

令和3年度年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
総括研究報告書

食品微生物試験法の国際調和のための研究

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

研究要旨：本研究では、国際的な微生物試験法に精通した専門家から構成される「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の活動を通じ、国際調和が取れた微生物試験法を確立し、食品の微生物規格基準等に関わる試験法の整備を行うことを目的として、食品微生物試験法の国際調和に向け、(1) 衛生指標菌等の食品微生物試験法に関する研究、(2) 食品微生物試験法の国際動向及び妥当性確認に関する研究、(3) ボツリヌス試験法に関する研究、(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究、(5) 食品からのウイルス試験法の標準化に向けた研究、について検討を進めた。(1) では、台湾が2021年に食品の微生物成分規格を大幅に改訂したことを受け、関連する微生物試験法を確認し、検討委員会と同様、ISO法を参照した試験法文書構成となっている状況を確認した。また、ウエルシュ菌及びセレウス菌等の標準試験法を確定したほか、NIHSJ法の作成・改訂に係るガイドラインST2案、並びにカンピロバクター定性試験法の培養時間の改訂等を進めた。更に、カンピロバクター定量試験法ST3案に係るコラボスタディを開始し、*C. jejuni*を用いたコラボスタディデータの取得と解析を進め、室間再現性の観点から、ISO法との同等性が確認された。(2) では、2021年6月にオンライン開催されたISO/TC34/SC9総会及び第26回、27回第3作業部会(妥当性確認)に参加し、情報収集及び意見交換を行い、微生物試験の妥当性評価に用いる用語の改訂、微生物試験所が試験法導入時に用いる妥当性確認のためのガイドライン案の作成、新たな試験法を開発する事業者が行うべき妥当性確認の手順等に関する情報の整理等を進め、微生物試験法の標準化を国際調和の観点から推進した。(3) では、複数機関による室間再現性の評価に向けた予備検討並びにコラボスタディ計画の策定を進め、A型、B型、F型菌を用いた解析を開始し、安定的と思われる検出成績が得られつつある。(4) では、国内で国際整合性に適合した遺伝子検査法を導入するためのガイドラインを提示することを目的に、ISOの発行する3文書を基に、食品からの微生物試験の使用者及び開発者を対象とするST2案を作成した。(5) では、野菜表面及び果実からのウイルス試験法に係る標準化を検討するため、食品マトリックスの違いの影響、RNA抽出方法、工程管理用ウイルスの調整方法について評価を進め、室間再現性評価に向けて、設定すべき条件を抽出することができた。

国内の食品微生物試験法の国際調和推進に引き続き寄与するため、上述の課題の更なる検討を進めると共に、国際動向を踏まえた課題の抽出並びに解決に向けた方針策定と実行につとめたい。

研究分担者

五十君 静信 東京農業大学
松岡 英明 東京農工大学
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所
倉園 久生 徳島大学
泉谷 秀昌 国立感染症研究所
上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所

山崎 栄樹 帯広畜産大学
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
横山 敬子* 東京都健康安全研究センター
吉田 朋高 食品分析開発センター

(敬称略、五十音順)

研究協力者 (*は検討委員会委員)

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
内田和之 ビオメリユー・ジャパン
梅田 薫 大阪健康安全基盤研究所
小川 紋 静岡県環境衛生科学研究所
荻原 博和 日本大学
奥村 香世 帯広畜産大学
甲斐 明美* 日本食品衛生協会
川瀬 遵 島根県保健環境科学研究所
工藤由起子* 国立医薬品食品衛生研究所
幸田 知子 大阪府立大学
小久保彌太郎* 日本食品衛生協会
小崎 俊司* 大阪府立大学
小高 秀正* コダカマイクロバイオロジーア
ンドサイエンス合同会社
今野 貴之 秋田県健康環境センター
澤田 千尋* 日本食品検査
品川 邦汎* 岩手大学
島田 慎一 埼玉県衛生研究所
下島 優香子 相模女子大学
高木 弘隆 国立感染症研究所
土屋 禎* 日本食品分析センター
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
檜木 真吾 東京農業大学
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
門間 千枝* 東京都健康安全研究センター
森 哲也* 東京顕微鏡院
森 曜子* 日本食品衛生協会
守山 隆敏 スリーエムジャパン
諸藤 圭 日本食品分析センター

A. 研究目的

本研究では国際的な微生物試験法に精通した専門家から構成される「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の活動を通じ、国際調和が取れた微生物試験法を確立し、特に食品の微生物規格基準等に関わる試験法の整備を行うことを目的として検討を行った。

上記委員会ではこれまでサルモネラ、黄色ブドウ球菌、リステリアをはじめとする通知法作成に寄ってきてきた。主要病原微生物の試験法は一定の成果を挙げてきたが、微生物試験法の国際調和を図る上では逐次変動する国際動向を見据えたアップデート等の作業が必要である。国際標準と認知される微生物試験法は国際標準化機構 (ISO) TC34/SC9で作成されており、日本からは発言権を有するPメンバー (委員長：分担研究者 五十君教授) として、国際調和に向けた微生物試験法に関する活動を始めているほか、研究分担者松岡名誉教授は微生物試験法の妥当性評価ガイドライン (ISO 16140) WGで意見を発信し、改訂作業への参画も求められている。

昨今の食品の輸出入拡大情勢は、国内の食品微生物試験法に関わる国際整合性の確保と情報発信が急務の課題であることを物語っている。本研究では、上記委員会を通じISO法を中心とする国際標準的な微生物試験法を参照法としつつ、国内の規格基準に関わる試験法の整備を進めると共に、我が国独自に作成した微生物試験法の英文化を進め、発信することで国内外の互換的整合を図ろうとする特色がある。特に、国内の微生物規格基準では大腸菌群等の衛生指標菌が食品別に多様な条件で設定されており、欧米等とは明確な差異が認められる試験項目である。こうした衛生指標菌の定義及び分類を試験法

の観点から整理し、もって国内の微生物規格基準に関わる試験法を国際調和のために構築しようとするところに本研究の独創性がある。更に、これ迄上記委員会では細菌及び同毒素試験の検討が主体ではあったが、食品安全領域ではノロウイルスのほか、近年の海外ではA型・E型肝炎ウイルスによる食品汚染の報告数も増加傾向にあるため、食品有害ウイルス試験法の情報収集と整備も今後、規格基準等を検討する際にはより重要な位置づけにあると思われる。そのため本研究ではウイルス試験法のアップデートや新規作成等に関わる分担項目を新たに設定した。以下に、分担研究毎に研究目的等を記す。

(1) 衛生指標菌等の食品微生物試験法に関する研究

① 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

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うち、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、これらを標準試験法として確定したほか、NIHSJ法の作成・改訂に係るガイドラインの策定に向けた検討等を進めたので報告する。

② 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

検討委員会では、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・改訂等を進めている。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1g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*を用いたコラボスタディを開始したので報告する。

(2) 食品微生物試験法の国際動向及び妥当性確認に関する研究

① 食品微生物試験法の国際動向に関する研究

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、最新の国際動向に関する情報を収集・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おり、本年度も引き続き、これらの役割を担い、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。

② 微生物試験法の妥当性評価に関する研究

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 法の作成と妥当性の評価が進められてきた。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。標準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す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の分類である。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。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

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して検討を進めた。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」にて、食品中のボツリヌス毒素産生評価法が通知法として示されているほか、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」では、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おり、両試験法ではマウス毒性試験を用いたボツリヌス菌同定法が採用されている。一方、国際標準試験法であ

る、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) ではボツリヌス毒素遺伝子をターゲットとした方法が、米国が採用する BAM 法では、マウスを用いた毒性試験、ボツリヌス毒素タンパク質の免疫学的試験並びにボツリヌス毒素遺伝子試験法が採用されている。これまで、我々はこれらの国内外の関連試験法を比較検証し、検討委員会でボツリヌス検査法として、ボツリヌス毒素遺伝子検出試験法を検討し、整備することが妥当との結論に至り、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、及び標準作業手順書を整備した。その後、コラボ実施計画案として NIHSJ-20TS-ST3 を作成し、プロトコールの実効性評価の準備を進めてきた。

本年度は、NIHSJ-20TS-ST3 に基づき、コラボスタディ計画を確定させた上で、4 機関にてコラボスタディを開始し、プロトコールの安定性と汎用性に関する評価を行ったので報告する。

(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

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。何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検討を行ったので報告する。

(5) 食品からのウイルス試験法の標準化に関する研究

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。

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、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) 衛生指標菌等の食品微生物試験法に関する研究

① 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

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 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採用された微生物試験法に関する情報を確認した。

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。

② 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

1) 予備検討

カンピロバクター定量試験法 ST3 案（NIHSJ-35-ST3）のコー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（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、試料を ISO 法に供し、保存前後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) コーラボスタディ

国立医薬品食品衛生研究所より、コーラボスタディ 参考機関（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。妥当性に関する解析の流れは本年度の妥当性評価に関する分担報告書に記載した。

(2) 食品微生物試験法の国際動向及び妥当性確認に関する研究

① 食品微生物試験法の国際動向に関する研究

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、その中で微生物標準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、米国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（分担研究者）、森曜子（研究協力者）、諸藤圭（研究協力者）、廣田雅光（研究協力者）、守山隆敏（研究協力者）、内田和之（研究協力者）、吉田朋高（研究協力者）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 並びに 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。

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エルシュ菌の標準試験法作成にあたっての評価方法について支援を行った。

② 微生物試験法の妥当性評価に関する研究

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。また、SC9 および SC9/WG3 の各事務局から随時送信される文書情報を分析した。

これらの海外情報に基づき、本年度は特に、(1) NIHSJ 法検証ガイドライン、及び (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、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、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 委員や引用文献著者との情報交換によって理解を深めた。また、*Campylobacter jejuni* 定量試験法(NIHSJ-35-ST3) のコロバスタディ結果を、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。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

1) 簡易 DNA 抽出キットの検出感度分析

昨年度迄に整備した芽胞調整プロトコール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

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

C. botulinum 62A 株を用いたコラボスタディで は、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、菌株毎に芽胞調整 プロトコールの整備を行う事とした。

4) 検討委員会における確認

作業部会会議にてコラボスタディで用いる添加 菌量及び一般食品の種類を検討し、第 74 回検討委 員会に提案を行い、作業計画の一部改訂を行った。 その後、作業計画改訂版に従って作業部会にて解析 を実施し、第 75 回及び第 76 回検討委員会におい て進捗状況を報告した。

(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

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」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」に諮り修正を行った。

(5) 食品からのウイルス試験法の標準化に関する 研究

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)、及び ISO15216-1 で工程管理用とされる Mengovirus (ATCC VR-1597, CeeramTools)、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。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. 研究成果

(1) 衛生指標菌等の食品微生物試験法に関する研究

① 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

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が大幅に改訂され、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（含氷雪氷菓）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、培養条件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い、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。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、ガイドライン案へ反映させた。

標準試験法（NIHSJ法）は原則として4つのステージを経て作成される：ステージ1では試験法作成の起案等を行い、ステージ2では作業部会での検討データを基に作業部会案を作成、ステージ3ではコラボラティブスタディを実施した上で、ステージ4で最終議論を行い、試験法を確定する流れとなっている。一方、本ガイドライン作成にはデータ取得作業が含まれないため、ST3は含めず、次回以降ST4へ進むことが第74回検討委員会で承認された。

② 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

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、被験菌株を含む試料の輸送過程は本菌の生存性、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（ $n=8 \times 3$ 時系列）。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、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。

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 R^2 値は0.9938と極めて高い値を示したほか、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。また、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。

以上より、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ず、mCCDA培地を選択分離培地とするNIHSJ法をコ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。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。

以上より、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。以上の内容について第75回検討委員会で審議を行い、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、中濃度接種群、高濃度接種群及びBlankからなる鶏皮試料を調整し、計10機関へ輸送した。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後、室間標準偏差等を求めたところ、ALs 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。

(2) 食品微生物試験法の国際動向及び妥当性確認に関する研究

① 食品微生物試験法の国際動向に関する研究

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。

② 微生物試験法の妥当性評価に関する研究

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。以下の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. SIR の検証法
7. eBias の検証法
8. 検証のためのフロー

これらの骨子は次に要約される。

- ・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(ペットフードや家畜糞尿など)が対象になっている。
- ・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。
- ・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である。
- ・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。

- ・検証すべき性能指標は eLOD₅₀、SIR、eBias、包含性・排他性である。
- ・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、SIR の値である。
- ・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従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国外の現状を鑑みると、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

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、本年度の作成文書は、特に POD 及び 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/2022.4.12PODLOD.pdf>)。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。

3) *Campylobacter jejuni* 定量試験法

(NIHSJ-35-ST3)の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 SL 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。

- ①Smirnov-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
- ④Cochran 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 SL 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
- ⑫Bias、 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 ALs 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。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

1) 簡易 DNA 抽出キットの検出感度解析

NIHSJ-20TS-ST3 で示される DNA 抽出法は、ISO 法と同様に CTAB 法を採用しているが、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最適とは言い難いことが作業部会で議論された。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、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。本結果を第 74 回検討委員会で報告し、コラ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いる。国内での健康被害実態に基づいた試験対象とすべき一般食品の選定は困難であったため、ISO16140-3:2021 Annex A に示される食品から選定することとした。食品マトリクスは、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、なおかつ ISO16140-3:2021 の Annex A で示されている「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し、これらを食品マトリクスとすることが承認された。

3) 接種菌量の設定

コラ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、*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。食品マトリクスにはハヤシライスソース (pH: 5.2、水分活性： > 0.98) を用いた。結果として、1,000 spore cfu/25g 試料で安定的に陽性となることが確認され、一般食品に対するコラボスタディにおいても 1,000 spore cfu/25g 試料を接種菌数とすることとした。

4) コ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ラ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。

更に、過去の食中毒事例の発生状況等を勘案し、B 型菌 (Okra 株) は、はちみつと一般食品、E 型

菌（Biwako 株）及び F 型菌（Langeland 株）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のみとし、各 2 濃度（はちみつでは 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する提案内容を作成・提出し、第 74 回検討委員会で承認された。

5) コラボスタディの結果

A、B、F 型菌については、芽胞調整に支障は見られず、検出安定性にも支障は見られなかった。

(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

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。各々の表題名（邦訳）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：食品及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マーゼ連鎖反応（PCR）－性能特性評価にあつての要求事項

・ 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マーゼ連鎖反応（PCR）－一般要求事項及び定義

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ることを確認し、本文書をベースに、ISO 22118 に記載の試験法の性能に関する要求事項、並びに 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 案として作成した。同案は ST2 としての承認を得て、次回以降は ST4 へ進むこととなった。

(5) 食品からのウイルス試験法の標準化に関する研究

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、冷凍ベリーからの洗浄処理を通じて得られた Ct 値はシリカカラム法、磁気ビーズ法ともに、30 前後となり、明確な差異は認められなかった。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、冷凍ベリーからの回収結果に比べ、やや良好な成績を示した。

2) Mengovirus の添加回収結果

自家調整した Mengovirus を直接 RNA 抽出に供したところ、シリカカラム法で抽出した際の Ct 値は 34-39 で比較的ばらつきが大きくなった。同様に、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。一方、予め製造事業者により妥当性が確認されている市販の工程管理用 Mengovirus 製品（Ceeramtools）を直接 RNA 抽出に供した際に得られた 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。

このほか、冷凍ベリーに自家調整した Mengovirus（ATCC 株）を添加し、回収を試みた場合にも、シリカカラム法により得られた Ct 値は 36-37、磁気ビーズ①（自動抽出）では 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、直接 RNA 抽出を行った場合と同様、自家調整した工程管理ウイルスでは Ct 値のばらつきが大きくなる傾向を認めた。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。

3) FCV の添加回収結果

FCV を PBS と混合し、直接 RNA 抽出に供した際の 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、Mengovirus で見られた事象と同様に、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。

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、成績の安定性確保の点から、自動抽出法を用いる有意性が確認された。

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。

D. 考察

(1) 衛生指標菌等の食品微生物試験法に関する研究

① 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

近年では、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 *B. 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、これまで食品中のウエルシュ菌及びセレウス菌の試験法が公定法や国際整合性のある試験法として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。これらの標準試験法は、今後、食中毒対応を含む行政検査や輸出事業者の出荷前製品検査等への適用を通じ、我が国の食品微生物試験の国際標準化に寄与するものと期待される。

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 以上の培養温度では分離同定作業に支障が生じることも報告されており、本試験法の整備は、年々輸出入量が増加傾向にある食肉及び食肉製品等の微生物試験への適用を通じ、国際間での当該菌試験に関する疑義照会リスクを低減させ、食品流通の円滑化に資するものと考えられる。

検討委員会で作成改訂を進め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。こうした改訂を受けて、NIHSJ 法を改訂する際の方針については明確に定められていない状況であったことから、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。

② 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

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。本菌の微好気性の性質から、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。同培地は選択性が高く、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の利点を有しており、その活用

は試験実施者の集落計数時の作業簡便化に資すると期待される。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。

(2) 食品微生物試験法の国際動向及び妥当性確認に関する研究

① 食品微生物試験法の国際動向に関する研究

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訂作業を行い、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、松岡英明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ため、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の考え方には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。

② 微生物試験法の妥当性評価に関する研究

本年度は 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。本案は、今後バリデーション作業部会並びに検討委員会での議論を経て最終確定する予定ではあるが、その内容は食品を取り扱う試験所で、使用する試験法の妥当性を確認する際の参考資料として活用されることで、国際標準的な試験法の妥当性確認が国内の試験所に普及・浸透し、特に輸入食品の微生物試験を行う試験所が、自ら用いる微生物試験の妥当性を表明することが可能となるものと期待される。

また、本年度は新たに開発される微生物試験法の妥当性評価を進める際の科学的根拠となりうるガイドライン案の作成についても検討を進めた。本案の最終確定は、NIHSJ 法の妥当性評価方針を明確化し、標準試験法の作成・改訂の透明性を更に向上させるものと思われる。また、国内製造事業者が新たに試験法を開発する際の根拠として活用することで、国際標準的な方法で妥当性が確認され、試験法としての性能が使用者が入手し易くなるものと期待される。

更に、本年度は、*C. jejuni* を用いたコラポスタディ成績に関する妥当性評価に対し、上述の知見を踏まえて技術的助言を行った。これまでの NIHSJ 法として作成されてきた定量試験法の中で、フルコラ

ポスタディを通じて定量成績を求め、妥当性を評価した試験法はないため、今回構築したスキームは今後、定量試験法を新たに検討する際にも適用可能となるものと考えられる。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

本年度は NIHSJ-20TS-ST3 コラポスタディ作業計画を構築し、コラポスタディを開始した。コラポスタディ作業計画の構築に必要な予備検討を行い、検討委員会での審議を経てコラポスタディ実施を開始した。現在までに A,B,F 型菌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。

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おり、これらの事項について今後作業部会で検討を行う予定としている。

- ・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。
- ・コラポ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。

(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

ISO 20395、ISO 22118、ISO 22119 の 3 文書の

うち、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が、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。検討の過程では、内容を使用者向けと開発者向けで明確に識別できるような構成が望ましいとの意見が挙げられ、それらを踏まえた ST2 案の作成を進めた。

(5) 食品からのウイルス試験法の標準化に関する研究

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、コロ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、コロ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、検討すべき課題と考えられる。

E. 結論

(1) 衛生指標菌等の食品微生物試験法に関する研究

① 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

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。

② 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

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ロ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ロボスタディを行い、最終的に NIHSJ 法の妥当性を確認できた。なお、本試験法の対象には *C. coli* も含まれているため、次年度には当該菌種を用いたコロ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。

(2) 食品微生物試験法の国際動向及び妥当性確認

に関する研究

① 食品微生物試験法の国際動向に関する研究

微生物試験をとりまく国際動向を収集・分析するため、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。

② 微生物試験法の妥当性評価に関する研究

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、評価に際して専門的助言を行った。

(3) ボツリヌス試験法に関する研究

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評価し、コラボスタディへの使用に支障ないことを確認できた。
- 2) 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。

(4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

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、遺伝子検査法を個別の試験法に導入した例はまだそれほど多くはないが、今後は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想定される。こうした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を策定していくことは重要と考えられる。

(5) 食品からのウイルス試験法の標準化に関する研究

食品からのウイルス試験法の標準化に向けて、昨年度作成した試験法原案に係る予備検討を行い、本試験法の室間再現性を多機関で評価する際には、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するこの有用性を見出した。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 書籍
 - 1) 朝倉宏. (2022) カンピロバクターによる食中毒. 臨床検査 (医学書院). 66: 32-38.
2. 論文
 - 1) 朝倉宏. (2021) *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. 71:15-21.
 - 2) 五十君静信. (2021) 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.

- 3) 五十君静信. (2022) 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.

3. 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) 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.)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 朝倉宏. カンピロバクター総論. 国立感染症研究所令和3年度細菌研修. (2022.1.24)
- 6) Hiroshi Asakura: Microbiological Risk Assessment Framework and Process Flow: JEMRA Approach. ILSI South East Region Workshop on Microbiological Risk Assessment (2022.3.17)

H. 知的財産権取得状況

該当なし

