

II. 分担研究報告

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食品微生物試験法の国際調和のための研究」

分担研究報告書

微生物標準試験法の作成・改訂，並びにこれらのガイドライン策定に向けた研究

研究代表者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	百瀬愛佳	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	五十君静信	東京農業大学	
	松岡英明	東京農工大学大学院	
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	
	内田和之	バイオメリュー・ジャパン	
	荻原博和	日本大学 生物資源科学部	
	澤田千尋	一般財団法人日本食品検査	
	森 哲也	一般財団法人東京顕微鏡院	
	森 曜子	公益社団法人日本食品衛生協会	
	守山隆敏	スリーエムジャパン	
	諸藤 圭	一般財団法人日本食品分析センター	
	門間千枝	東京都健康安全研究センター	
	吉田朋高	一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC	
	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨：食品からの微生物標準試験法検討委員会の運営を進め、ウエルシュ菌標準試験法（集落計数法 NIHSJ-24）並びにセレウス菌標準試験法（集落計数法 NIHSJ-28）について、これまでに検討された ST4 案における問題点を抽出し、検討委員会での討議を経て試験法最終案を確定させ、用語及び体裁の統一を行った上で初版を発行した。また、エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法（定性法 NIHSJ-27）の討議を進め、最終案を作成したほか、カンピロバクター定性試験法（NIHSJ-02）の培養時間を ISO 法との整合を図る趣旨で改訂作業を進めた。このほか、ISO 17468:2017 を参照しつつ、微生物試験法の作成・改訂に係るガイドライン案を ISO 16140 との関係を整理して ST2 案を作成した。本ガイドライン案は微生物試験に関わる試験所が国際調和のとれた試験法を運用する上で重要な意義を有すると考えられることから、次年度にはその骨子を確定させ、その普及に努めたい。

A. 研究目的

本研究では、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」（以下、検討委員会）の活動を軸に、食中毒菌及び

衛生指標菌の標準試験法/技術仕様書の作成・改訂、並びにそれらの作成におけるガイドライン策定等に関する活動を行っている。各試験法及びガイドラインは、作成方針

(図 1) に則って 4 つのステージ (ST1~ST4) で検討が進められ、令和 2 年度末時点で 10 試験法が策定され公開となっている。

令和 3 年度は、作成段階の ST4 まで進んでいる試験法案の内、標準試験法であるウエルシュ菌及びセレウス菌の集落計数法について最終的な検討を行い、これらを確定させることとしたほか、微生物試験法の作成及び改訂に係るガイドラインの策定に向けた検討を進めたので報告する。

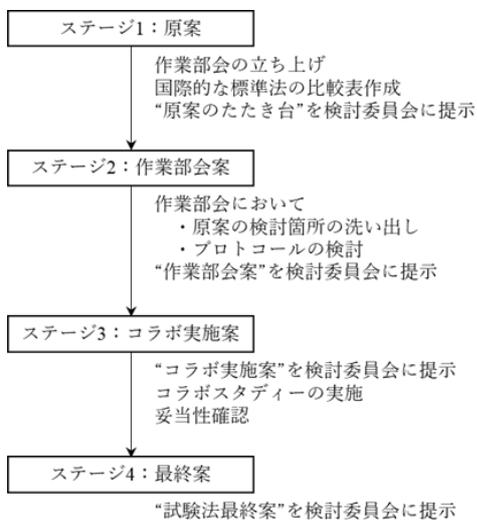


図 1. NIHSJ 標準試験法作成の流れ

B. 研究方法

1) 台湾における微生物成分規格に関わる微生物試験法に関する情報収集

台湾 FDA のホームページを参照し、2021 年に大幅改訂された食品微生物成分規格において採用された微生物試験法に関する情報を収集・整理した。

2) ウエルシュ菌標準試験法の作成

ウエルシュ菌標準試験法 ST4 案 (集落計数法 NIHSJ-24-ST4) について、標準試験法として運用する際の最終的な課題を抽出し、関連データの取りまとめ及び確認を行った。NIHSJ 法の標準形式に合わせて

フォーマットを修正した上で、第 74 回及び第 75 回検討委員会において最終版に向けた討議を行った。

3) セレウス菌標準試験法の作成

セレウス菌標準試験法 ST4 案 (集落計数法 NIHSJ-28-ST4) について、標準試験法として運用する際の最終的な課題を抽出し、関連データの取りまとめ及び確認を行った。NIHSJ 法の標準形式に合わせてフォーマットを修正し、第 75 回検討委員会において最終版確定に向けた討議を行った。

4) エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法最終案の作成

エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法 ST4 案 (定性試験法 NIHSJ-27-ST4) について、標準試験法として運用する際の最終的な課題を抽出し、関連データの取りまとめ及び確認を行い、NIHSJ 法の標準形式に合わせてフォーマットを修正し第 76 回検討委員会に提示した。

5) カンピロバクター定性試験法の微細改訂

カンピロバクター定性試験法 (NIHSJ-02:2019) について、培養時間の表記が現行の ISO 法と異なる点を議論し改訂を行った。

6) 標準試験法の作成・改訂に関するガイドライン ST2 案の作成

ISO 17468:2017 に基づき令和 2 年度の本研究において作成した、標準試験法の作成・改訂に関するガイドライン ST1 案を基に、バリデーション作業部会で ST2 案 (作業部会案) に向けた討議を行った。また、標準試験法とは異なる部分があるガイドライン作成時の手順について、第 74 回検討委員会に原案を提示した。

C. 研究結果

1) 台湾における微生物標準試験法

台湾では 2021 年に微生物規格基準を大幅に改訂し、乳・乳製品（含常温保存可能食品）、生鮮調理済食品（含そうざい）、清涼飲料水、冷凍食品（含冰雪氷菓）に対する成分規格には食中毒菌を主体としつつ、食品種ごとに腸内細菌科菌群（牛乳、清涼飲料水等）、大腸菌群（乳製品、缶詰を除く乳幼児用食品、加熱後摂取冷凍食品等）が設定されている状況を確認した。これらの微生物試験法を確認したところ、培養温度や培地等は日本に類似する点も見受けられたが、文書構成等は概ね ISO 法に準拠している状況が確認された（<https://www.fda.gov.tw/ENG/SiteList.aspx?sid=10358&k=MICRO>）。また、衛生指標菌試験に供する試料重量を 50g とする点は特徴的と思われた。

2) ウエルシュ菌標準試験法

ウエルシュ菌集落計数法 ST4 案（NIHSJ-24-ST4）は、ISO 7937:2004 を参考として、作業部会でより利便性を高める内容として作成された標準試験法案であった。すなわち、ISO 7937:2004 ではストマッキング処理時間が 1 分間となっていたが、本菌が偏性嫌気性菌である性状を鑑みて、より短い時間での処理が望ましいとの意見が出された。その後、作業部会で検討を行い、30 秒間と 1 分間のストマッキング処理時間の差異により、試験成績には影響が見られなかったことを確認した上で、同処理時間を「30 秒間～1 分間」とする内容を最終案に反映させた。また、確認試験については、2 法のいずれかを選択する方式であったが、検討の結果、1 法では不確実性がみられたことから、これを排除する趣旨で、一法を推奨することとしたほか、陽性対照として使用可

能な菌株を菌株保存機関へ寄託する方針を定めた。本試験法案は、第 76 回検討委員会において最終版としての承認がなされ、検討委員会ホームページ上で「ウエルシュ菌標準試験法・集落計数法（NIHSJ-24:2022）」として初版を公開した。

2) セレウス菌標準試験法

セレウス菌集落計数法 ST4 案（NIHSJ-28-ST4）は presumptive *Bacillus cereus* を検出対象とする ISO 7932:2004 を参考に作成された試験法であることを踏まえ、対象菌名を「推定 *Bacillus cereus*」とした。また、選択分離培地には ISO 推奨の MYP 寒天培地に加え国産の NGKG 寒天培地及び X-BC 寒天培地を追加し、国際整合性を担保しつつ、国内での適用も考慮した形とした。本試験法案は、第 75 回検討委員会で確定の承認がなされ、検討委員会ホームページ上に「セレウス菌標準試験法・集落計数法（NIHSJ-28:2022）」として公開した。

3) エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法

エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法 ST4 案（定性試験法 NIHSJ-27-ST4）については、用語や体裁の統一等を行った上で、第 76 回検討委員会に ST4 案として提出した。本試験法は ISO 10273:2003 を基に作成されたものであるが、2017 年に ISO 10273 が改訂されていることから、第 76 回検討委員会において、今後 2017 年版に沿った改訂を行うことを追記した上で、最終案として承認された。

4) カンピロバクター定性試験法

カンピロバクター定性試験法（NIHSJ-02:2019）について、一部の培養時間表記が現行の ISO 法（ISO 10272-1:2017）と異なり、時間幅が設けられていない点に着目し、国際調和及び実効性の両面から、ISO 法と整合させる案を作成し、第 75 回検討委員会

で審議を行った。結果として、提案内容は承認され、改訂版を検討委員会ホームページ上に公開した。

5) 標準試験法の作成・改訂に関するガイドライン ST2 案の作成

令和2年度に、ISO 17468:2017に基づいて作成した、「標準試験法の作成・改訂に関するガイドライン」ST1 案について、バリデーション作業部会で討議を行い、ST2 案(作業部会案)を作成した(使用する用語については、本研究班分担研究者である五十君静信教授からの分担研究報告書を参照されたい)。なお、ISO 17468:2017の直接的な邦訳では理解に支障があると想定された箇所については、上述の作業部会で議論を行い、ガイドライン案への反映を行った。

標準試験法(NIHSJ法)は、図1に示す4つのステージを経て作成されており、ステージ1で選択された原案について、作業部会での検討データを基に作業部会案を作成し、更にステージ3においてコラボラティブスタディを実施することとなっている。一方でガイドライン作成についてはデータ取得作業がないことを踏まえ、コラボラティブスタディは実施しない方針が、第74回検討委員会にて承認された(図2)。

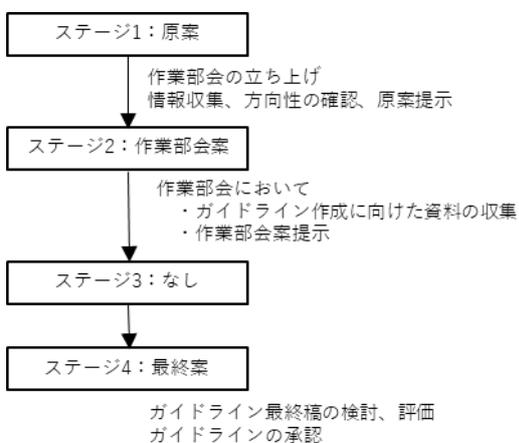


図2. ガイドライン作成手順

D. 考察

本年度、台湾で大幅に改訂された微生物成分規格並びにこれに関連する微生物試験法を確認し、サンプリングプランの適用を含め、試験法についても概ねISO法を参照して作成されている状況にあることが確認され、本研究で進めている国内の標準試験法の作成方針と合致している状況にあると思われた。

近年大量調理された食品を原因とするウエルシュ菌による大規模食中毒事例がしばしばみられている。また、セレウス菌は細菌学上、生物農薬として用いられる *Bacillus thuringiensis* との鑑別が重要な食中毒菌として知られている。我が国では、これまで両菌の試験法が公定法や国際整合性のある試験法としては検討されていなかったことから、本年度はこれらの試験法の最終確定作業を進めた。

また、エルシニア・エンテロコリチカは、豚肉等から高率に分離される低温増殖性の食中毒菌である。本菌は30°Cを超える培養温度では病原性プラスミドの脱落が起こる等、分離同定作業に支障が生じることも報告されているため、標準化は微生物試験の精度を確保する上で極めて重要な課題である。これらの試験法を標準化していくことは、国際整合性を持った微生物試験結果を得ることができるため、食中毒対応を含む行政検査や輸出入事業者の製品検査等への適用は国際間での試験に関する疑義照会リスクを低減させ、食品流通の円滑化や安全性確保の向上に資するものと考えられる。

本研究で策定している微生物標準試験法の多くはISO法に準拠するが、同法は数年単位で改訂が行われる場合もあるため、こうした改訂を受けて、「食品からの微生物標準委員会」が整備したNIHSJ試験法の改訂

を検討する際の根拠となるガイドラインの作成は急務であった。本年度は ISO 17468:2017 に準拠し、且つ国内特有の食品等にも配慮したガイドラインの確立を目指し、標準試験法の改訂等を迅速に行うためのガイドライン案の整備を進め、ST2 を終えた。次年度にはその策定を完了させる予定であるが、同ガイドラインの活用は国際情勢を踏まえた国内標準試験法の改訂作業の円滑化に寄与すると期待される。

E. 結論

本年度は、食品からの微生物標準試験法として、ウエルシュ菌標準試験法（集落計数法 NIHSJ-24）並びにセレウス菌標準試験法（集落計数法 NIHSJ-28）を確定させたほか、エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法（定性試験法 NIHSJ-27）の最終案を作成した。また、国内で整備される標準試験法が国際的整合性を伴う形で円滑に改訂等が行える礎を築くため、微生物標準試験法の作成及び改訂に係るガイドライン作業部会案（ST2 案）を作成した。引き続き食品微生物試験法の国際調和に向けた検討を進めたい。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1) Hiroshi Asakura: Microbiological Risk Assessment Framework and Process Flow: JEMRA Approach. ILSI South East Region Workshop on Microbiological Risk Assessment (2022.3.17)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食品微生物試験法の国際調和のための研究」

分担研究報告書

カンピロバクター定量試験法の妥当性評価に向けた研究

研究代表者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究分担者	松岡英明	東京農工大学
研究協力者	赤瀬 悟	東京都健康安全研究センター
	阿部光一郎	川崎市健康安全研究所
	小川 紋	静岡県環境衛生科学研究所
	今野貴之	秋田県健康環境センター
	島田慎一	埼玉県衛生研究所
	長岡宏美	静岡県環境衛生科学研究所
	中村寛海	大阪健康安全基盤研究所
	野本竜平	神戸市健康科学研究所
	水野卓也	岐阜県保健環境研究所
	山田和弘	愛知県衛生研究所
	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	横山敬子	東京都健康安全研究センター

研究要旨：本年度は、カンピロバクター定量試験法 ST3 案 (NIHSJ-35-ST3) について、コラボスタディに向けた予備検討を進め、ISO 16140-2:2016 に沿った形のコラボスタディ計画案を策定し、同委員会での承認を得た上で、*C. jejuni* NCTC 11168 株を用いた添加回収試験によるコラボスタディを計 10 機関で開始した。最終的に、各試験機関で求められた定量検出成績を基に、外れ値検定や精確さの確認、室間再現標準偏差等を求めた結果、*C. jejuni* の定量検出試験として、NIHSJ-35-ST3 は ISO 10272-2:2017 と同等の性能を有すると判断された。次年度には *C. coli* を用いた同様の検討を進め、本試験法の確定に向けて検討を進めたい。

A. 研究目的

食品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」（以下、検討委員会）では、これまで食中毒菌及び衛生指標菌の標準試験法並びに関連する技術仕様書の作成・改訂、並びにそれらの作成におけるガイドライン策定等に関する検討を行っている。

食品からの微生物試験のうち、衛生指標

菌を除く多くの食中毒菌に対する試験法は定性試験である場合が多く、検討委員会で策定してきた食中毒菌関連の試験法の多くも定性試験法である。一方で、近年、検討委員会で策定し、公定法の根拠として採用された定量試験法としては、リステリア・モノサイトゲネスの試験法が挙げられる。その背景には、対象食品に対する成分規格として当該食中毒菌が 100 cfu/g 以下であるこ

とが定められているためである。同値は、国際的な微生物リスク評価を通じて、健康被害が生じないためのリスク管理策として、欧州をはじめとする世界各国で採用されているものであるが、近年、欧州では食鳥処理工程におけるカンピロバクターの定量的なリスク管理措置も設けられている。当該地域の食鳥処理場では 2018 年より食鳥とたい首皮 1 g あたり 1,000 cfu を達成目標値とする管理措置が運用されており、同値を確認するための微生物試験法として ISO 10272-2:2017（以下、ISO 法）が採用されている。また、欧州では同時期に食鳥肉の流通段階における本菌の定量的汚染実態についても検討が開始されている状況にある。

これらの管理措置は、本菌による食中毒の発生低減を図る上でのリスク評価・管理を定量的成績に基づいて行う必要性が背景にあると考えられる。従って、定量的成績の集積を進めるためには、カンピロバクターの定量試験法の策定を定め、国内における本菌の汚染実態を把握し、リスクに基づく管理措置を講じていく方向性が求められていると想定される。一方、国内ではこれ迄、国際的な視点で妥当性等を確認し、標準化された定量試験法は存在しない状況であった。

上述の背景を踏まえ、検討委員会では、カンピロバクター定量試験法案を策定し、昨年度末にはコラボスタディ実施に関わるステージ 3 (ST3) への移行が検討委員会において承認された。本年度は、コラボスタディに向けた予備検討を進め、その計画について審議を受け、承認を得た後に、*Campylobacter jejuni* を対象としたコラボスタディを開始したので報告する。

B. 研究方法

1) 予備検討

カンピロバクター定量試験法 ST3 案 (NIHSJ-35-ST3) について、コラボスタディ計画を策定する中で、特に試料の輸送過程における当該菌の消長を確認するため、異なる菌量の *C. jejuni* NCTC 11168 株を鶏皮試料に接種し (n=8/群)、輸送条件と想定される環境 (保冷剤を含む 4 重包装内) 内で 0、24、48 時間静置した。その後、各試料を ISO 法に供し、保存前後での菌数動態を評価した。

2) シングルラボバリデーション

計 6 段階の異なる菌量の *C. jejuni* NCTC11168 株を鶏皮試料に接種し (1 群あたり n=5)、NIHSJ-35-ST3 及び ISO 法に供した。得られた定量成績を基に、ISO 16140-2:2016 で示される相対真値 (Relative trueness) 及び精確さの菌レベル依存性 (Accuracy profile) を求めた。

3) コラボスタディ

国立医薬品食品衛生研究所より、コラボスタディ参画機関 (計 10 機関) に、3 段階の異なる菌量の *C. jejuni* を接種した鶏皮試料及び Blank 試料を、4 重包装 (4 次容器にはジュラルミンケースを使用) で送付した。送付翌日に NIHSJ-35-ST3 及び ISO 法を用いた定量試験を開始し、得られた成績を取り纏めた。妥当性解析の流れについては、微生物試験法の妥当性評価に関する研究分担報告書に記載したので参照されたい。

C. 研究結果

1) 輸送過程でのカンピロバクターの消長

コラボ本試験に向けた予備検討事項として、カンピロバクターの細菌学的性状を踏まえると、被験菌株の輸送条件は本菌の生存性、ひいては試験成績に大きな影響を与えるこ

とが想定された。そこで、試料輸送に使用する予定の4重包装容器内に検体を入れ、常温(25±1°C)にて0、24時間、48時間保存し、各時系列における生存菌数をISO法により求めた(n=8×3時系列)。図1には、保存0時間時点での検出菌数が平均4.1 log CFU/g(セクションA)、平均4.7 log CFU/g(セクションB)とした際の消長成績を示す。概して、保存48時間後に比べ、保存24時間後の試料では相対的に菌数が安定的であることが確認され、本成績に基づき、当所から24時間以内に試料の輸送が完了することがコラボスタディ参画機関の条件として必要と判断された。

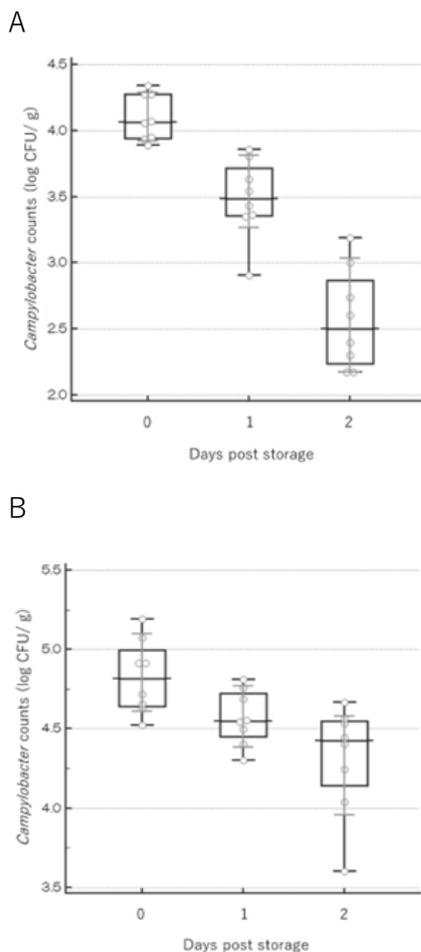


図1. 鶏皮試料中における *C. jejuni* NCTC 11168 株の消長.

2) シングルラボスタディによる試験法間の同等性評価

① 試料調整に係る比較

ISO法及びNIHSJ-35-ST3法の間では試料希釈倍率が異なること(前者は10倍、後者は5倍)に着目し、mCCDA培地を選択分離培地として、希釈倍率の差異が試験成績に与える影響を評価した。

6段階の異なる菌量の *C. jejuni* NCTC 11168 株を接種した鶏皮試料(n=5)を対象に2試験法を並行実施したところ、両試験法による成績間のR²値は0.9938と極めて高い値を示した(図2A)ほか、Bland-Altman分析において、両試験法の成績の差は許容範囲内に収束した(図2B)。

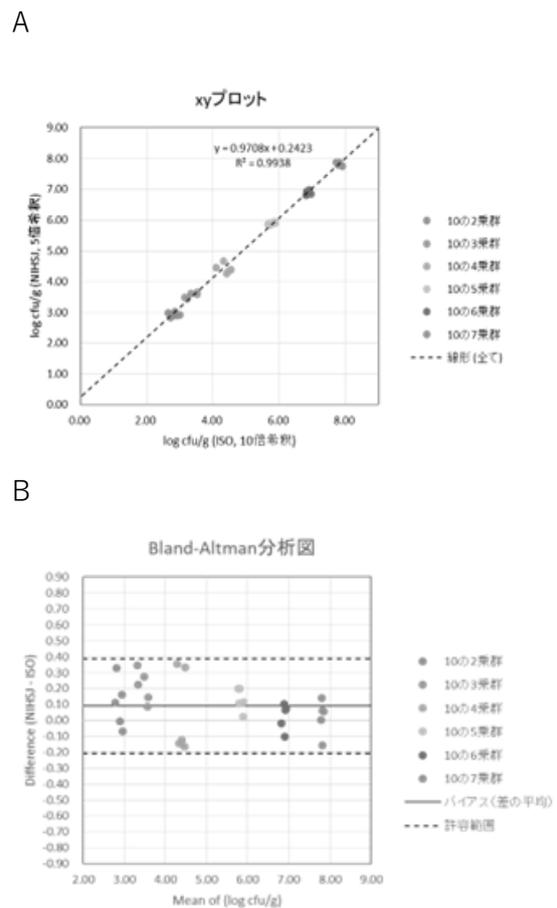


図2. *C. jejuni* NCTC11168 株を用いたNIHSJ法(mCCDA培地)とISO法間の相対真値試験成績.

また、上述の結果を基に、精確さの菌レベル依存性試験（Accuracy profile study）を実施したところ、 β -ETI 値は AL (± 0.5) 域内となった（図 3）。

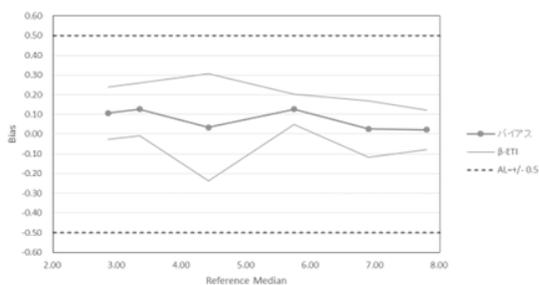


図 3. *C. jejuni* NCTC 11168 株を用いた NIHSJ 法（mCCDA 培地）と ISO 法間での精確さの菌レベル依存性試験成績。

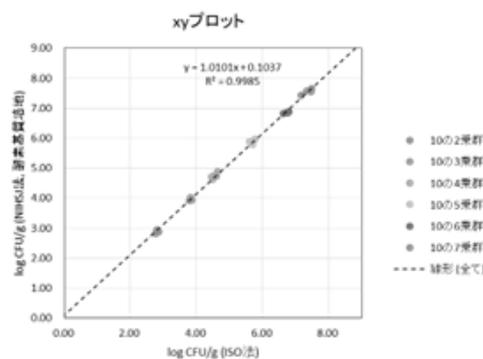
以上の結果より、希釈倍率の差異は試験結果に大きな影響を及ぼさないことが確認された。また、希釈倍率の差異以外で、NIHSJ 法と ISO 法の間では試料調整に異なる点は見受けられないことから、mCCDA 培地を選択分離培地とする NIHSJ 法をラボスタディの対象に含める必要はないと考えられた。

② 選択分離培地の種別

ISO 法では mCCDA 培地が選択分離培地として示されているが、今回検討中の NIHSJ 法では mCCDA に加え、酵素基質培地の利用も含めた試験法案としている。酵素基質培地を用いた NIHSJ 法と mCCDA 培地を用いた ISO 法との間で試験成績の差異を確認するため、①と同様に 6 段階の異なる菌数の *C. jejuni* NCTC 11168 株を接種した鶏皮試料 (n=5) を対象に、2 試験を並行実施し、相対真値試験及び精確さの菌レベル依存性試験を行った。その結果、両試験法

による成績間の R^2 値は 0.9985 と極めて高い値を示した（図 4A）ほか、Bland-Altman 分析において、両試験法の成績の差は許容範囲内に収束した（図 4B）。

A



B

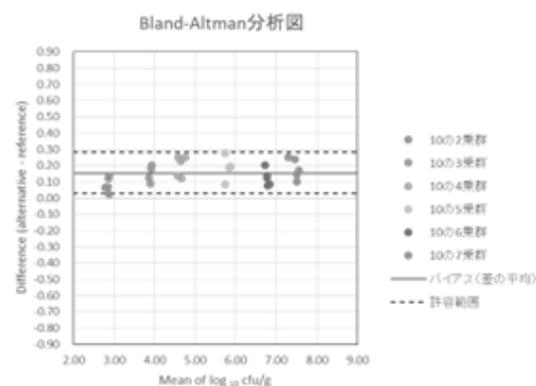


図 4. *C. jejuni* NCTC11168 株を用いた NIHSJ 法（酵素基質培地）と ISO 法間での相対真値試験成績。

また、上述の結果を基に、精確さの菌レベル依存性試験（Accuracy profile study）を実施したところ、 β -ETI 値は AL (± 0.5) 域内となった（図 5）。

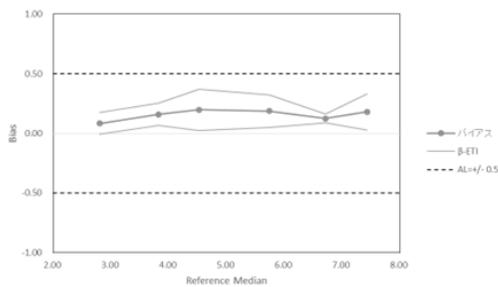


図 5. *C. jejuni* NCTC 11168 株を用いた NIHSJ 法 (mCCDA 培地) と ISO 法間での精確さの菌レベル依存性試験成績。

以上の結果より、選択分離培地の差異は試験結果に大きな影響を及ぼさないことが予備試験を通じて確認された。但し、選択分離培地の変更は、ISO 法では大きな変更内容とみなされ、コラボスタディを通じた妥当性の確認が必要とされることから、コラボスタディでは、酵素基質培地を用いた NIHSJ 法と mCCDA 培地を用いた ISO 法の間での比較を進めることとした。

上述の内容について第 75 回検討委員会にて審議を行い、コラボスタディ計画が承認され、開始する運びとなった。

3) コラボスタディ実施と解析結果の概要

上述の結果を受け、ISO 16140-2:2016 に基づき、低濃度接種群 (L)、中濃度接種群 (M)、高濃度接種群 (H) 及び Blank からなる鶏皮試料を調整し、計 10 機関へ輸送を行った。試料到着後は、速やかに NIHSJ 法 (酵素基質培地) 及び ISO 法を並行実施した。なお、輸送に際しては温度ロガーを容器内に配置し、いずれも上項で求めた際の温度範囲からの逸脱がないことが確認された。

その後、各機関で得られた定量試験成績を取り纏め、Smirnov-Grubbs 検定及び Cochran 検定を用いて外れ値を除き、試験所内分散を解析した (表 1) 後、室間標準偏

差等を求めたところ、AL は ± 0.5 を超えていたが、参照法の菌レベルごとの標準偏差の平均値を基にした ALs を算出し、それに基づいて再評価したところ、NIHSJ 法のバラツキ範囲は ISO 法の室間再現標準偏差 sR に基づく許容範囲 (ALs ± 1.44) 内に収束した (図 6) ことから、NIHSJ 法は参照法である ISO 法と同等であるとの結論を得た。

表 1. 試験所内分散分析

項目	試験所	Ref-L	Alt-L	Ref-M	Alt-M	Ref-H	Alt-H
試験所内分散	sr ² -1	0.0677	0.0540	0.0126	0.0375	0.0307	0.0008
	sr ² -2	0.0390	0.0599	0.0057	0.1265	0.1295	0.0183
	sr ² -3	0.0057	0.0981	0.0146	0.1520	0.0439	0.0838
	sr ² -4	0.0835	0.0149	0.1764	0.0375	0.0061	0.0186
	sr ² -5	0.0545	0.2137	0.0809	0.0660	0.0183	0.0091
	sr ² -6	0.0549	0.1505	0.0387	0.0265	0.0126	0.0016
	sr ² -7	0.0741	0.0454	0.0153	0.0110	0.0741	0.0051
	sr ² -8	0.0590	0.0201	0.0482	0.0179	0.0129	0.0066
	sr ² -9	0.0083	0.0278	0.0972	0.0093	0.0161	0.0557
	sr ² -10	0.0806	0.0169	0.0030	0.0201	0.0239	0.0387
分散の和	$\sum(sr^2)$	0.5272	0.7011	0.4926	0.5042	0.3679	0.2383

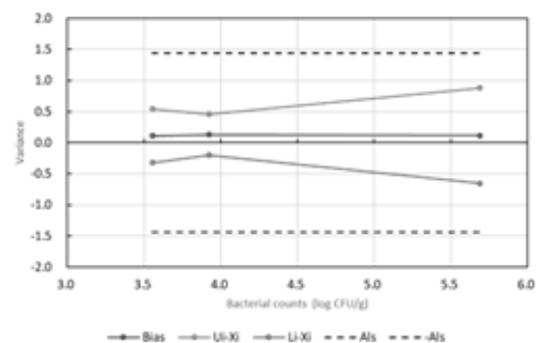


図 6. NIHSJ 法に関する精確さの確認図。

D. 考察

本年度はカンピロバクター定量試験法の標準化に向け、*C. jejuni* を対象としたコラボスタディを実施し、解析方法の策定を含めた検討を通じ、最終的に NIHSJ 法の妥当性を確認できた。

本菌の好気性の性質から、試料の輸送過程における菌数変動は避け難いと想定されていたため、コラボスタディに向けては予備検討でその菌数のばらつきを予め評価し、1 日以内の輸送時間を前提とした参画機関の選定を行った。

その後行った NIHSJ 法と ISO 法との間で見られる主な相違点に係るシングルラボスタディでは、これらの相違点は結果に大きな影響を与えないことが確認され、コラボスタディの実施計画が確立された。そのうちの一つである酵素基質培地については、国内外で複数製品が既に販売されており、多くは臨床検査での適用が開始されている状況にある。その利点としては、選択性が高く、色調に基づく定性集落の識別が容易であり、夾雑菌の発育が抑制されること、集落の遊走が生じにくいこと等が挙げられる。一方、食品を適用範囲とするカンピロバクター試験法のうち、ISO 定性試験法 (ISO 10272-1: 2017) では酵素基質培地の使用も認められている。一方で、ISO 定量試験法での適用はみられていない。その背景には定量性に関する知見が乏しいためことがあると想定されるが、その意味において、本研究で得られた成績は、今後 ISO 法を検討する部局等への発信を通じ、国際標準的な試験法への導入の根拠として活用されることが期待される。加えて、本試験法の最終確定は、国内の当該試験の効率的な運用を促し、国内におけるカンピロバクター定量試験成績の集積を通じ、リスクに基づく管理措置の発展に資するものと期待される。

E. 結論

本年度はカンピロバクター定量試験法の標準化に向け、*C. jejuni* を対象とした予備試験及びコラボスタディを実施し、解析方法を含めた検討を通じ、検討委員会では初めて独自に定量試験法としてのコラボスタディを行い、最終的に NIHSJ 法の妥当性を

確認できた。本成績は、次年度の検討委員会での審議を経て、最終判断がなされるところである。また、本試験法では、同一菌属ながら、異なる菌種として分類される *C. coli* も対象に含まれており、次年度には当該菌種を用いたコラボスタディを同様のスキームで実施し、最終的な試験法としての確定を目指す予定である。

F. 研究発表

論文発表

- 1) 朝倉宏: *Providencia alcalifaciens* の細菌学的性状, 疫学ならびに試験法について. 食品衛生研究 2021;71:15-21.

学会発表

- 1) 朝倉宏: 食肉および食鳥肉の衛生管理における定量的微生物モニタリング. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会 (2021.9.21)
- 2) 朝倉宏: *Providencia alcalifaciens* の細菌学的性状, 疫学並びに試験法について. 令和 3 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会 (2021.11.19)
- 3) 朝倉宏: カンピロバクターの試験法について. 一般社団法人食品衛生登録検査機関協会令和 3 年度微生物研修会 (2022.1.21)
- 4) 朝倉宏: カンピロバクター. 国立感染症研究所令和 3 年度細菌研修. (2022.1.24)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品微生物試験法の国際調和のための研究

分担研究報告書

食品微生物試験法の国際動向に関する研究

研究分担者	五十君 静信	（東京農業大学応用生物科学部・教授）
研究分担者	松岡 英明	（東京農工大学・名誉教授）
研究協力者	森 曜子	（一般社団法人 AOAC 日本・理事）
研究協力者	檜木 真吾	（東京農業大学応用生物科学部・研究員）

研究要旨：本研究班では、国際動向を踏まえた上で、国内の食品微生物試験法の妥当性を確認し、食品微生物試験法の国際調和を図る上で必要となる科学的根拠を創出することを目的としている。国際標準を策定するコーデックス委員会では各国の食品微生物基準を策定するためのガイドラインを示しており、この中で食品の微生物試験法に関しては ISO 法を標準とし、同法もしくは科学的に妥当性確認した試験法を採用することを求めている。国内の微生物規格基準はこれ迄独自に試験法を策定し公定法としてきたため、食品衛生管理の国際整合性が重要となっている。微生物試験法の国際調和は急務の課題といえる。分担研究課題は、食品微生物の試験法に関する国際動向の掌握と、食品の微生物試験法における妥当性確認のあり方に関する検討を行うことである。食品衛生のリスクマネジメントにおける微生物試験法の国際整合性の重要性から、本年度は 2021 年 6 月に、新型コロナウイルスの影響で web で開催された ISO/TC34/ SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）総会に参加し、ISO/TC34/SC9 の動向に関する情報収集と試験法の検討を行った。更に、ISO/TC34/SC9 での検討課題については逐次情報収集と情報交換を行い、検証すべき項目の集約につとめた。現在改訂が進められている ISO のバリデーションガイドライン (ISO 16140 シリーズ) 及び AOAC International が公表している妥当性確認ガイドを比較検討し、国内における妥当性確認の手法の方向性を検討した。本年度は、引き続き AOAC International のガイドライン並びに ISO/TC34/SC9 で策定が進められているガイドラインを元に、公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。検査室で新たな試験法を導入する場合に必要なベリフィケーションも、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理した。特に食品の微生物試験関連用語については、日本語訳が混乱している状況にあり、用語の整理と提案を行った。また、検討委員会で標準試験法の検討を進めているウエルシュ菌試験法の策定に関して、そのバリデーション方法について助言を行った。

A. 研究目的

食品微生物試験法の国際調和を図る上では、逐次変動する微生物試験法に関する国際動向を収集し、これらを見据えた改訂等の作業が必要である。

我々は、国際標準化機構 (ISO) SC9 の中で発言権を有する P メンバーの活動主体として、ISO/TC34/SC9 に出席し、国際動向に関する最新の情報を収集・整理し、我が国の食品微生物試験の在り方を検討する際に適宜情報発信を行ってきた。本年度も引き続き、これらの役割を担うべく、活動を行うことで、国際調和の観点で情報発信に努めることを目的とした。加えて、本年度は、食品の微生物試験法に関連した用語の表記が未だ統一

されていないことに着目し、バリデーション作業部会での活動を中心に用語の整理を行ったので、報告する。

B. 研究方法

コーデックス委員会の示す食品の微生物基準並びにガイドライン等は、食品のリスクマネジメントの世界標準とされている。その中で微生物試験法は国際標準化機構 (International Organization for Standardization: ISO) 法とされている。ISO で食品微生物試験法を担当するサブコミティは TC34/SC9 であることから、このサブコミティに発言権を有する P メンバーとして参加し、ISO 法の検討状況に関する情報収集と現

在策定中の ISO 試験法の議論に積極的に参加した。令和 3 年 6 月には ISO/TC34/SC9 総会が、新型コロナウイルスの影響で web 開催となり、研究班からは、五十君、松岡、岡田の 3 名と ISO/TC34/SC9 国内委員会事務局から 2 名が参加した。総会では食品微生物試験法関連の話題について、わが国からの情報発信ならびに海外からの情報収集を行った。

一方、アメリカにおける食品の微生物試験法に関する情報収集も行った。AOAC International 総会には、直接参加することはできなかったが、国内から当該学会に参加した AOAC インターナショナル日本セクション所属の研究者から、AOAC International の動向について情報収集を行った。妥当性確認に関する文書が AOAC International から公開されており、こちらについて、その内容の精査を引き続き行った。ISO における妥当性確認と AOAC International における妥当性確認を比較検討し、我が国における食品の微生物試験法の妥当性確認のあり方を検討、微生物試験法に関する用語の整理、妥当性確認に関する考え方の整理を行った。

これらの検討は、バリデーション作業部会を組織して行った。作業部会は、朝倉宏(研究代表者)、五十君静信(分担研究者)、松岡英明(分担研究者)、岡田由美子(標準試験法検討委員会事務局、分担研究者)、森曜子(協力研究者)、諸藤圭(協力研究者)、廣田雅光(協力研究者)、守山隆敏(協力研究者)、内田和之(協力研究者)、吉田朋高(協力研究者)のメンバーで組織した。

作業部会では、試験法関連の「日本語」用語の統一が早急に必要であるという結論に達し、試験法関連の用語集作成を行い、以前整理した用語集から、最新の情報を参考に再整理しなおし標準試験法検討委員会へ提案を行った。

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

具体的な試験法検討に当たっては、どのように妥当性確認を行うかは、各論であり、標準試験法検討委員会で提案される各作業部会から提案される試験法についてアドバイスを行った。研究班外の団体から提案された現在検討中のウェルシュ菌の標準試験法作成について、データ出しに協力すると共に評価方法について支援を行った。

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 (International Organization for Standardization; 国際標準化機構) の示す試験法であり、その他の試験法を用いる場合は、ISO 16140 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。6 月に web で開催された ISO/TC34/SC9 の総会に参加し、P メンバーとして試験法作成およびガイドライン等策定の議論に参加した。

ISO が作成する規格には、製品規格やマネジメント規格だけではなく、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。現在、ISO には 200 を超える TC が存在するが、食品の微生物試験法に関しては、TC34「食品専門委員会」の中の SC9「微生物分科委員会」及び乳製品については SC5「牛乳及び乳製品」が規格の作成を担当している。

2002 年から TC34/SC9 に係る「国内審議団体」として、一般財団法人日本食品分析センターが国内事務局となり、規格案などについての審議事務を担当してきた。参加地位には P (Participating) メンバーと O (Observers) メンバーとがあるが、前者には規格案に対する投票権があり、かつ国際会議(総会)への出席義務がある。一方の O メンバーは投票権や会議への出席義務はないがコメントの提出は可能である。長年にわたりわが国は SC9 の O メンバーとして対応してきた。

2018 年度から、わが国は食品の微生物試験法策定の専門委員会である ISO/TC34/SC9 に投票権のある正式メンバー(P メンバー)として加わった。

2021 年度の第 40 回総会は、6 月に web 方式で開催され、前半の 1 日間は CEN/TC275/WG6 の総会、後半の 4 日間には ISO/TC34/SC9 の総会が行われた。本年度の総会への参加国は、フランス(幹事国)、アルゼンチン、オーストラリア、ベルギー、カナダ、チリ、中国、コロンビア、デンマーク、エジプト、フィンランド、ドイツ、ハンガリー、インド、インドネシア、イラン、アイルランド、イタリア、日本、カザフスタン、ケニア、韓国、ナミビア、オランダ、ニュージーランド、ノルウェー、ペルー、ポルトガル、ロシア、セルビア、

南アフリカ、スペイン、スリランカ、スウェーデン、スイス、タンザニア、タイ、トルコ、イギリス、アメリカ、の合計 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。TC34/SC9 の総会で審議された、あるいは報告された内容については省略する。

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

現在、国際的に広く用いられている代替試験法の妥当性確認の方法を示したガイドラインである ISO 16140 は、2003 年に公開されてから改定されていなかった。一方、米国の AOAC International は、ISO 16140 の改定作業に先立ち、2012 年に AOAC INTERNATIONAL Method Validation Guidelines を公開した。試験法のバリデーションに関しては、100 年を超える歴史を持つ AOAC International は、妥当性確認に関する最新の考え方をまとめ、文書化した。この文書の内容は、我々が試験法の妥当性に関する議論をするためには非常に有用な情報を与えてくれる。AOAC International が長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方を集大成したガイドラインといえる。そのような考え方は、ISO にも反映され、ISO 16140 の改訂では、その改定案の検討に AOAC INTERNATIONAL Method Validation Guidelines と可能な限り整合性がある形で作業が進められている。ISO 16140 シリーズとして細分化されている。

国際的なスタンダードとしての微生物試験法のバリデーションに関しては、現在 ISO/TC34/SC9 で、ガイドライン ISO 16140 シリーズの改訂は順調に進んでいる。これまで代替法のバリデーションガイドとして広く用いられてきた ISO 16140:2003 は、単一の文書であったが、今回の改訂版ではパート 1 からパート 6 と、6 つの文書に分けて検討が進められている。2016 年に、パート

1 と 2 が公開された。パート 1 は、試験法のバリデーションに用いられる用語や定義に関する文書となっている。パート 2 は、代替法（独自法）のバリデーションに関する一般原則及び技術的プロトコールとなっている。そこで、作業部会では用語の和訳について、ISO 16140-1 に加えて、TS Z 0032 : 2012 (ISO/IEC Guide 99:2007 (VIM3)) 国際計量計測用語 - 基本及び一般概念並びに関連用語、JIS Z 8101-1 : 2015 (ISO 3534-1 : 2006) 統計-用語及び記号-第 1 部 : 一般統計用語及び確率で用いられる用語、JIS Z 8101-2 : 2015 (ISO 3534-2 : 2006) 統計-用語及び記号-第 2 部 : 統計の応用、JIS Z 8402-1 : 1999 (ISO 5725-1 : 1994) 測定方法及び測定結果の正確さ（真度及び精度） - 第 1 部 : 一般的な原理及び定義、JIS Q 0035 : 2008 (ISO Guide 35 : 2006) 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則、JIS K 0211 : 2005 分析化学用語（基礎部門）、CAC/GL72 : 2009 分析用語に関するガイドライン（厚生労働省 2012）などの文書を参考として、森曜子委員が中心となって日本語の用語集案の作成を進めた。以前の案を最新の情報をもとに再整理し作業部会で検討後、検討委員会へ提案した。この更新した検討案について添付資料として示した。

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

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

③ウエルシュ菌試験法策定支援

ウエルシュ菌定性試験法は、NPO 法人食の安全を確保するための微生物検査協議会が中心となって、東京都健康安全研究センターと顕微鏡院が協力し作業部会をつくり標準試験法策定を進め

てきた。試験法策定にあたっては、バリデーション作業部会が協力し、検討を進めてきた。ISO 法では単独の定性試験法がないため、定量法で用いている培地等を参考にし、どのように標準試験法を作成するかについて助言を行った。ステージ 3 の試験法案は、最終試験法(ST4)として確定させた。

D. 考察

①微生物試験をとりまく国際情勢

ISO/TC34/SC9 からは、わが国に対してその食習慣から、寄生虫の試験法、腸炎ビブリオ試験法、プロバイオティクス（乳酸菌）試験法、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。

②バリデーションガイドラインの現状

試験法のバリデーションに関しては、AOAC International が長い歴史の中で学問的な議論を繰り返して、その考え方をまとめ示してきた。そのような考え方は、ISO にも反映され、ISO 16140 に代替法のバリデーションのガイドラインとして示され国際的な考え方として広く受け入れられている。

代替法の妥当性評価ガイドラインとして示されこれまで広く用いられてきた ISO 16140:2003（食品の試験法のバリデーションに関するガイドライン）についても、新しい情報を加えた改訂作業が ISO/TC34/SC9 で進められており、6 つの独立したガイドラインの検討が進められている。既にパート 1 の用語、パート 2 の代替試験法のバリデーションガイドラインについては公開され活用がはじまっている。パート 1 については、以前の度用語集案の作成を行って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、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た。

また、代替試験法のバリデーションガイドであるパート 2 については、松岡先生を中心に整備を進めている（分担研究所参照）。残る 4 つのガイドラインについては、ISO/TC34/SC9 の WG での議論は進んでいるので数年のうちには改訂作業が完了するものと思われる。この改訂に先立ち 2012 年に米国の 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いくかは、TC34/SC9 総会でのトピックスとなると思われる。

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

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

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

③ウエルシュ菌試験法策定支援

ウエルシュ菌試験法のバリデーションについて、当該試験法の作業部会と連携をとりながら、バリデーション作業部会の中で技術的助言を行い、検討委員会での同試験法に関する議論の中では ISO 等での考え方を提供する等して、最終版作成に寄与した。

E. 結論

微生物試験をとりまく国際情勢としては、ISO/TC34/SC9 総会に参加し、多くの情報を得ることができた。バリデーションガイドラインの改訂が進んでいることから、わが国も ISO/TC34/SC9 の WG に積極的に関与し今後の ISO のバリデーションガイドラインの策定に係わっていくことが重要であると思われる。また、バリデーションの重要性、目的適合性、工程管理における試験法の選択に関する考え方の整理など、微生物試験法に関連する情報提供を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 五十君静信. 人の健康障害に係わる微生物の疫学並びにその制御に関する研究. 日本食品微生物学会雑誌. 38 : 53-66. 2021.
- 2) 五十君静信. 妥当性確認された微生物試験法の重要性と HACCP 制度化後の微生物検査の考え方. FFI ジャーナル. 227 : 4-9. 2022.

2. 学会発表

- 1) 五十君静信. HACCP 制度化後の食品衛生管理における公的検査と自主検査. 日本機能水学会第19回学術大会. 2021. 10. 31.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品微生物試験法の国際調和のための研究
分担研究報告書
微生物試験法の妥当性評価に関する研究

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

研究要旨：食品微生物試験法を国際調和させるために、我が国は ISO/TC34/SC9 の P メンバーとして、本年度は ISO/TC34/SC9 の 2021 年次総会（6/3-6/5）及び WG3（メソッドバリデーション）専門家会議〔26th（4/27-4/29）、27th（2022/1/18-1/20）〕に参加した。妥当性確認に関する中心文書 ISO 16140 の分冊化作業は活発で、分冊 part 1～6 は既刊で、後続の分冊計画と共に、既刊分冊の改訂作業も進行中である。こうした動向に基づき、我が国では一連の NIHSJ 法の開発評価に取り組んでいるが、同時に、それを利用しようとする試験室等は当該試験法の検証（ベリフィケーション）が必須である。そこで、part 3: Verification に基づき、「NIHSJ 法検証ガイドライン（NIHSJ-30）」原案を作成した。また、関連する技術的内容が集積された part 2: Validation に関しても、その改訂作業が活発で、それを考慮した解説文書が必要と考えられたことから、（参考資料）「微生物試験法バリデーションの活用の手引き—POD および LOD の求め方と解釈—」を作成した。こうした情報分析に基づき、開発中の NIHSJ 法の妥当性確認計画、結果の解析、評価に際して専門的助言を行った。

A. 研究目的

ISO 法等の国際動向調査に基づき、我が国における国際調和した食品微生物試験法として NIHSJ 法の開発が進められてきた。それに伴い、NIHSJ 法を多くの試験室等に普及させることが次の課題である。試験法の開発段階では、コラボスタディを必要とする煩雑な妥当性確認プロセスが必須であったが、試験室がユーザーとしてその試験法を導入する場合は、改めて妥当性確認を行う必要はない。しかし代わりに、当該の試験室がその試験法を的確に実施できることを示すこと（ベリフィケーション；検証）が必要である。そこで、本研究はこの検証のためのガイドラインの作成を目的としている。

通常、妥当性確認で適用される食品マトリクスの種類は限定的であるため、ユーザー試験室が適用しようと予定している食品マトリクスと一致しているとは限らない。厳密に考えれば、ユーザー試験室が、

その食品マトリクスを用いて、改めて妥当性確認をしなければならないことになる。しかしそれは現実的ではない。この問題については、ISO でも同様の認識であり、それを「まだ十分に妥当性確認されていない試験法」と位置付けて、その場合の検証法を別途議論している。

こうした状況の下で、NIHSJ 法検証ガイドラインを作成することは、国際動向を考慮しつつも、我が国が自ら発案していかなければならない課題ということである。

主として参照してきた ISO 文書の中で、妥当性確認や検証に関する中心文書は ISO 16140 シリーズ（part 1～6 に分冊化）であるが、検証に関する分冊は part 3 である。そこで、この ISO 16140-3 に基づいて、NIHSJ 法検証のためにガイドラインを作成することにした。また、技術的内容の多くは妥当性確認の分冊 ISO 16140-2 に掲載されており、しかもその内容の改訂作業が

盛んに進められている。そこで、その情報を反映させるために、技術的内容の改訂動向を平易に説明した文書の作成にも取り組んだ。

さらに、妥当性確認の有無の判断に直接関わってくるのが食品マトリクス分類である。マトリクスの中に複数の食品タイプがあり、各食品タイプに具体例として複数の食品アイテムが掲載されている。無限にある食品アイテムの分類は極めて難しいが、ISO 16140-2, -3 に掲載されている分類表に基づき、我国の食品事情を考慮して、新たな分類項目の提案が必要になるかも知れない。この問題に関する議論を進めることも本研究の目的の一つである。

以上のような、情報分析とともに、開発が進められている NIHSJ 法の妥当性確認の計画、結果の解析、評価に際して専門的助言を行った。

B. 研究方法

本年度は、ISO/TC34/SC9 の 2021 年次総会 (6/3-6/5)、及び WG3 (メソッドバリデーション) エキスパート会議 [26th (4/27-4/29)、27th 会議 (2022/1/18-1/20)] に参加した (いずれもウェブ会議)。また、SC9 および SC9/WG3 の各事務局から随時送信されてくる文書情報の分析を行った。

これらの海外情報に基づき、(1) NIHSJ 法検証ガイドライン、および(2)ISO 16140-2 技術的内容の解説文書、の作成に取り組んだ。国内委員会、バリデーション作業部会では、(1) に関しては、ISO 16140-3 邦訳 (バリデーション部会の守山隆敏委員の協力による)、ガイドラインでも問題となる妥当性確認関連の技術用語の邦訳の整理 (バリデーション部会の森曜子委員の協力による)、さらに食品マトリクス分類表の見直しに関する議論などを行った。

(2) に関しては、①ISO 16140-2: 2016 から登場した確定試験の考え方、②POD, LOD, RLOD の算出法、に関して、SC9/WG3 のエキスパートや引用文献著者との情報

交換によって理解を深めた。

このほか、*Campylobacter jejuni* 定量試験法 (NIHSJ-35-ST3) のコラボスタディ結果を、外れ値検定の後、part 3 本文の 6.2.3 節に掲載された解析手順に従って解析した。

C. 研究結果及び考察

(1) NIHSJ 法検証ガイドライン (NIHSJ-30) 原案の作成

ISO 16140-3 の邦訳版を作成し、それを基に NIHSJ 法を検証するためのガイドライン原案を作成した (添付資料 1)。8 節構成となっている。

1. 目的、
2. 検証ステージ
3. 試験法の検証条件と検証後に適用される食品カテゴリーの範囲、
4. 検証すべき性能特性
5. eLOD₅₀ の検証法
6. S_{IR} の検証法
7. eBias の検証法
8. 検証のためのフロー

骨子は次の 6 項目に要約される。

- ①食品マトリクスのカテゴリーは 15 種類に分類されており、「その他」の特別のカテゴリー 3 種類 (ペットフードた家畜糞尿など) が対象になっている。
- ②ユーザー試験室が適用しようとする食品マトリクスの範囲は、5 以上の「広範囲の食品」、4 以下の「限られた範囲の食品」、各々に「その他」を組み合わせた場合の何れかを選択する。
- ③既存の食品マトリクスカテゴリーに適合しない食品マトリクスの場合は、新たにカテゴリーを設けることも可能。
- ④検証のステージには、試験法を適切に実施できることを示すための実証検証と、特定の食品アイテムが適用できることを示すための食品アイテム検証がある。
- ⑤検証すべき性能指標は eLOD₅₀、S_{IR}、eBias、包含性・排他性である。
- ⑥性能指標の許容限界の基準は、妥当性確認試験で得られ公開されている LOD₅₀、

S_{IR} の値である。

- ⑦参照すべき基準値が無い場合は、例えば、ユーザー試験室が自らガイドラインにしたがって得たデータに適切な係数をかけて暫定基準値とすること、が考えられる。国外の現状を鑑みると、それが合理的と考えられる。

(2) ISO 16140-2 技術的内容の解説文書の作成

妥当性確認の中心文書である ISO 16140 シリーズ part-1~6 は既に出版済であり、さらに part 7以降の分冊も準備が進められている。また、参照法の妥当性確認に関する基本事項をまとめた ISO 17468 についても附属書の改訂の準備作業が進められている。議論と作業は SC9 の WG3、WG2 を中心に行われてきたが、今後は、新たに WG3-WG2 合同 WG としての活動も始まる。すなわち、妥当性確認関連の技術的内容に対する疑問や新規提案の場は WG3、あるいは合同 WG3/2 である。

①確定試験 (Confirmation) の扱い

本研究では、16140-2 に関する平易な解説文書の作成を目指し、技術的内容の実施上の問題点を分析してきた。その筆頭が、確定試験 (Confirmation) の扱いである。Part 2: 2016 版に登場して以来、その考え方や実施に際しての問題点など、理解に苦慮した。経緯を調べた結果、推察通り、代替法をできるだけ採用したい、との考えが背景になっていたようだ。

従来、代替法は参照法と一致しなかった場合は棄却されてきた。しかし、不一致といっても、代替法が参照法より優れている場合もあり得る、との議論があった。定性試験なので、例えば、参照法で陰性であっても代替法で陽性であったら、むしろ代替法の検出性能が参照法のそれよりも優れている、ということになる。そして、その代替法の性能を別途確認することが重要であるから、確定試験 (Confirmation) を追

加せよ、という議論である。

昨年度の報告書では、この確定試験結果に関わる用語の複雑な表記法についての議論の状況を紹介した。しかし、そうした表記上の問題よりも、実施に際しての具体的問題の方が厄介であると考えられた。すなわち、確定試験で使用すべき具体的な試験法が規定されていないこと、基本的には菌の同定試験法であるので、菌種に応じて別途考えなければならないこと、仮に選択した試験法が、別途、妥当性確認されているのか確認すること、など問題は簡単ではなかった。

こうした疑問に対する WG3 の part 2 改訂作業グループの回答は、意外なことに、「確定試験はオプション」ということであつた。規格文書中に「オプション」と表記はないが、妥当性確認実施者は、自身の目的に合致した部分だけを適宜、選択して実施計画を作成すれば良い、という考えを理解した。

②参考資料「微生物試験法バリデーションの活用の手引き—POD および LOD の求め方と解釈—」の作成

2016.10.16 バリデーションガイドライン (案) としてまとめた文書を、2021.11.24 に全面改訂した。しかし、その中で、定性試験における基本性能である POD あるいは LOD の算出に関する説明 (本文、Annex D、Annex F) は、ISO 16140-2 原文にも詳しい説明がなく、理解できる状態ではなかった。Part 2 本文中には LOD、RLOD などを算出するプログラムのウェブサイトが公開されているので、それを利用すれば実用的には問題ない。

しかし、必ずしも科学的に合否判断ができるとは限らない場合が多いので、解析過程や評価指標の設定過程は十分理解しておくことは重要であろう。最終的には part 2 全体の「手引き」としてまとめる予定であるが、今年度の文書は、特に POD および LOD の求め方に関する内容に限った参考資料としてウェブサイトに掲載した (<https://web.tuat.ac.jp/~msaito/2022.4.12PO>

[DLOD.pdf](#))。

(3) *Campylobacter jejuni* 定量試験法 (NIHSJ-35-ST3) のコラボスタディ結果の解析

次のステップで解析し、評価した。外れ値検定は2つの観点から実施した(ステップ①及び⑤)。また、⑨室間標準偏差 S_L の算出法は「ISO 5725-2 に掲載」となっているが、当該の文書に記載はない。そこで、考察した結果に基づき、算出した。

- ① Smirnov-Grubbs 検定： 各室、各レベルの 20 検体の測定結果の中での外れ値の検定
- ② 参照法及び代替法の結果の平均値の算出
- ③ 各室のレベルごとの 2 検体の標準偏差の算出
- ④ Cochran 検定で外れ値検定： 2 個の検体を測定したときの分散が異常に大きい場合の外れ値検定
- ⑤ 外れ値を除いて参照法及び代替法の結果の平均値の算出
- ⑥ 各室のレベルごとの 2 検体の標準偏差、分散の算出
- ⑦ 全室内平方和の算出
- ⑧ 室内併行標準偏差の算出
- ⑨ 室間標準偏差 S_L を求めるための若干複雑な計算
- ⑩ 各室のレベルごとの 2 検体の平均の算出
- ⑪ 室間平方和、室間分散の算出
- ⑫ Bias、 β -ETI の算出
- ⑬ 代替法平均値の 80%信頼性区間の算出
- ⑭ 信頼性区間と ± 0.5 との比較
- ⑮ 信頼性区間の上限値あるいは下限値が ± 0.5 の範囲を超えていたら、参照法の菌レベルごとの標準偏差の平均値を基にした新たな AL_s を算出し、それに基づいて再評価する。

以上の解析の結果、当該試験法は参照法の ISO 法と同等であるとの結論を得た。

D. 結論

本年度は ISO/TC34/SC9 の WG3 (メソッドバリデーション) 専門家会議に参加した。妥当性確認に関する中心文書 ISO 16140 分冊化の動向を把握した。また、各試験所が新たに妥当性確認された試験法を導入する際に行うべき検証の在り方を示す「NIHSJ 法検証ガイドライン (NIHSJ-30)」原案を作成した。また、新たな試験法を開発評価する際に必要となる妥当性確認について、「微生物試験法バリデーションの活用の手引き—POD および LOD の求め方と解釈—」を作成した。こうした一連の情報分析に基づき、検討中の NIHSJ 法の妥当性確認計画、結果の解析、評価に際して技術的助言を行った。

E. 研究発表

該当なし

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

	乾燥及び砂糖添加した低湿品 (水分活性<0.65)	ビスケット、チョコレート、菓子類、ハチミツ、砂糖、キャンディシロップ	X	X		X	X				X	
複数成分の食品又は食事成分	実質的に生の成分を含む複合食品（パイ、ケーキを除く）	冷蔵パスタ、サラダ、サンドウィッチ、チョコレートムース、パバロア	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	調理した複合食品	ホットミール	X		X	X	X	X	X	X	X	X
	凍ぐ（再）加熱できる冷凍品	調理済み冷凍食品、米飯、パスタ、ポローパンの真空パック品	X		X	X	X	X	X	X	X	X
	凍ぐ（再）加熱できる冷凍品	冷凍フライ、ピザ、惣め物入りクワッサン	X		X	X	X	X	X	X	X	X
	凍ぐ（再）加熱できる白粉	ポローパン胚粉									X	X
	凍ぐ（再）加熱できる惣婦品	惣水即席スープ	X					X	X	X		X
	マヨネーズを基にしたサラダ	ドレッシング付生野菜サラダ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	マヨネーズを基にしたサラダで生の成分を含むもの	加工成分を換んだサンドウィッチ	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	マヨネーズを基にしたサラダで加工成分を含むもの											X
	室温保存可能な酸性食品（pH<4.8）	ケチャップ、ソース、ドレッシング、マヨネーズ、マスタード	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ペットフード及び飼料	動物由来の成分	肉骨ミール、鶏肉羽毛ミール、フィッシュミール	X	X	X	X	X	X	X			X
	植物由来の成分	コーンミール、ダイズミール、野菜	X	X	X	X	X	X				X
	他の成分	酵母エキス、プロバイオティクスなど微生物製品	X	X	X	X	X	X				X
	乾燥食品（水分活性<0.7）	パンを固めたもの	X	X	X	X	X	X				X
	水分含有食品（水分活性>0.7）	新鮮な肉、ソーセージ、コロッケ	X	X	X	X	X	X				X
	白粉	肉、魚										X
	動物用飼料（牛、羊、豚用）	シリアル、粉米食品	X	X	X	X	X	X				X
	動物用飼料（家禽用）	シリアル、粉米食品	X	X	X	X	X	X				X
環境試料（食品又は飼料製品）	袋又は製品の残塊	試#取りサンプル、袋	X		X	X	X	X	X	X	X	X
	製造工程に使う水	再生洗浄水、処理水	X		X	X	X	X	X	X	X	X
一次生産物試料	動物の糞便	試#取りサンプル、糞便					X			X	X	
	環境試料及び糞便以外のもの	尿、消毒剤、家庭用水飲み物、ゴミ					X		X	X		

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食品微生物試験法の国際調和のための研究」

分担研究報告書

ボツリヌス試験法に関する研究

研究分担者	倉園久生	国立大学法人徳島大学
研究協力者	山崎栄樹	国立大学法人帯広畜産大学
	奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学
	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
	門間千枝	東京都健康安全研究センター
	梅田 薫	大阪健康安全基盤研究所
	幸田知子	公立大学法人大阪府立大学
	小崎俊司	公立大学法人大阪府立大学

研究要旨：“食品からの微生物標準試験法検討委員会（検討委員会）”においては、国際調和がとれた微生物試験法の作成が進められている。本研究班では同委員会の試験法作成方針に従ったボツリヌス菌に関する試験法（Technical Specification）の策定を目的としている。ボツリヌス菌については法規制等による菌株移動や取扱い設備についての制限が多く、検討委員会の試験法作成方針に含まれるバリデーション作業において実施可能な解析が限定的なものとなっているため、これまで本菌を使用したコラボスタディの実施方法について議論が進められてきた。本年度の研究においては、先行研究にて整備したボツリヌス毒素遺伝子試験法（NIHSJ-20TS-ST3）についてのコラボスタディ作業計画の構築に必要なデータの取得を行い、コラボスタディ作業計画について検討委員会の承認を得た後に、コラボスタディを開始した。コラボスタディ作業計画の構築あたっては、簡易DNA抽出キットがNIHSJ-20TSに適用可能なことを示すとともに、過去の国内食中毒事例及びISO 16140-3との整合性を勘案したコラボスタディで使用する食品マトリクス種の選定を行った。コラボスタディ作業計画においては、*C. botulinum* A型菌及びはちみつ試料を用いたコラボスタディによる室間再現性の検証とA型菌以外を用いたシングルラボスタディによる汎用性検証に作業を分けた計画を提案し、検討委員会において承認を得た。その後、4試験機関からなる作業部会にて検討を開始し、現在までにA,B及びF型菌についてNIHSJ-20TS-ST3の室間再現性及び汎用性が確認されている。今後、コラボスタディを完了させた後に、NIHSJ-20TS-ST4としての審議を経て、当該試験法の確定に向けた検討を加速化させたい。

A. 研究目的
コードックス委員会では食品の衛生に関する国際的な整合性の整備を目的として、各国の食品微生物基準を策定するためのガ

イドラインを示している。この中で食品微生物試験法に関してはISO法を標準とし、同法もしくは科学的に妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。一方で、国内の微生物規格基準は歴史的に独自に開発された試験法を採用してきた。食品流通のグローバル化が進む近年において、本邦で採用される試験法と国際的に利用されている試験法のハーモナイゼーションに対する要求は増しており、国際的通用性を持った標準試験法の国内における整備は急務の課題となっている。これらの課題を受け「食品からの微生物標準試験法検討委員会」（以下、検討委員会）において、現在、国際整合性を踏まえた主要食中毒原因微生物等の標準試験法の作成が進められてきた。これまで、複数の病原微生物・毒素に関する作業部会がデータ収集・解析を行い、同委員会でも妥当性等を協議することで標準試験法を策定している。

本研究では、ボツリヌス菌について国内で利用可能な国際的整合性を持った試験法の策定を目的とする。国内ではボツリヌスに関する検査法として食基発第0630002号・食監発第0630004号（平成15年6月30日）の通知「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」で食品中でのボツリヌス毒素産生性評価法が通知法として示されており、また、衛食第83号（平成10年8月26日）「イタリア産オリーブ加工品に関わる検査命令について」においてはオリーブ加工品からのボツリヌス毒素及びボツリヌス菌の検査方法が通知されているが、いずれの試験法においてもマウス試験によるボツリヌス菌の同定法が採用されている。一方で、国際的にはISO/TS

17191:2013 Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia（以下、ISO法）及びBAM chapter 17 *Clostridium botulinum*（以下、BAM法）が広く知られており、ISO法においてはボツリヌス毒素遺伝子をターゲットとした方法が、BAM法においてはマウス試験によるボツリヌス毒素検査、免疫学的手法によるボツリヌス毒素タンパク質検査及びボツリヌス毒素遺伝子検査が採用されている。先行研究において我々は、これらの国内外の試験法の比較検証を行い、検討委員会において整備・提案するボツリヌス検査法としてボツリヌス毒素遺伝子を検出指標とした試験法が妥当であるとの結論に至り、検討委員会が示す試験法作成方針に従い、ISO法を基に作成した標準試験法技術仕様書原案（NHISJ-20TS-ST1）を提案し、更にコラボスタディの実施に向け、NIHSJ-20TS-ST1を元にした標準作業手順書（NIHSJ-20TS-ST2）の整備を行った。さらにコラボ実施案としてNIHSJ-20TS-ST3を提案し、コラボスタディによるプロトコルの実効性評価の準備を進めてきた。

本年度は、NIHSJ-20TS-ST3についてコラボスタディ計画を確定させた上で、4機関においてコラボスタディを実施し、プロトコルの安定性と汎用性に関する評価を行うことを目的としたので報告する。

B. 研究方法

1.簡易 DNA 抽出キットの検出感度の解析

昨年度迄に整備した芽胞調整プロトコール（別添）に従って作製した芽胞液を 10 倍階段希釈後、はちみつ試料に添加し、同試料からのボツリヌス毒素遺伝子検出を NIHSJ-20TS-ST3 に従って実施した。DNA 抽出工程では培養液 0.8 mL を DNA 抽出用試料とし、Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics)を用いて DNA 抽出を行った。また、PCR 反応産物の検出には 2.0 % Agarose S (Nippon gene) in 0.5 x TBE buffer 及び Midori Green Direct を使用した。

2.一般食品に対する検出感度の解析

芽胞調整プロトコール（別添）に従って作製した芽胞液を 10 倍階段希釈後、ハヤシライスソースに添加し、同試料からのボツリヌス毒素遺伝子検出を NIHSJ-20TS-ST3 に従って実施した。培養液からの DNA 抽出及び PCR 解析は 1.のはちみつ試料に対する解析と同様に実施した。

3.コラボスタディの実施

コラボスタディの開始にあたって、NIHSJ-20TS-ST3、*C. botulinum* 62A 株芽胞調整プロトコール（別添）及び NIHSJ-20TS に関するコラボスタディ実施要領をコラボスタディ参加機関に配布した。併せて、コラボスタディに必要な試薬及び食品についても各機関へ同一ロットのものを配布した。*C. botulinum* 62A 株を用いたコラボスタディでは、別添に示すプロトコールに従って各機関で調整した芽胞菌液を食品試料添加用菌液として使用し、また、62A 株以外の株については同プロトコールに従い芽胞形成を評価し、十分な芽胞形成が認め

られない場合には、株毎に芽胞調整プロトコールの整備を行う事とした。各機関に配布した 3 種類のプロトコールに従って試験を実施した。

4.検討委員会における確認

コラボスタディ参加機関から構成される作業部会会議にてコラボスタディで使用する添加菌量（シングルラボスタディの結果に基づく）及び一般食品の種類について検討を行った後、第 74 回検討委員会（2021 年 10 月 12 日）に提案を行い、同会議にてコラボスタディの作業計画の改訂が行われた。その後、改定された作業計画に従って作業部会にて解析を実施し、第 75 回検討委員会（2021 年 12 月 20 日）及び第 76 回検討委員会（2022 年 3 月 15 日）において進捗状況の確認がなされた。

C. 研究結果

1.NIHSJ-20TS-ST3 に簡易 DNA 抽出キットを適用した際の検出感度の解析

NIHSJ-20TS-ST3 で示される DNA 抽出法は、ISO 法と同様に CTAB 法を採用している。しかしながら CTAB 法は手技が煩雑であり、クロロホルムの使用等、取扱い制限の多いボツリヌス菌を用いたコラボスタディ実施にあたっては、最適とは言い難いことが作業部会で議論された。第 71 回検討委員会では、これらの点を提起し、コラボスタディに DNA 抽出キットを用いることが承認され、昨年度までの研究において、市販簡易 DNA 抽出キットのうち Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics)のボツリヌス菌純培養液からの DNA 抽出効率が CTAB 法に比べて 1,000 倍以上高いことが確認されたことを受け、

本年度は同キットを NIHSJ-20TS-ST3 に適用した際のボツリヌス毒素遺伝子検出効率を検討した。その結果、当該キットを使用した場合、10 spore cfu/25g はちみつ試料の濃度で安定的に添加回収可能であることが確認され、CTAB の代替として使用可能であると判断された（表 1 及び 2-1）。本結果について、第 74 回検討委員会で報告を行い、コロボスタディでの使用が承認された。

2. 一般食品マトリクスの選定

NIHSJ-20TS-ST3 では、はちみつと一般食品に対して異なる試料調製プロトコールが示されており、コロボスタディでは一般食品とはちみつを個別に実施する必要がある。

国内で試験対象となり得る食品種の推定は困難であるため、本試験法が種々の食品に適用可能かを見極める検証の意義は小さく、コロボスタディの期間・規模に見合ったものではないと考えられた。そこでコロボスタディでは食品を 1 菌種あたり 1 種とし、NIHSJ-20TS-ST3 に示す一般食品用の増菌方法が適切に実施可能かを検証する事とした。使用食品は、A,B,F 型菌に対しては過去に国内のボツリヌス食中毒事例で問題となったために行政対応がなされている食品種であり、かつ、ISO16140-3:2021 の Annex A でボツリヌス菌に対する試験に適した食品カテゴリー（Multi-compornent food or meal components, Ready to (re)heat food: refrirated）とも合致する「容器包装詰低酸性食品」を、E 型菌に対しては過去に多くの国内ボツリヌス食中毒事例が報告されている「いずし」を選定し、第 74 回検討委員会にて提案を行い、同食品を用いたコロボスタディの実施について承認された。

3. 一般食品を用いたシングルラボスタディ

コロボスタディでの一般食品に対する添加菌量を決定するため、一般食品に対する *C. botulinum* 62A 株を用いた添加回収試験をシングルラボで検討した。食品マトリクスである容器包装詰低酸性食品としては、過去に国内での食中毒事例が報告されているものの中で、取扱い易さを考慮し、ハヤシライスソース（pH: 5.2、水分活性：>0.98）を選択した。同食品マトリクスに対し、*C. botulinum* 62A 株を用いた添加回収試験を実施した結果、1,000 spore cfu/25g 試料で安定的に陽性となることが確認された（表 4-1）。NIHSJ-20TS では下表に示す様に、はちみつでは試料の 25 g 相当を増菌培養に供するのに対し、一般食品では試料の 0.1 g 相当を増菌培養に供するプロトコールとなっている。このことから、ハヤシライスソースをマトリクスとして使用した際の試験結果が妥当と考えられた。

食品種	安定的に陽性の結果が得られる菌添加量	増菌培養に供する食品実量	増菌培養に持ち込まれる菌量（計算値）
はちみつ	10 spore cfu / 25 g	25 g	10 spore cfu
一般食品	1000 spore cfu / 25 g	0.1 g	4 spore cfu

上記の結果に基づき、コロボスタディで行う一般食品に対する A 型菌以外を用いた解析（図 1）でも 1,000 spore cfu/25g 試料を基準とした解析を実施することとした。

4. コロボスタディ作業計画の改訂

法規制等の多くの制限の下で実施されるボツリヌス菌を用いたコロボスタディの実施にあたっては、取扱いが容易な他種の病原体とは異なるスキームを構築する必要性が議論された。

本試験法は ISO/TS 17919 に基づいて作成されており、原則として国際整合性を満

たしているため、コラボスタディの目的としては、「同試験法の室間再現性の検証」とする事が妥当と考え、コラボスタディでははちみつ試料に対する *C. botulinum* 62A 株添加回収試験のみとすることを第 74 回検討委員会にて提案した。加えて、添加菌量として、下記の 3 レベルでの実施を提案した。

菌レベル	添加菌量	適用
高レベル	100 spore cfu/25 g	検出率 100% の高濃度試験
低レベル	10 spore cfu/25 g 1 spore cfu/25 g	検出限界付近での試験
無菌	添加なし	検出率 0%

更に、過去の食中毒事例の発生状況等を勘察し、B 型菌 (Okra 株) については、はちみつと一般食品、E 型菌 (Biwako 株) 及び F 型菌 (Langeland 株) については、はちみつの喫食を通じた健康被害との明確な関連性が見受けられない実態を踏まえ、一般食品についてのみ、それぞれ 2 濃度 (はちみつ試料では 10 及び 0 spore cfu/25g 試料、一般食品では 1000 及び 0 spore cfu/25g 試料) での添加回収試験を実施し、NIHSJ-20TS-ST3 が複数の菌型-食品の組み合わせについて利用可能なプロトコールであることを検証することとした。これらの提案については第 74 回検討委員会にて承認され、コラボスタディ計画を図 1 の通り改訂した。

5. コラボスタディの結果

コラボスタディの実施にあたっては、それぞれのコラボスタディ参加機関に対して NIHSJ-20TS-ST3、*C. botulinum* 62A 株芽胞調整プロトコール、及び NIHSJ-20TS に関するコラボスタディ実施要領を配布し、コラボスタディの実施を依頼した。

芽胞調整プロトコール (別添) を用いたスパイク用芽胞菌液の作成については、現在までに試験機関 2 (B 型菌担当機関) 及び試験機関 4 (F 型菌担当機関) より結果が報告

され、同プロトコールを用いて、各機関で A,B,F 型菌のいずれにおいても添加試験に十分な芽胞量 (1×10^7 spore cfu/mL 程度) が得られる事が確認された。

コラボスタディ実施結果を表 2-4 に示した。これ迄に試験機関 2 (B 型菌担当) 及び試験機関 4 (F 型菌担当) より結果が報告されている。はちみつ及び *C. botulinum* 62A 株を用いた室間再現性の検証の結果、試験機関 2 (表 2-2) 及び 4 (表 2-3) のいずれにおいても主幹機関 (表 2-1) と同等の結果が得られた。試験機関 2 で行った B 型菌 (Okra 株) を用いた試験では、はちみつ (表 3) 及び一般食品 (表 4-2) それぞれについて A 型菌と同等の感度で検出可能であった。また、試験機関 4 で行った F 型菌 (Langeland 株) を用いた試験では、一般食品に対する添加回収試験成績として、A 型菌と同等の検出感度が確認された (表 4-3)。

D. 考察

本年度は NIHSJ-20TS-ST3 コラボスタディ作業計画を構築し、コラボスタディを開始した。コラボスタディ作業計画の構築に必要な予備検討を行い、コラボスタディ計画を改訂し、検討委員会での審議を経てコラボスタディ実施が承認された。コラボスタディは現在までに A,B,F 型菌についての解析結果が得られており、E 型菌については解析が進められているところである。次年度はこれらの解析を進め、試験法としての妥当性評価を通じて、試験法の確定に向けた検討を予定している。

2021 年 1 月に ISO 16140-3
Microbiology of the food chain -Method

validation- Part3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory が示された。同文書では標準試験法あるいは国際的な第三者認証機関により妥当性が確認された方法を利用しようとする試験室が適切な感度で当該試験を実施する能力をもっているかを検証するための手順が示されている。同文書内の Clause 5 (Qualitative methods – Technical protocol for verification) には各試験室が妥当性確認されている標準試験法（定性法）を使用した際に、適切な結果を得る能力があるかを検証するための具体的な手順が記載されており、3種の選択可能なプロトコル（Protocols 1-3）が提示されている。このうち Protocol 1 及び 2 では利用しようとする試験法の LOD₅₀ に対して 1~9 倍濃度の添加菌量で添加回収試験を行った際の結果に基づき試験室の能力を評価する事となっている。本研究では、コラボスタディで得られたデータからはちみつ試料に対して *C. botulinum* 62A 株を添加した際の LOD₅₀ を算出する予定としている。算出された LOD₅₀ は ISO 16140-3 に基づいて試験能力を検証しようとする試験室に対して必要なデータを示すものである。現在、検討委員会バリデーション作業部会では ISO 16410-3 に基づくベリフィケーションガイドラインを作成中であり、今後同ガイドラインと本研究で得られる成果を連携することで、国内でのベリフィケーションのモデルケースを示したいと考える。

なお、本年度開催された検討委員会では NIHSJ-20TS-ST3 について以下の課題が挙げられている。

- ・一般食品を低酸性食品とそれ以外に分け、異なる液体培地を使用するように示しているため、酸性度の高い食品の定義づけが必要である。
 - ・PCR 反応液組成は ISO 法に基づいた表記となっているが、国内販売される反応試薬組成を考慮に入れて、汎用性を高めた表現を検討すべきである。
 - ・コラボスタディでは各毒素型につき 1 株での評価を行っているが、妥当性評価結果に基づく本試験法の汎用性を考慮すると、食中毒由来株や、E 型で問題となる *C. butyricum*、F 型で問題となる *C. baratii* 等を検討対象として含める必要性を作業部会で議論すべきである。
 - ・PCR は 2 回実施する計画となっているが、迅速性や簡便性を考慮した実施案を記述面で検討する必要がある。
 - ・簡易 DNA 抽出キットの適用に関する記述方法を検討する必要がある。
- 作業部会では今後、上記の指摘事項について検討を行う予定としている。得られた結果については、検討委員会に提出し、最終版としての作成を目指したい。

E. 結論

ボツリヌス毒素遺伝子試験法について、コラボスタディを進め、以下の知見を得た。

- 1) 簡易 DNA 抽出キットを適用した際の検出感度を検討し、妥当性を確認できた。
- 2) コラボスタディで用いる一般食品として、A,B,F 型菌では容器包装詰低酸性食品を、E 型菌ではいずしを用いることとした。
- 3) 改訂コラボスタディ計画に沿って、コラボスタディを開始し、現在迄に A,B,F 型菌について試験法の安定性及び汎用性を確認

した。

次年度にはコラボスタディ及び妥当性の解析を完了し、議論を経た上で必要な文書改定を行った上で、同試験法の確定を目指したい。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 引用文献

- ・ ISO/TS 17919:2013 Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia
- ・ BAM chapter 17 *Clostridium botulinum* (<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm>)
- ・ 食品衛生検査指針 微生物編 (2018) 第2章 11.ボツリヌス菌
- ・ ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- ・ ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain -Method validation- Part3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory

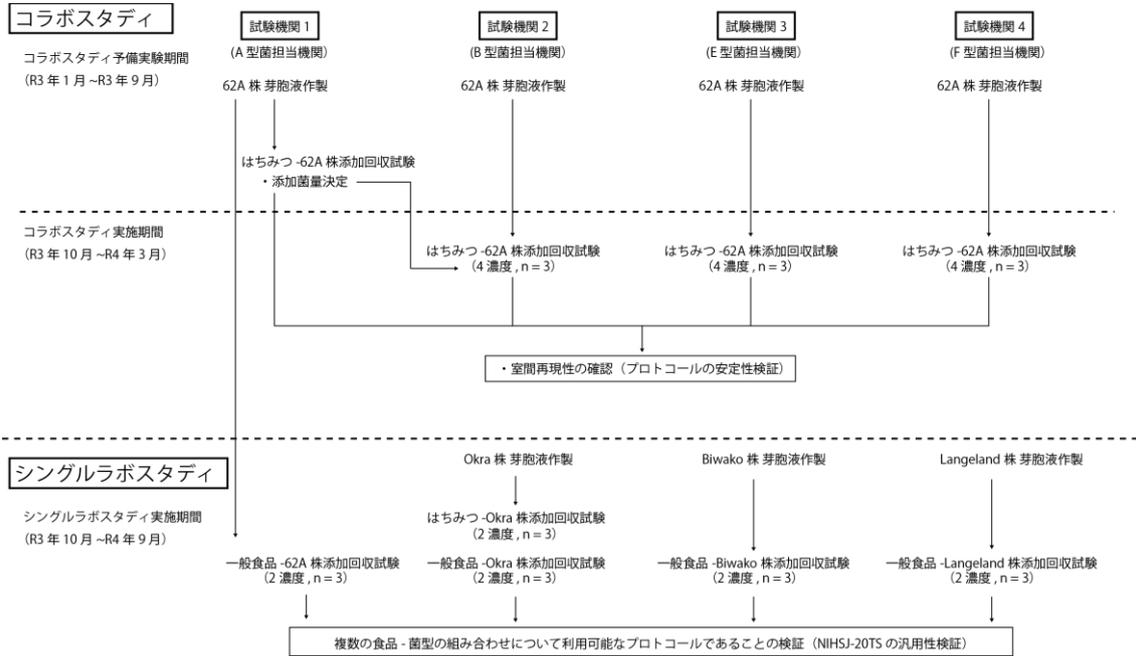


図1 コラボスタディ作業計画

表 1 はちみつへの *C. botulinum* 62A 株添加回収試験結果 (CTAB 法使用)

		添加 Spore 菌数 (cfu/25g はちみつ)						
		772.5	77.25	7.725	0.773	0.077	0.0077	0.0008
PCR(1 回目)	上清	0 (1)	0(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(1)	0(1)
	沈殿	1 (1)	2(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(1)	0(1)
PCR(2 回目)	上清	1 (1)	1(3)	1(2)	1(3)	1(3)	0(1)	0(1)
	沈殿	1 (1)	3(3)	2(2)	1(3)	2(3)	0(1)	0(1)
総合判定		1 (1)	3(3)	2(2)	1(3)	2(3)	0(1)	0(1)

DNA 抽出法として CTAB 法を使用した。各数値は Spore 菌数添加試料からのボツリヌス毒素 A 型遺伝子検出回数を示す (括弧内の数値は試行回数を示す)。

表 2-1 はちみつへの *C. botulinum* 62A 添加回収試験結果 (簡易 DNA 抽出法使用) (試験機関 1: 主幹機関)

		添加 Spore 菌数 (cfu/25g はちみつ)								添加
		1000	100	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	なし
PCR(1 回目)	上清	0 (2)	0 (3)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
	沈殿	1 (2)	0 (3)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
PCR(2 回目)	上清	2 (2)	1 (3)	0 (5)	1 (5)	0 (5)	1 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
	沈殿	2 (2)	2 (3)	5 (5)	2 (5)	1 (5)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
総合判定		2 (2)	3 (3)	5 (5)	2 (5)	1 (5)	1 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)

DNA 抽出法として Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics)を使用した。各数値は Spore 菌数添加試料からのボツリヌス毒素 A 型遺伝子検出回数を示す (括弧内の数値は試行回数を示す)。

表 2-2 はちみつへの *C. botulinum* 62A 株添加回収試験結果 (簡易 DNA 抽出法使用) (試験機関 2)

		添加 Spore 菌数 (cfu/25g はちみつ)				添加
		100	10	1		なし
PCR(1 回目)	上清	0 (3)	0 (3)	0 (3)		0 (3)
	沈殿	0 (3)	0 (3)	0 (3)		0 (3)
PCR(2 回目)	上清	0 (3)	0 (3)	0 (3)		0 (3)
	沈殿	3 (3)	2 (3)	0 (3)		0 (3)
総合判定		3 (3)	2 (3)	0 (3)		0 (3)

DNA 抽出法として Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics)を使用した。各数値は Spore 菌数添加試料からのボツリヌス毒素 A 型遺伝子検出回数を示す (括弧内の数値は試行回数を示す)。

表 2-3 はちみつへの *C. botulinum* 62A 株添加回収試験結果 (簡易 DNA 抽出法使用) (試験機関 4)

		添加 Spore 菌数 (cfu/25g はちみつ)			添加
		100	10	1	なし
PCR(1 回目)	上清	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
	沈殿	0 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
PCR(2 回目)	上清	2 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
	沈殿	2 (3)	3 (3)	2 (3)	0 (3)
総合判定		2 (3)	3 (3)	2 (3)	0 (3)

DNA 抽出法として Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics)を使用した。各数値は Spore 菌数添加試料からのボツリヌス毒素 A 型遺伝子検出回数を示す (括弧内の数値は試行回数を示す)。

表 3 はちみつへの *C. botulinum* Okra 株添加回収試験結果 (簡易 DNA 抽出法使用)

		添加 Spore 菌数 (cfu/25g はちみつ)			添加
		10			なし
PCR(1 回目)	上清	0 (3)			0 (3)
	沈殿	0 (3)			0 (3)
PCR(2 回目)	上清	0 (3)			0 (3)
	沈殿	3 (3)			0 (3)
総合判定		3 (3)			0 (3)

DNA 抽出法として Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics)を使用した。各数値は Spore 菌数添加試料からのボツリヌス毒素 B 型遺伝子検出回数を示す (括弧内の数値は試行回数を示す)。

表 4-1 ハヤシライスソースへの *C. botulinum* 62A 株添加回収試験結果（簡易 DNA 抽出法使用）

		添加 Spore 菌数 (cfu/25g ハヤシライスソース)				添加
		10000	1000	100	10	なし
PCR(1 回目)	加熱なし	3 (3)	1 (4)	0 (4)	0 (1)	0 (4)
	加熱あり	3 (3)	3 (4)	1 (4)	0 (1)	0 (4)
PCR(2 回目)	加熱なし	3 (3)	4 (4)	2 (4)	0 (1)	0 (4)
	加熱あり	3 (3)	4 (4)	1 (4)	0 (1)	0 (4)
総合判定		3 (3)	4 (4)	2 (4)	0 (1)	0 (4)

DNA 抽出法として Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) を使用した。各数値は Spore 菌数添加試料からのボツリヌス毒素 A 型遺伝子検出回数を示す（括弧内の数値は試行回数を示す）。

表 4-2 ハヤシライスソースへの *C. botulinum* Okra 株添加回収試験結果（簡易 DNA 抽出法使用）

		添加 Spore 菌数 (cfu/25g ハヤシライスソース)		添加
		10000	1000	なし
PCR(1 回目)	加熱なし	3 (3)	2 (3)	0 (3)
	加熱あり	3 (3)	3 (3)	0 (3)
PCR(2 回目)	加熱なし	3 (3)	3 (3)	0 (3)
	加熱あり	3 (3)	3 (3)	0 (3)
総合判定		3 (3)	3 (3)	0 (3)

DNA 抽出法として Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) を使用した。各数値は Spore 菌数添加試料からのボツリヌス毒素 B 型遺伝子検出回数を示す（括弧内の数値は試行回数を示す）。

表 4-3 ハヤシライスソースへの *C. botulinum* Langeland 株添加回収試験結果（簡易 DNA 抽出法使用）

		添加 Spore 菌数 (cfu/25g ハヤシライスソース)			添加
		10000	1000	100	なし
PCR(1 回目)	加熱なし	1 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
	加熱あり	1 (3)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
PCR(2 回目)	加熱なし	3 (3)	3 (3)	1 (3)	0 (3)
	加熱あり	3 (3)	3 (3)	1 (3)	0 (3)
総合判定		3 (3)	3 (3)	2 (3)	0 (3)

DNA 抽出法として Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) を使用した。各数値は Spore 菌数添加試料からのボツリヌス毒素 F 型遺伝子検出回数を示す（括弧内の数値は試行回数を示す）。

C. botulinum 62A 株芽胞液調整プロトコール

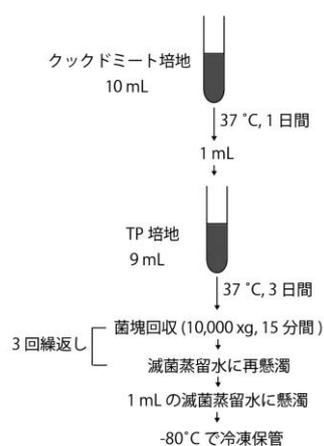
1. はじめに

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

2. 芽胞液調整手順

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

3. フローチャート



4. 芽胞浮遊液の芽胞濃度の測定

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

5. 培地組成および作成方法

① クックドミート培地

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

培地は使用前に沸騰水浴で 15 分間処理した後に急速水冷して脱気する。

基礎組成：10 mL あたり

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

② TP 培地

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

培地は使用前に沸騰水浴で 15 分間処理した後に急速水冷して脱気する。

基礎組成：1,000 mL あたり

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

③ 卵黄加変法 GAM 寒天培地

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

基礎組成：500 mL あたり

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

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

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

⑤ 生理食塩水

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

基礎組成：500 mL あたり

NaCl	8.5 g
蒸留水	1,000 mL
	pH 7.0 ± 0.2

研究分担者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長）

研究協力者 下島優香子（相模女子大学）

森 哲也（東京顕微鏡院）

川瀬 遵（島根県保健環境科学研究所）

研究要旨：食品の微生物規格基準等に係る試験法は培養法をベースに構築されてきた。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も菌の生化学的および／もしくは血清学的特性を利用したものである。近年のゲノム解析技術の発展は著しく、サルモネラでは約30万、大腸菌では20万株以上のゲノム情報が蓄積されている。ゲノム情報は、遺伝子検査法の発展にも影響し、研究段階では多様な遺伝子検査法が報告されている。微生物規格基準等に係る公的な試験法においても、遺伝子検査法を取り入れる動きがある。国際的な標準試験法を策定する国際標準化機構（ISO）でも志賀毒素産生性大腸菌をはじめとした個別の微生物試験法に遺伝子検査法が取り入れられている。本研究では食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、国際整合性に適合した遺伝子検査法を国内で用いる微生物試験法に導入、実施するためのガイドラインの検討を目的として検討を進めた。本年度はリアルタイムPCRに係るISO文書の検討、和訳、並びにISO文書を基軸とした、遺伝子試験法のガイドライン案の作成を行い、ST2案が了承され、以後ST4（最終ステージ）の議論へ進むこととなった。

A. 研究目的

食品の微生物規格基準等に係る試験法は培養法をベースに構築されてきた。その主たる工程は増菌、選択分離培養、同定からなる。いずれの工程も菌の生化学的および／もしくは血清学的特性を利用したものである。近年のゲノム解析技術の発展は著しく、腸管系細菌感染症起因菌に係るゲノムデータベース Enterobase では、サルモネラで30万、大腸菌で20万株以上のゲノム情報が蓄積されている。ゲノム情報は、遺伝子検査法の発展にも影響し、研究ベースでは多様な遺伝子検査法が報告されている。

微生物規格基準等に係る試験法でも遺伝子検査法を取り入れる動きがある。国際的な標準試験法を策定する国際標準化機構（International Organization for Standardization、ISO）でも志賀毒素産生性大腸菌をはじめとした個別の微生物

試験法において遺伝子検査法が取り入れられている。本研究では食品における遺伝子検査法について情報収集を行い、国内において、国際整合性に適合した遺伝子検査法を導入、実施するためのガイドラインの検討を目的としている。

B. 研究方法

国際整合性の観点から、国際標準試験法として扱われているISO文書のうち、リアルタイムPCR法、定量PCR（quantitative PCR、qPCR）法に関する文書として、ISO 20395、ISO 22118、ISO 22119を和訳し、その内容を検討した。

上記文書をベースにリアルタイムPCRに係る遺伝子試験法のガイドライン案を作成した。

本研究に係る文書の検討、ガイドライン案の作成及び検討については、昨年度設置した「遺伝子検査法に関する作業部会」（当該分担研究者、下島

優香子先生（相模女子大学）、森哲也先生（東京顕微鏡院）、川瀬遵先生（島根県保健環境科学研究所）、岡田由美子先生（国立医薬品食品衛生研究所）、朝倉宏先生（国立医薬品食品衛生研究所）を中心に行い、その内容を「バリデーション作業部会」及び「食品からの微生物標準試験法検討委員会（以下、本委員会）」に諮り修正を行った。

C. 研究結果および考察

ISO 文書の中でリアルタイム PCR 法の一般的な事項に関連するものとしては、ISO 20395、ISO 22118、ISO 22119 が該当した。各々の表題（和訳）は、以下の通りであった。

・ ISO 20395：バイオテクノロジー — 標的核酸配列の定量法（qPCR）の性能特性

・ ISO 22118：食品および動物用飼料の微生物学 — 食品媒介性病原体の検出と定量化のためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR） — 性能特性評価にあたっての要求事項

・ ISO 22119：食品および動物飼料の微生物学 — 食品媒介性病原体の検出のためのリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR） — 一般要求事項および定義

当該文書を邦訳し、作業部会で内容を精査した後、邦訳文書案を検討委員会にて説明した。ISO 20395 は最も詳しく、試験法のデザインから妥当性確認まで多岐にわたる記載があった。しかしながら、当該文書の分野がバイオテクノロジーであることから、ISO/TC34/SC9（食品からの微生物試験法に係る分科会）による文書である ISO 22118、ISO 22119 を骨子として、ガイドライン案を作成する方針となった。

その後、作業部会では、ISO/TC34/SC9 による文書 ISO 22119 がリアルタイム PCR 実施に係る一般事項を規定していたことを確認し、本文書をベースとして、ISO 22118 に記載の試験法の性能に関する要求事項を付加するガイドライン案を作成、検討した。その後、当該案に ISO 20395 の

内容を付加し、「食品からの病原体検出におけるリアルタイム PCR 試験法実施に関するガイドライン」案を NIHSJ-38TS-ST2 案として作成し、検討委員会において説明を行い、その内容を議論した（資料1）。

本委員会において当該案は了承され、検討委員会及びバリデーション作業部会からの意見を収集した上で、次回より ST4 案として検討することとなった。

D. 結論

食品からの微生物試験法は培養法をベースに構築されている。一方、多様な微生物に迅速に対応するために、PCR 法及びリアルタイム PCR 法は広く普及しており、こうした遺伝子検査法を導入することは有益であると考えられる。ISO においても、遺伝子検査法を使った個別の試験法はまだそれほど多くはないが、今後ますます遺伝子検査法を使った試験法が開発評価を受け、標準化されていく流れも予想される。これらの試験法が国際整合性に適合した試験法となるよう、国際基準に沿ったガイドライン案の策定は重要と考えられる。

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権取得状況

1 特許取得

なし

2 実用新案

なし

3 その他

なし

食品からの病原体検出におけるリアルタイム PCR 試験法実施に関するガイドライン NIHSJ-38TS-ST2

1 はじめに

ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）は、検体中の標的遺伝子を増幅し、食品からの微生物試験において迅速、高感度、特異的な検出法を提供する。通常の PCR 試験法では、反応後に生成された PCR 産物の検出工程を伴う。一方、リアルタイム PCR 試験法は、PCR による増幅反応を実施中に生成された特異的な遺伝子増幅産物の検出を可能とする手法である。検出原理は PCR 反応中における蛍光標識物質の励起による。

本ガイドラインは特にリアルタイム PCR に関する国際的な要求事項 ISO 22119、ISO 22118、ISO 20395 を参考に作成されたものであり、「食品からの病原体検出における PCR 試験法実施に関するガイドライン」（NIHSJ-34TS）と関連する。

2 適用範囲

本ガイドラインは、食品からの微生物試験法においてリアルタイム PCR を使用する際に、ISO 等の国際的要求事項を考慮する際の参考資料として使用できる。本ガイドラインは主に 2 つの内容からなる：1) リアルタイム PCR 試験法実施に関する要求事項、2) リアルタイム PCR 試験法の性能特性、品質確保に関する要求事項。1) は主に試験法の利用者、2) は主に試験法の開発・評価者を対象とする。

なお、本ガイドラインで示す方法には、危険を伴う物質、操作、機器の使用を含む可能性があるが、本ガイドラインではそれらに関する情報は含めない。したがって、実施者は適切な教育を受け、安全および衛生等を担保する環境を構築し、また試験に先立ち関連する法的制約の適用性を判断する責任を有する。

3 原理 {試験利用者} {試験開発者}

3.1 全般

リアルタイム PCR 試験は、一般的に以下の工程から成る。

- a) 蛍光プローブの存在下での PCR による特異的標的配列の増幅
- b) 各増幅サイクルでの蛍光プローブの結合
- c) 各サイクルでの励起による蛍光シグナルの生成
- d) 光学検出システムによる蛍光シグナルのモニタリング
- e) データ分析

注釈 スクリーニングの目的で、SYBR Green などの DNA 二本鎖結合色素からの蛍光シグナルも使用できる。

3.2 リアルタイム PCR用のプローブ

プローブは、PCR アッセイにおいてプライマーと共に使用する、標的配列に特異的なオリゴヌクレオチドである。生じる蛍光シグナルの強さは、特異的な PCR 産物の生成量に比例する。

3.2.1 加水分解プローブ

プローブの一端に、発光スペクトルを有する蛍光レポーター分子を持ち、これはもう一方の末端に位置する第 2 の分子によってクエンチングされる。加水分解プローブを用いたリアルタイム PCR 反応の概要を図 1 に示す。

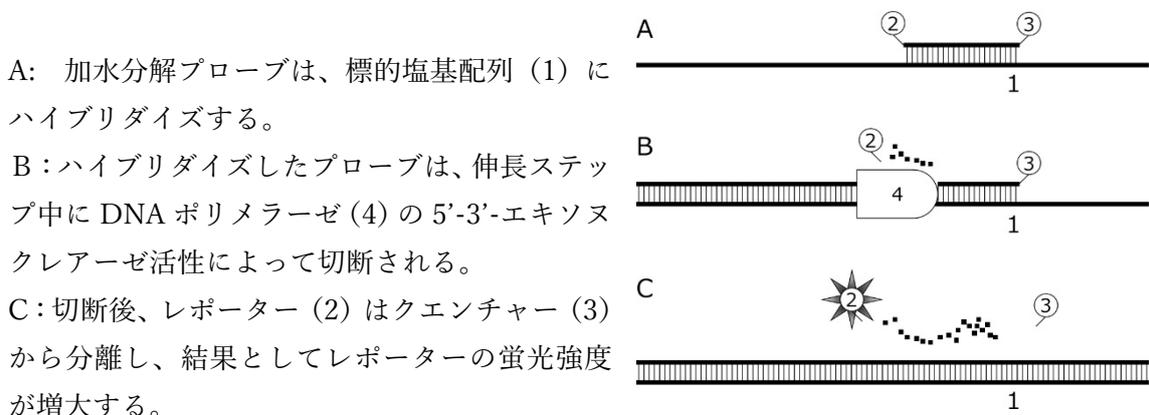


図 1. 加水分解プローブを用いたリアルタイム PCR 反応の概要

3.2.2 ハイブリダイゼーションプローブ

ハイブリダイゼーションプローブを用いたリアルタイム PCR 反応の概要を図 2 に示す。

A: ハイブリダイゼーションプローブは、2 種類から構成され、各々が蛍光分子を 1 つ含み、一方がドナーの役割 (3) を、もう一方がアクセプター (2) の役割を果たし、標的塩基配列 (1) にハイブリダイズする。

B: ハイブリダイゼーション後、両方の色素が接近するため、励起時に蛍光共鳴エネルギー移動が起こり、アクセプター分子が検出可能な蛍光シグナルを生成する。

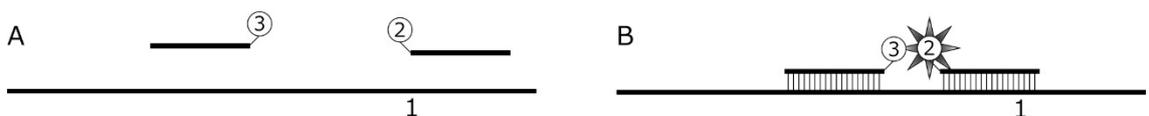


図 2. ハイブリダイゼーションプローブを用いたリアルタイム PCR 反応の概要

アクセプタープローブの3'末端は、PCR中にプローブからの伸長反応が起こらないよう修飾されていることが望ましい（例：3'末端のリン酸化）。

3.2.3 分子ビーコン

分子ビーコンを用いたリアルタイムPCR反応の概要を図3に示す。

A：分子ビーコンは、ハイブリダイゼーション温度で相補的標的配列（1）に結合すると、構造が変化してステム（分子内二重鎖；4）が乖離する。これにより、ステム部分より長く、より安定したプローブ-標的ハイブリッドが形成される。

B：これによりレポーター（2）とクエンチャー（3）が離れ、結果としてレポーターからの蛍光シグナルを生じさせる。

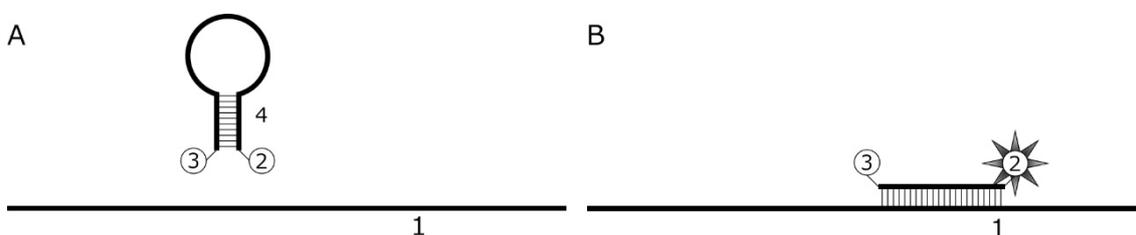


図3. 分子ビーコンを用いたリアルタイムPCR反応の概要.

4 検査室の一般要件

検査室の一般要件は、NIHSJ-34TSに従うものとする。

5 試薬および実験材料 {試験利用者} {試験開発者}

5.1 全般

分析の際は基本的に、分子生物学的用途に適した等級の試薬および水（滅菌蒸留水、脱塩水または核酸フリーおよびヌクレアーゼフリーの純度の水）を用いる。

増菌培地の成分など、蛍光を発して検出システムに干渉するような試薬または消耗品の使用を避ける。

5.2 DNAポリメラーゼおよびリアクションバッファー

5.2.1 DNAポリメラーゼ

PCRには耐熱性ポリメラーゼ（逆転写酵素活性を持つ場合もある）が用いられる。耐熱性ポリメラーゼは製造業者の使用説明書に従って使用する。

加水分解プローブを使用する場合、DNAポリメラーゼは5'-3'-エキソヌクレアーゼ活性を有するものを使用する。RNA分析の場合、逆転写酵素とDNAポリメラーゼの混合物または逆転写酵素活性を持つDNAポリメラーゼが必要である。

DNAポリメラーゼには、それぞれ異なる実験条件が必要な場合がある。

5.2.2 リアクションバッファー

リアクションバッファーは、NIHSJ-34TS に従うものとする。

5.3 デオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP)

dNTP は、NIHSJ-34TS に従うものとする。

5.4 プライマー

プライマーは、NIHSJ-34TS に従うものとする。

5.5 リアルタイム検出のための蛍光プローブ

プローブ用オリゴヌクレオチドは、適切な品質で、特異的 PCR 産物に存在する配列を検出するように設計されているものとする。

5.6 内部増幅コントロール

被験試料の増幅効率、試料の DNA 抽出物と同じ反応チューブに添加された内部コントロール DNA を用いて検証できる。内部コントロール DNA の増幅には、標的 DNA の増幅と同じプライマーペア (競合型内部増幅コントロール) または別のプライマーペア (非競合型内部増幅コントロール) のいずれかを使用できる。標的に対する反応系と内部増幅コントロールに対する反応系は、ほぼ等しい増幅効率になることが望ましい。添加される内部コントロール DNA の濃度は、わずかな阻害も検出し、同時に統計的に再現性のある陽性結果となるために、可能な限り低くすることが望ましい。さらに、内部増幅コントロールが標的の検出レベルに影響を与えないことを確認することが望ましい。以下のようにして検出レベルを下げないようにする。

- ー 競合型内部増幅コントロールの増幅効率を標的 DNA よりわずかに低くする。
- ー 非競合型内部増幅コントロール用プライマーの濃度を低くする。

内部増幅コントロールは、PCR 前の段階で試料に加えてもよい、その場合、同時にプロセスコントロールもしくは抽出コントロールの役割も果たす。

5.7 キャリーオーバーを防ぐための試薬

キャリーオーバー防止試薬は、NIHSJ-34TS に従うものとする。

6 装置 {試験利用者} {試験開発者}

6.1 全般

ハードウェアは、NIHSJ-34TS に従うものとする。

検査室は、用いる試験法に適した、適正に保守された機器を用いるものとする。

6.2 特殊な装置および機器

通常の検査室機器、および NIHSJ-34TS に示される機器に加え、以下の装置が用いられるものとする。

6.2.1 以下を備えたサーマルサイクラー：

- a) 蛍光分子の励起に適したエネルギー源。
- b) PCR 中に生成された蛍光シグナルの検出のための、光学検出システム。

内部コントロールの使用には、複数の波長のシグナルを検出できる必要がある。

6.2.2 100°Cまでの加熱および増幅サイクルの温度変化に損傷することなく対応可能、且つ、増幅過程中に生成される蛍光シグナルに影響を及ぼさない反応チューブまたは反応プレートおよびキャップまたはシール。

7 被験試料 {試験利用者} {試験開発者}

被験試料の条件として、当該食品マトリクス由来の核酸抽出物に、PCR を阻害する、もしくは蛍光に干渉する物質が含まれないことが挙げられる。

8 手順 {試験利用者} {試験開発者}

8.1 試料調製

被験試料の核酸抽出および／または精製は、NIHSJ-34TS 等に従って、適切に実施されることが望ましい。

得られる核酸溶液には、十分な量で十分な品質の標的核酸が含まれていることが望ましい（目安としては、反応に使う被験液中に 1 個～10 個の標的微生物またはウイルスゲノムに相当する量を検出できる定性分析によって、検出可能な量）。反応に使う被験液中の少量の標的を定性分析するためには、標的微生物の増菌および／もしくは濃縮、またはウイルスの濃縮が一般的に必要とされる。

得られた核酸溶液には、明白な PCR 阻害効果、蛍光干渉をもたらす物質が含まれていてはならない。

注釈：蛍光は、多くの場合、色のついた反応容器および増菌培地の成分に由来する。

定量分析では、得られる核酸溶液中の標的微生物またはウイルスの核酸の量が再現性の高いものとなるような試料調製手順が必要となる。

なお、試料の品質については「13 試料の品質管理」も参照されたい。

8.2 増幅

8.2.1 全般

特異的核酸の増幅は、規定のリアクションバッファー内で、オリゴヌクレオチドプライマー、デオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP)、および蛍光プローブの存在下で DNA ポリメラーゼにより触媒された反応を通じて、*in vitro* で実施される。

反応混合液のセットアップにおいても色のついたピペットチップおよび反応容器の使用を避けるものとする。反応容器外の粉塵粒子による汚染を防ぐよう注意を払う。

蛍光プローブのシグナルは、増幅過程中にモニタリングされる。

RNA は、最初に逆転写によって相補的 DNA 配列に転写されている必要がある。

8.2.2 サイクリングパラメータ

8.2.2.1 加水分解プローブ

一般的に増幅過程は、①熱変性のステップ、②プライマーとプローブのアニーリングおよ

び伸長を組み合わせたステップの、2ステップサイクリングプロトコルを用いる。蛍光シグナルは、アニーリングおよび伸長ステップ中にモニタリングされる。

8.2.2.2 ハイブリダイゼーションプローブ及び分子ビーコン

一般的に増幅過程は、①熱変性ステップ、②プライマーとプローブもしくは分子ビーコンのアニーリングステップ、③伸長ステップの3ステップサイクリングプロトコルを用いる。蛍光シグナルは、アニーリングステップ中にモニタリングされる。

8.3 コントロール

NIHSJ-34TS に概説されているコントロールを用いるものとする。

リアルタイム PCR では、標的となる病原体および内部増幅コントロールのシグナルを区別して同時に検出することが可能である。そのため内部増幅コントロールの使用が推奨される。

RNA を標的とする試験では逆転写酵素 (RT) を添加しない RT(-)のコントロールの使用が推奨される。

定量分析では、試験結果を評価もしくは校正するための陽性コントロールが必要である。

8.4 蛍光データの分析

8.4.1 増幅曲線

8.4.1.1 全般

増幅過程に、検出可能な PCR 産物の数が増加する。蛍光シグナルの増加は、PCR 産物の増加と関係しており、この関係は増幅曲線で図示される。一般的な増幅曲線は、PCR の進行を特徴付ける 3つのフェーズから成る (図 4)。

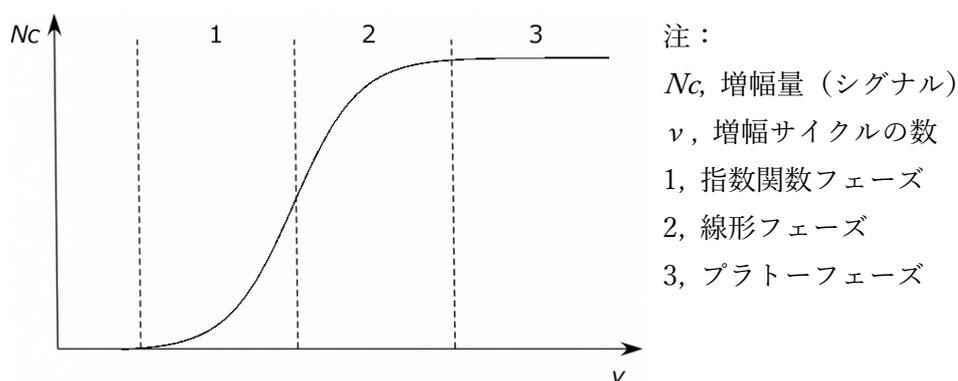


図 4. 増幅曲線の例.

8.4.1.2 フェーズ 1: 指数関数フェーズ

指数関数フェーズは、増幅効率が一定で高い特徴をもつ、高精度のサイクル領域である。指数関数フェーズ中の PCR 産物と初期テンプレートの関係は、以下の式によって表すこと

ができる。

$$Nc = N(1 + \eta)^v$$

注：

Nc , 増幅分子の数

N , 標的分子の初期数

η , 増幅反応の効率

v , 増幅サイクルの数

8.4.1.3 フェーズ 2：線形フェーズ

線形フェーズは、水平化効果による特徴をもち、増幅曲線の傾きが着実に減少する。この時点において反応液中の少なくとも 1 つの成分が臨界濃度を下回り、増幅効率が減少し始める。このフェーズは、増幅が幾何級数ではなく等差級数に近似しているため、線形と呼ばれる。

8.4.1.4 フェーズ 3：プラトーフーズ

プラトーでは、PCR 増幅が停止し、シグナルは比較的一定のままである。

8.4.2 蛍光データの評価

陽性試料は、典型的な増幅曲線の少なくともフェーズ 1 を有する増幅曲線を生成する。これらの試料の増幅曲線は、一定数のサイクル後に規定の閾値設定を超える。蛍光シグナルが閾値を上回る試料は、陽性と見なされる。

8.4.2.1 試験成立基準

PCR 増幅プロットは通常 3 つの増幅フェーズに相当する s 字状の反応曲線を示す。

測定手順には、

- 被験試料の増幅曲線の評価
- ベースライン及びプラトーフーズの蛍光シグナルと陽性及び陰性コントロール試料の蛍光シグナルとの比較を含めることが望ましい。

8.4.2.2 閾値の設定

閾値は以下のように設定することが望ましい。

- バックグラウンド蛍光によって増幅曲線が閾値を早期に超えないように、バックグラウンド蛍光ベースラインを十分に上回るようにする。
- プラトーフーズの影響を受けない増幅曲線の対数線形フェーズで閾値を超えるように、できるだけ低くする。
- 同一プレート上で同一アッセイを用いて測定するすべての試料に対して、固定する。

8.4.3 データの前処理

8.4.3.1 検量線を用いた qPCR

アッセイ最適化において決定した PCR 効率の信頼区間に基づき、検量線の傾きに対する合格限界を規定することが望ましい (11.2.3 参照)。

8.4.3.2 相対定量 PCR

C_q 生データの前処理には、閾値設定に関するラン間の変動補正を行わなければならない。
相対量の計算では、PCR 効率を補正しなければならない。

8.4.4 外れ値の特定

Dixon 検定又は Grubbs 検定などを用いて、範囲外の値がないか調べるのが望ましい。
外れ値が複数のある場合は、それらを検知できるようにデザインされたチェック機構を使うのが望ましい。

8.4.5 定量分析

8.4.5.1 全般

定量アッセイでは、PCR の指数関数フェーズ中に生成された標的塩基配列の量に対応する蛍光を測定する。これは、もとの試料中の標的核酸量を決定するのに用いることができる。
標的核酸は、検量線を参照して定量化される。

他の方法も、その妥当性が実証されていれば、適用可能である。

8.4.5.2 定量化のための検量線法

濃度が既知の安定かつ純度の高い標的 RNA または DNA ストック液を使って、階段希釈法による検量線を作成できる。検量線および標的核酸の増幅効率は、厳密に適合すべきである。標準物質の調製には、通常、プラスミド DNA および *in vitro* 転写 RNA が用いられる。
標的の濃度は、検量線の範囲内に収まることが望ましい。

定量範囲をカバーする適切な数の較正点および繰り返し試験が適用されることが望ましい。

例 1：少なくとも繰り返し 2 回ずつで 4 つの較正点（計 4×2 個の値）

例 2：各点において 1 回の測定で 6 つの較正点（計 6 個の値）。

9 評価および文書化 {試験利用者}

8.3 に規定されているコントロールを用いて得られた結果に問題がない場合、評価が可能である。

想定される PCR の結果の組み合わせが、NIHSJ-34TS 表に記載されている。

データの報告には、核酸の定量結果を独立して評価できるように十分な詳細情報が含まれていなければならない。

含めるべき報告要素の例については、NIHSJ-34TS に記載されている。測定結果には適切な単位及び不確かさを付すことが望ましい。

10 リアルタイム PCR による核酸定量試験法 (qPCR) のデザイン {試験開発者}

10.1 全般

リアルタイム PCR を用いた核酸定量試験のデザインには、適切な種類及び数の試料の選択、繰り返し処理、組み込むべきコントロール、試料の無作為化の必要性、並びに標準物質

の取り決めを含めなければならない。検討すべき具体的な要素を以下に概説する。当該試験法の妥当性確認において、適用対象及び範囲に対するアッセイの精確性を評価し、ルーチン分析中に行う繰り返し回数の指針が示されることが望ましい。

10.2 定量化の方法

10.2.1 全般

主な手法として検量線を用いて定量する方法と、相対的に定量する方法がある。

10.2.2 検量線を用いる核酸濃度の測定

検量線は、独立した測定標準物質を用いて策定しなければならない。標準物質は、被験試料と同一又は類似のマトリクスを有し、規定された絶対又は相対濃度（例として、コピー数濃度（コピー数/ μ l）、質量比標準（g/kg）、国際単位系（SI））を持つ。

検量線の不正確さは測定自体の不確かさを反映しており、被験試料の濃度測定の不確かさを評価する際にも考慮しなければならない。

RNAを解析する場合は、標準物質はRNAを含有し、被験試料と同様の処理、すなわち、逆転写の工程を含めること。環状DNAを解析する場合は、直鎖化して超らせん構造を排除すること。被験試料が一本鎖DNA（ssDNA）（cDNAなど）の場合、ssDNAテンプレートは最初のPCRサイクルでは増幅されないので、測定標準物質を一本鎖DNAとするか、又は1単位の C_q 差異を反映するように検量線の式を修正するか、いずれかを用いることが望ましい。（ C_q ：定量サイクル。反応に由来する蛍光シグナルが規定の閾値と交差したqPCRサイクル数）

検量線に使用する校正液は適用濃度範囲全体をカバーしていなければならないが、可能であれば当該範囲の外側もカバーすることが望ましい。

被験試料の濃度は検量線から推定する。濃度（ C_i ）は以下の式を用いて推定する。

$$\log_{10} C_i = \frac{C_q - a}{b}$$

ここで、

C_q は被験試料の C_q

a は検量線の切片

b は傾き

10.2.3 相対的定量化

検量線を使用せずに、qPCRの C_q 値に基づいて核酸の定量化を行うことを、「相対的定量化」と呼ぶことがある。 C_q 値は対数変数なので、2つの C_q 値の差分（デルタ C_q 、 ΔC_q ）は基本的に2つの量の比を測定することを表す。

ΔC_q は、同一のPCRアッセイで測定した2つ試料の C_q 値に基づくことが望ましく、同一試料に対する2つのPCRアッセイの C_q 値に基づくことは望ましくない。なぜなら、異なるPCRアッセイは独立した増幅特性及び閾値設定を持つからである。さらに、2つの試料に基づくデルタ C_q 値の計算は、PCR効率を考慮した以下の式を用いて線形スケールに変

換（通常は相対量と呼ばれる）することができる。

$$\text{相対量} = (1 + E)^{\Delta C_q}$$

ここで、

E はPCR効率（附属書A）

検量線がないため、複数の試験のデータを比較する際には、閾値設定の差異をノーマライゼーションするために、各プレートにキャリブレーションプレート又は参照試料を入れる必要がある。

また、検量線を作成する校正液を使わないことから、PCR効率が試験毎に測定されない。このため、各プレートに対して参照となる試料又は標準物質コントロールを入れ、PCR効率の再現性をモニターすることが望ましい。

信頼区間の設定、測定の変動不確かさなどの統計処理が、ある分布の仮定に基づいている場合、当該仮定の妥当性を確認することが望ましい。このような分布の仮定の確認については、最低30の独立したデータポイントを設定することが望ましい。分布の仮定の確認には、例えば、想定される分布からの逸脱に対する統計的検定又は分位数-分位数プロットの検査を含めてもよい。

例 正規性の仮定は、シャピロ-ウィルク検定又は正規確率プロットを使用して確認できる。

注記 分布の仮定についての確認は、仮定された分布からの逸脱が特定のデータセットに対して重大な懸念を引き起こすほど大きくないことを示すためのものであり、特定の分布を証明することにはならない。

対数変換したデータを用いて統計解析を行う場合、同スケールで信頼区間及び測定の不確かさを報告することが望ましい。対数変換値を線形スケールに変換する場合、非対称信頼区間若しくは測定の不確かさを計算しなければならない。あるいは、線形スケールでの信頼区間の対称近似値が2つの非対称信頼区間のうち最大のものを包含している証拠を提示しなければならない。

10.3 ノーマライゼーション戦略

ノーマライゼーションを適用する定量の手法は、そのノーマライゼーション戦略が適切であることを示さなければならない。

ノーマライゼーションは、技術的変動、即ち「ノイズ」の影響を最小化し、真の生物学的変動の測定を容易にする。

ノーマライゼーションは、核酸標的に特異的なものではなく、試料全般に影響を及ぼす要因を補正するものである。そのため対象遺伝子の測定に影響する非特異的な変動の原因を回避する。ノーマライゼーション戦略で制御される技術的要因として、サンプリングのばらつき、輸送及び保管中の試料の劣化並びに核酸抽出及び逆転写の収率などが挙げられる。

ノーマライゼーションは一般にqPCRの C_q 値に適用されるが、 C_q 値及びコピー数の両方に適用される場合もある。

技術的変動をノーマライゼーションするために多くの手法がある。DNA の分析に適合し得るノーマライゼーション戦略として、参照遺伝子に対するノーマライゼーションがある：

ゲノム DNA (gDNA) の定量化については、データは1つ以上の参照遺伝子に対してノーマライゼーションしてもよい。複数のゲノム遺伝子座を評価し、選択した遺伝子マーカーがゲノムのコピー数を代表していることを確認することが望ましい。使用するサンプルタイプにおける参照遺伝子の安定性について妥当性確認を行わなければならない。

11 標的核酸配列の定量に関するアッセイデザインの最適化 {試験開発者}

11.1 アッセイデザイン

11.1.1 全般

qPCR/RT-qPCR アッセイデザインによる RNA 及び DNA 定量に対する要求事項を以下に示す。

11.1.2 アンプリコンの選択

通常、短いアンプリコンは長いアンプリコンに比べて増幅効率がよいが、蛍光色素による検出系を用いる際は、プライマーダイマーと十分に区別される長さであることが望ましい。大半の qPCR アッセイに対しては、250 bp 以下のアンプリコンサイズが推奨される。GC に富む領域、反復領域、及び通常既知の SNP を持つ領域は避けることが望ましい。ただし、SNP の分別検出を目的としている場合を除く。プローブによる検出系を用いる場合、プライマー間の配列はプローブ結合に関して、効率的かつ特異的な部位をなすことが望ましい。

11.1.3 プライマー及びプローブの設計

プライマーは 50°C~68°C のアニーリング温度で設計することが望ましい。GC 含量が 40%~60% で、明らかな二次構造をとらないことが望ましい。プライマーペアのアニーリング温度の差異が 1°C~2°C 程度であることが最も望ましい。

プローブの長さは 30 塩基未満であることが望ましい。加水分解プローブを用いる際、プローブのアニーリング温度はプライマーより少なくとも 5 度は高いことが望ましい。プローブの 5' 端のグアニンは、蛍光シグナルを消光する可能性があるため、これを避けることが望ましい。プローブの溶融温度はマイナーグループバインダー又は修飾ヌクレオチド(ロックされた核酸など)の使用によって上昇させることができる。

11.1.4 特異性の in silico 評価

PCR アッセイは特異性を確保するようにデザインし、その特異性は in silico で確認しなければならない。

標的配列に対して設計された PCR プライマー及びプローブでも、意図しない標的(同一ゲノム内の相同遺伝子など)に一致もしくは少数の塩基対しか違わない配列がある場合は、その配列に結合する可能性がある。その際、プライマー結合部位の間が十分に小さければ(500 bp 未満)、PCR 中に意図しないアンプリコンが生じる可能性がある。また、当該意図しない標的がレポーターシグナルとして検出され、アッセイが標的遺伝子に対して特異的

でなくなる可能性がある。アッセイのデザインにプローブを加えることで、その特異性を向上させることができる。

標的アンプリコン配列に対する特異性を評価するために、目的のテンプレート及びコンタミネーションの可能性のあるテンプレートのゲノムデータベースに対して、プライマー及びプローブをスクリーニングしなければならない。

in silico スクリーニングで意図しない PCR 産物の可能性が特定された場合、プライマーペアの非特異的結合によって生じる可能性のあるアンプリコンの配列を、プローブ配列との相同性に関して評価し（ミスマッチ数など）、プローブアッセイの特異性向上に反映させなければならない。

11.1.5 逆転写 (RT-) qPCR の設計

RT 手法における cDNA の合成では、分子の 5' 端に向かって RT 酵素の処理能力が低下することから、用いる RT プライマーの位置から離れると RT 産物が少なくなる可能性がある (3' バイアス)。したがって、RT プライマーとアンプリコンの位置も考慮することが望ましい。

11.2 精製試料を用いたアッセイの最適化

11.2.1 全般

核酸定量アッセイの性能を最適化しなければならない。シグナル出力、PCR 効率、特異性など、最適なアッセイ能力を得るために考慮すべきパラメータに関する要求事項を以下に示す。

核酸定量アッセイは複数の製造業者から購入することができる。実際の試験で使用する前に、各試験室で当該アッセイの妥当性を確認することが望ましい。アッセイの性能に関するサプライヤーの要求を自家試験室で検証しなければならない。最適なアッセイ性能を得るためにさらに検討を重ねてもよい。

最初のアッセイ最適化のための理想的な陽性コントロール物質は、当該標的領域のみを含む単純なテンプレート分子である（プラスミド、オリゴヌクレオチドコンストラクト、in vitro 転写によって作られた RNA など）。これらの単純な陽性コントロール物質は、特異性の評価ができるような、交差反応しうる配列（相同遺伝子、偽遺伝子など）を含む、より複雑な核酸の陽性コントロール物質（gDNA、総 RNA など）と相互に補完的なものである。

11.2.2 蛍光シグナルの最適化

qPCR アッセイの最初の最適化には、ある程度の範囲の PCR のアニーリング温度、サイクル数、プライマー/プローブ濃度を検討し、蛍光シグナル出力に対する最適条件を調べなければならない。

11.2.3 [RT]-qPCR 増幅効率

上記の基本アッセイパラメータを最適化したら、qPCR 又は RT-qPCR を基にした測定手順の PCR 効率を決定しなければならない。

PCR 効率は、DNA (qPCR) もしくは RNA (RT-qPCR) のキャリブレーションもしくは

希釈系列を当該アッセイで分析することによって評価されなければならない（附属書 C 参照）。RT-qPCR では、RNA 希釈系列の検量線作成を行わなければならない。これにより、当該アッセイの適用される線形範囲にわたって RT 効率が等しいことの妥当性が確認できる。RT-qPCR アッセイでは、RT ステップから独立したプライマーの PCR 効率についての情報を収集するために、DNA 希釈系列の検量線作成を用いた PCR 効率を分析してもよい。

希釈系列の検量線の傾きから効率値を推定することができる（附属書 C 参照）。[RT]-qPCR の効率は試験を複数回行って評価すること（最低 3 回）が望ましく、推定値の正確性を評価するために信頼区間を計算する。反応への干渉がない場合、平均 PCR 効率は 90~110% ($-3.1 \cong \text{傾き} \cong -3.6$) であることが望ましい。相関係数（ピアソンの相関係数、R など）について、線形性の程度を特徴づけなければならない。相関係数 R^2 は 0.99 を上回ることが望ましい。

注 理論的には、テンプレート分子数が各サイクルで 2 倍を超えることはないので、PCR 効率は 100% を超えることはない。ただし、観察され、回帰分析によって計算された PCR 効率は 100% を超えることがある。観察された PCR 効率が繰り返し 100% を超える場合、これは検量線試料中の阻害物質もしくはアーティファクトの存在、又はデータ分析パラメータ（附属書 C 参照）による可能性がある。

11.2.4 RT 効率

RT 効率は非常に変動する可能性が高いので、RT 効率はアッセイ最適化中に評価しなければならない。RT 効率の最適化の証拠には以下を含めてもよい(may)。

- － 代替の RT 酵素/キットの比較
- － *in vitro* 転写 RNA テンプレートを用いた RT 効率の定量

11.2.5 特異性

標的に対する特異性、並びに、通常の生物試料に存在する可能性のある相同配列（SNPs/SNVs、偽遺伝子、パラログ又はオルソログ配列など）との潜在的な交差反応性について評価しなければならない。上述の *in silico* 解析を実際の試験に反映させることができる。

陽性コントロール物質の測定は、ほぼ同量の、試料に存在する可能性がある近縁なテンプレートを測定したものと比較することが望ましい。アッセイの特異性を向上させるために、PCR アニーリング温度の変更を要求としてもよい。

プライマーの特異性の証拠として、融解曲線分析を行ってもよい。融解曲線分析は、増幅産物の融解特性に基づいて特異性を評価するために PCR の後に行われる分析である。二本鎖 DNA 結合色素の存在下で、一定の範囲で温度を上げながら行う。単一の標的核酸配列の検出では、当該反応で単一のアンプリコンが増幅された証拠として、その微分プロットで単一のピークが観察されることが望ましい。

注記 融解温度 (T_m) は DNA 配列の長さ、GC 含量、バッファー、塩基配列に依存する。

当該アッセイについて、標的テンプレート濃度又は反応当たりの量に対して、アッセイの

偽陽性率を割合 (%) 表記として計算しなければならない。LOD を設定するために偽陽性率が必要である。

11.3 被験試料を用いた試験法の最適化

11.3.1 試料マトリクスにおける PCR 阻害物の作用

阻害化合物（試料調製試薬、過剰タンパク質など）を含む核酸試料は、PCR を部分的に又は完全に阻害する可能性がある。PCR 阻害物の存在は、増幅の遅延、低い再現精度、検量線の非直線性によってわかる場合がある。阻害物に対するアッセイごとの感受性の違いが観察されているため、有機溶媒、多糖類、タンパク質などの化学物質又は核酸の不純物の評価に加えて、試料マトリクスの当該 qPCR アッセイへの影響を評価しなければならない。

アッセイ性能に対する試料マトリクスの影響を測定して特異的 PCR の阻害を評価するための要求事項を以下に示すが、これらに限定されるわけではない。

— コントロールアンプリコン、プラスミド、精製 gDNA など標的核酸配列を持つ内部 PCR コントロールの定量。阻害（又は増強）の存在及び程度は以下を含むコントロール反応液の調製により判定してもよい。

- a) 抽出試料マトリクスに添加された内部 PCR コントロール
- b) 内部 PCR コントロールのみ（すなわち、抽出試料/マトリクスの非存在下で）
- c) 抽出試料マトリクスのみ（すなわち、内部 PCR コントロールなし）。核酸標的のバックグラウンド（が存在する場合の）濃度を測定するため。

適切な検定（t-検定など）を用いて統計的有意性を判定するために、各コントロール反応を最低 3 回繰り返すことが望ましい。試料マトリクスによるアッセイの変化がない場合、コントロール(a)によって測定された標的核酸量はコントロール(b)及び(c)によって測定された量の合計と等しく、その一方で、アッセイが試料マトリクスによって阻害（又は増強）されている場合、コントロール(a)の量はコントロール(b)及び(c)によって測定された量の合計より有意に少ない（又は多い）であろう。

— 試料の希釈。希釈により潜在的阻害物の濃度が低下するため、希釈から予想される濃度又は C_q 値の差異が観察される差異と一致するということは、阻害（又は増強）がないことの証拠を示している。

— 個々の反応速度の分析及び／又は希釈系列を用いた増幅効率の計算。

11.3.2 被験試料における核酸コンタミネーション物質の存在

gDNA コンタミネーション（抽出段階からのキャリーオーバー）に対する RT-qPCR アッセイの感受性を 11.1.5 及び 11.2.5 の記載通りに評価しなければならない。被験試料中の gDNA コンタミネーションの存在は、RT（-）コントロールを用いて特定することが望ましい。RNA 調製中に DNase を用いて gDNA コンタミネーションを回避することが望ましい。

RT（-）コントロールは増幅がないことを示すことが望ましい。ただし、RT（-）反応が陽性の結果となった場合、被験試料と対をなす RT（-）コントロールの反応との間で C_q 値

又は濃度の差異を特徴づけ、RT (一) が「陽性」となったことを説明しなければならない。
標的核酸の定量及び試験法の検出のレベル (LOD) の計算では、gDNA 由来のシグナルの影響を考慮に入れなければならない。

11.3.3 妥当性確認済みの測定範囲

LOD を包含する当該試験法に関する妥当性確認済みの測定範囲を記載し、試験法の線形範囲を規定することが望ましい。

試験法の妥当性確認済みの測定範囲を確立するために、その濃度が検出のレベルを含めた対象範囲にわたる参照物質 (参照物質が入手できない場合には、自家試料又はスパイク試料) の反応を試験することが必要である。

検量線を用いた qPCR による濃度の定量では、被験試料中の標的核酸の量は検量線が対象とする濃度範囲内であることが望ましい。

11.4 テンプレートなしのコントロール (NTC)

すべての NTC 及び陰性プロセスコントロールは PCR 増幅の証拠がないことを示すことが望ましい。非陰性の結果 (インターカレーションする色素を用いる試験法に対するプライマー-ダイマー、など) は、証拠を以て説明されなければならない (shall) (融解曲線分析を用いる、など)。

12 試験法の性能特性 {試験開発者}

12.1 全般

遺伝子検出法は、以下に示す性能特性を満たすものとする。当該検出法に関し、事前の妥当性確認で得られた情報 (例: パラメータや試薬のバリエーション)、複数または単一の検査室で実施した試行実験における具体的な情報など、その性能特性に関する情報が提供され、利用できるようにしなければならない。

12.2 試験法の範囲

当該方法の目的を示すこと。その使用目的および限界に関する情報を提供しなければならない。特に、方法提供者は、本ガイドラインに定められた基準が満たされていることを示すことが望ましい。

12.3 科学的根拠

原理の概要並びに関連する参考文献が提供されることが望ましい。

12.4 選択性

12.4.1 包含性試験

12.4.1.1 全般

標的微生物 (細菌・真菌・寄生虫) またはウイルスを用いた実施結果を提供するものとする。上記実施試験には、当該方法の範囲 (12.2) に従って、関連するすべての変異種または型を含むこととする。

12.4.1.2 特異性についての最低限の要求事項

方法の範囲（12.2）に適合するように、プライマー及び／またはプローブ結合部位に配列の違いがあっても、標的微生物またはウイルスの変異体が同等の増幅効率で検出されることとする。

可能であれば標的である微生物またはウイルス 50 株を試験するものとする。

12.4.2 排他性試験

12.4.2.1 全般

非標的微生物またはウイルスを用いた実施結果を提供することが推奨される。上記実施試験には、分類学的に密接に関連する微生物やウイルスと、関連しない微生物やウイルスの両方を含むこととする。

当該方法により、標的微生物またはウイルスと非標的微生物またはウイルスが明確に区別されることとする。

12.4.2.2 細菌を検出するための試験系

標的菌と干渉する可能性のある微生物株を少なくとも 30 株と、食品検体中に自然汚染を示す菌株を選定する。当該目的に使用されうる微生物の例を以下に示す。

細菌

- セレウス菌
- ブロコトリックス・テルミスファクタ
- カンピロバクター・ジェジュニ
- シトロバクター属菌
- ウエルシュ菌
- エンテロバクター属菌
- 大腸菌
- ラクトバシラス属菌
- リステリア・モノサイトゲネス
- シュードモナス属菌
- サルモネラ・エンテリカ
- 黄色ブドウ球菌
- エルシニア・エンテロコリチカ

真菌

- アスペルギルス属菌
- サッカロマイセス属菌

プライマー配列がウイルスの塩基配列と相同性があるなど、関連性がある場合には、当該ウイルスを検討に含めることが望ましい。

検討する微生物株の少なくとも 90%は細菌であること。残りの株は、酵母、カビまたはウイルスに属するものとする。

選択性の検討には、明確に検出可能な量の DNA（例： 10^6 個の菌由来の DNA）を用いるものとする。増幅に用いられる DNA の適合性は、rDNA 等を用いた PCR によって確認するものとする。

12.4.2.3 真菌類を検出するための試験系

少なくとも 30 株の非標的微生物を選択する。真菌の試験系の妥当性確認では、少なくとも 90% の菌株を真菌とし、残りは、細菌またはウイルスに属したのものとする。なお、例えば、プライマー配列がウイルスの塩基配列と相同性があるなど、関連性がある場合等には当該ウイルスを含めることが望ましい。

選択性の検討には、明確に検出可能な量の DNA（例： 10^6 個の菌由来の DNA）を用いるものとする。増幅に用いられる DNA の適合性は、rDNA 等を用いた PCR によって確認するものとする。

12.4.2.4 ウイルスを検出するための試験系

ウイルス検出のための試験系の妥当性確認では、少なくとも 3 つの非標的ウイルス株を試験するものとする。選択性の検討には、明確に検出可能な量の核酸（例： 10^6 個のウイルス粒子に由来する、又はそれに相当するゲノムの DNA 又は RNA）を用いることが望ましい。増幅に使用される核酸の適合性は、13 によって確認するものとする。

12.5 感度

12.5.1 全般

当該方法を適用することができる微生物量の範囲を検討するために、異なる濃度で実施した試験の結果を試験利用者がわかるようにし、妥当性確認の報告に記載しなければならない。

12.5.2 定性試験の感度に関する最低限の要求事項

定性試験で検出される食品媒介性病原体は、検討した規定量の食品マトリクス中で、細菌及び寄生虫についてはアッセイあたり 1~10 個、ウイルスについては 10~100 ウイルス粒子（又は相当量のゲノム）のレベルで検出されること。ここで言う濃度は、当該検出手順（増菌培養を含む）の開始前の被験量に関するものである。

注 反応感度は試験法の感度とは異なる。反応感度は、鋳型 DNA として使用される核酸の量によって正確に定義することができる。試験法の感度は、とりわけ、核酸抽出時の回収効率に依存する。

当該試験は、対象とする食品種に関連する細菌叢を含む試料で実施されなければならない。また、適用範囲を全ての食品とする場合には、感度の評価には、5 つの異なる食品カテゴリを含めることが望ましい。

12.5.3 定量試験の感度に関する最低限の要求事項

当該方法の線形範囲の上限及び下限を示さなければならない。上限、下限及び線形範囲の評価は、対象食品に関連した細菌叢を含む試料を用いて行わなければならない。また、利用者は、選択した方法が標的の所定の検出範囲をカバーしていることを確認しておかなくて

はならない。このほか、適用範囲を全ての食品とする場合には、感度の評価には、5つの異なる食品カテゴリを含めることが望ましい。

12.5.4 直線性

測定手順の直線性の範囲を記録しなければならない。

直線性の評価に用いられる試料は通常の被験試料を代表するものでなければならない。校正物質又は被験試料の希釈系列でもよい。

予め規定された核酸量と観察された核酸量を回帰分析する。得られた傾き及び相関係数（例えばピアソンの相関係数、 R ）によって、当該範囲の直線性の程度を特徴づけなければならない。測定対象は試験法による最終的な測定結果の値でなければならない。データ処理の途中の値（例： C_q 値）であってはならない。

予想値に対する実測値のプロットの予想される傾きは1.0であり、切片（0, 0）である。傾きは0.95と1.05の間に、相関係数 R^2 は0.99を上回ることが望ましい。

12.6 頑健性

12.6.1 全般

頑健性があることを確認するためには、試験結果への影響が懸念されるパラメータ（例えば、プライマーおよびプローブの濃度並びに供給元、PCR 試薬の組成、キット構成要素の濃度のばらつき、使用装置のばらつきなど）について、可能な範囲で検討することが望ましい。

12.6.2 頑健性の判定

頑健性は、検査室間（コラボ）実験を実施することによって判定することができる。検査室間実験の結果は、検査室間の堅牢性として解釈されなければならない。異なる検査室からの結果が著しく変わらない場合には、当該方法は適用可能である。

12.7 対照（コントロール）

NIHSJ-34TS に従ったコントロールを明確に規定し、結果の解釈を記録しなければならない。これには、使用した陽性および陰性コントロール、内部または外部増幅コントロールの詳細、および得られた結果の解釈が含まれなければならない。

12.8 真度及び精度

当該方法の真度と精度に関する情報を提供することが推奨される。

12.8.1 真度は、その試験法によって得られた（多数の）結果の平均が参照値にどれだけ近いかを表している。適切な参照値を得るための一般的手法が3つある。

- a) 認証標準物質の使用
- b) スパイクされた試料を用いた回収実験
- c) その他の手法から得られた結果との比較

a)では、認証標準物質は被験試料と非常に類似したマトリクスを有し、通常の試料と同じ範囲内の標的コピー数濃度を持っていないなければならない。

12.8.2 精度は規定条件下で同一試料に対して独立に得られた測定結果の変動性の尺度である。規定条件に応じて、測定精度は試験法の繰り返し精度、室内再現精度、再現精度に分けることができる。

単一試験室の妥当性確認の枠内で、試験法の繰り返し精度と室内再現精度の両方を調べなければならない。

試験 1 回当たりの反復（繰り返し）測定回数、並びに独立した試験回数は、信頼できる標準偏差（SD）の推定値を示すのに十分な数でなければならない。ISO 5725-1 には、SD の推定値の規定された不確かさを満たす反復測定回数についてのガイダンスが示されている。

一元配置分散分析（ANOVA）を行い、それぞれ式 12-1 及び式 12-2 に従って相対的な繰り返し精度（ $S_{repeat,rel}$ ）と相対的なランごとの変動（ $S_{run,rel}$ ）の標準偏差を計算することができる。

$$S_{repeat,rel} = \frac{\sqrt{MS_{within\ run}}}{\bar{c}_{sample,mean}} \quad (12-1)$$

$$S_{run,rel} = \frac{\sqrt{\frac{MS_{between\ run} - MS_{within\ run}}{\bar{n}_{repli}}}}{\bar{c}_{sample,mean}} \quad (12-2)$$

ここで、

$MS_{within\ run}$ は一元配置 ANOVA によって計算されたラン内の平均平方

$MS_{between\ run}$ は一元配置 ANOVA によって計算されたラン間の平均平方

\bar{n}_{repli} はランごとの平均反復数

$\bar{c}_{sample,mean}$ はすべてのランで測定された試料コピー数濃度の平均

である。

12.9 装置

機器の仕様は、当該方法の性能に影響を与える可能性がある。当該方法に適用する機器に関し、試料調製及び遺伝子分析に必要な要件が明確に記載されることが望ましい。

試験開発者は、方法の妥当性が確認された機器を明示しなければならない。

同等の結果が得られることが実験による検証で証明される場合、検査室は試験開発者が明記した以外の機器を使用することができる。

13 試料の品質管理 {試験利用者} {試験開発者}

13.1 全般

試料からの核酸抽出は、被験試料に対して適切に実施しなければならない。

qPCR の性能は反応の総核酸マトリクスにおける変動によって影響を受ける可能性があるため、qPCR ごとの試料インプット量が一定となるように、総核酸質量濃度（通常 ng/ μ l 又は μ g/ml として表す）を測定することが一般的に望ましい。劣化した試料の分析は、結果として、データの品質低下及び不正確な定量化を招く可能性がある。さらに、阻害物の存在は qPCR に影響を及ぼす可能性がある。

qPCR インプット量が標準化されていること、核酸試料の純度及び濃縮が十分であること、以後の qPCR の阻害又は増強する成分がないことを示すために、精製された核酸試料の特性評価に対して以下を明記しなければならない。

- 核酸の完全性
- 核酸の純度

これらのステップの 1 つ以上が適用できない場合、又は実用的ではない場合、その理由を記載することが望ましい。例えば、あるワークフローにおいて、反応のインプットをインプット量に対してノーマライゼーションする（例として、総核酸量ではなく、菌量）。

総核酸濃度の測定及びその品質の評価に用いられる一般的な手法を、適用にあたっての要求事項と共に以下に示す。

13.2 総核酸定量

13.2.1 全般

総核酸（必要に応じて DNA 又は RNA）の定量は、紫外分光光度法、蛍光 DNA/RNA 結合色素、及び qPCR など様々な手法を用いて実施することができる。

核酸試料の均質性は定量法において重要な因子である。核酸試料を完全に溶解し、定量前に十分に混合しなければならない。典型的なサンプルタイプに対し、同一試料を繰り返し測定した値の変動について情報を示すことが望ましい。

13.2.2 分光光度法

核酸は UV を強く吸収するため（260nm 付近で最大）、分光光度計を用いて UV 吸収を測定することにより定量することができる。この手法には以下のバイアスが影響を及ぼし、その原因を考慮することが望ましい。

- 存在するすべての核酸種が吸収に寄与する（DNA、RNA、短いオリゴヌクレオチド及び遊離ヌクレオチドなど）。したがって、目的とする核酸（DNA など）の濃度を過大評価する可能性がある。
- 多くの化学物質が 260nm 付近の UV を吸収し（分離又は溶解に使用するフェノール溶液など）、正に傾く潜在的なバイアスの代表的な原因となる。

質量濃度の結果を SI 単位で追跡可能にするために、被験試料の組成に類似した組成を持つ認証標準物質を用いた校正が必要である。

13.2.3 蛍光定量法

本手法は色素が核酸に結合する際における蛍光特性に依存する。蛍光定量手法には以下の潜在的なバイアスが影響を及ぼし、その原因を考慮することが望ましい。

- 核酸の変性状態
- ある色素が一定サイズ以上の分子に優先的に結合することで生じる核酸の劣化
- 温度
- pH
- UV 光への暴露（光退色）
- 結合効率に影響を及ぼす可能性のある化学物質のコンタミネーション(製造元からの情報を確認することが望ましい)
- 蛍光消光を引き起こす可能性がある化学物質のコンタミネーション。蛍光消光は蛍光の読取り値に重大な影響を及ぼす可能性がある。ヨウ化物アニオン及びセシウムカチオンなどの重イオン、並びにアクリルアミドなどの中性分子は消光剤として作用する可能性がある。

測定は校正物質又は核酸標準液によるため、測定の精確さは校正物質に付与された値の精確さ、及び被験試料と校正物質との組成の類似性に依存する。陽性コントロール及び陰性コントロールの評価も含めることが望ましい。

13.2.4 qPCR を用いた総 DNA 濃度の評価

qPCR を用いて、特定の分類学的区分に関する総 DNA (例: 総細菌 DNA、総真菌 DNA) を定量することができる。相当する分類学的に特異的なプライマーを使用し、生物のゲノムサイズの推定値を用いて質量濃度に変換する。この手法は増幅可能な DNA の量を測定するものであり、必ずしも試料中の総 DNA 濃度を測定するものではないので、結果は試料の完全性及び純度と共に解釈することが望ましい。

以下の要求事項は、総 DNA 定量に適用した際の qPCR に基づく手法に適用される。

- 特異性：市販の PCR アッセイを含め、PCR アッセイの特異性の証拠を示さなければならない。種特異的プライマーでは、他の種との相同性がないことを示さなければならない。既知の配列のプライマー及びプローブでは、11.1.4 及び 11.2.5 に従い、特異性の妥当性確認をしなければならない。
- 計量のトレーサビリティ：トレース可能な総 gDNA コピー数又は質量濃度の定量において、検量線は、質量濃度及び容量単位ごとのゲノムコピー数についての特徴づけられた標準物質に基づかなければならない。校正物質の由来を記載しなければならない。
- キャリブメント（校正物質）の可換性：キャリブメントの PCR 効率は分析される試料の PCR 効率と同一であることが望ましい。
- PCR 阻害がないこと：分析される試料に PCR 阻害がないこと。
- 総 DNA 濃度の測定用の PCR アッセイのアンプリコンサイズは以後の qPCR 分析に適合していなければならない。すなわち、アンプリコンサイズが類似しているか、又は核酸の完全性の証拠がなければならない。

13.3 核酸の完全性

核酸の完全性は特異的標的配列の正確な定量に影響を及ぼすことから、試料の完全性に

関する情報を示さなければならない。

核酸試料の完全性を評価するために通常用いられる手法を以下に示す。

DNA の完全性

- 電気泳動
- 長鎖 PCR (15kb 程度)
- 異なる大きさのアンプリコンを増幅する PCR アッセイ

RNA の完全性

- 電気泳動
- 異なる大きさのアンプリコンを増幅する RT-PCR アッセイ

もっともよく用いられる手法はゲル電気泳動(キャピラリー又はスラブ)及び異なるサイズのアンプリコンの測定である。被験試料中の核酸の完全性の可否を判断する、又はその完全性を定量するために用いられる陽性コントロール及び校正物質を考慮しなければならない。陽性コントロールとしての例として、ゲル電気泳動に関しては高品質な試料、異なるアンプリコンサイズのアッセイに関してはインタクトなプラスミドテンプレートを含めることもできる。さらに、様々な完全性の被験試料を用いて以後の qPCR 測定手順の性能について特性評価を行い、核酸の完全性の基準を設定することが望ましい。

13.4 核酸の純度

核酸の純度を調べなければならない。確認事項には以下が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

- 干渉する化学的不純物が存在しない。すなわち、試料マトリックス又は抽出ステップから持ち込まれる、有機溶媒、多糖類及びタンパク質成分が存在しない。
- RNA 試料中に gDNA コンタミネーションが存在しない (DNA 試料中に RNA が存在する場合には任意)

具体的な手法としては以下を適用してもよいが、これらに限定されない。

a) UV 分光光度法。潜在的に汚染されている有機物質の存在は、タンパク質に対しては 280nm 及び 230nm、カオトロピック塩及びフェノールに対しては 230nm で吸光度の読取り値を測定することによって、大まかに調べることができる。重要なパラメータは 260nm / 280nm の吸光度比 (260/280 比) 並びに 260nm / 230nm の吸光度比 (260/230 比) である。260/280 比は、純粋な DNA では 1.8 近辺であり、これより低いとタンパク質、フェノールなどの化学物質のコンタミネーションが疑われる。純度の高い RNA の 260/280 比は 2 近辺であり、1.8 ではタンパク質のコンタミネーションが疑われる。260/280 は pH 及びイオン強度によっても変化し注意が必要である。260/230 比は、2.0-2.2 の範囲が理想的である。

260nm における吸光度が 1 の場合、1 本鎖 RNA では約 40 μ g/ml、2 本鎖 RNA では約 46 μ g/ml、2 本鎖 DNA では約 50 μ g/ml に相当する。

この方法は UV 分光光度計による総核酸定量に対して十分な濃度を持つ試料に限られる。

- b) PCR 増幅に対して内部コントロールを用いる qPCR アッセイ。試料内にスパイクされた外因性コントロール分子の C_q 値を、バッファー中にスパイクされた相当量の外因性コントロール分子に対する C_q 値と比較したとき、 C_q 値の増加又は減少は、それぞれ反応阻害物又は反応増強物が存在することを示す。検量線に基づく qPCR 法では、試料内にスパイクされた外因性コントロール分子のコピー数を、バッファー中にスパイクされた相当量の外因性コントロール分子に対して測定されたコピー数と比較したとき、その増加及び減少はそれぞれ反応増強物又は反応阻害物が存在することを示す。
- c) RNA 又は DNA に対する特異性を持つ蛍光光度定量法。
- d) RT (-) コントロール反応又は gDNA を標的としたアッセイも、RNA 試料中の gDNA コンタミネーションを調べるのに適している。

14 妥当性確認のための性能特性 {試験開発者}

14.1 全般

試験法は、実際に用いられる条件下でその妥当性を確認されなければならない。

性能特性は、適用可能な場合、ISO 16140 の手順に従って確立されるものとする。適用できない場合、試験法の性能特性は、規定された当該試験法の適用範囲と目的 (12.2) に即した分析手順について決定されなければならない。

インハウスにおける妥当性確認の最低限の要求事項として、試験は少なくとも異なる 2 名により実施されなければならない。(妥当性確認) 試験は、感度試験の最低限の要求事項に即した汚染レベルを有する検体に対して実施されなければならない。

妥当性確認試験における実験室試験は、核酸抽出から始め、1 検体につき少なくとも 2 回は実施することが望ましい。

試験法の性能特性に関するパラメータとしては、以下の仕様を挙げるのが可能である。

- 偽陽性率
- 偽陰性率
- 特異性 (11.2.5 に概説した要求事項)
- 精度
- LOQ
- LOD
- 真度
- 直線性
- 頑健性

14.2 検出のレベル、定量下限、使用範囲の判定

14.2.1 定性試験

14.2.1.1 全般

定性試験は、予め設定された使用目的に合致した方法により妥当性を確認しなければならない。事前の増菌もしくは濃縮工程を含め、定性試験法は、調査対象の食品マトリックスの所定量において 1 cfu～10 cfu、またはウイルスゲノム相当量を検出できる感度を有することが推奨される。著しい数の偽陽性を発生させるべきではない。

定性試験の真度と精度を記載するため、偽陽性率と偽陰性率を使った概念が試験法の開発者向けの妥当性確認方法として提示されている。この種の妥当性確認における最重要課題は、自然汚染を示す試験材料の使用である。これが利用可能でない場合、人工的に汚染された検体を調製し使用することができる。例えば、試験の適用範囲とする食品マトリックス所定量に対し、以下の接種レベルで調製する：

- ・ 0 cfu (ブランク)
- ・ 1 cfu ~ 10 cfu
- ・ 10 cfu~100 cfu

接種する微生物株は、通常、適用範囲の食品マトリックスに関連する 2 株を用い、試験結果は、「陽性」または「陰性」で記す。

偽陰性結果は、実際には分析対象が検体中に存在しているにもかかわらず、分析対象が存在しないという結果になることを示し、偽陽性結果は、検体中に存在しない分析対象存在しているという結果になることを示す。一般的には、分析対象の量が当該方法の検出のレベル (LOD) に近づくと、偽陰性結果が多く観察されるようになる。

定性試験の LOD は、95 %の確率で陽性結果をもたらす分析対象の濃度として表すことができる。これは、偽陰性率が 5 %以下であることを意味する。定性試験の妥当性確認において、偽陽性率を決定することも重要である。また、偽陽性と偽陰性の両方の結果を率として表すことができる。

14.2.1.2 偽陽性率

偽陽性率とは、陰性とわかっている検体が当該方法によって陽性と判定される確率を意味し、当該試験法で陽性と誤判定された陰性検体数を、陰性検体の総数 (陽性と誤判定された陰性検体の数 + 正しく判定された陰性検体の数) で除して求められる (式 14-1 参照)。便宜上、偽陽性率 (p_{f+}) は、百分率として表すことができる。

$$p_{f+} = \frac{n_{f+}}{n_{r-} + n_{f+}} \times 100 \% \quad (14-1)$$

n_{f+} は、誤って陽性と判定された陰性検体の数であり、

n_{r-} は、正しく陰性と判定された検体の数である。

14.2.1.3 偽陰性率

偽陰性率とは、陽性とわかっている検体が当該方法によって陰性と判定される確率を意味し、当該試験法で陰性と誤判定された陽性検体数を、陽性検体の総数 (陰性と誤判定された陽性検体の数 + 正しく判定された陽性検体数) で除して求められる (式 14-2 参照)。便宜

上、偽陰性率 (p_{f-}) は百分率として表すことができる。

$$p_{f-} = \frac{n_{f-}}{n_{r+} + n_{f-}} \times 100 \% \quad (14-2)$$

n_{f-} は、誤って陰性と判定された陽性検体の数であり、

n_{r+} は、正しく陽性と判定された検体の数である。

14.2.2 定量試験

定量試験法の妥当性確認は、ISO 5725 -1 [2]、ISO 5725 -2 に記載されている。検出のレベル (LOD) または定量下限 (LOQ) の決定は、ある適用例に対する試験法の妥当性確立には必要ではない。例えば、当該方法が 1,000 cfu/g ~ 100,000 cfu/g の範囲の判定に使用される場合、LOD を 1 cfu/g と決定する必要はない。すなわち、妥当性確認においてはまず当該試験法の使用範囲を決定することが必要であり、その範囲内でのみ使用することが推奨される。

14.2.2.1 LOD

定量試験の LOD は、95 % の確率で陽性結果をもたらす分析対象の濃度として表すことができる。これは、偽陰性結果の割合が 5 % 以下であることを意味する。

測定手順の偽陽性率は、特異性の評価及び陰性コントロールの分析の一環として特徴づけられる。LOD が主にアッセイの偽陽性率によって決定される適用例では、真の陽性の結果の統計的分布を理論的にモデル化してもよい。

真の陽性検出率は、反応の陽性率が 0% 超及び 100% 未満でなお且つ求める信頼水準の範囲を満たす状態で、測定手順の動作範囲の下限で標的量を含む試料を繰り返し反復測定することによって推定することが望ましい。例えば、95% 信頼水準では、LOD は反復測定の 95% が陽性となる最も低い濃度である。これには、定量値及び測定の不確かさがすでに付与されている校正物質又は陽性試料を用いて、真の陽性検出率を特徴づけることが望ましい。希釈を行う場合、希釈の精度を特徴づけ、LOD として設定された濃度の測定の不確かさを計算するために使用することが望ましい。

反復測定の陽性率を校正物質の濃度に対してプロットし、データに S 字曲線をフィッティングさせることによって補間することでさらに高い精度を得ることができ、LOD 推定値の信頼区間を得ることができる。LOD の推定値の精度は、各濃度の繰り返し数及び濃度の増分に依存する。濃度レベルごとに最低 10 回は測定することが望ましい。濃度の増分は最大 2 倍までであることが望ましい。

注記：LOD がどのあたりになるか予想できない場合、LOD を推定するために、最初に広範囲の濃度を対象としたパイロット実験を行い、次に狭い範囲の濃度で反復数を多くして実験することが、戦略としてすぐれているであろう。

14.2.2.2 LOQ

LOQ は、使用範囲の最低濃度に対応している。

LOQ は、測定手順における線形範囲の低濃度部分にあたる試料濃度において繰り返し分析することにより計算する。

LOQ 推定値の精度は各濃度の繰り返し数及び試料間の濃度の増分に依存する。濃度を漸増しながら、各濃度で最低 10 回繰り返すことが望ましい (LOQ 予想濃度の上下 2 倍)。

14.2.2.3 繰り返し精度と室内・室間再現精度

測定手順の繰り返し精度は、使用する定量化戦略に合わせて表されることが望ましい。すなわち、検量線を用いた手法では、検量線の濃度単位の標準偏差 (SD) が適切である。

C_q 値の変動係数 (CV_{C_q}) として繰り返し精度を表すために、式 14-3 を用いてもよい。

$$CV_{C_q} = \sqrt{(1 + E)^{(SD_{C_q})^2 \times \ln(1+E)} - 1} \quad (14-3)$$

ここで、 SD_{C_q} は C_q 値の標準偏差である。

SD_{C_q} を C_q 平均値で除算することによって CV_{C_q} を表すのは不正確である。式 14-3 によって示される C_q の繰り返し精度の値を用いて、その測定手順によって測定された最終核酸量の繰り返し精度を計算しなければならない。

精度の測定は、 C_q を対数スケールで表すと、推定濃度付近で対称であることが多い。線形スケールに変換した場合、精度の測定は推定濃度付近で非対称になる。したがって、線形スケールでの精度の測定の対称近似が対数スケールで表した陽性区間及び陰性区間をカバーするのに十分であるかどうかを考慮することが望ましい。

一方、相対定量法では、SD は測定手順によって算出された最終量を反映しなければならない。すなわち、独立した試験間の精度又は試験室間の精度は生の C_q 値の SD として表してはいけない。なぜなら C_q 値は閾値設定での変動により試験間で比較できないからである。データ処理及びノーマライゼーションの後に、その測定手順の最終量に対する精度を表すことが望ましい。

15 妥当性確認の報告 {試験開発者}

15.1 全般

妥当性確認の報告は、少なくとも以下の情報を含まなければならない。

- a) 検査室の名称
- b) 妥当性を確認した日付
- c) 使用した検体の数
- d) 使用した食品マトリクスの数および種類
- e) 選択性試験の結果 (特異性試験で使用された DNA または RNA の量を含む):
 - 1) 使用された標的株の数及び名称
 - 2) 非標的微生物またはウイルスの数及び名称
 - 3) 選択性試験に使用された DNA または RNA を増幅する能力の試験結果
- f) 感度試験の結果

- g) 方法の頑健性に関する情報
- h) 使用されたコントロールに関する情報
- i) 使用された機器に関する情報
- j) 精度と真度に関する情報
- k) 妥当性確認実験中に行われたその他の関連する観察事項

15.2 定性試験

定性試験の妥当性確認報告書は、LOD（または感度）と選択性に関する情報を考慮することが推奨される。偽陽性率 (p_{f+}) を用いて、選択性の値[100%- p_{f+} %]を計算することができ、また偽陰性率 (p_{f-}) を用いて、感度の値[100%- p_{f-} %]を計算することができる。

15.3 定量試験

定量試験の妥当性確認報告書は、正確性（真度および精度）、使用範囲、および必要に応じて LOD および/または LOQ に関する情報を考慮することが推奨される。

16 核酸定量測定の特異性と比較可能性 {試験開発者}

16.1 計量特異性

測定結果の特異性は一般に計量特異性と呼ばれている。計量特異性は、測定結果と SI 単位などの合意された標準/参照を関連付けるものである。解析結果の比較可能性のため、特異性は不可欠である (ISO/IEC 17025 参照)。

qPCR 測定結果の計量特異性は ISO 17511 に従って設定してもよい。

特定の核酸配列のコピー数など、数を数える特性を持つ量の単位は 1 である。この単位 1 は本質的に任意の単位系の要素である。

単位 1 を持つ量は SI に対してトレーサブルであるとみなすことができる。したがって、SI に対する正式な特異性は、適切かつ妥当性確認された測定手順を介して導くことができる。

16.2 標準物質の使用

標準物質を用いて、測定結果の分析特異性を確保し、核酸測定手順の性能を検証することが望ましい。目的に応じて適切な核酸標準物質が入手できる場合には、それを用いることが望ましい。

16.3 装置の校正

核酸定量に用いる装置は、入手できる適切な校正物質や標準物質を用いて校正を行わなければならない。天びん及びマイクロピペットなど（これらが含まれるがこれらに限定されない）の補助器具も校正しなければならない。

17 qPCR 測定における不確かさ (Measurement Uncertainty; MU) {試験開発者}

17.1 MU 計算の一般要求事項

測定の不確かさは、測定の実値が存在すると推定される値の範囲と定義できる。値の範囲

は、測定結果の信頼性を示す。不確かさの推定には、測定手順におけるランダム誤差と系統誤差の両方の影響が含まれる。結果の測定の不確かさに寄与する要因の評価では、測定過程において考えられる変動のすべての原因を考慮することが望ましい。附属書 D には、qPCR 測定における不確かさの原因の概要が示されている。

試験データ、及び公表された結果や校正証明書など他の情報源を評価して、測定結果に影響を与える主な分析過程を反映した不確かさ計算表を策定しなければならない。qPCR の測定の不確かさの計算に関する詳細なガイダンスは参考文献[57]に示されている。

核酸定量法の測定の不確かさの計算には以下の推定値を含めることが望ましい。

- qPCR 測定の繰り返し精度、室内及び室間再現精度
- qPCR 測定のバイアス
- 校正物質に付与された値の不確かさ
- 被験試料又は校正物質の希釈の不確かさ（希釈のランダム誤差は、全過程を通して試験を繰り返す場合、室内再現精度で捕捉できる）。
- ノーマライゼーションに関係する不確かさ：参照遺伝子又はノーマライゼーションに適用されるその他の遺伝子の測定の不確かさを、当該試験法で用いる手順に従って適切に組み合わせなければならない（複数の参照遺伝子の量の幾何平均など）。
- 測定結果に影響を及ぼすことが合理的に予想できるその他の因子

これらについて、ISO/IEC Guide 98-3 に従って不確かさを組み合わせなければならない。特定の信頼レベル（95%など）を持つ拡張不確かさを計算するために適用される包含係数は、試験を反復する回数を考慮に入れることが望ましく、これにより包含係数の計算に用いられる自由度を決定できる。

試験法の妥当性確認で実施される試験で示される精度及び真度に関する情報は、測定の不確かさを計算する際に用いることができる。

繰り返し精度及びラン間の推定値に基づき、式 17-1 を用いて、測定された平均試料コピー数濃度に関連する試験法の室内再現精度の相対標準不確かさ ($u_{precision,rel}$) を計算することができる。

$$u_{precision,rel} = \sqrt{\frac{S_{repeat,rel}^2}{\bar{n}_{repli} \times n_{run}} + \frac{S_{run}^2}{n_{run}}} \quad (17-1)$$

ここで、 n_{run} は妥当性確認中に行われた試験数である。

試料濃度を標準物質に対する校正によって決定する場合、標準物質の濃度の不確かさを、合成する不確かさに含めなければならない。

真度の評価に独立した標準物質を利用できる場合、式 17-2 を用いて、バイアスの不確かさ ($u_{bias,rel}$) を計算することができる。

注記 この手法は、報告された核酸量に重大なバイアスが観察されない場合、又はバイアスが修正可能な場合のみ有効である。

$$u_{bias,rel} = \sqrt{u_{precision,rel}^2 + u_{cert,rel}^2} \quad (17-2)$$

ここで、 $u_{\text{cert,rel}}$ は認定標準物質のコピー数濃度に関する相対不確かさである。

17.2 qPCR の測定の不確かさ

qPCR の測定の不確かさは PCR 効率における不確かさも考慮に入れなければならない。PCR 効率は、検量線に基づく手法を用いた核酸標的量の計算に固有であることから、PCR 効率の変動は試験法の妥当性確認の室内再現精度データで捕捉することができる。

相対定量法については、アッセイ最適化における PCR 効率の信頼区間を使用することが可能である。これには複数の実験（3 回以上）からの PCR 効率の推定値を反映しなければならない。

17.3 相対定量

17.4 相対定量では、測定の不確かさは ISO/IEC Guide 98-3:2008, 5.2 に従い、変動間の相関を考慮に入れなければならない。2 つの量の間比率（コピー数又は対象遺伝子の C_q 及び参照遺伝子の C_q など）は、各量の平均値を用いて計算する場合、相関の調整が必要である。ただし、比率を反復測定ごとに直接計算する場合には（単一反応において SNV を含む領域の総コピーに対する SNV の割合（%）、など）、相関の調整は必要ない。

附属書 A PCR 効率

A.1 全般

qPCR アッセイの PCR 効率の試験では、通常、希釈系列の検量線を構築することで試験する (11.2.3 参照)。ここでは実験デザイン及び PCR 効率の計算に関する情報を示す。

A.2 デザイン

qPCR 効率の評価では、希釈系列に基づく検量線作成用の校正物質又は試料 (「標準液」) は、精製したテンプレート DNA から構成されることが望ましい。これらは合成オリゴヌクレオチド、精製プラスミド、精製 gDNA 又は精製 PCR 産物であってもよい。RT-qPCR の評価では、標準液は精製テンプレート RNA から構成されることが望ましい。標準液は高濃度のストックから連続希釈して作成することができる。

希釈系列を通して反応液の総核酸含有量を同等に保つため、キャリア核酸 (アッセイとの交差反応性がない) の使用が推奨される。チューブに付着する可能性があるオリゴヌクレオチド又はプラスミド DNA のような低分子量の分子に対しては、特に使用が推奨される。検量線は可能な限り広い濃度範囲を包含し、測定手順の使用目的に適用できるものでなければならない。

PCR 効率の正確な推定値は多数の標準を用いて得られる。例えば異なる 6 つの濃度で 4 回繰り返すなど、分散して最低 24 回の測定を行うことが推奨される。

A.3 計算

以下に示す結果の評価及びパラメータの計算が提案される。

a) 反復データの外れ値の存在について試験を行う。例えば、結果の残差に関するグラフィクス検定により、外れ値を特定することができる。95%信頼性を用いることが推奨される。

1) 単一の外れ値が検出された場合、外れ値の原因を特定するために、データ及び分析のレビューを行わなければならない。原因を特定して排除可能と判断できる場合、その外れ値を分析から除外し、残りのデータを用いて検量線を作成することができる。

2) 2 つ以上の外れ値が 1 つの試料で検出された場合、当該試料に相当するデータを検量線作成に用いないことが推奨される。

b) 「標準液」の qPCR データを線形回帰式 (A.1) に適合させる。

$$y = a + bx \quad (\text{A.1})$$

ここで

y は C_q 値

x は標準液の濃度の 10 を底とする対数 ($\log_{10}(c_i)$) 又は相対濃度 (希釈系列の場合)

a は切片

b は傾き

線形回帰の相関係数を評価しなければならない。

直線性に対する別の試験を行う場合がある。例えば、線形適合性と 2 次及び 3 次多項式の適合性の比較などである [式 (A.2) 及び (A.3)]。

$$y = a + bx + cx^2 \quad (\text{A.2})$$

$$y = a + bx + cx^2 + dx^3 \quad (\text{A.3})$$

ここで、

c は二次項の係数、d は三次項の係数である。

適合パラメータ c 及び d の重要性を傾き b と比較する。c 及び d の統計学的重みは低濃度や高濃度での直線性からの逸脱を示唆している。

データが直線性から逸脱している場合、極端なデータポイントを排除し、残りのデータ (より狭い範囲を包含する) の直線性を調べなければならない。

qPCR データについては、特に特定の装置において、直線性からの逸脱が高濃度下で頻繁に見られる。この逸脱については、最高濃度の試料の蛍光が早期に増大することによって当該装置のソフトウェアがベースラインを誤って減算することが原因である可能性がある。直線性からの逸脱は PCR 効率の推定値に対して深刻な影響を持つ可能性がある。なぜなら逸脱した試料は極端な濃度にあるため線形適合性に深刻な影響をもたらし、結果として理論上ありえない 100% を有意に上回る PCR 効率の推定値が得られることになる。可能であればベースラインの設定法を調整するか、又は測定手順を狭い範囲の濃度に適用して妥当性確認することが望ましい。

c) 平均 PCR 効率 (\bar{E}) は複数の試験からの平均勾配 (\bar{b}) を持つ [式 (A.4)] から推定される。

$$\bar{E} = 10^{-1/\bar{b}} - 1 \quad (\text{A.4})$$

標準誤差 (SE) [式 (A.5)]

$$SE_{\bar{E}} = SE_{\bar{b}} \times \frac{(1+\bar{E})\ln 10}{\bar{b}^2} \quad (\text{A.5})$$

及び信頼区間 (CI) [式 (A.6)]

$$CI = \bar{E} \pm t_{95\%,n-2} \times SE_{\bar{E}} \quad (\text{A.6})$$

ここで、

$t_{95\%,n-2}$ は t 分布の逆数から計算された 95% 信頼レベルでの拡張係数である。

n は PCR 効率を調べるために行われる試験数である。

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食品微生物試験法の国際調和のための研究」

分担研究報告書

食品からのウイルス標準試験法の評価に関する研究

研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究協力者 高木弘隆 国立感染症研究所 安全実験管理部

研究要旨：ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスに代表される食品媒介性ウイルスによる健康被害を抑制・防止する上で、汚染食品の流通制御は重要な課題の一つである。本年度は、昨年度より検討を開始した、食品からのウイルス試験法案を、果実野菜および表面を適用範囲とした際の検出感度と安定性を評価した。加えて、工程管理ウイルスの安定性についてもあわせて評価を行った。本検討を通じ、食品からのウイルス試験法の室間再現性の評価にあたっては、A型肝炎ウイルス及び妥当性が確認された工程管理ウイルスを用い、磁気ビーズ法（自動抽出）により RNA 抽出を進めることを条件として設定すべきことが明らかとなった。

A.研究目的

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは、世界的に食品媒介性病原ウイルスとして認識されている。中でもノロウイルスは、国内で毎年発生する食中毒患者の約半数の原因物質として報告されている。これらのウイルスに汚染された食品の喫食は健康被害に繋がるおそれがあるため、汚染食品の流通制御は、健康被害低減に直結するといえる。

国内でこれ迄に整備されてきた「食品からのウイルス試験法」は主に食中毒対応を想定して作成された試験法であり、迅速性や検出感度に重きを置いた検討が進められてきた。一方で、食品の輸出入が増加の一途を辿る国内の現況を踏まえると、食品の安全性を確認するための標準的な試験法の

整備を検討することも必要不可欠な状況にあると考えられる。

こうした背景を基に、昨年度は国際的な関連試験法の概要を整理し、ISO 法を参照法とする標準試験法案の作成に向けた検討を開始した。本年度は、作業部会でこれまで国内では未整備である一方、欧米では標準化されている、果実及び野菜表面を適用範囲とするウイルス試験法について、添加回収試験を通じた予備検討を進めたので報告する。

B.研究方法

1. 食品マトリクス

ISO 15216-1:2017 で示される適用範囲を参考としつつ、国内で多く流通する冷凍

ベリー及び野菜（ピーマンまたはパプリカ）を添加回収試験の食品マトリクスとした。

2. 添加回収試験用ウイルス

A 型肝炎ウイルス(HAV; ATCC VR-1402)、および ISO15216-1 にて工程管理のために使用されている Mengovirus(ATCC VR-1597、及び CeeramTools ((BioMerieux))、国内でノロウイルスの代替ウイルスとして汎用されるネコカリシウイルス (FCV; ATCC VR-782)を用いた。

3. ウイルス回収方法

① 洗浄処理を通じた評価

冷凍ベリー25 g に対し、それぞれのウイルス液 5 μ L を添加した後、40 mL の緩衝液を加え、洗浄操作を行った。更に、PEG/NaCl 沈殿にて得た沈渣に PBS を加えて、RNA 抽出に供した。

② 野菜表面拭き取りを通じた評価

野菜（ピーマンまたはパプリカ）表面にウイルス液 5 μ L を滴下後、PBS で湿潤させたスワブで拭き取り、これを RNA 抽出緩衝液中で手揉み後、RNA 抽出に供した。

4. ウイルス RNA 抽出

ウイルス RNA 抽出には、従来より国内で汎用されているシリカカラム法、並びに磁気ビーズ法を用いた。前者には High Pure Viral RNA kit (Roche 社)、後者には Maxwell RSC Virus Total Nucleic Acid Purification kit (Promega 社)、並びに NucliSENS magnetic extraction reagents (BioMerieux 社)を用いた。また、対照群には PBS に懸濁したウイルス懸濁溶液より直接 RNA 抽出に供したものを置いた。

5. 遺伝子検出

上項にて抽出された RNA を鋳型核酸として、Taqman 試薬を用いた 1 Step RT-qPCR に供し、各ウイルスの遺伝子が増幅/検知されるサイクル数(Ct 値)を比較した。

C. 研究結果

1. HAV の添加回収結果

HAV の添加回収試験の結果、対照群の Ct 値は 23-24 であった(図 1)ほか、冷凍ベリーからの洗浄処理を通じて得られた成績は、シリカカラム法、磁気ビーズ法ともに、Ct 値は 30 前後となり、明確な差異は認められなかった(図 2)。また、野菜表面に添加した後に拭き取りにより得られたウイルス懸濁液を 2 種の磁気ビーズ法を用いた RNA 抽出に供した結果、磁気ビーズ①を用いた自動 RNA 抽出法による Ct 値は 28 となり、冷凍ベリーからの回収結果に比べ、より良好な成績を示した(図 3)。

2. Mengovirus の添加回収結果

自家調整した Mengovirus (ATCC 株)を直接 RNA 抽出に供した対照群の成績として、シリカカラム法の Ct 値は 34-39 の範囲で比較的ばらつきが大きくなったほか、磁気ビーズ①(自動抽出)では 29-34、磁気ビーズ②(自動抽出)では 31-35、磁気ビーズ②(手動抽出)では 32-35 となり、上述の HAV の回収成績に比べ、ばらつきを認めた(図 1)。

一方、予め妥当性が確認されている市販工程管理ウイルスキット (Mengovirus, Ceeramtools) を PBS と混合し、直接 RNA 抽出に供した場合の Ct 値は、シリカカラム法では 30-32、磁気ビーズ①(自動抽出)では 28、磁気ビーズ②(自動抽出)では 28、磁

気ビーズ②(手動抽出)では 26-27 となり、安定性の向上が確認された(図 4)。

次に、冷凍ベリーに自家調整した Mengovirus (ATCC 株)を添加し、回収を試みたところ、シリカカラム法の Ct 値は 36-37、磁気ビーズ①(自動抽出)では同値が 31、磁気ビーズ②(自動抽出)では 35、磁気ビーズ②(手動抽出)では 32-34 となり、自家調整した工程管理ウイルスでは直接 RNA 抽出を行った場合と同様、Ct 値のばらつきが大きくなる傾向を認めた(図 2)。

そこで、妥当性確認済の Mengovirus (Ceeramtools) を野菜表面に添加し、回収試験に供した。結果として、Ct 値は磁気ビーズ①(自動抽出)では 29-30、磁気ビーズ②(自動抽出)では 28-29 となり、当該工程管理用ウイルスを用いて磁気ビーズ法(自動抽出)により RNA 抽出を行うことが安定的な工程管理が行う上で重要であることを示す知見を得た(図 3)。

3. FCV の添加回収結果

FCV を PBS と混合し、直接 RNA 抽出に供した対照群の Ct 値は、シリカカラム法では 25-26、磁気ビーズ①(自動抽出)では 22-25、磁気ビーズ②(自動抽出)では 24-25、磁気ビーズ②(手動抽出)では 25-28 となり、手動抽出法では相対的にばらつきが大きくなる傾向を認めた(図 1)。

次に、冷凍ベリーに FCV を添加し、回収を試みた結果、各 Ct 値はシリカカラム法では 26-28、磁気ビーズ①(自動抽出)では 25-27、磁気ビーズ②(自動抽出)では 27、磁気ビーズ②(手動抽出)では 25-28 となり、安定性の面から、自動抽出法を用いる有意性が確認された(図 2)。

そこで、野菜表面に FCV を添加した後、回収試験に供した際の Ct 値を 2 種の磁気ビーズ法(自動抽出)により評価したところ、得られた Ct 値は、磁気ビーズ①(自動抽出)では 28-29、磁気ビーズ②(自動抽出)では 27-29 となり、共に安定的な成績が得られることが確認された(図 3)。

D. 考察

本研究では、国内流通食品を対象と想定した際のウイルス標準試験法について、コラボスタディを通じた室間再現性の確認に向けた予備検討を進めた。

これまで、国内ではウイルス RNA の抽出は主にシリカカラム法で実施されてきたが、新型コロナウイルスパンデミックの影響を受けて自動抽出装置が多くの試験所に導入されている。自動抽出装置の多くは磁気ビーズ法に基づいており、ISO 法でも後者の手法を採用している実態を踏まえ、本研究ではシリカカラム法及び磁気ビーズ法の両法を採用し、評価を進めた。

ISO 15261-1 では、工程管理用ウイルスとして Mengovirus が採用されていることから、本研究では自家調整したものと予め製造事業者による妥当性が確認された製品をそれぞれ用いて検討を進め、結果として、工程管理ウイルスの使用にあたっては、自家調整は可能な限り避け、妥当性が予め確認された製品を使用することが安定的な工程管理を図る上では極めて有用であることが確認された。

また、HAV についてはシリカカラム、磁気ビーズ法(自動・手動抽出)の間で Ct 値に明確な差異は認められなかったが、FCV については、磁気ビーズ法(手動抽出)で、

Ct 値のばらつきが大きくなる傾向を認めた。

以上の研究結果から、本試験法の妥当性確認を進める上で、HAV、及び予め妥当性確認された工程管理用 Mengovirus 製品を用いて室間再現性を確認することが今後の検討を進める上での条件として設定された。

加えて、シリカカラム法は磁気ビーズ法に比べて Ct 値が大きくなり易い傾向が確認され、また、磁気ビーズ法も手動抽出ではばらつきが大きくなる傾向も認められたことから、コラボスタディ参加試験所の施設設備状況を確認し、統一的な RNA 抽出法を設定していくことも複数機関での評価を進める上で、今後検討すべき課題と位置付けられる。

E. 結論

食品からのウイルス試験法について、予備検討を行い、本試験法の室間再現性を確認するための多機関による評価に向けては、HAV 及び妥当性確認が行われた工程管理用 Mengovirus 製品を対象ウイルスとして、磁気ビーズ法（自動抽出）を用いることを条件として検討を進めることの重要性が見出された。

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・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 参考文献

- (1) 厚生労働省. ノロウイルスの検出法.
<https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/031105-1a.pdf>
- (2) International Organization for Standardization (ISO). 2017. ISO15216-1:2017. Microbiology of food chain-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR-Part1: method for quantification
<https://www.iso.org/standard/74263.html>
- (3) Sattar SA, Ali M, Tetro JA. In vivo comparison of two human norovirus surrogates for testing ethanol-based handrubs: the mouse chasing the cat! PLoS One. 2011 Feb 24;6(2):e17340.

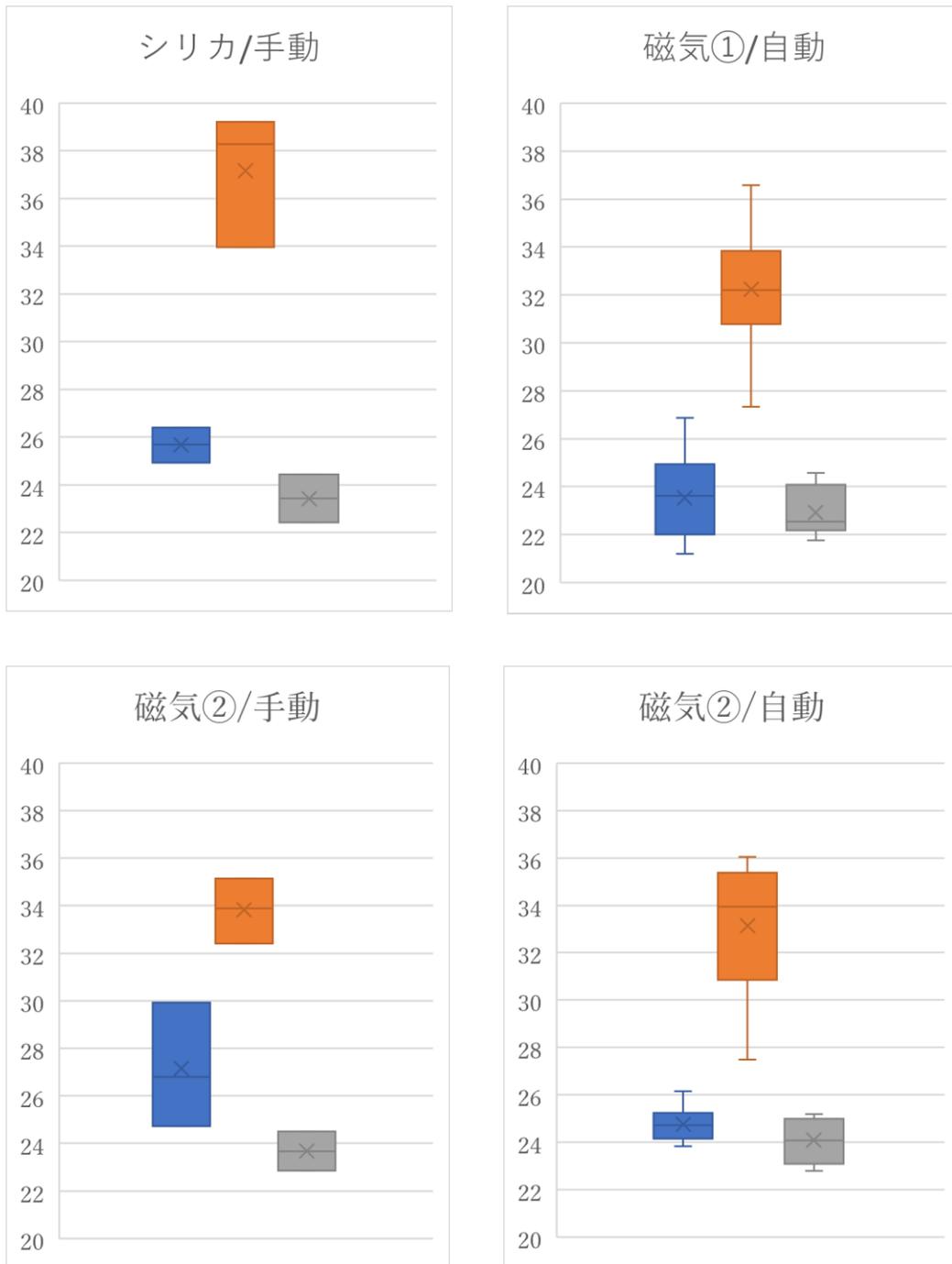


図1. 各ウイルスをPBSに懸濁した後、異なる方法でRNAを回収した際のCt値成績。
 (凡例：FCV, 自家調整 Mengovirus, HAV) Y軸はCt値を示す。

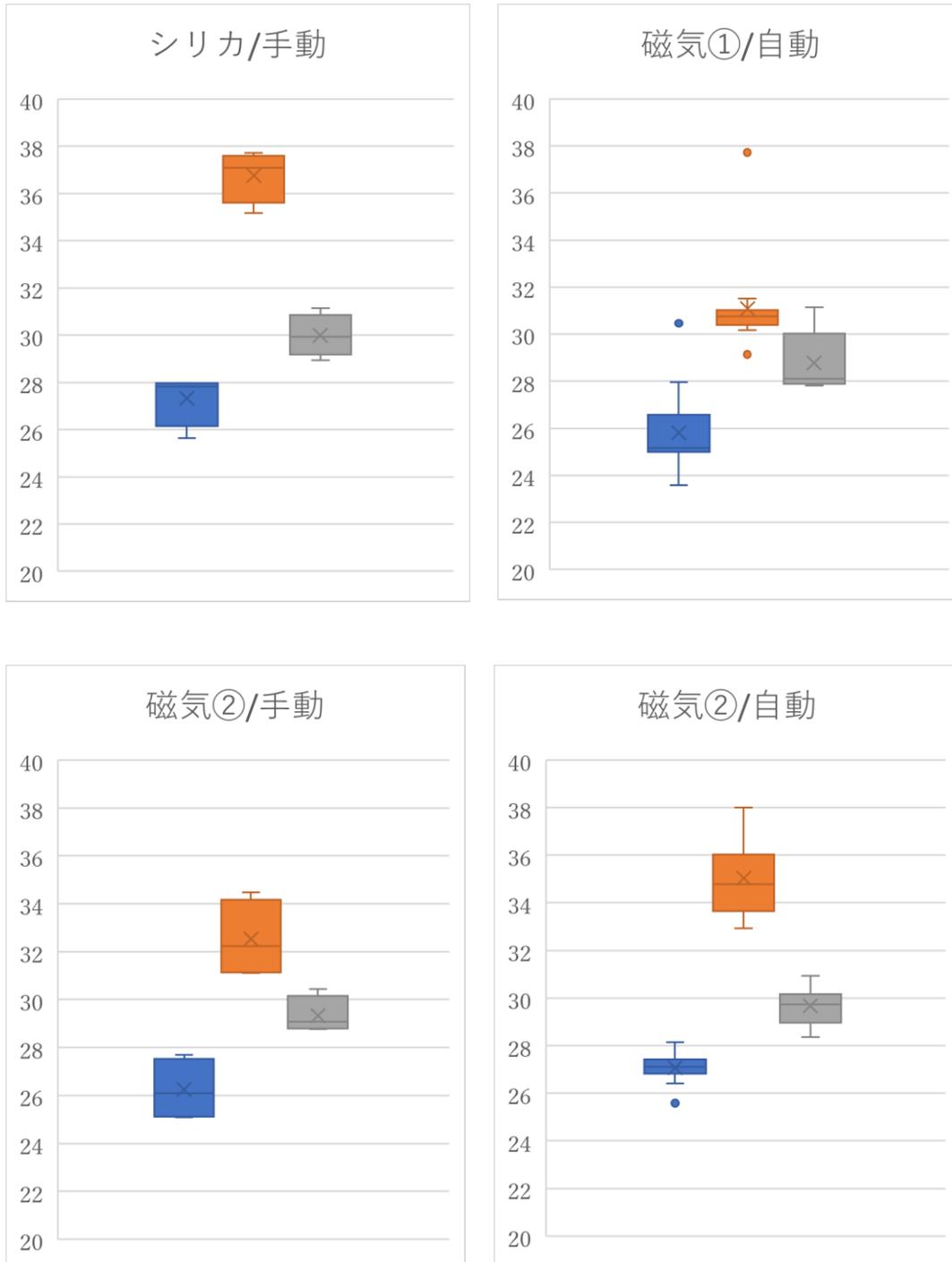


図 2. 各ウイルスを冷凍ベリリーへ添加し、異なる方法で RNA を回収した際の Ct 値成績.
 (凡例：FCV, 自家調整 Mengovirus, HAV) Y 軸は Ct 値を示す。

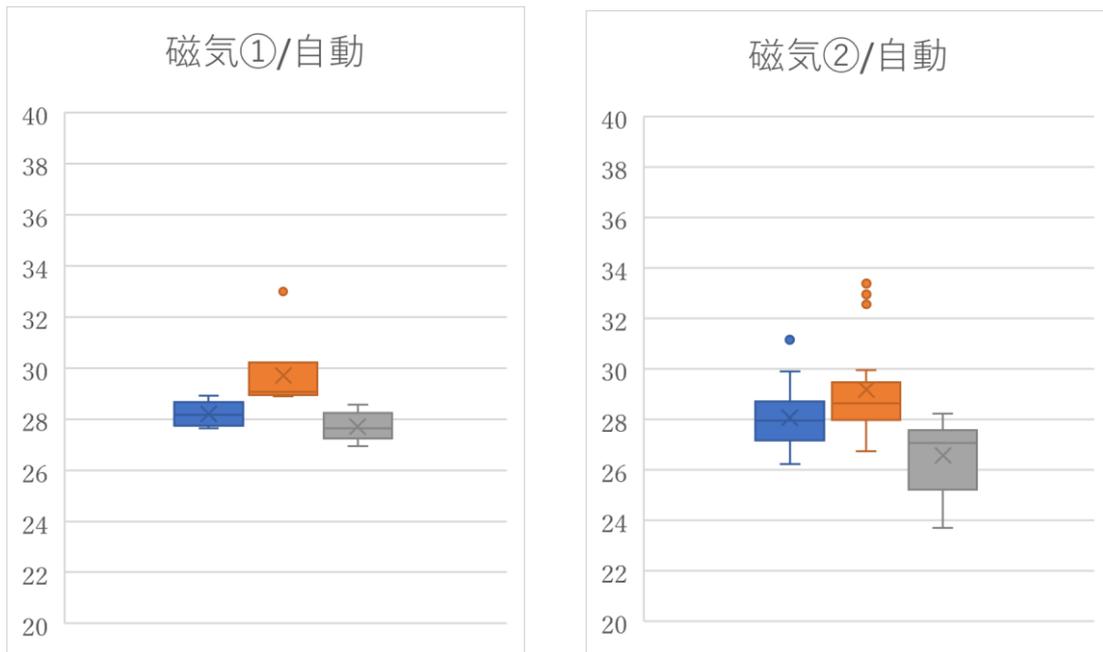


図 3. 各ウイルスを野菜表面へ添加し、拭き取り液を調整し、磁気ビーズ法で RNA を回収した際の Ct 値成績。(凡例: FCV, Mengovirus (CeeramTools), HAV) Y 軸は Ct 値を示す。

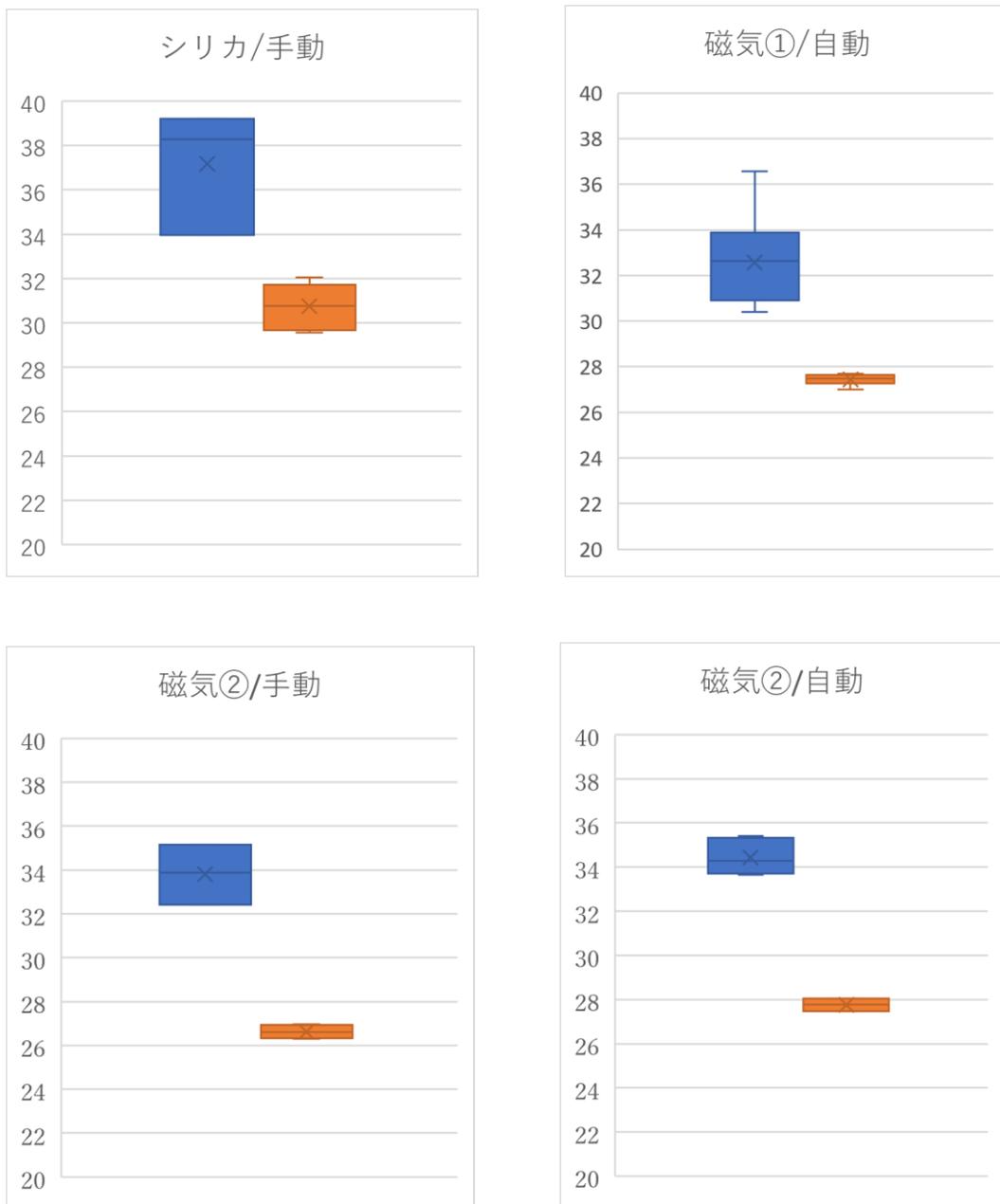


図4. 自家調整した Mengovirus ATCC 株及び CeeramTools を PBS に懸濁し、直接 RNA 抽出に供した際の Ct 値の比較. (凡例：自家調整 ATCC 株, CeeramTools) Y 軸は Ct 値を示す。