

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）
「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

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 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30万、大腸菌では15万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（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するためのガイドラインの検討を目的としている。本年度は遺伝子検査法作業部会を設置し、リアルタイムPCRを含めた遺伝子検査法の情報収集、並びにリアルタイムPCR法の策定に関するISO文書の策定状況並びにその内容を確認した。

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、サルモネラでは約30万、大腸菌では15万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ホームページ上にある微生物試験法の中で、遺伝子検査法（PCR法、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、その情報をまとめた。

上記文書のうち、qPCR法に係る試験法作成に係る要求事項を記載したISO20395について、内容を検討した。

昨年度までにISO22174、ISO20837、ISO20838をベースに作成したガイドライン案NIHSJ-34TSを修正した。

当該ガイドライン案の検討及び作成は、「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（東京都健康安全研究センター）、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

昨年度までに作成した「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 について、参考文献等の軽微な修正を施し、本委員会において了承された。

現在 ISO 文書として PCR 及びリアルタイム PCR/qPCR 法に関するものは約 30 あった。関連する ISO の各委員会（Technical Committee 及び Sub-committee）、個別及び全般事項別にまとめたものを表 1 に示す。TC34 が食品専門委員会で本研究班に関連する。中でも SC9 が食品からの微生物試験に係る委員会である。

個別の対象を試験する文書としては 19 あり、SC16 は動物種を対象としたバイオマーカー、SC4 では水質、土壌品質におけるレジオネラを対象とした試験法などが含まれていた。食品に係る SC9 関連文書では、

- ・ISO/TS 13136:2012 STEC (シガ毒素産生性大腸菌)
- ・ISO 15216-1/2:2017/2019 A 型肝炎ウイルス、ノロウイルス
- ・ISO/TS 17919:2013 ボツリヌス毒素
- ・ISO/TS 18867:2015 エルシニア
- ・ISO/AWI/TS 6579-4 monophasic *Salmonella* Typhimurium 同定

があった。

試験法全般に係る ISO 文書としては PCR 法関連で 5 つ、リアルタイム PCR/qPCR 法関連で 3 つあった。前者のうち 3 つは NIHSJ-34TS のベースとなった ISO 22174、20837、20838 であった。それぞれ「一般要求事項及び定義」「定性検出のための検体調製に係る要求事項」「定性法のための増幅及び検出に係る要求事項」の内容であった。

PCR 法関連の文書の残りの 2 つは、ISO 20836 「サーマルサイクラーの温度性能試験」及び ISO 22118 「食中毒菌の検出及び定量のための PCR-

性能特性」であった。

リアルタイム PCR 法関連の文書は ISO 22119 「食中毒菌の検出のためのリアルタイム PCR 法 - 一般要求事項及び定義」であった。上記は TC34/SC9 により定められた文書であった。

qPCR 法関連の文書は ISO 20395 「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」であった。本文書は qPCR 法試験法の一般文書として他の文書よりも詳細な記述があった。本文書を和訳し、その内容を検討した。大要は

1. 分析のデザイン：定量化戦略及びコントロール
2. 核酸試料の品質管理：濃度の定量化及び品質評価（純度及び完全性）
3. PCR アッセイのデザイン、最適化、in silico 及び in vitro 特異性試験
4. 合格基準、閾値設定、及びノーマライゼーションなどのデータの品質管理及び解析
5. 試験法の妥当性確認（精度、直線性、定量下限、検出限界、真度、頑健性）
6. 計量のトレーサビリティの確立、測定の不確かさを評価するためのアプローチ

であった。ISO 20395 は TC276 バイオテクノロジー専門委員会による文書であり、試験法策定に当たっての詳細が記載されていたが、これまでの TC34/SC9 の文書とは態様が異なっていた。

以上のことから、本委員会において SC9 文書である ISO22119 (及び ISO20118) をベースに ISO 20395 の内容を取り入れていく方向でリアルタイム PCR 法導入に向けての文書を作成する方向で了承された。

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。一方で 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

表 1. PCR 法及びリアルタイム PCR/qPCR 法に関する ISO 文書の集計

種別	PCR	RT/qPCR				計
専門委員会	TC34				TC276	
小委員会	SC9	SC16	SC9	SC4		
個別	3	12	3	1		19
全般	5	1	1		1	8
その他				1		1
総計	9	13	4	2	1	29