

マイコトキシン産生能を有する株の存在が知られている *P. islandicum* を、前年産米（平成 14 年産）1 検体（検出検体率、1%）と備蓄米 2 検体（13%）から分離した。このうち備蓄米の 1 検体で、この菌の着生が進行しており、PDA 培地で検出粒率 82%を示した。*P. islandicum* を分離した 3 検体は、それぞれ別々の地域で生産された玄米である。*P. islandicum* に高度に汚染されていた備蓄米が貯蔵されていた県内で生産された検体は、全部で 14 あったが、他には *P. islandicum* を検出したものはなかった。

株によってはアフラトキシンを産生する可能性がある *Aspergillus flavus* が前年産米（平成 14 年産）の 5 検体（5%）と備蓄米の 2 検体（13%）から検出されたが、検出粒率は、低かった（それぞれ 2~4%と 4~8%）。他に、マイコトキシン関連真菌として、*A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Fusarium* 等を検出した。このうち *A. versicolor* と *A. ochraceus* につ

いては検出粒率の高い検体があった。また、*A. versicolor* については、新米、前年産米、備蓄米すべての検体群にこれが検出された検体が存在し、全体の 16%の検体から検出された。

3. 生産地による差

日本を 4 つのブロックに分けて産地による真菌着生の差異を検体数が最も多かった平成 14 年産の前年産米で検討した。ブロック I: 北海道・東北地方、ブロック II: 関東・信越・北陸地方、ブロック III: 東海・近畿・中国地方、ブロック IV: 四国・九州地方に分けた。真菌着生粒率は、北から順に 8.5%, 18.0%, 20.5%, 22.3%であり、南に行くほど高かった（図 4）。また、この傾向は、*Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium* 属の菌で顕著であった（図 5）。平成 15 年産の前年産米には、産地の偏りがあったが、ほぼ同様の傾向があった。新米と備蓄米については、検体数が少なく産地も偏っていたためこの解析は行っていない。

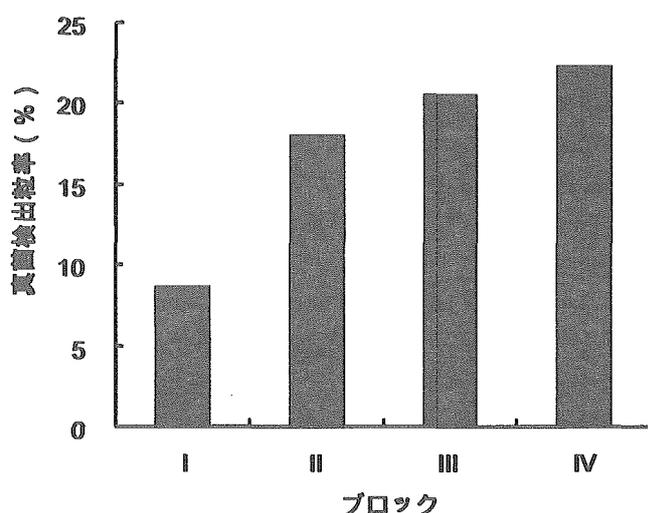


図 4. 真菌検出粒率の地域差
 ブロック I : 北海道・東北地方
 ブロック II : 関東・信越・北陸地方
 ブロック III : 東海・近畿・中国地方
 ブロック IV : 四国・九州地方

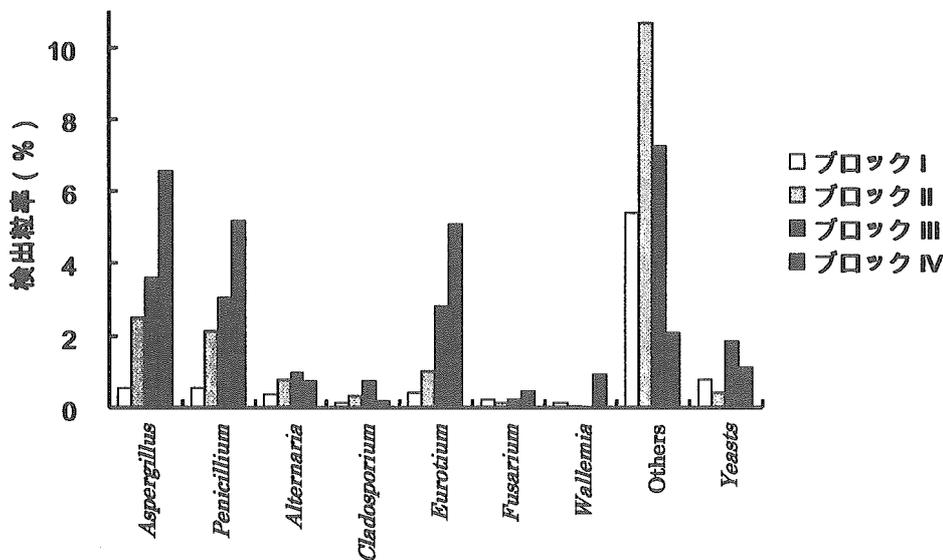


図 5. 各種真菌の検出粒率の地域差

4. *P. islandicum* の毒素産生能

P. islandicum は、熱帯産の米からよく検出されるが、国産米から検出されることは稀であるとされている。今回の調査では、3検体から検出され、そのうちの1検体では検出粒率も高かった。そこで、3検体から分離した *P. islandicum* の毒素産生能を試験した。*P. islandicum* の主要な毒成分としては、ルテオスカイリンとシクロクロチン (=イスランジトキシン) が知られているが、今回は毒素産生能の指標としてルテオスカイリン産生能を試験した。

P. islandicum の菌体抽出液について上野らの方法に従って TLC を行ったところ、 R_f 値 0.41 に橙黄色のスポットが認められた。この R_f 値はルテオスカイリンの文献値 (0.40) とほぼ一致している。また、このスポットは、*P. islandicum* に特異的で、同時に TLC を実施した *P. citrinum* TSY222, *P. aurantiogriseum* TSY271 および *P. expansum* TSY277 の培養抽出液には検出されなかった (図 6)。そこで、*P. islandicum* の培養抽出液について分取 TLC を実施し、 R_f 値 0.41 を示す橙黄色画分をアセトンで溶出した。ここで得られた TLC 溶出液のう

ち、*P. islandicum* 対照菌である *P. islandicum* TSY283 培養物由来の溶出液について LC/TOF-MS および LC/ion trap MS を実施したところ、HPLC で 8.5 分の保持時間を与えるピークがルテオスカイリンであると同等された。すなわち、LC/TOF-MS によりこのピークの精密質量を測定した結果、正イオンモードで観察されたプロトン化分子イオン; $(M+H)^+$ は $m/z=575.1182$ であり、ルテオスカイリンのプロトン化分子イオンの精密質量($m/z=575.1184$)との相対質量誤差は -0.35 ppm であった。また負イオンモードで観察された脱プロトン化分子イオン; $(M-H)^-$ の精密質量($m/z=573.1038$)との相対質量誤差は 1.31 ppm であった (図 7.a,b)。さらに LC/ion trap MS を用いて分子関連イオン(プロトン化及び脱プロトン化分子イオン)をプリカーサーイオンとした MS/MS スペクトルを測定した結果、正、負イオンモード共に中性分子の脱離として水分子が 1~3 個脱離したイオン(正イオン: $m/z=539, 521$ と負イオン: $m/z=555, 537$)及び図 7 に示した構造式の A 骨格由来のイオン(正イオン: $m/z=287, 271$ と負イオン: $m/z=285$)が観察された (図 7.c, d)。

Luteoskyrin →

Sample 1
 Sample 2
 Sample 3
P. islandicum TSY171
P. islandicum TSY283
P. citrinum TSY222
P. aurantiogriseum TSY271
P. expansum TSY277

図 6. *P. islandicum* 培養抽出液のTLCクロマトグラム

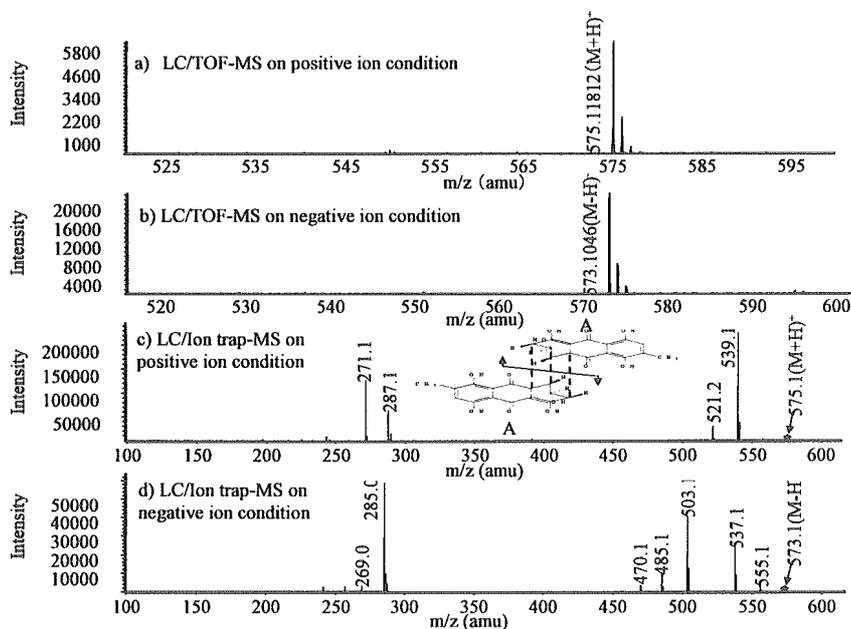


図 7. *P. islandicum* TSY 283によって産生されたルテオスカイリンのLC/TOF-MSとLC/ion trap-MSのスペクトル

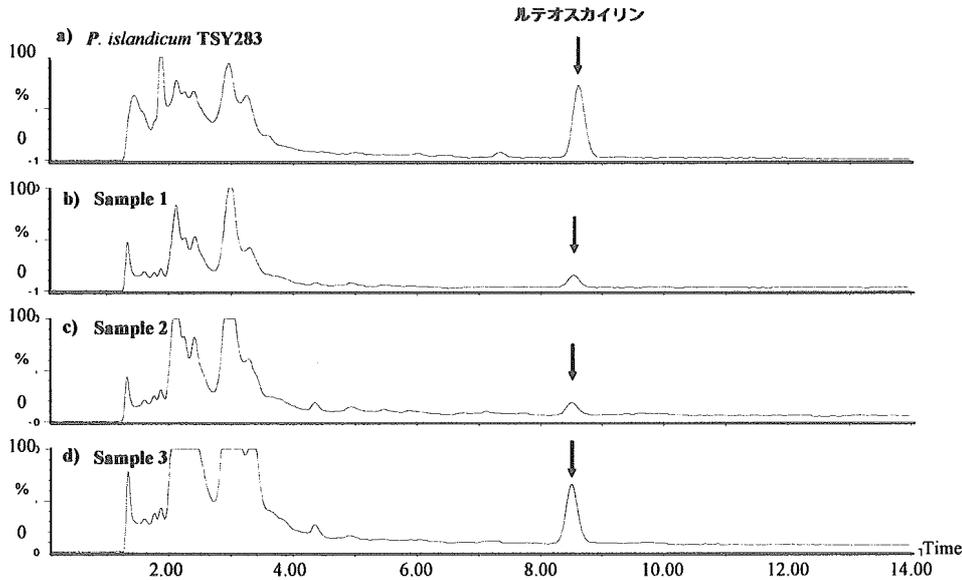


図 8. 国産玄米より分離された *P. islandicum* によって産生されたルテオスカイリンを含む TLC 画分の HPLC クロマトグラム

次に、検体より分離した *P. islandicum* 3 株の培養抽出液から得た TLC 溶出液について HPLC を実施した。図 8 に示したように、検体から分離した菌株から得た TLC 溶出液には、*P. islandicum* TSY283 から得た TLC 溶出液において LC/TOF-MS および LC/ion trap MS によってルテオスカイリンであることが確認されたピークに相当するピークが認められ、国産米より分離した *P. islandicum* 3 株は、いずれもルテオスカイリンを産生することが明らかになった。

D. 考察

備蓄米には、好乾性菌の着生が進んだものが多かった。一般に収穫直後の穀類では、好湿性の圃場性カビである *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* が真菌フローラ の中心を占めるが、貯蔵に伴って *Aspergillus*, *Penicillium* などの中湿性カビへ、さらには *Aspergillus restrictus*, *Eurotium* などの好乾性貯蔵カビへと推移していくことが知られている。我々の結果

も、同様の真菌フローラの変遷を示した。

今回の調査で *P. islandicum* の着生が 3 検体に認められ、うち 1 検体では汚染が進行していたので、*P. islandicum* について過去の報告を調べた。1950 年代の輸入米真菌調査では、この菌の寄生率(着生粒率) 1.5% 以上の米が全検体の 13% あったことが報告されている。国産米からは、1960 年代の調査で市販精白米 219 検体のうち 1 検体から、また、地域的な調査ではあるが、農家保有精白米 376 検体のうち 5 検体から、農家保有玄米 258 検体のうち 8 検体から検出されている。*A. flavus* は、調査や地域によって国産米から検出された例があるが、今回の結果と同様いずれの場合も検出粒率は低い(1~4%)。また、輸入米から分離された *A. flavus* にアフラトキシン産生能を認めた報告はあるが、国産米から分離された *A. flavus* は、培養によってアフラトキシンを産生しなかったと報告されている。今回の調査で検出検体率、検出粒率が比較的高かったマイコトキシン関連真菌に、*A. versicolor* と *A. ochraceus* とがある。この 2 つの菌は、それぞれステリグマトシ

スチンとオクラトキシシン A の産生菌として知られており、特に *A. versicolor* は、貯蔵米でステリグマトシスチンの自然汚染を起こした例がある。昭和 40 年代の国産米調査における *A. versicolor* と *A. ochraceus* の着生状況は、ほぼ今回と同程度であり、当時と比べて改善の状況は認められない。

Fusarium は、トリコセセン系を始めとして多様なマイコトキシンを産生する。特に、トウモロコシ、ムギ類の赤カビ病は有名で、この病気に冒された穀粒からは、デオキシニバレノール (DON)、ニバレノール (NIV)、T-2 トキシシン等が高濃度で検出される。最近、外国で米からも DON が検出されたという報告があり、国産米の DON、NIV による汚染実態が調査された。その結果 124 検体を調査して 4 検体に DON、15 検体に NIV が検出されている。真菌検査によって *Fusarium* による汚染状況を調べることは、*Fusarium* 毒素の存在を予測する上で有効であると考えられる。今回の調査結果は、*Fusarium* は貯蔵によって衰退することを示しており、*Fusarium* の検出を目的とした真菌検査は、収穫後早い時期に実施する必要があると考えられる。

昭和 40 年産国産精白米の真菌フローラの調査では、真菌発生頻度と検体収集地域との間には関連は認められなかったと報告されているが、今回の調査で真菌着生粒率は、米の産地が南になるほど高くなる傾向にあった。

第二次世界大戦後、エジプトから日本へ輸入された米に発生していた黄変米から原因菌として *P. islandicum* が分離・同定され、この菌の主要な毒性物質としてルテオスカイリンとシクロクロロチンが特定された。*P. islandicum* は、産生する色素によって 3 タイプに型別分類できるという報告があり、それによるとルテオスカイリンは、エジプト米より分離された株が属するタイプだけが産生するとされている。国産の米や小麦粉から検出された *P. islandicum* の毒素産生能について、マウスや HeLa 細胞を用いた毒性試験が実施され、培養液に強い毒性があることが報告されているが、毒性物質

を確認する化学的な証拠は示されていない。今回、我々は、LC/TOF-MS と LC を用いて国産米から分離した *P. islandicum* 3 株の菌体培養物中にルテオスカイリンが存在することを確認した。著者らの調べた限りでは、国産の穀物より分離された *P. islandicum* のルテオスカイリン産生能を化学的に確認したのは、この報告が始めてである。

今回は、収集した検体が少量であったため、玄米検体中にルテオスカイリンが蓄積していたかどうかを確認することはできなかった。また、現在のところ *P. islandicum* 毒素の食品からの分析法は確立されていない。この研究で培養物中のルテオスカイリンを確認するために用いた方法は、今後食品中のルテオスカイリン定量法を確立する際にモデルとすることができると考える。

E. 結論

今回の調査によってマイコトキシシン関連真菌が着生している国産玄米があることが明らかになった。*A. versicolor*, *A. ochraceus* 等のマイコトキシシン関連真菌の着生状況は、昭和 40 年代の調査と比べて改善されていなかった。*A. versicolor* はステリグマトシスチンを、*A. ochraceus* はオクラトキシシンを産生する菌として知られている。加えて今回の調査では *P. islandicum* を高い検出粒数をもって検出した検体があった。分離された *P. islandicum* にはいずれもルテオスカイリン産生能があることが明らかになった。また、新米からは、多様なマイコトキシンを産生する可能性がある *Fusarium* が高頻度で検出された。以上のことから、国産米のマイコトキシシン汚染に関する安全性を図る上では、ステリグマトシスチン、オクラトキシシン A、ルテオスカイリン、*Fusarium* 毒素等を分析の対象にするのが有効であると考えられる。*Fusarium* の検出を目的とする真菌検査は、収穫後早い時期に実施する必要があることが示された。また、今回の調査結果

は、国産米について有害な真菌による汚染防除の対策を立てる必要があることを示していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 酒井綾子, 川上久美子, 高鳥浩介, 斎藤行生: 真菌汚染による苦情食品とその喫食による健康被害. 食品衛生学雑誌, 45, 201-206 (2004).
- 2) 酒井綾子, 田中宏輝, 小西良子, 花澤 良, 太田利子, 中原徳之, 関口将二, 押田絵美, 滝埜昌彦, 一戸正勝, 吉川邦衛, 芳澤宅實, 高鳥浩介: 国産玄米の真菌調査と検出された *Penicillium islandicum* の毒素産生能. 食品衛生学雑誌, 投稿中.

2. 学会発表

- 1) 酒井綾子, 田中宏輝, 小西良子, 花澤 良, 太田利子, 中原徳之, 関口将二, 押田絵美, 高鳥浩介, 吉川邦衛, 一戸正勝, 芳澤宅實, : 国産玄米の真菌調査と *Penicillium islandicum* の検出について, 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会 (2004.11).

謝辞

P. islandicum 培養物からのルテオスカイリン分析を実施していただいた国立医薬品食品衛生研究所, 小西良子博士, 田中宏輝研究員並びに横河アナリティカルシステムズ, 滝埜昌彦博士に深く感謝致します。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全高度化推進事業）

食品企業における健康危機管理に関する研究

分担研究報告書（平成 16 年度）

微生物検査の精度管理方法論について

－検査員の技能評価－

主任研究者 玉木 武（社）日本食品衛生協会 理事長

分担研究者 松木 容彦（社）日本食品衛生協会食品衛生研究所 試験検査センター長

協力研究者 丹野 憲二，田中 廣行，宇田川 藤江（財）日本食品分析センター

小沼 博隆 東海大学海洋学部水産学科 教授

熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

研究要旨

微生物検査の精度管理において、検査員の技能を評価する手法（検査員個別の技能評価、検査員間の技能の比較評価）について検討を行った。

内部精度管理は、日常の検査において一連の操作が正しく行われ、得られた結果が正しいことを裏付けるために実施する活動である。寒天平板培養法による定量的な生菌数測定試験の場合は、一定の微生物数を含有する「管理試料」を同時に検査する方法や試料を繰り返し検査する方法等により、得られた測定値（定量値）の精確さを統計学的に評価・判定する手法が知られている。また、特定微生物の検出試験（定性的な試験）の場合は、統計学的な手法よりはむしろ「培養系の確認」及び「汚染の有無の確認」を目的とした手法（培地性能試験、対照試験）が主体となる。

定量的及び定性的な試験いずれの場合においても、微生物検査の大半が検査員の手作業により実施されることから、検査員の技能を正しく把握しておくことが極めて重要となる。

本研究では、複数の検査員を対象として、その技能を評価する手法に関する検討を行った。その結果、以下の方法が検査員の技能を評価する手法として応用できるものと考えられた。

1. 微生物株又は市販菌体製品を用いて、「生菌数測定技能」を評価する方法
2. 「菌液調製技能」（バクテリア計算盤等を用いて、一定菌数の微生物懸濁液を調製する技能）を評価する方法
3. 形態観察（顕微鏡観察）、生化学的試験、血清学的試験等を実施することにより、「同定鑑別技能」を評価する方法
4. 微生物株の混合菌液を用いて、「画線分離技能」を評価する方法
5. 微生物株を接種した試料を用いて、「検体調製技能」を評価する方法
6. 調製した培地の性能評価を行うことにより、「培地調製技能」を評価する方法
7. 「技能試験への参加」により技能を評価する方法

なお、以上の技能評価以外にも、それぞれの試験所の検査内容に応じて適切な技能評価を実施することが望ましいと考えられた。また、いずれの方法においても、継続的に各検査員の技

能を評価することが重要と考えられた。

A. 研究目的

「食の安全・安心」を確保することが強く求められている昨今、食品分析に関わる試験所の信頼性確保が国際的にもより一層要求されている。試験検査の信頼性を確保するためには、施設運営や機械・器具等の管理システムを構築するとともに、日常の試験検査が正しく実施されていることを確認するための手段としての精度管理及び検査員の技能評価を実施することが重要となる。

精度管理は、得られた結果が正しいことを裏付けるために不可欠な活動である。しかし、多数の検体についてすべての試験操作を絶えず確認・点検することは限りなく難しい。従って、何等かの手段により連続的に得られた結果が正しいことを確認する作業が必要となる。それが内部精度管理 (Internal Quality Control; 以下「IQC」という) であり、検査結果の信頼性を確保する上で重要な位置付けとなる。

寒天平板培養法による定量的な生菌数測定試験では、一定の微生物数を含有する「管理試料」を同時に検査する方法¹⁾や試料を繰り返し検査する方法²⁾等により、得られた測定値(定量値)の精確さを統計学的に評価・判定する手法が知られている。

一方、特定微生物の検出試験は、寒天培地又は液体培地(増菌培地)を用いて目的とする微生物が試料中に存在するか否かを調べる試験(定性的な試験)であるため、IQCとしては統計学的手法よりはむしろ「培養系の確認」(目的とする微生物が増殖可能な条件で培養されていることの確認)及び「汚染の有無の確認」(試験操作や使用培地等から汚染が生じていないことの確認)を目的とした手法が主体となる。

定量的及び定性的な試験いずれの場合においても、微生物検査の大半が検査員の手作業により実施されることから、検査員の技能を正しく把握しておくことが極めて重要となる。

わが国の精度管理の一般ガイドライン³⁾においても、検査員の技能について以下の事項の評価を定期的に行うこととされている。

①通常の試験品を用いて、定められた方法により製品検査する技能、②既知の微生物を含む特別な試験品から当該微生物を検出、分離、鑑別及び同定する技能、③既知の微生物を用いて、培地、染色液、試薬等の性質を調べる技能

本研究では、検査員の技能評価のうち、以下の内容について評価試験を実施したので、その結果を報告する。

- I. 「生菌数測定技能」に関する評価試験
- II. 「菌液調製技能」に関する評価試験
- III. 「同定鑑別技能」に関する評価試験
- IV. 「画線分離技能」に関する評価試験
- V. 「検体調製技能」に関する評価試験
- VI. 「技能試験」への参加

B. 研究方法

複数の検査員を対象として、以下の評価試験を実施した。

I. 「生菌数測定技能」に関する評価試験

1. 微生物株を用いた技能評価

枯草菌(*Bacillus subtilis* NBRC 3134)の芽胞数が $1\sim 3\times 10^4$ cfu/mlとなるように調製し、試験菌液とした。試験菌液の生菌数を標準寒天平板培養法(35℃48時間培養)により、定期的(1箇月毎)に測定し、得られた測定結果をZスコアにより評価した。

なお、技能評価試験の実施に先駆け、試験菌液の生菌数を繰り返し測定し、得られた測定値

(対数)をもとに「平均値(\bar{X})」及び「標準偏差(S)」を算出して目標値を設定した。技能評価試験においては、設定された目標値を用い、次式により各測定値(対数)のZスコア⁴⁾(Z)を算出して、技能の評価を行った。

・Zスコアの算出式

$$Z = (X_i - \bar{X}) / S$$

X_i : 測定値(対数)

\bar{X} : 平均値(目標値)

S: 標準偏差(目標値)

・Zスコアの評価基準

|Z| ≤ 2.0: 合格

2.0 < |Z| < 3.0: 疑わしい

|Z| ≥ 3.0: 不合格

2. 市販菌体製品を用いた技能評価

細菌検査精度管理用定量菌株として市販されている「Easy QA Ball」(日水製薬(株)から販売)のうち、「大腸菌群(*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048): 10,000 cfu」を入手した。この市販菌体製品の生菌数測定を定期的(1日毎)に実施し、得られた測定結果をZスコアにより評価した。

なお、生菌数は、標準寒天平板培養法(35℃48時間培養)により測定した。

II. 「菌液調製技能」に関する評価試験

大腸菌(*Escherichia coli* NBRC 3301)及び黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* NBRC 13276)を普通寒天斜面培地に接種・培養した。培養後の菌体をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、バクテリア計算盤を用いて1ml当たりの生菌数が $1 \sim 4 \times 10^5$ cfu(目標値)となるように調製(希釈)した。

調製菌液の生菌数を標準寒天平板培養法(35℃48時間培養)により測定し、目標値内であるか否かを判定した。

なお、本評価試験は、定期的(1箇月毎)に実施した。

III. 「同定鑑別技能」に関する評価試験

1. 形態観察(顕微鏡観察)による技能評価

- 1) *Escherichia coli* NBRC 3972
- 2) *Staphylococcus aureus* NBRC 13276
- 3) *Lactobacillus plantarum* NBRC 3070
- 4) *Bacillus cereus* NBRC 13494
- 5) *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 1832

以上の5菌株を寒天斜面培地に接種・培養し、試験菌株とした。各試験菌株の形態観察及びグラム染色を実施し、当該微生物の形態及びグラム染色性を判定した。

2. 生化学的性状試験による技能評価

- 1) *Escherichia coli* NBRC 3972
- 2) *Citrobacter freundii* (試験所分離株)
- 3) *Klebsiella pneumoniae* (試験所分離株)

以上の大腸菌群3菌株を寒天斜面培地に接種・培養し、試験菌株とした。各試験菌株について生化学的性状試験を実施し、当該微生物が大腸菌群又は大腸菌に該当するか否かを判定した。

3. 血清学的試験による技能評価

- 1) *Salmonella* Enteritidis NBRC 3313
- 2) *Salmonella* Typhimurium NBRC 12529
- 3) *Salmonella* Havana (試験所分離株)
- 4) *Salmonella* Thompson (試験所分離株)

以上のサルモネラ4菌株を寒天斜面培地に接種・培養し、試験菌株とした。市販サルモネラ免疫血清(デンカ生研(株)製)を用いて各試験菌株のO群血清型を判定した。

IV. 「画線分離技能」に関する評価試験

1. 混合菌液(3菌種)を用いた技能評価

- 1) *Escherichia coli* NBRC 3972
- 2) *Salmonella* Enteritidis NBRC 3313
- 3) *Citrobacter freundii* (試験所分離株)

以上の3菌株をトリプトソイブイオン培地に接種・培養後、リン酸緩衝生理食塩水を用いて

1 ml 当たりの菌数が $1\sim 3\times 10^7$ cfu となるように調製(希釈)した。各菌液を当量ずつ混合して試験菌液とした。試験菌液の 1 白金耳量を DHL 寒天平板培地 3 枚に画線分離し培養後、出現集落を観察し、各試験菌株の独立集落が分離・形成されているかを判定した。

2. 混合菌液(2 菌種)を用いた技能評価

1) *Escherichia coli* NBRC 3972

2) *Salmonella* Enteritidis NBRC 3313

大腸菌[菌株 1])の菌液は $1\sim 3\times 10^7$ cfu/ml、また、サルモネラ[菌株 2])の菌液は $1\sim 3\times 10^6$ cfu/ml(大腸菌の菌数の約 1/10)となるように調製後、各菌液を当量ずつ混合して試験菌液とした。試験菌液の 1 白金耳量を DHL 寒天平板培地 3 枚に画線分離し培養後、出現集落を観察し、サルモネラの独立集落が分離・形成されているかを判定した。

また、サルモネラ[菌株 2])の菌液を $1\sim 3\times 10^5$ cfu/ml(大腸菌の菌数の約 1/100)となるように調製して同様に試験した。

V. 「検体調製技能」に関する評価試験

$3\sim 4\times 10^7$ cfu/ml に調製した枯草菌芽胞液 0.1 ml を滅菌ポリ容器(200 ml 容量)に注入した。次に、市販のハチミツ 200 g を容器内に緩やかに注ぎ込み(攪拌・混合せず)、試料とした。

同一試料について、生菌数を繰り返し 5 回測定し、得られた測定結果を Z スコアにより評価した。

VI. 「技能試験」への参加

Central Science Laboratory が主催する技能試験(Food Examination Performance Assessment Scheme : FEPAS)のうち、以下のプログラムに参加し、検査員の技能評価を行った。

- ・ Aerobic Plate Count (Milk Powder)
- ・ *L. monocytogenes* (Chicken)

C. 研究結果

I. 「生菌数測定技能」に関する評価試験

1. 微生物株を用いた技能評価

検査員 5 名が、1 箇月毎に枯草菌芽胞液の生菌数を測定した結果を表 1 に示した。また、各測定値(対数)の Z スコアを算出し、表 2 に示した。

10 回の生菌数測定のうち、9 回は検査員全員の Z スコアが $|Z|\leq 2$ であり、検査員間の技能が許容範囲内にあると判断された。ただし、5 回目の生菌数測定では、検査員 C が $|Z|>2$ であり、検査員 C の技能に疑義が生じた。

10 回の生菌数測定値(対数)の標準偏差は、検査員 C が「0.066」と最も大きな値であった。一方、検査員 E の標準偏差は「0.031」と最も小さい値であり、各測定値(対数)の Z スコアはすべて $|Z|<1$ であった。

2. 市販菌体製品を用いた技能評価

検査員 5 名が、1 日毎に市販菌体製品の生菌数を測定した結果を表 3 に示した。また、各測定値(対数)の Z スコアを算出し、表 4 に示した。

20 回の生菌数測定のうち、19 回は検査員全員の Z スコアが $|Z|\leq 2$ であり、検査員間の技能が許容範囲内にあると判断された。ただし、11 回目の生菌数測定では、検査員 J が $|Z|>2$ であり、検査員 J の技能に疑義が生じた。

20 回の生菌数測定値(対数)の標準偏差は、検査員 J が「0.045」と最も大きな値であった。一方、検査員 H の標準偏差は「0.028」と最も小さい値であった。

II. 「菌液調製技能」に関する評価試験

検査員 3 名が、1 箇月毎に調製した菌液の生菌数測定結果を表 5 に示した。

5 回の測定において、検査員全員の測定値は、目標値である「 $1\sim 4\times 10^5$ /ml」を満たしており、良好な結果であった。

Ⅲ. 「同定鑑別技能」に関する評価試験

1. 形態観察(顕微鏡観察)による技能評価

検査員 3 名が、5 種類の微生物株について形態観察(顕微鏡観察)を行った結果を表 6 に示した。

検査員全員が、5 種類の微生物株について正しく形態観察(顕微鏡観察)を行うことができた。

2. 生化学的性状試験による技能評価

検査員 3 名が、3 種類の大腸菌群について生化学的性状試験を行った結果を表 7 に示した。

検査員全員が、大腸菌群 3 菌種について大腸菌群又は大腸菌の判定を正しく行うことができた。

3. 血清学的試験による技能評価

検査員 3 名が、4 種類のサルモネラについて O 群血清型を判定した結果を表 8 に示した。

検査員全員が、4 種類のサルモネラの O 群血清型を正しく判定することができた。

Ⅳ. 「画線分離技能」に関する評価試験

1. 混合菌液(3 菌種)を用いた技能評価

検査員 4 名が、3 菌種混合菌液(菌数比 *E.coli* 1:*S.Enteritidis* 1:*C.freundii* 1)の 1 白金耳量を DHL 寒天平板培地 3 枚に画線分離した結果を表 9 に示した。

検査員全員が、3 菌種それぞれの独立集落を形成するように分離することができた。

2. 混合菌液(2 菌種)を用いた技能評価

検査員 4 名が、2 菌種混合菌液の 1 白金耳量を DHL 寒天平板培地 3 枚に画線分離した結果を表 9 に示した。

菌数比が「*E.coli* 10:*S.Enteritidis* 1」の混合菌液について、検査員全員が 2 菌種それぞれの独立集落を形成するように分離することができた。

一方、菌数比が「*E.coli* 100:*S.Enteritidis* 1」の

混合菌液について、1 菌種(*E.coli*)のみ集落が形成される事例が生じるとともに、検査員間で画線分離技能に差異が認められた。

Ⅴ. 「検体調製技能」に関する評価試験

検査員 3 名が、枯草菌芽胞液を接種したハチミツについて生菌数を測定した結果を表 10 に示した。また、各測定値(対数)の Z スコアを算出し、表 11 に示した。

検査員 b 及び c は、5 回繰り返し測定した生菌数(対数)の Z スコアが、すべて $|Z| \leq 2$ であり、良好な結果であった。

一方、検査員 a は、繰り返し生菌数を測定する毎に測定値が少なくなる傾向が認められ、5 回目の測定値の Z スコアは、 $|Z| > 2$ となった。

Ⅵ. 「技能試験」への参加

検査員 7 名が、Aerobic Plate Count(Milk Powder)の技能試験に参加した結果を表 12 に示した。また、検査員 5 名が、*L.monocytogenes* (Chicken)の技能試験に参加した結果を表 13 に示した。

いずれの技能試験においても、検査員全員が、良好(Satisfactory)な結果であった。

D. 考 察

Ⅰ. 「生菌数測定技能」に関する評価試験

微生物株(枯草菌芽胞液)及び市販菌体製品(Easy QA Ball)を試料として、検査員の生菌数測定技能を評価した。

各検査員が試料の生菌数を定期的に測定することにより、「各検査員の技能はいつも安定しているのか?」、「各検査員の測定値のバラツキはどの程度なのか?」、「検査員間の測定値の精度は許容範囲内なのか?」等を確認することができると考えられた。

本研究では、技能評価試験の実施に先駆け、試料の生菌数を繰り返し測定し、「平均値(\bar{X})」及び「標準偏差(S)」を算出して目標値を設定

した。この目標値が当該試験所の基準値(技能レベル)となる。技能評価試験の実施に際しては、設定された目標値を用いて、各測定値(対数)のZスコアを算出し、技能の評価を行った。

なお、微生物株及び市販菌体製品以外にも、一定菌数の微生物を均一に安定して含有する試料であれば、生菌数測定技能を評価するための試料として使用できると考えられた。

II. 「菌液調製技能」に関する評価試験

IQC の実施に当たり、一定菌数の微生物懸濁液や一定菌数の微生物を含有する試料を調製する場合がある。このような場合に、検査員の菌液調製技能を評価しておく必要性が考えられるが、本研究では、バクテリア計算盤を用いて菌液を調製する場合の技能評価試験を実施した。

日常の検査業務において、菌液調製を実施している検査員 3 名を対象に評価試験を実施したが、いずれも良好な結果であった。

本研究では、大腸菌及び黄色ブドウ球菌を用いて菌液調製技能の評価を行ったが、他の微生物株を用いて評価試験を実施することも有意義と考えられた。

III. 「同定鑑別技能」に関する評価試験

形態観察(顕微鏡観察)、生化学的性状試験及び血清学的試験により、検査員の同定鑑別技能を評価した。

特定微生物の検出試験では、検体から検出された微生物について同定鑑別試験を実施し、目的とする微生物か否かを判断する。従って、同定鑑別は試験結果に直接影響を及ぼす重要な試験であり、各検査員の技能を評価しておくことが重要と考えられた。

同定鑑別の手法としては、本研究で実施した形態観察(顕微鏡観察)、生化学的性状試験及び血清学的試験の他にも、同定キットを用いる手法、生物学的手法、遺伝子学的手法等、様々な

手法が知られている。必要に応じて、これらの手法についても検査員の技能を確認・評価しておくことが重要と考えられた。

IV. 「画線分離技能」に関する評価試験

画線分離操作は、検査員の技能に強く依存するとともに、試験結果に大きな影響を及ぼす可能性がある(目的とする微生物が試料中に存在するにも係わらず、正しく画線分離が実施されない場合、当該微生物が検出されないことになる)。

本研究では、3 菌種混合菌液(同等菌数比)及び 2 菌種混合菌液(2 菌種の菌数比が 10 : 1 及び 100 : 1)を用いて、検査員の画線分離技能を評価した。

2 菌種混合菌液(2 菌種の菌数比 100 : 1)の場合、検査員間の技能に差異が認められており、画線分離技能を評価する重要性が認識された。

V. 「検体調製技能」に関する評価試験

故意に微生物の分布が不均一になるように調製した試料を用いて、検査員の検体調製技能の評価を行った。

検体調製は、微生物検査における最初の工程であるため、試験結果に及ぼす影響は大きい。従って、その技能を正しく評価しておくことが特に重要になる。

本研究においても、検体調製技能を評価する重要性が認識された。

VI. 「技能試験」への参加

本研究では、Central Science Laboratory が主催する技能試験(FEPAS)のプログラムに参加し、検査員の技能評価を行った。

世界の各試験所と試験結果を比較することにより、当該試験所の技能を客観的に評価することができると考えられた。良好な結果が得られた場合は、検査員自身の遣り甲斐や自信に繋

がり、疑わしい結果が得られた場合は、改善措置へ繋げることができるものと考えられた。

なお、FEPASでは、試験結果及び結果評価とともに、各試験所の試験方法に関する情報がフィードバックされるため、各試験所で採用されている試験方法(試験条件)を把握することができる。

以上の評価内容以外にも、試験所において使用培地を調製している場合は、検査員の培地調製技能を評価することも重要と考えられた。

検査員が調製した培地について、性能の評価を実施することにより、培地調製技能を評価する方法等が考えられた。

E. 結 論

本研究では、複数の検査員を対象として、その技能を評価する手法に関する検討を行った。その結果、以下の方法が検査員の技能を評価する手法として応用できるものと考えられた。

1. 微生物株又は市販菌体製品を用いて、「生菌数測定技能」を評価する方法
2. 「菌液調製技能」(バクテリア計算盤等を用いて、一定菌数の微生物懸濁液を調製する技能)を評価する方法
3. 形態観察(顕微鏡観察)、生化学的試験、血清学的試験等を実施することにより、「同定鑑別技能」を評価する方法
4. 微生物株の混合菌液を用いて、「画線分離技能」を評価する方法
5. 微生物株を接種した試料を用いて、「検体調製技能」を評価する方法
6. 調製した培地の性能評価を行うことにより、「培地調製技能」を評価する方法
7. 「技能試験への参加」により技能を評価する方法

微生物検査の大半が検査員の手作業により

実施されることから、検査員の技能を正しく把握しておくことが極めて重要となる。新たに検査業務を担当する検査員にあつては、必要なトレーニングを実施した後、技能の習得度合いを検証(評価)するために、技能評価試験を実施することが重要となる。評価試験の結果、他の検査員と同等の技能が確認された場合に、当該検査業務を正式に担当することになる。このような手順を踏むことにより、試験検査の信頼性が確保される。また、検査員が自身の技能を客観的に把握することができるとともに、当該検査業務の重要性も認識することができる。

なお、それぞれの試験所が実施している検査内容に応じて、適切な技能評価を実施することが望ましいと考えられた。また、いずれの方法においても、継続的に各検査員の技能を評価することが重要と考えられた。

F. 参考文献

- 1) 丹野憲二：細菌学的検査における内部精度管理の実施について．食品衛生研究,49,1 (1999)．
- 2) L.S.clesceri, A.E.Greenberg, A.D.Eaton：Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition. APHA (1998)．
- 3) 厚生省生活衛生局食品保健課長：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．衛食第117号,平成9年4月1日．
- 4) 大隈 昇：精度管理における統計的データ解析(1)．食品衛生研究,49,6 (1999)．
- 5) ISO/TS 11133-2：Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part2:Practical guidelines on performance testing of culture media.

表 1 枯草菌芽胞液の生菌数測定結果

測定*	1 ml 当たりの生菌数 (対数)				
	検査員 A	検査員 B	検査員 C	検査員 D	検査員 E
1	4.653	4.643	4.724	4.763	4.663
2	4.653	4.708	4.613	4.681	4.699
3	4.724	4.716	4.740	4.663	4.643
4	4.623	4.602	4.724	4.699	4.653
5	4.623	4.633	4.556	4.633	4.699
6	4.663	4.716	4.653	4.716	4.716
7	4.708	4.699	4.643	4.716	4.716
8	4.653	4.708	4.740	4.643	4.699
9	4.732	4.690	4.633	4.756	4.653
10	4.653	4.732	4.740	4.681	4.633
平均値	4.669	4.685	4.677	4.695	4.678
標準偏差	0.039	0.043	0.066	0.044	0.031

* 1 箇月毎に測定した。

表 2 Zスコアによる生菌数測定結果の評価

測定	Zスコア*				
	検査員 A	検査員 B	検査員 C	検査員 D	検査員 E
1	-0.364	-0.543	0.935	1.650	-0.190
2	-0.364	0.629	-1.103	0.148	0.472
3	0.935	0.783	1.229	-0.190	-0.543
4	-0.912	-1.299	0.935	-0.472	-0.364
5	-0.912	-0.725	-2.135	-0.725	0.472
6	-0.190	0.783	-0.364	0.783	0.783
7	0.629	0.472	-0.543	0.783	0.783
8	-0.364	0.629	1.229	-0.543	0.472
9	1.083	0.312	-0.725	1.512	-0.364
10	-0.364	1.083	1.229	0.148	-0.725
平均値	-0.082	0.213	0.068	0.404	0.080

* 目標値(事前設定)：平均値 4.673, 標準偏差 0.055

表3 市販菌体製品の生菌数測定結果

測定*	1個当たりの生菌数(対数)				
	検査員 F	検査員 G	検査員 H	検査員 I	検査員 J
1	4.146	4.179	4.100	4.107	4.049
2	4.097	4.114	4.137	4.061	4.161
3	4.173	4.100	4.182	4.097	4.196
4	4.161	4.104	4.124	4.086	4.104
5	4.097	4.100	4.104	4.146	4.097
6	4.079	4.170	4.137	4.179	4.137
7	4.158	4.149	4.086	4.134	4.140
8	4.146	4.053	4.155	4.064	4.182
9	4.173	4.111	4.143	4.134	4.093
10	4.072	4.093	4.137	4.090	4.100
11	4.146	4.104	4.149	4.100	4.033
12	4.134	4.124	4.173	4.064	4.090
13	4.117	4.127	4.161	4.149	4.107
14	4.130	4.107	4.140	4.104	4.111
15	4.199	4.086	4.124	4.124	4.185
16	4.121	4.057	4.182	4.158	4.097
17	4.117	4.090	4.127	4.124	4.076
18	4.173	4.057	4.137	4.158	4.127
19	4.086	4.167	4.130	4.140	4.104
20	4.079	4.170	4.190	4.114	4.041
平均値	4.130	4.113	4.141	4.117	4.112
標準偏差	0.037	0.038	0.028	0.034	0.045

* 1日毎に測定した。

表 4 Zスコアによる生菌数測定結果の評価

測定	Zスコア *				
	検査員 F	検査員 G	検査員 H	検査員 I	検査員 J
1	0.552	1.335	-0.539	-0.375	-1.758
2	-0.621	-0.215	0.328	-1.484	0.916
3	1.197	-0.539	1.404	-0.621	1.739
4	0.916	-0.457	0.021	-0.873	-0.457
5	-0.621	-0.539	-0.457	0.552	-0.621
6	-1.044	1.128	0.328	1.335	0.328
7	0.844	0.626	-0.873	0.252	0.403
8	0.552	-1.666	0.772	-1.395	1.404
9	1.197	-0.295	0.478	0.252	-0.704
10	-1.218	-0.704	0.328	-0.788	-0.539
11	0.552	-0.457	0.626	-0.539	-2.134
12	0.252	0.021	1.197	-1.395	-0.788
13	-0.136	0.099	0.916	0.626	-0.375
14	0.176	-0.375	0.403	-0.457	-0.295
15	1.804	-0.873	0.021	0.021	1.472
16	-0.057	-1.575	1.404	0.844	-0.621
17	-0.136	-0.788	0.099	0.021	-1.130
18	1.197	-1.575	0.328	0.844	0.099
19	-0.873	1.057	0.176	0.403	-0.457
20	-1.044	1.128	1.606	-0.215	-1.944
平均値	0.175	-0.233	0.428	-0.149	-0.273

* 目標値(事前設定)：平均値 4.123, 標準偏差 0.042

表5 調製菌液の生菌数測定結果

試験菌	測定	1 ml 当たりの生菌数		
		検査員 K	検査員 L	検査員 M
大腸菌	1	3.8×10^5	1.9×10^5	3.2×10^5
	2	2.6×10^5	2.6×10^5	1.5×10^5
	3	2.3×10^5	3.0×10^5	3.4×10^5
	4	3.1×10^5	2.1×10^5	3.2×10^5
	5	1.9×10^5	2.8×10^5	1.8×10^5
黄色ブドウ球菌	1	2.6×10^5	2.6×10^5	3.0×10^5
	2	1.8×10^5	1.6×10^5	2.4×10^5
	3	1.8×10^5	2.0×10^5	2.5×10^5
	4	3.0×10^5	2.6×10^5	2.0×10^5
	5	3.4×10^5	2.0×10^5	3.0×10^5

目標値： $1 \times 10^5 / \text{ml} \sim 4 \times 10^5 / \text{ml}$

表6 形態観察(顕微鏡観察)結果

試験菌	形態	観察結果		
		検査員 N	検査員 O	検査員 P
大腸菌 (<i>E.coli</i>)	グラム陰性 無芽胞桿菌	グラム陰性 無芽胞桿菌	グラム陰性 無芽胞桿菌	グラム陰性 無芽胞桿菌
黄色ブドウ球菌 (<i>S.aureus</i>)	グラム陽性 無芽胞球菌	グラム陽性 無芽胞球菌	グラム陽性 無芽胞球菌	グラム陽性 無芽胞球菌
乳酸桿菌 (<i>L.plantarum</i>)	グラム陽性 無芽胞桿菌	グラム陽性 無芽胞桿菌	グラム陽性 無芽胞桿菌	グラム陽性 無芽胞桿菌
セレウス菌 (<i>B.cereus</i>)	グラム陽性 有芽胞桿菌	グラム陽性 有芽胞桿菌	グラム陽性 有芽胞桿菌	グラム陽性 有芽胞桿菌
酵母 (<i>S.cerevisiae</i>)	酵母 (出芽)	酵母 (出芽)	酵母 (出芽)	酵母 (出芽)

表 7 生化学的性状試験結果

試験菌	試験項目	試験結果		
		検査員 Q	検査員 R	検査員 S
<i>E. coli</i>	グラム染色	—	—	—
	形態	桿菌	桿菌	桿菌
	芽胞	—	—	—
	乳糖分解(酸産生)	+	+	+
	乳糖分解(ガス産生)	+	+	+
	EC 培地でのガス産生 (44.5°C培養)	+	+	+
	IMViC 試験	++--	++--	++--
	大腸菌群の判定	該当	該当	該当
	大腸菌の判定	該当	該当	該当
	<i>C. freundii</i>	グラム染色	—	—
形態		桿菌	桿菌	桿菌
芽胞		—	—	—
乳糖分解(酸産生)		+	+	+
乳糖分解(ガス産生)		+	+	+
EC 培地でのガス産生 (44.5°C培養)		—	—	—
IMViC 試験		-+-+	-+-+	-+-+
大腸菌群の判定		該当	該当	該当
大腸菌の判定		該当せず	該当せず	該当せず
<i>K. pneumoniae</i>		グラム染色	—	—
	形態	桿菌	桿菌	桿菌
	芽胞	—	—	—
	乳糖分解(酸産生)	+	+	+
	乳糖分解(ガス産生)	+	+	+
	EC 培地でのガス産生 (44.5°C培養)	+	+	+
	IMViC 試験	--++	--++	--++
	大腸菌群の判定	該当	該当	該当
	大腸菌の判定	該当せず	該当せず	該当せず

表 8 O群血清型の判定結果

試験菌	O群血清型		
	検査員 T	検査員 U	検査員 V
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O 9 群	O 9 群	O 9 群
<i>Salmonella</i> Havana	O 13 群	O 13 群	O 13 群
<i>Salmonella</i> Thompson	O 7 群	O 7 群	O 7 群
<i>Salmonella</i> Typhimurium	O 4 群	O 4 群	O 4 群

表 9 混合菌液の画線分離結果

混合菌液 (菌数比)	分離 平板	DHL 寒天平板上に形成された集落(菌種数) *1			
		検査員 W	検査員 X	検査員 Y	検査員 Z
<i>E.coli</i> (1)	1	3 菌種 *2	3 菌種	3 菌種	3 菌種
<i>S.Enteritidis</i> (1)	2	3 菌種	3 菌種	3 菌種	3 菌種
<i>C.freundii</i> (1)	3	3 菌種	3 菌種	3 菌種	3 菌種
<i>E.coli</i> (10)	1	2 菌種 *3	2 菌種	2 菌種	2 菌種
<i>S.Enteritidis</i> (1)	2	2 菌種	2 菌種	2 菌種	2 菌種
	3	2 菌種	2 菌種	2 菌種	2 菌種
<i>E.coli</i> (100)	1	2 菌種 *3	2 菌種	2 菌種	1 菌種
<i>S.Enteritidis</i> (1)	2	2 菌種	1 菌種	1 菌種	1 菌種
	3	1 菌種	1 菌種	1 菌種	1 菌種

*1: 「1 菌種」とは *E.coli* の集落のみ形成されたことを意味する。

*2: 写真 1 参照 *3: 写真 2 参照

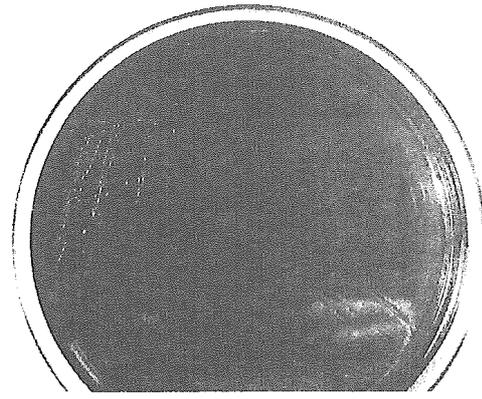


① *E.coli* の独立集落, ② *S.Enteritidis* の独立集落, ③ *C.freundii* の独立集落

写真 1 3 菌種混合菌液を画線分離した DHL 寒天平板上の出現集落



菌数比 *E.coli* 10 : *S.Enteritidis* 1



菌数比 *E.coli* 100 : *S.Enteritidis* 1

写真 2 2 菌種混合菌液を画線分離した DHL 寒天平板上の集落形成状況

表 10 微生物株接種試料の生菌数測定結果

測定*	1 g 当たりの生菌数(対数)		
	検査員 a	検査員 b	検査員 c
1	4.053	4.033	3.952
2	4.045	4.085	3.942
3	4.033	4.011	3.952
4	3.908	4.039	4.041
5	3.863	4.011	3.940
平均値	3.988	4.037	3.967
標準偏差	0.088	0.030	0.043
全測定値(対数)の平均値：3.994		全測定値(対数)の標準偏差：0.063	

* 同一日に繰り返し測定した。

表 11 Zスコアによる生菌数測定結果の評価

測定	Zスコア*		
	検査員 a	検査員 b	検査員 c
1	0.936	0.625	-0.666
2	0.813	1.434	-0.822
3	0.625	0.266	-0.666
4	-1.352	0.720	0.751
5	-2.067	0.266	-0.861
平均値	-0.099	0.675	-0.425

* 目標値：平均値 3.994, 標準偏差 0.063