

平成 30 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、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、衛生指標菌作業部会を開催し、わが国の衛生指標に関する議論を行い、乳・乳製品の製造工程管理には細菌数及び腸内細菌科菌群を、成分規格には細菌数のほか、大腸菌または腸内細菌科菌群を設定することが国際整合性及び実行性を踏まえた形として望ましいとの意見で集約された。これを受け、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において、腸内細菌科菌群定性試験法 NIHSJ-15 を ISO 21528-1:2017 に基づく改訂を行い、国際調和を図った。また、同委員会では、ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法を討議し、直接的な糞便汚染指標である大腸菌の試験法をフィルター過の必要性の有無により分類して検討を行うこととなったほか、これまでに作定されたサルモネラ属菌試験法 (NIHSJ-01) 及びカンピロバクター試験法 (NIHSJ-02) について、国際調和と実行可能性の向上に資する形とするべく、ISO 法改訂に応じた見直しを行った。(2)国際動向及び妥当性確認に関する研究としては、2018年6月に開催された ISO/TC34/ SC9 総会に参加し、情報収集及び意見交換を行った。また本年度は微生物試験法に関する用語集を整理し、検討委員会へ提案すると共に、各試験法のバリデーション方法について助言を行った。(3)ポツリヌス試験法に関する研究では、ポツリヌス試験法作業部会を開催し、ST2 案の作成を行った上で、コラポスタディに向けての予備検討並びに課題の整理を行い、次年度にコラポスタディを行う計画案を作成した。(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、ISO ガイドラインを和訳化した上で、遺伝子検査法作業部会を組織化し、食品からの微生物試験法に PCR 法を採用する上で求められる事項の整理を行った。

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）

大嶋 秀克	日本乳業技術協会
奥村 香世	帯広畜産大学
甲斐 明美*	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*	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ーア ンドサイエンス合同会社
品川 邦汎*	岩手大学
鈴木 淳*	東京都健康安全研究センター
下島優香子	東京都健康安全研究センター
土屋 禎*	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*	日本食品検査
関 享子	国立医薬品食品衛生研究所
百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所
門間 千枝*	東京都健康安全研究センター
森 哲也*	東京顕微鏡院
森 曜子*	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検討を行った。

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、昨年度には研究分担者である五十君教授を委員長として日本で同会合を開催する等、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、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進めている。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が、その状況は海外とは大きく乖離するところもあり、国際調和を図る上で我が国の大きな課題と考えられる。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

現在、日本国内では、乳および乳製品、冷凍食品等多くの食品種の微生物汚染指標に大腸菌群が設定されている。ここでいう大腸菌群とは、「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」を指し、*Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* 属等の *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科菌群) に属する菌が多く含まれる。一方、大腸菌群には、腸内細菌科菌群に属さない *Aeromonas* 属等も含まれており、微生物学上の分類とは必ずしも一致しない側面がある。

現在、EU をはじめとする諸外国の多くでは、食肉や乳製品等の製造工程管理に腸内細菌科菌群が糞便汚染指標として採用され、検体数や合格基準等を定めたサンプリングプランを設定し、運用している状況にある。腸内細菌科菌群は、「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、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」と定義づけられることから、分類学との整合も併せ持っている。

食品の国際間流通が加速化を呈する現状においては、国内における食品の衛生指標に関しても、国際調和を踏まえた形とすることが必要不可欠な状況にあると思われる。そのため、本研究では、国内における、衛生指標の考え方並びに試験法等に関する検討を行うこととし、衛生指標菌作業部会、バリデーション作業部会等を開催し、意見を集約した上で、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において議題として提起を行い、食品微生物学専門家の意見として取り纏めることとした。

#### (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

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。

食品微生物試験法を国際調和させるためには、我が国の試験法を ISO 16140 に従って妥当性確認する必要がある。そのため、当初は ISO 16140; 2003 に基づくガイドラインを作成した。しかし 2016 年に出された改訂版では内容が大幅に刷新されていた。そこで、改訂内容を調査し、それを反映した新たなガイドライン作成に取り掛かることとした。

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)」など、全く新しい概念の規定が加わっていて、その具体的な内容の理解に苦慮した。この規格を扱っているのは ISO TC34/SC9 であるため、その 2017 年次総会(東京)に出席し、議論の経緯を調査した。しかし十分な理解は得られなかった。そこで、本年度は 2018 年次総会(ローザンヌ、スイス)に出席し、継続調査することを目的とした。

本報告書では、これらの活動を通じて、明らかになった内容をまとめた。

#### (3) ポ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ゼ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。

本年度は、ボツリヌス試験法ST1案を基盤として、コラボスタディに向けた体制を整備するため、作業部会を組織化した上で、予備検討並びに必要な検討項目を整理し、ST2案の作成を行うことを目的とした。

#### (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案作成を目的とした。

## B. 研究方法

### (1) 衛生指標菌に関する研究

#### 1) 衛生指標菌の設定及び試験法に係る検討

現在、わが国では、乳等省令に基づき、細菌数と大腸菌群を乳及び乳製品の微生物成分規格として設定されている。一方、その科学的妥当性と国際整合性については定かではない。これらの点を鑑みて、衛生指標菌作業部会を開催し、今後食品中の衛生指標として用い得る試験項目について討議した。

#### 2) ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法の検討

ミネラルウォーター類の微生物規格については、世界保健機関の飲料水水質ガイドラインや水道法とは異なる指標菌が対象として運用されている。この点に係る整合性を科学的観点から検討するため、ミネラルウォーター類における大腸菌試験法について衛生指標菌作業部会で検討を行い、検討委員会で試験法の討議を行うこととした。

#### 3) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

NIHSJ-1-ST4:2009(サルモネラ属菌定性試験法)と本試験法を基に発出されるサルモネラ属菌の通知試験法(食安発0729第4号)では、使用する緩衝ペプトン水(Buffered peptone water, BPW)のpHに差異がみられることを探知し、その整合に向けてバリデーション作業部会を開催した上で、検討委員会に改定案を提起することとした。

#### 4) カンピロバクター試験法の改訂

NIHJS-2-ST4:2012(カンピロバクター試験法)で示される増菌培地の添加剤成分としてはシクロヘキシミド(抗真菌剤)が用いられているが、その発癌毒性を踏まえ、本年度に入り、国内での同培地の入手が不可能な状況となった状況を探知した。そこで、ISO法の改訂状況を確認すると共に、国内での実施体制の確保に向けた試験法整備を行うため、改訂案を作成し、検討委員会で

討議を行うこととした。

## (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 30 年 6 月には同サブコミティ総会が、スイスの Lausanne で開催され、研究班からは、五十君、松岡、岡田の 3 名が参加した。総会では食品微生物試験法関連の話題について、国内からの情報発信ならびに海外からの情報収集を行った。

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。AOAC International 総会には、参加できなかったが、国内から当該学会に参加した研究者から、AOAC International の動向について情報収集を行った。妥当性確認に関する文書が AOAC International 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 International 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。

作業部会では、試験法関連の「日本語」用語の統一

が早急に必要であるという結論に達し、試験法関連の用語集作成を行った。本年度は用語の和訳についての整理を行い、検討委員会に提案した。

具体的な試験法検討に当たっては、どのように妥当性確認を行うかは、各論であり、標準試験法検討委員会で現在検討中のウェルシュ菌の標準試験法作成について、データ出しに協力すると共に評価方法について支援を行った。

ISO TC34/SC9 の 2019 年次総会において、ISO16140: 2016 版の制定過程に携わっていた WG3 (メソッドバリデーション) および WG2 (統計学) の主査等と対面議論するとともに、帰国後も必要に応じてメールでの意見交換を行い、得られた情報・考え方を整理した。

## (3) ボツリヌス試験法に関する研究

ボツリヌス試験法作業部会を開催し、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) を基に作成された ST1 案に関する疑問点や検討すべき事項を抽出した。その上でコラボスタディを実施する上でバリデーションが必要と思われる内容を選定し、検討委員会に ST2 案を提案することとした。平行して、次年度に向けて、コラボスタディ実施計画を検討した。

## (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) 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、とくに PCR 法に関する一般事項について記載したものを検索し、その中でも重要と考えられる文書について和訳の検討を行った。

## C . 研究成果

### ( 1 ) 衛生指標菌に関する研究

#### 1) 乳及び乳製品の衛生指標に関する検討

衛生指標菌作業部会を開催し、EU における乳・乳製品の食品分類ごとに設定される衛生指標菌試験項目及び試験内容を確認し、整理を行った。その上で、乳及び乳製品に係る微生物規格基準に関して、(1) 製造工程管理にあたっては、加熱殺菌後の工程において、細菌数及び腸内細菌科菌群を採用することが国際整合上、有用との意見で集約された。また、(2) 製品の規格としては、細菌数に加え、腸内細菌科菌群もしくは -グルクロニダーゼ産生大腸菌(いわゆる衛生指標としての大腸菌)の何れかを採用することが望ましい、(3) チーズ等の乳製品の成分規格としてリステリア・モノサイトゲネスを設定する国もあるが、製造工程管理にリステリア属菌を指標菌としてモニタリングする動きもある、等の意見が出された。

#### 2) 腸内細菌科菌群試験法の改訂

上項の議論を通じ、腸内細菌科菌群試験法については速やかな確認と検討を行う必要性が提起されたことから、次に衛生指標菌作業部会において、関連する ISO 法最新文書を入手し、内容を確認した。結果として、同試験法は 2017 年に(1) EE 培地による二次増菌の削除、並びに(2) 確認試験で用いる培地の変更(グルコース寒天培地からグルコース OF 培地)が行われている状況を確認した。これらの変更点は実行可能性を高める利点があると考えられたこと、更に国際整合をより高める点も鑑みて、第 68 回検討委員会において、NIHSJ-15 法改定案を提案し承認を得た。その後、NIHSJ-15:2019 として改訂版を作成した。

更に、同委員会ではこれまで ISO 法改訂に伴う変更・改訂作業については定義がなされていなかったことから、本委員会における、ISO 法見直しに伴う NIHSJ 法改訂の基本方針を定めることとした。その概要は以下のとおりである。

#### 【基本方針】

ISO 法見直しが major revision である場合

- ・前増菌、増菌及び選択分離培養における培養温度、培養時間及び使用培地の変更等は原則として major revision とする。但し、同等性が既出の科学論文等で確認可能な場合には、minor revision として差し支えない。

- ・その場合、NIHSJ 法と改訂 ISO 法について、現在成分規格が設定されている食品及び将来的に設定されうる食品について、標準菌株を用いた添加回収試験(病原菌の場合)又は自然汚染食品を用いた試験(衛生指標菌の場合)を 1 試験所で実施し、得られた成績を検討委員会に提出することとする。

- ・ISO/TC34 より、改訂時の評価成績等を入手可能な場合には、検討委員会で評価を行う際の資料として活用できるものとする。

ISO 法改訂が minor revision の場合

- ・確認試験における使用培地の変更、前増菌、増菌及び選択分離培養における従来の使用培地組成の一部の変更等は minor revision とする。

- ・その場合、当該培地を用いた際に国内分離株数株によって典型的な性状が得られることの確認を 1 試験所で評価し、その成績を検討委員会に提出する。

- ・ISO/TC34 より、改訂時の評価成績等を入手可能な場合には、検討委員会で評価を行う際の資料として活用できるものとする。

改訂後の試験法名について

- ・改訂を行った試験法については、試験法名の最後尾に改訂年を追記する。

- ・新たに作成した試験法についても、作成年を最後尾に付記することとする。

#### 3) ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法に関する検討

平成 30 年 2 月 27 日に開催された、厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会では、「食品製造用水」及び「清涼飲料水(ミネラルウォーター類のうち殺菌又は除菌を行うもの)」に関する微生物規格について議論が行わ

れ、世界保健機構が発出した飲料水水質ガイドライン (Guidelines for drinking water quality, fourth edition,

[https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/dwq\\_guidelines/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/))に基づき、上水については特定酵素基質培地を用いた大腸菌定性試験法が厚生労働省令第 101 号で定められていることを踏まえ、国際・国内での整合を図る意味合いから、大腸菌を微生物規格の対象指標菌とすべきとの提言がなされた。一方、同試験法については別途検討することとなった。こうした背景を踏まえ、本研究班では第 36 回バリデーション作業部会で試験法の検討を行う上の留意点を整理した上で、第 67 回検討委員会を開催し、同法について討議を行った。

検討の結果、ミネラルウォーター類の衛生指標菌の試験法としては、前処理に用いるフィルターろ過が可能なもの(すなわち固形成分等によるフィルター目詰まりや通過障害等が生じないもの)を適用範囲として、ISO 9308-1:2014 (メンブランフィルターを用いた大腸菌試験法)に準拠した試験法を NIHSJ-30-ST1 として、水道法試験法 (厚生労働省令 101 号) に準拠した試験法を NIHSJ-31-ST1 としてそれぞれ検討を行うこととし、承認された。

#### 4) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

NIHSJ-1: 2009 (サルモネラ属菌定性試験法) では、希釈水である緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water, BPW) の pH が  $7.2 \pm 0.2$  とされている。一方で、本試験法に基づいて発出されたサルモネラ属菌試験法 (食安発 0729 第 4 号「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」) で示される BPW の pH は  $7.0 \pm 0.2$  とされている状況を探知した。ISO 文書を確認したところ、ISO 6579: 2002 (Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.)、ISO 6887-1: 1999 及び 2017 (General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution) で用いられ

る BPW はいずれも pH  $7.0 \pm 0.2$  と記載されている状況を探知した。

上記の背景を受け、国際調和の観点から、NIHJS-1 に記載される BPW の pH を  $7.0 \pm 0.2$  と変更することを第 36 回バリデーション作業部会及び第 67 回検討委員会に提案し、変更履歴及びその理由を末尾に示す形で、NIHSJ-01: 2018 とすることについて承認を受け、その内容を検討委員会ホームページ上に掲載することとした。

#### 5) カンピロバクター試験法の改訂

NIHJS-2-ST4:2012 (カンピロバクター定性試験法) では、プレストン培地添加成分としてシクロヘキシミド (抗真菌剤) が用いられていたが、その発癌毒性を踏まえ、ISO 法では代替としてアンフォテリシン B が採用されている状況が生じ、これに応じた形で培地製造事業者もシクロヘキシミドを含む増菌培地の国内供給が本年度停止されたことを受けて、NIHSJ 法に基づく試験実施体制の確保を目的として、ISO 法の変更内容を確認・整理した上で、検討委員会へ改定案を提起した。文献検索を通じ、両添加剤は食品及び水からのカンピロバクター検出能力が同等であることを示す報告内容を確認した (Lett Appl Microbiol. 2002;34(2):124-9.)。また、製造事業者、輸入販売事業者等に照会を行い、今後もシクロヘキシミドを含む増菌培地の供給体制を安定的に確保できる予定はない状況を確認した。

これらを踏まえ、NIHSJ-2 で培地添加剤に含まれるシクロヘキシミドの代替として、アンフォテリシン B が使用可能となるよう NIHSJ-2 改訂案を第 36 回バリデーション作業部会に提案し、了承を得た。その後、第 67 回検討委員会での討議を経て了承を受け、変更履歴を末尾に示す形で NIHSJ-02: 2018 として、検討委員会ホームページ上に掲載した。

#### (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

微生物試験をとりまく国際情勢

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試験法は、ISO（国際標準化機構）が示す試験法であり、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。スイスで開催されたISO/TC34/SC9の総会に参加し、Pメンバーとして試験法作成およびガイドライン等策定の議論に参加した。

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。

2019年度の第37回総会は、スイスのLausanneで開催され、前半の1日間はCEN/TC275/WG6の総会、後半の4日間にはISO/TC34/SC9の総会が行われた。本年度の総会への参加国は、フランス、オーストラ

リア、ベルギー、カナダ、中国、デンマーク、エジプト、フィンランド、ドイツ、アイルランド、イラン、オランダ、ノルウェー、スペイン、スイス（ホスト国）、タイ、イギリス、アメリカ、日本の合計19カ国であった。そのほかにAOAC International、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）、IUMS（国際微生物学連合）などの関連組織からの参加者を含め総計55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1にその概要を示した。

ISO/TC34/SC9には、いくつかの既に終了したワーキンググループを除くと、現在、表2に示したように25のワーキンググループが活動している。スイスの総会時にはさらにいくつかのワーキンググループを新規として追加の必要性あることについて議論された。この総会でわが国に求められた課題としては、一般生菌数や汚染指標均等の培養温度による集落計数値の違いに関するデータの提供、食品衛生に係わる寄生虫に関する情報提供、アリサイクロバシルス試験法に関する協力要請などであった。

#### 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 International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 International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 International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。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。そこで、作業部会では用語の和訳について、ISO 16140-1 に加えて、TS Z 0032 : 2012 (ISO/IEC Guide 99:2007 (VIM3) ) 国際計量計測用語 - 基本及び一般概念並びに関連用語、JIS Z 8101-1 : 2015 (ISO 3534-1 : 2006) 統計-用語及び記号-第 1 部: 一般統計用語及び確率で用いられる用語、JIS Z 8101-2 : 2015 (ISO 3534-2 : 2006) 統計-用語及び記号-第 2 部: 統計の応用、JIS Z 8402-1 : 1999 (ISO 5725-1 : 1994) 測定方法及び測定結果の正確さ（真度及び精度）- 第 1 部: 一般的な原理及び定義、JIS Q 0035 : 2008 (ISO Guide 35 : 2006) 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則、JIS K 0211 : 2005 分析化学用語（基礎部門）、CAC/GL72 : 2009 分析用語に関するガイドライン（厚生労働省 2012）などの文書を参考として、森曜子委員が用語集案の作成を行った（表 3）。この案を作業部会で検討後、検討委員会へ提案した。

#### ウェルシュ菌試験法策定支援

ウェルシュ菌定性試験法は、NPO 法人食の安全を確保するための微生物検査協議会が呼びかけ、東京都健康安全研究センターと東京顕微鏡院が主体的に作業部会を構成し、標準試験法策定を進めている。同試験法策定には、バリデーション作業部会が協力

して検討を進めている。ISO 法では単独の定性試験法がないため、定量法で用いている培地等を参考にし、どのように標準試験法を作成するかについて助言を行った。ウェルシュ菌 40 菌株について、2 機関（内 1 機関は 3 部署で対応）の 4 部署で試験法の評価を行った。培地の性能評価にあたっては、TGC 培地で増菌培養後、LS 培地、MM 培地及び LG 培地を対象とした。ISO 法では、確認試験 A と B が存在するため、こちらについても評価を行った。

#### ISO 16140:2016 版の整理

- 1) ペアードスタディ (paired study) とアンペアードスタディ (unpaired study) の区別について  
・スタディの最初の工程の増菌培養の条件が参照法と代替法が同じ場合はペアードスタディといい、条件が異なる場合をアンペアードスタディという。定性試験における感度評価で、「確認試験」の要求度が異なる。
- 2) 定性試験における評価項目  
・定性試験では次の 3 項目を実施する。すなわち、自然汚染食品あるいは菌添加食品を用いて感度 (sensitivity) を明らかにする。この場合の菌濃度は陽性率 50% 程度 (25~75% の範囲)、菌添加食品を用いて菌濃度の検出の相対水準 (relative level of detection; RLOD) [適切に検出できる菌濃度] を求める。  
代替法の包含性 (inclusivity) および排他性 (exclusivity) を求める。  
・試料数は 1 食品カテゴリーあたり、3 種類の食品タイプを選び、1 食品タイプあたり最低 20 個の試料数が必要である。したがって、1 つの食品カテゴリーあたり、[食品タイプの数: 3 以上] × 20 以上 [試料 / 食品タイプ] = 60 以上となる。  
・感度を明らかにする試験結果の整理と感度及び関連指標 (相対真度、代替法擬陽性率) を求める計算式  
代替法の感度:  $SE_A = (PA + PD) / (PA + ND + PD) \times 100\%$   
参照法の感度:  $SE_R = (PA + ND) / (PA + ND + PD) \times 100\%$   
相対真度 (Relative trueness):  $RT = (PA + NA) / N \times 100\%$ 、ただし  $N = PA + NA + ND + PD$  ( $N \geq 60$ )  
代替法の擬陽性率:  $FP = PD / N \times 100\%$ 。
- 3) 新たに確認試験を追加する条件と同等性評価に及ぼす影響

- ・定性試験で、参照法と代替法の結果が異なった場合、従来は、単に陽性偏差、あるいは陰性偏差と結論。しかし、改訂版では新たに確認試験の実施が追加されている。ペアード試験では陽性偏差の場合のみ実施すべきとなっているが、アンペアード試験では全ての場合に実施するよう規定されている。

- ・例えば、参照法（R）で陽性、代替法（A）で陰性のときは擬陰性となるが、引き続き実施した確認試験（C）が陽性か陰性かで結論が異なる。R、A、Cが陽性か陰性かで、以下の総計8ケースが考えられる。

R: 陽性、A: 陰性→C: 陽性 擬陰性（False negative）による陽性一致（Positive agreement）:PA<sub>FN</sub>\*

R: 陽性、A: 陰性→C: 陰性 陰性偏差（Negative deviation）:ND

R: 陰性、A: 陽性→C: 陽性 陽性偏差（Positive deviation）:PD

R: 陰性、A: 陽性→C: 陰性 擬陽性（False positive）による陰性一致（Negative agreement）:NA<sub>FP</sub>

R: 陽性、A: 陽性→C: 陽性 陽性一致（Positive agreement）:PA

R: 陽性、A: 陽性→C: 陰性 擬陽性（False positive）による陰性偏差（Negative deviation）:ND<sub>FP</sub>

R: 陰性、A: 陰性→C: 陽性 擬陰性（False negative）による陽性偏差（Positive deviation）:PD<sub>FN</sub>\*

R: 陰性、A: 陰性→C: 陰性 陰性一致（Negative agreement）:NA

- ・各ケースの数は次の表のようになる。

T: 全体 (total)

代替法の感度:  $SE_A = (PA_T + PD_T) / (PA_T + ND_T + PD_T) \times 100\%$

参照法の感度:  $SE_R = (PA_T + ND_T) / (PA_T + ND_T + PD_T) \times 100\%$

相対精確さ (Relative trueness):  $AC = (PA_T + NA_T) / N \times 100\%$  ただし  $N = PA_T + NA_T + ND_T + PD_T$  ( $N \geq 60$ )

代替法の擬陽性率:  $FP = (PD_T + ND_{FP} + NA_{FP}) / N \times 100\%$

#### 4) 新たに確認試験を追加する理由

- ・ペアード試験では擬陽性結果の場合に必要とされ、擬陰性結果の場合必ずしも必要ではない。しかし、これは、擬陽性が擬陰性の結果よりも重大な問題だ、というわけではない。試験法は、標的菌をできるだけ高頻度に検出できる方が高性能と考える。代替法で検出できて、参照法で検出できないのは、代替法のほうが高性能であることを示唆している。そこで、その検出したものが確実に標的菌であることを確認するために確認試験（菌種の確認、同定）を行うようにしよう、との考えである。

- ・確認試験に用いる試験法にはいくつかの選択肢があり、その中には代替法の一部（菌種の確定試験）を利用する選択肢もある。その代替法全体としては、まだ、バリデーションされていなくても、利用する菌種の確認試験の部分が他の試験法の中で、すでにバリデーションされている場合は、それを利用できる。

#### 5) RLODを求める計算式

- ・定性試験では RLOD が要求されており、そのための EXCEL プログラムがオンラインで提供されている。便利ではあるが、計算の各段階の詳細はわからない。これに対して、

Annex D Models for RLOD calculations using data from the method comparison study. および

Annex F Considerations for calculations of the relative level of detection (RLOD) between laboratories as obtained in an interlaboratory study.

を参照して、各段階を手計算で行うことも可能、となっているが、理解困難な点は変わらない。

#### 6) 定量試験における許容区間

- ・定量試験では、代替法と参照法の試験結果から、その平均値の差（バイアス）と代替法のバラツキの大きさから、それが許容限界  $\pm [0.5 \times (\text{Log } \text{COP})$

ニ一数)]の範囲内にあるかどうかによって、同等性を判定する。

- ・代替法のバラツキから、代替法の測定結果が 80% となるような菌数の範囲を求める。これが  $\beta$ -ETI ( $\beta$ -Expectation tolerance interval) である。  $t=0$  の両側に対称に広がる分布曲線  $f(t)$  で、  $t>T$  あるいは  $t<-T$  の値になる確率が  $\alpha$  (例えば 0.05) 以下になるとき、  $T$  の値を、両側検定による確率  $\alpha$  に対する  $t$  値とって、有意差がある場合を判定する  $t$ -検定で用いられる。同時に、  $f(t)$  が  $-T<t<T$  の範囲にある確率は  $1-\alpha$  であるといえる。
- ・同等性を判定する場合は  $\beta$  が用いられるが、その統計的処理は共通である。代替法の測定結果に基づく確率分布曲線として、  $t$ -分布曲線を用いる。  $\beta=0.8$  となるような  $T$  値は、両側検定による確率  $1-\beta=0.2$  として、  $t$ -関数の逆関数 (EXCEL では  $TINV$ ) を用いて求める。これに、代替法の平均標準偏差  $s_A$  と補正パラメータ  $\sqrt{(1+1/n)}$  をかけた値が  $\beta$ -ETI/2 である。
- ・評価式は、  
 $U_i = \text{バイアス(代替法の結果の平均値 - 参照法の結果の平均値)} + \beta\text{-ETI}(80\%)/2$   
 $L_i = \text{バイアス(代替法の結果の平均値 - 参照法の結果の平均値)} - [\beta\text{-ETI}(80\%)/2]$   
 $U_i < 0.5 \times (\text{Log コロニ一数})$ 、  $L_i > -0.5 \times (\text{Log コロニ一数})$  であれば、同等と判定する。
- ・ここで問題となるのは、何故、85%、90%、あるいは95%ではなく80%なのか、また何故2×、3×、あるいは5×ではなく4×なのか? という疑問である。しかし、これに対しては、WG2「統計学」が議論して妥当な値だとして決めたこと、WG3は統計学の専門ではないので、WG2の提言をそのまま受け入れた、とのことであった。ただ、WG2としては、実験計画とデータの検証には数年を要したそうである。通常、議論された全ての内容が、最終的に出版されるドラフトに盛り込まれることはないが、何故、その内容だけが選択されたのか理由を理解することは難しい。
- ・なお、一旦、試験結果が許容範囲を外れたら、その

根本原因を分析しなければならない。バリデーション・サーティフィケーション実施機関は、その分析結果に基づき、試験結果が受け入れられるかどうかの判断をする。

### (3) ボツリヌス試験法に関する研究

ボツリヌス毒素遺伝子試験法ステージ2(NHISJ-20TS-ST2)の作成

コラボスタディ(CS)に利用可能な標準作業手順書を作成し、第66回検討委員会(2018年9月21日)にてNIHSJ-20TS-ST2として承認された。NIHSJ-20TS-ST2の作成においては、可能な限りISO/TS 17191:2013に準ずる事でISO法との妥当性を確保した形での整備をおこなった。

#### バリデーション実施計画の作成

ボツリヌス菌は試験実施に要求される設備条件の特殊性や菌株移動の困難さから、これらを考慮したバリデーション実施計画の作成が重要と考えられた。新規試験法のバリデーションはその実施形態によって、単一試験室バリデーション(Single laboratory validation:SLV)とCSに大別されるが、検討委員会での議論の結果、NIHSJ-20TS-ST2についてはSLVとCSを組合せた形でのバリデーションの実施が妥当であるとの結論に至り、バリデーション計画を提案した。すなわち、ボツリヌス試験法においてはNIHSJ-20TS-ST2内で試料調整方法が異なる2種の食品(はちみつおよび、はちみつ以外の一般食品)と4種類の毒素型(A型、B型、E型およびF型)の組み合わせにより計8パターンの添加回収試験の実施が必要であるが、この中ではちみつにA型菌を添加した試料を用いてCSを実施することで併行条件でのNIHSJ-20TS-ST2のバリデーションおよびバリフィケーション(性能検証)を同時に実施し、その一方でそれ以外の組合せに関してはSLVによる検証を行うことで、試験室間の菌株移動を最小限に抑えた形態でのバリデーション実施計画を作成した。加えて、ボツリヌス菌を取扱う試験実施に要求される設備条件およびボツリヌス菌取扱い実績を考慮してCSに参加可能な組織の選定を行い、

大学2施設および地方衛生研究所2施設からなる作業部会（WG）を編成した。

バリデーションに使用する添加菌液調整プロトコールの作成

WGにおいてNIHSJ-20TS-ST2の検証を行い、国内の試験室の状況を加味しながらもISO法との妥当性を担保した形でNIHSJ-20TS-ST2の修正が行われ、また同時にWGで実施するバリデーションにおいて検討が必要な項目について抽出を行った。食品衛生検査指針 微生物編(2018)およびISO16140-2:2016において定性試験のバリデーションでは食品試料に菌レベルが無菌（検出率0%）、低レベル（検出率25-75%）、高レベル（検出率100%）となるように添加し検証を実施する様に提言されている。NIHSJ-20TS-ST2では芽胞とVegetative cellを分けて検出するプロトコールとなっていること、および菌を添加後の食品検体の配布が困難であり各CS参加機関において個々に食品への菌添加を行わざるを得ないことから、各CS参加機関における添加菌液の制御について慎重な検討が必要である事が指摘された。培養条件が芽胞形成割合に与える影響を検証した結果、添加菌液調整に使用する培養液の組成および培養条件によって芽胞形成割合が大きく異なることが明らかとなり、CS参加機関間で添加菌レベルを同水準に制御するためには添加菌液調整プロトコールの整備の必要性であることが明らかとなった。本解析の結果に基づき、添加回収試験における菌レベルの制御が可能なCS実施に向けて、同一組成の培地を利用した添加菌液調整プロトコールの原案を下記の様に提案した。ポツリヌス菌においては毒素型間で発育性状に差が見られること及び、CSにおいて各機関で由来の異なる菌株を使用せざる問えない現状から、今後、下記のプロトコールを基本としながらCS参加機関間でのデータ比較を実施し、安定した添加菌液を調整可能なプロトコールの整備を進めることとした。

【添加菌液調整プロトコール（原案）】試供菌株の保存液をクックドミート培地に接種し、 $37\pm 1$  で3日間、嫌気条件下で培養した培養液0.06 mLを新

しいクックドミート培地6 mLに接種し $37\pm 1$  で7日間、嫌気条件下で培養する。この培養液0.06 mLを新しいクックドミート培地6 mLに接種し80 で20分間加熱処理後、 $37\pm 1$  で7日間、嫌気条件下で培養する。この加熱処理および7日間培養の操作をさらに2回繰り返し得られた培養液を50%グリセロール溶液と1:1で混和し-80 で凍結保存する。

#### （4）遺伝子検査法に関する研究

ISOにおいてPCR法に関する記載があるものは約30あり、このうち当該法の一般的な事項に関する記載があるものを整理した。

コンベンショナルなPCR法の工程に関するものとしては、ISO 20837:2006、ISO 20838:2006、及びISO 22174:2005があった。遺伝子検査法に関する作業部会を作成し、当該作業部会においてこれらについて検討していくこととした。

上記3文書について英文和訳を行い、内容及び文言等を精査した。各文書の現時点での和訳タイトルは以下のとおりである。

ISO22174：食品および動物飼料の微生物学 - 食品媒介病原体検出のためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR） - 一般要求事項および定義

ISO20837：食品および動物飼料の微生物学 - 食品媒介病原体検出のためのポリメラーゼ連鎖反応法（PCR） - 定性的検出用検体調製に関する要求事項

ISO20838：食品および動物飼料の微生物学 - 食品媒介病原体検出のためのポリメラーゼ連鎖反応法（PCR） - 定性法のための増幅および検出に関する要求事項。

これらはPCRの使用機器(サーマルサイクラー)に関する文書ISO/TS 20836:2005と併せて、PCR法に関する工程の概要を規定するものであった。一般的に実験室で実施されるPCR法と比較してコントロールの設定が多様であった。一般的な陰性及び陽性コントロールに加えて、プロセスコントロール、抽出コントロール、内部/外部増幅コントロールが含まれていた。

## D. 考察

### (1) 衛生指標菌に関する研究

本研究では、ISO 法を基とした国際調和のとれた試験法の整備に主眼を置き、食品毎の衛生指標菌設定の現状を把握した上で、乳・乳製品を対象とした場合の衛生指標菌の設定に関する意見を、製造関係者を含めた専門家から構成される衛生指標菌作業部会において議論し、製造工程管理と製品の規格の2点において、それぞれの試験項目案の作成に至った。また、実行可能性からは簡易法の適用箇所についても探索を行う必要性が提起された。

また、ミネラルウォーター類の試験法として、新たに NIHSJ-30-ST1 及び 31-ST1 を設け、ISO 9308-1:2014 及び水道法試験法に準拠して検討を行うこととした。次年度には作業部会で ST2 案を作成した上で、妥当性評価を通じ試験法を確定させていきたい。

加えて、本委員会では、国際調和と実行性の向上に資するため、これ迄に作成された標準試験法のうち、サルモネラ属菌、カンピロバクター及び腸内細菌科菌群試験法の改訂を行った。本委員会では国際整合性を踏まえ、主として ISO 法に準拠した試験法の作成・検討にあたってきたが、これまで ISO 法見直しにあわせた NIHSJ 法改訂の在り方については議論されていない状況であった。本年度の活動として、その方針を定めることができたことは今後の国際情勢に合わせた速やかな検討を進める上で有意義であると思われる。次年度以降も、こうした観点から重要性・緊急性に応じた形で、標準試験法の改訂や作成にあたることで科学的な根拠を厚生労働行政へ反映させることが加速化されるものと期待される。現在、公定法で採用されている、リステリア・モノサイトゲネス試験法は本年度に ISO 法が改訂となり、その根拠には判定時間が短縮されたとの情報も得ている。試験利用者にとって有益な点が多いと思われることから、当該試験法の見直し作業は今年度以降の一候補試験法と捉えられよう。加え

て、カンピロバクター試験法については現在定性法のみが定められているが、近年の国際動向としては、定量的リスク評価が求められていることを踏まえ、ISO 法を基とした定量試験法の作成についても本委員会が喫緊に取り組むべき課題と思われる。

### (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

ISO/TC34/SC9 からは、わが国に対してその食習慣から、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。それぞれの試験法に係わる WG に今後積極的に参加し、試験法作成の議論に加わり貢献することが重要と思われる。

#### 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 International が長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方を纏め示してきた。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。パート1については、本年度用語集の作成で対応した。また、代替試験法のバリデーションガイドであるパート2については、松岡先生を中心に整備を進めている。残る4つのガイドラインについては、

ISO/TC34/SC9の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 International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。

#### ウェルシュ菌試験法策定支援

ウェルシュ菌定性試験法のバリデーションについては、当該試験法の検討グループと連携をとりながら試験法としての整備を進めてゆくのが重要と思われる。

#### (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菌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。これまで、こうした社会的要請を受けて検討委員会では国際的通用性をもつ試験法の整備が議論されてきた。本研究では研究期間内に試験法案を作成し、検討委員会での議論を経てTechnical Specificationとして整備・公開する事を最終目標として進めている。検討委員会では試験法のバリデーションおよびベリフィケーションをステージ1からステージ4の4つの手順に従い実施する方針を表明している。本研究においてはステージ2である作業部会案を作成し、WGにおいて詳細なプロトコールの検討の結果、国内の試験室の状況を加味した複数の指摘が挙げられ細かい修正がなされたが、本作業においても検討委員会の基本方針に従い、ISO法に準じて作成されたNIHSJ-20TS-ST2に対する大幅なプロトコールの変更を行うこと無く、ISO法との妥当性を担保した形でのNIHSJ-20TS-ST2の合意

に至った。今後、WGにおいて同法のベリフィケーションに重点をおいた検証作業を進め、最終的にTechnical Specificationとしての公開を目指す。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。

#### (4) 遺伝子検査法に関する研究

本年度はISOガイドラインを和訳化した上で、特に重要と思われる項目の整理を行った。特にコントロールの取り扱いについては、情報を詳細に整理した上で、国内の試験法への参考となるようどのように盛り込んでいくかが今後の課題の一つであると考えられた。これらの文書を土台として、遺伝子検査法に関するガイドライン案を当該作業部会において引き続き検討しているところであり、次年度には文言等についてバリデーション作業部会とも調整した上で、検討委員会に上申し、最終案を作成する予定である。

### E. 結論

#### (1) 衛生指標菌に関する研究

本年度は、「食品からの標準試験法検討委員会」のNIHSJ法改訂の基本方針を作成すると共に、腸内細菌科菌群(NIHSJ-15)、サルモネラ属菌(NIHSJ-1)及びカンピロバクター(NIHSJ-2)の標準試験法を改訂し、実行可能性と国際整合性の向上を図った。また、乳の製造工程基準及び成分規格に関する意見集約を行うと共に、ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法案としてNIHSJ-30-ST1及びNIHSJ-31-ST1を作成し、検討委員会へ上申した。

#### (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

・わが国もISO/TC34/SC9の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と思われる。その意味において、用語集を取り纏めた点は意義があると思われる。

- ・ ISO TC34/SC9 年次総会に参加し、WG2/WG3 の規格策定者らと緊密な議論を通じ、代替法のバリデーシンの基本的な考え方の理解を深めることができた。
- ・ 第一に得た重要な認識は、参照法よりも代替法(新たに開発された方法)の方が、性能が優れている場合が多く、一概に「同等」ではないからといって、代替法を棄却することは不合理だ、との考えが強まっていることである。その代わりに、代替法の検出したものが、確かに標的菌であるということ、念には念を入れて確認する、ということである。バリデーシンは規定通りに行えばよい、といった単純な考えは、もはや通用しない。試験法の本質を理解した人やチームによる、専門的な判断が常に要求されると考えるべきである。
- ・ それゆえ、バリデーシンのガイドラインの中身を議論するほどに、益々、我が国にも AOAC、AFNOR、NordVal、などに相当する実施監督機関が不可欠であるのと思いが強まった。
- ・ なお、今のところ代替法は培養法に限定されている。非培養法に基づく代替法は、まだ同等以上として認証された例はない。数年前に CEN から提案されたフローサイトメトリー法による生菌死菌計数法は、その後の議論の展開は見られない。非培養法に対しては、やはり、判断が難しく、最終的には生菌標準物質が不可欠ではないかと推察される。

### ( 3 ) ポツリヌス試験法に関する研究

- 1) ISO/TS 17191:2013 を基にコラポスタディに使用可能な作業手順書を作成し、NHISJ-20-ST2 として提案した。
- 2) NHISJ-20-ST2 のバリデーシおよびベリフィケーションを実施する作業部会を編成し、ポツリヌス菌の特性を考慮したバリデーシ進行案を作成した。
- 3) 作業部会におけるバリデーシおよびベリフィケーションに必要な基礎データの獲得を行った。

### ( 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。一方で、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。本研究の実施により、現在、一般的に実験室で実施されている PCR 法の工程と、ISO で国際的な基準として設定される PCR を用いた試験法の工程ガイドラインの間には必ずしも一致していない部分もあると考えられた。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 書籍

- 1) 朝倉宏 . 2019 . ポツリヌス菌 . Visual 栄養学テキスト . 食べ物と健康 III . 食品衛生学 . 中山書店 . 57-58 .
- 2) 朝倉宏 . 2018 . 細菌性食中毒 . 健康教室増刊号 . 東山書房 . 69 : 76-78 .
- 3) 朝倉宏、伊豫田淳 . 腸内細菌科菌群 . 食品衛生検査指針微生物編改訂第二版 2018 . 165-174 .

### 2. 論文

- 1) Asakura H, Makino S, Watanabe K, Tuchida Y, Kawabe M, Sakurai D. Kuma Bamboo Grass (*Sasa veitchii*) extracts exhibit protective effects against atypical *Aeromonas salmonicida* infection in goldfish (*Carassius auratus*). *Biocontrol Science*. In press.
- 2) Ito K, Takagi K, Matsushima Y, Iwasaki A, Tanaka N, Kanasaki Y, Martin-Laurent FF, Igimi S. Identification of the novel *hcbB* operon catalyzing the dechlorination of pentachlorophenol in the Gram-positive bacterium *Nocardioides* sp. strain PD653. *J Pestic Sci*. 43(2): 124-131. 2018.

### 3 . 学会発表

- 1) 朝倉宏 . 食品微生物試験法の国際調和 . 平成 30 年度食品薬品安全センター食品衛生精度管理セミナー . 2018 年 6 月 29 日 . 東京 .
- 2) 松岡英明: バイオにおける確からしさと不確かさ. (「電気化学と生命科学」企画シンポジウムにおける依頼講演)、電気化学会、平成 31 年 3 月 27 日、京都大学 .
- 3) 中山達哉、佐々木貴正、朝倉宏、五十君静信 . 食鳥処理場における薬剤耐性大腸菌の汚染実態 . 日本食品衛生学会 . 2018.11 .
- 4) 原田 義孝、綱 美香、高崎 一人、布藤 聡、五十君 静信 . 特異性の高い *Listeria monocytogenes* 検出法の開発 . 日本食品微生物学会 . 2018.9 .
- 5) Hiroyuki Chiba, Akinobu Kajikawa, Kenji Yokota and Shizunobu Igimi. Caco-2細胞を用いた *Listeria monocytogenes* の接着・侵入に関する評価 . 日本食品微生物学会 . 2018.9 .
- 6) 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、佐藤 守、山崎栄樹 . Cholix による細胞致死機構における新規結合タンパク質の同定と機能解析 . 第 65 回トキシシンポジウム, 金沢市 (2018.7)
- 7) Eiki Yamasaki, Hisao Kurazono, Myo Thura Zaw, Kayo Okumura, Shingo Yamamoto. *Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic Escherichia coli* isolated from both humans and companion animals, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. 4<sup>th</sup> International Conference on One Medicine One Science, チェンマイ, タイ (2019.1)

#### H. 知的財産権取得状況

該当なし