

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 には混釈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名が日本代表团（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 (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℃から 37℃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/ μ 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/ μ 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制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：版權のため、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 LOD₅₀ 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評価が重要である。しかし、WG3 は従来 WG2 の提言を一方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、培養中にガス発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℃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。

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/ μ 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/ μ 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/ μ 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/ μ 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/ μ 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にあるパート 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 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. 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 |

