

平成 27 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の開発及びその実効性・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 部長
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 名誉教授

妥当性確認に関する ISO、AOAC の動向を分析すると共に、セレウス菌など 4 種類の微生物の試験法、および微生物由来毒素セレウリドの各標準試験法の作成に際して、食品マトリクス分類法、検体数と統計解析、コラボにおける試験定数、などの観点で具体的な意見を述べた。また、ISO16140 改訂の見通しとなり、その邦訳を開始した。一方、妥当性確認のために重要な微生物生菌標準物質に関しては、サルモネラ標準法 (NIHSJ-01-ST4) 等の性能検証試験（昨年度）を指導し、その実用的有用性を確認した。その成果は、間もなく国際誌へ投稿される見通しである。さらに生菌標準物質の原理を傷害菌に適用する方法を提示し、具体的に浸透圧ストレスで調製した傷害菌モデルに適用できる指標を提示した。

A. 研究目的

微生物試験法の妥当性確認（バリデーション）あるいは検証（ベリフィケーション）に際しては、国際的に認証されたスキームで実施することが要請される。そのスキームの手本とされているのが、AOAC:2012.2 版ガイドライン（Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL 第 19 版 Appendix J “AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces” 2012 として収載）、ISO16140: 2003 等である。

しかし、ガイドライン案をまとめるのに際して、AOAC:2012.2 版ガイドラインを精査した結果、ISO16140: 2003 の内容と異なる点があった。しかも、その相違点の理由が必ずしも明確ではなかった。そのような背景の下、昨年度までの議論の結果、単に国際動向に従うのみではなく、自ら合理的と思われる考え方を示し、

国内外に発信していくことが重要であるとの結論に達していた。

本年度は、これまで積み上げてきた議論に基づいて、具体的にセレウス菌など 4 種類の微生物の試験法、および微生物由来毒素セレウリドの各標準試験法の作成に際して、専門的見地から意見を述べ、試験法作成を推進することを第一の目的とした。

一方、少数生菌の標準物質に関しては、昨年度までに、その概念を明示するとともに、食品マトリクス中にサルモネラ生菌がわずか 1 個ある場合に適用し、これをサルモネラ標準試験法 (NIHSJ-01-ST4) 等で検出できることを示していた。今年度は、その実用的有用性を示すとともに、その成果を国際誌に投稿する準備を進めた。また、生菌標準物質の原理を傷害菌に適用する方法を提示し、具体的に浸透圧ストレスで調製した傷害菌モデルに適用できる指標を提示することを第二の目的とした。

B. 研究方法

(1) 標準試験法のプロトコール作成、および妥当性確認の実施計画に関する議論

2012年2月に公開されたAOACのガイドラインとISO16140:2003の内容には、重要な項目で異なる点があったため、その点に関してどのように対応すればよいか、当初から困惑していた。しかし、例えば、定性試験における試料調製条件などについては、国際会議の場で、ISO16140がAOAC2012の内容に沿って改訂される見通しである、との情報を得たので、本研究チームとしても、その方向で作業を進めることとした。

ところが、妥当性確認でどのような食品マトリクスで実施すべきか、というような具体的な項目の決定は、監督者と実施者との議論で定める、というような条項があって、大きな問題として、残っていた。国際的協調といいながら、その具体的方法は各国の責任において決定するようになっている。このような問題は妥当性確認のガイドラインを文書化する際に避けて通れず、しかも国の責任体制がなければ実効力がない。これまでにもたびたび議論してきたことではあるが、本年度は、このような自らの判断で決めなければならない内容についての議論を重ねた。

なお、上記の議論に平行してISO16140改訂内容の邦訳作業を開始した。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

既に、生菌標準物質のオンサイト調製法に関する要素技術は完成されている。昨年度、サルモネラの1細胞汚染食品の調製に適用し、それを用いたサルモネラ定性試験標準法(NIHJSJ-01-ST4)、および迅速法(3MTM PetrifilmTM SALX)の性能検証ができたことによって、実用的有用性が確認できたと判断された。

そこで、本年度はその検証結果を国際誌に投稿する準備を進めた。さらに、検証結果に基づき、実用的見地からさらに検討すべき事項を整理した。第一は、生菌標準物質のオンサイト調製のハイスループット化であると判断された。これはセルソーターの装置改良になるので、関連企業との交渉を進めた。

第二は、冷凍食品中の生菌や、冷蔵食品中に長時間共存していることなどによって生じると推定されている、傷害菌の問題であった。傷害菌はその生成の原因の違いによって状態が異なると思われるので、具体的に、高濃度スクロースによる浸透圧ストレスが原因で生じるとと思われる傷害菌の場合に限って、その標準物質の可能性を検討した。

C. 研究結果

(1) 標準試験法のプロトコール作成、および妥当性確認の実施計画に関する議論

今年度は、セレウス菌の定性試験法をはじめ？種類の標準法の作成作業が進められた。その際、食品マトリクスの選定が第一の検討課題となった。しかし、AOAC2012版、及び想定されるISO改訂版で示されている食品マトリクス分類には捉われず、我国の実情に応じた食品マトリクスを選定することとした。

現時点では、本研究チームが、国際的に通用する、我国における試験法統括組織である、とみなすことができる。したがって、本研究チームで判断すれば良いこと、そしてその判断の妥当性は国際誌への発表によって国際的に認められるようになること、などの結論に達した。

上記の食品マトリクスの選定に続き、試料調製条件、培地の選定、などが検討課題となった。特に、培地の選定基準では、未知成分が多く含まれる酵素培地、特定の企業の商品に限定されることにな

ってしまう場合でも、性能優先で採用する方針とした。

以上の諸課題の検討に基づき、セレウス菌など4種類の微生物の試験法、および微生物由来毒素セレウリドの各標準試験法の作成を推進した。

また、これまでも、部分的に情報が入っていた ISO16140 の改定が、本格的に進むようであるとの動向に基づき、ISO 16140-1, ISO 16140-2 の邦訳を開始した。既に邦訳済の ISO 16140 2003 年版、および AOAC 2012 版と比較分析した。

(2) 微生物生菌標準物質の開発

(イ) 論文投稿の準備

サルモネラ1細胞汚染食品を用いた試験法の検証結果については、国際誌 J. AOAC International へ間もなく投稿する予定である。

(ロ) 生菌標準物質のハイスループット生産

オンサイトでの生菌標準物質のハイスループット製造方法に関しては、セルソーターのソーティング制御シグナルと同期して、直径 90 mm の寒天培地プレート自動的にセルソーターに設置し、また生菌ソーティングの後は、自動的に脱着する機能をもつ装置の設計を行った。製作は、別途、予算の見通しが得られてから進める。

(ハ) 傷害菌標準物質

試験菌として *Escherichia coli* ATCC 8739 を用いた。培養後、CFDA で染色し、フローサイトメトリーで生菌を選択し、100細胞を1細胞ずつ 10~50w/v%スクロース添加 Tryptic Soy Agar (20S-TSA) 上に、10×10の格子状にソーティングした。コロニー形成過程を自動計測し、最初のコロニー形成が確認できるまでの時間 T_{CF0} (h)、及びその後のコロニー数増加速度 CIR (n/h) 求め、スクロースを含まない TSA 上にソーティングしたコントロールの場合と比較した。また、最終的に形成

したコロニー総数を N とした。ソーティング細胞数が 100 であるから、最終的なコロニー形成率は N(%)となる。

得られたコロニーは、何れもスクロースによるストレスを受けた状態で増殖した細胞、すなわち傷害菌モデルを含んでいると考えられる。しかし、一旦増殖した後は、傷害を回復して、正常細胞となっている可能性もある。したがって、得られたコロニーは傷害細胞と正常細胞の混合物(傷害菌含有菌群)と考えられる。そこで、このコロニーを懸濁して、再度、セルソーターで分離した。スクロース 20%加 TSA 上で増殖したコロニーから得たフローサイトグラムを図 1 に示す。ソーティング画分 P2&P3, P5&P6, … などから得た単一菌を、各々 TSA プレート上にソーティングし、コロニー形成開始時間と最終的なコロニー形成率を調べた。その結果、スクロース 20%処理細胞から出発して、最終的に P5&P6 画分から得た菌が、傷害菌標準物質として利用できると思われる。

D. 結論

バリデーションガイドライン ISO16140 改訂版の邦訳を開始すると共に、その動向に基づき、セレウス菌など4種類の微生物の試験法、および微生物由来毒素セレウリドの各標準試験法の作成を推進した。

妥当性確認ガイドラインの文書化を要請されながら、未だに実現できずにいる。その最大の原因は、我国に、妥当性確認を統括する組織がないことである。これまでの本研究チームの成果を基盤に、恒常的にその任に当たるべき第三者認証機関を、是非、設立すべきであるとする。

国際動向を考慮しつつ、我国から先導的な妥当性確認方法論を発信していくことは極めて重要である。生菌標準物質の利用実績結果を国際誌へ投稿することは、

大きな成果である。既に準備が整っているので投稿を急いでいる。

また、生菌標準物質作製に関する発展技術として、傷害菌標準物質の概念を提示するとともに、具体的な標準物質調製の可能性を示したことは、上記の先導的方法論の観点からの重要な成果と言える。

E. 健康危害情報

該当なし。

F. 研究発表 (*別刷添付)

(原著論文)

*H. Ogawa, S. Nasu, M. Takeshige, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. *Sci. Rep.*, 5:10061 (2015) doi:10.1038/srep10061

(総説)

*松岡英明、斉藤美佳子: 微生物試験迅速法におけるバリデーシヨンの課題. 日本防菌防黴学会誌、43(8)、361-367 (2015).

*松岡英明: 日本セクションとは? ~ AOACI 日本セクションの設立経緯と役割 ~. 月刊フードケミカル、(11)

96-101 (2015).

(国際学術集会)

H. Matsuoka: Key Technology for a More Rational Validation – Standard Material of Viable Microbial cells (SMVM) –. 1st Asia Pacific Food Microbiology Advisory Board Meeting, December 2-3, 2015, Seoul, Korea.

(国内学術集会)

斉藤美佳子、吉田智紀、高谷周督、小川廣幸、松岡英明: 浸透圧ストレスによって調製した傷害菌モデルの性質. 第42回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2015.9.2).

小川廣幸、松岡英明、斉藤美佳子: タイムラプス画像解析法による寒天培地の性能評価. 第42回日本防菌防黴学会年次大会、大阪 (2015.9.2).

松岡英明: 微生物試験迅速法におけるバリデーシヨンとデファクトスタンダードの課題: 日本防菌防黴学会女性研究者の会、第14回学術講演会、東京 (2015.4.23).

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

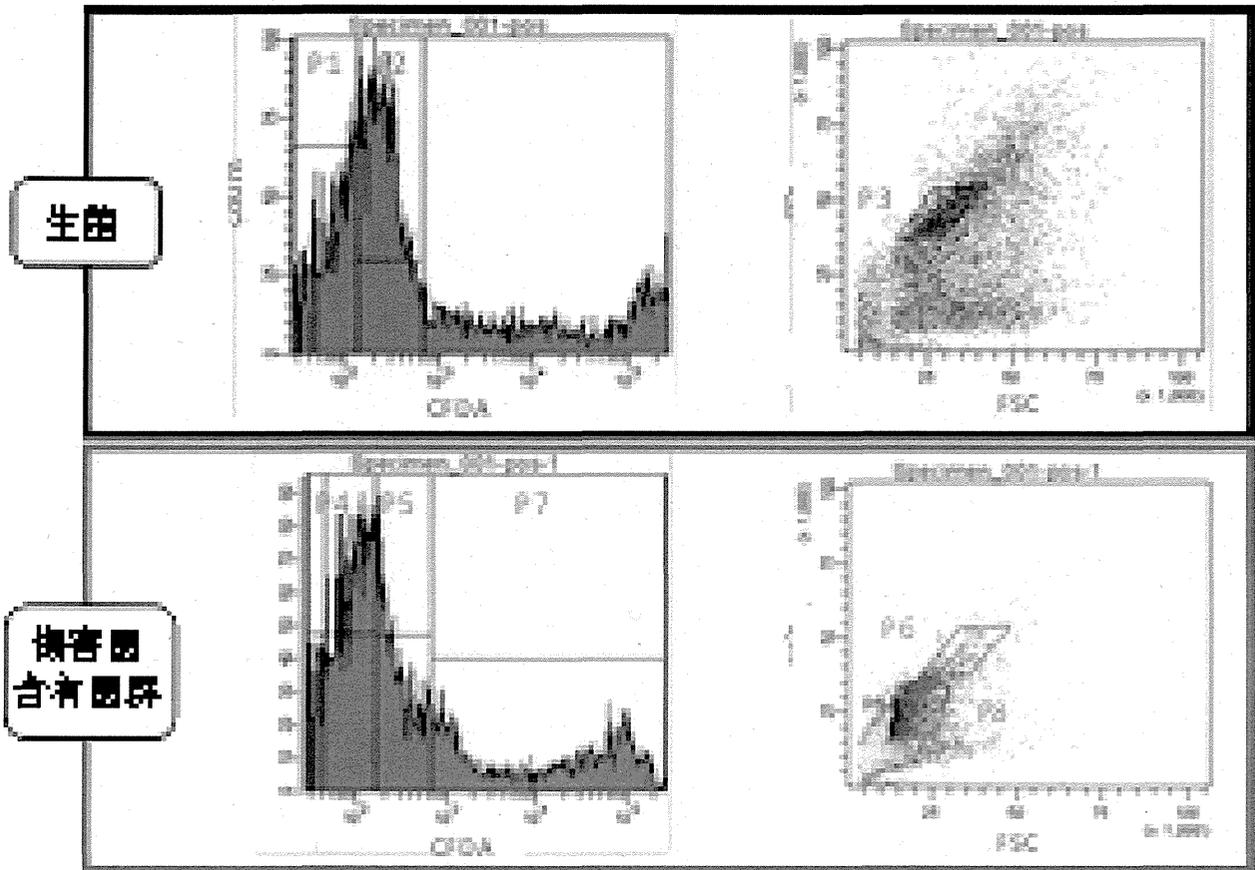


図1. 生菌と傷害因子含有菌群のフローサイトグラム

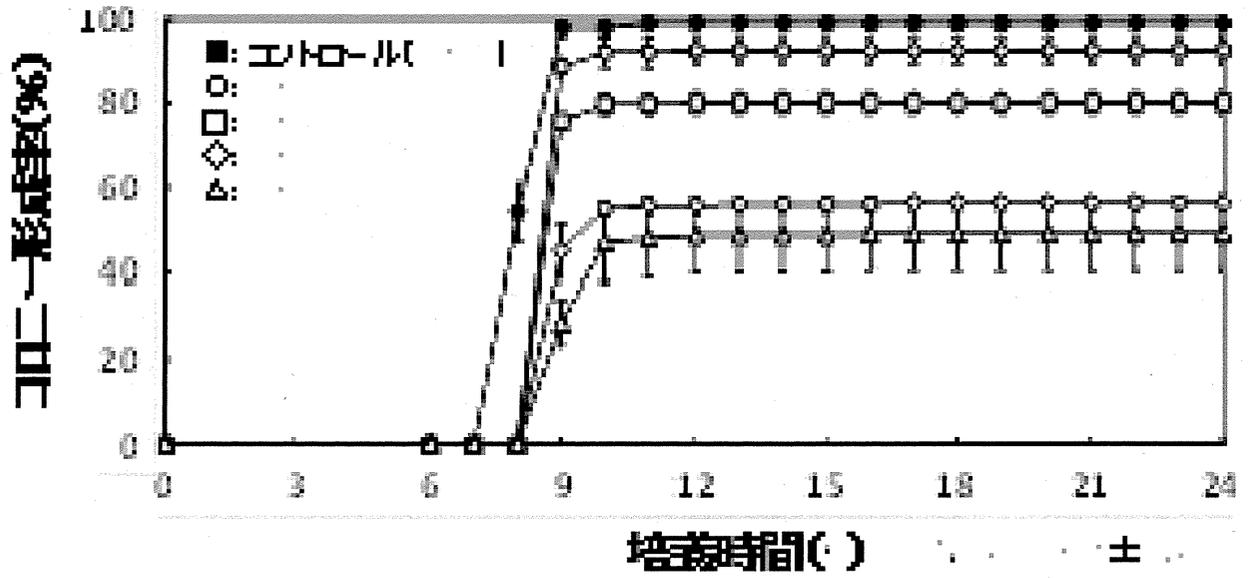
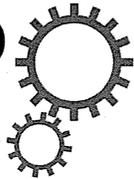


図2. 傷害菌含有菌群のフローサイトグラムから得られる傷害菌標準物質

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies

Received: 04 December 2014

Accepted: 26 March 2015

Published: 15 May 2015

Hiroyuki Ogawa¹, Senshi Nasu², Motomu Takeshige³, Mikako Saito⁴ & Hideaki Matsuoka⁴

We formerly developed an automatic colony count system based on the time-lapse shadow image analysis (TSIA). Here this system has been upgraded and applied to practical rapid decision. A microbial sample was spread on/in an agar plate with 90 mm in diameter as homogeneously as possible. We could obtain the results with several strains that most of colonies appeared within a limited time span. Consequently the number of colonies reached a steady level (N_{stdy}) and then unchanged until the end of long culture time to give the confirmed value (N_{conf}). The equivalence of N_{stdy} and N_{conf} as well as the difference of times for N_{stdy} and N_{conf} determinations were statistically significant at $p < 0.001$. N_{stdy} meets the requirement of practical routines treating a large number of plates. The difference of N_{stdy} and N_{conf} , if any, may be elucidated by means of retrievable big data. Therefore N_{conf} is valid for official documentation.

Cell division potentiality is the evidence of cell viability. Repeated cell divisions generate colonies with a diameter in the visible range of millimeters after long culture. In fact, every reference method, including ISO (International Organization for Standardization) methods and AOAC Official Methods of Analysis¹ is based on a visual count of colonies. In other words, every method stated as a reference method requires long time to obtain colony count results. For practical use, the colony count had better be determined as rapidly as possible without loss of reliability equivalent to reference methods.

To date various rapid methods have been developed using non-culture or micro-colony culture systems^{2–8}. Staining of viable cells with a specific fluorescent dye, for example, such as fluorescein diacetate derivatives^{9–11} and fluorescent glucose^{12,13} can be used to determine the number of viable cells rapidly within half an hour, requiring no time for growth verification. On the other hand, micro-colony count is based on culture on an agar plate and is able to provide count result relatively fast by using a microscope imaging system¹⁴. Those methods have been introduced as being useful enough for microbial test such as a hygiene self-check. However neither of them has been considered as equivalent as the standard reference method. This is because these rapid methods cannot exclude the possibility of false signals to get into the test process and to cause miscount.

Time-lapse measurement of colony growth might be the best way to distinguish viable cells from dead cells and non-biological particles^{15,16}. London *et al.* developed an automated system for the rapid colony enumeration, utilizing time-lapse measurement of colony growth¹⁷. To obtain a clear colony image, however, they had to take special care for in-focus measurements. In their set-up, the colonies were formed on a membrane filter placed on a carefully prepared flat agar medium. Recently Levin-Reisman *et al.* developed a more user-friendly system with downloadable software¹⁷. Their system is based on the time-lapse measurement of colony diameter of every colony on the entire plate with a standard size (ca. 90 mm). Such a system should be useful for personal uses in research fields. However it might not

¹Microbio Corporation, 6-6-3 Minamiyoshinari, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 989-3204, Japan. ²Sendai National College of Technology, Department of Intelligent and Electronic Systems, 4-16-1 Ayashi-Chuo, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 989-3128, Japan. ³Sendai National College of Technology, Advanced Course of Information Electronic System Engineering, 4-16-1 Ayashi-Chuo, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 989-3128, Japan. ⁴Tokyo University of Agriculture and Technology, Department of Biotechnology and Life Science, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.M. (email: mhide@cc.tuat.ac.jp)

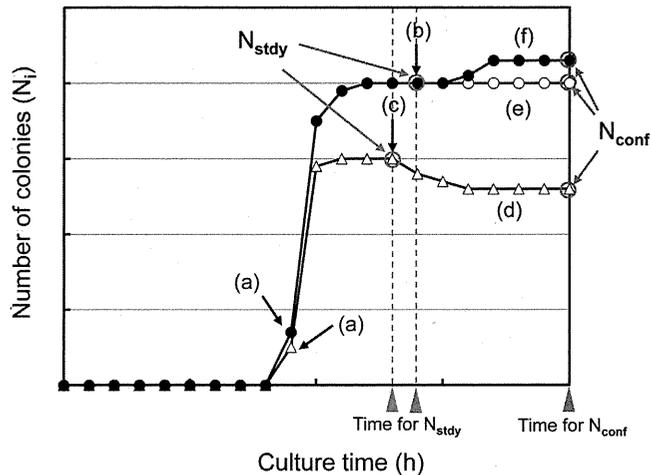


Figure 1. A theoretical model of time courses of the number of colonies, (a) initial recognition of colonies, (b,c) time point of reaching a steady level (N_{stdy}) of N_i , (d) occurrence of delayed decrease of N_i , (e) unchanged steady level, (f) delayed increase of N_i . Blue open circle: N_{stdy} values, red open circle: N_{conf} values, blue triangle: times for N_{stdy} determination, red triangle: time for N_{conf} .

be applied to practical purposes in which a much larger number of plates containing a wide range of cell density need to be measured simultaneously. Moreover rapid decision of the number of colonies is intensively required under those practical conditions.

To meet these practical requirements, we developed a unique automated system for acquiring the 3D shadow image of every colony in the entire culture plate of 90 mm in diameter by single capture shot¹⁸. Time-lapse shadow images are captured automatically in a multi-focus mode while the plates under test are being incubated under traditional culture conditions. This time-lapse shadow image analysis (TSIA) enabled the distinction of a single colony generated from a single cell, a doublet colony generated from 2 cells, and also a colony attached to a non-biological particle. Consequently the count loss due to such colony fusion could be avoided.

In this study we have upgraded the system so that big data of every colony in 100 agar plates can be stored and shown on a display by real-time processing. Then we applied the system to the colony measurement of 4 strains and 2 contaminated food samples in order to demonstrate its performance of rapid decision of the number of colonies in a wide range of cell density.

Results

A theoretical model of the time course of N_i is illustrated in Fig. 1, where N_i is the number of colonies at image capture time i . In this model, the initial colony is detected at (a). Then N_i increases sharply and approaches a steady level at (b) or (c). According to the criteria described below under the paragraph: criteria of reaching a steady level, N_i at (b) or (c) is decided to be a steady value, N_{stdy} . If N_i is unchanged until the end of long culture time (e), N_{stdy} can be an accurate rapid result and regarded as the confirmed value (N_{conf}). Otherwise there are occasions of (d) or (f). The decrease of N_i will occur because of the fusion of more than 2 colonies into a large colony. On the other hand, the increase of N_i will occur when slowly growing colonies appear. In either case, the cause of the difference between N_{stdy} and N_{conf} should be investigated. Stored data are retrievable and useful for its elucidation.

We have upgraded a formerly developed system so that it can treat 100 plates simultaneously. Twenty trays were placed in an incubator module (Fig. 2a) and the temperature of each tray was adjusted for growth of the microorganism concerned. The temperature was 35 °C for *E. coli* and colony forming bacteria in general, 33 °C for *B. pumilus*, and 28 °C for *C. albicans* and *A. brasiliensis*. Five plates were set on a tray (Fig. 2b). White light was illuminated to project shadow images of colonies on a CCD area sensor (1536 × 1536 pixels for 100 × 100 mm²) (Fig. 2c) and a 3D shadow images of each colony in or on an agar medium was recorded and analyzed (Fig. 2d). TSIA was conducted for every colony image in every plate at prescribed time intervals (usually 30 min or 1 h). Each of 20 trays was conveyed to the camera position by turns with a positional precision of 10 μm (Fig. 2e).

This study focuses the rapid decision of the number of colonies. From this viewpoint, there are 2 points to be considered. One is the decrease of the number of colonies which should occur when more than 2 colonies fuse into a large colony. The other is the delayed appearance of new colonies after most of colonies have appeared. The former point was solved by TSIA as reported previously¹⁸. The latter point, however, remained unsolved.

A typical case of the delayed appearance of colonies is shown in Fig. 3. Those colonies were located in a narrow rim area and seemed to grow horizontally, suggesting the growth from a cell attached on the

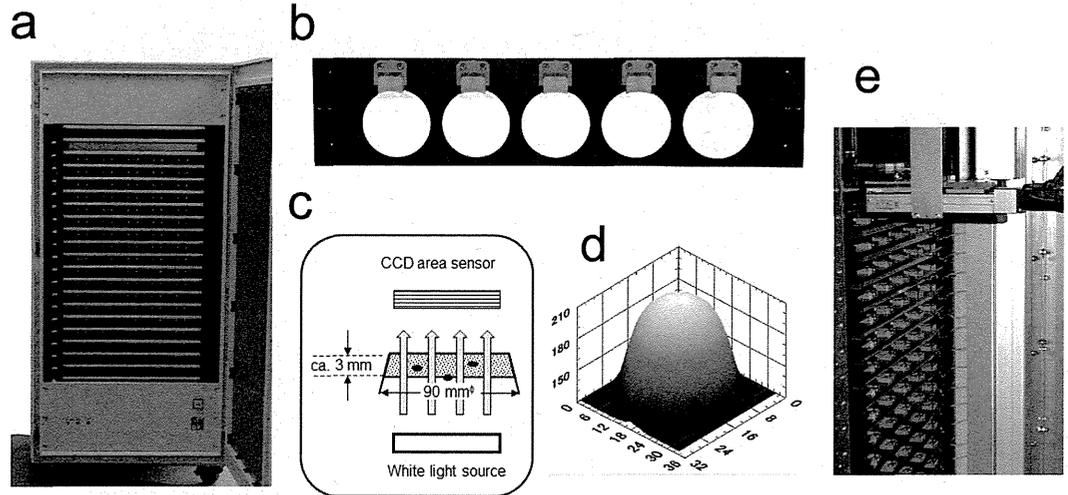


Figure 2. TSIA system. (a) Temperature controlled incubator module. (b) 5-Plate tray. (c) Shadow image capture system. (d) A 3D shadow image of a single colony. (e) Plate tray convey system installed inside of the incubator module.

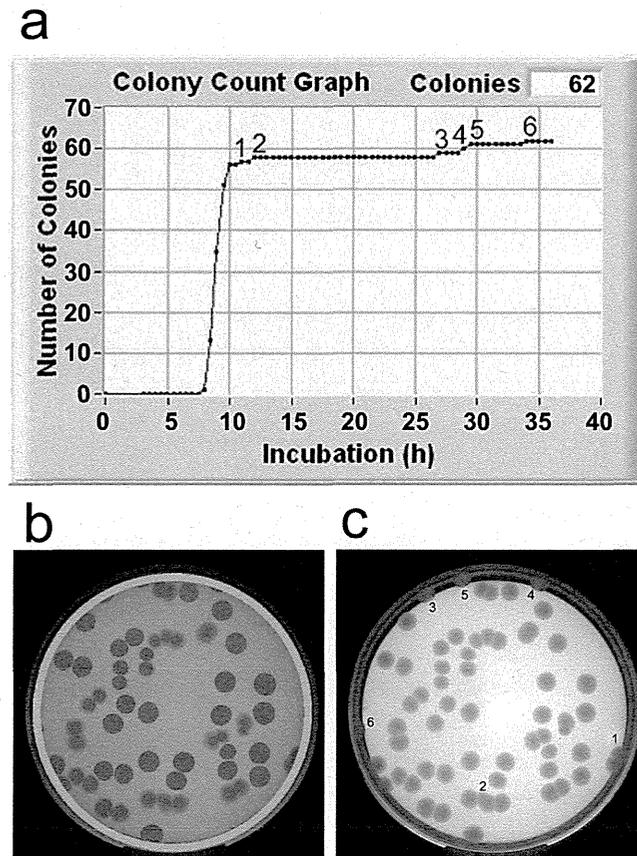


Figure 3. A typical case of delayed appearance of *E. coli* colonies. (a) time course of N_p , (b) recognized colonies designated by red markers, (c) image data recorded at the end of culture.

side wall of the petri plate. The colony growth from such cells was somehow retarded. This case should become a cause of disagreement between N_{stdy} and N_{conf} . Therefore homogeneous plating is thought to be important. Another point is the influence of colony location on or in the agar plate. In case of aerobic bacteria, the growth in the agar will be slower than that on the surface. In this viewpoint, the spread culture will be better than pour plate culture.

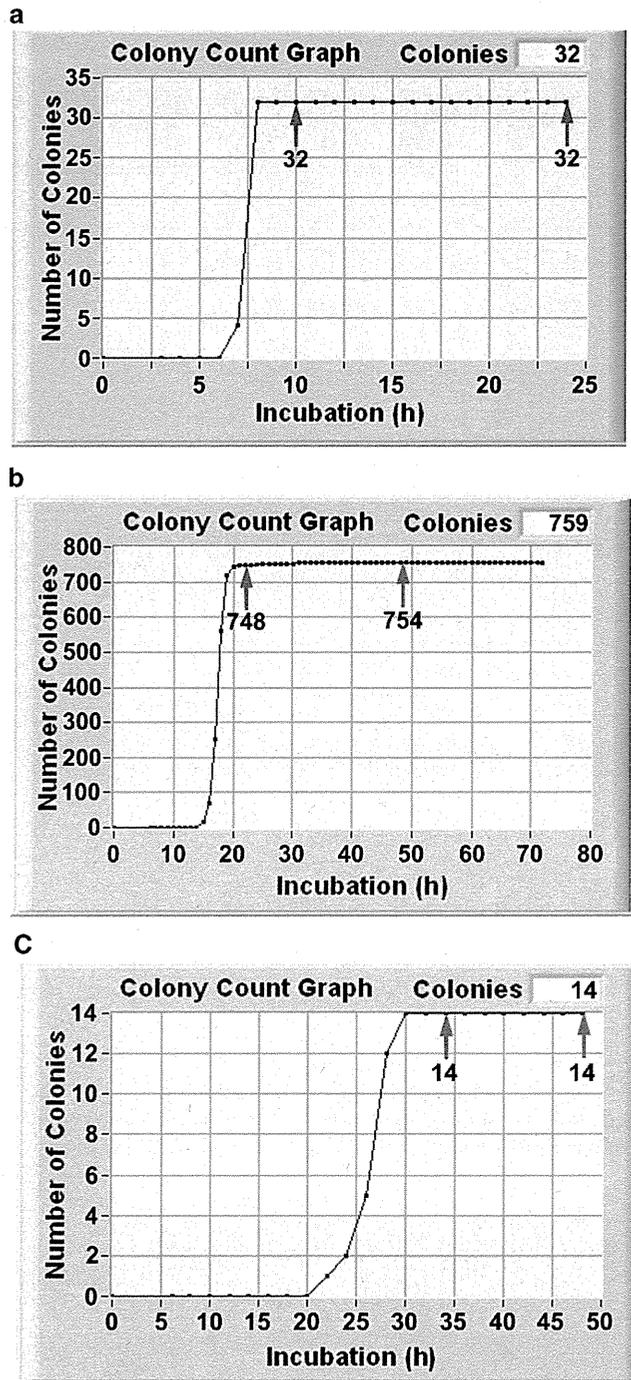


Figure 4. TSA data of pure culture samples. Time courses of N_t of (a) *E. coli*, (b) *C. albicans*, (c) *A. brasiliensis*. Blue arrows: N_{stdy} , red arrows: N_{conf} .

Taking care for homogeneous plating of a cell suspension in/on agar plates, we could obtain successful results with *E. coli*, *C. albicans*, and *A. brasiliensis* (Fig. 4a–c). After reaching a steady level, N_t was unchanged until the prescribed long culture time (24 h for *E. coli* and 48 h for *C. albicans* and *A. brasiliensis*). Visual count was also conducted and its results were same as those by TSA for *E. coli* and *A. brasiliensis*. However visual count was too difficult to make a reliable decision for *C. albicans* because of its large number.

The N_{stdy} and N_{conf} agreements could be obtained successfully also for samples containing a large number of noises such as food fragments (Fig. 5a,b). The images of an agar plate of hamburger captured at 0, 16, and 24 h are displayed in Fig. 5a. Though a number of small particles existed in the plate at 0 h, 7 colonies were counted correctly at 16 h and this value ($N_{stdy} = 7$) did not change until the end of 24 h culture ($N_{conf} = 7$). Another food matrix was a sample of cut vegetables (Fig. 5b). There appeared a large

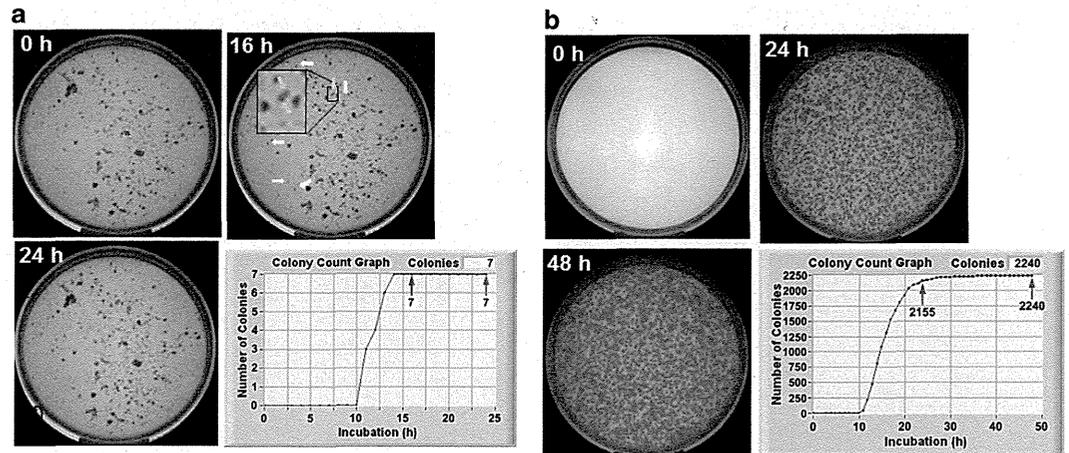


Figure 5. TSIA data of samples containing food matrices. (a) *E. coli* in hamburger. Red markers indicated by white and yellow arrows in the panel of 16 h: registered colonies, a yellow arrow indicates a doublet colony and 2 colonies can be recognized in a magnified inset; red markers in the panel of 24 h: registered colonies; blue and red arrows in the time course of N_i ; N_{stdy} and N_{conf} respectively. (b) Naturally contaminated bacteria in cut vegetables. Red markers in the panels of 24 h and 48 h: registered colonies; blue and red arrows in the time course of N_i ; N_{stdy} and N_{conf} respectively.

number of colonies at 24 h and the number of colonies was 2155 (N_{stdy}). This number increased and finally became 2240 (N_{conf}) at the end of 48 h culture. In this case the difference was $(2240-2155)/2240 = 3.8\%$.

The equivalence between N_{stdy} and N_{conf} was investigated statistically for 4 pure strains (3 strains shown in Fig. 4a–c and *B. pumilus*) and 1 contaminated food sample (*E. coli* in hamburger). In the case of pure strain of *E. coli*, the linear least square approximation makes a formula: $\text{Log}[N_{conf}] = 1.0055 \cdot \text{Log}[N_{stdy}] - 0.0073$ (Fig. 6a). The correlation coefficient was estimated as $r = 0.9998$ ($R^2 = 0.9997$) and degree of freedom was 5. Therefore the equivalence of both results was statistically significant at $p < 0.001$. On the other hand, the difference of times for N_{stdy} and N_{conf} determinations were also statistically significant at $p < 0.001$ by t-test. In the same manner, the N_{stdy} , N_{conf} equivalence as well as the time difference between N_{stdy} , N_{conf} determinations were statistically significant at $p < 0.001$ for the other cases (Fig. 6b–e). Such a good correlation was obtained in a wide range from 4 cells ($\log 4 = 0.602$) (Fig. 6c) to 4140 cells ($\log 4140 = 3.617$) (Fig. 6e).

Discussion

Conventional methods for microbial colony measurement are based on the combination of an appropriate agar medium and culture conditions such as temperature and culture time. It does not depend on whether it is a reference method or a non-validated method. The present system is for automatic processing of those conventional methods and not for proposing a new method based on a new principle. Therefore we have presented experimental data for verification¹⁹ of the performance of the system rather than for validation¹⁹ of a new method.

For automatic processing, it is necessary to define a threshold size of a colony. In conventional methods there is no formal criterion of colony size except a remark in ISO 4832²⁰. In fact, the colony count results determined by different personnel are often different^{21,22}. Operators' skill dependency is one of major causes of uncertainty in colony count method. In the present system, the threshold size was set as 65 μm , because such a micro-scale size was thought to be applicable to wide spectrum of strains in common, though a comparison with reference strains might be necessary. This threshold size was effective for every strain tested here and operators' skill dependent uncertainty in colony count could be eliminated by automatic processing.

A more serious problem causing measurement uncertainty is complex patterns of colonies after long culture. As long as only one image captured at the end of culture is concerned, it is impossible to determine accurate number of colonies. To solve this problem, retrievable data of time-lapse image should be effective. Thus we developed a system for storing a large number of image data of every colony from its initial appearance throughout until the end of long culture time. Here we have upgraded the system so that entire data of every colony of 100 plates could be processed automatically at practically reasonable speed.

Thus accumulated data may be called big data in comparison with the quantity of data treated by other systems so far developed for microbial colony measurement. As demonstrated above, big data of time-lapse 3D shadow images were really effective for the accurate determination of N_i at any time. Operators can easily make a decision of reaching a steady state by watching the real-time display of N_i time course on a display as well as by automatic processing according to the criteria defined in the online

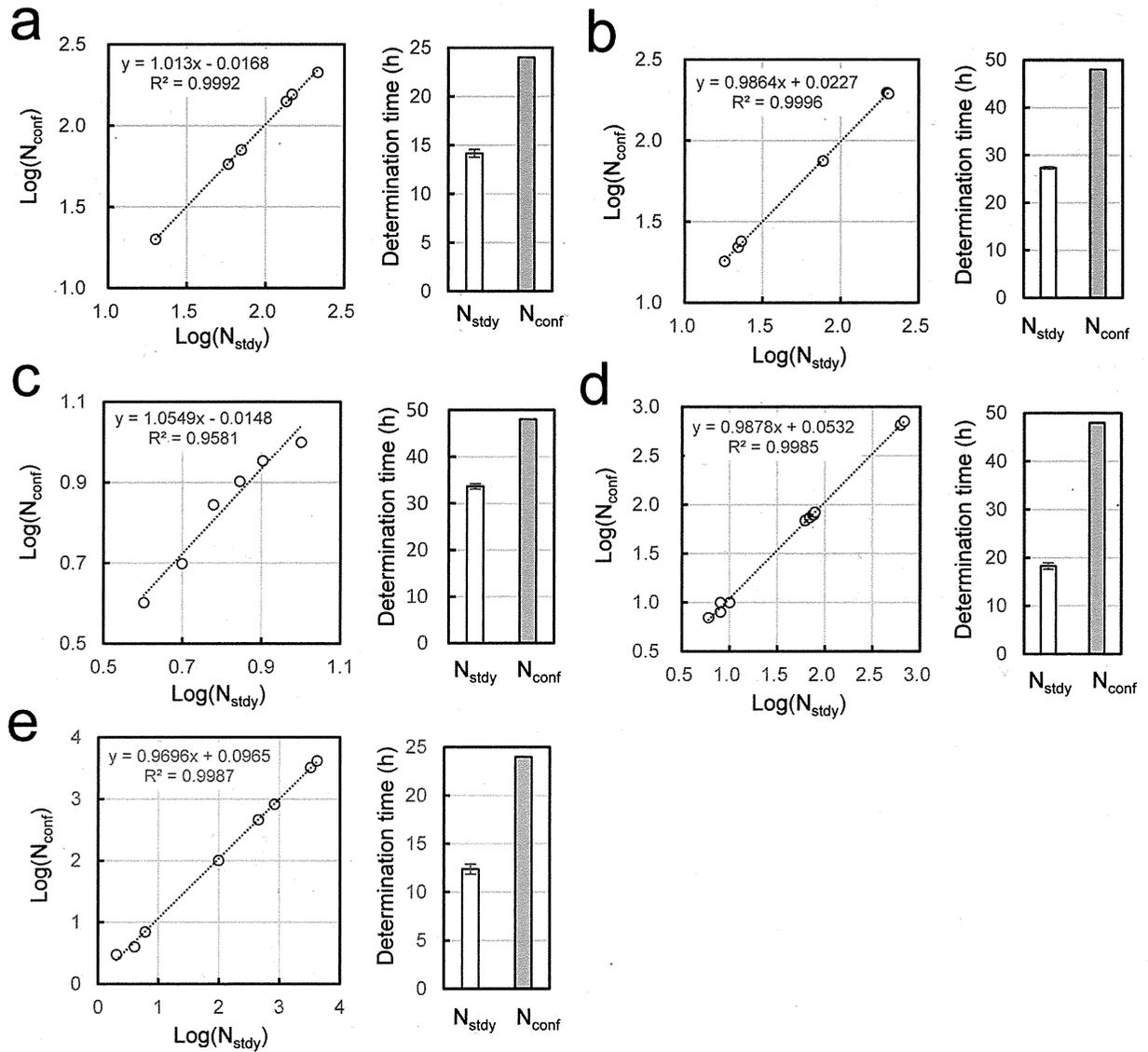


Figure 6. Linear correlation between N_{stdy} and N_{conf} and their determination times. (a) *E. coli*, (b) *C. albicans*, (c) *A. brasiliensis*, (d) *B. pulmilus*, (e) *E. coli* in hamburger. Left panels: Linear relationship between N_{stdy} and N_{conf} determined by least mean square method. Number of samples: 6 (*E. coli*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*), 11 (*B. pulmilus*), 8 (*E. coli* in hamburger). Right panels: difference of times for N_{stdy} and N_{conf} determination. Gray bars indicate fixed values, 24 h or 48 h. Error bars: mean \pm SEM.

method section. Thus determined N_{stdy} may be used as a rapid prediction with sufficient accuracy for routine tests in self-check management. Successive recording of the data might not be necessary only for making a rapid decision. However they will be found to be important in case official documentation happens to be required. Then N_{conf} will be used because N_{conf} can be understood to be the result of a reference method if the medium and the culture conditions were equivalent to those of the reference method.

In conclusion the big data based microbial measurement is believed to be an innovative and proactive methodology. In spite of big data processing, a practically reasonable system has been accomplished by unique design of software as well as of hardware.

Online Methods

Culture of microorganisms. *Escherichia coli* (NBRC 3972), *Candida albicans* (NBRC 1594), and *Aspergillus brasiliensis* (NBRC 9455) were obtained from the National Institute of Technology and Evaluation - Biological Resource Center (NBRC) (Kisarazu, Chiba, Japan). *Bucillus pumilus* (ATCC 27142) were obtained from ATCC. Each strain was suspended in a medium containing glycerol and frozen at a temperature lower than -35°C for storage.

Before use, each strain was taken out from a freezer and placed at room temperature. After thawing, the strain suspension was transferred to a tube containing peptone water (Becton Dickinson and Company) for initial culture. *E. coli* was streaked on desoxycholate agar plates. *C. albicans* and *A. brasiliensis* were streaked on potato dextrose agar (PDA) plates. *B. pumilus* was streaked on soybean-casein digest agar with lecithin and polysorbate 80 (SCDLP agar) plates. Every medium was purchased from Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo. The petri plate size was 90 mm in diameter.

Preparation of contaminated food samples. Hamburger samples contaminated with *E. coli* were prepared as follows. An aliquot of a pure culture of *E. coli* was added to the meat separated from hamburger and stomached for 1 min. A 1 ml aliquot of the resulting suspension was poured into a petri plate and then 20 ml desoxycholate agar medium was added to the plate followed by fully mixing. Cut vegetables were purchased from a market and stomached for 1 min in a phosphate buffered saline (PBS). The resulting suspension was diluted stepwise with PBS. A 1 ml aliquot of the second highest diluent was poured into a petri plate and then 20 ml SCDLP agar medium was added to the plate followed by fully mixing.

Time-lapse shadow image analysis (TSIA). TSIA program was developed previously for the acquisition of 3D shadow images of microbial colonies¹⁸. The shadow image of every colony in a 3-mm thick agar layer could be sharply focused on CCD by means of a multi-focus system²³. Viable colonies can be distinguished from dead colonies and non-biological particles by time-lapse analysis. The spatial analytical precision is 1 pixel size, i.e. $65 \times 65 \mu\text{m}^2$ and this size was defined as the threshold size of a colony. More than 2000 colonies per plate could be counted accurately. Using an air-tight bag for a plate, anaerobic bacteria can also be measured. In fact the growth of *Clostridium perfringens* and *Clostridium sporogenes* could be measured (unpublished data). Practically there is no data limit and therefore slowly growing organisms can be measured for sufficiently long culture time.

Criteria of reaching a steady level. The image of colonies and the number of colonies were recorded at each image capture time and designated as N_i ($i = 0, 1, 2, \dots$). When N_i satisfied the following criteria (1) or (2), N_{i+2} was assumed to reach a steady level and this level was designated as N_{steady} :

- (1) $N_i > 100$, $|N_{i+1} - N_i| \leq 0.01 \times N_i$ and $|N_{i+2} - N_{i+1}| \leq 0.01 \times N_{i+1}$;
- (2) $N_i \leq 100$, $|N_{i+1} - N_i| \leq 1$ and $|N_{i+2} - N_{i+1}| \leq 1$.

On the other hand, N_i confirmed at the end of long culture time was designated as N_{conf} .

References

1. AOAC International Microbiological Method Committee. In, *Official Methods of Analysis of AOAC International 19th Edition*. (ed Latimer, G.W. Jr). Ch.17, 1–279 (AOAC International, 2012).
2. Garry, E., Ouattara, G., Williams, P. & Pesta, M. Enumerating chromogenic agar plates using the color QCount automated colony counter. *J. Rapid Meth. Auto. Microbiol.* **17**, 46–54 (2009).
3. Clarke, M. L. *et al.* Low-cost, high throughput, automated counting of bacterial colonies. *Cytometry A*. **77**, 790–797 (2010).
4. DeJong, I. G., Beiharz, K., Kuipers, O. P. & Veening, J.-W. Live cell imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using automated time-lapse microscopy. *J. Vis. Exp.* **53**, 1–6 (2011).
5. Julou, T., Desprat, N., Bensimon, D. & Croquette, V. Monitoring microbial population dynamics at low densities. *Rev. Sci. Instrum.* **83** (2012) doi.org/10.1063/1.4729796.
6. Mertens, L., Van Derlinden, E. & Van Impe, J. F. A novel method for high-throughput data collection in predictive microbiology: optical density monitoring of colony growth as a function of time. *Food Microbiol.* **32**, 196–201 (2012).
7. Salam, F., Uludag, Y. & Tothill, I. E. Real-time and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using an automated quartz crystal microbalance (QCM) instrument with nanoparticles amplification. *Talanta* **115**, 761–767 (2013).
8. Fortes, E. D., David, J., Koeritzer, B. & Wiedmann, M. Validation of the 3M molecular detection system for the detection of *Listeria* in meat, seafood, dairy, and retail environments. *J. Food Prot.* **76**, 874–878 (2013).
9. Bunthof, C. J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F. M. & Abee, T. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2326–2335 (2001).
10. Matsuoka, H., Shigetomi, T., Funabashi, H., Saito, M. & Igimi, S. Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. *J. Microbiol. Methods* **93**, 49–51 (2013).
11. Matsuoka, H. *et al.* 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**, 479–483 (2014).
12. Fujioka, K., Geis, P., Saito, M. & Matsuoka, H. Visualization of yeast single-cells on fabric surface with a fluorescent glucose and their isolation for culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 685–688 (2007).
13. Matsuoka, H. *et al.* Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2459–2462 (2003).
14. Wang, X., Yamaguchi, N., Someya, T. & Nasu, M. Rapid and automated enumeration of viable bacteria in compost using a microcolony auto counting system. *J. Microbiol. Methods* **71**, 1–6 (2007).
15. London, R. *et al.* An automated system for rapid non-destructive enumeration of growing microbes. *PLoS ONE* **5**, e8609 (2010).
16. Pandey, R. *et al.* Live cell imaging of germination and outgrowth of individual *Bacillus subtilis* spores; the effect of heat stress quantitatively analyzed with SporeTracker. *PLoS ONE* **8**, e58972 (2013).
17. Levin-Reisman, I. *et al.* Automated imaging with ScanLag reveals previously undetectable bacterial growth phenotypes. *Nat. Methods* **7**, 737–739 (2010).
18. Ogawa, H. *et al.* Noise-free accurate count of microbial colonies by time-lapse shadow image analysis. *J. Microbiol. Methods* **91**, 420–428 (2012).

19. ISO/IEC 17025. *General requirement for the competence of testing and calibration laboratories*. (ISO, 2005).
20. ISO 4832. *Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of coliforms—Colony-count technique*. (ISO, 2006).
21. Corry, J. E. L., Jarvis, B., Passmore, S. & Hedges, A. A. Critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. *Food Microbiol.* **24**, 230–253 (2007).
22. Forster, L. I. Conclusions on measurement uncertainty in microbiology. *J. AOAC Int.* **92**, 312–319 (2009).
23. Nasu S, Inventor, Microbio Corporation, assignee. Photographing method and photographing device for subject in three-dimensional domain. *Japanese patent*. JP-4411109. 2009 Nov 20.

Acknowledgments

H. Matsuoka acknowledges support from Grant-in-aid for Scientific Research for the Promotion of Safety and Security of Foods on the subject, “Microbiological methods in foods and their validation” (H23-Food-General-010), The Ministry of Health, Labor, and Welfare. H.M. also thank The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan, for partial support for the development of a dynamic cell imaging system (No. 23246142, H23–H26).

Author Contributions

H.O., S.N. and M.T. developed the colony count system. H.O. also conducted microbiological tests. M.S. and H.M. proposed the concept of the method and analyzed the experimental results.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Ogawa, H. *et al.* Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. *Sci. Rep.* **5**, 10061; doi: 10.1038/srep10061 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

微生物試験迅速法におけるバリデーシンの課題

松岡 英明, 斉藤美佳子

1. はじめに

微生物試験法で公定法とされているものは全て培養法に基づくものである。適当な寒天培地上に生じてくるコロニーを計数し、さらにそのコロニーを採取して、種々の確認試験を行って、最終的な判断をする。通常、確認試験として別の培地での培養、コロニー性状の観察等が入る。したがって、全体としては結果を得るまでに何日もかかることが稀ではない。そのため、実用的には数時間以内、遅くとも1日以内に結果が得られる迅速法に対する要請は極めて強い。それに応えるべく、今日までに種々の迅速法が提案、試作、開発、そしてバリデーシオンがなされてきた。しかし、開発者の絶大な努力にもかかわらず、その要請に十分こたえるまでには至っていないのが実情である。原因は単純ではないが、肝心の最終段階のバリデーシオンが合理的に行えているとは言い難いことが大きい。本稿では、そうした迅速法のバリデーシオンに関する最近の動向について概説し、併せて将来に向けた対策と展望について提言したい。

2. 微生物試験の目的

微生物試験は、「どこで」、「何を」、「何のために」で語られる。「どこで」では、食品の生産工場や流通過程、医療品の生産工場や医療環境、洗剤や抗菌製品の評価が必要な生活環境などが対象となる。「何を」では、微生物生菌の計数と特定菌の検出とに大別される。「何のために」が目的となるが、衛生管理状態のチェック、微生物汚染の原因究明、微生物危害の防止などのような「作業内容に関する目的」と、自主的な実施か法規制による義務として実施するかの「規制遵守に関わる目的」とがある。言うまでもなく、バリデーシオンは後者の目的に対して適合するかどうか重要である。

3. 「バリデーシオン」の意味

試験法のバリデーシオンは、いつ誰が実施しても、精

確な分析値が得られることを担保することであり、「妥当性確認」という和訳が定着している。本学会では、作業環境や製品の無菌状態を確保する技術を評価することを、同じ「バリデーシオン」ということばで表記する。元々の英語 validation の意味からすれば、どちらも全く問題ないと思うが、試験法のバリデーシオンの場合の方が、比較的狭い意味の訳になっていると思う。例えて言えば、法律用語の類とでも言おうか。言うまでもなく、本稿で用いているバリデーシオンの意味は全てこの試験法に対するバリデーシオンの意味である。

4. 微生物試験法バリデーシオンにおけるボトルネック

精確な分析値を出すことを担保するために、予め行っておかなければならないことは何か？全くの白紙状態から考えると、意外に難しい。そのハウツーを100年以上前から試行錯誤して構築してきたものが「コロボスタディ (CS)」であり、その担い手が AOAC であった。要するに、多数の試験室で同じサンプルを用いて同時期に試験した結果を統計的に評価する方法である。当初は、具体的に書かれた試験手順書が全てであった。流石にそれだけでは済まないで、今日では、その手順書を①とすれば、②が試験実施者の技量であり、③が試験を実施する施設の設備状況であり、①～③を全て整備したうえで、コロボスタディが実施される。

さらに化学分析の場合は、これに④として標準物質が加わるが、微生物試験ではこれが難しい。化学物質の場合と同じように、必要な時にはすぐ保管庫から出して使えるような形の、生きた細胞の標準物質はごく限られた菌株にしかない (以下の9章で改めて詳述)。そのため、多種類の試験菌を必要とするバリデーシオンに際しては、実質的に利用できる標準物質は無いに等しい。そしてこのことが、微生物試験のバリデーシオンを、化学試験のバリデーシオンに比べて圧倒的に難しくしている原因である。新しい試験法をバリデーシオンする場合は、既にバリデーシオンされた試験法 (これを参照法と呼ぶ) と

同時に試験して同じ結果が得られることを確認する、という方法が取られる。しかし、標準物質があれば、新しい試験法の方が優れた成績を挙げた場合には、その性能評価に基づき、新しい試験法が、それまでの参照法にとって代わることができ、極めて合理的である。

ところが、微生物試験の場合は参照法の結果が全てである。厄介なのは、参照法自体が、使用する培地成分に未知成分が多種類含まれていることによって、性能がばらつく可能性があることである。それでも、微生物試験ではそれに勝る方法がなく、多分に経験に基づく最適培地での結果を基準として使わざるを得ない。その筆頭が、米国微生物学会が規定した培地群である。最近では、各メーカーが開発した培地も参照法に採用されるようになってきているが、未知成分が未知のままであることには変わりはなく、化学分析における厳密さから見れば、極めて曖昧な話である。そして、そのことが合理的な迅速法のバリデーションを行うためのボトルネックになっている。

5. 迅速法でも時間がかかる

従来から微生物試験の迅速法に関しては、様々の試みが報告されてきた¹⁻⁴⁾。時間がかかる原因が、コローニーができるまで培養しなければならない、ということで、培養しないで済む方法、即ち非培養法が種々提案された。例えば、蛍光試薬で生死菌を染め分ける方法がある。DAPIと呼ばれる蛍光色素は細胞膜を拡散透過してDNAに結合し、青色の蛍光を発する³⁾。蛍光色素は種々の環境要因によって強度や波長が変わるものが多く、それをポジティブに考えれば、そうした環境因子の変化を高感度に検出できる優れたプローブ、ということになるが、単純に黑白を決するような場合には、むしろ余り環境要因に影響を受けずに強い蛍光を発するものの方が都合が良い。その意味で、DAPIは都合が良い色素である。DAPI-DNA 結合体は非常に安定で強い蛍光を発する。DAPIは細胞の生死にかかわらず細胞膜を透過するので、これだけでは生死菌の区別ができない。一方、プロピジウム・アイオダイド (PI) と呼ばれる蛍光色素はイオン性の分子なので細胞膜は透過できないが、細胞膜の構造が壊れている死細胞では細胞内に拡散する。その結果、PIもDNAに結合するが、こちらは赤い蛍光を発する。即ち、死細胞のみが赤く染まることになる。そこで、DAPIとPIで二重染色すると、生細胞 (DAPIだけに染まった細胞) と死細胞 (DAPIとPIの両方に染まった細胞) が区別できることになる¹⁾。

以上の例では、非培養なので結果は迅速に得られる。ただ、個々の細胞は小さく数 μm 以下なので、高倍率の顕微鏡を通してでなければ計数できない。すなわち高価な顕微装置が必要である。また、一度に計測できる視

野も狭く、全体像を把握するためには顕微鏡視野を重複なく、また隙間なく走査するオートステージ制御プログラムも必要になる。結局、1個の検体について結果を出すのは迅速にできても、何百検体も調べるばあいは、全体でかかる時間が培養法より長くなってしまいかも知れない。そうかといって、このような光学系でのハイスループット化は、技術的には可能であっても、高価な装置になってしまう可能性が高い。果たしてどれだけの人が購入して使ってくれるだろうか? 例え数千万円の装置になっても、それが完全自動であり、測定作業にかかる人員を減らすことができるならば、それを購入することもあるかも知れない。しかし、残念ながら、微生物用迅速試験装置で、これまでに完全自動化された例を、寡聞にして筆者は知らない。

6. 迅速法のバリデーション

迅速法のバリデーションについて述べる前に、バリデーションのグレードについて説明しておく必要がある。上記のように、バリデーションの具体的方法はAOACによって開発されてきた。その最終目標はCSであることも述べた。その場合、10か所以上 (定性試験では12か所以上) の試験室で同時に試験をするが、それを実施する前に、予め単一の試験室で、確認しておく必要がある。それが単一試験室バリデーション (SLV) である。CSには時間も費用も相当かかるので、それが失敗しないためには、予めSLVをしておくことは当然のことである。もちろん、AOACでも最初にSLV、その後にCSを実施せよと規定している⁵⁾。こうした考え方は、現在では国際的に共通の認識となっている。AOACが米国発の組織であるのに対して、欧州ではISOが中心となっているが、そのISOの規則の中でも、最初にSLV、そして次にCSを実施することを規定している⁶⁾(表1)。

迅速法のバリデーションに関してしばしば議論になるのが、CSまで実施する完全なバリデーション (これをOMA (Official methods of analysis) と称する) と、SLVまでで良しとする簡便なバリデーションの使い分けである。AOACでは、短い周期で次々に開発されるキット類に対しては、長年月を要するバリデーションでは対応が難しい、との考えで、SLVだけでも一応の「バリデーション済」という認証を与えるプログラムを作り、これをPTM (Performance tested methods) と称した。いかにもプラグマティックな米国らしい対応と思うが、筆者は、これこそがバリデーションの考え方を混乱させた主因であると考えている。

我が国で微生物試験の迅速法の開発に取り組んできた企業の多くは、PTMで十分との見解を表明してきたように思われる。また、その理由も、自発的というより、

表1. バリデーションの実施形態

本講演での呼称		AOAC-OMA 19-J	ISO16140
定性試験	単一試験室バリデーション (Single laboratory validation)	開発者の自主バリデーション (Method developer validation)	
		単一試験室でのバリデーションあるいはプレコラボスタディ (Precollaborative study)	試験法比較スタディ (Methods comparison study)
		外部委託バリデーション (Independent validation study)	
	コラボスタディ (Collaborative study)	コラボスタディ	試験室間スタディ (Interlaboratory study)
定量試験	単一試験室バリデーション	開発者の自主バリデーション	
		単一試験室でのバリデーションあるいはプレコラボスタディ 外部委託バリデーション	試験法比較スタディ
		コラボスタディ	試験室間スタディ
確認同定試験		開発者の自主バリデーション	
		単一試験室でのバリデーションあるいはプレコラボスタディ 外部委託バリデーション	
		コラボスタディ	

規格:

- ・ Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL 第19版 Appendix J "AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces" 2012.
- ・ International standard ISO 16140 "Microbiology of food and animal feed - Protocol for the validation of alternative methods" 2003.5.1.

想定されるユーザーから「AOAC くらいは認証をとっているのですね」と言われて初めて検討した、という場合がほとんどのものである。偶々、それに対する助言を求められる機会があって、「まずはPTM。しかし最終的にはOMAを。」と述べたことがあったが、「取りあえずPTM くらいは。ユーザーが増えれば、そのうちOMAも。」と返され、当惑したものであった。筆者の趣旨は、OMA ならば国際的なユーザーが増えるであろう、ということであったのだが。バリデーションの費用とそれから得られると見込まれる収益との収支勘定をどう考えるか、ということである。

一方、バリデーションの目的は、試験法自体のユーザーではなく、それを適用する食品の末端消費者の安全確保であったはずだ。それを考えると、試験法の開発者として、またさらに試験法のユーザーとして、PTM で十分ということには決してならないはずである。

7. 「科学的」とは言えないガイドライン改訂理由

バリデーションのガイドラインは随時、新設、増補、改訂されている。それをタイムリーにキャッチアップしていくことは、なかなか大変であるが、何とか「結論を待つ」立場から「提言する」立場になっていきたいものである。それでない、必ずしも科学的とは言えない理由によって改変が重ねられつつある国際規格 (AOAC OMA や ISO) に、絶えず振り回される状況から脱却できないからである。実際、どのような改訂に悩まされることになるのか、最近の動向から3例ほど紹介する⁵⁾。

(1) CS を実施する際の試験室数

従来、定性試験では10、定量試験では8であったが、これが定性試験では12、定量試験では10~12となった。

定性試験での試験室数の増加は、実際にCSを行った実績では、どうしても1、2か所のデータが使えないことが多い。そのため最初から10ヶ所で行うと、一か所でも失敗してデータが使えなくなると、全体をもう一度やり直さなければならない。そこで、そのリスクを予め含んで12ヶ所でやるべし、となった。失敗する試験室があるかも知れないというリスクのことは、誰でも考えるであろう。したがって、実施に際して10から12に増えても実質的に困ることはないかも知れない。

しかし、そうしたリスクはあくまでも実施者側の判断であり、規格として決めるべきことではあるまい。十分教育訓練された試験室で実績のある試験室で実施すれば、そのリスクは下げられる可能性がある。すなわち予め教育訓練の努力によってCSのコストを下げるができる。しかし、規格で12と決められてしまえば、そうした努力の有無に関わらず最低でも12か所で行うなければならない。不思議なのは、定性試験ではそのような理屈で10を12に増やしていながら、定量試験では、できれば10~12で実施しておくことが望ましい、と曖昧な表現になっている点である。原文は次のようになっている。定性試験の場合は、「At least 12 laboratories per matrix should be included due to potential failure to follow protocol.」定量試験では、「It is suggested that at least 10-12 laboratories begin the analysis.」(下線は筆者)となっている。如何であろう。

(2) 食品マトリクスの選定基準

以前は、試験法を適用すべき食品マトリクスの選定は、ISO16140: 2003の付録 (Annex B) に規定された分類表によって行われてきた。食品の種類は極めて多く、それを高々十幾つの種類に分類しただけでは、実際に対象となる食品マトリクスが、その分類表の中にあるとは限

らない。性質の異なる食品で行った結果をもって、「別の食品にも適用できる」という判断になっても仕方がない、という面があった。

しかし、最近ではこの分類が一層細かくなっていく傾向にある。同時に、バリデーシヨンの第一段階であるSLVでは、想定される食品は全て調べておかなければならない、と改訂されている。一見合理的な判断であるが、食品マトリクスのバラエティはそれほど単純ではない。分類が細かくなっていくことは当然かもしれないが、重要なのは、「想定される食品は全て」という点である。例えば「魚肉」として「ぶり」で調べても、「マグロ」で調べたことにはならないのか？「米飯の入った弁当」で調べても「おにぎり」で調べたことにはならないのか？こうした疑問や議論は当然想定される。食品マトリクス分類表の改定作業の過程で、そうした議論は当然出てきたであろうし、それに対する模範解答の作成も難しかったと推察される。結局、AOACガイドラインの改定案では、「AOAC側のCS企画・実施責任者が決める」となっている。AOACの規格にしたがってバリデーシヨンを行おうとすれば、こうしたところでAOAC側と交渉しなければならぬことになる。日本食に特化した内容であれば、日本側の考えで結論を出せるようにしておくべきではないかと思うのだが。

(3) 汚染食品試料の調製条件

試験に際しては、対象となる食品マトリクスに既定の量の標的菌（汚染対象）を混入させた検体が必要である。言うまでもなく、第一には自然汚染食品の使用が推奨されているが、なかなか入手が難しい場合が多い。それで、人為的に、食品に標的菌を添加して汚染食品検体を調製する。その場合の汚染菌濃度は、定性試験のSLV、CS、定量試験のSLV、CSの夫々に対して規定されている（表2）。

この中で特に議論しなければならないものが定性試験のSLVの場合である。すなわち用意すべき検体は

POD=0, 0.25~0.75, 1.0のものが各々5個、20個、5個となっている。PODとは検出確率（Probability of detection）のことである。検体中に具体的に何個の細胞を添加するというような決め方ではなく、何個かの検体を調べたら菌が検出される確率が、例えば30%となるように添加せよ、ということである。技術的にも「言うは易く行うは難し」で問題が多いが、それよりも、科学的にも複数の要因を一緒にしてしまっている点が問題である。例えば、添加した個々の菌の性質（増殖能）のバラツキと、添加した菌の回収率の変動は、技術的には十分区別して考えることができるはずであるが、それを一緒にくたにしていることである。何れの要因も恐らく菌の種類によって状況が異なるであろうから、SLVの最初の段階で大変な作業が待っていることになる。

8. 培養法は常に精確か？

バリデーシヨンは既存の参照法との比較によって行うことになっているが、参照法は全て培養法であるから、迅速法のバリデーシヨンでは原理の全く異なる参照法と比較しなければならないことになる。上に挙げた例で言えば、蛍光染色法で求められる細胞数と、培養法で形成されるコロニー数の比較をすることになる。蛍光法では目視できるくらいの大きさにはならないマイクロコロニーでも検出できることが多いので、培養法でのコロニー計数結果よりも計数値が大きくなる傾向がある。食品マトリクスがあれば、食品の断片が非特異的に染色される場合が多々あり、その結果、計数値の差はさらに大きくなる傾向がある。経験的に、上に述べたDAPIやPI以外の蛍光色素でも本質的な改善にはならない。通常、培養法でのコロニー数以上の蛍光シグナルは擬陽性として扱われる（図1）。

本来、微生物細胞の検出原理が異なれば、計数値が異なることは十分考えられる。しかし、いかなる場合でも、培養法でのコロニー数が精確な値である、としていると

表2. 菌濃度の規定値（1/2）

a. 定性試験

バリデーシヨンの種類		食品マトリクスの有無	AOAC2012		ISO 16140	
定性試験	単一試験室バリデーシヨン	無	包含性, 排他性	LOD* ₅₀ (POD = 0.5となる濃度) の100倍	包含性, 排他性	最低検出レベルの10~100倍
		有	PODの95%信頼区間	POD = 0, 0.25~0.75, 1.0	相対精確さ, 相対特異性, 相対感度	陽性率50%
					相対検出レベル	3レベル以上, 5レベルが望ましい (ex. L ₀ (ネガコン), L ₁ (検出閾値), L ₂ (検出閾値のすぐ上), L ₃ (L ₂ の3倍以上), L ₄ (L ₃ の3倍以上))
	定量限界	0, 0近傍				
コラボスタディ	有	併行精度, 室間再現精度, 平均検出確率	無菌, 中間濃度, 高濃度	精確さ, 特異性, 感度	3レベル (ex. 0, 3, 30cells/25g)	

*この場合のLODはLevel of detection. したがってLOD₅₀は50%検出率の意。

表2. 菌濃度の規定値 (2/2)

b. 定量試験

バリデーシヨンの種類		食品マトリクスの有無	AOAC2012		ISO 16140	
定量試験	単一試験室バリデーシヨ	有	線形性, 併行精度	無菌, 低濃度 (検出限度 LOD 近傍), 中濃度, 高濃度	線形性, 相対精確さ	0, 中間値 1, 中央値, 中間値 2, 最大値 (ex. 最大値を3LOD, 10LOD, 100LOD などに設定, 10LOD に設定した場合は, 0, 2.5LOD, 5LOD, 7.5LOD, 10LOD)
	コロボスタディ	有	併行精度, 室間再現精度	無菌, 低濃度 (検出限度 LOD 近傍), 中濃度, 高濃度	検出限界 LOD, 定量限界 LOQ	6 以上のブランク測定値から s_0 , 陽性率95%程度を LOD, 例えば LOD=ブランク平均値+3.3 s_0 , 具体的濃度が決められる最低濃度が LOQ
					室間再現精度	0, 中間値 1, 中央値, 中間値 2, 最大値

*この b 表中の LOD は Limit of detection の意。

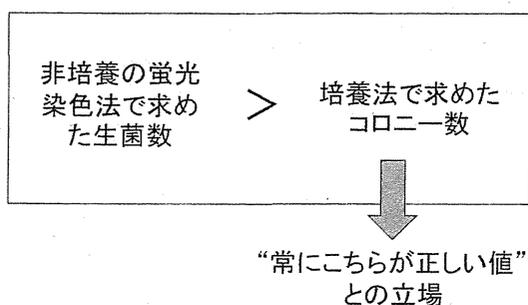


図1. 正しいのはいつも培養法

ここに問題がある。何故そうせざるを得ないのか？それは生菌の標準物質が無いからである。この点が化学分析と根本的に異なる点である。このことは迅速法に限らず、寒天培地を用いる培養法でも言えることである。培地が異なる場合、必ずしも参照法で用いている培地の方が常に良好な結果が得られるとは言いきれない。やはりその場合も、生菌の標準品があれば公平な判断ができるだろうと考えられる。

9. 生菌標準物質

生菌の標準品の事例は既に10年以上前に開発されている^{7,8)}。冷凍保存型のもので、30個の生細胞が精確に調製されていて、これを蒔くと30個のコロニーが生成する。ただ、これができているのは高々10株に過ぎない^{9,10)}。比較的頑丈な菌株のみでしか得られないようだ。したがって、多種類の菌株を必要とするバリデーシヨンには対応できない。そこで、冷凍保存型のもので、オンサイト調製型のもので提案されている^{11,12)}。

最近の報告例は、フローサイトメトリーを利用して、最適な細胞選別基準を設定し、それに基づいて、生細胞のみを100個、10×10のパターンで寒天培地上にソーティングする方法である⁴⁾。同時に、食品中に少数の決まった数、例えば n 個の細胞を添加する。精確な添加菌数は培養時間後になってからでしか確認はできないが、

それが例えば100個の細胞から99個のコロニーが形成したとすれば、食品中には0.99×n 個の生菌が添加されたことになる (図2)。もし100個ソーティングしてもコロニーが95個以上できなければ、フローサイトグラム上での生菌選別が最適にはなっていないと判断して、同時に菌を添加した食品検体は廃棄する。

実際、サルモネラ生菌を、食肉やエビ、各々25gに0.98×1 個ずつ添加し、この菌添加食品を全量用いて定性試験をした。その結果、検査した全ての検体からサルモネラが検出された¹³⁾。同時に、菌添加を行わなかったコントロールでは検出されなかった。生菌選別が良好に行われたことを物語っている。すなわち生菌標準物質のオンサイト調製が可能であることを示す結果である。

ところで、この場合、検出法は複数であったが、全ての検体の結果を合わせると0.98×1 個のサルモネラ生細胞を添加した検体数は18であり、その検出確率は POD=1 であったことになる。また、添加しなかった検体、即ちコントロールでは、検体数18で検出確率は POD=0 であった。すなわち、定性試験で POD=0.25~0.75 となるような菌数の添加はできないということを示している。この実験では1 検体重量は25g であり、菌添加後、検体全量を使用する条件になっていたが、その結果は極めて理に適っている。

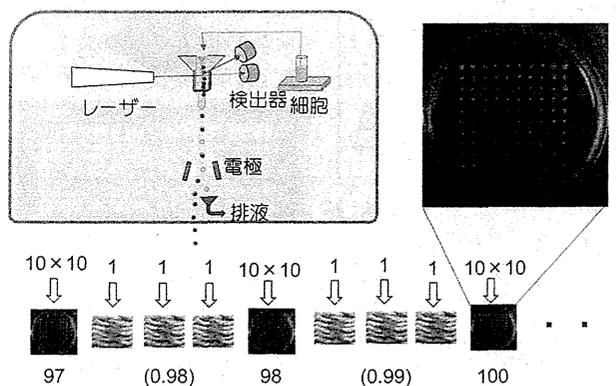


図2. 食品マトリクスへの少数生菌の添加

またこの方法を発展させると、傷害菌の標準物質も調製できる可能性がある。傷害菌の存在は、冷凍食品や漬物などの場合に必ず考慮しなければならないが、従来、傷害菌の標準物質は全く検討されてこなかった。そこで、予め一定の条件でストレスを与えた生菌の中から、傷害の程度の揃った菌を取得し、これをこれらの食品に添加することが計画されている¹⁴⁾。傷害菌の評価における重要な要素技術になると期待される。

このように、傷害菌も含めて生菌標準物質とみなせるものが多種類の菌株で調製できるならば、例えばオンサイトで調製しなければならないとしても、バリデーションの観点からは極めて画期的なことである。参照法との比較も、参照法と同じ結果になることを目指すために行うのではなく、むしろ参照法との性能を比較するために行う、ということになる。それによって様々の原理の迅速法も、極めて合理的な方法でバリデーションできるようになる。

10. 参照法に基づく迅速法

参照法自体で迅速な結果が得られるならば、最も信頼性の高い結果が得られるはずだ、という発想の迅速法が開発されている。培養しながら単一細胞の段階からタイムラプスで自動計測し、一定の大きさの閾値より大きくなったならコロニーと判定する、という方法である。顕微計測の範疇であるため、従来、タイムラプス計測では焦点合わせに注意が必要であったが¹⁵⁾、光学系の工夫により、直径90mmのプレートを1視野に収めながら、数十 μm の空間解像度を有し、さらに、厚さ3mmの寒天層の中、あるいは表面にある全てのコロニーの画像を同一スクリーン上に焦点が合うように設計された装置が開発された(図3)。しかも、コロニー画像とは、影の像でありその濃淡からコロニーの3次元形状を推定できるようになっている。合計100枚のプレートが一度に処

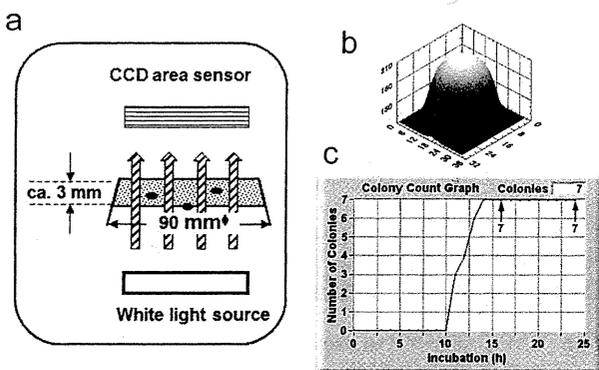


図3. タイムラプス影像解析

(a) 寒天培地中のコロニーの影像検出, (b) 2次元影像から構築された3次元コロニー形状, (c) タイムラプスコロニー計数結果の一例。ハンバーガー中の大腸菌。

理できるなど、ハイスループット性も備えている。この装置から時々刻々出されるデータから、コロニー数は迅速に推定され、さらに従来法で規定された時間まで引き続き測定されて、その推定値との比較も可能になっている。推定値の精確さ、推定時間の短縮結果は、十分実用に耐えるレベルと思われる^{16,17)}。

本来、試験法のバリデーションは、ユーザーが安心して使用できる性能を担保するために行うものである。バリデーションとしては、やはりCSまで行わなければ完成しない。試験法開発に携わった方にとっては、SLVで確認するまでが一苦勞であり、それが見事に出来たのであるし、しかもそれを複数の試験法ユーザーが確認してくれているのだから、それで十分ではないか、という気持ちになることもあろうかと思う。しかし、「確認」に国際的合意が得られる一般性を持たせようと思うならばCSが不可欠である。CSは、そのために100年以上かけて到達したノウハウなのである。

11. 我が国に是非バリデーション実施機関を

バリデーションの実施には、時間も費用もかかる。しかし最も厄介なのは、バリデーションの過程で企画・実施・監督の立場の人と議論して個別に決めなければならないことが多々あることであろう。また、十何か所の試験室に同一検体を同時に輸送すること自体も、汚染検体の輸送規制があつて容易ではない。そのような作業を円滑に行うシステムが要望される所以である。バリデーションの監督、指導、助言等を行う専門組織は「統括機関 (Management organization)」であるが、現在、国際的に認知されたバリデーション統括機関には、ISO, AOAC INTERNATIONAL (米国), AFNOR (フランス), MicroVal (オランダ), NordVal (北欧) 等がある。しかし、アジア地区にはまだ無い。我が国では微生物標準法検討委員会 (<http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html>) がその機能の一部を果たしているが、本格的にそれを行う第三者認証機関が望まれる。具体的には、例えばAOACで構築されているような専門家データベースを我国でも構築し、試験法の内容に即した専門家作業グループをアドホック委員会として、組織として対応するシステムである(図4)。

我国におけるバリデーション実施システムを作る目的は、単にCSを国内で円滑に実施することだけが目的ではない。想定されるCSの必要件数は、現状ではそれほど多くは無いと思うので、それだけならば、既存の海外の機関に依頼すればよい、ということになる。そうではなく、より重要な目的は、バリデーションの中身の議論、すなわち暫時行われていく改訂作業に、より積極的に参加して提言していくことである。その内容、分量を