

Food Safety Department
微生物検査の細菌の動向と信頼性のある試験法
- ペトリフィルム™ 培地を用いた微生物検査法 -



Innovating to
Enable Food Safety
& Protect Public Health

スリーエムヘルスケア株式会社
フードセイフティー製品技術グループ
守山 隆敏

第6回微生物講習会
6月14日 2013年
日本冷凍食品協会

3M

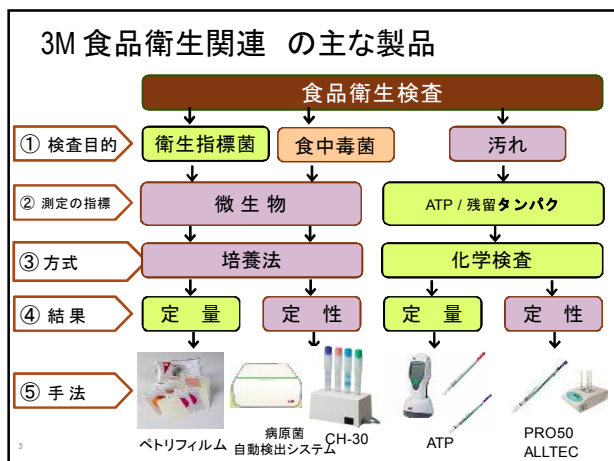
本日の内容

第一部 講義

- ・ 食の安全の最近の動向
- ・ 試験検査の役割と注意点
- ・ 信頼性のある試験法
- ・ 3Mペトリフィルム製品の説明および使用方法

第二部 実習

3M




「食の安全性」とは？

・ 食品衛生の定義

– ‘Food hygiene’ means all measures necessary for ensuring the safety, wholesomeness, and soundness of food at all stages from its growth, production, or manufacture until its final consumption.

– 「食品衛生」とは、成長、生産、製造から最終的なすべての段階において、**安全で、高栄養価、良質な食品を確保**するために必要なすべてを意味します。

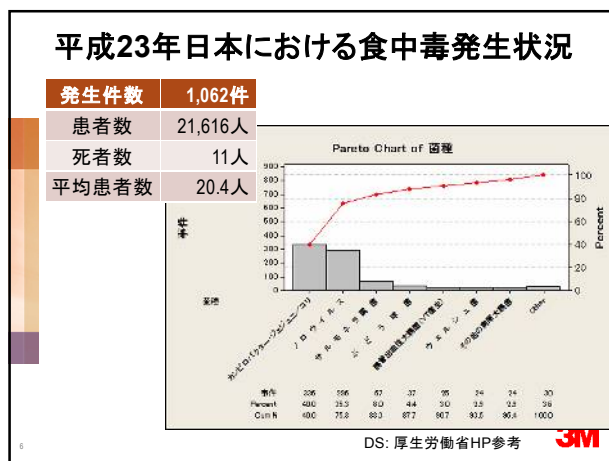


DS: WHO Home Page 3M

食品衛生法 第三条 食品等事業者の責務

食品を供給する事業者は、自らの責任において販売食品等の安全性を確保するため、知識および技術の習得、原材料の安全性の確保、**自主検査の実施等の措置**を講ずるよう つとめなければなりません。

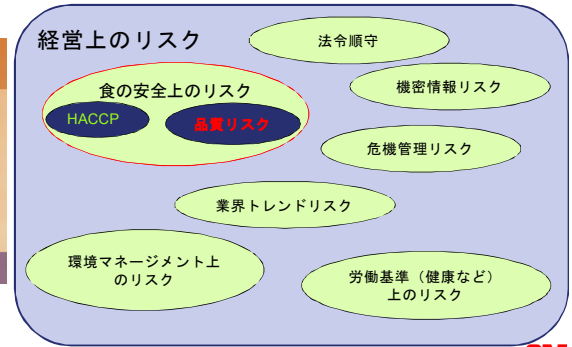
DS: 食品衛生法 3M



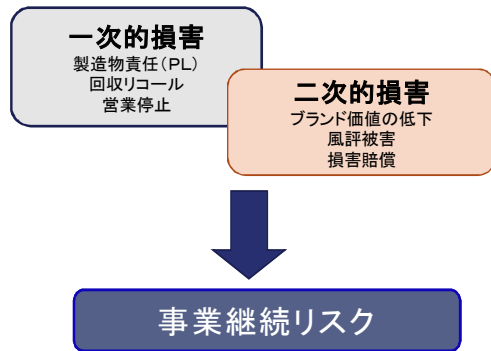
大規模食中毒事例

発生時期	地域	原因食品	原因物質	患者数
1991	堺市	カイワレ大根	腸管出血性大腸菌	7,966
1993	大阪府	三色ケーキ	Salmonella Enteritidis	1,371
1993	北海道	いくら醤油漬け	腸管出血性大腸菌	49
1993	群馬県	卵巾着	Salmonella Enteritidis	568
2000	大阪市	加工乳など	ブドウ球菌	13,420
1999	愛媛県	学校給食	Salmonella Enteritidis	904
1999	青森県	イカ乾燥	Salmonella Oranienburg, Salmonella Chester	1,634
2001	千葉	ローストビーフ	O157	665
2002	福岡	シューアイス	Salmonella Enteritidis	644
2002	高松	給食弁当	Salmonella Enteritidis	725
2002	福島	弁当	Salmonella Enteritidis	905
2005	滋賀県	鮭の塩焼き	ブドウ球菌	863
2007	静岡	仕出し弁当	Salmonella Enteritidis	1,148
2011	北海道	学校給食	Salmonella Enteritidis	1,638
2011	富山	焼肉	腸管出血性大腸菌	181

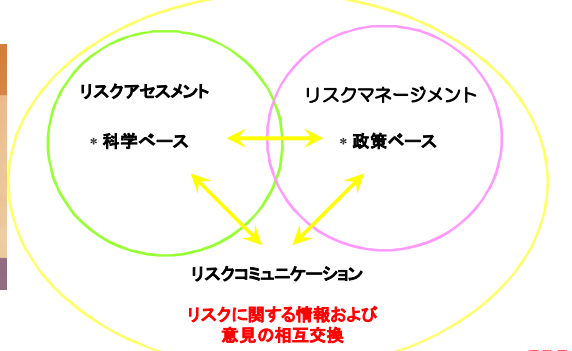
食品会社におけるリスクは？



食中毒による企業損害

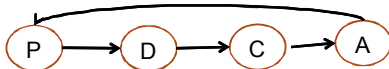


リスクアナリシスとリスクマネージメント

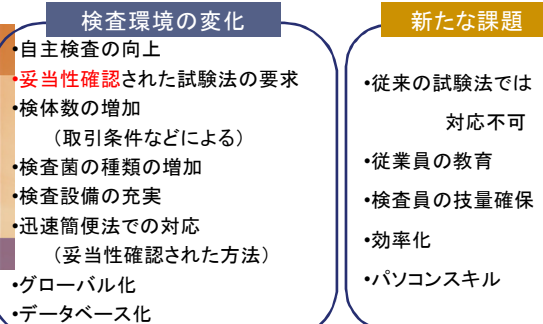


品質リスク/ 食の安全と安心 の考え方

- リスク分析と管理基準の設定
 - サンプリングプラン
 - 環境モニタリング
- 基準値内の管理(SSOP)
- 規格外の早期発見
 - 自主検査による迅速法
- 是正措置とリスクコミュニケーション



微生物検査における環境変化



食品中での微生物制御

■食品製造環境の衛生化

- ✓衛生指標菌によるモニタリング
- ✓食中毒菌によるモニタリング
- ✓ATP, タンパクなどによる迅速モニタリング

■ゾーニングの考え方

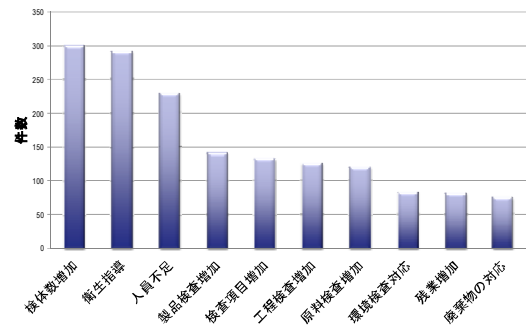
- ✓原材料からの微生物除去と二次汚染防止

食品中における微生物の殺菌または発育阻止

3M

13

現在の課題 n=1170



14

© 3M 2011. All Rights Reserved.

DS: 3M セミナーアンケート結果による

3M

求められる自主検査における検査要件とは？

- 妥当性確認された方法(信頼性)
 - 国際的に通用する方法
- 技量に左右されない方法(簡便)
 - 操作性が良い
 - 測定誤差が少ない
- 時間的に短縮できる方法(時短)

3M

15

微生物の基礎



16

3M

微生物とは？



細菌

カビ

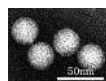
酵母



原生動物



藻類



ウイルス

3M

17

微生物試験の難しさ

- 試料検体についている菌の分布が均一でない
- 菌の種類が多彩であり、条件によっては増殖しにくい
- 試験方法が複雑で、熟練が必要である
- 加熱、冷凍など菌が損傷を受けている(一定でない)
- 試料検体の保存、調製、検査のやり方で結果が違う
- 検査担当者による測定誤差がある

18

3M

主な病原菌の増殖温度			
病原菌	最低温度℃	最適温度℃	最高温度℃
サルモネラ	5	35-37	47
カンピロバクター	30	42	47
黄色ブドウ球菌	6.5	37-40	48
ボツリヌス菌	10		50
セレウス菌	4	30-35	48-50

19

DS:WHO ホームページ

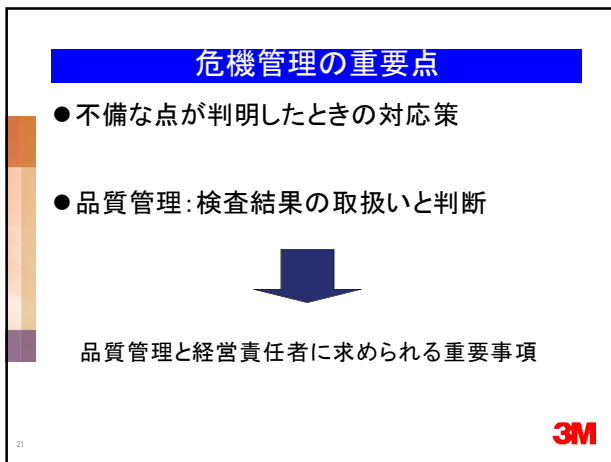
3M

病原菌の死滅 温度/時間による変化			
温度(℃)	時間(分・秒)	温度(℃)	時間(分・秒)
60	43' 29''	73	00' 48''
61	33' 44''	74	00' 35''
62	23' 16''	75	00' 26''
63	17' 06''	76	00' 19''
64	12' 40''	77	00' 14''
65	09' 18''	78	00' 10''
66	06' 49''	79	00' 06''
67	05' 01''	80	00' 05''
68	03' 43''	81	00' 04''
69	02' 43''	82	00' 03''
70	02' 00''	83	00' 02''
71	01' 28''	84	00' 02''
72	01' 05''	85	00' 01''

20

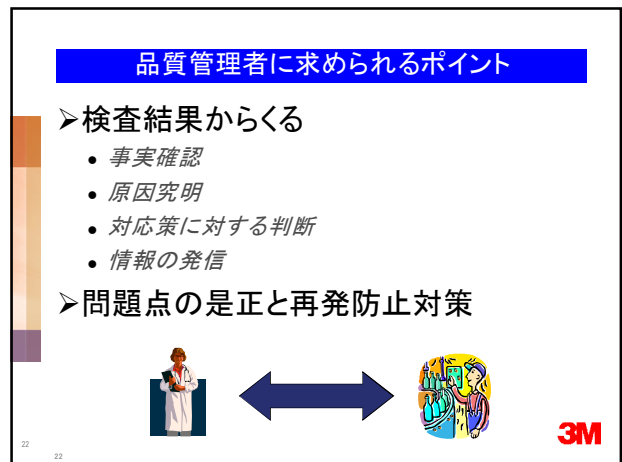
DS:WHO ホームページ

3M



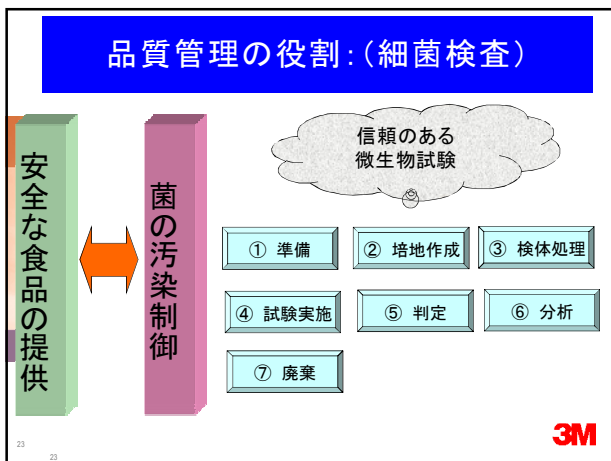
21

3M



22

3M



23

23

3M



24

3M

微生物試験(衛生管理)の目的

1. 原材料、製品の衛生管理

1. 原材料の受け入れ検査
2. 製品の衛生(微生物汚染)状態の確認、出荷判定

2. 製造工程の衛生管理

1. CCP(重要管理点)の管理
2. 製造工程の洗浄消毒後の管理(洗浄確認)
3. 製造環境工程の微生物汚染状態の把握と分析
4. 洗浄消毒剤の効果確認

3M

試験方法を選択するときの注意点

1. 試験の目的を明確にする
2. 採用する試験法の特性を理解する
3. 適切な試験法(定性、定量、感度など)
4. 妥当性確認された試験法であること
5. 試験法が対象とする食材に適しているか
 1. 食品成分(添加物含む)
 2. 夾雑菌
 3. pH
 4. 色

3M

試験方法を選択するときの注意点

試験の目的に適した方法を使用すること

- 行政による試験(食中毒など法的処置がからむ場合で指導は除く)
 - ・ 規格基準に定められた方法(公定法)
- 行政による指導、モニタリング検査
 - ・ 公定法にこだわらない
- 海外との取引(国際的に認証されている方法)
 - ・ AOAC OMA、AFNOR(ISO)など
- 標準となる試験法
 - ・ 標準試験法(進行中)
 - ・ FDA BAM、ISO試験法
- 参考となる試験法
 - ・ 指針、注解:食品衛生検査指針、衛生試験法
- 食品企業における自主衛生管理
 - ・ 迅速簡便法:妥当性確認された方法(AOAC OMA、AFNORなど)

3M

試験法の考え方

施設	目的	公定法	簡便法 (妥当性確認)
検疫所、登録検査機関、保健所、衛生試験所	行政としての試験(食中毒など法的処置がからむ場合)	◎	X
登録検査機関、保健所、衛生試験所	食中毒の原因追及のための検査	◎	◎
保健所	モニタリング検査	◎	◎
登録検査機関	企業からのルーチン検査	◎	◎
食品事業者	ルーチン検査・自主検査	◎	◎

3M

注意

細菌検査室における注意点

- 検体の取り扱いに関する問題
 - 細菌の増殖の防止や死滅の確認
- 培地等保管、調製に関する問題
 - 培地成分変質防止、再加熱による変質
- 特徴的器具装置に関する問題
 - 汚染防止、滅菌や培養温度の確認
- 検査実施に関する問題
 - 汚染防止、確実な判断、計算

精度管理講習会(三田)より抜粋

3M

注意

検査失敗の原因(1)

- 検体の分類把握の問題:液体、半固体、粉末、固体
- 検体採取方法の問題:採取量、最終箇所
- 検体運搬中の問題:温度管理、時間管理
- 検体保管中の問題:温度管理、時間管理
- 検体の処理方法の問題:処理時間
- 検体自身の問題:pH、色、保存量など
- 検体採取ロット数の問題:n数

3M



失敗の原因(2)

- 培地および試薬の品質の問題
- 試験法そのものの問題
- 使用機器類のキャリブレーションの問題
- 検査担当者の問題
 - ・ 基本的技術と経験不足
 - ・ 理解力と判断力
 - ・ 計算ミスと報告ミス
 - ・ 疲労



培地に関する注意点(粉末培地)

- 開封前の保管 : 温度、湿度、光、期間
- 開封後の保管 : 温度、湿度、光、期間
- 調製時の確認 : 配合、計量、pHの確認
- 調製後の保管 : 温、湿度、光、期間取り違い
- 滅菌時の確認 : 滅菌の有無・温度、成分変質の有無
- 使用時の確認 : 汚染防止、再加熱変質防止
- 使用後の廃棄 : 適切な廃棄 ペトリフィルムは青のみ



pH調整は何のために行うか？

細菌の大部分はpH6~8の間でよく増殖するために、通常培地は7.0~7.6に調整する。

培地のpH調整には 通常

- ・ 1N水酸化ナトリウムまたは1N塩酸を用いる。



適正測定範囲とは？

測定誤差: 食品検査において、培地、培養温度、培養時間、試験方法によって測定値に誤差が生じます。希釈試料液中の菌の分布はピペット操作でも誤差が生じます。その為に、どの分布のものの菌数のプレートを数えればよいのか適正な測定範囲があります。

⇒ 信頼性のある範囲

万一、適正範囲のプレートが無い場合には、それ以下あるいは以上のプレートで測定します。



試料調製の注意点

1. 無菌操作
 1. 外部からの菌の混入が無いこと
 2. 外部への汚染が無いこと
2. 均一化
 1. 検体採取方法および検体量
 2. ホモジナイザーの時間
3. 適した希釈液の使用
4. 迅速性
 1. 検体の保管条件 (0-4℃ 36時間以内: 国際的基準)



試料の採取と調製方法

- 液状検体
 - 容器ごと約30cmの振幅で7秒間で25回混合し、混合後3分以内に内容物の一定量を採取する
- 粘度の高い半流動状
 - 容器を無菌的に開封し、滅菌スプーンなどで内容物を良くかき混ぜた後、原則として25g、均一化が容易にできるものは10gでも可能
- 粉末状
 - 液状に準じて混合するか、または、容器を無菌的に開封後、滅菌スプーンなどで内容物をよくかき混ぜて原則25g採取。均一化が容易に出来る場合には10gでも可能。
- 固形状
 - 滅菌した鋏、ピンセットなどを使用して、できるだけ細かく切断し、混合した後一定量を採取する。できるだけ25g採取。出来ない場合には10gでも可能
 - 秤量から希釈試料液の調製までの所要時間は15分以内に終了させる



検査における重点項目

- 製品サンプリングの考え方
- 原材料のサンプリングの考え方
- 中間製品のサンプリングの考え方
- 製品サンプル保管の考え方
- 手指のふき取り検査の考え方

3M

技能上でのポイント

- 決められた試験手順および条件に従う
- 試験法への慣れ
- 試験計画
 - 材料の準備
- 記入ミス、計算間違いの注意
- 測定ミス
- 結果の判断
- 技能試験(クロスチェック)参加のお勧め

3M

細菌検査技能評価試験(クロスチェック)

- 目的：食品事業者における細菌検査の実施に対し、検査業務上細菌検査技能の向上と精度の確保をすることを目的としている。

3M

クロスチェックを行う上での注意点

- 検体試料の取り方
 - 包装容器の各部位から万遍なく採取する
 - 食品のマトリックスによる違い
- 希釈後の十分な攪拌
- 検体試料の取扱い
 - 「冷蔵した菌を室温に戻してから接種」と「冷蔵した菌を取り出して直ちに接種」とでは菌の状態が違いがある。← 前者で対応

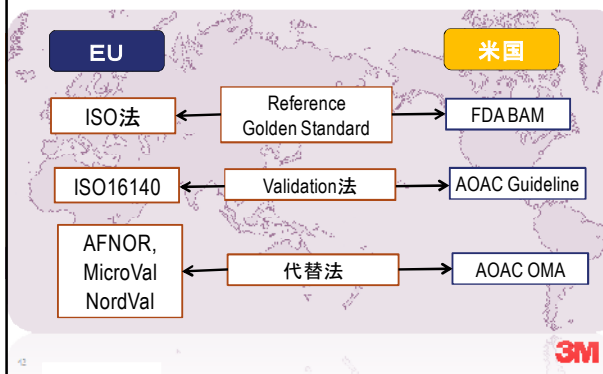
3M

妥当性確認(バリデーション)された試験法

- 海外におけるバリデーションされた試験法の考え方
 - Standard Method: 標準法・参照法
 - US: FDA BAM
 - EU: ISO
- ISO16140などバリデーション方法に基づいて検証
- 代替法として採用

3M

世界での参照法/標準法と試験法認証機関



3M

微生物試験法のバリデーション (AOACI OMAガイドライン)		
区分	定性的試験法	定量的試験法
参加 本数	10ヵ所以上	8ヵ所以上
試料の 種類	・食品全般を対象とした試験法の場合は、規定の食品カテゴリー(9 区分)のうち6 カテゴリーから試料を選定 ・特定の食品カテゴリーのみを対象とした試験法の場合は、当該カテゴリーから試料を選定	
試料数	種類ごとに①～③の試料を6個ずつ調製 ① 陰性試料(未接種) ② 低レベル接種試料(ex.1-5 cfu/25g) ③ 高レベル接種試料(ex.10-50cfu /25g)	種類ごとに①～④の試料を4個ずつ調製 ① 陰性試料(未接種) ② 低レベル接種試料(検出限界の菌数) ③ 中レベル接種試料(②の約10倍の菌数) ④ 高レベル接種試料(②の約100倍の菌数)
	微生物を接種した試料ではなく、自然汚染試料を用いる場合あり	
評価 パラメ ータ	・感度(Sensitivity)、特異性(Specificity)、偽陰性率(False negative rate) ・偽陽性率(False positive rate)、繰り返し精度(Repeatability) ・室間再現精度(Reproducibility)、相対標準偏差(Relative standard deviation)	

海外における試験法の妥当性確認(EU)	
評価機関	AFNOR(フランス), MicroVal(オランダ), NordVal (ノルウェー)
評価方法	ISO16140に従う
評価基準 の試験法	ISO が規定する試験法
評価結果	認定書に要約が記載
適用	各評価機関のWeb上に認定書が公開 国際規格法と同等な代替法 として採用

海外における試験法の妥当性確認(その他)	
AOAC セクション	カナダ、日本、ドイツ、中国、ベルギー、タイ、台湾、
AOACの考え方を取り入れている国(事例)	日本、中国、台湾、タイ、韓国など
ISOの考え方を取り入れている国事例	EU、日本、ベトナム、ブラジルなど

情報

新検査法で3日短縮 12月から — pekinshuho

1/2 ページ

北京週報

日本版

www.pekinshuho.com

本電子版はデフォルトで英語に設定されています

中国語版

ホーム 政治 経済 国際 中国と日本 記者会見 社会 文化 観光 スポーツ 文藝・娯楽 法律・法規 中日関係

関連ニュース

輸出入食品検査、新検査法で3日短縮 12月から

国際的に用いられる、食品に含まれる微生物の検査法「3Mペトリフィルム」が12月1日から、中国の輸出入食品検査検査・安全検査に基準基準の一つとして採用される。「新聞晩報」が伝えた。

この検査方法により、乳製品、畜産物、肉製品などの各種食品輸出入の際に、細菌数、大腸菌、黄色ブドウ球菌、乳酸菌などの検査時間が3日～5日短縮できる。

「人民網日本語版」2007年9月25日

Petrifilm™ Status of Validation					
Petrifilm Plate	対象菌種	AOAC OMA	AOAC RI	AFNOR	NordVal
AC Plate	好気菌(生菌数)	●		●	●
CC Plate	大腸菌群数	●		●	●
RCC Plate	大腸菌群数迅速測定	●		●	●
HSCC Plate	高感度大腸菌群数測定	●		●	●
EC Plate	E.coliおよび大腸菌群数測定	●		●	●
SEC Plate	E.coli数測定用	●		●	●
EB Plate	腸内細菌数測定	●		●	●
STX Plate	黄色ブドウ球菌数測定用	●		●	●
EL Plate	リステリア環境測定用	●	●	●	●
YM Plate	カビ・酵母数測定用	●		●	●

