

平成 29 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
総括研究報告書

食品微生物試験法の国際調和に関する研究

研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨：本研究では、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”を活動の軸に置きつつ、国内の食品微生物試験法を国際調和の取れた形へと導くための科学的根拠を創出することを目的として本年度より開始された。本研究班では、食品微生物試験法の国際調和に向けて、(1) 衛生指標菌試験法に関する研究、(2) 食品微生物試験法の国際動向及び妥当性確認に関する研究、(3) ポツリヌス試験法に関する研究、(4) 遺伝子検査法に関する研究、の4つに区分し、それぞれの分担研究項目に係る知見の収集にあたった。

(1) 衛生指標菌試験法に関する研究では、ISO 21528-1:2017の改定に伴い、先行研究で作成した腸内細菌科菌群の標準試験法 NHISJ-15 及び 16 の改訂に向けた検討を行うこととし、ST1 案を作成し、検討委員会の議題とした。また、低温殺菌牛乳計 7 製品・126 検体を対象とした各種指標菌の定量検出試験により、ISO 法と国内公定法との間で一般細菌数及び大腸菌群の数値は相関性が高いことが示されたほか、複数検体より腸内細菌科菌群および大腸菌群が検出され、当該食品の衛生管理に関する更なる知見の収集が必要と考えられた。また、国際動向として、欧州等では乳及び乳製品の製造工程管理に腸内細菌科菌群が採用されており、これらの動きへの調和をはかる上でも低温殺菌牛乳を主体とした検討を更に推し進める必要性が提起された。(2) 国際動向及び妥当性確認に関する研究としては、食品衛生のリスクマネジメントにおける微生物試験法の国際整合性の重要性から、2017 年 6 月に東京で ISO/TC34/ SC9 (食品の微生物試験法に関するサブコミティ) 総会を開催し、研究分担者である五十君教授は開催委員長としてアジア初となる同会議を主催し、国内からの情報発信ならびに海外からの情報収集を担った。更に、ISO での検討課題については逐次情報収集を行い、検証すべき項目の集約化につとめた。現在改訂が進められている ISO のバリデーションガイドライン (ISO 16140) 及び AOAC インターナショナルが公表している妥当性確認ガイドを比較検討し、国内における妥当性確認の手法の方向性を検討した。初年度は、AOAC インターナショナルと ISO のガイドを元に、標準試験法を策定するためのガイドライン原案の作成を進めた。(3) ポツリヌス試験法に関する研究では、国際動向調査および国内法と国際的に利用されている方法の比較検討を行った上で食品からの標準法検討委員会で整備・提案するポツリヌス検査法としてポツリヌス遺伝子試験法 (Technical Specification) の ST1 案 (NHISJ-20-ST1) を作成し、了承された。(4) 遺伝子検査法に関する研究では、近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある状況を踏まえ、食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、その活用にあたってのガイドラインの検討を目的として、本年度は、現在発表されている ISO 法及び BAM 法にて示されている、遺伝子検査法の情報を収集し、取り纏めた。

研究分担者（検討委員会委員兼務）

五十君 静信 東京農業大学
松岡 英明 東京農工大学
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所
倉園 久生 帯広畜産大学
泉谷 秀昌 国立感染症研究所

研究協力者（*は検討委員会委員）

井田 美樹 東京都健康安全研究センター
奥村 香世 帯広畜産大学
甲斐 明美* 公益財団法人日本食品衛生協会
工藤由起子* 国立医薬品食品衛生研究所
小久保彌太郎* 公益財団法人日本食品衛生協会
小崎 俊司* 大阪府立大学
小高 秀正* コダカマイクロバイオロジィアンドサイエンス合同会社
品川 邦汎* 岩手大学
下島優香子 東京都健康安全研究センター
鈴木 穂高 茨城大学
土屋 禎* 一般財団法人日本食品分析センター
平井 昭彦* 東京都健康安全研究センター
廣田 雅光* 一般財団法人日本食品検査
牧野 有希 国立医薬品食品衛生研究所
森 哲也* 一般財団法人東京顕微鏡院
森 曜子* 一般財団法人 AOAC 日本
山崎 栄樹 帯広畜産大学
山本 詩織 国立医薬品食品衛生研究所

（敬称略、五十音順）

A. 研究目的

本研究は、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”を活動の軸に置きつつ、国内の食品微生物試験法を国際調和の取れた形へと導くための科学的根拠を創出することを目的として本年度より検討が開始された。

当該委員会は、これまでサルモネラ、黄色ブドウ球菌、リステリアをはじめとする通知法作成に寄与してきた。主要病原微生物試験法については一定の成果を発信してきたが、国際調和を図る上では、逐次変動する国際動向を見据えたアップデート等の作業が必要である他、これらを英文化し、海外への発信も併せた機能を同組織にもたせることが、今後の我が国における標準試験法の推進を図る上で不可欠である。実際に、同組織は国際標準化機構（ISO）SC9の中で発言権を有するPメンバーの活動中心に位置づけられており、平成29年6月には同会合を研究分担者である五十君教授を委員長として日本で開催する等、国際調和に向けた食品微生物試験の在り方に関する議論を進めている。このように国内外の情報を相互補完しうる機能性を持つ組織を構築することは本研究の特色といえる。上記委員会での検討対象としては、現在まで完了していないものの中で、HACCPを見据え自主検査等で汎用される遺伝子試験法の使用に関するガイドライン等の策定を行い、指標菌を含め、食品検査法として未だ整備がなされていない試験項目を、国際標準を満たす試験法へ導くことが早急な課題として挙げられる。同項目については、1～2年目に原案を作成し、検討委員会での議論を経て、試験法、Technical Specification (TS)、あるいはガイドラインとして整備・公開していく予定である。現在の国内における食品の微生物規格基準については、多様な食品に対して様々な衛生指標菌が設定されている。その状況は海外とは大きく乖離する領域であるため、国際調和を図る上で、我が国の大きな課題と目される。本研究では、この点を重視し、海外諸国における衛生指標菌に係る規格基準について、科学的な観点から知見・情報収集を行った上で、国内現行法の科学的妥当性を確認しつつ、国際基準に適合しうる国内での運用の在り方を科

学的根拠を持って提示しようとする独創性と社会要求性を有している。同項はこれまで数十年にわたり実施されておらず、その推進は国際調和の観点から欠かすことができない。

以下に、分担研究毎に研究目的等を記す。

(1) 衛生指標菌に関する研究

Enterobacteriaceae (腸内細菌科) は微生物分類においてプロテオバクテリア門ガンマプロテオバクテリア綱エンテロバクター目に属しており、通性嫌気性でブドウ糖を発酵してガスと酸を産生するグラム陰性桿菌である。2005年に発行された *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria* では腸内細菌科に42属の細菌が含まれているが、2008年に *Enterobacter* 属から *Cronobacter* 属が独立するなど、現在では少なくとも52属が含まれている。その中には、人に病原性を示す *Escherichia*、*Klebsiella*、*Salmonella* 等や、日和見感染の原因となる *Hafnia*、*Morganella*、*Rahnella* 等の他、植物や昆虫、魚類に病原性を示すものも含まれている。EU諸国では食肉や乳製品等の製造工程管理上の衛生指標菌として *Enterobacteriaceae* を用いており、更に検体数や基準適合検体数を定めたサンプリングプランを設定している。本菌の国際的な標準試験法としては、International Organization for Standardization (ISO)が定める ISO 21528-1:2017 (定性法及びMPN法)、ISO 21528-2:2017 (定量法)がある。現在日本国内では、生食用食肉の成分規格として「腸内細菌科菌群が陰性でなければならない」としており、平成23年には当時のISO 21528-1:2004に準拠した標準試験法に基づく試験法を通知として発出した。しかしながら2017年にはISO法の改訂が行われ、結果の判定までに要する時間が大幅に短縮されたことから、国内においても腸内細菌科菌群の標準試験法の改訂について、食品中の微生物の標準試験法を作成している「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に提案することとした。

また、現在日本においては、食品中の微生物汚染の指標として、大腸菌群を規格基準として用いている食品種が数多く存在する。大腸菌群とは、乳糖を分解して酸とガスを産生する、好気性または通性嫌気性のグラム陰性無芽胞形成の桿菌群を指すもので、*Escherichia*、*Citrobacter*、*Klebsiella*、*Enterobacter* 等の *Enterobacteriaceae* に属する菌が多く含まれている。一方、同属に属さない *Aeromonas* も含まれており、微生物学上の分類とは一致しない部分がある。これらについて、国際整合性に鑑み、腸内細菌科菌群を指標とした場合の食品中の微生物汚染実態を把握するための、乳製品について腸内細菌科菌群と大腸菌群の調査を行った。

国内で製造流通する牛乳については、食品衛生法に基づいて定められた「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)」により成分規格が定められており、このうち微生物規格としては、細菌数5万/mL以下、大腸菌群陰性とされる¹⁾。同規格を担保するための製造基準には一般衛生管理に加え、「保持式により摂氏63度で30分間加熱殺菌するか又はこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌すること」と定められており、主に「超高温瞬間殺菌」、「高温短時間殺菌」、「低温殺菌」等の加熱殺菌方法が採用されている。

乳・乳製品に起因した国内の食中毒発生事例として、厚生労働省に届け出がなされたものは、過去10年間で2件に留まっており、いずれも加熱殺菌処理が行われた牛乳によるものではないことから、国内で製造流通される牛乳の微生物危害性について、緊急に対応を求める状況にはないとも考えられる。一方、自治体等による微生物実態調査報告としては、これまでに複数の事例が報告されており、多くは低温殺菌牛乳によるものとされる。

平成28年度の牛乳製造量を殺菌処理別にみると、超高温瞬間殺菌(UHT)牛乳が326万kLと最も多く、75以上の高温短時間殺菌(HTLT)牛乳が13万kL、63~65での低温長時間殺菌(LTLT)牛乳が5万8千kLとなっている。低温殺菌牛乳は、相対的に夕

ンパク変性が少なく、より生乳に近い風味を呈するとされるが、乳中に芽胞菌や耐熱性菌等が混入した場合には残存しうることも懸念される。このほかにも、一部の低温殺菌牛乳製品等からは微生物が検出される事例も報告されていることから、製品の保存・流通段階での適切な温度管理並びに製造工程管理がより重要な食品群として位置づけるべきと考えられる。

以上の背景を踏まえ、本研究では国内で製造流通する低温殺菌牛乳を対象として国際標準微生物試験法である ISO 法を主体とする衛生指標菌の定量分布を把握すると共に、海外の食中毒事例として挙げられる主要病原細菌の汚染実態を探知した。併せて代表検体の構成菌叢解析から、各指標菌の適切性に関して考察を行ったので報告する。

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

研究班では国内の食品微生物試験法を国際調和の取れた形へと導くため、食品微生物試験法の国際調和を科学的観点から推進することを目的とする。国際調和を図る上では、逐次変動する微生物試験法に関する国際動向を見据えたアップデート等の作業が必要である。分担研究課題としては、食品微生物の試験法に関する国際動向の掌握と、食品の微生物試験法における妥当性確認のあり方に関する検討を行うこととする。

我が国の微生物試験法の公定法を国際的にハーモナイズさせるためには、試験法ごとに、国際的に認証された試験法を手本(参照法)として、公定法と参照法の同等性を確認しなければならない。その確認スキーム(メソッドバリデーション)の手本とされてきた規格が ISO 16140 である。そこで、先行研究では、ISO 16140:2003 の邦訳、それに基づくガイドラインの策定作業を進めてきた。その過程で、2016年6月に改訂版が出た。変更内容には、それに先立って出された AOAC:2012.2 版ガイドラインの内容と同調した、と推察される部分が少なからずあった。しかし、その部分については、既に、先行研究

の中でも情報分析していたので特に大きな問題とはならなかった。ところが、ISO 16140 の改訂版では、例えば、「ペアード(Paired)試験とアンペアード(Unpaired)試験」、「確定試験(Confirmation)」の要請のように、全く新しい概念の規定が加わったこともありその具体的内容の理解に苦慮していた。

幸い、我が国は平成27年(2015)から ISO TC34/SC9 の P メンバーになり、今年度、東京で SC9 国際年次会議を実施した。本年度の第一の目的は、この会議に、日本側委員として出席し、ISO 16140 改訂版策定に直接関わった SC9 のメンバーと情報交換することであった。SC9 ではテーマごとに20以上のワーキンググループ(WG)で議論を重ねているが、メソッドバリデーションに関わる WG1 は、WG3 「メソッドバリデーション」と WG2 「統計学」である。そこで、本報告書では、特にこの2つの WG の報告から洞察された内容を報告する。

ところで、メソッドバリデーションに深く関係しながら、極めて厄介な問題である「測定不確か」は、研究分担者が、かつて研究代表者として調査研究した問題である。それが今回の SC9 総会では、WG2 (統計学) から ISO 19036 の改訂案として提示された。そのため、この問題についても、改めて問題点の本質を考察することとした。

なお、ISO の会議内容は非公開となっているので、WG の報告内容に関しては多少曖昧な表現になっていること、ご容赦願いたい。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

コーデックス委員会では食品の衛生に関する国際的な整合性の整備を目的として、各国の食品微生物基準を策定するためのガイドラインを示している。この中で食品微生物試験法に関しては ISO 法を標準とし、同法もしくは科学的に妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。一方で、国内の微生物規格基準は歴史的に独自に開発された試験法を採用してきた。食品流通のグローバル化が進む近年において、本邦で採用される試験法と国際的に利用されている試験法のハーモナイズーション

に対する要求は増しており、国際的通用性を持った標準試験法の国内における整備は急務の課題となっている。

これらの課題を受け、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”において、現在、国際整合性を踏まえた主要食中毒細菌の標準試験法の作成が進められている。これまで、複数の病原微生物・毒素に関する作業部会がデータ収集・解析を行い、同委員会で妥当性確認等を協議することで標準試験法を策定してきた。

本研究では、これまでに食品検査法としての海外で利用される方法との妥当性確認が行なわれていないボツリヌス菌について国内で利用可能な試験法の整備を行い、国際的整合性を持った試験法の策定を目的とする。研究期間内に試験法の原案を作成し、検討委員会での議論を経て、将来的に試験法、Technical Specification (TS)、あるいはガイドラインとして整備・公開する事を最終目標とする。本研究により得られる成果は、食品の衛生試験法の国際調和を図る上での重要性に加え、食餌性ボツリヌス症疑い事例対応への活用も期待される。

本年度の研究では、ボツリヌス菌に対する国際標準試験法等に関する情報を収集し、国内現行法との相違点や国内現行法の科学的妥当性等について整理を行った。

(4) 遺伝子検査法に関する研究

わが国の食品衛生法では食品(種)ごとに種々の微生物に対する規格基準が規定されており、それに対応する個別の試験法が定められている。試験法は培養法をベースに構築されている。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も菌の生化学的および/もしくは血清学的特性を利用している。近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある。こうした状況をふまえ、本研究では食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、その活用にあたってのガイドラインの作成に資する基礎知見を集積するこ

とを目的とした。

B. 研究方法

(1) 衛生指標菌に関する研究

1) ISO 21528-1:2017 の概要

2017年に改定されたISOによる腸内細菌科菌群試験法について、概要を作成した。また、2004年に発行された前版との相違点について纏めた。

2) アイスクリーム等の汚染実態調査

市販のアイスクリーム等について、衛生指標菌汚染実態を調査した。検体はアイスクリーム(乳固形分15.0%以上、乳脂肪分8.0%以上)6検体、アイスマルク(乳固形分10.0%以上、乳脂肪分3.0%以上)15検体、ラクトアイス(乳固形分3.0%以上)5検体、氷菓4検体を用いた。試験項目は、細菌数(生菌数)、腸内細菌科菌群及び大腸菌群とした。試験方法は、細菌数については「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」に示された試験法(以下乳等省令)、腸内細菌科菌群はISO法、大腸菌群については乳等省令を用いた。腸内細菌科菌群は、選択分離寒天培地であるVRBG寒天について3つのメーカーの製品を用いた。また、大腸菌群については収去直後と6か月後の二度実施した。検出された大腸菌群は乳等省令の確認試験に加え、TSI寒天及びLIM培地での性状、尿素分解性、VP試験、クエン酸利用能、マロン酸利用能、IPA産生能及び酢酸塩利用能に関する生化学性状試験を行い、菌種の同定にはAPI20E(バイオメリュー)を用いた。

3) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査

市販の低温殺菌牛乳等について、衛生指標菌汚染実態を調査した。検体は、低温保持殺菌牛乳(LTLT: 63 ~ 65、30分)8検体、高温短時間殺菌牛乳(HTST: 72以上、15秒以上)2検体、高温保持殺菌牛乳(HTLT: 75以上、15分以上)1検体、超高温瞬間殺菌牛乳(UHT: 120 ~ 150、1秒~3秒)3検体を用いた。試験項目は、細菌数、腸内細菌科菌群及び大腸菌群とした。試験方法は、細菌数については乳等省令及びISO法を用い、腸内細菌科菌群はISO法を、大腸菌

群については乳等省令を用いた。検出された指標菌の菌種の同定には、RapiD 20E(バイオメリュー)を用いた。

4) NIHSJ-15-ST1:2017 案及び NIHSJ-16-ST1:2017 案の作成

1) の概要を元に、腸内細菌科菌群の定性試験法として NIHSJ-15:2017 を、定量法として NIHSJ-16:2017 のステージ1案を作成し、第65回食品からの微生物標準試験法検討委員会に提出した。

5) 低温殺菌牛乳検体

乳事業者7社で製造された計126検体(各製品につき3ロットを供することとし、各ロットにつき6検体とした)の低温殺菌牛乳を平成29年5月~7月に入手した。いずれの検体も入手後は速やかに10 以下の温度帯で管理し、24時間以内に以下の試験に供した。

6) ISO試験法

各検体における衛生指標菌の定量試験には国際標準微生物試験法として位置付けられるISO法を主として用いた。一般細菌はISO4833-1:2003、腸内細菌科菌群はISO21528-2:2017、大腸菌群はISO4832:2006、大腸菌はISO16649-2:2001、低温細菌はISO6730:2005、黄色ブドウ球菌はISO6888-1:1999を用いた。

7) 国内公定法

一般細菌、大腸菌群の検出には乳等省令において定められる方法を用いた。また、腸内細菌科菌群の検出には平成23年9月厚労省食安発0926第1号で通知された定性法を用いた。大腸菌群の測定にはBGLG発酵管を用いた試験法を用いた。大腸菌の試験には、いわゆる糞便系大腸菌群の推定試験を行い、確認試験陽性となったものをIMViC試験に供して判定することとした。黄色ブドウ球菌の検出には平成27年7月に厚生労働省から発出された通知法を用いた。

8) STEC及びサルモネラ属菌の検出試験

STEC及びサルモネラ属菌の検出にあたっては、緩衝ペプトン水225mLに検体25mLを加え、37 にて20時間培養後、PCR反応によるスクリーニングを行うことで定性判定を行った。

9) 菌叢解析

代表検体について、菌叢解析用試料として無作為に選定し、EMA処理後、Cica Genius DNA Extraction kit(関東化学)を用いて全DNA抽出を行った。次に同抽出物を鋳型として16SrRNA部分配列(領域799-1179)をPCR反応により増幅し、E-gel SizeSelect 2%(Thermo Fisher)およびAMPure XP(Beckman)を用いて増幅産物を精製・定量した。その後、等量混合ライブラリーをIon Chef/PGMシステム(Thermo Fisher)を用いたbarcoded ion semiconductor pyrosequencingに供した。取得配列データは、CLC Genomic Workbench ver.9.0(キアゲン)を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipelineにより取得配列の階層化分類等を行った。

(2)食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

コーデックス委員会の示す食品の微生物基準並びにガイドライン等は、食品のリスクマネジメントの世界標準とされている。その中で微生物試験法は国際標準化機構(International Organization for Standardization:ISO)法とされている。ISOで食品微生物試験法を担当するサブコミティはTC34/SC9であることから、このサブコミティに発言権を有するPメンバーとして参加し、ISO法の検討状況に関する情報収集と現在策定中のISO試験法の議論に積極的に参加した。平成29年6月には同サブコミティ総会を五十君が開催委員長として東京で開催し、総会では食品微生物試験法関連の国内からの情報発信ならびに海外からの情報収集を担った。

一方、アメリカにおける食品の微生物試験法に関する情報収集も行った。妥当性確認に関する文書がAOACインターナショナルから公開されており、こちらについて、その内容の精査を行った。ISOにおける妥当性確認とAOACインターナショナルにおける妥当性確認を比較検討し、我が国における食品の微生物試験法の妥当性確認のあり方を検討、微生物試験法に関する用語の整理、妥当性確認に関する考え方の整理を行った。

これらの検討は、バリデーション作業部会を組織して行った。作業部会は、五十君静信(分担研究者)、松岡英明(分担研究者)、岡田由美子(標準試験法検討委員会事務局、分担研究者)、森曜子(協力研究者)、吉田信一郎(協力研究者)、守山隆敏(協力研究者)、内田和之(協力研究者)、齋藤利江(協力研究者)、吉田朋高(協力研究者)のメンバーで組織した。

研究分担者として参画してきた先行研究「食品中の微生物試験法の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究分担研究」では、バリデーションガイドラインの作成に取り組んできた。その過程で抽出し、議論してきた課題を整理した。また、バリデーション最終段階の試験結果の評価において必須となる統計学の問題点を分析した。一方、測定不確かさの問題は、微生物試験に限ったことではないが、理化学試験や生化学試験に比べると、微生物試験の場合は標準物質がないために格段に難しい。周知のごとく、微生物試験では、コロニー計数法に基づく方法を「参照法」として、その結果を「標準」としてきた。そのことに起因する「微生物試験法における測定不確かさ」については、研究代表者として取り組んできた「食品の規格基準に係わる測定値に伴う不確かさに関する研究」で議論を重ねてきたが、その結論を改めて見直し検討課題として整理した。

上記により整理された課題を念頭に、文献情報の他、今年度は ISO TC34/SC9 の年次総会に委員として出席し、公式、あるいは非公式に国際動向の情報取得に努めた。関連する WG の委員と対面での意見交換を行った。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

食品中のボツリヌス試験法である ISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia (以下、ISO法) および BAM chapter 17 *Clostridium botulinum* (以下、BAM法) を精査し、

国内法を含めたプロトコールに関する整理表を作成した。また、標準試験法検討委員会に検討課題を整理した内容を議題として挙げた上で、ST1案を作成・提出した。

(4) 遺伝子検査法に関する研究

国際的な標準試験法として扱われている欧州 International Organization for Standardization (ISO) および、米国 Food and Drug Administration (FDA) による Bacterial Analytical Manual (BAM) ホームページ上にある微生物試験法の中で、遺伝子検査法 (PCR) に関する記載があるものを検索し、その情報を整理した。

C. 研究成果

(1) 衛生指標菌に関する研究

1) ISO 21528-1:2017 の概要

表 1 に ISO21528-1:2017 (定性法) の、表 2 に ISO21528-2:2017 (定量法) の概要を示した。また、2004 年に発行された前版との相違点について纏めた (表 3) 定性法における変更点は 2 次増菌培養の省略と、確認試験におけるグルコース発酵性試験の使用培地の変更であった。それにより、2004 年版で結果の判定までに 6 日間を要していたものが、5 日間での判定が可能となった。定量法においては、定性法と同様に確認試験の使用培地が変更されていた。定量法の所要日数は 2004 年版と同じ、4 日間であった。

2) アイスクリューム類の汚染実態

表 4 に、アイスクリューム等の細菌汚染実態調査の結果を示した。今回用いた検体で、微生物成分規格(アイスクリューム:細菌数 100,000cfu/g 以下、大腸菌群陰性、アイスマルク及びラクトアイス:細菌数 50,000 cfu/g 以下、大腸菌群陰性、氷菓:細菌数 10,000 cfu/mL (融解水) 以下、大腸菌群陰性)に違反している検体はほとんどなかったが、ラクトアイスの 1 検体について、1 種の培地から腸内細菌科菌群が検出され、*Klebsiella oxytoca* と

同定された。この検体は2017年7月に大腸菌群試験を実施した際に 1.5×10^1 cfu/gを検出しており、ラクトアイスの成分規格不適合であったものの、収去6か月後の検査では大腸菌群は陰性であった。また、当該検体は、細菌数についても30検体中2番目に多い値を示していた。今回用いた試験法において、腸内細菌科菌群の試験結果を得るまでの所要時間は最長4日、大腸菌群試験の所要時間は最長5日であった。

3) 低温殺菌牛乳等の汚染実態調査

表5に、低温殺菌牛乳等の細菌汚染実態調査の結果を示した。今回用いた検体で、大腸菌群が陽性のものはなかったが、低温殺菌牛乳の1検体で腸内細菌科菌群が検出され、*Pantoea* spp.と同定された。本検体は大腸菌群試験では陰性と判定された。ほぼすべての検体でISO法を用いた細菌数が乳等省令の細菌数より高い結果を示していた。ISO法を用いた細菌数をみるとLTLT牛乳では全8検体が1以上で最大は 10^3 cfu/mlであり、HTST牛乳では2検体のうち1検体 10^2 cfu/ml、他の1検体は不検出であった。UHT牛乳では3検体中2検体は細菌数が不検出であり、1検体については試料原液を接種した2平板の一方から1集落が形成されたが、落下菌の可能性が高いと思われた。今回用いた試験法において、腸内細菌科菌群の試験結果を得るまでの所要時間は最長5日、大腸菌群試験の所要時間は最長6日であった。

4) NIHSJ-15-ST1：2017案及びNIHSJ-16-ST1：2017案の作成

改訂されたISO 21528を元に、NIHSJ-15-ST1：2017案及びNIHSJ-16-ST1：2017案を作成し（別添1及び2）、第65回食品からの微生物標準試験法検討委員会に提出した。委員会での議論を経て、腸内細菌科菌群試験法の改訂に向けた検討を行うこと、前版と区別するために試験法番号に年号をつけること、及びST1案が承認された。

5) 市販低温殺菌牛乳検体における衛生指標菌成績

低温殺菌牛乳計7製品・126検体の加熱殺菌条件は63～65・30分であり、無脂乳固形分及び乳脂

肪分はそれぞれ8.0%～8.5%以上、及び3.5%～4.5%以上であった。衛生指標菌の検出試験に供し、以下の成績が得られた。

(1) 一般細菌数

ISO法

一般細菌数は製品間で大きく異なっており、特に製品B、C、Dで高値を示した。同指標菌平均値は、製品Dが84CFU/mLと最も高く、製品Bが70CFU/mL、製品Cが31CFU/mLであった。製品F及びGの平均値はそれぞれ3.41CFU/mL及び1.57CFU/mLであった。製品A及びEでは、それぞれ5検体及び4検体で最大1.67CFU/mLが検出されるにとどまった。7製品間での一般細菌数値の分散には有意差が認められ($p < 0.01$)、A製品ではE製品以外、B製品ではD製品以外、CからG製品では何れの製品に対しても統計学的に異なる一般細菌数分布を示した($p < 0.05$)。

国内公定法

ISO法と同様に、製品間での大きな差異が認められ、製品B、C、Dで高値を示した。同指標菌平均値は、製品Dが79CFU/mLと最も高く、製品Bが66CFU/mL、製品Cが24CFU/mLとISO法に比べ、やや少ない値ではあったが、有意差は認められなかった。製品F及びGもISO法と同様に全て陽性となり、検出菌数はそれぞれ3.23CFU/mL及び1.18CFU/mLであった。製品A及びEでは、それぞれ3検体で検出された。製品間での分散有意差もISO法による成績と同様であった。

以上より、低温殺菌牛乳検体における一般細菌試験成績はISO法、国内公定法の間で有意差を示さなかった。また、製品B・C・Dは他製品に比べて、相対的に高い一般細菌数を示したが、国内の乳等省令で定められる成分規格を満たしていた。

(2) 腸内細菌科菌群、大腸菌(群)

ISO法

製品A～Gの計126検体のうち、製品C及びDはそれぞれ3検体(18検体中)より、最大で1CFU/mLの腸内細菌科菌群が検出された。その他の5製品(A、B、E、F、G)はいずれも不検出であった。

大腸菌群については、製品 D の 2 検体で 0.33-0.67CFU/g と低い数値ながらも検出された。他の 6 製品 (A, B, C, E, F, G) についてはいずれも不検出であった。なお、大腸菌については、製品 A ~ G の計 126 検体全てで陰性であった。

国内公定法

腸内細菌科菌群の試験では 25g を試験対象とした。結果として ISO 法と同様に、製品 C 及び D のそれぞれ 3 検体で陽性を示した。当該試験は定性法であるため、定量比較を行うことはできなかった。

大腸菌群の試験法では、1mL を対象として実施することとされている。今回の検討では全ての供試検体で不検出となった。なお、大腸菌についても、全供試検体で不検出であった。

以上より、指標菌の種別から見た場合 (試験法は異なるが)、現行の成分規格からの逸脱は認められなかった。

(3) 低温細菌数

低温細菌は、製品 C の全検体 (18 検体) 及び製品 F の 5 検体より検出された。それぞれの検出平均値は 25.22CFU/mL および 0.09CFU/mL であった。製品間での分散分析を通じ、製品 C では他製品に対して有意差を認めた ($p < 0.01$)。

(4) 黄色ブドウ球菌数 (図 3、表 6)

ISO 法

黄色ブドウ球菌は製品 E 及び G を除く 5 製品で認められた。平均値として最も高い値を示した製品は、製品 B であり (4.09CFU/mL)、製品 A が 0.89CFU/mL、製品 D が 0.22CFU/mL、製品 C 及び F がそれぞれ 0.06CFU/mL であった。最も高い平均検出値を示した製品 B では全検体より検出されたが製品 C, D, F の陽性検体数はそれぞれ 3, 6, 3 検体にとどまった。

国内公定法

国内公定法は平成 27 年に食品からの微生物標準試験法検討委員会での議論を経て、定められたものである。同法を用いた試験成績は ISO 法と同様に計 5 製品 (A, B, C, D, F) で陽性となった。

6) 指標菌種別間の相関性

(1) 一般細菌数と低温細菌数

ISO 法により求めた一般細菌数と低温細菌数間の R^2 値は 0.0801 となり、両指標菌間に明確な相関性は認められなかった。但し、両指標菌が共に検出された製品 C の R^2 値は 0.419 と相対的に高い値を示した。

(2) 一般細菌数と腸内細菌科菌群数

ISO 法により求めた一般細菌数と腸内細菌科菌群数間の R^2 値は 0.0076 となり、両指標菌間に明確な相関性は認められなかった。

(3) 低温細菌数と腸内細菌科菌群数

ISO 法により求めた低温細菌数と腸内細菌科菌群数間の R^2 値は 0.00495 となり両指標菌間に明確な相関性は認められなかった。

なお、その他の指標菌種別間では相関係数を求めることが統計上不可能であった。

(4) ISO 法及び国内公定法の腸内細菌科菌群の検出率の比較

製品 C/D で検出された腸内細菌科菌群の定性検出率は両試験法で共に 16.7% (6/36) であった。

7) STEC 及びサルモネラ属菌の検出成績

STEC 及びサルモネラ属菌は全ての検体において不検出であった。

8) 代表検体の構成菌叢解析

7 製品 A-G より 3 検体を無作為に抽出し、全 DNA を抽出した後、16S rRNA barcoded ion semiconductor pyrosequencing 解析を行い、各製品の構成菌叢に関する検討を行った。図 5 にはバーチャートでその成績概要を記した。最終的に供試検体の構成菌叢としては、587 菌属が検出されたが、全体での優勢菌叢としては、*Pseudomonas* 属、*Sphingomonas* 属、*Arthrobacter* 属、*Brevundimonas* 属、*Rhodococcus* 属等が同定された。また、腸内細菌科菌群に属する細菌属としては、*Erwinia* 属、*Serratia* 属、*Klebsiella* 属等が検出された。

このうち、腸内細菌科菌群、大腸菌群、黄色ブドウ球菌が検出された製品 D の代表検体では、検体間での多様性に富んでおり、他製品で最も優勢であっ

た *Pseudomonas* 属及び *Sphingomonas* 属の占有率はそれぞれ 1.2% 及び 3.1% と総じて低い傾向を示した。また、衛生指標菌の検出成績が最も良好と思われた製品 E では、低温細菌の一種である *Flavobacterium* 属の占有率が他製品に比べて高い傾向にあった (20.0% vs. 2.1%)。このほか、黄色ブドウ球菌が高頻度に検出された製品 B では、*Arthrobacter* 属の占有率が相対的に低く (0.7% vs. 14.7%)、対して *Acinetobacter* 属の占有率は相対的に高い傾向を示した (4.5% vs. 2.2%)。

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

微生物試験をとりまく国際情勢

食品の国際的な規格基準を決めているコーデックスでは、国家レベルの食品の微生物学的基準の判定で用いる試験法は、科学的根拠のある妥当性確認 (バリデーション) を行った試験法であることを求めている。コーデックスにおける食品の微生物基準判定に用いる標準となる試験法は、ISO (International Organization for Standardization; 国際標準化機構) の示す試験法であり、その他の試験法を用いる場合は、ISO 16140 (食品の試験法のバリデーションに関するガイドライン) に示された科学的根拠のあるバリデーションを行った科学的根拠のある試験法の採用も可能としている。

食品の微生物試験法については、WTO (World Trade Organization; 世界貿易機関) の協定の中に、試験規格の策定は ISO が行うと示されていることから、ISO が国際標準と考えるのが妥当といえる。ISO で、食品の微生物試験法を議論している主なサブコミティは、乳製品が TC34/SC5、食品一般が TC34/SC9 である。

ISO/TC34/SC9 総会の開催

ISO が作成する規格には、製品規格やマネジメント規格だけではなく、食品の微生物試験法に関するものがある。それぞれの規格は新規提案をもとに段階的に審議されたのち国際規格として発行される

が、個別の審議は TC (Technical Committee; 専門委員会) または TC の下部組織である SC (Sub-Committee; 分科委員会) で行われる。現在、ISO には 200 を超える TC が存在するが、食品の微生物試験法に関しては、TC34 「食品専門委員会」の中での SC9 「微生物分科委員会」及び乳製品については SC5 「牛乳及び乳製品」が規格の作成を担当している。

2002 年から TC34/SC9 に係る「国内審議団体」として、一般財団法人日本食品分析センターが国内事務局となり、規格案などについての審議事務を担当してきた。参考として表 1 に TC34 に係る国内審議団体一覧を示す。表中に示した参加地位には P (Participating) メンバーと O (Observers) メンバーとがあるが、前者には規格案に対する投票権があり、かつ国際会議 (総会) への出席義務がある。一方の O メンバーは投票権や会議への出席義務はないがコメントの提出は可能である。長年にわたりわが国は SC9 の O メンバーとして対応してきた。

2018 年度から、わが国は食品の微生物試験法策定の専門委員会である ISO/TC34/SC9 に投票権のある正式メンバー (P メンバー) として加わった。その準備として、2013 年ドイツのベルリンで開催された総会から、毎年専門委員会に参加し、情報収集と審議文書の審議に参加してきた。このような経緯から、2018 年 6 月には、ISO/TC34/SC9 総会をホスト国として東京都内の三田国際会議所にて開催した。総会は、前半の 3 日間は ISO/TC34/SC9 の総会、後半の 2 日間には CEN/TC275/WG6 の総会を開催した。これらの総会への参加国は、フランス、オーストラリア、ベルギー、中国、フィンランド、ドイツ、インド、イラン、オランダ、ノルウェー、スペイン、スイス、イギリス、タイ、アメリカ、日本 (ホスト国) の合計 16 カ国であった。そのほかに AOAC インターナショナル、CEN (欧州標準化委員会)、EU-RL (欧州連合レファレンス検査機関)、IDF (国際酪農連盟) などの関連組織からの参加者を含め総計 47 名が参加した。参加者の多くは行政を含む研究機関や民間の研究機関、当該国の規格協会の代表者で、

いずれも食品の微生物試験についてのエキスパートであった。TC34/SC9 の総会で審議された、あるいは報告された内容については表 2 に概要を示した。

バリデーションガイドラインの現状

現在、国際的に広く用いられている代替試験法の妥当性確認の方法を示したガイドラインである ISO 16140 は、2003 年に公開されてから改定されていなかった。一方、米国の AOAC インターナショナルは、ISO 16140 の改定作業に先立ち、2012 年に AOAC INTERNATIONAL Method Validation Guidelines を公開した。試験法のバリデーションに関しては、100 年を超える歴史を持つ AOAC インターナショナルは、妥当性確認に関する最新の考え方をまとめ、文書化した。この文書の内容は、我々が試験法の妥当性に関する議論をするためには非常に有用な情報を与えてくれる。AOAC インターナショナルが長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方を集大成したガイドラインといえる。そのような考え方は、ISO にも反映され、ISO 16140 の改訂では、その改定案の検討に AOAC INTERNATIONAL Method Validation Guidelines と可能な限り整合性がある形で作業が進められている。

国際的なスタンダードとしての微生物試験法のバリデーションに関しては、現在 ISO/TC34/SC9 で、ガイドライン ISO 16140 の改訂が進んでいる。これまで代替法のバリデーションガイドとして広く用いられてきた ISO 16140:2003 は、単一の文書であったが、今回の改訂版ではパート 1 からパート 6 と、6 つの文書に分けて検討が進められている（表 3）。2016 年に、パート 1 と 2 が公開された。パート 1 は、試験法のバリデーションに用いられる用語や定義に関する文書となっている。パート 2 は、代替法（独自法）のバリデーションに関する一般原則及び技術的プロトコールとなっている。

バリデーション実施システム

バリデーションガイドラインは最終的には「案」とするに留めた。公開が難しかった最大の理由は、

我が国には未だ公的なバリデーション実施システムが無かったからである。ガイドラインの中には「専門家の判断を要する事項」が少なからずあるが、この場合の「専門家」とは、単に専門的な経験や知識をもった者というだけでなく、その判断をする権限をも与えられた者、という意味である。具体的には、国際的バリデーション実施機関である AOAC、AFNOR、NordVal などが組織した専門委員会等である。我が国には、それに相当する組織が無い。そのため、この組織の構築を目指す議論や活動も行なったが、難しい状況は変わらなかった。そのため当面は、当該の厚労科研グループのなかで、アドホック組織を作り対応していくことが現実的な解ではないか、との意見などが出されていたが結論には至らなかった。

本年度に至り、HACCP の制度化を含めた食品衛生管理への対応策として、衛生指標菌に対する標準試験法の確立が喫緊の課題となった。しかし、衛生指標菌についての国際的な定義はなく、したがって国際的に認証された試験法もない。そこで、我が国としては国際的に通用する衛生指標菌試験法の開発において、是非、先導的役割を果たすべきであると考えられる。このような状況を背景に、公的なバリデーション実施システムを構築すべきとの声が高まることが期待される。

同等性の判定基準

微生物試験法では標準物質がない。参照法として認証されている試験法の結果が標準物質の代わりとなる。前提として、参照法の結果は常に正しい、とされる。しかし、参照法の多くは特定の固相培地で形成されるコロニーの数を数える方法であって、数%程度のバラツキは避けられない。したがって、参照法の結果と比較する試験法（代替法や迅速法）が同等であると断定することは容易ではない。それでも、他に方法がないので、可能な限りプロトコールをきめ細かく規定してバラツキの少ない、再現性のある結果が得られるようにしているのが実情である。問題は、そのようにして得られた結果から、

同等性を判定するための基準の意味についてである。例えば、最終的には統計学的判断をするので、測定データの数が問題となる。そのため、プロトコルでは同一条件での繰り返し数を規定している。また、バリデーションの最終段階で実施される共同試験(コラボスタディ)では、何ヶ所の試験所で実施すべきかが規定されている。例えば、12ヶ所で5回繰り返しのデータを得た場合と、15ヶ所で4回繰り返しのデータを得た場合を考える。単位データの数だけでいうなら、どちらも60データで同じ条件になる。しかし、バラツキの原因を考えると、試験所間のバラツキと、試験所内でのバラツキは区別して考える。

煩雑ではあるが、このような数は実施段階で考えられることなので容易に揃えることはできる。実際は、どこかの試験所でのデータのバラツキが極端に大きい場合は「おかしい」と判断し、外れ値と称して除外する。その場合の判断基準もやはり統計学的に決められる。その結果、折角、当初は数を揃えておいても、最終的に比較する段階では数が揃わなくなる場合もある。t-検定では、両者の数がそろっていなくても問題はない。むしろ重要なのは有意な差と判断する確率である。多くの場合、95%が採用される。すなわち、両者の結果が95%以上の確率で同等(有意差がある確率は5%以下)と判断される時、両者は同等であると結論する。問題はその先である、この95%に何の根拠があるのか、何も説明がないのである。精度の高い化学分析でならともかく、参照法自体のバラツキ(この問題は「測定不確かさ」として別途論じる)が数%もあることを考えれば、95%が果たして妥当な判定基準となりうるか、との疑問が生じる。

このような統計学的判断は、察するに、多くの人が問題であると考えていたようだ。ISO 16140: 2016の中には、そのような判定基準の決め方に、今なお逡巡している様子が見てとれる。

具体的には、定量試験結果の判定基準を規定した箇所である。同等性の判定基準として、今までには無かった期待許容区間(expectation

tolerance interval; -ETI)を採用している点である。参照法の平均値(複数試料について測定した結果の平均値)と代替法の平均値の差がバイアスである。バイアスがゼロであれば、参照法と代替法(は同一の結果を示したことになる。しかし、平均値が同一であっても、統計的なバラツキはあるはずで、そのバラツキを考慮した、統計学的な同等性を示す必要がある。通常、t-検定で95%以上の確率で有意差がある場合を検定することが多いが、今の有意差がないこと、すなわち同等であることを80%の確率でいえることを判定する。何故、この場合は、95%ではないのか?科学的な理由はない。さらに、80%の確率ではあるが、バイアス値 \pm -ETI(80%)が、 ± 0.5 Log units以内なら同等であると結論される。さらにその先があつて、もし、部分的にでも ± 0.5 Log unitsを超える場合があつたとしても、参照法の標準偏差の4倍以内であれば同等でとしてよい、となっている。

80%という数値を決めるに当たっては、「同等であるのに、同等ではないと判断してしまう間違い」をできるだけ少なくしたい、という趣旨と理解されるが、そのために益々複雑な統計学的解析をすることに、果たして合理性があるか非常に疑わしい。肝心の「コロニー計数法」の精度を上げるための技術革新の法が春賀に科学的で合理的であると考えられる。

確定試験

定性試験において、結果次第でさらに確認のための念押し試験が要請されるようになった。率直に言って「なぜ?」である。参照法ではネガで代替法ではポジの場合は、擬陽性である。その場合は、さらに別の試験法で確認しろ、という。その逆に、擬陰性の場合は、確認試験は不要という。擬陽性と擬陰性に重み付けをするような発想は全く理解できない。検出することが、試験法の本来の要請であるから、検出できなかった、ということはリスク管理上、問題である。それに比べて、擬陽性はフェイルセーフの観点から問題にはならない、ということか。しかしバリデーションは本来、同等性のみを評価する

もので、どちらかが検出感度が高いとか、検出スペクトルが広いとかを判断するものではない。さらに、この確定試験の必要性の有無が、ペアード試験かアンペアード試験かによって左右されるという。

念を入れるという気持ちは理解できるが、その確定試験法がどのようなものかについては、参照法の確認手順、代替法の確認手順、あるいは両者を混合した手順などの何れかの手順に従って、と記載されている。バリデーション実施者は、ここで確実に戸惑うはずである。参照法と代替法が同一結果になるか否かを調べる規格であるから、異なった値が出ることは当然想定されているはずである。それにも拘らず、敢えて、第3の試験手順、しかもそのプロトコルが任意性のあるもので再確認せよ、としているのは、自己撞着としか言いようがない。しかも、「代替法の擬陰性による陰性偏差、陽性偏差、または陽性一致」、「代替法の擬陽性による陽性偏差、陰性偏差、または陰性一致」の6つのケースが定義されているが、その区別が分かりにくい。実際、発行された ISO 16140: 2016 版中でも明らかに誤記と思われるままになっている。

このように複雑で難解な手順が組み込まれるようになった背景を推察するに、同等性を調べた際に、できるだけ合格(同等であるという結論)させたいという思いがあったのではないか。同等といっても、そもそも、参照法自体に相当の不確かさがあるのだから、その不確かさの故に、代替法が、本来、正確な結果を出していたはずなのに、参照法の結果と異なる結果であった、という理由で、不合格になってしまうことが、不合理であると考える者が、少なからずいたということではないか。もし、それが事実であればそのことを明確に書くべきである。規格を読んで、それに従ってバリデーションを実際に行おうとする人は、ほとんど、そのような背景を理解しているわけではない。その結果、実施できずに当惑するか、逆に適当に解釈して本筋とは異なる手順で行ってしまうか、であろう。我が国で、当に指導的専門家集団である標準法検討委員会で検討しても理解できない、ということが、その証左である。

定性試験での判定基準：感度

定性試験では、次の3項目を調べる。感度 (Sensitivity)、 相対検出レベル (Relative level of detection; RLOD)、 代替法の包含性 (Inclusivity) と排他性 (Exclusivity)。この中で、感度は、参照法と代替法の結果を比較して、各々が陽性か陰性かを調べることある。この時、両方も陽性になるか、陰性になれば良いが、異なったときにどうするか、というときに、上記の(3)確定試験で述べたような判断が入る。最終的には、4つの場合、すなわち陽性一致、陰性一致、陽性偏差(参照法が陰性で、代替法が陽性の場合)、陰性偏差(参照法が陽性で、代替法が陰性)に分かれ、各々の場合の数から、感度が計算されるが、この計算結果が同じになるのは、陽性偏差と陰性偏差の数が等しいときである(なお、この場合の「数」には、各々、擬陽性による陰性偏差や擬陰性による陽性偏差も含める数であるので、混同しないように「総数」と表記する)。また、いずれの偏差にしても、その数が多ければ、両方法が同等とは言えない。したがって、両方法が同等であると判断できる基準として、

陽性偏差と陰性偏差の各々の総数の差が規定数以下、であって、かつ 陽性偏差と陰性偏差の各々の総数の和が規定数以下の場合、となっている。理屈は理解できる。問題は、この規定数の根拠がわからないことである。わからなくても具体的数値が定められているので、バリデーションの実施は機械的にできるようにはなっている。しかし、厄介なことに、陽性偏差と陰性偏差の数自体を決める際に、上記の確認試験の結果が必要になる。例えば、陽性偏差の総数は、「陽性偏差 + 擬陰性による陽性偏差」、陰性偏差の総数は、「陰性偏差 + 擬陽性による陰性偏差」、である。この判断が煩雑で、合理的とも思えず、規格本文で誤記されていたりして、混乱していることは上記の通りである。

定性試験での判定基準：RLOD

定性試験の第2の調査項目は RLOD である。3段

階の菌濃度、すなわち無菌、低濃度、高濃度で、参照法と代替法の陽性率を比較する。この場合の低濃度とは、参照法での陽性率が25～75%になるような濃度、というように規定されているが、そのような試料を調製することは意外に難しい。予め、予備実験で検討しておくことは必須である。書いてある手順通りにバリデーションしようとしても、このような条件設定があると、そこで止まってしまうことにもなりかねない。さらに、こうした条件を設定できて結果が得られたとしても、その先の解析法は、規格ではブラックボックスになっている。すなわちEXCEL上で自動計算するプログラムがISOから無償でウェブサイト (<http://standards.iso.org/iso/16140>) に公開されている。参照法検体数、代替法検体数、参照法陽性数、代替法陽性数、を入力すると、RLOD、その信頼区間、対数変換後の標準偏差、そして参照法と代替法の検定結果(p値)などの統計学的数値が直ちに得られる。一見便利ではあるが、ブラックボックスであることに変わりはない。

これまでの記述からも容易に考えられることであるが、同等性の判断、すなわち合否判定基準の根拠は、必ずしも科学的合理的に決められたものとは限らない。肝心の統計学的計算の過程を理解することが、専門外の人には難しい、ということがしばしば言われるが、それは正しくない。わかるような表現になっていない、というべきであろう。難解なこととして、ブラックボックス化することは極力避けなければならない。ISOとしてはサービスのつもりでも、ユーザーとしては理解の妨げになっていると言わざるを得ない。

東京会議でのWG3(メソッドバリデーション)の報告・結論

(イ) ISO 16140では手本とすべき参照法の存在を前提としているが、それがいない場合は、そもそも、そのような参照法自体を開発しなければならない。また既に参照法がある場合でも、その内容を改変したりする場合、どのようなバリデーションをすれば

良いのか、という問題提起は以前からなされていた。それに関わる規格がISO 17468: 2016: Microbiology of the food chain Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method. である。この規格に対する改訂案がだされた。元々、本文4ページにAnnex Aとして図が1個(フローチャート)付いているだけの簡単な内容であったから、随時、改訂が重ねられていくことは予想された。新しい参照法を開発する場合に対しては、次の5段階から成るスキームを提示している。

- ・ステップ1: 試験法の選択、
- ・ステップ2: 試験法の評価、
- ・ステップ3: 実際のマトリクスを用いた複数試験所で試験、
- ・ステップ4: ステップ1～3までのデータに基づき、その先の評価を進めるべき試験法と実施する者の選択、
- ・ステップ5: コラボスタディ。

これに引き続いて、既存の参照法を改定する場合の留意事項が述べられている。そして、今回、提案された改訂は、この後半の部分に関してであり、具体的な事例を加えるなど、出来るだけ分かりやすくしようとの意図が感じられた。このような議論は、具体的な事例が出されると、議論が発散する恐れがあるとはいえ、我が国としても最も重要な内容であるので、注視していくことが重要である。

(ロ) ISO 16140: 2016は、今後出版される予定の分冊も含め、6分冊構成である。第1分冊「用語」、第2分冊「参照法に対する代替法(市販キット等)の妥当性確認の手順」が出版済みであり、第3分冊「単一試験所で実施される参照法および妥当性確認済代替法の検証手順」、ベリフィケーションの仕方、各試験所で導入する場合に必須、第4分冊「単一試験所試験法の妥当性確認手順」、第5分冊「市販キット等になっていない試験法のための部分的試験所間妥当性確認手順」、第6分冊「微生物確定試験および識別のための代替法の妥当性確認手順」が計画中である。こうした背景により、各規格の作成、

あるいは改訂作業、特に、実際に実験によって確認する作業を行ってくれるメンバーを募る、等の提案がなされた。ボランティアとしての協力をどのように行なってゆくべきか我が国としての課題である。

東京会議での WG2 (統計学) の報告・結論

測定不確かさの問題が議論された。かつて、この問題について長時間議論した経験とその結果を反芻しながら、改めて、この難問についての議論内容を考察した。測定不確かさの基本概念は、恐らく 1993 年に発行された文書 GUM によって提示されたのが最初であろう。その後、議論、改訂を経て、2008 年 ISO/IEC Guide 98-3 としてまとめられた内容が、当時としての最も明確な表記であると考えられる。その骨子の中の 2 項目、測定・分析における「真値」の概念を排除し、そこから派生する「かたよりのバイアス」という概念を全て「測定不確かさ」という分散成分に置き換える、その測定不確かさを評価するために、測定・分析のプロセスを明示することを要求する、は基本概念としては理解できるものであった。しかし、例えば、にしたがって測定・分析のプロセスを個々の段階に分解し、その各段階の測定不確かさを推定して積み上げようとしても、見積もりが難しい段階があれば、結局は、全体の積み上げができないことになる。そこで、そのような段階は除外して考えよう、ということが当時の ISO の方針であった。それでは厳密な意味で全体の測定不確かさが決められないことになってしまう。しかし第 3 項、統計的実験に基づかない、「エキスパート・オピニオン」による主観的評価を導入することによって「適当に」判断する、とした。一見、科学的判断を半ば諦めたような内容ともとれるが、元来、複雑な測定・分析のプロセスの全てが科学的に扱うことができる、と考える方が非現実的であり、そのような時こそ十分な経験と知識を持った「エキスパート」の判断が頼りである、という常識的な結論を示しているとも考えられるのである。

平成 20～22 年度 (2008～2010) に実施された厚労科研：食品の安心・安全確保推進研究事業「食品

の規格基準に係わる測定値に伴う不確かさに関する研究」(研究代表者：松岡英明)では、理化学試験、生化学試験、微生物試験の全てが対象となっていたが、特に微生物試験に対する議論が集中的に行われた。上記の国際動向調査に関連して、ISO TC69 (統計学的方法)/SC6 (測定方法と測定値)の国際および国内委員とも連携して議論が進められたが、最終的には、次のような結論を出した。すなわち、

「測定不確かさ」と表記されても、それが意味する内容は同じとは限らない、「測定不確かさ」はその推定の目的によって、具体的方法が異なる、「測定不確かさ」は、その具体的な値を必要とする状況の緊急度に応じて、その趣旨に合った推定法で実施することが必要、「測定不確かさ」を議論する対象となる分析法や試験法は、バリデーションされていること、あるいはバリデーションするに足る方法であることを前提としている、多くの場合、トップダウン法に頼らざるを得ないので、そのために必要となる標準物質、あるいは標準法は不可欠、であるとの結論に至った。そして、自ら、不十分ながら、その生菌の標準物質の開発に取り組み、その原理とプロトタイプの開発に成功して今日に至っている。

以上の結論の中で、にいう「トップダウン法」は各段階の不確かさを積み上げていく「ボトムアップ法」に対比される考え方である。言うまでもなく、当面見積もりが困難な段階については考慮の対象外にしておくとしても、最終的に、科学的な議論のためにはボトムアップ法でなければ成らないであろう。その考えに基づく規格が、ISO/TS 19036:2006 “Microbiology of the food chain—Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determination” 「フードシステム(生産・加工・流通・保管・販売)の微生物学 定量分析における測定不確かさ (Measurement uncertainty; MU) を見積もるためのガイドライン」であり、2006.2.1 に第 1 版が出され、2009.2.1 に補正 1 が出されている。

東京会議での WG3 からの提言は 53 項目に及んで

いるが、多くは、不確かさの要因をできるだけ詳細に、かつ合理的に分類すること、その上で、個々に不確かさをできるだけ、小さくするための技術的改善を図ること、に関係している。しかし、例えばコロニー計数をイメージング装置で高精度に行うという、不確かさを減じるためには最も有効と思われる方法の導入が全く議論されていない(ように思えるのだが)ことは、2010年当時と全く変わらず、不可解としか言いようがない。イメージング技術は熟練者の何倍ものスピードで、各コロニーの時空間的情報を精確に捉えることができるのだから。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

1) ボツリヌス標準試験法に関する国際動向の調査
食品中のボツリヌス試験法については ISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia (以下、ISO法) および BAM chapter 17 *Clostridium botulinum* (以下、BAM法) が国際的に広く利用されている。表1に示す様に、ISO法においてはボツリヌス毒素遺伝子をターゲットとした方法が、BAM法においてはマウス試験によるボツリヌス毒素検査(I.およびII.)、免疫学的手法によるボツリヌス毒素タンパク質検査(III.およびIV.)、およびボツリヌス毒素遺伝子検査(V.)が採用されている。

一方で、本邦ではボツリヌスに関する検査法として食基発第0630002号・食監発第0630004号(平成15年6月30日)の通知「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」で示される、食品へのボツリヌス菌添加回収試験が通知法として示されている。本試験法は検査対象食品中にボツリヌス菌が含まれた場合の、食品中でのボツリヌス毒素産生性をマウス試験により検討する試験法であり、食品からのボツリヌス菌の分離・同定法は記載されていない。加えて、衛食第83号(平成10年8月26日)「イタリア産オリーブ加工品に関わる検査命

令について」においてオリーブ加工品からのボツリヌス毒素およびボツリヌス菌の検査方法が通知されている。本試験法においてもマウス試験によるボツリヌス菌の同定法が採用されている。

以上の比較から、国内通知法と国際的に利用されている試験法の間には整合性は見られず、国際調和性の観点から、国内で利用可能な新たなボツリヌス試験法整備の重要性が確認された。

2) 標準法検討委員会におけるボツリヌス標準試験法策定に関する検討事項の整理

標準法検討委員会においては平成24年12月7日付けボツリヌス菌標準試験法(NIHSJ-19)としてステージ1(ST1)案が提出され議論がなされてきた。当該ST1案においてはマウス毒性試験、生化学的性状試験、毒素遺伝子検出によりボツリヌス菌の同定を行うプロトコルとして立案された。一方で同委員会においてボツリヌス毒素遺伝子試験法(NIHSJ-20)についても第30回委員会にて提案がなされたものの、最終判定をマウス試験により行うためのスクリーニング法としての位置付けが提案され、標準試験法としての取扱いについては議論が進んでいなかった。

平成24年12月7日付けNIHSJ-19-ST1をISO法およびBAM法と比較した結果、1) NIHSJ-19-ST1では段階希釈液の作製、3種類の前処理条件、4種類の分離培養用培地を使用する等、ISO、BAM法と比較して作業がかなり煩雑であること、2) はちみつを検体とした場合、ISO法では芽胞菌のみを検出するプロトコルになっている一方で、NIHSJ-19-ST1でははちみつの場合は敢えて加熱を行わない手順になっていること、3) NIHSJ-19-ST1で使用するブドウ糖・でんぷん加クックドミート培地はISO、BAM法とは異なり、芽胞産生用培地であること等を始めとして、NIHSJ-19-ST1とISO、BAM法の妥当性検証を行う上で大きな問題があることが明らかとなった

加えて、動物実験に対する国際的動向を踏まえ、国際的通用性を担保した試験法においてマウス試験の採用は国際的理解を得るのに大きな障害となる問題点も抽出された。

以上の議論から、第64回 食品からの標準法検討委員会（平成30年1月19日）において1)ポツリヌス毒素遺伝子試験法(NHISJ-20)を優先して整備を進めること、2)NHISJ-20の整備にあたっては、ISO/TS 17191:2013を参照法とし、Technical Specification (TS)として整備を進めることが決定された。

3) ポツリヌス毒素遺伝子試験法ステージ1(NHISJ-20-ST1)の作成

ISO/TS 17191:2013 を基に作業手順書を作成し、NHISJ-20-ST1 として提案した。

(4) 遺伝子検査法に関する研究

ISO 法において、PCR に関する記載があるものは約 30 あった。このうち、微生物の試験法に関するものは 7 であった。対象は STEC (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*)、ポツリヌス菌、エルシニア、レジオネラ、A 型肝炎ウイルスであった。食品に関連した細菌の試験法としては前 3 者が該当した。

BAM 法において、PCR に関する記載があるものは約 10 あった。食品に関連した細菌の試験法としては 5 であった。対象はサルモネラ、大腸菌 O157、リステリア、下痢原性大腸菌であった。

D. 考察

(1) 衛生指標菌に関する研究

本研究により、アイスクリーム類 30 検体について昨年発行された ISO 21528-2 (定量法)による腸内細菌科菌群試験及び乳等省令による大腸菌群試験を行ったところ、ラクトアイス 1 検体から腸内細菌科菌群が検出された。当該検体からは収去直後の検査において大腸菌群が検出されているものの、収去 6 か月後の検査では大腸菌群は陰性となっていたため、長期間の冷凍保存により損傷された菌が大腸菌群の試験法では増殖できず、腸内細菌科菌群試験法でのみ検出可能となった可能性が示唆された。また、低温殺菌牛乳等の検討でも、LTLT 牛乳 1 検体から腸内細菌科菌

群が検出された。当該検体の細菌数は他の低温殺菌牛乳検体と比較して高くはなかったことから、細菌数と腸内細菌科菌群汚染との相関はないと思われた。

以上より、腸内細菌科菌群が乳製品の衛生指標として有用である可能性が示された。ISO 法の改訂に伴い、今後国内の腸内細菌科菌群の標準試験法についても、改訂に向けた検討が行われることとなった。次年度は、当該試験法案を用いた乳製品の汚染実態調査を継続すると共に、現在腸内細菌科菌群不検出が成分規格とされている生食用食肉を用いた試験法案のシングルラボバリデーションを実施する予定である。

また、本研究では、国内の 7 乳業事業者により製造された低温殺菌牛乳計 126 検体を対象として、衛生指標菌の分布状況を検討した。ISO 法を中心とした検討を通じ、製品により、各種衛生指標菌の分布状況は大きく異なり、特に製品 C 及び D で腸内細菌科菌群が検出されたことは、当該食品の更なる安全性確に向け、製造工程管理ならびに温度管理等に課題があることが示されたと考えられる。

国内公定法による検討成績としては、いずれも乳等省令の成分規格として定められる「細菌数 5 万/mL 以下および大腸菌群陰性」を満たしていた。しかしながら、一般細菌及び低温細菌を主体としつつ、少なからず細菌の生存が確認されたことは、保存流通段階における温度管理の不備が生じた場合には、微生物増殖、ひいては健康被害を招く恐れがあることが改めて示されたといえる。

低温殺菌に耐えうる細菌としては、これまでに *Mycobacterium* 属や芽胞形成性の *Bacillus* 属等が報告されている。国内で製造流通される低温殺菌牛乳の消費期限は、超高温瞬間殺菌牛乳等に比べて比較的短期間に設定されていることに加え、10 以下の保存を行うことでこれらの発芽・増殖を抑制しうる等の知見を踏まえると、現行の乳等省令で定められる温度管理の遵守により、これらの危害を制御しうるものと考えられる。実際に、

近年我が国で製造される当該食品に起因する健康被害実態は報告されていない。しかしながら、国際整合性の観点からは、国際基準としての食品の冷蔵温度がより低い温度に設定されていることを考慮した検討も必要と思われる。その根拠には温度管理の厳格化が微生物の増殖制御に有効との複数の研究報告もある。また、低温殺菌牛乳は他の殺菌処理牛乳よりも微生物学的品質として、製品間の差異や季節変動が大きい可能性も指摘されており、本研究の成績はこれを支持するものといえる。従って、当該食品の更なる安全性確保には製造工程管理の検証も必要な事項であろう。実際に、2013年に低温殺菌牛乳より大腸菌群が検出されているが、その原因としては機械の洗浄不良、包装資材の汚染、温度管理の不備等が推察されている。本研究においてもISO法により大腸菌群陽性を認めたものが存在したが、大腸菌群を対象とする現行のISO法(集落計数法;ISO 4832:2006)では、検体1gあるいは1mLにつき100以上の菌数が想定される食品を主体とした試験法となっているため、加熱殺菌後の工程管理に用いる意義が大きいとは言い難い。従って、迅速かつ正確な製造工程管理を行うためのスクリーニング法については、今後一層の検討が必要不可欠な課題であろう。この点に関連した事項として、EUでは乳・乳製品の製造基準をはかる衛生指標として、腸内細菌科菌群が一般細菌数と共に採用されており、国内で現在用いられている大腸菌群を腸内細菌科菌群へと変更することは、国際整合性、更には当該食品の微生物学的品質の確保を図ると共に、同成績の国際発信を促す上で有用と思われる。本研究の成績は陽性検体における最大検出菌数が1CFU/mLとEUの基準値である10CFU/mLを大きく下回るものであった。今後、製造施設における衛生管理実態の検証にあたって、両指標菌を平行して検討することで、これに関連する科学的知見の集積に努めたい。

(2)食品微生物試験法の国際動向および妥当性確

認に関する研究

微生物試験をとりまく国際情勢

食品の国際的な規格基準を決めているコーデックスでは、国家レベルの食品の微生物学的基準で用いる微生物試験法は妥当性確認(バリデーション)と国際的な整合性を求めている。国内の試験法はそれに対応した“標準試験法”の議論が進み、現在コーデックスが求めるISO法を標準試験法とする考え方と、バリデーション(妥当性確認)による食品の微生物試験法の科学的根拠のある評価の重要性については既に定着している。わが国も、今後食品の微生物制御の国際整合性の中で工程管理(HACCP)の制度化が進んでゆくが、この中で検証として用いられる迅速簡便法をどのように導入してゆくかについては、代替試験法のバリデーションという考え方を理解して活用していく必要があるものと思われる。

ISO/TC34/SC9 総会の開催

2018年6月にアジアで初めてのISO/TC34/SC9総会をホスト国として開催したが、これらの総会への参加国は、フランス、オーストラリア、ベルギー、中国、フィンランド、ドイツ、インド、イラン、オランダ、ノルウェー、スペイン、スイス、イギリス、タイ、アメリカ、日本(ホスト国)の合計16カ国であった。そのほかにAOACインターナショナル、CEN(欧州標準化委員会)、EU-RL(欧州連合レファレンス検査機関)、IDF(国際酪農連盟)などの関連組織からの参加者を含め総計47名が参加した。この開催規模は、ヨーロッパで開催する例年の規模に匹敵し、参加者からも大変好評であった。

食品の微生物試験法の国際標準を検討するTC34/SC9にわが国も正式な一員として加わり、ホスト国としての役割を十分に果たせたと思われる。今後は、それぞれのWGの議論に積極的に加わり、原案の段階から日本からの提案ができるようになることが期待される。TC34/SC9総会へは継続的で積極的な参加と関与が期待される。

TC34/SC9からは、わが国に対してその食習慣が

ら、寄生虫の試験法、腸炎ビブリオ試験法、プロバイオティクス(乳酸菌)試験法、さらには今後の試験法の発展として、遺伝子学的な試験法をどのように取り上げていくべきか、動物を用いない毒素の試験法の標準化、フローサイトメトリーによる菌数測定法などの新たにはじまる WG への参加が期待されている。

バリデーションガイドラインの現状

試験法のバリデーションに関しては、AOAC インターナショナルが長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方をまとめ示してきた。そのような考え方は、ISO にも反映され、ISO 16140 に代替法のバリデーションのガイドラインとして示され国際的な考え方として広く受け入れられている。

代替法の妥当性評価ガイドラインとして示されこれまで広く用いられてきた ISO 16140:2003 (食品の試験法のバリデーションに関するガイドライン) についても、新しい情報を加えた改訂作業が ISO/TC34/SC9 で進められており、6 つの独立したガイドラインの検討が進められている。既にパート1の用語、パート2の代替試験法のバリデーションガイドラインについては公開され活用がはじまった。残る4つのガイドラインについても WG での議論は進んでいるので数年のうちには改訂作業が完了するものと思われる。この改訂に先立ち2012年にアメリカの AOAC インターナショナルは、バリデーションガイドラインを公開している。これらの2つのガイドラインは相互に整合性を持つように議論されていたが、一部の用語について異なった概念が取り入れられており、今後このあたりの考え方をどのように調整してゆくかは、TC34/SC9 総会でのトピックスとなると思われる。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

ボツリヌス感染症は発生時に死亡を含む極めて高い健康危害性を顕す国内でも慎重な対策が求められる感染症である。しかしながら現在、本邦においては食品中のボツリヌス検査法につい

て公定法などの標準化された検査法が存在せず、早急な整備が求められているところである。この社会的要請を受けて“食品からの微生物標準試験法検討委員会”において国際的通用性をもつ試験法の整備が議論されてきた。本研究においては、過去の検討委員会において議論された方法と国際的に利用されている ISO 法、BAM 法との比較検討を行い、ボツリヌス毒素遺伝子試験法

(NIHSJ-20) を TS として提案することで合意に至った。今後、NIHSJ-20 で使用されるプライマーの設定、培養法の国内食品に対する適合性等の検証を行った後に、国立研究機関、大学、地方衛生研究所等の協力を受けながら ST1 の検討箇所を設定し、実験データから細かいプロトコルの検討を行い、重要な指摘がある場合はそれを考慮したステージ2案を作成する。その後、協力機関とのインターラボラトリースタディを実施し、試験法の実行性を評価し、NIHSJ-20 法としての公開を目指す。

(4) 遺伝子検査法に関する研究

BAM において2015年以前に定められたサルモネラ、サルモネラ エンテリティディス、大腸菌 O157 を対象とした試験法は、特定の食品からの迅速な検出を目的とした方法と考えられた。Testing methodology for *Salmonella* Enteritidis (SE) (2009) は2008年発表の鶏舎環境中のサルモネラ属菌のサンプリングと検出の代替え法 (Environmental Sampling and Detection of *Salmonella* in Poultry Houses) の位置づけにあたるものである。

2017年改訂の下痢原性大腸菌の試験法はスクリーニングおよび同定を目的としている。本項は2009年よりほぼ毎年改訂されている。

2009年7月：リアルタイム PCR スクリーニング法。

2011年2月：プライマー追記。O157:H7 確認用マルチプレックス PCR 追記。

2013年7月：STEC 分子血清型別プロトコル(ルミネックス法)。

2014年7月：葉菜類検体処理追記。

2015年11月：STEC分子血清型別および病原因子型別改訂（ルミネックス法）

2016年8月：リアルタイムPCR法改訂。

2017年10月：STEC分離注意事項追記。マルチプレックスPCR法改訂。O157:H7についてPFGE及び全ゲノム解析の追記。

ISOにおいては全ての方法にTS（Technical Specification）が付与されている。上記BAMの下痢原性大腸菌の頻繁な改訂から推測されるように、遺伝子検査法は有用である一方、固定された標準法になりにくいことが予想された。

ISOでは、本年度に情報収集した個別の微生物に対する遺伝子検査法に関する記載以外に、PCRを実施する際の要求事項をまとめたものもあり、次年度以後はこうした一般事項についてまとめていく必要があると考えられた。

E. 結論

（1）衛生指標菌に関する研究

ISO 21528-1：2017の改定に伴い、先行研究で作成した腸内細菌科菌群の標準試験法NIHSJ-15及び16について、改訂に向けた検討が行われることが、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」で決定された。今年度の市販乳製品を用いた検討で、低温殺菌牛乳において大腸菌群陰性、腸内細菌科菌群陽性の検体が1検体見出された。また、ラクトアイスにおいては、大腸菌群陽性であった1検体が、6か月の保存後に再検査をおこなったところ陰性となったものの、腸内細菌科菌群では陽性であったものがあり、腸内細菌科菌群が衛生指標として有用である可能性が示された。次年度は、当該試験法案を用いた乳製品の汚染実態調査を継続すると共に、腸内細菌科菌群が成分規格に用いられている生食用食肉を用いて、改定試験法案の検討を実施する予定である。

国内で製造流通する、計7製品・126検体の低温殺菌牛乳製品を対象として、ISO法による衛生指標菌の定量検出試験を実施し、以下の知見を得

た。

・両試験法による比較成績として、一般細菌数及び大腸菌群の数値は相関性が高いことが示された。

・腸内細菌科菌群の検出成績として、ISO法（定量法）と国内公定法（定性法）は同等の感度を示した。EU等では牛乳の製造工程管理に衛生指標菌として一般細菌数及び腸内細菌科菌群を採用しているが、本成績より、定性・定量試験のいずれかで腸内細菌科菌群を製造基準に適用できる可能性が示唆された。

・製品間の微生物学的品質に係る差異としては、一般細菌数、低温細菌数等で顕著に認められたが、一般細菌数についてはISO法・国内公定法の両者間で有意差を認めなかった。

・ISO法により、腸内細菌科菌群及び大腸菌群が2製品で検出された。

・製品間での構成菌叢は大きく異なっており、特に腸内細菌科菌群及び大腸菌群を認めた製品Dでは検体間での多様性に富むため、製造工程管理及び保存・流通段階での温度の安定化等が今後の課題として示唆された。

・STEC及びサルモネラ属菌は全検体で陰性となった。EU等では乳及び乳製品の微生物基準として当該菌の一部が採用されていることを踏まえると今回の供試検体は上記国の微生物学的品質を十分に確保していると考えられる。

（2）食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

微生物試験をとりまく国際情勢としては、ISO/TC34/SC9総会をホスト国として開催し、多くの情報を得ることができた。ISO/TC34/SC9総会の2018年6月の東京開催については、無事その任務を果たすことができた。バリデーションガイドラインの改訂が進んでいることから、わが国もWGに積極的に関与し今後のISOのバリデーションガイドラインの策定に係わっていくことが重要であると思われる。

ISO TC34/SC9 の P メンバーとして、規格策定に直接関わっている専門家と議論できるようになったことは、エポックメイキングである。そこで、これまで長年、ISO 16140 を筆頭に既存の規格の邦訳、それに基づく国内向けガイドラインの作成に取り組んできた過程で直面した疑問点を改めて整理した。それを元に、年次総会中に公式、あるいは非公式に議論を試みた。ところが、こちらが疑問に思う論点が、相手にとっては、既に過去のことなのか、議論が噛み合わない。その状況は、我が国にとっての疑問点と年次総会での提案事項の比較表(下記)からも明らかである。しかし、この認識の違いをより明確にして、発信し続けることが、次の段階で我が国からの提言を速やかに賛同してもらうために極めて重要であると思われる。また、提言だけでなく、例えば ISO 16140 の第 3~6 分冊の編纂作業への実質的な貢献についても、P メンバーになったことの責任の一部と考えるべきであろう。こうした認識が得られ、国際的動向の中で我が国が果たすべき責務を明確にすることができたことは、大きな成果である。

なお、生菌標準物質に関する研究に関しては、今年度の研究計画に含まれてはいなかったが、本研究に密接に関わる内容であるので、自主的に実施し、その成果を学会等で発表したことを付記する。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

- 1) ボツリヌス標準試験法に関する国際動向調査および、国内法と国際的に利用されている方法の比較検討を行い、食品からの標準法検討委員会で整備・提案するボツリヌス検査法としてボツリヌス遺伝子試験法 (Technical Specification) が妥当であることが明らかにされた。
- 2) ISO/TS 17191:2013 を基に作業手順書を作成し、NHISJ-20-ST1 として提案した。

(4) 遺伝子検査法に関する研究

細菌の食品からの微生物試験法は培養法をベースに構築されている。多様な微生物に迅速に対応す

るため PCR をはじめとした遺伝子検査法は有用であると考えられる。一方で、毎年多くの手法が発表され、技術改良も著しいことから、遺伝子検査法の導入に関する定義付けには一層の検討と議論が必要と思われる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 書籍

- 1) 朝倉宏 . 2018 . ボツリヌス食中毒に係わる現状と課題 . 食品衛生研究 . 68 (2): 7-13 .
- 2) 加藤はる、朝倉宏、百瀬愛佳 . 2017 . ボツリヌス症ってどんな病気? 健康教室 . 2017 年 10 月号 . 76-79 .

2. 論文

- 1) 朝倉宏 , 岡田由美子 , 五十君静信 : 食品・医薬品・環境分野等の微生物試験法および微生物汚染の制御に関する最近の話題「食品衛生検査指針 微生物編 2015」収載試験法 . 日本防菌防黴学雑誌 2017;45:225-229. (2017.4)
- 2) Asakura H, Yamamoto S, Momose Y, Kato H, Iwaki M, Shibayama K. Genome Sequence of *Clostridium botulinum* strain Adk2012 associated with a foodborne botulinum case in Tottori, Japan, in 2012. *Genome Announc.* 5(34): e00872-17.
- 3) Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Maiti B, Okumura K, Morimatsu F, Balakrish Nair G, Kurazono H.: Detection of Cholera Toxin by an Immunochromatographic Test Strip. *Methods Mol. Biol.*, 1600:1-7, 2017.
- 4) Aryantini, N. P. D., Yamasaki E, Kurazono, H, Sujaya I. N., Urashima T, Fukuda K.: *In vitro* safety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's

milk. *Animal Science Journal*, 88(3):517-525, 2017.

3. 学会発表

- 1) 藤田和弘, 福沢栄太, 佐藤信彦, 佐野勇氣, 高橋洋武, 梶田弘子, 松田りえ子, 森曜子, 大城直雅, 五十君静信, 鎌田洋一。LC-MS/MSによる米飯中のセレウス菌嘔吐毒(セレウリド)分析法の検討。日本食品化学学会。2017.6.三重県志摩市
- 2) 藤田和弘, 福沢栄太, 佐藤信彦, 佐野勇氣, 高橋洋武, 梶田弘子, 松田りえ子, 森曜子, 大城直雅, 五十君静信, 鎌田洋一。LC-MS/MSによる米飯中のセレウス菌嘔吐毒(セレウリド)分析法の検討。AOAC IJS年次大会。2017.7.20.品川区
- 3) 安藤洸幸、嶋岡泰世、五十君静信、山越昭弘。酵素基質培地を用いた加熱損傷黄色ブドウ球菌の検出。日本食品微生物学会。2017.10.5-6。徳島
- 4) 綱 美香、原田 義孝、高崎 一人、布藤 聡、五十君 静信。*Listeria monocytogenes* の簡易検出法の開発。日本食品微生物学会。2017.10.5-6。徳島
- 5) 斉藤美佳子、松岡英明：大腸菌の死菌が生菌の増殖に及ぼす影響。第44回日本防菌防黴学会年次大会、大阪(2017.9.26)
- 6) 山崎栄樹, 楠本晃子, 七戸新太郎, 福本晋也, 菅沼啓輔, 奥村香世, 倉園久生, 森松文毅。ISO/IEC17025 認定に基づく大学における検査精度管理への取り組み。第91回日本細菌学会総会, 福岡市(2018.3)
- 7) 山崎栄樹, 楠本晃子, 七戸新太郎, 福本晋也, 菅沼啓輔, 横山直明, 五十嵐郁男, 玄学南, 倉園久生, 石井利明, 森松文毅。大学における ISO/IEC17025 認定取得の取り組み。第38回日本食品微生物学会学術総会, 徳島市(2017.10)
- 8) 山崎栄樹, 福本晋也, 菅沼啓輔, 楠本晃子,

七戸新太郎, 横山直明, 五十嵐郁夫, 玄学南, 倉園久生, 石井利明, 井上昇, 森松文毅。大学における ISO/IEC17025 認定取得の取り組み。AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第20回記念年次大会, 東京都(2017.7)

H. 知的財産権取得状況

該当なし