

トのマイクロ流路を介して、各層ごとに独立してメンブレンフィルター側に移送できることを確認し、フロー制御のためのバルブおよびアクチュエータの設計条件が明らかになった。

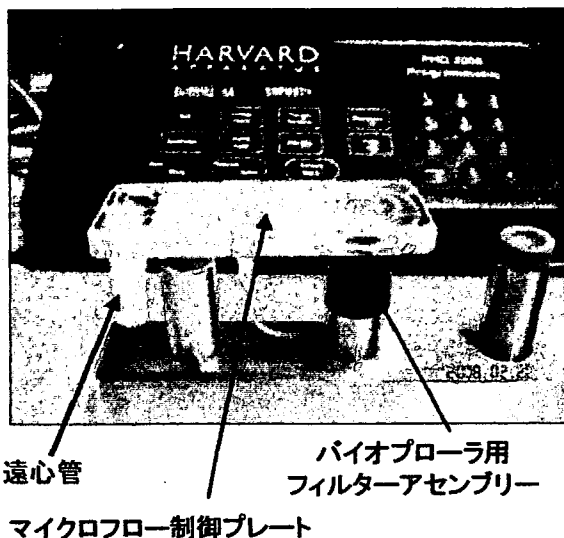


図6. マイクロフロー制御プレートの機能試験

CFDA を用いた非培養生菌計数の結果

新規製作した装置により、Percoll 密度勾配遠心分離法で分画したのち、培養法(x)とCFDA 染色法(y)の生菌計数結果を比較した。その結果、図7に示すような相関が得られた。

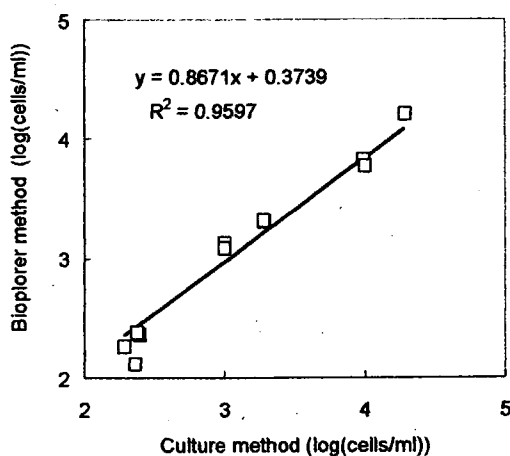


図7. バイオフィローラ法と培養法の相関

D. 結論

超音波分離法については、添加微生物(大

腸菌)と脂肪粒(カゼインを含む)効果的に分離できることが示された。流路の改良によって、さらに高効率の分離が可能と考察された。そこで、スウェーデン側では流路デバイスの新設計を目指し、また日本側では、超音波分離のための前処理技術の開発を進め、将来、再度、共同研究を行うこととした。それが、まさに現在進行中(2007年7月より)である。

一方、Percoll 密度勾配遠心分離法に関しては、その高い汎用性が期待され、実用システム構築を目指し、遠心分離後の各画分を、簡便迅速かつ高精度に採取する装置の基本設計を進め、有用なデータを得た。即ち、最も基本となる、複数本の微細採取管アセンブリ、マイクロフロー制御プレートの仕様を決定した。これによって、次の装置設計段階に進めことができるようになった。

E. 研究発表

○学会発表

- ・松岡英明, “微生物試験における精度目標”, AOAC インターナショナル総会・シンポジウム『食品分析討論会 2007~ゴールはどこに?~』東京, 2007.6.9
- ・松岡英明, “食品微生物試験の標準化の動向について”, AOACI 日本セクション・食品分析研究会 合同シンポジウム in 信州, 長野県上伊那郡, 2007.11.2
- ・松岡英明, “微生物検査法における生菌分離技術の開発”, 日本防菌防黴学会 第35回通常総会付設講演会, 大阪, 2007.5.24
- ・松岡英明, 高山幸大, 小泉貴寛, 荒木恵美子, 斉藤美佳子, “食品中の生菌の迅速分画計数システムの開発”, 日本化学会第87春季年会, 大阪, 2007.3.28
- ・瀬口裕介, 小泉貴寛, 斉藤美佳子, 松岡英明, “密度勾配遠心分離後の生菌画分回収システムの開発”, 日本防菌防黴学会第34回年次大会, 大阪, 2007.8.31

資 料

「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」

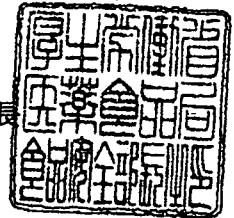
(食発第1115001号，平成19年11月15日)



食安発第1115001号
平成19年11月15日

各
都道府県知事
保健所設置市長
特別区長
殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長



食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて

食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（以下「農薬等」という。）に関する試験法については、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）及び「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成17年1月24日付け食安発第0124001号。以下「通知」という。）により定めているところである。

このうち、通知で試験法を定めている農薬等について、通知で定める試験法（以下「通知試験法」という。）以外の方法によって試験を実施しようとする場合には、通知試験法と比較して真度、精度及び定量限界において、同等又はそれ以上の性能を有するとともに、特異性を有すると認められる方法（以下「同等な試験法」という。）によって実施するものとしている（通知の別添の第1章の5.の（1））ところであるが、今般、通知試験法以外の方法によって試験をする場合に、その試験法の妥当性を各試験機関が評価するためのガイドラインを別添のとおり策定した。

については、今後、各試験機関において、通知試験法以外の試験法で試験を実施しようとする場合に、その試験法について、本ガイドラインのそれぞれの基準に適應していることが確認されれば、通知で定める同等な試験法とみなすこととするのでご了承ください。

また、本ガイドラインの内容につき、関係者への周知方よろしく願います。

食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン

1 趣旨

本ガイドラインは、食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（以下「農薬等」という。）に関する試験法について、「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成17年1月24日付け食安発第0124001号。以下「通知」という。）において定める試験法以外の方法によって試験を実施する場合に、各試験機関がその試験法の妥当性を評価するための手順を示すものである。

なお、本ガイドラインは、機器分析法を対象とする。

注：ここに示す手順は、試験法の妥当性を評価する標準的方法の一例であり、国際的に認められた他の手順を使用することもできる。

2 本ガイドラインの対象

通知で示している試験方法以外の方法によって試験を実施するために、通知の別添の第1章の5. の（1）に基づき、各試験機関において開発した試験法とする。

ただし、抗生物質又は化学合成品（化学的手段により元素又は化合物に分解反応以外の化学的応答を起こさせて得られた物質をいう。）たる抗菌性物質に関する試験法については、個別に残留基準値を設定している食品に関するものに限る。

3 用語の定義

本ガイドラインにおいて、用語の定義は次のとおりとする。

- (1) 「選択性」とは、試料中に存在すると考えられる物質の存在下で、分析対象物を正確に測定する能力をいう。
- (2) 「真度(回収率)」とは、十分多数の試験結果から得た平均値と承認された標準値(添加濃度)との一致の程度をいう。
- (3) 「精度」とは、指定された条件下で繰り返された独立した試験結果間の一致の程度をいう。
- (4) 「併行精度」とは、同一と見なされる試料の測定において、同一の方法を用いて、同一の試験室で、同一の実施者が同一の装置を用いて、短時間のうちに独立した試験結果を得る条件(併行条件)による測定結果の精度をいう。
- (5) 「室内精度」とは、同一と見なされる試料の測定において、同一の方法を用い、同一の試験室で、独立した試験結果を得る条件(室内条件)による測定結

果の精度をいう。

(6)「定量限界」とは、適切な精確さをもって定量できる分析対象物の最低量又は濃度をいう。本ガイドラインでは、原則として通知に示された定量限界を用いる。

(7)「枝分かれ実験計画」とは、ある因子の全ての水準が、他の全ての因子の一つの水準だけに現れる実験の計画をいう。

4 評価の方法

食品毎に、妥当性を評価する試験法の分析対象である農薬等を添加し、測定結果から以下のパラメータを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。

(1) 選択性

分析対象である農薬等を含まない試料（ブランク試料）について操作を行い、定量を妨害するピークがないことを確認する。

妨害ピークを認める場合は、

- ① 定量限界が基準値の1/3以下の場合は、そのピークの面積（又は高さ）が、基準値に相当するピーク面積（又は高さ）の1/10未満、
- ② 定量限界が基準値の1/3を超える場合は、定量限界濃度に相当するピークの面積（又は高さ）の1/3未満であることを確認する（表1参照）。

表1 定量限界及び基準値の比と妨害ピークの許容範囲

定量限界と基準値の関係	妨害ピークの許容範囲
定量限界 ≤ 基準値の1/3	< 基準値ピークの1/10
定量限界 > 基準値の1/3	< 定量限界ピークの1/3

(2) 真度（回収率）

同一濃度の分析対象である農薬等を添加した試料（以下「添加試料」という。）5個以上を試験法に従って 定量し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比を求める^{※1)}。

真度（回収率）の目標値は表2のとおりとする。

注1) サロゲート（回収率の変動の補正を目的として、分析試料に添加する安定同位体標識標準品）を使用した場合には、サロゲートの回収率が40%以上であることを確

認する。

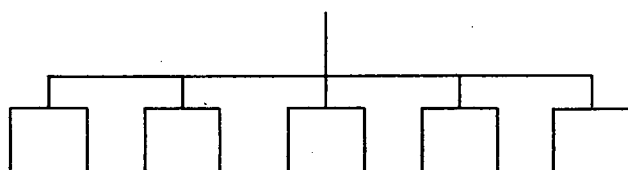
(3) 精度

添加試料の分析をくり返し、定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度及び複数の分析者又は分析日による室内精度を評価する。試行の回数は5回以上とする。この場合、室内精度評価のための枝分かれ実験^{注2)}により、併行精度と室内精度を同時に評価することが可能である。また、内部精度管理データを用いて評価することも可能である。

併行精度及び室内精度の目標値は表2のとおりとする。

注2) 室内精度評価のための枝分かれ実験の例

(例1) 分析者1名が、同一の添加試料を1日2回、5日間分析する枝分かれ実験計画



(例2) 分析者2名が、それぞれ添加試料を1日2回、3日間分析する枝分かれ実験計画

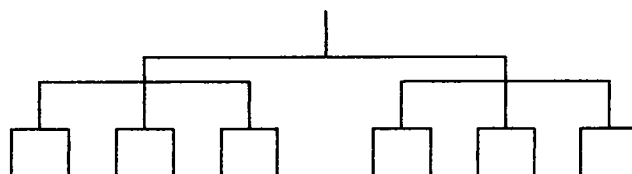


表2 各濃度毎の真度 (回収率) 及び精度の目標値

濃度 (ppm)	試行回数 (回)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	5	70 ~ 120	30 >	35 >
$0.001 < \sim \leq 0.01$	5	70 ~ 120	25 >	30 >
$0.01 < \sim \leq 0.1$	5	70 ~ 120	15 >	20 >
$0.1 <$	5	70 ~ 120	10 >	15 >

(4) 定量限界

基準値が定量限界と一致している場合には、以下の条件を満足していることを確認する。

- ① 定量限界濃度を添加したブランク試料を分析したとき、表2の真度（回収率）及び精度（併行及び室内）の目標値を満足していること。
- ② クロマトグラフィーによる分析では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピークが、 $S/N \geq 10$ であること。

5 添加を行う食品の種類及び添加濃度

(1) 添加を行う食品の種類

添加を行う食品は、原則試験法を適用しようとする食品から選択する。一律基準を考慮した場合には、全ての食品が対象となるが、全ての食品について評価するのは現実的に困難であるので、代表的な食品を選択する。具体的には、成分としての特性及び抽出法の違いを考慮して、それぞれの目的に応じて、原則として、下記に示すものを選択する。

① 農産物

- ・穀類（玄米等）
- ・豆類（大豆等）
- ・種実類
- ・野菜（ほうれんそう等の葉緑素を多く含むもの、キャベツ等のイオウ化合物を含むもの及びばれいしょ等のデンプンを多く含むもの）
- ・果実（オレンジ、りんご等）
- ・茶
- ・ホップ
- ・スパイス等

② 畜水産物

- ・牛、豚、鶏等の筋肉
- ・牛、豚、鶏等の脂肪
- ・牛、豚、鶏等の肝臓
- ・牛、豚、鶏等の腎臓
- ・鶏卵
- ・牛乳
- ・はちみつ等の養蜂製品
- ・魚介類（うなぎ等の脂肪を多く含むもの）等

(2) 添加濃度に関する留意事項（表3参照）

- ① 農薬等の添加濃度は原則として2種類の濃度とし、一方を「基準値又は基準値の1/2の濃度」とし、他方を「一律基準濃度又は定量限界濃度（又はその2倍）」とする。基準値と定量限界が等しい場合には、添加濃度は「定量限界濃度」の1種類の濃度とする。

- ② 2種類の濃度における評価が困難な場合は、「基準値又は基準値の1/2の濃度」による評価を優先して実施する。

ただし、通知の別添第2章に掲げる一斉法において、各農薬等の基準値が異なるために基準値濃度の添加が困難な場合にあつては、「各農薬等の基準値に近い一定の濃度」としてもよい。

表3 定量限界及び基準値の関係比と添加濃度

定量限界と基準値の関係	添 加 濃 度
定量限界<基準値	「基準値又は基準値の1/2の濃度」及び「定量限界濃度(又はその2倍)又は一律基準濃度」
定量限界=基準値	定量限界

(3) 添加試料の作成等に当たつての留意事項

- ① 添加試料の作成に当たつては新鮮な食品を使用し、均一化して秤量した後に農薬等を添加する。添加する農薬等の標準溶液の量はできるだけ少量にとどめ1～2mL程度とする。溶媒は試料と混合する溶媒を用いる。農薬等の添加後よく混合し、30分程度放置した後に抽出操作を行う。

ただし、飼料添加物及び動物用医薬品にあつては、特に指定のない限り、添加後直ちに抽出操作を行うこと。

- ② 枝分かれ実験等、数日間にわたり試験を行う場合にあつては、均一化した試料を冷凍保存し、凍結及び融解を繰り返すことを避け、試験を実施する日毎に添加試料を作成すること。

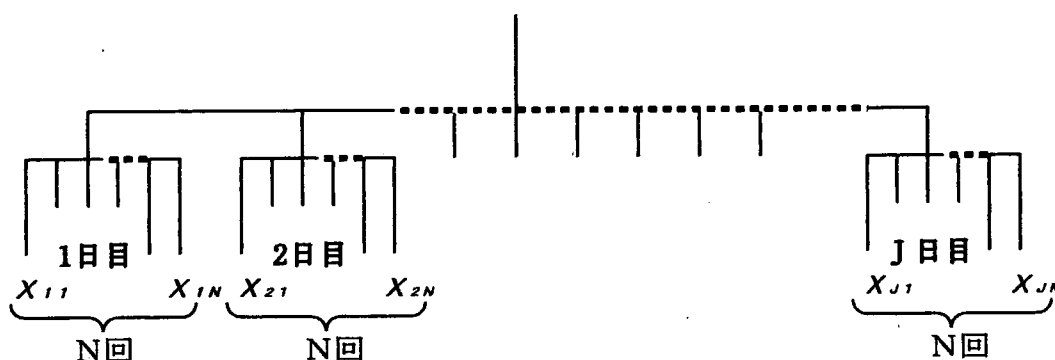
(別紙)

枝分かれ実験の解析方法 (参考)

1 一般的な解析方法の考え方

(1) 分析者1名が、同一ロットの食品から作成した添加試料を1日N回、J日間分析する実験計画の場合、枝分かれ実験計画は下記のとおりとなる。

<枝分かれ実験計画>



(2) 一日当たりの試験回数、実験計画日数及び実験計画に従って分析を行い得られた分析値を用いて、一元配置の分散分析による解析を行い、試験法の評価に必要な併行精度及び室内精度を算出する。

<各測定値>

	1日	2日	J日
1回目	X_{11}	X_{21}	X_{J1}
2回目	X_{12}	X_{22}	X_{J2}
3回目	X_{13}	X_{23}	X_{J3}
⋮	⋮	⋮		⋮
N回目	X_{1N}	X_{2N}	X_{JN}

<一元配置の分散分析表>

変動要因	平方和	自由度	分散の期待値
日間	S_{RW}	$J-1$	V_{RW}
併行	S_r	$J(N-1)$	V_r
合計	S_T	$JN-1$	

注) 一元配置の分散分析は、市販の統計ソフトや表作成ソフトのツールを用いて、容易に行える。この場合、使用するソフトによって、分散分析表の各用語がこの例示と異なる場合があるので留意すること。

(平方和→変動、日間→グループ間、併行→グループ内 等)

各日における母平均の標準偏差を σ_d 、併行標準偏差を σ_r とすると、併行精度及び室内精度は、次のとおり。

$$\begin{aligned} \text{併行精度} &: \sigma_r \quad (\text{併行標準偏差}) \\ \text{室内精度} &: \sqrt{\sigma_r^2 + \sigma_d^2} \end{aligned}$$

また、分散分析の結果から求められる分散の期待値と σ_d 及び σ_r の間には次の関係がある。

$$\begin{aligned} \bullet V_{RW} &= \sigma_r^2 + N \sigma_d^2 \\ \bullet V_r &= \sigma_r^2 \end{aligned}$$

$$\left. \begin{aligned} \sigma_d^2 &: \text{各日における母平均の分散} \\ \sigma_r^2 &: \text{併行分散} \\ N &: \text{一日当たりの試験回数} \end{aligned} \right\}$$

従って

$$\begin{aligned} \bullet \sigma_r &= \sqrt{V_r} \\ \bullet \sigma_d &= \sqrt{(V_{RW} - \sigma_r^2) / N} \end{aligned}$$

これらから、併行精度及び室内精度が求められる。

さらに、データの総平均を求め、それぞれの精度のRSD%を算出する。

$$\text{併行又は室内精度 (RSD\%)} = \text{併行又は室内精度} / \text{データの総平均} \times 100$$

(3) 判定

上記により求められた併行精度、室内精度のRSD%及び分析値をガイドラインの「表2 各濃度毎の真度(回収率)及び精度の目標値」に照らし、それぞれが目標値に適合しているか否かを確認する。

(4) その他

- ① 内部精度管理で2回分析を行ったデータも同様に計算することが可能である。
- ② 分析者2名が、それぞれ添加試料を1日2回、3日間分析する枝分かれ実験計画(3(3)注2)の例2)において、試験者と試験日の効果をそれぞれについて判定する必要がない場合には、上記と同様に一元配置の分散分析により解析することが可能である。

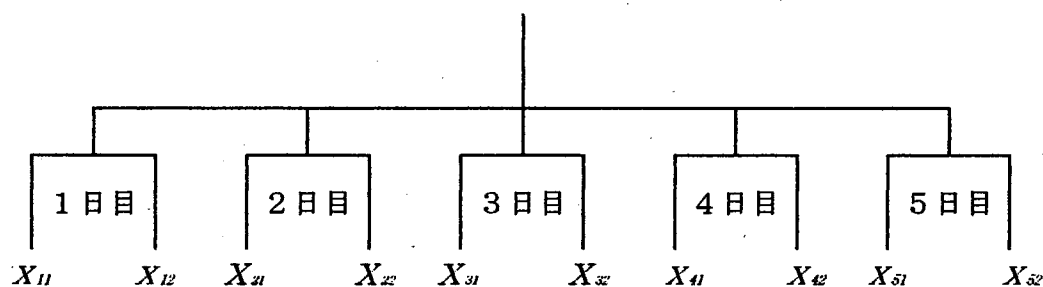
この場合、上記参考例のJは測定者数(2名)と日間(3日間)の組合せの数($2 \times 3 = 6$)、Nは1日当たりの試験回数(2)となる。

2 具体的な解析事例

(例題)

分析者1名が、同一ロットの食品から作成した添加試料を1日2回、5日間分析する枝分かれ実験計画を実施した場合

<枝分かれ実験計画>



<各測定値>

	1日	2日	3日	4日	5日
1回目	0.0485	0.0512	0.0559	0.0391	0.0468
2回目	0.0436	0.0564	0.0587	0.0385	0.0446

(解析)

- (1) 一元配置の分散分析を実施し、評価に必要なパラメータ(日間標準偏差及び併行標準偏差)を算出する。

<分散分析表>

変動要因	平方和	自由度	分散の期待値
日 間	0.000426636	4	0.000106659
併 行	0.000032045	5	0.000006409
合 計	0.000458681	9	

各日における母平均の標準偏差を σ_d 、併行標準偏差を σ_r とすると、

$$\begin{aligned} \cdot \sigma_r^2 &= V_r = 0.000006409 & \therefore \sigma_r &= 0.00253 \\ \cdot \sigma_d^2 &= (V_{RW} - \sigma_r^2) / N = (0.000106659 - 0.000006409) / 2 \\ &= 0.000050125 \\ &\therefore \sigma_d &= 0.00708 \end{aligned}$$

従って

$$\begin{aligned} \cdot \text{併行精度} &: \sigma_r = 0.00253 \\ \cdot \text{室内精度} &: \sqrt{\sigma_r^2 + \sigma_d^2} = \sqrt{0.00253^2 + 0.00708^2} = 0.00752 \end{aligned}$$

データの総平均は 0.0483 なので、それぞれの精度のRSD%は、

$$\begin{aligned} \cdot \text{併行精度 (RSD\%)} &= 0.00253 / 0.0483 \times 100 = 5.2 \% \\ \cdot \text{室内精度 (RSD\%)} &= 0.00752 / 0.0483 \times 100 = 15.6 \% \end{aligned}$$

(2) 判定

各分析値は、 $0.01 < \sim \leq 0.1$ の範囲にあるので、併行精度(RSD%)は $15 >$ 、室内精度(RSD%)は $20 >$ の範囲になければならない。

上記の結果から、併行精度、室内精度ともにこの目標値に適合しているので、今回、導入しようとする試験法は妥当なものと評価される。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松岡英明	微生物の迅速検出と自動化	山根誠久、仲西寿男	食中毒と食品微生物—食生活の安全性と衛生管理—	臨床病理刊行会	東京	2006	92-99
松岡英明	微生物検査法のバリデーションの概略	永田忠博、後藤哲久、丹野憲二、安井明美、湯川剛一郎	食品分析法の妥当性確認ハンドブック	サイエンスフォーラム	東京	2007	189-198

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
松岡英明	技能試験の必要性と標準化の動向	NISSUI TECHNOMEDIA	7	2-7	2007

III. 研究成果の刊行物・別刷

1. 松岡英明：微生物の迅速検出と自動化 “食中毒と食品微生物—食生活の安全性と衛生管理—”（山根誠久、仲西寿男、編）第2章7節、臨床病理レビュー特集第136号、臨床病理刊行会、(2006) pp92-99.
2. 松岡英明：微生物検査法のバリデーションの概略 “食品分析法の妥当性確認ハンドブック”（永田忠博、後藤哲久、丹野憲二、安井明美、湯川剛一郎、編）第4章1節、サイエンスフォーラム (2007) pp189-198.
3. 松岡英明：技能試験の必要性和標準化の動向. *NISSUI TECHNOMEDIA* 7, 2-7 (2007).

食中毒と食品微生物
— 食生活の安全性と衛生管理 —

第2章 食品衛生

7. 微生物の迅速検出と自動化

松岡英明

7. 微生物の迅速検出と自動化

松岡 英明*

要 旨

微生物検出法は培養法を基礎としているが、培養時間が長く、その時間の調整も難しいため、迅速法として種々の非培養法が開発されてきた。しかし、何れも公定法あるいは公認法として採用されるには至っていない。非培養法の信頼性を高めるためには、前処理としての生菌分離技術が鍵になるであろう。一方、培養以外の作業を簡便化することによっても、全体の作業時間を短縮することは可能である。この観点から、既に多くのキット類が開発されてきた。迅速法、簡便法、自動システムの開発に際しては、そのコストと、それらを使用することによって得られるメリットとのバランスを考えることが重要である。国際的な食品流通システムの中で、大きなメリットを得るためには、国際的なメソッドバリデーションが不可欠である。

Key words 微生物迅速検出, 非培養法, 生菌分離, 単一細胞検出, メソッドバリデーション, 国際的ハーモナイゼーション

はじめに

食品を微生物汚染から守り、食品の安全性を確保するためには、微生物の迅速検出が重要であるが、具体的にどの程度重要か、そしてその重要性の中身に応じて、どの程度の技術的チャレンジをすべきか、という問題はそれほど単純ではない。「食品の安全性」というわれわれの日常生活に直接関わる内容だけに、フィット・フ

ォー・パーパス (fit for purpose) の原則から乖離した議論は極力避けなければならない。特に、メソッドバリデーション (以下、単にバリデーション) 無しでは国際的にはほとんど説得力のない今日、迅速法の原理、装置、さらに自動化についても、単に技術的性能を羅列するだけでは意味がないであろう。そこで、本稿では、バリデーションされた方法を中心に、迅速法、簡便法、そして自動化に関する現状を概説する。

Rapid Methods of Microbial Cell Detection and Their Automatization.

* Hideaki MATSUOKA

Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology
東京農工大学工学府 生命工学専攻 (〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16)

I. 迅速化, 簡便化, そして自動化の目標

微生物検出法の基本は培養法であるが, 全体の作業の流れは概ね図1-Aのように表される。言うまでもなく, ④の培養が最も調整の効かない作業で長時間(2~3日以上)を要する。他の作業も, 多数の試料を人手で行う場合は比較的長時間かかるかも知れないが, Bの培養試験キット(図1-B)に見られるように, 簡便化が可能で全体の作業時間の短縮も比較的容易である。実際, そのための装置や器具は種々開発されており実用されている。そのため, 迅速化を図るためには, やはり培養時間を短縮する工夫, 最終的には非培養での検出法が望まれることになる。

非培養法の一例として蛍光色素を利用した顕微蛍光解析法(図1-C)に即して考えると, 培養

時間が省略できるので, 全体の作業時間は2~3時間以内になる。ただし, 例えば⑤顕微計測では通常, 高価な光学装置で一試料ずつ解析していくので, 多数の試料を処理しなければならない場合には, 時間が積算され結果的に培養法より長くかかってしまうこともある。それならば, 自動化によって多数試料の同時解析を行えるようにすれば, 迅速化の目的は達成されるはずだ, ということになる。ただ, 自動化装置の開発には多大なコストがかかり, また, 仮に完成したとしてもその装置の価格が高すぎて, 結局はユーザーが購入してくれない, ということもありえる。

微生物検出法が高いコストをかけてでも使われるかどうかは, それがバリデーションされているか否かが大きく影響する。さらに, それが公定法, あるいは公認法となっていれば, 一層無理してでも使用してくれるであろう。近年は

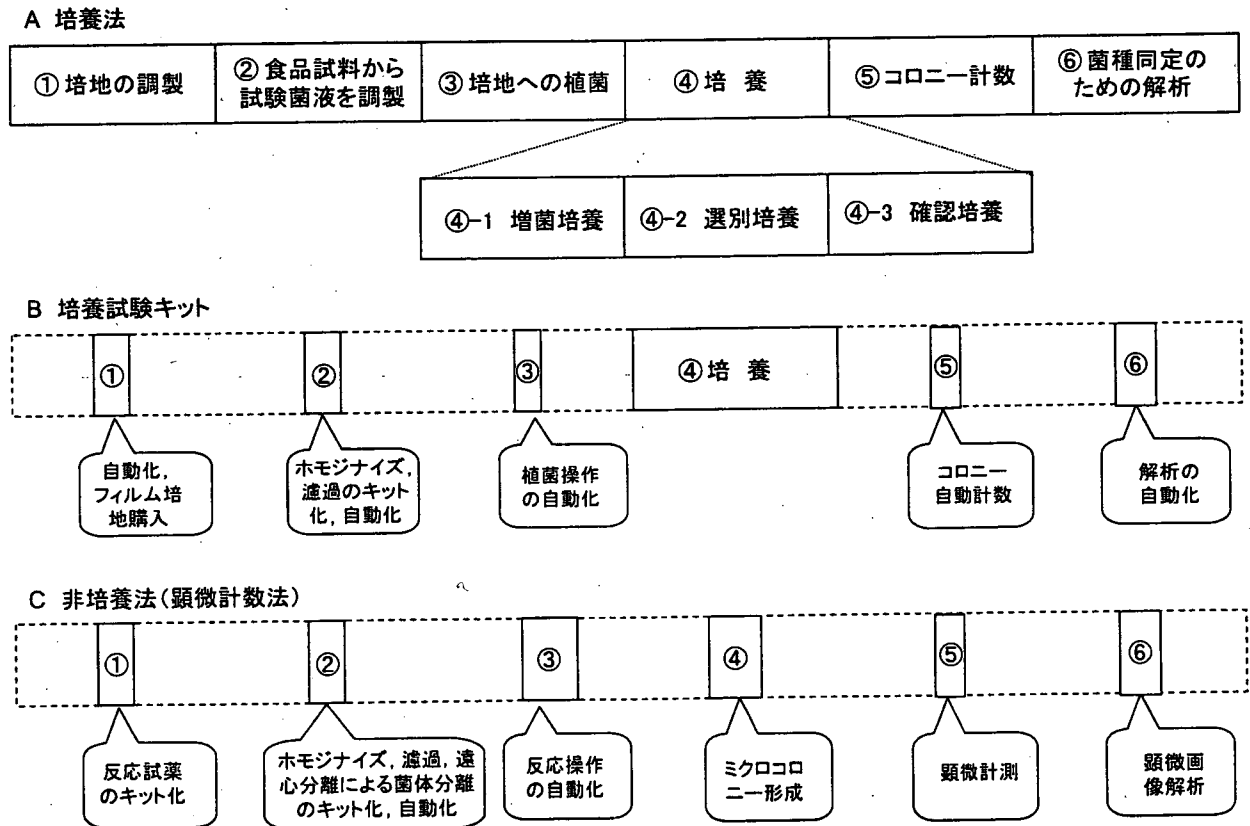


図1 培養法, 培養試験キット, 非培養法における作業の流れ

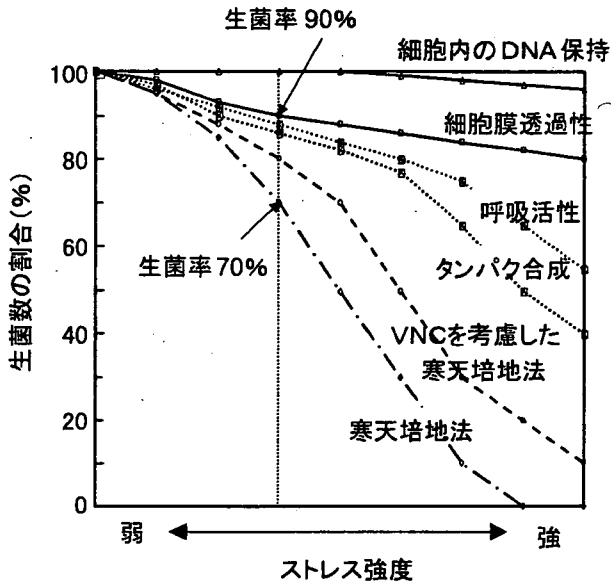


図2 培養法および非培養法における生菌率の見積りの違い

生菌に与えるストレスの強さを増していった時に生菌として残っている割合を概念図として示したもの(大澤 朗教授(神戸大学)の原図に基づく)。

例えば、培養法で計数した生菌率 70% の試料を膜透過性を指標にした非培養法で計数した場合は生菌率 90%、ということが起こる。

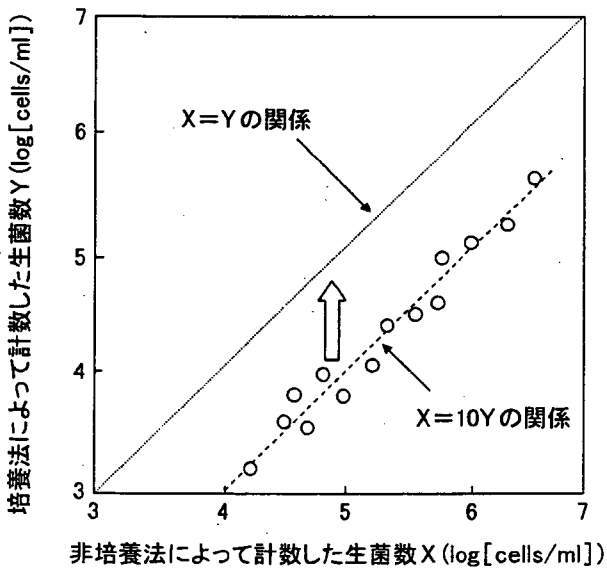


図3 培養法と同一の結果を出力する非培養法

培養法(Y)と非培養法(X)で直線関係が得られることが前提。図のように、 $X=10Y$ の関係が得られた場合は、Xを1/10倍した値、 X' をプロットすれば $X'=Y$ となり、培養法と同一の結果を出力できる。

国際的なバリデーション相互承認の動向が顕著であるから、わが国でもそれに向けた準備を急ぐ必要がある。幸い、国立医薬品食品衛生研究所の主導で、平成 17 年度よりスタートした「食品からの微生物検査標準法検討委員会」、および平成 18 年度よりスタートした「食品における微生物迅速検査法の開発およびその精度評価システムに関する研究」は時宜を得たものといえる¹⁾。国際的なバリデーションにおいては、非培養法はあくまでも培養法と同じ結果を出せること、としている。非培養法はその種類によって測定している現象が異なるので、異なる非培養法同士の間でも結果は異なって当然だし(図2)、まして培養法とは同じ結果になるはずはない。しかし、実用的な迅速法という場合は、培養法と同じ結果を当に「迅速」に出すことが必須の要件になっている。図3に示すような相関が得られた場合、迅速法の結果を補正して、両者の値が等しくなれば良しと考えるのである。

こうして、バリデーションされれば、少なくとも培養法と同じ結果を保証でき、その結果、ユーザーも安心してその迅速法を利用することになる。ユーザーがその迅速法の導入に十分な企業メリットを認めるならば、例え高価でもその装置を購入するであろう。したがって迅速法開発者としては、コストをかけてでも自動化を行う意味が出てくるわけである。ユーザーの確保が先か、バリデーションが先か、という問題は迅速法開発者にとっては切実な問題である。

II. 生菌検出と特定菌検出

微生物検出は生菌検出と特定菌検出に分けて考える必要がある。生菌検出が目的の場合は、菌の種類によらず同じように検出できることが要請される。例えば滅菌状態を確認する場合などである。一方、特定菌検出の場合は高い選択性が要請される。検査時点での菌の生死は問わない場合もある。例えば食中毒の汚染指標菌を検出する場合などである。菌種の同定あるいは確認のために行われる検査法は、大別して(イ)遺伝子解析法、(ロ)免疫分析法、(ハ)代謝基質

表1 微生物迅速検出法

培養・非培養の別	原理・指標	検出・計測法
マイクロコロニー法 (培養法)	固体培地上で生成した、通常よりはるかに小さなコロニーを計数。	蛍光染色後、顕微計数 ¹³⁾
細胞成長顕微解析法 (培養法)	真菌の場合で、細胞成長に伴う形状変化を直接顕微解析。	菌糸伸張速度計測法
		酵母出芽形状解析法 ¹⁴⁾
非培養法	色素分子に対する細胞膜透過性の有無によって生死判別。色素分子の受動的取込。	蛍光染色法 (PI, DAPI など)
		レドックス色素を利用した電気化学測定法
	細胞内エステラーゼ活性。生細胞で活性。	エステル型蛍光色素 (FDA, CFDA など) を細胞内導入
	栄養基質取込活性。生細胞は能動的取込。	蛍光基質法 (2NBDG, NBD-Gly など) ¹⁵⁾
	生細胞が持つ還元力を直接、あるいは適当なメディエータを介して計測。	蛍光色素法
		NAD法 (テトラゾリウム塩の利用など)
		電気化学的方法
	呼吸活性。分子状酸素を電子受容体とした還元力。	酸素電極法、走査型電気化学顕微鏡 ¹⁶⁾
	生細胞では高エネルギー分子の生成。	ATP法 (ルシフェリン・ルシフェラーゼ系)
生細胞では生体高分子 (DNA, RNA, タンパク, etc.) 合成。	タンパク質定量法	
生細胞では遺伝子発現。	GFP などのレポーター遺伝子を利用して遺伝子発現を可視化	

解析法、であり、(ハ)は培養法に準ずるが、(イ)および(ロ)は化学分析であるから、培養法との対比というような議論は当たらない。一方、生菌検出では培養法と対比される非培養法が種々提案されてきた。表1に示すように、多くは光学的シグナル(蛍光、発色、発光)を検出する原理である。食品中にはこれらのシグナルと干渉したりノイズ源になったりするものが多数含まれている。それが擬陽性、あるいは擬陰性のシグナルの原因となる。一方、培養時間を短縮した方法も提案されている。これらの非培養法は研究目的には既に多くの使用実績があり、多数の学術論文に掲載されている。しかし、バリデーションでは、AOAC(正式には AOAC INTERNATIONAL, The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence, 1884年設置で当初は米国の組織。1991年より国際組織)の最高グレードのバリデーションで

ある Official Methods of Analysis (OMA) で承認された方法は、次節に述べるもの以外は一つもない。

III. バリデーションされた迅速法の例

微生物試験法のバリデーションを実施あるいは議論する国際機関には、上述の AOAC の他、ISO(食品関係では TC34 Food products の委員会で議論されており、TC34 中の Sub-committee (SC)9 が食品関係の微生物検査を扱っている委員会)、CODEX(正式には Codex Alimentarius Committee で 1963 年より食品の国際基準(Food Standard)作成を開始)、IDF(正式には International Dairy Federation で、乳製品を専門とする組織)などがある。さらに各国の国内機関がある。近年は、各機関間でのハーモナイゼーションが積極的に行われている。バリデーションの木目の細かさで最も定評のあるのは AOAC

の OMA であるが、また、それよりもはるかに簡略なバリデーション Performance Tested Methods (PTM) が AOAC Research Institute によって実施されている。PTM はテストキット類に適用され認証番号が発行されている。

AOAC の OMA は全体で 51 章、2000 余頁からなるが、その中で微生物試験法は 17 章「Microbiological Methods」にまとめられ 244 頁を費やしている²⁾。この中で非培養法は、第 17.1.02 節「卵と卵製品のための技術」の中に、メチレンブルー染色後、人が顕微鏡観察によって直接計数する方法が記載されているのみである。1940 年の登録であること、人が判断する方法であることを考えると、それから直ちに今日の迅速法に結びつけることは難しい。また、生菌の還元力をテトラゾリウム (TZ) の発色で検出する方法は、表 1 にもあるように、非培養法の一つとして利用されているが、同じ方法が OMA では培養法として記載されている (第 17.2.04 節「生乳および滅菌処理乳中の菌計数」)。液体培地 (寒天培地ではなく) で菌数を 10^3 倍に増菌させ、還元された TZ の発色を反射光として計測する方法である。培養によって、その増菌過程の変化から初期の菌数を外挿する方法である。所要培養時間は、標準的には低温菌では 48 時間 (7℃)、中温菌では 3~4 時間 (35℃) となっているので、中温菌の場合に限れば迅速法の範疇に入るかもしれない。2002 年頃までは Wescor 社から Omnispec という装置として販売されていた。

AOAC の PTM はキット類が主であり、今日までに 73 件が認証されているが³⁾、この中に、上記の Omnispec に似た原理の装置がある。2003 年 1 月登録の BioSys/MicroFoss Coliform Test (Centrus International 社 / Foss 社) である。図 4 に示すように、生菌の代謝によって液体培地の pH や酸化還元電位が変化するので色の变化で連続測定するようになっている。下部に設けた寒天培地が上部の液体の色を反射するミラーの役割をしている。培養法ではあるが、この方法によって、2~3 日かかっていた測定が 7

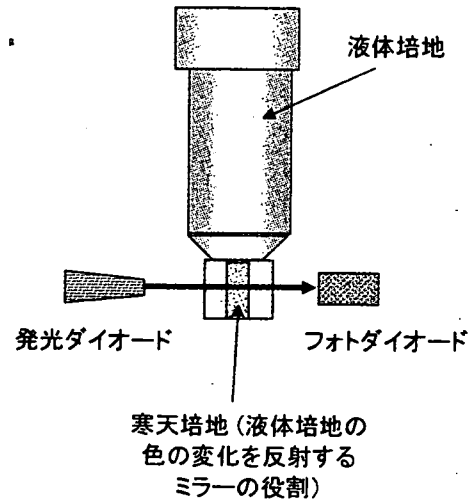


図 4 AOAC PTM で承認された迅速法の一例
BioSys/MicroFoss Coliform Test

時間にまで迅速化された。

IV. 前処理技術として重要な生菌分離

非培養法の信頼性の鍵は前処理技術にある。食品試料中には多数の妨害物質が含まれていたとしても、これらを速やかに分離除去でき、菌だけを単離できるならば、その後の非培養迅速法の精度は格段に向上するはずである。化学分析では、例えばカラムクロマトグラフィーにかける前には、十分試料を精製することが常識である。ところが、微生物検出では、菌を分離しなくても、そのまま寒天培地に播けばよし、とすることがあったためか、従来は、試料の前処理条件に余り注意が払われてこなかったように思われる。菌がきれいに単離できれば、生菌検出の場合に止まらず、特定菌検出における遺伝子解析や免疫分析においても著しく精度が向上すると期待される。その結果、特定菌検出に際して要請されていた「前処理としての培養」も必要なくなるかもしれない。

生菌分離の原理と方法には図 5 に示したものが挙げられる。濾過法に関しては精度のよい簡便な分離機器が既に開発されている⁴⁾。また、遠心分離法に関しても、密度勾配遠心分離後の簡便で精度のよい分取装置の開発が進められて