

短報

日常精度管理試料の作製と 精度管理の実施について

鈴木理恵子^{*}, 山本陽子, 永井 裕, 佐藤修二

Production of quality control samples and practice of quality control

Rieko SUZUKI, Youko YAMAMOTO,
Yutaka NAGAI and Shuji SATOH

はじめに

平成9年1月16日の食品衛生施行令等の改正に伴い「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」¹⁾により検査, 試験に関する管理基準が示され, 都道府県, 政令市等の設置する食品検査施設においても管理要領に従って検査を実施することになった。続いて示された平成9年4月1日付「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)「精度管理の一般ガイドライン」²⁾では, 精度管理の実施方法についての基本的事項が示され, 効果的な精度管理の実施を確保することとなっている。食品検査における信頼性確保のために, 日常の内部精度管理は重要であるが, 微生物学的検査においては, 精度管理用試料の材料や方法等の実施方法は確立されていない。

地域調査部厚木分室の内部精度管理は, 「通常検出される微生物を対象とした検査等」として一般細菌数を実施することが多いが, 市販枯草菌芽胞液を用いて行うため, 日常的な検査工程とは異なり, 検査工程の管理ではなく, 希釈操作の精度が主な評価対象となっている。そこで, 実際に使用する細菌数検査実施標準作業書に基づいた, 細菌数の日常内部精度管理を実施するため「精度管理の一般ガイドライン」に示された, 「添加量が明らかな試験品」を作製するための検討を

行った。

試験品の作製にあたっては, 基になる試験品は入手や作製が容易であること, 添加菌数のコントロールが可能なこと, 菌数の変動が少なく, 良好な回収率であること, 作製後数ヶ月間安定なこと, 検査における操作が煩雑にならないことに留意した。作製した試験品について実際の標準作業書に従った方法で内部精度管理を実施したので報告する。

検査材料と方法

1. 寒天基材の検討

試験品は, Agar (BD) および Agarose (TaKaRa) をリン酸緩衝水(以下, PB)で溶解した寒天基材を用いた。

試験品を作製するにあたり, Agar 濃度 1.0%, 0.7%, 0.5% および 0.2% の4段階, Agarose 濃度 0.4% および 0.2% の2段階の寒天基材 200g を各々作製し冷却後冷蔵保管した。その後, 寒天基材の外観, 秤量時の混和状態, 採取時の扱いやすさ, ストマッカー処理後の均一性, 希釈時の抵抗性について評価を行い, 以下の寒天基材濃度について菌を添加した試験品を作製した。

2. 試験品の作製

250ml ねじ口瓶に Agar0.7%(以下, A), Agar0.5%(以下, B), Agarose0.2%(以下, C)の各寒天基材を 200g 各々6本作製し, 121 15分高圧蒸気滅菌した。滅菌後, 寒天基材を恒温水槽(44.5 ± 0.2)で保持した後, 枯草菌芽胞液(栄研化学)(1.1×10^7 CFU/ml) 1ml を各々添加し, 均一となるように良く攪拌し, 冷却後冷蔵保管した。枯草菌芽胞液を添加した寒天基材(以下, 試験品 A, B, C)は, 洋生菓子の模擬食品と想定し, 細菌数の測定を実施した。

3. 精度管理の実施方法

細菌数の検査は, 平成21年度地域調査部微生物検査実施標準作業書のうち細菌数検査実施標準作業書(SOP 15-40-11100 および SOP 15-40-11132)に準拠し, 試験品 A, B, C について平成21年10月から平成22年3月まで毎月1回(計6回), 2名の検査員で各々の試験品について5重測定を実施した。

試験品 A, B, C 各1本を室温に戻し, 滅菌した薬さじで良くかき混ぜ, 25g を無菌的にストマッカー袋に量りとった。PB225ml を加えてストマッカーで30秒間細砕し, これを試料原液(10倍希釈液)とした。

試料原液 1ml を PB9ml に加えて混合し, 10倍段階希釈を行った。同様に3段階まで希釈し, 試料液は, 試料原液及び段階希釈液とし, 滅菌ピペットで各試料液 1ml を滅菌シャーレ2枚に採取した。

神奈川県衛生研究所 地域調査部
〒243-0004 厚木市水引2-3-1
suzuki.s3df@pref.kanagawa.jp
^{*} 現 微生物部

43 ~ 45 に保持した標準寒天培地を約 15ml ずつ滅菌シャーレに分注し、回転混和後室温に放置し冷却凝固させた。平板を倒置して 35 ± 1.0 で 24 ± 2 時間培養した。

試料原液及び各倍率希釈の集落数 30 ~ 300 のものを計測し、1 希釈倍数につき複数の平板を計数した場合、それらの算術平均を求め、その希釈倍数を乗じて試料中の細菌数とした。

結果および考察

寒天基材 6 種類を作製し、検体と想定した。外観、扱いやすさ等について実際に検査を行っている検査員複数で評価を行った。

評価項目は、冷蔵保管した寒天基材の状態および他の検査機関で実施する場合の輸送の適正度（外観）、秤量時の薬さじで細砕した場合の細かさ（混和）、薬さじで採取する時の扱いやすさ（採取）、希釈液を添加しストマッカー処理後の状態（均一性）、ストマッカー処理後のピペットによる希釈作業時の抵抗性（希釈）の 5 点について、各々の評価基準（表 1）を定め、「○」「△」「×」で評価した。総合評価は評価項目の中で「×」がある場合は「×」とし、「○」「△」が混在する場合にはその数の多い方を総合評価とした（表 2）。

表 1 寒天基材の評価基準

表記	外観	混和	採取	均一性	希釈
○	輸送適 表面に水分がなく 形状が保持される	5mm程度に 細砕される	容易	均一な状態	容易
△	—	1cm程度に 砕ける	若干 難あり	小さな固形物は あるが均一な状態	若干 抵抗あり
×	輸送不適 表面に水分があり 形状が保持できない	砕くことが できない	困難	固形物があり 不均一（沈殿あり）	抵抗あり

表 2 寒天基材の評価

寒天基材	濃度	外観	混和	採取	均一性	希釈	総合評価
Agar	1.0%	○	×	△	×	×	×
	0.7%	○	△	○	△	△	△
	0.5%	○	○	○	○	△	○
	0.2%	×	○	×	○	○	×
Agarose	0.4%	○	×	×	×	×	×
	0.2%	○	○	○	△	○	○

寒天基材の外観は、Agar0.2%で冷蔵保管後の寒天表面に水分が確認され、ねじ口瓶を軽く振ると寒天基材が崩れ形状を保持することができなかつた。寒天基材を輸送後、他の施設で精度管理を実施することを考慮し、輸送不適と判定した。その他の 5 種類の寒天基

材は、いずれも寒天基材の形状が保持できたことから輸送可能と判定した。

薬さじで混和すると Agarose0.4%は弾力が強く、薬さじでは混和不能、Agar1.0%は弾力が強く、大きな固まりとなり細砕ができなかつた。Agar0.7%は弾力が強いものの 1cm 程度に砕くことは可能であつた。Agar0.5%、0.2%および Agarose0.2%は薬さじで容易に 5mm 程度に細砕され試験品を均一化とすることが可能であつた。

寒天基材の採取は、Agar1.0%および Agarose0.4%は細砕できないため秤量が困難、Agar0.2%は水分が多く薬さじで採取しにくいなどの問題があつた。

希釈液を加えストマッカー処理した後は、Agar1.0%および Agarose0.4%では固形物が沈殿して不均一な状態、Agar0.7%および Agarose0.2%では、小さな固形物はあるが均一な状態、Agar0.5%、0.2%では固形物が見られない均一な状態であつた。

ピペットによる希釈では、Agar1.0%および Agarose0.4%で抵抗があり希釈に注意が必要で、Agar0.7%および 0.5%でやや抵抗があるが希釈可能、Agar0.2%および Agarose0.2%で抵抗がなく希釈可能であつた。

今回、6 種類の寒天基材を 5 項目で評価した結果、総合評価で「○」または「△」であつた Agar0.7%、0.5%および Agarose0.2%の 3 種類の寒天基材が輸送、検査過程の採材、ストマッカー処理等の工程において適当であると思われ、これらについて試験品の作製を行った。

一般細菌数など通常検出する微生物を添加し試験品を作製する場合、食品中に基準値程度と基準値の 1/5 程度に調整した 2 種類の菌量について試験を行うこと²⁾とされている。しかし、通常業務と並行し、日常精度管理として 2 種の試験品について 5 重測定を実施することは容易ではない。今回は、2 種類の濃度のうち細菌数基準値の 1/5 程度の濃度の 1 種類を選択し、試験品の作成を行った。「洋生菓子の衛生規範について」³⁾をはじめとして細菌数基準値の多くが、製品 1g につき 10 万個と設定されていることから、試験品の濃度は、基準値の 1/5 程度である 10⁴CFU/g とした。実際には、寒天基材 200g に対し市販枯草菌芽胞液を 1ml 添加し、試験品 A、B、C の細菌数が 5.5 × 10⁴CFU/g となるように作成した。

試験品 A、B、C を 2 人の検査員で 5 重測定を 6 回（6 ヶ月間）実施した結果 細菌数の平均値はそれぞれ、3.1 × 10⁴CFU/g、5.1 × 10⁴CFU/g、3.2 × 10⁴CFU/g で回収率は 56.4%、92.7%、58.2%であつた（表 3）。

表3 各試験品に対する枯草菌芽胞液の回収率

試験品	添加量 (CFU/g)	細菌数 (CFU/g)	回収率 (%)
A (Agar0.7%)	5.5×10^4	3.1×10^4	56.4
B (Agar0.5%)	5.5×10^4	5.1×10^4	92.7
C (Agarose0.2%)	5.5×10^4	3.2×10^4	58.2

表4 細菌数の精度管理成績

試験品	測定月	測定数	菌数平均値 ($\times 10^3$ CFU/g)	標準偏差 (SD)
A (Agar0.7%)	10月	10	29.70	2.79
	11月	10	35.60	3.24
	12月	10	29.00	3.97
	1月	10	35.50	2.84
	2月	10	27.60	2.72
	3月	10	31.10	3.28
	平均	60	31.42	4.35
B (Agar0.5%)	10月	10	56.60	6.59
	11月	10	47.10	5.02
	12月	10	47.50	6.55
	1月	10	52.30	3.37
	2月	10	50.40	4.84
	3月	10	53.20	2.90
	平均	60	51.18	5.80
C (Agarose0.2%)	10月	10	28.60	3.20
	11月	10	35.80	3.55
	12月	10	32.60	2.55
	1月	10	27.30	3.13
	2月	10	40.90	3.00
	3月	10	25.00	1.94
	平均	60	31.70	5.87

細菌数データの集計は、1,000 で除した数値を用いて標準偏差を算出し(表4)、統計ソフトウェア SPSS Ver.11.5 を用いて xbar- R 管理図を作製した(図1)。

xbar- R 管理図は、平成 21 年度食品衛生外部精度管理調査結果報告書⁴⁾においても、一般細菌数測定検査の評価に用いられている。今回は 1 回毎の日常精度管理を一つの群と見なし、この群内変動(測定値のばらつき)と 6 回の日常精度管理における群間変動(平均値のばらつき)とを比較するために xbar- R 管理図を用いた。

測定値のばらつきを xbar 管理図(図1:上段)で

見ると、 $\pm 2SD$ 値は試験品 A, B, C それぞれ 8.71, 11.60, 11.73 で、いずれの試験品も 6 回の測定値は $\pm 2SD$ 範囲内の変動であった。細菌数は、6 ヶ月間の冷蔵保存においても大きな変動はなく、中でも試験品 A の $\pm 2SD$ 値が最も低く安定していた。

平均値のばらつきを R 管理図(図1:下段)で見ると、試験品 A, B, C はいずれも管理限界線(UCL, LCL)内の標準的なばらつきの範囲内にあり、その点の散らばり方に偏りは見られなかった。管理限界線幅は試験品 C が最も小さかった。

試験品の作製については、大島ら⁵⁾がろ紙に枯草菌芽胞液をしみこませたバイオロジカルインジケータ、自然汚染食品または寒天基材を用いた一般細菌数測定試験品の作製を試みている。ろ紙では、輸送が簡単で安定性、均一性であることなど利点も多いが、実際の検査手順と異なること等の問題点があり、自然汚染食品では実際の食材ではあるが、試料中に種々の微生物が混入しているなど、菌数コントロールの難しさ等の問題点があった。寒天基材を用いた試験品では、安定した成績が得られ、添加菌数のコントロールが容易であることから、平成 13 年以降の食品衛生外部精度管理調査にも用いられている。

今回の試験品は、素原料が入手しやすく、作製は容易であり、滅菌処理により他の微生物の除去が可能であること、表1に示した各評価項目が「」または「」であることを条件に作製を行った。素材の寒天基材 Agar および Agarose はともに実験室内に常備されており、素原料が入手しやすく、作製は容易で他の微生物を除去できる。表1に示した作業工程の条件を満たす、Agar0.7%、0.5%および Agarose0.2%では、添加菌として枯草菌芽胞液を用いることで、菌数コントロールが可能であり、菌数変動も少ない安定した試験品を作製できた。

「精度管理の一般ガイドライン」に示された精度管理に必要な目標値の設定(1)回収率等の確認の中に、試験品中の濃度と検査結果の差を最小限とするため、添加した既知の微生物の回収率を少なくとも 70% ~ 120% を目安として確保することと記載されている。試験品 A, B, C を用いて日常精度管理を実施した場合の回収率は 56.4% ~ 92.7% であった。同じ素材の試験品(Agar)であっても濃度の違いにより回収率に差が認められ、3種類の試験品の中でガイドラインに示された回収率が確保されたのは試験品 B のみであった。良好な回収率である試験品 B を模擬食品として日常精度管理を実施することにより、日常精度管理の目標値を確保することが可能であると思われた。

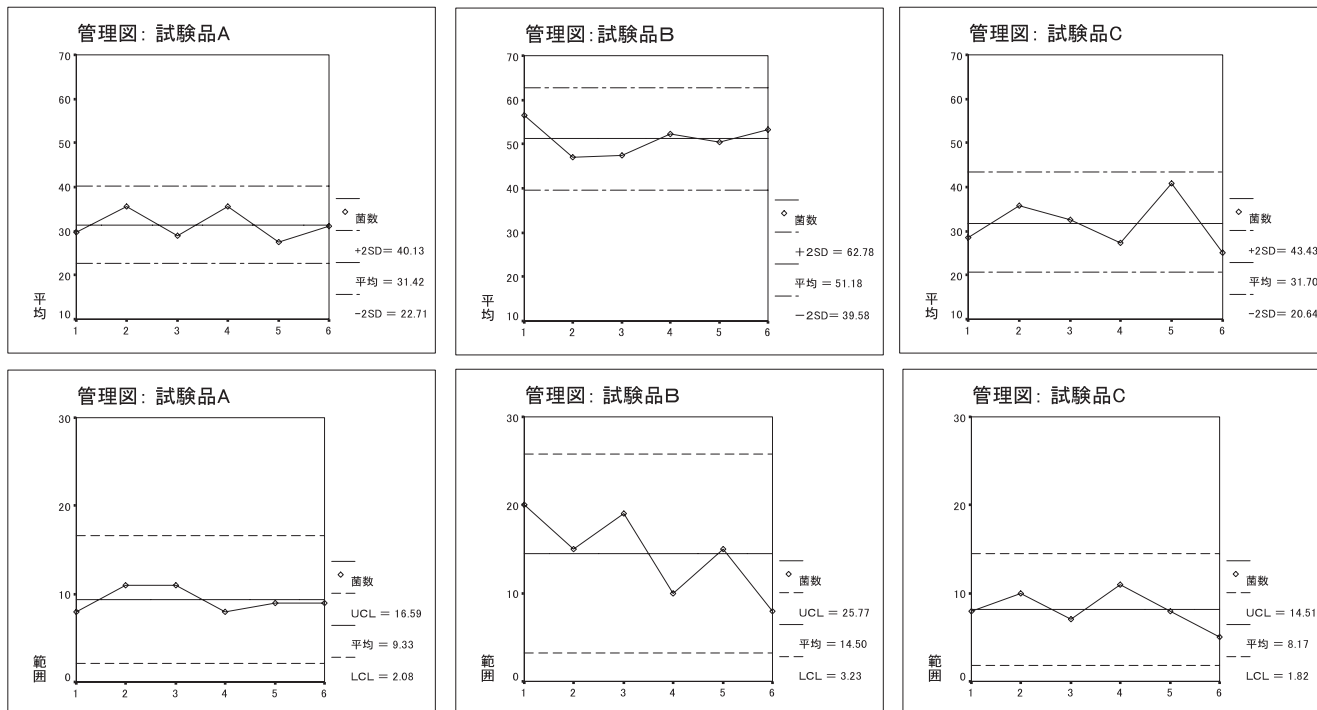


図1 試験品 xbar-R 管理図 (上段: xbar 管理図 下段: R 管理図)

今回の検討で、寒天基材による試験品は、実際の食品と生菌の分布や性状の点で異なるが、実際に使用している細菌数検査実施標準作業書に基づき、一連の検査手順に従って実施でき、添加菌量のコントロールが容易である。また、均一性、安定性に優れ、6ヶ月間の保存でも同様な結果が得られることが明らかとなった。今後は、さらに寒天基材濃度および添加菌量を変化させ、均一性および安定性に優れた試験品の検討を行っていきたい。

本検討にあたり、データ解析にご協力いただきました地域調査部茅ヶ崎分室の寺西大氏に深謝いたします。

(平成22年8月20日受理)

文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領，平成9年1月16日衛食第8号，(1997)
- 2) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：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，平成9年4月1日衛食第117号，(1997)
- 3) 厚生省環境衛生局食品衛生課長通知：洋生菓子の衛生規範について，昭和58年3月31日環食第54号，(1983)
- 4) 財団法人食品薬品安全センター：平成21年度食品衛生外部精度管理調査結果報告書 - 総括報告書 - ，(2010)

- 5) 大島赴夫, 鈴木達也, 山田健一, 高野恵美, 山本奈々美, 中阪聡亮他：一般細菌数検査に関わる調査試料と調査成績，食品衛生研究，54，7-14，(2004)