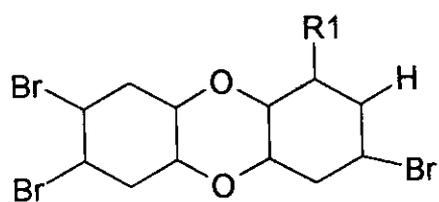


表1 抗PBDD/Fsモノクローナル抗体のアイソタイプ

Hybridoma	Mouse strain	Immunogen	Isotype	
			Class	L-chain
B2-1	BALB/c	TB-3-BSA	IgG2a	κ
B2-30	BALB/c	TB-3-BSA	IgG2a	κ
B2-31	BALB/c	TB-3-BSA	IgA	κ
B6-11	BALB/c	TB-3-BSA	IgG1	κ
B6-44	BALB/c	TB-3-BSA	IgG1	κ



Hapten	R1
TB-2	NHCO(CH ₂) ₂ COOH
TB-3	NHCO(CH ₂) ₃ COOH
TB-4	NHCO(CH ₂) ₄ COOH

図1 免疫原及び酵素標識体の調製に用いたダイオキシンのハプテン誘導体

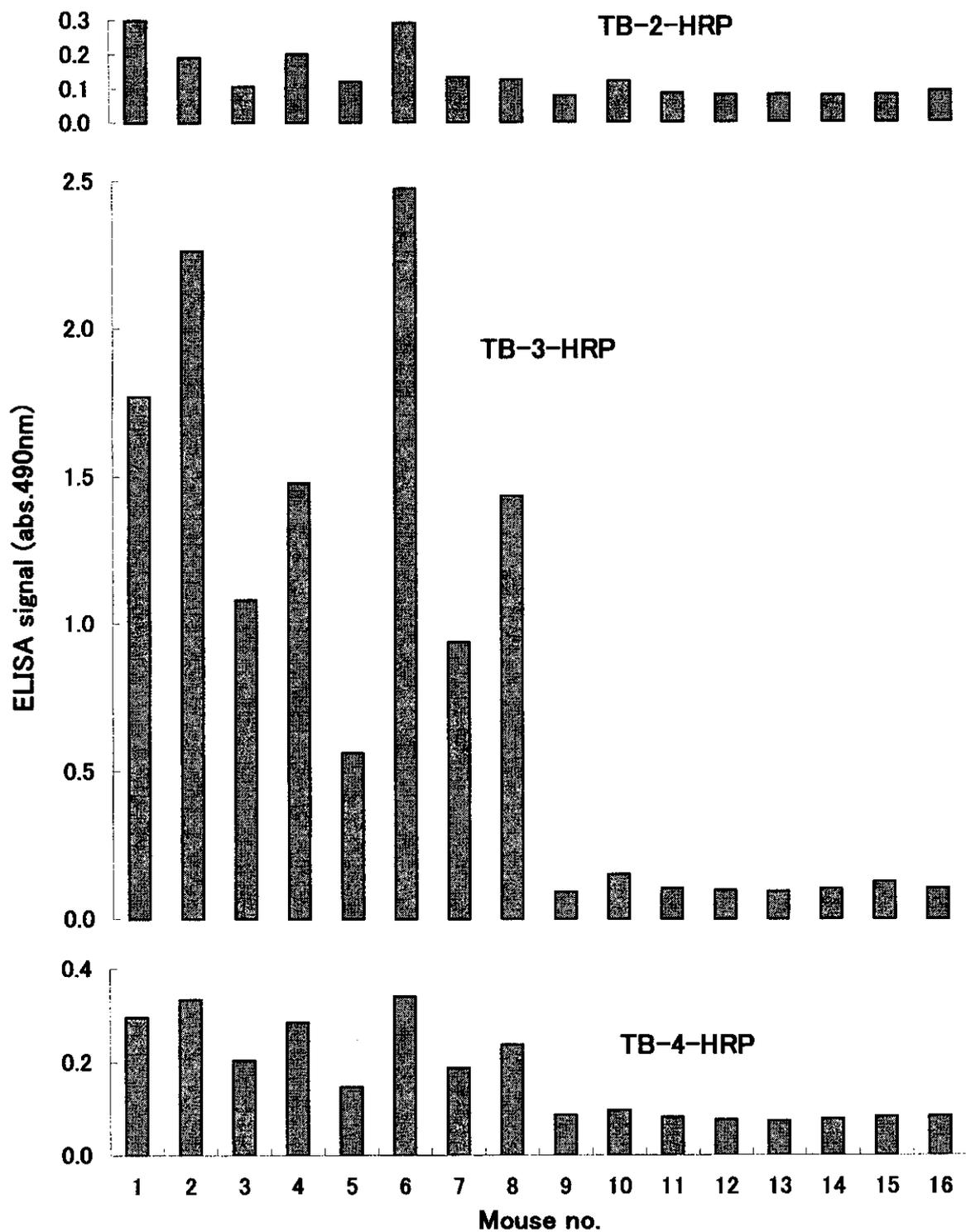


図2 マウス血清中の抗TBDD抗体価

免疫原 : no.1-8:TB-3-BSA, no.9-16:TB-4-BSA

抗血清 : 追加免疫 4 回後 (5000 倍希釈)

HRP-hapten : 20 ng/well

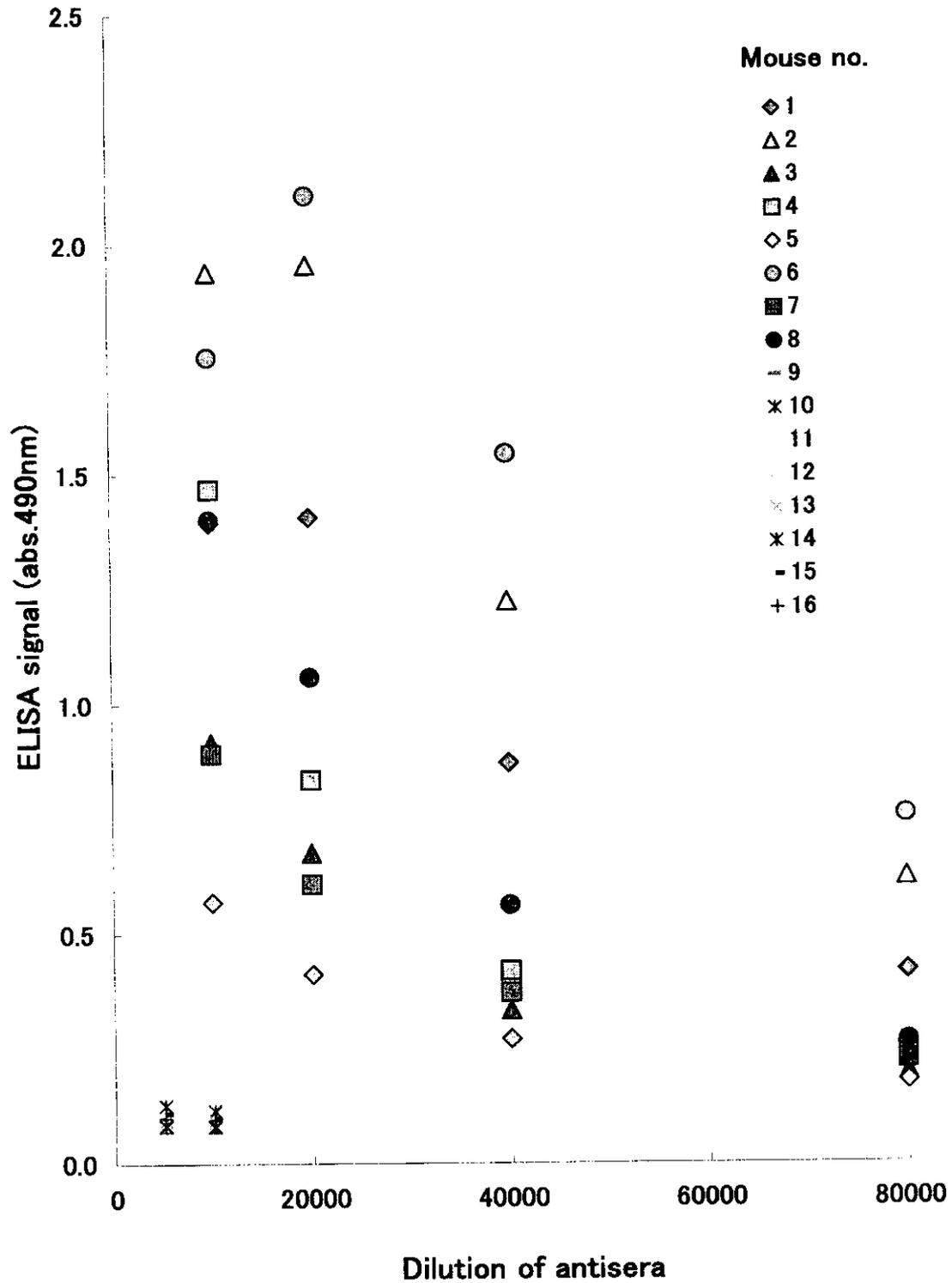


図3 抗 PBDD/Fs 抗血清の希釈曲線

免疫原 : Mouse no.1-8:TB-3-BSA, no.9-16:TB-4-BSA

抗血清 : 追加免疫 4 回後

TB-3-HRP : 20 ng/well

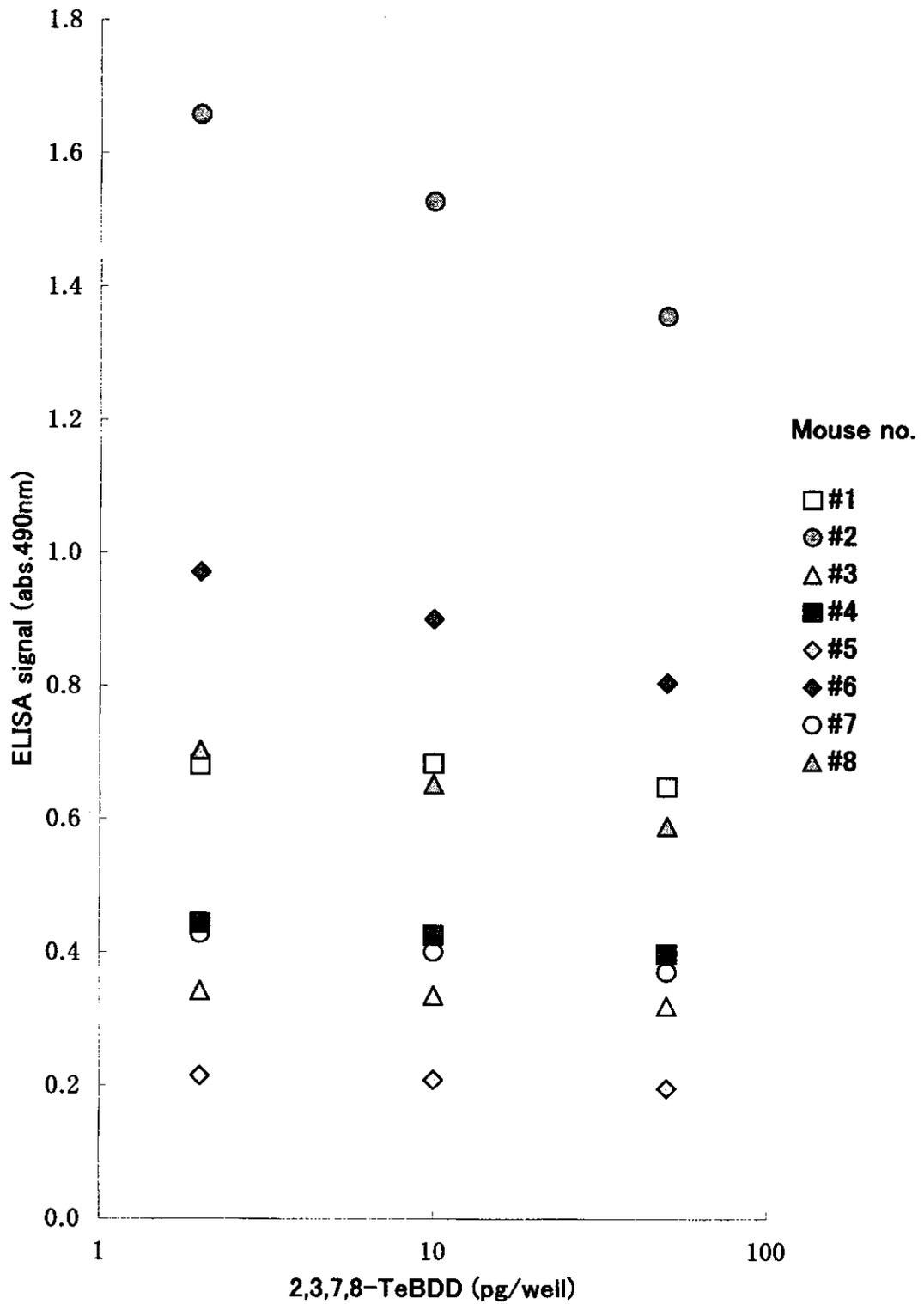


図 4 遊離ハプテン (2,3,7,8-TeBDD) の添加による結合阻害効果
 抗血清(4回追加免疫後): 50000倍希釈
 TB-3-HRP: 20 ng/well

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査精度管理調査における
適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その 2）
ーダイオキシン ELISA キットのバリデーション試験ー

主任研究者	柳澤 健一郎	(財)食品薬品安全センター 理事長
分担研究者	松木 容彦	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 副所長
協力研究者	奥山 光伸	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	中澤 裕之	星薬科大学 教授

協力機関 株式会社エスアールエル、株式会社荏原総合研究所、国土環境株式会社、株式会社島津テクノリサーチ、株式会社東レリサーチセンター、東和科学株式会社、株式会社ビー・エム・エル、株式会社ユニチカ環境技術センター、和光純薬工業株式会社

研究要旨

ダイオキシン類の汚染実態を把握するために、安価で簡便、迅速かつ高感度なスクリーニング法およびモニタリング法の開発が強く求められている。我々は平成 11～13 年度の厚生科学研究費補助金研究よりモノクローナル抗体を用いた生体試料中ダイオキシンの酵素免疫測定法（ELISA 法）を開発してキット化した。本年度はこの ELISA キットのダイオキシン簡便測定法としての有用性を評価するために、標準品および標準品添加精製バターを共通試料としてダイオキシン分析機関 8 社と当安全センターの 9 機関でバリデーション試験を実施した。

測定機関内における検量線吸光度の相対変動係数（cv）は各濃度とも 14%以下であり、4パラメーター回帰式に良好に適合した。標準品試料および標準品添加精製バター試料を測定したときの機関間変動はやや大きかったものの、試料 I および試料 II の機関内変動はほとんどがそれぞれ 10%および 15%以下であった。これらの測定変動は簡易測定法としてほぼ満足できるものであり、また、測定値の濃度順位が逆転することはほとんどなかったことから、本 ELISA キットの生体試料中ダイオキシンのモニタリング法およびスクリーニング法としての有用性が示された。

A. 研究目的

ダイオキシンによる環境や食物への汚染とそのヒトへの健康影響に対する社会的関心は

高く、ヒトへの曝露とその汚染実態を把握することは行政上の急務かつ重要な課題である。従来、ダイオキシンの測定には高分解能ガス

クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) が用いられてきたが、その試料前処理には他段階で煩雑なクリーンアップ操作を必要とし、測定に要する時間が長く、経費は著しく高価なものとなっていることから、安価で簡便、迅速かつ高感度なダイオキシンのスクリーニング法およびモニタリング法の開発が強く求められている。

我々は平成 11~13 年度の厚生科学研究費補助金研究においてモノクローナル抗体を用いた生体試料中ダイオキシンの酵素免疫測定法 (ELISA) を開発してキット化した。本年度はこの ELISA キットをダイオキシンの簡便測定法としての有用性を評価するために、標準品およびバターを精製した後に標準品を添加した試料についてダイオキシン分析機関 8 社と当研究所でバリデーション試験を実施した。

B. 研究方法

1. 参加機関

株式会社エスアールエル
株式会社荏原総合研究所
国土環境株式会社
株式会社島津テクノリサーチ
株式会社東レリサーチセンター
東和科学株式会社
株式会社ビー・エム・エル
株式会社ユニチカ環境技術センター
財団法人食品薬品安全センター

2. 実験材料

1) 試薬

アセトン、エタノール、メタノール、*n*-ヘキ

サン：和光純薬工業 ダイオキシン類分析用
フルオロベンゼン：和光純薬工業 再蒸留品
トリトン X-100：Sigma Chemicals T-9284
水酸化カリウム、硫酸：和光純薬工業 特級
ダイオキシン標準液：Cambridge Isotope
Laboratories, Inc. EDF-5008 (表 1)

2) 器材

ダイオキシン ELISA キット：和光純薬工業
code no. 299-59000
固相抽出カートリッジカラム：和光純薬工業
Wakogel P-29

3. 試料の調製

1) 試料 I (標準品)

ダイオキシン標準液 4、12 または 40 μ L と
1% トリトン X-100 メタノール溶液 0.25 mL
にエタノールを加えてそれぞれ 20 mL とし
た。この液 1 mL をガラス試験管に分注して
ロータリーエバポレーターで有機溶媒を乾固
し、それぞれ試料 I-L、試料 I-M および試
料 I-H とした。

2) 試料 II (標準品添加精製バター)

バター 6 g にエタノール 50 mL および 10
mol/L KOH 5 mL を加えて約 40°C で 2 時間
攪拌し、室温で一晩放置した。加温溶解して
分液ロートに移し、*n*-ヘキサン 30 mL およ
び水 50 ml を加えて室温で 5 分間振蕩して
静置後、ヘキサン層をナス型フラスコに分取
した。水層を *n*-ヘキサン 30 mL で更に 2 回
抽出し、ロータリーエバポレーターでヘキサ
ンを約 5 mL に濃縮してガラス遠心管に移し
た。この遠心管に濃硫酸 1 mL を加えて室温
で 5 分間振蕩後、遠心分離 (3000 rpm、室

温3分)して硫酸を除去した。硫酸層がほとんど着色しなくなるまで、この操作を更に2回繰り返した。ヘキサン層を室温で乾固し、濃硫酸 1 mLを加えて60~70°Cで約30分間放置した。*n*-ヘキサン1 mLで3回抽出し、合わせたヘキサン層に水2 mLを加えて室温で5分間振蕩し、氷冷後、遠心分離(3000 rpm、4°C、5分)した。次いで、フルオロベンゼン1 mL、エタノール1 mL、アセトン3 mLおよび*n*-ヘキサン3 mLで洗浄したwakogel P-29カートリッジカラムに先のヘキサン層を負荷し、*n*-ヘキサン2 mLおよびフルオロベンゼン/*n*-ヘキサン(3:97)2 mLでカラムを洗浄後、フルオロベンゼン/*n*-ヘキサン(3:7)1 mLでダイオキシン類を溶出した(図1)。

バター120 g分の溶出液にダイオキシン標準液0、4または12 μ Lと1%トリトンX-100メタノール溶液0.25 mLをそれぞれに加えてエタノールで20 mLとした。この液1 mLをガラス試験管に分注してロータリーエバポレーターで有機溶媒を乾固し、それぞれ試料II-BL、試料II-Lおよび試料II-Mとした。

4. ELISA

ダイオキシンELISAキットの現品説明書に従って操作した(図2)。

試料溶解液で希釈した陽性コントロールの有機溶媒を乾固して、検量線希釈系列を作製した。検量線希釈系列および試料に緩衝液Bを加えて溶解し、抗ダイオキシン抗体溶液、次いでペルオキシダーゼ標識ハプテン溶液を添加後、混合液を各ウェルに分注して冷蔵下で一晩放置した。ウェルを洗浄し、基質溶液

を加えて室温で約30分間酵素反応させ、反応停止液を加えた後、波長 450 nmの吸光度を測定した。4-パラメーター回帰式にフィットさせた検量線から試料中のダイオキシンを2,3,7,8-TCDD 相当量として算出した。

C. D. 研究結果および考察

1. 検量線

バリデーション試験に参加した9機関の典型的な検量線の機関内変動および相対吸光度(B/Bo)を表2および図3に示した。

検量線吸光度の実施機関内における相対変動係数(cv)は1~14%(表2)であり、ほとんどは5%以下であった。相対吸光度の測定機関間変動はやや大きかったものの、検量線を4-パラメーター回帰式にフィットさせたときの相関係数(r)はすべて0.99以上であり、本ELISAキットは再現性が高いことが示された。

2. 試料I(標準品)の測定

試料Iの測定値はL、M、Hそれぞれ176~453(平均310)、376~740(平均540)および759~2579(平均1334)2,3,7,8-TeCDD pg eq./mLであり、機関間変動(各機関の平均値のcv)はそれぞれ41%、24%および41%であった。機関内変動(各機関のcv)はL、M、Hのそれぞれ3~15%、0~38%および1~12%、平均はそれぞれ7%、9%および5%でほとんどは10%以下であった(表3)。

また、キットに使用している抗体のダイオキシン異性体との交差反応性から算出した理論値はL、M、Hそれぞれ155、466、1552 pg eq./mLであり、各機関のほとんどの測定値はこれらの値と大きくかけ離れることはな

かった。

標準品試料の測定変動は機関間でやや大きかったものの機関内では小さく、また、測定値の濃度順位は逆転することなく再現された。

試料II (標準品添加精製バター) の測定

試料IIの測定値は BL、L、M それぞれ 0~504 (平均 204)、119~579 (平均 296) および 234~794 (平均 438) 2,3,7,8-TeCDD pg eq./mL であり、機関間変動 (各機関の平均値の cv) はそれぞれ 81%、49% および 43% であった。機関内変動 (各機関の cv) は BL、L、M それぞれ 0~25%、5~30% および 3~19%、平均はそれぞれ 12%、11% および 11% でほとんどは 15% 以下であった (表 4)。

また、キットに使用している抗体のダイオキシン異性体との交差反応性から算出した添加ダイオキシン理論値は BL、L、M それぞれ 0、155、466 pg eq./mL であり、定量限界に近い BL を除いて各機関の測定値はこれらの値と大きくかけ離れることはなかった。

BL の測定機関間変動が大きかったことは生体試料からの疑陽性物質の除去が不完全であることが示唆され、試料調製法を改良する必要が示された。しかし、L および M の測定変動は機関間でやや大きかったものの機関内では小さく、また、測定値の濃度順位は 2 機関を除いて逆転することなく再現された。

E. 結論

モノクローナル抗体を用いたダイオキシン ELISA キットを開発し、標準品および標準品添加精製バターを共通試料として 9 機関でバリデーション試験を行い、ダイオキシン類の

モニタリング法およびスクリーニング法としての有用性を評価した。

その結果、測定機関間変動はやや大きかったものの、試料 I および II の測定機関内変動はほとんどがそれぞれ 10% および 15% 以下と小さく、簡便測定法として満足できるものであった。本法は操作が簡便で多検体が同時に測定できるうえ、測定内変動が小さく、また試料中濃度順位が逆転することなく再現されたことから安価な簡易測定法としてダイオキシン類のスクリーニング法およびモニタリング法となることが示された。

今後は生体試料だけでなく、環境試料も測定できる前処理法を再検討し、更に、本法の適用を広げる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Development of Simple and Rapid Purification Methods for Bioanalytical Detection of Dioxins: Mitsunobu Okuyama, Wakako Endo, Takako Anjo, Yasuhiko Matsuki, Shinjiro Hori, Norihiro Kobayashi, Junichi Goto, Atsunori Sano, Tomonori Matsuda. Organohalogen Compounds. 58, 365-368 (2002)

2. 学会発表

1) 奥山光伸、武田和香子、安生孝子、松木容彦、神戸川 明、小林典裕、後藤順一、

堀 伸二郎：生体試料中ダイオキシン
ELISAの構築及び試料精製法の開発、第
7回免疫化学測定法研究会、2002. 7. 5.
神戸

- 2) M.Okuyama, W.Takeda, T. Anjo, Y.
Matsuki, S. Hori, N. Kobayashi, J. Goto,
J. Ito, A. Sano, T. Matsuda :
Development of Simple and Rapid
Purification Methods for Bionanalytical
Detection of Dioxins. 22nd International
Symposium on halogenated
Environmental Organic Pollutants and

PoPs, August 11-16, 2002, Barcelona,
Spain

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特願 2000-315948 号 (ダイオキシ
ンに対するモノクローナル抗体)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 ダイオキシン標準溶液の組成

	Compound	Concentration (ng/mL)
PCDD	2,3,7,8-TeCDD	100
	1,2,3,7,8-PeCDD	250
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	250
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	250
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	250
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	250
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	500
PCDF	2,3,7,8-TeCDF	100
	1,2,3,7,8-PeCDF	250
	2,3,4,7,8-PeCDF	250
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	250
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	250
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	250
	2,3,4,7,8,9-HxCDF	250
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	250
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	250
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	500

表2 検量線(吸光度)の機関内変動

TriCDA conc. (pg/mL)	CV for Absorbance (%)										Mean
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Lab I	
0	2.1	7.9	1.0	1.6	2.7	3.5	2.0	5.7	1.2	3.1	
40	3.2	4.0	4.7	5.4	0.1	1.7	1.4	6.4	4.6	3.5	
100	7.3	6.2	3.1	3.0	5.7	2.9	3.3	8.9	0.9	4.6	
250	2.9	7.1	2.3	2.7	3.3	2.9	1.1	11.9	2.5	4.1	
500	1.2	5.4	2.2	1.9	6.0	3.6	5.2	6.5	0.8	3.6	
1000	2.1	13.2	3.9	8.9	4.0	1.9	0.6	13.5	1.3	5.5	
2500	1.7	4.4	8.1	3.5	7.5	4.0	5.3	7.6	1.8	4.9	

表3 試料 I (標準品) の測定結果

Sample I	2,3,7,8-TeCDD (pg eq./mL)											Mean	SD	cv (%)			
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Lab J	Lab K						
L	482	254	198	551	254	178	355	213	247								
	428	275	192	nt	344	159	391	254	233								
	450	261	183	nt	325	191	380	224	236								
	Mean	453	263	191	551	308	176	375	230	239	310	127	41.0				
SD	27	11	8		47	16	18	21	7								
cv (%)	6.0	4.1	4.0		15.4	9.1	4.9	9.2	3.1	7.0							
M	726	591	383	773	384	371	610	447	539								
	650	555	401	650	644	449	613	411	526								
	731	599	344	797	325	451	610	446	550								
	Mean	702	582	376	740	451	424	611	435	538	540	129	23.8				
SD	45	23	29	79	170	46	2	21	12								
cv (%)	6.5	4.0	7.7	10.7	37.6	10.8	0.3	4.7	2.2	9.4							
H	1544	2569	799	1401	838	1348	1235	1071	1557								
	1535	2705	733	1401	806	1192	1249	847	1546								
	1518	2464	745	1126	815	1283	1262	966	1450								
	Mean	1532	2579	759	1309	820	1274	1249	961	1518	1334	544	40.8				
SD	13	121	35	159	17	78	14	112	59								
cv (%)	0.9	4.7	4.6	12.1	2.0	6.1	1.1	11.7	3.9	5.2							

表4 試料II (標準品添加精製バター)の測定結果

Sample II	2,3,7,8-TeCDD (pg eq./mL)											Mean	SD	cv (%)			
	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D	Lab E	Lab F	Lab G	Lab H	Lab I	Lab J	Lab K						
BL	575	208	275	ND	104	60	282	74	45								
	500	187	313	ND	ND	60	350	75	48								
	437	189	334	ND	73	77	381	104	ND								
	Mean	504	195	307	ND	89	66	338	84	47	204	165	81.0				
SD	69	12	30		22	10	51	17	2								
cv (%)	13.7	6.0	9.7	0.0	24.8	14.9	15.0	20.2	4.6	12.1							
L	475	243	271	466	213	108	392	170	204								
	447	291	301	775	240	124	337	185	169								
	425	285	275	495	299	125	321	169	181								
	Mean	449	273	282	579	251	119	350	175	185	296	145	48.9				
SD	25	26	16	171	44	10	37	9	18								
cv (%)	5.6	9.6	5.8	29.5	17.5	8.0	10.6	5.1	9.6	11.3							
M	624	341	338	931	334	212	552	391	320								
	764	486	329	708	259	238	451	298	300								
	649	476	347	742	304	251	502	356	325								
	Mean	679	434	338	794	299	234	502	348	315	438	188	42.9				
SD	75	81	9	120	38	20	51	47	13								
cv (%)	11.0	18.6	2.7	15.1	12.6	8.5	10.1	13.5	4.2	10.7							

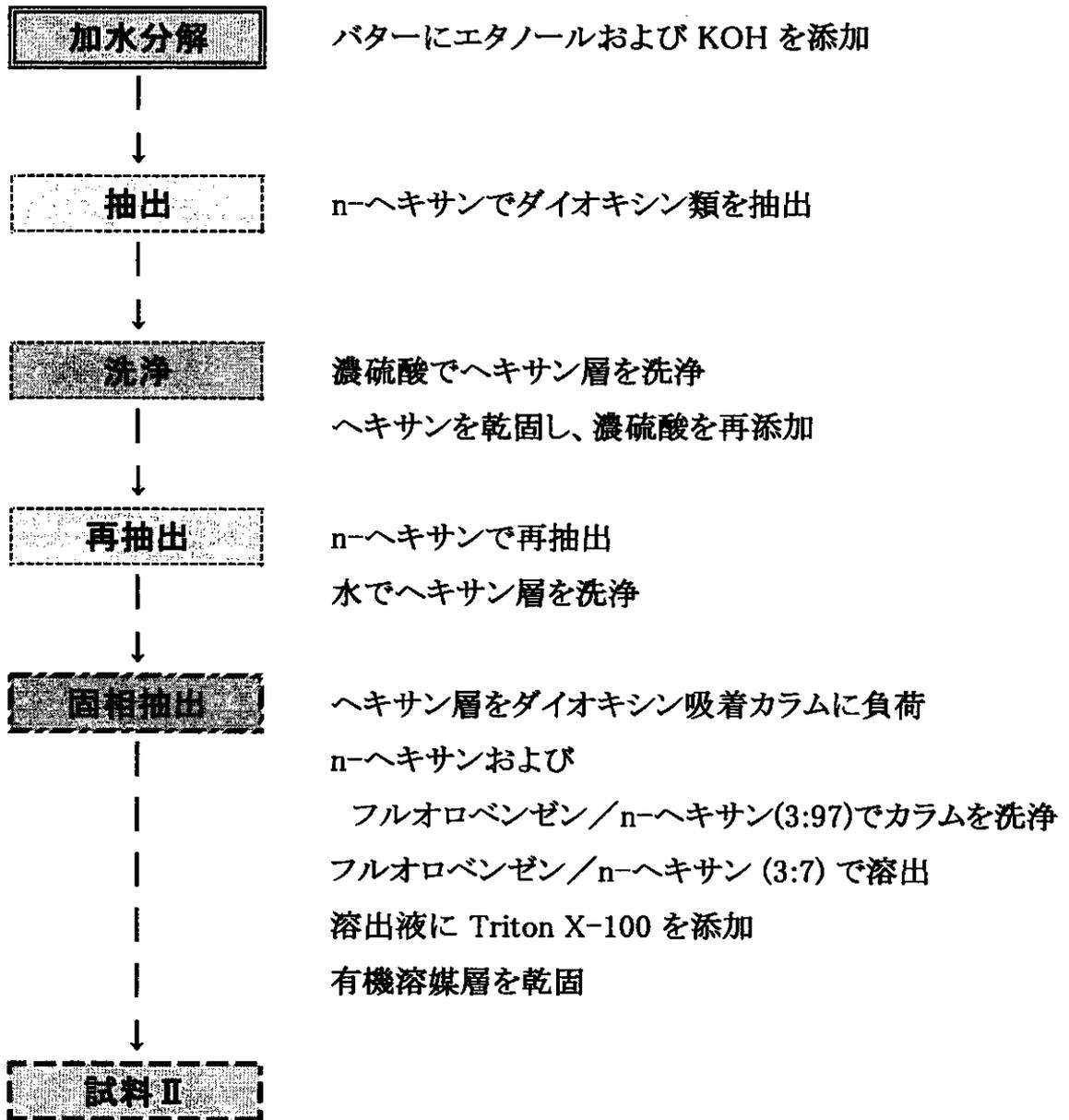


図1 試料Ⅱの調製法

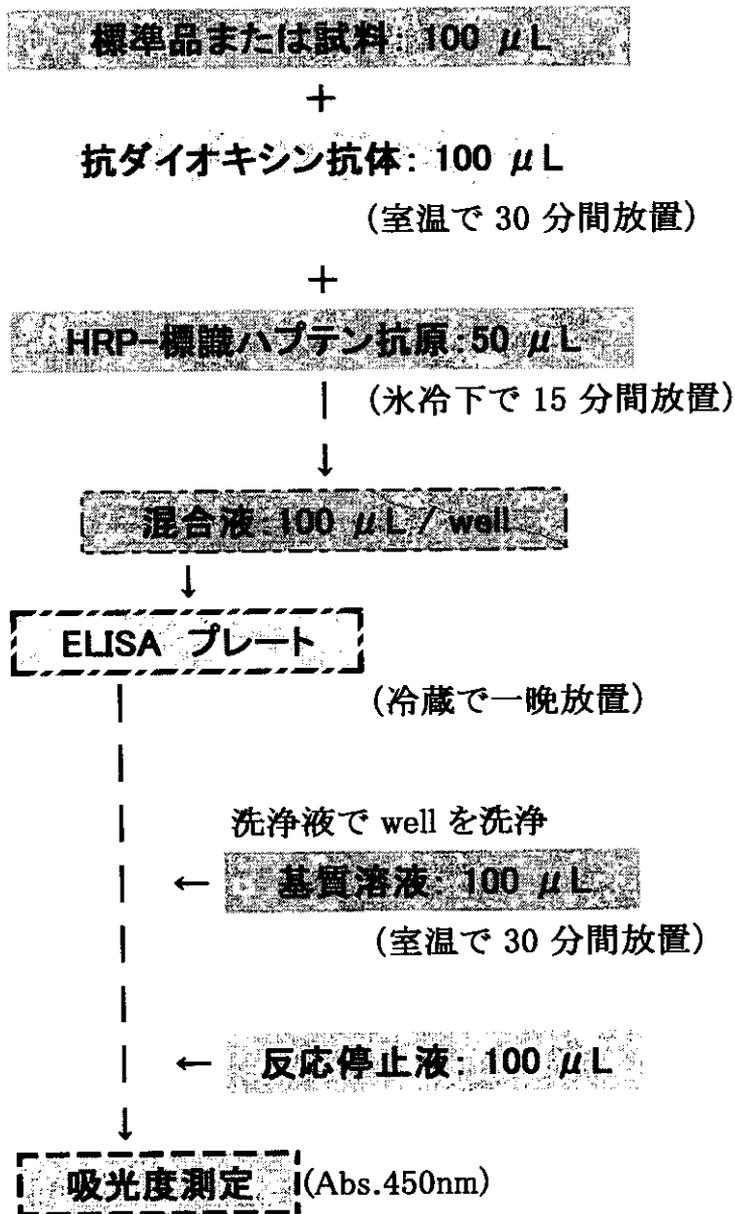


図 2 ELISA の操作手順

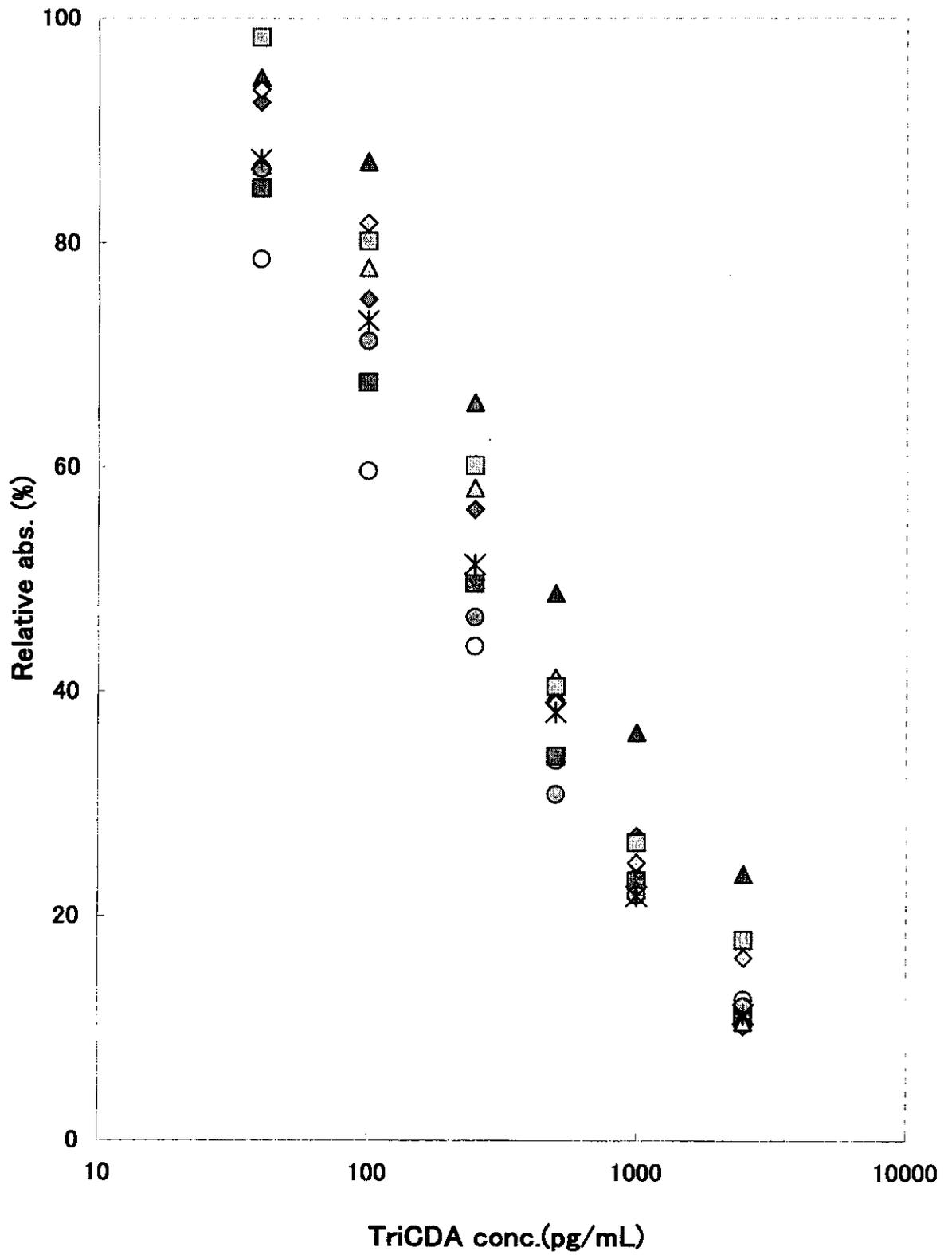


図3 ダイオキシンELISAキットの検量線

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査精度管理調査における
適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その3）
—大腸菌同定検査における検査方法の検討—

主任研究者 柳澤健一郎 (財)食品薬品安全センター 理事長
分担研究者 松木容彦 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 副所長
協力研究者 大島赴夫 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 室長
鈴木達也 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
大隅 昇 文部科学省統計数理研究所 教授

研究要旨

EC 培地の培養条件の違いによる大腸菌の検出について外部精度管理調査試料を用いて検討した。試験菌 10 株を用いて大腸菌の検査手順に従い EC 培地 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間で選択増菌培養すると、本条件下で大腸菌陽性と判定できない菌株の存在を認めた。培養温度による障害、培養時間の不足が要因と考えられ、培養時間を 48 時間まで延長すると多くの菌株が判定条件（ガス産生）を満たす結果であった。しかしながら、温度障害を受けやすい性状の菌株は、本条件下で発育を認めなかった。EC 培地を $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で選択増菌培養に採用する場合は、 24 ± 2 時間で大腸菌の有無を判定するのではなく、48 時間まで培養時間を延長することによって大腸菌の検出率が高まることが示唆された。

A. 研究の目的

平成 13 年度より食品衛生外部精度管理調査（大腸菌同定検査）試料としてマッシュポテトを基材とした調査試料を採用してきた。本基材を用いることによって、検査に必要な生菌数が確保された状態で比較的安定に試験菌を提供することが可能となった。しかしながら、新たな問題として、選択される検査方法によっては、検出可能な範囲で生菌数が試料中に確保されているにも係らず、多くの施設で大腸菌の検出が困難であるとの検査

成績を認めた。この原因は、マッシュポテト基材を検査試料として用いたために生じた結果なのか、選択された検査方法に問題点があったのか明確ではなかった。もし、マッシュポテト基材を採用したことによって生じた結果だとすると、例えば安定で均一な調査試料であっても、精度管理調査試料としては不相当と判断せざるを得ない。今後の基材作製のためにも、原因を明確にする事が必須と考える。

今年度は、上記の問題点を踏まえ、まず大

腸菌検査における検査方法の検証とその問題点を明確にすることを目的として検討を行った。

B. 研究方法

大腸菌同定用試料のための基材の検討

1. 試験菌株

Escherichia coli IFO3240

Escherichia coli NIHJ

Escherichia coli DH-1

Escherichia coli IFO3139

Escherichia coli NHL u5/41

Escherichia coli NCTC9001

Escherichia coli HIC1203

Escherichia coli HIC1207

Escherichia coli HIC2211

Escherichia coli ATCC8739

2. 大腸菌の発育とガス産生

試験菌液は、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト (SCD) 培地を用いて $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約 $10 \sim 100 \text{ cfu/mL}$ となるように調製した。

大腸菌の培養は、大腸菌検査の公定法で採用されている EC 培地並びに大腸菌の一般検査で汎用される BGLB 培地の 2 種を用いて、各培地 9mL に試験菌液 1mL を加え、EC 培地は $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、BGLB 培地は $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で 48 時間まで培養し、各菌株間の発育状況とガス産生に付いて比較検討した。

3. 大腸菌の接種濃度とガス産生

E. coli HIC2211 及び *E. coli* ATCC8739 株を用いて、大腸菌の接種濃度と大腸菌の発育増殖並びにガス産生について検討した。

試験菌液は、SCD 培地を用いて $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約 $10^1 \sim 10^8 \text{ cfu/mL}$ となるように調製した。また、EC 培地および BGLB 培地の 2 種

を用い、マッシュポテト存在下並びに非存在下について実施した。

培養条件は、各培地 9mL に菌液 0.5mL 並びに 5 倍希釈マッシュポテトまたはリン酸緩衝液 0.5mL を加え、EC 培地は $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、BGLB 培地は $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で 48 時間まで培養し、菌液接種 3 時間、6 時間、24 時間、30 時間、48 時間後の生菌数測定を行い、各菌株の増殖曲線を作成し、併せてガス産生を観察した。

4. 大腸菌検査における培養温度の発育およびガス産生への影響

ガス産生の異なる 3 種の大腸菌 [ガス高度産生株 *E. coli* IFO3240、ガス中程度産生株 *E. coli* HIC 2211、ガス弱産生株 *E. coli* ATCC8739] を用いて培養温度による発育及びガス産生の影響を検討した。

試験菌液は、SCD 培地を用いて $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約 $10 \sim 100 \text{ cfu/mL}$ となるように調製した。

EC 培地 9mL に菌液 1mL を加え、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で 24 時間培養して試験菌の発育とガス産生を判定した後、ガス産生を認めない菌株については $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ でさらに 24 時間培養して試験菌の発育並びにガス産生を観察した。

C. 結果

試験結果は、表 1. 11 及び図 1、2 に示した。

菌株間の培地中での発育並びにガス産生は、用いた菌株間、並びに選択された培地によって大きく異なっていた。BGLB 培地を用いて観察した結果では、24 時間後に 10 株中 8 株でガス産生が認められ、48 時間後では 10 株中 9 株がガス産生を示した。一方、EC 培地では、24 時間後に 10 株中 5 株でガス産

生を認め、48時間後では10株中6株がガス産生を示した。また、培地中での発育は、BGLB培地を用い、 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、24時間で全ての試験菌株が約 $10^{7\sim 8}$ cfu/mL のレベルまで増殖していたのに反し、EC培地を用い、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24時間培養では、約 $10^{5\sim 7}$ cfu/mL のレベルまでの増殖が認められ、2菌株についてはほとんど発育を認めなかった（表1~4）。

マッシュポテトの添加による発育増殖への影響は、ほとんど認められず、ガス産生への影響も有意な差としては観察されなかった（表5~10、図1、2）。

EC培地における、接種菌濃度とガス産生について、24時間培養による判定では、低濃度接種量ではガス産生を認めず、高濃度接種では判定可能であった。また、48時間培養ではいずれの添加濃度においても明らかなガス産生を認めるが、菌株間の違いが大きく、菌株によっては低濃度接種菌量ではガス産生を認める事が出来なかった（表9、10）。

ガス産生能の異なる菌株を用いた培養温度の影響では、ガス高度産生株ではEC培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24時間培養で発育並びにガス産生を示すものの、中度並びにガス弱産生株では発育並びにガス産生を認めなかった。この2株に付いて、 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ でさらに24時間培養してガス産生を観察すると、中度ガス産生能株では発育並びにガス産生を示したが、弱ガス産生能株は増殖を示さず、後培養で死滅を確認した（表11）。

D. 考察

加熱後摂取冷凍食品（凍結直前加熱以外）や非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品などの大腸菌検査では推定試験にEC培地を用い、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養してガス産生を指標に判定する試験方法が公定法として採用されている。その他には、BGLB培地を

用い $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で48時間培養してガス産生を確認する方法などがあるが、外部精度管理調査において選択される可能性のある試験方法には幾つかの検査手順が考えられる。

日常行われている検査方法を想定して、保存菌株に対するEC培地並びにBGLB培地中での発育並びにガス産生について基礎的検討を行った結果では、EC培地は大腸菌に対する選択性は高いものの、菌株によっては判定基準であるガス産生を指標に大腸菌の有無を推定するのは困難であると考えられる。すなわち、汚染している大腸菌の食材中での存在様式、食材の保存条件、大腸菌自身の性状など様々な要因で、汚染大腸菌はEC培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養によるガス産生が陰性となりうる可能性が示唆された。

今回得られた結果が、日常の食品検査で普遍的に見られている事象であるか否かを論ずるには、さらに多くの菌株を用いて詳細な検討が必要であると考え、一方ではより精度の高い検査方法の導入についても考える必要があるものと思われる。

E. 結論

食品衛生外部精度管理調査（大腸菌同定検査）試料に対する検査は、参加施設のSOPに従って実施され、公定法が試験方法として採用されることが多い。従って、調査試料配布にあたり見立て食材を提示している。例示すると、大腸菌検査の見立て食材を加熱後摂取冷凍食品（凍結直前加熱以外）とした場合、試験方法はEC培地を用いた $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24時間培養によるガス産生が推定試験として実施されることになる（図3）。しかしながら、大腸菌が高濃度に添加された調査試料を配布しているのにも係らず参加施設からの回答中には、公定法の採用により大腸菌の検出が陰性と示される場合がある。ここには、調査試料の不備による結果なのか、検査施設