

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 30 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 妥当性確認及び国際動向調査に関する研究

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 （東京農工大学大学院工学府・名誉教授）  
研究協力者 森 曜子 （公益社団法人 日本食品衛生協会）

### 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。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、2018 年 6 月にスイスの Lausanne で開催された ISO/TC34/ SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）総会に参加し、ISO/TC34/SC9 の動向に関する情報収集と試験法の検討を行った。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 シリーズ) 及び AOAC International 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。本年度は、引き続き AOAC International 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案の作成を進めるため、微生物試験法に関する用語について整理し、日本語訳リスト案として検討委員会へ提案を行った。また、検討委員会で標準試験法の検討を進めているウェルシュ菌試験法の策定に関して、バリデーション方法について助言を行った。

#### 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した。

本研究では、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”を活動の軸に置きつつ、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の科学的根拠を創出することを目的とした。主要病原微生物試験法については一定の成果を発信してきたが、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他、これらを英文化し、海外への発信

も併せた機能を同組織にもたせることが、今後の我が国における標準試験法の推進を図る上で不可欠である。実際に、同組織は国際標準化機構 (ISO) SC9 の中で発言権を有する P メンバーの活動中心に位置づけられており、研究分担者である五十君を委員長とする ISO/TC34/SC9 国内委員会において、ISO 対応等につき議論を進め、国際調和に向けた食品微生物試験の在り方に関する検討を行っている。上記委員会での検討対象としては、現在まで完了していない試験法やガイドライン等の中で、HACCP を見据え自主検査等で汎用される遺伝子試験法の使用に関するガイドライン等の策定を行い、指標菌を含め、食品検査法として未だ整備がなされていない試験項目を、国際標準を満たす試験法へ導くことが早急な課題として挙げられる。同項目については、1～2年目に原案を作成し、検討委員会での議論を経て、試験法、Technical Specification (TS)、あるいはガ

イドラインとして整備・公開していく予定である。現在の国内における食品の微生物規格基準については、多様な食品に対して様々な衛生指標菌が設定されている。その状況は海外とは大きく乖離する領域であるため、国際調和を図る上で、今後どのような方向性で整理してゆくかは我が国の大きな課題と目される。本研究では、この点を重視し、海外諸国における衛生指標菌に係る規格基準について、科学的な観点から知見・情報収集を行った上で、国内現行法の科学的妥当性を確認しつつ、科学的根拠を持って国際基準に適合しうる国内での運用の在り方を提示しようとするものである。

## 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 30 年 6 月には同サブコミティ総会が、スイスの Lausanne で開催され、研究班からは、五十君、松岡、岡田の 3 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、国内からの情報発信ならびに海外からの情報収集を行った。

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。AOAC International 総会には、参加できなかったが、国内から当該学会に参加した研究者から、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。

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。

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った。本年度は用語の和訳についての整理を行い、検討委員会に提案した。

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現在検討中のウェ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。

## (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

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。スイスで開催された 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。長年にわたり我が国は 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。

2019年度の第37回総会は、スイスの Lausanne 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。本年度の総会への参加国は、フランス、オーストラリア、ベルギー、カナダ、中国、デンマーク、エジプト、フィンランド、ドイツ、アイルランド、イラン、オランダ、ノルウェー、スペイン、スイス(ホスト国)、タイ、イギリス、アメリカ、日本の合計19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を含め総計55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1にその概要を示した。

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、表2に示したように25のワーキンググループが活動している。スイス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の必要性あることについて議論された。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、アリサイクロバシルス試験法に関する協力要請などであった。

#### 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 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。

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。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、森曜子委員が用語集案の作成を行った(表3)。この案を作業部会で検討後、検討委員会へ提案した。

#### ウェルシュ菌試験法策定支援

ウェ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いる。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、検討を進めている。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。ウェルシュ菌40菌株について、2機関(内1機関は3部署で対応)の4部署で試験法の評価を行った。培地としては、TGC培地で増殖後、LS培地、MM培地、LG培地について評価を行った。ISO法では、確認試験AとBが存在するため、こちらについても評価を行った。

#### D. 考察

##### 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。

##### 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た。パート1については、本年度用語集の作成で対応した。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。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と思われる。

##### ウェルシュ菌試験法策定支援

ウェ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としての整備を進めてゆくのが重要と思われる。

#### E. 結論

微生物試験をとりまく国際情勢としては、ISO/TC34/SC9総会に参加し、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. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ito K, Takagi K, Matsushima Y, Iwasaki A, Tanaka N, Kanasaki Y, Martin-Laurent FF, Igimi S. Identification of the novel hcbB operon catalyzing the dechlorination of pentachlorophenol in the Gram-positive bacterium *Nocardioides* sp. strain PD653. *J Pestic Sci.* 20; 43(2): 124-131. 2018

##### 2. 学会発表

- 1) 佐々木貴正、中山達哉、岡田由美子、百瀬愛佳、朝倉宏、五十君静信。採卵鶏農場におけるフルオロキノロン耐性カンピロバクター。日本獣医学会。2018.9.
- 2) 中山達哉、佐々木貴正、朝倉宏、五十君静信。食鳥処理場における薬剤耐性大腸菌の汚染実態。日本食品衛生学会。2018.11.
- 3) 佐々木貴正、中山達哉、百瀬愛佳、朝倉宏、五十君静信。食鳥処理場における鶏肉の広域スペクトラムセファロスポリン耐性サルモネラ汚染。日本食品衛生学会。2018.11.
- 4) 原田義孝、綱美香、高崎一人、布藤聡、五十君静信。特異性の高い *Listeria monocytogenes* 検出法の開発。日本食品微生物学会。2018.9.
- 5) Hiroyuki Chiba, Akinobu Kajikawa, Kenji Yokota and Shizunobu Igimi. Caco-2細胞を用いた *Listeria monocytogenes* の接着・侵入に関する評価。日本食品微生物学会。2018.9.

#### G. 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/SC9の総会での討議内容

1. 一般議題 (General Aspect)  
[N792～795]  
SC9全体の活動に係る一般的な懸案事項
2. ワーキンググループの年間報告  
[N796～806, 810～828, 830～833]  
WGの活動報告, 今後の予定について
3. 今後の改訂事項  
[N807～809, 829, 834, 837]  
今後の改訂の方向性, 新規提案について
4. CEN関連  
[N835, 836]  
CENとの関係性, CENミーティングでの決議  
事項について
5. その他 [N838]  
2019年の総会開催地について

表2. 2018年度 ISO/TC34/SC9のワーキンググループ

WG2	Statistics	WG17	Sampling from surfaces
WG3	Method validation	WG18	$\beta$ -glucuronidase-posit. <i>E.coli</i>
WG4	Proficiency testing	WG19	Challenge testing
WG5	Culture media	WG20	<i>B.thuringiensis</i> & <i>B.cereus</i>
WG6	Food-borne parasites	WG21	<i>Enterococci</i>
WG7	General requirements	WG23	Sulfite reducing bacteria & <i>C.perfringens</i>
WG8	Preparation of test samples		
WG10	Serotyping of <i>Salmonella</i>	WG24	<i>Shigella</i>
WG11	Contaminants & probiotics	WG25	Whole-genome sequencing
WG12	Spoilage TAB	WG26	<i>C.botulinum</i> toxins
WG13	Coag.-posit. <i>staphylococci</i>	WG27	Hybridization of <i>V. parahaemolyticus</i>
WG15	Psychrotrophic micro.	WG28	Micro-organisms at 30°C
WG16	Yeasts and moulds	WG29	Enumeration of spores

表3. 試験法関連用語集案 : Microbiology of the food chain - Method validation - ISO16140 Part1: Vocabulary

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)

2018/11案

	邦訳語案	ISO 16140-1	ISO 16140-1:2016
2.1	AL 許容限界	acceptability limit AL	試料(2.69)の参照値(2.60)(または、不明な場合は、容認された参照値)と、分析法の作業手順を適用した場合に得られる個々の結果との間の正または負の最大の許容差。 maximum positive or negative acceptable difference between the reference value (2.60) (or if not known, the accepted reference value) of a sample (2.69) and an individual result obtained when applying the operating procedure of an analytical method
2.2	精確さ	accuracy	測定された量の値と、測定対象に付与された量の値との一致の度合い。 measurement accuracy closeness of agreement between a measured quantity value and an assigned quantity value of a measurand
2.3	アキュラシー・プロファイル	accuracy profile	参照値の異なる濃度レベルに対する報告値及び許容限界(AL)とβ-ETIを組み合わせて、定量法の測定能力をグラフにして表現したものの。 graphical representation of the capacity of measurement of the quantitative method (2.57), obtained by combining acceptability intervals and β-expectation tolerance intervals (2.8), both reported to different levels of the reference value (2.60)
2.4	代替法	alternative method	
2.5	代替法による試験結果	alternative method result	
2.6	試験対象	analyte	component represented in the name of a measurable quantity
2.7	付与値	assigned value	比較のために、合意された計量参照となる値。 注記: 通常は、実験から又は実験に基づいて得られる。 value that serves as an agreed-upon reference for comparison
2.8	β-ETI 第2種の過誤(β)許容区間	β-expectation tolerance interval β-ETI	母集団の指定された割合が存在すると期待される値の範囲。 range of values within which a stated proportion of the population is expected to lie
2.9	かたより バイアス	bias	系統測定誤差の推定、又は、付与された定量値と複数回の測定結果の平均との系統的な差。 estimate of a systematic measurement error, or the systematic difference between the quantitative assigned value (2.7) and the average of measurement replicate (2.65) results
2.10	ブラインド(盲検)試験用 試料	blind replicates	分析者に試験対象の有無及び/又は濃度が知られていない、パフォーマンスを評価するために提供されるサンプルセット。 set of samples (2.69) submitted to evaluate performance in which the presence and/or concentration of the analyte (2.6) is unknown to the analyst

