

## 研究ノート

## 食品中の生菌数測定のための内部精度管理試験用試料の評価

細谷 幸恵, 川崎 晋, 根井 大介, 稲津 康弘<sup>§</sup>

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

## Evaluation of reference materials for microbiological internal quality control

Yukie Hosotani, Susumu Kawasaki, Daisuke Nei and Yasuhiro Inatsu<sup>§</sup>National Food Research Institute, NARO  
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

## Abstract

The combination of food matrix and bacterium used for internal quality control of viable cell counting was evaluated. The viable cell numbers of each of *Escherichia coli*, coliform (*Enterobacter aerogenes*) and aerobic cells (*Staphylococcus aureus*) contaminated into each of 4 kinds of foods were measured by 8 members. No significant difference of measured viable cell numbers among all of tested samples was observed. Therefore, the combination of each of tested food and bacterium will be applicable for the standard sample for internal quality control of viable cell counting of foods.

Key words: internal quality control; viable cell counts

## 緒言

細菌数の測定は、定められた検査法で行った場合でも、その結果が検査実施者の知識、経験あるいは検査室のレベル等によって左右されることがある。細菌検査の精度管理は、検査実施者の技能を正しく評価し、技術水準を維持・向上させるとともに、検査結果の確実性を保証するために、極めて重要な意味を有する。一般に、精度管理は内部精度管理と外部精度管理に大

別される。内部精度管理は検査室内での操作が適切に行われ、検査結果が正しいことを証明するために、内部の定められたルールに従って一定の頻度で実施される技能評価である。一方、外部精度管理は第三者機関により定期的に検査室間の検査精度水準を評価し、その施設における検査結果の妥当性を客観的に確認するものである。両精度管理は測定結果の信頼性を維持、向上するための有効な手段となりうる (安井: 2004, 加藤: 2008)。

FAO / WHO 合同コーデックス委員会は、食品の輸

<sup>§</sup> 連絡先 (corresponding author), inatu@affrc.go.jp

出入に関わる試験室の条件として、(1)妥当性が確認された方法を用いていること、(2)内部精度管理を行っていること、(3)外部精度管理に参加していること、および(4)ISO/IEC17025:1999の要求事項を満たしていることの4点を挙げている(CAC:1999)。また食品衛生法に基づき厚生大臣から指定された食品衛生指定検査機関は、同法第19条の4に基づく業務管理基準に合致した精度管理(GLP)の実施が要求される。平成9年1月16日の食品衛生施行令等の改正に伴い「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」(厚生省:1997a)により検査、試験に関する管理基準が示され、都道府県、政令市等の設置する食品検査施設においても管理要領に従って検査を実施することになった。続いて示された平成9年4月1日付「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」(別添)「精度管理の一般ガイドライン」(厚生省:1997b)には精度管理の実施方法についての基本的事項が示されており、これには通常検査に供する食品を用いた、通常の培養条件で検出される微生物と検出されない微生物を対象とする試験の実施が定められている。しかし、このガイドラインは概括的なものであって、精度管理用試料の具体的な作成方法や分析方法等に関する詳細な記載はない。

生菌数測定の精度管理試験の実施にあたっては、検出すべき菌の培養液やその凍結乾燥物そのもの、あるいは分析対象となる食品にこれらの検出すべき菌を混入させたものを精度管理用試料として使用することが多い。前者と比較した場合、後者の方がより現実に近い状態で検体中の生菌数を測定していることになるが、一方で、食材によっては元々付着している菌や食品マトリクスの残渣による計数値の誤判定等の問題も生じえる。そこで本研究では物性、色調の異なる複数の食品マトリクスに濃度既知の市販凍結乾燥菌体を混入して作成した精度管理用試料について、内部精度管理試験を複数回実施することにより、精度管理用試料選定の妥当性評価を行った。

### 実験材料および方法

検体秤量から計数までの一連の操作に伴う誤差が一定範囲に収まっていることを確認することを目的として、農研機構食品総合研究所において研究活動を行っており、同一試験室に所属する8名の作業者を対象として、2008、2009および2012年に試験を行った。試験に使用する試薬および器具は作業者が通常業務で使用

しているものと同じものを使用し、試験用の細菌は一定の生菌数が保証された市販凍結乾燥菌体を使用した。また一連の操作は「食品衛生検査指針 微生物編」(厚生労働省:2004)に準拠しつつ、作業者が通常業務で行っているのと同様の方法で行った。

#### 1. PBS乳剤の生菌数測定

以下の方法にて、食品マトリクスの違いの影響を受けない生菌数の測定を行った。3種類(大腸菌 *Escherichia coli* (ATCC 11775)、エンテロバクター *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) および黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538))の「Easy QA Ball」(日水)またはその後続品である「Bio Ball」(シスメックス・ビオメリュー)各々1個(約10,000 CFU)を同一の50 mLの滅菌リン酸緩衝液(PBS)に溶解したものを、2本ずつ準備した。各々の原液およびPBS 10倍希釈乳剤をそれぞれ1 mLずつシャーレに取り、それぞれの菌に対応した3種類の培地(Merck Coliform Agar, デソキシコレート寒天培地および標準寒天培地)と混釈した。これを室温にて固化させ、35℃のインキュベーターにて24±2時間(大腸菌および大腸菌群)または48±2時間(一般細菌)培養した。Coliform Agar上の紫色コロニー(大腸菌)、デソキシコレート寒天培地上の赤色コロニー(大腸菌群:大腸菌+エンテロバクター)および標準寒天上の全コロニー(一般細菌:大腸菌+エンテロバクター+黄色ブドウ球菌)を計数し、これに希釈率を乗じることによって生菌数を求めた。

#### 2. 食品混入菌の生菌数測定

3種類の「Easy QA Ball」(または「Bio Ball」)を、菌種ごとに異なる各4種類の食品(10 g)に対して1つずつ混合した検体を、各々2個ずつ作成した。これにPBSを9倍重量加え、ストマッキング処理を1分間行い、PBS乳剤を作成した。以上の作業は食品ごとにランダムに割り当てられた試験者が行い、その際に使用した食品および10倍希釈乳剤の重量を記録した。以上の方法で作成した12種類の検体(各2つずつ)の生菌数を、全ての参加者が30分以内に測定した。測定方法は、前述のPBS乳剤の生菌数測定と同様とした。

#### 3. 統計処理

検体母集団の一部を抜き取って得られる生菌数の標本平均は対数正規分布に従うため、コロニー数から算出した検体中の生菌数は、対数化を行った後に必要な

統計処理を行った（Microsoft EXCEL 2003を使用）。Zスコアは、試験参加者全員の生菌数測定結果から求めた、各検体の対数化生菌数の平均値および標準偏差を元に算出した。多重比較はTukey-Kramer法により行った（有意水準5%）。

### 結果および考察

3回の試験において測定したPBS乳剤中の大腸菌、大腸菌群（大腸菌+エンテロバクター）および一般細菌（大腸菌+エンテロバクター+黄色ブドウ球菌）の生菌数の平均値および標準偏差はそれぞれ $2.32 \pm 0.18$ 、 $2.45 \pm 0.22$ および $2.69 \pm 0.20$ であった。図1に試験数延べ40回（2008年：8名、2009年：8名、2012年：4名、各測定項目につき2反復）の測定値のZスコアを示した。正規分布に従う母集団から得られた無作為抽出標本のZスコアが $-2.0 \sim 2.0$ および $-3.0 \sim 3.0$ の範囲に入る確率はそれぞれ94.55%および99.73%であることから、統計的工程管理においては $\pm 2Z$ および $\pm 3Z$ の値

が警戒限界値および管理限界値として設定されることが多い（JIS Z 9020: 1999）。本試験室において行った3回の試験においては、ほとんどの測定値のZスコアが $-2.0 \sim 2.0$ の範囲に収まっていたことから、測定はほぼ適正に行われたものと考えられた。

3回の試験において各回8名が測定した、食品マトリクス中の大腸菌、大腸菌群および一般細菌の生菌数と、そのZスコアをそれぞれ表1および図2に示した。他の食品と比較すると、うずら卵中の大腸菌群数が低めに出ているものの、その差は $0.1 \sim 0.2 \log \text{CFU/g}$ 程度であって、実用上の問題はない。また、プロセスチーズや魚肉ソーセージについても使用した製品によっては同様の問題が観察された。なお、これらの食品は、スタマッキングによって作成したPBS乳剤の混濁が著しいため、生菌数の計数が困難であった。これがZスコアのばらつきの原因の一因となったと考えられた。またカットレタスおよびカットキュウリには添加した大腸菌の少なくとも2桁以上の数の大腸菌群が付着しており、これがColiform Agarではバックグラ

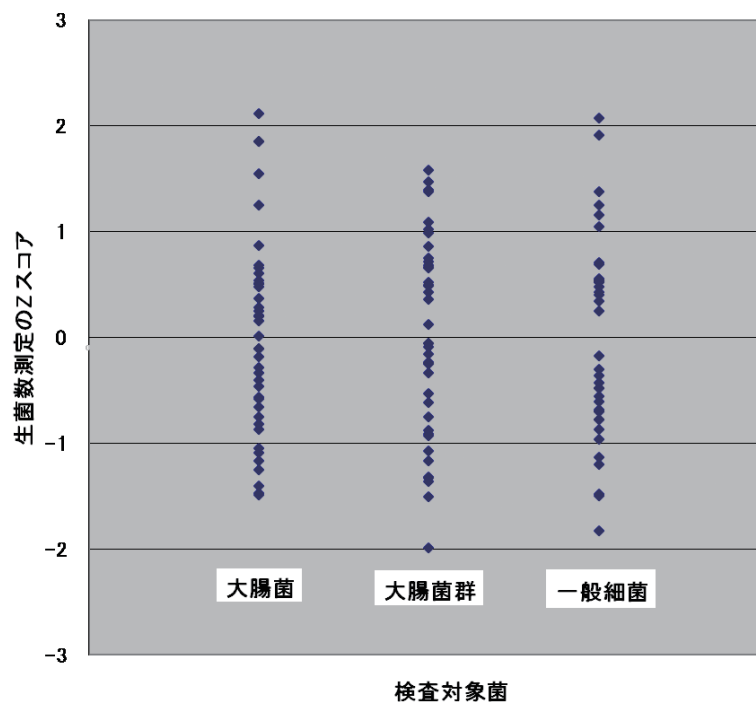


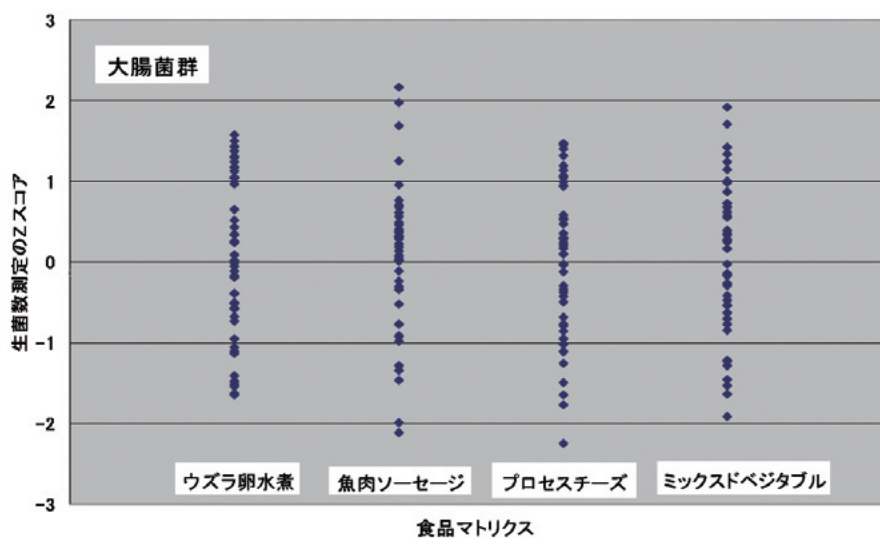
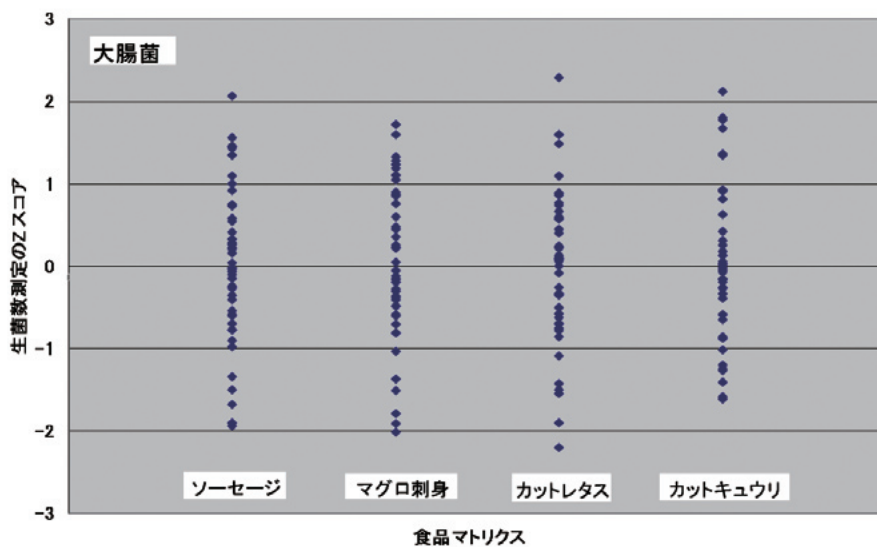
図1. PBS希釈乳剤の生菌数測定より得られたZスコア

異なる3年に、 $2.3 \sim 2.7 \log \text{CFU/mL}$ の菌を含む溶液（2連）の生菌数を測定した。得られた生菌数を対数化した後にそれらの平均値および標準偏差を求め、Zスコアを算出した。

表 1. 食品マトリクスから回収された生菌数

検査対象菌	食品マトリクス	生菌数 (log CFU/g)	
大腸菌	ソーセージ	2.02 ± 0.06	A
	マグロ刺身	2.02 ± 0.06	A
	カットレタス	2.01 ± 0.07	A
	カットキュウリ	2.01 ± 0.06	A
大腸菌群	ウズラ卵水煮	1.70 ± 0.14	B
	魚肉ソーセージ	1.80 ± 0.22	C
	プロセスチーズ	1.92 ± 0.13	D
	ミックスドベジタブル	1.83 ± 0.17	C
一般細菌	ミートボール	1.95 ± 0.10	AD
	ツナフレーク	1.90 ± 0.10	D
	フルーツカクテル	1.90 ± 0.09	D
	煮豆	1.97 ± 0.08	AD

異なる3年に、約 2 log CFU/g の菌を含むように作成した食品マトリクス（2連）の生菌数を、各8名が測定した。得られた生菌数を対数化した後にそれらの平均値および標準偏差を求めた。生菌数の肩付文字が異なるものは、各生菌数の平均値の間に有意な差がある（有意水準 5%）



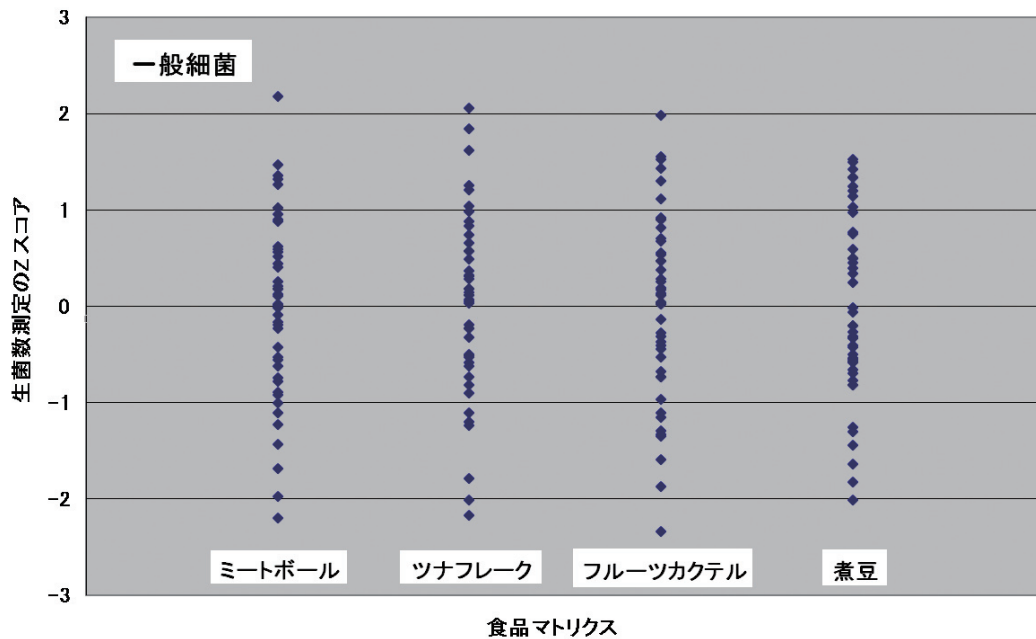


図2. 食品マトリクスの生菌数測定値から得られたZスコア

ウンド（ピンク色のコロニー）として現れることで、大腸菌コロニー計数の妨害となっていた。しかしながら、いずれの食品中の細菌数のZスコアもおおむね-2.0~2.0の範囲に収まっており、測定はほぼ適正に行われていると考えられた。

以上の結果より、細菌数測定の内部精度管理試験用検体として、表1に示した食品と市販の精度管理用乾燥細菌菌体の組み合わせが利用可能であることが示唆された。

### 要約

細菌数測定の内部精度管理試験に用いることが可能な食品マトリクスと細菌の組み合わせについて検討を行った。大腸菌、大腸菌群（大腸菌+エンテロバクター）および一般細菌（大腸菌+エンテロバクター+黄色ブドウ球菌）の市販乾燥菌体を、それぞれ異なる4種類の食品に添加したものを検体として用いて、8名が生菌数の測定を行った。3回の試験の結果、いずれの細菌と食品の組み合わせについても著しい生菌数の差はみられず、Zスコアもおおむね-2.0~2.0の範

囲に収まったことから、内部精度管理試験用の標準検体として使用可能であることが示唆された。

### 参考文献

- 1) 安井明美, 食品分析における信頼性確保, THE CHEMICAL TIMES. 191(1) 13-18 (2004) .
- 2) 加藤一郎, 微生物検査精度管理の実施, 食品と技術, 3, 10-17(2008).
- 3) CAC : Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food., CAC/GL 27 (1999)
- 4) 平成9年1月16日付け衛食第8号厚生省生活衛生局食品保健課長通知「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」, (1997a).
- 5) 平成9年4月1日付け衛食第117号厚生省生活衛生局食品保健課長通知「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」, (1997b).
- 6) 厚生労働省 (監修), 「食品衛生検査指針 微生物編」, (日本食品衛生協会), (2004).