

令和4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）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

— 一般細菌数測定検査用調査試料の開発（4） —

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	高坂 典子	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 室長
	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
	中阪 聡亮	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	堀田 実和	（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、微生物学調査では主に一般細菌数測定検査に用いる基材開発を行った。

一般細菌数測定検査の新規基材として白飯（見立て食材：冷凍食品）を用い、妥当性確認として①性能評価、②品質評価、③パイロットスタディの実施による運用確認を行った。

性能評価では冷凍試料（ -15°C 以下）と冷凍11日後に 22.5°C へ移送した試料（常温試料）の2通りの調査試料について、最大84日間保存までの生菌数の挙動を観察した。

品質評価ではパイロットスタディ用に作製した調査試料から採取した10個の調査試料を2名の検査員でそれぞれ生菌数測定を行い、配付前の品質評価（均質性確認試験）および報告期間後までの品質評価（安定性確認試験）を行った。なお均質性確認試験では公表する暫定値の算出に加えてISO/TS 19036 : 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations を用いた標準不確かさの算出を行った。

パイロットスタディでは50機関の参加機関に対して調査試料を配付し、報告値を回収して解析を行った。

性能評価はポイントごとの2回の生菌数の範囲、および接種日と冷凍28日目の生菌数の差をもとに妥当性を評価した。品質評価（均質性確認試験）の評価基準は算出した標準不確かさが0.1以下であることとし、品質評価（安定性確認試験）の評価基準は平均値が均質性確認試験の平均値の $\pm 20\%$ の範囲であることとした。パイロットスタディの評価基準は報告値（実数）の変動係数が30%未満であることとした。

全ての評価基準を満たしたため、白飯は一般細菌数測定検査の基材として妥当であると評価した。

A. 研究目的

食品衛生管理の外部精度管理事業において、現在当財団で実施している微生物学区分の一般細菌数測定検査ではゼラチン基材を氷菓と見立てて配付している。公定法に従うと液状にした調査試料を用いた試験法であることから、参加機関の報告値はばらつきが小さくなり、結果として常識的に考えて異常値ではない報告値でもZスコア±3を超えるという問題が生じている。見立て食材を固形に変更することでこの問題は軽減できると推測できることから、今年度の研究では固形の基材開発とパイロットスタディによる運用上の問題点の洗い出しを目的とした。

B. 方法

1. 試料基材および添加菌

1) 試料基材

試料基材は白飯（アルファ米、市販品）を用いた。

2) 添加菌

添加菌は*Bacillus subtilis*（枯草菌芽胞液、栄研化学、製品コードNo. LK1000）を用いた。

3) 培地等

- ・精製水（日本薬局方）（小塚製薬）
- ・標準寒天培地（日水製薬）
- ・SCD培地（日本製薬）
- ・NaCl（和光特級、富士フィルム和光純薬）
- ・滅菌希釈水 90mL（栄研化学）
- ・0.04w/v% フェノールレッド溶液（富士フィルム和光純薬）

2. 使用機器

調査試料、培地等の滅菌にはオートクレーブを使用した。試験操作は安全キャビネットまたはクリーンベンチ内で行い、培養には恒温槽を使用した。

3. 準拠する試験法（一般細菌数測定検査）

一般細菌数測定検査は、「食品、添加物等の規格基準」（昭和34年厚生省告示第370号）に準拠して実施した。以下にその測定手順を示した。

調査試料25 gを滅菌希釈水225 mLで10倍希釈し、以降10倍段階希釈を適宜実施した。各10倍段階希釈液1 mLを2枚のシャーレに分取して混積培地にした後、35.0℃設定の恒温槽で22-26時間培養した。集落数30~300 cfu/plate の希釈段を用いて生菌数を算出した（図1）。

4. 調査試料の作製

1) 基材の滅菌

アルファ米40 gをレトルトパウチに秤量し、121℃60分間の高圧蒸気滅菌を行った。無菌的に乾燥させた後、菌を添加するまで室温保存した。

2) 添加菌液の調製

0.04% (w/v) フェノールレッド溶液と40% (w/v) 相当のNaClを等量混合した溶液を菌液希釈用溶液とした。

市販の枯草菌芽胞液を菌液希釈用溶液で希釈し、約 1.7×10^6 cfu/mLに希釈したものを添加菌液とした。

3) 調査試料の作製

基材に20% (w/v) NaCl溶液68 mLと添加菌液1 mLを添加し、均質になるよう十分に攪拌した。これを調査試料とした。

調査試料は使用、または配付するまで冷凍保存した（図2）

5. 調査試料の性能評価

1) 保存条件

調査試料の保存条件は①冷凍保存（以下、「冷凍試料」という）、②冷凍保存11日後に22.5℃に移送（以下、「常温試料」という）の2条件とした。

常温試料は実際の調査試料配付を想定とし、保存中の温度変化を考慮して行う参考情報とした。

2) 生菌数測定

冷凍試料は添加菌の添加直後、保存開始から11、14、28、84日後に生菌数測定を行った。常温試料は保存開始から14、28日後に生菌数測定を行った。各ポイントで調査試料は1個使用し、秤量回数2回とした（表1）。

結果をもとに、①冷凍試料の測定ポイントごとの2つの生菌数の対数値差が $\pm 0.5 \log \text{ cfu/g}$ 以内、②冷凍試料の添加直後と28日目の各平均値の差が $\pm 1.0 \log \text{ cfu/g}$ 以内、の2条件を評価基準とした。

6. 調査試料の品質評価

1) 配付用調査試料の作製

4項に示した方法で配付用調査試料を作製し、その一部を用いて品質評価を行った。

2) 均質性確認試験

配付用調査試料から無作為に抽出した10個の配付用調査試料を用いて2名の検査員が1回ずつ生菌数測定を行った。計20回の生菌数（実数）から平均値、標準偏差、変動係数の算出および一元配置分散

分析（Microsoft Excel）を行った。また併せてISO/TS 19036 : 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations を参考に標準不確かさの算出を行った。

ここで算出した平均値はパイロットスタディの暫定値として使用した。

なお、算出した標準不確かさ $0.1 \log \text{ cfu/g}$ 以下であることを評価基準とした。

3) 安定性確認試験

無作為に抽出した10個の配付用調査試料を用いて、作製から約2か月後に均質性確認試験と同様の生菌数測定を行った。計20回の生菌数（実数）から平均値の算出を行った。

安定性確認試験で得られた平均値（実数）が均質性確認試験で得られた平均値（実数）の $\pm 20\%$ 以内であることを評価基準とした。

7. パイロットスタディ（室間共同試験）

1) 調査試料の配付と報告値の回収

均質性確認で問題がないことを確認できた配付用調査試料を使用し、パイロットスタディを実施した。

一般細菌数測定検査のパイロットスタディとして参加募集を行い、50機関を対象にパイロットスタディ（以下、室間共同試験）を実施した。検査機関には調査試料を1個ずつ配付した [2022年11月25日発送、飛脚クール便]。見立て食材を「冷凍食品」として試料処理および測定操作は各機関の方法で実施し、繰り返し試験数は3回とした。検査機関からの報告

値提出期限は2022年12月23日とした。

2) データ解析

解析は当財団が実施している食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査で採用している従来方式（算術平均値および標準偏差を用いた評価方法）による手法を用いて実数での解析を行った。すなわち、各検査機関よりデータを回収後、データ・クリーニング（暫定値の1/100以下および100倍以上の報告値を除外）を行い、この範囲外となる報告値および欠測値のある報告値（3個未満）については、以後の解析対象から除外した。次いで各検査機関間、検査機関内の変動を $\bar{X}-R$ 管理図を代用する方法で観察した後、各検査機関からの報告値の平均値（機関別平均値）について、基本統計量、ヒストグラムおよび正規確率プロットを作成することによりデータ全体の様相を把握した。分布に極端な歪みや尖りが観察された場合には2シグマ（総平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差）以上の値を報告した検査機関を除外した後、同様の処理を行った（2シグマ処理）。最終的に各検査機関の z -スコアと $\bar{X}-R$ 管理図に基づいて各検査機関の解析を行った。さらに、各検査機関より回収したデータを対数に変換し、実数解析と同様に z -スコアに基づいて各検査機関の解析を行った。なお、実数解析および対数解析の z -スコアは参考に留めた。

また、経過記録書についてもとりまとめ、解析を行った。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮として、検査機関をコード番号化し、調査に関する秘密保持を図

った。

C. D. 研究結果および考察

1. 調査試料の作製

アルファ米 40 g をレトルトパウチに秤量し、121°C 60 分間の高圧蒸気滅菌を行った。無菌的に乾燥させた後、菌を添加するまで室温保存した。

0.04% (w/v) フェノールレッド溶液と40% (w/v) 相当のNaClを等量混合した溶液を菌液希釈用溶液とした。

市販の枯草菌芽胞液を菌液希釈用溶液で希釈し、約 1.7×10^6 cfu/mL に希釈したものを添加菌液とした。基材に20% (w/v) NaCl 溶液 68 mL と添加菌液 1 mL を添加し、均質になるよう十分に攪拌し、これを調査試料とした。

調査試料は使用、または配付するまで冷凍保存した。

2. 調査試料の性能評価

冷凍試料の生菌数測定を添加菌の添加直後、保存開始から11、14、28、84日後の5回実施した。また常温試料の生菌数測定を保存開始から14、28日後の2回実施した。いずれも1個の調査試料を使用し、秤量回数2回とした（表1）。

冷凍試料は保存開始から84日後まで非常に安定した生菌数を維持し、各実施日の生菌数の差も $\pm 0.5 \log$ cfu/g の範囲内であった。また添加菌添加直後と28日後の生菌数平均値差は $-0.06 \log$ cfu/g であった（表2~4、図3）。

参考情報として実施した常温試料も、保存開始14、28日後のいずれも冷凍試料とほぼ同等の生菌数を維持していた

(表 2～3、図 3)。

3. 調査試料の品質評価

パイロットスタディ用の調査試料は冷凍保存し、その中から均質性確認試験および安定性確認試験用に無作為に各 10 個の調査試料を抽出した。

均質性確認試験は 2 名の検査員が各 1 回ずつ生菌数測定を行い、実数の平均値、標準偏差、変動係数および一元分散分析を行った (表 5～6)。また均質性確認試験では試験結果をもとに標準不確かさを算出した (表 7)。標準不確かさは $0.06 \log \text{ cfu/g}$ と非常に小さい数値であり、調査試料として問題ないと評価した。安定性確認試験は調査試料の作製から約 2 カ月後に均質性確認試験と同様に試験を実施した後、実数の平均値を算出した (表 8～9)。

4. パイロットスタディ (室間共同試験)

対象とした全 50 機関から結果を回収した。実数解析の結果は表 10 と図 4～図 6 に、対数解析の結果は表 11 と図 7～図 8 に、経過記録書の集計結果は表 12 に示した。

① 実数解析

データ・クリーニングにより除外される機関はなく、2 シグマ処理は実施しなかった。

正規確率プロットを確認したところ、概ね直線状にデータが分布しており、正規分布に従っていると考えられた。また管理限界外となった機関は \bar{X} 管理図においては 0 機関、 R 管理図においては 1 機関であった。 z -スコアによる解析で

は、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$ に該当する機関が 2 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が 1 機関であった。

相対標準偏差は 14.62 % であり、ゼラチン基材を調査試料とする食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査における過去 5 年間 (2017 年度～2021 年度) の相対標準偏差 (11～18 %) と大差のないものであった。

② 対数解析

データ・クリーニングにより除外される機関はなく、2 シグマ処理は実施しなかった。

正規確率プロットを確認したところ、概ね直線状にデータが分布しており、正規分布に従っていると考えられた。また、 z -スコアによる解析では、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$ に該当する機関が 2 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が 1 機関であった。

相対標準偏差は 1.76 % であり、ゼラチン基材を調査試料とする食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査における過去 5 年間 (2017 年度～2021 年度) の相対標準偏差 (1.0～2.3 %) と大差のないものであった。

なお、実数解析と対数解析を比較したところ、いずれも概ね正規分布に従っていた。一般的に微生物学的技能試験は対数解析を行っているものが多く、国際的に見ても今後の外部精度管理調査では対数解析を採用したほうがよいと考えられた。

E. 結論

これらの結果から、本調査試料は技能

試験に供するにあたって十分な均質性と安定性を有し、実数解析、対数解析のいずれの解析においても参加機関を正しく評価できると考えられた。昨年度実施した「弁当及びそうざいの衛生規範について」（第3次改正〔平成7年10月12日衛食第188号・衛乳第211号・衛化第119号〕）に基づく「弁当」とは異なる見立てとして、「冷凍食品」での運用が可能と考えられた。

本調査試料は2022年度にISO/IEC 17043の微生物技能試験認定範囲に追加した。2023年度の外部精度管理調査にて実運用を開始する見込みである。

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

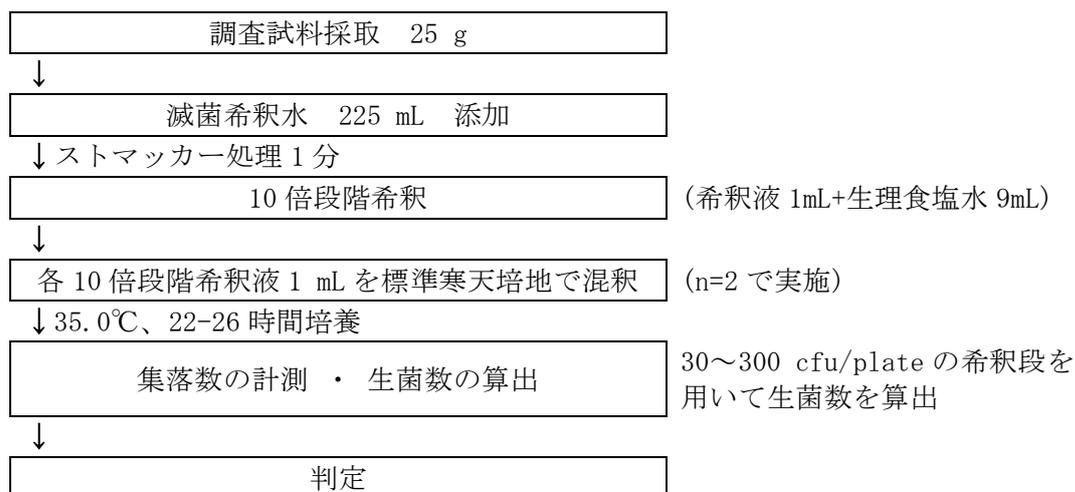


図1 一般細菌数測定検査 試験手順

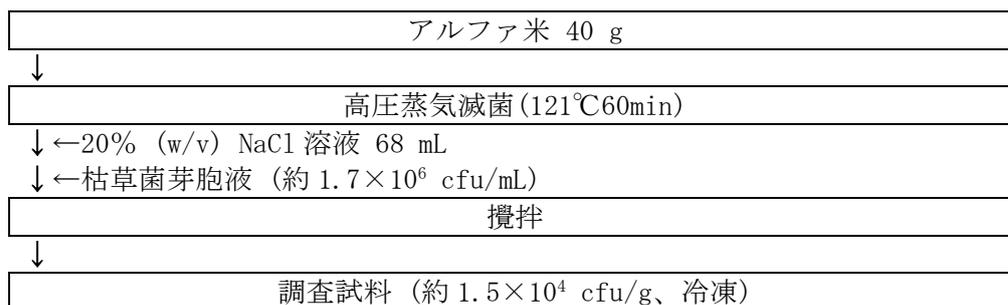


図2 調査試料 作製手順

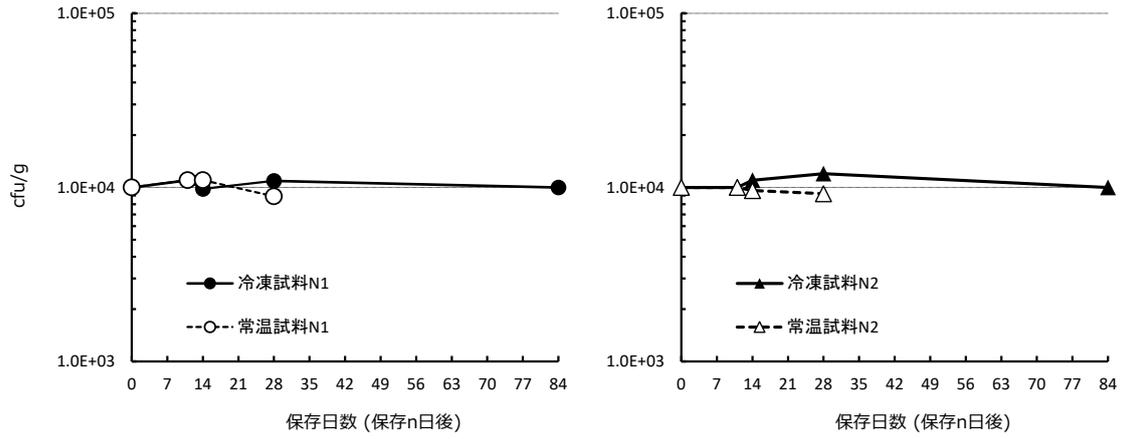


図3 調査試料の性能評価（生菌数の挙動、左図：N1 右図：N2）

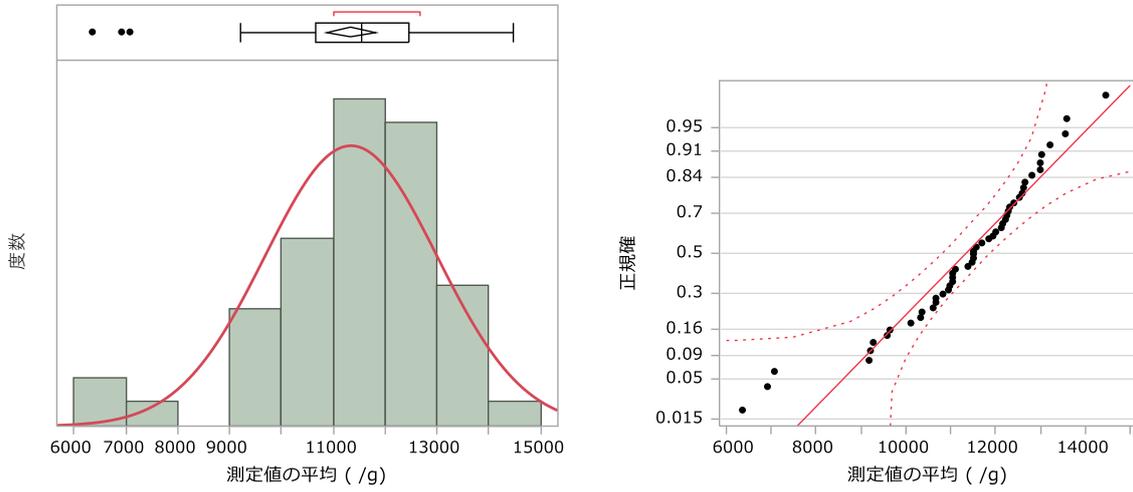


図4 パイロットスタディ 実数解析のヒストグラムと正規確率プロット

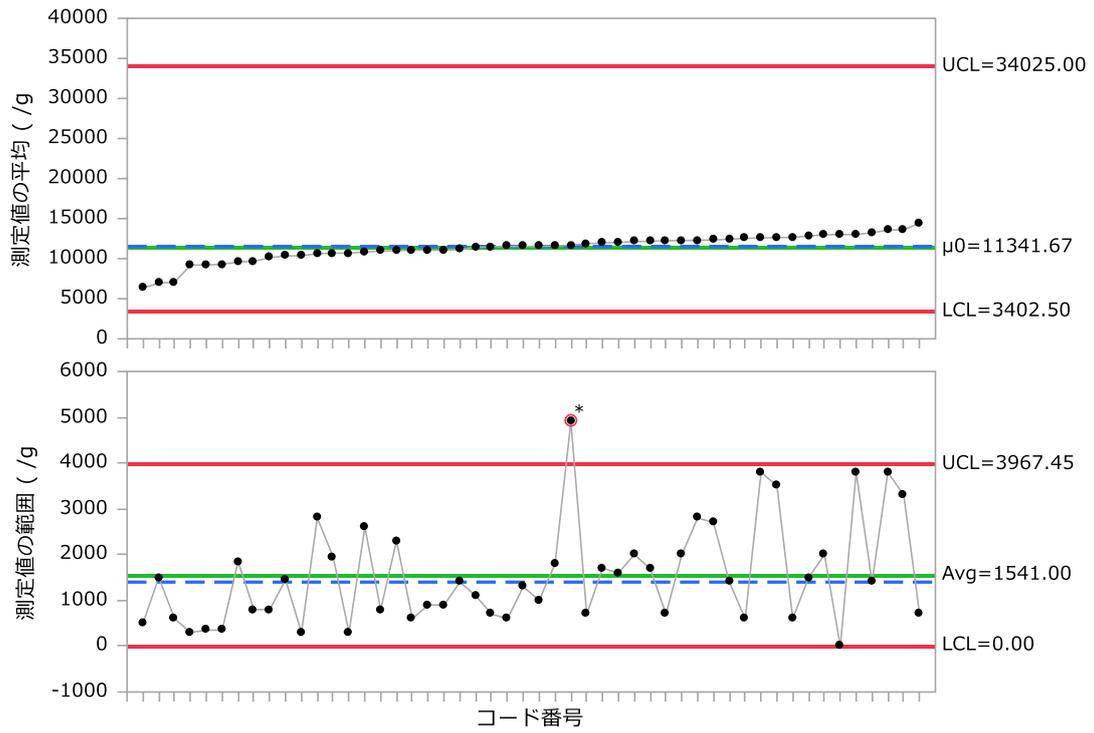


図5 パイロットスタディ 実数解析の $\bar{X}-R$ 管理図

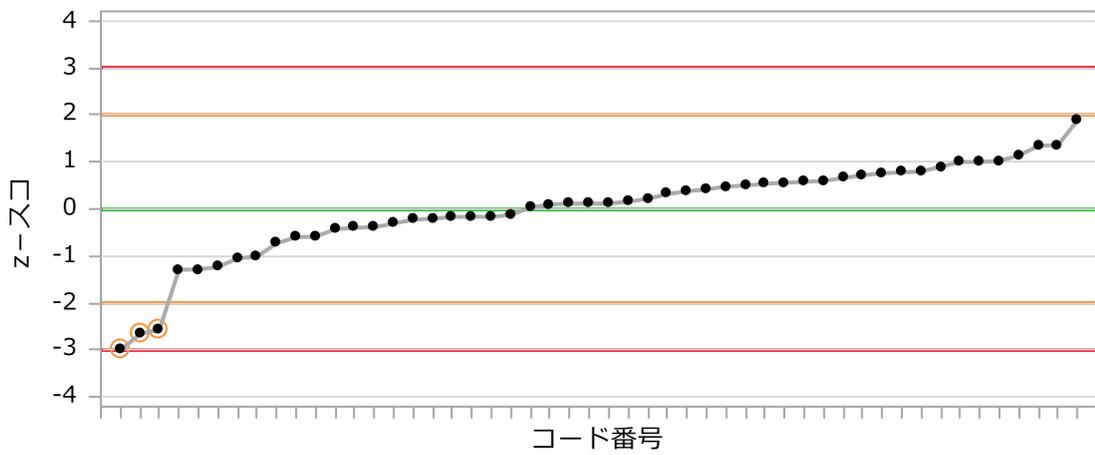


図6 パイロットスタディ 実数解析のz-スコアの順位

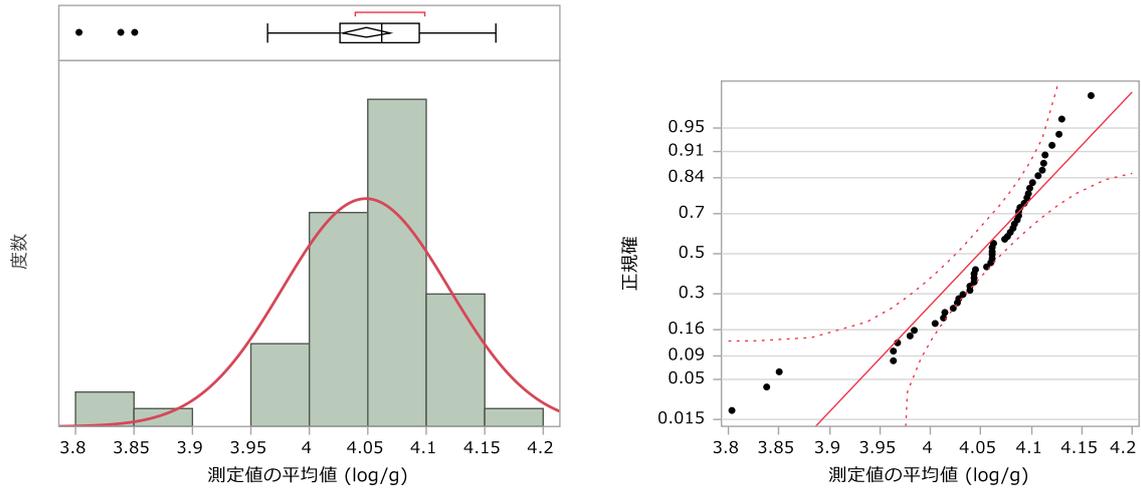


図7 パイロットスタディ 対数解析のヒストグラムと正規確率プロット

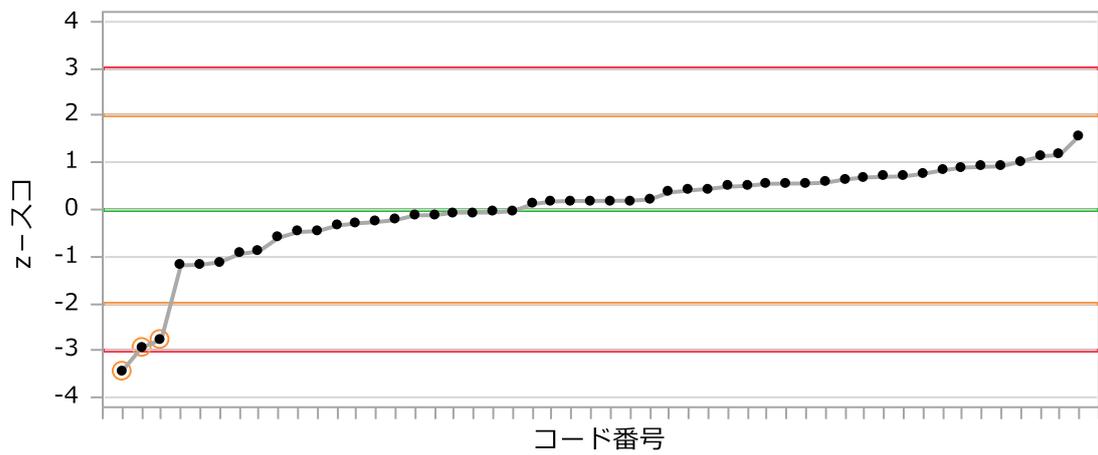


図8 パイロットスタディ 対数解析のz-スコアの順位

表1 調査試料の品質評価 保存条件および試験内容

保存日数	冷凍試料	温度変化試験
		(22.5℃ (常温試料))
0 (添加直後)	○ (添加後、冷凍せずに試験実施)	
11	○	(冷凍から 22.5℃に移動)
14	○	○
28	○	○
84	○	—

各ポイントで調査試料1個を使用、秤量回数は2回とした。

表2 調査試料の性能評価 結果 (実数)

保存日数	N1		N2	
	冷凍試料	常温試料	冷凍試料	常温試料
0 (添加直後)	1.0×10^4	—	1.0×10^4	—
11	1.1×10^4	—	1.0×10^4	—
14	9.8×10^3	1.1×10^4	1.1×10^4	9.6×10^3
28	1.1×10^4	8.9×10^3	1.2×10^4	9.2×10^3
84	1.0×10^4	—	1.0×10^4	—

生菌数の単位：cfu/g

N1、N2は秤量n回目を示した。

表3 調査試料の性能評価 (対数)

保存日数	N1		N2	
	冷凍試料	常温試料	冷凍試料	常温試料
0 (添加直後)	4.00	—	4.00	—
11	4.04	—	4.00	—
14	3.99	4.04	4.04	3.98
28	4.04	3.95	4.08	3.96
84	4.00	—	4.00	—

生菌数の単位：log cfu/g

N1、N2は秤量n回目を示した。

表4 調査試料の性能評価（評価結果）

冷凍試料 保存日数	生菌数 ^{※1}		A-B	平均値 ^{※2}	評価① ^{※3}	評価② ^{※4}	
	A	B					
0（添加直後）	4.00	4.00	0.00	4.00	適合	—	—
11	4.04	4.00	0.04	4.02	適合	—	—
14	3.99	4.04	-0.05	4.02	適合	—	—
28	4.04	4.08	-0.04	4.06	適合	-0.06	適合
84	4.00	4.00	0.00	4.00	適合	—	—

生菌数の単位：log cfu/g

※1： A、生菌数A、Bは表3の冷凍試料 N1、N2の数値を転記した。

※2： A、Bの平均値を示した。

※3： A、Bの冷凍の生菌数（対数値）の差が±0.5 log cfu/g以内である場合に適合とした。

※4： [添加直後の平均値] - [28日目の平均値] を算出し、その数値が±1.0 log cfu/g以内である場合に適合とした。

表5 調査試料の品質評価（均質性確認試験 実数）

調査試料	生菌数（検査員 A）	生菌数（検査員 B）
①	9.3×10^3	8.8×10^3
②	1.1×10^4	8.6×10^3
③	9.6×10^3	7.1×10^3
④	1.0×10^4	1.1×10^4
⑤	1.0×10^4	9.2×10^3
⑥	1.1×10^4	9.9×10^3
⑦	1.1×10^4	8.9×10^3
⑧	8.7×10^3	9.1×10^3
⑨	1.1×10^4	7.6×10^3
⑩	1.1×10^4	8.5×10^3

生菌数の単位：cfu/g

表6 調査試料の品質評価（均質性確認試験 実数 分析値）

平均値	9565
標準偏差	1200
変動係数	0.125
一元分散分析 F値	0.492
一元分散分析 F値に対する有意確率	0.850

生菌数の単位：cfu/g

表 7 調査試料の品質評価 (均質性確認試験 標準不確かさの算出)

調査試料	検査員 A		検査員 B		$\frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$
	生菌数 (x_{iA})	$\log_{10}(x_{iA})$ (y_{iA})	生菌数 (x_{iB})	$\log_{10}(x_{iB})$ (y_{iB})	
①	9.3×10^3	3.97	8.8×10^3	3.94	0.0003
②	1.1×10^4	4.04	8.6×10^3	3.93	0.0057
③	9.6×10^3	3.98	7.1×10^3	3.85	0.0086
④	1.0×10^4	4.00	1.1×10^4	4.04	0.0009
⑤	1.0×10^4	4.00	9.2×10^3	3.96	0.0007
⑥	1.1×10^4	4.04	9.9×10^3	4.00	0.0010
⑦	1.1×10^4	4.04	8.9×10^3	3.95	0.0042
⑧	8.7×10^3	3.94	9.1×10^3	3.96	0.0002
⑨	1.1×10^4	4.04	7.6×10^3	3.88	0.0129
⑩	1.1×10^4	4.04	8.5×10^3	3.93	0.0063
標準不確かさ ^{※1}	0.06		log cfu/g		
均質性確認試験の評価 ^{※2}	適合				

生菌数の単位 : cfu/g (実数)、log cfu/g (対数)

※1 : 標準不確かさ $S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (y_{iA} - y_{iB})^2 / 2}{10}}$

※2 : 標準不確かさの算出値が 0.1 log cfu/g 以下である時に適合と判定した。

表 8 調査試料の品質評価 (安定性確認試験 実数)

調査試料	生菌数 (検査員 A)	生菌数 (検査員 B)
①	9.2×10^3	1.2×10^4
②	9.0×10^3	9.2×10^3
③	1.0×10^4	1.1×10^4
④	1.0×10^4	1.0×10^4
⑤	9.2×10^3	9.9×10^3
⑥	9.5×10^3	1.0×10^4
⑦	9.1×10^3	8.5×10^3
⑧	8.6×10^3	9.4×10^3
⑨	8.4×10^3	1.0×10^4
⑩	1.0×10^4	9.2×10^3

生菌数の単位 : cfu/g

表 9 調査試料の品質評価 (安定性確認試験 実数 分析値)

平均値	9610
安定性確認試験の評価 ^{※1}	適合

生菌数の単位：cfu/g

※1：均質性確認試験の平均値 (9565cfu/g) の±20% (7652～11478 cfu/g) の範囲にある時に適合と判定した。

表 10 パイロットスタディ 実数解析の結果

回収機関数	50	
データ・クリーニングによる除外	なし	
2シグマ処理による除外	なし	
データ数 (有効機関数)	50	
付与値 (平均値)	11341.67 /g	
標準偏差	1658.32 /g	
相対標準偏差	14.62 %	
\bar{X} 管理図による評価	$LCL : 3402.50 /g, UCL : 34025.00 /g$	
	不満足	$\bar{x} < LCL$ 0機関
	満足	$LCL \leq \bar{x} \leq UCL$ 50機関
R 管理図による評価	不満足	$UCL < \bar{x}$ 0機関
	$UCL : 3967.45 /g$	
z -スコアによる評価	満足	$R \leq UCL$ 49機関
	不満足	$UCL < R$ 1機関
	満足	$ z\text{-スコア} < 2$ 47機関
	疑わしい	$2 \leq z\text{-スコア} < 3$ 2機関
	不満足	$3 \leq z\text{-スコア} $ 1機関

LCL : 下部管理限界線、 UCL : 上部管理限界線

表 11 パイロットスタディ 対数解析の結果

回収機関数	50	
データ・クリーニングによる除外	なし	
2シグマ処理による除外	なし	
データ数 (有効機関数)	50	
付与値 (平均値)	4.048 log/g	
標準偏差	0.071 log/g	
相対標準偏差	1.76 %	
z -スコアによる評価	満足	$ z\text{-スコア} < 2$ 47機関
	疑わしい	$2 \leq z\text{-スコア} < 3$ 2機関
	不満足	$3 \leq z\text{-スコア} $ 1機関

表 12 パイロットスタディ 経過記録書の集計結果

経験年数	1年以下	2年～4年	5年～9年	10年以上
	22	7	10	11
試料採取量	10 g	25 g		
	0	50		
希釈液	リン酸 緩衝希釈水	ペプトン加 生理食塩水	その他	
	46	2	2	
均質化方法	ストマッカー	ブレンダー		
	50	0		
均質化処理時間	30 秒	1 分	2 分	
	1	48	1	
使用培地	標準寒天培地	普通寒天培地	SCD 寒天培地	
	50	0	0	
使用培地タイプ	粉末培地	生培地	フィルム培地	
	50	0	0	
培養温度	35±1℃			
	50			
培養時間	24 時間程度	48 時間程度	その他	
	47	3	0	