

技術レポート

7 飼料を対象とするサルモネラ試験法の選択増菌培地液量の減量化に関する検討

奥村 寿章^{*1}, 加藤 まどか^{*2}, 関口 好浩^{*1}, 三枝 尚子^{*3}, 宮野谷 杏^{*1},
名塚 英一^{*4}, 内山 丈^{*5}, 千原 哲夫^{*6}, 橋本 亮^{*1}

Improvement of Selective Enrichment for Detection Method of Salmonella in Feed
~ Reduction of the Volume of Selective Enrichment Broth ~

Toshiaki OKUMURA^{*1}, Madoka KATO^{*2}, Yoshihiro SEKIGUCHI^{*1},
Naoko SAEGUSA^{*3}, Kyou MIYANOYA^{*1}, Eiichi NAZUKA^{*4},
Takeshi UCHIYAMA^{*5}, Tetsuo CHIHARA^{*6} and Sayaka HASHIMOTO^{*1}

(*¹ Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

^{*2} Nagoya Regional Center, FAMIC

^{*3} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Sendai Regional Center, FAMIC)

^{*4} Sendai Regional Center, FAMIC

^{*5} Fukuoka Regional Center, FAMIC

^{*6} Kobe Regional Center, FAMIC)

The Japanese official method for detection of *Salmonella* in feed was compared with a compactified method in the selective enrichment stage.

Apart from selective enrichment, analytical procedures in both methods were the same. The volume of selective enrichment broth in the official method was 100 mL, and the volume in the compactified method was scaled down to 10 mL. For Hajna tetrathionate broth of the official method and the compactified method, 10 mL and 1 mL of inoculum were inoculated respectively. Similarly, for Rappaport-Vassiliadis enrichment broth of the official method and the compactified method, 10 mL and 0.1 mL of inoculum were inoculated respectively. The ratio of inoculation volume to selective enrichment broths volume was changed in Rappaport-Vasiliadis enrichment broth, but it was not changed in Hajna tetrathionate broth.

In a comparative study using feed samples that had been found naturally contaminated by *Salmonella*, 11 out of 20 samples were *Salmonella* positive (55.0 %) with both methods, and all results matched. A comparative study on routinely inspected feed showed that 4 of 102 samples were *Salmonella* positive (3.9 %) with both methods, and all results matched.

These results demonstrated that the compactified method is an acceptable alternative to the official method.

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

*³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 仙台センター

*⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

*⁵ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

*⁶ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

Key words: *Salmonella*; selective enrichment broth; feed; harmonization of testing method; validation test

キーワード：サルモネラ；選択増菌培地；飼料；検査法の調和；妥当性確認試験

1 緒 言

サルモネラは家畜、家きん及びペット等の腸管内をはじめ、河川や下水等自然界に広く分布している細菌であり、その一部は病原性の高さから家畜衛生や公衆衛生上の大きな問題となっている。家畜等の飼養面において、サルモネラに汚染された飼料が給与された場合、腸管感染が成立する可能性があり、更に腸管内で増殖したサルモネラを含む糞便は、飼育環境を汚染することにより、同居動物や飼育者への感染源となりうる。また、保菌動物をと畜する際に食肉等が汚染された場合、ヒトの食中毒の原因にもなりうる¹⁾。このため、飼料の生産、流通段階における飼料安全対策の一環として、飼料のサルモネラ試験の実施は重要である。

飼料及びペットフードを対象としたサルモネラの試験法は、我が国においてはそれぞれ飼料分析基準²⁾収載法（以下「飼料公定法」という。）及び愛玩動物用飼料等の検査法³⁾収載法（以下「ペットフード公定法」という。）が公定法として用いられている。また、飼料や食品等を対象としたサルモネラの試験法は国内外に数多く存在している（Table 1）^{2~10)}。近年、我が国では食品からの微生物検査標準法検討委員会が中心となって、複雑化した食品を対象とするサルモネラ試験法（培養法）¹¹⁾の調和を図るべく、ISO 6579 の試験法⁶⁾との互換性を考慮して検討¹²⁾した標準試験法⁴⁾が公定法に採用されている。一方、飼料公定法及びペットフード公定法と他の試験法を比較すると、特にサルモネラを選択的に増菌培養する条件が異なっており、Table 1 に示したとおり両公定法の培地の液量及びこれに接種する前増菌培地の液量が他の試験法よりも多く規定されている。この培地液量が他の試験法と同程度に減量できれば、検査コストの削減はもとより廃棄物の排出抑制によって環境への負荷低減効果が期待できる。

そこで、選択増菌培養条件について、過去の飼料を対象とした調査でサルモネラの汚染が確認された試料を用い、培地液量及び前増菌培養液の接種量を減量化した試験法について、飼料分析基準への適用の可否を検討した。更に平成 28 年度に飼料製造事業場で採取した飼料についても同様に検討した。

2 実験方法

2.1 試 料

1) サルモネラ汚染試料

過去の調査でサルモネラ汚染が確認され、冷蔵（4℃）保管している 20 検体を用いた。その内訳は、配合飼料 4 検体、混合飼料 1 検体及び飼料原料 15 検体である。なお、これらの試料は平成 17 年 7 月から平成 27 年 3 月までの間に採取したもので、全て自然汚染に由来するものである。

2) 平成 28 年度比較検討用試料

平成 28 年 4 月から平成 29 年 2 月までの期間に、国内の飼料製造事業場から採取した飼料 102 検体を用いた。その内訳は、配合飼料 43 検体、混合飼料 5 検体及び飼料原料 54 検体である。なお、試料は冷蔵（4℃）保管とした。

Table 1 Selective enrichment in domestic and international testing methods of *Salmonella*

Method	Sample	Selective enrichment		
		Type	Volume (mL)	Inoculation (mL)
Analytical standards of feeds ²⁾ (Official method in Japan)	Feed	HTT	100	10
		RV	100	10
Analytical standards of pet foods ³⁾ (Official method in Japan)	Pet food	HTT	100	10
		RV	100	10
MHLW ⁴⁾	Food	TT	10	1
		RV	10	0.1
Japanese Pharmacopoeia ⁵⁾	Medical and pharmaceutical product	RV	10	0.1
ISO 6579 ⁶⁾ , JIS K 3705 ⁷⁾	Food, feed	MKTTn	10	1
		RVS	10	0.1
FDA/BAM ⁸⁾	Food, partial pet food, environmental sample	TT	10	1
		RV	10	0.1
FDA/BAM ⁹⁾	Environmental sample in poultry house	HTT	10	1
		RV	10	0.1
AOAC 995.20 ¹⁰⁾	Highly contaminated raw foods and animal feed	TT with BG	10	1
		RV	10	0.1

HTT: Hajna-tetrathionate broth, RV: Rappaport-Vassiliadis broth, TT: Tetrathionate broth, MKTTn: Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth, RVS: Rappaport-Vassiliadis soya peptone broth, BG: Brilliant green

2.2 試薬

- 1) 水は AQUARIUS (東洋製作所製), Elix Essential 5 (Millipore 製), DIRECT-Q UV3 (Millipore 製) 及び純水製造装置ピュアライン WL220 型 (ヤマト科学製) により精製した精製水を用いた。
- 2) 界面活性剤溶液, ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液, 生理食塩液及び緩衝ペプトン水は, 飼料公定法²⁾に記載のとおり調製した。なお, 調製に用いた試薬は, 等級があるものは特級を用いた。また, 以下の市販の既成培地を用いた。

ハーナ・テトラチオン酸塩培地 (ハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地 “栄研”, 栄研化学製, 以下「HTT 培地」という。)

ラポポート・バシリアデイス培地 (RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) ENRICHMENT BROTH, Oxoid 製, 以下「RV 培地」という。)

DHL 寒天培地 (パールコア DHL 寒天培地 “栄研”, 栄研化学製)

ブリリアントグリーン寒天培地 (Difco Brilliant Green Agar, Becton, Dickinson and Company 製, 以下「BG 寒天培地」という。)

クロモアガーサルモネラ寒天培地 (CHROMagar Salmonella, CHROMagar 製, 以下「CAS 寒天培地」という。)

TSI 寒天培地 (パールコア TSI 寒天培地 “栄研”, 栄研化学製)

SIM 寒天培地 (SIM 培地 “栄研”, 栄研化学製)

リジン脱炭酸試験用培地 (リジン脱炭酸試験用培地 “栄研”, 栄研化学製, 以下「LD 培地」という。)

3) O 群の決定には、サルモネラ免疫血清「生研」（デンカ生研製）を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター：庫内温度を 37~42 °C（管理精度：±1 °C）に設定できるものを用いた。
- 2) ペトリ皿：内径 90 mm，高さ 20 mm のものを用いた。
- 3) 白金耳：材質はニクロム製とし，2.4 の 1) で定義する選択分離培養には直径 3 mm のものを，2.4 の 1) で定義する純粋分離培養には直径 2 mm のものを用いた。なお，直径 3 mm の 1 白金耳の採取量は，2.5~3.0 µL の範囲とした。
- 4) その他：試験に用いた器具のうち，培地及び菌液に接触するものは，滅菌済みのものを用いた。

2.4 試験方法等

1) サルモネラの検出方法

飼料公定法並びに飼料公定法の選択増菌培養液の量及びこれに接種する前増菌培養液量を減量した方法（以下「減量化法」という。）は，それぞれ以下の手順による。

i 飼料公定法

緩衝ペプトン水に試料 25 g を加えて増菌培養（37 °C，18~24 時間）（前増菌培養）し，得られた培養液 10 mL を HTT 培地（液量 100 mL）及び RV 培地（液量 100 mL）にそれぞれ接種し，サルモネラを選択的に増菌培養（42 °C，18~24 時間）（選択増菌培養）した。得られた各選択増菌培養液各 1 白金耳を DHL 寒天培地，BG 寒天培地及び CAS 寒天培地にそれぞれ画線塗抹し，サルモネラを選択的に培養（37 °C，18~24 時間）（選択分離培養）した。各培地において，サルモネラと疑われる集落が検出された場合は単離（純粋分離培養）し，TSI 寒天培地，SIM 寒天培地及び LD 培地を用いて培養（37 °C，18~24 時間）（確認培養）後，その性状を確認した。サルモネラと疑われる性状であった場合は，TSI 培地の斜面部に培養された菌を用いて O 抗原の免疫血清との凝集反応を確認した。凝集が認められた場合は，サルモネラ検出と判定した。それ以外の場合，平成 28 年度比較検討用試料はサルモネラ不検出と判定し，サルモネラ汚染試料は iii の遅延二次増菌培養を実施した。

ii 減量化法

緩衝ペプトン水に試料 25 g を加えて前増菌培養（37 °C，18~24 時間）し，得られた培養液 1 mL を HTT 培地（液量 10 mL）に，0.1 mL を RV 培地（液量 10 mL）にそれぞれ接種しサルモネラを選択的に増菌培養（42 °C，18~24 時間）した。これ以降の手順及びサルモネラ判定基準は，飼料公定法と同様とした。

iii 遅延二次増菌培養

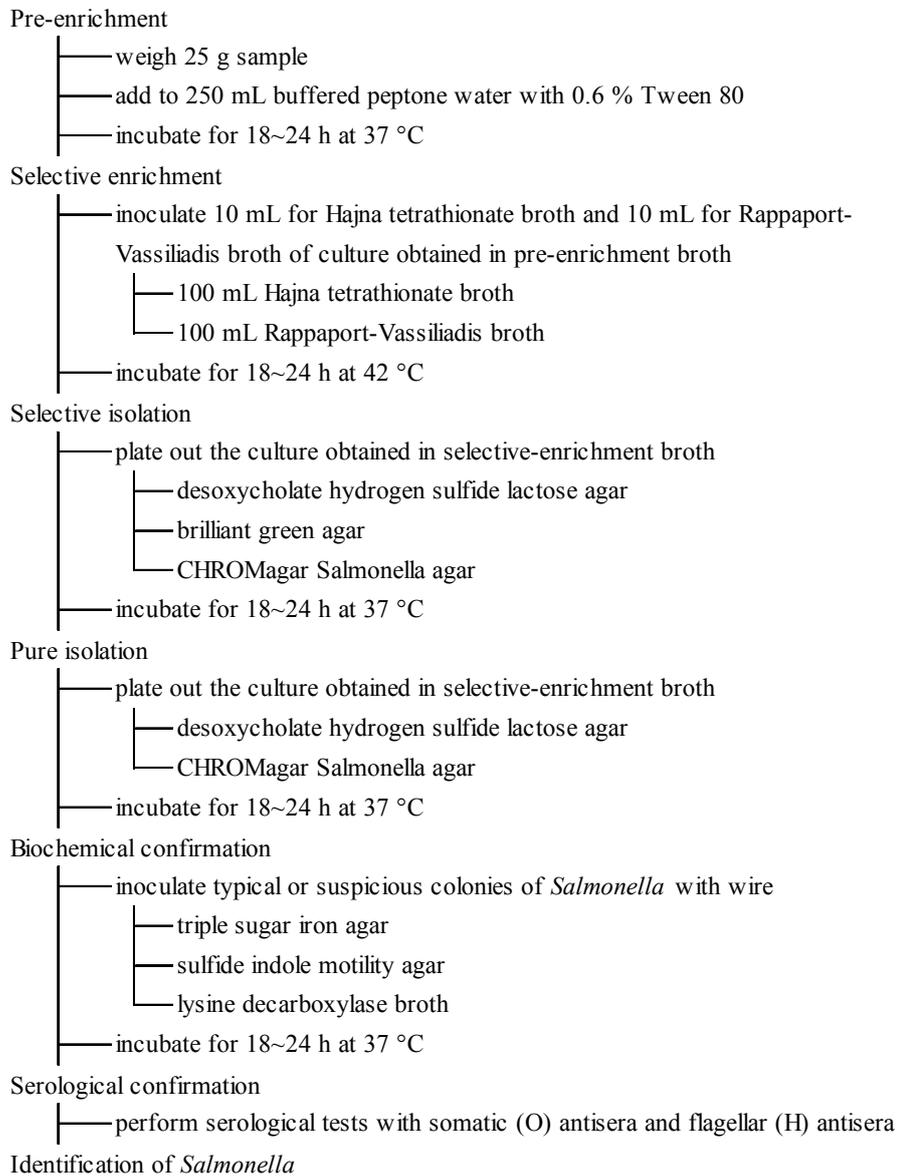
サルモネラ汚染試料を用いた検討において，選択分離培養を終えた培地でサルモネラと疑われる集落が認められなかった場合，確認培養でサルモネラと疑われる性状でなかった場合及び O 抗原の免疫血清との凝集反応で凝集が認められなかった場合，遅延二次増菌培養¹³⁾により追加試験をすることとした。その方法は，選択増菌培養後の HTT 培養液を更に 25 °C で 7 日間延長培養し，この培養液について，HTT 培地を用いて減量化法の培養条件で再試験を行い，検出された菌と免疫血清との凝集が認められた場合にサルモネラ検出，それ以外はサルモネラ不検出と判定した。

2) 実施試験室

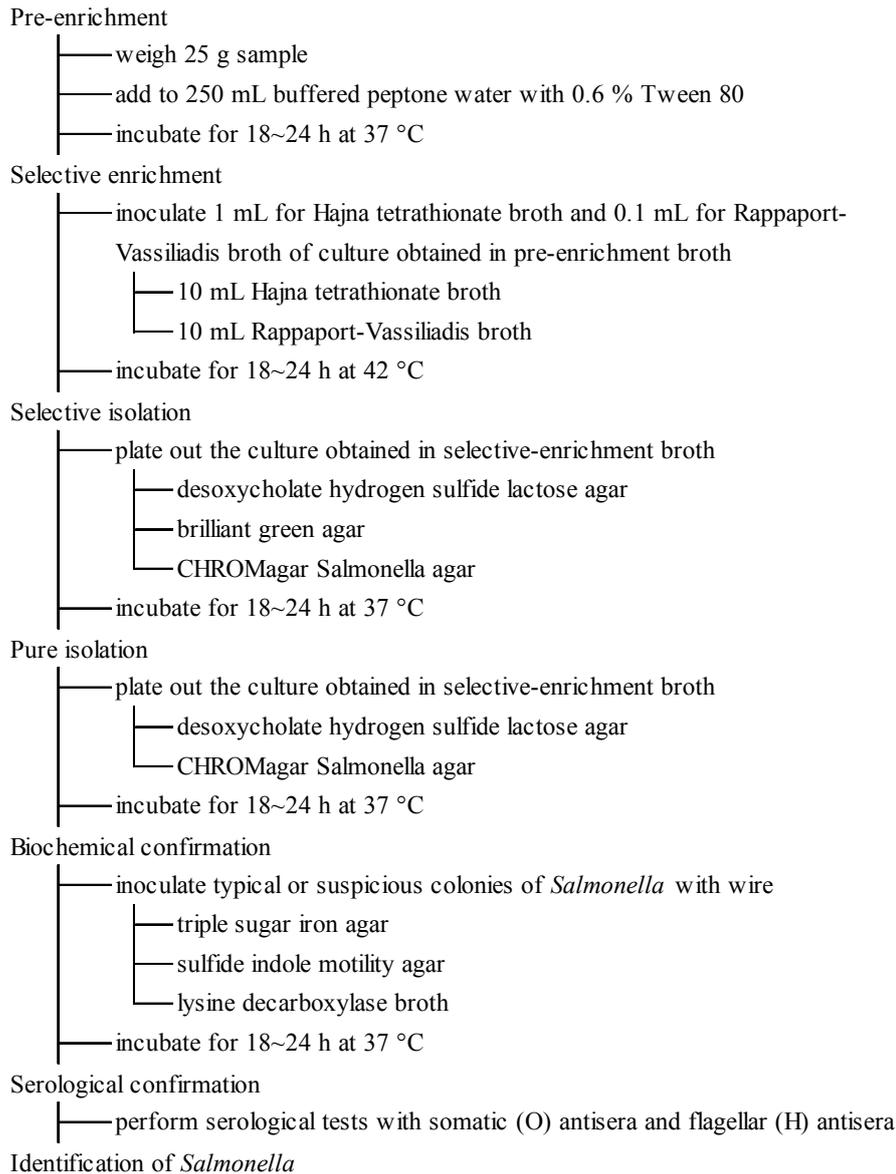
サルモネラ汚染試料を用いた検討は本部で実施した。平成 28 年度の比較検討は、本部並びに仙台、神戸及び福岡センターで実施した。

3) 分析法の概要

飼料公定法及び減量化法の概要をそれぞれ Scheme 1 及び 2 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for *Salmonella* in official method of feeds



Scheme 2 Analytical procedure for *Salmonella* in compactified method

3 結果及び考察

サルモネラ汚染試料を用いて、選択増菌培地の液量及びこれに接種する前増菌培養液量の減量がサルモネラの検出に及ぼす影響を検討した。その結果、全 20 検体のうち、飼料公定法、減量化法ともに共通した 11 検体でサルモネラ検出、9 検体でサルモネラ不検出と判定された (Table 2)。検出と判定された試料は、全ての選択増菌培養液 (HTT 培地及び RV 培地) から塗抹した全ての選択分離培地 (DHL 寒天培地、BG 寒天培地及び CAS 寒天培地) でサルモネラを疑う集落が検出された。選択分離培養、性状確認でサルモネラが検出されなかった 9 検体は、更に遅延二次増菌培養を行い、不検出であることを確認した。この結果から、減量化法は飼料公定法と同等の精度でサルモネラを検出できることが見込まれたため、さらに平成 28 年度に飼料製造事業場で採取した飼料について比較検討することとした。なお、過去の試験でサルモネラが検出されたものが本比較試験で検出されなかった理由は、長期の冷蔵保管によりサルモネラが死滅したためと推定された。

Table 2 Detection of *Salmonella* from naturally contaminated feed^{a)}
in official method of feeds and compactified method^{b)}

Kind of feed	Number of samples			Number of samples of identical judgement in both methods
	Examined	Detected	Not detected	
Formula feed				
For poultry	2	1	1	2
For swine	1		1	1
For cattle	1		1	1
Subtotal	4	1	3	4
Mixed feed				
from animal matter	1		1	1
Subtotal	1		1	1
Feed ingredient				
Soybean meal	2	1	1	2
Poultry by-product meal	2	1	1	2
Fish meal	8	5	3	8
Meat and bone meal ^{c)}	2	2		2
Feather meal	1	1		1
Subtotal	15	10	5	15
Total	20	11	9	20

- a) The feed samples used in this study were once determined to be *Salmonella*-positive by the official method in the period from July 2005 to March 2015.
- b) The method which reduced the volume of selective enrichment broth and pre-enrichment inoculation on the selective enrichment
- c) All samples were derived from pork and poultry.

平成 28 年度比較検討用試料を用い、同様に検討した結果、全 102 検体のうち、4 検体でサルモネラ検出、98 検体でサルモネラ不検出と判定された (Table 3) . 試料ごとの検出又は不検出の判定は、両試験法で一致していた。検出と判定された試料は、両試験法で全ての選択増菌培養液 (HTT 培地及び RV 培地) からサルモネラを疑う集落が検出された (Table 4) .

Table 3 Detection of *Salmonella* from routinely inspected samples
in official method of feeds and compactified method

Kind of feed	Number of samples			Number of samples of identical judgement in both methods
	Examined	Detected	Not detected	
Formula feed				
For poultry	14		14	14
For swine	11	2	9	11
For cattle	17	1	16	17
For fish	1		1	1
Subtotal	43	3	40	43
Mixed feed				
containing animal matter	4		4	4
of plant origin	1		1	1
Subtotal	5		5	5
Feed ingredient				
Defatted rice bran	2		2	2
Corn gluten feed	1		1	1
Wheat bran	7		7	7
Barley bran	1		1	1
Sesami meal	1		1	1
Corn gluten meal	1		1	1
Soybean meal	1		1	1
Rapeseed meal	1		1	1
Poultry by-product meal	10		10	10
Fish meal	21	1	20	21
Meat and bone meal ^{a)}	3		3	3
Feather meal	5		5	5
Subtotal	54	1	53	54
Total	102	4	98	102

a) Two samples were derived from pork and poultry, and the other one was derived from pork.

Table 4 Results of selective isolation on *Salmonella*-detected routinely inspected samples
in official method of feeds and compactified method

No.	Kind of feed	Official method						Compactified method					
		HTT			RV			HTT			RV		
		DHL	BG	CAS	DHL	BG	CAS	DHL	BG	CAS	DHL	BG	CAS
1	Formula feed for cattle	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
2	Formula feed for swine	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
3	Formula feed for swine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Fish meal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

HTT: Hajna-tetrathionate broth, RV: Rappaport-Vassiliadis broth, DHL: Desoxycholate hydrogen sulfide lactose agar, BG: Brilliant green agar, CAS: CHROMagar Salmonella agar, +: detection of typical colony suspected as *Salmonella*, -: absence of typical colony suspected as *Salmonella*

国内外の主なサルモネラ試験法（培養法）における選択増菌培地には、HTT 培地、テトラチオネート培地、ミュラー・カウフマン・テトラチオネート・ノボビオシン培地、RV 培地及びラポポート・バシリアディス・ソーヤペプトン培地（以下「RVS 培地」と言う。）等が用いられている。試験法は異なるが、選択増菌培地液量は 10 mL に調和されており、テトラチオン酸塩を選択剤としている選択増菌培地に接種する前増菌培養液量は 1 mL、RV 培地及びそれを改良した RVS 培地に接種する前増菌培養液量は 0.1 mL に調和されている⁴⁻¹⁰⁾ (Table 1)。Vassiliadis らによると、食品、糞便及び環境汚水を試料とした場合、RV 培地における選択増菌培地液量と前増菌培養液の接種量の関係は、選択増菌培地液量と接種量が 10 mL : 0.1 mL と 100 mL : 0.1 mL では前者のサルモネラの検出率が高く、選択増菌培地を 10 mL とした場合の 3 接種条件 (0.1 mL, 0.2 mL, 0.5 mL) では検出率に差はなかったと報告している¹⁴⁾。さらに、競合微生物の発育は培地量に対する接種量の割合が大きいほど盛んであることも明らかにしている¹⁴⁾。また、当センターが過去に実施した RV 培地及び RVS 培地の液量と接種量の割合に関する検討において、飼料公定法 (100 mL : 10 mL) とその 10 分の 1 (100 mL : 1 mL) の培養条件で増菌した培養液におけるサルモネラ菌数に差は認められていない¹⁵⁾。今回行った培地液量と接種量を 10 分の 1 (HTT 培地は 10 mL : 1 mL, RV 培地は 10 mL : 0.1 mL) に減量した比較試験においてもサルモネラの検出率に差は認められなかった。これらのことから、10~100 mL の培地液量の範囲で選択増菌培地と接種量の割合が同じであれば、培地液量の変更は可能であると考えられた。

他方、選択増菌培地の試薬量は現行の 10 分の 1 になることから、試験コストの大幅な削減が期待できる。また、RV 培地に含まれているマラカイトグリーンは、食品安全委員会による食品健康影響評価¹⁶⁾において、生物の健康リスクに懸念がある合成抗菌剤として、ヒトにおける発がんリスクは明確ではないが、げっ歯類における発がん性が示唆され、遺伝毒性も否定できないと評価されており、養殖水産動物への使用が禁止、食品において不検出と規定されている物質¹⁷⁾である。マラカイトグリーンを含む培地の使用量削減は、試験後の培地由来による廃棄物の減量につながり、環境負荷の低減に寄与することが期待できる。

以上のことから、減量化法は飼料公定法と同等のサルモネラ検出精度を有する試験法であり、加えて経済面や環境面からは、より優れた試験法であり、減量化法を飼料分析基準に採用することで、国内外におけるサルモネラ試験法との調和につながると考えられた。また、今回の比較試験は飼料を用いた検討であるが、試料を前増菌培養した後に行う選択増菌操作の選択増菌培養液量と接種する前増菌培養液の減量化であり、飼料公定法を基に検討されたペットフード公定法にも適用が可能と考えられた。

4 まとめ

飼料を対象とするサルモネラ試験法（培養法）について、選択増菌培地の液量及びこれに接種する前増菌培養液の量を減量化について、飼料公定法への適用の可否を検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 過去にサルモネラ汚染が確認された試料 (20 検体) を用いて飼料公定法と減量化法とのサルモネラ検出状況を比較した結果、いずれの試験法とも 11 検体はサルモネラ検出、9 検体はサルモネラ不検出と判定され、この結果は両試験法で一致した。

- 2) 平成 28 年度に製造事業場で採取した飼料 (102 検体) を用いて飼料公定法と減量化法のサルモネラ検出状況を比較した結果, いずれの試験法とも 4 検体はサルモネラ検出, 98 検体はサルモネラ不検出と判定され, この結果は両試験法で一致した.

謝 辞

本試験の実施に当たり, ご助言いただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門, 秋庭正人博士に感謝の意を表します.

文 献

- 1) 中澤 宗生: 微生物の辞典, 東京, 朝倉書店, 252 (2008) (ISBN: 978-4254171365).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 農林水産消費安全技術センター理事長通知: 愛玩動物用飼料等の検査法の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 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 (2015).
- 5) 厚生労働省医薬・生活衛生局長通知: 第十七改正日本薬局方の制定等について, 平成 28 年 3 月 7 日, 食安発 0307 第 3 号 (2016).
- 6) ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. (2002)/ Amd (2007).
- 7) 日本工業規格: 培地の試験方法-サルモネラ属菌用培地-サルモネラ属菌の検出, JIS K 3705(2008).
- 8) U.S. Food and Drug Administration: FDA/BAM. Biological analytical method Chapter 5, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>, cited 16 Dec. 2016.
- 9) U.S. Food and Drug Administration: FDA/BAM. Environmental sampling and detection *Salmonella* in poultry houses, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114716.htm>, cited 10 Jan. 2017.
- 10) AOAC Official method of analysis: *Salmonella* in raw, highly contaminated foods and poultry feed. 995.20. 2012.
- 11) 浅尾 努, 河合 高生, 久米田 裕子, 寺本 忠司, 石黒 厚, 梅迫 誠一, 小笠原 準, 高須 一重, 美野 朋隆, 日野 亮一, 斉藤 利江, 小崎 俊司, 山本 茂貴: 食品の細菌学的試験法の現状と問題点, 日本食品微生物学会雑誌, **24**, 134-143 (2007).
- 12) 国立医薬品食品衛生研究所: サルモネラ属菌標準試験法 NIHSJ-01-ST4, http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/pdf/protocol/NIHSJ-01_ST4_rev03.1.pdf, cited 18 Jan. 2017.
- 13) 盛田 隆行, 北澤 秀基, 村本 靖之: 飼料および食品製造施設で用いるサルモネラ属菌分離のための遅延二次増菌培養法の評価, 日本食品微生物学会雑誌, **27**, 21-26 (2010).
- 14) Vassiliadis P, Mavrommati C, Kalapothaki V, Chronas G and Efstratiou M: *Salmonella* isolation with Rappaport-Vassiliadis enrichment medium seeded with different sized inocula of pre-enrichment cultures of meat products and sewage polluted water, J. Hyg. Camb., **95**, 139-147 (1985).

- 15) 千原 哲夫, 田中 里美, 八木 寿治 : 飼料中のサルモネラ検査に用いる選択増菌培地の検討, 日本食品微生物学会雑誌, **28**, 175-185 (2011).
- 16) 内閣府食品安全委員長通知 : MG および LMG の食品健康影響評価について 別添, 平成 17 年 11 月 24 日, 府食第 1140 号 (2005).
- 17) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 : 食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件について, 平成 18 年 5 月 30 日, 食安発 0530001 号 (2006).