

で一括して管理できるのかを判断するにも、
更なる具体的事例の収集が必要である。

E. 結論

実試料の二重分析値を利用した内部精度管理は、2つの分析値のばらつきの程度がランダム誤差の範囲内であるか否かを判定指標として各試料の分析値が適切に実施された分析試験により得られた結果であることを確認する有効な手段となり得る。また、その運用に当っては、特定の試料を用いて得られた多数の分析値から求めた信頼限界値(例えば 95%信頼限界)を管理基準として利用するのが現実的である。

ただし、当該精度管理手法では分析値の精度は管理できるが真度の管理ができないため、管理試料導入法など他の適切な手法との併用が必要となる。また、多種類の試料マトリックスや幅広い濃度範囲の試料と取り扱う試験室においては、どの程度の試料範囲及び濃度範囲を一括して管理できるかが実用面での課題である。

F. 健康危機に関する情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

- 1) “Guidelines for the Assessment of the Competence of Testing Laboratories Involved in the Import and Export Control of Food”, CAC/GL27 (1997).
- 2) “Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories”, *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 649-666 (1995).
- 3) 科学技術庁資源調査会食品成分部会編：“五訂日本食品標準成分表分析マニュアル”，39-40 (1997) 社団法人 資源協会
- 4) “シューハート管理図”，JIS Z9021 (1998)

Table 1 粉末青汁の硝酸根分析データ(2回併行×20組)

		分析値 x_{ij} g/kg		差 d_i	d_i^2	範囲 R_i
$i \backslash j$	1	2				
1	6.62	6.67	-0.05	0.0025	0.05	
2	6.78	6.71	0.07	0.0049	0.07	
3	6.62	6.69	-0.07	0.0049	0.07	
4	6.59	6.68	-0.09	0.0081	0.09	
5	6.66	6.80	-0.14	0.0196	0.14	
6	6.58	6.53	0.05	0.0025	0.05	
7	6.72	6.67	0.05	0.0025	0.05	
8	6.63	6.77	-0.14	0.0196	0.14	
9	6.63	6.71	-0.08	0.0064	0.08	
10	6.78	6.78	0.00	0.0000	0.00	
11	6.88	6.61	0.27	0.0729	0.27	
12	6.88	6.72	0.16	0.0256	0.16	
13	6.64	6.65	-0.01	0.0001	0.01	
14	6.78	6.64	0.14	0.0196	0.14	
15	6.91	6.82	0.09	0.0081	0.09	
16	6.90	6.84	0.06	0.0036	0.06	
17	6.66	6.75	-0.09	0.0081	0.09	
18	6.55	6.77	-0.22	0.0484	0.22	
19	6.78	6.79	-0.01	0.0001	0.01	
20	6.85	6.74	0.11	0.0121	0.11	
合計 Σ	268.78		0.10	0.2696	1.90	
分析値総平均	6.7195					
差のデータ数 n			20			
範囲の平均 R_{mean}					0.0950	

Table 2 複数の手順による2つの測定値の差 d の95%信頼限界推定結果

本文中の項	利用した統計量	差 d の95%信頼限界推定結果
C.3	差の標準偏差 s_d	$ d \leq 2.4$
C.4	併行標準偏差 s_r	$ d \leq 2.3$
C.5	範囲の平均 R_{mean}	$ d \leq 2.4$

Table 3 粉末青汁試料の硝酸根の二重分析データ

試料	測定値 x g/kg		平均 x_{mean}	差 $ d $
	1	2		
A	4.20	4.38	4.290	0.18
B	5.24	5.21	5.225	0.03
C	5.24	5.24	5.240	0.00
D	14.53	14.51	14.520	0.02
E	7.41	7.49	7.450	0.08
F	27.91	28.00	27.955	0.09

別添資料 2

平成18年度厚生労働科学研究 微生物試験における内部精度管理実施について

1. 実施目的

平成17年度において、食品衛生登録検査機関（以下、「登録検査機関」という。）を対象に「微生物試験における内部精度管理について」のアンケート調査を実施した。

アンケートの調査項目としては「食品衛生検査施設における検査等の業務管理の実施について」の別添「精度管理の一般ガイドライン」に示されている微生物試験の内部精度管理について登録検査機関での実施状況について行った。

調査内容は、

- 1) 既知の微生物を含む試験品（生菌数）についての添加回収試験
- 2) 大腸菌群、E. coli 等の陰性基準のある試験品についての実施方法 等

アンケート調査の結果、登録検査機関においては、概ね「一般ガイドライン」により実施しているが一部の機関においては、一般ガイドラインとは異なる方法で実施していた。アンケート調査への要望事項としては、登録検査機関においての統一的な実施方法に関しての内容もあったことから、本年度においては輸入食品等の命令検査の対象になっている冷凍食品の成分規格の細菌数（生菌数）、大腸菌群及び E. coli で行った。細菌数（生菌数）においては添加回収試験及び陰性基準のある大腸菌群、E. coli については検出下限値となる菌数等を定め同定鑑別を実施した。

2. 実施方法

2.1 検査項目 細菌数（生菌数）における添加回収試験

1. 対象食品 冷凍食品（加熱後摂取冷凍食品凍結直前加熱）

2. 基準値の菌数 $1 \times 10^5 \text{cfu/g}$ 以下

3. 添加菌液調製

1) 使用菌液：枯草菌芽胞液（ $1 \times 10^7 \text{cfu/mL}$ 含有・生菌数測定内部精度管理用栄研器材株）

2) 添加菌数：①基準値の菌数 $1 \times 10^5 \text{cfu/g}$

②基準値の1/5の菌数 $2 \times 10^4 \text{cfu/g}$

3) 添加菌液の調整方法

①基準値の菌数： $1 \times 10^5 \text{cfu/g}$ （ $2.5 \times 10^6 \text{cfu/25g}$ ）の調製

$1 \times 10^7 \text{cfu/mL}$ の枯草菌芽胞菌を滅菌生理食塩水を用い10倍希釈し $1 \times 10^6 \text{cfu/mL}$ とする。

検体22.5gに対し $1 \times 10^6 \text{cfu/mL}$ の菌液2.5mL添加[$1 \times 10^5 \text{cfu/g}$ （ $2.5 \times 10^6 \text{cfu/25g}$ ）]する（①試験品）。

②基準値の1/5の菌数： $2 \times 10^4 \text{cfu/g}$ （ $5 \times 10^5 \text{cfu/25g}$ ）の調製

①で調製した $1 \times 10^6 \text{cfu/mL}$ の菌液2mLを8mLの滅菌生理食塩水で希釈して、 $2 \times 10^5 \text{cfu/mL}$ とする。

検体22.5gに対し $2 \times 10^5 \text{cfu/mL}$ の菌液2.5mL添加 [$2 \times 10^4 \text{cfu/g}$ （ $5 \times 10^5 \text{cfu/25g}$ ）]する（②試験品）。

／25g)] する (②試験品)。

4. 試験操作

①, ②の試験品について厚生省告示第 370 号食品・添加物等の規格基準・加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱) の検査方法により細菌数 (生菌数) の算定を行う。また, 試験品への添加前の菌数も同時に算定し, ①, ②の試験品への添加回収率を求める。

5. 結果の記載方法

- 1) 基準値の菌数の算定結果 (有効数字上位 2 桁とし 3 桁目を四捨五入) 及び添加回収率 (目安とする回収率 70%~120%)

①基準値の菌数及び添加菌数の算定結果

測定回数	添加菌数 (cfu/g)	1 g あたりの実測値 (cfu/g)					一回当たりの所要時間 (分)
		1 回	2 回	3 回	4 回	5 回	
1 日							
2 日							
3 日							
4 日							
5 日							

②基準値における添加菌数の回収率 (目安とする回収率 70%~120%)

測定回数	添加菌数 (cfu/g)	添加回収率 (70~120%)				
		1 回	2 回	3 回	4 回	5 回
1 日						
2 日						
3 日						
4 日						
5 日						

- 2) 基準値の 1/5 の菌数の算定結果 (有効数字上位 2 桁とし 3 桁目を四捨五入) 及び添加回収率 (目安とする回収率 70%~120%)

①基準値の 1/5 の菌数及び添加菌数の算定結果

測定回数	添加菌数 (cfu/g)	1 g あたりの実測値					一回当たりの所要時間 (分)
		1 回	2 回	3 回	4 回	5 回	
1 日							
2 日							
3 日							
4 日							
5 日							

②基準値の1/5の菌数における添加菌数の回収率

測定回数	添加菌数 (cfu/g)	添加回収率(70~120%)				
		1回	2回	3回	4回	5回
1日						
2日						
3日						
4日						
5日						

2.2 検査項目 大腸菌群およびE. coliの陰性基準のある試験品

(通常検出されない微生物を対象とした検査等)

1. 対象食品 冷凍食品 [加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱)] 及び [加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱以外)]

2. 基準値及び添加菌：陰性、検出下限値 1×10^2 cfu/g の5倍の菌数

3. 添加菌液調整

- 1) 使用菌株：E. cloacae等の大腸菌群及びE. coli

(各検査機関において日常使用している菌株)

- 2) 添加菌数；検出下限値を 1×10^2 cfu/g (2.5×10^3 cfu/25g) とし、その5倍の菌数 5×10^2 cfu/g (1.3×10^4 cfu/25g) とする。

- 3) 添加菌液の調整方法：試験前日からトリプトニックイオン培地等で一夜培養 (35℃、20 ± 2 時間) し、滅菌生理食塩水を用いて約 10^8 cfu/mL の菌液を作製する。

さらに希釈して 5×10^3 cfu/mL に調整し接種菌液とする。

検体 22.5g に対し、 5×10^3 cfu/mL の菌液 2.5mL 添加

[5×10^2 cfu/mL (1.3×10^4 cfu/25g)] する (試験品)。

4. 試験操作

試験品について厚生省告示第 370 号食品・添加物等の規格基準・加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱) の検査方法により大腸菌群及び加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前未加熱) の検査方法により E. coli の形態観察 (顕微鏡観察) により同定鑑別を行う。

5. 結果の記載方法

- 1) 大腸菌群試験結果

①添加菌数：1 (cfu/g)

2 (cfu/g)

3 (cfu/g)

②大腸菌群の形態観察による同定鑑別

試験菌	判定基準	形態観察結果		
		1	2	3
大腸菌群	グラム染色 (陰性)			
	形態 (桿菌)			
	芽胞 (無芽胞)			
	乳糖分解 (酸産生) (+)			
	乳糖分解 (ガス産生) (+)			
大腸菌群の判定 (該当・非該当)				

2) E. coli 試験結果

①添加菌数：1 (cfu/g)

2 (cfu/g)

3 (cfu/g)

②E. coli の形態観察による同定鑑別

試験菌	判定基準	形態観察結果		
		1	2	3
E. coli	グラム染色 (陰性)			
	形態 (桿菌)			
	芽胞 (無芽胞)			
	EC 培地でのガス産生 (+)			
	乳糖分解 (酸産生) (+)			
	乳糖分解 (ガス産生) (+)			
E. coli の判定 (該当・非該当)				

3. 実施結果

3.1 細菌数 (生菌数) における添加回収試験

1) 基準値の菌数及び添加菌数の算定結果

実施機関	測定回数	添加菌数 (cfu/g)	1 g あたりの実測値					所要時間 (分)
			1回	2回	3回	4回	5回	
A	1日	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	8
	2日	1.2×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	1.3×10^5	1.3×10^5	6

	3日	1.3×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	6
	4日	1.0×10^5	9.9×10^4	1.0×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.1×10^5	8
	5日	1.2×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	1.3×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	8
B	1日	1.1×10^5	1.3×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	9.3×10^4	9.4×10^4	10
	2日	8.9×10^4	9.9×10^4	1.2×10^5	9.7×10^4	8.1×10^4	9.8×10^4	6
	3日	1.1×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	5
	4日	8.4×10^4	8.1×10^4	1.1×10^5	9.4×10^4	8.7×10^4	9.0×10^4	5
	5日	1.2×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	5
C	1日	7.6×10^4	6.7×10^4	6.6×10^4	6.4×10^4	7.2×10^4	7.3×10^4	10
	2日	7.8×10^4	7.9×10^4	7.1×10^4	7.5×10^4	6.4×10^4	7.0×10^4	10
	3日	7.4×10^4	6.5×10^4	6.8×10^4	8.0×10^4	6.7×10^4	6.2×10^4	10
	4日	8.1×10^4	7.4×10^4	7.2×10^4	6.7×10^4	7.4×10^4	6.8×10^4	10
	5日	7.5×10^4	7.7×10^4	7.0×10^4	6.6×10^4	7.2×10^4	7.2×10^4	10
D	1日	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	19
	2日	1.0×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	19
	3日	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5	17
	4日	1.1×10^5	1.0×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	14
	5日	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	14
E	1日	8.3×10^4	1.0×10^5	9.4×10^4	9.3×10^4	9.4×10^4	1.0×10^5	6
	2日	9.3×10^4	9.6×10^4	9.3×10^4	1.0×10^5	9.7×10^4	1.1×10^2	6
	3日	1.0×10^5	9.0×10^4	1.0×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	6
	4日	1.1×10^5	9.3×10^5	1.0×10^5	9.8×10^4	1.0×10^5	9.6×10^4	6
	5日	1.0×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	9.8×10^4	9.9×10^5	9.3×10^4	6
F	1日	9.6×10^4	9.8×10^4	1.0×10^5	9.9×10^4	9.5×10^4	1.0×10^5	8
	2日	1.0×10^5	9.4×10^4	1.0×10^5	9.7×10^4	9.8×10^4	9.4×10^4	8
	3日	9.9×10^4	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	8
	4日	1.0×10^5	1.0×10^5	9.4×10^4	1.0×10^5	9.2×10^4	1.1×10^5	9
	5日	9.5×10^4	9.4×10^4	9.9×10^4	9.6×10^4	9.8×10^4	9.5×10^4	8
G	1日	1.2×10^5	9.6×10^4	1.2×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	12
	2日	1.5×10^5	1.3×10^5	1.3×10^5	1.3×10^5	1.3×10^5	1.2×10^2	13
	3日	7.1×10^4	7.8×10^4	7.5×10^4	9.1×10^4	7.0×10^4	8.7×10^4	12
	4日	1.1×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	11
	5日	1.0×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	15
H	1日	8.8×10^4	1.2×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	18
	2日	9.3×10^4	8.4×10^4	1.1×10^5	8.6×10^4	8.3×10^4	9.2×10^4	18
	3日	6.4×10^4	7.3×10^4	7.6×10^4	7.2×10^4	7.4×10^4	9.0×10^4	18
	4日	4.1×10^4	5.2×10^4	4.7×10^4	4.1×10^4	4.9×10^4	4.4×10^4	18
	5日	1.0×10^5	1.2×10^5	1.3×10^5	9.0×10^4	1.0×10^5	1.1×10^5	18

I	1日	1.0×10^5	1.1×10^5	9.9×10^4	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	12
	2日	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	12
	3日	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5	12
	4日	1.2×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	12
	5日	1.2×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	12
J	1日	1.1×10^5	8.7×10^4	9.0×10^4	1.4×10^5	8.2×10^4	1.3×10^5	25
	2日	1.2×10^5	8.5×10^4	9.2×10^4	1.4×10^5	9.3×10^4	1.1×10^5	24
	3日	1.2×10^5	9.5×10^4	1.1×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	23
	4日	1.1×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5	1.3×10^5	1.4×10^5	26
	5日	1.0×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	9.5×10^4	24
K	1日	8.6×10^4	8.9×10^4	8.5×10^4	8.7×10^4	8.7×10^4	8.6×10^4	5
	2日	1.0×10^5	9.1×10^4	9.3×10^4	9.6×10^4	8.5×10^4	9.6×10^4	6
	3日	9.0×10^4	1.0×10^5	9.6×10^4	9.8×10^4	9.6×10^4	9.7×10^4	5
	4日	1.1×10^5	1.0×10^5	8.8×10^4	9.7×10^4	1.0×10^5	1.1×10^5	4
	5日	9.1×10^4	9.1×10^4	9.2×10^4	9.1×10^4	7.8×10^4	8.1×10^4	6
L	1日	9.9×10^5	1.0×10^6	7.2×10^5	6.5×10^5	8.6×10^5	6.8×10^5	9
	2日	9.8×10^5	8.9×10^5	8.9×10^5	7.2×10^5	6.8×10^5	6.8×10^5	8
	3日	8.4×10^5	2.2×10^5	2.5×10^5	4.0×10^5	6.1×10^5	5.2×10^5	6
	4日	9.4×10^5	6.5×10^5	4.8×10^5	6.4×10^5	5.2×10^5	6.5×10^5	8
	5日	1.0×10^6	7.0×10^5	1.0×10^6	1.0×10^6	8.1×10^5	7.2×10^5	8
M	1日	1.1×10^5	1.1×10^5	9.2×10^4	1.1×10^5	1.1×10^5	9.4×10^4	25
	2日	1.0×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5	25
	3日	1.0×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	25
	4日	1.0×10^5	1.2×10^5	9.6×10^4	1.0×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	25
	5日	1.0×10^5	1.2×10^5	1.1×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5	1.2×10^5	25

2) 基準値の菌数における添加菌数の回収率

実施機関	測定回数	添加菌数 (cfu/g)	添加回収率 (70~120%)					回収率平均
			1回	2回	3回	4回	5回	
A	1日	1.1×10^5	100	100	109	100	109	104
	2日	1.2×10^5	100	100	100	108	108	103
	3日	1.3×10^5	92	92	84	84	92	89
	4日	1.0×10^5	99	100	110	100	110	104
	5日	1.2×10^5	100	100	108	92	83	97
B	1日	1.1×10^5	118	100	109	85	83	99
	2日	8.9×10^4	111	135	108	91	110	111
	3日	1.1×10^5	91	109	100	100	109	102
	4日	8.4×10^4	96	131	112	104	107	110

	5日	1.2×10^5	100	92	92	92	100	95
C	1日	7.6×10^4	87	87	83	94	96	89
	2日	7.8×10^4	101	91	96	82	90	92
	3日	7.4×10^4	88	92	109	91	84	93
	4日	8.1×10^4	91	89	82	91	84	87
	5日	7.5×10^4	101	92	87	95	95	94
D	1日	1.1×10^5	100	100	100	100	109	102
	2日	1.0×10^5	100	120	120	100	100	108
	3日	1.1×10^5	100	100	100	109	91	100
	4日	1.1×10^5	91	100	100	100	91	96
	5日	1.1×10^5	100	100	100	100	100	100
E	1日	8.3×10^4	120	108	112	113	120	115
	2日	9.3×10^4	103	100	108	104	118	107
	3日	1.0×10^5	90	100	110	100	100	100
	4日	1.1×10^5	85	91	89	91	87	89
	5日	1.0×10^5	110	110	98	99	93	102
F	1日	9.6×10^4	102	104	103	99	104	102
	2日	1.0×10^5	94	100	97	98	94	97
	3日	9.9×10^4	111	111	111	111	101	109
	4日	1.0×10^5	100	94	100	92	110	99
	5日	9.5×10^4	99	104	101	103	100	101
G	1日	1.2×10^5	80	100	92	83	100	91
	2日	1.5×10^5	87	87	87	87	80	86
	3日	7.1×10^4	110	106	128	99	123	113
	4日	1.1×10^5	100	91	91	100	91	95
	5日	1.0×10^5	110	100	120	100	120	110
H	1日	8.8×10^4	136	136	125	136	125	132
	2日	9.3×10^4	90	118	92	89	99	98
	3日	6.4×10^4	114	119	112	116	141	120
	4日	4.1×10^4	127	115	100	120	107	114
	5日	1.0×10^5	120	130	90	100	110	110
I	1日	1.0×10^5	110	99	110	110	120	110
	2日	1.1×10^5	100	109	109	100	109	105
	3日	1.1×10^5	100	100	91	109	91	98
	4日	1.2×10^5	92	100	92	100	92	95
	5日	1.2×10^5	100	92	83	108	92	95
J	1日	1.1×10^5	79	82	127	75	118	96
	2日	1.2×10^5	71	77	117	78	92	87

	3日	1.2×10^5	95	110	120	100	120	109
	4日	1.1×10^5	100	100	83	108	117	102
	5日	1.0×10^5	120	120	100	120	95	111
K	1日	8.6×10^4	103	99	101	101	100	101
	2日	1.0×10^5	91	93	96	85	96	92
	3日	9.0×10^4	111	107	109	107	108	108
	4日	1.1×10^5	91	80	88	91	100	90
	5日	9.1×10^4	100	101	100	86	89	95
L	1日	9.9×10^5	100	73	68	86	69	79
	2日	9.8×10^5	89	89	76	75	75	81
	3日	8.4×10^5	37	31	45	55	58	45
	4日	9.4×10^5	65	53	64	65	54	60
	5日	1.0×10^6	70	91	91	81	72	81
M	1日	1.1×10^5	100	84	100	100	85	94
	2日	1.0×10^5	100	100	120	110	100	106
	3日	1.0×10^5	120	110	110	110	120	114
	4日	1.0×10^5	120	96	100	100	100	103
	5日	1.0×10^5	120	110	110	120	120	116

3) 基準値の1/5の菌数及び添加菌数の算定結果

実施機関	測定回数	添加菌数 (cfu/g)	1gあたりの実測値					所要時間(分)
			1回	2回	3回	4回	5回	
A	1日	2.0×10^4	2.0×10^4	2.3×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	8
	2日	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	9
	3日	2.5×10^4	2.3×10^4	2.4×10^4	2.4×10^4	2.4×10^4	2.5×10^4	6
	4日	2.4×10^4	2.2×10^4	2.4×10^4	2.2×10^4	2.3×10^4	2.2×10^4	6
	5日	2.2×10^4	1.9×10^4	1.9×10^4	2.0×10^4	1.8×10^4	2.1×10^4	8
B	1日	2.2×10^4	2.2×10^4	2.2×10^4	2.3×10^4	2.1×10^4	1.9×10^4	10
	2日	1.8×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	2.3×10^4	1.9×10^4	1.9×10^4	6
	3日	2.2×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	5
	4日	1.7×10^4	1.9×10^4	2.1×10^4	1.9×10^4	1.7×10^4	1.9×10^4	5
	5日	2.4×10^4	2.0×10^4	2.2×10^4	2.0×10^4	1.8×10^4	1.6×10^4	5
C	1日	1.4×10^4	1.3×10^4	1.2×10^4	1.2×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	12
	2日	1.4×10^4	1.3×10^4	1.4×10^4	1.4×10^4	1.5×10^4	1.3×10^4	12
	3日	1.3×10^4	1.3×10^4	1.4×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	1.2×10^4	12
	4日	1.4×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	1.2×10^4	1.2×10^4	1.3×10^4	12
	5日	1.4×10^4	1.2×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	1.2×10^4	12
D	1日	2.0×10^4	2.2×10^4	2.3×10^4	2.4×10^4	2.3×10^4	2.4×10^4	18

	2日	2.1×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	16
	3日	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	13
	4日	2.1×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	17
	5日	2.1×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	2.2×10^4	2.2×10^4	2.1×10^4	16
E	1日	1.8×10^4	1.8×10^4	1.8×10^4	1.8×10^4	1.9×10^4	1.8×10^4	6
	2日	2.1×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	6
	3日	2.0×10^4	1.8×10^4	2.2×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	6
	4日	1.9×10^4	1.8×10^4	2.1×10^4	1.9×10^4	2.0×10^4	1.9×10^4	6
	5日	2.1×10^4	2.0×10^4	1.8×10^4	2.3×10^4	2.1×10^4	2.2×10^4	6
F	1日	1.9×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	1.9×10^4	2.0×10^4	8
	2日	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	1.9×10^4	2.0×10^4	8
	3日	2.1×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	8
	4日	2.0×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	9
	5日	1.8×10^4	1.8×10^4	1.9×10^4	1.9×10^4	1.8×10^4	2.1×10^4	8
G	1日	2.0×10^4	2.4×10^4	2.6×10^4	2.7×10^4	2.1×10^4	2.3×10^4	13
	2日	2.5×10^4	2.4×10^4	2.2×10^4	2.5×10^4	2.5×10^4	2.7×10^4	13
	3日	7.7×10^3	7.0×10^3	7.6×10^3	7.3×10^3	7.7×10^3	8.0×10^3	12
	4日	1.1×10^4	1.1×10^4	1.1×10^4	1.1×10^4	1.0×10^4	1.1×10^4	10
	5日	1.1×10^4	1.1×10^4	1.1×10^4	1.2×10^4	1.1×10^4	1.0×10^4	14
H	1日	2.1×10^4	2.3×10^4	2.1×10^4	2.2×10^4	2.2×10^4	2.1×10^4	18
	2日	1.6×10^4	1.8×10^4	1.8×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	1.9×10^4	18
	3日	1.3×10^4	1.7×10^4	1.8×10^4	1.9×10^4	1.8×10^4	1.9×10^4	18
	4日	7.6×10^3	1.1×10^4	1.1×10^4	1.1×10^4	9.9×10^3	9.9×10^3	18
	5日	1.9×10^4	2.4×10^4	2.3×10^4	2.2×10^4	2.3×10^4	2.4×10^4	18
I	1日	1.6×10^4	1.3×10^4	1.2×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	1.5×10^4	12
	2日	1.5×10^4	1.2×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	1.2×10^4	12
	3日	1.6×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4	1.2×10^4	1.2×10^4	1.3×10^4	12
	4日	1.6×10^4	1.3×10^4	1.2×10^4	1.2×10^4	1.2×10^4	1.2×10^4	12
	5日	1.6×10^4	1.3×10^4	1.4×10^4	1.4×10^4	1.4×10^4	1.2×10^4	12
J	1日	2.2×10^4	2.0×10^4	1.9×10^4	1.7×10^4	1.7×10^4	2.2×10^4	24
	2日	2.4×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	1.9×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	24
	3日	2.0×10^4	2.2×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.2×10^4	2.0×10^4	24
	4日	2.4×10^4	2.5×10^4	2.2×10^4	2.4×10^4	2.1×10^4	2.1×10^4	25
	5日	2.0×10^4	2.1×10^4	1.9×10^4	2.2×10^4	1.8×10^4	1.8×10^4	25
K	1	1.7×10^4	1.9×10^4	1.9×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	5
	2	1.6×10^4	1.8×10^4	1.9×10^4	1.8×10^4	1.9×10^4	1.8×10^4	5
	3	1.4×10^4	1.6×10^4	1.6×10^4	1.6×10^4	1.5×10^4	1.5×10^4	6
	4	1.9×10^4	1.5×10^4	1.9×10^4	1.7×10^4	1.8×10^4	1.7×10^4	5

	5	1.8×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	4
L	1	1.0×10^4	7.2×10^3	8.2×10^3	5.2×10^3	5.7×10^3	8.3×10^3	9
	2	9.5×10^3	3.3×10^3	4.3×10^3	4.4×10^3	5.1×10^3	5.1×10^3	7
	3	1.3×10^4	5.1×10^3	8.1×10^3	7.5×10^3	8.5×10^3	8.3×10^3	7
	4	1.3×10^4	1.0×10^4	1.1×10^4	1.1×10^4	8.3×10^3	7.8×10^3	8
	5	9.8×10^3	8.5×10^3	8.7×10^3	7.5×10^3	9.0×10^3	9.8×10^3	9
M	1日	2.1×10^4	1.8×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	1.8×10^4	1.9×10^4	25
	2日	1.9×10^4	2.2×10^4	1.9×10^4	2.0×10^4	2.2×10^4	1.8×10^4	25
	3日	2.0×10^4	2.2×10^4	2.4×10^4	2.2×10^4	2.3×10^4	2.1×10^4	25
	4日	2.0×10^4	2.1×10^4	1.8×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	25
	5日	1.8×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.1×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4	25

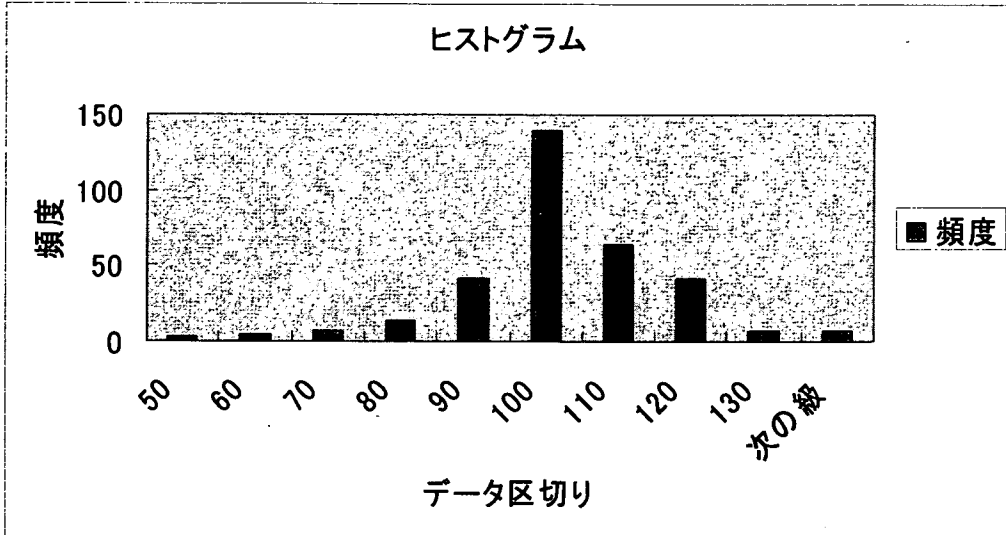
4) 基準値の1/5の菌数における添加菌数の回収率

実施機関	測定回数	添加菌数 (cfu/g)	添加回収率(70~120%)					回収率 平均
			1回	2回	3回	4回	5回	
A	1日	2.0×10^4	100	115	105	105	105	106
	2日	2.0×10^4	100	100	100	100	100	100
	3日	2.5×10^4	92	96	96	96	100	96
	4日	2.4×10^4	92	100	92	96	92	94
	5日	2.2×10^4	86	86	91	82	95	88
B	1日	2.2×10^4	100	100	105	95	86	97
	2日	1.8×10^4	117	117	128	106	106	115
	3日	2.2×10^4	91	91	91	91	91	91
	4日	1.7×10^4	112	124	112	100	112	112
	5日	2.4×10^4	83	92	83	75	67	80
C	1日	2.0×10^4	91	87	87	92	89	89
	2日	2.0×10^4	100	102	107	95	95	100
	3日	2.5×10^4	99	96	96	96	100	97
	4日	2.4×10^4	96	90	89	85	91	90
	5日	2.2×10^4	87	95	95	96	0.88	75
D	1日	2.0×10^4	110	115	120	115	120	116
	2日	2.1×10^4	100	100	105	100	95	100
	3日	2.0×10^4	100	100	105	105	105	103
	4日	2.1×10^4	100	95	100	100	95	98
	5日	2.1×10^4	100	100	100	105	100	101
E	1日	1.8×10^4	100	100	100	106	100	101
	2日	2.1×10^4	95	100	95	95	95	96
	3日	2.0×10^4	90	110	100	100	100	100

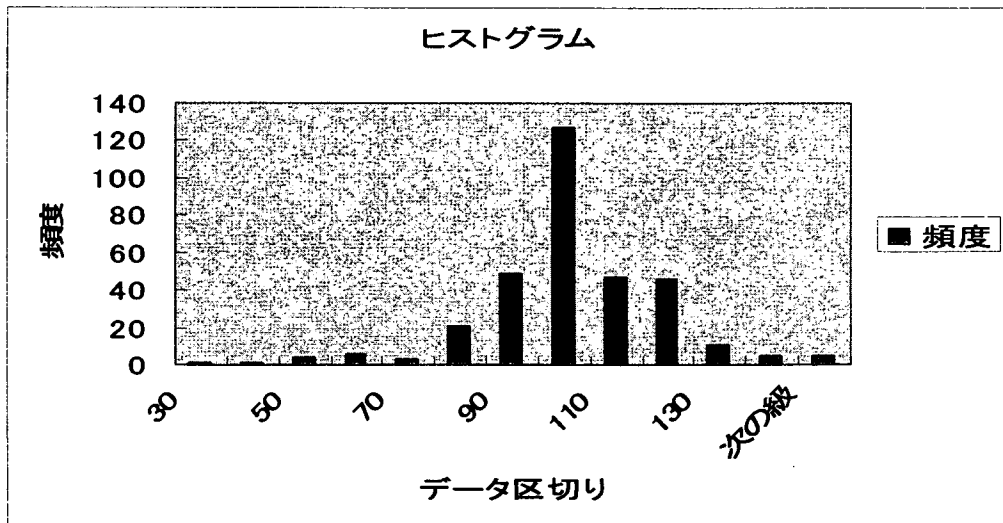
	4日	1.9×10^4	95	111	100	105	100	102
	5日	2.1×10^4	95	86	110	100	105	99
F	1日	1.9×10^4	111	105	105	100	105	105
	2日	2.0×10^4	100	100	105	95	100	100
	3日	2.1×10^4	100	100	100	95	100	99
	4日	2.0×10^4	100	105	100	105	100	102
	5日	1.8×10^4	100	106	106	100	117	106
G	1日	2.0×10^4	120	130	135	105	115	121
	2日	2.5×10^4	96	88	100	100	108	98
	3日	7.7×10^3	91	99	95	100	104	98
	4日	1.1×10^4	100	100	100	91	100	98
	5日	1.1×10^4	100	100	109	100	91	100
H	1日	2.1×10^4	110	100	101	101	100	102
	2日	1.6×10^4	112	112	131	125	119	120
	3日	1.3×10^4	131	138	146	138	146	140
	4日	7.6×10^3	145	145	145	130	130	139
	5日	1.9×10^4	126	121	116	121	126	122
I	1日	1.6×10^4	81	75	81	81	94	82
	2日	1.5×10^4	80	87	87	87	80	84
	3日	1.6×10^4	81	81	75	75	81	79
	4日	1.6×10^4	81	75	75	75	75	76
	5日	1.6×10^4	81	88	88	88	75	84
J	1日	2.2×10^4	91	87	77	77	100	86
	2日	2.4×10^4	83	83	79	83	83	82
	3日	2.0×10^4	110	100	105	110	100	105
	4日	2.4×10^4	104	92	100	88	88	94
	5日	2.0×10^4	105	95	110	90	90	98
k	1日	1.7×10^4	112	112	118	118	118	116
	2日	1.6×10^4	113	119	113	119	113	115
	3日	1.4×10^4	114	114	114	107	107	111
	4日	1.9×10^4	79	100	89	95	89	90
	5日	1.8×10^4	117	111	117	111	111	113
L	1日	1.0×10^4	72	82	52	57	83	69
	2日	9.5×10^3	37	47	47	51	52	47
	3日	1.3×10^4	46	58	58	61	44	53
	4日	1.3×10^4	71	73	79	64	71	72
	5日	9.8×10^3	94	89	76	90	98	89
M	1日	2.1×10^4	86	95	100	86	90	91

	2日	1.9×10^4	116	100	105	116	95	106
	3日	2.0×10^4	110	120	110	115	105	112
	4日	2.0×10^4	105	90	100	100	100	99
	5日	1.8×10^4	117	111	117	111	111	113

5) 基準値の菌数における添加菌数回収率のヒストグラム



6) 基準値の 1/5 の菌数における添加菌数回収率のヒストグラム



7) 大腸菌群検出試験結果

①大腸菌群添加菌数算定結果

実施機関	添加菌数測定回数		
	1	2	3
A	1.1×10^3 cfu/g	1.5×10^3 cfu/g	1.4×10^3 cfu/g
B	2.1×10^2 cfu/g	8.8×10^2 cfu/g	9.9×10^2 cfu/g

C	5.7×10^2 cfu/g	5.5×10^2 cfu/g	5.1×10^2 cfu/g
D	3.8×10^2 cfu/g	3.9×10^2 cfu/g	4.3×10^2 cfu/g
E	8.5×10^2 cfu/g	9.5×10^2 cfu/g	2.4×10^3 cfu/g
F	7.2×10^2 cfu/g	6.4×10^2 cfu/g	6.8×10^2 cfu/g
G	5.3×10^2 cfu/g	4.1×10^2 cfu/g	4.4×10^2 cfu/g
H	5.0×10^2 cfu/g	5.7×10^2 cfu/g	5.3×10^2 cfu/g
J	1.0×10^3 cfu/g	1.2×10^3 cfu/g	7.5×10^2 cfu/g
K	8.7×10^2 cfu/g	1.1×10^3 cfu/g	9.8×10^2 cfu/g
L	1.0×10^4 cfu/g	9.8×10^3 cfu/g	9.6×10^3 cfu/g
M	5.8×10^2 cfu/g	5.9×10^2 cfu/g	5.7×10^2 cfu/g

②大腸菌群形態観察による同定鑑別結果

試験菌	判定基準	試験結果		
		1	2	3
大腸菌群	グラム染色 (陰性)	陰性	陰性	陰性
	形態 (桿菌)	桿菌	桿菌	桿菌
	芽胞 (無芽胞)	無芽胞	無芽胞	無芽胞
	乳糖分解 (酸産生) (+)	+	+	+
	乳糖分解 (ガス産生) (+)	+	+	+
大腸菌群の判定 (該当・非該当)		該当	該当	該当

8) E. coli 検出試験結果

①E. coli 添加菌数算定結果

機関名	添加菌数測定回数		
	1	2	3
A	1.1×10^3 cfu/g	1.1×10^3 cfu/g	1.1×10^3 cfu/g
B	2.1×10^2 cfu/g	8.8×10^2 cfu/g	9.9×10^2 cfu/g
C	1.1×10^3 cfu/g	9.8×10^2 cfu/g	1.1×10^3 cfu/g
D	3.2×10^2 cfu/g	5.6×10^2 cfu/g	4.9×10^2 cfu/g
E	3.5×10^2 cfu/g	3.5×10^2 cfu/g	2.5×10^3 cfu/g
F	7.2×10^2 cfu/g	6.4×10^2 cfu/g	6.8×10^2 cfu/g
G	5.3×10^2 cfu/g	4.1×10^2 cfu/g	4.4×10^2 cfu/g
H	5.0×10^2 cfu/g	5.7×10^2 cfu/g	5.3×10^2 cfu/g
J	1.0×10^3 cfu/g	1.2×10^3 cfu/g	7.5×10^2 cfu/g
K	8.7×10^2 cfu/g	1.1×10^3 cfu/g	9.8×10^2 cfu/g
L	1.0×10^5 cfu/g	9.4×10^4 cfu/g	9.6×10^4 cfu/g
M	4.1×10^2 cfu/g	4.0×10^2 cfu/g	4.2×10^2 cfu/g

②E. coli 形態観察における同定鑑別結果

試験菌	判定基準	試験回数		
		1	2	3
E. coli	グラム染色 (陰性)	陰性	陰性	陰性
	形態 (桿菌)	桿菌	桿菌	桿菌
	芽胞 (無芽胞)	無芽胞	無芽胞	無芽胞
	EC 培地でのガス産生 (+)	+	+	+
	乳糖分解 (酸産生) (+)	+	+	+
	乳糖分解 (ガス産生) (+)	+	+	+
E. coli の判定 (該当・非該当)		該当	該当	該当

平成 18 年度 厚生科学研究費補助金（食品の安心・安全確保研究事業）

食品安全施策等に関する国際協調のあり方に関する研究

分担研究報告書

ISO ガイドラインに適合した内部精度管理試料の作製について

主任研究者 玉木 武 (社) 日本食品衛生協会理事長 食品衛生研究所長
分担研究者 松木 容彦 (社) 日本食品衛生協会
研究協力者 大島 赴夫 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所
鈴木 達也 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

これまでに作製した寒天を用いた生菌数測定用試料について、接種菌の安定性確認を行った。また基材として用いる寒天のメーカーごとの相違について確認した。*B. subtilis* を添加した寒天基材の作製 13 ヶ月後における生菌数を測定したところ、作製時と比較して大幅な菌数変動は認められなかったことから、寒天を用いた生菌数測定用精度管理試料は少なくとも 13 ヶ月は安定した菌数を得られるものと考えられた。しかしながら、作製後 3 ヶ月から冷蔵保存に伴い寒天基材の収縮が起こり、容器から解離するという現象が認められたことから、基材中の生菌数のみならず基材の物理化学的性状も長期間の保存においては重要な項目であることが強く示唆された。また市販されている 5 社の寒天粉末を用い、同様に生菌数測定用試料を作製し、基材の強度および基材中での添加菌の分散性について検討したところ、同一濃度においても基材の強度に差が認められ、かつストマッカー処理後の寒天粒子と添加菌の吸着が起こっている可能性が示唆された。以上のことから、寒天を基材とした生菌数測定用試料は長期間に亘り極めて安定ではあるものの、どのメーカーの寒天粉末を用いるかによって検査結果にも大きな影響を与える可能性があることが考えられた。

A. 研究目的

食品汚染化学物質等の測定はこれら汚染化学物質等のヒト体内への摂取に伴う健康被害等を評価するうえで重要である。そのためにも日常実施される食品汚染化学物質等の検査技術の維持または分析結果の信頼

性確保は検査機関にとって必須であり、日頃からの内部精度管理の実施や定期的な外部精度管理への参加によって担保されるものと考えられる。しかしながら、検査方法を確認するための比較対象になると考えられる認証標準物質は非常に高価であり、し

かも鉄鋼関連や環境関連検査においては認証標準物質の供給が先行しているものの、食品検査に関わる標準物質としては十分に活用されているとは言いがたい。とりわけ微生物学検査における認証標準物質は数が少なく、実際の検査にすぐに応用しうるものではないと考えられる。そのためまず始めに内部精度管理試料の作製を行うこととし、安定性等の基本性状の確認検討を進め、最終的には認証標準物質としての性能を満たすか否かについて検討することとした。また、本研究では定量検査を主とするため、生菌数測定用試料について検討することとした。

昨年度における検討から、微生物学検査における標準試料あるいは内部精度管理試料を作製するためには、その生菌数をどのように担保するのか、また長期間の安定性をどのように保証するのかについて大きな問題となりうるものが考えられた。そこで、本年度は昨年度から引き続き寒天を基材とした内部精度管理試料の安定性確認を行うこととし、さらに基材として使用する寒天のメーカー間の相違についても併せて解析することを目的とした。

B. 研究方法

1. 生菌数測定用試料の作製

生菌数測定用試料として寒天基材を採用し、添加菌は市販の *Bacillus subtilis* 芽胞液を使用した。すなわち、安定化剤を加えた 0.65% 寒天溶液を作製し、これをガラス瓶に 100 mL ずつ分注した。121°C、30 分間の高圧蒸気滅菌処理を行った後、室温にて放置することにより約 50°C まで基材の温度を下げた。これに最終濃度が約 1×10^3

または 1×10^4 colony forming units (cfu)/g となるように調整した *B. subtilis* 芽胞液を 1 mL 加え、完全に固化するまで室温にて放置したものを生菌数測定用試料とした。なお、寒天基材のみを高圧蒸気滅菌処理した後に生菌が確認されないことを、寒天平板混釈法により確認した。

また、基材として使用する寒天のメーカーは 5 社を採用した。

2. 物理化学的性状の確認

作製した生菌数測定用試料は輸送による変質を考慮し振とう器を用いた基材の崩壊の有無について確認した。すなわち、振とう器に試料瓶を立てて設置し、100 rpm にて 24 時間の往復振とうを行い、基材の崩壊が認められなかった場合には、さらに試料瓶を横にして同条件で往復振とうを行い、基材の崩壊の有無について確認した。

3. 生菌数測定

試料瓶より試作試料 10 g をストマッカー袋に秤量し、これに滅菌リン酸緩衝液を加え 1 分間のストマッカー処理を行い、測定原液を作製した。この原液 1 mL を滅菌リン酸緩衝液 9 mL に加えて十分攪拌した。測定原液およびその 10 倍段階希釈液について、それぞれ 1 mL ずつを滅菌シャーレに分注し、これに滅菌後あらかじめ約 45°C に保温した標準寒天培地を 15~20 mL 加えて混釈平板とし、寒天が固化した後、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養した。培養後に得られた集落数を計測し、生菌数を算出した。

なお、接種菌の安定性確認試験については作製から 13 ヶ月後の安定性について確認した。

C.,D. 研究結果および考察

1. 生菌数測定用試料の長期安定性

認証標準物質や内部精度管理試料として使用するためには、基材中での均一性はもちろん、長期間の安定性を確保しなければ、検査結果の経時的な判断をする対象として使用することはできない。そこで作製した試料の安定性確認のため、昨年度から引き続き 4℃にて冷蔵保存した生菌数測定用試料について解析を行った。その結果、図 1 に示したとおり、寒天基材中に接種した添加菌 (*B. subtilis*) は作製後 7 ヶ月目に 5 ヶ月目と比較すると減少傾向にあるものの、全体的にはばらつきの範囲内にあるものと考えられることから、本生菌数測定用試料は作製から 13 ヶ月後においても極めて安定的に回収することができた。このことから生菌数の安定化という意味においては十分に保証しうるものであり、内部精度管理試料としての使用に耐えうるものと考えられた。しかしながら、物理化学的性状を確認したところ、保存開始から 3 ヶ月以降において、寒天基材の収縮が認められたことに加え、冷蔵保存した試料を室温に放置することにより、寒天基材中に気泡が生じた。これは時間の経過とともに消失し、通常の形状へと戻るものの、その過程で容器中に水分の流出を認めることから、より物理化学的性状の安定な基材を作製する必要があることが示唆された。

2. 生菌数測定用試料における寒天のメーカー間の相違

試薬として市販されている寒天はメーカーによりその精製度が異なることがあり、これが結果として寒天基材作製における強度や添加菌の均一性に影響を及ぼす可能性

が考えられる。そこで、細菌用粉末寒天を販売している 5 社より寒天粉末を購入し、これらを用いた生菌数測定用試料の作製を行い、物理化学的性状および添加菌の回収について検討した。なお、物理化学的性状の確認として、振とう器を用いた縦方向および横方向への 24 時間振とう、スパーテルを用いた破碎性、ストマッカー処理による分散性を指標とした。また、ストマッカー袋についてもフィルターの有無に伴う菌数の変動も併せて検討した。その結果、表 1 および 2 に示したとおり、全ての寒天基材において容器を立てた状態で振とうを行っても全く基材の崩壊は認められなかった。これに対して、A および C の寒天基材において容器を横にしての振とうを行った際に基材の崩壊が認められたが、これ以外の寒天については 24 時間の横向き振とうによっても基材の崩壊は一切認められなかった。また同一条件下で振とうした際に寒天基材表面への水分の流出について確認したところ、いずれの寒天基材においても横向き振とうを行った場合に水分の流出が認められた。一方、基材の調製時における寒天粉末の溶解性について観察したところ、B および D において溶解性が他と比較すると悪かった。さらに固化後のスパーテルを用いた破碎性について確認したが、寒天粉末の溶解性の悪かった B および D において他の寒天基材と比較すると若干悪いものであった。なお、これは寒天そのものが他のものと比較して堅かったことが原因であると考えられた。スパーテルによる破碎後、ストマッカー袋に入れ、1 分間のストマッカー処理を行った。その結果、B を除いた 4 種の寒天基材では比較的良好な溶液中への分散性