

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金

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 7 年（2025）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 -----	17
---------------	----

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 -----	27
----------------	----

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. 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 -----	45
---------------	----

5. 国際動向及び妥当性評価に関する研究

五十君 静信 他 -----	99
----------------	----

令和 6 年度消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
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・定量する試験法については、食品の輸出入の活発化に伴い、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。また、試験法は科学技術の進歩に伴って日々改良され、その性能は常に向上している。本研究では、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」の活動を通じて、国際的な整合性が取れた微生物の標準試験法を確立し、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を作成することを目的としている。

国内における食品の微生物規格のひとつとして、特定加熱食肉製品および加熱食肉製品に対しクロストリジウム属菌の成分規格が設定され、これらの食品の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。令和 6 年度の研究では、前年度に引き続き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として国内で用いられているパウチ法と、前年度研究で NIHSJ-42-ST2 とする方針が定められた ISO 15213-1:2023 の比較について予備検討を行ったところ、現時点で結果に大きな差異は見られなかった。令和 7 年度研究では作業部会内で様々な食品を用いた添加回収試験（プレスタディ）を行うこととなり、そのプロトコル案の作成を行った。

近年諸外国では食品製造環境の衛生指標としてリステリア属菌を対象菌としたふき取り検査を実施することが多くなっていることから、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、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、近年新菌種が増えているリステリア属菌について確認試験の範囲について作業部会で検討し、細胞バンクから購入したリステリア属菌標準菌株を用いた各種培地上の集落の性状解析を行うと共に、選択分離培地上でリステリアに類似した集落を形成する菌株を用いて確認試験として用いる項目の検討を行った。

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場合がある。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。

多くの検査現場では迅速検査を目的に、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、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスを材料に、ウイルス検出のためのデジタル PCR の最適化に向けた検証を実施した。その結果デジタル PCR の利用に向けてはリアルタイム PCR とは異なる条件を設定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 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、五十君分担研究者、松岡分担研究者及び岡田研究代表者が年次総会(R6.6.11-6.14)に参加した。また、松岡分担研究者は 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、WG3 会議(R6.4.8-4.10、R7.2.17-2.19)に参加（WEB）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。検証（ベリフィケーション）ガイドラインに関して、昨年度の第 10 改訂版を修正し、完成文書 NIHSJ-39 とした。実装の観点から、本ガイドラインの適用例として食品中のサルモネラの単一生菌検出結果に対する 50%検出レベル推定値（eLOD₅₀）解析を実施した。更に、現在検討委員会で作成中の試験法、技術仕様書等に関しては、妥当性確認に関する技術的助言を行った。また、ISO 16140-2 を筆頭に、ISO 16140 シリーズの改訂および開発動向と我が国における実装戦略の課題をまとめた。

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、バリデーション作業部会の承認を得て導入時の検証のガイドライン作成のためのサブワーキンググループを新たに作り、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簡易版導入検証（ベリフィケーション）ガイドラインについてワーキンググループ案を作成した。

これらの研究により、現在食肉製品の成分規格として用いられているクロストリジウム属菌試験法の国際整合性の検証、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リステリア属菌試験法に関する技術仕様書の作成、デジタル PCR 技術を用いた食品中ウイルスの定量性の向上、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、食品から微生物を検出する試験法について、妥当性確認を含む国際整合性の確保に役立てることが可能となると思われる。

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
小田 俊一 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 十文字学園女子大学
山崎 栄樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部

令和6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 大西 貴弘 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 十文字学園女子大学
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

日本国内では以前より、食中毒菌及び衛生指
標菌等の食品中微生物を検出・定量するための
試験法については、微生物の専門家が自らの経
験や学術的知識に基づき作出した試験法を書
籍等で公表し、その一部が通知法等の公定法と
して大きく変更されることなく長年活用され
てきた。一方国際的には、様々な食品中微生物
の試験法について、国際標準化機構（ISO：
International Organization for Standardization）の
定めるガイドラインに則り、広く科学的な検証
結果を踏まえて策定された標準試験法（ISO 法）

が用いられている。また、代替法として迅速簡便法を用いる際にも、ISO の定めるガイドラインに則った導入検証を行い、その結果を踏まえて代替法を使用することが定められている。食品の輸出入が一層活発化している今日、日本国内で用いられる試験法についても国際整合性が重視されている。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ウム属菌の定量試験法、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簡易版妥当性評価ガイドライン策定に向けた研究を実施した。

B. 研究方法

1. クロストリジウム属菌試験法に関する研究

1) 予備検討 1

食肉製品の規格基準適合性を調べるための公定法（以下パウチ法）と、ISO 15213-1:2023 の比較のための予備検討を、当該菌が自然汚染している可能性の高い食品検体を用いて実施した。食品は、鶏生レバー及び冷凍生ソーセージ

各 10g を用いた。検体希釈液には滅菌したペプトン加生理食塩水を用い、ストマッカーで 2 時間懸濁後、必要に応じて滅菌 PBS を用いて階段希釈した。パウチ法には検体希釈液を 10mL、ISO 法には 1mL を分注し、50℃に加温した選択分離培地を規定量加えて混和した。ISO 法では固化後に同じ培地で重層を行った。パウチ法は固化後に口をシールして好気条件下で 35℃にて 24 時間、ISO 法はアネロパックを用いた嫌気条件下で 37℃にて 48 時間培養し、形成された黒色集落を 6 コロニー釣菌してそれぞれ 2 枚の血液寒天に画線塗抹し、好気培養と嫌気培養を行うことで確認試験を行った。

2) 予備検討 2

パウチ法と ISO 法の比較を、食品への菌添加回収試験により実施した。接種菌は *Clostridium perfringens* NCTC8237 株を用い、TGC 培地に接種した純培養菌を適宜階段希釈し 3 段階（目標値は低菌量 200 CFU/g、中菌量 1000 CFU/g、高菌量 5000 CFU/g）の菌液濃度としたものを、食品は鶏肉を原料とする加熱食肉製品を用いた。検体希釈液の調製及び培地への接種は、予備検討 1 と同様に行った。各接種濃度につき 2 枚の培地（またはパウチ）を用いて菌数を測定した。接種菌液の菌数測定はパウチ法を用いて行った。

3) 検討委員会での討議

第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、クロストリジウム属菌試験法作業部会案について予備検討結果を示して討議を行った。

4) 培地における排他性の検討

培地の排他性試験として、NIHSJ-42 において使用する 2 種類の培地にクロストリジウム属菌以外の細菌を接種し、黒色集落の形成性について検討した。細菌は、*Proteus mirabilis* 2 株、

Citrobacter youngae、*Citrobacter werkmanii*、*Salmonella* 属菌、大腸菌及び黄色ブドウ球菌の野外分離株を用いた。各菌株は SCD ブイヨンで 35°C1 日培養後に 10⁸ cfu/mL の菌液から階段希釈液を調製した。クロストリジウム培地については、パウチ又はシャーレに 1mL の菌液を接種し、培地作成時に水分量を通常と同じ濃度になるように調節して作製した。シャーレでの培養は、アネロパックを用いた嫌気培養で行い、パウチ法は好気培養を行った。菌数は、35°C24 時間培養後に測定した。

5) プレスタディ案の作成

予備検討及び検討委員会での議論の結果を踏まえ、作業部会内で多検体での検討を行うプレスタディ案を作成した。

2. リステリア属菌試験法案の検討

第 82 回及び第 84 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購入した 8 株のリステリア属菌標準菌株及び保有株、選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株の性状を確認した。検討した項目は、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、カタラーゼ試験、VP 試験、37°C と 30°C における傘状発育の確認とした。選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株については、一部の菌株から Nucleospin Blood Kit (Macherey-Nagel 社) を用いて全 DNA を抽出し、Bacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ株式会社) と Blast を用いた塩基配列解析により菌種同定を行った。更に、リステリア属菌に特異的とされる *prs* 遺伝子の検出を PCR 法により行った。

3. デジタル PCR の検討

1) 定量に用いた検体

GII ノロウイルス懸濁液及び A 型肝炎ウイルス (HAV, ATCC VR-1402) 懸濁液を用いた。ゲノムコピー数は GII 約 2500 コピー/5uL、HAV 約 5000 コピー/5uL となるよう調整した。

2) RNA 抽出

1) のウイルス懸濁液と Nuclease free water を合計 300μL となるように混合して、磁気ビーズによる自動核酸抽出 (Maxwell RSC viral total RNA kit, Promega) により RNA を抽出し、1 Step RT-dPCR に供した。

3) プライマー及びプローブ

ノロウイルス : ISO15216-1(ISO)及び通知法に示される配列。

A 型肝炎ウイルス : ISO15216-1(ISO)に示される配列。

4) dPCR

使用機器

QIAcuity ONE (QIAGEN)

使用試薬

QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (QIAGEN)

QIAGEN 社の 1 step RT-dPCR キット試薬を用いた。

5) qPCR

使用機器

7500 realtime PCR システム(Thermofisher)

使用試薬

TaqMan Fast Virus 1 Step Mastre Mix (Thermofisher)

4. 国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究

1) -1. 国際標準試験法に関する動向の把握

2024 年 6 月に米国セントルイスで開催された ISO/TC34/SC9 総会に参加し、ISO 法の策定、

改訂およびガイドライン等に関する議論に参加すると共に、情報の収集を行った。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 (乳製品の国際規格) に P メンバーとして活動することになり、五十君が国内委員会委員長、岡田が副委員長となり、こちらのサブコミティーからも情報収集を行った。アメリカにおける食品の微生物試験法に関する情報収集も行った。AOAC International 総会には、直接参加することはできなかったが、国内から当該学会に参加した AOAC インターナショナル日本セクション所属の研究者から、AOAC International の動向について情報収集を行った。妥当性確認に関する文書が AOAC International から公開されており、その内容の精査を継続した。

1) -2. ISO 16140 シリーズの開発・改訂の動向調査

ISO/TC34/SC9, 2024 年次総会(R6.6.11- 6.14) (WEB 参加)、SC9 内の妥当性確認ワーキンググループ 3 (WG3) 会議 (R6.4.8-4.10, R7.2.17-2.19) (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 6 回) に対応し、必要に応じてコメントを発信した。以上の活動によって得た情報に基づき、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。特に、ISO 16140-2 に関しては、ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024 を反映した手引きとしてまとめた。

2) 検証ガイドラインの作成

令和 5 年度の報告書添付資料 1「第 10 改訂版 (R6.3.3)」に関して、バリデーション作業部会

及び検討委員会で再度議論し、ガイドラインを作成した。

3) 簡易版ガイドラインの作成

現場での実施に有用な、簡易版ガイドライン作成のためのサブワーキンググループを結成し、2025 年 2 月 26 日の第一回会議には、登録検査機関や食品メーカー等から合計 16 名が参加した。国内における試験時の導入検証の手法の方向性を検討した。

昨年度たたき台案として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検討を進めた。

C. 研究結果

1. クロストリジウム属菌試験法に関する研究

1) 予備検討 1

鶏生レバーを用いた検討と冷凍生ソーセージを用いた検討を各 1 回実施した (百瀬分担報告書表 1)。その結果得られた黒色集落を血液寒天培地に画線塗抹して好気培養と嫌気培養を実施したところ、全て好気培養で発育が見られ、今回使用した食品検体における自然汚染菌である黒色集落がクロストリジウム属菌ではないことが確認された。

2) 予備検討 2

鶏肉を用いた加熱食肉製品に *C. perfringens* NCTC8237 株を接種した添加回収試験を行ったところ、百瀬分担報告書表 2 の結果を示した。接種菌量の実測値は、低菌量で 244 CFU/g、中菌量で 1220 CFU/g、高菌量で 6100 CFU/g であった。パウチ法と ISO 法のいずれも理論値よりも菌数がやや高い傾向が見られたが、おおむね同等の結果が得られた。

3) 検討委員会での討議

第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、クロストリジウム属菌試験法作業部会案について予備検討 2 の結果を示して討議を行った。予備検討 1 は、*Clostridium* の自然汚染検体が得られなかったため、検討委員会では示さなかった。委員より、判定時に採用するコロニー数として 10-100 個を提案している理由について質問があり、当該菌では集落が大きいため、通常生菌数等で用いられている 30—300 個の集落数では計測が難しいことが説明された。また、パウチの使用方法について、培地をパウチに封入した後にパウチの口を下にする事で凝固水を下に貯める様にして培養するとスウォーミングを防止することが可能であるとの助言があり、今後作業部会にて検討することとなった。今後作業部会でプレスタディによる試行を重ねたのちに ISO 16140 シリーズに基づく同等性の評価を行うことが確認された。

4) 培地における排他性の検討

クロストリジウム属菌以外の細菌を、NIHSJ-42 において使用する培地に接種し、黒色集落の形成性について検討した結果、クロストリジウム培地では *Proteus mirabilis*、*Citrobacter youngae*、*Citrobacter werkmanii*、*Salmonella* 属菌及び大腸菌で黒色集落を形成した（百瀬分担報告書表 3）。一方、ISA 培地では *Proteus mirabilis* は用いなかったものの、*Salmonella* 属菌で黒色集落の形成が見られた。

5) プレスタディ案の作成

予備検討及び検討委員会での議論の結果を踏まえ、作業部会内でのメール討議を通じて、来年度に作業部会で実施する多検体での検討を行うプレスタディ案を作成した（百瀬分担報告書表 4）。

2. リステリア属菌試験法案の検討

第 82 回食品からの微生物標準試験法検討委員会（令和 6 年 8 月 5 日開催）において、NIHSJ-40TS 及び 41TS の作業部会案（ST2 案）について前年度の結果報告を行ったところ、①作業部会メンバー保有株を用いた選択分離培地上の定型集落の検討で、培地ごとの使用菌株数の相違や発育不良株の割合が不明瞭であることから、データの蓄積と表現方法の統一を行うこと②学術的な細菌分類と食品検査で対象とする菌種の違い、及び本検討で対象とする菌種について再確認され、本検討で対象とする菌種についてはワーキンググループにて検討が続けられること、との意見が出された。また、食品衛生におけるリステリア属菌の重要性は、*L. monocytogenes* の衛生指標としてのものであることから、対象とする菌種は、*L. monocytogenes* と同様の挙動、性状を示すものに限定してはどうかとの提案があった。第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会（令和 7 年 2 月 6 日開催）においては、細胞バンクより購入したリステリア属菌の標準菌株 8 株を用いた検討の報告（岡田分担報告書表 1）と、第 82 回検討委員会で報告された、リステリア属菌保有菌株及び選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いた検討に追加データを加えたもの（岡田分担報告書表 2）が示された。委員からは、①検討に定量性をもたせるため、選択分離培地等への画線塗抹ではなく接種菌量の調整を行うべきであること②確認試験等の検討でリステリア・モノサイトゲネス菌株との比較が必要である、との指摘がなされた。今後、定量性を確保するためにミスラ法を用いた検討を行うこととされた。また、現在検討している食品からのリステリア属菌を検出する技術仕様書で対象とする菌の範囲について、学術的

な細菌分類とは主旨が異なることから、ISO/TC34/SC9 でも ISO 11290-1 及び 2 の対象としている狭義のリステリア属菌（岡田分担報告書表 1）とすることが提案された。酵素基質培地とその他の選択分離培地上での集落形成性については、細胞バンクから購入した標準菌株等を用いた比較検討を行った（岡田分担報告書表 3）。今回用いた 5 菌株 2 亜種（計 8 株）のリステリア属菌のうち、*Listeria grayi* の 2 菌株が ALOA 培地、PALCAM 培地及び TSA 培地上で他のリステリア属菌とは異なる色調を示していた。運動性試験については全ての株で 30℃における傘状発育を示し、一部の株では 37℃でも傘状発育を示していた。VP 試験は 8 株全てで陽性を示した。

選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いた検討では、類似集落形成菌の多くは TSA 平板上でリステリア属菌よりも着色した集落を形成する傾向が見られた（岡田分担報告書表 4）。また、リステリア属菌に該当しない菌では VP 反応が陰性で、半流動寒天培地で傘状発育を示さないものが多く見られた。これらの菌株を 16S rDNA 塩基配列解析により同定した結果、*Microbacterium* 属、*Curtobacterium* 属、*Cellulosimicrobium* 属、*Leuconostoc* 属、*Brachybacterium* 属及び *Kocuria* 属に属しており、*Kocuria* 属菌の株は VP 反応陽性で傘状発育を示すなど、*prs* 遺伝子の確認以外の方法でのリステリア属菌との鑑別が困難であった。今回検討した 8 株の中にリステリア属菌は 1 株あり、*prs* 遺伝子を保有しており、VP 反応陽性と半流動寒天培地での傘状発育を示していた。

3. デジタル PCR の検討

1) 定量に用いた検体

GII ノロウイルス懸濁液及び A 型肝炎ウイルス（HAV, ATCC VR-1402）懸濁液を用いた。

ゲノムコピー数は GII 約 2500 コピー/5uL、HAV 約 5000 コピー/5uL となるよう調整した。

2) RNA 抽出

1) のウイルス懸濁液と Nuclease free water を合計 300μL となるように混合して、磁気ビーズによる自動核酸抽出（Maxwell RSC viral total RNA kit, Promega）により RNA を抽出し、1 Step RT-dPCR に供した。

3) プライマー及びプローブ

ノロウイルス：ISO15216-1(ISO)及び通知法に示される配列。

A 型肝炎ウイルス：ISO15216-1(ISO)に示される配列。

4) dPCR

使用機器

QIAcuity ONE (QIAGEN)

使用試薬

QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (QIAGEN)

QIAGEN 社の 1 step RT-dPCR キット試薬を用いた。

5) qPCR

使用機器

7500 realtime PCR システム(Thermofisher)

使用試薬

TaqMan Fast Virus 1 Step Mastre Mix (Thermofisher)

4. 国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究

1) 国際標準試験法に関する動向の把握

2024 年 6 月に、米国・セントルイスで開催された ISO/TC34/SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）総会へ参加し、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試験法の検討に加わった。総会への参加国は、フランス（幹事国）他の約27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100名以上が参加した。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。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。

ISOが作成する規格については、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ている。SC5の国内委員会には、研究班から五十君と岡田が参加した。

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。

1) -2. ISO 16140 シリーズの開発・改訂の動向調査

①ISO 16104-2:2016/Amd.1:2024

ISO 16140 シリーズの中心文書であり、本年度の改定案をめぐり盛んに議論され、Amd.1に反映されることになった。改訂内容の概要は以下のとおりである。

(a) 偽陽性と偽陰性の議論：

定性試験における感度試験では参照法と代替法で同一検体を試験する。その結果の陽性/陰性結果に基づく性能評価の問題である。参照法（陽性）、代替法（陰性）、確定試験結果（陽性）の場合、「代替法の偽陰性による陰性偏差」というような、難解な表現をする。この表現法に関する議論に多くに時間を割いたが、昨年度に決着したものの、本年度にまた偽陰性率（False negative ratio; FNR）に関するコメントが出た。既に偽陽性率（False positive ratio）はペアード試験とアンペアード試験、各々に対して計算式が示されているが、FNRに対しても同様の計算式を示すべきだ、という内容であった。

(b) 半定量法（Semi-quantitative methods）の新設：

従来、妥当性確認は定性試験と定量試験から構成されていたが、新たに Amd.1:2024 で半定量試験が導入された。その内容は、

・〔定性試験の代替法〕対〔定量試験の参照法〕

でバリデーション。

- ・参照法の検出閾値を確認し、これを代替法が検出できるか（陽性 or 陰性）を試験。
- ・アンペアード試験として評価

の3点のみが異なるだけで、後の条件は定性試験の場合と同じであった。

(c) 商業的滅菌試験：

16140-2:2016 には 当初(A)から(I)まで 9 個の附録 (Annex) が付いていた。その内訳は、(A) 食品と汚染菌の組合せ、(B)(C)は菌で汚染された食品試料の調製、(D)(F)は RLOD 解析、(E)は包含性と排他性に適用する菌種、(G)(H)(I)は精確さの菌濃度依存性の解析（具体的計算例を掲載）、であった。その後、改訂作業の過程で、2023 年に「商業的滅菌試験」に関するプロジェクトグループ (PG) ができ、Annex J として「商業的滅菌法のバリデーション」が加わった。

それまで ISO 16140-2 の対象は、特定の食品と特定の菌種の組合せであったが、初めて、食品や菌種を問わず横断的な滅菌方法の妥当性を評価する、という内容を対象とするものであった。実用的には、極めて適用範囲が広く、また需要が大きい内容であるが、具体的な議論は難しかった。その第一は、滅菌条件が十分であったことを確認するための指標菌を何にすればよいか、という問題である。また冷凍品や冷蔵品の場合、生菌が残っていたとしても、その増殖は遅く、検出は難しいことが予想される。

ISO での議論の現状は、対象食品はコーデックスの定義に従う、すなわち「常温保存可能な製品（分活性(a_w) >0.86)、であるが、脱水製品、チルド製品、保存料を使用した製品は対象外とする。具体的に「フルーツジュース」、「超高温瞬間殺菌乳および植物由来乳」など数項目を挙げ、各々に対して考慮すべき菌種（好気性、嫌気性、芽胞、高温嫌気性菌、乳酸菌、など）を

規定する、との考え方が示されている段階である。また、この時点で、食品と菌種との組み合わせが、既存の Annex (A)の分類と整合性が取れるか、との議論もあった。

②ISO 16140 の他のパートの動向

(a) ISO/PWI 16140-1 語彙

PWI は Preliminary work item. 121 個の語彙について意味がまとめられている。例えば、

“Qualitative method” は“分析対象物質が、指定された検体において、直接的または間接的に検出されるか検出されないかのいずれかの反応を示す分析方法”

“Quantitative method”は “分析法の一種で、その応答が分析対象物質の量（個数または質量）であり、指定された検体において、直接的に（例：質量または体積中の個数測定）または間接的に（例：色吸収、インピーダンスなど）測定されるもの”

“Semi-quantitative method”は “分析対象物質が、指定された（希釈された）検体中に直接的または間接的に検出されるか検出されないかを示す分析方法であり、定量的な参照方法に対して技術的プロトコルに従って妥当性確認され、定性法を評価するために使用される”

現在、用語集編集作業を実施している国内委員会バリデーション部会と情報共有している。

(b) ISO 16140-4:2019/DAmD.2 単一試験室でのバリデーション

Draft for ISO 16140-3:2021/FDAmd.1 と同じタイミングで ISO 16140-4 に関しても、菌株同定に関する事項が追加された。菌株同定のための規格は、別途、作製された ISO 16140-7 に詳しく記載されているが、それを参考に、ISO16140-4 では Annex I で、試験すべき菌株

数を最小 250 株、最大 1000 株、と規定している。

(c) ISO 16140-6:2019 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 Part2 に導入された確定試験の選択肢として利用可能。

(d) ISO/16140-7:2024 菌種同定法の出版

(e) ISO/NP 16140-8:ウイルスと寄生虫
新プロジェクト（New project; NP）として作製中。

(f) ISO/PWI 16140-9 細菌毒素と生物由来アミン
予備作業項目（Preliminary work item; PWI）として作製中。

2) 検証ガイドラインの作成

①NIHSJ-39 として完成〔添付資料 1（オンラインでは非公開）〕

本ガイドラインの目的は「NIHSJ 法を作成する作業部会および共同試験に参加する試験室が、ISO 法等を改良、和訳、導入する際の技術的要件を示すものであり、ISO 16140-3:2021 に基づく」となっていたが、複数の委員から、現在の我が国の実施者を想定すると、内容が難解で具体的操作が複雑過ぎる、との見解が出され、再度議論された。その結果、目的を「ISO 16140-3:2021 原本に基づく導入検証の実施を希望し、その内容をより理解したいと考える試験者を対象とする解説文書の作成を目的としている」とし、これを完成文書 NIHSJ-39 とした。

② Draft for ISO 16140-3/FDAmD.1

ISO での改訂が進められ、2025.3.11 時点で菌株同定に関する事項の改訂が合意された。すなわち、許容限界（NIHSJ-39 では 2.4 節の表、ISO 16140-3-2021 では 8 節の Table 8）に次の項目が

加わる。

同定法	菌株パネル	100% 一致
-----	-------	---------

続けて、新たに 9 節「妥当性確認済みの同定法 — 検証のための技術的プロトコル」が追加された。そして検証すべき菌株の数、結果報告のテンプレートが、各々、表 17、表 18 として追加された。

表 17. 妥当性確認済み同定法の実装検証における菌株数

妥当性確認済み同定法の範囲	試験すべき菌株数
複数の科と属に属する種	15
同一科内に属する複数の属に属する種	10
同一属に属する種	5

表 18. 妥当性確認済み同定法の検証結果の概要

試験株	寒天培地	菌株の同定		検証試験法によって同定された菌株の科・属	結果の解釈 (IA, ID, No)*
		同定された科・属	菌株の起源		
1					
2					
3					
Etc.					
*IA:一致, ID:偏差, No:不一致					

さらに、表 18 の具体例が附録 G として追加された。

3) 簡易版ガイドラインの作成

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、昨年までに作成した実用的なガイドラインたたき台案を基に、ガイドライン作成のためのサブワーキンググループを作り、検討を進め、WG案を作成した。国内における試験時の導入検証の手法の方向性を検討し整理し意見交換を行った。その検討内容は五十君分担報告書別添文書2に示した。

D. 考察

今年度の本研究では、クロストリジウム属菌標準試験法（NIHSJ-42）について、現在の公定法であるパウチ法との同等性を確認することで、パウチ法 Annex として付記し、今後も使用可能とするための予備検討を実施した。鶏肉を用いた加熱食肉製品に3段階の濃度の *C. perfringens* 菌液を接種したところ、ISO法とパウチ法で大きな差は見られなかった。一方、特にパウチ法では理論上の接種菌量を上回る集落数が計測されたことから、次年度に行うプレスタディではばらつきの範囲を計測する目的で、1検体当たり3枚の平板又はパウチに接種することとなった。また、現在の食品成分規格でクロストリジウム属菌を設定している食品群は一部の食肉製品であるが、レトルト包装に類似した形態をとりつつレトルト殺菌を行っていない製品のチルド品としての流通が増加している。そのため、これらの食品の保存温度の逸脱によっては、クロストリジウム属菌等の芽胞形成菌が食品内で増殖しうることが懸念される。そのため、NIHSJ-42は標準試験法として食品種を加熱食肉製品に限定せず、プレスタディでは作業部会メンバーのこれまでの経験からクロストリジウム属菌汚染が起こりうると思われる魚肉練り製品、食品内で生残している可能性が高いレトルト類似食品、香辛料等の

幅広い食品群を用いて添加回収試験を行うこととした。来年度はプレスタディでの結果を確認してステージ2案を作成し、更にコラボラティブスタディを実施して NIHSJ-42 の策定をおこなう予定である。

リステリア属菌試験法については、当該属における新菌種が近年増加しており、菌種同定に分子遺伝学的手法が必要とされる菌種も存在すること、リステリア属菌用の選択分離培地上で定型集落と鑑別困難な類似集落について、食品製造事業者が純培養と各種の確認試験を行うのは困難であると思われることを踏まえ、今年度の本研究では、国際的な標準試験法である ISO 法に準拠したリステリア属菌の試験法を検討しつつ、その確認試験の範囲と手法について検討を行った。その結果、細胞バンクから購入した標準菌株等はリステリア属菌に定型的な性状を示した。一方、研究室保有のリステリア属菌の中には選択分離培地上での集落形成性が劣る株も見られた。更に、食品から分離されたリステリア属菌類似集落の鑑別に有用と思われる性状を見出し、リステリア属菌の確認試験として、TSA 平板上の集落性状、半流動寒天培地を用いた傘状発育の確認及び VP 試験が有用である可能性が示された。来年度は更に多くの菌株についてデータを集積し、確認試験として必要とされる範囲を確定することで、NIHSJ-40 TS 及び NIHSJ-41TS の最終案を作成する。

デジタル PCR ガイドラインについては、すでに広く用いられるリアルタイム PCR(qPCR)のプライマー、プローブを用いて、デジタル PCR(dPCR)を行う場合の条件と、定量性について検討した。qPCR では、検量線として $10^2 \sim 10^7$ copies/ μ L 程度の幅広いレンジのコピー数の測定が可能であるが、dPCR での定量範囲は、本研究で試行した GII ノロウイルス及び

HAV に関しては $10^2 \sim 10^3$ copies/ μ L 程度と、qPCR と比較して非常に小さかった。これは、今回利用した dPCR の反応プレート (Nanoplate 8.5K 24-well, QIAGEN) が 1 反応あたり約 8500 個のプロットが計測できるプレートであり、理論的に最大 8500 コピー程度までしか陽性コピー数を測定できなかったためと考えられる。Nanoplate 26K 24-well, QIAGEN などの 26,000 個のプロットを計測できるプレートを用いれば測定範囲をさらに 10^4 copies/ μ L 程度までは拡大できる可能性があるが、使用する試薬の量も増えるため (8.5k プレート ; 12 μ L, 26k プレート ; 40 μ L) 1 反応あたりのコストが高くなることが懸念される。

BIO-RAD 社の機器の場合は、反応液中に 20,000 個程度の液滴を形成させて PCR 反応を行うため、測定範囲は 26k プレートと同程度と考えられる。

dPCR の定量範囲は qPCR と比較して小さいものの、検出限界については、今回 HAV が 45 copies/ μ L 程度、GII ノロウイルスが 11 copies/ μ L 程度であれば確実に検出されており、qPCR に近い感度を持っていることが示唆された。

dPCR の原理は通常の 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ため、実験室内の遺伝子汚染に強いと考えられる。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、本研究で示したようなプライマー、プローブの濃度や、PCR サイクル条件などをターゲットごとに検

証することで、dPCR を食品からの微生物検出に利用可能となることが示された。

国際動向に関する研究では、ISO/TC34/SC9 の 2024 年度のトピックスは、培地成分の有害化学物質について今後排除していく方向で塩化リチウムなど有害とされた化学物質に対し調査を行い、必要な措置を行うことを決定した。今後培地に使われる有害化学物質については排除していく方向性が示された。

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・モノサイトゲネス試験法等使用培地の変更が検討されている試験法も複数挙げられた。

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。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で引続き試験法策定の作業を行っていく。

バリデーション等については、今年度研究に基づき次のような実装戦略が考えられた。

①代替法に関する技術開発が進むと、代替法の性能が参照法より高くなる場合が多くなる。定

性法では、参照法では検出できないが、代替法では検出できた、という場合である。その結果、参照法との同等性よりも代替法の確実性を追求することがより重要になってくる。この場合の確実性とは、代替法が検出した菌が、確実に標的菌である、ということである。したがって、菌種同定に関する合理的な試験体系を構築することが必要になる。したがって、この問題については、ISOでの議論の結果を待つのみでなく、自ら最適と考えられる試験体系を構築することが重要となっている。

②定性法の感度は高ければ、低濃度の菌体試料で全陽性の結果になる場合が多くなる。その場合はISOで提供している計算ソフトのみでは解析できない。統計学に基づく近似法など、柔軟な解析法の創案が必須となる。本年度の成果の論文は、まさにその課題に対する解答例といえる。従来、我が国では、統計学エキスパートは専ら食品微生物のリスクアセスメントに関わっていたように見受けられる。しかし、今後は、リスクマネジメント（試験結果の評価に際して）にも統計学エキスパートが強力に動員されることが望まれる。

③ISOでの議論は多岐にわたっているが、その内容の多くが、必ずしも我が国の実務者が必要としている情報に調和していないように感じる。海外との取引に関する実務量が少ないことが一因かも知れない。したがって、逆に、コストをかけるに値する実務量がある試験法を特定し、それを国際調和する意義を明確にすることが必要と思われる。

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、昨年度までにガイドラインたたき台案としてまとめたものを基として、現場での実用性を考慮したガイドライン作成のためのサブワーキンググループを作り、検討を進めた。どのような方向でガイドラインを作っていくかの意見交換とその方向性を議論し、WG案を作成した。

HACCPなどの工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性については、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

昨年度の本研究でクロストリジウム属菌の標準試験法として検討することとなったISO 15213-1:2023と、現行法であるパウチ法との同等性確認を実施するための予備検討を実施したところ、*C. perfringens* NCTC8237株を用いた添加回収試験において、ほぼ同等の結果が示された。また、多検体を用いたプレスタディを作業部会内で行うためのプレスタディ案を作成した。次年度には様々な食品や菌株を用いて2つの試験法の同等性を確認するプレスタディと、その結果を踏まえたコラボスタディを実施する予定である。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、細胞バンクから購入した標準菌株等、作業部会保有株及びリステリア属菌類似集落を形成する菌株を用いて検討し、確認試験として有用と思われる項目を抽出した。

デジタルPCRガイドラインに関する研究としては、dPCRについて検査室、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一方、その利用には既存のqPCRのプロトコルを改良する必要があることを示した。また、高濃度の遺伝子測定範囲はqPCRに劣るものの、低濃度の遺伝子検出感度はqPCRと同程度であると考えられた。検査導入に向けては、食品への添加回収試験により、遺伝子検出感度がどの程度影響を受けるかなど、さらに検討すべき項目が抽出された。

「NIHSJ法を作成する作業部会および共同試験に参加する試験室が、ISO法等を改良、和訳、導入する際の技術的要件を示すものであり、ISO 16140-3:2021に基づく」検証ガイドラインとして、NIHSJ-39が完成した。

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る。

公定法策定に関する規格である ISO 17468 を基に NIHSJ 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。試験法導入時の検証に関しては現場での実用性を考慮したガイドライン作成のためのサブワーキンググループを作り、検討を進めた。

F. 健康危機管理情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Matsuoka, T. Moriyama, N. Koshimizu, N. Takatani, T. Yoshida, Y. Shimabara, T. Hirai, K. Nakajima, S. Igimi, M. Saito: Detection of single cell contamination of *Salmonella* in foods by SALX System and NIHSJ-01 and estimation of LOD₉₅. *Food Safety* 2025 (in press)

2. 学会発表

- 1) 五十君静信：食品における食中毒起因細菌制御の重要性. 日本食品衛生学会 令和6年度シンポジウム (2024年6月、東京)
- 2) 五十君静信：生食用野菜の微生物の実態と食品安全の考え方. 野菜科学研究会シンポジウム. (2024年8月、東京)
- 3) 五十君静信：食中毒を起こさないための品質管理、微生物管理についての対策. Ifia Japan, HACCP・異物対策セッション (2024年5月、東京)
- 4) 五十君静信：HACCP導入に伴う微生物検査の考え方並びに最新の社会動向と微生物制

御の話題. 福岡県獣医師会公衆衛生部会研修会 (2024.11.9 福岡)

- 5) 松岡英明、斉藤美佳子：ISO16140ウェブサイトのLOD₅₀自動解析プログラムの理論的背景と活用シミュレーション. 日本防菌防黴学会第51回年次大会 (2024年9月、東京)
- 6) 岡田由美子、下島優香子、井田美樹、西野由香里、三橋華子、都丸亜希子、西野智子：食品及び製造環境から分離されたリステリア属菌の性状. 第 45 回日本食品微生物学会 (2024 年 9 月、青森)

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 |

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
令和6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	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	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（クロストリジウム属菌試験法作業部会）

小田俊一*	一般財団法人日本食品分析センター
小久保彌太郎*	公益社団法人日本食品衛生協会
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
西野由香里	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
門間千枝*	十文字学園女子大学
山崎栄樹	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

（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。昨年度本研究では、国際的な標準試験法であるISO 15213-1:2023 に準拠した標準試験法 NIHSJ-42 を策定すると共に、国内現行法であるパウチ法との同等性を評価し、確認された場合にはパウチ法を Annex として付記する方針が定められた。今年度の本研究では、パウチ法と ISO 15213-1:2023 の比較の予備検討を実施すると共に、作業部会において多くの食品検体と各研究室の保有するクロストリジウム属菌菌株を用いた添加回収試験をプレスタディとして実施するためのプレスタディ案を作成した。

A. 研究目的

本研究班は、「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）での議論を通じ、国際調和を重視した標準試験法、技術仕様書及びガイドラインの整備を行っ

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、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。クロストリジウム属菌の公定法としては、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法となっているが、当該試験法の国際整合性は現在確認されていない。

本分担研究では、食品の衛生管理における試験法の国際調和を目指し、クロストリジウム属菌の標準試験法について検討をおこなっている。昨年度の本研究では、国際的な標準試験法である ISO 法、BAM 法等と公定法を比較し、検討委員会での議論を通じて、今後の標準試験法として ISO 15213-1:2023 に準拠したものを NIHSJ-42 として作成することが決定された（ステージ 1）。また、現行の公定法と ISO 法との間で科学的根拠に基づいた妥当性評価を実施し、同等性が確認された場合には現行法を Annex として標準試験法の一部に記載することとなった（図 1）。本年度の本研究では、公定法と ISO 法の比較検討を行うための予備検討と、多検体での検討を行うプレスタディ案の作成を行った。

B. 研究方法

1) 予備検討 1

食肉製品の規格基準適合性を調べるための公定法（以下パウチ法）と、ISO 15213-1:2023 の比較のための予備検討を、当該菌が自然汚染している可能性の高い食品検体を用いて実施した。食品は、鶏生レバー及び冷凍生ソーセージ各 10g を用いた。検体希釈液には滅菌したペプトン加生理食塩水を用い、ストマッカーで 2 分間懸濁後、必要に応じて滅菌 PBS を用いて階段希釈した。パウチ法には検体希釈液を 10mL、ISO 法には 1m

L を分注し、50℃に加温した選択分離培地を規定量加えて混和した。ISO 法では固化後に同じ培地で重層を行った。パウチ法は固化後に口をシールして好気条件下で 35℃にて 24 時間、ISO 法はアネロパックを用いた嫌気条件下で 37℃にて 48 時間培養し、形成された黒色集落を 6 コロニー釣菌してそれぞれ 2 枚の血液寒天に画線塗抹し、好気培養と嫌気培養を行うことで確認試験を行った。

2) 予備検討 2

パウチ法と ISO 法の比較を、食品への菌添加回収試験により実施した。接種菌は *Clostridium perfringens* NCTC8237 株を用い、TGC 培地に接種した純培養菌を適宜階段希釈し 3 段階（目標値は低菌量 200 CFU/g、中菌量 1000 CFU/g、高菌量 5000 CFU/g）の菌液濃度としたものを、食品は鶏肉を原料とする加熱食肉製品を用いた。検体希釈液の調製及び培地への接種は、予備検討 1 と同様に行った。各接種濃度につき 2 枚の培地（またはパウチ）を用いて菌数を測定した。接種菌液の菌数測定はパウチ法を用いて行った。

3) 検討委員会での討議

第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、クロストリジウム属菌試験法作業部会案について予備検討結果を示して討議を行った。

4) 培地における排他性の検討

培地の排他性試験として、NIHSJ-42 において使用する 2 種類の培地にクロストリジウム属菌以外の細菌を接種し、黒色集落の形成性について検討した。細菌は、*Proteus mirabilis* 2 株、*Citrobacter youngae*、*Citrobacter werkmanii*、*Salmonella* 属菌、大

腸菌及び黄色ブドウ球菌の野外分離株を用いた。各菌株は SCD ブイヨンで 35℃1 日培養後に 10⁸ cfu/mL の菌液から階段希釈液を調製した。クロストリジウム培地については、パウチ又はシャーレに 1mL の菌液を接種し、培地作成時に水分量を通常と同じ濃度になるように調節して作製した。シャーレでの培養は、アネロパックを用いた嫌気培養で行い、パウチ法は好気培養を行った。菌数は、35℃24 時間培養後に測定した。

5) プレスタディ案の作成

予備検討及び検討委員会での議論の結果を踏まえ、作業部会内で多検体での検討を行うプレスタディ案を作成した。

C. 研究結果

1) 予備検討 1

鶏生レバーを用いた検討と冷凍生ソーセージを用いた検討を各 1 回実施した(表 1)。その結果得られた黒色集落を血液寒天培地に画線塗抹して好気培養と嫌気培養を実施したところ、全て好気培養で発育が見られ、今回使用した食品検体における自然汚染菌である黒色集落がクロストリジウム属菌ではないことが確認された。

2) 予備検討 2

鶏肉を用いた加熱食肉製品に *C. perfringens* NCTC8237 株を接種した添加回収試験を行ったところ、表 2 の結果を示した。接種菌量の実測値は、低菌量で 244 CFU/g、中菌量で 1220 CFU/g、高菌量で 6100 CFU/g であった。パウチ法と ISO 法のいずれも理論値よりも菌数がやや高い傾向が見られたが、おおむね同等の結果が得られた。

3) 検討委員会での討議

第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、クロストリジウム属菌試験法作業部会案について予備検討 2 の結果を示して討議を行った。予備検討 1 は、*Clostridium* の自然汚染検体が得られなかったため、検討委員会では示さなかった。委員より、判定時に採用するコロニー数として 10-100 個を提案している理由について質問があり、当該菌では集落が大きいいため、通常生菌数等で用いられている 30—300 個の集落数では計測が難しいことが説明された。また、パウチの使用方法について、培地をパウチに封入した後にパウチの口を下にする事で凝固水を下に貯める様にして培養するとスウォーミングを防止することが可能であるとの助言があり、今後作業部会にて検討することとなった。今後作業部会でプレスタディによる試行を重ねたのちに ISO 16140 シリーズに基づく同等性の評価を行うことが確認された。

4) 培地における排他性の検討

クロストリジウム属菌以外の細菌を、NIHSJ-42 において使用する培地に接種し、黒色集落の形成性について検討した結果、クロストリジウム培地では *Proteus mirabilis*、*Citrobacter youngae*、*Citrobacter werkmanii*、*Salmonella* 属菌及び大腸菌で黒色集落を形成した(表 3)。一方、ISA 培地では *Proteus mirabilis* は用いなかったものの、*Salmonella* 属菌で黒色集落の形成が見られた。

5) プレスタディ案の作成

予備検討及び検討委員会での議論の結果を踏まえ、作業部会内でのメール討議を通じて、来年度に作業部会で実施する多検体での検討を行うプレスタディ案を作成した。

(表 4)。

D. 考察

昨年度の本研究で、NIHSJ-42 として策定する方針となったクロストリジウム属菌標準試験法について、現在の公定法であるパウチ法との同等性を確認することで、パウチ法 Annex として付記し、今後も使用可能とするための予備検討を今年度研究として実施した。鶏肉を用いた加熱食肉製品に 3 段階の濃度の *C. perfringens* 菌液を接種したところ、ISO 法とパウチ法で大きな差は見られなかった。一方、特にパウチ法では理論上の接種菌量を上回る集落数が計測されたことから、次年度に行うプレスタディではばらつきの範囲を計測する目的で、1 検体当たり 3 枚の平板又はパウチに接種することとなった。また、現在の食品成分規格でクロストリジウム属菌を設定している食品群は一部の食肉製品であるが、レトルト包装に類似した形態をとりつつレトルト殺菌を行っていない製品のチルド品としての流通が増加している。そのため、これらの食品の保存温度の逸脱によっては、クロストリジウム属菌等の芽胞形成菌が食品内で増殖しうることが懸念される。そのため、NIHSJ-42 は標準試験法として食品種を加熱食肉製品に限定せず、プレスタディでは作業部会メンバーのこれまでの経験からクロストリジウム属菌汚染が起こりうると思われる魚肉練り製品、食品内で生残している可能性が高いレトルト類似食品、香辛料等の幅広い食品群を用いて添加回収試験を行うことと

した。特に、パウチ法は容器をシールして密封することで好気培養を可能にしているが、食品検体に糖が多く含まれる場合、培養中にガスの産生が起こるため、パウチの膨潤が起こりうることから、これまでパウチ法が用いられていない様々な食品を用いた検討が必要と考えられる。来年度はプレスタディでの結果を確認してステージ 2 案を作成し、更にコラボラティブスタディを実施して NIHSJ-42 の策定をおこなう予定である。

E. 結論

昨年度の本研究でクロストリジウム属菌の標準試験法として検討することとなった ISO 15213-1:2023 と、現行法であるパウチ法との同等性確認を実施するための予備検討を実施したところ、*C. perfringens* NCTC8237 株を用いた添加回収試験において、ほぼ同等の結果が示された。また、多検体を用いたプレスタディを作業部会内で行うためのプレスタディ案を作成した。次年度には、様々な食品や菌株を用いて 2 つの試験法の同等性を確認するプレスタディを行い、その後コラボスタディを実施する予定である。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

・パウチ法

検体 x g+ペプトン加生食 9x mL

↓

ストマッキング

↓

必要に応じて階段希釈

↓

各希釈液を2枚のパウチに10 mL 分注し、

45～50℃に保持したクロストリジウム培地 15 mL を加え、混和後シールして固化

↓

35℃±1℃、24 時間±2 時間、好気培養

↓

黒色集落の計数

・ISO 15213:2023

検体 x g+ペプトン加生食 9x mL

↓

ストマッキング

↓芽胞を計測する場合は 80℃10 分

必要に応じて階段希釈

↓

各希釈液を2枚のシャーレに1 mL 分注し、

45～50℃に保持した ISA 培地 12～15 mL を加えて混和し、固化後に 7 mL を重層

↓

37℃±1℃、48 時間±2 時間、嫌気培養

↓

黒色、黄色がかった茶色、灰色集落の計数

↓

確認試験（好気/嫌気培養）

図 1. 現行法（パウチ法）と ISO 15213-1：2023 のプロトコール

表 1. 予備検討 1 の結果（食品を用いた検討：未接種）

	試験法	公定法	ISO 法
	培地	クロストリジウム培地	Iron Sulfite Agar (ISA)
	容器	パウチ	シャーレ
	気相	好気	嫌気
	試料液量	10 mL	1 mL
実験 1	食品検体	鶏生レバー	
	測定菌数	420	30
	好気培養	+	+
	嫌気培養	+	+
実験 2	食品検体	冷凍生ソーセージ	
	測定菌数	600	80
	好気培養	+	+
	嫌気培養	+	+

表 2. 予備検討 2 の結果（食品を用いた検討： *C. perfringens* NCTC8273 株の添加）

試験法	公定法	ISO 法
培地	クロストリジウム 培地	Iron Sulfite Agar (ISA)
容器	パウチ	シャーレ
気相	好気培養	嫌気培養
平均菌数 (cfu/g)		
低菌量 (接種菌量：244 cfu/g)	615	350
中菌量 (接種菌量：1220 cfu/g)	3050	1915
高菌量 (接種菌量：6100 cfu/g)	11400	9800

表 3. クロストリジウム属菌以外の細菌による黒色集落の形成性

菌株	標準寒天 培地	クロストリジウム培地		ISA 培地
		パウチ	混釈	
<i>Proteus mirabilis</i>	48×10^8	40×10^8	NT	NT
<i>Proteus mirabilis</i>	26×10^8	26×10^8	NT	NT
<i>Citrobacter youngae</i>	31×10^8	31×10^8	23×10^8	21×10^8
<i>Citrobacter werkmanii</i>	37×10^8	42×10^8	35×10^8	41×10^8
<i>Salmonella</i>	18×10^8	20×10^8	22×10^8	17×10^8
<i>Escherichia coli</i>	16×10^8	17×10^8	18×10^8	12×10^8
<i>Staphylococcus aureus</i>	23×10^8	$<1 \times 10^8$	$<1 \times 10^8$	$<1 \times 10^8$

塗りつぶし部分は黒色集落を形成したもの

表 4. プレスタディ案

項目	内容
検体	食肉製品、魚肉練り製品、レトルトパウチ及び類似形態の食品、ジャム等
前処理方法	検体 25g+ペプトン加生食 225mL
供試菌株	各研究室保有のクロストリジウム菌株
目標添加菌量	低菌量＝10 倍乳剤 1 mL あたり 20CFU 中菌量＝10 倍乳剤 1 mL あたり 100CFU 高菌量＝10 倍乳剤 1 mL あたり 600CFU 未接種
使用培地	クロストリジウム培地 Iron Sulfite Agar
接種菌量の測定	クロストリジア測定用培地に接種し、パウチで 35℃24 時間培養
接種菌液の調製	TGC 培地に接種し、嫌気培養で 35℃一夜培養

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
令和6年度分担研究報告書

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

非加熱喫食食品を含む様々な食品から分離され、致死率の高い食中毒を引き起こすリステリア・モノサイトゲネスの食品製造環境における管理は、諸外国における食品衛生上の重要課題となっている。それらの国では、リステリア・モノサイトゲネスを含むリステリア属菌を広く製造環境ふき取り試験における対象とすることで、施設・設備の衛生環境の維持が広く行われている。そのため、近年日本国内でもリステリア属菌を衛生指標とした製造施設のふき取り試験への関心が高まっている。本研究では、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、リステリア属菌試験法における確認試験の範囲を検討するため、作業部会保有のリステリア属菌菌株、購入した標準菌株及び選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いて、確認試験項目における性状について解析を行った。その結果、リステリア属菌の確認試験として TSA 平板上の集落性状、半流動寒天培地を用いた傘状発育の確認及び VP 試験が有用である可能性が示された。

A. 研究目的

リステリア症は *Listeria monocytogenes*（以下 Lm）を原因菌としてヒトに脳脊髄膜炎、敗血症及び流死産を引き起こす食中毒である。これまでに世界各国で発生した集団事例の原因食品としては乳製品、肉製品、魚介類、野菜果物、惣菜等様々なものが挙げられる。本菌は 4℃以下でも増殖可能な低温増殖能を持つこと、バイオフィルムを形

成して食品製造環境に長期間生残することが特徴である。重篤な症状を引き起こす侵襲型リステリア症の致死率は 10～25%とされており、欧米諸国ではリステリア症の発生防止が公衆衛生上の最重要課題の一つとされている。そのため、Lmを含む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的に広く行われている。食品中微生物の国際標準試験法

は国際標準化機構（ISO）の TC34/SC9 に
おいて作成されており、作成した試験法は
5 年ごとに見直しされる。2017 年には ISO
11290-1 及び 2 の改定を行い、試験法の対
象微生物をリステリア・モノサイトゲネス
のみではなくリステリア属菌も含めること
とした。現在日本国内ではリステリア属菌
の試験法は規定されておらず、当該菌に対
象とする食品製造環境のふき取り検査も一
般的ではない。しかしながら、食品輸出の際
に相手国から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を含む衛生管
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、国内で
も製造工程管理項目の一つとしてリステリ
ア属菌を対象とした環境ふき取り検査の実
施を考慮する事業者が増えつつある。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ている。
今年度の本研究では、リステリア属菌試
験法における確認試験の範囲を検討するた
め、作業部会保有のリステリア属菌菌株、購
入した標準菌株及び選択分離培地上で定型
集落と類似の集落を形成する菌株を用いて、
確認試験項目における性状について解析を
行った。

B. 研究方法

1) リステリア属菌試験法案の検討

第 82 回及び第 84 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購入した 8 株のリ
ステリア属菌標準菌株及び保有株、選択分
離培地上で定型集落と類似の集落を形成す

る菌株の性状を確認した。検討した項目は、
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、カタラーゼ試験、VP 試験、
37℃と 30℃における傘状発育の確認とし
た。選択分離培地上で定型集落と類似の集
落を形成する菌株については、一部の菌株
から Nucleospin Blood Kit (Macherey-Nagel
社) を用いて全 DNA を抽出し、Bacterial
16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ株式会社)
と Blast を用いた塩基配列解析により菌種
同定を行った。更に、リステリア属菌に特異
的とされる *prs* 遺伝子の検出を PCR 法によ
り行った。

C. 研究結果

1) リステリア属菌試験法案の検討

第 82 回食品からの微生物標準試験法検
討委員会（令和 6 年 8 月 5 日開催）におい
て、NIHSJ-40TS 及び 41TS の作業部会案
（ST2 案）について前年度の結果報告を行
ったところ、①作業部会メンバー保有株を
用いた選択分離培地上の定型集落の検討で、
培地ごとの使用菌株数の相違や発育不良株
の割合が不明瞭であることから、データの
蓄積と表現方法の統一を行うこと②学術的
な細菌分類と食品検査で対象とする菌種の
違い、及び本検討で対象とする菌種につい
て再確認され、本検討で対象とする菌種に
ついてはワーキンググループにて検討が続
けられること、との意見が出された。また、
食品衛生におけるリステリア属菌の重要性
は、*L. monocytogenes* の衛生指標としてのも
のであることから、対象とする菌種は、*L.*
monocytogenes と同様の挙動、性状を示すも
のに限定してはどうかとの提案があった。
第 84 回食品からの微生物標準試験法検討
委員会（令和 7 年 2 月 6 日開催）において
は、細胞バンクより購入したリステリア属

菌の標準菌株 8 株を用いた検討の報告（表 1）と、第 82 回検討委員会で報告された、リステリア属菌保有菌株及び選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いた検討に追加データを加えたものが示された（表 2）。委員からは、①検討に定量性をもたせるため、選択分離培地等への画線塗抹ではなく接種菌量の調整を行うべきであること②確認試験等の検討でリステリア・モノサイトゲネス菌株との比較が必要である、との指摘がなされた。今後、定量性を確保するためにミスラ法を用いた検討を行うこととされた。また、現在検討している食品からのリステリア属菌を検出する技術仕様書で対象とする菌の範囲について、学術的な細菌分類とは主旨が異なることから、ISO/TC34/SC9 でも ISO 11290-1 及び 2 の対象としている狭義のリステリア属菌（表 1）とすることが提案された。酵素基質培地とその他の選択分離培地上での集落形成性については、細胞バンクから購入した標準菌株等を用いた比較検討を行った（表 3）。今回用いた 5 菌種 2 亜種（計 8 株）のリステリア属菌のうち、*Listeria grayi* の 2 菌株が ALOA 培地、PALCAM 培地及び TSA 培地上で他のリステリア属菌とは異なる色調を示していた。運動性試験については全ての株で 30℃における傘状発育を示し、一部の株では 37℃でも傘状発育を示していた。VP 試験は 8 株全てで陽性を示した。

選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いた検討では、類似集落形成菌の多くは TSA 平板上でリステリア属菌よりも着色した集落を形成する傾向が見られた（表 4）。また、リステリア属菌に該当しない菌では VP 反応が陰性で、半流動寒天培地で傘状発育を示さないものが多く見られた。これらの菌株を 16S rDNA

塩基配列解析により同定した結果、*Microbacterium* 属、*Curtobacterium* 属、*Cellulosimicrobium* 属、*Leuconostoc* 属、*Brachybacterium* 属及び *Kocuria* 属に属しており、*Kocuria* 属菌の株は VP 反応陽性で傘状発育を示すなど、*prs* 遺伝子の確認以外の方法でのリステリア属菌との鑑別が困難であった。今回検討した 8 株の中にリステリア属菌は 1 株あり、*prs* 遺伝子を保有しており、VP 反応陽性と半流動寒天培地での傘状発育を示していた。

D. 考察

髄膜炎、敗血症及び流死産を引き起こす侵襲性リステリア症の致死率が 10～25% にもなることから、欧米を中心とする諸外国では近年、食品製造環境での Lm 制御のため、性状、挙動が Lm と類似しているリステリア属菌を衛生管理の指標として、清掃消毒の徹底による除去等を行うことにより、食品製造施設の衛生レベルを維持している。食品の輸出拡大等に伴い、国内でも食品製造事業者による食品製造環境でのリステリア属菌モニタリングへの関心が高まっており、国際的な整合性のあるリステリア属菌試験法を技術仕様書として整備することは社会的ニーズが拡大している状況である。一方で、リステリア属菌の新菌種は近年増加しており、その中には従来の生化学性状試験では分類が不可能で、分子遺伝学的手法が必要とされる菌種も存在する。また、リステリア属菌用の選択分離培地上で定型集落と鑑別困難な類似集落について、食品製造事業者が純培養と各種の確認試験を行うのは困難であると思われる。今年度の本研究では、国際的な標準試験法である ISO 法に準拠したリステリア属菌の試験法を検討しつつ、その確認試験の範囲と手法につ

いて細胞バンクからの購入菌株及び作業部会メンバーの研究室保有菌株を用いて検討を行った。その結果、細胞バンクから購入した標準菌株等はリステリア属菌に定型的な性状を示した。一方、研究室保有のリステリア属菌の中には選択分離培地上での集落形成性が劣る株も見られた。更に、食品から分離されたリステリア属菌類似集落の鑑別に有用と思われる性状を見出し、リステリア属菌の確認試験として、TSA 平板上の集落性状、半流動寒天培地を用いた傘状発育の確認及び VP 試験が有用である可能性が示された。来年度は更に多くの菌株についてデータを集積し、確認試験として必要とされる範囲を確定することで、NIHSJ-40 TS 及び NIHSJ-41TS の最終案を作成する。

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、細胞バンクから購入した標準菌株等、作業部会保有株及びリステリア属菌類似集落を形成する菌株を用いて検討し、確認試験として有用と思われる項目を抽出した。

F. 研究発表

学会発表

岡田由美子、下島優香子、井田美樹、西野由香里、三橋華子、都丸亜希子、西野智子、食品及び製造環境から分離されたリステリア属菌の性状、第 45 回日本食品微生物学会（2024 年 9 月、青森）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. リステリア属菌の性状

菌種	古典的な種	運動性	カタラーゼ	VP 反応	溶血性	ラムノース	キシロース	マンニット	タガトース	4℃での発育
<i>Listeria monocytogenes</i>	○	+	+	+	+	+	—	—	—	+
<i>Listeria innocua</i>	○	+	+	+	—	v	—	—	—	+
<i>Listeria ivanovii</i>	○	+	+	+	++	—	+	—	—	+
<i>Listeria seeligeri</i>	○	+	+	+	弱い+	—	+	—	—	+
<i>Listeria welshimeri</i>	○	+	+	+	—	v	+	—	+	+
<i>Listeria grayi</i> *	○	+	+	+	—	v	—	+	—	+
<i>Listeria marthii</i>		+	+	+	—	—	—	—	—	+
<i>Listeria farberii</i>		+	+	+	—	+	—	—	—	+
<i>Listeria immobilis</i>		—	+	+	—	—	+	—	—	+
<i>Listeria cossartiae</i>		+	+	+	—	—	—	—	—	+
<i>L. swaminathanii</i>		+	+	+	—	—	—	—	—	+
他 17 菌種 *		ほぼ—	ほぼ+	ほぼ—	—	v	ほぼ+	v	v	v

*：網掛部分は広義のリステリア属菌、それ以外は狭義のリステリア属菌

v：菌種あるいは菌株によって異なる性状を示す

表 2. 作業部会保有菌株の選択分離培地等における集落形成性

菌種（赤字は広義の リステリア属菌）	総菌 株数	ALOA 培地		CHROMagar Listeria 培地		PALCAM 培地		血液寒天 培地	CHROMagar Identification Listeria 培地	
		集落	ハロー	集落	ハロー	集落	ハロー	溶血	集落	ハロー
<i>L. monocytogenes</i>	18	青	小～あり	青	小～あり	オリーブ 13/灰色 5	黒	±～+	紫	なし/あり
<i>L. innocua</i>	9	青	なし	青	なし	オリーブ	黒	－	紫	なし
<i>L. seeligeri</i>	15	青 5/発育なし 3/ ほぼ発育なし 7	なし	青 9/ほぼ 発育なし 6	なし	オリーブ/灰色/発育 弱い 1	黒	－～+	白	なし
<i>L. welshimeri</i>	11	青 10/ほぼ 発育なし 1	なし	青	なし	オリーブ 8/灰色 3	黒	－	紫	なし
<i>L. grayi</i>	7	青 4/水色 2/発育 弱い 1	なし	青	なし	黄色 3/発育なし 2/ 黄・発育弱い 2	黄色 4/ 弱い黒 1	－	白/紫	なし
<i>L. ivanovii</i>	4	青	あり	青	あり	灰色	黒	++	白	あり
<i>L. newyorkensis</i>	2	青	なし	青	なし	オリーブ/発育なし	黒	－	紫	なし
<i>B. cereus</i>	2	ほぼ発育なし	あり	ほぼ発育 なし	あり	白	なし	－～+	白	あり

表 3. 標準菌株等の性状

	ID	菌種	TSA 上 集落	運動性試験		傘状発育			ALOA 培地		CHROMagar Listeria 培地		PALCAM 培地		血液寒天 培地	CHROMagar Identification Listeria 培地	
				37°C	25°C	37°C	30°C	25°C	集落	ハロ ー	集落	ハロー	集落	ハロー	溶血	集落	ハロー
1	JCM 7681	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	白	++	++ +	-	+	+	青	白 大	青	白 大	灰	黒	++	白	白 大
2	JCM 32813	<i>L. grayi</i>	やや黄 色	—	—	+	+	+	水色	なし	青	なし	黄 増 殖弱い	黄	—	紫	なし
3	JCM 32814	<i>L. innocua</i>	白	±	+	+	+	+	青	なし	青	なし	灰	黒	—	紫	なし
4	JCM 32815	<i>L. seeligeri</i>	白	±	+	-	+	±	青	なし	青	なし	灰 増 殖弱い	黒	+	白	なし
5	JCM 32816	<i>L. welshimeri</i>	白	±	+	-	+	+	青	なし	青	なし	オリ ーブ	黒	—	紫	なし
6	JCM 32891	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	白	±	±	-	+	+	青	白	青	白	灰	黒	++	白	白
7	ATCC BAA-139	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	白	±	+	-	±	±	青	白	青	白	灰	黒	++	白	白
8	ATCC 25401	<i>L. grayi</i>	やや黄 色	+	++	+	+	+	水色	なし	青	なし	黄	黄	—	紫	なし

表 4. リステリア属菌類似菌株の性状と同定菌種

	ALOA 培地		CHROMagar Listeria 培地		PALCAM 培地		CHROMagar Identification Listeria		TSA 培地	カタラ ーゼ試 験	溶血性 試験	VP 反応	傘状発育		prs	16S rDNA 塩基配列解析による 同定菌種
	集落	ハロー	集落	ハロー	集落	ハロー	集落	ハロー	集落色				37℃	30℃		
1	青緑	なし	黄緑	なし	白 ラフ	なし	オレンジ	なし	オレンジ	+	—	—	—	—	—	<i>Microbacterium</i> sp.
2	黄緑	なし	黄緑	なし	灰 弱い	黒	オレンジ	なし	黄	+	—	—	—	—	—	<i>Curtobacterium</i> sp.
3	黄緑	なし	黄緑	なし	発育なし		オレンジ	なし	オレンジ	+	—	—	—	—	—	<i>Curtobacterium</i> sp.
4	青	なし	青緑	なし	オリーブ	黒	オレンジ	なし	オレンジ	+	—	—	—	—	—	<i>Microbacterium arborescens</i> / <i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
5	青	なし	青	なし	オリーブ	黒	紫	なし	白	+	—	+	+	+	+	<i>Listeria innocua</i>
6	白	なし	青 弱い	なし	発育なし		白	なし	白	+	—	—	—	—	—	<i>Leuconostoc</i> sp.
7	白	なし	青 弱い	なし	発育なし		白	なし	白	+	—	—	—	—	—	<i>Brachybacterium</i> sp.
8	白 弱い	なし	青 弱い	なし	発育なし		白	なし	白	+	—	+	+	+	—	<i>Kocuria</i> sp.

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
令和 6 年度分担研究報告書

デジタル PCR の反応条件最適化に関する研究

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。

多くの検査現場では、迅速検査を目的に、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、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスを材料に、ウイルス検出のためのデジタル PCR の最適化に向けた検証を実施した。その結果デジタル PCR の利用に向けてはリアルタイム PCR とは異なる条件を設定する必要があることが示された。

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。食品由来病原微生物は主に細菌を対象に培養法を基本として検査法が整備されてきた。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。

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のほか、Codex 委員会において食品中の病原ウイルス（ノロウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスなど）に対する衛生管理ガイドラインの改訂作業が開始されるなど、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

のある動きが見られる。

昨年度本研究では、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 と比較を行い、これまで利用されてきた qPCR とは異なる条件設定が必要であることを示した。

今年度は、ノロウイルスと A 型肝炎ウイルスを材料に、dPCR を実施する際のプライマー濃度等の条件設定について最適化について検討した。

B. 研究方法

1) 定量に用いた検体

GII ノロウイルス懸濁液及び A 型肝炎ウイルス (HAV, ATCC VR-1402) 懸濁液を用いた。ゲノムコピー数は GII 約 2500 コピー/5uL、HAV 約 5000 コピー/5uL となるよう調整した。

2) RNA 抽出

1) のウイルス懸濁液と Nuclease free water を合計 300μL となるように混合して、磁気ビーズによる自動核酸抽出 (Maxwell RSC viral total RNA kit, Promega) により RNA を抽出し、1 Step RT-dPCR に供した。

3) プライマー及びプローブ

ノロウイルス: ISO15216-1(ISO) 及び通知法に示される配列。

A 型肝炎ウイルス: ISO15216-1(ISO) に示される配列。

4) dPCR

使用機器

QIAcuity ONE (QIAGEN)

使用試薬

QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (QIAGEN) QIAGEN 社の 1 step RT-dPCR キット試薬を用いた。

5) qPCR

使用機器

7500 realtime PCR システム (Thermofisher)

使用試薬

TaqMan Fast Virus 1 Step Mastre Mix (Thermofisher)

C. 研究結果

1) GII ノロウイルスの検出条件

令和 5 (2023) 年度本報告書にて、食品からのノロウイルス検出法 (国内通知法) で示されるプライマー、プローブと、50°C40 分、95°C2 分、(95°C5 秒、60°C30 秒) x40 サイクルの温度サイクルを用いた dPCR では、陽性と陰性のプロットが分離できずに定量不可となることを報告した。今年度は、PCR 工程を (95°C5 秒、50°C15 秒、72°C15 秒) x40 サイクルの 3 段階サイクルに変更した結果、陽性と陰性反応のプロットを分離することが可能となった。プライマー、プローブの組合せについては、ノロウイルスについては ISO15216-1 に示されるプライマー、プローブを用いる方が通知法のプライマー、プローブを用いるよりも陽性と陰性のプロットが明確に分離された (図 1)。

ISO プライマー、プローブを用いた GII ノロウイルスの RT-dPCR について、HAV

での検討と同様にプライマー、プローブの濃度を2倍にして2段階及び3段階サイクルの検出コピー数の比較を行った結果、GII ノロウイルスについては、ISO プライマー、プローブを用いた場合は検出コピー数に差は見られなかった（結果示さず）。

2) HAV の検出条件

ISO15216-1 の手順に従い、プライマー濃度 0.4 μ M, プローブ 0.2 μ M、温度サイクルを 50°C40 分、95°C2 分、(95°C5 秒、60°C30 秒) x40 サイクルに設定して HAV の検出を試みた。HAV 懸濁液を合計 300 μ L となるように HAV 懸濁液 1、10、100 μ と Nuclease free water を混合し、RNA 抽出後に、RT-qPCR 及び RT-RT-dPCR を実施した。表 1 に示すように、RT-qPCR ではそれぞれ Ct 値が 25.0、21.5、18.0 となり問題なく検出された。RT-dPCR では検出されない結果となった（表 1. 各濃度 3well で実施）。

次に、プライマーとプローブの反応液中の濃度を2倍にして、同様に RT-dPCR を実施した（表 2）。HAV のコピー数は HAV 1, 10, 100 μ L がそれぞれ 1628.5, 12704.2, 12387.6 となった(表 2)。

また、温度サイクルを GII ノロウイルスの条件検討と同様に 50°C40 分、95°C2 分、(95°C5 秒、50°C15 秒、72°C15 秒) x40 サイクルの3段階温度サイクルにしたところ、陰性と陽性のプロットが明確に分離される傾向が見られた（結果示さず）。

3) HAV の定量性の検討

C. 2)で検証した条件（ISO プライマー 0.8 μ M, プローブ 0.4 μ M, 3 段階 PCR サイクル）にて、RT-dPCR で定量性できるコピー

数の範囲を検討した（図 2）。

HAV ウイルス液を2倍階段希釈で 1x から 1/128x まで7段階の希釈列を作成し、各希釈 3well ずつ、2 日間を2回試行し、定量した結果を表に示した。4 回の試行の平均値は、希釈倍率 1x が 4796.3 コピーから希釈倍率 1/128x が 44.4 コピー、希釈と定量値の相関係数は $R^2=0.9654$ となった。試行 1、2 回目の平均値は希釈倍率 1x が 6188.1 コピーから希釈倍率 1/128x が 27.5 コピー、希釈と定量値の相関係数は $R^2=0.9979$ となった。試行 3、4 回目の平均値は希釈倍率 1x が 3404.6 コピーから希釈倍率 1/128x が 61.3 コピー、希釈と定量値の相関係数は $R^2=0.8711$ となった。4 回の試行の平均値に関して、各希釈倍率における標準偏差は表に示すように希釈倍率 1x、1/32x, 1/64x, 1/128x の標準偏差が大きかった。

4 回の試行から、100 コピーから 3000 コピー程度が定量値として信頼性が高いと考えられた。

4) GII ノロウイルスの定量性の検討

GII ノロウイルスについては ISO プライマーを用いて、HAV と同様の条件で3回の試行を行った（図 3）。平均値は、希釈倍率 1x が 2377.8 コピーから希釈倍率 1/128x が 11.2 コピー、希釈と定量値の相関係数は $R^2=0.9997$ となった。HAV と異なり、標準偏差は小さい傾向にあった。HAV と同様に、100 コピーから 3000 コピー程度が定量値として信頼性が高いと考えられた。

D. 考察

本研究では、すでに広く用いられるリアルタイム PCR(qPCR)のプライマー、プローブを用いて、デジタル PCR(dPCR)を行う場合の条件と、定量性について検討した。

qPCR では、検量線として $10^2 \sim 10^7$ copies/ μ L 程度の幅広いレンジのコピー数の測定が可能であるが、dPCR での定量範囲は、本研究で試行した GII ノロウイルス及び HAV に関しては $10^2 \sim 10^3$ copies/ μ L 程度と、qPCR と比較して非常に小さかった。これは、今回利用した dPCR の反応プレート(Nanoplate 8.5K 24-well, QIAGEN)が 1 反応あたり約 8500 個のプロットが計測できるプレートであり、理論的に最大 8500 コピー程度までしか陽性コピー数を測定できなかったためと考えられる。

Nanoplate 26K 24-well, QIAGEN などの 26,000 個のプロットを計測できるプレートを用いれば測定範囲をさらに 10^4 copies/ μ L 程度までは拡大できる可能性があるが、使用する試薬の量も増えるため(8.5k プレート ; 12 μ L, 26k プレート ; 40 μ L) 1 反応あたりのコストが高くなることが懸念される。

BIO-RAD 社の機器の場合は、反応液中に 20,000 個程度の液滴を形成させて PCR 反応を行うため、測定範囲は 26k プレートと同程度と考えられる。

dPCR の定量範囲は qPCR と比較して小さいものの、検出限界については、今回 HAV が 45 copies/ μ L 程度、GII ノロウイルスが 11 copies/ μ L 程度であれば確実に検出されており、qPCR に近い感度を持っていることが示唆された。

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に、検体中の遺伝子コピー数を定量できるため、実験室内の遺伝子汚染に強いと考えられる。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、本研究で示したようなプライマー、プローブの濃度や、PCR サイクル条件などをターゲットごとに検証することで、dPCR を食品からの微生物検出に利用可能となることが示された。

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り、利用には、既存の qPCR のプロトコルを改良する必要があることを示した。また、高濃度の遺伝子測定範囲は qPCR に劣るものの、低濃度の遺伝子検出感度は qPCR と同程度であると考えられた。検査導入に向けては、食品への添加回収試験により、遺伝子検出感度がどの程度影響を受けるかなど、さらに検討すべき項目が載る。

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

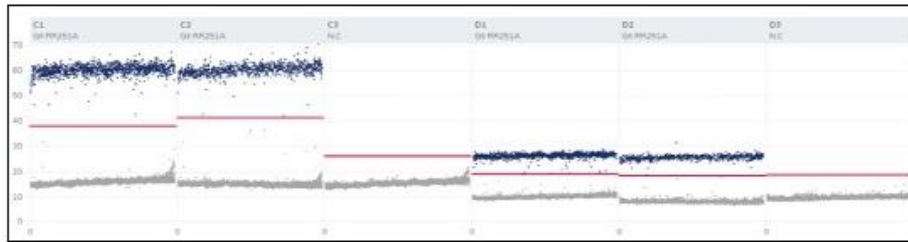
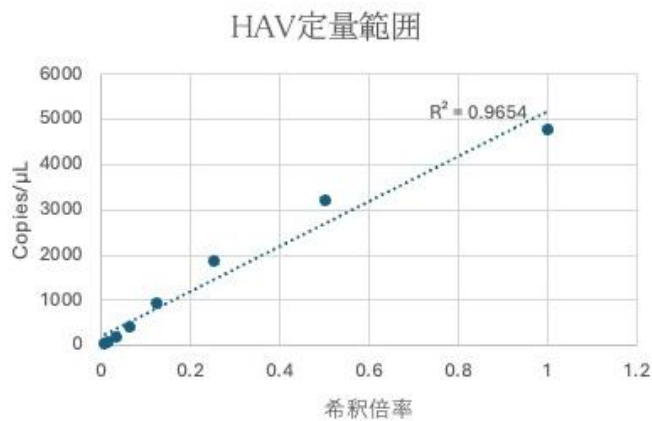
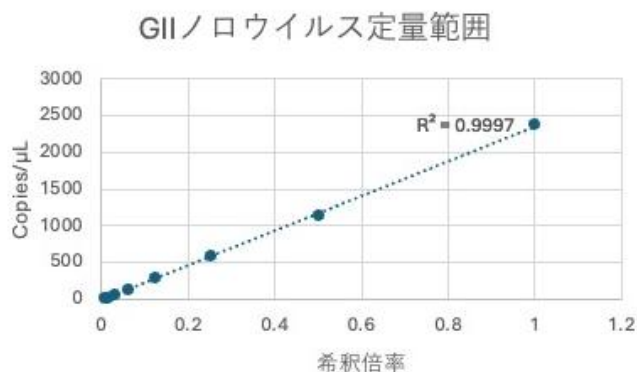


図1. GIIノロウイルスのRT-dPCR 反応 プロット
 C1, C2, C3; ISOプライマー、プローブ
 D1, D2, D3; 通知法プライマー、プローブ
 C3, D3; 陰性コントロール、
 RT-dPCRのPCRサイクルは50℃40分、95℃2分、(95℃5秒、50℃15秒、72℃15秒) x40サイクル
 ISOプライマー、プローブの方が陰性、陽性プロットの分離が明確であった。



HAV希釈	平均値	標準偏差
原液	4796.3	1659.7
1/2	3231.4	240.4
1/4	1865.3	272.8
1/8	938.8	192.3
1/16	430.2	167.4
1/32	192.0	114.9
1/64	92.4	61.2
1/128	44.4	23.9

図2. HAVの定量性の検討
 2倍階段希釈のウイルス液をRT-dPCRにて定量した。



GIIN希釈	平均値	標準偏差
原液	2377.8	26.9
1/2	1143.6	34.9
1/4	585.8	30.3
1/8	293.0	19.8
1/16	144.2	20.1
1/32	60.0	20.0
1/64	26.7	11.1
1/128	11.2	4.6

図3. GIIノロウイルスの定量性の検討
 2倍階段希釈のウイルス液をRT-dPCRにて定量した。

表1. RT-dPCRとRT-qPCRによるHAV遺伝子の検出 (ISOプライマー0.4 μ M, プローブ0.2 μ M)

		RT-dPCR (copies/ μ L)			RT-qPCR
		Well 1	Well 2	Well 3	Ct値
HAV	100 μ L	0	0	0	18.0
	10 μ L	0	0	0	21.5
	1 μ L	0	0	0	25.0

表2. RT-dPCRとRT-qPCRによるHAV遺伝子の検出 (ISOプライマー0.8 μ M, プローブ0.4 μ M)

		RT-dPCR (copies/ μ L)			RT-qPCR
		Well 1	Well 2	Well 3	Ct値
HAV	100 μ L	12787.2	13088	11287.7	18.0
	10 μ L	11537.5	13287.2	13287.9	21.5
	1 μ L	1557.7	1606.4	1721.3	25.0

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
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(R6.6.11-6.14)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(R6.4.8-4.10、R7.2.17-2.19)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6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、昨年度完成させた第10改訂版を修正（R6.12.17）し、完成図書NIHSJ-39とした。実装の観点から、本ガイドラインの適用例として、食品中のサルモネラの単一生菌検出結果に対する50%検出レベル推定値（eLOD₅₀）解析を実施した。高感度試験法では、しばしば低菌濃度でも全陽性結果となり直接eLOD₅₀が求められない問題があったが、統計学的近似法を創案して95%検出レベル（LOD₉₅）を求めることで解決し、論文発表に至った（Food Safety, in press）。また、リステリア属菌試験法、クロストリジウム試験法、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、ISO 16140-2を筆頭に、ISO 16140シリーズの改訂および開発動向をまとめ、我が国における実装戦略の課題をまとめた。

A. 研究目的

《試験法の実装とは？》

国際調和した食品微生物試験法を実装するまでのプロセスは、①国際的参照法の開発・改訂動向の調査、②その動向を考慮した国内の標準法の開発・改訂、そして③国内の具体的なユーザーによる標準法の運用に直結する実装になる。

①②に関しては、既に着実に実績をあげてきているが、実装の段階では未解決の課題が多い。技術的な議論は理解できても、それを実施するためには、相応のコストや時間がかかる。したがって、実施者がその条件を考慮してでも実施すべきである、との意識を持つことが重要になる。

《実装段階に至る過程でブラックボックス

スを作ってはならない》

国際的参照法の動向調査の対象としてきたのは、ISO 16140 シリーズ、および参照法の妥当性確認に関する規格 ISO 17468 であった。ISO 16140 シリーズの中心文書は part2「妥当性確認（バリデーション）」である。その中で、複雑な統計的解析が記述されているが、それを経て得られる結果が、概略計算によって得られる結果と大差ない場合がある。この場合、実装の観点では簡単な概略計算でも十分である、という考えになりがちである。しかし、重要なことは、「概略計算でも十分である」との結論は、詳細な統計解析結果があって初めて言えることである。厄介ではあるが、その詳細な解析過程に関してもブラックボックス

にしてはならない、ということである。

《国際調和の本質》

食品の種類の複雑さを考えると、試験法の性能評価は極めて難しい。参照法との同等性を科学的に判断することは不可能である。実装の観点から、合理的な判断をしなければならない。その判断の元になる条件は、多様な利用者側の要望や社会的要請によって絶えず変わる。一旦規格として決まっても、要請の変化に応じて修正や改訂を行う。それが合理的判断の実体である。国際調和とは、このように絶えず変動する動向に調和するということである。定められた国際規格に、我が国が無条件に一方的に合わせることはない。我が国の事情に適合した内容に理解あるいは改変して実施していくことである。国際規格の中身を理解した上で、我が国なりの考え方を主張することが重要である。

《本分担研究が目指すもの》

ISO 16140-3「検証」はバリデーションが終了している試験法の実装に際して適用する規格である。昨年度、この規格に基づくガイドラインとして、一旦、完成したが、その後、実装に関わる具体的な利用者にとって難解すぎる、との意見が出た。そこで、これに関する議論を再開し、改めて「ガイドライン」として完成させることを第一の目的としている。

ISO 16140-2「バリデーション」に関しては、SC9 年次総会、および SC9/WG3 会議で、2016 版以降に議論されてきた内容を反映させた「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」（昨年度成果報告書、添付資料 2）をまとめた。引き続き、本年度も、2016 版の修正版 ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024 の作成を目指し、多くの項目について議論された。この動向を解説すると同時に、昨年度の「手引き」の改訂版を作成し、我が国における実装戦略を策定するための基礎資料として供することを、第二の目的としている。

試験法の実装に際して直面した問題と

して、高感度定性試験法に対する LOD₅₀ が求められない事例がある。規格では、低濃度、中濃度、高濃度での定性試験結果から LOD₅₀ を求めるようになっているが、全ての試験結果が陽性結果の場合は、それが求められない。しかし、高感度の試験法では低濃度の検体でも全て検出可能、すなわち全陽性結果になることは容易に想像される。その場合は、ブランク検体で全陰性結果が得られれば合理的な結論が得られるはずである。しかし奇妙なことに、ISO の規格ではそれが考慮されていない。そこで、サルモネラ定性試験の具体的な試験結果に基づいて、この問題を解決し論文としてまとめることを第三の目的とした。

リステリア属菌試験法、クロストリジウム試験法、デジタル PCR 法等の個別試験法に関しては、国内委員会に置いて、バリデーションの観点から技術的助言をすると共に、必要に応じて LOD₅₀ の解析等において解析支援をすることを第四の目的とした。

B. 研究方法

《検証ガイドラインの作成》

前年度の報告書添付資料 1「第 10 改訂版（R6.3.3）」に関して、検討委員会で再度議論した。

《ISO 16140 シリーズの開発・改訂の動向調査》

ISO/TC34/SC9, 2024 年次総会(R6.6.11- 6.14)

(WEB 参加)、SC9 内の妥当性確認ワーキンググループ 3 (WG3) 会議 (R6.4.8-4.10、R7.2.17-2.19) (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 6 回）に対応し、必要に応じてコメントを発信した。以上の活動によって得た情報に基づき、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。特に、ISO 16140-2 に関しては、ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024 を反映した手引きとしてまとめた。

C. 研究結果及び考察

(1) 検証ガイドライン

①NIHSJ-39 として完成〔添付資料 1〕

本ガイドラインの目的は「NIHSJ 法を作成する作業部会および共同試験に参加する試験室が、ISO 法等を改良、和訳、導入する際の技術的要件を示すものであり、ISO 16140-3:2021 に基づく」となっていたが、複数の委員から、現在の我が国の実施者を想定すると、内容が難解で具体的操作が複雑過ぎる、との見解が出され、再度議論された。その結果、目的を「ISO 16140-3:2021 原本に基づく導入検証の実施を希望し、その内容をより理解したいと考える試験者を対象とする解説文書の作成を目的としている」とし、これを完成図書 NIHSJ-39 として議論を閉じた。我が国の実施者側の状況を考慮した当面の判断である。しかし、国際協調の真意に鑑み、消極的過ぎる結論であるとの感も拭い難く、今後の国際協調戦略を考える際に、改めて発展的な議論をする必要があろう。

②Draft for ISO 16140-3/FDAmd.1

国内で NIHSJ-39 作成に手間取っている間に、ISO では改訂が進められ、2025.3.11 時点で次の、菌株同定に関する事項の改訂が合意された。すなわち、許容限界 (NIHSJ-39 では 2.4 節の表、ISO 16140-3:2021 では 8 節の Table 8) に次の項目が加わる。

同定法	菌株パネル	100% 一致
-----	-------	---------

続けて、新たに 9 節「妥当性確認済みの同定法 - 検証のための技術的プロトコル」が追加された。そして検証すべき菌株の数、結果報告のテンプレートが、各々、表 17、表 18 として追加された。

表 17. 妥当性確認済み同定法の実装検証における菌株数

妥当性確認済み同定法の範囲	試験すべき菌株数
複数の科と属に属する種	15
同一科内に属する複数の属に属する種	10
同一属に属する種	5

表 18. 妥当性確認済み同定法の検証結果の概要

試験株	寒天培地	菌株の同定		検証試験法によって同定された菌株の科・属	結果の解釈 (IA, ID, No)*
		同定された科・属	菌株の起源		
1					
2					
3					
Etc.					
*IA:一致, ID:偏差, No:不一致					

さらに、表 18 の具体例が附録 G として追加された。

(2) 妥当性確認関連文書に関する議論の動向

①ISO 16104-2:2016/Amd.1:2024

ISO 16140 シリーズの中心文書であり、本年度の改定案をめぐり盛んに議論され、Amd.1 に反映されることになった。昨年度の報告書添付資料 2 にもその内容を反映させた。詳しくは本報告書〔添付資料 2〕を参照されたい。

改訂内容の概要は以下のとおりである。

(a) 偽陽性と偽陰性の議論：

定性試験における感度試験では参照法と代替法で同一検体を試験する。その結果の陽性/陰性結果に基づく性能評価の問題である。参照法（陽性）、代替法（陰性）、確定試験結果（陽性）の場合、「代替法の偽陰性による陰性偏差」というような、ややこしい表現をする。この表現法に関する議

論に多くに時間を割いたが、一応昨年度に決着した。ところが、本年度にまた偽陰性率 (False negative ratio; FNR) に関するコメントが出た。既に偽陽性率 (False positive ratio) はペアード試験とアンペアード試験、各々に対して計算式が示されているが、FNR に対しても同様の計算式を示すべきだ、という内容である。内容的には些細であるが、こうしたコメントが度々出るとは、偽陽性や偽陰性の要因に対する関心が高まっていることを反映していると考えられる。

(b) 半定量法 (Semi-quantitative methods) の新設：

従来、妥当性確認は定性試験と定量試験から構成されていたが、新たに Amd.1:2024 で半定量試験が導入された。目次を見ると、定性試験の項目と全く同じタイトルの項目が並んでいる。内容をチェックした結果、

- ・[定性試験の代替法] 対 [定量試験の参照法] でバリデーション。
- ・参照法の検出閾値を確認し、これを代替法が検出できるか (陽性 or 陰性) を試験。
- ・アンペアード試験として評価

の 3 点のみが異なるだけで、後の条件は定性試験の場合と同じである。

(c) 商業的滅菌試験：

16140-2:2016 には 当初(A)から(I)まで 9 個の附録 (Annex) が付いていた。その内訳は、(A)食品と汚染菌の組合せ、(B)(C)は菌で汚染された食品試料の調製、(D)(F)は RLOD 解析、(E)は包含性と排他性に適用する菌種、(G)(H)(I)は精確さの菌濃度依存性の解析 (具体的計算例を掲載)、であった。その後、改訂作業の過程で、2023 年に「商業的滅菌試験」に関するプロジェクトグループ (PG) ができ、Annex J として「商業的滅菌法のバリデーション」が加わった。

それまで ISO 16140-2 の対象は、特定の食品と特定の菌種の組合せであったが、初めて、食品や菌種を問わず横断的な滅菌方法の妥当性を評価する、という内容を対象とするものであった。実用的には、極めて

適用範囲が広く、また需要が大きい内容であるが、具体的な議論は難しかった。その第一は、滅菌条件が十分であったことを確認するための指標菌を何にすればよいか、という問題である。また冷凍品や冷蔵品の場合、生菌が残っていたとしても、その増殖は遅く、検出は難しいことが予想される。

我が国では、現在、腸内細菌科菌群を衛生指標菌とする議論が進んでいる。滅菌法の妥当性を確認するために衛生指標菌が必要となるからである。ISO での議論に直接加わっているわけではないが、我が国としても社会的ニーズに迅速に対応すべく、独自に議論を進めていく必要がある。

ISO での議論の現状は、対象食品はコーデックスの定義に従う、すなわち「常温保存可能な製品 (分活性(a_w))>0.86)、であるが、脱水製品、チルド製品、保存料を使用した製品は対象外とする。具体的に「フルーツジュース」、「超高温瞬間殺菌乳および植物由来乳」など数項目を挙げ、各々に対して考慮すべき菌種 (好気性、嫌気性、芽胞、高温嫌気性菌、乳酸菌、など) を規定する、との考え方が示されている段階である。また、この時点で、食品と菌種との組み合わせが、既存の Annex (A) の分類と整合性が取れるか、との議論もある。こうした状況を鑑みると、我が国での衛生指標菌に関する議論は、むしろ国際的にも先導して進めるべき段階にあると考えられる。

②ISO 16140 の他のパートの動向

(a) ISO/PWI 16140-1 語彙

PWI は Preliminary work item。121 個の語彙について意味がまとめられている。例えば、

“Qualitative method” は“分析対象物質が、指定された検体において、直接的または間接的に検出されるか検出されないかのいずれかの反応を示す分析方法”

“Quantitative method” は “分析法の一種で、その応答が分析対象物質の量 (個数または質量) であり、指定された検

体において、直接的に（例：質量または体積中の個数測定）または間接的に（例：色吸収、インピーダンスなど）測定されるもの”

“Semi-quantitative method”は“分析対象物質が、指定された（希釈された）検体中に直接的または間接的に検出されるか検出されないかを示す分析方法であり、定量的な参照方法に対して技術的プロトコルに従って妥当性確認され、定性法を評価するために使用される”

現在、用語集編集作業を実施している国内委員会バリデーション部会と情報共有している。

(b) ISO 16140-4:2019/DAmD.2 単一試験室でのバリデーション

Draft for ISO 16140-3:2021/FDAmD.1 と同じタイミングで ISO 16140-4 に関しても、菌株同定に関する事項が追加された。菌株同定のための規格は、別途、作製された ISO 16140-7 に詳しく記載されているが、それを参考に、ISO16140-4 では Annex I で、試験すべき菌株数を最小 250 株、最大 1000 株、と規定している。

(c) ISO 16140-6:2019 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

Part2 に導入された確定試験の選択肢として利用可能。

(d) ISO/16140-7:2024 菌種同定法の出版

(e) ISO/NP 16140-8:ウイルスと寄生虫

新プロジェクト（New project; NP）として作製中。

(f) ISO/PWI 16140-9 細菌毒素と生物由来アミン

予備作業項目（Preliminary work item; PWI）として作製中。

①代替法に関する技術開発が進むと、代替法の性能が参照法より高くなる場合が多くなる。定性法では、参照法では検出できないが、代替法では検出できた、という場合である。その結果、参照法との同等性よりも代替法の確実性を追求することがより重要になってくる。この場合の確実性とは、代替法が検出した菌が、確実に標的菌である、ということである。したがって、菌種同定に関する合理的な試験体系を構築することが必要になる。したがって、この問題については、ISO での議論の結果を待つのみでなく、自ら最適と考えられる試験体系を構築することが重要となっている。

②定性法の感度は高ければ、低濃度の菌体試料で全陽性の結果になる場合が多くなる。その場合は ISO で提供している計算ソフトのみでは解析できない。統計学に基づく近似法など、柔軟な解析法の創案が必須となる。本年度の成果の論文は、まさにその課題に対する解答例といえる。

従来、我が国では、統計学エキスパートは専ら食品微生物のリスクアセスメントに関わっていたように見受けられる。しかし、今後は、リスクマネジメント（試験結果の評価に際して）にも統計学エキスパートが強力に動員されることを期待する。

③ISO での議論は多岐にわたっているが、その内容の多くが、必ずしも我が国の実務者が必要としている情報に調和していないように感じる。海外との取引に関する実務量が少ないことが一因かも知れない。したがって、逆に、コストをかけるに値する実務量がある試験法を特定し、それを国際調和する意義を明確にすることが必要ではないか。

D. 研究発表

1) 学会発表 合計 1 件

1. 松岡英明、斉藤美佳子：ISO16140 ウェブサイトの LOD₅₀ 自動解析プログラ

(3) 実装戦略の課題

本研究に基づき次のような実装戦略を提言する。

ムの理論的背景と活用シミュレーション. 日本防菌防黴学会第 51 回年次大会、東京、1P-Cp26、(2025.9.17)

2) 論文発表 合計 1 件

1. H. Matsuoka, T. Moriyama, N. Koshimizu, N. Takatani, T. Yoshida, Y. Shimabara, T. Hirai, K. Nakajima, S. Igimi, M. Saito: Detection of single cell contamination of *Salmonella* in foods by SALX System and NIHSJ-01 and estimation of LOD₉₅. *Food Safety* 2025 (in press)

E. 添付資料

- 1) 検証ガイドライン (NIHSJ-39) (オンライン非公開)
- 2) ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024 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。

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
令和6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。

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2024年6月に、米国 Saint-Louis で開催された ISO/TC34/SC9 (食品の微生物試験法に関するサブコミティ) 総会 (2024年6月) 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、バリデーション作業部会の承認を得て導入時の検証のガイドライン作成のためのサブワーキンググループを新たに作り、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) についてワーキンググループ案を作成した。

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、食品衛生法で食品のリスクマネジメントにHACCPを制度化したことから、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、昨年度NIHSJ-39（ベリフィケーションガイドライン）をST4最終版とした。

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は、実用性を考慮し現場での実施に有用なガイドライン作成のためのサブワーキンググループを組織して検討を進め、WG案を作成した。

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コミティはTC34/SC9であることから、このサブコミティに発言権を有するPメンバーとして参加し、ISO法の検討状況に関する情報収集と現在策定中のISO試験法の議論に積極的に参加した。令和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、岡田（対面）、五十君（web）、松岡（web）、の3名とISO/TC34/SC9国内委員会事務局から2名（対面）、の計5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（乳製品の国際規格）にPメンバーとして活動することになり、五十君が国内委委員会委員長、岡田が副委員長となり、こちらのサブコミティー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インターナショナル日本セクション所属の研究者から、AOAC Internationalの動向について情報収集を行った。妥当性確認に関する文書がAOAC Internationalからも公開されており、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。

現場での実施に有用なガイドライン作成のためのサブワーキンググループには、研究班からは五十君、岡田が参加し、研究協力者の森曜子氏が事務局を務めた。2025年2月26日の第一回会議には、登録検査機関や食品メーカー等から合計16名が参加した。国内における試験時の導入検証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）。

昨年度たたき台案として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）も、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため検討を進めた（分担研究者五十君、協力研究者森）。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。2024 年 6 月に、米国・セントルイスで開催された 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 試験法の検討に加わった。

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ている。

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。

2024 年度の SC9 総会は、6 月に米国・セントルイスにて、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 27 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 100 名以上が参加した。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、NIHSJ-39（ベリフィケーションガイドライン）を ST4 最終版とした。

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、昨年までに作成した実用的なガイドラインたたき台案を基に、ガイドライン作成のためのサブワーキンググループを作り、検討を進め、WG 案を作成した。研究班からは五十君、岡田が参加し、研究協力者の森曜子氏が事務局を務めた。2025 年 2 月 26 日の第一回会議には、登録検査機関や食品メーカー等から合計 16 名が参加し

た。国内における試験時の導入検証の手法の方向性を検討し整理し意見交換を行った。その検討内容は別添文書 2 に示す。

D. 考察

①微生物試験をとりまく国際情勢

ISO/TC34/SC9 の 2024 年度のトピックスは、培地成分の有害化学物質について今後排除していく方向で塩化リチウムなど有害とされた化学物質に対し調査を行い、必要な措置を行うことを決定した。今後培地に使われる有害化学物質については排除していく方向性が示された。

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。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で引続き試験法策定の作業を行っていく。

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、昨年度までにガイドラインたたき台案としてまとめたものを基として、現場での実用性を考慮したガイドライン作成のためのサブワーキンググループを作り、検討を進めた。どのような方向でガイドラインを作っていくかの意見交換とその方向性を議論し、WG 案を作成した。

HACCP などの工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性については、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る。

公定法策定に関する規格である ISO 17468 を基に NIHSJ 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。試験法導入時の検証に関しては現場での実用性を考慮したガイドライン作成のためのサブワーキンググループを作り、検討を進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

- 1) 五十君静信。食品における食中毒起因細菌制御の重要性、2024. 6. 7、日本食品衛生学会 令和6年度シンポジウム。銀座プロッサム中央区立中央会館
- 2) 五十君静信。生食用野菜の微生物の実態と食品安全の考え方、2024. 8. 22、野菜科学研究会シンポジウム。東京農大
- 3) 五十君静信。食中毒を起こさないための品質管理、微生物管理についての対策。2024. 5. 23、Ifia Japan, HACCP・異物対策セッション、東京ビックサイト
- 4) 五十君静信。HACCP導入に伴う微生物検査の考え方並びに最新の社会動向と微生物制御の話題。2024. 11. 9、福岡県獣医師会公衆衛生部会研修会 2024. 11. 9 アーク博多

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

2025/3/3 作成

事務局作成（森 曜子）

ST1 原案についてのコメント、修正案等 2025/2/26 ミーティングでの検討結果（赤字：合意事項）

No.	機関名	章/ページ	コメント箇所	意見・コメント・疑義	変更案	検討結果 OK:提案受け入れ
1	A	1/6 ページ タイトル	食品等の微生物試験法導入時検証 のためのガイドライン	ISO16140-3 の簡易版ということが伝わら ないため、「簡易」という言葉を挿入。表現 方法については、要検討。	食品等の微生物試験法導入時検 証のための簡易ガイドライン	2025 年度検討事項
2	B	1/6 ページ タイトル	食品等の微生物試験法導入時検証 のためのガイドライン	漢字の並びすぎを解消しては？		2025 年度検討事項
3	A	1/6 ページ 1. 2 行目	試験結果が妥当であることを実証	1と同じ理由	試験結果を簡易的に妥当である ことを実証	2025 年度検討事項
4	C	1/6 ページ 1.	趣旨の内容の変更	あくまでもこのガイドで示す要件は、最低 限の事項であって、信頼ある試験検査を 行うためにはバリデーションされた試験法 を用いて使用前にベリフィケーションする ことが大前提であることを記述する必要が あるように思いました。 (このガイドは最低限の事項であって、こ のガイドに従っておけば十分という誤解を まねかないようにするべき と考えます)	ガイド全体のコンセプトに関する コメントのため、変更案はコンセプ トが合意いただけとなった場合 に示したいと思います。	2025 年度検討事項
5	C	1/6 ページ	概念の項の追加	ISO 16140-3 のようにバリデーションとベリ	ガイド全体のコンセプトに関する	2025 年度検討事項

				フィクションの関係に関する解説が必要のように思います。その上で、ベリフィクションとして実施すべき事項が何で、その中で最低限に確認すべきことがこのガイド内容であることを明確にした方がわかりやすいと思います。	コメントのため、変更案はコンセプトが合意いただけとなった場合に示したいと思います。	
6	B	1/6 ページ 1.	本ガイドラインは、食品等の微生物試験法導入時に、自らの施設および試験手順で試験法を適切に実施でき、		本ガイドラインは、 すでに妥当性が確認された微生物試験法を導入する際に食品等の微生物試験法導入時に、自らの施設および試験手順で試験法を適切に実施でき、	2025 年度検討事項
7	B	1/6 ページ 1.	試験結果が継続して妥当であることを実証することが望ましい。		変更後の 試験結果が継続して妥当であることを 本ガイドラインにより 実証することが望ましい。	OK
8	B	1/6 ページ 1.	本ガイドラインは、すべての試験法（迅速・簡便法を含む）を対象とする。		本ガイドラインは、すべての 微生物 試験法（迅速・簡便法を含む）を対象とする。	OK
9	C	1/6 ページ 2.	用語の定義の追加 用語の整理	定性試験と定量試験についても加えた方がよい ように思います。なぜなら、定性・定量の認識が日本の場合曖昧だからです。公定法で「陰性」と表記する関係で、本来定量試験である試験が定性的に捉えられている場合が少なくありません。増菌培養により元の数が知れない試験が定性試験であって、検出下限以下を陰性と示すのは定量試験として扱う旨、また逆に		2025 年度検討事項

				MPN 法は定性試験であることの追記も必要ではと考えます。 (ガイド案では, ○○法と○○試験が混在しています)		
10	B	1/6 ページ 2.1	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		原料、製造／加工工程中の中間 製品、最終製品、および環境検 体(ふき取り検体など)	OK
11	B	1/6 ページ 2.2	LODx (level of detection) (検出のレベル)	(検出のレベル) 不要では？	(検出のレベル) を削除	OK
12	B	1/6 ページ 2.2	検出の確率が X となる試験対象の 濃度レベル		検出確率が X となる対象微生物 の濃度レベル	OK
13	B	1/6 ページ 2.3, 2.5	注:本ガイドラインでは試行数が少 ないため、「推定●●●」という用語 を用いる。	読み直せば意味はわかりますが、わかり にくいと思いました。	注 削除	OK
14	D	1/6 ページ 2/6 ページ	試験員 作業者	「試験員」と「作業者」が混在しているの で、同じ意味で使用しているのであれば 統一した方が良い。		「試験者」に統一
15	D	1/6 ページ 2.4	かたより	「偏り」が漢字表記のため、「かたより」も 「片寄り」とする方が良い。		「バイアス(Bias)」 を使用
16	B	1/6 ページ 2.4	バイアス、かたより、偏り (bias)	かたより、偏り は説明文中で出てくるの で表題としては不要では？	2.4 バイアス (bias)	同上
17	B	1/6 ページ 2.4	バイアス、かたより、偏り (bias)	測定のかたより(偏り) 漢字は不要では？	測定のかたより(偏り)	OK

18	D	1/6 ページ 2.4	標準菌接種試験	「標準菌接種試験」という表記で初めてこの文書を見る人が理解できるか？サブWGに参加している人や検査機関などの人は理解できると思うが、その他の人が見た時に理解できるかどうか……。	現段階で適切な表現が思いついておりません。	「標準菌株等を用いた接種試験」に修正
19	E	1/6 ページ 2.6	併行標準偏差 併行条件()内	()内わかりにくい。測定システム？ →局方(参考情報)分析法バリデーションの内容を参照した例	試験室、試験者、装置、器具及び試薬のロットなど分析条件を変えずに、均質な検体から採取した複数の試料を短時間(通常1日以内)に繰り返し試験する条件	事務局修正 併行、室内、室間精度に用いる用語を統一する。(次回提示)
20	E	1/6 ページ 2.6	併行標準偏差 短時間のうち	短時間の目安はどれくらいか？ 「分析法の妥当性に関するガイドライン」では短時間(通常1日以内)の表記	短時間(通常●●以内)	同上
21	B	1/6 ページ 2.6	併行標準偏差 併行条件(同じ作業者が、同じ方法を用いて、)	言葉の統一	併行条件(同一の作業者が、同一の方法を用いて、	同上
22	D	1/6 ページ 2/6 ページ 2.6, 2.7, 2.8	同じ方法 同一の方法	「同じ方法」と「同一の方法」が混在しているので、統一した方が良い。		事務局修正 用語を統一する。
23	D	1/6 ページ 2/6 ページ 2.6, 2.7, 2.8	測定システム	「測定システム」は2.7に記載されている「器具、装置、作業者、時間」を指していると思うので、「測定システム(器具、装置、作業者、時間)」としてはどうか？		同上
24	E	2/6 ページ 2.7	室内再現条件()	()内わかりにくい	同一試験室内で、試験者、試験日時、装置、器具及び試薬のロットなど一部または全ての分析条件	同上

					を変えて、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し試験する条件	
25	E	2/6 ページ 2.8	室間再現条件()	()内わかりにくい	異なった試験室で、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し試験する条件	同上
26	B	2/6 ページ 2.9	方法の性能特性の確立と、意図した用途に対して性能要件が満たされていることの客観的証拠の提示。	定番の表現でしょうか？理解が難しいように思います。意図した用途？		ISO/IEC 17025 の用語に合わせる
27	B	2/6 ページ 2.10	妥当性確認された方法が、ラボラトリにおいて妥当性確認で決定された詳細(仕様／手順)に従って実施でき、意図する目的に適していることの実証。	趣旨と表現をあわせてはいかがでしょうか。「適切に実施でき、試験結果が妥当であることの実証」とか？意図した目的？		森さん(東京顕微鏡院) 修正案を提示(次回)
28	D	2/6 ページ 2.10	妥当性確認	2.10 の文章の中に「妥当性確認」が2回出てくるが、後半の部分は表記が無くて良いのではないかな？		同上
29	D	2/6 ページ 2.11	Challenging item	この部分に、6 ページ 4.の例を示した方が分かり易いと思われる。		2.11 削除
30	E	2/6 ページ 2.11	Challenging item	英語表記でも良いのでは？		2.11 削除
31	D	2/6 ページ 3/6 ページ	ラボラトリ、試験所 試験機関	「ラボラトリ」、「試験所」、「試験機関」が混在しているので、統一した方が良い。		「ラボラトリ」に統一
32	B	2/6 ページ 3.1	試験品の選択	本文に「…予想される品目(item)を1つ」と記載されているが、タイトルに合わせた方が良い。	「…予想される試験品を1つ選択する」に変更。	OK
33	B	2/6 ページ	注:標準菌液の調製方法は 別紙1	別紙1 はどこでしょうか？		注)を削除

		3.2	を参照。			別紙1は2025年度 検討事項
34	B	2/6 ページ 3.2	1) 認証標準物質から調製した標準 菌液	認証標準物質、標準菌株の説明(注釈) が必要だともいいました。また、標準菌液 という表現がよくわかりませんでした。		2025 年度検討事項 用語の説明 微生物分野における 用語を調査
35	B	3/6 ページ 3.3	室内再現標準偏差 (S_R) ※任意	以降で説明がないため、室内再現標準偏 差 (S_R) は文章で説明した方がよいので は？または、室内再現標準偏差 (S_R) が不 要と思います。		見直し S_R の確認を行う要件 を注釈として追加？ 2025 年度検討事項
36	D	3/6 ページ 3.4	test portion 試験試料	「test portion」と「試験試料」は同じ意味だ と思うので、統一した方が良い。		「Test portion」に統一
37	E	3/6 ページ 3.4	test portion	英語表記でいきますか		同上
38	D	3/6 ページ 3.4.1	接種用標準菌液 接種用菌液	「接種用標準菌液」と「接種用菌液」が混 在しているので、統一した方が良い。		「標準菌液を調製し、 接種する」に修正
39	E	3/6 ページ 3.4.1	接種用標準菌液、接種用菌液	標準菌液でよいのでは。 そもそも、接種用に標準菌液を調製して いる。	標準菌液を調製し、接種する	同上
40	B	3/6 ページ 3.4.1	試験法の LOD50 を 1 cfu/test portion と仮定して、	この説明が表1の注でも出てきますので、 ここでは不要と思います。		表1の注)を削除
41	A	3/6 ページ 3.4.1	試験法の LOD50 を 1 cfu/test portion と仮定して	バリデートされた方法では、LOD50 が算 出されているので、そちらが分からない場 合に1を使用するとしてはいかがでしょう か。メーカーに問い合わせれば教えてく れます。	試験法の LOD50 が不明な場合 は、1 cfu/test portion と仮定し て、	2025 年度検討事項 趣旨の見直しに合わ せて、文章を見直す

42	A	3/6 ページ 3.4.1		食品衛生検査指針では、バリデートされた方法については、個別の試験室でベリフィケーションすれば採用して良いとしているので、バリデートされていない方法というのは、例えばどのような方法を想定されているのか。		同上 妥当性確認されているか否かでなく、妥当性確認時のデータが得られるか否かで区別する方向で検討する。
43	B	3/6 ページ 3.4.1 手順 1	一晚培養した標準菌株から調製する場合(添加菌液の濃度が不確実) 最大 9 cfu/mL を目標に高濃度レベルの接種用菌液を調製し、1:3 に階段希釈して中濃度、低濃度の 3 レベルの接種用菌液を調製する。		一晚培養した標準菌株から調製する場合(添加菌液の濃度が不確実) 最大 9 cfu/mL を目標に高濃度 レベル の接種用菌液を調製し、1:3 に階段希釈して中濃度、低濃度の 3 レベルの接種用菌液を調製する。	OK
44	B	3/6 ページ 3.4.1 手順 1	最大 9 cfu/mL を目標に高濃度レベルの接種用菌液を調製し、	どうやって最大 9 cfu/mL を目標に菌液調製するのか、がわかりませんでした。		別紙1については、 2025 年度検討事項
45	B	3/6 ページ 3.4.1 手順 1	中濃度、低濃度の 3 レベル接種用菌液		3 レベルの接種用菌液	OK
46	F	3/6 ページ 3.4.1	eLOD ₅₀ の評価手順	手順 1 の菌数(9 cfu/mL)について、多くの食品会社では対応しにくい内容かと考えております		別紙1については、 2025 年度検討事項
47	B	3/6 ページ 3.4.1	手順 2:手順 1 で予想通りの結果が得られず、試験を繰り返す必要が生	手順を示すはずなのに、「場合」で終わっている。		事務局で修正し、提案する

		手順 2 手順 3	じた場合 手順 3:認証標準物質(濃度が既知)を使用する場合	「～する。」で終わった方がよい。		
48	B	4/6 ページ 表-1	表-1 タイトル 各手順別の標準菌接種レベル	わかりにくい？	手順別の接種レベル	OK
49	E	4/6 ページ 表-2	手順 2	n数と合計が不一致	3-5-1 では？	OK
50	E	5/6 ページ 表-3	プロトコール1、2、3	“プロトコール“が唐突にでてきている	表-2 の手順1、2、3のこと？	OK

2025 年度 今後の検討事項及び要望事項

No.	検討事項	意見・コメント・理由 等
E	3.2 接種用標準菌液の調製	表 1 の菌液の濃度調整は慣れていないと難しい。標準菌株の選び方、解説、事例を入れるか。試験項目によっては菌液調製が難しい場合もあるが、その場合どうするか。
F	本ガイドラインは多くの食品会社がよりどころとするものと思います。 工場の現場ではこの内容でも読み解くのが難しく思いますので、別途解説があった方がよいと考える。	用語の定義、解説 どうする？
A	この文書を読んで現場担当者が理解できるような平易な表現の解説書の様な物が必要と思われる。	
事務局	全ての微生物試験を対象とする場合、妥当性確認データが入手可能な場合と入手が不可の場合を分けて記載するか？	

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	巻号	ページ	出版年
H. Matsuoka et al.	Detection of single cell contamination of <i>Salmonella</i> in foods by SALX System and NIHSJ-01 and estimation of LOD ₉₅	<i>Food Safety</i>	In press	In press	2025

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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： ）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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：）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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： ）	☐	☒	☐		☐

（※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」、「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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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 7年 5月 19日

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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)	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「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. 食品衛生基準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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 6 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 食品衛生基準科学研究費 食品衛生基準行政推進調査事業
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) 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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。