

研究課題名： 食品微生物試験法の国際調和のための研究

分担研究課題： 遺伝子検査法の導入に関する研究

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 39 万、大腸菌では約 24 万株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大きな影響を与え、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（ISO）でもシガ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。リアルタイム PCR に係る ISO 文書の情報収集、ガイドライン案の検討を行い、「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」案の作成を行った。

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、サルモネラで約 39 万、大腸菌で約 24 万株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）でもシガ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た。

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）法に関する文書を検索し、その情報収集を行った。

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、「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、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。

ガイドライン案作成におけるステージのあり方について、検討を行った。

C. 研究結果および考察

令和2年時点で、PCR及びリアルタイムPCR法（qPCR法を含む）に関するISO文書は約30あった。

個別の対象を試験する文書としては19あり、食品の試験法に係るものとしては、シガ毒素産生性大腸菌（ISO/TS 13136:2012）、A型肝炎ウイルス及びノロウイルス（ISO 15216-1/2:2017/2019）、ボツリヌス毒素（ISO/TS 17919:2013）、エルシニア（ISO/TS 18867:2015）、サルモネラ（ネズミチフス菌の単相バリエーション）（ISO/AWI/TS 6579-4）があった。

遺伝子試験法全般に係るISO文書としては、PCR法関連で5、リアルタイムPCR法関連で3あった。前者の一部（ISO 22174、ISO 20837、ISO 20838）についてはNIHSJ-34-TS「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」のベースとなった。

リアルタイムPCR法全般及びPCR法の性能特性に関する以下のISO文書を参考に、「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」案を作成した：

ISO 20395：バイオテクノロジー — 標的核酸配列の定量法（qPCR）の性能評価にあたっての要求事項

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

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。

具体的には、食品の試験法に関連するISO 22119及びISO 22118をベースとし、ISO 20395を付加する方向でガイドライン案を検討した（ST1）。

ガイドライン案作成に当たり、ステージのあり方について検討し、一般的な標準試験法におけるST3（プロトコールを検証・評価するコラボ案の計画及び実施）をスキップするステージ構成を提案し、本委員会において承認された。

作業部会において原案を作成し、ST2案として承認された。

本委員会、作業部会並びにバリデーション作業部会森曜子先生から意見を収集しST4案の作成を行った。ST2案からST4案にかけて、以下の作業を行った：

用語の統一化、必要な用語の説明の追加を行った。

本ガイドライン案が、試験法の利用者と試験法の開発・評価者の両者を対象としたことから、それぞれが参照すべき該当箇所がわかるように、表の追加を行った。

開発・評価部分の特に測定の不確かさについて、文献 Griffiths KR, et al. Quantitative polymerase chain reaction: a framework for improving the quality of results and estimating uncertainty of measurement, Anal. Methods, 2011, 3, 2201–2211.の情報を基に具体的な解析の実施例を追加した。

本委員会において当該案はNIHSJ-38TS-ST4最終案として承認された。

PCR及びリアルタイムPCRを始め、遺伝子を使用した試験法は技術の進歩が非常に早い。本ガイドライン案は一般的なものとして作成したが、今後、技術の変化に対応して改訂を検討する必要が生じる可能性が考えられる。

D. 結論

細菌の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。PCR 法及びリアルタイム PCR 法は広く普及しており、多様な微生物に迅速に対応するために、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。今後ますます遺伝子検査法を使った試験法が開発されることが予想される。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、国際的な基準に沿ったガイドライン案の策定は重要であると考えられる。

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

