

度は新しい規格 ISO4883-2 (ISO 塗抹法) と従来法 (検査指針法) においてもその相関性を算出した。その相関係数(R^2)は 0.8814 (グラフ 2) と、混釈法どうしの相関係数よりも若干低い値となった。

測定結果においては、昨年度と同様、従来法より ISO 混釈法の方が高くなる傾向があった (グラフ 4) が、63 検体中 57 検体が 1Log CFU/g の範囲内であった。肉の種類ごとの測定値の差 (表 3) および、加工の種類ごとの測定値の差 (表 4) からは、肉の種類、加工の種類による特色はみられなかった。1Log CFU/g の範囲外であった検体は、表 5 のとおり。1Log CFU/g の範囲外の 6 検体について菌の同定をおこなった結果は、表 6 のとおりである。結果に違いの出る要因として、培養温度と培養時間が挙げられる (表 7) ので、分離された菌種について各培養温度帯での発育曲線の比較を行い確認する必要がある。

ISO 4833-1:2013 (混釈法) 及び ISO 4833-2:2013 (平板塗抹法) の規格においては採用する試験法により得られる結果が異なる場合があると記載があるが、測定値の差は、-0.389~0.951 の範囲内であり 1 Log CFU/g の範囲を超えた検体はなく、2 試験法で得られた結果は、ほぼ変わらなかった。またその相関係数(R^2)は、0.9748 (グラフ 3) であった。

表 7 培養温度と培養時間

試験法	培養温度	培養時間
標準寒天平板培養法 (食品衛生検査指針 2004)	35±1℃	48±3 時間
ISO 4833:2003	30±1℃	72±3 時間

以上

別紙：測定結果一覧

試料 No.	品名	肉種	形態	検査指針	ISO 混釈法	ISO 塗抹法
1	豪州産 牛肉上バラカルビ焼肉用	牛	スライス	6.8837	7.0174	7.1517
2	アメリカ産 牛肉 カレーシチュー用	牛	スライス	6.1021	6.9800	7.0492
3	牛小間切れ(小)国内産	牛	スライス	7.2240	7.2163	7.2385
4	輸入牛 肩バラうすぎり	牛	スライス	5.7202	5.6443	5.7068
5	愛知県産尾張牛小間切 交雑種	牛	スライス	5.0453	5.2102	5.2464
6	牛肉 小間切 国産	牛	スライス	5.8325	5.8451	5.8751
7	国産牛肩ロース切落とし	牛	スライス	4.0374	4.1124	4.1852
8	アメリカ産 牛肉ヒレステーキ用	牛	ブロック	6.1206	6.7475	7.1230
9	オーストラリア産 牛肩ロース ステーキ用	牛	ブロック	6.7482	6.7889	6.9191
10	牛モモ(ローストビーフ用)(小)ニュージーランド産	牛	ブロック	5.7033	5.8451	5.9476
11	輸入牛 バラブロック	牛	ブロック	6.5855	6.6284	6.7324
12	豪州産牛かたまり(バラ肉)	牛	ブロック	6.0394	7.4797	7.4465
13	牛肉 ブロック オーストラリア産	牛	ブロック	7.1644	7.2109	7.2316
14	国産牛ヒレステーキ用 交雑種	牛	ブロック	5.2393	5.2746	5.3040
15	牛肉挽肉(国産)	牛	ミンチ	5.6232	6.1063	6.2151
16	国産牛 ミンチ	牛	ミンチ	6.2718	6.3916	6.0323
17	めぐみ野大沼牛挽肉(小)(解凍品)北海道産	牛	ミンチ	5.0917	5.1954	5.2498
18	牛上ひき肉(国産牛)	牛	ミンチ	6.3424	6.4983	6.1094
19	尾張牛挽肉 愛知県産	牛	ミンチ	7.0414	7.0450	7.0396
20	牛ミンチ 九州産	牛	ミンチ	8.1038	8.1748	8.1094
21	国産牛挽肉(解凍)	牛	ミンチ	4.1508	4.7943	4.6353
22	若どりもも肉すきやき用(国産)	鶏	スライス	7.5966	7.9566	7.9340
23	国産若鶏 むね肉 親子丼用	鶏	スライス	4.5502	5.1461	6.0969
24	めぐみ野あか鶏もも鍋・炒め物用(小)国内産	鶏	スライス	5.8325	5.9714	6.0268
25	鹿児島県産若鶏むね肉切落とし	鶏	スライス	5.4425	5.5870	5.9431
26	若鶏小間切(むね肉・もも肉)国内産	鶏	スライス	6.1189	6.8751	7.1545
27	親鶏 すき焼き用 国産	鶏	スライス	8.2014	9.0641	9.0742
28	国産若鶏もも・むね親子丼用	鶏	スライス	5.4338	5.9104	6.0249
29	若どりもも肉(ブラジル産)	鶏	ブロック	7.3424	8.5085	8.6284
30	ブラジル産 若鶏もも肉	鶏	ブロック	3.1055	4.0039	4.1274
31	国内産若鶏もも肉	鶏	ブロック	6.1038	6.0555	6.1573
32	若鶏もも肉 一枚	鶏	ブロック	4.1658	4.2281	4.0969
33	三河赤鶏むね肉 愛知県産	鶏	ブロック	3.5855	3.6443	3.9629
34	若鶏 正肉(モモ) 鹿児島県産	鶏	ブロック	7.8195	8.6021	8.6829
35	国産若鶏もも肉	鶏	ブロック	3.7597	3.8644	3.9454

試料 No.	品名	肉種	形態	検査指針	ISO 混釈法	ISO 塗抹法
36	いきいき鶏むね挽肉(国産)	鶏	ミンチ	6.7993	7.9542	8.0759
37	国産若鶏 むね肉ミンチ	鶏	ミンチ	5.8228	6.2564	6.7295
38	めぐみ野若鶏むね挽肉(小)解凍品国内産	鶏	ミンチ	5.6484	5.6232	5.6021
39	若鶏むねひき肉	鶏	ミンチ	4.1319	4.1852	4.1109
40	若鶏挽肉(むね肉)国内産	鶏	ミンチ	5.1818	5.3859	6.0503
41	若鶏 ミンチ(上等) 鹿児島県産	鶏	ミンチ	7.3170	8.3677	8.4678
42	国産若鶏もも・むね挽肉(解凍)	鶏	ミンチ	6.2317	6.8507	6.8829
43	国産 豚肉バラうすぎり	豚	スライス	7.2430	7.1941	7.3050
44	北海道産味わい豚 カレー用	豚	スライス	5.9542	6.0342	6.7748
45	めぐみ野豚小間切れ宮城県産	豚	スライス	5.3355	5.3916	5.4500
46	国産豚 肩肉極うすぎり	豚	スライス	4.7443	4.8129	5.1600
47	豚小間切 国内産	豚	スライス	4.9269	5.6353	5.8590
48	豚 小間切 国産	豚	スライス	7.5563	8.8394	9.0136
49	国産豚小間切	豚	スライス	3.1569	3.3727	3.4500
50	米国産 チルド豚肉 T-LOIN HEAD OFF	豚	ブロック	6.8949	7.0378	7.1573
51	国産味わい麦豚 もも かたまり	豚	ブロック	6.2945	6.6619	6.5209
52	豚もも赤身ブロック(中)国内産	豚	ブロック	6.6675	6.8507	6.9104
53	国産豚 ヒレブロック	豚	ブロック	3.5315	3.6307	3.5870
54	みかわ旨香ポーク豚かたまり(モモ肉)愛知県産	豚	ブロック	4.0774	5.4837	6.1124
55	豚バラ ブロック 九州産	豚	ブロック	6.5502	7.1414	7.3424
56	国産豚肩ロースブロック	豚	ブロック	3.2613	3.7331	3.8006
57	豚肉挽肉(国産)	豚	ミンチ	8.4057	8.7368	8.8420
58	国産豚 ミンチ	豚	ミンチ	3.7818	4.6398	4.9960
59	めぐみ野豚挽肉(解凍品)宮城県産	豚	ミンチ	6.1584	6.2777	6.2629
60	豚挽肉(2度挽)(国産)	豚	ミンチ	5.2878	6.1215	6.0000
61	国内産豚挽肉	豚	ミンチ	6.0792	6.1708	6.6788
62	豚 ミンチ 九州産	豚	ミンチ	8.4639	8.9980	9.0059
63	国産豚肉挽肉(解凍)	豚	ミンチ	5.9661	6.8189	6.9080

試験法名一覧

ISO 4833-1 : 2013

Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part1: Colony-count at 30 °C by the pour plate technique

ISO 4833-2 : 2013

Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part2: Colony-count at 30 °C by the surface plating technique

ISO 6887-1:1999

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-2:2003

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

ISO 7218:2007

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 7218:2007Amd1:2013

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations AMENDMENT1

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品中の微生物試験法及びその妥当性評価に関する研究
分担研究報告書

妥当性評価

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
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学研究院 教授

研究要旨

我国の公定法と国際的に認知された参照法とのハーモナイゼーションを図りつつ、主要な菌種について、順次、標準法が開発されている。本研究は、この標準法及びこれを参照法とする代替法の妥当性確認ガイドラインの作成を第一の目的としている。そこで、AOAC:2012.2 版ガイドラインと ISO16140:2003、及びそれらの最新改訂内容を検証した結果に基づき、ガイドラインの原案を作成した。第二の目的は、少数生菌標準物質のその場調製法の開発である。前年度まで適用できることを実証した 16 株に関する結果をまとめ、J. AOAC Int.へ論文投稿したところ、受理されインプレスとなった。生菌標準物質のその場調製のコンセプトが AOAC で議論するための準備が整った。また、この方法が少数生菌を含む標準汚染食品の調製にも適用できることが示された。以上は、バリデーションの方法論の観点から重要な成果である。

A. 研究目的

我国から発信する微生物試験法を国際的に通用するものにするには、国際的に認証されたスキームによってバリデーションしなければならない。国際的に認証されたスキームのモデルとしては、AOAC: 2012.2 版ガイドライン、ISO16140: 2003、及びそれらの最新改訂文書が重要であると判断されたので、昨年まで研究で、それらの文書を詳細に調査した。具体的な数値の規定など、AOAC と ISO では異なる点が多々あったが、それらの根拠を検討し、最終的に合理的なガイドラインとすべく、その原案を作成することとした。これが第一の目的である。

一方、妥当性確認においては、従来から、生菌標準物質が限られた少数菌株についてしか得られないことがボトルネックとなっていた。そこで、セルソーターを利用するその場調製法に着目し、その有効性を検討してきたが、前年度までに

16 株について調べた結果、すべての株で適用できることが示された。本年度はその成果を論文としてまとめ、J. AOAC Int.へ投稿すること、2014 年度の AOAC INTERNATIONAL の総会におけるサイエンス・セッションに、当該テーマで応募することを目的とした。またこの方法による、少数生菌で汚染された標準汚染品の調製、に適用するための諸条件についても検討することとした。

B. 研究方法

(1) バリデーション・ガイドラインの原案作成

2012 年 2 月に公開された AOAC のガイドラインと ISO16140: 2003 と比較した結果、両者で、微妙に、あるいは明確に異なる内容があったが、その理由は必ずしも明確ではないことが分かった。そこで、そうした差異が出てくる背景を洞察し、むしろ我国から合理的な考え方を提唱しよう、との発想で原案をまとめるこ

ととした。そこで、ガイドライン原案に、随所に注記を入れ、合理的判断の根拠を示すこととした。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

(イ) 「コロニー形成能」の概念の導入

昨年度までの成果をまとめて J. AOAC Int. に投稿するに際して、「生菌 = a living cell あるいは a viable cell」では誤解が生じるので、コロニー形成能を有する細胞 (a cell with colony-forming potentiality (CFP)) と表記することにした。生きてはいるが、コロニーを形成しない、あるいはマイクロコロニーしか作らない、という例が多々あるからである。

CFP を有すると期待される細胞を 100 個ソーティングした結果、100 個のコロニーができれば、コロニー形成率 (colony forming rate (CFR)) 100% ということになる。昨年度の成果は、フローサイトグラムの上で、どの領域の細胞を選択すれば 95% 以上の CFR が達成されるか、というゲート条件が 16 株すべてについて得られた、ということである。

(ロ) 標準汚染食品のその場調製

95% の CFR を達成するためのゲート条件が決められたとはいえ、偶々、細胞の状態が変化していたり、あるいはセルソーターの流路が汚れていたりして、CFR が低下してしまうことがあるかもしれない。セルソーターのメンテナンスに十分な配慮がなされているとはいえ、実際に、精確な少数菌を添加した標準汚染食品を調製する場合には、検量用プレートに同時にソーティングしておくことが望ましい。

すなわち、食品マトリクスへの細胞のソーティングと同時に、並置した検量用の TSA プレートへもソーティングし、その時の CFR を求めておくようにする。例えば、食品に 10 細胞ソーティングした場合、検量用プレートでの CFR が 98% であ

ったとすれば、実際に添加された細胞数は 9.8 個であると見積られる。このように統計的な概念が入って、菌数が少数点以下の数字で表記されるようになる。

(ハ) セルソーティング条件

細胞をカルボキシフルオレッセインジアセテート (CFDA) で染色する条件、使用したセルソーター (専用オートステージ付きの AriaII (BD 社)) は前年度までと同様である。標準型プレートは直径 86mm^φ で、その寒天培地上に等間隔で 10×10=100 の位置に 1 細胞ずつ滴下した。検量用プレートは、場合によって小さいプレートを使用し、例えば 7×7+1=50 か所に 1 細胞ずつ滴下した。

また、コロニー形成能を検証するための培地も前年度までと同様、Tryptic soy agar (TSA) を用いた。

C. 研究結果

(1) バリデーション・ガイドラインの原案

添付資料参照。

(2) 微生物生菌標準物質の開発結果

前年度の成果を論文としてまとめ、AOAC で議論するための第一歩として、J. AOAC Int. に投稿した。査読者との議論の過程で、「生菌」を表すことばとして「コロニー形成能 CFP」を導入することを提示した。最終的に受理され、in press となっている (添付ゲラ参照)。

標準汚染食品の調製法に関しては、以下の結果が得られた。

(1) 飲料は適当な容器に入れて、検量用プレートと共に、セルソーターのステージにセットし、これに少数生菌をソーティングした。しかし調製された菌添加飲料を、他の容器に移す際に、器壁等への菌の吸着の影響が大きいことがわかった。

(2) 飲料へ菌を添加した場合に、飲料成分が菌のコロニー形成に及ぼす影響を調

べるためには、飲料を含む寒天ゲル上に直接ソーティングする方法が有効であることが分かった。

(3) 固体や粉体の場合は添加された菌が器壁に吸着する問題はないと考えられた。

(4) ソーティングされた菌の CFP の安定性は菌の種類によって異なる。調製後、バリデーション等に使用するまでの時間を考慮して、安定性に関するデータをしておく必要があると結論された。

D. 結論

AOAC:2012.2 版ガイドラインと ISO16140:2003、及びそれらの最新改訂内容を検証した結果に基づき、ガイドラインの原案を作成した。POD の概念の導入により検体調製の高精度化が求められるようになった。

しかし、本研究では少数生菌標準物質の調製、さらにそれを利用した少数生菌を精確に添加した生菌汚染標準食品の調製に関する技術開発を世界に先駆けて進めてきた。既に論文としても J. AOAC Int. に掲載予定であり、また 2014 年 9 月の AOAC INTERNATIONAL 総会において、生菌標準物質と題するシンポジウムも予定されている。迅速法、簡便法も含めた合理的な微生物試験バリデーションに向けた重要な成果と考えられる。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表

(原著論文)

H. Matsuoka, K. Nakano, N. Takatani, T. Yoshida, S. Igimi, M. Saito: A flow cytometric method for the in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. J. AOAC Int.97 (2014) in press

(国際学術集会)

H. Matsuoka: Global thinking of validation in Japan. Korea Food and Drug Administration Symposium: Establishing System of Microbiological Testing Procedures, Cheongwon, Korea (2013.4.26)

H. Matsuoka, T. Yoshida, N. Takatani, M. Saito, S. Igimi: In situ preparation of standard material of viable single-cells for innovative validation of microbiological methods. 127th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Chicago, USA (2013.8.26)

(国内学術集会)

吉田智紀, 高谷周督, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明: 保存安定性を考慮した生菌標準物質の調製. AOACIJS2013 年次大会、東京 (2013.6.1)

高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明: FACS を利用した生菌ソーティング法による標準低汚染飲料の調製条件の検討. AOACIJS2013 年次大会、東京 (2013.6.1)

吉田智紀、高谷周督、Alvin Mariogani、斉藤美佳子、五十君静信、松岡英明: 生菌標準物質の保存安定性. 第 40 回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2013.9.11)

高谷周督, 吉田智紀, Alvin Mariogani, 斉藤美佳子, 五十君静信, 松岡英明: FACS を利用した生菌ソーティング法による標準低汚染飲料の調製条件の検討. 第 40 回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2013.9.11)

松岡英明: 微生物分析法の妥当性確認におけるボトルネック—生菌標準物質. JASIS コンファレンス、幕張 (2013.9.6)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

微生物試験法のバリデーションガイドライン原案 (2014.3.20 版)

項目	内容	注記
1. 用語の定義	<p><u>バリデーション (妥当性確認 Validation)</u> : ISO/IEC17025 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項 (JIS Q17025:2005,5.4.5.1) では、「意図する特定の用途に対して個々の要求事項が満たされていることを調査によって確認し、客観的な証拠を用意すること」と定義されている。</p>	
	<p><u>試験、検査、分析</u> : 行政上、あるいは管理上の判断を伴う概念は「検査 (Test, Inspection) で表記され、科学技術的方法論の概念は「<u>化学分析 (Analysis)</u>」、「<u>生物測定 (Measure)</u>」、「<u>物理計測 (Measurement)</u>」で表記される。一般的な概念をあらわす場合は「<u>試験 (Examination, Test)</u>」と表記される。本バリデーションガイドライン原案 (以下、単に「本ガイドライン」) では、「<u>試験</u>」と表記する。</p>	
	<p><u>参照法、公定法、標準法、代替法、参考法</u> : 参照法は国際的に認証され、裁判にも採用される高い信頼度を有する試験法で次の3種類がある。</p> <p>①公定法 : 国が規定した、あるいは認知した試験法で、通知、通達、告示などで示された試験法*1。</p> <p>②標準試験法 : 微生物標準試験法検討委員会で共同試験によって検証された試験法。公定法を③の既存法と比較検討して国際的にハーモナイズさせて作成した標準法 (ハーモナイズド標準法) と③の中に適当な既存法がないので新規に開発した標準法 (新規標準法) とがある*1,2,3。</p> <p>③第三者認証機関で認証された試験法 : ISO16140 あるいは AOAC International Validation Guideline 2012 版 (以下、単に「AOAC2012 版」と表記) に基づき、バリデーションされ第三者認証機関 [ISO、AOAC-OMA (米国)、AFNOR (フランス)、MicroVal (オランダ)、NordVal (ノルウェー) 等] で共同試験によるバリデーションされた試験法。</p>	<p>(*1) 我が国の公定法と③の既存法との比較検証作業が進められている。その成果は②となっている。</p> <p>(*2) 標準法検討委員会で作成した試験法は、バリデーションの後、これを国際専門誌に掲載することによって「参照法」となる。</p> <p>(*3) 既存の試験法の「一部」修正の場合は検証 (ベリフィケーション Verification) の範疇に入る。ベリフィケーションとは試験法が目的通りの性能を発揮することを確認すること。</p> <p>(*4) 代替法 (Alternative method) は ISO16140 で用いられている用語。AOAC2012 版では候補法 (Candidate method) という用語を用いているが、本ガイドラインでは代替法で表記した。</p>

	<p>以上の3種類以外の試験法は参考法である。 代替法*4とは、参照法と比較試験を行った後、代わりに使用する試験法の意。 ハーモナイズド標準法の他、簡便法や迅速法も含む。</p>		
	<p><u>試験法、食品マトリクス、分析種、試料、繰り返し数、検体</u>：試験法 (Method) は食品の種類 (食品マトリクス Food matrix) と菌の種類 (一般的には分析種 Analyte という) の組み合わせに対して規定される。バリデーションでは、これに菌濃度の種類 (Analyte level or concentration)、繰り返し数 (Number of replicates)、共同試験を実施する場合の試験室数 (Number of collaborators)、が規定される。食品マトリクス・菌の種類・菌濃度、で規定される試験対象を試料 (Sample) という。1試料中では菌濃度は一様とみなす。1試料から n 個の検体 (Test portion) を分取して試験するように規定されているが、この n を繰り返し数という。通常 25 g と規定されているのは、1検体量である。バリデーションでは、1試験法あたり、「食品の種類×菌の種類×菌濃度の種類×繰り返し数×試験室数」の検体数、検体量が必要になる。</p>		
	<p><u>その他の用語</u>*1</p>		<p>(*1) AOAC2012 版の冒頭に Collaborative study (CS), Composite test portion, Confirmed results, Fractional recovery, Inclusivity, Precision, Presumptive results, etc. 等がリストアップされている。用語の統一は、日本語訳だけではなく、元の英語表現でも必要なので、継続的に議論、改訂が必要。</p>
<p>2. 目的</p>	<p>2.1. 食品微生物試験の目的</p>	<p>食品に関する微生物試験の対象分野は、食品、飲料、飼料、環境 (生活、医療、製造、流通など) などである。その目的は</p> <ul style="list-style-type: none"> ①食品の微生物管理のための検査 ②食中毒原因究明のための病原菌のスクリーニングと分離 <p>に大別され、①はさらに、</p>	

	<p>(A)法的判断のために行う検査 (B)製造工程管理のための検査</p> <p>に分けられ、それぞれ採用できる試験法は異なる場合がある。</p>	
2.1.1. 食品の微生物管理のための試験	<p>規格基準への適合性を評価したり、食品の食中毒の発生を未然に防ぐために、微生物汚染レベルを検証するために行われる試験で、病原微生物が検出されるか否か（定性試験）、あるいは、衛生指標菌がある菌数以下に抑えられているか否か（定量試験）、などを調べるための試験である。試験法には、裁判に採用できる程度の高い信頼度を有することが求められる。その信頼度を科学的に支持するのがバリデーションである。</p> <p>A. 法的判断のために行う試験：規格基準の適合性や、輸入検疫などの検査で採用できる試験法は、通知、通達、告示で示された公定法であり、原則的には培養法に基づく試験法が採用されている*1。</p> <p>B. 自主衛生検査、工程管理のために行う試験*2：食品の製造工程における微生物の菌数レベルを、自主管理するために行う微生物試験であり、この目的に使用する試験法は、A の場合と同様の高い信頼性のあるものの他、求める精度を満たす範囲で迅速・簡便法の使用が可能である。</p>	<p>(*1) 公定法は、例え標的菌が同じでも、食品が対象外であれば公定法から外れる。</p> <p>(*2) 自主検査で用いる試験法は、検査の目的に合った適切なものを選択し、ベリフィケーションを行った上で使用する。</p>
2.1.2. 食中毒原因究明のための病原菌のスクリーニングと分離に用	<p>食中毒事件が既に発生している場合は、病原菌のスクリーニングと分離が緊急に必要である。この場合に採用する試験法は、2.1.1. の場合とは根本的に異なり、当該の病原微生物を迅速に確保することが重要で、最新の技術を導入した迅速・簡便試験法などを応用しながら、迅速に対象微生物をスクリーニングし分離することが求められる。PCR による遺伝子検査、抗体を利用した試験法、</p>	

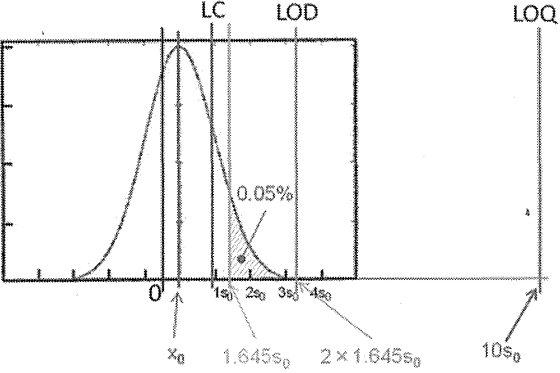
	いる試験法	酵素基質を利用した培養法なども利用される。	
	2.2.適用する試験法	<p>本ガイドラインは、食品、飲料、飼料、環境（生活、医療、製造、流通など）の微生物試験で、次のいずれかの場合に適用する。</p> <p>①ハーモナイズド標準法 ②新規標準法 ③代替法</p> <p>①および③は、適当な参照法との比較試験を、単一試験室バリデーション、および共同試験で行う。②は当該試験法単独で、単一試験室バリデーション、および共同試験を行う。</p>	
3. バリデーション実施体制	3.1. バリデーション実施機関*1	微生物試験法バリデーションの国際的ハーモナイゼーションに関する業務を統括する。	(*1) 国際的に認知されたバリデーション実施機関は ISO、AOAC-OMA、AFNOR、MicroVal、NordVal 等である。日本には対応する機関がまだないが、標準法検討委員会がその機能を果たしている。
	3.2. バリデーション実施監督者	微生物試験法バリデーションに関する専門的知識・経験を有し、該試験法の内容を十分理解している者が担当する。バリデーション実施機関が任命する。	
	3.3. バリデーション実施試験室と試験実施者	別途定める試験所認定基準を満たす試験室で、別途定める技量認定資格を有する試験者が実施する。	
	3.4. 共同試験を実施す	共同試験バリデーションに必要な試験室数*1 は、定性試験においては 12 ヶ所以上とし、10 ヶ所以上から有効な試験結果を得るよ	(*1) 試験室数と繰返し数のバランスについては ISO 5725-1 (JIS Z 8402-1)の規定を参照すれば、最低数が

	る試験室数	うにする。 定量試験においては10ヶ所以上とし、8ヶ所以上から有効な試験*2結果を得るようにする。	10、あるいは8としなければならない理由もない。しかし、実用に際して、統計上の判断をショートカットするために、ISOやAOACでは具体的な数字としてガイドラインで規定していると考えられる。したがって、1条件あたりの総検体数（1試験室での繰返し数×試験室数）が十分大きければ、試験室数は定性試験では10または11、定量試験では8または9としてもよい、と言える。しかし、こうした議論には統計学的理論武装が重要である。それもバリデーション実施機関の責務であろう。
4. 試験対象	4.1. 標的菌	該試験法を適用する標的菌の内容（特定の単一株 strain か、特定の種 species か、特定の属 genus か、特定の科 family）を定める*1。	(*1) 例えば「本試験法は、食品中の <i>Salmonella</i> genus に適用する。ただし、 <i>Salmonella typhi</i> と <i>Salmonella paratyphi</i> には適用しない。」
	4.2. 食品の種類	試験法を適用する食品は全て試験する。基本的にマトリクスエクステンションは認められないが、どの範囲までが同一の食品と見なせるかは、バリデーション実施監督者がバリデーション実施者と協議して決める*1。 食品の種類のカテゴリに関しては、SICコード（Standard Industrial Classification）に基づく分類*2、あるいはISO 16140:2003およびAOAC 2002版の付表*3があるが、我が国特有の食品のカテゴリは考慮されていないので、別途、検討する必要がある。	(*1)特定の食品マトリクスで実施したとき、どの範囲の食品マトリクスまで適用できるのか、という判断は、AOACではジェネラルレフェリーがラボスタディディレクターと相談して決める、としている。この考え方に準じて、我が国としては、その判断に同等に対応できるバリデーション実施監督者が、バリデーション実施者と相談して決める、とした。 (*2) SICコードの場合、例えば「2013」はソーセージ、肉加工品に適用。大グループ20は食品および同類の製品、201は肉製品、その中の小分類で2013がソーセージおよび他の調理済肉製品。 (*3) AOAC2012版以前は、全ての食品に適用するため

	<p>4.3. 汚染食品</p>	<p>(1) 汚染食品の原料：自然汚染食品が第一優先であるが、入手困難な場合は菌添加食品*1を使用する。1食品マトリクスあたり1種類（血清型が違うだけの場合も別の菌種）の純培養した菌を添加することを基本とする。</p> <p>(2) 傷害菌の考慮：食品の性状に応じて添加菌の種類や状態を考慮した添加方法も考慮する必要がある。例えば複数菌共存条件で試験する場合は複数の菌種を同時に添加する。加熱食品に対しては加熱処理した菌*2を、乾燥食品には凍結乾燥した菌*2を添加する。また、冷凍食品の場合は、解凍して菌添加し、十分混合した後、再凍結*2する。</p> <p>(3) 競合菌の考慮：自然汚染食品では、標的菌と競合する菌が共存している場合が多い。この状況を再現することは有用である。その場合は標的菌の10倍の濃度の競合菌を同時に添加する。</p>	<p>には、ISO では5種のカテゴリー×3以上のタイプ。AOACでは、6種のカテゴリーで合計20タイプ。</p> <p>(*1) 0.25<POD<0.75となるように少数生菌を精確に添加しなければならない場合が重要となっている。この要請に応えるべく、フローサイトメトリー法によって少数生菌を精確に添加した「汚染食品標準物質」をオンサイトで調製する方法が開発されつつある。</p> <p>(*2) これらのストレスを受けた菌が、どの程度、傷害菌となっているかについて、別途、評価しておく。</p>
<p>5. 定性試験</p>	<p>5.1. 単一試験室バリデーション*1</p> <p>5.1.1. 包含性・排他性試験</p>	<p>(1) 菌種の選定：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・包含性(Inclusivity)とは、検出可能な菌種の範囲。標的菌を含む50株以上*1（ただし、Salmonellaでは30株以上*2）で試験する。 ・排他性(Exclusivity)とは、標的菌を他の菌種と区別できる選択性。30株以上*1の非標的菌で試験する*1。 <p>(2) 試験条件：検体は食品を含まない塩溶液で、1種類の標的菌のみを含む。菌濃度は50%陽性率*3の100倍の値。1標的菌あ</p>	<p>(*1) Single laboratory validation (SLV) or Method developer validation</p> <p>*1) 新規標準法の検出性能を確認するために用いる菌株の種類は、バリデーション実施監督者が試験実施者と相談して決める。</p> <p>*2) AOAC2012では血清型として100種以上となっている。</p> <p>*3) AOAC2012版ではLOD₅₀ (Level of 50% detection)と表記。なお、下付の数字なしでLODはLimit of detectionの略語として使われている。混同しないよ</p>

	<p>たり 2 個以上の検体で試験する。</p> <p>(3) 結果の表記：例えば「50 菌株中 47 菌株が検出された。検出されなかった 3 菌株は・・・。」と報告。</p>	<p>う注意。</p>
5.1.2. 食品マトリクスでの試験	<p>(1) 食品の種類：食品の選定については 4.2.参照。</p> <p>(2) 菌数あるいは菌濃度*1：汚染食品の考え方については 4.3.を参照のこと。食品試料を 3 群に分割し、各々の菌レベルが $POD^{*2}=0, 0.25\sim 0.75^{*3}, 1.0$ となるように菌を添加する（ただし自然汚染食品を用いる場合は $POD=0$ は省略可能）。検体数は、各々 5, 20, 5 個とする。</p> <p>(3) 結果の表記：</p> <p>(a) 各菌レベルに対して $POD=x/N$ を求める。ただし $POD=POD_R, POD_A^{*4}$、x 陽性数、N 検体数。 POD の値に応じて、その 95%信頼区間(LCL, UCL)*5 を付録 A1.に従って求める。</p> <p>(b) $dPOD_A=POD_A-POD_R$ の値を求め、それに対する 95%信頼区間を付録 A2.に従って求める。</p> <p>(c) 判定：$dPOD_A$ の (LCL,UCL) の区間に 0 が含まれれば参照法と代替法は統計的に 95%で同等*6</p>	<p>(*1)以下、単に「菌レベル」と表記。</p> <p>(*2) Probability of detection</p> <p>(*3) 0, 1 以外の POD を Fractional POD という。</p> <p>(*4) 下付きの R, A は各々 Reference method, Alternative method の意。</p> <p>(*5) LCL, UCL は各々 Lower confidence limit, Upper confidence limit で(LCL, UCL)が 95%信頼区間。</p> <p>(*6) AOAC2012 版では POD_A の代わりに、この段階ではまだ推定値なので「推定 POD_A (POD_{AP})」としているが、本ガイドラインでは簡単のため「POD_A」とした。</p>
5.2. 共同試験*1		(*1) Collaborative study
5.2.1. 試験室数	3.4.参照。	
5.2.2. 食品の種類	食品の種類は 1 種類以上。その一種類を何にするか、またその他の食品を追加する場合、その種類や数に関しては 4.2.参照。	
5.2.3. 菌レベルと検体	汚染食品の考え方については 4.3.を参照のこと。菌レベルは無菌、低レベル、高レベルの 3 段階*1。検体数は各レベルに対して 12 個	(*1) 5.1.2.に準じて、無菌レベルは $POD=0$ 、高レベルは $POD=1$ 、であるが低レベルは $0.25 < POD < 0.75$ を

	数	とする。	目標とする。
	5.2.4. 結果の表記	<p>(1) 併行標準偏差 s_r : L は試験室数、R は 1 試験室の繰返し数、$N=LR$ は総検体数、x_i は各試験室($i=1\sim L$)内での陽性数とおく。試験室 i での測定値は x_i 個の 1 と $(R-x_i)$ 個の 0 であり、これから試験室 i の分散 s_i^2 を求める。これより、全試験室内分散 s_r^2 を求めれば、その平方根が併行標準偏差 s_r となる*1。</p> <p>(2) 室間再現標準偏差 s_R : POD_i ($i=1\sim L$) から平均値 $LPOD=x/N$ (ただし x は全陽性数)、標準偏差 s_L を求める。これより $s_R=(s_L^2+s_r^2)^{1/2}$ を求める。</p> <p>(3) $LPOD$, $dLPOD$ に基づく判定法 : 代替法と参照法の比較試験を行った結果の判定</p> <p>(a) 各菌レベルに対して $LPOD$ を求める。その値に応じて、95% 信頼区間を付録 A3. に従って求める。</p> <p>(b) $dLPOD_A=LPOD_A-LPOD_R$ の値、およびその 95% 信頼区間を付録 A4. に従って求める。</p> <p>(c) 判定 : $dLPOD_A$ の (LCL, UCL) の区間に 0 が含まれれば参照法と代替法は統計的に 95% で同等。</p>	<p>(*1 補足) 試験室 i の測定値 (1,1,1,0,0,1,0,・・・) の平方和 $ss_i=分散 \times 自由度(R-1)$ を計算。全試験室内の平方和 ss_i, $i=1\sim L$ を加算し、全試験室内自由度 ($L \times (R-1)$) で割れば全試験室内分散 s_r^2 となる。</p> <p>(*2) $t_{0.975,df}$ の df は各試験室の POD 値 (L 個) から分散を求める際の自由度で $L-1$。0.975 は t 分布での両側 5% の意。</p>
6 定量試験	6.1. 単一試験室バリデーション		
	6.1.1. 包含性・排他性試験	(1) 菌種の選定、(2) 試験条件、(3) 結果の表記、に関する規定は定性試験の場合 5.1.1. を適用する。	
	6.1.2. 食品マトリクス	<p>(1) 食品の種類 : 食品の選定については 4.2. 参照。</p> <p>(2) 菌レベル : 汚染食品の考え方については 4.3. を参照のこと。</p>	(*1) ここでいう LOD は Limit of detection。ブランク試験で得られた平均値 x_0 と標準偏差 s_0 を基準に、図示

<p>での試験</p>	<p>無菌、低レベル（検出限度 LOD*1 近傍）、中レベル、高レベルの 4 段階*2（ただし自然汚染食品を用いる場合は、無菌は省略可能）。検体数は、各レベル に対して 5 個とする。</p> <p>(3) 結果の表記：</p> <p>(a) 併行標準偏差 s_r</p> <p>測定結果は、対数変換する。無菌の場合を加味して次の式で行う。</p> <p>$\text{Log}_{10}[\text{CFU/unit}+(0.1) f]$, ただし f は最低濃度*3 外れ値を除去した後*4、各菌レベル、各食品マトリクス、各試験法に対する、併行標準偏差 s_r を求める。</p> <p>(b) 直線性(Linearity)</p> <p>代替法と参照法の比較試験をした場合は、4 濃度×5 繰返しの結果より、参照法の結果と対応する代替法の結果をプロットして、直線近似式 $y=a+bx$ を得る。a, b の 95%信頼区間を求め、$a=0$, $b=1$ がこの信頼区間に入っていれば、両法は同等と判定する。</p>	<p>されたように、$x_0+2 \times 1.645 \times s_0$ の値が LOD。</p>  <p>x_0, s_0 : プランクの平均値と標準偏差</p> <p>(*2) 試験法の適用濃度範囲が 4logs 以上の場合、中間レベルを増やす。</p> <p>(*3) f は報告可能な最低濃度で、例えば 0.003CFU/unit. (*4) Cochran 検定、および Grubbs 検定。</p>
<p>6.2. 共同試験</p>		
<p>6.2.1. 試験室数</p>	<p>3.4.参照。</p>	
<p>6.2.2. 食品の種類</p>	<p>食品の種類は 1 種類以上。その一種類を何にするか、またその他の食品を追加する場合、その種類や数に関しては 4.2.参照。</p>	
<p>6.2.3. 菌レベルと検体数</p>	<p>汚染食品の考え方については 4.3.を参照のこと。菌レベルは無菌、低レベル、中レベル、高レベル（ただし自然汚染食品を用いる場合は、無菌は省略可能）。検体数は、各レベル 2 個とする。</p>	

6.2.4. 結果の表記	<p>(1) 併行標準偏差 s_r : 測定結果は、対数変換する。無菌の場合を加味して次の式で行う。 $\text{Log}_{10}[\text{CFU}/\text{unit}+(0.1) f]$, ただし f は最低濃度 各試験室 i ($i=1\sim L$) について、各菌レベル、各食品マトリクス、各試験法に対する、平均値 m_i と併行標準偏差 s_{ri} を求める。さらに全試験室の併行精度の総和である s_r を求める*1。</p> <p>(2) 室間再現標準偏差 s_R : m_i ($i=1\sim L$) から全試験室の平均値 m、標準偏差 s_L を求める。これより $s_R=(s_L^2+s_r^2)^{1/2}$ を求める。</p>	(*1) 5.2.4.の補足*1 では、各試験室の測定値は 1 か 0 で 12 個以上あったが、定量試験では任意の数字ではあるが最低 2 個である。この測定値に対して平均値 m_i と $ss_i=分散 \times 自由度(2-1)$ を求める。全試験室の平方和 ss_i , $i=1\sim L$ を加算してじゆうど ($L-1$) で割れば全試験室の分散 s_r^2 が得られる。この平方根が全試験室内の併行標準偏差 s_r となる。
付録	A1. 定性試験における POD に対する 95%信頼区間	<p>POD=x/N、x 陽性数、N 検体数</p> <p>① $x=0$ のとき POD=0, LCL=0, UCL=3.8415/(N+3.8415)</p> <p>② $x=N$ のとき POD=1, LCL=N/(N+3.8415), UCL=1</p> <p>③ $0 < x < N$ のとき POD=x/N, LCL=[$x+1.9207-1.9600 \times (x-x^2/N+0.9604)^{1/2}$]/(N+3.8415), UCL=[$x+1.9207+1.9600 \times (x-x^2/N+0.9604)^{1/2}$]/(N+3.8415)</p>
	A2. 定性試験における $dPOD_A=POD_A-POD_R$ に対する 95%信頼区間	<p>LCL=$dPOD_A-\{(POD_A-LCL_A)^2+(POD_R-UCL_R)^2\}^{1/2}$ UCL=$dPOD_A+\{(POD_A-UCL_A)^2+(POD_R-LCL_R)^2\}^{1/2}$</p>
	A3. 定性試験の共同試験における LPOD に対する 95%信頼区間	<p>LPOD=x/LR、x 総陽性数、L 試験室数、R 試験室数あたりの繰返し数</p> <p>① $0.15 \leq LPOD \leq 0.85$ のとき LCL=$\max\{0, LPOD-(t_{0.975,df} \times s(POD)/L^{1/2})^2\}$ UCL=$\min\{1, LPOD+(t_{0.975,df} \times s(POD)/L^{1/2})\}$</p> <p>② $LPOD < 0.15$ または $LPOD > 0.85$ のとき LCL=$\{x+1.9207-1.9600 \times (x-x^2/N+0.9604)^{1/2}\}/(N+3.8415)$</p>

		$UCL = \{x + 1.9207 + 1.9600 \times (x - x^2/N + 0.9604)^{1/2}\} / (N + 3.8415)$ <p>③ LPOD=0 のとき $LCL = 0, UCL = 3.8415 / (N + 3.8415)$</p> <p>④ LPOD=1 のとき $LCL = N / (N + 3.8415), UCL = 1$</p>
	A4. 定性試験の共同試験における $dLPOD_A = LPOD_A - LPOD_R$ の 95%信 頼区間	$LCL = dLPOD_A - \{(LPOD_A - LCL_A)^2 + (LPOD_R - UCL_R)^2\}^{1/2}$ $UCL = dLPOD_A + \{(LPOD_A - UCL_A)^2 + (LPOD_R - UCL_R)^2\}^{1/2}$

