

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
食品微生物試験法の国際標準化実装に向けた研究
令和6年度分担研究報告書

食品微生物試験法の妥当性評価ガイドライン策定に向けた研究

研究代表者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授

食品微生物試験法を国際調和させるために、ISO TC34/SC9のPメンバーとなっている日本の専門委員として、年次総会(R6.6.11-6.14)に参加（WEB会議）した。またSC9内の妥当性確認（バリデーション）ワーキンググループ（WG3）に専門技術委員として、WG3会議(R6.4.8-4.10、R7.2.17-2.19)に参加（WEB）した。さらに、SC9あるいはSC9/WG3から随時発せられるメール審査（本年度は6回）に対応し、必要に応じてコメントを発信した。これらの活動によって、妥当性確認関連文書の議論〔ISO 16140シリーズ（既刊のpart1~6の改訂、およびpart7以降の新規作成）および参照法に関するISO 17468の改訂〕の動向を調査した。国内では標準法検討委員会及び妥当性確認作業部会で、国際動向に基づく議論をリードした。特に議論が錯綜していた検証（ベリフィケーション）ガイドラインに関して、昨年度完成させた第10改訂版を修正（R6.12.17）し、完成図書NIHSJ-39とした。実装の観点から、本ガイドラインの適用例として、食品中のサルモネラの単一生菌検出結果に対する50%検出レベル推定値（eLOD₅₀）解析を実施した。高感度試験法では、しばしば低菌濃度でも全陽性結果となり直接eLOD₅₀が求められない問題があったが、統計学的近似法を創案して95%検出レベル（LOD₉₅）を求めることで解決し、論文発表に至った（Food Safety, in press）。また、リステリア属菌試験法、クロストリジウム試験法、デジタルPCR法等の個別試験法に関しては、妥当性確認に関する技術的助言を行った。さらに、ISO 16140-2を筆頭に、ISO 16140シリーズの改訂および開発動向をまとめ、我が国における実装戦略の課題をまとめた。

A. 研究目的

《試験法の実装とは？》

国際調和した食品微生物試験法を実装するまでのプロセスは、①国際的参照法の開発・改訂動向の調査、②その動向を考慮した国内の標準法の開発・改訂、そして③国内の具体的なユーザーによる標準法の運用に直結する実装になる。

①②に関しては、既に着実に実績をあげてきているが、実装の段階では未解決の課題が多い。技術的な議論は理解できても、それを実施するためには、相応のコストや時間がかかる。したがって、実施者がその条件を考慮してでも実施すべきである、との意識を持つことが重要になる。

《実装段階に至る過程でブラックボックス

スを作ってはならない》

国際的参照法の動向調査の対象としてきたのは、ISO 16140 シリーズ、および参照法の妥当性確認に関する規格 ISO 17468 であった。ISO 16140 シリーズの中心文書は part2「妥当性確認（バリデーション）」である。その中で、複雑な統計的解析が記述されているが、それを経て得られる結果が、概略計算によって得られる結果と大差ない場合がある。この場合、実装の観点では簡単な概略計算でも十分である、という考えになりがちである。しかし、重要なことは、「概略計算でも十分である」との結論は、詳細な統計解析結果があって初めて言えることである。厄介ではあるが、その詳細な解析過程に関してもブラックボックス

にしているのではない、ということである。

《国際調和の本質》

食品の種類の複雑さを考えると、試験法の性能評価は極めて難しい。参照法との同等性を科学的に判断することは不可能である。実装の観点から、合理的な判断をしなければならない。その判断の元になる条件は、多様な利用者側の要望や社会的要請によって絶えず変わる。一旦規格として決まっても、要請の変化に応じて修正や改訂を行う。それが合理的判断の実体である。国際調和とは、このように絶えず変動する動向に調和するということである。定められた国際規格に、我が国が無条件に一方的に合わせることはない。我が国の事情に適合した内容に理解あるいは改変して実施していくことである。国際規格の中身を理解した上で、我が国なりの考え方を主張することが重要である。

《本分担研究が目指すもの》

ISO 16140-3「検証」はバリデーションが終了している試験法の実装に際して適用する規格である。昨年度、この規格に基づくガイドラインとして、一旦、完成したが、その後、実装に関わる具体的な利用者にとって難解すぎる、との意見が出た。そこで、これに関する議論を再開し、改めて「ガイドライン」として完成させることを第一の目的としている。

ISO 16140-2「バリデーション」に関しては、SC9 年次総会、および SC9/WG3 会議で、2016 版以降に議論されてきた内容を反映させた「ISO 16140-2 に基づく食品微生物試験法バリデーションの手引き」（昨年度成果報告書、添付資料 2）をまとめた。引き続き、本年度も、2016 版の修正版 ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024 の作成を目指し、多くの項目について議論された。この動向を解説すると同時に、昨年度の「手引き」の改訂版を作成し、我が国における実装戦略を策定するための基礎資料として供することを、第二の目的としている。

試験法の実装に際して直面した問題と

して、高感度定性試験法に対する LOD₅₀ が求められない事例がある。規格では、低濃度、中濃度、高濃度での定性試験結果から LOD₅₀ を求めるようになっているが、全ての試験結果が陽性結果の場合は、それが求められない。しかし、高感度の試験法では低濃度の検体でも全て検出可能、すなわち全陽性結果になることは容易に想像される。その場合は、ブランク検体で全陰性結果が得られれば合理的な結論が得られるはずである。しかし奇妙なことに、ISO の規格ではそれが考慮されていない。そこで、サルモネラ定性試験の具体的な試験結果に基づいて、この問題を解決し論文としてまとめることを第三の目的とした。

リステリア属菌試験法、クロストリジウム試験法、デジタル PCR 法等の個別試験法に関しては、国内委員会に置いて、バリデーションの観点から技術的助言をすると共に、必要に応じて LOD₅₀ の解析等において解析支援をすることを第四の目的とした。

B. 研究方法

《検証ガイドラインの作成》

前年度の報告書添付資料 1「第 10 改訂版（R6.3.3）」に関して、検討委員会で再度議論した。

《ISO 16140 シリーズの開発・改訂の動向調査》

ISO/TC34/SC9, 2024 年次総会(R6.6.11- 6.14)

(WEB 参加)、SC9 内の妥当性確認ワーキンググループ 3 (WG3) 会議 (R6.4.8-4.10、R7.2.17-2.19) (WEB 参加) に出席した。さらに SC9 あるいは SC9/WG3 から随時発せられるメール審査（本年度は 6 回）に対応し、必要に応じてコメントを発信した。以上の活動によって得た情報に基づき、主要なトピックをまとめ、その理由や背景について概説した。特に、ISO 16140-2 に関しては、ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024 を反映した手引きとしてまとめた。

C. 研究結果及び考察

(1) 検証ガイドライン

①NIHSJ-39 として完成〔添付資料 1〕

本ガイドラインの目的は「NIHSJ 法を作成する作業部会および共同試験に参加する試験室が、ISO 法等を改良、和訳、導入する際の技術的要件を示すものであり、ISO 16140-3:2021 に基づく」となっていたが、複数の委員から、現在の我が国の実施者を想定すると、内容が難解で具体的操作が複雑過ぎる、との見解が出され、再度議論された。その結果、目的を「ISO 16140-3:2021 原本に基づく導入検証の実施を希望し、その内容をより理解したいと考える試験者を対象とする解説文書の作成を目的としている」とし、これを完成図書 NIHSJ-39 として議論を閉じた。我が国の実施者側の状況を考慮した当面の判断である。しかし、国際協調の真意に鑑み、消極的過ぎる結論であるとの感も拭い難く、今後の国際協調戦略を考える際に、改めて発展的な議論をする必要があろう。

②Draft for ISO 16140-3/FDAmd.1

国内で NIHSJ-39 作成に手間取っている間に、ISO では改訂が進められ、2025.3.11 時点で次の、菌株同定に関する事項の改訂が合意された。すなわち、許容限界 (NIHSJ-39 では 2.4 節の表、ISO 16140-3:2021 では 8 節の Table 8) に次の項目が加わる。

同定法	菌株パネル	100% 一致
-----	-------	---------

続けて、新たに 9 節「妥当性確認済みの同定法 - 検証のための技術的プロトコル」が追加された。そして検証すべき菌株の数、結果報告のテンプレートが、各々、表 17、表 18 として追加された。

表 17. 妥当性確認済み同定法の実装検証における菌株数

妥当性確認済み同定法の範囲	試験すべき菌株数
複数の科と属に属する種	15
同一科内に属する複数の属に属する種	10
同一属に属する種	5

表 18. 妥当性確認済み同定法の検証結果の概要

試験株	寒天培地	菌株の同定		検証試験法によって同定された菌株の科・属	結果の解釈 (IA, ID, No)*
		同定された科・属	菌株の起源		
1					
2					
3					
Etc.					

*IA:一致, ID:偏差, No:不一致

さらに、表 18 の具体例が附録 G として追加された。

(2) 妥当性確認関連文書に関する議論の動向

①ISO 16104-2:2016/Amd.1:2024

ISO 16140 シリーズの中心文書であり、本年度の改定案をめぐり盛んに議論され、Amd.1 に反映されることになった。昨年度の報告書添付資料 2 にもその内容を反映させた。詳しくは本報告書〔添付資料 2〕を参照されたい。

改訂内容の概要は以下のとおりである。

(a) 偽陽性と偽陰性の議論：

定性試験における感度試験では参照法と代替法で同一検体を試験する。その結果の陽性/陰性結果に基づく性能評価の問題である。参照法（陽性）、代替法（陰性）、確定試験結果（陽性）の場合、「代替法の偽陰性による陰性偏差」というような、ややこしい表現をする。この表現法に関する議

論に多くに時間を割いたが、一応昨年度に決着した。ところが、本年度にまた偽陰性率 (False negative ratio; FNR) に関するコメントが出た。既に偽陽性率 (False positive ratio) はペアード試験とアンペアード試験、各々に対して計算式が示されているが、FNR に対しても同様の計算式を示すべきだ、という内容である。内容的には些細であるが、こうしたコメントが度々出るとは、偽陽性や偽陰性の要因に対する関心が高まっていることを反映していると考えられる。

(b) 半定量法 (Semi-quantitative methods) の新設：

従来、妥当性確認は定性試験と定量試験から構成されていたが、新たに Amd.1:2024 で半定量試験が導入された。目次を見ると、定性試験の項目と全く同じタイトルの項目が並んでいる。内容をチェックした結果、

- ・[定性試験の代替法] 対 [定量試験の参照法] でバリデーション。
- ・参照法の検出閾値を確認し、これを代替法が検出できるか (陽性 or 陰性) を試験。
- ・アンペアード試験として評価

の 3 点のみが異なるだけで、後の条件は定性試験の場合と同じである。

(c) 商業的滅菌試験：

16140-2:2016 には 当初(A)から(I)まで 9 個の附録 (Annex) が付いていた。その内訳は、(A)食品と汚染菌の組合せ、(B)(C)は菌で汚染された食品試料の調製、(D)(F)は RLOD 解析、(E)は包含性と排他性に適用する菌種、(G)(H)(I)は精確さの菌濃度依存性の解析 (具体的計算例を掲載)、であった。その後、改訂作業の過程で、2023 年に「商業的滅菌試験」に関するプロジェクトグループ (PG) ができ、Annex J として「商業的滅菌法のバリデーション」が加わった。

それまで ISO 16140-2 の対象は、特定の食品と特定の菌種の組合せであったが、初めて、食品や菌種を問わず横断的な滅菌方法の妥当性を評価する、という内容を対象とするものであった。実用的には、極めて

適用範囲が広く、また需要が大きい内容であるが、具体的な議論は難しかった。その第一は、滅菌条件が十分であったことを確認するための指標菌を何にすればよいか、という問題である。また冷凍品や冷蔵品の場合、生菌が残っていたとしても、その増殖は遅く、検出は難しいことが予想される。

我が国では、現在、腸内細菌科菌群を衛生指標菌とする議論が進んでいる。滅菌法の妥当性を確認するために衛生指標菌が必要となるからである。ISO での議論に直接加わっているわけではないが、我が国としても社会的ニーズに迅速に対応すべく、独自に議論を進めていく必要がある。

ISO での議論の現状は、対象食品はコーデックスの定義に従う、すなわち「常温保存可能な製品 (分活性(a_w))>0.86)、であるが、脱水製品、チルド製品、保存料を使用した製品は対象外とする。具体的に「フルーツジュース」、「超高温瞬間殺菌乳および植物由来乳」など数項目を挙げ、各々に対して考慮すべき菌種 (好気性、嫌気性、芽胞、高温嫌気性菌、乳酸菌、など) を規定する、との考え方が示されている段階である。また、この時点で、食品と菌種との組み合わせが、既存の Annex (A) の分類と整合性が取れるか、との議論もある。こうした状況を鑑みると、我が国での衛生指標菌に関する議論は、むしろ国際的にも先導して進めるべき段階にあると考えられる。

②ISO 16140 の他のパートの動向

(a) ISO/PWI 16140-1 語彙

PWI は Preliminary work item。121 個の語彙について意味がまとめられている。例えば、

“Qualitative method” は“分析対象物質が、指定された検体において、直接的または間接的に検出されるか検出されないかのいずれかの反応を示す分析方法”

“Quantitative method” は “分析法の一種で、その応答が分析対象物質の量 (個数または質量) であり、指定された検

体において、直接的に（例：質量または体積中の個数測定）または間接的に（例：色吸収、インピーダンスなど）測定されるもの”

“Semi-quantitative method”は“分析対象物質が、指定された（希釈された）検体中に直接的または間接的に検出されるか検出されないかを示す分析方法であり、定量的な参照方法に対して技術的プロトコルに従って妥当性確認され、定性法を評価するために使用される”

現在、用語集編集作業を実施している国内委員会バリデーション部会と情報共有している。

(b) ISO 16140-4:2019/DAmD.2 単一試験室でのバリデーション

Draft for ISO 16140-3:2021/FDAmD.1 と同じタイミングで ISO 16140-4 に関しても、菌株同定に関する事項が追加された。菌株同定のための規格は、別途、作製された ISO 16140-7 に詳しく記載されているが、それを参考に、ISO16140-4 では Annex I で、試験すべき菌株数を最小 250 株、最大 1000 株、と規定している。

(c) ISO 16140-6:2019 菌種、型の確認試験に利用される代替法（営利的）のバリデーション

Part2 に導入された確定試験の選択肢として利用可能。

(d) ISO/16140-7:2024 菌種同定法の出版

(e) ISO/NP 16140-8: ウイルスと寄生虫

新プロジェクト（New project; NP）として作製中。

(f) ISO/PWI 16140-9 細菌毒素と生物由来アミン

予備作業項目（Preliminary work item; PWI）として作製中。

(3) 実装戦略の課題

本研究に基づき次のような実装戦略を提言する。

①代替法に関する技術開発が進むと、代替法の性能が参照法より高くなる場合が多くなる。定性法では、参照法では検出できないが、代替法では検出できた、という場合である。その結果、参照法との同等性よりも代替法の確実性を追求することがより重要になってくる。この場合の確実性とは、代替法が検出した菌が、確実に標的菌である、ということである。したがって、菌種同定に関する合理的な試験体系を構築することが必要になる。したがって、この問題については、ISO での議論の結果を待つのみでなく、自ら最適と考えられる試験体系を構築することが重要となっている。

②定性法の感度は高ければ、低濃度の菌体試料で全陽性の結果になる場合が多くなる。その場合は ISO で提供している計算ソフトのみでは解析できない。統計学に基づく近似法など、柔軟な解析法の創案が必須となる。本年度の成果の論文は、まさにその課題に対する解答例といえる。

従来、我が国では、統計学エキスパートは専ら食品微生物のリスクアセスメントに関わっていたように見受けられる。しかし、今後は、リスクマネジメント（試験結果の評価に際して）にも統計学エキスパートが強力に動員されることを期待する。

③ISO での議論は多岐にわたっているが、その内容の多くが、必ずしも我が国の実務者が必要としている情報に調和していないように感じる。海外との取引に関する実務量が少ないことが一因かも知れない。したがって、逆に、コストをかけるに値する実務量がある試験法を特定し、それを国際調和する意義を明確にすることが必要ではないか。

D. 研究発表

1) 学会発表 合計 1 件

1. 松岡英明、斉藤美佳子：ISO16140 ウェブサイトの LOD₅₀ 自動解析プログラ

ムの理論的背景と活用シミュレーション. 日本防菌防黴学会第 51 回年次大会、東京、1P-Cp26、(2025.9.17)

2) 論文発表 合計 1 件

1. H. Matsuoka, T. Moriyama, N. Koshimizu, N. Takatani, T. Yoshida, Y. Shimabara, T. Hirai, K. Nakajima, S. Igimi, M. Saito: Detection of single cell contamination of *Salmonella* in foods by SALX System and NIHSJ-01 and estimation of LOD₉₅. *Food Safety* 2025 (in press)

E. 添付資料

- 1) 検証ガイドライン (NIHSJ-39) (オンライン非公開)
- 2) ISO 16140-2:2016/Amd.1:2024 に基づく食品微生物試験法バリデーションの手引き

F. 知的所有権の取得状況

該当なし。