

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

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏

令和2(2020)年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

令和2(2020)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

衛生指標菌及び食中毒菌の標準試験法作成及び改訂に関する研究

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

----- 29

食品微生物試験法の妥当性評価に関する研究

松岡 英明 他

----- 37

#### 3. ボツリヌス試験法に関する研究

倉園久生 他

----- 45

#### 4. 遺伝子検査法に関する研究

泉谷秀昌

----- 50

### ・ 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 55

令和元年度 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）

梅田 薫 大阪健康安全基盤研究所

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

河合 高生 大阪健康安全基盤研究所

工藤由起子\* 国立医薬品食品衛生研究所

幸田 知子 大阪府立大学

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

土屋 禎\* 一般財団法人日本食品分析センター

榎木 真吾 東京農業大学

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

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\* 公益財団法人日本食品衛生協会

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）



## I. 總括研究報告



令和元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）ボ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、通知法の基礎となっている NIHSJ 法のうち、腸内細菌科菌群試験法及びリステリア・モノサイトゲネス試験法について、国際整合性及び科学的妥当性を踏まえた検討を行い、結果判定までの時間を短縮する試験法として改訂を行った。また、食肉・食鳥肉由来食中毒起因菌として制御が求められているカンピロバクターの定量試験法の作成を開始し、本年度中に ST2 に至った。次年度以降、コラボスタディを通じた妥当性確認を行う予定である。このほか、NIHSJ 法文書の表示に関する規定を新たに設定し、試験法間の記述的整合を通じた利用者の利便性向上を図った。（２）国際動向及び妥当性確認に関する研究としては、2019 年 7 月に開催された ISO/TC34/ SC9 総会に参加し、関連情報について収集すると共に意見交換を行った。その中では、我が国が対応すべき試験法及び関連項目が抽出されたほか、妥当性確認に関する作業部会への積極的関与を通じ、ISO 16140 ガイドラインにおいて修正すべき事項を提言し承諾された。また、牛乳製造施設で生乳受入れの際に実施される直接鏡検法（総菌数試験法）で用いられるニューマン染色液が使用規制強化により代替染色液が求められる状況を鑑み、国際的なガイドラインでも示される -ETI を指標とした統計解析を行い、ブロードハースト・パーレイ改良染色液（BPV2）の代替染色液としての妥当性を示すことができた。（３）ボツリヌス試験法に関する研究では、ボツリヌス試験法作業部会を開催し、同試験法 ST2 案及びコラボスタディ実施計画案について、法的規制の大きな当該病原体等の性質を踏まえた修正を行った。（４）遺伝子検査法に関する研究では、近年の微生物性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に積極的に採用する動向を踏まえ、食品微生物試験に PCR 法を取り入れる際の留意点を取り纏め、技術文書として作成を行った。

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）

梅田 薫 大阪健康安全基盤研究所  
奥村 香世 帯広畜産大学  
甲斐 明美\* 日本食品衛生協会  
河合 高生 大阪健康安全基盤研究所  
工藤由起子\* 国立医薬品食品衛生研究所  
幸田 知子 大阪府立大学  
小久保彌太郎\* 日本食品衛生協会  
小崎 俊司\* 大阪府立大学  
小高 秀正\* コダカマイクロバイオロジー  
アンドサイエンス合同会社  
品川 邦汎\* 岩手大学  
下島優香子 東京都健康安全研究センター  
鈴木 淳\* 東京都健康安全研究センター  
土屋 禎\* 日本食品分析センター  
檜木 真吾 東京農業大学  
廣田 雅光\* 日本食品検査  
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\* 日本食品衛生協会  
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。

同委員会は、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。これまで主要な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、一昨年度には研究分担者である東京農業大学・五十君静信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について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

国内の生乳の微生物基準は、「乳および乳製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)」において、直接個体鏡検法に基づき400万以下/mLとする旨が規定されており、食品原料である生乳を受け入れる際の衛生試験法として広く用いられている。当該試験法では1,1,2,2-テトラクロロエタンを含む、ニューマン染色液を用いることとされている。同物質は平成22年に施行された「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律(化管法)」において「第二種指定化学物質」の指定を受けているほか、平成26年には「労働安全衛生法」中の「特定化学物質等障害予防規則の特定化学物質：第二類物質」に指定される等、その使用にあたっては、使用・管理場所の制限や健康管理への対応等が厳密に求められる状況となっている。そのため、代替染色液の社会的要求性が高まりを見せており、これに対応する形で、先行研究では、数種の染色液の性能に関する検討が行われていた。一方で代替染色液としての妥当性については未だ結論が得られていない状況を踏まえ、本研究では食品微生物試験法としての妥当性の観点から、結果について統計解析を行い、ニューマン染色液の代替染色液としての妥当性を確認するための原案を作成し、「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)に提出し、意見を求めた。

上記検討委員会では、これまでにリステリア・モノサイトゲネス及び腸内細菌科菌群標準試験法を作成しており、これらはともに厚生労働省の通知法の根拠として活用されている。今般、これらの試験法のうち、より実行可能性が高く、かつ食品微生物分野において既に関連情報が集積されている一部内容について改訂を行うべきとの意見が挙げられたことを踏まえ、改訂作業を行い、同委員会での審

議を経て、最終案の作成に至った。このほか、同委員会では本年度新たにカンピロバクター定量試験法の検討を開始し、コラボスタディに向けた基礎データの収集等を行ったので、あわせて報告する。

#### (2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

国内の食品微生物試験法の国際調和を図る上では、逐次変動する微生物試験法に関する国際動向を見据えたアップデート等の作業が必要である。本分担研究では、食品微生物試験法に関する国際動向の掌握と、妥当性確認のあり方に関する検討を行った。

国際動向及び妥当性確認に関する研究を進めるにあたっては、対応する国際組織であるISO TC34/SC9のPメンバーとして、本年度はMi lano(イタリア)で開催された2019年次総会(7/9-7/12)およびリエゾンのCEN/TC275/WG6の2019会議(7/8)に出席し、情報収集を行うと共に、日本としての意見を提起することとした。様々の菌種の試験法に横断的に関わっている基本事項が妥当性確認(バリデーション)であり、また、その最終結果の合否判定に適用されるのが統計学に基づく判定基準である。これを扱うワーキンググループがSC9であることから、本年度は特に、各々のエキスパートから構成されているWG3(バリデーション)とWG2(統計学)の活動報告に重点を置き、国際動向をより精密に調査することとした。更に、バリデーションにおける要ともいべきISO16140に関して大きな改訂の動向を把握したので、これらについても取り纏めた。その内容は、2020年2月に開催された第24回WG3会議(Dauphin Island、米国)での議題に採用され、議論されたのであわせて報告する。

また、生乳受け入れ時の細菌数試験法に関して、ISO16140:2016に規定される、-ETI(80%)をパラツキの許容範囲とする方法で妥当性確認を行った。本統計学的判定法が合理的と思われる評価結果を得る上で有効であることを具体的に示す好例であったことから、その内容についてもあわせて報告する。

#### (3) ボツリヌス試験法に関する研究

本分担研究では、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、食品からのボツリヌス試験法に着目し、国内で利用可能であり、かつ国際整合性を持つ試験法策定を目的として検討を進めた。国内では食基発第0630002号・食監発第0630004号(平成15年6月30日)「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」で食品中でのボツリヌス毒素産生性評価法が示されているほか、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」で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示されている。両試験法ではマウス毒性試験による同定試験が採用されており、動物試験代替法の積極的な活用が求められている国際動向とは乖離する点もみられる。

本研究ではこれまで、国内外の試験法について比較検証を行い、検討委員会で整備・提案するボツリヌス検査法としては、ボツリヌス遺伝子を対象とした遺伝子検査を含む試験法が実行可能性を有するため、妥当との結論に至り、標準試験法原案を作成・提案してきた。本年度は感染症法の使用・管理規制が強く、一般的な食品有害微生物とは取り扱いが異なる性質を持つ、ボツリヌス菌を対象としたコラボスタディの実施にむけた計画を策定したので、報告する。

#### (4) 遺伝子検査法に関する研究

わが国の食品衛生法では食品(種)ごとに種々の微生物に対する規格基準が規定されており、それに対応する個別の試験法が定められている。試験法は培養法をベースに構築されている。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も菌の生化学的および/もしくは血清学的特性を利用している。近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある。こうした状況をふまえ、本研究では食品微生物試験法においてPCR法を採用する際の留意点を取り纏め、技術文書としての作成を検討したので報告する。

## B. 研究方法

### (1) 衛生指標菌に関する研究

#### 1) 生乳受入れ時の総菌数試験についての技術仕様書の作成

同一生乳検体塗抹標本にニューマン染色液と、代替候補となる2種の染色液を用いた場合の総菌数について、作業部会を構成し、統計解析を行うこととした。先行研究では、4試験機関で各2検体を3種の染色液を用いた直接鏡検法により総菌数を求めていた。これらの測定値について、チューキーのHSD検定(Tukey Honestly Significant Difference test)を用いた多重比較検定により評価した。

#### 2) 標準試験法(NIHSJ法)表記法規則作成

令和元年度の時点で、NIHSJ法は9種の試験法が最終ステージを経て最終版としてホームページ上で公開されている。これらの多くは試薬等(ペプトン等)の表記方法が必ずしも統一されていなかったことを踏まえNIHSJ法について再度見直しを行うこととした。また、単位の記載方法や段落番号等にも統一の必要性があることから、表記法規則案を作成し、バリデーション作業部会及び検討委員会に提案を行った。

#### 3) リステリア・モノサイトゲネス標準試験法(NIHSJ-08及び09)の改訂

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

#### 4) 腸内細菌科菌群標準試験法(NIHSJ-15及び16)の改訂

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

#### 5) カンピロバクター定量試験法(NIHSJ-3x-ST1)

## の作成

本年度より鶏肉及び食鳥と体を対象としたカンピロバクター定量試験法を作成することとした。作業部会を構成し、検討委員会で出た意見について協議を行い、ST2案を作成した。

### (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、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。令和元年7月にはISO/TC34/SC9総会が、イタリアのミラノにあるイタリア規格協会(UNI)で開催され、研究班からは、五十君、松岡、岡田の3名とISO/TC34/SC9国内委員会事務局から2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、わが国からの情報発信ならびに海外からの情報収集を行った。また、ISO16140:2016版の作成過程に携わっていたWG3(メソッドバリデーション)のチェアマンであるPaul in't Veld氏(食品および消費者の製品安全性庁、オランダ)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。国内では、ISO TC34/SC9国内対策委員会事務局を介して配信されるSC9文書の分析に基づく動向調査を実施した。国内委員会で議論される個々の微生物試験法の議論では、バリデーションの観点から意見を述べると共に、統計学的判定法の実例を示した。

一方、米国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、直接参加できなかったが、同総会に参加したAOACインターナショナル日本セクション所属の研究者

より、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からも公開されており、こちらについて、その内容の精査を引き続き行った。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。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い、その一覧は昨年度の研究報告書に添付した。

昨年度から引き続きAOAC InternationalとISOのガイドならびにISO/TC34/SC9のガイドラインとの整合性を考慮して、公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表であるNIHSJ法の策定手順の見直しを行った。一方、検査室で新たな試験法を導入する場合に必要なベリフィケーションも、ISO/TC34/SC9との整合性を持たせるため整理した。HACCP等の工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性のまとめを行った。

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提案される各作業部会から提案される試験法について技術的助言を行った。研究班外の団体から提案された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。

### (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やその他の方法を確認しつつ作成されたNIHSJ-20TS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、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) が示す微生物試験法の中で、遺伝子検査法、とくに PCR 法に関する一般事項について記載した文書 ISO22174、ISO20837、ISO20838 を確認した上で、我が国の実態に即した形となるよう、食品からの微生物試験において PCR 法を採用する際の留意点を取り纏め、ガイドライン原案の作成を行った上で、その内容を「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に諮り適宜修正を行い、最終的に技術文書として作成を完了させた。

### C. 研究成果

#### (1) 衛生指標菌に関する研究

##### 1) 生乳受入れ時の総菌数試験に関する技術仕様書作成

先行研究で得られた同一生乳検体塗抹標本にニューマン染色液と、代替候補となる2種の染色液を用いた場合の総菌数データを基に、チューキーの HSD 検定 (Tukey honestly significant difference test) を用いた多重比較検定を行った。ブロードハーストパーレイ染色液ではニューマン染色液と比較して調整済み p 値 (adjusted p-value) が 0.002 となり、統計学的有意差が見られたが、ブロードハーストパーレイ改良染色液はニューマン染色液に比べ調整済み p 値が 0.191 と明確な相違が見られず、代替染色液として許容できるレベルにあると考えられた。以上の点を踏まえて、検討委員会に統計解析結果を報告した。その後の検討委員会、バリデーション作業部会における審議並びに新たな検討内容については松岡らの分担研究報告書に記載したので、適宜参照されたい。

#### 2) 標準試験法 (NIHSJ 法) 表記法規則の作成

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

#### 3) リステリア・モノサイトゲネス標準試験法の改訂

NIHSJ-08:2014 (リステリア・モノサイトゲネス定性試験法) では、half Fraser broth での前増菌培養を 24 時間 ± 2 時間と、Fraser broth での増菌培養を 48 時間としている。現在、一般的な微生物試験として Fraser broth を用いた増菌培養時間は 24 時間で行われる実態もあるとの意見が出たため、増菌培養時間を短縮した際の影響を主な検討項目とした。また、第二選択分離培地の選択肢に挙げられる Oxford 寒天培地にはシクロヘキシミド (抗真菌剤) が含まれているが、現在同剤は発がん毒性が示されているため、代替に関する検討を行うこととした。

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

文献検索を通じ、以下の論文中で、half Fraser

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

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

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

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

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

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

#### 4) 腸内細菌科菌群試験法の改訂

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

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

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

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

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

#### 5) カンピロバクター定量試験法の作成

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

##### (1) 試料の採材部位及び試料懸濁液の調整

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

試料懸濁液の調整について、NIHSJ-02 で採用されている 5 倍乳剤の適切性を ISO 10272-2:2017 で採用されている 10 倍乳剤と比較検討した。NIHSJ-02 (定性試験)によりカンピロバクター陽性が確認された市販鶏肉皮試料(n=30)を対象とした比較試験を行ったところ、5 倍乳剤調整群で対象菌が 20CFU/g 未満検出された試料では 10 倍乳剤調整群は不検出となり、5 倍乳剤を用いる有意性が示された。

なお、夾雑菌の出現については、両群間で明らかな差異は認められなかった(夾雑菌出現試料数は

5 倍・10 倍乳剤調整群で各 14・12 試料)。

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

## (2) 試料懸濁液の選択分離培地への塗抹量

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

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

## (2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

### 微生物試験をとりまく国際情勢

コーデックスにおける食品の微生物基準判定に用いる標準となる試験法は、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。令和元年 7 月にイタ

リアで開催された 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。

第 38 回総会では、前半 1 日間は GEN/TC275/WG6 総会、後半 4 日間は ISO/TC34/SC9 総会が行われた。参加国は、フランス (幹事国)、オーストラリア、ベルギー、デンマーク、エジプト、フィンランド、ドイツ、アイルランド、インド、イラン、イタリア (ホスト国)、日本、ケニア、オランダ、ノルウェー、ポルトガル、ロシア、スペイン、スリランカ、スイス、スウェーデン、タンザニア、タイ、イギリス、アメリカの合計 25 カ国であった。その他に AOAC International、GEN (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約 50 名が参加した。

ISO/TC34/SC9 では、25 のワーキンググループ (WG) が活動している。本総会でわが国に求められた課題としては、一般細菌数や汚染指標菌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、アリス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と動向

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 年に公開されて以降改訂されていなかった。一方、米国の AOAC International では 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。

そこで AOAC International と ISO のガイドならびに ISO/TC34/SC9 のガイドラインとの整合性を考慮し、公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。こちらについては、これまで NIHSJ 法ホームページで公表していた作成手順の一部修正を行った。一方、検査室で新たな試験法を導入する場合に必要なベリフィケーションも、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理した。

HACCP などの工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性のまとめを行った。工程管理の検証に用いる微生物検査は、病原菌を対象とするというよりも一般細菌数を含めた衛生指標菌数を用いた確認となるため、迅速簡便法を活用することが有用と考えられる。但し、第三者機関でバリデーションの行われている迅速簡便法を活用することの重要性を確認し、その考え方の要点を取り纏めた。また、これに該当する試験法リストを更新し、NIHSJ 法のホームページに公開した。

今後の動向については、SC9 のキーメンバーである、DeAnn Benesh 氏 (AOAC International 会長、米国) が 2017/10/24 にサンチャゴで開催された INOFOOD 会議で発表した内容を、また Paul in 't Veld 氏が 2019/6/4 にオスロで開催された AOAC Europe/NMKL NordVal Symposium で発表した内容を公開しているので、その資料に基づいて説明する。  
<https://www.inofood.cl/wp-content/uploads/2017/08/1.-DeAnn-Benesh.pdf>  
<http://aoaceurope.com/images/sampled/2019/06/04/paul-int-val.pdf>

ISO16140 の Part 1、2 は出版済、Part6 も 2019 年出版済、Part 3、4、5 は間もなく出版になると予想されている。

既にバリデーションされた試験法の適用範囲を

拡張したいと考える場合は多い。具体的には食品の種類が異なる場合がその例である。フルバリデーションを行ったときに用いた食品は、分類表にしたがって選択した食品マトリクスであるが、新たに適用したい食品が、その時の食品と「同等」とみなせるか、という判断は難しい。また試験法を適用する目的が、単に自主管理の場合には、改めてバリデーションする必要はなく、ベリフィケーションのみで十分である。あるいは参照法自体の適用範囲を拡張する場合には、どの程度のバリデーションをし直す必要があるのか、などの議論に多くの時間が割かれてきたようである。そうした背景により、具体的な場合に応じたプロトコールが開発されてきた。各 Part の選択スキーム一覧は に纏められている。

従って、目的によっては ISO 16140 Part2 に従ってフルバリデーションをする必要はないと判断される場合があることを周知することが今後社会的に求められるべきと思われる。

#### 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きた。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、検討を進めてきた。ISO 法に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、こちらについても昨年に引き続き検討を行い、試験法 (ST4) として確定させた。

#### ISO 16140:2016 修正提案について

昨年度の報告書でまとめた修正提案は、2018 年度中に英文化して Paul in 't Veld 氏に提出した。そ

れに対して、当該規格は随時修正の議論をしているので、次の機会に反映できるだろう、との回答を得ていた。実際、その内容は、フランスのエキスパートからの提案と共に、2020.2.12-2/13 開催の24thWG3 会議の議題に組み込まれた。なお、WG3 会議への参加募集は、新たにエキスパート登録したからで、これによって、全体会議である年次総会よりも、バリデーションに関する木目の細かい議論に参加できるようになった。

提案事項に対する議論の結果について、情報公開の規約に反しない範囲で紹介する。既に、ISO 16140: 2016 では旧版に比べ大きな変化があったことは既に報告しているが、その一つが、Confirmation (本報告書では「確認試験」と訳す)の追加である。これは、定性試験における感度評価で、代替法と参照法の結果が異なった場合、さらに追加で行う試験のことである。これらの試験結果が陽性が陰性かで、次の8通りの組み合わせがある。

R: 陽性、A: 陰性 C: 陽性 擬陰性 ( False negative ) による 陽性一致 ( Positive agreement ) :PAFN

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<sub>FP</sub>

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<sub>FP</sub>

R: 陰性、A: 陰性 C: 陽性 擬陰性 ( False negative ) による 陽性偏差 ( Positive deviation ) :PD<sub>FN</sub>

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

以上のうち太字が修正されることになった部分である。このような修正が必要なのは、その後続く判定法において用いる、擬陽性と擬陰性の数が、各々PD、NDではなくて、 $PDT=PD+PD_{FN}$ 、 $NDT=ND+ND_{FP}$ であり、これらの数値の和や差が次の判定基準になるからである。因みに、規格本文では表中に小さく付記されているだけで、本文中ではPD<sub>T</sub>、ND<sub>T</sub>と表記すべきところも、全てPD、NDのままである。誤解を防ぐために、本報告書では区別して表記する。

次の判定基準はPD<sub>T</sub>-ND<sub>T</sub>、PD<sub>T</sub>+ND<sub>T</sub>の値を問題にする。すなわち、この値がいずれも一定の数以下であれば同等であるとの判断になる。ここで問題となったのは、PD<sub>T</sub>-ND<sub>T</sub>であり、絶対値を付けるべきではないかとの意見である。ところが、この点はかつて十分議論された経緯があり、絶対値は付けないという。負の値の場合はPD<sub>T</sub>が大きいこと、すなわち代替法が陽性で参照法が陰性の場合が多かったことを意味する。このことは、できるだけ検出できる試験法が「高性能」という考えに照らせば、代替法の方が参照法より高性能であることになる。したがって、負の値については制限を設けない、との考えになる。

そもそも、確認試験を導入したのは、バリデーションの煩雑さが増しても、本来、高性能の代替法を、参照法と同じ結果が得られないという理由だけで棄却するのは非合理的だ、との考えに基づいている。不思議なことであるが、そのような基本的な考え方については、何故か記述がない。何れにしても、「高性能」と推定される代替法が本当に標的菌をとらえているのか、については確認試験で十分確認することを要請している。

規格の中には、数的条件に関する「何故その数値に？」が頻出してくる。その多くは統計学に基づく判断であり、WG2の判断である。その根拠には、解析的に得られる唯一の解、というようなものはほとんどない、と理解しておいた方がよい。例えば、-ETI (80%)をバラツキの許容範囲とする同等性の判断基準がある。しかし、何故80%なのか、との説明はないし、聞いても単にWG2が判断して決めた、と

しか言えないという。

一方、我が国から提示した質問の一つに「Acceptability limit; AL」の元になっているデータは何か？エキスパートの見解の理論的背景は？」に対しては、プロジェクトリーダーの Frederic Martinez 氏から資料提供がなされた。また、MicroVal、AFNOR の認証試験では AL の値を変えている、との情報があるので、同氏らは AFNOR、MicroVal と連絡を取る、としている。このように、関連機関との連携を生かして、根拠となる情報を直ちに精査する姿勢には学ぶところが大きい。

生乳受け入れ時の総菌数試験法(ブリード法)の代替染色法の評価

国内では乳等省令により生乳の微生物基準として細菌数(直接個体鏡検法)が 400 万/ml と規定され、同法の染色液としてはニューマン染色液が指定されている。ニューマン染色液には 1,1,2,2-テトラクロロエタンが一成分として含まれるが、同物質は、平成 22 年に施行された「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律(化管法)」に規定する「第二種指定化学物質」の指定を受けたほか、平成 26 年に施行された「労働安全衛生法」では、「特定化学物質等障害予防規則の特定化学物質:第二類物質」に指定され、ニューマン染色液を取扱う際には、使用場所の制限や健康管理への対応等が厳格に求められる状況となった。そこで、ニューマン染色液に代わる染色液の開発が求められていた。

そこで、代替染色液として、ブロードハーストパーレイ染色液(BPV1)、ブロードハースト・パーレイ改良染色液(BPV2)を選定し、4 機関で小規模コラボスタディが実施された。その結果について、ISO16140:2016 の定量試験に規定されている、 $\beta$ -ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする方法で、ブリード法と BPV1 法、BPV2 法の各々との同等性を評価し、ブリード法と BPV2 法の同等性を示した。Sample n 個で参照法の結果の平均値を  $X_i$ 、代替法の結果の平均値を  $Y_i$ 、代替法の結果の分散

を SA2 とした時、 $|Y_i - X_i| \pm \text{-ETI}(80\%)/2$  が許容範囲内であれば、同等と見做される方法を採用した。なお、許容範囲は  $\pm 0.5 \text{Log}_{10}$  (菌数)とし、この範囲を超える場合があっても  $\pm 4S_R$  以下なら許容されるとした( $S_R$ は参照法の標準偏差)。その結果、BPV1 法はニューマン染色液を用いた場合と同等とは言えないが、BPV2 法は同等と言えるとの結論に至った。

### (3) ボツリヌス試験法に関する研究

第 69 回検討委員会(2019 年 7 月 22 日)、第 70 回検討委員会(2019 年 12 月 16 日)および第 71 回検討委員会(2020 年 2 月 18 日)にてコラボスタディ計画について審議を行った。また、検討委員会前後に CS 参加予定機関より編成されるワーキンググループ(WG)においてメール会議を実施し、各機関の設備状況等を確認し、CS 開始前に準備が必要な項目について精査を行った。以上の議論により決定されたバリデーション計画および、抽出された課題事項を以下に示す。

#### NIHSJ-20TS-ST2 の作成

ボツリヌス菌の特殊性から、各 CS 参加予定機関の設備条件を考慮した手順書の整備が必要と考えられたため、WG 会議を通して各施設の設備状況を調査し、CS で用いる手順書(NIHSJ-20TS-ST3)の原案である NIHSJ-20TS-ST2 について各施設の設備的な制約を反映した調整を行った。

#### バリデーション実施計画案の作成

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 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、2 段階でのバリデーション計画を提案し、検討委員会において承認された。すなわち、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)を同時に実施する事とした。その一方でそれ以外の組合せに関してはSLVによるバリデーションを行うこととした。以上、法および設備的な制限のある中で、これらの事情を勘案したNIHSJ-20TSのバリデーション作業計画が立案・承認された。

#### CS評価指標の設定

CSにおける併行精度を評価する指標の候補として複数の国際的に通用性をもつ指標が挙げられた。本研究内で実施するCSで用いる評価指標としての適切性について、検討委員会内バリデーション作業部会に諮問した結果、ボツリヌス菌の取扱いの難さや設備的な制限(設備的な制限により、一度に扱える検体数も制限される)を考慮し、Limit of Detection (LOD:検出下限)を指標としたCSが適切との結論に至った。

本研究で第一義的に実施予定としたはちみつとA型菌を用いたCSでは主管機関である帯広畜産大学にてLODを決定した後に、各CS参加機関において上記のLODを再現可能かについて検証を行うこととした。

#### 接種菌液調整プロトコルの整備

ボツリヌス菌を添加した食品検体を配布することは、法的規制を踏まえると、極めて実行可能性に乏しい。そのため、各CS参加予定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と考えられた。ボツリヌス菌は培養条件により芽胞形成が著しく変動することが既知であり、異なる試験室でスパイク菌液を作成せざるを得ない本CSでのスパイク菌液作成法の作成・提示にあたっては、多元的な科学的根拠に基づくことが重要との結論に至った。ボツリヌス菌の食品内動態等を考慮した結果、スパイク菌液として精製芽胞菌液の利用が適切と判断さ

れ、WGでの議論を通じ、複数の精製芽胞菌液作成プロトコルが提示された。この際、ISO/TS 17191:2013 Annex D (informative)でも、芽胞菌液作成プロトコルが示されているが、同プロトコルはバスソニケーターが必要であることや、芽胞菌液の保存に1の冷蔵設備が求められることから実行可能性は乏しいと結論づけられた。一方で、食基発第0630002号・食監発第0630004号「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」で示される芽胞菌液作製法では、国内施設での使用実績等の優位性から本研究で実施するCSへの適用も最適と判断された。但し、同プロトコルでは使用する培地の種類が指定されていないため、培養液の選択の根拠となる実証データの取得が必要であるとの意見が挙げられた事を受け、WG内で培地および培養条件の妥当性を検証することとした。加えて、ボツリヌス菌は毒素型間で発育性状に差が見られることを踏まえ、A型菌以外を用いるSLVでは各機関で各菌株に適した芽胞液調整条件の実証データを取得した上で、芽胞液調整プロトコルを整備することとした。

#### DNA抽出法の妥当性確認

ISO/TS 17191:2013ではDNA抽出法としてCTAB抽出法が示されている。しかしながら、同法は手技の煩雑さや設備要件の面で、CS参加予定機関の中にも実施困難な施設がみられた。そのため、CS実施に先駆けて代替となる簡易法の選定が必要と考えられ、市販キットや国立感染症研究所レファレンス委員会/地方衛生研究所全国協議会発行の病原体検出マニュアル(ボツリヌス症)に記載の方法を含め、資料作成を進めている。次年度前期には速やかに共有する予定である。

#### (4) 遺伝子検査法に関する研究

作業部会において、ISO22174、ISO20837及びISO20838を確認しつつ、PCR法を取り入れる場合の留意点について取り纏め、NIHSJ-34TS-ST2案を作成した。

その後、「食品からの微生物標準試験法検討委員

会」にて審議、修正を行い、NIHSJ-34TS-ST4 案（技術文書）として作成を完了させた。本文書の主たる項目は、以下の通りである：1．序文、2．適用範囲、3．原理、4．被験物質、5．検査室の一般要件、6．廃棄物管理、7．試薬、8．機器および装置、9．手順、10．対照の使用、11．結果の解釈・評価、12．試験報告、13．試験法の性能、14．増幅反応に関する全般的事項、15．プライマー設計。

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

#### D. 考察

##### （1）衛生指標菌に関する研究

本研究では、乳等省令の「生乳受入れ時の総菌数試験法」（直接鏡検法）で用いられるニューマン染色液が健康被害の懸念から使用制限が大きい実態を鑑み、代替染色液の妥当性について統計解析を通じて評価した上で、食品からの微生物標準試験法検討委員会での審議を経て、最終的に同試験法に関する技術仕様書を作成した。

一般的に、技術仕様書は標準試験法とは異なる位置づけにあり、要求事項や指針になりうるものとして扱われる。NIHSJ 法は元来培養法を基本としており、直接鏡検法である本試験法は技術仕様書として作成することが妥当と考えられたことが今回の検討背景にはある。

また、本年度はこれまでに作成された標準試験法の表記方法の整合性確保を行う文書を作成し、今後作成される試験法についてはこれに準拠した形で提出を求めることとなった。本仕様の作成は同一の食品検体から複数の微生物試験を平行実施する際の利便性の向上や、培地等調製時の参照の容易さ等に反映されることが期待される。

また、リステリア・モノサイトゲネス試験法、及び腸内細菌科菌群試験法について改訂を行い、結果的に試験所要時間が短縮されることとなった。食品

微生物試験では迅速性も重要な要素であることは周知のとおりであり、本改訂法は多くの利用者にとって大きな利点となるものと考えられ、通知法等への反映が望まれる。

なお、今回のような NIHSJ 法の定期的な見直しや改訂は国際的な技術の発展に応じて適宜行うことが国際調和の進展及び更なる安全性確保に際して、必要且つ有効な事項と思われる。引き続き、国際調和の流れに沿った食品の微生物リスク管理の発展に寄与するため、これらの活動を継続することは必須の課題と考えられる。

##### （2）食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

###### 微生物試験をとりまく国際情勢

わが国に対し、ISO/TC34/SC9 からは、食習慣を踏まえ、寄生虫の試験法、腸炎ピブリオ試験法、プロバイオティクス（乳酸菌）試験法、さらには今後の試験法の発展として、遺伝子学的な試験法をどのように取り上げていくべきか、動物を用いない毒素の試験法の標準化、フローサイトメトリーによる菌数測定法、バリデーションなどの新たにはじまる WG への参加が期待されている。今後、国内外の各微生物試験法に係わる WG に積極的に参加し、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及び動向

代替試験法のバリデーションガイドである ISO16140 については、Part 1/2 以外の整備が WG ないで進められており、数年内には全ての改訂作業が完了するものと思われる。また、米国の AOAC International は、バリデーションガイドラインを 2012 年に公開している。これら 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いることから、今後の調整が TC34/SC9 総会でのトピックスの一つとなるものと思われる。

本年度は標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。こちらにつ

いては、これまでホームページで公表していた NIHSJ 法の作成手順が、ISO の考え方にほぼ一致していたことから、一部の表現等の修正を行い、更新することで対応できる状況とした。一方、検査室で新たな試験法を導入する場合に必要なベリフィケーションについては、整理を開始したところである。今後文書として纏める必要があると思われる。

また、生乳の受け入れに際して汎用されるブリード法の染色液に関する妥当性確認結果は、サンプル数が限定的であっても合理的な評価を行う上で有用であることを実例で示した初めての事例と考えられ、今後の活用も期待できる。

現在、我が国で制度化が進められている HACCP 方式の工程管理に係る分野での、検証に用いる微生物試験法は、主として衛生指標菌のレベルの確認となることから、試験法の選択にあたっては目的適合性を踏まえた上で、第三者認証機関で同等性が確認された迅速検査法の積極的な活用が期待される。

#### 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の最終版に進めることができた。

生乳受け入れ時の総菌数試験法（ブリード法）の代替染色法の評価

ISO16140:2016の定量試験に規定されている、 $\beta$ -ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする方法を用いた妥当性評価については、サンプル数が限定的であった場合にも一定の合理的な評価を行える方法であることが国内では初めて確認することができた良例と考えられる。

#### (3) ボツリヌス試験法に関する研究

ボツリヌス感染症は発生時に死亡を含む極めて高い健康危害性を顕すため、国内でも慎重な対策が求められる感染症である。しかしながら現在、本邦においては食品中のボツリヌス検査法について公定法などの標準化された検査法は存在せず、早急な整備が求められている。本研究では実行可能性と国際整合性を併せ持つ試験法の整備に向けた検討を

進めてきた。特に本年度はCSに際して参加予定機関からの多角的な意見を抽出した上で事前に検討すべき項目を整理することができた。本研究で行うCSはこの様な制限の下に実施される解析であるため、取扱いが容易な他種の病原体に対して行われる解析とは異なったスキーム構築が必要となった。本研究で実施するスキーム構築は、取扱いが制約的な病原体を用いたCSのモデルケースになるものと考えられる。

#### (4) 遺伝子検査法に関する研究

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

### E. 結論

#### (1) 衛生指標菌に関する研究

本年度の研究では、乳等省令の「生乳受け入れ時の総菌数試験法」で用いられるニューマン染色液の代替染色液として、ブロードハーストパーレイ改良染色液を用いる妥当性について、統計解析を通じて評価し、結論づけることができた。また、国際動向を踏まえ、リステリア・モノサイトゲネス標準試験法、腸内細菌科菌群標準試験法を改訂し、より実行可能性の高い試験法を作成することができた。このほか、食肉食品等で社会的影響の大きなカンピロバクター定量試験法の検討を開

始し、試験法設定にあたって必要となる事項の整理と検討を行い、試験法 ST2 案を作成した。

( 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

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にも本年度から参画し、発信した提案が受諾される等、我が国の食品微生物試験法の国際調和に向けた活動を加速化させる礎を築くことができた。また、今後日本が積極的に関与すべき試験法及び関連事項についてもSC9参加を通じて明確化された。このほか、ISO妥当性評価ガイドラインに含まれる手法を用いてブリード法の代替染色液に関する評価を行い、利用者の安全性確保に繋がる代替染色液の妥当性を示すことができた。

( 3 ) ボツリヌス試験法に関する研究

- 1) ISO/TS 17191:2013 を基にコラボスタディに使用可能な作業手順書を作成し、NHISJ-20-ST2 として提案した。
- 2) NHISJ-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。

( 4 ) 遺伝子検査法に関する研究

国際標準的な文書を確認しつつ、食品からの微生物試験へ PCR 法を導入する際の留意点を取り纏め、NIHSJ-34TS-ST4 ( 技術文書 ) を作成した。本技術文書は、PCR 法を含む食品微生物試験法の実施にあたり、試験精度の管理や安定的な実施への活用が期待される。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 書籍

- 1) 朝倉宏 . 2019. カンピロバクター感染症の疫学、病原性および診断治療 . 感染制御と予防衛生 . 3(2): 87-93.
- 2) 泉谷秀昌 . 2019. 腸管出血性大腸菌 ~ 分子疫学解析を利用した病原体サーベイランス . 感染制御と予防衛生 . 3(2): 75-80.

### 2. 論文

- 1) 鎌田洋一、藤田和弘、福沢栄太、佐藤信彦、佐野勇気、橘田規、高橋洋武、大城直樹、岡田由美子、五十君静信、白藤由紀子、山崎朗子、梶田弘子、上田成子、志賀俊人 . LC-MS/MS による米飯およびチャーハン中のセレウス菌嘔吐毒、セレウリド試験法 . 日本防菌防黴学会誌 . 2020. 48(2): 49-56.
- 2) 泉谷秀昌 . 広域散発事例探知に向けた取り組み . 日本食品微生物学会雑誌 . 36(1):10-12. 2019.
- 3) Yahiro K, Ogura K, Terasaki Y, Satoh M, Miyagi S, Terasaki M, Yamasaki E, Moss J. Cholix toxin, an eukaryotic elongation factor 2 ADP-ribosyltransferase, interacts with Prohibitins and induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in human hepatocytes. Cell Microbiol. 2019, 21:e13033.

### 3. 学会発表

- 1) 朝倉宏 . シンポジウム「低温微生物の生態とその予防 ~ 食中毒細菌」. 日本防菌防黴学会 46 回年次大会 . 令和元年 9 月 25 日 . 大阪府 .
- 2) 朝倉宏 . 食品微生物検査法の概要と国際調和に向けた検討について . 令和元年度食品衛生登録検査機関協会研修会 . 令和元年 12 月 6 日 . 東京都 .
- 3) 中山達哉、岡田由美子、朝倉宏 . シンポジウム「微生物試験法 : 製造現場において必要な微生物試験法・測定法」 ~ 衛生管理のために

用いるべき、試験法の動向について．日本防菌防黴学会第 46 回年次大会．令和元年 9 月 25 日．大阪府．

- 4) 千葉寛之、梶川揚申、横田健治、五十君静信．*Listeria monocytogenes* の腸管上皮細胞への腸管上皮細胞への接着・侵入に関わるインターナリン A の評価。第 40 回日本食品微生物学会学術総会．令和元年 11 月 28 日．東京都．
- 5) 五十君静信．HACCP などの食品の工程管理における微生物検査の考え方．第 52 回日本食品微生物学会学術セミナー．令和元年 12 月 20 日．大阪府．
- 6) 千葉寛之、梶田和彌、布藤 聡、中曾 譲、高崎一人、梶川揚申、横田健治、五十君静信．*L. monocytogenes* のヒト腸管上皮細胞への接着・侵入の評価．第 93 回日本細菌学会総会．令和 2 年 2 月 20 日．愛知県．
- 7) 伊藤正弥、三宅眞実、安木真世、梶川揚申、横田健治、五十君静信．*Clostridium perfringens* と *Bacillus cereus* の芽胞耐熱性の比較．第 93 回日本細菌学会総会．令和 2 年 2 月 20 日．愛知県．
- 8) 松岡英明：微生物試験法の国際的バリデーションの動向．日本防菌防黴学会 46 回年次大会特別講演．令和元年 9 月 25 日．大阪府．
- 9) 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、宮城聡、山崎栄樹．ヒト肝臓細胞における新規 Cholix 結合膜蛋白質の同定と細胞致死機構の解明．第 93 回日本細菌学会総会．令和 2 年 2 月 19 日．愛知県．
- 10) 李謙一、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真．WGS 解析による MLVA の評価と効率的腸管出血性大腸菌 O157 サーベイランス手法の確立．第 92 回日本細菌学会学術総会．令和元年 4 月 23 日．北海道．
- 11) 泉谷秀昌．腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について．衛生微生物技術協議会第 40 回研究会．令和元年 7 月 10 日．熊本県．
- 12) 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真．

2018 年における腸管出血性大腸菌の MLVA による分子疫学解析．第 40 回日本食品微生物学会学術総会．令和元年 11 月 28 日、東京都．

#### H. 知的財産権取得状況

該当なし

## II. 分担研究報告



令和元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）

分担研究報告書

衛生指標菌及び食中毒菌の標準試験法作成及び改訂に関する研究

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	下島 優香子	東京都健康安全研究センター微生物部
	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター微生物部
	松岡 英明	東京農工大学
	森 曜子	公益社団法人日本食品衛生協会
	泉谷 秀昌	国立感染症研究所細菌第一部
	品川 邦汎	岩手大学
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

乳等省令に示される生乳受入れ時の総菌数試験法について、これまでの検討結果に基づき、染色液の同等性を判断するための評価検討を行った。バリデーション作業部会での検討及び検討委員会での審議を経て、最終的に技術仕様書 NIHSJ-33TS:2020 を作成した。また、これ迄に上記委員会で策定された標準試験法(NIHSJ法)のうち、リステリア・モノサイトゲネス試験法(NIHSJ-08 及び 09) 及び腸内細菌科菌群試験法(NIHSJ-15 および 16) について現状の実態に即した改訂を行った。このほか、本年度はカンピロバクターの定量試験法作成に関する検討を開始し、ST2 案の提示に至った。更に、標準試験法の表記方法を統一するための表記法規則を作成した。これらの成果は各種食品微生物試験法の通知法作成や改訂等へ波及することが期待される。

A. 研究目的

現在国内では、「乳および乳製品の成分規格等に関する省令(乳等省令)」において、直接個体鏡検法に基づいて、生乳の微生物基準を400万以下/mLとする旨が規定されており、食品原料である生乳の衛生試験法として広く用いられている。当該試験法では、従来ニューマン染色液を用いるとされているが、その成分には1,1,2,2-テトラクロロエタンが含まれている。同物質は、平成22年に施行された「特定化学物質の環境への排出量の把握

等及び管理の改善の促進に関する法律(化管法)」に規定する「第二種指定化学物質」の指定を受けたほか、平成26年に施行された「労働安全衛生法」に規定される「特定化学物質等障害予防規則の特定化学物質：第二類物質」に指定されており、ニューマン染色液の使用にあたっては、使用・管理場所の制限や健康管理への対応等が厳密に求められる状況となっている。そのため、代替染色液の必要性が高まり、先行研究において、数種の染色液の性能が検討された。しかしながら、それら

の代替染色液としての有効性については評価がなされていなかったことを受け、本研究では、食品微生物試験法の妥当性評価の観点からニューマン染色液の代替となりうる染色液候補のデータ解析を行い、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」及びバリデーション作業部会において議論を行うこととした。

また、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」では、これまでにリステリア・モノサイトゲネス及び腸内細菌科菌群標準試験法を作成し、これらはともに厚生労働省の通知法の根拠として活用されている。今般、これらの試験法のうち、より実行可能性が高く、かつ食品微生物分野において既に関連情報が集積されている一部内容について改訂を行うべきとの意見が挙げられたことを踏まえ、改訂作業を行い、同委員会での審議を経て、最終案の作成に至った。このほか、同委員会では本年度新たにカンピロバクター定量試験法の検討を開始し、コラボスタディに向けた基礎データの収集等を行ったので、あわせて報告する。

## B. 研究方法

### 1) 生乳受入れ時の総菌数試験についての技術仕様書の作成

同一生乳検体塗抹標本にニューマン染色液と、代替候補となる2種の染色液を用いた場合の総菌数について、作業部会を構成し、統計解析を行うこととした。先行研究では、4試験機関で各2検体を3種の染色液を用いた直接鏡検法により総菌数を求めていた。これらの測定値について、チューキーのHSD検定(Tukey Honestly Significant Difference test)を用いた多重比較検定により評価した。

2) 標準試験法(NIHSJ法)表記法規則作成  
令和元年度の時点で、NIHSJ法は9種の試験法が最終ステージを経て最終版としてホームページ上で公開されている。これらの多くは試薬等(ペプトン等)の表記方法が必ずしも統一されていなかったことを踏まえNIHSJ法について再度見直しを行うこととした。また、単位の記載方法や段落番号等にも統一の必要性があることから、表記法規則案を作成し、バリデーション作業部会及び検討委員会に提案を行った。

### 3) リステリア・モノサイトゲネス標準試験法(NIHSJ-08及び09)の改訂

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

### 4) 腸内細菌科菌群標準試験法(NIHSJ-15及び16)の改訂

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

### 5) カンピロバクター定量試験法(NIHSJ-35-ST2案)の作成

本年度より鶏肉及び食鳥と体を対象としたカンピロバクター定量試験法を作成することとした。作業部会を構成し、検討委員会が出た意見について協議を行い、ST2案を作

成した。

## C. 研究結果

### 1) 生乳受入れ時の総菌数試験に関する技術仕様書作成

先行研究で得られた同一生乳検体塗抹標本にニューマン染色液と、代替候補となる2種の染色液を用いた場合の総菌数データを基に、チューキーのHSD検定(Tukey honestly significant difference test)を用いた多重比較検定を行った。ブロードハーストパーレイ染色液ではニューマン染色液と比較して調整済みp値(adjusted p-value)が0.002となり、統計学的有意差が見られたが、ブロードハーストパーレイ改良染色液はニューマン染色液に比べ調整済みp値が0.191と明確な相違が見られず、代替染色液として許容できるレベルにあると考えられた。以上の点を踏まえて、検討委員会に統計解析結果を報告した。その後の検討委員会、バリデーション作業部会における審議並びに新たな検討内容については松岡らの分担研究報告書に記載したので、適宜参照されたい。

### 2) 標準試験法(NIHSJ法)表記法規則の作成

第38回バリデーション作業部会及び第69回検討委員会において承認を得、標準試験法表記法規則を作成した(別添2)。試験法のフォーマットはISO方式を採用し、基本的に段落番号にピリオドで枝番を付することとした。フォントは日本語を游明朝、英数字をTimes New Romanにすることとした。単位はSI単位系を基本とするが、大桁数字はコンマ区切りとし、SI及びISOで用いられている小数点を起点として3桁ごとに半角1文字分のスペースを空ける方式は採用しなかった。培地組成に用いられる「酵素分解産物」は「酵

素消化物」に統一した。ペプトン類の記載は、ISO法に準拠している試験法はISO原文を基本としつつ、国内で流通している当該培地の組成を参考に、注釈として「カゼインペプトン等」などの記載を加えることとした。また、最終案が確定した試験法名からST4の文言を削除すること及び各試験法の末尾に改訂履歴を付することとした。

### 3) リステリア・モノサイトゲネス標準試験法の改訂

NIHSJ-08:2014(リステリア・モノサイトゲネス定性試験法)では、half Fraser brothでの前増菌培養を24時間±2時間と、Fraser brothでの増菌培養を48時間としている。現在、一般的な微生物試験としてFraser brothを用いた増菌培養時間は24時間で行われる実態もあるとの意見が出たため、増菌培養時間を短縮した際の影響を主な検討項目とした。また、第二選択分離培地の選択肢に挙げられるOxford寒天培地にはシクロヘキシミド(抗真菌剤)が含まれているが、現在同剤は発がん毒性が示されているため、代替に関する検討を行うこととした。

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

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

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

また、定量試験法における蘇生培養に関しては、以下の論文において、蘇生を行わない

場合にも十分量のリステリアを検出できたとの報告があったことから、同知見を基盤とする原案を作成し、検討委員会に提出した。

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

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

以上の状況確認を踏まえ、検討委員会委員間でのメール討議の結果、前増菌培養時間の短縮や蘇生培養の削除等から成る改訂案が了承され、変更履歴を末尾に示す形で NIHSJ-08:2020 及び NIHSJ-09:2020 として改訂された。(別添 3 及び 4)。

#### 4) 腸内細菌科菌群試験法の改訂

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

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

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

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

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

#### 5) カンピロバクター定量試験法の作成

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

##### (1) 試料の採材部位及び試料懸濁液の調整について

コラボスタディ実施に向け、市販鶏肉(n=25, 10g)を対象に、皮・肉部位間での菌数を比較検討した。その結果、対象菌の検出菌数は皮部分が肉部分に比べて高い傾向を示した(図 1)。

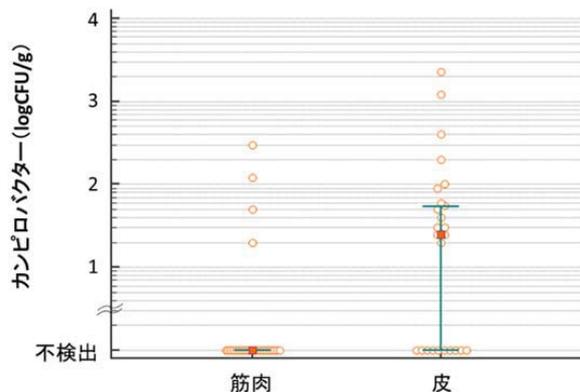


図 1. 市販鶏肉試料からのカンピロバクター検出菌数の比較（採材部位）

試料懸濁液の調整について、NIHSJ-02 で採用されている 5 倍乳剤の適切性を ISO 10272-2:2017 で採用されている 10 倍乳剤と比較検討した。NIHSJ-02（定性試験）によりカンピロバクター陽性が確認された市販鶏肉皮試料（ $n=30$ ）を対象とした比較試験を行ったところ、5 倍乳剤調整群で対象菌が 20CFU/g 未満検出された試料では 10 倍乳剤調整群は不検出となり、5 倍乳剤を用いる有意性が示された（図 2）。

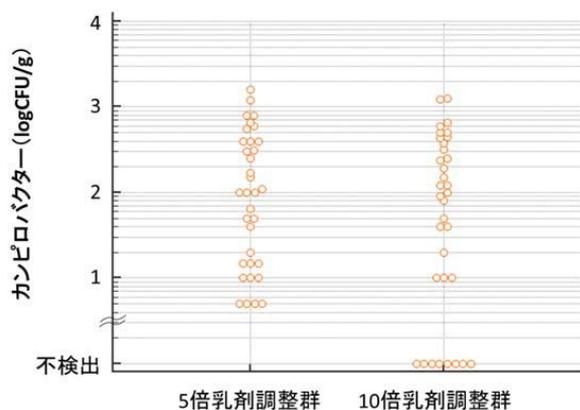


図 2. 鶏皮試料からのカンピロバクター検出菌数の比較（乳剤希釈倍率）

なお、夾雑菌の出現については、両群間で

明らかな差異は認められなかった（夾雑菌出現試料数は 5 倍・10 倍乳剤調整群でそれぞれ 14 及び 12 試料）。

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

## (2) 試料懸濁液の選択分離培地への塗抹量について

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

表 1. 試料（市販鶏皮）5 倍乳剤の塗抹量の違いによる、選択分離培地（mCCDA 培地）上での対象菌及び夾雑菌の発育状況の比較

塗抹液量 (使用枚数)	判定可能 試料数	対象菌数 (平均 CFU/g)	対象菌遊走を認 めた試料数	夾雑菌遊走を認 めた試料数
200μl (5枚)	10	$1.6 \times 10^2$	1	0
250μl (4枚)	9	$1.3 \times 10^2$	2	1
333μl (3枚)	4	$8.1 \times 10^1$	5	7
500μl (2枚)	0	-	6	8

以上の結果を踏まえ、選択分離培地の使用枚数は4枚から5枚(塗抹量としてシャーレ1枚あたり200~250μL)が適切と考えられた。

#### D. 考察

本研究では、乳等省令で示される「生乳受入れ時の総菌数試験法」で用いられるニューマン染色液が健康被害の懸念から使用制限が大きい実態を鑑み、代替染色液の妥当性を統計解析を通じて評価した上で、食品からの微生物標準試験法検討委員会での審議を経て、同試験法に関する技術仕様書を作成した。

一般的に、技術仕様書は標準試験法とは異なる位置づけにあり、要求事項や指針になりうるものとして扱われる。NIHSJ法は元来培養法を基本としており、直接鏡検法である本試験法は技術仕様書として作成することが妥当と考えられたことが今回の検討背景である。

また、本年度はこれまでに作出された標準試験法の表記方法の整合性を確保するため、表記方法の手順書を作成した。今後作成される試験法についてはこれに準拠した形での提出を求めることとなった。本仕様の作成は同一の食品検体から複数の微生物試験を平行実施する際の利便性の向上や、培地等調製時の参照の容易さ等に反映されることが期待される。

また、リステリア・モノサイトゲネス試験法、及び腸内細菌科菌群試験法について改訂を行い、結果的に試験所要時間が短縮されることと

なった。食品微生物試験では迅速性も重要な要素であることは周知のとおりであり、本改訂法は多くの利用者にとって大きな利点となるものと考えられ、通知法等への反映が望まれる。

なお、今回のようなNIHSJ法の定期的な見直しや改訂は国際的な技術の発展に応じて適宜行うことが国際調和の進展及び更なる安全性確保に際して、必要且つ有効な事項と思われる。引き続き、国際調和の流れに沿った食品の微生物リスク管理の発展に寄与するため、これらの活動を継続することは必須の課題と考えられる。

#### E. 結論

本年度の研究では、乳等省令の「生乳受入れ時の総菌数試験法」で用いられるニューマン染色液の代替染色液として、ブロードハーストパーレイ改良染色液を用いる妥当性を統計解析を通じて評価することができた。また、現時点の微生物試験に関わる国際動向を踏まえ、リステリア・モノサイトゲネス標準試験法、腸内細菌科菌群標準試験法を改訂し、より実行可能性の高い試験法を作成することができた。このほか、食肉食品等で社会的影響の大きなカンピロバクター定量試験法の検討を開始し、試験法設定にあたって必要となる事項の整理と検討を行い、試験法原案を作成した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 学術論文、著書等

1) 朝倉宏 . カンピロバクター感染症の疫学、病原性および診断治療 . 感染制御と予防衛生 . 3(2): 87-93. 2019.

## 2. 学会発表

1) 朝倉宏 . シンポジウム「低温微生物の生態とその予防」～食中毒細菌 . 日本防菌防黴学会 46 回年次大会 . 令和元年 9 月 25 日 大阪府 .

2) 朝倉宏 . 食品微生物検査法の概要と国際調和に向けた検討について . 令和元年度食品衛生登録検査機関協会研修会 . 令和元年 12 月 6 日 . 東京都 .

3) 中山達哉、岡田由美子、朝倉宏 . シンポジウム「微生物試験法：製造現場において必要な微生物試験法・測定法」～衛生管理のために用いるべき、試験法の動向について . 日本防菌防黴学会第 46 回年次大会 . 令和元年 9 月 25 日 . 大阪府 .

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



令和元年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
食品微生物試験法の国際調和に関する研究

分担研究報告書  
食品微生物試験法の国際動向に関する研究

研究分担者 五十君 静信 （東京農業大学応用生物科学部・教授）  
研究協力者 檜木 真吾 （東京農業大学応用生物科学部・研究員）

### 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。国際標準を策定す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、本年度は 2019 年 6 月にイタリアのミラノで開催された 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/TC34/SC9 での検討課題については逐次情報収集と情報交換を行い、検証すべき項目の集約につとめた。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 のガイドならびに ISO/TC34/SC9 で策定が進められているガイドラインを元に、公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。検査室で新たな試験法を導入する場合に必要なベリフィケーションも、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理した。HACCP などの工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性のまとめを行った。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、その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/TC34/SC9 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きた。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の整備を見据え、NIHSJ 標準法の検討手順の見直しを行った。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。令和元年 7 月には ISO/TC34/SC9 総会が、イタリアのミラノにあるイタリア規格協会 (UNI) で開催され、研究班からは、五十君、松岡、岡田の 3 名と ISO/TC34/SC9 国内委員会事務局から 2 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、わが国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、直接参加することはできなかったが、国内から当該学会に参加した AOAC インターナショナル日本セクション所属の研究者から、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、その内容の精査を引き続き行った。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、朝倉宏 (研究代表者)、

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)、諸藤圭 (協力研究者)、廣田雅光 (協力研究者)、守山隆敏 (協力研究者)、内田和之 (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い、その一覧は昨年度の研究報告書に添付した。

昨年度から引き続き AOAC International と ISO のガイドならびに ISO/TC34/SC9 のガイドラインとの整合性を考慮して、公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。一方、検査室で新たな試験法を導入する場合に必要なベリフィケーションも、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理した。HACCP などの工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性のまとめを行った。

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提案される各作業部会から提案される試験法についてアドバイスを行った。研究班外の団体から提案された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。7 月にイタリアで開催された 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。

2020 年度の第 38 回総会は、7 月にイタリアのミラノにあるイタリア規格協会で開催され、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(幹事国)、オーストラリア、ベルギー、デンマーク、エジプト、フィンランド、ドイツ、アイルランド、インド、イラン、イタリア(ホスト国)、日本、ケニア、オランダ、ノルウェー、ポルトガル、ロシア、スペイン、スリランカ、スイス、スウェーデン、タンザニア\*、タイ、イギリス、アメリカの合計 25 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約 50 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、アリス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。この案を作業部会で検討後、検討委員会へ提案した。この検討案については昨年度の分担報告書に添付した。

昨年度から引き続き AOAC International と ISO のガイドならびに ISO/TC34/SC9 のガイドラインとの整合性を考慮し、公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。こちらについては、これまでホームページで公表していた作成手順の一部修正を行った。一方、検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要なベリフィケーションも、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理した。

HACCP などの工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性のまとめを行った。工程管理の検証に用いる微生物検査は、病原菌を対象とするというよりも一般生菌数や衛生指標菌のレベルの確認となるため、迅速簡便法を活用することが有用である。第三者機関でバリデーションの行われている迅速簡便法を活用することの重要性を確認し、その考え方の要点については、図1に示した。また、これに該当する試験法リストを更新し、NIHSJ 法のホームページに公開した。

#### 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、検討を進めてきた。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、こちらについても昨年に引き続き検討を行い、試験法(ST4)として確定させた。

#### 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、バリデーション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、昨年度用語集案の作成を行い、検討会での確認を行った。

また、代替試験法のバリデーションガイドであるパート2については、松岡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。

昨年度から引き続き公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。こちらについては、これまでホームページで公表していた NIHSJ 法の作成手順が、ISO の考え方にほぼ一致していたことから、一部の表現等の修正を行い、更新することで対応することにした。

一方、検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要なベリフィケーションについては、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理を開始した。こちらは将来的に文書としてまとめる必要があると思われる。

HACCP などの工程管理の検証に用いる試験法の

選択に関する方向性の整理については、工程管理の検証の微生物検査では、病原菌を対象とするというよりも一般生菌数や衛生指標菌のレベルの確認となるため、試験法の選択の重要なポイントとして目的適合性を重視する必要がある。この観点から、妥当性確認の行われた迅速簡便法を活用することが有用である。第三者機関でバリデーションの行われている迅速簡便法を活用することの重要性を確認し、これに該当する第三者機関による妥当性確認の行われている迅速簡便法試験法リストを更新し、NIHSJ 法のホームページに公開した。

#### 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の最終版に進めることができた。

#### 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。また、バリデーションの重要性、目的適合性、工程管理における試験法の選択に関する考え方の整理など、微生物試験法に関連する情報提供を行った。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 鎌田洋一、藤田和弘、福沢栄太、佐藤信彦、佐野勇氣、橘田規、高橋洋武、大城直樹、岡田由美子、五十君静信、白藤由紀子、山崎朗子、梶田弘子、上田成子、志賀俊人．LC-MS/MS による米飯およびチャーハン中のセレウス菌嘔吐毒、セレウリド試験法．日本防菌防黴学会誌. 2020. 48(2): 49-56.

##### 2. 学会発表

- 1) 千葉寛之、梶川揚申、横田健治、五十君静信．*Listeria monocytogenes* の腸管上皮細胞への腸管上皮細胞への接着・侵入に関わるインターナリンAの評価。第40回日本食品微生物学会学術総会．タワーホール船堀．2019.11
- 2) 五十君 静信．HACCP などの食品の工程管理における微生物検査の考え方．第52回日本食

品微生物学会学術セミナー．大阪府立大学 I-Site . 2019.12

- 3) 千葉 寛之, 梶田 和彌, 布藤 聡, 中曾 譲, 高崎 一人, 梶川 揚申, 横田健治, 五十君 静信 . *L. monocytogenes* のヒト腸管上皮細胞への接着・侵入の評価 . 第93回日本細菌学会総会. ウィンクあいち . 2020.2
- 4) 伊藤 正弥, 三宅 眞実, 安木 真世, 梶川 揚申, 横田 健治, 五十君 静信 . *Clostridium perfringens* と *Bacillus cereus* の芽胞耐熱性の比較 . 第93回日本細菌学会総会 . ウィンクあいち . 2020.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

表1. 第38回ISO/TC34/SC9の総会での討議内容

1. 一般議題 (General Aspect)  
[N852, 853]  
SC9全体の活動に係る一般的な懸案事項
2. アドホックグループの報告  
[N854～857, 878]
3. ワーキンググループの年間報告  
[N859～871, 873～877, 879, 881～891]  
WGの活動報告, 今後の予定について
3. 今後の改訂事項 (Systematic Review)  
[N893]  
今後の改訂の方向性, 新規提案について
4. CEN/TC275/WG6年次総会の情報  
[N895]  
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 [N858, 872, 880, 894, 896]

表2. 2019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	$\beta$ -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

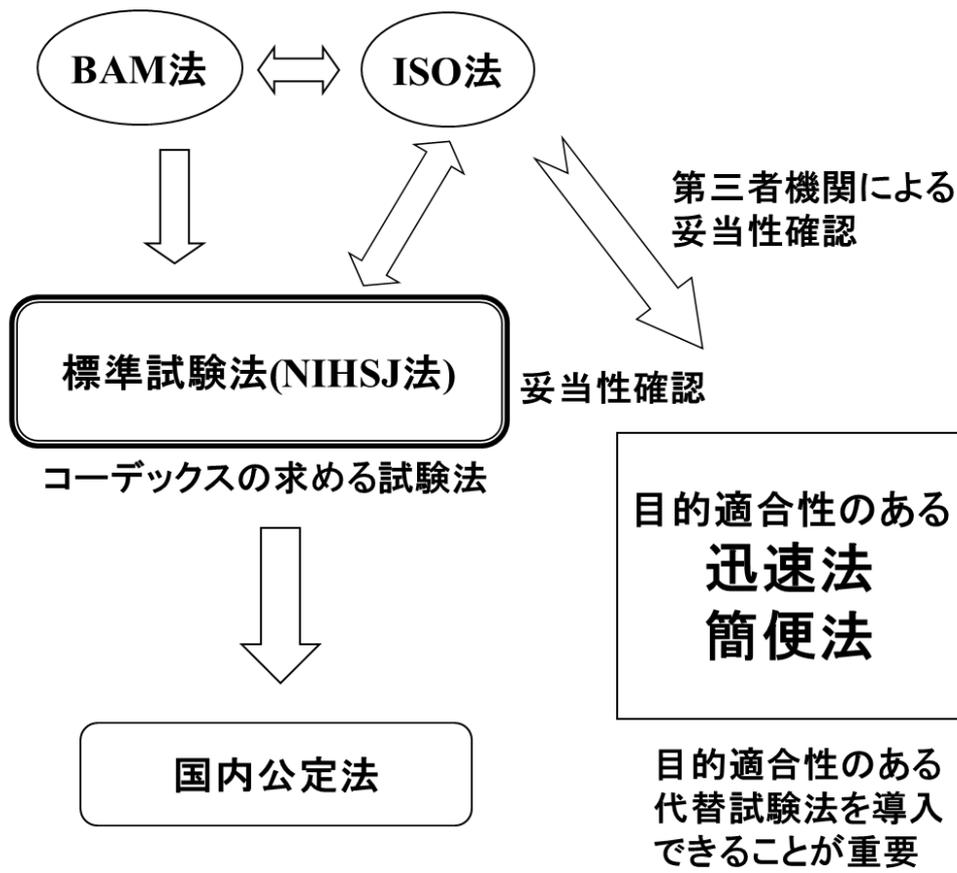


図1. HACCPなど工程管理における妥当性確認した迅速・簡便試験法選択の考え方

令和元年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
食品微生物試験法の国際調和に関する研究  
分担研究報告書

食品微生物試験法の妥当性評価に関する研究

分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授  
研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長

国内の食品微生物試験法を国際調和させるため、ISO/TC34/SC9 の P メンバーとして同総会に参加し、海外のメンバーとの緊密な意見交換を通じた的確な国際動向特に WG3（メソッドバリデーション）および WG2（統計学）の議論を重点的に調査する必要がある。本年度はイタリア・ミラノで開催された 2019 年次総会(7/9-7/12)およびリエゾンの CEN/TC275/WG6 の 2019 会議(7/8)に出席した。SC9 総会では 24 個の WG、5 個のアドホック WG の活動報告に立会い、現在議論されている問題点を集約した。特に WG3 で進行中の ISO16140:2016 の修正作業に関しては、エキスパート登録をして具体的なコメントを発信した。その内容は、修正版に反映されることになった。バリデーションで最終的に同等性の判定に採用される統計学的方法に関しては直感的に理解しがたい場合が多々あるが、WG2 の結論にしたがっている状況も理解された。統計解析の具体的手順は難解な場合も多々あるが、合理的判断をするための統計学であるとの認識が共有されている。海外のエキスパートと随時、直接意見交換できるネットワークが構築され、国際調和戦略上、重要な成果が得られた。国内での議論では、生乳受け入れ時の総菌数試験法に関して実用的な統計学的評価法を導入することにより、合理的な評価結果が得られる等、具体的な好例を示すことができた。

## A．研究目的

我が国の食品微生物試験法を国際調和させるために、対応する国際組織である ISO TC34/SC9 の P メンバーとして、例年、総会に参加し、アップデートの情報を収集してきた。本年度は Milano（イタリア）で開催された 2019 年次総会(7/9-7/12)およびリエゾンの CEN/TC275/WG6 の 2019 会議(7/8)に出席した。様々の菌種の試験法に横断的に関わっている基本事項が妥当性確認（バリデーション）であり、また、その最終結果の合否判定に適用されるのが統計学に基づく判定基準である。これを扱うワーキンググループが SC9 である。そのため、各々のエキスパートから構成されている WG3（バリデーション）と WG2（統計学）の活動報告に重点を置き、国際動向を調査した。さらに、バリデーションにおけ

る要ともいふべき ISO16140 に関して大きな動きが進行している。すなわち、最新版（2016 年度版）の修正が進められているが、同時に ISO16140 の分冊化の準備が進められている。その分冊化に伴い、これまでの ISO16140:2016 は ISO16140-2(パート 2)と称することになった。その動向についても情報を整理した

我が国におけるバリデーションのガイドラインは、これまで、ISO16140:2016 を基に作成を進めてきた。しかしその内容の修正は現在も随時行われている。したがって、その内容修正は、その理由も含め、速やかに情報入手しておくことが重要である。本年度の年次総会では、その修正作業に関して WG3 エキスパートの追加募集があったので、松岡が登録し、同時に、これまでの解析で得られた疑問点や質問事項を文書で提出した。その内容は、

2020/2/12/-2/13 に開催された 24thWG3 会議 ( Dauphin Island、米国 ) での議題に組み込まれ議論された。その結果についても以下に記述する。

国内委員会で行われた、個々の試験法に関する議論でもバリデーションの観点から意見を述べた。特に生乳受け入れ時の細菌数試験法に関しては、ISO16140:2016 に規定されている  $\beta$ -ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする方法で評価した。若干複雑ではあるが、合理的な評価結果を得るために統計学的判定法が有効であることを具体的に示す好例であったので、その内容も以下に示す。

## B . 研究方法

ISO TC34/SC9 の 2019 年次総会に出席した。また、ISO16140: 2016 版の作成過程に携わっていた WG3 ( メソッドバリデーション ) のチェアマンである Paul in't Veld 氏 ( 食品および消費者の製品安全性庁、オランダ ) 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。

国内においては、ISO TC34/SC9 国内対策委員会事務局を介して配信される SC9 文書の分析に基づく動向調査を実施した。

国内委員会で議論される個々の微生物試験法の議論では、バリデーションの観点から意見を述べると共に、統計学的判定法の実例を示した。

## C . 研究結果及び考察

( 1 ) ISO 16140: 2016 の修正提案について昨年度の報告書でまとめた修正提案は、2018 年度中に英文化して Paul in't Veld 氏に送った。それに対して、当該規格は随時修正の議論をしているので、次の機会に反映できるだろう、との回答を得ていた。実際、その内容は、フランスのエキスパートからの提案と共に、2020.2.12-2/13 開催の

24thWG3 会議の議題に組み込まれた。

なお、WG3 会議への参加募集は、新たにエキスパート登録したからで、これによって、全体会議である年次総会よりも、バリデーションに関する木目の細かい議論に参加できるようになった。

提案事項に対する議論の結果について、情報公開の規約に反しない範囲で、紹介する。既に、ISO 16140: 2016 では旧版に比べ大きな変化があったことは既に報告しているが、その一つが、Confirmation ( 本報告書では「確認試験」と訳す ) の追加である。これは、定性試験における感度評価で、代替法と参照法の結果が異なった場合、さらに追加で行う試験のことである。これらの試験結果が陽性か陰性かで、次の 8 通りの組み合わせがある。

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

以上のうち太字が修正されることになった部分。

このような修正が必要なのは、その後続く判定法において用いる、擬陽性と擬陰性の数が、各々、PD、ND ではなくて、 $PD_T = PD + PD_{FN}$ 、 $ND_T = ND + ND_{FP}$  であり、これらの数値の和や差が次の判定基準になるからである。因みに、規格本文では表中に

小さく付記されているだけで、本文中では  $PD_T$ 、 $ND_T$  と表記すべきところも、全て  $PD$ 、 $ND$  のままである。誤解を防ぐために、本報告書では区別して表記する。

次の判定基準は  $PD_T - ND_T$ 、 $PD_T + ND_T$  の値を問題にする。すなわち、この値がいずれも一定の数以下であれば同等であるとの判断になる。ここで問題となったのは、 $PD_T - ND_T$  であり、絶対値を付けるべきではないかとの意見である。ところが、この点がかつて十分議論された経緯があり、絶対値は付けないという。負の値の場合は  $PD_T$  が大きいこと、すなわち代替法が陽性で参照法が陰性の場合が多かったことを意味する。このことは、できるだけ検出できる試験法が「高性能」という考えに照らせば、代替法の方が参照法より高性能であることになる。したがって、負の値については制限を設けない、との考えになる。

そもそも、確認試験を導入したのは、バリデーションの煩雑さが増しても、本来、高性能の代替法を、参照法と同じ結果が得られないという理由だけで棄却するのは非合理的だ、との考えに基づいている。不思議なことであるが、そのような基本的な考え方については、何故か記述がない。何れにしても、「高性能」と推定される代替法が本当に標的菌をとらえているのか、については確認試験で十分確認することを要請している。

規格の中には、数的条件に関する「何故その数値に？」が頻出してくる。その多くは統計学に基づく判断であり、WG2 の判断である。その根拠には、解析的に得られる唯一の解、というようなものはほとんどない、と理解しておいた方がよい。例えば、 $\beta$ -ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする同等性の判断基準がある。しかし、何故80%七日、との説明はないし、聞いても単にWG2 が判断して決めた、としか言えないという。

一方、我が国から提示した質問の一つに「Acceptability limit; AL」の元になっているデータは何か？エキスパートの見解の理論的背景は？」に対しては、プロジェクトリーダーの Frederic Martinez 氏から資料提供がなされた。また、MicroVal、AFNOR

の確認試験では AL の値を変えている、との情報があるので、同氏らは AFNOR、MicroVal と連絡を取る、としている。このように、関連機関との連携を生かして、根拠となる情報を直ちに精査する姿勢には学ぶところが大きい。

## (2) ISO 16140 分冊化の動向

ISO 16140 が分冊化の計画は既に何年も前から議論されていたが、具体化されたのは3年ほど前からのようだ。2017年の東京での ISO/TC34/SC9 の年次総会で、その進行状況が報告されていたが、この2年間で一気に作業が進んだとの印象を受けた。本来、当会議の情報は非公開ではあるが、SC9 のキーメンバーである、DeAnn Benesh 氏(3M、同時に AOAC International 会長、米国)が 2017/10/24 にサンチャゴで開催された INOFOOD 会議で発表した内容を、また Paul in't Veld 氏が 2019/6/4 にオスロで開催された AOAC Europe/NMKL NordVal Symposium で発表した内容を公開している。その資料に基づいて説明する。

[https://www.inofood.cl/wp-content/uploads/2017/08/1.-](https://www.inofood.cl/wp-content/uploads/2017/08/1.-DeAnn-Benesh.pdf)

[DeAnn-Benesh.pdf](#)

[http://aoaceurope.com/images/sampledata/symposium/presentations/M5\\_Paul\\_int\\_Veld.pdf](http://aoaceurope.com/images/sampledata/symposium/presentations/M5_Paul_int_Veld.pdf)

ISO16140 の Part 1、2 は出版済、Part 6 も 2019 年出版済、Part 3、4、5 は間もなく出版になると予想されている。内容を図 1 に示す。

- Part 1: Vocabulary 用語
- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method  
参照法に対する代替法（市販キット等）のバリデーション
- Part 3: Protocol for the verification of validated reference methods and validated alternative methods implemented in a single laboratory  
バリデーション済の試験法を単一ラボでバリフィケーション
- Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory  
単一ラボでのバリデーションで当該ラボ内でのみ有効
- Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods  
非営利的試験法のコンパクトバリデーション、特殊な試験法で、コラボできるラボ数が十分確保できない場合など
- Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedure  
菌種、型の確認試験に利用される代替法（市販キット等）のバリデーション

図1 . ISO 16140 シリーズ

とみなせるか、という判断は難しい。また試験法を適用する目的が、単に自主管理の場合には、改めてバリデーションする必要はなく、バリフィケーションのみで十分はずだ。あるいは参照法自体の適用範囲を拡張する場合には、どの程度のバリデーションをし直す必要があるのか、などの議論に多くの時間が割かれてきたようである。そうした背景により、具体的な場合にに応じたプロトコルが開発されてきた。図2には各 Part の選択スキームが一覧にまとめられている。

必ずしも Part2 にしたがってフルバリデーションをする必要がないと判断される

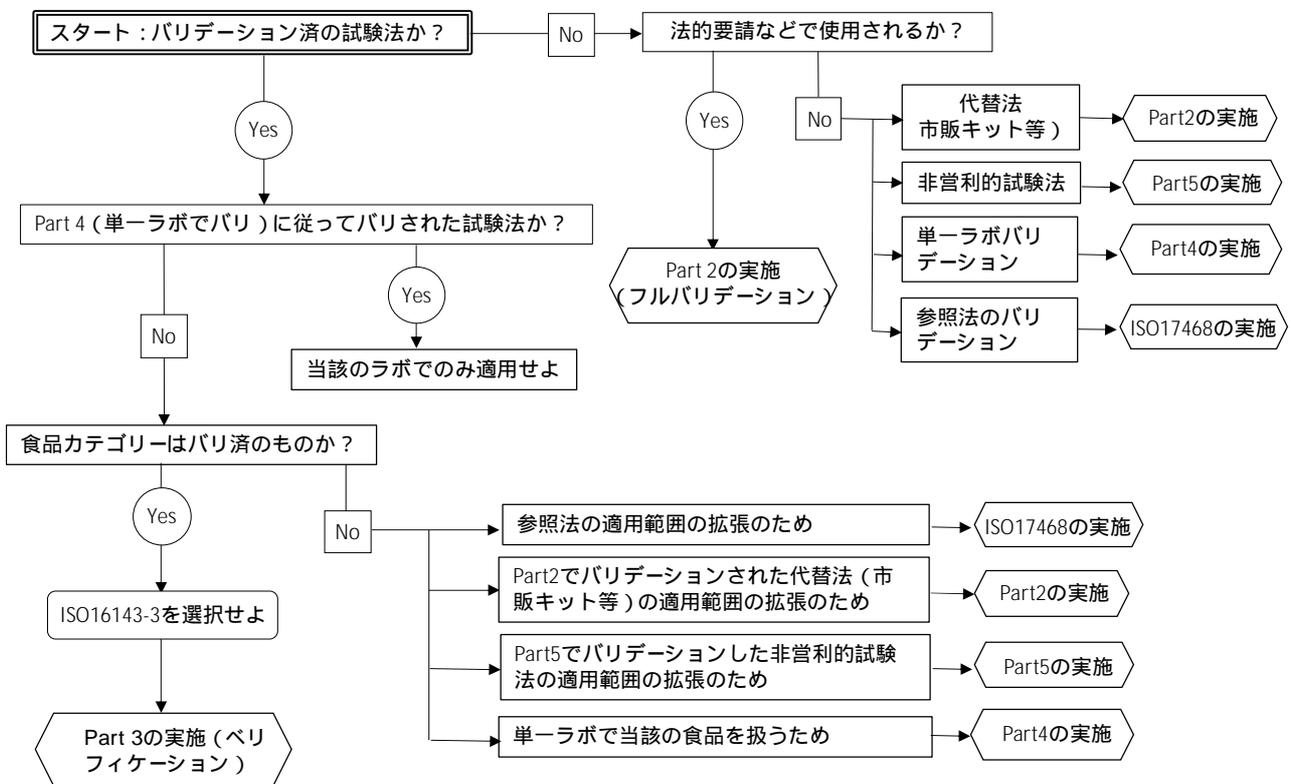


図2 . バリデーションにISO16140シリーズのどのパートを使うか？

既にバリデーションされた試験法の適用範囲を拡張したいと考える場合は多い、具体的には食品の種類が異なる場合がその例である。フルバリデーションを行ったときに用いた食品は、分類表にしたがって選択した食品マトリクスであるが、新たに適用したい食品が、その時の食品と「同等」

場合があることが理解されよう。具体的には、例えばバリデーションに際して参加すべきラボ数の違いに現れている（図3）。

ラボ数	参照法と共に実施	参照法無しで実施
1	Part 4	Part 4
定性試験：4~7 定量試験：4~9	Part 5	Part 5
定性試験：≥10 定量試験：≥8	Part 2	適用無し

図3. ISO 16140 シリーズ

### (3) 生乳受け入れ時の総菌数試験法(ブリード法)の代替染色法の評価

国内では乳等省令により生乳の微生物基準として細菌数(直接個体鏡検法)が400万/mlと規定され、同法の染色液としてはニューマン染色液が指定されている。ニューマン染色液には1,1,2,2-テトラクロロエタンが一成分として含まれるが、同物質は、平成22年に施行された「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律(化管法)」に規定する「第二種指定化学物質」の指定を受けたほか、平成26年に施行された「労働安全衛生法」では、「特定化学物質等障害予防規則の特定化学物質：第二類物質」に指定され、ニューマン染色液を取扱う際には、使用場所の制限や健康管理への対応等が厳格に求められる状況となった。そこで、ニューマン染色液に代わる染色液の開発が求められていた。

そこで、代替染色液として、ブロードハーストパーレイ染色液(BPV1)、ブロードハースト・パーレイ改良染色液(BPV2)を選定し、4機関で小規模コラボスタディが実施された。その結果について、ISO16140:2016の定量試験に規定されている、β-ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする方法で、ブリード法とBPV1法、BPV2法の各々との同等性を評価し、ブリード法とBPV2法の同等性を示した。

具体的な解析方法と結果は添付資料1に示す。

## D. 結論

ISO/TC34/SC9の年次総会に連続3回参加した。リアルタイムで多くの情報を得ることができた。第一は、バリデーションの中心文書であるISO16140の分冊化の整備作業が速い、との印象である。それだけ喫緊のトピックになっていることである。一方、我が国では、ISO16140-2のみに関して詳細に理解、それを基に、一般に公開できるガイドライン作成を目指してきた。遅々として進まなかった原因は、16140-2の中で、理解困難な部分が多々あり、そのままでは公開できる内容には出来なかったからである。

しかし、漸く、その問題を解決できる見通しがついた。すなわち、解析的に結論が出ない問題はエキスパート達の経験に基づく判断で解決する、基本は科学的厳密性を重視するものの、その結果が合理的でなければ、合理的な結論が得られるようなプロトコルを積極的に提言し、議論し、修正していく、という流れが理解できたように思われる。

荒削りのガイドラインであっても、それを公開し、実用し、そこから指摘される問題点を検討し、速やかに修正や改訂にフィードバックさせる流れを作ることが肝要であろう。そうした活動を恒常的に展開するために、海外のAOAC、AFNOR、NordVal、などに相当するシステムがあれば、との思いは強い。

## E. 健康危害情報

該当なし。

## F. 研究発表

- (1) 国内論文 0件
- (2) 海外論文 0件
- (3) 学会発表 1件

1. 松岡英明：微生物試験法の国際的バリデーションの動向。(日本防菌防黴学会46回年次大会特別講演、令和元年9月25日、大阪)

## G . 知的所有権の取得状況

該当なし。

## 生乳受入れ時の総菌数試験法（ブリード法）の代替染色法の評価

### 1. 評価法の概要

〔試験法〕

ブリード法を参照法とし、これに対する2種類の代替法、BPV1、BPV2の同等性評価

〔評価基準〕

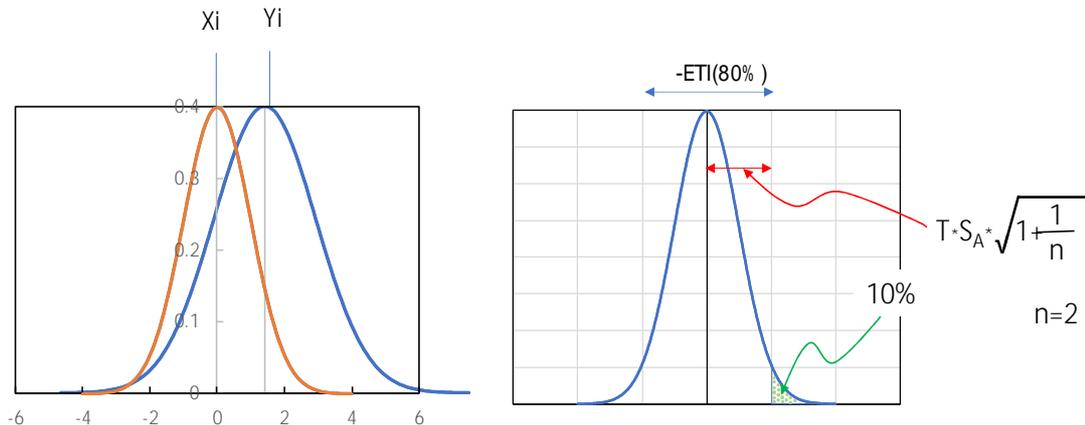
ISO 16140-2: 2016 において定量試験評価法として記載されている、 $\beta$ -ETI(80%)（図1）をバラツキの許容範囲とする方法を適用。

〔評価基準の意味〕

Sample n個で参照法での結果の平均値： $X_i$ 、代替法での結果の平均値： $Y_i$ 、代替法での結果の分散： $S_A^2$ 、のとき  $|Y_i - X_i| \pm \beta\text{-ETI}(80\%)/2$  が許容範囲内であれば、同等。

〔許容範囲〕

$\pm 0.5 \text{Log}_{10}$ （菌数）、この範囲を超える場合があっても  $\pm 4S_R$  以下なら許容。ただし  $S_R$  は参照法の標準偏差。



$$|Y_i - X_i| \pm \beta\text{-ETI}(80\%)/2 < \text{許容範囲?}$$

図1. バラツキの範囲〔 $\beta$ -ETI(80%)〕説明図

### 2. 評価結果

〔結論〕

- ・BPV1法は同等とは言えない。
- ・BPV2法は同等と言える。

〔コメント〕

- ・サンプル数が少なく（n=2、繰返し数4、ただし異なる4試験所で各1）

### 3. 解析結果

図2参照。

	繰返試験試料(Test portion)	BPV1		BPV2	
		試料(Sample) Sample 1	試料(Sample) Sample 2	試料(Sample) Sample 1	試料(Sample) Sample 2
参照法計 数値	1	582.0417	713.9063	582.0417	713.9063
	2	303.8963	780.6122	303.8963	780.6122
	3	364.455	655.2	364.455	655.2
	4	483.6298	712.6961	483.6298	712.6961
代替法計 数値	1	134.625	521.5521	494.8438	674.0625
	2	326.8716	678.8053	237.7153	835.1888
	3	171.3075	404.7225	279.1425	375.375
	4	240.5804	429.8574	329.2155	618.5198
参照法 Log10 変 換	1	2.76	2.85	2.76	2.85
	2	2.48	2.89	2.48	2.89
	3	2.56	2.82	2.56	2.82
	4	2.68	2.85	2.68	2.85
	平均値Xi	2.623	2.854	2.62	2.85
代替法 Log10 変 換	1	2.13	2.72	2.69	2.83
	2	2.51	2.83	2.38	2.92
	3	2.23	2.61	2.45	2.57
	4	2.38	2.63	2.52	2.79
	平均値Yi	2.315	2.697	2.508	2.779

	標準偏差 $S_R$	BPV1		BPV2	
		0.126	0.031	0.126	0.031
参照法	合成標準偏差 $S_R$	0.092		0.092	
	標準偏差 $S_A$	0.169	0.101	0.137	0.147
代替法	合成標準偏差 $S_A$	0.139		0.142	
	平均値の 差	$Y_i - X_i$	-0.309	-0.156	-0.115
ETI(80%)	$S_A^*(q:補正計数)=SQRT(1+1/n),n=4)$	0.155		0.159	
	$T=t$ 検定両側20%を 与える $t$ 値(自由度 $3*2=6$ )	1.440		1.440	
	$T*S_A*q$	0.224		0.229	
	$U_i=(Y_i-X_i)+T*S_A*q$	-0.085	0.067	0.114	0.154
	$L_i=(Y_i-X_i)-T*S_A*q$	-0.533	-0.380	-0.344	-0.303
拡張許容 範囲	$4S_R$	0.366			
	$-4S_R$	-0.366			

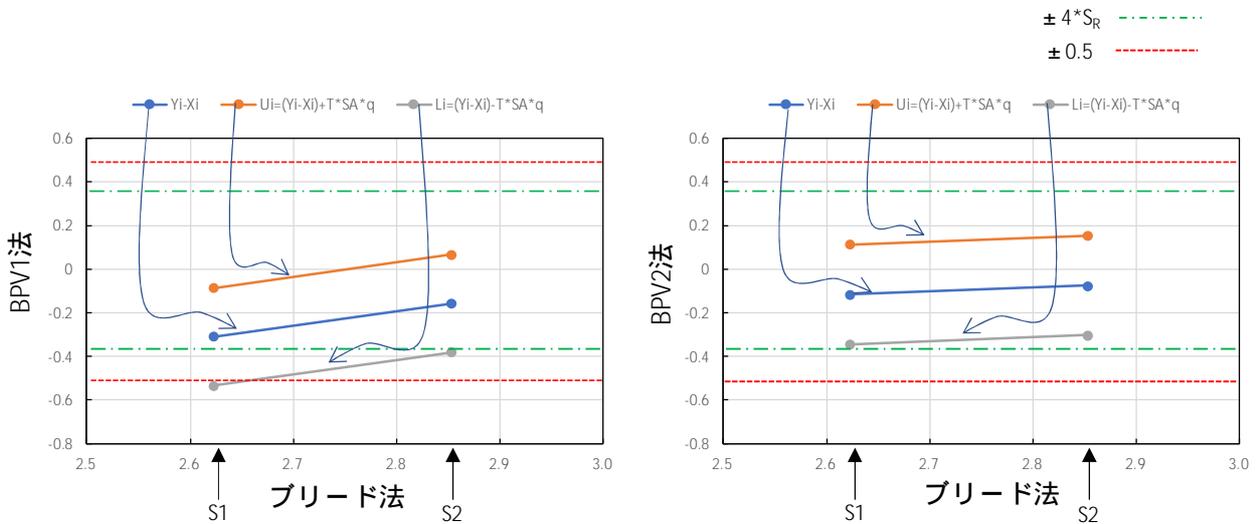


図 2.許容範囲の相関性に関する説明図 .

令和元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	国立大学法人徳島大学
研究協力者	山崎栄樹	国立大学法人帯広畜産大学
	奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学
	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
	鈴木 淳	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
	河合高生	大阪健康安全基盤研究所
	梅田 薫	大阪健康安全基盤研究所
	幸田知子	公立大学法人大阪府立大学
	小崎俊司	公立大学法人大阪府立大学

**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）”では、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。一方、感染時には公衆衛生上極めて高い健康被害をもたらすボツリヌス菌及び同毒素については、NIHSJ法としては作成がなし得ていない。本研究班では国際調和性を持つボツリヌス試験法の策定を目的として検討を行ってきた。本年度は、昨年度までに整備したボツリヌス遺伝子試験法（Technical Specification）の作業部会案（ステージ2）を基本としてバリデーション実施に向けた計画案の構築を行った。作業部会での協議を経て、対象微生物等については法規制が大きく、菌株移動や取扱い施設設備の制限も多いことから、バリデーション作業においても実行可能性を踏まえた計画案の作成が重要と判断された。すなわち、他種の病原体とは異なるスキームの構築が必要となる。検討委員会での議論を経て、ボツリヌス試験法の妥当性評価としては、Collaborative studyとSingle laboratory validationを組合せたバリデーション計画を行うスキームが妥当と考えられた。また、これに先行して対象菌に特有の基礎データを取得すべき項目を抽出した。こうしたスキーム構築は、取扱いに制約を有する病原体等に対する試験法バリデーションのモデルケースとなるものであり、国際整合性を踏まえた食品からの標準試験法構築に重要な知見を与えるものと考えられる。

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、国際調和性の高い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が策定されてきた。

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した。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法で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。

昨年度までに、本研究では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、標準試験法(Technical Specification)の原案(NHISJ-20TS-ST1)を作成・提案し、更に、コラボスタディ(Collaborative study:以下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)の整備を行ってきた。本年度は、3回の検討委員会での議論を通じて、法規制の強いボツリヌス菌の特性を勘案したコラボスタディ計画の立案とその妥当性検証方法について検討したので報告する。

## B. 研究方法および結果

NIHSJ-20-ST-ST2を基に、第69回検討委員会(2019年7月22日)、第70回検討委員会(2019年12月16日)および第71回検討委員会(2020年2月18日)にてコラボスタディ計画について審議を行った。また、検討委員会前後にCS参加予定機関より編

成されるワーキンググループ(WG)においてメール会議を実施し、各機関の設備状況等を確認し、CS開始前に準備が必要な項目について精査を行った。以上の議論により決定されたバリデーション計画および、抽出された課題事項を以下に示す。

#### 1. NIHSJ-20TS-ST2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から、CSの実施にあたり各CS参加機関の設備条件を考慮した手順書の整備が必要である。この理由から、WG会議を通して各施設の設備状況を調査し、CSで用いる手順書(NIHSJ-20TS-ST3)の原案であるNIHSJ-20TS-ST2について各施設の設備的な制約を反映した調整が行われた(参考資料)。

#### 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2段階でのバリデーション計画を提案し、検討委員会において承認された。すなわち、NIHSJ-20TS内では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)を同時に実施する事とした。その一方でそれ以外の組合せに関してはSLVによるバリデーションを実施することとなった。以上の様に、法的小および設備的な制限のある中で、これらの事情を勘案したNIHSJ-20TSのバリデーション作業計画が立案・承認された。

#### 3. CSにおける評価指標の設定

CSにおける併行精度を評価する指標の候補として表1に示す複数の国際的に通用性をもつ指標が挙げられた。本研究内で実施するCSで用いる評価指標としての適切性について、検討委員会内バリデーション作業部会に諮問を行った結果、ボツリヌス菌の取扱いの困難さや設備的な制限(設備的な制限により、一度に扱える検体数も制限される)を考慮し、Limit of Detection(LOD:検出下限)を指標としたCSが適切であるとの結論に至った。

本研究で実施するはちみつおよびA型菌を用いたCSにおいては主管機関である帯広畜産大学にてLODを決定した後に、各CS参加機関において上記のLODを再現可能かについて検証を行う(図1)。上記のような二段階のスキームを採用することにより、設備的な制限が理由で多数の検体を一度に処理することが不可能なボツリヌス菌試験法のバリデーションにおいて、時間的効率も加味した現実的なCS案の提案に至った。

#### 4. スパイク菌液作成プロトコールの整備

ボツリヌス菌を添加した食品検体を配布することは、法的規制を踏まえると、極めて実行可能性に乏しい。そのため、各 CS 参加予定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と考えられた。ボツリヌス菌については培養条件により培養液内の Vegetative form と Spore form の割合が大きく変化することが既知であり、異なる試験室でスパイク菌液を作成せざるを得ない本 CS でのスパイク菌液作成法の作成・提示にあたっては、多元的な科学的根拠に基づくことが重要との結論に至った。ボツリヌス菌の食品内動態等を考慮した検討委員会での議論の結果、スパイク菌液として精製芽胞菌液を利用することが適切であるとの結論に達し、これを受けて WG より複数の精製芽胞菌液作成プロトコールについて提案がなされた。なお、ISO/TS 17191:2013 では Annex D (informative)として芽胞菌液作成プロトコールが示されている。しかしながら、当該プロトコールにおいてはバスソニケーターの準備が必要であることや、芽胞菌液の保存に 1 の冷蔵設備が求められている事等の設備要件を含めて、国内施設での CS 実施において障害となる問題点が挙げられた。その一方で、食基発第 0630002 号・食監発第 0630004 号「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」で指定される芽胞菌液作製法については、国内施設での使用実績等の優位性から本研究で実施する CS への適用が適切であると考えられた。しかしながら、当該プロトコールにおいては使用する培養液の種類に関する指定がなく、また、本研究の昨年度までの検討の結果、芽胞形成割合が培地の組成によって大きく異なることが示されている。

そのため、培養液の選択の根拠となる実証データの取得が必要であると指摘され、現在、WG 内において培地および培養条件の妥当性について検証中である。加えて、ボ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が知られていることから、A 型菌以外を用いる SLV においては各機関において各菌株に適した芽胞液調整条件の実証データを獲得し、芽胞液調整プロトコールの整備を行うこととした。

#### 5. DNA 抽出法の妥当性確認

ISO/TS 17191:2013 に従って DNA 抽出法として CTAB 抽出法を指定している。しかしながら CTAB 抽出法は手技の煩雑さや設備要件の面で、CS 参加予定機関の中にも実施困難な施設がみられた。そのため、CS 実施に先駆けて代替となる簡易法を選定することが必要と考えられた。現在、市販キットや国立感染症研究所レファレンス委員会/地方衛生研究所全国協議会発行の病原体検出マニュアル(ボツリヌス症)に記載の方法を含め、NIHSJ-20TS での使用に係る選定のための資料作成を進めている。次年度前期には速やかに共有する予定である。

#### 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。

ボツリヌス菌については法的な規制が強 く、菌株の移動が現実的には困難な状況に ある。また、ボツリヌス菌の取扱いに求め られる施設・設備要件に起因する制約を理 由として、CS 参加機関で実施可能な解析 も限定的なものとなっている。本研究で行 う CS はこの様な制限の下に実施される解 析であるため、取扱いが容易な他種の病原 体に対して行われる解析とは異なったスキ ーム構築が必要となった。本研究で実施す るスキーム構築は、取扱いが制約的な病原 体を用いた CS のモデルケースになりうる ものと考えている。そのため、NHISJ-20TS については最終的に試験法自体の公開に加 え、試験法のバリデーション手法について も公開可能なものとなるように取りまとめ たい。本研究により得られるこれらの成果 は、食品の衛生試験法の国際調和を図る上 で重要なモデルになるものと考ええる。

#### E. 結論

- 1) NHISJ-20TS-ST2 について CS 参加予定機 関間での議論を行い、実行可能性を踏まえ、 試験法原案へ修正案を反映させた。
- 2) ボツリヌス菌に対する法的な制限を顧 慮した NHISJ-20TS に対するバリデーショ ン作業計画を構築した。
- 3) CS 実施に先立ち、検証が必要な基礎デ ータの抽出を行った。

#### F. 研究発表

論文発表

1. Yahiro K, Ogura K, Terasaki Y, Satoh M, Miyagi S, Terasaki M, Yamasaki E, Moss J.: Cholix toxin, an eukaryotic elongation factor 2 ADP-ribosyltransferase, interacts with Prohibitins and induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in human hepatocytes. *Cell Microbiol.*, 2019, 21:e13033.

学会発表

1. 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、宮城 聡、山崎栄樹. ヒト肝臓細胞における新 規 Cholix 結合膜蛋白質の同定と細胞 致死機構の解明. 第 93 回日本細菌学会, 名古屋市 (2020.3)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 バリデーションに利用される評価指標例

指標	定義*
Probability of detection (POD)	Proportion of positive analytical outcomes for a qualitative method for a given matrix at a given analyte level or concentration.
Level of detection (LOD <sub>x</sub> )	Measured analyte concentration, obtained by a given measurement procedure, for which the probability of detection is x. EXAMPLE: LOD <sub>90</sub> is the level of detection for which 90 % of test give a positive result.
Limit of detection	The lowest quantity of an analyte that can be distinguished from the absence of that analyte with a stated confidence level.

\*ISO 16140-1:2016 Microbiology of the food chain - Method Validation- の定義に従った

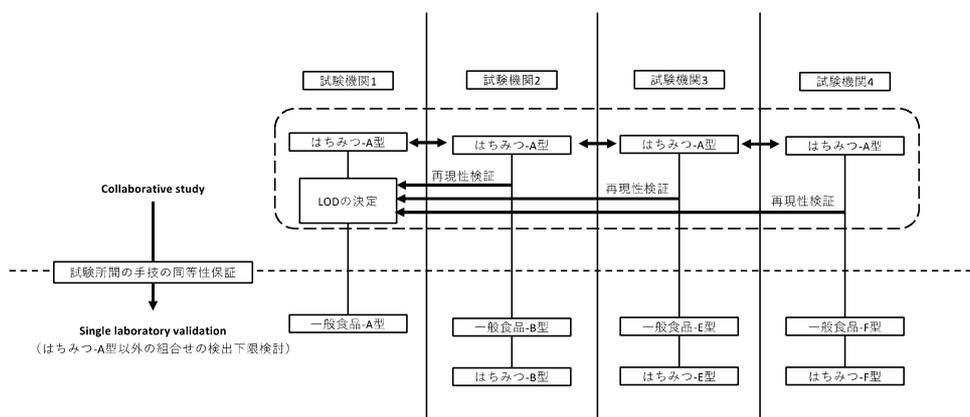


図1 ボツリヌス菌取扱いに要求される設備条件の特殊性や菌株移動の困難さを考慮したNIHSJ-20TSのバリデーション実施計画

令和元年厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品微生物試験法の国際調和に関する研究

分担研究報告書

遺伝子検査法に関する研究

研究分担者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部 室長

## 研究要旨

わが国の食品衛生法では食品（種）ごとに種々の微生物に対する規格基準が規定されており、それに対応する個別の試験法が定められている。試験法は培養法をベースに構築されている。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も対象菌の生化学的および/もしくは血清学的特性を利用している。近年、遺伝子検査法の発展により、また微生物の性状の多様化により、遺伝子検査法を微生物試験法に取り入れる動きがある。こうした状況をふまえ、本研究では食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、その活用にあたってのガイドラインの検討を目的として検討を行ってきた。本年度は、PCR 法に関する一般的要求事項について情報を整理し、作業部会での意見集約を経て、技術文書を作成した。今後、PCR 法を含む食品微生物試験法を実施する際に本ガイドラインを参照することで、対象とする微生物試験法の精度管理向上に資することが期待される。

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

国際的な標準試験法として扱われている欧州 International Organization for Standardization (ISO) の食品微生物試験法の中で、遺伝子検査法、とくに PCR 法に関する一般事項について記載した文書 ISO22174、ISO20837、ISO20838 を

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

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

### C. 研究結果および考察

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

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

了させた。

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

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

#### D. 結論

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

#### E. 研究発表

##### 1) 論文発表

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

防衛生. 3(2): 75-80. 2019.

##### 2) 学会発表

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

#### F. 知的所有権取得状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案  
なし
- 3 その他  
なし

表 1 . PCR 法の一般事項に関して記載のある ISO 文書

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



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表



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	カンピロバクター感染症の疫学、病原性および診断治療.	感染制御と予防衛生	3	87-93	2019
泉谷秀昌	腸管出血性大腸菌～分子疫学解析を利用した病原体サーベイランス	感染制御と予防衛生	3	75-80	2019

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
鎌田洋一、藤田和弘、福沢栄太、佐藤信彦、佐野勇氣、橘田規、高橋洋武、大城直樹、岡田由美子、五十君静信、白藤由紀子、山崎朗子、梶田弘子、上田成子、志賀俊人.	LC-MS/MSによる米飯およびチャーハン中のセレウス菌嘔吐毒 セレウリド試験法	日本防菌防黴学会誌	48	49-56	2020
泉谷秀昌	広域散発事例探知に向けた取り組み	日本食品微生物学会雑誌	36	10-12	2019
Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M.	Effective surveillance using multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole-genome sequencing for enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157.	Appl Environ Microbiol.	85	e00728-19	2019
Yahiro K, Ogura K, Terasaki Y, Satoh M, Miyagi S, Terasaki M, Yamasaki E, Moss J.	Cholix toxin, an eukaryotic elongation factor 2 ADP-ribosyltransferase, interacts with Prohibitins and induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in human hepatocytes.	Cell Microbiol	21	e13033	2019



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

次の職員の令和元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)

(※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: )

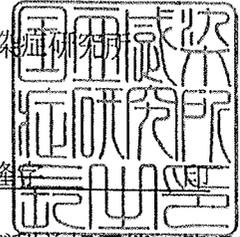
(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

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



次の職員の令和元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。

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



次の職員の令和元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

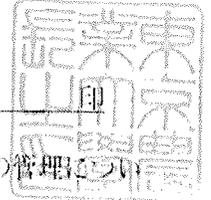
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はそ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

所属研究機関長 職名 学長

氏名 高野 克己



次の職員の令和元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) 応用生物科学部農芸化学科・教授

(氏名・フリガナ) 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。

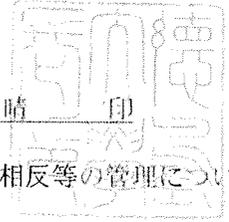
令和2年 3月13日

厚生労働大臣 殿

機関名 徳島大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 野地 澄晴 印



次の職員の令和元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) 研究支援・産官学連携センター・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: )
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。

厚生労働大臣 殿

令和 2 年 3 月 5 日

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



次の職員の令和元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 (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。