

表1 果実ペースト試料中、保存料（ソルビン酸及びPHBA類）の均一性試験結果

添加保存料	保存条件	いちご		バナナ	
		冷蔵	冷凍	冷蔵	冷凍
ソルビン酸	平均値 (g/kg)	0.249	0.246	0.249	0.248
	回収率 (%)	99.6	98.4	99.6	99.2
	RSD (%)	0.7	0.8	0.9	0.9
	F 値	1.611	1.477	1.530	1.794
PHBA エチル	平均値 (g/kg)	0.0501	0.0447	0.0493	0.0464
	回収率 (%)	50.1	44.7	49.3	46.4
	RSD (%)	12.3	9.9	8.8	4.3
	F 値	3.157	2.580	3.242	0.1285
PHBA プロピル	平均値 (g/kg)	0.0591	0.0706	0.0575	0.0722
	回収率 (%)	59.1	70.6	57.5	72.2
	RSD (%)	5.9	5.9	5.5	3.1
	F 値	1.268	1.392	2.970	0.1191
PHBA イソプロピル	平均値 (g/kg)	0.0831	0.0871	0.0823	0.0876
	回収率 (%)	83.1	87.1	82.3	87.6
	RSD (%)	3.3	3.6	3.3	2.2
	F 値	1.245	1.087	2.620	0.1422
PHBA ブチル	平均値 (g/kg)	0.0865	0.0887	0.0834	0.0871
	回収率 (%)	86.5	88.7	83.4	87.1
	RSD (%)	3.2	3.0	3.4	2.2
	F 値	1.930	0.5484	1.636	0.1471
PHBA イソブチル	平均値 (g/kg)	0.0783	0.0936	0.0770	0.0928
	回収率 (%)	78.3	93.6	77.0	92.8
	RSD (%)	2.1	2.2	2.3	1.8
	F 値	2.360	0.5602	1.494	0.1877

添加濃度： 0.25 g/kg（ソルビン酸として）及び 0.1 g/kg（PHBA 類）

平均値及び RSD は n=10 の測定値から算出した。

有意水準 5%点： 3.020

表2 魚肉練り製品試料（しんじょう）中、ソルビン酸の均一性試験結果

No.	冷蔵			冷凍		
	ソルビン酸濃度 (g/kg)		平均値 (g/kg)	ソルビン酸濃度 (g/kg)		平均値 (g/kg)
	1	2		1	2	
1	0.223	0.216	0.219	0.225	0.232	0.228
2	0.216	0.221	0.218	0.232	0.225	0.228
3	0.214	0.217	0.215	0.226	0.232	0.229
4	0.219	0.220	0.219	0.228	0.233	0.230
5	0.220	0.224	0.222	0.228	0.224	0.226
6	0.214	0.225	0.219	0.226	0.226	0.226
7	0.216	0.217	0.216	0.232	0.229	0.230
8	0.219	0.223	0.221	0.221	0.224	0.222
9	0.218	0.230	0.224	0.234	0.233	0.233
10	0.218	0.224	0.221	0.228	0.235	0.231
平均値 (g/kg)			0.219	平均値 (g/kg)		0.228
SD (g/kg)			0.00272	SD (g/kg)		0.00309
RSD (%)			1.2	RSD (%)		1.4
回収率 (%)			87.6	回収率 (%)		91.2
F 値			0.6018	F 値		1.656

添加濃度：0.25 g/kg（ソルビン酸として）

平均値及びRSDはn=10の測定値から算出した。

有意水準5%点：3.020

表3 魚肉練り製品試料（魚のすり身（生））中、ソルビン酸の均一性試験結果

試料量	1 kg	3 kg
平均値 (g/kg)	0.949	0.923
回収率 (%)	94.9	92.3
RSD (%)	2.0	1.4
F 値	1.092	0.9676

添加濃度：ソルビン酸として 1 g/kg

有意水準 5%点：3.020

表4 魚肉練り製品試料（かまぼこ）における蒸し方法検討結果1

－餅つき機「蒸し」機能の利用－

位置	A	B	C	上部*	下部*	全試料
個体あるいは分割数 (繰り返し回数)	6 (n=2)	6 (n=2)	6 (n=2)	3 (n=3)	3 (n=3)	3 (n=6)
平均値 (g/kg)	0.914	0.915	0.952	0.929	0.925	0.927
回収率 (%)	91.4	91.5	95.2	92.9	92.5	92.7
RSD (%)	1.1	1.8	1.7	1.8	3.1	2.5
F 値	0.7824	0.8170	1.086	3.222	12.84	13.65
有意水準 5%点	4.387	4.387	4.387	5.143	5.143	3.682

添加濃度：ソルビン酸として 1 g/kg

\*：上部はA・B・Cにおける1～3、下部はA・B・Cにおける4～6

表5 魚肉練り製品試料（かまぼこ）における蒸し方法検討結果2-1

－ウィンディーオープン①－

No.	上段 (図5の灰色試料)			下段 (図5の白色試料)		
	ソルビン酸濃度 (g/kg)		平均値 (g/kg)	ソルビン酸濃度 (g/kg)		平均値 (g/kg)
	1	2		1	2	
1	0.862	0.845	0.853	0.924	0.929	0.926
2	0.827	0.848	0.837	0.907	0.909	0.908
3	0.834	0.856	0.845	0.892	0.887	0.889
4	0.851	0.845	0.848	0.904	0.894	0.899
5	0.841	0.857	0.849	0.895	0.836	0.865
6	0.846	0.868	0.857	0.900	0.675	0.787
7	0.849	0.842	0.845	0.883	0.885	0.884
8	0.830	0.852	0.841	0.909	0.890	0.899
9	0.820	0.846	0.833	0.898	0.902	0.900
10	0.902	0.909	0.905	0.898	0.895	0.896

添加濃度：1 g/kg (ソルビン酸として)

オープン設定温度：110℃

表6 魚肉練り製品試料（かまぼこ）における蒸し方法検討結果2-2

ーウィンディーオープン②ー

	上段	下段 <sup>1)</sup>	手前 <sup>2)</sup>	奥 <sup>3)</sup>	全試料 <sup>1)</sup>
平均値 (g/kg)	0.851	0.896	0.881	0.863	0.873
SD (g/kg)	0.0202	0.0167	0.0254	0.0319	0.0293
RSD (%)	2.4	1.9	2.9	3.7	3.4
回収率 (%)	85.1	89.6	88.1	86.3	87.3
F 値	5.060	2.489	13.14	6.922	9.006
有意水準 5%点	3.020	3.230	3.020	3.230	2.182

添加濃度：1 g/kg（ソルビン酸として）

オープン設定温度：110℃

1) 下段 No. 6 を棄却し、試料数 9 または 19 とした検定結果

2) 図 5(b) の灰色試料 5、6、9、10 及び白色試料 3、4、7、8、9、10

3) 図 5(b) の灰色試料 1、2、3、4、7、8 及び白色試料 1、2、5

表7 高速遠心粉砕機による玄米試料均一化の検討

	ダイアジノン	クロルピリホス	マラチオン	フェニトロチオン
回収率 (%)	68.2	70.9	61.4	73.4
SD (%)	1.78	1.87	2.53	2.38
F 値	0.9087	2.922	1.885	1.172

有意水準 5%点：3.020

表8 玄米及び精米の粉砕法の比較

試料		ダイアジノン	クロルピリホス	マラチオン	フェニトロチオン	
小型粉砕機	玄米	回収率 (%)	84.7	88.8	68.2	89.1
		SD (%)	5.81	6.41	4.95	6.70
		F 値	7.767	5.809	6.162	3.905
	精米	回収率 (%)	83.7	89.8	92.2	104.4
		SD (%)	3.25	4.77	5.44	6.54
		F 値	3.930	2.834	2.509	2.227
高速遠心粉砕機	玄米	回収率 (%)	68.2	70.9	61.4	73.4
		SD (%)	1.78	1.87	2.53	2.38
		F 値	0.909	2.922	1.885	1.172
	精米	回収率 (%)	49.7	55.5	52.7	56.8
		SD (%)	1.42	1.97	1.32	1.55
		F 値	1.958	3.157	1.133	1.547

有意水準 5%点：3.020

表9 粉体フラスコ内壁面への農薬残存率

粉体フラスコ No.	粉体フラスコ内壁面残渣中の農薬残存率 (%)			
	ダイアジノン	クロルピリホス	マラチオン	フェニトロチオン
1	3.54	3.83	4.13	4.04
2	0.87	0.99	0.97	1.02
3	6.40	7.07	7.91	7.99
4	5.79	6.26	7.05	6.91
5	6.67	7.32	8.37	8.23
6	5.86	6.55	7.24	7.62
7	5.08	5.56	6.13	6.14
8	7.45	8.23	9.15	9.16
9	8.06	8.82	9.75	10.03
10	7.80	8.72	9.66	9.70
平均値 (%)	5.75	6.34	7.04	7.11
RSD (%)	38.0	38.1	38.9	39.4

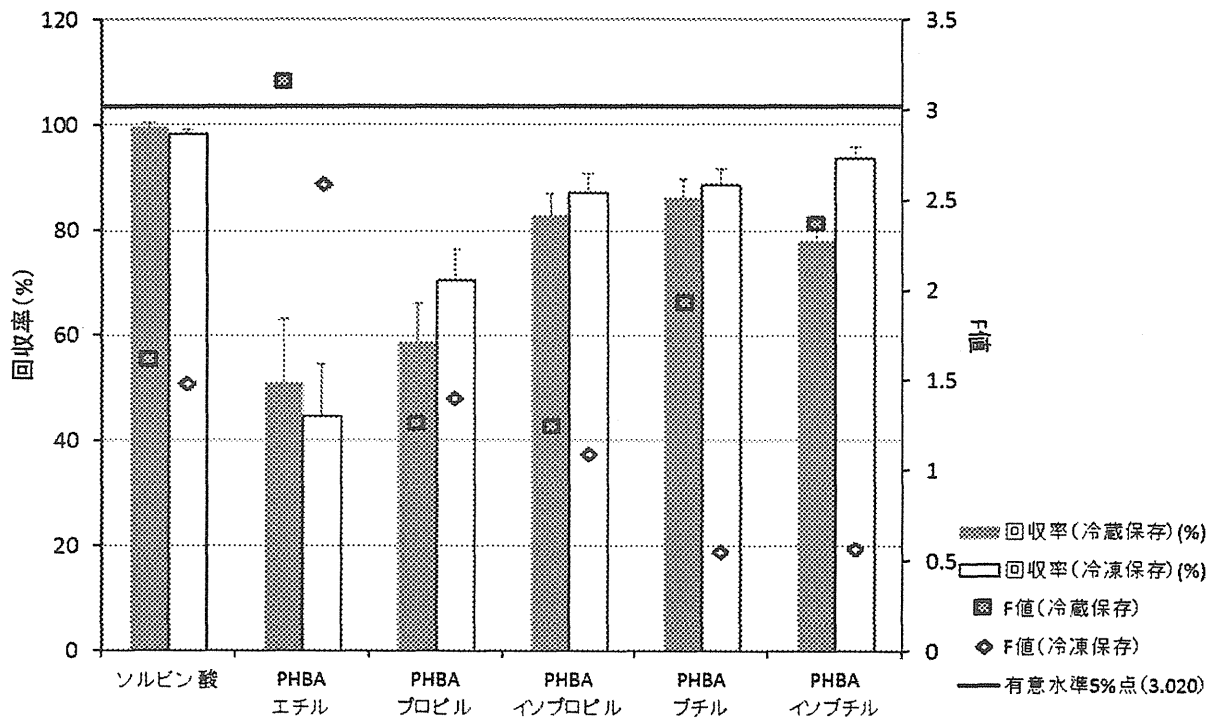


図1 果実（いちご）ペースト試料中、保存料の均一性試験結果

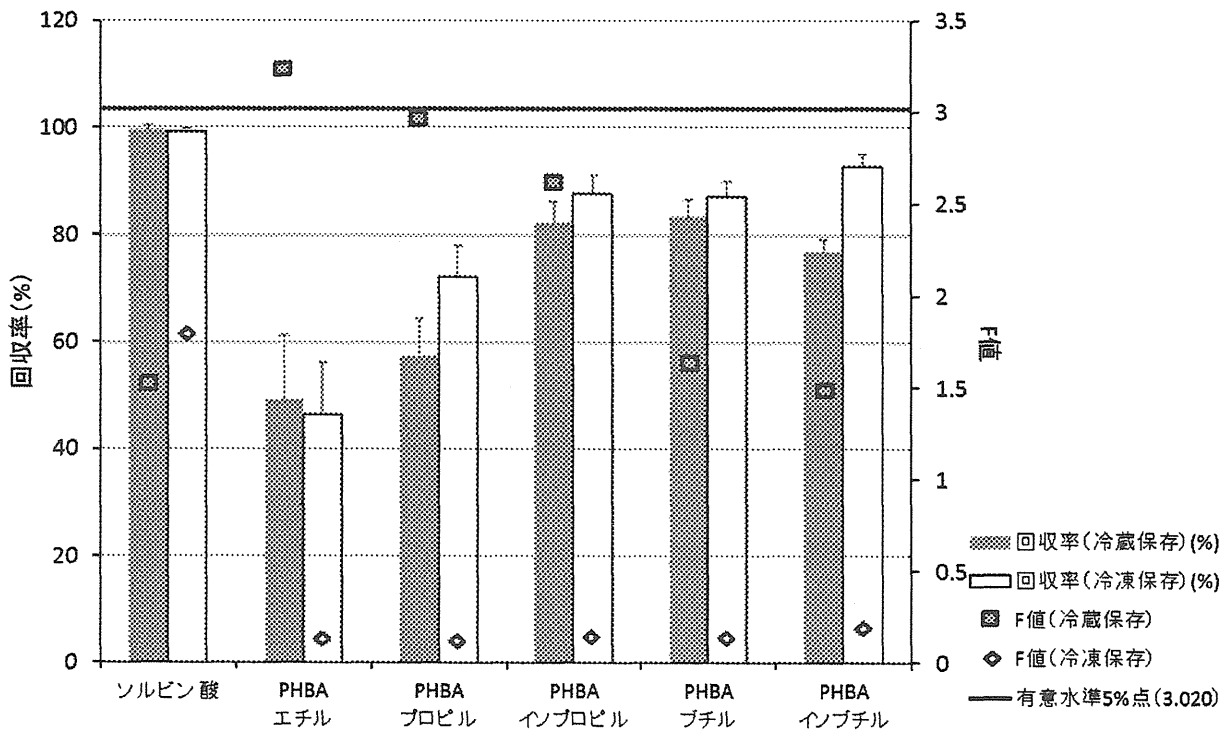


図2 果実（バナナ）ペースト試料中、保存料の均一性試験結果

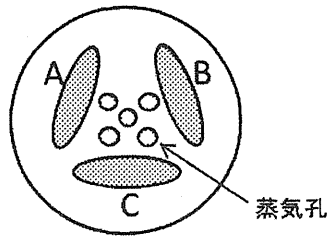


図3 餅つき機による「蒸し」位置の模式図

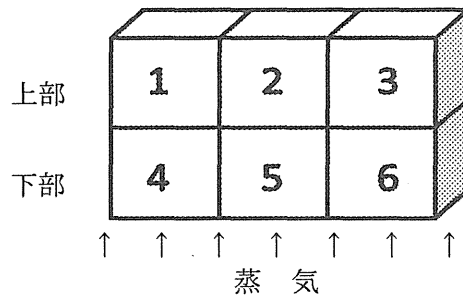


図4 餅つき機による「蒸し」検討時のかまぼこの側面からの分割図

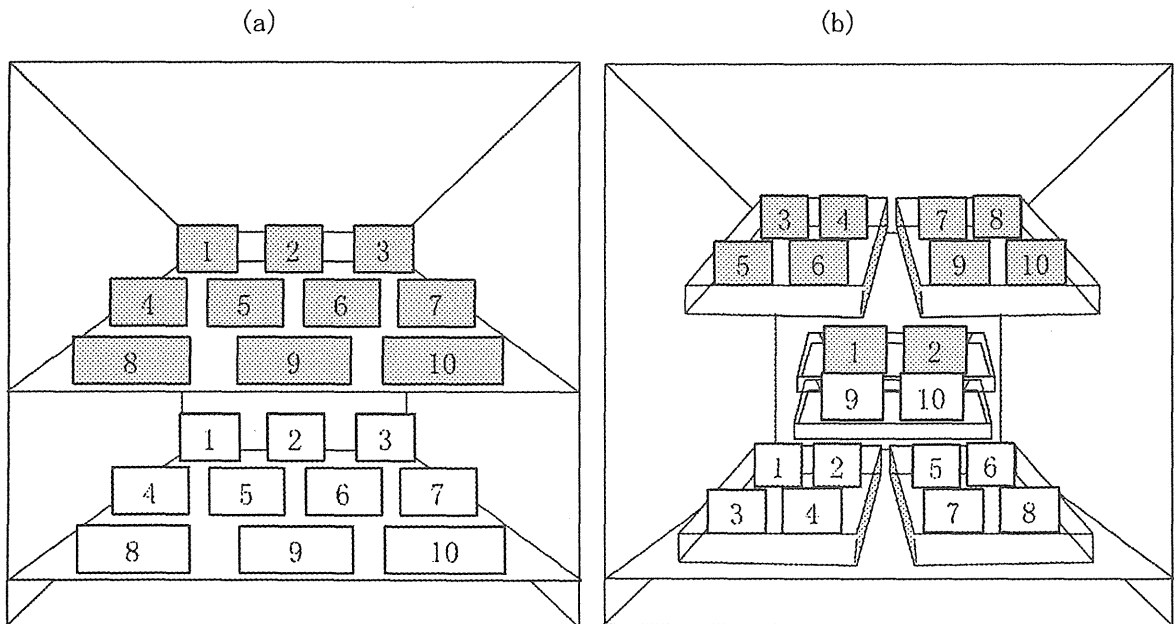


図5 ウィンディーオープンでの魚肉練り製品試料（かまぼこ）の蒸し位置

- (a) : 設置～30分 (チャック付袋)
- (b) : 設置後30分～60分 (サランラップ)
- 灰色試料No. 1～10 : 上段
- 白色試料No. 1～10 : 下段

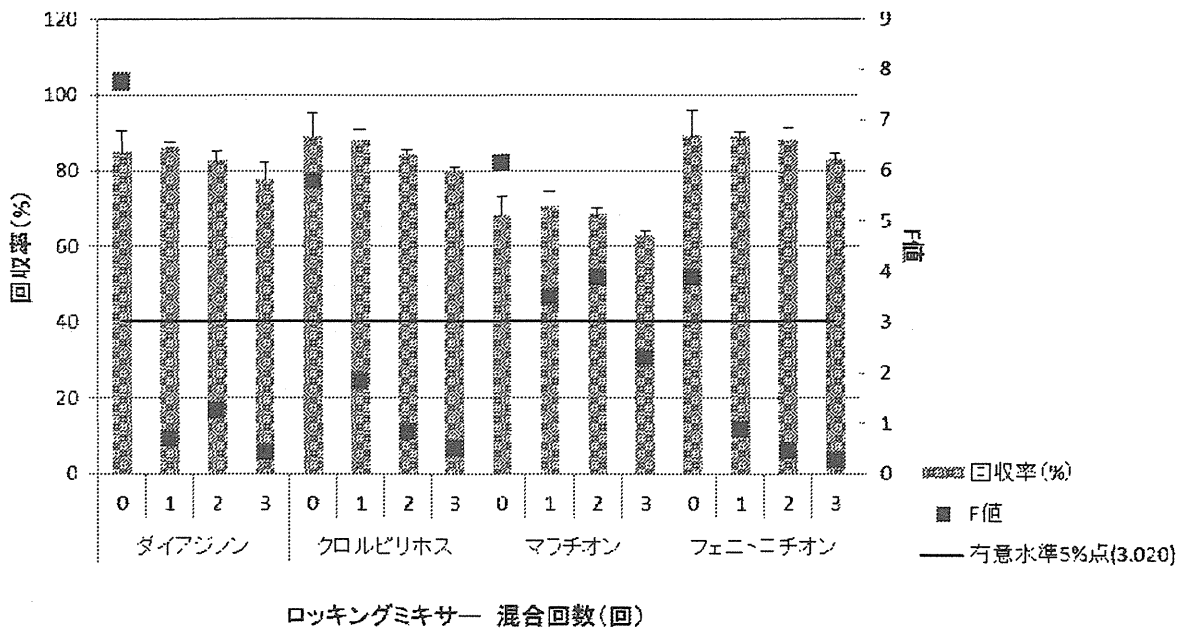


図6 玄米試料均一化の検討

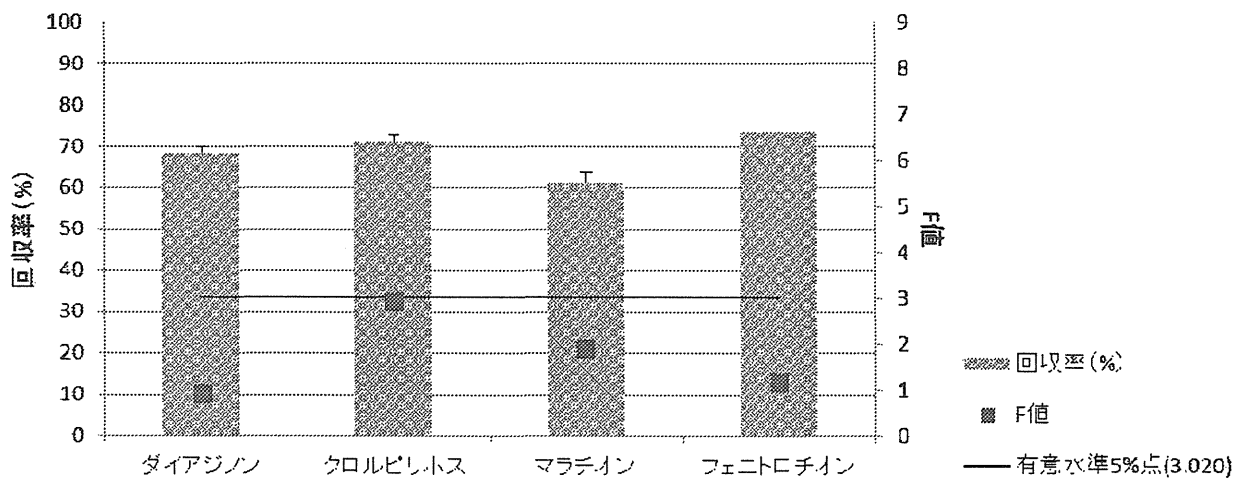


図7 高速遠心粉碎機による玄米試料均一化の検討



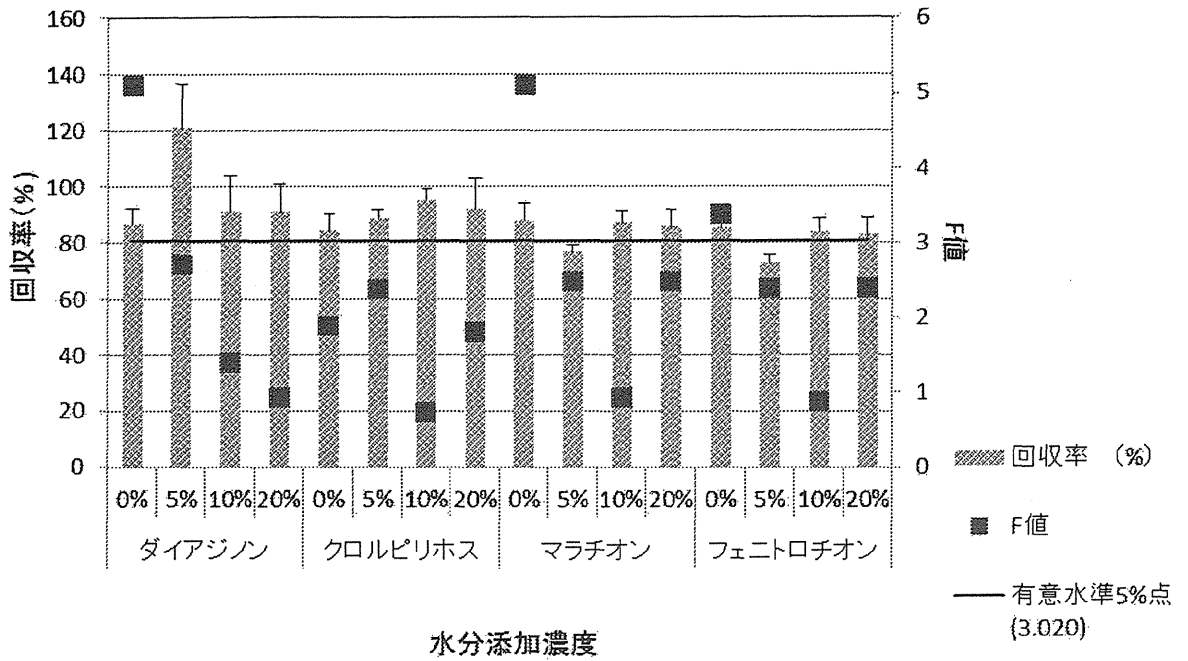


図8 枝豆水添加試料の均一性評価

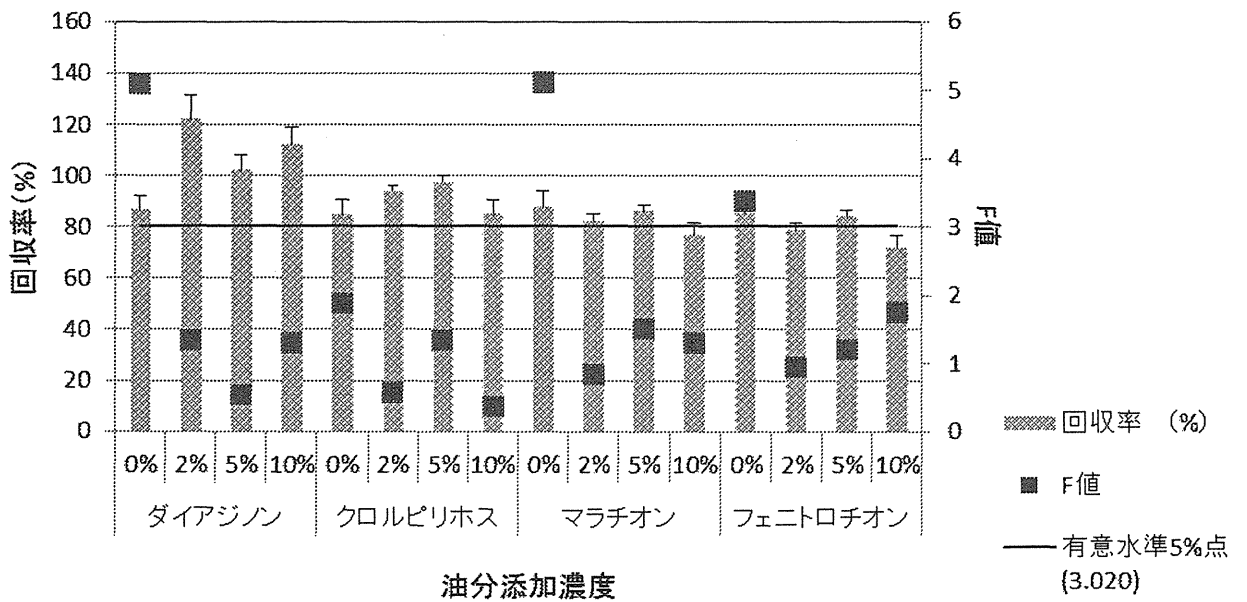


図9 枝豆油添加試料の均一性評価

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用適正試料の作製検討と

信頼性確保に関する研究（その 2）

—一般細菌数測定検査用調査試料の改良に関する検討—

主任研究者	小島 幸一	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	所長
分担研究者	渡辺 卓穂	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	部長
協力研究者	鈴木 達也	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	山田 健一	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	梶原三智香	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

研究要旨

平成 24 年度の食品衛生外部精度管理調査の一般細菌数測定検査において、調査試料として配布した寒天状基材中の生菌数がストマッカー袋のメーカーにより回収率が異なった原因について、解析を行った。*B. subtilis* を 2 種のストマッカー袋（フィルター付き）に添加し、寒天基材とともにストマッカー処理を行った後の、フィルターの内側と外側で生菌数を比較したところ、いずれもほぼ同等であり、かつ添加菌の回収率は 90～120% となった。このことから、フィルターの孔径や材質が異なるストマッカー袋においても *B. subtilis* のフィルターへの吸着等は認められず、菌液としては十分に均一化した状態で回収できることが示唆された。また、寒天状基材は寒天のメーカーによってもその硬度や回収率が異なってくることから、3 社（4 製品）について寒天基材を作製して回収率を確認したところ、寒天濃度によっては 40～60% 程度の回収率となるものもあった。また、多くの寒天状基材においてストマッカー処理時間を 3 分とすることで回収率の上昇傾向が認められた。

以上のことから、外部精度管理調査用試料として採用している寒天状基材を作製する際の寒天のメーカーとストマッカー袋の組み合わせによっては検査結果に影響を及ぼす可能性を示唆し、より精度の高い検査結果を得るためには基材の物理化学的性状を維持しながら、より粒子径の小さくなるような成分構成を構築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では微生物学調査における定量検査として唯一、一般細菌

菌数測定が調査試料として提供されている。

外部精度管理調査試料は最終的に得られた報告値からその検査機関の評価を行うこと

を考慮すると、少なくとも作製した調査試料の均一性と安定性を保証する必要がある。しかし、微生物は時間経過に伴って生菌数を変動させることがあること、実試料においてもサンプリング部位によって生菌数が異なる可能性があること、試料の保存状況により菌数の変動が認められる可能性があるなど、多様な変動要因を含んだ状況下で検査を実施することとなる。そのため、当財団では *B. subtilis* の芽胞菌を採用することで長期間の安定性を担保することとし、さらに溶解した寒天に試験対象菌を添加することで調査試料中の均一性を確保することを考案し、これを外部精度管理調査試料として採用した。この寒天状基材は添加菌数を人為的にコントロールすることが可能であり、かつ長期間安定して試験対象菌を回収することができるというメリットを有している。しかし、平成 24 年度の外部精度管理調査において、ストマッカー袋のメーカーにより回収が異なるとの事例が食品衛生外部精度管理調査への参加機関から報告されたことに伴い、この状況確認を当方にて実施したところ、最低で約 40% 程度の回収率しか得られないものが存在することが明らかとなった。本調査試料は、寒天を固化させることにより試験対象菌を寒天の形成する網目構造中に封入することで作製していることから、ストマッカー処理の際に粒子状に残留した寒天がフィルターを通過できないために回収率が低下した可能性が考えられた。そこで、一般細菌数測定用調査試料として採用している寒天状基材についてこの原因を明らかにすることを目的とし、さらに使用する寒天のメーカーに基づく差異が存在するかについても検討するこ

ととした。

## B. 研究方法

### 1. 試験菌株

試験菌株は、枯草菌 6633 栄研（栄研化学株式会社）を使用した。

### 2. 寒天基材の作製

寒天（試薬）に安定化剤と精製水を加え、加熱溶解したものを容器に分注した。これを高圧蒸気滅菌処理した後、室温で放置することにより固化させた。試験に使用するにあたり、固化した基材を 100℃で 30 分間加熱溶解した後、約 50℃に低下させ、これに試験菌液 0.1 mL を添加することによって調査試料を作製した。なお、寒天濃度の検討を行う場合には、0.60%、0.65%、0.70% および 0.75% とした。

### 3. 一般細菌数測定

調査試料 10 g を秤量し、これをストマッカー袋に加えた後、ペプトン食塩緩衝液 90 mL を添加した。これを 1 分間および 3 分間ストマッカーでホモジナイズ処理を行い、測定原液を調製した。この原液を生理食塩液で適宜希釈した後、1 mL を滅菌シャーレ 2 枚に分注し、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±1℃で 48±3 時間培養した。生菌数測定には、1 平板あたり 300 個以下の集落を形成する平板について出現した集落数を計測し、2 枚のシャーレの平均値を求め、これを一般細菌数とした。ストマッカー袋は以下のものを使用した。細菌検査用ポリ袋（オルガノ）、ストマフィルターNEO（GSI クレオス）、滅菌フィルターバッグ NB（サンセイ医療機材）、ピクソン 20（エルメックス）、サニスペックテストバッグ（サニーフーズ）。

#### C. D. 研究結果および考察

##### 1. 試験菌のフィルターへの吸着に関する検討

一般細菌数検査の測定において、これまで当方において使用していたストマフィルターNEO (GSI クレオス) ではフィルターなしのストマッカー袋を使用して同様に試験したものと比較して低い回収率を認めたことがなかったが、一部のメーカーでは約40%と低い回収率となった。メーカーによりストマッカー袋に付属のフィルターの孔径や材質も異なっている。このことから、通常当財団において使用しているストマッカー袋と、平成24年度の検討において最も回収率の低かったストマッカー袋の2種を用いて、試験菌がフィルターを通過すること、ならびにフィルターへの吸着性の有無を確認するため、寒天状基材の非存在下、試験菌を添加したときのフィルターの内側と外側、すなわち試料溶液の採取側と調査試料をストマッカー袋に入れた側での試験菌濃度の差について確認した。その結果、試験菌の濃度はフィルターの内側と外側でほぼ同等であり、かつ添加濃度に対する回収率も90~120%を示した(表1)。また、回収率は試験菌と寒天状基材を別途加えたときにも同様であった。このことから、試験菌はいずれのストマッカー袋においても通過することが可能であり、フィルターに吸着する可能性も低いものと考えられた。また、この結果を踏まえると、寒天状基材中に封入された試験菌がストマッカー処理により粒子状となった寒天中に取り込まれたままとなり、この寒天粒子がフィルターを通過できなかったことにより、回収率が低くな

る可能性が示唆された。

##### 2. 寒天のメーカーごとの回収率に関する検討

これまでの経験から、基材として使用する寒天はメーカーによって硬度等が異なることから、ストマッカー処理後の寒天粒子の残存に大きな影響を及ぼすものと考えられる。そこで、3社(4製品)を用いて、0.6~0.75%の濃度範囲で作製した寒天状基材における回収率について検討した。その結果、低濃度の寒天で作製した基材において、ストマッカー袋間での相違が大きくなった。また、高濃度の寒天で作製した場合には、いずれのストマッカー袋においても回収率が低く、ストマッカー袋間での大きな相違は認められなかった(図1)。なお、この傾向は試料の作製42日後においても同様であった(図2)。

また、一般細菌数測定用調査試料は陸送することで各検査機関に配送される。そのため、寒天濃度が低い場合には、輸送時の振動や荷物の取扱いといった衝撃が加わる可能性がある。これにより、基材の破壊ということも考えられることから、作製した寒天状基材を振盪器で容器の縦方向または横方向に振盪したときの、基材の物理的形狀変化について観察した。振盪器に容器を立て、これを振盪したところ、いずれの基材も変形は認められなかった。これに対して、容器を横に設置して振盪を行ったところ、和光純薬の2製品で作製した0.6%の寒天濃度において、容器から基材がはがれた。これ以外の基材では、振盪に伴う基材からの浸出液が増加する傾向はあるものの、基材の崩壊は認められなかった(データは示していない)。

寒天粒子をさらに小さくするための手段のひとつとしてストマッカー処理時間の延長が挙げられる。そこで、最も寒天濃度の高い 0.75%においてストマッカー処理時間を 1 分間と 3 分間で回収率を比較したところ、和光純薬の 2 製品で作製した基材では 3 分間のストマッカー処理により試験菌の回収率の上昇が認められたが、これ以外では明らかな回収率の上昇は認められなかった。

さらに、より詳細に検討するため、外部精度管理調査において使用頻度が比較的高く、かつ低めの値を報告した検査機関で採用されていたストマッカー袋を用いて各寒天濃度における回収率を検討したところ、和光純薬の 2 製品で作製した基材では濃度によらず、ピクソン 20 (エルメックス) を除く 3 種のストマッカー袋において高い回収率を示した。これに対して、OXOID および MERCK の寒天で作製した基材では、寒天の濃度に依存した回収率の低下が認められた。また、いずれの基材においてもピクソン 20 で回収率が低くなる傾向が認められた。また、寒天およびストマッカー袋の組み合わせにおける試験対象菌の吸着の可能性を検討したところ、通常使用している和光純薬の寒天とサニスペックテストバッグ (サニーフーズ) の組み合わせで回収率が約 60%であったものの、これ以外の組み合わせではいずれも回収率が 80%以上であったことから、試験対象菌のストマッカー袋への吸着はほとんどないと考えられた (表 2)。

#### E. 結論

平成 24 年度の外部精度管理調査におい

て、一般細菌数測定用基材として採用している寒天状基材でストマッカー袋のメーカーにより試験対象菌の回収率が異なるとの報告があったことから、この原因について明らかにするべく検討を行った。その結果、一部のストマッカー袋において著しく低い回収率が認められ、この要因としてストマッカー処理した後の寒天の粒子径がストマッカー袋のフィルターを通過することができず、寒天粒子中に取り込まれた試験対象菌を回収することができなかったことに基づくと考えられた。これは試験対象菌がフィルターに吸着しなかったこと、ならびにストマッカー処理時間を延長することで回収率の上昇傾向が認められたことによっても支持される。しかも、使用する寒天のメーカーによっても低い回収率となる傾向は異なり、基材を作製するうえで、非常に重要な要因となることが明らかとなった。寒天状基材は外部精度管理調査の一般細菌数測定検査において秤量が可能であり、かつ安定的に試験対象菌を回収することができることから非常に有益な基材であると考えられる。そのため、本検討結果を踏まえて十分な予備検討を必要とすることに加え、使用機材に影響を受けない基材中の成分の改良等についても検討する必要があることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

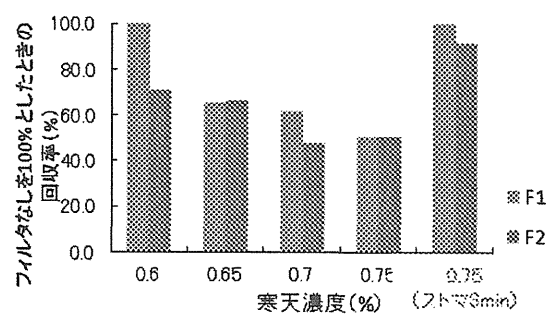
##### 2. 学会発表

- |               |           |
|---------------|-----------|
| なし            | 2. 実用新案登録 |
| H. 知的所有権の取得状況 | なし        |
| 1. 特許取得       | 3. その他    |
| なし            | なし        |

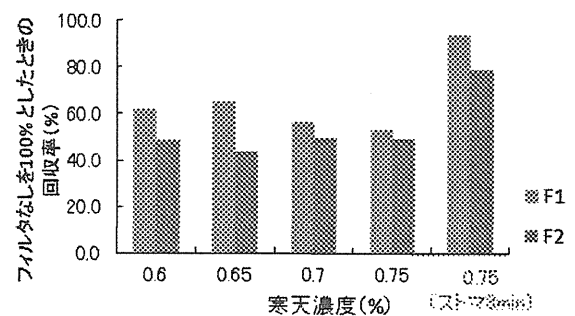
表1 ストマッカー袋フィルターの内外における生菌数と回収率

ストマッカー袋	寒天の有無	採取部位	生菌数 (cfu/g)	回収率 (%)
細菌検査用ポリ袋 (フィルターなし)	なし	—	$7.9 \times 10^4$	—
ストマフィルター-NEO	なし	内側	$7.2 \times 10^4$	91.7
	なし	外側	$7.5 \times 10^4$	94.5
滅菌フィルターバッグ NB	なし	内側	$8.4 \times 10^4$	106.0
	なし	外側	$8.2 \times 10^4$	103.5
ストマフィルター-NEO	あり	内側	$9.5 \times 10^4$	120.2
	あり	外側	$9.3 \times 10^4$	118.5
滅菌フィルターバッグ NB	あり	内側	$9.0 \times 10^4$	114.3
	あり	外側	$8.9 \times 10^4$	112.5

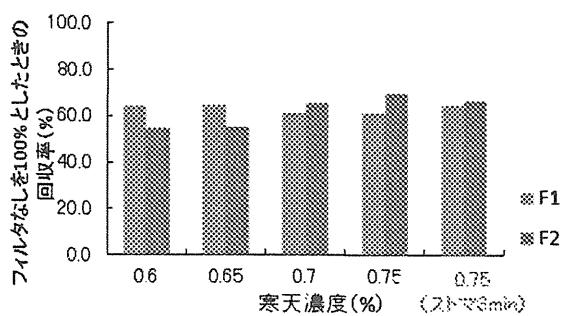
寒天ありは、寒天状基材と試験対象菌を別途加えることにより調製した。



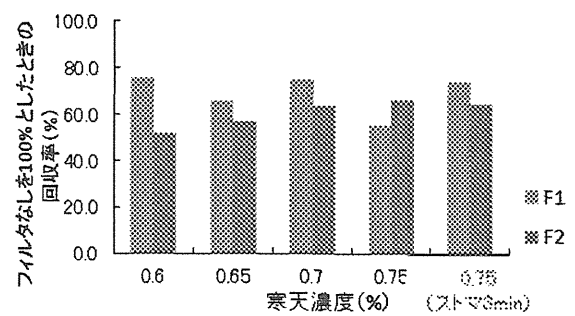
1) 和光純薬 (通常使用品)



2) 和光純薬 (試薬特級)



3) OXOID

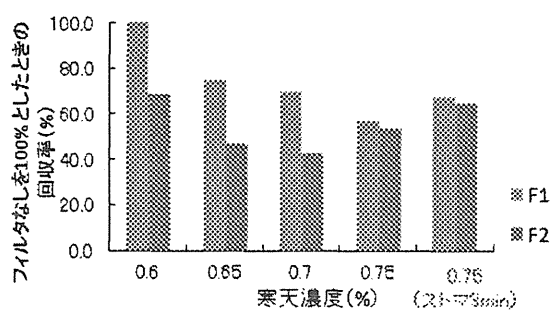


4) MERCK

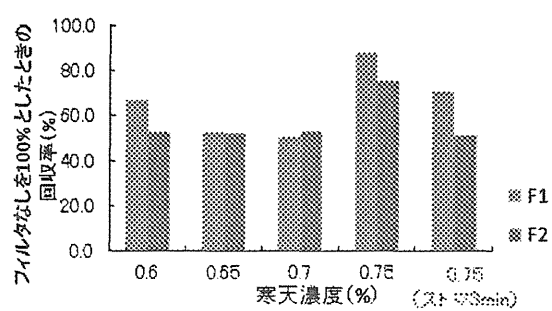
図1 寒天状基材からの試験対象菌の回収に及ぼす寒天およびストマッカー袋の影響  
(作製2日後)

F1: ストマフィルターNEO、F2: 滅菌フィルターバッグ NB

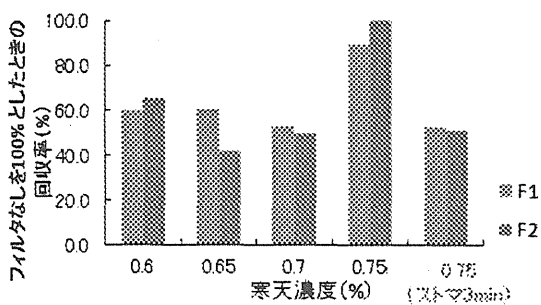




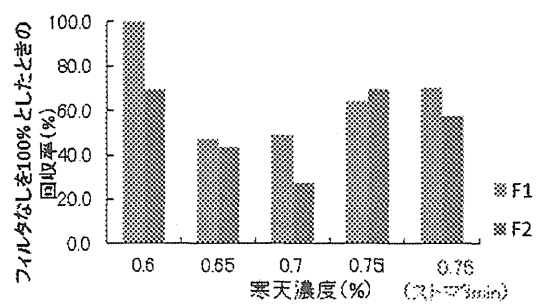
1) 和光純薬 (通常使用品) DAY42



2) 和光純薬 (特級) DAY42



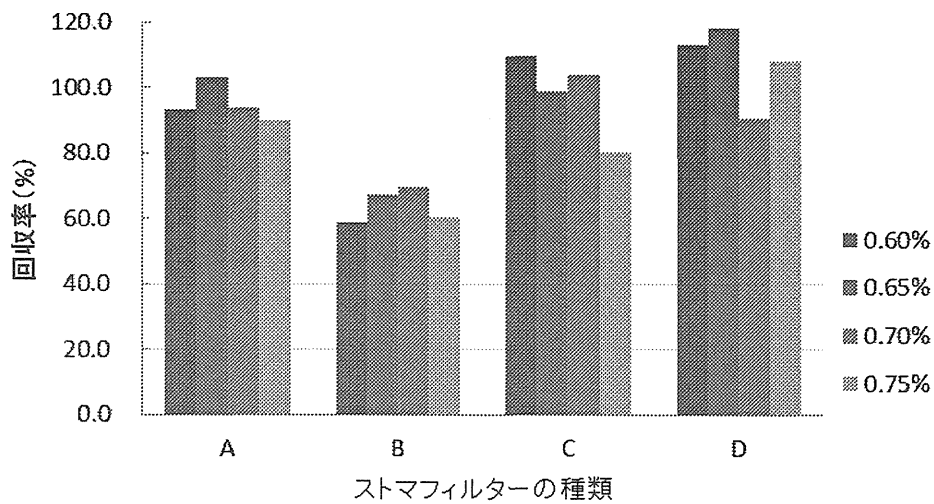
3) OXOID DAY42



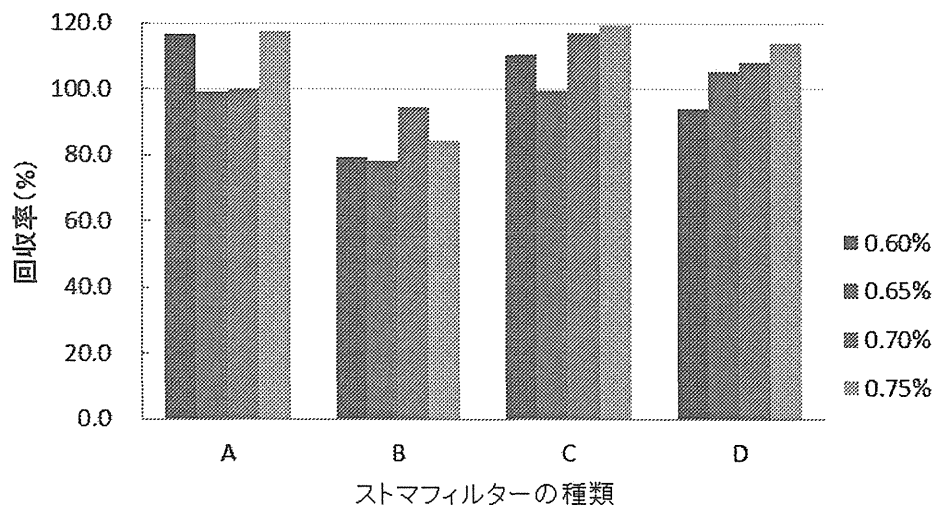
4) MERCK DAY42

図 2 寒天状基材からの試験対象菌の回収に及ぼす寒天およびストマッカー袋の影響 (作製 42 日後)

F1 : ストマフィルター-NEO、F2 : 滅菌フィルターバッグ NB



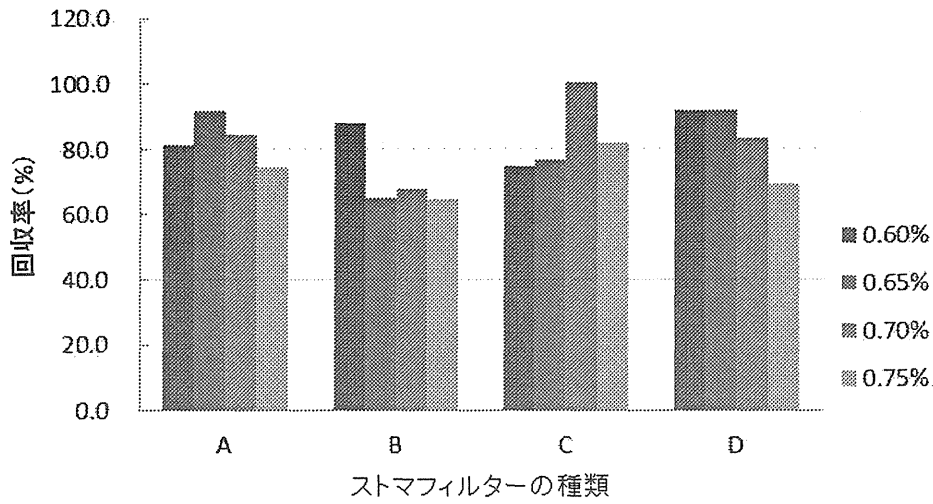
a) 和光純薬(通常使用品)-ストマッカー処理1分



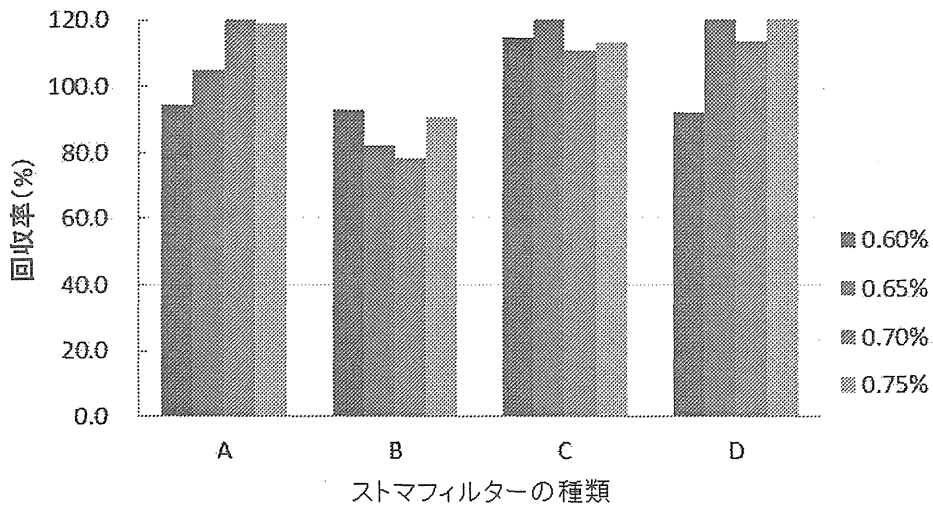
b) 和光純薬(通常使用品)-ストマッカー処理3分

図3 和光純薬(通常使用品)で作製した調査試料における寒天濃度、ストマフィルターおよびストマッカー処理時間の影響

A: ストマフィルターNEO、B: ピクソン 20、C: 滅菌フィルターバッグ NB、  
D: サニスペックテストバッグ



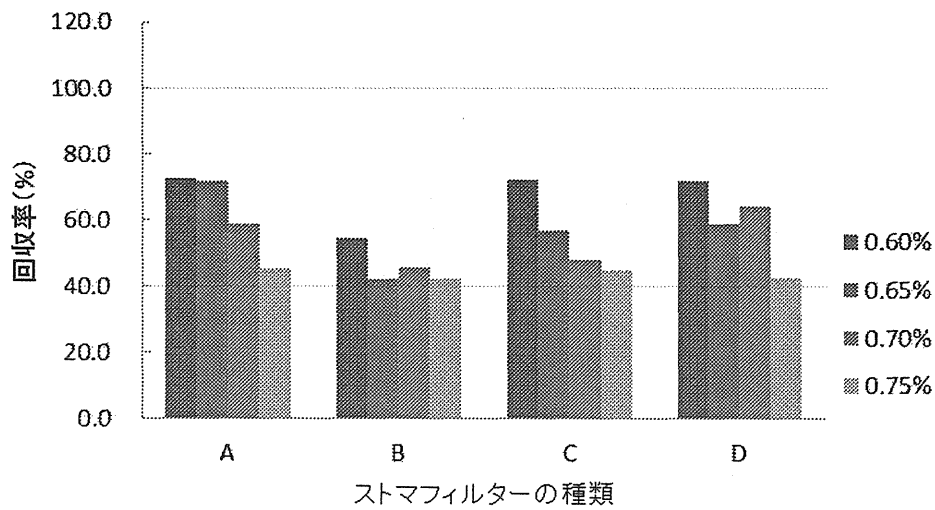
a) 和光純薬(試薬特級)-ストマッカー処理1分



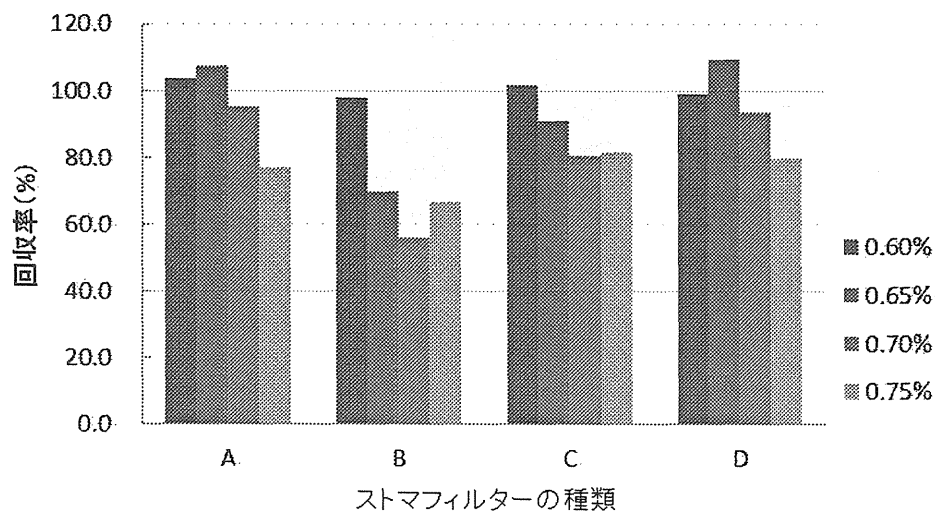
b) 和光純薬(試薬特級)-ストマッカー処理3分

図4 和光純薬(試薬特級)で作製した調査試料における寒天濃度、ストマフィルターおよびストマッカー処理時間の影響

A: ストマフィルターNEO、B: ピクソン 20、C: 滅菌フィルターバッグ NB、D: サニスペックテストバッグ



a) OXOID-ストマッカー処理1分



b) OXOID-ストマッカー処理3分

図5 OXOIDの寒天で作製した調査試料における寒天濃度、ストマフィルターおよびストマッカー処理時間の影響

A: ストマフィルター-NEO、B: ピクソン 20、C: 滅菌フィルターバッグ NB、  
D: サニスペックテストバッグ