

であった。今回の内部精度管理から求めた日間のRSDは、試験者Aでは5.8%、試験者Bでは7.4%であった。

平成16年度

試料として茶粉末を用いており、TEQは1pg/g以下で、平成14年及び15年に使用した魚試料と比べて1/5以下の濃度である。このような試料を用いても、TEQで22%程度の機関間RSDが得られた。参加機関中には、全ての異性体について正あるいは負のスコアが偏って現れる機関が多く見られた。

D. 考察

平成14年度

特に濃度の低い異性体を除き、参加機関間の報告値から計算したTEQの変動は7%程度のRSDとなった。今回試料に選んだボラは、脂肪含量が高く、硫酸処理等の前処理工程が複雑であり、実際の食品からのダイオキシン類摂取の主たる原因となっている魚に近いと考えられる。このような試料を用いても、TEQで7%程度の機関間RSDが得られたため、食品中のダイオキシン類分析の品質はかなり高いと考えられた。

TEQでは大きくはずれたzスコアは見られないが、個々の異性体ごとに計算したzスコアでは、異性体によっては、非常に大きな値となった機関があった。また、Co-planar PCBsでは、zスコアが正あるいは負に偏っている機関がみられ、個々の機関で用いている標準品あるいは内標準の濃度等にバイアスの要因があることが示唆された。

平成15年度

2名の試験者の結果に差があるかを検討した。まず、各異性体の濃度の分散についてF検定を行った結果、1,2,3,7,8-PeCDFと2,3,4,6,7,8-HxCDFにおいて、試験者Bの分散が有意に大きい結果となった。他の異性体については有意差はなかった。各異性体濃度

の平均値についてt検定を行った結果、1,2,3,4,7,8-HxCDFと2,3,4,6,7,8-HxCDFについては、試験者Bが有意に高い値となり、他の異性体については有意差は見られなかった。

他の異性体については、平均値、ばらつき共に有意の差は観測されなかったが、試験者BのRSDが全体的に試験者Aよりも高い傾向がみられたので、対になった符号検定で検定した結果、PCDD及びPCDFでは、危険率5%で両試験者に差は認められなかったが、Co-PCBでは試験者BのRSDが有意に大きい結果となった。

zスコアの変動をみると、PCDD、PCDF、non-ortho Co-PCB類では、各異性体がそれぞれ異なる動きを示し、試験者間でも同じ傾向があらわれることはなかった。しかし、mono-ortho Co-PCBのzスコアはいずれの試験者においても全ての異性体がほぼ同じ値となり、系統的な変動が現れた。また、試験者二人の間でも、3回目と4回目を除いた回で、類似したパターンが現れていた。

このように同じ変動パターンが現れる原因としては、検量線作成時と測定時でGC/MS測定のRRFが変動しているか、添加する内部標準の濃度が変動しているということが考えられる。このような変動の原因を特定し除去することにより、TEQの変動をより小さくできると考えられる。

平成16年度

濃度の低い異性体では、参加機関間の報告値の変動は30%程度であった。比較的濃度の高い異性体のRSDは10-20%程度であった。報告値から計算したTEQの変動は22%程度のRSDとなった。茶試料のTEQは1pg/g以下であり、魚試料と比べて1/5以下の濃度である。このような試料を用いても、TEQで22%程度の機関間RSDが得られたことは、食品中のダイオキシン類分析の品質はかなり高い

ことを示している。

TEQ で大きな z-スコアを与えた機関はなかったが、個々の異性体では、3以上の z-スコアとなった機関があった。大部分の z-スコアが正あるいは負に偏っている機関がみられた。これは例年認められる傾向であり、個々の機関で用いている標準品あるいは内標準の濃度等にバイアスの要因があることが示唆された。これらの原因を確定し、分析値のバイアスを小さくすることが、今後の信頼性保証の上で重要である。

E. 結論

Table 1 には、1998年から2003年に実施した、食品中のダイオキシン類外部精度管理の結果を示す。初期には認証標準物質等を試料として用いたが、2001年以降はダイオキシン類が含まれる可能性のある食品を用いて試料を作成している。これらの試料の均一性も外部精度管理の目的には十分であり、さらに自然汚染試料であるところから、分析の能力評価にはふさわしいと考えられる。また、徐々に低濃度の試料を取り入れており、いわゆる困難な分析での技能が評価されている。

Figure 1 は、各試料の TEQ と室間再現性の関係を表示している。見やすくするために、横軸は対数表示とした。全体として、TEQ の増加と共に RSD は低下している。植物性試料であるハウレンソウ及び茶はいずれも TEQ が 1 以下であり、室間再現性は 20%以上となった。TEQ が 1 以上の試料では、RSD は 20% 以下となった。

この結果、我が国の分析機関は、TEQ 1pg/g 程度の試料については、信頼できる分析能力を有していると考えられる。

技能試験の結果から、TEQ が 1pg/g 以下の試料においても、試験室間の変動は 20%RSD 程度であることが示され、我が国における食品中のダイオキシン類分析値の信頼性が保

証された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

The Proficiency Testing of Determination of Dioxins in Food
R. Matsuda, T. Tsutsumi, M. Toyoda, T. Maitani; Organohalogen Compounds Volume 66 (2004), 576-581.

2. 学会発表

The Proficiency Testing of Determination of Dioxins in Food
R. Matsuda, T. Tsutsumi, M. Toyoda, T. Maitani, Dioxin 2004, Berlin(2004)

H. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1 1998-2003年に実施された食品中ダイオキシン類外部精度管理結果

年	参加者	試料	TEQ (pg/g)	RSD%
1998	6	BCR CRM607 粉乳	3.3	6.6
1999	15	BCR CRM607 粉乳	3.6	11
		CARP-1 魚ホモジネート	79	8.0
		標準品溶液	23	8.7
2000	10	BCR RM534 粉乳	4.6	18
		標準品溶液	16	9.0
2001	8	スズキ 凍結乾燥粉末	6.1	11
		ホウレンソウ 凍結乾燥粉末	0.32	31
2002	10	ボラ 凍結乾燥粉末	7.3	7.1
2003	10	茶粉末	0.95	22

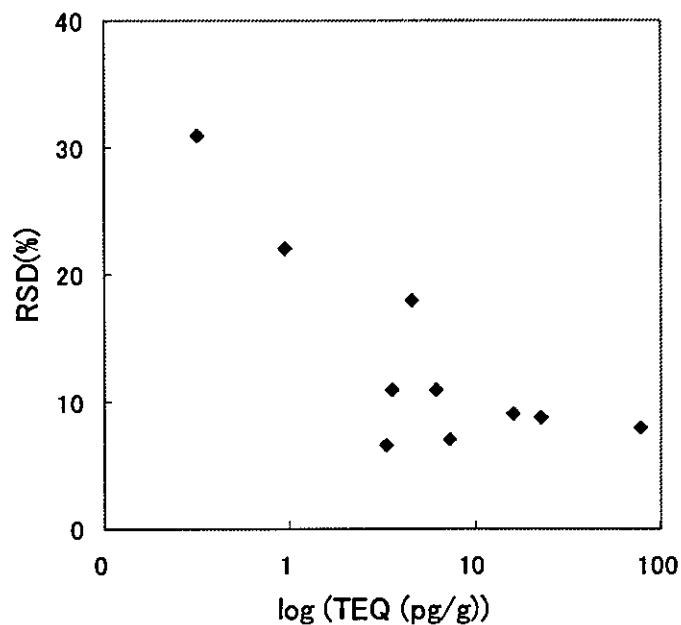


Figure 1 外部精度管理試料のTEQと室間精度の関係

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

資料4

「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」

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

（平成 14～16 年度）

- 4-1 ダイオキシン ELISA キットの構築とバリデーション試験
- 4-2 大腸菌検査における標準菌株の選択、検査法並びに実食材を用いた調査試料の作製
- 4-3 理化学的検査調査試料の作製に関する研究
- 4-4(1) 遺伝子組換え DNA 食品検査外部精度管理調査と検査法の検討
- 4-4(2) 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関わる研究
- 4-5 精度管理調査方法の効率化に関する検討

分担研究者 松木容彦

資料4-1

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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

分担総合研究報告書（平成14～16年度）

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的向上に関する研究（その1）
—ダイオキシン ELISA キットの構築とバリデーション試験—

主任研究者	柳澤 健一郎	(財)食品薬品安全センター 特別参事
分担研究者	松木 容彦	(財)食品薬品安全センター 特別参事
協力研究者	奥山 光伸	(株)帝国臓器製薬メディカル 開発研究部 研究員
	小林 典弘	神戸薬科大学 教授
	池川 茂男	近畿大学薬学部 教授
	神戸川 明	神戸川研究所 所長
	伊藤 順子	相模女子短期大学 教授
	和光純薬工業(株)、コスモ石油(株)及び8検査機関の協力を得た。	

研究要旨

ダイオキシン類の汚染実態やヒトへの曝露状況を把握するために、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。我々の開発したモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた ELISA キットについてダイオキシン簡易測定法としての有用性を評価するために、模擬生体試料および魚肉試料についてバリデーション試験を実施した。その結果、本 ELISA は生体試料および食品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有用であることが示された。

ポリ臭素化ダイオキシン類は化学合成品、特に難燃剤の不純物として存在し、焼却時に多量に発生するとされている。また、PBDD/Fs およびごみ焼却や環境中で生ずる混合ハロゲン化ダイオキシン類(PXDD/Fs)の毒性はPCDD/Fsと同等とされているが、それらの環境や食品の汚染あるいはヒトの体内曝露レベルに関する研究は遅れている。我々はPBDD/Fsのヒト体内曝露レベルのスクリーニングあるいはモニタリングに適用可能な簡易アッセイ法を提供することを目的とし、マウスモノクローナル抗体を用いるPBDD/FsのELISAを開発した。本法は塩素化および臭素化ダイオキシンに対して同程度に親和性が高く、臭素化、塩素化、臭素・塩素混合ダイオキシン類の有用な簡易測定法として期待される。

A. 研究目的

ダイオキシンによる環境や食物の汚染とそのヒトへの健康影響に対する懸念は大きく、環境、食品およびヒトの汚染実態を迅速に把

握することが求められている。公定法である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は、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簡易測定法の開発が期待されている。

そこで、平成 11～13 年度の厚生科学研究費補助金研究において開発したマウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体を用いたダイオキシン ELISA キットの簡易測定法としての有用性を評価するため、模擬生体試料および魚肉試料についてバリデーション試験を実施した。

ポリ臭素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン (PBDDs) およびポリ臭素化ジベンゾフラン (PBDFs) は、塩素化ダイオキシン類 (PCDD/Fs) と同様程度の毒性を有すると考えられており、臭素化難燃剤の使用増加に伴って環境汚染やヒトへの健康影響が懸念されている。PBDD/Fs の分析法は複雑であり、環境中での汚染状況やヒトへの曝露および健康影響などに関してほとんど明らかになっていない。今後、PBDD/Fs の汚染実態調査など大規模なモニタリング試験が実施される場合には、公定法として期待されるガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーを補完する簡便法が必要となることが予測されるため、マウスモノクローナル抗体を用いた PBDD/Fs の ELISA を開発した。

B. 研究方法

1. 塩素化ダイオキシン ELISA キットのバリデーション：(試料) ダイオキシン類混合標準液、標準品添加精製バター、標準品添加牛乳および国立医薬品食品衛生研究所で作製した凍結乾燥魚肉を用いた。
(ELISA 試料の調製) 試料を水酸化カリウムで加水分解後、*n*-ヘキサンで抽出した。ヘキ

サン層を濃硫酸で洗浄し、魚肉の場合はさらに化学修飾シリカゲルカラムで精製後、フタロシアニン固定化シリカゲルカラムで精製した。

(ELISA) ダイオキシン ELISA キットの現品説明書に従って操作し、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濃度を算出した。

1. 臭素化ダイオキシン ELISA の確立

(抗 PBDD/Fs モノクローナル抗体の作製) ハプテンの BSA 結合体を免疫して得たマウス脾臓細胞とミエローマ細胞を常法により融合させた。抗 PBDD/Fs 抗体を産生しているハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。

(ELISA の構築) PBDD/Fs との親和性および臭素化・塩素化・臭素塩素混合ダイオキシンとの交差反応性を調べて適切なモノクローナル抗体を選別し、抗体量、標識抗原量および試料溶解液濃度を最適化して臭素化ダイオキシンの ELISA を構築した。

C. D. 研究結果および考察

1. 塩素化ダイオキシン ELISA キットのバリデーション

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた ELISA キットによる模擬生体試料の測定結果は、両キットとも機関間変動はやや大きかったものの、測定内変動は小さかった。測定値は理論値と大きく乖離することもなく、濃度順位が逆転することもなかった。

魚肉試料の測定内変動、測定間変動および

機関間変動はそれぞれ 5～29%、15～51%および 72%であり、測定値は理論値の 10～60%であった。

2. 臭素化ダイオキシン ELISA

四または五塩素化、臭素化、塩素・臭素混合型 PBDD/Fs との反応性が高いモノクローナル抗体を選択して ELISA を最適化し、定量限界 2,3,7,8-TeBDD 1pg/assay の ELISA を確立した。

E. 結論

塩素化ダイオキシンの ELISA キットについて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、両キットとも操作が比較的簡便で多検体が同時に測定できるうえ、同時再現性が良好であったことから、安価な簡易測定法として生体試料および食品中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して有用であることが示された。

臭素化ダイオキシンの ELISA を構築するに際し、毒性が強いと考えられている四または五塩素化、臭素化、塩素・臭素混合型ダイオキシン類と反応性が高い抗体を選択した。本 ELISA は塩素系および臭素系を合わせたダイオキシン毒性の簡便なスクリーニング法およびモニタリング法として有用性が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mitsunobu Okuyama, Norihiro Kobayashi, Wakako Takeda, Takako Anjo, Yasuhiko Matsuki, Junichi Goto, Akira Kambegawa, Sinjiro Hori
“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Monitoring Toxic Dioxin Congeners in Milk Based on a Newly Generated Monoclonal Anti-Dioxin Antibody”
Analytical Chemistry 76(7), 1948-1956, 2004

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

資料 4-2

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
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

分担総合研究報告書（平成 14～16 年度）

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）
—大腸菌検査における標準菌株の選択、検査法並びに実食材を用いた調査試料の作製—

主任研究者	柳澤健一郎	(財)食品薬品安全センター	特別参事
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 特別参事
分担研究者	大島 赴夫*	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 部長
協力研究者	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 室長補佐
	大隅 昇	文部科学省統計数理研究所	名誉教授

(*平成 16 年度の分担研究者)

研究要旨

大腸菌検査用調査試料作製にあたり試験菌株の選択と大腸菌検査法（公定法）による試験菌株の検出確認について外部精度管理用調査試料を用いて検討した。また食品・添加物等規格基準に示されている食品のカテゴリーに基づき選択した実食材を基材とする調査試料の作製を試みた。大腸菌検査（公定法）に従い、EC 培地 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間の選択増菌培養しガス産生を指標として判定（推定試験）した場合、ガス産生が確認できない菌株の存在を認めた。大腸菌 10 株を用いて推定試験を行い、菌株間のガス産生能を比較検討した結果、大腸菌の菌株によって 1) EC 培地で十分な増殖を示し、指定時間内に十分なガス産生を示す菌株（Type I）、2) EC 培地で増殖は確認できるが指定時間内にガス産生を認めない菌株（Type II）、3) EC 培地 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 培養で増殖せず指定時間内にガス産生を示さない菌株（Type III）に大別された。したがって試験菌株の選択は目的によって使い分ける必要があり、外部精度管理調査試料の作製に当たっては Type I に属する菌株を試験菌として選択することが適切であるものと思われた。

これらの結果を踏まえて実食材（ハンバーグ）を用いた大腸菌検査のための外部精度管理調査試料作製を試みた。併せて、大腸菌群検査（実食材：ハンバーグ）、サルモネラ属菌検査（実食材：殺菌液卵）についても実食材を基材とした調査試料の作製を試み、試験菌の接種方法、接種菌数の設定、試料中の試験菌の安定性ならびに均一性について検討した。試作試料を用いて特定微生物の検査手順に従い検査を実施し、判定基準への適合性を確認した。ハンバーグを用いた大腸菌群および大腸菌検査用調査試料では、基材表面に比較的均一な分布で汚染状態を形成することが可能となり、 4°C 保存、 -20°C 保存いずれでも約 5 週間の保存期間中安定した生菌数の推移を示した。また、公定法による試験菌の検出確認では、いずれも判定基準を満たしていたが、大腸菌検査（公定法の推定試験）における 24 ± 2 時間培養後のガス産生能は 48 ± 3 時間培養後での判定に比べてガス産生が微弱なため、推定試験の判

定基準に従ったガス産生能の確認に困難をきたす傾向にあった。殺菌液卵を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料では、安定化剤の添加によって4℃保存下、約4週間基材の安定を確認したが、試験菌は低温保存でも増加傾向にあり、一定菌数で保存することは困難であった。公定法による試験菌の検出確認では、各検査手順の確認段階においても判定基準を満たし、添加菌の検出が可能であった。これらの試験結果よりハンバーグ・殺菌液卵いずれの基材においても、精度管理調査用試料として作製可能と判断されたが、特に殺菌液卵を基材として採用する場合はその保存や輸送を考慮して試験菌の接種量とその安定化ならびに増殖抑制などについて、さらなる改良が必要であることが示唆された。

A. 研究の目的

食品衛生外部精度管理調査（特定微生物検査）試料の作製にあたっては日常の検査手順に従って実施可能な均一で安定な調査試料が求められ、さらに検討事項として「実食材を基材とする調査試料の開発」と「適切な試験菌株の選択」が上げられる。平成13年度よりマッシュポテトを基材とした食品衛生外部精度管理調査試料（大腸菌検査）の配布を開始し、調査試料には食品・添加物等規格基準に示されている食品のカテゴリーを示し各検査機関の操作手順書（SOP）にしたがって検査を行い、その精度管理を実施してきた。大腸菌検査では、EC培地 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養を推定試験とする公定法の採用が最も多く認められた。報告された結果では、調査試料中に検出可能な大腸菌数が確保されているにも関わらずEC培地を用いた推定試験によって添加された大腸菌が検出できないという検査機関が多数認められ、大腸菌検査に係わる外部精度管理調査の実施に当たり改善しなければならない新たな問題が発生した。このことから、大腸菌検査における試験菌株の選択とEC培地を用いた推定試験による調査試料からの大腸菌検出について、試験菌株の選択、ならびに検査方法の検証が必要となった。一方、実食材を採用し調査試料として提供して欲しいとの要望も多く、試験菌株の選択、検査法の検証に加えて実食材を基材とする調査試料の作製検討が

急務となった。

これまでのマッシュポテトを主材料とした基材による調査試料は、輸送による温度変化の影響が少なく、基材中での試験菌の増減も少ない比較的均一で安定な調査試料であり、作製も容易で扱いやすい調査試料であった。一般に流通している実食材を基材として調査試料を作製する場合、基材の変質抑制、長期間安定で均一な試料作製に心がけなければならないが、試験菌を人為的に添加した食材中の汚染分布は自然汚染によるものとは微妙に異なり試験菌の増減を長期間コントロールすることが困難な場合が多い。加えて選択された検査法で確実に菌を検出することができるような調査試料を作製しなければならない。

これらの観点から平成14～16年度の3年間に亘り、食品衛生外部精度管理調査実施のための大腸菌検査用調査試料作製に関する試験菌株の選択、検査法の検証、ならびに実食材（ハンバーグ）を基材とした調査試料の作製について検討した。加えて、大腸菌群検査（ハンバーグ基材を採用）およびサルモネラ属菌検査（殺菌液卵基材採用）のための実食材を基材とする調査試料の作製についても検討を試みた。

B. 研究方法

1. 試験菌株

試験菌株は、秦野研究所保存の以下の14

菌種を用いた。

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
Klebsiella oxytoca ATC33496
Acinetobacter calcoaceticus IFO12552
Salmonella Enteritidis HIC12042
Proteus mirabilis ATCC25933

2. 培養条件の違いによる大腸菌のガス産生能の比較

大腸菌の培養は、大腸菌検査の公定法の推定試験で示されている EC 培地、ならびに大腸菌の自主検査等で汎用される BGLB 培地の 2 種を用いた。各培地 9mL に試験菌液 1 mL 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、推定試験の判定基準であるガス産生能について比較検討した。なお、各試験菌は、ソイビン・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 $10^1 \sim 10^8$ cfu/mL となるように調製したものを接種菌液とした。

3. 大腸菌の接種濃度とガス産生におけるマッシュポテトの影響

E. coli HIC2211 及び *E. coli* ATCC8739 株を用い、大腸菌の接種菌数と発育増殖ならびにガス産生能について検討した。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 $10^1 \sim 10^3$ 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 0.5 mL 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 時間後に生菌数測定を行い、各菌株の増殖曲線を作成し、併せてガス産生能を観察した。

4. 大腸菌の発育およびガス産生能に対する培養温度の影響

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、これらの菌の発育増殖及びガス産生能に対する培養温度の影響を検討した。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 $10^1 \sim 10^8$ 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能を判定した後、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能を観察した。

5. 異なった培養条件下での培養による大腸菌数の比較

EC 培地 ($44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 培養)、及び BGLB 培地 ($32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養) で 24 時間、並びに 48 時間培養後の各試験菌株の増殖能を生菌数測定により比較した。なお、試験菌の接種量は培地 (9mL) あたり $10^1 \sim 10^8$ 個とした。

6. 異なった培養条件下での大腸菌数の経時変化とガス産生能の比較

E. coli HIC2211 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 $10^1 \sim 10^8$ 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種を用いて実施した。培養条件は、各培地9mLに菌液1mL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、菌液接種直後、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、生菌数測定とガス産生能を観察した。

7. 大腸菌・大腸菌群検査用調査試料作製のための実食材基材の選択（食品・食品添加物等規格基準のカテゴリーを参考とした選択）

実食材を用いた大腸菌・大腸菌群検査用調査試料作製のための基材は、市販の冷凍ハンバーグ（T社、I社、M社）を用いて実施した。

試験菌（*Escherichia coli* IFO3240、*Klebsiella oxytoca* ATCC33496、*Acinetobacter calcoaceticus* IFO12552）をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト（SCD）寒天培地で $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18～24時間培養した後、安定化剤を含む滅菌生理食塩液に懸濁して約 10^8 colony forming units (cfu)/mLの試験菌液を調製し、これにあらかじめ前処理して加熱殺菌した冷凍ハンバーグ（T社、I社、M社）を調製菌液に浸漬してハンバーグ表面に試験菌を均一に付着させた。これらを 4°C 下に35日間保存し、接種当日、7、14、21、28、35日目に生菌数測定を行い付着菌数とその経日的変化を確認した。1回の測定に3個のハンバーグを用い、菌数測定は $n=2$ で行いその平均値を求めて生菌数（cfu/g）とした。

8. ハンバーグ基材中の接種菌の均一性と安定性の確認

先に示したと同様の方法で菌液調製を行いハンバーグ（M社）に試験菌を均一に付着させた後、これらを 4°C 下に保存して接種当日、7、14、28日目にハンバーグ表面の生菌数の分布を確認した。ハンバーグを8分割し、

各分面ごとに生菌数測定を行い、付着菌数を測定して、付着菌数の均一性と安定性を確認した。また、14日間、28日間保存試料については、EC培地を用い $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養して試験菌の発育ならびにガス産生の有無について確認を行った後、培養液の1白金耳をEMB寒天培地に移植し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養して発育集落の有無ならびにその性状を観察した。

9. 保存条件の異なるハンバーグ基材を用いた大腸菌の培養における生菌数の経時変化とガス産生能の比較

先に示した手順に従ってハンバーグ（M社）基材表面に大腸菌を付着させた後、 4°C ならびに -20°C に35日間保存し、生菌数を経日的に測定して接種菌数の推移を確認した。また、保存28日目の試料を用いて、EC培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間～ 48 ± 3 時間培養またはBGLB培地で $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間～ 48 ± 3 時間培養を行い、試験菌の発育ならびにガス産生量についてその有無を観察した。

10. 4°C 保存ハンバーグ基材を用いた大腸菌・大腸菌群の培養における生菌数の経時変化とガス産生能の比較

ハンバーグ（M社）に*E. coli*、*K. oxytoca*および*A. caacoaceticus*を単独で付着させ経日的に生菌数測定を行い生菌数の推移を確認した。なお、*E. coli*については、異なった濃度の調製菌液を用いてハンバーグに付着させた後、付着菌数と生菌数の推移についても併せて測定した。また、*E. coli*および*K. oxytoca*については、35日間まで保存した試料について経日的に試験培地（EC培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養、BGLB液体培地で $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 48 ± 3 時間培養）中での発育とガス産生についてその有無を観察した。

11. 安定化剤の選択とサルモネラ属菌の 4°C 保存液卵中での生菌数の推移

実食材を用いたサルモネラ属菌検査用試料作製のための基材は、市販の殺菌液卵（鶏卵）を用いた。

殺菌液卵と滅菌済み安定化剤（SPG10、SPG20）とを1：1の容量比で混合して試験液卵を作製した。なお、安定化剤の代わりに滅菌生理食塩液を用いて作製したものを対照試験液卵とした。

試験菌（*Salmonella Enteritidis*HIC12042、*Proteus mirabilis* ATCC25933）をSCD培地で $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18～24時間培養した後、試験菌液約 10^8cfu/mL を作製し、試験菌液1mLを試験液卵100mL（最終菌液濃度約 10^7cfu/mL ）に加えて 4°C 下に28日間保存して接種後7日目、14日目、28日目に生菌数測定を行い、試験菌数の経日的推移を計測した。なお、同様に調製したものを 22.5°C に3日間静置し、基材変質の有無について観察した。また、異なる試験菌液を調製して殺菌液卵に接種後、先に示したと同様に 4°C 下に28日間静置して経日的に生菌数測定を行い、保存期間中の菌数の推移を観察した。

12. 選択培地中での試験菌の発育確認

試験菌（*S. Enteritidis*、*P. mirabilis*）を用いて調製した試料について、検査法に従い前増菌培地（緩衝ペプトン水、EEM液体培地）、増菌培地（セレナイトシスチン培地、テトラチオネート培地、ラパポートバシリアディス培地）、確認培地（DHL寒天培地、MLCB寒天培地、ブルアントグリーン寒天培地、ESサルモネラ寒天培地）を用いて培養したときの試験菌の発育の有無を観察し、サルモネラ属菌の判定基準に従った検出確認を実施した。

倫理面への配慮

研究に使用する微生物などの取り扱いには特定の区域内で行う。実験に使用した微生物や微生物汚染試料は、実験終了後すみやかに廃棄処理方法に従って滅菌処理する。さらに、

実務担当者は自らの健康管理に十分配慮し、健康診断などの記録の保管を行う。

C. 結果

1. 大腸菌の試験菌株間における培地中での増殖能とガス産生能の比較

秦野研究所保存の大腸菌10株について異なる培養条件（2条件：EC培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 培養、BGLB培地で $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養）におけるガス産生能を比較した結果、試験菌株によってガス産生能が大きく異なる結果を得た。BGLB培地を用いて観察した結果では、 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養後に10株中8株でガス産生が認められ、 48 ± 3 時間後では10株中9株がガス産生を示した。一方、EC培地（公定法）では、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養後に10株中5株でガス産生を認め、他の5株ではガス産生が認められず、 48 ± 3 時間培養後でも10株中6株でガス産生を認める結果であった。また、培地中での発育は、BGLB培地による $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養で全ての試験菌株が約 $10^{7\sim 8}\text{cfu/mL}$ 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 ± 2 時間培養では、約 $10^{5\sim 7}\text{cfu/mL}$ のレベルまでの増殖が認められたが、2菌株についてはほとんど発育を認めなかった（表1、2）。

2. 大腸菌の発育およびガス産生に及ぼすマッシュポテトの影響

調査試料の作製に当たって、マッシュポテトを基材としているため、大腸菌の発育やガス産生にマッシュポテトが影響を及ぼすか否かを検討した。その結果、BGLB培地、ならびにEC培地いずれの培地中でも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。また、異なる接種菌数でのガス産生については、接種菌数、ならびに培養時間の増

加に従ってガス産生の判定が容易である傾向を示したが、マッシュポテトの有無については有意な差を認めなかった(表3、4)。EC培地(公定法、推定試験)での接種菌数とガス産生能の関係については、低濃度接種量では24時間培養後の判定でガス産生を認めず、高濃度の接種菌数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数ではガス産生を認める事が出来なかった(表5)。

3.異なるガス産生能を示す大腸菌の発育およびガス産生に対する培養温度の影響

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 ± 2 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。即ち、EC培地(公定法、推定試験) $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養で明らかにガス産生を示すグループ(Type I)、EC培地でガス産生を示さないがBGLB培地 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養ではガス産生を示すグループ(Type II)、いずれの培地でもガス産生を認めないグループ(Type III)と大きく3つのカテゴリーに分類された。Type IIIは、全く増殖を示さない菌株も含まれる(表6)。

4.ハンバーグを基材とした大腸菌群・大腸菌検査のための調査試料作製

ハンバーグを基材として用いる場合、肉に含まれている脂肪の量によって前処理が異なり、残存する脂肪の量が少ないほうが試験菌の接種に適していた。試験菌の接種方法で

は浸漬法が安定した結果を示しており、ハンバーグ表面に均一な付着菌数を持つ試料の作製が可能であった。作製した試料は、 4°C 保存でも -20°C 保存でも接種後28日間まで安定した菌数で推移し、接種菌数の大きな増減は認められなかった。調製試料を 4°C 下で28日間保存し、EC培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \sim 48$ 時間培養、またはBGLB培地で $35.0 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $24 \sim 48$ 時間培養した後、判定基準にしたがってガス産生の有無を観察した結果、いずれの培地でもガス産生を認めた。しかしながら、EC培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養では、EC培地中の接種菌数によってBGLB培地に比べ微弱なガス産生を認める結果であった。 4°C 、 -20°C いずれの保存条件でも、EC培地中でのガス産生には影響が認められなかった。大腸菌群および大腸菌検査のための調査試料として調製したハンバーグ基材による試料は、低温保存で少なくとも約5週間安定であり、付着菌数のコントロールも調製菌液の菌数を調整することで可能であった。これらの結果は、表7-15に示した。

5.殺菌液卵(鶏卵)を基材としたサルモネラ属菌検査のための調査試料作製

殺菌液卵(鶏卵)を用いたサルモネラ属菌検査のための調査試料作製には、安定化剤の共存が必要であった。試験菌を接種後、常温に保存すると接種菌の活発な増殖を認め、24時間後には異臭を認め基材の変質が観察された。 4°C 、28日間の保存条件では、低温保存であるにもかかわらず接種菌の増殖を認めたが、常温保存時に観察された基材の変質ならびに極端な異臭を認めることはなく(微弱な異臭を認める場合がある)、初発菌数をコントロールすることによって長期間保存後の試料中の菌数を調節することは可能であった。また、*S. Enteritidis*の各種培地中での増殖を確認した結果、検査法(公定法)

の判定基準にしたがって接種菌の有無を判定することが可能であった。調製試料が液状であるため輸送時の液漏れによる汚染を防ぐため、振盪機を用いて液漏れ確認を行った。試料容器を密封した後、繰り返し振盪することにより容器からの液漏れ確認を行ったが、液漏れは認められなかった。これらの結果は、表 16～20 に示した。

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の公定法（推定試験）では 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検査手順が示されている。その他自主検査等では、BGLB 培地を用い $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養してガス産生を確認する方法などがあるが、食材のカテゴリーを提示して調査試料を提供している外部精度管理調査においては、食材のカテゴリーに従って公定法が選択される場合が多い。

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能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となるガス産生能を指標に大腸菌の有無を推定するのは困難な場合があることが考えられる。すなわち、汚染している大腸菌の食品中での存在様式、食品の保存条件、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。ここに示したように、培養条件によって、試験対象となる大腸菌は 3 グループに大別され、採用される検査手順によっては大腸菌が存在していても陰性と報告する結果がありうる。ガス産生能については、

まず培地中で一定菌数（約 $10^{7\sim 8}$ cfu/mL 以上）にまで増殖することが必要と考えられ、対数増殖期には主に乳糖分解により得られたブドウ糖をエネルギー利用として一定菌数にまで増殖し、その後解糖系（ピルビン酸の生成）の進行に伴う糖の発酵からガスの産生が生じていると推測する（大腸菌はブドウ糖発酵菌であることによる）。従って添加菌の life cycle における対数増殖期から静止期・衰退期へと移行する過程で菌の十分な増殖に伴うガス発生の結果としてダーラム管中に十分量のガスが蓄積されるものと考えられる。したがって培地中での菌数が一定数以上に達しないとガス産生による判定が困難となる。すなわち、汚染している大腸菌の食品中での存在様式、食品の保存条件、個々の大腸菌が持つ性状など様々な要因に依存して、汚染大腸菌の EC 培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養による推定試験では十分な発育増殖を認めないかぎりガス産生が陰性となりうる可能性が考えられる。日常の食品検査では様々な性状を持つ大腸菌が、検査対象となっているのも事実であり、試験菌株の選択については外部精度管理調査の目的によって使い分けることが必要であると考え、今回得られた結果を踏まえ試験菌株としての採用は確実に検出される type の菌種をまず優先して選択することが必要であるものと考えられる。また、今回の EC 培地を用いた推定試験結果が、普遍的に見られる現象であるかは更なる検討が必要であり、大腸菌検査における検査方法についても再度検証が必要ではないかと考える。

実食材を基材とした調査試料作製については、まず大腸菌群検査・大腸菌検査ならびにサルモネラ属菌検査を対象とし、ハンバーグおよび殺菌液卵を基材として作製の検討を実施した。食品の場合、食品表面に菌が汚染している場合と食品内外に菌が汚染して

いる場合があげられる。ハンバーグは挽肉を材料として作られている場合が多く、この場合は食品内外について微生物汚染が想定される。今回の調製法では、試験菌が基材内部にも浸潤するが、基材表面への微生物付着を主とする調製法となっている。ハンバーグ中には脂肪が多く含まれているため、今回の調製法では試験菌の食品中への浸潤や表面付着に対して素材の持つ脂肪（油脂成分）が菌の定着に影響を及ぼす可能性があるため適度な脱脂が必要であり、調製工程で基材を汚染した微生物に対する滅菌処理が必要となる。このような前処理を考慮して M 社製ハンバーグを基材に採用することとした。

前処理済みハンバーグ基材に接種した試験菌は、4℃保存でも-20℃保存でも保存期間中は生菌数の大きな変化を認めず比較的安定に推移していた。調査試料として参加機関に配布するときの輸送条件などを考え、まず 4℃保存試料を優先してその安定性・均一性ならびに検査法（公定法など）による試験菌の検出の有無を検討した。但し、食品の規格基準に示されている冷凍食品として冷凍試料を配布する場合でも、冷凍保存条件ならびに配布時の輸送条件を適切な条件下に設定できれば、凍結融解を避けて冷凍試料を配布することは可能な状況にまで達している。

採用が想定される検査方法（主に公定法）での試験菌の検出確認でも添加菌の検出は可能であったが、これまでの検討結果で示したように、使用する試験菌株の性状によっては大腸菌検査で汎用される EC 培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養（推定試験）では、判定基準となるガス産生が微弱な検出のみに留まる場合もあり、調査試料として指定する食品のカテゴリー、試料作製に選択する試験菌株や選択される検査手順などを考慮した調査試料の作製が必要である。

サルモネラ属菌検査用調査試料として検

討した殺菌液卵（鶏卵）は、液状基材のため取り扱いが容易であったが、添加菌が低温保存中に発育増殖を示すため、安定化剤の添加による試験菌の増殖抑制を考慮した基材の設計にする必要があり、低温保存中の菌の増殖を考慮して接種菌量を設定することにより、増加菌数を加味した最終の生菌数を期待する設定範囲に留めることは可能と考える。しかしながら今回のような液状基材の場合、菌の増殖抑制と基材の変質（腐敗臭の発生）防止のために安定化剤の添加は必須と考えられ、特殊な安定化剤を選択して菌の増殖をコントロールする場合は、検査手法（特に前増菌培地中での発育抑制）への影響を十分考慮しなければならない。したがって、調査試料として一定の有効期間を保証するために接種菌が安定で死滅せず、増減を示さない調査試料の提供が望まれ、さらに他の調査試料作製と同様に、最終的に同定検査の対象となる試験菌株の生化学的性状についても十分考慮しなければならない。食品・食品添加物等規格基準のカテゴリーに記載されている実食材（殺菌液卵など）を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料の作製にあたり、解決しなければならない問題点については今後の検討課題と考える。

E. 結論

食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり均一で安定な調査試料の作製を主眼としてこれまで検討してきた。その結果、マッシュポテトを基材とする場合は比較的安定な調査試料の提供が可能となった。一方、食品・食品添加物等規格基準に記載されている食品のカテゴリーを参考に調査試料に対し見立て食材を提示した場合、公定法にしたがった検査手順が採用されることが多い。例えば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 ± 2 時間培養によるガス産生能を推定試験とする検査法を選択することになる。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推定試験の判定結果が大腸菌陰性と判定される場合がある。この結果は、調査試料の不備、検査施設の技術的問題、採用した検査方法の問題、試験菌株自身の生化学的性状など様々な要因が考えられる。検査施設の技術的問題については、現時点において我々自身が検証するのは困難であるが、調査試料の不備による結果と考える場合、マッシュポテトの影響または添加した試験菌株の性状に依存した結果と推定するが、必ずしも公定法を採用した全ての機関が大腸菌陰性と判定しているわけではない。そこで、試験菌株の性状、検査法として公定法を採用した場合の試験菌の検出に関する基礎的検討をまず試みた。

今回の基礎的検討結果では、まず公定法として採用されている「EC 培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養によるガス産生の判定（推定試験）」により種々の菌株を用いてガス産生能に対する影響を検討した。その結果、大腸菌の汚染濃度、大腸菌の履歴、大腸菌の性状によっては、本試験方法（推定試験）で大腸菌が存在していても判定結果が大腸菌陰性となりうる事が示唆された。これは、まず推定試験の判定基準がガス産生能を指標としているため、菌株の性状、増菌培地の特性、培養温度などによって変動し易い指標（ガス産生能）で判定している結果と推測する。EC 培地の対大腸菌に対する選択性を考慮して本培地を推定試験に採用する場合には、検査試料を直接 EC 培地で培養するのではなく、一度増菌培養（例えば、乳糖ブイヨン、SCD 培地、BGLB 培地などで $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で $24 \sim 48$ 時間前培養を行う）を実施した後、EC 培地

（ $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養）で培養する手順などを採用した方がより正確に大腸菌を検出する事ができるものと考えられ、「検査方法（増菌培地、培養温度、培養時間）と試験菌の検出率」に大きな関係があることが示唆された。事実、今回の検討結果では EC 培地を用い $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養によるガス産生能を判定基準とした場合、先に示したように大腸菌は少なくとも 3 つの Type に大別される。またガス産生を指標にする場合は、 24 ± 2 時間以内に十分な菌の増殖を認めない限り判定に十分なガス産生にまで移行しないことが示唆された。EC 培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ の培養温度は、糞便性大腸菌に対して選択性の高い培養方法ではあることが示されているが、通常の検査では様々な食品を対象とするため食品中に存在する大腸菌の履歴（凍結保存による細胞障害などが考えられる場合）によって培養条件の選択性から大腸菌が検出できない（増殖できない）場合も推測される。したがって、調査試料作製に使用する試験菌株は、目的によってどのような生化学的性状の菌株を選択することが適切かを考える必要がある。検査方法それ自身の問題を別にすれば、外部精度管理調査で多くの施設が採用している公定法「EC 培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養によるガス産生の判定（推定試験）」で判定基準を満たす菌株を第一に選択することが適切かと考える。今後の食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、「試験菌株の選択と検査方法による特定微生物の検出確認」について様々な局面から詳細な検討を加え、外部精度管理調査の目的に応じて適切な試験菌株の選択と調査試料の作製、ならびに調査試料の提供が必要ではないかと考える。

食品衛生外部精度管理調査の特定微生物検査用調査試料として、これまでマッシュポテトを基材とした均一で安定な調査試料を

作製し提供してきたが、実食材を基材とした調査試料配布の要望に答えるため大腸菌群・大腸菌検査用試料としてハンバーグ、サルモネラ属菌検査用試料として殺菌液卵（鶏卵）を選択し調査試料作製を試みた。

ハンバーグ（大腸菌群・大腸菌検査用調査試料）を基材として用いる場合、ハンバーグの原材料によって基材として用いるための前処理に注意が必要であった。今回の調製方法では試験菌の分散性・均一性ならびに安定性が一定期間確保され、調査試料として提供が可能となった。特に調査試料は、作製から少なくとも約5週間の品質保証が必要となるが、4℃下保存ハンバーグの生菌数の推移は作製時に比べて大きな増減を認めず、EC培地（公定法、推定試験）で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ による培養、またはBGLB培地で $35.0 \pm 1^\circ\text{C}$ による培養で判定規準であるガス産生の確認が可能であった。但し、調査試料の作製に当たっては、適量の大腸菌数（少なくとも約50～100cfu/培地）がEC培地に添加されること、ならびに 24 ± 2 時間培養後のガス産生による判定がかのうであること条件を満たすよう十分考慮することが必要である。また、今回 -20°C 下で冷凍保存したハンバーグについても検討したが、凍結ハンバーグについても4℃下保存試料と同様に大腸菌の検出が可能であった。凍結保存試料の配布では、凍結状態の維持ならびに輸送時の温度管理の点でまだ問題があるため、冷蔵保存試料の配布を優先して検討してきたが、検査対象となる食品カテゴリーには冷凍食品が含まれており、ハンバーグ基材はこのカテゴリーを満たす形態で提供可能な調査試料と考える。

サルモネラ属菌検査のための調査試料として殺菌液卵（鶏卵）を採用して検討した結果、安定化剤の添加基材中でも4℃保存条件でも試験菌の増殖を認め、菌の死滅は抑制するが、保存4週目では試験菌の増殖に伴う微

弱な腐敗臭が感じられ、基材に対する接種菌量の設定などを詳細に検討しなければならない。今回の殺菌液卵（鶏卵）を用いたサルモネラ属菌検査試料は、前増菌培地や選択増菌培地中で試験菌の十分な発育を認め、殺菌液卵を基材としてサルモネラ属菌検査用調査試料を作製することは十分可能であると判断した。現段階でも調査試料として用いることは可能であるが、さらに適切な調査試料として配布するためには、基材中での菌の安定性や基材の変質防止など改良しなければならない点が多々あり、これらについては今後の検討課題と考える。

食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、食品・食品添加物等の規格基準に示されている食品カテゴリーを参考とした調査試料作製のための実食材の選択とそれらを基材とした均一で安定な調査試料作製を継続して検討する必要がある。また試料の作製にあたっては、これまで問題とされてきている「試験菌株の選択と公定法等の検査方法における特定微生物の検出確認」など様々な局面を考慮して、外部精度管理調査の目的に応じて適切な試験菌株を選択し、日常の検査試料に近い調査試料を提供することによりさらに向上した精度管理の実施が遂行されるものとする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大島赴夫、鈴木達也、山田健一、高野恵美、山本奈々美、川崎 勝、松木容彦（2003）食品衛生外部精度管理調査の概要—大腸菌検査に係る検査方法と調査成績—食品衛生研究、第53巻（7）、39—47

- 2) 大島赴夫、鈴木達也、山田健一、高野恵美、山本奈々美、鈴木恭子、川崎 勝、松木容彦 (2003) 食品衛生外部精度管理調査の概要 ―サルモネラ検査に係る検査方法と調査成績― 食品衛生研究、第53巻 (8) 、17-27

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1.大腸菌の BGLB 培地および EC 培地中での培養に伴うガス産生能

試験菌株	培 養 時 間			
	24 時間培養後のガス産生		48 時間培養後のガス産生	
	BGLB 培地	EC 培地	BGLB 培地	EC 培地
HIC12014	30%	20%	70%	50%
NIHJ	—	—	<5%	—
DH-1	10%	—	25%	—
IFO 3139	20%	—	40%	—
NHL u5/41	10%	5%	10%	10%
NCTC9001	30%	20%	70%	25%
HIC1207	—	—	—	—
HIC 1203	30%	15%	50%	50%
HIC 2211	20%	5%	50%	50%
ATCC 8739	10%	—	40%	40%

ガス産生量 (%)、ダーラム管全体を 100%としたときの、ダーラム管中に占めるガスの割合を示す。
BGLB 培地は $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、EC 培地は $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ での培養結果を示す。

表 2. 大腸菌の BGLB 培地および EC 培地中での培養 24 ならびに 48 時間後の生菌数

試験菌株	初発菌数	培 養 時 間			
		24 時間後		48 時間後	
		BGLB 培地	EC 培地	BGLB 培地	EC 培地
HIC12014	2.0×10^1	5.8×10^7	6.8×10^7	7.9×10^6	1.3×10^7
NIHJ	7.0×10^1	1.9×10^7	3.4×10^5	2.0×10^5	3.7×10^6
DH-1	1.0×10^1	5.9×10^7	2.4×10^7	2.5×10^7	7.9×10^6
IFO 3139	7.0×10^1	1.6×10^8	<10	7.1×10^7	<10
NHL u5/41	3.0×10^1	8.2×10^5	3.0×10^7	2.0×10^7	9.6×10^1
NCTC9001	5.0×10^1	1.6×10^8	1.4×10^7	3.9×10^7	6.3×10^6
HIC1207	5.0×10^1	7.2×10^7	<10	7.7×10^3	<10
HIC 1203	9.0×10^1	6.0×10^7	2.9×10^7	4.6×10^6	7.4×10^6
HIC 2211	4.0×10^1	1.2×10^8	2.1×10^7	3.4×10^7	6.2×10^6
ATCC 8739	7.0×10^1	8.9×10^7	2.7×10^7	1.4×10^7	4.5×10^7

表中の数値は、培地 1mLあたりの生菌数を示す。

BGLB 培地は $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、EC 培地は $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ での培養結果を示す。

表3. マンシユポテト存在下・非存在下における BGLB 培地中での *E. coli*HIC2211 の経時的生菌数変化とガス産生

菌数レベール	初発菌数	マンシユポテト	測定	培養時間					
				接種直後	3 時間後	6 時間後	24 時間後	30 時間後	48 時間後
10 ¹	1.8×10 ¹	存在下	生菌数	<10	2.1×10 ²	2.1×10 ³	1.2×10 ⁸	7.5×10 ⁷	6.2×10 ⁷
			ガス産生	—	—	—	30%	40%	80%
10 ²	1.8×10 ²	非存在下	生菌数	<10	3.0×10 ²	2.5×10 ³	8.4×10 ⁷	1.1×10 ⁸	3.0×10 ⁷
			ガス産生	—	—	—	15%	20%	50%
10 ³	1.8×10 ³	存在下	生菌数	2.0×10 ¹	3.4×10 ²	9.5×10 ³	1.2×10 ⁸	7.1×10 ⁷	3.2×10 ⁷
			ガス産生	—	—	—	10%	15%	50%
10 ³	1.8×10 ³	非存在下	生菌数	1.0×10 ¹	2.9×10 ²	6.9×10 ⁴	7.4×10 ⁷	9.0×10 ⁷	4.0×10 ⁷
			ガス産生	—	—	—	20%	50%	70%
10 ³	1.8×10 ³	存在下	生菌数	1.1×10 ²	3.6×10 ³	9.9×10 ⁴	1.0×10 ⁸	8.3×10 ⁷	7.0×10 ⁷
			ガス産生	—	—	—	30%	40%	60%
10 ³	1.8×10 ³	非存在下	生菌数	2.3×10 ²	1.5×10 ³	1.1×10 ⁵	7.7×10 ⁷	8.3×10 ⁷	3.5×10 ⁷
			ガス産生	—	—	—	25%	25%	60%

表中の数値は、培地 1mL あたりの生菌数を示す。

ガス産生量 (%)、ダーラム管全体を 100% としたときの、ダーラム管中に占めるガスの割合を示す。