

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
分担総合研究報告書
食品微生物試験法の妥当性評価に関する研究

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

研究要旨：

本研究では、わが国の食品微生物試験法の国際調和に資する上で必須となる、国内試験法のバリデーション実施に係るガイドラインの作成及び国際動向を反映したアップデートを速やかに行うための基盤づくりを目的として検討を進めた。ISO/TC34/SC9 に日本国内委員会委員として参画し、特に妥当性評価に関わる作業部会である WG2, WG3 にも新たに加わり、国際的な妥当性評価に関して更に詳細な情報収集を行える体制を整えた。特に ISO16140 関連文書の徹底的な理解を目指し、疑問点については SC9 のエキスパートと直接議論を行った。国内では、食品からの微生物標準試験法検討委員会委員として、バリデーション作業部会の活動を進めた。より具体的には、代替法の妥当性評価にあたっての活用が期待される、-ETi を用いた評価をわが国では初めて生乳受入時の細菌数測定法である直接個体鏡検法の染色液比較に適用し、代替染色液として使用可能性があるものを国際的手法を用いて評価することができた。

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ことは食品の安全性確保を行う上で必須である。従来、文書情報に基づいて国内法の作成あるいは改訂が進められてきたが、その手本とする ISO 法や AOAC 法自体が随時、改訂されるため、タイムリーに国際協調することが困難であった。これに対応するためには ISO 法などの作成や改訂に直接携わっている海外のエキスパートと、随時意見交換できるネットワークづくりが急務となった。対応する組織は ISO/TC34/SC9 であるため、我が国は、2016 年に SC9 の P メンバーになり、この要請に応える準備を進めた。本研究は、翌 2017 年 4 月から始まる 3 年間で実施され、SC9 エクスパートとの情報交換ネットワークを構築し、ISO 法の新設や改訂の動向をタ

イムリーに把握し、国内のバリデーション・ガイドライン作成および国際動向を反映したアップデートを速やかに行うための基盤づくりを目的とした。

様々の試験法を横断的に貫くものは、妥当性確認、すなわちメソッドバリデーションであり、またバリデーションの最終段階での合否判定は統計学に基づく判定基準にしたがう。したがって、本研究では SC9 全体の活動を視野に入れながらも、特にワーキンググループ (WG) 3「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こととした。

既に先行研究において、2016 年度版 ISO16140 に基づくバリデーション・ガイドラインの作成作業を進めてきてはいたが、都度、専門的判断を要する事項が多々あること、

最終的な合否判定の考え方や解析手順の理解が困難な点があること、などのため直ちに公刊するには至らなかった。そうした問題提起に基づき、本研究では、ISO16140 関連文書の徹底的な理解を目指し、疑問点については SC9 のエキスパートと直接議論するようにした。

そのようなバリデーションに関する国際動向に注視しながら、国内においては、具体的な個別試験法のバリデーションに関して、技術的課題の議論に参加した。

B. 研究方法

(1) SC9 エキスパートとの情報交換ネットワークの構築

2017年に東京で開催されたISO/TC34/SC7の年次総会に、日本の委員として初めて参加し、続けて2018年スイスのローザンヌ、2019年イタリアのミラノで開催された年次総会に参加した。それによって多くの海外のエキスパートと直接議論する機会を得た。課題であったISO16140:2016に関しては、WG3「メソッドバリデーション」とWG2「統計学」が深く関わっていることを理解した。

(2) バリデーション・ガイドライン作成基盤の整備

手本とすべきISO16140:2016は、必ずしも完璧な形になっているわけではない。しかし、ガイドラインを作成して公にする以上は、理解できていない内容をそのまま日本語にするだけではガイドラインにならない。そこで、疑問点を徹底的に分析し、公にできるガイドライン作成の準備を行った。

(3) 個別の試験法プロトコールに対する意見

本委員会では日本における標準法の開発

に取り組んでいる。元になるISO法がある場合はそれを基に、無い場合は新規に開発する、との方針であった。そうした試験法のプロトコール設計の段階での意見、さらにその妥当性を検討する計画に対しての意見、さらにその性能を評価するバリデーションの結果に対しての意見を述べた。特に妥当性の検討に際しては、必ずしもフルバリデーションを実施するわけにはいかない事情がある。そのような場合でもできる限り現実的で合理的な解を見出す立場で意見を述べるようにした。前後するが、そうした姿勢はISO/TC34/SC9の会議に参加して得た洞察でもあった。

C. 研究結果及び考察

(1) SC9 エキスパートとの情報交換ネットワークの構築

年次総会において、WG3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）と親しく議論した。総会後も必要に応じてメールでの意見交換をした。また、WG2に関してはJanet Corry氏（英国）らと議論した。因みにCorry氏は、かつて「不確かさ」の研究プロジェクト実施中に調査した論文の中で、真っ先に注目した論文の著者であった。不確かさの要因分析の実例を英国におけるプロジェクト研究としてまとめたものであった。

WG3のキーマンの一人でもあり、またそれ以上にAOAC Internationalの元会長でもあるDeAnn Benesh氏とは、AOACの活動を通して親交があったが、SC9においても緊密な情報交換ができた。特に、ISOとAOACの立場の違いはEUと米国の立場の違いを反映している部分があり、そうした観点での意見も聞くことができ、大いに参考になった。それ以外にも、様々な国のエキスパートとの意見交換ができ、それらを通して、各々の国のISO戦

略を窺うことができた。

(2) バリデーション・ガイドライン作成基盤の整備

ISO16140:2016 の分析の結果、見いだされた疑問点を Paul in't Veld 氏に問い合わせた。直接明快な回答が得られた項目がある一方、統計学的判定基準に関しては、WG2「統計学」の見解に従っているだけ、との回答で当惑した。その後の意見交換で、統計学的判断の本質をある程度理解した。

有意差検定では、例えば t-検定で $p < 0.05$ という言い方をする。これは 2 つの事象の差が大きくて、一致する（重なる）確率は 5% 未満である、という意味である。逆に同等性である確率は 5% に満たない、ということになる。2 つの事象が近づいてきて、大きく重なってくると、この値は大きくなり例えば 95% 重なれば、95% の確率で同等であると判断する。これらは解析結果であるから、だれが計算しても変わらない。ところが、規格では、同等性、すなわち参照法と代替法の性能が同等かどうか、という判定をしなければならない。何%以上が同等であるとするかを決めておかなければ合否判定ができない。他の多くの事例で 95% を合格ラインとしているからといって、どの試験法でも同じにする理由はない。しかし、WG2 のエキスパートは、この合格ラインに対しても数年間を費やして結論を出しているはず、との Paul in't Veld 氏のコメントは極めて示唆に富む。不確かさの推定法に関する、かつての研究結果を思い起こす。すなわち、例えばシャーレ内のコロニーの計数で、何故、30 個以下の場合にはカウントしないようにしたのか、という経緯が思い起こされる。要するに 30 個以下の場合、不確かさが急に大きくなるからであった。

明らかに誤記と思われる個所が見いださ

れたが、それについては、「次の修正や改訂の議論に提起」する、とのコメントであったが、実際、それらは 2020/2/12-2/13 に Dauphin Island、US で開催された 24th WG3 Meeting の議題に組み込まれ、適切に修正されることで合意がなされた。その中で興味深かったのは、定性試験における許容限界 (Acceptability limit; AC) に関するトピックであった。参照法 (R 法) と代替法 (A 法) で特定の微生物を検出する試験をした結果、R 法では検出されなかったが、A 法では検出された場合は擬陽性という。多少の擬陽性は許容されても、それが著しく多くなれば、A 法は棄却することになるであろう。しかし、規格に示されている AC では、この点は問題にしていない。それは、より高頻度で検出できる A 法の方が、本来手本とすべき R 法よりも高性能ではないか、との考えがあるからである。ここに合理的な解を重視する姿勢が如実に表れている。

(3) 個別の試験法プロトコールに対する意見

ISO16140:2016 で規定された事項は、必ずしも厳格に守ることが難しい、あるいは合理的とは思われない、という場合が多々あるようだ。そして、そしてそのような場合に、海外のエキスパートたちは躊躇なく合理性を優先しているようだ。SC9 のエキスパートたちの見解を聞くにつけ、そのような姿勢を強く感じた。2016 シリーズの開発も、そうした姿勢から進められてきたものであると考えられる。

とはいえ、本来厳格に行うべき点は、きちんと行うべきであり、それを十分理解した上で、現実的で合理的な解 (対外的に説明できる内容) を見出す必要がある。そして、実際、バリデーションのプランニングやバリデーシ

ョン結果（合否判定）に際して、多少なりともそのような解を提示できたのではないかと考えている。

具体的には、生乳受け入れ時の総菌数試験法（ブリード法）に関して、である。代替染色法の評価に際して、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、最終的には、ブリード法とBPV2法の同等性を示すことができた。ブリード法は、この場合は参照法、すなわち手本となる試験法であるが、それ自体がバラツキの大きい試験法である。考えようによっては、代替法がどのような値をとっても、その大きなばらつきの中に入ってしまうと、統計学的には高い同等性を示すことになる。しかし、それは定量試験の結果としては直感に合わない。そこで、若干複雑ではあるが、上記の方法で評価した結果、合理的な解が得られたといえる。

D. 結論

各年度での活動を各々2点にまとめた。

2017	<ul style="list-style-type: none"> ・2016版の理解困難な個所に難渋 ・海外のエキスパートとの議論開始
2018	<ul style="list-style-type: none"> ・Paul、他との緊密な意見交換 ・理解困難な個所の整理、討論、解決
2019	<ul style="list-style-type: none"> ・16140修正作業に参加 ・SC9の現実的、科学的、合理性理解

ISO/TC34/SC9への参加によって、食品微生物試験法のバリデーション・ガイドライン作製の基盤は十分構築された、と考えられる。日本の立場として発信すべきトピックも少なくないはずであるが、発信と表裏一体のデータ作成等の作業量を考えると、発信する具体的内容には慎重ならざるを得ない。しかし現実的かつ科学的合理性が重要なコンセプトであることは間違いない。そのコンセプトにしたがって、国内で整備できるところから

進めていくことが肝要と思われる。ISO16140シリーズの開発は、たちまち修正や改訂に向けた作業の段階に入っている。引き続き、こうした動向を注視しつつ、国内活動を進めていく必要がある。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

- (1) 国内合計 0件
- (2) 海外合計 0件
- (3) 学会発表 合計3件
 1. 齊藤美佳子、松岡英明：大腸菌の死菌が生菌の増殖に及ぼす影響．日本防菌防黴学会第44回年次大会、2017年9月26日、大阪．
 2. 松岡英明：バイオにおける確からしさと不確かさ．（「電気化学と生命科学」企画シンポジウムにおける依頼講演）、電気化学会、2018年3月27日、京都．
 3. 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、2019年9月25日、大阪．