

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2～4年度 分担研究総合報告書

食品微生物試験法の国際調和のための研究
分担課題 妥当性確認及び国際動向調査に関する研究

| | | |
|-------|--------|---------------------|
| 研究分担者 | 五十君 静信 | （東京農業大学応用生物科学部・教授） |
| 研究分担者 | 松岡 英明 | （東京農工大学・名誉教授） |
| 研究協力者 | 森 曜子 | （一般社団法人 AOAC 日本・理事） |
| 研究協力者 | 檜木 真吾 | （東京農業大学応用生物科学部・研究員） |

研究要旨

本研究班では、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創出することを目的としている。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。国内の微生物規格基準はこれまで独自に試験法を策定し公定法としてきたため、食品衛生管理の国際整合性が重要となっている。微生物試験法の国際調和は急務の課題といえる。

分担研究課題は、食品微生物の試験法に関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検討を行うことである。

食品衛生のリスクマネジメントにおける微生物試験法の国際整合性の重要性から、R3 年度および R4 年度は、新型コロナウイルスの影響のため web 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）総会に参加し、ISO/TC34/SC9 の動向に関する情報収集と試験法の検討を行った。ISO/TC34/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、検証すべき項目の集約につとめた。現在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。3 年間を通じ 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、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。検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な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。特に食品の微生物試験関連用語については、日本語訳が混乱している状況にあり、R2 年度、R3 年度に用語の整理と検討委員会への提案を行った。R4 年度は、標準化された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。

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取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とした。加えて、研究班で策定する試験法の妥当性確認方法のサポートを行うことを目的とした。

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た。主要病原微生物試験法については一定の成果を発信してきたが、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、これらを英文化し、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。上述委員会での検討対象としては、現在まで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、試験法、Technical Specification (TS)、あるいはガイドラインとしての整備を見据え、NIHSJ 標準法の検討手順の見直しを行った。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、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。

特に食品の微生物試験法関連の用語については、日本語表記が統一されていないこともあり、検討委員会としては用語の日本語表記の整理を行う必要があり、R2-R3 年度にその検討結果を検討委員会に報告した。

国内における妥当性確認の手法の方向性を検討した。R4 年度は、引き続き 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、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。検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な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は国際標準化機構 (International Organization for Standardization: ISO) 法と

されている。ISO で食品微生物試験法を担当するサブコミティは TC34/SC9 であることから、このサブコミティに発言権を有する 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。R3-R4 年度には ISO/TC34/SC9 総会が、新型コロナウイルスの影響で web 開催となり、研究班からは、五十君、松岡、岡田の 3 名と ISO/TC34/SC9 国内委員会事務局から 2 名が参加した。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。

一方、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参加者から、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 から公開されており、こちらについて、その内容の精査を引き続き行った。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検討し、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整理、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、バリデーション作業部会を組織して行った。作業部会は、朝倉宏 (研究代表者)、五十君静信 (分担研究者)、松岡英明 (分担研究者)、岡田由美子 (標準試験法検討委員会事務局、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) のメンバーで組織した。

作業部会では、試験法関連の「日本語」用語の統一が早急に必要であるという結論に達し、試験法関連の用語集作成を行い、以前整理した用語集から、最新の情報を参考に再整理しなおし R2 年度と R3 年度に標準試験法検討委員会へ用語の整理に関する提案を行った。

引き続き AOAC International と ISO のガイドならびに ISO/TC34/SC9 のガイドラインとの整合性を考慮して、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。一方、検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な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た。

検査室で新たなる試験法を導入する場合に必要な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た。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。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。

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 について精査を行った。

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アドバイスを行った。研究班外の団体から提案された現在検討中のウェルシュ菌の標準試験法作成について、データ出しに協力すると共に評価方法について支援を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

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 (International Organization for Standardization; 国際標準化機構) の示す試験法であり、その他の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。R3-4 年は、各年度 6 月に web で開催された ISO/TC34/SC9 の総会に参加し、P メンバー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 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。現在、ISO には 200 を超える TC が存在するが、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。

2002 年から TC34/SC9 に係る「国内審議団体」として、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。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。

R3-4 年度の総会は、6 月に web 方式で開催され、前半の 1 日間は CEN/TC275/WG6 の総会、後半の 4 日間には ISO/TC34/SC9 の総会が行われた。各年度の総会への参加国は、各年度約 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。TC34/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。例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、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

現在、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、2003 年に公開されてから改定されていなかった。一方、米国の AOAC International は、ISO 16140 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くれる。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 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。ISO 16140 シリーズとして細分化されている。

国際的なスタンダードとしての微生物試験法

のバリデーションに関しては、現在 ISO/TC34/SC9 で、ガイドライン ISO 16140 シリーズの改訂は順調に進んでいる。これまで代替法のバリデーションガイドとして広く用いられてきた ISO 16140:2003 は、単一の文書であったが、今回の改訂版ではパート1からパート6と、6つの文書に分けて検討が進められている。2016年に、パート1と2が公開された。パート1は、試験法のバリデーションに用いられる用語や定義に関する文書となっている。パート2は、代替法（独自法）のバリデーションに関する一般原則及び技術的プロトコールとなっている。そこで、作業部会では用語の和訳について、ISO 16140-1に加えて、TS Z 0032 : 2012 (ISO/IEC Guide 99:2007 (VIM3)) 国際計量計測用語 - 基本及び一般概念並びに関連用語、JIS Z 8101-1 : 2015 (ISO 3534-1 : 2006) 統計-用語及び記号-第1部 : 一般統計用語及び確率で用いられる用語、JIS Z 8101-2 : 2015 (ISO 3534-2 : 2006) 統計-用語及び記号-第2部 : 統計の応用、JIS Z 8402-1 : 1999 (ISO 5725-1 : 1994) 測定方法及び測定結果の正確さ（真度及び精度） - 第1部 : 一般的な原理及び定義、JIS Q 0035 : 2008 (ISO Guide 35 : 2006) 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則、JIS K 0211 : 2005 分析化学用語（基礎部門）、CAC/GL72 : 2009 分析用語に関するガイドライン（厚生労働省 2012）などの文書を参考として、森曜子委員が中心となって日本語の用語集案の作成を進めた。以前の案を最新の情報をもとに再整理し作業部会で検討後、R3年度に検討委員会へ提案した。

AOAC International と ISO のガイドならびに ISO/TC34/SC9 のガイドラインとの整合性を考慮し、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。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作成手順の一部修正を行った。一方、検査室で新たな試験法を導入する場合に必要な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た。

R3-4年度には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。

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一般生菌数や衛生指標菌のレベルの確認となるため、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、その考え方の要点については、論文としてまとめた。また、これに該当する試験法リストを更新し、NIHSJ法のホームページに公開した。

③ ウェルシュ菌試験法策定支援

ウェルシュ菌定性試験法は、NPO 法人食の安全を確保するための微生物検査協議会が中心となって、東京都健康安全研究センターと顕微鏡院が協力し作業部会をつくり標準試験法策定を進めてきた。試験法策定にあたっては、バリデーション作業部会が協力し、検討を進めてきた。ISO法では単独の定性試験法がないため、定量法で用いている培地等を参考にし、どのように標準試験法を作成するかについて助言を行った。ステージ3の試験法案は、最終試験法(ST4)として確定させた。

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、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

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に代替法のバリデーション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 で進められており、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、以前

の度用語集案の作成を行って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、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た。

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、松岡先生を中心に整備を進めている(分担研究所参照)。残る4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る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。

引き続き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。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、ISO 17468(標準化された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)の考え方にほぼ一致していたことから、一部の表現等の修正を行い、更新する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に必要なベリフィケーションについては、ISO/TC34/SC9との整合性を持たせるため整理を開始した。こちらは将来的に文書としてまとめる必要があると思われる。

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整理については、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、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た。

③ウェルシュ菌試験法策定支援

ウェルシュ菌定性試験法のバリデーションについては、当該試験法の検討グループと連携をとりながら試験法の最終版に進めることができた。

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、多くの情報を得ることができた。バリデーションガイドライン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る。公定法に相当する標準試験法の規格であるISO 17468を基にNIHDJ法の策定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. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 五十君静信：HACCPなどの食品の工程管理における微生物検査の考え方。クリーンテクノロジー2020年8月号。2020
- 2) 五十君静信：人の健康障害に係わる微生物の疫学並びにその制御に関する研究。日本食品微生物学雑誌。38巻53-66。2021
- 3) 五十君静信：妥当性確認された微生物試験法の重要性とHACCP制度化後の微生物検査の考え方。FFIジャーナル。227巻4-9。2022
- 4) 五十君静信：HACCP制度化における微生物の自主検査の考え方～妥当性確認された簡便・迅速な代替法の選択と活用～。食品衛生研究72巻6号：7-13。2022
- 5) 五十君静信：HACCPの検証における微生物検査法の選択と活用。月刊フードケミカル12:32-36。2022

2. 学会発表

- 1) 五十君静信：HACCP制度化後の食品衛生管理における公的検査と自主検査。日本機能水学会第19回学術大会。2021.10.31.
- 2) 五十君静信：ウェルシュ菌による食中毒とその制御法。日本防菌防黴学会第49回年次大会。2022.9.26
- 3) 五十君静信：HACCP制度化後の食品衛生管理における公的検査と自主検査。日本食品工学会。2022.10.31
- 4) 五十君静信：HACCPなど工程管理の検証に用いる微生物検査の活用～HACCPの制度化に対応した微生物試験法の選択～。全国食肉衛生検査所協議会。

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし