

令和7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）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

－ウエルシュ菌検査用調査試料の開発(3)－

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 副所長
研究分担者	梶原 三智香	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 室長
研究協力者	中阪 聡亮	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 室長
	高坂 典子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	堀田 実和	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

研究要旨

食品衛生外部精度管理調査、微生物学調査ではウエルシュ菌検査用調査試料の開発を目的としてパイロットスタディを実施した。参加機関50機関に対しウエルシュ菌陽性、陰性各1菌株（計2菌株）を個別に添加した2本の調査試料を配付した。

野菜のポタージュを調査試料とし、事前に性能評価で約1か月間の冷凍保存で安定性を確認後、同一ロットの資材で配付用調査試料を作製した。配付用調査試料は参加機関への配付前（均質性確認試験）および報告期限後（安定性確認試験）に品質評価を行った。調査試料を参加機関に配布後、報告値の回収および解析を実施した。

調査試料は性能評価、均質性確認、安定性確認ともに評価基準を満たした。また、冷凍便での輸送に問題は生じなかった。参加した50機関のうち、49機関が正しく判定し、1機関がNo. 1とNo. 2を逆に判定した。参加機関が採用した試験法はCW寒天培地を使用した方法、またはパウチ法（いずれも食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018収載）の2通りが多く、これらを採用したすべての参加機関が追加の確認試験を実施して判定した。前述の2試験法は検出限界が大きく異なるため、CW寒天培地では発育集落が少なく、パウチ法では発育集落数が極めて多く単離が困難な結果となった。将来的に公定法となった場合は現在の採用試験法の2極化が解消される可能性が高いと思われるが、現段階では調査試料の添加菌濃度の設定が非常に難しく、外部精度管理調査への適用は困難であると示唆された。また、参加機関に対するアンケートでは、今後、本調査項目を外部精度管理調査として実施した場合、「参加したい」または「公定法となった場合は参加したい」と回答した機関は計46機関であり、参加に前向きな機関が約9割を占めた。将来的にウエルシュ菌検査の公定法が示される場合、試験法の二極化が解消され、外部精度管理調査用の調査試料における菌数の設定が容易になること、また参加機関の参加が十分に見込めることから、外部精度管理調査への適用が期待される。

A. 研究目的

厚生労働省が公表する食中毒患者数の統計において、微生物ではカンピロバクター ジェジュニ/コリおよびウェルシュ菌が上位を維持している。カンピロバクター ジェジュニ/コリは微好気環境で増殖する低温環境に弱い特徴を持ち、ウェルシュ菌は嫌気環境で増殖して芽胞を形成する特徴を持つ。外部精度管理調査を提供する機関として、当財団が将来的にこれらの微生物を対象とした調査項目を運用できる体制を整えるため、比較的配付しやすいと思われるウェルシュ菌を用いた調査試料の開発を行うこととした。本研究ではウェルシュ菌の調査項目が実施可能であるかを検証することを目的とし、調査試料の開発およびパイロットスタディを実施した。

B. 方法

1. 試料基材および添加菌

1) 試料基材

試料基材は野菜のポタージュを用いた。

2) 添加菌

(1) *Clostridium sporogenes*

(以降、Cs、ウェルシュ菌陰性)

HIC 220400 [1]

HIC 220401 [2]

HIC 220402 [3]

(2) *Clostridium perfringens*

(以降、Cp、ウェルシュ菌陽性)

HIC 250431 [4]

HIC 250432 [5]

HIC 250433 [6]

性能評価では [1]～[6] の6菌株を使用し、スクリーニングを行った。パイロッ

トスタディでは [2] および [5] の2菌株を使用した。

(HICは当機関で保有する菌株の管理番号)

2. 使用培地等

後述で用いる培地名の略称は、[] で示した。

- ・精製水（日本薬局方）（小堺製薬）
- ・標準寒天培地 [SA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・強化クロストリジア培地 [RCM培地]
（塩谷エムエス）
- ・強化クロストリジア寒天培地
（強化クロストリジア培地100mLに1.5 gの寒天を添加した培地）[RCM寒天培地]
- ・寒天, 粉末（富士フイルム和光純薬）
- ・NaCl（富士フイルム和光純薬）
- ・グリセリン（富士フイルム和光純薬）
- ・Bacto Peptone
（Thermo Fisher Scientific）
- ・緩衝ペプトン水（BPW ISO組成）[BPW]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・マッシュポテト（カルビーポテト）
- ・ニンジンペースト（新進）
- ・カナマイシン含有卵黄加CW培地（極東製薬工業）
- ・ハンドフォード改良培地（栄研化学）
- ・Tryptose sulfite cycloserine寒天培地 [TSC寒天培地]（Merck）
- ・TGC培地（島津ダイアグノスティクス）
- ・Lactose sulfite培地 [LS培地]
（Solabia Biokar Diagnostics）
- ・Motility Nitrate培地 [NM培地]
（Sigma-Aldrich）
- ・Lactose Gelatin培地 [LG培地]
（Sigma-Aldrich）

- ・豚皮ゼラチン（Aタイプ）
（新田ゼラチン）
- ・嫌気性パウチ（嫌気性芽胞菌（ウェルシュ菌等）培養用）（スギヤマゲン）

3. 使用機器

調査試料、培地等の滅菌にはオートクレーブを使用した。試験操作は安全キャビネット内で行い、培養には恒温槽または恒温水槽を使用した。嫌気培養には嫌気ジャー（スギヤマゲン）およびアネロパック・ケンキを使用した。

4. 準拠する試験法

ウェルシュ菌検査は、「ウェルシュ菌標準試験法（集落数計数法）[ステージ1；原案]」（NIHSJ-24-ST1）および「食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018」（公益社団法人日本食品衛生協会、2018）を参考にして実施した（図1から図3）。

1) 試験溶液の調製

流水（約20℃の水道水）に30分浸し、半解凍した調査試料を十分に混和して25 gを秤量した後、BPW 225 mLを加えて1分間のストマッカー処理を実施したものを試験溶液（10倍希釈溶液）とした。

2) ウェルシュ菌標準試験法（集落数計数法）[ステージ1；原案]（NIHSJ-24-ST1）を参考にした定性試験（以降、NIHSJ法）

試験溶液を10倍段階希釈してTSC寒天培地に混釈平板培地を作製し、37.0℃で18～24時間嫌気培養した。その後確認試験A、確認試験Bを実施した。

(1) 確認試験A

TSC寒天培地上の黒色集落を1集落釣菌してFluid Thioglycollate (TGC) 培地 10 mLに移植し、37.0℃で18～24時間嫌気培養した。培養液0.1 mLをダーラム管を入れたLS培地 8 mLに移植し、46.0℃で18～24時間嫌気培養した。LS培地まで増殖を認め、LS培地の黒変とダーラム管内の1/4以上のガス産生を認めた場合にウェルシュ菌陽性とした。

(2) 確認試験B

TSC寒天培地上の黒色集落を1集落釣菌してTSC寒天培地に画線し、同培地10 mLを重層後37.0℃で18～24時間嫌気培養した。増殖集落をNM培地 10 mLおよびLG培地 10 mLに移植し、37.0℃で24時間嫌気培養した。LG培地は5℃で1時間の冷却後、培地の固化が認められた場合は37.0℃で24時間の嫌気培養を追加実施した。NM培地が運動性陰性、亜硝酸塩還元陽性、さらにLG培地でガス産生、培地の黄変およびゼラチンの液状化を認めた場合にウェルシュ菌陽性と判定した。

3) 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018：卵黄加CW培地（以降CW培地法）

試験溶液およびその10倍段階希釈液をそれぞれカナマイシン含有卵黄加CW培地2枚に0.1 mLずつ塗抹し、37.0℃で18～24時間嫌気培養した。培地上に真珠様の光沢、白色ハローを伴う白色集落を認めた場合にウェルシュ菌陽性と判定した。

4) 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018：パウチ法（以降パウチ法）試験溶液10 mLおよびハンドフォード改良培地15 mLをパウチ袋に添加して素早く混和し、薄く固化させた後、開口部をシールして46.0℃で24時間好気培養した。1～3 mmの黒色集落を認めた場合にクロストリジウム陽性と判定した。さらに2)、3)の定性試験における典型反応をもってウェルシュ菌陽性の判定を実施した。

5. 調査試料作製手順

調査試料作製手順を図4に示した。

1) 基材の作製

ニンジンペースト（市販品）に対し、等量のマッシュポテト粉末（市販品）を安定化剤で10倍希釈したものを加えて十分攪拌し、50 gずつガラス製容器（100 mL）に分注後、121℃30分で高圧蒸気滅菌をした。基材は無菌性確認後に-20℃以下で冷凍保存した。

2) 基材の無菌性確認

基材10 gを秤量し、BPW 90 mLで10倍希釈した溶液を試験溶液とした。試験溶液 1 mLを4枚のシャーレに、10 mLを1枚のパウチ袋に分取し、前者はTSC寒天培地およびSA 20 mLで2枚ずつ混釈寒天平板培地とした。後者はハンドフォード改良培地 15 mLで混釈し、開口部をシールして固化させた。TSC寒天培地は37℃で24時間嫌気培養、標準寒天培地は37℃で24時間好気培養、ハンドフォード改良培地は46℃で24時間好気培養し、全ての培地に発育集落を認めない場合に無菌性適合と判定し

た。

3) 添加菌液の調製

凍結保存菌株をRCM培地 10 mLに接種し、37.0℃で20～28時間嫌気培養後、RCM培地で適宜希釈して添加菌液を調製した。

4) 菌液の添加

冷凍保存した基材に添加菌液 0.5 mLを添加し、調査試料とした。なお添加菌は参加機関には開示せず、調査試料No. 1、No. 2として作製した。調査試料は使用、または配付するまで-20℃以下で冷凍保存した。

6. 調査試料の性能評価

事前確認として、パイロットスタディに使用する添加菌株のスクリーニングおよび基材の性能評価を実施した。

1) 添加菌液の調製法の検討

Cs 3菌株およびCp 3菌株の凍結保存菌株をそれぞれRCM培地 10 mLに接種し、37℃で24時間または48時間嫌気培養した。培養液をBPWで10倍段階希釈し、希釈段ごとに2枚のシャーレでRCM寒天培地を用いて混釈平板培地を作製した。RCM寒天培地は37℃24時間嫌気培養後に生菌数測定を実施した。

生菌数測定の結果から、調査試料の最終濃度が 10^3 cfu/g程度になるように性能評価に使用する添加菌の調製方法を決定した。

2) 調査試料の作製

決定した調製法に従い調製した添加菌液

0.5 mLを、冷凍保存した基材に添加した。添加後は速やかに-20℃以下で冷凍保存した。

3) 生菌数測定

保存0日目/12日目/28日目の3ポイントで生菌数測定を実施した。

試験溶液を適宜BPWで10倍段階希釈し、希釈段ごとに2枚のシャーレに1 mL分取した。これをRCM寒天培地で混釈平板培地にした後、37℃で24時間嫌気培養した。

4) 定性試験

保存12日目/28日目の2ポイントにおいて、B. 4項 に従い定性試験を実施した。なおTSC寒天培地（NIHSJ法）およびハンドフォード改良培地（パウチ法）は典型集落の生菌数測定を並行して実施した。卵黄加CW培地は28日目のみ実施した。

5) 添加菌のスクリーニング

生菌数測定結果および定性試験の反応を総合的に評価し、パイロットスタディに使用する添加菌を決定した。

7. パイロットスタディ（品質評価）

1) 配付用調査試料の作製

5項に示した方法で配付用調査試料を作製し、その一部を用いて品質評価を行った。

2) 均質性確認試験

添加菌ごとに、系統的に抽出した5個の配付用調査試料を用いて生菌数試験を行い、その平均値を添加濃度とした。また、5個の配付用調査試料のうち2個を用

いて定性試験を行った。

なお生菌数測定はCpではTSC寒天培地、CsではRCM寒天培地を用い、試験溶液をBPWで10倍段階希釈した各希釈液を2枚のシャーレに分取し、各培地で混釈平板培地を作製したのち37℃で24時間嫌気培養した。

3) 安定性確認試験

添加菌ごとに、系統的に抽出した1個の配付用調査試料を用いて、作製から約2か月後に均質性確認試験と同様の生菌数測定および定性試験を行った。

8. パイロットスタディ（室間共同試験）

50機関の参加機関に対して配付用調査試料を冷凍便（ヤマト運輸、クール宅急便、冷凍タイプ、-15℃以下）で発送し、参加機関から検査結果を回収した。調査試料は「野菜のポタージュ」として配付し、試料処理および測定操作は各機関の方法で実施した。なお、繰り返し試験数は1回とした。検査機関からの報告期限は2026年1月6日とした。なお、倫理面への配慮として、参加機関に配付する結果報告書では検査機関をコード番号化し、調査に関する秘密保持を図った。

C. D. 研究結果および考察

1. 調査試料の性能評価

1) 添加溶液の調製法の検討

添加菌 6 菌株を RCM 培地で 37℃、24 時間または 48 時間嫌気培養した培養液の生菌数を RCM 寒天培地で測定し、添加菌液の培養時間と希釈率を決定した（表 1）。Cs の HIC 22402 以外の 5 菌株は 24

時間培養で十分な生菌数を得られたため、この5菌株を用いて性能評価試験を実施した。また本結果より培養液の希釈率を1~1000倍の間でそれぞれ決定した。なお培養液の希釈はRCM培地を使用した。

2) 調査試料の作製

無菌性が確認された冷凍基材を使用して調査試料を作製した。

Cs2菌株、Cp3菌株の添加菌液を作製後、冷凍基材に添加菌液0.5 mLを個別に添加して調査試料を作製した。調査試料は各菌3本作製し、菌を添加したのち速やかに-20℃以下で冷凍保存した。

3) 生菌数測定

保存0日目/12日目/28日目の3ポイントで生菌数測定を実施した(図5、表2、表3)。パイロットスタディで使用することを想定し、保存0日目と12日目の生菌数の対数値差が $\pm 1.0 \log \text{cfu/g}$ 以内であることを評価基準としたところ、CsのHIC 220400は評価基準を下回り、それ以外の4菌株は評価基準に適合した。ただしCpのHIC 250431は保存28日目の生菌数が検出限界を下回ったため、安定性が疑わしいことからパイロットスタディへの使用は不適切と判断した。

4) 定性試験

保存12日目/28日目にNIHSJ法、パウチ法、CW培地法を実施した。CW培地法は保存28日目のみ実施した。

NIHSJ法(表4、表5)において、Csの

HIC 220400、HIC 220401はTSC寒天培地で増殖を認めず、最初の培地でウェルシュ菌陰性の判定が確定した。Cpの3菌株はすべての培地で典型反応を認め、陽性と判定した。

Csは12日目の試験においてTSC寒天培地以降の確認試験を生菌数測定の発育集落を移植して継続した。確認試験AではTGC培地に増殖を認め、LS培地の黒変と微弱なガス産生を認めた。確認試験BではTSC寒天培地による純粋培養で増殖を認めなかったため、以降の試験を実施しなかった。Cs2菌株において確認試験A、Bからウェルシュ菌陽性と誤判定される可能性は低いと示唆されたことから、28日目では最初のTSC寒天培地で増殖を認めない場合はウェルシュ菌陰性と判定し、試験終了とした。

パウチ法(表6)において、CsのHIC 220400は発育を認めなかった。HIC 250401はおおよそRCM寒天培地の1/100、Cpの3菌株はRCM寒天培地と同程度か1/10以下の生菌数を認めた。培地が若干液状化し、集落の計測が困難であったことも集落が減少した要因と考えられる。

CW培地法(表7)において、Csの2菌株は発育集落を認めなかった。CpのHIC 250431でも発育集落を認めなかった。CpのHIC 250432およびHIC 250433は典型反応を伴う発育集落を認めたが、平板培地1枚につき平均2集落程度と非常に少ない集落数であった。

5) パイロットスタディ配付用調査試料の添加菌の選定

生菌数試験および定性試験の結果から、Cs は安定した生菌数を示した HIC 220401、Cp は TSC 寒天培地で高い生菌数を維持し、定性試験も明瞭な典型反応を示した HIC 250432 を使用することとした。

2. パイロットスタディ（品質評価）

均質性確認試験において調査試料 No. 1（HIC 220401）、No. 2（HIC 250432）の配付用調査試料の生菌数平均値（添加濃度）はそれぞれ 1.8×10^2 、 4.7×10^3 cfu/g であった。また、定性試験でも分離培地などで増殖能に若干の差があったものの、性能評価と同様の判定結果が得られたことから、配付用調査試料は均質であると評価した（表 8、表 9）。
報告期限後（配付から約 2 か月後）に実施した安定性確認試験において調査試料 No. 1、No. 2 の生菌数は 1.0×10^2 、 2.8×10^3 cfu/g であり、均質性確認試験と同等の結果となった。定性試験の結果も均質性確認試験と同様の判定結果となったことから、パイロットスタディ実施期間中の調査試料は安定であったと評価した（表 10、表 11）。

3. パイロットスタディ（室間共同試験）

1) 参加機関の結果報告

対象とした全 50 機関から回収した結果報告を表 12 および表 13 に示した。50 機関が参加し、49 機関は正しく判定したが、1 機関が試料 No. 1 を陽性、試料 No. 2 を陰性と判定した。この原因は不明であるが、調査試料の取り違い、または誤記入が原因である可能性が考えられ

た。

また、各参加機関への調査試料の輸送状況を表 14 および表 15 に示した。12 月 1 日午後に当財団から発送し、12 月 2 日または 12 月 3 日に到着した。参加機関での到着日時とドライアイスの残存状況を確認したところ、12 月 3 日の到着を含め、45 機関（90%）の機関でドライアイスの残存を確認できた。ドライアイスの残存が確認できなかった機関、特に 12 月 2 日に到着した機関においては、輸送会社の取扱い不備や同梱したドライアイスのサイズのばらつきが影響した可能性のほか、機関に到着した時点ではドライアイスが残存しており、担当者が確認するまでに調査試料のみ取り出され、ドライアイス残存確認まで室温で放置されていたなどの扱いが影響した可能性が考えられた。図 6 には 50 機関から 10 機関を抽出して輸送中の温度変化をデータロガーで確認した結果を示した。輸送中の温度は概ね -20°C 以下の範囲で推移していた。1 機関については当該検査機関が報告した到着日時（12 月 2 日 16 時）までに 30°C を超える温度上昇が認められたが、配送業者の配達記録（12 月 2 日 10 時 22 分）より、温度上昇より前に到着していたと考えられる。なお、配送業者の記録した配達日時における温度は -28.2°C であった。また、本調査研究においては、逆に回答した 1 機関を含めて全ての参加機関がウェルシュ菌の発育を確認できていたことから、輸送上の問題はなかったと判断した。

2) 参加機関の採用試験法

参加機関の経過記録書の回答を表 16 に示した。全体の 86%において SOP がある (31 機関)、または通常実施している試験法がある (12 機関) と回答しており、ペプトン加生理食塩水等の希釈水で 10 倍希釈したのち、CW 培地法 (40 機関) またはパウチ法 (9 機関) による試験を実施し、確認試験や同定試験で最終判定した。その他、1 機関が同定キットでの試験法を採用した。

CW 培地法をベースにした試験法を採用した 40 機関のうち、26 機関は TGC 培地と卵黄加 CW 寒天培地 (または CW 寒天培地) を併用し、半数以上がグラム染色や同定キットによる確認試験を実施し、うち 8 機関は特定遺伝子の検出キットによりウェルシュ菌を判定した。

パウチ法をベースにした試験法を採用した 9 機関のうち、6 機関がハンドフォード改良培地、3 機関がクロストリジア測定用培地を用い、検出菌を卵黄加 CW 寒天培地、NM 培地、LG 培地などに移植して確認試験を実施してウェルシュ菌を判定した。さらにグラム染色や同定キットを併用した機関もあった。

本調査研究で、国内で採用されるウェルシュ菌検査の試験法が主に 2 通りであること、および採用する試験法による検出限界に大きな差があることが明確になった。アンケート (表 18) で調査試料 No. 2 の接種菌数が少ない、または多いという意見が散見されたが、CW 培地法を使用した機関では発育集落が少なく判定が困難となり、一方パウチ法を採用した機関では菌が多すぎるため単離が困難となったことからの意見である。食品衛生検査指

針に準拠した試験法を参照すると、CW 寒天培地では調査試料中の菌数の 1/100、パウチ法では等倍の集落数の発育が想定される。今回の調査試料の菌数からは、CW 寒天培地で 1 平板当たり約 50 cfu、ハンドフォード改良培地で 1 パウチ当たり約 5000 cfu の集落が得られると見込まれた。しかし実際には、各培地の選択性が強く作用し、ウェルシュ菌の増殖も抑制されたため、各培地上の集落数は CW 寒天培地では約 5 cfu、ハンドフォード改良培地では約 500 cfu の集落数にとどまったものと推察される。培地特性により集落数に大きな差が生じることは当財団でも事前確認で把握しており、両培地で検出できる中間濃度として今回の濃度設定を決定したが、想定通りに両試験法で問題が生じる結果となった。

通常、ウェルシュ菌は食中毒発生後の検査が多く、定性試験を実施する場合は増菌培養を実施しているケースが多いと考えられ、CW 培地法はその観点から考えれば特に問題ない。一方、パウチ法は特別な機器等を必要としないため簡便、低コストであるが、培養後の単離には一定の手技が求められる。小型の嫌気培養キットが開発された現代において、パウチ法は将来的に参照法の扱いになることが予想され、ウェルシュ菌検査用調査試料は CW 寒天培地などの塗抹を前提とした試験法を想定して設計できるようになる可能性が高い。

なお、本調査研究では食品衛生検査指針に掲載されている NM 培地や LG 培地等を用いた確認試験が多数実施されていたが、本試験法の引用元である ISO 7973:

2004 はすでに廃止され、ISO/TS 15213-2:2023 に継承されるとともに、大幅な改正が行われている。また、ウェルシュ菌の定性試験ガイドラインとして ISO 15213-3:2024 が発行されており、国際標準としてはこれらのガイドラインを意識していく必要もあると考えられる。ステージ4まで進んだ国内微生物標準試験法（ウェルシュ菌：定量）[NIHSJ-24] は、ISO 7973:2004 をベースに作成されていたが、最終案は公開されておらず、今後の動向は不明である。

3) アンケート結果

外部精度管理調査事業の今後の運用として、ウェルシュ菌検査を実施する場合のアンケート調査を行ったところ（表17）、「参加したい」「公定法となった場合は参加したい」を合わせると92%がウェルシュ菌検査の調査試料に前向きな回答であった。

E. 結論

ウェルシュ菌検査のパイロットスタディでは、50機関中1機関が何らかの理由で誤判定した。採用した試験法は食品衛生検査指針に掲載されているCW寒天培地を用いる方法とパウチ法の2通りが多く、これらの方法を採用した機関ではウェルシュ菌を疑う場合に追加試験を実施していた。2通りの試験法は検出限度値に大きな差があるため、現状では外部精度管理調査での運用は難しいことが明確となった。外部精度管理調査事業にウェルシュ菌を適用するためには、国際標準法（NIHSJ法）などで国内の公定法が定めら

れることが最低条件であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 硫化水素非産生株を用いたサルモネラ属菌検査の技能試験プログラム開発：
梶原三智香、中阪聡亮、堀田実和、高坂典子、渡辺卓穂（第121回日本食品衛生学会学術講演会 2025. 10. 16～2025. 10. 17）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

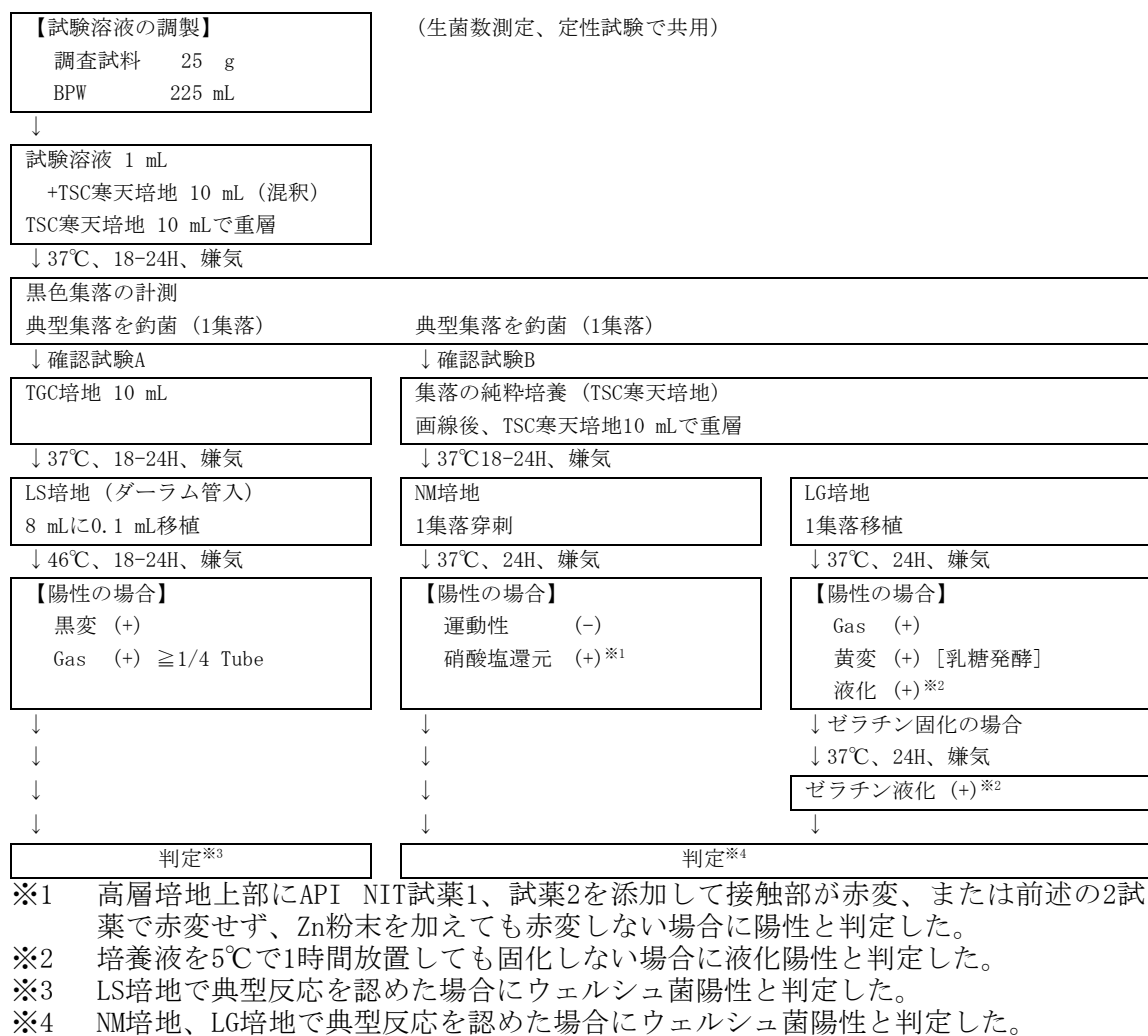


図1 ウェルシュ菌検査 (NIHSJ法) 試験手順

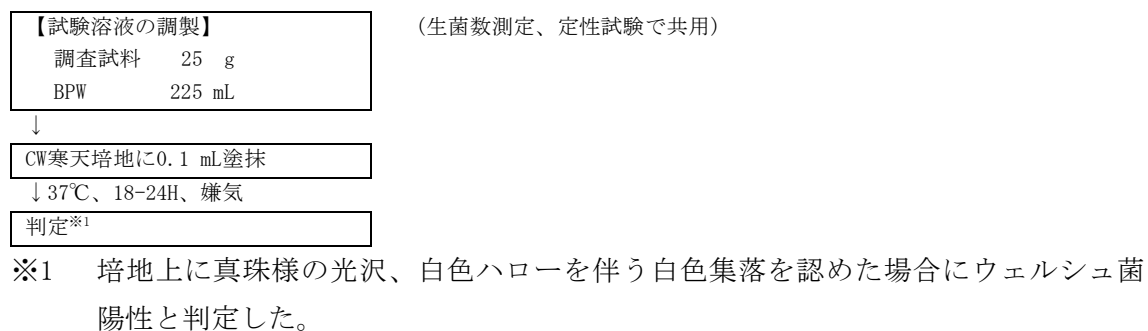


図2 ウェルシュ菌検査 (CW培地法) 試験手順

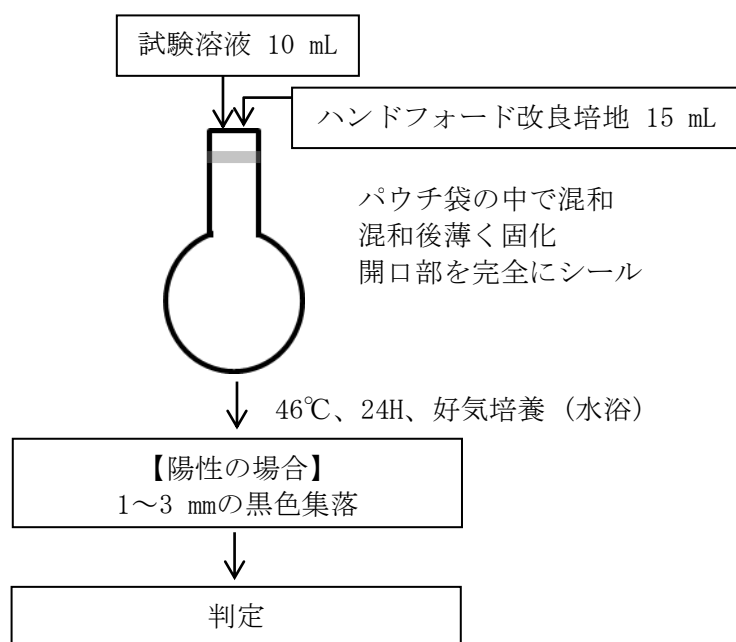
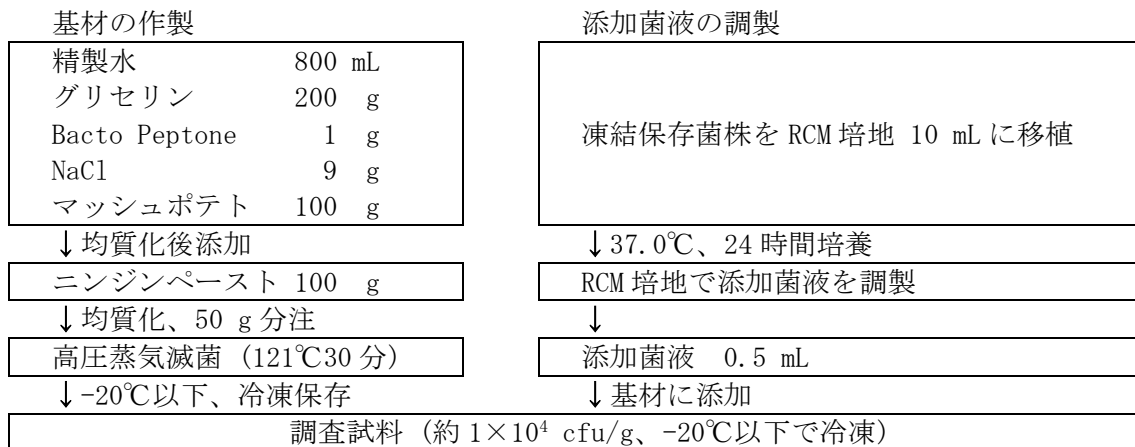


図3 ウェルシュ菌検査（パウチ法）試験手順



※1 基材の秤量値は作製容量によって変動。

図4 ウェルシュ菌検査 調査試料作製手順

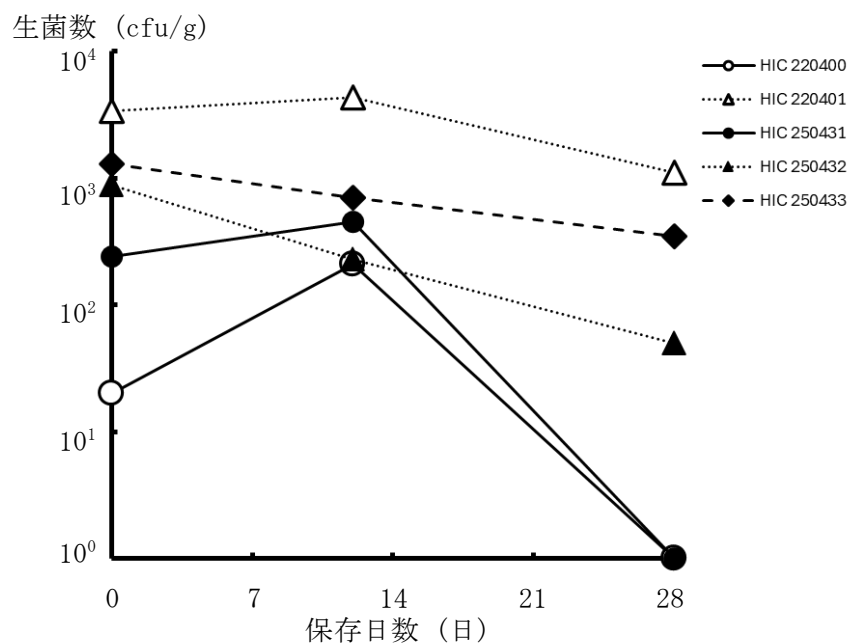


図5 性能評価 調査試料の生菌数の挙動 (-20℃以下で冷凍保存)
白抜きマークはCs (ウェルシュ菌陰性)、黒マークはCp (ウェルシュ菌陽性)

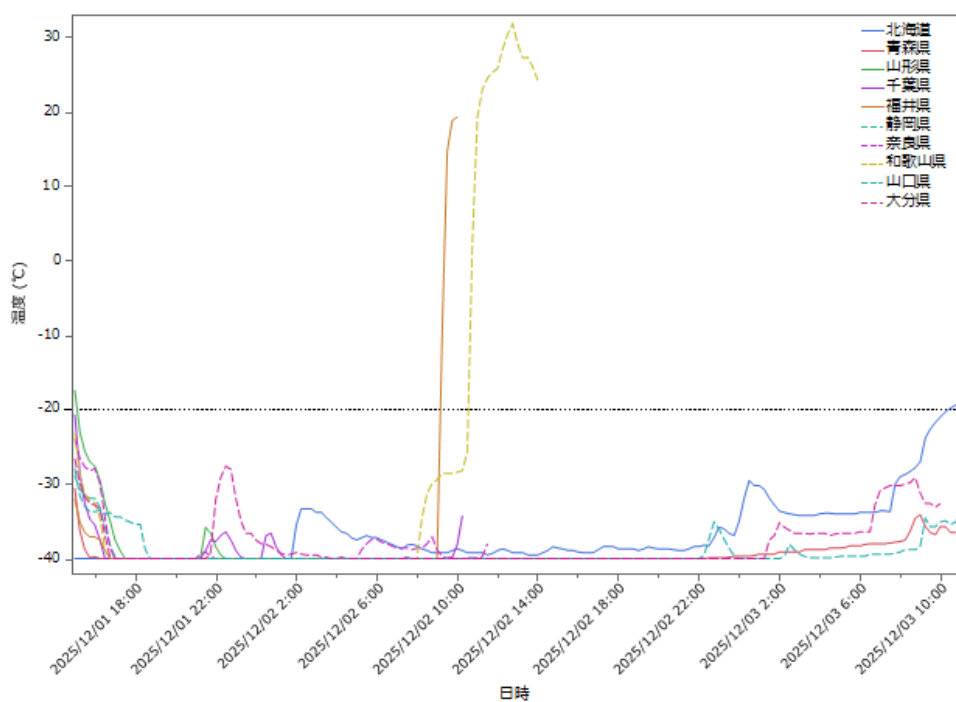


図6 輸送中の温度モニタリング結果
参加機関から10機関を選択して調査試料と同梱輸送し、返送後にデータ回収した。発送日 (2025年12月1日) から2日後 (12月3日) まで収集したデータのうち、各参加機関の受領時間までを図に使用した。

表 1 調査試料の性能評価 -添加溶液の調製法の検討・菌液調製手順の確認-

HIC No.	220400	220401	220402	250431	250432	250433
培養時間 ^{※1}						
24 時間	5.5×10^6	1.3×10^4	$<10^3$	1.4×10^8	5.5×10^7	1.8×10^8
48 時間	1.3×10^6	6.1×10^5	9.5×10^7	2.0×10^7	3.0×10^7	1.2×10^8
培養液希釈率 ^{※2}	1/30	希釈なし	不採用	1/1000	1/300	1/1000

※1 RCM 培地 10 mL に添加菌を接種後 37℃、各培養時間で培養した。これを BPW で適宜 10 倍段階希釈し、RCM 寒天培地による混濁平板培地を 37℃で嫌気培養し、生菌数測定を実施した。数値は各培養液の生菌数 (cfu/mL) を示す。

※2 培養液の生菌数結果から決定した添加菌液調製のための培養液希釈率を示した。(24 時間培養後の培養液で添加菌液を調製する場合の希釈率)

表 2 調査試料の性能評価 -生菌数測定 (1)-

HIC No.	220400		220401	
	実数	対数	実数	対数
保存日数				
添加菌液 ^{※1}				
0 ^{※2}	4.6×10^3	3.67	5.0×10^4	4.70
12 ^{※2}	2.0×10^1	1.31	3.4×10^3	3.54
28 ^{※2}	2.1×10^2	2.33	4.3×10^3	3.64
	<10	—	1.1×10^3	3.05
評価 ^{※3}		1.02		0.10
判定 ^{※4}		不適合		適合

※1 生菌数の単位：cfu/mL または log cfu/mL

※2 生菌数の単位：cfu/g または log cfu/g

※3 評価： 生菌数対数値[(保存日数 0 日目)-(保存日数 12 日目)]の絶対値を示した。

※4 判定： 評価の数値が 1.0 以内の場合に適合と判定した。

表 3 調査試料の性能評価 -生菌数測定 (2)-

HIC No.	250431		250432		250433	
	実数	対数	実数	対数	実数	対数
保存日数						
添加菌液 ^{※1}						
0 ^{※2}	6.7×10^4	4.83	1.1×10^5	5.05	1.6×10^5	5.21
12 ^{※2}	2.4×10^2	2.39	8.8×10^2	2.95	1.3×10^3	3.12
28 ^{※2}	4.5×10^2	2.66	2.3×10^2	2.37	7.0×10^2	2.85
	<10	—	5.0×10^1	1.70	3.5×10^2	2.55
評価 ^{※3}		0.27		0.58		0.30
判定 ^{※4}		適合 ^{※5}		適合		適合

※1 生菌数の単位：cfu/mL または log cfu/mL

※2 生菌数の単位：cfu/g または log cfu/g

※3 評価： 生菌数対数値[(保存日数 0 日目)-(保存日数 12 日目)]の絶対値を示した。

※4 判定： 評価の数値が 1.0 以内の場合に適合と判定した。

※5 評価基準は満たしたが保存日数 28 日目で検出限界外となったため、調査試料への使用は不適切と判断した。

表 4 調査試料の性能評価 -定性試験 (NIHSJ 法、確認試験 A)-

HIC No.	220400	220401	250431	250432	250433
保存日数 12 日目 TSC 寒天培地※ ¹ (黒色集落)	<10	<10	1.2×10^2	1.1×10^3	8.0×10^2
TGC 培地※ ²	+※ ³	+※ ³	+	+	+
LS 培地 (黒変)※ ⁴ (ガス産生)※ ⁵	+ ±	+ ±	+ 3/4	± 4/4	- 4/4
判定 (ウェルシュ菌)	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
保存日数 28 日目 TSC 寒天培地※ ¹ (黒色集落)	<10	<10	5.5×10^1	6.4×10^2	5.4×10^2
TGC 培地※ ²	実施せず ^a	実施せず ^a	+	+	+
LS 培地 (黒変)※ ⁴ (ガス産生)※ ⁵	実施せず ^a	実施せず ^a	- 4/4	± 4/4	- 4/4
判定 (ウェルシュ菌)	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性

※¹ 黒色集落数から生菌数を算出した (生菌数の単位: cfu/g)。典型集落を認めない場合、<10cfu /g とした。

※² +: 増殖を認める。

※³ TSC 寒天培地で菌の発育を認められなかったため、生菌数測定 of RCM 寒天培地から移植して試験を継続した。

※⁴ +: 培地の黒変を認める。 -: 培地の黒変を認めない。

※⁵ ±: 微量のガス産生を認める。ガス産生を認める場合はドラム管内のガス割合を示した。

表 5 調査試料の性能評価 -定性試験 (NIHSJ 法、確認試験 B)-

HIC No.	220400	220401	250431	250432	250433
保存日数 12 日目※ ¹ TSC 寒天培地 (純粋培養)	-	-	+	+	+
NM 培地 (運動性) (硝酸塩還元)※ ²	実施せず ^a	実施せず ^a	- +	- +	- +
LG 培地 (黄変) (ガス産生) (液化)※ ³	実施せず ^a	実施せず ^a	+ + +	+ + +	+ + +
判定 (ウェルシュ菌)	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性
保存日数 28 日目 TSC 寒天培地 (純粋培養)	実施せず ^a	実施せず ^a	+	+	+
NM 培地 (運動性) (硝酸塩還元)※ ²	実施せず ^a	実施せず ^a	- +	- +	- +
LG 培地 (黄変) (ガス産生) (液化)※ ³	実施せず ^a	実施せず ^a	+ + +	+ + +	+ + +
判定 (ウェルシュ菌)	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性

確認試験 A の TSC 寒天培地以降の試験結果を示した。

※¹ TSC 寒天培地で菌の発育を認められなかったため、生菌数測定 of RCM 寒天培地から移植して試験を継続した (保存日数 12 日目のみ)。

※² 高層培地上部に API NIT 試薬 1、試薬 2 を添加して接触部が赤変、または前述の 2 試薬で赤変せず、Zn 粉末を加えても赤変しない場合に (+) と判定した。

※³ 培養液を 5℃で 1 時間放置しても固化しない場合に液化陽性と判定した。

表6 調査試料の性能評価 -定性試験 (パウチ法)-

HIC No.	220400	220401	250431	250432	250433
保存日数 12 日目	0	1.1×10^1	2.2×10^1	1.4×10^2	2.4×10^2
保存日数 28 日目	0	1.6×10^1	2.9×10^1	1.2×10^2	2.8×10^2

生菌数の単位：cfu/g

集落数を認めない場合、0 cfu/g とした。

表7 調査試料の性能評価 -定性試験 (CW培地法)-

HIC No.	220400	220401	250431	250432	250433
保存日数 28 日目	<100	<100	<100	1.5×10^2	2.0×10^2

生菌数の単位：cfu/g

集落数を認めない場合、<100 cfu/g とした。

表8 調査試料の品質評価 -均質性確認 (生菌数測定)-

調査試料	調査試料No. 1 生菌数	調査試料No. 2 生菌数
Sample1	1.7×10^2	5.1×10^3
Sample2	1.5×10^2	3.9×10^3
Sample3	2.4×10^2	4.5×10^3
Sample4	1.4×10^2	5.3×10^3
Sample5	2.0×10^2	4.7×10^3
生菌数平均値 (添加濃度)	1.8×10^2	4.7×10^3
均質性確認試験の評価	均質である	均質である

生菌数の単位：cfu/g

No. 1 (HIC 220401)は RCM 寒天培地、No. 2 (HIC 250432) は TSC 寒天培地を用いて生菌数測定を実施した。

各添加菌について、5 個の生菌数に大きな差が認められず、定性試験結果が性能評価と同様の結果を得られた場合に均質であると評価した。

表9 調査試料の品質評価 -均質性確認 (定性試験)-

調査試料	調査試料No. 1 定性試験結果	調査試料No. 2 定性試験結果
NIHSJ法 (確認試験A) (TSC寒天培地 生菌数) ^{※1}	ウェルシュ菌 陰性 ($<10^1$)	ウェルシュ菌 陽性 (4.7×10^3)
NIHSJ法 (確認試験B)	ウェルシュ菌 陰性	ウェルシュ菌 陽性
パウチ法 (生菌数) ^{※2}	クロストリジア 陽性 (6.0×10^0)	クロストリジア 陽性 (TNTC)
CW法 (生菌数) ^{※3}	ウェルシュ菌 陰性 ($<10^2$)	ウェルシュ菌 陽性 (1.8×10^2)
均質性確認試験の評価	均質である	均質である

生菌数の単位：cfu/g。表8、生菌数測定のSample1およびSample5を使用した。

全ての試験においてSample1およびSample5で同様の結果を得られた。

図1～図3の判定基準に従い、最終判定結果を示した。

※1 典型集落を認めない場合 $<10^1$ cfu/gとした。

※2 典型集落の発育を認めた場合にクロストリジア陽性と判定した。計測困難な集落数についてTNTCとした。

※3 典型集落の発育を認めた場合にウェルシュ菌陽性と判定した。典型集落を認めない場合 $<10^2$ cfu/gとした。

表10 調査試料の品質評価 -安定性確認 (生菌数測定)-

調査試料	調査試料No. 1 生菌数	調査試料No. 2 生菌数
Sample1	1.0×10^2	2.8×10^3
安定性確認試験の評価	安定性を認める	安定性を認める

生菌数の単位：cfu/g

No. 1 (HIC 220401) は RCM 寒天培地、No. 2 (HIC 250432) は TSC 寒天培地を用いて生菌数測定を実施した。

各添加菌について、均質性確認と同等の結果を得られた場合に安定性を認めると評価した。

表11 調査試料の品質評価 -安定性確認 (定性試験)-

調査試料	調査試料No. 1 定性試験結果		調査試料No. 2 定性試験結果	
NIHSJ法 (確認試験A) (TSC寒天培地 生菌数)※ ¹	ウェルシュ菌	陰性 ($<10^1$)	ウェルシュ菌	陽性 (2.8×10^3)
NIHSJ法 (確認試験B)	ウェルシュ菌	陰性	ウェルシュ菌	陽性
パウチ法 (生菌数)※ ²	クロストリジア	陽性 (1.9×10^1)	クロストリジア	陽性 (5.6×10^2)
CW法 (生菌数)※ ³	ウェルシュ菌	陰性 ($<10^2$)	ウェルシュ菌	陽性 (1.5×10^2)
安定性確認試験の評価	安定性を認める		安定性を認める	

生菌数の単位：cfu/g。表10、生菌数測定のSample1を使用した。

図1～図3の判定基準に従い、最終判定結果を示した。

※¹ 典型集落を認めない場合 $<10^1$ cfu/gとした。

※² 典型集落の発育を認めた場合にクロストリジア陽性と判定した。

※³ 典型集落の発育を認めた場合にウェルシュ菌陽性と判定した。典型集落を認めない場合 $<10^2$ cfu/gとした。

表12 パイロットスタディ -参加機関の報告 (1)-

コード番号	試料No. 1 判定結果	試料No. 1 評価	試料No. 2 判定結果	試料No. 2 評価
A034	陰性	満足	陽性	満足
A044	陰性	満足	陽性	満足
A087	陰性	満足	陽性	満足
A088	陰性	満足	陽性	満足
A124	陰性	満足	陽性	満足
A138	陰性	満足	陽性	満足
A140	陰性	満足	陽性	満足
A161	陰性	満足	陽性	満足
A171	陰性	満足	陽性	満足
A179	陰性	満足	陽性	満足
A195	陰性	満足	陽性	満足
A229	陰性	満足	陽性	満足
A230	陰性	満足	陽性	満足
A236	陰性	満足	陽性	満足
A260	陰性	満足	陽性	満足
A262	陰性	満足	陽性	満足
A314	陰性	満足	陽性	満足
A325	陰性	満足	陽性	満足
A331	陰性	満足	陽性	満足
A348	陰性	満足	陽性	満足
A352	陰性	満足	陽性	満足
A368	陰性	満足	陽性	満足
A375	陰性	満足	陽性	満足
A406	陰性	満足	陽性	満足
A423	陰性	満足	陽性	満足
A452	陰性	満足	陽性	満足
A479	陰性	満足	陽性	満足
A487	陰性	満足	陽性	満足
A541	陰性	満足	陽性	満足
A556	陰性	満足	陽性	満足
A568	陰性	満足	陽性	満足
A571	陰性	満足	陽性	満足

試料No. 1 評価

満足 : 陰性

不満足 : 陽性

試料No. 2 評価

満足 : 陽性

不満足 : 陰性

表13 パイロットスタディ-参加機関の報告 (2)-

コード番号	試料No.1 判定結果	試料No.1 評価	試料No.2 判定結果	試料No.2 評価
A575	陰性	満足	陽性	満足
A605	陽性	不満足	陰性	不満足
A646	陰性	満足	陽性	満足
A682	陰性	満足	陽性	満足
A683	陰性	満足	陽性	満足
A723	陰性	満足	陽性	満足
A740	陰性	満足	陽性	満足
A743	陰性	満足	陽性	満足
A775	陰性	満足	陽性	満足
A814	陰性	満足	陽性	満足
A820	陰性	満足	陽性	満足
A822	陰性	満足	陽性	満足
A874	陰性	満足	陽性	満足
A880	陰性	満足	陽性	満足
A892	陰性	満足	陽性	満足
A975	陰性	満足	陽性	満足
A986	陰性	満足	陽性	満足
A987	陰性	満足	陽性	満足

試料No.1 評価

満足 : 陰性

不満足 : 陽性

試料No.2 評価

満足 : 陽性

不満足 : 陰性

表 14 参加機関への輸送状況 (1)

輸送先	到着日時*1	ドライアイス残存	最高温度 (℃)	最低温度 (℃)
北海道	12月3日11時00分	あり	-19.2	-40未満
北海道	12月3日11時00分	なし	—	—
青森県	12月3日10時30分	あり	-30.6	-40未満
青森県	12月3日10時25分	あり	—	—
岩手県	12月2日11時00分	あり	—	—
宮城県	12月2日11時15分	あり	—	—
宮城県	12月2日10時15分	あり	—	—
山形県	12月2日10時10分	あり	-17.4	-40未満
福島県	12月2日09時28分	なし	—	—
福島県	12月2日11時03分	あり	—	—
茨城県	12月2日09時45分	あり	—	—
茨城県	12月2日11時20分	あり	—	—
群馬県	12月2日10時35分	あり	—	—
群馬県	12月2日10時15分	あり	—	—
埼玉県	12月2日10時20分	あり	—	—
埼玉県	12月2日10時35分	あり	—	—
千葉県	12月2日10時00分	あり	—	—
千葉県	12月2日09時00分	あり	—	—
千葉県	12月2日10時30分	あり	—	—
千葉県	12月2日10時20分	あり	-20.7	-40未満
東京都	12月2日10時50分	あり	—	—
東京都	12月2日11時30分	あり	—	—
東京都	12月2日09時30分	あり	—	—
東京都	12月2日09時45分	あり	—	—
東京都	12月2日10時50分	あり	—	—
神奈川県	12月2日09時20分	なし	—	—
神奈川県	12月2日09時30分	あり	—	—
神奈川県	12月2日10時00分	あり	—	—
神奈川県	12月2日10時26分	あり	—	—
富山県	12月2日08時55分	あり	—	—

*1：24 時間表記、参加検査機関から申告のあった日時

表 15 参加機関への輸送状況 (2)

輸送先	到着日時*1	ドライアイス残存	最高温度 (℃)	最低温度 (℃)
福井県	12月2日10時00分	あり	19.3*2	-40未満
静岡県	12月2日11時30分	あり	-28.9	-40未満
愛知県	12月2日15時15分	なし	—	—
愛知県	12月2日15時45分	あり	—	—
京都府	12月2日09時40分	あり	—	—
京都府	12月2日09時35分	あり	—	—
大阪府	12月2日09時30分	あり	—	—
大阪府	12月2日09時00分	あり	—	—
大阪府	12月2日09時25分	あり	—	—
兵庫県	12月2日12時00分	あり	—	—
兵庫県	12月2日09時00分	あり	—	—
奈良県	12月2日11時30分	あり	-23.9	-40未満
和歌山県	12月2日16時00分	あり	31.8*3	-40未満
岡山県	12月3日11時55分	あり	—	—
岡山県	12月3日10時30分	あり	—	—
山口県	12月3日11時15分	なし	-27.9	-40未満
徳島県	12月3日11時00分	あり	—	—
香川県	12月3日12時20分	あり	—	—
香川県	12月3日11時57分	あり	—	—
大分県	12月3日10時13分	あり	-26.6	-40未満

*1：24時間表記、参加検査機関から申告のあった日時

*2：2025年12月2日09時15分頃より温度が上昇し、到着時に最高温度を記録
輸送会社の配送記録では2025年12月2日09時01分に配達完了とあり、その時点で
-40℃未満を記録

*3：2025年12月2日10時45分頃より温度が上昇し、12時45分に最高温度を記録
輸送会社の配送記録では2025年12月2日10時22分に配達完了とあり、その時点で
-28.2℃を記録

表16 パイロットスタディ－経過記録書の集計結果－

調査試料到着日								
12月2日		12月3日						
39		11						
調査試料到着時のドライアイスの残存								
あり		なし						
45		5						
経験年数								
0-1年		2-4年		5-9年		10年以上		
22		8		13		7		
解凍方法								
冷蔵庫		流水(水浴)		室温		その他		
2		39		6		3		
解凍時間								
15分程度		30分程度		1時間程度		その他		
7		27		10		6		
調査試料の混和時間								
30秒程度		1分程度		その他				
28		18		4				
ベースとした試験法								
食品衛生 検査指針 (CW寒天培地)	食品衛生 検査指針 (パウチ法)	ISO 7937 : 2004	ISO 15213- 1 : 2023	ISO 15213- 2 : 2023	ISO/TS 15213-3 : 2024	NIHSJ法 (NIHSJ-24-ST1)	その他	
40	9	0	0	0	0	0	1	
試料採取量								
10 g		25 g		その他				
9		41		0				
希釈液								
ペプトン加 生理食塩水	リン酸緩衝 生理食塩水	緩衝ペプト ン水 (BPW)	その他					
32	12	0	6					
試料液の均質化の処理時間								
30秒程度		1分程度		2分程度		その他		
11		39		0		0		
使用した培地※								
CW 寒天培地	卵黄加 CW寒天培地	ハンド フオード 改良培地	SC (TSC) 寒天培地	TGC培地 (F-TGC培地 ・改良培地)	LS培地 (Lactose Sulfite)	LG培地 (Lactose Gelatin)	NM培地 (Nitrate Motility)	その他
6	40	8	1	29	3	7	7	10
嫌気培養法								
該当せず	嫌気用 恒温槽	嫌気培養用 キット (アネロバック ・ケンキ等)	その他					
1	0	48	1					
検査機関としての2024年度のウェルシュ菌検査実績								
3件以下		4-10件		11-20件		21件以上		
26		5		3		16		
検査機関のウェルシュ菌の標準操作手順書 (SOP)								
SOPがある	SOPはない が通常実施 している方 法がある	SOPがない						
31	12	7						

※：複数回答あり

表17 パイロットスタディアンケート結果 (1)

外部精度管理調査としてウェルシュ菌検査を実施した場合

回答	機関数 (全体比)	
1) 外部精度管理調査としてウェルシュ菌検査を実施した場合		
参加したい	28	(56%)
公定法となった場合は参加したい	18	(36%)
参加しない	4	(8%)
2) 「参加しない」以外を選択した46機関に追加質問		
現状の参加項目に加えて参加できる	9	(20%)
予算次第だが現状の参加項目に加えて参加できる (参加できない可能性がある)	33	(72%)
他の調査項目への参加に影響する可能性がある	4	(9%)

表18 パイロットスタディアンケート結果（2）

ウェルシュ菌検査用調査試料についてのご意見、ご要望（抜粋）

梱包状態	今回はドライアイスが同封されており、冷凍状態で受領できて良かった。 試料1のみ緩衝材で保護されており試料2については保護されていない状態で届いた。
発送	検査用試料の到着日を火曜日までにしてほしい。
試料	検体量を増やしてほしい。 実施要領に「野菜のポタージュ」とあったので液状になるのかと思ってしまい、必要以上に長時間解凍した。 実施要領に従い流水30分で解凍したが全く解凍できなかった。また、瓶内の試料が解凍しているか目視では判断が難しく、何をもって完全に解凍なのかの不明瞭であったため、解凍作業に苦心した。解凍作業について明確に記載してほしい。
試験操作	原液（野菜のポタージュの直接塗抹）では菌の発育が認められたが、10～10000倍希釈では菌の発育が認められなかった。また、10倍希釈液を70℃20分間で加熱させ、10000倍希釈まで段階希釈をし、同様に検査を実施したが、10～10000倍希釈液では菌の発育は認められなかった。希釈液でも菌の発育が見られるように、菌量を調整してほしい。 今回陽性と判定したNo. 2の検体については、好気培養で若干の発育が見られたが、嫌気培養と比較して、発育が強く抑制されていたことから、No. 2をウェルシュ菌陽性と判定した。 検体No. 2について、直接培養では10倍乳剤に調製した試料0.1 mLを卵黄加CW寒天培地2枚に塗抹したところ、1枚の培地のみに1コロニーの定型的集落の発育が認められた。一方、試料をTGC培地で増菌培養後、その増菌液を塗抹した培地では多数の定型的集落が確認された。確実に検出するためには、増菌培養が必要だと感じた。 No. 2は菌量が想定より非常に多く、パウチ法の培養ではガス産生によりパウチが膨張し、次の操作で危険を感じた。また、単離コロニーを得るのが困難だった。