

令和5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
ーサルモネラ属菌検査用調査試料および一般細菌数測定検査用調査試料の開発(4)ー

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、微生物学調査では硫化水素（H₂S）非産生株を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料の開発および前年度までに開発した一般細菌数測定検査用調査試料の実運用を行った。

H₂S非産生株を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料の開発では51機関の参加機関に対してパイロットスタディを実施した。パイロットスタディでは当財団の食品衛生外部精度管理調査事業で通常使用している陽性菌、陰性菌に加え、H₂S非産生サルモネラ属菌の計3菌株を個別に添加した3本の調査試料を配付した。なおH₂S非産生株は2012年度の厚生労働科学研究費補助金にて実施したスクリーニング結果を参考に決定した。調査試料は性能評価を実施し、1か月間の冷蔵保存で安定していることを確認してから同一ロットの資材で配付用調査試料を作製し、参加機関に配付し報告値の回収および解析を実施した。なお配付用調査試料は配付前の均質性確認、報告期限後の安定性確認で調査試料の品質評価をした。一般細菌数測定検査用調査試料の実運用では2023年度の食品衛生外部精度管理調査事業の一般細菌数測定検査項目にて白飯基材の調査試料を配付し、報告値の回収、解析および改善点の検証を実施した。

H₂S非産生株を用いたサルモネラ属菌検査のパイロットスタディ用調査試料は性能評価、均質性確認、安定性確認ともに評価基準を満たしていた。ほとんどの参加機関が陽性、陰性を正しく判定したが、一部の参加機関でH₂S非産生株を陰性と判定した。なおH₂S非産生株を陰性と誤判定した機関はクエン酸能確認試験で非定型反応と判定したことが要因であった。一般細菌数測定検査の実運用では、389機関中2機関が生菌数を回答できなかった。1機関はフィルム培地の液状化により測定不能となったため、1機関は手順書に従った操作で検出限度値未満と判定したためであった。前者は当該フィルム培地と添加菌の相性が悪いことが要因であり、後者は調査試料の菌濃度が公定法（冷凍食品）の基準値の1/10程度であったことが要因であった。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査事業において、現在当財団で実施している微生物学調査区分のサルモネラ属菌検査ではH₂S 産生 *Salmonella* sp. を陽性菌、*Proteus mirabilis* を陰性菌として配付している。サルモネラ属菌検査ではH₂S 産生株、非産生株が公定法の検出対象であるが、H₂S 非産生菌を用いた調査試料はまだ存在せず、外部精度管理調査の課題であった。今年度の研究ではH₂S 非産生株を用いたサルモネラ属菌検査をパイロットスタディで実施し、運用上の問題点の洗い出しを目的とした。併せて前年度までに開発した一般細菌数測定検査の白飯基材で実運用を行い、改善点の検証を実施することを目的とした。

B. 方法

I. サルモネラ属菌検査

1. サルモネラ属菌検査-試料基材および添加菌

1) 試料基材

試料基材は液卵希釈液（市販の液卵を希釈液で1/5希釈した溶液）を用いた。

2) 添加菌

添加菌は①*Proteus mirabilis* HIC 210396、②*Salmonella* sp. HIC 210393、③*Salmonella* sp. HIC 230403を用いた。①②は現在食品衛生外部精度管理で使用している菌株、③はH₂S非産生株（サルモネラ属菌陽性）である。

3) 培地等

後述で用いる培地名の略称は、[] で示す。

- ・精製水（日本薬局方）（小堺製薬）

- ・標準寒天培地 [SA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・SCD培地 [SCDB]（塩谷エムエス）
- ・NaCl（試薬特級、富士フイルム和光純薬）
- ・Tween 80（東京化成工業）
- ・0.04w/v% フェノールレッド溶液
（富士フイルム和光純薬）
- ・緩衝ペプトン水（ISO組成）[BPW]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地 [RVB]（塩谷エムエス）
- ・テトラチオネート培地 [TTB]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・よう化カリウム（試薬特級）
（富士フイルム和光純薬）（TTBに添加）
- ・よう素（試薬特級）
（富士フイルム和光純薬）（TTBに添加）
- ・DHL寒天培地 [DHLA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・XLD（キシロース・リジン・デソキシコール酸）寒天培地 [XLDA]
（塩谷エムエス）
- ・MLCB寒天培地 [MLCBA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・ブリリアントグリーン寒天培地
（栄研化学）滅菌後にスルファピリジン添加 [BGSA]
- ・Sulfapyridine（東京化成特級）
（東京化成工業）（BGSAに添加）
- ・N,N-Dimethylformamide
（東京化成特級）（東京化成工業）
（BGSAに添加）
- ・CHROMagar *Salmonella* [CHS]
（CHROMagar）
- ・ESサルモネラ寒天培地Ⅱ [ESⅡA]

- (栄研化学)
- ・ chromID Salmonella agar [SM2A]
(バイオメリュー)
- ・ TSI寒天培地 [TSIA]
(島津ダイアグノスティクス)
- ・ LIM培地 [LIMA]
(島津ダイアグノスティクス)
- ・ Kovacs reagent (バイオメリュー)
- ・ サルモネラ免疫血清「生研」1号セット (デンカ)
- ・ API 20E (バイオメリュー)

2. サルモネラ属菌検査-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内で行い、培養には恒温槽または恒温水槽を使用した。

3. サルモネラ属菌検査-準拠する試験法

サルモネラ属菌検査は、「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」（平成27年食安発0729第4号）に準拠して実施した（図1）。

調査試料25 gをBPW（ISO組成）225 mLで10倍希釈したものを試験溶液とした。これを37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養した。培養後のBPWから0.1 mLをRVBに、1 mLをTTBに移植し、42.0℃設定の恒温水槽で20-24時間培養した。培養後、各培養液からDHLA、XLDA、MLCBA、BGSA、CHS、ES II A、SM2Aに移植し、37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養した。培養後の発育集落の一部をTSIA（斜面培地）に画線、穿刺し、LIMA（高層培地）に穿刺した後、37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養し

た。LIMAは培養後の観察後にKovacs reagentを重層し、インドール反応を確認した。TSIAの発育集落の一部をSAに移植し、37.0℃設定の恒温槽で18時間以上培養し、その発育集落を用いてO血清群別試験を実施した。なお、H₂S非産生サルモネラ属菌はO血清群別試験と並行して簡易同定キット（API 20E）に供し、オキシダーゼ試験、クエン酸利用能試験、VP試験、ONPG試験を実施した。

一連の試験においてサルモネラの定型反応を示す場合に陽性、示さない場合に陰性と判定した。

なお、生菌数測定を要する場合は試験溶液をBPWで10倍段階希釈し、各希釈段から1 mLを2枚のシャーレに分取してSAで混釈平板培地にしたものを37.0℃設定の恒温槽で18時間以上培養し、計測した集落数をもとに生菌数を算出した。

4. サルモネラ属菌検査-調査試料作製

調査試料作製手順を図2に示した。

1) 基材の滅菌

NaCl 153 g、Tween80 180 g、精製水 12.6 L、グリセリン 1800 gを均質化し、80 mLずつ樹脂製容器（100 mL）に分注後、121℃30分で高圧蒸気滅菌をした。

2) 添加菌液の調製

凍結保存菌株をSAに移植し、35.0℃設定の恒温槽で24時間培養した。発育集落をSCD培地100 mLに1白耳移植し、35.0℃設定の恒温槽で24時間培養した。この培養液を生理食塩液で100倍希釈し、さらにフェノールレッド含有生食で10倍希釈したものを添加菌液とした。

フェノールレッド含有生食は1.8 % NaCl

溶液と0.04 w/v% フェノールレッド溶液を等量混和して作製した。

3) 調査試料の作製

滅菌後の基材に市販の無菌卵黄液20 mLおよび添加菌液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。なお添加菌は参加機関には開示せず、調査試料No. 1、No. 2、No. 3として作製した。

調査試料は使用、または配付するまで冷蔵保存した。

5. サルモネラ属菌検査-性能評価

1) 保存条件

調査試料の保存条件は冷蔵保存（以下、「冷蔵試料」という）、冷蔵保存10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

冷蔵試料は添加菌の添加直後、保存開始から10、13、28日後に生菌数測定を行った。常温試料は保存開始から13、28日後に生菌数測定を行った。各ポイントで調査試料を1個使用した。

3) 定性試験

外部精度管理調査で通常使用している菌株（添加菌①および②）は、分離培地の選択においてXLD寒天培地とESサルモネラ寒天培地Ⅱを使用した。添加菌③は全工程で全ての培地を使用した。なお定性試験は添加菌の添加直後、保存開始から13、28日後に行った。

6. サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ（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

添加菌ごとに、配付用調査試料から系統的に抽出した5個の配付用調査試料を用いて生菌数試験を行い、その平均値を添加濃度とした。また、5個の配付用調査試料のうち2個を用いて定性試験を行った。なお分離培地はXLDAとESⅡAを使用した。

3) 安定性確認試験

添加菌ごとに、系統的に抽出した1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定性試験および生菌数測定を行った。

7. サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ（室間共同試験）

51機関の参加機関に対して配付用調査試料を冷蔵便で発送し、参加機関から検査結果を回収した。見立て食材を「殺菌液卵」とし、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1回とした。検査機関からの報告期限は2023年12月22日とした。なお、倫理面への配慮として、参加機関に配付する結果報告書では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。

Ⅱ. 一般細菌数測定検査（白飯）

1. 一般細菌数測定検査-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

後述で用いる培地名の略称は、[] で示す。

- ・精製水（日本薬局方）（小堺製薬）
- ・標準寒天培地 [SA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・SCD培地 [SCDB]（塩谷エムエス）
- ・NaCl（試薬特級、富士フイルム和光純薬）
- ・滅菌希釈水 90mL（栄研化学）
- ・0.04w/v% フェノールレッド溶液
（富士フイルム和光純薬）

2. 一般細菌数測定検査-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内で行い、培養には恒温槽を使用した。

3. 一般細菌数測定検査-準拠する試験法

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。

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SAで混釈平板培地にした後、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4）。

4. 一般細菌数測定検査-調査試料作製

調査試料作製手順を図5に示した。

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。

5. 一般細菌数測定検査-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系統的に抽出した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、相対標準偏差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外部精度管理調査の暫定値として使用した。

3) 安定性確認試験

系統的に抽出した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。

6. 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査

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、389機関を対象に外部精度管理調査を実施した。

検査機関には調査試料を1個ずつ配付した。見立て食材を「冷凍食品」とし、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。回収した報告値の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。なお、倫理面への配慮として、参加機関に配布する結果報告書では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

I. サルモネラ属菌検査

1. サルモネラ属菌検査-調査試料の性能評価

添加菌①、②、③の接種直後の濃度はそれぞれ 4.1×10^3 、 3.1×10^4 、 7.0×10^3 cfu/gであった。冷蔵試料では保管開始から28日後まで大きな菌数の増減は観察されなかった。また、10日後に冷蔵から22.5℃に移管した常温試料でも28日目まで生菌数を算出でき、定性試験においても添加菌①が陰性、添加菌②が陽性（ H_2S 産生+）、添加菌③が陽性（ H_2S 非産生-）と判定され、調査試料の品質に問題ないと評価した（図3、表1）。

2. サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ（品質評価）

均質性確認において添加菌①、②、③の配付用調査試料の生菌数平均値（添加濃度）はそれぞれ 3.9×10^3 、 1.9×10^4 、 4.3×10^3 cfu/g であった。また、定性試験でも性能評価と同様の結果が得られたことから、配付用調査試料は均質であると評価した（表 2）。

配付から約 2 か月後に実施した安定性確認において添加菌①、②、③の生菌数は 3.0×10^2 、 3.5×10^2 、 7.1×10^2 cfu/g であった。均質性確認時の 1/10 程度に減少したが、定性試験の結果は均質性確認試験と同様の結果となったことから、定性試験を実施する上で影響がないと判断し、パイロットスタディ実施期間中の調査試料は安定であったと評価した（表 3）。

3. サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ（室間共同試験）

対象とした全 51 機関から結果を回収した。結果は表 4 に、経過記録書の集計結果は表 5 に示した。また、アンケート結果を表 6 に示した。

1) 定性試験

通常的外部精度管理調査で使用している添加菌①、②は 51 機関全てが正しく報告した。しかし、添加菌③は 51 機関中 3 機関がサルモネラ属菌陰性と判定した。添加菌③を誤判定した 3 機関のうち 2 機関は、クエン酸利用能陰性のためサルモネラ陰性と報告した。うち 1 機関は API20E 実施によりサルモネラ陽性であったが当該機関の手順書に従った判定で

サルモネラ陰性と報告した。残り 1 機関はクエン酸利用能およびマロン酸利用能試験を実施し、非定型反応であることからサルモネラ陰性と報告した。

2) 経過記録書の集計結果

前増菌培地では BPW が多く、増菌培地では RVB と TTB の組み合わせでの使用が多かった。また、分離培地では DHLA と CHS を採用する検査機関が多く、2 種類の分離培地を採用している検査機関が多かった。この他、 H_2S の産生により判定する分離用寒天培地として MLCBA、 H_2S の産生によらない分離培地として ES II A を採用している検査機関も比較的多かった。また、生化学的性状試験において 36 機関がクエン酸利用能試験を実施し、クエン酸利用能試験を実施していない 15 機関のうち 10 機関は簡易同定キットでクエン酸利用能を確認していた。

3) アンケート結果

外部精度管理調査事業の今後の運用として、 H_2S 産生/非産生サルモネラ属菌および陰性菌の 3 種のうち 2 種の組み合わせで実施する場合のアンケート調査を行ったところ、「どの組み合わせでもよい」が半数以上（58.8%）となった。また、「陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい」（27.5%）を含めると 80%以上が H_2S 非産生サルモネラ属菌の調査試料に前向きな回答であった。

また、パイロットスタディに対するコメントとして、 H_2S 非産生サルモネラ属菌のクエン酸利用能の定型反応が弱いといったコメントが散見された。本試験に使用するシモンズクエン酸培地はメーカーによる反応差や菌の接種量による偽陰性

/偽陽性が出やすく、検査員の経験や技量が大きく影響する可能性が示唆された。

II. 一般細菌数測定検査（白飯）

1. 一般細菌数測定検査-品質評価

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系統的に各 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、相対標準偏差および一元分散分析を行った（表 7～8）。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 9）。標準不確かさは $0.05 \log \text{cfu/g}$ 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 か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 10～11）。

2. 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査

対象とした全 389 機関から結果を回収した。実数解析の結果は表 12 と図 6～図 8 に、対数解析の結果は表 13 と図 9～図 10 に、経過記録書の集計結果は表 14 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た機関は 3 機関、2 シグマ処理で除外された機関は 1 機関であった。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 1 機関、 R 管理図においては 9 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 13 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が 5 機関であった。

データ・クリーニングにより除外された 3 機関はそれぞれ報告時の転記ミス、標準操作手順書に従って実施した結果検出限度値未満 ($< 3.00 \times 10^4 / \text{g}$) になった、フィルム培地の液状化により菌数の計測ができなかったことが原因であった。前者は添加菌（市販）の濃度とコストを考慮して設定した調査試料の濃度が見立て食材（冷凍食品）の基準値の $1/10^\circ\text{C}$ であったことが要因であり、後者は枯草菌によるフィルム培地の液状化現象が起きたことが要因である。フィルム培地の液状化現象に関してはメーカー側でも把握しており、対応製品も販売されている。

2) 対数解析

データ・クリーニングにより除外された機関は 2 機関、2 シグマ処理で除外された機関は 1 機関であった。

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

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。

E. 結論

H₂S非産生株を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料の開発では、ほとんどの参加機関で正しく報告したが、51機関中3機関（全体の約6%）が添加菌③においてクエン酸利用能試験陽性の判定ができず誤回答となった。調査試料としてはほぼ問題ないと考えられる結果であったが、クエン酸利用能試験で陽性となるH₂S非産生株の再検討を行うことを次年度の課題とする。

一般細菌数測定検査の実運用においては、2機関において生菌数を報告できない事例が発生した。枯草菌によるフィルム培地の液化化現象に関してはメーカー側でも把握しており、対応製品も販売されている。枯草菌は生菌数測定で検出する一般的な菌でもあることから、参加機関への危機管理啓蒙の意味も含め、菌株の変更は検討しない方針とする。一方、基準値を考慮した標準操作手順書で実施した機関で検出限度値未満となった件に関しては、対応として調査試料の生菌数の濃度を基準値以上に設定することが望まれるが、国内の市販芽胞菌液では高濃度芽胞液がないため、海外の芽胞液製品も含めた再検討を実施することを次年度の課題とする。

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

- 1) 白飯を用いた一般細菌数測定検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ：梶原三智香、中阪聡亮、堀田実和、高坂典子、渡辺卓穂（第119回日本食品衛生学会学術大会
2023. 10. 12～2023. 10. 13）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

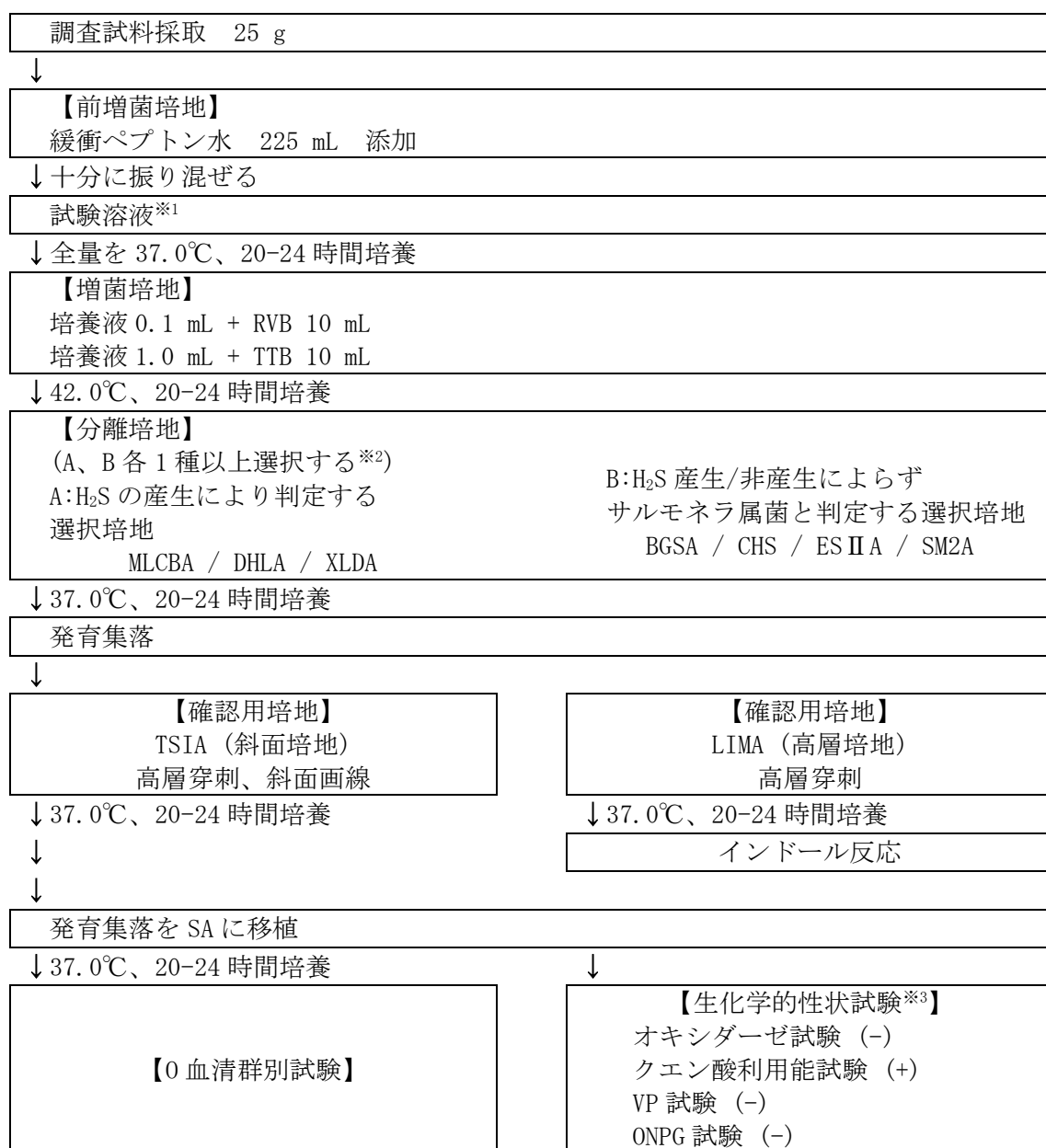
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



※¹： 生菌数測定を要する場合は試験溶液の一部を10倍段階希釈し、SAで混釈平板培地にした後、37.0℃で18時間以上培養して集落数の計測、生菌数の算出を実施した。

※²： 添加菌③、性能評価以外はXLDA、ESⅡAのみを使用した。

※³： H₂S非産生サルモネラ属菌のみAPI 20Eを用いて実施した。

図1 サルモネラ属菌検査 試験手順

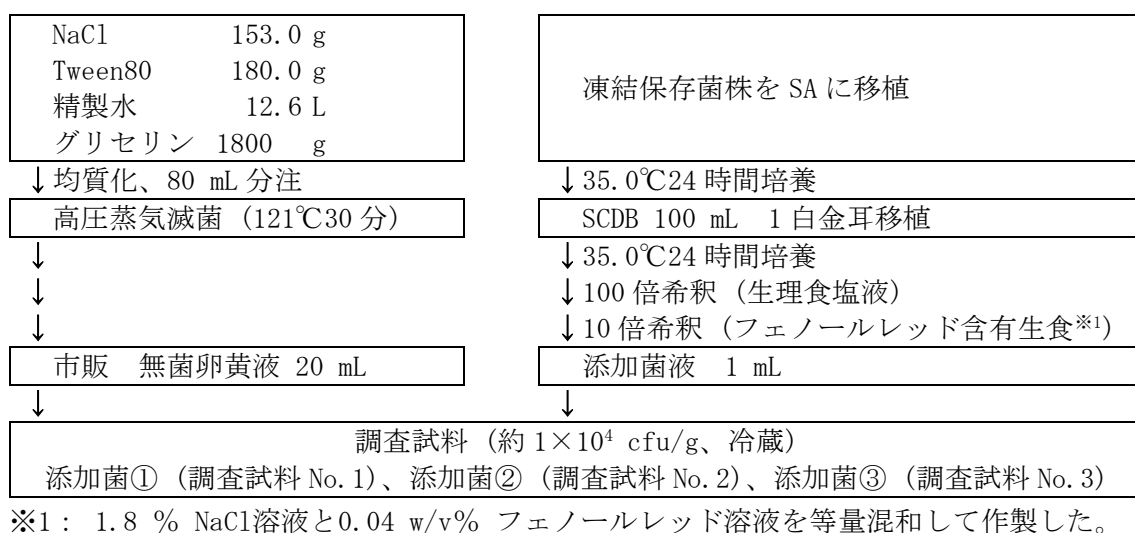


図2 サルモネラ属菌検査 調査試料作製手順

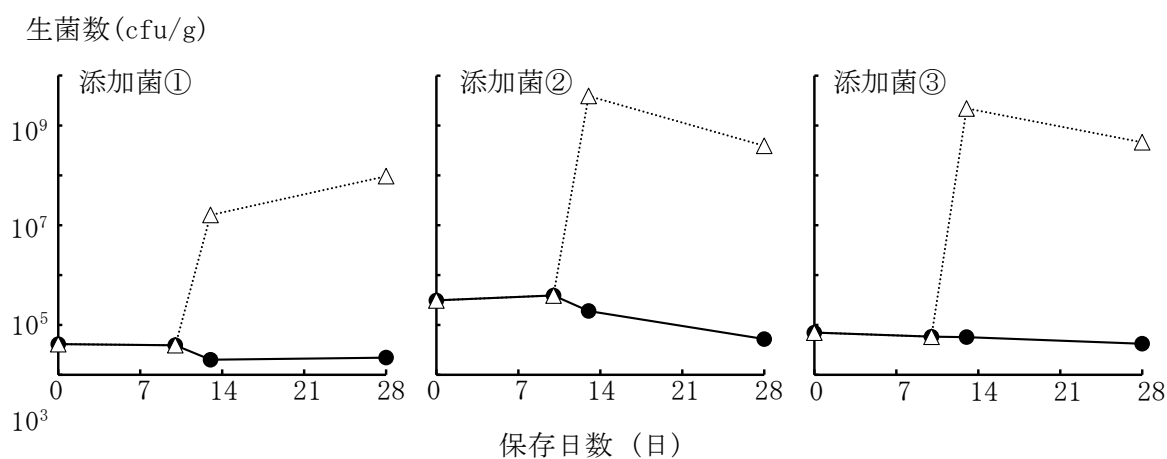


図3 サルモネラ属菌検査-性能評価 調査試料の生菌数の挙動

(●: 冷蔵試料、△: 常温試料)

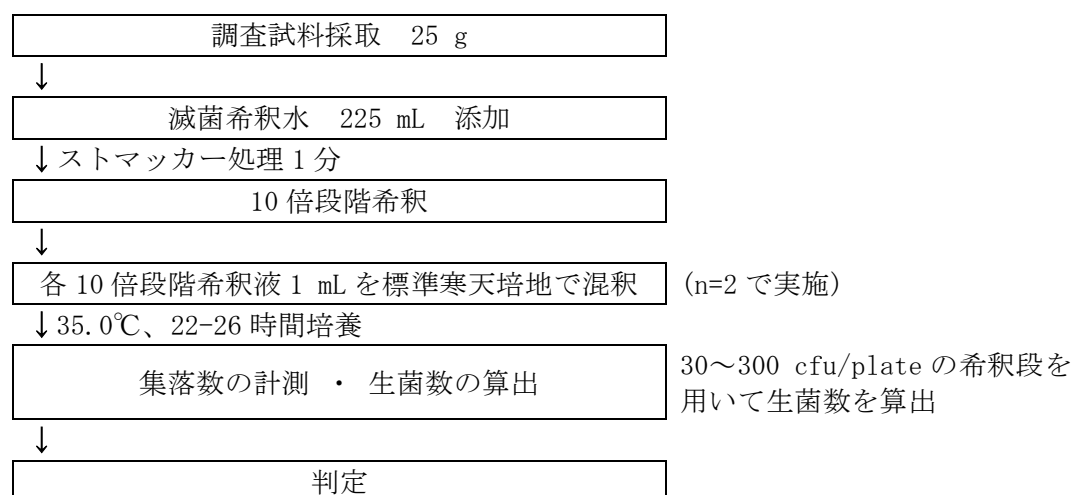
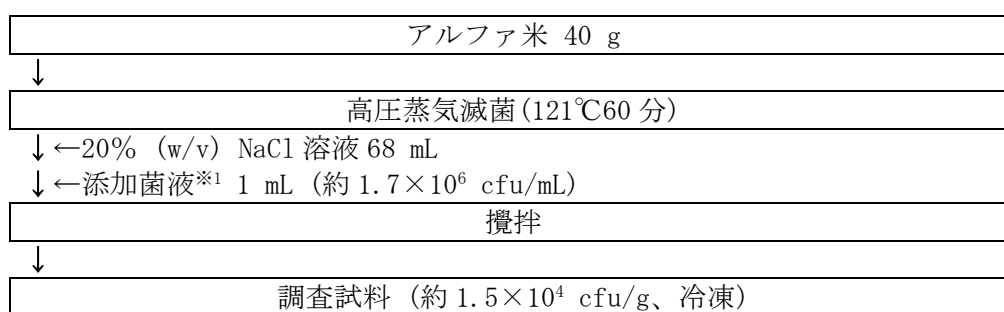


図 4 一般細菌数測定検査 試験手順



※1： 0.04% (w/v) フェノールレッド溶液と 40% (w/v) 相当の NaCl を等量混合して作製した溶液で枯草菌芽胞液（市販）を希釈し、約 1.7×10^6 cfu/mL に調整した。

図 5 一般細菌数検査 調査試料作製手順

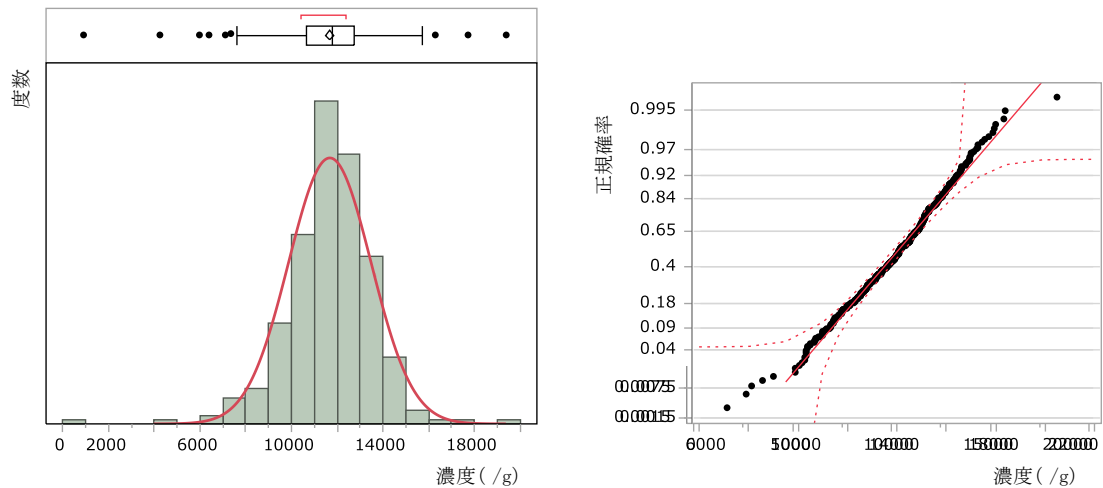


図6 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 実数解析のヒストグラムと正規確率プロット

有効機関：385 機関、データクリーニング除外機関：3 機関、2 シグマ処理除外機関：1 機関

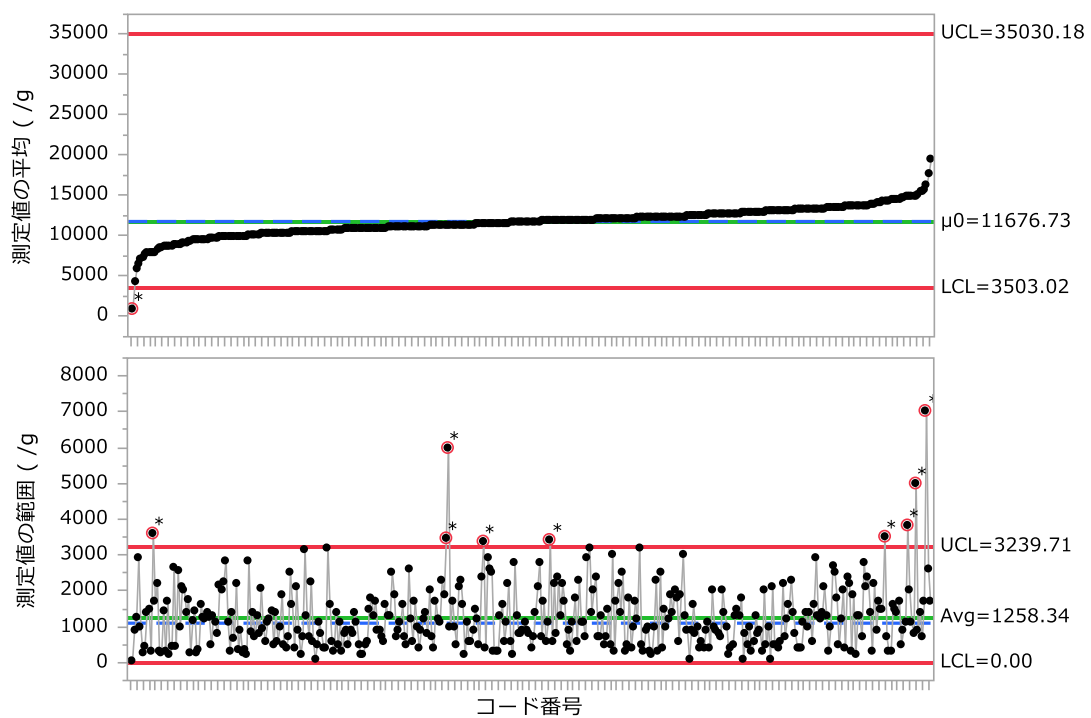


図7 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 実数解析の $\bar{X}-R$ 管理図

有効機関：385 機関、データクリーニング除外機関：3 機関、2 シグマ処理除外機関：1 機関

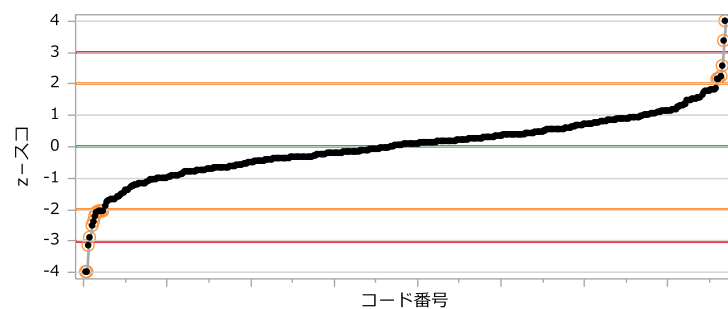


図8 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 実数解析のzスコアの順位
有効機関：385 機関、データクリーニング除外機関：3 機関、2 シグマ処理除外機関：1 機関

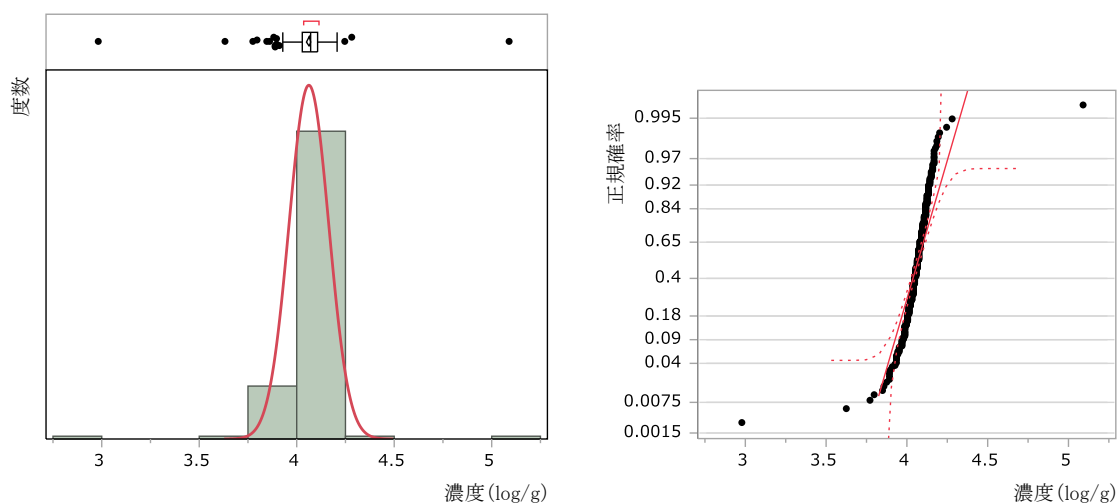


図9 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 対数解析のヒストグラムと正規確率プロット
有効機関：386 機関、データクリーニング除外機関：2 機関、2 シグマ処理除外機関：1 機関

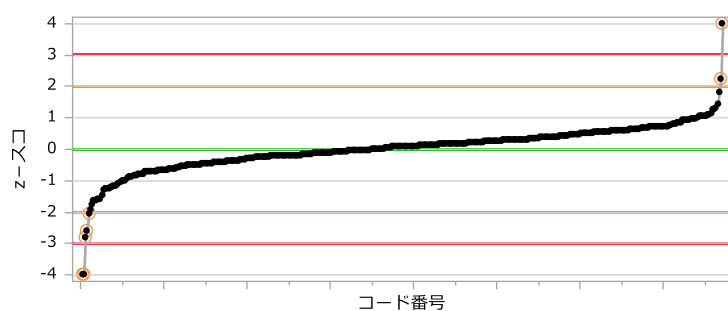


図10 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 対数解析のzスコアの順位
有効機関：386 機関、データクリーニング除外機関：2 機関、2 シグマ処理除外機関：1 機関

表1 サルモネラ属菌検査-性能評価 調査試料の生菌数測定結果および定性試験結果

保管日数	添加菌①	添加菌②	添加菌③
接種菌液	5.5×10^5	2.3×10^6	2.5×10^5
A：冷蔵試料			
0（添加直後）	4.1×10^3	3.1×10^4	7.0×10^3
10	3.9×10^3	3.9×10^4	5.8×10^3
13	2.0×10^3	1.9×10^4	5.7×10^3
28	2.2×10^3	5.2×10^3	4.2×10^3
B：常温試料			
13	1.6×10^6	3.9×10^8	2.2×10^8
28	9.6×10^6	3.9×10^7	4.6×10^7
定性試験判定 (0血清群別試験結果)	陰性 (該当なし)	陽性 (H ₂ S産生+) (04群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)

生菌数の単位：cfu/g

定性試験は冷蔵試料の保存 0、13、28 日目の試料について実施し、添加菌ごとに全て同じ結果となった。

表2 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ用調査試料の品質評価（均質性確認試験）
配付用調査試料の生菌数測定結果および定性試験結果

調査試料	添加菌① 生菌数	添加菌② 生菌数	添加菌③ 生菌数
接種菌液	3.4×10^5	6.8×10^5	1.3×10^5
Sample1	5.2×10^3	1.9×10^4	3.9×10^3
Sample2	4.0×10^3	2.0×10^4	4.1×10^3
Sample3	4.1×10^3	1.7×10^4	4.1×10^3
Sample4	3.0×10^3	1.9×10^4	4.6×10^3
Sample5	3.0×10^3	1.8×10^4	4.9×10^3
生菌数平均値（添加濃度）	3.9×10^3	1.9×10^4	4.3×10^3
定性試験判定 (0血清群別試験結果)	陰性 (該当なし)	陽性 (H ₂ S産生+) (04群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)
均質性確認試験の評価	均質である	均質である	均質である

生菌数の単位：cfu/g

定性試験は Sample1、5 について実施し、添加菌ごとに全て同じ結果となった。

各添加菌について、5 個の生菌数に大きな差が認められず、定性試験結果が性能評価と同様の結果を得られた場合に均質であると評価した。

表3 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ用調査試料の品質評価（安定性確認試験）
配付用調査試料の生菌数測定結果および定性試験結果

調査試料	添加菌① 生菌数	添加菌② 生菌数	添加菌③ 生菌数
Sample1	3.0×10^2	3.5×10^2	7.1×10^2
定性試験判定 (O血清群別試験結果)	陰性 (該当なし)	陽性 (H ₂ S産生+) (04群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)
安定性確認試験の評価	安定であった	安定であった	安定であった

生菌数の単位：cfu/g

生菌数が計測でき、各添加菌の定性試験結果が均質性確認試験と同様の結果となったことからパイロットスタディ実施期間中の調査試料は安定であったと評価した。

表4 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ結果

添加菌	正答	機関数		正答率
		正	誤	
添加菌①	サルモネラ属菌陰性	51	0	100%
添加菌②	サルモネラ属菌陽性	51	0	100%
添加菌③	サルモネラ属菌陽性	48	3	94.1%

表5 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ経過記録書の集計結果

経験年数	0-1年		2-4年		5-9年		10年以上		
	14		14		11		12		
試料採取量	1 g		10 g		25 g				
	0		0		51				
前増菌培地*	実施せず		L-システイン添加緩衝ペプトン水		緩衝ペプトン水				
	0		1		50				
増菌培地*	実施せず		デトラチオン酸塩培地		ラバポート培地		ラバポート・バシリアディス培地		セレナイトシスチン培地
	0		49		1		50		1
分離培地*	DHLA	MLCBA	XLDA	ES II A	BGA	CHS	SS寒天培地	X-SAL寒天培地	その他
	35	16	5	15	5	34	2	1	1
確認用培地*	実施せず		TSIA		LIMA		LIA培地 (リジン鉄寒天培地)		その他
	0		51		49		2		2
O血清群別試験	実施		実施せず						
	51		0						
生化学的性状試験*	実施せず	オキシダーゼ試験	クエン酸利用能試験	VP試験	ONPG試験	マロン酸利用能試験	その他		
	7	41	36	38	27	28	6		
簡易同定キット*	実施せず	API20E	IDテスト・EB-20	BBLクリスタルE/NF	rapid ID 32 E	RapiD 20 E	VITEK 2	その他	
	21	11	10	0	2	3	2	3	

※：複数回答あり

表6-1 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディアンケート結果

外部精度管理調査のサルモネラ属菌検査用調査試料として、H₂S産生菌/H₂S非産生菌/サルモネラ陰性菌の3種から2種を採用するときの組み合わせについて

回答	機関数（全体比）	
どの組み合わせでもよい	30	(58.8%)
陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい	14	(27.5%)
H ₂ S非産生菌は採用しないほしい	7	(13.7%)

表6-2 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディアンケート結果
サルモネラ属菌検査用調査試料についてのご意見、ご要望（抜粋）

非定型的サルモネラ属菌が疑われた場合においても、O抗原の血清学的試験を行うべきか。
クエン酸利用能試験で陰性を示すサルモネラ属菌も存在するようである。一方で、「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について（平成27年7月29日食安発0729第4号）」の注解には「サルモネラ属菌は…クエン酸利用能陽性、…である」との記述がある。非定型的サルモネラ属菌を疑ったもののクエン酸利用能が陰性であった場合、どのように判断すればよいか。また、クエン酸利用能以外の項目（オキシダーゼ試験・VP試験・ONPG試験）についても、陽性となった場合は、どのように判断すればよいか。
添加菌③の運動性が弱かった。
添加菌③のシモンズクエン酸ナトリウム培地での反応が弱かった。
日常検査でも陽性検体を扱う機会は少ないため、定型のサルモネラ属菌は毎回加えてほしい。
非定型菌の組み合わせは勉強になった。
H ₂ S非産生性 <i>Salmonella</i> 属菌検出を目的とした外部精度管理調査は今後とも（毎回でなくとも）実施すべきと考える。

表 7 一般細菌数検査-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	1.2×10^4	1.1×10^4
②	1.1×10^4	8.9×10^3
③	1.2×10^4	1.3×10^4
④	1.1×10^4	1.0×10^4
⑤	9.2×10^3	1.0×10^4
⑥	1.4×10^4	1.1×10^4
⑦	1.5×10^4	1.3×10^4
⑧	1.5×10^4	1.2×10^4
⑨	1.2×10^4	1.3×10^4
⑩	1.3×10^4	1.4×10^4

生菌数の単位：cfu/g

表 8 一般細菌数検査-品質評価（均質性確認試験 実数 分析値）

平均値	12000
標準偏差	1800
相対標準偏差	0.147%
一元分散分析 <i>F</i> 値	3.011
一元分散分析 <i>F</i> 値に対する有意確率（ <i>P</i> 値）	0.050

生菌数の単位：cfu/g

表 9 一般細菌数検査-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	1.2×10^4	4.08	1.1×10^4	4.04	0.0007
②	1.1×10^4	4.04	8.9×10^3	3.95	0.0042
③	1.2×10^4	4.08	1.3×10^4	4.11	0.0006
④	1.1×10^4	4.04	1.0×10^4	4.00	0.0009
⑤	9.2×10^3	3.96	1.0×10^4	4.00	0.0007
⑥	1.4×10^4	4.15	1.1×10^4	4.04	0.0055
⑦	1.5×10^4	4.18	1.3×10^4	4.11	0.0019
⑧	1.5×10^4	4.18	1.2×10^4	4.08	0.0047
⑨	1.2×10^4	4.08	1.3×10^4	4.11	0.0006
⑩	1.3×10^4	4.11	1.4×10^4	4.15	0.0005
標準不確かさ※ ¹		0.05	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 10 一般細菌数検査-品質評価（安定性確認試験 実数）

調査試料	生菌数
①	1.4×10^4
②	1.2×10^4
③	1.3×10^4
④	1.0×10^4
⑤	1.2×10^4
⑥	1.2×10^4
⑦	9.9×10^3
⑧	1.3×10^4
⑨	1.2×10^4
⑩	1.3×10^4

生菌数の単位：cfu/g

表 11 一般細菌数検査-品質評価（安定性確認試験 実数 分析値）

平均値	12090
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（12000cfu/g）の±20%（9600～14400 cfu/g）の範囲にある時に適合と判定した。

表 12 一般細菌数検査-外部精度管理調査（実数解析の結果）

回収機関数	389機関		
データ・クリーニングによる除外	3機関		
2シグマ処理による除外	1機関		
データ数（有効機関数）	385機関		
付与値（平均値）	11676.73 /g		
標準偏差	1805.31 /g		
相対標準偏差	15.46 %		
$\bar{X}$ 管理図による評価	$LCL : 3503.02 /g$ 、 $UCL : 35030.18 /g$		
	不満足	$\bar{x} < LCL$	1機関
	満足	$LCL \leq \bar{x} \leq UCL$	384機関
	不満足	$UCL < \bar{x}$	0機関
R 管理図による評価	$UCL : 3239.71 /g$		
	満足	$R \leq UCL$	376機関
	不満足	$UCL < R$	9機関
z -スコアによる評価	満足	$ z\text{-スコア} < 2$	367機関
	疑わしい	$2 \leq z\text{-スコア} < 3$	13機関
	不満足	$3 \leq z\text{-スコア} $	5機関

LCL ：下部管理限界線、 UCL ：上部管理限界線

表 13 一般細菌数検査-外部精度管理調査（対数解析の結果）

回収機関数			389機関
データ・クリーニングによる除外			2機関
2シグマ処理による除外			1機関
データ数（有効機関数）			386機関
付与値（平均値）			4.062477 log/g
標準偏差			0.102074 log/g
相対標準偏差			2.51 %
z-スコアによる評価	満足	$ z\text{-スコア} < 2$	379機関
	疑わしい	$2 \leq z\text{-スコア} < 3$	4機関
	不満足	$3 \leq z\text{-スコア} $	3機関

表 14 一般細菌数検査-外部精度管理調査（経過記録書の集計結果）

経験年数	0-1 年	2-4 年	5-9 年	10 年以上	
	104	117	90	78	
試料採取量	10 g	25 g	その他		
	35	347	7		
解凍方法	解凍せず	流水（水浴）	冷蔵庫	室温	その他
	170	65	89	53	12
解凍時間	30 分未満	30-60 分	61-120 分	121-240 分	241 分以上
	92	55	30	24	18
希釈液	生理食塩水	ペプトン加 生理食塩水	緩衝ペプトン水	リン酸 緩衝希釈水	その他
	25	16	3	339	6
均質化方法	ストマッカー	ブレンダー	その他		
	366	12	11		
均質化処理時間	30 秒	1 分	2 分	3 分	その他
	35	328	14	6	6
使用培地	標準寒天培地	普通寒天培地	SCD 寒天培地	その他	
	352	0	0	37	
使用培地タイプ	粉末培地	生培地	フィルム培地	その他	
	346	2	37	4	
培養温度	35℃	その他			
	369	20			
培養時間	24 時間程度	48 時間程度	その他		
	311	77	1		