

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標準化実装に向けた研究

令和6年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 由美子

令和6年(2024)5月



## 目次

### I. 総括研究報告

食品微生物試験法の国際標準化実装に向けた研究

岡田 由美子

----- 1

### II. 分担研究報告

1. クロストリジウム属菌試験法の標準化に向けた研究

百瀬 愛佳 他

----- 19

2. リステリア属菌定性及び定量試験法（技術仕様書）の策定に関する研究

岡田 由美子 他

----- 29

3. デジタル PCR とリアルタイム PCR の性能比較に関する研究

上間 匡

----- 37

4. 国際動向及び妥当性評価に関する研究

五十君 静信 他

----- 47

5. 食品微生物試験法の妥当性評価ガイドライン策定に向けた研究

松岡 英明 他

----- 59

令和5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標準化実装に向けた研究

研究代表者 岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 第三室長

#### 研究要旨

食品中の病原菌及び衛生指標菌を検出・定量する試験法は、科学技術の進歩に伴って改良され、その性能が日々向上している。また、国際的な食品流通の活発化に伴い、各国で用いられる食品試験法の国際整合性が取れていることが、国際社会において大変重要視されている。本研究は、食品中微生物の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」の活動により、国際整合性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整備のための研究を行うと共に、それらの活用の際に国際的に標準とされている妥当性評価及び検証に関する実装化のためのガイドライン作成をその目的とした。

日本の食品の微生物規格としては、特定加熱食肉製品および加熱食肉製品にクロストリジウム属菌の成分規格が設定されており、微生物学的品質評価のための衛生指標菌として用いられている。今年度の研究では、食品の衛生管理における国際調和を目指し、クロストリジウム属菌の標準試験法について検討を行った。クロストリジウム属菌試験法において国内においては公定法（成分規格試験）として嫌気培養を必要としないパウチ法が用いられている一方、国際的な標準試験法であり、国際標準化機構（ISO：International Organization for Standardization）により定められている ISO 15213-1:2023 には混積培養法が採用されている。国際整合性の観点および嫌気培養が比較的容易となった現状を鑑み、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入することとした。また、パウチ法と ISO 15213-1:2023 について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付することとして、クロストリジウム属菌標準試験法 NIHSJ-42-ST1 の Stage 1 が完了した。

近年諸外国では食品製造環境のふき取り検査等において、リステリア属菌を対象菌とすることで、食中毒菌であるリステリア・モノサイトゲネスの汚染指標として施設・設備の衛生環境の維持を図っていることから、国内でもリステリア属菌試験法について技術仕様書（Technical Specification; TS）として整備する目的で、食品からの微生物標準試験法検討委員会において定性試験法（NIHSJ-40TS）並びに定量試験法（NIHSJ-41TS）の作成を行った。今年度の本研究では作業部会案の実用性を高める目的で、作業部会保有のリステリア属菌菌株を用いて、各種培

地上の集落の性状について解析を行うと共に、更に多くの菌株を用いて検討すべき項目の抽出を行った。

微生物の検出において、従来の培養法による検査では、結果判定までに数日の時間が必要となること、また食品媒介性ウイルスなど有効な培養法が十分確立されていない病原体には対応できないこと、ゲノム解析による詳細な微生物の疫学解析の発展などから、遺伝子検査法は食品からの微生物検出において重要なツールとなっている。今年度の分子生物学的手法の導入に関する研究としては、リアルタイム PCR の定量性をさらに発展させ、リアルタイム PCR に比較して絶対定量などの多くの利点をもつデジタル PCR 技術を食品分野で活用するためのガイドライン策定に向けた検討として、国内外での利用実績のあるノロウイルス検出のためのリアルタイム PCR 法の条件等を基本条件としてデジタル PCR の検証を実施した。その結果、デジタル PCR の利用に向けては現時点でのリアルタイム PCR の条件に加えて、さまざまな条件を検討する必要があることが示された。

食品中微生物試験法の国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究では、今年度は 2023 年 6 月にストックホルムで開催された ISO/TC34/SC9（食品の微生物試験法）及び CEN/TC463 総会（令和 5 年 6 月 26-30 日）へ参加した。ISO/TC34/SC9 と CEN/TC463 の動向に関する情報収集と ISO 試験法の検討を行った。更に、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、検証すべき項目の収集につとめた。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、バリデーションやベリフィケーションの手順について整理し、特に微生物試験を行う検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）についてガイドライン案の作成を進めた。

食品微生物試験法の妥当性評価ガイドライン策定に向けた研究では、SC9 内の妥当性確認（バリデーション）ワーキンググループ（WG3）に専門技術委員として参加し、妥当性確認関連文書の議論〔ISO 16140 シリーズ（既刊の part1~6 の改訂、および part7 以降の新規作成）および参照法に関する ISO 17468 の改訂〕の動向を調査すると共に、検証（ベリフィケーション）ガイドラインの完成版（第 10 改訂版、R6.3.3）をまとめた。さらに、ISO 16140-2 に基づくバリデーションの解説文書のひな型を作成した。

これらの研究により、食肉製品の成分規格として用いられている試験法の国際整合性の確認、国際的な動向を踏まえた食品製造環境における衛生管理に用いる試験法の作成、新技術を用いた食品中ウイルスの定量性の向上、国際標準に則った試験法導入時の検証ガイドライン等、食品中の微生物試験の確立とその実施における国際実装を目指した関連文書の整備が進められ、その結果が輸出入を含む食品の微生物試験における、妥当性確認を含む国際標準化の推進に活用されうると考えられた。

研究分担者（五十音順）

五十君 静信 東京農業大学 総合研究所  
上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部  
松岡 英明 東京農工大学  
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部

研究協力者（五十音順）

井田 美樹 東京都健康安全研究センター  
微生物部  
小久保 彌太郎 公益社団法人日本食品衛生  
協会  
齋藤 明美 一般財団法人日本食品分析  
センター  
澤田 千尋 一般財団法人日本食品検査  
下島 優香子 東洋大学 食環境科学部  
都丸 亜希子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部  
西田 智子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部  
西野 由香里 東京都健康安全研究センター  
微生物部  
三橋 華子 東京都健康安全研究センター  
微生物部  
森 哲也 一般財団法人東京顕微鏡院  
森 曜子 東京農業大学 食品安全研  
究センター  
門間 千枝 東京都健康安全研究セン  
ー 微生物部

令和5年度食品からの微生物標準試験法検討委  
員会 委員（五十音順）

委員長 上間 匡 国立医薬品食品衛生研  
究所 食品衛生管理部  
副委員長 工藤 由起子 国立医薬品食品衛

生研究所 衛生微生物部

委員  
五十君 静信 東京農業大学 総合研究所  
泉谷 秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部  
岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品衛生管理部  
小田 俊一 一般財団法人日本食品分析セン  
ター  
甲斐 明美 公益社団法人日本食品衛生協会  
小久保 彌太郎 公益社団法人日本食品衛生  
協会  
小崎 俊司 大阪公立大学  
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  
澤田 千尋 一般財団法人日本食品検査  
品川 邦汎 岩手大学  
下島 優香子 東洋大学 食環境科学部  
松岡 英明 東京農工大学  
森 哲也 一般財団法人東京顕微鏡院  
森 曜子 東京農業大学  
食品安全研究センター  
門間 千枝 東京都健康安全研究センター  
微生物部  
横山 敬子 東京都健康安全研究センター  
微生物部

A. 研究目的

食品中の食中毒菌等の微生物を検出・定量す  
るための試験法は、日本国内では従来、当該微  
生物の専門家が自らの経験に基づき作出した  
試験法を公表し、その一部が通知法等の公定法  
として活用されてきた。しかしながら、食品の  
国際流通が一般的となっていた近年において  
は、一部の食中毒菌について Codex による国際  
規格が定められ、その試験法については国際標  
準化機構（ISO：International Organization for

Standardization) が策定する標準試験法 (ISO 法)、  
或いはそれと妥当性確認のなされた試験法を  
用いることが求められており、日本国内で用い  
られる試験法についても国際整合性を重視す  
ることが必要となっている。また、試験法の運  
用についても、国際的なガイドラインに則った  
検証を実施することが国際的に基本とされつ  
つある。本研究では、国際的な標準試験法と妥  
当性確認された食品中微生物の試験法の策定  
及びそれらの国際的な基準を満たす運用のた  
めのガイドライン等の作成を目的とし、食品の  
微生物試験に携わる約 20 名の専門家により構  
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、食中毒菌及び衛生指標菌  
の標準試験法及び技術仕様書の作成・改訂、ガ  
イドラインの策定を行っている。各試験法及び  
ガイドラインは作成方針に則り、公開の場での  
議論を行い、4 つのステージ (ST1~ST4) で検  
討が進められている。今年度の研究では、現在  
食肉製品の成分規格となっているクロストリ  
ジアの試験法、国際的に食品製造施設の衛生指  
標として用いられているリステリア属菌の試  
験法、分子生物学的手法の導入に関する研究と  
してデジタル PCR に関する検討、食品中微生  
物試験法の国際動向の把握及び妥当性評価に  
関する研究及び食品微生物試験法の妥当性評  
価ガイドライン策定に向けた研究を実施した  
ので、報告する。

## B. 研究方法

### 1. クロストリジア試験法に関する研究

1) 関連する国際的な標準試験法に関する調査  
クロストリジウム属菌に関する国際的な標準  
試験法として、以下を調査対象とした。

①ISO 法

②アメリカ食品医薬品局 Food and Drug

Administration (FDA) の Bacteriological  
Analytical Manual (BAM 法)

③アメリカ合衆国農務省・食品安全検査局 Food  
Safety and Inspection Service, U.S. Department of  
Agriculture (USDA-FSIS) の Microbiology  
Laboratory Guidebook (MLG 法)

### 2) 原案の素案作成 (ST1 案)

パウチ法と国際標準試験法の比較表を作成  
し、作業部会を開催して検討すべき課題および  
妥当性評価項目の抽出を行った。

### 3) 原案の作成 (ST1)

第 80 回検討委員会に議題として提出し、試  
験法案の説明および討議を行った。

## 2. リステリア属菌試験法案の検討

1) リステリア属菌試験法 (NIHSJ-40TS 及び  
NIHSJ-41TS) の作成

第 80 回及び第 81 回食品からの微生物標準試  
験法検討委員会において、リステリア属菌試験  
法作業部会案について討議を行った。それらの  
内容に基づき、リステリア属菌試験法作業部会  
においてそれぞれが保有するリステリア属菌  
菌株の性状 (各選択分離培地及び確認試験用培  
地上の集落性状、溶血性等) を試験・確認する  
と共に、今後データを集積すべき点についての  
討議を行った。

2) リステリア属菌試験法の改訂に関する国際  
動向に関する情報収集

ISO/TC34/SC9 の WG32 (リステリアの前増菌  
培地の検討) のオンライン会議 (令和 5 年 4 月  
及び 9 月、令和 6 年 3 月開催) に参加し、リス  
テリア・モノサイトゲネス及びリステリア属菌  
の前増菌培地の変更に関する国際標準試験法  
の改訂動向についての情報収集を行った。

### 3. デジタル PCR の検討

#### 1) dPCR の原理・メリットなどについての情報収集

Google 検索にて[dPCR 原理]のキーワードで検索を実施して上位に表示された以下の4社のサイトを参照した。

Thermofisher Scientific 「次世代の定量技術！デジタル PCR の原理とは？」

QIAGEN 「dPCR 対 qPCR」

Eurofins 「第 3 世代の PCR～デジタル PCR～ddPCR はここがすごい | これって何？バイオコラム第 44 回」

AZ Science 「デジタル PCR 装置とは？原理やメリット・用途を分かりやすく解説」

(各サイトの URL については分担報告書に記載)

#### 2) dPCR 関連文書

European Network of GMO Laboratories (ENGL) の報告書 Overview and recommendation for the application of digital PCR を参照した。

#### 3) dPCR の基本性能の検証

##### 3)-1 使用機器

qPCR: 7500 realtime PCR システム (Thermofisher)

dPCR: QIAcuity ONE (QIAGEN)

##### 3)-2 使用試薬

qPCR: TaqMan Fast Virus 1 Step Master Mix (Thermofisher)

dPCR: QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (QIAGEN)

##### 3)-3 PCR 用プライマープローブ

ノロウイルス：病原体検出マニュアル ノロ

ウイルス (通知法) および ISO15216-1(ISO)に示される配列を用いた。

A 型肝炎ウイルス: ISO15216-1(ISO)に示される配列を用いた。

#### 4) ノロウイルス qPCR 用陽性コントロールプラスミド

タカラ社 RR250A を用いた。

#### 5) 試薬の調整および PCR 条件

qPCR については ISO に準じてプライマー、プローブの濃度を設定し、試薬の説明書に従って調整した。

dPCR については ISO に準じてプライマープローブの濃度を設定し、試薬説明書に従って調整した。

### 4. 国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究

令和 5 年 6 月には ISO/TC34/SC9 総会に五十君他 5 名が日本代表団 (JISC) として参加し、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、国際酪農連盟の国内委員会は以前より乳製品の ISO 基準の策定に寄与していたことから、2023 年 4 月より乳の国際基準を検討する ISO/TC34/SC5 に P メンバーとして活動することになり、こちらのサブコミTEEからも情報収集を行った。

加えて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についても、AOAC International 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からその動向について情報収集すると共に、妥当性確認に関する文書の内容を精査した。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し、我が国における食品の微生物

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更新、妥当性確認に関する考え方の整理を行うと共に、国内における妥当性確認の手法の方向性を検討して、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た。検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な導入検証（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、ガイドライン案を作成した。公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格 ISO 17468 について精査も行った。

## 5. 妥当性評価ガイドライン策定に向けた研究

### 1) 検証ガイドラインの作成

検証ガイドラインの目的や適用に関して、国内の標準法検討委員会及びバリデーション作業部会で議論を行った。

### 2) 妥当性確認関連文書に関する議論の動向調査

ISO/TC34/SC9, 2023 年次総会 (R5.6.27- 6.30) (WEB 参加)、また SC9 内の妥当性確認ワーキンググループ 3 (WG3) の専門技術委員として、WG3 会議 (R5.4.3-4.4, R5.11.6-11.7) (WEB 参加) に出席した。さらに SC9 あるいは SC9/WG3 から随時発せられるメール審査(本年度は8回)に対応し、必要に応じてコメントを発信した。審査内容は多岐にわたるので、都度、SC9 国内委員に配信して意見を集約するようにした。

妥当性確認に関しては、SC9 及び SC9/WG3 で議論されてきた主要なトピックをまとめ、その理由や背景について概説した。

### 3) ISO 16140-2 に基づく食品微生物試験法バリデーションの手引き

先行研究の集大成としてまとめた解説文書を基に、本年度実施された ISO 16140-2 の改訂の議論を反映させ、改訂版(R6.4.18)としてまとめた。

## C. 研究結果

### 1. クロストリジウム試験法に関する研究

#### 1) 関連する国際的な標準試験法

##### ① ISO 法

2023 年に亜硫酸塩還元嫌気性細菌の集落計数法 ISO 15213:2003 が改訂され、亜硫酸塩還元クロストリジウム属菌の集落計数法 ISO 15213-1:2023 が発行されている。

##### ② BAM 法

Chapter 16 がウエルシュ菌の集落計数法、Chapter 17 がボツリヌス菌・毒素および毒素遺伝子の検出法となっているが、衛生指標としてのクロストリジウム属菌の試験法は規定されていない。

##### ③ MLG 法

Chapter 13 が食肉および食鳥肉製品のウエルシュ菌試験法(集落計数法)であり、Chapter 14 は食肉および食鳥肉製品からのボツリヌス毒素検出法であるが、衛生指標としてのクロストリジウム属菌の試験法は規定されていない。

#### 2) 原案の素案作成 (ST1 案)

国内の公定法であるパウチ法、および国際標準試験法である ISO 15213-1:2023 について比較を行った(百瀬分担報告書表 2)。

2つの試験法の主な違いは、封入/混釈する検体量・培地組成・培養条件であり、また、芽胞数を求める際の加熱処理条件も異なっていた。寒天培地一枚のみを用いて計測したと仮定した場合の理論上の検出下限値は、パウチ法が 1 cfu/g、ISO 15213-1:2023 が 10 cfu/g である。なお、ISO 15213-1:2023 には 140 mm 程度の大シ

ヤーレを用いて混釈するプロトコールもあり、この場合の検出下限値はパウチ法と同じ 1 cfu/g となる。

パウチ法が成分規格試験に採用された背景としては、嫌気性条件の作出が当時は難しかったこと、培養温度は他の衛生指標菌の試験にあわせて 35 °C が採用されたこと、培養時間を 48 時間とした場合パウチ内で黒色部が拡散し観察が困難になるため 24 時間が採用されたことが挙げられた。また、加熱処理条件は、規格試験策定に当たって業界に意見を求め、実際の加熱温度と時間を基に条件設定がなされていた。

他の衛生指標菌の標準試験法作成方針も考慮し、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入する方針を主軸とした原案の素案 (ST1 案) をまとめ、第 80 回検討委員会へ議題として提出した。

### 3) 原案 (ST1) の作成

第 80 回検討委員会に提出した素案 (ST1 案) は、委員による討議の結果、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入することで委員会の承認を得た。また、パウチ法について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付する方針となった。試験法番号として NIHSJ-42 を付与し、NIHSJ-42-ST1 が確定した。

## 2. リステリア属菌試験法案の検討

### 1) リステリア属菌試験法案の検討

第 80 回食品からの微生物標準試験法検討委員会 (令和 5 年 10 月 19 日開催) において、NIHSJ-40TS 及び 41TS の作業部会案 (ST2 案) についての説明を行ったところ、①NIHSJ/40TS (定性試験法) における二次増菌培養について、

Lm とそれ以外の菌種で手順の記載を分けるのではなく、リステリア属菌の検出手順について記述する方が、試験者にとって理解しやすいのではないかと②NIHSJ-41TS (定量試験法) においては、準拠する ISO 11290-2 : 2017 と同様に酵素基質培地のみを用いることとしているが、リステリア属菌の中に酵素基質培地上での発育が抑制されるものがあることから、NIHSJ-40TS と同様に酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用とすべきではないかと③血液寒天培地を用いる場合には、使用する血液の動物種を指定したほうがよいのではないかと、との意見が出された。また、第 81 回食品からの微生物標準試験法検討委員会 (令和 6 年 2 月 29 日開催) においては、①確認試験の一つである運動性試験に関し、旋回運動が 37°C 培養菌でも観察可能かと②学術的な細菌分類と食品の検査は主旨が異なるため、本試験法の目的を明確にした上で対象となる菌群の範囲をどのように設定するか、との質問がなされた。それらの意見を元に作業部会案の再検討を行い、試験法案に反映させ、二次培養手順についての記載を変更した (岡田分担報告書表 1)。溶血性試験に用いる血液の動物種については、ISO 11290 では「羊、仔牛又は牛」とされている。一方、国内で一般的に入手可能な血液の動物種には羊、馬、ウサギ等が挙げられる。作業部会内でのこれまでの経験上溶血性試験に用いる血液は羊が最も適していたことから、羊血液を用いる旨を記載することとした。また、NIHSJ-41TS における酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用については、作業部会内での保有菌株を用いた集落形成性の比較検討を行った (岡田分担報告書表 2)。今回用いた 7 菌種のリステリア属菌のうち、*Listeria seeligeri* の一部の菌株が酵素基質培地の 1 種類で集落形成性が低いことが示された。

同様に、*Listeria grayi* 及び *Listeria newyorkensis* でも一部の菌株がその他の選択分離培地において集落形成能が低い結果を示した。また、Lmの一部の菌株は酵素基質培地上でハローの形成能が低く、それらの菌株は血液寒天培地上での溶血性も低かった。その他の選択分離培地上の集落色は黄色、灰色及びオリーブ色など多様性があったが、菌種による違いではなく、同一菌種内でも菌株によって異なる色合いを示すことが明らかとなった。運動性試験については今後の検討項目とし、作業部会内での保有菌株を用いて 25°C から 37°C での運動性を確認することとなった。

## 2) リステリア属菌試験法の改訂に関する国際動向に関する情報収集

ISO/TC34/SC9 の WG32 (リステリアの前増菌培地の検討) のオンライン会議 (令和 5 年 4 月及び 9 月、令和 6 年 3 月開催) に参加し、リステリア・モノサイトゲネス及びリステリア属菌の前増菌培地の変更に関する国際標準試験法の改訂動向についての情報収集を行った。現在様々な前増菌培養条件 (培地組成、培養温度及び培養時間の組み合わせ) の比較検討が行われており、今後、その中から更に比較検討を行う条件を選定していくこととなった。

## 3. デジタル PCR の検討

### 1) dPCR の原理、メリット

上間分担報告書図 1 に dPCR の原理を示した。dPCR は検体由来の核酸と増幅用の試薬 (PCR 酵素やプライマー、プローブなど) の混合は qPCR と同様に行う。qPCR がチューブで検体と試薬の混合を行い、そのままサーマルサイクラーにて PCR 反応を行うのに対して、dPCR では検体に含まれる標的遺伝子を限

界希釈して微小区画に 1 または 0 となるように分配する。微小区画は検体・試薬の混合液にオイルを加えてエマルジョン化して微小区画化するドロップレット方式または、専用のプレート上に作成された微小ウェルに分配するウェルチップ方式がある。どちらも 1 反応あたりの微小区画数は数万から数十万程度となる。qPCR では微小区画化せずに反応液中に含まれるテンプレートの量に比例して増幅されてくるターゲットを検出するのに対して、dPCR では微小区画ごとにターゲットが存在すれば増幅により陽性と判定される。検体・試薬の混合液は多くの場合 50µL 程度であるので、数万の微小区画それぞれの陰陽判定にはキャピラリーや高精度カメラによる撮影が必要となる。

主な dPCR のメリットとしては以下の点が挙げられる。

- ・ qPCR が定量のために検量線、および検量線作成のための標準遺伝子が必要であるのに対して、検量線や標準品の必要なく定量が可能。
- ・ dPCR は PCR 終了後のエンドポイントで判定するため PCR 増幅効率の影響が小さい。
- ・ 微小区画化することで阻害物質の影響を小さくできる。

qPCR のメリットは以下の点が挙げられる。

- ・ 低濃度から高濃度まで検出可能な広いダイナミックレンジを持つ。
- ・ PCR 反応中に増幅の確認ができる。
- ・ 広く確立されたプロトコルが豊富にある。

上間分担報告書表 1 に dPCR と qPCR の比較を示した。

## 2) dPCR 関連文書の解析

dPCR は、PCR であるので、コンベ PCR、qPCR と基本的なターゲット遺伝子増幅の原理は同様である。従って、qPCR で確立された多くのプロトコル（プライマー、プローブの濃度、温度サイクル条件など）が応用可能と考えられるが、dPCR の導入にあたって検討すべきこととして以下の点が挙げられる。

- ・ ドロップレット dPCR の場合、核酸抽出試薬がドロップレット形成に影響する可能性がある。
- ・ 2 本鎖 DNA の場合、2 本鎖を denature 後に微小区画へ分配すると 2 倍にカウントされる可能性がある。
- ・ ドロップレット、ウェルチップどちらの dPCR においても、機器に最適化された試薬を用いる必要がある、qPCR で使用している試薬はそのまま利用できない可能性が高い。
- ・ プライマー、プローブの濃度は微小区画化されることで qPCR よりも相対的に高濃度となるため、至適濃度については検討が必要となる可能性がある。
- ・ qPCR プローブでクエンチャーとして使用している標識を見直す必要がある場合がある。
- ・ PCR サイクルのアニーリング温度は至適条件を検討する必要がある可能性が高い。

## 3)dPCR の基本性能の検証

### 3)-1 ノロウイルスコントロールプラスミドを用いたダイナミックレンジの検証

qPCR 用試薬として市販されているノロウイルス GI および GII のコントロールプラスミド（タカラ社 RR251A）をと ISO プライマー、プロ

ーブ用いて、qPCR と dPCR の測定レンジを比較した。qPCR では GI、GII ともに  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L のレンジで確実に検出可能であった。dPCR では  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L のレンジで検出可能であった（上間分担報告書図 2 : GI, 同図 3 : GII）。

通知法プライマー、プローブを用いた場合、dPCR では GI（上間分担報告書図 4）、GII（同図 5）ともに定量不可能となった。

### 3)-2 qPCR の Ct 値と dPCR による定量値の関係

3)-1 の結果を参考に、陽性コントロールプラスミドの希釈液を調整し、qPCR および dPCR を実施し、検出感度を比較した結果を図 6 に示す。X 軸が qPCR による Ct 値を示しており、最小 20.2 から最大 41.0 まで qPCR では検出されていた。一方で、dPCR では ISO プライマーを用いる場合 Ct 値 23.5 から 31.9 までは陽性として定量値が示された。

## 4. 国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究

### 1) 微生物試験をとりまく国際情勢の把握

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;国際標準化機構の示す試験法であり、その他の代替試験法を用いる場合は、ISO 16140 シリーズ（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。2023 年 6 月に、ストックホルムで開催された ISO/TC34/SC9（食品の微生物試験法）及び CEN/TC463 総会（令和 5 年 6 月 26-30 日）へ参加し、P メンバー国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/TC34/SC9の動向に関する情報収集とISO試験法の検討を行った。

ISOが作成する規格には、製品規格やマネジメント規格だけではなく、食品の微生物試験法に関するものがある。それぞれの規格は新規提案をもとに段階的に審議されたのち国際規格として発行されるが、個別の審議はTC (Technical Committee; 専門委員会) またはTCの下部組織であるSC (Sub-Committee; 分科委員会) で行われる。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。SC5についても、2023年よりOメンバーからPメンバーとなり、積極的な活動を開始した。

TC34/SC9に係る「国内審議団体」として、2002年から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。ISOへの参加地位には、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。現在、研究班から五十君と岡田がSC9の国内委員会に参加している。

一方、乳製品についてはISO/TC34/SC5「牛乳及び乳製品」が規格の作成を担当している。SC5においても微生物試験法の策定を行っており、これまで国際酪農連盟を介してこの活動を行

ってきたが、2023年よりISO/TC34/SC5についても、OメンバーからPメンバーとなり、積極的な活動を開始した。SC5の国内委員会には、研究班から五十君と岡田が参加している。

2023年度のSC9総会は、6月にストックホルムにて、対面とwebのハイブリッド方式で開催され、前半の1日間はCEN/TC463の総会、後半の4日間にISO/TC34/SC9の総会が行われた。ISO/TC34/SC9の総会への参加国は、フランス(幹事国)他の約40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。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省略する。

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、25のワーキンググループが活動している。今年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などであった。

## 2) バリデーションガイドラインの現状

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、現在6つの文書に細分化され、順次規格として文書化が進んでいる。一方、米

国の AOAC International は、ISO 16140 シリーズ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きた。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 シリーズの改訂では、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。

昨年度から引き続き AOAC International と ISO の 16140 シリーズの ISO/TC34/SC9 の文書との整合性を考慮し、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。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 ISO 16140 シリーズ、公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格 ISO 17468などを元に、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。ISO 17468 については、これまでホームページで公表していた NIHSJ 法の策定手順と共通性が高く基本的には同等なものといえるが、表現など一部の修正を行った。

一方、検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）についても、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせる

ため整理した。ISO 16140 シリーズのベリフィケーションに関する文書 16140-3 は、かなり難解な内容を含んでおり、その和訳に相当する文書の作成を松岡が担当した。一方、公定法や代替法などを実施する試験所における導入検証（ベリフィケーション）については、実用性を尊重して検討する必要がある重要な項目を検討し、実用的なガイドライン案を作成した。別添文書に示す。

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、通常の商品から検出の可能である一般生菌数や衛生指標菌のレベルの確認となるため、公定法などの培養による方法に限定する必要はなく、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示し、その考え方の要点をまとめた。また、これに該当する試験法リストを更新した。

## 5. 妥当性評価ガイドライン策定に向けた研究

### 1) 検証ガイドラインの作成

第 5 改訂版から出発して、改訂を重ね、第 10 改訂版 (R6.3.3) としてまとめた (添付資料 1)。

(注：著作権のため、現時点では公開しない)

この版は、最終の標準法検討委員会での議論を反映させた内容になっているが、改めて、次年度の委員会で完成版としての承認を受ける予定である。

### 2) 妥当性確認関連文書に関する議論の動向調査

2)-1. 「確定試験」における偽陽性や偽陰性の表記について

定性試験において、参照法と代替法の比較だけでなく、さらに確定試験が課されている。その場合の結果が例えば、参照法陽性、代替法陽性、確定試験陰性の場合、「代替法の偽陽性による陽性一致」というような複雑な表現をする。この表現をめぐる多くの議論が交わされたが、漸く、決着した。その結果は、添付書類2に反映させた。

#### 2)-2. LOD-RLOD 算出プログラムの改訂

<https://standards.iso.org/iso/16140/> から >4>ed-1>en>PODLOD と順次進んで到達するサイトで確認できる。菌濃度対 MPN の関係から LOD<sub>50</sub> を求める解析プログラムは <https://standards.iso.org/iso/7218/> のサイトで“MPN calculation Excel program”を選択してダウンロードできる。

#### 3) -3.大きな検体の扱い

検体の大きさは従来 25 g であったが、定性試験において、それより大きい検体、例えば 100 g、200 g、375 g などを直接試験することが必要になってきた。環境試料では多くの場合、大検体を扱う。また国や地域によって大検体での試験が要請されている場合がある。そして、大検体中の微生物の性質は小検体中の場合とは異なるようだ、との指摘がある。そこで、検体の大きさの違いによる影響をバリデーションの項目にも加えるようになった。

#### 2) -4. WG3「バリデーション」とWG2「統計学」との連携強化

バリデーションにおける判定基準では統計学的评价が重要である。しかし、WG3 は従来 WG2 の提言を一方向的に受け入れてきた。しかし、バリデーションにおける具体的実施条件と

統計学的判定条件は互いに密接に関連している。そこで、文書作成の早い段階から意見交換することが重要と考えられ、WG2/WG3 サブワーキンググループができた。

#### 2) -5. ISO 17468 における国際コラボの必要性

バリデーションの最終段階は研究室間共同試験 (Interlaboratory study; ILS) (AOAC ではコラボスタディ Collaborative study) である。参照法のバリデーションの場合は、これに参加する試験室が2か国以上でなければならない、となった。我が国にとっては煩雑さが増すので反対意見を述べたが通らなかつた。国際的な参照法であるから2か国以上でバリデーションするのが当然という意見が大勢であった。危険を伴う検体の場合は、実施者の責任で、輸送中の安全確保を十分考慮しなければならない。

#### 2) -6. ISO-16140-2 改訂に向けた議論

2024.6 の改訂に向けた修正の議論が多く行われた。例えば、定性法における評価法、ILS における RLOD 解析法、相対真度解析における計算と解釈など。また、新たに「商業的無菌試験：滅菌または超高温の乳製品および植物ベースの液体製品の妥当性確認のための技術プロトコル」が附録 I として加わった。

#### 2) -7. ISO 16140-8: ウイルスや寄生虫、ISO 16140-9: バクテリアトキシン文書の作成

文書の内容は具体的な試験法ではなくて、あくまでも「バリデーション」の条件。したがって、例えば、「コロボスタディでは試験室の数が5」と規定して細菌の場合より少ない (ISO 16140-8)。一方、具体的な試験法に関しては、例えば「Hepatitis E Virus (WG31)」、「Qualitative determination of staphylococcal (WG30)」、

「Detection of Clostridium botulinum toxins (WG26)」で議論されている。

3) 「ISO 16140-2に基づく食品微生物試験法バリデーションの手引き」のまとめ

添付資料2としてまとめた。

(注：版權のため、現時点では公開しない)

#### D. 考察

クロストリジウム試験法については、国内で成分規格試験として用いられているパウチ法は有用な手法であるが、国際的には嫌気培養の簡便法として過去に報告があるという状況であり、嫌気培養が比較的容易となった現状および他の衛生指標菌の方針ともあわせると、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 法を導入することは理に適ったものと考えられる。ISO 法はパウチ法よりも理論上の検出感度が低いことはマイナス面であるものの、現在の成分規格を満たすのに十分な感度を有している。なお、大シャーレを用いて混積量を増やすことは可能であり、大シャーレの操作性が問題となる場合には、深型シャーレを用いることも1つの解決手段となり得る。

今後の検討課題として、パウチ法の妥当性確認が必要となる。具体的には、ISO 15213-1:2023を参照法、パウチ法を代替法として ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を進める予定である。

パウチ法が Annex として標準試験法に添付されることになった場合、現在規格試験の対象となっている食品以外にも応用されることが想定される。試料中に食品由来の糖の持ち込みがあるものは、培養中にガス産生が起るためパウチ法の利用は難しく、この点は注意が必要である。また、食品衛生検査指針において、計数

する定型集落の大きさや必要に応じて実施する確認試験について解説がなされており、これらの項目も現在 ISO において検討中のウェルシュ菌試験法 (ISO 15213-2:2023 (集落計数法, published) および ISO/TS 15213-3 (定性法, under development)) との関連を考慮した今後の検討が必要と考えられる。

リステリア属菌試験法については、リステリア属菌の性状、挙動が Lm と同様であることから、欧米を中心とする諸外国では近年、食品製造環境におけるリステリア属菌のモニタリングを実施し、食品媒介リステリア症のリスク低減をはかっている。日本国内でも、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において、ISO 11290-1:2017 及び ISO 11290-2:2017 に準拠してリステリア属菌定性試験法 (NIHSJ-40TS) 及び定量試験法 (NIHSJ-41TS) を技術仕様書として整備することとなった。今年度の研究と食品からの標準試験法検討委員会における討議から、作業部会案の一部について、作業手順を理解しやすくなるよう修正すると共に、これまでの経験から確認試験で明確な結果を得られると思われる培地組成を明記する等の変更を行った。一方、今年度の検討委員会での指摘事項に、定量試験における酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用、運動性試験における 37°Cでの運動性の有無等、検討にある程度の菌株数が必要となる項目も含まれており、これらについては次年度の検討項目となった。更に、リステリア属菌試験の確認試験である鏡検について、グラム染色を実施する場合があるが、リステリア属菌の染色性を variable とする文献があることから、ISO 7218:2007 に記載されているグラム染色の代替法である劉氏の方法も含め、保有菌株を用いた検討も今後の課題と考えられた。

食品製造環境におけるリステリア属菌の存

在が、最終製品を汚染する Lm の汚染指標として大変有用であることは、既に国際的に認知されている。現在、我が国は国内で製造された食品の輸出を強化しており、最終製品の衛生管理のみでなく製造施設における衛生管理についても国際標準を取り入れる必要性が高まっている。また、バイオフィルム形成やパーシスター株の存在によって食品製造環境に長期的に生残するリステリア属菌の汚染防止、除去等を徹底することにより、食品製造施設の衛生レベルを高く保つことができると思われることから、我が国でも食品製造環境でリステリア属菌をモニタリングすることへの関心が高まっている。本研究により当該試験法を技術仕様書として整備することは、国内で完全制度化された HACCP による衛生管理の運用において実用性が高いと考えられた。

デジタル PCR ガイドラインの検討については、その原理はコンベ PCR、qPCR と基本的に同様であるが、大きなメリットは検量線作成のための標準検体を必要とせずに、検体中の遺伝子コピー数を定量できることである。遺伝子コピー数の定量値そのものが食品に含まれる微生物学的リスクをそのまま評価する指標とはならないが、ノロウイルスをはじめとした培養が困難な病原体の汚染指標として利用されることが今後十分考えられる。

現在主に用いられる qPCR では検量線を作成するために  $10^2 \sim 10^7$  copies/ $\mu$ L 程度の希釈列を、qPCR の実施ごとに作成する必要があり、検査実施者の手間がかかるうえに、遺伝子コンタミネーションのリスク要因ともなっている。 $10^7$  copies/ $\mu$ L 程度の標準検体を作成するためには、標準検体のストックの濃度は  $10^9$  copies/ $\mu$ L 程度が必要となり、qPCR 検査の実施のたびに非常に高濃度の標準検体を扱

う必要がある。PCR 自体の検出感度が非常に高いため、標準検体による実験系の汚染は、検査室への影響が深刻なものとなるため、標準検体が不要な dPCR は特に微量な遺伝子検出が必要とされる食品の検査にはおおきなメリットがあると考えられる。

一方で、C.3)dPCR の基本性能の検証で示されたように、すでに qPCR 検査として広く用いられているノロウイルスの検出系において、qPCR が  $1.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L のレンジの遺伝子を安定的に検出するのに対して、dPCR は  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L と検出可能なレンジは小さいことが示されたほか、プライマーとプローブについても ISO15216-1 に記載のノロウイルスを対象としたプライマーとプローブが dPCR でも qPCR と同様に利用できるのに対して、国内の検査で広く用いられている通知法のプライマープローブでは dPCR では利用が難しいことが示された。このようにすでに確立されている qPCR のプロトコルが dPCR でそのまま利用できるかどうかは、実際に検証する必要があることから、検査への導入までにはプライマー、プローブの設計を新たに行い、その特異性や検出感度についての検証が必要になる。

また、dPCR で定量値が得られるのが qPCR の Ct 値として 23 から 30 未満となったが、食品に含まれる病原体が微量である場合は dPCR で検出困難となる可能性を示唆している。今後のリスク評価でたとえば qPCR での Ct 値が 30 より大きい場合（検体中の遺伝子コピー数がある程度小さい場合）の健康リスクは許容できる、などの知見が得られた場合は dPCR の利用も促進されることが期待できる。

食品媒介ウイルスについては現在、感染性ウイルスの定量的評価による健康リスクに基

づいた規格基準が存在しないことから、細菌など定量的リスク評価の面で先行している検査対象について dPCR の利用導入を検証する必要もあると考えられた。

国際動向及び妥当性評価に関する研究については、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）試験法への貢献が期待されている。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。微生物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 シリーズに代替法のバリデーション等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 で行われており、現在も 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、パート 3 のベリフィケ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ている。パート 1 については、用語集であり、以前示した用語集案から時間を経ていることもあ

り、最新の情報を反映し改正作業を行い、研究班としては作業部会で検討後、標準試験法検討委員会での確認を行っていく予定である。

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、松岡を中心に整備を進めている（松岡分担研究報告書参照）。残る 3 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。これらの改訂に先立ち 2012 年にアメリカの AOAC International は、バリデーションガイドラインを公開している。これらの 2 つのガイドラインは相互に整合性を持つように議論されていたが、一部の用語について異なった概念が取り入れられており、今後このあたりの考え方をどのように調整してゆくかは、TC34/SC9 総会でのトピックスとなると思われる。

ISO の動向に合わせて、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、“公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格”である ISO 17468 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う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は導入検証（ベリフィケーション）が求められるため、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため実用性を考慮して、検討・整理した。こちらは将来的に実用的な文書としてまとめる必要があると思われることから、ガイドライン案としてまとめた（別添ガイドライン案参照）。

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、公定法などを用いるよりも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た。食品関連事業者の迅速簡便法選択の一助となると思われる。

#### E. 結論

クロストリジウム属菌の標準試験法として、ISO 15213-1:2023 を導入することとした。また、パウチ法と ISO 15213-1:2023 について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付する。試験法番号として NIHSJ-42 を付与し、クロストリジウム属菌標準試験法の Stage 1 が完了した (NIHSJ-42-ST1)。

食品製造環境におけるリステリア・モノサイトゲネスの汚染指標菌として国際的に重要視されているリステリア属菌の定性法 (NIHSJ-40TS) 並びに定量法 (NIHSJ-41TS) について、選択分離培地上での集落性状及び性状を、作業部会保有株を用いて検討すると共に、更に検討すべき課題を抽出した。

dPCR は検査室、実験系の深刻な汚染原因となる標準検体を必要とせずに定量値が得られることは、検査法として優れた点であるが、既存の qPCR のプロトコルがそのまま適用できない可能性もあるほか、遺伝子検出感度のレンジも qPCR に比較して小さいという大きな課題があり、検査導入に向けて検討すべき項目が多いと考えられる。

定量的なリスク評価の面で先行する病原体に対する検査法として検討することで、より実践的な導入に向けたガイドラインの策定が行えると思われる。

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、また AOAC インターナショナル年次大会参加者からの情報提供により、多くの新しい情報を得ることができた。バリデーショングイドラインである ISO 16140 シリーズ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 のバリデーショング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た。公定法策定に関する規格である ISO 17468 を基に NIHDJ 法の策定方法について整理を行った。また、バリデーシンの重要性、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. 健康危機管理情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 五十君静信。食中毒統計には表れないリステリア食中毒発生状況とその対策。フードケミカル 39 (6), 56-61, 2023.
- 2) 五十君静信。食中毒統計ではわからないリステリアの食中毒リスク 食の安全と安心通信。49, 2023

##### 2. 学会発表

- 1) 五十君静信。食肉の安全性の確保について 第59回全国食肉衛生検査所協議会全国大会 2023.7.19

- 2) 五十君静信。HACCP制度化後、微生物検査をどのように考えればよいのか  
NPO食の安全と微生物検査 2022年度微生物検査実技研修会 2024.1.26
- 3) 松岡英明：国際規格に基づく微生物試験法ベリフィケーションの技術的課題と適用事例. AOAC International Japan Section 25th Meeting, 2023.7.14

#### 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



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)  
令和5年度分担研究報告書

クロストリジウム属菌試験法の標準化に向けた研究

研究分担者 百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
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 (クロストリジウム属菌試験法作業部会)

小久保彌太郎\* 公益社団法人日本食品衛生協会  
齋藤明美 一般財団法人日本食品分析センター  
澤田千尋\* 一般財団法人日本食品検査  
西野由香里 東京都健康安全研究センター 微生物部  
森哲也\* 一般財団法人東京顕微鏡院  
門間千枝\* 東京都健康安全研究センター 微生物部

(五十音順; \*は食品からの微生物標準試験法検討委員会委員)

研究要旨

日本の食品の微生物規格では、特定加熱食肉製品および加熱食肉製品にクロストリジウム属菌の成分規格が設定されており、微生物学的品質評価のための衛生指標菌として用いられている。本分担研究では、食品の衛生管理における国際調和を目指し、クロストリジウム属菌の標準試験法について検討を行った。クロストリジウム属菌試験法における国内外の状況を調査した結果、国内においては公定法（成分規格試験）として嫌気培養を必要としないパウチ法が用いられている一方、国際的な標準試験法である ISO 15213-1:2023 には混積培養法が採用されている。国際整合性の観点および嫌気培養が比較的容易となった現状を鑑み、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入することとした。また、パウチ法と ISO 15213-1:2023 について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付することとした。以上を以て、クロストリジウム属菌標準試験法の Stage 1 が完了した。[NIHSJ-42-ST1]

A. 研究目的

本研究班は、国際調和の観点から、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）の運営を通じ、国際的な標準試験法もしくは科学的に妥当性が確認された試験法の整備を行っている。

日本の食品の微生物規格では、特定加熱食肉製品および加熱食肉製品にクロストリ

ジウム属菌の成分規格が設定されており (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-1130500-Shokuhinanzendu/0000071198.pdf>)、微生物学的品質評価のための衛生指標菌として用いられている（表1）。

クロストリジウム属菌は、土壌・海底・河川や湖沼の泥・ヒトや動物の腸管内など自然界に広く分布している。本菌群は芽胞を

形成することから、加熱や乾燥に対して強い抵抗性を示し、条件によっては加熱処理後も食品中に生残する可能性がある。現在、多くの市販食品に真空包装・ガス置換包装・脱酸素剤の添加等が行われており、内部を嫌気状態にすることで一般的には食品の保存性が高まるが、保存条件によっては生残したクロストリジウム属菌の増殖を助長し、腐敗・変敗など食品の品質劣化につながるおそれがある。

クロストリジウム属菌の試験法として、国内では、嫌気培養を必要としないパウチ法が特定加熱食肉製品および加熱食肉製品の成分規格試験となっているが、標準試験法は策定されていない。

本分担研究では、食品の衛生管理における国際調和を目指し、クロストリジウム属菌の標準試験法について検討を開始することとした。本試験法を標準化することによって、食品の製造から流通までの過程における衛生管理や微生物学的品質の担保に活用できる他、嫌気性芽胞形成菌を原因とする食中毒の発生予防のための試験標準化へもつながると期待される。公定法と国際標準試験法との間で科学的根拠に基づいた妥当性評価を実施することにより、国際整合性を持った標準試験法が整備できると考えられ、将来的には、迅速・簡便法導入時の性能評価における参照法として活用されることも期待される。

## B. 研究方法

### 1) 関連する国際的な標準試験法に関する調査

クロストリジウム属菌に関する国際的な標準試験法として、以下を調査対象とした。

#### ①国際標準化機構 International Organization for Standardization の ISO 法

②アメリカ食品医薬品局 Food and Drug Administration (FDA) の Bacteriological Analytical Manual (BAM 法)

③アメリカ合衆国農務省・食品安全検査局 Food Safety and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture (USDA-FSIS) の Microbiology Laboratory Guidebook (MLG 法)

### 2) 原案の素案作成 (ST1 案)

パウチ法と国際標準試験法の比較表を作成し、作業部会を開催して検討すべき課題および妥当性評価項目の抽出を行った。

### 3) 原案の作成 (ST1)

第 80 回検討委員会に議題として提出し、試験法案の説明および討議を行った。

## C. 研究結果

### 1) 関連する国際的な標準試験法

#### ① ISO 法

2023 年に亜硫酸塩還元嫌気性細菌の集落計数法 ISO 15213:2003 が改訂され、亜硫酸塩還元クロストリジウム属菌の集落計数法 ISO 15213-1:2023 が発行されている。

#### ② BAM 法

Chapter 16 がウエルシュ菌の集落計数法、Chapter 17 がボツリヌス菌・毒素および毒素遺伝子の検出法となっているが、衛生指標としてのクロストリジウム属菌の試験法は規定されていない。

#### ③ MLG 法

Chapter 13 が食肉および食鳥肉製品のウエルシュ菌試験法（集落計数法）であり、Chapter 14 は食肉および食鳥肉製品からのボツリヌス毒素検出法であるが、衛生指標としてのクロストリジウム属菌の試験法は規定されていない。

## 2) 原案の素案作成 (ST1 案)

国内の公定法であるパウチ法、および国際標準試験法である ISO 15213-1:2023 について比較を行った (表 2)。

2 つの試験法の主な違いは、封入/混釈する検体量・培地組成・培養条件であり、また、芽胞数を求める際の加熱処理条件も異なっていた。寒天培地一枚のみを用いて計測したと仮定した場合の理論上の検出下限値は、パウチ法が 1 cfu/g、ISO 15213-1:2023 が 10 cfu/g である。なお、ISO 15213-1:2023 には 140 mm 程度の大シャーレを用いて混釈するプロトコルもあり、この場合の検出下限値はパウチ法と同じ 1 cfu/g となる。

パウチ法が成分規格試験に採用された背景としては、嫌気性条件の作出が当時は難しかったこと、培養温度は他の衛生指標菌の試験にあわせて 35 °C が採用されたこと、培養時間を 48 時間とした場合パウチ内で黒色部が拡散し観察が困難になるため 24 時間が採用されたことが挙げられた。また、加熱処理条件は、規格試験策定に当たって業界に意見を求め、実際の加熱温度と時間を基に条件設定がなされていた。

他の衛生指標菌の標準試験法作成方針も考慮し、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入する方針を主軸とした原案の素案 (ST1 案) をまとめ、第 80 回検討委員会へ議題として提出した。

## 3) 原案の作成 (ST1)

第 80 回検討委員会に提出した素案 (ST1 案) は、委員による討議の結果、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 15213-1:2023 を導入することで委員会の承認を得た。また、パウチ法について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥

当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付する方針となった。試験法番号として NIHSJ-42 を付与し、NIHSJ-42-ST1 が確定した。

## D. 考察

国内で成分規格試験として用いられているパウチ法は有用な手法であるが、国際的には嫌気培養の簡便法として過去に報告があるという状況であり、嫌気培養が比較的容易となった現状および他の衛生指標菌の方針ともあわせると、クロストリジウム属菌の標準試験法として ISO 法を導入することは理に適ったものと考えられる。ISO 法はパウチ法よりも理論上の検出感度が低いことはマイナス面であるものの、現在の成分規格を満たすのに十分な感度を有している。なお、大シャーレを用いて混釈量を増やすことは可能であり、大シャーレの操作性が問題となる場合には、深型シャーレを用いることも 1 つの解決手段となり得る。

今後の検討課題として、パウチ法の妥当性確認が必要となる。具体的には、ISO 15213-1:2023 を参照法、パウチ法を代替法として ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を進める予定である。

パウチ法が Annex として標準試験法に添付されることになった場合、現在規格試験の対象となっている食品以外にも応用されることが想定される。試料中に食品由来の糖の持ち込みがあるものは、培養中にガス産生が起こるためパウチ法の利用は難しく、この点は注意が必要である。また、食品衛生検査指針において、計数する定型集落の大きさや必要に応じて実施する確認試験について解説がなされており、これらの項目も現在 ISO において検討中のウエルシュ菌試験法 (ISO 15213-2:2023 (集落計数法,

published) および ISO/TS 15213-3 (定性法, under development)) との関連を考慮した今後の検討が必要と考えられる。

#### E. 結論

クロストリジウム属菌の標準試験法として、ISO 15213-1:2023 を導入することとした。また、パウチ法と ISO 15213-1:2023 について、ISO 16140-2:2016 に基づいた妥当性評価を実施し、妥当性が確認できた場合、パウチ法を Annex として添付する。試験法番号として NIHSJ-42 を付与し、クロストリジウム属菌標準試験法の Stage 1 が完了した (NIHSJ-42-ST1)。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H. 参考文献

Bladel BO *et al.* Pouch method for the isolation and enumeration of clostridia. *Appl Microbiol* 13(2): 281-285, 1965.

Greenberg RA *et al.* Use of the anaerobic pouch in isolating *Clostridium botulinum* spores from fresh meats. *Appl Microbiol* 14(2): 223-228, 1966.

小久保彌太郎. 食品衛生検査におけるクロストリジウム測定用培地について. *メディアサークル* 32(11): 473-479, 1987.

楠博文. 食肉製品の規格基準改正について. *食品衛生研究* 43(7): 7-21, 1993.

ISO 15213:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions (withdrawn)

ISO 15213-1:2023, Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. - Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique

Rhodehamel E *et al.* Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 16: *Clostridium perfringens*. 2021. (Content current as of: 08/03/2021)

Solomon HM *et al.* Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 17: *Clostridium botulinum*. 2001. (Content current as of: 10/31/2017)

McNamara AM *et al.* USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook Chapter 13. Examination of meat and poultry products for *Clostridium perfringens*. 1998.

USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook Chapter 14. Methods for the detection of *Clostridium botulinum* toxins in meat and poultry products (ARCHIVED Feb 16, 2016).

表 1. 食肉製品の成分規格および保存基準の概要

(厚生労働省: 食品、添加物等の規格基準「食肉製品」より一部抜粋)

分類	区分別 表示事項	成分規格 (個別規格)	保存基準 (個別基準)
乾燥食肉製品 例: サラミ	なし	E. coli : 陰性 Aw < 0.87	
非加熱食肉製品 例: 生ハム	pH、Aw	E. coli ≤ 100/g 黄色ブドウ球菌 ≤ 1,000/g サルモネラ属菌 : 陰性 L. monocytogenes ≤ 100/g	10 °C以下 (肉塊のみを原料食肉とする Aw ≥ 0.95 の製品は 4 °C以下)
特定加熱食肉製品 例: ローストビーフ	Aw	E. coli ≤ 100/g クロストリジウム属菌 ≤ 1,000/g 黄色ブドウ球菌 ≤ 1,000/g サルモネラ属菌 : 陰性	Aw ≥ 0.95 : 4 °C以下 Aw < 0.95 : 10 °C以下
加熱食肉製品 例: ロースハム ソーセージ ベーコン類	包装後 加熱	大腸菌群 : 陰性 クロストリジウム属菌 ≤ 1,000/g	10 °C以下 (気密性の容器包装に充填後、製品中心部温度を 120 °Cで 4 分間加熱又は同等以上の方法で殺菌したものを除く)
	加熱後 包装	E. coli : 陰性 黄色ブドウ球菌 ≤ 1,000/g サルモネラ属菌 : 陰性	

日本において嫌気性芽胞形成菌数の規格基準がある食品

- ・ 特定加熱食肉製品および包装後加熱食肉製品の成分規格

クロストリジウム属菌 1,000/g 以下

グラム陽性の芽胞形成桿菌であって亜硫酸を還元する嫌気性の菌をいう。

- ・ ミネラルウォーター類 (殺菌・除菌無) の製造基準

原水: 芽胞形成亜硫酸還元嫌気性菌 陰性

表 2. 公定法（パウチ法）と ISO 法の比較表

	公定法	ISO 15213-1:2023
対象菌群	芽胞形成亜硫酸還元 偏性嫌気性菌	Sulfite-reducing <i>Clostridium</i> spp.
定性 / 定量	集落計数法（パウチ）	集落計数法（混積）
10 倍乳剤・ 希釈列の希釈液	ペプトン加生理食塩水	ISO 6887 series に従う
加熱処理	70 °C、20 分 （非加熱製品）	80 ± 2 °C、10 ± 1 分 （芽胞数を求めたい場合）
培地	クロストリジア 測定用培地	(modified) Iron sulfite agar
混積量 （検体 + 培地）	パウチ封入 10 mL + 15 mL	1 mL + 12-15 mL （重層 5 mL） 10 mL + 45-50 mL （重層 10 mL）
培養条件	好気培養 35 ± 1 °C、24 ± 2 時間	嫌気培養 37 ± 1 °C、48 ± 2 時間
確認試験	—	嫌気性 / 好気性 発育試験

【参考：公定法】

○食品、添加物等の規格基準

(昭和三十四年十二月二十八日)(厚生省告示第三百七十号)

○食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について

(平成五年三月一七日)(衛乳第五四号)

(別紙1) 食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品の試験法

○食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正

について(平成27年7月29日)(食安発0729第4号)

[別添]

(別紙1) 食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品の試験法

第2 試薬及び培地

1 微生物試験に用いる試薬及び培地

試薬及び培地は、次のとおりとする。なお、(2) から (6) については市販品を用いても差し支えない。

(5) クロストリジウム培地

標準処方は次のとおりとする。

混合ペプトン 15.0 g、大豆ペプトン 7.5 g、酵母エキス 7.5 g、肉エキス 7.5 g、クエン酸鉄アンモニウム 1.0 g、メタ重亜硫酸ナトリウム 1.0 g、L-システイン塩酸塩 0.75 g 及び寒天 30.0 g を精製水 1,000 mL に加え、加熱溶解し、滅菌する。最終 pH は  $7.6 \pm 0.1$  でなければならない。

第3 試験法

1 微生物

(5) クロストリジウム属菌試験法

試料液 10 mL 及び試料液の 10 倍希釈液 10 mL ずつをそれぞれについて 2 枚の滅菌パウチ(ラミネートフィルム製、市販品あり。)に正確に採り、あらかじめ加温して溶かし  $45^{\circ}\text{C}$  ~  $50^{\circ}\text{C}$  の温度に保持したクロストリジウム培地約 15 mL をこれに加え、よく混合し、熱シールした後、冷却凝固させる。培地が凝固した後、 $35.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  で 24 時間  $\pm 2$  時間培養する。この場合、検体の希釈に用いた滅菌ペプトン加生理食塩水 10 mL を培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養したものを対照とし、パウチ、滅菌生理ペプトン加食塩水及び培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確かめなければならない。菌数の算定は、黒色の集落につき、食品、添加物等の規格基準中第 1 食品の部 D 各条の

項の○ 氷雪の 1 氷雪の成分規格の(2)の 2. の a から g までに準じて行い、クロストリジウム属菌の菌数とする。

クロストリジウム属菌の菌数の算定は、次の要領による。

① 1 平板内に集落数 30~300 の場合

各原液及び倍率希釈の可検物の平板中集落数 30~300 のものを採り計測する。

② 全平板に集落数 300 以上の場合

全ての希釈検液の集落数が 300 以上であつたならば、その希釈倍率の最も高いものについて、後述の密集集落平板測定法により細菌数を計測する。

③ 全平板に集落数 30 以下の場合

全ての平板に 30 以下の集落が発生した場合は、その最も希釈倍率の低いものを計測する。ただし、この場合はその算定数に「以下」の文字を付けなければならない。

④ 拡散集落のある場合

選び出した平板に拡散集落のある場合は、次の条件のものに限りそれ相当の部分を計測する。

イ 他の集落がよく分散していて、拡散集落があつても計測に支障のないもの

ロ 拡散集落の部分が平板の 2 分の 1 以下の場合

⑤ 試験室内事故

次のような特殊な事故に対しては、試験室内事故 (L. A. ) とする。

イ 集落が発生しなかつた場合

ロ 拡散集落の部分が平板の 2 分の 1 を超える場合

ハ 汚染されたことが明らかなもの

ニ その他不適當と思われるもの

⑥ 算出法

細菌数は各場合の計測に有効な 2 枚以上の集落数の算術平均に希釈倍率を乗じたものとする。この数値は上位の 2 桁を有効数字として略算する。

⑦ 密集集落平板計測法

1 平板上の集落数が 300 を少し超えている場合は、その平板の一部分の集落数を正確に  $1\text{ cm}^2$  の区画のある計算板を用いて次の要領により計測し、それより平板全面の集落数を算出する。

イ  $1\text{ cm}^2$  に集落数 10 以下の場合は集落計測板の中心を通過し直交する 2 直径を作り、その中心より各  $1\text{ cm}$  ずつ区分し、6 か所の区画の面積中にある集落数を計測し、 $1\text{ cm}^2$

の平均集落数を求め、これに平板全面積を乗じて算出する。

- ロ  $1\text{ cm}^2$  に集落数 10 を超える場合は、イの場合の 4 区画について計測し、以下イと同様にして算出する。



令和5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

リステリア属菌定性及び定量試験法（技術仕様書）の策定に関する研究

研究代表者	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	東洋大学	食環境科学部
	井田美樹	東京都健康安全研究センター	微生物部
	西野由香里	東京都健康安全研究センター	微生物部
	三橋華子	東京都健康安全研究センター	微生物部
	都丸亜希子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	西田智子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨

近年、諸外国では食品製造環境のふき取り検査等において、リステリア属菌を対象菌とすることで、食中毒菌であるリステリア・モノサイトゲネスの汚染指標として施設・設備の衛生環境の維持を図っている。日本国内でもリステリア属菌試験法について技術仕様書（Technical Specification; TS）として整備する目的で、食品からの微生物標準試験法検討委員会において定性試験法（NIHSJ-40TS）並びに定量試験法（NIHSJ-41TS）の作成を行っている。今年度の本研究では作業部会案について実用性を高める目的で、作業部会保有のリステリア属菌菌株を用いて、各種培地上の集落の性状について解析を行うと共に、更に多くの菌株を用いて検討すべき項目の抽出を行った。

A. 研究目的

*Listeria monocytogenes*（以下 Lm）を原因菌とするリステリア症は脳脊髄膜炎、敗血症及び流死産を引き起こし、その場合の致命率は20%前後とされている。ヒトへの感染経路は主に汚染食品の喫食によるものであり、原因食品としては乳製品、肉製品、魚介類、野菜果物、惣菜等様々であることが知られている。また、本菌を含むリステリア属菌は4℃以下でも増殖可能であり、冷蔵保存した食品でも増殖が起こりうる。欧米諸国では頻繁に Lm による集団事例が発生していることから、Lm 汚染の防除が食品衛生上の最重要課題のひとつとされており、

リステリア属菌全体を衛生指標菌とした食品製造環境の衛生管理の実施が国際標準となっている。食品中微生物の国際標準試験法を作成している国際標準化機構（ISO）の TC34/SC9 においても、2017年にリステリア・モノサイトゲネスの試験法である ISO 11290-1 及び 2 を改訂した際に、その対象にリステリア属菌も含めている。現在日本国内ではリステリア属菌の試験法は整備されていないが、諸外国への食品輸出の際にリステリア属菌を試験対象とした製造施設のふき取り検査等による衛生管理が要求される可能性がある。また、令和3年度の HACCP 完全制度化に伴い、日本国内でも

製造工程管理項目の一つとしてリステリア属菌試験の実施を考慮する事業者が増えている。本研究では、国際的な試験法と整合性のあるリステリア属菌の定性及び定量試験法について、ISO 11290-1：2017 及び 2：2017 に準拠し、技術仕様書としての作成を行った。

## B. 研究方法

### 1) リステリア属菌試験法案の検討

第 80 回及び第 81 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、リステリア属菌試験法作業部会案について討議を行った。それらの内容に基づき、リステリア属菌試験法作業部会においてそれぞれが保有するリステリア属菌菌株の性状（各選択分離培地及び確認試験用培地上の集落性状、溶血性等）を試験・確認すると共に、今後データを集積すべき点についての討議を行った。

## C. 研究結果

### 1) リステリア属菌試験法案の検討

第 80 回食品からの微生物標準試験法検討委員会（令和 5 年 10 月 19 日開催）において、NIHSJ-40TS 及び 41TS の作業部会案（ST2 案）についての説明を行ったところ、①NIHSJ/40TS（定性試験法）における二次増菌培養について、Lm とそれ以外の菌種で手順の記載を分けるのではなく、リステリア属菌の検出手順について記述する方が、試験者にとって理解しやすいのではないか②NIHSJ-41TS（定量試験法）においては、準拠する ISO 11290-2：2017 と同様に酵素基質培地のみを用いることとしているが、リステリア属菌の中に酵素基質培地上での発育が抑制されるものがあることから、NIHSJ-40TS と同様に酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用とすべきではない

か③血液寒天培地を用いる場合には、使用する血液の動物種を指定したほうがよいのではないかと、との意見が出された。また、第 81 回食品からの微生物標準試験法検討委員会（令和 6 年 2 月 29 日開催）においては、①確認試験の一つである運動性試験に関し、旋回運動が 37°C 培養菌でも観察可能か②学術的な細菌分類と食品の検査は主旨が異なるため、本試験法の目的を明確にした上で対象となる菌種の範囲をどのように設定するか、との質問がなされた。それらの意見等を元に作業部会案の再検討を行い、試験法案に反映させ、二次培養手順についての記載を変更した（表 1）。溶血性試験に用いる血液の動物種については、ISO 11290 では「羊、仔牛又は牛」とされている。一方、国内で一般的に入手可能な血液の動物種には羊、馬、ウサギ等が挙げられる。作業部会内でのこれまでの経験上溶血性試験に用いる血液は羊が最も適していたことから、羊血液を用いる旨を記載することとした。また、NIHSJ-41TS における酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用については、作業部会内での保有菌株を用いた集落形成性の比較検討を行った（表 2）。今回用いた 7 菌種のリステリア属菌のうち、*Listeria seeligeri* の一部の菌株が酵素基質培地の 1 種類で集落形成性が低いことが示された。同様に、*Listeria grayi* 及び *Listeria newyorkensis* でも一部の菌株がその他の選択分離培地において集落形成能が低い結果を示した。また、Lm の一部の菌株は酵素基質培地上でハローの形成能が低く、それらの菌株は血液寒天培地上での溶血性も低かった。その他の選択分離培地上の集落色は黄色、灰色及びオリーブ色など多様性があったが、菌種による違いではなく、同一菌種内でも菌株によって異なる色合いを示すこ

とが明らかとなった。運動性試験については今後の検討項目とし、作業部会内での保有菌株を用いて 25°Cから 37°Cでの運動性を確認することとなった。

#### D. 考察

リステリア属菌の性状、挙動が Lm と同様であることから、欧米を中心とする諸外国では近年、食品製造環境におけるリステリア属菌のモニタリングを実施し、食品媒介リステリア症のリスク低減をはかっている。日本国内でも、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において、ISO 11290-1:2017 及び ISO 11290-2:2017 に準拠してリステリア属菌定性試験法 (NIHSJ-40TS) 及び定量試験法 (NIHSJ-41TS) を技術仕様書として整備することとなった。今年度の研究と食品からの標準試験法検討委員会における討議から、作業部会案の一部について、作業手順を理解しやすくなるよう修正すると共に、これまでの経験から確認試験で明確な結果を得られると思われる培地組成を明記する等の変更を行った。一方、今年度の検討委員会での指摘事項に、定量試験における酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用、運動性試験における 37°Cでの運動性の有無等、検討にある程度の菌株数が必要となる項目も含まれており、これらについては次年度の検討項目となった。更に、リステリア属菌試験の確認試験である鏡検について、グラム染色を実施する場合があるが、リステリア属菌の染色性を variable とする文献があることから、ISO 7218:2007 に記載されているグラム染色の代替法である劉氏の方法も含め、保有菌株を用いた検討も今後の課題と考えられた。

食品製造環境におけるリステリア属菌の存在が、最終製品を汚染しうる Lm の汚染指標として大変有用であることは、既に国際的に認知されている。現在、我が国は国内で製造された食品の輸出を強化しており、最終製品の衛生管理のみでなく製造施設における衛生管理についても国際標準を取り入れる必要性が高まっている。また、バイオフィーム形成やパーシスター株の存在によって食品製造環境に長期的に生残するリステリア属菌の汚染防止、除去等を徹底することにより、食品製造施設の衛生レベルを高く保つことができると思われることから、我が国でも食品製造環境でリステリア属菌をモニタリングすることへの関心が高まっている。本研究により当該試験法を技術仕様書として整備することは、国内で完全制度化された HACCP による衛生管理の運用において実用性が高いと考えられた。

#### E. 結論

食品製造環境におけるリステリア・モノサイトゲネスの汚染指標菌として国際的に重要視されているリステリア属菌の定性法 (NIHSJ-40TS) 並びに定量法 (NIHSJ-41TS) について、選択分離培地上での集落性状及び性状を、作業部会保有株を用いて検討すると共に、更に検討すべき課題を抽出した。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

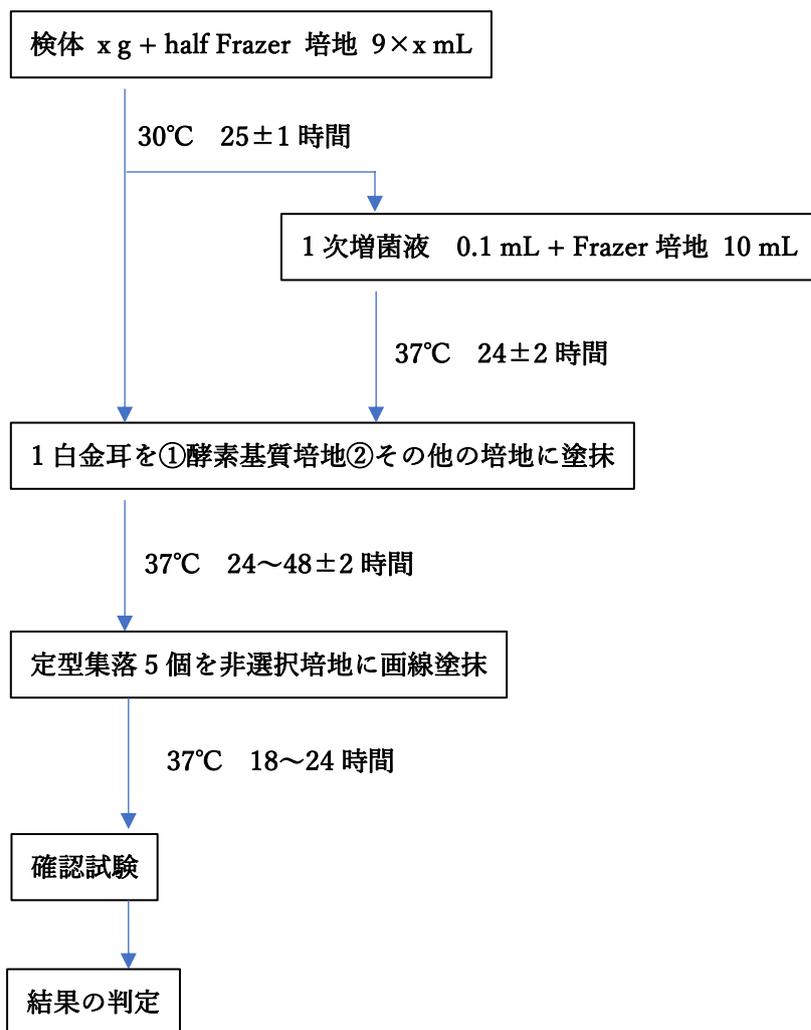


図 1. NIHSJ-40TS (ST2) フロー図

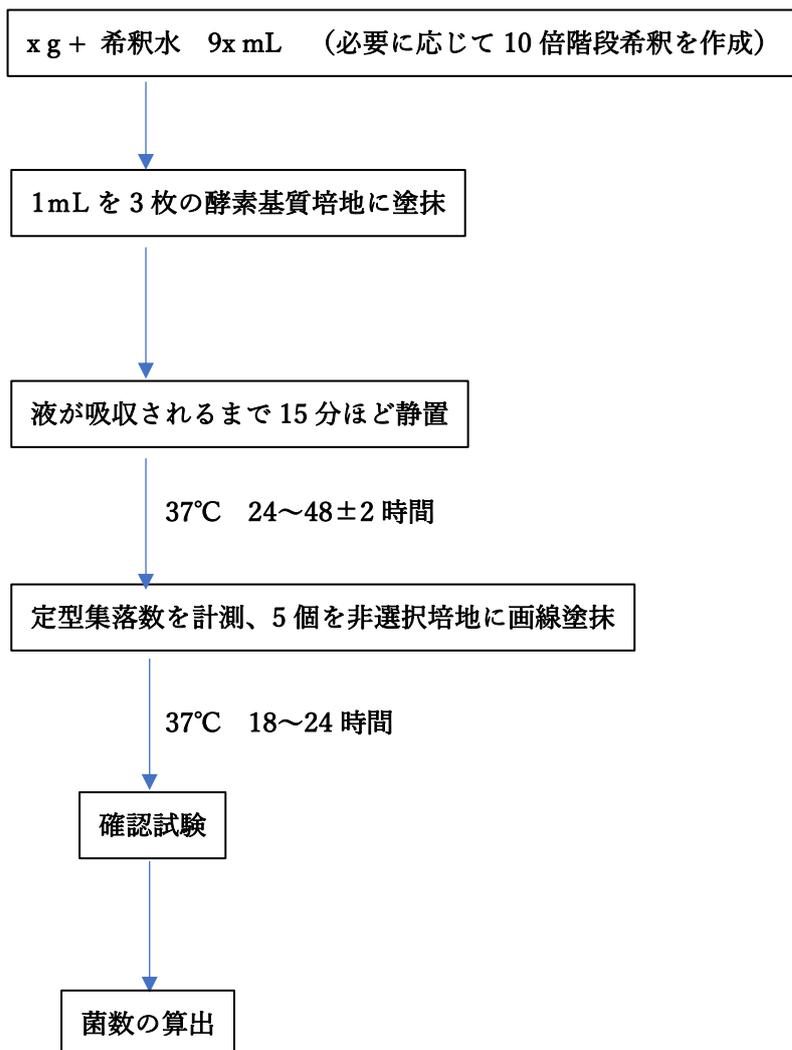


図 2. NIHSJ-41TS (ST 2) フロー図

表 1. NIHSJ-40TS の 2 次増菌培養に関する記述の変更

旧	新
<p>5.2.2.</p> <p>37 °Cで 24 時間 ± 2 時間培養する。L. <i>monocytogenes</i> 以外のリステリア属菌の検出には、更に 24 時間の培養を行うことでより多くの菌種を検出できる。</p>	<p>5.2.2.</p> <p>37 °Cで 24 時間 ± 2 時間培養する。<del>L. <i>monocytogenes</i> 以外のリステリア属菌の検出には、</del>更に 24 時間の培養を行うことでより多くの菌種を検出できる。</p>

表 2. 作業部会によるリステリア属菌の選択分離培地上の集落形成及び性状試験検討結果

菌種	総菌株数	酵素基質培地 1			酵素基質培地 2			その他の選択分離培地			血液寒天	
		使用菌株数	コロニー	ハロー	使用菌株数	コロニー	ハロー	使用菌株数	コロニー	ハロー	使用菌株数	溶血
<i>L. monocytogenes</i>	13	5	青	小～あり	13	青	小～あり	12	オリーブ/灰色	黒	13	±～+
<i>L. innocua</i>	8	2	青	なし	8	青	なし	8	オリーブ	黒	8	—
<i>L. seeligeri</i>	17	1	青	なし	17	青/ほぼ発育なし	なし	8	オリーブ/灰色	黒	17	—～+
<i>L. welshimeri</i>	8	3	青	なし	8	青	なし	7	オリーブ/灰色	黒	8	—
<i>L. grayi</i>	4	2	青	なし	4	青	なし	4	黄色/発育なし	黒	4	—
<i>L. ivanovii</i>	1	1	青	あり	1	青	あり	1	灰色	黒	1	+
<i>L. newyorkensis</i>	2	2	青	なし	2	青	なし	2	オリーブ/発育なし	黒	2	—
<i>B. cereus</i>	4	2	発育なし	なし	4	ほぼ発育なし	あり/なし	4	白	なし	4	—～+



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標準化実装に向けた研究」  
分担報告書

デジタル PCR とリアルタイム PCR の性能比較に関する研究  
研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所

## 研究要旨

微生物の検出において、従来の培養法による検査では、結果判定までに数日の時間が必要となること、また食品媒介性ウイルスなど有効な培養法が十分確立されていない病原体には対応できないこと、ゲノム解析による詳細な微生物の疫学解析の発展などから、遺伝子検査法は食品からの微生物検出において重要なツールとなっている。

従来からのコンベンショナル PCR に続いて、検査の迅速性を目的に、定性性と定量性を併せ持ったリアルタイム PCR が多く実用されてきた。近年、リアルタイム PCR の定量性をさらに発展させ、リアルタイム PCR に比較して絶対定量などの多くの利点をもつデジタル PCR 技術が医薬の分野で利用され始めている。本研究では食品分野でのデジタル PCR 活用のためのガイドライン策定に向けた検討として、国内外での利用実績のあるノロウイルス検出のためのリアルタイム PCR 法の条件等を基本条件としてデジタル PCR の検証を実施した。その結果デジタル PCR の利用に向けては現時点でのリアルタイム PCR の条件に加えて、さまざまな条件を検討する必要があることが示された。

本研究では、デジタル PCR とリアルタイム PCR の直接比較のため、ノロウイルス検出のためのリアルタイム PCR 試薬を用いて検討を行った。

### A. 研究目的

食品中の微生物に対する規格基準の設定、製品の規格検査においては、昨今輸出入を前提に、国際整合性を持つことが重要となっている。規格基準の設定は、食品に由来する微生物学的リスクの管理を目的として、検査法と合わせて設定される。従来、食品由来病原微生物は主に細菌を対象として培養法を基本として検査法が整備されてきた。従来の培養法による検査では、結果判定までに数日

の時間が必要となること、また食品媒介性ウイルスなど有効な培養法が十分確立されていない病原体には対応できないこと、ゲノム解析による詳細な微生物の疫学解析の発展などから、遺伝子検査法は食品からの微生物検出において重要なツールとなっている。

国内の食中毒統計資料<sup>1)</sup>から読み取れるように、国内で報告される食中毒事件の約3割、食中毒患者の半数においてノロウイルスが原因と推定されている。また、米国、欧州

などでもノロウイルスや A 型肝炎ウイルスは代表的な食品由来病原ウイルスとして認識され、食品からの検査法として ISO15216-1<sup>2)</sup>が示されている。また、CODEX 委員会では食品衛生部会において、今後優先的に取り組む課題として、食品中のウイルスに関する衛生管理ガイドラインの改正を挙げている<sup>3)</sup>。

ノロウイルスなどの食品媒介ウイルスについては培養ができないために現状では遺伝子検査のみが実施されるが、ウイルス遺伝子検出は感染性ウイルスの検出ではないため、健康リスクとウイルス感染性の関係性を示すことができず、食品中の病原ウイルスの規格基準は世界的にも設定されていないが、輸入カキについて ISO15216-1 に準じたウイルス検査を実施して輸入許可を行うシンガポールの事例<sup>4)</sup>や、スイスにおける食肉製品製造における E 型肝炎ウイルス汚染検査導入の試み<sup>5)</sup>など、食品中の病原ウイルスの規格基準設定につながる可能性のある動きは見られる。

これまで遺伝子検査は、PCR 後に電気泳動および塩基配列解析によって標的遺伝子の増幅を確認するコンベンショナル PCR (コンベ PCR)、加水分解プローブを用いて、標的遺伝子の増幅を特異的かつリアルタイムに確認できるリアルタイム PCR (qPCR) が行われてきた。近年、qPCR の定量性をさらに発展させ、qPCR に比較して絶対定量などの多くの利点をもつデジタル PCR (dPCR) 技術が医薬分野で利用され始めている。

本研究では、dPCR の原理や利点について、機器、試薬メーカー等のサイト情報や European Network of GMO Laboratories (ENGL) の報告書など情報収集を実施した。また、遺伝子検査による食品中の微生物規格

基準の設定に向けた今後の国際的な動向にも対応するために、dPCR を食品検査に導入するためのガイドライン策定に向けた dPCR の基本的性能について qPCR と比較することで検証した。

## B. 研究方法

### 1) dPCR の原理・メリットなどについて

Google 検索にて [dPCR 原理] のキーワードで検索を実施して上位に表示された以下の 4 社のサイトを参照した。

Thermofisher Scientific 「次世代の定量技術！デジタル PCR の原理とは？」<sup>6)</sup>

QIAGEN 「dPCR 対 qPCR」<sup>7)</sup>

Eurofins 「第 3 世代の PCR～デジタル PCR～ddPCR はここがすごい | これって何？バイオコラム第 44 回」<sup>8)</sup>

AZ Science 「デジタル PCR 装置とは？原理やメリット・用途を分かりやすく解説」<sup>9)</sup>

### 2) dPCR 関連文書

European Network of GMO Laboratories (ENGL) の報告書 Overview and recommendation for the application of digital PCR<sup>10)</sup>を参照した。

### 3) dPCR の基本性能の検証

#### 3)-1 使用機器

qPCR: 7500 realtime PCR システム (Thermofisher)

dPCR: QIAcuity ONE (QIAGEN)

#### 3)-2 使用試薬

qPCR: TaqMan Fast Virus 1 Step Mastre Mix (Thermofisher)

dPCR: QIAcuity OneStep Advanced Probe

Kit (QIAGEN)

### 3)-3 PCR用プライマープローブ

ノロウイルス：病原体検出マニュアル ノロウイルス（通知法）および ISO15216-1(ISO)に示される配列。

A 型肝炎ウイルス：ISO15216-1(ISO)に示される配列。

### 4) ノロウイルス qPCR 用陽性コントロールプラスミド

タカラ社 RR250A を用いた。

### 5) 試薬の調整および PCR 条件

qPCR については ISO に準じてプライマー、プローブの濃度を設定し、試薬の説明書に従って調整した。

dPCR については ISO に準じてプライマー、プローブの濃度を設定し、試薬説明書に従って調整した。

## C. 研究結果

### 1) dPCR の原理、メリット

図 1 に dPCR の原理を示した。dPCR は検体由来の核酸と増幅用の試薬（PCR 酵素やプライマー、プローブなど）の混合は qPCR と同様に行う。qPCR がチューブで検体と試薬の混合を行い、そのままサーマルサイクラーにて PCR 反応を行うのに対して、dPCR では検体に含まれる標的遺伝子を限界希釈して微小区画に 1 または 0 となるように分配する。微小区画は検体・試薬の混合液にオイルを加えてエマルジョン化して微小区画化するドロップレット方式または、専用のプレート上に作成された微小ウェルに分配するウェル

チップ方式がある。どちらも 1 反応あたりの微小区画数は数万から数十万程度となる。

qPCR では微小区画化せずに反応液中に含まれるテンプレートの量に比例して増幅されてくるターゲットを検出するのに対して、dPCR では微小区画ごとにターゲットが存在すれば増幅により陽性と判定される。検体・試薬の混合液は多くの場合 50 $\mu$ L 程度であるので、数万の微小区画それぞれの陰陽判定にはキャピラリーや高精度カメラによる撮影が必要となる。

主な dPCR のメリットとしては以下の点が挙げられる。

- ・ qPCR が定量のために検量線、および検量線作成のための標準遺伝子が必要であるのに対して、検量線や標準品の必要なく定量が可能。
- ・ dPCR は PCR 終了後のエンドポイントで判定するため PCR 増幅効率の影響が小さい。
- ・ 微小区画化することで阻害物質の影響を小さくできる。

qPCR のメリットは以下の点が挙げられる。

- ・ 低濃度から高濃度まで検出可能な広いダイナミックレンジを持つ。
- ・ PCR 反応中に増幅の確認ができる。
- ・ 広く確立されたプロトコルが豊富にある。

表 1 に dPCR と qPCR の比較を示した。

### 2) dPCR 関連文書の解析

dPCR は、PCR であるので、コンベ PCR、qPCR と基本的なターゲット遺伝子増幅の原理は同様である。従って、qPCR で確立された多くのプロトコル（プライマー、プローブ

の濃度、温度サイクル条件など)が応用可能と考えられるが、dPCRの導入にあたって検討すべきこととして以下の点が挙げられる。

- ・ ドロップレット dPCR の場合、核酸抽出試薬がドロップレット形成に影響する可能性がある。
- ・ 2本鎖 DNA の場合、2本鎖を denature 後に微小区画へ分配すると2倍にカウントされる可能性がある。
- ・ ドロップレット、ウェルチップどちらの dPCR においても、機器に最適化された試薬を用いる必要がある、qPCR で使用している試薬はそのまま利用できない可能性が高い。
- ・ プライマー、プローブの濃度は微小区画化されることで qPCR よりも相対的に高濃度となるため、至適濃度については検討が必要となる可能性がある。
- ・ qPCR プローブでクエンチャーとして使用している標識を見直す必要がある場合がある。
- ・ PCR サイクルのアニーリング温度は至適条件を検討する必要がある可能性が高い。

### 3)dPCR の基本性能の検証

#### 3)-1 ノロウイルスコントロールプラスミドを用いたダイナミックレンジの検証

qPCR 用試薬として市販されているノロウイルス GI および GII のコントロールプラスミド(タカラ社 RR251A)をと ISO プライマー、プローブ用いて、qPCR と dPCR の測定レンジを比較した。qPCR では GI、GII とも

には  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L のレンジで確実に検出可能であった。dPCR では  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L のレンジで検出可能であった(図2: GI, 図3: GII)。

通知法プライマー、プローブを用いた場合、dPCR では GI (図4)、GII (図5)ともに定量不可能となった。

#### 3)-2 qPCR の Ct 値と dPCR による定量値の関係

3)-1 の結果を参考に、陽性コントロールプラスミドの希釈液を調整し、qPCR および dPCR を実施し、検出感度を比較した結果を図6に示す。X軸が qPCR による Ct 値を示しており、最小 20.2 から最大 41.0 まで qPCR では検出されていた。一方で、dPCR では ISO プライマーを用いる場合 Ct 値 23.5 から 31.9 までは陽性として定量値が示された。

### D. 考察

dPCR の原理はコンベ PCR、qPCR と基本的に同様であるが、大きなメリットは検量線作成のための標準検体を必要とせず、検体中の遺伝子コピー数を定量できることである。遺伝子コピー数の定量値そのものが食品に含まれる微生物学的リスクをそのまま評価する指標とはならないが、ノロウイルスをはじめとした培養が困難な病原体の汚染指標として利用されることが今後十分考えられる。

現在主に用いられる qPCR では検量線を作成するために  $10^2 \sim 10^7$  copies/ $\mu$ L 程度の希釈列を、qPCR の実施ごとに作成する必要がある、検査実施者の手間がかかるうえに、遺伝子コンタミネーションのリスク要因ともなっている。 $10^7$  copies/ $\mu$ L 程度の標準検体を

作成するためには、標準検体のストックの濃度は  $10^9$  copies/ $\mu$ L 程度が必要となり、qPCR 検査の実施のたびに非常に高濃度の標準検体を扱う必要がある。PCR 自体の検出感度が非常に高いため、標準検体による実験系の汚染は、検査室への影響が深刻なものとなるため、標準検体が不要な dPCR は特に微量な遺伝子検出が必要とされる食品の検査にはおおきなメリットがあると考えられる。

一方で、C.3)dPCR の基本性能の検証で示されたように、すでに qPCR 検査として広く用いられているノロウイルスの検出系において、qPCR が  $0.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L のレンジの遺伝子を安定的に検出するのに対して、dPCR は  $4.0 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L と検出可能なレンジは小さいことが示されたほか、プライマーとプローブについても ISO15216-1 に記載のノロウイルスを対象としたプライマーとプローブが dPCR でも qPCR と同様に利用できるのに対して、国内の検査で広く用いられている通知法のプライマー・プローブでは dPCR では利用が難しいことが示された。このようにすでに確立されている qPCR のプロトコルが dPCR でそのまま利用できるかどうかは、実際に検証する必要があることから、検査への導入までにはプライマー、プローブの設計を新たに行い、その特異性や検出感度についての検証が必要になる。

また、dPCR で定量値が得られるのが qPCR の Ct 値として 23 から 30 未満となったが、食品に含まれる病原体が微量である場合は dPCR で検出困難となる可能性を示唆している。今後のリスク評価でたとえば qPCR での Ct 値が 30 より大きい場合（検体中の遺伝子コピー数がある程度小さい場合）の健康

リスクは許容できる、などの知見が得られた場合は dPCR の利用も促進されることが期待できる。

食品媒介ウイルスについては現在、感染性ウイルスの定量的評価による健康リスクに基づいた規格基準が存在しないことから、細菌など定量的リスク評価の面で先行している検査対象について dPCR の利用導入を検証する必要もあると考えられる。

## E. 結論

dPCR は検査室、実験系の深刻な汚染原因となる標準検体を必要とせずに定量値が得られることは、検査法として優れた点であるが、既存の qPCR のプロトコルがそのまま適用できない可能性もあるほか、遺伝子検出感度のレンジも qPCR に比較して小さいという大きな課題があり、検査導入に向けて検討すべき項目が多いと考えられる。

定量的なリスク評価の面で先行する病原体に対する検査法として検討することで、より実践的な導入に向けたガイドラインの策定が行えると思われる。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

参考文献など

1. 食中毒統計資料  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoushokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/04.html)
2. ISO15216-1:2017 <https://www.iso.org/standard/65681.html>
3. Codex CCFH 54 REP 24/FH [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode-x%252FMeetings%252FCX-712-54%252FFINAL%2BREPORT%252FREPP24\\_FHe.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode-x%252FMeetings%252FCX-712-54%252FFINAL%2BREPORT%252FREPP24_FHe.pdf)
4. シンガポールにおけるカキの輸入検疫について  
<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/singapore.html>
5. Ripellino P, Pianezzi E, et al., Control of Raw Pork Liver Sausage Production Can Reduce the Prevalence of HEV Infection. *Pathogens*. 2021 Jan 22;10(2):107. doi: 10.3390/pathogens10020107.
6. ThermoFisher <https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/digitalpcr1/>
7. QIAGEN <https://www.qiagen.com/ja-jp/applications/digital-pcr/beginners>
8. Eurofins <https://www.eurofins.co.jp/clinical-testing/%E3%82%B5%E3%83%BC%E3%83%93%E3%82%B9/geneticlab/%E6%8A%80%E8%A1%93%E3%82%B3%E3%83%A9%E3%83%A0/%E7%AC%AC3%E4%B8%96%E4%BB%A3%E3%81%AEpcr-%E3%83%87%E3%82%B8%E3%82%BF%E3%83%ABpcr-%E3%81%AF%E3%81%93%E3%81%93%E3%81%8C%E3%81%99%E3%81%94%E3%81%84-%E3%81%93%E3%82%8C%E3%81%A3%E3%81%A6%E4%BD%95-%E3%83%90%E3%82%A4%E3%82%AA%E3%82%B3%E3%83%A9%E3%83%A0-%E7%AC%AC44%E5%9B%9E/>
9. アズサイエンス <https://azscience.jp/column/category/top06-sub18/>
10. Overview and recommendation for the application of digital PCR, European Network of GMO Laboratories (ENGL)  
<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/WG-dPCR-Report.pdf&ved=2ahUKEwjpjNjWxJuGAxWXbfUHHdIFDgEQFnoECAkQAQ&usq=AOvVaw2-Go-rTfI0sxxLmwI9nw43>

図1 dPCR の原理

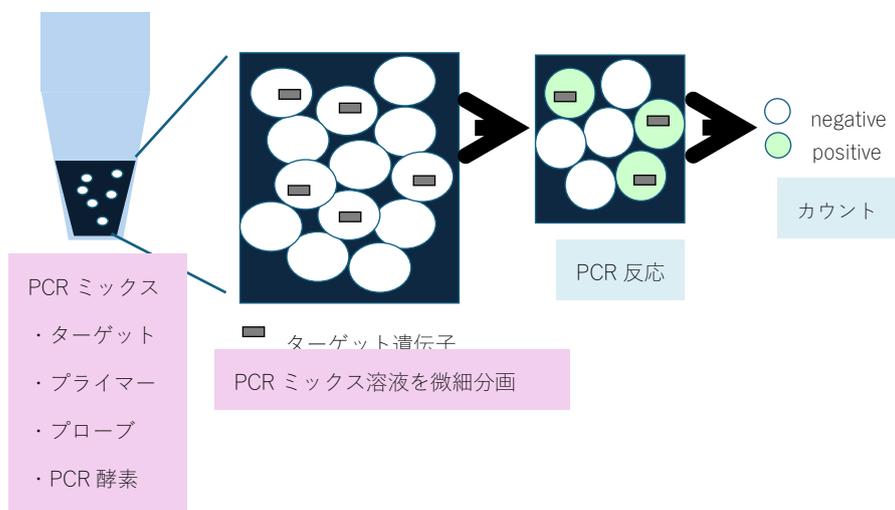
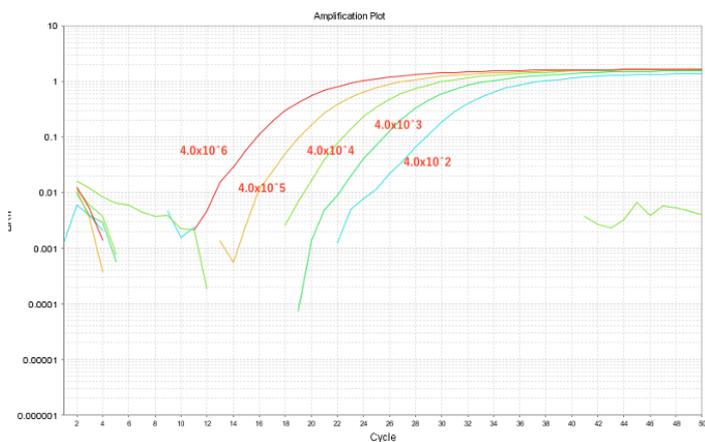


図2:GI ノロウイルス陽性コントロールプラスミドを用いた遺伝子検出レンジの比較  
A; qPCR



B; dPCR (上部の青いプロットが陽性カウント、下部のグレーのプロットが陰性カウント)

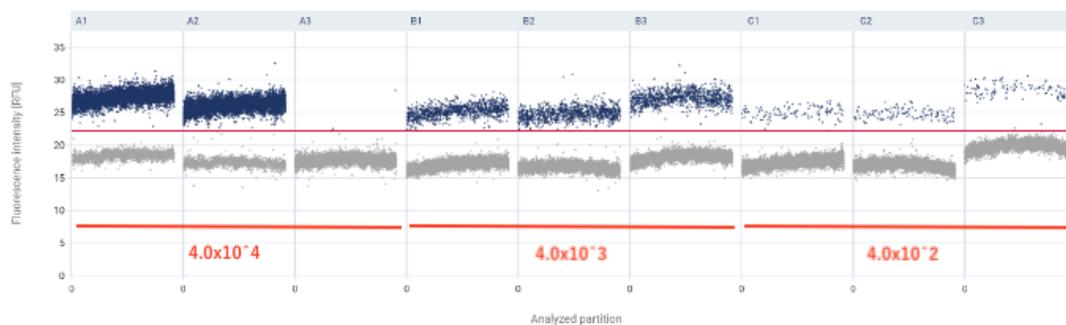
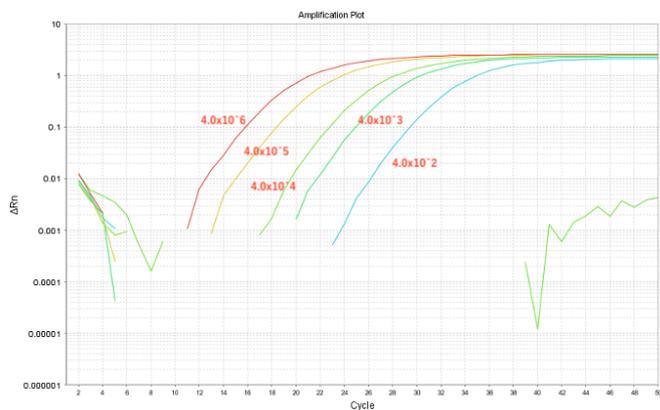


図3：GII ノロウイルス陽性コントロールプラスミドを用いた遺伝子検出レンジの比較  
A; qPCR



B; dPCR(上部の青いプロットが陽性カウント、下部のグレーのプロットが陰性カウント)

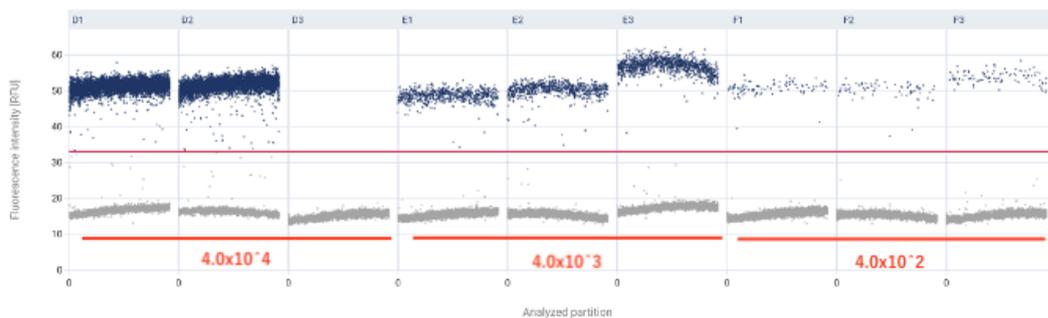


図4：GI ノロウイルス陽性コントロールプラスミド（通知法プライマー、プローブ）  
陽性カウントと陰性カウントが分離せずにカウント不能となった

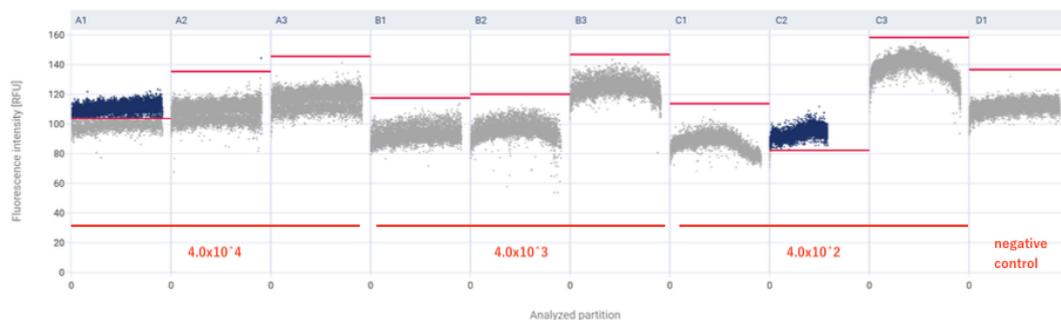


図5：GII ノロウイルス陽性コントロールプラスミド（通知法プライマー、プローブ）  
陽性カウントと陰性カウントが分離せずにかウント不能となった  
陽性シグナルの強度に大きなばらつきが生じている

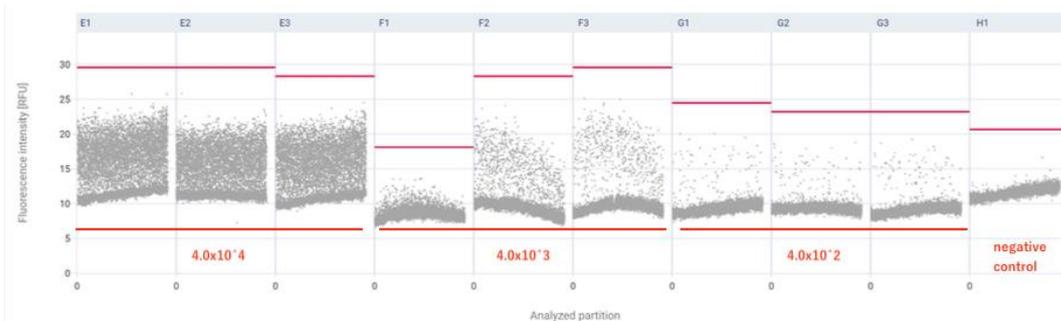
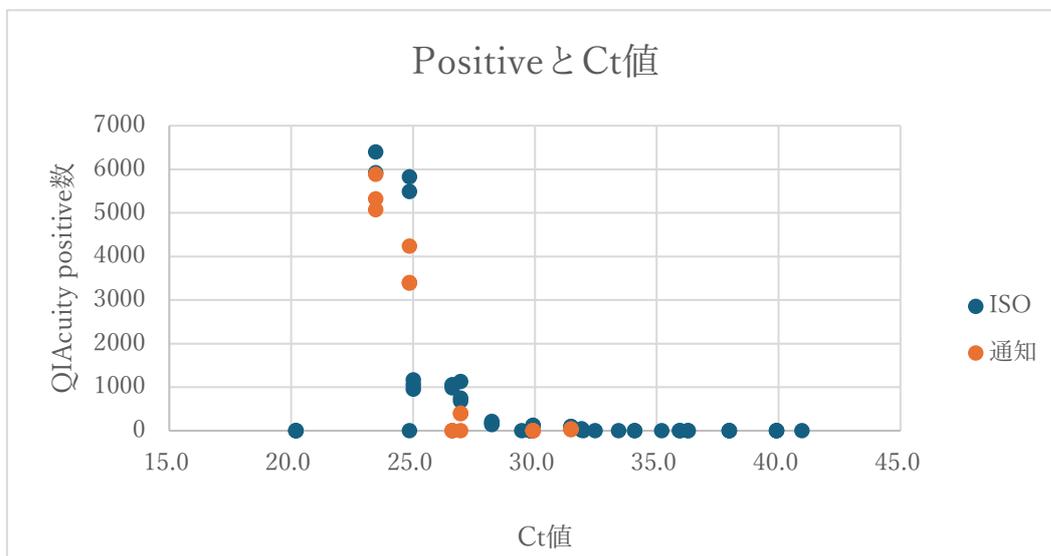


図6：qPCRのCt値（x軸）と、dPCRの陽性カウント（y軸）の比較





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）  
令和5年度 分担研究報告書

食品微生物試験法の国際標準化実装に向けた研究  
分担課題 国際動向及び妥当性評価に関する研究

研究分担者 五十君 静信 （東京農業大学総合研究所・教授）  
研究協力者 森 曜子 （東京農業大学食品安全研究センター・協力研究員）

### 研究要旨

本研究は国際的な食品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、現行国内試験法の妥当性を評価することにより、国内における食品の微生物規格基準等に関わる試験法を国際調和のとれた形へと実装するための研究を行うことを目的とする。上記委員会ではこれまでに腸内細菌科菌群、サルモネラ等の通知法作成に寄与し、主要な病原微生物の試験法は公定法への移行という形で成果を挙げてきたが、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改訂等の作業が必要である。また、現行の規格基準に関わる試験法の妥当性については一部の試験法など検討が必要な状況にあり、これらの妥当性を評価することは食品の輸出入が増加の一途にある上で至急の対応が求められる課題である。本研究では上記委員会活動を通じ、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て国内の規格基準に関わる試験法の整備を進めると共に、我が国で策定された微生物試験法の妥当性を評価し、英文化を経て国際発信することが求められる。我が国の食品における微生物規格基準が国際調和を伴った形となるよう体制の確立を目指すと共に、科学的妥当性を付与・表明へと波及させることを目的とする。

本研究では、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提供する。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。

分担研究課題は、食品微生物の試験法に関する変動してい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。

国際動向掌握については、本年度は2023年6月に、ストックホルムで開催されたISO/TC34/SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）及びCEN/TC463総会（令和5年6月26-30日）へ参加した。ISO/TC34/SC9とCEN/TC463の動向に関する情報収集とISO試験法の検討を行った。更に、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、検証すべき項目の収集につとめた。現在も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、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、バリデーションやベリフィケーションの手順について整理し、分担研究としては、特に微生物試験を行う検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）についてガイドライン案の作成を進めた。

#### A. 研究目的

研究班では国内の食品微生物試験法を国際調和の取れた形へと導くため、食品微生物試験法の国際調和を科学的観点から推進することを目的とする。国際調和を図る上では、逐次変動する微生物試験法に関する国際動向を見据えたアップ

デート等の作業が必要である。分担研究課題としては、食品微生物の試験法に関する変動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ガイドラインの検討を行うこととした。加えて、研究班で策定する試験法については、妥当性確認方法のサポートを行っ

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ている。主要病原微生物試験法については、公定法への移行という形で成果を挙げてきたが、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、国内で策定した試験法を英文化し、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、現在までに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、標準試験法、技術文書であるTechnical Specification (TS)、あるいは試験法の作成にあたってのガイドラインの整備を進める。現在の国内における食品の微生物規格基準については、多様な食品に対して様々な衛生指標菌が設定されている。その状況は海外とは大きく乖離する領域であるため、リスクマネジメントにHACCPを導入したことを考慮し、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。

標準試験法検討委員会のバリデーション作業部会では、国内における妥当性確認の手法の方向性を検討した。AOAC Internationalの示すガイドラインとISO/TC34/SC9で策定が進められているISO 16140シリーズのガイドラインを元に、試験を実施する検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）に関するガイドラインについて検討し、現場での実

施に有用なガイドライン作成を進めた。また、公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格ISO 17468について精査検討を行った。

## 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に関する規格については、国際標準化機構（ISO：International Organization for Standardization）法を標準とするとされている。ISOで食品微生物試験法を担当する主なサブ委員会はTC34/SC9であることから、このサブ委員会で発言権を有する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5年6月にはISO/TC34/SC9総会が、対面とwebのハイブリッド開催となり、研究班からは、五十君（対面）、松岡（web）、岡田（対面）の3名とISO/TC34/SC9国内委員会事務局から2名（対面）、1名（web）の計6名が日本代表団（JISK）として参加した。SC9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、国際酪農連盟の国内委員会は以前より乳製品のISO基準の策定に寄与していたことから、2023年4月より乳の国際基準を検討するISO/TC34/SC5にPメンバーとして活動することになり、こちらのサブコミTEEからも情報収集を行った。

加えて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 International日本セッ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からも公開されており、こちらについて、その内容の精査を継続した。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更新、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、標準試験法検討委員会のメンバーからなるバリデーション作業部会を組織して行った。作業部会は、岡田由美子（研究代表者、標準試験法検討委員会事務局）、五十君静信（分担研究者）、松岡英明（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

で行った。

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 のガイドラインならびに ISO/TC34/SC9 で策定が続けられている ISO 16140 シリーズを元に、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（分担研究者松岡担当）。検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な導入検証（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、ガイドライン案を作成した（分担研究者五十君、協力研究者森）。公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格 ISO 17468 について精査も行った。

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支援・アドバイスも行った。

#### （倫理面への配慮）

本研究では、研究内容から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

#### ①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;国際標準化機構の示す試験法であり、その他の代替試験法を用いる場合は、ISO 16140 シリーズ（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。2023 年 6 月に、ストックホルムで開催された ISO/TC34/SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）及び CEN/TC463 総会（令和 5 年 6 月 26-30 日）へ参加し、P メンバー国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/TC34/SC9 の動向に関する情報収集と ISO 試験法の検討を行った。

ISO が作成する規格には、製品規格やマネジメント規格だけではなく、食品の微生物試験法に関するものがある。それぞれの規格は新規提案をもとに段階的に審議されたのち国際規格として発行されるが、個別の審議は TC（Technical Committee; 専門委員会）または TC の下部組織である SC（Sub-Committee; 分科委員会）で行われる。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。SC5 についても、2023 年より O メンバーから P メンバーとなり、積極的な活動を開始した。

TC34/SC9 に係る「国内審議団体」として、2002 年から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。ISO への参加地位には、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。現在、研究班から五十君と岡田が SC9 の国内委員会に参加している。

一方、乳製品については ISO/TC34/SC5「牛乳及び乳製品」が規格の作成を担当している。SC5 においても微生物試験法の策定を行っており、これまで国際酪農連盟を介してこの活動を行ってきたが、2023 年より ISO/TC34/SC5 についても、O メンバーから P メンバーとなり、積極的な活動を開始した。SC5 の国内委員会には、研究班から五十君と岡田が参加している。

2023 年度の SC9 総会は、6 月にストックホルムにて、対面と web のハイブリッド方式で開催され、前半の 1 日間は CEN/TC463 の総会、後半の 4 日間に ISO/TC34/SC9 の総会が行われた。ISO/TC34/SC9 の総会への参加国は、フランス（幹事国）他の約 40 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。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省略する。

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、25 のワーキンググループが活動している。今年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などであった。

## ②バリデーションガイドラインの現状

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、現在 6 つの文書に細分化され、順次規格として文書化が進んでいる。一方、米国の AOAC International は、ISO 16140 シリーズ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きた。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 シリーズの改訂では、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。

昨年度から引き続き AOAC International と ISO の 16140 シリーズの ISO/TC34/SC9 の文書との整合性を考慮し、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。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 ISO 16140 シリーズ、公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格 ISO 17468などを元に、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。ISO 17468 については、これまでホームページで公表していた NIHSJ 法の策定手順と共通性が高く基本的には同等なものといえるが、表現など一部の修正を行った。

一方、検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）についても、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理した。ISO 16140 シリーズのベリフィケーションに関する文書 16140-3 は、かなり難解な内容を含んでおり、その和訳に相当する文書の作成を松岡が担当した。一方、公定法や代替法などを実施する試験所における導入検証（ベリフィケーション）については、実用性を尊重して検討する必要のある重要な項目を検討し、実用的なガイドライン案を作成した。別添文書に示す。

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、通常食品から検出の可能である一般生菌数や衛生指標菌のレベルの確認となるため、公定法などの培養による方法に限定する必要はなく、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示し、その考え方の要点をまとめた。また、これに該当する試験法リストを更新し、NIHSJ 法のホームページ内に公開した。

## D. 考察

### ①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）試験法への貢献が期待されている。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。また、リステリア試験法の作業部会が結成されることとなり、わが国もメンバーとして参加することにした。

### ②バリデーションガイドラインの現状

微生物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 シリーズに代替法のバリデーション等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 で行われており、現在も 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、パート 3 のベリフィケ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ている。パート 1 については、用語集であり、以前示した用語集案から時間を経ていることもあり、最新の情報を反映し改正作業を行い、研究班としては作業部会で検討後、標準試験法検討委員会での確認を行っていく予定である。

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、松岡を中心に整備を進めている（松岡分担研究報告書参照）。残る3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。これらの改訂に先立ち2012年にアメリカのAOAC Internationalは、バリデーションガイドラインを公開している。これらの2つのガイドラインは相互に整合性を持つように議論されていたが、一部の用語について異なった概念が取り入れられており、今後このあたりの考え方をどのように調整してゆくかは、TC34/SC9総会でのトピックスとなると思われる。

ISOの動向に合わせて、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、“公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格”であるISO 17468考え方にはほぼ一致していたことから、一部の表現等の修正を行うことで対応することにした。

一方、検査室で新たな試験法を導入する場合は導入検証（ベリフィケーション）が求められるため、ISO/TC34/SC9との整合性を持たせるため実用性を考慮して、検討・整理した。こちらは将来的に実用的な文書としてまとめる必要があると思われることから、ガイドライン案としてまとめた（別添ガイドライン案参照）。

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、公定法などを用いるよりも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ている。

#### E. 結論

微生物試験をとりまく国際情勢としては、ISO/TC34/SC9総会に参加し、またAOACインターナショナル年次大会参加者からの情報提供により、多くの新しい情報を得ることができた。バリデーションガイドラインであるISO 16140シリーズ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た。公定法策定に関する規格であるISO 17468を基にNIHDJ法の策定方法について整理を行った。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. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 五十君静信。食中毒統計には表れないリステリア食中毒発生状況とその対策。フードケミカル 39 (6), 56-61, 2023.
- 2) 五十君静信。食中毒統計ではわからないリステリアの食中毒リスク。食の安全と安心通信。49, 2023

##### 2. 学会発表

- 1) 五十君静信。食肉の安全性の確保について、2023. 7. 19、山形国際ホテル、第59回全国食肉衛生検査所協議会全国大会
- 2) 五十君静信。HACCP制度化後、微生物検査をどのように考えればよいのか、2024. 1. 26、東京顕微鏡院豊海研究所、NPO食の安全と微生物検査。2022年度微生物検査実技研修会

#### G. 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 |

# 食品等の微生物試験結果の妥当性確保のためのガイドライン (作業部会案)

## 1. 目的

食品等の微生物試験を実施する機関が試験結果の妥当性を確保することを目的とし、以下の手順のガイドラインを示す。

- 1) 試験法導入時の**検証(verification)**
- 2) 試験結果の**妥当性をモニタリング**する手順を示す。

本ガイドラインに示す手順は、ISO 16140-3:2021 Annex F<sup>2)</sup> 及び ISO/IEC 17025:2017<sup>3)</sup>を基に、さらに Eurachem Guide AML<sup>5)</sup> 及び FDA ORA Laboratory Manual<sup>6)</sup>を参考にして作成した。

## 2 用語の定義と解説

### 2.1 食品等

原料、製造／取扱い工程での中間産物・拭き取り検体、および製品

### 2.2 LOD<sub>x</sub> (level of detection) (検出のレベル) <定性法>

所定の試験手順によって、検出の確率が X となる試験対象の濃度。

(例) LOD<sub>50</sub> は、試験の 50 % が陽性結果をもたらす検出のレベル。

(注) これは、化学および物理試験で用いられる LOD (Limit of detection) とは異なる。

### 2.3 推定 LOD<sub>50</sub> (estimated LOD<sub>50</sub>: eLOD<sub>50</sub>)

本ガイドラインに基づき推定された LOD<sub>50</sub>

(注) 本ガイドラインでは試行数が少ないため、「推定 LOD<sub>50</sub>」という用語を用いる。

### 2.4 バイアス、かたよりの、偏り (bias)

測定のかたよりの (偏り)

付与された値 (添加菌量等) と繰り返し測定結果の平均値との系統的な差

### 2.5 推定バイアス/かたよりの (estimated bias: eBias)

本ガイドラインに基づき推定されたバイアス。

(注) 本ガイドラインでは試行数が少ないため、「推定バイアス」という用語を用いる。

### 2.6 室間再現標準偏差 ( $S_R$ )

室間再現条件 (異なる施設、異なる作業員、異なる測定システムを含む条件で、同一または類似の対象について複数の測定値を得る条件) 下で得られた試験結果の標準偏差

### 2.7 室内再現標準偏差 ( $S_{IR}$ )

室内再現条件 (同一の施設で同じ方法を用いて、異なる器具を用いた異なる作業員によって、同一または類似の対象について複数の測定値を得る条件) 下で得られた試験結果の標準偏差

## 3. 試験法導入時の検証(verification)手順

試験法を導入する際に、自らの試験施設で適切に実施できることを確認するため、以下の確認を行う。

- 1) 試験実施手順の検証 (Implementation verification)
- 2) 試験品目の適用性の検証 (item verification)

### 3.1 試験実施手順の検証 (Implementation verification)

試験法の導入時に、自らの施設および試験手順で試験法を適切に実施でき、試験結果が妥当であることを実証する。

なお、試験結果に大きな影響を及ぼす要因 (装置・試薬・試験員など) を変更した場合、継続して試験結果が妥当であることを

を実証することが望ましい。

#### 3.1.1 試験品の選択

試験法の適用範囲から試験所の試験頻度が高いと予想される品目(item)を1つ選択する。

#### 3.1.2 検証に用いる標準菌

純培養した標準菌株または認証標準物質から調製した標準菌液を用いる。

#### 3.1.3 検証する性能特性

<定性法>

- ・推定 LOD<sub>50</sub> (eLOD<sub>50</sub>)

<定量法>

- ・推定バイアス (eBias) (衛生指標菌および常在菌には適用しない)
- ・室内再現性標準偏差 ( $S_{IR}$ )

#### 3.1.4 性能特性の評価法と評価目標値

微生物試験の性能特性に関する評価法および評価目標値を表-1に示す。

表-1 - 性能特性の評価法と評価目標値

試験法	性能特性	許容限界
定性法	eLOD <sub>50</sub>	<p>添加した菌量が既知の場合 (例：参照標準物質等を用いた場合) 試験法で規定されている試料 <math>x</math> g を 7 個採取し、それぞれに 3 cfu から 5 cfu の対象微生物を添加した時、陽性結果が 6 個以上</p>
		<p>添加した菌量が不確かな場合 (標準菌株を用いて自家調製した場合) (1) 試験法の妥当性確認時の LOD<sub>50</sub> が入手できない場合 <math>eLOD_{50} \leq 4 \text{ cfu} / \text{試験部位 (test portion)}</math> (2) 試験法の妥当性確認時の LOD<sub>50</sub> が入手できる場合 妥当性確認で得られた LOD<sub>50</sub> の 4 倍以下 <math>eLOD_{50} \leq 4 \text{ LOD}_{50} / \text{試験部位 (test portion)}</math></p>
定量法	eBias	<p>日常測定する濃度範囲内の濃度レベルの対象微生物の標準菌液を調製し、それぞれ 1mL を試料の初期懸濁液に接種する(<math>n=2</math>) 接種した標準菌液の実測濃度 (<math>\log_{10} \text{ cfu/mL}</math>) と試料(<math>x</math> g)当たりの菌数(<math>\log_{10} \text{ cfu/test portion}</math>)の中央値との差の絶対値が 0.5 <math>\log_{10}</math> 以下。</p>
	$S_{IR}$	<p>試験法の適用範囲内であって、通常試験を行っている試験品の最低 10 検体について、室内再現条件で 2 点の試験を実施し、得られた試験結果 A と B の差から下記の式を用いて計算する。</p> $S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$

		<p><math>n</math>: 検体数 <math>y_{iA}, y_{iB}</math>: 試験結果 A 及び B の結果を常用対数に変換(<math>\log_{10} \text{ cfu/g}</math>)して得られたデータ 妥当性確認でのデータが得られる場合、共同実験で得られた室内再現標準偏差の 2 倍以下。 妥当性確認でのデータが得られない場合は、評価は不要。 ただし、ここで得られた室内再現精度を用いて、測定の不確かさを推定することができる<sup>4)</sup>。</p>
--	--	--

### 3.2 試験品目の適用性の検証 (item verification)

下記の試験品目について試験を実施する場合は、試験品目ごとに検証を実施し、試験法が適用できるか評価する。

- 1) 試験法の適用範囲及び妥当性確認範囲外の試験品目
- 2) 試験品目の物性 (pH、水分活性等) や成分 (高脂肪、高ポリフェノール) 等が、微生物の発育を阻害するおそれがある試験品目 (別紙 1 参照)

以下に例を挙げる

- ・酸性食品：概ね pH xx 以下の食品  
例) 酢漬け 等
- ・水分活性の低い食品：概ね Aw xx 以下の食品  
例) 粉末食品、乾燥食品 等
- ・ポリフェノールを多く含む食品  
例) 緑茶、コーヒー、紅茶、チョコレート 等

評価する性能特性は、以下の通り。

定性試験：eLOD<sub>50</sub>、

定量試験：eBias

### 4. 試験結果の妥当性のモニタリング

試験機関は、試験実施内容を継続的に評価し、結果の妥当性をモニタリングする。

モニタリングする項目としては以下のものがあるが、これらに限定されない。

- 1) 陽性及び陰性対照試験の並行実施
- 2) 測定・試験機器の機能チェック
- 3) 自然汚染試料又はスパイク試料での試験
- 4) 二重 (反復) 試験
- 5) 試験結果の二重評価 (2 人の試験員での結果の評価)

例) 同一のシャーレーのコロニー計

数を 2 人で実施 (全てのシャーレーについて実施する必要はない)。

これらは、データをプロットして管理図を作成し、傾向を視覚的に評価できるように記録する。

### 5. 参考文献

- 1) ISO 16140-1: 2016: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary
- 2) ISO 16140-3: 2021: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
- 3) ISO/IEC 17025-2017 (JIS Q 17025-2018) : General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項)
- 4) ISO 19036: 2019: Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
- 5) Eurachem Guide Accreditation for Microbiological Laboratories (2023)

<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/microbiol>

- 6) FDA Office of Regulatory Affairs (ORA) Laboratory Manual  
<https://www.fda.gov/science-research/field-science-and-laboratories/field-science-laboratory-manual>



令和5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標準化実装に向けた研究分担研究報告書

食品微生物試験法の妥当性評価ガイドライン策定に向けた研究

研究代表者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長  
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授

食品微生物試験法を国際調和させるために、ISO TC34/SC9のPメンバーとなっている日本の専門委員として、年次総会(R5.6.27-6.30)に参加（WEB会議）した。またSC9内の妥当性確認（バリデーション）ワーキンググループ（WG3）に専門技術委員として、WG3会議(R5.4.3-4.4、R5.11.6-11.7)に参加（WEB）した。さらに、SC9あるいはSC9/WG3から随時発せられるメール審査（本年度は8回）に対応し、必要に応じてコメントを発信した。これらの活動によって、妥当性確認関連文書の議論〔ISO 16140シリーズ（既刊のpart1~6の改訂、およびpart7以降の新規作成）および参照法に関するISO 17468の改訂〕の動向を調査した。国内では標準法検討委員会及び妥当性確認作業部会で、国際動向に基づく議論をリードした。特に議論が錯綜していた検証（ベリフィケーション）ガイドラインに関して、目的と適用範囲を新たに明確に定義し直すことによって、漸く完成版（第10改訂版、R6.3.3）としてまとめることができた。また、クロストリジヤ試験法やデジタルPCR法等の個別試験法に関しては、妥当性確認に関する技術的助言を行った。さらに、長年、調査してきたISO 16140-2に基づくバリデーションの解説文書を平易にまとめ、さらに常に更新できるようにウェブ公開することの重要性に鑑み、そのひな型を作成した。

## A. 研究目的

《そもそも国際調和とは？》

食品の輸出入に際して、微生物汚染に対する食品の安心・安全を確保する鍵は、国際調和した食品微生物試験法である。我が国においては、独自の法整備に基づき食の安全を確保してきた実績があるものの、実施する試験法が諸外国の試験法と同等以上の性能を示すことを予め確認しておくことが必須となっている。そのため、平成21年（2009年）にNIHSJ-01法としてサルモネラ属菌定性法を作成して以来、今日に至るまで20余種類のNIHSJ法を作成し公開してきた。

NIHSJ法作成の過程で、国際的な参照法であるAOAC-OMA法やISO法と旧来の我が国の衛生試験法との性能比較に多くの時間が割かれた。しかし、試験法の同等性の証明は食品成分の複雑さのため極めて

難しい。また対象とする菌の属や種の違いによっても試験条件が異なる。結局、科学的に唯一の結論が得られるとは限らない。実際のユーザーの立場を考慮した合理的な結論が最適解となる。国際調和とは、そうした合理的最適解を理解し、NIHSJ法に反映させることである。

《AOACとISO》

ISO法に関してはISO34/SC9、AOAC-OMAはAOAC INTERNATIONALで議論され作成されている。現在では、両者は互いにリエゾン委員を送って連携している。我が国では、AOAC International Japan SectionでAOACと情報交換すると共に、SC9国内委員会でPメンバーとしてSC9と情報交換している。厚労科研では、当初の新規作成方針から、国際状況に鑑み、ISO法の導入あるいは一部修正へ方針転換した。したがって、SC9の年会には例年、専門委員として

参加（対面あるいはリモート）し、さらに個別課題のワーキンググループに専門技術委員として参加（リモート）している。

本分担研究の大目的は、国際的参照法と調和したNIHSJ法の作成を支援することである。そのため、新規作成の試験法、あるいはISO法を一部修正した試験法の性能を、ISO法と性能比較する際の技術文書を理解し、具体的な実施計画において指導的助言をする。技術文書は妥当性確認に関する中心文書ISO 16140-part2を筆頭とするISO 16146シリーズと参照法の妥当性確認に関するISO 17468が該当する。

#### 《具体的目標》

本分担研究の第一の目的は、ISO 16140シリーズの中のpart3 検証（ベリフィケーション）に特化して、これと調和した国内向けガイドラインを作成することである。試験法のユーザーは、初めて試験法を導入する場合は必ず検証に相当する予備試験を行っているが、その検証の方法について詳しくまとめた文書がpart3である。国内のユーザーがNIHSJ法、あるいはISO法などを初めて導入する際の検証法として、一応、part3に調和した日本版ガイドラインを作成しておくことは必要であろう、との判断で作成が検討された。そして、先行研究で原案（R4.2.25）から改訂を重ねて第5改訂版（R5.2.20）として、国際調和に耐えうる基本文書が作成された。

ところが、当初想定していた、登録検査機関や食品製造企業品質管理部署などのユーザーにとっては、敢えて厳格なガイドラインが無くとも問題ない、との意見もあった。そのため、新規ガイドラインを敢えて実施する理由について説明を求められていた。

本分担研究の第二の具体的目標は、妥当性確認関連文書に関する議論の動向調査である。SC9年次総会で総覧的に議論されるが、特に重要な妥当性確認に関しては、特化したワーキンググループWG3「妥当性

確認」で詳細に議論されているので、その内容をまとめることが必要である。

第三の目的は、長年調査し続けてきたISO 16140-2に基づくバリデーションの解説文書をまとめ、常に更新できるようにウェブ公開するためのひな型を作成することである。複雑な内容を平易に解説しながら、かつ、タイムリーに改訂内容を反映させるようにすることは極めて重要と考えるからである。

## B. 研究方法

### 《検証ガイドラインの作成》

新規作成中の検証ガイドラインの目的や適用に関して、国内の標準法検討委員会及びバリデーション作業部会で議論を重ねた。

### 《妥当性確認関連文書に関する議論の動向調査》

ISO/TC34/SC9, 2023年次総会（R5.6.27-6.30）（WEB参加）、またSC9内の妥当性確認ワーキンググループ3（WG3）の専門技術委員として、WG3会議（R5.4.3-4.4、R5.11.6-11.7）（WEB参加）に出席した。さらにSC9あるいはSC9/WG3から随時発せられるメール審査（本年度は8回）に対応し、必要に応じてコメントを発信した。審査内容は多岐にわたるので、都度、SC9国内委員に配信して意見を集約するようにした。

妥当性確認に関しては、SC9及びSC9/WG3で議論されてきた主要なトピックをまとめ、その理由や背景について概説した。

### 《ISO 16140-2に基づく食品微生物試験法バリデーションの手引き》

先行研究の集大成としてまとめた解説文書を基に、本年度実施されたISO 16140-2の改訂の議論を反映させ、改訂版（R6.4.18）としてまとめた。

## C. 研究結果

### （1）検証ガイドライン

第5改訂版から出発して、改訂を重ね、第10改訂版(R6.3.3)としてまとめた(添付資料1)。この版は、最終の標準法検討委員会での議論を反映させた内容になっているが、改めて、次年度の委員会で完成版としての承認を受ける予定である。(ISO 著作権保護のため、現時点では公開しない。)

## (2) 妥当性確認関連文書に関する議論の動向

### ①「確定試験」における偽陽性や偽陰性の表記について

定性試験において、参照法と代替法の比較だけでなく、さらに確定試験が課されている。その場合の結果が例えば、参照法陽性、代替法陽性、確定試験陰性の場合、「代替法の偽陽性による陽性一致」というような複雑な表現をする。この表現をめぐって多くの議論が交わされたが、漸く、決着した。その結果は、添付書類2に反映させた。

### ②LOD-RLOD 算出プログラムの改訂

<https://standards.iso.org/iso/16140/> から >4>ed-1>en>PODLOD と順次進んで到達するサイトで確認できる。菌濃度対 MPN の関係から LOD<sub>50</sub> を求める解析プログラムは <https://standards.iso.org/iso/7218/> のサイトで“MPN calculation Excel program”を選択してダウンロードできる

### ③大きな検体の扱い

検体の大きさは従来 25 g であったが、定性試験において、それより大きい検体、例えば 100 g、200 g、375 g などを直接試験することが必要になってきた。環境試料では多くの場合、大検体を扱う。また国や地域によって大検体での試験が要請されている場合がある。そして、大検体中の微生物の性質は小検体中の場合とは異なるようだ、との指摘がある。そこで、検体の大きさの違いによる影響をバリデーシヨンの項目にも加えるようになった。

### ④WG3「バリデーシヨン」と WG2「統計学」との連携強化

バリデーシヨンにおける判定基準では統計学的評価が重要である。しかし、WG3は

従来は WG2 の提言を一方的に受け入れてきた。しかし、バリデーシヨンにおける具体的実施条件と統計学的判定条件は互いに密接に関連している。そこで、文書作成の早い段階から意見交換することが重要と考えられ、WG2/WG3 サブワーキンググループができた。

④ISO 17468 における国際コラボの必要性  
バリデーシヨンの最終段階は研究室間共同試験(Interlaboratory study; ILS)(AOACではコラボスタディ Collaborative study)である。参照法のバリデーシヨンの場合は、これに参加する試験室が2か国以上でなければならぬ、となった。我が国にとっては煩雑さが増すので反対意見を述べたが通らなかった。国際的な参照法であるから2か国以上でバリデーシヨンするのが当然という意見が大勢であった。危険を伴う検体の場合は、実施者の責任で、輸送中の安全確保を十分考慮しなければならない。

### ⑤ISO-16140-2 改訂に向けた議論

2024.6の改訂に向けた修正の議論が多く行われた。例えば、定性法における評価法、ILSにおけるRLOD解析法、相対真度解析における計算と解釈など。また、新たに「商業的無菌試験：滅菌または超高温の乳製品および植物ベースの液体製品の妥当性確認のための技術プロトコル」が附録Iとして加わった。

### ⑥ISO 16140-8: ウイルスや寄生虫、ISO 16140-9: バクテリアトキシン文書の作成

文書の内容は具体的な試験法ではなくて、あくまでも「バリデーシヨン」の条件。したがって、例えば、「コラボスタディでは試験室の数が5」と規定して細菌の場合より少ない(ISO 16140-8)。一方、具体的な試験法に関しては、例えば「Hepatitis E Virus (WG31)」、「Qualitative determination of staphylococcal (WG30)」、「Detection of Clostridium botulinum toxins (WG26)」で議論されている。

## (3) 「ISO 16140-2 に基づく食品微生物試

## 「検査バリデーションの手引き」のまとめ

添付資料 2 としてまとめた。(ISO 著作権保護のため、現時点では公開しない。)

### D 健康危害情報

該当なし。

### E. 研究発表

- 1) 学会発表 合計 1 件
  1. 松岡英明：国際規格に基づく微生物試験法バリフィケーションの技術的課題と適用事例. AOAC International Japan Section 25th Meeting, 2023.7.14, Tokyo.参加者 95 名 (オンライン 15 名を含む)

### F. 添付資料

- 1) 検証ガイドライン
- 2) ISO 16140-2 に基づく食品微生物試験法バリデーションの手引き

### F. 知的所有権の取得状況

該当なし。

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
五十君静信	食中毒統計には表れないリステリア食中毒発生状況とその対策	フードケミカル	39 (6)	56-61	2023
五十君静信	食中毒統計ではわからないリステリアの食中毒リスク	食の安全と安心通信	49		2023

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 本間 正充

次の職員の令和5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標準化実装に向けた研究

3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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"/>
-------------	---

## 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 本間 正充

次の職員の令和5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標準化実装に向けた研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品衛生管理部・部長

(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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 本間 正充

次の職員の令和5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標準化実装に向けた研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品衛生管理部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 百瀬 愛佳・モモセ ヨシカ

## 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 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5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標準化実装に向けた研究 (23KA1008)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 総合研究所・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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

次の職員の令和5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 (20KA1008)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院工学研究院・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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) 該当なし

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。