

## 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ために、ISO法などの国際標準法（参照法）を基に一連の国内標準法、すなわちNIHSJ法を作成してきた。作成に際して、国際標準法を改変した場合は、新規に作成した試験法は国際標準法と同等の性能を示すこと（妥当性確認；バリデーション）を実施しなければならない。国際標準法をそのまま導入する場合はその必要はない。作成された試験法はNIHSJ法として次のウェブサイトに掲載されている。

<https://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/protocol.html>

また、試験室が特定のNIHSJ法を初めて利用する場合は、その試験法が、その試験室で実施できることを検証（ベリフィケーション）しなければならない。妥当性確認及び検証の方法は、各々、ISO 16140-2、ISO 16140-3に記載されているが、内容が複雑で、また随時、修正や改訂が行われている。先行研究では、妥当性確認ガイドラインの作成作業と並行して、ISOの年次総会に出席し、ISO法作成・改訂の議論に直接参加しながら、ISOの動向を反映したガイドライン暫定版を完成させた。

2020年度から始まった本研究の目的を図1に示す。先行研究にも増して密度の高い国際動向調査によって、我が国で作成する試験法

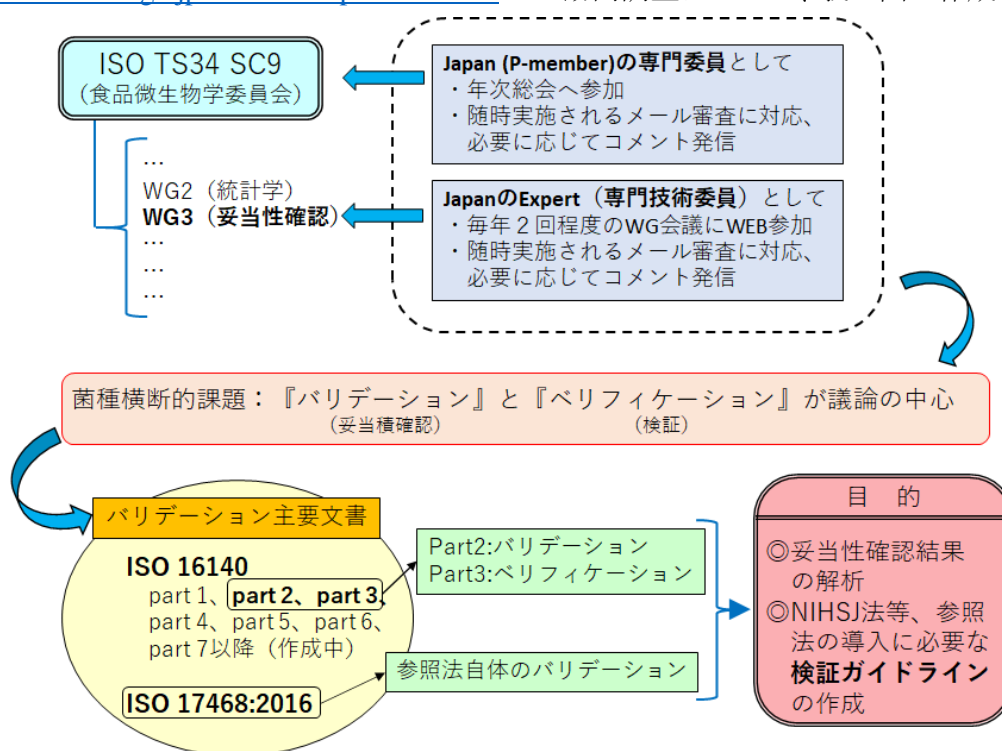


図1. 微生物試験法の妥当性評価に関する研究

や文書をリアルタイムで国際調和させることが目的である。文書作成では、様々の微生物の試験法を横断的に扱う妥当性確認と検証が中心である。特に検証のガイドラインを新たに作成することが第一の目的であるが、検証の前提となる妥当性確認の理解が必須であるため、既に完成させていたガイドライン暫定版を基に「利用の手引き」の作成も併行して行うこととした。一方、新しいNIHSJ法の作成に際しては、その過程で妥当性確認が必要になる。その計画、及び結果の解析においては専門的見地からの助言、支援が必須となる。それを実施することも重要な目的であった。

## B. 研究方法

### (1) 国際動向調査

ISO TC34/SC9のPメンバーとなっている日本の専門員として、年次総会へ毎年出席した(第39回2020.6.3-6.5, 第40回2021.6.8-6.11, 第41回2022.6.14-6.17, いずれもウェブ会議)。また、SC9内の妥当性確認ワーキンググループ(WG3)に専門技術委員として参加した(第25回2020.10.15-10.16, 第26回2021.4.27-4.29, 第27回2022.1.18-1.20, 第28回2022.12.6-12.7, いずれもウェブ会議)。さらに、SC9あるいはSC9/WG3から随時発せられるメール審査(Ballot)に対応し、必要に応じて国内のSC9委員会に諮りつつ、コメントを発信した。

こうした会議への参加を通じて知り合った他国の専門技術委員や、ISO 16140-2の引用文献の著者(例えばJ. AOAC Int., 92, 1763-1772(2009)の著者のC. Wilrich)とのメールでの情報交換も行った。

### (2) 国内での議論

妥当性確認、及び検証に関して得た国際動向に関してまとめた情報や、ガイドライン関連

資料を作成し、食品微生物試験法検討委員会およびバリデーション部会(いずれもウェブ会議)で議論した。妥当性確認に関しては、先行研究で十分議論を重ねて「妥当性確認ガイドライン暫定版」が作成されていたが、内容が複雑で難解な個所が多かったので、補足説明や注記を挿入することによって、利用の手引きとなるような表現にした。一方、検証ガイドラインの作成に関しては、バリデーション作業部会会員の守山隆敏氏によるISO 16140-3の概要紹介に始まり、守山氏と松岡による邦訳を経て、国内委員会等での議論に基づき改訂を重ねた。

## C. 研究結果

### (1) 国際動向調査結果

ISO TC34/SC9の年次総会には米国の専門員が常に10名近く出席していた。彼らの中の数名は米国に本部を置く食品分析科学の国際機関であるAOAC Internationalの会員でもあり、AOACと協調した意見も述べた。一方、欧州標準化委員会(the European Committee for Standardization; CEN) EC)にも食品微生物に関する技術委員会(Technical Committee 463; TC463)があり、その委員が出席していた。すなわち、TC34/SC9での議論は欧米全体の食品微生物試験に関する動向を反映していると考えてよい。

我が国は1998年AOAC Internationalの日本支部(Japan Section)をアジアで初めて設立した。

<https://aoacijs.org/aoac-international-japan-section/>

また、2016年ISO TC34/SC9の幹事国(Pメンバー)になった。さらに、第38回年次総会(2019.7.9-12、ミラノ)以後、TC34/SC9/WG3にも専門技術委員として議論に参加するようになった。WG3への参加によって、情報の

精度が格段に上がった。年次総会は網羅的な報告が主であったが、WG3では“何故？”に関する議論も十分行われた。早口での議論についていくことはなかなか厄介であるが、会議直後に結論集（Resolutions）が配信されるので、遅ればせながら何とか理解することができた。

妥当性確認のISO 16140-2: 2016は、出版後、多くの修正や改訂のための議論が行われてきた。我が国でガイドライン作成を進めていた際にしばしばその内容の変化に戸惑っていた。しかし、2020年以降は、WG3を通しての緊密な情報交換によって、理解が深まった。

ISOでは当然ではあるが、各国の事情（特定の食品産業分野の事情など）に関わる問題が率直に提案され議論されていた。参加国は各々、自国の利益のために、科学的、合理的な議論によって他国の理解を得ようと努力しているように見えた。また、新しい課題に対するアドホックWGも複数新設され、そのための専門技術委員が自薦、他薦で決められ、直ちに委員会の日程調整がなされた。もし我が国にとって重要な案件があれば、同様に、直ちにアドホックWGの新設を提案し、コンビナーとなって会議を主導していくことができることが実感された。

## （2）妥当性確認と検証に関する国際動向のトピック

ISO 16140-2、ISO 16147-3、ISO17468などの改訂の議論の中で、注目すべき事項を例示し、その理由や背景についての調査結果を示す。

### ①妥当性確認における確認試験の導入

参照法と代替法の比較試験の結果が一致しなかった場合、以前は直ちに不合格と判断されていた。しかし、定性試験法ではできるだけ検出能の高い方が高性能と考えるべきである。したがって、代替法が陽性結果、参照法

が陰性結果の場合は、直ちに代替法を不合格とするのではなく、むしろ代替法の方が高性能であると判断すべきではないか、という見解である。それが発端となって、参照法と代替法の比較試験結果によらず、第3の試験法で確認試験をやるように改訂された。ところが、この第3の試験法が具体的に決められてはいない。これではISO 16140-2による妥当性確認が完結しない。第3の試験法は菌種の確認試験なので、それ自体が十分信頼性の高い試験法でなければならない。そこで、菌種確認のための試験法のために新たにISO 16140-6 が作成された。これによって新開発された代替法が高性能であれば合格となる道が開かれた。ただ、今日まで、この方法で合格となった代替法の例はないという。必ずしも実際のニーズは無くても、想定される課題が提起されれば、それに対する妥当な対処法を明文化しておく、ということがISOの大原則の一つであると言える。

### ②検体の単位量と統計学に関する議論

かつて、一検体の量は25gと決まっていたかと思っていたが、他の重量、例えば200g、375gでも良いとされるようになった（2021.3.26発の文書：3rd Draft CD Amd 1 for ISO 16140-2: 2016）。ある国の規格では、例えば375gが一検体量となっているので、それと合わせたいという意見があったことが理由の一つである、と聞いている。これに伴って、検体量が異なる条件で行った妥当性確認の扱いについて議論された。その結果、例えば375gで妥当性確認をした場合、それ以下の重量で改めて妥当性確認する必要はないが、逆に25gで実施した場合、その試験法をそれより大きい検体に適用するためには、改めて、その重量の検体で妥当性確認しなおすこと、となっている。

しかし、何故、検体量が大きい場合はやり

直さなければならず、小さい場合はその必要はない、というのか、統計学上の理由らしいが、どのようなバラツキの評価理論に基づいているのかは不明である。WG3内の議論で、不明な点は半分無くなってきたが、統計学上の問題に関しては例外である。基本的に、他のWGは、統計学WG2の提言に全て従うことになっているという。妥当性確認や検証で合否判定の基準値はWG2の提言に基づいている場合が多いにもかかわらず、その科学的合理性には疑問を感じる場合が多い。その疑問を我が国から発する際には、我が国の統計学専門家が、WG2の専門技術委員として参加し、WG2内で直接議論に加わることが、どうしても必要であろう。

### ③ISO 17468における2か国以上でのラボスタディ

妥当性確認では複数の試験室で同じ試料を用いて同時に試験をするラボスタディ（ISOではInterlaboratory study; ILSという）が必要とされる。しかし、参照法の妥当性確認を規定しているISO 17468では、ラボスタディに参加する試験室は2か国以上であることが「望ましい」、となっていた。それが昨年度より「ねばならない」に変えようとの議論がなされている。国際的な標準法にするためには2か国以上の試験室が参加する国際的ラボスタディでなければならない、という理由である。しかし、国の違いが具体的にどのような点の違いを指しているのかは何も規定が無い。これでは選択した国がラボスタディに適正かどうかの判断ができない。また、欧州のように陸続きで近距離に他国がある場合は、試験材料を他国に輸送することはそれほど困難ではないと考えられているようだ。しかし、我が国のように、遠方に空輸しなければならない場合は技術的な問題が大きい。また毒性物質を含む場合は安全にか

かわる法的規制もある。

むしろ、試験実施者を海外から招請し、国際的ラボスタディ実施チームを結成し、一か国内で実施する方がはるかに合理的で安全だと思われる。

以上のような意見を2023.3.5のメール審査（Ballot;投票）で発信した。今後の議論を注視したい。

### ④検証ガイドラインの評価基準値

試験室がNIHSJ法を初めて利用する場合は、その試験法を確実に実施できることを示さなければならない。そのためのガイドラインの作成が必要であった。その基になったのがISO 16140-3であった。この規格の中では、例えば定性法に対しては、妥当性確認で得られたLOD<sub>50</sub>の値を合否判定基準としている。ところが、LOD<sub>50</sub>が得られている試験法は少ない。そこでISOでは、暫定基準値としてLOD<sub>50</sub> = 1.0 cfu/検体を採用するようにしている。

このような状況であるから、小規模のラボスタディ、あるいは単一試験室での試験によって、自ら求めたLOD<sub>50</sub>を基準とする方が合理的と考えられる。そして、その合理性を主張するためには、LOD<sub>50</sub>の求め方をよく理解していることが前提になる。ISOにはLOD<sub>50</sub>を自動的に算出するウェブサイトが公開されているが、それに頼っているだけでは、試験条件を柔軟に設計して求めたLOD<sub>50</sub>の妥当性を説明することが難しい。そこで、自ら解析して求める方法を詳しく解説した文書を作成し、公開した。

<https://web.tuat.ac.jp/~msaito/2022.4.12PODLOD.pdf>

### E. 健康危険情報

該当なし。

## F. 研究発表

### (1) 学会発表 1件

1. 松岡英明：微生物試験における迅速簡便法の課題と展望—迅速・簡便・高精度・高信頼性を目指す技術開発動向。日本防菌防黴学会、2022.9.27、東京

### (2) 解説・総説等 合計2件

1. 齊藤美佳子、松岡英明：損傷菌の標準化。日本防菌防黴学会誌、48(10) 535-540 (2020).
2. 松岡英明、齊藤美佳子：微生物試験法バリデーションの国際動向と今後の展望。日本防菌防黴学会誌、51(2), 87-94 (2023).

