

食品微生物検査における内部精度管理の試み ～一般細菌数～

國井敏¹⁾ 鈴木理恵 黒澤久美子 鈴木智子 熊田裕子²⁾ 須釜久美子
 県中支所 ¹⁾福島県立総合衛生学院 ²⁾試験検査課

要 旨

食品微生物検査における内部精度管理を，厚生省が示したガイドラインに沿って実施するため，保存菌株を用いて一般細菌数の内部精度管理用試料を作製し，その安定性について検討した．作製試料の凍結 1 ヶ月後から 9 ヶ月後までの一般細菌数測定結果は良好であり，内部精度管理用試料としての有用性を示した．

キーワード：食品微生物検査，内部精度管理，一般細菌数

はじめに

指定検査機関における精度管理は，平成 9 年に厚生省（現厚生労働省）から通知された「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」別添の「精度管理の一般ガイドライン」¹⁾（以下，“ガイドライン”とする）により，実施することとなっている．しかしそのガイドラインには，精度管理の一般的な基本的事項の記述しかなく，具体的な試料や方法については示されていない．

今回，食品微生物検査のうち，一般細菌数（以下，“細菌数”とする）の内部精度管理について検討したのでその結果を報告する．

材 料

1 使用菌株

Escherichia coli O86:H51（食品由来）

福島県衛生研究所病原体等安全管理規程に基づく保存菌株を用いた．

2 菌液の調製

郡山らの方法^{2) -4)}に基づき，ブレインハートインフュージョンブイオンを用い，35℃ 24 時間で 2 回継代培養し，更に普通寒天培地で 35℃ 6 時間培養した後に，滅菌生理食塩水で $1 \sim 3 \times 10^8$ cfu/mL の濃度にした．これを 30% グリセリン加ブレインハートイ

ンフュージョンブイオンで 1×10^7 cfu/mL に調製し，攪拌しながら凍結保存チューブに約 1mL ずつ分注し -80℃ で凍結保存した．この調製保存菌液を一般細菌数内部精度管理用標準菌液（以下，“標準菌液”とする）として検討に用いた．使用時は室温の水浴中におき，解凍後速やかに使用した．

3 模擬食材の作製

市販のマッシュポテト粉末に，規定量の温水を加えてマッシュポテトを作製した後，121℃ 15 分高圧蒸気滅菌し，25g ずつストマックバッグに入れ，ポリシーラーで密封して -80℃ で保存した．使用時には室温の水浴中におき，解凍後速やかに使用した．

方 法

細菌数の測定には，食品衛生法に定められた混積培養法による標準平板菌数測定法を用いた．滅菌リン酸緩衝生理食塩水を希釈液として使用し，10 倍段階希釈の 1mL をシャーレに採取して標準寒天培地にて混積培養した．培養条件は 35 ± 1 ℃， 48 ± 3 時間とした．

1 標準菌液の細菌数直接測定

標準菌液の調製後，凍結前の細菌数を求めるために 12 本の菌液保存チューブについ

て、4名で菌数測定を実施した。

模擬食材への標準菌液添加量は、菌液の直接菌数測定の結果から算定した。

2 模擬食材に添加しての細菌数測定

マッシュポテト 25g に対し目標値として 10,000cfu/g になる量の標準菌液を加え⁵⁾、通常の食品検体と同様に希釈液で 10 倍量とした後ストマッキングしたものを試料原液とし、希釈液による 10 倍段階希釈をして混積平板培養法を行った。

結果及び考察

1 標準菌液の直接菌数測定

1) 凍結前

保存チューブ毎の測定値は表 1 に示すように、チューブ間に大きな差はなく均一な試料と認められた。平均値は 1.7×10^6 cfu/mL であった。

2) 凍結後

凍結後の標準菌液の細菌数を直接測定した (表 2, 3)。

表 1 凍結前の標準菌液細菌数測定結果

実施者	tube No.	1 回	2 回	チューブの 平均値
A	1	1.6×10^6	1.6×10^6	1.6×10^6
	2	1.7×10^6	1.6×10^6	1.7×10^6
	3	1.7×10^6	1.7×10^6	1.7×10^6
B	4	1.6×10^6	1.6×10^6	1.6×10^6
	5	1.6×10^6	1.8×10^6	1.7×10^6
	6	1.6×10^6	1.8×10^6	1.7×10^6
C	7	1.6×10^6	1.7×10^6	1.7×10^6
	8	1.5×10^6	1.7×10^6	1.6×10^6
	9	1.3×10^6	1.5×10^6	1.4×10^6
D	10	2.0×10^6	2.2×10^6	2.1×10^6
	11	2.0×10^6	1.6×10^6	1.8×10^6
	12	1.9×10^6	2.1×10^6	2.0×10^6
全ての測定の平均値				1.7×10^6

単位：cfu/mL

凍結 1 ヶ月から 9 ヶ月までの期間で 5 回測定した。変動係数は 3 % 以下であり、 \bar{X} -R 管理図でも、管理限界値を外れることはなく、安定した測定結果が得られた (図 1, 2)。

表 2 凍結後の標準菌液直接細菌数測定結果

凍結後 経過時間	算定数 (cfu/mL)				平均値 (\bar{X})	最大値と最小値の 差 (R)
1 ヶ月後	1.9×10^6	2.1×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^5
	1.9×10^6	1.9×10^6	2.0×10^6	1.9×10^6		
5 ヶ月後	2.0×10^6	1.8×10^6	1.7×10^6	1.5×10^6	2.0×10^6	8.0×10^5
	2.1×10^6	2.3×10^6	2.0×10^6	1.9×10^6		
	2.0×10^6	2.0×10^6	1.9×10^6	2.2×10^6		
	2.2×10^6	2.2×10^6	1.9×10^6	1.8×10^6		
6 ヶ月後	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	1.8×10^6	2.1×10^6	8.0×10^5
	2.0×10^6	2.1×10^6	2.1×10^6	2.0×10^6		
	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	2.1×10^6		
	2.0×10^6	2.3×10^6	2.2×10^6	2.6×10^6		
8 ヶ月後	2.1×10^6	2.1×10^6	2.1×10^6	1.8×10^6	2.1×10^6	5.0×10^5
	2.3×10^6	2.1×10^6	2.0×10^6	1.8×10^6		
	2.1×10^6	2.0×10^6	2.2×10^6	2.1×10^6		
	2.2×10^6	2.2×10^6	2.2×10^6	2.3×10^6		
9 ヶ月後	2.2×10^6	2.0×10^6	1.9×10^6	1.9×10^6	2.1×10^6	4.0×10^5
	2.0×10^6	2.0×10^6	2.1×10^6	2.2×10^6		
	2.2×10^6	1.9×10^6	2.1×10^6	2.1×10^6		
	2.2×10^6	1.9×10^6	2.1×10^6	2.3×10^6		

表3 凍結後の標準菌液直接細菌数測定結果 (統計値)

データ数	5
測定値の平均値の平均値($\bar{\bar{X}}$)	2.1×10^6
測定値の平均値の最大値	2.1×10^6
測定値の平均値の最小値	2.0×10^6
測定値の平均値の標準偏差	4.9×10^4
変動係数	2.4 %

測定値単位：cfu/mL

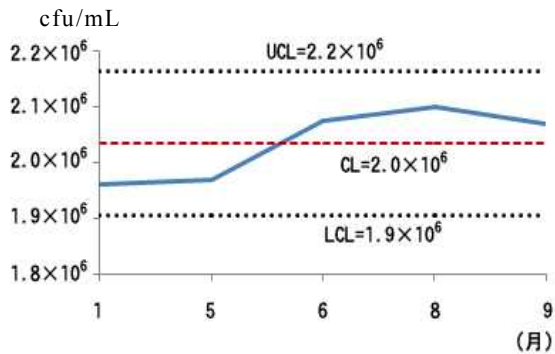


図1 凍結後の標準菌液直接細菌数測定値の \bar{X} 管理図

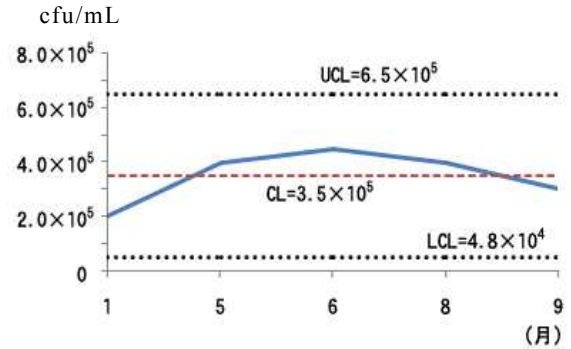


図2 凍結後の標準菌液直接細菌数測定値のR管理図

表5 模擬食材に添加した細菌数測定結果 (統計値)

データ数	6
測定値の平均値の平均値($\bar{\bar{X}}$)	1.0×10^4
測定値の平均値の最大値	1.0×10^4
測定値の平均値の最小値	1.0×10^4
測定値の平均値の標準偏差	0
変動係数	0 %

測定値単位：cfu/g

表4 模擬食材に添加した細菌数測定結果

凍結後 経過時間	算定数 (cfu/g)				平均値 (\bar{X})	最大値と最小値 の差 (R)
	1	2	3	4		
1ヶ月後	9.6×10^3	1.1×10^4	9.2×10^3	1.1×10^4	1.0×10^4	2.4×10^3
	1.1×10^4	1.1×10^4	9.5×10^3	8.6×10^3		
2ヶ月後	9.2×10^3	1.1×10^4	9.6×10^3	9.6×10^3	1.0×10^4	1.8×10^3
	9.6×10^3	9.6×10^3	1.1×10^4	1.1×10^4		
5ヶ月後	1.1×10^4	9.3×10^3	9.9×10^3	1.0×10^4	1.0×10^4	2.7×10^3
	9.4×10^3	9.5×10^3	1.1×10^4	9.4×10^3		
	9.7×10^3	9.3×10^3	1.1×10^4	1.0×10^4		
	9.5×10^3	1.1×10^4	1.2×10^4	1.0×10^4		
6ヶ月後	1.0×10^4	1.1×10^4	1.0×10^4	1.1×10^4	1.0×10^4	2.4×10^3
	1.0×10^4	9.6×10^3	1.1×10^4	1.0×10^4		
	1.2×10^4	1.0×10^4	1.1×10^4	9.8×10^3		
	1.1×10^4	9.8×10^3	1.1×10^4	9.9×10^3		
8ヶ月後	8.9×10^3	9.8×10^3	1.0×10^4	1.1×10^4	1.0×10^4	3.1×10^3
	9.8×10^3	1.0×10^4	1.0×10^4	1.1×10^4		
	1.1×10^4	1.1×10^4	1.1×10^4	1.1×10^4		
	9.4×10^3	9.3×10^3	1.1×10^4	1.2×10^4		
9ヶ月後	1.0×10^4	1.0×10^4	8.3×10^3	9.5×10^3	1.0×10^4	3.9×10^3
	9.4×10^3	1.2×10^4	9.5×10^3	1.1×10^4		
	1.0×10^4	1.0×10^4	9.9×10^3	1.0×10^4		
	8.1×10^3	1.1×10^4	1.0×10^4	1.1×10^4		

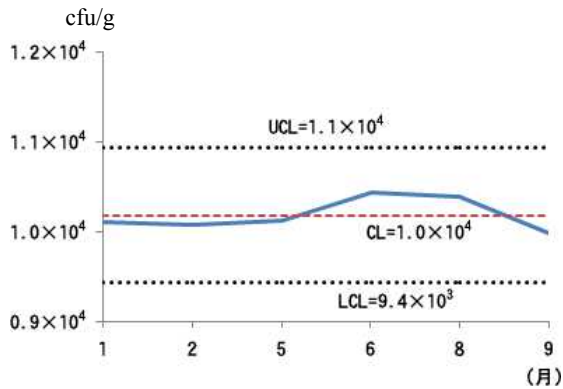


図3 模擬食材に添加した細菌数測定値の \bar{X} 管理図

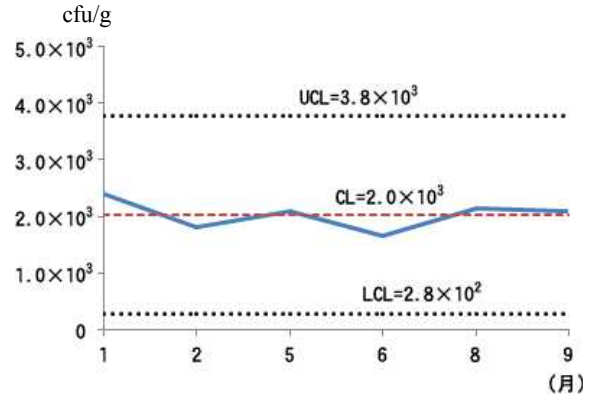


図4 模擬食材に添加した細菌数測定値の R管理図

2 模擬食材に添加した細菌数測定

標準菌液を 120 μ L 添加して調製試料とした。細菌数測定を 6 回実施した結果を表 4, 5 に示す。 \bar{X} -R 管理図では平均値, 範囲共に管理限界を外れることはなかった (図 3, 4)。

まとめ

自施設の保存菌株を用いて内部精度管理用の標準菌液を作製し検討した。

作製した標準菌液の直接菌数測定では, 凍結 1 ヶ月後から 9 ヶ月後までの実施で, 変動係数が 3 %以下であり, \bar{X} -R 管理図でも管理限界値内に収まっており, 内部精度管理のための試料としての安定性が認められた。

標準菌液を添加した模擬食材の細菌数測定でも, \bar{X} -R 管理図においては試験品が良好な管理状態にあることを示した。

また, ガイドラインでは, 精度管理に必要な目標値の設定として, 添加した既知の微生物の回収率を少なくとも 70 %から 120 %を目安として確保すること, と示している。測定数の平均値を基準とした場合, 今回のすべての測定数において回収率はガイドラインの目標を達成した。

今回実施した凍結後 9 ヶ月までの検討では, 食品検査における細菌数測定の内部精度管理手法として有用であると認められた。

引用文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課. 食品衛生施設等における検査等の業務の管理の実施について. 衛食第 117 号, 2009.
- 2) 郡山洋一郎, 寒河江春夫, 宮崎健, 他. 食品細菌検査の精度管理に供する細菌の保存に関する検討. 第 11 回食品微生物学会抄録 1990.
- 3) 郡山洋一郎, 青木真里子, 豊岡弥生, 他. 食品微生物学的検査における精度管理用試料の作製と精度管理の実施について. 日本食品微生物学会雑誌. 1998 : 125 - 128.
- 4) 郡山洋一郎, 青木真里子, 濱田有希江, 他. 凍結菌液を用いた食品微生物学的検査における内部精度管理について. 第 79 回食品衛生学会 2000.
- 5) 鈴木理恵子, 山本陽子, 永井 裕, 他. 日常精度管理試料の作製と精度管理の実施について. 神奈川県衛生研究所研究報告 2010 ; 40 : 17 - 20.