

食安基発0729第3号
食安監発0729第1号
平成27年7月29日

農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長
厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長
(公 印 省 略)

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

標記について、別添のとおり各都道府県等宛て通知しましたので、御了知いただくとともに、貴管下の関係業界団体に対する周知をお願いします。



食安発0729第4号
平成27年7月29日

各
〔 都道府県知事
保健所設置市市長
特別区区长 〕 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長
(公印省略)

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

食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号。以下「告示」という。）に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法について、国際整合性を図る観点から、国立医薬品食品衛生研究所における試験法検討の結果、今般、その試験法が報告されたところである。

については、「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5年3月17日付け衛乳第54号。以下「平成5年通知」という。）及び「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10年11月25日付け生衛発第1674号。以下「平成10年通知」という。）を下記のとおり改正することとしたので、関係者への周知方よろしく願います。

なお、本通知は、平成28年1月29日から適用することとし、それまでの間、なお従前の例によることができる旨申し添える。

記

- 1 平成5年通知のうち、別紙1を本通知の別添のとおり改める。
- 2 平成10年通知のうち、第2の2の(2)のA中「別紙に示す試験法により、」を「平成5年3月17日付け衛乳第54号に示す試験法により、」に改め、別紙を削除する。

(別紙1) 食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品の試験法

第1 検体の採取、運搬及び試料の調製

1 食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品

- (1) 1検体当たり約100gを採取する。検体は、原則として容器包装のまま採取する。ただし、ハム等のように、1包装単位が1kg以上に及ぶものは、切断して採取する。この場合、滅菌した器具及び容器を用い、汚染の起こらぬよう検体を採取すること。また、切断面で微生物が増殖したり、包装内面を伝わって断面部から微生物が内部に侵入しないように保管法にも注意すること。
- (2) 採取した検体の運搬は、保冷容器を用い、氷等で4℃以下に検体を保ち、速やかに検査に供することができるよう運搬すること。なお、冷凍状態のものは、ドライアイス等で凍結しつつ運搬すること。
- (3) 微生物試験に供する試料の調製は、製品（スライスハム等細切された製品を除く。）の切断すべき表面をアルコール綿でよくふいた後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から25gを無菌的に採り試料とする。試料に滅菌ペプトン加生理食塩水225mLを加えて細碎し、試料液とする。スライスハム等細切された製品にあつては、滅菌した器具を用いて25gを無菌的に切断して採り、試料とする。試料に滅菌ペプトン加生理食塩水225mLを加えて細碎し、試料液とする。

ただし、食肉製品に係る試験のうち、サルモネラ属菌については別添1、黄色ブドウ球菌については別添2によること。

2 砂糖、でん粉及び香辛料

検体の採取に当たっては、検査対象を十分にかき混ぜた後、砂糖又はでん粉にあつては100g以上、香辛料にあつては10g以上を無菌的に滅菌採取ビンに採る。

検体は、よくかき混ぜた後、無菌的に5gを滅菌試料ビンに採取し、滅菌ペプトン加生理食塩水を加えて100mLとし、密栓してよく振り混ぜる。

その液約20mLを無菌的に滅菌中試験管（18mm×180mm）に採り、沸騰水浴中に入れ10分間加熱した後、急冷して試料液とする。

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。

ただし、食肉製品に係る試験のうち、サルモネラ属菌については別添1、黄色ブドウ球菌については別添2によること。

(1) ペプトン加生理食塩水

ペプトン1.0 g及び塩化ナトリウム8.5 gを精製水1,000 mLに溶かし、滅菌する。最終pHは 7.0 ± 0.1 でなければならない。

(2) ECはっ酵管

標準処方は次のとおりとする。

ペプトン20.0 g、乳糖5.0 g、胆汁酸塩1.5 g、リン酸水素カリウム4.0 g、リン酸二水素カリウム1.5 g及び食塩5.0 gを1,000 mLの精製水に溶かす。これをはっ酵管に分注して滅菌した後、速やかに冷却する。最終pHは 6.9 ± 0.1 でなければならない。

(3) EMB培地

標準処方は次のとおりとする。

ペプトン10.0 g、リン酸水素カリウム2.0 g、乳糖10.0 g、エオシンY0.4 g、メチレンブルー0.065 g及び寒天15 gを精製水1,000 mLに加え、加熱溶解し、滅菌し、分注して、平板とする。最終pHは 7.0 ± 0.1 でなければならない。

(4) 乳糖ブイオンはっ酵管

標準処方は次のとおりとする。

肉エキス3.0 g、ペプトン5.0 g、乳糖5.0 g及びブロムチモールブルー0.024 gを1,000 mLの精製水に溶かす。これをはっ酵管に分注して滅菌した後、速やかに冷却する。最終pHは 7.2 ± 0.1 でなければならない。

(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。

(6) 倍濃度BGLBはっ酵管

標準処方は次のとおりとする。

ペプトン 10.0 g、乳糖 10.0 g、牛胆汁末 20.0 g 及びブリアントグリーン 0.0133 g に精製水を加えて 500 mL とし、加温溶解し、はつ酵管に約 10 mL ずつ分注した後、滅菌する。最終 pH は 7.2 ± 0.1 でなければならない。

2 亜硝酸根の試験に用いる試薬

試薬は、次のとおりとする。

- (1) スルファニルアミド：〔特級〕
- (2) スルファニルアミド液：スルファニルアミド 0.5 g を塩酸（1→10）100 mL に加温しながら溶かす。
- (3) ナフチルエチレンジアミン溶液：N—1—ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.12 g を水 100 mL に溶かす。
- (4) N—1—ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩：〔特級〕

第3 試験法

1 微生物

(1) 非加熱食肉製品及び特定加熱食肉製品の E. coli の試験法

- ① 試料液 1 mL ずつを接種した EC はつ酵管を 5 本、試料液の 10 倍希釈液 1 mL ずつを接種した EC はつ酵管を 5 本用意し、 $44.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ の温度で 24 時間 \pm 2 時間培養した後、ガス発生を認めないものは E. coli 陰性とする。
- ② ガス発生を認めた場合は、直ちに 1 白金耳量を EMB 培地に塗抹培養して、独立した集落を形成させる。 $35.0 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ で 24 時間 \pm 2 時間培養後 EMB 培地から大腸菌群の定型的集落を釣菌して、乳糖ブイオンはつ酵管及び寒天斜面培地に移植する。
その乳糖ブイオンはつ酵管で当該集落を 48 時間培養してガス発生を確認したものと相対する寒天斜面培地上の菌について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合は E. coli 陽性とし、その他の場合は E. coli 陰性とする。
- ③ 試料液について陽性を示すものが 3 以下であれば E. coli がその 1 g につき 10 以下、試験液の 10 倍希釈液について陽性を示すものが 3 以下であれば E. coli がその 1 g につき 100 以下とする。

(2) 加熱食肉製品及び乾燥食肉製品の E. coli の試験法

① 試料液 1 mL それぞれについて 5 本の EC はっ酵管に接種し、 $44.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ の温度で 24 時間 \pm 2 時間培養した後、ガス発生を認めないものは E. coli 陰性とする。

② ガス発生を認めた場合は、直ちに 1 白金耳量を EMB 培地に塗抹培養して、独立した集落を形成させる。 $35.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 24 時間 \pm 2 時間培養後 EMB 培地から大腸菌群の定型的集落を釣菌して、乳糖ブイオンはっ酵管及び寒天斜面培地に移植する。

その乳糖ブイオンはっ酵管で当該集落を 48 時間培養してガス発生を確認したものと相対する寒天斜面培地上の菌について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合は E. coli 陽性とし、その他の場合は E. coli 陰性とする。

(3) サルモネラ属菌試験法

別添 1 の方法によること。

(4) 黄色ブドウ球菌試験法

別添 2 の方法によること。

(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 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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、 $35.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 24 時間 \pm 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。

(6) 大腸菌群試験法

① 3 本の倍濃度 BGLB はっ酵管に試料液 10 mL ずつをそれぞれに接種し、 $35.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ の温度で 48 時間 \pm 3 時間培養した後、ガス発生を認めないものは大腸菌群陰性とする。

② ガス発生を認めた場合は、直ちに 1 白金耳量を EMB 培地に塗抹培養して、独立した集落を形成させる。 $35.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 24 時間 \pm 2 時間培養後 EMB 培

地から大腸菌群の定型的集落を釣菌して、乳糖ブイオンはっ酵管及び寒天斜面培地に移植する。その乳糖ブイオンはっ酵管で当該集落を 48 時間±3 時間培養してガス発生を確認したものと相対する寒天斜面培地上の菌について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合は大腸菌群陽性とし、その他の場合は大腸菌群陰性とする。

(7) 芽胞数の試験法

試料液の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液を作成する。

試料液、試料液の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液のそれぞれについて滅菌ペトリ皿を 2 枚用意し、滅菌ピペットを用いて対応する滅菌ペトリ皿に当該試料液 1 mL ずつを正確に採り、あらかじめ加温して溶かし 45 ℃~50 ℃の温度に保持した標準寒天培地（食品、添加物の規格基準中第 1 食品の部D 各条の○ 氷雪の 1 氷雪の成分規格の目の(2)の 2 細菌数（生菌数）の測定法に規定する標準寒天培養基をいう。）約 15 mL をこれに加え、静かによく混合し、冷却凝固させる。培地が凝固した後、倒置して 35.0 ℃±1.0 ℃で 48 時間±3 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 1 mL に培地を混合し、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、ペトリ皿、滅菌ペプトン加生理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。

芽胞数の算定は、食品、添加物等の規格基準中第 1 食品の部D 各条の項の○ 氷菓の 1 氷菓の成分規格の目の(3)の 2 細菌数（生菌数）の測定法に規定する細菌数の算定により行う。

2 亜硝酸根

(1) 試料液の調製

試料約 10 g を正確に量り、約 80 ℃の水 80 mL 及び 0.5N 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え、ホモジナイズした後、容量 200 mL のフラスコに移す。容器は温水 10 mL ずつで 5 回洗浄し、洗液はフラスコに加える。これに硫酸亜鉛溶液（3→25）10 mL を加えてよく振り混ぜた後、ときどき振り混ぜながら 80 ℃の水浴中で 20 分間加温する。次に、冷水中で室温まで冷却した後、0.5N 水酸化ナトリウム溶液で pH 9.5 に調整し、水を加えて正確に 200 mL とする。内容をよく混和し、冷蔵庫中に約 30 分間放置した後、乾燥ろ紙を用いて共栓フラスコへろ過する。最初のろ液約 20 mL を捨て、澄明なる液を試料液とする。

(2) 空試料液の調製

水 10 mL を容量 200 mL のフラスコに採り、(1) 試料液の調製と同様に操作し、空試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

亜硝酸ナトリウム 0.150 g を正確に量り、1,000 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて溶かして正確に 1,000 mL とし、標準原液とする。標準原液 10 mL を正確に量り、100 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて正確に 100 mL とし、その 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とし標準液とする（この液 1 mL は、亜硝酸根 0.2 μg を含む。）。標準液 2.5 mL、5 mL、10 mL、15 mL 及び 20 mL をそれぞれ正確に量り、それぞれ水を加えて正確に 20 mL とし、それぞれを検量線用標準液とする（これらの液 20 mL 中には、それぞれ亜硝酸根 0.5 μg 、1 μg 、2 μg 、3 μg 及び 4 μg を含む。）。

(4) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 540 nm の吸光度を測定する。

② 測定

試料液及び空試料液それぞれ 20 mL（注 1）を正確に量り、それぞれ 25 mL のメスフラスコに入れ、それぞれにスルファニルアミド液 1 mL、塩酸（1→2）1 mL、ナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL 及び水を加えてそれぞれ正確に 25 mL とし、よく振り混ぜ、20 分間放置し（注 2）、測定液及び空測定液とする。水 20 mL を用いて同様に操作したものを対照として 540 nm における測定液及び空測定液の吸光度を測定し、 E_A 、 E_B とする。試料液が着色しているときは試料液 20 mL を正確に量り、塩酸（1→2）1 mL 及び水を加えて正確に 25 mL としたものを、水を対照として吸光度を測定し、 E_C とする。

吸光度差 $E_A - E_B$ 、又は試料液が着色した場合は吸光度差 $E_A - (E_B + E_C)$ を求め、 ΔE とする（注 3）。

③ 検量線

検量線用標準液 20 mL ずつをそれぞれ正確に量り、それぞれ 25 mL のメスフラスコに入れ、②測定における試料液と同様に操作し、それぞれの吸光度差 ΔE_{S_1} 、 ΔE_{S_2} 、 \dots ΔE_{S_5} を求め、検量線を作成する。

④ 定量

測定液の吸光度差 ΔE と検量線から試料液中の亜硝酸根含有量 ($\mu\text{g}/\text{tube}$) を求め、次式によって検体中の亜硝酸根含量 (g/kg) を計算する。

亜硝酸根含量 (g/kg)

$$= C \times (200/20) \times (1/W) \times (1/1,000)$$

$$= C / (100 \times W)$$

C : 試料液中の亜硝酸根含量 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)

W : 試料の採取量 (g)

- (注1) NO_2^- 濃度の高い場合は、検量範囲 ($0.02 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) に入るよう試料液を希釈する。
- (注2) 呈色は反応時間 10 分間から 2 時間程度まで安定であるので、約 20 分間 放置してよい。
- (注3) 試料中にアスコルビン酸等の還元物質が含まれている場合は定量妨害となり、亜硝酸の測定値は低くなる。その場合、試料量の 10 g を 5 g 又は 2 g に減らすか、試料液の 20 mL を 10 mL 又は 5 mL に減らすことにより、その測定値の低下を幾分か防止することができる。

3 pH

(1) 食肉製品

次の①又は②の方法により行うこと。

① 直接法

ニードル型電極を検体に直接挿入するか、又はスリーブ型電極を直接検体切断面に当てて pH を測定する。測定部分は、いずれの電極を用いた場合も検体表面から 5 mm 以上の内側とし、最低 3 か所を測定して、その平均値を検体の pH とする。

② 水抽出法

検体表面から 5 mm 以上の内側の部分を採取し試料とする。試料に、食肉の場合は試料に対して 9 倍量以内、製品の場合は試料と 2～3 倍量以内の精製水を加え、均質化し、得られた上澄液について pH を測定し、検体の pH とする。

(2) 魚肉ねり製品

製品の一部を採取し試料とし、試料に、その 10 倍量の精製水を加え、細碎し、pH を測定し、検体の pH とする。

4 水分活性

次の(1)又は(2)の方法により行うこと。ただし、(2)により行うことができるのは、アルコール等揮発性物質の影響を受けない場合に限る。

なお、飽和溶液の選定に当たっては測定しようとする（適否の判定基準となる）水分活性を中心に上下同間隔を持つ試薬を用いるよう留意すること。また、飽和溶液の作製に当たっては、25℃における溶解度を予め把握しておくこと。水分活性の測定値は小数点以下2桁までとし、3桁以下は切捨とすること。

(1) 容器包装を取り除き、検体表面から5 mm以上内側の部分を速やかに細切するが、表層部分が除去しにくい検体にあつてはそのまま輪切りにして試料とする。試料は水分活性測定装置の検出器内空間容積の3%以上の容積となるよう適当量を採取し、アルミ箔皿又は開放型平皿に乗せ、直ちに検出器に入れて上蓋を閉めて密閉し、25℃±2℃の条件下に置く。10分間隔で数値を読み、その間に数値の変動が認められない時点が、検出器内の水蒸気圧が平衡状態になったと見なし、その時の数値を検体の水分活性とする。

なお、水分活性測定装置には電気抵抗式（Change in electrical conductivity of immobilized salt soln）による機器を用い、測定する前に既知飽和溶液を用いて校正すること。

(2) 容器包装を取り除き、無作為に10 g～20 gを採り、これを検体とする。

検体を速やかに細切し、これより約1 gをとり、（又は検体を内径25 mmのコルクポーターで抜き取った後約1 gになるようにスライスし、）予め精秤したアルミ箔（内径25 mm）に入れて精秤する。これを試料とする。

測定しようとする水分活性より高い値をもつ飽和溶液A及び測定しようとする水分活性より低い値をもつ飽和溶液Bを準備する。

試料は速やかにコンウエイユニット（以下「ユニット」という。）の内室に入れ、外室にはA、Bを別々のユニットに3 mL～4 mLを入れた後、ユニットのすり合わせ部分にワセリンを塗り蓋をする。クリップして気密を保つようにして25℃±2℃で2時間±0.5時間静置する。

2時間±0.5時間静置後試料の重量を精秤し、予め測定した重量との増減を求め、次式により試料の水分活性を算出する。

$$\text{水分活性} = (b \times x - a \times y) / (x - y)$$

a : 飽和溶液Aの水分活性の値

b : 飽和溶液Bの水分活性の値

x : Aを使用した際の試料の重量増加量

y : Bを使用した際の試料の重量減少量

