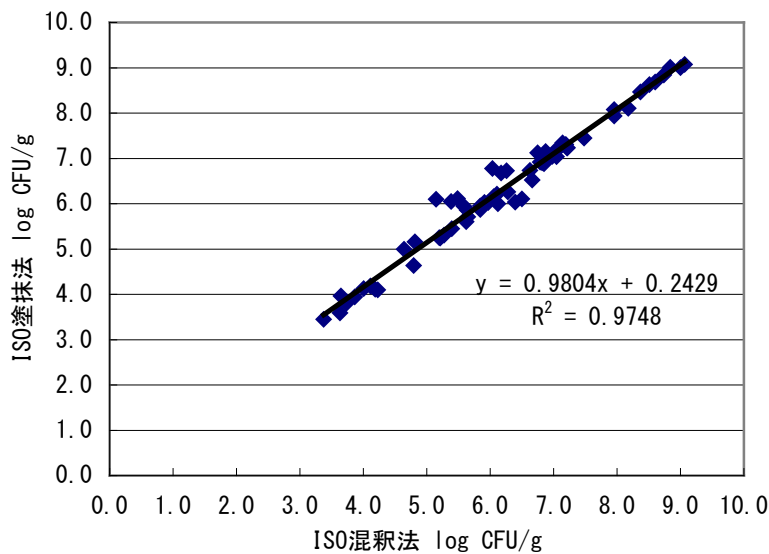
各試験法による測定値の相関を見るために、測定値の対数をグラフにプロットし、回帰式および相関係数を算出した。



グラフ 1 : ISO 混釈法と検査指針法による測定値の相関



グラフ 2 : ISO 塗抹法と検査指針法による測定値の相関



グラフ 3 : ISO 混釈法と ISO 塗抹法による測定値の相関

(3) 測定値の差

各試験法による測定値の差の傾向を見るために、測定値の対数を取り、差を算出した。

表 3 肉の種類ごとの測定値の差 (Log CFU/g (ISO混釈法) - Log CFU/g (検査指針法))

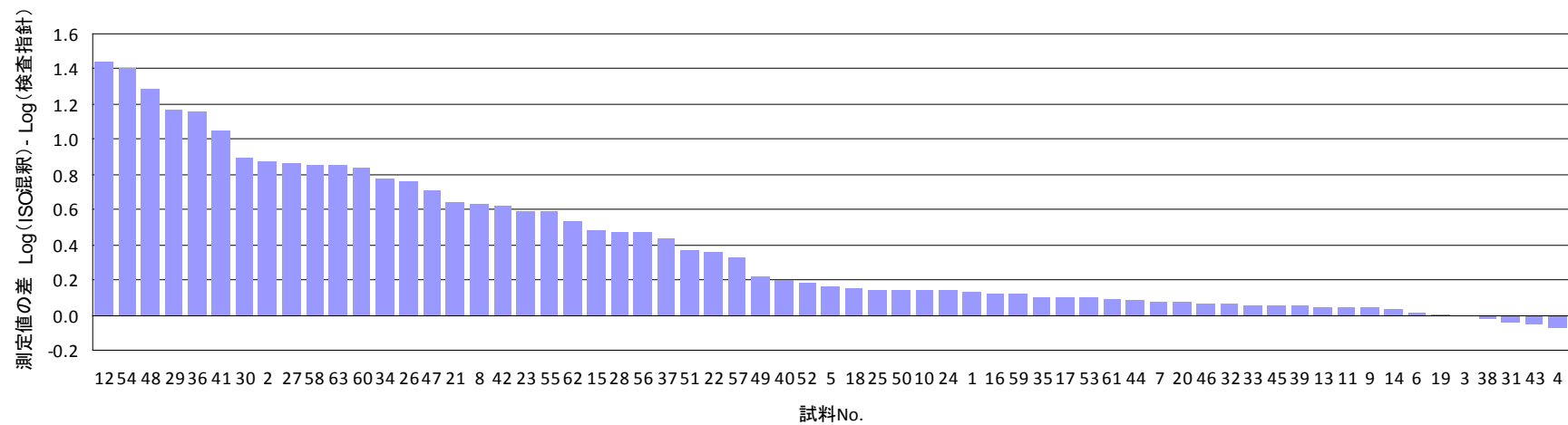
肉の種類	範囲	1.0 超過の検体数
牛肉	-0.076 ~ +1.440	1 / 21
鶏肉	-0.048 ~ +1.166	3 / 21
豚肉	-0.049 ~ +1.406	2 / 21

表 4 加工の種類ごとの測定値の差 (Log CFU/g (ISO混釈法) - Log CFU/g (検査指針法))

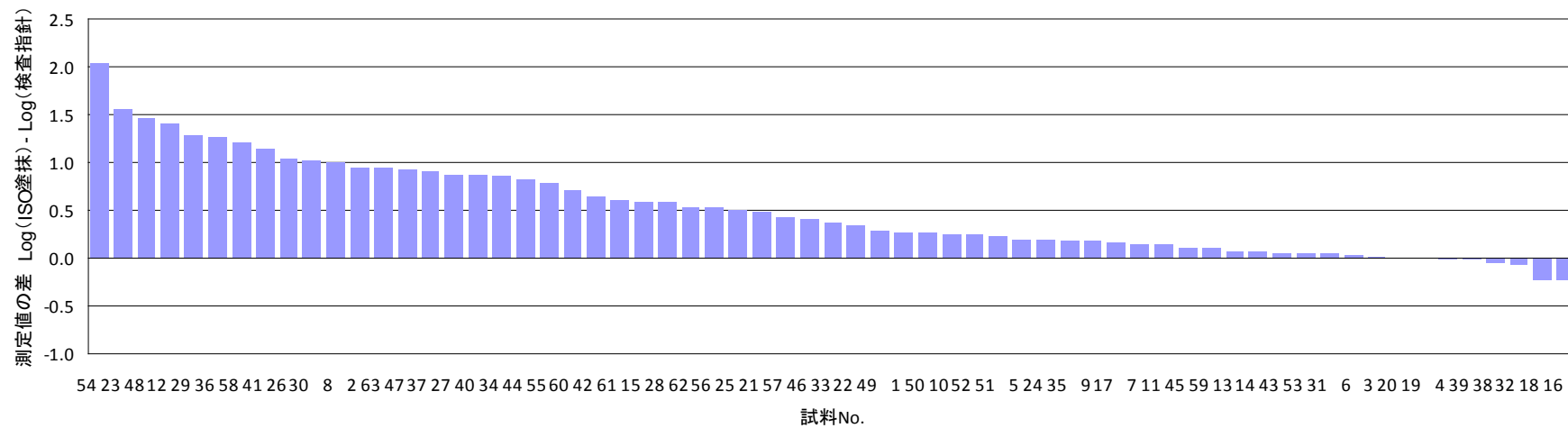
加工の種類	範囲	1.0 超過の検体数
スライス	-0.076 ~ +1.283	1 / 21
ブロック	-0.048 ~ +1.440	3 / 21
ミンチ	-0.025 ~ +1.155	2 / 21

表5 (Log CFU/g (ISO法)–Log CFU/g (従来法)) の差1.0超過の検体

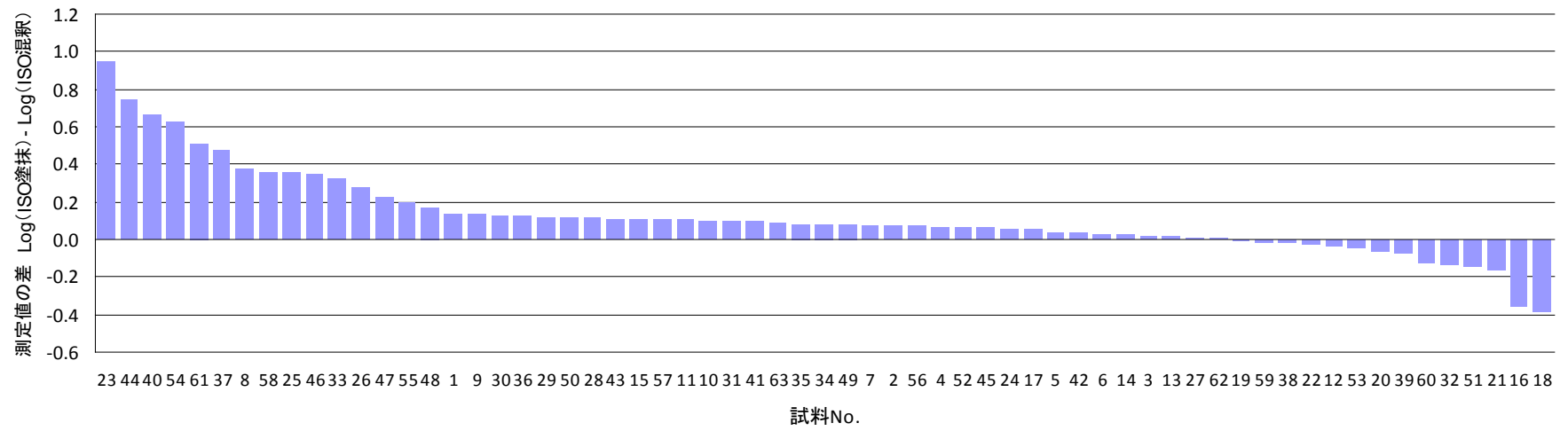
No.	肉の種類	加工の種類	ISO 混釈法 菌数 (a) (Log CFU/g)	検査指針法 菌数 (b) (Log CFU/g)	測定値の差 (a)–(b)
12	牛肉	ブロック	7.4797	6.0394	1.440
54	豚肉	ブロック	5.4837	4.0774	1.406
48	豚肉	スライス	8.8394	7.5563	1.283
29	鶏肉	ブロック	8.5085	7.3424	1.166
36	鶏肉	ミンチ	7.9542	6.7993	1.155
41	鶏肉	ミンチ	8.3677	7.3170	1.051



グラフ 4 : $\text{Log}(\text{ISO混釈})$ と $\text{Log}(\text{検査指針})$ の差



グラフ 5 : $\text{Log}(\text{ISO塗抹})$ と $\text{Log}(\text{検査指針})$ の差



グラフ 6 : $\text{Log}(\text{ISO 混釈})$ と $\text{Log}(\text{ISO 塗抹})$ の差

(4) 菌の同定

ISO混釈法と食品衛生検査指針法について、測定値の対数の差が1.0を超過した検体から3菌株を分離し、菌種の同定をおこなった。

表6 菌の同定

No.	肉の種類	加工の種類	ISO 混釈法	検査指針法
12	牛肉	ブロック	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Bacillus circulans</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> 同定不可
54	豚肉	ブロック	<i>Hafnia alvei</i> (<i>Enterobacter hafniae</i>) <i>Hafnia alvei</i> (<i>Enterobacter hafniae</i>) <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Micrococcus luteus</i>
48	豚肉	スライス	<i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus circulans</i> 同定不可	<i>Bacillus circulans</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> Group
29	鶏肉	ブロック	<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)
36	鶏肉	ミンチ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>) <i>Serratia marcescens</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Chromobacterium violaceum</i>
41	鶏肉	ミンチ	Misc.Gram Negative Bacilli Misc.Gram Negative Bacilli Misc.Gram Negative Bacilli	Misc.Gram Negative Bacilli Misc.Gram Negative Bacilli <i>Pseudomonas fluorescens</i>

BBL クリスタル E/NF および GP による同定結果。

4. 考察

ISO 混釈法と従来法（食品衛生検査指針法）の測定結果の相関係数(R²)は、0.9224 と高い相関が認められた（グラフ1）。昨年度同事業で検討した「肉及び肉製品」以外の食品群においても2つの試験法は、高い相関（相関係数 0.9048）が認められたことからISO 混釈法と従来法は、ISO6881にある4つの食品群においては高い相関を示す。本年

度は新しい規格 ISO4883-2 (ISO 塗抹法) と従来法 (検査指針法) においてもその相関性を算出した。その相関係数(R^2)は 0.8814 (グラフ 2) と、混釈法どうしの相関係数よりも若干低い値となった。

測定結果においては、昨年度と同様、従来法より ISO 混釈法の方が高くなる傾向があった (グラフ 4) が、63 検体中 57 検体が 1Log CFU/g の範囲内であった。肉の種類ごとの測定値の差 (表 3) および、加工の種類ごとの測定値の差 (表 4) からは、肉の種類、加工の種類による特色はみられなかった。1Log CFU/g の範囲外であった検体は、表 5 のとおり。1Log CFU/g の範囲外の 6 検体について菌の同定をおこなった結果は、表 6 のとおりである。結果に違いの出る要因として、培養温度と培養時間が挙げられる (表 7) ので、分離された菌種について各培養温度帯での発育曲線の比較を行い確認する必要がある。

ISO 4833-1:2013 (混釈法) 及び ISO 4833-2:2013 (平板塗抹法) の規格においては採用する試験法により得られる結果が異なる場合があると記載があるが、測定値の差は、-0.389~0.951 の範囲内であり 1 Log CFU/g の範囲を超えた検体はなく、2 試験法で得られた結果は、ほぼ変わらなかった。またその相関係数(R^2)は、0.9748 (グラフ 3) であった。

表 7 培養温度と培養時間

試験法	培養温度	培養時間
標準寒天平板培養法 (食品衛生検査指針 2004)	35±1℃	48±3 時間
ISO 4833:2003	30±1℃	72±3 時間

以上

別紙：測定結果一覧

試料 No.	品名	肉種	形態	検査指針	ISO 混釈法	ISO 塗抹法
1	豪州産 牛肉上バラカルビ焼肉用	牛	スライス	6.8837	7.0174	7.1517
2	アメリカ産 牛肉 カレーシチュー用	牛	スライス	6.1021	6.9800	7.0492
3	牛小間切れ(小)国内産	牛	スライス	7.2240	7.2163	7.2385
4	輸入牛 肩バラうすぎり	牛	スライス	5.7202	5.6443	5.7068
5	愛知県産尾張牛小間切 交雑種	牛	スライス	5.0453	5.2102	5.2464
6	牛肉 小間切 国産	牛	スライス	5.8325	5.8451	5.8751
7	国産牛肩ロース切落とし	牛	スライス	4.0374	4.1124	4.1852
8	アメリカ産 牛肉ヒレステーキ用	牛	ブロック	6.1206	6.7475	7.1230
9	オーストラリア産 牛肩ロース ステーキ用	牛	ブロック	6.7482	6.7889	6.9191
10	牛モモ(ローストビーフ用)(小)ニュージーランド産	牛	ブロック	5.7033	5.8451	5.9476
11	輸入牛 バラブロック	牛	ブロック	6.5855	6.6284	6.7324
12	豪州産牛かたまり(バラ肉)	牛	ブロック	6.0394	7.4797	7.4465
13	牛肉 ブロック オーストラリア産	牛	ブロック	7.1644	7.2109	7.2316
14	国産牛ヒレステーキ用 交雑種	牛	ブロック	5.2393	5.2746	5.3040
15	牛肉挽肉(国産)	牛	ミンチ	5.6232	6.1063	6.2151
16	国産牛 ミンチ	牛	ミンチ	6.2718	6.3916	6.0323
17	めぐみ野大沼牛挽肉(小)(解凍品)北海道産	牛	ミンチ	5.0917	5.1954	5.2498
18	牛上ひき肉(国産牛)	牛	ミンチ	6.3424	6.4983	6.1094
19	尾張牛挽肉 愛知県産	牛	ミンチ	7.0414	7.0450	7.0396
20	牛ミンチ 九州産	牛	ミンチ	8.1038	8.1748	8.1094
21	国産牛挽肉(解凍)	牛	ミンチ	4.1508	4.7943	4.6353
22	若どりもも肉すきやき用(国産)	鶏	スライス	7.5966	7.9566	7.9340
23	国産若鶏 むね肉 親子丼用	鶏	スライス	4.5502	5.1461	6.0969
24	めぐみ野あか鶏もも鍋・炒め物用(小)国内産	鶏	スライス	5.8325	5.9714	6.0268
25	鹿児島県産若鶏むね肉切落とし	鶏	スライス	5.4425	5.5870	5.9431
26	若鶏小間切(むね肉・もも肉)国内産	鶏	スライス	6.1189	6.8751	7.1545
27	親鶏 すき焼き用 国産	鶏	スライス	8.2014	9.0641	9.0742
28	国産若鶏もも・むね親子丼用	鶏	スライス	5.4338	5.9104	6.0249
29	若どりもも肉(ブラジル産)	鶏	ブロック	7.3424	8.5085	8.6284
30	ブラジル産 若鶏もも肉	鶏	ブロック	3.1055	4.0039	4.1274
31	国内産若鶏もも肉	鶏	ブロック	6.1038	6.0555	6.1573
32	若鶏もも肉 一枚	鶏	ブロック	4.1658	4.2281	4.0969
33	三河赤鶏むね肉 愛知県産	鶏	ブロック	3.5855	3.6443	3.9629
34	若鶏 正肉(モモ) 鹿児島県産	鶏	ブロック	7.8195	8.6021	8.6829

試料 No.	品名	肉種	形態	検査指針	ISO 混釈法	ISO 塗抹法
35	国産若鶏もも肉	鶏	ブロック	3.7597	3.8644	3.9454
36	いきいき鶏むね挽肉(国産)	鶏	ミンチ	6.7993	7.9542	8.0759
37	国産若鶏 むね肉ミンチ	鶏	ミンチ	5.8228	6.2564	6.7295
38	めぐみ野若鶏むね挽肉(小)解凍品国内産	鶏	ミンチ	5.6484	5.6232	5.6021
39	若鶏むねひき肉	鶏	ミンチ	4.1319	4.1852	4.1109
40	若鶏挽肉(むね肉)国内産	鶏	ミンチ	5.1818	5.3859	6.0503
41	若鶏 ミンチ(上等) 鹿児島県産	鶏	ミンチ	7.3170	8.3677	8.4678
42	国産若鶏もも・むね挽肉(解凍)	鶏	ミンチ	6.2317	6.8507	6.8829
43	国産 豚肉バラうすぎり	豚	スライス	7.2430	7.1941	7.3050
44	北海道産味わい豚 カレー用	豚	スライス	5.9542	6.0342	6.7748
45	めぐみ野豚小間切れ宮城県産	豚	スライス	5.3355	5.3916	5.4500
46	国産豚 肩肉極うすぎり	豚	スライス	4.7443	4.8129	5.1600
47	豚小間切 国内産	豚	スライス	4.9269	5.6353	5.8590
48	豚 小間切 国産	豚	スライス	7.5563	8.8394	9.0136
49	国産豚小間切	豚	スライス	3.1569	3.3727	3.4500
50	米国産 チルド豚肉 T-LOIN HEAD OFF	豚	ブロック	6.8949	7.0378	7.1573
51	国産味わい麦豚 もも かたまり	豚	ブロック	6.2945	6.6619	6.5209
52	豚もも赤身ブロック(中)国内産	豚	ブロック	6.6675	6.8507	6.9104
53	国産豚 ヒレブロック	豚	ブロック	3.5315	3.6307	3.5870
54	みかわ旨香ポーク豚かたまり(モモ肉)愛知県産	豚	ブロック	4.0774	5.4837	6.1124
55	豚バラ ブロック 九州産	豚	ブロック	6.5502	7.1414	7.3424
56	国産豚肩ロースブロック	豚	ブロック	3.2613	3.7331	3.8006
57	豚肉挽肉(国産)	豚	ミンチ	8.4057	8.7368	8.8420
58	国産豚 ミンチ	豚	ミンチ	3.7818	4.6398	4.9960
59	めぐみ野豚挽肉(解凍品)宮城県産	豚	ミンチ	6.1584	6.2777	6.2629
60	豚挽肉(2度挽)(国産)	豚	ミンチ	5.2878	6.1215	6.0000
61	国内産豚挽肉	豚	ミンチ	6.0792	6.1708	6.6788
62	豚 ミンチ 九州産	豚	ミンチ	8.4639	8.9980	9.0059
63	国産豚肉挽肉(解凍)	豚	ミンチ	5.9661	6.8189	6.9080

試験法名一覧

ISO 4833-1 : 2013

Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part1: Colony-count at 30 °C by the pour plate technique

ISO 4833-2 : 2013

Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part2: Colony-count at 30 °C by the surface plating technique

ISO 6887-1:1999

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-2:2003

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

ISO 7218:2007

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 7218:2007Amd1:2013

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations AMENDMENT1

平成 25 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及びその妥当性評価に関する研究
分担研究報告書

妥当性評価

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
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学研究院 教授

研究要旨

我国の公定法と国際的に認知された参照法とのハーモナイゼーションを図りつつ、主要な菌種について、順次、標準法が開発されている。本研究は、この標準法及びこれを参照法とする代替法の妥当性確認ガイドラインの作成を第一の目的としている。そこで、AOAC:2012.2 版ガイドラインと ISO16140:2003、及びそれらの最新改訂内容を検証した結果に基づき、ガイドラインの原案を作成した。第二の目的は、少数生菌標準物質のその場調製法の開発である。前年度まで適用できることを実証した 16 株に関する結果をまとめ、J. AOAC Int.へ論文投稿したところ、受理されインプレスとなった。生菌標準物質のその場調製のコンセプトが AOAC で議論するための準備が整った。また、この方法が少数生菌を含む標準汚染食品の調製にも適用できることが示された。以上は、バリデーションの方法論の観点から重要な成果である。

A. 研究目的

我国から発信する微生物試験法を国際的に通用するものにするには、国際的に認証されたスキームによってバリデーションしなければならない。国際的に認証されたスキームのモデルとしては、AOAC: 2012.2 版ガイドライン、ISO16140: 2003、及びそれらの最新改訂文書が重要であると判断されたので、昨年まで研究で、それらの文書を詳細に調査した。具体的な数値の規定など、AOAC と ISO では異なる点が多々あったが、それらの根拠を検討し、最終的に合理的なガイドラインとすべく、その原案を作成することとした。これが第一の目的である。

一方、妥当性確認においては、従来から、生菌標準物質に限られた少数菌株についてしか得られないことがボトルネックとなっていた。そこで、セルソーターを利用するその場調製法に着目し、その有効性を検討してきたが、昨年度までに

16 株について調べた結果、すべての株で適用できることが示された。本年度はその成果を論文としてまとめ、J. AOAC Int.へ投稿すること、2014 年度の AOAC INTERNATIONAL の総会におけるサイエンス・セッションに、当該テーマで応募することを目的とした。またこの方法による、少数生菌で汚染された標準汚染品の調製、に適用するための諸条件についても検討することとした。

B. 研究方法

(1) バリデーション・ガイドラインの原案作成

2012 年 2 月に公開された AOAC のガイドラインと ISO16140: 2003 と比較した結果、両者で、微妙に、あるいは明確に異なる内容があったが、その理由は必ずしも明確ではないことが分かった。そこで、そうした差異が出てくる背景を洞察し、むしろ我国から合理的な考え方を提唱しよう、との発想で原案をまとめるこ

とした。そこで、ガイドライン原案に、随所に注記を入れ、合理的判断の根拠を示すこととした。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

(イ) 「コロニー形成能」の概念の導入

昨年度までの成果をまとめて J. AOAC Int. に投稿するに際して、「生菌 = a living cell あるいは a viable cell」では誤解が生じるので、コロニー形成能を有する細胞 (a cell with colony-forming potentiality (CFP)) と表記することにした。生きてはいるが、コロニーを形成しない、あるいはマイクロコロニーしか作らない、という例が多々あるからである。

CFP を有すると期待される細胞を 100 個ソーティングした結果、100 個のコロニーができれば、コロニー形成率 (colony forming rate (CFR)) 100% ということになる。昨年度の成果は、フローサイトグラムの上で、どの領域の細胞を選択すれば 95% 以上の CFR が達成されるか、というゲート条件が 16 株すべてについて得られた、ということである。

(ロ) 標準汚染食品のその場調製

95% の CFR を達成するためのゲート条件が決められたとはいえ、偶々、細胞の状態が変化していたり、あるいはセルソーターの流路が汚れていたりにして、CFR が低下してしまうことがあるかもしれない。セルソーターのメンテナンスに十分な配慮がなされているとはいえ、実際に、精確な少数菌を添加した標準汚染食品を調製する場合には、検量用プレートに同時にソーティングしておくことが望ましい。

すなわち、食品マトリクスへの細胞のソーティングと同時に、並置した検量用の TSA プレートへもソーティングし、その時の CFR を求めておくようにする。例えば、食品に 10 細胞ソーティングした場合、検量用プレートでの CFR が 98% であ

ったとすれば、実際に添加された細胞数は 9.8 個であると見積られる。このように統計的な概念が入って、菌数が少数点以下の数字で表記されるようになる。

(ハ) セルソーティング条件

細胞をカルボキシフルオレッセインジアセテート (CFDA) で染色する条件、使用したセルソーター (専用オートステージ付きの AriaII (BD 社)) は前年度までと同様である。標準型プレートは直径 86mm^φ で、その寒天培地上に等間隔で 10×10=100 の位置に 1 細胞ずつ滴下した。検量用プレートは、場合によって小さいプレートを使用し、例えば 7×7+1=50 か所に 1 細胞ずつ滴下した。

また、コロニー形成能を検証するための培地も前年度までと同様、Tryptic soy agar (TSA) を用いた。

C. 研究結果

(1) バリデーション・ガイドラインの原案

添付資料参照。

(2) 微生物生菌標準物質の開発結果

前年度の成果を論文としてまとめ、AOAC で議論するための第一歩として、J AOAC Int. に投稿した。査読者との議論の過程で、「生菌」を表すことばとして「コロニー形成能 CFP」を導入することを提示した。最終的に受理され、in press となっている (添付資料参照)。

標準汚染食品の調製法に関しては、以下の結果が得られた。

(1) 飲料は適当な容器に入れて、検量用プレートと共に、セルソーターのステージにセットし、これに少数生菌をソーティングした。しかし調製された菌添加飲料を、他の容器に移す際に、器壁等への菌の吸着の影響が大きいことがわかった。

(2) 飲料へ菌を添加した場合に、飲料成分が菌のコロニー形成に及ぼす影響を調

べるためには、飲料を含む寒天ゲル上に直接ソーティングする方法が有効であることが分かった。

(3) 固体や粉体の場合は添加された菌が器壁に吸着する問題はないと考えられた。

(4) ソーティングされた菌の CFP の安定性は菌の種類によって異なる。調製後、バリデーション等に使用するまでの時間を考慮して、安定性に関するデータを得ておく必要があると結論された。

D. 結論

AOAC:2012.2 版ガイドラインと ISO16140:2003、及びそれらの最新改訂内容を検証した結果に基づき、ガイドラインの原案を作成した。POD の概念の導入により検体調製の高精度化が求められるようになった。

しかし、本研究では少数生菌標準物質の調製、さらにそれを利用した少数生菌を精確に添加した生菌汚染標準食品の調製に関する技術開発を世界に先駆けて進めてきた。既に論文としても J. AOAC Int. に掲載予定であり、また 2014 年 9 月の AOAC INTERNATIONAL 総会において、生菌標準物質と題するシンポジウムも予定されている。迅速法、簡便法も含めた合理的な微生物試験バリデーションに向けた重要な成果と考えられる。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

(原著論文)

H. Matsuoka, K. Nakano, N. Takatani, T. Yoshida, S. Igimi, M. Saito: A flow cytometric method for the in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. J. AOAC Int.97 (2014) in press

(国際学術集会)

H. Matsuoka: Global thinking of validation in Japan. Korea Food and Drug Administration Symposium: Establishing System of Microbiological Testing Procedures, Cheongwon, Korea (2013.4.26)

H. Matsuoka, T. Yoshida, N. Takatani, M. Saito, S. Igimi: In situ preparation of standard material of viable single-cells for innovative validation of microbiological methods. 127th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Chicago, USA (2013.8.26)

(国内学術集会)

吉田智紀, 高谷周督, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明: 保存安定性を考慮した生菌標準物質の調製. AOACIJS2013 年次大会、東京 (2013.6.1)

高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明: FACS を利用した生菌ソーティング法による標準低汚染飲料の調製条件の検討. AOACIJS2013 年次大会、東京 (2013.6.1)

吉田智紀、高谷周督、Alvin Mariogani、斉藤美佳子、五十君静信、松岡英明: 生菌標準物質の保存安定性. 第 40 回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2013.9.11)

高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明: FACS を利用した生菌ソーティング法による標準低汚染飲料の調製条件の検討. 第 40 回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2013.9.11)

松岡英明: 微生物分析法の妥当性確認におけるボトルネック—生菌標準物質. JASIS コンファレンス、幕張 (2013.9.6)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

微生物試験法のバリデーションガイドライン原案 (2014.3.20 版)

項 目	内 容	注 記
1. 用語の定義	<p><u>バリデーション (妥当性確認 Validation)</u> : ISO/IEC17025 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項 (JIS Q17025:2005,5.4.5.1) では、「意図する特定の用途に対して個々の要求事項が満たされていることを調査によって確認し、客観的な証拠を用意すること」と定義されている。</p>	
	<p><u>試験、検査、分析</u> : 行政上、あるいは管理上の判断を伴う概念は「検査 (Test, Inspection) で表記され、科学技術的方法論の概念は「<u>化学分析 (Analysis)</u>」、「<u>生物測定 (Measure)</u>」、「<u>物理計測 (Measurement)</u>」で表記される。一般的な概念をあらわす場合は「試験 (Examination, Test)」と表記される。本バリデーションガイドライン原案 (以下、単に「本ガイドライン」) では、「試験」と表記する。</p>	
	<p><u>参照法、公定法、標準法、代替法、参考法</u> : 参照法は国際的に認証され、裁判にも採用される高い信頼度を有する試験法で次の3種類がある。</p> <p>①公定法 : 国が規定した、あるいは認知した試験法で、通知、通達、告示などで示された試験法*1。</p> <p>②標準試験法 : 微生物標準試験法検討委員会で共同試験によって検証された試験法。公定法を③の既存法と比較検討して国際的にハーモナイズさせて作成した標準法 (ハーモナイズド標準法) と③の中に適当な既存法がないので新規に開発した標準法 (新規標準法) とがある*1,2,3。</p> <p>③第三者認証機関で認証された試験法 : ISO16140 あるいは AOAC International Validation Guideline 2012 版 (以下、単に「AOAC2012 版」と表記) に基づき、バリデーションされ第三者認証機関 [ISO、AOAC-OMA (米国)、AFNOR (フランス)、MicroVal (オランダ)、NordVal (ノルウェー) 等] で共同試験によるバリデーションされた試験法。</p>	<p>(*1) 我が国の公定法と③の既存法との比較検証作業が進められている。その成果は②となっている。</p> <p>(*2) 標準法検討委員会で作成した試験法は、バリデーションの後、これを国際専門誌に掲載することによって「参照法」となる。</p> <p>(*3) 既存の試験法の「一部」修正の場合は検証 (ベリフィケーション Verification) の範疇に入る。ベリフィケーションとは試験法が目的通りの性能を発揮することを確認すること。</p> <p>(*4) 代替法 (Alternative method) は ISO16140 で用いられている用語。AOAC2012 版では候補法 (Candidate method) という用語を用いているが、本ガイドラインでは代替法で表記した。</p>

	<p>以上の3種類以外の試験法は参考法である。</p> <p>代替法*4とは、参照法と比較試験を行った後、代わりに使用する試験法の意。</p> <p>ハーモナイズド標準法の他、簡便法や迅速法も含む。</p>		
	<p><u>試験法、食品マトリクス、分析種、試料、繰返し数、検体</u>：試験法 (Method) は食品の種類 (食品マトリクス Food matrix) と菌の種類 (一般的には分析種 Analyte という) の組み合わせに対して規定される。バリデーションでは、これに菌濃度の種類 (Analyte level or concentration)、繰返し数 (Number of replicates)、共同試験を実施する場合の試験室数 (Number of collaborators)、が規定される。食品マトリクス・菌の種類・菌濃度、で規定される試験対象を試料 (Sample) という。1試料中では菌濃度は一様とみなす。1試料から n 個の検体 (Test portion) を分取して試験するように規定されているが、この n を繰返し数という。通常 25 g と規定されているのは、1検体量である。バリデーションでは、1試験法あたり、「食品の種類×菌の種類×菌濃度の種類×繰返し数×試験室数」の検体数、検体量が必要になる。</p>		
	<p><u>その他の用語</u>*1</p>		<p>(*1) AOAC2012 版の冒頭に Collaborative study (CS), Composite test portion, Confirmed results, Fractional recovery, Inclusivity, Precision, Presumptive results, etc. 等がリストアップされている。用語の統一は、日本語訳だけではなく、元の英語表現でも必要なので、継続的に議論、改訂が必要。</p>
2. 目的	2.1. 食品微生物試験の目的	<p>食品に関する微生物試験の対象分野は、食品、飲料、飼料、環境 (生活、医療、製造、流通など) などである。その目的は</p> <p>①食品の微生物管理のための検査</p> <p>②食中毒原因究明のための病原菌のスクリーニングと分離に大別され、①はさらに、</p>	

	<p>(A)法的判断のために行う検査</p> <p>(B)製造工程管理のための検査</p> <p>に分けられ、それぞれ採用できる試験法は異なる場合がある。</p>	
2.1.1. 食品の微生物管理のための試験	<p>規格基準への適合性を評価したり、食品の食中毒の発生を未然に防ぐために、微生物汚染レベルを検証するために行われる試験で、病原微生物が検出されるか否か（定性試験）、あるいは、衛生指標菌がある菌数以下に抑えられているか否か（定量試験）、などを調べるための試験である。試験法には、裁判に採用できる程度の高い信頼度を有することが求められる。その信頼度を科学的に支持するのがバリデーションである。</p> <p>A. 法的判断のために行う試験：規格基準の適合性や、輸入検疫などの検査で採用できる試験法は、通知、通達、告示で示された公定法であり、原則的には培養法に基づく試験法が採用されている*1。</p> <p>B. 自主衛生検査、工程管理のために行う試験*2：食品の製造工程における微生物の菌数レベルを、自主管理するために行う微生物試験であり、この目的に使用する試験法は、A の場合と同様の高い信頼性のあるものの他、求める精度を満たす範囲で迅速・簡便法の使用が可能である。</p>	<p>(*1) 公定法は、例え標的菌が同じでも、食品が対象外であれば公定法から外れる。</p> <p>(*2) 自主検査で用いる試験法は、検査の目的に合った適切なものを選択し、ベリフィケーションを行った上で使用する。</p>
2.1.2. 食中毒原因究明のための病原菌のスクリーニングと分離に用	<p>食中毒事件が既に発生している場合は、病原菌のスクリーニングと分離が緊急に必要である。この場合に採用する試験法は、2.1.1. の場合とは根本的に異なり、当該の病原微生物を迅速に確保することが重要で、最新の技術を導入した迅速・簡便試験法などを応用しながら、迅速に対象微生物をスクリーニングし分離することが求められる。PCR による遺伝子検査、抗体を利用した試験法、</p>	

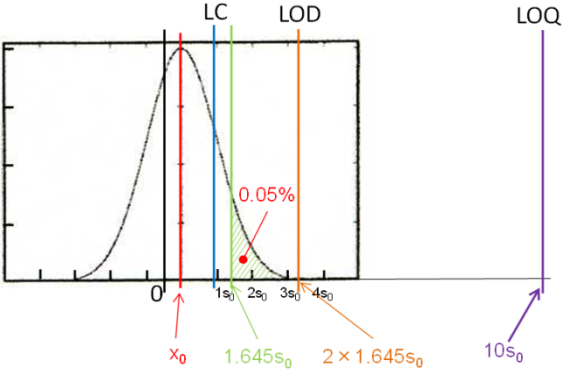
	いる試験法	酵素基質を利用した培養法なども利用される。	
	2.2.適用する試験法	<p>本ガイドラインは、食品、飲料、飼料、環境（生活、医療、製造、流通など）の微生物試験で、次のいずれかの場合に適用する。</p> <p>①ハーモナイズド標準法</p> <p>②新規標準法</p> <p>③代替法</p> <p>①および③は、適当な参照法との比較試験を、単一試験室バリデーション、および共同試験で行う。②は当該試験法単独で、単一試験室バリデーション、および共同試験を行う。</p>	
3. バリデーション実施体制	3.1. バリデーション実施機関*1	微生物試験法バリデーションの国際的ハーモナイゼーションに関する業務を統括する。	(*1) 国際的に認知されたバリデーション実施機関は ISO、AOAC-OMA、AFNOR、MicroVal、NordVal 等である。日本には対応する機関がまだないが、標準法検討委員会がその機能を果たしている。
	3.2. バリデーション実施監督者	微生物試験法バリデーションに関する専門的知識・経験を有し、該試験法の内容を十分理解している者が担当する。バリデーション実施機関が任命する。	
	3.3. バリデーション実施試験室と試験実施者	別途定める試験所認定基準を満たす試験室で、別途定める技量認定資格を有する試験者が実施する。	
	3.4. 共同試験を実施す	共同試験バリデーションに必要な試験室数*1 は、定性試験においては 12 ヶ所以上とし、10 ヶ所以上から有効な試験結果を得るよ	(*1) 試験室数と繰返し数のバランスについては ISO 5725-1 (JIS Z 8402-1)の規定を参照すれば、最低数が

	る試験室数	うにする。 定量試験においては10ヶ所以上とし、8ヶ所以上から有効な試験*2結果を得るようにする。	10、あるいは8としなければならない理由もない。しかし、実用に際して、統計上の判断をショートカットするために、ISOやAOACでは具体的な数字としてガイドラインで規定していると考えられる。したがって、1条件あたりの総検体数（1試験室での繰返し数×試験室数）が十分大きければ、試験室数は定性試験では10または11、定量試験では8または9としてもよい、と言える。しかし、こうした議論には統計学的理論武装が重要である。それもバリデーション実施機関の責務であろう。
4. 試験対象	4.1. 標的菌	該試験法を適用する標的菌の内容（特定の単一株 strain か、特定の種 species か、特定の属 genus か、特定の科 family）を定める*1。	(*1) 例えば「本試験法は、食品中の <i>Salmonella</i> genus に適用する。ただし、 <i>Salmonella typhi</i> と <i>Salmonella paratyphi</i> には適用しない。」
	4.2. 食品の種類	試験法を適用する食品は全て試験する。基本的にマトリクスエクステンションは認められないが、どの範囲までが同一の食品と見なせるかは、バリデーション実施監督者がバリデーション実施者と協議して決める*1。 食品の種類分類に関しては、SICコード（Standard Industrial Classification）に基づく分類*2、あるいはISO 16140:2003およびAOAC 2002版の付表*3があるが、我が国特有の食品の分類は考慮されていないので、別途、検討する必要がある。	(*1)特定の食品マトリクスで実施したとき、どの範囲の食品マトリクスまで適用できるのか、という判断は、AOACではジェネラルレフェリーがコラボスタディディレクターと相談して決める、としている。この考え方に準じて、我が国としては、その判断に對等に対応できるバリデーション実施監督者が、バリデーション実施者と相談して決める、とした。 (*2) SICコードの場合、例えば「2013」はソーセージ、肉加工品に適用。大グループ20は食品および同類の製品、201は肉製品、その中の小分類で2013がソーセージおよび他の調理済肉製品。 (*3) AOAC2012版以前は、全ての食品に適用するため

			には、ISO では 5 種のカテゴリー×3 以上のタイプ。 AOAC では、6 種のカテゴリーで合計 20 タイプ。
	4.3. 汚染食品	<p>(1) 汚染食品の原料：自然汚染食品が第一優先であるが、入手困難な場合は菌添加食品*1を使用する。1 食品マトリクスあたり 1 種類（血清型が違うだけの場合も別の菌種）の純培養した菌を添加することを基本とする。</p> <p>(2) 傷害菌の考慮：食品の性状に応じて添加菌の種類や状態を考慮した添加方法も考慮する必要がある。例えば複数菌共存条件で試験する場合は複数の菌種を同時に添加する。加熱食品に対しては加熱処理した菌*2を、乾燥食品には凍結乾燥した菌*2を添加する。また、冷凍食品の場合は、解凍して菌添加し、十分混合した後、再凍結*2する。</p> <p>(3) 競合菌の考慮：自然汚染食品では、標的菌と競合する菌が共存している場合が多い。この状況を再現することは有用である。その場合は標的菌の 10 倍の濃度の競合菌を同時に添加する。</p>	<p>(*1) 0.25<POD<0.75 となるように少数生菌を精確に添加しなければならない場合が重要となっている。この要請に応えるべく、フローサイトメトリー法によって少数生菌を精確に添加した「汚染食品標準物質」をオンラインで調製する方法が開発されつつある。</p> <p>(*2) これらのストレスを受けた菌が、どの程度、傷害菌となっているかについて、別途、評価しておく。</p>
5. 定性試験	5.1. 単一試験室バリデーション*1		(*1) Single laboratory validation (SLV) or Method developer validation
	5.1.1. 包含性・排他性試験	<p>(1) 菌種の選定：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・包含性(Inclusivity)とは、検出可能な菌種の範囲。標的菌を含む 50 株以上*1（ただし、Salmonella では 30 株以上*2）で試験する。 ・排他性(Exclusivity)とは、標的菌を他の菌種と区別できる選択性。30 株以上*1の非標的菌で試験する*1。 <p>(2) 試験条件：検体は食品を含まない塩溶液で、1 種類の標的菌のみを含む。菌濃度は 50%陽性率*3の 100 倍の値。1 標的菌あ</p>	<p>*1) 新規標準法の検出性能を確認するために用いる菌株の種類は、バリデーション実施監督者が試験実施者と相談して決める。</p> <p>*2) AOAC2012 では血清型として 100 種以上となっている。</p> <p>*3) AOAC2012 版では LOD₅₀ (Level of 50% detection) と表記。なお、下付の数字なしで LOD は Limit of detection の略語として使われている。混同しないよ</p>

	<p>たり 2 個以上の検体で試験する。</p> <p>(3) 結果の表記：例えば「50 菌株中 47 菌株が検出された。検出されなかった 3 菌株は・・・。」と報告。</p>	<p>う注意。</p>
5.1.2. 食品マトリクスでの試験	<p>(1) 食品の種類：食品の選定については 4.2.参照。</p> <p>(2) 菌数あるいは菌濃度*1：汚染食品の考え方については 4.3.を参照のこと。食品試料を 3 群に分割し、各々の菌レベルが $POD^{*2}=0, 0.25\sim 0.75^{*3}, 1.0$ となるように菌を添加する（ただし自然汚染食品を用いる場合は $POD=0$ は省略可能）。検体数は、各々 5, 20, 5 個とする。</p> <p>(3) 結果の表記：</p> <p>(a) 各菌レベルに対して $POD=x/N$ を求める。ただし $POD=POD_R, POD_A^{*4}$、x 陽性数、N 検体数。 POD の値に応じて、その 95%信頼区間(LCL, UCL)*5を付録 A1.に従って求める。</p> <p>(b) $dPOD_A=POD_A-POD_R$ の値を求め、それに対する 95%信頼区間を付録 A2.に従って求める。</p> <p>(c) 判定：$dPOD_A$ の (LCL,UCL) の区間に 0 が含まれれば参照法と代替法は統計的に 95%で同等*6</p>	<p>(*1)以下、単に「菌レベル」と表記。</p> <p>(*2) Probability of detection</p> <p>(*3) 0, 1 以外の POD を Fractional POD という。</p> <p>(*4) 下付きの R, A は各々 Reference method, Alternative method の意。</p> <p>(*5) LCL, UCL は各々 Lower confidence limit, Upper confidence limit で(LCL, UCL)が 95%信頼区間。</p> <p>(*6) AOAC2012 版では POD_A の代わりに、この段階ではまだ推定値なので「推定 POD_A (POD_{AP})」としているが、本ガイドラインでは簡単のため「POD_A」とした。</p>
5.2. 共同試験*1		(*1) Collaborative study
5.2.1. 試験室数	3.4.参照。	
5.2.2. 食品の種類	食品の種類は 1 種類以上。その一種類を何にするか、またその他の食品を追加する場合、その種類や数に関しては 4.2.参照。	
5.2.3. 菌レベルと検体	汚染食品の考え方については 4.3.を参照のこと。菌レベルは無菌、低レベル、高レベルの 3 段階*1。検体数は各レベルに対して 12 個	(*1) 5.1.2.に準じて、無菌レベルは $POD=0$ 、高レベルは $POD=1$ 、であるが低レベルは $0.25 < POD < 0.75$ を

数	とする。	目標とする。
5.2.4. 結果の表記	<p>(1) 併行標準偏差 s_r : L は試験室数、R は 1 試験室の繰返し数、$N=LR$ は総検体数、x_i は各試験室($i=1\sim L$)内での陽性数とおく。試験室 i での測定値は x_i 個の 1 と $(R-x_i)$ 個の 0 であり、これから試験室 i の分散 s_i^2 を求める。これより、全試験室内分散 s_r^2 を求めれば、その平方根が併行標準偏差 s_r となる*1。</p> <p>(2) 室間再現標準偏差 s_R: POD_i ($i=1\sim L$) から平均値 $LPOD=x/N$ (ただし x は全陽性数)、標準偏差 s_L を求める。これより $s_R=(s_L^2+s_r^2)^{1/2}$ を求める。</p> <p>(3) $LPOD$, $dLPOD$ に基づく判定法：代替法と参照法の比較試験を行った結果の判定</p> <p>(a) 各菌レベルに対して $LPOD$ を求める。その値に応じて、95% 信頼区間を付録 A3. に従って求める。</p> <p>(b) $dLPOD_A=LPOD_A-LPOD_R$ の値、およびその 95% 信頼区間を付録 A4. に従って求める。</p> <p>(c) 判定：$dLPOD_A$ の (LCL,UCL) の区間に 0 が含まれれば参照法と代替法は統計的に 95% で同等。</p>	<p>(*1 補足) 試験室 i の測定値 (1,1,1,0,0,1,0,・・・) の平方和 $ss_i=分散 \times 自由度(R-1)$ を計算。全試験室内の平方和 ss_i, $i=1\sim L$ を加算し、全試験室内自由度 ($L \times (R-1)$) で割れば全試験室内分散 s_r^2 となる。</p> <p>(*2) $t_{0.975,df}$ の df は各試験室の POD 値 (L 個) から分散を求める際の自由度で $L-1$。0.975 は t 分布での両側 5% の意。</p>
6 定量試験	<p>6.1. 単一試験室バリデーション</p> <p>6.1.1. 包含性・排他性試験</p> <p>(1) 菌種の選定、(2) 試験条件、(3) 結果の表記、に関する規定は定性試験の場合 5.1.1. を適用する。</p> <p>6.1.2. 食品マトリクス</p> <p>(1) 食品の種類：食品の選定については 4.2. 参照。</p> <p>(2) 菌レベル：汚染食品の考え方については 4.3. を参照のこと。</p>	<p>(*1) ここでいう LOD は Limit of detection。ブランク試験で得られた平均値 x_0 と標準偏差 s_0 を基準に、図示</p>

<p>での試験</p>	<p>無菌、低レベル（検出限度 LOD*1 近傍）、中レベル、高レベルの 4 段階*2（ただし自然汚染食品を用いる場合は、無菌は省略可能）。検体数は、各レベル に対して 5 個とする。</p> <p>(3) 結果の表記：</p> <p>(a) 併行標準偏差 s_r</p> <p>測定結果は、対数変換する。無菌の場合を加味して次の式で行う。</p> <p>$\text{Log}_{10}[\text{CFU/unit}+(0.1) f]$，ただし f は最低濃度*3 外れ値を除去した後*4、各菌レベル、各食品マトリクス、各試験法に対する、併行標準偏差 s_r を求める。</p> <p>(b) 直線性(Linearity)</p> <p>代替法と参照法の比較試験をした場合は、4 濃度×5 繰返しの結果より、参照法の結果と対応する代替法の結果をプロットして、直線近似式 $y=a+bx$ を得る。a, b の 95%信頼区間を求め、$a=0$, $b=1$ がこの信頼区間に入っていれば、両法は同等と判定する。</p>	<p>されたように、$x_0+2 \times 1.645 \times s_0$ の値が LOD。</p>  <p>x_0, s_0 : ブランクの平均値と標準偏差</p> <p>(*2) 試験法の適用濃度範囲が 4logs 以上の場合は、中間レベルを増やす。</p> <p>(*3) f は報告可能な最低濃度で、例えば 0.003CFU/unit。(*4) Cochran 検定、および Grubbs 検定。</p>
<p>6.2. 共同試験</p>		
<p>6.2.1. 試験室数</p>	<p>3.4.参照。</p>	
<p>6.2.2. 食品の種類</p>	<p>食品の種類は 1 種類以上。その一種類を何にするか、またその他の食品を追加する場合、その種類や数に関しては 4.2.参照。</p>	
<p>6.2.3. 菌レベルと検体数</p>	<p>汚染食品の考え方については 4.3.を参照のこと。菌レベルは無菌、低レベル、中レベル、高レベル（ただし自然汚染食品を用いる場合は、無菌は省略可能）。検体数は、各レベル 2 個とする。</p>	

6.2.4. 結果の表記	<p>(1) 併行標準偏差 s_r : 測定結果は、対数変換する。無菌の場合を加味して次の式で行う。 $\text{Log}_{10}[\text{CFU}/\text{unit}+(0.1) f]$, ただし f は最低濃度 各試験室 i ($i=1\sim L$) について、各菌レベル、各食品マトリクス、各試験法に対する、平均値 m_i と併行標準偏差 s_{ri} を求める。さらに全試験室の併行精度の総和である s_r を求める*1。</p> <p>(2) 室間再現標準偏差 s_R : m_i ($i=1\sim L$) から全試験室の平均値 m、標準偏差 s_L を求める。これより $s_R=(s_L^2+s_r^2)^{1/2}$ を求める。</p>	(*1) 5.2.4.の補足*1 では、各試験室の測定値は 1 か 0 で 12 個以上あったが、定量試験では任意の数字ではあるが最低 2 個である。この測定値に対して平均値 m_i と $s_{si}=\text{分散} \times \text{自由度}(2-1)$ を求める。全試験室の平方和 ss_i . $i=1\sim L$ を加算してじゆうど($L-1$) で割れば全試験室の分散 s_r^2 が得られる。この平方根が全試験室内の併行標準偏差 s_r となる。
付録	<p>A1. 定性試験における POD に対する 95%信頼区間</p> <p>A2. 定性試験における $d\text{POD}_A = \text{POD}_A - \text{POD}_R$ に対する 95%信頼区間</p> <p>A3. 定性試験の共同試験における $L\text{POD}$ に対する 95%信頼区間</p>	<p>POD=x/N、x 陽性数、N 検体数</p> <p>① $x=0$ のとき POD=0, LCL=0, UCL=3.8415/(N+3.8415)</p> <p>② $x=N$ のとき POD=1, LCL=N/(N+3.8415), UCL=1</p> <p>③ $0 < x < N$ のとき POD=x/N, LCL=[$x+1.9207-1.9600 \times (x-x^2/N+0.9604)^{1/2}$]/(N+3.8415), UCL=[$x+1.9207+1.9600 \times (x-x^2/N+0.9604)^{1/2}$]/(N+3.8415)</p> <p>LCL=$d\text{POD}_A - \{(\text{POD}_A - \text{LCL}_A)^2 + (\text{POD}_R - \text{UCL}_R)^2 \}^{1/2}$ UCL=$d\text{POD}_A + \{(\text{POD}_A - \text{UCL}_A)^2 + (\text{POD}_R - \text{LCL}_R)^2 \}^{1/2}$</p> <p>$L\text{POD} = x/LR$、$x$ 総陽性数、L 試験室数、R 試験室数あたりの繰返し数</p> <p>① $0.15 \leq L\text{POD} \leq 0.85$ のとき LCL=$\max\{0, L\text{POD} - (t_{0.975,df} \times s(\text{POD})/L^{1/2})^*2\}$ UCL=$\min\{1, L\text{POD} + (t_{0.975,df} \times s(\text{POD})/L^{1/2})\}$</p> <p>② $L\text{POD} < 0.15$ または $L\text{POD} > 0.85$ のとき LCL=$\{x+1.9207-1.9600 \times (x-x^2/N+0.9604)^{1/2}\}/(N+3.8415)$</p>

		$UCL = \{x + 1.9207 + 1.9600 \times (x - \bar{x}^2 / N + 0.9604)^{1/2}\} / (N + 3.8415)$ <p>③ LPOD=0 のとき $LCL = 0, UCL = 3.8415 / (N + 3.8415)$</p> <p>④ LPOD=1 のとき $LCL = N / (N + 3.8415), UCL = 1$</p>
	A4. 定性試験の共同試験における $dLPOD_A = LPOD_A - LPOD_R$ の 95%信 頼区間	$LCL = dLPOD_A - \{(LPOD_A - LCL_A)^2 + (LPOD_R - UCL_R)^2\}^{1/2}$ $UCL = dLPOD_A + \{(LPOD_A - UCL_A)^2 + (LPOD_R - UCL_R)^2\}^{1/2}$

研究成果の刊行に関する一覧表

論文発表

1. Matsuoka H., Shigetomi T., Funabashi H., Saito M., Igimi S.: Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. *J. Microbiol. Methods* 93: 49-51 (2013).
2. Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R, Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K, Yahiro S, Fujita M, Igimi S. Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: Collaborative study. *J AOAC Int.* 96:991-997. (2013)
3. Matsuoka H, Nakano K, Takatani N, Yoshida T, Igimi S, Saito M. Flow cytometric method for in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. *J AOAC Int.* 97(2):479-483. (2014)
4. 五十君静信。食品の微生物試験法の国際対応と、現場における試験法選定の考え方～生食肉の規格基準のもたらしたもの～。月刊食品と開発。5月号。48(5):5-8 (2013)