

研究分担者：

松岡英明 東京農工大学

分担課題：試験法のメソッドバリデーション

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/kennsahou-index.htm>) 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、腸炎ビブリオなど、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実施するための「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。この要請に応えるために、第一に必要とされたものが、(1) メソッドバリデーション支援プログラムである。同じ議論を繰り返さず、また複雑な条件の組み合わせなどの見通しをよくするために、極めて有用と考えられたからである。第二は、上

記①～④の認識に基づき、国際的バリデーションの理論、実施法などを十分理解したうえで、

(2) バリデーションガイドライン原案を作成することが必須と考えられたので、錯綜した関連規定、ガイドラインを精査することとした。さらに、バリデーションの実施に際して、常に問題となっていた、(3) 微生物生菌標準物質の調製技術の検討にも取り組むこととした。本研究は、微生物試験法のメソッドバリデーションに関する上記の 3 重要課題を目的として実施された。

B. 研究方法

メソッドバリデーション支援プログラムの開発

バリデーションのプロトコール作製に際しては、複雑な条件（食品マトリックスの種類、試験菌株の種類、数量、培養温度・時間など）を設定するための議論が多く、一見、同じような議論を繰り返すような場合も少なくない。したがって、議論した結果を一覧できるようにしておくことは重要である。また、一旦、完成したプロトコールに従ってバリデーションを実施する場合に、用意すべき試験試料の種類や個数の管理、試験結果の評価基準や統計解析法などが、速やかに参照できるようにしておくことは極めて有用である。さらに、国際動向の変化に応じて、今後、一部の条件を修正しなければならない場合に、迅速に対応できるようにしておくことも重要であろう。本支援プログラムは、こうした要請に応えるために開発するものである。そして、具体的に、サルモネラ試験法に即して、検体の準備、前培養増菌、選択増菌培養、分離用寒天培地での培養、確認培養、サルモネラ確認試験、からなるプロトコールを WEB 上で一覧できる「メソッドバリデーション支援プログラム」を作成した。

バリデーションのガイドライン原案作成のた

めの調査

(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、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 についても併せて内容を整理した。

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性を求めるための基本的な方法 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な方法 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、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。

微生物生菌標準物質の調製技術の検討

標準菌株から調製した生菌の蛍光染色と、セルソーターによる単一細胞の分配、それを受ける最適培地、から構成されるシステムの可能性を検討した。

(イ) 菌株

標準菌株として以下の5株を選び、それぞれ、(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部・生物遺伝資源部門(NBRC)、あるいは American Type Culture Collection(ATCC)より入手した。

- *Escherichia coli* NBRC 3301,
- *E. coli* ATCC 8739,
- *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12689),
- *Bacillus subtilis* NBRC 3009,
- *Staphylococcus aureus* NBRC 102135)

試験に使用する場合は、凍結保存菌を、一旦、標準寒天培地に播種し、37°Cで18時間培養して得られたコロニーを、再度、標準寒天培地で同一条件の培養を2回繰り返して、最終的に得られたコロニーをPBSに懸濁して終濃度が約 1×10^8 cells/mlになるように調整した。

(ロ) 生菌識別用蛍光色素

生菌を死菌と区別して染色する蛍光色素には、その原理の違いによって数種類あるが、色素の安定性や蛍光強度の観点から最適なものとして、カルボキシフルオレッセインジアセテート(CFDA)を第一に選定した。生細胞のみが細胞内エステラーゼ活性を保持している、という性質に基づいている。第二の色素として、蛍光グルコース(2NBDG)を選定した。細胞

の種類によらず、グルコースを栄養源として取り込む細胞は多い。生細胞のみに見られる性質である。このグルコースのアナログ分子である2NBDGが細胞に取り込まれると細胞内濃度が高くなって顕微画像として識別できるようになる、この性質を利用する方法である。

(ハ) セルソーター：Aria (BD)

専用オートステージを設置して、96 ウェルプレート各ウェルの中心に、所定の個数の液滴（実際は1個の細胞を含む液滴1個）を、自動的に滴下できるようにした。また、通常の円形プレート（86mm^φ）の寒天培地上に、等間隔で10×10の位置に所定の個数の液滴を自動的に滴下するための専用プレートアダプターも作製し、併用した。

(ニ) 培地

生菌であることの証明はコロニーの形成である。セルソーターで分配される単一細胞を受ける培地として、第一に標準寒天培地を使用した。しかし、菌の種類によっては、十分なコロニー形成率が得られない可能性がある。そのような場合には、より高いコロニー形成率が得られる培地を検討した。同一菌株でも、培地の種類によってコロニー形成能が異なることは予想されたが、本システムでは、確実に生菌が供給されたことを示すことが重要である。したがって、どの菌株に対しても、高いコロニー形成率（目標値95%以上）を示す培地が用意できることが必須である。本研究では、以上の要請に応えられる見通しを得ることを目標としている。

C. 研究結果

メソッドバリデーション支援プログラムの開発

(イ) コンセプト

「文書として公開された、サルモネラ菌試験法

(NIHSJ-01-ST4)の内容を、試験法についての経験の異なる人でも、等しく、正しく、速やかに理解できるように」というコンセプトでプログラムを設計した。プロトコール中の用語の説明や試験条件の詳しい解説など、経験豊富な人には必ずしも必要ではないが、経験の少ない人には必須であろう。しかし、多くの情報を常に同時に掲載しては煩雑になって、「一目瞭然」とはいかない。むしろ、プログラム使用者が、必要とする情報を必要になったときのみ、その場で参照できるようになっていれば、極めて便利であろう。このような事を可能にするものがWEB閲覧型のプログラムである。

(ロ) コンテンツの構成

図1にWEB画面の例を示す。標準試験法、コラボスタディごとに

- ・ 試験の目的
- ・ 試験条件の決定と検体の準備
- ・ 試験実施フロー
- ・ 成績・評価

を図示した。この中で、試験実施フローが中心となる画面であるが、この画面上に、①検体の準備、②前培養増菌、③選択増菌培養、④分離用寒天培地での培養、⑤確認試験、⑤サルモネラ確認試験、の順に示されている。

図中の各用語をクリックすると、その説明のウィンドウが開く。また、単に、作業内容を示すだけでなく、個々の試験条件を決めるために準拠した規則やガイドラインなどの文献情報、試験条件について曖昧な表現を避けるために議論した内容、例えば、錯綜していた培養温度条件についての議論の要約、などが示されるようになっている。こうすることによって、後日、別の人たちが、別の状況で、同じ議論を繰り返さないようにすることができるかと期待される。

また、成績・評価の画面では、定性試験の実施例に即して、統計的解析の具体的プロセスを表示しているが、将来的には、信頼性区間や、不

確かさの推定などについての解説や具体的算出法を表示することを計画している。試験実施者のみならず、成績評価者にとっても有用なプログラムになると期待される。

(ハ) サルモネラ試験法のバリデーションへの応用

サルモネラ菌試験法(NIHSJ-01-ST4)にしたがって実施された、以下のコラボスタディ試験成績の検証に適用した。

《コラボスタディの概要》

- ・目的: 配布検体中のサルモネラ菌を検出し、そのO抗原型を確定する、定性試験
- ・検体: 試験菌を添加した生ハムホモジネート
- ・添加菌濃度: 2レベル(1~10CFU/25g、11~100CFU/25g)
- ・添加菌種: 硫化水素産生菌として *Salmonella typhimurium* (O4)、硫化水素非産生菌として *Salmonella senftenberg* (O1,3,19)を用いた。
- ・反復試験数: 6検体/菌濃度レベル/菌種
- ・非接種検体: 6検体
- ・検体数/試験室: 30検体
- ・試験室数: 10

《成績評価》

各試験室から報告された成績から、ISO16140:2003[5.2.2]で規定されている、定性試験コラボスタディに対する次の評価指標を算出した。すなわち、

- ・擬陽性率 (False positive; FP)
- ・真の陽性率 (True positive; TP)
- ・相対精度 (Relative accuracy; AC)
- ・相対特異性 (Relative specificity; SP)
- ・相対感度 (Relative sensitivity; SE)

である。

バリデーションのガイドライン原案作成のための調査結果

ISO 16140:2003の内容を整理し、解説を加え

た資料を付録Aとした。さらに、別途、実施されることになった全文和訳に際して、監修、指導を行った。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。

微生物汚染食品標準物質の調製技術の検討

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個ずつ分配した。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。同様にして2NBDGで染色した場合についても微生物細胞を1個ずつ分配した。その結果、表1のような結果を得た。*E. coli* ATCC 8739の場合の一例を図2に示す。

CFDAの場合、*E. coli*では2株とも90%以上のコロニー出現率であったが、他の菌については80%以下であり、特に *P. aeruginosa* は低い値であった。一方、2NBDGの場合は、*E. coli* ATCC 8739株では55%に留まった。しかし、*E. coli* NBRC 3301では97%であった。因みに、ATCC 8739株は、従来、2NBDGをほとんど取り込まない株として知られていたものであったが、セルソーターの光学系が高感度であるため、取り込み量が少なくても、ある程度、生菌識別ができたものと推定される。

コロニー形成率を向上させるために、特に成績の低かった *P. aeruginosa* について、他の培地を検討した。CFDA処理自体がデリケートな細胞に対してはストレスになる可能性がある。そのためCFDAによる処理後、蛍光強度の違う細胞分画を取り、そのコロニー形成率を比較した。また、一連の操作の間に細胞温度が低下することの影響も調べた。しかし、いずれの場合も特に有効な手掛かりを得るには至らなかった。次に、傷害を受けている可能性を想定して、それを修復できるような培地として知られている、Tryptic Soy 寒天培地を用いた。その結果、標準

寒天培地の場合（15%）に比べて、25%に向上した。さらに、ソーティングする前の培養を、標準寒天培地から Tryptic Soy Broth による 21～24 時間培養に変えた。その結果、極めて顕著な効果が得られ、コロニー形成率が 92%にまで向上した。

そこで、再度、5 種類の菌株について、Tryptic Soy Broth で培養した後、Tryptic Soy 寒天培地上にソーティングしたところ、全ての菌株において、97%以上のコロニー形成率が得られた。すなわち、目標値である 95%以上のコロニー形成率が達成された（表 2）。*E. coli* NBRC 3301 の場合の一例を図 3 に示す。

D. 結論

(1) 試験成績の評価方法に関しては、今後、試験の種類や件数の増大に対応したシステム作りが必要になるであろう。その観点から、今回試作した、メソッドバリデーション支援プログラムは極めて有用であると期待される。

(2) 標準法自体のバリデーショ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、バリデーション済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ョ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。

(3) 微生物細胞を確実に 1 細胞ずつ分配することができることが示され、かつ、それが生菌であることを保証する染色条件と培地条件を決めることができた。本研究では 5 菌株のみについての結果を示しただけであるが、元々培養法で用いる培地でのコロニー形成率が基本で

あるので、本質的な問題はないと考えられる。また、セルソーターで処理する過程で、若干、傷害を受けるか、あるいは休止状態になってしまうなどの影響が考えられる。したがって、その問題解決法があるか、という点が重要である。本研究では、傷害の可能性がある場合に対して Tryptic Soy Broth が有効であるとの結果を得ている。この効果は一般性が高いと考えられ、今後、他の多くの菌株に対しても、同様の発想で有効な方法が見いだせるのではないかと考えられる。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

○著書・総説等

- ・後藤哲久、安井明美、五十君静信、松岡英明：妥当性確認の要求事項“最新版—食品分析法の妥当性確認ハンドブック”（安井明美、五十君静信、後藤哲久、丹野憲二、湯川剛一郎、編）第 2 章 1-I 節、サイエンスフォーラム（2010）pp10-27.
- ・松岡英明：微生物試験法の妥当性確認と不確かさの推定“最新版—食品分析法の妥当性確認ハンドブック”（安井明美、五十君静信、後藤哲久、丹野憲二、湯川剛一郎、編）第 7 章 1 節、サイエンスフォーラム（2010）pp223-231.
- ・斉藤美佳子、松岡英明“微生物の迅速検出法”日本防菌防黴学会誌 **36**, 99-105 (2008).
- ・斉藤美佳子、松岡英明“微生物の迅速検出法”クリーンテクノロジー **18** (11), 1-5 (2008).
- ・島北寛仁、斉藤美佳子、松岡英明“微生物迅速検査装置「バイオプローラ」”食品工業 **51**(16), 34-42 (2008).
- ・斉藤美佳子、松岡英明：微生物の迅速検出法。日本防菌防黴学会誌 **36**, 99-105 (2008).

○学会発表

- ・重富知也, 斉藤美佳子, 松岡英明, "生乳中微生物の非培養・培養トレーサブル検出", 日本化学会第89春季年会, 船橋(2009年3月29日)
- ・H. Matsuoka, T. Matsuzaki, T. Shimakita, M. Saito, "Automatic system for the non-destructive separation of microbial cells from food samples and its applicability to nonculture-to-culture seamless method", 122nd AOAC International Annual Meeting and Exposition, Dallas (September 21-24, 2008).
- ・末崎拓広, 島北寛仁, 斉藤美佳子, 松岡英明, "密度勾配遠心分離法に基づく食品中微生物のバイアブルセパレーション", 日本防菌防黴学会第35回年次大会, 浜松(2008年9月12日)
- ・島北寛仁, 高山幸大, 末崎拓広, 水野靖紀, 斉藤美佳子, 松岡英明, "CFDA 法対応型蛍光顕微計数装置の開発", 日本防菌防黴学会第35回年次大会, 浜松(2008年9月12日)

○シンポジウム等

- ・松岡英明“微生物試験の妥当性確認の進め方と不確かさの推定”, 食品産業戦略研究所主催セミナー, 東京, (2011年3月10日)
- ・松岡英明“食品微生物試験法のバリデーションの国際動向”, 第77回 化学センサ研究会,

東京, (2011年1月21日)

- ・松岡英明“微生物試験法における培養法と非培養法の相互補間”, 日本防菌防黴学会学術講演会 2010, 西宮(2010年5月26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)
- ・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“迅速微生物検査技術の開発とバリデーション”, 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)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

サルモネラ菌 試験法 N1HSJ-01-ST4

- 標準試験法
- コラボスタディ

コラボスタディ

サルモネラ菌 試験法 N1HSJ-01-ST4

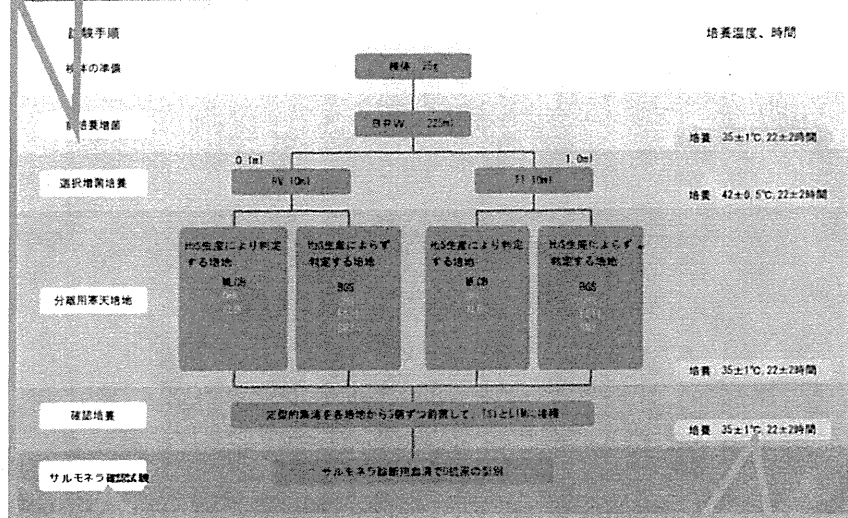
- 試験の目的
- 試験条件の決定と検体の準備
- 試験実施フロー
- 成績・評価

選択増菌培養

- RV 培地およびTT 培地を約42℃となるように温めておく。
- BPW で前培養した培養液0.1 ml をRV 培地10 ml に接種する。
- BPW で前培養した培養液1 ml をTT 培地10 ml に接種する。
- 接種したRV およびTT 培地を42±0.5℃、22±2時間培養する。

コラボスタディ 試験実施フロー

サルモネラ菌 試験法 N1HSJ-01-ST4



サルモネラ菌確認試験

①血清型別試験

サルモネラと疑われる菌についてサルモネラ免疫血清を用いたスライド凝集法によるO血清型別試験と15%寒天培地表面から菌を採取して実施する。
 (ア) O多価血清およびO1多価血清を用いて凝集試験を行い、凝集が見られたO群血清を用いて当該菌のO群を決定する。
 (イ) サルモネラの定量的な生化学的性状を示したにもかかわらず、いずれの血清にも凝集が見られないときはO群型別不能とする。

②生化学的性状試験

非定量的サルモネラが疑われるときは(ア)~(オ)に示した生化学的性状を実施する。同定キットの使用も可。
 (ア)オキシダーゼ試験 96ウェルオキシダーゼ試験用紙に菌を塗布して1分以内に深青色になれば陽性とする。
 (イ)クエン酸シモンズクエン酸トリウム培地に菌を塗布後、35±1℃、22±2時間培養する。培地が深青色になれば陽性とする。
 (ウ)VP VP寒天培地に菌を塗布し、35±1℃、22±2時間培養後、VP用試薬A、Bを滴下する。陽性の時は数分後に試薬が赤色となる。1時間後も赤色とならなければ陰性とする。
 (エ)ONPG ONPGディスク1枚を小試験管に取り、滅菌製氷水1mlを加える。新鮮培養液を1白金針挿し、置かれ35±1℃、18-24時間培養し、液色で判定する(黒いものは1分経過後で判定可能)。液色が黄色となったものを陽性とする。液色が変化しないものは陰性である。
 (オ)マロン酸利用地試験 マロン酸培地に新鮮培養液を用い白濁して接種し、35±1℃、24-48時間培養して判定する。液色が明らかに黄色となったものを陽性とし、緑色にとどまるものを陰性と判定する。

注意: サルモネラはオキシダーゼ陰性、クエン酸陽性、VP陰性である。ONPGでは、ほとんどのサルモネラは陰性であるが、*subsp. anatum* および *subsp. anatum* では陽性 (India では不定) であるので注意を要する。マロン酸利用地では、ほとんどのサルモネラは陰性であるが、*subsp. salamae*、*anatum* および *subsp. anatum* では陽性であるので注意を要する。

ISO法では、基準となる培養温度が37℃である。これに対して、国内の食品微生物試験法(対象が病原微生物)では、従来の35±1℃を用いてきた。培養温度の統一の議論の時、35℃と37℃では試験結果にほとんど差が無く、35-37℃と表記しようとの議論もあったが、精度管理上は、X±A℃の表記が望ましい、ということで、これまで食品検査で主に用いられてきた35℃を採用することとし、35±1℃と統一した。
 しかし、国内で、別途行われている、衛生指標菌の試験法では培養温度をISO法の37℃を適用する方向で議論が進んでいる。そうすると、国内で、病原微生物は35±1℃、衛生指標菌は37±1℃と、統一性が無いことになってしまう。
 そこで、これを機会に、病原微生物も37±1℃にすることとした。そのため、既に35℃でコラボを実施したサルモネラと黄色ブドウ球菌の試験法については、後日、35℃と37℃での比較データを示す必要があるが、その具体的方法については議論が必要である。

図1. メソッドバリデーション支援プログラムのWEB画面の例

表1. 標準寒天培地で受け t 倍のコロニー形成率

菌 種			CFDA				2-NBDG			
			n1	n2	n3	平均(%)*1)	n1	n2	n3	平均(%)*1)
NBRC 3009	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草菌	72	82	75	80	76	78	75	80
NBRC 3301	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	92	93	92	96	95	93	91	97
NBRC 12689	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	緑膿菌	14	12	9	12	5	8	9	8
NBRC 102135*2)	<i>Staphylococcus aureus</i>	黄色ブドウ球菌	81	72	77	80	57	39	42	48
ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	91	87	88	92	50	56	53	55

*1) $100 \times [(n1+n2+n3)/3]/96$ (%)

*2) 37°C、48h 培養。他は37°C、18h培養。

表2 Tryptic Soy Brothを用いた場合のコロニー形成率

菌 種			CFDA				培養条件	
			n1	n2	n3	平均(%)*1)	温度(°C)	時間(h)
NBRC 3009	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草菌	99	99	98	99	37	16
NBRC 3301	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	100	96	96	97	37	16
NBRC 12689	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	緑膿菌	99	98	100	99	37	21
NBRC 102135	<i>Staphylococcus aureus</i>	黄色ブドウ球菌	99	99	98	99	37	24
ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	100	100	98	99	37	16

*1) $100 \times [(n1+n2+n3)/3]/100$ (%)

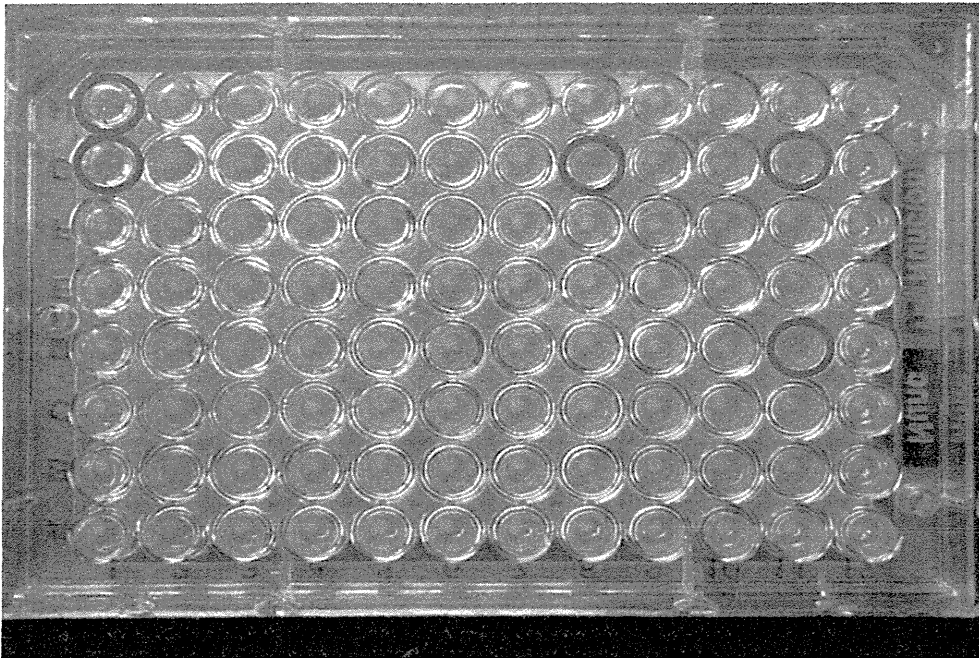


図2. *E. coli* ATCC 8739 CFDA陽性細胞を分配開いた場合の例。
朱記のウェルにはコロニーが認められない。91/96でコロニーが形成。

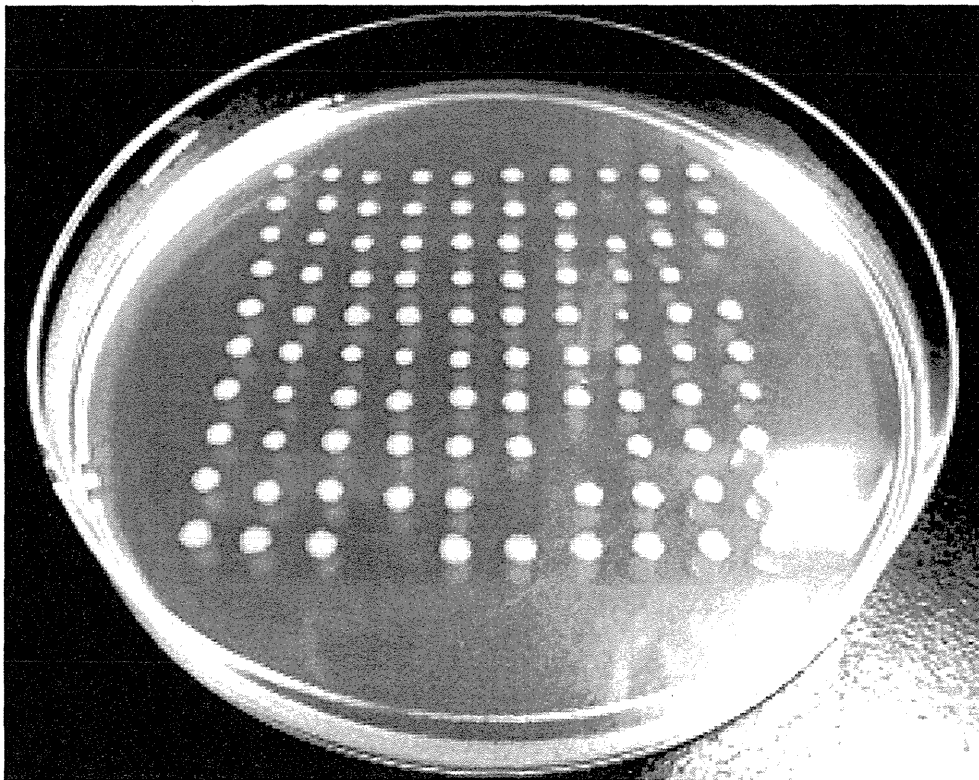


図3. *E. coli* NBRC 3301 CFDA陽性細胞を分配した場合の例
95/100でコロニーが形成。

【付録A】

『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—汎用法)” 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 定性法、第 6 章 定量法、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. 定性法

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 (表 A-1)。「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。代替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 (表 A-2)。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を選択に際しては、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 (表 A-3)。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」培地といつている。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（表 A-4）。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

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。

SLVでは菌濃度レベルが1種類（陽性率が50%程度になるように設定）であったが、CSでは菌濃度は3段階（2レベル（ L_1, L_2 ）+ブランク（ L_0 ））であり、各段階で繰り返し数は8（AOACでは6）である。したがって、必要な試験試料数は、10ラボの場合、 $(8 \text{ または } 6) \times 3(\text{レベル}) \times 10(\text{ラボ}) \times 2(\text{参照法と代替法}) = 480 \text{ または } 360$ となる。

相対特異性、相対感度については、表 A-5 に従って算出する。一方、相対精確さについては、各レベル、あるいは全レベル合計での結果を、表 A-1 と同様にまとめ、算出する。全レベル合計での相対精確さは次のようになる。

$$AC = (PA + NA) / N \times 100\%$$

但し、 $PA = L_0, L_1, L_2$ で、参照法と代替法で同時に陽性となった数

$NA = L_0, L_1, L_2$ で、参照法と代替法で同時に陽性となった数

$PD = L_0, L_1, L_2$ で、参照法で陰性、代替法で陽性となった数

$ND = L_0, L_1, L_2$ で、参照法で陽性、代替法で陰性となった数
 $N_+ = PA + ND, N_- = NA + PD, N = N_+ + N_-$

4. 定量法

微生物の定量試験では、平板培地上に形成された集落数を計数する方法と、Most probable number method (MPN法) により菌数を確率的に推定する方法がある。MPN法は、対象となる食品中に菌数が低い場合に、確率論的に推定する方法である。平板培地を用いる方法では、平板当たりの計数する集落は多すぎても少なすぎても信頼性が低い。ISO16140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。少ない方の制限はしていないが、ISO 4833:2003のように、15コロニー以下は採用しないとしている場合もある。国内の告示法の規定では、コロニー数30~300を計数し、これより少ない場合は“以下”と注釈を付けて計数する。集落数を対数変換して、統計学的評価を行う。

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。表A-6に具体的濃度設定例を示す。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 、代替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。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る。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、代替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、代替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、代替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} : 代替法による全測定値の分散 ($=V_{y_i}$ の $i=1$ to q の平均値)

$s_r(x), s_r(y)$: 参照法、代替法、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、代替法、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 と表記していても、(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 [$R = s_r(y)/s_r(x)$] を検討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、代替法の結果を 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、 $V_x = 1/(N-1)\sum(x_{ij}-\bar{x})^2$, $V_y = 1/(N-1)\sum(y_{ij}-\bar{y})^2$, $s_x = \sqrt{V_x}$, $s_y = \sqrt{V_y}$ 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 $V_x = n/(N-1)\sum(\bar{x}_i - \bar{x})^2$, $V_y = 1/(N-1)\sum(y_{ij} - \bar{y})^2$, $s_x = \sqrt{V_x}$, $s_y = \sqrt{V_y}$ 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%。

(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 よりは大きくなる。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、代替法で得られる値が、参照法で得られる値と大きく（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）以上と非添加（ネガコン）、同一濃度の試料は各 4 個で、参照法と代替法とで 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。

各試験室の試験結果は、 (x_{ijk}, y_{ijk}) , $i=1 \sim n$, $j=1 \sim q$, $k=1 \sim L$ として得られる。但し、 n 、 Q 、 L は各々、繰返し数、菌濃度の種類、試験室数。これから、例えば菌濃度 j ごとに解析する。外れ値検定の後、参照法及び代替法における併行標準偏差 $s_{r,alt}$, $s_{r,ref}$ を求め、 $F = (s_{r,alt}/s_{r,ref})^2$ の値を求める。一方、95%で両者の併行精度が等しいかどうかの判定をするために、F分布表から $F_{0.05;L,L}$ の値を求める。もし、 $F > F_{0.05;L,L}$ であれば、両試験法の併行精度は異なると判定される。

室間再現標準偏差に関しては、菌濃度jに対して、参照法及び代替法における $s_{R,ref} = (s_{r,ref}^2 + s_{L,ref}^2)^{1/2}$ 、 $s_{R,alt} = (s_{r,alt}^2 + s_{L,alt}^2)^{1/2}$ を求め、 $F = (s_{R,alt}/s_{R,ref})^2$ の値を求める。一方、95%で両者の室間再現性が等しいかどうかの判定をするために、F分布表から $F_{0.05;L-1,L-1}$ の値を求める。もし、 $F > F_{0.05;L-1,L-1}$ であれば、両試験法の室間再現性は異なると判定される。

同様に、他の菌濃度に対する併行標準偏差、室間再現標準偏差についても、参照法との比較をする。なお、ISO 16140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、通常解析法における平均値に対応する「メジアンj」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。

5. おわりに

上述のように、参照法を基準として代替法を評価する場合は、妥当性の判定基準を示すことが可能であるが、適当な参照法が得られないか、新規の参照法を開発した場合のバリデーションでは、最終段階の評価指標が決まっていない。この点が、今後の大きな課題である。

表 A-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 (参照法)	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: 擬陽性数

NA: 陰性正解数

ND: 擬陰性数

N: 検体総数 = PA + PD + ND + NA

N_P: 参照法で陽性と判定した総数

N_N: 参照法で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 A-2. 食品の種類を選択数と適用範囲及び必要な試験試料数

試験法を適用させたい食品の種類	食品カテゴリーの数	食品タイプの数/食品カテゴリー	試験試料数/食品タイプ	試験試料数/食品カテゴリー (N)	同一試料での繰り返し試験数		繰り返しを考えた試験総数
					参照法	代替法	
全ての食品	5	3	20	60	1	1	600
特定の食品カテゴリーのみ	1	3	20	60	1	1	120

表 A-3. 定性分析における相対検出レベルの試験に必要な試験試料数

食品カテゴリー	食品タイプ/食品カテゴリー	菌濃度の種類	菌濃度	試験試料総数	同一試料での繰り返し試験数		繰り返しを考えた試験総数
					参照法	代替法	
5	1 (One food product という表記)	5濃度が望ましいが、最低3以上	L0 (ネガコン)	25	6	6	300
			L1 (検出閾値)		6	6	300
			L2 (検出閾値の直ぐ上)		6	6	300
			L3 (L2の3倍以上)		6	6	300
		4濃度で実施する場合	L4 (L3の3倍以上)	6	6	300	
			L0 (ネガコン)	20	6	6	240
			L1 (検出閾値)		6	6	240
			L2 (検出閾値の直ぐ上)		6	6	240
L3 (L2の3倍以上)	6	6	240				

表 A-4. 標的菌と非標的菌の選択基準

評価項目	試験すべき菌の種類の数		検出対象としたい菌のカテゴリと、その場合の菌種の選び方		食品の種類	菌の濃度
包含性試験 (Inclusivity)	標的菌	50 pure cultures (<i>Salmonella</i> の場合30)	ある科 (Family, ex. <i>Enterobacteriaceae</i>) に対する検出法	その科に属する属の範囲から50株。代表的な属を含むように。	食品は含まず	相対検出レベル(最低検出レベル)の10~100倍高い濃度
			ある属 (Genus, ex. <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Listeria</i>)に対する検出法	その属に属する種の範囲から50株。可能なら、その属の全ての種を含むように。		
			ある種 (Species, ex. <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>)に対する検出法	その種に属する50株。株の定義は、 <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> では血清型。 <i>Listeria</i> spp.ではファージ型も。将来は遺伝子型も。		
		I (特に記載はないが)	特定の株に対する検出法	その株		
排他性試験 (Exclusivity)	非標的菌	30 pure culture	ある科 (Family, ex. <i>Enterobacteriaceae</i>) に対する検出法	その科に属する複数の株を含まなければならない。	食品は含まず	予想される最大汚染レベル
			ある属 (Genus, ex. <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Listeria</i>)に対する検出法	その属に似ている属の株を含まなければならない。		
			ある種 (Species, ex. <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>)に対する検出法	同じ属内の他の種を含まなければならない。		
			特定の株に対する検出法	同じ種の他の株を含まなければならない		

表 A-5. CS による相対精確さ、相対特異性、相対感度の評価式

	L ₀ (ネガコン)		L ₁ (検出レベルより僅かに高い濃度)		L ₂ (L ₁ の約10倍)	
	参照法	代替法	参照法	代替法	参照法	代替法
試験室1						
試験室2	(繰返し数8のうち、陽性となった回数を記入)					
試験室3						
etc.						
陽性数の合計	FP _R	FP _A	TP _{1R}	TP _{1A}	TP _{2R}	TP _{2A}
試料総数	N _{0R}	N _{0A}	N _{1R}	N _{1A}	N _{2R}	N _{2A}

FP_R, FP_Aは擬陽性の数なので

$$SP_R = (1 - (\frac{FP_R}{N_{0R}})) \times 100\% \quad SP_A = (1 - (\frac{FP_R}{N_{0R}})) \times 100\%$$

TP_{1R}, TP_{1A}, TP_{2R}, TP_{2A}は真の陽性数なので

$$SE_R = \frac{TP_{1R} + TP_{2R}}{N_{1R} + N_{2R}} \times 100\% \quad SE_A = \frac{TP_{1A} + TP_{2A}}{N_{1A} + N_{2A}} \times 100\%$$

表 A-6. 定量分析における濃度レベル

細菌濃度レベル	具体的な濃度の設定例				サブ検体数/菌濃度	サブ検体の10倍希釈繰り返し回数 (n)	試験総数/食品カテゴリー
	狭い濃度範囲で線形目盛			広濃度範囲で対数目盛			
	最大値 2×LODの場合	最大値 10×LODの場合	最大値 100×LODの場合	最大値500×LODの場合 2.70+LOG(LOD)			
0 (ネガコン)	0	0	0	Log(LOD)	2以上、5~10を推奨	特に規定無し	10以上(25-50推奨)×n×4 ディッシュ(参照法2+代替法2)
中間値1	0.5×LOD	2.5×LOD	25×LOD	0.68+Log(LOD)	2以上、5~10を推奨		
中央値	1.0×LOD	5×LOD	50×LOD	1.35+Log(LOD)	2以上、5~10を推奨		
中間値2	1.5×LOD	7.5×LOD	75×LOD	2.02+Log(LOD)	2以上、5~10を推奨		
最大値	2.0×LOD	10×LOD	100×LOD	2.70+Log(LOD)	2以上、5~10を推奨		

平成 20-22 年度厚生労働科学研究補助金（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

衛生指標菌試験法に関する研究

分担研究者 伊豫田淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

協力研究者 田中廣行，諸藤圭（日本食品分析センター 微生物部）

森曜子（日本適合性認定協会 認定センター）

研究要旨

欧州における食品の微生物基準（COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs）では、衛生指標菌として Aerobic colony count（好気性集落数），Enterobacteriaceae（腸内細菌科）及び *E. coli*（大腸菌）が採用されており、試験法としては ISO が定める国際規格の方法（ISO 法）が Analytical reference method（参照試験法）として指定されている。

一方、わが国の食品衛生法では衛生指標菌として主に細菌数（生菌数），大腸菌群，*E. coli*（糞便系大腸菌群）等が採用されている。食品衛生法における衛生指標菌の試験法は告示・通知等により公定法として示されているが、これら試験法の中には長年改正されていないために実際の試験にそぐわないものや、試験法間で整合性の取れない操作・手順のあることなどが指摘されている。さらに、国際的な標準法（ISO 法や FDA/BAM 法）との調和が取られていないことから、食品の輸出入に係わる企業や試験を行う試験所等において混乱を生じることが少なくない。これらの現状を改善するために、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」における専門家による会議及び衛生指標菌作業部会において引き続き検討を行った。その結果、今後規格が制定・改正される食品の衛生指標菌試験法として、基本的には ISO 法をそのまま移行した Enterobacteriaceae（腸内細菌科），Presumptive *Escherichia coli*（推定大腸菌），Coliforms（大腸菌群）の試験法を確立することとした。本研究では、上記の試験法に対応する ISO 法の逐語和訳版を作製した。さらに、大腸菌群測定用培地であるデソキシコーレイト寒天培地及びバイオレット・レッド胆汁酸塩寒天培地の比較を行った。また、腸内細菌科測定用培地であるバイオレット・レッド胆汁酸塩ブドウ糖寒天培地による生育集落の比較を行った。

A. 研究目的

欧州では、食品に係わる微生物基準として「COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs」が制定されており、食

品安全に係わる基準（Food safety criteria）と製造工程上の衛生に係わる基準（Process hygiene criteria）に大別されている。これらの基準では、衛生指標菌として Aerobic colony count（好気性集落数），Entero-