

令和元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に関する研究
分担研究報告書

食品微生物試験法の妥当性評価に関する研究

分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授
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 部長

国内の食品微生物試験法を国際調和させるため、ISO/TC34/SC9 の P メンバーとして同総会に参加し、海外のメンバーとの緊密な意見交換を通じた確かな国際動向特に WG3（メソッドバリデーション）および WG2（統計学）の議論を重点的に調査する必要がある。本年度はイタリア・ミラノで開催された 2019 年次総会(7/9-7/12)およびリエゾンの CEN/TC275/WG6 の 2019 会議(7/8)に出席した。SC9 総会では 24 個の WG、5 個のアドホック WG の活動報告に立会い、現在議論されている問題点を集約した。特に WG3 で進行中の ISO16140:2016 の修正作業に関しては、エキスパート登録をして具体的なコメントを発信した。その内容は、修正版に反映されることになった。バリデーションで最終的に同等性の判定に採用される統計学的方法に関しては直感的に理解しがたい場合が多々あるが、WG2 の結論にしたがっている状況も理解された。統計解析の具体的手順は難解な場合も多々あるが、合理的判断をするための統計学であるとの認識が共有されている。海外のエキスパートと随時、直接意見交換できるネットワークが構築され、国際調和戦略上、重要な成果が得られた。国内での議論では、生乳受け入れ時の総菌数試験法に関して実用的な統計学的評価法を導入することにより、合理的な評価結果が得られる等、具体的な好例を示すことができた。

A．研究目的

我が国の食品微生物試験法を国際調和させるために、対応する国際組織である ISO TC34/SC9 の P メンバーとして、例年、総会に参加し、アップデートの情報を収集してきた。本年度は Milano（イタリア）で開催された 2019 年次総会(7/9-7/12)およびリエゾンの CEN/TC275/WG6 の 2019 会議(7/8)に出席した。様々の菌種の試験法に横断的に関わっている基本事項が妥当性確認（バリデーション）であり、また、その最終結果の合否判定に適用されるのが統計学に基づく判定基準である。これを扱うワーキンググループが SC9 である。そのため、各々のエキスパートから構成されている WG3（バリデーション）と WG2（統計学）の活動報告に重点を置き、国際動向を調査した。さらに、バリデーションにおけ

る要ともいふべき ISO16140 に関して大きな動きが進行している。すなわち、最新版（2016 年度版）の修正が進められているが、同時に ISO16140 の分冊化の準備が進められている。その分冊化に伴い、これまでの ISO16140:2016 は ISO16140-2(パート 2)と称することになった。その動向についても情報を整理した

我が国におけるバリデーションのガイドラインは、これまで、ISO16140:2016 を基に作成を進めてきた。しかしその内容の修正は現在も随時行われている。したがって、その内容修正は、その理由も含め、速やかに情報入手しておくことが重要である。本年度の年次総会では、その修正作業に関して WG3 エキスパートの追加募集があったので、松岡が登録し、同時に、これまでの解析で得られた疑問点や質問事項を文書で提出した。その内容は、

2020/2/12/-2/13 に開催された 24thWG3 会議 (Dauphin Island、米国) での議題に組み込まれ議論された。その結果についても以下に記述する。

国内委員会で行われた、個々の試験法に関する議論でもバリデーションの観点から意見を述べた。特に生乳受け入れ時の細菌数試験法に関しては、ISO16140:2016 に規定されている β -ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする方法で評価した。若干複雑ではあるが、合理的な評価結果を得るために統計学的判定法が有効であることを具体的に示す好例であったので、その内容も以下に示す。

B . 研究方法

ISO TC34/SC9 の 2019 年次総会に出席した。また、ISO16140: 2016 版の作成過程に携わっていた WG3 (メソッドバリデーション) のチェアマンである Paul in't Veld 氏 (食品および消費者の製品安全性庁、オランダ) と対面で議論するとともに、帰国後も必要に応じてメールでの意見交換を行った。

国内においては、ISO TC34/SC9 国内対策委員会事務局を介して配信される SC9 文書の分析に基づく動向調査を実施した。

国内委員会で議論される個々の微生物試験法の議論では、バリデーションの観点から意見を述べると共に、統計学的判定法の実例を示した。

C . 研究結果及び考察

(1) ISO 16140: 2016 の修正提案について昨年度の報告書でまとめた修正提案は、2018 年度中に英文化して Paul in't Veld 氏に送った。それに対して、当該規格は随時修正の議論をしているので、次の機会に反映できるだろう、との回答を得ていた。実際、その内容は、フランスのエキスパートからの提案と共に、2020.2.12-2/13 開催の

24thWG3 会議の議題に組み込まれた。

なお、WG3 会議への参加募集は、新たにエキスパート登録したからで、これによって、全体会議である年次総会よりも、バリデーションに関する木目の細かい議論に参加できるようになった。

提案事項に対する議論の結果について、情報公開の規約に反しない範囲で、紹介する。既に、ISO 16140: 2016 では旧版に比べ大きな変化があったことは既に報告しているが、その一つが、Confirmation (本報告書では「確認試験」と訳す) の追加である。これは、定性試験における感度評価で、代替法と参照法の結果が異なった場合、さらに追加で行う試験のことである。これらの試験結果が陽性か陰性かで、次の 8 通りの組み合わせがある。

R: 陽性、A: 陰性 → C: 陽性 **擬陰性 (False negative) による陽性一致 (Positive agreement)** : PA_{FN}

R: 陽性、A: 陰性 → C: 陰性 **陰性偏差 (Negative deviation)** : ND

R: 陰性、A: 陽性 → C: 陽性 **陽性偏差 (Positive deviation)** : PD

R: 陰性、A: 陽性 → C: 陰性 **擬陽性 (False positive) による陰性一致 (Negative agreement)** : NA_{FP}

R: 陽性、A: 陽性 → C: 陽性 **陽性一致 (Positive agreement)** : PA

R: 陽性、A: 陽性 → C: 陰性 **擬陽性 (False positive) による陰性偏差 (Negative deviation)** : ND_{FP}

R: 陰性、A: 陰性 → C: 陽性 **擬陰性 (False negative) による陽性偏差 (Positive deviation)** : PD_{FN}

R: 陰性、A: 陰性 → C: 陰性 **陰性一致 (Negative agreement)** : NA

以上のうち太字が修正されることになった部分。

このような修正が必要なのは、その後続く判定法において用いる、擬陽性と擬陰性の数が、各々、PD、ND ではなくて、 $PD_T = PD + PD_{FN}$ 、 $ND_T = ND + ND_{FP}$ であり、これらの数値の和や差が次の判定基準になるからである。因みに、規格本文では表中に

小さく付記されているだけで、本文中では PD_T 、 ND_T と表記すべきところも、全て PD 、 ND のままである。誤解を防ぐために、本報告書では区別して表記する。

次の判定基準は PD_T-ND_T 、 PD_T+ND_T の値を問題にする。すなわち、この値がいずれも一定の数以下であれば同等であるとの判断になる。ここで問題となったのは、 PD_T-ND_T であり、絶対値を付けるべきではないかとの意見である。ところが、この点がかつて十分議論された経緯があり、絶対値は付けないという。負の値の場合は PD_T が大きいこと、すなわち代替法が陽性で参照法が陰性の場合が多かったことを意味する。このことは、できるだけ検出できる試験法が「高性能」という考えに照らせば、代替法の方が参照法より高性能であることになる。したがって、負の値については制限を設けない、との考えになる。

そもそも、確認試験を導入したのは、バリデーションの煩雑さが増しても、本来、高性能の代替法を、参照法と同じ結果が得られないという理由だけで棄却するのは非合理的だ、との考えに基づいている。不思議なことであるが、そのような基本的な考え方については、何故か記述がない。何れにしても、「高性能」と推定される代替法が本当に標的菌をとらえているのか、については確認試験で十分確認することを要請している。

規格の中には、数的条件に関する「何故その数値に？」が頻出してくる。その多くは統計学に基づく判断であり、WG2 の判断である。その根拠には、解析的に得られる唯一の解、というようなものはほとんどない、と理解しておいた方がよい。例えば、 β -ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする同等性の判断基準がある。しかし、何故80%七日、との説明はないし、聞いても単にWG2 が判断して決めた、としか言えないという。

一方、我が国から提示した質問の一つに「Acceptability limit; AL」の元になっているデータは何か？エキスパートの見解の理論的背景は？」に対しては、プロジェクトリーダーの Frederic Martinez 氏から資料提供がなされた。また、MicroVal、AFNOR

の確認試験では AL の値を変えている、との情報があるので、同氏らは AFNOR、MicroVal と連絡を取る、としている。このように、関連機関との連携を生かして、根拠となる情報を直ちに精査する姿勢には学ぶところが大きい。

(2) ISO 16140 分冊化の動向

ISO 16140 が分冊化の計画は既に何年も前から議論されていたが、具体化されたのは3年ほど前からのようだ。2017年の東京での ISO/TC34/SC9 の年次総会で、その進行状況が報告されていたが、この2年間で一気に作業が進んだとの印象を受けた。本来、当会議の情報は非公開ではあるが、SC9 のキーメンバーである、DeAnn Benesh 氏(3M、同時に AOAC International 会長、米国)が 2017/10/24 にサンチャゴで開催された INOFOOD 会議で発表した内容を、また Paul in't Veld 氏が 2019/6/4 にオスロで開催された AOAC Europe/NMKL NordVal Symposium で発表した内容を公開しているため、その資料に基づいて説明する。

<https://www.inofood.cl/wp-content/uploads/2017/08/1.->

DeAnn-Benesh.pdf

http://aoaceurope.com/images/sampledata/symposium/presentations/M5_Paul_int_Veld.pdf

ISO16140 の Part 1、2 は出版済、Part 6 も 2019 年出版済、Part 3、4、5 は間もなく出版になると予想されている。内容を図 1 に示す。

- Part 1: Vocabulary 用語
- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
参照法に対する代替法（市販キット等）のバリデーション
- Part 3: Protocol for the verification of validated reference methods and validated alternative methods implemented in a single laboratory
バリデーション済の試験法を単一ラボでバリフィケーション
- Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory
単一ラボでのバリデーションで当該ラボ内でのみ有効
- Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods
非営利的試験法のコンパクトバリデーション、特殊な試験法で、コラボできるラボ数が十分確保できない場合など
- Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedure
菌種、型の確認試験に利用される代替法（市販キット等）のバリデーション

図1 . ISO 16140 シリーズ

とみなせるか、という判断は難しい。また試験法を適用する目的が、単に自主管理の場合には、改めてバリデーションする必要はなく、バリフィケーションのみで十分なはずだ。あるいは参照法自体の適用範囲を拡張する場合には、どの程度のバリデーションをし直す必要があるのか、などの議論に多くの時間が割かれてきたようである。そうした背景により、具体的な場合にに応じたプロトコルが開発されてきた。図2には各 Part の選択スキームが一覧にまとめられている。

必ずしも Part2 にしたがってフルバリデーションをする必要がないと判断される

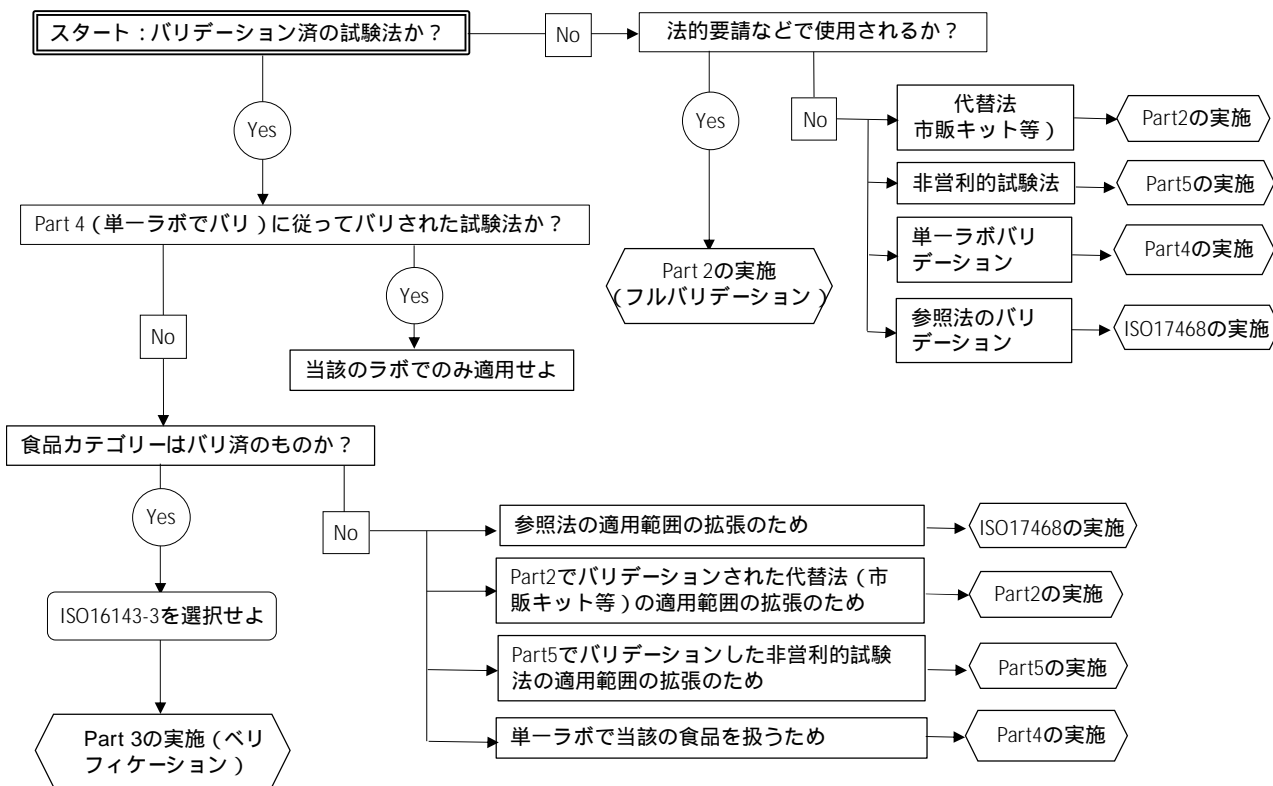


図2 . バリデーションにISO16140シリーズのどのパートを使うか？

既にバリデーションされた試験法の適用範囲を拡張したいと考える場合は多い、具体的には食品の種類が異なる場合がその例である。フルバリデーションを行ったときに用いた食品は、分類表にしたがって選択した食品マトリクスであるが、新たに適用したい食品が、その時の食品と「同等」

場合があることが理解されよう。具体的には、例えばバリデーションに際して参加すべきラボ数の違いに現れている（図3）。

ラボ数	参照法と共に実施	参照法無しで実施
1	Part 4	Part 4
定性試験：4~7 定量試験：4~9	Part 5	Part 5
定性試験：≥10 定量試験：≥8	Part 2	適用無し

図3. ISO 16140 シリーズ

(3) 生乳受け入れ時の総菌数試験法(ブリード法)の代替染色法の評価

国内では乳等省令により生乳の微生物基準として細菌数(直接個体鏡検法)が400万/mlと規定され、同法の染色液としてはニューマン染色液が指定されている。ニューマン染色液には1,1,2,2-テトラクロロエタンが一成分として含まれるが、同物質は、平成22年に施行された「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律(化管法)」に規定する「第二種指定化学物質」の指定を受けたほか、平成26年に施行された「労働安全衛生法」では、「特定化学物質等障害予防規則の特定化学物質：第二類物質」に指定され、ニューマン染色液を取扱う際には、使用場所の制限や健康管理への対応等が厳格に求められる状況となった。そこで、ニューマン染色液に代わる染色液の開発が求められていた。

そこで、代替染色液として、ブロードハーストパーレイ染色液(BPV1)、ブロードハースト・パーレイ改良染色液(BPV2)を選定し、4機関で小規模コラボスタディが実施された。その結果について、ISO16140:2016の定量試験に規定されている、β-ETI(80%)をバラツキの許容範囲とする方法で、ブリード法とBPV1法、BPV2法の各々との同等性を評価し、ブリード法とBPV2法の同等性を示した。

具体的な解析方法と結果は添付資料1に示す。

D. 結論

ISO/TC34/SC9の年次総会に連続3回参加した。リアルタイムで多くの情報を得ることができた。第一は、バリデーションの中心文書であるISO16140の分冊化の整備作業が速い、との印象である。それだけ喫緊のトピックになっていることである。一方、我が国では、ISO16140-2のみに関して詳細に理解、それを基に、一般に公開できるガイドライン作成を目指してきた。遅々として進まなかった原因は、16140-2の中で、理解困難な部分が多々あり、そのままでは公開できる内容には出来なかったからである。

しかし、漸く、その問題を解決できる見通しがついた。すなわち、解析的に結論が出ない問題はエキスパート達の経験に基づく判断で解決する、基本は科学的厳密性を重視するものの、その結果が合理的でなければ、合理的な結論が得られるようなプロトコルを積極的に提言し、議論し、修正していく、という流れが理解できたように思われる。

荒削りのガイドラインであっても、それを公開し、実用し、そこから指摘される問題点を検討し、速やかに修正や改訂にフィードバックさせる流れを作ることが肝要であろう。そうした活動を恒常的に展開するために、海外のAOAC、AFNOR、NordVal、などに相当するシステムがあれば、との思いは強い。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

- (1) 国内論文 0件
- (2) 海外論文 0件
- (3) 学会発表 1件

1. 松岡英明：微生物試験法の国際的バリデーションの動向。(日本防菌防黴学会46回年次大会特別講演、令和元年9月25日、大阪)

G . 知的所有権の取得状況

該当なし。

生乳受入れ時の総菌数試験法（ブリード法）の代替染色法の評価

1. 評価法の概要

〔試験法〕

ブリード法を参照法とし、これに対する2種類の代替法、BPV1、BPV2の同等性評価

〔評価基準〕

ISO 16140-2: 2016 において定量試験評価法として記載されている、 β -ETI(80%)（図1）をバラツキの許容範囲とする方法を適用。

〔評価基準の意味〕

Sample n 個で参照法での結果の平均値： X_i 、代替法での結果の平均値： Y_i 、代替法での結果の分散： S_A^2 、のとき $|Y_i - X_i| \pm \beta\text{-ETI}(80\%)/2$ が許容範囲内であれば、同等。

〔許容範囲〕

$\pm 0.5 \text{Log}_{10}$ （菌数）、この範囲を超える場合があっても $\pm 4S_R$ 以下なら許容。ただし S_R は参照法の標準偏差。

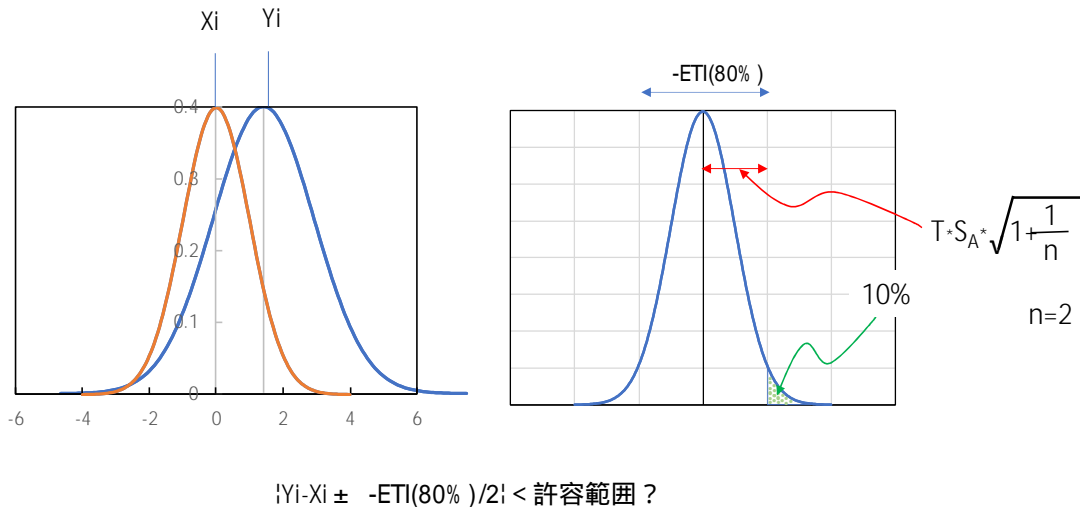


図1. バラツキの範囲〔 β -ETI(80%)〕説明図

2. 評価結果

〔結論〕

- ・BPV1法は同等とは言えない。
- ・BPV2法は同等と言える。

〔コメント〕

- ・サンプル数が少なく（ $n=2$ 、繰返し数4、ただし異なる4試験所で各1）

3. 解析結果

図2参照。

		BPV1		BPV2	
	繰返試験試料(Test portion)	試料(Sample)		試料(Sample)	
		Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2
参照法計 数値	1	582.0417	713.9063	582.0417	713.9063
	2	303.8963	780.6122	303.8963	780.6122
	3	364.455	655.2	364.455	655.2
	4	483.6298	712.6961	483.6298	712.6961
代替法計 数値	1	134.625	521.5521	494.8438	674.0625
	2	326.8716	678.8053	237.7153	835.1888
	3	171.3075	404.7225	279.1425	375.375
	4	240.5804	429.8574	329.2155	618.5198
参照法 Log10 変 換	1	2.76	2.85	2.76	2.85
	2	2.48	2.89	2.48	2.89
	3	2.56	2.82	2.56	2.82
	4	2.68	2.85	2.68	2.85
	平均値Xi	2.623	2.854	2.62	2.85
代替法 Log10 変 換	1	2.13	2.72	2.69	2.83
	2	2.51	2.83	2.38	2.92
	3	2.23	2.61	2.45	2.57
	4	2.38	2.63	2.52	2.79
	平均値Yi	2.315	2.697	2.508	2.779

		BPV1		BPV2	
参照法	標準偏差 S_R	0.126	0.031	0.126	0.031
	合成標準偏差 S_R	0.092		0.092	
代替法	標準偏差 S_A	0.169	0.101	0.137	0.147
	合成標準偏差 S_A	0.139		0.142	
平均値の 差	$Y_i - X_i$	-0.309	-0.156	-0.115	-0.075
ETI(80%)	$S_A^*(q:補正計数)=SQRT(1+1/n),n=4)$	0.155		0.159	
	$T=t$ 検定両側20%を 与える t 値(自由度 $3*2=6$)	1.440		1.440	
	$T*S_A*q$	0.224		0.229	
	$U_i=(Y_i-X_i)+T*S_A*q$	-0.085	0.067	0.114	0.154
	$L_i=(Y_i-X_i)-T*S_A*q$	-0.533	-0.380	-0.344	-0.303
拡張許容 範囲	$4S_R$	0.366			
	$-4S_R$	-0.366			

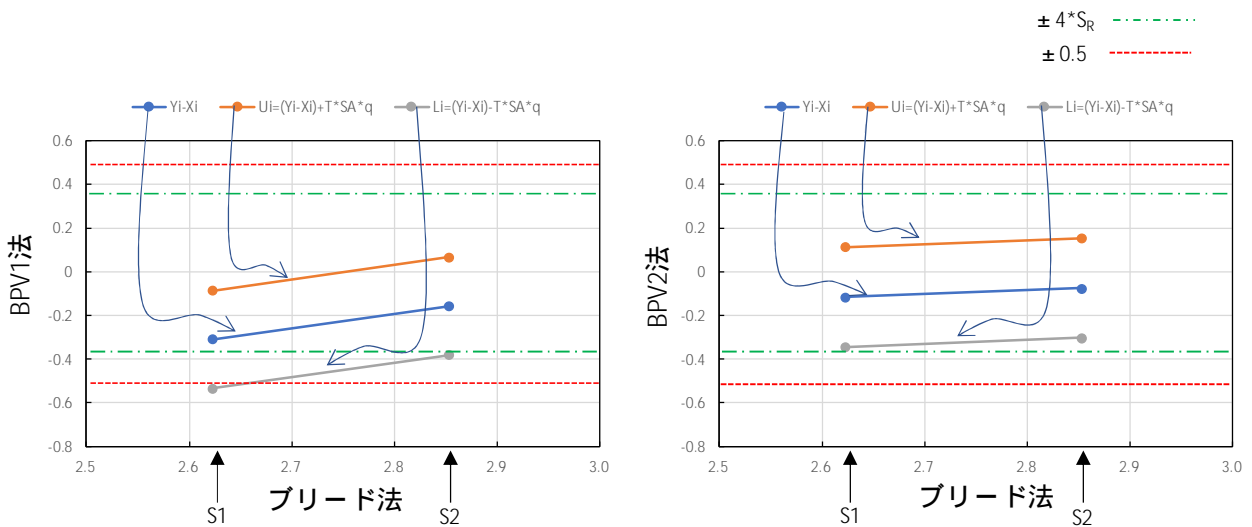


図 2.許容範囲の相関性に関する説明図 .