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)
令和 5 年度分担研究報告書

クロストリジウム属菌試験法の標準化に向けた研究

研究分担者　百瀬愛佳　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（クロストリジウム属菌試験法作業部会）
小久保彌太郎*　公益社団法人日本食品衛生協会
齋藤明美　一般財団法人日本食品分析センター
澤田千尋*　一般財団法人日本食品検査
西野由香里　東京都健康安全研究センター　微生物部
森哲也*　一般財団法人東京顕微鏡院
門間千枝*　東京都健康安全研究センター　微生物部
（五十音順; *は食品からの微生物標準試験法検討委員会委員）

研究要旨
日本の食品の微生物規格では、特定加熱食肉製品および加熱食肉製品にクロストリジウム属菌の成分規格が設定されており、微生物学的品質評価のための衛生指標菌として用いられている。本分担研究では、食品の衛生管理における国際調和を目指し、クロストリジウム属菌の標準試験法について検討を行った。クロストリジウム属菌試験法における国内外の状況を調査した結果、国内においては公定法（成分規格試験）として嫌気培養を必要としないパウチ法が用いられている一方、国際的な標準試験法である ISO 15213-1:2023 には混釈培養法が採用されている。国際整合性の観点および嫌気培養が比較的容易となった現状を鑑み、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入することとした。また、パウチ法と ISO 15213-1:2023 について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付することとした。以上を以て、クロストリジウム属菌標準試験法の Stage 1 が完了した。［NIHSJ-42-ST1］

A. 研究目的

本研究班は、国際調和の観点から、食品からの微生物標準試験法検討委員会（以下、検討委員会）の運営を通じ、国際的な標準試験法もしくは科学的に妥当性が確認された試験法の整備を行っている。

日本の食品の微生物規格では、特定加熱食肉製品および加熱食肉製品にクロストリジウム属菌の成分規格が設定されており（https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenbu/0000071198.pdf）、微生物学的品質評価のための衛生指標菌として用いられている（表 1）。

クロストリジウム属菌は、土壌・海底・河川や湖沼の泥・ヒトや動物の腸管内など自然界に広く分布している。本菌群は芽胞を

形成することから、加熱や乾燥に対して強い抵抗性を示し、条件によっては加熱処理後も食品中に生残する可能性がある。現在、多くの市販食品に真空包装・ガス置換包装・脱酸素剤の添加等が行われており、内部を嫌気状態にすることで一般的には食品の保存性が高まるが、保存条件によっては生残したクロストリジウム属菌の増殖を助長し、腐敗・変敗など食品の品質劣化につながるおそれがある。

クロストリジウム属菌の試験法として、国内では、嫌気培養を必要としないパウチ法が特定加熱食肉製品および加熱食肉製品の成分規格試験となっているが、標準試験法は策定されていない。

本分担研究では、食品の衛生管理における国際調和を目指し、クロストリジウム属菌の標準試験法について検討を開始することとした。本試験法を標準化することによって、食品の製造から流通までの過程における衛生管理や微生物学的品質の担保に利活用できる他、嫌気性芽胞形成菌を原因とする食中毒の発生予防のための試験標準化へもつながると期待される。公定法と国際標準試験法との間で科学的根拠に基づいた妥当性評価を実施することにより、国際整合性を持った標準試験法が整備できると考えられ、将来的には、迅速・簡便法導入時の性能評価における参照法として活用されることも期待される。

B. 研究方法

1) 関連する国際的な標準試験法に関する調査

クロストリジウム属菌に関する国際的な標準試験法として、以下を調査対象とした。

①国際標準化機構 International Organization for Standardization の ISO 法

②アメリカ食品医薬品局 Food and Drug Administration (FDA) の Bacteriological Analytical Manual（BAM 法）

③アメリカ合衆国農務省・食品安全検査局 Food Safety and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture（USDA-FSIS）の Microbiology Laboratory Guidebook（MLG 法）

2) 原案の素案作成（ST1 案）

パウチ法と国際標準試験法の比較表を作成し、作業部会を開催して検討すべき課題および妥当性評価項目の抽出を行った。

3) 原案の作成（ST1）

第 80 回検討委員会に議題として提出し、試験法案の説明および討議を行った。

C. 研究結果

1) 関連する国際的な標準試験法

① ISO 法

2023 年に亜硫酸塩還元嫌気性細菌の集落計数法 ISO 15213:2003 が改訂され、亜硫酸塩還元クロストリジウム属菌の集落計数法 ISO 15213-1:2023 が発行されている。

② BAM 法

Chapter 16 がウエルシュ菌の集落計数法、Chapter 17 がボツリヌス菌・毒素および毒素遺伝子の検出法となっているが、衛生指標としてのクロストリジウム属菌の試験法は規定されていない。

③ MLG 法

Chapter 13 が食肉および食鳥肉製品のウエルシュ菌試験法（集落計数法）であり、Chapter 14 は食肉および食鳥肉製品からのボツリヌス毒素検出法であるが、衛生指標としてのクロストリジウム属菌の試験法は規定されていない。

2) 原案の素案作成（ST1 案）

国内の公定法であるパウチ法、および国際標準試験法である ISO 15213-1:2023 について比較を行った（表 2）。

2 つの試験法の主な違いは、封入/混釈する検体量･培地組成･培養条件であり、また、芽胞数を求める際の加熱処理条件も異なっていた。寒天培地一枚のみを用いて計測したと仮定した場合の理論上の検出下限値は、パウチ法が 1 cfu/g、ISO 15213-1:2023 が 10 cfu/g である。なお、ISO 15213-1:2023 には 140 mm 程度の大シャーレを用いて混釈するプロトコールもあり、この場合の検出下限値はパウチ法と同じ 1 cfu/g となる。

パウチ法が成分規格試験に採用された背景としては、嫌気性条件の作出が当時は難しかったこと、培養温度は他の衛生指標菌の試験にあわせて 35 ℃が採用されたこと、培養時間を 48 時間とした場合パウチ内で黒色部が拡散し観察が困難になるため 24 時間が採用されたことが挙げられた。また、加熱処理条件は、規格試験策定に当たって業界に意見を求め、実際の加熱温度と時間を基に条件設定がなされていた。

他の衛生指標菌の標準試験法作成方針も考慮し、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入する方針を主軸とした原案の素案（ST1 案）をまとめ、第 80 回検討委員会へ議題として提出した。

3) 原案の作成（ST1）

第 80 回検討委員会に提出した素案（ST1 案）は、委員による討議の結果、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入することで委員会の承認を得た。また、パウチ法について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付する方針となった。試験法番号として NIHSJ-42 を付与し、NIHSJ-42-ST1 が確定した。

D. 考察

国内で成分規格試験として用いられているパウチ法は有用な手法であるが、国際的には嫌気培養の簡便法として過去に報告があるという状況であり、嫌気培養が比較的容易となった現状および他の衛生指標菌の方針ともあわせると、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 法を導入することは理に適ったものと考えられる。ISO 法はパウチ法よりも理論上の検出感度が低いことはマイナス面であるものの、現在の成分規格を満たすのに十分な感度を有している。なお、大シャーレを用いて混釈量を増やすことは可能であり、大シャーレの操作性が問題となる場合には、深型シャーレを用いることも 1 つの解決手段となり得る。

今後の検討課題として、パウチ法の妥当性確認が必要となる。具体的には、ISO 15213-1:2023 を参照法、パウチ法を代替法として ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を進める予定である。

パウチ法が Annex として標準試験法に添付されることになった場合、現在規格試験の対象となっている食品以外にも応用されることが想定される。試料中に食品由来の糖の持ち込みがあるものは、培養中にガス産生が起こるためパウチ法の利用は難しく、この点は注意が必要である。また、食品衛生検査指針において、計数する定型集落の大きさや必要に応じて実施する確認試験について解説がなされており、これらの項目も現在 ISO において検討中のウエルシュ菌試験法（ISO 15213-2:2023（集落計数法，

published）および ISO/TS 15213-3（定性法, under development)）との関連を考慮した今後の検討が必要と考えられる。

E. 結論

クロストリジウム属菌の標準試験法として、ISO 15213-1:2023 を導入することとした。また、パウチ法と ISO 15213-1:2023 について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付する。
試験法番号として NIHSJ-42 を付与し、クロストリジウム属菌標準試験法の Stage 1 が完了した（NIHSJ-42-ST1）。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

Bladel BO *et al.* Pouch method for the isolation and enumeration of clostridia. *Appl Microbiol* 13(2): 281-285, 1965.

Greenberg RA *et al.* Use of the anaerobic pouch in isolating *Clostridium botulinum* spores from fresh meats. *Appl Microbiol* 14(2): 223-228, 1966.

小久保彌太郎. 食品衛生検査におけるクロストリジア測定用培地について. メディアサークル 32(11): 473-479, 1987.

楠博文. 食肉製品の規格基準改正について. 食品衛生研究 43(7): 7-21, 1993.

ISO 15213:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions (withdrawn)

ISO 15213-1:2023, Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. - Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique

Rhodehamel E *et al.* Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 16: *Clostridium perfringens*. 2021. (Content current as of: 08/03/2021)

Solomon HM *et al*. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 17: *Clostridium botulinum*. 2001. (Content current as of: 10/31/2017)

McNamara AM *et al*. USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook Chapter 13. Examination of meat and poultry products for *Clostridium perfringens*. 1998.

USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook Chapter 14. Methods for the detection of *Clostridium botulinum* toxins in meat and poultry products (ARCHIVED Feb 16, 2016).

表 1. 食肉製品の成分規格および保存基準の概要

（厚生労働省: 食品、添加物等の規格基準「食肉製品」より一部抜粋）

分類	区分別 表示事項	成分規格（個別規格）	保存基準（個別基準）
乾燥食肉製品 例：サラミ	なし	E. coli ：陰性 Aw < 0.87	
非加熱食肉製品 例：生ハム	pH、Aw	E. coli ≦ 100/g 黄色ブドウ球菌 ≦ 1,000/g サルモネラ属菌 ：陰性 *L. monocytogenes* ≦ 100/g	10 ℃以下 (肉塊のみを原料食肉とする Aw ≧ 0.95 の製品は 4 ℃以下)
特定加熱食肉製品 例：ローストビーフ	Aw	E. coli ≦ 100/g **クロストリジウム属菌** **≦ 1,000/g** 黄色ブドウ球菌 ≦ 1,000/g サルモネラ属菌 ：陰性	Aw ≧ 0.95 ：4 ℃以下 Aw < 0.95 ：10 ℃以下
加熱食肉製品 例：ロースハム ソーセージ ベーコン類	包装後 加熱	大腸菌群 ：陰性 **クロストリジウム属菌** **≦ 1,000/g**	10 ℃以下 （気密性の容器包装に充填後、製品中心部温度を120 ℃で 4 分間加熱又は同等以上の方法で殺菌したものを除く）
	加熱後 包装	E. coli ：陰性 黄色ブドウ球菌 ≦ 1,000/g サルモネラ属菌 ：陰性	

日本において嫌気性芽胞形成菌数の規格基準がある食品

・特定加熱食肉製品および包装後加熱食肉製品の成分規格

クロストリジウム属菌 1,000/g 以下

グラム陽性の芽胞形成桿菌であって亜硫酸を還元する嫌気性の菌をいう。

・ミネラルウォーター類（殺菌・除菌無）の製造基準

原水：芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌 陰性

表 2. 公定法（パウチ法）と ISO 法の比較表

	公定法	**ISO 15213-1:2023**
対象菌群	芽胞形成亜硫酸還元 偏性嫌気性菌	Sulfite-reducing *Clostridium* spp.
定性 / 定量	集落計数法（パウチ）	集落計数法（混釈）
10 倍乳剤・ 希釈列の希釈液	ペプトン加生理食塩水	ISO 6887 series に従う
加熱処理	70 ℃、20 分 （非加熱製品）	80±2 ℃、10±1 分 （芽胞数を求めたい場合）
培地	クロストリジア 測定用培地	(modified) Iron sulfite agar
混釈量 （検体＋培地）	パウチ封入 10 mL + 15 mL	1 mL + 12-15 mL　（重層 5 mL） 10 mL + 45-50 mL　（重層 10 mL）
培養条件	好気培養 35±1 ℃、24±2 時間	嫌気培養 37±1 ℃、48±2 時間
確認試験	－	嫌気性 / 好気性 発育試験

【参考：公定法】

○食品、添加物等の規格基準

（昭和三十四年十二月二十八日）（厚生省告示第三百七十号）

○食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について

（平成五年三月一七日）（衛乳第五四号）

（別紙 1）食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品の試験法

○食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について（平成 27 年 7 月 29 日）（食安発 0729 第 4 号）

[別添]

(別紙 1)　食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品の試験法

第 2　試薬及び培地

1　微生物試験に用いる試薬及び培地

試薬及び培地は、次のとおりとする。なお、(2) から (6) については市販品を用いても差し支えない。

(5) クロストリジウム培地

標準処方は次のとおりとする。

混合ペプトン 15.0 g、大豆ペプトン 7.5 g、酵母エキス 7.5 g、肉エキス 7.5 g、クエン酸鉄アンモニウム 1.0 g、メタ重亜硫酸ナトリウム 1.0 g、L－システイン塩酸塩 0.75 g 及び寒天 30.0 g を精製水 1,000 mL に加え、加熱溶解し、滅菌する。最終 pH は 7.6 ± 0.1 でなければならない。

第 3　試験法

1　微生物

(5)　クロストリジウム属菌試験法

試料液 10 mL 及び試料液の 10 倍希釈液 10 mL ずつをそれぞれについて 2 枚の滅菌パウチ（ラミネートフィルム製、市販品あり。）に正確に採り、あらかじめ加温して溶かし 45 ℃～50 ℃の温度に保持したクロストリジウム培地約 15 mL をこれに加え、よく混合し、熱シールした後、冷却凝固させる。培地が凝固した後、35.0 ℃ ± 1.0 ℃で 24 時間 ±2 時間培養する。この場合、検体の希釈に用いた滅菌ペプトン加生理食塩水 10 mL を培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養したものを対照とし、パウチ、滅菌生理ペプトン加食塩水及び培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確かめなければならない。菌数の算定は、黒色の集落につき、食品、添加物等の規格基準中第 1　食品の部 D　各条の

項の○　氷雪の 1　氷雪の成分規格の(2)の 2. の a から g までに準じて行い、クロストリジウム属菌の菌数とする。

クロストリジウム属菌の菌数の算定は，次の要領による。

① 1 平板内に集落数 30～300 の場合

各原液及び倍率希釈の可検物の平板中集落数 30～300 のものを採り計測する。

② 全平板に集落数 300 以上の場合

全ての希釈検液の集落数が 300 以上であつたならば，その希釈倍率の最も高いものについて，後述の密集集落平板測定法により細菌数を計測する。

③ 全平板に集落数 30 以下の場合

全ての平板に 30 以下の集落が発生した場合は，その最も希釈倍率の低いものを計測する。ただし，この場合はその算定数に「以下」の文字を付けなければならない。

④ 拡散集落のある場合

選び出した平板に拡散集落のある場合は，次の条件のものに限りそれ相当の部分を計測する。

イ　他の集落がよく分散していて，拡散集落があつても計測に支障のないもの

ロ　拡散集落の部分が平板の 2 分の 1 以下の場合

⑤ 試験室内事故

次のような特殊な事故に対しては，試験室内事故（L. A. ）とする。

イ　集落が発生しなかつた場合

ロ　拡散集落の部分が平板の 2 分の 1 を超える場合

ハ　汚染されたことが明らかなもの

ニ　その他不適当と思われるもの

⑥ 算出法

細菌数は各場合の計測に有効な 2 枚以上の集落数の算術平均に希釈倍率を乗じたものとする。この数値は上位の 2 桁を有効数字として略算する。

⑦ 密集集落平板計測法

1 平板上の集落数が 300 を少し超えている場合は，その平板の一部分の集落数を正確に 1 cm^2 の区画のある計算板を用いて次の要領により計測し，それより平板全面の集落数を算出する。

イ　1 cm^2 に集落数 10 以下の場合は集落計測板の中心を通過し直交する 2 直径を作り，その中心より各 1 cm ずつ区分し，6 か所の区画の面積中にある集落数を計測し，1 cm^2

の平均集落数を求め，これに平板全面積を乗じて算出する。

ロ　1 cm^2 に集落数 10 を超える場合は，イの場合の 4 区画について計測し，以下イと同様にして算出する。