

食品の微生物学的検査における精度管理試料の検討

塚本展子 米田葵 野口貴美子 安里桂子 島田慎一 大塚佳代子 鈴木浩治

Examination of Quality Control Sample on Food Microbiological Test

Nobuko Tsukamoto, Aoi Yoneda, Kimiko Noguchi, Keiko Asato, Shinichi Shimada, Kayoko Otsuka, Koji Suzuki

はじめに

食品の微生物学的検査における信頼性確保のために、内部精度管理を適正に行うことは重要である。現在、「衛生研究所微生物検査精度管理実施要領」に基づき調製したチェックサンプルを使用しており、添加菌液調製に際しては、チェックサンプル作製の数日前から計画的に準備を進める必要がある。

そこで我々は、菌液を凍結保護溶媒に入れ冷凍保存し、使用時に解凍して使用することにより、チェックサンプル調製を効率的に行うことができると考えた。細菌の菌株保存方法について、食品衛生検査指針¹⁾では「10%スキムミルクに濃厚菌液を浮遊させ、超低温または液体窒素に保存する」と記載されているが、菌液の濃度については具体的に言及されていない。そのためチェックサンプル作製に適した保存菌液の調製及び保存方法について大腸菌 (*Escherichia coli*, 以下 *E. coli*) 及び黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, 以下 *S. aureus*) を用いて検討したのでその概要を報告する。

材料及び方法

1 材料

(1) 菌原液

マイクロバンク (イワキ) を用いて -30°C で冷凍保存した *E. coli* 標準菌株 (*E. coli* 1003) 及び *S. aureus* 標準菌株 (*S. aureus* ATCC6538) を、Tryptic Soy Broth (BD, 以下 TSB) 5ml に接種し、 35°C で 24 時間培養したものを菌原液とした。

(2) 希釈液

市販のリン酸緩衝液 (LSI メディエンス, 以下 PB) を添付文書に従い調製して用いた。

(3) 使用培地

EC 培地 (栄研化学) 及び標準寒天培地 (日水製薬) を使用方法に従い調製し用いた。EC 培地は、発酵管を入れた中試験管に 10ml ずつ分注し使用した (以下、EC 発酵管)。

(4) スキムミルク液

凍結保護溶媒として汎用されているスキムミルク (BD) を精製水を用いて 10%, 15% 及び 20% に調製し、高圧滅菌 (118°C , 20 分) して使用した。

(5) チェックサンプル作製用試料

レトルトパウチ食品「かゆ」を 25g ずつストマッカー袋

に分注後 -20°C で保管し、使用時に室温で解凍して使用した。

2 方法

各試験に使用した菌原液等の菌数の測定は、「食品、添加物等の規格基準」²⁾ (以下、規格基準) における、氷雪の細菌数測定法に準じて実施した。但し、検液は PB による 10 倍段階希釈系列とし、培養時間は 48 ± 3 時間とした (以下、混釈法)。*E. coli* のガス発生は、規格基準における加熱後摂取冷凍食品の *E. coli* 試験法 (推定試験) (以下、*E. coli* 試験法) に準じて、3 本の EC 発酵管に 1ml ずつ接種し、 $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養後に、ガス発生の有無を観察した。

E. coli について EC 発酵管でガス発生を認める菌量を把握するために試験 1 を実施し、スキムミルク液で保存する菌量を決定した。菌を添加した各濃度のスキムミルク液の性能評価を試験 2 で実施した。試験 1 及び 2 の結果から添加菌量と保存スキムミルク液濃度を選定して、チェックサンプル作製用試料を用いた再現性確認を試験 3 で実施した。

(1) 試験 1

E. coli 菌原液の 10^7 , 10^8 及び 10^9 倍希釈液について菌数測定及び *E. coli* 試験法を行い、ガス発生の有無を観察した。試験は 2 回実施した。

(2) 試験 2

試験 1 の結果を踏まえて *E. coli* については菌濃度 10^5cfu/ml 及び 10^6cfu/ml , *S. aureus* については、食肉製品等の試験法³⁾ で 1 平板 30~300 コ程度の集落を作る濃度である 10^5cfu/ml 及び 10^6cfu/ml となるように、上述した各濃度のスキムミルク液で希釈した。

各濃度スキムミルク液で *E. coli* は菌原液を 10^3 及び 5×10^3 倍希釈, *S. aureus* は菌原液を 10^3 及び 10^4 倍希釈し、1ml ずつ分注したものを菌添加直後 (0 日目測定用) を除き -80°C で冷凍保存した (以下、冷凍保存菌液)。

測定時に各冷凍保存菌液を 37°C の恒温水槽にて 10 分間解凍し、PB250ml を加えてストマッカーで攪拌し試料原液とした。測定は菌添加直後 (0 日目)、冷凍保存後 1, 7, 21, 56 及び 84 日目にそれぞれ 3 検体ずつ実施した。

E. coli は、各冷凍保存菌液について *E. coli* 試験法を実施し、同時に菌数を測定し平均値を求めた。

S. aureus は、試料原液 0.1ml について混釈法を、それぞれ 3 検体ずつ実施し、平均値を求めた。

(3) 試験 3

試験 2 の結果を踏まえて、10%スキムミルク液で *E. coli*

は菌原液を 10^3 倍希釈, *S. aureus* は菌原液を 10^4 倍希釈したものを 1ml ずつ分注後, -80°C で冷凍保存した. かゆ 25g 及び解凍した冷凍保存菌液に PB225ml を加えてストマッカーで攪拌後, 試料原液として試験 2 と同様に測定を実施した. 測定は菌添加直後(0 日目), 冷凍保存後 1, 7, 28, 56 及び 84 日目に行った. 試験は *E. coli* は 2 回, *S. aureus* は 1 回実施した.

結果

1 試験 1

2 回の試験ともに, 菌原液の菌数は, $1.6 \times 10^9 \text{cfu/ml}$ であった.

$1.6 \times 10^2 \text{cfu/ml}$ (10^7 倍希釈液)において, すべての EC 発酵管にガスの発生が確認できた. $1.6 \times 10 \text{cfu/ml}$ (10^8 倍希釈液)では, ガス発生が弱いものが散見され, 1.6cfu/ml (10^9 倍希釈液)ではガス発生のみられないものもあった(表 1). これらの結果から陽性対照として安定して使用するには, EC 発酵管に *E. coli* を $1.6 \times 10^2 \text{cfu/ml}$ 以上接種しなければならないと考え, *E. coli* 試験法における試料原液の調製方法を鑑みて, スkimミルクで保存する菌量を $4.0 \times 10^5 \text{cfu/ml}$ 以上とした.

表 1 EC 発酵管ガス発生状況

	1 回目	2 回目
$1.6 \times 10^2 \text{cfu/ml}$ (10^7 倍希釈液)	3/3*	3/3
$1.6 \times 10 \text{cfu/ml}$ (10^8 倍希釈液)	3/3(1)**	3/3(1)
1.6cfu/ml (10^9 倍希釈液)	2/3(1)	0/3

*: ガス発生を認めた本数/菌を接種した本数

** : ガス発生が弱い本数

2 試験 2

菌原液の菌数は, *E. coli* で $2.2 \times 10^9 \text{cfu/ml}$, *S. aureus* で $8.7 \times 10^8 \text{cfu/ml}$ であった.

E. coli: 菌濃度 $2.2 \times 10^6 \text{cfu/ml}$ (10^3 倍希釈)並びに $4.4 \times 10^5 \text{cfu/ml}$ (5×10^3 倍希釈)の各濃度の skim ミルク冷凍保存菌液において, 菌添加直後(0 日目)と冷凍保存後 1 日目の菌数に差はみられなかった. さらに, その後 84 日目まで菌数に著変はみられなかった(図 1).

また, 菌濃度 $2.2 \times 10^6 \text{cfu/ml}$ (10^3 倍希釈)の各濃度 skim ミルク冷凍保存菌液において, 菌添加直後(0 日目)から冷凍保存後 84 日目まで全試験期間で EC 発酵管にガス発生がみられた. 一方, 菌濃度 $4.4 \times 10^5 \text{cfu/ml}$ (5×10^3 倍希釈)の各濃度 skim ミルク冷凍保存菌液においては, 菌添加直後(0 日目)から EC 発酵管にガス発生が弱いものがみられた(表 2).

S. aureus: 菌濃度 $8.7 \times 10^5 \text{cfu/ml}$ (10^3 倍希釈)の各濃度 skim ミルク冷凍保存菌液における菌添加直後(0 日目)と冷凍保存後 1 日目の菌数に差はみられなかった. さらに, 冷凍保存後 84 日目まで菌数に著変はみられなかった. 菌濃度 $8.7 \times 10^4 \text{cfu/ml}$ (10^4 倍希釈)の各濃度 skim ミルク冷凍

保存菌液においても同様の傾向を示した(図 2).

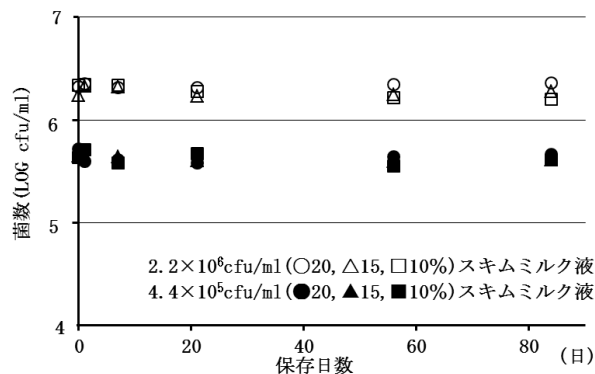


図 1 スkimミルク冷凍保存菌液の菌数変化(*E. coli*)

表 2 スkimミルク冷凍保存菌液の EC 発酵管ガス発生状況

冷凍保存菌液	$2.2 \times 10^6 \text{cfu/ml}$			$4.4 \times 10^5 \text{cfu/ml}$		
	skim ミルク濃度			skim ミルク濃度		
保存日数	20%	15%	10%	20%	15%	10%
0 日目	9/9*	9/9	9/9	9/9(1)**	9/9	9/9
1 日目	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
7 日目	9/9	9/9	9/9	9/9(1)	9/9(4)	9/9(3)
21 日目	9/9	9/9(3)	9/9(1)	9/9(6)	9/9(9)	8/9(4)
56 日目	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9(1)	9/9
84 日目	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9(1)

*: ガス発生を認めた本数/菌を接種した本数

** : ガス発生が弱い本数

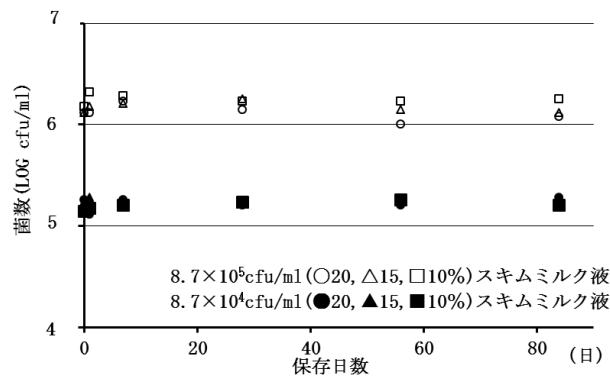


図 2 スkimミルク冷凍保存菌液の菌数変化(*S. aureus*)

3 試験 3

菌原液の菌数は, *E. coli* で 1 回目 $5.0 \times 10^9 \text{cfu/ml}$, 2 回目 $1.5 \times 10^9 \text{cfu/ml}$, *S. aureus* で $9.1 \times 10^8 \text{cfu/ml}$ であった.

E. coli: 1 回目の菌濃度 $5.0 \times 10^6 \text{cfu/ml}$ 冷凍保存菌液と 2 回目の菌濃度 $1.5 \times 10^6 \text{cfu/ml}$ 冷凍保存菌液において, 菌添加直後(0 日目)から 84 日目までに菌数に著変はみられなかった. (図 3). また, 2 回の試験の全試験期間において EC 発酵管にガス発生がみられた.

S. aureus: 菌濃度 $9.1 \times 10^4 \text{cfu/ml}$ の冷凍保存菌液で菌添加直後(0 日目)から 84 日目までに菌数に著変はみられなかった(図 3).

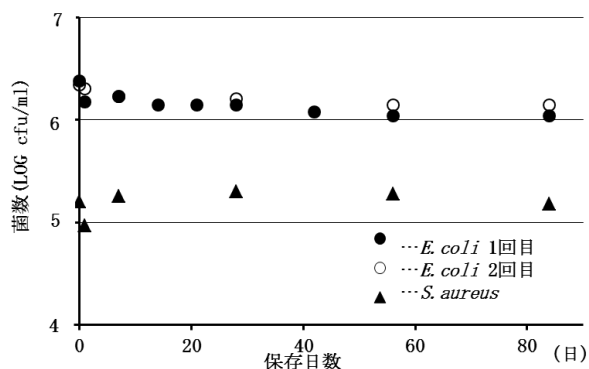


図3 10%スキムミルク冷凍保存菌液の菌数変化

考察

内部精度管理を適正に行うためには、微生物学的に安定な精度管理用チェックサンプルを調製することが必要であり、さらに調製工程が効率的であることが望まれる。

今回我々は、チェックサンプル調製に適した保存菌液の濃度及びスキムミルク液濃度を試験2で検討したところ、いずれの濃度のスキムミルク液においても、*E. coli*について 10^5 cfu/ml及び 10^6 cfu/ml、*S. aureus*について 10^4 cfu/ml及び 10^5 cfu/mlの菌液が84日間、冷凍保存に対して安定であることを確認した。また、濃度の高いスキムミルク液ほど粘稠性が高く、ピペット内壁に残存し数回の共洗いが必要であったことから作業性を勘案すると、冷凍保護溶媒として用いるスキムミルク液の濃度は10%が適していると思われた。

*E. coli*で 10^6 cfu/ml又は*S. aureus*で 10^5 cfu/mlの10%スキムミルクにおける約3か月間の保存安定性について試験2及び3より*E. coli*で3回、*S. aureus*で2回試験を実施し、再現性を確認した。この結果より、現在、収去食品の細菌検査の都度行っている内部精度管理用添加菌液の調製を四半期に一度にすることができると考える。

試験2と試験3の10%スキムミルク冷凍保存菌液の結果を比較したところ、菌数に著変がみられなかったことから、今回用いたチェックサンプル作製用試料の「かゆ」は菌数に影響を与えないと考えられた。国が示した「食品衛生検査施設における検査等の業務の実施について」(別添)「精度管理の一般ガイドライン」⁴⁾(以下、ガイドライン)によると「同一の検査実施手順の試験品が多種の食品等にわたっている場合には、代表的な食品等を使用して精度管理を行うこと」とあることから、これに準拠した検査を行うには、「かゆ」をチェックサンプル作製用試料として使用できると考える。

さらにガイドラインには、精度管理のための既知の微生物を含む試験品として「陰性基準のものにあつては、検出下限値の5倍程度の濃度となるよう検査対象微生物を添加・調製した試験品」を用いる旨の記載がある。今後ガイドラインに準拠したチェックサンプル作製のためには、

10%スキムミルク液による菌液の保存性をさらに少ない菌量で検討する必要があると思われる。

文献

- 1) 食品衛生検査指針 微生物編: 社団法人 日本食品衛生協会, 58(2004)
- 2) 食品, 添加物等の規格基準: 昭和34年12月28日厚生省告示第370号 (1959)
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 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(2015)
- 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(1997)