

食品微生物学的検査における内部精度管理（定性法）の検討

森村実加・足立有彩・田中慶哉・佐伯美由紀・田邊純子

Examination of Internal Quality Control Method (Qualitative Method) on Food Microbiological Test

Mika MORIMURA・Arisa ADACHI・Keiya TANAKA・Miyuki SAEKI and Sumiko TANABE

食品の安全性に関わる食品微生物検査の信頼性を確保するため、黄色ブドウ球菌による検査前処理を含む内部精度管理（定性法）を確立した。内部精度管理試料の基材として「水ようかん」を選定し、材料の混合比を検討した。作製した基材に菌を添加し、均質性の確認、保存期間および保存温度による回収率変化を確認した。添加菌量については、LOD₅₀を用いて検出下限値を算出した。作製した内部精度管理試料の妥当性評価を行ったところ、すべて適合した。本検討により、適切な「菌種」と「基材」を選択することで、施設の状況に合わせた精度管理の実施が可能となった。

緒言

食品微生物学的検査は、食品の安全性を確保するために重要な役割を果たしている。食の安全管理に対する消費者、生産者、行政の意識が高まってきたことで、食を取り巻く環境が変化しつつある。生産者である食品事業者には、令和3年6月から、コーデックス委員会が推奨している HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) に沿った衛生管理が義務化されている。HACCP は、従来の最終製品の抜き取り検査だけでなく、重要な工程を連続して管理する手法であり、危害微生物のリスク管理に有用である。一方、行政では、食の安全性を確保するため、製造施設や販売施設から食品を収去（抜き取り）し、微生物等の検査を実施している。この検査を担当する食品衛生検査施設は、検査結果の高い精度と信頼性を確保する必要がある。食品衛生検査を実施する地方衛生研究所においても、検査に従事する者の技能水準を確保し、食品微生物学的検査の精度を保つために精度管理を適切に行うことは重要である。

奈良県では、食品の試験検査の信頼性確保のため、「奈良県食品関係試験検査業務管理要綱」に従い、各種点検や精度管理を実施している。当センターの内部精度管理については、奈良県の「精度管理実施要領」に従って行うこととされ、具体的方法について「精度管理実施マニュアル」が定められている。これに則り、「菌数計測を目的とする検査等」（定量法）は市販の生菌数測定内部精度管理用枯草菌芽胞液を用い、一般細菌数の添加回収試験を実施しているが、定性法は実施出来ていない状況である。

そこで、前処理を含む全工程の検査を自施設で評価できる内部精度管理方法（定性法）を確立することを目的とし、検討を行ったので報告する。

方法

1. 基材の作製

内部精度管理方法（定性法）を構築するため、自施設で作製可能な精度管理試料について比較検討を行った。内部精度管理試料の要件として、①自施設で簡単に作製できる、②微生物の分布が均一、③一定期間の保存が可能、④食品検体とマトリクスが類似、⑤菌数の調整が可能であることとした。さらに、奈良県が食品衛生法に基づく収去検査を行っている食品分類のうち、黄色ブドウ球菌を項目とし、収去頻度が高い食品を対象とした中で、要件を満たしていると考えた和菓子の生菓子である水ようかんを用いた。

マトリクスを類似させるため、一般的な水ようかんの材料（水1：さらしあん7、砂糖（12%）、凝固剤として Bacto™ Agar (BD)）に加え、安定剤としてグリセリンを用いて作製した。基材の作製にあたっては、砂糖添加の有無、アガー濃度、グリセリン濃度について検討した。作製方法は、さらしあん、砂糖、Bacto™ Agar を混合後、水、グリセリンを加えた。これを20分間沸騰水浴中で加熱後、45℃の恒温水槽で基材の温度を一定にし、滅菌した仕切り容器に流し入れ、凝固させた基材を個包装して作製した。

基材に菌を添加した際の混ざりやすさ（混和）、凍結前後の潰しやすさ（堅さ）、および凍結融解後の形状安定性（解凍後離水量）を指標に評価を行った。基材の評価基準は表 1 に示す。また、凍結融解後の形状安定性を確認するため、-20℃および-80℃の冷凍庫で 1 日凍結後、5℃の冷蔵庫および室温で解凍したときの離水量を重量測定した。

表 1 基材の評価基準

表記	混和	堅さ
適	液体状でスムーズに混ざる	菓さじで潰したときペースト状になる
不適	泥状でスムーズに混ざらない	(柔) 菓さじで潰したとき液状になり分離する (堅) 菓さじで潰したとき塊状になる

2. 均一性の確認

供試菌株は BIOBALL Multishot 10E8 *Staphylococcus aureus* NCTC 10788（バイオメリュー・ジャパン株式会社）を継代培養した株を用いた。均質性確認用試料は、1. の手順で選定した基材（45℃保持）に菌液を添加し、 6.1×10^3 CFU/g に調整した試料をよく混合し、凝固させて作製した。

均質性の確認は、作製した均質性確認用試料から無作為に 12 個を抽出し、各試料から 4 部位を採取（計 48 カ所）して培養法にて菌数を測定した。測定結果の検定には EZR (ver.1.61) ¹⁾ を用い、Shapiro-Wilk 検定により正規分布であることを確認後、一元配置分散分析および Bartlett 検定を実施した。

3. LOD₅₀ の算出および添加菌量算定基準の設定

1) BIOBALL に含まれる菌数計測（培養法）

BIOBALL 1 粒を選択培地用再溶解液（バイオメリュー・ジャパン株式会社）（内容量 1.1 mL）にて溶解した菌液 100 μL を 9.9 mL の生理食塩水に接種した菌液を接種菌原液とした。この接種菌原液をさらに生理食塩水で 10³ 倍希釈した菌液 100 μL を、3%卵黄加マンニト食塩培地（日研生物）に 100 μL ずつ 3 枚に塗抹し、48 時間培養して菌数の計測を行った。

2) 菌接種試料（水ようかん）の LOD₅₀ 濃度の算出

3. 1) で測定した接種菌原液（ 8.5×10^5 CFU/mL）を 10 倍希釈した菌液をさらに生理食塩水で 2 倍段階希釈を繰返し、2, 4, 8, 16, 32 倍希釈したものを接種菌液とした。先に 1. の手順で作製した基材（45℃保持）99 g に、接種菌液を 1 mL ずつ接種してよく混合させた後に凝固させ、菌接種試料を作製した。試料 1 g 中に含まれた菌濃度に換算すると高い方から、425, 212.5, 106.25, 53.125, 26.5625 CFU/g となり、この

菌接種試料を用いて、標準作業書（SOP）に準拠して検査を実施した。滅菌ストマッカー袋に菌接種試料 10 g を採取し、ペプトン加生理食塩水 90 g を加えてストマッキングし、作製した 10 倍希釈液を 3%卵黄加マンニト食塩培地に 100 μL ずつ 2 枚に塗抹し、48 時間培養した。この一連の操作を検査員 4 人で 2 回ずつ菌数の測定を行った。

微生物定性試験法の性能評価指標として、ISO 16140-3:2021 ²⁾ では、実施試験の 50%が陽性となる菌量である LOD₅₀ (level of detection) を用いている。このことから、検出下限値の算出方法として Wilrich ³⁾ らの手法に準じた以下の LOD₅₀ の計算式を用いた。

$$\sum_{i=1}^5 \left(\frac{y_i d_i}{\exp(A_0 F d_i) - 1} - (n - y_i) d_i \right) = 0$$

$$LOD_{50} = -\frac{\ln 0.5}{A_0 F}$$

A₀ : 培地中への接種量

d : 試料中の菌濃度

F : 検出感度に影響を与える基材固有の値

n : 試験実施数

y : 陽性検査数

3) 添加菌量算定基準の設定

添加菌量については、「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」⁴⁾（以降「ガイドライン」）に基づき、検出下限値の 5 倍量を算定基準とした。

4. 保存期間の検証

1) 保存期間による回収率確認

一般に、凍結により菌量は低下することが知られていることから、選定した基材における凍結保存による菌量の低下傾向を確認した。

基材 249 g に、 3.7×10^6 CFU/mL に調整した菌液 1 mL を添加し、菌接種試料とした。菌添加直後（0 日目）および -20℃または -80℃で凍結保存後 1, 7, 14, 21, 28, 56, 91, 119 日目の試料について SOP に従い検査を実施し、保存条件による平均回収率の推移を確認し、回収率の減少による補正值を設定した。

2) 試料での検出菌量の再現性の確認

上記で設定した添加菌量の補正の確認および再現性の確認を目的に、4. 1) で算定した菌添加濃度 1256 CFU/g となるよう作製した菌接種試料について、菌添加直後（0 日目）および -20℃または -80℃で凍結保存後 1, 7, 14, 28, 56, 84, 91 日目の各試料を 6 回ずつ

標準作業書に従い検査を実施し、保存期間による検出菌量の推移と再現性について確認した。

5. 内部精度管理試料の評価

選定した菌接種試料（以下、内部精度管理試料）の妥当性確認のため、食品微生物検査担当者7名（当センター：4名，他施設：3名）により、作製後-20℃または-80℃で28日間保存した内部精度管理試料各1検体および、-80℃で28日間保存した陰性コントロール試料（菌未添加）1検体の計3検体についてそれぞれ標準作業書に従って検査を実施した。内部精度管理試料の菌添加濃度は、3.3)の算定基準に凍結による減少値を補正した値とした。判定基準は、内部精度管理試料は陽性、陰性コントロール試料は陰性と判定したものを適合とした。

結果

1. 基材の選定

評価結果を表2に示す。「混和」「堅さ」が評価基準に適合しており、「解凍後離水量」がいずれも0%である、砂糖未添加、アガー濃度1.75%、グリセリン濃度15%の材料比を選定した。

2. 均質性の確認

Shapiro-Wilk 検定 ($p=0.134$) により正規分布であること、一元配置分散分析 ($p=0.086$) および Bartlett 検定 ($p=0.446$) により十分に均質性が保持されていることを確認した。

3. LOD50 濃度および添加菌量算定基準の設定

菌接種試料における陽性検査数を表3に示す。この結果より、LOD50は157 CFU/gと算出した。また、上記の手法により算定した添加菌量における検出率（陽性率）を図1に示す。添加菌量については、LOD50の5倍量である785 CFU/gを算定基準とした。

表3 菌接種試料における陽性検査数

	試料中の菌量 (CFU/g)				
	425.0	212.5	106.3	53.1	26.6
検査員 A-1	+	+	-	-	-
検査員 A-2	+	+	-	-	-
検査員 B-1	+	+	-	-	+
検査員 B-2	-	-	+	-	-
検査員 C-1	+	-	+	-	+
検査員 C-2	+	+	-	-	-
検査員 D-1	+	-	+	-	-
検査員 D-2	+	+	-	-	-
陽性検査数/ 試験実施数	7/8	5/8	3/8	0/8	2/8

+ : 陽性 , - : 陰性

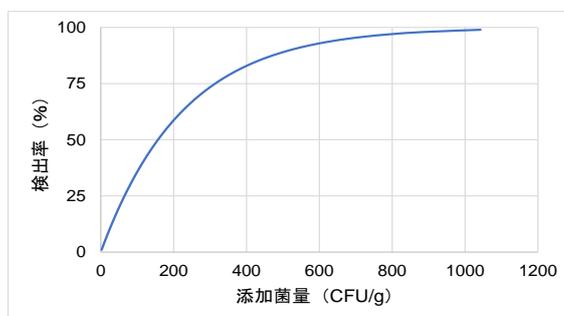


図1 添加菌量における検出率

表2 基材の評価結果

砂糖	アガー濃度 (w/w)%	グリセリン濃度 (w/w)%	混和	堅さ			解凍 (冷蔵) 後離水量 (%)		解凍 (常温) 後離水量 (%)	
				(凍結前)	(-20℃凍結後)	(-80℃凍結後)	-20℃	-80℃	-20℃	-80℃
未添加	1.5	5	適	不適 (柔)	不適 (柔)	不適 (柔)	7.3	6.4	4.4	4.8
		10	適	不適 (柔)	不適 (柔)	不適 (柔)	2.3	4.0	1.2	2.1
		15	適	適	適	適	0.3	0.9	0.1	0.4
		20	適	適	適	適	0.4	0.1	0.8	1.0
	1.75	5	適	不適 (柔)	不適 (柔)	不適 (柔)	2.9	3.0	0	0
		10	適	適	適	適	0.6	0.5	0	0
		15	適	適	適	適	0	0	0	0
		20	適	不適 (堅)	適	適	0	0	0	0
	2.0	5	適	適	適	適	1.2	2.3	0	0
		10	不適	適	適	適	0	0.5	0	0
		15	不適	不適 (堅)	適	適	0	0	0	0
		20	不適	不適 (堅)	適	適	0	0	0	0
添加	1.5	5	適	適	適	不適 (柔)	0.3	0.7	0.8	0.9
		10	適	適	適	適	0.4	0.3	0.6	1.2
		15	適	適	適	適	0.4	0.5	0.9	0.5
		20	適	不適 (堅)	適	適	0.5	0.5	0.7	0.6
	1.75	5	適	不適 (堅)	適	適	0	0	0.1	0
		10	適	不適 (堅)	適	適	0	0	0.5	0
		15	不適	不適 (堅)	適	適	0	0	0.4	0
		20	不適	不適 (堅)	適	適	0	0	0.4	0
	2.0	5	不適	不適 (堅)	適	適	0	0	0	0
		10	不適	不適 (堅)	適	適	0	0	0	0
		15	不適	不適 (堅)	適	適	0	0	0	0
		20	不適	不適 (堅)	適	適	0	0	0	0

4. 保存期間の検証

1) 保存期間による回収率確認

-20℃、-80℃保存のいずれの試料においても保存期間が長くなるほど回収率が低下する傾向が見られた(図2)。28日目までは保存温度による大きな差はなかったが、-80℃保存では28日目以降91日目まで回収率60%程度を維持していたのに対し、-20℃保存では56日目以降は30%を下回った。

この結果より、凍結保存に伴う菌量の低下を考慮し、添加菌量の補正を行った。-20℃保存より安定していた-80℃保存において、28日目以降91日目までの平均回収率が62%であったことから、減少分の補正を行った。すなわち、添加菌量については、算定基準とした785 CFU/gを1.6倍した1256 CFU/gとした。

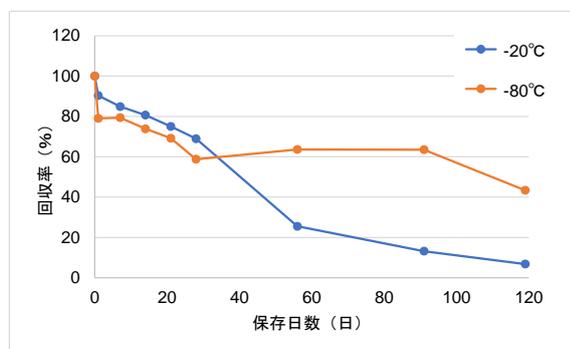
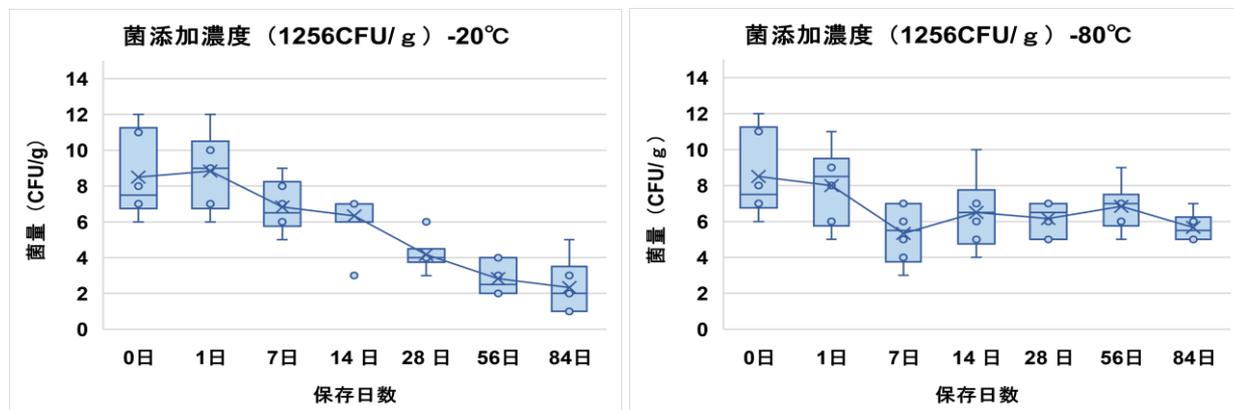


図2 保存条件別回収率推移

2) 試料での検出菌量の再現性の確認

補正菌添加濃度における保存期間による再現性を実施した結果、4. 1)と同じ推移を示し、かつ全ての試料で菌が検出されたことから、設定した添加菌量が適切であることを確認した(図3)。



*培地1枚あたり(試料0.01g中)の平均コロニー数

図3 保存条件における再現性比較

5. 内部精度管理試料の評価

いずれの試料においても適合率100%(7名/7名が適合)であった(表4)。培地1枚あたりの検出菌量は、-20℃保存試料は平均4.3 CFU、-80℃保存試料は平均3.6 CFUであった。

考察

本検討では、黄色ブドウ球菌を対象とし、検査前処理を含む全工程の検査を自施設で評価できる内部精度管理(定性法)を確立した。本検討結果から精度管理試料に用いた、水ようかんのLOD₅₀は157 CFU/gと算出し、培地1枚あたりに換算すると1.57 CFUであった。添加菌量は、ガイドラインに準じ5倍した785 CFU/gを算定基準と設定し、これに凍結保存による補正を行い最終添加菌量は1256 CFU/gとした。

現在、精度管理は厚生労働省通知のガイドライン⁴⁾で概要が示されており、微生物学的検査における精度管理の項では、「通常検出される微生物を対象とした検査等」および、「通常検出されない微生物を対象とした検査等」により、効果的な精度管理の実施が推奨されている。しかし、精度管理試料の材料や作製方法、添加菌量の算定方法(特に検出下限値算出方法)など具体的な方法が示されていないため実施が十分でない施設が多い。

本検討は、検出下限値としてLOD₅₀を用い、統計処理により算出したことで、ガイドラインに基づいた菌量での内部精度管理が実施可能となり、検出レベルについても、市販試料よりも低菌量の試料を用いることにより、高感度な評価が可能となった。今回、検出下限値としてLOD₅₀を用いた理由は、100%に近い検出率の菌量を試料に添加した場合、過剰な菌量を添加することとなり、十分な感度の確認ができないため

表4 内部精度管理試料の検査結果

県内施設	検査員	内部精度管理試料 (菌添加-20℃保存)				内部精度管理試料 (菌添加-80℃保存)				内部精度管理試料 (菌未添加)			
		コロニー数*			判定	コロニー数*			判定	コロニー数*			判定
		1枚目	2枚目	平均		1枚目	2枚目	平均		1枚目	2枚目	平均	
施設A	検査員①	6	1	4	陽性	0	4	2	陽性	0	0	0	陰性
	検査員②	5	2	4	陽性	3	2	3	陽性	0	0	0	陰性
	検査員③	6	3	5	陽性	5	3	4	陽性	0	0	0	陰性
施設B	検査員④	3	2	3	陽性	2	3	3	陽性	0	0	0	陰性
	検査員⑤	6	1	4	陽性	9	5	7	陽性	0	0	0	陰性
	検査員⑥	6	7	7	陽性	3	2	3	陽性	0	0	0	陰性
	検査員⑦	2	4	3	陽性	4	2	3	陽性	0	0	0	陰性

*培地1枚あたり(試料0.01g中)のコロニー数

である。また、LOD₅₀はISO 16140-3:2021²⁾においても性能評価指標として使用されているように、施設間の検出感度比較としても有用であると考えられる。施設の状況によっては、LOD₉₅等を用いた高菌量の試料を追加することにより、2濃度測定することも有意義であると考えられる。

内部精度管理試料の評価結果において、2施設7名で実施した結果、いずれの試料においても適合率100% (7名/7名が適合)であった。検出コロニー数は平均4CFUと少数であるにもかかわらず検出できていることから、検出下限値を考慮した十分な精度であると考え、作製した内部精度管理試料は適切であると判断した。

凍結保存による菌量の減少率が大きい点については、基材の選定時、基材の均一性・形状安定性を優先して試料を作製したため、糖などの菌が代謝する成分が不足していたことが原因となっている可能性があり、成分割合について追加検討の余地があると考え。

近年、食品流通の国際化や消費者の安全意識の高まりを受け、地方衛生研究所で実施する食品微生物検査においても今後は国際規格であるISO/IEC 17025:2017⁵⁾で品質管理が求められ、精度管理の実施についても義務づけられると想定される。本検討結果を活用することにより、適切な「菌種」と「基材」を選択することができ、施設の状況に合わせた精度管理の実施が可能となる。さらに、内部精度管理が未実施の施設への普及促進も期待され、食品衛生検査水準の維持・向上に寄与すると推察される。

謝 辞

本研究でご協力いただきました奈良県食品衛生検査所の皆様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kanda Y, : Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 48, 452-458 (2013)
- 2) International Organization for Standardization, ISO16140-3. Microbiology of the food chain- Method validation-Part3: Protocol for the verification of referencemethods and validated alternative methods in a singlelaboratory. ISO, Geneva, Switzerland (2021)
- 3) Wilrich. C, and Wilrich, P. T: Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative
- 4) 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
- 5) International Organization for Standardization, ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva, Switzerland (2017)

