

Table A. 協力機関の試験成績

(死亡匹数/注射匹数)

機関 ID	陽性試料	陰性試料	陽性試料死亡時間 (h)
1	3 / 3	0 / 3	3~3.5
2	3 / 3	0 / 3	<21
3	3 / 3	0 / 3	8~13
4	2 / 3	0 / 3	<18
5	3 / 3	0 / 3	<1
6	2 / 3	0 / 3	<18.5~22
7	3 / 3	0 / 3	2

ホタテ細切（ホモジナイズ）用ミンチ機



中腸腺をミンチ中

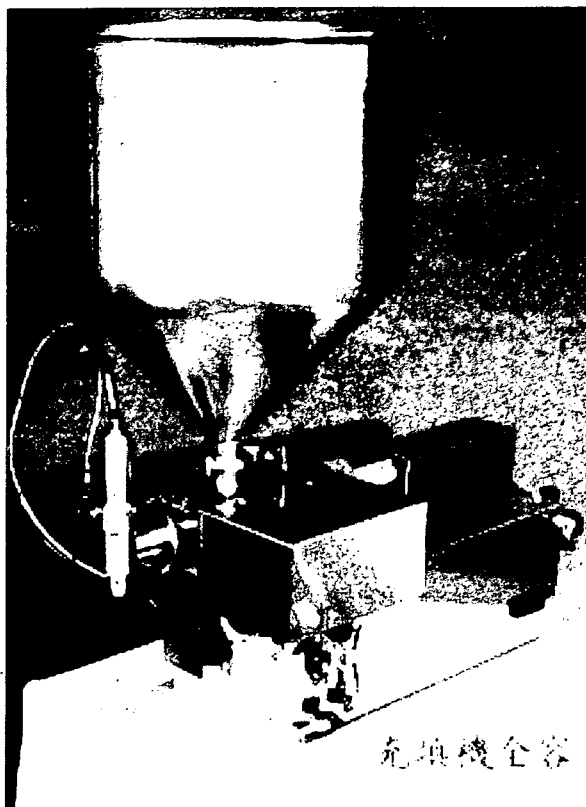
半解凍状態のため金属部が汗をかいている



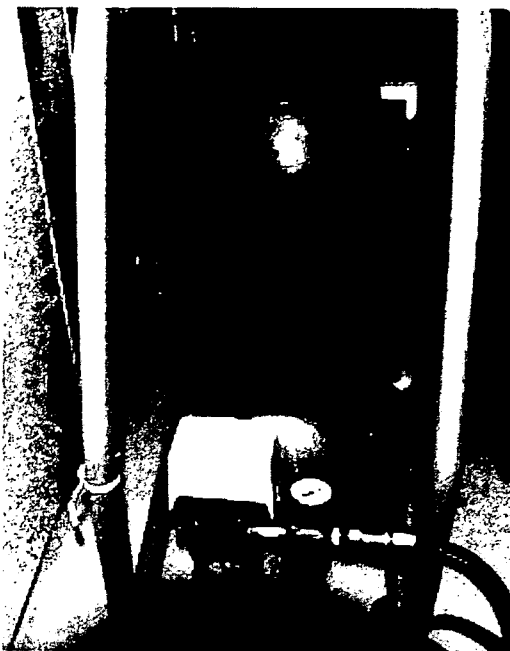
図7 ホタテ剥き身及び中腸線の電動ミンチ機による細切の様子

試料充填中

充填機全容



動力源のエアコンプレッサー



充填の様子

(充填操作はフットスイッチによる)

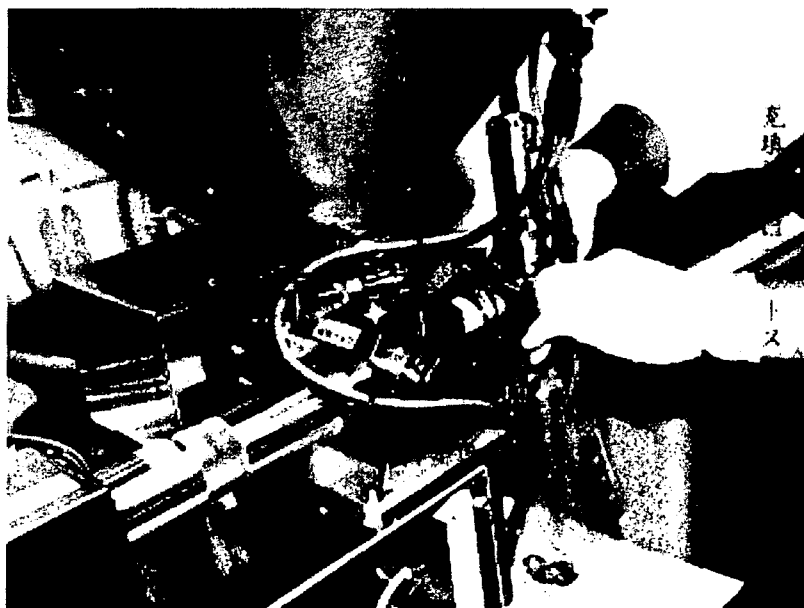


図8 充填機によるホタテホモジネートの充填の様子

サンプル融解の前にお読みください

下痢性貝毒試験精度管理調査用試作試料使用要領

この度はお忙しい中、私共の調査にご協力頂きまして、誠に有難う存じます。

本試料の検査は、食品衛生検査指針の下痢性貝毒検査法によることを想定して作製しておりますが、原則、貴機関で使用されているSOPに則り実施して下さい。

以下、本試料に限り必要と思われる注意事項を記載致します。

この度お送り致しました下痢性貝毒試験用のサンプル PDWH-00 は、アルミラミネート袋を二段に仕切り、上段には毒素を浸潤しました濾紙（バイアル入）が、下段には一袋につき約120gのホタテホモジネートが入っております。

試験実施までは、 -70°C 程度の超低温フリーザに保管をお願い致します。

試験手順概要

1. お送りしましたアルミラミネート袋を水道水（湯は不可です）に浸けて解凍し、解凍後に袋上部よりバイアル瓶を取り出す。
2. アルミラミネート袋下段の口を、ハサミでなるべく上側を切って開ける。
3. 2. の中身を全量（120gとして秤量は省略して下さい）ホモジナイザーカップなどにあけ、袋の内壁は適宜アセトンで洗い、洗い液を同じホモジナイザーカップに合わせ入れる。
4. 1. で取り出したバイアル瓶¹⁾より濾紙を取り出して3. のホモジナイザーカップ等に入れ、バイアル瓶を適宜アセトンで洗浄し、洗い液を同じホモジナイザーカップ等に合わせ入れる。
5. 4. についてアセトン抽出を行い（アセトン量は、3.、4. で使用した量も考慮する事。）、減圧乾涸の後、エーテル-水分配し、エーテル画分を再び減圧乾涸する。
6. 5. で最終的に減圧乾涸した残渣は1% tween60²⁾ 添加生理食塩水と混和し、全量6mlとし、試験液とする。
7. 6. で得られた試験液を3匹のマウス³⁾に1ml/マウス、腹腔内注射し、24時間時点での生死を記録する。
8. 得られた結果〔3匹中の死亡数。可能な範囲で注射後生存時間（推定可）〕を別紙「試験結果回答用紙」にご記入のうえ、FAXにてご返送下さい。

※ なお、ご不明の点は、03-XXXX-XXXX 00 までご連絡下さい。不在の場合は、留守電メッセージへ、ご連絡先を入れていただければ幸いです。

1) : バイアル瓶については現在取り出しやすいものを検討中です。

2) : Polyoxyethylenesorbitan Monostearate

3) : マウスは20g未滿で出来るだけ20gに近い個体をご使用下さい。

FAX: 03-XX00-XXXX

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 第二室
町井研士 行

精度管理調査用試料性能調査結果回答用紙

機関番号

試料記号	死亡数	各マウスの生存時間(推定可)*
PDWH- 1	/3	
PDWH- 2	/3	

*: 観察可能な場合のみで結構です。

(1) 試料到着時のドライアイスの残存状況

(1. 全く無い、2. 差し支えない程度に残存 3. 十分残存)

(2) 試料の凍結の状況

(1. 全体が融解、2. やや温度高いが凍結 3. 完全凍結)

(3) 試料到着から試験実施までの日数及び保管庫の温度

(___日、 ___℃)

(4) なお、本製品は標準物質が高価である等の事情で、担当機関が作製し、実際に皆様にご利用頂く際には、かなり高価になる事が予想されます。その際の価格(成績評価資料作成費等含む)として、やむを得ないと思われる価格の上限額(外部精度管理調査が義務であってもここまでという額)のお考えをお教え下さい。

(1. 10万円 2. 20万円 3. 30万円 4. その他 ___万円)

(5) ご意見等

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 19 年度 分担研究報告書

食品外部精度管理調査における適性調査試料作製と信頼性確保に関する研究

- （その 1）理化学的検査調査試料の作製に関する研究
- （その 2）食品基材中の黄色ブドウ球菌の安定性確保に関する検討
- （その 3）食品中のアレルギー関連物質検査の外部精度管理に関する調査試料の作製検討

分担研究者 大島 赴夫

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

分担研究報告書(平成 19 年度)

食品外部精度管理調査における適性調査試料作製と
信頼性確保に関する研究(その 1)

—理化学的検査調査試料の作製に関する研究—

主任研究者	遠藤 明	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	理事長
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	渡辺 卓穂	(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	室長
	勝村利恵子	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	高坂 典子	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

研究要旨

適正な調査試料作製は精度管理調査を行なう上で非常に重要であり、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。また、新規な基材の開発も実情に則して開発していかなければならない課題である。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料を作製することを目的とし、実分析に即した調査試料の作製を試みた。調査試料として、野菜ペースト(有機リン系農薬)及び食肉(サルファ剤)について均一性、回収率等の検討を行った。有機リン系残留農薬調査試料の基材として、かぼちゃ及びえだまめペーストを比較した結果、2種類の有機リン系残留農薬いずれにおいても、かぼちゃペーストで良好な回収率と均一性が認められた。また、かぼちゃペースト中でのクロルピリホスおよびフェントロチオンの冷凍 49 日間の安定性はそれぞれ 97.8 %及び 107.8 %と調査試料に適正であった。一方、残留動物用医薬品用基材として食肉(トリササミ肉)の調査試料としての可能性について、サルファ剤を用いて検討を行った。10 %水添加することで、均一なトリササミペーストができた。10 %水添加ペーストにおいて、8種のサルファ剤の回収率は約 80 %以上となり、調査試料に使用可能であることが示された。さらに、国内基準のあるスルファジミジンを用いて個別法で分析検討した結果、回収率は約 80 %、CV2.9~5.4 %と調査試料として用いることが可能であることがわかった。

A. 研究目的

食品の安全性を確保するためには、試験・検査等の信頼性の確保が重要である。食品衛生法により、それぞれの検査機関は、業務管理について具体的事項を定め、試験・検査等の信頼性の確保が求められている。信頼性の確保のためには、外部・内部精度管理調査が重要な項目である。この精度管理調査を実施するためには、検査対象物質の濃度が均一で、検査期間において濃度が安定である調査試料が求められる。そこで、検査対象物質の濃度が均一で安定な調査試料を開

発するために以下の検討を行った。

B. 研究方法

1. 有機リン系残留農薬調査試料の検討

かぼちゃ及びえだまめを調査試料基材として、2種の有機リン系農薬を用いて調査試料の作成法及び2種類の基材の比較検討も行った。

1) 試料基材および試薬

かぼちゃ及びえだまめ(マイクロペースト状食料):株式会社 新進、クロルピリホス、フェントロチオン:残留農薬分析用、関東化学株式会社、

アセトン、ヘキサンおよびアセトニトリル：残留農薬分析用、和光純薬工業株式会社

2) 試料作製

かぼちゃペースト 5 kg をステンレス製ボール (20 L 容) に採り、これに 2 種の有機リン系農薬 (クロルピリホス、フェニトロチオン) のアセトン溶液 5 mL を添加した。ハンドミキサーで 5 分間ずつ 3 回攪拌した後、ポリプロピレン製容器に小分けにし、凍結した (作製予定濃度 クロルピリホス: 0.15 ppm、フェニトロチオン: 0.25 ppm)。小分けした容器から無作為に 10 個ずつ取り出して、それぞれ繰り返し 2 回、有機リン系農薬を測定し、均一性および安定性を調べた。

えだまめペーストは 10 kg をステンレス製ボール (20 L 容) に採り、これに 2 種の有機リン系農薬 (クロルピリホス、フェニトロチオン) のアセトン溶液 10 mL を添加した。かぼちゃペーストと同様にハンドミキサーで 5 分間ずつ 3 回攪拌した後、ポリプロピレン製容器に小分けし、凍結した (作製予定濃度 クロルピリホス: 0.15 ppm、フェニトロチオン: 0.25 ppm)。

3) 測定方法

試料 20 g を秤量してオムニミキサーを使用し、アセトン 100 mL を加えて 5 分間抽出した。ろ過を行い、残渣に新たなアセトン 100 mL を加えて 5 分間抽出の操作を 2 回繰り返してろ液と合わせて、約 25 mL まで減圧濃縮した。濃縮液に 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えた後、ヘキサン 100 mL で振とう抽出し、20% 酢酸エチル含有ヘキサン 100 mL ずつで、2 回、振とう・抽出 (10 分間) した。有機溶媒層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下 (40°C 以下) で濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をヘキサン 20 mL に溶解してガスクロマトグラフに供した。

ガスクロマトグラフ条件

ガスクロマトグラフ：島津製作所 GC-17A (炎光光度型検出器付)

カラム：DB-210 (内径 0.25 mm、長さ 30 mm、膜厚 0.25 μ m)

注入口温度：250°C、検出器温度：325°C

カラムオープン温度：60°C (2 min)、昇温 20°C/min、160°C (0 min)、昇温 5°C/min、230°C (1 min)、キャリアーガス：ヘリウム、流量：1.3 mL/min 線速度：32 cm/sec、水素：100 kpa 空気：70 kpa、試料導入：スプリットレス

2. 残留動物用医薬品のための調査試料基材の基礎的検討

残留動物用医薬品の検査に使用する調査試料として、食肉にサルファ剤を添加して、基材としての食肉の利用の可能性を検討した。

1) 基材および試薬

食肉：市販の鶏肉 (ササミ)、スルファジアジン (SDZ)、スルファメラジン (SMR)、スルファジミジン (SDD)、スルファメキシピリダジン (SMPD)、スルファモノメキシシン (SMMX)、スルファメキサゾール (SMXZ)、スルファジメキシシン (SDMX)、スルファキノキサリン (SQ)：残留動物用医薬品検査用、関東化学株式会社、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノール、無水硫酸ナトリウム、ギ酸、リン酸一ナトリウム：試薬特級、和光純薬工業株式会社、アセトニトリル、メタノール：高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業株式会社、ボンドエルトアルミナミニカラム (500 mg)：バリアン

2) 試料作製

鶏ササミ肉をミンチにして、マルチミルグラインダー (グローエンジニアリング製) を使用し、水無添加ペースト肉および 10% 水添加ペースト肉 2 kg にそれぞれ 8 種サルファ剤を含むメタノール溶液 (10 μ g/mL) 20 mL 及び (50 μ g/mL) 40 mL を添加し、良く混合した。作製予定濃度は、低濃度試料 (0.1 μ g/g)、高濃度試料 (1 μ g/g) に調製し、回収率、均一性を調べた。また、10% 水添加ペースト肉 500 g に SDD を含むメタノール溶液 (5 μ g/mL) 10 mL を添加し、良く混合した。作

製予定濃度は 0.1 µg/g に調製した。

3) 測定方法

測定操作は食品衛生法に準拠した。すなわち、8種サルファ剤では、試料 5g を採取して酢酸エチル 20 mL ずつで3回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、濃縮乾固した。残渣をアセトニトリル 50 mL で溶解した後、アセトニトリル飽和ヘキサン 50 mL ずつ2回抽出して、油脂分を除去した。アセトニトリル層を濃縮乾固し、高速液体クロマトグラフの移動相に溶解して、高速液体クロマトグラフで測定した。また、SDD は、試料 5 g を採取してアセトニトリル 25 mL ずつで3回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、アセトニトリル飽和ヘキサン 50 mL ずつ1回抽出して、油脂分を除去し、濃縮乾固した。アセトニトリル層を濃縮乾固し、アセトニトリル:水(19:1)に溶解して、アルミナミニカラムで精製し、高速液体クロマトグラフで測定した。

4) 精製方法

アルミナミニカラム(500 mg)に、アセトニトリル:水(19:1)10 mL でコンディショニングし、乾固した試料抽出物をアセトニトリル:水(19:1)1 mL に溶解し、カラムに注入し、流出液は捨てる。このカラムにアセトニトリル:水(17:3)10 mL を注入し、流出液をすりあわせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下で減圧乾固した。これをアセトニトリル:0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液の混液(3:17)1 mL に溶解させ、高速液体クロマトグラフで測定した。

高速液体クロマトグラフ条件

8 種同時分析法

高速液体クロマトグラフ:島津製作所 LC-6A、検出器:島津製作所 SPD-6A、検出波長:272 nm、カラム:mightysil RP-18(H)(150×4.6 mm、5 µm)、移動相:0.05mol/mL ギ酸溶液:アセトニトリル:メタノール 75:15:10、流量:0.9 mL/min

スルファジミジン個別分析法

高速液体クロマトグラフ:島津製作所 LC-10A、検出器:島津製作所 SPD-10A、検出波長:272 nm、カラム:mightysil RP-18(H)(150×4.6 mm、5 µm)、移動相:0.025mol/L アセトニトリル:リン酸一ナトリウム溶液:3:17、流量:0.8 mL/min

(倫理面への配慮)

食の安全・安心に係わる研究であり、特に倫理面への配慮を必要としなかった。実験者および環境への配慮としては、有害な溶媒(ベンゼン等)を使用しなかった。

C. D. 研究結果及び考察

1. 有機リン系残留農薬調査試料の検討

有機リン系農薬(クロルピリホス、フェントロチオン)を添加したかぼちゃペースト及びえだまめペーストの小分けした容器から無作為に 10 個ずつ採取し、それぞれ 2 回繰り返し測定し、均一性を調べた。

かぼちゃペーストではクロロピリホスおよびフェントロチオンはそれぞれ 87.3 %、75.6 %の回収率を示した。F 値はクロロピリホス 2.74、フェントロチオン 1.88 であった(表 1、2)。一方、えだまめペーストでは、回収率はクロロピリホス 63.2 %、フェントロチオン 82.6 %となり、F 比はそれぞれクロロピリホス 1.10、フェントロチオン 1.23 であった(表 3、4)。これらの F 比は、いずれの場合でも 5%水準(F 値 3.02)より小さくなり、精度管理調査に使用する調査試料として均一な濃度を確保することができた。しかし、えだまめペーストにおいてクロロピリホスの回収率は 70 %以下となり、また、CV も 10 %以上と調査試料としては適当でないことが示唆された。一方、フェントロチオンは F 比、回収率、CV はいずれも許容を満たしていた。かぼちゃペーストおよびえだまめペーストにクロロピリホスおよびフェントロチオンを

添加し作成後、49 日間の冷凍保管における安定性を調べた結果、作製当日の濃度に対する作製 49 日後の濃度は、かぼちゃペーストではクロロピリホス 97.8 %、フェニトロチオン 107.8 %であった。一方、えだまめペーストではクロロピリホス 112.0 %、フェニトロチオン 61.1 %となると共に、CV はそれぞれ 11.8 %、30.3 %となり、調査試料として不適切であることがわかった。これらの原因については、詳細な検討が必要であると考えられた。以上の結果より、かぼちゃペーストにクロロピリホス、フェニトロチオンを添加した調査試料は、今回回収率が低かったものの十分な期間の安定性が確認された。

2. 残留動物用医薬品のための調査試料基材の基礎的検討

鶏ササミ肉をミンチし、マルチグラインダーを使用しペースト状にし、サルファ剤 8 種 (SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMX、SDMX、SQ) を添加混合し、均一性を調べた。サルファ剤 8 種の標準品のクロマトグラムを図 1 に示す。サルファ剤の回収率および均一性に対する基材への水添加の影響を調べた (表 5)。サルファ剤添加濃度は 1 ppm で 20 回測定した。水無添加基材ではサルファ剤 8 種 (SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMX、SDMX、SQ) の回収率はそれぞれ 67.5、64.4、72.6、62.8、71.6、69.0、70.7 および 74.7%と低い回収率を示した。また、CV は約 10 %とばらつきが大きくなった。また均一性を示す F 比は、SDD、SMPD および SDMX で 5 %水準より小さくなったが、他のサルファ剤は 5 %水準を超え、均一性が認められなかった。一方、10 %水添加した基材では、水無添加に比べサルファ剤の回収率は約 10 %程良好となった。また、CV もいずれのサルファ剤でも 6 %以下とばらつきは改善され、F 比は 0.32~1.66 と均一な基材となった。よって、水を添加することで均一な基材の作製が可能となった。そこで、さらに 10 %水添加基材を用い、8種サルファ剤添加し

た低濃度試料 (0.1 ppm) を作製し、回収率と均一性を検討した (表 6)。いずれのサルファ剤も約 80 %以上の回収率を示し、CV は全体的にやや大きい、F 比はいずれも 5 %水準より小さい値となり、均一性のあることが確認された。これらのサルファ剤中、国内基準のあるスルファジミジン (SDD) についてさらに検討した。公定法に準拠し、10 %水添加ペースト肉に SDD を 0.1 ppm および 0.05 ppm 添加し、個別分析法により回収率の比較を行った (表 7)。図 2 に SDD のクロマトグラムを示す。ブランクのクロマトグラム上に SDD を妨害するピークは認められなかった。0.1 ppm および 0.05 ppm 添加した場合の回収率はそれぞれ 80.0 %、78.2 %であった。これはサルファ剤の同時定量した場合と回収率に差は認められなかった。また、CV も 5.4 %、2.9 %と良好となった。以上より、10 %水添加トリササミペーストを基材とする SDD を調査試料として用いることが可能であることがわかった。

E. 結論

精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料を作製することを目的とし、実分析に即した調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

1. 収穫後に水蒸気処理を行ったかぼちゃ及びえだまめペースト (マイクロペースト状食材) を使用し、有機リン系農薬 2 種 (クロロピリホス、フェニトロチオン) を添加混合し、かぼちゃペーストで均一な濃度の試料を作製できることが分かったが、えだまめペーストでは、これら有機リン系農薬の基材として風適当であることがわかった。また、かぼちゃペーストに添加した農薬の安定性も確認され、精度管理調査における適正な試料であることがわかった。

2. 鶏ササミ肉をミンチし、マルチグラインダーを

使用し、サルファ剤 8 種 (SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMXZ、SDMX、SQ) を添加混合し、試料作製し、基材に 10 % 水添加することで良好な均一性が得られた。また、SDD を調査試料とすることが可能であることが示された。

F. 健康危険情報

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

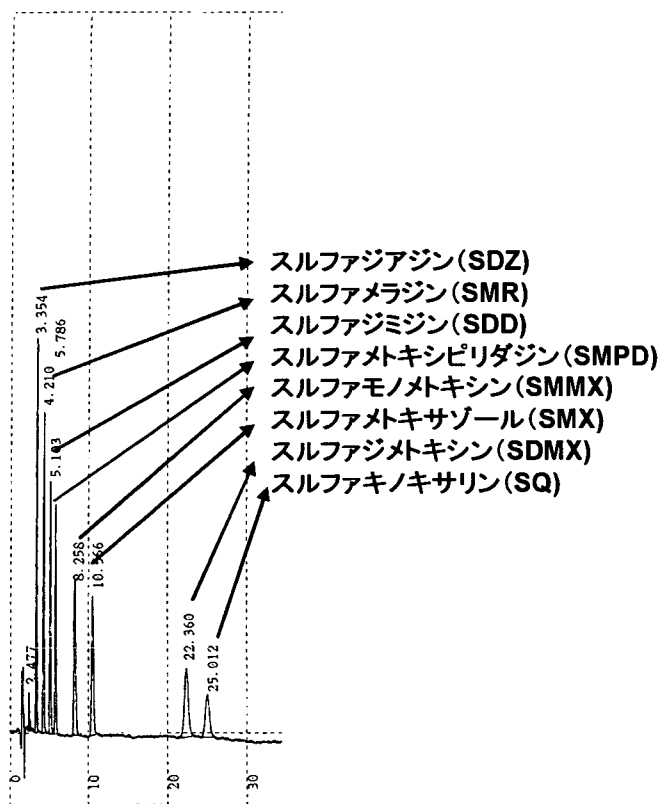


図1 サルファ剤標準品のクロマトグラム

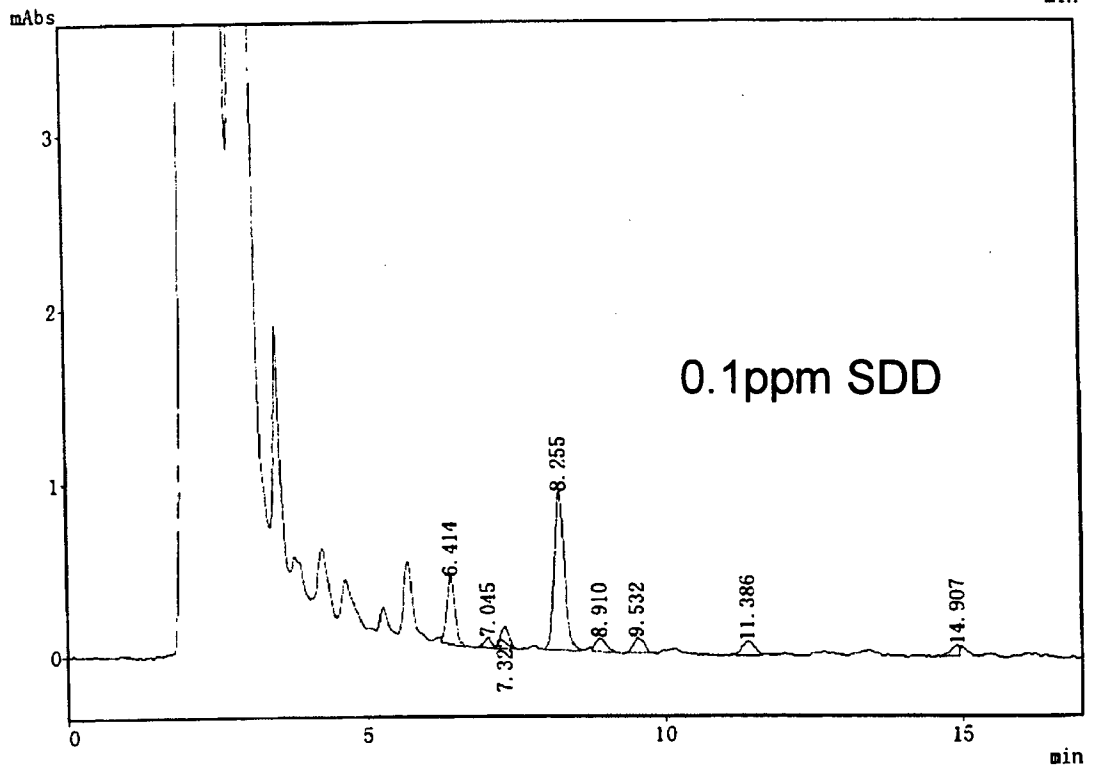
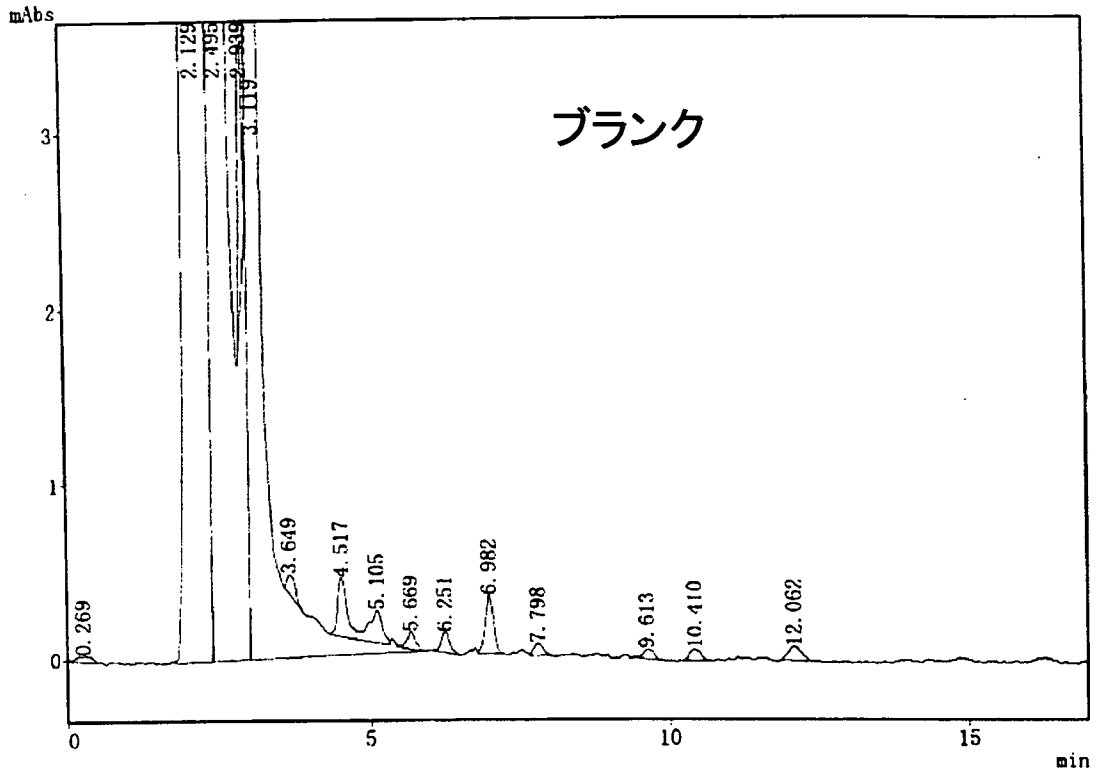


図2 鶏ササミ肉ペースト中の無精製スルファジミジンのクロマトグラム

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料の作製と
信頼性確保に関する研究(その 2)

－食品基材中の黄色ブドウ球菌の安定性確保に関する検討－

主任研究者	遠藤 明	(財)食品薬品安全センター	理事長
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
研究協力者	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 室長補佐
	山田 健一	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	中阪 聡亮	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	山本 奈々美	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	梶原 三智香	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員

研究要旨

黄色ブドウ球菌の検査を対象とした食品衛生外部精度管理調査の実施にあたり、黄色ブドウ球菌のための基材として数種の肉製品を選択し、基材への菌接種に伴う均一性ならびに冷蔵保存した際の安定性について検討し、試験菌の増減を抑制した安定な調査試料の提供のための条件検討を行った。精度管理試料の基材として採用するにあたり、市販の蒸し鶏、とりそぼろおよびミートボールを高圧蒸気滅菌処理し、基材の性状の変化を観察した。その結果、とりわけそぼろにおいて著しい基材の黒変が認められたことから、基材として使用することは難しいものと考えられた。さらにこれらの高圧蒸気滅菌後の基材について無菌性を確認したところ、ミートボールの一部で菌の発育が認められた。これまでに黄色ブドウ球菌検査用基材として採用しているマッシュポテト、ならびにハンバーグ、蒸し鶏、ミートボールについて *S. aureus* あるいは *S. epidermidis* を添加し、冷蔵保存することにより安定性を観察した。その結果、蒸し鶏を除く 3 基材では菌液接種後 35 日目においても 1 オーダーの菌数減少に留まった。

以上の結果から、市販のハンバーグまたはミートボールを用いることにより、黄色ブドウ球菌の定性検査に使用することができるものと考えられた。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査(特定微生物検査)試料の作製にあたり特に考慮しなければならない事項として、「実食材を基材とした調査試料の開発」と「試験菌(標準菌株)の選択」ならびに試験に用いる培地の組み合わせが挙げられる。これまで黄色ブドウ球菌検査用調査試料としてマッシュポテトを採用してきたが、接種菌の安定性という面から判断すると、調査試料として適した基材であると考えられるが、現実的な食材であるとはいえなかった。これまで他の調査項目においては、実食材に近似した調査試料の作製を行ってきた。大腸菌群検査および大腸菌検査用試料では加熱食肉製品を対象とした市販ハンバーグを採用し、外部精度管理調査試料として使用している。実食材を基材として採用し調査試料を作製する場合には、基材の変質抑制や接種菌の安定性について気を付ける必要があるが、試験菌を人為的に添加した食材中での汚染の分布は、自然汚染によるものとは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。加えて採用された検査法(通常選択される試験培地の組み合わせを含む)で確実に菌を検出することができるような調査試料であることが必須となる。

そこで今年度は食品・添加物等規格基準に示されている食品カテゴリーのうち、黄色ブドウ球菌検査における加熱食肉製品を対象とした調査試料の作製を行うこととし、市販の肉製品について滅菌後の物性変化ならびに試験菌添加後の安定性について検討することとした。

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 2

菌種を用いた。

Staphylococcus aureus HIC 11011

Staphylococcus epidermidis HIC 11012

2. 基材

黄色ブドウ球菌検査用調査試料の作製には、市販の蒸し鶏、とりそばろ、ミートボールおよびハンバーグの計 4 種を用いた。なお、これらの基材については使用前に 121°C で 30 分間の高圧蒸気滅菌を行ったものを以下の検討に使用した。

3. 試料の調製

各試験菌液 (10^8 colony forming units (cfu)/mL) に安定化剤を加え、これに市販の蒸し鶏、ミートボール、ハンバーグを漬け込んだ後、直ちに取り出した。余分な水分を十分切った後、滅菌済み袋に試料を入れ、4°C にて保存した。

4. 加熱食肉製品の高圧蒸気滅菌後の性状変化および滅菌後の生菌の確認

市販されている魚肉練り製品 4 種について、121°C、30 分間の高圧蒸気滅菌を行い、滅菌後の製品の変化について目視により観察した。さらに滅菌後の基材を 14 日間冷蔵保存した後、これにソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)培地を加え、菌の発育の有無を確認した。

5. 加熱食肉製品中の生菌数ならびに大腸菌群検査による検出確認

各作製試料中の生菌数測定は、菌液接種後 7 日ごとに標準寒天培地を用い、常法に従って実施した。また作製試料について、作製 35 日後に黄色ブドウ球菌検査を公定法に従って実施した。すなわち、試料の 10 倍希釈溶液の 0.1mL を卵黄加マンニト食塩寒天培地に塗抹し、35±1°C で 24~48 時間培養した後、典型集落の有無を確認した。また、得られた陽性集落については簡易同定キットを用いた同

定検査を行い、黄色ブドウ球菌であることを確認した。

C. 研究結果

1. 調査試料の高圧蒸気滅菌後における物性変化

現在、基材として精度管理調査試料の作製に用いる場合、基材中に存在する他の微生物の影響を防ぐため、あらかじめ作製前に基材の高圧蒸気滅菌処理を行い、その後これに目的とする菌種を添加するという方法をとっている。そのため、基材として採用するうえで、高圧蒸気滅菌処理後の物性変化が小さいことは重要なポイントとなる。そこで、市販の蒸し鶏、とりそばろ、ミートボールの計3種の加熱食肉製品を121℃、30分間の高圧蒸気滅菌処理を行い、まず物性の変化について観察を行った(表1)。

その結果、とりそばろでは滅菌処理後に広範囲に炭化が認められたことから物性の点で基材としては適さないものと判断された。これに対して蒸し鶏では滅菌後の容器に脂肪分、水分の貯留が認められたが、概ね試料としての変質は少ないものであった。さらにミートボールでは一部に黒変が認められたものの、基材として採用するには問題ないと判断された。また、冷蔵保存14日後の基材の無菌性について確認したところ、ミートボールの一部で菌の増殖が認められた。

2. 調査試料の冷蔵保存時の安定性

滅菌処理後の3種の加熱食肉製品(蒸し鶏、ミートボール、ハンバーグ)およびマッシュポテトに*S. aureus*あるいは*S. epidermidis*を接種した後、冷蔵保存した際の菌数変化について35日目まで観察した結果を図1、および図2に示した。10⁸ cfu/mLの菌液に試料を漬け込んだ

後のそれぞれの検体における生菌数は約10⁶~10⁷ cfu/gであった。これを冷蔵保存することにより、全ての基材において菌数減少が認められたが、35日後において*S. aureus*では初発菌数と比べて1オーダーから2オーダー、*S. epidermidis*では2オーダーから3オーダーの菌数減少であった。また、全ての基材の中ではマッシュポテト、およびハンバーグが比較的安定な推移であった。

3. 調査試料からの黄色ブドウ球菌の検出

調査試料に菌液を接種した後、少なくとも35日間は接種菌数が確保されていることが明らかとなったことから、菌液接種後35日目に各調査試料について黄色ブドウ球菌検査を公定法に従って行ったところ、全ての*S. aureus*接種試料において、卵黄加マンニト食塩寒天培地上に典型的な陽性集落の形成を認めた。また、得られた陽性集落の生化学的性状を簡易同定キットを用いて行ったところ、*S. aureus*を確認し、外部汚染による発育集落ではないことを確認した。

D. 考察

マッシュポテトに代わる実食材を用いて黄色ブドウ球菌検査を行うための調査試料を試作し、高圧蒸気滅菌処理後の物性変化、冷蔵保存時の接種菌の安定性および公定法による添加菌の検出について検討を行った。

黄色ブドウ球菌検査用調査試料として加熱食肉製品を採用し、蒸し鶏、とりそばろ、ミートボールについて検討を行ったが、とりそばろを除く2種については滅菌方法を考慮することにより高圧蒸気滅菌処理後の変形ならびに変色を最小限に抑えることができることが明らかとなった。また、これまでの結果から、試験菌液に安定化剤を添加することにより低温保存にお

いても接種菌の死滅を少なくすることができることが明らかとなっていたため、本研究においても安定化剤を添加したが、初発菌数に比べて最大で、3~4 オーダーの菌数減少が認められた。大腸菌検査等においてハンバーグを採用した場合には、比較的菌数は安定しており、反対に増加傾向も認められていたことを考慮すると、黄色ブドウ球菌の場合には菌液調製における溶液組成や菌数の接種方法についても変更する必要があるものと考えられた。本来であれば試験菌の接種後に大幅な菌数変動がないものが望ましいと考えられるが、外部精度管理調査において最も懸念すべき事項は検査期間中に対象微生物が検出できなくなることである。この点から判断した場合、本研究において試作した調査試料は作製後 35 日目においても対象微生物を公定法により検出することができ、かつその生菌数は 10^4 cfu/g 程度であったことから、長期間の保存においても定性検査を行ううえでは大きな問題はないものと考えられた。しかしながら、検査法として黄色ブドウ球菌数検査も存在することから、今後接種菌の変動が小さい基材あるいは接種方法について検討する必要性があるものと考えられた。また、今回蒸し鶏を基材として用いて検討を加えてきたが、他の基材と比較すると、接種菌数の減少傾向が最も強いものであった。これまで、冷蔵保存することにより基材中の水分量が低下することにより、菌数減少が著しくなることが認められていることを考慮すると、菌数と水分活性との関係から蒸し鶏はもともと水分保持能力が高くなかったために、冷蔵保存後の安定性が他の基材と比較すると劣っていた可能性も考えられた。

E. 結論

食品衛生外部精度管理調査の黄色ブドウ球菌検査用調査試料として、これまでにマッシュポテトを基材として採用し、均一かつ安定な調査試料を提供してきたが、新たに加熱食肉製品を対象とした調査試料を作製すべく、市販製品に対象菌を添加することにより、その安定性ならびに基本性状について検討を実施してきた。

黄色ブドウ球菌検査用調査試料として蒸し鶏、とりそぼろおよびミートボールを採用し、高圧蒸気滅菌処理後の物性変化について確認したところ、とりそぼろでは著しい炭化が認められたため、基材として採用することは難しいと判断されたが、これ以外の 2 種の基材については若干の褐変が認められるものの大きな物性の変化は認められなかった。そこで、これらの 2 種の基材に他の試験においても実績のあるハンバーグならびにマッシュポテトを用い、これらを試験菌液 (*S. aureus* あるいは *S. epidermidis*) に漬け込み、これを冷蔵保存することにより接種菌の安定性について検討した。その結果、全ての基材において菌液接種後 35 日目まで初発菌数に比べて菌数は減少傾向にあるものの、公定法によっても接種菌を検出することは十分に可能であった。さらに新規で採用したミートボールおよび蒸し鶏では菌数と水分活性との関係からマッシュポテトと比較した場合に安定性は低かったが、菌液の接種方法等を検討することにより、より安定した菌数を確保できるものと考えられた。

以上のことから今回試作した加熱食肉製品は、黄色ブドウ球菌検査用調査試料として接種菌の安定性について考慮する必要はあるものの、外部精度管理調査試料として使用しうるものと考えられた。しかしながら、今後の食品衛生外部精度管理調査の実施にあたり、食品

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かつ安定な調査試料の作製を継続して検討する必要がある、これまでに問題とされてきている「指定された特定微生物に対する検査方法の適正とその検査方法の検証」、「標準菌株の選択と採用検査方法による特定微生物の検出の検証」、「調査試料の輸送条件における試験菌数の変動」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標準菌株を選択し、日常の検査試料に近似した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考えられる。

F. 健康危険情報

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 市販魚肉練り製品の高圧蒸気滅菌後の物性変化

製品	滅菌後の性状
蒸し鶏	脂肪分、水分が滅菌容器底部に貯留したが、基材の外観に大きな変化なし 14日後においても菌の発育は認められない
とりそぼろ	一部成分の炭化が認められた 14日後においても菌の発育は認められない
ミートボール	基材表面の黒変あり 14日後に一部で菌の発育あり

全ての基材について121℃、30分間の高圧蒸気滅菌を行った。なお、性状の変化は目視により行った。

滅菌後の菌数測定は、14日間の冷蔵保存後にSCD培地を添加することにより行った。

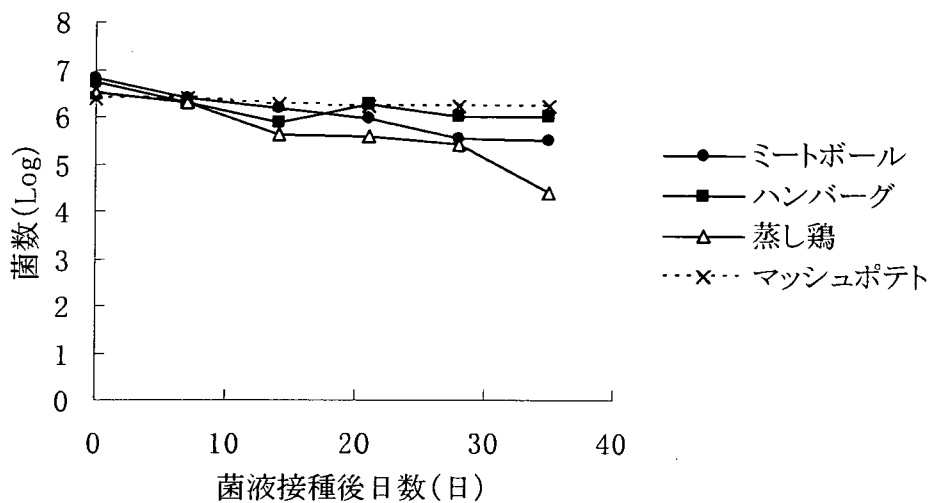


図1 *S. aureus* 接種した魚肉練り製品における菌数変化
 図中の数値は基材 1 g あたりの生菌数を示す。

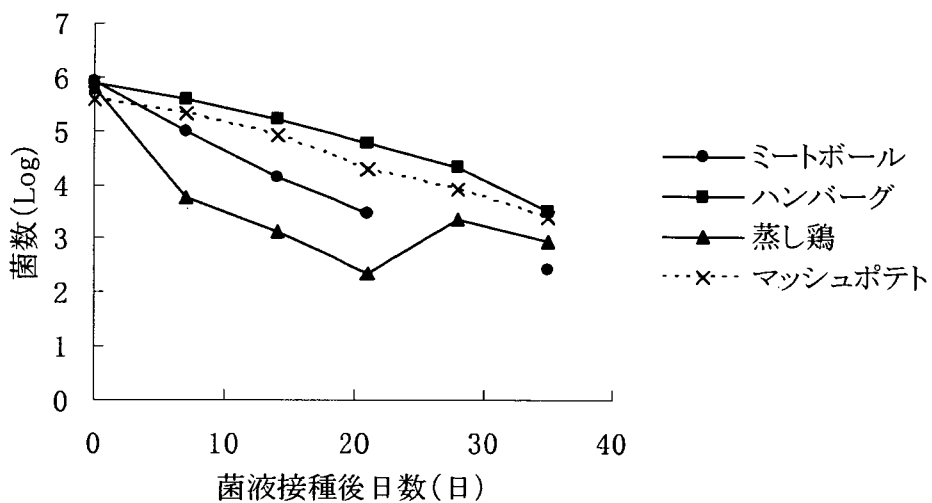


図2 *S. epidermidis* 接種した魚肉練り製品における菌数変化
 図中の数値は基材 1 g あたりの生菌数を示す。