

令和元年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）

食品微生物試験法の国際調和に関する研究

分担研究報告書

遺伝子検査法に関する研究

研究分担者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部 室長

研究要旨

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。いずれの工程も対象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検討を目的として検討を行ってきた。本年度は、PCR 法に関する一般的要求事項について情報を整理し、作業部会での意見集約を経て、技術文書を作成した。今後、PCR 法を含む食品微生物試験法を実施する際に本ガイドラインを参照することで、対象とする微生物試験法の精度管理向上に資することが期待される。

A. 研究目的

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検討を目的としている。

B. 研究方法

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) の食品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文書 ISO22174、ISO20837、ISO20838 を

確認しつつ、ガイドライン案の検討を行った（表 1 を参照）。また同様の文書を ISO 以外の情報源からも検索し、当該案に取り込み、ガイドライン案の作成を行った。

当該ガイドライン案の検討及び作成は、遺伝子検査法に関する作業部会（当該分担研究者、下島優香子先生（東京都健康安全研究センター）、森哲也先生（東京顕微鏡院）、岡田由美子先生（国立医薬品食品衛生研究所）、朝倉宏先生（国立医薬品食品衛生研究所））を中心に行い、その内容を「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に諮り適宜修正を行った。

C. 研究結果および考察

作業部会において、ISO22174、ISO20837 及び ISO20838 を確認しつつ、PCR 法を取り入れる場合の留意点を取り纏め、NIHSJ-34TS-ST2 案として作成した。

その後、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において審議、修正を行い、NIHSJ-34TS-ST4 案（技術文書）として作成を完

了させた。

本文書の主たる項目は、以下の通りとした：1．序文、2．適用範囲、3．原理、4．被験物質、5．検査室の一般要件、6．廃棄物管理、7．試薬、8．機器及び装置、9．手順、10．対照の使用、11．結果の解釈・評価、12．試験報告、13．試験法の性能、14．増幅反応に関する全般的事項、15．プライマー設計。

なお、上記文書については「食品からの微生物標準試験法検討委員会」での審議において、単位の記載方法等、マイナーな点で記載方法の整合等を行う必要があるとの意見が出たが、内容としては支障ないものと判断され、最終案として確認された。

D. 結論

食品からの微生物試験法のうち、細菌に関するものは概して培養法を Golden standard として構築されている。一方、近年では多様な微生物に迅速に対応するため PCR 法をはじめとした遺伝子検査法の導入が有用と見做され、適用は拡大傾向にある。一方で、食品中には PCR 増幅反応を阻害する物質が含まれることも想定されるほか、増幅産物のコンタミネーションなど検査室環境の汚染が試験結果に影響することも想定される。このため、使用する対照の設定や検査室の設計など、国際標準的なガイドライン案の策定は我が国の食品微生物試験法における国際調和を図る上で、極めて重要と考えられる。本技術文書は、PCR 法を含む食品微生物試験法の実施にあたり、試験精度の管理や安定的な実施への活用が期待される。

E. 研究発表

1) 論文発表

1. 泉谷秀昌 .広域散発事例探知に向けた取り組み .日本食品微生物学会雑誌 .36(1):10-12. 2019.
2. 泉谷秀昌 .腸管出血性大腸菌～分子疫学解析を利用した病原体サーベイランス.感染制御と予

防衛生. 3(2): 75-80. 2019.

2) 学会発表

1. 李謙一、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真 .WGS 解析による MLVA の評価と効率的腸管出血性大腸菌 O157サーベイランス手法の確立. 第 92 回日本細菌学会学術総会. 令和元年 4 月 23 日. 北海道 .
2. 泉谷秀昌 .腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について.衛生微生物技術協議会第 40 回研究会 . 令和元年 7 月 10 日 . 熊本県 .
3. 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真 . 2018 年における腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析 . 第 40 回日本食品微生物学会学術総会 . 令和元年 11 月 28 日、東京都 .

F. 知的所有権取得状況

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案
なし
- 3 その他
なし

表 1 . PCR 法の一般事項に関して記載のある ISO 文書

機関	文書番号	年	タイトル
ISO	20837	2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for sample preparation for qualitative detection
ISO	20838	2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for amplification and detection for qualitative methods
ISO	22174	2005	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions

