

平成 28 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の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

研究分担報告書

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 -

研究代表者	渡辺 卓穂	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	部長
研究協力者	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

これまで一般細菌数測定検査で運用している寒天を用いた試料では、試料を分取する際にフィルター付き検体袋を使用する場合、メーカーによってはストマッカー処理後の破砕された試料の一部がトラップされ、寒天に内包された試験菌がフィルターを通過できずに試験結果に影響する可能性が高いことが示唆されたことから、早急に対応する必要があった。そのため、一般細菌数測定検査用試料における新規基材の開発を行うこととした。

寒天に代わる試料として、見立て食材を「氷菓」とし、ゼラチンを用いた試料を検討した。ゼラチンを用いた試料の生菌数は 28 週間の安定性が確保され、フィルター付き検体袋のメーカー間でのばらつきが低く、併せて検体袋のフィルター内外での差も低かった。

実際に 2017 年度の外部精度管理の試料として配付した際の参加機関から回収した報告値の基本統計量は、外れ値を除いた場合の標準偏差および変動係数の数値が寒天状基材と比較すると大幅に低くなった。また、アンケートの集計結果ではゼラチンを溶解してから試験に供する操作が可能かよくわからず、操作が煩雑になったといった意見が数件見られた。

以上のことから、寒天試料に代わる試料としてゼラチン試料は有用であるが、運用にあたっては溶解してから試験に供する旨を明文化する必要があると考えられた。

A. 研究目的

新たに定量試験（一般細菌数）の新規調査用試料としてゼラチン試料の検討について実施した。

外部精度管理の参加機関へのこれまでのアンケート結果から、フィルター付き検体袋を用いた場合に、結果のばらつきが目立つこと、また数値のばらつく参加機関が使用するフィルター付き検体袋に一定の傾向が確認されたことから、それらのメーカーのフィルター付き検体袋を用いて生菌数測定を実施したところ、寒天試料に内包された試験菌がフィルターを通過できず、試験溶液がフィルター内外で均一になっていない可能性が高いと示唆された。

また、検体袋のメーカーに個別に確認したところ、ほぼ全てのメーカーにおいて検体袋に使用する不織布に明確な基準がないことが判明した。

これらのことから、フィルターを通過できる寒天試料を検討するより、液体で試験操作できる見立て食材を検討する方が妥当であると考え、見立て食材を「氷菓」として、冷蔵から室温の環境変化で固体から液体に溶解するゼラチンを用いた試料を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 試験菌株

試験菌株は、市販の枯草菌芽胞液（栄研化学）を使用した。

2. ゼラチン試料の濃度

ゼラチン試料の濃度は、冷蔵、固形の状態から 24 前後（室温を想定）で 1 時間程度で完全に溶解し、液体になる濃度を検討した。

ゼラチン濃度を 1% から 5% まで 5 段階に振り、寒天試料の寒天をゼラチンに代えて調製した。これを 121 40 分間で高圧蒸気滅菌処理した後、5 以下で 1 晩以上冷蔵した。

冷蔵後、完全に固化したゼラチンを 24 前後の室温に放置し、1 時間ごとに基材形状の経過観察を実施した。

3. ゼラチン試料の安定性の検討

前項で決定したゼラチン濃度で試料を 10 本作製し、寒天試料と同様に、最終濃度が $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ CFU/mL 相当となるように試験菌を接種した。接種後、ゼラチン試料の生菌数の経時的変化を観察し、接種直後からの増減を確認した。なお、経時変化は接種から 28 週間後（約 4 ヶ月）とした。

なお、ゼラチン試料は室温で溶解したことを確認してから 10mL をフィルターなしの検体袋に秤量し、ペプトン食塩緩衝液で 10 倍段階希釈して生菌数測定に供した。

4. ゼラチン試料でフィルター付き検体袋を用いた場合の影響の検討

前項と同様に試料を 10 本作製し、試験菌を接種したゼラチン試料を用いて、フィルターなしの検体袋およびフィルター付き検体袋で生菌数測定を実施した。フィルター付き検体袋は、これまでの外部精度管理調査結果からばらつきが比較的少ないもの（A 社製）と多いもの（B 社製）の 2 種を使用した。

また、フィルター付き検体袋については、ストマッカー 1 分処理の後、検体とペプトン食塩緩衝液を投入した側（フィルター外部）とピペットを挿入する側（フィルター内部）の 2 点について生菌数測定を実施した。

5. 外部精度管理調査試料としての運用

2017年度の外部精度管理で実際にゼラチン試料を運用し、前年度の寒天試料との比較および参加機関からのアンケート集計を実施した。これらの結果から、改善点を考察した。

C.D. 研究結果及び考察

1. ゼラチン試料の濃度

表1に5種のゼラチンの濃度で調製したゼラチン試料を冷蔵後、室温（24前後）にて放置し経過観察した結果を示した。ゼラチン1%および2%では冷蔵しても固形にならなかった。また、4%では1時間後に溶解しているものの、若干粘土が高い状態であり、5%では1時間後では半固形の状態であったことから、1時間後に液状化している条件に当てはまらないと判断した。

以上のことから、ゼラチン濃度は3%として以降の検討を実施することとした。

2. ゼラチン試料の安定性の検討

表2にゼラチン試料10本の生菌数平均値の経時的变化、併せて各測定時の標準偏差、変動係数および冷蔵から取り出した直後の外観を示した。

生菌数は接種直後（0週）から28週目まで殆ど変動することがなかったため、安定であると判定した。また、変動係数も0.05から0.07の間にあり、検体間のばらつきも非常に少ないと考えられた。

併せて、冷蔵保管中にゼラチンが変性して液状に変化することもなかったことから、安定性に特に問題はないと考えられた。

3. ゼラチン試料でフィルター付き検体袋を用いた場合の影響の検討

表3にゼラチン試料10本についてフィルターなし検体袋、2社のフィルター付き検

体袋を用いて生菌数測定を実施した結果を示した。

フィルターなし検体袋の生菌数平均値を100%とした場合のフィルター付き検体袋の各生菌数測定値の比率は80%以上であり、フィルターなし検体袋の生菌数とほぼ同等であると評価できる結果となった。

また、各項目の変動係数も0.1以下と低い数値であることから、フィルター付き検体袋を用いることによる生菌数への影響は低減化できると示唆された。

4. 外部精度管理調査試料としての運用

表4に2015年度および2016年度の外部精度管理調査の統計結果を示した。フィルター付き検体袋を使用する参加機関が大半である状況は2015、2016年度とも変わらないにもかかわらず、2016年度の方が変動係数が低くなったことから、実際の運用からもゼラチン試料の方がフィルター付き検体袋の影響が生菌数結果に反映されにくいことが明らかとなった。

しかしながら、アンケート結果を集計したところ、ゼラチン試料を氷菓と同様に溶解操作できると明言されていなかったため、半固体の状態が無理やりピペットで10mL秤量した、試験中にだんだん液体になって操作しにくかった、氷菓は液状での操作となっているが固体なので仕方なく重量で秤量した、などの意見が見られた。氷菓と同じ操作で試験ができるので良い、といった意見もあったことから、溶解操作について明文化することで混乱を避ける必要があると考えられた。

E. 結論

ゼラチン試料は安定性に問題なく、参加機関の使用する器材による試験結果への影

響も少ない点で寒天試料より一般細菌数用の試料として優れていると考えられた。また、実際の運用時に取扱いについて若干の補足を加えることで、外部精度管理調査用の試料としての品質をさらに向上できると考えられた。

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 ゼラチン試料のゼラチン濃度の検討

ゼラチン濃度	0 時間後	1 時間後	2 時間後	3 時間後	4 時間後	5 時間後
1%	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)
2%	液状 粘性(+)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)
3%	横倒しで壁面に固着した状態を保てる(弱)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)
4%	横倒しでも動かない	液状 粘性(+)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)
5%	横倒しでも全体が固い感じで動かない	固形、横倒しで崩れる	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)

試料を高圧蒸気滅菌処理後、1 晩以上冷蔵保管したものをを用いた。

表2 ゼラチン試料 生菌数平均値の経時的変化

保管期間(週)	生菌数	標準偏差	変動係数	外観
0	1.7×10^4	1.00×10^3	0.0588	
4	1.5×10^4	1.00×10^3	0.0667	固形
8	1.6×10^4	1.00×10^3	0.0625	固形
12	1.9×10^4	1.00×10^3	0.0526	固形
16	1.9×10^4	1.00×10^3	0.0526	固形
20	1.8×10^4	1.00×10^3	0.0556	固形
24	1.8×10^4	1.00×10^3	0.0556	固形
28	1.8×10^4	1.00×10^3	0.0556	固形

生菌数の単位：CFU/mL

ゼラチン試料 10 本の平均値を示した。

0 週目は冷蔵前で液状であることから、比較対象から除外した。

表3 フィルター付き検体袋のゼラチン試料への影響

試験項目	生菌数	標準偏差	変動係数	回収率(%)
フィルターなし	3.2×10^4	2.00×10^3	0.0625	
フィルター(A): 内側	2.7×10^4	1.00×10^3	0.0370	84.4
フィルター(A): 外側	2.6×10^4	2.00×10^3	0.0769	81.3
フィルター(B): 内側	2.6×10^4	1.00×10^3	0.0385	81.3
フィルター(B): 外側	2.8×10^4	2.00×10^3	0.0714	87.5

生菌数の単位：CFU/mL

ゼラチン試料 10 本の平均値を示した。

フィルター(A)：ばらつきの少ないメーカー、フィルター(B)：ばらつきが多いメーカー
試料を入れる側をフィルター外側、ピペットを挿入する側をフィルター内側と表記した。
フィルターなしの生菌数を 100%とした場合の回収率を示した。

表4 外部精度管理調査 一般細菌数統計結果

実施年度	参加機関数	フィルター付検体袋 使用機関数	生菌数	標準偏差	変動係数
2015 年度	351	328	30026.26 /g	9237.82	0.3077
2016 年度	337	258	26478.34 /mL	4089.01	0.1544

2016 年度は平均値から大きく外れた 2 機関を除外した 2シグマ処理後の統計値を転載した。
2015 年度は寒天基材、2016 年度はゼラチン基材を用いた試料を配付した。