

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

平成28年度 総括・分担研究報告書

(課題番号：H26-食品-一般-003)

研究代表者 五十君 静信

東京農業大学 応用生物科学部

平成29(2017)年5月

目 次

I. 平成 28 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. セレウス菌標準試験法に関する研究	29
荻原博和	
2. <i>Yersinia</i> の標準試験法に関する研究	43
岡田由美子	
3. 試験法の妥当性確認・衛生指標菌に関する研究	51
松岡英明、伊豫田淳、五十君静信	
4. 食中毒毒素試験法の検討：	
セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法の検討	73
鎌田洋一	

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品中の微生物試験法の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 五十君静信 東京農業大学 応用生物科学部

研究要旨

本研究では、食品における微生物試験法のメソッドバリデーションの手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法の作成を行う。これまでの研究班の成果である標準試験法作成方針に従い、セレウス菌、エルシニア・エンテロコリチカ、セレウリドなど食中毒起因菌毒素、衛生指標菌などの標準試験法を作成する。今後リスク評価の結果を受けて作成される食品の微生物基準に利用可能な試験法となるように ISO 法などと互換性のある妥当性確認されていると認められる試験法を提供する。さらに、作成された標準試験法を精度高く実施するために必要な導入時の検証、微生物標準品の設定、試験精度の管理に関する基礎的研究を行う。

食中毒起因細菌や衛生指標菌の試験法に関する専門家、約 20 名程度からなる“標準法検討委員会”を組織し、これまでの研究班により作成された標準試験法作成方針に従い、微生物標準試験法の作成を行ったが、国際的にもまだ確立していない検討結果の統計処理方法とその評価方法については、実際の試験法作成の検討データを基に策定を進めた。これらの試験法策定過程は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ上に公開し、一般にも広く意見を求めた。

研究班の行う当該微生物の試験法策定は、それぞれ作業部会を組織し本研究班の代表、分担、協力研究者が標準法の妥当性確認に必要と思われるデータの作成にあたった。各作業部会は、4つのステージからなる“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い“標準法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。各作業部会の標準試験法作成は、3年目の平成 28 年にはコラボ案作成及び最終試験法の検討（ステージ 3～4）、標準試験法とした。

平成 28 年度は、セレウス菌試験法(NIHSJ-28)、エルシニア試験法(NIHSJ-27、NIHSJ30TS)、セレウリド試験法(NIHSJ-26TS)について、コラボ案及び最終案の検討（ステージ 3～4）を行った。試験法のバリデーション（妥当性確認）に関しては、ISO 16140 を基にしたガイドライン作成を目的とし、AOAC から出されたバリデーションに関する新しい文書や海外の第三者認証機関の妥当性確認のプロトコールなどを参考に検討を進め、標準試験法の妥当性確認ガイドライン案を標準試験法検討委員会で検討した。衛生試験法については、関連用語の整理、集落計数法、妥当性確認の方法について検討を進めた。また、ISO 法と従来の国内の公定法との試験結果の相違について検証を行った。他の研究班により進められているウェルシュ菌標準試験法(NIHSJ-29)についても、定性試験法策定を行った。

研究分担者：
松岡英明：東京農工大学大学院

荻原博和：日本大学生物資源科学部
鎌田洋一：岩手大学農学部

岡田由美子:国立医薬品食品衛生研究所
伊豫田淳:国立感染症研究所

A. 研究目的

食品が国際的に流通していることから、食品の微生物制御は各国間で共通であることが重要であり、微生物汚染状況を確認する微生物試験法は国際的に共通性があることが重要である。ISO 法はその標準的な方法として示されている。ただ、それぞれの国の食品事情は異なっており、必ずしも国際的に統一した試験法のみを用いているわけではなく、多くの国ではその国のリスクマネジメントに適する試験法を採用している。異なる試験法の妥当性確認を行うために、ISO16140 では試験法の妥当性を評価する方法について示されており、これに従い科学的根拠のある妥当性確認が行われた試験法が作られている。

わが国の微生物試験法は、これまで行われた厚生労働科学研究班の“食中毒起因細菌の標準となる試験法がどの様にあるべきか”の議論により、国際的なレベルで妥当性確認された標準試験法を作成する手順が示され、それに従い標準試験法が作成されてきた。本研究班もその方針を引き継ぎ、早急に対応が必要と思われる微生物の標準試験法の策定を行う。厚労省が報告を義務づけている食中毒菌のうち、セレウス菌、エルシニア・エンテロコリチカ、加えて食中毒起因菌の産生する毒素、さらには食品の工程管理に利用される衛生指標菌試験法などについて標準試験法の策定を試みる

標準法検討委員会では、“食品からの微生物標準試験法作成方針”を作成し、試験法作成手順についてはほぼ確立している。一方、作成された試験法の妥当性の確認方法については、国際的にも現在まだ議論が続いている状況であり更なる検討を必要としている。従って、本研究班では妥当性確認の適用方法を中心に議

論を進める。妥当性確認に必要とされるデータ数と統計手法の選択、統計値の解釈、コラボスタディの規模、微生物標準品をどうするかなどを検討する。加えて標準法が整備された後、食品における微生物試験を行うにあたり標準試験法をどのように導入し、また試験精度を担保していくかに関しても検討を行う。

B. 研究方法

約 20 人の食品微生物の専門家で構成する“標準法検討委員会”（親委員会）を組織する。この親委員では、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従って、作業部会から提案される試験法のプロトコル案の検討・評価を行う。当該微生物の試験法案の提案は、作業部会が行う。作業部会は、4つのステージに従い試験法の作成を進めた。

ステージ1：当該微生物の試験法に関する情報収集を行い、海外の試験法との互換性を考慮すると共に、今後検討の必要が必要と思われる箇所を指摘したプロトコル原案を作成する。ステージ2：公開による意見などを考慮し、原案の検討事項について整理し、具体的なデータを基に試験法のプロトコルの妥当性を検討し、検討データを付けて作業部会案として親委員会に改良した試験法プロトコルを提出する。ステージ3：作業部会案は一定の期間の評価を受けた後、指摘された問題点等については、追加実験を行い修正または確認を行った上で、“コラボ案”とする。コラボ案では、試験法を SOP 化し、用いる培地等の調査を行い、その組成表を作成する。親委員会では初年度に検討した“メソッドバリデーションの手法”を基に、具体的なコラボの実施方法につき明らかにし、コラボ案として公開する。ステージ4：コラボ案の公開と共に、コラボ参加希望機関を募り、最終的には 15 カ所程度の試験・検査機関、地方衛生研究所、検疫所、大学

などに協力していただき、プロトコールの実行性を評価するコラボスタディを行う。コラボの結果は、コラボ作業部会で統計的な検討を行う。親委員会は、コラボの結果と作業の進行が作成方針に従って行われているかの確認を行った後、標準法として公開する。

これらの試験法策定過程は国立医薬品食品衛生研究所ホームページ上に公開し、一般にも広く意見を求めた。

研究班の行う当該微生物の試験法策定は、それぞれの作業部会を組織し進めた。本研究班の代表、分担、協力研究者が、作業部会を組織し具体的な標準法案策定の作業にあたった。各作業部会は、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い“標準試験法検討委員会”の評価を受けながら作業を進めた。H28年度の試験法の策定は、作業部会案の検討及び最終試験法の検討（ステージ3～4）を行った。

研究分担は、研究総括と標準法検討委員会運営は五十君が担当した。検討委員会の事務局は岡田が担当した。妥当性評価は松岡が担当し、五十君も協力した。試験法プロトコールの作成は、セレウス菌（荻原が担当）、食中毒菌毒素セレウリド試験法（鎌田が担当）、エルシニア・エンテロコリチカ（岡田が担当）、衛生指標菌（伊豫田淳が担当、五十君、（一財）食品分析センター、（一財）日本冷凍食品検査センターが協力）衛生指標菌は集落計数法の作業部会を組織した。各作業部会は“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い、試験法作成を進める。4つのステージで検討を進めるが、それぞれのプロトコール案は、国立医薬品食品衛生研究所のホームページ上に公開し、広く意見を求める。H28年度に、ステージ4まで進めた。

これに対応し“標準試験法検討委員会”はH28年度に6回開催し、それぞれの標準試験法策定が適切に行われていること

を確認すると共に、微生物試験法の妥当性確認の手法をISO 16140を基にAOACのバリデーションガイドライン、海外の第三者認証機関が示しているプロトコールなどを参考とし検討し、ガイドライン原案の検討を開始した。

他の研究班で食品微生物に関する試験法の作成を行う場合は、その研究班と協力し“食品からの微生物標準試験法作成方針”を基に“標準試験法検討委員会”が標準試験法の作成の方向性を示した。平成28年度は、特定非営利活動法人食の安全を確保するための微生物検査協議会が中心となって進めるウェルシュ菌試験法については、定性法について作業部会案からコラボ案作成（ステージ3）の検討を行った。

C. 研究結果

食品微生物の専門家19名で構成する“標準試験法検討委員会”を組織した。この委員会は試験法案を検討し、“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い標準試験法策定にあたった。汚染指標菌の標準試験法は、ISO法の酵素基質培地を用いた大腸菌試験法について検討し、その試験法案の作成を行った。衛生指標菌・バリデーション合同作業部会から提出された資料を基に妥当性確認に関する方法論に関する議論を進めた。

それぞれの標準試験法案プロトコールの作成は、作業部会単位で進めた。セレウス菌（荻原、岡田、五十君）、エルシニア（岡田）、衛生指標菌（伊豫田、五十君、日本食品分析センター、日本冷凍食品検査協会）の試験法案について各作業部会で検討を行った。その検討内容については各作業部会の分担研究報告書を確認していただきたい。標準試験法検討委員会は“食品からの微生物標準試験法作成方針”に従い、試験法策定を進めた（五十君は総括および検討委員会運営）、事務局（岡田）と共に試験法の検討を進めた。

妥当性確認に関する検討（松岡、五十君）は衛生指標菌作業部会との合同作業部会を開催し、AOAC インターナショナルの示したガイドラインや海外の第三者機関による妥当性確認に関する文書を参考に議論を進め、標準試験法のバリデーショングイドライン案を作成した。

標準試験法検討委員会の事務局は、岡田が担当し、19名の専門家委員と2名の行政官で構成した。平成28年度6回の検討委員会を開催した。各作業部会が機能し、標準法策定が順調に行われているかを評価した。他の研究班等で検討中のウェルシュ菌標準試験法について諮問を受け評価した。これらの試験法の検討状況をwebへ公開した。

セレウス菌試験法作業部会（荻原担当）は、ISO 7932:2004を中心に検討を進めた。米国FDAからは、BAM法として試験法が示されている。国内の一般的な方法も含め、各試験法の比較を行うために、各方法の比較表の作成を行った。問題点や評価点を探究し、最も適切な試験法の検討を行うこととした。国際的に互換性のあるセレウス菌試験法としてISO 7932:2004を基礎とする標準試験法(NIHSJ-28)を作成した。さらに日本で入手可能な*B. cereus*の選択培地について、供試菌株42菌株を用いて選択培地の有効性並びに評価を行った。その結果、*B. cereus* 選択培地間には、*B. thuringiensis* 除き、他の供試菌株と*B. cereus*と明確な判別が可能なことから良好な選択性を有した。さらに検出菌数についても各選択培地間に有意な差は認められなかった。これらの培地は特徴を理解して使用することにより*B. cereus*を有効に検出できるものと推察された。

エルシニア試験法作業部会（岡田担当）では、ISO 10273とハーモナイズした定性法(NIHSJ-27)の策定を行った。現在日本国内では、食品から本菌を検出するための告示法、通知法等が定められていな

いため、国際的な試験法と互換性のある、食品からエルシニアを分離するための標準試験法を策定する必要がある。国際的標準試験法と互換性のある食品からの*Yersinia*試験法として、昨年度の検討で最も所要時間が短かったISO 10273:2003を基礎とした標準試験法案を作成・検討することとしたが、研究協力機関による検討から、PMPブrossを用いて4℃で培養する*Y. pseudotuberculosis*の試験法としてBAMに記されている方法（2004年版食品衛生検査指針にも記されている方法）が最も分離率が優れていたため、NIHSJ-30TSとして推奨試験法を策定した。

衛生指標菌作業部会（伊豫田担当）では、衛生指標菌・菌群としては、一般生菌数と、大腸菌群、腸内細菌科菌群などの検討を行った。ISO試験法と国内の従来法について、バリデーショナル作業部会と合同で検討を進めた。

バリデーショナル作業部会（松岡・五十君担当）は衛生指標菌作業部会と合同で検討した。セレウス菌等、4種類の微生物及び微生物由来毒素の各標準試験法の作成に際して、妥当性確認ガイドラインに基づき検討を進めた。またガイドラインの基となったISO 16140が改訂されたことから、その和訳を作成し分析した。ウェルシュ菌標準試験法の評価を行い、NIHSJ-29をステージ3とした。海外の第三者機関による妥当性確認のガイドラインを比較検討し、AOACインターナショナルが新規に提案したガイドラインとISO 16140を比較しながら妥当性確認に必要な内容をまとめ、標準試験法のバリデーショングイドライン案を作成した。微生物試験法の合理的な妥当性確認のために重要な、オンサイト調製型の生菌標準物質に関しては、広範囲の菌種に適用できる見通しを得た。パリで開催されたISO TC34/SC9に参加し、ISO策定の議論に加わった。また、米国で開催された

AOAC INTERNATIONAL の年次大会に参加した。

これらの試験法に関する情報提供を、学会等のシンポジウムや講演会及び関連雑誌の総説で行った。

D. 結論

食品における微生物標準試験法の妥当性確認の手法を検討し、統一した方向性を持ち、科学的根拠のある信頼性の高い標準試験法プロトコール作成を進めた。セレウス菌 (NIHSJ-28)、エルシニア (NIHSJ-27、NIHSJ-30TS)、ウェルシュ菌試験法 (NIHSJ-29-ST3) などの標準試験法の策定を進めた。海外の第三者機関のガイドラインを比較検討し、妥当性確認に関する考え方を整理し、妥当性確認ガイドライン案をまとめた。微生物試験法の合理的な妥当性確認のために重要な、オンサイト調製型の生菌標準物質に関しては、広範囲の菌種に適用できる見通しを得た。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

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

書籍

1. 食品衛生検査指針 微生物編 2015。公益社団法人日本食品衛生協会

講演・研修会等

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

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

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の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究

平成28年度 研究組織

研究代表者 五十君 静信 東京農業大学 応用生物科学部

研究分担者 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
鎌田 洋一 岩手大学 農学部
岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部

セレウス菌試験法作業部会

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
五十君 静信 東京農業大学 応用生物科学部
鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所
斎藤 瞳 日本大学 生物資源科学部
大坪 愛実 日本大学 生物資源科学部

エルシニア・エンテロコリチカ試験法作業部会

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 吉田 麻利江 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
下島 優香子 東京都健康安全研究センター 微生物部
井田 美樹 東京都健康安全研究センター 微生物部
福井 理恵 東京都健康安全研究センター 微生物部
渡邊 真弘 一般財団法人日本冷凍食品検査協会

バリデーション・衛生指標菌合同作業部会

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	東京農業大学 応用生物科学部
	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
	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
	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
	吉田 朋高	財団法人食品分析開発センター SUNATEC
	守山 隆敏	スリーエム ヘルスケア株式会社
	内田 和之	シスメックス・ビオメリユ株式会社
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	吉村 昌徳	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	須田 貴之	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	安河内 彩	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	森 篤志	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法作業部会

研究分担者	鎌田 洋一	岩手大学農学部 共同獣医学科
研究協力者	松田 りえ子	国立医薬品食品衛生研究所 食品部
	大城 直雅	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	森 曜子	日本適合性認定協会
	藤田 和弘	日本食品分析センター 彩都研究所
	福沢 栄太	日本食品分析センター 彩都研究所
	後藤 浩文	日本食品分析センター 彩都研究所
	佐野 勇氣	日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター
	橘田 規	日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター

事務および経理担当者

内山 貴満 東京農業大学 総合研究所

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	東京農業大学・応用生物科学部
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	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
	鎌田 洋一	岩手大学（作業部会）
	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
	小高 秀正	公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所
	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
	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	吉原 尚喜	厚生労働省・基準審査課
	井河 和仁	厚生労働省・基準審査課
	梅田 浩史	厚生労働省・監視安全課

平成 28 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 58 回検討委員会： 2016 年 6 月 8 日開催

第 59 回検討委員会： 2016 年 8 月 25 日開催

第 60 回検討委員会： 2016 年 10 月 31 日開催

第 61 回検討委員会： 2016 年 12 月 26 日開催

第 62 回検討委員会： 2017 年 1 月 27 日開催

第 63 回検討委員会： 2017 年 2 月 15 日開催

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げられた。
24. NDt 及び PDt について、絶対値か否かとの質問が挙げられたが、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。
- ・ バージー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

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

セレウス菌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
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所
五十君静信 東京農業大学 応用生物科学部
研究協力者 鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所
斎藤 瞳 日本大学 生物資源科学部
大坪 愛実 日本大学 生物資源科学部

研究要旨:セレウス菌 (*Bacillus cereus*) は環境に広く分布するグラム陽性の芽胞形成菌で、食品を媒介とする病原細菌である。食中毒の発生件数は、年間数件から十数件程度の発生頻度で、発生数や患者数は他の食中毒菌と比較して少なく散発的である。セレウス菌食中毒は嘔吐型が大半を占め、下痢型は少ない。原因食品としては穀類や複合調理食品によるものが大部分を占め、特に米飯、炒飯、スパゲティによるものが多くを占めている。わが国において代表的な *B. cereus* の試験法としては、食品衛生検査指針が利用されているが、これらの試験法は国際的に評価されていない。そのため ISO (International Organization for Standardization) が制定する試験法や FDA(Food and Drug Administration)法などと調和や整合性がとれていない可能性が指摘されている。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」においてセレウス菌標準試験法の検討が行われている。

本研究では、国際的に用いられているセレウス菌の試験法を比較検討し、国内での標準試験法を定めるにあたって必要となる事項について継続して検討を行ってきた。その結果、*B. cereus* の標準試験法として ISO が定める国際規格の方法について継続して検討を行い、国内での標準試験法の策定のための検討を行った。特にセレウス菌標準試験法による選択培地の問題については、ISO 法の推奨される MYP 寒天培地と国産の NGKG 寒天培地および X-BC 寒天培地についてデータの構築を行い、その検出能の総合的な評価を行った。

A. 研究目的

現在、わが国ではセレウス菌の検出法は国際的な ISO 法や FDA 法との調和が十分取れていない状況が存在している。これらの現状を解決するために「食品からの微生物標準試験法検討委員会」においてセレウス菌標準試験法の検討を行うこととなった。そこで国際法として実績のある ISO 法を基本としたセレウス菌試験法を確立することを目的に検討が行われている。特に試験法については ISO (7932)、ISO(21871)、FDA (BAM ; Bacteriological Analytical Manual) , 食品衛生検査指針等があり、それぞれの特徴と用途により採用されている。現在日本においては国際法に準ずる方法はなく、国内法では食品衛生検査指針が用いられている。

本研究では、国際的整合性のあるセレウス菌標準試験法について ISO 法を参考に検討を続けている。前年度は各試験法の比較検討を行い、最適と思われるフローチャーを作成した。特にセレウス菌の検出に重要な選択培地等についても *B. cereus* 標準菌株を用いて性能評価を行った。本年度は作成されたセレウス菌標準試験法について、実際の食品に *B. cereus* を接種した検体を用いて検出能の評価を行った。

B. 研究方法

(1)セレウス菌試験法プロトコールの作成

前年度に引き続き ISO 7932:2004 の試験法を参考にプロトコールを作成し、食品からの微生物標準試験法検討委員会に提案して意見やアドバイスを取り入れながら検討

を行った。

(2)セレウス菌標準試験法の評価検討

セレウス菌試験法のプロトコールを参考に作成された標準試験法について、*B. cereus* を接種した食品を用いてこれらの標準試験法における評価を行った。

供試食品は市販のマッシュポテトと炒飯を用い、供試菌株は *B. cereus* ATCC 10876 と *B. cereus* ATCC 33019 を用いた。

B. cereus 芽胞懸濁液の調製は、TSB 培地にて 2 代継代培養した後に、芽胞形成培地に塗抹して 30°C で 10 日間培養した。培地に発育した集落をかきとり滅菌精製水に懸濁した。懸濁液は遠心分離を行い、上澄みを除去した後、再び同様の操作を行った。これらの懸濁液は 70°C で 40 分間加熱処理を行い *B. cereus* 芽胞懸濁液を調製した。芽胞懸濁液は適宜希釈を行って食品中の接種菌量が検出される低濃度菌量として 50~100 CFU/g と高濃度菌量として 500~1000 CFU/g になるように食品に接種した。

検討するセレウス菌の選択培地は ISO 推奨培地の MYP 寒天培地 (MERCK) と国産の NGKG 寒天培地 (NISSUI) と X-BC 寒天培地 (NISSUI) を用いた。

予備実験として 2 種類の食品 (マッシュポテトと炒飯) に 2 種類の *B. cereus* ATCC 10876 と *B. cereus* ATCC 33019 を低濃度菌量 (50~100CFU/g) と高濃度菌量 (500~1000CFU/g) が検出されるように各食品に接種して調製した。この食品検体を用いて試験を 2 回行った。

本実験としては食品を炒飯と *B. cereus* ATCC 33019 に絞り、予備実験と同様に調製

された食品検体を使用して、試験数を8回行った。

すなわち検出については、*B.cereus* 接種食品検体 25g を無菌的に採取し、225mL の BPW を入れ、1 分間のストマッキング処理を行った。

低濃度菌量 (50~100 CFU/g) の接種食品からの検出では、ストマッキング処理された 10 倍懸濁液の 1mL を 3 枚の各選択培地に 300 μ L, 300 μ L, 400 μ L を接種し、これらを 2 組 (複式) 行った。さらに高濃度菌量 (500~1000 CFU/g) の接種食品からの検出では、10 倍懸濁液の 0.1mL を 2 枚の各選択培地に 100 μ L を接種 (複式) した。選択培地は、予備実験と本実験とも MYP 寒天培地では 30 $^{\circ}$ C、NGKG 寒天培地・X-BC 寒天培地では 37 $^{\circ}$ C で培養を行い、発育した定型的な集落を計測した。これらの結果から検出能評価を行った。

(3) セレウス菌試験法・集落計数法の作成

食品からのセレウス菌を検出するための標準試験法を作成するにあたり ISO7932 : 2004 の *B.cereus* 検出法を参考にして、試験法の定義、試験方法の概要、使用器具、装置、培地、試薬、選択培地、試験手順、試料の調製、塗抹および培養、集落の計測、確認試験、菌数の算定等について試験法を作成した。

C. 結果及び考察

(1) セレウス菌標準試験法プロトコールの作成

ISO ISO (7932)、ISO(21871)、FDA 法、食品衛生検査指針等の試験法を比較検討し

た。前年度検討委員会から得た助言やアドバイスを参考にセレウス菌標準法のプロトコールを作成した。これらは図 1 に示した。食品中の *B.cereus* を検出するための集落計数法は、平板法では検出限度である 1mL を 3 枚の選択培地に塗抹して菌数を計測することから、食品中 10 個/g 以上から検出が可能である。さらに選択培地から検出された定型集落数を計測し、その 5 菌株を純粋培養し、これらの菌株の溶血反応を利用して陽性であればセレウス菌陽性としてとして算出法に準じて菌数を算出する方法である。

なお、*B. thuringiensis* との判別は Parasporal crystals (芽胞周辺にある結晶；クリスタルトキシン)を確認して判定する。

(2) セレウス菌標準試験法の評価検討

① 予備実験

食品のマッシュポテトと炒飯に *B.cereus* ATCC 10876 と *B.cereus* ATCC 33019 をそれぞれ接種して各選択培地より検出を行った結果を表 1~4 に示した。

マッシュポテトに *B.cereus* ATCC 10876 を接種して検出を試みたところ、低濃度菌量では 35~85 CFU/g、高菌濃度量では 500~750 CFU/g の範囲で検出され、設定された菌量の範囲で検出された (表 1)。

同様に炒飯に *B.cereus* ATCC 10876 を接種して検出を行ったところ、低菌濃度菌量では 55~95 CFU/g、高菌濃度菌量では 300~1000 CFU/g の範囲で検出された (表 2)。

次に菌株を *B.cereus* ATCC 33019 に変更してマッシュポテトに接種して検出を行ったところ、低濃度菌量では 60~100 CFU/g、高濃度菌量では 450~1050 CFU/g の範囲で

検出された (表 3)。

同様に *B.cereus* ATCC 33019 を炒飯に接種して検出を行ったところ、低濃度菌量では 60~110 CFU/g、高濃度菌量では 800~1050 CFU/g の範囲で検出された (表 4)。

以上、食品から *B.cereus* の検出を試みた結果、検出された菌数には食品の違いや *B.cereus* 菌株による著しい相違は認められなかった。さらに MYP 寒天培地、NGKG 寒天培地、X-BC 寒天培地間についても顕著な差は見られなかった。

②本実験

本実験では予備実験の結果を踏まえて *B.cereus* ATCC 33019 を、食品では炒飯を選択した。予備実験と同様に低濃度菌量及び高濃度菌量となるように接種した炒飯を用いて MYP 寒天培地での検討を行った。試験数は 8 回行った結果を表 5 に示した。低濃度菌量では 60~130 CFU/g、高濃度菌量では 550~1100 CFU/g の範囲で検出された。次に、国内で入手できる NGKG 寒天培地について同様に検出を行った結果を表 6 に示した。低濃度菌量では 65~115 CFU/g、高濃度菌量では 600~1050 CFU/g の範囲で検出された。さらに X-BC 寒天培地での結果を表 7 に示した。低濃度菌量では 50~105 CFU/g、高濃度菌量では 350~1350 CFU/g の範囲で検出され、ややばらつきが認められた。

これらの供試 3 選択培地の結果を表 8 に示した。低濃度菌量接種による *B.cereus* の平均検出菌数は、MYP 寒天培地で 1.90 ± 0.10 CFU/g、NGKG 寒天培地で 1.91 ± 0.08 CFU/g、X-BC 寒天培地で 1.87 ± 0.11 CFU/g であった。高濃度菌量接種による *B.cereus*

の検出では、MYP 寒天培地で 2.93 ± 0.10 CFU/g、NGKG 寒天培地で 2.87 ± 0.09 CFU/g、X-BC 寒天培地で 2.86 ± 0.19 CFU/g であった。

次に、検出菌数のデータを ANOVA 並びに多重比較検定を用いた統計処理を行った結果を表 9 に示した。さらに低濃度菌量試験の結果を図 2 に、高濃度菌量試験結果を図 3 に示した。

以上の結果、食品に接種された *B.cereus* の低濃度菌量及び高濃度菌量の検出結果からは、ISO 法で使用される MYP 寒天培地と比較して、いずれの選択培地でも危険率 5% 基準で有意差が認められなかった。

したがって、今回検討した NGKG 寒天培地と X-BC 寒天培地は ISO 推奨の MYP 寒天培地と検出能には顕著な差が認められず代替培地としても有効と判断された。

(3) セレウス菌試験法・集落計数法

セレウス菌標準試験法を策定するために ISO7932 : 2004 を参考に、日本での重要な事情や要件について試験法検討委員会で議論しながら標準試験法の作成を行った。セレウス菌 (*B.cereus*) の定義、試験方法の概要、使用器具、装置、培地、試薬、選択培地、試験手順、試料の調製、塗抹および培養、集落の計測、確認試験、菌数の算定等について日本での使用を考慮して作成した。

(資料：セレウス菌標準試験法・集落計数法 NIHSJ-28-ST-4 を添付した)。

まとめ

(1)セレウス菌検出のためのプロトコールを作成した。

(2)セレウス菌標準試験法の評価

セレウス菌標準試験法の検討を行ったところ、低濃度菌量と高濃度菌量の *B.cereus* を接種した食品から検出を試みた結果、予備実験に関して *B.cereus* の検出には問題がみられなかった。さらに本実験では試験数を 8 に増やして検討したところ、予備実験と同様、本実験でも良好な検出結果が得られた。さらに ISO 推奨の MYP 培地と国産の NGKG 培地及び X-BC 培地を比較検討した結果、いずれの選択培地を用いても検出菌数の平均値や統計的な観点からも遜色ない検出性能を有しているものと思われた。

(3)セレウス菌標準試験法・集落計数法（定量法：集落計数法）NIHSJ-28-ST-4（案）を作成した。

D. 結論

国際的に互換性のある食品からのセレウス菌標準試験法として ISO 法の *B.cereus* 検出法を参考にした標準試験法(案)を作成した。セレウス菌標準試験法について作成されたプロトコールと試験法の評価を行った。その結果、概ね ISO を参考にした標準試験法には問題は見られなかった。さらに MYP 寒天培地と国産の NGKG 寒天培地と X-BC 寒天培地を検討した結果、これらの選択培地間に有意差は認められず、MYP 寒天培地の代替培地として NGKG 寒天培地と X-BC 寒天培地も有効に利用できるものと考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

日本食品衛生学会第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会

期日：平成 28 年 10 月 27 日～28 日

会場：函館国際ホテル（北海道函館市）

題目：*Bacillus cereus* の選択培地における比較検討（ポスター発表）

発表者：○荻原博和¹⁾、上村真理子¹⁾、吉川夏未¹⁾、岡田由美子²⁾

¹⁾日本大学生物資源科学部、

²⁾国立医薬品食品衛生研究所

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 セレウス菌標準試験法・集落計数法 NIHSJ-28
フローチャート

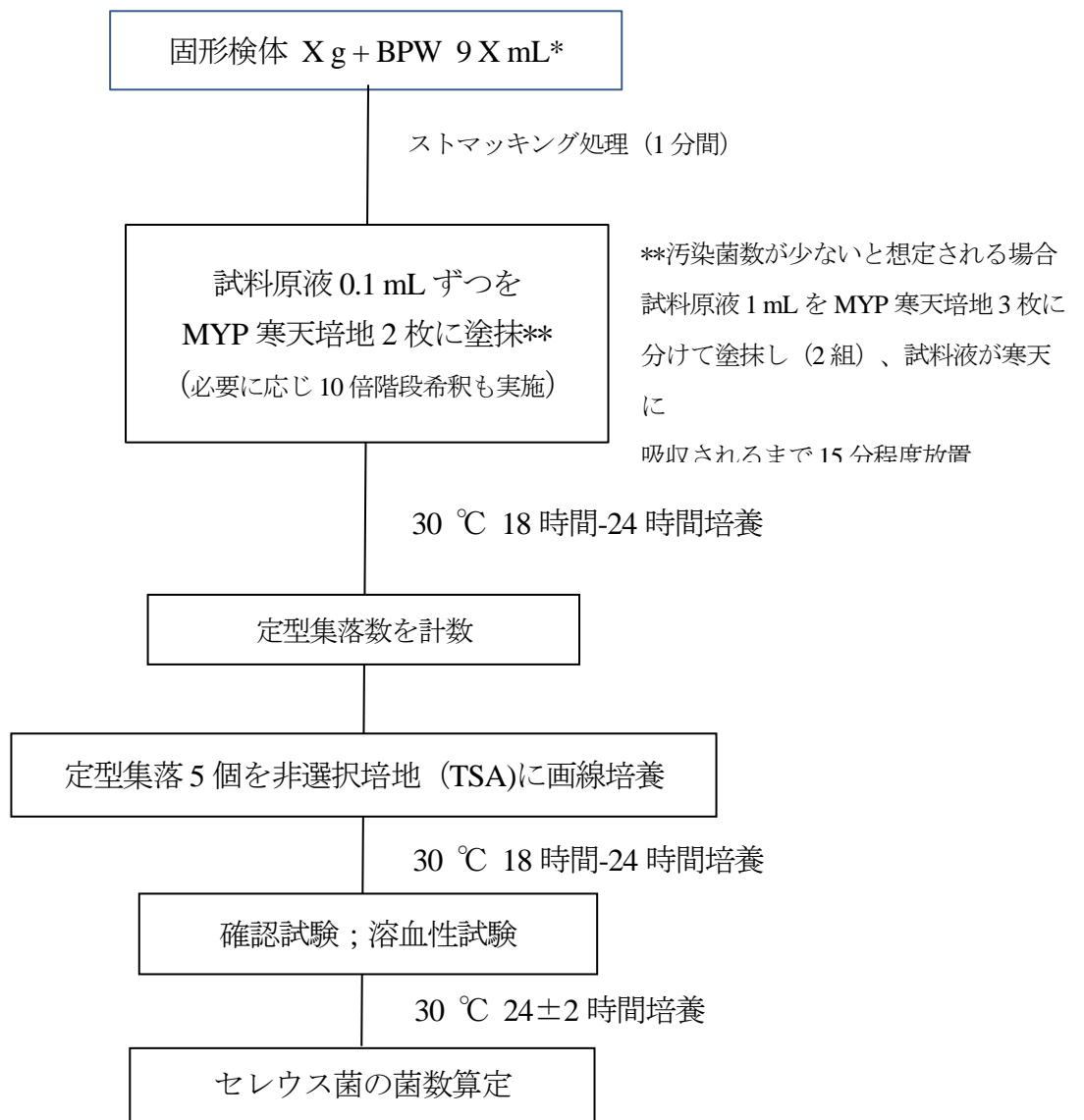


表1 *B. cereus* ATCC 10876 を接種したマッシュポテトからの検出結果

供試培地	試験 No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
			平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
MYP	1	1	4 ^a	35 ^b	8 ^c	750 ^d
		2	3		7	
寒天培地	2	1	3	40	4	550
		2	5		7	
NGKG	1	1	8	85	6	550
		2	9		5	
寒天培地	2	1	6	45	5	600
		2	3		7	
X-BC	1	1	7	45	9	750
		2	2		6	
寒天培地	2	1	6	50	2	500
		2	4		8	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表2 *B. cereus* ATCC 10876を接種した炒飯からの検出結果

供試培地	試験 No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
			平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
MYP	1	1	7 ^a	65 ^b	3 ^c	350 ^d
		2	6		4	
寒天培地	2	1	8	60	5	400
		2	4		3	
NGKG	1	1	8	80	7	600
		2	8		5	
寒天培地	2	1	8	70	8	550
		2	6		3	
X-BC	1	1	7	55	9	1000
		2	4		11	
寒天培地	2	1	10	95	3	300
		2	9		3	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表3 *B. cereus* ATCC 33019 を接種したマッシュポテトからの検出結果

供試培地	試験 No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
			平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
MYP	1	1	4 ^a	65 ^b	5 ^c	450 ^d
		2	9		4	
寒天培地	2	1	8	80	7	800
		2	8		9	
NGKG	1	1	11	95	9	1050
		2	8		12	
寒天培地	2	1	8	65	10	950
		2	5		9	
X-BC	1	1	6	60	6	500
		2	6		4	
寒天培地	2	1	11	100	5	450
		2	9		4	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表4 *B. cereus* ATCC 33019を接種した炒飯からの検出結果

供試培地	試験 No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
			平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平均計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
MYP	1	1	9 ^a	70 ^b	9 ^c	800 ^d
		2	5		7	
寒天培地	2	1	11	110	9	800
		2	11		7	
NGKG	1	1	9	90	10	1050
		2	9		11	
寒天培地	2	1	6	60	9	1000
		2	6		11	
X-BC	1	1	7	85	9	850
		2	10		8	
寒天培地	2	1	6	50	8	900
		2	4		10	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表5 *B. cereus* ATCC 33019を接種した炒飯からMYP寒天培地を用いて検出された菌数結果

試験No.	複式	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
		平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
1	1	9 ^a	85 ^b	11 ^c	1000 ^d
	2	8		9	
2	1	9	75	5	900
	2	6		13	
3	1	7	65	14	1000
	2	6		6	
4	1	7	85	8	650
	2	10		5	
5	1	7	70	6	850
	2	7		11	
6	1	7	60	10	950
	2	5		9	
7	1	7	90	5	550
	2	11		6	
8	1	11	130	8	1100
	2	15		14	
Blank(1)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(2)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(3)	1	0		0	
	2	0		0	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表6 *B.cereus* ATCC 33019を接種した炒飯からNGKG寒天培地を用いて検出された菌数結果

試験No.	平板 複式.	低濃度菌量(1000 μ L)		高濃度菌量(100 μ L)	
		平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
1	1	10 ^a	115 ^b	5 ^c	650 ^d
	2	13		8	
2	1	8	85	7	750
	2	9		8	
3	1	6	65	9	700
	2	7		5	
4	1	8	70	6	650
	2	6		7	
5	1	8	70	6	650
	2	6		7	
6	1	11	95	6	600
	2	8		6	
7	1	9	70	12	1050
	2	5		9	
8	1	10	85	9	950
	2	7		10	
Blank(1)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(2)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(3)	1	0		0	
	2	0		0	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表7 *B. cereus* ATCC 33019を接種した炒飯からX-BC寒天培地を用いて検出された菌数結果

試験No.	平板 複式.	低菌量(1000 μ L)		高菌量(100 μ L)	
		平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)	平板計数 (個)	算出菌数 (CFU/g)
1	1	12 ^a	80 ^b	11 ^c	750 ^d
	2	4		4	
2	1	7	85	14	1350
	2	10		13	
3	1	7	70	6	500
	2	7		4	
4	1	10	85	8	600
	2	7		4	
5	1	5	55	3	350
	2	6		4	
6	1	5	50	8	750
	2	5		7	
7	1	7	80	3	750
	2	9		12	
8	1	10	105	13	1250
	2	11		12	
Blank(1)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(2)	1	0		0	
	2	0		0	
Blank(3)	1	0		0	
	2	0		0	

a: 平板3枚に1000 μ Lを塗抹して発育した集落合計 b: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 10倍希釈

c: 平板1枚に100 μ Lを塗抹して発育した集落合計 d: 複式2組の発育した集落合計の平均値 \times 100倍希釈

表8 MYP寒天培地、NGKG寒天培地、X-BC寒天培地において検出された*B.cereus*の対数値

低濃度 菌量	対数 CFU/g			高濃度 菌量	対数 CFU/g		
	MYP寒天 培地	NGKG寒天 培地	X-BC寒天 培地		MYP寒天 培地	NGKG寒天 培地	X-BC寒天 培地
L1	1.929	2.061	1.903	H1	3.000	2.813	2.875
L2	1.875	1.929	1.929	H2	2.954	2.875	3.130
L3	1.813	1.813	1.845	H3	3.000	2.845	2.699
L4	1.929	1.845	1.929	H4	2.813	2.813	2.778
L5	1.845	1.845	1.740	H5	2.929	2.813	2.544
L6	1.778	1.978	1.699	H6	2.978	2.778	2.875
L7	1.954	1.845	1.903	H7	2.740	3.021	2.875
L8	2.114	1.929	2.021	H8	3.041	2.978	3.097
Ave.	1.90	1.91	1.87	Ave.	2.93	2.87	2.86
S.D.	0.10	0.08	0.11	S.D.	0.10	0.09	0.19

表9 *B.cereus* 選択培地における検出菌数の統計処理値の比較

菌数対数値	パラメトリック p 値	MYP寒天培地 vs NGKG寒天培地	MYP寒天培地 vs X-BC寒天培地
低濃度菌量・対数値	0.6200	p > 0.05	p > 0.05
高濃度菌量・対数値	0.4601	p > 0.05	p > 0.05

パラメトリック：Repeated Measure ANOVA

多重比較：Dunnnett Multiple Comparisons Test

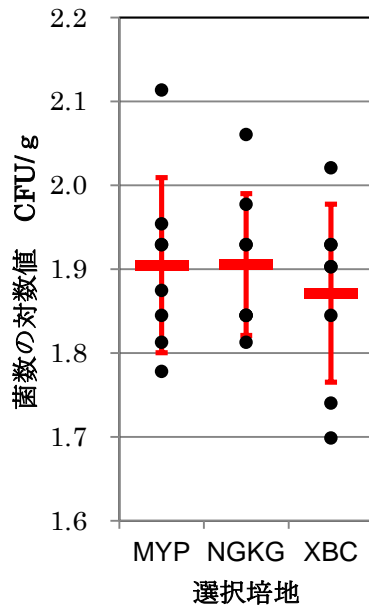


図2 低濃度菌量における MYP 寒天培地、NGKG 寒天培地、X-BC 寒天培地の対数値分布

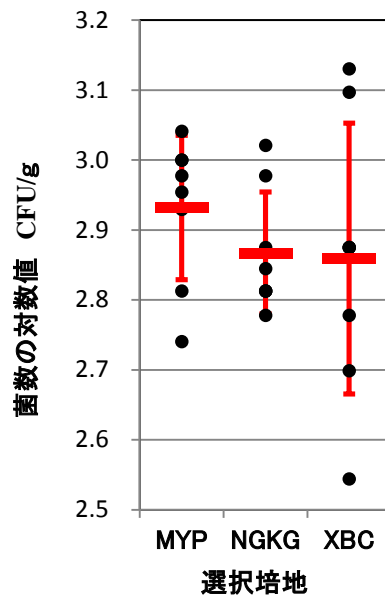


図3 高濃度菌量における MYP 寒天培地、NGKG 寒天培地、X-BC 寒天培地の対数値分布

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

Yersinia の標準試験法に関する研究

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	第三室長
研究協力者	吉田麻利江	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	鈴木穂高	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部	
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部	
	福井理恵	東京都健康安全研究センター微生物部	
	渡邊真弘	一般財団法人日本冷凍食品検査協会	

研究要旨

食品からのエルシニア標準試験法について検討を行った。食品媒介エルシニア症の原因菌は *Yersinia enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の 2 菌種あり、国際的な標準試験法においては *Y. enterocolitica* のみを対象としているものと、両者の試験法を定めているものがある。初年度は、エルシニア標準試験法検討のステージ 1 として、現在海外で用いられている標準的な本菌の試験方法である BAM 法、USDA FSIS 法及び ISO 法と、国内で用いられてきた食品衛生検査指針（2004 年）に記載された方法の比較検討を行い、最も培養日数の少ない ISO 10273 : 2003 法を中心に以後の検討を行うこととした。次年度は、ステージ 2 案作成のため、ISO 法に基づいて豚ひき肉及び豚タンへの *Y. enterocolitica* 添加回収試験を実施したところ、食品由来の夾雑菌の増殖が抑制されず、添加菌の回収が困難であることが示された。一方、研究協力者らの検討において、BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法と食品衛生検査指針（2004 年）に記載されたエルシニア属試験法がほぼ同一の試験法であり、食品からの *Y. enterocolitica* 添加回収試験において好成績を示すことが明らかとなった。そのため、本年度食品からの微生物標準試験法検討委員会において本菌試験法をステージ 1 に戻し、日常的な食品検査のための標準試験法としては ISO 10273 : 2003 法に基づく試験法を NIHSJ-27 として作成し、食中毒発生時の原因食品同定等を目的として BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法に基づく試験法を NIHSJ-30 として作成し、検出感度を示した。

A. 研究目的

Yersinia 属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、人に病原性を示すのはペストの原因菌である *Y. pestis* の他に、食品による媒介が知られている *Y. enterocolitica* と *Y.*

pseudotuberculosis の 2 菌種である。食中毒としてのエルシニア症の原因食品としては、生あるいは加熱不十分な豚肉や乳製品、本菌を保有するげっ歯類の糞便等に汚染された水等が知られている。本菌による人の感染症は

下痢、腹痛、発熱等を主な症状とする。エルシニア症の集団事例は、北米、EU 諸国、中東、オーストラリア等世界各国で報告されている。EU ではカンピロバクター、サルモネラに次ぐ発生数第3位の食中毒であり、2014年にはドイツで約2500名、フランスで約570名の事例が報告されている。日本国内でも、平成3年の青森県での事例（推定患者数732名）や平成9年の徳島県での事例（患者数66名）、平成25年の東京都の事例（患者数52名）等の発生が明らかとなっている。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 10273 : 2003) と、アメリカ合衆国の Food and Drug Administration (FDA)による BAM 法 (2007年)、同じく米国の USDA FSIS の試験法 (1998年) がある。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おらず、2015年に発行された食品衛生検査指針において独自の方法が紹介されている。そのため、国際的な試験法と互換性のある、食品からエルシニアを分離するための標準試験法を策定する必要がある。本研究では平成26年度から、国際的標準試験法の中から最も培養時間の短い ISO 法を中心に検討を行ったが、ISO 法の検出感度が検査指針の方法より感度が低い可能性が示されたため、豚タンへの添加回収試験を行い、検出感度の比較検討を行った。その結果から、エルシニアの標準試験法を、日常的な食品検査のための試験法として比較的迅速に結果が得られる ISO 法に基づく試験法と、食中毒原因究明のための試験法として培養日数が長いものの検出感度に優れる BAM 法及び検査指針の方法に基づく試験法の2種類の試験法を作出した。

B. 研究方法

1) ISO 10273 : 2003、BAM 法 (2007年) 及び検査指針 (2004年) の試験法を用いた豚タンへの添加回収試験

市販豚タン 10 g を用い、研究室保有の *Y. enterocolitica* (血清型 O3) を添加した。ISO 法における添加菌数は 3、15、26、73、79、240、260、730 及び 2600 CFU/g であった。その内 15、79 及び 240 CFU/g を接種した試験では、検体数を 5 とした。その他の試験では、1 検体を用いた。BAM 法及び検査指針の方法における添加菌数は、3 CFU/g であった。ISO 法では、検体に 90 ml の PSB ブロスを加え、10 倍乳剤作成後、25°C 2 日間培養するものと (ISO ①法)、その 10 倍乳剤 10 ml に 90 ml の ITC ブロスを加えて 25°C 2 日間の増菌培養行うもの (ISO ②法) の 2 種の増菌培養を行った。培養後の PSB ブロスは一部をそのまま、一部をアルカリ処理後に、CIN 培地と CHROMagar™ *Y. enterocolitica* (CYE) 培地に塗布し、25-30°C で培養して定型集落の発育を確認した。ITC ブロスによる培養では、SSDC 培地及び CYE 培地に接種した。BAM 法及び検査指針の方法では、検体に PMP ブロス 90 ml を加え、10 倍乳剤作成後、4 °C で 3 週間増菌培養し、アルカリ処理後に IN 培地、VYE 培地及び 10 倍乳剤作成後、10°C 10 日間培養し、アルカリ処理又は生理食塩水処理後 CIN 培地、マッコンキー培地及び CYE 培地に塗布した (指針法)。

2) ISO 10273 : 2003 におけるストマッカー処理時間が検出率に及ぼす影響の検討

ISO 10273 : 2003 で規定されている試験試料のストマッカー処理時間 2 分間が妥当であるか検討するため、市販豚タン 10 g を用い、

研究室保有の *Y. enterocolitica* (血清型 03) を添加した回収試験を行った。添加菌数は 460 CFU/g であった。ストマッカー処理時間は 30 秒、1 分及び 2 分とし、各群 3 検体を用いて検討した。

3) NIHSJ-27-ST4 案及び NIHSJ-30TS-ST4 案の作成

1) 及び 2) の検討結果を元に、日常的な食品検査のための標準試験法としては ISO 10273:2003 法に基づく試験法を NIHSJ-27 として作成し、食中毒発生時の原因食品同等を目的として BAM 法の *Y. pseudotuberculosis* 試験法に基づく試験法を NIHSJ-30 としてステージ 4 案を作成した。

C. 研究結果

1) ISO 10273 : 2003、BAM 法 (2007 年) 及び検査指針 (2004 年) の試験法を用いた豚タンへの添加回収試験

表 1 に、豚タンへの添加回収試験結果を示した。検査指針の方法では、3 cfu/g の添加により、増菌培養 1 週間で CIN 培地及び CYE 培地上に *Y. enterocolitica* の定型集落が認められ、CYE 培地上では増菌培養 2 週間でも定型集落が認められた。一方、PSB ブロスを用いて 25°C で増菌する ISO②法では、3 cfu/g、15 cfu/g 及び 26 cfu/g の添加では全ての培養条件で添加菌が回収されなかった。73 cfu/g の添加でアルカリ処理を行った場合に CIN 培地及び CYE 培地上に定型集落が認められ、79 cfu/g の添加では 5 検体のうち CYE 培地で 1 検体が陽性、4 検体が陰性となり、CIN 培地では 5 検体が陰性となった。240 cfu/g の添加では、CIN 培地で 5 検体中 1 検体が陽性、CYE 培地で 5 検体中 4 検体が陽性の結果を

示した。260 cfu/g 及び 730 cfu/g の添加では、CIN 培地で陰性、CYE 培地で陽性の結果を示し、2600 cfu/g の接種では、両培地で陽性の結果が得られた。一方、ISO②法でアルカリ処理を行わない場合、ITC ブロスを用いて 25°C で増菌する ISO①法では、添加した *Y. enterocolitica* の発育は見られなかった。

2) ISO 10273 : 2003 におけるストマッカー処理時間が検出率に及ぼす影響の検討

表 2 に、ISO 10273 : 2003 におけるストマッカー処理時間を 30 秒、1 分及び 2 分とした場合の検出率を比較した結果を示した。アルカリ処理を行わない場合は、ストマッキング時間 30 秒では CYE 培地上に定型集落が認められず、1~2 分で認められる結果となった。一方、アルカリ処理を行う場合は、ストマッキング処理時間が 30 秒でも検出率の低下は見られなかったため、ストマッキング時間を 1 分としても、アルカリ処理を行う場合、行わない場合の両方において、原法の 2 分と検出率が変わらないことが示された。

3) NIHSJ-27-ST4 案及び NIHSJ-30TS-ST4 案の作成

食品からの病原性エルシニア・エンテロコリチカ及びシュードツベルクロシスを検出するための標準試験法として、ISO 10273 : 2003 を基本として、試験法の定義、試験方法の概要、使用器具、装置、培地、試薬、選択培地、試験手順、試料の調製、塗抹および培養、集落の計測、確認試験等からなる NIHSJ-27 を作成した (別添 1)。また、作業部会において一部に独自の確認を行い、ストマッカー時間を 2 分から 1 分に変更すること、酵素基質培地として CHROMagar*Y. enterocolitica* を併用すること、

確認試験の使用培地の一部を国内で他の食中毒菌試験に用いられている培地に変更することとした。また、食中毒発生時の原因食品同定を目的とした参照法として、BAM法(2007年)及び検査指針(2004年)を基本としたNIHSJ-30TSを作成した(別添2)。

D. 考察

国際的に整合性のある食品からの *Yersinia* 標準試験法として検討することになったISO法に基づく試験法NIHSJ-27と、BAM法及び食品衛生検査指針の方法に基づく試験法NIHSJ-30TSについて、豚タンを用いた添加回収試験を実施した結果、BAM法及び検査指針の方法では3 cfu/gの添加により、添加菌の回収が可能であった。一方、ISO法では、3 cfu/g、15 cfu/g及び26 cfu/gの添加では全ての培養条件で添加菌が回収されず、73 cfu/gまたはそれ以上の添加量で菌の回収が可能であった。5検体を用いた試験において、半数以上の検体で回収が可能であったのは240 cfu/g添加時であり、79 cfu/g添加時は5検体中1検体のみで回収が可能であったことから、本試験法のLevel of detection 50% (LOD₅₀)は、両者の間にあると思われた。以上より、検出感度はNIHSJ-30TSがNIHSJ-27より優れていたが、前者は増菌培養時間が1~3週間と、日常的な食品検査に用いるには長いため、増菌培養日数が2日間である後者と、目的により使い分けるのが妥当であると思われた。

E. 結論

国際的標準試験法と互換性のある食品からの *Yersinia* 試験法として、初年度の検討で最も所要時間が短かったISO 10273:2003を基礎とした標準試験法案を作成・検討す

ることとしたが、昨年度の検討により、ISO法では夾雑菌の多い豚ひき肉検体においても、豚ひき肉に比べ夾雑菌が少ない豚タン検体においても、添加回収試験による添加菌の回収が困難であった。研究協力機関による検討から、PMPブロスをを用いて4℃で培養する *Y. pseudotuberculosis* の試験法としてBAMに記されている方法(2004年版食品衛生検査指針にも記されている方法)が最も分離率が優れていたため、本試験法の検討をステージ1に戻し、再度検討した。その結果に基づき、日常的な食品検査のための試験法として比較的迅速に結果が得られるISO法に基づく標準試験法NIHSJ-27と、食中毒原因究明のための試験法として培養日数が長いものの検出感度に優れるBAM法及び検査指針の方法に基づく参照試験法NIHSJ-30TSの2種類の試験法を作出した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. ISO 10273 : 2003 及び食品衛生検査指針の方法における食品接種試験による検出限界値測定

接種菌 : *Yersinia enterocolitica* O3

接種検体 : 豚タン

	ISO①法	ISO②法	
増菌培養液	ITC	PSB	
培養温度	25℃	25℃	
培養時間	2日	2日	
培養状態	静置	振盪	
アルカリ処理	なし	あり	なし

指針法
PMP
4℃
1~3週間
静置
あり

添加菌量(CFU/g)	選択分離培地					
	SSDC	CYE	CIN	CYE	CIN	CYE
3	-	-	-	-	-	-
15 (n=5)	ND	ND	(-)5	(-)5	(-)5	(-)5
26	-	-	-	-	-	-
73	-	-	+	+	-	-
79 (n=5)	ND	ND	(-)5	(+)1, (-)4	(-)5	(-)5
240 (n=5)	-	-	(+)1, (-)4	(+)4, (-)1	(-)5	(-)5
260	-	-	-	+	-	-
730	-	-	-	+	-	-
2600	-	-	+	+	-	-

添加菌量(CFU/g)	増菌培養	CIN	VYE	CYE
3	1w	+	-	+
	2w	-	-	+
	3w	-	-	-

SSDC: Salmonella/Shigella agar with sodium desoxycholate and calcium chloride

CYE: CHROMagar *Yersinia enterocolitica*

CIN: Cefsurodin, Irgasan and Novobiocin agar

VYE: virulent *Yersinia enterocolitica*

表 2. ストマッキング処理時間ごとの陽性検体数

供試検体：豚タン

接種菌：*Y.eneterocolitica*（血清型 O3）

接種菌量：420 CFU/g

各処理時間につき 3 検体実施

ストマッキング時間	CIN		CHROM agarYe	
	アルカリ処理		アルカリ処理	
	無	有	無	有
30 sec	0/3	3/3	0/3	3/3
1 min	0/3	2/3	1/3	2/3
2 min	0/3	2/3	2/3	1/3

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品中の微生物試験法の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究分担研究
報告書

試験法の妥当性評価・衛生指標菌

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 部長
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授
分担研究者 伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部 室長

ISO16140:2016 Part1「用語」、Part2「代替法バリデーション」が出版された。確定試験（Confirmation）やペアード・アンペアードスタディ（paired/unpaired study）などの新しい概念が随所に加わっている。こうした国際動向を反映し、かつ我が国において実現可能なガイドラインとすべく、Part1を参照しつつ、Part2の章構成に合わせて作文した。本文は概ね完成した。一方、生菌標準物質の開発に関しては、これまで実用化を困難にしていた、オフサイトでの調製技術の見通しを立てることができた。すなわち、チミジンゼラチン重層法によって、セルソーターで調製した生菌が、1週間の冷蔵保存後、95%以上のコロニー形成率を示した。1週間は世界中に輸送するのに十分な時間である。我が国は、昨年からは ISO TC34 SC9 の P メンバーになったが、その活動にも積極的に関わっている。

A. 研究目的

微生物試験法の妥当性確認（バリデーション）あるいは検証（ベリフィケーション）に際しては、国際的に認証されたスキームで実施することが要請される。そのスキームの手本とされてきた ISO16140 の改訂版が 2016 年 6 月に出た。変更内容には、AOAC:2012.2 版ガイドラインの内容に合わせた、と推察される部分が少なからずあった。それに関しては本研究グループでも、かねてより検討してきたので問題はなかった。しかし、「確定試験(Confirmation)」の要請のように、全く新しい概念の規定が加わったこともあり、本年度の第一の目的は、この ISO16140:2016 の内容を検証し、その内容に則ったガイドラインを作成することである。併せて、セレウス菌、セレウリド、エルシニア・エンテロコリチカ、衛生指標菌の標準試験法の作成に際して、

妥当性確認の国際動向の観点から意見を述べ、試験法作成の推進することを第一の目的とした。

一方、少数生菌の標準物質に関しては、既に、生菌標準物質のオンサイト調製法に関する要素技術を完成させている。昨年度は、実用的見地からさらに検討すべき事項を整理し、その一つとして損傷菌の問題を検討した。すなわち、冷凍食品中の生菌や、冷蔵食品中に長時間共存していることなどによって生じる可能性のある損傷菌の標準物質が調製できるか、という問題であった。そして、具体的に、高濃度スクロースによる浸透圧ストレスを与えた生菌が損傷菌になっていると推察され、その標準物質を調製できる見通しを得ることができた。

本年度は実用的見地からの検討事項として、オフサイトでの生菌標準物質の利用法について検討することを目的とした。すなわち、オフサイトで調製した標準物

質を遠隔地に輸送する場合に、輸送中に増殖や損傷あるいは死滅が起きないように条件を検討することとした。これが本年度の第二の目的である。

B. 研究方法

(1) 2016 版の ISO16140 に則ったガイドラインの作成

ISO16140:2016 は、今後出版される予定の分冊も含め、6 分冊構成である。第一分冊「用語」、第二分冊「参照法に対する代替法（市販キット等）の妥当性確認の手順」が出版済みであり、第三分冊「単一試験所で実施される参照法および妥当性確認済代替法の検証手順」、第 4 分冊「単一試験所試験法の妥当性確認手順」、第 5 分冊「市販キット等になっていない試験法のための部分的試験所間妥当性確認手順」、第 6 分冊「微生物確定試験および識別のための代替法の妥当性確認手順」が計画中である。

本年度は、2016 版第一分冊の用語を参照しながら、第 2 分冊の章構成に合わせて、日本語での原案を作文した。最終的に公開することを念頭に、訳語の選択や統一に留意し、作業部会で入念に議論した後、本委員会ですらに議論を重ねて最終版とした。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

既に、生菌標準物質のオンサイト調製法に関する要素技術は完成されている。昨年度、実用的見地からさらに検討すべき事項を整理した。第一は、冷凍食品中の生菌や、冷蔵食品中に長時間共存していることなどによって生じると推定されている、傷害菌の問題であった。そして、具体的に、高濃度スクロースによる浸透圧ストレスが原因で生じるとされる傷害菌の場合に限って、その標準物質の可能性を検討した。

本年度は実用的見地からの検討事項と

して、オフサイトでの生菌標準物質の利用法について検討することとした。

C. 研究結果

(1) 2016 版の ISO16140 に則ったガイドラインの作成

用語、訳語の整理に重点を置いた。例えば、キーワードである「validation」は、従来「妥当性確認」と訳してきたが、具体的な内容の理解の普及度を鑑み直接「バリデーション」というカタカナ表記にすることとした。また「study」も頻出する言葉であり、従来「研究」や「試験」と訳してきたが、他分野で使用されてきた研究や試験とは、内容や概念が非常に異なるので、これも直接「スタディ」とカタカナ表記にすることとした。これらの議論を経て作成されたガイドラインが添付資料 1 である。

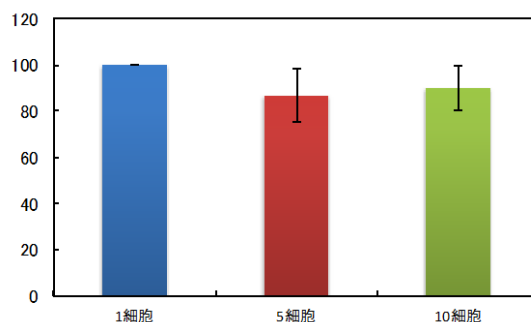
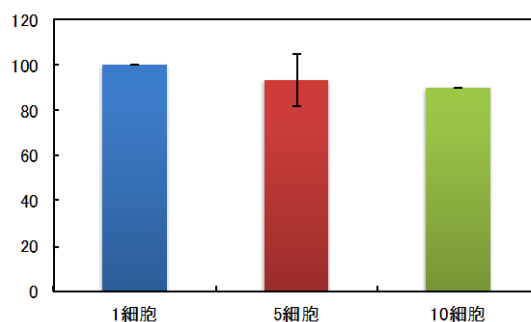
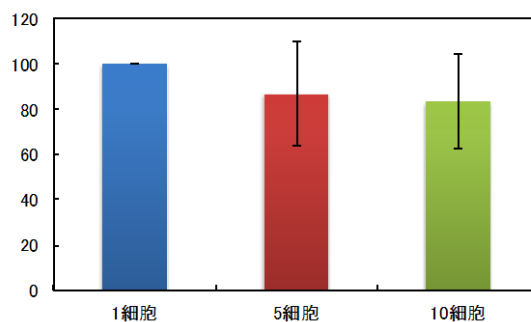
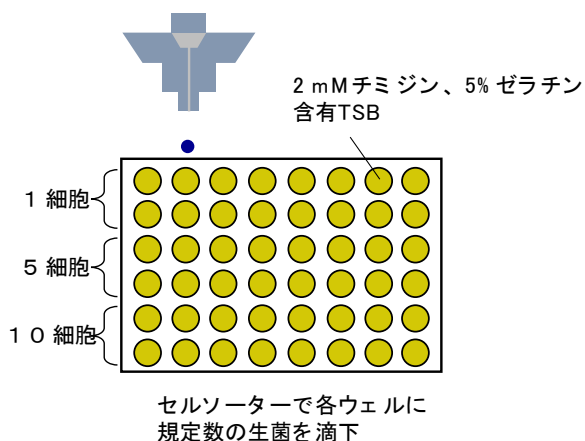
(2) 微生物生菌標準物質の開発

生菌標準物質をオフサイトでも利用するためには、国内外、何れの場所を想定しても 1 週間ほどの保存安定性があれば十分と考えた。そこで、生菌標準物質調製後 1 週間の一時保存法について検討した。すなわち、保存中の細胞分裂を抑制しつつ、かつ使用時にはコロニー形成能を抑制しない方法について検討した。

第一の方法では、直径 10 cm のガラスプレートに薄層寒天培地 (TSA) を形成させ、この上に、セルソーターで単一生菌ずつ規定された個数を滴下し、その上に同じ TSA を重層して、生菌を挟むようにした (TSA 重層保存生菌)。第二の方法では、24 マルチウェルプレートの各ウェルに生菌 1 個ずつを滴下し、その上に溶解した TSA 溶液を滴下した後、室温まで冷やし固化して保存した (TSA 単層保存生菌)。第三の方法では、48 ウェルプレートの各ウェルに、規定数の生菌を滴下し、続いて高濃度チミジンと 5% ゼラ

チンを加えて調製した培地を滴下した (T-ゼラチン単層保存生菌) (図 1)。第一、第二の方法の各保存生菌は最長 1 週間冷室に静置保存した後、37°C で 24 h 培養した。第三の方法の場合は、生菌を保持した固形状の T-ゼラチンを、予め 10 cm シャーレ内に調製しておいた TSA 上に置き、常温で 5min 程度静置して T-ゼラチンを液体状にした後、TSA 上に広げた。この操作によって、チミジンは希釈され、生菌は増殖できるようになる。これを 37°C で 24 h 培養した。

第一の方法では、保存後の生菌の個数が安定しなかった。保存中の生菌の細胞分裂が抑制しきれず、また分裂した細胞が不規則に移動するが多かった。後から加える寒天培地の水分を予め十分除去しきれなかったことが原因と考えられた。第二の方法では、保存生菌が安定して 95% 以上のコロニー形成率を示した。しかし、保存中に細胞が分裂しなかった、ということの確認は難しかった。第三の方法では、チミジン 2 mM の場合、1 個の生菌を滴下した試料では、保存中に細胞分裂はせず、保存後 100% のコロニー形成率を示した。5 個、10 個を滴下した試料では、各々 85%、90% のコロニー形成率を示した。以上により、第三の方法に基づく保存法が有望であるとの結論を得た。



冷蔵保存期間7日のコロニー形成率 (N=3, means±SD)

図 1. チミジン-ゼラチン重層法

図 2. 冷凍保存後のコロニー形成率

D. 結論

これまで、ISO16140:2003、AOAC:2012.2 版ガイドラインに則り、我が国におけるガイドライン案を幾度か作成してきたが、公開するには至らなかった。ガイドラインの中では、しばしばバリデーションを

統括する組織がでてくるが、我が国にはそれがまだ整備されていなかったことが理由の一つであった。

今般の ISO16140:2016 版を見ると、バリデーションの方法論の変化の激しさに驚く。このような状況の下では、改訂された結果を追うだけではなく、議論の初めから参加し、自ら提言してイニシアチブをとることが重要であると考えざるを得ない。このような認識のもとに、本年より我が国が ISO TC34 SC9 の P メンバーになったことは大きな意義を有する。2017 年 6 月 19-23 日に東京でその総会が開かれる。これまで、本研究委員会等での議論は隔靴搔痒の感があったが、それを緊密に議論できる好機であると考えられる。

生菌標準物質作製に関する発展技術としても大きな成果があった。すなわち、これまでオンサイトでの利用しか議論されてこなかったのもので、セルソーターとい

う高価な装置がなければ実施できない位と考えられてきたが、その問題の解決を見通しが立ったことである。実用化に向けた大きな成果である。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

(国内学術集会)

齊藤美佳子、高谷周督、五十君静信、松岡英明：生菌標準物質をオフサイトで利用するための一時保存法．第 43 回日本防菌防黴学会年次大会、東京（2016.9.26）．

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

【添付資料1】

食品微生物試験法バリデーション (Validation) ガイドライン(案)

目次	(Accuracy profile study)
1. 適用範囲	6.1.3.1. 食品カテゴリーの選択
2. 規定された参考文献	6.1.3.2. 試料 (sample) の数
3. 用語と定義	6.1.3.3. アキュラシープロファイル試験結果の計算と解釈
4. 代替法の妥当性確認の一般測	6.1.4. 定量化の限界
5. 定性試験法—妥当性確認のための技術的手順	6.1.4.1. 一般的事項
5.1. 試験法比較スタディ	6.1.4.2. 食品カテゴリーの選定
5.1.1. 一般的事項	6.1.4.3. 試料の数
5.1.2. ペアードスタディとアンペアードスタディ	6.1.4.4. 結果の計算と解釈
5.1.3. 感度	6.1.5. 包含性および排他性
5.1.3.1. 食品カテゴリーの選択	6.1.5.1. 試験菌株選定と数
5.1.3.2. 試料 (sample) の数	6.1.5.2. 対象菌 (包含性)
5.1.3.3. 代替法の結果と確認	6.1.5.3. 非対象菌 (排他性)
5.1.3.4. 計算と感受性の解釈	6.1.5.4. 結果の表記と解釈
5.1.4. 適切に検出できる菌濃度 (RLOD)	6.2. 試験室間スタディ
5.1.4.1. 食品カテゴリーの選択、試料の数、及び繰返し数	6.2.1. 一般的事項
5.1.4.2. 5.1.4.2 計算と RLOD の解釈	6.2.2. 測定手順
5.1.5. 包含性と排他性	6.2.3. データの計算、要約、および解釈
5.1.5.1. 菌株の選択と数	
5.1.5.2. 対象菌株の接種 (包含性)	
5.1.5.3. 非対象菌の接種 (排他性)	
5.1.5.4. 結果の表記と解釈	
5.2. 試験室間スタディ	
5.2.1. 一般的事項	
5.2.2. 測定手順	
5.2.3. データの計算と要約	
6. 定量試験法—妥当性確認のための技術的手順	
6.1. 試験法比較スタディ	
6.1.1. 一般的事項	
6.1.2. 相対真度	
6.1.2.1. 食品カテゴリーの選定	
6.1.2.2. 試料 (sample) の数	
6.1.2.3. 相対真度の計算と解釈	
6.1.3. アキュラシープロファイル	

平成 28 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品中の微生物試験法の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究
研究代表者 五十君 静信（東京農工大学）

分担研究報告書

食中毒毒素試験法の検討：セレウス菌嘔吐毒素セレウリド試験法の検討

分担研究者	鎌田 洋一	（岩手大学農学部 共同獣医学科）
協力研究者	松田 りえ子	（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）
	森 曜子	（公益社団法人 日本食品衛生協会）
	大城 直雅	（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）
	藤田 和弘	（日本食品分析センター 多摩研究所）
	福沢 栄太	（日本食品分析センター 彩都研究所）
	佐藤 信彦	（日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター）
	佐野 勇氣	（日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター）
	橋田 規	（日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター）

セレウリドはセレウス菌が食品内に産生する環状ドデカデブシペプチドで食中毒危害性を有する。平成 26 年度よりセレウリド試験法の確立を試みている。対象食品に炊飯済み米飯を選択した。定量法に LC-MS/MS を採用した。セレウリド添加炊飯済み米飯からのメタノールおよび含水メタノールによる抽出と、前処理カラムの平衡状態とカラム添加物のメタノール濃度を一致させる処理を行い、LC-MS/MS で分析した。セレウリド添加検体の質量スペクトルから、定量に適したイオンを選抜し、試験法の性能を評価した。非添加検体からはセレウリドの検出と定量を阻害するシグナルは検出されず、特異性が確認された。炊飯済み米飯にセレウリドを 5 ng/g の濃度で添加した試料を用い、その試料を 1 日 2 併行、5 日間分析し、試験法の性能を評価した。その結果から、真度、精度及び定量限界を推定した。真度 94%、併行精度 0.8%~3.7%、室内精度 2.0%~8.6%、定量限界（室内精度の標準偏差に 10 を乗じたもの）0.9 ng/g~4.0 ng/g の性能が推定された。以上から、炊飯済み米飯を対象としたセレウリド試験法を確立できたと考える。

A. 研究目的

セレウス菌食中毒には2つの型がある^{1,2)}。下痢を示すものと、嘔吐が主症状になっている型の2種類で、我が国では嘔吐を主症状とする食中毒のみが発生すると認識されている。嘔吐型のセレウス菌食中毒は、同菌が産生する低分子ペプチドが、直接の嘔吐誘発の原因物質になっている。同ペプチドはセレウリドと呼称される。セレウリドはセレウス菌が食品内で増殖する際に産生される、分子量11153.00の環状デプシペプチドである。セレウリドには強い耐熱性を示す。100℃のみならず、オートクレーブ処理においても失活しない。セレウリドは上述したように、食品内で増殖したセレウス菌が合成、分泌する。同菌を原因と疑う食中毒が起こった際には、食品内のセレウリドを検出する必要がある。食品中のセレウス菌食中毒危害性を評価する場合も同様である。感度のよい検査法が必要になる。

セレウリドの検出法には数種ある。毒性的に最も適切なものは、その嘔吐毒性を検知することである。嘔吐はヒトや霊長類では容易に観察されるが、ラットやマウスなど、普及している実験動物は嘔吐を示さない。例外はスunksで、学名 *Suncus mirinum*、ジャコウネズミの別名がある。スunksはセレウリドに対し、明瞭な嘔吐反応を示す。残念なことにスunksは実験動物会社から購入するほど我が国には普及しておらず、試験法に採用には不適切状態にある。動物実験の場合にしばしば観察される、ばらつ

きも問題となるだろう³⁾。

オートクレーブしたセレウリド食中毒事例分離セレウス菌培養液中に、空胞化誘導活性が特異的に見られる⁴⁾。空胞化誘導反応は特異的ではあるが、種々問題を抱えている。セレウリド処理後に誘導されたHEp-2細胞質中の空胞を検出するには、観察技術と経験が必要になる。懸濁したHEp-2細胞を培養容器に入れ、そこに2倍段階希釈したセレウリド含有検疫を一定量加えた後、24時間程度培養し、その後、容器中の細胞を100個以上観察し、空胞出現の有無を確認する。その反応は、連続的に希釈したセレウリドを加えているにもかかわらず、一定のセレウリド濃度範囲のみで空胞化が観察される。この現象の説明はまだなされていない。培養細胞技術と空胞化観察経験の良否がセレウリド濃度を決定してしまう。本法は我が国では一部の研究機関で実施できるのが現状である。

質量分析装置を用いてセレウリドを分析する方法がある。イオン化したセレウリドを検出する方法であり、物質同定の手法としては、非常に優秀な方法になる。しかし、機器が高価であることや、食中毒細菌を取り扱う試験者には機器分析の経験が少ない傾向があり、その利用に逡巡がある。さらに、質量分析装置では、絶対的な標準物質が必要で、これまで開発されてきた方法では、セレウリドに類似した構造を持つイオノフォアであるバリノマイシンが用いられてきた。最も優れた標準物質が、セレウリ

ド自体であることは言うまでもない。

セレウリドは、デプシ酸およびアミノ酸 4 種類が 3 回繰り返され、かつ、閉鎖した環状構造をとっている。この構造が原因で、セレウリドは長く有機化学合成がされてこなかった。2013 年になり、試薬企業から市販されるようになった。この状況から、本分担研究において、昨年度は、2 社のセレウリドが標準物質として適応可能かどうか、LS/MS/MS を用いて検証し、その有用性を確認した。

バックライスを検査対象食品として構築した、セレウリド試験法の概要を図 1 に示す。LC/MS/MS 部分は別記する。本法で、添加回収実験を行った。その結果、40%弱から 85%程度の回収率で、全体として低かった。室内精度も 27%と不足だった（平成 26 年度報告書）。

LC-MS/MS が高価な機器であるため、その汎用性が危惧される。そのため、LC/MS を用いて、セレウリドの試験法の開発を試みた。試験対象やセレウリド抽出法、前処理カラム法は LC/MS/MS を用いての場合と同様であった。検討の結果、装置を汚染する物質の洗浄が完璧には行えず、長い検討を必要とすることが明らかになった（平成 27 年度報告書）。

本年度は、試験に用いる機器を LC-MS/MS とし、セレウリドの抽出法、前処理カラムへの添加条件、LC における溶媒グラディエント条件について検討し、セレウリド試験法を確立した。

B. 研究方法

B-1. セレウリド、バックライス

セレウリドは、和光純薬工業株式会社から購入した。バックライスは、炊飯済み室温保存の市販品を用いた。

B-2. バックライスへのセレウリド接種と抽出

バックライスを 25 g 秤量し、ホモジナイザーカップに移した。メタノール溶解セレウリド(125 ng/mL)を 1 mL、バックライスに数か所ドロップした。暗所で 60 分放置した。この添加により 5 ng セレウリド/g バックライスが形成される。

B-3. セレウリドのメタノールによる抽出方法検証

1 回目のメタノールによる抽出後、2 回目以降の抽出を、A 液：メタノール及び水混液 (7 : 3) または、B 液：メタノール及び水混液(95:5)で実施した場合で比較した。以下に手順を示す。

- ① 試料（バックライス）25 g を採取した（A 液及び B 液 各 N=2, 計 4 本）。
- ② セレウリド標準溶液（500 ng/mL）2.5 mL をそれぞれの試料に添加した。試料の 5 か所以上の部位に滴下し（バックライスとして 50 ng/g 相当）、60 分間、フタを開けた状態でドラフト内に静置した。

- ③ 水 25 mL を加え、ホモジナイザーを用いて 1 分間均質化した。
- ④ メタノール 100 mL を加えてホモジナイズ、遠心分離、GF ろ過を行い、ろ紙をメタノール 5 mL×2 回で洗浄して洗液をろ液と合わせ、メタノールで 200 mL に定容した。・・・抽出液 1
- ⑤ 残留物に A 液または B 液 50 mL を加えてホモジナイズ、遠心分離、GF ろ過を行い、ろ紙を A 液または B 液 5 mL×2 回で洗浄して洗液を合わせた後、ナス型フラスコに分取した。・・・抽出液 2
- ⑥ ⑤と同様・・・抽出液 3
- ⑦ ⑤と同様・・・抽出液 4
- ⑧ 抽出液 1 はその一部をシリンジフィルターでろ過し、試験溶液とした。
- ⑨ 遠心分離後の上澄み液を、ガラス繊維ろ紙を用いてろ過した。ろ液は上記全量フラスコに回収後、水で正確に 250 mL とし、よく混合して試験液とした。
- ⑩ 試験液 10 mL を共栓付試験管に正確に量り取り、水を 5 mL を正確に加えて混合し、カートリッジカラムへの負荷用試料とした。

B-4. HLB カラムによる前処理

- ① あらかじめメタノール 3 mL、メタノール及び水混液 (1 : 1) 3 mL の順にカラムに通してカラムを平衡化した。
- ② 負荷用試料全量 (15 mL) をカラムに負荷した。
- ③ メタノール及び水混液 (1 : 1) 試料の

入っていた試験管を 3 mL で共洗いし、洗液をカラムに負荷した。流出液を捨てた。

- ④ メタノール及び水混液 (7 : 3) 3 mL でカラムを洗浄した。流出液を捨てた。
- ⑤ メタノール及び水混液 (95 : 5) 3 mL でセレウリドを溶出させ、溶出液を得た。
- ⑥ 窒素気流下でのアルミブロック恒温槽 (50°C)、あるいはロータリーエバポレーターを用いて、溶出液を濃縮乾固させた。
- ⑦ 残留物 (試料 1 g 相当) にメタノールを正確に 1 mL 加えて溶解し、シリンジフィルターでろ過し、試験溶液とした。

B-5. LC-MS/MS によるセレウリドの検出と定量

① 検量線用標準溶液の調製

アンプルを開封し、セレウリド標準液 (50 µg/mL) 400 µL を、40 mL 全量フラスコに正確に量り取り、メタノールを加え、正確に 40 mL とした (セレウリド標準溶液 (500 ng/mL))。本溶液は、適宜の容量に分け、-20°C 以下で密閉保存する。本溶液をメタノールで希釈して 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 及び 10 ng/mL の濃度の検量線用標準溶液を調製した。

② 検量線の作成

検量線用標準溶液を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。絶対検量線とする。

③ 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、検量線から試料中のセレウリド濃度を求める。

④ 測定条件例

高速液体クロマトグラフ：UltiMate3000
[Thermo Scientific 製]

タンデム型質量分析装置：QTRAP 4500
[SCIEX 製]

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル
(内径 2.1 mm、長さ 50 mm、粒子径 3.5 μ
m) (Zorbax Eclipse XDB-C18)

カラム温度：40°C

流量：0.2 mL/min

移動相：A；0.1 vol% ギ酸及び 10 mmol/L
ギ酸アンモニウム水溶液

B；0.1 vol% ギ酸及び 10 mmol/L ギ酸ア
ンモニウム含有メタノール溶液

グラジエント条件；0 ~ 2 min (A:B=20:80)

→ 16 min (A:B=5:95)

→ 16.01 ~ 20 min (A:B=20:80)

注入量：1~10 μ L

イオン化モード：ESI (+)

イオン源温度：700°C

イオン化電圧：5.0 kV

プリカーサーイオン： m/z 1171 (アンモ
ニウム付加体)

プロダクトイオン： m/z 172 (定量用)、
 m/z 357、 m/z 314 (確認用)

結果を表 1 及び 2 に示した。両試験室の
結果はほぼ一致しており、1 回目のメタノ
ール（試料に均一化のために先に水を添加
はしているが）で 90%前後の回収が得られ
た。また、2 回目以降については、抽出液に
よる差はないと考えられた。本結果から、
操作性を考慮して A 液を採用し、抽出回数
は 3 回とすることとした(表 1、2)。

C-2. 試験法の性能評価

セレウリドを添加しないパックライスを
分析（1 日 2 回分析を 1 日実施）し、妨害
ピークの有無を確認した。無添加区からは
セレウリドのピークは検出されず、選択性
に問題はないと考えられた。

分析者 1 名が同一の添加試料（セレウリ
ドを 5 ng/g の濃度で添加したパックライ
スを、分析手順に従って、分析機関にお
いて、1 日 2 回分析を 5 日間繰り返す。得
られた測定結果を用いて、試験室毎に一元
配置分散分析により解析し、真度、併行精
度および室内精度を算出した。添加回収試
験の結果、真度は 94.3%及び 94.5%を示し
た。また、精度を HORRAT_r で評価したとこ
ろ、いずれも 2 以下であった。また、定量
限界(室内精度の標準偏差に 10 を乗じたも
の) 0.9 ng/g~4.0 ng/g の性能が推定され
た(表 3)。

C. 研究結果

C-1 パックライスに添加したセレウリド
へのメタノールによる抽出効果の検証

D. 考察

LC/MS/MS を用いてのセレウリド試験法

の確立を試みた。平成 26 年度に検討をしたものの、市販のパックライスへのセレウリド添加回収試験を実施した結果は、室内精度が悪く、回収率は 40 %を下回ることもあった（平成 27 年度報告書）。その際の問題点として、①メタノールによる抽出、②抽出液の濃縮法、③濃縮物のメタノール濃度と平衡化した前処理カラムのメタノール濃度の不一致、④LC 部分の溶媒グラディエントが考えられていた。

今年度はパックライスからのメタノール抽出方法を 2 種類設定し、それぞれの結果を検討比較して、結果に基づいた抽出法を選抜した。検討した 2 種類は、100%メタノール抽出の後、A液（含水 70%メタノール）あるいはB液（95%メタノール）それぞれ 3 回抽出した。結果、セレウリド抽出率は A液では 99.6%~102%、B液では 97.5%~100.1%と、差が認められなかった。この結果に基づき、試験法には、取扱い易いA液の含水 70%メタノールとした。この検討により、セレウリドの米飯からの抽出工程に関し、結果に基づいた抽出法となった。

前処理カラムは 50%メタノールで平衡化する。通常は上記抽出物を濃縮し、カラムに添加するが、この度は、濃縮操作は行わず、抽出液に水を加えて 50%メタノール濃度とし、それを前処理カラムに添加した。この行程は、試験実施の時間と手間を短縮し、かつ、メタノール濃度をカラムと検体で一致させ、セレウリドの回収率の安定化に貢献していると考えられた。

平成 26 年度にセレウリド試験法を LC-MS/MS で検討した際、結果に問題はなかったが、LC に適応する有機溶媒のグラディエント組成が一般的なものでなかった。求めるセレウリドの検出ピークが、グラディエント終了後に設定されていたため、今年度は、グラディエント条件を変更し、ピークがグラディエント中に出現できるように調整した。本試験法は機器分析部門が使用する可能性が高く、同部門の専門家に違和感を与えない条件になったと推察する。

指定検査機関の 2 試験所において、勘案したセレウリド試験法を試行した。LC およびマススペクトルの成績を示す(図 1~6)。

試験法の性能評価を行った。添加回収試験の結果、真度は 94.3%及び 94.5%とコーデックス委員会の手続きマニュアル（手続きマニュアル）の範囲（10 ng/g : 60-115 %）内であり、国内の農薬等の妥当性評価ガイドラインの範囲（70-120%）も満たしていた。また、精度を $HORRAT_r$ で評価したところ、いずれも 2 以下であり、手続きマニュアルの範囲内であり、国内の農薬等の妥当性評価ガイドラインの範囲（ RSD_r : <25 %、 RSD_{rw} : <30 %）も満たしていた。この分析結果から、本試験法の性能が評価され、十二分に使用可能であることが示された。

検出限界については、食中毒事例の食品中のセレウリド濃度がその考察に役にたつ。緒言で述べたように、これまで報告されたセレウリド濃度は正確ではないが、検出感度の考察には有効と考える。安形らによる

と、嘔吐型セレウス食中毒の原因食のうち、米飯では数 10 ng/g 以上のセレウリドを検出している⁵⁾。この試験法の定量限界は 0.9 ng/g~4.0 ng/g を示した。報告されたセレウリド濃度から考え、試行したセレウリド試験法は十二分に検出感度を担保していると考えられる。図 7 にセレウリド試験法の流れを示す。本試験法はその性能が評価され、広く使用可能であることが示された。今後、本法が普及し、食中毒患者喫食品中のセレウリド濃度の正確な数値が測定され、蓄積してゆくことが望まれる。その結果、一般食品におけるセレウリドの食中毒危害性も評価が可能になると考える。

E. 参考文献

- 1) 獣医公衆衛生学教育研修協議会 編 「獣医公衆衛生学 I」セレウス菌、pp. 157-159. 文永堂出版、東京、2014.
- 2) 山中英明、藤井建夫、塩見一夫. 食品衛生学第三版、恒星社厚生閣、東京、2012.
- 3) Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M, A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus*

cereus. FEMS Microbiol. Lett. 129, 17-20, 1995.

- 4) Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. FEMS Microbiol Lett. 121:31-34, 1994.
- 5) Agata M, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various food. Inter. J. Food Microbiol. 73, 23-27, 2002.

F. 研究発表

なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案取得

なし。

3. その他

なし。

表 1 A 試験機関が実施したセレウリドのメタノールによる抽出

抽出ステップ	抽出液種	セレウリド回収率 (%)			
		A 液		B 液	
		1	2	1	2
1	メタノール 100 mL	89.4	93	87.3	92.4
2	混液 50 mL	8.2	7.4	7.8	5.8
3	混液 50 mL	1.7	1.6	2	1.6
4	混液 50 mL	0.4	0.4	0.4	0.4
合 計		99.6	102.4	97.5	100.1

表 2 B 試験機関が実施したセレウリドのメタノールによる抽出

抽出ステップ	抽出液種	セレウリド回収率 (%)			
		A 液		B 液	
		1	2	1	2
1	メタノール 100 mL	93.1	92.7	90.8	91.1
2	混液 50 mL	7.3	5.3	4.9	4.8
3	混液 50 mL	1.3	1	1.4	1.7
4	混液 50 mL	0.3	0.3	0.5	0.4
合 計		102	99.3	97.5	98

表 3 実施したセレウリド試験法の真度及び精度

試験室	添加 濃度 (ng/g)	真度 (回収 率) (%)	併行精度 (RSD _r) (%)	室内精度 (RSD _{rw}) (%)	LOQ ^a (ng/g)	HORRAT _r ^b
A	5	94.5	0.8	2.0	0.9	0.2
B	5	94.3	3.7	8.6	4.0	0.8

^a室内精度の標準偏差 (SD) の 10 倍として算出した。

^b実測値(RSD_{rw})/計算値(PRSD_{rw})

なお、計算値は Horwitz 修正式を 2 で除し、“PRSD_{rw} = 11”として算出した。

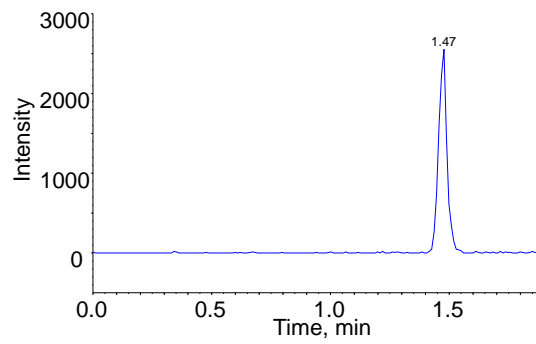


図1 セレウリド0.5 ng/mLのクロマトグラム例 (m/z 1171→172)

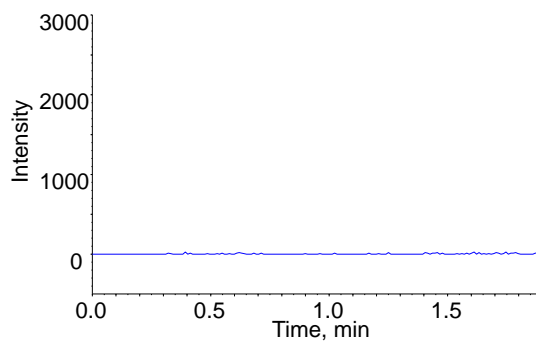


図2 無添加パックライスのクロマトグラム例 (m/z 1171→172)

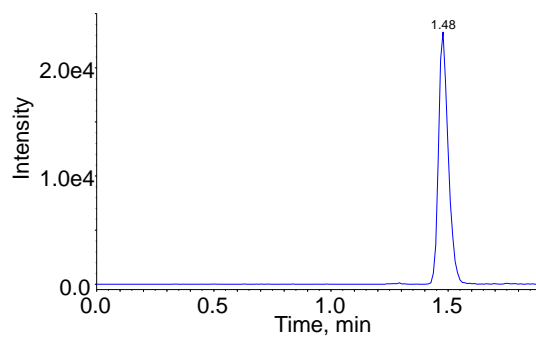


図3 セレウリド添加回収試験のクロマトグラム例 (m/z 1171→172)

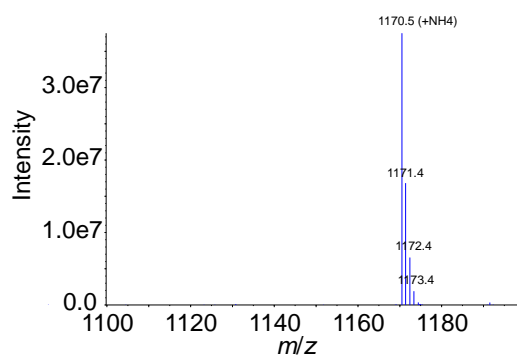


図4 セレウリドのマススペクトル スキャン範囲 m/z 500~1500
測定条件：ESI (+)、イオン導入孔収束電圧：41 V

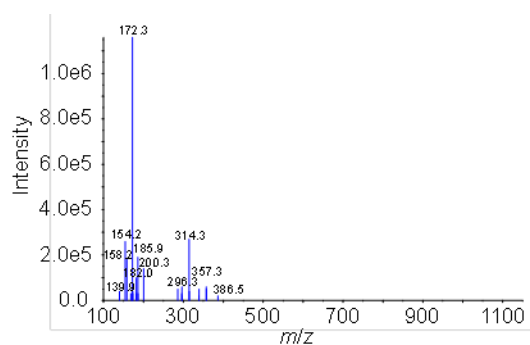


図5 セレウリドのプロダクトスキャンスペクトル プリカーサーイオン m/z 1171
測定条件：ESI (+)、イオン導入孔収束電圧：41 V、コリジョンエネルギー：117 eV

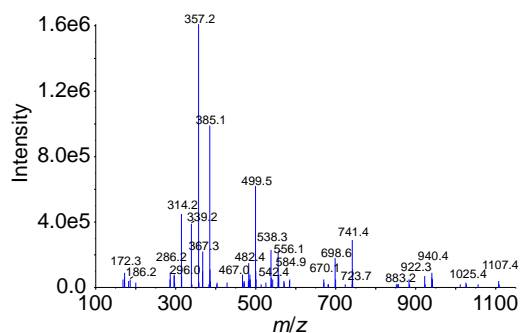
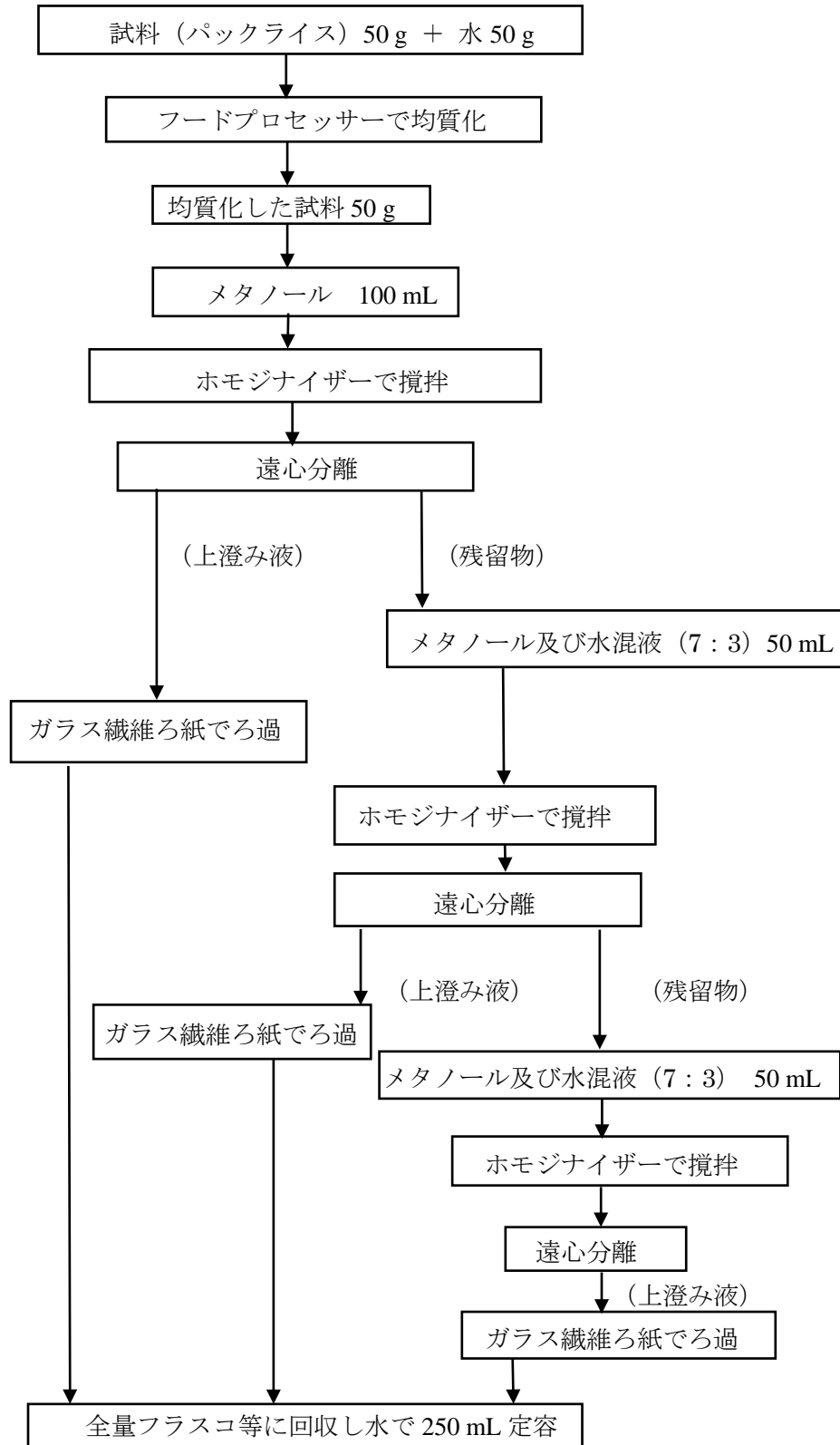


図6 セレウリドのプロダクトスキャンスペクトル プリカーサーイオン m/z 1171
測定条件：ESI (+)、イオン導入孔収束電圧：41 V、コリジョンエネルギー：75 eV

セレウリド試験法 フローチャート

1 : 均質化及び抽出



2 : クリーンアップ

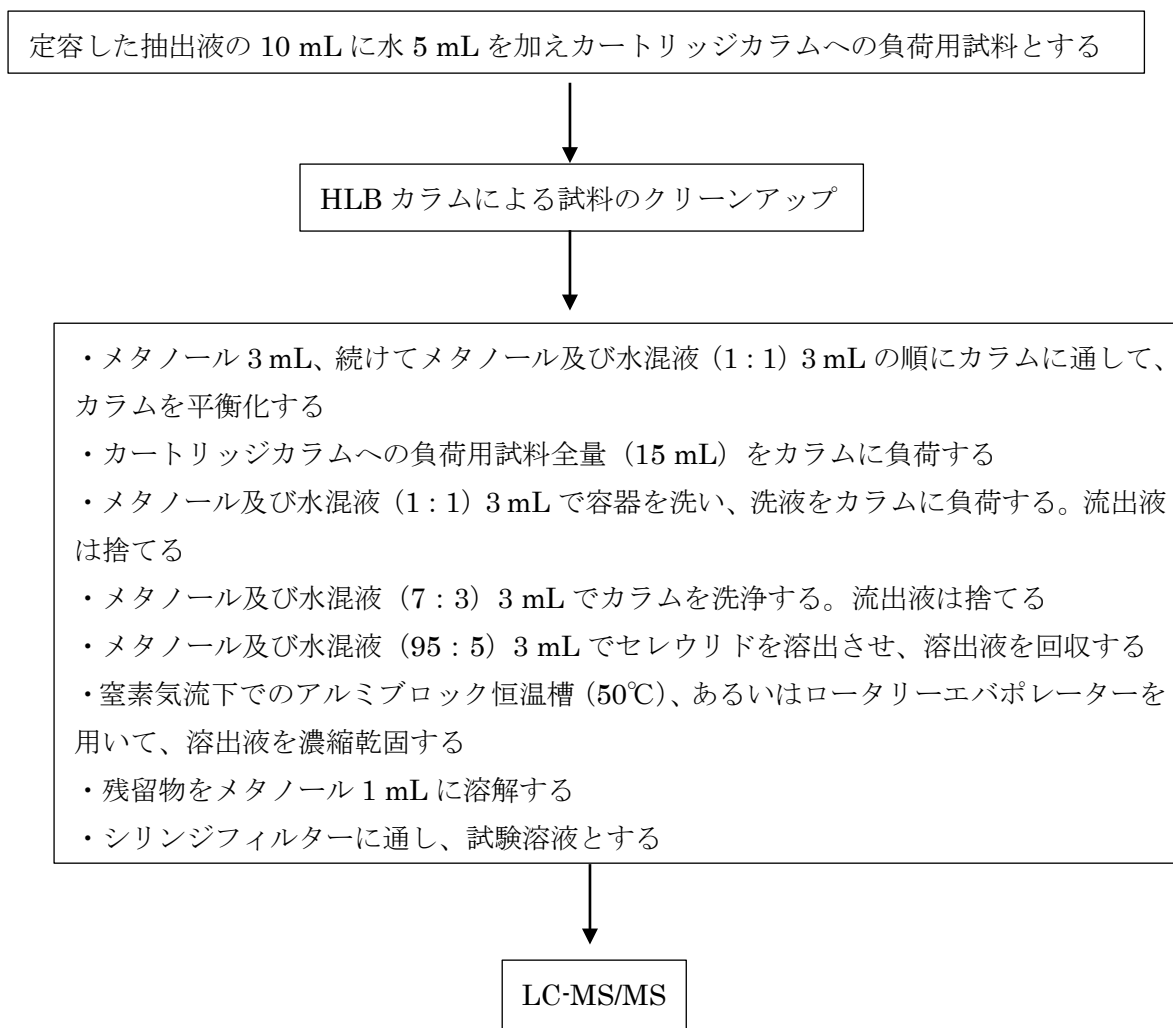


図7 セレウリド試験法のフローチャート

研究成果の刊行に関する一覧表

論文発表

1. 五十君静信。サルモネラ属菌および黄色ブドウ球菌試験法の改正についてーその背景にある国際整合性ー。食品衛生研究。66 巻 No.4 : 7-10 (2016.4)
2. 五十君静信。微生物試験法におけるバリデーションの重要性と目的適合性のある試験法選択。月刊フードケミカル Vol.375:114-119 (2016.7)