

平成 28 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）  
食品中の微生物試験法の開発及びその実効性・妥当性評価に関する研究分担研究  
報告書

試験法の妥当性評価・衛生指標菌

研究代表者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長  
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授  
分担研究者 伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部 室長

ISO16140:2016 Part1「用語」、Part2「代替法バリデーション」が出版された。確定試験（Confirmation）やペアード・アンペアードスタディ（paired/unpaired study）などの新しい概念が随所に加わっている。こうした国際動向を反映し、かつ我が国において実現可能なガイドラインとすべく、Part1を参照しつつ、Part2の章構成に合わせて作文した。本文は概ね完成した。一方、生菌標準物質の開発に関しては、これまで実用化を困難にしていた、オフサイトでの調製技術の見通しを立てることができた。すなわち、チミジンゼラチン重層法によって、セルソーターで調製した生菌が、1週間の冷蔵保存後、95%以上のコロニー形成率を示した。1週間は世界中に輸送するのに十分な時間である。我が国は、昨年からは ISO TC34 SC9 の P メンバーになったが、その活動にも積極的に関わっている。

## A. 研究目的

微生物試験法の妥当性確認（バリデーション）あるいは検証（ベリフィケーション）に際しては、国際的に認証されたスキームで実施することが要請される。そのスキームの手本とされてきた ISO16140 の改訂版が 2016 年 6 月に出た。変更内容には、AOAC:2012.2 版ガイドラインの内容に合わせた、と推察される部分が少なからずあった。それに関しては本研究グループでも、かねてより検討してきたので問題はなかった。しかし、「確定試験(Confirmation)」の要請のように、全く新しい概念の規定が加わったこともあり、本年度の第一の目的は、この ISO16140:2016 の内容を検証し、その内容に則ったガイドラインを作成することである。併せて、セレウス菌、セレウリド、エルシニア・エンテロコリチカ、衛生指標菌の標準試験法の作成に際して、

妥当性確認の国際動向の観点から意見を述べ、試験法作成の推進することを第一の目的とした。

一方、少数生菌の標準物質に関しては、既に、生菌標準物質のオンサイト調製法に関する要素技術を完成させている。昨年度は、実用的見地からさらに検討すべき事項を整理し、その一つとして損傷菌の問題を検討した。すなわち、冷凍食品中の生菌や、冷蔵食品中に長時間共存していることなどによって生じる可能性のある損傷菌の標準物質が調製できるか、という問題であった。そして、具体的に、高濃度スクロースによる浸透圧ストレスを与えた生菌が損傷菌になっていると推察され、その標準物質を調製できる見通しを得ることができた。

本年度は実用的見地からの検討事項として、オフサイトでの生菌標準物質の利用法について検討することを目的とした。すなわち、オフサイトで調製した標準物

質を遠隔地に輸送する場合に、輸送中に増殖や損傷あるいは死滅が起きないように条件を検討することとした。これが本年度の第二の目的である。

## B. 研究方法

### (1) 2016 版の ISO16140 に則ったガイドラインの作成

ISO16140:2016 は、今後出版される予定の分冊も含め、6 分冊構成である。第一分冊「用語」、第二分冊「参照法に対する代替法（市販キット等）の妥当性確認の手順」が出版済みであり、第三分冊「単一試験所で実施される参照法および妥当性確認済代替法の検証手順」、第 4 分冊「単一試験所試験法の妥当性確認手順」、第 5 分冊「市販キット等になっていない試験法のための部分的試験所間妥当性確認手順」、第 6 分冊「微生物確定試験および識別のための代替法の妥当性確認手順」が計画中である。

本年度は、2016 版第一分冊の用語を参照しながら、第 2 分冊の章構成に合わせて、日本語での原案を作文した。最終的に公開することを念頭に、訳語の選択や統一に留意し、作業部会で入念に議論した後、本委員会ですらに議論を重ねて最終版とした。

### (2) 微生物生菌標準物質の開発

既に、生菌標準物質のオンサイト調製法に関する要素技術は完成されている。昨年度、実用的見地からさらに検討すべき事項を整理した。第一は、冷凍食品中の生菌や、冷蔵食品中に長時間共存していることなどによって生じると推定されている、傷害菌の問題であった。そして、具体的に、高濃度スクロースによる浸透圧ストレスが原因で生じるとされる傷害菌の場合に限って、その標準物質の可能性を検討した。

本年度は実用的見地からの検討事項と

して、オフサイトでの生菌標準物質の利用法について検討することとした。

## C. 研究結果

### (1) 2016 版の ISO16140 に則ったガイドラインの作成

用語、訳語の整理に重点を置いた。例えば、キーワードである「validation」は、従来「妥当性確認」と訳してきたが、具体的な内容の理解の普及度を鑑み直接「バリデーション」というカタカナ表記にすることとした。また「study」も頻出する言葉であり、従来「研究」や「試験」と訳してきたが、他分野で使用されてきた研究や試験とは、内容や概念が非常に異なるので、これも直接「スタディ」とカタカナ表記にすることとした。これらの議論を経て作成されたガイドラインが添付資料 1 である。

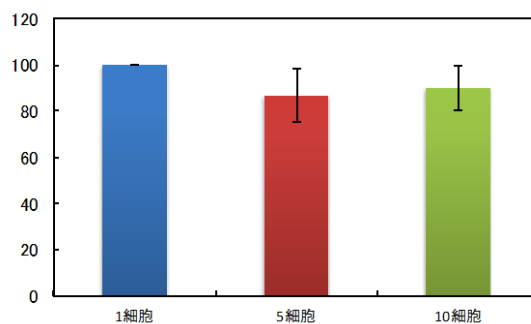
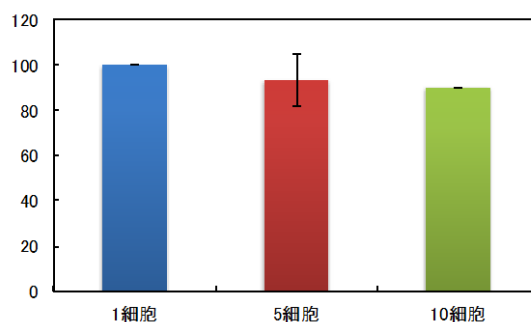
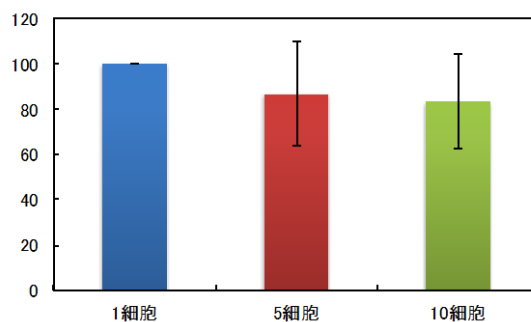
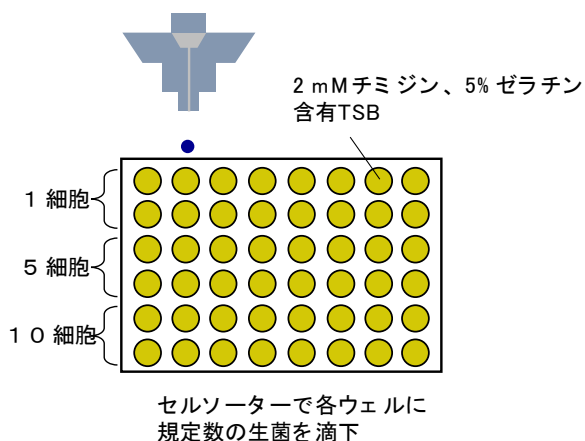
### (2) 微生物生菌標準物質の開発

生菌標準物質をオフサイトでも利用するためには、国内外、何れの場所を想定しても 1 週間ほどの保存安定性があれば十分と考えた。そこで、生菌標準物質調製後 1 週間の一時保存法について検討した。すなわち、保存中の細胞分裂を抑制しつつ、かつ使用時にはコロニー形成能を抑制しない方法について検討した。

第一の方法では、直径 10 cm のガラスプレートに薄層寒天培地 (TSA) を形成させ、この上に、セルソーターで単一生菌ずつ規定された個数を滴下し、その上に同じ TSA を重層して、生菌を挟むようにした (TSA 重層保存生菌)。第二の方法では、24 マルチウェルプレートの各ウェルに生菌 1 個ずつを滴下し、その上に溶解した TSA 溶液を滴下した後、室温まで冷やし固化して保存した (TSA 単層保存生菌)。第三の方法では、48 ウェルプレートの各ウェルに、規定数の生菌を滴下し、続いて高濃度チミジンと 5% ゼラ

チンを加えて調製した培地を滴下した (T-ゼラチン単層保存生菌) (図 1)。第一、第二の方法の各保存生菌は最長 1 週間冷室に静置保存した後、37°C で 24 h 培養した。第三の方法の場合は、生菌を保持した固形状の T-ゼラチンを、予め 10 cm シャーレ内に調製しておいた TSA 上に置き、常温で 5min 程度静置して T-ゼラチンを液体状にした後、TSA 上に広げた。この操作によって、チミジンは希釈され、生菌は増殖できるようになる。これを 37°C で 24 h 培養した。

第一の方法では、保存後の生菌の個数が安定しなかった。保存中の生菌の細胞分裂が抑制しきれず、また分裂した細胞が不規則に移動するが多かった。後から加える寒天培地の水分を予め十分除去しきれなかったことが原因と考えられた。第二の方法では、保存生菌が安定して 95% 以上のコロニー形成率を示した。しかし、保存中に細胞が分裂しなかった、ということの確認は難しかった。第三の方法では、チミジン 2 mM の場合、1 個の生菌を滴下した試料では、保存中に細胞分裂はせず、保存後 100% のコロニー形成率を示した。5 個、10 個を滴下した試料では、各々 85%、90% のコロニー形成率を示した。以上により、第三の方法に基づく保存法が有望であるとの結論を得た。



冷蔵保存期間7日のコロニー形成率 (N=3, means±SD)

図 1. チミジン-ゼラチン重層法

図 2. 冷凍保存後のコロニー形成率

#### D. 結論

これまで、ISO16140:2003、AOAC:2012.2 版ガイドラインに則り、我が国におけるガイドライン案を幾度か作成してきたが、公開するには至らなかった。ガイドラインの中では、しばしばバリデーションを

統括する組織がでてくるが、我が国にはそれがまだ整備されていなかったことが理由の一つであった。

今般の ISO16140:2016 版を見ると、バリデーションの方法論の変化の激しさに驚く。このような状況の下では、改訂された結果を追うだけではなく、議論の初めから参加し、自ら提言してイニシアチブをとることが重要であると考えざるを得ない。このような認識のもとに、本年より我が国が ISO TC34 SC9 の P メンバーになったことは大きな意義を有する。2017 年 6 月 19-23 日に東京でその総会が開かれる。これまで、本研究委員会等での議論は隔靴搔痒の感があったが、それを緊密に議論できる好機であると考えられる。

生菌標準物質作製に関する発展技術としても大きな成果があった。すなわち、これまでオンサイトでの利用しか議論されてこなかったのもので、セルソーターとい

う高価な装置がなければ実施できない位と考えられてきたが、その問題の解決を見通しが立ったことである。実用化に向けた大きな成果である。

#### E. 健康危害情報

該当なし。

#### F. 研究発表

(国内学術集会)

齊藤美佳子、高谷周督、五十君静信、松岡英明：生菌標準物質をオフサイトで利用するための一時保存法．第 43 回日本防菌防黴学会年次大会、東京（2016.9.26）．

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

## 【添付資料1】

### 食品微生物試験法バリデーション (Validation) ガイドライン(案)

目次	(Accuracy profile study)
1. 適用範囲	6.1.3.1. 食品カテゴリーの選択
2. 規定された参考文献	6.1.3.2. 試料 (sample) の数
3. 用語と定義	6.1.3.3. アクキュラシープロファイル試験結果の計算と解釈
4. 代替法の妥当性確認の一般測	6.1.4. 定量化の限界
5. 定性試験法—妥当性確認のための技術的手順	6.1.4.1. 一般的事項
5.1. 試験法比較スタディ	6.1.4.2. 食品カテゴリーの選定
5.1.1. 一般的事項	6.1.4.3. 試料の数
5.1.2. ペアードスタディとアンペアードスタディ	6.1.4.4. 結果の計算と解釈
5.1.3. 感度	6.1.5. 包含性および排他性
5.1.3.1. 食品カテゴリーの選択	6.1.5.1. 試験菌株選定と数
5.1.3.2. 試料 (sample) の数	6.1.5.2. 対象菌 (包含性)
5.1.3.3. 代替法の結果と確認	6.1.5.3. 非対象菌 (排他性)
5.1.3.4. 計算と感受性の解釈	6.1.5.4. 結果の表記と解釈
5.1.4. 適切に検出できる菌濃度 (RLOD)	6.2. 試験室間スタディ
5.1.4.1. 食品カテゴリーの選択、試料の数、及び繰返し数	6.2.1. 一般的事項
5.1.4.2. 5.1.4.2 計算と RLOD の解釈	6.2.2. 測定手順
5.1.5. 包含性と排他性	6.2.3. データの計算、要約、および解釈
5.1.5.1. 菌株の選択と数	
5.1.5.2. 対象菌株の接種 (包含性)	
5.1.5.3. 非対象菌の接種 (排他性)	
5.1.5.4. 結果の表記と解釈	
5.2. 試験室間スタディ	
5.2.1. 一般的事項	
5.2.2. 測定手順	
5.2.3. データの計算と要約	
6. 定量試験法—妥当性確認のための技術的手順	
6.1. 試験法比較スタディ	
6.1.1. 一般的事項	
6.1.2. 相対真度	
6.1.2.1. 食品カテゴリーの選定	
6.1.2.2. 試料 (sample) の数	
6.1.2.3. 相対真度の計算と解釈	
6.1.3. アクキュラシープロファイル	

