

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のための研究

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝倉 宏

令和3年(2021)3月

食品微生物試験法の国際調和のための研究

研究代表者 朝倉 宏

令和3(2021)年 3月

目次

I. 総括研究報告

食品微生物試験法の国際調和のための研究

朝倉 宏

----- 3

II. 分担研究報告

1. 衛生指標菌に関する研究

標準試験法の作成・改訂，並びにこれらのガイドライン策定に向けた研究

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及び妥当性評価に関する研究

松岡英明，五十君静信 他

----- 27

3. ボツリヌス試験法に関する研究

倉園久生 他

----- 31

4. 遺伝子検査法に関する研究

泉谷秀昌

----- 43

5. ウイルス試験法に関する研究

上間 匡 他

----- 47

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 55

令和2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 徳島大学
泉谷 秀昌 国立感染症研究所
上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者（*は検討委員会委員）

内田 和之 ビオメリュージャパン株式会社
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
川瀬 遵 島根県保健環境科学研究所
楠原 一 三重県保健環境研究所
工藤由起子* 国立医薬品食品衛生研究所
幸田 知子 公立大学法人
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
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
廣田 雅光* 一般財団法人日本食品検査
三浦 尚之 国立保健医療科学院
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所
守山 隆敏 スリーエムジャパン株式会社
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
諸藤 圭 一般財団法人日本食品分析センター
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
吉田 朋高 一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC

（敬称略、五十音順）

I. 総括研究報告

令和 2 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のための研究

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、本研究は国際的な微生物試験法に精通した専門家から構成される「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の活動を通じ、国際調和が取れた微生物試験法を確立し、食品の微生物規格基準等に関わる試験法の整備を行うことを目的として、食品微生物試験法の国際調和に向け、(1) 衛生指標菌試験法等に関する研究、(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) 遺伝子検査法の導入に関する研究、(5) ウイルス試験法に関する研究の項目に係る知見の収集にあたった。

(1) 衛生指標菌試験法等に関する研究では、腸内細菌科菌群及びリステリア・モノサイトゲネス試験法を精査し、より整合性のとれた体系とするための改訂案を作成し、検討委員会での審議を経て、最終版としての承諾を得た。これら 4 試験法は、試験法改訂に係る令和 3 年 3 月 30 日付の通知を発出する際の根拠として活用された。また、カンピロバクター定量試験法 (NIHSJ-35) について PCR による確認試験の妥当性評価を行い、検討委員会での審議を経て、共同試験へと進むことが了承された。更に、標準試験法の作成及び改訂のガイドライン案を検討委員会に議題として挙げ、NIHSJ 文書として検討することとなった。(2) 国際動向及び妥当性確認に関する研究では、2020 年 6 月にオンライン開催された ISO/TC34/ SC9 総会及び第 25 回第 3 作業部会 (妥当性確認) に参加し、情報収集及び意見交換を行った。国際調和の観点から、クローズアップされた課題の筆頭は食品マトリクスの分類であった。例え参照法であっても、妥当性確認の際に使用した食品と異なる食品に適用する場合は、「妥当性確認はまだなされていない」試験法となることから、本研究によってクローズアップされた喫緊の課題である。(3) ボツリヌス試験法に関する研究では、共同試験開始前に検討が必要な事項として、共同試験参加機関が食品への芽胞添加を行えるよう、芽胞調整プロトコールを作成すると共に、簡易 DNA 抽出法の妥当性確認等を行った。検討委員会での審議を経て、共同試験の開始が承認された。(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究では、食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、国内で、国際整合性に適合した遺伝子検査法を導入するためのガイドラインの検討を目的として、本年度は遺伝子検査法作業部会を設置し、リアルタイム PCR を含めた遺伝子検査法の情報収集、並びにリアルタイム PCR 法の策定に関する ISO 文書の策定状況並びにその内容を確認した。(5) ウイルス試験法に関する研究では、欧米で現在用いられるウイルス標準試験法を確認し、国内試験法との比較を通じ、国際調和に向けて検討が必要と思われる事項の抽出を図った。特に、国内試験法では食品表面拭取り検体に対する試験法が十分に整備されていない実態を把握した。今後、抽出された課題について、検討を進めるべきと思われる。

研究分担者（検討委員会委員兼務）

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

研究協力者（*は検討委員会委員）

内田 和之	ビオメリュージャパン株式会社
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
川瀬 遵	島根県保健環境科学研究所
楠原 一	三重県保健環境研究所
工藤由起子*	国立医薬品食品衛生研究所
幸田 知子	公立大学法人
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ィ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
土屋 禎*	日本食品分析センター
廣田 雅光*	日本食品検査
三浦 尚之	国立保健医療科学院
百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所
守山 隆敏	スリーエムジャパン株式会社
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
諸藤 圭	日本食品分析センター
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
吉田 朋高	食品分析開発センターSUNATEC

（敬称略、五十音順）

A. 研究目的

本研究では国際的な微生物試験法に精通した専門家から構成される「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の活動を通じ、国際調和が取れた微生物試験法を確立し、特に食品の微生物規格基準等に関わる試験法の整備を行うことを目的として検討を行った。

上記委員会で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。主要病原微生物の試験法は一定の成果を挙げたが、微生物試験法の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。国際標準と認知される微生物試験法は国際標準化機構（ISO）TC34/SC9で作成されており、日本からは発言権を有するPメンバー（委員長：研究分担者五十君教授）として、国際調和に向けた微生物試験法に関する活動を始めているほか、研究分担者松岡名誉教授は微生物試験法の妥当性評価ガイドライン（ISO 16140）WGで意見を発信し、改訂作業への参画も求められている。

昨今の食品の輸出入拡大情勢は、国内の食品微生物試験法に関わる国際整合性の確保と情報発信が急務の課題であることを物語っている。本研究では、上記委員会を通じISO法を中心とする国際標準的な微生物試験法を参照法としつつ、国内の規格基準に関わる試験法の整備を進めると共に、我が国独自に作成した微生物試験法の英文化を進め、発信することで国内外の互換的整合を図ろうとする特色がある。特に、国内の微生物規格基準では大腸菌群等の衛生指標菌が食品別に多様な条件で設定されており、欧米等とは明確な差異が認められる試験項目である。こうした衛生指標菌の定義及び分類を試験法の観点から整理し、もって国内の微生物規格基準に関わる試験法を国際調和のために構築しようとするところに本研究の独創性がある。更に、これ迄上記委員会では細菌及び同毒素試験の検討が主体ではあったが、食品安全領域ではノロウイルスのほか、近年の海外ではA型・E型肝炎ウイルスによる食品汚染の報告数も増加傾向にあるため、食品有害ウイルス試験法の情報収集と整備も今後、規格基準等を検討する際にはより重要な位置づけにあ

ると思われる。そのため本研究ではウイルス試験法のアップデートや新規作成等に関わる分担項目を新たに設定した。

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

食品中の微生物を検出するための試験法は、その目的に応じて幾つかに分類される。対象食品に規格基準が設定されている場合、その基準適合性の判断には、国により定められた公定法を用いる必要がある。また、微生物規格が設定されていない微生物についても、参照すべき標準試験法が定められているものがある。また、今日では、世界貿易機関 (WTO) 加盟国において、科学的な正当性を示すことなく海外で広く用いられている規格基準や試験法と異なる国内規格や試験法を用いることは、非関税障壁とみなされ、提訴される可能性がある。逆に、諸外国で用いられている試験法よりも感度の低い試験法を用いている場合は、海外で流通できない汚染レベルの食品が国内に輸入されるリスクも考えられる。我が国は多くの食品を海外からの輸入に頼っており、食品の規格基準及びその試験法における国際ハーモナイゼーションは極めて重要といえる。そこで平成 17 年に、日本国内における食品からの微生物試験法の今後の方向性を議論し、標準試験法を作成するため、約 20 名の専門家から構成される「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) が結成された。検討委員会においては、試験法についての議論を公開の場で行い、表 1 に示す 4 ステージを経て試験法を作成してきた。一方、国際標準化機構 (International Organization of Standardization: 以下 ISO) が定める国際的な標準試験法 (以下 ISO 法) において、2017 年に第 34 技術分科会中の第 9 分科会より、「妥当性評価されていない参照法について標準試験法と比較検討を行って作成する際、及び作成した参照試験法の改訂を行う際のガイドライン」として ISO 17468 が発行された。

本研究では、こうした背景を踏まえつつ、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の運営にあた

り、昨年度 ST4 として策定した、腸内細菌科菌群試験法 (NIHSJ-15, -16)、並びにリステリア・モノサイトゲネス試験法 (NIHSJ-08, -09) について、定量法と定性法間で文章表現上に整合が取れていない点を鑑み、これらの整理を行うこととした、また、定量的リスク評価が国際的に求められる中、食鳥肉等を主な適用範囲とするカンピロバクター定量試験法について、検討を進めた。

更に本研究では、ISO 17468 を詳細に確認し、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において実施している作成方針・手順との比較を行うことで、更なる国際調和に向けた微生物試験法の作成にあたることを目的として検討を進めたので報告する。

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

我が国の食品微生物試験法を国際調和させることは、国際流通の中で、我が国における食品の安全を確保するために不可欠である。しかし試験法の具体的要件は複雑で、必ずしも科学的に結論が出せるものばかりではない。しかも運用しながらも、常に問題提起がなされ、修正や改訂に向けた議論が続けられている。こうした国際的議論の動向をリアルタイムで理解し、結論が出るよりも早い段階で、我が国としての意見を提示することは極めて重要である。そこで、食品微生物試験法に関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、また、SC9 内のワーキンググループ WG2 「妥当性確認」のエキスパートとして WG2 会議に参加して、アップデートの情報を収集し、成果を挙げてきた。本研究では、これらの調査活動を通じ、国際動向の情報を集約し、国内の食品微生物試験法の開発、実施、結果の評価等に反映させることを目的とした。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

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。先行研究において我々は、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、検討委員会が示す試験法作成方針に従い、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、更に、コラボスタディ（Collaborative study:CS）の実施にむけてNIHSJ-20TS-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。本研究ではコラボスタディを通してNIHSJ-20TSの妥当性・実効性の検証を行い、検討委員会での確認・承認の後にNIHSJ法として広く公開することを最終目的として、本年度は、検討委員会から提言されたコラボスタディ開始前に検討が必要な事項について解析し、検討委員会への提示および議論の後にコラボ実施ステージ（ステージ3）への移行について承認を得ることを目的とした。

（４）遺伝子検査法に関する研究

食品の微生物規格基準等に係る試験法は培養法をベースに構築されてきた。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たものである。近年のゲノム解析技術の発展は著しく、サルモネラでは約30万、大腸菌では15万株以上のゲノム情報が蓄積されている。ゲノム情報は、遺伝子検査法の発展にも影響し、研究ベースでは多様な遺伝子検査法が報告されている。

微生物規格基準等に係る試験法でも遺伝子検査法を取り入れる動きがある。国際的な標準試験法を策定する国際標準化機構（International Organization for Standardization、ISO）でも志賀毒素産生性大腸菌をはじめとした個別の微生物試験法において遺伝子検査法が取り入れられている。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、国内において、国際整合性に適合した遺伝子検査法を導入するためのガイドラインの検討を目的とした。

（５）ウイルス試験法に関する研究

ノロウイルスやA型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスは、世界的に食品媒介性病原ウイルスとして認識されている。中でもノロウイルスは、国内で毎年発生する食中毒患者の約半数の原因物質として報告されている。これらのウイルスに汚染された食品の喫食は健康被害に繋がるおそれがあるため、汚染食品の流通段階での制御は、健康被害低減に直結する対策の一つと想定される。すなわち、生産段階のみならず、食品の製造加工、更には流通段階におけるウイルス汚染実態の把握は、食品の安全性確保向上に向けて必要な課題と考えられる。

多くの食品媒介性ウイルスは、現時点では実験室内での実用的な培養法が確立されていないため、食品からのウイルス検出にはリアルタイムPCR法が採用される場合が多い。国内では、食品に対するノロウイルス検出法は平成19年に最終改定され、厚生労働省から示される「ノロウイルスの検出法」および「食品衛生検査指針微生物編2018」にて示されているが、これらは基本的に食中毒対応のために示されているものであり、流通食品を対象としたウイ

ルス試験法は十分には整備されていない状況と思われた。更に、国内試験法については最終改訂から10年以上が経過していることを踏まえ、本研究では、欧米における現行のウイルス標準試験法に関する動向を収集・整理した上で、国際調和に向けて、国内試験法で今後検討すべきと思われる事項の抽出を図ったので報告する。

B. 研究方法

(1) 衛生指標菌に関する研究

1) 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の小規模改訂

腸内細菌科菌群試験法（定性試験法 NIHSJ-15、定量試験法 NIHSJ-16）及びリステリア・モノサイトゲネス試験法（定性試験法 NIHSJ-08、定量試験法 NIHSJ-09）について、定性・定量試験法間で表現等の比較確認を行い、検討委員会に小規模な修正案として提示した。

2) カンピロバクター定量試験法

カンピロバクター定量試験法（NIHSJ-35-ST2）について検討を進めるため、本年度は確認試験に用いるとした PCR 法の評価を行った。包含性試験には計 96 株の *C. jejuni* 及び *C. coli* 株を、排他性試験には *C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. hyointestinalis*、*C. fetus*、*E. coli*、*Salmonella* spp.、*Arcobacter butzleri*、*Helicobacter pylori*、*Aeromonas* spp.、*Enterobacter* spp.、*Shigella* spp.、*Vibrio cholera*、*V. parahemolyticus* を含む計 99 株を用いた。

また、コラボスタディ計画案の作成にあたっては、カンピロバクター作業部会をオンラインで開催し、検討項目や検討時期等の案を作成した。

3) ISO 17468:2017 の確認を通じた標準試験法作成方針案の作成

ISO 17468:2017 文書の内容を確認、精査しつつ、バリデーション作業部会が作成した ISO 16140-1:2016 に基づく用語集との整合性を確認し、標準試験法作成方針の原案（初版）を作成した。その後、第 42 回バリデーション作業部会で作業部会案として改訂を行い、第 73 回検討委員

会に議題として提出し、議論を行った。

(2) 食品微生物試験法の国際動向および妥当性確認に関する研究

本年度の ISO TC34/SC9 の総会は、当初、2021 年 1 月初旬にシドニー（オーストラリア）で実施される予定であった。しかし、コロナ禍のために、ウェブ会議となり 6/3-6/5 に開催され、これに出席した。WG3 会議は、本年度は第 25 回 WG3 ウェブ会議が 2020/10/15-10/16 に開催され、これに出席した。これらの会議への参加による海外エキスパートとの意見交換、SC9 および SC9/WG3 の各事務局から随時送信されてくる文書情報の分析、国内委員会での議論などにより、妥当性確認に関する国際動向をまとめた。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

1) 芽胞液作製プロトコールの整備

1-1) 芽胞形成に要する培養時間に関する検討

： *C. botulinum* 62A 株をクックドミート培地に接種し、37°C・24 時間で嫌気培養した増菌液 1 mL を TP 培地、0.1%チオグリコール酸ナトリウム加 TP 培地、可溶性デンプン加変法クックドミート培地の各 9 mL に接種し、37°C で 24 時間、48 時間及び 72 時間、嫌気培養を行った。得られた菌液は 80°C・20 分間の加熱処理後、卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養を行い、発育集落数を求めた（芽胞数）。平行して、培養後の菌液を加熱処理を経ずに卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養後に発育した集落数を求め（芽胞+栄養型菌の総数）、両者の比から芽胞形成率を算定した。

1-2) 継代培養回数に関する検討： *C. botulinum* 62A 株をクックドミート培地に接種し嫌気培養を行い、増菌液 1 mL を TP 培地 9 mL に接種して、更に 72 時間の嫌気培養を行った。得られた菌液 1 mL を新鮮な TP 培地 9 mL に再び接種し、80°C・20 分間の加熱処理を経て、72 時間の嫌気培養に供した。同操作を更に 3 回繰り返しそれぞれの培養回について培養開始後 24、48 及び 72 時間後の芽胞形成率を上項と同様の方

法で評価した。

2) NIHSJ-20TS-ST2の検出効率に関する検討

芽胞調整プロトコールに従って作製した芽胞液を10倍階段希釈後、はちみつ試料に添加し、同試料からのボツリヌス毒素遺伝子検出をNIHSJ-20TS-ST2に従って解析した。PCR反応産物の検出はアガロースゲル電気泳動法により行った。LOD₅₀の算出はISO16140-2に記載の方法に従い添加菌量を25gはちみつ試料あたりの菌数として求めた。

3) 簡易DNA抽出キットの妥当性検証

C. botulinum 62A株または*C. botulinum* Okra株をTPGY培地に接種後、24時間嫌気培養を行い、得られた増菌液の階段希釈液について、NIHSJ-20TS-ST2に記載されるCTAB法のほか、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 並びにFoodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics)を用いてDNA抽出を行った。CTAB法では段階希釈液1 mLを、DNeasy Blood & Tissue Kitでは0.1mL、Foodproof StarPrep Two Kitでは0.08 mLをDNA抽出用試料とした。抽出効率の評価は、NIHSJ-20TS-ST2で示されるPCR法へDNA抽出液を適用することに拠った。

(4) 遺伝子検査法に関する研究

国際整合性の観点から、国際標準試験法として扱われている 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 (PCR 法、リアルタイム PCR 法、定量 PCR (quantitative PCR、qPCR) 法に関する文書を検索し、その情報をまとめた。

上記文書のうち、qPCR 法に係る試験法作成に係る要求事項を記載した ISO20395 について、内容を検討した。また、昨年度までに ISO22174、ISO20837、ISO20838 をベースに作成したガイドライン案 NIHSJ-34TS を修正した。

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」を中心に行い、その内容を「バリデーション作業部会」及び「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に諮った。

(5) ウイルス試験法に関する研究

1) ウイルス標準試験法に関する情報収集及び国内外比較

国内のウイルス試験法としては、厚生労働省より発出された、「ノロウイルスの検出法 (平成 19 年)」、「A 型肝炎ウイルスの検出法 (平成 21 年)」、及びこれらを収載している「食品衛生検査指針微生物編 2018」を参考とした。欧米のウイルス試験法については、欧州 ISO/TC34/SC9 及び米国 FDA で作成された ISO15216-1:2017 及び FDA Foods program、BAM26B を参照し、試験法間で差異の見られる事項の抽出を図った。

2) 試験法に関わる文献調査

国内で実施されている二枚貝のノロウイルス試験法を含めて、近年報告された学術文献のうち、試験法に関わるものを検索し、考察に用いた。

C. 研究成果

(1) 衛生指標菌等に関する研究

1) 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の改訂 (2020)

腸内細菌科菌群試験法 (NIHSJ-15, 16) 及びリステリア・モノサイトゲネス試験法 (NIHSJ-08, 09) は共に定性試験法と定量試験法の両者を含んでいる。これらは個別に検討・確認がなされてきたことから、文言の表現方法や体裁は必ずしも一致しない点が複数確認された。特に、リステリア・モノサイトゲネス試験法については、現行の通知法に定性・定量法が共に採用されているが、通知法の表現についても整合が取れていない箇所が複数見受けられる状況であった。標準試験法の記載の在り方については、昨年度の検討委員会で提案が出された事を受け、本年度はその整合性確保に向けて、文書としての整理を行い、第 73 回検討委員会で確認がなされ承認された。その後令和 3 年 3 月に検討委員会ホームページ上にこれらの試験法改訂版を公開した。また、並行して厚生労働省食品基準審査課に情報提供を行い、通知法として採用されているこれらの試験法の改

訂通知を出す際の参考資料として活用された。

2) カンピロバクター定量試験法における確認試験としての PCR 法の評価

カンピロバクター定量試験法 (NIHSJ-35-ST2) については、これまでコラボスタディに向けて、適用範囲、コラボスタディで用いる食品マトリックス、希釈倍率、塗抹液量、選択培地等の要素について比較検討を行ってきた。本年度は確認試験に用いる PCR 法を評価することとした。

PCR 法の評価にあたって、*C. jejuni* 及び *C. coli* 計 96 株を対象としたところ、全ての菌株が陽性反応を示した。これに対して、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. hyointestinalis*、*C. fetus*、*E. coli*、*Salmonella* spp.、*Arcobacter butzleri*、*Helicobacter pylori*、*Aeromonas* spp.、*Enterobacter* spp.、*Shigella* spp.、*Vibrio cholera*、*V. parahemolyticus* を含む計 99 株を対象とした試験では陽性反応は認められなかった。以上の結果より、NIHSJ-35-ST2 で記載する PCR 法については十分な包含性・排他性を有することが確認された。

次にコラボスタディを行うための計画案を作業部会で作成した。本試験法は定量試験であることを踏まえ、低濃度、中濃度、高濃度の接種検体を調整することとし、少なくとも 8 箇所以上の試験所に群毎に同時配布することとした。

上記の成績を第 73 回検討委員会に議題として挙げ、議論を行ったところ、予備的に追加検討すべき事項はあるが、コラボスタディへ進めることについては支障がないと判断され、次回以降は NIHSJ-35-ST3 として検討を進めることが承認された。

3) ISO 17468:2017 の確認を通じた、標準試験法作成方針案の作成

ISO 17468:2017 において、新しい参照試験法の妥当性確認は、①試験法の選定、②試験法の評価、③多試験所による共同試験、④更なる妥当性確認のための試験法選定、⑤コラボラティブスタディー、の 5 段階に分けて行われることが示されていた。参照試験法の改訂については、用いる試験技

術の変更、培地組成、培養時間及び温度等の変更については大規模な変更と見做される一方、文章の表現上の変更等については小規模な変更と定義されていた。なお、大規模な変更の場合は、その裏付けとなるデータの評価が必須とされる一方、小規模な変更については背景説明や議論を経て決議されることも可能な状況であることが示され、特に本年度行った計 4 試験法の改訂は後者に位置づけられる内容で、その取扱いについても ISO で示される流れと同等のものであることが確認された。

(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

1) ISO 16140 シリーズの開発動向

妥当性確認に関する中心文書 ISO 16140 は、当初 1 冊 (現在の Part 2 に相当) であったが、現在、以下の 6 分冊となっている。

Part 1: Vocabulary 用語 (既刊)

Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method 「参照法に対する代替法 (営利的) のバリデーション」

- ・2016 版既刊。
- ・コメント随時受付、WG3 で議論し、その結果は修正版に反映される。現時点では、25th WG3 ウェブ会議での議論に基づいてまとめられた修正版 1 (Amd1) (ISO 文書としては CD の段階) に対して、改めて 2021/4/15 締切でコメントを受け、その内容に関する議論が 26th WG3 ウェブ会議 (2021/4/27-4/29) で行われた。
- ・背景として、必ずしも参照法が絶対ではない、優れた代替法の積極的採用すべき、との考えに基づき確定法で再確認。
- ・しかし、この結果に基づく感受性試験 Sensitivity の式は、まだ混乱している。

Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory 「参照法およびバリデーショ

ン済の代替法の単一ラボでのベリフィケーション」

- ・2021.1 出版済。
- ・議論の焦点の一つが、バリデーションされていない試験法（食品マトリクスの違い）の場合のベリフィケーションはどのように扱うかが不透明であった。
- ・Annex F 内容を分析するため邦訳済

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」

- ・2020 既刊。

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でのバリデーション」

- ・2020 既刊。

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（営利的）のバリデーション」

- ・2019 既刊。

関連規格としては以下のものが策定されていた。

ISO 17468:2016: Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method「食物連鎖の微生物学-標準化された参照方法の確立または改訂に関する技術的要件とガイダンス」

2) ISO 16140-2 の解説文書の準備

当初、ガイドラインとしてまとめることを目指して文書化を進めていたが、公的文書化には至っていなかった。しかし、Part 2 の内容は引き続き分析し改訂作業を続けてきた。SC9 参加後は、速やかな情報入手により改訂作業が加速した。現在、WG3

情報をリアルタイムで得ながら、随時更新しているので、柔軟に改訂できる解説書としての文書化を検討している。

3) ISO 16140-3 の文書化

参照法を導入しようとする試験所では、最初に、その試験法が使えることを検証しなければならない。それがベリフィケーションである。実用的には、そのニーズは大きいので、この Part 3 の文書化（日本語）を計画し、そのため和訳を開始した。これらから、Part 3 の内容が概観できる。

なお、Annex F については上述のように、既に和訳済である。また、今後、集中議論が必要な食品マトリクス分類表についても和訳した。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

1) スパイク用芽胞液作製プロトコールの整備

先行研究では食基発第0630002号・食基発第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」に記載の方法に基づく芽胞液作製を行うことについて承認を得ている。しかしながら、同法では芽胞産生用培地の組成が示されていない。そこで本研究では3種類の培地を使用した際の芽胞産生性を比較し、安定的な芽胞産生が可能な培地の選択および芽胞液調整プロトコールの作成を行った。芽胞形成に要する培養時間に関する検討を行った結果、全ての培地において24時間の培養時間では芽胞形成が確認されず、培養開始後48時間以降で安定的な芽胞形成が確認された。また、3種類の培地における芽胞形成数および芽胞形成率を比較した結果、TP培地で最も高くかつ安定的な芽胞形成率を認めた。更に、継代培養回数に関する検討を目的として上記の試験において最も良い芽胞形成が確認されたTP培地を用いて芽胞形成に与える培養の繰り返し回数の影響について検討した結果、培養の繰り返しによる芽胞形成の速度および芽胞数に大きな変化は観察されなかった。

2) NIHSJ-20TS-ST2の検出効率に関する検討

第71回検討委員会では、コラボスタディの評価基準としてLOD₅₀による評価が妥当との提案を受けて

いた。そこで、NIHSJ-20TS-ST2を使用して解析を行った際のLOD₅₀を試算した。全ての試行において、培養開始から24時間後のPCRよりも90時間後のPCR（以下、2nd PCR）でより高い検出感度を示すことが確認された。2nd PCRでは、上清または沈殿のいずれかが陽性となった試料を総合判定陽性と判定した場合、25gはちみつ試料あたりの添加芽胞数がlog₁₀CFU = 0.9以上の場合には全て陽性を示し、log₁₀CFU = -0.1では3回のうち1回が陽性となった。log₁₀CFU = -1.1では、3回の試行のうち2回が陽性となった。また、log₁₀CFU = -11.1では全てが陰性となった。これらの結果よりLOD₅₀を試算した結果、LOD₅₀ = -0.34 log₁₀CFU/25gはちみつ試料（95%信頼区間の上限値 = 0.26, 下限値 = -0.92）となり、NIHSJ-20TS-ST2は十分な検出感度を有すると判断された。

3) 簡易DNA抽出キットの妥当性検証

NIHSJ-20TS-ST2で示されるDNA抽出法は、ISO法と同様にCTAB法を採用している。しかしながら、CTAB法は手技が煩雑であり、クロロホルムの使用等、取扱制限の多いボツリヌス菌を用いた試験法のコラボスタディ実施にあたっては、必ずしも最適とは言いがたいことが作業部会で議論された。第71回検討委員会では、これらの点を提起し、コラボスタディにDNA抽出キットを用いることが承認された。これを受け、作業部会では計2類の異なる仕様から成るDNA抽出キットを選定した上で、それらの妥当性を判断するために、検出感度に関する検討を行った。DNeasy Blood & Tissue KitはProteinase Kを用いたタンパク分解後にスピンカラムを用いてDNAを抽出精製する方法である。一方、Foodproof StarPrep Two Kitは物理的に菌体を粉碎後、遠心分離によりDNAを抽出する方法となっている。*C. botulinum* 62A株またはOkra株の培養液を試料としてCTAB法と2種類のキットのDNA抽出効率を比較した結果、両キットともCTAB法に比較して、62A株では10,000倍以上、Okra株では約1,000倍以上の高い抽出効率を認めた。また、2種類のキットのプロトコールを確認したところ、Foodproof StarPrep Two Kitの方が手技的に

簡潔であるほか、物理的破碎を密閉環境で行えるため、安全性確保の点からもより有用性が高いとの意見が出た。また、後者については、MicroValの認証を受けていることも確認された。以上の点を踏まえ、コラボスタディではFoodproof StarPrep Two Kitの使用が妥当と判断された。

(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

昨年度までに作成した「食品からの病原体検出におけるPCR試験法実施に関するガイドライン」NIHSJ-34TSについて、参考文献等の軽微な修正を施し、本委員会において了承された。

現在ISO文書としてPCR及びリアルタイムPCR/qPCR法に関するものは約30あった。関連するISOの各委員会(Technical Committee及びSub-committee)、個別及び全般事項別にまとめたものを表1に示す。

TC34が食品専門委員会で本研究班に関連する。中でもSC9が食品からの微生物試験に関する委員会である。個別の対象を試験する文書としては19あり、SC16は動物種を対象としたバイオマーカー、SC4では水質、土壌品質におけるレジオネラを対象とした試験法などが含まれていた。食品微生物試験に関するSC9関連文書では、

- ・ ISO/TS 13136:2012 STEC（志賀毒素産生性大腸菌）
- ・ ISO 15216-1/2:2017/2019 A型肝炎ウイルス、ノロウイルス
- ・ ISO/TS 17919:2013 ボツリヌス毒素
- ・ ISO/TS 18867:2015 エルシニア
- ・ ISO/AWI/TS 6579-4 monophasic *Salmonella* Typhimuriumの同定があった。

試験法全般に係るISO文書としてはPCR法関連で5つ、リアルタイムPCR/qPCR法関連で3つあった。前者のうち3つはNIHSJ-34TSのベースとなったISO 22174、20837、20838であった。それぞれ「一般要求事項及び定義」「定性検出のための検体調製に係る要求事項」「定性法のための増幅及び検出に係る要求事項」の内容であった。

PCR法関連の文書の残りの2つは、ISO 20836「サーマルサイ클ラーの温度性能試験」及びISO 22118「食中毒菌の検出及び定量のためのPCR－性能特性」であった。

リアルタイムPCR法関連の文書はISO 22119「食中毒菌の検出のためのリアルタイムPCR法— 一般要求事項及び定義」であった。上記はTC34/SC9により定められた文書であった。

qPCR法関連の文書はISO 20395「標的核酸配列の定量法（qPCR）の性能評価にあたっての要求事項」であった。本文書はqPCR法試験法の一般文書として他の文書よりも詳細な記述があった。本文書を和訳し、その内容を検討した。大要は、

1. 分析のデザイン：定量化戦略及びコントロール
2. 核酸試料の品質管理：濃度の定量化及び品質評価（純度及び完全性）
3. PCRアッセイのデザイン、最適化、in silico 及びin vitro特異性試験
4. 合格基準、閾値設定、及びノーマライゼーションなどのデータの品質管理及び解析
5. 試験法の妥当性確認（精度、直線性、定量下限、検出限界、真度、頑健性）
6. 計量のトレーサビリティの確立、測定の不確かさを評価するためのアプローチ

であった。ISO 20395はTC276バイオテクノロジー専門委員会による文書であり、試験法策定に当たっての詳細が記載されていたが、これまでのTC34/SC9の文書とは態様が異なっていた。

以上より、検討委員会ではSC9文書であるISO22119（及びISO20118）やCodexの関連ガイドラインをベースとして、適宜ISO 20395の内容を取り入れていく方向でリアルタイムPCR法導入に向けての文書を作成する方向で了承された。

（5）ウイルス試験法に関する研究

1) 試験法の適用範囲及び対象ウイルス

対象食品については、生食されるカキを始めとする二枚貝はノロウイルス等の健康被害リスクが高いことを踏まえ、国内、欧米ともに対象食品となっ

ていた。この他、国内試験法では、「他の食品（食品表面）」及び「セミドライトマト」が含まれていたが、後者はA型肝炎ウイルスの検出対象として示されていた。

欧州では、ISO15216-1：2017（2017年最終改訂）が標準試験法として示されていた。同試験法では、ソフトフルーツ（ベリー類）、生鮮野菜、ボトル詰めミネラルウォーター、食品表面（食品が接触するハードサーフェスを含む）を適用範囲として、ノロウイルス及びA型肝炎ウイルスの定量検出を行う内容となっていた。

米国では、FDA Foods program及びBAM法（BAM26B）が標準試験法として採用されていた。前者の試験法は二枚貝及びソフトフルーツ、後者の試験法ではネギ類を対象食品として、ノロウイルス及びA型肝炎ウイルスの定量検出を行う内容となっていた。

2) 試験法の実施手順

国内及び欧米における標準試験法は共に、①食品の前処理（ウイルス濃縮）、②ウイルスRNAの抽出、③遺伝子検出の3工程から構成されていた。以下に各工程の概要を記す。

① 食品の前処理

- ・二枚貝

国内では、3-10個体の二枚貝中腸腺から1.0-1.5 gを取り出し、PBSを用いて10%乳剤を作成した後にポリエチレングリコール（PEG）を用いた濃度勾配遠心分離（以下、PEG/NaCl沈殿）を実施する方法が示されていた。

ISO15216-1：2017では、最低10個体の二枚貝中腸腺から2 gを取り出し、ProteinaseK処理後の遠心上清をウイルス抽出液として扱う方法が示されていた。BAM法では、12個体の中腸腺から4 gを取り出し、蒸留水を用いて10%乳剤を作成した上で、超遠心分離によりウイルスを抽出する手法が示されていた。

以上より、試験法間で検体の個数、重量、希釈液組成等に差異が認められたほか、BAM法では超遠心分離が必要であることが明らかとなった。

- ・他の食品

国内では、セミドライトマトからのA型肝炎ウイルスの濃縮法として、同検体7～10 gに5～10倍量のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を加え、15分間の超音波処理を行った後、PEG/NaCl沈殿に供する方法が示されていた。

ISO15216-1：2017では、ソフトフルーツ25gに対して40 mLの緩衝液を加え、洗浄を行った後、PEG/NaCl沈殿に供する方法が示されていた。また、ボトル詰めミネラルウォーターについては濾過法が示されていた。

BAM法では、ソフトフルーツ50 gに対して50 mMグリシン/トリス/6% beef extract緩衝液（pH9.5）30 mL、ネギ50 gに対しては同緩衝液55mLを加え、15分間150rpmで振盪後、遠心分離及び超遠心分離を行う方法が示されていた。

以上より、特にBAM法については超遠心分離が不可欠であることが見出された。

・ハードサーフェス

国内試験法及び米国BAM法ではハードサーフェスを対象とした方法は示されていない状況であったが、ISO 15216-1:2017ではPBSスワブによる10x10cmの拭き取り手順が示されており、拭き取り後スワブはRNA抽出用溶解緩衝液を用いて直接手揉みする手順が示されていた。

以上より、食品との接触が想定されるハードサーフェスからのウイルス検出にあたっては、ISO法を参照する意義が確認された。

②ウイルスRNAの抽出

国内では、前処理後のウイルス抽出液について、シリカカラムを用いたRNA抽出法が示されていた。

ISO 15216-1:2017では、免疫磁気ビーズを用いたRNA抽出法が示されていた。

BAM法では、国内試験法と同様にシリカカラムを用いた抽出法が示されていた。

以上より、国内試験法及び米国BAM法ではシリカカラムを用いた抽出法が共通していたのに対し、ISO法では異なる方法が採用されていた。但し、後者の方法は第三者認証機関による妥当性評価が行

われているものであり、国際標準的な手法として妥当であることも確認された。

③遺伝子検出

1. プライマー・プローブ

何れの試験法もリアルタイムPCR法が示されており、同法の共通性が確認された。

国内及び米国ではKageyamaらの報告(9)にあるリアルタイムPCR法が採用されていた。一方、ISO15216-1:2017では、国内及び米国とは異なるプライマー・プローブが示されていた。但し、同法の検出対象領域は、国内及び米国の試験法の検出対象領域に含まれている状況を確認した。

2. 工程

米国BAM法および欧州ISO法では、1st step RT-qPCRを実施していたのに対し、国内では逆転写反応を実施し、その後合成されたcDNAを鋳型とする2 step RT-qPCRが示されていた。

3. コントロール

定量検出を目的とするISO 15216-1:2017では、工程管理コントロールが設定されていたが、国内試験法では同コントロールは設定されていない状況であった。また、BAM法では、複数或いは単独の試験所でのValidationを行う上で有用と思われる、複数のウイルス株が例示されていた。

4. 検証 (Verification)

米国FDAでは、「Guidelines for the detection of microbial pathogens in foods and feeds」において、食品媒介性RNAウイルスを標的とした試験における検証方法が示されており、その中で使用者は試験所に初めて導入する際には、各N=6で被験ウイルスを接種した群と非接種群を用いて、擬陽性・偽陰性反応が出現しないことを検証するよう求めている状況を確認した。

D. 考察

(1) 衛生指標菌等に関する研究

本研究では通知法の根拠として活用されてきた腸内細菌科菌群及びリステリア・モノサイトゲ

ネス試験法について、小規模な改訂を行い、より整合の取れた標準試験法の整備に向けた活動を行うことができた。

また、カンピロバクター定量試験法については、検討委員会での審議を経て、コラボスタディを開始する ST3 へと進めることが出来た。次年度には前期より予備試験を進めつつ、コラボスタディ参加機関との調整をはかり、円滑なコラボスタディの実施につとめたい。

さらに、本研究では ISO 17468:2017 (国際標準試験法である ISO 法との間で妥当性が評価されていない参照法を、標準試験法と比較検討を通じて評価する場合や、作成済の参照試験法の改訂を行い場合の手順を示したガイドライン文書)の詳細が明らかとなった。参照試験法の作成は5段階に分けて行われ、その内容は過去14年にわたり活動している「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における日本国内の食品中微生物の標準試験法作成方針とほぼ同じ内容であった。次年度には、以前より検討が行われている ISO 16140-2:2016 との整合性や相違点を確認し、検討委員会の作成及び改訂方針について見直すべき箇所の有無等を行う予定である。

本委員会ではこれまでに、35種のNIHSJ法について検討を行っており、それらはISO法やBAM法等国際的な標準試験法との妥当性確認やハーモナイゼーションを重視して作成している。ISO法は約5年毎に見直しを行うこととされており、今後も国際整合性を鑑み、ISO法の改訂や技術の進歩に合わせたNIHSJ法の見直し及び改訂を行う必要があると思われる。また、NIHSJ法について食品の輸出入に関連した問い合わせも見られていることから、今後、作成及び改訂方針や作成したNIHSJ法の英文による公表も検討が必要となるものと考えられる。

(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

ISO 16140 Part 3における議論の焦点の一つと

しては、「バリデーションされていない試験法(食品マトリクスの違い)の場合のベリフィケーションはどのように扱うか」である。

国際的に参照法と認証されている試験法では、5種類以上の食品カテゴリーで妥当性確認しておけば、全ての食品に適用できる、となっている。ところが、4種類以下の食品カテゴリーでしか妥当性確認していない場合は、参照法としては認証されても、適用範囲は試験で使用した食品のみに限られる。このような状態の参照法の扱いが厄介なのである。試験で使用した食品と新たに適用したい食品が同等かどうか、という議論である。

この議論の先には、食品マトリクスの分類表がある。すなわち、どのような食品マトリクスが同等の食品とみなせるか、という判断の基である。

Part 3のAnnex Aに掲載された分類表は国際版であるため、我が国の食品分類表もこれと調和させる必要がある。複雑多様な食品マトリクス群を考えると、容易ではないが、現実的な解を出して、必要に応じて、WG3会議で提案していく必要がある。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

本年度はNIHSJ-20TSに関するコラボスタディの作業計画を決定するあたり事前に検討が必要な事項を解析した。作業部会での議論を経て、第72回検討委員会(2020年12月23日)にて報告し、以下の合意を得た。

コラボスタディで使用するスパイク用芽胞液作製プロトコールに関する検討では、芽胞産生用培地としてTP培地が最も適していると判断され、また、継代培養は繰り返し行っても安定的な芽胞形成に寄与しないことが示された。以上の結果より芽胞調整プロトコールを提案し、62A株を用いたコラボスタディでは、同プロトコールに従って各機関で調整した芽胞菌液を食品試料添加用菌液として使用する事で合意された。また、62A株以外の株については、同プロトコールに従い芽胞形成を評価し、十分な芽胞形成が認められない場合には、株毎に芽胞調整プロトコールの整備を行う事となった。

NIHSJ-20TS-ST2の検出効率に関する検討では、シングルラボスタディの結果として、 $LOD_{50} = -0.34 \log_{10} \text{ spore CFU}/25\text{g}$ はちみつ試料という結果を得た。加えて、簡易DNA抽出キットの妥当性検証においては、コラボスタディにおけるFoodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics)使用の妥当性が確認され、コラボスタディにおいて同キットを使用する事で合意された。今後、同キットを用いた際の LOD_{50} 算出を含めたコラボスタディを実施し、同法の更なる妥当性確認を進めたい。

第72回検討委員会では上記データに関する確認を行うとともに、コラボスタディ作業計画案を提示した。ボツリヌス菌については法規制が強いため、菌株移動や取扱い設備についての制限が多く、コラボスタディによるバリデーション作業において実施可能な解析が限定的なものとなっている。このような制限の下に実施されるコラボスタディにおいては、取扱いが容易な他種の病原体とは異なるスキームの構築が必要となる。このため、同計画ではコラボスタディ期間を以下の3つの期間に分割し解析を進める作業計画を提案した。

1) コラボスタディ予備試験期間

主幹機関にて、はちみつに62A株を添加した際の検出感度を検証し、 LOD_{50} を求める（DNA抽出キットを使用）。併せて、コラボスタディで使用する添加菌量を決定する。平行して、各機関では芽胞調整プロトコルに従って芽胞液を調整し、芽胞形成率の安定性を検証する。

2) コラボスタディ実施期間

各機関にてはちみつに対する62A株添加回収試験（4濃度x 3回繰返し）を実施する。はちみつ試料、培地、DNA抽出キット等は、主幹機関より同一製品・同一ロットを頒布する。各機関で得られた結果について、解析結果の試験所間比較（プロトコルの安定性検証、試験所間の手技の同等性確認）および、コラボスタディ全体での LOD_{50} 算出を行った後、バリデーション作業部会に試験法の妥当性に関する確認を依頼する。

3) シングルラボスタディ実施期間

各機関にてA型菌以外の芽胞液調整及びはちみつ・一般食品への添加回収試験を行い、NIHSJ-20TSの汎用性を検証する。シングルラボスタディでは LOD_{50} 算出等の統計解析は行わず、様々な食品をマトリクスとして使用した際の検出効率の変化についての検証を中心に進める。

第72回検討委員会において上記のコラボスタディ作業計画について確認がなされ、同委員においてNIHSJ-20TSについてコラボスタディの開始（ステージ3への移行）の承認がなされた。これを受けて、第73回検討委員会にNIHSJ-20TS-ST3の第1案を提示し、今後、コラボスタディの結果を反映しながら同委員会において改訂作業が進められる予定である。

(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

本年度の情報収集・整理の成果を基に検討委員会で議論を行ったところ、ISO/TC34/SC9 文書であるISO22119（及びISO20118）やCodex委員会の関連ガイドラインをベースとしつつ、適宜ISO 20395で示される具体的な内容を取り入れていく方向で、今後リアルタイムPCR法導入に向けた文書作成していくこととなった。今後もリアルタイムPCRを導入した食品微生物試験法の作成・改訂は増えるものと想定されることから、本研究の遂行は、食品微生物試験法の国際調和に資するものと期待される。

(5) ウイルス試験法に関する研究

国内試験法は、食中毒対応を念頭においた試験法である一方、欧州のISOや米国のFDA Foods programやBAM等では流通食品や製造施設環境を対象とした定量試験法が近年整備されている状況が確認された。

こうした欧米での動向の背景には、食品媒介性ウイルスによる健康被害低減に向けて、汚染食品の流通制御が重要な課題と捉えられているためと思われる。実際に、欧米では二枚貝のほか、生鮮野菜やソフトフルーツ等の流通食品を対象としたウイルス試験法が輸出入食品に対しても適用される状況となっている。従って、国際調和を果たすためには、

国内での定量試験法の整備は今後検討すべき課題と考えられる。

ウイルスの培養法は平準化されていないため、現時点では欧米を含め、食品中のウイルスの基準値は設定されていない。しかしながら、定量試験では定量値が記録され、健康被害の発生データを基とした今後の解析を想定した場合には、将来的に何らかの基準提案が行われる可能性もあると思われる。

試験法として今後検討すべき項目について調査した結果として、食品マトリックスを捉えた場合、カキ等の二枚貝については、ISO 15216-1:2017と国内通知法間での妥当性が最近になって確認されており、本研究での検討対象として優先的位置づけにはないものと考えられた。また、他の食品のうち、セミドライトマト表面からの試験は国内ではA型肝炎ウイルス検出に限定され、ノロウイルス等での利用実績は文献調査からは見出せなかったことから、ノロウイルスの濃縮効率やISO法との成績比較に関する検証は今後検討すべき項目であろう。

このほか、食品が接触する施設等の表面からのウイルス試験法は、国内では未整備であった。ISO法を参考とした評価の実施は、食中毒事件の原因施設における調査等へ活用し得るものと推察される。但し、食中毒対応を主眼においた場合には、定量性を求めるよりも、検出感度及び精度の確保を重視した検討が必要と思われる。

ウイルスRNA抽出工程では米国と国内の試験法では明確な差異は認められず、特段改良に向けた検討を進める必然性は想定し難い状況であることが確認された。

遺伝子検出工程では、プライマー/プローブを変更する必然性はないと判断されたが、定量検出を主眼においた場合には、1 step RT-qPCRやコントロールの設定等、幾つかの課題が見出された。試験法の検証方法として、米国FDAガイドラインは参照に値するものと考えられた。

E. 結論

(1) 衛生指標菌等に関する研究

腸内細菌科菌群試験法並びにリステリア・モノサイトゲネス試験法について用語及び体裁の統一化を図り、2020年版として最終確定した。これら試験法について厚生労働省食品基準審査課に提示し、通知法改正の根拠として活用された。

カンピロバクター定量試験法に示されるPCR確認試験法を検証し、妥当性が確認されたことから、NIHSJ-35-ST3として共同試験へと進むことが承認された。

ISO 17468:2017の確認を通じた国内標準試験法の作成や改訂に向けたガイドライン案の作成を開始した。ISO 17468:2017に示される試験法作成のためのガイドラインは、これまでに「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において用いてきた標準試験法の作成方針と同様の骨子であることが確認され、引き続き、国際整合性を担保した試験法策定を行う意義が示された。

(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

- ・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、ISO 16140-3の和訳化は特に国際調和を進めていく上で大きな意義があると思われた。
- ・食品マトリックスの分類体系に関する知見は、我が国特有の食品マトリックスを対象とする試験法を作成・改訂していくために、作業部会へ発信していくことが重要である。

(3) ポツリヌス試験法に関する研究

- 1) NHISJ-20TSコラボスタディにあたり、スパイク用芽胞菌液作製プロトコルの整備及び簡易DNA抽出キットの妥当性を確認した。加えてシングルラボスタディでNIHSJ-20TS-ST2の検出効率を検証した。
- 2) 第72回検討委員会においてNIHSJ-20TSに関するステージ2の終了及びコラボスタディの開始（ステ

ージ3への移行)が承認された。

3) 第73回検討委員会においてNIHSJ-20TS-ST3原案の提示を行った。

(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

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。PCR法及びリアルタイムPCR法は広く普及しており、多様な微生物に迅速に対応するために、こうした遺伝子検査法を導入することは有益と考えられる。ISOにおいて遺伝子検査法を使った個別の試験法は現時点ではそれほど多くはないが、今後は遺伝子検査法を使った試験法の開発導入が進むものと予想される。これらの試験法が国際整合性に適合した試験法となるよう、国際的な基準に沿ったガイドライン案の策定は重要であると考えられる。

(5) ウイルス試験法に関する研究

本研究では、欧米における現行の食品媒介性ウイルス標準試験法に関する情報を収集・整理し、国内の現行試験法との比較を通じて、現在国内では適用範囲として設定されていないマトリックスの存在や、前処理法、工程管理のためのコントロールの設定等について今後検討すべき項目を抽出することができた。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 朝倉 宏. *Providencia alcalifaciens* の細菌学的性状, 疫学ならびに試験法について. 食品衛生研究. 2021. 71: 15-21.
- 2) Asakura H, Sakata J, Yamamoto S, Igimi S. Draft genome sequences of non-H₂S-producing strains of *Salmonella enterica* serovars Infantis, Enteritidis, Berta, and Kiambu in Japan. Microbiol. Resour. Announc. 2020.

9(30): e00335-20.

- 3) Yamasaki E, Matsuzawa S, Takeuchi K, Morimoto Y, Ikeda T, Okumura K, Kurazono H. Rapid serotyping of *Salmonella* isolates based on single nucleotide polymorphism-like sequence profiles of a *Salmonella*-specific gene. Foodborne Pathog. Dis. 2020. 18(1): 31-40.
- 4) Okumura K, Kaido M, Yamasaki E, Akai Y, Kurazono H, Yamamoto S: Genomic sequences of uropathogenic *Escherichia coli* strains with various fluoroquinolone resistance profiles. Microbiol. Resour. Announc. 2020. 9(38): e00199-20.
- 5) 齊藤美佳子、松岡英明: 損傷菌の標準化. 日本防菌防黴学会誌. 2020. 48(10):535-540.

2. 学会発表

- 1) 朝倉宏. ポツリヌス菌及びその他の食中毒細菌等の試験法の動向について. 令和2年度衛生微生物技術協議会関東甲信越ブロック細菌部会. 2020年11月6日, 埼玉県.
- 2) 倉園久生. 『これからの産学官連携』(微生物試験に関わる産学官連携). 第73回日本細菌学会中国・四国支部総会. 2020年10月17日, 徳島県.

H. 知的財産権取得状況

該当なし

II. 分担研究報告

令和2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

標準試験法の作成・改訂，並びにこれらのガイドライン策定に向けた研究

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
	五十君静信	東京農業大学	
	松岡 英明	東京農工大学大学院	
研究協力者	森 曜子	公益社団法人日本食品衛生協会	
	諸藤 圭	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	
	吉田朋高	一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC	
	内田和之	バイオメリュージャパン株式会社	
	守山隆敏	スリーエムジャパン株式会社	
	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

腸内細菌科菌群試験法（NIHSJ-15,16）並びにリステリア・モノサイトゲネス試験法（NIHSJ-08,09）について用語及び体裁の統一化を図り、2020年版として最終確定した。これら試験法について、厚生労働省に提示し、通知法改正の根拠として活用された。また、カンピロバクター定量試験法のうち、確認試験に用いるPCR法の妥当性評価を行い、これまでの検討内容を取り纏め、検討委員会での審議を経て、NIHSJ-35-ST3として共同試験へと進むことが承認された。更に、こうした標準試験法の作成及び改訂のガイドライン案を検討委員会に議題として提示し、NIHSJ文書として、ISO 17468:2017を確認しつつ原案の作成を開始した。ISO 17468:2017では、これ迄に妥当性評価されていない参照法を、ISO法等の標準試験法と比較検討しつつ作成する場合や作成された参照試験法を改訂する場合のガイドラインとして国際標準化機構（ISO）第34技術分科会第9分科会より発行されたものである。新たな参照試験法の妥当性確認は、①試験法の選定②試験法の評価③複数試験所による共同試験④更なる妥当性確認のための試験法選定⑤コラボティブスタディーの5段階に分けて行われることが示されており、その手順は「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の従来からの作成方針とほぼ同様であった。また、参照法を改訂する際には、大規模な変更（用いる試験技術の変更、培地・培養温度及び時間等の変更）と小規模な変更（文章の表現上の変更等）に分けられ、改訂の担当者がいずれに当たるかを評価することとされていた。大規模な変更の場合は、その裏付けとなるデータの評価が必要とされており、参照法の改訂手順についても、検討委員会で行われている標準試験法の改訂手順との整合性が確認された。

A. 研究目的

食品中の微生物を検出するための試験法は、その目的に応じて幾つかに分類される。対象食品に規格基準が設定されている場合、その基準

適合性の判断には、国により定められた公定法を用いる必要がある。また、微生物規格が設定されていない微生物についても、参照すべき標準試験法が定められているものがある。また、

今日では、世界貿易機関 (WTO) 加盟国において、科学的な正当性を示すことなく海外で広く用いられている規格基準や試験法と異なる国内規格や試験法を用いることは、非関税障壁とみなされ、提訴される可能性がある。逆に、諸外国で用いられている試験法よりも感度の低い試験法を用いている場合は、海外で流通できない汚染レベルの食品が国内に輸入されるリスクも考えられる。我が国は多くの食品を海外からの輸入に頼っており、食品の規格基準及びその試験法における国際ハーモナイゼーションは極めて重要といえる。そこで平成 17 年に、日本国内における食品からの微生物試験法の今後の方向性を議論し、標準試験法を作成するため、約 20 名の専門家から構成される「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) が結成された。検討委員会においては、試験法についての議論を公開の場で行い、表 1 に示す 4 ステージを経て試験法を作成してきた。一方、国際標準化機構 (International Organization of Standardization: 以下 ISO) が定める国際的な標準試験法 (以下 ISO 法) において、2017 年に第 34 技術分科会中の第 9 分科会より、「妥当性評価されていない参照法について標準試験法と比較検討を行って作成する際、及び作成した参照試験法の改訂を行う際のガイドライン」として ISO 17468 が発行された。

本研究では、こうした背景を踏まえつつ、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の運営にあたり、昨年度 ST4 として策定した、腸内細菌科菌群試験法 (NIHSJ-15, -16)、並びにリステリア・モノサイトゲネス試験法 (NIHSJ-08, -09) について、定量法と定性法間で文章表現上に整合が取れていない点を鑑み、これらの整理を行うこととした、また、

定量的リスク評価が国際的に求められる中、食鳥肉等を主な適用範囲とするカンピロバクター定量試験法について、検討を進めた。

更に、本研究では、ISO 17468 を詳細に確認し、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において実施している作成方針・手順との比較を行うことで、更なる国際調和に向けた微生物試験法の作成にあたることを目的として検討を進めたので報告する。

B. 研究方法

1) 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の小規模改訂

腸内細菌科菌群試験法 (定性試験法 NIHSJ-15、定量試験法 NIHSJ-16) 及びリステリア・モノサイトゲネス試験法 (定性試験法 NIHSJ-08、定量試験法 NIHSJ-09) について、定性・定量試験法間で表現等の比較確認を行い、検討委員会に小規模な修正案として提示した。

2) カンピロバクター定量試験法

カンピロバクター定量試験法 (NIHSJ-35-ST2) について検討を進めるため、本年度は確認試験に用いるとした PCR 法の評価を行った。包含性試験には計 96 株の *C. jejuni* 及び *C. coli* 株を、排他性試験には *C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. hyointestinalis*、*C. fetus*、*E. coli*、*Salmonella* spp.、*Arcobacter butzleri*、*Helicobacter pylori*、*Aeromonas* spp.、*Enterobacter* spp.、*Shigella* spp.、*Vibrio cholera*、*V. parahemolyticus* を含む計 99 株を用いた。

また、コラボスタディ計画案の作成にあたっては、カンピロバクター作業部会をオンラインで開催し、検討項目や検討時期等の案を作成した。

3) ISO 17468:2017 の確認を通じた標準試験法作成方針案の作成

ISO 17468:2017 文書の内容を確認、精査しつつ、バリデーション作業部会が作成した ISO 16140-1:2016 に基づく用語集との整合性を確認し、標準試験法作成方針の原案(初版)を作成した。その後、第 42 回バリデーション作業部会で作業部会案として改訂を行い、第 73 回検討委員会に議題として提出し、議論を行うこととした。

C. 研究結果

1) 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の改訂 (2020)

腸内細菌科菌群試験法 (NIHSJ-15, 16) 及びリステリア・モノサイトゲネス試験法 (NIHSJ-08, 09) は共に定性試験法と定量試験法の両者を含んでいる。これらは個別に検討・確認がなされてきたことから、文言の表現方法や体裁は必ずしも一致しない点が複数確認された。特に、リステリア・モノサイトゲネス試験法については、現行の通知法に定性・定量法が共に採用されているが、通知法の表現についても整合が取れていない箇所が複数見受けられる状況であった。標準試験法の記載の在り方については、昨年度の検討委員会で提案が出された事を受け、本年度はその整合性確保に向けて、文書としての整理を行い、第 73 回検討委員会で確認がなされ承認された。その後令和 3 年 3 月に検討委員会ホームページ上でこれらの試験法改訂版を公開した。また、並行して厚生労働省食品基準審査課に情報提供を行い、通知法として採用されているこれらの試験法の改訂通知を出す際の参考資料として活用された。

2) カンピロバクター定量試験法における確認試験としての PCR 法の評価

カンピロバクター定量試験法 (NIHSJ-35-ST2) については、これまでコラボスタディに向けて、適用範囲、コラボスタディで用いる食品マトリックス、希釈倍率、塗抹液量、選択培地等の要素について比較検討を行ってきた。本年度は確認試験に用いる PCR 法の検証を行うこととした。

PCR 法の評価にあたって、*C. jejuni* 及び *C. coli* 計 96 株を対象とした試験を行ったところ、全ての菌株が陽性反応を示した。これに対して、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. hyointestinalis*、*C. fetus*、*E. coli*、*Salmonella* spp.、*Arcobacter butzleri*、*Helicobacter pylori*、*Aeromonas* spp.、*Enterobacter* spp.、*Shigella* spp.、*Vibrio cholera*、*V. parahemolyticus* を含む計 99 株を対象とした試験では陽性反応は認められなかった (表 1)。以上の結果より、NIHSJ-35-ST2 で記載する PCR 法については十分な包含性・排他性を有することが確認された。

表 1. PCR 試験結果の概要。

菌属種	供試菌株数	陽性菌株数	陰性菌株数
<i>C. jejuni</i>	48	48	0
<i>C. coli</i>	48	48	0
<i>C. lari</i>	3	0	3
<i>C. upsaliensis</i>	2	0	2
<i>C. hyointestinalis</i>	2	0	2
<i>C. fetus</i>	3	0	3
<i>E. coli</i>	25	0	25
<i>Salmonella</i> spp.	20	0	20
<i>Arcobacter butzleri</i>	15	0	15
<i>Helicobacter pylori</i>	5	0	5
<i>Aeromonas</i> spp.	7	0	7
<i>Enterobacter</i> spp.	5	0	5
<i>Shigella</i> spp.	4	0	4
<i>V. cholera</i>	3	0	3
<i>V. parahemolyticus</i>	5	0	5

次にコラボスタディを行うための計画案を作業部会で議論し、作成した(図1)。本試験法は定量試験であることを踏まえ、低濃度、中濃度、高濃度の接種検体を調整することとし、少なくとも8箇所以上の試験所に群毎に同時配布することとした。

- ① 予備試験計画(案)
- 国衛研にて、以下の検討を実施予定。
- ・凍結融解繰り返しによる鶏皮試料中の標的菌の不活化
 - ・保存条件の設定(0, 1, 2日間冷蔵保存後の生残性評価)
 - ・コラボスタディで用いる添加菌数の設定
- (文献上では、3.5, 4.5, 5.5 logCFU/gで検討。Int J Food Microbiol. 2019, 288: 32-38.)
- ② 本試験計画(案)
- 国衛研
- 鶏皮 25 g + *C. jejuni* NCTC 11168
- 試験運行 ↓ ↑ 成績送付
- 機関A, B, C… (計12機関を想定)
- 国衛研
- 鶏皮 25 g + *C. coli* JCM 2529
- 試験運行 ↓ ↑ 成績送付
- 機関A, B, C… (計12機関を想定)

図1. コラボスタディ計画案

上記の成績を第73回検討委員会に議題として挙げ、議論を行ったところ、予備的に追加検討すべき事項はあるが、コラボスタディへ進めることについては支障がないと判断され、次回以降はNIHSJ-35-ST3として検討を進めることが承認された。

3) ISO 17468:2017 の確認を通じた、標準試験法作成方針案の作成

ISO 17468:2017では、新たな参照試験法の妥当性確認は、①試験法の選定、②試験法の評価、③多試験所による共同試験、④更なる妥当性確認のための試験法選定、⑤コラボラティブスタディー、の5段階に分けて行われることが示されていた。参照試験法の改訂については、用いる試験技術の変更、培地組成、培養時間及び温度等の変更については大規

模な変更と見做される一方、文章の表現上の変更等については小規模な変更と定義されていた。なお、大規模な変更の場合は、その裏付けとなるデータの評価が必須とされる一方、小規模な変更については背景説明や議論を経て決議されることも可能な状況であることが示され、特に本年度行った計4試験法の改訂は後者に位置づけられる内容で、その取扱いについてもISOで示される流れと同等のものであることが確認された。

D. 考察

本研究では通知法に活用されてきた腸内細菌科菌群及びリステリア・モノサイトゲネス試験法の中で小規模な改訂を行い、より整合の取れた標準試験法の策定に向けた活動を行うことができた。

また、カンピロバクター定量試験法については、検討委員会での審議を経て、コラボスタディを開始するST3へと進めることが出来た。次年度には前期より予備試験を進めつつ、コラボスタディ参加機関との調整をはかり、円滑なコラボスタディの実施につとめたい。

さらに、本研究ではISO 17468:2017(国際標準試験法であるISO法との間で妥当性が評価されていない参照法を、標準試験法と比較検討を通じて評価する場合や、作成済の参照試験法の改訂を行い場合の手順を示したガイドライン文書)の詳細が明らかとなった。参照試験法の作成は5段階に分けて行われ、その内容は過去14年にわたり活動している「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における日本国内の食品中微生物の標準試験法作成方針とほぼ同じ内容であった。次年度には、以前より検討が行われているISO

16140-2:2016 との整合性や相違点を確認し、検討委員会の作成及び改訂方針について見直すべき箇所の有無等を行う予定である。

本委員会ではこれまでに、35 種の NIHSJ 法について検討を行っており、それらは ISO 法や BAM 法等国際的な標準試験法との妥当性確認やハーモナイゼーションを重視して作成している。ISO 法は約 5 年毎に見直しを行うこととされており、今後も国際整合性を鑑み、ISO 法の改訂や技術の進歩に合わせた NIHSJ 法の見直し及び改訂を行う必要があると思われる。また、NIHSJ 法について食品の輸出入に関連した問い合わせも見られていることから、今後、作成及び改訂方針や作成した NIHSJ 法の英文による公表も検討が必要となるものと考えられる。

E. 結論

腸内細菌科菌群試験法並びにリステリア・モノサイトゲネス試験法について用語及び体裁の統一化を図り、2020 年版として最終確定した。これら試験法について厚生労働省食品基準審査課に提示し、通知法改正の根拠として活用された。

カンピロバクター定量試験法に示される PCR 確認試験法を検証し、妥当性が確認されたことから、NIHSJ-35-ST3 として共同試験へと進むことが承認された

ISO 17468:2017 の確認を通じた国内標準試験法の作成や改訂に向けたガイドライン案の作成を開始した。ISO 17468:2017 に示される試験法作成のためのガイドラインは、これまでに「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において用いてきた標準試験法の作成方針と同様の骨子であることが確認され、引き続き、国際整合性を担保した試

験法策定を行う意義が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文

- 1) 朝倉宏. *Providencia alcalifaciens* の細菌学的性状, 疫学ならびに試験法について. 食品衛生研究. 2021. 71: 15-21.
- 2) Asakura H, Sakata J, Yamamoto S, Igimi S. Draft genome sequences of non-H₂S-producing strains of *Salmonella enterica* serovars Infantis, Enteritidis, Berta, and Kiambu in Japan. Microbiol. Resour. Announc. 2020. 9(30): e00335-20.

2. 学会発表

- 1) 朝倉宏. ボツリヌス菌及びその他の食中毒細菌等の試験法の動向について. 令和 2 年度衛生微生物技術協議会関東甲信越ブロック細菌部会. 2020 年 11 月 6 日, 埼玉県.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和 2 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のための研究分担研究報告書

食品微生物試験法の国際動向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
分担研究者 五十君 静信 東京農業大学 応用生物科学部 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

食品微生物試験法を国際調和させるために、我が国は ISO/TC34/SC9 の P メンバーとなり、例年、総会に参加し、海外のメンバーとの緊密な意見交換を通して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している。本年度は、コロナ禍のためにウェブ会議となった 2020 年次総会（6/3-6/5）に出席した。また、SC9 の WG3「妥当性確認」のエキスパートとして第 25 回 WG3 ウェブ会議（2020/10/15-10/16）に出席した。妥当性確認に関する中心文書 ISO16140 が part 1～6 に分冊化され、全体の運用法をめぐる議論、分冊化前の本文であった part 2 に関する綿密な修正提案についての議論、実用的には直ちに利用したい「ベリフィケーション（検証）」の part 3 に関する最終段階（FDIS）での議論などに参加し、意見を発信した。国際調和の観点から、クローズアップされた課題の筆頭は食品マトリクスの分類であった。例え参照法であっても、妥当性確認の際に使用した食品と異なる食品に適用する場合は、「妥当性確認はまだなされていない」試験法となる。こうした議論の根本に、複雑多様な食品マトリクス間での同等性の判断の難しさがある。この動向に鑑み、我が国の食品分類と ISO の分類を調和させることが、本研究によってクローズアップされた喫緊の課題である。

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ことは、国際流通の中で、我が国における食品の安全を確保するために不可欠である。しかし試験法の具体的要件は複雑で、必ずしも科学的に結論が出せるものばかりではない。しかも運用しながらも、常に問題提起がなされ、修正や改訂に向けた議論が続けられている。こうした国際的議論の動向をリアルタイムで理解し、結論が出るよりも早い段階で、我が国としての意見を提示することは極めて重要である。そこで、食品微生物試験法に関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、また、SC9 内のワーキンググループ WG2「妥当性確認」のエキスパートとして WG2 会議に参加して、アップデートの情報を収集し、成果を挙げて

きた。本研究は、その調査活動を継続して、国際動向の情報集約し、それを国内の食品微生物試験法の開発、実施、結果の評価等に反映させることを目的としている。

B. 研究方法

本年度の ISO TC34/SC9 の総会は、当初、2021 年 1 月初旬にシドニー（オーストラリア）で実施される予定であった。しかし、コロナ禍のために、ウェブ会議となり 6/3-6/5 に開催され、これに出席した。WG3 会議は、本年度は第 25 回 WG3 ウェブ会議が 2020/10/15-10/16 に開催され、これに出席した。これらの会議への参加による海外エキスパートとの意見交換、SC9 および SC9/WG3 の各事務局から随時送信されてくる文書情報の分析、国内委員会での議論などにより、妥当性確認に関する国際動向

をまとめた。

C. 研究結果及び考察

(1) ISO 16140 シリーズの開発動向

妥当性確認に関する中心文書 ISO 16140 は、当初 1 冊（現在の Part 2 に相当）であったが、現在、以下の 6 分冊となっている。

Part 1: Vocabulary 用語（既刊）

Part 2: Protocol for the validation of

alternative (proprietary) methods against a reference method「参照法に対する代替法（営利的）のバリデーション」

- 2016 版既刊。
- コメント随時受付、WG3 で議論し、その結果は修正版に反映される。現時点では、25th WG3 ウェブ会議での議論に基づいてまとめられた修正版 1（Amd1）（ISO 文書としては CD の段階）に対して、改めて 2021/4/15 締切でコメントを受け、その内容に関する議論が 26th WG3 ウェブ会議（2021/4/27-4/29）で行われた。
- Cd Amd1 では、「確定法（Confirmation）の結果の判定の分類で、代替法と確定法の結果が異なった場合」の表記が、次のようになっている（黄色の部分）。

Ref	Alt	Conf	Interpretation
+	+	+	PA
+	+	-	PA _{FP(alt)}
-	-	-	NA
-	-	+	NA _{FN(alt)}
+	-	-	ND
+	-	+	ND _{FN(alt)}
-	+	+	PD
-	+	-	PD _{FP(alt)}

- 背景として、必ずしも参照法が絶対ではない、優れた代替法の積極的採用すべき、との考えに基づき確定法で再確認。
- しかし、この結果に基づく感受性試験 Sensitivity の式は、まだ混乱している。

Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory 「参照法およびバリデーション済の代替法の単一ラボでのベリフィケーション」

- 2021.1 出版済。
- 議論の焦点の一つが、バリデーションされていない試験法（食品マトリクスの違い）の場合のベリフィケーションはどのように扱うか？ → Annex F (Normative)
- Annex F 内容を分析するため邦訳済〔添付資料 1〕

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」

- 2020 既刊。

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でのバリデーション」

- 2020 既刊。

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（営利的）のバリデーション」

- 2019 既刊。

このほかの関連規格としては以下のものが挙げられる。

ISO 17468:2016: Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method 「食物連鎖の微生物学-標準化された参照方法の確立または改訂に関する技術的要件とガイダンス」

- (2) ISO 16140-2 の解説文書の準備
当初、ガイドラインとしてまとめること

を目指して文書化を進めていたが、公的文書化には至っていなかった。しかし、Part 2の内容は引き続き分析し改訂作業を続けてきた。SC9参加後は、速やかな情報入手により改訂作業が加速した。現在、WG3情報をリアルタイムで得ながら、随時更新しているため、柔軟に改訂できる解説書としての文書化を検討している。

(3) ISO 16140-3 の文書化

参照法を導入しようとする試験所では、最初に、その試験法が使えることを検証しなければならない。それがベリフィケーションである。実用的には、そのニーズは大きいので、このPart 3の文書化（日本語）を計画し、そのため和訳を開始した。本文と附録（Annex A～F）から成るが、既に作業が終わった本文の「前書き」と「序文」をから、Part 3の内容が概観できる。なお、Annex Fについては上述のように、既に和訳済である。また、今後、集中議論が必要な食品マトリクス分類表（Annex A）についても和訳した。

(4) 我が国から発信すべき課題

Part 3における議論の焦点の一つが、「バリデーションされていない試験法（食品マトリクスの違い）の場合のベリフィケーションはどのように扱うか」である。

国際的に参照法と認証されている試験法では、5種類以上の食品カテゴリーで妥当性確認しておけば、全ての食品に適用できる、となっている。ところが、4種類以下の食品カテゴリーでしか妥当性確認していない場合は、参照法としては認証されても、適用範囲は試験で使用了食品のみに限られる。このような状態の参照法の扱いが厄介なのである。試験で使用了食品と新たに適用したい食品が同等かどうか、という議論である。

この議論の先には、食品マトリクスの分類表がある。すなわち、どのような食品マトリクスが同等の食品とみなせるか、とい

う判断の基である。

Part 3のAnnex Aに掲載された分類表は国際版であるため、我が国の食品分類表もこれと調和させる必要がある。複雑多様な食品マトリクス群を考えると、容易ではないが、現実的な解を出して、必要に応じて、WG3会議提案していく必要がある。

D 健康危害情報

該当なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

齊藤美佳子、松岡英明：損傷菌の標準化。日本防菌防黴学会誌、48(10) 535-540 (2020).

F. 知的所有権の取得状況

該当なし。

令和2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のための研究」

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）”においては、国際調和がとれた微生物試験法の作成が進められている。本研究班では同委員会の試験法作成方針に従ったボツリヌス菌に関する試験法の策定を目的としている。ボツリヌス菌については法規制等による菌株移動や取扱い設備についての制限が多く、試験法作成方針に含まれるバリデーション作業において実施可能な解析が限定的なものとなっているため、これまで検討委員会において本菌を使用したコラボスタディの実施方法について議論がなされてきた。本年度の研究においては、先行研究において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）について、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。コラボスタディ（ステージ3）開始前に検討が必要な事項として、スパイク用芽胞液作製プロトコルの検討、簡易 DNA 抽出法の妥当性確認等を実施した。その結果、各コラボスタディ参加機関にて個別に食品への菌添加が実施可能なプロトコルを構築し、また簡易 DNA 抽出法を代替法として用いることで限定的な設備環境下でも実施可能なコラボスタディ作業計画の構築に至った。同作業計画については検討委員会に提案し、同委員会においてコラボスタディの開始が承認された。これを受けて本研究班よりステージ3の第1案(NIHSJ-20TS-ST3)を検討委員会に提示しており、今後、コラボスタディの結果を反映しながら作業部会および検討委員会において改訂作業が進められることとなる。

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原因微生物等の標準試験法の作成が進められてきた。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等を協議することで標準試験法を策定している。

本研究では、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。先行研究において我々は、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、検討委員会が示す試験法作成方針に従い、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、更に、コラボスタディ（Collaborative study:CS）の実施にむけてNIHSJ-20TS-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。本研究においては研究期間内にコラボスタディを通してNIHSJ-20TSの妥当性・実効性の検証を行い、検討委員会での確認・承認の後にNIHSJ法として広く公開することを目的とする。本年度の研究においては、検討委員会から提言されたコラボスタディ開始前に

検討が必要な事項について解析し、検討委員会への提示および議論の後にコラボ実施ステージ（ステージ3）への移行について承認を得た。

B. 研究方法

1. 芽胞液作製プロトコールの整備

1-1) 芽胞形成に要する培養時間に関する検討：*Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) 62A 株をクックドミート培地に接種し、37°C・24 時間で嫌気培養を行った増菌液 1 mL を、TP 培地（5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, pH7.0：培地 A）、0.1%チオグリコール酸ナトリウム加 TP 培地（5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, 0.1%チオグリコール酸ナトリウム, pH7.0：培地 B）、可溶性デンプン加変法クックドミート培地（0.3%グルコース, 0.2%可溶性デンプン加クックドミート培地：培地 C）の各 9 mL に接種し、37°C で 24 時間、48 時間及び 72 時間、嫌気培養を行った。得られた菌液について、80°C・20 分間の加熱処理を行った後、卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養（37°C・24 時間）を行い、発育集落数を求めた（芽胞数）。平行して、培養後の菌液について、加熱処理を経ずに卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養後に発育した集落数を求め（芽胞+栄養型菌の総数）、両者の比から、芽胞形成率を算定した。

1-2) 継代培養回数に関する検討：*C. botulinum* 62A 株をクックドミート培地に接種し 37°C・24 時間の嫌気培養を行った後に得られた増菌液 1 mL を、TP 培地 9 mL に接種し、37°C で 72 時間の嫌気培養を行った。得られた菌液 1 mL を新鮮な TP 培地 9 mL に再び接種し、80°C・20 分間の加熱処理を経

て、37°C で 72 時間の嫌気培養に供した。同操作を更に 3 回繰り返し、それぞれの培養回について、培養開始後 24, 48 および 72 時間後の芽胞形成率を上項と同様の方法で評価した。

2. NIHSJ-20TS-ST2 の検出効率に関する検討

芽胞調整プロトコールに従って作製した芽胞液を 10 倍階段希釈後、はちみつ試料に添加し、同試料からのボツリヌス毒素遺伝子検出を NIHSJ-20TS-ST2 に従って解析した。PCR 反応産物の検出には 2.0 % Agarose S (Nippon gene) in 0.5 x TBE buffer および Midori Green Direct を使用した。LOD₅₀ の算出については ISO16140-2 に記載の方法に従い添加菌量を spore CFU/25g はちみつ試料で算出した（結果については log₁₀ spore CFU /25g はちみつ試料で示した）。

3. 簡易 DNA 抽出キットの妥当性検証

C. botulinum 62A 株または *C. botulinum* Okra 株を TPGY 培地に接種後、24 時間嫌気培養を行い、得られた増菌液の階段希釈液について、NIHSJ-20TS-ST2 に記載される CTAB 法のほか、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 並びに Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) を用いて DNA 抽出を行った。CTAB 法では段階希釈液 1 mL を、DNeasy Blood & Tissue Kit では 0.1 mL、Foodproof StarPrep Two Kit では 0.08 mL を DNA 抽出用試料とした。抽出効率の評価は、NIHSJ-20TS-ST2 で示される PCR 法へ DNA 抽出液を適用することに拠った。

4. 検討委員会における確認

コラボスタディ開始前に必要な検討事項の解析結果についてコラボスタディ参加機関から構成される作業部会会議にて確認を行った後、コラボスタディ作業計画案を作

成し、第 72 回検討委員会（2020 年 12 月 23 日）に提出しコラボスタディの開始について審議頂いた。加えて第 73 回検討委員会（2021 年 3 月 11 日）に NIHSJ-20ST-ST3 の第 1 案を提示した。

C. 結果

1. スパイク用芽胞液作製プロトコールの整備

我々は先行研究で第 71 回検討委員会（2020 年 2 月 18 日）において、食基発第 0630002 号・食基発第 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」に記載の方法（図 1）に基づく芽胞液作製を行うことについて承認を得ている。しかしながら、同法では芽胞産生用培地の組成が示されていない。そこで本研究では 3 種類の培地を使用した際の芽胞産生性を比較し、安定的な芽胞産生が可能な培地の選択および芽胞液調整プロトコールの作成を行った。芽胞形成に要する培養時間に関する検討を行った結果、全ての培地において 24 時間の培養時間では芽胞形成が確認されず、培養開始後 48 時間以降で安定的な芽胞形成が確認された（図 2）。また、3 種類の培地における芽胞形成数および芽胞形成率を比較した結果、TP 培地（培地 A）で最も高くかつ安定的な芽胞形成率を認めた。更に、継代培養回数に関する検討を目的として上記の試験において最も良い芽胞形成が確認された TP 培地を用いて芽胞形成に与える培養の繰り返し回数の影響について検討した結果、培養の繰り返しによる芽胞形成の速度および芽胞数に大きな変化は観察されなかった（図 3）。

2. NIHSJ-20TS-ST2 の検出効率に関する検討

我々は先行研究で第 71 回検討委員会において、コラボスタディの評価基準として LOD₅₀ による評価が妥当との提案を受けている。そこで、本検討ではコラボスタディに資するプレデータの取得を目的として、NIHSJ-20TS-ST2 を使用して解析を行った際の LOD₅₀ を試算した（表 1）。全ての試行において、培養開始から 24 時間後の PCR（以下、1st PCR）よりも 90 時間後の PCR（以下、2nd PCR）でより高い検出感度を示すことが確認された。2nd PCR では、上清または沈殿のいずれかが陽性となった試料を総合判定陽性と判定した場合、25g はちみつ試料あたりの添加芽胞数が \log_{10} CFU = 0.9 以上の場合には全て陽性を示し、 \log_{10} CFU = -0.1 では 3 回のうち 1 回が陽性となった。 \log_{10} CFU = -1.1 では、3 回の試行のうち 2 回が陽性となった。また、 \log_{10} CFU = -11.1 では全てが陰性となった。これらの結果より LOD₅₀ を試算した結果、LOD₅₀ = -0.34 \log_{10} CFU/25g はちみつ試料（95%信頼区間の上限値 = 0.26, 下限値 = -0.92）となり、NIHSJ-20TS-ST2 が十分な検出感度を有する試験法であると判断された。

3. 簡易 DNA 抽出キットの妥当性検証

NIHSJ-20TS-ST2 で示される DNA 抽出法は、ISO 法と同様に CTAB 法を採用している。しかしながら、CTAB 法は手技が煩雑であり、クロロホルムの使用等、取扱い制限の多いボツリヌス菌を用いた試験法のコラボスタディ実施にあたっては、必ずしも最適とは言い難いことが作業部会で議論された。第 71 回検討委員会では、これらの点を提起し、コラボスタディに DNA 抽出キットを用いることが承認された。これを受け、作業部会では計 2 種類の異なる仕様から成る DNA 抽出

キットを選定した上で、それらの妥当性を判断するために、検出感度に関する検討を行った。DNeasy Blood & Tissue Kit は Proteinase K を用いたタンパク分解後にスピンカラムを用いて DNA を抽出精製する方法である。一方、Foodproof StarPrep Two Kit は物理的に菌体を粉碎後、遠心分離により DNA を抽出する方法となっている。*C. botulinum* 62A 株(表2)または *C. botulinum* Okra 株(表3)の培養液を試料として CTAB 法と2種類のキットの DNA 抽出効率を比較した結果、両キットとも CTAB 法に比較して、*C. botulinum* 62A 株では10,000倍以上、*C. botulinum* Okra 株では約1,000倍以上の高い抽出効率を認めた。また、2種類のキットのプロトコールを確認したところ、Foodproof StarPrep Two Kitの方が手技的に簡潔であるほか、物理的破碎を密閉環境で行えるため、安全性確保の点からもより有用性が高いとの意見が出た。また、後者については、MicroValの認証を受けていることも確認された。以上の点を踏まえ、コラボスタディでは Foodproof StarPrep Two Kit の使用が妥当と判断された。

D. 考察

本年度の研究においては NIHSJ-20TS に関するコラボスタディの作業計画を決定するあたり事前に検討が必要な事項について解析を行った。解析結果についてはコラボスタディ参加機関間会議による議論を行った後に、第72回検討委員会(2020年12月23日)において報告し、以下の合意を得た。

コラボスタディで使用するスパイク用芽胞液作製プロトコールに関する検討では、

芽胞産生用培地として TP 培地が最も適していると判断され、また、継代培養は繰り返し行ったとしても安定的な芽胞形成に寄与しないことが示された。以上の結果より別添1に示す芽胞調整プロトコールを提案し、62A株を用いたコラボスタディでは、同プロトコールに従って各機関で調整した芽胞菌液を食品試料添加用菌液として使用する事で合意された。また、62A株以外の株については、同プロトコールに従い芽胞形成を評価し、十分な芽胞形成が認められない場合には、株毎に芽胞調整プロトコールの整備を行う事となった。NIHSJ-20TS-ST2の検出効率に関する検討では、シングルコラボスタディの結果として、 $LOD_{50} = -0.34 \log_{10} \text{ spore CFU}/25\text{g}$ はちみつ試料という結果を得た。加えて、簡易 DNA 抽出キットの妥当性検証においては、コラボスタディにおける Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) 使用の妥当性が確認され、コラボスタディにおいて同キットを使用する事で合意された。今後、同キットを用いた際の LOD_{50} 算出を含めたコラボスタディを実施し、同法の更なる妥当性確認を進めたいと考える。

第72回検討委員会では上記データに関する確認を行うとともに、図4に示すコラボスタディ作業計画案の提示を行った。ボツリヌス菌については法規制が強いため、菌株移動や取扱い設備についての制限が多く、コラボスタディによるバリデーション作業において実施可能な解析が限定的なものとなっている。この様な制限の下に実施されるコラボスタディにおいては、取扱いが容易な他種の病原体とは異なるスキームの構築が必要となる。このため、同計画で

はコラボスタディ期間を以下の3つの期間に分割し解析を進める作業計画を提案した。

1) コラボスタディ予備試験期間

主幹機関（試験機関1）にて、はちみつに62A株を添加した際の検出感度を検証し、LOD₅₀を求める（DNA抽出キットを使用）。併せて、コラボスタディで使用する添加菌量を決定する。平行して、各コラボスタディ参加機関では、別添1の芽胞調整プロトコールに従って、芽胞液を調整し、芽胞形成率の安定性を検証する。

2) コラボスタディ実施期間

各機関にて、はちみつに対する62A株添加回収試験（4濃度 x 3回繰返し）を実施する。はちみつ試料、培地、DNA抽出キット等は、主幹機関より同一製品・同一ロットを頒布する。各機関で得られた結果について、解析結果の試験所間比較（プロトコールの安定性検証、試験所間の手技の同等性確認）および、コラボスタディ全体でのLOD₅₀算出を行った後、バリデーショナル作業部会に試験法の妥当性に関する確認を依頼する。

3) シングルラボスタディ実施期間

それぞれの機関にてA型菌以外の芽胞液調整および、はちみつ・一般食品への添加回収試験を行い、NIHSJ-20TSの汎用性を検証する。シングルラボスタディではLOD₅₀算出等の統計解析は行わず、様々な食品をマトリクスとして使用した際の検出効率の変化（マトリクス-菌型の組合せの影響）についての検証を中心に進める。

第72回検討委員会において上記のコラボスタディ作業計画について確認がなされ、同委員においてNIHSJ-20TSについてコラ

ボスタディの開始（ステージ3への移行）の承認がなされた。これを受けて、第73回検討委員会（2021年3月11日）にNIHSJ-20TS-ST3の第1案を提示し、今後、コラボスタディの結果を反映しながら同委員会において改訂作業が進められることとなっている。

E. 結論

1) NIHSJ-20TS コラボスタディにあたって、スパイク用芽胞菌液作製プロトコールの整備及び簡易DNA抽出キットの妥当性を確認した。加えてシングルラボスタディでNIHSJ-20TS-ST2の検出効率を検証した。

2) 第72回検討委員会においてNIHSJ-20TSに関するステージ2の終了及びコラボスタディの開始（ステージ3への移行）が承認された。

3) 第73回検討委員会においてNIHSJ-20TS-ST3原案の提示を行った。

F. 研究発表

論文発表

1. Yamasaki E, Matsuzawa S, Takeuchi K, Morimoto Y, Ikeda T, Okumura K, Kurazono H: Rapid Serotyping of *Salmonella* Isolates Based on Single Nucleotide Polymorphism-Like Sequence Profiles of a *Salmonella*-Specific Gene. *Foodborne Pathog. Dis.*, 18(1): 31-40, 2020.

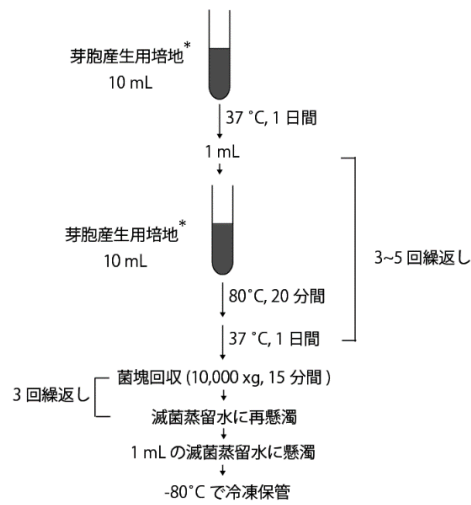
2. Okumura K, Kaido M, Yamasaki E, Akai Y, Kurazono H, Yamamoto S: Genomic Sequences of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains with Various Fluoroquinolone Resistance Profiles.

Microbiol. Resour. Announc. 9(38):
e00199-20, 2020.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

H. 引用文献

- ISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia
- BAM chapter 17 *Clostridium botulinum* (<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm>)
- 食品衛生検査指針微生物編 2018. 第2章 11. ボツリヌス菌.
- 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



*芽胞産生用培地の選択肢について

可溶性デンプン加変法クックドミート培地 (クックドミート培地, 0.3% グルコース, 0.2% 可溶性デンプン)

(出典: 食品衛生検査指針)

TP 培地 (5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, pH 7.0)

(出典: H14 年度厚生労働科学研究費補助金「容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価」(小熊ら))

図 1 食基発第 0630002 号・食基発第 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」に記載されている芽胞液作製手順の概要

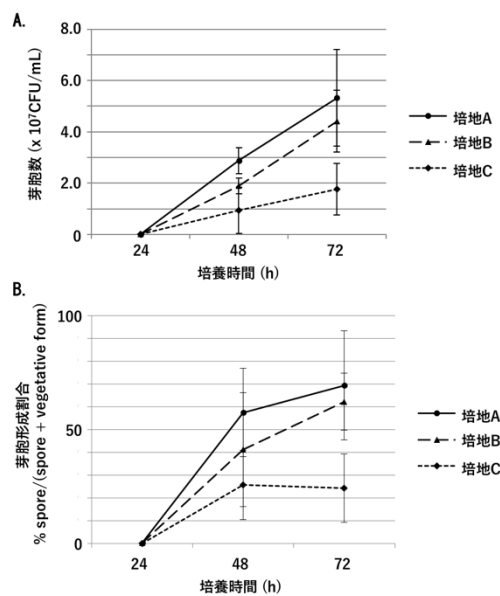


図 2 芽胞形成に要する培養時間に関する検討

TP 培地 (培地 A)、0.1%チオグリコール酸ナトリウム加 TP 培地 (培地 B) および可溶性デンプン加変法クックドミート培地 (培地 C) を用いた際の各培養液中の芽胞数 (A) および芽胞形成割合 (B) を示した。

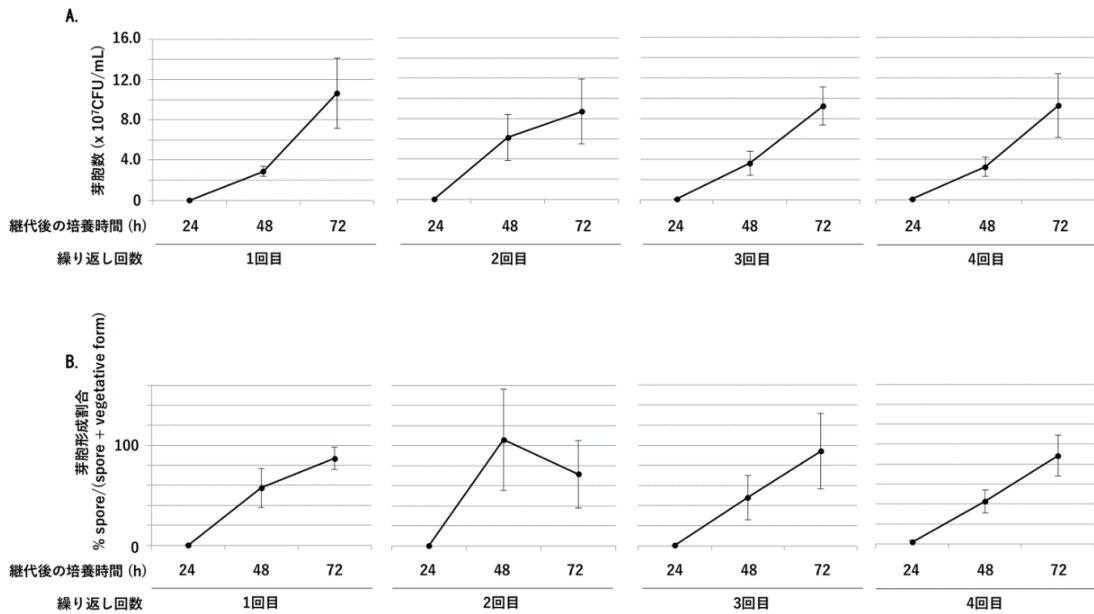


図3 継代培養回数に関する検討

TP 培地を用いて繰り返し培養を行った際の、芽胞数 (A) 及び芽胞形成割合 (B) を示す。

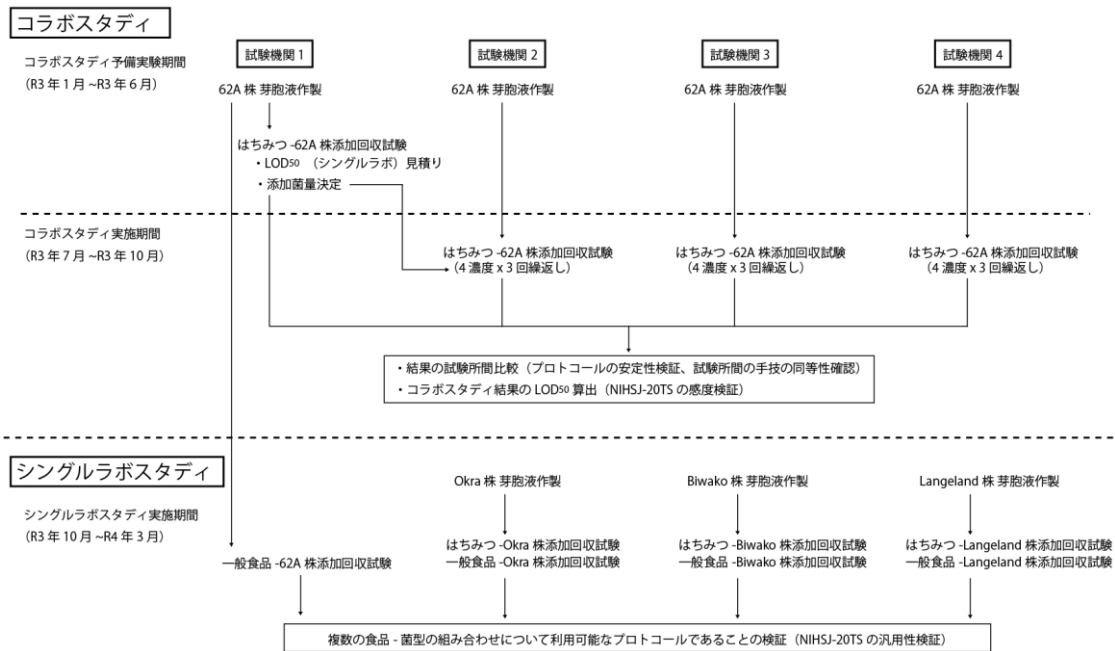


図4 コロボスタディ作業計画

表 1 ボツリヌス A 型 62A 株を用いた添加回収試験による、NIHSJ-20TS-ST2 の検出効率に関する検討

PCR	試料形態	添加芽胞数 (log ₁₀ CFU) *						
		2.9	1.9	0.9	-0.1	-1.1	-11.1	-111.1
1 st PCR	上清	0 (1)	0(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(1)	0(1)
	沈殿	1 (1)	2(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(1)	0(1)
2 nd PCR	上清	1 (1)	1(3)	1(2)	1(3)	1(3)	0(1)	0(1)
	沈殿	1 (1)	3(3)	2(2)	1(3)	2(3)	0(1)	0(1)
総合判定	-	1 (1)	3(3)	2(2)	1(3)	2(3)	0(1)	0(1)

*異なる芽胞数を添加したはちみつ試料 25 g よりボツリヌス A 型毒素遺伝子が検出された回数を示す。括弧内の数字は試行回数を意味する。

表 2 *C. botulinum* 62A 株に対する DNA 抽出効率の比較

	菌液濃度 (Log ₁₀ CFU/mL) †						
	6	5	4	3	2	1	0
CTAB method (1 mL)*	+	+	+	-			
DNeasy Blood & Tissue Kit (0.1 mL)*			+	+	+	+	
Foodproof StarPrep Two Kit (0.08 mL)*			+	+	+	+	-

*括弧内の数値は各法に供した培養液量を示す。

† 10 倍階段希釈した菌液から DNA 抽出を行い、NIHSJ-20TS-ST2 に示す PCR に供した結果、陽性を+、陰性を-で示す。

表 3 *C. botulinum* Okra 株に対する DNA 抽出効率の比較

	菌液濃度 (Log ₁₀ CFU/mL) †					
	6	5	4	3	2	1
CTAB 法 (1 mL)*	+	+	+	-	-	
DNeasy Blood & Tissue Kit (0.1 mL)*			+	+	-	-
Foodproof StarPrep two kit (0.08 mL)*			+	+	+	-

*括弧内の数値は各法に供した培養液量を示す。

† 10 倍階段希釈した菌液から DNA 抽出を行い、NIHSJ-20TS-ST2 に示す PCR に供した結果、陽性を+、陰性を-で示す。

C. botulinum 62A 株芽胞液調整プロトコール

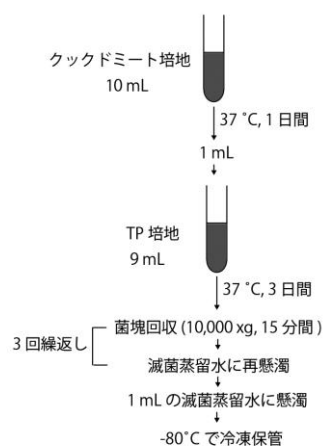
1. はじめに

本プロトコールは NIHSJ-20TS に関するコラボスタディで実施する、C. botulinum 62A 株を用いた一般食品およびはちみつへの添加回収試験において使用する添加用芽胞液を調整するためのプロトコールである。

2. 芽胞液調整手順

C. botulinum 62A 株の保存培養液（あるいは芽胞懸濁液）を、クックドミート培地に接種し、37℃で1日間嫌気培養する。培養液を、新しい TP 培地に接種し、37℃で3日間培養する。得られた培養液 1 mL を 10,000×g, 15 分間遠心分離して芽胞を回収し、滅菌蒸留水で3回遠心分離による洗浄を行い、再度、1 mL の滅菌蒸留水を加えて均一な芽胞浮遊液とする。浮遊液は適量に分注し、-80℃で保存する。

3. フローチャート



4. 芽胞浮遊液の芽胞濃度の測定

芽胞浮遊液を 80℃で 20 分加熱後、滅菌生理食塩水を用いて 10 倍段階希釈液を作製する。各段階の希釈液 0.1 mL を卵黄加変法 GAM 寒天培地に塗布し、37℃で 24 時間嫌気培養し、形成したコロニー数を計測する。

5. 培地組成および作成方法

① クックドミート培地

基礎培地の各成分を加温溶解し、121 °Cにて 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。調製した培地は 5 ± 3 °C で保管する（使用期限：4 週間）。

培地は使用前に沸騰水浴で 15 分間処理した後に急速水冷して脱気する。

基礎組成：10 mL あたり

COOKED MEAT MEDIUM (OXIDO, cat. CM0081,)	1.0 g
蒸留水	10 mL

② TP 培地

基礎培地の各成分を加温溶解し、121 °Cにて 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。調製した培地は 5 ± 3 °C で保管する（使用期限：4 週間）。

培地は使用前に沸騰水浴で 15 分間処理した後に急速水冷して脱気する。

基礎組成：1,000 mL あたり

BBL™ Trypticase™ Peptone (BD, cat.211921)	50.0 g
Bacto™ Proteose Peptone No.3 (BD, cat.211693)	50.0 g
蒸留水	1,000 mL
	pH 7.0 ± 0.2

③ 卵黄加変法 GAM 寒天培地

基礎培地の各成分を加温溶解し、115 °Cにて 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。

基礎組成：500 mL あたり

GAM Agar, Modified "Nissui" (Nissui, cat.05426)	28.4 g
蒸留水	450 mL

滅菌後の培地を 50°C の水浴で保持した後に、無菌卵黄液 (50%) (KYOKTO, cat.04005) 50 ml を加え、均一化し、滅菌シャーレーに適量加えて平板培地とする。調製した培地は 5 ± 3 °C で保管する（使用期限：4 週間）。

培地は使用前日よりアネロバックケンキをいれたジャーにて 37 °C あるいは 30 °C で一晩処理した後に使用する。

⑤ 生理食塩水

各成分を溶解し、121 °Cにて 15 分間高圧蒸気滅菌を行う。調製した培地は 5 ± 3 °C で保管する。

基礎組成：500 mL あたり

NaCl	8.5 g
蒸留水	1,000 mL
	pH 7.0 ± 0.2

令和2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のための研究」
分担研究報告書

遺伝子検査法の導入に関する研究

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

食品の微生物規格基準等に係る試験法は培養法をベースに構築されてきた。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たものである。近年のゲノム解析技術の発展は著しく、サルモネラでは約30万、大腸菌では15万株以上のゲノム情報が蓄積されている。ゲノム情報は、遺伝子検査法の発展にも影響し、研究ベースでは多様な遺伝子検査法が報告されている。微生物規格基準等に係る試験法でも遺伝子検査法を取り入れる動きがある。国際的な標準試験法を策定する国際標準化機構（ISO）でもシガ毒素産生性大腸菌をはじめとした個別の微生物試験法において遺伝子検査法が取り入れられている。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、国内において、国際整合性に適合した遺伝子検査法を導入するためのガイドラインの検討を目的としている。本年度は遺伝子検査法作業部会を設置し、リアルタイムPCRを含めた遺伝子検査法の情報収集、並びにリアルタイムPCR法の策定に関するISO文書の策定状況並びにその内容を確認した。

A. 研究目的

食品の微生物規格基準等に係る試験法は培養法をベースに構築されてきた。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たものである。近年のゲノム解析技術の発展は著しく、サルモネラでは約30万、大腸菌では15万株以上のゲノム情報が蓄積されている。ゲノム情報は、遺伝子検査法の発展にも影響し、研究ベースでは多様な遺伝子検査法が報告されている。

微生物規格基準等に係る試験法でも遺伝子検査法を取り入れる動きがある。国際的な標準試験法を策定する国際標準化機構（International Organization for Standardization、ISO）でもシガ毒素産生性大腸菌をはじめとした個別の微生物試験法において遺伝子検査法が取り入れられている。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、国内において、国際整合性に適合した遺伝子検査法を導入するためのガイドラインの検討を目的としている。

B. 研究方法

国際整合性の観点から、国際標準試験法として扱われている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（PCR法、リアルタイムPCR法、定量PCR（quantitative PCR、qPCR）法に関する文書を検索し、その情報をまとめた。

上記文書のうち、qPCR法に係る試験法作成に係る要求事項を記載したISO20395について、内容を検討した。

昨年度までにISO22174、ISO20837、ISO20838をベースに作成したガイドライン案NIHSJ-34TSを修正した。

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）、川瀬遵先生（島根県保健環境科学研究所）、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「バリデーション作業部会」及び「食品からの微生物標準試

験法検討委員会（以下、本委員会）」に諮り修正を行った。

C. 研究結果および考察

昨年度までに作成した「食品からの病原体検出における PCR 試験法実施に関するガイドライン」NIHSJ-34TS について、参考文献等の軽微な修正を施し、本委員会において了承された。

現在 ISO 文書として PCR 及びリアルタイム PCR/qPCR 法に関するものは約 30 あった。関連する ISO の各委員会（Technical Committee 及び Sub-committee）、個別及び全般事項別にまとめたものを表 1 に示す。TC34 が食品専門委員会で本研究班に関連する。中でも SC9 が食品からの微生物試験に係る委員会である。

個別の対象を試験する文書としては 19 あり、SC16 は動物種を対象としたバイオマーカー、SC4 では水質、土壌品質におけるレジオネラを対象とした試験法などが含まれていた。食品に係る SC9 関連文書では、

- ・ISO/TS 13136:2012 STEC (シガ毒素産生性大腸菌)
- ・ISO 15216-1/2:2017/2019 A 型肝炎ウイルス、ノロウイルス
- ・ISO/TS 17919:2013 ボツリヌス毒素
- ・ISO/TS 18867:2015 エルシニア
- ・ISO/AWI/TS 6579-4 monophasic *Salmonella* Typhimurium 同定

があった。

試験法全般に係る ISO 文書としては PCR 法関連で 5 つ、リアルタイム PCR/qPCR 法関連で 3 つあった。前者のうち 3 つは NIHSJ-34TS のベースとなった ISO 22174、20837、20838 であった。それぞれ「一般要求事項及び定義」「定性検出のための検体調製に係る要求事項」「定性法のための増幅及び検出に係る要求事項」の内容であった。

PCR 法関連の文書の残りの 2 つは、ISO 20836 「サーマルサイクラーの温度性能試験」及び ISO 22118 「食中毒菌の検出及び定量のための PCR-

性能特性」であった。

リアルタイム PCR 法関連の文書は ISO 22119 「食中毒菌の検出のためのリアルタイム PCR 法 - 一般要求事項及び定義」であった。上記は TC34/SC9 により定められた文書であった。

qPCR 法関連の文書は ISO 20395 「標的核酸配列の定量法 (qPCR) の性能評価にあたっての要求事項」であった。本文書は qPCR 法試験法の一般文書として他の文書よりも詳細な記述があった。本文書を和訳し、その内容を検討した。大要は

1. 分析のデザイン：定量化戦略及びコントロール
2. 核酸試料の品質管理：濃度の定量化及び品質評価（純度及び完全性）
3. PCR アッセイのデザイン、最適化、in silico 及び in vitro 特異性試験
4. 合格基準、閾値設定、及びノーマライゼーションなどのデータの品質管理及び解析
5. 試験法の妥当性確認（精度、直線性、定量下限、検出限界、真度、頑健性）
6. 計量のトレーサビリティの確立、測定の不確かさを評価するためのアプローチ

であった。ISO 20395 は TC276 バイオテクノロジー専門委員会による文書であり、試験法策定に当たっての詳細が記載されていたが、これまでの TC34/SC9 の文書とは態様が異なっていた。

以上のことから、本委員会において SC9 文書である ISO22119 (及び ISO20118) をベースに ISO 20395 の内容を取り入れていく方向でリアルタイム PCR 法導入に向けての文書を作成する方向で了承された。

D. 結論

細菌の食品からの微生物試験法は培養法をベースに構築されている。PCR 法及びリアルタイム PCR 法は広く普及しており、多様な微生物に迅速に対応するために、こうした遺伝子検査法を導入することは有益であると考えられる。一方で ISO においても、遺伝子検査法を使

った個別の試験法はまだそれほど多くはない。今後ますます遺伝子検査法を使った試験法が開発されることが予想される。これらの試験法が国際整合性に適合した試験法となるよう、国際的な基準に沿ったガイドライン案の策定は重要であると考えられる。

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権取得状況

1 特許取得

なし

2 実用新案

なし

3 その他

なし

表 1. PCR 法及びリアルタイム PCR/qPCR 法に関する ISO 文書の集計

種別	PCR	RT/qPCR				計
専門委員会	TC34				TC276	
小委員会	SC9	SC16	SC9	SC4		
個別	3	12	3	1		19
全般	5	1	1		1	8
その他				1		1
総計	9	13	4	2	1	29

令和2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のための研究」
分担研究報告書

食品からのノロウイルス検出試験法に関する研究

研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長
研究協力者 三浦 尚之 国立保健医療科学院
楠原 一 三重県保健環境研究所

研究要旨

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスに代表される食品媒介性ウイルスによる健康被害は世界的にも大きな課題の一つである。これらのウイルスの多くは、現時点では細胞や実験動物を用いた実験室内での培養が不可能、あるいは困難であるため、食品に対して汚染ウイルスの基準を設けることは難しい現状にある。一方でこれらのウイルスによる健康被害を抑制・防止するためには、汚染食品の流通を制御することが重要と考えられる。本分担研究では、欧米で現在用いられるウイルス標準試験法を確認し、国内試験法との比較を通じ、国際調和に向けて検討が必要と思われる事項の抽出を図った。特に、国内試験法では食品表面拭取り検体に対する試験法が十分に整備されていない実態を把握した。今後、抽出された課題について、検討を進めるべきと思われる。

A.研究目的

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは、世界的に食品媒介性病原ウイルスとして認識されている。なかでもノロウイルスは、国内で毎年発生する食中毒において、食中毒患者の半数の原因物質として報告される重要なウイルスである。これらのウイルスに汚染された食品の喫食は健康被害に繋がるおそれがあることから、汚染食品の流通制御は、健康被害低減に直結するといえる。すなわち、生産段階のみならず、食品製造加工段階においてもウイルス汚染実態の把握は、食品の更なる安全性確保に向けて必要な課題であると考えられる。

多くの食品媒介性ウイルスは、現時点では実験室内での実用的な培養法が確立され

ていないため、食品からのウイルス検出には、リアルタイム PCR 法が採用されている。国内では、食品に対するノロウイルス検出法は、平成 19 年に最終改定され、厚生労働省から示される「ノロウイルスの検出法⁽¹⁾」および「食品衛生検査指針微生物編 2018」において示されているが、これらは基本的に食中毒対応のために示されているものであり、流通食品を対象としたウイルス試験法は十分には整備されていない状況と思われた。更に、国内試験法については最終改訂から 10 年以上が経過していることを踏まえ、本研究では、欧米における現行のウイルス標準試験法に関する動向を収集・整理した上で、国際調和に向けて、国内試験法で今後検討すべきと思われる事項の抽出を図ったので報告する。

B. 研究方法

1. ウイルス標準試験法に関する情報収集及び国内外比較

国内のウイルス試験法としては、厚生労働省より発出された、「ノロウイルスの検出法（平成 19 年）、「A 型肝炎ウイルスの検出法（平成 21 年）⁽²⁾」、及びこれらを収載している「食品衛生検査指針微生物編 2018」を参考とした。欧米のウイルス試験法については、欧州 ISO/TC34/SC9 及び米国 FDA で作成された ISO15216-1:2017⁽³⁾ 及び FDA Foods program^(4,5)、BAM(Bacteriological Analytical Manual)26B⁽⁶⁾を参照し、試験法間で差異の見られる事項の抽出を図った。

2. 試験法に関わる文献調査

国内で実施されている二枚貝のノロウイルス試験法を含めて、近年報告された学術文献のうち、試験法に関わるものを検索し、考察に用いた。

C. 研究結果

1. 試験法の適用範囲及び対象ウイルス

国内、欧米で用いられる食品からのウイルス標準試験法の概要を表 1 に示した。

対象食品については、生食されるカキを始めとする二枚貝はノロウイルス等の健康被害リスクが高いことを踏まえ、国内、欧米ともに対象食品となっていた。この他、国内試験法では、「他の食品（食品表面）」及び「セミドライトマト」が含まれていたが、後者は A 型肝炎ウイルスの検出対象として示されていた。

欧州では、ISO15216-1:2017（2017 年最終改訂）が標準試験法として示されていた。同試験法では、ソフトフルーツ（ベリー

類）、生鮮野菜、ボトル詰めミネラルウォーター、食品表面（食品が接触するハードサーフェスを含む）を適用範囲として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスの定量検出を行う内容となっていた。

米国では、FDA Foods program 及び BAM 法（BAM26B）が標準試験法として採用されていた。前者の試験法は二枚貝及びソフトフルーツ、後者の試験法ではネギ類を対象食品として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスの定量検出を行う内容となっていた。

2. 試験法の実施手順

国内及び欧米における標準試験法は共に、①食品の前処理（ウイルス濃縮）、②ウイルス RNA の抽出、③遺伝子検出の 3 工程から構成されていた。以下に各工程の概要を記す。

① 食品の前処理

・二枚貝

国内では、3-10 個体の二枚貝中腸腺から 1.0-1.5g を取り出し、PBS を用いて 10% 乳剤を作成した上で、PEG/NaCl 沈殿を実施する方法が示されていた。

ISO15216-1:2017 では、最低 10 個体の二枚貝中腸腺から 2g を取り出し、ProteinaseK 処理後の遠心上清をウイルス抽出液として扱う方法が示されていた。

BAM 法では、12 個体の中腸腺から 4g を取り出し、蒸留水を用いて 10% 乳剤を作成した上で、超遠心分離によりウイルスを抽出する手法が示されていた。

以上より、試験法間で検体の個数、重量、希釈液組成等に差異が認められたほか、BAM 法では超遠心分離が必要であること

が明らかとなった。

・他の食品

国内では、セミドライトマトからの A 型肝炎ウイルスの濃縮法として、同検体 7~10g に 5~10 倍量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え、15 分間の超音波処理を行った後、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた濃度勾配遠心分離 (以下、PEG/NaCl 沈殿) に供する方法が示されていた。

ISO15216-1:2017 では、ソフトフルーツ 25g に対して 40mL の緩衝液を加え、洗浄を行った後、PEG/NaCl 沈殿に供する方法が示されていた。また、ボトル詰めミネラルウォーターについては濾過法が示されていた。

BAM 法では、ソフトフルーツ 50g に対して 50mM グリシン/トリス/6% beef extract 緩衝液 (pH9.5) 30mL、ネギ 50g に対しては同緩衝液 55mL を加え、15 分間 150rpm で振盪後、遠心分離 (12,000 x g, 15 分間) 及び超遠心分離 (170,000 x g, 45 分間) を行う方法が示されていた。

以上より、特に BAM 法については超遠心分離が不可欠であることが見出された。

・ハードサーフェス

国内試験法及び米国 BAM 法ではハードサーフェスを対象とした方法は示されていない状況であったが、ISO 15216-1:2017 では PBS スワブによる 10x10cm の拭き取り手順が示されており、拭き取り後スワブは RNA 抽出用緩衝液を用いて直接手揉みする手順が示されていた。

以上より、食品との接触が想定されるハードサーフェスからのウイルス検出にあ

っては、ISO 法を参照する意義が確認された。

②ウイルス RNA の抽出

国内では、前処理後のウイルス抽出液について、シリカカラムを用いた RNA 抽出法が示されていた。

ISO 15216-1:2017 では、免疫磁気ビーズを用いた RNA 抽出法が示されていた。

BAM 法では、国内と同様にシリカカラムを用いた抽出法が示されていた。

以上より、国内試験法及び米国 BAM 法ではシリカカラムを用いた抽出法が共通していたのに対し、ISO 法では異なる方法が採用されていた。但し、後者の方法は第三者認証機関による妥当性評価が行われているものであり、国際標準的な手法として妥当であることも確認された。

③遺伝子検出

1) プライマー・プローブ

何れの試験法もリアルタイム PCR 法が示されており、同法の共通性が確認された。

国内及び米国では Kageyama らの報告⁽⁹⁾にあるリアルタイム PCR 法が採用されていた。一方、ISO15216-1:2017 では、国内及び米国とは異なるプライマー・プローブが示されていた。但し、同法の検出対象領域は、国内及び米国の試験法の検出対象領域に含まれている状況を確認した。

2) 工程

米国 BAM 法および欧州 ISO 法では、1st step RT-qPCR を実施していたのに対し、国内では逆転写反応を実施し、その後合成された cDNA を鋳型とする 2 step RT-

qPCR が示されていた。

3) コントロール

定量検出を目的とする ISO 15216-1:2017 では、工程管理コントロールが設定されていたが、国内試験法では同コントロールは設定されていない状況であった。また、BAM 法では、複数或いは単独の試験所での Validation を行う上で有用と思われる、複数のウイルス株が例示されていた。

4) 検証 (Verification)

米国 FDA では、「Guidelines for the detection of microbial pathogens in foods and feeds」⁽¹⁰⁾において、食品媒介性 RNA ウイルスを標的とした試験における検証方法が示されており、その中で使用者は試験所に初めて導入する際には、各 N=6 で被験ウイルスを接種した群と非接種群を用いて、擬陽性・偽陰性反応が出現しないことを検証するよう求めている状況を確認した。

D. 考察

国内試験法は、食中毒対応を念頭においた試験法である一方、欧州の ISO や米国の FDA Foods program や BAM 等では、流通食品や製造施設環境を対象とした定量試験法が近年整備されている状況が確認された。

こうした欧米での動向の背景には、食品媒介性ウイルスによる健康被害低減に向けて、汚染食品の流通制御が重要な課題と捉えられているためと思われる。実際に、欧米では二枚貝のほか、生鮮野菜やソフトフルーツ等の流通食品を対象としたウイルス試験法が輸出入食品に対しても適用される状況となっている。従って、国際調和を果

たすためには、国内での定量試験法の整備は今後検討すべき課題と考えられる。

ウイルスの培養法は平準化されていないため、現時点では欧米を含め、食品中のウイルスの基準値は設定されていない。しかしながら、定量試験では定量値が記録され、健康被害の発生データを基とした今後の解析を想定した場合には、将来的に何らかの基準提案が行われる可能性もあると思われる。

試験法として今後検討すべき項目について調査した結果として、食品マトリックスを捉えた場合、カキ等の二枚貝については、ISO 15216-1:2017 と国内通知法間での妥当性が最近になって確認されており⁽¹¹⁾、本研究での検討対象として優先的位置づけにはないものと考えられた。また、他の食品のうち、セミドライトマト表面からの試験は国内では A 型肝炎ウイルス検出に限定され、ノロウイルス等での利用実績は文献調査からは見出せなかったことから、ノロウイルスの濃縮効率や ISO 法との成績比較に関する検証は今後検討すべき項目であろう。

このほか、食品が接触する施設等の表面からのウイルス試験法は、国内では未整備であった。ISO 法を参考とした評価の実施は、食中毒事件の原因施設における調査等へ活用し得るものと推察される。但し、食中毒対応を主眼においた場合には、定量性を求めるよりも、検出感度及び精度の確保を重視した検討が必要と思われる。

ウイルス RNA 抽出工程では米国と国内の試験法では明確な差異は認められず、特段改良に向けた検討を進める必然性は想定し難い状況であることが確認された。

遺伝子検出工程では、プライマー/プロー

ブを変更する必然性はないと判断されたが、定量検出を主眼においた場合には、1 step RT-qPCR やコントロールの設定等、幾つかの課題が見出された。試験法の検証方法として、米国 FDA ガイドラインは参照に値するものと考えられた。

E. 結論

本研究では、欧米における現行の食品媒介性ウイルス標準試験法に関する情報を収集・整理し、国内の現行試験法との比較を通じて、現在国内では適用範囲として設定されていないマトリックスの存在や、前処理法、工程管理のためのコントロールの設定等について今後検討すべき項目を抽出することができた。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

I. 参考文献

(1) 厚生労働省. ノロウイルスの検出法.

<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/031105-1a.pdf>

(2) 厚生労働省. A 型肝炎ウイルスの検出法

https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/091201_01_01.pdf

(3) International Organization for Standardization (ISO). 2017. ISO15216-1:2017. Microbiology of food chain-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR-Part1: method for quantification <https://www.iso.org/standard/74263.html>

(4) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2014. FDA Foods program, Concentration, extraction, and detection of norovirus and hepatitis A virus in soft fruits.

<https://www.fda.gov/media/114183/download>

(5) US Food and Drug Administration (US-FDA). FDA Foods program, Concentration, extraction, and detection of norovirus and hepatitis A virus in molluscan shellfish.

<https://www.fda.gov/media/114187/download>

(6) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2014. BAM26B, Detection of hepatitis A virus in foods.

<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods/bam-26b-detection-hepatitis-virus-foods>

(7) Imamura et al. Interlaboratory evaluation of methods for quantification of norovirus RNA as an alternative use for ISO 15216-1:2017 to conduct Japan baseline survey of oysters. Foodborne pathogens and disease, <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2874>

(8) Lowther et al. 2019. Validation of EN ISO method 15216-1 quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. Int. J. Food

Microbiol. 288: 82-90.

(9) Kageyama et al. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41:1548-57.

(10) US Food and Drug Administration (US-FDA). 2019. Methods for the detection of microbial pathogens in foods and feeds. Ed. 3.0.

<https://www.fda.gov/media/83812/download>

(11) Imamura S, Shibata S, Kishine M, Kushida A, Uema M, Noda M, Zou B, Kawasaki C, Miura T, Fukunaga Y. 2021. Interlaboratory evaluation of a method for quantification of Norovirus RNA as an alternative use for ISO 15216-1:2017 to conduct Japan baseline survey of oysters. *Foodborne Pathog Dis.* 18(5):331-6.

表 1. 食品等からのRNAウイルス試験法の概要

適用範囲	通知			ISO 15216-1:2017			FDA Foods program	BAM 26B	FDA Foods program
	カキ等二枚貝	セミドライトマト (A型肝炎ウイルスのみ)	他の食品 (表面)	カキ等二枚貝	ソフトフルーツ、 生鮮野菜	ボトル詰ミネラル ウォーター	食品表面(含 ハードサーフェ ス)	ネギ	ソフトフルーツ
前処理	<ul style="list-style-type: none"> 3-10個より中腸腺切り出し 1.0-1.5gを使用 PBSにて10%乳剤作成 	<ul style="list-style-type: none"> 7-10gを使用 5-10倍量のPBSを用いて超音波処理15分 		<ul style="list-style-type: none"> 最低10個より中腸腺切り出し 2gを使用 ProtanaseKを含む滅菌蒸留水 2mLにて乳剤作成 	<ul style="list-style-type: none"> 25gを使用 (2.5x2.5x2.5cm) Glycine/Tris/beef extract緩衝液40mLで洗浄20分 	<ul style="list-style-type: none"> 0.3-5Lを電化膜ろ過 Glycine/tris/beef extractバッファーで溶出 	<ul style="list-style-type: none"> 剥き身12個より中腸腺切り出し 4.0gを使用 滅菌蒸留水40mLにて乳剤作成 	<ul style="list-style-type: none"> 50gを使用 2-5インチに切断 グリシンバッファ-55mLを用いて洗浄15分 	<ul style="list-style-type: none"> 50gを使用 Glycine/tris/beef extract緩衝液30mLで洗浄15分
前処理	<ul style="list-style-type: none"> 10,000rpm x 20分 PEG/NaCl沈殿 	<ul style="list-style-type: none"> PEG/NaCl沈殿 	<ul style="list-style-type: none"> PEG/NaCl沈殿 	<ul style="list-style-type: none"> 3,000 x g, 5分 	<ul style="list-style-type: none"> PEG/NaCl沈殿 	<ul style="list-style-type: none"> 4,000 x g, 15分 	<ul style="list-style-type: none"> 低速心(9,000-12,000 x g, 15-30分) 超速心 (170,000 x g, 45-60分) 		
RNA抽出	シリカカラム			シリカカラム			シリカカラム		
遺伝子検出	逆転写にてcDNA合成			1step RT-qPCR			1step RT-qPCR		

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
朝倉 宏	<i>Providencia alcalifaciens</i> の細菌学的性状, 疫学ならびに試験法について.	食品衛生研究	71	15-21	2021
斉藤美佳子、 <u>松岡英明</u>	損傷菌の標準化.	日本防菌防黴学会誌	48	535-540	2020
Yamasaki E, Matsuzawa S, Takeuchi K, Morimoto Y, Ikeda T, Okumura K, <u>Kurazono H.</u>	Rapid serotyping of <i>Salmonella</i> isolates based on single nucleotide polymorphism-like sequence profiles of a <i>Salmonella</i> -specific gene.	Foodborne Pathog. Dis.	18	31-40	2020
Okumura K, Kaido M, Yamasaki E, Akai Y, <u>Kurazono H.</u> , Yamamoto S.	Genomic sequences of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains with various fluoroquinolone resistance profiles.	Microbiol. Resour. Announc.	9	e00199-20	2020
<u>Asakura H.</u> , Sakata J, Yamamoto S, <u>Igimi S.</u>	Draft genome sequences of non-H ₂ S-producing strains of <i>Salmonella enterica</i> serovars Infantis, Enteritidis, Berta, and Kiambu in Japan.	Microbiol. Resour. Announc.	9	e00335-20	2020

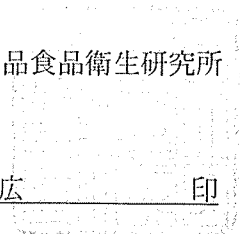
令和3年 3 月 29 日

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 合田 幸広 印



次の職員の令和2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のための研究 (20KA1007)
- 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。

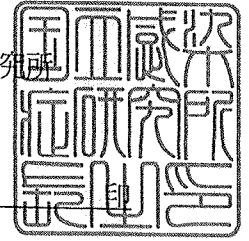
令和3年4月13日

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 隆宇



次の職員の令和2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のための研究
- 3. 研究者名 (所属部・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。

令和3年 3 月 29 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 合田 幸広 印

次の職員の令和2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のための研究 (20KA1007)
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・第四室室長
(氏名・フリガナ) 上間 匡・ウエマ マサシ

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:国立医薬品食品衛生研究所 研究者倫理基準)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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。

令和3年3月29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 合田 幸広 印

次の職員の令和2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のための研究 (20KA1007)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品衛生管理部・第三室室長
 (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□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。

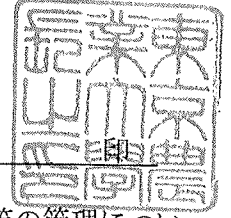
令和3年 4月 5日

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 東京農業大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 江口 文陽



次の職員の令和2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のための研究 (20KA1007)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 応用生物科学部・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。

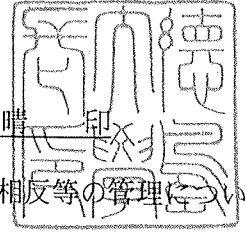
令和3年3月9日

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



次の職員の令和2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。

令和 年 月 日

厚生労働大臣 殿

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 千葉 一裕 印

次の職員の令和2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のための研究 (20KA1007)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 工学府・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 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。