

表. 1-3 混合標準液の原料、原料純度及び目標仕込み量 (純度補正值)

No.	原 料	原料メーカー	Lot No.	純度 (%)	純度補正值 (mg)
59	ブタミホス	関東化学㈱	708X7110	99.2	30.2
60	フルジオキシニル	関東化学㈱	006X1233	99.9	30.0
61	フルシトリネート	Dr. Ehrenstorfer	71210	92.0	32.6
62	フルトラニル	Dr. Ehrenstorfer	60512	99.5	30.2
63	フルバリネート	関東化学㈱	905X7101	98.0	30.6
64	プレチラクロール	関東化学㈱	008X1499	99.8	30.1
65	プロピコナゾール	関東化学㈱	904X7104	99.6	30.1
66	ヘキサコナゾール	Dr. Ehrenstorfer	81013	97.0	30.9
67	ペルメトリン	Dr. Ehrenstorfer	80311	94.0	31.9
68	ペンコナゾール	Dr. Ehrenstorfer	70307	99.2	30.2
69	ペンディメタリン	関東化学㈱	712X7101	99.2	30.2
70	ホサロン	関東化学㈱	102U1764	99.3	30.2
71	ホスチアゼート	Dr. Ehrenstorfer	70618	96.5	31.1
72	マラチオン	Dr. Ehrenstorfer	70328	99.0	30.3
73	メトラクロール	関東化学㈱	909X1525	99.9	30.0
74	メフェナセット	関東化学㈱	012X1278	99.8	30.1
75	メプロニル	関東化学㈱	807X7102	99.9	30.0
76	レナシル	Dr. Ehrenstorfer	80318	99.0	30.3

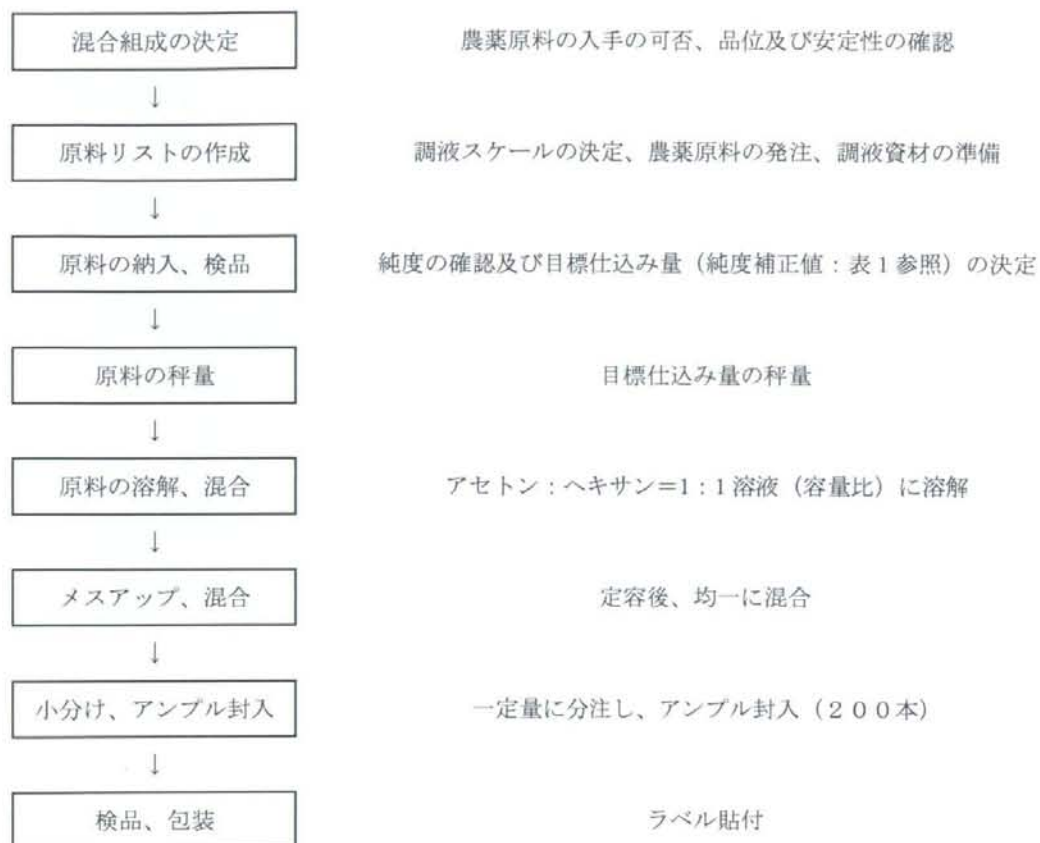


Fig.1 農薬混合標準液（76種）調液フロー

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 20 年度 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
（理化学検査・微生物学検査・アレルギー物質検査・DNA 技術応用食品検査）
の作製検討と信頼性確保に関する研究

分担研究者 大島 赴夫

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—

主任研究者	小島 幸一	(財) 食品薬品安全センター秦野研究所	所長
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状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。平成 19 年度は、食肉（鶏ささみ）が残留動物用医薬品用基材として適性であるか検討を行った。水 10% 添加することで、8 種類のサルファ剤において調査試料に使用可能であることがわかった。今年度は調査試料として、食肉（スルファジミジン）について均一性および安定性等の検討を行った。鶏ささみを使用し、水添加量 10、20、30、40% としたペースト状試料の均一性試験を行った結果、F 比は水添加 10% で 14.37、20% では 2.47 と実際の試料としては水添加 20% の時もっとも均一性が良好となったことから水添加 20% の鶏ささみを使用することとした。安定性については、86 日冷凍保存では 98.6%、7 日間冷蔵保存で 108.6%、冷凍・解凍を 3 回行った場合 103.0% と良好であった。また、腐敗を防ぐため保存料の添加を検討した結果、ソルビン酸、安息香酸および亜硝酸ナトリウムは使用できないことがわかった。一方、鶏肉のむね、ももと他の部位についても検討した結果、水を 0、10、20% 添加し、これらにスルファジミジンを 0.2 $\mu\text{g/g}$ となるように作製した時のスルファジミジン濃度は、いずれの部位および水添加量においても 87~101% の回収率であり、またその時の相対標準偏差は、3.5~7.4% であった。さらに、水無添加のむね及びももについて均一性試験を行った結果、F 比はそれぞれ 2.36 および 1.64 で、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

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（鶏肉）にスルファジミジンを添加して、基材としての食肉（鶏肉）の利用の可能性を検討した。

1. 試料基材および試薬

食肉：市販の鶏肉（ささみ、むね（皮つき）、もも（皮つき））を3度挽いたミンチ肉、スルファジミジン（以下 SDD）：食品分析用、関東化学株式会社、アセトニトリル、蒸留水：高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業株式会社、ヘキサン、ジエチルエーテル、無水硫酸ナトリウム、リン酸一ナトリウム、ソルビン酸、安息香酸および亜硝酸ナトリウム：試薬特級、和光純薬工業株式会社

2. 使用機器および測定条件

混合機：ロボ・クープミキサー（R-23 およびブリクサー5 プラス） 株式会社エフ・エム・アイ

測定機器：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、タンデム質量分析装置 Waters Premier XE

HPLC の測定条件：カラム Mightysil RP-18(H) (150×4.6 mm, 5 μ m)

移動相：0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液/アセトニトリル (17:3)

流速：1.0mL/min、カラム温度：40℃

LC/MS/MS の測定条件：カラム Acquity UPLC BEH C18 (2.1×50 mm, 1.7 μ m)

移動相：0.1% 酢酸/アセトニトリル

(50%→100%)

流速：0.3mL/min、カラム温度：40℃、キャピラリー：3.5kV、コーン：40V、コリジョン：25V、測定イオン：279→186 (m/z)

3. 試料作製および脂質測定

各部位のミンチ肉をロボ・クープミキサーを使用してペーストにし、これらに水および SDD を添加し、良く混合した。水分添加量の検討として、水分添加量が、作製量全体の 10、20、30、40%となるように水を加えたささみ肉ペースト各 400 g に、SDD が 0.1 μ g/g になるよう添加した。調査用試料としての実作製に即した方法の検討として、水分添加量を 10%、20%としたささみ肉ペースト 10 kg（外部精度管理試料作製予定量）に、SDD が水添加 10%は 0.1 μ g/g、20%は 0.2 μ g/g になるよう添加した。脂質量がささみと異なる他部位の使用の検討として、水分添加量を 0、10、20%としたむねおよびもも肉ペースト各 2 kg に SDD が 0.2 μ g/g になるように添加した。水分無添加のささみ、むね、ももの各試料（SDD 0.2 μ g/g）について、脂質をソックスレー抽出法で測定を行った。

4. 測定方法

測定操作は、食品衛生法に準拠した。

試料 5.00 g を採取し、アセトニトリル 50、30、30 mL で 3 回ポトリロンを用い抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 50 mL を加え振とうした。アセトニトリル層をとり、n-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加え振とうし、先に採取したアセトニトリル層と合わせ、40℃以下で濃縮乾固した。0.025mol/L リン酸一

ナトリウム溶液：アセトニトリル（17：3）5 mL で溶解させ、高速液体クロマトグラフで測定した。また、保存料の検討に LC/MS/MS を用いて同定確認した。

5. 保存料の検討

800 µg/mL ソルビン酸（以下 SOA）、安息香酸（以下 BA）をそれぞれ 1 mL と 0.2 µg/mL（移動相溶液）SDD 1 mL を 30 秒混合し、高速液体クロマトグラフで測定した。また、200 µg/mL 亜硝酸ナトリウム 5 mL と 1 µg/mL SDD 5 mL を 30 秒混合し（100 µg/mL 亜硝酸ナトリウム、0.5 µg/mL SDD 溶液）、冷蔵保存で 1 時間後を 0 日の 100% とし、1、2、6、10、19 日の経時変化をみた。鶏肉ささみペースト 160 g に、500 µg/mL 亜硝酸ナトリウム 40 mL を添加し 1 分間混合し、作製した。このペーストに SDD が 0.2 µg/g になるように添加し（水添加 20%、100 µg/mL 亜硝酸ナトリウム、SDD 0.2 µg/g 鶏ささみペースト）、測定した。

（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. 研究結果および考察

1. 水分添加量の検討

鶏ささみ肉ペーストに、水分添加量が 10、20、30、40%、SDD が 0.1 µg/g になるように添加混合し、SDD 濃度を測定し、ばらつきを調べた。SDD 濃度の回収率は、81.1、91.9、89.0 および 89.8% といずれも 80% 以上で、RSD は 1.3、

3.4、4.3 および 3.5% と 5% 以下で、ばらつきも小さかった（表 1）。水分添加量 30 および 40% は粘性が低くなるため、SDD 標準液添加後混合する操作は容易であるが、液状化しており、肉の形態としては違いすぎる為、不適切であった。そこで、水分添加量を 10% および 20% とし、外部精度管理調査試料として実際に試料を作製する量 10 kg を作製し、均一性を検討した。F 比は、水分添加量 10% で 14.4、20% で 2.4 と、10% で F 値 3.02 より大きく、均一性が得られなかった。一方、20% は均一性も良く、外部精度管理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。さらに、脂質量の異なる鶏むね、もも肉ペーストに、水分添加量が 0、10 および 20%、SDD が 0.2 µg/g になるように添加混合し、ばらつきを調べた。回収率は、むね肉で 87.0、95.0、90.5%、RSD は 4.0、7.4、4.4% であった。もも肉は、100.0、98.5、100.5%、RSD は 4.5、4.6、3.5% であった（表 2、3）。水無添加および水添加のむね肉およびもも肉は、SDD の回収率はいずれも 80% 以上で、ばらつきも小さかった。水無添加のささみ、むねおよびもも肉の脂質は、0.7、7.3、13.5% であった（表 4）。ささみ肉は、水無添加および水添加 10% では粘性があり、混合が困難で均一になりにくい、脂質が多いむね、もも肉は水無添加でも均一になることがわかった。水無添加のむね肉およびもも肉の F 比は、2.36 および 1.64 で均一であり、調査試料の基材として用いることが可能であることがわかった。また、水分添加量を変えた鶏ささみ、むね、もものペースト試料（SDD 無添加）

について、SDD 添加試料と同様に操作し、高速液体クロマトグラフで測定したところ、妨害となるピークはみられなかった。

2. 安定性の確認

20%水添加鶏ささみ肉の冷凍(-20~-24℃)保存における安定性は、作製当日の濃度に対する 86 日後の濃度は 98.6%で、冷蔵保存(4~8℃)で、3 および 7 日後は 96.8、108.6%であった(表 5)。冷凍、解凍(冷蔵庫内で解凍)を繰り返した場合、1 回解凍した濃度に対して、2 および 3 回で 103.5 および 103.0%であった(表 6)。この時の SDD 無添加肉のクロマトグラム上には、SDD を妨害するピークは認められなかった。冷凍保存 86 日、冷蔵保存 7 日、繰り返し凍結、解凍 3 回に関して、水添加 20% 鶏ささみ肉の SDD の安定性が確認された。

3. 防腐剤(保存料)の検討

肉が腐敗することにより、高速液体クロマトグラフで測定時、妨害ピークが多くなるため、保存料が使用可能か検討した。安息香酸、ソルビン酸のピークは、SDD のピークと保持時間が近いこと、使用には適さないことがわかった(図 1、2)。1 µg/mL SDD 5 mL に 200 µg/mL 亜硝酸ナトリウム 5 mL を加え、30 秒混合し、1 時間室温で放置した SDD 濃度に対して、冷蔵保存で 1、2、6、10 および 19 日後は、それぞれ 90.4、70.9、55.5、50.7、34.6%と減少した(表 7)。また亜硝酸ナトリウムのピークは、SDD のピーク付近にはみられなかった。鶏ささみペーストに亜硝酸ナトリウム溶液を加え、水分添加 20%とし、これに SDD を

添加したところ、約 1 時間で SDD が分解することがわかった。さらに、その分解を確認するために、LC/MS/MS によって測定した。HPLC/UV ではピークが確認できなかったが、LC/MS/MS により約 20ng/mL 残留していることがわかった(図 3)。SDD は亜硝酸ナトリウムによりジアゾ化されると考えられる。しかし、鶏肉中には、アミノ酸をはじめ亜硝酸ナトリウムと反応する物質が種々存在し、SDD がどのような物質に分解されているかについては、食品の安全、衛生上、今後検討する必要がある。よって、調査用試料には亜硝酸ナトリウムも保存料として使用ができないことがわかった。

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. 鶏肉(ささみ、むね、もも)を 3 度挽きペーストにすることにより、スジおよび脂肪が均一である肉を得ることができ、ロボ・クープ・ミキサーで肉ペーストと SDD を混合することにより、肉を基材とした調査試料を作製することができた。

2. 鶏ささみ肉ペーストは粘性があり、水 20%を添加することにより、均一性が得られた。冷凍保存 86 日、冷蔵保存 7 日、3 回の冷凍・解凍においても安定であり、平成 20 年度の外部精度管理調査用試料として採用した。

3. 鶏むねおよびもも肉ペーストは脂肪含有により、水無添加で均一性が得られた。今後の調査試料とすることが可能であることが示された。

4. 肉の腐敗を防ぐため、保存料が使用可能か検討した。ソルビン酸および安息香酸は、測定時に妨害する可能性があり、亜硝酸ナトリウムは SDD を分解するため、使用はできないことが確認された。

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

表 1. 水分添加量の違いによる鶏肉ささみ中の SDD 濃度

水分添加量	10%	20%	30%	40%
測定濃度	0.0804	0.0946	0.0909	0.0897
($\mu\text{g/g}$)	0.0824	0.0885	0.0846	0.0868
	0.0806	0.0925	0.0914	0.0930
平均値($\mu\text{g/g}$)	0.0811	0.0919	0.0890	0.0898
SD($\mu\text{g/g}$)	0.0011	0.0031	0.0038	0.0031
RSD(%)	1.4	3.4	4.3	3.5

鶏肉ささみ(脂質 0.7%)

表 2. 水分添加量の違いによる鶏肉むね中の SDD 濃度

水分添加量	0%	10%	20%
測定濃度	0.176	0.179	0.181
($\mu\text{g/g}$)	0.178	0.174	0.179
	0.168	0.188	0.177
	0.184	0.199	0.173
	0.166	0.209	0.195
平均値($\mu\text{g/g}$)	0.174	0.190	0.181
SD	0.007	0.014	0.008
RSD(%)	4.0	7.4	4.4

鶏肉むね(脂質 7.3%)

表 3. 水分添加量の違いによる鶏肉もも中の SDD 濃度

水分添加量	0%	10%	20%
測定濃度	0.194	0.188	0.192
($\mu\text{g/g}$)	0.213	0.193	0.207
	0.200	0.192	0.198
	0.205	0.210	0.198
	0.190	0.202	0.208
平均値($\mu\text{g/g}$)	0.200	0.197	0.201
SD	0.009	0.009	0.007
RSD(%)	4.5	4.6	3.5

鶏肉もも(脂質 13.5%)

表 4. 鶏肉の脂質量

鶏肉部位	むね	もも	ささみ
測定値	7.29	13.57	0.73
(%)	7.28	13.27	0.77
	7.43	13.61	0.70
平均値(%)	7.3	13.5	0.7
SD	0.1	0.2	0.0
RSD(%)	1.4	1.5	0.0

表 5. 解凍鶏肉の冷蔵保存による安定性

冷蔵日数(日)	0	3	7
測定濃度	0.192	0.181	0.209
($\mu\text{g/g}$)	0.174	0.172	0.199
	0.183	0.182	0.194
	0.211	0.187	0.209
	0.163	0.175	0.196
平均値($\mu\text{g/g}$)	0.185	0.179	0.201
SD($\mu\text{g/g}$)	0.018	0.006	0.007
RSD(%)	9.7	3.4	3.5
安定性*(%)	—	96.8	108.6

$$* : \text{安定性}(\%) = \frac{\text{3日あるいは7日冷蔵保存時のスルファジミジン濃度平均値}}{\text{0日時のスルファジミジン濃度平均値}} \times 100$$

表 6. 繰り返し凍結、解凍による安定性

凍結・解凍回数	1	2	3
測定濃度	0.197	0.201	0.203
($\mu\text{g/g}$)	0.192	0.200	0.209
	0.192	0.202	0.191
	0.196	0.209	0.202
	0.210	0.211	0.213
平均値($\mu\text{g/g}$)	0.197	0.205	0.204
SD($\mu\text{g/g}$)	0.007	0.005	0.008
RSD(%)	3.6	2.4	3.9
安定性*(%)	—	103.5	103.0

$$* : \text{安定性}(\%) = \frac{\text{2回あるいは3回凍結・解凍時のスルファジミジン濃度平均値}}{\text{1回凍結・解凍時のスルファジミジン濃度平均値}} \times 100$$

*スルファジミジン 0.2 $\mu\text{g/g}$ 添加

表 7. 亜硝酸ナトリウム添加による鶏肉中 SDD の経時変化

保存日数	0日	1日	2日	6日	10日	19日
測定濃度	0.475	0.435	0.346	0.283	0.200	0.178
($\mu\text{g/mL}$)	0.472	0.422	0.350	0.278	0.264	0.187
	0.491	0.443	0.325	0.238	0.266	0.134
平均値($\mu\text{g/mL}$)	0.479	0.433	0.340	0.266	0.243	0.166
SD($\mu\text{g/mL}$)	0.010	0.011	0.013	0.025	0.038	0.028
RSD(%)	2.1	2.4	3.9	9.3	15.4	17.1
安定性*(%)	—	90.4	70.9	55.5	50.7	34.6

冷蔵庫で保存(4~8°C) pH6.0

$$* : \text{安定性}(\%) = \frac{\text{保存日数毎のスルファジミジン濃度平均値}}{\text{0日のスルファジミジン濃度平均値}} \times 100$$

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）

－セレウス菌検査用調査試料の新規開発に関する予備的検討－

主任研究者	小島	幸一	（財）食品薬品安全センター秦野研究所	所長
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	坂田	憲昭	（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
	山田	健一	（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

セレウス菌検査用調査試料を作製することを目的に、使用菌株の選択および基材について予備的検討を行った。その結果、栄養型の *B. cereus* では 3 社の NGKG 寒天培地および 1 社の MYP 寒天培地上において典型集落を形成することを確認した。また、作製した芽胞液を用いて基材中での安定性について検討する予定であったが、基材の候補として挙げた白米はオートクレーブ処理後の物性において調査試料としては適さないと判断したことに加え、さらに通常の 65℃、30 分間の熱処理を 3 回繰り返して行うことにより調製した *B. cereus* の芽胞液は一部の菌株において長期間保存できなかった。一方、マッシュポテトでは、接種菌数の低下は認められるものの、添加菌は添加後 57 日目まで観察された。

以上のことから、現状では長期間安定したセレウス菌検査用の外部精度管理調査試料を作製することは困難であると判断した。そのため、安定的に作製しうる芽胞の調製方法を確立することに加え、栄養型を用いた安定性についても検討する必要があ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（衛生指標

菌および食中毒病因微生物検査）試料の
作製にあたりとりわけ考慮しなければな

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での反応性が挙げられる。これまで大腸菌群、E. coli およびサルモネラ属菌検査について、ハンバーグやつみれといった食材を使用した外部精度管理調査用基材を作製してきた。しかしながら、食品衛生法ではこれ以外の食中毒病因微生物を対象とした検査も実施されていることを考慮すると、外部精度管理調査を実施するにあたり、より多くの項目について実施できるような体制を構築することが望まれる。セレウス菌は、土壌、塵埃、汚水等に存在しており、食品の腐敗菌として広く知られていることに加え、耐熱性芽胞を形成するため、加熱処理することによっても完全に死滅させることが困難であることから、品質管理上大きな問題となりうる。さらに、本菌による食中毒は感染型と毒素型の両者が認められている。

一方、外部精度管理調査試料としては、その性質上、定性検査の場合には確実に陽性、陰性の判定ができることに加えて、その結果が少なくとも1ヶ月間は保持される必要がある。また、本調査では陰性対照についても調査試料を作製し、送付を行っているが、陰性対照については選択培地上で陰性集落を形成するか、またはその他の普通寒天培地といった一般栄養培地において少なくとも集落を観察できる状況が必要となる。

そこで、本年度は新規項目としてセレウス菌検査を導入することを目的に、外部精度管理調査試料を作製するための検

討を行うとともに、安定的に菌液接種を行うための菌株の選定ならびに基材の選定を行うこととした。

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7菌株を用いた。

Bacillus cereus HIC 080115

Bacillus cereus HIC 080116

Bacillus cereus HIC 080117

Bacillus subtilis ATCC 6633

Bacillus subtilis HIC 080138

Bacillus megaterium HIC 080136

Bacillus sphaericus HIC 080137

なお、試験菌株は5継代以内のものを使用した。また、*B. subtilis* ATCC 6633は市販の芽胞液を使用した。

2. 対象微生物の選択培地上での反応性の確認

各菌株をNGKG寒天培地およびMYP寒天培地に接種し、35℃で24～48時間培養した後、形成した集落およびその周辺部の色調を観察した。なお、NGKG培地はA社、E社およびN社製を、MYP寒天培地はM社製を用いた。

3. 基材の検討

使用基材には、市販の白米およびマッシュポテトを用いた。白米基材を作製する際の米：水の比率は、1:0.8、1:1、1:1.2および1:1.4とした。また、マッシュポテト基材の組成はこれまでに外部精度管理調査試料として採用されている組成を採用した。これらの基材は121℃で30分

間のオートクレーブ処理を行った。なお、白米基材についてはオートクレーブ処理後の物性を確認した。基材の作製後の物性については目視ならびに滅菌スパーテルを用いた攪拌により確認した。

4. 芽胞液の調製

上記菌株をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト (SCD) 寒天培地に接種し、30~35°Cで7日間培養した。培養終了後、65°Cで30分間の熱処理を3回繰り返して行い、処理後に得られた溶液を芽胞液とした。

なお、*B. subtilis* ATCC 6633 については市販の芽胞液を使用した。

C. 研究結果

1. 芽胞形成菌の寒天培地上での集落形成の確認

セレウス菌検査において選択培地上での集落形成は、最終的な検査結果を判定するうえで重要な意味を持っている。これまでの経験から、外部精度管理調査試料の作製においていわゆる標準菌株を使用したとしても、その基材中での安定性や冷蔵保存等の条件により、検査過程で明らかに陽性または陰性を示すか否か不確定であることが多かった。そのため、まず初めに現在市販されている選択培地上での標準菌株の集落形成を確認することとした。栄養型の *B. cereus* HIC 080115、HIC 080116、HIC 080117 および *B. subtilis* ATCC 6633 芽胞型を NGKG 寒天培地 (3社) ならびに MYP 寒天培地 (1社) に接種したところ、*B. cereus* の3菌株についてはいずれの選択培地においても良好な発育が認められ、かつコロニー周辺

の赤変や白い帯の形成も認められた (表1)。これに対して、*B. subtilis* では NGKG 寒天培地において24時間培養では3社ともほとんど発育しなかったが、MYP 寒天培地では良好な発育が認められたものの、典型集落の形成はなかった。しかしながら、48時間の培養によりいずれの培地においても擬陽性と判定できる集落の形成を認めた。

2. セレウス菌検査に用いる基材の選定

上記の予備検討において使用したいずれの菌株も選択培地上での反応性から外部精度管理調査における標準菌株として使用できる可能性が高いと考えられたことから、これらの菌株を基材に接種し、基材中での安定性を確認することとした。なお、基材として市販の白米を用いることとした。まず初めに、米:水の比率を1:0.8から1:1.4まで変え、これらをオートクレーブ処理した後の性状について確認した。その結果、1:1.2以上の水分比のときにオートクレーブ直後の形状は通常の米飯と同等となったが、これを1日室温にて放置することにより、全体が固まってしまい、これに菌液を添加しても攪拌が全く行えない状況となった。そのため、これまでに外部精度管理調査試料として使用実績のあるマッシュポテトに菌液を接種したときの、菌数変化について確認することとした。その結果、芽胞液調製7日後の菌数が明らかに減少している菌株が認められた (表2)。芽胞を形成しなかった *B. cereus* HIC 080116 を除いた2菌株および *B. subtilis* をマッシュポテトに接種したところ、接種7日目以

降の生残菌数が約 10^{2-3} cfu/g であり (表 3)、ほぼこの菌数で接種後 57 日目まで推移した。さらに、陰性対照として使用した *B. subtilis* は選択培地上において赤色の帯が E 社では 48 時間の培養によって、A 社では 24 時間の培養によっても観察された。

3. 標準菌株の再検討

これまでの結果から、今回使用した *B. cereus* はセレウス菌検査を実施するにあたって、作製した芽胞液の安定性および選択培地上での反応性に問題があるものと考えられたこと、さらに使用した *B. subtilis* では選択培地上において擬陽性を示す可能性があることから、再度、使用する標準菌株の選定を行うこととした。なお、*B. cereus* の芽胞液を作製するにあたり、65°C 30 分間 3 回の熱処理を行ったが、安定的に芽胞を回収できていないことから、芽胞作製における至適条件を探るため、文献調査を併せて行った。

初めに陰性対照菌について同定を行い、さらに NGKG 寒天培地上での発育を確認した。その結果、栄養型の *B. sphaericus* HIC 080137 では陰性集落 (赤色または黄色の集落で周辺部に白い帯なし) の発育が認められたが、*B. megaterium* HIC 080136 では選択培地上に集落形成が全く認められなかった (表 4)。また、*B. sphaericus* は簡易同定キットの API CHB および API 20E においてもほとんど陽性反応を示さなかったことから、仮に集落を検出したとしても同定を行うことも困難であると考えられた。

一方、芽胞の作製方法について文献検索を行ったところ、芽胞形成率を高める

ために硫酸マンガンを添加した普通寒天培地あるいは土壌エキスキャンテン培地を用い、35°C で 3~10 日間培養した後、65 または 70°C で 15~30 分間と、いくつかの手法があった。

D. 考察

外部精度管理調査試料として新規項目を導入するため、セレウス菌検査を対象とした調査試料の作製を行うべく、予備的検討を行った。セレウス菌検査では最終的に NGKG 寒天培地または MYP 寒天培地上に形成される集落の形状を確認することにより、その判定が行われるが、時折、得られた集落について結果をどう判断するか苦慮することがある。そのため、外部精度管理調査を行ううえでは、陽性対照、陰性対照のいずれにおいても、選択培地上で明らかに鑑別できる菌種を採用する必要がある。そこで、*B. cereus* 3 菌株、陰性対照の *B. subtilis* 1 菌株について、選択培地上での集落形成を観察したところ、*B. cereus* については、いずれの 3 菌株とも NGKG 寒天培地および MYP 寒天培地のいずれにおいても典型集落が観察された。また、メーカーごとに判定のしやすさ等に差が認められた。しかし、これらの芽胞液を作製したところ、作製後 1 週間の時点で菌数の減少が認められた。このことは、使用した菌株の芽胞形成能が低いか、あるいは作製した芽胞液中に一部栄養型 (65°C での熱処理によっても死滅しない) が残存している可能性が考えられた。そのため、芽胞液として高頻度にかつ高い濃度で回収するために

は、その作製方法について検討する必要があることが示唆された。

一方、陰性対照では、これまでの調査試料には選択培地上に陰性集落を形成するものを採用してきた。しかしながら、今回の *B. subtilis* では NGKG 寒天培地上に集落形成が認められないか、あるいは認められた場合でも菌株によっては擬陽性を示すことがあった。このことは、陰性対照の設定方法を再考する必要があることを示している。すなわち、陰性対照菌が選択培地上では発育しないものの、他の一般栄養培地（普通寒天培地等）に接種することにより発育するものである。これにより、検査担当者は調査試料中に菌が添加されていないのではなく、発育しない菌種であると判断することができる。今回の検討においてもいくつかの陰性対照菌種を設定し、選択培地上での発育確認を行ったが、発育を認めない菌種もあった。このことから、セレウス菌検査における陰性対照について選択培地上での陰性集落形成を指標とすることは、使用候補菌種の選別において大きな障壁となる可能性もあることから、現状では選択培地上で明らかに陰性と判断されることを優先して選定する必要があると考えられた。

またこれと併行して、調査試料用基材の選定を行うため、白米を候補として使用した。現在、外部精度管理調査試料として用いている基材は、全て事前にオートクレーブ処理を行い、添加菌以外の菌種の影響を排除することとしている。そのため、オートクレーブ処理後の物性変化ならびその後の基材としての安定性は

外部精度管理調査を行ううえで非常に重要な要因となる。そこで、白米に水を添加し、これについてオートクレーブ処理を行ったところ、処理当日についてはある程度の柔らかさが確保されていたにも関わらず、翌日にはすでに全体が固まり、菌液を添加しても混合することができない状況であった。そのため、白米を外部精度管理調査試料用基材として採用することは非常に難しいものと判断した。そのため、今後は芽胞の作製方法を検討するとともに、栄養型菌をマッシュポテト等に添加することにより安定な調査試料を作製することができるか否かについて確認する必要があるものと考えられた。

E. 結論

外部精度管理調査試料として新規項目を導入することを目的として、セレウス菌検査を対象とした調査試料の作製を行うための予備検討を実施した。

当財団が有している標準菌株 (*B. cereus* HIC 080115、HIC 080116、HIC 080117、いずれも栄養型) および市販の *B. subtilis* ATCC 6633 芽胞液を用いて NGKG 寒天培地および MYP 寒天培地上での集落形成を確認したところ、*B. cereus* についてはいずれの菌株も典型集落の形成を認めた。これに対して、*B. subtilis* では NGKG 寒天培地上に発育集落はほとんど認められなかったが 48 時間培養により擬陽性と判定しうる集落の形成を認めた。一方、MYP 寒天培地上には陰性集落の発育を認めたものの、これについても培養時間を延長することにより擬陽性集落を認めた。なお、NGKG 寒天培地については 3

社について実施したが、判定のしやすさ等に差があるものの、概して同様の反応性を示した。以上のことから *B. cereus* については外部精度管理試料へと適用できると考えられたが、*B. cereus* の芽胞液を作製したところ、作製後 1 週間の時点で菌数の減少が認められた。このことは芽胞液として安定した回収が得られていないことを示しており、芽胞液の作製方法について検討することに加え、栄養型で菌液調製をしたときのマッシュポテト中での安定性についても検討する必要があるものと考えられた。セレウス菌は芽胞形成菌であることを考慮すると、芽胞状態で調査試料を作製したほうが、調査試料の安定性という点では有利であると考えられるが、その至適条件を見出すことは困難が予想される。この予測を踏まえると、これまでに実績のある無芽胞形成菌での安定性の確保方法がセレウス菌にも適用できる可能性は高いものと思われる。

これに対して、一部の陰性対照菌は選択培地上において 48 時間培養により擬陽性を示すことが明らかとなった。この事実は、最終的な菌種の同定を行わない限り、検査結果を陽性と判断する可能性を示しており、新規項目の導入時には避けるべき条件であると考えられる。そのため、陰性対照菌の選択培地上での反応性について、「発育しない」ということも含めて再考する必要がある。ただし、選択培地上に発育集落を認めないことは、場合によっては添加菌が存在しないことを意味することもありうることから、普通寒天

培地等の一般的な栄養培地上で発育することが絶対条件となろう。

また基材の検討においては、今回白米を候補として挙げたが、オートクレーブ処理後の物性変化のため採用することは難しいものと判断した。これまでの外部精度管理調査試料用基材の条件として、オートクレーブ処理ができるもの、その後の形状が少なくとも 1 ヶ月間保持できるもの、対象菌の接種が容易であるものが挙げられる。そのため、別の候補となりうる基材を選定する必要があると考えられた。しかし、マッシュポテトはこれまでも採用実績があることに加え、基材としての大きな問題点はないことから、これについて検討することは調査試料の新規開発という意味において今後の進捗に大きく関わるものであると考えている。

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 *B. cereus* および *B. subtilis* 標準菌株の選択培地上での反応性

培地	<i>B. cereus</i> HIC 080115	<i>B. cereus</i> HIC 080116	<i>B. cereus</i> HIC 080117	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
NGKG 寒天培地 (A社)	典型集落の 形成あり	典型集落の 形成あり	典型集落の 形成あり	48時間後に 擬陽性集落あり
NGKG 寒天培地 (E社)	↓	↓	↓	↓
NGKG 寒天培地 (N社)	↓	↓	↓	↓
MYP 寒天培地 (M社)	↓	↓	↓	↓

B. cereus は栄養型菌を選択培地に接種し、48時間後までの選択培地上での集落形成を観察した。

表2 作製した *B. cereus* 芽胞液の菌数変化

	作製直後	作製7日後
<i>B. cereus</i> HIC 080115	5.0×10^8	1.5×10^9
<i>B. cereus</i> HIC 080116	$<10^3$	—
<i>B. cereus</i> HIC 080117	1.2×10^6	9.1×10^5

表中の数値は1mLあたりの生菌数 (cfu/mL) を示す。

—: 実施せず

表3 マッシュポテト中での添加菌の安定性

	<i>B. cereus</i> HIC 080115	<i>B. cereus</i> HIC 080117	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
SCD 寒天培地			
接種直後	1.0×10^4	6.8×10^4	6.8×10^4
7日後	9.0×10^2	5.2×10^3	6.2×10^3
29日後	5.6×10^2	3.8×10^3	—
57日後	8.1×10^2	4.5×10^3	5.0×10^2
NGKG 寒天培地			
接種直後	1.7×10^3	7.3×10^4	3.0×10^3
7日後	7.5×10^3	5.7×10^3	8.0×10^2
29日後	5.2×10^2	1.9×10^3	—
57日後	6.0×10^2	3.7×10^3	6.0×10^2

NGKG 寒天培地は A 社製を使用した。

— : 実施せず

表4 陰性対照菌の選択培地上での反応性

	<i>B. megaterium</i> HIC 080136	<i>B. sphaericus</i> HIC 080137	<i>B. subtilis</i> HIC 080138
NGKG 寒天培地	陰性集落の形成あり	集落形成なし	わずかに集落形成あり

栄養型菌を N 社製培地に塗抹して 24 時間後の集落形成を観察した。

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作製と
信頼性確保に関する研究（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—

主任研究者 小島 幸一 (財)食品薬品安全センター 所長
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 食品衛生事業部長
協力研究者 笠間 菊子 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
井上 雪乃 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

研究要旨

アレルギー物質を含む特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）については食品への表示が義務付けられており、検査法が厚生労働省から通知されている。特定原材料検査の精度の適正化および向上のためには外部精度管理の実施が不可欠であるため、配布用調査試料作製が必要となっている。本年度は昨年引き続き、そば、落花生、小麦試料の調製について検討するとともに、少規模での調製については検討済みの卵について、配布量を想定した規模での試料調製を試みた。

そば、落花生は昨年度の粉末をより細かくした粉末を作製し、標準品規格による抽出液のタンパク質抽出量およびこの粉末を添加した試料の回収率および安定性を検討した。その結果、そばでは抽出率が改善し、また試料の安定性も向上した。落花生では抽出率、安定性ともにそばほどの改善は認められなかった。小麦は市販の小麦粉を用いた検討を続けた結果、Naturart 薄力粉を添加した試料でキット間の測定値の乖離が昨年度と比べ小さくなった。これらの添加試料を用いて PCR 法による確認試験を実施した結果、Genomic-Tip 20/G により抽出した DNA では、全試料で添加した特定原材料の増幅物が確認された。配布量を想定して作製した卵試料では、一元配置による均一性が確認できたほか、18 週間保存後の試料について実施した安定性試験およびウエスタンブロットによる確認試験の結果も良好であった。

A. 研究の目的

アレルギー体質を持つ人の健康危害の発生を防止するため平成 13 年 4 月にアレルギー物質を含む原材料 24 品目について、

食品への表示が推奨された。そのうち卵、乳、小麦、そば、落花生の 5 品目は特定原材料と指定され、食品への表示が義務付けられた。さらに平成 20 年 6 月には 2