

研究課題名： 食品微生物試験法の国際調和に関する研究
分担研究課題： 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。食品からの細菌試験法は培養法をベースに構築されており、その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も細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。一方、近年では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積極的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、特に PCR 法の活用にあたっての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。これまでに発表されている PCR 法に関する一般事項について国際的な試験法の情報を確認しつつ、遺伝子試験法の国内外での現状調査を行い、最終的に PCR 法に関するガイドライン案の検討及び作成を行い、食品からの微生物標準試験法検討委員会での審議を経て、同委員会における技術文書として作成完了に至った。

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）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、とくに PCR 法について記載した文書を検索し、その情報を整理した。

ISO22174、ISO20837、ISO20838 をベースにガイドライン案の検討を行った。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

1) 個別の遺伝子試験法の現状

BAM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（表 1）。

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法 (Environmental Sampling and Detection of *Salmonella* in Poultry Houses) の位置づけにあった。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た。本項は 2009 年よりほぼ毎年改訂されており、リアルタイム PCR 法の導入から、全ゲノム解析使用の言及まで幅広いものであった。

ISO 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*)、ボツリヌス菌、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（表 2）。

ISO においては全ての方法に TS (Technical Specification) が付与されていた。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、試験法が日々改良・更新される可能性が高く、固定された標準法になりにくいことが予想された。

2) 遺伝子試験法ガイドライン案の作成

ISO では、上記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、こうした一般事項についてまとめてガイドライン化していくことは有用であると考えられた。当該要件に係る ISO 文書としては以下の 3 つがあった：

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。

そこで当該遺伝子試験法作業部会において、つ
上記 ISO22174、ISO20837 及び ISO20838 をベ
ースにガイドライン案を取りまとめ、
NIHSJ-34TS-ST2 案を作成した。

「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に
て審議、修正を行い、NIHSJ-34TS-ST4 案を作成
した。

主たる項目は、以下の通りとなった：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
および装置、9. 手順、10. コントロールの使用、
11. 結果の解釈・評価、12. 試験報告、13. 試験
法の性能について、14. 増幅反応に関する全般的
事項について、15. プライマーについて。

当該案については「食品からの微生物標準試験
法検討委員会」にて改めて審議し、単位の記載方
法などの点において他の試験法との記載法と併
せるなどの調整を行う必要があるが、ほぼ最終案
として確認された。

D. 結論

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。食品中には PCR の増
幅反応を阻害する物質が含まれることも想定さ
れる。また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、使用するコントロールの設
定、検査室の設計など、国際的な基準に沿ったガ
イドライン案の策定は重要であると考えられた。

E. 研究発表

なし

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

