

表9 水分5%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

測定時点につき10容器、各 n=2

冷凍保存期間(月)		添加農薬			
		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
0	平均値(μg/g)	0.00949	0.267	0.440	0.418
	RSD(%)	1.7	2.6	2.2	2.9
	回収率(%)	94.9	89.0	88.0	83.6
	F 値	1.160	1.974	2.046	1.666
1	平均値(μg/g)	0.00870	0.281	0.420	0.393
	RSD(%)	2.0	6.9	6.9	7.2
	回収率(%)	87.0	93.7	84.0	78.6
	F 値	1.832	2.077	1.877	1.128
2	平均値(μg/g)	0.00905	0.263	0.390	0.367
	RSD(%)	5.8	4.1	4.2	4.7
	回収率(%)	90.5	87.7	78.0	73.4
	F 値	1.069	1.907	1.151	1.051
3	平均値(μg/g)	0.00843	0.269	0.371	0.348
	RSD(%)	6.9	4.7	4.1	5.3
	回収率(%)	84.3	89.7	74.2	69.6
	F 値	1.821	1.042	1.329	1.262
6	平均値(μg/g)	0.00840	0.248	0.372	0.354
	RSD(%)	3.9	4.2	3.5	4.5
	回収率(%)	84.0	82.7	74.4	70.8
	F 値	1.425	1.125	1.050	1.789
9	平均値(μg/g)	0.00852	0.272	0.404	0.351
	RSD(%)	4.3	3.4	2.8	3.9
	回収率(%)	85.2	90.7	80.8	70.2
	F 値	1.017	1.566	1.031	2.321

表10 水分10%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

測定時点につき10容器、各 n=2

冷凍保存期間(月)		添加農薬			
		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
0	平均値(μg/g)	0.00885	0.279	0.437	0.422
	RSD(%)	2.7	3.5	4.8	6.4
	回収率(%)	88.5	93.0	87.4	84.4
	F 値	1.318	1.255	1.481	2.151
1	平均値(μg/g)	0.00947	0.259	0.423	0.405
	RSD(%)	3.0	5.5	4.0	4.4
	回収率(%)	94.7	86.3	84.6	81.0
	F 値	1.805	1.182	1.057	1.067
2	平均値(μg/g)	0.00915	0.274	0.412	0.401
	RSD(%)	4.4	3.0	3.5	3.8
	回収率(%)	91.5	91.3	82.4	80.2
	F 値	1.379	1.064	1.450	1.412
3	平均値(μg/g)	0.00875	0.264	0.372	0.340
	RSD(%)	2.9	2.8	2.8	3.5
	回収率(%)	87.5	88.0	74.4	68.0
	F 値	1.562	0.925	1.021	1.455
6	平均値(μg/g)	0.00815	0.290	0.455	0.422
	RSD(%)	8.4	6.0	4.0	6.1
	回収率(%)	81.5	96.7	91.0	84.4
	F 値	1.918	1.708	1.013	2.665
9	平均値(μg/g)	0.00814	0.318	0.404	0.354
	RSD(%)	6.7	7.0	4.8	5.8
	回収率(%)	81.4	106	80.8	70.8
	F 値	1.921	1.859	1.353	1.415

表11 水分20%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

測定時点につき10容器、各n=2

冷凍保存期間(月)		添加農薬			
		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
0	平均値(μg/g)	0.00812	0.283	0.430	0.416
	RSD(%)	3.5	6.7	5.9	6.7
	回収率(%)	81.2	94.3	86.0	83.2
	F値	1.398	1.909	1.258	2.273
1	平均値(μg/g)	0.00924	0.275	0.417	0.386
	RSD(%)	2.1	6.0	5.1	6.7
	回収率(%)	92.4	91.7	83.4	77.2
	F値	1.461	1.315	1.103	1.494
2	平均値(μg/g)	0.00939	0.275	0.393	0.366
	RSD(%)	2.0	3.5	3.9	5.1
	回収率(%)	93.9	91.7	78.6	73.2
	F値	1.478	1.368	1.035	1.142
3	平均値(μg/g)	0.00944	0.265	0.385	0.363
	RSD(%)	2.6	4.9	5.7	5.2
	回収率(%)	94.4	88.3	77.0	72.6
	F値	1.954	2.188	2.125	2.518
6	平均値(μg/g)	0.00651	0.252	0.405	0.395
	RSD(%)	12.9	3.3	5.8	5.6
	回収率(%)	65.1	84.0	81.0	79.0
	F値	1.391	1.090	2.487	1.118
9	平均値(μg/g)	0.00555	0.230	0.333	0.295
	RSD(%)	8.4	5.4	4.5	4.6
	回収率(%)	55.5	76.7	66.6	59.0
	F値	1.909	2.904	2.009	1.118

表12 油分2%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

測定時点につき10容器、各n=2

冷凍保存期間(月)		添加農薬			
		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
0	平均値(μg/g)	0.00923	0.283	0.417	0.400
	RSD(%)	1.7	2.6	2.6	2.98
	回収率(%)	92.3	94.3	83.4	80.0
	F値	1.156	1.740	1.077	1.149
1	平均値(μg/g)	0.00958	0.281	0.414	0.398
	RSD(%)	0.9	3.5	3.1	3.2
	回収率(%)	95.8	93.7	82.8	79.6
	F値	1.035	1.009	1.088	1.143
2	平均値(μg/g)	0.00885	0.290	0.405	0.378
	RSD(%)	4.0	2.8	4.2	4.2
	回収率(%)	88.5	96.7	81.0	75.6
	F値	1.911	1.343	1.619	1.316
3	平均値(μg/g)	0.00928	0.267	0.377	0.355
	RSD(%)	2.6	3.4	3.6	4.8
	回収率(%)	92.8	89.0	75.4	71.0
	F値	1.242	1.161	1.686	1.261
6	平均値(μg/g)	0.00908	0.264	0.376	0.330
	RSD(%)	3.9	6.0	6.2	7.1
	回収率(%)	90.8	88.0	75.2	66.0
	F値	1.514	1.227	1.359	1.237
9	平均値(μg/g)	-	0.256	0.387	0.322
	RSD(%)	-	5.0	4.0	4.7
	回収率(%)	-	85.3	77.4	64.4
	F値	-	0.677	1.442	2.081

表中「-」は、標準品の保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定不可となった。

表13 油分5%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

測定時点につき10容器、各 n=2

冷凍保存期間(月)		添加農薬			
		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
0	平均値(μg/g)	0.00953	0.291	0.431	0.422
	RSD(%)	1.2	2.8	2.9	2.7
	回収率(%)	95.3	97.0	86.2	84.4
	F 値	1.031	2.001	1.518	1.524
1	平均値(μg/g)	0.00937	0.283	0.425	0.400
	RSD(%)	1.6	2.5	2.9	4.0
	回収率(%)	93.7	94.3	85.0	80.0
	F 値	1.435	1.252	1.026	1.177
2	平均値(μg/g)	0.00902	0.282	0.424	0.388
	RSD(%)	0.9	2.4	2.5	3.4
	回収率(%)	90.2	94.0	84.8	77.6
	F 値	1.074	1.234	1.160	1.495
3	平均値(μg/g)	0.00881	0.256	0.395	0.388
	RSD(%)	2.0	4.2	3.5	5.0
	回収率(%)	88.1	85.3	79.0	77.6
	F 値	1.423	1.189	1.004	1.765
6	平均値(μg/g)	0.00814	0.267	0.414	0.399
	RSD(%)	4.1	4.2	3.9	5.9
	回収率(%)	81.4	89.0	82.8	79.8
	F 値	1.593	1.386	2.288	1.944
9	平均値(μg/g)	-	0.255	0.393	0.334
	RSD(%)	-	5.3	5.4	7.6
	回収率(%)	-	85.0	78.6	66.8
	F 値	-	0.506	1.426	1.944

表中「-」は、標準品の保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定不可となった。

表14 油分10%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

測定時点につき10容器、各 n=2

冷凍保存期間(月)		添加農薬			
		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
0	平均値(μg/g)	0.00876	0.259	0.440	0.420
	RSD(%)	4.5	5.2	5.5	5.4
	回収率(%)	87.6	86.3	88.0	84.0
	F 値	1.635	1.018	1.967	1.784
1	平均値(μg/g)	0.00921	0.264	0.407	0.395
	RSD(%)	3.0	5.0	6.1	5.9
	回収率(%)	92.1	88.0	81.4	79.0
	F 値	1.367	2.074	1.926	1.638
2	平均値(μg/g)	0.00822	0.251	0.390	0.372
	RSD(%)	9.1	4.8	5.1	6.1
	回収率(%)	82.2	83.6	78.0	74.4
	F 値	1.025	1.636	1.206	1.433
3	平均値(μg/g)	0.00937	0.258	0.385	0.377
	RSD(%)	1.3	3.5	3.0	3.5
	回収率(%)	93.7	86.0	77.0	75.4
	F 値	1.844	1.031	1.766	1.434
6	平均値(μg/g)	0.00855	0.253	0.404	0.387
	RSD(%)	8.6	5.8	4.7	6.0
	回収率(%)	85.5	84.3	80.8	77.4
	F 値	1.679	1.924	1.295	1.392
9	平均値(μg/g)	-	-	-	-
	RSD(%)	-	-	-	-
	回収率(%)	-	-	-	-
	F 値	-	-	-	-

表中「-」は、標準品の保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定不可となった。

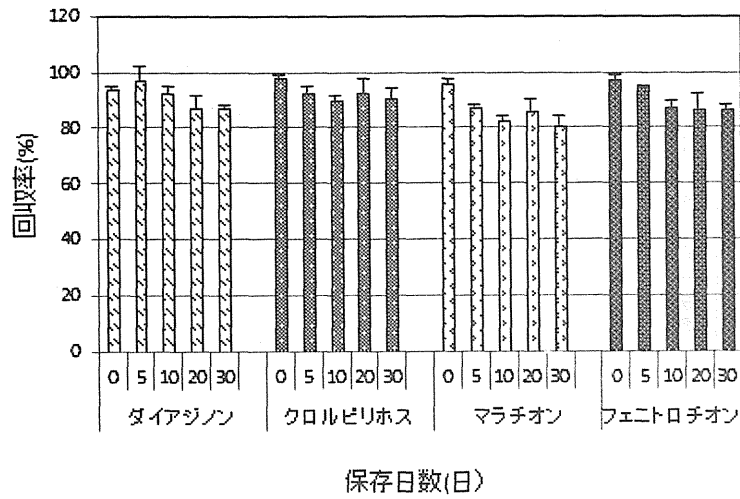


図1 非加熱精米の古米に添加した各種農薬の安定性

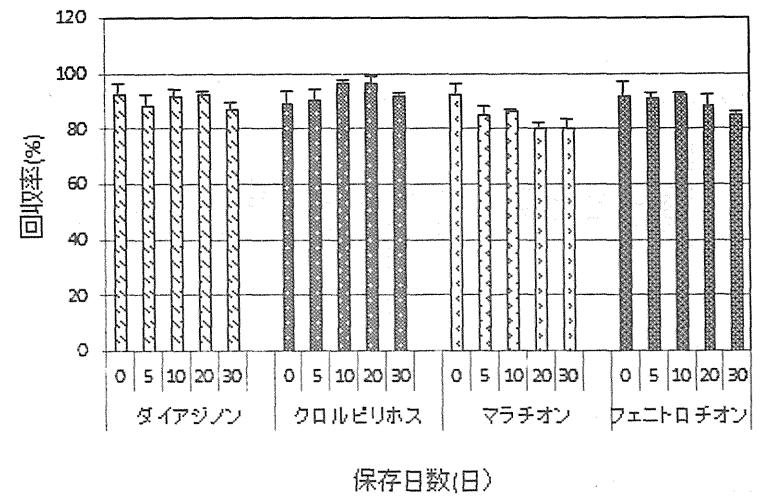


図2 非加熱精米の新米に添加した各種農薬の安定性

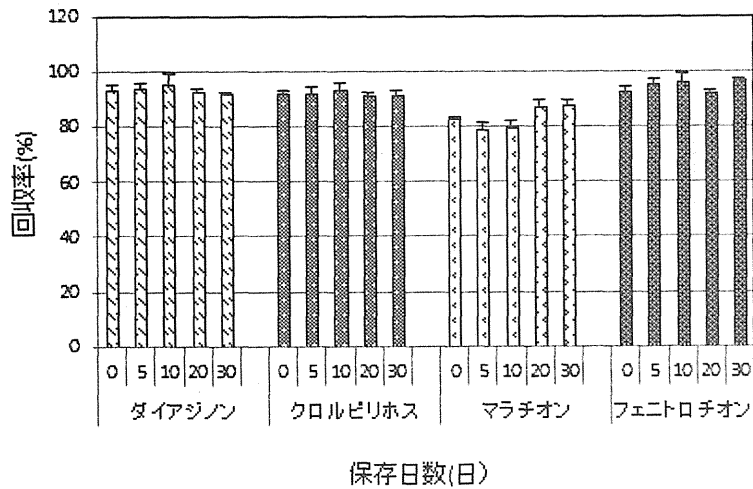


図3 非加熱玄米の古米に添加した各種農薬の安定性

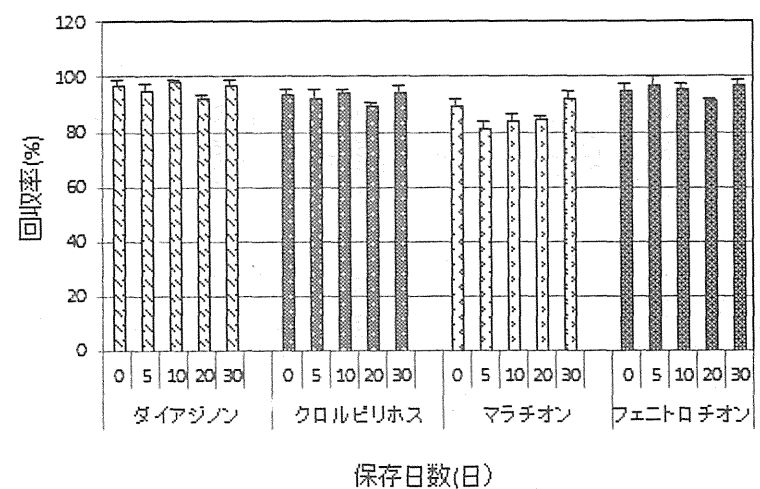


図4 非加熱玄米の新米に添加した各種農薬の安定性

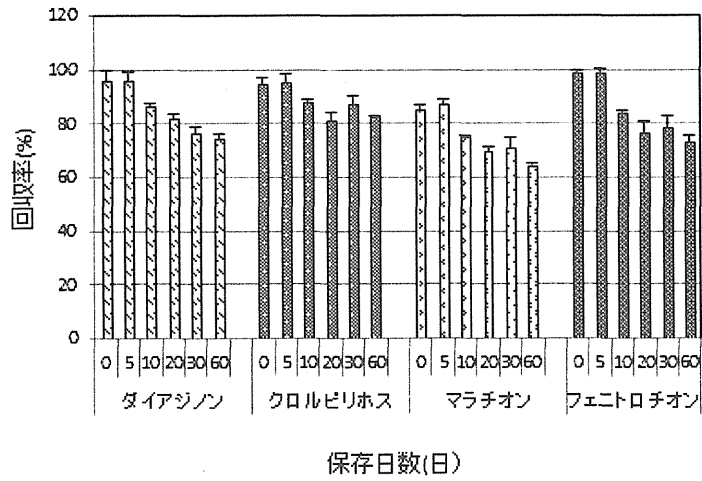


図5 加熱精米の古米に添加した各種農薬の安定性

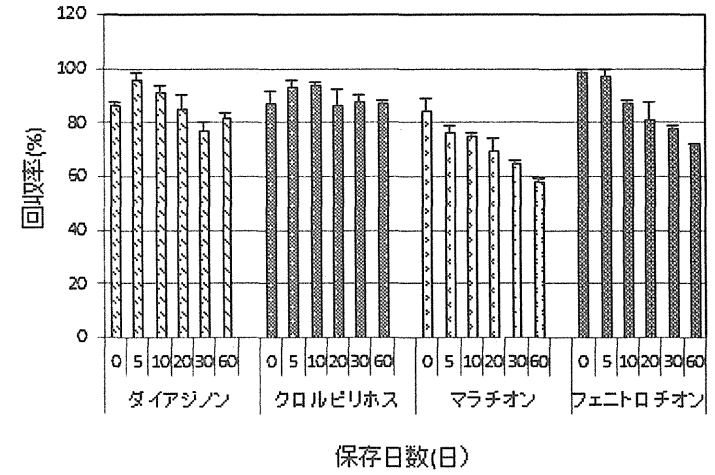


図6 加熱精米の新米に添加した各種農薬の安定性

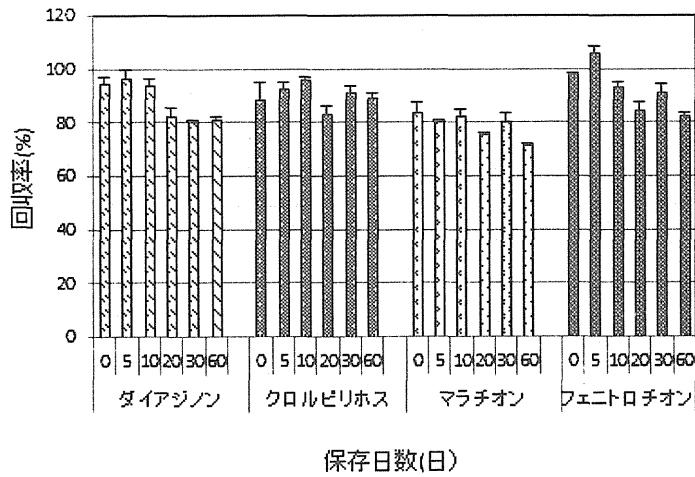


図7 加熱玄米の古米に添加した各種農薬の安定性

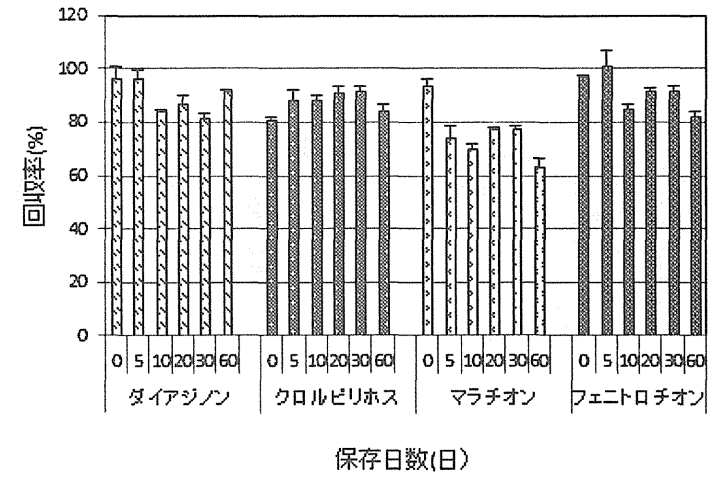


図8 加熱玄米の新米に添加した各種農薬の安定性

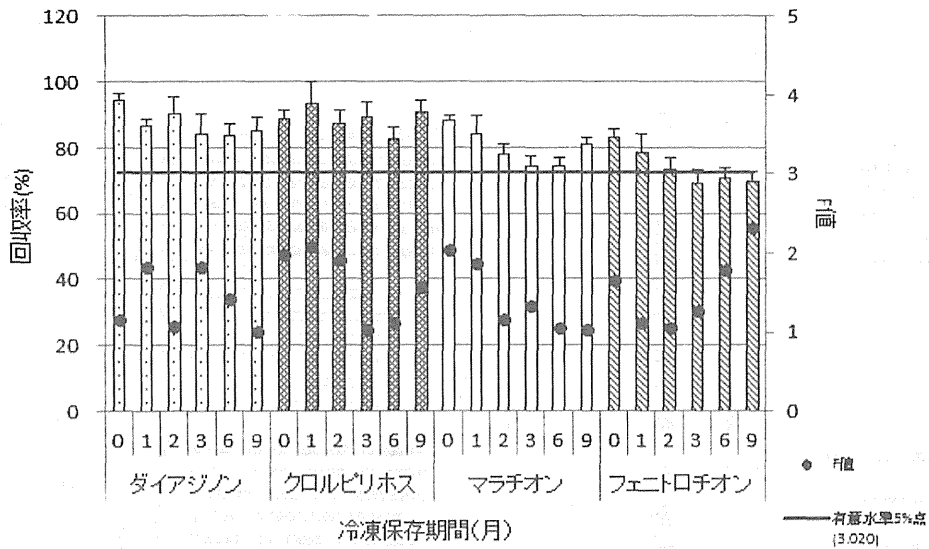


図9 水分5%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

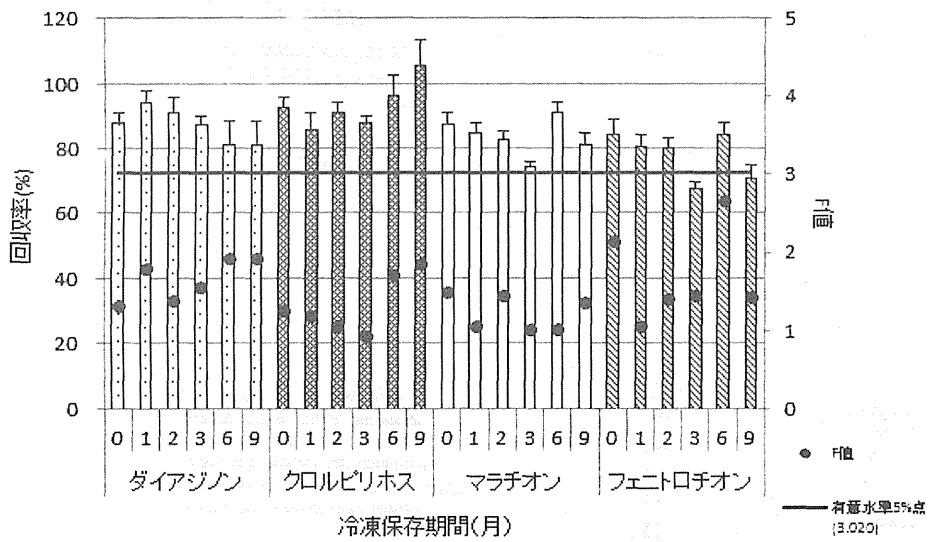


図10 水分10%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

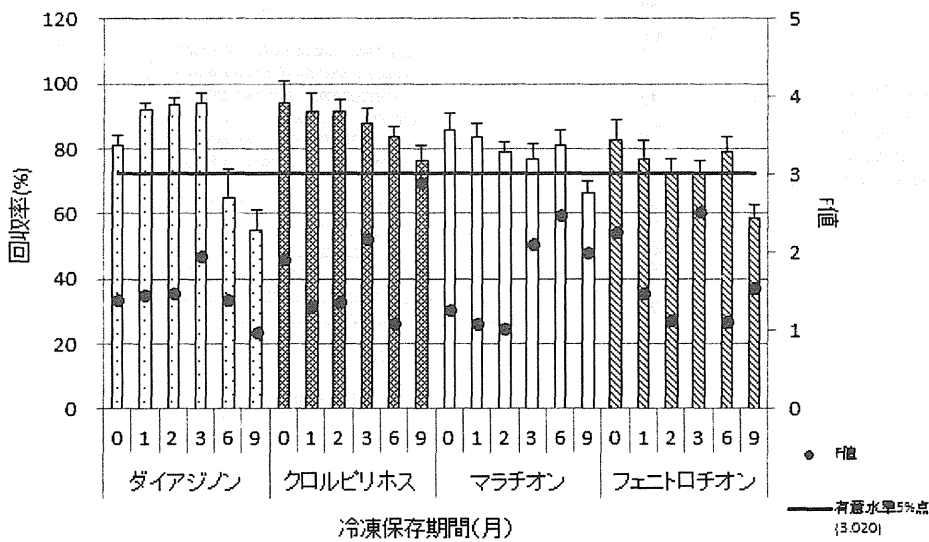


図11 水分20%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

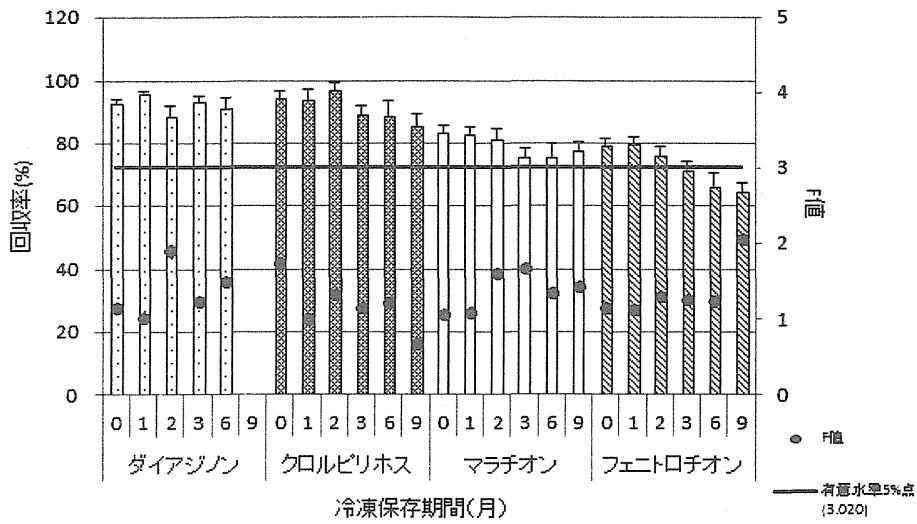


図12 油分2%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

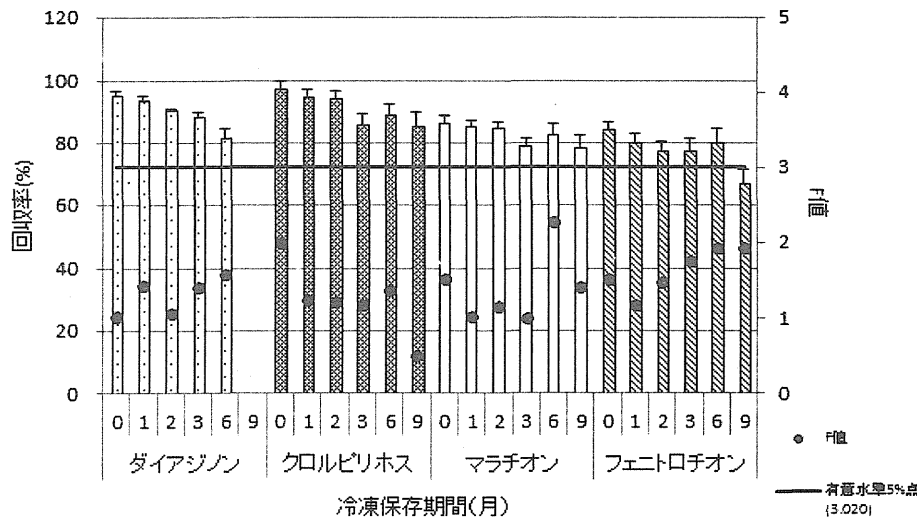


図13 油分5%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

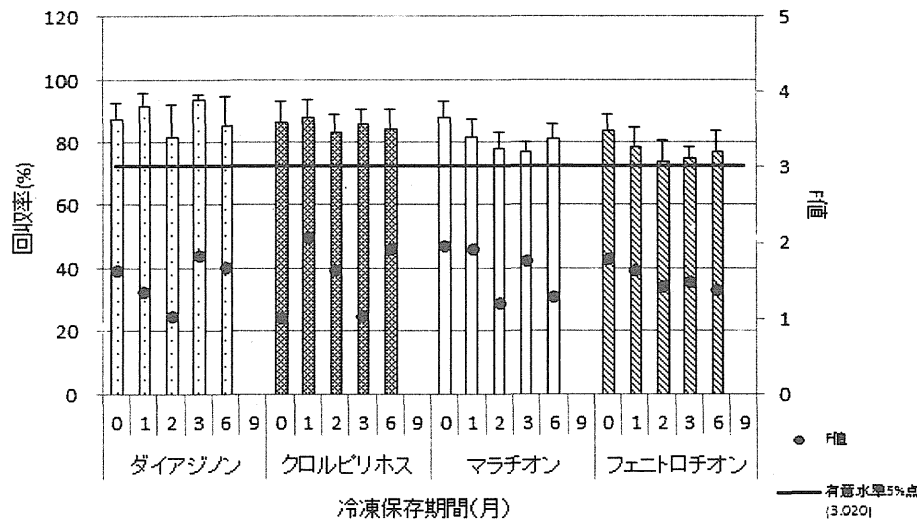


図14 油分10%添加枝豆ペースト中の各種農薬の安定性

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）

－微生物学検査のための適正調査試料の作製検討－

主任研究者	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

食品衛生外部精度管理調査、微生物学調査では、これまで実施してきた腸炎ビブリオ、セレウス菌の定性試験の新規調査試料の検討に加え、新たに基材中の菌数安定化を目的とした微生物担体の検討を実施した。

腸炎ビブリオ調査試料の検討では、こうや豆腐を用いて冷蔵保存 28 日後まで定性試験が可能であることを確認した。併せて実施した生菌数測定および最確数法による定量試験より、調査試料中の生菌数は冷蔵保存 14 日後を境に減少傾向を示すことを確認した。ビブリオ属菌は低温環境下に保存することで損傷を受け、VBNC (viable but non-culturable) 状態に移行している可能性が考えられたため、損傷菌の回復に効果があると報告のあるピルビン酸を添加した調査試料で同様の冷蔵保存試験を実施したが効果が認められなかった。

セレウス菌調査試料の検討では、米飯を用いて冷蔵および 32.5℃で保存 8 週間後まで定性試験が可能であることを確認した。併せて標準寒天培地で実施した生菌数測定でも、保存 8 週間後まで生菌数が非常に安定していることを確認した。選択培地を使用した定量試験では、陽性菌は全ての培地で標準寒天培地で実施した生菌数測定と同等の結果を得られたが、陰性菌は NGKG 培地上で発育が認められず、その他の培地でも標準寒天培地で得られて数値の半分程度の生菌数となった。

微生物担体の検討では、人造いくらの製法で微生物を封入した微生物担体を作製し、安定した菌数を維持できるかを確認した。冷蔵保存 7 日後までの生菌数の挙動を確認したところ、接種菌によって担体間のばらつきが大きくなるものや減少傾向を示すものなどが認められた。

以上のことから、腸炎ビブリオ調査試料ならびにセレウス菌調査試料では定性試験とし

ての運用が見込める状況であり、定量試験に適用できる試料の検討が今後の課題であることが確認できた。微生物担体は保存条件や微生物の選択等を含めた検討が必要であることが確認できた。

A. 研究目的

これまで定性試験の新規調査試料として検討を進めている腸炎ビブリオおよびセレウス菌について、実際の運用を視野に入れた試料作製と安定性の確認を本年度の目的とした。

腸炎ビブリオ検査用調査試料は、操作性の向上を目的とし、こうや豆腐を小型（約 2.5 g/1 個）から大型（約 16.5 g/1 個）に変更し、大量滅菌する条件を検討した。併せて変更後の調査試料を冷蔵保存した場合に定性試験が最低 1 ヶ月は実施可能であるか否かを確認した。また、冷蔵保存下での菌数の低下を抑制する方法を模索することとした。

セレウス菌検査用調査試料は、室温での長期保存も可能であることが確認されているが、今後定量試験に供することを視野に入れ、2 種の温度帯で長期保存し、定性試験と併せて生菌数測定および選択培地を用いた定量試験を実施することとした。

食品衛生外部精度管理調査の定性試験では、調査試料の発送から結果の報告期限まで少なくとも 1 ヶ月間は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、時間経過による生菌数の変動や接種方法に起因する菌濃度の不均一など、多様な変動要因を含んだ状況下で検査が実施されることとなる。加えて食品衛生外部精度管理調査では全国の参加機関に一斉に調査試料を送付するため、輸送時の温度変化や参加機関での取扱い条件が一様ではなく、

調査結果に影響を受けることとなる。これまで当財団では調査試料中の菌数の安定化について継続的に検討を続けているが、定性試験では基材（食材）と微生物が直接接触した状態で存在するため、設定した菌数を安定的に維持することが難しい。そこで、微生物を微小なカプセル等の微生物担体に封入し、接種微生物の安定化と菌数の制御が可能であるかを検討することとした。

B. 研究方法

1. 試験菌株

試験菌株は、秦野研究所に保存してある以下の菌株を用いた。

腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討

Vibrio parahaemolyticus HIC 140279

Vibrio fluvialis HIC 140282

セレウス菌検査用調査試料の検討

Bacillus cereus HIC 140280

Bacillus subtilis HIC 140244

微生物担体の検討

Staphylococcus aureus HIC 140243

Escherichia coli HIC140246

Salmonella enterica HIC 140294

なお、試験菌株は 5 継代以内のものを使用した。

2. 腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討

外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する 40 個単位で調製を行い、調査試料の基材であるこうや豆腐の有用性を検討した。試験操作は国立医薬品食品衛生研究所 HP で公開されている NIHSJ-06-ST3（定性試験

法) および NIHSJ-07-ST2 (定量試験法) に従って実施した。樹脂製容器 40 個に個別に収納したこうや豆腐 (約 16.5 g/1 個) を 121℃ で 40 分間高圧蒸気滅菌後、その全てについて無菌性を確認した。

無菌性が確認された方法で滅菌したこうや豆腐を用い、調査試料の安定性確認試験を実施した。Marine agar (Difco) に 37℃ で 24 時間培養した試験菌を添加剤含有 Marine broth (Difco) に接種し、同様に培養した培養液を適宜希釈したものを試験菌液とした。試験菌液 50 mL を滅菌済こうや豆腐に添加したものを調査試料とした。調査試料は冷蔵保存し、保存 0、7、14、21、28 日後に定性試験、寒天平板表面塗抹法および最確数法による生菌数測定を実施した。併せて損傷菌の回復に効果があるとの報告があるピルビン酸を添加した試験菌液で調査試料を作製し、保存 14、21、28 日後に同様の試験を実施してピルビン酸による生菌数低下の抑制効果を検討した。定性試験および最確数法では、TCBS 寒天培地 (日水製薬、栄研化学、極東製薬、OXOID、MERCK)、X-VP 寒天培地「ニッスイ」(日水製薬)、CHROMagar Vibrio (関東化学)、ビブリオ寒天培地「ニッスイ」(日水製薬)、ES ビブリオ寒天培地 (栄研化学) の 9 種の選択寒天培地を使用した。最確数法の結果は、3%NaCl 添加標準寒天培地を用いて寒天平板混釈法で得られた生菌数と比較した。

3. セレウス菌検査用調査試料の検討

外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する 30 個単位で調製を行い、調査試料の基材である米飯の有用性を検討した。試験操作は食品衛生検査指針 (微生物編) に記載の試験法に準拠して定性試験および定量

試験を実施した。調査試料は 121℃ で 40 分間高圧蒸気滅菌した米飯を使用した。高濃度 NaCl 溶液で 10^5 CFU/mL に調整した試験菌液 (芽胞液) を滅菌済の米飯に接種し、十分に吸収させたものを調査試料とした。調査試料は、冷蔵および 32.5℃ で保存し、接種 0、4、8 週間後に定性試験および定量試験を実施した。定性試験では NGKG 寒天培地 (日水製薬)、MYP 寒天培地 (OXOID)、セレウス選択培地 (MERCK) の 3 種の選択寒天培地を使用した。定量試験では、標準寒天培地を用いた寒天平板表面塗抹法または寒天平板混釈法による生菌数測定、ならびに定性試験の 3 種の選択寒天培地を用いた寒天平板表面塗抹法による生菌数測定を実施した。

4. 微生物担体による安定化技術の検討

現在運用している調査試料の菌数の安定化を妨げる要因として、食品と微生物が直接接触していることが挙げられる。この問題を解消する手段として、バイオリアクター等に利用されている人造いくらで作製方法を用いて微生物担体を作製し、その安定性を検討した。

標準寒天培地で培養した試験菌を生理食塩液に懸濁し、 10^4 CFU/mL 相当の試験菌液を調製した。試験菌液を 0.5%アルギン酸ナトリウム含有生理食塩液に加え、約 0.05 mL ずつ 5%塩化ナトリウム溶液に滴下した。なお、微生物担体 1 個 (約 0.05 mL) あたりの生菌数が 50~100 CFU となるように調製した。滴下 30 秒後に形状を崩さないように塩化ナトリウム溶液から回収し、生理食塩液に浮遊させた。これを冷蔵保存し、保存 0、1、2、5、6、7 日後に微生物担体 10 個の生菌数を測定した。併せて試験菌液の残液を

試験対照とし、同様に保存および生菌数測定を実施して 0.05 mL あたりの生菌数を算出した。

C. D. 研究結果および考察

1. 腸炎ピブリオ検査用調査試料の検討

外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する 40 個を同時に滅菌した結果、樹脂製容器の変形もなく、基材であるこうや豆腐についても滅菌後の無菌性が確認された。

定性試験では、用いた 9 種の寒天培地上で保存 28 日後まで腸炎ピブリオを判定することが可能であった。陰性菌である *V. fluvialis* では、一部の酵素基質培地上で陽性を疑う集落が確認されたが、NIHSJ-06-ST3 では腸炎ピブリオと推定される集落について同定試験を実施することとなっているため問題とはならないと考えられた（定性試験に関するデータは示していない）。

最確数法では、保存 28 日後まで陰性、陽性ともに集落の発育を認めたが、選択培地上の陽性集落のみを計測したため、陰性菌は陽性反応を検出した CHROMagar を除いて <3.0 との結果が得られた。陽性菌では、保存 14 日後以降減少傾向が認められたものの、いずれの寒天培地を用いた場合でも保存 28 日後まで腸炎ピブリオが検出可能であった（図 1）。このことから、NIHSJ-07-ST2（定量試験法）に従った試験のための調査試料として有用であることが示唆された。しかしながら最確数法による生菌数測定を行うための調査試料では 1400 CFU/g を超えないよう試験菌を接種する必要がある、保存 14 日後以降の菌数の減少傾向を抑制することが必要と考えられた。

VBNC 状態のピブリオ属菌に対する回復効

果の報告のあるピルビン酸を加えた調査試料について同様に冷蔵保存試験を実施したところ、ピルビン酸を含まない調査試料よりも生菌数の減少幅が大きくなる結果となった（図 2）。これより、最確数法による定量試験のための調査試料としては、ピルビン酸の添加は不適と判断し、定量試験用の調査試料については添加剤等のさらなる検討が必要だと考えられた。

以上のことから、こうや豆腐を用いた調査試料は定性試験において有用性が認められた。併せて定性試験用の調査試料の検討が今後の課題であると示唆された。

2. セレウス菌検査用調査試料の検討

調査試料の基材として米飯を使用し、食品衛生検査指針（微生物編）に記載の試験法に従って定性試験、定量試験を実施した。

定性試験では、セレウス菌を接種した調査試料において、冷蔵ならびに 32.5℃ 保存の両者で、接種 8 週間後まで用いたすべての選択寒天培地上で陽性集落が確認された。一方、陰性菌として接種した枯草菌において、NGKG 寒天培地上では集落の発育が認められなかったが、MYP 寒天培地およびセレウス選択寒天培地では陰性集落の形成（発育）が認められた。国内では入手の容易さや過去の実績などから多くの機関が定性試験に NGKG 寒天培地を選択している可能性が高いことから、陰性菌が NGKG 寒天培地上で発育しない点については十分な検討が必要と思われた。

定量試験では、標準寒天培地による生菌数測定の結果、いずれの試験菌も保存開始から 8 週間にわたってほぼ同等の菌数が維持されたことから、非常に安定性の高い調査試料であることが示唆された（表 1）。ま

た、32.5℃で保存した調査試料でも菌数の変動が認められなかったことから、実際に外部精度管理調査試料として送付した場合に予想される温度変化による試験結果への影響が低いことが示唆された。定性試験用の寒天培地による生菌数測定では、NGKG 寒天培地において枯草菌が発育しないことから<1000 CFU/g となった(表 2)が、MYP 寒天培地(表 3)およびセレウス選択寒天培地(表 4)では、陽性菌は標準寒天培地の生菌数測定結果と同等、陰性菌はそれより低い数値であったものの保存条件に関わらず試験期間にわたって菌数が維持された。なお、陽性集落と陰性集落は集落外縁の培地色や不透明帯などの違いで判別されるが、見慣れていない場合は誤判定も考えられるため、陰性菌の集落数についても計測を実施した。

以上のことから、国内で利用が多いと思われる NGKG 培地で発育する陰性菌の探索などの課題を残すものの、定量試験用の調査試料としての有用性が認められた。

3. 微生物担体による安定化技術の検討

調製直後の微生物担体の生菌数は、目標とした生菌数の範囲内であった(表 5)。このことから、任意の生菌数の微生物担体の作製が可能であることが示唆された。微生物担体中の生菌数の挙動を確認したところ、黄色ブドウ球菌では個々の微生物担体から得られた生菌数測定値のばらつきが大きく、担体間で 10 倍以上の差が認められた(図 3)。黄色ブドウ球菌では、他の試験菌に比べて試験対照での生菌数の変化も大きいことから、試験菌の特徴に起因することが考えられた。大腸菌(図 4)およびサルモネラ属菌(図 5)では個々の微生物担体から得ら

れた生菌数測定値のばらつきが小さく、生菌数の平均値と試験対照での生菌数の変化についても安定的な挙動を示した。以上のことから、試験菌による差は認められるものの、人造いくらの製法で作製した微生物担体に一定量の微生物を封入することが可能であり、少なくとも 7 日間は安定であることが確認された。事前に実施した予備検討の結果から、培地やリン酸緩衝液にアルギン酸ナトリウムを溶解して調製した微生物担体を冷蔵保存した場合、または生理食塩液にアルギン酸ナトリウムを溶解して調製した微生物担体を 15℃前後で保存した場合も生菌数が安定しないことが明らかとなっている。これらのことから、微生物担体を調製する際に使用する溶液として培地やリン酸緩衝液は適当ではないこと、保存温度によっては微生物担体中に封入した微生物が増殖すると考えられ、微生物を封入した担体は保存条件を十分に検討する必要があることが示唆された。また、7 日間の生菌数が最も安定して推移したサルモネラ属菌についても、7 日後には接種時の半分以下の菌数まで低下していることから、更に長期間安定な担体とするためには保存剤の添加を含めた保存条件の検討が必要であると考えられた。

E. 結論

新規検査項目として検討を行っている腸炎ビブリオ検査用調査試料では、保存 28 日後まで腸炎ビブリオを検出することが可能であり、陰性菌についても使用したほとんどの培地で陰性集落の発育による判定が可能であったことから、定性試験用の調査試料として有用と判断された。最確数法によ

る定量試験に用いる場合、調査試料中で1400 CFU/g以下の菌数を維持することが求められるが、現状での運用を考慮すると、6週間程度菌数が安定的に維持できることが求められるため、菌数の安定的な維持が課題として明らかとなった。セレウス菌検査用調査試料では、添加した試験菌の菌数が保存温度に関わらず8週間にわたり安定であることが明らかとなった。これにより外部精度管理調査試料として重要な安定性が確保されたと判断した。セレウス菌用調査試料ではNGKG寒天培地で陰性菌（枯草菌）が発育しないことが明らかとなっているため、菌株の探索などより良い調査試料とするための検討が必要であると考えられた。

基材中の菌数安定化を目的とした微生物担体の検討では、「実試料に近い菌数を含んだ調査試料」の実現に向け、微生物担体を用いた菌数の安定化技術について検討した。これまでも外部精度管理調査において実食材に近い基材の採用や新規検査項目の設定など、参加機関からの要望に対応すべく検討を進めているが、食材と微生物が接触することから接種菌数の低減や新しい食材の選択等で問題点が多いのが現状である。今回検討した微生物担体は、試験菌による挙動の相違や保存条件の検討など課題はあるものの、一定量の微生物を封入し、その菌数のある程度の期間維持できることが確認された。

調査試料中に存在する生菌数に関わらず、陰性、陽性の判定は最終選択培地上に発育した集落で実施することが調査試料の理想である。陰性菌でも最終培地まで確実に発育すること、陽性菌は選択培地による生菌数測定にも耐えられることなど、新規検査項目の検討結果を踏まえて実用化に向けた十分な検討を継続することに加え、添加する菌株の検索や使用される定性試験用寒天培地上での挙動・反応の把握など、より広い視野での検討が必要で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

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

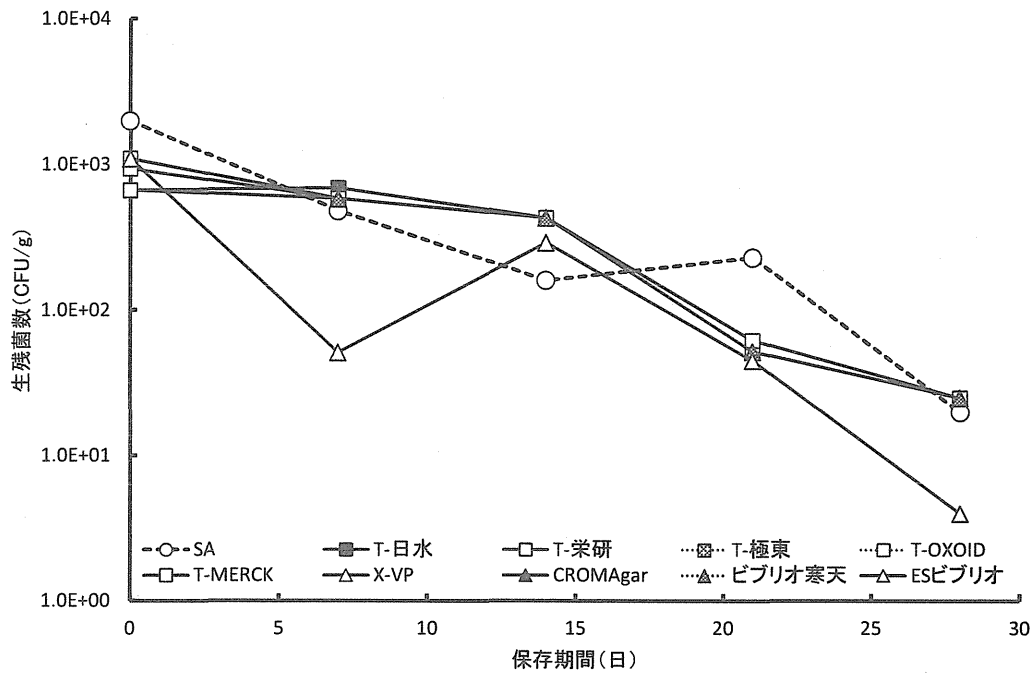


図1 腸炎ビブリオ検査用調査試料 冷蔵保存下における生菌数の挙動

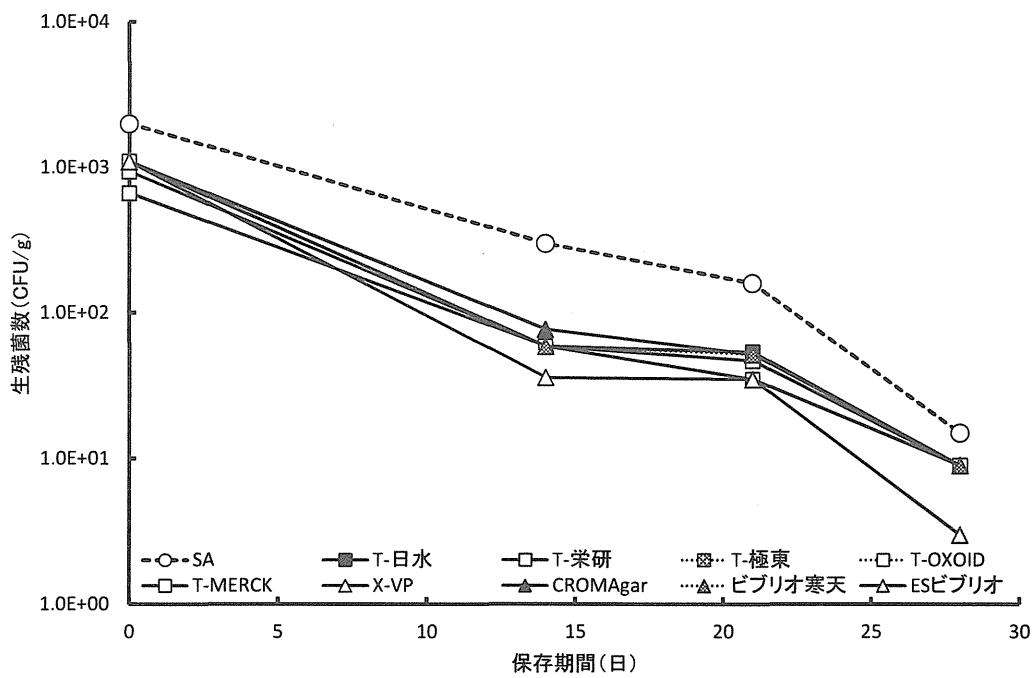


図2 腸炎ビブリオ検査用調査試料 冷蔵保存下における生菌数の挙動 (ピルビン酸添加)

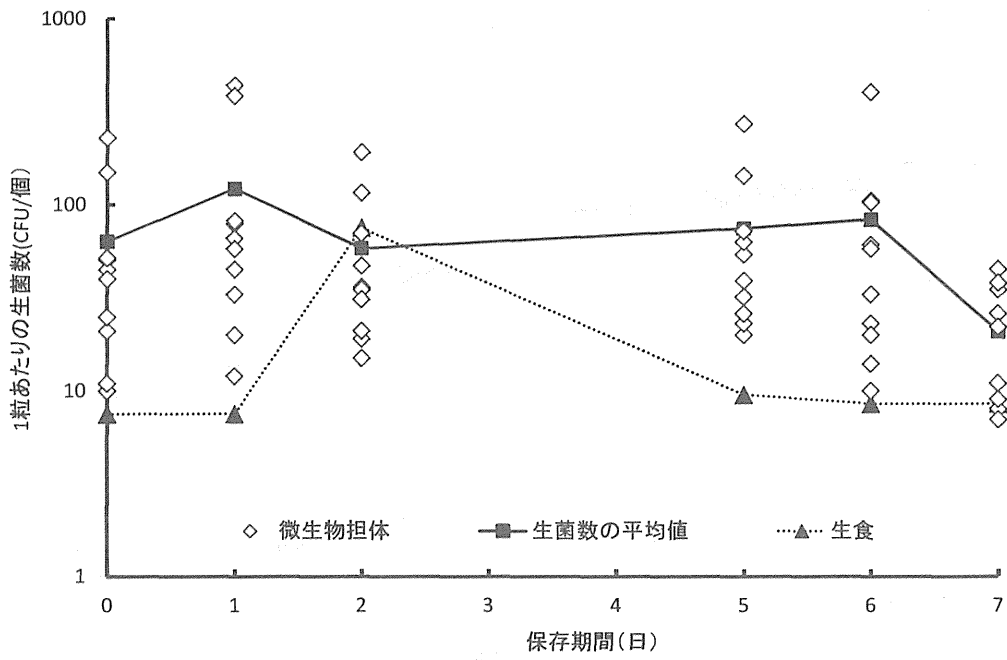


図 3：微生物担体 冷蔵保存下における生菌数の挙動およびばらつき (*S. aureus*)

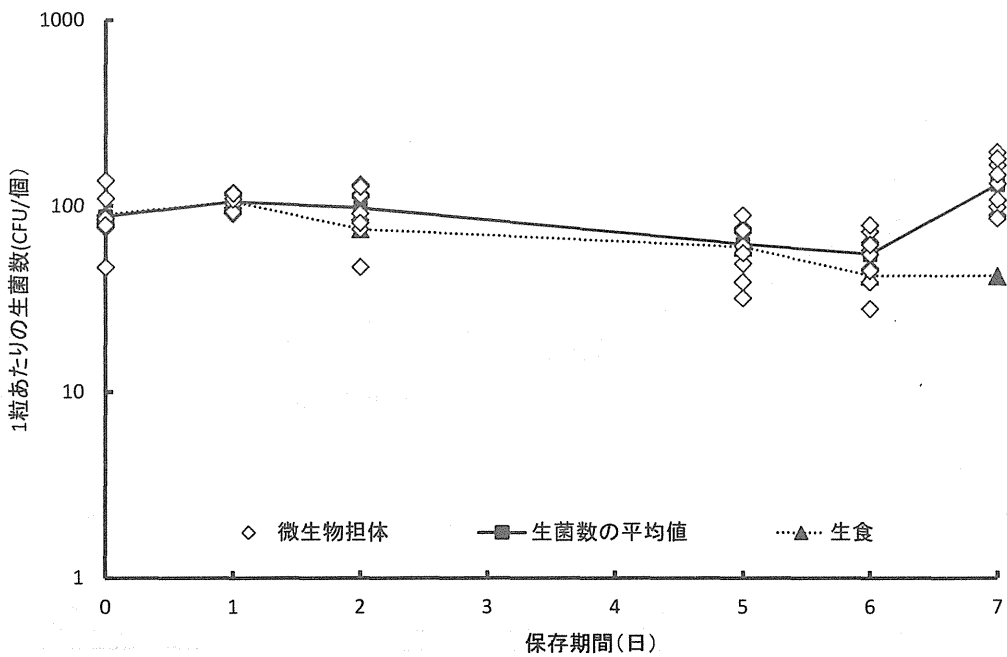


図 4：微生物担体 冷蔵保存下における生菌数の挙動およびばらつき (*E. coli*)

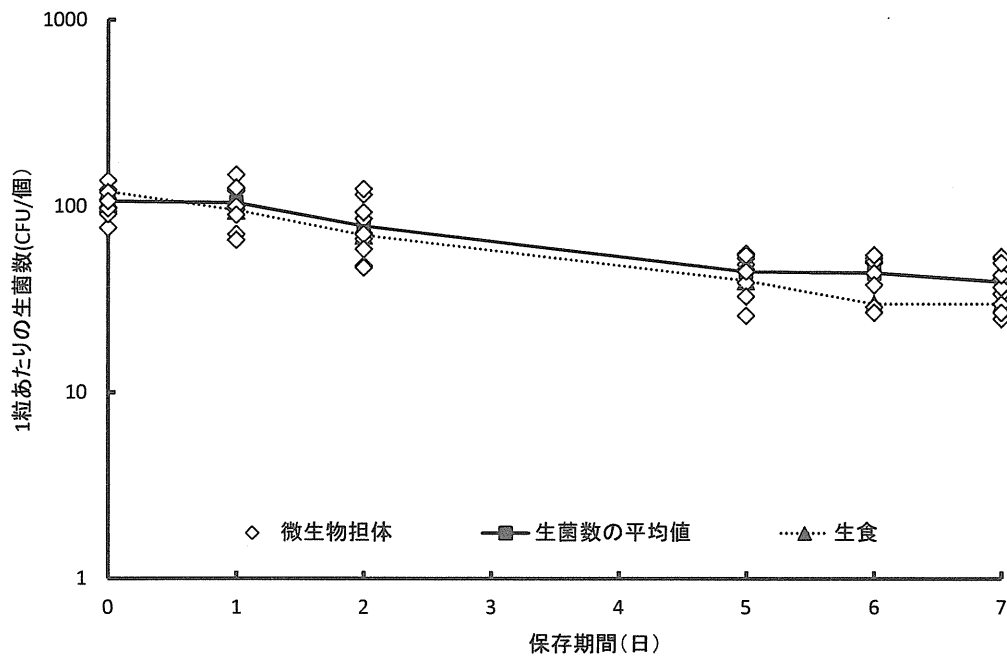


図 5：微生物担体 冷蔵保存下における生菌数の挙動およびばらつき (*Sal. enterica*)

表1 セレウス菌検査用調査試料 米飯基材の生菌数の経時的変化 (標準寒天培地)

保存期間	冷蔵保存		32.5℃保存	
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
接種直後	6.7×10^4	7.8×10^4	6.7×10^4	7.8×10^4
4週間	6.1×10^4	5.5×10^4	4.7×10^4	5.7×10^4
8週間	6.3×10^4	6.2×10^4	4.1×10^4	5.8×10^4

単位：CFU/ g

表2 セレウス菌検査用調査試料 米飯基材の生菌数の経時的変化 (NGKG 寒天培地)

保存期間	冷蔵保存		32.5℃保存	
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
接種直後	<1000	1.0×10^5	<1000	1.0×10^5
4週間	<1000	6.8×10^4	<1000	6.9×10^4
8週間	<1000	8.2×10^4	<1000	7.7×10^4

単位：CFU/ g

表3 セレウス菌検査用調査試料 米飯基材の生菌数の経時的変化 (MYP 寒天培地)

保存期間	冷蔵保存		32.5℃保存	
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
接種直後	3.6×10^4	1.0×10^5	3.6×10^4	1.0×10^5
4週間	4.1×10^4	6.9×10^4	3.4×10^4	7.4×10^4
8週間	3.7×10^4	7.3×10^4	2.7×10^4	6.1×10^4

単位：CFU/ g