

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）
令和5年度 分担研究報告書

食品微生物試験法の国際標準化実装に向けた研究
分担課題 国際動向及び妥当性評価に関する研究

研究分担者 五十君 静信 （東京農業大学総合研究所・教授）
研究協力者 森 曜子 （東京農業大学食品安全研究センター・協力研究員）

研究要旨

本研究は国際的な食品微生物試験法に精通した専門家から構成される「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の活動を通じ、国際調和が取れた微生物試験法を確立し、現行国内試験法の妥当性を評価することにより、国内における食品の微生物規格基準等に関わる試験法を国際調和のとれた形へと実装するための研究を行うことを目的とする。上記委員会ではこれまでに腸内細菌科菌群、サルモネラ等の通知法作成に寄与し、主要な病原微生物の試験法は公定法への移行という形で成果を挙げてきたが、微生物試験法の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改訂等の作業が必要である。また、現行の規格基準に関わる試験法の妥当性については一部の試験法など検討が必要な状況にあり、これらの妥当性を評価することは食品の輸出入が増加の一途にある上で至急の対応が求められる課題である。本研究では上記委員会活動を通じ、ISO法を中心とする国際標準的な微生物試験法を参照法として国内の規格基準に関わる試験法の整備を進めると共に、我が国で策定された微生物試験法の妥当性を評価し、英文化を経て国際発信することが求められる。我が国の食品における微生物規格基準が国際調和を伴った形となるよう体制の確立を目指すと共に、科学的妥当性を付与・表明へと波及させることを目的とする。

本研究では、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提供する。国際標準を策定す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。

分担研究課題は、食品微生物の試験法に関する変動してい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。

国際動向掌握については、本年度は2023年6月に、ストックホルムで開催されたISO/TC34/SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）及びCEN/TC463総会（令和5年6月26-30日）へ参加した。ISO/TC34/SC9とCEN/TC463の動向に関する情報収集とISO試験法の検討を行った。更に、SC9での検討課題については逐次情報収集と情報交換を行い、検証すべき項目の収集につとめた。現在も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、AOAC InternationalとISOのガイドならびにISO/TC34/SC9で策定が進められているガイドラインを元に、バリデーションやベリフィケーションの手順について整理し、分担研究としては、特に微生物試験を行う検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）についてガイドライン案の作成を進めた。

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と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変動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ガイドラインの検討を行うこととした。加えて、研究班で策定する試験法については、妥当性確認方法のサポートを行っ

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ている。主要病原微生物試験法については、公定法への移行という形で成果を挙げてきたが、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、国内で策定した試験法を英文化し、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/TC34/SC9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きた。

上記委員会での検討対象としては、現在までに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、標準試験法、技術文書であるTechnical Specification（TS）、あるいは試験法の作成にあたってのガイドラインの整備を進める。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、リスクマネジメントにHACCPを導入したことを考慮し、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。

標準試験法検討委員会のバリデーション作業部会では、国内における妥当性確認の手法の方向性を検討した。AOAC Internationalの示すガイドラインとISO/TC34/SC9で策定が進められているISO 16140シリーズのガイドラインを元に、試験を実施する検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）に関するガイドラインについて検討し、現場での実

施に有用なガイドライン作成を進めた。また、公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格ISO 17468について精査検討を行った。

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に関する規格については、国際標準化機構（ISO：International Organization for Standardization）法を標準とするとされている。ISOで食品微生物試験法を担当する主なサブ委員会はTC34/SC9であることから、このサブ委員会に発言権を有する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。令和5年6月にはISO/TC34/SC9総会が、対面とwebのハイブリッド開催となり、研究班からは、五十君（対面）、松岡（web）、岡田（対面）の3名とISO/TC34/SC9国内委員会事務局から2名（対面）、1名（web）の計6名が日本代表団（JISK）として参加した。SC9総会では食品微生物試験法関連の話題について、わが国からの情報発信ならびに海外からの情報収集を行った。また、国際酪農連盟の国内委員会は以前より乳製品のISO基準の策定に寄与していたことから、2023年4月より乳の国際基準を検討するISO/TC34/SC5にPメンバーとして活動することになり、こちらのサブコミティーからも情報収集を行った。

加えて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、直接参加することはできなかったが、国内から当該学会に参加したAOACインターナショナル日本セクション所属の研究者から、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からも公開されており、こちらについて、その内容の精査を継続した。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更新、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、標準試験法検討委員会のメンバーからなるバリデーション作業部会を組織して行った。作業部会は、岡田由美子（研究代表者、標準試験法検討委員会事務局）、五十君静信（分担研究者）、松岡英明（分担研究者）、森曜子（協力研究者）、諸藤圭（協力研究者）、廣田雅光（協力研究者）、守山隆敏（協力研究者）、内田和之（協力研究者）、吉田朋高（協力研究者）のメンバー

で行った。

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 のガイドラインならびに ISO/TC34/SC9 で策定が続けられている ISO 16140 シリーズを元に、公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った（分担研究者松岡担当）。検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）も、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理し、ガイドライン案を作成した（分担研究者五十君、協力研究者森）。公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格 ISO 17468 について精査も行った。

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提案される各作業部会から提案される試験法について支援・アドバイスも行った。

（倫理面への配慮）

本研究では、研究内容から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

①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;国際標準化機構の示す試験法であり、その他の代替試験法を用いる場合は、ISO 16140 シリーズ（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。2023 年 6 月に、ストックホルムで開催された ISO/TC34/SC9（食品の微生物試験法に関するサブコミティ）及び CEN/TC463 総会（令和 5 年 6 月 26-30 日）へ参加し、P メンバー国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/TC34/SC9 の動向に関する情報収集と ISO 試験法の検討を行った。

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。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。SC5 についても、2023 年より O メンバーから P メンバーとなり、積極的な活動を開始した。

TC34/SC9 に係る「国内審議団体」として、2002 年から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。ISO への参加地位には、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。現在、研究班から五十君と岡田が SC9 の国内委員会に参加している。

一方、乳製品については ISO/TC34/SC5「牛乳及び乳製品」が規格の作成を担当している。SC5 においても微生物試験法の策定を行っており、これまで国際酪農連盟を介してこの活動を行ってきたが、2023 年より ISO/TC34/SC5 についても、O メンバーから P メンバーとなり、積極的な活動を開始した。SC5 の国内委員会には、研究班から五十君と岡田が参加している。

2023 年度の SC9 総会は、6 月にストックホルムにて、対面と web のハイブリッド方式で開催され、前半の 1 日間は CEN/TC463 の総会、後半の 4 日間に ISO/TC34/SC9 の総会が行われた。ISO/TC34/SC9 の総会への参加国は、フランス（幹事国）他の約 40 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約 50 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。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省略する。

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、25 のワーキンググループが活動している。今年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などであった。

②バリデーションガイドラインの現状

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、現在 6 つの文書に細分化され、順次規格として文書化が進んでいる。一方、米国の AOAC International は、ISO 16140 シリーズ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きた。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 シリーズの改訂では、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。

昨年度から引き続き AOAC International と ISO の 16140 シリーズの ISO/TC34/SC9 の文書との整合性を考慮し、標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。AOAC International と ISO のガイドならびに ISO/TC34/SC9 で策定が進められている ISO 16140 シリーズ、公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格 ISO 17468などを元に、公的な標準試験法を策定する場合のバリデーションや手順について整理し、その代表である NIHSJ 法の策定手順の見直しを行った。ISO 17468 については、これまでホームページで公表していた NIHSJ 法の策定手順と共通性が高く基本的には同等なものといえるが、表現など一部の修正を行った。

一方、検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な導入検証（ベリフィケーション）についても、ISO/TC34/SC9 との整合性を持たせるため整理した。ISO 16140 シリーズのベリフィケーションに関する文書 16140-3 は、かなり難解な内容を含んでおり、その和訳に相当する文書の作成を松岡が担当した。一方、公定法や代替法などを実施する試験所における導入検証（ベリフィケーション）については、実用性を尊重して検討する必要のある重要な項目を検討し、実用的なガイドライン案を作成した。別添文書に示す。

HACCP などの工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性のまとめを行った。工程管理

の検証に用いる微生物検査は、病原菌を対象とするというよりも、通常の商品から検出の可能である一般生菌数や衛生指標菌のレベルの確認となるため、公定法などの培養による方法に限定する必要はなく、迅速簡便法を活用することが有用である。第三者機関でバリデーションの行われている迅速簡便法を活用することの重要性を示し、その考え方の要点をまとめた。また、これに該当する試験法リストを更新し、NIHSJ 法のホームページ内に公開した。

D. 考察

①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）試験法への貢献が期待されている。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、バリデーション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。また、リステリア試験法の作業部会が結成されることとなり、わが国もメンバーとして参加することにした。

②バリデーションガイドラインの現状

微生物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 シリーズに代替法のバリデーション等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 で行われており、現在も 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、パート 3 のベリフィケ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ている。パート 1 については、用語集であり、以前示した用語集案から時間を経ていることもあり、最新の情報を反映し改正作業を行い、研究班としては作業部会で検討後、標準試験法検討委員会での確認を行っていく予定である。

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、松岡を中心に整備を進めている（松岡分担研究報告書参照）。残る3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。これらの改訂に先立ち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思われる。

ISOの動向に合わせて、NIHSJ法の策定手順の見直しを行った。こちらについては、これまでホームページで公表していたNIHSJ法の作成手順が、“公定法など標準とされる参照法の確立または改定に関する技術的要因およびガイダンスに関する規格”であるISO 17468考え方にはほぼ一致していたことから、一部の表現等の修正を行うことで対応することにした。

一方、検査室で新たな試験法を導入する場合は導入検証（ベリフィケーション）が求められるため、ISO/TC34/SC9との整合性を持たせるため実用性を考慮して、検討・整理した。こちらは将来的に実用的な文書としてまとめる必要があると思われることから、ガイドライン案としてまとめた（別添ガイドライン案参照）。

HACCPなどの工程管理の検証に用いる試験法の選択に関する方向性については、工程管理の検証の微生物検査では、病原菌を対象とするというよりも一般生菌数や衛生指標菌のレベルの確認となるため、試験法の選択の重要なポイントとして目的適合性を重視する必要がある。この観点から、公定法などを用いるよりも妥当性確認の行われた迅速簡便法を活用することが有用である。第三者機関でバリデーションの行われている迅速簡便法を活用することの重要性を確認し、これに該当する第三者機関による妥当性確認の行われている迅速簡便法試験法リストを更新し、NIHSJ法のホームページに公開している。

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、またAOACインターナショナル年次大会参加者からの情報提供により、多くの新しい情報を得ることができた。バリデーションガイドラインであるISO 16140シリーズ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た。公定法策定に関する規格であるISO 17468を基にNIHDJ法の策定方法について整理を行った。また、バリデーションの重要性、目的適合性、工程管理における試験法の選択に関する考え方の整理など、微生物試験法に関連する情報提供を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 五十君静信。食中毒統計には表れないリステリア食中毒発生状況とその対策. フードケミカル 39 (6), 56-61, 2023.
- 2) 五十君静信。食中毒統計ではわからないリステリアの食中毒リスク。食の安全と安心通信. 49, 2023

2. 学会発表

- 1) 五十君静信。食肉の安全性の確保について、2023. 7. 19、山形国際ホテル、第59回全国食肉衛生検査所協議会全国大会
- 2) 五十君静信。HACCP制度化後、微生物検査をどのように考えればよいのか、2024. 1. 26、東京顕微鏡院豊海研究所、NP0食の安全と微生物検査。2022年度微生物検査実技研修会

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

食品等の微生物試験結果の妥当性確保のためのガイドライン (作業部会案)

1. 目的

食品等の微生物試験を実施する機関が試験結果の妥当性を確保することを目的とし、以下の手順のガイドラインを示す。

- 1) 試験法導入時の**検証(verification)**
- 2) 試験結果の**妥当性をモニタリング**する手順を示す。

本ガイドラインに示す手順は、ISO 16140-3:2021 Annex F²⁾ 及び ISO/IEC 17025:2017³⁾を基に、さらに Eurachem Guide AML⁵⁾ 及び FDA ORA Laboratory Manual⁶⁾を参考にして作成した。

2 用語の定義と解説

2.1 食品等

原料、製造／取扱い工程での中間産物・拭き取り検体、および製品

2.2 LOD_x (level of detection) (検出のレベル) ＜定性法＞

所定の試験手順によって、検出の確率が X となる試験対象の濃度。

(例) LOD₅₀ は、試験の 50 %が陽性結果をもたらす検出のレベル。

(注) これは、化学および物理試験で用いられる LOD (Limit of detection) とは異なる。

2.3 推定 LOD₅₀ (estimated LOD₅₀: eLOD₅₀)

本ガイドラインに基づき推定された LOD₅₀

(注) 本ガイドラインでは試行数が少ないため、「推定 LOD₅₀」という用語を用いる。

2.4 バイアス、かたより、偏り (bias)

測定のかたより (偏り)

付与された値 (添加菌量等) と繰り返し測定結果の平均値との系統的な差

2.5 推定バイアス/かたより (estimated bias: eBias)

本ガイドラインに基づき推定されたバイアス。

(注) 本ガイドラインでは試行数が少ないため、「推定バイアス」という用語を用いる。

2.6 室間再現標準偏差 (S_R)

室間再現条件 (異なる施設、異なる作業員、異なる測定システムを含む条件で、同一または類似の対象について複数の測定値を得る条件) 下で得られた試験結果の標準偏差

2.7 室内再現標準偏差 (S_{IR})

室内再現条件 (同一の施設で同じ方法を用いて、異なる器具を用いた異なる作業員によって、同一または類似の対象について複数の測定値を得る条件) 下で得られた試験結果の標準偏差

3. 試験法導入時の検証(verification)手順

試験法を導入する際に、自らの試験施設で適切に実施できることを確認するため、以下の確認を行う。

- 1) 試験実施手順の検証 (Implementation verification)
- 2) 試験品目の適用性の検証 (item verification)

3.1 試験実施手順の検証 (Implementation verification)

試験法の導入時に、自らの施設および試験手順で試験法を適切に実施でき、試験結果が妥当であることを実証する。

なお、試験結果に大きな影響を及ぼす要因 (装置・試薬・試験員など) を変更した場合、継続して試験結果が妥当であることを

を実証することが望ましい。

3.1.1 試験品の選択

試験法の適用範囲から試験所の試験頻度が高いと予想される品目(item)を1つ選択する。

3.1.2 検証に用いる標準菌

純培養した標準菌株または認証標準物質から調製した標準菌液を用いる。

3.1.3 検証する性能特性

＜定性法＞

- ・推定 LOD_{50} ($eLOD_{50}$)

＜定量法＞

- ・推定バイアス ($eBias$) (衛生指標菌および常在菌には適用しない)
- ・室内再現性標準偏差 (S_{IR})

3.1.4 性能特性の評価法と評価目標値

微生物試験の性能特性に関する評価法および評価目標値を表-1に示す。

表-1 - 性能特性の評価法と評価目標値

試験法	性能特性	許容限界
定性法	eLOD ₅₀	添加した菌量が既知の場合 (例：参照標準物質等を用いた場合) 試験法で規定されている試料 x g を 7 個採取し、それぞれに 3 cfu から 5 cfu の対象微生物を添加した時、陽性結果が 6 個以上
		添加した菌量が不確かな場合 (標準菌株を用いて自家調製した場合) (1) 試験法の妥当性確認時の LOD₅₀ が入手できない場合 $eLOD_{50} \leq 4 \text{ cfu} / \text{試験部位 (test portion)}$ (2) 試験法の妥当性確認時の LOD₅₀ が入手できる場合 妥当性確認で得られた LOD₅₀ の 4 倍以下 $eLOD_{50} \leq 4 \text{ LOD}_{50} / \text{試験部位 (test portion)}$
定量法	eBias	日常測定する濃度範囲内の濃度レベルの対象微生物の標準菌液を調製し、それぞれ 1mL を試料の初期懸濁液に接種する($n=2$) 接種した標準菌液の実測濃度 ($\log_{10} \text{ cfu/mL}$) と試料(x g)当たりの菌数($\log_{10} \text{ cfu/test portion}$)の中央値との差の絶対値が 0.5 $\log_{10}$ 以下。
	S_{IR}	試験法の適用範囲内であって、通常試験を行っている試験品の最低 10 検体について、室内再現条件で 2 点の試験を実施し、得られた試験結果 A と B の差から下記の式を用いて計算する。 $S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$

		n: 検体数 y_{iA}, y_{iB}: 試験結果 A 及び B の結果を常用対数に変換($\log_{10} \text{ cfu/g}$)して得られたデータ 妥当性確認でのデータが得られる場合、共同実験で得られた室内再現標準偏差の 2 倍以下。 妥当性確認でのデータが得られない場合は、評価は不要。 ただし、ここで得られた室内再現精度を用いて、測定の不確かさを推定することができる⁴⁾。
--	--	--

3.2 試験品目の適用性の検証 (item verification)

下記の試験品目について試験を実施する場合は、試験品目ごとに検証を実施し、試験法が適用できるか評価する。

- 1) 試験法の適用範囲及び妥当性確認範囲外の試験品目
- 2) 試験品目の物性 (pH、水分活性等) や成分 (高脂肪、高ポリフェノール) 等が、微生物の発育を阻害するおそれがある試験品目 (別紙 1 参照)

以下に例を挙げる

・酸性食品：概ね pH xx 以下の食品

例) 酢漬け 等

・水分活性の低い食品：概ね Aw xx 以下の食品

例) 粉末食品、乾燥食品

等

・ポリフェノールを多く含む食品

例) 緑茶、コーヒー、紅茶、

チョコレート 等

評価する性能特性は、以下の通り。

定性試験：eLOD₅₀、

定量試験：eBias

4. 試験結果の妥当性のモニタリング

試験機関は、試験実施内容を継続的に評価し、結果の妥当性をモニタリングする。

モニタリングする項目としては以下のものがあるが、これらに限定されない。

- 1) 陽性及び陰性対照試験の並行実施
- 2) 測定・試験機器の機能チェック
- 3) 自然汚染試料又はスパイク試料での試験
- 4) 二重 (反復) 試験
- 5) 試験結果の二重評価 (2 人の試験員での結果の評価)

例) 同一のシャーレーのコロニー計

数を 2 人で実施 (全てのシャーレーについて実施する必要はない)。

これらは、データをプロットして管理図を作成し、傾向を視覚的に評価できるように記録する。

5. 参考文献

- 1) ISO 16140-1: 2016: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary
- 2) ISO 16140-3: 2021: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
- 3) ISO/IEC 17025-2017 (JIS Q 17025-2018) : General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項)
- 4) ISO 19036: 2019: Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
- 5) Eurachem Guide Accreditation for Microbiological Laboratories (2023)

<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/microbiol>

- 6) FDA Office of Regulatory Affairs (ORA) Laboratory Manual

<https://www.fda.gov/science-research/field-science-and-laboratories/field-science-laboratory-manual>

