

大腸菌群(牛肉10倍乳剤、ウシ糞便菌液)

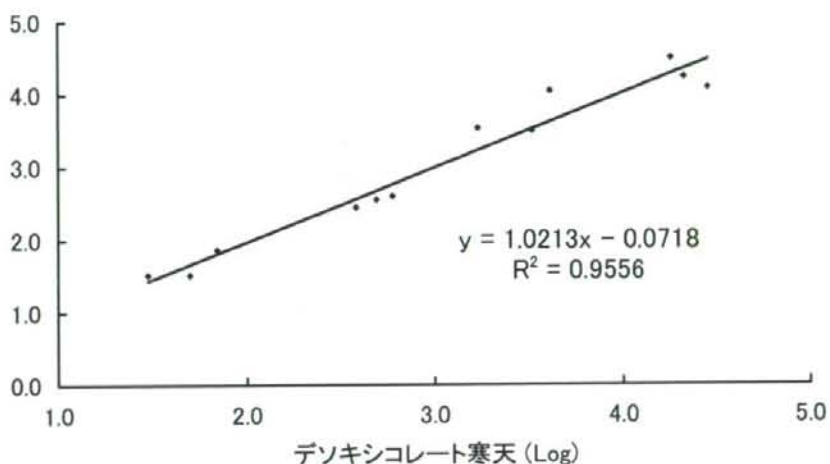


図 2B ウシ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌群をテンポ法と平板培養法 (デソキシコレート寒天) で測定した菌数の相関性

大腸菌群(牛肉10倍乳剤、ウシ糞便菌液)

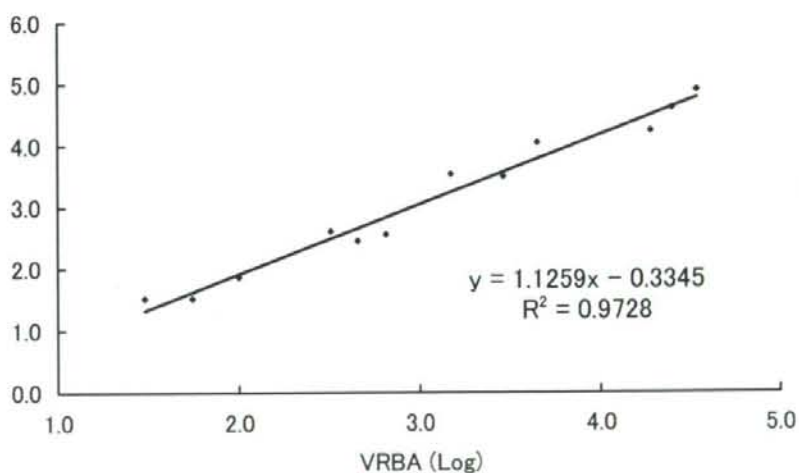


図 2C ウシ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌群をテンポ法と平板培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

### 大腸菌(牛肉10倍乳剤、ウシ糞便菌液)

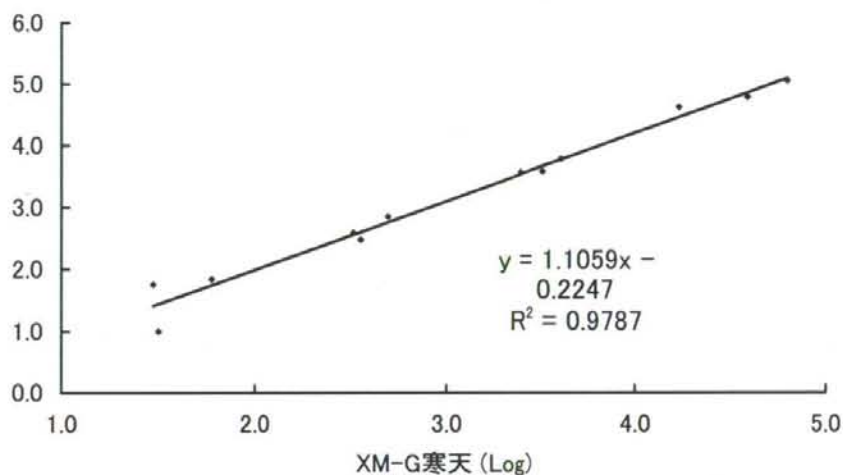


図 2D ウシ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌をテンポ法と平板培養法 (XM-G 寒天) で測定した菌数の相関性

### 腸内細菌科菌群(牛肉10倍乳剤、ウシ糞便菌液)

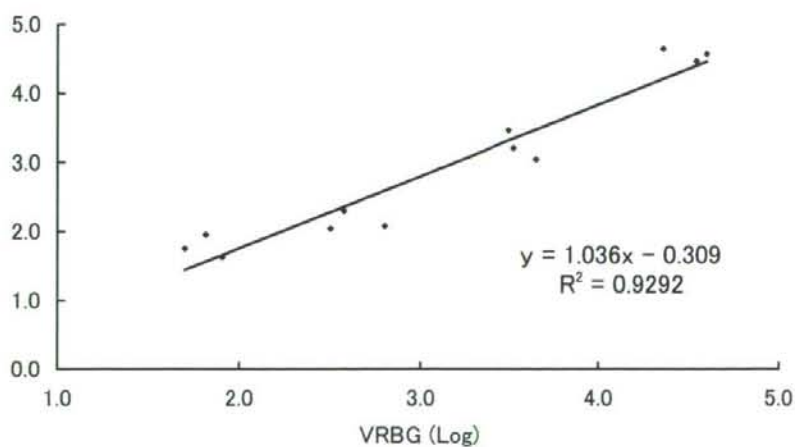


図 2E ウシ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の腸内細菌科菌群をテンポ法と平板培養法 (VRBG) で測定した菌数の相関性

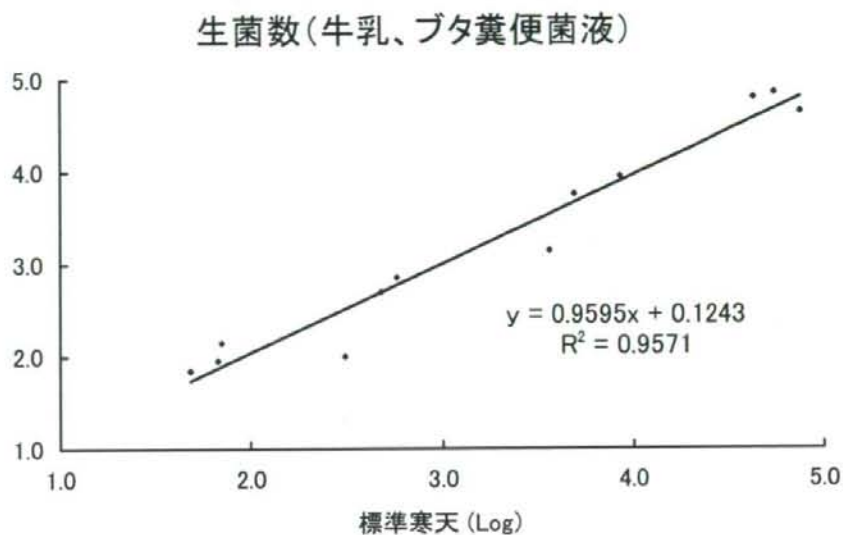


図 3A ブタ糞便菌液を接種した牛乳中の一般生菌をテンポ法と平板培養法で測定した菌数の相関性

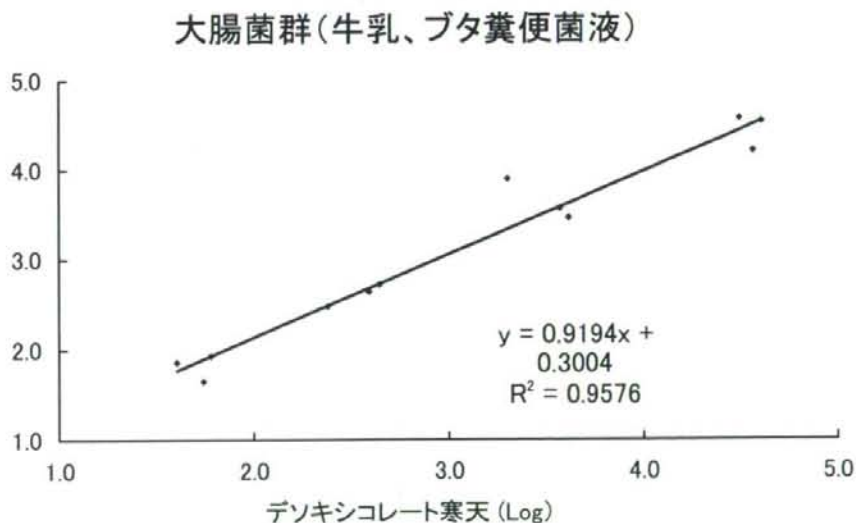


図 3B ブタ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌群をテンポ法と平板培養法（デソキシコレート寒天）で測定した菌数の相関性

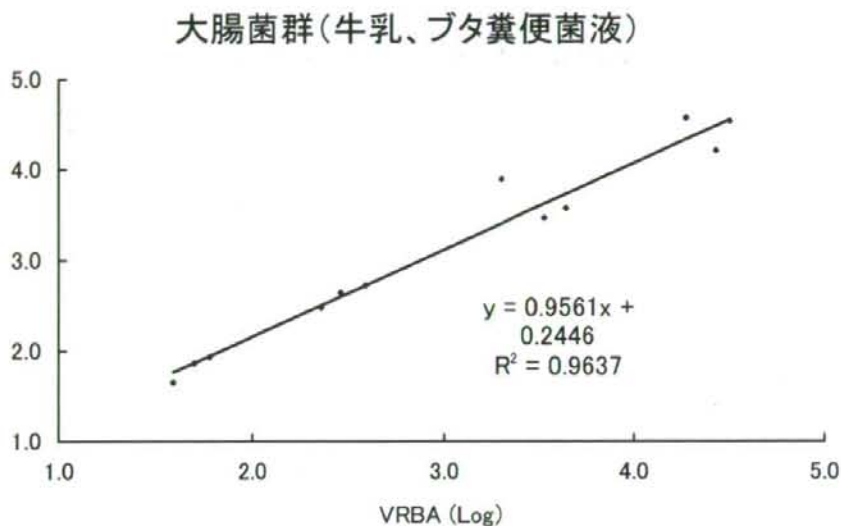


図 3C ブタ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌群をテンポ法と平板培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

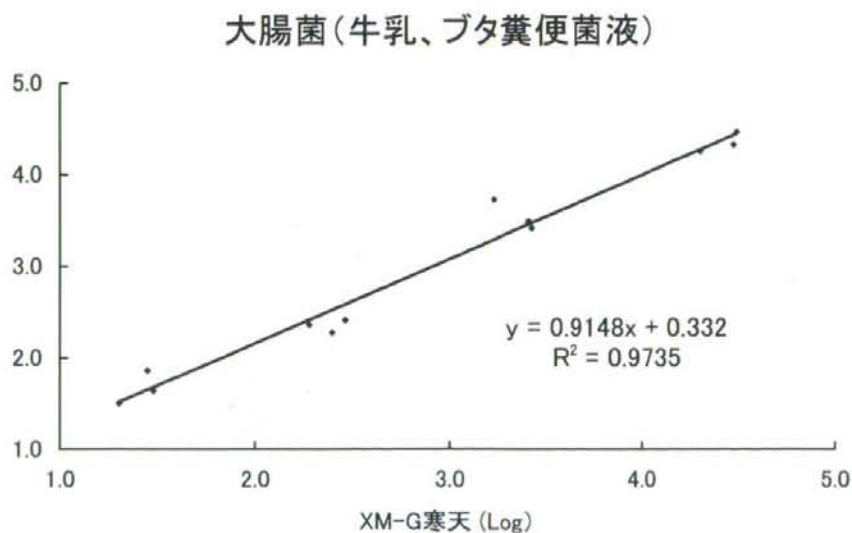


図 3D ブタ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌をテンポ法と平板培養法 (XM-G寒天) で測定した菌数の相関性

### 腸内細菌科菌群(牛乳、ブタ糞便菌液)

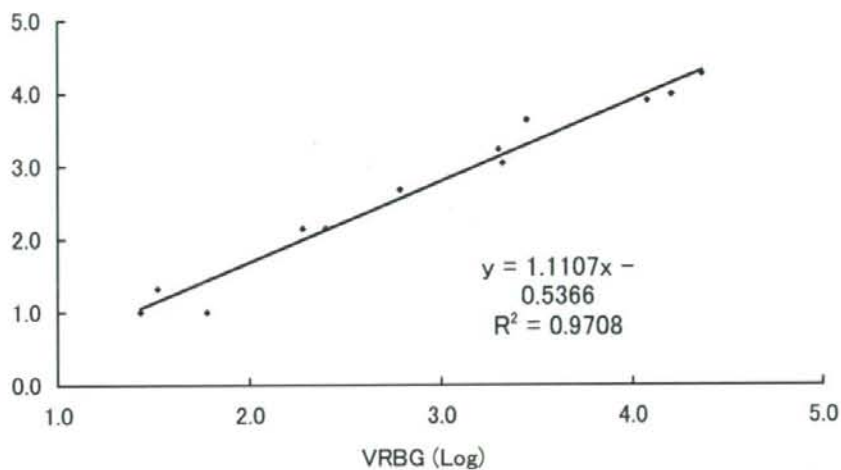


図 3E ブタ糞便菌液を接種した牛乳中の腸内細菌科菌群をテンポ法と平板培養法 (VRBG) で測定した菌数の相関性

### 生菌数(牛肉10倍乳剤、ブタ糞便菌液)

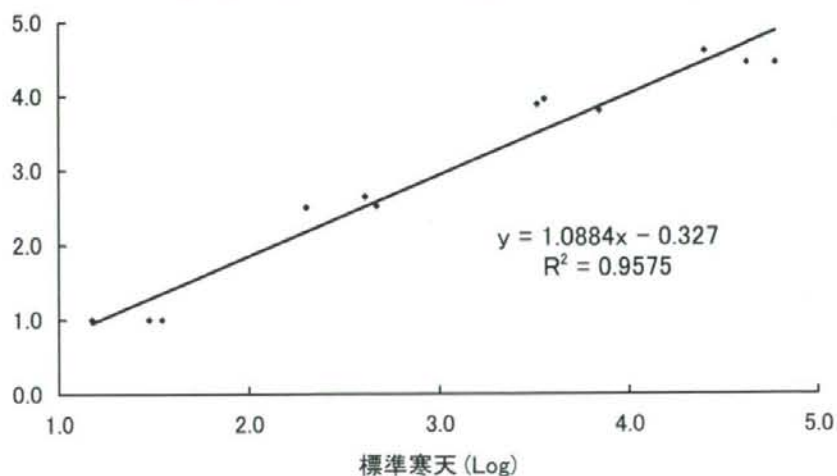


図 4A ブタ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の一般生菌をテンポ法と平板培養法で測定した菌数の相関性

大腸菌群(牛肉10倍乳剤、ブタ糞便菌液)

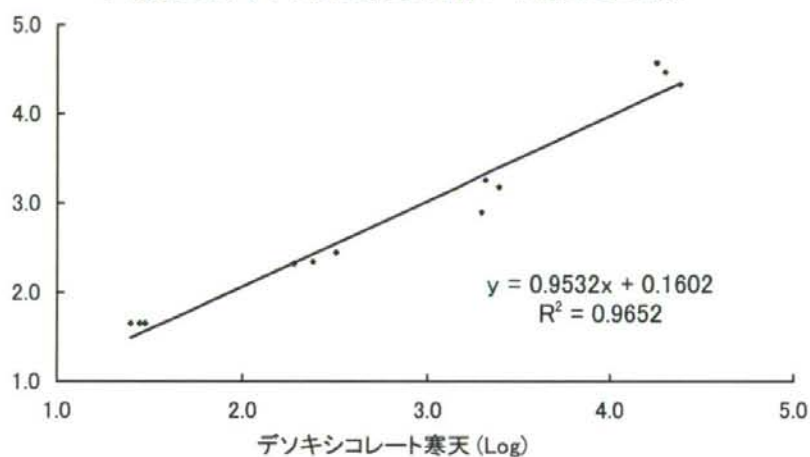


図 4B ブタ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌群をテンポ法と平板培養法 (デソキシコレート寒天) で測定した菌数の相関性

大腸菌群(牛肉10倍乳剤、ブタ糞便菌液)

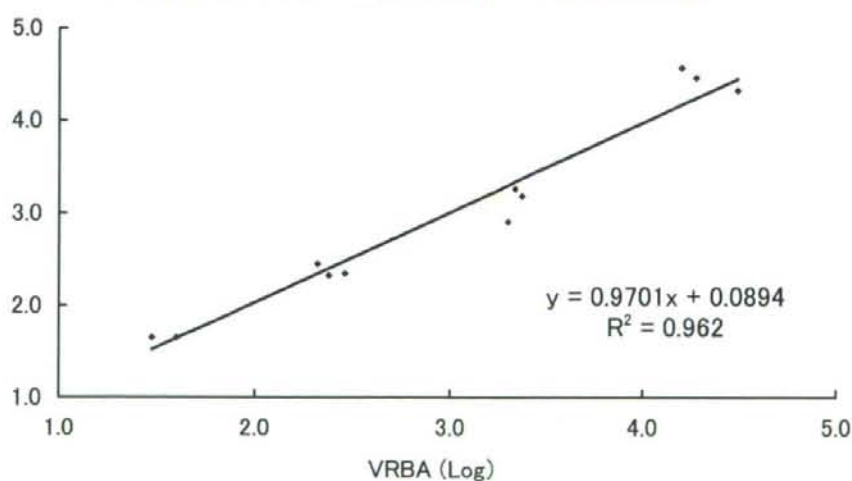


図 4C ブタ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌群をテンポ法と平板培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

大腸菌(牛肉10倍乳剤、ブタ糞便菌液)

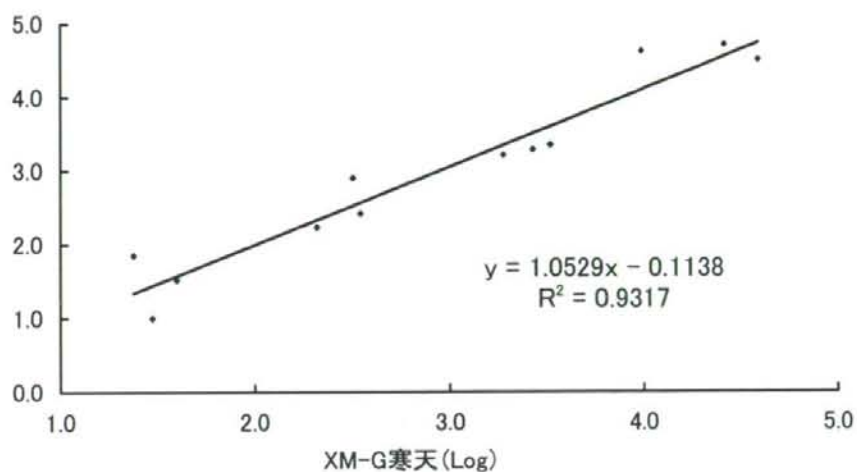


図 4D ブタ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌をテンポ法と平板培養法 (XM-G 寒天) で測定した菌数の相関性

腸内細菌科菌群(牛肉10倍乳剤、ブタ糞便菌液)

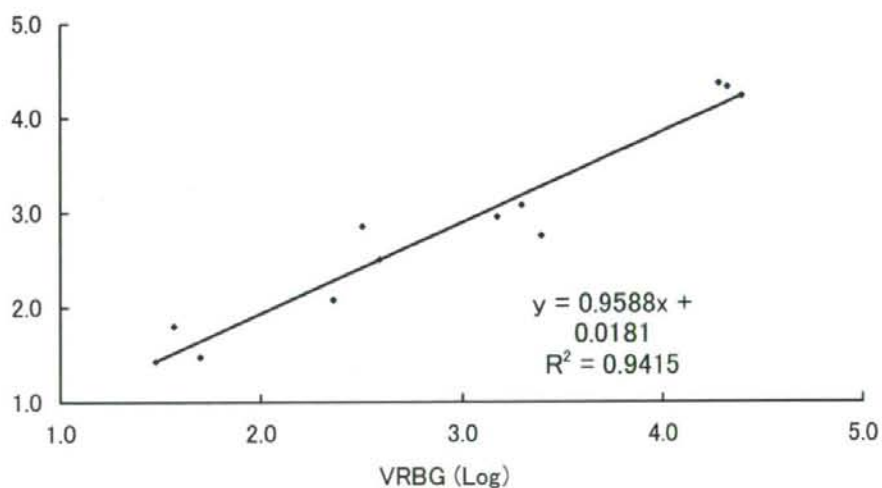


図 4E ブタ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の腸内細菌科菌群をテンポ法と平板培養法 (VRBG) で測定した菌数の相関性

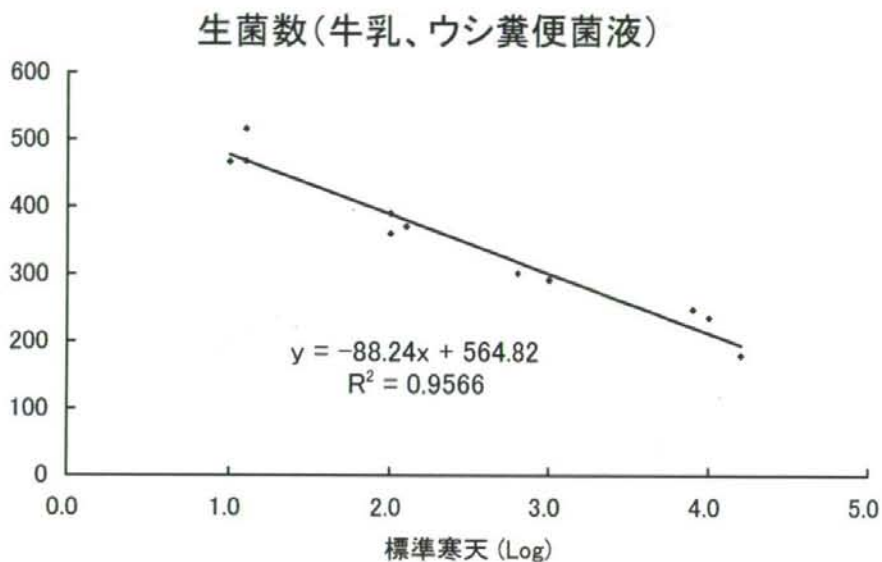


図 5A ウシ糞便菌液を接種した牛乳中の一般生菌を DOX と平板培養法で測定した菌数の相関性

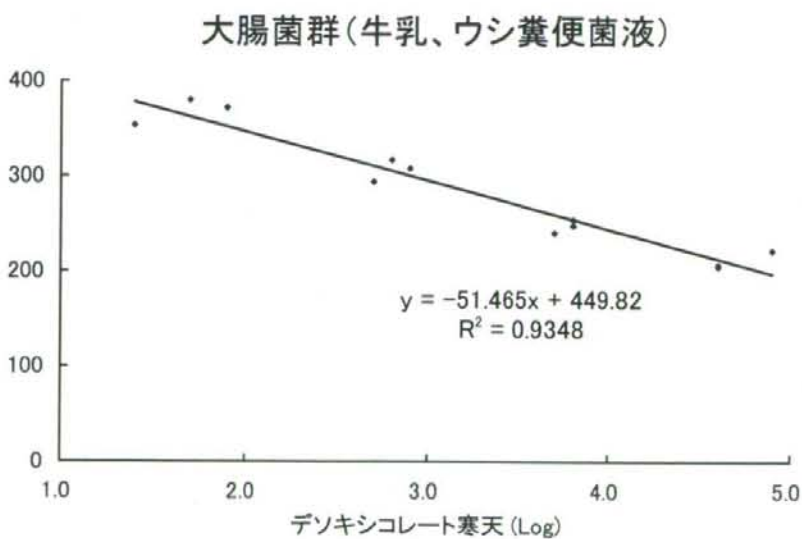


図 5B ウシ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌群を DOX と平板培養法 (デソキシコレート寒天) で測定した菌数の相関性



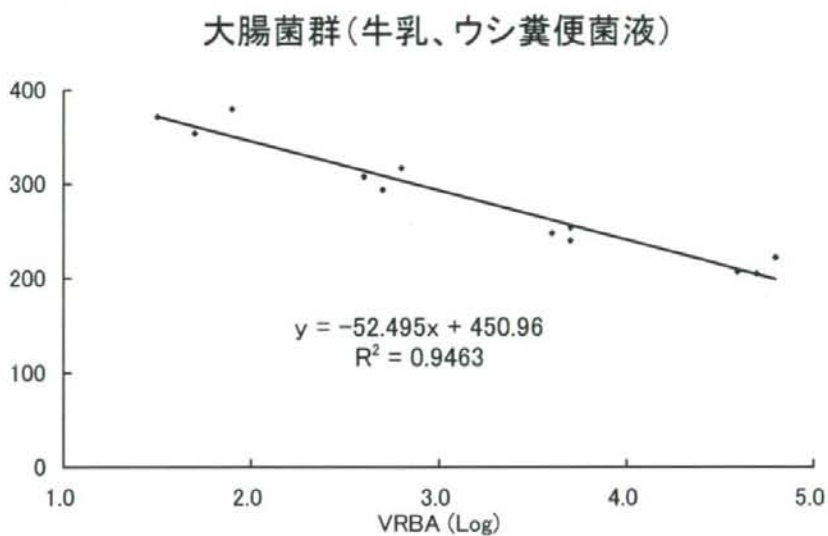


図 5C ウシ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌群を DOX と平板培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

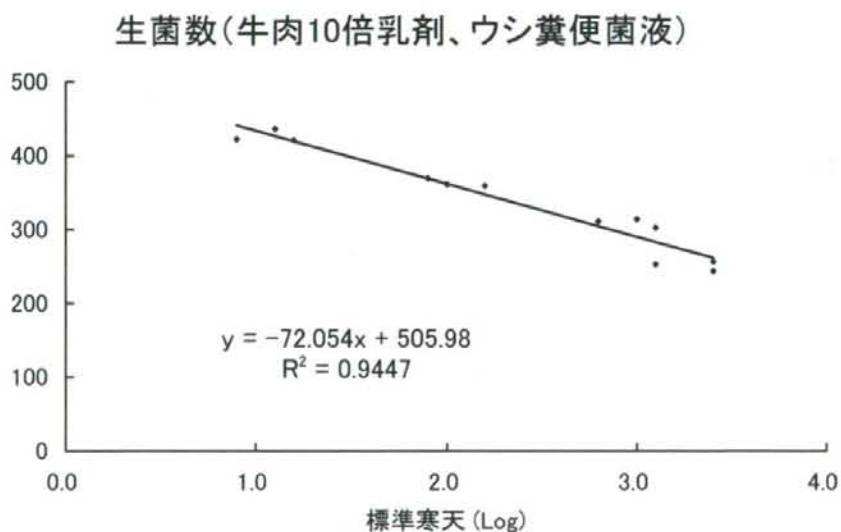


図 6A ウシ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の一般生菌を DOX と平板培養法で測定した菌数の相関性

大腸菌群(牛肉10倍乳剤、ウシ糞便菌液)

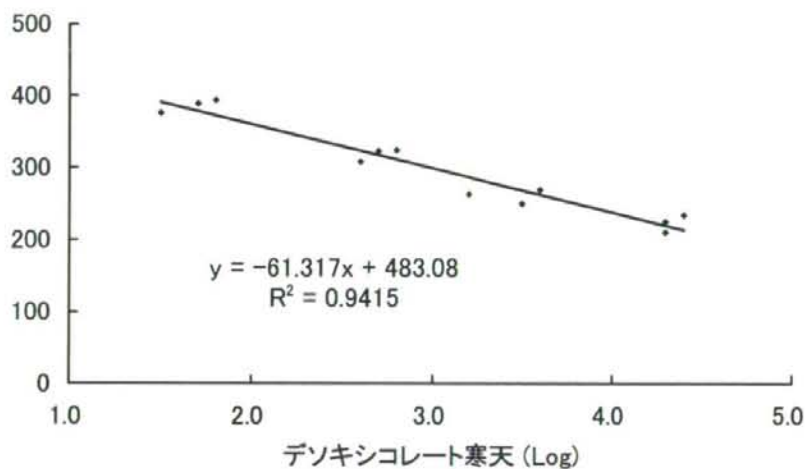


図 6B ウシ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌群を DOX と平板培養法 (デソキシコレート寒天) で測定した菌数の相関性

大腸菌群(牛肉10倍乳剤、ウシ糞便菌液)

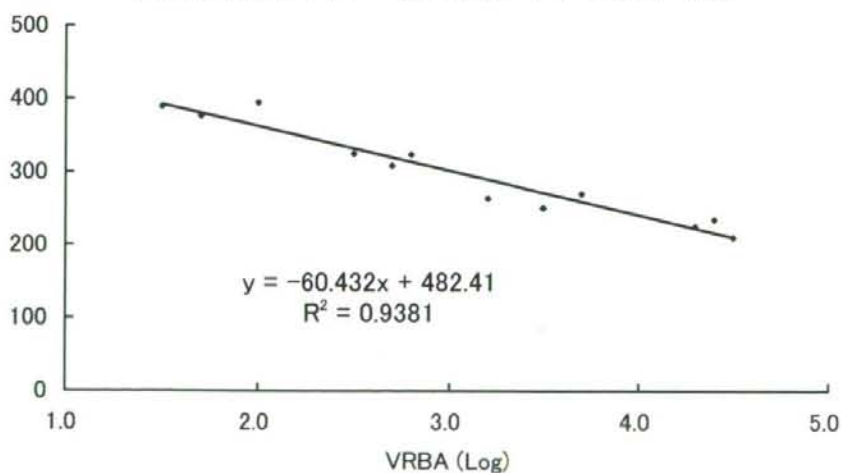


図 6C ウシ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌群を DOX と平板培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

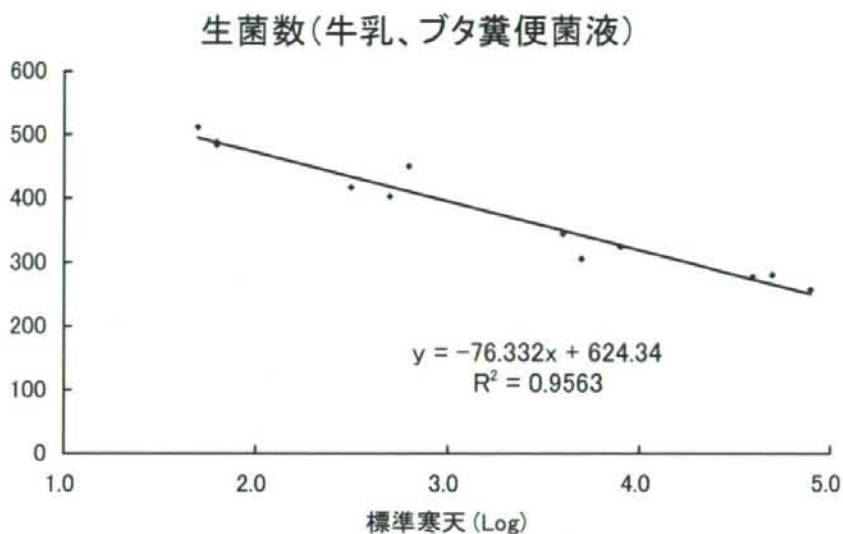


図 7A ブタ糞便菌液を接種した牛乳中の一般生菌を DOX と平板培養法で測定した菌数の相関性

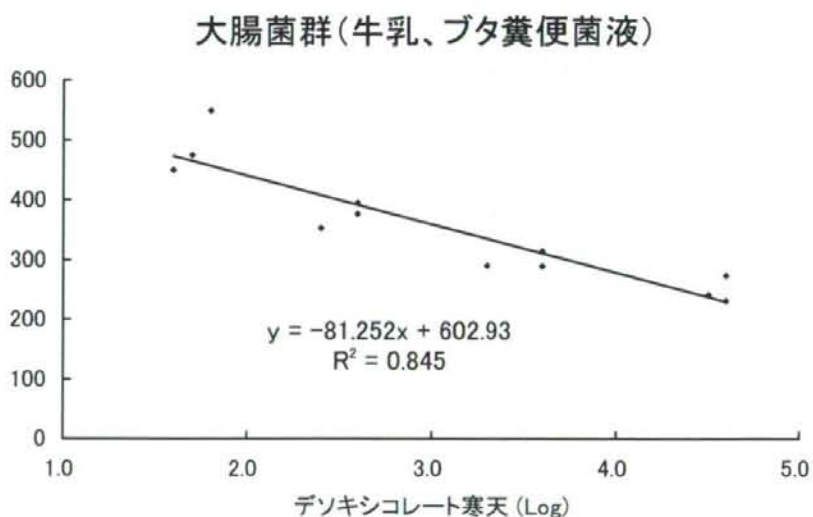


図 7B ブタ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌群を DOX と平板培養法 (デソキシコレート寒天) で測定した菌数の相関性

### 大腸菌群(牛乳、ブタ糞便菌液)

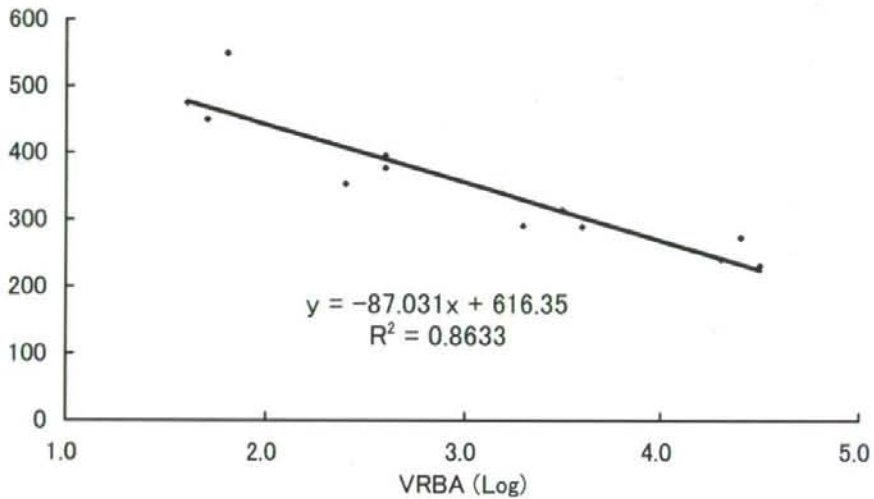


図 7C ブタ糞便菌液を接種した牛乳中の大腸菌群を DOX と平板培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

### 生菌数(牛肉10倍乳剤、ブタ糞便菌液)

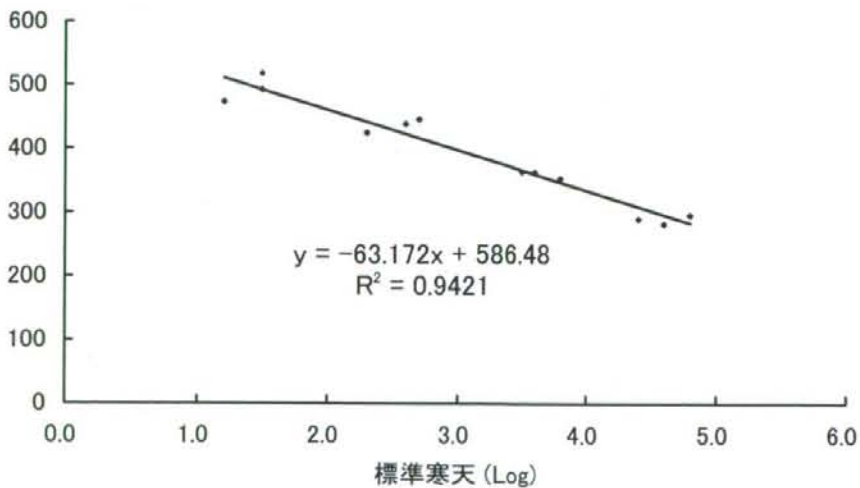


図 8A ブタ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の一般生菌を DOX と平板培養法で測定した菌数の相関性

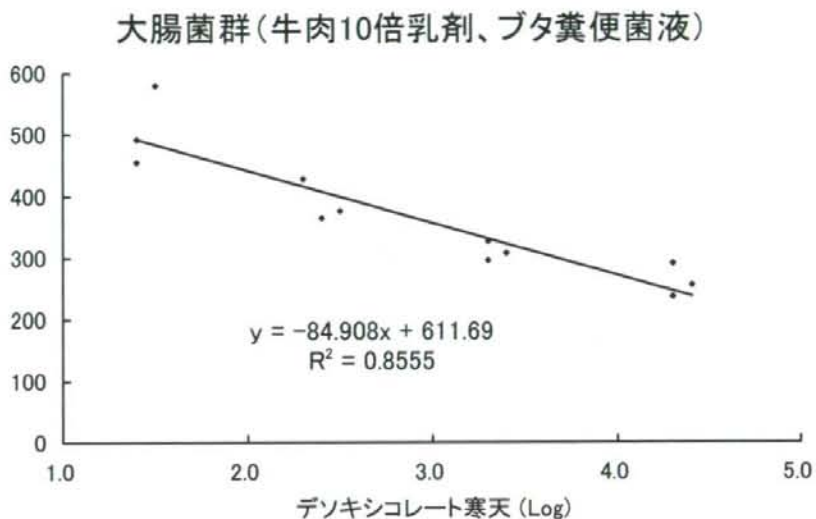


図 8B ブタ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌群を DOX と平板培養法 (デソキシコレート寒天) で測定した菌数の相関性

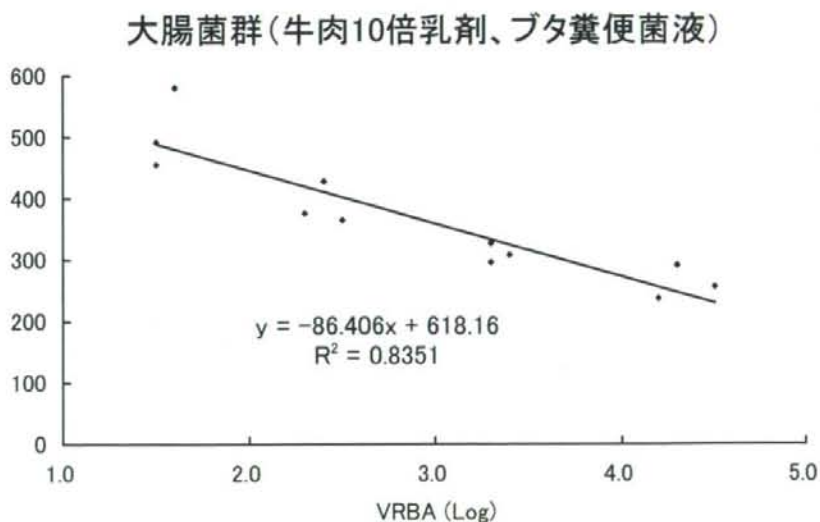


図 8C ブタ糞便菌液を接種した牛肉 10 倍乳剤中の大腸菌群を DOX と平板培養法 (VRBA) で測定した菌数の相関性

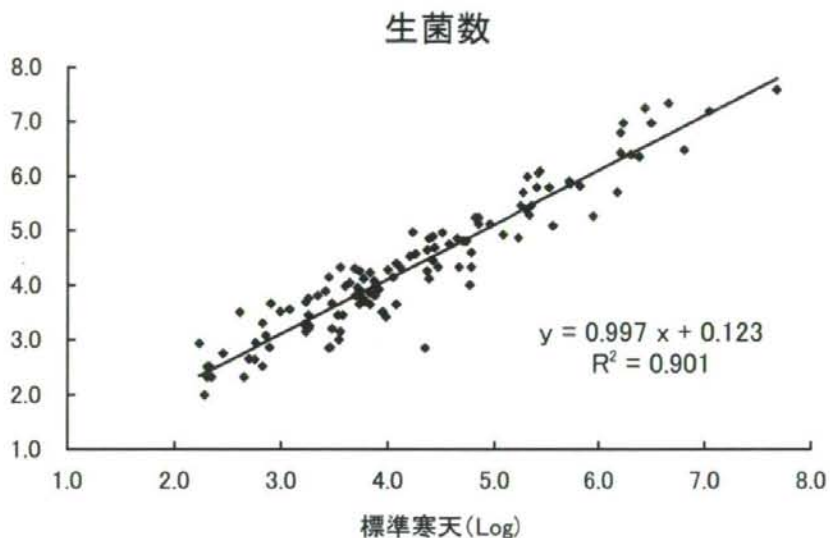


図 9A 市販惣菜および生鮮食品の生菌数をテンポ法と平板培養法で測定した菌数の相関性

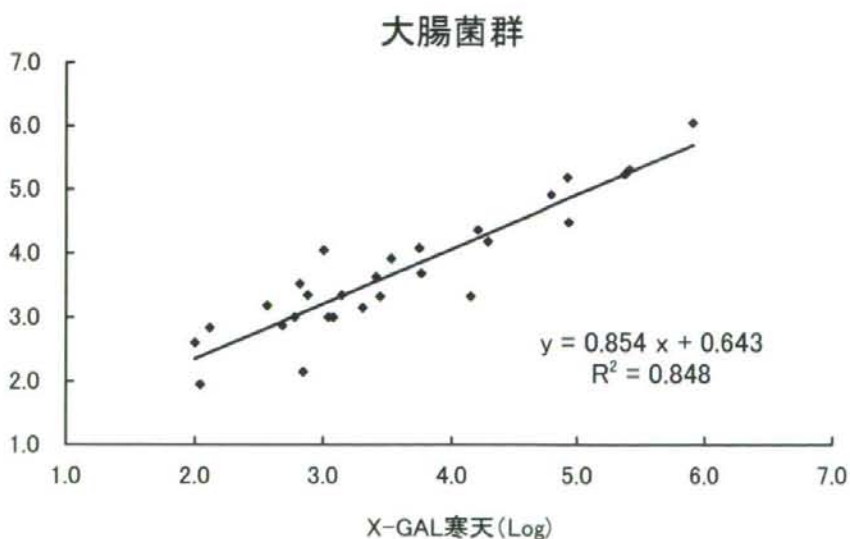


図 9B 市販惣菜および生鮮食品の大腸菌群をテンポ法と平板培養法で測定した菌数の相関性

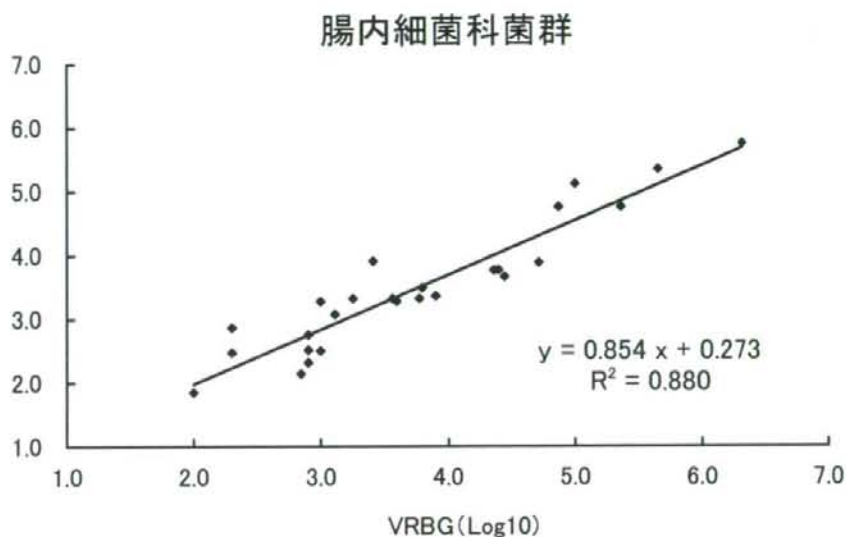


図 9C 市販惣菜および生鮮食品の腸内細菌科菌群をテンポ法と平板培養法で測定した菌数の相関性

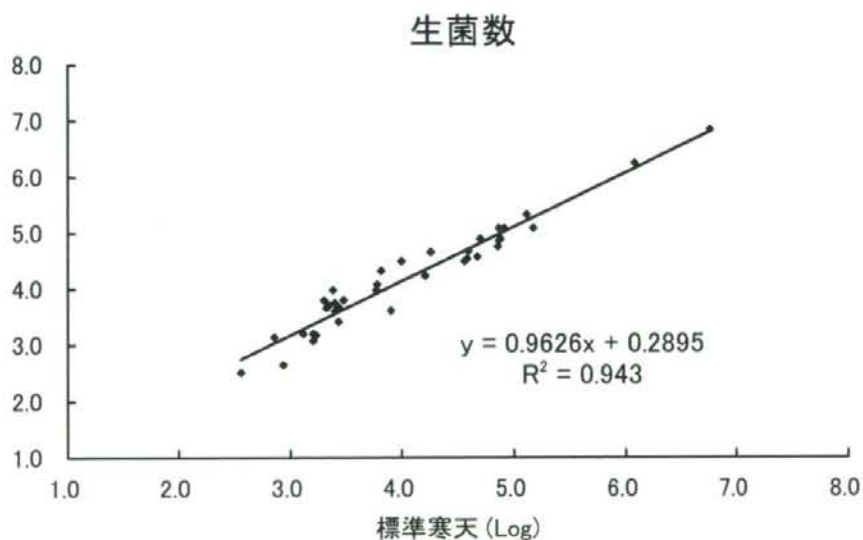


図 9D 生菌数の対数值差が1より大きくなった惣菜をテンポ法と平板培養法で測定した菌数の相関性

平成20年度 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

食品における微生物迅速検査の開発及びその精度評価システムに関する研究  
一般生菌数や汚染指標細菌などを標的とした迅速法の精度評価に関する検討

分担研究者 木村 凡（東京海洋大学 海洋科学部 教授）  
研究協力者 浅尾 努 大阪府立公衆衛生研究所感染症部  
高橋 肇 東京海洋大学

### 研究要旨

一般生菌数（SPC）は、食品の微生物学的汚染指標として最もよく利用されている。しかし、公定法ではSPC測定に最低2日間を要し、様々な要求から流通期間が短縮されてきている今日においては検査の迅速化が急務となっている。そこで時間短縮を目的とした各種の迅速法が近年、開発されてきた。国際的には、各種の迅速法は定められた指針に従って妥当性を確認することで、そのような迅速法の適切な利用を促し、食品の安全・衛生管理の高度化に活かされている。しかし本邦においてはそのような指針は存在せず、ユーザーへの適切な情報提供という観点からも望まれるところである。

そこで本研究では、生菌数迅速測定法の評価指針の策定に必要な各種事項について検討した。過去2年の研究成果より、既存の評価指針には過度に厳密となる点が判明している。そこで、本年度はA迅速法に加えて新たにB迅速法、C迅速法によるデータを収集し、これらの有用性を確かめた。これらが十分な有用性を持つと判断されたため、そのデータを用いて考察を行い、過度な厳密性を排除した、本邦における迅速法評価指針の案を考案した。

### A. 研究目的

一般生菌数（SPC；標準寒天培地において、35℃48時間の培養）は、食品における微生物学的汚染の指標を得ることを目的として行われる微生物検査の項目であり、食品関連企業、検査機関、研究所等各所で日常的に実施されている。SPCは食品の微生物学的汚染状態を実際によく反映するため有用な指標となっているが、結果判定までの時間短縮が近年、特に望まれている。そのニーズを汲み、各種の迅

速測定法が開発されてきた。国際的には、各種の迅速法は定められた指針に従って分析法としての妥当性を確認することで、適切な利用を促し、食品の安全・衛生管理の高度化に活かされている。しかしそのような制度は本邦においては存在せず、それを望む開発者はAOAC（米国）の認証（OMA, official method for analysis; PTM, performance tested method）取得、あるいは近年ではISOの妥当性確認ガイドライン（ISO 16140:2003）への適合性を評



備している状況である。

しかし本邦からこれら諸外国の規定に沿うよう申請する上では、コラボスタディ先の確保や外部認証機関の利用など、地理的にも各種の不都合が想定されうる。さらに、食習慣の違い、ひいては食品製造に関する事情の違いや検査機関の実情の違いなども想定され、本邦に本籍を置く迅速法開発企業からの申請は多大な時間と労力、費用をかけているのが現状である。この様な状況の中、本邦において迅速法評価指針を整備することは、特に中小の食品製造業者等では導入時に自前で手法評価を行う余裕が無いと考えられることもあり、ユーザーへの適切な情報提供という観点から望まれるところであると共に、本邦における迅速法関連の研究および実用化を活発にすることも期待される。

そこで本研究ではこのような日常検査における食品の安全性を確保するための迅速・簡易検査法はどうあるべきか、満たすべき要件とその性能等について検討し、培養による“標準検査法”を尺度とした検査精度の評価システムの構築を試み、異なる仕様で開発され使用されている迅速検査法の評価を行うことの出来る環境を整備することを目的とし、平成18年度より遂行した。

過去2年の研究成果より、既存の評価指針には過度に厳密となる点が判明している。そこで、本年度は新たにB迅速法、C迅速法によるデータを収集し、これらの有用性を確かめた。その結果を受け、過度な厳密性を排除した、本邦における迅速法評価指針の原案を作

成することを最終目標とした。

## B. 研究方法

### B-1. 試料と方法

#### <試料>

本研究では本邦において特に迅速法ニーズの強い食品分野として鮮魚を想定し、サンプルとして用いた。

東京都内の市場より購入したサバ(2008年8月期~2009年1月期)、アジ、カレイ、イワシ等鮮魚。なお、必要に応じて菌数調整のため、一部のサンプルについては恒温保管した鮮魚を試料とした。

#### <参照法試験手順>

##### 1) AOAC966.23

標準寒天平板培地(栄研)を用いた混釈法により実施した。培養は35℃48時間行った。その他、各操作は食品衛生検査指針およびBacteriological Analytical Manualに従って行った。

##### 2) TSA-ASW

TSA寒天培地(Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)を50%人工海水(奥積ら, 1981)にて調製したもの。100・1の試験液を塗抹し、20℃で5日間培養した。

#### <迅速法試験手順>

##### 1) B社法による一般生菌数測定

鮮魚もしくは恒温保管した魚体試料について、参照法として標準寒天培地(栄研)によ

る一般生菌数測定 (n=5, 35°C, 48h) とB社迅速測定法による試験を並行して行った。

B社迅速法の実施にあたっては、パッケージインサートに従って行った。B社迅速法の結果は、CFU/gとして表示される。この数値を、B社迅速法による一般生菌数測定値とした。なお、必要に応じて試料は希釈した。

## 2) C迅速法による生菌数推計

鮮魚もしくは恒温保管した魚体試料47検体 (23検体のアジ、8検体のサバ、9検体のイワシ、2検体のカレイ、3検体のサンマ、2検体のカツオ) について、C迅速法による生菌数推計を行った。並行して、参照法としてTSA-ASW寒天培地による生菌数を測定した。C迅速法の一次結果は1~40までの小数を含む数値にて提示され、予め別途作成した標準曲線をもとに生菌数値を推定した。

### <精度評価>

B社法結果と一般生菌数測定結果、C迅速法とTSA-ASW寒天培地測定結果をそれぞれ比較した。それぞれ菌数はlog値に変換後、参照法と迅速法をそれぞれx、y軸に置いた散布図を作成して比較した。特に断りがなければ比較には最小二乗法による回帰分析を用いた。

- 1) AOAC基準: 個々のデータポイントについて参照法による測定と迅速法による測定結果について、有意差検定を行った (P value 0.05)。基準では、有意差を生じないことが求められる。
- 2) ISO16140: 全データポイントをx軸に参照法、y軸に迅速法を取った同一散布

図に載せ、その回帰直線を求める。後、回帰直線のy切片が0、傾きが1と、それぞれ有意に異なるか否かを確認した (異ならないことが求められる)。

### <統計処理>

精度評価における統計処理には、SPSS 17.0ソフトウェア (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を利用した。

### <実験デザイン>

AOAC、ISOいずれも認証に必要な実験のデザインについては (サンプルの準備、外部実験室と並行したデータ収集、外部認証機関を利用したデータ収集など) 別途詳細な規定があるが、本研究では収集したデータの精度評価基準についてのみ焦点を当てた。

## C. 結果および考察

### C-1 各種迅速法による実データ収集

#### C-1-2 B社迅速法および参照法による一般生菌数測定結果の比較

計26サンプルについて測定・比較結果をまとめたものが図3である。

B社迅速法の回帰直線は  $y=1.00x-0.426$ 、相関係数0.90となり、参照法と良好な一致を示した。

#### C-1-2 C迅速法による生菌数推計値とTSA-ASW寒天平板による生菌数との比較

計47サンプルについて測定・比較結果をま

とめたものが図4である。

C迅速法の回帰直線は  $y = 1.00x + 0.21$ 、  
相関係数 0.94 となり、参照法（この場合、  
TSA-ASW）と良好な一致を示した。

## C-2 各種ガイドラインによる妥当性評価の 試行

### C-2-1 各迅速法のAOAC法による妥当性評価

以上2方法によるデータ、およびこれまでの  
研究成果で報告済みのA迅速法によるデータ  
セットについて、それぞれAOACに従って評価  
を行った。具体的には各データポイントにつ  
いて有意差検定を行い、有意差の有無を確認  
した（表1）。AOACは両方法による測定結果に  
有意差が出ないことを求めている（データポ  
イント数の過不足は本報告では考慮していな  
い）。

A社迅速法についてその詳細を述べると、図  
2、“有意差無し”判定は、各迅速法の結果  
と参照法の結果が完全一致するライン（ $y=x$ 、  
図2破線）に近いデータポイントに限られて  
いることがわかる（図2、○）。それぞれのデ  
ータポイントを表1で確認すると、同等の数値  
を示していることが確認された。

しかし一方で、有意差検定が過度に厳密で  
あると考えられるデータポイントも存在した。  
たとえばA社法 sample 28は、 $\log$ 値  
 $7.71 \pm 0.12$  (SPC)、 $7.88 \pm 0.01$  (A社) とほぼ、  
一致しているにも関わらず、有意差検定では  
有意差有りと判定される。同様の結果は他の  
いくつかのデータポイントにおいても観察され  
た。一方、例えばA社法sample 39において

は3.97 (SPC)、3.31 (A社迅速法) とsample 28  
に較べて差が大きいにも関わらず有意差無し  
と判定されている。

これらの問題の理由を有意差検定による検  
定方法の面から考察すると、

ステューデントのt検定： $t_0$ 値を既知のt  
分布表に比較し、検定する。 $t_0 < t$  であ  
れば、有意差無し（ $\therefore t_0$ 小 $\cdots$ 有意差無  
し方向）

$$t_0 = \frac{X(\bar{)} - Y(\bar{)}}{\sqrt{\{Ue (1/m+1/n)\}}}$$

X, Y(̄): 迅速法、参照法各々の平均値

Ue: X, Yそれぞれの不偏分散を合わせたもの

上式において、分子は両手法によるデータ間  
の差異、分母は両手法のばらつきと考えるこ  
とができる。よって、

- ① 迅速法、参照法のデータの差異が小さい  
（分子が小さい）
- ② 手法の繰り返し間のばらつきが大きい  
（分母が大きい）

いずれかの場合に、 $t_0$ は小さくなり、有意差  
無しとなる。

よって、有意差検定による手法の精度比較  
には、手法のばらつきに依存して以下の2点  
の問題点が考えられる。

(A) 迅速法、参照法の値が十分に同程度で  
あっても、両手法のばらつきがそれぞれ充分  
小さい場合は有意差有りとして判定し得る

(B) 両手法の値が比較的異なっているにも、

両手法のばらつきが充分大きい場合に有意差無しとして判定し得る

このことより、AOACの定める有意差検定による精度評価は、適合する場合は十分に評価精度が高いものの、過度に厳密となる場合もあることが示された。

食品の品質管理上必要とされる生菌数の情報は、概ね1桁程度の誤差であれば許容されること (CCFRA guideline #29)、および迅速性と精度のバランスを鑑みると、迅速法の妥当性評価にAOACの定める有意差検定は必ずしも適していないと考えられた。

C-2-2 各迅速法のISO法による妥当性評価

以上3方法によるデータセットについて、それぞれISO16140に従って評価を行った。ISO16140においては、仕様とする範囲においてデータをプロットし、最小二乗法による回帰分析の結果から評価する方法をとる。具体的には回帰直線の傾きが1、切片が0と有意に異なることを検証する必要がある (=95%信頼区間にそれぞれ1、0を含む)。

- ・ A迅速法は $y=0.915x+0.951$  (95%信頼区間: 傾き0.778~1.053; 切片 0.241~1.661) (不適合)
  - ・ B迅速法は  $y=1.00x +0.43$  (95%信頼区間: 傾き0.86~1.14; 切片-1.18~0.32) (適合)
  - ・ C迅速法は $y=1.00x+0.21$  (95%信頼区間: 傾き0.92~1.08; 切片-0.27~0.68) (適合)
- A手法のみ切片が条件から外れるため

当てはまらない

いずれの方法も、回帰直線への適応性 (Fit of Linearity) に関しては問題ないようであった。

AOAC基準で解析した結果 (C-2-1項) と比較すると、ISO16140は個々のデータポイントにおける精度評価の積み重ねではなく、データセット全体の理想直線 ( $y=x$ ) への適合性を評価する方法といえる。AOAC基準で見られた、“迅速、参照法の結果のばらつきが小さい場合は有意差が出やすく、逆に、どちらかの手法の結果のばらつきが大きい場合は有意差が出にくくなる” という問題点も、ISO16140では問題とならず正当に評価できると思われる。

このことから、AOAC基準が迅速法の認証に対して過度に厳密であるという観点に立つならば、ISO16140法のほうが適当といえる。

C-3 既存の精度評価基準における長短、課題

AOAC、ISO両基準によるA~C迅速法のデータセットによる精度評価の判定結果を下にまとめる。(データセットが、精度評価基準に適合するか否かのみ、その他非考慮)

	A迅速法	B迅速法	C迅速法
AOAC	×	×	×
ISO 16140	×	○	○

○、適合; ×、不適合

以上の結果の通り、現存する精度評価基準にはそれぞれ特性がある。方法の精度評価の