

食品の微生物基準をめぐる国際情勢と 試験法の妥当性確認の重要性



国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部長

い ぎ み し ず の ぶ

五十君 静信

igimi@nihs.go.jp

日本冷凍食品協会第2回微生物標準試験法セミナー
2015.6.4 新大阪ブリックビル 3階会議室D

生食肉の規格基準、実は画期的

- ◆コーデックスの求める基準設定のガイドライン(2007)に基づいて作成された国内で最初の規格基準
- ◆数的指標(Metrics)を導入した規格基準
- ◆数的指標を確定するため、リスク評価により科学的根拠のある数値の算出と公衆衛生目標との関連
- ◆腸内細菌科菌群試験法(国際スタンダード)の導入
- ◆検証のための微生物検査に、サンプリングプランを導入
- ◆規格の対象となった食品の特殊性: 対象となった食品は食べる部分を直接加熱殺菌できない食品

食品の微生物基準設定に関連する国際情勢

食品の国際基準としてのコーデックス

国際基準の決め方

リスク評価を基にした微生物学的基準の設定

各国の規格基準設定のためのガイドライン(2007年)

微生物学的リスク評価による科学的根拠

数的指標Metricsの導入

公衆衛生指標(ALOP)との関連づけを望む

SPS協定とは？

WTO協定の1つ

食品安全、動植物の健康に関するすべてを対象

- 食品の安全
 - Codex委員会が制定した基準、勧告、ガイドライン
- 動物の健康、人畜共通伝染病
 - 国際獣疫事務局（OIE）による基準、勧告、ガイドライン
- 植物の健康
 - 国際植物防疫条約事務局（IPPC）の下で作成された基準、勧告、ガイドライン

コーデックス委員会とは

- コーデックス委員会“Codex Alimentarius Commission”は、食品の**国際規格**を設定する機関
- 国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)が1963年に共同で設立した合同食品規格委員会
- 食品の国際規格・基準(Codex規格)を策定
 - A) **食品の安全に関する基準**
消費者の健康を保護することを目的とする
 - B) **食品の品質に関する規格**
公正な貿易を促進することを目的とする

加盟国は184カ国+EU、日本は1966年から参加

コーデックスにおける科学の役割

- コーデックスの食品基準”Codex food standards”やガイドライン”guidelines”などは科学的な根拠や手法に基づいていなければならない
- 科学的根拠となるのは
 - FAO / WHO専門家会議(Microbiological Risk Assessment)
 - 学術団体”Scientific community”
 - 科学を基礎とする国際組織 (国際獣疫事務局”OIE”など)

微生物学的リスク管理のための「数的指標 (Metrics)」の導入(コーデックス委員会)

- 数的指標Metricsの導入
 - FSO (Food Safety Objectives)(摂食時安全目標値)
摂食時点での微生物学的目標値
 - PO (Performance Objectives)(達成目標値)
フードチェーンのより上流での微生物学的目標値
 - PC (Performance Criteria)(達成基準)
例: 4対数個減少 する処理
- 微生物学的リスク評価を用いた、食品中の数的指標と公衆衛生指標(リスク、ALOP)との関連付けが望ましい

Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Management and its annex on Guidance on Microbiological Risk Management Metrics (CAC/GL 63- 2007)

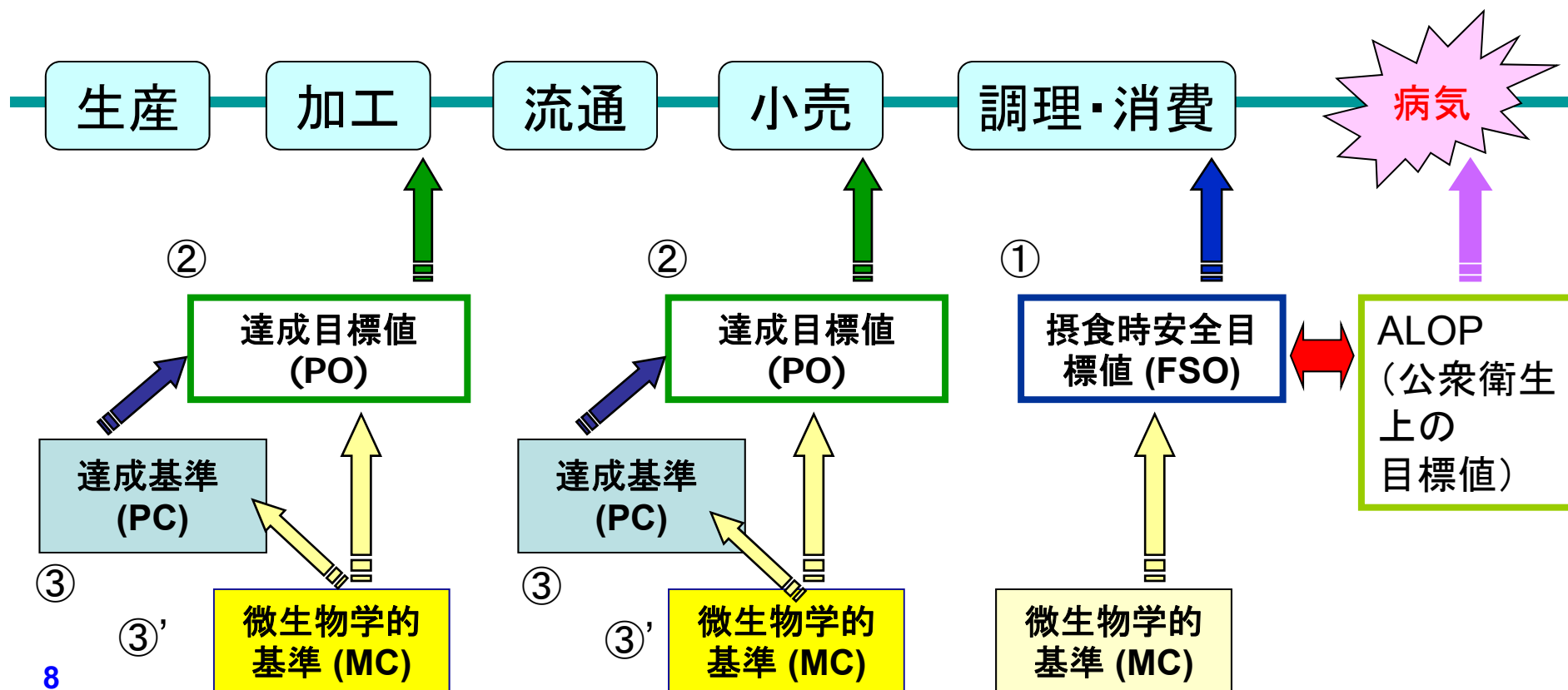
数的指標(FSO, PO, PC)から微生物学的基準 (Microbiological Criteria)設定への流れ

(CAC/GL 63- 2007より)

FSO: Food Safety Objective (摂食時安全目標値)

PO: Performance Objective (達成目標値)

PC: Performance Criterion (達成基準)



新たな規格基準を設定するためには

- 当該食品と関連する微生物に関するリスクプロファイルの作成とリスク評価項目の決定
- 科学的根拠のあるリスク評価を実施
- リスク評価の結果を受けて、リスクマネジメント方法を検討
- 数的指標(FSO, PO, PC, MC)を用いたマネジメント方法の決定
- 新たな規格基準案の設定
- WTOへの通報と、指摘に対する対応

生食用食肉の衛生基準(平成10年)

- 平成10年9月、食品衛生調査会(当時)の答申を受けて、通知により、事業者による適切な衛生管理を指導
 - 牛又は馬の肝臓又は食肉を対象
 - 成分規格目標として、糞便系大腸菌群及びサルモネラ属菌を陰性と規定
 - 加工基準目標又は調理基準目標として、器具の洗浄消毒、トリミング、調味等について規定

生食用食肉の規格基準検討の経緯

- 6月28日 } 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
- 7月6日 } 食中毒・乳肉水産食品部会
- 7月8日 食品安全委員会に食品健康影響評価の
依頼
- 7月25日～8月23日 パブリックコメントの募集
- 8月25日 食品安全委員会から食品健康影響評価
結果の通知
- 8月31日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
- 9月21日 規格基準の公布、自治体あて説明会
- 10月1日 施行

生食用食肉のリスクプロファイル作成

- 平成10年の衛生基準においては、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター、リステリア等について危害評価を行い、糞便系大腸菌及びサルモネラ属菌を管理
- 今回の規格基準の検討にあたり、危害となりうる病原体について、枝肉・市販の食肉等における汚染実態及び過去の食中毒事例を整理した

生食用食肉の危害が想定される微生物

□牛

腸管出血性大腸菌、(病原大腸菌)、サルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ／コリ、リステリア、黄色ブドウ球菌、クロストリジウム属菌(ウェルシュ菌、ボツリヌス菌)、セレウス菌、寄生虫(ザルコシスティス・ホミニス、無鉤条虫、トキソプラズマ)

□馬

腸管出血性大腸菌、(病原大腸菌)、サルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ／コリ、リステリア、黄色ブドウ球菌、クロストリジウム属菌(ウェルシュ菌、ボツリヌス菌)、セレウス菌、エルシニア・エンテロコリチカ、寄生虫(トリヒナ、ザルコシスティス属)

生食用食肉(牛肉)の危害評価

危害微生物	生体からの分離	枝肉からの分離	市販生肉からの分離	食中毒事例	その他	評価結果
腸管出血性大腸菌	中程度	稀～少ない	稀	有	2～9個／人の摂取で食中毒事例報告あり	高い
サルモネラ属菌	少ない	稀～少ない	稀～少ない	有	100個／人程度の摂取で食中毒事例報告あり	高い

→これらの微生物を対象に規格基準設定の検討が必要

生食用食肉（馬肉）の危害評価

危害微生物	生体からの分離	枝肉からの分離	市販生肉からの分離	食中毒事例	その他	評価結果
腸管出血性大腸菌	稀	無	—	無	2～9個／人の摂取で食中毒事例報告あり	低い
サルモネラ属菌	有	無	稀	無	100個／人程度の摂取で食中毒事例報告あり	低い

→衛生基準による管理が適当

（寄生虫のザルコシスティス属については調査研究途上）

薬事・食品衛生審議会食中毒・乳肉衛生食品合同部会

(1)規格基準の対象となる動物・部位

→牛の食肉(内臓を除く)

馬の食肉については、引き続き衛生基準により管理

(2)規格基準の対象となる微生物

→腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌

(これらの微生物を含む腸内細菌科菌群を指標菌として採用)

(3)規格基準設定の考え方

→コーデックス委員会の考え方を適用

腸管出血性大腸菌による死者数(年間1~9人)を1人未満
とすることを目標に検討

汚染濃度を4対数個低減する加工方法を検討

(4)加熱による微生物低減効果の検討

→熟成が進むとより深部(1cm以上)に菌体が浸潤

牛肉表面1cm下の60℃・2分加温保持により、(3)を達成することが可能

生食用食肉基準の摂食時安全目標値(FSO)の設定

- 腸管出血性大腸菌による死者数

年	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
人口動態統計	1	7	5	7	3	4	7	6	4	5
食中毒統計	0	1	0	9	1	0	0	0	0	0

- 牛切り落とし肉における腸管出血性大腸菌汚染濃度
O157として、5~40 cfu/g（幾何平均14 cfu/g）
(Carney E. *et al.*, 2006)
- 死亡率が平均汚染濃度（対数値）と比例すると仮定
- 死者数を年1人未満とすることを目標とし、さらに安全係数100を取ると、
 $14 \div 10 \div 100 = 0.014 \text{ cfu/g} (= 1 \text{ cfu/70 g})$
⇒ これを腸管出血性大腸菌のFSOとする
- 独自のデータがないため、サルモネラ属菌についても同じとする

生食用食肉基準の達成目標値(PO)の設定

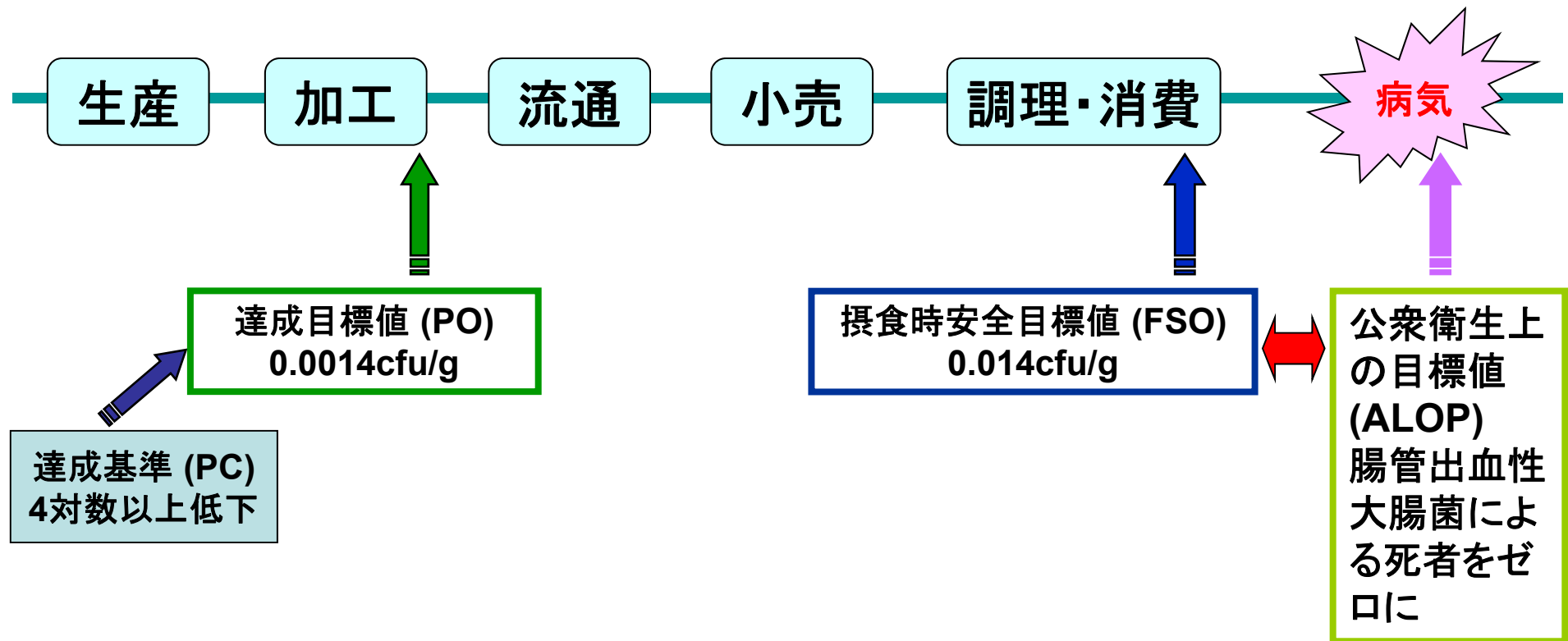
- 飲食店でスライスする際、二次汚染や温度管理の不備による増殖を、完全には防げないことを想定
- むしろ、二次汚染による菌数の増加が起こることを想定
- POはFSOの10分の1とする
- すなわち、
$$0.014 \div 10 = 0.0014 \text{ cfu/g}$$

⇒ これを腸管出血性大腸菌ならびにサルモネラ属菌のPOとし、フローチャートの加熱工程終了後の段階に適用するものとする
- POは、当初汚染濃度 14 cfu/g からは、4対数個低い濃度となる(すなわち、PC = 4 対数個以上減少)

厚労審議会
配付資料より
原図: 春日文子

生食肉の基準における数的指標 (FSO, PO, PC) の設定

FSO: 摂食時安全目標値: 腸管出血性大腸菌 0.014 cfu/g
PO: 達成目標値: 腸管出血性大腸菌 0.0014 cfu/g
PC: 達成基準 4 対数個以上減少



微生物学的基準 (MC)

Principles for the Establishment and Application of Microbiological Criteria for Foods (CAC/GL 21-1997)

- 原則的に:食品製品あるいはあるロットの合否を規定するもの。特定の試験法とサンプリングプランの使用条件下で認められる微生物濃度と汚染頻度
- 考慮される要素:
 - 微生物(毒素)
 - サンプリングプラン(二階級法・三階級法、1ロットあたりの検体数、基準値、基準値を超してもロットを合格とする検体の数)
 - 検査単位(一検体あたりの重量あるいは容量)
 - 試験(検出)法
 - フードチェーンにおいて適用される箇所

厚労審議会
配付資料より
原図:春日文子

サンプリングプラン

- 二階級法 (Class 2) サンプリングプラン

n: 1ロットからランダムに取り出される検体の個数

m: 基準値

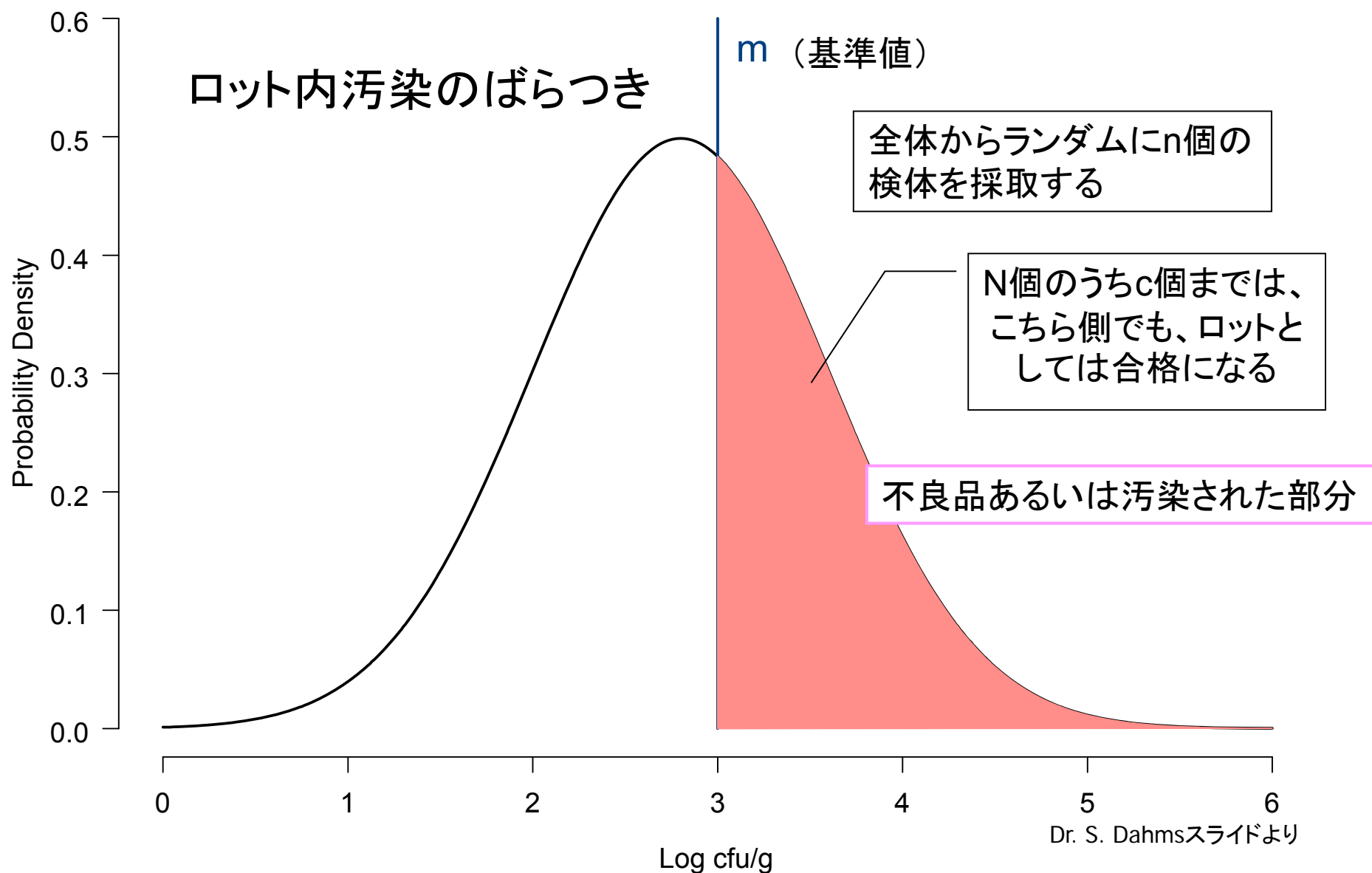
c: ロットを合格と判定する基準となる不良検体の個数
(nのうち、mを超えてもよい検体数)

- 三階級法 (Class 3) サンプリングプラン

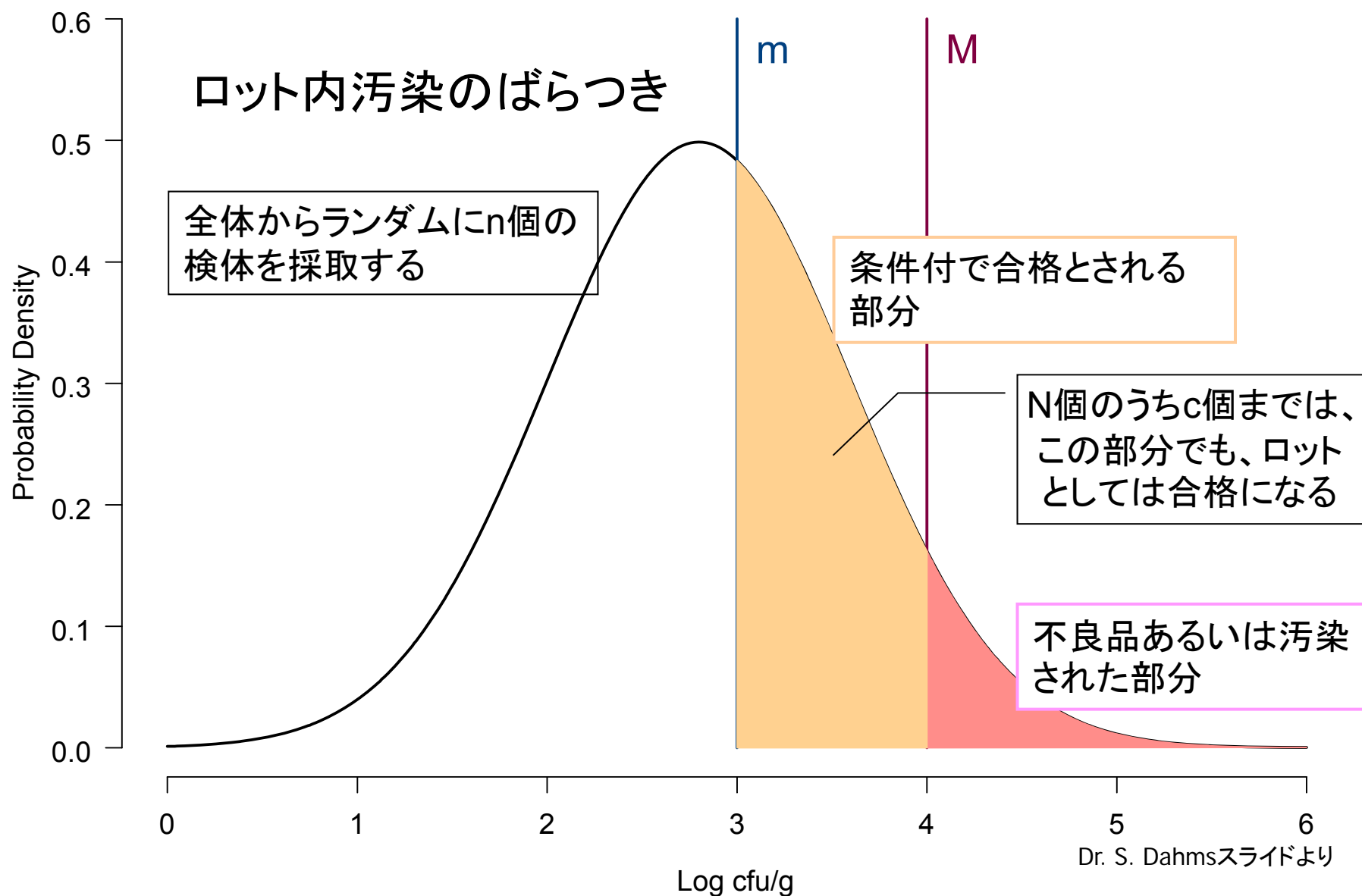
n, c, mに加え

M: 条件つき合格と判定する基準となる菌数限界、それ以上の菌数是不許可

二階級法サンプリングプラン



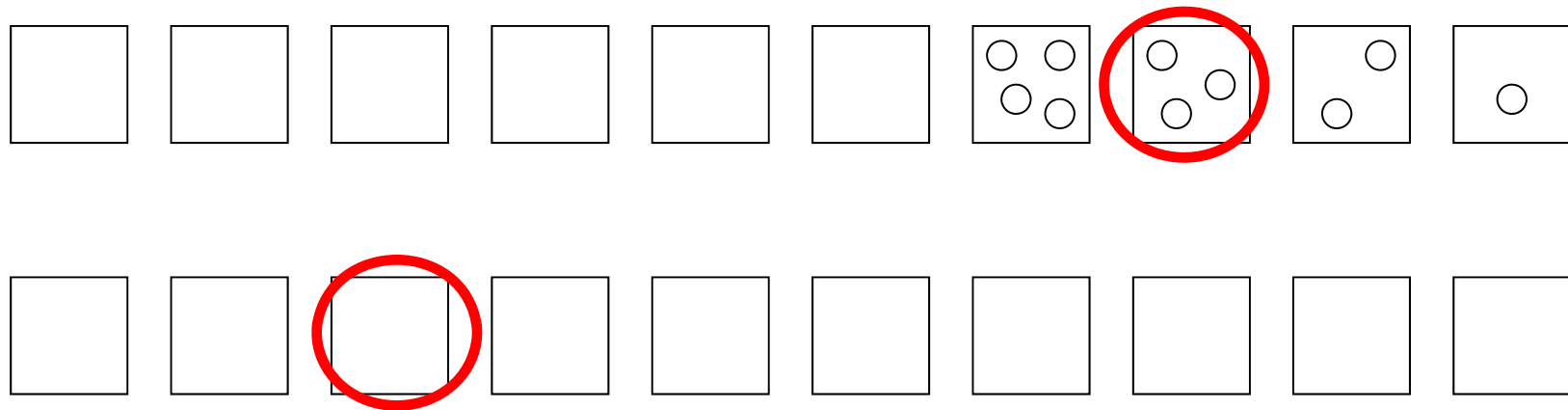
三階級法サンプリングプラン



Dr. S. Dahmsスライドより

厚労審議会配付資料より

検査結果の意味すること



微生物の汚染は偏在しているため、汚染のない部分から検体が採取されると、そのロットは陰性として、汚染が見逃されることになる

食品衛生における微生物試験法の要点

- ◆微生物学的基準(MC)では
試験法はISO法、または同等の感度、再現性、信頼性などが、妥当性確認された方法を採用する
- ◆国内の試験法は
ISO法に準拠するか、**妥当性確認**が行われていると
国際的に認知される試験法の整備が急務

微生物学的基準(MC)の検討

- 対象となる病原微生物は、次の2菌種
腸管出血性大腸菌
サルモネラ属菌
- サンプリングプランとして、2階級法を採用しよう！
- 検査単位は、ひとまず25gとしよう！
- ロット内汚染の標準偏差を $1.2 \log \text{cfu}$ と仮定し、サンプリングプランを検討
PO:0.0014cfu/gは、n=100以上でも、検証不能!!
- 試験法は、どうしよう？
腸管出血性大腸菌.....
サルモネラ属菌....

基準設定は不可能かもしれない

微生物学的基準(MC)の設計

- 腸内細菌科菌群：腸管出血性大腸菌を
100:1 と仮定
⇒ POは、腸内細菌科菌群 として
 $0.0014 \text{ cfu/g} \times 100$
 $= 0.14 \text{ cfu/g} = -0.85 \log \text{ cfu/g}$
- MCはPOが満たされているかを確認するための微生物検査の規格
- MCにより、最も汚染されているロットでも、その
97.7% (標準偏差の2倍値) が、腸内細菌科菌群として
 $-0.85 \log \text{ cfu/g}$ を超えないようにする
- ロット内汚染の標準偏差を $1.2 \log \text{ cfu}$ と仮定
- すなわち、最も汚染されているロットの汚染平均値 (μ) は、 $-0.85 - 2 \times 1.2 = -3.25 \log \text{ cfu/g}$

VRBG寒天培地と大腸菌群(coliforms)用培地比較

	VRBG	VRBL	デソ(大腸菌群)
ペプトンなど	7.0 g	7 g	10 g
酵母エキス	3.0 g	3 g (Yeast Ext.)	—
胆汁酸塩	1.5 g	1.5 g	—
デソキシコール酸Na	—	—	1 g
ブドウ糖	10.0 g	—	—
乳糖	—	10 g	10 g
NaCl	5.0 g	5 g	5 g
クエン酸鉄アンモン	—	—	2 g
リン酸一カリウム	—	—	2 g
ニュートラルレッド	0.03 g	0.03 g	0.033g
クリスタルバイオレット	0.002 g	0.002 g	—
寒天	9 ~ 18 g	12 ~ 18g	15 ~ 25g
精製水	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
pH	7.4 ± 0.2	7.4 ± 0.2	7.3 ~ 7.5
記載	ISO 21528-1	ISO 4832	乳等省令 (アイスクリーム類)

食品の微生物試験法の要点

◆国際的な食品の微生物基準設定

リスク評価→適切な保護の水準

→食品安全目標→ →微生物基準

◆微生物基準では

試験法はISO法、または同等の感度、再現性、信頼性などが、妥当性確認された方法

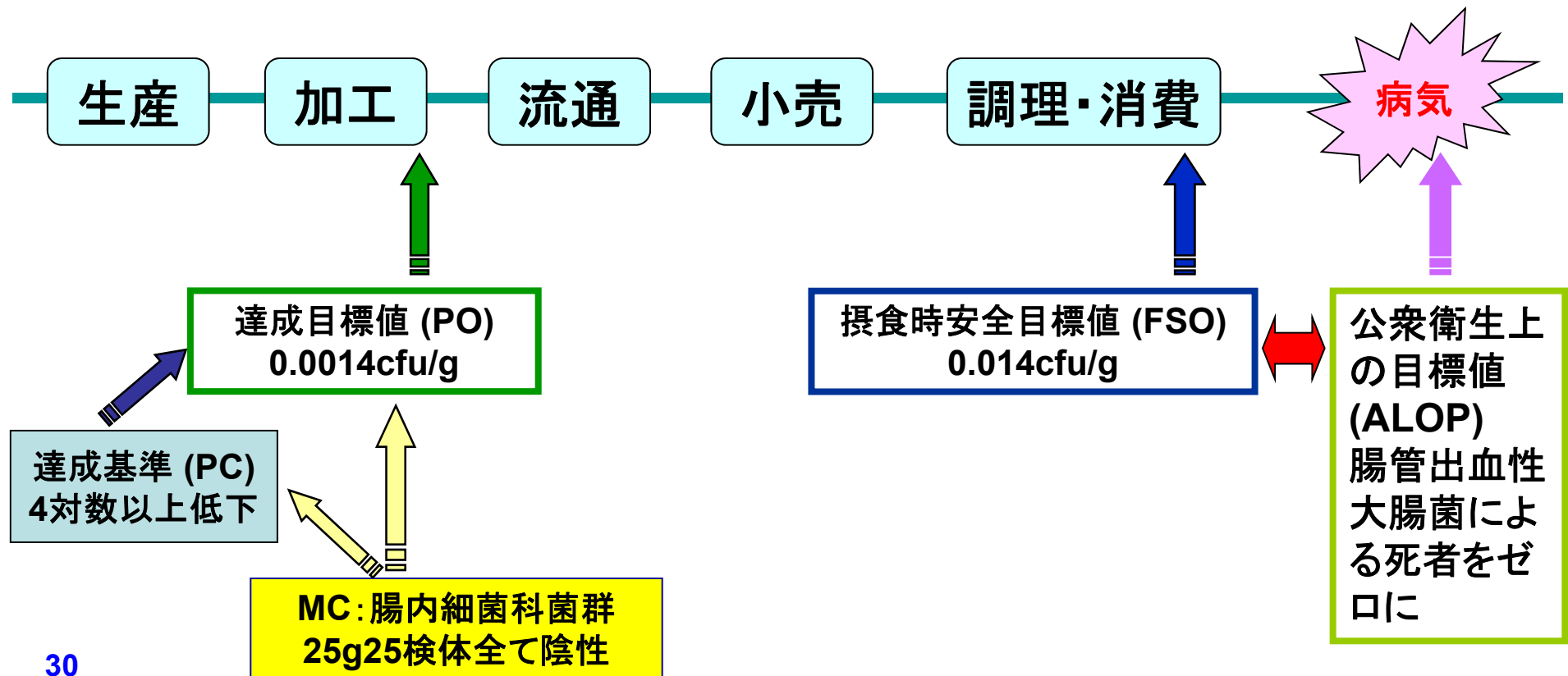
◆国内の試験法は

ISO法に準拠するか、妥当性確認が行われていると国際的に認知される試験法が必要

迅速・簡便法導入に有用な妥当性確認システム構築

生食肉の基準における数的指標(FSO, PO, PC)から微生物学的基準 (MC)の設定

FSO: 摂食時安全目標値:腸管出血性大腸菌 0.014 cfu/g
PO: 達成目標値:腸管出血性大腸菌 0.0014 cfu/g
PC: 達成基準 4 対数個以上減少



生食用食肉規格基準(平成23年10月1日施行)

◆対象となる食品

生食用食肉として販売される**牛の食肉(内臓を除く)**

〔ユッケ、タルタルステーキ、牛刺し、牛タタキなど〕

◆管理の対象となる微生物

腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌

〔成分規格の指標として、腸内細菌科菌群とする〕

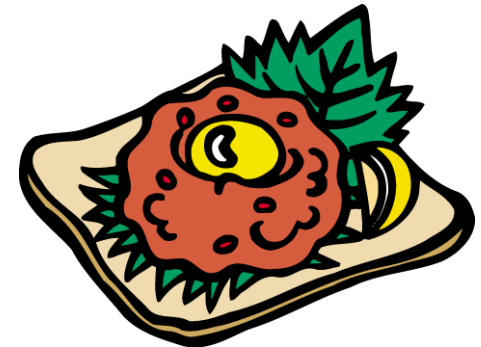
◆加工基準

枝肉から切り出した後、速やかに**加熱殺菌**を行う

◆保存基準

冷蔵4℃以下、凍結－15℃以下で保存

◆調理基準



加工基準のポイント

- ◆肉塊が接触する設備は専用のものであるとする
- ◆認定生食用食肉取扱者(適任と認める者)をおく
- ◆加熱殺菌による加工基準
 - 熟成を経ず、加熱殺菌までの処理を速やかに行う
 - 肉塊を容器包装に入れて密封し、温浴加熱処理
 - 肉塊の表面から1cm以上、60℃、2分間以上
- ◆殺菌の検証
 - 25gずつ25検体以上の検査を定期的実施
 - 検査では腸内細菌科菌群検出されない
 - 年1回以上行い、記録を保存



数的指標を導入した初めての微生物規格 基準は何をもたらしたか

1. 数的指標を導入した規格基準作りでは、基準を作成するために必要な科学的根拠を明確にする必要がある
危害分析、リスク評価などシステムの整備
2. 数的指標(FSO, PO, PC)の設定により、微生物学的基準(MC)におけるサンプリングプランと、国際的に認知される試験法の考え方の導入が進んだ
標準試験法、バリデーション、精度管理の重要性
3. 数的指標に対応した高い精度の工程管理が求められ、科学的根拠のある微生物管理が求められる

牛レバーの生食禁止 (H24年7月)

- 牛肝臓からは大腸菌やカンピロバクターが検出され、腸管出血性大腸菌も同様な状況と考えられる
- 表面汚染ではないため、汚染除去が困難
- 食べたいという要望の署名活動 ― 生食は文化！
- 他の方法が難しいのならば、可能性のある放射線殺菌についても検討すべきではないのか
- 平成24年度開始の研究班により、生レバーの生食の可能性について検討を行った

Codexのリステリア微生物基準

対象となる食品

非加熱喫食食品 (ready-to-eat (RTE) foods)
いずれの工程における検査に対しても同様

①消費期限内増殖の見られないRTE

$n=5$, $c=0$, $m=100\text{CFU/g}$, Class Plan 2

②増殖の認められる場合RTE

$n=5$, $c=0$, $m=25\text{g}$ から非検出, Class Plan 2

③菌の挙動に関する科学的評価を行ったRTE

行政当局の科学的根拠のある検討により微生物基準を設定することができる

各国のリステリアの管理体制

- 規制する対象となる食品

非加熱喫食食品いわゆるready-to-eat食品

- 規格、基準の基本

食品中から検出してはならない(アメリカ)

年間500人の死者、致死率の高い感染症で集団発生もたびたび経験、
リステリアは低温増殖性があり食品流通時の増菌により摂取直前の
最終的な菌数を担保できない

一定菌数までの存在を認める(ヨーロッパ、カナダ)

多くの食品が汚染されているといっても実際は低い菌数で、この程度の
菌数を摂取しても健康上の問題はなく、いわゆるゼロトレランスは現実
的でない。EU諸国でも、乳製品については25g中に検出不可

国内の基準策定まで

- 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会で、規格基準策定の検討が必要
- 厚生労働省から食品安全委員会へ、リスク評価依頼
- 食品安全委員会微生物・ウイルス専門調査会で、リステリアに関する食品健康影響評価

2012年 2/8、2/28、6/4、7/17、10/19、11/29

2013年 1/17、4月にリスク評価終了

2014年 4月厚労審議会基準として了承
12月基準として通知

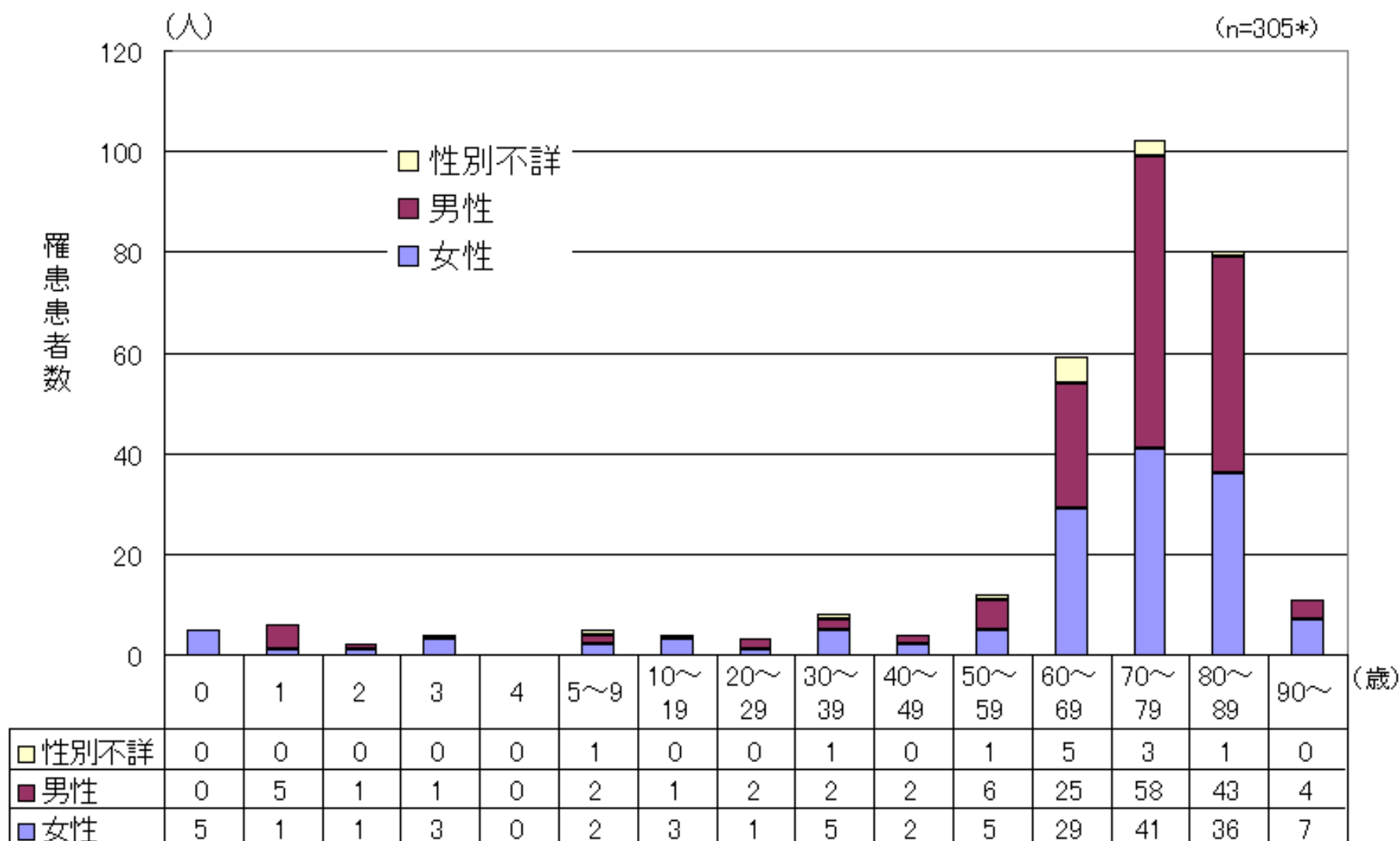
表 1. 推定リステリア症罹患率と JANIS 検査部門集計対象医療機関の年次推移

	2008 年	2009 年	2010 年	2011 年
推定罹患率 (/100 万人・年)	1.06	1.38	1.58	1.57
推定リステリア症患者数(人)	135.2	176.0	202.1	200.9
JANIS リステリア患者数(人)	49	65	84	109
集計対象医療機関数	426	480	483	579



Infection Agents Surveillance Report

図1. 年齢群、性別リステリア症罹患患者数 2008～2011年



*年齢不詳であった2例は集計から削除

リステリア症発症予想 (リステリア1個食べると)

- **FAO/WHO-(JEMRA) 2004年**

健康成人 2.37×10^{-14}

(ID₅₀ $\sim 3.0 \times 10^{13}$)

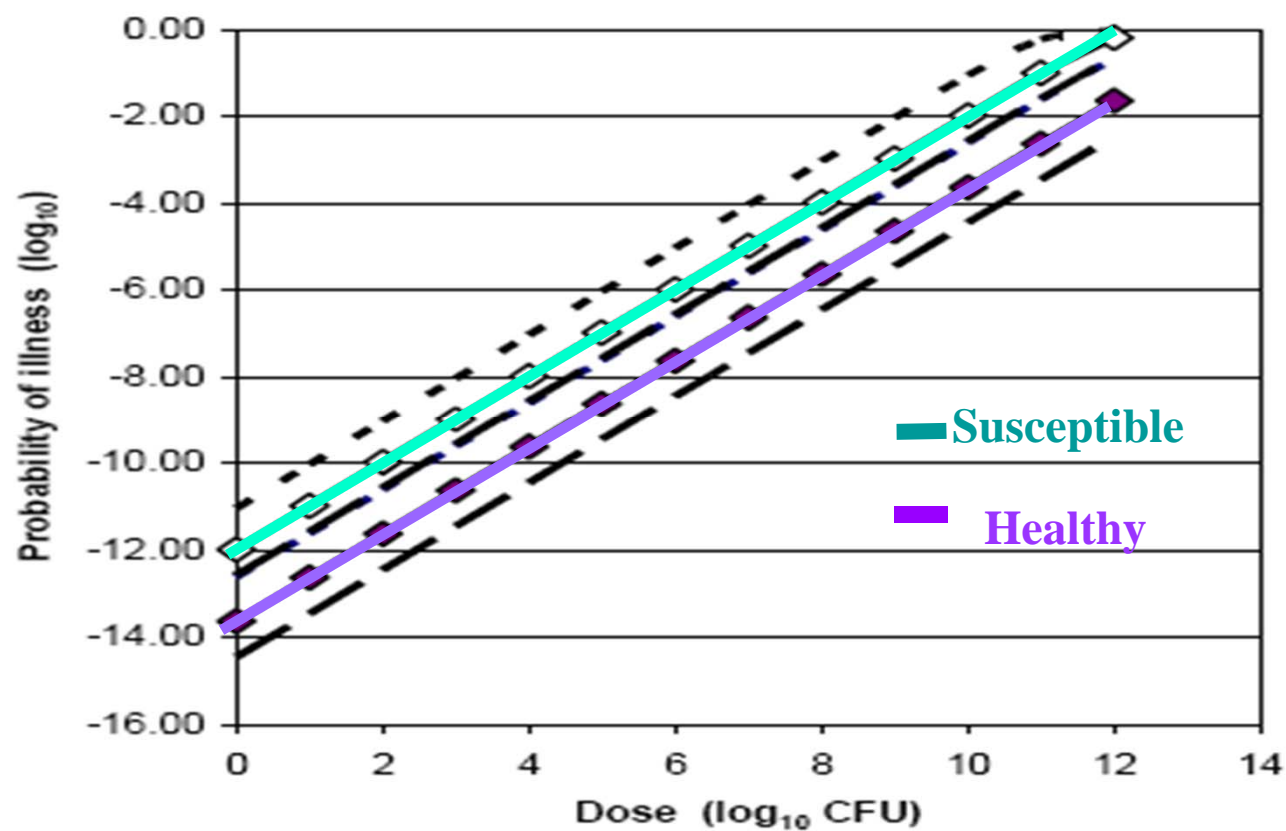
- **FDA/FSIS/CDC 2003年**

全ての消費者 1×10^{-15}

(ID₅₀ $\sim 6.9 \times 10^{14}$)

京 兆 億 万
1,000,000,000,000,000
15 12 9 6 3

用量反応曲線



1,000,000,000,000,000
 15 12 9 6 3

The FAO/WHO *Listeria monocytogenes* risk assessment

専門調査会におけるリスク評価の方向性①

- リステリア症の患者数は侵襲性のみを対象とする
- RTE食品（調理済み食品）を対象とする
- JEMRAのリスク評価をベースに評価を行い、我が国のデータとして喫食量、汚染率、感受性集団の割合等を可能な限り採用する
- リステリア感染症の年間発症リスクを同一菌量で汚染されている場合と汚染分布に基づく複数用量を用いた2つのアプローチで行う
- RTE食品の喫食量は1食あたり50g、100g、200gと仮定する

専門調査会におけるリスク評価の方向性②

- 我が国のリステリア感染症の感受性集団の割合は27%とした。
- 国内のリステリア感染症の年間患者数はJANISデータによる推定値より約200人を用いる。
- RTE食品のリステリア汚染率は2.58%とした。
- 喫食時のRTE食品のリステリア汚染分布を利用したアプローチでリスク評価を行う。
- 法的規制をしても何らかの理由で高い菌数の食品による事例が発生することを考慮する必要がある。

食品衛生法第11条第1項に基づく成分規格

対象食品

非加熱食肉製品（加熱せずに食すものに限る）

ナチュラルチーズ（ソフト及びセミソフトタイプに限る）

成分規格

リステリアの基準値（100cfu/g）を設定

検査

ISO法に準じた試験法

$n=5$, $c=0$, $m=100$ cfu/g, Class Plan 2



リステリアの基準策定における試験法



- 標準試験法 : NIHSJ-08: **ISO 11290-1:1996**
- 標準試験法 : NIHSJ-09: **ISO 11290-2:1998**
- NIHSJ-08は、定性試験法
- NIHSJ-09は、集落計数法による定量法
- これらの試験法は、ISO法と国際整合性をとっている

食品中のリステリアの検査手順(現行)

増菌培養

検体25gをEB培地¹⁾またはUVM培地²⁾ 225mlに接種

30°C, 48時間

Oxford寒天培地またはPALCAM寒天培地に塗抹

分離培養

30~35°C, 24~48時間

疑わしい集落5個釣菌

6%酵母エキス加Trypticase Soy寒天(TSYEA)培地に塗抹

30°C, 24時間

斜光法による観察(真珠様集落)

確認培養

確認培養

同定

血清型別

1)乳・乳製品(厚生省, 1993年 / IDF準拠)

2)その他の食品(食品衛生検査指針 追補1996年)

食品及び飼料中のリステリアの検査手順

ISO 11290-2:1998

集落計数法

NIHSJ-09

蘇生
培養

試料Xg又はXml＋9×XmlBPW(重/容量比1:9)

20±2℃, 1時間±5分

1mlを酵素基質平板培地3枚に塗抹

15分間程度放置

Ottaviani and Agostiリステリア寒天培地
又は、同等である他の酵素基質培地

選択
培養

37℃, 24～48±3時間

疑わしい集落5個釣菌

6%酵母エキス加Trypticase Soy寒天(TSYEA)培地に塗抹

35～37℃, 18～24時間

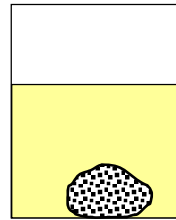
確認
培養

確認試験

集落数の算出、菌数計算

定量試験法通知法の概要 (NIHSJ-09) (10%乳剤の1 mlを3平板)

集落計数法



滅菌ストマック袋に入れた試料 25 g (X g又はX ml)
+
225 ml のBPW (9X ml)

ストマック処理：30秒～1分間

20±2 °C, 1 時間±5 分蘇生培養



培養液1ml全量を、滅菌ピペットを用いてよく乾燥させた3枚の選択分離培地(ALOA®, CHROMagar™など)上に分けて(0.3ml・0.3ml・0.4ml)コンラージ塗抹する。

* 液が寒天に吸収されるまで15分程度放置

37 °C, 24～48±3時間培養

3枚の選択分離寒天培地上に形成された定型集落の合計数を計測

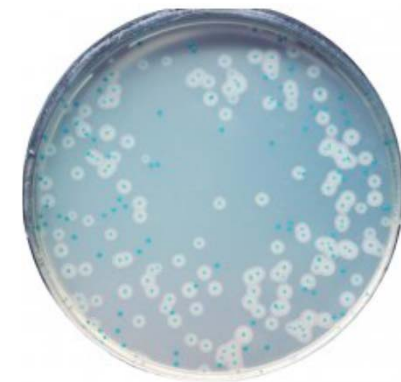
典型的集落5 個を釣菌

TSYEA 平板で、37 °C, 18～24 時間培養

L. monocytogenes の確認試験

CAMP 試験

ラムノース陽性、キシロース陰性



クロモアガーリステリアによる培養例

食品及び飼料中のリステリアの検査手順

ISO 11290-1:1996

定性法

NIHSJ-08

増菌
培養

検体25gをhalf Fraser培地に接種(重/容量比1:9)

30°C, 24時間

0.1mlをFraser培地10mlに接種 ALOA寒天培地およびPALCAM,/Oxford寒天培地に塗抹

35~37°C, 48時間

分離
培養

ALOAL寒天培地およびPALCAM/Oxford寒天培地に塗抹

30~ 37°C, 24~48時間

疑わしい集落5個釣菌

6%酵母エキス加Trypticase Soy寒天(TSYEA)培地に塗抹

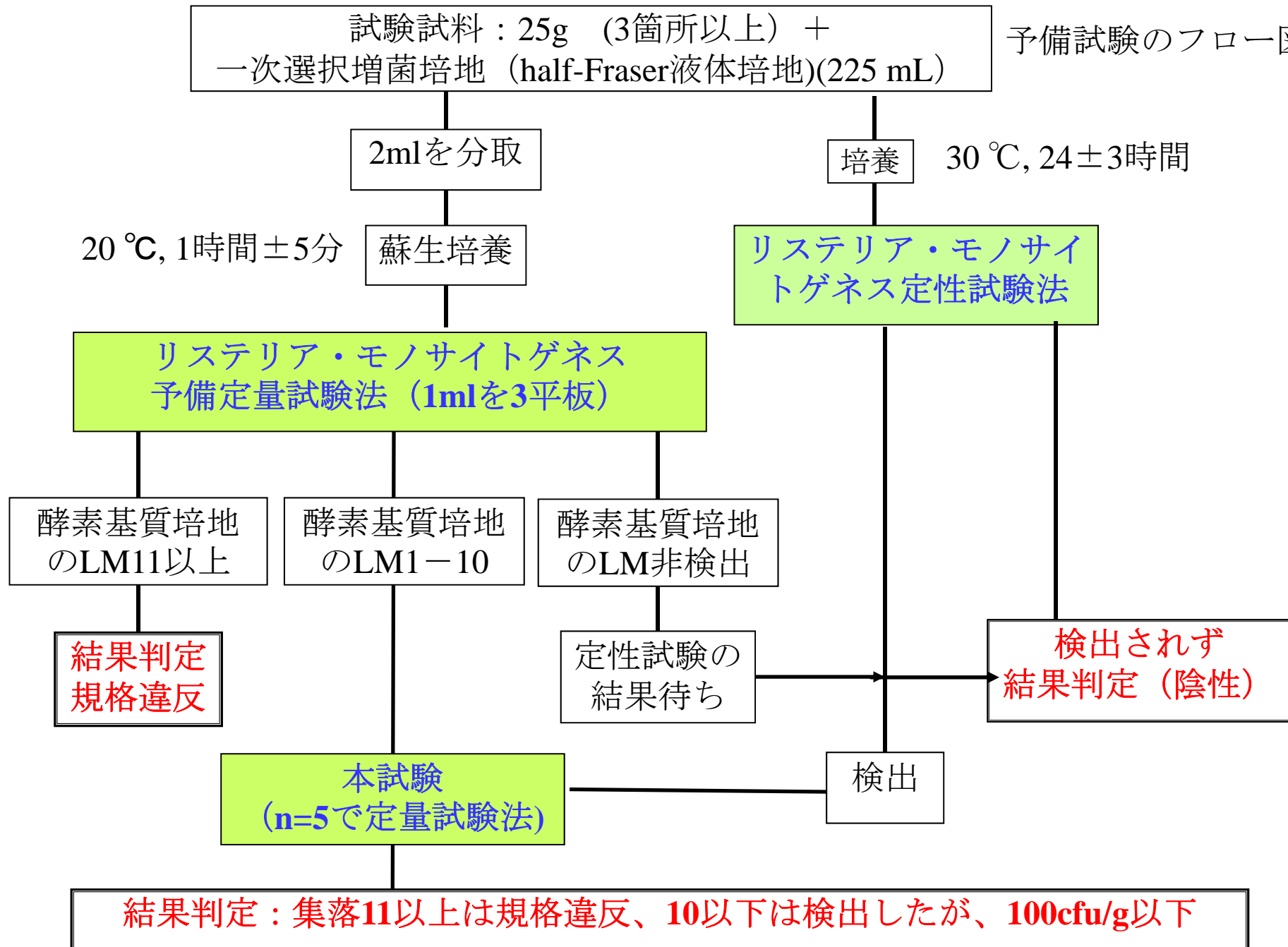
35~37°C, 18~24時間

確認
培養

確認培養

同定

予備試験のフロー図



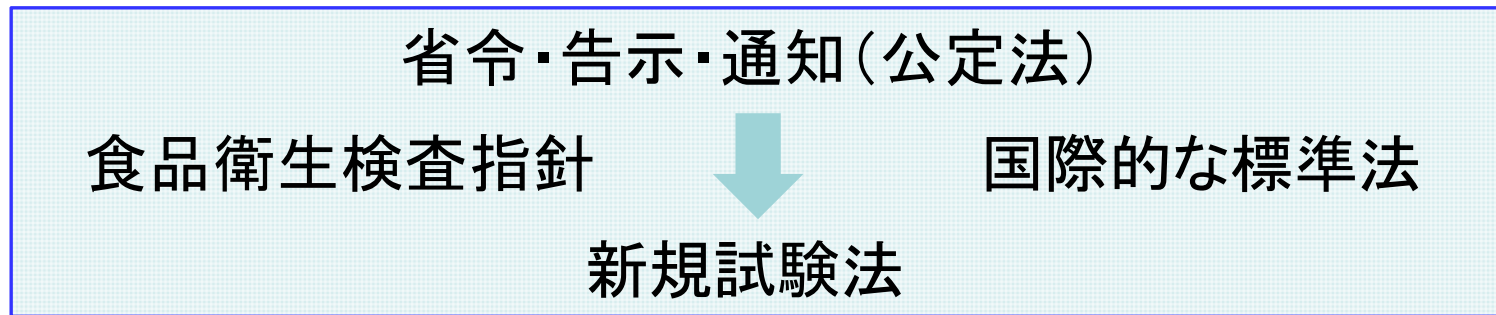
国内の食品の微生物基準は

- ◆国際的な食品の微生物学的基準のある場合
採用するか
採用しないで独自に策定する→WTOへ通報必要
- ◆国内の食品の規格基準の見直し
科学的データ、リスク評価(食品安全委員会)
適切な管理目標設定と、基準値設定など(厚労省)
(対象微生物、サンプリングプラン、試験単位、試験法)
新たなる規格基準はWTOへ通報・公開
海外から指摘があれば対応が必要

微生物学的基準の微生物試験法の要点

- ◆微生物学的基準(MC)では
試験法はISO法、または同等の感度、再現性、信頼性などが、妥当性確認された方法を採用する
- ◆国内の試験法は
ISO法に準拠するか、**妥当性確認**が行われていると
国際的に認知される試験法の整備が急務
⇒**標準試験法**
試験を正確に行う環境整備 ⇒試験所の能力確認
⇒内部精度管理

わが国における新規試験法の妥当性確認



試験法の妥当性を確認（評価）して公開する仕組みは確立していない

↓

わが国の公定法は国際的には認知されていない？

<http://www.jetro.go.jp/jpn/regulations/guidebook/>

↓

国際的に通用するわが国の「標準法」策定の必要性

↓

「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の発足（2005.10）

<http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html>

微生物標準試験法検討委員会の構成

委員長:五十君静信 部長(国衛研/食品衛生管理部)
副委員長:寺嶋 淳 部長(国衛研/衛生微生物部)
事務局:岡田由美子 室長(国衛研/食品衛生管理部)
委員:国公立研究機関, 大学, 登録検査機関など20名

特定微生物
作業部会

...

特定微生物
作業部会

バリデーション
作業部会

サルモネラ, カンピロバクター, 黄色ブドウ球菌, 腸炎ビブリオ, リステリア, 衛生指標菌, ボツリヌス菌, ボツリヌス毒素遺伝子, クロノバクター属菌など

妥当性確認
導入時の検証
試験法の選定

標準試験法とは

- ① 食品衛生の目的で用いる試験法として、基準となる試験法
- ② 他の試験法を評価するための基準となる参照法
- ③ 国際的な試験法と妥当性確認（バリデーション）が行われていること
- ④ その正当性が多くの専門家の検討により、確認されていること
- ⑤ 試験者、試験所が変わっても同様な試験結果が得られることを確認していること

コーデックスで求める**妥当性確認された試験法**

標準試験法作成方針の概要

原案(ステージ1)



関連する国際的な標準法の比較から、“原案”として試験法のおおよその流れをまとめる

作業部会案(ステージ2)



作業部会は実験データから細かいプロトコールの検討を行い“作業部会案”を作成する

コラボ実施案(ステージ3)



コラボスタディーを行う試験法をまとめる

標準法(最終ステージ)

コラボの結果とパブコメを反映した試験法とする

食品からの微生物標準試験法 - Windows Internet Explorer

http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/protocol.html

ファイル(E) 編集(E) 表示(V) お気に入り(A) ツール(T) ヘルプ(H)

お気に入り おすすめサイト HotMail の無料サービス NCBI Blast Research Tools オンラインストレージ[FILEBAN...] クレジットカード ケータイクレジ... 情報の登録・更新 - 研究開... JSA Web Store

食品からの微生物標準試験法

Google カスタム検索 検索

食品からの微生物標準試験法

The Methods for the Microbiological Examination of Foods

English お問い合わせはこちらまで
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

トップページ NIHSJ(標準試験)法 標準法検討委員会 試験法関連情報

プロトコール

No.	対象菌群名	試験法	標準/推奨	プロトコール	公定法への引用
NIHSJ-01	サルモネラ属菌	定性法	標準	ST4:2009	あり
NIHSJ-02	カンピロバクター	定性法	標準	ST4:2012	あり
NIHSJ-03	黄色ブドウ球菌	集落計数法	標準	ST4:2009	
NIHSJ-05	黄色ブドウ球菌	MPN法	標準	ST4:2009	
NIHSJ-08	リステリア(ISO 11290-1:1996)	定性法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-09	リステリア(ISO 11290-2:1998)	集落計数法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-10	推定E.coli増菌	ISO定性法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-11	推定E.coli.MPN(ISO 11866-1:2005)	ISOMPN法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-12	coliforms 増菌	ISO定性法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-13	coliforms 集落計数(ISO 4832:2006)	ISO集計数法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-14	coliforms MPN(ISO 4831:2006)	ISOMPN法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-15	腸内細菌科菌群(ISO 21528-1:2004)	ISO定性法	標準	ST4:2011	あり
NIHSJ-16	腸内細菌科菌群(ISO 21528-2:2004)	ISO集計数法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-17	腸内細菌科菌群(ISO 21528-1:2004)	ISOMPN法	標準	ST1(概要紹介)	
NIHSJ-21	サルモネラ属菌(ISO 6785:2001)	ISO定性法	標準	ST1(概要紹介)	

食品からの微生物標準試験法に関するホームページ
http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html

57

インターネット 125%

スタート リムーバブル ディスク (E:) Microsoft PowerPoint... 国立医薬品食品衛生... 食品からの微生物標... 検索するアイテム 9:01

プロトコール対象菌名 No.		ステージ1 (原案)	ステージ2 (作業部会案)	ステージ3 (コラボ案)	ステージ4 (試験法)
NIHSJ-01	サルモネラ属菌	★	★	★	★
NIHSJ-02	カンピロバクター	★	★	★	★
NIHSJ-03	黄色ブドウ球菌定量	★	★	★	★
NIHSJ-04	黄色ブドウ球菌定性	★	★		
NIHSJ-05	黄色ブドウ球菌MPN	★	★	★	★
NIHSJ-06	腸炎ビブリオ定性	★	★	★	
NIHSJ-07	腸炎ビブリオ定量	★	★	★	
NIHSJ-08	リステリア定性	★	★	★	★公開方法
NIHSJ-09	リステリア集落計数	★	★	★	★公開方法
NIHSJ-10	推定 <i>E. coli</i> 定性	★	—	★	★公開方法
NIHSJ-11	推定 <i>E. coli</i> MPN	★	—	★	★公開方法
NIHSJ-12	coliforms定性	★	—	★	★公開方法
NIHSJ-13	coliforms集落計数	★	—	★	★公開方法
NIHSJ-14	coliformsMPN	★	—	★	★公開方法
NIHSJ-15	腸内細菌科定性	★	—	★	★
NIHSJ-16	腸内細菌科集落計数	★	—	★	★公開方法
NIHSJ-17	腸内細菌科MPN	★	—	★	★公開方法
NIHSJ-18	集落計数法	検討中			
NIHSJ-19	ボツリヌス菌	★	★		
NIHSJ-20	ボツリヌス毒素遺伝子	★			
NIHSJ-21	サルモネラ属菌ISO	★	—	★	★公開方法
NIHSJ-22	クロノバクター属菌定性	★	★	★検討中	
NIHSJ-23	クロノバクター属菌MPN	★	★	★検討中	
NIHSJ-24	ウェルシュ菌	★	★		
NIHSJ-25	大腸菌ISO集落計数	★			

★作成済、★webで公開中、★文書公開検討中(著作権のため)

食品における微生物試験の種類

①サーベイランス

問題の程度、あるいは実態を知るための調査

②工程管理などのモニタリング

製造工程などで矯正的措施をとる必要があるか
決定するため

③コンプライアンスのため

a)経済上あるいは法律上の命令遵守を決定
するため → 標準試験法が必須

b)食中毒の原因究明(食中毒事例が発生した
場合に、原因となる食品の特定)

微生物管理には最も適した試験法を選ぶ

A. 工程管理などのモニタリング

製造工程などで矯正的措施をとる必要があるか
決定するため

迅速性・簡便性重要→迅速法

B. コンプライアンスのため

法律上の命令遵守を決定するため

裁判に耐えうるデータ→公定法（標準試験法）

目的適合性!

目的適合性

目的適合性(Fitness for purpose)

分析結果の利用目的

利用方法

分析実施者の能力

分析にかけられる時間やコスト

を考慮し、適切で無駄のない方法を選択する

行政で、法的権限に基づいて行う規制

→分析の確実さ、データの信頼性が重要

企業内で製品が一定の規格内である確認

→コストと迅速性がより重要視される

妥当性確認の手法自体に、その分析法が必要とされる
目的や性能を踏まえての目的適合性が存在する

微生物試験の選択肢を増やす

目的にあった試験法を選択できるようにしたい

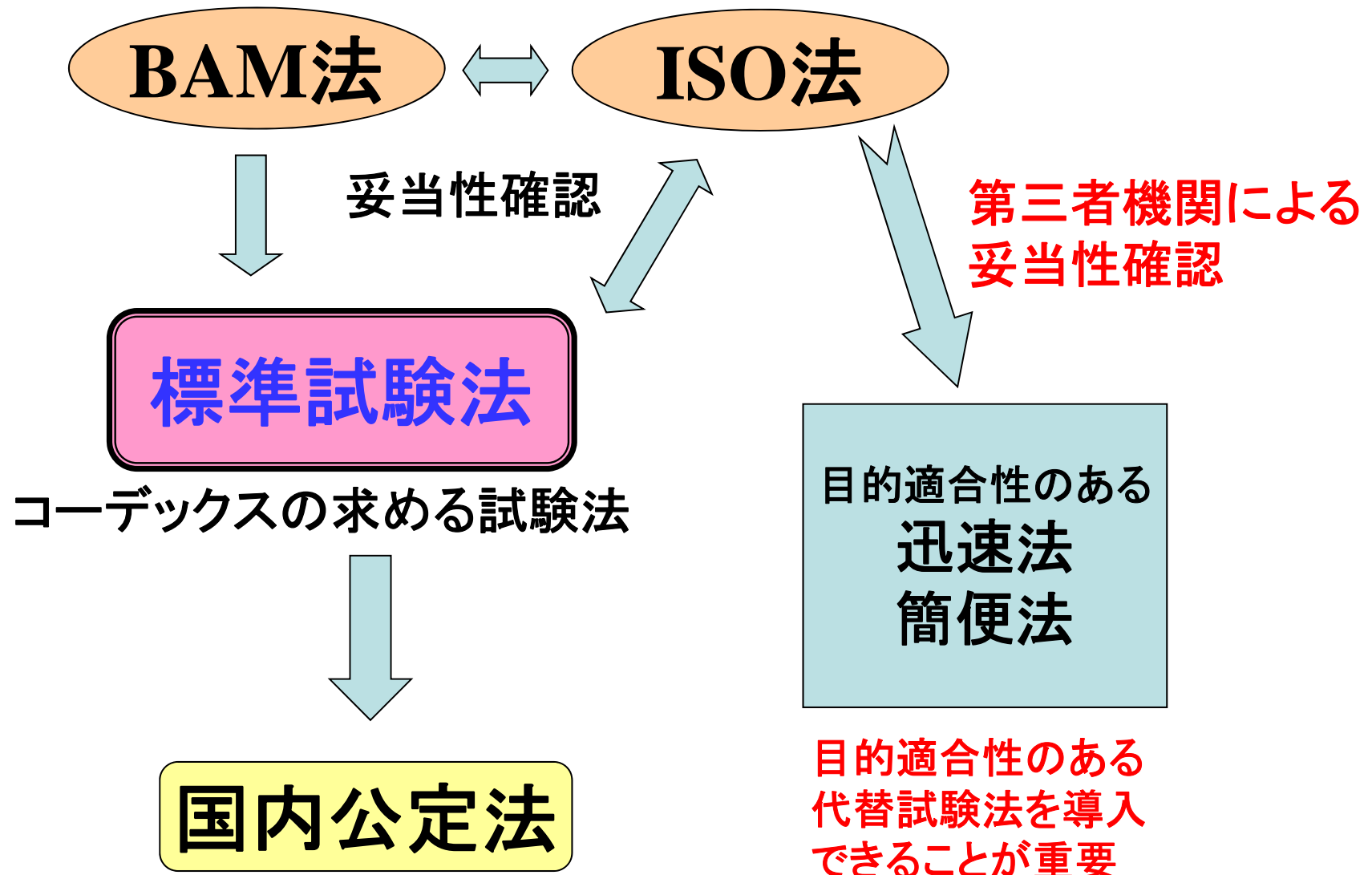
試験法の精度は落とすことはできない

標準試験法を尺度として、他の試験法を評価する
メソッドバリデーションにより科学的に評価

代替法としてどの程度の性能かを明確にする
目的にあった試験法が使えるようになる

第三者機関による評価で客観的に

迅速・簡便法をどのように捉えてゆくか



妥当性確認と検証

試験法の**妥当性確認**(Validation)

分析法の持つ能力を、マトリックス、分析種、それと実際に行う分析操作(試験法)を一組として確認すること

検証(Verification)

すでに妥当性確認されている分析法を、その確認範囲の中に於いて実際に使用する場で同等の結果が得られることを示すこと

定義： 最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック
サイエンスフォーラム(2010)

単一試験室妥当性確認

(Single laboratory validation; SLV)

微生物では、対象となるAnalyteは
“ある試験法で特定の反応や形態を取るもの”
と定義されることが一般的であり、一義的に決定することは難しい

食品の種類や共存菌の状況で選択性が変わってくる

参照法と比較して得る性能指標

相対精確さ

相対特異性

相対感度

菌濃度は、陽性率50%程度になるように設定

当該試験についての知識や経験が必要

単一試験室定量試験の妥当性確認

直線性と適用菌数範囲

繰り返し試験結果から求められる併行精度
標準菌株の階段希釈を用いて、直線性を証明

食品成分や他の微生物菌叢の共存で直線性阻害
菌濃度は、5段階

検出限界(Limit of Detection; LOD)を基準

最大濃度をLODの3倍、10倍、100倍など

ブランク(濃度0)と最大濃度の間を等分

各濃度は2回以上(5~10を推奨)繰り返し測定する

参照法による測定結果 X_{ij} 、代替法の測定結果 Y_{ij}

xy平面上にプロットし、直接判断し外れ値を除く

直線性試験(Linearity test)で適用菌数範囲を示す

複数試験室による妥当性確認

IUPAC-ISO-AOACのハーモナイズドプロトコール
“規制に用い得るべき分析法の妥当性確認法”
アメリカ、ヨーロッパで広く用いられている
通称:フルコラボ

近年わが国でも、JIS規格の見直し(分析法の見直し)
新たな分析法では、このレベルの妥当性確認必要
訴訟に堪えられる分析法の妥当性確認のレベル
大規模なコラボ(**Collaborative study**:共同試験)
使用する試料の最低数、参加するラボの最低数規定
目的は、室間再現性(**Reproducibility**)を求める

複数試験室による妥当性確認

複数の試験室によるコラボ（フルコラボには及ばない）
室間再現性の統計的な厳密さが、やや低い
特殊な装置を使う等で参加可能な試験室が限定される
場合は、ある一定の枠の中でフルコラボとしてみなす

最小スケール：2ヶ所の機関による

AOACIのPTMプログラムなど

開発者（メーカー）が単一試験室による妥当性確認で
キットのもつ性能を示し、第三の試験室が正しいかを
確認する

コラボ(フルコラボ)で行う妥当性確認

- 定量試験8、定性試験10力所以上の試験室で行う
- 食品1種と標的菌1種の組み合わせで試験
- 自然汚染食品を優先するが、人為的添加も可能
- 添加菌が充分均一に分布していることを確認
- 菌濃度は3段階(2レベル(L1,L2)+ブランク(L0))
- 各段階の繰り返しは8(AOACIでは6)

10ラボの場合の試験総数は、
 $(8 \text{ or } 6) \times 3(\text{レベル}) \times 10(\text{ラボ}) \times 2(\text{参照法と代替法})$
 $= 480 \text{ 又は } 360$

コラボで重点的に検討すべき項目と注意点

室内再現性(Repeatability)

室間再現性(Reproducibility)

堅牢性(結果的に室間再現性の中に含まれる)

目的適合性(Fitness for purpose)

すべての項目をコラボで確認しようとするしない

妥当性確認の国際スタンダード

- ◆ ISO 16140:2003のバリデーションガイドラインは、現在改訂作業中
- ◆ AOACのガイドラインは、2012年2月24日から有効、webから確認できる
- ◆ 定性試験法の評価について
ISO: Limit of Detection LOD_{50}
AOAC: Probability of Detection POD_{50}

コーデックスの乳児用調製粉乳の 微生物学的基準

病原微生物

Microorganisms	n	c	m	M	Class Plan
<i>Cronobacter</i> spp. *	30	0	0/10 g	N/A	2
<i>Salmonella</i>	60	0	0/25 g	N/A	2

*当初*Enterobacter sakazakii*とされていたが、現在分類学的には*Cronobacter* spp.

工程の衛生管理

Microorganisms	n	c	m	M	Class Plan
Mesophilic Aerobic Bacteria	5	2	500/g	5000/g	3
Enterobacteriaceae	10	2	0/10 g	NA	2

Class plan : Microorganisms in Foods 7 (ICMSF,2002)による

HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)

HACCP: 危害要因(ハザード)分析重要管理点

- ◆安全で衛生的な食品は、どうすればつくれるか？ どのような種類の病原菌が、どのような時に汚染し、増えるか？それを、防ぐにはどうすればよいか？

→→→ 危害要因分析

- ◆衛生管理のためのマニュアルを作成しておき、そのマニュアルに従って、工程を管理する
- ◆5つの手順を元に、7つの原則をHACCPプランに盛り込む

HACCPの5つの手順

- ◆ 手順1. 食品生産者自身がHACCP導入の必要性を強く認識し、プランの作成およびそれによる衛生管理の実施を担う専門家チームを編成
- ◆ 手順2. 原材料および最終製品はどのようなものか
- ◆ 手順3. その食品はいつ、誰が、どこで、どのようにして食べるのか
- ◆ 手順4. その食品の製造工程一覧図および製造施設内見取り図を作成
- ◆ 手順5. 手順4で作成された製造工程一覧図および施設内見取り図を現場で確認し、同時にSSOPによる一般的衛生管理プログラムの作業状況も確認



HACCPのメリット



- 1.つくられる食品の安全性が向上するため、他社との競争力が強化される
- 2.製造加工中および最終製品の廃棄といった食品のムダが減少する
- 3.HACCPの導入には全従業員の協力が必要であるため、組織全体の意識が一体化される
- 4.科学的に裏づけられたデータに基づくため、従来の経験や勘による衛生管理よりも安定した安全な製品の製造が可能となる
- 5.衛生管理の状態が記録に残されているため、製品の安全性が保証され、PL(製造物責任)法にも容易に対応できる
- 6.HACCPは継続させることによって食品の安全性が持続する