

令和5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標準化実装に向けた研究分担研究報告書

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(R5.6.27-6.30)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(R5.4.3-4.4、R5.11.6-11.7)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8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、目的と適用範囲を新たに明確に定義し直すことによって、漸く完成版（第10改訂版、R6.3.3）としてまとめることができた。また、クロストリジヤ試験法やデジタル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、長年、調査してきたISO 16140-2に基づくバリデーションの解説文書を平易にまとめ、さらに常に更新できるようにウェブ公開することの重要性に鑑み、そのひな型を作成した。

A. 研究目的

《そもそも国際調和とは？》

食品の輸出入に際して、微生物汚染に対する食品の安心・安全を確保する鍵は、国際調和した食品微生物試験法である。我が国においては、独自の法整備に基づき食の安全を確保してきた実績があるものの、実施する試験法が諸外国の試験法と同等以上の性能を示すことを予め確認しておくことが必須となっている。そのため、平成21年（2009年）にNIHSJ-01法としてサルモネラ属菌定性法を作成して以来、今日に至るまで20余種類のNIHSJ法を作成し公開してきた。

NIHSJ法作成の過程で、国際的な参照法であるAOAC-OMA法やISO法と旧来の我が国の衛生試験法との性能比較に多くの時間が割かれた。しかし、試験法の同等性の証明は食品成分の複雑さのため極めて

難しい。また対象とする菌の属や種の違いによっても試験条件が異なる。結局、科学的に唯一の結論が得られるとは限らない。実際のユーザーの立場を考慮した合理的な結論が最適解となる。国際調和とは、そうした合理的最適解を理解し、NIHSJ法に反映させることである。

《AOACとISO》

ISO法に関してはISO34/SC9、AOAC-OMAはAOAC INTERNATIONALで議論され作成されている。現在では、両者は互いにリエゾン委員を送って連携している。我が国では、AOAC International Japan SectionでAOACと情報交換すると共に、SC9国内委員会でPメンバーとしてSC9と情報交換している。厚労科研では、当初の新規作成方針から、国際状況に鑑み、ISO法の導入あるいは一部修正へ方針転換した。したがって、SC9の年会には例年、専門委員として

参加（対面あるいはリモート）し、さらに個別課題のワーキンググループに専門技術委員として参加（リモート）している。

本分担研究の大目的は、国際的参照法と調和したNIHSJ法の作成を支援することである。そのため、新規作成の試験法、あるいはISO法を一部修正した試験法の性能を、ISO法と性能比較する際の技術文書を理解し、具体的な実施計画において指導的助言をする。技術文書は妥当性確認に関する中心文書ISO 16140-part2を筆頭とするISO 16146シリーズと参照法の妥当性確認に関するISO 17468が該当する。

《具体的目標》

本分担研究の第一の目的は、ISO 16140シリーズの中のpart3 検証（ベリフィケーション）に特化して、これと調和した国内向けガイドラインを作成することである。試験法のユーザーは、初めて試験法を導入する場合は必ず検証に相当する予備試験を行っているが、その検証の方法について詳しくまとめた文書がpart3である。国内のユーザーがNIHSJ法、あるいはISO法などを初めて導入する際の検証法として、一応、part3に調和した日本版ガイドラインを作成しておくことは必要であろう、との判断で作成が検討された。そして、先行研究で原案（R4.2.25）から改訂を重ねて第5改訂版（R5.2.20）として、国際調和に耐えうる基本文書が作成された。

ところが、当初想定していた、登録検査機関や食品製造企業品質管理部署などのユーザーにとっては、敢えて厳格なガイドラインが無くとも問題ない、との意見もあった。そのため、新規ガイドラインを敢えて実施する理由について説明を求められていた。

本分担研究の第二の具体的目標は、妥当性確認関連文書に関する議論の動向調査である。SC9年次総会で総覧的に議論されるが、特に重要な妥当性確認に関しては、特化したワーキンググループWG3「妥当性

確認」で詳細に議論されているので、その内容をまとめることが必要である。

第三の目的は、長年調査し続けてきたISO 16140-2に基づくバリデーションの解説文書をまとめ、常に更新できるようにウェブ公開するためのひな型を作成することである。複雑な内容を平易に解説しながら、かつ、タイムリーに改訂内容を反映させるようにすることは極めて重要と考えるからである。

B. 研究方法

《検証ガイドラインの作成》

新規作成中の検証ガイドラインの目的や適用に関して、国内の標準法検討委員会及びバリデーション作業部会で議論を重ねた。

《妥当性確認関連文書に関する議論の動向調査》

ISO/TC34/SC9, 2023年次総会（R5.6.27-6.30）（WEB参加）、またSC9内の妥当性確認ワーキンググループ3（WG3）の専門技術委員として、WG3会議（R5.4.3-4.4、R5.11.6-11.7）（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8回）に対応し、必要に応じてコメントを発信した。審査内容は多岐にわたるので、都度、SC9国内委員に配信して意見を集約するようにした。

妥当性確認に関しては、SC9及びSC9/WG3で議論されてきた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。

《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》

先行研究の集大成としてまとめた解説文書を基に、本年度実施されたISO 16140-2の改訂の議論を反映させ、改訂版（R6.4.18）としてまとめた。

C. 研究結果

（1）検証ガイドライン

第5改訂版から出発して、改訂を重ね、第10改訂版(R6.3.3)としてまとめた(添付資料1)。この版は、最終の標準法検討委員会での議論を反映させた内容になっているが、改めて、次年度の委員会で完成版としての承認を受ける予定である。(ISO 版權保護のため、現時点では公開しない。)

(2) 妥当性確認関連文書に関する議論の動向

①「確定試験」における偽陽性や偽陰性の表記について

定性試験において、参照法と代替法の比較だけでなく、さらに確定試験が課されている。その場合の結果が例えば、参照法陽性、代替法陽性、確定試験陰性の場合、「代替法の偽陽性による陽性一致」というような複雑な表現をする。この表現をめぐって多くの議論が交わされたが、漸く、決着した。その結果は、添付書類2に反映させた。

②LOD-RLOD 算出プログラムの改訂

<https://standards.iso.org/iso/16140/> から >4>ed-1>en>PODLOD と順次進んで到達するサイトで確認できる。菌濃度対 MPN の関係から LOD₅₀ を求める解析プログラムは <https://standards.iso.org/iso/7218/> のサイトで“MPN calculation Excel program”を選択してダウンロードできる

③大きな検体の扱い

検体の大きさは従来 25 g であったが、定性試験において、それより大きい検体、例えば 100 g、200 g、375 g などを直接試験することが必要になってきた。環境試料では多くの場合、大検体を扱う。また国や地域によって大検体での試験が要請されている場合がある。そして、大検体中の微生物の性質は小検体中の場合とは異なるようだ、との指摘がある。そこで、検体の大きさの違いによる影響をバリデーシヨンの項目にも加えるようになった。

④WG3「バリデーシヨン」と WG2「統計学」との連携強化

バリデーシヨンにおける判定基準では統計学的評価が重要である。しかし、WG3は

従来は WG2 の提言を一方的に受け入れてきた。しかし、バリデーシヨンにおける具体的実施条件と統計学的判定条件は互いに密接に関連している。そこで、文書作成の早い段階から意見交換することが重要と考えられ、WG2/WG3 サブワーキンググループができた。

④ISO 17468 における国際コラボの必要性
バリデーシヨンの最終段階は研究室間共同試験(Interlaboratory study; ILS)(AOACではコラボスタディ Collaborative study)である。参照法のバリデーシヨンの場合は、これに参加する試験室が2か国以上でなければならぬ、となった。我が国にとっては煩雑さが増すので反対意見を述べたが通らなかった。国際的な参照法であるから2か国以上でバリデーシヨンするのが当然という意見が大勢であった。危険を伴う検体の場合は、実施者の責任で、輸送中の安全確保を十分考慮しなければならない。

⑤ISO-16140-2 改訂に向けた議論

2024.6の改訂に向けた修正の議論が多く行われた。例えば、定性法における評価法、ILSにおけるRLOD解析法、相対真度解析における計算と解釈など。また、新たに「商業的無菌試験：滅菌または超高温の乳製品および植物ベースの液体製品の妥当性確認のための技術プロトコル」が附録Iとして加わった。

⑥ISO 16140-8: ウイルスや寄生虫、ISO 16140-9: バクテリアトキシン文書の作成

文書の内容は具体的な試験法ではなくて、あくまでも「バリデーシヨン」の条件。したがって、例えば、「コラボスタディでは試験室の数が5」と規定して細菌の場合より少ない(ISO 16140-8)。一方、具体的な試験法に関しては、例えば「Hepatitis E Virus (WG31)」、「Qualitative determination of staphylococcal (WG30)」、「Detection of Clostridium botulinum toxins (WG26)」で議論されている。

(3) 「ISO 16140-2 に基づく食品微生物試

「検査バリデーションの手引き」のまとめ

添付資料 2 としてまとめた。(ISO 著作権保護のため、現時点では公開しない。)

D 健康危害情報

該当なし。

E. 研究発表

- 1) 学会発表 合計 1 件
 1. 松岡英明：国際規格に基づく微生物試験法バリフィケーションの技術的課題と適用事例. AOAC International Japan Section 25th Meeting, 2023.7.14, Tokyo.参加者 95 名 (オンライン 15 名を含む)

F. 添付資料

- 1) 検証ガイドライン
- 2) 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

F. 知的所有権の取得状況

該当なし。