

写真-3 いとより ストレス処理あり 前培養「なし」
18～24時間培養 [10倍希釈液]

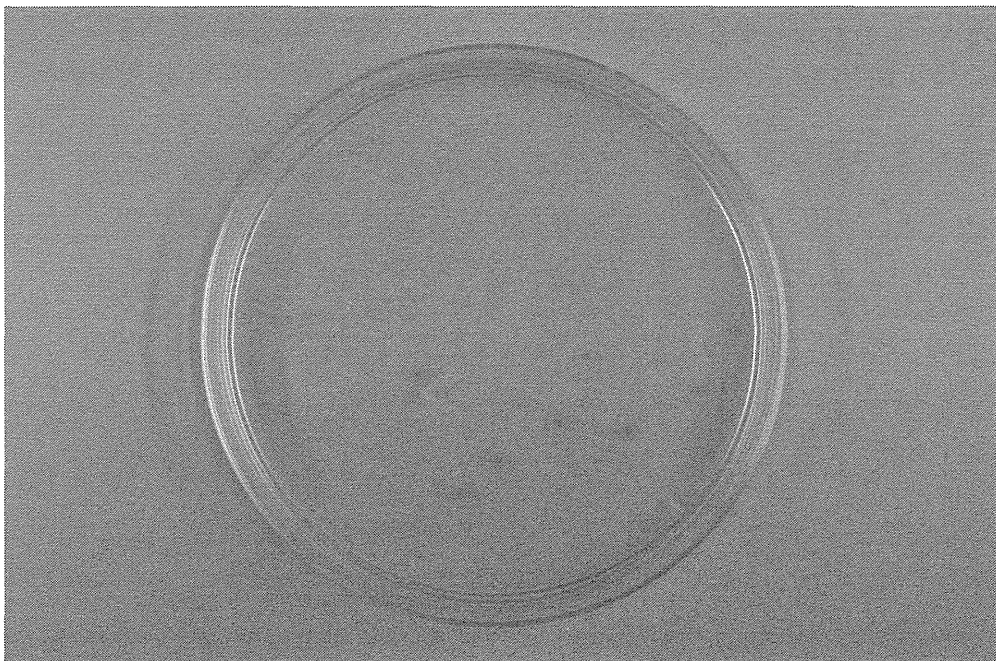


写真-4 いとより ストレス処理あり 前培養「あり」
18～24時間培養 [10倍希釈液]

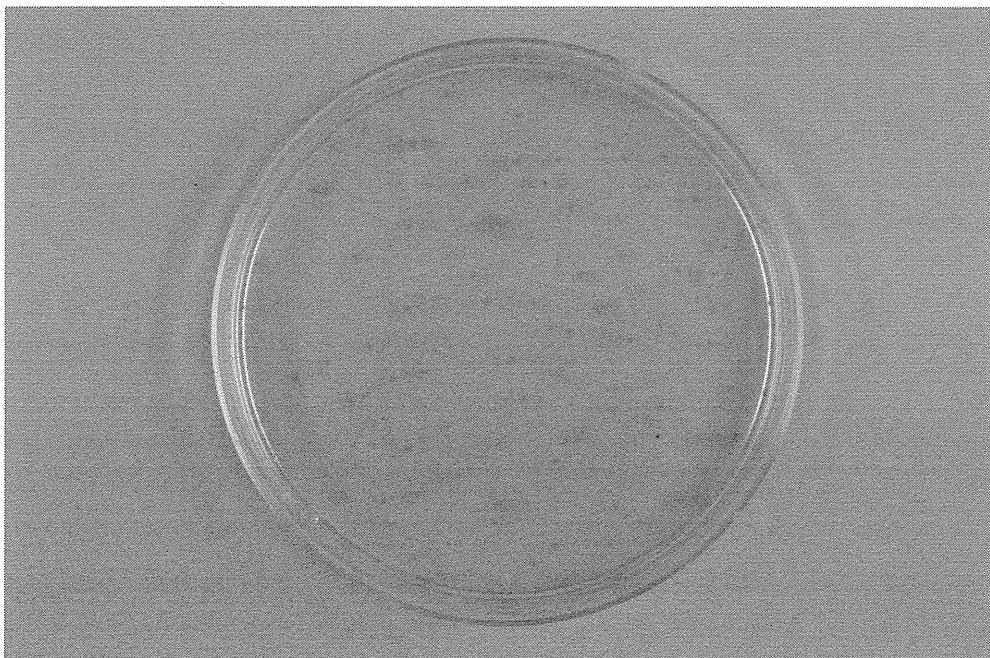


写真-5 豚ひき肉 18～24時間培養 [100倍希釈液]

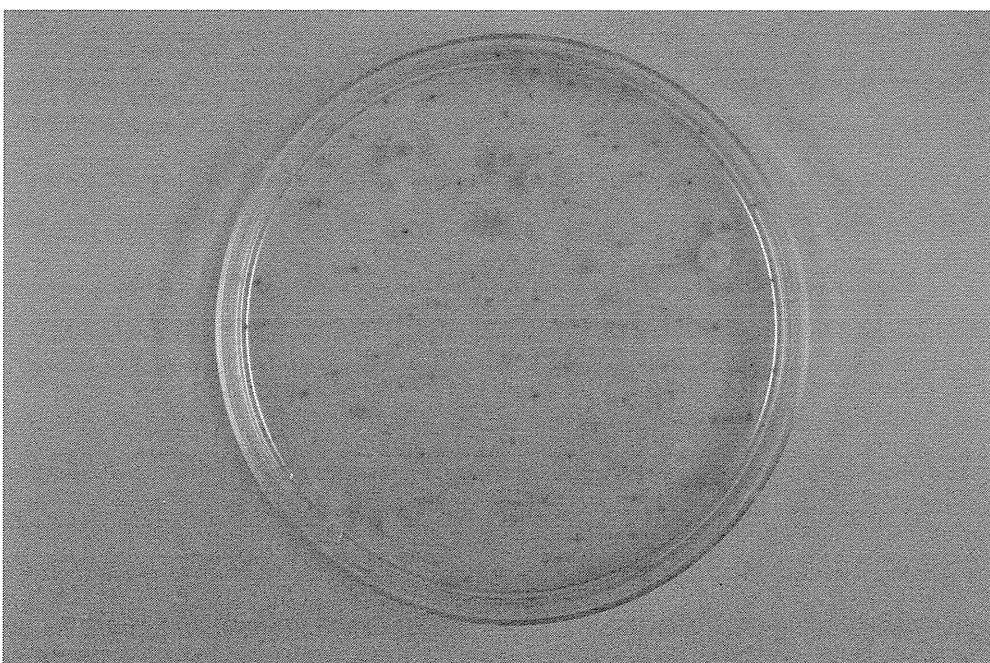


写真-6 豚ひき肉 42～48時間培養 [100倍希釈液]

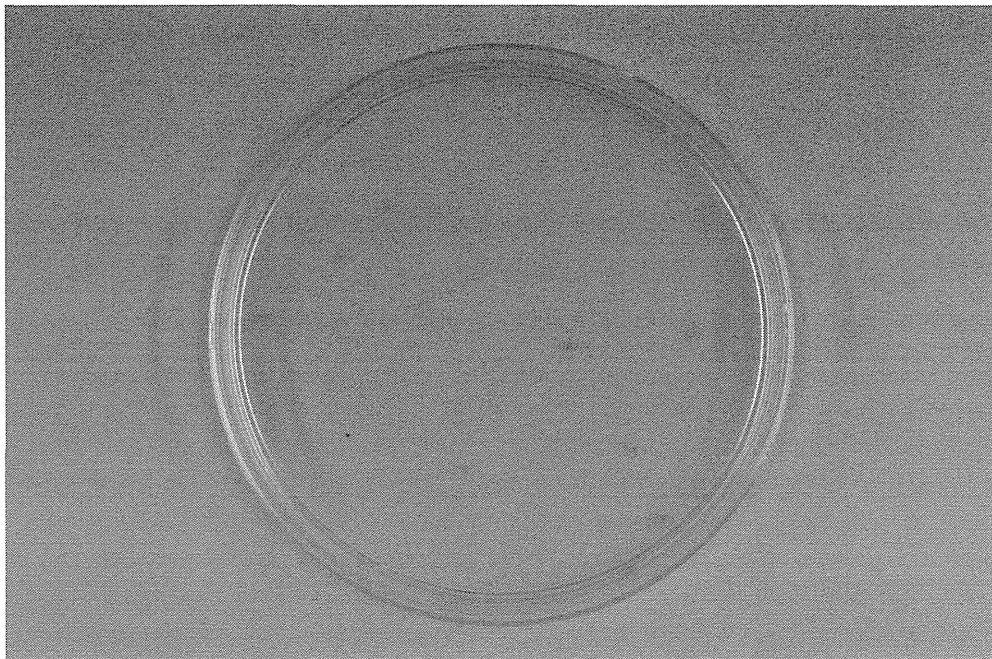


写真-7 いとより 18~24時間培養 [10倍希釈液]

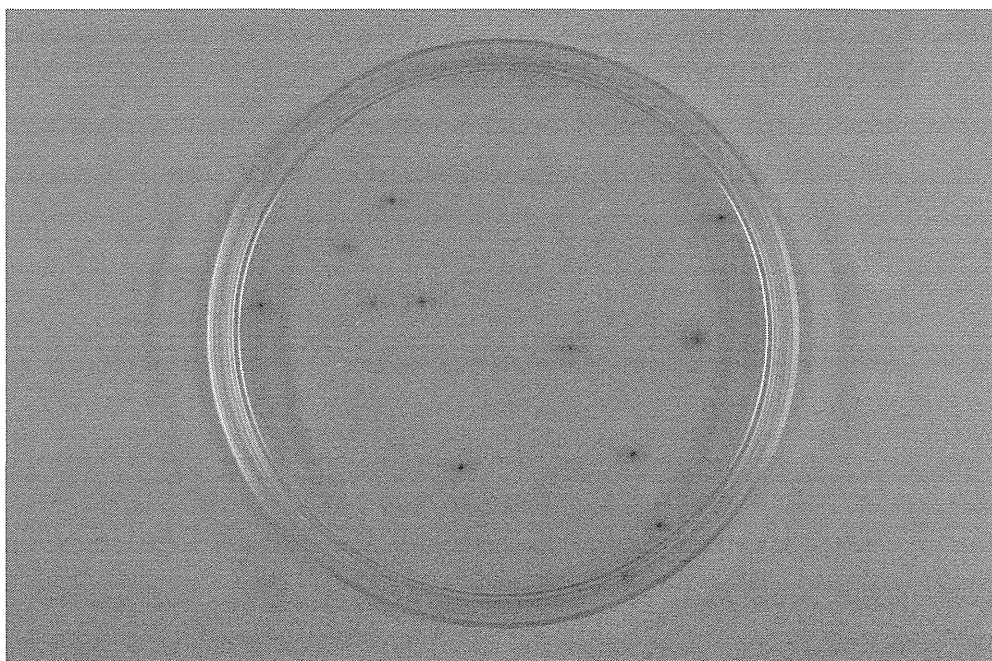


写真-8 いとより 42~48時間培養 [10倍希釈液]

平成 23-25 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

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

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

国際的に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を作成するために、AOAC、ISO など国際的に妥当性確認（バリデーション）された試験法の内容を詳しく調査してきた。その結果、既報の国際的ガイドラインに示された具体的数値が必ずしも一致してはいなかった。さらに、国際基準と国内の公定法との際についても検討が必要であった。例えば、我が国の公定法の中には、プロトコールに多少曖昧な点があっても、試験実施者が経験と技術で問題なく妥当な結果をだせるような場合もあるかも知れない。しかしそのようなプロトコールは国際的には通用し難い、という側面がある。また、食品の分類に関しては、ガイドラインの根幹をなすにもかかわらず、日本食の特質が全く考慮されていない。国際的にハーモナイズするといっても、単に技術的視点のみな

らず、教育や文化の違いまで十分考慮しなければならないかもしれない。しかし、それ故に、試験法に関する問題は国際的な議論の場でイニシアチブをとることが極めて重要と考えられる。そこで、そうした背景の下で、国際的のみならず国内状況とのハーモナイゼーションを図りつつ、妥当性確認のガイドラインを作成することが、本研究の第一の目的であった。

一方、妥当性確認に際してボトルネックとなっている課題の一つが、微生物汚染食品標準物質であった。既に、フリーズドライ型の生菌標準物質として、BioBall 等が開発されてはいるが、わずか 10 種類の菌でしか得られていない。したがって、多数の菌種・株に対して適用するために、根本的に異なる戦略が必要と考えられていた。本研究では、冷凍保存型の標準物質に代わって、オンサイトで調製する方針で可能な方法を追究すること

にした。その結果、セルソーターを利用する方法が有望と考えられ、その可能性を追究することを第二の目的とした。

B. 研究方法

(1) 妥当性確認のガイドライン作成

AOAC、ISO 文書の相違点の精査から始めた。2012年2月に公開されたAOACのガイドラインには、それまでのガイドラインに比べて、いくつかの重要な変更点があった。例えば、定性試験を共同試験で行う場合に、各試験室で分析する検体の数、すなわち繰返し数が、従来の6から一挙に2倍の12となった。しかし、その理由はどこにも記載がないばかりか、AOACのBoardメンバーに直接訊ねても明確な答えが返ってこなかった。そこで、文献のみならず、AOACやISO/TC34/SC9などの国際会議での議論を通じて、そのような世界動向を、調査分析した。それ基に我が国から発信すべき内容のガイドライン原案を作成した。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

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、次の16株を用いた。

- *Escherichia coli* K-12 (NBRC 3301)
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC 12689)
- *Bacillus subtilis* (NBRC 3009)
- *Klebsiella pneumoniae* (NBRC3318)
- *Enterobacter aerogenes* (NBRC 12010)
- *Staphylococcus aureus* (NBRC 102135)
- *Escherichia coli* O126 (isolate from food)
- *Micrococcus luteus* (NBRC 12708)

- *Enterobacter cloacae* (isolate from food)
- *Enterobacter agglomerans* (isolate from food)
- *Citrobacter freundii* (isolate from food)
- *Morganella morganii* (provided by T. Fujii)
- *Escherichia coli* AW539 (obtained from Nagoya University)
- *Campylobacter jejuni* (National Institute of Health Sciences)
- *Campylobacter coli* (National Institute of Health Sciences)

(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。

(ハ) セルソーター：AriaII (BD)

専用オートステージを設置して、通常の円形プレート (86mm^φ) の寒天培地上に、等間隔で 10×10 の位置に自動的に滴下するための専用プレートアダプター、及び、複数のプレートに同時にソーティングするためのアダプターを作製した。

(ニ) 培地

ソーティングされた生菌がコロニー形成能 (Colony-forming potentiality; CFP) を有することを示すために、Tryptic soy agar (TSA) を用いた。

C. 研究結果

(1) 妥当性確認のガイドライン作成

① ISO16140:2003 の内容検証

当初、内容の検証に取り組んだ規格は代替

法の妥当性確認の方法を詳細に規定した ISO16140:2003 であった。すでに国際的に認証されている、何らかの参照法の存在を前提にしたものである。したがって、全く新しい試験法の場合には、直接、利用できない、という問題はあったものの、国際動向を理解するためには非常に有用な資料であった。

一方、従来から妥当性確認に関しては、AOAC-OMA の方法論が国際的には定評があり、当然その内容と詳細に比較分析した。その結果、具体的な数値や条件が同じではないことに当惑した。我が国におけるガイドラインとして、どちらか一方と全く同じ内容にするわけにもいかず、しばらくは両方の内容を併記し、何故違うのかについて、議論するための資料としてまとめることとした。

②AOAC ガイドライン改訂版（2012年2月）のインパクト

初年度を終えようとする間際の2012年2月にウェブ上で公開されたAOACガイドライン改訂版（以下、単に「AOAC2012年版」と表記）の内容は、それまでの議論を大幅に見直す契機となった。その内容を調査分析し、2012年9月、JASIS (Japan Analytical & Scientific Instruments Show) コンファレンスで講演した。その時のスライドの一部を資料として添付した（添付資料1）。その要点は、妥当性確認の実施に際して、実施責任者および試験実施者が専門的観点から自ら判断しなければならない事項が著しく増えた、ということである。従来は、規定に従って実施すればよい、という姿勢で、いわば指示待ち型で済んでいたが、それでは全く機能しなくなってしまった、ということである。これが国際動向であれば、我が国としても早急に対策をたてなければならない。具体的には、AOACのように妥当性確認に関する業務を

行う組織なり仕組みなりを構築することが望まれる。現在の標準法検討委員会が当にその機能を果たしている、と言えるが、願わくは、それが恒常的な組織になって欲しいと願わざるを得ない。

③ISO と AOAC のハーモナイゼーション

AOAC2012年版に記載された具体的数値の変更点で目を引くのは、定性試験を単一試験室バリデーションする場合の菌レベルの設定法としてPOD (Probability of detection)の概念を導入したこと、それから定性試験を共同試験で行う場合の繰返し数を従来の6から一気に2倍の12にしたことである。前者のPODに関しては、菌レベルの調整が難しく、規定されたレベル、 $0.25 < \text{POD} < 0.75$ となるような検体調製が難しいことが問題であった。また、後者の繰返し数に関しては、統計的な議論があったと思われるが、その詳細はいまだにはっきりしない。ところが、2013年シカゴで開催されたAOAC INTERNATIONAL年次大会におけるシンポジウムで、このAOAC2012版の内容にISOも従う旨の発表がなされたのである。統計的な議論がなされるのでは、という期待は裏切られた。この一事からも、今後は、我が国としては、改訂の議論の段階から意見を言っていけるような体制が不可欠であると痛感した。

④日本版ガイドライン原案

以上の経緯により、現段階ではAOAC2012版の骨子に従ってガイドラインの原案を作成することが妥当と判断された。H25年度の成果報告書にも添付したその原案を、3年間の集大成として本報告にも添付した（添付資料2）。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

「定性試験において、たった1個の細胞が入

っている検体で、この菌の存在を検出できるか？」という命題は、少し前までは現実離れしたものであった。しかし、「標的菌が検出されてはならない」という基準がある一方で、試験法の性能を評価できていなければ、この基準は空文になってしまう。しかし、近年、冒頭の命題が技術的に答えられる段階になってきた。セルソーターを利用した少数生菌標準物質のオンサイトでの調製技術の開発である。

2003年にBioBallが開発されて以来、単一細胞レベルの生菌標準物質の有用性が広く認識されるようになった。BioBallは冷凍保存できて使用法も簡単であった。しかし、フリーズドライ法で作製された菌が確実にコロニー形成能を保持できる株はごく限られているようで、実際、今日に至るまで、作製されたBioBallは10種類のみである。しかし、こうした生菌標準物質の有用性を考えると、例えば、冷凍保存できなくても、オンサイトで簡便に作製できるならば、それだけでも十分利用する価値があると認識された。

そこで、フローサイトメトリーに基づいて、生菌を選択し、これをセルソーターで1個ずつ滴下する、という方法で、コロニー形成能を保持した生菌を確実に何個、という形で提供できるか、検討した。セルソーターは通常、動物細胞を対象としており、微生物細胞のように1 μ m程度では正確にソーティングできないと心配されたが、装置の調整を十分行うことによって、コロニー形成能を持った生菌のみを、1個単位で正確にソーティングできることが実証された(添付資料3)。2013年3月までに16種類の菌で成功し、その成果をまとめてJ. AOAC Int. に投稿した結果、現時点で、掲載予定となっている(添付資料4)。菌の種類に関しては、2014年3月までに、さらに2株増え、現在18株について適用できることが示されている。

オンサイト調製型生菌標準物質を用いると、

従来、分析技術者が段階希釈法で調製していた場合のような菌数の曖昧さが無くなる。液体、固体、粉体などの様々の状態の食品に添加する菌数を精確に規定できる。食品成分の中には菌に色々な影響を与える成分が多種類含まれているが、生菌標準物質を利用すれば、そのような影響を予め調べておくこともできる。実際、飲料に添加した菌のコロニー形成率が、飲料の種類によって著しく異なることが示された。

コロニー計数は微生物試験の基本であるにもかかわらず、コロニーの定義はない。そして、実験者が目視で判断しているに過ぎないので、小さなコロニーが多く存在している試料では、人によって計数値が異なる場合がある。セルソーターで滴下した100個の細胞から生じたコロニーの大きさを見ると、多くの場合、均一な大きさのコロニーが形成されることが分かった。菌種によって大きさが異なるのは、それぞれの増殖速度の違いを反映しているものと考えられる。こうした均一な形状のコロニー形成を実験的にできることから、培養に関係している様々の因子の影響を、根本的に調べ直す手がかりが得られたと考えられる。コロニー形成機構に関する詳しい研究が可能になり、その結果、微生物試験に関して、より合理的な考え方が生まれる契機になるかも知れない。

また、同じ菌株を異なる培地にソーティングした場合には、培地間でコロニーの有無に差はないものの、コロニーの大きさが異なる場合があった。この結果は、培地性能を反映しているともいえ、例えば培地のロット管理など、実用面での応用の可能性もあるのではないかと考えられる。

D. 結論

本研究では、第一の目的である、食品微生物

物試験法の妥当性確認ガイドライン作成に関しては原案を作成することができた。ISO および AOAC の最新動向を反映した内容であり、かつ我が国の現状を考慮した上で将来展望を加味した内容となっている。随所に注記された論点については、今後のさらなる議論が必要とはいえ、一応、具体的に実施する際の指針として十分に整理された内容となっている。さらに、今後、益々重要になってくると思われる政策立案や科学的討論に際しても重要な基礎資料になると考えられる。

第二の目的である、生菌標準物質に関しては、オンサイトで調製する、という戦略で進めてきた開発研究において大きな成果を挙げた。既に、論文発表およびシンポジウム企画によって、AOAC における議論を先導する準備が整っている。簡便法や迅速法をも含めた、食品微生物試験法の妥当性確認に関する今後の国際動向を牽引することになると期待され、関連研究を大きく展開させる必要があると思われる。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表(*は巻末に資料添付)

(原著論文)

- *H. Matsuoka, T. Shigetomi, H. Funabashi, M. Saito, S. Igimi: Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. *J. Microbiol. Methods* **93**(1), 49-51 (2013).
- Y. Momose, Y. Okada, H. Asakura, T. Ekawa, K. Masuda, H. Matsuoka, K. Yokoyama, A. Kai, S. Saito, R. Hiramatsu, M. Taguchi, K. Ishimura, K. Tominaga, S. Yahiro, M. Fujita, S. Igimi: Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for

the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: collaborative study. *J. AOAC Int.* **96** (5), 991-997 (2013).

- *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**(2), 479-483 (2014).

(解説・総説等)

- 松岡英明: AOAC 法による微生物試験・評価法. *日本防菌防黴学会誌*, **40**(5), 279-288 (2012).

(国際会議)

- H. Matsuoka (Symposium organizer): Symposium (AM-2) "Towards rapid and reliable methods for microbial cell", International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011), Sapporo, September 6, 2011.
- H. Matsuoka (Invited): Struggles towards rapid, reliable, and reasonable methods. IUMS 2011, Sapporo, September 6, 2011.
- H. Matsuoka, T. Shigetomi, K. Nakano, H. Funabashi, M. Saito: In situ preparation of microbial cell standard material containing exact small number of viable cells. IUMS 2011, Sapporo, September 7, 2011.
- H. Matsuoka, T. Shigetomi, K. Nakano, H. Funabashi, M. Saito: Feasibility of single-cell sorting for the in situ preparation of definite small number of viable microbial cells. 125th AOAC Annual Meeting and Exposition, New Orleans, September 19, 2011.
- H. Matsuoka (Invited): Global thinking of validation in Japan. Korea Food and Drug

Administration Symposium: Establishing System of Microbiological Testing Procedures, Cheongwon, Korea, April 26, 2013.

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, August 26, 2013.

(国内学術集会依頼講演)

松岡英明: 微生物試験法の合理的バリデーションの鍵となる生菌標準物質. 日本微生物資源学会第 19 回大会、シンポジウム「標準微生物とカルチャーコレクション」、木更津(2012.6.29)

松岡英明: 微生物試験法バリデーションの国際動向—AOACと公定法との今後の関係. メルクミリポア・マイクロバイオロジーセミナー2012、東京(2012.7.11)、大阪(2012.7.13)

*松岡英明: 微生物試験法の妥当性確認の新ガイドライン. JASIS コンファレンス「国際化に対応する分析値の質の向上とAOACの新しい分析法妥当性確認」、幕張(2012.9.7)

松岡英明: 食品微生物試験法の不確かさと標準物質. 統計数理研究所リスク解析戦略研究センター・ワークショップ「食品の安全性科学と統計科学」(2013.3.14)

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～AOAC インターナショナル: その今と分析の質の向上へのアプローチ～、幕張(2013.9.6)

(国内学会)

中納広一郎、重富知也、舟橋久景、斉藤美佳子、松岡英明: 少数生菌の定量的ソーティング. 第 38 回日本防菌防黴学会年次大会、東京(2011.8.30).

中納広一郎、高谷周督、吉田智紀、舟橋久景、斉藤美佳子、松岡英明、五十君静信: FACS を利用した微生物生菌標準物質の「その場」調製法. 第 39 回日本防菌防黴学会年次大会、東京(2012.9.11)

高谷周督、吉田智紀、斉藤美佳子、松岡英明、五十君静信: 微好気性細菌を好気条件で定量ソーティングするための条件検討. 第 39 回日本防菌防黴学会年次大会、東京(2012.9.11)

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)

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「化学分析（Analysis）」、「生物測定（Measure）」、「物理計測（Measurement）」で表記される。一般的な概念をあらわす場合は「試験（Examination, Test）」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、「試験」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>	

(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

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。

2.1.1. 食品の微生物管理のための試験

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。

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。

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。

(*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。

(*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、バリフィケーションを行った上で使用する。

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

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、

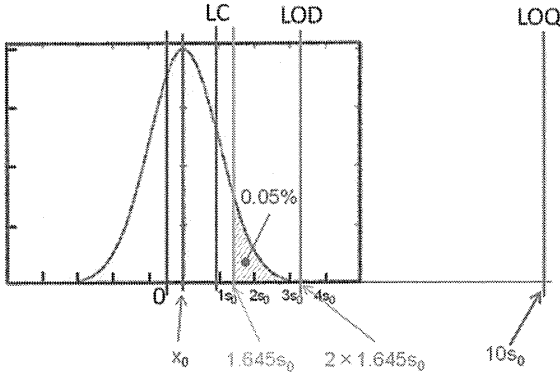
	いる試験法	酵素基質を利用した培養法なども利用される。	
	2.2.適用する試験法	本ガイドラインは、食品、飲料、飼料、環境（生活、医療、製造、流通など）の微生物試験で、次のいずれかの場合に適用する。 ①ハーモナイズド標準法 ②新規標準法 ③代替法 ①および③は、適当な参照法との比較試験を、単一試験室バリデーション、および共同試験で行う。②は当該試験法単独で、単一試験室バリデーション、および共同試験を行う。	
3. バリデーション実施体制	3.1. バリデーション実施機関*1	微生物試験法バリデーションの国際的ハーモナイゼーションに関する業務を統括する。	(*1) 国際的に認知されたバリデーション実施機関は 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。 食品の種類分類に関しては、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種類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コ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、その判断に対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>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>
	4.3. 汚染食品	<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>(*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>
5. 定性試験	5.1. 単一試験室バリデーション*1		(*1) Single laboratory validation (SLV) or Method developer validation
	5.1.1. 包含性・排他性試験	<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) 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>
<p>5.1.2. 食品マトリクスでの試験</p>	<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>
<p>5.2. 共同試験*1</p>		<p>(*1) Collaborative study</p>
<p>5.2.1. 試験室数</p>	<p>3.4.参照。</p>	
<p>5.2.2. 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>5.2.3. 菌レベルと検体</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、高レベルの 3 段階*1。検体数は各レベルに対して 12 個</p>	<p>(*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</p>

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	<p>6.1. 単一試験室バリデーション</p> <p>6.1.1. 包含性・排他性試験</p> <p>6.1.2. 食品マトリクス</p>	<p>(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。</p> <p>(1) 食品の種類 : 食品の選定については 4.2. 参照。 (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> <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>

<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 : ブ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。 (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×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 $d\text{POD}_A = \text{POD}_A - \text{POD}_R$ に対する 95%信頼区間	<p>LCL=$d\text{POD}_A - \{(\text{POD}_A - \text{LCL}_A)^2 + (\text{POD}_R - \text{UCL}_R)^2\}^{1/2}$ UCL=$d\text{POD}_A + \{(\text{POD}_A - \text{UCL}_A)^2 + (\text{POD}_R - \text{LCL}_R)^2\}^{1/2}$</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 $0.15 \leq \text{LPOD} \leq 0.85$ のとき LCL=$\max\{0, \text{LPOD} - (t_{0.975,df} \times s(\text{POD})/L^{1/2})^2\}$ UCL=$\min\{1, \text{LPOD} + (t_{0.975,df} \times s(\text{POD})/L^{1/2})\}$</p> <p>② $\text{LPOD} < 0.15$ または $\text{LPOD} > 0.85$ のとき LCL=$\{x+1.9207-1.9600 \times (x-x^2/N+0.9604)^{1/2}\}/(N+3.8415)$</p>	

	$UCL = \{x + 1.9207 + 1.9600 \times (x - \bar{x}^2 / N + 0.9604)^{1/2}\} / (N + 3.8415)$ <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	$LCL = dLPOD_A - \{(LPOD_A - LCL_A)^2 + (LPOD_R - UCL_R)^2\}^{1/2}$ $UCL = dLPOD_A + \{(LPOD_A - UCL_A)^2 + (LPOD_R - UCL_R)^2\}^{1/2}$