

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）  
総合研究報告書

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新たに設置し、低温殺菌牛乳製品における微生物汚染実態に関する調査を行った上で、乳・乳製品の製造工程管理や成分規格に関する提言を取り纏めた。これを受け、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」では、腸内細菌科菌群定性試験法 NIHSJ-15 を改訂し、国際調和を図ると共に、同定量試験法を作成した。また、サルモネラ試験法、カンピロバクター定性試験法、並びにリステリア定性・定量試験法についても国際調和のために改訂を行った。更に、カンピロバクター定量試験法の作成を開始し ST2 に至った。（２）国際動向及び妥当性確認に関する研究では、2017 年に我が国で初めて ISO/TC34/SC9 総会を主催したほか、その後も ISO/TC34/ SC9 総会に発言権を有する P メンバーとして参画し、国際動向調査及び意見発信等を行った。微生物試験法に関する用語集を作成すると共に、バリデーション作業部会を多数開催し、各試験法の妥当性確認に関する技術的助言を行った。その中では乳等省令で規定される生乳中の総菌数試験法（ブリード法）に関する成績を -ETi を指標として用いることで科学的に評価し、これまでのニューマン染色液以外の代替染色液を利用することも妥当であるとの結論に至った。（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新たに設置し、試験法原案の作成を通じ、ST2 に至った。とりわけ、予備検討を進める中で、特定 2 種病原体に位置づけられる当該微生物試験法のコラボスタディを行う際のさきがけ的な方法論の確立を行うことができた。（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や微生物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 及び BAM 試験法において採用される遺伝子検査法に関する情報を整理した上で、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い、ガイドライン案として食品からの微生物試験法検討委員会において概ね承認された。

以上のように、平成 29 年度から令和元年度にかけて、食品微生物試験法の国際調和に向けた基盤整備並びに試験法改訂等の作業を進めることができた。今後、国際調和のための検討を更に進め、継続的に応用展開を図ることが微生物リスクを踏まえた食品の安全性確保に向けて必要な事項と解される。

#### 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 徳島大学  
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  
梅田 薫 大阪健康安全基盤研究所  
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  
下島 優香子 東京都健康安全研究センター  
鈴木 淳\* 東京都健康安全研究センター  
鈴木 穂高 茨城大学  
関 享子 国立医薬品食品衛生研究所  
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  
牧野 有希 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) に属する複数の細菌が含まれる。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。このほか、食品からの微生物標準試験法検討委員会を主催すると共に、各試験法の改訂や新たな作成等を担当した。

#### (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

本研究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している。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。本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を目的として検討を進めた。

食品微生物試験法を国際調和させていくためには、我が国の試験法を ISO 16140 や AOAC International が定める評価方法に準じて妥当性を確認する必要がある。ISO/TC34/SC9 総会の主催 (2017 年度) 並びに 2018 ~ 2019 年度の同総会へ P メンバーとしての参画を通じ、2016 年に同文書が大幅に改訂された内容を精査し、食品からの微生物標準試験法検討委員会において妥当性を評価する上で必要と見做される内容を整理した上で、新たなガイドライン案の作成について検討することを目的とした。

#### (3) ボツリヌス試験法に関する研究

本分担研究では、これまでに食品検査法として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、国際的整合性を持ちつつ、国内で利用可能な試験法の整備を行うことを目的とした。作業部会並びに検討委員会での議論を経て、ボツリヌス毒素検出法を検討対象とした上で、議論並びに検証を行い、コラボスタディ原案の作成に至ったので、報告する。

#### (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国際的な情報収集を行い、国内の実態を踏まえつつ、その活用にあたってのガイドライン案を作成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) 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った。

#### 3) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

NIHSJ-01:2009(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) カンピロバクター定性試験法の改訂

NIHJS-02:2012(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、国内での同培地の入手が困難な状況となったことから、国際動向を確認すると共に、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。

#### 5) リステリア試験法(定性・定量)の改訂

NIHSJ-08及び-09はリステリア通知法の基礎となる試験法として2014年に作成された。現状の実態に即して、改訂が必要と思われる事項が同試験法に複数見受けられたことから、本年度は同試験法の改訂作業を行うこととした。

#### 6) 腸内細菌科菌群試験法(定性・定量)の改訂

腸内細菌科菌群標準試験法についても同じく現状の実態に即した改訂が必要と思われる事項が含まれていたことを受け、衛生指標菌バリデーション作業部会及び検討委員会での改訂の討議を経て、上記の表記規則に基づいた最終版の作成にあたった。

#### 7) カンピロバクター定量試験法の作成検討

令和元年度より鶏肉(製品)及び食鳥と体を対象としたカンピロバクター定量試験法を作成することとした。作業部会を組織し、原案を作成した上で、検討委員会において審議を行った。

#### 8) その他

NIHSJ法の表記方法について統一化を図るため、バリデーション作業部会及び検討委員会に提案を行った。

### (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。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しても、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、その内容を精査した。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うことが必要と考えられた。そのため、バリデーション作業部会を組織して検討を進めた。同作業部会ではまず試験法関連の用語集を作成に当たり、検討委員会に提案した。

各試験法の妥当性確認の在り方については各論であり、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。また、乳等省令で示される生乳中の総菌数試験法（ブリード法）について、ニューマン染色液の代替として複数の染色液を用いた場合の成績を先行研究より提示されたことから、その同等性を統計学的に評価した。

### （ 3 ）ポツリヌス試験法に関する研究

ポツリヌス試験法作業部会を組織し、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) 等を確認した上で、国内の実態も加味しつつ、ST 1 原案を作成した。検討委員会での審議を経て、疑問点や検討すべき事項を抽出・整理し、その上でコラポ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及びコ

ラポスタディ実施計画案を作成した。

### （ 4 ）遺伝子検査法に関する研究

ISO 法やBAM法に含まれる微生物試験法の中で、遺伝子検査法、とくに PCR 法を導入している試験法を整理した上で、PCR 法実施に際して注意すべき一般事項を整理し、PCR 法利用にあたってのガイドライン原案を作成すると共に、検討委員会へ提出し、意見を求めた。

## 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、(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、関連する試験法を確認した。ISO 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、NIHSJ-15 法改定案を作成

し、第 68 回検討委員会に提案、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（詳細は平成 30 年度研究報告書を参照されたい）。

### 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。

#### 6) 標準試験法 (NIHSJ 法) 表記法規則の作成

第 38 回バリデーション作業部会及び第 69 回検討委員会において承認を得、標準試験法表記法規則を作成した (別添 2)。試験法のフォーマットは ISO 方式を採用し、基本的に段落番号にピリオドで枝番を付することとした。フォントは日本語を游明朝、英数字を Times New Roman にすることとした。単位は SI 単位系を基本とするが、大桁数字はコンマ区切りとし、SI 及び ISO で用いられている小数点を起点として 3 桁ごとに半角 1 文字分のスペースを空ける方式は採用しなかった。培地組成に用いられる「酵素分解産物」は「酵素消化物」に統一した。ペプトン類の記載は、ISO 法に準拠している試験法は ISO 原文を基本としつつ、国内で流通している当該培地の組成を参考に、注釈として「カゼインペプトン等」などの記載を加えることとした。また、最終案が確定した試験法名から ST4 の文言を削除すること及び各試験法の末尾に改訂履歴を付することとした。

#### 7) リステリア・モノサイトゲネス標準試験法の改訂

NIHSJ-08:2014 (リステリア・モノサイトゲネス定性試験法) では、half Fraser broth での前増菌培養を 24 時間 ± 2 時間と、Fraser broth での増菌培養を 48 時間としている。現在、一般的な微生物試験として Fraser broth を用いた増菌培養時間は 24 時間で行われる実態もあるとの意見が出たため、増菌培養時間を短縮した際の影響

を主な検討項目とした。また、第二選択分離培地の選択肢に挙げられる Oxford 寒天培地にはシクロヘキシミド (抗真菌剤) が含まれているが、現在同剤は発がん毒性が示されているため、代替に関する検討を行うこととした。

NIHSJ-09:2014 (定量試験法) では乳剤調製後に蘇生培養後に酵素基質培地への直接塗抹を行っているが、その有効性についても検討項目とした。

文献検索を通じ、以下の論文で、half Fraser broth を用いた前増菌培養後には十分量の増菌がなし得ていることが報告されたことを受け、同知見を基盤とする原案を作成し、検討委員会に提出した。

参考文献: Besse et al. Int J Food Microbiol. 2019. 288: 13-21.

また、定量試験法における蘇生培養に関しては、以下の論文において、蘇生を行わない場合にも十分量のリステリアを検出できたとの報告があったことから、同知見を基盤とする原案を作成し、検討委員会に提出した。

参考文献: Rollier et al. Int J Food Microbiol. 2019. 288: 22-31.

このほか、Oxford 寒天培地に含まれる抗真菌剤については、市販生培地の多くでは既にシクロヘキシミドの代替としてアンフォテリシン B を採用している実態を確認したため、これを検討委員会に提出した。

以上の状況確認を踏まえ、検討委員会委員間でのメール討議の結果、前増菌培養時間の短縮や蘇生培養の削除等から成る改訂案が了承され、NIHSJ-08:2020 及び NIHSJ-09:2020 として改訂された。

#### 8) 腸内細菌科菌群試験法の改訂

生食用食肉の成分規格に関わる試験法である腸内細菌科菌群試験法 (定性法) については、前増菌・増菌・選択分離の 3 段階の培養工程が含まれ、衛生指標菌試験としては比較的時間を要する。そこで、本研究では表記方法の変更のほか、以下の内容を主

な論点として検討を行った。概要を以下に示す。

・緩衝ブリリアントグリーン胆汁ブドウ糖ブイヨン (EE ブイヨン) 中での増菌培養を削除: BPW 中での前増菌培養が行われていることから、EE ブイヨン中での増菌培養の必要性について疑義が生じた。文献検索を通じ、以下の論文では EE ブイヨンを用いた増菌培養の有無は腸内細菌科菌群の定性検出結果に大きく影響しないとの報告があったことから、同知見とあわせて検討委員会に意見を求め、削除することについて了承を得た。

参考文献: Biesta-Peters et al. Int J Food Microbiol. 2019. 288: 75-81.

また、定量試験法についてはこれまで公定法としての採用履歴はないが、国際的には主に乳肉食品の製造工程管理や成分規格等にも採用されており、国際調和の観点からは速やかに現況にあったものを作成すべきとの観点から、過去に検討委員会で作成された同試験法を基に改訂を行うこととした。検討の結果、表記方法の統一に関する修正等を経て、検討委員会に提出し、審議を経て、了承を得た。

最終的に変更履歴を末尾に示す形で、NIHSJ-15:2020 及び NIHSJ-16:2020 として改訂された (別添 5 及び 6)。

#### 5) カンピロバクター定量試験法の作成

第 70 回検討委員会において、カンピロバクター定量試験法の作成を議題として取り上げ、了承された (ST1)。その後、作業部会を構成した上で ST2 原案の作成を行い、第 71 回検討委員会に提示を行った。その際に出た意見を踏まえ、以下の項目について整理及び検討を行った。

##### 1. 試料の採材部位及び試料懸濁液の調整について

コラボスタディ実施に向け、市販鶏肉 (n=25, 10g) を対象に、皮・肉部位間での菌数を比較検討した。その結果、対象菌の検出菌数は皮部分が肉部分に比べて高い傾向を示した。

試料懸濁液の調整について、NIHSJ-02 で採用される 5 倍乳剤の適切性を 10 倍乳剤と比較検討した。NIHSJ-02 (定性試験) によりカンピロ

バクター陽性が確認された市販鶏肉皮試料 (n=30) を対象とした比較試験を行ったところ、5 倍乳剤調整群で対象菌が 20CFU/g 未満検出された試料では 10 倍乳剤調整群は不検出となり、5 倍乳剤を用いる有意性が示された。

なお、夾雑菌の出現については、両群間で明らかな差異は認められなかった (夾雑菌出現試料数は 5 倍・10 倍乳剤調整群でそれぞれ 14 及び 12 試料)。

以上よりコラボスタディでは鶏皮を用いて 5 倍乳剤を調整する方法が適切と判断された。

##### (2) 試料懸濁液の選択分離培地への塗抹量について

ISO 法では試料懸濁液 1ml をシャーレ 3 枚に塗抹するとされるほか、USDA-FSIS 法では試料懸濁液 1ml をシャーレ 4 枚に塗抹する等が示されている。対象菌は乾燥や大気中の酸素ストレスに抵抗性が弱く、塗抹開始から微好気培養に至る時間経過は試験成績に大きく影響するものと考えられた。そこで、国内での実行可能性及び科学的妥当性を有する塗抹量に関する知見を創出するため、予めカンピロバクター陰性・ESBL 産生大腸菌陽性が確認された鶏皮試料 25g (n=10) に対し、約  $2.3 \times 10^3$  CFU/g の *C. jejuni* NCTC 11168 株を接種し、5 倍検体懸濁液 1mL を異なる枚数の mCCDA 平板培地に塗抹し、微好気培養後の対象菌及び夾雑菌の発育状況を比較した。結果として、シャーレ 1 枚あたり 200  $\mu$ l ~ 250  $\mu$ l の塗抹量とした場合、対象菌の発育及び夾雑菌による判定不能例は 10 試料中 1 試料以下であった (表 1)。一方、シャーレ 1 枚あたり 333  $\mu$ l 以上の塗抹量とした場合には、対象菌・夾雑菌両者の滑走を招き、判定不能となる検体が半数以上で認められた。

以上の結果を踏まえ、選択分離培地の使用枚数は 4 枚から 5 枚 (塗抹量 200 ~ 250  $\mu$ l / シャーレ 1 枚) が適切と考えられた。

##### (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) : $PA_{FN}^*$

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) : $NA_{FP}$

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) : $ND_{FP}$

R: 陰性、A: 陰性→C: 陽性 擬陰性 (False negative) による陽性偏差 (Positive deviation) : $PD_{FN}^*$

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 $\pm[0.5 \times (\text{Log コロニー数})]$ 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、

$U_i = \text{バイアス(代替法の結果の平均値 - 参照法の結果の平均値)} + \beta\text{-ETI}(80\%/2)$

$L_i = \text{バイアス(代替法の結果の平均値 - 参照法の結果の平均値)} - [\beta\text{-ETI}(80\%/2)]$

$U_i < 0.5 \times (\text{Log コロニー数})$ 、 $L_i > -0.5 \times (\text{Log コロニー数})$  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。

この  $\beta$ -ETI を指標として、生乳受入れ時の総菌数試験法(ブリード法)について、代替染色液の利用可能性を評価した結果、BPV2 染色液については参照法であるニューマン染色液を用いた場合と同等であると結論付けられた。

### (3) ポツリヌス試験法に関する研究

ポツリヌス毒素遺伝子試験法案の作成

検討委員会にてポツリヌス毒素試験法を技術文書として作成していく旨の説明がなされ、ST1 として承認された。その後、作業部会を組織し、ST2 案の作成を行った (NIHSJ-20TS-ST2)。

バリデーション実施計画の作成

ポツリヌス菌を用いた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は重要である。新規試験法のバリデーションは SLV と CS を組合せた形で行うべきとの結論に至り、計画案を作成し、検討委員会へ提案した。NIHSJ-20TS-ST2 案では 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 CS で検討することで、バリデーションおよびベリフィケーションを同時に実施することとした。それ以外の組合せに関しては SLV 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を確保できると想定されたためである。

添加菌液調整プロトコルの作成

作業部会において、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を抽出した。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ことが一般的な標準の形態であることからこれを基本に進めることとした。

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り芽胞形成割合は大きく異なったことから、CS 参加機関間で統一的な芽胞調整方法を設定すべきと考えられた。その後、作業部会で下記プロトコル原案を作成した。今後、これを基本としつつ、作業部会で意見の集約を図り CS 開始へとつなげていくことが必要と考えられる。

【芽胞調整プロトコル(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 があることを確認した。遺伝子検査法作業部会を組織し、これらの文書を読みこみ、特に重要と考えられる要点の整理を行った。

上記の 3 文書は 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。

BAM 法においても特に重要と思われる事項を同じく抽出した上で、国内の作業実態を踏まえて、基本的かつ一般的な作業工程において特に重要と思われる内容を更に精査し、ガイドライン案を作成した。

## 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、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(定性)、カンピロバクター(定性)、腸内細菌科菌群(定性・定量)、リステリア(定性・定量)の各試験法について改訂を行った。本委員会では国際整合性を踏まえた試験法の作成・検討にあたってきたが、これまで 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。本研究班において、その方針を定めることができたことは、表記方法の統一化とあわせて、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と思われる。今後もこうした観点から重要性・緊急性に応じて、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、公定法の基盤として採用されている、リステリア・モノサイトゲネス試験法や腸内細菌科菌群試験法(定性)は実施者の安全性確保の向上、及び判定時間の短縮に繋がる改訂内容であり、試験実施者・利用者にとって有益な点が多いと思われる。このような妥当と考え

られる科学的根拠をもった微生物試験法の見直し作業の継続的取り組みを公定法等へ波及させることは我が国の食品の安全性を国際的に示す上でも必要不可欠な事項と思われる。

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から、令和元年度より定量試験法の作成にあたった。本試験法の最終的な作成は国際調和を図る上でやはり緊急的に対応すべき事項と思われる。

## (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 では、わが国の食習慣を踏まえ、寄生虫の試験法、腸炎ピブリオ試験法、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状況にある。それぞれの試験法に係わる WG に今後も積極的に参加し、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。このような考え方は、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)については、その後、新たな情報を加えた改訂作業が ISO/TC34/SC9 で進められており、現時点で 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、用語集の作成を行うことでその対応にあたった。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、松岡らにより整備が進められている。特に  $\beta$ -ETi (後述) を用いた妥当性評価法を、直接個体鏡検法の代替染色液を対象として国内ではじめて試行的に実施できたことは、今後同様の事例を評価する際の有益な情報となるものと期待される。

なお、残る 4 つのガイドラインについては、ISO/TC34/SC9 WG での議論は進んでおり、数年のうちに改訂作業が完了すると推察される。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になるとと思われる。

### 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いくのが重要と思われる。

### 直接個体鏡検法(ブリード法)における代替染色法の評価

$\beta$ -ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする方法で、ブリード法と BPV1 法、BPV2 法の各々の同等性を評価し、最終的には、ニューマン染色液を用いるブリード法と BPV2 染色液の同等性を示すことができた。ニューマン染色液を用いるブリード法は参照法であるが、それ自体がバラツキの大きい試験法である。考えようによっては、代替法がどのような値をとっても、その大きなばらつきの中に入ってしまうと、統計学的には高い同等性を示すことになる。しかし、それは定量試験の結果としては適切とは言いがたい。 $\beta$ -ETI を指標とする統計解析法は若干複雑ではあるが、評価結果は合理的な見識につながるものと考えられる。

### (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

BAM 及び ISO 法のうち、食品微生物試験法として遺伝子検査法を含むものを抽出し、近年の動向を確認した。これらの情報及び遺伝子検査法のうち、PCR法に関わる国際文書等を確認した上で、その実施にあたり、特に重要と思われる項目を抽出し、要点を精査した上で、PCR法利用に係るガイドライン案の作成に至った。PCR法の実施にあたり、

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に盛り込んでいくかが今後の課題の一つと考えられた。ISO法において、PCR法等の遺伝子検査法利用に係る文書は複数あるが、これらは何れも短期間に改訂等が行われている。その背景には、技術の進展が速いことが挙げられる。我が国の食品微生物試験法への適用についてはまさに現在ボツリヌス試験法でこのPCR法を含む検討がなされているところであり、両者が緊密に協調することで、より実効性の高いガイドラインの改訂等へ結びつくことも期待される。

## E. 結論

### (1) 衛生指標菌に関する研究

「食品からの標準試験法検討委員会」の NIHSJ 法改訂基本方針の作成のほか、現時点での食品微生物試験法に関わる国際動向を踏まえ、通知法の基礎として用いられるサルモネラ属菌標準試験法、リステリア・モノサイトゲネス標準試験法、腸内細菌科菌群標準試験法、更には食品検査指針に掲載されるカンピロバクター定性試験法の改訂を行い、国際調和を踏まえつつ実行性に富む標準試験法を整備することができた。また、乳の製造基準及び成分規格に関わる微生物試験の在り方を取り纏めた。このほか、食肉等で社会要求性が高いとされるカンピロバクター定量試験法の作成を令和元年度より開始し、ST2まで進めることができた。

### (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

- ・2017年度に我が国で初めて ISO/TC34/SC9 総会を主催した。
- ・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である。そのため、まずは基礎となる用語集を取り纏めたほか、WG2/WG3 へ新たに参画することにより、食品微生物試験法のバリデーション・ガイドライン作製の

基盤を構築できたと考えられる。なお、今後はまず日本として発信すべきトピックスを整理するところから進めていくべきと思われる。

- ・ ISO TC34/SC9 の 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ョ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との考えが強まっていることである。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を慎重に確認することが求められる。バリデーションは規定通りに行えばよいという単純な性質ではなく、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。
- ・ 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の確保が不可欠と推察される。

### ( 3 ) ポツリヌス試験法に関する研究

ポツリヌス毒素を検出するための試験法作成にあたり、作業部会を組織し、海外主要国で用いられる試験法を整理した上で、ポツリヌス毒素遺伝子検出を基盤とする試験法原案を作成した。その後、コラボスタディに使用可能な作業手順書を作成し、NHISJ-20-ST2 として検討委員会に提案した。また、妥当性確認試験にあたっては、ポツリヌス菌の特性を考慮した試験計画が不可欠であるとの考えに立ち、これに沿った形で計画案を作成した。また、その計画案作成に必要な基礎データの一部を集積した。

### ( 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が、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の需要は増加傾向にある。本研究で作成した、PCR 法利用に係るガイドライン案は、国際基準として設定される PCR 試験法の管理内容から、特に重要もしくは認識を新たに持つべき事項を整理したものである。今後、PCR 法を含む食品微生物試験を実施する際に参照することは、微生物試験法全体の信頼性確保に繋がるものと考えられる。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 書籍

- 1) 朝倉宏 . 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) 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. 2017.
- 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, NPD, Yamasaki E, Kurazono H, Sujaya IN, 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.
- 5) 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*. 24(3): 145-154. 2019.
- 6) 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.
- 7) 朝倉宏 . カンピロバクター感染症の疫学、病原性および診断治療 . 感染制御と予防衛生 . 3(2): 87-93. 2019.
- 8) 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.
- 9) Yahiro K, Ogura K, Terasaki Y, Satoh M, Miyagi S, Terasaki M, Yamasaki E, Moss J. Cholix toxin, an eukaryotic elongation factor 2 ADP-ribosyltransferase, interacts with prohibitins and induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in human hepatocytes. *Cell Microbiol*. 21: e13033. 2019.
- 10) 鎌田洋一、藤田和弘、福沢栄太、佐藤信彦、佐野勇氣、梶田規、高橋洋武、大城直樹、岡田由美子、五十君静信、白藤由紀子、山崎朗子、梶田弘子、上田成子、志賀俊人. LC-MS/MS による米飯およびチャーハン中のセレウス菌嘔吐毒セレウリド試験法. *日本防菌防黴学会誌*. 48: 49-56. 2020.
- 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 .
- 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 . 東京 .
- 3) 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 . 2017 年 7 月 .
- 4) 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 . 日本防菌防黴学会第 44 回年次大会 . 2017 年 9 月 26 日 . 大阪 .
- 5) 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 . 第 38 回日本食品微生物学会学術総会 . 2017 年 10 月 5 日 . 徳島 .
- 6) 網 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 . 第 38 回日本食品微生物学会学術総会 . 2017 年 10 月 5 日 . 徳島 .
- 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．2017年10月6日．徳島．
- 8) 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回日本細菌学会学術総会. 2018年3月. 福岡.
  - 9) 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.
  - 10) 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. 第114回日本食品衛生学会学術講演会. 2018年11月15日. 広島.
  - 11) 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. 第39回日本食品微生物学会学術総会. 2018年9月.
  - 12) 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. 第39回日本食品微生物学会学術総会. 2018年9月.
  - 13) 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. 石川. (2018.7)
  - 14) 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)
  - 15) 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、2019年3月27日. 京都.
  - 16) 朝倉宏. シンポジウム「低温微生物の生態とその予防」～食中毒細菌. 日本防菌防黴学会46回年次大会. 2019年9月25日. 大阪.
  - 17) 朝倉宏. 食品微生物検査法の概要と国際調和に向けた検討について. 令和元年度食品衛生登録検査機関協会研修会. 2019年12月6日. 東京.
  - 18) 中山達哉, 岡田由美子, 朝倉宏. シンポジウム「微生物試験法: 製造現場において必要な微生物試験法・測定法」～衛生管理のために用いるべき、試験法の動向について. 日本防菌防黴学会第46回年次大会. 2019年9月25日. 大阪.
  - 19) 松岡英明: 微生物試験法の国際的バリデーションの動向. 日本防菌防黴学会46回年次大会特別講演. 2019年9月25日. 大阪.

#### H. 知的財産権取得状況

該当なし