

令和 2-4 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  
総合研究報告書

食品微生物試験法の国際調和に向けた研究

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) 食品微生物試験法の策定及び改訂に向けた研究、(2) 食品微生物試験法の国際動向及び妥当性評価に関する研究、(3) ポ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、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」を運営すると共に、ウエルシュ菌、推定セレウス菌、及びカンピロバクター・ジェジュニ/コリ、並びに病原性エルシニア・エンテロコリチカの各試験法の初版を発行したほか、技術仕様書として、ポツリヌス毒素遺伝子試験法、生乳受入れ時の直接鏡検法による総菌数試験法等の初版を発行した。また、衛生指標菌としてのリステリア属菌の試験法について検討を進めた。(2) では、2022 年度に開催された ISO/TC34/SC9 総会及び第 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集の改訂版を発行したほか、妥当性確認のための望ましいガイドライン案の作成、並びにバリデーション作業部会における技術的支援を行った。(3) では、ポツリヌス毒素遺伝子試験法の作成に努め、A・B・E・F 型菌を対象とした技術仕様書の発行に至った。(4) では、遺伝子検査法を微生物試験へ導入する際のガイドライン案を作成し、最終版の発行に至った。(5) では、野菜表面及び果実からのノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスの定性試験法に関する検討を進め、今後進めるべき課題の抽出を図りつつ、最終ステージへ議論を進展させた。

以上、本研究では複数の食品微生物試験法並びに関連ガイドラインの発行、並びに技術仕様書やガイドラインの原案を進めることができた。食品の輸出入が増加傾向にある昨今、国内の食品微生物試験法の効果的・効率的な国際調和を更に進めていくためには、今後も継続的に国際動向を収集・解析した上で、新たな解決に向けた方針の策定と改訂、提案等につとめる必要があると考えられる。

## 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（令和2～3年度）  
山崎 栄樹 帯広畜産大学（令和4年度）  
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

## 研究協力者

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  
有田 佳子 国立医薬品食品衛生研究所  
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  
倉園 久生\* 徳島大学  
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  
町田 李香 国立医薬品食品衛生研究所  
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 ネオジェン・ジャパン  
諸藤 圭 日本食品分析センター  
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  
SUNATEC

（敬称略、五十音順；\*は検討委員会委員）

## A. 研究目的

本研究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」（以下、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た。

検討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：研究分担者五十君教授）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) 食品微生物試験法の策定及び改訂に向けた研究

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もの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調和は重要な課題である。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技術仕様書の作成・改訂、並びに関連するガイドラインの策定に関する活動を行っている。

国際標準化機構（International Organization for

Standardization: 以下、ISO）は、第34技術分科会・第9分科会にて、「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それを作成する際のガイドライン、並びに作成した参照試験法を改訂する際のガイドライン」としてISO 17468を発行した。本研究では、本ガイドラインを詳細に検討し、国内の食品微生物検出のための試験法の作成手順と比較検討を行い、国際的な整合性の確認を行った。また、衛生指標菌としてのリステリア属菌試験法の策定に向けた検討や国際的第三者認証取得代替試験法一覧の改訂を進めたほか、検討委員会でこれまでに最終案提案の段階まで進んでいる試験法案を確定させたので、あわせて報告する。

#### (2) 食品微生物試験法の国際調和のための研究

##### ① 妥当性確認及び国際動向調査に関する研究

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見据えたアップデート等の作業が必要である。本分担研究課題では、食品微生物の試験法に関する国際動向の掌握と、食品の微生物試験法における妥当性確認のあり方に関する検討を行うこと、並びに研究班で策定する試験法の妥当性確認方法のサポートを行うことを目的とした。

##### ② 微生物試験法の妥当性評価に関する研究

本分担研究では、微生物試験法の作成にあたっては、様々な試験法を横断的に扱う妥当性検証のガイドラインを新たに作成することを第一の目的とした。また、検証の前提となる妥当性確認の理解が必須であるため、既に完成させていたガイドライン暫定版を基に「利用の手引き」の作成も併行して行うこととした。更に、新規の試験法作成に際して、技術的支援を行った。

#### (3) ボツリヌス試験法に関する研究

ボツリヌス菌及びボツリヌス毒素は、公衆衛生上、最も危害性の高いものとして国際的に認知される。国内ではマウス毒性試験が通知法等で示されているが、昨今の動物愛護の観点から代替的な試験の検討も求められている状況にある。本研究では、食品からのボツリヌス菌試験法について、国内で利用が

可能であり、かつ国際的整合性を持つ試験法の策定を最終的な目的として検討を進めた。

#### (4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

近年、微生物規格基準等に係る試験法では遺伝子検査法を取り入れる動きがある。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案の策定を目的とした。

#### (5) 食品からのウイルス検出試験法に関する研究

ノロウイルスや A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは、食品媒介性病原ウイルスとして国際的に認識される。中でもノロウイルスは、国内で毎年発生する食中毒において、食中毒患者の半数の原因物質として報告される重要な病因物質である。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。すなわち、生産段階及び食品製造加工段階でのウイルス汚染実態の把握は、食品の更なる安全性確保に向けて必要な課題と考えられる。

国内では、食品からのノロウイルス試験法は、平成 19 年に最終改定された厚生労働省の通知法および食品衛生検査指針微生物編 2018 で示されているが、これらは基本的に食中毒対応のために示されているものであり、流通食品を対象としたウイルス試験法は十分には整備されていない状況であったことを踏まえ、本研究では、欧米での現行のウイルス標準試験法に関する動向を収集・整理した上で、国際調和に向けて、国内試験法として、今後検討すべきと思われる事項の抽出並びに検討を進めたので報告する。

## B. 研究方法

### (1) 食品微生物試験法の策定及び改訂に向けた研究

#### 1) 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（集落計数法 NIHSJ-24）ST4 案について、標準試験法として運用する際の最終的な課題を抽出し、関連データの取り纏め及び確

認を行った。

#### 2) セレウス菌標準試験法の作成

セレウス菌標準試験法（集落計数法 NIHSJ-28）ST4 案について、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。

#### 3) 病原性エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法の作成

病原性エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法（定性試験法 NIHSJ-27）ST4 案について、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。

#### 4) 直接鏡検法による総菌数試験法の作成

生乳受入れ時の直接鏡検法による総菌数試験法（NIHSJ-33TS）ST4 案について、最終版確定に向けた確認を行った。

#### 5) リステリア属菌試験法の作成

現時点でリステリア属菌に分類される菌種の情報を調査した。また、Codex ガイドライン、米国 FDA の食品製造環境でのリステリア属菌モニタリングガイダンス等、衛生指標菌としてのリステリア属菌の取り扱いを調査した。これらの情報を基に、検討委員会に提案及び議論を行った。

#### 6) カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法の作成

集落計数法である ISO 10272-2:2017 を参照し、ST2 案を作成した。バリデーション作業部会での技術的助言を経て、検討すべき課題を抽出し、関連データの取りまとめ及び確認を行った。その後、検討を行った上で、最終版確定に向けて議論を行った。

#### 7) 標準試験法の作成及び改訂のガイドライン案の作成

ISO 17468:2017 の全文和訳を行い、微生物試験法に沿った表現へ修正を行った。また、バリデーション作業部会が作成した用語集（案）との整合性を確認し、標準試験法作成方針原案を作成し、第 73 回検討委員会にて議論を行った。

#### 8) 国際的第三者認証を受けた代替試験法の改訂

検討委員会 HP 上で公開している、第三者認証を

受けた試験法の情報更新を行った。

## (2)食品微生物試験法の国際調和のための研究

### ①妥当性確認及び国際動向調査に関する研究

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る。その中で微生物試験法は国際標準化機構（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 であり、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。R3-R4 年度には 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並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参加者から、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。

バリデーション作業部会では、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 R2 年度と R3 年度に標準試験法検討委員会へ用語の整理に関する提案を行った。

引き続き、AOAC International と ISO のガイド並びに ISO/TC34/SC9 のガイドラインとの整合性

を考慮して、標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順を整理し、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。

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。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。

公定法等の参照法の確立または改定に関する技術的要因及びガイダンスに関する規格 ISO 17468 について精査を行った。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ついて、データ出しに協力すると共に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

#### 1) 妥当性評価に関する国際動向調査

ISO TC34/SC9 の P メンバーとなっている日本の専門員として、年次総会へ毎年出席した（第 39 回 2020.6.3-5, 第 40 回 2021.6.8-11, 第 41 回 2022.6.14-17, いずれもウェブ会議）。また、SC9 内の妥当性確認ワーキンググループ（WG3）に専門技術委員として参加した（第 25 回 2020.10.15-16, 第 26 回 2021.4.27-29, 第 27 回 2022.1.18-20, 第 28 回 2022.12.6-7, いずれもウェブ会議）。さらに、SC9 あるいは SC9/WG3 から随時発せられるメール審査（Ballot）に対応し、必要に応じて国内の SC9 委員会に諮りつつ、コメントを発信した。

こうした会議への参加を通じて知り合った他国の専門技術委員や、ISO 16140-2 の引用文献の著者（例えば J. AOAC Int., 92, 1763-1772 (2009) の著者の C. Wilrich）とのメールでの情報交換も行った。

## 2) 国内での議論

妥当性確認、及び検証に関して得た国際動向に関してまとめた情報や、ガイドライン関連資料を作成し、食品微生物試験法検討委員会及びバリデーション部会（何れもウェブ会議）で議論した。妥当性確認に関しては、先行研究で十分議論を重ねて「妥当性確認ガイドライン暫定版」が作成されていたが、内容が複雑で難解な個所が多かったため、補足説明や注記を挿入することによって、利用の手引きとなるような表現にした。一方、検証ガイドラインの作成に関しては、バリデーション作業部会会員の守山隆敏氏による ISO 16140-3 の概要紹介に始まり、守山氏と松岡による邦訳を経て、国内委員会等での議論に基づき改訂を重ねた。

### (3) ボツリヌス試験法に関する研究

#### 1) スパイク用芽胞液作製プロトコールの整備

##### 1-1) 芽胞形成に要する培養時間の検討

*C. botulinum* 62A 株をクックドミート培地に接種し、37°C、24 時間で嫌気培養後、TP 培地、0.1% チオグリコール酸ナトリウム加 TP 培地、および可溶性デンプン加変法クックドミート培地に接種し、37°C で 24、48 及び 72 時間の嫌気培養を行った。得られた菌液について、80°C、20 分間の加熱処理を行った後、卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養を行い発育集落数を求めた（芽胞数）。平行して、培養後の菌液を加熱処理を経ずに卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養後に発育した集落数を求め（芽胞+栄養型の総数）、両者の比から、芽胞形成率を算定した。

1-2) 芽胞形成に与える培養繰り返し回数の影響の検討：*C. botulinum* 62A 株をクックドミート培地に接種し 37°C、24 時間の嫌気培養を行った後に得られた増菌液を、TP 培地に接種し、37°C、72 時間の嫌気培養を行った。得られた菌液を新鮮な TP 培地に再び接種し、80°C、20 分間の加熱処理を経て、37°C、72 時間の嫌気培養に供した。同操作を更に 3 回繰り返し、それぞれの培養回について、培養開始後 24、48 及び 72 時間後の芽胞形成率を上項と同様に評価した。

## 2) 簡易 DNA 抽出キットの妥当性の解析

*C. botulinum* 62A 株または Okra 株を TPGY 培地に接種後、24 時間嫌気培養を行い、得られた増菌液の段階希釈液について、CTAB 法のほか、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 並びに Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) を用いて DNA 抽出を行った。CTAB 法では段階希釈液 1 mL を、DNeasy Blood & Tissue Kit では 0.1 mL、Foodproof StarPrep Two Kit では 0.8 mL を DNA 抽出用試料とした。抽出効率の評価は、NIHSJ-20TS-ST3 で示される PCR 法へ DNA 抽出液を適用することに拠った。更に芽胞調整プロトコールに従って作製した 62A 株芽胞液を 10 倍段階希釈後、はちみつ試料に添加し、NIHSJ-20TS-ST3 に従って培養し、得られた培養液に対し、上述の DNA 抽出及び PCR によるボツリヌス毒素遺伝子検出を行った。

### 3) コラボスタディの実施

NIHSJ-20TS-ST3、芽胞調整プロトコール及びコラボスタディ実施要領を参加機関に配布した。併せて、コラボスタディに必要な試薬・食品を各機関へ配布した。各機関が保管する菌株を用いてスパイク用菌液を作成した後、試験を実施した。

### 4) 検討委員会における確認

作業部会にてコラボスタディ作業計画案の確認や必要となる予備検討等について検討委員会で議論を行った。最終的な記述内容や様式の微細な変更を進めた。

### (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) 法に関する文書を検索し、その情報収集を行った。その後、ISO 20395、ISO 22118、ISO 22119 を和訳し、その内容を精査し、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は、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検討委員会に諮り

修正を行った。

## (5)食品からのウイルス検出試験法に関する研究

### 1) 情報収集及び国内外比較

国内の試験法としては、厚生労働省より発出されたノロウイルスの検出法（平成 19 年）、A 型肝炎ウイルスの検出法（平成 21 年）、及びこれらを収載している食品衛生検査指針微生物編 2018 を参考とした。欧米のウイルス試験法については、欧州 ISO/TC34/SC9 で作成された ISO 15216-1:2017、及び米国 FDA で作成された FDA Foods program、BAM 26B を参照し、試験法間で差異の見られる事項の抽出を図った。

### 2) 試験法に関わる文献調査

国内で実施されている二枚貝のノロウイルス試験法を含め、近年報告された学術文献のうち、試験法に関わるものを検索し、考察に用いた。

### 3) 果実野菜類からのウイルス試験法

#### 3-1) 対象食品

食品のウイルス試験法の食品検体として、欧州 ISO/TC34/SC9 で作成された ISO15216-1:2017 を参考に、果実野菜類検体として一般的な小売店舗で購入可能な市販食品をいた。洗浄処理を実施する検体として冷凍ベリー、拭き取り検体として、ピーマン、パプリカを用いた。

#### 3-2) 対象ウイルス

食品検体への添加回収に用いたウイルスとして、A 型肝炎ウイルス(HAV; ATCC VR-1402)、及び ISO15216-1 にて工程管理に用いる Mengovirus (ATCC 株 VR-1597、及び市販 CeeramTools)、参考としてネコカリシウイルス(FCV; ATCC VR-782)を用いた。

#### 3-3) 食品検体の処理

##### 冷凍ベリー

25g に対して各ウイルス液 5 uL を添加してウイルス汚染させた。40 mL の緩衝液を加え、洗浄操作後、PEG/NaCl 沈殿にて得た沈渣に PBS を加えて、RNA 抽出に供した。

##### 拭き取り

ピーマン又はパプリカの表面にウイルス液 5 uL

を滴下した後、PBS スワブで拭き取り、RNA 抽出緩衝液を加えて直接手揉み後、RNA 抽出に供した。

### 3-4) 核酸抽出

ウイルス RNA の抽出は従来より国内で広く実施されるシリカカラム法及び磁気ビーズ法で実施した。シリカカラム法では、High Pure Viral RNA kit (Roche 社、手動操作)、QIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN、手動操作)を用い、磁気ビーズ法では Maxwell RSC Virus Total Nucleic Acid Purification kit (Promega 社、機械自動抽出)及び NucliSENS magnetic extraction reagents (BioMerieux 社、手動操作)を用いた。

### 3-5) 遺伝子検出

抽出 RNA を用いて各ウイルスの遺伝子検出を 1 Step RT-qPCR にて実施し、ウイルス遺伝子が増幅/検知されるサイクル数(Ct 値)の比較を行った。

1 Step RT-qPCR 試薬としては、RNA UltraSens One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen)、TaqMan Fast virus 1-Step Master Mix (Thermofisher Scientific)を用いた。

## C. 研究成果

### (1)食品微生物試験法の策定及び改訂に向けた研究

#### 1) ウエルシュ菌標準試験法

本試験法は、ISO 7937:2004 を参考に、より利便性を高めた内容で作業部会から提案されたプロトコルである。ストマッキング処理時間について、ウエルシュ菌が偏性嫌気性菌であることからより短い時間が望ましいと考えられること、作業部会での検討において 30 秒間と 1 分間の処理時間による成績の差が見られなかったことから、30 秒間~1 分間を最終版に採用した。また、確認試験に関して、その手法を確定させると共に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、「ウエルシュ菌標準試験法・集落計数法 (NIHSJ-24:2022)」として初版を発行した。

#### 2) セレウス菌標準試験法

本試験法は、対象菌群を「推定 *Bacillus cereus*」として、選択分離培地に ISO 推奨の MYP 寒天培地に加えて国産の NGKG 寒天培地及び X-BC 寒天培地も採用し、国際整合性を担保しつつ国内での適用にも考慮した標準試験法として確定させた。本試験法案は、第 75 回検討委員会において最終版としての承認がなされ、「セレウス菌標準試験法・集落計数法 (NIHSJ-28:2022)」として初版を発行した。

#### 3) 病原性エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法

本試験法は、ISO 10273:2003 を基に作成が進められてきたものであるが、2017 年に ISO 10273 が改訂となっている。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確定することが承認され、「病原性エルシニア・エンテロコリチカ標準試験法・定性法 (NIHSJ-27:2022)」として初版を発行した。

#### 4) 直接鏡検法による総菌数試験法の作成

本試験法は、ブリード法として従来使用されてきたニューマン染色液に含まれる 1,1,2,2-テトラクロロエタンの取扱いに、使用場所の制限や健康管理への対応が厳格に求められる状況となったことを踏まえ、代替とできる染色液を追加したものである。第 79 回検討委員会において最終版としての承認がなされ、「直接鏡検法による総菌数試験法 (NIHSJ-33TS:2023)」として初版を発行した。

#### 5) リステリア属菌試験法の作成

第 77 回検討委員会において、リステリア属菌が食品製造施設の環境モニタリング指標として国際的に汎用されていること、国内ではリステリア属菌の標準試験法が策定されていないこと、国内の HACCP 制度化に伴い、本試験の用途が増える可能性が考えられることから、リステリア属菌試験法の作成を提案した。欧米では、リステリア属菌を衛生指標菌として用いること実態から、試験の実行性を確保するため、選択分離培地等は可能な限り省力化し、菌種同定は省略することとした。更に、衛生指標菌試験としての性質を考慮し、本試験法は技術仕様書としての取り扱いとし、シングルラボでの評価等を経て、プロトコルを検討していくこととなっ

た。試験法番号として、NIHSJ-40TS (定性法) 及び NIHSJ-41TS (集落計数法) を付与した。

#### 6) カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法

本試験法は、ISO 10272-2:2017 を基に、定性法である及び NIHSJ-02 を適宜参照しつつ、作成が進められてきたものである。ST2 案と ISO 法との大きな差異点は、試料希釈倍率と選択分離培地であった。これらについては、予備検討を通じ、NIHSJ-02 法で定められた 5 倍希釈、並びに ISO 10272-1:2017 でオプションとして使用を認めているほか、臨床試験で近年利用頻度が高まりを見せている酵素基質培地の有用性が確認された。その後、共同試験を進め、ISO 16140 に準じた同等性が評価され、NIHSJ-35 法案は、ISO 10272-2:2017 との間で同等性を有すると判断された。その後、第 79 回検討委員会において最終版としての承認がなされ、「カンピロバクター・ジェジュニ/コリ試験法 (集落計数法) (NIHSJ-35:2023)」として初版を発行した。

#### 7) 標準試験法の作成及び改訂のガイドライン案

ISO 17468:2017 では、新規の参照試験法の妥当性を確認する際には、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、⑤collaborative study の 5 段階に分けて行うことが示されていた。試験法の改訂のうち、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、文章表現上の変更等については小規模な変更と見做される状況となっており、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いた。

#### 8) 国際的第三者認証を受けた代替試験法の改訂

国際的第三者認証機関として AOAC International (Official Methods of Analysis)、AFNOR、MicroVal 及び NMKL NordVal International による認証を取得している代替試験法の一覧を作成した。

#### 9) 他の試験法及びガイドラインの作成

ボツリヌス毒素遺伝子試験法 (定性法 NIHSJ-20TS:2023)、及びリアルタイム PCR ガイドライン (NIHSJ-38TS:2023) については、第 79

回検討委員会において最終版としての承認がなされ、初版を発行した。ノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの試験法は、第 79 回検討委員会において作業部会案が承認され、最終案の提案に向けた作業に入ることとなった。ペリフィケーションガイドラインについては、作業部会案の推敲を継続することとなった。

## (2) 食品微生物試験法の国際調和のための研究

### ① 妥当性確認及び国際動向調査に関する研究

#### 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 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。R3-4 年は各年度 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。

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。各年度の総会への参加国は、各年度約 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。例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、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基に再整理し作業部会で検討後、R3 年度に検討委員会へ提案した。

AOAC International と ISO のガイド並びに 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支援した。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も、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理した。R3-4 年度には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 ISO 17468 について精査検討を行った。

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(含考察)

#### 1) 国際動向調査結果

ISO TC34/SC9 の年次総会には米国の専門員が常に 10 名近く出席していた。彼らの中の数名は米国に本部を置く食品分析科学の国際機関である

AOAC International の会員でもあり、AOAC と協調した意見も述べた。一方、欧州標準化委員会 (the European Committee for Standardization; CEN) EC) にも食品微生物に関する技術委員会

(Technical Committee 463; TC463) があり、その委員が出席していた。すなわち、TC34/SC9 での議論は欧米全体の食品微生物試験に関する動向を反映していると考えてよい。

我が国は 1998 年 AOAC International の日本支部 (Japan Section) をアジアで初めて設立した。<https://aoacijs.org/aoac-international-japan-section/>

また、2016 年 ISO TC34/SC9 の幹事国 (P メンバー) になった。さらに、第 38 回年次総会

(2019.7.9- 12、ミラノ) 以後、TC34/SC9/WG3 にも専門技術委員として議論に参加するようになった。WG3 への参加によって、情報の精度が格段に上がった。年次総会は網羅的な報告が主であったが、WG3 では“何故?”に関する議論も十分行われた。早口での議論についていくことはなかなか厄介であるが、会議直後に結論集 (Resolutions) が配信されるので、遅ればせながら何とか理解することができた。

妥当性確認の IS 16140-2: 2016 は、出版後、多くの修正や改訂のための議論が行われてきた。我が国でガイドライン作成を進めていた際にしばしばその内容の変化に戸惑っていた。しかし、2020 年以降は、WG3 を通しての緊密な情報交換によって、理解が深まった。

ISO では当然ではあるが、各国の事情 (特定の食品産業分野の事情など) に関わる問題が率直に提案され議論されていた。参加国は各々、自国の利益のために、科学的、合理的な議論によって他国の理解を得ようと努力しているように見えた。また、新しい課題に対するアドホック WG も複数新設され、そのための専門技術委員が自薦、他薦で決められ、直ちに委員会の日程調整がなされた。もし我が国にとって重要な案件があれば、同様に、直ちにアドホック WG の新設を提案し、コンビーナーとなって

会議を主導していくことができることが実感された。

2) 妥当性確認と検証に関する国際動向のトピック ISO 16140-2、ISO 16147-3、ISO17468 などの改訂の議論の中で、注目すべき事項を例示し、その理由や背景についての調査結果を示す。

#### 1. 妥当性確認における確認試験の導入

参照法と代替法の比較試験の結果が一致しなかった場合、以前は直ちに不合格と判断されていた。しかし、定性試験法ではできるだけ検出能の高い方が高性能と考えるべきある。したがって、代替法が陽性結果、参照法が陰性結果の場合は、直ちに代替法を不合格とするのではなく、むしろ代替法の方が高性能であると判断すべきではないか、という見解である。それが発端となって、参照法と代替法の比較試験結果によらず、第 3 の試験法で確認試験をやるように改訂された。ところが、この第三の試験法が具体的に決められてはいない。これでは ISO 16140-2 による妥当性確認が完結しない。第三の試験法は菌種の確認試験なので、それ自体が十分信頼性の高い試験法でなければならない。そこで、菌種確認のための試験法のために新たに ISO 16140-6 が作成された。これによって新開発された代替法が高性能であれば合格となる道が開かれた。ただ、今日まで、この方法で合格となった代替法の例はないという。必ずしも実際のニーズは無くても、想定される課題が提起されれば、それに対する妥当な対処法を明文化しておく、ということが ISO の大原則の一つであると言える。

#### 2. 検体の単位量と統計学に関する議論

かつて、一検体の量は 25g と決まっていたと思っていたが、他の重量、例えば 200g, 375g でも良いとされるようになった (2021.3.26 発の文書: 3rd Draft CD Amd 1 for ISO 16140-2: 2016)。ある国の規格では、例えば 375g が一検体量となっているので、それと合わせたいという意見があったことが理由の一つである、と聞いている。これに伴って、検体量が異なる条件で行った妥当性確認の扱いについて議論された。その結果、例えば 375g で妥当

性確認をした場合、それ以下の重量で改めて妥当性確認する必要はないが、逆に 25g で実施した場合、その試験法をそれより大きい検体に適用するためには、改めて、その重量の検体で妥当性確認しなおすこと、となっている。

しかし、何故、検体量が大きい場合はやり直さなければならず、小さい場合はその必要はない、というのか、統計学上の理由らしいが、どのようなバラツキの評価理論に基づいているのかは不明である。WG3 内の議論で、不明な点は十分無くなってきたが、統計学上の問題に関しては例外である。基本的に、他の WG は、統計学 WG2 の提言に全て従うことになっているという。妥当性確認や検証で合否判定の基準値は WG2 の提言に基づいている場合が多いにもかかわらず、その科学的合理性には疑問を感じる場合が多い。その疑問を我が国から発する際には、我が国の統計学専門家が、WG2 の専門技術委員として参加し、WG2 内で直接議論に加わることが、どうしても必要であろう。

### 3. ISO 17468 での 2 か国以上でのコラボスタディ

妥当性確認では複数の試験室で同じ試料を用いて同時に試験をするコラボスタディ（ISO では Interlaboratory study; ILS という）が必要とされる。しかし、参照法の妥当性確認を規定している ISO 17468 では、コラボスタディに参加する試験室は 2 か国以上であることが「望ましい」、となっていた。それが昨年度より「ねばならない」に変えようとの議論がなされている。国際的な標準法にするためには 2 か国以上の試験室が参加する国際的コラボスタディでなければならない、という理由である。しかし、国の違いが具体的にどのような点の違いを指しているのかは何も規定が無い。これでは選択した国がコラボスタディに適正かどうかの判断ができない。また、欧州のように陸続きで近距離に他国がある場合は、試験材料を他国に輸送することはそれほど困難ではないと考えられているようだ。しかし、我が国のように、遠方に空輸しなければならない場合は技術的な問題が大きい。また毒性物質を含む場合は安全にかかわる法的規制もある。

むしろ、試験実施者を海外から招請し、国際的コラボスタディ実施チームを結成し、一か国内で実施の方が遥かに合理的で安全だと思われる。

以上の意見を 2023.3.5 のメール審査（Ballot; 投票）で発信した。今後の議論を注視したい。

### 4. 検証ガイドラインの評価基準値

試験室が NIHSJ 法を初めて利用する場合は、その試験法を確実に実施できることを示さなければならない。そのためのガイドラインの作成が必要であった。その基になったのが ISO 16140-3 であった。この規格の中では、例えば定性法に対しては、妥当性確認で得られた LOD<sub>50</sub> の値を合否判定基準としている。ところが、LOD<sub>50</sub> が得られている試験法は少ない。そこで ISO では暫定基準値として LOD<sub>50</sub> = 1.0 cfu/検体を採用するようにしている。

このような状況であるから、小規模のコラボスタディ、あるいは単一試験室での試験によって、自ら求めた LOD<sub>50</sub> を基準とする方が合理的と考えられる。そして、その合理性を主張するためには、LOD<sub>50</sub> の求め方をよく理解していることが前提になる。ISO には LOD<sub>50</sub> を自動的に算出するウェブサイトが公開されているが、それに頼っているだけでは、試験条件を柔軟に設計して求めた LOD<sub>50</sub> の妥当性を説明することが難しい。そこで、自ら解析して求める方法を詳しく解説した文書を作成した。

### (3) ボツリヌス試験法に関する研究

#### 1) スパイク用芽胞液作製プロトコルの整備

ボツリヌス菌は法的制限の高さから、各機関にて個々に食品への菌添加を行わざるを得ない状況であった。この制限から、先行研究において、スパイク菌液の作製方法の制御が重要とお意見がだされ、第 71 回検討委員会にて、食基発第 0630002 号・食基発第 0630004 号「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」に記載の方法に基づき作製された芽胞液をスパイク用菌液として使用することとなった。しかしながら、同法では芽胞産生用培地の組成が示されておらず、この問題に対して本研究では 3 種類の培地（TP 培地、0.1%チオグリコール酸ナトリウム加 TP 培地、可溶性デン

ブン加変法クックドミート培地)を用いた際の芽胞産生性を比較し、安定的な芽胞産生が可能な条件の検討を行った。芽胞形成に要する培養時間及び芽胞形成に与える培養の繰り返し回数の影響を検討した結果、芽胞産生用培地として TP 培地が最も適していると判断され、また、継代培養は繰り返し行ったとしても安定的な芽胞形成に寄与しないことが示された。以上の結果より、62A 株についての芽胞調整プロトコルを整備し、同プロトコルに従って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する事となった。更に、同プロトコルに従って各機関が保管する複数の毒素型株を用いて、スパイク用菌液の作成を実施した結果、A 型菌 (62A 株) のみならず、B 型菌 (Okra 株)、E 型菌 (Biwako 株) 及び F 型菌 (Langeland 株) についても同一プロトコルにより添加試験に十分な芽胞量 ( $1 \times 10^7$  spore cfu/mL 程度) が得られる事が確認された。

#### 2)簡易 DNA 抽出キットを用いた際の検出感度解析

NIHSJ-20TS では DNA 抽出法として ISO 法と同様に CTAB 法を採用していた。しかしながら、CTAB 法は手技が煩雑であり、クロロホルムの使用等、取扱い制限の多い当該菌を用いた検討では最適とは言い難いことが作業部会で議論された。先行研究では検討委員会にこの問題点を提起し、第 71 回検討委員会においてコラボスタディに DNA 抽出キットを用いることが承認された。本研究では予備実験としてグラム陽性菌に対して使用可能であることが確認されている複数の市販の簡易 DNA 抽出キットについて検討を行い、そのうち Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) についてボツリヌス菌純培養液からの DNA 抽出効率が CTAB 法と比較して 1,000 倍以上高いことを示した。更に、同キットを NIHSJ-20TS に適用した際のボツリヌス毒素遺伝子検出効率について検討を行った結果、Foodproof StarPrep Two Kit を使用した場合においても CTAB 法を用いた場合と同様に 10 spore cfu/25g はちみつ試料の濃度で安定的に添加回収試験陽性となり、同キットが CTAB 法の代替

法として使用可能である事が確認された。

#### 3)コラボスタディで使用する一般食品種の選定

NIHSJ-20TS 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ルを指定していた。このため、一般食品に対する添加回収試験をはちみつとは別に実施しなくてはならないと想定された。ボツリヌス菌については今後国内で試験対象となり得る食品種の推定が困難であるため、現時点で NIHSJ-20TS が様々な食品種に対して使用可能かの検証はあまり意味を持たず、また、本検討の期間・規模に見合ったものではないと考えられた。そこで、使用する食品種を各菌種あたり 1 種類のみとし、NIHSJ-20TS に記載の一般食品用の増菌方法が適切に実施可能であるかについての確認を目的とすることとした。使用する食品として 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あり、かつ、ISO16140-3:2021 の Annex A でボツリヌス菌に対する試験に適した食品カテゴリー (Multi-component food or meal components, Ready to (re)heat food) とも合致する「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、検討委員会で承認された。作業部会での検討の結果、使用する容器包装詰低酸性食品としては、過去に国内での食中毒事例が報告されているものの中で取扱いの簡便さからハヤシライスソース (保存方法:  $10^{\circ}\text{C}$  以下にて冷蔵保存、喫食方法: 熱湯で約 5 分沸騰させた後に喫食、pH: 5.2、水分活性:  $> 0.98$ ) が選択された。

#### 4)作業計画の改訂

先行研究では、法規制等で多くの制限の下に実施されるボツリヌス菌を用いたコラボスタディにおいては取扱いが容易な他種の病原体とは異なるスキーム構築の必要性を示し、コラボスタディパートとシングルラボスタディパートを組み合わせたコラボスタディ計画案を提案してきた。本研究においてはコラボスタディ計画の詳細について更に検討を行った。

NIHSJ-20TSはISO/TS 17919に基づき作成されたプロトコルであり、国際整合性についての妥当性を満たしている。このことから、コラボスタディ計画内のコラボスタディパートの目的を

「NIHSJ-20TSを複数の試験室で使用した場合の室間再現性の検証」とする事が妥当であると考え、コラボスタディパートでははちみつ試料に対する62A株添加回収試験のみを実施することを第74回検討委員会にて提案した。さらに、コラボスタディ作業計画内のシングルラボスタディパートにおいては過去の食中毒事例の発生状況等を勘案し、B型菌（Okra株）についてははちみつと一般食品について、E型菌（Biwako株）及びF型菌（Langeland株）についてははちみつの喫食を通じた健康被害との関連性が見受けられない実態を踏まえ一般食品についてのみ添加回収試験を実施し、

「NIHSJ-20TSが複数の菌型-食品種の組み合わせについて利用可能なプロトコルであることの検証」を行うこととした。これらの提案については第74回検討委員会にて承認され、コラボスタディ計画を改訂した。

#### 5)コラボスタディ結果

##### 5-1)コラボスタディパートの結果

4機関にて、はちみつ-62A株を用いた検討を実施した結果、添加菌量0 - 100 spore cfu/25 gの範囲で全機関で同等の結果が得られ、NIHSJ-20TS-ST3の室間再現性が示され、安定性が確認された。

##### 5-2) シングルラボスタディパートの結果

###### 5-2-1. A型菌に対するシングルラボスタディ

一般食品（ハヤシライスソース）に対するA型菌（62A株）添加回収試験を実施した結果、少なくとも1000 spore cfu/25 g食品試料の添加菌量で安定的に陽性の結果が得られることが確認された。

###### 5-2-2) B型菌に対するシングルラボスタディ

はちみつ試料に対するB型菌（Okra株）添加回収試験を実施した結果、A型菌と同様に、少なくとも10 spore cfu/25 g試料の添加で陽性の結果が得られた。加えて、一般食品（ハヤシライスソース）に対するB型菌添加回収試験を実施した結果、A型菌

と同様、少なくとも1000 spore cfu/25 g食品試料の添加菌量で安定的に陽性の結果が得られた。

##### 5-2-3) E型菌に対するシングルラボスタディ

一般食品（いずし）に対するE型菌（Biwako株）添加回収試験を実施した結果、A型菌と同様、少なくとも1000 spore cfu/25 g食品試料の添加菌量で安定的に陽性の結果が得られた。

##### 5-2-4) F型菌に対するシングルラボスタディ

一般食品（ハヤシライスソース）に対するF型菌（Langeland株）添加回収試験を実施した結果、A型菌と同様、少なくとも1000 spore cfu/25 g食品試料の添加菌量で安定的に陽性の結果が得られた。

以上より、複数の食品-毒素型の組み合わせに対してNIHSJ-20TSが利用可能であることが明らかとなり、その汎用性が示された。

#### (4)遺伝子検査法の導入に関する研究

令和2年時点でPCR及びリアルタイムPCR法（含qPCR法）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であった。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。

作業部会にて原案を作成し、ST2 案として承認された。その後、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。

#### (5)食品からのウイルス検出試験法に関する研究

##### 1) 適用範囲及び対象ウイルスの情報調査

対象食品については、生食されるカキを始めとする二枚貝はノロウイルス等の健康被害リスクが高いことを踏まえ、国内、欧米共に対象食品となっ

いた。この他、国内では、「他の食品（食品表面）」及び「セミドライトマト」が含まれていたが、後者は A 型肝炎ウイルスのみが検出対象となっていた。

欧州では、ISO15216-1：2017 が標準試験法として示されていた。同法では、ソフトフルーツ（ベリー類）、生鮮野菜、ボトル詰ミネラルウォーター、食品表面（食品が接触するハードサーフェスを含む）を適用範囲として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスを検出対象としていた。

米国では、FDA Foods program 及び BAM 法（BAM26B）が示されていた。前者の試験法では二枚貝及びソフトフルーツ、後者の試験法ではネギ類を対象食品として、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルスを検出対象としていた。

##### 2) 試験法の実施手順

国内及び欧米における標準試験法は共に、①食品の前処理（ウイルス濃縮）、②ウイルス RNA の抽出、③遺伝子検出の 3 工程から構成されていた。以下に各工程の概要を記す。

###### ① 食品の前処理

###### ・二枚貝

国内では、3-10 個体の二枚貝中腸腺から 1.0-1.5g を取り出し、PBS を用いて 10%乳剤を作成した上で、PEG/NaCl 沈殿を実施する方法が示されていた。ISO15216-1：2017 では、最低 10 個体の二枚貝中腸腺から 2g を取り出し、Proteinase K 処理後の遠心上清をウイルス抽出液として扱う方法が示されていた。

BAM 法では、12 個体の中腸腺から 4 g を取り出し、蒸留水を用いて 10 %乳剤を作成した上で、超遠心分離によりウイルスを抽出する手法が示されていた。

以上、試験法間で検体の個数、重量、希釈液組成等に差異が認められたほか、BAM 法では超遠心分離が必要であることが明らかとなった。

###### ・他の食品

国内では、セミドライトマトからの A 型肝炎ウイルス濃縮法として、同検体 7～10 g に 5～10 倍量のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を加え、15 分

間の超音波処理を行った後、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた濃度勾配遠心分離 (以下、PEG/NaCl 沈殿) に供する方法が示されていた。

ISO15216-1:2017 では、ソフトフルーツ 25 g に対して 40 mL の緩衝液を加え、洗浄を行った後、PEG/NaCl 沈殿に供する方法が示されていた。また、ボトル詰めミネラルウォーターについては濾過法が示されていた。

BAM 法では、ソフトフルーツ 50 g に対して 50 mM グリシン/トリス/6 % beef extract 緩衝液 (pH 9.5) 30 mL、ネギ 50 g に対しては同緩衝液 55 mL を加え、15 分間 150 rpm で振盪後、遠心分離 (12,000 x g、15 分間) 及び超遠心分離 (170,000 x g、45 分間) を行う方法が示されていた。

以上より、特に BAM 法については超遠心分離が不可欠であることが見出された。

#### ・ハードサーフェス

国内試験法及び米国 BAM 法ではハードサーフェスを対象とした方法は示されていない状況であったが、ISO 15216-1:2017 では PBS スワブによる 10 x 10 cm の拭き取り手順が示されており、拭き取り後スワブは RNA 抽出用緩衝液を用いて直接手揉みする手順が示されていた。

以上より、食品との接触が想定されるハードサーフェスからのウイルス検出にあたっては、ISO 法を参照する意義が確認された。

### ②ウイルス RNA の抽出

国内では、前処理後のウイルス抽出液について、シリカカラムを用いた RNA 抽出法が示されていた。ISO 15216-1:2017 では、免疫磁気ビーズを用いた RNA 抽出法が示されていた。一方、BAM 法では、国内と同様にシリカカラムを用いた抽出法が示されていた。

以上より、国内及び米国ではシリカカラムを用いた抽出法が共通していたのに対し、ISO 法では異なる方法が採用されていた。但し、後者の方法は第三者認証機関による妥当性評価が行われているものであり、国際標準的な手法として妥当であると考えられた。

### ③遺伝子検出

#### 1. プライマー・プローブ

何れの試験法もリアルタイム PCR 法が示されており、同法の共通性が確認された。国内及び米国では Kageyama らの報告にあるリアルタイム PCR 法が採用されていた。一方、ISO 15216-1:2017 では、国内及び米国とは異なるプライマー・プローブが示されていた。但し、同法の検出対象領域は、国内及び米国の試験法の検出対象領域に含まれている状況を確認した。

#### 2. 工程

米国 BAM 法および欧州 ISO 法では、1st step RT-qPCR を実施していたのに対し、国内では逆転写反応を実施し、その後合成された cDNA を鋳型とする 2 step RT-qPCR が示されていた。

#### 3. コントロール

定量検出を目的とする ISO 15216-1:2017 では、工程管理コントロールが設定されていたが、国内試験法では同コントロールは設定されていない状況であった。また、BAM 法では、複数或いは単独の試験所で Validation を行う上で有用と思われる、複数のウイルス株が例示されていた。

#### 4. 検証

米国 FDA では、「Guidelines for the detection of microbial pathogens in foods and feeds」において、食品媒介性 RNA ウイルスを標的とした試験における検証方法が示されており、その中で使用者は試験所に初めて導入する際には、各 N=6 で被験ウイルスを接種した群と非接種群を用いて、擬陽性・偽陰性反応が出現しないことを検証するよう求めている状況を確認した。

#### 3) RNA 抽出法の比較

##### 3-1) HAV の添加回収結果

冷凍ベリーでの HAV 添加回収実験の結果、シリカカラム、磁気ビーズ法ともに、Ct 値 30 前後であった。PBS と HAV を混合して、直接 RNA 抽出を実施した対照群では、Ct 値が 23-24 となり冷凍ベリーでの HAV 添加回収実験は良好な結果を示した。

野菜表面に添加した場合は、Maxwell の自動

RNA 抽出の場合、Ct 値は 28 となり、冷凍ベリーよりも良好な回収が可能だった。

### 3-2) Mengovirus の添加回収結果

冷凍ベリーでの Mengovirus (ATCC 株)添加回収実験の結果、シリカカラム(Roche)では Ct 値が 36-37、シリカカラム (Qiagen) では Ct 値が 31、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)では Ct 値が 31、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出では Ct 値が 35、手動抽出では Ct 値が 32-34 となった。PBS と混合して、直接 RNA 抽出を実施した対照群では、シリカカラム(Roche)では Ct 値が 34-39 とばらつきが比較的大きくなり、シリカカラム (Qiagen)では Ct 値が 30-32、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)では Ct 値が 29-34、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出では Ct 値が 31-35、手動抽出では Ct 値が 32-35 となり、HAV と比較して対照群の回収は相対的にばらつきを認めた。

野菜表面に Mengovirus (Ceeramtools) を添加した場合、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)では Ct 値が 29-30、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出では Ct 値が 28-29 となった。

### 3-3) FCV の添加回収結果

冷凍ベリーを用いた FCV 添加回収実験の結果、シリカカラム(Roche)では Ct 値が 24-28、シリカカラム (Qiagen)では Ct 値が 26-28、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)では Ct 値が 25-27、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出では Ct 値が 27、手動抽出では Ct 値が 25-28 となった。PBS と混合して、直接 RNA 抽出を実施した対照群において、シリカカラム(Roche)では Ct 値が 25-26、シリカカラム (Qiagen)では Ct 値が 25、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)では Ct 値が 22-25、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出では Ct 値が 24-25、手動抽出では Ct 値が 25-28 となった。

野菜表面に FCV を添加した場合は、磁気ビーズ(Maxwell 自動抽出)では Ct 値が 28-29、磁気ビーズ(BioMerieux)自動抽出では Ct 値が 27-29 となった。

### 4) 1 Step RT-qPCR 試薬の比較

Promega 社磁気ビーズ法、QIAGEN 社シリカカラムにて抽出した RNA を用いて、1 Step RT-qPCR 試薬の比較(RNA UltraSens, TaqMan)を実施した。

#### 4-1) HAV の検出性能

ウイルスを 1,000 倍希釈して添加回収を実施したところ、検出率は TaqMan 使用時に Promega 社磁気ビーズが 6/16、QIAGEN 社シリカカラムが 4/4 となった。一方、UltraSens 使用時には検出不可(0/4)となった。100 倍希釈したウイルスを用いた場合、TaqMan ではウイルス検出できたが、UltraSens では不検出(0/4)となった。なお、ウイルス液原液の野菜への添加回収、及び PBS 混合からの回収を行った際には、共に検出された。

#### 4-2) Mengovirus の検出性能

工程管理に用いる Mengovirus を添加回収したところ、ウイルス原液を用いた時に UltraSens では Promega 社磁気ビーズで 0/4、QIAGEN 社シリカカラムで 0/11 と検出できなかった。TaqMan では、ウイルス原液の添加回収で Promega 社磁気ビーズで 14/20、QIAGEN 社シリカカラムで 12/12 となった。

#### 4-3) FCV の検出性能

FCV の添加回収では、UltraSens の検出率は QIAGEN シリカカラムでウイルス原液 2/3、その他の PBS との混合、100 倍、1000 倍希釈ともに未検出(0/3、0/4、0/4)となった。

## D. 考察

### (1)食品微生物試験法の策定及び改訂に向けた研究

近年、給食等を原因とするウエルシュ菌による大規模な食中毒事例の発生がしばしばみられている。また、セレウス菌は生物農薬として用いられる *Bacillus thuringiensis* との鑑別が重要な食中毒菌として知られている。一方、食品中のウエルシュ菌及びセレウス菌の試験については、わが国では公定法もしくは国際整合性のある試験法が示されていないため、これらの菌群の標準試験法を整備した本研究の成果は、行政検査等の平準化に寄与するものと期待される。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食中毒菌であるが、30℃を超える培養温度では病原性プラスミドの脱落が起こるなど、分離同定が難しい食中毒菌であり、国際的な標準試験法である ISO 法と互換性のある国内標準試験法を整備することで、食肉及び食肉製品の輸出入等における衛生確保に貢献しうると思われる。

日本では食品衛生法の一部改正により、令和3年6月に HACCP 制度が完全施行され、以降、全ての食品等事業者が HACCP に沿った衛生管理を行うこととなった。食品及び同製造環境における食中毒菌の汚染率及び汚染菌数は低いことが多く、また、その分布も不均一であるため、衛生指標菌の試験を行うことで食中毒菌による汚染の可能性を把握することが行われている。しかしながら、生菌数、大腸菌群や腸内細菌科菌群等の広く用いられている衛生指標が必ずしも食中毒細菌の存在と高い相関を示さない例があることも知られている。一方、リステリア属菌の存在は、食中毒菌であるリステリア・モノサイトゲネスの優れた指標となることが国際的に広く知られており、欧米を中心とする諸外国では近年、食品媒介リステリア症のリスクを低減するために、特に非加熱喫食食品の製造工程における衛生管理にリステリア属菌を管理項目として用い、モニタリングを実施している。ここ数年、我が国でも食品製造環境でリステリア属菌のモニタリングも行われつつあるが、現時点ではリステリア属菌の試験法が整備されていないため、本研究でその試験法を整備することは、HACCP に沿った衛生管理においても有意義と考えられる。

カンピロバクターについては、国内では定性試験法が標準試験法として策定されてきたが、近年の欧州では定量試験がリスク管理へ活用される状況となっていることを鑑みて、本研究では定量試験法の検討を進めた。その検討にあたっては、特に効率的な運用を視野に入れ、希釈倍率や培地に着目して進めた。現在、食鳥処理場にて自治体の食鳥検査員が行っている HACCP 外部検証微生物試験のほか、事業者による自主検査等へ本試験法が活用されるこ

とにより、国内の食鳥肉及び食鳥とたいにおける当該菌の汚染実態を定量的に把握することが容易となり、ひいてはリスク管理の向上へと繋がることが期待される。

本研究課題で策定している標準試験法の多くは ISO 法に準拠しており、数年に一度改訂される ISO 法への対応のため、標準試験法の作成及び改訂のガイドラインの整備は緊急性が求められる。ISO 17468:2017 に準拠し、且つ国内特有の食品等への対応にも配慮したガイドラインの確立を行うことで、標準試験法の改訂等を迅速に行うことが可能になると考えられる。

## (2)食品微生物試験法の国際調和のための研究

### ①妥当性確認及び国際動向調査に関する研究

#### 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。また、リステリア試験法の作業部会が結成されることとなり、わが国もメンバーとして参加することにした。

#### 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正作業を行い、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。

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 17468（標準化された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）の考え方に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

ウエルシュ菌定性試験法のバリデーションについては、当該試験法の検討グループと連携をとりながら試験法の最終版に進めることができた。

### (3)ボツリヌス試験法に関する研究

国内における食品からのボツリヌス試験はこれまで、容器包装詰食品を原因としたボツリヌス菌食中毒発生時に原因食品から分離された菌株のボツリヌス毒素産生性を評価する方法（通知法）、そして、イタリア産オリーブ加工品に対するボツリヌス毒素及びボツリヌス菌の検査法がそれぞれ通知により示されている。このほか、国立感染症研究所病原体検出マニュアルでは、臨床検体を主体とした試験法が参照として示され、活用されている。これらの試験法では、いずれもマウス毒性試験によるボツリヌス菌の同定法が採用されている。一方、ISO法ではボツリヌス毒素遺伝子を標的とした遺伝子検出法が示されているため、ボツリヌス菌に対する国内での評価結果を海外の結果と比較することは困難な状況となっていた。本研究ではこの問題に対して、ISO法に対して妥当性を確保した国内試験法の構築を行うことで食品微生物検査の国際整合性の確保へ貢献することを目的とし、食品からのボツリヌス毒素遺伝子試験法（定性法）を技術仕様書として、NIHSJ-20TS-ST4の初版発行に至った。今後、ISO/TS 17919の改訂の動きに合わせて適宜改訂を行うことも必要であろう。

ボツリヌス菌の使用・保管に際しては、法的規制が強く、菌株等の移動が現実的に困難な状況にある。また、ボツリヌス菌の取扱いに求められる施設・設備要件に起因する制約を理由として、参加機関で実

施可能な解析も限定的なものとなっていた。ポツリヌス菌を対象とした検討はこの様な制限下で実施される解析であるため、取扱いが容易な他種の病原体に対して行われる解析とは異なったスキーム構築が必要であった。本研究では標準試験品配布の代替としてスパイク用菌液作成プロトコルの標準化により菌株移動を行うことなく試験を実施できるようなスキームを構築した。加えて、シングルラボスタディを組み合わせたコンパクトかつ効果的なコラボスタディ作業スキームを構築した。これらのスキーム構築は、取扱いが制約的な病原体等を用いたモデルケースになりうるものと考えられる。2021年1月に示されたISO 16140-3では標準試験法あるいは妥当性確認された方法を利用しようとする試験室が適切な感度で当該試験を実施する能力を持っているかを検証するための手順が示されている。文書内の Clause 5 (Qualitative methods – Technical protocol for verification) には、各試験室が妥当性確認されている標準試験法(定性法)を使用した際に、適切な結果を得る能力があるかを検証するための具体的な手順が記載されており、3種類の選択可能なプロトコル(Protocol 1, 2 及び 3) が提示されている。このうち Protocol 1 及び 2 では、試験法の Level of detection 50% (LOD<sub>50</sub>) に対し、1~9 倍濃度の添加菌量で添加回収試験を行った際の結果に基づき試験室の能力を評価する事となっている。上記の様な国際的な動きに対応するためには、国内においても試験法を公表した後に同試験法を利用しようとするユーザーに対して基準値となる LOD<sub>50</sub> を提示していくことが必要となる。

作業部会では現在、NIHSJ-20TS の利用性向上のために、同試験法の LOD<sub>50</sub> の算出を行っている。また、研究班内で別途検討中の ISO 16410-3 に基づく国内向けベリフィケーションガイドラインを本研究で得られる成果に連携させることで、国内でのベリフィケーションのモデルケースを示したいと考えている。これらの活動は本邦における食品からのポツリヌス試験を効率的・効果的に行うための素地となりうる事が期待される。

#### (4) 遺伝子検査法の導入に関する研究

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性が生じる可能性が考えられる。

#### (5) 食品からのウイルス検出試験法に関する研究

##### 1) 国際比較

国内試験法は、食中毒対応を念頭においた試験法である一方、欧州の ISO や米国の FDA Foods program や BAM 等では、流通食品や製造施設環境を対象とした定量試験法が近年整備されている状況が確認された。

こうした欧米での動向変化の背景には、食品媒介性ウイルスによる健康被害低減に向けて、汚染食品の流通制御が重要な課題と捉えられているためと思われる。実際に、欧米では二枚貝のほか、生鮮野菜やソフトフルーツ等の流通食品を対象としたウイルス試験法が輸出入食品に対しても適用される状況となっている。従って、国際調和を果たすためには、国内での定量試験法の整備は今後検討すべき課題と考えられる。

多くの食品媒介性ウイルスでは培養法が平準化されていないため、現時点では欧米を含め、食品中のウイルスの基準値は設定されていない。しかしながら、定量試験では定量値が記録され、健康被害の発生データを基とした今後の解析を想定した場合には、将来的に何らかの基準提案が行われる可能性もあると思われる。

調査の結果から、食品マトリックスとしては、カキ等の二枚貝については、ISO 15216-1:2017 と国内通知法間での妥当性が最近になって確認されており、本研究での検討対象として優先的位置づけにはないと考えられた。また、他の食品のうち、セミドライトマト表面からの試験は国内では A 型肝炎ウイルスに限定され、ノロウイルス等での利用実績は文献調査からも見出せなかったことから、ノロウイルスの濃縮効率や ISO 法との成績比較に関する検証は今後検討すべき項目であろう。

このほか、食品が接触する施設等の表面からのウイルス試験法は、国内では未整備であった。ISO法を参考とした評価の実施は、食中毒事件の原因施設における調査等へ活用し得るものと推察される。但し、食中毒対応を主眼においた場合には、定量性を求めるよりも、検出感度及び精度の確保を重視した検討が必要と思われる。

ウイルス RNA 抽出工程では米国と国内の試験法では明確な差異は認められず、特段改良に向けた検討を進める必然性は想定し難い状況であることが確認された。

遺伝子検出工程では、プライマー/プローブを変更する必然性はないと判断されたが、定量検出を主眼においた場合には、1 step RT-qPCR やコントロールの設定等、幾つかの課題が見出された。試験法の検証方法として、米国 FDA ガイドラインは参照に値するものと考えられた。

## 2) 食品からのウイルス検出法実施手順の検証

### 2-1) 核酸抽出法について

国内ではこれまでウイルス 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うけて自動抽出装置が多くの試験検査機関に導入されていることを考慮し、シリカカラム法、磁気ビーズ法、自動抽出、手動抽出の比較を実施した。ISO 15216-1 で例示される自動抽出装置 MiniMAG (BioMerieux 社)は既に生産終了となり、国内では入手不可な状況であるが、ISO 15216-1 例示 RNA 抽出試薬である NucliSENS (BioMerieux 社)は入手可能で、手動抽出も可能である。また、自動抽出装置である Maelstrom-8 (TANBead 社)はこれ迄国内入手可能であったが、令和 5 年 3 月時点で終売予定のアナウンスがあった。また、Promega 社の自動抽出装置及び試薬 (Maxwell RSC)は、国内流通状況も良好であった。

以上より、本研究で検討した磁気ビーズ自動抽出の中では、Promega 社装置のみが国内入手可能と考えられた。一方、他社からも同様の装置は販売されており、国内流通している装置について引き続き検証作業を行うことも有用であろう。

### 2-2) 1 Step RT-qPCR 試薬について

1 Step RT-qPCR の試薬として、ISO 15261-1 で例示される UltraSens(invitrogen 社)は新型コロナウイルスパンデミックの影響で、世界的に供給不足となっているが、TaqMan Fast Virus 1 Step Master Mix(ThermoFisher 社)は同等の性能を示す試薬でありながら、供給も潤沢であり入手に問題はなかった。しかしながら、本研究の評価で、両者の検出性能には大きな差があることも確認された。工程管理に用いる Mengovirus は基本的に希釈せずに添加回収することを想定しているが、UltraSens では磁気ビーズ、シリカカラムどちらの核酸抽出法でも Mengovirus 遺伝子を検出できなかった。また HAV、FCV の添加回収実験においても、UltraSens は TaqMan に比較して検出性能が大きく劣る結果となった。

添加回収に用いるウイルスとしては、HAV 及び Mengovirus(ATCC 株、CeeramTools)が簡便かつ妥当性確認がなされた活用しやすいものであり、添加回収実験の結果も良好であった。但し、当該品は ISO 15216-1 準拠品として欧州を含む海外で広く流通しているが現時点では国内在庫はなく、今後こうした製品の入手が容易となることが望まれよう。

現時点で国内入手できる試薬及び装置を利用し、HAV 及び工程管理用に Mengovirus を用いることで、多機関参加によるラボ間再現性の確認は可能と考えられた。但し、シリカカラム法は磁気ビーズ法に比べて Ct 値が大きい傾向にあること、また、手動抽出が自動抽出に比べてばらつきが大きくなる可能性を示したことから、各ラボの定量値の単純比較については、更なる検討が必要と考えられた。

以上、ISO 15216 に例示される試薬で ISO プロトコルに従った場合でも期待される性能を得られない場合があること、標準化にあたって試薬の性能評価を実施する必要があることが明らかとなった。

## E. 結論

(1)食品微生物試験法の策定及び改訂に向けた研究食品の微生物試験法(標準試験法)として、ウエ

ルシュ菌、セレウス菌及びカンピロバクター・ジェジュニ/コリの集落計数法と、病原性エルシニア・エンテロコリチカの定性法を最終版として確定させ、初版を発行した。技術仕様書としては、ボツリヌス毒素遺伝子試験法、生乳受入れ時の直接鏡検法による総菌数試験法、及びリアルタイム PCR ガイドラインの初版を発行した。リステリア属菌試験法、標準試験法の作成及び改訂ガイドライン、及びベリフィケーションガイドラインは作業部会案を作成し、ノロウイルス及び A 型肝炎ウイルス試験法については作業部会案の承認まで完了した。また、国際的第三者認証を受けた代替試験法一覧を改訂し、試験実施者が閲覧できるよう公開した。

## (2)食品微生物試験法の国際調和のための研究

### ①妥当性確認及び国際動向調査に関する研究

ISO/TC34/SC9 総会に参加し、微生物試験をとりまく国際情勢に関する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 のガイドライン策定に係わっていくことが重要と思われる。公定法に相当する標準試験法の規格である ISO 17468 を基に NIHDJ 法の策定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等、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

ISO/TC34/SC9 内の妥当性確認ワーキンググループ (WG3) に専門技術委員として参加し、妥当性評価等に関する情報収集を行うと共に、バリデーション作業部会での提案・議論を通じて、検証ガイドラインの暫定案を作成した。

### (3)ボツリヌス試験法に関する研究

食品からのボツリヌス試験法として、ISO/TS 17919:2013 を参照しつつ検討を進め、技術仕様書として、NIHSJ-20TS:2023 ボツリヌス毒素遺伝子試験法 (定性法) を作成した。同法は国際調和のとれた試験法であり、国内での食餌性ボツリヌス症疑い事例への対応にあたり、迅速簡便な原因食品の

スクリーニング等への活用が期待される。

### (4)遺伝子検査法の導入に関する研究

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が、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、本研究班において検討した、国際的な基準に沿ったガイドライン案の策定は重要性を増すものと考えられる。

### (5)食品からのウイルス検出試験法に関する研究

本研究では、欧米における食品媒介性ウイルス標準試験法に関する情報を収集・整理し、国内の現行試験法との比較を通じ、現在国内では適用範囲として設定されていないマトリックスの存在や、前処理法、工程管理のためのコントロールの設定等について今後検討すべき項目を抽出することができた。ウイルス試験法の標準化に向けた検討では、果実野菜検体からウイルスを問題なく回収でき、試薬の性能評価も可能であることが確認できた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1)五十君静信：HACCP などの食品の工程管理における微生物検査の考え方. クリーンテクノロジー 30(8): 70-73. 2020.
- 2)五十君静信：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. 日本食品微生物学雑誌. 38: 53-66. 2021.
- 3)五十君静信：妥当性確認された微生物試験法の重要性和 HACCP 制度化後の微生物検査の考え方. FFI ジャーナル. 227: 4-9. 2022.

- 4)五十君静信：HACCP 制度化における微生物の自主検査の考え方～妥当性確認された簡便・迅速な代替法の選択と活用～. 食品衛生研究 72: 7-13.2022.
- 5)五十君静信：HACCP の検証における微生物検査法の選択と活用. 月刊フードケミカル 12:32-36.2022.
- 6) 斉藤美佳子、松岡英明：損傷菌の標準化. 日本防菌防黴学会誌. 48(10):535-540. 2020.
- 7) 松岡英明、斉藤美佳子：微生物試験法バリデーションの国際動向と今後の展望. 日本防菌防黴学会誌. 51(2):87-94. 2023.
- 8) 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. 71: 15-21. 2021.

## 2. 学会発表

- 1)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.
- 2)五十君静信：ウェルシュ菌による食中毒とその制御法. 日本防菌防黴学会第 49 回年次大会. 2022.9.26.
- 3)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. 日本食品工学会. 2022.10.31.
- 4)五十君静信：HACCP など工程管理の検証に用いる微生物検査の活用～HACCP の制度化に対応した微生物試験法の選択～. 全国食肉衛生検査所協議会（オンデマンド）. 2022.
- 5) 松岡英明：微生物試験における迅速簡便法の課題と展望—迅速・簡便・高精度・高信頼性を目指す技術開発動向. 日本防菌防黴学会. 2022.9.27. 東京.
- 6) 上間匡、南村幸世、朝倉宏：食品からのウイルス検出における核酸抽出法の比較. 第118回日本食品衛生学会学術講演会、2022年11月10日、長崎.
- 7) 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.

- 8) Asakura H: Microbiological Risk Assessment Framework and Process Flow: JEMRA Approach. ILSI Southeast Region Workshop on Microbiological Risk Assessment. 2022.3.17. Online.
- 9) 朝倉宏：食品衛生. 令和 4 年度FETP講習会. 国立感染症研究所. 2022.4.20.
- 10) 朝倉宏：カンピロバクター総論. 令和 4 年度細菌研修. 国立感染症研究所. 2022.10.12.

## H. 知的財産権取得状況

該当なし

