令和２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）
分担研究報告書

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
　　　　　　五十君靜信　　　東京農業大学
　　　　　　松岡　英明　　　東京農工大学大学院
研究協力者　森　曜子　　　　公益社団法人日本食品衛生協会
　　　　　　諸藤　圭　　　　一般財団法人日本食品分析センター
　　　　　　廣田雅光　　　　一般財団法人日本食品検査
　　　　　　吉田朋高　　　　一般財団食品分析開発センターSUNATEC
　　　　　　内田和之　　　　ビオメリュージャパン株式会社
　　　　　　守山隆敏　　　　スリーエムジャパン株式会社
　　　　　　百瀬愛佳　　　　国立医薬品食品衛生研究所　食品衛生管理部
　　　　　　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
　腸内細菌科菌群試験法（NIHSJ-15, 16）並びにリステリア・モノサイトゲネス試験法（NIHSJ-08,09）について用語及び体裁の統一化を図り、2020 年版として最終確定した。これら試験法について、厚生労働省に提示し、通知法改正の根拠として活用された。また、カンピロバクター定量試験法のうち、確認試験に用いる PCR 法の妥当性評価を行い、これまでの検討内容を取り纏め、検討委員会での審議を経て、NIHSJ-35-ST3 として共同試験へと進むことが承認された。更に、こうした標準試験法の作成及び改訂のガイドライン案を検討委員会に議題として提示し、NIHSJ 文書として、ISO 17468:2017 を確認しつつ原案の作成を開始した。ISO 17468:2017 では、これ迄に妥当性評価されていない参照法を、ISO 法等の標準試験法と比較検討しつつ作成する場合や作成された参照試験法を改訂する場合のガイドラインとして国際標準化機構（ISO）第 34 技術分科会第 9 分科会より発行されたものである。新たな参照試験法の妥当性確認は、①試験法の選定②試験法の評価③複数試験所による共同試験④更なる妥当性確認のための試験法選定⑤コラボラティブスタディーの 5 段階に分けて行われることが示されており、その手順は「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の従来からの作成方針とほぼ同様であった。また、参照法を改訂する際には、大規模な変更（用いる試験技術の変更、培地・培養温度及び時間等の変更）と小規模な変更（文章の表現上の変更等）に分けられ、改訂の担当者がいずれに当たるかを評価することとされていた。大規模な変更の場合は、その裏付けとなるデータの評価が必要とされており、参照法の改訂手順についても、検討委員会で行われている標準試験法の改訂手順との整合性が確認された。

A.　研究目的

　食品中の微生物を検出するための試験法は、その目的に応じて幾つかに分類される。対象食品に規格基準が設定されている場合、その基準適合性の判断には、国により定められた公定法を用いる必要がある。また、微生物規格が設定されていない微生物についても、参照すべき標準試験法が定められているものがある。また、

今日では、世界貿易機関（WTO）加盟国において、科学的な正当性を示すことなく海外で広く用いられている規格基準や試験法と異なる国内規格や試験法を用いることは、非関税障壁とみなされ、提訴される可能性がある。逆に、諸外国で用いられている試験法よりも感度の低い試験法を用いている場合は、海外で流通できない汚染レベルの食品が国内に輸入されるリスクも考えられる。我が国は多くの食品を海外からの輸入に頼っており、食品の規格基準及びその試験法における国際ハーモナイゼーションは極めて重要といえる。そこで平成 17 年に、日本国内における食品からの微生物試験法の今後の方向性を議論し、標準試験法を作成するため、約 20 名の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」(以下、検討委員会）が結成された。検討委員会においては、試験法についての議論を公開の場で行い、表 1 に示す 4 ステージを経て試験法を作成してきた。一方、国際標準化機構（International Organization of Standardization：以下 ISO）が定める国際的な標準試験法（以下 ISO 法）において、2017 年に第 34 技術分科会中の第 9 分科会より、「妥当性評価されていない参照法について標準試験法と比較検討を行って作成する際、及び作成した参照試験法の改訂を行う際のガイドライン」として ISO 17468 が発行された。

本研究では、こうした背景を踏まえつつ、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の運営にあたり、昨年度 ST4 として策定した、腸内細菌科菌群試験法（NIHSJ-15, -16)、並びにリステリア・モノサイトゲネス試験法（NIHSJ-08, -09）について、定量法と定性法間で文章表現上に整合が取れていない点を鑑み、これらの整理を行うこととした、また、定量的リスク評価が国際的に求められる中、食鳥肉等を主な適用範囲とするカンピロバクター定量試験法について、検討を進めた。

更に、本研究では、ISO 17468 を詳細に確認し、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において実施している作成方針・手順との比較を行うことで、更なる国際調和に向けた微生物試験法の作成にあたることを目的として検討を進めたので報告する。

B. 研究方法

1) 腸内細菌科菌群試験法及びリステリア・モノサイトゲネス試験法の小規模改訂

腸内細菌科菌群試験法（定性試験法 NIHSJ-15、定量試験法 NIHSJ-16）及びリステリア・モノサイトゲネス試験法（定性試験法 NIHSJ-08、定量試験法 NIHSJ-09）について、定性・定量試験法間で表現等の比較確認を行い、検討委員会に小規模な修正案として提示した。

2）カンピロバクター定量試験法

カンピロバクター定量試験法（NIHSJ-35-ST2）について検討を進めるため、本年度は確認試験に用いるとした PCR 法の評価を行った。包含性試験には計 96 株の *C. jejuni* 及び *C. coli* 株を、排他性試験には *C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. hyointestinalis*、*C. fetus*、*E. coli*、*Salmonella* spp.、*Arcobacter butzleri*、*Helicobacter pylori*、*Aeromonas* spp.、*Enterobacter* spp.、*Shigella* spp.、*Vibrio cholera*、*V. parahemolyticus* を含む計 99 株を用いた。

また、コラボスタディ計画案の作成にあたっては、カンピロバクター作業部会をオンラインで開催し、検討項目や検討時期等の案を作成した。

3) ISO 17468:2017 の確認を通じた標準試験法作成方針案の作成

ISO 17468:2017 文書の内容を確認、精査しつつ、バリデーション作業部会が作成した ISO 16140-1:2016 に基づく用語集との整合性を確認し、標準試験法作成方針の原案（初版）を作成した。その後、第 42 回バリデーション作業部会で作業部会案として改訂を行い、第 73 回検討委員会に議題として提出し、議論を行うこととした。

C．研究結果

1) 腸内細菌科菌群試験法及びリステリア・モノサイトゲネス試験法の改訂（2020）

腸内細菌科菌群試験法（NIHSJ-15, 16）及びリステリア・モノサイトゲネス試験法（NIHSJ-08, 09）は共に定性試験法と定量試験法の両者を含んでいる。これらは個別に検討・確認がなされてきたことから、文言の表現方法や体裁は必ずしも一致しない点が複数確認された。特に、リステリア・モノサイトゲネス試験法については、現行の通知法に定性・定量法が共に採用されているが、通知法の表現についても整合が取れていない箇所が複数見受けられる状況であった。標準試験法の記載の在り方については、昨年度の検討委員会で提案が出された事を受け、本年度はその整合性確保に向けて、文書としての整理を行い、第 73 回検討委員会で確認がなされ承認された。その後令和３年３月に検討委員会ホームページ上でこれらの試験法改訂版を公開した。また、並行して厚生労働省食品基準審査課に情報提供を行い、通知法として採用されているこれらの試験法の改訂通知を出す際の参考資料として活用された。

2）カンピロバクター定量試験法における確認試験としての PCR 法の評価

カンピロバクター定量試験法（NIHSJ-35-ST2）については、これまでコラボスタディに向けて、適用範囲、コラボスタディで用いる食品マトリックス、希釈倍率、塗抹液量、選択培地等の要素について比較検討を行ってきた。本年度は確認試験に用いる PCR 法の検証を行うこととした。

PCR 法の評価にあたって、C. jejuni 及び C. coli 計 96 株を対象とした試験を行ったところ、全ての菌株が陽性反応を示した。これに対して、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. hyointestinalis*、*C. fetus*、*E. coli*、*Salmonella* spp.、*Arcobacter butzleri*、*Helicobacter pylori*、*Aeromonas* spp.、*Enterobacter* spp.、*Shigella* spp.、*Vibrio cholera*、*V. parahemolyticus* を含む計 99 株を対象とした試験では陽性反応は認められなかった（表 1）。以上の結果より、NIHSJ-35-ST2 で記載する PCR 法については十分な包含性・排他性を有することが確認された。

表 1. PCR 試験結果の概要.

菌属種	供試菌株数	陽性菌株数	陰性菌株数
C. jejuni	48	48	0
C. coli	48	48	0
C. lari	3	0	3
C. upsaliensis	2	0	2
C. hyointestinalis	2	0	2
C. fetus	3	0	3
E. coli	25	0	25
Salmonella spp.	20	0	20
Arcobacter butzleri	15	0	15
Helicobacter pylori	5	0	5
Aeromonas spp.	7	0	7
Enterobacter spp.	5	0	5
Shigella spp.	4	0	4
V. cholera	3	0	3
V. parahemolyticus	5	0	5

次にコラボスタディを行うための計画案を作業部会で議論し、作成した（図１）。本試験法は定量試験であることを踏まえ、低濃度、中濃度、高濃度の接種検体を調整することとし、少なくとも 8 箇所以上の試験所に群毎に同時配布することとした。

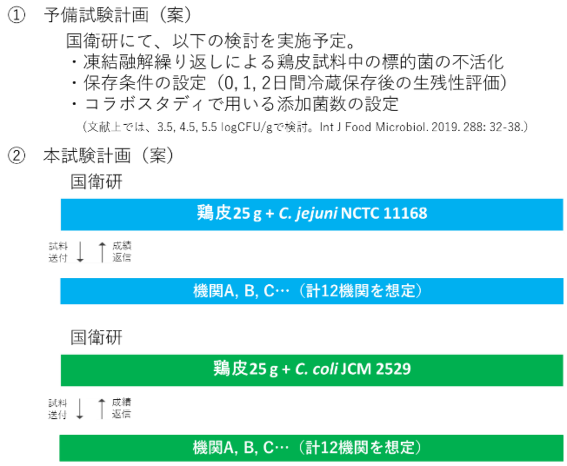

図 1.　コラボスタディ計画案

上記の成績を第 73 回検討委員会に議題として挙げ、議論を行ったところ、予備的に追加検討すべき事項はあるが、コラボスタディへ進めることについては支障がないと判断され、次回以降は NIHSJ-35-ST3 として検討を進めることが承認された。

3) ISO 17468:2017 の確認を通じた、標準試験法作成方針案の作成

ISO 17468:2017 では、新たな参照試験法の妥当性確認は、①試験法の選定、②試験法の評価、③多試験所による共同試験、④更なる妥当性確認のための試験法選定、⑤コラボラティブスタディー、の 5 段階に分けて行われることが示されていた。参照試験法の改訂については、用いる試験技術の変更、培地組成、培養時間及び温度等の変更については大規模な変更と見做される一方、文章の表現上の変更等については小規模な変更と定義されていた。なお、大規模な変更の場合は、その裏付けとなるデータの評価が必須とされる一方、小規模な変更については背景説明や議論を経て決議されることも可能な状況であることが示され、特に本年度行った計 4 試験法の改訂は後者に位置づけられる内容で、その取扱いについても ISO で示される流れと同等のものであることが確認された。

D.　考察

本研究では通知法に活用されてきた腸内細菌科菌群及びリステリア・モノサイトゲネス試験法の中で小規模な改訂を行い、より整合の取れた標準試験法の策定に向けた活動を行うことができた。

また、カンピロバクター定量試験法については、検討委員会での審議を経て、コラボスタディを開始する ST3 へと進めることが出来た。次年度には前期より予備試験を進めつつ、コラボスタディ参加機関との調整をはかり、円滑なコラボスタディの実施につとめたい。

さらに、本研究では ISO 17468:2017（国際標準試験法である ISO 法との間で妥当性が評価されていない参照法を、標準試験法と比較検討を通じて評価する場合や、作成済の参照試験法の改訂を行い場合の手順を示したガイドライン文書）の詳細が明らかとなった。参照試験法の作成は 5 段階に分けて行われ、その内容は過去 14 年にわたり活動している「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における日本国内の食品中微生物の標準試験法作成方針とほぼ同じ内容であった。次年度には、以前より検討が行われている ISO

16140-2:2016との整合性や相違点を確認し、検討委員会の作成及び改訂方針について見直すべき箇所の有無等を行う予定である。

本委員会ではこれまでに､35種のNIHSJ法について検討を行っており､それらはISO法やBAM法等国際的な標準試験法との妥当性確認やハーモナイゼーションを重視して作成している。ISO法は約5年毎に見直しを行うこととされており、今後も国際整合性を鑑み、ISO 法の改訂や技術の進歩に合わせたNIHSJ法の見直し及び改訂を行う必要があると思われる。また、NIHSJ法について食品の輸出入に関連した問い合わせも見られていることから、今後、作成及び改訂方針や作成した NIHSJ 法の英文による公表も検討が必要となるものと考えられる。

E.　結論

腸内細菌科菌群試験法並びにリステリア・モノサイトゲネス試験法について用語及び体裁の統一化を図り、2020年版として最終確定した。これら試験法について厚生労働省食品基準審査課に提示し、通知法改正の根拠として活用された。

カンピロバクター定量試験法に示されるPCR確認試験法を検証し、妥当性が確認されたことから、NIHSJ-35-ST3として共同試験へと進むことが承認された

ISO 17468:2017の確認を通じた国内標準試験法の作成や改訂に向けたガイドライン案の作成を開始した。ISO 17468:2017に示される試験法作成のためのガイドラインは、これまでに「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において用いてきた標準試験法の作成方針と同様の骨子であることが確認され、引き続き、国際整合性を担保した試験法策定を行う意義が示された。

F.　健康危険情報

特になし

G.　研究発表

1.　論文

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.

2) Asakura H, Sakata J, Yamamoto S, Igimi S. Draft genome sequences of non-H_2S-producing strains of *Salmonella enterica* serovars Infantis, Enteritidis, Berta, and Kiambu in Japan. Microbiol. Resour. Announc. 2020. 9(30): e00335-20.

2.　学会発表

1) 朝倉宏. ボツリヌス菌及びその他の食中毒細菌等の試験法の動向について. 令和2年度衛生微生物技術協議会関東甲信越ブロック細菌部会. 2020年11月6日, 埼玉県.

H.　知的財産権の出願・登録状況

なし