

平成 14 年度 長崎県立食品衛生検査施設における 内部精度管理試験(微生物部門)

山崎 省吾・野口 英太郎・衛藤 毅¹⁾

Estimation of Nagasaki Prefectural data in Internal Quality Control Investigation, 2002 (The microorganism department)

Shogo YAMASAKI, Hidetaro NOGUCHI and Tsuyoshi ETOH

1)長崎県生活衛生課

Key word : internal quality control , standard plate count , the recovery test , *Salmonella*
キーワード:内部精度管理,生菌数(標準平板菌数測定法),添加回収試験,サルモネラ属菌

はじめに

平成 13 ~ 14 年度にわたり、長崎県生活衛生課は長崎県立の食品衛生検査施設を対象として食品衛生 GLP 検討委員会を開催した。食品衛生検査を実施する保健所、食肉衛生検査所および衛生公害研究所は、平成 9 年 1 月 16 日付け衛食第 8 号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について」により、各施設において業務管理要領や検査標準作業手順書 (SOP) 等の整備を行い運用してきた。実際の検査に適さなかったり、県立施設として業務管理の統一がされていないことが、当委員会において実効性のある GLP を目指し、県立食品衛生検査施設における業務管理の再度の見直しを行った¹⁾。

内部精度管理試験については、現在まで県立施設で統一した試験を実施しておらず、また当所においても厚生科学研究への参加という形態で対応してきた現状であった²⁾³⁾。この為、県立施設において統一した検査試料(リファレンス・マテリアル; RM)についての精度管理試験を平成 14 年度に試行として実施することとなった。

当委員会では内部精度管理試験を行うにあたり、RM の調整および検査結果の評価を行う指定職員(衛生公害研究所研究員)指定された¹⁾。平成 14 年度の検査項目として 生菌数測定 サルモネラ属菌の検出の 2 項目について試験を行い、その試験データの評価を行ったのでその概要を報告する。

試行試験対象検査施設

県立食品衛生検査施設の一部である、県立保健所 6 施設、食肉衛生検査所 1 施設および衛生公害研究所の 8 施設を対象とした。

RM の調整と試験実施方法

1 RM の調整

RM は、生菌数測定 サルモネラ属菌の検出ともにマッシュポテトを用いた。

(1)生菌数測定試験用 RM

市販粉末マッシュポテト(カルビー) 140 g を滅菌磷酸緩衝生理食塩水(PBS) 1 L で混和し、1 検体あたり保存容器 500 ml 容に 200 g 秤量し、高圧蒸気滅菌した。添加菌液は、市販菌数測定用菌液 *Bacillus subtilis* (商品名:枯草菌芽胞液, 栄研器材, $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ cfu/ml) を用い、本菌液を 10 倍希釈した後、試料 200 g に希釈菌液 1 ml を添加し、ホモジナイザーにて 8000 rpm, 5 分間混和した。

(2)サルモネラ属菌検出試験用 RM

前記(生菌数測定用 RM)と同様の方法で作製したマッシュポテト 50 g を保存容器 100 ml 容に 50 g 秤量し、高圧蒸気滅菌した。添加菌液は、*Salmonella* Enteritidis(食中毒事件分離株)をトリプチケースソイ・ブロス(BBL) 10 ml で一晩培養後、PBS で 1.83×10^9 cfu/ml に調整した菌液 1 ml をマッシュポテトに添加した検体を陽性検体(最終菌量: 1.83×10^4 cfu/g)とした。また、菌液無添加のものを陰

性検体とした。

2 生菌数測定用 RM の検証試験(添加回収試験と保存試験)

RM の検証として、菌数保存性の確認の為に保存試験を行った。

試料の保存温度は4℃(冷蔵庫内)とし、保存期間は、RM 作製時から18, 48, 72時間および8日間保存後のRM 各保存期間2検体ずつとした。

菌数の測定は、添加菌液の生菌数を定法である混釈法⁴⁾にて測定した値から理論値を求め(理論値: 測定値 cfu/ml × 10¹ × 1/200), RM2 検体を各5回計10回測定し、2検体分の平均値をRM の菌数(実測平均値)とした。回収率は、実測平均値/理論値 × 100 (%)から求め、保存期間に対する、回収率の変化を観察した。また、測定値に対するZ値、変動係数(C.V.)を求め、マッシュポテトへの菌液混和の状態を検証した。

3 検体の送付

生菌数測定試験用 RM ,サルモネラ属菌検出試験用RM共にゆうパックのチルド便にて検査施設に送付した。生菌数測定試験用 RM のみに温度記録計(クールメモリー:サンヨー)を梱包し、輸送温度を確認した。

4 試験実施方法

生菌数測定試験(図1),サルモネラ属菌検出試験(図2)共に各検査施設のSOPに従い実施するよう指示した。

生菌数測定試験⁴⁾は、検体25gについて測定し、測定回数を5回以上とした。

サルモネラ属菌検出試験は、試験品「加熱食肉製品のうち加熱殺菌した後容器包装に入れたもの」の試験法⁵⁾に従うように指示した。

5 評価

生菌数測定試験は、平成10年度食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者研修会資料⁶⁾を参考にし返送された試験成績から各検査施設におけるZ値、変動係数、理論値からの回収率を求め、各施設の検査精度を評価した。

サルモネラ属菌検出試験は、適正に検出されたか否かで評価した。

6 アンケート

各試験品についてアンケートを同封し、試験品の問題点や試験項目についての意見を聴取した。

試料秤量	25g
希釈液	225ml 試料原液 10 ¹ 倍希釈 (滅菌リン酸緩衝液もしくは滅菌生理食塩水)
試料の希釈	1ml
希釈液	9ml【×10 ² 、10 ³ 、10 ⁴ 、10 ⁵ 、10 ⁶ 】
各1ml	をシャーレへ分注(各2枚)
標準寒天	の分注 (15~20ml)
培地	混合後、固化後重層
固化後培養	フラン器 35 ± 1 24-48時間

図1 生菌数測定試験(標準平板菌数測定法)

試料	25g
EEM プイオン	225ml 35 ± 1.0 18 ± 2時間
培養液	1ml
培地	セレナイトブリリアントグリーン培地, セレナイトシスチン培地, ハーナのテトラチオン酸塩培地のいずれか 15ml 35.0 ± 1.0 , 20 ± 2時間
培地	MLCB 培地または DHL 培地に塗抹 35.0 ± 1.0 , 24 ± 2時間
判定	TSI, LIM, ONPG ディスクにて判定

図2 サルモネラ属菌検出試験

結果

1 生菌数測定用 RM の検証試験(添加回収試験と保存試験)

添加液の生菌数は 1.01 × 10⁷cfu/ml であり、RM 中の生菌数の理論値は 5.05 × 10³cfu/ml であった。

測定した4期間では漸次菌数(回収率)が 4.19 × 10³ ~ 2.56 × 10³cfu/g (回収率: 82.9%から50.7%)減少する傾向が認められた。各期間における測

定値の変動係数は 7.4 ~ 14.2 であった(表 1)。

2 検体の送付

RM の輸送温度は、概ね 0 ~ 10 に保持されていた。

3 試験実施方法

(1)生菌数測定試験

RM の添付資料として、検査法を参考資料としていたため、全 8 施設において図 1 に示した方法で実施されていた。

表 1 検証試験の結果

保存期間	18時間	48時間	72時間	8日間
平均値 ($\times 10^3$ cfu/g)	4.19	3.59	2.87	2.56
標準偏差 ($\times 10^3$ cfu/g)	0.55	0.27	0.30	0.36
各保存期間 実測値のZ値	0.30- 1.58	0.05- 1.94	0.06- 1.76	0.03- 1.54
変動係数	13.1	7.4	10.3	14.2
理論値からの 回収率(%)	82.9	71.0	56.8	50.7

2 検体 10 回測定値より

(2)サルモネラ属菌検出試験

試料の採取量は 7 施設で 25g, 1 施設 10 g 採取であり、前増菌培養液は全施設とも EEM ブイヨンを用い、7 施設で 225 ml, 1 施設で 90 ml に混和後、35 ~ 37, 18 ~ 20 時間で実施していた。

2 次選択増菌培地は、セレナイトシスチン培地 4 施

設、ハーナのテトラチオン酸塩培地 1 施設、セレナイトブリリアントグリーン培地 1 施設、ラパポート培地 2 施設であり、培養温度は全施設とも 35 ~ 37, 18 ~ 20 時間で実施していた。

分離培地は、DHL 寒天と MLCB 寒天培地を併用が 3 施設、DHL 寒天、SS 寒天、MLCB 寒天培地の 3 培地併用が 3 施設、SS 寒天と DHL 寒天培地併用が 1 施設、DHL 寒天とクロモアガーサルモネラ培地の併用が 1 施設で実施していた。

性状試験は、全施設とも TSI 培地、LIM 培地およびグラム染色を用い同定していたが、追加試験としての ONPG ディスク、VP 半流動培地、シモンズ・クエン酸培地、チトクロームオキシダーゼ試験、O 多価血清、同定キット(アピキット、バイオテストなど)等の使用状況は、検査施設により異なっていた。

4 評価

(1)生菌数測定試験

全検査施設とも適正に測定されており、Z 値は良好な成績であったが、変動係数が 10.0 以下の施設が 4 施設、10.0 ~ 20.0 が 3 施設、20.0 以上が 1 施設であった。また、検査開始が 1 週間遅れた施設は、他の検査施設と比較し菌数が低値であった(表 2)。

(2)サルモネラ属菌検出試験

1 施設のみ 2 検体とも陽性であったが、他の 7 施設は適正に検出し同定されていた。

表 2 8 施設の生菌数測定試験の評価

施設	A	B	C	D	E	F	G	H
検査開始日	12/11	12/10	12/11	12/11	12/11	12/17	12/12	12/11
平均値 $\times 10^3$ cfu/g	3.46	3.88	3.25	3.91	4.72	1.86	3.23	1.87
標準偏差 $\times 10^3$ cfu/g	0.54	0.30	0.35	1.06	0.03	0.33	0.33	0.04
各機関実測 値のZ値	0.11- 1.55	0.73- 1.25	0.28- 1.27	0.39- 1.73	0.49- 1.10	0.37- 1.46	0.36- 1.44	0.49- 1.29
変動係数	15.6	7.8	10.9	27.2	3.48	1.76	10.3	2.40
理論値からの 回収率(%)	68.5	76.8	64.4	77.4	93.5	36.9	64.0	37.1

* Z 値(Zscore) = $|$ 測定値 $|$ - $|$ 平均値 $|$ / $|$ 測定値の標準偏差 $|$

精度管理では以下のような判定区分が提案されている⁶⁾。

$|$ Z 値 $|$ 2.0 (合格), $2.0 < |$ Z 値 $|$ 3.0 (疑わしい), $|$ Z 値 $|$ 3.0 (不合格)

* 変動係数 (C.V.: coefficient of variation) = $|$ 測定値の標準偏差 $|$ / $|$ 測定値の平均値 $|$ \times 100
(標準偏差と平均値の比)

5 アンケート

生菌数測定試験用RMについては、菌数が低いという意見があったが、特に問題となる意見は無かった。サルモネラ属菌検出試験用RMについては、マッシュポテトが硬く、保存容器の口径が狭く、検体を採取しにくい。また、同定キットによる性状試験で一部異なる性状が存在したなどの意見があった。

考察

1 生菌数測定試験用RMの検証試験および試験実施8施設における回収率

本試行では、長崎県は、離島(しま)の保健所で生菌数測定試験の精度管理試験を行うにあたり、検体送付の時間的相違を考慮に入れる必要があった為、生菌数の経時的変化を観察することとした。

本試験方法では、経時的に生菌数(回収率)の減少が確認された施設Fは、離島保健所であり、且つ業務の都合上、試料作製日(平成14年12月10日)から試験実施日が7日経過していたこともあり、回収率が減少したと考えられたが、施設Gが適切に試験を開始していたが、回収率が低値を示した点は、不明であった。

本試験方法により精度管理試験を行う場合は、対象検査施設がRM受領後速やかに試験を行うことが適切に試験成績を提出する為に必要であることが示唆された。

2 検体の送付

送付温度は、低温でほぼ安定しており問題はないものと考えられた。

3 生菌数測定試験の評価

試験方法については全施設とも同様の方法で実施し、問題点は認められなかった。

全8施設とも測定値のZ値は2以下であり、検査は適性に実施されていると判断された。

しかしながら変動係数は、当所の成績では2検体10回測定値による変動係数が7.4~14.2であったため、対象施設の変動係数の目標値として15以下を設定していたが、大きく逸脱し20以上を示した施設が1施設あり、測定値のバラツキが考えられた。再現性のあるデータの確保の為、これまで以上の検査精度の向上が求められた。

4 サルモネラ属菌検出試験の評価

試験方法については、前増菌培地は全施設とも同一であったが、2次選択増菌培地、分離培地は施設により異なっており、県立施設での統一したSOPが

必要であることが考えられた。

検出結果では7施設とも適正に検出・同定を行っていたが、1施設2検体とも陽性であった点は、試料作製者におけるナンバリングのミスやコンタミネーション、検査実施者におけるコンタミネーションが原因として考えられるが、その原因は不明であった。

5 アンケート

生菌数測定試験用RMは、検体として問題がないと考えられたが、菌数の減少については今後検体を送付する際、考慮に入れる必要があるものと考えられた。

サルモネラ属菌検出試験用RMは、サルモネラの検出に関しては問題がないものと考えられたが、保存容器の変更、使用菌株については標準菌株(ATCC株など)の使用が必要であると考えられた。

6 総括

今回、一部の県立食品衛生検査施設で統一して内部精度管理試験を実施してきたが、初年度ということもあり、いくつかの改善点を見出すことができた。

精度管理の方法としては平成9年4月に厚生省から「精度管理の一般ガイドライン・微生物における精度管理」が示された⁷⁾。一方では、標準化された精度管理の方法が確立されていない現段階では、検査担当者に多くの負担を強いることなく、日常業務に支障なく実施できる方法で行うことが望ましい⁸⁾との考え方がある。

本試験の方法が適切な内部精度管理試験であるのかという点には疑問が残ったが、次年度からは、県立食品衛生検査施設の全施設を対象するので、平成14年度の試行結果を基とし改善し、実施していきたいと考えている。

謝辞

本試行は、宮崎県が実施している内部精度管理調査微生物部門の資料およびデータの大部分を参考としており、試行試験を行うに当たり、貴重なデータの閲覧や実施方法について御教授いただいた宮崎県衛生環境研究所の工藤食品衛生検査管理監、河野細菌課長、東研究員に厚く深謝いたします。

参考文献

1)県民生活環境部長、福祉保健部長通知:長崎県食品衛生検査施設における検査等の業務管理要綱及び長崎県食品衛生検査業務連絡協議会設置要領等の制定について、14生衛食第18号、14福保第

231号,平成15年3月20日(2003).

2)田栗利紹:平成11年度内部精度管理調査(微生物部門)における長崎県データの評価,長崎県衛生公害研究所報,45,111-114(1999).

3)田栗利紹他:平成12年度全国内部精度管理調査(微生物部門)における長崎県地研データの評価,長崎県衛生公害研究所報,46,115-117(2000).

4)厚生省生活衛生局監修;食品衛生検査指針微生物編,70-77(1990).

5)食品、添加物等の規格基準の一部改正、平成5年3月17日厚告第73号.

6)厚生省生活衛生局食品保健課:平成10年度食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者研修会(1999).

7)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,別添精度管理の一般ガイドライン,衛食第117号,(1997).

8)神保勝彦他:食品衛生検査施設における Good Laboratory Practice(GLP)とその現状 地方衛生研究所の立場から,防菌防黴,29(3),177-192(2001).