

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

平成 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏

平成 30 (2018) 3 月

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

平成 30 (2018) 年 3 月

目次

・ 総括研究報告

食品微生物試験法の国際調和に関する研究

朝倉 宏

----- 3

・ 分担研究報告

1. 衛生指標菌に関する研究

*Enterobacteriaceae*試験法に関する研究

岡田由美子 他

----- 17

低温殺菌牛乳における微生物汚染実態に関する研究

朝倉 宏 他

----- 17

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

食品微生物試験法の国際動向に関する研究

五十君静信 他

----- 21

食品微生物試験法の妥当性確認に関する研究

松岡 英明 他

----- 29

3. ボツリヌス試験法に関する研究

倉園久生 他

----- 35

4. 遺伝子検査法に関する研究

泉谷秀昌

----- 39

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 77

平成 29 年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

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 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）

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 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)、岡岡英明(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) アイスクリーム類の汚染実態

表 4 に、アイスクリ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 1.5×10^4 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正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

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）

「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

Enterobacteriaceae の標準試験法に関する研究

研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	鈴木穂高	茨城大学農学部
	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部

研究要旨

食品からの *Enterobacteriaceae* 標準試験法について検討を行った。先行研究において、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」は *Enterobacteriaceae* の標準試験法（定性法及び定量法）を ISO 21528-1:2004 及び ISO 21528-2:2004 に準拠して作成し、NIHSJ-15 及び 16 とした。当該試験法は平成 23 年に生食用食肉中の腸内細菌科菌群検出試験法として、発出されている（食安発 0926 第 1 号）。しかしながら、ISO 21528-1 は 2017 年に改定され、増菌培養の省略、確認試験培地の変更等が行われた。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* を用いている。一方、現在わが国において、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。今年度の本研究では、ISO 21528-1:2017 に基づく NIHSJ-15 の改定について検討すると共に、その試験法を用いた腸内細菌科菌群汚染状況と、従来の衛生指標菌である大腸菌群の汚染状況を、市販の低温殺菌牛乳及びアイスクリーム類において調査した。

A. 研究目的

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, PartB: 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。

B. 研究方法

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。

C．研究結果

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) アイスクリーム類の汚染実態

表 4 に、アイスクリ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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 . ISO21528-1:2017 (定性法) の概要

	試料調製	BPW で 10 倍乳剤作成、適宜希釈
	1 次増菌培養	37 18 時間 ± 2 時間
	2 次増菌培養	なし
	選択分離培養	VRBG 寒天平板、37 24 時間 ± 2 時間
	確認試験	オキシダーゼ試験 ブドウ糖発酵性

表 2 . ISO21528-2:2017 (定量法) の概要

	試料調製	液体の場合は原液を、その他の場合は ISO 6887-1、ISO 18593 に使われている希釈水を用いて 10 倍乳剤及び階段希釈液を作成
	分注	シャーレに試料原液 1mL を接種しする
	培地	44 ~ 47 の VRBG 寒天培地 15mL を加え、良く攪拌して固化する
	重層	44 ~ 47 の VRBG 寒天培地 5mL を重層し、固化する
	培養	37 ± 1 24 時間 ± 2 時間
	確認試験	オキシダーゼ試験 ブドウ糖発酵性

表3 . ISO 腸内細菌科菌群試験法 2003年版と2017年版の主な相違点

		定性法	
		ISO 21528-1:2004	ISO 21528-1:2017
	2次増菌培養	1次増菌液 1ml+EE プイヨン 10ml、 37 24時間 ± 2時間	なし
	確認試験 グルコース発酵 性試験で用いる培地	グルコース寒天培地	グルコース OF 培地

		定量法	
		ISO 21528-2:2004	ISO 21528-2:2017
	確認試験 グルコース発酵 性試験で用いる培地	グルコース寒天培地	グルコース OF 培地

表4. アイスクリーム等の汚染実態

検体 番号 a)	食品種	細菌数 (CFU/g) ^{b)}	大腸菌群 (CFU/g)	腸内細菌科菌群(CFU/g)			同定結果
		乳等省令	乳等省令	ISO 法			
				BD	Oxoid	Merck	
1	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
2	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
3	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
4	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
5	アイスクリーム	<10	<10	<10	<10	<10	
6	アイスクリーム	2.5 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	
7	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
8	アイスマルク	1.5 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	
9	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
10	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
11	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
12	アイスマルク	7.7 × 10 ²	<10	<10	<10	<10	
13	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
14	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
15	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
16	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
17	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
18	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
19	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
20	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
21	アイスマルク	<10	<10	<10	<10	<10	
22	ラクトアイス	3.0 × 10 ¹	<10 ^{a)}	1.0 × 10 ¹	<10	<10	<i>Klebsiella oxytoca</i>
23	ラクトアイス	<10	<10	<10	<10	<10	
24	ラクトアイス	<10	<10	<10	<10	<10	
25	ラクトアイス	1.0 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	
26	ラクトアイス	<10	<10	<10	<10	<10	
27	氷菓	1.0 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	
28	氷菓	<10	<10	<10	<10	<10	
29	氷菓	<10	<10	<10	<10	<10	
30	氷菓	<10	<10	<10	<10	<10	

a) 1-27 は 2017.7, 28-30 は 2018.1 収去. 2018.1 実施.

b) 1-27 は 2017.7 実施

c) 2017.7 実施時は $1.5 \times$

10^1

表 5 . 低温殺菌牛乳等の汚染実態

検体番号	食品種	殺菌法	細菌数 (CFU/mL) ^{a)}		腸内細菌科菌群	大腸菌群	同定結果
			乳等省令	ISO 法	ISO 法	乳等省令	
1	LTLT	65 30分	1	76.5	陰性	陰性	
2	LTLT	66 30分	0	122.5	陰性	陰性	
3	LTLT	63 30分	16	315	陰性	陰性	
4	LTLT	65 30分	8	6.5	陰性	陰性	
5	LTLT	65 30分	6.5	77	陰性	陰性	
6	LTLT	63 30分	24.5	1045.5	陰性	陰性	
7	LTLT	65 30分	9.5	53.5	陽性	陰性	<i>Pantoea</i> spp.
8	LTLT	65 30分	2	5	陰性	陰性	
9	HTST	79 15秒	124.5	497	陰性	陰性	
10	HTST	74 15秒	0	0	陰性	陰性	
11	HTLT	75 15分	1.5	0.5	陰性	陰性	
12	UHT	130 2秒	0	0	陰性	陰性	
13	UHT	130 2秒	0	0	陰性	陰性	
14	UHT	130 2秒	0	0.5	陰性	陰性	

^{a)}平板 2 枚の平均値

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」

平成 29 年度分担研究報告書

低温殺菌乳における微生物汚染実態に関する研究

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
研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	牧野有希	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨：国内で製造される低温殺菌牛乳 7 製品（製品 A～G）・126 検体について、衛生指標菌を対象とした定量検出試験（主として ISO 法を採用）ならびに志賀毒素産生性大腸菌（STEC）及びサルモネラ属菌の定性検出試験を行った。指標菌検出成績は、製品間で大きな差異を認めた。一般細菌数は全ての製品で検出され、その数値（0～118CFU/mL）はいずれも乳等省令で定められる牛乳の成分規格には適合していた。低温細菌は 2 製品（C、F）より検出された（0～40CFU/mL）。また、糞便汚染指標菌である腸内細菌科菌群及び大腸菌群についてはそれぞれ 2 製品（C、D）の 6 検体及び 1 製品（D）の 2 検体より検出され、それぞれの最大値は 1CFU/mL 及び 0.67CFU/mL であった。更に、黄色ブドウ球菌は低菌数（0～6CFU/mL）ながらも、製品 E 及び G を除く 5 製品で認められ、特に製品 B で相対的に高い値を示した（2.67～6CFU/mL）。STEC 及びサルモネラ属菌は全検体で陰性であった。7 製品 21 代表検体を対象とした構成菌叢解析により計 587 菌属が検出され、*Pseudomonas* 属、*Sphingomonas* 属、*Arthrobacter* 属、*Brevundimonas* 属、*Rhodococcus* 属等が優勢菌叢として検出された。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、生化学的性状からこれらはいずれも大腸菌群としての性質を併せて有すると考えられた。構成菌叢解析を通じ、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 では他製品に比べて構成菌叢が検体間で多様性に富んでおり、製造工程管理或いは温度管理の不安定性が示唆された。以上の成績より、低温殺菌牛乳の微生物学的安全性の確保にあたっては、製品の保存流通における温度管理ならびに製造工程管理に関する更なる知見の集積が必要と考えられた。また、製造基準等を見据えた衛生試験法としての国際調和ならびに糞便汚染指標としての適切性を考慮した場合には、腸内細菌科菌群を用いることが有用と考えられた。

A. 研究目的

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(表1)^{1,2)}。

表1. 牛乳の殺菌方法及び処理温度及び処理時間。

殺菌方法	処理温度	処理時間
低温保持殺菌 (Low Temperature Long Time; LTLT)	63~65℃	30分
連続式低温殺菌 (LTLT)	65~68℃	30分
高温短時間殺菌 (High Temperature Short Time; HTST)	72℃以上	15秒以上
高温保持殺菌 (High Temperature Long Time; HTLT)	75℃以上	15分以上
超高温瞬間殺菌 (Ultra High Temperature; UHT)	120~150℃	1~3秒

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(表2)³⁾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。

表2. 国内の過去10年間における乳類及びその加工品に係る食中毒発生事例。

年月日	原因食品	発生場所	病因物質	摂食者数	患者数	死者数
2014年	未殺菌牛乳	兵庫県	カンピロバクター	56	40	0
2010年	ソフトクリーム	宮城県	ブドウ球菌	1,591	85	0

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(表3)。

表3. 国内での乳・乳製品に関する調査成績として規格違反が想定された事例(抜粋)

報告年	地域	対象食品	規格対象微生物	検出結果	対応
2016年	大阪府	カマンベールチーズ	大腸菌群	20CFU/g	行政指導
2012年	兵庫県	低温殺菌牛乳	大腸菌群	不明	自主回収
2006年	東京都	低温殺菌牛乳	細菌数	10万/ml	行政指導
		アイスクリーム	大腸菌群	不明	
		アイスマルク	大腸菌群	不明	
2003年	不明(調査)	低温殺菌牛乳	細菌数、大腸菌群	不明	行政指導

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⁴⁾。低温殺菌牛乳は、相対的にタ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⁵⁾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⁶⁻⁸⁾。また、表3に加え、一部の低温殺菌牛乳等から微生物が検出される事例も報告されている^{6,9)}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。

以上の背景より、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法を主体として、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、更には構成菌叢解析から、各指標菌の相関性について考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 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(表3)。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。

表4. 低温殺菌牛乳検体の製品仕様概要

製造地域	製品名	加熱殺菌条件	品質保持期間	無脂肪固形分	乳脂肪分
関東 東北	A	65℃30分	製造日を含め6日間	8.4%以上	3.5%以上
	B	63℃30分	製造後5日間	8.3%以上	3.5%以上
北海道	C	65℃30分	製造日を含め6日	8.3%以上	3.5%以上
東北	D	65℃30分	製造日を含む8日	8.5%以上	4.5%以上
四国	E	65℃30分	製造日を含む8日	8.3%以上	3.6%以上
北海道	F	63℃30分	5日	8.0%以上	3.6%以上
東北	G	65℃30分	要冷蔵(10℃以下)で 発送日から6日間	8.0%以上	3.5%以上

2. 衛生指標菌定量試験

1) ISO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。各試験法の培養条件の概要は表5の通りである。

項目	ISO法		国内公定法
	試験法名	増菌培養条件	増菌培養条件
一般細菌	ISO 4833-1: 2013	30±1℃, 72±3h	35℃, 48±3h
腸内細菌科菌群	ISO 21528-2: 2017	37±1℃, 24±2h	37℃, 24±2h
大腸菌群	ISO 4832: 2006	30±1℃, 24±2h	35℃, 48±3h
大腸菌	ISO 16649-2: 2001	44±1℃, 21±3h	44.5℃, 24±2h
低温細菌	ISO 6730: 2005	6.5±0.5℃, 10days	該当なし
黄色ブドウ球菌	ISO 6888-1: 1999	37±1℃, 48±2h	37℃, 48±2h

2) 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。

3. 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。

4. 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。

C. 結果

1. 国内市販の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検体の製品情報は表3のとおりである。対象製品の加熱殺菌条件は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(一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、低温細菌数、及び黄色ブドウ球菌数)の検出試験に供し、以下の成績が得られた。

(1) 一般細菌数(図1、表6)

1) 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 ($p < 0.05$)

2) 国内通知法

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)(表6)

1) 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。

2) 国内通知法

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 (図2、表6)

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)

1) 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。

2) 国内通知法

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。

2. 指標菌種別間の相関性

(1) 一般細菌数と低温細菌数 (図4A)

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 (図 4B)

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 (図 4C)

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定性検出成績の比較 (表 6)

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ともに 16.7% (6/36) と同一であった。

3. 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。

4. 代表検体の構成菌叢解析 (図 5)

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%)。

D. 考察

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⁶⁻⁹⁾。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^{7,9)}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^{10,11)}。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¹²⁾、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¹³⁾。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¹⁴⁾、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。

E. 結論

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供試対象とした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。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1) 厚生労働省：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令、昭和 26 年 12 月 27 日厚生省令第 52 号。
- 2) 一般社団法人日本乳業協会.牛乳の殺菌方法 .
http://www.nyukyoku.jp/cgi/dairy/index.cgi?rm=result_bk&bk_id=363
- 3) 厚生労働省：食中毒統計資料
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html.
- 4) Jミルク. 生乳及び牛乳乳製品関連の基礎的データ 牛乳の殺菌温度別処理量の推移.
<http://www.j-milk.jp/gyokai/database/milk-kiso.html#anc1-1>
- 5) タカナシ乳業株式会社. 低温殺菌牛乳、
<http://www.takanashi-milk.co.jp/feature/ltlt.html>.
- 6) Kikuchi, M., Matsumoto, Y., Sun, M. Takao, S. Incidence and significance of thermophilic bacteria in farm milk supplies and commercial pasteurized milk Anim. Sci. Technol. 67: 265-72, 1996
- 7) 下島優香子、井田美樹、西野由香里、福井理恵、黒田寿美代、幾田泰久、平井昭彦、貞升健志. 低温殺菌牛乳製造乳処理業施設における細菌学的調査および分離菌株の性状、日本食品微生物学会雑誌、34:207-13、2017
- 8) Lund BM, Grahame WG, and Rampling AM. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data, Int. J. Food Microbiol., 77: 135-145, 2002.
- 9) 荻原博和、桐部奈美、星野麻美、小田好恵、古川壮一、森永 康：低温保持式殺菌乳の微生物学的品質とその微生物叢、日本食品微生物学会雑誌、27: 152-7. 2010
- 10) 春田三佐夫：飲用乳のシェルフライフ、乳技協資料、36: 34-45、1987.
- 11) 吉村 迪、伊藤ゆかり、大島秀克：乳および乳製品の試験法に関する研究 低温保持殺菌乳の微生物学的品質について、乳技協資料、43、124-134、1993.
- 12) 難波江：牛乳等の品質保持期限に関する調査研究 殺菌，保存等の条件と品質変化について、乳技協資料、44: 27-40、1994.
- 13) 水取敦子、藤井真理子、田中達也、倉持聖子. 都内に流通する低温殺菌牛乳の微生物学的実態調査. 食品衛生研究. 65:22-38、2015.
- 14) EUR-Lex. Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32005R2073>.

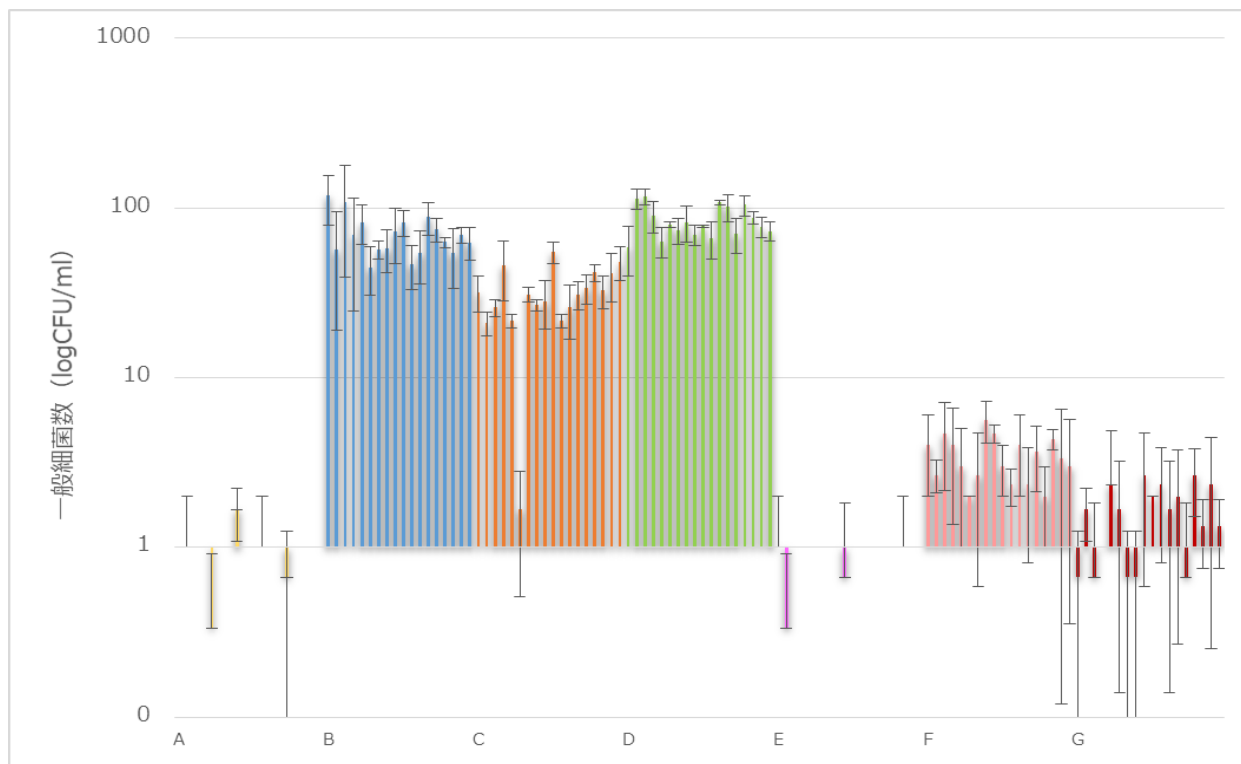


図1 . 低温殺菌牛乳計7製品・126検体における一般細菌の検出状況 (ISO法) .

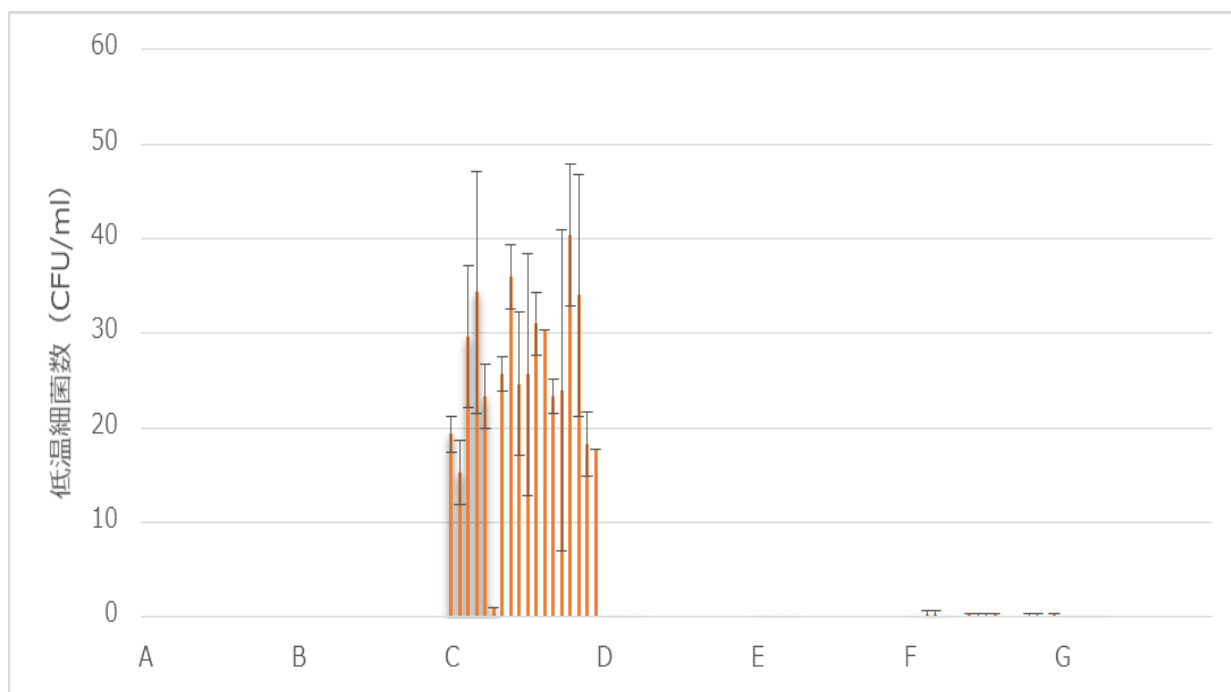


図2 . 低温殺菌牛乳計7製品・126検体における低温細菌の検出状況 .

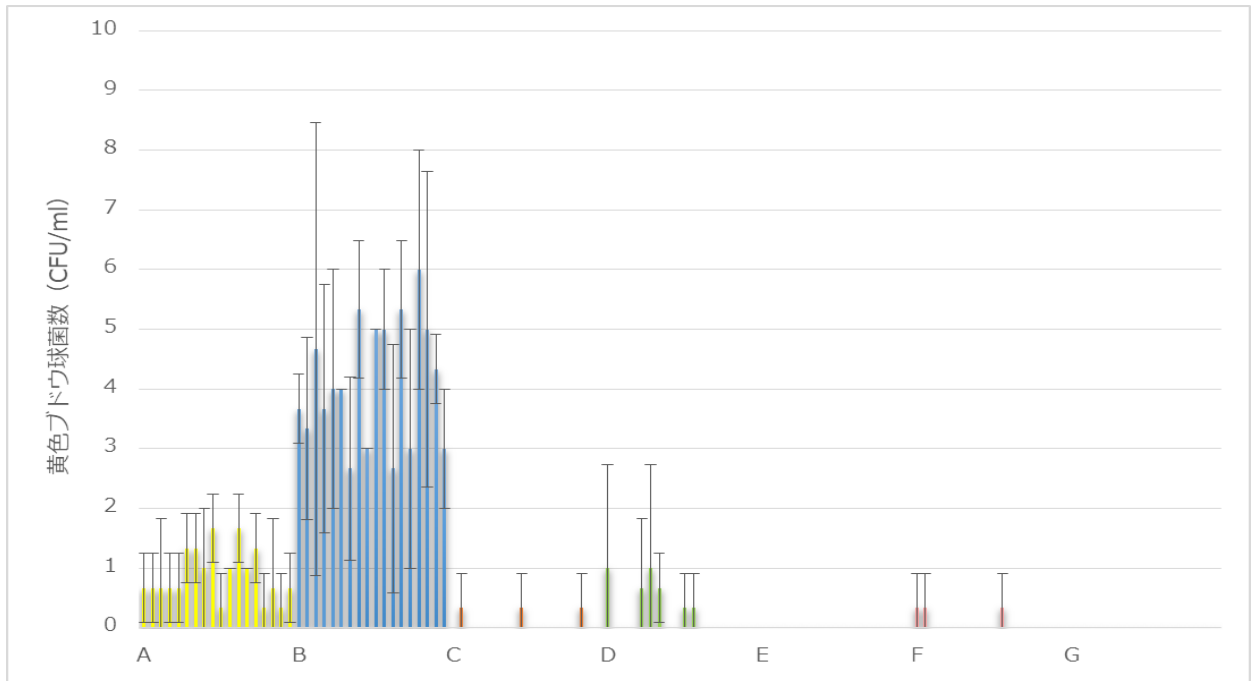
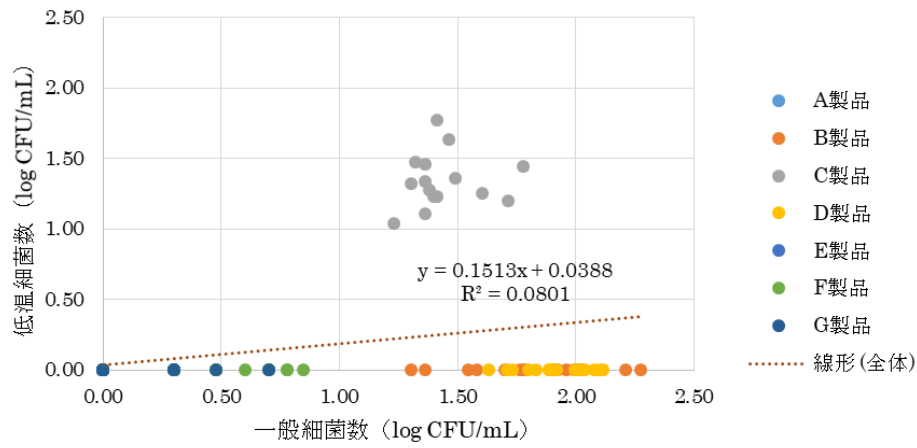
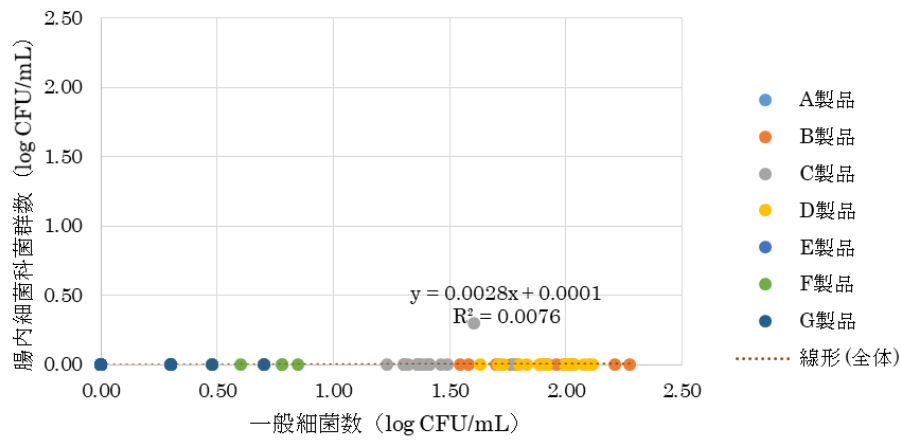


図 3 . 低温殺菌牛乳計 7 製品・126 検体における黄色ブドウ球菌の検出状況 (ISO 法) .

A



B



C

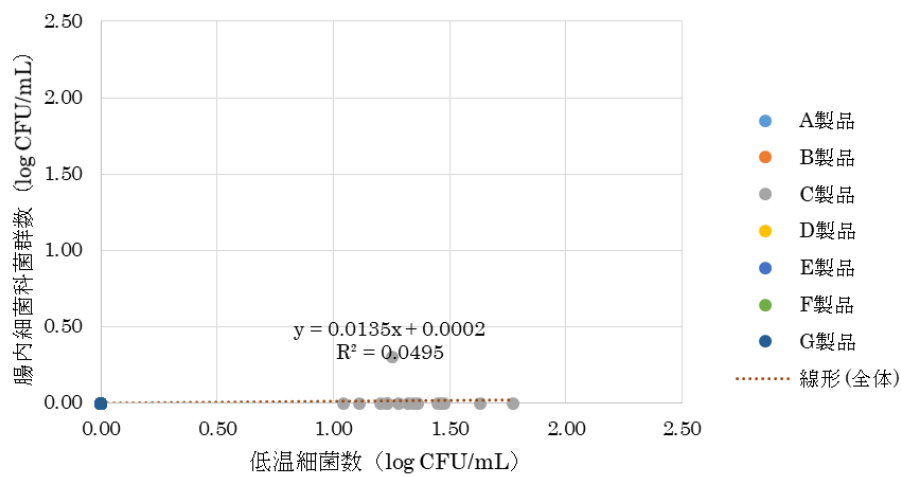


図4. 試験法間での成績相関性に関する検討 (ISO法)

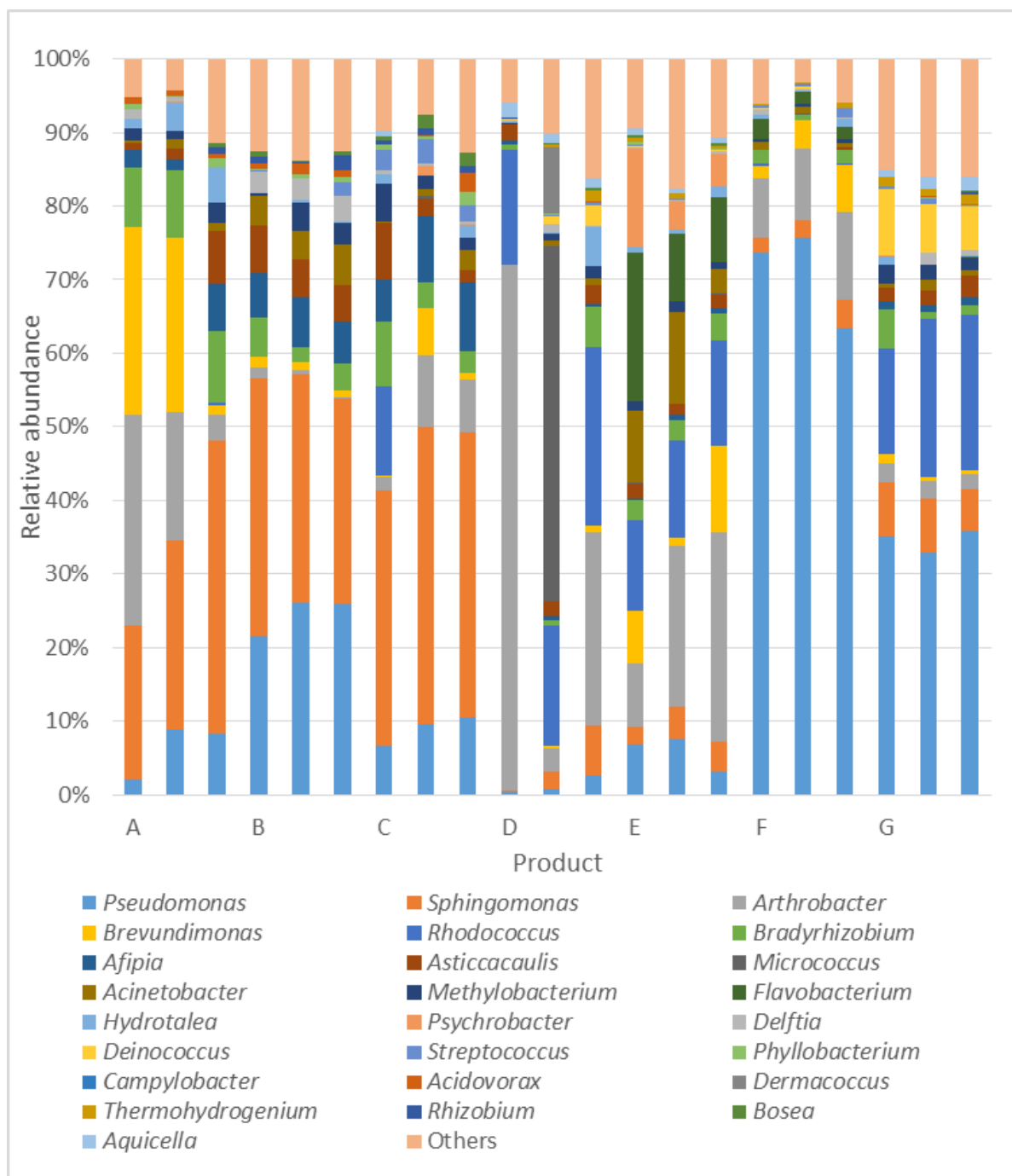


図5. 製品 A-C 代表検体に関する構成菌叢解析結果の概要

表6. 低温殺菌牛乳検体における衛生指標菌検出成績の概要

A ISO法

項目	製品A(n=18)		製品B(n=18)		製品C(n=18)		製品D(n=18)		製品E(n=18)		製品F(n=18)		製品G(n=18)	
	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数
一般細菌	5	0.26	15	70.24	18	31.41	18	84.15	4	0.17	18	3.41	18	1.57
腸内細菌科菌群	0	-	0	-	3	0.13	3	0.11	0	-	0	-	0	-
大腸菌群	0	-	0	-	0	-	2	0.06	0	-	0	-	0	-
大腸菌	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
黄色ブドウ球菌	18	0.89	18	4.09	3	0.06	6	0.22	0	-	3	0.06	0	-
低温細菌	0	-	0	-	18	25.22	0	-	0	-	5	0.09	0	-

B 国内公定法

項目	製品A(n=18)		製品B(n=18)		製品C(n=18)		製品D(n=18)		製品E(n=18)		製品F(n=18)		製品G(n=18)	
	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数	陽性数	菌数
一般細菌	3	0.24	18	65.92	18	24.15	18	79.05	3	0.17	18	3.23	18	1.18
腸内細菌科菌群	0	-	0	-	3	NT	3	NT	0	-	0	-	0	-
大腸菌群	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
大腸菌	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
黄色ブドウ球菌	18	1.03	18	3.98	4	0.12	6	0.25	0	-	2	0.11	0	-

*菌数の単位はCFU/mLを指す。

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）
平成 29 年度 分担研究報告書

食品微生物試験法の国際調和に関する研究
分担課題 食品微生物試験法の国際動向に関する研究

研究分担者 五十君 静信 （東京農業大学応用生物科学部・教授）
研究分担者 松岡 英明 （東京農工大学名誉教授）

研究要旨

本研究班では、国際動向を踏まえた上で、国内の食品微生物試験法の妥当性を確認し、食品微生物試験法の国際調和を図る上で必要となる科学的根拠を創出することを目的としている。コーデックス委員会では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おり、この中で食品の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。国内の微生物規格基準はこれまで独自に試験法を策定し公定法としてきたため、食品衛生管理の国際整合性が重要となっている。特に微生物試験法の国際調和は急務の課題といえる。

分担研究課題は、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である。

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、五十君はその開催委員長として会の運営にあたった。アジア地区としては、はじめての開催であり、ISO/TC34/SC9 は、非公開の会議ではあるが、情報を漏洩しないことを条件に、特例として国内の試験法関係者もオブザーバーとして参加を認めた。総会では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。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。病原体の取扱いについては、国立医薬品食品衛生研究所病原体等安全管理規程に基づき適切に行った。

C. 研究結果

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国際ナショナル、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国際ナショナルは、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国際ナショナルは、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国際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。

D. 考察

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

評かであった。

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でき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。

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と思われる。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 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。AOACIJS 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

表 1. ISO/TC34 に関連する国内審議団体

委員会	参加地位*	国内審議団体
TC34 食品	P	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
TC34/SC2 採油用種子及び果実	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC3 果実，野菜及びそれらの二次製品	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC4 穀物及び豆類	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC5 牛乳及び乳製品	O	国際酪農連盟日本国内委員会
TC34/SC6 食肉，家禽，魚，卵及びそれらの製品	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC7 スパイス，ハーブ及び香味調味料	O	農林水産省 食料産業局食品製造卸売課
TC34/SC8 茶	O	農林水産省 生産局 農産部地域作物課
TC34/SC9 微生物	P	一般財団法人 日本食品分析センター
TC34/SC10 動物用飼料	O	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
TC34/SC11 動植物の油脂	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC12 官能分析	O	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
TC34/SC14 生鮮果実，生鮮野菜，乾燥果実及び乾燥野菜	N	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC15 コーヒー	O	農林水産省 食料産業局食品製造卸売課
TC34/SC16 分子生物指標の分析に係る横断的手法	P	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
TC34/SC17 食品安全のためのマネジメントシステム	P	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

* P: Participating Member, O: Observers Member, N: None Member

表 2 . 2018 年 TC34SC9 総会 (東京) で審議された WG 報告等

WG1	Microbiological analysis of meat and meat products
WG2	Statistics
WG3	Method validation
WG4	Proficiency testing
WG5	Culture media
WG6	Parasites
WG7	General requirements and guidance for microbiological examinations
WG8	Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions
WG9	Detection of Salmonella
WG10	Serotyping of Salmonella
WG11	Detection of microbial contaminants in starter cultures and probiotics
WG12	Detection of spoilage thermo-acidophilic spore forming bacteria
WG13	Enumeration of coagulase positive staphylococci using BP agar
WG14	Detection and enumeration of E. coli by MPN technique
WG15	Enumeration of psychrotrophic microorganisms
WG16	Yeasts and moulds
WG17	Sampling techniques from surfaces of food/feed environment
WG18	Enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i>
WG19	Guidelines for conducting challenge tests
WG20	<i>Bacillus cereus</i> Colony-count technique at 30°C
WG23	Sulfite reducing clostridia and <i>Clostridium perfringens</i>
WG25	Whole-genome sequencing for typing and genomic characterization
WG26*	Detection of <i>Clostridium botulinum</i> toxins in food
WG28*	Enumeration of micro-organisms at 30°C

情報提供

TC147/SC4	Water microbiology
TC 69/SC 6	Measurement methods and results
ISO/TC 212	Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems
ISO/TC 217	Cosmetics
ISO/TC 276	Biotechnology
Liaisons with other organisations	

表 3. バリデーションガイドライン ISO 16140 の改訂状況

ISO 16140:2003	Published in 2003
Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods	
Published in 2016	
ISO 16140-1:2016	Terminology - Published August 2016
Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 1: Vocabulary	
ISO 16140-2:2016	Validation of (alternative) Methods
Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method	
Expected publication 2019	
ISO 16140-3:	Submitted for Draft International Standard (DIS) review by SC9
Methods Verification	
ISO 16140-4:	Submitted for Draft International Standard (DIS) review by SC9
In-house Single Laboratory Method Validation	
ISO 16140-5:	Submitted for Draft International Standard (DIS) review by SC9
Factorial Multi-laboratory Method Validation	
ISO 16140-6:	Submitted for Draft International Standard (DIS) review by SC9
Validation for Confirmation Methods	

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）
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
食品微生物試験法の妥当性評価に関する研究

分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授
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 部長

我が国が ISO TC34/SC9 の P メンバーになり、今年度、東京で SC9 国際年次総会を実施したことは、食品微生物試験法の妥当性確認に関する諸問題を国際的視点で議論する絶好の機会となった。分担研究者は、既に、先行研究において、ISO 16140:2016 の邦訳、並びにそれに基づく、国内向けバリデーションガイドラインの作成を主導してきたが、特に 2016 改訂版において合理的に理解できない点を多々見出していた。また、同じく先行研究において、バリデーションに密接に関わる「測定不確かさ」に関する諸問題を整理してきた。関連するのは WG3（メソッドバリデーション）および WG2（統計学）であるが、そこから提起された課題は、参照法のバリデーション、ISO 16140 の第 3～6 分冊の編纂、そして測定不確かさの ISO 19036 の改訂が主であった。国内で議論していた内容は、既に過去の議論なのか、あるいは困難なために、取合えずスキップされてきたことなのか、推察するに止まった。本研究では、改めて、我が国で議論してきた問題点の本質を考察した。その結果、現在進行中の SC9 の作業に対する有用な提言になるとの認識が得られた。それによって、WG3 および WG2 のメンバーとの議論も深まるはずである。同時に、我が国としては、WG の作業に積極的に協力することが、P メンバーになったことの権利であり、同時に責務でもある。

A . 研究目的

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、その具体的な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 WG 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。

B．研究方法

(1) ISO16140: 2016 および関連規格における問題点の整理

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。

(2) 国際動向調査

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。

C．研究結果

(1) 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に対応するために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。

(2) 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)と判断されるとき、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 β 期待許容区間(β expectation tolerance interval; β -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 $\pm\beta$ -ETI(80%)が、 ± 0.5 Log units 以内なら同等であると結論される。さらにその先があって、もし、部分的にでも ± 0.5 Log units を超える場合があったとしても、参照法の標準偏差の4倍以内であれば同等でるとしてよい、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ている。

(3) 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。

(4) 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、両方とも陽性になるか、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きめられているので、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。

(5) 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。

(6) 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、それが無い場合は、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、などの提案がなされた。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。

(7) 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(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。

D . 結論

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。

「メソッドバリデーション」及び「統計学」に関して、我が国で議論されてきた課題	ISO TC34/SC9 東京年次総会で、WG3: メソッドバリデーション、及び WG2: 統計学、から提案された事項
測定不確かさ	測定不確かさ
バリデーション実施システム	-----
同等性の判定基準	-----
確定試験	-----
定性試験での判定基準: 感度	-----
定性試験での判定基準: RLOD	-----
参照法のバリデーション	参照法のバリデーション
-----	ISO 16140 の第 3～6 分冊の編纂

E . 健康危害情報

該当なし。

F . 研究発表

（国内学術集会）

齊藤美佳子、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）．

G . 知的所有権の取得状況

該当なし。

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）

「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

ボツリヌス試験法に関する研究

研究分担者 倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学
グローバルアグロメディシン研究センター
研究協力者 山崎栄樹 国立大学法人帯広畜産大学
動物・食品検査診断センター
奥村香世 国立大学法人帯広畜産大学
獣医学研究部門

研究要旨：“食品からの微生物標準試験法検討委員会”においては、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。本研究班では感染時に極めて高い健康危害を顕し国内でも慎重な対策が求められるボツリヌス菌について国際的整合性を持った試験法の策定を目的としている。本年度の研究においては、ボツリヌス標準試験法に関する国際動向の調査および、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、国内で利用可能な国際的整合性をもったボツリヌス試験法の整備に向けて、ISO/TS 17191 に基づいたボツリヌス遺伝子試験法（Technical Specification）の原案（ステージ1）を提案した。

A. 研究目的

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。

本年度の研究においては、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。

B. 研究方法および結果

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ー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(NHISJ-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に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(表2)。

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)ボ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. ボ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(別紙)。

D. 考察

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(NHISJ-20)をTSとして提案することで合意に至った。今後、NHISJ-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、NHISJ-20法としての公開を目指す。

E. 結論

1)ボツリヌス標準試験法に関する国際動向の調査および、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。

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)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

2. 学会発表

1. 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)
2. 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)
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

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 引用文献

- ・ 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
- ・ BAM chapter 17 *Clostridium botulinum* (<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm>)

表 1 Clostridium botulinum 標準試験法の国内外の動向

区分	規格番号	規格名	規格構成	試験法の概要
国外試験法	ISO/TS 17191	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	-	ボツリヌス毒素遺伝子をターゲットとした PCR, real-time PCR 法
	BAM Chapter17	Clostridium botulinum	I. Mouse Bioassay for Clostridium botulinum Toxin II. Mouse Screening Procedure for Clostridium botulinum Type E Spores in Smoked Fish III. Amplified ELISA Procedure for Detection of Botulinal Toxins A, B, E, and F from Culture IV. Detection of Type A, B, E, and F Clostridium botulinum Toxins Using Digoxigenin-labeled IgGs and the ELISA (DIG-ELISA) V. Specific Detection of Clostridium botulinum Types A, B, E, and F Using the Polymerase Chain Reaction (PCR)	マウス試験によるボツリヌス毒素検査法(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法(IIIおよびIV)、およびボツリヌス毒素遺伝子検査法(V)
国内通知法	食基発第0630002号・食監発第0630004号(平成15年6月30日)	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	-	食品へのボツリヌス菌添加回収試験法
	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	-	食品からのボツリヌス菌分離法およびマウス試験によるボツリヌス菌の同定法

表 2 NIHSJ-19-ST1 案と ISO,BAM 法の比較

試験法	NIHSJ-19 (H24.12.7 案)	ISO/TS 17191	BAM (Alternative Method I)
所要日数	12~20 日間	5 日間	17~27 日間
行程数	23	23	26
完全試験項目	マウス毒性試験 生化学的性状試験 毒素遺伝子検出	毒素遺伝子検出	マウス試験 卵黄加寒天培地での発育
供試食品量 (食品換算)	未定	はちみつ:25g(全量) はちみつ以外の一般食品:0.1g	固形食品:1g 液体食品:2g
マウス使用数	260 <	0	208 <
増菌培養条件	ブドウ糖・でんぷん加クッドミート培地	TPGY 培地	クッドミート培地 TPGY 培地

<p style="text-align: center;">NHHSJ-20-ST1</p> <p style="text-align: center;">ポツリヌス毒素遺伝子試験法 (定性法) [ステージ 1]</p> <p>1. はじめに</p> <p>本試験法は ISO/TS 17919:2013 に準じた、A, B, E および F 型ポツリヌス毒素遺伝子を PCR 法により検出するための Technical specification (TS) である。本 TS においては、毒素ではなく遺伝子検出を目的としているため、本試験で毒性であったとしても、その結果が必ずしも試料中にポツリヌス毒素の存在を示すものではない。</p> <p>2. 試験の概要</p> <p>本試験法は、はちみつを試料とする場合は試料中の芽胞を、はちみつ以外の食品を試料とする場合は芽胞および生菌の存在を A, B, E および F 型ポツリヌス毒素遺伝子特異的 PCR 法により判定する定性試験法である。はちみつを試料とする場合は、50℃で加熱殺菌した試料 25 g に 1% polysorbate 80 含有滅菌蒸留水を加えて均質化し、遠心分離により得られた上清を 0.45 μm ニトロセルロースフィルターでろ過してフィルター上に捕集された菌および、遠心分離により得られた沈渣を TPGY 培地に懸濁し、65℃で 10 分間処理後に 30℃で嫌気培養する。はちみつ以外の食品を試料とする場合は、試料 25g に 0.1% ベプトン加生理食塩水を加えて均質化した試料溶液を TPGY 培地に加え、65℃で 10 分間の処理 (芽胞測定) および非処理 (生菌測定) の後に、30℃で嫌気培養する。いずれの試料においても、24 時間後の増菌液から DNA 抽出を行い、ポツリヌス毒素遺伝子特異的 PCR 法によりポツリヌス毒素遺伝子の存在を確認する。24 時間後の増菌液でポツリヌス毒素遺伝子陰性であった場合には、更に 48 時間の嫌気培養を行った後に、培養液 1 mL を新鮮な TPGY 培地 9 mL に加え、30℃で 18 時間の嫌気培養を行い、得られた培養液に対して DNA 抽出およびポツリヌス毒素遺伝子特異的 PCR を行い、ポツリヌス毒素遺伝子の存在を確認する。</p> <p>3. 使用機器および器具 省略</p> <p>4. 培地および試薬</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 0.1% ベプトン加生理食塩水 ② tryptone-peptone-glucose-yeast extract broth (TPGY 培地) ③ リン酸緩衝液 ④ 緩衝 TPGY 培地 ⑤ CTAB 抽出緩衝液 ⑥ CTAB 沈殿緩衝液 ⑦ プロアアーゼ K 溶液 ⑧ TE buffer 	<p style="text-align: center;">NHHSJ-20-ST1</p> <p>5. 試験手順</p> <p>5-1 試料液調製 (はちみつ以外の一般食品)</p> <ol style="list-style-type: none"> ① ストマッキング袋に試料 25±0.1 g を取り分け、0.1% ベプトン加生理食塩水 225 mL を加え、1 分間のストマッキング処理を行う。 ② ①で得られた試料 1 mL を、30±1℃の水浴で加熱した TPGY 培地^{※1} 9 mL と混和する (生菌測定用試料)。 ③ ①で得られた試料 1 mL を、65±1℃の水浴で加熱した TPGY 培地^{※2} 9 mL と混和し、65±1℃で 10 分間インキュベートする。その後、30±1℃の水浴で急冷する (芽胞測定用試料)。 ④ ②および③で得られた培養液を 30±1℃で 24±2 時間の嫌気培養後、1 mL を分取し「5-3. PCR 検査」を実施する。残りの培養液については引き継ぎ嫌気培養を行う。 ⑤ ④で得られたサンプルが PCR 検査陰性の場合には、更に 48±2 時間の嫌気培養 (30±1℃) 後、培養液 1 mL を 30±1℃の水浴で加熱した 9 mL の新鮮な TPGY 培地^{※2} に加え、18±2 時間の嫌気培養 (30±1℃) を行った後に、再度「5-3. PCR 検査」を実施する。 <p>^{※1}：TPGY 培地は使用前直前に沸騰水浴で 15 分間の加熱により脱気したものを使用する。また、酸阻性の高い食品に対しては、緩衝 TPGY 培地を使用する。</p> <p>5-2 試料液調製 (はちみつ)</p> <ol style="list-style-type: none"> ① はちみつが入った容器を 50±1℃の水浴で 30 分間加熱する。加熱後に容器を数回転倒混和して均一化する。 ② 滅菌した遠心管に試料 25±2 g を取り分け、50±1℃に加熱した 1% polysorbate 80 含有滅菌蒸留水 50 mL を加え、よく均一化する。 ③ 12,000 x g で 30 分の遠心分離後、上清と沈渣をデカンテーションにより分離する。沈渣は 5±3℃で使用まで保管する。 ④ ③で得られた上清を 0.45 μm の滅菌ニトロセルロースフィルターでろ過する。フィルターが目詰まりした場合は、新しいフィルターに交換し、全ての上清をろ過する。なお、得られたフィルターが複数存在する場合は、その全てを 1 試料としてまとめて取り扱う。得られたフィルターに 65±1℃の水浴で加熱した TPGY 培地^{※2} 10 mL を加え、65±1℃で 10 分間インキュベートする。 ⑤ ③で得られた沈渣を 65±1℃の水浴で加熱した TPGY 培地^{※2} 10 mL に懸濁し、65±1℃で 10 分間インキュベートする。 ⑥ ④および⑤で得られた培養液を 30±1℃で 24±2 時間の嫌気培養後、1 mL を分取し「5-3. PCR 検査」を実施する。残りの培養液については引き継ぎ嫌気培養を行う。 ⑦ ⑥で得られたサンプルが PCR 検査陰性の場合には、更に 48±2 時間の嫌気培養 (30±1℃) 後、培養液 1 mL を 9 mL の 30±1℃の水浴で加熱した新鮮な TPGY 培地^{※2} 培地に加え、18±2 時間の嫌気培養 (30±1℃) を行った後に、再度「5-3. PCR 検査」
--	--

NIHSJ-20-ST1

を実施する。
*注：TRGy 培養は使用前に沸騰水浴で 15 分間の加熱により脱気したものを使用する。

5-3. PCR 検査

- ① 1 mL の培養液を 1.5 mL 遠心チューブに分取し、12,000 x g で 5 分間の遠心分離後、マイクロベレットを上清を完全に除去する。
- ② 沈渣（菌塊）に 65 °C に加熱した 0.5 mL の CTAB 抽出緩衝液を加え、沈渣を完全に懸濁する。
- ③ 65 °C で 30 分間、攪拌しながらインキュベートする。
- ④ 20 µL のブローカーセ K 溶液を加えて穏やかに臨濁液剤後、更に 65 °C で 30 分間穏やかに攪拌しながらインキュベートする。
- ⑤ 12,000 x g で 10 分間の遠心分離後、上清を新しい遠心チューブに回収する。
- ⑥ 回収した上清に 0.7 – 1 倍容のクロホルムを加え、数秒間ボルテックスにより攪拌する。
- ⑦ 12,000 x g で 15 分間の遠心分離後、上層（水層）を新しい遠心チューブに回収する。
- ⑧ 回収した上層に 2 倍容の CTAB 沈殿緩衝液を加え、室温にて 60 分間静置する。12,000 x g で 10 分間の遠心分離後に得られた沈渣を 350 µL の 1.2 mol/L NaCl 溶液に溶解する。350 µL のクロホルムを加え、激しく攪拌後、12,000 x g で 10 分間の遠心分離を行い、マイクロベレット等を用いて、得られた上層（水層）を新しい 1.5 mL 遠心チューブに回収する。^{*注3}
- ⑨ 回収した上層に 0.6 倍容のイソプロパノールを加え、ボルテックス等により激しく攪拌後、室温で 20 分間、静置する。
- ⑩ 12,000 x g で 15 分間の遠心分離後、上清を廃棄する。
- ⑪ DNA の沈殿に 0.5 mL の 70% エタノール溶液を加え、チューブを数回颠倒しチューブの内壁を洗浄する。
- ⑫ 12,000 x g で 10 分間の遠心分離後、上清を廃棄し、沈渣を室温で乾燥させる。
- ⑬ 沈渣を 100 µL の TE buffer に懸濁し、顕微 DNA 溶液とする。
- ⑭ 得られた顕微 DNA 溶液に対して PCR 検査を実施し、得られた顕微 DNA 溶液は 20 °C で保存する。

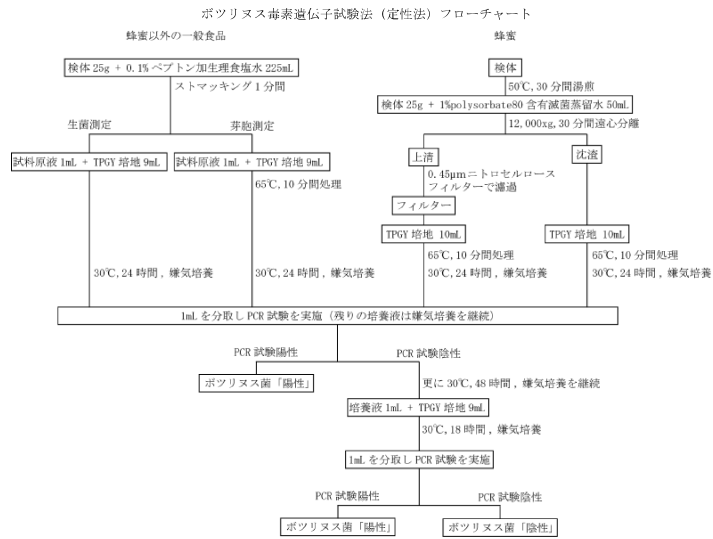
*注3：行程⑩（CTAB 沈殿）は必須ではないもの、タンパク質やポリリサッカライドに富む食品マトリクスを利用した場合には推奨される。また、スピノグラムを用いた同種 DNA 抽出法も使用可能である。

6. 結果の解釈

本試験は液体中のポツリヌス毒素遺伝子を保有する菌体の検出を目的としているため、上述の PCR 検査の結果が必ずしも検体中のポツリヌス毒素の存在を反映してはい

NIHSJ-20-ST1

るわけではないことに注意が必要である。ポツリヌス毒素の確認には毒素タンパク質あるいは活性を測定可能な方法を用いた追加試験を行わなくてはならない。



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 第二室 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。本年は、現在発表されている ISO 及び BAM 法において示されている、遺伝子検査法の情報を収集した。

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（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. 研究結果および考察

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。これらについて表 1 にまとめた。

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。これらについて表 2 にまとめた。

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。

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。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おいては多くの議論が予想される。

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

表1. 遺伝子検査法を使用しているISO法

ISO No	年	タイトル	対象	用途	方法	工程	標的	備考
ISO/TS 13136	2012	Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups	STEC	スクリーニング	リアルタイム △PCR	増菌後	stx1, stx2, eae	
					リアルタイム △PCR	増菌後	O157 rfbE, O111 wbdI, O26 wzx, O145 ihp1, O103 wzx	
				確認	PCR	分離後	stx1, stx2, eae	
					リアルタイム △PCR	分離後	stx1, stx2, eae	
ISO/TS 17919	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	ボツリヌス菌	スクリーニング	PCR	増菌後	BoNT A, B, E, F	
ISO/TS 18867	2015	Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of pathogenic <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	エルシニア エンテロコロリチカ エルシニア エンテロコロリチカ	スクリーニング スクリーニング	リアルタイム △PCR リアルタイム △PCR	増菌後 増菌後	ye-all all	生物型1Aは対象外 ブローブ2種類から選択
			仮性結核菌	スクリーニング	リアルタイム △PCR	増菌後	ypS	ブローブ2種類から選択

表2. 遺伝子検査法を使用しているBAM法							
年	タイトル	対象	用途	方法	工程	標的	備考
2011	qPCR method for the Detection of <i>Salmonella</i> in Papaya –General Laboratory Procedure	サルモネラ	スクリーニング	リアルタイムPCR	前増菌後	invA	
2012	Testing methodology for <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE)	サルモネラ エンテリティディス					
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	イムノアッセイ		SDIX RapidChek SELECT™ Salmonella Enteritidis Test System	*1
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	イムノアッセイ		Neogen Reveal Salmonella Enteritidis (SE) Test System	*1
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	リアルタイムPCR		Applied Biosystems TaqMan® Salmonella Enteritidis Detection Kit from Life Technologies	*1
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	リアルタイムPCR		Applied Biosystems TaqMan® Salmonella Enteritidis Detection Kit from Life Technologies	*2
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	イムノアッセイ		SDIX RapidChek SELECT™ Salmonella Enteritidis Test System	*2
		サルモネラ エンテリティディス	代替法	PCR		BAX® System PCR Assay for Salmonella (2)	*2
2015	Testing Methodologies for <i>E. coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella</i> species in Spent Sprout Irrigation Water (or Sprouts)	大腸菌O157	スクリーニング	リアルタイムPCR	増菌後	stx1,2, uidA	
2017	BAM Protocol: Simultaneous Confirmation of <i>Listeria</i> species and <i>L. monocytogenes</i> isolates by real-time PCR	リステリア	確認	リアルタイムPCR	分離後	iap (リステリア属菌、 <i>L. monocytogenes</i>)	
2017	BAM: Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>	下痢原性大腸菌					
		EPEC	スクリーニング	コロニーハイブリダイゼーション	(大腸菌レベル > 1e4/gのとき)	LT,ST	
			確認	PCR	分離後	LT,ST	
		EIEC	確認	PCR	分離後	invA ?	
		EPEC	確認	PCR	分離後	eae	
		STEC	スクリーニング	リアルタイムPCR	増菌後	stx1,2, uidA (,O157wzy)	
			確認	Luminex suspension array	分離後	O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O157, eae, aggR	
			確認	リアルタイムPCR	分離後	stx1, stx2	
*1, FDA has determined that the following methods are equivalent to "Environmental Sampling and Detection of Salmonella in Poultry Houses" (April 2008) in accuracy, precision, and sensitivity in detecting Salmonella Enteritidis:							
*2, FDA has determined that the following methods are equivalent to Chapter 5 (Salmonella) of FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM, December 2007 Edition) in accuracy, precision, and sensitivity in detecting Salmonella Enteritidis							

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
朝倉 宏	ボツリヌス食中毒に係わる現状と課題	食品衛生研究 (日本食品衛生協会)	68	7-13.	2018
加藤はる、朝倉宏、百瀬愛佳.	ボツリヌス症ってどんな病気?	健康教室・東山書房	10	76-79	2017

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
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	45	225-229.	2017
Asakura H, Yamamoto S, Momose Y, Kato H, Iwaki M, Shibayama K.	Genome Sequence of <i>Clostridium botulinum</i> strain Adk2012 associated with a foodborne botulinum case in Tottori, Japan, in 2012.	Genome Announc.	5	e00872-17	2017
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.	<i>Methods Mol. Biol.</i>	1600	1-7	2017
Aryantini, N. P. D., Yamasaki E, Kurazono, H, Sujaya I. N., Urashima T, Fukuda K.	<i>In vitro</i> safety assessments and antimicrobial activities of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> strains isolated from a fermented mare's milk.	<i>Animal Science Journal</i>	88	517-525	2017

