

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）  
平成 29 年度 分担研究報告書

食品微生物試験法の国際調和に関する研究  
分担課題 食品微生物試験法の国際動向に関する研究

研究分担者 五十君 静信 （東京農業大学応用生物科学部・教授）  
研究分担者 松岡 英明 （東京農工大学名誉教授）

### 研究要旨

本研究班では、国際動向を踏まえた上で、国内の食品微生物試験法の妥当性を確認し、食品微生物試験法の国際調和を図る上で必要となる科学的根拠を創出することを目的としている。コーデックス委員会では各国の食品微生物基準を策定するためのガイドラインを示しており、この中で食品の微生物試験法に関しては ISO 法を標準とし、同法もしくは科学的に妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。国内の微生物規格基準はこれまで独自に試験法を策定し公定法としてきたため、食品衛生管理の国際整合性が重要となっている。特に微生物試験法の国際調和は急務の課題といえる。

分担研究課題は、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である。

食品衛生のリスクマネジメントにおける微生物試験法の国際整合性の重要性から、2017 年 6 月に東京で ISO/TC34/ SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）総会を開催し、五十君はその開催委員長として会の運営にあたった。アジア地区としては、はじめての開催であり、ISO/TC34/SC9 は、非公開の会議ではあるが、情報を漏洩しないことを条件に、特例として国内の試験法関係者もオブザーバーとして参加を認めた。総会では国内からの情報発信ならびに海外からの情報収集を担った。更に、ISO での検討課題については逐次情報収集を行い、検証すべき項目の集約化につとめた。現在改訂が進められている ISO のバリデーションガイドライン (ISO 16140) 及び AOAC インターナショナルが公表している妥当性確認ガイドを比較検討し、国内における妥当性確認の手法の方向性を検討した。初年度は、AOAC インターナショナルと ISO のガイドを元に、標準試験法を策定するためのガイドライン原案の作成を進めた。

#### A. 研究目的

研究班では国内の食品微生物試験法を国際調和の取れた形へと導くため、食品微生物試験法の国際調和を科学的観点から推進することを目的とする。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。分担研究課題としては、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とする。

#### B. 研究方法

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ている。その中で微生物試験法は国際標準化機構（International Organization for Standardization: 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 であることから、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。平成 29 年 6 月には同サブコミティ総会を五十君が開催委員長として東京で開催し、総会では食品微生物試験法関連の国内からの情報発信ならびに海外からの情報収集を担った。

一方、アメリカ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。妥当性確認に関する文書が AOAC インターナショナルから公開されており、こちらについて、その内容の精査を行った。ISO における妥当性確認と AOAC インターナショナル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。

これらの検討は、バリデーション作業部会を組

織して行った。作業部会は、五十君静信（分担研究者）松岡英明（分担研究者）岡田由美子（標準試験法検討委員会事務局、分担研究者）森曜子（協力研究者）吉田信一郎（協力研究者）守山隆敏（協力研究者）内田和之（協力研究者）齋藤利江（協力研究者）吉田朋高（協力研究者）のメンバーで組織した。

#### （倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。病原体の取扱いについては、国立医薬品食品衛生研究所病原体等安全管理規程に基づき適切に行った。

### C. 研究結果

#### 微生物試験をとりまく国際情勢

食品の国際的な規格基準を決めているコーデックスでは、国家レベルの食品の微生物学的基準の判定で用いる試験法は、科学的根拠のある妥当性確認（バリデーション）を行った試験法であることを求めている。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（International Organization for Standardization; 国際標準化機構）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（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。

食品の微生物試験法については、WTO（World Trade Organization; 世界貿易機関）の協定の中に、試験規格の策定はISOが行うと示されていることから、ISOが国際標準と考えるのが妥当といえる。ISOで、食品の微生物試験法を議論している主なサブコミティは、乳製品がTC34/SC5、食品一般がTC34/SC9である。

#### ISO/TC34/SC9 総会の開催

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はなく、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。参考として表1にTC34に係る国内審議団体一覧を示す。表中に示した参加地位には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。その準備として、2013年ドイツのベルリンで開催された総会から、毎年専門委員会に参加し、情報収集と審議文書の審議に参加してきた。このような経緯から、2018年6月には、ISO/TC34/SC9総会をホスト国として東京都内の三田国際会議所にて開催した。総会は、前半の3日間はISO/TC34/SC9の総会、後半の2日間にはCEN/TC275/WG6の総会を開催した。これらの総会への参加国は、フランス、オーストラリア、ベルギー、中国、フィンランド、ドイツ、インド、イラン、オランダ、ノルウェー、スペイン、スイス、イギリス、タイ、アメリカ、日本（ホスト国）の合計16カ国であった。そのほかにAOAC国際ナショナル、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）などの関連組織からの参加者を含め総計47名が参加した。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表2に概要を示した。

#### 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国際ナショナルは、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国際ナショナルは、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国際ナショナル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。

国際的な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 の改訂が進んでいる。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（表 3）。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。

#### D. 考察

##### 微生物試験をとりまく国際情勢

食品の国際的な規格基準を決めているコーデックスでは、国家レベルの食品の微生物学的基準で用いる微生物試験法は妥当性確認（バリデーション）と国際的な整合性を求めている。国内の試験法はそれに対応した“標準試験法”の議論が進み、現在コーデックスが求める ISO 法を標準試験法とする考え方と、バリデーション（妥当性確認）による食品の微生物試験法の科学的根拠のある評価の重要性については既に定着している。わが国も、今後食品の微生物制御の国際整合性の中で工程管理（HACCP）の制度化が進んでゆくと、この中で検証として用いられる迅速簡便法をどのように導入してゆくかについては、代替試験法のバリデーションという考え方を理解して活用していく必要があるものと思われる。

##### ISO/TC34/SC9 総会の開催

2018 年 6 月にアジアで初めての ISO/TC34/SC9 総会をホスト国として開催したが、これらの総会への参加国は、フランス、オーストラリア、ベルギー、中国、フィンランド、ドイツ、インド、イラン、オランダ、ノルウェー、スペイン、スイス、イギリス、タイ、アメリカ、日本（ホスト国）の合計 16 カ国であった。そのほかに AOAC インターナショナル、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）などの関連組織からの参加者を含め総計 47 名が参加した。この開催規模は、ヨーロッパで開催する例年の規模に匹敵し、参加者からも大変好

評かであった。

食品の微生物試験法の国際標準を検討する TC34/SC9 にわが国も正式な一員として加わり、ホスト国としての役割を十分に果たせたと思われる。今後は、それぞれの WG の議論に積極的に加わり、原案の段階から日本からの提案ができるようにできることが期待される。TC34/SC9 総会へは継続的で積極的な参加と関与が期待される。

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などの新たにはじまる WG への参加が期待されている。

##### 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 インターナショナル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た。残る 4 つのガイドラインについても WG での議論は進んでいるので数年のうちに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 インターナショナルは、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と思われる。

#### E. 結論

微生物試験をとりまく国際情勢としては、ISO/TC34/SC9 総会をホスト国として開催し、多くの情報を得ることができた。ISO/TC34/SC9 総会の 2018 年 6 月の東京開催については、無事その任務を果たすことができた。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 WG に積極的に関与し今後の ISO のバリデーションガイドラインの策定に係わっていくことが重要であると思われる。

#### F. 健康危険情報

( 分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入 )

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 朝倉宏, 岡田由美子, 五十君静信: 食品・医薬品・環境分野等の微生物試験法および微生物汚染の制御に関する最近の話題「食品衛生検査指針 微生物編 2015」収載試験法. 日本防菌防黴学雑誌 2017;45:225-229. (2017.4)

##### 2. 学会発表

- 1) 藤田和弘, 福沢栄太, 佐藤信彦, 佐野勇氣, 高橋洋武, 梶田弘子, 松田りえ子, 森曜子, 大城直雅, 五十君静信, 鎌田洋一. LC-MS/MS による米飯中のセレウス菌嘔吐毒 (セレウリド) 分析法の検討. 日本食品化学学会. 2017.6. 三重県志摩市
- 2) 藤田和弘, 福沢栄太, 佐藤信彦, 佐野勇氣, 高橋洋武, 梶田弘子, 松田りえ子, 森曜子, 大城直雅, 五十君静信, 鎌田洋一. LC-MS/MS による米飯中のセレウス菌嘔吐毒 (セレウリド) 分析法の検討. AOACIJS 年次大会. 2017.7.20. 品川区
- 3) 安藤洸幸, 嶋岡泰世, 五十君静信, 山越昭弘. 酵素基質培地を用いた加熱損傷黄色ブドウ球菌の検出. 日本食品微生物学会. 2017.10.5-6. 徳島
- 4) 綱美香, 原田 義孝, 高崎 一人, 布藤 聡, 五十君 静信. *Listeria monocytogenes* の簡易検出法の開発. 日本食品微生物学会. 2017.10.5-6. 徳島

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

表 1. ISO/TC34 に関連する国内審議団体

委員会	参加地位*	国内審議団体
TC34 食品	P	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
TC34/SC2 採油用種子及び果実	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC3 果実，野菜及びそれらの二次製品	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC4 穀物及び豆類	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC5 牛乳及び乳製品	O	国際酪農連盟日本国内委員会
TC34/SC6 食肉，家禽，魚，卵及びそれらの製品	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC7 スパイス，ハーブ及び香味調味料	O	農林水産省 食料産業局食品製造卸売課
TC34/SC8 茶	O	農林水産省 生産局 農産部地域作物課
TC34/SC9 微生物	P	一般財団法人 日本食品分析センター
TC34/SC10 動物用飼料	O	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
TC34/SC11 動植物の油脂	O	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC12 官能分析	O	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
TC34/SC14 生鮮果実，生鮮野菜，乾燥果実及び乾燥野菜	N	農林水産省 消費・安全局消費・安全政策課
TC34/SC15 コーヒー	O	農林水産省 食料産業局食品製造卸売課
TC34/SC16 分子生物指標の分析に係る横断的手法	P	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
TC34/SC17 食品安全のためのマネジメントシステム	P	独立行政法人 農林水産消費安全技術センター

\* P: Participating Member, O: Observers Member, N: None Member

表 2 . 2018 年 TC34SC9 総会 ( 東京 ) で審議された WG 報告等

WG1	Microbiological analysis of meat and meat products
WG2	Statistics
WG3	Method validation
WG4	Proficiency testing
WG5	Culture media
WG6	Parasites
WG7	General requirements and guidance for microbiological examinations
WG8	Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions
WG9	Detection of Salmonella
WG10	Serotyping of Salmonella
WG11	Detection of microbial contaminants in starter cultures and probiotics
WG12	Detection of spoilage thermo-acidophilic spore forming bacteria
WG13	Enumeration of coagulase positive staphylococci using BP agar
WG14	Detection and enumeration of E. coli by MPN technique
WG15	Enumeration of psychrotrophic microorganisms
WG16	Yeasts and moulds
WG17	Sampling techniques from surfaces of food/feed environment
WG18	Enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i>
WG19	Guidelines for conducting challenge tests
WG20	<i>Bacillus cereus</i> Colony-count technique at 30°C
WG23	Sulfite reducing clostridia and <i>Clostridium perfringens</i>
WG25	Whole-genome sequencing for typing and genomic characterization
WG26*	Detection of <i>Clostridium botulinum</i> toxins in food
WG28*	Enumeration of micro-organisms at 30°C

情報提供

TC147/SC4	Water microbiology
TC 69/SC 6	Measurement methods and results
ISO/TC 212	Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems
ISO/TC 217	Cosmetics
ISO/TC 276	Biotechnology
Liaisons with other organisations	

表 3. バリデーションガイドライン ISO 16140 の改訂状況

ISO 16140:2003	Published in 2003
Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods	
Published in 2016	
ISO 16140-1:2016	Terminology - Published August 2016
Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 1: Vocabulary	
ISO 16140-2:2016	Validation of (alternative) Methods
Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method	
Expected publication 2019	
ISO 16140-3:	Submitted for Draft International Standard (DIS) review by SC9
Methods Verification	
ISO 16140-4:	Submitted for Draft International Standard (DIS) review by SC9
In-house Single Laboratory Method Validation	
ISO 16140-5:	Submitted for Draft International Standard (DIS) review by SC9
Factorial Multi-laboratory Method Validation	
ISO 16140-6:	Submitted for Draft International Standard (DIS) review by SC9
Validation for Confirmation Methods	

