農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

生産工程プロジェクトにおける微生物技能試験への2008年度参加結果

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2019-12-20
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 内藤, 成弘
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002856

技術報告

生産工程プロジェクトにおける微生物技能試験への2008年度参加結果

内藤　成弘[§]

Results of research project members participating in a proficiency testing program for food microbiology in 2008

Shigehiro Naito[§]

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642 Japan

Abstract

Forty eight members of the Research Project Ensuring Food Safety from Farm to Table supported by a grant-in-aid from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan participated in a proficiency testing program in food microbiology for viable cell counts (total counts for *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Enterococcus faecalis*) and all reported values were judged as acceptable because absolute values of z scores were less or equal 2. Forty two of the 48 members also measured coliform group (total counts for *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogeneses*) and 39 reported values were acceptable. Out of the 48 members 26 and 23 members reported the counts for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively, all of which counts were acceptable.

Keywords: 微生物技能試験，一般生菌数，大腸菌群の菌数，大腸菌数，黄色ブドウ球菌数

緒　言

技能試験[1,2]への参加は，試験所認定（ISO/IEC 17025[3]，試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項[4]）や食品衛生法上の検査機関登録の必須条件[5]であり，農林水産省から実態調査等の依頼分析を受託する分析機関も技能試験への参加が要求されている[6]．これは，国際食品規格委員会（Codex Alimentarius Commission：以下 CAC）が，食品の輸出入に係わる試験所の条件として，① ISO/IEC 17025への適合，②適切なプロフィシエンシィテスティング（技能試験）への参加，③妥当性が確認された方法の使用，④内部質管理の実施の４点をガイドライン(CAC/GL27-1997)[7]に挙げており，第三者が実施する技能試験に参加することが分析値の信頼性確保の一つの方法として国際的に認識されているためである．

平成20年度から５年計画で開始された農林水産省の委託研究プロジェクト「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」（以後，生産工程プロと記す）においても，微生物数のデータを報告する課題担当者は関連する技能試験に参加することが求められている．

技能試験では，実施者が均質な試料を参加試験室に配付し，各試験室は任意の方法で分析後，実施者に分析値を提出する．実施者は分析値の評価結果（かたより）を示した報告書を返送するので，参加試験室はかたよりの大小によって各自の技能を確認し，他の試験室の分析方法などを参考にして技能向上に役立てることができる．

2009年10月30日受付　2009年10月30日受理

微生物技能試験としてはイギリスのFERA（Food and Environment Research Agency）が1997年から提供しているFEPAS（Food Examination Performance Assessment Scheme）[8]が有名である．FEPASでは牛肉，鶏肉，魚，牛乳，粉乳，小麦粉，チョコレート，ココア，米，幼児食，飼料などのマトリックスに含まれる微生物の定量又は定性試験のプログラムを提供しているが，一部の試料は輸入が規制されている．

生産工程プロで微生物数の測定を行うマトリックスは野菜，畜産物，水産物，土壌，有機資材など多彩なため，異なるマトリックスを扱う課題担当者が同一の技能試験に参加しやすいように，マトリックスを含まない菌液を凍結乾燥させただけの試料を配付する微生物技能試験に参加することにした．

技能試験の結果は参加者だけに報告されるのが原則のため，参加者以外が技能試験結果の情報を入手することは一般的には制限されている．しかし，測定値の分布や使用された測定法に関する情報など，技能試験結果には参加者以外にとっても有益な情報が多い．また，技能試験への参加の必要性を啓蒙するためにも技能試験結果を多くの人に知ってもらう必要がある．

そこで，生産工程プロの課題担当者が2008年度に参加した微生物技能試験の菌数測定結果及び測定法に関するアンケート結果について，技能試験提供者の了解を得て報告する．

方　法

参加者

生産工程プロで微生物測定を行う課題担当者のなかで，FEPASなどの微生物技能試験に既に参加している担当者以外は原則参加した．参加者の所属先による分類を表１に示す．

微生物技能試験

日水製薬株式会社（東京）は，一般生菌数，大腸菌群数，大腸菌数，黄色ブドウ球菌数の技能試験を春（個別参加者が対象で約1500人が参加）と秋（参加人数がある程度まとまった事業所ごとに参加，約300人）に有料で実施しており，2008年の第８回技能試験（秋）に参加した．参加者は菌数と使用した培地などのアンケート結果を日水製薬㈱及び生産工程プロの微生物技能試験担当者に2008年11月26日までに報告した．

表１．参加者の所属先による分類　（人）

参加機関	一般生菌	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
独法研究機関	22	22	14	13
大学	22	16	10	8
都道府県等の研究機関	4	4	2	2
計	48	42	26	23

配付試料

培地や検査手技・手法の内部精度管理用に日水製薬㈱が販売している製品（Easy QA Ball，一定菌数に調製した菌液を瞬間凍結させた後に乾燥したボール状のもの）を，今回の技能試験用に特別に調製したものが日水製薬㈱から参加者に2008年11月５日に発送された．

一般生菌数は以下の試料A-1＋A-2＋A-3の合計菌数，大腸菌群数は試料A-1＋A-2の合計菌数，大腸菌数は試料A-1のみの菌数である．黄色ブドウ球菌数は，希釈操作がないので，試料Ｂをそのまま測定した菌数である．

・試料A-1：*Escherichia coli*（大腸菌）
　NCTC 9001 / ATCC 11775
・試料A-2：*Enterobacter aerogenes*（大腸菌群）
　NCTC 10006 / ATCC 13048
・試料A-3：*Enterococcus faecalis*（腸球菌）
　NCTC 775 / ATCC 19433
・試料Ｂ：*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）
　NCTC 10788 / ATCC 6538

日水製薬㈱によれば，Easy QA Ballに含まれる生菌数は，試料調製時，凍結や乾燥などの操作により若干減少するが，製造後は－20℃保存で２年間安定であり，保冷状態での輸送であれば数日間は安定な菌数を保つことができる．

菌種毎の目標値

2008年の第８回技能試験（春）の全データから算出した平均菌数をもとにｚスコアを算出し，その集計結果よりｚスコアが－３～＋３の範囲を逸脱した報告菌数を“外れ値”とし，外れ値を除いた残りの平均菌数を目標菌数として日水製薬㈱が設定した．ｚスコアは，FEPASのプロトコル[9]を参考に，菌数の対数値（$\log_{10}$）が正規分布すると仮定し，この正規分布の標準偏差を0.25とし，正規分布の平均に$\log_{10}$（目標菌数）を用いて以下の式で計算した．

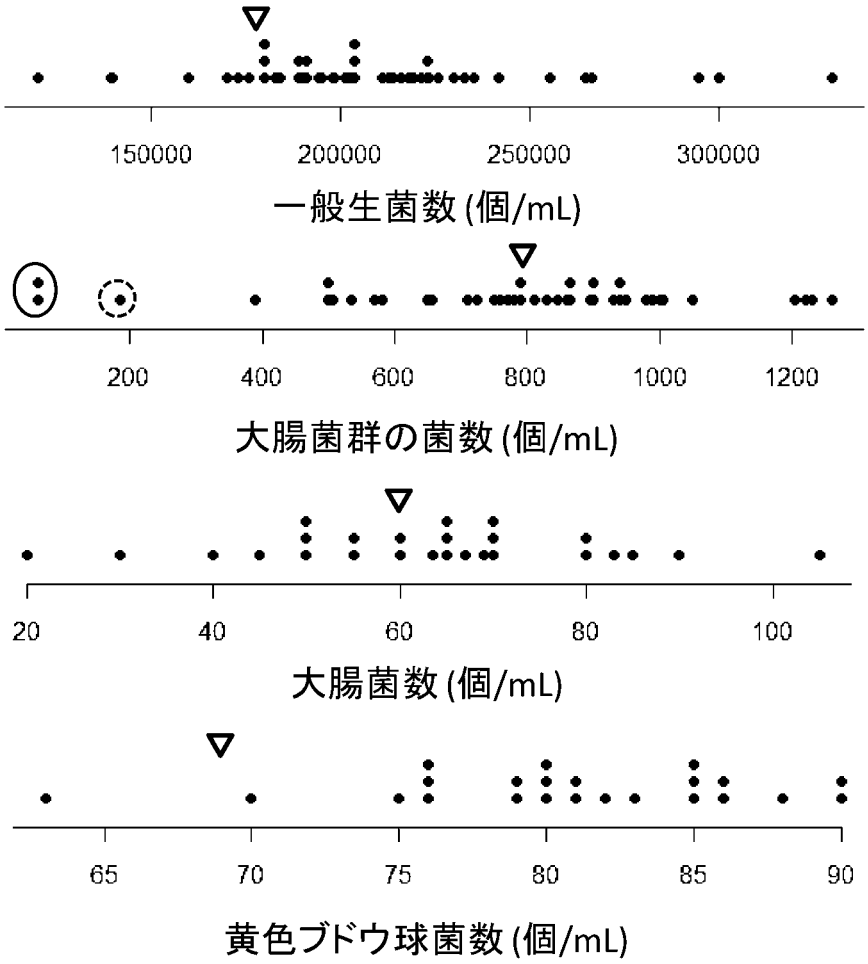

図１　菌数測定値の分布

▽は目標値を示す.
○はｚスコアが－３より小さく，◌はｚスコアが－２～－３であることを示す.

ｚスコア＝{$\log_{10}$(報告菌数)－$\log_{10}$(目標菌数)}/0.25

一般生菌数の目標値は1437個のうち1350個のデータ，大腸菌群数の目標値は1420個のうち1321個のデータ，大腸菌の目標値は　977個のうち895個のデータ，黄色ブドウ球菌の目標値は1295個のうち1261個のデータの各平均値である.

受け入れ可能な菌数の範囲

FEPAS のプロトコル[9]を参考に計算したｚスコアが－２～＋２の範囲を受け入れ可能な範囲とした．菌数の対数値（$\log_{10}$）のｚスコアが－２の限界値と＋２の限界値では，$\log_{10}$（菌数）が0.25×2×2＝1だけ異なり，これを菌数に換算すると１桁（10^1）の違いに相当する.

データ解析

菌数の分布図はフリーウエア R2.81（http://www.r-project.org/）上でdotplot関数（http://www.stat.wisc.edu/~larget/R/dotplot.R）を用いて作図した．アンケートの集計には Excel2003及び2007を用いた.

結果及び考察

生産工程プロの参加者の菌数測定結果の分布を図１に，ｚスコアの分布を図２に，要約を表２に示す．一般生菌数及び黄色ブドウ球菌数の報告値の分布は，菌数の対数（$\log_{10}$）をとった場合もとらない場合も目標値に対して右側に裾の長い測定値の分布であった（図１，２）．一方，大腸菌群の菌数及び大腸菌数の分布は，菌数の対数変換をしなくても左右対称の分布に近

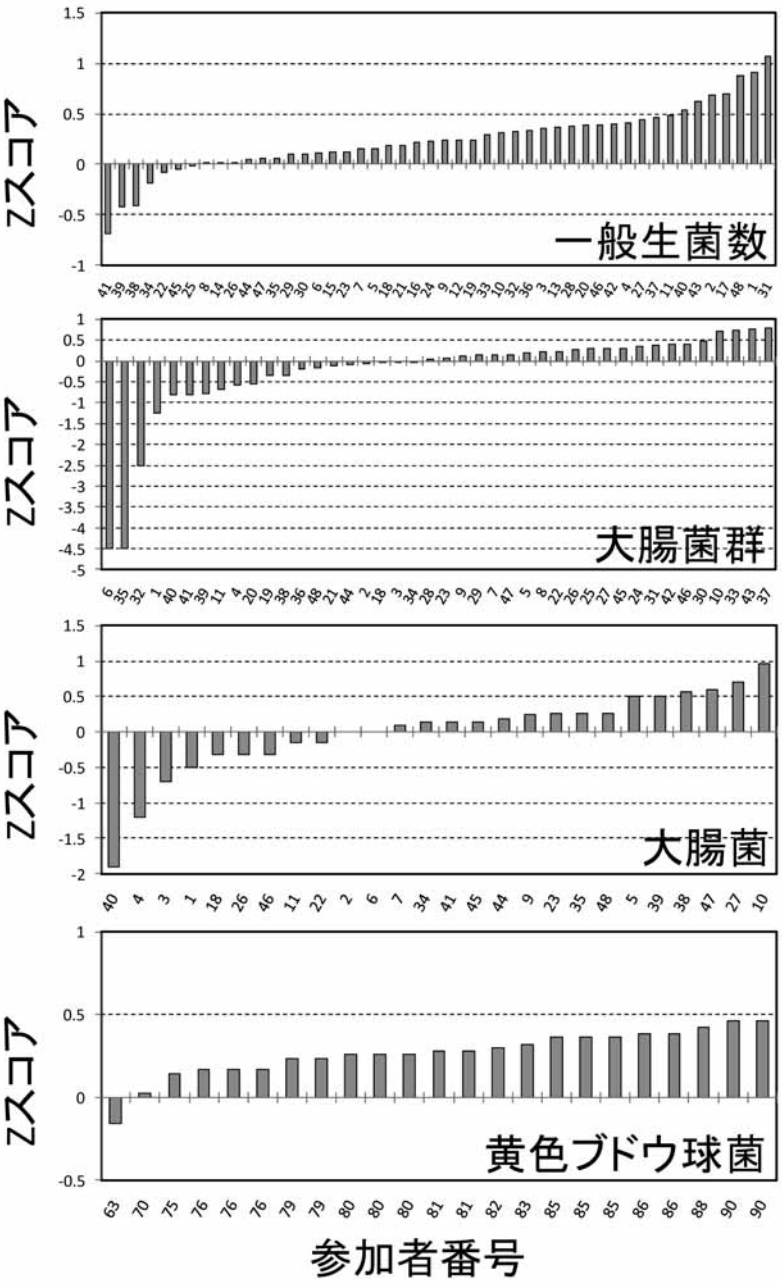

図２　ｚスコアの分布

かった（図１）．

一般生菌，大腸菌，黄色ブドウ球菌については参加者全員のｚスコアの絶対値が２以下であり，報告値はすべて受け入れ可能な菌数の範囲内であった（表２，図２）．大腸菌群では，２人の報告値が60個/mLでｚスコアが－4.5，１人の報告値が186個/mLでｚスコアが－2.5であり，ｚスコアの絶対値が２以下（受け入れ可能な報告値）の比率は39/42＝92.9%であった．これら３人の大腸菌群の測定に関するアンケート結果を表３に示すが，特に問題は見当たらなかった．日水製薬㈱の調査によると，ｚスコアの絶対値が２を超えた主な原因は希釈倍率の間違い又は計算間違いがほとんどとのことである．これら３人以外の大腸菌群の報告値の最小値は390個/mLであった（図１）．

菌数測定に関するアンケートの結果を表４及び表５に示す．日水製薬㈱が作成し，参加者に送付した技能試験報告書には2008年の第８回技能試験（春）のアンケートの一部の項目の集計結果しか記載されていない

表２．菌数測定結果

（濃度の単位：個/mL）

	一般生菌	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌
生産工程プロのデータ				
参加数	48	42	26	23
最大値	330000	1260	105	90
中央値	203250	820	65	81
平均値	207962	779	63	81
最小値	120000	60	20	63
実施元の第８回（春）データ				
目標値	178000	794	60	69
ｚスコア＝＋２の濃度	563000	2510	190	218
ｚスコア＝－２の濃度	56300	251	19	22
報告数	1437	1420	977	1295
ｚスコアの絶対値が２以下の数（比率）	321（91.9%）	1293（91.1%）	872（89.3%）	1248（96.4%）

表３．受け入れ可能な範囲外の報告値の菌数測定に関するアンケート結果

質問項目	大腸菌群	受け入れ範囲外のデータ		
		60個／ｍＬ	60個／ｍＬ	186個／ｍＬ
検査法	寒天平板塗抹法	○	○	
	寒天平板混釈法			○
使用培地名	デゾキシコレート培地			○
	その他	○	○	
使用培地メーカー	栄研器材	○	○	
	関東化学（メルク）			○
培地調製日	検査当日			○
	前日以前	○	○	
培地調製条件	加温溶解			○
	オートクレーブ滅菌	○	○	
加温溶解後の滅菌実施	はい	○	○	
	いいえ			○
加温溶解の条件	沸騰水中で加温	○	○	
	電子レンジ			○
オートクレーブ滅菌温度	121℃	○	○	
	未記入			○
オートクレーブ滅菌時間	15分間	○	○	
	未記入			○
培地調製後，混釈までの保温時間	１時間			○
	未記入	○	○	
混釈培養時の温度把握	はい			○
	未記入	○	○	
混釈培養時の温度	48℃			○
	未記入	○	○	
培養温度	35℃			○
	37℃	○	○	
培養時間	18時間		○	
	20時間	○		○

注１）質問項目間が点線の場合は，１セットの質問であったことを示す．

表４．菌数測定に関するアンケート結果

質問項目	一般生菌	計 48	大腸菌群	計 42	大腸菌	計 26	黄色ブドウ球菌	計 23
検査を日頃実施					実施している	7	実施している	2
					定性試験のみ実施	0	定性試験のみ実施	1
					していない	19	していない	20
検査法	寒天平板塗抹法	31	寒天平板塗抹法	27	寒天平板塗抹法	17	寒天平板塗抹法	21
	寒天平板混釈法	17	寒天平板混釈法	15	寒天平板混釈法	9	寒天平板混釈法	1
	簡易培地による方法	0	簡易培地による方法	0	簡易培地による方法	0	簡易培地による方法	0
			MPN 法	0			未記入	1
使用培地名	標準寒天培地	35	デゾキシコレート培地	14	発色酵素基室培地	11	卵黄加マンニット食塩培地	6
	ペトリフィルム	0	XM−G 培地（日水）	10	XM−G 培地（日水）	10	X−SA 寒天培地（日水）	3
	コンパクトドライ（日水）	0	X−GAL 培地（日水）	8	ペトリフィルム	0	食塩卵寒天培地	1
	その他	13	発色酵素基質培地	1	コンパクトドライ（日水）	0	発色酵素基室培地	0
			ペトリフィルム	1	その他	5	ペトリフィルム	0
			コンパクトドライ（日水）	0			コンパクトドライ（日水）	0
			BGLB 培地	0			その他	12
			その他	8			未記入	1
使用培地メーカー	日水製薬	23	日水製薬	27	日水製薬	13	日水製薬	10
	栄研器材	12	栄研器材	12	栄研器材	0	栄研器材	8
	極東製薬	0	極東製薬	0	極東製薬	0	極東製薬	0
	ＢＤ	8	ＢＤ	0	ＢＤ	0	ＢＤ	3
	関東化学（メルク）	3	関東化学（メルク）	2	関東化学（メルク）	10	関東化学（メルク）	0
	3M	0	3M	1	3M	0	3M	0
	その他	1	その他	0	その他	3	その他	1
	未記入	1					未記入	1
培地調製日	検査当日	27	検査当日	25	検査当日	19	検査当日	4
	前日以前	21	前日以前	16	前日以前	7	前日以前	12
	生培地	0	生培地	1	生培地	0	生培地	7
培地調製条件			加温溶解	19			加温溶解	2
			オートクレーブ滅菌	22			オートクレーブ滅菌	13
			未記入	1			加温溶解・オートクレーブ滅菌	1
							未記入	7
加温溶解後の滅菌実施	はい	20	はい	8			はい	10
	いいえ	27	いいえ	30			いいえ	6
	未記入	1	未記入	4			未記入	7
加温溶解の条件	直火で煮沸（加温）	0	直火で煮沸（加温）	0			直火で煮沸（加温）	0
	沸騰水中で加温	18	沸騰水中で加温	16			沸騰水中で加温	10
	電子レンジ	1	電子レンジ	10			電子レンジ	0
	未記入	29	未記入	16			未記入	13
オートクレーブ滅菌温度	121℃	47	121℃	21			121℃	14
	未記入	1	未記入	21			未記入	9
オートクレーブ滅菌時間	12分間	3	12分間	1			15分間	14
	15分間	42	15分間	19			未記入	9
	20分間	2	20分間	1				
	未記入	1	未記入	21				
試料（菌株）溶解の溶媒	ペプトン食塩緩衝液	26						
	生理食塩水	18						
	その他	4						
培地調製後、混釈までの保温時間	1時間	9	1時間	8				
	2時間	2	2時間	3				
	3時間	3	3時間	2				
	4時間	1	4時間	2				
	6時間	1	5時間	1				
	未記入	32	未記入	26				
混釈培養時の温度把握	はい	17	はい	14				
	いいえ	0	いいえ	0				
	未記入	31	未記入	28				
混釈培養時の温度	40℃	1	40℃	1				
	47℃	1	45℃	1				
	50℃	9	47℃	1				
	52℃	6	48℃	1				
	未記入	31	50℃	9				
			52℃	1				
			未記入	28				
培養温度	30℃	2	30℃	1	35℃	7	35℃	8
	35℃	12	35℃	10	37℃	18	37℃	15
	37℃	34	37℃	31	121℃	1		
培養時間	18時間	1	18時間	2	18時間	1	18時間	1
	20時間	9	20時間	12	20時間	11	20時間	3
	22時間	1	22時間	1	22時間	1	21時間	1
	24時間	6	24時間	20	24時間	10	22時間	1
	41.5時間	2	48時間	7	48時間	3	24時間	7
	48時間	29					42時間	1
							48時間	9
確認試験					同定キット	7	グラム染色	4
					グラム染色	2	同定キット	3
					IMViC 試験	2	ラテックス凝集コアグラーゼ試験	2
					グラム染色・同定キット	1	血漿でのコアグラーゼ試験	1
					未記入	14	上記のすべて	1
							未記入	12

注１）菌名の右横の「計」は技能試験への参加者数を示す．
注２）質問項目間が点線の場合は，１セットの質問であったことを示す．
注３）斜線は質問項目になかったことを示す．

表５．黄色ブドウ球菌測定のみの質問項目のアンケート結果

質問項目	黄色ブドウ球菌	計 23
卵黄液添加の有無	加えている	6
	加えていない	10
	未記入	7
卵黄液の最終濃度	10%	1
	8.3%	3
	5%	2
	未記入	17
卵黄液の調製	自家調製	5
	市販品を使用	1
	未記入	17
卵黄液添加時の培地温度の把握	はい	6
	いいえ	0
	未記入	17
培地の温度	50℃	5
	52℃	1
	未記入	17
コンラージ棒の種類	使い捨て樹脂製	17
	使い捨てガラス製	0
	ガラス製	4
	未記入	2

注１）菌名の右横の「計」は技能試験への参加者数を示す.
注２）質問項目間が点線の場合は，１セットの質問であったことを示す.

ため，記載された第８回（春）のアンケート結果との相違点についてのみ以下に示す．一般生菌での標準寒天培地の利用率は生産工程プロでは35人/48人＝73%であり，比率73%の95%信頼区間は61～85%のため，第８回(春)の技能試験参加者の86%よりも危険率５%で有意に低かった．大腸菌群の使用培地について，第８回（春）の技能試験参加者ではデゾキシコレート培地が51%，発色酵素基質培地が32%と大多数であったが，生産工程プロではデゾキシコレート培地が14人/42人＝33%，XM-G 培地が10人/42人＝24%の順に多く，XM-G 培地，X-GAL 培地以外の発色酵素基質培地は１人しか利用していなかった. 大腸菌については，第８回（春）の技能試験参加者の67.8%が日頃検査を実施していたが，生産工程プロでは７人/42人＝27%のみが日頃検査を実施していた．黄色ブドウ球菌の使用培地について，第８回（春）の技能試験参加者では卵黄加マンニット食塩寒天培地が71%と大多数を占めていたが，生産工程プロでは卵黄加マンニット食塩寒天培地は６人/23人＝26%しか利用していなかった.

微生物の菌数測定において培地の影響は大きいが，食品衛生法に基づく公定法の培地以外にも，簡易・迅速を目的に多くの培地が開発され，市販されている[10]. 生産工程プロの参加者と第８回（春）の技能試験参加者では，使用した培地の傾向が異なるが，受け入れ可能な報告値の比率は大腸菌群でほぼ等しく，一般生菌，大腸菌，黄色ブドウ球菌では生産工程プロの参加者の方が高かった.

フランスで1988年から提供されている食品微生物の技能試験（RAEMA，1988年の参加者76人，2002年の参加者440人）では，標準化された方法や妥当性確認された方法の利用者が年々増加してきたが，受け入れ可能な範囲外の値を報告する人の割合はほぼ一定（30℃の好気性菌測定で20～30%）と報告されている[11]．これは測定法の進歩によらず，一定の割合で測定値にかたよりが生じることを示唆しており，技能試験よる定期的なかたよりチェックの必要性を示している.

今回の微生物技能試験への参加では，大腸菌群での３人以外は一般生菌，大腸菌群，大腸菌，黄色ブドウ球菌で全員が受け入れ可能な値を報告しており，全体的にはよく管理された状態下で菌数測定が行われたことが推察された．受け入れ可能な範囲外の測定値を報告した３人は，操作法や測定法，計算法などについて点検する必要があることを認識できた点で技能試験への参加が役立っており，この３人以外の生産工程プロ関係者にも技能試験への参加の必要性を改めて認識させる結果であった．フランスの上記報告[11]が示すように，測定する限りは一定の確率で疑わしい測定値が報告されることを考えると，今後とも技能試験に定期的に参加し，測定値の信頼性に関して高い意識と技能を維持することが重要である.

要　約

一般生菌，大腸菌群，大腸菌，黄色ブドウ球菌の菌数測定を行う技能試験に参加した48人, 42人, 26人, 23人の測定結果及び菌数測定に関するアンケートの集計結果を報告した. z スコアの絶対値が２を超えたため，受け入れ可能な範囲外と判定された菌数を報告したのは大腸菌群での３人だけであり，他はすべて受け入れ可能な範囲内の報告値であった.

本研究は農林水産省の委託研究プロジェクト「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」の予算で行われた.

文　献

1）Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R., The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. Pure & Appl. Chem., **78**(1), 145-196 (2006).
http://www.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf（引用日2009年12月９日）

2）JIS Q0043-1，試験所間比較による技能試験 第１部：技能試験スキームの開発及び運営（1998）.

3）ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (2005).

4）JIS Q 17025，試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項（2005）.

5）厚生労働省，食品衛生検査施設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）
http://wwwhourei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE = tsuchi & DMODE = CON TENTS & SMODE = NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=5827（引用日2009年12月９日）

6）農林水産省消費・安全局，サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン　―「評価・公表」に関する部分―
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/guide_zenbun.pdf（引用日2009年12月９日）

7）Codex CAC/GL 27, Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food. (1997).
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/355/CXG_027e.pdf（引用日2009年12月９日）

8）FEPAS, http://www.fapas.com/fepas.cfm?newlang=jp（引用日2009年12月９日）

9）FEPAS, Food examination performance assessment scheme (FEPAS®) protocol for the organisation and analysis of data, third ed.. (2002).
http://www.fapas.com/fepas-protocol.cfm（引用日2009年12月９日）

10）「食品衛生検査指針　微生物編」，（日本食品衛生協会，東京），pp. 121-122, 140-143（2004）.

11）Augustin J.-C. and Carlier, V., French laboratory proficiency testing program for food microbiology. J. AOAC Int., 85(4), 952-959 (2002).