

RP-18(H)(150 × 4.6 mm)、移動相 : 0.025mol/mL リン酸二水素ナトリウム : アセトニトリル 17 : 3、流量 : 1.0 mL/min

(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. D. 研究結果及び考察

1. 重金属（カドミウム）の玄米調査試料の検討

カドミウム溶液に玄米を浸漬し、一定時間放置後、玄米を取り出し乾燥させた。カドミウム添加玄米試料を作製する際の浸漬用カドミウム溶液の酸濃度及び浸漬後の放置時間について検討した。玄米浸漬液の硝酸濃度を 0.005、0.01 及び 0.1mol/L としてカドミウム濃度を 0.5 μ g/mL、TBZ 濃度を 500 μ g/mL、浸漬時間を 24 時間とし、カドミウム添加玄米を作製し、それぞれの試料中カドミウム濃度を測定した。その結果、硝酸濃度が 0.005mol/L では 0.62 \pm 0.03 μ g/g、0.01mol/L では 0.65 \pm 0.02 μ g/g であり、いずれの濃度でも浸漬液中カドミウム濃度の約 1.2 倍となった。一方、0.1mol/L では 0.15 \pm 0.02 μ g/g であり、浸漬液中カドミウム濃度の約 1/3 であった (表 1)。また、玄米浸漬時間を 6、24 及び 48 時間として、硝酸濃度を 0.01mol/L、カドミウム濃度を 0.5 μ g/mL、TBZ 濃度を 500 μ g/mL とし、カドミウム添加玄米を作製し、カドミウム濃度を測定したところ、いずれの浸漬時間においても 0.65～

0.68 μ g/g であり、玄米浸漬時間によるカドミウム濃度の差は認められなかった。いずれの酸濃度あるいは浸漬時間においても、水分は 13～14%であり、浸漬前のカドミウム無添加玄米の水分 13.4%とほぼ同等であった (表 1)。

これらの処理条件から、以下の作製条件 (浸漬液の酸濃度 : 0.01mol/L、浸漬時間 : 24 時間、カドミウム濃度 : 1 μ g/mL、TBZ 濃度 : 500 μ g/mL) を設定し、カドミウム高濃度添加玄米を作製した。次いで、この高濃度添加玄米中のカドミウム濃度を測定後、カドミウム無添加玄米を混合し、目的とする濃度の検査試料を作製した。

カドミウム高濃度米を作製して、濃度を測定 (表 2) した後、カドミウム無添加米 (表 3) と混合・攪拌および遠心粉碎機で粉碎・混合して作製した混合玄米 (作製予定濃度約 0.41 ppm) については、小分けにした容器から無作為に容器 10 個を採取し、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 0.41 ppm に対して、作製した調査試料の濃度は、0.405 \pm 0.004ppm、変動係数 1.0%と、作製予定濃度に対して 98.8%と近似した濃度の試料を作製することができた。また、この時の F 比が、1.462 と 5%水準 (F 値 3.02) より小さく、精度管理調査に使用する調査試料として均一な濃度を確保することができた (表 4)。また、作製後、120 日間の冷蔵保管における安定性を同様に調べた結果、作製当日のカドミウム濃度に対する作製 120 日後の濃度は 99.5 \pm 0.8%であり、調査試料としては十分な期間の安定性が確認された。また、水分について

は、作製時、作製 120 日後のいずれにおいても $13.3\pm 0.1\%$ であり、安定していた。

2. 有機リン系残留農薬調査試料の検討

有機リン系農薬（EPN、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、フェンチオンおよびマラチオン）を添加したかぼちゃペースト及びサツマイモペーストの小分けした容器から無作為に 10 個ずつ採取し、それぞれ 2 回繰り返し測定し、均一性を調べた。

かぼちゃペーストではいずれの農薬も 92~106%の回収率を示した。F 値はそれぞれ EPN 0.93、クロルピリホス 1.07、ダイアジノン 1.63、フェニトロチオン 1.84、フェンチオン 2.64 およびマラチオン 1.77 であった（表 5）。一方、サツマイモペーストでは、回収率は 84~94%、F 値がそれぞれ EPN 2.77、クロルピリホス 1.75、ダイアジノン 1.99、フェニトロチオン 1.34、フェンチオン 1.76 およびマラチオン 3.03 であった（表 6）。これらの F 値は、サツマイモペーストのマラチオン以外 5%水準（F 値 3.02）より小さく、精度管理調査に使用する調査試料として均一な濃度を確保することができた。試料を作製するとき、かぼちゃペーストはハンドミキサーで混合可能であったが、サツマイモペーストは含水量が少なく、ハンドミキサーでは混合できず、手で混合した。また、回収率もかぼちゃと比較すると低いことと作製時の再現性等を考慮し、かぼちゃペーストを使用することとした。また、農薬の項目は、均一性が良く、検出事例の多いクロルピリホスとやはり均一性の良い EPN とした。かぼちゃペーストに EPN 及びクロルピリホスを添加し作製後、100 日

間の冷凍保管における安定性を調べた結果、作製当日の濃度に対する作製 100 日後の濃度は、EPN 96.0%、クロルピリホス 95.0%であり、かぼちゃペーストの調査試料として十分な期間の安定性が確認された（表 7、8）。

3. 残留動物用医薬品のための調査試料 基材の基礎的検討

豚（ヒレ肉）をミンチにし、マルチグラインダーを使用し、ペースト状にし、サルファ剤 8 種（SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMXZ、SDMX、SQ）を添加混合し、均一性を調べた。n=10 による結果、低濃度試料では、作製予定濃度 $0.1\mu\text{g/g}$ に対して 104.4~44.7%、変動係数 14.5~51.5%、高濃度試料は、作製予定濃度 $1.0\mu\text{g/g}$ に対して、73.4~44.7%、変動係数 7.7~25.8%であった（表 9）。作製した試料の濃度は、作製予定濃度よりほとんどのサルファ剤で低く、ばらつきも大きかった。今後、ペースト状の肉にサルファ剤を添加し、混合する方法及び肉を柔らかくするための水添加等の検討が必要であると考えられた。

E. 結論

精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料を作製することを目的とし、実分析に即した調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

1. あらかじめカドミウムを添加して作製した玄米のカドミウム濃度を測定し、これにカドミウム無添加玄米を加えて希釈し、遠心粉碎機で粉碎・混合する方法が、目的とする作製予定濃度の試料を作

製できること、および濃度の均一性が確保できる適切な方法であることが分かった。

2. 収穫後に水蒸気処理を行ったかぼちゃ及びサツマイモペースト（ミクロペースト状食材）を使用し、有機リン系農薬 6 種（EPN、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、フェンチオンおよびマラチオン）を添加混合して、均一な濃度の試料を作製できることがわかった。かぼちゃペーストとサツマイモペーストを比較し、回収率及び作製の再現性から、かぼちゃペーストを採用することとした。また、かぼちゃペーストに添加した農薬の安定性も確認され、精度管理調査における適正な試料であることがわかった。

3. 豚（ヒレ肉）をミンチにし、マルチグラインダーを使用し、サルファ剤 8 種（SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMXZ、SDMX、SQ）を添加混合し、試

料作製したが、良好な均一性は得られなかった。試料とサルファ剤を混合する方法に関して、検討が必要なことがわかった。

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 カドミウム濃度に対する浸漬溶液の酸濃度と放置時間の影

試料	HNO ₃ 濃度 (mol/L)	浸漬時間 (時間)	Cd濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TBZ濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	カドミウム濃度測定結果($\mu\text{g}/\text{g}$)			水分(%)					
					1	2	3	平均 \pm SD	1	2	3	平均 \pm SD	
A	0.005	24	0.5	500	0.59	0.62	0.65	0.62 \pm 0.03	13.1	13.1	13.1	13.1	13.1 \pm 0.0
B	0.01	24	0.5	500	0.64	0.67	0.65	0.65 \pm 0.02	13.1	13.2	13.1	13.1	13.1 \pm 0.1
C	0.1	24	0.5	500	0.14	0.14	0.17	0.15 \pm 0.02	12.9	12.9	12.9	12.9	12.9 \pm 0.0
D	0.01	6	0.5	500	0.69	0.64	0.71	0.68 \pm 0.04	13.5	13.5	13.5	13.5	13.5 \pm 0.0
E	0.01	24	0.5	500	0.64	0.67	0.65	0.65 \pm 0.02	13.1	13.2	13.1	13.1	13.1 \pm 0.1
F	0.01	48	0.5	500	0.62	0.66	0.67	0.65 \pm 0.03	13.9	13.9	13.9	13.9	13.9 \pm 0.0

表 2 カドミウム高濃度添加玄米中カドミウム濃度

試料番号	測定 1	測定 2	平均濃度($\mu\text{g/g}$)
1	1.06	1.08	1.07
2	1.12	1.09	1.11
3	1.08	1.09	1.09
4	1.05	1.03	1.04
5	1.07	1.00	1.04
6	1.03	1.06	1.05
7	1.13	1.05	1.09
8	1.05	1.03	1.04
9	1.10	1.13	1.12
10	1.07	1.01	1.04
平均			1.07
SD			0.03
F 比			1.952

表 3 カドミウム無添加玄米中のカドミウム濃度及び水分量

	カドミウム濃度($\mu\text{g/g}$)	水分(%)
1	0.02	13.4
2	0.03	13.4
3	0.03	13.3

表 4 カドミウムの玄米調査試料の均一性

	カドミウム($\mu\text{g/g}$)
平均値	0.405
標準偏差	0.004
変動係数	0.00988
F 比	1.462006
上の値に対する有意確立	0.280583
有意水準 5%点	

ここで F 比の値について自由度は(9,10)である。

表 5 有機リン系残留農薬のかぼちゃペースト中の均一性

有機リン系残留農薬	作製予定濃度 ($\mu\text{g/g}$)	平均濃度 ($\mu\text{g/g}$)	SD	CV(%)	F 比
ダイアジノン	0.1	0.0924	0.0032	3.5	1.63
クロルピリホス	0.1	0.0924	0.0077	8.3	1.40
馬拉チオン	0.1	0.0995	0.0057	5.7	1.77
EPN	0.1	0.0926	0.0074	8.0	0.93
フェンチオン	0.05	0.0531	0.0059	11.1	2.64
フェニトロチオン	0.2	0.198	0.0179	9.0	1.84

表 6 有機リン系残留農薬のサツマイモペースト中の均一性

有機リン系残留農薬	作製予定濃度 ($\mu\text{g/g}$)	平均濃度 ($\mu\text{g/g}$)	SD	CV(%)	F 比
ダイアジノン	0.1	0.0924	0.0032	3.5	1.99
クロルピリホス	0.1	0.0924	0.0077	8.3	1.75
馬拉チオン	0.1	0.0995	0.0057	5.7	3.03
EPN	0.1	0.0926	0.0074	8.0	2.77
フェンチオン	0.05	0.0531	0.0059	11.1	1.76
フェニトロチオン	0.2	0.198	0.0179	9.0	1.34

表 7 EPN 用かぼちゃペースト調査試料の均一性

試料番号	測定 1	測定 2	平均濃度($\mu\text{g/g}$)
1	0.142	0.171	0.1565
2	0.171	0.180	0.1755
3	0.195	0.182	0.1885
4	0.198	0.191	0.1945
5	0.190	0.170	0.1800
6	0.183	0.178	0.1805
7	0.177	0.186	0.1815
8	0.182	0.177	0.1795
9	0.180	0.174	0.1770
10	0.180	0.180	0.1800
平均			0.1793
SD			0.00979
CV(%)			5.5
F 比			2.24

表 8 クロルピリホス用かぼちゃペースト調査試料の均一性

試料番号	測定 1	測定 2	平均濃度(μg/g)
1	0.0175	0.0180	0.01775
2	0.0184	0.0190	0.01870
3	0.0162	0.0185	0.01735
4	0.0190	0.0175	0.01825
5	0.0200	0.0199	0.01995
6	0.0183	0.0182	0.01825
7	0.0182	0.0181	0.01815
8	0.0176	0.0177	0.01765
9	0.0176	0.0176	0.01760
10	0.0184	0.0176	0.01800
平均			0.0182
SD			0.00074
CV(%)			4.1
F 比			2.48

表 9 サルファ剤用食肉(豚ヒレ肉)調査試料の添加回収率

サルファ剤	低濃度試料(μg/g)			高濃度試料(μg/g)		
	回収率(%)	SD	CV(%)	回収率(%)	SD	CV(%)
SDZ	104.4	0.0305	29.2	73.7	0.2378	17.5
SMR	62.1	0.0143	23.0	69.6	0.1293	18.6
SDD	63.1	0.0102	16.1	66.9	0.1441	21.5
SMPD	102.1	0.0149	14.5	66.9	0.1727	25.8
SMMX	56.1	0.00864	15.4	66.6	0.1158	15.0
SMXZ	47.6	0.0113	23.7	66.5	0.1077	16.2
SDMX	44.7	0.0105	23.5	60.2	0.04624	7.7
SQ	47.0	0.0242	51.5	56.9	0.1019	17.9

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料の作製と

信頼性確保に関する研究（その 2）

－食品基材中の大腸菌群の安定性確保に関する検討－

主任研究者	遠藤	明	（財）食品薬品安全センター	理事長
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
研究協力者	鈴木	達也	（財）食品薬品安全センター	秦野研究所 室長補佐
	山田	健一	（財）食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	中阪	聡亮	（財）食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	山本	奈々美	（財）食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	梶原	三智香	（財）食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員

研究要旨

大腸菌群の検査を対象とした食品衛生外部精度管理調査の実施にあたり、大腸菌群検査のための基材として魚肉練り製品を選択し、基材への菌接種に伴う均一性ならびに冷蔵保存した際の安定性について検討し、試験菌の増減を抑制した安定な調査試料の提供のための条件検討を行った。ちくわ 2 種、つみれおよびかまぼこの計 4 種の魚肉練り製品を用いて、それぞれに *Klebsiella oxytoca* あるいは *Acinetobacter calcoaceticus* を懸濁した菌液中に漬け込んだ後、これを取り出すことにより作製した大腸菌群検査用調査試料の安定性について確認したところ、ちくわ B を除く 3 種の試料では菌液接種後 7 日目において 2 オーダー程度の菌数増加が認められるものの、その後は菌液接種 28 日後まで安定して添加菌が回収されることが明らかとなった。これに対してちくわ B では *A. calcoaceticus* では接種後 28 日目まで安定した菌数変化を示したが、*K. oxytoca* では菌液添加後 28 日目で接種時よりも 1 オーダーの低下が認められた。

以上のことから、魚肉練り製品を対象とした食品衛生外部精度管理調査試料として十分に使用しうるものと判断された。

- A. 研究目的
- 検査) 試料の作製にあたり特に考慮しな
食品衛生外部精度管理調査 (特定微生物 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」ならびに試験に用いる培地の組み合わせが挙げられる。これまで大腸菌群検査用調査試料としてマッシュポテトを採用したが、この試料は作製後 1 ヶ月間は検査に耐えるものではあったが、基材中に接種した菌数が徐々に減少し、1 ヶ月で約 2 オーダーの菌数減少が認められていた。そこで新たにハンバーグを基材として採用し、食品衛生外部精度管理調査を実施してきたが、この基材は調査試料の輸送に伴う接種菌の死滅が少なく比較的安定して接種菌を回収することができるものであった。そのためこれまでに確立した加熱食肉製品以外の食品・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を新たに開発することとした。実食材を基材として採用して調査試料を作製する場合には、基材の変質抑制や接種菌の安定性について気を付ける必要があるが、試験菌を人為的に添加した食材中で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（通常選択される試験培地の組み合わせを含む）で確実に菌を検出することができるような調査試料であることが必須となる。

そこで今年度は食品・添加物等規格基準に示されている食品カテゴリーのうち、魚肉練り製品を対象とした調査試料作製を行うこととし、滅菌後の物性変化ならびに試験菌添加後の安定性について検討することとした。

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 2 菌種を用いた。

Klebsiella oxytoca HIC 12023

Acinetobacter calcoaceticus HIC 12071

2. 基材

大腸菌群検査用調査試料の作製には、市販のちくわ 2 種、つみれおよびかまぼこの計 4 種を用いた。なお、これらの基材については使用前に 121℃で 30 分間の高圧蒸気滅菌を行ったものを以下の検討に使用した。

3. 試料の調製

各試験菌液（ 10^8 colony forming units (cfu)/mL）に安定化剤を加え、これに市販のちくわ、つみれ、かまぼこを漬け込んだ後、すぐに取り出した。余分な水分を拭いた後、滅菌済み袋に試料を入れ、4℃にて保存した。

4. 魚肉練り製品の高圧蒸気滅菌後の性状変化

市販されている魚肉練り製品 4 種について、121℃、30 分間の高圧蒸気滅菌を行い、滅菌後の製品の変化について目視により観察した。

5. 魚肉練り製品中の生菌数ならびに大腸菌群検査による検出確認

各作製試料中の生菌数測定は、菌液接種後 7 日ごとに標準寒天培地を用いて実施した。また作製試料について作製 28 日後に大腸菌群検査を公定法に従って実施した。すなわち、試料の 10 倍希釈溶液の 1mL を BGLB 培地 9mL に加え、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24～48 時間培養した後、ダーラム管中のガス産生を確認した。ガス産生が確認された培地については、この 1 白金耳を EMB 寒天培

地に塗抹し、陽性集落の発育の有無を確認した。さらに得られた陽性集落について簡易同定キットを用いた同定検査を行い、添加菌と同一菌種であることを確認した。

C. 研究結果

1. 調査試料の高圧蒸気滅菌後における物性変化

現在、精度管理調査試料として用いる場合には他の混入菌の影響を防ぐため、作製前に高圧蒸気滅菌を行い、これに目的とする菌種を添加するという方法をとっている。そのため、基材として採用するうえで、高圧蒸気滅菌後の物性変化が小さいことは重要なポイントとなる。そこで、市販のちくわ2種、つみれ、かまぼこの計4種の魚肉練り製品を121℃、30分間の高圧蒸気滅菌を行い、物性の変化について観察した(表1)。

その結果、ちくわの場合には横置きして滅菌を行うことにより形状がつぶれてしまうため、縦置きにして滅菌を行う必要性があった。また高圧蒸気滅菌を行うことにより若干の褐変が認められた。また、かまぼこでは高圧蒸気滅菌後に大きく形状が変形し、表面の色調も元のものとは明らかに変わっていた。これに対してつみれでは高圧蒸気滅菌によっても大きな変形は認められず、かつ変色についても他の3種に比較するとその変化は小さいものであった。

2. 調査試料の冷蔵保存時の安定性

滅菌後の4種の魚肉練り製品に *K. oxytoca* あるいは *A. calcoaceticus* を接種した後、冷蔵保存した際の菌数変化について28日目まで観察した結果を図1および図2に示した。10⁸ cfu/mLの菌液に試料を漬け

込んだ後の生菌数は約10⁶ cfu/gであった。これを冷蔵保存することにより、ちくわBを除く3種の試料は *K. oxytoca* および *A. calcoaceticus* の両者において菌液接種後7日目に約10⁸ cfu/gまで増加し、これは接種後28日目まで継続した。一方、ちくわBの場合には *A. calcoaceticus* では大きな菌数変動は認められなかったものの、*K. oxytoca* では接種菌が減少する傾向が認められ、接種後28日目には接種時と比較すると約1オーダー程度減少した(図1および図2)。

3. 調査試料からの大腸菌群の検出

調査試料に菌液を接種した後、少なくとも28日間は接種菌数が確保されていることが明らかとなったことから、菌液接種後28日目に各調査試料について大腸菌群検査を行ったところ、全ての *K. oxytoca* 接種試料においてBGLB培地での増菌ならびにガス産生が認められ、その1白金耳をEMB寒天培地に塗抹したところ、陽性集落の形成を認めた。また、得られた陽性集落の生化学的性状を簡易同定キットを用いて行ったところ、*K. oxytoca*を確認し、外部汚染による発育集落ではないことを確認した。

D. 考察

ハンバーグに代わる実食材を用いて大腸菌群検査を行うための調査試料を試作し、高圧蒸気滅菌後の物性変化、冷蔵保存時の接種菌の安定性および公定法による添加菌の検出について検討した。

大腸菌群検査用調査試料として新たに魚肉練り製品を採用し、ちくわ2種、つみれ、かまぼこについて検討を行ったが、かまぼこを除く3種については滅菌方法を考慮す

ることにより高圧蒸気滅菌後の変形ならびに変色を最小限に抑えることができることが明らかとなった。またこれまでの結果から試験菌液に安定化剤を添加することにより低温保存においても接種菌の死滅を少なくすることができることが明らかとなっていたため、本研究においても安定化剤を添加したが、冷蔵保存によっても増菌傾向が認められた。本来であれば試験菌の接種後に大幅な菌数変動がないものが望ましいと考えられるが、外部精度管理調査において最も懸念すべき事項は検査期間中に対象微生物が検出できなくなることである。この点から判断した場合、本研究において試作した調査試料は作製後 28 日目においても対象微生物を公定法により検出することができ、かつその生菌数は 10^8 cfu/g 程度であったことから、長期間の保存においても定性検査を行ううえでは大きな問題はないものと考えられた。しかしながら、検査法として大腸菌群数検査も存在することから、今後接種菌の変動が小さい基材あるいは接種方法について検討する必要性があるものと考えられた。

E. 結論

食品衛生外部精度管理調査の大腸菌群検査用調査試料として、これまでにマッシュポテトやハンバーグといった基材を採用し、均一かつ安定な調査試料を提供してきたが、新たに魚肉練り製品を対象とした調査試料を作製すべく、市販製品に対象菌を添加することにより、その安定性ならびに基本性状について検討した。

大腸菌群検査用調査試料としてちくわ 2 種、つみれおよびかまぼこを採用し、高圧

蒸気滅菌後の物性変化について確認したところ、かまぼこでは形状の変形が認められたが、これ以外の 3 種の基材については若干の褐変が認められるものの大きな物性の変化は認められなかった。そこで、これらの 4 種の基材を菌液 (*K. oxytoca* および *A. calcoaceticus*) に漬け込み、これを冷蔵保存することにより接種菌の安定性について検討した。その結果、菌液接種後 7 日目において 2 オーダー程度の菌数増加が認められたが、その後 28 日目まで安定して接種菌を回収することができた。またちくわ B については *A. calcoaceticus* では菌液接種後大きな変動は認められなかったものの、*K. oxytoca* において菌液接種 28 日目に約 1 オーダーの菌数減少が認められた。さらに菌液接種後 28 日目に公定法による大腸菌群検査を行い、*K. oxytoca* 接種群において BGLB 培地での増菌ならびにガス産生を認め、その後の選択培地上での典型集落の形成を認めた。以上のことから今回試作した魚肉練り製品は大腸菌群検査用調査試料として十分に使用に耐えうるものと判断された。しかしながら、今後の食品衛生外部精度管理調査の実施にあたり、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かつ安定な調査試料の作製を継続して検討する必要がある、これまでに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」、「調査試料の輸送条件における試験菌数の変動」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似した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られる。

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 市販魚肉練り製品の高圧蒸気滅菌後の物性変化

製品	滅菌後の性状
ちくわ A	若干の変形、褐変あり 滅菌時に縦置きの状態で行う必要がある
ちくわ B	若干の変形、褐変あり 滅菌時に縦置きの状態で行う必要がある
つみれ	変形、変色は認められない 滅菌時の基材の設置方法による差が認められない
かまぼこ	大きな変形が認められ、かつ変色が大きい

全ての基材について 121℃、30 分間の高圧蒸気滅菌を行った。なお、性状の変化は目視により行った。

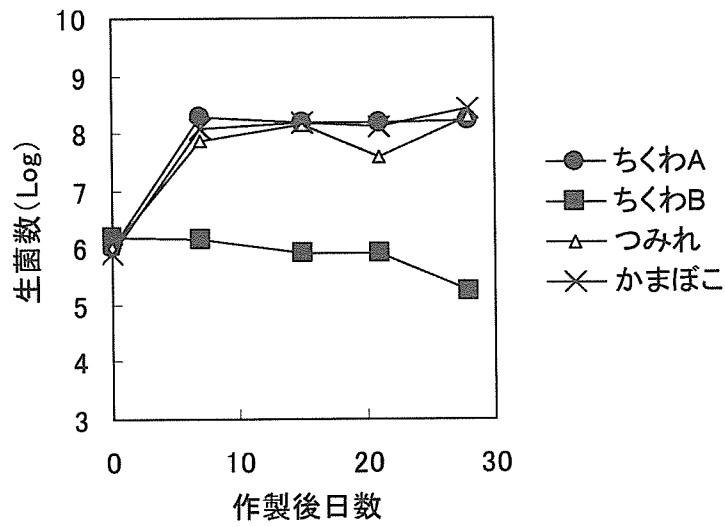


図1 *K. oxytoca* 接種した魚肉練り製品における菌数変化
 図中の数値は基材 1g あたりの生菌数を示す。

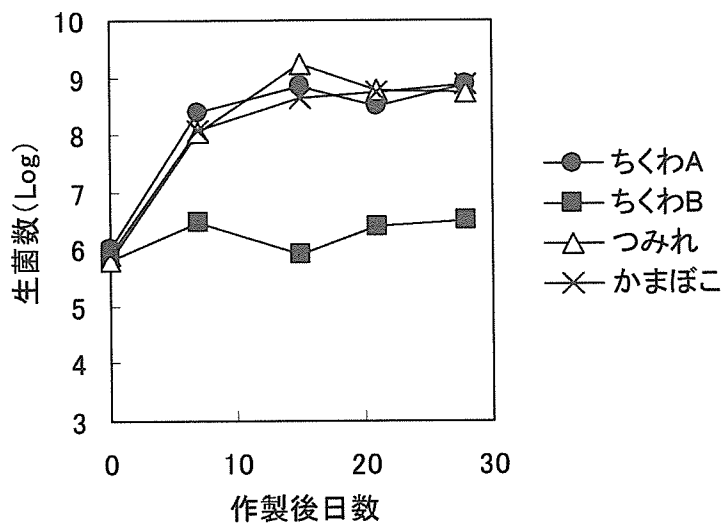


図2 *A. calcoaceticus* 接種した魚肉練り製品における菌数変化
 図中の数値は基材 1g あたりの生菌数を示す。

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料作製と
信頼性確保に関する研究（その 3）

—食品中のアレルギー関連物質検査の外部精度管理に関する調査試料の作製検討—

主任研究者 遠藤 明 (財)食品薬品安全センター 理事長
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 食品衛生事業部長
協力研究者 笠間 菊子 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所 研究員
井上 雪乃 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所 研究員

研究要旨

アレルギー物質を含む特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生）については平成 13 年 4 月に食品への表示が義務化されたのに伴い、厚生労働省からの通知に従って検査が行われている。特定原材料検査の精度の適正化および向上のためには外部精度管理の実施が不可欠でそのための配布用試料が必要となった。本年度は特定原材料のうち主に牛乳用試料の調製について検討した。2 種のスキムミルクおよび Whole Milk Powder を用いてタンパク質の抽出を行い、抽出液のタンパク質量を化学的方法と ELISA 法で測定すると共に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その結果タンパク質の回収率が最も良く、変性も少ないと認められたスキムミルク粉末（和光）を、抽出用原料として用いることとした。抽出液については -80°C での、抽出液を添加した食材については -20°C での保存安定性を検討した結果、12 週後までの安定性が確認でき、精度管理に使用可能な試料が作製できたと考えられた。

ELISA 法と、ウエスタンブロット法で異なる抽出溶媒を使用する厚生労働省の通知法に対応するため、卵またはスキムミルクをそのまま添加した模擬食材試料の作製を行った。作製試料について回収率、および -20°C での安定性を検討した結果、卵、牛乳添加試料共に ELISA 法による測定値、ウエスタンブロットによる確認試験ともほぼ満足できる結果が得られ、ELISA 法と、ウエスタンブロット法の両方に対応できる精度管理試料が作製できたと考えられた。

A. 研究の目的

アレルギー体質を持つ人の健康危害の発生を防止するため平成 13 年 4 月にアレルギー

一物質を含む原材料 24 品目について食品への表示が義務化された。そのうち 5 品目については特定原材料（卵、乳、小麦、そ

ば、落花生)と指定され、検査法が通知されたため、食品衛生法施行規則に基づき検査の精度の適正化および向上のため外部精度管理の実施を検討する必要性が生じた。

特定原材料の検査法は平成 14 年 11 月 6 日厚生労働省医薬局食品保健部長より通知(食発第 1106001 号)された後、平成 17 年 10 月(食安発第 1011002 号)、平成 18 年 3 月(食安発第 0324001 号)および平成 18 年 6 月(食安発第 0622003 号)にその一部が改正され現在に至っている。このうち、平成 18 年 3 月には標準品規格が追加され、平成 18 年 6 月にはそれまで指定されていた測定キットが全て通知からはずれ、代わって検査方法を評価するためのガイドラインのみが記載されるようになった。しかし、平成 18 年 6 月の時点で検査方法の評価が終了した測定法はなく、それ以前に通知に記載されていたキットは全て移行措置として平成 21 年 6 月 30 日まで使用が認められている。このため、本年度の検討は平成 18 年 3 月の通知(食安発第 0324001 号)に基づき、当該通知に記載されている測定法により実施した。

昨年度は ELISA 法による定量に主眼を置いて検討を行った。すなわち平成 18 年 3 月付けの標準品規格に記載されている SDS、メルカプトエタノールを含む緩衝液で抽出した Egg Solids 抽出液を食材に添加した試料を作製し、ELISA 法による測定値から、卵タンパク質の添加回収率、および試料の安定性(-20℃、1 ヶ月)を検討した。その結果、いずれもおおむね満足できる結果が得られている。一方、卵、乳に関する通知法は ELISA 法による定量と、ウエスタンブロット法による確認試験の組み合わせと

なっており、ELISA 法の検体抽出液は SDS、メルカプトエタノールを含む¹⁾のに対し、ウエスタンブロット法の検体抽出液はこれらを含まない。このため、あらかじめ SDS、メルカプトエタノールを含む抽出液を加えた試料ではウエスタンブロット用に試料を抽出する際、卵タンパク質の挙動が違ってくる可能性があった。本年度は、この問題点を解決し、ELISA 法と、ウエスタンブロット法の両方に使用できる試料を作製するため、卵については卵をそのまま食材に添加した試料の作製について検討した。また乳については昨年度と同様に、食材に自家製の抽出液を添加する方法での試料作製と共に、スキムミルクをそのまま食材に添加した試料の作製についても検討した。

B. 研究方法

1. タンパク質の定量

タンパク質の定量は化学的方法には 2-D Quant Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス㈱)を使用し、キットの説明書に従って操作後 480nm における吸光度を分光光度計 (PharmaSpec UV-1700㈱島津製作所)により測定し、検量線から総タンパク質の濃度を求めた。免疫化学的方法 (ELISA 法)は卵タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 卵 測定キット (卵白アルブミン) (㈱森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II 卵 (日本ハム㈱)を、牛乳タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 牛乳 測定キット (カゼイン) (㈱森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 (日本ハム㈱)を使用し、通知法に従って操作した。次いで 450nm/630nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (BIO- KINETICS

READER EL 312e、Bio-Tek Instruments, Inc.)により測定し、4-パラメーターにより作製した検量線から試料中の卵または牛乳タンパク質の濃度を求めた。

2. SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング

電気泳動はゲルに SDS-PAGE mini (テフコ㈱) を使用し、電気泳動槽 STC-808 (テフコ㈱) により行った。ブロッティングは転写膜に Hybond-P(GE ヘルスケアバイオサイエンス㈱) を使用し、トランスブロット SD セル(BIO-RAD)を用いて実施した。免疫染色には卵ウエスタンブロットキット (卵白アルブミン)、卵ウエスタンブロットキット (オボムコイド)、牛乳ウエスタンブロットキット (β -ラクトグロブリン)、牛乳ウエスタンブロットキット (カゼイン) (以上 ㈱森永生科学研究所)、VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit、Alkaline Phosphatase Substrate kit IV (以上 VECTOR) を使用し、通知法に従って実施した。

3. 抽出および混合

食材からのタンパク質の抽出および混合には、振とう機: RECIPRO SHAKER NR-I および Double Shaker R-30 mini (以上 TAITEC)、フードプロセッサー: MK-K-58 (松下電器産業㈱)、ミルサー: IFM-700G (岩谷産業㈱) および遠心機: himac CF 16RX (日立工機㈱) を使用した。

4. 卵および乳試料

卵試料には Egg Solids(MP Biomedicals, Inc.)、および全卵(神奈川県内の食品店で購

入)を使用した。

乳試料には高濃度標準溶液(牛乳標準品二次希釈液)(㈱ニッポンジーン)、スキムミルク粉末(和光)、スキムミルク(雪印)および Whole Milk Powder (National Institute of Standards & Technology)を使用した。

5. 添加用基材

添加基材には原材料の欄に卵または乳を使用した旨の表示のない食材を神奈川県内の食品店で購入し、使用した。

6. 精度管理試料の調製

6.1 原材料の抽出液添加による試料調製

卵は Egg Solids、乳はスキムミルク粉末(和光)を厚生労働省の通知(食安発第0622003号)の標準品規格に従って抽出し、自家製抽出液とした。次に食材をフードプロセッサーで均一化後 1g を 50mL 容の遠沈管に量り取り、自家製抽出液をタンパク質量として約 5 または 10 μ g 添加した。牛乳については高濃度標準溶液(牛乳標準品二次希釈液)を同様に添加した試料も作製した。

6.2 原材料添加による試料調製

市販の乾燥マッシュポテト、ゲル化剤および PBS を混合した模擬食材に全卵またはスキムミルク粉末(和光)の水溶液を卵または牛乳タンパク質量として約 10 μ g/g となるよう添加して調製した。

倫理面への配慮

添加試料が食材であるため、誤って口に入ることが無いよう、試料の残余や廃棄物は速やかに焼却処分に付した。

C. D. 結果および考察

1. 乳試料作製の検討

1.1 高濃度標準溶液の食材への添加回収試験

乳を使用した旨の表示のない食材（クッキー、ハンペン、肉そぼろ、クラッカー、ビスケット、クリームサンドクッキー、パイ）に高濃度標準溶液（牛乳標準品 二次希釈液）を添加し、回収率からマトリックスの影響を検討した。添加量は厚生労働省の通知で陽性と判断される牛乳タンパク質量である $10 \mu\text{g/g}$ を目安とした。食材のみ、および添加食材の牛乳タンパク質をモリナガ FASPEK 牛乳 測定キット（カゼイン）と FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳で測定し、結果を表 1 に示した。ビスケットは食材のみでも牛乳タンパク質が検出されたが、これ以外の食材では未添加試料の測定値は検出限界以下であった。ビスケットを除く添加試料のうち、クッキー、クラッカー、パイでは添加タンパク質量に対する回収率がいずれの ELISA 法キットでも 70% 以上であり、キット間の測定値にも大きな差はなかった。一方これら食材に比べ、ハンペン、肉そぼろは回収率が低かった。3 測定間の RSD は FASPEK 牛乳 測定キット（カゼイン）では全て 5% 以下であったが、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳ではこれより大きく、パイでは 13.3% であった。以上の結果から、クッキー、クラッカーの 2 種が、牛乳用抽出液添加用基材として使用可能と思われた。

1.2 乳抽出液作製の検討

高濃度標準溶液（牛乳標準品 二次希釈液）に代わる試料添加用の牛乳抽出液を作

製するため、スキムミルク粉末（和光）、スキムミルク（雪印）および Whole Milk Powder について厚生労働省の通知法、標準品規格（食安発第 0622003 号）による抽出を行った。得られた抽出液についてタンパク質量を化学的方法および ELISA 法で測定し、それぞれの測定値および添付文書の分析値（ケルダール法）、さらにこれらを相互に比較した結果を表 2 に示した。

スキムミルク粉末（和光）およびスキムミルク（雪印）では抽出液の化学的方法および ELISA 法による測定値を添付文書のタンパク質量で除して求めた抽出率、ELISA による測定値を化学的方法による測定値で除した回収率ともほとんど差がなかった。Whole Milk Powder では化学的方法による抽出率は他の 2 種とそれほど差がなかったが、ELISA 法による抽出率、回収率では 10% 以上低かった。またいずれの試料も FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳の測定値はモリナガ FASPEK 牛乳 測定キット（カゼイン）に比べ、15% 程度低かった。

次にこれらの抽出液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後クマシー染色した。泳動像を図 1 に示したが、スキムミルク粉末（和光）、スキムミルク（雪印）、Whole Milk Powder はいずれも 40~25k に 3 本、20k 付近に 1 本のバンドを認めた。しかしスキムミルク粉末（和光）、スキムミルク（雪印）の泳動像はバンドがクリアで、参考のため泳動した牛乳の泳動パターンとも類似していたのに対し、Whole Milk Powder はレーン全体が染色され、バンドがクリアでなかった。Whole Milk Powder は昨年卵で使用した Whole Egg Powder と同様に滅菌のため放射線照射したことが示されている。

ELISA 法における回収率が低いことおよび電気泳動の結果を考えあわせると放射線照射によりタンパク質の構造が変化した²⁾可能性が疑われた。

以上の結果から乳抽出液の作製にはいずれの測定でも回収率が高かったスキムミルク粉末(和光)を用いることとした。

1.3 自家製抽出液(乳)の保存の検討

スキムミルク粉末(和光)の抽出原液を 20 倍希釈し、自家製抽出液(乳)(137 ng/ μ L、2-D Quant Kit の測定値から計算)とした。これを -80°C で保存し、保存前および 1、4、12 週後に ELISA キットで牛乳タンパク質を測定し、保存安定性について検討した。2-D Quant Kit によるタンパク質量を基準にして求めた保存前の回収率は FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳では 57%、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キット(カゼイン)では 85%と差が認められた(表 3)。一方、保存前の測定値を基準にして求めた回収率は、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キット(カゼイン)、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳のいずれのキットでも保存後 12 週まで 94%以上であり、自家製抽出液(乳)の -80°C における安定性が確認できた。(図 2)

1.4 自家製抽出液(乳)添加食材の添加回収および安定性試験

高濃度標準溶液による添加回収試験で回収率が比較的良好であったクッキー1gを取り、自家製抽出液(乳)をタンパク質量として 10.9 μg (2-D Quant Kit の測定値から計算)添加したものを自家製抽出液(乳)添加試料とした。この試料を -20°C で保存し、保存前および 1、4、12 週後に ELISA キットで牛

乳タンパク質を測定し、保存安定性について検討した。添加タンパク質量を基準にして求めた保存前の回収率はモリナガ FASPEK 牛乳 測定キット(カゼイン)で 85%、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳で 58%と 1.3 の結果と同様に ELISA キット間で差が認められた(表 4)。保存後の測定値を保存前の測定値で除して求めた回収率は、いずれのキットのいずれの時点でも 95%以上で、添加試料の -20°C における安定性が、12 週後まで確認された。(図 3)

1.5 模擬食材への原材料添加による添加回収および安定性試験

ELISA 法のみでなくウエスタンブロット法にも対応できるよう、SDS、メルカプトエタノールを含まない試料の作製を検討した。すなわち、あらかじめ作製したマッシュポテト基材にスキムミルク粉末(和光)の水溶液を混合して試料を作製した。牛乳タンパク質の添加量は 10 $\mu\text{g/g}$ (2-D Quant Kit の測定値から計算)とした。添加タンパク質量を基準にして求めた保存前の回収率はモリナガ FASPEK 牛乳 測定キット(カゼイン)で 93.5%、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳で 74.9%であった(表 5)。添加試料を -20°C で保存し、1、4、12 週後の測定値を保存前の測定値で除した回収率はいずれも 75%以上で、添加試料の -20°C における安定性が 12 週後まで確認された(図 4)。また、本試料について均一性試験は実施していないが、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キット(カゼイン)の各時点における測定値の RSD(n=4)が、4 週を除き全て 4%以内だったことから、ある程度均一性が確認できたものと考えられた。

1.6 ウェスタンブロットによる確認試験

1.5 の試料について -20°C で約 2 ヶ月保存後にウェスタンブロットによる確認試験を実施し、結果を図 5 に示した。試料のゲルへの重層量を変えて電気泳動し、カゼイン抗体と β -ラクトグロブリン抗体で検出した結果、スキムミルク添加模擬食材の抽出液はいずれの抗体でも食材への添加量として $5\mu\text{g/g}$ に相当する重層量までバンドを確認できた。一方、模擬食材のみではバンドは検出されなかった。また、1.4 の試料を -20°C で約 2 ヶ月保存後に ELISA 法用抽出液で抽出した液についても同様に確認試験を実施した。その結果、自家製抽出液(乳)添加クッキーでも $5\mu\text{g/g}$ に相当する重層量までバンドを確認できた。またクッキーのみではバンドは検出されなかった。以上の結果からマッシュポテト基材にスキムミルク粉末(和光)を添加した食材は、ELISA 法のみでなくウェスタンブロット法にも使用でき、少なくとも -20°C で 2 ヶ月まで安定であると考えられた。また、自家製抽出液(乳)添加クッキーもウェスタンブロット法に使用できることが分かった。

2. 卵試料作製の検討

2.1 卵抽出液の確認

標準品規格は平成 17 年度の報告後に厚生労働省から通知(食安発第 0622003 号)されたため、昨年度食材への添加回収試験に使用した Egg Solids 抽出液については標準品規格による検討を実施していなかった。幸い抽出法は標準品規格と同一であったため、電気泳動像のみ、追加検討した。すなわち Egg Solids さらに比較のため Whole Egg Powder (National Institute of

Standers & Technology)、全卵を標準品規格の項に従って抽出し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後クマシー染色した(図 6)。全卵の泳動像では標準品規格にある 50k、90k、130k、200k のバンドが全て確認できたが、Egg Solids および Whole Egg Powder の泳動像はレーン全体が染色されており、50k、90k、130k のバンドは確認できるものの 200k のバンドは不明瞭であった。この傾向は Whole Egg Powder でより強く、タンパク質の変性の度合いが Egg Solids よりも大きいことがうかがえた。昨年度の検討で、Whole Egg Powder の測定値は化学的方法に比べ ELISA 法の測定値が大幅に低く、その原因の一つとしてタンパク質の変性が疑われていた。今回の電気泳動の結果はこの考察を支持するものと考えられた。

2.2 自家製抽出液(卵)添加食材の安定性試験

昨年度から引き続き自家製抽出液(卵)(Egg Solids 抽出液)をハンバーグおよびクリームサンドクッキーに添加した試料の安定性を検討した。添加試料を -20°C で保存後 ELISA キットで測定し、保存開始前の測定値と比較した。添加タンパク質量を基準にして求めた回収率はモリナガ FASPEK 卵測定キットはいずれの時点でも 68%以上、FASTKIT エライザ Ver. II 卵では 81%以上であった(表 6)。保存後の測定値を保存前の測定値で除して求めた回収率はいずれの時点でも 90%以上で添加試料の -20°C における安定性が、14 週まで確認された。(図 7)