

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 22 年度)

食品衛生外部精度管理調査における適性調査試料の作製検討と  
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	副所長
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
	福光 徹	(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、実分析をふまえ、新規基材を開発していかなければならないことも課題である。そこで、今年度もこれらの必須項目を満たす調査試料の作製を試みた。

平成 20 年度および平成 21 年度はスルファジミジン(以下 SDD)を添加した鶏肉(ささみ、むねおよびもも肉)試料について検討を行い、外部精度管理用調査試料の基材として平成 20 年度は 20%水添加の鶏肉(ささみ肉)、平成 21 年度および平成 22 年度は水無添加の鶏肉(むね肉)を採用した。また、平成 21 年度は豚肉各部位(ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉)を基材に SDD を含む 10 種のサルファ剤を添加して添加回収試験を行い、70%以上の回収率を得ることができた。今年度は 10 種のサルファ剤を添加した豚肉各部位(ヒレ、カタおよびバラ肉)の試料を作製し、均一性、冷凍保存安定性、冷蔵保存安定性および凍結融解安定性を検討することで調査試料への適用性を検討した。まず、均一性については、ヒレおよびカタ肉では全てのサルファ剤について確保することができたが、バラ肉では 10 種中 6 種のサルファ剤について確保することができなかった。バラ肉はヒレおよびカタ肉に比べ水分含量が低く、脂質含量が高いため、ヒレおよびカタ肉と同様の混合方法では均一な試料とすることが難しいと考えられた。均一性試験の約 100 日後の冷凍保存安定性は、いずれの基材およびサルファ剤においても 90%前後を確保することができた。冷蔵保存安定性は、多くのサルファ剤について、冷蔵 4 日

目においてはヒレおよびバラ肉では約 100%であったが、カタ肉では 80~90%となった。また、冷蔵 7 日目においてはヒレおよびバラ肉では 85%以上の安定性であったが、カタ肉では 80%を下回った。凍結融解安定性については、解凍 3 回目においても、いずれの基材およびサルファ剤においても 85%前後の安定性を得た。以上の結果から、豚肉においてはヒレ肉が調査試料としては最も適用可能性が高いと考えられた。

## 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新規調査試料の開発を行った。

今年度までの3年間の外部精度管理調査残留動物用医薬品検査において、検査対象として検出事例の多いスルファジミジンを採用し、これを鶏肉基材に添加して試料を作製した。平成18年5月より食品中に残留する農薬等についてポジティブリスト制度が導入されたことで、より多くの動物用医薬品について検査の信頼性を確保する必要性が生じるものと考えられることから、今年度はスルファジミジンを含む10種のサルファ剤について同時に検討することとした。検討基材として、検査機関からの要望の高い豚肉(ヒレ、カタおよびバラ肉)を選択し、各豚肉試料の外部精度管理用調査試料としての利用の可能性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試料基材および試薬

#### 1) 試料基材(食肉)

市販の豚肉(ヒレ、カタおよびバラ肉)を 3 度挽いたミンチ肉

#### 2) 標準品(サルファ剤 10 種)

スルファジミジン(以下 SDD)、スルファジアジン(以下 SDZ)、スルファメラジン(以下 SMR)、スルファメトキシピリダジン(以下 SMPD)、スルファモノメトキシシン(以下 SMMX)、スルファクロルピリダジン(以下 SCPD)、スルファメトキサゾール(以下 SMX)、スルファジメトキシシン(以下 SDMX)およびスルファキノキサリン(以下 SQ)(食品分析用、関東化学(株))、スルフイソキサゾール(以下 SIX)(残留農薬試験用、Dr. Ehrenstorfer GmbH)

#### 3) 試薬

メタノール、アセトニトリルおよび蒸留水(高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業(株))、n-ヘキサン、無水硫酸ナトリウム、リン酸一ナトリウム二水塩およびジエチルエーテル(試薬特級、和光純薬工業(株))、けい砂(鹿 1 級、関東化学(株))

固相抽出カラム: Sep-Pak® アルミナ N カートリッジ(Waters)、フィルター: エキクロディスク 25(0.45 μm 孔径)(日本ボール(株))

## 2. 使用機器および測定条件

### 1) 試料作製用混合機

ロボ・クープブリークサー5 プラス(容器容量:3.5 L、以下ブリークサー)

### 2) 試料抽出用機器

オムニミキサー (OMNI-International)、減圧濃縮器(東京理化器械株)

### 3) 測定機器

高速液体クロマトグラフ(以下 HPLC):LC-10A(株島津製作所)、検出器:SPD-10A(株島津製作所)

### 4) 測定条件

カラム:Mightysil RP-18(H)(150×4.6 mm、5 μm)、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:0.8 mL/min、カラム温度:40°C

## 3. 試料作製

ブリークサーを用いて豚肉の各部位のミンチ肉 2 kg をペーストにすると同時に各 20 μg/mL に調製したサルファ剤混合液(メタノール溶液)を 20 mL 添加し、よく混合した(添加濃度:0.20 μg/g)。これらを約 80 g ずつ容器に分注して冷凍(-24°C~-20°C)し、試料とした。同様にして、ほぼ同量の基材に同割合のメタノールを添加して、ブランク試料とした。

## 4. 試験方法

### 1) 試料からのサルファ剤の抽出

測定操作は、「食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編(2003)」に準じた。

試料 5.0 g を採取し、アセトニトリル 50、30 および 30 mL で 3 回オムニミキサーを用い

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採り、残った n-ヘキサン層に 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°C 以下で濃縮乾固した。残留物をメタノール 0.5 mL およびアセトニトリル:水(19:1)4 mL で溶解し、予めアセトニトリル:水(19:1)10 mL でコンディショニングした固相抽出カラムに注入した。その流出液は捨て、さらに固相抽出カラムにアセトニトリル:水(17:3)10 mL を注入し、その流出液を採り、40°C 以下で濃縮乾固した。残留物を 0.025 mol/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、フィルターでろ過した後、HPLC(UV)で測定した。

### 2) 基材の脂質量の測定(エーテル抽出法)

試料 10 g を採取し、無水硫酸ナトリウム 20 ~30 g を加え、ジエチルエーテル各 100 mL で 3 回オムニミキサーを用いて抽出した。1 晩放置後、エーテル層を採り、さらに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、濃縮乾固して得られた残留物重量を脂質量とした。

### 3) 基材の水分量の測定(常圧加熱乾燥法(乾燥助剤法))

試料 5 g を蒸発皿に採取し、適量の水およびけい砂を加えて混合した。65°C で加温し、添加した水分がほぼなくなった状態から 105°C で 5 時間乾燥した。得られた残留物重量を、採取した重量から差し引いた量を水分量とした。

(倫理面への配慮)

食の安心・安全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. 豚肉試料の均一性の確認

均一性試験は、作製後より冷凍保存した試料について、分注した容器から 10 容器を選択し、各 n=2 で各サルファ剤濃度を測定した。得られた結果について一元配置分散分析を行ったところ、ヒレおよびカタ肉では全てのサルファ剤において均一性が認められた（表 1）。しかしバラ肉では、10 種中 6 種のサルファ剤（SDZ、SMR、SDD、SMPD、SDMX および SQ）において均一性が認められなかった（表 1）。そこで、各基材について脂質量および水分量の測定を行ったところ、脂質量についてはバラ肉（34.0%）>カタ肉（22.2%）>ヒレ肉（6.8%）となり（表 2）、水分量については逆にヒレ肉（71.4%）>カタ肉（58.1%）>バラ肉（48.8%）となった（表 3）。以上の結果から、バラ肉は脂肪分が多く水分量が少ないため、ヒレおよびカタ肉と同様の混合方法では均一な試料を作製することは不可能であることが示唆された。また、いずれの基材においてもほぼ全てのサルファ剤について 80～90%の回収率を得た（表 1）。

### 2. 豚肉試料の冷凍保存安定性の確認

冷凍保存安定性試験は、作製後より冷凍保存した試料について、均一性試験の約 100 日後に、均一性試験同様、10 容器を選択し、各 n=2 で各サルファ剤濃度を測定した。得られた結果について、均一性試験時の

各サルファ剤濃度に対する割合（安定性（%））を算出した。3 種の基材について、冷凍約 100 日後の安定性を確認したところ、カタ肉における SQ（82.7%）およびバラ肉における SDD（83.9%）を除き、いずれの基材においても全てのサルファ剤について 85%以上の安定性が得られた（表 4）。このことから、一部のサルファ剤を除き、100 日間の冷凍保存において試料中のサルファ剤の安定性は良好であることが確認された（表 4）。

### 3. 豚肉試料の冷蔵保存安定性の確認

冷蔵保存安定性試験は、作製後より冷凍保存した試料について、分注した容器から 5 容器を選択し、各 n=1 で各サルファ剤濃度を測定した。試料解凍初日を冷蔵 0 日目とし、測定後の試料を冷蔵保存し、続いて冷蔵 4 日および 7 日目についても同様に測定を行った。安定性は、冷蔵 0 日目の n=5 の各サルファ剤濃度平均値に対する冷蔵 4 日目または冷蔵 7 日目の n=5 の各サルファ剤濃度平均値の割合（%）として算出した（冷蔵 0 日目の安定性は 100%）。その結果、ヒレ肉では、冷蔵 4 日目においては SIX（83.2%）を除き、95～100%の安定性であり、冷蔵 7 日目においては SCPD（81.5%）、SIX（37.9%）および SMX（83.3%）を除き、85%以上の安定性が確認された（表 5）。一方、カタ肉では、冷蔵 4 日目の時点で SDZ（105.7%）を除き、安定性は 80～90%となり、SMR（84.4%）、SIX（77.7%）、SMX（82.3%）および SDMX（83.6%）については 85%を下回った（表 6）。また、冷蔵 7 日目においては SDZ（104.5%）を除く他のサルファ剤についても

80%を下回るまでに低下した(表 6)。バラ肉では、冷蔵 4 日目においては SIX(77.6%)を除き、約 90%以上の安定性であり、冷蔵 7 日目においては SDZ(73.2%)、SIX(16.1%)、SMX(81.5%)を除き 85%以上の安定性が確認された(表 7)。ヒレおよびバラ肉の結果を比較すると、多くのサルファ剤においてバラ肉の方が高い回収率を得た(表 5 および表 7)。ヒレ、カタおよびバラ肉における SDZ、バラ肉における SMR においては、HPLC 測定における各サルファ剤のピークがバックグラウンドピークと重なったため、差し引いて算出した。また、いずれの基材においても、SIX は時間経過とともに他のサルファ剤と比較して大きく安定性が低下した。これは基材中の物質との相互作用による影響と考えられた。いずれの現象も冷凍保存安定性試験時には認められなかった。しかし、これらサルファ剤を調査対象に適用するのは難しいと考えられた。冷蔵保存安定性の結果、バラ肉がヒレおよびカタ肉に比べ高い安定性を有していると判断できるが、均一性試験の結果よりバラ肉は不適當であるため、カタ肉に比べて冷蔵保存安定性が良好であったヒレ肉が調査試料用基材としてはより適していることが示唆された。また、調査試料として、ヒレ肉における添加サルファ剤としては、冷蔵保存日数を最大 4 日間と規定することにより、SDZ および SIX を除き、適用可能であり、冷蔵保存日数を最大 7 日間と規定することにより、SDZ、SCPD、SIX および SMX を除き、適用可能であると考えられた。

#### 4. 豚肉試料の凍結融解安定性の確認

凍結融解安定性試験は、作製後より冷蔵保

存した試料について、分注した容器から 5 容器を選択し、各 n=1 で各サルファ剤濃度を測定した。解凍回数 1、2 および 3 回目について測定を行った。安定性は、解凍 1 回目の n=5 の各サルファ剤濃度平均値に対する解凍 2 回目または解凍 3 回目の n=5 の各サルファ剤濃度平均値の割合(%)として算出した(解凍 1 回目の安定性は 100%)。その結果、いずれの基材においても、凍結融解を繰り返すことで安定性が低下する傾向が認められたものの、2 回目の解凍では 90%以上の安定性が確保されていた(表 8~10)。3 回目の解凍では、ヒレ肉においては SDD(82.8%)および SCPD(84.5%)、カタ肉においては SCPD(83.4%)、バラ肉においては SDZ(82.2%)、SMR(84.5%)、SIX(76.8%) および SCPD(83.7%)について、85%を僅かながら下回ったものの、他のサルファ剤においては 85%以上の安定性を確保することができた(表 8~10)。より精度の高い調査試料の確保のためには、凍結融解回数を 2 回までと規定することが適切であると考えられた。

#### 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同等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、実分析をふまえた調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

豚肉基材として異なる 3 部位(ヒレ、カタおよびバラ肉)を採用し、それぞれについて 10 種のサルファ剤を添加した試料を作製し、均一性、冷凍保存安定性、冷蔵保存安定性お

よび凍結融解安定性を確認した。均一性試験の結果、ヒレおよびカタ肉は均一性が確認されたが、バラ肉については均一性が確保されなかった。また、冷蔵保存安定性の結果、バラ肉がヒレおよびカタ肉に比べ安定性が高く、次いでヒレ肉が高い安定性を有していることが示唆された。冷凍保存安定性および凍結融解安定性試験の結果は、いずれの基材においても安定性は良好であった。以上の結果から、ヒレ肉が調査試料として適切であることを確認した。冷蔵保存安定性がヒレおよびカタ肉に比べて良好であったバラ肉を用いた均一な試料の作製方法は、今後検討する必要があると考えられた。

#### 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 豚肉試料の均一性試験結果

	ヒレ肉			カタ肉			バラ肉					
	平均値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)	RSD (%)	分散比	平均値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)	RSD (%)	分散比	平均値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)	RSD (%)	分散比
スルファアジジン	0.170	85.0	3.13	0.77	0.175	87.5	5.10	1.55	**0.176	88.0	7.53	*7.35
スルファアマジン	0.174	87.0	2.92	1.21	0.183	91.5	5.08	1.59	**0.181	90.5	5.52	*7.80
スルファジミジン	0.169	84.5	2.80	0.99	0.177	88.5	5.10	2.49	0.173	86.5	5.63	*4.79
スルファメキシリダジン	0.165	82.5	4.06	1.81	0.174	87.0	4.97	1.99	0.171	85.5	5.43	*4.28
スルファモノトキシジン	0.168	84.0	3.38	1.14	0.177	88.5	5.66	2.04	0.172	86.0	6.98	2.54
スルファクロルピリダジン	0.161	80.5	4.08	1.96	0.169	84.5	5.27	1.39	0.164	82.0	6.74	2.77
スルファインキサゾール	0.155	77.5	5.37	2.91	0.165	82.5	4.82	2.12	0.164	82.0	5.80	2.80
スルファメキサゾール	0.172	86.0	3.08	0.85	0.181	90.5	5.19	2.87	0.180	90.0	5.24	2.25
スルファアジメキシジン	0.170	85.0	3.53	0.82	0.178	89.0	5.23	1.31	0.170	85.0	6.46	*4.52
スルファメキサリン	0.159	79.5	3.69	0.87	0.169	84.5	7.85	1.70	0.162	81.0	8.20	*6.48

平均値およびRSDは、容器間 (n=10) で算出した。

得られた分散比が有意水準5%でのF検定値(3.02)より小さい場合、試料は均一であると見なされないものに\*を付した。

\*\*HPLC測定におけるピークがバックグラウンドと重なったため、ブランク試料のバックグラウンドピークを差し引いて計算した(バラ肉におけるSDZおよびSMR)。

表2 豚肉基材の脂質量

豚肉基材	ヒレ	カタ	バラ
測定値	6.62	21.92	34.05
(%)	6.77	21.67	35.09
	6.89	22.34	33.59
	—	22.63	33.30
	—	22.64	33.97
平均値(%)	6.8	22.2	34.0
SD(%)	0.14	0.43	0.68
RSD(%)	2.1	1.9	2.0

表3 豚肉基材の水分量

豚肉基材	ヒレ	カタ	バラ
測定値	71.77	57.64	48.99
(%)	71.23	58.18	49.16
	71.35	57.97	48.80
	71.36	58.32	48.62
	71.53	58.43	48.54
平均値(%)	71.4	58.1	48.8
SD(%)	0.21	0.31	0.26
RSD(%)	0.3	0.5	0.5

表4 豚肉試料の安定性試験結果

	ヒレ肉				カタ肉				バラ肉			
	平均値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)	RSD (%)	安定性 (%)	平均値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)	RSD (%)	安定性 (%)	平均値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)	RSD (%)	安定性 (%)
スルファジアジン	0.157	78.5	3.45	92.5	0.161	80.5	5.05	92.1	0.161	80.5	5.27	92.2
スルファメテゾドン	0.162	81.0	2.91	93.0	0.165	82.5	5.29	90.1	0.166	83.0	4.15	92.5
スルファジミジン	0.156	78.0	5.07	92.1	0.157	78.5	7.03	88.9	0.145	72.5	8.54	83.9
スルファメキシピリダジン	0.158	79.0	3.70	95.5	0.158	79.0	5.06	91.0	0.160	80.0	3.46	93.5
スルファモノメキシジン	0.159	79.5	3.47	94.6	0.157	78.5	6.46	88.8	0.162	81.0	4.48	94.3
スルファクロルピリダジン	0.145	72.5	4.03	90.3	0.146	73.0	4.98	86.5	0.155	77.5	3.79	94.4
スルファインキサゾール	0.137	68.5	4.79	88.4	0.147	73.5	3.78	89.2	0.146	73.0	4.46	89.1
スルファトキサゾール	0.163	81.5	2.12	94.7	0.160	80.0	4.62	88.6	0.167	83.5	4.40	92.6
スルファジメキシジン	0.169	84.5	5.62	99.5	0.157	78.5	7.78	88.4	0.151	75.5	7.50	89.1
スルファキノキサリン	0.155	77.5	6.44	97.5	0.140	70.0	8.33	82.7	0.151	75.5	6.83	92.9

平均値およびRSDは、容器間(n=10)で算出した。  
安定性は、容器間(n=10)の各測定値について、均一性試験時の平均値に対する割合(%)として計算し、そのn=10の平均値を示した。



表5 ヒレ肉試料の冷蔵保存安定性

		冷蔵日数(日)	0	4	7
*スルファジアジン	SDZ	平均値(μg/g)	0.166	0.171	0.126
		回収率(%)	83.0	86.0	63.5
		RSD(%)	4.9	3.9	5.9
		安定性(%)	100.0	103.6	76.5
スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.171	0.172	0.161
		回収率(%)	85.5	86.0	80.5
		RSD(%)	5.8	2.7	4.1
		安定性(%)	100.0	100.6	94.2
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.169	0.168	0.150
		回収率(%)	84.5	84.0	75.0
		RSD(%)	6.7	2.6	4.2
		安定性(%)	100.0	99.4	88.8
スルファメキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.162	0.164	0.142
		回収率(%)	81.0	82.0	71.0
		RSD(%)	7.2	5.2	5.0
		安定性(%)	100.0	101.2	87.7
スルファモノメキシシン	SMMX	平均値(μg/g)	0.172	0.169	0.151
		回収率(%)	86.0	84.5	75.5
		RSD(%)	5.6	4.3	3.8
		安定性(%)	100.0	98.3	87.8
スルファクロルピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.162	0.159	0.132
		回収率(%)	81.0	79.5	66.0
		RSD(%)	6.1	5.3	5.7
		安定性(%)	100.0	98.1	81.5
スルフィンソキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.161	0.134	0.061
		回収率(%)	80.5	67.0	30.5
		RSD(%)	6.7	7.1	6.2
		安定性(%)	100.0	83.2	37.9
スルファメキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.174	0.165	0.145
		回収率(%)	87.0	82.5	72.5
		RSD(%)	4.1	5.0	5.4
		安定性(%)	100.0	94.8	83.3
スルファジメキシシン	SDMX	平均値(μg/g)	0.169	0.167	0.148
		回収率(%)	84.5	83.5	74.0
		RSD(%)	9.8	5.8	8.1
		安定性(%)	100.0	98.8	87.6
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.161	0.166	0.141
		回収率(%)	80.5	83.0	70.5
		RSD(%)	9.0	9.6	6.7
		安定性(%)	100.0	103.1	87.6

平均値およびRSDはn=5の測定値から算出した。

安定性は、冷蔵0日目に対する冷蔵n日目の濃度平均値の割合(%)として算出した。

\*HPLC測定におけるピークがバックグラウンドと重なったサルファ剤  
(ブランク試料のバックグラウンドピークを差し引いて算出)

表6 カタ肉試料の冷蔵保存安定性

		冷蔵日数(日)	0	4	7
*スルファジアジン	SDZ	平均値(μg/g)	0.176	0.186	0.184
		回収率(%)	88.0	93.0	92.0
		RSD(%)	4.7	5.0	12.5
		安定性(%)	100.0	105.7	104.5
スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.180	0.152	0.143
		回収率(%)	90.0	76.0	71.5
		RSD(%)	5.0	2.7	4.6
		安定性(%)	100.0	84.4	79.4
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.176	0.158	0.130
		回収率(%)	88.0	79.0	65.0
		RSD(%)	5.2	2.3	3.9
		安定性(%)	100.0	89.8	73.9
スルファメキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.177	0.151	0.126
		回収率(%)	88.5	75.5	63.0
		RSD(%)	4.1	0.8	4.8
		安定性(%)	100.0	85.3	71.2
スルファモノメキシン	SMMX	平均値(μg/g)	0.173	0.152	0.126
		回収率(%)	86.5	76.0	63.0
		RSD(%)	6.1	6.9	7.6
		安定性(%)	100.0	87.9	72.8
スルファクロルピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.177	0.151	0.109
		回収率(%)	88.5	75.5	54.5
		RSD(%)	4.1	0.8	6.6
		安定性(%)	100.0	85.3	61.6
スルフィンキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.166	0.129	0.101
		回収率(%)	83.0	64.5	50.5
		RSD(%)	4.3	3.5	5.3
		安定性(%)	100.0	77.7	60.8
スルファメキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.181	0.149	0.131
		回収率(%)	90.5	74.5	65.5
		RSD(%)	3.6	5.9	7.4
		安定性(%)	100.0	82.3	72.4
スルファジメキシン	SDMX	平均値(μg/g)	0.171	0.143	0.128
		回収率(%)	85.5	71.5	64.0
		RSD(%)	5.7	3.9	5.0
		安定性(%)	100.0	83.6	74.9
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.169	0.149	0.121
		回収率(%)	84.5	74.5	60.5
		RSD(%)	10.5	5.1	8.1
		安定性(%)	100.0	88.2	71.6

平均値およびRSDはn=5の測定値から算出した。

安定性は、冷蔵0日目に対する冷蔵n日目の濃度平均値の割合(%)として算出した。

\*HPLC測定におけるピークがバックグラウンドと重なったサルファ剤  
(ブランク試料のバックグラウンドピークを差し引いて算出)

表7 バラ肉試料の冷蔵保存安定性

		冷蔵日数(日)	0	4	7
*スルファジアジン	SDZ	平均値(μg/g)	0.179	0.167	0.131
		回収率(%)	89.5	83.5	65.5
		RSD(%)	5.9	6.2	14.1
		安定性(%)	100.0	93.3	73.2
*スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.174	0.180	0.174
		回収率(%)	87.0	90.0	87.0
		RSD(%)	6.3	3.9	6.1
		安定性(%)	100.0	103.4	100.0
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.177	0.172	0.164
		回収率(%)	88.5	86.0	82.0
		RSD(%)	5.6	5.7	14.2
		安定性(%)	100.0	97.2	92.7
スルファメトキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.176	0.171	0.163
		回収率(%)	88.0	85.5	81.5
		RSD(%)	2.7	2.3	9.0
		安定性(%)	100.0	97.2	92.6
スルファモノトキシシ	SMMX	平均値(μg/g)	0.176	0.173	0.162
		回収率(%)	88.0	86.5	81.0
		RSD(%)	4.7	2.3	4.6
		安定性(%)	100.0	98.3	92.0
スルファクロルピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.172	0.163	0.150
		回収率(%)	86.0	81.5	75.0
		RSD(%)	3.9	2.5	6.9
		安定性(%)	100.0	94.8	87.2
スルフィンキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.174	0.135	0.028
		回収率(%)	87.0	67.5	14.0
		RSD(%)	4.8	9.1	26.8
		安定性(%)	100.0	77.6	16.1
スルファメトキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.184	0.173	0.150
		回収率(%)	92.0	86.5	75.0
		RSD(%)	3.3	6.2	8.4
		安定性(%)	100.0	94.0	81.5
スルファジメトキシシ	SDMX	平均値(μg/g)	0.175	0.156	0.154
		回収率(%)	87.5	78.0	77.0
		RSD(%)	10.6	10.0	12.0
		安定性(%)	100.0	89.1	88.0
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.176	0.169	0.156
		回収率(%)	88.0	84.5	78.0
		RSD(%)	8.8	7.2	10.5
		安定性(%)	100.0	96.0	88.6

平均値およびRSDはn=5の測定値から算出した。

安定性は、冷蔵0日目に対する冷蔵n日目の濃度平均値の割合(%)として算出した。

\*HPLC測定におけるピークがバックグラウンドと重なったサルファ剤  
(ブランク試料のバックグラウンドピークを差し引いて算出)

表8 ヒレ肉試料の凍結融解安定性

		解凍回数(回)	1	2	3
スルファジアジン	SDZ	解凍回数(回)			
		平均値(μg/g)	0.171	0.157	0.152
		回収率(%)	85.5	78.5	76.0
		RSD(%)	3.3	2.6	2.6
スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.174	0.164	0.161
		回収率(%)	87.0	82.0	80.5
		RSD(%)	3.2	3.2	3.8
		安定性(%)	100.0	94.3	92.5
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.169	0.155	0.140
		回収率(%)	84.5	77.5	70.0
		RSD(%)	4.1	4.7	4.6
		安定性(%)	100.0	91.7	82.8
スルファメキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.160	0.155	0.144
		回収率(%)	80.0	77.5	72.0
		RSD(%)	5.4	2.4	6.3
		安定性(%)	100.0	96.9	90.0
スルファモノメキシシ	SMMX	平均値(μg/g)	0.168	0.159	0.157
		回収率(%)	84.0	79.5	78.5
		RSD(%)	3.8	4.5	3.1
		安定性(%)	100.0	94.6	93.5
スルファクロルピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.161	0.145	0.136
		回収率(%)	80.5	72.5	68.0
		RSD(%)	5.1	3.4	4.9
		安定性(%)	100.0	90.1	84.5
スルフィンキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.153	0.136	0.132
		回収率(%)	76.5	68.0	66.0
		RSD(%)	6.4	6.5	5.7
		安定性(%)	100.0	88.9	86.3
スルファメキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.173	0.164	0.157
		回収率(%)	86.5	82.0	78.5
		RSD(%)	3.2	3.6	5.0
		安定性(%)	100.0	94.8	90.8
スルファジメキシシ	SDMX	平均値(μg/g)	0.173	0.164	0.160
		回収率(%)	86.5	82.0	80.0
		RSD(%)	3.2	3.4	4.5
		安定性(%)	100.0	94.8	92.5
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.165	0.152	0.166
		回収率(%)	82.5	76.0	83.0
		RSD(%)	5.2	5.6	3.7
		安定性(%)	100.0	92.1	100.6

平均値およびRSDはn=5の測定値から算出した。

安定性は、解凍1回目に対する解凍n回目の濃度平均値の割合(%)として算出した。

表9 カタ肉試料の凍結融解安定性

		解凍回数(回)	1	2	3
スルファジアジン	SDZ	解凍回数(回)			
		平均値(μg/g)	0.173	0.162	0.153
		回収率(%)	86.5	81.0	76.5
		RSD(%)	3.4	6.9	4.8
		安定性(%)	100.0	93.6	88.4
スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.183	0.166	0.162
		回収率(%)	91.5	83.0	81.0
		RSD(%)	5.7	7.6	3.3
		安定性(%)	100.0	90.7	88.5
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.174	0.161	0.151
		回収率(%)	87.0	80.5	75.5
		RSD(%)	2.1	8.4	5.1
		安定性(%)	100.0	92.5	86.8
スルファメキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.171	0.160	0.150
		回収率(%)	85.5	80.0	75.0
		RSD(%)	2.0	7.1	4.7
		安定性(%)	100.0	93.6	87.7
スルファモノメキシシ	SMMX	平均値(μg/g)	0.173	0.159	0.157
		回収率(%)	86.5	79.5	78.5
		RSD(%)	3.4	9.1	5.0
		安定性(%)	100.0	91.9	90.8
スルファクロルピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.163	0.148	0.136
		回収率(%)	81.5	74.0	68.0
		RSD(%)	2.5	6.6	6.7
		安定性(%)	100.0	90.8	83.4
スルフィンキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.162	0.145	0.143
		回収率(%)	81.0	72.5	71.5
		RSD(%)	2.7	6.3	5.5
		安定性(%)	100.0	89.5	88.3
スルファメキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.178	0.160	0.157
		回収率(%)	89.0	80.0	78.5
		RSD(%)	1.7	6.4	5.8
		安定性(%)	100.0	89.9	88.2
スルファジメキシシ	SDMX	平均値(μg/g)	0.178	0.160	0.157
		回収率(%)	89.0	80.0	78.5
		RSD(%)	6.4	13.8	5.8
		安定性(%)	100.0	89.9	88.2
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.162	0.146	0.162
		回収率(%)	81.0	73.0	81.0
		RSD(%)	5.3	12.0	3.2
		安定性(%)	100.0	90.1	100.0

平均値およびRSDはn=5の測定値から算出した。  
 安定性は、解凍1回目に対する解凍n回目の濃度平均値の割合(%)として算出した。

表10 バラ肉試料の凍結融解安定性

		解凍回数(回)	1	2	3
スルファジアジン	SDZ	平均値(μg/g)	0.180	0.159	0.148
		回収率(%)	90.0	79.5	74.0
		RSD(%)	2.5	9.0	9.1
		安定性(%)	100.0	88.3	82.2
スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.181	0.167	0.153
		回収率(%)	90.5	83.5	76.5
		RSD(%)	3.6	5.5	9.6
		安定性(%)	100.0	92.3	84.5
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.174	0.147	0.148
		回収率(%)	87.0	73.5	74.0
		RSD(%)	4.0	9.4	8.5
		安定性(%)	100.0	84.5	85.1
スルファメキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.170	0.156	0.147
		回収率(%)	85.0	78.0	73.5
		RSD(%)	2.6	5.8	9.4
		安定性(%)	100.0	91.8	86.5
スルファモノメキシシ	SMMX	平均値(μg/g)	0.173	0.162	0.153
		回収率(%)	86.5	81.0	76.5
		RSD(%)	5.4	6.6	9.0
		安定性(%)	100.0	93.6	88.4
スルファクロルピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.166	0.153	0.139
		回収率(%)	83.0	76.5	69.5
		RSD(%)	4.7	5.6	9.3
		安定性(%)	100.0	92.2	83.7
スルフィンキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.164	0.143	0.126
		回収率(%)	82.0	71.5	63.0
		RSD(%)	2.5	3.5	9.7
		安定性(%)	100.0	87.2	76.8
スルファメキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.178	0.166	0.152
		回収率(%)	89.0	83.0	76.0
		RSD(%)	3.6	8.0	7.8
		安定性(%)	100.0	93.3	85.4
スルファジメキシシ	SDMX	平均値(μg/g)	0.169	0.151	0.149
		回収率(%)	84.5	75.5	74.5
		RSD(%)	6.4	8.7	12.5
		安定性(%)	100.0	89.3	88.2
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.161	0.151	0.142
		回収率(%)	80.5	75.5	71.0
		RSD(%)	6.8	10.1	10.2
		安定性(%)	100.0	93.8	88.2

平均値およびRSDはn=5の測定値から算出した。

安定性は、解凍1回目に対する解凍n回目の濃度平均値の割合(%)として算出した。

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およびビブリオ属菌検査用調査試料の  
新規開発に関する基礎的検討—

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 副所長
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
	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

昨年度の報告において、米飯を基材とした場合にセレウス菌検査用調査試料として使用しうる可能性を示唆したが、添加菌の安定性をより確保することを目的として基材に添加する食塩濃度について検討した。その結果、陽性対照菌として用いた全ての菌株において10%から15%のいずれの食塩濃度においても28日目まで安定した菌数を示した。これに対して陰性対照菌は10%および12.5%では菌数が増加したが、15%では菌数の増加は弱かった。なおこれらの結果は22.5℃の培養条件において認められたことから、調査試料の送付における温度変化に対して非常に有利であるものと考えられた。

一方、ビブリオ属菌については昨年度に培地中での長期間の保存が可能となったことから、基材に添加することでの安定性について確認することとした。基材としてこうや豆腐および麩を選択し、これらにビブリオ属菌を添加したところ、こうや豆腐において22.5℃保存で104日まで添加菌を回収することができた。実際に調査試料を送付する際には添加菌の安定性を考慮して冷蔵にて送付することから、増菌後に冷蔵保存した際の安定性について検討したが、22.5℃保存と比較すると明らかに不安定であり、菌数の減少が認められた。

以上のことから、セレウス菌検査用調査試料は外部精度管理調査においても菌数測定用基材としても有用である可能性が高いものと考えられた。一方、ビブリオ属菌検査における調査試料は基材中において添加菌を比較的安定化させることができたが、調査試料の送付条件等を含めてさらに検討の必要が考えられた。また、より実用的な基材の開発も必要であると考えられた。

## 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。これまでに外部精度管理調査試料の定性検査用試料として、大腸菌群、E. coli、黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌の4種について提供してきた。しかしながら、食品検査における微生物検査はこれら以外にも多数存在することから、実際の微生物検査を見据えた調査項目の選定が必要である。また、外部精度管理調査では参加機関からの意見として、実際の食材に近いものを提供してほしいとのことであるため、単に検査対象菌種の安定性を保証し、寒天培地等を用いて検査対象菌のみを提供することはできない。そのため、接種菌の安定性を採用する食品基材中においても保証する必要がある。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、ビブリオ属菌は、水中に多く生息しているが、耐塩性を有しているために海水中にも存在することから、魚介類の生食による食中毒の原因としても挙げられる。

外部精度管理調査用試料は、その試料を用いて共同試験を実施することから、試料中の均一性と安定性が保証されなければならない。また、特に微生物検査の場合には通常採

用される検査方法に基づいた定性検査を実施したときに、その選択培地上で明らかに陽性、陰性が調査試料の配布から1ヶ月間に亘って判定できることが求められる。

そこで、本年度はセレウス菌検査およびビブリオ属菌検査を対象とした調査試料作製を目標として、基材を用いた基礎的検討を行うこととした。

## B. 研究方法

### 1. 試験菌株

試験菌株は、秦野研究所に保存してある以下の菌株を用いた。

#### セレウス菌検査用

*Bacillus cereus* HIC 080115

*Bacillus cereus* HIC 080117

*Bacillus cereus* HIC 090147

*Bacillus cereus* HIC 100172

*Bacillus subtilis* HIC 080138

*Bacillus subtilis* HIC 100165

*Bacillus megaterium* HIC 080136

#### ビブリオ属菌検査用

*Vibrio parahaemolyticus* HIC 090153

*Vibrio fluvialis* HIC 090156

なお、試験菌株は5継代以内のものを使用した。

### 2. セレウス菌検査用菌株の芽胞液作製

上記のセレウス菌検査用菌株をMnSO<sub>4</sub>を含有する普通寒天培地に接種し、30~35℃で7日間培養した。培養終了後、生理食塩液に懸濁させ、芽胞液を得た。

### 3. セレウス菌検査用基材の作製

市販の白米について、121℃で60分間のオ



オートクレーブ滅菌を行った後、これに 10% NaCl 溶液、12.5% NaCl 溶液または 15% NaCl 溶液を添加し、完全に水分が吸収され米飯状となったことを確認し、これをセレウス菌検査用基材(米飯)とした。

#### 4. セレウス菌検査用試料における均一性および安定性の確認

セレウス菌検査用基材に試験菌を接種し、よく攪拌した後、22.5℃で 28 日間保存した。保存開始時、保存 7 日目、14 日目および 28 日目に試料を取り出し、試料から試料溶液を作製した後、この試料溶液についてソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)寒天培地を用いて生菌数測定をそれぞれ実施した。同様に NGKG 寒天培地、MYP 寒天培地、PEMBA 寒天培地およびコンパクトドライにも保存後に調製した試料溶液を添加し、培地上での集落形成等の定性反応を観察した後、菌数測定を行った。なお、生菌数測定は n=1 で行った。

定性反応における判定は典型集落を形成する場合に「+」、典型集落ではない集落が認められるか、または生育しなかった場合に「-」とした。

#### 5. ビブリオ属菌の基材中での安定性の確認

ビブリオ属菌を 2%ゼラチン加 Marine broth で 24 時間前培養した後、2%ゼラチン加 Marine broth で 10 倍希釈したものを試験菌液とした。試験菌液 20mL、基材および 2%ゼラチン加 Marine broth を加え、合計重量が 100g となるようにした。これを 22.5℃にて保存し、経時的に Marine agar を用いて生菌数測定を行った。なお、保存期間は 104 日までとした。

#### 6. ビブリオ属菌の各種選択培地上での菌数測定

上記と同様に調製したこうや豆腐を用いた基材に、ビブリオ属菌の 2 種を添加した後、22.5℃にて約 100 日間保存したものについて TCBS 寒天培地および酵素基質培地を用いて集落の確認および生菌数測定を行った。

### C. 研究結果

#### 1. セレウス菌検査用基材作製における食塩濃度の影響

外部精度管理調査試料を作製するにあたり、とりわけ菌数測定も行う場合には、基材に接種した添加菌の長期間の安定性と温度変化に強いことが求められる。昨年度の結果から、セレウス菌検査用調査試料として作製した米飯が長期間に亘り安定した菌数を確保できることが明らかとなった。そこで、基材作製を行う際に添加する食塩濃度について検討することとした。すなわち、オートクレーブ処理した米飯に 10%、12.5%および 15%の滅菌食塩液を添加した後、セレウス菌芽胞液を添加した。これを 22.5℃で保存し、経時的に選択培地上の典型集落の形成の有無、および菌数測定を行った。なお、測定には NGKG 寒天培地、MYP 寒天培地、PEMBA 寒天培地およびコンパクトドライを用いた。なお、対照としてソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)寒天培地を用いた。

その結果、*B. cereus* の 4 菌株および陰性対照である *B. subtilis* および *B. megaterium* について 28 日目まで 22.5℃で保存した際の菌数測定を SCD 寒天培地で測定したところ、*B. cereus* の 4 菌株についてはいずれの食塩濃度においても 28 日目まで接種菌数とほぼ同等の菌数が得られた。これに対して、*B. subtilis* の 2 菌株および *B. megaterium* では食塩濃度に依

存した菌数上昇の抑制が認められた。特に15%の滅菌食塩液を用いた際には、*B. subtilis* HIC 100165 においては接種菌数と同等の菌数であった(図 1、2)。

さらに NGKG 寒天培地、MYP 寒天培地、PEMBA 寒天培地およびコンパクトドライを用いた典型集落の形成の有無および菌数測定を行ったところ、*B. cereus*の4菌株についてはいずれの選択培地においても典型集落の形成を認め、かつ平板上の集落数から算出した生菌数は SCD 寒天培地における結果とほぼ同等であった。これに対して、陰性対照菌である *B. megateirum* ではいずれの選択培地においても集落形成を認めなかったが、*B. subtilis* の2菌株については NGKG 寒天培地およびコンパクトドライでは典型集落の形成を認めなかったが、MYP 寒天培地および PEMBA 寒天培地上には典型集落は認めないものの、非典型集落の形成を認めた(表 1~7)。

## 2. ビブリオ属菌検査用調査試料の選択と安定性

昨年度の報告において、Marine agar を用いることによりビブリオ属菌を 22.5℃にて長期間保存できることを明らかとした。そこで、この条件をもとに調査試料として配布することを前提とした基材の選択を行った。なお、基材としてはこうや豆腐および麩を用い、吸水性が高い食材を選択した。すなわち、こうや豆腐または麩を乾燥状態でオートクレーブ処理を行うか、あるいは麩に2%ゼラチン加 Marine broth を加えた後にオートクレーブ処理を行った。これに乾燥状態でオートクレーブ処理したものには2%ゼラチン加 Marine broth を添加した後、菌液を添加した。2%ゼラチン加 Marine broth を添加してオートクレーブ処理を行った麩について

は、そのまま菌液のみを添加した。なお、いずれの基材についても基材、添加液量および菌液の合計が 100g となるようにした。これらについて 22.5℃にて保存したところ、こうや豆腐については、*V. parahaemolyticus*、*V. fluvialis* のいずれにおいても一度  $10^8$  オーダーまで菌数が上昇した後、 $10^7$  オーダーまで減少し、その後一定となる傾向が認められた。しかも菌数は菌液接種後 104 日目まで持続した。これに対して、麩では *V. parahaemolyticus* の場合に菌液接種後 21 日目には検出限界以下にまで減少した。*V. fluvialis* についても同様であったが、菌液接種後 29 日目において  $10^4$  オーダーまで菌数が減少した(図 3)。

## 3. ビブリオ属菌の増菌後の冷蔵保存

上記において、こうや豆腐を用いることにより長期間に亘ってビブリオ属菌を安定的に基材中に生残させることが可能となったが、微生物学調査試料の取り扱いには基本的に冷蔵保存または冷凍保存となる。そこで、こうや豆腐を用いた際に冷蔵保存を行ったときの接種菌の安定性について検討した。すなわち、約  $10^5$  cfu/g となるように菌液接種後 22.5℃で保存、菌液接種後 22.5℃で 3 日間保存した後に冷蔵保存、菌液接種後冷蔵保存の3条件で行った。その結果、いずれの菌株においても 22.5℃保存以外の条件では長期的に菌数を保持することはできなかった。なお、今回の試験では *V. fluvialis* を 22.5℃で保存した場合に長期保存することはできなかった。特に、22.5℃にて増菌培養を行った後に冷蔵保存を行うことによっても接種菌の減少が認められたことから、現状では冷蔵保存により接種菌の安定化を図ることは難しいものと考えられた(図 4、5)。また、メーカーの異なる TCBS 寒天培地 5

種と酵素基質培地を用いた菌数測定を行ったところ、*V. parahaemolyticus*ではいずれの培地においても Marine agar と比較すると若干低いものの、ほぼ同等の菌数が得られた。これに対して、*V. fluvialis*の場合、一部の TCBS 寒天培地において Marine agar で認められた菌数と比較して、 $10^3$  オーダー以上低く認められたものがあった(図 6)。

#### D. 考察

外部精度管理調査にセレウス菌とビブリオ属菌検査に関する調査試料を導入することを目標として、基材作製ならびに基材中での安定化を検討するための基礎的検討を行った。昨年度の結果からセレウス菌検査用調査試料の作製において、米飯に滅菌食塩液を添加することにより、長期間に亘って安定的に添加菌を回収できる基材を開発することができた。しかも、この基材を用いることにより、冷蔵保存のみならず、 $22.5^{\circ}\text{C}$ まで上昇させても菌数の変動がほとんど認められなかった。配送業者では配送時の温度管理を行っているが、全てについて適切に実施されているかについては疑問がある。そのため、予防的措置として温度変化に強い調査試料を作製することは検査結果のばらつきの回避にも有効な手段であるものと考えられる。今回の結果は、まさに輸送に伴う温度の変化あるいは受け取り後の保管条件の逸脱等においても菌数として影響を受けにくいことを示しており、生菌数測定を行う外部精度管理調査試料としては非常に有利な点であると考えられる。そこで、本年度は昨年度に開発した米飯基材をもとに、これに添加する滅菌食塩液の濃度について検討し、より安定的に添加菌を回収できる条件を見出すこととした。その結果、*B. cereus*の4菌株では10~15%のい

ずれの食塩濃度でも  $22.5^{\circ}\text{C}$ での保存によっても28日間の菌数変動はほとんど認められなかった。これに対して、陰性対照菌である *B. subtilis* および *B. megaterium* では食塩濃度に依存的な増菌抑制効果が認められた。さらに、定性検査では陽性対照菌で使用した全ての培地において典型集落を形成し、しかも得られる菌数はSCD寒天培地において認められる菌数とほぼ同等であった。一方、陰性対照菌では選択培地上で典型集落を認める場合と、非典型集落を認める場合の2とおりが観察された。外部精度管理調査を行う場合、陽性対照菌については公定法により当該検査を実施した場合に明らかに陽性と判定される必要があり、かつ陰性対照菌についても必ず陰性と判定される必要がある。今回用いた菌株では上記の要件を満たしているものの、陰性対照菌において選択培地上で集落形成を認めない事例が認められた。外部精度管理調査を行う場合、調査試料について検査を実施した際に選択培地上に集落が認められなかった場合、参加者は菌が調査試料に接種されていないのではと考える可能性もある。そのため、セレウス菌検査に関する外部精度管理調査を実施する場合にはいくつかの選択培地上で非典型集落を形成する *B. subtilis* は非常に当方の意図として適した菌種であるのかもしれない。ただし、全ての選択培地上で非典型集落を形成するわけではないので、その部分をどのように配慮するかが問題となる。しかし、この陰性対照菌に関する事例を除くと、温度変化に非常に強く、かつ接種菌が安定して回収できることは外部精度管理調査試料として採用するには十分な要件であると考えられた。今後は菌数濃度を低くした際の安定性について検討し、より実用的な基材の開発が必要であると考えら

れた。

一方、ビブリオ属菌検査用調査試料に関する検討では、昨年度の検討において長期間の保存が可能であった Marine agar および Marine broth を安定化のためのベースとして、吸水性の高いこうや豆腐および麩を基材として選択することにより、培地成分を含んだ状態の基材中で添加菌を安定化させることができるのではないかと考え、これらの基材を用いたときの添加菌の安定性について観察した。その結果、こうや豆腐を用いることにより陽性対照菌、陰性対照菌ともに 104 日間の長期に亘って添加菌を回収することができた。しかし麩では長くても 71 日目では完全に添加菌を測定することができなかったことから、こうや豆腐は基材として採用できる可能性が考えられた。ビブリオ属菌は魚介類等から多く検出されることを考慮すると今回のこうや豆腐は適切ではないかもしれない。しかし、食材中での安定化を図ることは最終的な実食材への適用を図るうえで非常に重要なことであるものとする。すなわち、培地成分のみならず食材中に含まれる構成成分等との相互作用により添加菌の安定性が変化する可能性は十分に考えられる。そのためにも、こうや豆腐のように比較的単純な構成成分から成る食材から開始することで、今後より多くの知見を得るための足がかりになればと考えている。さらに、安定性の確認において一度  $10^8$  オーダーまで増菌してから安定化する傾向が認められた。そこで、外部精度管理調査を実施する際に用いる輸送および保存の温度条件である冷蔵保存における菌数の変化について確認した。しかし、増菌の有無に関わらず冷蔵保存することによって著しい菌数の減少が認められたことから、現時点においてこうや豆腐を用いて作製したビブリオ属菌検査

用調査試料は冷蔵保存を行うことはできないものと判断した。また、 $22.5^{\circ}\text{C}$  で 100 日間保存したこうや豆腐基材について TCBS 寒天培地 5 種および酵素基質培地 3 種についてそれぞれ定性反応および菌数測定を行ったところ、陰性対照菌である *V. fluvialis* において TCBS 寒天培地のメーカーによって大きく菌数が変動することが明らかとなった。この現象は菌液単独でも観察されていることから、基材との相互作用に基づくものではなく、あくまでもメーカーごとの反応性の相違に基づくものと考えられた。

## E. 結論

外部精度管理調査における新規項目を導入することを目的として、セレウス菌検査およびビブリオ属菌検査に関する調査試料の作製を試みた。

セレウス菌用調査試料では米飯基材に 10~15%の滅菌食塩液を添加することにより、*B. cereus* ではいずれの濃度においても安定的に添加菌が回収されたが、*B. subtilis* および *B. megaterium* では食塩濃度に依存した増菌抑制効果が認められた。さらに、*B. megaterium* では採用した全ての選択培地上で集落を形成しなかったが、*B. subtilis* では選択培地の種類によっては非典型集落形成を認めた。

一方、ビブリオ属菌検査ではこうや豆腐と麩を基材として採用し、昨年度に確立した Marine broth を用いる系で安定性について検討したところ、こうや豆腐において *V. parahaemolyticus* および *V. fluvialis* のいずれにおいても 100 日まで安定して添加菌を回収することができた。しかし、添加濃度を維持して 100 日目まで推移するのではなく、一般的な栄養型細菌と同様に一度増菌してから安定化す