

Figure 8. Performance of the instant call of target cells to MVC. **A:** Mouse ES cell. **B:** Cultured tobacco BY-2 cell. **C:** Consecutive registration of multiple mouse ES cells and successive microinjection of a fluorescent dye and their observation with a different optical apparatus: (a) before and (b) after microinjection of fluorescent dye with IX-71, (c) bright field image, and (d) fluorescent image observed with LSM510 system. White arrows indicate target cells. Cell_i , Cell_{i+1} , ..., Cell_{i+n} indicate a part of consecutive numbers in many cells. **D:** Consecutive observation of the cell growth process, a, b, and c indicate three different single-cells in different dishes. Each single-cell at 1st day grew into a colony 100 μm in diameter at 6th day.

is applicable to any type of dishes produced by many companies. Therefore, the disposable CS chip can be used by many researchers and students who are engaged in various single-cell experiments with different types of culture dishes.

ACKNOWLEDGMENTS

Funds for this work were provided to H. Matsuoka from CREST of Japan Science and Technology Agency on the research subject The High Throughput Creation of Disease Model Cells and the Analysis of Their Function. We thank T. Kisoo, M. Okamoto, K. Sugiyama, K. Nitta, H. Ichikawa, Y. Masuda, Y. Irie, and N. Ueda for their valuable advice about metal mold machining. We also thank H. Niwa of the Center for Developmental Biology, Riken Institute, Kobe, Japan, for providing us with feeder free mouse ES cells.

REFERENCES

- ASHBURNER, M., BALL, C.A., BLAKE, J.A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J.M., DAVIS, A.P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S.S., EPPIG, J.T., HARRIS, M.A., HILL, D.P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIA, A., LEWIS, S., MATESE, J.C., RICHARDSON, J.E., RINGWALD, M., RUBIN, G.M. & SHERLOCK, G. (2000). Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25, 25–29.
- KAMENSKY, L.A. & KAMENSKY, L.D. (1991). Microscope-based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry. *Cytometry* 12, 381–387.
- KATO, K., MATSUMOTO, T., KOIWA, A., MIZUSAKI, S., NISHIDA, K., NOGUCHI, M. & TAMAKI, E. (1972). Liquid suspension culture of tobacco cells. *Ferment Technol Today*, 689–695.
- MARUYAMA, H., ARAI, F., FUKUDA, T. & KATSURAGI, T. (2005). Immobilization of individual cells by local photo-polymerization on a chip. *Analyst* 130, 304–310.
- MATSUOKA, H., KOMAZAKI, T., MUKAI, Y., SHIBUSAWA, M., AKANE, H., CHAKI, A., UETAKE, N. & SAITO, M. (2005). High throughput easy microinjection with a single-cell manipulation supporting robot. *J Biotechnol* 116, 185–194.
- MATSUOKA, H. & SAITO, M. (2006). High throughput microinjection technology toward single-cell bioelectrochemistry. *Electrochemistry* 74, 12–18.
- MATSUOKA, H., YAMADA, Y., MATSUOKA, K. & SAITO, M. (2006). High throughput microinjection technology for the single-cell analysis of BY-2 in vivo. In *Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics*, Nagata, T., Matsuoka, K. & Inze, D. (Eds.), pp. 339–346. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- MEER, C.C. & PANTANO, P. (2001). Spatial confinement of avidin domains in microwell arrays. *Lab Chip* 1, 158–163.
- OVERBEEK, R., BEGLEY, T., BUTLER, R.M., CHOUDHURI, J.V., CHUANG, H.-Y., COHOON, M., DE CRECY-LAGARD, V., DIAZ, N., DISZ, T., EDWARDS, R., FONSTEIN, M., FRANK, E.D., GERDES, S., GLASS, E.M., GOESMANN, A., HANSON, A., IWATA-REUYL, D., JENSEN, R., JAMSHIDI, N., KRAUSE, L., KUBAL, M., LARSEN, N., LINKE, B., MCHARDY, A.C., MEYER, F., NEUEWGER, H., OLSEN, G., OLSON, R., OSTERMAN, A., PORTNOY, V., PUSCH, G.D., RODIONOV, D.A., RUCKERT, C., STEINER, J., STEVENS, R., THIELE, I., VASSIEVA, O., YE, Y., ZAGNITKO, O. & VONSTEIN, V. (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* 33, 5691–5702.
- PARK, J., JUNG, S.-H., KIM, Y.-H., KIM, B., LEE, S.-K. & PARK, J.-O. (2005). Design and fabrication of an integrated cell processor for single embryo cell manipulation. *Lab Chip* 5, 91–96.
- RETTING, J.R. & FOLCH, A. (2005). Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays. *Anal Chem* 77, 5628–5634.
- SMITH, A.G. (1991). Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J Tiss Cult Methods* 13, 89–94.
- YANG, M., LI, C.W. & YANG, J. (2002). Cell docking and on-chip monitoring of cellular reactions with a controlled concentration gradient on a microfluidic device. *Anal Chem* 74, 3991–4001.
- YASUKAWA, T., GLIDLE, A., COOPER, J.M. & MATSUE, T. (2005). Electroanalysis of metabolic flux from single-cells in picoliter volume microsystems. *Anal Chem* 74, 5001–5008.

Humoral Immune Responses Against Norovirus Infections of Children

Nobuhiro Iritani,¹ Toshiyuki Seto,^{2,4} Hideji Hattori,² Katsurou Natori,³ Naokazu Takeda,³ Hideyuki Kubo,¹ Tsunekazu Yamano,² Minoru Ayata,⁴ Hisashi Ogura,⁴ and Yoshiyuki Seto^{4,5*}

¹Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, Tennoji-ku, Osaka, Japan

²Department of Pediatrics, Osaka City University Medical School, Abeno-ku, Osaka, Japan

³Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

⁴Department of Virology, Osaka City University Medical School, Abeno-ku, Osaka, Japan

⁵Laboratory of Veterinary Microbiology, Osaka Prefecture University, Naka-ku, Sakai, Osaka, Japan

In 2 infants with gastroenteritis associated with Norovirus (NoV), serum immunoglobulin (Ig) G, IgM, IgA, and fecal IgA antibody responses against NoV were examined by enzyme-linked immunosorbent assay using 11 different antigenic and genetic types of NoV virus-like particles expressed in insect cells. These two cases were putative primary single NoV infections, because antibodies against NoVs were not detected in acute-phase serums. In one of two cases, long-term excretion of virus RNA for 33 days was observed. Serum IgG responses demonstrated strong seroresponse to the homologous type, and weak seroresponse to the heterologous types within the genogroup. After more than 2 years, the IgG antibody titer remained high to the homologous type and low to the heterologous type within the genogroup. IgM and IgA were specific to the homologous type. IgM was short lived and the serum IgA antibody titer remained low to the homologous type for a long period. These results improve our understanding of the humoral immune response to NoV infection. **J. Med. Virol. 79:1187–1193, 2007.**

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: norovirus; primary infection; humoral immune response; ELISA; virus-like particle

INTRODUCTION

Noroviruses (NoVs) in the family *Caliciviridae* are the major cause of acute nonbacterial gastroenteritis in all age groups, and NoV infections have occurred worldwide as outbreaks and sporadic cases [Green et al., 2001].

NoVs are a genetically and antigenically diverse group. Genetic analysis of the RNA polymerase and capsid region revealed that human NoVs can be divided into two genogroups, genogroup I (GI) and genogroup II (GII) [Green et al., 1994; Wang et al., 1994]. Recent studies of genotyping on the basis of capsid N-terminal/shell (N/S) domain classified NoVs into at least 31 genotypes (14 genotypes in GI and 17 genotypes in GII) [Katayama et al., 2002; Kageyama et al., 2004]. These viruses cannot be grown in cell culture, but the expression of the major capsid protein (VP1) in insect cells resulted in the formation of virus-like particles (VLPs) that are morphologically and antigenically similar to native NoV [Jiang et al., 1992; Lew et al., 1994]. Antigenic analysis using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with VLPs and hyperimmune antisera showed that the genetic and antigenic relationship corresponded well [Kobayashi et al., 2000a,b,c; Katayama et al., 2002; Kamata et al., 2005; Hansman et al., 2006], but there were unusual cross-reactivities between certain genogroups and/or genotypes based on the antibody ELISA [Hansman et al., 2006]. Serological studies using these recombinant VLP (rVLPs) have shown a high prevalence and broad responses of NoV-specific antibodies both in children and adults [Parker et al., 1994a, 1995; Noel et al., 1997; Farkas et al., 2003]. IgM, IgA, and IgG serologic responses in adult volunteers and patients also reported [Treanor et al., 1993;

Grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

*Correspondence to: Yoshiyuki Seto, Laboratory of Veterinary Microbiology, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan.
E-mail: seto@vet.osakafu-u.ac.jp

Accepted 6 April 2007

DOI 10.1002/jmv.20897

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

Gray et al., 1994; Rockx et al., 2005a]. But almost all sera used in previous studies had pre-existing antibodies against many types of NoV. Therefore, it was not clear whether the production of cross-reactivity antibodies emerged after primary infection or by multiple infections during their lifetime. In addition, there is little information about the immune response to NoV infections in infants, including primary infection. To interpret the cross-reactivity of antibodies to NoVs, it is necessary to investigate the immune response to primary NoV infection.

In the present study, serum and fecal samples from infants infected with NoV were examined for specific IgM, IgA, and IgG using ELISA with 11 different genotypes of VLPs. This study describes the cross-reactivity and specific antibody responses in putative primary NoV infection.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Fecal or serum samples were collected from 2 infants suffering from nonbacterial gastroenteritis at their medical examination and follow-up in the hospital. After the ethical discussion in this working group, we concluded that this study was ethically acceptable. Informed consent for this study was obtained from their parents. The histo-blood group antigen (HBGA) type of the two infants was unknown. Their development was normal. After recovery from diarrhea, their prognosis was favorable. These two cases were sporadic and not related to each other.

Patient A (male): He had acute gastroenteritis at 2 years in December. The major symptoms were diarrhea and vomiting. The diarrhea was sometimes accompanied by benign afebrile convulsions. He had mild diarrhea for about 6 weeks. During the diarrhea, five fecal and serum samples on the 5th, 12th, 18th, 33rd, and 40th days post-onset were collected. After recovery from diarrhea, one fecal and one serum sample on the 60th day post-onset, and one serum sample at 2 years and 10 months post-onset were collected. Re-infection of NoVs during this long period was unknown.

Patient B (male): He had acute gastroenteritis at 1 year in January. The major symptom was diarrhea. The diarrhea was sometimes accompanied by benign afebrile convulsions. He had mild diarrhea for about 1 week. During the diarrhea, one fecal and one serum sample on the 2nd day post-onset were collected. After recovery from diarrhea, one serum sample on the 105th day post-onset was collected. He did not have gastroenteritis again during the period studied.

Detection of NoVs and Other Viruses in Fecal Specimens

NoVs were detected using RT-PCR with primer pairs, Ando's G1 (SR33, SR48, SR50, and SR52) and G2 (SR33 and SR46) primer sets [Ando et al., 1995] amplifying a 123-bp RNA polymerase region, mon381/mon383 [Noel et al., 1997] amplifying a 322-bp capsid region, and

SK primers [Kojima et al., 2002] amplifying a 344-bp capsid N/S region as previously described [Iritani et al., 2000; Seto et al., 2005]. Other gastroenteritis viruses were detected with our laboratory method [Iritani et al., 2003]. Briefly, antigens of group A rotavirus and enteric adenoviruses (serotypes 40 and 41) were tested using commercially available antigen ELISA kits, ROTACLONE, and ADENOCLONE-E, respectively, according to the instructions (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH). Enteroviruses and adenoviruses were tested using cell cultures with Vero and RD-18S cells. The virus-negative samples for group A rotavirus, adenoviruses, enteroviruses, and NoVs were tested using electron microscopy (EM) [Iritani et al., 2000], to directly detect virus particles with a negative stain.

Genetic Analysis of NoVs

Sequencing of RT-PCR products and phylogenetic analysis were performed as previously described [Iritani et al., 2000; Seto et al., 2005]. Genotyping based on the Capsid N/S domain was performed as described by Katayama et al. [2002] and Kageyama et al. [2004].

Expression of VLPs

Eleven VLPs (four genotypes in GI and seven genotypes in GII), expressed in insect cells infected with recombinant baculoviruses carrying the capsid gene, were used for ELISA (Table I). These VLPs were produced in the Department of Virology II, National Institute of Infectious Disease. The expressed capsid antigens were purified by a sucrose gradient followed by CsCl gradient centrifugation and confirmed by EM, as previously described [Kobayashi et al., 2000a,b,c; Tamura et al., 2000; Kamata et al., 2005].

Antibody ELISA for Serum Samples

The wells of 96-well flat-bottom microtiter plates (IMMULON2 HB, Dynex Technologies, Inc., Chantilly, VA) were coated with 100 μ l of each VLP (0.5 μ g/ml in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)), and incubated at 4°C overnight. The wells were then washed twice with 10 mM phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBS-T; pH 7.2) using a micro plate washer (S8/12J model, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) and were blocked at room temperature for 1 hr with 200 μ l of Block Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.). The wells were washed twice and twofold serial dilutions in PBS-T containing 25% Block Ace (25% BA/PBS-T) of serum samples, starting at a 1:50 dilution, were added to antigen-coated plates. After incubation for 1 hr at 37°C, the wells were washed five times, 100 μ l of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgG (heavy and light chains), IgM (μ -chain), or IgA (α -chain)-specific antibodies (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA) at a dilution of 1:4,000 in 25% BA/PBS-T were added, and the plates were incubated for 1 hr at 37°C. After washing the wells five times, 100 μ l of substrate, 0.4 mg/ml of *O*-phenylenediamine (Sigma Chemical Co.

TABLE I. Description of 11 VLPs Used in This Study

Genogroup	Genotype	VLP	Strain	Accession no.	References
GI	GI/1	rSeto	Aichi124/1989/JP (Seto)	AB031013	Kobayashi et al. [2000b]
	GI/2	rFUV	Funabashi 258/1996/JP	AB078335	Tamura et al. [2000]
	GI/3	r645	Kashiwa645/1999/JP	BD011871	Kamata et al. [2005]
	GI/4	rChiba	Chiba407/1987/JP	AB022679	Kobayashi et al. [2000a]
GII	GII/3	r809	Sanbu809/1998/JP	BD011876	Kamata et al. [2005]
	GII/4	rNAV	Narita104/1997/JP	AB078336	Kitamoto et al. [2002]
	GII/5	r745	Ichikawa745/1998/JP	BD011877	Kamata et al. [2005]
	GII/6	rUEV	Ueno7k/1994/JP	AB078337	Tamura et al. [2000]
	GII/7	r10-25	Osaka10-25/1999/JP	BD011881	Kamata et al. [2005]
	GII/12	rChitta	Chitta76/1996/JP	AB032758	Kobayashi et al. [2000c]
	GII/14	rKAV	Kashiwa47/2000/JP	AB078334	Kitamoto et al. [2002]

Ltd., St. Louis, MO) was added and the plates were incubated for 30 min at room temperature. The reaction was stopped with 50 μ l of 4N H₂SO₄. Absorbance at 492 nm (A492) was measured with a microplate reader (Multiskan MS-UV model, Labsystems OY, Helsinki, Finland). IgG, IgM, or IgA titers were defined as the highest dilution of serum given an A492 that was threefold higher than the A492 of the corresponding antigen control well.

Antibody ELISA for Fecal IgA

Five fecal samples on the 5th, 12th, 18th, 40th, and 60th days from Patient A were used for ELISA to detect VLP-specific IgA. There was not sufficient volume of the other samples for ELISA. Fecal samples were prepared as a 10% (wt/vol) suspension in PBS containing 10% fetal bovine serum (FBS). Each fecal suspension was homogenized, and centrifuged at 12,000g for 10 min. The supernatant was used for ELISA to detect VLP-specific IgA.

The plates were coated with VLPs as described above. Twofold serial dilutions of fecal suspensions were made in PBS containing 10% FBS. The diluted suspensions were added to antigen-coated plates; thereafter, the ELISA protocol was performed as described above. Virus-negative fecal samples were included on each plate as a negative control. The sample was considered positive for VLP-specific IgA when the absorbance of the well containing fecal samples from patient A was threefold higher than that of the negative control well.

Nucleotide Sequence Accession Numbers

The nucleotide sequences determined in this study were deposited in DDBJ with the following accession numbers: AB089871, OCS980730 (patient A); AB262773, OCS000564 (patient B).

RESULTS

Detection of the Viruses in Stool Specimens From Two Infants With Gastroenteritis

NoVs were detected in two infants by RT-PCR (Table II). In patient A, who had mild diarrhea for about

6 weeks, four fecal samples on the 5th, 12th, 18th, and 33rd day were NoV-positive, although the sample on the 33rd day produced a thin band (data not shown). Those four RT-PCR products had identical nucleotide sequences. In patients B, who had mild diarrhea, fecal samples on the 2nd were NoV-positive, respectively. These stool specimens were negative to other etiological agents of gastroenteritis. NoV strains from the two infants were classified as GII/4 genotype in the capsid N/S region (Fig. 1). These two NoV strains were closely related, with 100% amino acid identity and 98.8% nucleotide identity in the RNA polymerase region, and 100% amino acid identity and 98.5% nucleotide identities in the capsid region. Pairwise comparison of the capsid N/S region showed that these two NoV strains had 100% amino acid identity and 98.9% nucleotide identities to NAV (GII/4), 73.4–78.7% amino acid identities to the other 6 GII VLP strains, and 60.2% amino acid identities to the 4 GI VLP strains.

Detection of Specific Antibodies to 11 VLPs in the Two Infants

The specific IgG antibody titer to the 11 VLPs is shown in Table II. In two acute-phase serum samples from patient A on the 5th day and patient B on the 2nd day, none of the specific IgG antibodies to all VLPs were detected (<1:50). IgG antibodies to rNAV in patient A showed that the first detection was the 12th day post-onset, and the highest titer was observed on the 33rd to 60th day (1:25,600). IgG antibodies to other five GII VLPs excluding r809 appeared from the 18th to 40th day post-onset and their appearance had a time lag. In a serum sample from patient A at 2 years and 10 months, high IgG titers (1:6,400) to rNAV have persisted, and those IgG titers to the other six GII VLPs were the same or higher than other convalescent-phase serum. In patient B, IgG antibodies to rNAV and other six GII VLPs including r809 were detected with high titer (1:51,200) and low (1:100 – 1:200), respectively. There were no specific IgG antibodies to the four GI VLPs in any serum samples.

Specific IgM antibodies to rNAV were detected in four serum samples on the 12th, 18th, 33rd, and 40th days from patient A (Table III). Two serum samples on the 12th and 18th days had a high titer (1:1,600), and later

TABLE II. Detection of IgG to the 11 Kinds of VLPs in Serum Samples Collected From Infantile Patients by ELISA

Patient (age)	Time post-onset of illness	Symptoms*	RT-PCR ^b	Genogroup I					Genogroup II				
				rSeto (GI/1)	rFUV (GI/2)	r645 (GI/3)	rChiba (GI/4)	r809 (GI/5)	rNAV (GI/6)	r745 (GI/7)	rUEV (GI/8)	r10-25 (GI/9)	rChitta (GI/10)
				rSeto (GI/1)	rFUV (GI/2)	r645 (GI/3)	rChiba (GI/4)	r809 (GI/5)	rNAV (GI/6)	r745 (GI/7)	rUEV (GI/8)	r10-25 (GI/9)	rChitta (GI/10)
A (2 years)	5th day	D, V, AC	+	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	12th day	D	+	<50	<50	<50	<50	<50	800	<50	<50	<50	<50
	18th day	D, AC	+	<50	<50	<50	<50	<50	12,800	<50	<50	<50	<50
	33rd day	D, AC	+w	<50	<50	<50	<50	<50	25,600	200	<50	50	<50
	40th day	D, AC	-	<50	<50	<50	<50	<50	25,600	200	<50	100	100
	60th day	Recovered	-	<50	<50	<50	<50	<50	25,600	200	<50	100	100
B (1 year)	2 years 10 months	Normal	NT	<50	<50	<50	<50	400	6,400	400	200	200	400
	2nd day	D, AC	+	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
	105th day	Recovered	NT	<50	<50	<50	<50	100	51,200	100	100	200	100

Bold: homologous type.

*D, Diarrhea; V, vomiting; AC, afebrile convulsions.

^b+, Positive; +w, positive but weak band; -, negative; NT, not tested.

samples had a reduction in the IgM titer. There were no specific IgM antibodies to rNAV in serum samples from patient B. IgM antibodies to the other 10 VLPs were not detected in any serum samples.

Specific IgA antibodies to rNAV were detected in all serum samples excluding two acute-phase sera on the 5th day of patient A and the 2nd day of patient B (Table III). For patient A, three serum samples on the 18th, 33rd, and 40th days had a high IgA antibody titer (1:800–1:1,600) and a serum sample at 2 years and 10 months had a low titer (1:100) to rNAV. IgA antibodies to the other 10 VLPs were not detected in any serum samples excluding a serum sample from patient A at 2 years and 10 months to r809 (Table III).

In the five fecal samples of patient A, specific IgA antibodies to rNAV were detected in three samples collected after the 18th day post-onset (Table III). IgA antibodies to the other 10 VLPs were not detected in any fecal samples.

DISCUSSION

From the detection of NoV-specific antibodies in the two patient sera, it appeared that these two patients were putative primary single infections of NoV because antibodies against NoVs were not detected in acute-phase sera. These two cases showed three distinct features compared to the usual NoV-associated gastroenteritis; obstinate mild diarrhea for 1 and 6 weeks, long-term excretion of virus RNAs from patient A for 33 days, and benign afebrile convulsions. The detection of NoVs in patient A indicated that his diarrhea was related to NoV infection up to 33 days, but the direct relation between diarrhea and NoV infection is then unclear, because NoV was not detected from fecal samples of diarrhea on the 40th day post-onset. In a recent study, Rockx et al. [2002] showed that children under 1 year had a tendency toward long-term duration of diarrhea up to the 28th day and excretion of the virus gene up to the 22nd day. Some reports also showed the long-term duration of diarrhea in NoV infections in patients under 2 years [Sakai et al., 2001; Tsugawa et al., 2006]. Our previous study showed that benign afebrile convulsion-associated diarrhea in NoV infections was observed in 6.7% of children under 2 years [Iritani et al., 2003]. Primary NoV infection or age under 2 years may be related to those three distinct features, persistent diarrhea, viral excretion, and afebrile convulsion. Therefore, these two cases in this study were considered general infection cases with NoVs.

Our data showed that the kinetics of serum antibody responses for NoV infection as follows, the peak of IgM in 5th to 12th day, decrease in 18th to 33rd day, and disappearance in 40th to 60th day; the peak of IgA in 12th to 18th day, decrease in 40th to 60th day, and persistence for a long period with low titer; the peak of IgG in >18th day, and persistence for a long period with high titer. This kinetics of serum antibody responses is similar to those seen in previous studies [Erdman et al., 1989; Gray et al., 1994; Brinker et al., 1998, 1999]. Fecal

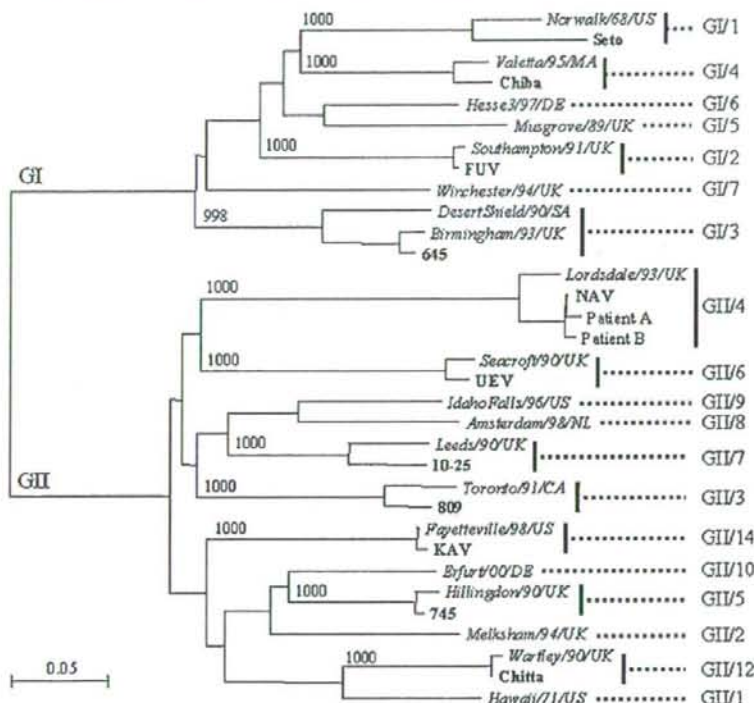


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the capsid N/S domain region (GI, 294 nt; GII, 282 nt) constructed using neighbor-joining method. NoV strains for VLP and reference strains are represented in boldface and italics, respectively. Bar indicates the number of substitutions per site. The numbers on each branch indicate the bootstrap value of clusters including NoV strains for VLP. GenBank accession numbers for reference strains used in this analysis are as follows: Amsterdam/98/NL, AF195848; Birmingham/93/UK, AJ277612; DesertShield/90/SA,

U04469; Erfurt/00/DE, AF427118; Fayetteville/98/US, AY113106; Hawaii/71/US, U07611; Hesse/39/DE, AF093797; Hillingdon/90/UK, AJ277607; Idaho Falls/96/US, AY054299; Leeds/90/UK, AJ277608; Lordsdale/93/UK, X86557; Melksham/94/UK, X81879; Musgrove/89/UK, AJ277614; Norwalk/68/US, M87661; Seacroft/90/UK, AJ277620; Southampton/91/UK, L07418; Toronto/91/CA, U02030; Valetta/95/MA, AJ277616; Warrley/90/UK, AJ277618; Winchester/94/UK, AJ277809.

IgA antibodies specific to rNAV were detected from the 18th day post-onset. This specific fecal IgA seems to be followed by the reduction of PCR product or virus excretion, suggesting that fecal IgA was effective in the excretion of NoV.

The cross-reactivity of IgG in this study showed lower reaction to the heterologous type within the genogroup. Many serological studies in adults or children also demonstrated cross-reactivity within and between the genogroups [Treanor et al., 1993; Noel et al., 1997; Hale et al., 1998; Smit et al., 1999; Farkas et al., 2003; Rockx et al., 2005a]. Some reports showed that cross-reactivity was stronger or limited to the genogroups [Noel et al., 1997; Hale et al., 1998; Farkas et al., 2003]. In antibody ELISA using VLPs and their hyperimmune sera, low levels of cross-reaction were observed [Kamata et al., 2005; Hansman et al., 2006]. These findings indicated that NoV strains had a common epitope to stimulate the production of IgG. The common epitopes within and between the genogroups were previously described [Kitamoto et al., 2002; Yoda et al., 2003; Parker et al., 2005]. Yoda et al. [2003] described that the common

epitope between genogroups may be located in the N-terminus of capsid protein. This region is highly conserved and located in the inner part of capsid protein surrounding the RNA genome [Prasad et al., 1999]. From the above results, cross-reactivity between genogroups may be difficult to produce.

As described in previous reports [Parker et al., 1994a, 1995; Smit et al., 1999], antibodies to NoVs were acquired at a young age and had cross-reactivity; therefore, it is unclear whether cross-reactive antibodies occurred after single infection, or after multiple infections with different genotypes of NoV. Our study demonstrated that cross-reactive antibodies to heterologous types were produced after primary single infection. We could observe that the production of IgG to the heterologous type was later and lower than the homologous type, and had a time lag in patient A. The time lag of IgG production may be related to antigenic differences among these GII NoV strains. The seroconverted against r809 of IgG and IgA in a serum of patient A at 2 years and 10 months are uncertain because the serum was obtained too long after the last serum sample was negative.

TABLE III. Detection of Serum IgM, IgA, and Fecal IgA to the 11 VLPs in Infantile Patients by ELISA

Patient (age)	Time post-onset of illness	Reciprocal of serum dilution						Existence of specific fecal IgA ^a		
		IgM		IgA		RT-PCR ^a	Other VLPs	rNAV (GII/4)	r809 (GII/3)	rNAV (GII/4)
		rNAV (GII/4)	Other VLPs	rNAV (GII/4)	Other VLPs					
A (2 years)	5th day	<50	<50	<50	<50	+	<50	-	-	-
	12th day	1,600	<50	50	<50	+	<50	-	-	-
	18th day	1,600	<50	1,600	<50	+	<50	+	+	NT
	33rd day	200	<50	800	<50	+	<50	NT	+	NT
	40th day	200	<50	1,600	<50	-	<50	+	+	-
	60th day	<50	<50	50	<50	-	<50	+	+	NT
B (1 year)	2 years 10 months	<50	<50	100	<50	NT	50	NT	NT	NT
	2nd day	<50	<50	<50	<50	+	<50	NT	NT	NT
	105th day	<50	<50	400	<50	NT	<50	NT	NT	NT

Bold: homologous type.

*, Positive; +w, positive but weak band; -, negative; NT, not tested.

A serum sample from patient A at 2 years and 10 months had IgG antibodies to the homologous type with a high titer and the heterologous type within the genogroup with a low titer. The existence of IgG antibodies to VLPs may have been maintained without re-infection or emerged from re-infection. Patient A might have been re-infected with GII/4 NoV or other GII NoV excluding these seven genotypes in GII, because the IgG titer to the heterologous type was \geq twofold higher and IgM responses were not observed. The data of IgG analysis suggested that the cross-reactivity of IgG is produced in the primary infection and then the level of IgG against NoVs will be raised each time NoV infection occurs throughout life.

IgM and IgA antibody responses were specific to the homologous genotype. Previous studies using adult sera also suggested that serum IgM and IgA antibodies might be more specific for the homologous type than the heterologous type [Parker and Cubitt, 1994b; Brinker et al., 1998, 1999; Hale et al., 1998; Rockx et al., 2005a; Tsugawa et al., 2006]. To interpret the cross-reactivity of IgM and IgA, further investigations are needed based on cases of NoV primary infection.

Recent studies have shown that HBGA may function as receptors of NoV through outbreak investigation [Hennessy et al., 2003; Rockx et al., 2005b] and volunteer challenge studies [Hutson et al., 2002; Lindesmith et al., 2003]. The relation between HBGA and immune response to NoV infection was unknown, because the HBGA type of these two patients was unknown, but these are cases, which were naturally infected with NoV and the typical symptoms appeared, and will represent general immune response to primary NoV infection. This is the first study on humoral immune response in putative primary NoV infection using 11 different antigenic and genetic types of VLPs. Our data will improve understanding of the humoral immune response to NoV infection. However, only two cases were examined in this study. To interpret the immunity for NoV infection, further investigations at the human level are needed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. K. Haruki and T. Murakami for supporting our work. This work was partially supported by a Grant for Research on Emerging and Reemerging Diseases from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

REFERENCES

- Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI. 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* 33:64-71.
- Brinker JP, Blacklow NR, Estes MK, Moe CL, Schwab KJ, Herrmann JE. 1998. Detection of Norwalk virus and other genogroup I human caliciviruses by a monoclonal antibody, recombinant antigen-based immunoglobulin M capture enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 36:1064-1069.
- Brinker JP, Blacklow NR, Jiang X, Estes MK, Moe CL, Herrmann JE. 1999. Immunoglobulin M antibody test to detect genogroup II Norwalk-like virus infection. *J Clin Microbiol* 37:2983-2986.

- Erdman DD, Gary GW, Anderson LJ. 1989. Serum immunoglobulin A response to Norwalk virus infection. *J Clin Microbiol* 27:1417-1418.
- Farkas T, Thornton SA, Wilton N, Zhong W, Altaye M, Jiang X. 2003. Homologous versus heterologous immune responses to Norwalk-like viruses among crew members after acute gastroenteritis outbreaks on 2 US navy vessels. *J Infect Dis* 187:187-193.
- Gray JJ, Cunliffe C, Ball J, Graham DY, Desselberger U, Estes MK. 1994. Detection of immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG Norwalk virus-specific antibodies by indirect enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen in adult volunteers challenged with Norwalk virus. *J Clin Microbiol* 32:3059-3063.
- Green SM, Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. 1994. Human enteric Caliciviridae: A new prevalent small round-structured virus group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. *J Gen Virol* 75:1883-1888.
- Green KY, Chanick RM, Kapikian AZ. 2001. Human caliciviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields virology*, 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp 841-874.
- Hale AD, Lewis DC, Jiang X, Brown DWG. 1998. Homotypic and heterotypic IgG and IgM antibody responses in adults infected with small round structured viruses. *J Med Virol* 54:305-312.
- Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N. 2006. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 87:909-919.
- Hennessy EP, Green AD, Connor MP, Darby R, MacDonald P. 2003. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 188:176-177.
- Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. 2002. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 185:1335-1337.
- Iritani N, Seto Y, Haruki K, Kimura M, Ayata M, Ogura H. 2000. Major change in the predominant type of Norwalk-like viruses in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, between April 1996 and March 1999. *J Clin Microbiol* 38:2649-2654.
- Iritani N, Seto Y, Kubo H, Murakami T, Haruki K, Ayata M, Ogura H. 2003. Prevalence of Norwalk-like virus infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* 41:1756-1759.
- Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66:6527-6532.
- Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K. 2004. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* 42:2988-2995.
- Kamata K, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kobayashi S, Sakae K, Oseto M, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Katayama K, Tanaka T, Takeda N, Taniguchi K. 2005. Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of noroviruses in stool samples. *J Med Virol* 76:129-136.
- Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojohori T, Takeda N. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299:225-239.
- Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK. 2002. Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J Clin Microbiol* 40:2459-2465.
- Kobayashi S, Sakae K, Natori K, Takeda N, Miyamura T, Suzuki Y. 2000a. Serotype-specific antigen ELISA for detection of chiba virus in stools. *J Med Virol* 62:233-238.
- Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Shinozaki K, Okada M, Ishiko H, Kamata K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N. 2000b. Molecular cloning, expression, and antigenicity of Seto virus belonging to genogroup I Norwalk-like viruses. *J Clin Microbiol* 38:3492-3494.
- Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Ishiko H, Kamata K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N. 2000c. Expression of recombinant capsid proteins of chiba virus, genogroup II Norwalk virus, and development of an ELISA to detect the viral antigen. *Microbiol Immunol* 44:687-693.
- Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 100:107-114.
- Lew JF, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY. 1994. Molecular characterization and expression of the capsid protein of a Norwalk-like virus recovered from a Desert Shield troop with gastroenteritis. *Virology* 200:319-325.
- Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendu J, Baric R. 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9:548-553.
- Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe SS, Glass RI. 1997. Correlation of the patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol* 53:372-383.
- Parker SP, Cubitt WD. 1994b. Measurement of IgA responses following Norwalk virus infection and other human caliciviruses using a recombinant Norwalk virus protein EIA. *Epidemiol Infect* 113:143-151.
- Parker SP, Cubitt WD, Jiang X, Estes MK. 1994a. Seroprevalence studies using a recombinant Norwalk virus protein enzyme immunoassay. *J Med Virol* 42:146-150.
- Parker SP, Cubitt WD, Jiang X. 1995. Enzyme immunoassay using baculovirus-expressed human calicivirus (Mexico) for the measurement of IgG responses and determining its seroprevalence in London, United Kingdom. *J Med Virol* 46:194-200.
- Parker TD, Kitamoto N, Tanaka T, Hutson AM, Estes MK. 2005. Identification of genogroup I and genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid. *J Virol* 79:7402-7409.
- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286:287-290.
- Rockx B, Wit M, Vennema H, Vinje J, Bruin E, Duynhoven Y, Koopmans M. 2002. Natural history of human calicivirus infection: A prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 35:246-253.
- Rockx B, Baric RS, Grijns I, Duizer E, Koopmans M. 2005a. Characterization of the homo- and heterotypic immune responses after natural norovirus infection. *J Med Virol* 77:439-446.
- Rockx B, Vennema H, Hoebe CJPA, Duizer E, Koopmans MPG. 2005b. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis* 191:749-754.
- Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S. 2001. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J* 20:849-853.
- Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, Nishio O, Ayata M, Ogura H. 2005. Genotyping of Norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. *Microbiol Immunol* 49:275-283.
- Smit TK, Bos P, Peenze I, Jiang X, Estes MK, Steele AD. 1999. Seroprevalence study of genogroup I and II calicivirus infections in South and Southern Africa. *J Med Virol* 59:227-231.
- Tamura M, Natori K, Kobayashi S, Miyamura T, Takeda N. 2000. Interaction of recombinant Norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. *J Virol* 74:11589-11597.
- Treanor JJ, Jiang X, Madore HP, Estes MK. 1993. Subclass-specific serum antibody responses to recombinant Norwalk virus capsid antigen (rNV) in adults infected with Norwalk, Snow Mountain, or Hawaii virus. *J Clin Microbiol* 31:1630-1634.
- Tsugawa T, Numata-Kinoshita K, Honma S, Nakata S, Tatsumi M, Sakai Y, Natori K, Takeda T, Kobayashi S, Tsutsumi H. 2006. Virological, serological, and clinical features of an outbreak of acute gastroenteritis due to recombinant genogroup II norovirus in an infant home. *J Clin Microbiol* 44:177-182.
- Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desselberger U, Ando T, Seto Y, Oishi I, Lew JF, Green KY, Estes MK. 1994. Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J Virol* 68:5982-5990.
- Yoda T, Suzuki Y, Terano Y, Yamazaki K, Sakon N, Kuzuguchi T, Oda H, Tsukamoto T. 2003. Precise characterization of norovirus (Norwalk-like virus)-specific monoclonal antibodies with broad reactivity. *J Clin Microbiol* 41:2367-2371.

第1節 微生物検査法のバリデーションの概略

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以外の副産物が同様に染まって蛍光を発する場合があり、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、顕微鏡計数	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	5), 6)
			酵母出芽形状解析法	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	PCR法 ハイブリダイゼーション法

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ればはじめて、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、食品分野に留まらず、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

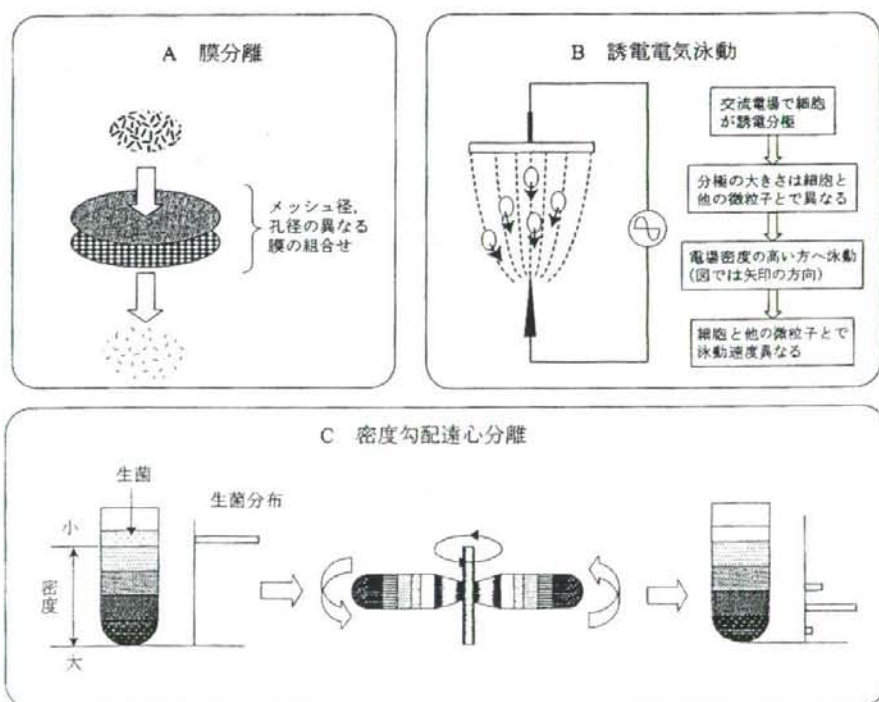


図-1 生菌分離法

組みも、これまで決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は、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る。緊急を要する場合が多いので、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と、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。

3. 検査法開発から妥当性確認までの流れ

新しい微生物検査法の開発に取り組んでから、それが公認法になるまでの流れは、おおむね図-2のようになる。重要なのは、最終的に公認法として登録することを目指すにしても、これを国内の公認法に留めておくのか、国際的な公認法にまでするのか、さらに、国際的と言っても具体的にどの国での利用を想定するのか、ということを考えておくことである。化学分析の場合の流れも基本的には同じであるが、微生物試験の場合、例えば図-2の①の段階で、「従来法との相関を確認する」という箇所があって、それが極めて高いハードルになっている。微生物検査法における従来法は「培養法」である。したがって、どの培地を使用するかが規定されなければならない。しかし、培地には通常、多くの未知成分が含まれているため、メーカーが異なれば成分も異なると考えるのが自然であろう。そのため、仮に同図の①～③の段階で一貫して日本のメーカーの培地を用いていたが、④の段階で対照にすべき国際基準の従来法が、海外の培地を使用するように規定されていた場合どうなるか。おそらく、そこに規定されている培地と日本製の培地との等価性が示されない限り、①～③までの作業を、海外の培地で最初からやり直さなければならないということになってしまうのではないかと。

また、①～③の国内段階では、実験条件がある程度幅のある条件で良しとしていたものが、④の国際段階でプロトコルの不備と指摘されることがあり得る。その結果、やはり①～③のやり直しを迫られることがあるだろう。通常、学会発表や学術雑誌に投稿する際には、開発者自身のノウハウによってはじめて実施可能な検査法は、むしろ独創性の高い方法として高く評価されるはずである。そうした考えに慣れてきた者にとっては、逆に「誰にでも同じように実施できなければならない」ことが重要との発想には馴染めないかもしれない。

しかし、とにかく、国際的な公認法として登録されれば、この検査法に関しては高い信頼性を確保したことになり、検査技術ビジネスも有利に進められることになる。

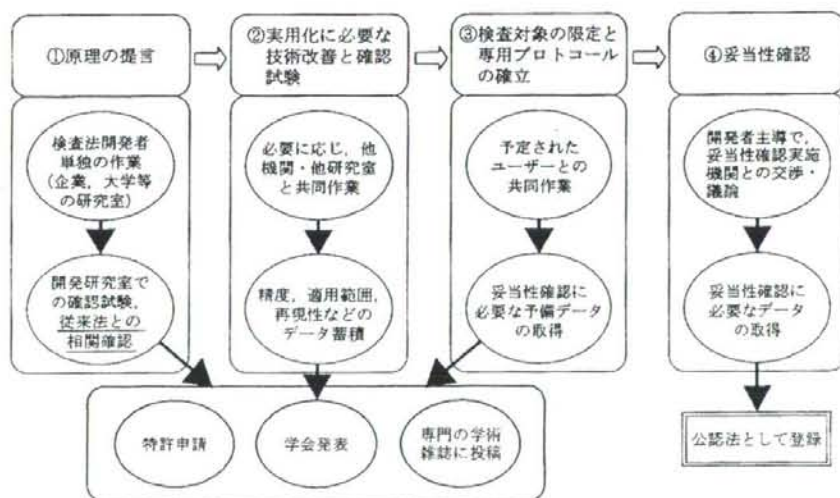


図-2 新しい検査法の開発から公認法としての登録までの流れ

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ラ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 の中の 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が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

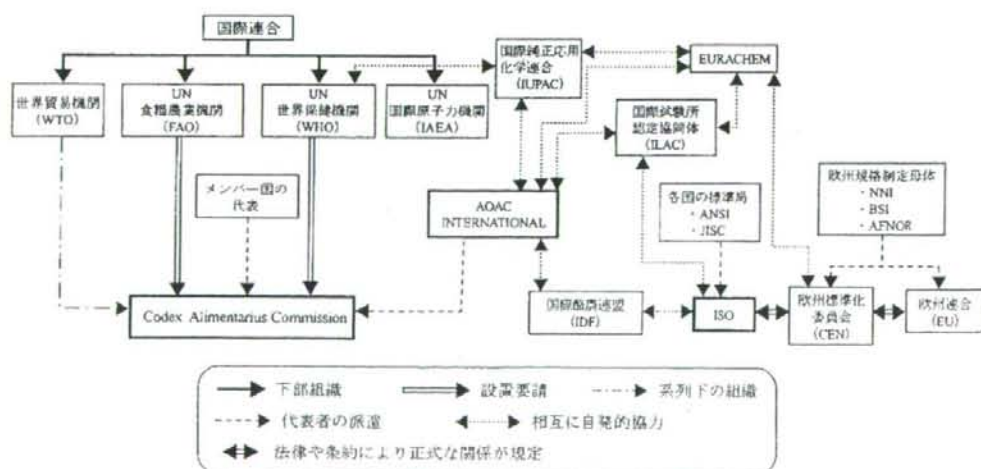


図-3 基準、規格の制定及び検査法妥当性確認を実施する機関の例

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って、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²⁴⁾。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 ビタミン及び栄養素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数倍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とは言ってもないが、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いといけない。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: バイオセレク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: バイオセレクトレーサーを用いた生葉アセトン抽出物中の抗菌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 ⁵¹Cr-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, 日本防菌防黴学会誌, 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/tclst/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/tclst/TechnicalCommitteeStandardsListPage.TechnicalCommitteeStandardList? COMMID=1368](http://www.iso.org/iso/en/stdsdevelopment/tc/tclst/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)

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ていなければならない。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えるべき、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(厚生省)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、