

図5 生菌分離の原理と方法

いる⁵⁾。特定菌を選択回収するために、抗体固定化微粒子を用いた生菌分離方法を導入したキットも開発されている⁶⁾。密度の違いを利用した超音波分離法は、ルント大学の Laurell T によって展開され⁷⁾、既に血液中の血球と脂肪球の分離が試みられているが、さらに生菌分離への応用が検討されている。

生菌分離では、菌を「生かしたまま」分離することが重要である。非培養で迅速に検出した後、さらに菌種同定あるいは確認のために、その菌を増殖させて増やす必要が想定されるからである。信頼性の点では多少不安でも、とにかく迅速に結果を出すことが先決であり、その後、さらに念を押す必要があれば、始めに観察した、まさにその菌を増菌して、十分量の遺伝子や抗原を得て、詳細な解析を行うようにする、という趣旨である(図6)。

V. 培養時間の短縮による迅速化

自然環境に存在する菌の中には、増殖の遅い、あるいは小さなコロニーを作った後、増殖を停止しているように見える菌がいることが知られている。このような菌に対しては、マイクロコロニーの段階で計数せざるを得ない。これがマイクロコロニー法であり、コロニーが大きくなるのを待たずに計数するので、結果的に迅速化が達成されるかもしれない。また、増殖しつつある細胞の形状変化を時々刻々測定することによって増殖速度を測定する装置も報告されている。細胞分裂を連続画像でとらえることによって、生菌が迅速に検出できる。

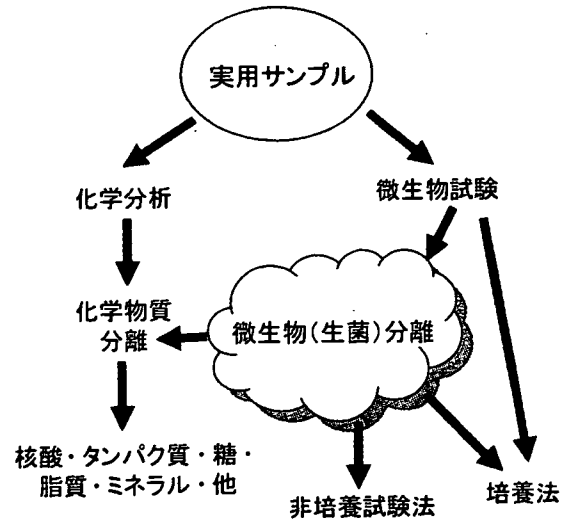


図6 生菌分離の目的

生菌が分離できれば、その後の非培養試験や遺伝子解析なども、高精度にできる。必要とあれば培養もできる。

ペトリフィルム法は、3M 社によって開発された簡便型培養法であり、既に多種類の菌に対する専用キットが AOAC の OMA の認証を得ている。培地の調製が不要で便利であるが、培養時間は例えば大腸菌群の場合、24 時間以上かかっていた。これを、培地の工夫などにより 10 時間程度で計数できるようにして迅速化が図られた⁸⁾。培地調製を省略できることは実用的に大きなメリットである。同様の発想のキットを、わが国の 2 社が製品化し、既に PTM の認証を受けている⁹⁾。培養法が基本であることから、培地成分の改良など、増殖速度を高めるための工夫は、まだまだ検討する余地が大きいかも知れない。

VI. 自動化システム

微生物迅速検出法の自動化を実現するためには次のような要素技術が必要となる。

(1) 食品試料から試験菌液を自動調製する技術：液体、固体、粉体、ペーストなどの食品の性状に応じて、食品試料を攪拌、細断、ホモジネート、可溶化、などの処理を行う。食品によって具体的な方法や条件はそれぞれ異なるもの

の、データベース化が可能である。物理的処理と化学的処理に分かれるが、いずれの場合も菌を生かしたままで行う必要がある。一旦、条件が決まれば、専用の自動化装置の設計は可能であろう。

(2) 試験菌液から菌以外の夾雑物を除去する技術：上記の IV. で述べた技術である。(1)との組み合わせの技術として考えるべきであろう。

(3) 試験菌液から目的菌を回収濃縮する技術：抗体固定化微粒子によって目的菌を選択結合して回収する方法、微粒子として磁気微粒子を利用する方法、細い流路に固定した抗体で細胞をトラップする方法などが考えられ、それぞれ分離作業を自動化する装置の事例がある。技術的に大きな困難はないと考えられる。ただ、液体を移送する装置ではポンプおよびバルブの微小化と低コスト化が課題であろう。

(4) 菌の可視化技術(生菌, 死菌, 特定菌)：蛍光試薬, 発光試薬, 蛍光基質など, 多種類の色素が市販で入手できる。生菌のまま蛍光観察できる栄養基質であるグルコースの誘導体である 2-NBDG(表1)は筆者らの開発になるが, 生菌のみがこれを能動的に取り込むことができるため, 生菌のまま蛍光観察でき, 極めて有用な試薬と期待される。染色過程も自動化は可能であるが, やはり液送系の微小化が課題となる。

(5) 菌の計数技術：一旦, 可視化された単一細胞の顕微画像を単一の光点として計数する場合は, 光強度が一樣であれば, その自動計数は技術的に容易である。しかし, 光点の強度がバラツク場合, また, そのレベルが試料毎にも大きく変動する場合には, 計数に際しての光強度閾値を一定にできず, ソフトウェアの設計が難しい。

(6) 菌の溶解と遺伝子解析技術：PCR 反応を自動的に行う独立した装置として, 既に広く普及している。反応後の電気泳動を自動的に行う装置の例もある。同時に何種類の遺伝子を解析するか, また非特異的な増幅を如何に抑えるか, という観点での技術開発が進行中である。疾患関連遺伝子解析の大きなニーズを背景に高精度

解析技術の開発が進められている。

(7) 菌の免疫分析技術：サルモネラの血清型解析に代表される煩雑な免疫分析に対しては, できるだけ高密度に抗体固定を行い, 非特異的な結合反応を抑えるためのブロッキング処理などが必要な技術であるが, 固定化条件の定量的評価には, 表面プラズモン共鳴センサーを組み込んだ Biacore システム(Biacore 社)の評価が高い。肝心のセンサー部分の性能評価に関しては, 葉酸定量に即して PTM の認証を得ている¹⁰⁾。

(8) 微小反応液移送技術：Lab-on-chip の開発研究分野で, 様々のマイクロ流路が試作されているが, 微生物検出自動化システムに実用された例はない。chip の大きさにマッチしたポンプおよびバルブ系が未開発である。一方, 菌懸濁液を一定の低速度で移送し, 単一細胞ずつ滴下する技術はフローサイトメトリーとして完成した技術である。BactoScan FC は, この技術が自動計数システムに取り入れられた実例である¹¹⁾。

おわりに

本年(2006年)5月に発表された残留農薬に関する「Positive List」については, 9月に Minneapolis で開催された 120th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition で早速, シンポジウムに取り上げられた。対象は微生物ではないが, 食品の安全確保とそのための技術, さらにその開発や実施に要するコストなど, 様々の要件のバランスを考えなければならないということは, 微生物の場合と全く共通の問題であると理解した。食品流通の国際的広がりを考えれば考えるほど, 国際的バリデーションの重要性は益々高まると思われる。それは, 単に他国のバリデーションの動向をキャッチアップするのではなく, むしろわが国の事情に適したバリデーションを提言し, 国際基準にしていくことが肝要と思われる。

ところで, 上記の自動化技術の項で紹介したフローサイトメトリーを利用したシステムの話で, バイオボール¹²⁾の話を思い出した。バイオボールとは一定数の生菌を凍結乾燥して作製し

たもので、 30 ± 2 個の生菌の標準試料である。少し前までは、菌を 1 個ずつ扱うことなど考えもしなかったが、こうした関連技術の発展、普及に伴って、微生物検出技術においても「単一細胞」を直接扱うことが当たり前のようになる日が近いかもしれない。そのような単一細胞を扱う技術を先導していくことが、高精度の微生物検出迅速法の開発につながるかもしれない。

文 献

- 1) 議事録がウェブサイト (<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>) に公開されているだけでなく、オブザーバーとして委員会の傍聴も可能。
- 2) AOAC のホームページ <http://www.aoac.org> から入り、「OMA ONLINE」, 「Full Text Search-More>>」の順にクリックすると「Text inPDF Files」が出てくるので、ここにキーワードを入れれば、該当する試験法およびその骨子が表示される。さらに本文を見るためには会員になる必要がある。
- 3) <http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html> で、「Microbiological Test Kits」に 2006 年 6 月現在の一覧が示されている。
- 4) Shimakita T, Tashiro Y, Katsuya A, et al. Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit. *J Food Prot* 2006; 69: 170-6.
- 5) Nayak BB, Kamiya E, Nishino T, et al. Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting. *FEMS Microbiol Eco* 2006; 51: 179-86.
- 6) ListerTest (VICAM 社, www.vicam.com/products/listertest.html) 1993 年 8 月, AOAC PTM として最初に認証を受けたキット。固定磁気ビーズでリステリアを選択結合回収し、磁気ビーズをプレートに播き、22 時間後、コロニー計数。コロニーを膜に写し取り、第一抗体、第二抗体、色素反応で確認。総計 24 時間。
- 7) Nilsson A, Petersson F, Jönsson H, Laurell T. Acoustic control of suspended particles in microfluidic chips. *Lab Chip* 2004; 4: 131-5. 装置開発は ErySave 社 (www.erysave.com).
- 8) AOAC OMA 第 17.3.04A 節「食品中の大腸菌群の迅速計測」. 3M 社の Petrifilm (3M 社, <http://multimedia.mmm.com/mws/mediawebserver.dyn?666660Zjcf6lVs6EVs66653QCOrrrrQ->)
- 9) チッソ : Sanita-kun Total Plate Count, PTM 011001 (2001); 日本製薬 : Nissui Compact Dry Total Count, PTM 010404 (2004), Compact Dry CF, PTM 110401 (2004), Compact Dry EC, PTM 110402 (2004).
- 10) Biacore AB : Qflex Kit Folic Acid, PTM 080201 (2002).
- 11) <http://www.foss.dk/Solutions/ProductsDirect/BactoScanFC.aspx>, 生乳中の菌数測定に利用されている。DNA 染色試薬で染色した菌液をマイクロシリンジの先端から一定流速で流下させ、文字通り 1 個ずつ計数する装置である。AOAC のバリデーションは行っていないが、米国の Food and Drug Administration (FDA) の Milk Testing Requirement を満たしているとされている。
- 12) <http://www.btfbio.com/product.php?nav=Other>
- 13) Kitaguchi A, Yamaguchi N, Nasu M. Simultaneous enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. within three hours by multicolor fluorescence in situ hybridization with vital staining. *J Microbiol Methods* 2006; 65: 623-7.
- 14) Oh KB, Chen YS, Matsuoka H, et al. Morphological recognition of fungal spore germination by a computer-aided image analysis and application to antifungal activity evaluation. *J Biotechnol* 1996; 45: 71-9.
- 15) Matsuoka H, Oishi K, Watanabe M, et al. Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67: 2459-62.
- 16) Yasukawa T, Glidle A, Cooper JM, et al. Electroanalysis of metabolic flux from single cells in picolitre-volume microsystems. *Anal Chem* 2002; 74: 5001-8.

第1節

微生物検査法のバリデーシヨンの概略

1. 微生物検査の目的と検査法の分類

1.1 生菌検出と特定菌検出

微生物検査法の目的は、生菌検出と特定菌検出に分かれる。例えば、殺菌処理の確認のためには非特異的な生菌検出が必要となる。代表的な菌種を指標として、その生菌を選択的に測定する方法でも実用的に間に合う場合もあるが、基本は、どんな菌種でも殺菌されなかった菌はすべて検出されるという方法が理想である。一方、微生物汚染によって疾病が発生した場合の原因究明では、特定菌の同定が不可欠である。また、発酵食品や乳製品など生菌を含む食品の管理においても、食中毒菌のみを選択的に検出することが必要である。

1.2 培養法と非培養法

微生物検査の化学検査と異なる点は、検査対象の量が検査中に変化することである。それどころか、検査対象を培養して増やすことが検査法の基本になっている。培養の理由は2つある。生菌検出の場合は、増殖することが「生きている」ことを示す最も信頼できる指標だからである。特定菌検出の場合は、十分量の菌が単離された状態で得られれば、直接、菌種特異的なプローブ(遺伝子や抗原を認識して、これに選択的に結合する性質を持った化学物質)で確認できるので培養の必要はない。しかし、通常は雑多な成分の中に極微量の菌がいるだけであるから、選択培地でその菌のみを選択的に増殖させる「前処理」が必要である。この前処理なしでは、「非特異的なノイズ」*の影響が無視できないことが多いので、やはり培養法が基本となる。

これらの「培養法」に対して、直接細胞を検出する「非培養法」が種々開発され、迅速法として利用されてきた(表-1, 表-2)。共存物質が少ない場合や対象菌が十分量ある場合は、有効な検査法として信頼性も高く、学術研究に利用された例は多い。しかし、食品検査の場合のように妨害物質やノイズの原因となる雑多なものが共存している場合は、信頼性の確保が難しい。少なくとも、現時点では、国の内外を問わず公定法あるいは公認法の妥当性確認の基準となっているのは「培養法」である。

ところで、顕微鏡によって1個の細胞が分裂して2個になることが確認できれば、短時間で生菌検出ができることになる。また細胞の成長に伴う形状の変化を顕微鏡観測できれば、それによって細胞が生きていることを迅速に検知できる。また、菌の種類によっては、ある程度増殖してマイクロコロニーを形成し、その段階で増殖が停止してしまうような場合もある。これらの場合は培養法のカテゴリーであるから、その妥当性確認が得られやすく、しかも迅速に結果が得られる利点がある。しかし、例えば顕微鏡と画像処理装置を組み合わせた高価な装置が必要であったり、あるいは同時に処理でき

* : 光学的なノイズの意味で、例えばDNAと結合して蛍光を発する試薬で染めたのに、DNA以外の混合物が同様に染まって蛍光を発する場合があります、これが非特異的な光のシグナルとなる。これをノイズと言う。

表-1 生菌検出法

迅速性	培養・非培養の別	原理・指標	検出・計測法	文献
通常培養法	培養法	固体培地上に生成したコロニー(肉眼で検知できる大きさ)を計数	寒天培地コロニー計数法 フィルム、不織布などのシート状培地でのコロニー計数法	1)~3)
		液体培地中で増殖した菌体量を測定、あるいは重量で計測	液体培地培養法	
迅速法	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	4)
	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	菌糸伸長速度計測法 酵母出芽形状解析法	5), 6) 7)
	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。生細胞では透過性なし。色素分子の受動的取込み	蛍光染色法(PI, DAPI, など)	8), 9)
			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	10), 11)
		栄養基質取込み活性。生細胞は能動的取込み	蛍光基質法(2NBDG, NBD-Gly など)	12), 13)
		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ーを介して計測	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	14)
		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)	15)
生細胞では生体高分子(DNA, RNA, 蛋白など)合成	蛋白質定量法			
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			

表-2 特定菌検出法

培養・非培養の別	原理	検出・測定法
培養法	代謝基質の種類に基づく同定法	特異基質培地 特異酵素基質培地 特異代謝産物検出用培地(pH, CO ₂ , H ₂ など)
非培養法	免疫反応を利用する方法	免疫磁気ビーズ法 イムノクロマト法 蛍光免疫法 ラテックス凝集法
		遺伝子解析に基づく方法

る検体数が少なかったりするために、食品分析分野に広く普及するには至っていない。

表-1及び表-2の中で、どの検査法が妥当性確認されているのか、という総論的な議論は意味がない。検査対象となる食品マトリックスの種類、その食品中の微生物の種類、そして検出の定性的あるいは定量的目標などの組合せが決まってはじめて、その個別の検査法の妥当性確認の議論が始まるからである。

1.3 生菌分離技術の重要性

非培養法の利点は、単に培養法で得られるはずの結果を迅速に得られるというだけに留まらない。自然界には、①増殖しにくい種類、②化学的増殖阻害要因(貧栄養環境、過剰栄養環境)、③物理的増殖阻害要因(常温常圧から乖離した環境、異常光照射環境、異常電磁場)、④傷害菌、⑤生物的要因(共生菌の影響、拮抗菌の影響)などの理由によって、培養法では検出が困難な菌が少なからず存在するからである。これらを確実に検出できるのは非培養法である。したがって、非培養法は、食品分野に限らず、医療、環境、日用品などの広い分野で要請されている。

非培養法の原理は光学的計測(蛍光、発光、発色)が中心である。しかし、試料中には不特定の着色物質、蛍光物質が混在している場合が多い。細胞に対する特異性の高いプローブの開発も有効ではあるが、共存妨害物質の除去の方が実用的にはより効果的と考えられ重要である。仮に、有効な特異的プローブが利用できる場合でも、あらかじめ共存妨害物質が除去されていれば、測定感度の向上が期待できる。したがって、菌体をこれらの妨害物質から高効率に分離できれば、その後の非培養検査の信頼性は格段に向上するはずである。また、この分離に際しては「生菌」のまま分離することが肝要である。非培養検査の後、必要に応じて培養によって増殖させ、遺伝子や蛋白質レベルの解析に供することができるようになるからである。

生菌を他の微粒子と分離する原理としては、細胞の電気的性質、細胞半径・密度、細胞表面の認識分子などの違いの利用が考えられる。その原理に基づく具体的な方法としては、図-1に示した膜分離¹⁶⁾、誘電電気泳動¹⁷⁾、密度勾配遠心分離¹⁸⁾のほか、抗体固定化磁気微粒子による磁気分離、あるいは超音波分離などが報告されている。しかし、対象となる微生物細胞のみを生菌の状態での効率良く分離することは、それほど簡単ではない。そして、微生物検査における前処理技術としての体系的な取

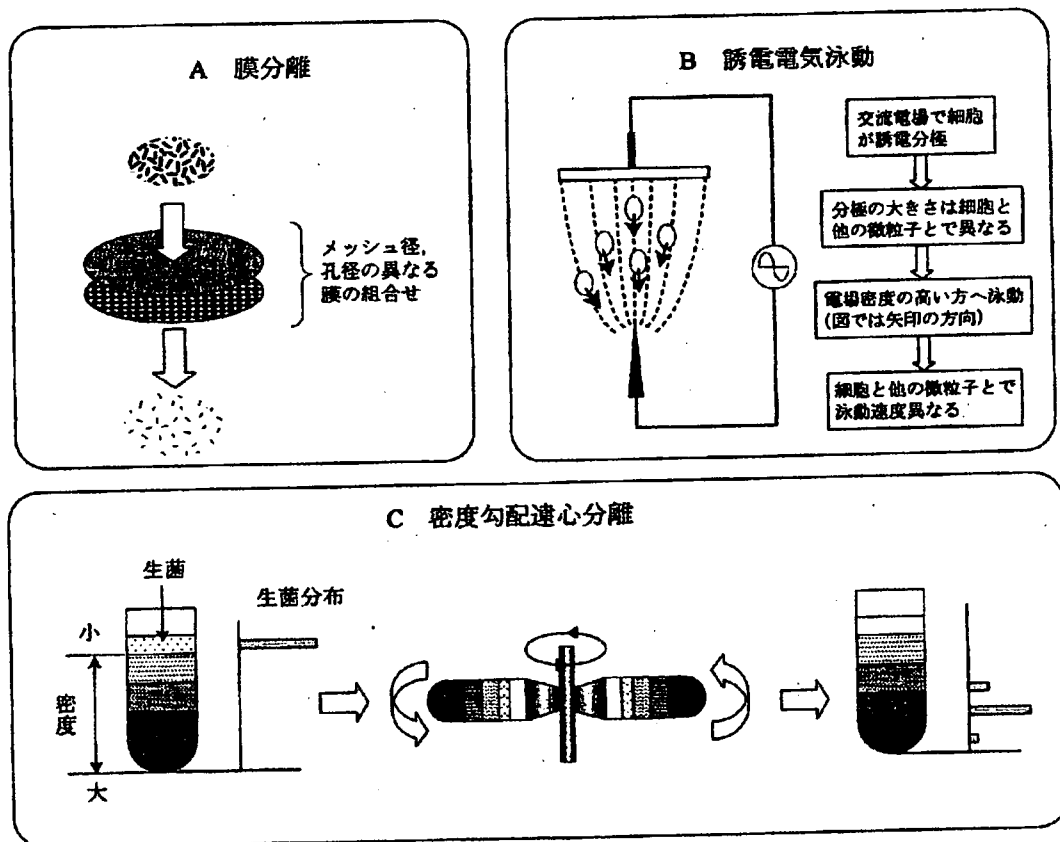


図-1 生菌分離法

組みも、これまでけっして十分なされてきたとは言えない。この問題は、今後の微生物検査技術において戦略的にも重要な研究開発課題であると考えられる。

2. 新しい検査法開発の動機

新しい検査法開発の動機は2つある。1つは行政的要請であり、もう1つは検査技術ビジネス展開の要請である。いずれの場合も、その基になっている社会的要請には共通部分が多いであろうし、また行政的要請の軽重がビジネスの大小にも直結する傾向があるので、その違いを区別することは、一見、無意味かもしれない。しかし、検査法の妥当性確認を考えるうえで、この動機の違いが非常に重要になってくる。それは、妥当性確認には予想以上に多くのコストと時間がかかるからである。

2.1 行政的要請

行政的要請によって新しい検査法の開発が必要になった場合は、通常、専門分野の研究機関や企業に依頼する。費用は公的資金を基本とするが、企業の開発資金が加わることもあろう。緊急を要するケースが多いので、何とか検査できることが優先し、時間と手間のかかる妥当性確認を入念に行っている余裕がないかもしれない。その任にあたった研究者・技術者にとっては、確実に検査できることが優先するので、自分の経験やノウハウに基づく方法を優先することは自然である。しかし、行政的要請によって実施されることを考えると、誰にでも共通に実施できる方法であることが望ましい。最終的に提示される検査法のプロトコールとしては、随所に幅のある条件が記されたものになる可能性が高い。実際、告示法や通知法として示されてきたわが国の公定法ないし公認法はおおむねこのような記述になっている^{19)・20)}。もともと、専門的知識も経験もある人が見て、適切に判断しながら確実な結果を出すような場合を想定して作成されたのであろう。あるいは、流儀の違う多くの専門家の誰からもクレームがこないようにとの配慮があったのかもしれない。しかし、経験の浅い人がこれを見て実際に検査をしようとする、まったく当惑することになる。実験者の経験や技量の問題は別途考えるべきことではあるが、条件の幅によっては、たとえ知識や経験があっても、検査結果に大きな違いが出る可能性があることは否定できない。そして、そのことが、「誰が実施しても同じ結果が得られること」を基本とする国際的公認法の要件に合致しない大きな理由になっていると考えられるのである。

2.2 検査技術ビジネス展開の要請

企業が自主的に開発に取り組む場合は、当然、資金は自社の開発経費であろう。現行の検査法よりも簡便・迅速・安価で、信頼性の高い検査結果を出せる新しい方法であれば、必ず多くのユーザーが採用するはずだ、との見通しに基づいて開発に踏み切ることになる。想定されるユーザーは、食品の製造・流通・販売を行う企業、及びその衛生状態を監督する立場の公的機関、さらに消費者団体などである。しかし、これらのユーザー側からすれば、その検査法が公定法ないし公認法となっているかどうかは採否の重要な判断基準になる。海外のユーザーの場合は、当然のことながら、国際的公認法になっていることが必須になってくる。したがって、開発費に勝るとも劣らない費用を自ら投入してでも国際的に通用するような妥当性確認を行う必要が出てくる。

ビジネス展開の視点では、もう一つ別のニュアンスの動機がある。食品製造・流通・販売企業が、自社だけでしか行っていない“先端的な”検査法で製品の安全性をしっかりとチェックしていることを、宣伝のために採用したいというものである。他社との差別化には格好の材料かもしれないが、科学技術者としては戸惑いを禁じ得ない。そもそも食品の安全性は、いくら頑張ってみたところで科学的に100%保証できるものではないが、それだからといって、最初からイメージ戦略の一つくらいにしか考えない姿勢は、技術開発者に対する冒瀆に近い。

4. 微生物検査法に関する基準や規格の作成に関与している機関

4.1 AOAC, Codex 及び ISO における微生物検査法の議論

国際的な基準や規格の作成に関わっている組織の例を図-3に示す。米国に本拠を置く AOAC INTERNATIONAL(以下, AOAC)は, その発祥は古く, 米国の国内機関として 1884 年にスタートした。当初は肥料成分の化学分析法が対象であったが, その後, 分析対象が食品関連物質に広がり, 1965 年に微生物試験も対象とするようになり, 1991 年に国際組織となった。一方, 1950 年代半ばにオーストリアで食品の地域基準の作成が盛んになり, やがて European Codex Alimentarius として組織化された。これが基になり, FAO/WHO(Food and Agriculture Organization/ World Health Organization) 連合委員会の要請に基づき, Codex Alimentarius Commission が設置され, 1963 年, 食品の国際基準(Food Standard) 作成を開始した。ISO(International Organization for Standardization)は, 各種産業に必要なあらゆる物品の国際基準を決めるために, 1946 年に設立された機関である。分析科学よりさらに広い分野を包含する。現在 229 の Technical Committee(TC)がある²¹⁾。微生物検査に関しては, 食品, ヘルスケア製品, 化粧品などの対象によってそれぞれ異なる TC で扱われている。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である。

4.2 専門性の高い機関との連携

特定の対象に絞れば, それを専門とする他の国際機関がより木目の細かい議論をしている。例えば, 乳製品の場合, 1903 年に設立された専門機関 IDF(International Dairy Federation)がある。専門的な知識や経験, 関連技術やノウハウなどを結集させて議論するためには, そうした専門機関との協力が不可欠であろう。実際, 乳製品の場合は, 1970 年以降, ISO の TC34, IDF, そして AOAC から成る三者委員会で議論されるようになってきている。ISO は規格等の編集, 出版, 運営に関する専門的ノウハウ, 世界の他の規格制定機関との最大のチャンネルを持っている。IDF は乳製品に関して, 日々, 測定データを得る方法, その結果を製品管理に生かしていく方法などについて豊富な知識と経験を有している。そして, AOAC は具体的な検査法の妥当性確認の仕方について最高のグレードのプログラムを

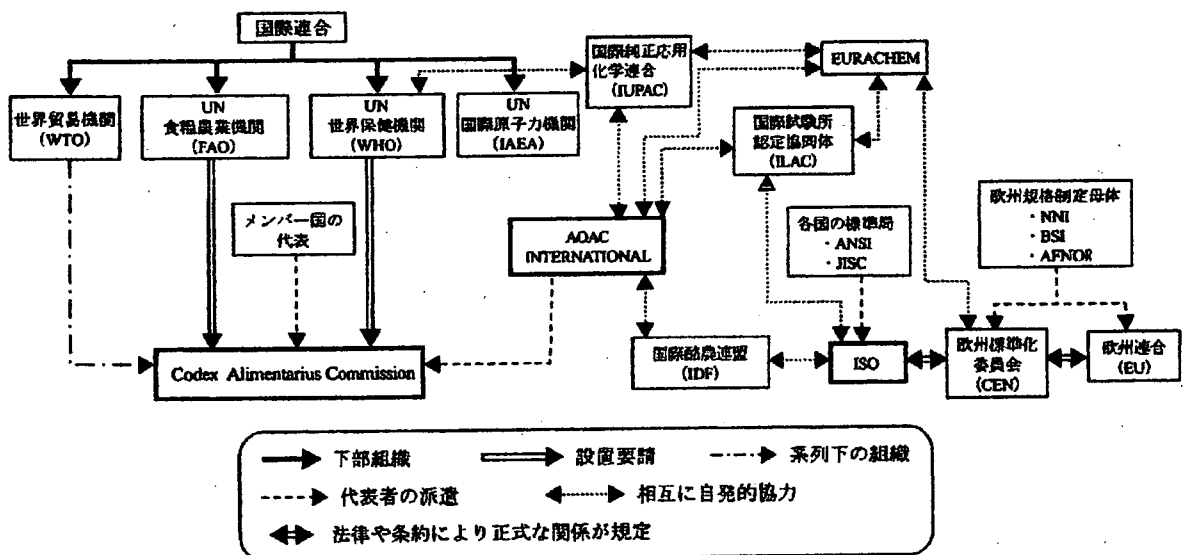


図-3 基準、規格の制定及び検査法妥当性確認を実施する機関の例

開発し、実績を蓄積している。そうした、各機関の得意なところを出し合って作業の効率化とハーモナイゼーションを図るとの趣旨である。

4.3 各国の国内機関の立場

各国にはそれぞれ国内機関があつて、食品の微生物検査に関しても、国内における公定法あるいは公認法に関わる作業を行っている。米国の ANSI (American National Standards Institute), フランスの AFNOR (Association Française de Normalisation), 英国の BSI (British Standards Institution), 日本の JSA (Japanese Standards Association) などは ISO の国内版である。より専門性の高い組織としては、米国の FDA, カナダの Health Canada, スカンジナビアの NORDVAL (Nordic System of Validation of Alternative Microbiological Methods), 英国を中心とした EMMAS (European Microbiological Methods Assessment Scheme) などがある。日本では、厚生労働省あるいは農林水産省が窓口としての機能を果たしてきた。国内機関は、各国の事情を考慮しつつも、上記の国際機関とのハーモナイゼーションを図っている。

5. 妥当性確認済みの微生物検査法

5.1 AOAC の OMA に登録されている検査法

国内外の各機関が、公定法あるいは公認法を定めるためには、その妥当性確認の手続きが必要である。そのためのプログラムとしては、AOAC の Official Method Analysis が最も定評がある。それをまとめたものが冊子として出版され、そのタイトルも『Official Methods of Analysis (OMA)』となっている。「Book of Methods」の通称と呼ばれ、分析科学者によって広く利用されてきた。1920 年に第 1 版が出版されて以来、5 年ごとに改版を重ね、現在は 2005 年に出版された第 18 版に至っている。最新版では冊子版と Web 版となった。全体で 51 章、2,000 余ページから成るが、その中で第 17 章が「Microbiological Methods」で、最多の 224 ページを費やしている²²⁾。第 18 版となって新たに増えた 26 節中、*Salmonella* の内容が 9 節、*Staphylococcus*, *Listeria* が各々 4 節ずつ、そして新たに *Bacillus anthracis* の 3 節が加わった点などが特記される。1 章平均 39 ページからすると、この第 17 章は格段に分厚い章となっている。但しこのことは、単に微生物関係は章分けせずに全部一緒にしてしまったということかもしれない。もともと、化学分析が中心であった AOAC の歴史的背景を考えると、そう考えても不思議はない。

微生物検査法についての記述は他のいくつかの章にも散見する。例えば、第 5 章中の「5.3 飼料中の抗生物質を測定するための微生物試験」、第 7 章中の「7.3 化粧品中の殺真菌物質」、第 45 章中の「45.2 ビタミン及び栄養物測定のための微生物試験法」、第 50 章中の「50.1.18 ~ 50.1.22 乳児用人工乳及び食事療法食材の微生物試験法」などである。これらも含めると、微生物検査法は「微生物がいるかいないか」に関するものと「微生物に効くか効かないか」に関するものに大別して考えることができる。「微生物に効くか効かないか」では菌の生死判別が要請されるだけであるが、「微生物がいるかいないか」では菌の生死判別と菌種の同定が要請される。第 17 章に記載されているものはすべて後者である。

5.2 ISO に登録されている微生物検査法

ISO における微生物検査法の妥当性確認のプロセスは、AOAC の場合と様相を異にする。AOAC ではプロトコールの設計が厳密で、それに従って、定性試験ならば 10 カ所以上、定量試験ならば 8 カ所以上の試験研究所でコラボスタディーが実施される。ISO ではコラボスタディーの規定はない。もちろん、委員会に提出する具体的資料としては、自主的に実施したコラボスタディーの成績、あるいはそれに代わるデータが不可欠であるが、8 ないし 10 カ所でのコラボでなければならないとの規定はな

- ・ AOAC で参照した培養法：965.25 ~ 965.68, 995.25, 2000.06 (Official Methods of Analysis の第 17 版及び増補に掲載)
- ・ ISO で参照した培養法：6579：2002 Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp.

- コラボの数：欧米の連邦政府機関、私企業など 21 試験研究機関が参加
- 食品の種類：チーズ、卵を原料とする乾燥製品、鶏肉
- 菌の添加法：*Salmonella* 及びそれと競合する微生物フローラを人為的に添加
- 結果：コラボの結果は良好で、ISO 6579 は AOAC でも妥当性確認されたとの結論。
AOAC Official Method 2002.10 for the analysis of fresh cheese, dried egg, and raw, ground poultry として First Action に登録された。

図-4 食品中のサルモネラ検査法の ISO 対 AOAC の等価性確認のためのコラボスタディーの結果²⁴⁾

い。AOAC の OMA のためのコラボスタディーに要する何千万円という費用と 1~2 年の時間を考えると、これが必須ではない ISO での登録の方がはるかに敷居が低いように思われるであろう。妥当性確認プログラムの厳密さを重視して相応の費用と時間をかけて、高い信頼性を確保するか、あるいは、ある程度ショートカットのプログラムで済ませ、信頼性は低くなるかもしれないが、少なくとも国際的には「妥当性確認された検査法」として登録するか、なかなか悩ましい選択である。ちなみに、ISO の TC34/SC9 に登録された微生物検査は 33 件(1991~2006 年)であるが²³⁾、このなかで AOAC の OMA の妥当性確認プログラムに従って再確認されたのは、今日に至るまで、ISO 6579:2002 Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. のみである(図-4)²⁴⁾。ハーモナイゼーションと言っても、等価であることを示すことがいかに大変かを如実に物語っている。

6. 国際的ハーモナイゼーションへの取組み

6.1 AOAC 方式か ISO 方式か

3. 項で述べたように、「培地としてどれを使用するか」から始まって、検査法のプロトコールで規定すべき項目には、各国の歴史的背景や、同じ国の中でも対象となる分野(例えば、食品と医薬)によって条件が異なる場合が多々ある。それらは、科学的議論のみでどれが最適であると結論できる内容ではない。AOAC では厳格なコラボスタディーによって、誰が、いつ、どこで実施しても同じ結果が得られるようにすることを究極の目標にし、専門のメソッド委員会で議論され、承認される。一方 ISO では TC/SC の参加国代表(TC34/SC9 の場合、参加国(Participating countries)は 28 カ国)が、それぞれの国の考え方も含めて議論し、それを各国 1 票ずつの投票により採否を決める考え方もある。しかし、AOAC 方式か ISO 方式か、あるいは他の方式か、と明確に分けられるものでもなく、ISO における議論の根拠に AOAC ですでに妥当性確認された検査法が出されたり、逆に、検査法のプロトコールだけではなく、それを実施する人の技能についても考慮すべきである、との ISO の考え方(Proficiency Testing Program)が AOAC に導入されたりしている(OMA 等のプログラムと直接関係はしないが)。現在では、各機関の間で様々な形の連携、協力、情報交換によりハーモナイゼーションが行われている。上述の ISO-IDF-AOAC の三者委員会もその一例である。

6.2 わが国独自のスキームの構築

国際的ハーモナイゼーションの動向に対して、わが国としても組織的戦略的に関わっていくことが重要である。その第一歩は、微生物検査法の基本となっている培養法に関して、わが国としての考え方と具体的プロトコールを国際的に認知されるようにすることであろう。幸い、その具体的作業は現在、国立医薬品食品衛生研究所の主導で進められている²⁵⁾。おそらく、その際、培地の選定をめぐる

議論が大変重要になると予想される。AOAC が基準としてきた培地が、BAM (Bacteriological Analytical Manual)²⁶⁾ で指定されたものを中心としているので、AOAC の実績を考えればそれを十分考慮しなければならないであろう。しかし、わが国で用いられてきた培地でも、十分経験を積んだ専門家が実施することによって、等価な結果が出せるはずである。それを実証するデータを示すことによって、日本製培地を国際基準にしていくことが肝要である。

6.3 微生物検査法の専門家としての活動の重要性

必ずしも科学的判断だけでは決着がつかない内容に関して、国際的議論の場で自国の論理を展開し理解を得るようになるには大変なエネルギーが必要である。誰がその矢面に立つにしろ、国としての組織的なバックアップ体制が必要である。上述の培養法の標準化のための活動は、その観点から極めて意義が大きい。さらに、そのような議論の場に多くの人が積極的に出かけていって、専門家になって頂くことが重要である。専門家の要件とは、例えば、学術論文(国際誌)の発表実績を持つこと、国際会議に最低でも連続3年以上は出席し、研究報告をし続ける実績を持つことなどであるが、その結果、海外の専門家に名を知られるようになることである。自分が抱えている問題に関しては世界で最も自分がよく知っているはずであり、それを科学的に表現できる人が専門家である。

さらに付言すれば、ここで言う専門家になるべき人とは、検査法に直接関わった技術系の人は言うまでもないが、行政の立場の人にも言えることである。AOAC や ISO に限らず、議論の中心は極めて科学的・技術的な内容になるものの、結局、科学的議論だけでは結論が出ない場合が多い。それでも、最終的にはハーモナイゼーションの折り合い点を見つけなければならない。その際、行政的判断も重要になるはずである。その担当者が、上記のような専門家であれば、わが国にとって極めて大きな力になるはずである。

[松岡英明]

文 献

- 1) Petrifilm® method (例えば 17.2.09, 17.3.02, 17.4.01C) : Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (18th Edition, Horwitz, W. and Latimer Jr., G. W. eds.) (2005)
- 2) Kodaka, H., et al. : Comparison of the compact dry TC method with the standard pour plate method (AOAC Official Method 966.23) for determining aerobic colony counts in food samples, *J. AOAC Int.*, **88**, 1702-1713 (2005)
- 3) Morita, H., et al. : Evaluation of the Sanita-kun coliforms, a dehydrated medium sheet for coliform detection, Performance-Tested Method 100402, *J. AOAC Int.*, **89**, 399-416 (2006)
- 4) Ferrari, B. C., et al. : Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8714-8720 (2005)
- 5) 呉 基鳳, 松岡英明 : バイオセルトレーサーによる細胞センシング, 信学技法, **CPM96-CPM32(6)**, 25-30 (1996)
- 6) 飯田泰広, 他 : バイオセルトレーサーを用いた生薬アセトン抽出物中の抗真菌活性物質の高感度スクリーニング, 薬学雑誌, **119(12)**, 964-971 (1999)
- 7) Oh, K.-B., et al. : Morphological Recognition of Fungal Spore Germination by a Computer-aided Image Analysis and Application to Antifungal Activity Evaluation, *J. Biotechnol.*, **45**, 71-79 (1996)
- 8) Bank, H. L. : Rapid Assessment of Islet Viability with Acridine Orange and Propidium Iodide, *In Vitro Cell and Devel. Biol.*, **24**, 266-275 (1988)
- 9) Frankfurt, O.S. : Assessment of Cell Viability by Flow Cytometric Analysis using DNase Exclusion, *Exp. Cell Res.*, **144**, 478-482 (1983)
- 10) Ingham, E. R. and Klein, D. A. : Soil Fungi: Relationships between Hyphal Activity and Staining with Fluorescein Diacetate, *Soil Biol. Biochem.*, **16**, 273-278 (1984)
- 11) Wierda, W. G., et al. : Comparison of Fluorochrom-labeled and 51 Cr-labeled Targets for Natural Killer Cytotoxicity Assay, *J. Immunol. Meth.*, **122**, 15-25 (1989)
- 12) Oh, K.-B. and Matsuoka, H. : Rapid Viability Assessment of Yeast cells Using Vital Staining with 2-NBDG, a Fluorescent Derivative of Glucose, *Intern. J. Food Microbiol.*, **76**, 47-53 (2002)
- 13) Matsuoka, H., et al. : Viable Cell Detection by the Combined Use of Fluorescent Glucose and Fluorescent Glycine, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2459-2462 (2003)
- 14) Yasukawa, T., et al. : Electroanalysis of Metabolic Flux from Single Cells in Picolitre-Volume Microsystems, *Anal. Chem.*,

- 74, 5001-5008(2002)
- 15) 高橋寿洋, 他: 自動化 MicroStar-RMDS-SPS(ATP- バイオルミネッセンス法)のビール工場における製品検査への応用, 日本防菌防霉学会誌, 27(11), 759-764(1999)
- 16) Shimakita, T., et al. : Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit, *J. Food Prot.*, 69, 170-176(2006)
- 17) Pohl, H. A. : Dielectrophoresis (Cambridge University Press, 1978)
- 18) Nayak, B. B., et al. : Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting, *FEMS Microbiol. Eco.*, 51, 179-186(2006)
- 19) 食品衛生研究会編: 平成 14 年版食品衛生小六法(新日本法規出版, 2001)
- 20) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針(微生物編)(日本食品衛生協会, 2004)
- 21) <http://www.iso.org/iso/en/stdsdevelopment/tc/tclist/TechnicalCommitteeList.TechnicalCommitteeList>
- 22) Horwitz, W. and Latimer Jr., G. W. (eds.) : Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (18th Edition) (2005)
- 23) [http://www.iso.org/iso/en/stdsdevelopment/tc/tclist/TechnicalCommitteeStandardsListPage.TechnicalCommitteeStandardList? COMMID=1368](http://www.iso.org/iso/en/stdsdevelopment/tc/tclist/TechnicalCommitteeStandardsListPage.TechnicalCommitteeStandardList?COMMID=1368)
- 24) Feldsein, P. T., et al. : Detection of *Salmonella* in fresh cheese, poultry, products, and dried egg products by ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC Official Method: collaborative study, *J. AOAC Int.*, 86, 275-295(2003)
- 25) <http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>
- 26) Food and Drug Administration: Bacteriological Analytical Manual(8th Edition) (1995)



食品分析法の妥当性確認ハンドブック

書籍コード No.0301

2007年1月12日 第1版第1刷発行

ISBN978-4-916164-83-4 C3058 Y25000E

編集委員長 永田 忠博

編集委員 後藤 哲久 丹野 憲二

安井 明美 湯川剛一郎

発行人 元山 裕孝

発行元 株式会社 **サイエンスフォーラム**

〒113-0033 東京都文京区本郷2-40-14

Tel. (03)5689-5611 Fax. (03)5689-5622

定価 26,250 円 (本体 25,000 円 + 税)

©2007

printed in japan 禁複製

落丁・乱丁本はお取替えいたします。

印刷・製本/ニッケイ印刷

1 技能試験の必要性和標準化の動向

東京農工大学 大学院工学府 生命工学専攻

松岡 英明

1 はじめに

食品中の微生物試験の目的は、微生物汚染のレベルが健康を害しない程度の低いレベルであることを保証することである。そのためには微生物試験結果が十分信頼できるものでなければならない。信頼性のある結果を得るためには、その微生物試験法の妥当性が確認されなければならない。この妥当性確認をMethod Validation (MV)という。ごく最近までは、このMVのために、検査法のプロトコールについて専ら議論されてきた。それを実施するのは、「基本的な技量」を習得している人が、「基本的な設備」のあるところで実施することを前提としているので、敢えて議論する必要がなかった。ところが、1990年代の後半になると、これらの前提となる「基本的な技量・設備」についても確認する必要があると考えられるようになった。それが、試験をする人の技量の認定(Proficiency Certification; PC)と試験所の管理基準の認定(Laboratory Accreditation; LA)である。さらにそれらが総合的に機能しているかどうかをチェックするには、既知濃度の微生物試料が不可欠であるが、その要望に応えるものが標準物質(Standard Materials; SM)である。どれか一つ欠けても、信頼性のある結果は得られない。

最終的には、国際的に通用する内容でなければならないが、その目的とするところを考えれば、国際動向に合わせるというよりも、我が国から発信する基準を国際基準にしていく戦略の方がより重要ではないだろうか。そうした戦略の第一歩とも言うべき、我が国の「微生物標準法」策定作業が当に始まったばかりである。そして、その作業を強力に支援するものが、2003年に開発された生菌

標準物質、BioBallである。本稿では、こうした状況について概説する。

2 我が国における微生物標準法策定の動向

国内における微生物試験法は、厚生労働省(厚労省)からの通知文書と食品衛生検査指針(微生物編)(厚生労働省 監修、日本食品衛生協会、(2004))を参考にして行われている。それらは、検査の現場では「公定法」あるいは「標準法」と理解され、利用されてきた。しかし、その中には、長期にわたって見直されることの無かった試験法も少なく、また、現場の条件に応じて、それらに修正が加えられた亜流の方法も行われてきた。そのため、国外の標準法のような規格化されたプロトコールに従った試験が国内では行われていない。そのことが、微生物試験法の国際的ハーモナイゼーションを進めるうえで障害になる可能性がある。実際、具体的な食品の輸出入に際して、その安全性を保証するはずの試験法が、我が国では通用しているが、相手国では通用していないために、相手国で通用する試験法でもう一度試験しなければならないことがある。したがって、一般論としては、国際的に通用する標準法を是非策定しなければならない、ということになる。

ところが、つい最近まで、我が国ではそうした「国際的に通用する我が国の標準法」を、戦略的組織的に策定することに、それ程積極的ではなかった。その理由は、例え、国際的な通商の場で問題が発生するとしても、極めて限られた特定の食品、特定の相手国であるから、必要なら相手国側が納得する試験法でもう一度試験すればよいではないか、

という考えが支配的であったからだと思われる。そういう状況に立たされた当事者にしてみれば、極めて不条理なことを強られることになり、「国は何をしている!」という憤懣になる。しかし、国の立場で考えれば、特別のケースとして、限られた場合のみに対応すれば済むものを、組織的に対処せんがために、理屈では過去に構築されてきた膨大な試験法の全てを基本から見直さなければならぬ、ということにもなりかねない。とすれば、そのことの方が、コスト的にも時間的にも、はるかに厳しい話である。

国際的ハーモナイゼーションといっても、最終的には我が国の国益に叶うようなものでなけれ

ば、全く意味がない。そのためには、国際的ハーモナイゼーションの中味を、我が国自身が先導していくことが重要である。「今度ISOでこうなったから、我が国でも、早速対応しなければ・・・」式の受動的対応は、労多くして益少なし、である。そうではなくて、試験法の哲学から始まって、試験法の科学、技術、さらに食品文化に至るまで、国際基準は斯くあるべし、と提言し続け、それによってイニシアチブを採っていくことが重要であると思われる。一見科学的な議論であっても、実は、科学的には決して結論を出せない部分が少なからずあるからである。

3 厚労省科学研究費補助金による「検査法バリデーションシステムの構築」を目指す第一歩

厚労省は、上記の観点での重要性に、漸く重い腰を上げ始めている。平成17年度より始まった、厚労省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」がそれである。平成19年度までの3年間のプロジェクトであり、実施計画を議論する過程で、具体的課題が

- (A)「食品からの微生物検査標準法検討委員会」運営
- (B) サルモネラ検査法の検討
- (C) 腸炎ビブリオ検査法の検討
- (D) 黄色ブドウ球菌検査法の検討

の4分担研究課題に絞り込まれた。(A)では図1に示す委員会を構成し、国立医薬品食品衛生研究所・

食品衛生管理部を事務局として、これまでに9回の委員会(H17年度4回、H18年度5回)を行ってきた(<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>)。この委員会での議論内容は、上記Webで公開されているが、その目的は、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌について、培養法を見直し、標準法としてのプロトコルを提案すること、およびそのプロトコルにしたがってバリデーションする仕組みを構築することである。標準法として提案するためには、これまでに実施されてきた検査法についての情報調査、および実験的検討が必要であり、菌種毎にそれを行うために設置された課題が(B)~(D)である。

委員長	山本 茂貴 (国衛研・食品衛生管理部)
副委員長	高島 浩介 (国衛研・衛生微生物部)
委員	浅尾 努 (大阪府立公衆衛生研究所・日本食品微生物学会)
	荒川 英二 (国立感染症研・細菌第一部) 作業部会
	五十君 静信 (国衛研・食品衛生管理部) 事務局、作業部会
	伊藤 武 (財団法人東京顕微鏡院)
	甲斐 明美 (東京都健康安全研究センター) 作業部会
	春日 文子 (国衛研・食品衛生管理部)
	小久保 彌太郎 (社団法人日本食品衛生協会)
	小崎 俊司 (大阪府立大学 農学部)
	品川 邦汎 (岩手大学 農学部)
	清水 晃 (神戸大学・農学部) 作業部会
	田中 廣行 (財団法人日本食品分析センター)
	塚本 定三 (大阪府立公衆衛生研究所) 作業部会
	藤井 建夫 (東京海洋大学 海洋科学部)
	松岡 英明 (AOAC International Japan Section)
	丸山 務 (社団法人日本食品衛生協会)
	宮原 美知子 (国衛研・衛生微生物部) 作業部会
	森 曜子 (財団法人日本冷凍食品検査協会)
	渡辺 治雄 (国立感染症研・副所長)
行政から	道野 英司 (厚労省・監視安全課)
	近藤 卓也 (厚労省・基準審査課)

図1. 食品からの微生物検査標準法検討委員会の構成

このプロジェクトが発足すると、まもなく、その「目的」に関して色々な方からご意見を頂くようになった。標準法といっても、一意に決められるものではないし、実用的には色々な変法を駆使して妥当な結論を出している、何よりもコロニーを観る目を持っているかどうかが大事なことから、機械的にプロトコルを詳細に決めても結局は使えないのではないかと、などなど。こうしたご意見は、当初は委員会内でも、複数の委員から出され、その議論に多くの時間を費やした。議事録をご覧になると、その状況がよくお分かりいただけると思う。ここで、再度強調しておきたい点は、この委員会の目的は、(1)「誰もが従わなければならない標準法」を策定する、のではなくて、(2)「誰もが使うことが出来る標準法」を策定すること、である。したがって、一旦、本委員会で「標準法」として提案しても、それに代わる変法や迅速法が次々に提案されることを想定しており、それらのバリデーションの際に、対照法として利用できる「国際的に通用する標準法」を、是非、提案しようではないか、という趣旨である。今後、新たに提案されるであろう、多くの変法や迅速法などのバリデーションに際して、それを、是非、国内で自前でするようにしておこうではないか、しかも、それが国際的にも通用するものとして、それを、該委員会では最終的に提示する策定案という意味で、「最終案」と呼ぶことにしている。

該委員会では、最終案に至るまでの作業段階を図2に示すような4段階(ステージ)に分けている。簡単には以下ようになる。

- ①ステージ1: 広く意見を求めるために必要な「原案」の提示。
- ②ステージ2: コラボスタディーを行うための具体的プロトコルのたたき台「作業部会案」の提示。
- ③ステージ3: コラボスタディーを実施するためのプロトコル「作業部会試案」を提示してコラボレーターを募集。
- ④ステージ4: コラボスタディーの結果に基づく評価、および標準法としての「最終案」の提示、からなる。

4 検討委員会での議論の具体的内容

これまでの委員会を経て現在、最終年度を迎えているが、予想通り、ステージ1の段階で多くの議論がなされた。その中では、サルモネラの場合が一步先んじてステージ2の段階を議論しているので、以下に引用する。腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌については、これからステージ2の段階に入るところである。図3のプロトコルが現在、議論中の作業部会案である。

食品検体25gを検体袋に入れて緩衝ペプトン水(BPW)225mlを加え、ストマッカー、あるいは揉み洗い処理し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間、前培養する。その培養液0.1mlをRappaport-Vassiliadis (RV) 培地10mlに、また、1.0mlをTetrathionate (TT) 培地10mlに接種し、 $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間、両培地で培養する。RVとTT培養液は各々よく混和後に1白金耳量を2種類の分離平板培地(硫化水素産生により判定する培地および硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地)に画線塗抹し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養する。各分離平板培地に発育・増殖した定型的あるいは疑わしい集落を2個ずつ釣菌して、Triple Sugar Iron (TSI) 培地とLysine Indole Motility (LIM) 培地等に接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養する。培養後、TSI培地にあつては高層部黄変・黒変・ガス産生(高層部における気泡または亀裂の発生)および斜面部が赤変したものを、LIM培地にあつては培地全体が紫変、インドール陰性、運動性陽性のものをサルモネラと判定するが非定型的な性状を示すサルモネラが疑われる場合はさらに詳しく生化学的性状を調べて同定する。血清学的試験としてO多価血清での凝集試験を行い、さらにO抗原血清型について決定する。

さらに上記で用いる培地の作製保存方法、各培地への接種量などについての注意点が付記されている。例えば、BPW培養液のTT培地への接種量は国際的な整合性をとるため、従来使われていた0.5mlから1.0mlへ変更した、BPW培養液のRV培地への接種量は選択性を確保するため0.1mlとした、TT基礎培地(BAM準拠培地を使用)は作製後1週間冷蔵庫で保存可能であるが、ヨウ素溶液添加後には作製当日使用のこと、などである。

原案（ステージ1）：
 ・標準法検討委員会（親委員会）は、作業部会を立ち上げる。
 ・作業部会は文献調査や情報収集により、関連する国際的な標準法の比較表を作成し、それを基に“原案のたたき台”を親委員会に提出する。
 ・親委員会では、このたたき台を議論し、当該検査法の方向性を確認した上で、原案としてまとめる。
 ・その作成方針を含めて、インターネット上に公開、期間を設定し意見を求める。
 また、文書にて第三者組織（食品微生物学会や、衛生微生物技術協議会等）の意見を求める。

作業部会案（ステージ2）：
 ・各作業部会は、国立研究機関、大学、地方衛生研究所、食肉検査所、登録検査機関、検査所等の協力を受けながら原案の検討箇所を設定する。
 ・各作業部会は、実験データから細かいプロトコルの検討を行い、重要な指摘がある場合はそれを考慮した“作業部会案”を作成する。
 ・作業部会案は、親委員会に提出するとともに、一定期間インターネット上で公開し広く意見を求める。
 さらに、第三者組織の意見を求める。

作業部会試案（ステージ3）：
 ・親委員会は、インターネットや第三者組織の意見などを参考とし、作業部会案について議論し、作業部会試案とする。
 ・コロバスタディーの規模や協力施設の数等を示し、インターネット上で公開し、意見を求める。
 ・コロバスタディー参加者を募る。

最終案（標準法）（ステージ4）：
 ・作業部会は、複数の検査機関でコロバスタディーによりその実行性を評価する。
 ・親委員会は、コロバスタディーの結果を受け、作業の進捗が方針に従って行われているかの確認を行った後、最終案（標準法）として公開する。

図2. 標準法策定に至る4ステージ

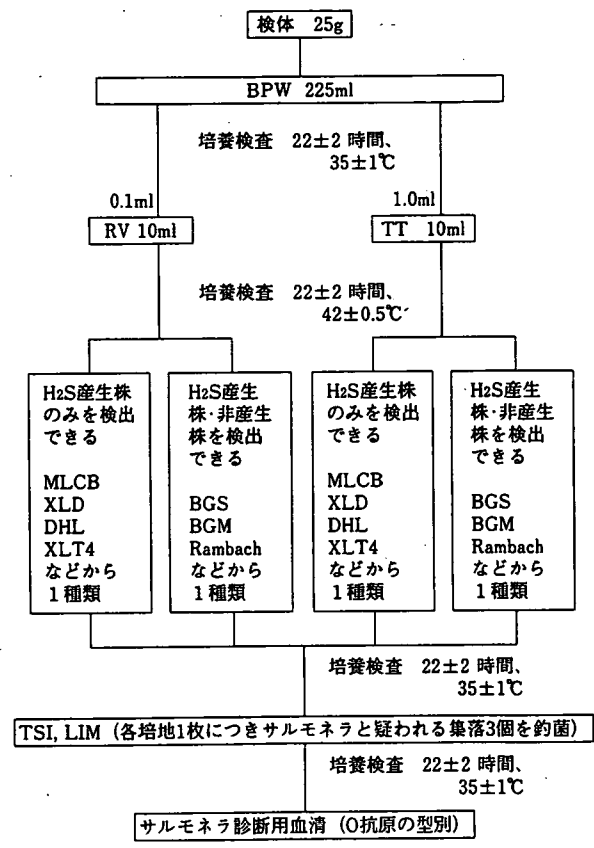


図3. サルモネラ検出試験法プロトコル