

方法などについて純培養の菌液を用いて検討し、作業部会案を作成した。本年度は、2種類の食品に人工的に添加した本菌の回収を作業部会案によって行い、わが国特有の食品からの回収が、国際的に知られているハイリスク食品と同様に行われるか否かを検証した。

A. 研究目的

人獣共通感染症の1種であるリステリア症は、高齢者や糖尿病患者などの免疫弱者、乳幼児に脊髄膜炎や敗血症、妊産婦に流死産を引き起こし、発症時の致命率は20～30%に上る重篤な疾患である。その原因菌である *L. monocytogenes* のヒトへの主な感染経路は、本菌による汚染食品の摂取である。本菌は動物の腸管内や河川水など自然界に広く分布しており、また、4℃以下の低温条件や12%もの高食塩濃度下でも増殖可能であることが知られている。そのため本菌は、食肉、魚介類やそれらの加工品、乳製品、野菜類など様々な食品から分離されており、冷蔵条件での保存中にも増殖することが可能である。一方、本菌は芽胞を形成せず、通常の食中毒菌と同様の加熱条件で殺菌が可能である。したがって、食品媒介リステリア症の原因食品としては、製造工程で最終的に加熱殺菌がなされずに低温で長期間保存・熟成されるナチュラルチーズや、生ハムなどの非加熱食肉製品、サラダなどのいわゆる ready-to-eat 食品が多くみられる。生ハム、サラミソーセージなどの非加熱食肉製品やナチュラルチーズの多くは海外からの輸入食品であり、これらの食品が輸入時の検疫や業者による自主試験等の微生物試験により本菌の汚染が明らかとなって自主回収、積戻しとなる食品もしばしば見られる。しかしながら、さまざまな食品汚染細菌の規格基準及び試験法に関して、その国際的整合性が輸入時のトラブルとなっている例も見られてい

る。本菌についても、現行の国内における乳及び乳製品を対象とした通知法が準拠している国際酪農連盟（IDF）の試験方法が、近年 International Standard Organization (ISO) の試験法に合流したことから、国際的整合性のある標準試験法を新しく定めることが急務となっている。昨年度の本研究では、国際的に通用しうる食品からのリステリア検出のための標準的試験法を作成するにあたり、国際的に用いられている ISO の試験方法を基礎としていくことを決定し、いくつかの変更点について純培養菌を用いた検討を行った。本年度はさらに、国内の標準法作出時に変更・検討が必要な箇所について ISO 法原法との同等性の検証を、2種類の食品への添加・回収試験により行った。

B. 研究方法

試験法の検討は、本研究の研究分担者及び研究協力者が所属する、国内4ヶ所の公的試験研究機関において実施した。

1. 使用菌株

Listeria monocytogenes の標準菌株として ATCC19115 株(血清型 4b)を使用した。

2. 使用培地

今回のリステリア標準試験法検討に使用した培地類を表1に示した。

3. 温度ロガー

輸送中及び培養時の温度を記録するため、同一条件に設定した温度トレーサー TL20 (3M 社製)を用い、30分間隔で温度を記録し、試験終

了後にデータを解析した。

4. 食品への *L. monocytogenes* 添加・回収試験 (別添1)

リステリアを添加する食品には、国際的にリステリア症のハイリスク食品として知られているナチュラルチーズと、日本特有の食品でその汚染率、汚染菌数が高いことが過去の調査で知られているマグロすきみを用いた。ナチュラルチーズは乳業メーカーの協力により、通常市販製品には実施されている最終製品の加熱殺菌工程を省略した、乳酸菌が生きている状態の国産のカマンベールタイプチーズを冷凍状態で分与を受け、使用直前に解凍して使用した。マグロすきみはメーカーより同一ロットのものを必要量購入し、チーズ、マグロともに *L. monocytogenes* を含まないことを培養により確認した。試料は1検体を10gとし、マグロ検体は東京都健康安全研究センターで、チーズ検体は国立医薬品食品衛生研究所にて調製し、低菌量群 100 - 999 CFU/g、高菌量群 1,000-9,999 CFU/g 及び非スパイク群を作成するよう、菌液の接種を行った。各試験機関には、低菌量群各3サンプル、高菌量群各3サンプル及び非スパイク群各3サンプルの合計9サンプルを、温度ロガー及び保冷材とともにクール便にて各機関に到着日を指定して発送し、到着日に試験を開始した。検体調製機関の試験する検体については、試験開始まで温度ロガーとともに4℃で保管した。各検体にそれぞれ Buffered Peptone Water (BPW) 90ml を加え、1分間ストマッキングした(10倍乳剤作成)。10倍乳剤を選択培地3枚に合計1mlとなるよう接種したものを2組つくり、コンラージ棒を用いて塗布した。さらに、10倍乳剤0.1mlを2枚の選択培地に接種し、塗布した。酵素基質培地は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、PALCAM 培地は $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で48時

間培養し、典型集落数を計測、菌数を算出した。

5. 統計解析

食品からの微生物試験法のバリデーション方法の確立に向けての試みとして、化学物質分析法で用いられているものと同様の統計解析を実施した。今回実施した、食品からの *L. monocytogenes* の添加回収試験の結果は、食品間、使用培地間及び試験機関間の差の有無について一元配置分散分析、可能なものについては二元配置分散分析により検定を行った。

C. 研究結果

昨年度設定した作業部会法を用いた、2種の食品からのリステリアの添加・回収試験結果を表2に、その統計解析結果を表3～5に示す。マグロすきみへの添加菌量は低菌量が510～520 CFU/g、高菌量が5,100～5,200 CFU/gであり、チーズへの添加菌量は低菌量が120～150 CFU/g、高菌量が1,200～1,500 CFU/gであった。未接種群のマグロ、チーズ共に *L. monocytogenes* はみられなかったが、いくつかの検体からごく少数の *L. innocua* や *L. ivanovii* が検出された。また、チーズについて1機関で試験開始前の輸送・保存期間中での温度逸脱があったためそのデータを除外した他(図1)、他の機関で高菌量接種のチーズ検体の菌数において測定不能のものが各培地につき1検体あった(表2-1)。

集計結果は、各試験機関をE、F、G及びHとし、2種の酵素基質培地をそれぞれ培地A、培地B、選択培地を培地Cと表記した。各食品、各菌量ともに3検体ずつの試験を行ったため、それぞれの培地ごとに対数表記した平均値、標準偏差、最大値及び最小値と、測定菌数を接種菌数で割った補正後の数値とその平均を算出した(表2-1及び2)。その結果、約72時間の

輸送期間中に、チーズ内において低菌量で 6.5 から 8.4 倍、高菌量で 6.1 から 10.8 倍増殖し、マグロすきみ内においては低菌量で 1.2 から 2.9 倍、高菌量で 1.1 から 2.8 倍増殖していた。各試験機関の検体に同封された温度ロガーから抽出した、試験開始前の輸送・保存中の検体温度の積算時間を図 1 に示した。チーズでは、温度逸脱のため除外した 1 機関を除く 3 機関において、輸送・保存温度に大きな差は見られなかった。一方マグロすきみでは、G、H の 2 機関が E、F よりも低い温度帯にある時間が長い傾向が見られた。回収菌数の統計解析結果においても、培地間、食品間に差は見られなかったが、試験機関間のマグロすきみのみ、差がある結果が得られた。

D. 考察

昨年度の本研究で、わが国における国際的に整合性のある食品からのリステリア試験法として ISO 法を基礎とした国内標準試験法を作成することとなり、今年度の研究として国内の状況にあわせた改変点の検証を、人工的に本菌を添加した食品からの回収試験により実施したところ、(1) 日本独特の食品であるマグロすきみに添加されたリステリアの回収が諸外国でしばしば汚染が報告されているナチュラルチーズからの回収と同様に可能であった (2) 酵素基質培地 2 種と従来からの選択培地に回収率の差が認められなかった (3) マグロすきみについて実施試験機関による差が見られたが、宅配便による低温輸送中の記録温度の差に起因すると思われたことが示された。宅配便による低温輸送では、温度上昇のコントロールはなされているが、 -5°C から 5°C からの間の変動への対策は本来不要なためなされておらず、低温で増殖可能な本菌においては、チルド温度

帯でのわずかな温度差が輸送期間中の増殖によって菌数に反映されてしまうため、今後同様の試験を実施する場合には、冷凍輸送が必要と思われた。これまでに得られた知見からは、わが国における食品からのリステリア試験法として今回実施した方法を採用することに問題がなく、また、使用した 2 種の酵素基質培地の性能に大きな差はないと思われた。

E. 結論

国際的に整合性のある食品からのリステリア試験法として ISO 法を基礎とした標準試験法を策定するに当たり、国内の状況にあわせた改変点について食品への添加回収試験によって検討した結果、これらの改変による試験成績に差がないことが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

井田美樹、金子誠二、仲真晶子、岡田由美子、樋脇弘、江渕寿美、中村寛海、大塚佳代子、竹村壘、長田共未、三山九美、吉田朋高、五十君静信 リステリア検査用酵素基質培地の検討 第 30 回日本食品微生物学会 東京 2009 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別添 1. リステリア食品添加定量試験

1. 試験の概要

Listeria monocytogenes (以下リステリア) の高リスク食品 (ナチュラルチーズ) 及び日本国内特有の高リスク食品(マグロすきみ)にリステリアを2段階の菌量で添加し、作業部会法に従って定量的回収試験を行う。試料の10段階希釈液を選択培地平板に塗抹後24時間及び48時間培養して発育コロニー数と形状を観察する。

2. 参考引用規格

本試験法は、ISO11290-2に準拠し、また、ISOの考え方を取り入れているAOACのコラボレートスタディーの実施例を参照し実行する。

3. 実施予定試験所数

4ヶ所

4. 試験方法

以下の方法について使用培地等試験法詳細を特定して検査を行い、それぞれの妥当性を検証する。
直接平板培養法における菌数測定法

5. 試験検体

国際的にリステリア症のハイリスク食品として知られているナチュラルチーズ (SIC code 2022) と、日本特有の食品でその汚染率、汚染菌数が高いことが過去の調査で知られているマグロすきみ (SIC code 2092) を用いて行う。試料は1検体10gとする。

6. 試験菌株

L. monocytogenes ATCC19115 を使用する。

7. 菌接種試料の調製

スパイクによる2段階の菌量レベルを検討する。菌液濃度は

- ①100-999 CFU/g × 3サンプル
- ②1000-9999 CFU/g × 3サンプル
- ③非スパイク群 × 3サンプル

8. 試料の輸送

アイスパックで7℃以下に保って冷蔵輸送し、各試験室に到着後は5℃以下で冷蔵保存。温度記録を

とる。

9. 試験

別添のプロトコールによる。選択培地平板3種類（酵素基質培地2種類：メルク生培地およびクロモアガーリステリア生培地、PALCAM 培地）を用いる。

試験は、試料が到着後速やかに開始する。

10. 試験試料の処理方法

- ①試料の包装(ストマッカー袋)表面をアルコール面で拭く。
- ②滅菌したピンセット、はさみを用い、包装を開く。
- ③試料に希釈液 90ml を加え、1 分間ストマッキングして 10 倍乳剤とする。

11. 結果の提示

試験結果は、試料 1g あたりのリステリア菌数で示し、生データとともに解析担当者に提出する。

12. 統計

全ての生データを解析担当者が集め、統計解析を行う。

フローチャート

試料(10g)に BPW90ml を加え、1 分間ストマッキング(10 倍乳剤)後、 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ・1 時間 ± 5 分静置

↓
①選択培地平板 3 枚に合計 1ml 接種 ×2

②選択培地平板 1 枚に 0.1ml 接種 ×2

↓
酵素基質培地： $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ・24 及び 48 時間、

PALCAM 培地： $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ・48 時間

↓
典型コロニーの計測

↓
結果の記録

チーズ低菌量		log		
試験機関		培地A	培地B	培地C
E	2	3.00	3.04	3.00
	4	2.91	2.97	2.89
	5	3.04	3.00	2.96
	平均	2.99	3.00	2.95
	SD	0.07	0.03	0.05
	最小値	2.91	2.97	2.89
	最大値	3.04	3.04	3.00
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
2	6.7	9.2	8.3	
4	5.5	7.8	6.5	
5	7.3	8.3	7.6	
平均	6.5	8.433333	7.466667	

チーズ高菌量		log		
試験機関		培地A	培地B	培地C
E	3	4.11	4.11	4.08
	6	4.00	3.91	3.92
	9	4.04	4.04	3.97
	平均	4.05	4.02	3.99
	SD	0.06	0.10	0.08
	最小値	4.00	3.91	3.92
	最大値	4.11	4.11	4.08
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
3	8.7	10.8	10	
6	6.7	5.5	7	
9	7.3	9.2	7.8	
平均	7.566667	8.5	8.266667	

F	2	3.00	2.96	2.98
	4	3.04	2.94	2.98
	5	2.98	2.99	2.91
	平均	3.01	2.96	2.96
	SD	0.03	0.02	0.04
	最小値	2.98	2.94	2.91
	最大値	3.04	2.99	2.98
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
2	6.7	7.7	8	
4	7.3	7.3	7.9	
5	6.4	8.1	6.8	
平均	6.8	7.7	7.566667	

F	3	3.98	4.11	4.00
	6	4.00	4.11	3.98
	9	-	-	-
	平均	3.99	4.11	3.99
	SD	0.01	0.00	0.02
	最小値	3.98	4.11	3.98
	最大値	4.00	4.11	4.00
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
3	6.4	10.8	8.3	
6	6.7	10.8	7.9	
9	-	-	-	
平均	6.55	10.8	8.1	

G	2	3.18	2.97	3.04
	4	3.08	3.04	3.04
	5	2.95	2.95	2.91
	平均	3.07	2.99	3.00
	SD	0.06	0.05	0.08
	最小値	2.95	2.95	2.91
	最大値	3.18	3.04	3.04
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
2	10	7.8	9.2	
4	8	9.2	9.2	
5	6	7.5	6.8	
平均	8	8.166667	8.4	

G	3	3.92	3.98	3.99
	6	4.00	4.00	4.00
	9	3.94	3.99	3.96
	平均	3.96	3.99	3.98
	SD	0.04	0.01	0.02
	最小値	3.92	3.98	3.96
	最大値	4.00	4	4.00
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
3	5.6	8	8.2	
6	6.7	8.3	8.3	
9	5.9	8.2	7.6	
平均	6.066667	8.166667	8.033333	

マグロ低菌量		log		
試験機関		培地A	培地B	培地C
E	1	3.04	3.11	3.08
	3	3.15	3.26	3.18
	7	2.96	3.08	2.92
	平均	3.05	3.15	3.06
	SD	0.09	0.09	0.13
	最小値	2.96	3.08	2.92
	最大値	3.15	3.26	3.18
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
	1	2.2	2.5	2.3
	3	2.7	3.5	2.9
	7	1.8	2.4	1.6
	平均	2.233333	2.8	2.266667

マグロ高菌量		log		
試験機関		培地A	培地B	培地C
E	4.00	4.04	4.15	4.04
	5.00	4.11	4.18	4.11
	8.00	4.11	4.15	4.04
	平均	4.09	4.16	4.07
	SD	0.04	0.02	0.04
	最小値	4.04	4.15	4.04
	最大値	4.11	4.18	4.11
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
	4	2.2	2.7	2.1
	5	2.5	2.9	2.5
	8	2.5	2.7	2.1
	平均	2.4	2.766667	2.233333

F	1	3.28	3.26	3.11
	3	3.26	3.28	2.97
	7	2.90	2.86	2.65
	平均	3.14	3.13	2.91
	SD	0.21	0.24	0.23
	最小値	2.90	2.86	2.65
	最大値	3.28	3.28	3.11
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
	1	3.7	3.5	2.5
	3	3.5	3.7	1.8
	7	1.5	1.4	0.87
	平均	2.9	2.866667	1.723333

F	4.00	4.00	3.96	4.06
	5.00	4.04	4.00	4.03
	8.00	3.79	3.66	3.96
	平均	3.94	3.87	4.02
	SD	0.14	0.18	0.05
	最小値	3.79	3.66	3.96
	最大値	4.04	4.00	4.06
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
	4	2	1.8	2.1
	5	2.2	1.9	2.1
	8	1.2	0.9	1.75
	平均	1.8	1.533333	1.983333

G	1	2.89	2.80	2.83
	3	2.85	2.93	2.90
	7	3.04	2.94	2.98
	平均	2.92	2.89	2.91
	SD	0.10	0.08	0.07
	最小値	2.85	2.80	2.83
	最大値	3.04	2.94	2.98
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
	1	1.5	1.2	1.3
	3	1.4	1.7	1.5
	7	2.2	1.7	1.8
	平均	1.7	1.533333	1.533333

G	4	3.81	3.90	3.85
	5	3.89	3.80	3.83
	8	3.82	3.81	3.87
	平均	3.84	3.83	3.85
	SD	0.04	0.05	0.02
	最小値	3.81	3.80	3.83
	最大値	3.89	3.90	3.87
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
	4	1.3	1.5	1.3
	5	1.5	1.2	1.3
	8	1.3	1.3	1.4
	平均	1.366667	1.333333	1.333333

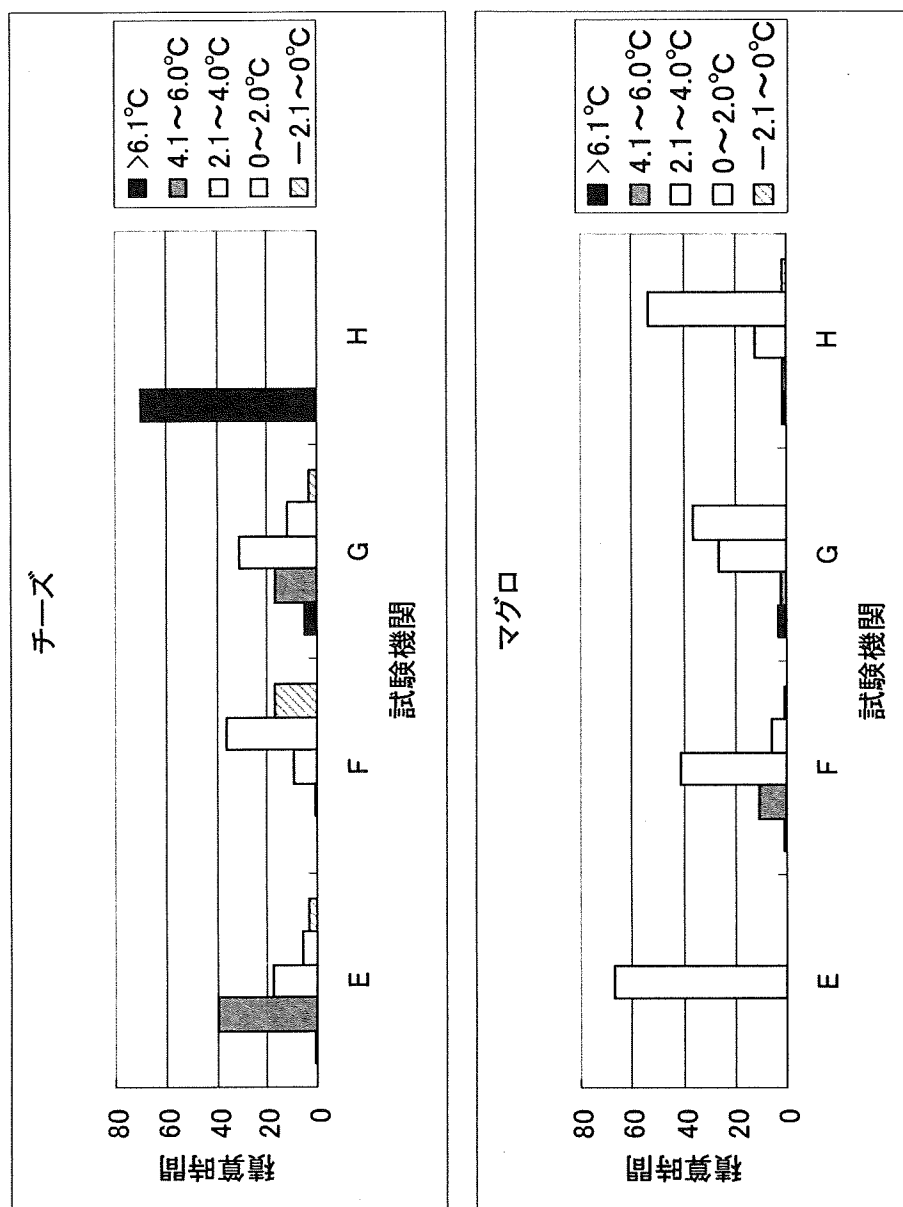
H	1	2.86	2.81	2.79
	3	2.93	2.92	2.80
	7	2.81	2.74	2.83
	平均	2.86	2.82	2.81
	SD	0.06	0.09	0.02
	最小値	2.81	2.74	2.79
	最大値	2.93	2.92	2.83
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
	1	1.4	1.3	1.2
	3	1.7	1.6	1.2
	7	1.3	1.1	1.3
	平均	1.466667	1.333333	1.233333

H	4	3.75	3.76	3.75
	5	3.74	3.78	3.83
	8	3.79	3.73	3.74
	平均	3.76	3.76	3.77
	SD	0.02	0.02	0.05
	最小値	3.74	3.73	3.74
	最大値	3.79	3.78	3.83
	補正後	(測定菌数/接種菌数)		
	4	1.1	1.1	1.1
	5	1.1	1.2	1.3
	8	1.2	1.1	1.1
	平均	1.133333	1.133333	1.166667

表 1. 使用選択培地

培地名	メーカー	備考	典型的集落
酵素基質培地			
Listeria Selective Agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI	MERCK	寒天平板(生培地)	白いハローを持つ青色コロニー
クロモアガーリステリア	CHROMagar	寒天平板(生培地)	白いハローを持つ青色コロニー
PALCAM 培地	OXOID	自家調整	黒いハローを持つ灰色コロニー

図1. 各試験機関における、検体の輸送・保存温度の積算時間



平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究

分担研究報告書

試験法のメソッドバリデーション

研究代表者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻 教授

研究要旨

国際的ハーモナイゼーションを図りつつ、我国における微生物試験標準法の作成が進められている。本研究は、その個々の標準試験法のメソッドバリデーションの実施計画の検証、試験結果の検証、を具体的に行うと共に、そうした検証を機能的に実施するためのシステムを創案することを目的としている。平成 20 年度は、サルモネラ菌試験法(NIHSJ-01-ST4)のコラボスタディ試験成績を検証するとともに、その作業を機能的におこなうための「メソッドバリデーション支援プログラム」のコンセプトを提唱し、WEB 閲覧型の具体的なプログラムを開発した。本年度は、標準法及び代替法のバリデーションに関して、これまでの議論を踏まえたガイドライン原案を提示した。また、バリデーションに際してボトルネックとなっている微生物汚染食品標準物質の技術的課題を検討した。

A. 研究目的

平成 17—19 年度に実施された、「食品からの微生物標準試験法の検討委員会」(<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsaho-u-index.html>)によって、国際的ハーモナイゼーションを図りつつ、我国における微生物試験標準法の作成が進められてきた。具体的には、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ、に対する試験法から順次、議論された。個々の試験法のプロトコールを決める段階で議論された項目は多岐にわたるが、次のような点が共通認識としてクローズアップされた。

- ①標準法自体のバリデーションをするための「基準」はない。
- ②バリデーション済の試験法で、プロトコールの一部を変更した場合、どの程度のバリデーションをし直すべきか、決まりがあるわけではない。
- ③国際的にバリデーション済とされる

ISO 法や AOAC 法でも、そのプロトコールは同じではない。

④バリデーションのために必須とされるコラボスタディには、大きなコストがかかる。

以上を受けて、平成 20 年度より開始された「食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究」では、他の微生物に対する試験法についても、同様にプロトコール作成を進めるとともに、それらのバリデーションの考え方や具体的方法の策定が必要となった。この要請に応えることが、本分担研究の課題である。平成 20 年度では、それまでの議論でしばしば問題になった“同じ議論の繰り返し”を防ぐために、プロトコール作成過程で収集された情報、培地や温度など条件を巡って長時間に渡って行われた議論、最終判断に至った経緯、などを誤解なく伝えるための文書化の方法を検討した。そ

の結果、WEB 閲覧型が適当であろうとの結論に達し、サルモネラ菌試験法を例に、WEB 閲覧型文書のプログラムを開発した。これに、プロトコールだけでなく、コラボスタディによるバリデーション結果も表示できるようにした。WEB 閲覧型式の情報を前にして議論すれば、予備知識の違いによらず、速やかに前提条件を共有することができることが実感された。これによって試験法各論に関する文書化の準備は整った。

平成 21 年度は、各種試験法のバリデーションの基本的考え方を整理することとした。すなわち、標準法、及び迅速法を含む種々の代替法に対するバリデーションのガイドライン原案を作成する。また、バリデーションに際してボトルネックとなっている微生物汚染食品標準物質の技術的課題を検討した。既に、フリーズドライ型の生菌標準物質として、BioBall が開発されているが、開発済の数株以外は難しく、多数の菌種・株に対して適用できる方法が要請されていたからである。

B. 研究方法

[1]バリデーションのガイドライン原案作成

(イ) 参照した規格

標準法のバリデーションガイドラインを作成するための準備として、代替法のバリデーションガイドライン(案)を作成することとした。そこで、ISO の代替法バリデーションガイドラインである 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.の内容を整理した。また、コラボスタディのガイドラインをまとめた AOACI Official Methods of Analysis 18th Edition, 2005, Appendix D を検証し、その内容を加味した。

さらに、試験結果の評価法に関しては、次の資料を参考とした。

JIS Z 8402-1~5; 1999~2002 (ISO 5725-1~5; 1994~1998): 測定法及び測定結果の精確さ(真度及び精度) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results

第 1 部 一般的な原理及び定義
General principles and definitions.

第 2 部 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方法
Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

第 3 部 標準測定方法の中間精度
Intermediate measures of the precision of a standard measurement method

第 4 部 標準測定方法の真度を求めるための基本的方法
Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method

第 5 部 標準測定方法の精度を求めるための代替法
Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method

(ロ) 国内外の関連研究グループとの連携

厚労科研(食品の安心・安全確保推進研究事業)「食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究」グループとの連携により、数理統計研究所、樁統計解析の専門家の助言を得た。

ISO TC34(食品)/SC9(微生物)の議長を迎えての討論会(日本食品微生物学会の企画)に参加して、直接、討論した。

[2] 微生物汚染食品標準物質

任意の生菌を、食品マトリクスに、1細胞単位で定量的に添加する方法として、生菌染色試薬とセルソーターを用いる方法を検討した。

(イ) 菌種: グラム陰性菌 (*Escherichia coli* NBRC 3301, *E. coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12689)、

グラム陽性菌 (*Bacillus subtilis* NBRC 3009, *Staphylococcus aureus* NBRC 102135)

(ロ) 培地：標準寒天培地 (日水)

(ハ) セルソーター：Aria (BD)

(ニ) 生菌染色試薬：蛍光グルコース (2NBDG)、細胞内エステラーゼ活性検出用蛍光色素 (CFDA)

C. 研究結果

[1]バリデーシヨンのガイドライン原案作成

ISO 16140:2003 の内容を整理し、解説を加えた資料を付録とした。なお、コラポスタディのガイドラインをまとめた AOACI Official Methods of Analysis 18th Edition, 2005, Appendix D を検証し、その内容を加味した。

[2] 微生物汚染食品標準物質

セルソーターで標準寒天培地を充填した 96 ウェルプレートに、CFDA で染色した微生物細胞を 1 個ずつ充填した。その後、37℃で 18 時間培養後、各ウェル中のコロニーの有無を調べた。その結果、*E. coli* NBRC 3301, *E. coli* ATCC 8739 の場合において、それぞれ、92/96=96%、89/96=93%のウェルに 1 個ずつ同じ大きさのコロニーが観測された。すなわち、その場で確実に 1 生細胞ずつ供給できることが分かった。今後は他の菌種についても、最適条件を検討する予定である。

D. 結論

標準法自体のバリデーシヨンの雛形は無いとはいえ、新規に開発した「標準法」を「新規試験法(代替法)」と考え、バリデーシヨンの海外の試験法を参照法と考えれば、ISO16140 の適用を考えることができる。また、独自に標準法に対する適切なバリデーシヨンガイドラインを考える上でも、ISO16140 に盛り込まれた考え方や技術は大いに参考になる。実際、

付録で解説したように、最終的には統計的解析を駆使しなければならない。既に統計学者との協力体制も構築されつつあるので、いわゆるブラックボックスの無い議論ができるようになると期待される。

一方、微生物生菌の標準物質に関しては、菌に性質の違いによって生菌染色条件や、セルソーティング条件を最適化する必要があることが認識された。さらに、ソーティングする際に受けての培地の種類や状態についても検討の余地があると考察された。今後の検討課題である。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

○シンポジウム等講演

- ・松岡英明 “迅速微生物検査技術の開発とバリデーシヨン”、日本食品衛生学会 第 97 回学術講演会 シンポジウム、東京 (2009 年 5 月 15 日)
- ・松岡英明 “微生物検査・測定法とその適用の基本的考え方”、日本防菌防黴学会 第 36 回年次大会基礎講座、大阪、(2009 年 9 月 15 日)
- ・松岡英明 “微生物試験における不確かさ”、JAIMA コンファレンス「セミナー：分析法の妥当性確認 (Method Validation) の方法と実際」、幕張、(2009 年 9 月 4 日)
- ・松岡英明 “微生物標準試験法の開発動向”、AOACI 日本セクション・食品分析懇話会 2010 合同シンポジウム、熱海、(2010 年 1 月 22 日)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

『ISO 16140:2003 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods”

(食品及び飼料の微生物—代替試験法のバリデーションのための手続き)』概説

1. はじめに

本規定 16140 は、欧州規格委員会 (European Committee for Standardization; CEN) が、ISO/TC34/SC9 との、ISO-CEN 技術協力協定 (ウィーン協定) に基づく共同作業によって、作成したものである。実働部隊は、前書きに記されているように、Technical Committee (技術委員会) CEN/TC275 “Food analysis-Horizontal methods (食品分析—多くのケースに対して共通の方法)” と ISO/TC34 “Agricultural food products (農産食品)” /SC9 である。

全体で 74 頁あるが、最初の 3 頁までに第 1 章 目的、第 2 章 基準とする文献、第 3 章 用語と定義、第 4 章 バリデーション (Validation) とサーティフィケーション (Certification) の一般則、が記載されており、それに続いて第 5 章 定性試験法、第 6 章 定量試験法、となっている。その後、付録 (Annex) A から U まであり、巻末に文献リストがついている。

本規定は代替法に関するものであるから、当然、基準となる参照法が必須である。しかし、具体的に何を参照法とするかについては記載がない。したがって、本規定にしたがってバリデーションするには、具体的に何を参照法として採用するかを決めなければならない。

2. SLV と CS

バリデーションの第一段階は一試験室で行うものであり、他の規格等では、単一試験室バリデーション (Single laboratory validation; SLV)、プレコラボラティブスタディ (Pre-collaborative study)、試験法開発者によるバリデーション (Method developer validation) などいろいろな用語で表現されているものである。第二段階は複数の試験室で同時に行うもので、コラボスタディ (Collaborative study; CS) と表記される場合が多い。本規格では、各段階に対して、それぞれ試験法比較研究 (Methods comparison study)、試験室間研究 (Interlaboratory study) と表記しているが、その内容は他と同じである。実際、第二段階に対して、本文中では「具体的に実施することは collaborative study である」と表記されている。以下では、簡単のため、第一段階を SLV、第二段階を CS と略記する。

3. 定性試験

食品中の特定の標的菌がいるか、いないかを調べるのが目的である。「特定」という言葉から、厳密な選択性を考えがちであるが、培養法を基本とする微生物試験では化学分析ほど厳密な選択性を期待することは難しい。むしろ、どのような条件 (食品の種類、共存菌の種類) で選択性が要求されるか、という実例に対応できることが肝要である。

3. 1. 相対精確さ、相対特異性、および相対感度

定性試験で調べなければならない性能指標の第一のグループは「相対精確さ (Relative accuracy)」、「相対特異性 (Relative specificity)」、「相対感度 (Relative sensitivity)」である。選定した食品に対して標的菌 1 種を選び、その組み合わせに対して調べる。「相対」となっているのは「参照法」と

比較して得る性能指標だからである。菌濃度は「陽性率が 50%程度になるよう」に規定されているので、予め適当な濃度を定める試験をしておかなければならないことになる。この点は、当該試験法についての知識や経験が必要なことを意味している。選定した食品と菌の自然汚染試料が最優先されるが、その入手が困難な場合は、菌を人為的に添加した試料で試験してもよし、とする。

なお、日本語訳の使い方で注意を要するのは「精確さ」と「精度」である。ISO 5725-1: 1994, JIS Z 8402-1: 1999 によれば、「精確さ (Accuracy)」は「真度 (trueness)」+「精度 (precision)」と定義されており、ここでも、その定義に従うこととする。

3. 2. 適用できる食品の種類

多種多様な食品の中から何を選んで試験しておけばよいか、ということは悩ましい問題である。本規定では付録 B で 8 群 (Category という) に分類している。すなわち、□肉製品 (Meat products)、□家禽 (Poultry)、□魚およびシーフード製品 (Fish and seafood products)、□果物及び野菜を主体とした製品 (Fruits and vegetable based products)、□乳製品 (Dairy products)、□チョコレート/パン製品 (Chocolate/bakery products)、□その他の製品 (Other products)、□飼料 (Animal feeds) である。さらに、食品カテゴリーごとに食品タイプが分類されている。例えば、肉製品では、生 (Raw)、熱処理品 (Heat processed)、冷凍品 (Frozen)、発酵させたもの (Fermented)、燻製品 (Cured)、その他 (Others) という 6 タイプである。新規試験法を適用する食品が決まっていれば、当然、その食品カテゴリーで試験しておく必要がある。ところが、5 種類のカテゴリーの食品について試験しておけば、すべての食品に適用できる試験法と認める、となっている。科学的に考えればナンセンスであるが、これも“現実的な解”の一つであろう。

5 種類のカテゴリーの食品を選ぶ場合、食品タイプについても 3 種類以上を選ぶこととしている。例えば 5 種類すべて「生」ばかりではなく「冷凍品」や「熱処理品」も選べ、ということである。ところが「その他の製品」のカテゴリーでは趣の異なるタイプが列挙されている。すなわち、ビール (Beer)、ドレッシング (Dressings)、香辛料 (Spices)、マヨネーズ (Mayonnaise)、パスタ (Pasta)、卵とその加工品 (Egg and derivatives)、シリアル/米 (Cereals/rice) となっている。これらは、明らかに「生」や「熱処理品」などのタイプとは異なり、むしろカテゴリーで分類される内容である。結局、この場合も食品の種類の選択に際しては、規定によって全て決まるわけではなく、規定に示された枠の中で、実施者がその知識と経験に基づいて判断しなければならないわけである。

3. 3. 相対検出レベル

定性試験で調べる性能指標の第二グループは「相対検出レベル (Relative detection level)」である。選定した食品に対して標的菌 1 種を選ぶこと、そして自然汚染食品が最優先されることも、上記の「相対精確さ」等を求める場合と同様である。どの程度の少ない菌まで検出できるか、を知ることが目的であるから、菌濃度を 5 段階 (最低でも 3 段階以上) に変えた試料を用意して調べる。5 段階とは、ネガティブコントロール (菌を含まない試料)、理論的な検出レベル (min)、それよりわずかに上の濃度 (mid)、mid の 3 倍程度高い濃度、および mid の 9 倍程度高い濃度、である。各濃度での繰り返し数は 6 と規定している。

3. 4. 検出できる菌種の範囲

性能指標の第三のグループは「包含性 (Inclusivity)」と「排他性 (Exclusivity)」である。「包含性」は標的微生物を含め、どの範囲の類似の菌種まで検出できるか、ということであり、逆に「排他性」はどの類縁菌まで検出してしまわないか、という概念である。

一般にセンサー技術に携わって来たものにとっては、両方含めて「選択性」あるいは「特異性」として理解されていることであるが、なぜ、わざわざ「包含性」と「排他性」という2つの概念に分けて表わす必要があるのかと思うが、この点についての論述は見当たらない。また、2つに分けて表わすとしても、日本語としては「包含性」よりも「検出範囲」の方がしっくりくるし、また「排他性」より「非検出範囲」と表記した方が分かりやすい気がする。

ところで微生物試験では、特定の菌のみが生育できる培地を「選択」培地といている。しかし、「選択」とはいえ、決して化学分析で言うような「選択性」を保証するものではない。それで「選択性」という語は避けて、「包含性」と「排他性」という言葉を使うようにしたのかもしれない。

本規定では「包含性」のためには、標的菌を含む50種類（サルモネラの場合は30種類）の菌株で確かめることを要請している。50株は、選び方の指針が示されているだけで、具体的な菌名が指定されているわけではない。実際に使用する株の種類を選定するのは、実施者であり、適切な種類の株を選定するためには、当該の試験法に関する十分な知識や経験が必須となる。このことは、「排他性」のための非標的菌30種類の選定に関しても言えることである。

なお、以上の包含性と排他性は、食品マトリクスを含まない、純粋な菌液を用いて行われる試験である。

3. 5. コラボスタディ

コラボスタディ (CS) では10箇所以上の試験室で行う。適当な食品1種と標的菌1種の組み合わせを選ぶ。SLVの場合は、自然汚染食品を第一優先としていたが、CSでは、菌添加食品を使用することを規定している。自然汚染食品は大量に用意することが難しく、また、試料中の均質性を保証することも難しい場合が多いからであろう、と理解している。CSでは菌濃度は3段階(2レベル+ブランク)であり、繰り返し数は8である。

4. 定量試験

試験データはすべて各プレートで得られるコロニー数であるが、これが多すぎても少なすぎても信頼性が低い。そこで本規定ではコロニー数300以下のもののみ採用し、これに希釈率をかけて、元の試料の菌数を算出するように規定している。本規定では、少ない方の制限はしていないが、30コロニー以下の結果は採用しないように規定している規定もある。

なお、統計的評価に際しては、離散数であるコロニー数を対数変換、あるいは平方根変換して議論する。それによって、バラツキの分布が対称分布、あるいは正規分布に近似されることが経験的に示されている。

4. 1. 直線性

標的菌 1 種を選び、これを含む食品を試料とする。自然汚染食品が第一優先であるが、それが入手しがたい場合は菌添加食品を用いる。菌濃度（レベル(Level)）と表現している）は 5 種類で、検出限界（Limit of detection; LOD）を基準として、最大濃度を LOD の 3 倍、10 倍、あるいは 100 倍の何れかにする。その上で、ブランク（濃度 0）と最大濃度の間を等分する。例えば、最大濃度を $3 \times \text{LOD}$ としたとき、5 種類の濃度とは、0, $0.75 \times \text{LOD}$, $1.5 \times \text{LOD}$, $2.25 \times \text{LOD}$, $3 \times \text{LOD}$ である。また、より広い範囲で試験する場合は対数変換して等分割する。例えば、最大濃度 $3 \times \text{Log}(\text{LOD})$ の場合、5 種類の濃度は、0, $0.75 \times \text{Log}(\text{LOD})$, $1.5 \times \text{Log}(\text{LOD})$, $2.25 \times \text{Log}(\text{LOD})$, $3 \times \text{Log}(\text{LOD})$ となる。各濃度での繰り返し数は $n=2$ 以上（5~10 を推奨）となっている。

各試料を参照法で測定した結果を x 、新規試験法で測定した結果を y として、 xy 平面にプロットする。濃度ごとに n 個ずつのデータがかたまっただけでプロットされるはずである。図から直接判断して外れ値を除くように規定しているが、その判断は難しい。外れ値となった原因が分かれば除いてよいが、そうでない場合は除いてはいけない場合がある。この外れ値検定をしたのち、直線性試験（Linearity test）を行う。

直線性試験とは、単に直線近似式 $y=a+bx$ を得て、相関係数 r の計算をするだけでなく、「原点を通り傾きが 1 ($a=0, b=1$)」が成り立つかどうかを調べることである。そうならない場合は、統計学者の助けを得よ、と記載されているものの、解析の筋道については理解しておく必要があろう。付録 R に記述されているので、その内容について概略説明する。

付録 R は、R.1~R.6 から構成されている。R.1 は文字の定義である。

〔試料数等のパラメータ〕

q : 濃度の種類総数（上記の例では 5）、 i : 個々の濃度 ($i=1$ to q)、 n : 同一濃度での繰り返し試験数、 j : 個々の繰り返し試験 ($j=1$ to n)、 N : 試験総数 ($N=qn$)

〔標準偏差等の計算結果を表わすパラメータ〕

\bar{x}_i : 濃度 i での、参照法による測定値の平均値

\bar{y}_i : 濃度 i での、新規試験法による測定値の平均値

V_{xi} : 濃度 i での、参照法による測定値の分散

V_{yi} : 濃度 i での、新規試験法による測定値の分散

s_{xi}, s_{yi} : それぞれ濃度 i での参照法、新規試験法による測定値の標準偏差 ($=\sqrt{V_{xi}}, \sqrt{V_{yi}}$)

V_{wx} : 参照法による全測定値の分散 ($=V_{xi}$ の $i=1$ to q の平均値)

V_{wy} : 新規試験法による全測定値の分散 ($=V_{yi}$ の $i=1$ to q の平均値)

$s_r(x), s_r(y)$: 参照法、新規試験法、それぞれによる全測定値の標準偏差 ($=\sqrt{V_{wx}}, \sqrt{V_{wy}}$)

\bar{x}, \bar{y} : 参照法、新規試験法、それぞれによる全測定値の平均値

ここで「全」は global を訳したものである。例えば、「全測定値の分散」というとき、(イ) 濃度ごとの分散を平均する場合と、(ロ) 元の全測定値の分散を計算する場合とでは結果が異なる。実際、R.1 では(イ)の意味で用いており、同一濃度でのデータ間の分散という意味で within variance と表記している。これに対して、R.3 では、同じ global と表記しているが、(ロ)の意味で用いている。こうした点を混同しないように、それぞれに適した用語があればよいと思うのだが、残念ながらよい案が浮かばない。

R.2 評価式の選択基準では、R.1 で計算した $s_r(x)$ と $s_r(y)$ の大小関係 [$R = s_r(y)/s_r(x)$] をけんとうするところから始まる。R>2 の場合は、そのまま通常の最小二乗法 (Ordinary least squares; OLS) で

直線近似式を求める(R.4 に記載)。R<1/2 の場合は、参照法の測定結果の方がバラツキが大きいことを意味している。この場合は、x と y を交換して、新規試験法の結果を x、参照法の結果を y として、OLS で直線近似式を求める。一方、1/2<R<2 の場合は、両方法でのバラツキが同程度であると解釈される。この場合は次の R.3 直交線形回帰で直線の式を求める。

R.3 直交線形回帰では、最初に (ロ) の意味での全分散、全標準偏差を求める。すなわち、 $V_x = 1/(N-1)\sum\sum(x_{ij}-\bar{x})^2$ 、 $V_y = 1/(N-1)\sum\sum(y_{ij}-\bar{y})^2$ 、 $s_x = \sqrt{V_x}$ 、 $s_y = \sqrt{V_y}$ である。同様に相関分散 $V_{xy} = 1/(q-1)\sum(\bar{x}_i - \bar{x})(\bar{y}_i - \bar{y})$ を求める。次に相関係数 $r = V_{xy}/(V_x V_y)^{1/2}$ を求める。以上の値を用いて、直線近似式の y 切片 a と傾き b は $b = s_y/s_x$ 、 $a = \bar{y} - b\bar{x}$ で計算される。

得られた直線式に測定点 (x_i, y_i) を代入することによって、それぞれの場合の a, b の値が計算でき、これから a および b の標準偏差 s_a, s_b が求められる。最後に、a および b の平均値がそれぞれ 0、1 からどの程度ずれているかを求め、Student の t-分布に基づき 95% の信頼性区間内にあるかどうかを判断する。この範囲内であれば、直線近似式としては妥当であった、と判断される。

R.4 通常の最小二乗法では、 V_x, V_y の求め方が R.3 の場合とは式の形が少し異なる。すなわち $V_x = n/(N-1)\sum(\bar{x}_i - \bar{x})^2$ 、 $V_y = 1/(N-1)\sum\sum(y_{ij} - \bar{y})^2$ 、 $s_x = \sqrt{V_x}$ 、 $s_y = \sqrt{V_y}$ である。これに続く計算手続きは、R.3 の場合と同様で、最終的には a および b の平均値と標準偏差 s_a, s_b を求める。

最後に、R.6 で信頼性区間 (Confidence limit; CL) が示されている。具体的な式の形は、 $CL = a + b x \pm t s(<y>)$ 、ただし、 $s(<y>)$ は $s_{y,x} \times [1 + 1/N + (x-\bar{x})^2/\{(N-1) V_x\}]$ 、t は Student の t 値、である。この式に出てくる $s_{y,x}$ は、残余標準偏差 (Residual standard deviation; $s_{y,x}$) であり、実際の測定点 (x_i, y_i) と直線近似式が y 方向でどのくらいはなれているか、についてのパラメータである。 $x = x_i$ の時、直線上の点は Y_i 、実測点は y_i であるから、 $s_{y,x} = \{\sum(y_i - Y_i)^2/(N-2)\}^{1/2}$ である。

4. 2. 検出限界と定量限界

(1) 臨界値 (Critical level; LC)

濃度の特定はできないが、確かに存在すると検知できる最低濃度。擬陰性率が 50% (ということは陽性率が 50%ということか?)。

(2) 検出限界 (Detection limit; LOD)

LC より高濃度で陽性率が 95%。このような条件となる濃度として、例えば、 $LOD = (\text{ブランクの平均値}) + z \times (s_0 \text{ ブランクの標準偏差})$ で、 $z = 2 \times 1.645 \doteq 3.3$ が示されている。ブランクの平均値自体はほぼ 0 に近い値と予想されるが、そのバラツキよりも十分高い濃度を LOD とする考えのようである。「十分高い」レベルをどう見積もるか? それに対する答えが、Student の t-分布で片側 5% (したがって両側で 10% の場合の値を、t-分布の Table から読み取る。自由度 (測定点数-1) が ∞ のときの値が 1.645 である。自由度が小さくなれば、この値は大きくなる。ちなみに自由度が 2 のとき 2.920、自由度が 1 のとき 6.314 となる。通常、測定点数は 3 (自由度は 2) 以上であるから、 $z = 2 \times 1.645 \doteq 3.3$ としておけば、2.920 より大きくなる。したがって、上式の LOD 値がブランク値と同じレベルになってしまう確率は 5% 以下である、という理屈である。

(3) 定量限界 (Quantification limit; LOQ)

検出できるだけでなく、具体的な濃度が決められる最低濃度。AOAC では、この値を $LOQ = 10s_0$ としている。ただし、 s_0 はブランクの標準偏差。

4. 3. 相対感度および未知試料の定量

相対感度とは、新規試験法で得られる値が、参照法で得られる値と大きくは（30%以下）ずれないことを確かめるために調べる項目である。具体的には、異なる濃度の菌を測定し、それぞれ同じ結果が得られること、あるいは測定範囲全体にわたって菌濃度を変化させた場合に、その変化に対応した結果が得られること。直線性を調べてあれば、当然、両法で一致した結果が得られるはずであるが、「相対感度」には、直線性の概念は入っていない（ようだ）。実際、両方法の違いが30%以下であればよし、とする点は、直線近似式の検定で述べた厳密さに比較すると、いかにもラフな感が否めない。なお、ここで「測定範囲」といつているものは「直線性を確かめた範囲」と明記してはいないが、測定の実際が「直線性」を調べる際の方法を引用していることから、「直線性を確かめた範囲」であると理解するのが妥当であろう。したがって、測定の実際は、直線性を検定する場合と同様である。

4. 4. 特異性、包含性、排他性

包含性のためには30種類以上の菌、排他性のためには20種類以上の菌で調べるように規定されている。この場合も、具体的な菌名は指定されていない。

4. 5. コラボスタディ

8箇所以上の試験室で実施するよう規定されている。適当な食品を1種類選定する。菌添加食品の使用も可能、と記載していることから察して、明記はしていないが、自然汚染食品を第一優先すべきと理解すべきであろう。菌濃度は3段階（低、中間、高）以上+ネガコン。同一濃度の試料は各4個で、参照法と新規試験法とで2個ずつ測定する。この場合、定量試験であるから、1個の試料の測定は次のようにして行う。すなわち、1試料の10倍希釈列を作製し、各希釈列は2個のプレートで菌数計測をする。

測定結果については外れ値検定をしてから、室間再現標準偏差を求めるが、本規定では外れ値検定を行わないロバスト法を紹介している。具体的には、通常の解析法における平均値に対応する「メジアン」を求め、これを基準とした室間再現標準偏差 S_R 、および相対室間再現標準偏差 RSD_R を求める方法が示されている。

通常、 RSD_R がコラボスタディの最終段階の評価指標とされるが、微生物試験では妥当性を判断するための具体的数値が定まっていない。この点が、今後の大きな課題である。

表 1. ISO 16140:2003 の要約

バリデーションの種類	代替法のバリデーション(代替法と標準法の比較試験)										
	単一試験室バリデーション					共同試験室バリデーション					
	定性分析					定量分析					
評価すべき指標	相対精度、相対特異性、相対感度	相対検出レベル	包含性・排他性	直線性	検出限界、定量限界	相対感度	特異性・包含性・排他性	相対精度、相対特異性、相対感度	定性分析	定量分析	
共同試験における試験室数	—	—	—	—	—	—	—	10 [10]	8 [8]		
食品試料の選択	規定の食品カテゴリーから最大5種、かつ3タイプ以上。	規定の食品カテゴリーから最大5種、かつ3タイプ以上。			規定の食品カテゴリーから最大5種。環境試料(表面汚染)も一つのカテゴリー。	規定の食品カテゴリーから最大5種。環境試料(表面汚染)も一つのカテゴリー。		適当な食品マトリクスを1種選択	適当な食品マトリクスを1種選択	適当な食品マトリクスを1種選択	
試験菌の選択	選定した1食品(カテゴリー、タイプ)に対して適切な1菌株を選定。	選定した1食品(カテゴリー、タイプ)に対して適切な1菌株を選定。	標的菌50株 (Salmonellaの場合)は30、非標的菌30株		選定した1食品(カテゴリー、タイプ)に対して適切な1菌株を選定。	選定した1食品(カテゴリー、タイプ)に対して適切な1菌株を選定。	標的菌30株、非標的菌20株	菌種規定に記載なし(文脈からは、適切な1菌株選定)	菌種規定に記載なし(文脈からは、適切な1菌株選定)	菌種規定に記載なし(文脈からは、適切な1菌株選定)	
試験試料の調製	自然汚染食品の調製が極めて重要。得られなければ菌添加食品を用いても良い。1食品カテゴリーあたり60、レベルは陽性率50%が目安。	自然汚染食品。得られなければ菌添加食品を用いても良い。3レベル以上(5レベルが望ましい)。	標的菌は相対検出レベル(陽性率)50%になるような菌濃度、最低検出レベルの10~100倍高い濃度、非標的菌は予想される最大汚染レベル。	自然汚染食品の使用が重要。得られなければ菌添加食品を用いても良い。ブラランクを含む5レベル以上。	自然汚染か菌添加か記載なし。本菌種は無い。	菌種の菌濃度。ただし菌株的な濃度の距離は無い。	標的菌は相対検出レベル(最低検出レベル)の100倍高い濃度。非標的菌については記述なし。	菌添加食品を使用。3レベル。[2レベル+ブラランク]	菌添加食品を用いても良い。4レベル以上。[食品・菌・レベルの組み合わせ(material)で5以上。ただしブラランクは数に入れない。Youden pairは2 test samplesであるが1 material]	菌添加食品を用いても良い。4レベル以上。[食品・菌・レベルの組み合わせ(material)で5以上。ただしブラランクは数に入れない。Youden pairは2 test samplesであるが1 material]	菌添加食品を用いても良い。4レベル以上。[食品・菌・レベルの組み合わせ(material)で5以上。ただしブラランクは数に入れない。Youden pairは2 test samplesであるが1 material]
繰り返し数	1(標)+1(代)	6(標)+6(代)	1(標)+1(代)	サブサンプル2以上(理想的には5~10)(標)と各サブサンプルは10倍希釈系列を調製し、各希釈系列を2ディップでコロニー計数。	6(好ましくは10)ブラランク(標)+6(好ましくは10)ブラランク(代)	サブサンプル2以上(理想的には5~10)(標)と各サブサンプルは10倍希釈系列を調製し、各希釈系列を2ディップでコロニー計数。	1(標)+1(代)	8(標)+8(代) [6]	2(標)+2(代)、サブサンプルと称する各サブサンプルは10倍希釈系列を調製し、各希釈系列を2ディップでコロニー計数。[Youden pairsの場合、反復数は試験室あたり2]	2(標)+2(代)、サブサンプルと称する各サブサンプルは10倍希釈系列を調製し、各希釈系列を2ディップでコロニー計数。[Youden pairsの場合、反復数は試験室あたり2]	2(標)+2(代)、サブサンプルと称する各サブサンプルは10倍希釈系列を調製し、各希釈系列を2ディップでコロニー計数。[Youden pairsの場合、反復数は試験室あたり2]
試験試料の数	60 × (1+1) × 5食品カテゴリー=800 (表7)	(6+6) × 5レベル × 5食品カテゴリー=300 (表8)	(50+30)株 × (1+1)=160	2あるいは5~10) × 2 × 5レベル × 5食品カテゴリー=100あるいは250 (表9)	6+6あるいは10+10=12あるいは20	2あるいは5~10) × 2 × 5レベル × 5食品カテゴリー=100あるいは250 (表9)	(30+20)株 × (1+1)=100	(8+8) × 3レベル × 10ラボ=480 [(6+6) × (2レベル+ブラランク) × 10ラボ=360]	(2+2) × 4レベル × 8ラボ =128 [(2+2) × (5レベル+ブラランク) × 8ラボ=192]	(2+2) × 4レベル × 8ラボ =128 [(2+2) × (5レベル+ブラランク) × 8ラボ=192]	(2+2) × 4レベル × 8ラボ =128 [(2+2) × (5レベル+ブラランク) × 8ラボ=192]
データ処理法	(表1)、(表2)	(表3)	(表4-1)、(表4-2)	標準法(x)対代替法(y)の直線。y=a+bx Ga=0, b=1の検証	ゼロあるいは関連差における標準偏差の計算	標準法(x)対代替法(y)の直線	(表4-1)、(表4-2)	(表5)	(表6)	(表6)	

(注) [] 内はAOACでの規定

表1. 相対精度、相対特異性、相対感度を評価するための結果のまとめ

検体		陽性(標準法)		陰性(標準法)		合計
代替法の結果	陽性	PA	PD			
	陰性	ND	NA			
合計		N _p	N _n			N

PA:陽性正解数 PD:疑陽性数

NA:陰性正解数 ND:疑陰性数

N:検体総数=PA+PD+ND+NA

N_p:陽性と判定した総数

N_n:陰性と判定した総数

相対精度(Relative accuracy) AC=(PA+NA)/N×100%

相対特異性(Relative specificity) SP=NA/N_n×100%

相対感度(Relative sensitivity) SE=PA/N_p×100%

表2. 各食品マトリクスの場合の相対精度、相対特異性、相対感度

食品マトリクスの種類	PA	NA	ND	PD	N	AC(%)	N _p	SE(%)	N _n	SP(%)

表3. 相対検出レベルの評価表

	-	+	合計
参照法	a	n-a	n=6
代替法	b	n-b	n=6
	a+b	2n-(a+b)	2n=12

×(濃度レベルの種類)×(食品力テゴリー)

例えばL1で検出率(n-b)/nが50%以下、L2で検出率(n-b)/nが50%以上のとき、相対検出レベルは「L1～L2」のように範囲で示す。