

令和 6 年度消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
総括研究報告書

食品微生物試験法の国際標準化実装に向けた研究

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

研究要旨

食品中の病原菌及び衛生指標菌を検出・定量する試験法については、食品の輸出入の活発化に伴い、各国で用いられる食品試験法の国際整合性が取れていることが国際社会において大変重要視されている。また、試験法は科学技術の進歩に伴って日々改良され、その性能は常に向上している。本研究では、食品中微生物の試験法に精通した専門家から構成される「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の活動を通じて、国際的な整合性が取れた微生物の標準試験法を確立し、食品の微生物規格基準等に関わる試験法整備のための研究を行うと共に、それらの活用の際に国際的に標準とされている妥当性評価及び検証に関する実装化のためのガイドラインを作成することを目的としている。

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

近年諸外国では食品製造環境の衛生指標としてリステリア属菌を対象菌としたふき取り検査を実施することが多くなっていることから、国内でもリステリア属菌試験法について技術仕様書（Technical Specification; TS）として、定性試験法（NIHSJ-40TS）並びに定量試験法（NIHSJ-41TS）の作成を行っている。今年度の本研究では、近年新菌種が増えているリステリア属菌について確認試験の範囲について作業部会で検討し、細胞バンクから購入したリステリア属菌標準菌株を用いた各種培地上の集落の性状解析を行うと共に、選択分離培地上でリステリアに類似した集落を形成する菌株を用いて確認試験として用いる項目の検討を行った。

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

多くの検査現場では迅速検査を目的に、定性性と定量性を併せ持ったリアルタイム PCR が多く実用されてきた。近年、リアルタイム PCR の定量性をさらに発展させ、リアルタイム PCR に比較して絶対定量などの多くの利点をもつデジタル PCR 技術が医薬の分野で利用され始めている。本研究では食品分野でのデジタル PCR 活用のためのガイドライン策定に向けた検討として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスを材料に、ウイルス検出のためのデジタル PCR の最適化に向けた検証を実施した。その結果デジタル PCR の利用に向けてはリアルタイム PCR とは異なる条件を設定する必要があることが示された。

食品中微生物試験法の国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究では、今年度は ISO TC34/SC9 の P メンバーとなっている日本の専門委員として、五十君分担研究者、松岡分担研究者及び岡田研究代表者が年次総会(R6.6.11-6.14)に参加した。また、松岡分担研究者は SC9 内の妥当性確認（バリデーション）ワーキンググループ（WG3）に専門技術委員として、WG3 会議(R6.4.8-4.10、R7.2.17-2.19)に参加（WEB）した。これらの活動によって、妥当性確認関連文書の議論〔ISO 16140 シリーズ（既刊の part1~6 の改訂、および part7 以降の新規作成）および参照法に関する ISO 17468 の改訂〕の動向を調査した。検証（ベリフィケーション）ガイドラインに関して、昨年度の第 10 改訂版を修正し、完成文書 NIHSJ-39 とした。実装の観点から、本ガイドラインの適用例として食品中のサルモネラの単一生菌検出結果に対する 50%検出レベル推定値（eLOD₅₀）解析を実施した。更に、現在検討委員会で作成中の試験法、技術仕様書等に関しては、妥当性確認に関する技術的助言を行った。また、ISO 16140-2 を筆頭に、ISO 16140 シリーズの改訂および開発動向と我が国における実装戦略の課題をまとめた。

AOAC International と ISO のガイドならびに ISO/TC34/SC9 で策定が進められているガイドラインを元に、バリデーションやベリフィケーションの手順について整理し、分担研究としては、バリデーション作業部会の承認を得て導入時の検証のガイドライン作成のためのサブワーキンググループを新たに作り、微生物試験を行う検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な簡易版導入検証（ベリフィケーション）ガイドラインについてワーキンググループ案を作成した。

これらの研究により、現在食肉製品の成分規格として用いられているクロストリジウム属菌試験法の国際整合性の検証、国際的な動向を踏まえた食品製造環境における衛生管理に用いるリステリア属菌試験法に関する技術仕様書の作成、デジタル PCR 技術を用いた食品中ウイルスの定量性の向上、試験法導入時の検証ガイドライン等、食品中の微生物試験の確立とその実施における国際実装を目指した関連文書の整備が進められ、食品から微生物を検出する試験法について、妥当性確認を含む国際整合性の確保に役立てることが可能となると思われる。

上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
松岡 英明 東京農工大学
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部

研究協力者（五十音順）

井田 美樹 東京都健康安全研究センター
微生物部
小久保 彌太郎 公益社団法人日本食品衛生
協会
小田 俊一 一般財団法人日本食品分析
センター
澤田 千尋 一般財団法人日本食品検査
下島 優香子 東洋大学 食環境科学部
都丸 亜希子 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
西田 智子 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
西野 由香里 東京都健康安全研究センター
微生物部
三橋 華子 東京都健康安全研究センター
微生物部
森 哲也 一般財団法人東京顕微鏡院
森 曜子 東京農業大学 食品安全研
究センター
門間 千枝 十文字学園女子大学
山崎 栄樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部

令和6年度食品からの微生物標準試験法検討委員会 委員（五十音順）

委員長 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究
所 食品衛生管理部
副委員長 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生
研究所 衛生微生物部

委員
五十君 静信 東京農業大学総合研究所
泉谷 秀昌 国立感染症研究所細菌第一部
岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
小田 俊一 一般財団法人日本食品分析セ
ンター
甲斐 明美 公益社団法人日本食品衛生協会
小久保 彌太郎 公益社団法人日本食品衛生
協会
小崎 俊司 大阪公立大学
小高 秀正 コダカマイクロバイオロジーア
ンドサイエンス
澤田 千尋 一般財団法人日本食品検査
品川 邦汎 岩手大学
下島 優香子 東洋大学 食環境科学部
松岡 英明 東京農工大学
森 哲也 一般財団法人東京顕微鏡院
森 曜子 東京農業大学
食品安全研究センター
門間 千枝 十文字学園女子大学
横山 敬子 東京都健康安全研究センター
微生物部

A. 研究目的

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

が用いられている。また、代替法として迅速簡便法を用いる際にも、ISO の定めるガイドラインに則った導入検証を行い、その結果を踏まえて代替法を使用することが定められている。食品の輸出入が一層活発化している今日、日本国内で用いられる試験法についても国際整合性が重視されている。本研究では、国際的な標準試験法と妥当性確認された食品中微生物の試験法の策定及びそれらの国際的な基準を満たす運用のためのガイドライン等の作成を目的とし、食品の微生物試験に携わる約 20 名の専門家により構成される「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の活動を通じ、食中毒菌及び衛生指標菌の標準試験法及び技術仕様書の作成・改訂、ガイドラインの策定を行っている。各試験法及びガイドラインは作成方針に則り、公開の場での議論を行い、4 つのステージ (ST1～ST4) で検討が進められている。今年度の研究では、現在食肉製品の成分規格となっているクロストリジウム属菌の定量試験法、国際的に食品製造施設の衛生指標として用いられているリステリア属菌の試験法、分子生物学的手法の導入に関する研究としてデジタル PCR に関する検討、食品中微生物試験法の国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究及び食品微生物試験法の簡易版妥当性評価ガイドライン策定に向けた研究を実施した。

B. 研究方法

1. クロストリジウム属菌試験法に関する研究

1) 予備検討 1

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

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

2) 予備検討 2

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

3) 検討委員会での討議

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

4) 培地における排他性の検討

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

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

5) プレスタディ案の作成

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

2. リステリア属菌試験法案の検討

第 82 回及び第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、リステリア属菌試験法作業部会案について討議を行った。それらの内容に基づき、リステリア属菌試験法作業部会において購入した 8 株のリステリア属菌標準菌株及び保有株、選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株の性状を確認した。検討した項目は、各選択分離培地及び確認試験用培地上の集落性状、溶血性、カタラーゼ試験、VP 試験、37°C と 30°C における傘状発育の確認とした。選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株については、一部の菌株から Nucleospin Blood Kit (Macherey-Nagel 社) を用いて全 DNA を抽出し、Bacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ株式会社) と Blast を用いた塩基配列解析により菌種同定を行った。更に、リステリア属菌に特異的とされる *prs* 遺伝子の検出を PCR 法により行った。

3. デジタル PCR の検討

1) 定量に用いた検体

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

2) RNA 抽出

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

3) プライマー及びプローブ

ノロウイルス: ISO15216-1(ISO)及び通知法に示される配列。

A 型肝炎ウイルス: ISO15216-1(ISO)に示される配列。

4) dPCR

使用機器

QIAcuity ONE (QIAGEN)

使用試薬

QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (QIAGEN)

QIAGEN 社の 1 step RT-dPCR キット試薬を用いた。

5) qPCR

使用機器

7500 realtime PCR システム(Thermofisher)

使用試薬

TaqMan Fast Virus 1 Step Mastre Mix (Thermofisher)

4. 国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究

1) -1. 国際標準試験法に関する動向の把握

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

改訂およびガイドライン等に関する議論に参加すると共に、情報の収集を行った。また、国際酪農連盟の国内委員会は以前より乳製品の ISO 基準の策定に寄与していたことから、2023 年 4 月より乳の国際基準を検討する ISO/TC34/SC5（乳製品の国際規格）に P メンバーとして活動することになり、五十君が国内委員会委員長、岡田が副委員長となり、こちらのサブコミティーからも情報収集を行った。アメリカにおける食品の微生物試験法に関する情報収集も行った。AOAC International 総会には、直接参加することはできなかったが、国内から当該学会に参加した AOAC インターナショナル日本セクション所属の研究者から、AOAC International の動向について情報収集を行った。妥当性確認に関する文書が AOAC International から公開されており、その内容の精査を継続した。

1) -2. ISO 16140 シリーズの開発・改訂の動向調査

ISO/TC34/SC9, 2024 年次総会(R6.6.11- 6.14) (WEB 参加)、SC9 内の妥当性確認ワーキンググループ 3 (WG3) 会議 (R6.4.8-4.10, R7.2.17-2.19) (WEB 参加) に出席した。さらに SC9 あるいは SC9/WG3 から随時発せられるメール審査（本年度は 6 回）に対応し、必要に応じてコメントを発信した。以上の活動によって得た情報に基づき、主要なトピックをまとめ、その理由や背景について概説した。特に、ISO 16140-2 に関しては、ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024 を反映した手引きとしてまとめた。

2) 検証ガイドラインの作成

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

及び検討委員会で再度議論し、ガイドラインを作成した。

3) 簡易版ガイドラインの作成

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

昨年度たたき台案として検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）も、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため検討を進めた。

C. 研究結果

1. クロストリジウム属菌試験法に関する研究

1) 予備検討 1

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

2) 予備検討 2

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

3) 検討委員会での討議

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

4) 培地における排他性の検討

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

5) プレスタディ案の作成

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

2. リステリア属菌試験法案の検討

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

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

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

3. デジタル PCR の検討

1) 定量に用いた検体

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

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

2) RNA 抽出

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

3) プライマー及びプローブ

ノロウイルス：ISO15216-1(ISO)及び通知法に示される配列。

A 型肝炎ウイルス：ISO15216-1(ISO)に示される配列。

4) dPCR

使用機器

QIAcuity ONE (QIAGEN)

使用試薬

QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (QIAGEN)

QIAGEN 社の 1 step RT-dPCR キット試薬を用いた。

5) qPCR

使用機器

7500 realtime PCR システム(Thermofisher)

使用試薬

TaqMan Fast Virus 1 Step Mastre Mix (Thermofisher)

4. 国際動向の把握及び妥当性評価に関する研究

1) 国際標準試験法に関する動向の把握

2024 年 6 月に、米国・セントルイスで開催された ISO/TC34/SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）総会へ参加し、P メンバー国

として試験法作成およびガイドライン等策定の議論に参加した。ISO/TC34/SC9の動向に関する情報収集とISO試験法の検討に加わった。総会への参加国は、フランス（幹事国）他の約27カ国であった。そのほかにAOAC International、CEN（欧州標準化委員会）、EU-RL（欧州連合レファレンス検査機関）、IDF（国際酪農連盟）、IUMS（国際微生物学連合）などの関連組織からの参加者を含め総計100名以上が参加した。参加者の多くは行政を含む研究機関や民間の研究機関、当該国の規格協会の代表者で、いずれも食品の微生物試験についてのエキスパートであった。ISO/TC34/SC9には、いくつかの既に終了したワーキンググループを除くと、現在、25のワーキンググループが活動している。今年の総会時にはさらにいくつかのワーキンググループを新規として追加の必要性あることについて議論された。この総会でわが国に求められた課題としては、一般生菌数や汚染指標均等の培養温度による集落計数値の違いに関するデータの提供、食品衛生に係わる寄生虫に関する情報提供などであった。

ISOが作成する規格については、個別の審議はTC（Technical Committee; 専門委員会）またはTCの下部組織であるSC（Sub-Committee; 分科委員会）で行われる。食品の微生物試験法に関しては、TC34「食品専門委員会」の中のSC9「微生物分科委員会」及び乳製品についてはSC5「牛乳及び乳製品」が規格の作成を担当している。SC5についても、2023年よりOメンバーからPメンバーとなり、積極的な活動を開始している。SC5の国内委員会には、研究班から五十君と岡田が参加した。

国内から当該学会に参加したAOAC International日本セクション所属の研究者から、AOAC Internationalの動向について情報収

集を行った。妥当性確認に関する文書がAOAC Internationalからも公開されており、こちらについて、その内容の精査を継続した。ISOにおける妥当性確認とAOAC Internationalにおける妥当性確認を比較し、我が国における食品の微生物試験法の妥当性確認のあり方を検討、微生物試験法に関する用語の更新、妥当性確認に関する考え方の整理を行った。

1) -2. ISO 16140 シリーズの開発・改訂の動向調査

①ISO 16104-2:2016/Amd.1:2024

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

(a) 偽陽性と偽陰性の議論：

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

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

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

・〔定性試験の代替法〕対〔定量試験の参照法〕

でバリデーション。

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

の3点のみが異なるだけで、後の条件は定性試験の場合と同じであった。

(c) 商業的滅菌試験：

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

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

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

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

②ISO 16140 の他のパートの動向

(a) ISO/PWI 16140-1 語彙

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

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

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

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

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

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

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

数を最小 250 株、最大 1000 株、と規定している。

(c) ISO 16140-6:2019 菌種、型の確認試験に利用される代替法（営利的）のバリデーション Part2 に導入された確定試験の選択肢として利用可能。

(d) ISO/16140-7:2024 菌種同定法の出版

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

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

2) 検証ガイドラインの作成

①NIHSJ-39 として完成〔添付資料 1（オンラインでは非公開）〕

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

② Draft for ISO 16140-3/FDAmD.1

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

加わる。

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

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

表 17. 妥当性確認済み同定法の実装検証における菌株数

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

表 18. 妥当性確認済み同定法の検証結果の概要

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

さらに、表 18 の具体例が附録 G として追加された。

3) 簡易版ガイドラインの作成

公定法や代替法などを実施する試験所における導入検証（ベリフィケーション）について

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

dPCR の原理は通常の PCR、qPCR と基本的に同様であるが、大きなメリットは検量線作成のための標準検体を必要とせずに、検体中の遺伝子コピー数を定量できるため、実験室内の遺伝子汚染に強いと考えられる。遺伝子コピー数の定量値そのものが食品に含まれる微生物学的リスクをそのまま評価する指標とはならないが、ノロウイルスをはじめとした培養が困難な病原体の汚染指標として利用されることが今後十分考えられ、本研究で示したようなプライマー、プローブの濃度や、PCR サイクル条件などをターゲットごとに検

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

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

ISO/TC34/SC9 からは、わが国に対してその食習慣から、寄生虫の試験法、腸炎ビブリオ試験法、プロバイオティクス (乳酸菌) 試験法への貢献が期待されている。さらには今後の試験法の発展として、遺伝子学的な試験法をどのように取り上げていくべきか、動物を用いない毒素の試験法の標準化、フローサイトメトリーによる菌数測定法、バリデーションなどの新たにはじまる WG への参加が期待されている。それぞれの試験法に係わる WG に今後積極的に参加し、試験法作成の議論に加わり貢献することが重要と思われる。また、リステリア・モノサイトゲネス試験法等使用培地の変更が検討されている試験法も複数挙げられた。

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

代替法の妥当性評価ガイドラインとして示されこれまで広く用いられてきた ISO 16140:2003 (食品の試験法のバリデーションに関するガイドライン) についても、新しい情報を加えた改訂作業が ISO/TC34/SC9 で行われており、現在も 6 つの独立したガイドラインの検

討が進められている。既にパート1の用語、パート2の代替試験法のバリデーションガイドライン、パート3のベリフィケーションガイドラインについては公開され活用がはじまっている。パート1については、用語集であり、以前示した用語集案から時間を経ていることもあり、最新の情報を反映し改正作業を行い、研究班としては作業部会で検討後、標準試験法検討委員会での確認を行っていく予定である。

また、代替試験法のバリデーションガイドであるパート2については、松岡を中心に整備を進めている。残る3つのガイドラインについては、ISO/TC34/SC9のWGでの議論は進んでいるので数年のうちには改訂作業が完了するものと思われる。これらの改訂に先立ち2012年にアメリカのAOAC Internationalは、バリデーションガイドラインを公開している。これらの2つのガイドラインは相互に整合性を持つように議論されていたが、一部の用語について異なった概念が取り入れられており、今後このあたりの考え方をどのように調整してゆくかは、TC34/SC9総会でのトピックスとなると思われる。

ISOの動向に合わせて、NIHSJ法の策定手順の見直しを行った。こちらについては、これまでホームページで公表していたNIHSJ法の作成手順が、“公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格”であるISO 17468考え方にはほぼ一致していたことから、一部の表現等の修正を行うことで対応することで引続き試験法策定の作業を行っていく。

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

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

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

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

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

一方、検査室で新たなる試験法を導入する場合は導入検証（ベリフィケーション）が求められるため、ISO/TC34/SC9との整合性を持たせるため実用性を考慮して、検討・整理した。こちらは将来的に実用的な文書としてまとめる

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

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

E. 結論

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

ゲネスの汚染指標菌として国際的に重要視されているリステリア属菌の定性法（NIHSJ-40TS）並びに定量法（NIHSJ-41TS）について、選択分離培地上での集落性状及び性状を、細胞バンクから購入した標準菌株等、作業部会保有株及びリステリア属菌類似集落を形成する菌株を用いて検討し、確認試験として有用と思われる項目を抽出した。

デジタルPCRガイドラインに関する研究としては、dPCRについて検査室、実験系の深刻な汚染原因となる標準検体を必要とせずに定量値が得られることは、検査法として優れた点である一方、その利用には既存のqPCRのプロトコルを改良する必要があることを示した。また、高濃度の遺伝子測定範囲はqPCRに劣るものの、低濃度の遺伝子検出感度はqPCRと同程度であると考えられた。検査導入に向けては、食品への添加回収試験により、遺伝子検出感度がどの程度影響を受けるかなど、さらに検討すべき項目が抽出された。

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

微生物試験をとりまく国際情勢としては、ISO/TC34/SC9総会に参加し、またAOACインターナショナル年次大会参加者からの情報提供により、多くの新しい情報を得ることができた。

バリデーションガイドラインであるISO 16140シリーズの改訂が進んでいることから、わが国もISO/TC34/SC9のWGに積極的に関与し今後のISOのバリデーションガイドラインの策定に係わっていくことが重要であると思われる。

公定法策定に関する規格である ISO 17468 を基に NIHSJ 法の策定方法について整理を行った。また、バリデーションの重要性、目的適合性、工程管理における試験法の選択に関する考え方の整理など、微生物試験法に関連する情報提供を行った。試験法導入時の検証に関しては現場での実用性を考慮したガイドライン作成のためのサブワーキンググループを作り、検討を進めた。

F. 健康危機管理情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

御の話題. 福岡県獣医師会公衆衛生部会研修会 (2024.11.9 福岡)

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |