

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 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏

平成 31 (2019) 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31(2019)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

衛生指標菌試験法作成並びに標準試験法改訂に関する研究

朝倉 宏、岡田由美子 他

----- 21

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

----- 47

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

----- 55

3. ボツリヌス試験法に関する研究

倉園久生 他

----- 63

4. 遺伝子検査法に関する研究

泉谷秀昌

----- 69

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 74

平成 30 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）

大嶋 秀克 公益財団法人日本乳業技術協会
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 淳* 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
関 享子 国立医薬品食品衛生研究所
福田 理恵 東京都健康安全研究センター
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所
森田 加奈 東京都健康安全研究センター
門間 千枝* 東京都健康安全研究センター
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 30 年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
総括研究報告書

食品微生物試験法の国際調和に関する研究

研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨：本研究では、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”を活動の軸に置きつつ、国内の食品微生物試験法を国際調和の取れた形へと導くための科学的根拠を創出することを目的として、食品微生物試験法の国際調和に向けて、(1)衛生指標菌試験法に関する研究、(2)食品微生物試験法の国際動向及び妥当性確認に関する研究、(3)ポツリヌス試験法に関する研究、(4)遺伝子検査法に関する研究、の4つに区分し、それぞれの分担研究項目に係る知見の収集にあたった。

(1)衛生指標菌試験法に関する研究では、衛生指標菌作業部会を開催し、わが国の衛生指標に関する議論を行い、乳・乳製品の製造工程管理には細菌数及び腸内細菌科菌群を、成分規格には細菌数のほか、大腸菌または腸内細菌科菌群を設定することが国際整合性及び実行性を踏まえた形として望ましいとの意見で集約された。これを受け、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において、腸内細菌科菌群定性試験法 NIHSJ-15 を ISO 21528-1:2017 に基づく改訂を行い、国際調和を図った。また、同委員会では、ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法を討議し、直接的な糞便汚染指標である大腸菌の試験法をフィルター過の必要性の有無により分類して検討を行うこととなったほか、これまでに作定されたサルモネラ属菌試験法 (NIHSJ-01) 及びカンピロバクター試験法 (NIHSJ-02) について、国際調和と実行可能性の向上に資する形とするべく、ISO 法改訂に応じた見直しを行った。(2)国際動向及び妥当性確認に関する研究としては、2018年6月に開催された ISO/TC34/ SC9 総会に参加し、情報収集及び意見交換を行った。また本年度は微生物試験法に関する用語集を整理し、検討委員会へ提案すると共に、各試験法のバリデーション方法について助言を行った。(3)ポツリヌス試験法に関する研究では、ポツリヌス試験法作業部会を開催し、ST2 案の作成を行った上で、コラボスタディに向けての予備検討並びに課題の整理を行い、次年度にコラボスタディを行う計画案を作成した。(4)遺伝子検査法に関する研究では、近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある状況を踏まえ、ISO ガイドラインを和訳化した上で、遺伝子検査法作業部会を組織化し、食品からの微生物試験法に PCR 法を採用する上で求められる事項の整理を行った。

研究分担者（検討委員会委員兼務）

五十君静信	東京農業大学
松岡 英明	東京農工大学
岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所
倉園 久生	帯広畜産大学
泉谷 秀昌	国立感染症研究所

研究協力者（*は検討委員会委員）

大嶋 秀克	日本乳業技術協会
奥村 香世	帯広畜産大学
甲斐 明美*	日本食品衛生協会
工藤由起子*	国立医薬品食品衛生研究所
小久保彌太郎*	日本食品衛生協会
小崎 俊司*	大阪府立大学
小高 秀正*	コダカマイクロバイオロジーア ンドサイエンス合同会社
品川 邦汎*	岩手大学
鈴木 淳*	東京都健康安全研究センター
下島優香子	東京都健康安全研究センター
土屋 禎*	日本食品分析センター
平井 昭彦	東京都健康安全研究センター
廣田 雅光*	日本食品検査
関 享子	国立医薬品食品衛生研究所
百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所
門間 千枝*	東京都健康安全研究センター
森 哲也*	東京顕微鏡院
森 曜子*	AOAC 日本
山崎 栄樹	帯広畜産大学
山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所

（敬称略、五十音順）

A. 研究目的

本研究では、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”を活動の軸に置きつつ、国内の食品微生物試験法を国際調和の取れた形へと導くための科学的根拠を創出することを目的として検討を行った。

当該委員会は、これまでサルモネラ、黄色ブドウ球菌、リステリアをはじめとする通知法作成に寄与してきた。主要病原微生物試験法については一定の成果を発信してきたが、国際調和を図る上では、逐次変動する国際動向を見据えたアップデート等の作業が必要である他、これらを英文化し、海外への発信も併せた機能を同組織にもたせることが、今後の我が国における標準試験法の推進を図る上で不可欠である。実際に、同組織は国際標準化機構（ISO）SC9の中で発言権を有するPメンバーの活動中心に位置づけられており、昨年度には研究分担者である五十君教授を委員長として日本で同会合を開催する等、国際調和に向けた食品微生物試験の在り方に関する議論を進めている。このように国内外の情報を相互補完しうる機能性を持つ組織を構築することは本研究の特色といえる。上記委員会での検討対象としては、現在まで完了していないものの中で、HACCPを見据え自主検査等で汎用される遺伝子試験法の使用に関するガイドライン等の策定を行い、指標菌を含め、食品検査法として未だ整備がなされていない試験項目を、国際標準を満たす試験法へ導くことが早急な課題として挙げられる。同項目については、原案を作成し、検討委員会での議論を経て、試験法、Technical Specification (TS)、あるいはガイドラインとして整備・公開していく予定で進めている。現在の国内における食品の微生物規格基準については、多様な食品に対して様々な衛生指標菌が設定されているが、その状況は海外とは大きく乖離するところもあり、国際調和を図る上で我が国の大きな課題と考えられる。本研究ではこの点を重視し、海外諸国における衛生指標菌に係る規格基準について、科学的な観点から知見・情報収集を行った上で、国内現行法の科学的妥当性を確認しつつ、国際基準に適合しうる国内での運用の在り方を科学的根拠を持って提示

しようとする独創性と社会要求性を有している。同項はこれまで数十年にわたり実施されておらず、その推進は国際調和の観点から欠かすことができない。

以下に、分担研究毎に研究目的等を記す。

(1) 衛生指標菌に関する研究

現在、日本国内では、乳および乳製品、冷凍食品等多くの食品種の微生物汚染指標に大腸菌群が設定されている。ここでいう大腸菌群とは、「乳糖を分解して酸とガスを産生する、好気性または通性嫌気性のグラム陰性無芽胞形成の桿菌群」を指し、*Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* 属等の *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科菌群) に属する菌が多く含まれる。一方、大腸菌群には、腸内細菌科菌群に属さない *Aeromonas* 属等も含まれており、微生物学上の分類とは必ずしも一致しない側面がある。

現在、EU をはじめとする諸外国の多くでは、食肉や乳製品等の製造工程管理に腸内細菌科菌群が糞便汚染指標として採用され、検体数や合格基準等を定めたサンプリングプランを設定し、運用している状況にある。腸内細菌科菌群は、「プロテオバクテリア門ガンマプロテオバクテリア綱エンテロバクター目に属し、通性嫌気性でブドウ糖を発酵してガスと酸を産生するグラム陰性桿菌」と定義づけられることから、分類学との整合も併せ持っている。

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

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

研究班では国内の食品微生物試験法を国際調和

の取れた形へと導くため、食品微生物試験法の国際調和を科学的観点から推進することを目的とする。国際調和を図る上では、逐次変動する微生物試験法に関する国際動向を見据えたアップデート等の作業が必要である。分担研究課題としては、食品微生物の試験法に関する国際動向の掌握と、食品の微生物試験法における妥当性確認のあり方に関する検討を行うこととする。

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

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

本報告書では、これらの活動を通じて、明らかになった内容をまとめた。

(3) ポツリヌス試験法に関する研究

コーデックス委員会では食品の衛生に関する国際的な整合性の整備を目的として、各国の食品微生物基準を策定するためのガイドラインを示している。この中で食品微生物試験法に関しては ISO 法を標準とし、同法もしくは科学的に妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。一方で、国内の微生物規格基準は歴史的に独自に開発された試験法を採用してきた。食品流通のグローバル化が進む近年において、本邦で採用される試験法と国際的に利用されている試験法のハーモナイゼーションに対する要求は増しており、国際的通用性を持った

標準試験法の国内における整備は急務の課題となっている。

これらの課題を受け、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”において、現在、国際整合性を踏まえた主要食中毒細菌の標準試験法の作成が進められている。これまで、複数の病原微生物・毒素に関する作業部会がデータ収集・解析を行い、同委員会でも妥当性確認等を協議することで標準試験法を策定してきた。

本研究では、これまでに食品検査法としての海外で利用される方法との妥当性確認が行なわれていないボツリヌス菌について国内で利用可能な試験法の整備を行い、国際的整合性を持った試験法の策定を目的とする。研究期間内に試験法の原案を作成し、検討委員会での議論を経て、将来的に試験法、Technical Specification (TS)、あるいはガイドラインとして整備・公開する事を最終目標とする。本研究により得られる成果は、食品の衛生試験法の国際調和を図る上での重要性に加え、食餌性ボツリヌス症疑い事例対応への活用も期待される。

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

(4) 遺伝子検査法に関する研究

わが国の食品衛生法では食品(種)ごとに種々の微生物に対する規格基準が規定されており、それに対応する個別の試験法が定められている。試験法は培養法をベースに構築されている。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も菌の生化学的および/もしくは血清学的特性を利用している。近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある。こうした状況をふまえ、本研究では食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、その活用にあたってのガイドライン案作成を目的とした。

B. 研究方法

(1) 衛生指標菌に関する研究

1) 衛生指標菌の設定及び試験法に係る検討

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

2) ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法の検討

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

3) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

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

4) カンピロバクター試験法の改訂

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

討議を行うこととした。

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

コーデックス委員会の示す食品の微生物基準並びにガイドライン等は、食品のリスクマネジメントの世界標準とされている。その中で微生物試験法は国際標準化機構 (International Organization for Standardization: ISO) 法とされている。ISO で食品微生物試験法を担当するサブコミティは TC34/SC9 であることから、このサブコミティに発言権を有する P メンバーとして参加し、ISO 法の検討状況に関する情報収集と現在策定中の ISO 試験法の議論に積極的に参加した。平成 30 年 6 月には同サブコミティ総会が、スイスの Lausanne で開催され、研究班からは、五十君、松岡、岡田の 3 名が参加した。総会では食品微生物試験法関連の話題について、国内からの情報発信ならびに海外からの情報収集を行った。

一方、アメリカにおける食品の微生物試験法に関する情報収集も行った。AOAC International 総会には、参加できなかったが、国内から当該学会に参加した研究者から、AOAC International の動向について情報収集を行った。妥当性確認に関する文書が AOAC International から公開されており、こちらについて、その内容の精査を行った。ISO における妥当性確認と AOAC International における妥当性確認を比較検討し、我が国における食品の微生物試験法の妥当性確認のあり方を検討、微生物試験法に関する用語の整理、妥当性確認に関する考え方の整理を行った。

これらの検討は、バリデーション作業部会を組織して行った。作業部会は、五十君静信(分担研究者)、松岡英明(分担研究者)、岡田由美子(標準試験法検討委員会事務局、分担研究者)、森曜子(協力研究者)、吉田信一郎(協力研究者)、守山隆敏(協力研究者)、内田和之(協力研究者)、齋藤利江(協力研究者)、吉田朋高(協力研究者)のメンバーで組織した。

作業部会では、試験法関連の「日本語」用語の統一

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

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

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

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

ボツリヌス試験法作業部会を開催し、ISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia (以下、ISO法) を基に作成された ST1 案に関する疑問点や検討すべき事項を抽出した。その上でコラボスタディを実施する上でバリデーションが必要と思われる内容を選定し、検討委員会に ST2 案を提案することとした。平行して、次年度に向けて、コラボスタディ実施計画を検討した。

(4) 遺伝子検査法に関する研究

国際的な標準試験法として扱われている欧州 International Organization for Standardization (ISO) ホームページ上にある微生物試験法の中で、遺伝子検査法、とくに PCR 法に関する一般事項について記載したものを検索し、その中でも重要と考えられる文書について和訳の検討を行った。

C . 研究成果

(1) 衛生指標菌に関する研究

1) 乳及び乳製品の衛生指標に関する検討

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

2) 腸内細菌科菌群試験法の改訂

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

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

【基本方針】

ISO 法見直しが major revision である場合

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

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

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

ISO 法改訂が minor revision の場合

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

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

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

改訂後の試験法名について

- ・改訂を行った試験法については、試験法名の最後尾に改訂年を追記する。

- ・新たに作成した試験法についても、作成年を最後尾に付記することとする。

3) ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法に関する検討

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

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

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

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

4) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

NIHSJ-1: 2009 (サルモネラ属菌定性試験法) では、希釈水である緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water, BPW) の pH が 7.2 ± 0.2 とされている。一方で、本試験法に基づいて発出されたサルモネラ属菌試験法 (食安発 0729 第 4 号「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」) で示される BPW の pH は 7.0 ± 0.2 とされている状況を探知した。ISO 文書を確認したところ、ISO 6579: 2002 (Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.)、ISO 6887-1: 1999 及び 2017 (General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution) で用いられ

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

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

5) カンピロバクター試験法の改訂

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

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

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

微生物試験をとりまく国際情勢

コーデックスにおける食品の微生物基準判定に用いる標準試験法は、ISO（国際標準化機構）が示す試験法であり、他の試験法を用いる場合は、ISO 16140（食品の試験法のバリデーションに関するガイドライン）に示された科学的根拠のあるバリデーションを行った科学的根拠のある試験法の採用も可能としている。スイスで開催されたISO/TC34/SC9の総会に参加し、Pメンバーとして試験法作成およびガイドライン等策定の議論に参加した。

ISOが作成する規格には、製品規格やマネジメント規格だけでなく、食品の微生物試験法に関するものがある。それぞれの規格は新規提案をもとに段階的に審議されたのち国際規格として発行されるが、個別の審議はTC（Technical Committee；専門委員会）またはTCの下部組織であるSC（Sub-Committee；分科委員会）で行われる。現在、ISOには200を超えるTCが存在するが、食品の微生物試験法に関しては、TC34「食品専門委員会」の中のSC9「微生物分科委員会」及び乳製品についてはSC5「牛乳及び乳製品」が規格の作成を担当している。

2002年からTC34/SC9に係る「国内審議団体」として、一般財団法人日本食品分析センターが国内事務局となり、規格案などについての審議事務を担当してきた。参加地位にはP（Participating）メンバーとO（Observers）メンバーとがあるが、前者には規格案に対する投票権があり、かつ国際会議（総会）への出席義務がある。一方のOメンバーは投票権や会議への出席義務はないがコメントの提出は可能である。長年にわたりわが国はSC9のOメンバーとして対応してきた。

2018年度から、わが国は食品の微生物試験法策定の専門委員会であるISO/TC34/SC9に投票権のある正式メンバー（Pメンバー）として加わった。

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

リア、ベルギー、カナダ、中国、デンマーク、エジプト、フィンランド、ドイツ、アイルランド、イラン、オランダ、ノルウェー、スペイン、スイス（ホスト国）、タイ、イギリス、アメリカ、日本の合計19カ国であった。そのほかにAOAC International、CEN（欧州標準化委員会）、EU-RL（欧州連合レファレンス検査機関）、IDF（国際酪農連盟）、IUMS（国際微生物学連合）などの関連組織からの参加者を含め総計55名が参加した。参加者の多くは行政を含む研究機関や民間の研究機関、当該国の規格協会の代表者で、いずれも食品の微生物試験についてのエキスパートであった。TC34/SC9の総会で審議された、あるいは報告された内容については表1にその概要を示した。

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

バリデーションガイドラインの現状

現在、国際的に広く用いられている代替試験法の妥当性確認の方法を示したガイドラインであるISO 16140は、2003年に公開されてから改定されていなかった。一方、米国のAOAC Internationalは、ISO 16140の改定作業に先立ち、2012年にAOAC INTERNATIONAL Method Validation Guidelinesを公開した。試験法のバリデーションに関しては、100年を超える歴史を持つAOAC Internationalは、妥当性確認に関する最新の考え方をまとめ、文書化した。この文書の内容は、我々が試験法の妥当性に関する議論をするためには非常に有用な情報を与えてくれる。AOAC Internationalが長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方を集大成したガイドラインといえる。そのような考え方は、ISO

にも反映され、ISO 16140 の改訂では、その改定案の検討に AOAC INTERNATIONAL Method Validation Guidelines と可能な限り整合性がある形で作業が進められている。

国際的なスタンダードとしての微生物試験法のバリデーションに関しては、現在 ISO/TC34/SC9 で、ガイドライン ISO 16140 の改訂が進んでいる。これまで代替法のバリデーションガイドとして広く用いられてきた ISO 16140:2003 は、単一の文書であったが、今回の改訂版ではパート 1 からパート 6 と、6 つの文書に分けて検討が進められている。2016 年に、パート 1 と 2 が公開された。パート 1 は、試験法のバリデーションに用いられる用語や定義に関する文書となっている。パート 2 は、代替法（独自法）のバリデーションに関する一般原則及び技術的プロトコールとなっている。そこで、作業部会では用語の和訳について、ISO 16140-1 に加えて、TS Z 0032 : 2012 (ISO/IEC Guide 99:2007 (VIM3)) 国際計量計測用語 - 基本及び一般概念並びに関連用語、JIS Z 8101-1 : 2015 (ISO 3534-1 : 2006) 統計-用語及び記号-第 1 部: 一般統計用語及び確率で用いられる用語、JIS Z 8101-2 : 2015 (ISO 3534-2 : 2006) 統計-用語及び記号-第 2 部: 統計の応用、JIS Z 8402-1 : 1999 (ISO 5725-1 : 1994) 測定方法及び測定結果の正確さ（真度及び精度）- 第 1 部: 一般的な原理及び定義、JIS Q 0035 : 2008 (ISO Guide 35 : 2006) 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則、JIS K 0211 : 2005 分析化学用語（基礎部門）、CAC/GL72 : 2009 分析用語に関するガイドライン（厚生労働省 2012）などの文書を参考として、森曜子委員が用語集案の作成を行った（表 3）。この案を作業部会で検討後、検討委員会へ提案した。

ウェルシュ菌試験法策定支援

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

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

ISO 16140:2016 版の整理

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

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

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

R: 陽性、A: 陰性→C: 陽性 擬陰性（False negative）による陽性一致（Positive agreement）： PA_{FN}^*

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

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

R: 陰性、A: 陽性→C: 陰性 擬陽性（False positive）による陰性一致（Negative agreement）： NA_{FP}

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

R: 陽性、A: 陽性→C: 陰性 擬陽性（False positive）による陰性偏差（Negative deviation）： ND_{FP}

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

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

- ・各ケースの数は次の表のようになる。

T：全体（total）

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

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

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

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

4) 新たに確認試験を追加する理由

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

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

5) RLOD を求める計算式

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

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

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

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

6) 定量試験における許容区間

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

ニ一数)]の範囲内にあるかどうかによって、同等性を判定する。

- ・代替法のバラツキから、代替法の測定結果が 80% となるような菌数の範囲を求める。これが β -ETI (β -Expectation tolerance interval) である。 $t=0$ の両側に対称に広がる分布曲線 $f(t)$ で、 $t>T$ あるいは $t<-T$ の値になる確率が α (例えば 0.05) 以下になるとき、 T の値を、両側検定による確率 α に対する t 値とって、有意差がある場合を判定する t -検定で用いられる。同時に、 $f(t)$ が $-T<t<T$ の範囲にある確率は $1-\alpha$ であるといえる。
- ・同等性を判定する場合は β が用いられるが、その統計的処理は共通である。代替法の測定結果に基づく確率分布曲線として、 t -分布曲線を用いる。 $\beta=0.8$ となるような T 値は、両側検定による確率 $1-\beta=0.2$ として、 t -関数の逆関数 (EXCEL では $TINV$) を用いて求める。これに、代替法の平均標準偏差 s_A と補正パラメータ $\sqrt{(1+1/n)}$ をかけた値が β -ETI/2 である。
- ・評価式は、
$$U_i = \text{バイアス(代替法の結果の平均値 - 参照法の結果の平均値)} + \beta\text{-ETI}(80\%)/2$$

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

$$U_i < 0.5 \times (\text{Log コロニ一数}), L_i > -0.5 \times (\text{Log コロニ一数})$$
 であれば、同等と判定する。
- ・ここで問題となるのは、何故、85%, 90%, あるいは 95% ではなく 80% なのか、また何故 2 \times , 3 \times , あるいは 5 \times ではなく 4 \times なのか? という疑問である。しかし、これに対しては、WG2「統計学」が議論して妥当な値だとして決めたこと、WG3 は統計学の専門ではないので、WG2 の提言をそのまま受け入れた、とのことであった。ただ、WG2 としては、実験計画とデータの検証には数年を要したそうである。通常、議論された全ての内容が、最終的に出版されるドラフトに盛り込まれることはないが、何故、その内容だけが選択されたのか理由を理解することは難しい。
- ・なお、一旦、試験結果が許容範囲を外れたら、その

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

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

ボツリヌス毒素遺伝子試験法ステージ 2(NHISJ-20TS-ST2)の作成

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

バリデーション実施計画の作成

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

大学2施設および地方衛生研究所2施設からなる作業部会（WG）を編成した。

バリデーションに使用する添加菌液調整プロトコールの作成

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

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

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

（4）遺伝子検査法に関する研究

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

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

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

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

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

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

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

D. 考察

(1) 衛生指標菌に関する研究

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

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

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

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

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

微生物試験をとりまく国際情勢

ISO/TC34/SC9 からは、わが国に対してその食習慣から、寄生虫の試験法、腸炎ビブリオ試験法、プロバイオティクス(乳酸菌)試験法、さらには今後の試験法の発展として、遺伝子学的な試験法をどのように取り上げていくべきか、動物を用いない毒素の試験法の標準化、フローサイトメトリーによる菌数測定法などの新たにはじまる WG への参加が期待されている。それぞれの試験法に係わる WG に今後積極的に参加し、試験法作成の議論に加わり貢献することが重要と思われる。

バリデーションガイドラインの現状

試験法のバリデーションに関しては、AOAC International が長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方を纏め示してきた。そのような考え方は、ISO にも反映され、ISO 16140 に代替法のバリデーションのガイドラインとして示され国際的な考え方として広く受け入れられている。

代替法の妥当性評価ガイドラインとして示されこれまで広く用いられてきた ISO 16140:2003 (食品の試験法のバリデーションに関するガイドライン) についても、新しい情報を加えた改訂作業が ISO/TC34/SC9 で進められており、6つの独立したガイドラインの検討が進められている。既にパート1の用語、パート2の代替試験法のバリデーションガイドラインについては公開され活用がはじまった。パート1については、本年度用語集の作成で対応した。また、代替試験法のバリデーションガイドであるパート2については、松岡先生を中心に整備を進めている。残る4つのガイドラインについては、

ISO/TC34/SC9のWGでの議論は進んでいるので数年のうちには改訂作業が完了するものと思われる。この改訂に先立ち2012年にアメリカのAOAC Internationalは、バリデーションガイドラインを公開している。これらの2つのガイドラインは相互に整合性を持つように議論されていたが、一部の用語について異なった概念が取り入れられており、今後このあたりの考え方をどのように調整してゆくかは、TC34/SC9総会でのトピックスとなると思われる。

ウェルシュ菌試験法策定支援

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

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

ボツリヌス感染症は発生時に死亡を含む極めて高い健康危害性を顕す国内でも慎重な対策が求められる感染症である。しかしながら現在、本邦においては食品中のボツリヌス菌検査法について公定法などの標準化された検査法が存在せず、早急な整備が求められているところである。これまで、こうした社会的要請を受けて検討委員会では国際的通用性をもつ試験法の整備が議論されてきた。本研究では研究期間内に試験法案を作成し、検討委員会での議論を経てTechnical Specificationとして整備・公開する事を最終目標として進めている。検討委員会では試験法のバリデーションおよびベリフィケーションをステージ1からステージ4の4つの手順に従い実施する方針を表明している。本研究においてはステージ2である作業部会案を作成し、WGにおいて詳細なプロトコールの検討の結果、国内の試験室の状況を加味した複数の指摘が挙げられ細かい修正がなされたが、本作業においても検討委員会の基本方針に従い、ISO法に準じて作成されたNIHSJ-20TS-ST2に対する大幅なプロトコールの変更を行うこと無く、ISO法との妥当性を担保した形でのNIHSJ-20TS-ST2の合意

に至った。今後、WGにおいて同法のベリフィケーションに重点をおいた検証作業を進め、最終的にTechnical Specificationとしての公開を目指す。本研究により得られる成果は、食品の衛生試験法の国際調和を図る上での重要性に加え、食餌性ボツリヌス症疑い事例対応への活用も期待される。

(4) 遺伝子検査法に関する研究

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

E. 結論

(1) 衛生指標菌に関する研究

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

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

・わが国もISO/TC34/SC9のWGに積極的に関与し今後のISOのバリデーションガイドラインの策定に係わっていくことが重要と思われる。その意味において、用語集を取り纏めた点は意義があると思われる。

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

(3) ポツリヌス試験法に関する研究

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

(4) 遺伝子検査法に関する研究

細菌の食品からの微生物試験法は培養法をベースに構築されている。一方で、多様な微生物に迅速に対応するため PCR をはじめとした遺伝子検査法は有用であると考えられる。本研究の実施により、現在、一般的に実験室で実施されている PCR 法の工程と、ISO で国際的な基準として設定される PCR を用いた試験法の工程ガイドラインの間には必ずしも一致していない部分もあると考えられた。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 書籍

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

2. 論文

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

3. 学会発表

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

H. 知的財産権取得状況

該当なし

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

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

衛生指標菌試験法作成並びに標準試験法改訂に関する研究

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	五十君静信	東京農業大学	
	大嶋 秀克	公益財団法人	日本乳業技術協会
	小久保 彌太郎	公益社団法人	日本食品衛生協会
	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	
	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター	
	鈴木 穂高	茨城大学	
	下島 優香子	東京都健康安全研究センター	
	福田 理恵	東京都健康安全研究センター	
	森田 加奈	東京都健康安全研究センター	
	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター	
	土屋 禎	一般財団法人	日本食品分析センター
	廣田 雅光	一般財団法人	日本食品検査
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨

衛生指標菌は様々な食品の製造工程管理や成分規格に採用されており、わが国では主に細菌数及び大腸菌群が用いられている。一方、国際的には食肉（製品）、乳（乳製品）等の製造工程管理や成分規格等に腸内細菌科菌群が多く採用される現状を踏まえ、衛生指標菌作業部会を開催し、わが国の衛生指標に関する議論を行い、乳・乳製品の製造工程管理には細菌数及び腸内細菌科菌群を、成分規格には細菌数のほか、大腸菌または腸内細菌科菌群を設定することが国際整合性及び実行性を踏まえた形として望ましいとの意見で集約された。これを受け、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において、腸内細菌科菌群定性試験法 NIHSJ-15 を ISO 21528-1:2017 に基づく改訂を行い、国際調和を図った。また、同委員会では、ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法を討議し、直接的な糞便汚染指標である大腸菌の試験法をフィルターろ過の必要性の有無により分類して検討を行うこととなったほか、これまでに作定されたサルモネラ属菌試験法（NIHSJ-01）及びカンピロバクター試験法（NIHSJ-02）について、国際調和と実行可能性の向上に資する形とするべく、ISO 法改訂に応じた見直しを行った。

A. 研究目的

現在、日本国内では、乳および乳製品、冷

凍食品等多くの食品種の微生物汚染指標に

大腸菌群が設定されている。ここでいう大腸

菌群とは、「乳糖を分解して酸とガスを産生する、好気性または通性嫌気性のグラム陰性無芽胞形成の桿菌群」を指し、*Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* 属等の *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科菌群) に属する菌が多く含まれる。一方、大腸菌群には、腸内細菌科菌群に属さない *Aeromonas* 属等も含まれており、微生物学上の分類とは必ずしも一致しない側面がある。

現在、EU をはじめとする諸外国の多くでは、食肉や乳製品等の製造工程管理に腸内細菌科菌群が糞便汚染指標として採用され、検体数や合格基準等を定めたサンプリングプランを設定し、運用している状況にある。腸内細菌科菌群は、「プロテオバクテリア門ガンマプロテオバクテリア綱エンテロバクター目に属し、通性嫌気性でブドウ糖を発酵してガスと酸を産生するグラム陰性桿菌」と定義づけられることから、分類学との整合も併せ持っている。

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

B. 研究方法

1) 衛生指標菌の設定及び試験法に係る検討

現在、わが国では、乳等省令に基づき、細

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

2) ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法の検討

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

3) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

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

4) カンピロバクター試験法の改訂

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

体制の確保に向けた試験法整備を行うため、改訂案を作成し、検討委員会で討議を行うこととした。

C . 研究結果

1) 乳及び乳製品の衛生指標に関する検討

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

各衛生指標菌試験の実行可能性を考慮するため、国際的な第三者認証を取得している簡易法を含めて整理を行った。判定に要する時間について、簡易法では確認試験が省略されていることが試験開始翌日に判定できる背景にあることを確認した。

2) 腸内細菌科菌群試験法の改訂

上項の議論を通じ、腸内細菌科菌群試験法については速やかな確認と検討を行う必要性が提起されたことから、次に衛生指標菌作業部会において、関連する ISO 法最新文書を入手し、内容を確認した。結果として、同試

験法は 2017 年に(1)EE 培地による二次増菌の削除、並びに(2)確認試験で用いる培地の変更(グルコース寒天培地からグルコース OF 培地)が行われている状況を確認した。これらの変更点は実行可能性を高める利点があると考えられたこと、更に国際整合をより高める点も鑑みて、第 68 回検討委員会において、NIHSJ-15 法改定案を提案し、討議を経て、同委員会の承認を得た。その後、NIHSJ-15:2019 として改訂版を作成した。なお、本試験法の詳細については版權を考慮し、非公開とした。

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

【基本方針】

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

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

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

ISO 法改訂が minor revision の場合

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

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

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

改訂後の試験法名について

・改訂を行った試験法については、試験法名の最後尾に改訂年を追記する。

・新たに作成した試験法についても、作成年を最後尾に付記することとする。

3) ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法に関する検討

平成 30 年 2 月 27 日に開催された、厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会では、「食品製造用水」及び「清涼飲料水（ミネラルウォーター類のうち殺菌又は除菌を行うもの）」に関する微生物規格について議論が行われ、世界保健機構が発出した飲料水水質ガイドライン（Guidelines for drinking water quality, fourth edition, https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/）に基づき、上水については特定酵素基質培地を用いた大腸菌定性試験法が厚生労働省令第 101 号で定められていることを踏まえ、国際・国内での整合を図る意味合いから、大腸菌を微生物規格の対象指標菌とすべきとの提言がなされ

た。一方、同試験法については別途検討することとなった。こうした背景を踏まえ、本研究班では第 36 回バリデーション作業部会で試験法の検討を行う上の留意点を整理した上で、第 67 回検討委員会を開催し、同法について討議を行った。

検討の結果、ミネラルウォーター類の衛生指標菌の試験法としては、前処理に用いるフィルターろ過が可能なもの（すなわち固形成分等によるフィルター目詰まりや通過障害等が生じないもの）を適用範囲として、ISO 9308-1:2014（メンブランフィルターを用いた大腸菌試験法）に準拠した試験法を NIHSJ-30-ST1 として、水道法試験法（厚生労働省令 101 号）に準拠した試験法を NIHSJ-31-ST1 としてそれぞれ検討を行うこととし、承認された（表 3）。

4) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

NIHSJ-1: 2009（サルモネラ属菌定性試験法）では、希釈水である緩衝ペプトン水（Buffered peptone water, BPW）の pH が 7.2 ± 0.2 とされている。一方で、本試験法に基づいて発出されたサルモネラ属菌試験法（食安発 0729 第 4 号「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」）で示される BPW の pH は 7.0 ± 0.2 とされている状況を探知した。ISO 文書を確認したところ、ISO 6579: 2002 (Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.)、ISO 6887-1: 1999 及び 2017 (General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution) で用いられる BPW はいずれも pH 7.0 ± 0.2 と記載されている状況を探知した。

上記の背景を受け、国際調和の観点から、

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

5) カンピロバクター試験法の改訂

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

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

D. 考察

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

また、ミネラルウォーター類の試験法として、新たに NIHSJ-30-ST1 及び 31-ST1 を設け、ISO 9308-1:2014 及び水道法試験法に準拠して検討を行うこととした。ST1 案の了承を受けたことから、次年度以降には、作業部会で ST2 案を作成し、添加回収試験等を通じた試験成績の妥当性評価を通じ、試験法を確定させる予定である。

加えて、本委員会では、国際調和と実行性の向上に資するため、これ迄に作成された標準試験法のうち、サルモネラ属菌、カンピロバクター及び腸内細菌科菌群試験法の改訂を行った。本委員会では国際整合性を踏まえ、主として ISO 法に準拠した試験法の作成・検討にあたっているが、これまで ISO 法見直しにあわせた NIHSJ 法改訂の在り方については議論がなされていない状況であった。本年度の活動として、その方針を定めることができたことは今後の国際情勢に合わせた速やかな検討を進める上で有意義と解される。次年度以降も、こうした観点から重要性・緊急性に応じた形で、標準試験法の改訂や作成にあたる予定である。具体例として、現在公定法で採用されている、リステリア・モノサイ

トゲネス試験法は本年度にISO法が改訂され、判定時間が短縮されたとの情報を得ており、今後、同様の見直し作業を速やかに実施する一候補となるものと考えられる。また、カンピロバクター試験法については現在定性法のみが定められているが、近年の国際動向としては、同菌のリスク評価・管理に定量成績の創出が求められているところであることから、ISO法を基とした新たな定量試験法の作成についても本委員会が行うべき課題と思われる。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 朝倉宏．食品微生物試験法の国際調和．平成30年度食品薬品安全センター食品衛生精度管理セミナー．2018年6月29日．東京．

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1-1. 乳・乳製品に対して EU で設定される微生物成分規格概要

(出典 : COMMISSION REGULATION (EU) No 365/2010 of 28 April 2010 amending Regulation (EC) No 2073/2005)

食品分類	対象微生物等	サンプリングプラン†		基準値	試験法	適用箇所
		n	c	M		
生乳または不十分な加熱処理乳より製造されたチーズ、バター及びクリーム	サルモネラ属菌	5	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
粉乳およびホエイパウダー	サルモネラ属菌	5	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
アイスクリーム(製造工程もしくは製品の組成によってサルモネラのリスクを排除できるものを除く)	サルモネラ属菌	5	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
チーズ、粉乳、ホエイパウダー	黄色ブドウ球菌エンテロトキシン	5	0	不検出/ 25g	European screening method *1	販売時
調製粉乳及び乾燥食品*2	サルモネラ属菌	30	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
フォローアップミルク	サルモネラ属菌	30	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
調製粉乳および乾燥食品*2	クロノバクタ 属菌	30	0	陰性/ 10g	ISO/TS 22964	販売時

*1 Community reference laboratory for coagulase positive staphylococci. European screening method for the detection of staphylococcal enterotoxins in milk and milk products.

*2 6 ヶ月未満の乳児のための特定医療目的のもの

† n = 検体数、c = ロットの合格基準、基準値 m と M の間の数値を示す検体数。

【補足】ロットから n 個のサンプルを抜き取ったとき、

- 1) 菌数が m を超える不良品がなければ当該ロットは合格。
- 2) 菌数が m ~ M の不良品が c 個以下なら、条件付き合格。
- 3) 菌数が M を超える不良品がある場合は、不合格。

表 1-2. 乳・乳製品に対して EU で設定される微生物基準の概要

食品分類	対象微生物等	サンプリングプラン		基準値		試験法	適用箇所	逸脱時の措置
		n	c	m	M			
低温殺菌乳及び乳飲料	腸内細菌科菌群	5	0	10 cfu/ ml		ISO 21528-2	最終製品	加熱殺菌工程、殺菌後二次汚染予防措置、原材料微生物学的品質等確認
加熱殺菌乳・ホエイより製造されたチーズ	<i>E. coli</i>	5	2	100 cfu/ g	1,000 cfu/ g	ISO 16649-1/2	最高汚染想定箇所	製造工程管理及び原料選択による改善措置
生乳より製造されたチーズ	コアグラージェ陽性 staphylococci	5	2	10 ⁴ cfu/ g	10 ⁵ cfu/ g	EN/ISO 6888-2	最高汚染想定箇所	製造工程管理及び原料選択による改善措置を実施し、10 ⁵ cfu/ g を超えるロットはエンテロトキシンの検査も実施
低温/高温殺菌乳及びホエイより製造されたフレッシュチーズ	コアグラージェ陽性 staphylococci	5	2	10 cfu/ g	100 cfu/ g	EN/ISO6888-1/2	最終製品	製造工程管理改善措置を経ても、10 ⁵ cfu/ g を超えたロットはエンテロトキシン検査を実施
生乳/不十分な加熱処理乳より製造されたバター・クリーム	<i>E. coli</i>	5	2	10 cfu/ g	100 cfu/ g	ISO 16649-1/2	最終製品	製造工程管理及び原料選択による改善措置
粉乳及びホエイパウダー	腸内細菌科菌群	5	0	10 cfu/ g		ISO 21528-2	最終製品	加熱殺菌工程と再汚染予防措置の確認
	コアグラージェ陽性 staphylococci	5	2	10 cfu/ g	100 cfu/ g	EN/ISO6888-1/2	最終製品	製造工程管理改善措置を経ても、10 ⁵ cfu/ g を超えたロットはエンテロトキシン検査を実施
アイスクリーム及び乳を含む氷菓	腸内細菌科菌群	5	2	10 cfu/ g	100 cfu/ g	ISO 21528-2	最終製品	製造工程管理の改善
調製粉乳及び乾燥食品*	腸内細菌科菌群	10	0	陰性/ 10g		ISO 21528-1	最終製品	製造工程管理の改善

フォローアップミルク	腸内細菌科菌群	5	0	陰性/ 10g		ISO 21528-1	最終製品	製造工程管理の改善
調製粉乳及び乾燥食品*	推定セレウス菌	5	1	50 cfu/ g	500 cfu/ g	EN/ISO 7932	最終製品	製造工程管理の改善、再汚染予防策、原材料の確認

* 6ヶ月未満の乳児のための特定医療目的のもの。

表2. 乳・乳製品に対する衛生指標菌試験法の概要

対象	試験法	培養温度	検出感度	最短所要時間・日数 (陰性判定時)	最長所要時間・日数 (陽性判定時)
細菌数	公定法	32	10 個/mL	2 日	2 日
	ISO 法 (ISO 4833-1)	30	10 個/mL	3 日	3 日
	簡易法	30/32	1 個/mL	1~2 日	2~3 日
大腸菌群	公定法	35	1 個/2.22mL	48 時間	6 日
	簡易法	35	1 個/mL	24 時間	24 時間
	ISO 法 (ISO 4832)	30/37	10 個/mL	24 時間	3 日
腸内細菌科菌群	生食用食肉通知法	37	1 個/mL	24 時間	3 日
	ISO 法 (ISO 21528-1)	37	1 個/10mL	48 時間	4 日
	簡易法	37	1 個/mL	24 時間	24 時間
大腸菌	糞便系大腸菌群 (E.coli) 試験法	44.5	1 個/3mL	24 時間	7 日
	ISO 法 (ISO 16649-2)	44	1 個/mL	24 時間	24 時間
	簡易法	44	1 個/mL	24 時間	24 時間

注記：ここでいう簡易法とは、特定の簡易迅速キット製品を指すものではないが、国際的な第三者認証機関の認証を受けた、国内で入手可能な代表製品の情報を基に、総合的に勘案して示した内容となっている。なお、使用可能な製品例については、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」ホームページ上に掲載しているので適宜参照されたい。また、対象とする指標菌のうち、大腸菌群については、公定法と ISO 法及び簡易法の間で定義が異なること、同様に大腸菌については国内外で定義が異なることに留意が必要である。

表 3. ミネラルウォーター類における大腸菌（群）試験法に関する比較対象表

日数	公定法 (清涼飲料水の大腸菌群試験法)	ISO 9308-1:2014 (大腸菌試験法)		厚生労働省令 101 号 (上水の大腸菌試験法)
1	試料原液 10mL 及び 1mL、10 倍希釈液 1mL を BTB 加乳糖ブイヨン発酵管に接種	試料原液又は希釈液 100 mL をメンブランフィルターでろ過		試料原液 100 mL
		フィルターを CCA 培地に設置		特定酵素基質培地に添加
	35 ± 1 で最大 48 ± 3 時間培養	36 ± 2 で 21 ± 3 時間培養		36 ± 2 で 26 ± 2 時間培養
2		ピンク～赤色集落は大腸菌群と判定	濃青～紫色集落は大腸菌陽性と判定	蛍光発色に基づく、定性判定
3	ガス産生の確認			
	陽性試験管から EMB 培地に接種	ガス産生 (-) なら陰性		
	35 ± 1 24 時間			
4	定型集落 (なければ 2 個以上の非定型集落) を釣菌			
	乳糖ブイヨン発酵管に接種	普通寒天培地に塗抹		
	35 ± 1 / 48 ± 3 時間培養	35 ± 1 / 48 ± 3 時間培養		
5				
6	ガス産生の確認	グラム染色		
	ガス産生をみた場合、陽性判定	グラム陰性無芽胞桿菌があれば、陽性判定		

別添 1 . サルモネラ属菌試験法

サルモネラ属菌標準試験法

NIHSJ-01: 2019

サルモネラ試験法

NIHSJ-01:2019

1. はじめに

本試験法で述べるサルモネラ属菌とは、以下の試験法で *Salmonella* spp. と同定されたものとする。

2. 試験法の概要

試験試料 25 g をストマッキング袋等に無菌的にとりわけ、緩衝ペプトン水 (BPW) 225 mL を加え、ストマッカーなどで均質化し、培養する。その培養液の一部を RV (Rappaport-Vassiliadis) 培地と TT (Tetrathionate) 培地で選択増菌培養後、2 種類の分離寒天培地 (硫化水素産生性で検出する培地と硫化水素産生性に関係なくサルモネラを検出する培地、それぞれ 1 種類) に塗抹培養し、集落の形成を観察する。サルモネラと疑われる集落 3 個を TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地および LIM (Lysine Indole Motility) 培地に接種し、生化学的性状の確認を行う。さらに、抗 O 血清による凝集反応により O 抗原の血清型別を実施してサルモネラ属菌と確定する。

3. 使用器具、装置

滅菌ハサミ
滅菌ピンセット
滅菌装置
ストマッカー
ストマッキング袋
三角フラスコ
自動秤量分注装置または秤量器
pH 計
滅菌ピペットまたはマイクロピペットと滅菌チップ
メスシリンダー
小試験管
中試験管
試験管立て
白金耳
高圧蒸気滅菌器 (滅菌のインジケーター必要)
乾熱滅菌器 (滅菌のインジケーター)
恒温槽または恒温水槽 (37 ±1 と 42.0 ±0.5 の制御)
滅菌シャーレ

4. 培地、試薬および抗血清

前増菌用培地緩衝ペプトン水 (BPW) ISO 処方 : 加温溶解後、121 で 15 分間滅菌する。

選択増菌用培地

Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地 : 加温溶解後、10 mL ずつ中試験管に分注し、115 、15 分間滅菌す

る。作製後は冷蔵庫で数週間保存可能。

Tetrathionate (TT) 培地：沸騰まで加温混和後、45℃以下に冷却する。ヨウ素溶液 20 mL を培地 1 L に加え、よく攪拌する。さらに攪拌しながら、10 mL ずつ滅菌中試験管に分注する。TT 基礎培地は作製後冷蔵庫で保存可能であるが、ヨウ素溶液添加後には作製当日に使用すること。

分離寒天培地

硫化水素の産生により判定する培地：MLCB、DHL と XLD から 1 種類。使用説明書に従って作製する。
硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する培地：BGS(プリリアントグリーン+スルファピリジン)、CHS(クロモアガーサルモネラ)、ES II (ES サルモネラ寒天培地 II) , SM2 から 1 種類。使用説明書に従って作製する。

確認用培地

TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で 15 分間滅菌し、高層斜面とする。

LIM (Lysine Indole Motility) 培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で 15 分間滅菌し、高層に固める。

O 群別確認血清

サルモネラ免疫血清 O 多価、O1 多価および O 群血清

生化学的性状確認培地と試薬等

シモンズクエン酸ナトリウム培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で 15 分間滅菌し、斜面とする。

VP 半流動培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で 15 分間滅菌し、高層に固める。

インドール試薬

VP 用試薬

チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙

ONPG ディスク

5. 試験手順

1) 前増菌培養

BPW を約 37℃となるよう温めておく。

試料 25 g に BPW225 mL を加え、1 分間ストマッカー処理する。

37℃、22±2 時間前増菌培養する。

2) 選択増菌培養

RV 培地および TT 培地を約 42℃となるように温めておく。

BPW で前培養した培養液 0.1 mL を RV 培地 10 mL に接種する。

BPW で前培養した培養液 1 mL を TT 培地 10 mL に接種する。

接種した RV 及び TT 培地を 42℃、22±2 時間培養する。

3) 選択分離培養

培養後の RV および TT 培地をよく攪拌する。

1 白金耳量を、以下の(ア)硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地および(イ)硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地のグループからそれぞれ 1 種類を選び、画線塗抹する。

(ア) 硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地 (1 種類選択)

I. MLCB

II. DHL

III. XLD

(イ) 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地（1種類選択）

I. BGS（ブリリアントグリーン＋スルファピリジン）

II. CHS（クロモアガーサルモネラ）

III. ESII（ESサルモネラ寒天培地II）

IV. SM2（chromID Salmonella Agar）

接種した培地を 37℃、22±2 時間培養する。

注意：サルモネラを釣菌する際、集落の色については、硫化水素により判定する培地では黒色集落をサルモネラと推定し、硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する培地の BGS では無色透明で培地色が赤色になったもの、CHS では藤色、ESII ではピンクそして SM2 ではピンクをサルモネラと推定する。分離用寒天培地上でのサルモネラ集落の色についてはあらかじめ検証後に試験に使用すること。

4) 確認培養

各分離寒天培地に形成された定型集落（各培地の上記注意を参照）を 3 個ずつ釣菌して、TSI 寒天培地と LIM 培地に接種する。

TSI 寒天培地には白金線で高層に穿刺し、斜面に塗抹する。

LIM 培地は高層に穿刺する。

接種した培地は 37℃、22±2 時間培養する。

培養後、以下の結果が得られたものは定型的サルモネラの性状である。

(ア) TSI 寒天培地：高層部黄変・黒変・ガス産生（高層部における気泡または亀裂の発生）および斜面部が鮮やかに赤変したもの。

(イ) LIM 培地：培地全体が紫変（リジン陽性）、運動性陽性、

上記性状確認後にインドール反応を検討する。サルモネラはインドール反応陰性（色の变化無し）、定型的なサルモネラの性状と確認された菌株は、5) に示す O 抗原の血清学的試験を行い、サルモネラであることの確定および O 抗原群について決定する。

サルモネラには、硫化水素非産生性、運動性の弱いもの、リジン陰性といった非定型的性状を示すものがあり、また、市販の O 血清に凝集の弱い O 群型別不能のサルモネラも知られている。

- により、サルモネラの確認は可能であると考えるが、定型的性状を示さない場合は 6) に示す生化学的性状試験も検討し、サルモネラの確認をする。

5) O 血清群別

サルモネラと疑われ釣菌された菌株についてサルモネラ免疫血清を用いたスライド凝集法による O 血清群別試験を TSI 寒天培地斜面上から菌を採取して実施する。

(ア) O 多価血清および O1 多価血清を用いて凝集試験を行い、凝集が見られた O 群血清を用いて当該菌の O 群を決定する。

(イ) サルモネラの定型的な生化学的性状を示したにもかかわらず、いずれの血清にも凝集が認められないときは O 群型別不能とする。

6) 生化学的性状

非定型的サルモネラが疑われるときは（ア）～（エ）に示した生化学的性状を実施する。

同定キットの使用も可とする。

（ア） オキシダーゼ試験：チトクロームオキシダーゼ試験用紙に菌を塗布して1分間以内に深青色になれば陽性とする。

（イ） クエン酸：シモンズクエン酸ナトリウム培地に菌を塗抹後、37℃、22±2時間培養する。培地が深青色になれば陽性とする。

（ウ） VP:VP 半流動培地に菌を穿刺し、37℃、22±2時間培養後、VP 用試薬 A,B を滴下する。陽性の時は数分後に試薬が赤色となる。1時間後も赤色とならなければ陰性とする。

（エ） ONPG：ONPG ディスク1枚を小試験管にとり、滅菌精製水1mLを加える。

新鮮培養菌を1白金耳接種し、混和後37℃、18-24時間培養し、液色で判定する

（早いものは1-2時間で判定可能）。液色が黄色となったものを陽性とする。液色が変化しないものは陰性である。

注意：サルモネラはオキシダーゼ陰性、クエン酸陽性、VP 陰性、ONPG 陰性である。

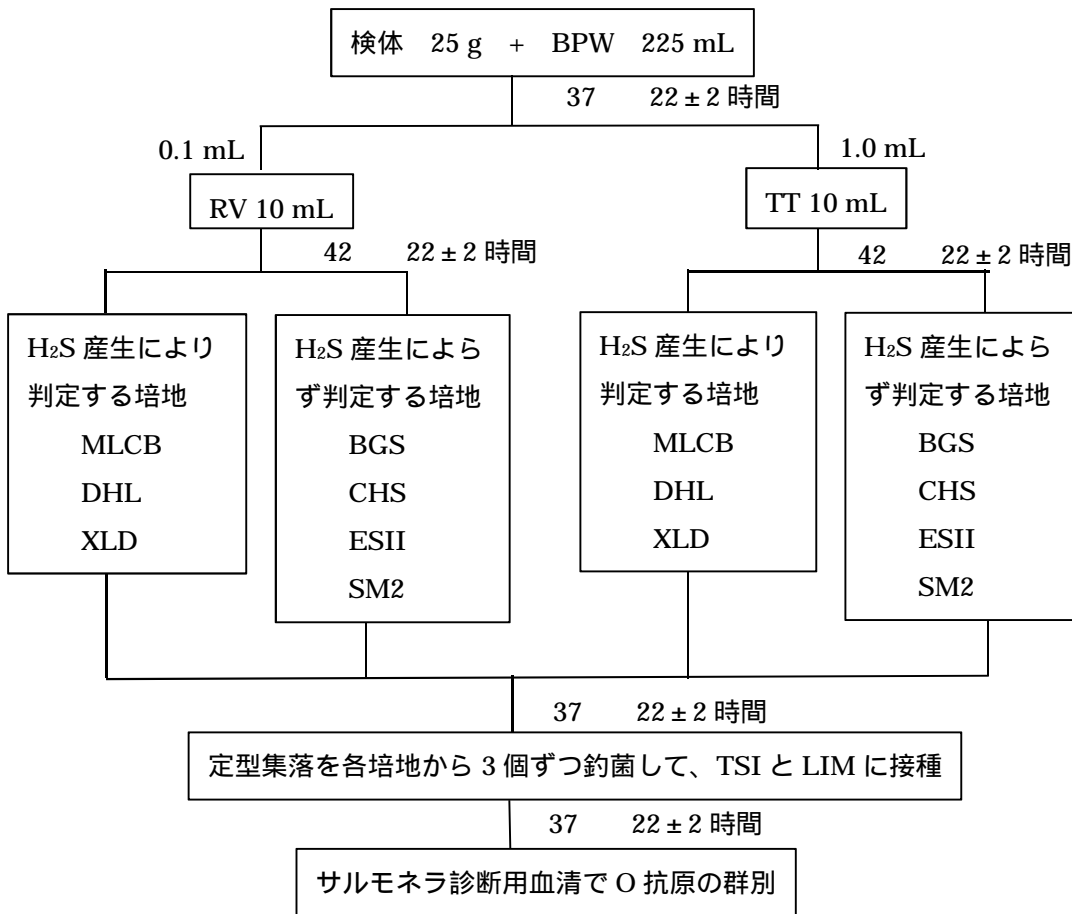
7) 試験成績の結果表示

以上の試験によりサルモネラの検出された場合は、“陽性 / 25 g”と記載する。

検出されなかった場合は、“陰性 / 25 g”と記載する。

6. フローチャート

サルモネラ試験法



7. 培地組成（参考例）および作製方法

緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water: BPW) ISO 処方

組成：1,000 mL あたり

カゼイン酵素分解産物	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸二水素カリウム	1.5 g
リン酸水素二ナトリウム (12 水和物)	9.0 g
精製水	1,000 mL

* オートクレーブ滅菌 121 、15 分間、pH 7.0±0.2

ラパポート - バシリアディス液体培地

(Rappaport-Vassiliadis: RV)

組成：1,000 mL あたり

ソイペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	8.0 g
リン酸二水素カリウム (KH ₂ PO ₄)	1.4 g
リン酸水素二ナトリウム (K ₂ HPO ₄)	0.2 g
塩化マグネシウム六水和物 (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	40.0 g
マラカイトグリーン	0.04 g
精製水	1,000 mL

* オートクレーブ滅菌 115 、15 分間、pH 5.2±0.2

テトラチオネート液体培地 (Tetrathionate USA: TT)

組成：1,000 mL あたり

カゼインペプトン	2.5 g
肉ペプトン	2.5 g
胆汁酸塩	1.0 g
炭酸カルシウム	10.0 g
チオ硫酸ナトリウム	30.0 g
精製水	1,000 mL

pH 8.0±0.2

* 煮沸するまで混和加熱する。この液体培地は 4 で数週間保存可能である。

この溶液を 45 以下に冷却後、1,000 mL に対して下記に示すヨウ素溶液 20 mL を添加した後、混和する。よく混和しながら、10 mL ずつ滅菌した試験管に分注する。

ヨウ素溶液を添加した後は直ちに使用する。

ヨウ素溶液組成

ヨウ素	6.0 g
ヨウ化カリウム	5.0 g
精製水	20.0 mL

硫化水素産生により判定する分離寒天平板培地

MLCB

組成：1,000 mL あたり

酵母エキス	5.0 g
ペプトン	10.0 g
ハートエキス末	2.0 g
塩化ナトリウム	4.0 g
マンニット	3.0 g
L-リジン塩酸塩	5.0 g
チオ硫酸ナトリウム	4.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
クリスタルバイオレット	0.01 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

pH 6.8±0.2

* 加温溶解後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

DHL

組成：1,000 mL あたり

肉エキス	3.0 g
ペプトン	20.0 g
乳糖	10.0 g
白糖	10.0 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
チオ硫酸ナトリウム	2.3 g
クエン酸ナトリウム	1.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0 g
中性紅	0.03 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

pH 7.4±0.2

* 加温溶解後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

XLD

組成：1,000 mL あたり

酵母エキス	3.0 g
L-リジン塩酸塩	5.0 g
キシロース	3.75 g
乳糖	7.5 g
白糖	7.5 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g

チオ硫酸ナトリウム	6.8 g
クエン酸第二鉄アンモニウム	0.8 g
フェノールレッド	0.08 g
寒天	12.5 g
精製水	1,000 mL

pH 7.4 ±0.2

* 加温溶解後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

硫化水素産生によらずサルモネラ判定する分離寒天平板培地

BGS

BGA (ブリリアントグリーン寒天培地)

組成：1,000 mL あたり

プロテオース ペプトン	10.0 g
酵母エキス	3.0 g
乳糖	10.0 g
白糖	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
フェノールレッド	0.08 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
寒天	12.0 g
精製水	1,000 mL

pH 6.9 ±0.2

* 上記 BGA をオートクレーブ滅菌 121、15 分間後、液温を約 70 に下げ、その温度に保って、下記のスルファピリジン溶液を添加し、混和する。

培地の温度が 60 以下の場合では、結晶が析出するので注意する。

混和後、溶液温度を 60 前後に冷却し、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

スルファピリジン溶液の作製方法

ジメチルホルムアミド 2 mL にスルファピリジン 1 g を加えて溶解する。

CHS (クロモアガーサルモネラ)

組成：1,000 mL あたり

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.0 g
塩化ナトリウム	0.8 g
その他塩類	7.2 g
選択剤と色素混合物	4.9 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

pH 7.6±0.2

* 加温溶解後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

ESII (ES サルモネラ寒天培地 II)

組成：1,000 mL あたり

ペプトン	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二ナトリウム	1.0 g
チオ硫酸ナトリウム	1.0 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
マンニット	15.0 g
中性紅	0.03 g
合成酵素基質	0.45 g
ノボビオシン	0.02 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

pH 7.4±0.2

* オートクレーブ滅菌 121、15 分間滅菌後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

SM2 (chromID Salmonella Agar)

組成：1,000 mL あたり

ペプトン	6.25 g
トリス	0.16 g
乳糖	6.0 g
胆汁酸塩	1.5 g
発色基質混合物	0.03 g
塩化ナトリウム	5.0 g
選択剤混合物	0.03 g
寒天	14.0 g
精製水	1,000 mL

pH 7.3±0.2

* 組成は上記の通りだが、生培地以外では販売していない。

TSI、LIM、インドール試薬や生化学的性状試験に使用する試薬についてはサルモネラ確認にのみ用いるものではないので、製品情報に従って作製し、用いること。

7. 改訂の履歴

日付	項目	内容
2009年2月18日	初版発行	-
2009年6月23日	文言の一部修正	「0血清型別」を「0血清群別」に修正した
2009年10月14日	培養温度の変更	・35±1 で培養していた箇所を 37±1 へと変更した(ISO法への合流)。

<p>2019年2月25日</p>	<p>緩衝ペプトン水の pH の変更、及び文言の一部修正</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・緩衝ペプトン水の pH を 7.2 ± 0.2 から 7.0 ± 0.2 へ変更した (ISO 法への合流)。 ・下記の文言等を修正した。 【2. はじめに】 「集落の産生を検討」 「集落の形成を観察」 【4. 培地、試薬および抗血清、 選択増菌用培地、Tetrathionate (TT) 培地】 「40 以下」 「45 以下」 【5. 試験手順、4)確認培養及び6. フローチャート】 「定型的集落」 「定型集落」
-------------------	----------------------------------	---

別添 2 . カンピロバクター試験法

カンピロバクター試験法 (定性法)

NIHSJ-02: 2019

カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法

NIHSJ-02: 2019

はじめに

本試験法でいうカンピロバクター・ジェジュニ/コリは、ISO 10272-1:2006 で述べる選択分離培地上で微好気培養を行った場合、25℃では集落を形成せず、42±1℃で特徴的な集落を形成する細菌で、運動性を持ち、ISO 10272-1:2006 で述べる生化学的性状と一致するものをいう。

1. 試験の概要

本試験は、試料中にカンピロバクター・ジェジュニ/コリが存在するかを、選択増菌培地にて増菌させた後、選択分離培地上に画線塗抹し、形成されたカンピロバクター・ジェジュニ/コリの集落を確認することによって判定する定性試験法である。試料を25g秤量し、プレストン増菌培地100mlを加えて均質化し、微好気培養により増菌した後、その1白金耳量を各1枚ずつ2種類の選択分離培地に塗抹、微好気培養し、カンピロバクター・ジェジュニ/コリの集落を形成させる。選択分離培地として、mCCDA培地ならびに第二選択分離培地¹の2種類を用いる。選択分離培地上に形成された疑わしい集落は、純培養を行った後、生化学性状を確認し同定する。

2. 使用機器、器具

乾熱滅菌器、オートクレーブ

ふらん器 (37 ± 1℃、42 ± 1℃) この場合は市販の微好気用ガスケットを利用する
または微好気培養のできるふらん器 (37 ± 1℃、42 ± 1℃) を用いる。

寒天平板用乾燥器あるいはふらん器 (25 ~ 50℃)

pHメーター

天秤

メスシリンダー

除菌フィルター (0.22 μm)

ストマッカー、ストマッカー袋

ハサミ、ピンセット

試験管、試験管立て

三角フラスコ

滅菌シャーレ (直径 85 ~ 100mm)

パスツールピペット、滅菌ピペット

白金耳、白金線、ガラス棒

¹ 第二選択分離培地: その試験法において共通に用いる、培地組成が明示された選択分離培地 (ここではmCCDA培地を指す) に追加することによって、当該微生物の分離を補助する効果が期待できると思われる選択分離培地。試験所または試験者が選択メカニズムなどの相違を考慮し選択することができる。

4. 試験手順

1) 増菌培養法

試料調製

試料 25 g をハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取する。ストマッカー袋に入れ、100 ml のプレストン増菌培地を加え、1 分間ストマッキング処理を行う。

増菌培養

微好気条件下にて 42 ± 1 にて 24 ~ 48 時間培養する。

2) 微好気培養方法

微好気条件は、下記の方法によって実現する。

培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータを使用する。微好気条件とは、酸素 $5 \pm 2\%$ 、二酸化炭素ガス $10 \pm 3\%$ 、残りはチッ素を基本とする。水素を添加する場合には、酸素 $5 \pm 2\%$ 、二酸化炭素ガス $10 \pm 3\%$ 、水素 10% 以下、残りはチッ素とする。

市販の微好気ジャーシステム（ガスキットシステムなど）を利用する。

3) 選択分離培養

選択分離培地に、24 時間後と 48 時間後の増菌培養液を画線塗抹し、 42 ± 1 にて 24 ~ 48 時間微好気培養する。選択分離培地は、mCCDA 培地および第二選択分離培地の 2 種類を用いる（第二選択分離培地の例：バツラー寒天培地、スキロー寒天培地、プレストン寒天培地、カルマリー寒天培地など）。培養液は油層を出来る限り避けて採取し、選択分離培地に塗抹する。

4) 確認試験

集落の観察および採取

選択分離培地上に発育した集落のうち、カンピロバクター・ジェジュニ/コリと思われる集落を各平板につき 1 個を釣菌し、鑑別同定を行う。判定の結果カンピロバクター・ジェジュニ/コリでなかった場合は、4 個の集落について鑑別同定を行う。鑑別同定を行う集落は、非選択寒天培地に継代し、純培養を行う。 37 ± 1 で 22 ± 2 時間微好気培養する。

グラム染色などによる菌形の確認：ラセン状のグラム陰性桿菌（球状 [コッコイド] の場合もある）

カタラーゼ試験

単離集落の 1 白金耳量をスライドガラス上に取り、3% 過酸化水素水 1 滴を滴下する。30 秒以内に気泡の発生が確認された場合、カタラーゼ反応陽性と判定する。カンピロバクター・ジェジュニ/コリは陽性である。

オキシダーゼ試験

白金耳、白金線またはガラス棒を用いて単離集落の一部を取り、オキシダーゼ試薬を含ませたる紙または市販のオキシダーゼ試験用紙の上に塗抹する。なお、ニクロム線を用いて塗抹してはならない。10 秒以内の紙が暗色化した場合、オキシダーゼ反応陽性と判定する。また、市販のオキシダーゼ試験用紙を使用する場合は製造業者の使用説明書に従って判定する。カンピロバクター・ジェジュニ/コリは陽性である。判定に迷う場合は、必要に応じて以下を追加して行う。

ラテックス凝集テスト

市販のラテックス凝集試験用キットを使用し、製造業者の使用説明書に従って判定する。

TSI 培地などで生化学性状試験

菌種を決定する場合は、以下を追加して行う。

馬尿酸塩加水分解試験 (*C. jejuni* [+] *C. coli* [-])

インドキシル酢酸塩加水分解陽性 (*C. jejuni* [+] *C. coli* [+])

PCR 法によるジェジュニ/コリの判別

5. 培地および試薬

プレストン増菌培地

基礎培地の各成分または乾燥培地を加温溶解し、121 にて15分間高圧蒸気滅菌を行う。必要であれば、滅菌後に25 でのpHが 7.5 ± 0.2 となるよう調整する。ウマ溶血液、および選択剤を、高圧蒸気滅菌後の基礎培地に添加して使用する。

基礎組成: 1,000 ml あたり

肉エキス	10 g
動物組織の酵素消化物*	10 g
塩化ナトリウム	5 g
ピルビン酸ナトリウム	0.25 g
メタ重亜硫酸ナトリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	0.25 g
精製水	940 ml

* 獣肉ペプトンなど

血液添加量: 基礎培地 1,000 ml あたり

馬無菌溶血液	50 ml
--------	-------

選択剤組成: 基礎培地 1,000 ml あたり

ポリミキシン B	5,000 IU
リファンピシン	10 mg
トリメトプリム乳酸塩	10 mg
アンホテリシン B	10 mg
95%エタノール	10 ml

mCCDA 培地

基礎培地の各成分または乾燥培地を加温溶解し、121 にて15分間高圧蒸気滅菌を行う。必要であれば、滅菌後に25 でのpHが 7.4 ± 0.2 となるよう調整する。フィルター滅菌した選択剤を、高圧蒸気滅菌後の基礎培地に添加し、寒天平板として使用する。

基礎培地組成: 1,000 ml あたり

肉エキス	10 g
動物組織の酵素消化物*	10 g
塩化ナトリウム	5 g
活性炭	4 g

カゼインの酵素消化物**	3 g
デオキシコール酸ナトリウム	1 g
硫酸鉄() (硫酸第一鉄)	0.25 g
ピルビン酸ナトリウム	0.25 g
寒天	8 ~ 18 g***
精製水	1,000 ml

* 獣肉ペプトンなど

** カゼインペプトンなど

*** 寒天のゲル強度による

選択剤組成: 基礎培地 1,000 ml あたり

セフォペラゾン	32 mg
アンホテリシン B	10 mg
精製水	5 ml

(参考文献 : ISO 10272-1:2006)

オキシダーゼ試薬

用事調整して使用する。市販のオキシダーゼ試験用紙を用いても良い。

<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチル- <i>p</i> -フェニレンジアミン・ジヒドロクロライド	1 g
精製水	100 ml

6. 改訂の履歴

日付	項目	内容 (改訂理由)
2012年7月31日	初版発行	-
2019年2月25日	プレストン増菌培地及び mCCDA 寒天培地に加える 添加剤の変更	プレストン増菌培地及び mCCDA 寒天培地 1L 当たりシクロヘキシミド 100 mg からアンホテリシン B 10mg へ変更 (ISO 法への合流, 及びシクロヘキシミド含有添加剤の国内販売停止)

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 30 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 妥当性確認及び国際動向調査に関する研究

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 （東京農工大学大学院工学府・名誉教授）
研究協力者 森 曜子 （公益社団法人 日本食品衛生協会）

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。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、2018 年 6 月にスイスの Lausanne で開催された ISO/TC34/ SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）総会に参加し、ISO/TC34/SC9 の動向に関する情報収集と試験法の検討を行った。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 シリーズ) 及び AOAC International 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。本年度は、引き続き AOAC International 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案の作成を進めるため、微生物試験法に関する用語について整理し、日本語訳リスト案として検討委員会へ提案を行った。また、検討委員会で標準試験法の検討を進めているウェルシュ菌試験法の策定に関して、バリデーション方法について助言を行った。

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した。

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、研究分担者である五十君を委員長とする ISO/TC34/SC9 国内委員会において、ISO 対応等につき議論を進め、国際調和に向けた食品微生物試験の在り方に関する検討を行っている。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試験法やガイドライン等の中で、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、今後どのような方向性で整理してゆくかは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、科学的根拠を持って国際基準に適合しうる国内での運用の在り方を提示しようとするものである。

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

一方、アメリカにおける食品の微生物試験法に関する情報収集も行った。AOAC International 総会には、参加できなかったが、国内から当該学会に参加した研究者から、AOAC International の動向について情報収集を行った。妥当性確認に関する文書が AOAC International から公開されており、こちらについて、その内容の精査を行った。ISO における妥当性確認と AOAC International における妥当性確認を比較検討し、我が国における食品の微生物試験法の妥当性確認のあり方を検討、微生物試験法に関する用語の整理、妥当性確認に関する考え方の整理を行った。

これらの検討は、バリデーション作業部会を組織して行った。作業部会は、五十君静信（分担研究者）、松岡英明（分担研究者）、岡田由美子（標準試験法検討委員会事務局、分担研究者）、森曜子（協力研究者）、吉田信一郎（協力研究者）、守山隆敏（協力研究者）、内田和之（協力研究者）、齋藤利江（協力研究者）、吉田朋高（協力研究者）のメンバーで組織した。

作業部会では、試験法関連の「日本語」用語の

統一が早急に必要であるという結論に達し、試験法関連の用語集作成を行った。本年度は用語の和訳についての整理を行い、検討委員会に提案した。

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

（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

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。スイスで開催された ISO/TC34/SC9 の総会に参加し、P メンバーとして試験法作成およびガイドライン等策定の議論に参加した。

ISO が作成する規格には、製品規格やマネジメント規格だけではなく、食品の微生物試験法に関するものがある。それぞれの規格は新規提案をもとに段階的に審議されたのち国際規格として発行されるが、個別の審議は TC（Technical Committee; 専門委員会）または TC の下部組織である SC（Sub-Committee; 分科委員会）で行われる。現在、ISO には 200 を超える TC が存在するが、食品の微生物試験法に関しては、TC34「食品専門委員会」の中の SC9「微生物分科委員会」及び乳製品については SC5「牛乳及び乳製品」が規格の作成を担当している。

2002 年から TC34/SC9 に係る「国内審議団体」として、一般財団法人日本食品分析センターが国内事務局となり、規格案などについての審議事務を担当してきた。参加地位には P（Participating）メンバーと O（Observers）メンバーとがあるが、前者には規格案に対する投票権があり、かつ国際会議（総会）への出席義務がある。一方の O メンバーは投票権や会議への出席義務はないがコメントの提出は可能である。長年にわたりわが国は SC9 の O メンバーとして対応してきた。

2018年度から、わが国は食品の微生物試験法策定の専門委員会である ISO/TC34/SC9 に投票権のある正式メンバー(Pメンバー)として加わった。

2019年度の第37回総会は、スイスの Lausanne で開催され、前半の1日間は CEN/TC275/WG6 の総会、後半の4日間には ISO/TC34/SC9 の総会が行われた。本年度の総会への参加国は、フランス、オーストラリア、ベルギー、カナダ、中国、デンマーク、エジプト、フィンランド、ドイツ、アイルランド、イラン、オランダ、ノルウェー、スペイン、スイス(ホスト国)、タイ、イギリス、アメリカ、日本の合計19カ国であった。そのほかに AOAC International、CEN(欧州標準化委員会)、EU-RL(欧州連合レファレンス検査機関)、IDF(国際酪農連盟)、IUMS(国際微生物学連合)などの関連組織からの参加者を含め総計55名が参加した。参加者の多くは行政を含む研究機関や民間の研究機関、当該国の規格協会の代表者で、いずれも食品の微生物試験についてのエキスパートであった。TC34/SC9の総会で審議された、あるいは報告された内容については表1にその概要を示した。

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

バリデーションガイドラインの現状

現在、国際的に広く用いられている代替試験法の妥当性確認の方法を示したガイドラインである ISO 16140 は、2003年に公開されてから改定されていなかった。一方、米国の AOAC International は、ISO 16140の改定作業に先立ち、2012年に AOAC INTERNATIONAL Method Validation Guidelines を公開した。試験法のバリデーションに関しては、100年を超える歴史を持つ AOAC International は、妥当性確認に関する最新の考え方をまとめ、文書化した。この文書の内容は、我々が試験法の妥当性に関する議論をするためには非常に有用な情報を与えてくれる。AOAC International が長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方を集大成したガイドラインといえる。そのような考え方は、ISOにも反映され、ISO 16140の改訂では、その改定案の検討に AOAC

INTERNATIONAL Method Validation Guidelines と可能な限り整合性がある形で作業が進められている。

国際的なスタンダードとしての微生物試験法のバリデーションに関しては、現在 ISO/TC34/SC9 で、ガイドライン ISO 16140の改訂が進んでいる。これまで代替法のバリデーションガイドとして広く用いられてきた ISO 16140:2003 は、単一の文書であったが、今回の改訂版ではパート1からパート6と、6つの文書に分けて検討が進められている。2016年に、パート1と2が公開された。パート1は、試験法のバリデーションに用いられる用語や定義に関する文書となっている。パート2は、代替法(独自法)のバリデーションに関する一般原則及び技術的プロトコルとなっている。そこで、作業部会では用語の和訳について、ISO 16140-1に加えて、TS Z 0032:2012 (ISO/IEC Guide 99:2007 (VIM3)) 国際計量計測用語 - 基本及び一般概念並びに関連用語、JIS Z 8101-1:2015 (ISO 3534-1:2006) 統計-用語及び記号-第1部:一般統計用語及び確率で用いられる用語、JIS Z 8101-2:2015 (ISO 3534-2:2006) 統計-用語及び記号-第2部:統計の応用、JIS Z 8402-1:1999 (ISO 5725-1:1994) 測定方法及び測定結果の正確さ(真度及び精度)-第1部:一般的な原理及び定義、JIS Q 0035:2008 (ISO Guide 35:2006) 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則、JIS K 0211:2005 分析化学用語(基礎部門)、CAC/GL72:2009 分析用語に関するガイドライン(厚生労働省2012)などの文書を参考として、森曜子委員が用語集案の作成を行った(表3)。この案を作業部会で検討後、検討委員会へ提案した。

ウェルシュ菌試験法策定支援

ウェルシュ菌定性試験法は、NPO 法人食の安全を確保するための微生物検査協議会が中心となって、東京都健康安全研究センターと顕微鏡院が協力し作業部会をつくり標準試験法策定を進めている。試験法策定にあたっては、バリデーション作業部会が協力し、検討を進めている。ISO法では単独の定性試験法がないため、定量法で用いている培地等を参考にし、どのように標準試験法を作成するかについて助言を行った。ウェルシュ菌40菌株について、2機関(内1機関は3部署で対応)の4部署で試験法の評価を行った。培地としては、TGC培地で増殖後、LS培地、MM培地、LG培地について評価を行った。ISO法では、確認試験AとBが存在するため、こちらについても評価を行った。

D. 考察

微生物試験をとりまく国際情勢

ISO/TC34/SC9からは、わが国に対してその食習慣から、寄生虫の試験法、腸炎ビブリオ試験法、プロバイオティクス（乳酸菌）試験法、さらには今後の試験法の発展として、遺伝子学的な試験法をどのように取り上げていくべきか、動物を用いない毒素の試験法の標準化、フローサイトメトリーによる菌数測定法などの新たにはじまるWGへの参加が期待されている。それぞれの試験法に係わるWGに今後積極的に参加し、試験法作成の議論に加わり貢献することが重要と思われる。

バリデーションガイドラインの現状

試験法のバリデーションに関しては、AOAC Internationalが長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方をまとめ示してきた。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。パート1については、本年度用語集の作成で対応した。また、代替試験法のバリデーションガイドであるパート2については、松岡先生を中心に整備を進めている。残る4つのガイドラインについては、ISO/TC34/SC9のWGでの議論は進んでいるので数年のうちには改訂作業が完了するものと思われる。この改訂に先立ち2012年にアメリカのAOAC Internationalは、バリデーションガイドラインを公開している。これらの2つのガイドラインは相互に整合性を持つように議論されていたが、一部の用語について異なった概念が取り入れられており、今後このあたりの考え方をどのように調整してゆくかは、TC34/SC9総会でのトピックスとなるとと思われる。

ウェルシュ菌試験法策定支援

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

E. 結論

微生物試験をとりまく国際情勢としては、ISO/TC34/SC9総会に参加し、多くの情報を得ることができた。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ISO/TC34/SC9のWGに積極的に関与し今後のISOのバリデーションガイドラインの策定に係わっていくことが重要であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito K, Takagi K, Matsushima Y, Iwasaki A, Tanaka N, Kanasaki Y, Martin-Laurent FF, Igimi S. Identification of the novel hcbB operon catalyzing the dechlorination of pentachlorophenol in the Gram-positive bacterium *Nocardioides* sp. strain PD653. *J Pestic Sci.* 20; 43(2): 124-131. 2018

2. 学会発表

- 1) 佐々木貴正、中山達哉、岡田由美子、百瀬愛佳、朝倉宏、五十君静信。採卵鶏農場におけるフルオロキノロン耐性カンピロバクター。日本獣医学会。2018.9.
- 2) 中山達哉、佐々木貴正、朝倉宏、五十君静信。食鳥処理場における薬剤耐性大腸菌の汚染実態。日本食品衛生学会。2018.11.
- 3) 佐々木貴正、中山達哉、百瀬愛佳、朝倉宏、五十君静信。食鳥処理場における鶏肉の広域スペクトラムセファロスポリン耐性サルモネラ汚染。日本食品衛生学会。2018.11.
- 4) 原田義孝、綱美香、高崎一人、布藤聡、五十君静信。特異性の高い *Listeria monocytogenes* 検出法の開発。日本食品微生物学会。2018.9.
- 5) Hiroyuki Chiba, Akinobu Kajikawa, Kenji Yokota and Shizunobu Igimi. Caco-2細胞を用いた *Listeria monocytogenes* の接着・侵入に関する評価。日本食品微生物学会。2018.9.

G. 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/SC9の総会での討議内容

1. 一般議題 (General Aspect)
[N792～795]
SC9全体の活動に係る一般的な懸案事項
2. ワーキンググループの年間報告
[N796～806, 810～828, 830～833]
WGの活動報告, 今後の予定について
3. 今後の改訂事項
[N807～809, 829, 834, 837]
今後の改訂の方向性, 新規提案について
4. CEN関連
[N835, 836]
CENとの関係性, CENミーティングでの決議
事項について
5. その他 [N838]
2019年の総会開催地について

表2. 2018年度 ISO/TC34/SC9のワーキンググループ

WG2	Statistics	WG17	Sampling from surfaces
WG3	Method validation	WG18	β -glucuronidase-posit. <i>E.coli</i>
WG4	Proficiency testing	WG19	Challenge testing
WG5	Culture media	WG20	<i>B.thuringiensis</i> & <i>B.cereus</i>
WG6	Food-borne parasites	WG21	<i>Enterococci</i>
WG7	General requirements	WG23	Sulfite reducing bacteria & <i>C.perfringens</i>
WG8	Preparation of test samples		
WG10	Serotyping of <i>Salmonella</i>	WG24	<i>Shigella</i>
WG11	Contaminants & probiotics	WG25	Whole-genome sequencing
WG12	Spoilage TAB	WG26	<i>C.botulinum</i> toxins
WG13	Coag.-posit. <i>staphylococci</i>	WG27	Hybridization of <i>V. parahaemolyticus</i>
WG15	Psychrotrophic micro.	WG28	Micro-organisms at 30°C
WG16	Yeasts and moulds	WG29	Enumeration of spores

表3. 試験法関連用語集案 : Microbiology of the food chain - Method validation - ISO16140 Part1: Vocabulary

TS Z 0032 : 2012 (ISO/IEC Guide 99:2007 (VIM3)) 国際計量計測用語 - 基本及び一般概念並びに関連用語
 JIS Z 8101-1 : 2015 (ISO 3534-1 : 2006) 統計-用語及び記号-第1部: 一般統計用語及び確率で用いられる用語
 JIS Z 8101-2 : 2015 (ISO 3534-2 : 2006) 統計-用語及び記号-第2部: 統計の応用
 JIS Z 8402-1 : 1999 (ISO 5725-1 : 1994) 測定方法及び測定結果の正確さ (真度及び精度) - 第1部: 一般的な原理及び定義
 JIS Q 0035 : 2008 (ISO Guide 35 : 2006) 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則
 JIS K 0211 : 2005 分析化学用語 (基礎部門)
 CAC/GL72 : 2009 分析用語に関するガイドライン (厚生労働省2012)

2018/11案

	邦訳語案	ISO 16140-1	ISO 16140-1:2016
2.1	AL 許容限界	acceptability limit AL	試料 (2.69) の参照値 (2.60) (または、不明な場合は、容認された参照値) と、分析法の作業手順を適用した場合に得られる個々の結果との間の正または負の最大の許容差。 maximum positive or negative acceptable difference between the reference value (2.60) (or if not known, the accepted reference value) of a sample (2.69) and an individual result obtained when applying the operating procedure of an analytical method
2.2	精確さ	accuracy	測定された量の値と、測定対象に付与された量の値との一致の度合い。 measurement accuracy closeness of agreement between a measured quantity value and an assigned quantity value of a measurand
2.3	アキュラシー・プロファイル	accuracy profile	参照値の異なる濃度レベルに対する報告値及び許容限界 (AL) と β -ETI を組み合わせ、定量法の測定能力をグラフにして表現したものの。 graphical representation of the capacity of measurement of the quantitative method (2.57), obtained by combining acceptability intervals and β -expectation tolerance intervals (2.8), both reported to different levels of the reference value (2.60)
2.4	代替法	alternative method	
2.5	代替法による試験結果	alternative method result	
2.6	試験対象	analyte	component represented in the name of a measurable quantity
2.7	付与値	assigned value	比較のために、合意された計量参照となる値。 注記: 通常は、実験から又は実験に基づいて得られる。 value that serves as an agreed-upon reference for comparison
2.8	β -ETI 第2種の過誤 (β) 許容区間	β -expectation tolerance interval β -ETI	母集団の指定された割合が存在すると期待される値の範囲。 range of values within which a stated proportion of the population is expected to lie
2.9	かたより バイアス	bias	系統測定誤差の推定、又は、付与された定量値と複数回の測定結果の平均との系統的な差。 estimate of a systematic measurement error, or the systematic difference between the quantitative assigned value (2.7) and the average of measurement replicate (2.65) results
2.10	ブラインド (盲検) 試験用 試料	blind replicates	分析者に試験対象の有無及び/又は濃度が知られていない、パフォーマンスを評価するために提供されるサンプルセット。 set of samples (2.69) submitted to evaluate performance in which the presence and/or concentration of the analyte (2.6) is unknown to the analyst

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 30 年度分担研究報告書

国際動向調査及び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

研究要旨：

食品微生物試験法を国際調和させるためには、国際動向を的確に把握し、わが国の妥当性評価ガイドライン案の更新に反映させることが必要である。そのため、ローザンヌ（スイス）で開催された ISO/TC34/SC9 の 2018 年次総会(6/19-6/22)に出席し、最新の国際動向を収集することとした。同会議では 25 のワーキンググループ（WG）、3 のアドホック WG の活動報告、及びそれらに関連する議論が行われた。懸案となっていた ISO16140:2016 版（代替法の妥当性評価に関するガイドライン）の内容で理解できなかった諸点については、その制定過程に携わっていた WG3（メソッドバリデーション）および WG2（統計学）の主査等と直接議論した。特に、WG3 関連事項に関しては理解を深めることができた。最も重要な点は、代替法の方が、参照法よりも優れた性能を示す場合は、単に同等ではないとしてその代替法を棄却するのではなく、出来る限り、代替法を認証するようにしよう、との方針になっていることである。そして、そのために、念入りな手続きが新たに導入されていることを確認し、取り纏めた。一方、WG3 関連事項である統計学的評価基準については、WG2 の提言を自動的に採用しているとの情報を得た。WG2 の提言とは、数年にわたって集積された実験データに基づいて、経験的に定めた内容である、とのことであった。関連する WG に数年にわたって参加し議論を主導することは、現状では、困難と思われるので、少なくとも WG の主要メンバーと直接議論できるチャンネルを維持することが、今後のわが国における国際整合を踏まえた代替法の採用を検討するにあたっては重要な課題であると考えられる。

A．研究目的

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

改訂版では、例えば、「ペアード(Paired)試験とアンペアード(Unpaired)試験」、「確定試験(Confirmation)」など、全く新しい概念の規定が加わっていて、その具体的な内

容の理解に苦慮した。この規格を扱っているのは ISO TC34/SC9 であるため、その 2017 年次総会(東京)に出席し、議論の経緯を調査した。しかし十分な理解は得られなかった。そこで、今年度 2018 年次総会(ローザンヌ、スイス)に出席し、継続調査することを目的とした。

本報告書では、こうして明らかになった内容をまとめた。

B．研究方法

ISO TC34/SC9 の 2019 年次総会に出席すると共に、ISO16140:2016 版の制定過程に携わっていた WG3（メソッドバリデーション）

ョン)および WG2(統計学)の主査等と対面で議論するとともに、帰国後も必要に応じてメールでの意見交換を行った。

C. 研究結果

(1) ペアードスタディ (paired study) とアンペアードスタディ (unpaired study) の区別について

- ・スタディの最初の工程の増菌培養の条件が参照法と代替法が同じ場合はペアードスタディといい、条件が異なる場合をアンペアードスタディという。定性試験における感度評価で、「確認試験」の要求度が異なる。

(2) 定性試験における評価項目

- ・定性試験では次の3項目を実施する。すなわち、
 - 自然汚染食品あるいは菌添加食品を用いて感度 (sensitivity) を明らかにする。この場合の菌濃度は陽性率 50% 程度 (25~75% の範囲)。
 - 菌添加食品を用いて菌濃度の検出の相対水準 (relative level of detection; RLOD) [適切に検出できる菌濃度] を求める。
 - 代替法の包含性 (inclusivity) および排他性 (exclusivity) を求める。
- ・試料 (Sample) の数は 1 食品カテゴリーあたり、3 種類の食品タイプを選び、1 食品タイプあたり最低 20 個の試料数が必要。したがって、1 つの食品カテゴリーあたり、[食品タイプの数: 3 以上] × 20 以上 [試料 / 食品タイプ] = 60 以上。
- ・感度を明らかにする試験結果の整理と感度および関連指標 (相対真度、代替法擬陽性率) を求める計算式

	参照法陽性 (R ⁺)	参照法陰性 (R ⁻)
代替法陽性 (A ⁺)	陽性一致 PA	陽性偏差 PD

代替法陰性 (A ⁻)	陰性偏差 ND	陰性一致 NA
-------------------------	---------	---------

代替法の感度: $SE_A = (PA + PD) / (PA + ND + PD) \times 100\%$ 、

参照法の感度: $SE_R = (PA + ND) / (PA + ND + PD) \times 100\%$ 、

相対真度 (Relative trueness): $RT = (PA + NA) / N \times 100\%$ 、ただし $N = PA + NA + ND + PD$ ($N \geq 60$)、

代替法の擬陽性率: $FP = PD / N \times 100\%$ 。

- ・試験結果に基づく許容限界 (Acceptability limit; AL)

カテゴリー	ペアードスタディ		アンペアードスタディ
	ND - PD*	ND + PD	ND - PD*
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7

*原文に記載はないが、絶対値と理解すべき。

(3) 新たに確認試験 (Confirmation) を追加する条件と同等性評価に及ぼす影響

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

る。

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

- R: 陽性、A: 陰性→C: 陽性 擬陰性 (False negative) による陽性一致 (Positive agreement) :PA_{FN}*
- R: 陽性、A: 陰性→C: 陰性 陰性偏差 (Negative deviation) :ND
- R: 陰性、A: 陽性→C: 陽性 陽性偏差 (Positive deviation) :PD
- R: 陰性、A: 陽性→C: 陰性 擬陽性 (False positive) による陰性一致 (Negative agreement) :NA_{FP}
- R: 陽性、A: 陽性→C: 陽性 陽性一致 (Positive agreement) :PA
- R: 陽性、A: 陽性→C: 陰性 擬陽性 (False positive) による陰性偏差 (Negative deviation) :ND_{FP}
- R: 陰性、A: 陰性→C: 陽性 擬陰性 (False negative) による陽性偏差 (Positive deviation) :PD_{FN}*
- R: 陰性、A: 陰性→C: 陰性 陰性一致 (Negative agreement) :NA

なお、この中で*の表記は原文では誤記。

- 各ケースの数は次の表のようになる。

	参照法陽性 (R ⁺)	参照法陰性 (R ⁻)
代替法陽性 (A ⁺)	陽性一致 PA _T (PA+PA _{FN})	陽性偏差 PD _T (PD+PD _{FN})
代替法陰性 (A ⁻)	陰性偏差 ND _T (ND+ND _{FP})	陰性一致 NA _T (NA+NA _{FP})

T: 全体 (total)

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

参照法の感度: SE_R = (PA_T + ND_T) / (PA_T +

$$ND_T + PD_T) \times 100\%$$

相対精確さ (Relative trueness): AC = (PA_T + NA_T) / N × 100% ただし N =

$$PA_T + NA_T + ND_T + PD_T \quad (N \geq 60)$$

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

- この結果に基づく許容限界

カテゴリー	ペアードスタディ		アンペアードスタディ
	ND _T - PD _T *	ND _T + PD _T	ND _T - PD _T *
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7

*原文では誤記。

- 具体的な事例は、添付資料1に掲載。

(4) 新たに確認試験を追加する理由

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

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

(5) RLOD を求める計算式

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

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

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

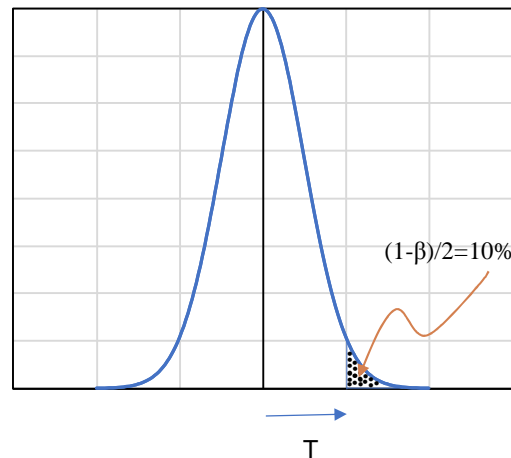
を参照して、各段階を手計算で行うことも可能、となっているが、理解困難な点は変わらない。

(6) 定量試験における許容区間

- ・ 定量試験では、代替法と参照法の試験結果から、その平均値の差（バイアス）と代替法のバラツキの大きさから、それが許容限界 $\pm[0.5 \times (\text{Log コロニー数})]$ の範囲内にあるかどうかによって、同等性を判定する。
- ・ 代替法のバラツキから、代替法の測定結果が 80% となるような菌数の範囲を求める。これが β -ETI (β -Expectation tolerance interval) である。 $t=0$ の両側に対称に広がる分布曲線 $f(t)$ で、 $t>T$ あるいは $-t<-T$ の値になる確率が α (例えば 0.05) 以下になるとき、 T の値を、両側検定による確率 α に対する t 値といって、有意差がある場合を

判定する t -検定で用いられる。同時に、 $f(t)$ が $-T<t<T$ の範囲にある確率は $1-\alpha$ であるといえる。

- ・ 同等性を判定する場合は β が用いられるが、その統計的処理は共通である。代替法の測定結果に基づく確率分布曲線として、 t -分布曲線を用いる。 $\beta=0.8$ となるような T 値は、両側検定による確率 $1-\beta=0.2$ として、 t -関数の逆関数 (EXCEL では $TINV$) を用いて求める (図 1)。これに、代替法の平均標準偏差 s_A と補正パラメータ $\sqrt{(1+1/n)}$ をかけた値が β -ETI/2 である。



T : Student-t分布の逆関数 (EXCELではTINV(両側検定1-β, dof)を用いて得られる値。

$$\beta\text{-ETI}/2 = T \times s_A \times \sqrt{1+1/n}$$

図1 . β -ETI(80%)説明図

- ・ 評価式は
 $U_i = \text{バイアス(代替法の結果の平均値 - 参照法の結果の平均値)} + \beta\text{-ETI}(80\%)/2$
 $L_i = \text{バイアス(代替法の結果の平均値 - 参照法の結果の平均値)} - [\beta\text{-ETI}(80\%)/2]$
 $U_i < 0.5 \times (\text{Log コロニー数})$ 、 $L_i > -0.5 \times (\text{Log コロニー数})$ であれば、同等と判定する。
- ・ 図 2 の Accuracy profile の例では、6 種

類の菌濃度で、各濃度で 5 試料ずつ試験した結果を示している。この中で、2 番目の菌濃度条件では L_i が範囲外になった。しかしこの場合、もし、 $4 \times$ (参照法の標準偏差 s_R)を超えなければ、依然として同等と判定する。

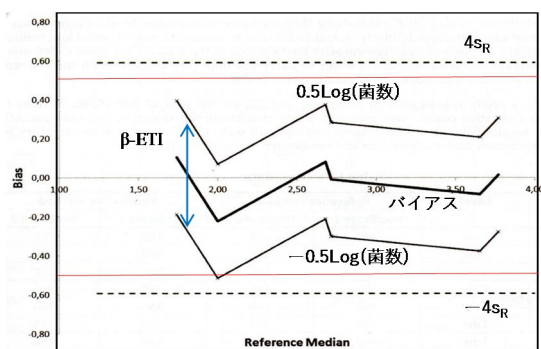


図2. Accuracy profile の例

- ここで問題となるのは、何故、85%、90%、あるいは 95%ではなく 80%なのか、また何故 $2 \times$ 、 $3 \times$ 、あるいは $5 \times$ ではなくて $4 \times$ なのか？という疑問である。しかし、これに対しては、WG2「統計学」が議論して妥当な値だとして決めたこと、WG3は統計学の専門ではないので、WG2の提言をそのまま受け入れた、とのことであった。ただ、WG2としては、実験計画とデータの検証には数年を要したそうである。通常、議論された全ての内容が、最終的に出版されるドラフトに盛り込まれることはないが、何故、その内容だけが選択されたのか理由を理解することは難しい。
- なお、一旦、試験結果が許容範囲を外れたら、その根本原因を分析しなければならない。バリデーション・サーティフィケーション実施機関は、その分析結果に基づき、試験結果が受け入れられるかどうかの判断をする。こうした追加の調査は有用ではあるが、ISO16140-2にはその規定はない。

(7) その他

ISO 16140: 2016 で誤記と思われる内容を添付資料 2 にまとめた。

D. 結論

- ISO TC34/SC9 の P メンバーとして年次総会に参加するようになって 2 年目の今年は WG2、WG3 で規格策定に直接関わっている専門家と前回以上に緊密に議論できた。その結果、代替法のバリデーションの基本的なスタンスが理解できた。
- 第一に得た重要な認識は、参照法よりも代替法(新たに開発された方法)の方が、性能が優れている場合が多く、一概に「同等」ではないからといって、代替法を棄却することは不合理だ、との考えが強まっていることである。その代わりに、代替法の検出したものが、確かに標的菌であるということ、念には念を入れて確認する、ということである。バリデーションは規定通りに行えばよい、といった単純な考えは、もはや通用しない。試験法の本質を理解した人やチームによる、専門的な判断が常に要求されると考えるべきである。
- それゆえ、バリデーションのガイドラインの中身を議論するほどに、益々、我が国にも AOAC、AFNOR、NordVal、などに相当する実施監督機関が不可欠であるのと思いが強まった。
- なお、今のところ代替法は培養法に限定されている。非培養法に基づく代替法は、まだ同等以上として認証された例はない。数年前に CEN から提案されたフローサイトメトリー法による生菌死菌計数法は、その後の議論の展開は見られない。非培養法に対しては、やはり、判断が難しく、最終的には生菌標準物質が不

可欠ではないかと推察される。

E . 健康危害情報

該当なし。

F . 研究発表

- (1) 国内合計 0 件
- (2) 海外合計 0 件
- (3) 学会発表 合計 1 件
 - 1 . 松岡英明：バイオにおける確からしさと不確かさ. (「電気化学と生命科学」企画シンポジウムにおける依頼講演)、電気化学会、平成 31 年 3 月 27 日、京都大学
- (4) 研究班会議：バリデーション部分会議等：合計 1 回
 - 1 . 第 36 回バリデーション作業部会、平成 30 年 11 月 28 日(水)、バイオメリユー・ジャパン(株)会議室、参加者 10 名、NIHSJ-2(カンピロバクター定性法)の培地組成変更について、他 5 課題について議論)

G . 知的所有権の取得状況

該当なし。

AFNOR 認証システムで、確認試験を行った例

Category	Type	PA	NA	PD	ND	PPND	PPNA	SE _{PA} %	SE _{NA} %	RT %	FPR %
1	a Ready to eat	7	10	3	1	0	0	90.9	72.7	81.0	0.0
	b Ready to reheat	7	10	2	1	0	0	90.0	80.0	85.0	0.0
	c Pastries, desserts, omelettes	8	12	0	1	0	0	88.9	100.0	95.2	0.0
	Total	22	32	5	3	0	0	90.0	83.3	87.1	0.0
2	a Raw, frozen, seasoned	10	10	3	4	0	0	76.5	82.4	74.1	0.0
	b Ready to eat and processed meat products	3	14	2	2	0	0	71.4	71.4	81.0	0.0
	c Delicatessen	4	13	3	3	0	0	70.0	70.0	73.9	0.0
	Total	17	37	8	9	0	0	73.5	76.5	76.1	0.0
3	a Raw dairy products	10	10	3	0	0	0	100.0	76.9	87.0	0.0
	b Pasteurized milk cheese	3	11	3	3	0	0	66.7	66.7	70.0	0.0
	c Ice cream, milk (pasteurized), flavored milk	5	12	2	1	0	0	87.5	75.0	85.0	0.0
	Total	18	33	8	4	0	0	86.7	73.3	81.0	0.0
4	a Raw vegetable products (fresh, frozen)	8	16	1	1	0	0	90.0	90.0	92.3	0.0
	b Mapped vegetables and heat processed vegetables	7	6	4	2	1	0	78.6	71.4	65.0	16.7
	c Vegetables based preparations, processed vegetables	4	15	1	2	0	0	71.4	85.7	86.4	0.0
	Total	19	37	6	5	1	0	80.6	80.6	82.4	2.7
5	a Raw products (fresh, frozen)	8	10	1	1	0	0	90.0	90.0	90.0	0.0
	b Smoked, marinated	7	10	3	0	0	0	100.0	70.0	85.0	0.0
	c Ready to eat or ready to reheat	7	12	0	3	0	0	70.0	100.0	86.4	0.0
	Total	22	32	4	4	0	0	86.7	86.7	87.1	0.0
6	a Process water	7	14	0	0	0	0	100.0	100.0	100.0	0.0
	b Dusts	5	11	4	5	0	1	64.3	71.4	65.4	9.1
	c Wipes	9	15	0	2	0	1	81.8	100.0	92.6	6.7
	Total	21	40	4	7	0	2	78.1	87.5	85.1	4.8
All categories		119	211	35	32	1	2	82.4	81.3	83.0	1.4

前増菌培養法が異なるために、アンペアードスタディとなり、 $|ND_T - PD_T| = |32 - 35| = 3$ 。6 カテゴリーに対する AL は 6 であるから、この場合は同等と判断される。

(2) 3M : MDA *Cronobacter* spp. の事例

Category	Type	Protocol	Study design	PD	ND	PPND	Unpaired study design		Paired study design			Combined unpaired and paired		
							(ND+PPND)-PD	AL	(ND+PPND)-PD	AL	(ND+PPND)+PD	AL	(ND+PPND)-PD	AL
1	a	General	Paired	0	0	0								
		Specific 1	Unpaired	2	1	0	-1							
	b	General	Paired	0	1	0		1		1				
		Specific 1	Unpaired	4	2	0	-2							
	c	General	Paired	0	0	0		0		0				
		Specific 1	Unpaired	4	1	0	-3							
Total 10g				0	1	0		1	3	1		6		
Total 300g Protocol 1				10	4	0	-6	3						
2	a	General	Paired	0	0	0								
		Specific 2	Unpaired	2	1	1	0							
	b	General	Paired	0	0	0		0		0				
		Specific 2	Unpaired	1	4	0	3							
	Total 10g				0	0	0		0	3	0		6	
	Total 300g Protocol 2				3	5	1	3	3					
3	a	General	Paired	0	1	0			1		1			
		General	Paired	0	2	0			2		2			
	b	General	Paired	0	0	0			0		0			
		General	Paired	0	0	0			0		0			
	Total				0	3	0		1	3	1		6	
	General Protocol (total paired)				0	4	0		4	5	4		19	
Specific Protocol 1				10	4	0	-6	3						
Specific Protocol 2				3	5	1								
Specific protocols (total unpaired)				13	9	1	-3							
Total				13	13	1		4	1	1	1	1	5	

赤枠はアンペアードスタディで、 $|ND_T - PD_T| = 3$ 。6 カテゴリーに対する AL は 6 であるから、この場合は同等と判断される。

青枠はペアードスタディで、 $|ND_T - PD_T| = 4$ (6 以下)、 $ND_T + PD_T = 4$ (16 以下)、あるから、この場合は同等と判断される。

ISO 16140-2: 2016 の誤記と史料された内容に係る確認状況

ISO 16140-2:2016 について、WG 議長へ以下の内容について確認を行った。

- (1) 確認試験の結果に基づき、擬陽性か擬陰性かの判断の表記に誤りがあると思われる。
該当箇所は、[5.1.3.4 Calculation and interpretation for sensitivity] (定性試験のシングルラボスタディにおける) の Table 1-4、[5.2.3 Calculations and summary of data] (定性試験のコラボスタディにおける) の Table 9-11 である。
- (2) 定性試験における許容限界を示す表で、(ND-PD)が絶対値になっていない。
- (3) [5.2.3 Calculations and summary of data] (定性試験のコラボスタディにおける) で、式(6)(7)に記載されている P_0 、 CP_0 の説明は誤解されるかも知れない。ここでは、参照法では擬陽性の総数 P_0 、代替法では確認試験後の擬陽性総数 CP_0 を用いる、と明記すればよいと思われる。ただし、代替法では、必ずしも確認試験をするとは限らないので、そのことを付記すべきであるが、その記載がない。
- (4) [5.2.3 Calculations and summary of data] (定性試験のコラボスタディにおける) で、「 N_X in equations (12)-(14)」は「 $N_{X(R+A)}$ for equation (14) is the total number of N_{XR} and N_{XA} 」のように参照法と代替法の場合を区別した表記にすべきと思われる。
- (5) [6.2.3 Calculation, summary, and interpretation of data] (定量試験のコラボスタディにおける)
Table 18 の Suffixes of collaborator (i), level (k), and replicate (l) in Table 18 は collaborator (k), level (i), and replicate (j) のように本文と合わせるようにすべきと思われる。
- (6) [Annex H Table H.1]
Calculated results of Step 1 (X_i) and Step 2 (Y_i) における以下の記載について、
 X_i (1.740, 2.114, 2.681, 2.716, 3.653, 3/771) は正しくは(1.780, 2.179, 2.657, 2.682, 3.685, 3.778)
 Y_i (1.845, 1.778, 2.763, 2.708, 3.568, 3.785) は正しくは(1.181, 1.728, 2.800, 2.700, 3.666, 3.839)
ではないか。これらは簡単な平均値の計算での間違いであり、考えが正しければ、後続の計算結果 Step3 ~ Step7 全ても誤記となるのではないか。
- (7) 以上の意見に対し、
『残念ながら、指摘された内容を直ちに改訂することはできないため、次回の改版時、あるいは修正時に検討されるようにしたい。その際には、提出できるよう準備をお願いしたい。』との回答を得た。

平成30年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「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
獣医学研究部門
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（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、昨年度までに整備したボツリヌス遺伝子試験法（Technical Specification）の原案（ステージ1）の実効性の検証を目的として、検討委員会の試験法検討案作成方針に従い専門家より構成される作業部会を編成し、試験法のバリデーションに使用される作業部会案（ステージ2）の整備および、バリデーション実施に必要な基礎データの獲得を行った。これらの成果は試験法検討案作成方針に従った標準試験法の整備において重要なステップであり、今後、編成された作業部会において方針に従った検証作業を進めることで、公開可能なボツリヌス遺伝子試験法の整備を目指す。

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」（以下、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国際的整合性を持った試験法の策定を目的とする。国内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」で食品中でのボツリヌス毒素産生性評価法が通知法として示されており、また、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」においては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が、いずれの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。一方で、国際的には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）が広く知られており、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、免疫学的手法によるボツリヌス毒素タンパク質検査およびボツリヌス毒素遺伝子検査が採用されている。本研究において昨年度までに、これらの国内外の試験法の比較検証を行い、検討委員会において整

備・提案するボツリヌス検査法としてボツリヌス遺伝子を検出指標とした試験法が妥当であるとの結論に至り、ISO法を基に作成した標準試験法（Technical Specification）の原案（NHISJ-20TS-ST1）を提案した。本年度の研究においてはコラボスタディ（Collaborative study:CS）の実施にむけてNIHSJ-20ST-ST1を元にした標準作業手順書（NIHSJ-20TS-ST2）の整備を行い、バリデーション（妥当性確認）実施に必要な基礎データの獲得を行った。

B. 研究方法および結果

1. ボツリヌス毒素遺伝子試験法ステージ2(NHISJ-20TS-ST2)の作成

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

2. バリデーション実施計画の作成

ボツリヌス菌においては試験実施に要求される設備条件の特殊性や菌株移動の困難さから、これらを考慮したバリデーション実施計画の作成が重要である。新規試験法のバリデーションはその実施形態によって、単一試験室バリデーション（Single laboratory validation:SLV）とCSに大別されるが、検討委員会での議論の結果、NIHSJ-20TS-ST2についてはSLVとCSを組合せた形でのバリデーションの実施が妥当であるとの結論に至り、図1に示す体制でのバリデーション計画を提案した。すなわ

ち、ポツリヌス試験法においては NIHSJ-20TS-ST2 内で試料調整方法が異なる 2 種の食品(はちみつおよび、はちみつ以外の一般食品)と 4 種類の毒素型(A 型、B 型、E 型および F 型)の組み合わせにより計 8 パターンの添加回収試験の実施が必要であるが、この中ではちみつに A 型菌を添加した試料を用いて CS を実施することで併行条件での NIHSJ-20TS-ST2 のバリデーションおよびベリフィケーション(性能検証)を同時に実施し、その一方でそれ以外の組合せに関しては SLV による検証を行うことで、試験室間の菌株移動を最小限に抑えた形態でのバリデーション実施計画を作成した。加えて、ポツリヌス菌を取扱う試験実施に要求される設備条件およびポツリヌス菌取扱い実績を考慮して CS に参加可能な組織の選定を行い、大学 2 施設および地方衛生研究所 2 施設からなる作業部会(WG)を編成した。

3. バリデーションに使用する添加菌液調整プロトコールの作成

WG において NIHSJ-20TS-ST2 の検証を行い、国内の試験室の状況を加味しながらも ISO 法との妥当性を担保した形で NIHSJ-20TS-ST2 の修正が行われ、また同時に WG で実施するバリデーションにおいて検討が必要な項目について抽出を行った。食品衛生検査指針 微生物編(2018)および ISO16140-2:2016 において定性試験のバリデーションでは食品試料に菌レベルが無菌(検出率 0%)、低レベル(検出率 25-75%)、高レベル(検出率 100%)となるように添加し検証を実施する様に提言されている。NIHSJ-20TS-ST2 では芽胞と Vegetative cell を分けて検出するプロトコールとなっているこ

と、および菌を添加後の食品検体の配布が困難であり各 CS 参加機関において個々に食品への菌添加を行わざる得ないことから、各 CS 参加機関における添加菌液の制御について慎重な検討が必要である事が指摘された。培養条件が芽胞形成割合に与える影響を検証した結果、添加菌液調整に使用する培養液の組成および培養条件によって芽胞形成割合が大きく異なることが明らかとなり(図 2) CS 参加機関間で添加菌レベルを同水準に制御するためには添加菌液調整プロトコールの整備の必要性であることが明らかとなった。本解析の結果に基づき、添加回収試験における菌レベルの制御が可能な CS 実施に向けて、同一組成の培地を利用した添加菌液調整プロトコールの原案を下記の様に提案した。ポツリヌス菌においては毒素型間で発育性状に差が見られること及び、CS において各機関で由来の異なる菌株を使用せざる問えない現状から、今後、下記のプロトコールを基本としながら CS 参加機関間でのデータ比較を実施し、安定した添加菌液を調整可能なプロトコールの整備を進める。

【添加菌液調整プロトコール(原案)】試供菌株の保存液をクックドミート培地に接種し、 37 ± 1 で 3 日間、嫌気条件下で培養した培養液 0.06 mL を新しいクックドミート培地 6 mL に接種し 37 ± 1 で 7 日間、嫌気条件下で培養する。この培養液 0.06 mL を新しいクックドミート培地 6 mL に接種し 80 で 20 分間加熱処理後、 37 ± 1 で 7 日間、嫌気条件下で培養する。この加熱処理および 7 日間培養の操作をさらに 2 回繰り返し得られた培養液を 50%グリセロール溶液と 1:1 で混和し-80 で凍結保存する。

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菌検査法について公定法などの標準化された検査法が存在せず、早急な整備が求められているところである。この社会的要請を受けて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。本研究では研究期間内に試験法案を作成し、検討委員会での議論を経て Technical Specification として整備・公開する事を最終目標としている。検討委員会においては試験法のバリデーションおよびベリフィケーションをステージ1からステージ4の4つの手順に従い実施する方針を表明している。本研究においてはステージ2である作業部会案を作成し、WGにおいて詳細なプロトコルの検討の結果、国内の試験室の状況を加味した複数の指摘が挙げられ細かい修正がなされたが、本作業においても検討委員会の基本方針に従い、ISO法に準じて作成された NIHSJ-20TS-ST2 に対する大幅なプロトコルの変更を行うこと無く、ISO法との妥当性を担保した形での NIHSJ-20TS-ST2 の合意に至った(参考資料)。今後、WGにおいて同法のベリフィケーションに重点をおいた検証作業を進め、最終的に Technical Specification としての公開を目指す。本研究により得られる成果は、食品の衛生試験法の国際調和を図る上での重要性に加え、食餌性ボツリヌス症疑い事例対応への活用も期待される。

E. 結論

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

F. 研究発表

学会発表

1. 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、佐藤守、山崎栄樹。Cholix による細胞致死機構における新規結合タンパク質の同定と機能解析。第65回トキシシンポジウム、金沢市(2018.7)
2. Eiki Yamasaki, Hisao Kurazono, Myo Thura Zaw, Kayo Okumura, Shingo Yamamoto. *Uropathogenic specific protein* gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli* isolated from both humans and companion animals, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. 4th International Conference on One Medicine One Science, チェンマイ, タイ(2019.1)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H . 引用文献

- ・ ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- ・ 食品衛生検査指針 微生物編 (2018) 第 1 章 4. 試験法の妥当性確認と性能検証

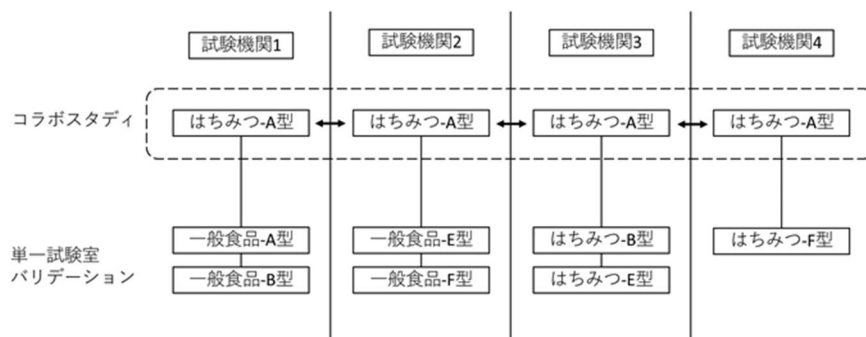


図1 ボツリヌス菌取扱いに要求される設備条件の特殊性や菌株移動の困難さを考慮したNIHSJ-20TS-ST2のバリデーション実施計画

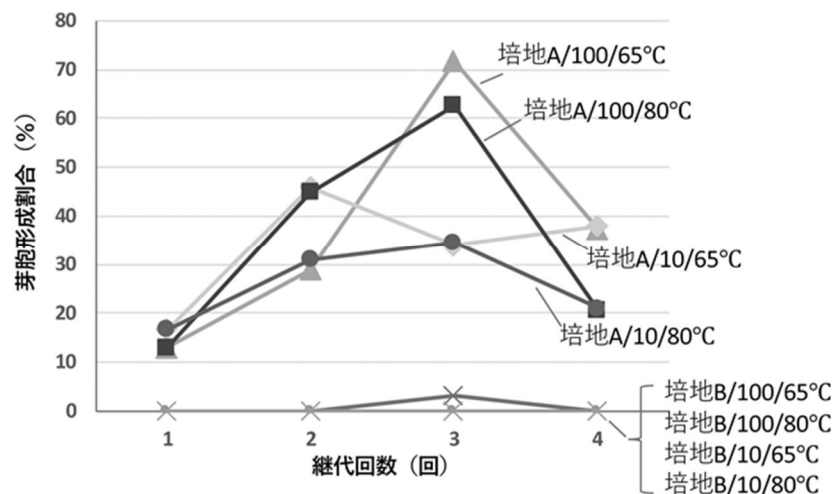


図2 ボツリヌス菌の芽胞形成に対する培養条件の影響

組成の異なる培地 A および B で増菌した Okra 株を 100 倍もしくは 10 倍容の新鮮な培地に接種後、65℃、10 分間もしくは 80℃、20 分間で加熱処理した後に、嫌気条件下 (37℃) で 7 日間の培養を行った。同様の処理を 1-4 回繰り返した培養液に対して、グラム染色観察を行い、芽胞形成割合を算出した。

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 30 年度分担研究報告書

遺伝子検査法に関する研究

研究分担者 泉谷秀昌（国立感染症研究所細菌第一部第二室 室長）

研究協力者 森 哲也（東京顕微鏡院）

下島優子（東京都健康安全研究センター）

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、PCR 法に関する一般事項について ISO 法を中心に情報収集し、ガイドライン案のベースとなる文書の選択、和訳等を行った。

A. 研究目的

わが国の食品衛生法では食品（種）ごとに種々の微生物に対する規格基準が規定されており、それに対応する個別の試験法が定められている。試験法は培養法をベースに構築されている。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も菌の生化学的および/もしくは血清学的特性を利用している。近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある。こうした状況をふまえ、本研究では食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、その活用にあたってのガイドラインの検討を目的としている。

B. 研究方法

国際的な標準試験法として扱われている欧州 International Organization for Standardization (ISO) ホームページ上にある微生物試験法の中

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

C. 研究結果および考察

ISO において PCR 法に関する記載があるものは約 30 あり、このうち、当該法の一般的な事項に関する記載があるものを表 1 にまとめた。

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

遺伝子検査法に関する作業部会として、下島優香子（東京都健康安全研究センター）、森哲也（東京顕微鏡院）、岡田由美子（国立医薬品食品衛生研究所）、朝倉宏（国立医薬品食品衛生研究所）敬

称略)に加わっていただいた。

上記3文書について英文和訳を行い、内容及び文言等について精査した。

各文書の現時点での和訳タイトルは以下のとおり：

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

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

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

これらはPCRの使用機器(サーマルサイクラー)に関する文書ISO/TS 20836:2005と併せて、PCR法に関する工程の概要を規定するものであった。一般的に実験室で実施されるPCR法と比較してコントロールの設定が多様であった。一般的な陰性及び陽性コントロールに加えて、プロセスコントロール、抽出コントロール、内部/外部増幅コントロールが含まれていた。これらについて情報を整理し、ガイドライン案にどのように盛り込んでいくかが今後の課題の一つであると考えられた。

これらの文書を土台として、現在、遺伝子検査法に関するガイドライン案を当該作業部会において検討しており、次年度には文言等についてバリデーション作業部会とも調整した上で、検討委員会に上申し、最終案を作成する予定である。

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。一方で、多様な微生物に迅速に対応するためPCRをはじめとした遺伝子検査法は有用であると考えられる。本研究の実施により、現在、一般的に実験室で実施されているPCR法の工程と、ISOで国際的な基準として設定されるPCRを用いた試験法の工程ガイドラインの間には必ずしも一致していない部分もあると考えられた。

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 . 遺伝子検査法の一般事項について記載した ISO 文書

ISO 文書番号		年	タイトル
ISO	20837	2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for sample preparation for qualitative detection
ISO	20838	2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for amplification and detection for qualitative methods
ISO	22118	2011	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens – Performance characteristics
ISO	22119	2011	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions
ISO	22174	2005	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions
ISO/TS	20836	2005	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Performance testing for thermal cyclers

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	ボツリヌス菌	Visual栄養学テキスト 食べ物と健康Ⅲ. 食品衛生学.	-	57-58.	2019
朝倉宏	細菌性食中毒	健康教室増刊号. 東 山書房	69	76-78	2018
朝倉宏、伊豫田淳	腸内細菌科菌群試験法	食品衛生検査指針 微生物編2018	-	165-174	2018

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
Asakura H, Makino S, Watanabe K, Tuchida Y, Kawabe M, Sakurai D.	Kuma Bamboo Grass (<i>Sasa veitchii</i>) extracts exhibit protective effects against atypical <i>Aeromonas</i> <i>salmonicida</i> infection in goldfish (<i>Carassius auratus</i>).	Biocontrol Sci.	-	In press	2019
Ito K, Takagi K, Matsushima Y, Iwasaki A, Tanaka N, Kanesaki Y, Martin-Laurent Martin-Laurent FF, Igimi S.	Identification of the novel <i>hcbB</i> operon catalyzing the dechlorination of pentachlorophenol in the Gram-positive bacterium <i>Nocardioides</i> sp. strain PD653.	J Pestic Sci.	43	124-131	2018

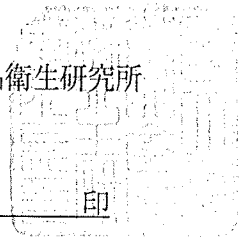
平成31年3月28日

厚生労働大臣
（国立医薬品食品衛生研究所長）殿
（国立保健医療科学院長）

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 食品微生物試験法の国際調和に関する研究 (H29 - 食品 - 一般 - 006)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・部長

(氏名・フリガナ) 朝倉 宏 ・ アサクラ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) 病原体等の取り扱い (所内の管理規定に従って実験を実施)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

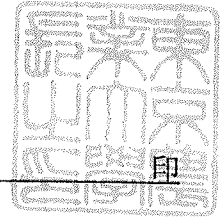
令和 元年 5月 10日

厚生労働大臣 殿

機関名 東京農業大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 高野 克己



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品微生物試験法の国際調和に関する研究

3. 研究者名 応用生物科学部・教授

五十君 静信・イギミ シズノブ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立大学法人東京農工大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 大野 弘幸 印

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進事業
- 2. 研究課題名 食品微生物試験法の国際調和に関する研究 (H29-食品-一般-006)
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 東京農工大学 名誉教授
(氏名・フリガナ) 松岡 英明 (マツオカ ヒデアキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和元年5月10日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立大学法人帯広畜産大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 奥田 潔 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品微生物試験法の国際調和に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) グローバルアグロメディシン研究センター・教授
(氏名・フリガナ) 倉園久生・クラゾノヒサオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: 審査は平成30年度に実施)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

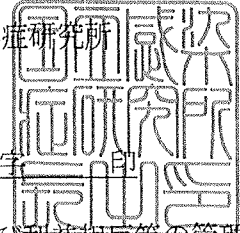
平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品微生物試験法の国際調和に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 細菌第一部・室長
(氏名・フリガナ) 泉谷秀昌・イズミヤヒデマサ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

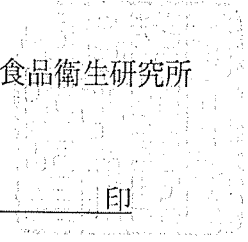
平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品微生物試験法の国際調和に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部 第三室長
(氏名・フリガナ) 岡田 由美子 (オカダ ユミコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) 病原体等の取扱い(所内の管理規定に従って実験を実施)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。