

図 2 ダイオキシンELISA の操作手順

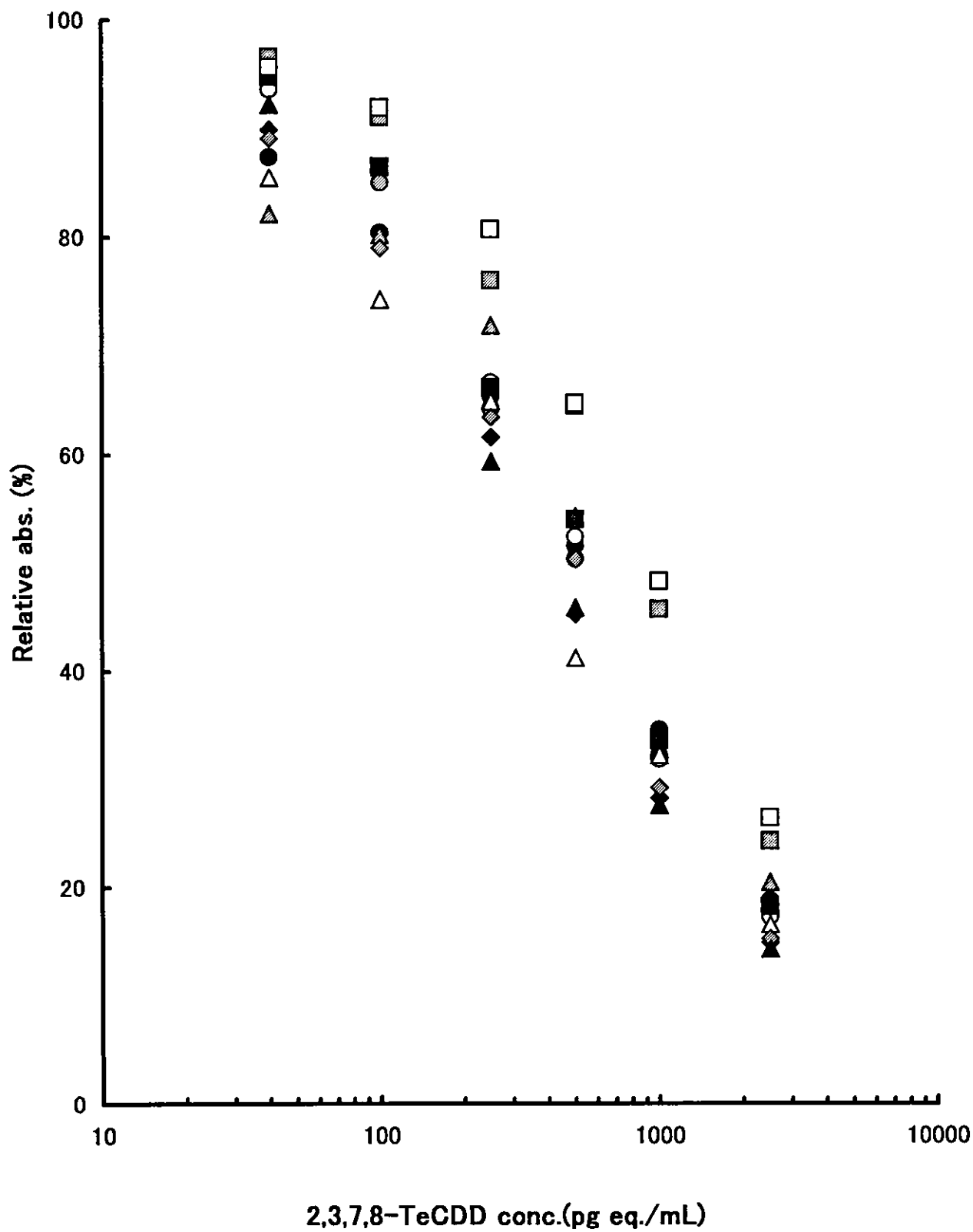


図3 ダイオキシンELISAの検量線

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

「ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における  
信頼性確保と生体曝露モニタリング法の確立に関する研究」

平成16年度  
分担研究報告書

食品衛生検査精度管理調査における適正調査試料作製と  
質向上に関する調査研究

- （その1）実食材を用いた微生物検査試料の作製の検討
- （その2）理化学的検査調査試料の作製に関する研究
- （その3）精度管理調査方法の効率化に関する検討

分担研究者 大島赴夫

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と  
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書（平成16年度）

食品衛生検査精度管理調査における適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その1）  
—実食材を用いた微生物検査試料の作製の検討—

主任研究者 柳澤健一郎 (財)食品薬品安全センター 特別参事  
分担研究者 大島赴夫 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 部長  
協力研究者 鈴木達也 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 室長補佐  
協力研究者 大隅 昇 文部科学省統計数理研究所 教授

研究要旨

大腸菌、大腸菌群、サルモネラ属菌検査を対象として食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、食品・添加物等規格基準に示されている食品のカテゴリーに基づき選択した実食材を基材とした調査試料の作製を試みた。大腸菌群および大腸菌検査のための基材として市販のハンバーグを、サルモネラ属菌検査のための基材として食鳥卵（殺菌液卵；鶏卵）を選択し、試験菌の接種方法、接種菌数の設定、試料中の試験菌の安定性ならびに均一性について検討し、併せてそれぞれの検査法に従って検査を実施した場合の判定基準への適合性を確認した。ハンバーグを用いた大腸菌群および大腸菌検査用調査試料では、基材表面に比較的均一な分布で汚染状態を形成することが可能であり、4℃保存、-20℃保存いずれでも約5週間の保存期間中安定した生菌数の推移を示した。また、公定法による試験菌の検出確認では、いずれも判定基準を満たしていたが、EC培地による44.5±0.2℃、24時間培養によるガス産生の確認は48時間培養での判定に比べガス産生が微弱なため困難をきたす傾向にあった。殺菌液卵を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料では、安定化剤の添加によって4℃保存下、約4週間基材の安定を確認したが、試験菌は低温保存でも増加傾向にあり、一定菌数で保存することは困難であった。公定法による試験菌の検出確認では、いずれの確認段階においても判定基準を満たし、添加菌の検出が可能であった。これらの試験結果よりハンバーグ・殺菌液卵いずれの基材においても、精度管理調査用試料として作成可能と判断されたが、特に殺菌液卵を試料として採用するにはその保存や輸送を考慮して基材中での試験菌の安定化・増殖抑制などについて、基材のさらなる改良が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査（特定微生物の同定検査）試料の作製にあたって特に考慮しなければならない事項として「実食材を基材とした調査試料の開発」と「試験菌（標準菌）株の選択」が上げられる。これ

までマッシュポテトを主材料とした基材の開発について検討してきた。本基材による調査試料は、輸送の影響が少なく、試験菌の死滅変動も少ない比較的安定な調査試料であり、外部精度管理調査試料として作製が可能なるものであった。この調査試料

に対し食材のカテゴリー（見立て食材）を提示して調査試料を提供してきたが、外部精度管理調査も回を重ねるごとに模擬食材（マッシュポテト）に代えて食品・添加物等規格基準に定められている実食材を基材とした調査試料の提供が強く求められてきている。実食材を基材として安定な調査試料を作製する場合、基材の変質抑制、長期間安定で均一な試料作製に心がけなければならないが、試験菌を人為的に添加した食材中の汚染分布は自然汚染によるものとは異なり試験菌の増減を長期間コントロールすることが困難な場合が多い。加えて採用された検査法で確実に菌を検出することができるような調査試料としなければならない。

今年度は、これらの要望に対応するため、まず大腸菌群・大腸菌検査ならびにサルモネラ属菌検査を対象とした実食材の選択と試料作製を試みることにした。食品・添加物等規格基準に示されている食品のカテゴリーのうち冷凍食品、食肉製品、食鳥卵（殺菌液卵）で大腸菌やサルモネラ属菌の検査が指定されており、これらのカテゴリーに適合する食材としてハンバーグ（大腸菌群・大腸菌検査用）と殺菌液卵（サルモネラ属菌検査用）を選択し、調査試料の作製検討に着手した。

## B. 研究方法

### 1. 試験菌株

試験菌株は、秦野研究所保存の以下の5菌種を用いた。

*Escherichia coli* IFO3240

*Klebsiella oxytoca* ATC33496

*Acinetobacter calcoaceticus* IFO12552

*Salmonella* Enteritidis HIC12042

*Proteus mirabilis* ATCC25933

### 2. 基材（食品・食品添加物等規格基準のカ

### テゴリーを参考とした選択）

大腸菌・大腸菌群検査用調査試料作製のためのハンバーグは、市販の冷凍ハンバーグ（T社、I社、M社）を用いて実施した。また、サルモネラ属菌検査用試料作製についても同様に、市販の殺菌液卵（鶏卵）を用いた。

### 3. 素材の異なるハンバーグを用いた大腸菌・大腸菌群検査のための基材の選択

試験菌（*E. coli*、*K. oxytoca*、*A. calcoaceticus*）をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト（SCD）寒天培地で $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18～24時間培養した後、安定化剤を含む滅菌生理食塩液に懸濁して約 $10^8$  colony forming units (cfu)/mLの試験菌液を調製し、これにあらかじめ前処理して加熱殺菌した冷凍ハンバーグ（T社、I社、M社）を調製菌液に浸漬してハンバーグ表面に試験菌を均一に付着させた。これらを $4^\circ\text{C}$ 下に35日間保存し、接種当日、7、14、21、28、35日目に生菌数測定を行い付着菌数とその経日的変化を確認した。1回の測定に3個のハンバーグを用い、菌数測定は $n=2$ で行いその平均値を求めて生菌数（cfu/g）とした。

### 4. ハンバーグ基材中の接種菌の均一性と安定性の確認

先に示したと同様の方法で菌液調製を行いハンバーグ（M社）に試験菌を均一に付着させた後、これらを $4^\circ\text{C}$ 下に保存して接種当日、7、14、28日目にハンバーグ表面の生菌数の分布を確認した。ハンバーグを8分割し、各分面ごとに生菌数測定を行い、付着菌数を測定して、付着菌数の均一性と安定性を確認した。また、14日間、28日間保存試料については、EC培地を用い $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で $24 \pm 2$ 時間培養して試験菌の発育ならびにガス産生の有無について確認を行った後、培養液の1白金耳をEMB

寒天培地に移植し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で $24\pm 2$ 時間培養して発育集落の有無ならびにその性状を観察した。

#### 5. 保存条件の異なるハンバーグ基材を用いた大腸菌の培養における経時的生菌数の変化とガス産生の確認

先に示した手順に従ってハンバーグ（M社）基材表面に大腸菌を付着させた後、 $4^{\circ}\text{C}$ ならびに $-20^{\circ}\text{C}$ に35日間保存し、生菌数を経日的に測定して接種菌数の推移を確認した。また、保存28日目の試料を用いて、EC培地で $44.5\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、 $24\pm 2$ 時間～ $48\pm 3$ 時間培養またはBGLB培地で $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $24\pm 2$ 時間～ $48\pm 3$ 時間培養を行い、試験菌の発育ならびにガス産生量についてその有無を観察した。

#### 6. $4^{\circ}\text{C}$ 保存ハンバーグ基材を用いた大腸菌・大腸菌群の培養における経時的生菌数の変化とガス産生の確認

ハンバーグ（M社）に*E. coli*、*K. oxytoca* および*A. calcoaceticus*を単独で付着させ経日的に生菌数測定を行い生菌数の推移を確認した。なお、*E. coli*については、異なる濃度の調製菌液を用いてハンバーグに付着させた後、付着菌数と生菌数の推移についても併せて測定した。また、*E. coli* および*K. oxytoca*については、35日間まで保存した試料について経日的に試験培地（EC培地で $44.5\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、 $24\pm 2$ 時間培養、BGLB液体培地で $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $48\pm 3$ 時間培養）中での発育とガス産生についてその有無を観察した。

#### 7. 安定化剤の選択とサルモネラ属菌の $4^{\circ}\text{C}$ 保存液卵中での生菌数の推移

殺菌液卵と滅菌済み安定化剤（SPG10、SPG20）とを1:1の容量比で混合して試験液卵を作製した。なお、安定化剤の代わりに滅菌生理食塩液を用いて作製したものを対照試験液卵とした。

試験菌（*S. Enteritidis*、*P. mirabilis*）をSCD培地で $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、18～24時間培養した後、試験菌液約 $10^9\text{cfu/mL}$ を作製し、試験菌液1mLを試験液卵100mL（最終菌液濃度約 $10^7\text{cfu/mL}$ ）に加えて $4^{\circ}\text{C}$ 下に28日間保存して接種後7日目、14日目、28日目に生菌数測定を行い、試験菌数の経日的推移を計測した。なお、同様に調製したものを $22.5^{\circ}\text{C}$ に3日間静置し、基材変質の有無について観察した。また、異なる試験菌液を調製して殺菌液卵に接種後、先に示したと同様に $4^{\circ}\text{C}$ 下に28日間静置して経日的に生菌数測定を行い、保存期間中の菌数の推移を観察した。

#### 8. 選択培地中での発育確認

試験菌（*S. Enteritidis*、*P. mirabilis*）を用いて調製した試料について、検査法に従い前増菌培地（緩衝ペプトン水、EEM液体培地）、増菌培地（セレナイトシスチン培地、テトラチオネート培地、ラパポートバシリアディス培地）、確認培地（DHL寒天培地、MLCB寒天培地、ブルルアントグリーン寒天培地、ESサルモネラ寒天培地）を用いて培養したときの試験菌の発育の有無を観察し、サルモネラ属菌の判定基準に従った検出確認を実施した。

#### 倫理面への配慮

研究に使用する微生物などの取り扱いには特定の区域内で行う。実験に使用した微生物や微生物汚染試料は、実験終了後すみやかに廃棄処理方法に従って滅菌処理する。さらに、実務担当者は自らの健康管理に十分配慮し、健康診断などの記録の保管を行う。

## C. 結果

### 1. ハンバーグを基材とした大腸菌群・大腸菌検査のための調査試料作製

試験結果は、表1～9に示した。

ハンバーグを基材として用いる場合、肉に含まれている脂肪の量によって前処理が異なり、残存する脂肪の量が少ないほうが試験菌の接種に適していた。試験菌の接種には浸漬法が安定しており、ハンバーグ表面に均一の付着菌数を持つ試料の作製が可能となった。作製した試料は、4℃保存でも-20℃保存でも接種後28日間まで安定した菌数で推移し、接種菌数の大きな増減は認められなかった。調製試料を4℃下で28日間保存し、EC培地で44.5±0.2℃、24~48時間培養、またはBGLB培地で35.0±1℃、24~48時間培養した後、判定基準にしたがってガス産生の有無を観察した結果、いずれの培地でもガス産生を認めた。しかしながら、EC培地で44.5±0.2℃、24±2時間培養では、EC培地中の接種菌数によってBGLB培地に比べ微弱的なガス産生を認める結果であった。4℃、-20℃いずれの保存条件でも、EC培地中のガス産生には影響が認められなかった。大腸菌群および大腸菌検査のための調査試料として調製したハンバーグ基材による試料は、低温保存で少なくとも約5週間安定であり、付着菌数のコントロールも調製菌液の菌数を調整することで可能であった。

## 2. 殺菌液卵（鶏卵）を基材としたサルモネラ属菌検査のための調査試料作製

試験結果は、表10~14に示した。

殺菌液卵（鶏卵）を用いたサルモネラ属菌検査のための調査試料作製には、安定化剤の共存が必要であった。試験菌を接種後、常温に保存すると接種菌の活発な増殖を認め、24時間後には異臭を認め基材の変質が観察された。4℃、28日間の保存条件では、低温保存であるにもかかわらず接種菌の増殖を認めたが、常温保存時に観察された基材の変質ならびに極端な異臭を認め

ることはなく（微弱は異臭を認める場合がある）、初発菌数をコントロールすることによって長期間保存後の試料中の菌数を調節することは可能であった。また、*S. Enteritidis*の各種培地中での増殖を確認した結果、検査法（公定法）の判定基準にしたがって接種菌の有無を判定することが可能であった。調製試料が液状であるため輸送時の液漏れによる汚染を防ぐため、振盪機を用いて液漏れ確認を行った。試料容器を密封した後、繰り返し振盪することにより容器からの液漏れ確認を行ったが、液漏れは認められなかった。

## D. 考察

実食材を用いて、大腸菌群・大腸菌検査のための調査試料（ハンバーグ）ならびにサルモネラ属菌検査のための調査試料（殺菌液卵）の作製を検討した。

食品の場合、食品表面に菌が汚染している場合と食品内外に菌が汚染している場合が考えられる。ハンバーグは挽肉を材料として作られている場合が多く、この場合は食品内外について微生物汚染が想定される。今回の調製法では、試験菌が基材内部にも浸潤するが、基材表面への微生物付着を主とする調製法となっている。ハンバーグ中には脂肪が多く含まれているため、今回の調製法では試験菌の食材中への浸潤や表面付着に対して素材の持つ脂肪（油脂成分）が菌の定着に影響を及ぼす可能性があるため適度な脱脂が必要であり、調製工程で基材を汚染した微生物に対する滅菌処理が必要となる。このような前処理を考慮してM社製ハンバーグを基材に採用することとした。

前処理済みハンバーグ基材に接種した試験菌は、4℃保存でも-20℃保存でも保存期間中は生菌数の大きな変化を認めず

比較的安定に推移していた。調査試料として参加機関に配布するときの条件を考え、まず 4℃保存試料を優先してその安定性・均一性ならびに検査法による試験菌の検出の有無を検討した。但し、食品の規格基準に示されている冷凍食品として冷凍試料を配布する場合でも、冷凍保存条件ならびに配布時の輸送条件を適切な条件下に設定できれば、凍結融解を避けて冷凍試料を配布することは可能と考える。

採用が想定される検査方法での試験菌の検出確認でも試験菌の検出は可能であったが、これまでの検討結果で示したように、使用する試験菌株の性状によっては大腸菌検査で汎用される EC 培地で  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間培養では、判定基準となるガス産生が微弱な検出のみに留まる場合もあり、調査試料として指定する食品のカテゴリー、試料作製に採用する標準菌株や選択される検査方法などを考慮した検査試料の作製が必要と考える。

サルモネラ属菌検査用調査試料として検討した殺菌液卵（鶏卵）の取り扱いが容易であったが、試験菌が低温保存下でも発育増殖を示すため、増殖抑制を考慮して基材に安定化剤を添加する必要があった。低温で保存すれば接種菌量を調整することにより、調査試料中の菌数を期待する菌数範囲に留めることは可能であったが、今回のような基材の場合、菌の増殖抑制と基材の変質（腐敗臭の発生）防止のため安定化剤の添加は必須と考えられた。しかしながら、特殊な安定化剤を選択して菌の増殖をコントロールする場合は、検査手法（特に前増菌培地中での発育抑制）への影響を十分考慮しなければならない。したがって、調査試料として一定の有効期間を保証するために接種菌が安定で死滅せず、増減を示さない試料作製が求められ、他の調査試

料作製と同様、試験菌として選択する標準菌株についても十分考慮しなければならず、これらの点については今後のさらなる検討が必要と考える。

## E. 結論

食品衛生外部精度管理調査の特定微生物検査用調査試料として、これまでマッシュポテトを基材とした均一で安定な調査試料を提供してきたが、実食材を基材とした調査試料配布の要望に対応するため大腸菌群・大腸菌検査用試料としてハンバーグ、サルモネラ属菌検査用試料として殺菌液卵（鶏卵）を選択し調査試料作製を検討した。

ハンバーグ（大腸菌群・大腸菌検査用調査試料）を基材として用いる場合、ハンバーグの材質によって基材として用いるための前処理に注意が必要となるが、今回作製した方法により試験菌の分散性・均一性ならびに安定性が確保された調査試料の作製が可能となった。特に、調査試料を配布してから少なくとも約5週間は検査可能な調査試料としてその品質を維持する必要があるが、4℃保存ハンバーグの生菌数の推移は大きな増減を認めず、EC 培地で  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  による培養、または BGLB 培地で  $35.0 \pm 1^\circ\text{C}$  による培養での判定規準とされているガス産生を確認することは可能であった。但し、推定試験における試験培地への接種菌数ならびに培養時間については適切な条件を満たすよう十分考慮することが必要である。また、今回  $-20^\circ\text{C}$  で冷凍保存したハンバーグについても検討したが、試料解凍後に各検査法で試験菌の検出を実施した結果、接種菌の検出が可能であることが明らかとなった。凍結保存試料の配布は、保存ならびに輸送時の温度管理の点でまだ問題があるため、冷蔵保存



試料の配布を優先して検討してきたが、検査対象となる食品カテゴリーには冷凍食品が含まれており、ハンバーグ基材はこれらの検査にも対応可能な試料であると考ええる。

サルモネラ属菌検査のための調査試料として殺菌液卵（鶏卵）を採用して検討した結果、安定化剤の添加によって4℃保存下で約4週間、接種菌の死滅は抑制することが可能であった。しかしながら、低温保存でも試験菌の増殖抑制は困難であり、保存4週目では基材の変質に伴う微弱な腐敗臭が感じられ、接種菌数の調整が必要であった。今回の殺菌液卵を用いたサルモネラ属菌検査試料は、前増菌培地や選択増菌培地中で試験菌の十分な発育を認め、殺菌液卵（鶏卵）としてサルモネラ属菌検査用調査試料を配布することは可能な試料となった。しかしながら、基材中での菌の安定性や基材の変質防止など改良しなければならぬ点が多々あり、適切な調査試料として配布するためには今後のさらなる検討が必要と考える。

今後の食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、食品の規格基準に示されている食品カテゴリーを参考とした調査試料作製のための実食材の選択とそれらを基材とした均一で安定な調査試料作製を継続して検討する必要がある、これまで問題とされてきている「指定された特定微生物に対する検査方法の適正とその検査方法の検証」、「標準菌株の選択と採用検査方法による特定微生物の検出の検証」など様々な局面を考慮して、外部精度管理調査の目的に応じて適切な標準菌株を選択し、日常の検査試料に近い調査試料を提供することによりさらに向上した精度管理の実施が遂行されるものと考ええる。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表  
1. 論文発表  
なし  
2. 学会発表  
なし

H. 知的所有権の取得状況  
1. 特許取得  
なし  
2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

表1. 素材の異なるハンバーグに対する *Escherichia coli* の付着菌数と経日変化 (4℃保存)

ハンバーグ (調製菌液 cfu/mL)	n 数	付着菌数の経日変化 (cfu/g)					
		接種当日	7日間	14日間	21日間	28日間	35日間
T社 (8.5×10 <sup>7</sup> )	n=1	2.8×10 <sup>5</sup>	3.5×10 <sup>5</sup>	2.6×10 <sup>5</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>6</sup>	—
	n=2	3.7×10 <sup>5</sup>	3.0×10 <sup>5</sup>	3.6×10 <sup>5</sup>	2.8×10 <sup>6</sup>	2.2×10 <sup>6</sup>	2.3×10 <sup>6</sup>
	n=3	3.4×10 <sup>5</sup>	2.0×10 <sup>5</sup>	8.0×10 <sup>5</sup>	2.4×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>
	平均	3.3×10 <sup>5</sup>	2.8×10 <sup>5</sup>	4.7×10 <sup>5</sup>	2.2×10 <sup>6</sup>	1.7×10 <sup>6</sup>	1.7×10 <sup>6</sup>
I社 (8.5×10 <sup>7</sup> )	n=1	3.7×10 <sup>5</sup>	4.2×10 <sup>5</sup>	3.9×10 <sup>5</sup>	3.9×10 <sup>5</sup>	5.0×10 <sup>5</sup>	3.5×10 <sup>5</sup>
	n=2	3.1×10 <sup>5</sup>	3.1×10 <sup>5</sup>	4.5×10 <sup>5</sup>	3.6×10 <sup>5</sup>	5.0×10 <sup>5</sup>	2.0×10 <sup>5</sup>
	n=3	4.4×10 <sup>5</sup>	3.1×10 <sup>5</sup>	2.9×10 <sup>5</sup>	5.0×10 <sup>5</sup>	2.6×10 <sup>5</sup>	1.7×10 <sup>5</sup>
	平均	3.7×10 <sup>5</sup>	3.5×10 <sup>5</sup>	3.8×10 <sup>5</sup>	4.2×10 <sup>5</sup>	4.2×10 <sup>5</sup>	2.4×10 <sup>5</sup>
M社 (9.0×10 <sup>7</sup> )	n=1	9.6×10 <sup>5</sup>	3.5×10 <sup>5</sup>	5.7×10 <sup>5</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>6</sup>	6.6×10 <sup>5</sup>
	n=2	4.2×10 <sup>5</sup>	2.8×10 <sup>5</sup>	4.9×10 <sup>5</sup>	7.0×10 <sup>5</sup>	7.4×10 <sup>5</sup>	3.6×10 <sup>5</sup>
	n=3	8.1×10 <sup>5</sup>	2.8×10 <sup>5</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>	4.6×10 <sup>5</sup>	8.4×10 <sup>5</sup>	5.5×10 <sup>5</sup>
	平均	7.3×10 <sup>5</sup>	3.0×10 <sup>5</sup>	7.5×10 <sup>5</sup>	7.9×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>	5.2×10 <sup>5</sup>

表2. *Escherichia coli* 接種ハンバーグの均一性確認と付着菌数の経日変化 (4℃保存)

画分	保存期間中の生菌数 (cfu/g)			
	接種当日	7日間	14日間	28日間
No.1	1.1×10 <sup>4</sup>	5.3×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>	3.9×10 <sup>3</sup>
No.2	6.8×10 <sup>3</sup>	5.3×10 <sup>3</sup>	9.2×10 <sup>3</sup>	6.4×10 <sup>3</sup>
No.3	5.6×10 <sup>3</sup>	4.5×10 <sup>3</sup>	6.1×10 <sup>3</sup>	4.6×10 <sup>3</sup>
No.4	1.2×10 <sup>4</sup>	4.6×10 <sup>3</sup>	5.5×10 <sup>3</sup>	6.6×10 <sup>3</sup>
No.5	7.8×10 <sup>3</sup>	6.3×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	7.5×10 <sup>3</sup>
No.6	7.5×10 <sup>3</sup>	9.6×10 <sup>3</sup>	1.2×10 <sup>4</sup>	7.0×10 <sup>3</sup>
No.7	5.7×10 <sup>3</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>	7.1×10 <sup>3</sup>	5.8×10 <sup>3</sup>
No.8	6.9×10 <sup>3</sup>	6.9×10 <sup>3</sup>	8.2×10 <sup>3</sup>	8.1×10 <sup>3</sup>
平均	7.9×10 <sup>3</sup>	6.7×10 <sup>3</sup>	8.6×10 <sup>3</sup>	6.2×10 <sup>3</sup>

調製試験菌液 4.7×10<sup>5</sup> cfu/mL

表 3. *Klebsiella oxytoca* 接種ハンバーグの均一性確認と付着菌数の経日変化 (4℃保存)

画分	保存期間中の生菌数 (cfu/g)			
	接種当日	7日間	14日間	28日間
No.1	1.1×10 <sup>4</sup>	8.1×10 <sup>3</sup>	2.1×10 <sup>4</sup>	3.3×10 <sup>4</sup>
No.2	1.7×10 <sup>4</sup>	2.3×10 <sup>4</sup>	2.4×10 <sup>4</sup>	1.8×10 <sup>4</sup>
No.3	1.7×10 <sup>4</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>	1.8×10 <sup>4</sup>	1.3×10 <sup>4</sup>
No.4	1.5×10 <sup>4</sup>	8.7×10 <sup>3</sup>	1.2×10 <sup>4</sup>	2.0×10 <sup>4</sup>
No.5	1.3×10 <sup>4</sup>	1.1×10 <sup>4</sup>	1.2×10 <sup>4</sup>	2.0×10 <sup>3</sup>
No.6	1.6×10 <sup>4</sup>	9.2×10 <sup>3</sup>	1.5×10 <sup>4</sup>	1.2×10 <sup>4</sup>
No.7	1.9×10 <sup>4</sup>	1.4×10 <sup>4</sup>	5.3×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>
No.8	1.3×10 <sup>4</sup>	2.2×10 <sup>4</sup>	8.9×10 <sup>3</sup>	1.8×10 <sup>4</sup>
平均	1.5×10 <sup>4</sup>	1.3×10 <sup>4</sup>	1.5×10 <sup>4</sup>	1.8×10 <sup>4</sup>

調製試験菌液 7.2×10<sup>5</sup> cfu/mL

表 4. ハンバーグ接種菌の EC 培地でのガス産生ならびに EMB 寒天培地上での発育確認

画分	発育確認とガス産生							
	<i>Escherichia coli</i>				<i>Klebsiella oxytoca</i>			
	14日間保存		28日間保存		14日間保存		28日間保存	
	EC培地	EMB培地	EC培地	EMB培地	EC培地	EMB培地	EC培地	EMB培地
No.1	ガス+	発育+	ガス+	発育+	ガス-	発育-	ガス-	発育-
No.2	ガス+	発育+	ガス+	発育+	ガス-	発育-	ガス-	発育-
No.3	ガス+	発育+	ガス+	発育+	ガス-	発育-	ガス-	発育-
No.4	ガス+	発育+	ガス+	発育+	ガス-	発育-	ガス-	発育-
No.5	ガス+	発育+	ガス+	発育+	ガス-	発育-	ガス-	発育-
No.6	ガス+	発育+	ガス+	発育+	ガス-	発育-	ガス-	発育-
No.7	ガス+	発育+	ガス+	発育+	ガス-	発育-	ガス-	発育-
No.8	ガス+	発育+	ガス+	発育+	ガス-	発育-	ガス-	発育-

注: *Escherichia coli* を接種したハンバーグについて EC 培地により 44.5±0.2℃、24 時間培養後のガス産生は弱い、同条件で 48 時間まで培養すると全ての画分で判定に十分なガス産生を認める。*Klebsiella oxytoca* については、EC 培地で培養後、EMB 寒天培地に培養液を塗抹しても接種菌の発育を認めない。

表5. 保存条件の違いによる *Escherichia coli* 接種ハンバーグの付着菌数と経日変化

保存条件	n 数	保存期間中の生菌数 (cfu/g)				
		接種当日	7 日間	14 日間	28 日間	35 日間
4°C	n=1	$2.4 \times 10^4$	—	$1.4 \times 10^4$	$7.6 \times 10^3$	$7.7 \times 10^3$
	n=2	$9.8 \times 10^3$	—	$8.9 \times 10^3$	$6.2 \times 10^3$	$8.2 \times 10^3$
	n=3	$1.0 \times 10^4$	—	$7.8 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$	$6.3 \times 10^3$
	平均	$1.5 \times 10^4$	—	$1.0 \times 10^4$	$8.3 \times 10^3$	$7.4 \times 10^3$
-20°C	n=1	$2.4 \times 10^4$	$7.8 \times 10^3$	$8.2 \times 10^3$	$3.5 \times 10^3$	—
	n=2	$9.8 \times 10^3$	$6.4 \times 10^3$	$5.8 \times 10^3$	$4.1 \times 10^3$	—
	n=3	$1.0 \times 10^4$	$4.4 \times 10^3$	$3.5 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	—
	平均	$1.5 \times 10^4$	$6.2 \times 10^3$	$5.8 \times 10^3$	$3.6 \times 10^3$	—

-20°C保存ハンバーグの解凍は、25°Cで3時間行った。

表6. 保存温度条件の違いによる *Escherichia coli* 接種ハンバーグの EC 培地ならびに BGLB 培地でのガス産生の確認

n 数	ガス産生量 (%) の確認																
	4℃保存						-20℃保存										
	28日間保存後						28日間保存後										
	24時間培養			48時間培養			24時間培養			48時間培養							
	EC (x10)	EC (x100)	BGLB	EC (x10)	EC (x100)	BGLB	EC (x10)	EC (x100)	BGLB	EC (x10)	EC (x100)	BGLB	EC (x10)	EC (x100)			
n=1	20	5	<5	25	30	70	60	60	40	5	10	5	30	30	70	60	60
n=2	20	15	5	30	30	70	60	50	5	10	<5	5	30	30	70	60	60
n=3	25	10	5	30	20	70	60	60	30	20	10	5	30	25	70	50	60

注： 表中の数値は、ダレーラム管全体を100%としたときの、ダレーラム管中に占めるガス産生量 (%) を示す

試験管中に添加された菌数は、4℃保存の場合 EC (x10)およびBGLB で約8.3×10<sup>2</sup>個、EC (x100)で約83個、-20℃保存の場合 EC (x10)およびBGLB で約3.6×10<sup>2</sup>個、

EC (x100)で約36個

表7. *Escherichia coli* 調製菌数の違いによるハンバーグ付着菌数と経日変化 (4°C保存)

調製菌液の菌数 (cfu/mL)	n 数	付着菌数の経日変化 (cfu/g)					
		接種当日	7日間	14日間	21日間	29日間	36日間
$9.8 \times 10^5$	n=1	$1.2 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$5.4 \times 10^3$	$1.5 \times 10^4$
	n=2	$1.2 \times 10^4$	$7.1 \times 10^3$	$8.2 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	$4.0 \times 10^3$	$5.5 \times 10^3$
	n=3	$8.4 \times 10^3$	$7.9 \times 10^3$	$6.5 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$	$6.1 \times 10^3$	$5.5 \times 10^3$
	平均	$1.1 \times 10^4$	$9.3 \times 10^3$	$9.9 \times 10^3$	$1.2 \times 10^4$	$5.2 \times 10^3$	$8.7 \times 10^3$
$8.7 \times 10^6$	n=1	$7.9 \times 10^4$	$7.7 \times 10^4$	$7.7 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$
	n=2	$5.6 \times 10^4$	$3.1 \times 10^4$	$5.4 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$6.9 \times 10^4$
	n=3	$5.8 \times 10^4$	$7.2 \times 10^4$	$4.3 \times 10^4$	$9.4 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	$7.9 \times 10^4$
	平均	$6.4 \times 10^4$	$6.0 \times 10^4$	$5.8 \times 10^4$	$9.8 \times 10^4$	$9.4 \times 10^4$	$9.3 \times 10^4$
$9.0 \times 10^7$	n=1	$9.6 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$5.7 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$6.6 \times 10^5$
	n=2	$4.2 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$	$4.9 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$	$7.4 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$
	n=3	$8.1 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$	$8.4 \times 10^5$	$5.5 \times 10^5$
	平均	$7.3 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$	$7.5 \times 10^5$	$7.9 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$5.2 \times 10^5$

表8. 試験菌種の違いによるハンバーグ付着菌数と経日変化 (4°C保存)

試験菌 (cfu/mL)	n 数	付着菌数の経日変化 (cfu/g)				
		接種当日	7日間	14日間	21日間	28日間
<i>E. coli</i> $9.0 \times 10^7$	n=1	$9.6 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$5.7 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$
	n=2	$4.2 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$	$4.9 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$	$7.4 \times 10^5$
	n=3	$8.1 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$	$8.4 \times 10^5$
	平均	$7.3 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$	$7.5 \times 10^5$	$7.9 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$
<i>K. oxytoca</i> $1.1 \times 10^8$	n=1	$1.2 \times 10^6$	$8.6 \times 10^5$	$3.3 \times 10^7$	$3.2 \times 10^6$	$4.4 \times 10^5$
	n=2	$1.3 \times 10^6$	$5.3 \times 10^5$	$1.1 \times 10^7$	$2.1 \times 10^6$	$2.4 \times 10^5$
	n=3	$1.0 \times 10^6$	$5.9 \times 10^5$	$6.9 \times 10^5$	—	$2.6 \times 10^5$
	平均	$1.2 \times 10^6$	$6.3 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	$2.6 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$
<i>A. calcoaceticus</i> $1.8 \times 10^7$	n=1	$2.9 \times 10^5$	$3.3 \times 10^5$	$3.1 \times 10^5$	$5.2 \times 10^5$	$6.5 \times 10^5$
	n=2	$2.4 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$7.6 \times 10^5$
	n=3	$5.6 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	—	$3.8 \times 10^4$
	平均	$3.3 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	$6.6 \times 10^5$	$8.4 \times 10^5$	$5.5 \times 10^5$

*E. coli*: *Escherichia coli*

*K. oxytoca*: *Klebsiella oxytoca*

*A. calcoaceticus*: *Acinetobacter calcoaceticus*

表9. 精度管理調査用試作試料の試験菌数推移と試験菌の経日的発育確認 (4°C保存)

試験菌 (調製菌数 cfu/mL)	保存期間と生菌数 (cfu/g)				
	接種当日	7日間	14日間	21日間	35日間
<i>E. coli</i> (8.0×10 <sup>7</sup> )	9.5×10 <sup>4</sup>	9.7×10 <sup>6</sup>	8.0×10 <sup>6</sup>	5.0×10 <sup>6</sup>	4.3×10 <sup>6</sup>
EC 培地中の発育確認*1	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生
BGLB 培地中の発育確認*2	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生
<i>K. oxytoca</i> (1.2×10 <sup>8</sup> )	1.4×10 <sup>6</sup>	8.1×10 <sup>6</sup>	5.4×10 <sup>6</sup>	3.6×10 <sup>6</sup>	3.0×10 <sup>6</sup>
EC 培地中の発育確認*1	発育せず	発育せず	発育せず	発育せず	発育せず
BGLB 培地中の発育確認*2	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生	発育・ガス産生

\*1: 44.5±0.2°Cで24時間培養した後、発育ならびにガス産生を判定した。

\*2: 35±2°Cで48時間培養した後、発育ならびにガス産生を判定した。

表 10. 4℃保存下での液卵中の生菌数変化に対する安定化剤の影響

試験菌 (初発菌数)	安定化剤の種類	保存期間中の生菌数 (cfu/g)		
		7日間	14日間	28日間
<i>S. Enteritidis</i> ( $1.4 \times 10^7$ cfu/g)	無添加 (Log)	$1.6 \times 10^7$ (7.20)	$6.6 \times 10^6$ (6.82)	$2.9 \times 10^5$ (5.46)
	SPG 10 (Log)	$4.3 \times 10^7$ (7.63)	$2.9 \times 10^7$ (7.46)	$1.8 \times 10^7$ (7.26)
	SPG 20 (Log)	$1.9 \times 10^7$ (7.28)	$1.7 \times 10^6$ (6.23)	$2.4 \times 10^5$ (5.38)
<i>P. mirabilis</i> ( $1.9 \times 10^7$ cfu/g)	無添加 (Log)	$1.6 \times 10^7$ (7.20)	$3.1 \times 10^7$ (7.49)	$5.3 \times 10^7$ (7.72)
	SPG 10 (Log)	$5.6 \times 10^7$ (7.75)	$1.9 \times 10^7$ (7.28)	$2.0 \times 10^8$ (8.30)
	SPG 20 (Log)	$1.7 \times 10^7$ (7.23)	$2.9 \times 10^7$ (7.46)	$1.9 \times 10^7$ (7.28)

表 11. 22.5℃保存下での液卵中の生菌数変化に対する安定化剤の影響

試験菌 (初発菌数)	安定化剤の種類	保存期間中の生菌数 (cfu/g)		
		1日間	2日間	3日間
<i>S. Enteritidis</i> ( $1.2 \times 10^7$ cfu/g)	無添加	$2.0 \times 10^8$	$2.9 \times 10^8$	$5.4 \times 10^8$
	SPG 10	$2.2 \times 10^8$	$3.1 \times 10^8$	$5.9 \times 10^8$
	SPG 20	$1.0 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$
<i>P. mirabilis</i> ( $1.4 \times 10^7$ cfu/g)	無添加	$4.2 \times 10^8$	$6.0 \times 10^8$	$7.1 \times 10^8$
	SPG 10	$3.3 \times 10^8$	$3.6 \times 10^8$	$5.2 \times 10^8$
	SPG 20	$7.0 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	$5.2 \times 10^8$

1日目より臭気発生、経日的に臭気の増強あり



表 12. *Salmonella* Enteritidis の接種菌数と液卵中の生菌数変化に対する安定化剤の影響

<i>S. Enteritidis</i>	安定化剤の種類 (接種菌数 cfu/g)	保存期間中の生菌数 (cfu/g)		
		7 日間	14 日間	28 日間
高濃度接種菌群	SPG 10-B ( $9.6 \times 10^5$ )	$7.8 \times 10^6$	$1.6 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$
	SPG 10-R ( $9.8 \times 10^5$ )	$5.3 \times 10^6$	$9.6 \times 10^6$	$2.6 \times 10^7$
	SPG 20-B ( $9.6 \times 10^5$ )	$4.1 \times 10^6$	$7.3 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$
	SPG 20-R ( $9.8 \times 10^5$ )	$3.1 \times 10^6$	$7.8 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$
低濃度接種菌群	SPG 10-B ( $9.5 \times 10^3$ )	$5.7 \times 10^5$	$4.5 \times 10^6$	$5.6 \times 10^6$
	SPG 10-R ( $8.5 \times 10^3$ )	$7.1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$4.7 \times 10^5$
	SPG 20-B ( $9.5 \times 10^3$ )	$9.9 \times 10^4$	$3.9 \times 10^5$	$8.0 \times 10^4$
	SPG 20-R ( $8.5 \times 10^3$ )	$3.3 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$1.3 \times 10^3$

表 13. *Proteus mirabilis* の接種菌数と液卵中の生菌数変化に対する安定化剤の影響

<i>P. mirabilis</i>	安定化剤の種類 (接種菌数 cfu/g)	保存期間中の生菌数 (cfu/g)		
		7 日間	14 日間	28 日間
高濃度接種菌群	SPG 10-B ( $8.3 \times 10^5$ )	$8.6 \times 10^6$	$8.3 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$
	SPG 10-R ( $1.2 \times 10^6$ )	$3.5 \times 10^6$	$4.4 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$
	SPG 20-B ( $8.3 \times 10^5$ )	$4.7 \times 10^6$	$4.7 \times 10^7$	$6.9 \times 10^7$
	SPG 20-R ( $1.2 \times 10^6$ )	$1.4 \times 10^6$	$7.1 \times 10^6$	$6.1 \times 10^7$
低濃度接種菌群	SPG 10-B ( $7.3 \times 10^3$ )	$6.8 \times 10^5$	$1.9 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8$
	SPG 10-R ( $9.7 \times 10^3$ )	$2.1 \times 10^5$	$1.8 \times 10^6$	$7.9 \times 10^7$
	SPG 20-B ( $7.3 \times 10^3$ )	$1.7 \times 10^5$	$1.5 \times 10^6$	$3.3 \times 10^7$
	SPG 20-R ( $9.7 \times 10^3$ )	$1.0 \times 10^5$	$5.5 \times 10^5$	$3.0 \times 10^7$

表 14. 液卵中の生菌数変化

試験菌	初発菌数 (cfu/g)	保存期間中の生菌数 (cfu/g)		
		7 日間	14 日間	28 日間
<i>S. Enteritidis</i>	$1.0 \times 10^4$	$6.1 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5$	$2.9 \times 10^6$
<i>P. mirabilis</i>	$8.6 \times 10^3$	$4.4 \times 10^4$	$6.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7$

保存温度：4℃、安定化剤：SPG 10-R

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と  
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書（平成 16 年度）

食品衛生検査精度管理調査  
における適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その 2）  
—理化学的検査調査試料の作製に関する研究—

主任研究者	柳澤 健一郎	(財) 食品薬品安全センター秦野研究所	特別参事
分担研究者	大島 赴夫	(財) 食品薬品安全センター秦野研究所	部長
協力研究者	福原 克治	(財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	鈴木 達也	(財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長補佐

研究要旨

食の安全及び安心を確保するために「食品安全基本法」が制定され、それに伴い食品安全委員会が設置された。当委員会は、食品の健康への影響評価（リスク評価）、リスクコミュニケーションの促進及び緊急事態への対応等が主な役割としている。その施策には、信頼できる試験・検査結果に基づいたデータが必須である。試験・検査結果の信頼性を確保する規格には、国際的にはISO17025（試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項）が認知されている。わが国では、食品衛生法に基づく「登録検査機関における製品検査のための業務管理要綱」及び「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要綱」が通知され、それぞれの検査機関は、業務管理について具体的事項を定め、検査等の信頼性の確保が求められている。検査等の信頼性の確保のためには、なかでも精度管理調査（内部、外部）が重要な項目である。この精度管理調査を実施するに当たり、検査対象物質の濃度が均一で、検査期間において濃度が安定であることが求められる。このような目的で、検査対象物質の濃度が均一で安定な試料の開発を検討、研究した報告は極めて少なく、検査の調査のための適切な試料の開発が遅れている。

今年度は、重金属（カドミウム）、残留農薬（有機リン系農薬）および残留動物用医薬品（フルベンダゾール）の検査における調査試料について検討した。重金属検査試料として粉碎した白米、残留農薬検査試料としてとうもろこしおよび残留動物用医薬品検査試料として液卵を使用し、それぞれの濃度の均一性および安定性について検討した。

その結果、いずれの検討試料についても適切な結果が得られ、重金属、残留農薬および残留動物用医薬品の検査に使用できる調査試料を開発することができた。

A. 研究目的

食品衛生検査を実施している検査機関の外部精度管理調査に使用する「調査試料」の作製方法を確立することを目的として、以下の検討を実施した。

B. 研究方法

1. 重金属（カドミウム）検査試料

重金属（カドミウム）検査に使用する調査試料として、白米にカドミウムを添加して、そのカドミウム濃度の均一性について調べた。

1) 試料基材および試薬

白米：ひとめぼれ、宮城県産、生産年 2003 年、硝酸、硫酸：有害金属測定用、関

東化学株式会社、カドミウム標準液（1000 ppm）：原子吸光分析用、関東化学株式会社、ジエチルジチオカルバミン銀酸（DDTC）、メチルイソブチルケトン（MIBK）：原子吸光分析用。和光純薬工業株式会社、水：日局 注射用水、光製薬株式会社

## 2) 試料作製

### ①カドミウム添加白米（添加白米）

硝酸酸性溶液にカドミウム標準液（1000 ppm）を加えた後、水で 20 L に定容し、濃度 2 ppm のカドミウム溶液を調製した。この溶液に白米 15 kg を添加した後、24 時間静置した。この間 5 回、良く攪拌した。ザルで白米を採り、ろ紙上に 3 日間放置して、水分を蒸散した（添加白米）。無作為に白米 10 g を採取してカドミウム濃度を測定した。

### ②粉碎白米

①で作製したカドミウム添加白米に適量のカドミウム無添加白米を加え、遠心粉碎機で粉碎して粉碎白米を作製した（作製予定濃度約 0.267 ppm）。

## 3) 測定法

試料 10 g をケルダール分解フラスコに量り、硝酸 40 mL を添加して、加熱、分解した。硝酸による激しい反応が終了後、硫酸 20 mL を加え、溶液が暗色になったら硝酸を 2~3 mL 追加して溶液が透明になるまで加熱を繰り返した。分解液を水で希釈しながらメスフラスコに移し、100 mL に定容した。この試料液 50 mL を採り、DDTC-MIBK 法により抽出を行い、原子吸光光度法により以下の条件でカドミウムを測定した。

原子吸光光度計の条件

原子吸光光度計 AA-660 株式会社 島津製作所

使用ガス 可燃性ガス；アセチレン  
支燃性ガス；空気

ランプ 中空陰極ランプ

波長 カドミウム； 228.8 nm

2. 残留農薬（有機リン系農薬）検査試料  
とうもろこしを使用して、残留農薬（有機リン系農薬）検査に使用する調査試料の作製法について検討した。

## 1) 試料基材および試薬

とうもろこし（マイクロペースト状食材）：株式会社 新進、クロルピリホスおよびマラチオン：残留農薬分析用、関東化学株式会社、ヘキササンおよびアセトニトリル：残留農薬分析用、和光純薬工業株式会社

## 2) 試料作製

とうもろこしの冷凍品を一昼夜、冷蔵庫中で解凍して、その 5 kg を速やかにテフロンコーティングステンレス容器（20 L 容）に採り、これに有機リン系農薬（クロルピリホスおよびマラチオン）のアセトン溶液を添加した。ハンドミキサーで 5 分間ずつ 3 回攪拌した後、ポリプロピレン製容器に小分けにした（作製予定濃度 クロルピリホス 0.080 ppm、マラチオ 0.320 ppm）。小分けした容器から無作為に 10 個ずつ採取して、それぞれ繰り返し 2 回、有機リン系農薬を測定した。小分けした残りの容器は、冷蔵庫および冷凍庫に保管してそれぞれ濃度の安定性を調べた。

## 3) 測定法

試料 20 g を秤量して分液ロートに採り、アセトン 100 mL を加えて 5 分間振とう・抽出した。ろ過を行い、残渣に新たなアセトン 100 mL を加えて 5 分間振とう・抽出を行い先のろ液と合わせて、約 25 mL まで減圧濃縮した。濃縮液に 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えた後、20% 酢酸エチ

ル含有ヘキサン 100 mL ずつで、2回、振とう・抽出（10 分間）した。有機溶媒層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下（40℃以下）で濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をアセトン 5 mL で溶解してガスクロマトグラフに供した。

#### ガスクロマトグラフ条件

ガスクロマトグラフ：島津製作所 GC-17A（炎光光度型検出器付）

カラム：DB-210（内径 0.25 mm、長さ 30 mm、膜厚 0.25 μm）

注入口温度：260℃、検出器温度：260℃

カラムオープン温度：60℃（2 min）、昇温 20℃/min、240℃（15 min）キャリアガス：ヘリウム、流量：0.8 mL/min 線速度：19 cm/sec、水素：60 kpa 空気：70 kpa、試料導入：スプリットレス

### 3. 残留動物用医薬品（フルベンダゾール）検査試料

液卵について残留動物用医薬品（フルベンダゾール）検査に使用する調査試料の作製法の再現性について検討した。

#### 1) 基材および試薬

液卵：市販の鶏液卵、フルベンダゾール：残留動物用医薬品検査用、関東化学株式会社、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノール、無水硫酸ナトリウム：試薬特級、和光純薬工業株式会社、アセトニトリル、メタノール：高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業株式会社

#### 2) 試料作製

水約 1 kg にフルベンダゾールを含むメタノール溶液（20 μg/mL）約 100 mL および液卵 4 kg を加え良く攪拌した。全量の水で 8 kg に調整し良く攪拌した後、ポリ

エチレン製容器に約 25 g ずつ分注した。フルベンダゾール作製予定濃度は、0.280 ppm とした。

#### 3) 測定法

測定操作は食品衛生法に準拠した。液卵 2.5 g を採取して酢酸エチル 50 mL ずつで 2回抽出し、抽出液を硫酸ナトリウムで脱水した後、濃縮乾固した。残渣をアセトニトリル 50 mL で溶解した後、アセトニトリル飽和ヘキサン 50 mL ずつ 2回抽出して、油脂分を除去した。アセトニトリル層を濃縮乾固し、高速液体クロマトグラフの移動相 1 mL に溶解して、高速液体クロマトグラフで測定した。

#### 高速液体クロマトグラフ条件

高速液体クロマトグラフ：島津製作所 LC-10A、検出器：島津製作所 SPD-10A、検出波長：290 nm、カラム：mightysil RP-18(H)(150×6.0 mm)、移動相：アセトニトリル：メタノール 7：13、流量：1.0 mL/min、カラムオープン：40℃

#### （倫理面への配慮）

食の安全・安心に係わる研究であり、特に倫理面への配慮を必要としなかった。実験者および環境への配慮としては、有害な溶媒（ベンゼン等）を使用しなかった。

### C. 研究結果

#### 1. 重金属（カドミウム）検査調査試料の作製

粉碎白米（予定作製濃度約 0.267 ppm）については、小分けにした容器から無作為に容器 10 個採取し、それぞれの容器について n=2 で、カドミウム濃度を測定して濃度の均一性を調べた。その結果、作製予定濃度約 0.267 ppm に対して、作製した調査試料の濃度は、0.257 ppm、標準偏差