

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)

分担研究報告書(平成 21 年度)

食品外部精度管理調査における適性調査試料作製と
信頼性確保に関する研究(その 1)

—理化学的検査調査試料の作製に関する研究—

主任研究者	小島 幸一	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	所長
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
協力研究者	渡辺 卓穂	(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
	勝村利恵子	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	高坂 典子	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	福光 徹	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

研究要旨

適正な調査試料作製は精度管理調査を行う上で非常に重要であり、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。また、実分析をふまえ、新規基材を開発していかなければならないことも課題である。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料の作製を試みた。

平成 20 年度は、スルファジミジンを添加した食肉(鶏肉)試料について検討を行い、調査試料の基材として水添加量 20%とした鶏肉(ささみ肉)を採用したが、鶏肉(むねおよびもも肉)においては水無添加で均一な試料を作製できることが確認できた。今年度は引き続き鶏肉(むねおよびもも肉)および鶏肉以外の食肉(豚肉)に関して検討を行った。鶏肉(むねおよびもも肉)試料は約 70 日間の冷凍保存および 3 回凍結融解においてスルファジミジンの安定性が保たれていることが確認された。しかし 7 日間の冷蔵保存後のもも肉試料において高速液体クロマトグラフ測定でスルファジミジンと同じ位置に妨害ピークが見られたことから、安定性が良好であったむね肉を調査試料とした。また、豚肉(ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉)については、10 種のサルファ剤を添加して添加回収試験を行い、70%以上の回収率を得ることができた。さらにヒレ肉について 10 種のサルファ剤を添加した試料を作製し、それぞれの薬剤について均一性および回収率を確認したところ、全ての薬剤について均一であることが確認されるとともに、回収率についても 70%以上であったため、調査試料として用いることが可能であると考えられた。

一方、食品添加物検査の一つである着色料について、平成 19~21 年度の 3 年間に亘り、しょうが漬けを基材として調査試料を作製し、調査を行った。今年度は、新たな基材として大根漬けを用い、調査試料作製の検討を行った。その結果、しょうが漬けとは基材成分が異なるため、定性試験において、精製法などを若干変更したが、大根漬けとして自然な色調となる添加色素の組み合わせと濃度で作製することができた。また、作製した試料の同等性、安定性は、共に確保できた。

A. 研究目的

食品の安全性を確保するためには、試験・検査等の信頼性の確保が重要である。食品衛生法により、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、試験・検査等の信頼性の確保が求められている。信頼性の確保のためには、外部・内部精度管理調査が重要な項目である。この精度管理調査を実施するためには、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調査試料が求められる。そこで、検査対象物質の濃度が均一で安定な調査試料を開発するために以下の検討を行った。

B. 研究方法

残留動物用医薬品の検査に使用する調査試料として、食肉（鶏肉および豚肉）にスルファジミジンまたはスルファジミジンを含む10種のサルファ剤を添加して、基材としての食肉（鶏肉および豚肉）の利用の可能性を検討した。

着色料検査の新たな基材として、漬物（大根漬け）を用いる検討を行った。

1. 試料基材および試薬

1) 残留動物用医薬品

(1) 試料基材（食肉）

市販の鶏肉（むねおよびもも肉）および豚肉（ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉）を3度挽いたミンチ肉

(2) 標準品

スルファジミジン（以下 SDD）、スルファジアジン（以下 SDZ）、スルファメラジン（以下 SMR）、スルファメトキシピリダジン（以下 SMPD）、スルファモノメトキシシン（以下 SMMX）、スルファクロルピリダジン（以下 SCPD）、スルファメトキサゾール（以下 SMX）、スルファジメトキシシン（以下 SDMX）お

よびスルファキノキサリン（以下 SQ）（食品分析用、関東化学㈱）、スルフィソキサゾール（以下 SIX）（残留農薬試験用、関東化学㈱）

(3) 試薬

メタノール、アセトニトリルおよび蒸留水（高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業㈱）、n-ヘキサン、無水硫酸ナトリウムおよびリン酸一ナトリウム二水塩（試薬特級、和光純薬工業㈱）

固相抽出カラム：Sep-Pak® アルミナ N カートリッジ（Waters）、フィルター：エキクロディスク 25（0.45 μm 孔径）（日本ポール㈱）

2) 着色料

(1) 試料基材（漬物（大根漬け））

① 12 色素添加用：甘口たくあん（㈱新進）、べつたら（㈱ヒロシ食品）および紀の郷（㈱古川）、② 選択色素添加用：甘口たくあん（㈱新進）

(2) 標準品

食用赤色 2 号（以下 R2）、食用赤色 3 号（以下 R3）、食用赤色 40 号（以下 R40）、食用赤色 102 号（以下 R102）、食用赤色 104 号（以下 R104）、食用赤色 105 号（以下 R105）、食用赤色 106 号（以下 R106）、食用青色 1 号（以下 B1）、食用青色 2 号（以下 R2）、食用黄色 4 号（以下 Y4）、食用黄色 5 号（以下 Y5）および食用緑色 3 号（以下 G3）（食品添加物公定書標準品、㈱日本公定書協会）

(3) 添加用色素

R2、R3、R40、R104、R105 および B2（和光特級、和光純薬工業㈱）、R102、R106、B1、Y4 および Y5（和光一級、和光純薬工業㈱）、G3（和光純薬工業㈱）

(4) 試薬

日本薬局方注射用水、光製薬㈱、28%アンモニア水およびアセトニトリル（試薬特級、関東化学㈱）、エタノール（99.5）、酢酸、無水硫酸ナトリウム、酢酸エチル、アセトン、3-メチルー

1-ブタノールおよびメタノール(試薬特級、和光純薬工業(株))、ポリアミド C-100(カラムクロマトグラフ用、和光純薬工業(株))、HPTLC シリカゲル 60、TLC シリカゲル 60 RP-18 F254_s および 50 HPTLC Plates Cellulose (Merck)

2. 使用機器および測定条件

1) 残留動物用医薬品

(1) 試料作製用混合機

ロボ・クープブリクサー5 プラス(容器容量:3.5 L、以下ブリクサー)、ロボ・クープミキサー R-23(容器容量:23 L、以下ミキサー)(株エフ・エム・アイ)

(2) 試料抽出用機器

オムニミキサー(OMNI-International)、減圧濃縮器(東京理化学器械(株))

(3) 測定機器

高速液体クロマトグラフ(以下 HPLC):LC-10A(株島津製作所)、検出器:SPD-10A(株島津製作所)

(4) 測定条件

カラム: Mightysil RP-18(H)(150×4.6 mm、5 μm)、移動相: 0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液: アセトニトリル(17:3)、流速: 0.8 mL/min、カラム温度: 40°C

2) 着色料

(1) 使用機器

卓上多本架遠心機 KN-70(株久保田製作所)、湯浴 SB-55(東京理化学器械(株))

(2) 薄層クロマトグラフィー(以下 TLC)

① HPTLC シリカゲル 60: 酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア水(3:1:1)、② TLC シリカゲル 60 RP-18 F254_s: メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム(3:3:10)、③ 50 HPTLC Plates Cellulose: アセトン・3-メチル-1-ブタノール・水(6:5:5)

3. 試料作製

1) 残留動物用医薬品

ブリクサーを用いて各部位のミンチ肉をペーストにすると同時に SDD またはサルファ剤混合液(メタノール溶液)を添加し、よく混合した。これらを約 80 g ずつ容器に分注して冷凍(-24°C~-20°C)し、試料とした。同様にして、ほぼ同量の基材に同割合のメタノールを添加して、ブランク試料を作製した。

調査用試料の実際の作製に即した混合方法の検討として、まず、ブリクサーを用いて鶏肉(むね肉)2 kg に 0.18 μg/g となるように SDD を添加して SDD ペーストを作製した。これを 10 個作製した後、それら 20 kg をミキサーで混合した。これらを約 80 g ずつ容器に分注して冷凍し、試料とした。ブランク試料はブリクサーのみを用いて 2 kg を上記同様に作製した。

2) 着色料

添加用色素 12 種類を、異なる 3 種の大根基材の漬物に添加し、それらが検出可能であるかを確認した。また、良好に検出された色素のうち、複数色素を選択し、漬物として自然な色調となる組み合わせおよび濃度を調整し、添加した試料について、同等性と安定性の確認を行った。

(1) 12 色素添加

長さ約 10~15 cm の円柱状の漬物を縦に 4 分割し、各添加用色素の濃度が 50 μg/mL になるように調製した溶液(水溶媒)に、各々浸漬した。

(2) 選択色素添加

長さ約 10~15 cm の円柱状の漬物を縦に 4 分割し、以下に示す各添加用色素を添加した溶液(水溶媒)に浸漬した。

色調①(オレンジ系): R40(約 10 μg/mL)、Y4(50 μg/mL)および Y5(約 40 μg/mL)

色調②(赤系): R3(約 40 μg/mL)、R106(約

40 µg/mL)および Y4(約 10 µg/mL)
色調③(茶系):R102(約 20 µg/mL)、Y4(50 µg/mL)、Y5(約 30 µg/mL)および B1(約 10 µg/mL)

4. 試験方法

1) 残留動物用医薬品

測定操作は、「食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編(2003)」に準じた。

試料 5.00 g を採取し、アセトニトリル 50、30 および 30 mL で 3 回オムニミキサーを用い抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 50 mL を加え振とうした。アセトニトリル層を採り、残った n-ヘキサン層に n-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加え振とうし、先に採取したアセトニトリル層と合わせ、40°C 以下で濃縮乾固した。残留物を 0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液:アセトニトリル(17:3)5 mL で溶解させ、フィルターでろ過した後、HPLC(UV)で測定した。ただし鶏肉(もも肉)および豚肉については必要に応じて、濃縮乾固の後、まずアセトニトリル:水(19:1)3 mL で溶解し、固相抽出カラムに注入した。その流出液は捨て、さらに固相抽出カラムにアセトニトリル:水(17:3)10 mL を注入し、その流出液を採り、40°C 以下で濃縮乾固した。残留物を 0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液:アセトニトリル(17:3)5 mL で溶解させ、フィルターでろ過した後、HPLC(UV)で測定した。

2) 着色料

(1) 添加用色素と標準品の比較

調査試料作製のために用いる、添加用色素(市販品)12 種類について、その適用性を確認するため定性試験を行い、標準品と比較検討した。添加用色素試薬および標準品 20 mg を各々正確に量り、水を加えて溶かし、各々正確に 20 mL とした。定性試験を行

い、各々の色素溶液から得られたスポットの位置および色調を、自然光下で比較観察した。

(2) 定性試験方法の確認および測定方法

以下の内容につき、「食品衛生検査指針 食品添加物編(2003)」の第 9 章 着色料の項に準じて方法の確認を行った。

① 溶解液の検討

精製後、濃縮乾固した試料を溶解する溶液として、水または 50v/v%エタノールを用い、それぞれのクロマトグラムの色と Rf 値を比較観察した。なお、このときの精製法は、a. ポリアミドカラム法を用いた。

② 精製条件の検討

12 種類の添加用色素を添加した漬物(3 種基材)を用い、以下の a. ポリアミドカラム法、b. ポリアミドバッチ法、c. バッチ/カラム法の精製方法の検討を行った。

a. ポリアミドカラム法

検液に酢酸(3→50)を加えて酸性(pH3~4)とした後、ポリアミド 0.6 g を充てんしたカラムに流し込み、液を流出させた。カラムを酢酸(1→100)で洗液がほとんど無色となるまで洗い、更に、水約 20 mL を流して洗った後、エタノール・アンモニア混液を加え、溶出してきた着色液を集めた。酢酸(3→50)で中和した後、水浴上で濃縮乾固した。残留物に溶解液 1 mL を正確に加えて溶かし、試料液とした。

b. ポリアミドバッチ法

検液を遠心管にとり、酢酸(3→50)を加えて酸性(pH3~4)とし、良く混和した。次にポリアミド 0.5 g を加え、約 1 分間振り混ぜた後、3,500 回転/分で 5 分間遠心分離した。上澄液は捨て、残留物を酢酸(3→50)および水で洗った。残留物にエタノール・アンモニア混液を加え、よく振り混ぜ遠心分離をした。この操作をエタノール・アンモニア混液が着色しなく

なるまで繰り返した。得られたエタノール・アンモニア混液を合わせ、酢酸(3→50)で中和した後、水浴上で濃縮乾固した。残留物に溶解液 1 mL を正確に加えて溶かし、試料液とした。

c. バッチ/カラム法

検液を遠心管にとり、酢酸(3→50)を加えて酸性(pH3~4)とし、良く混和した。次にポリアミド 0.6 g を加え、約 1 分間振り混ぜた後、3,500 回転/分で 5 分間遠心分離した。上澄液は捨て、残留物を酢酸(3→50)および水で洗った。着色したポリアミドをカラムに充てんし、エタノール・アンモニア混液を加え、溶出してきた着色液を集めた。酢酸(3→50)で中和した後、水浴上で濃縮乾固した。残留物に溶解液 1 mL を正確に加えて溶かし、試料液とした。

③ 抽出液の検討

試料 20 g をとり、50 mL の水、50v/v%エタノールまたはアンモニア・エタノール溶液を加え、水浴上で 30 分間加温した。冷後、綿ろ過した。ろ液を酢酸(3→50)で中和した後、水浴上で濃縮して約 20 mL とし、検液とした。

④ 定性試験

あらかじめ活性化(120°C、15 分間)した薄層板の下端より 1.5 cm のところに、試料液および定性用標準液(1000 µg/mL)を直径約 3 mm 以下になるように、1 cm の間隔に塗布し、ドライヤー(冷風)を用いて風乾した。各薄層板に対応する展開溶媒を用い、薄層板の下端 0.5~1 cm を展開溶媒に浸し展開した。展開終了後、試料液および定性用標準液それぞれから得られたクロマトグラムの色と Rf 値を、それぞれ比較観察した。

(3) 試料作製の検討

① 12 色素添加試料の同等性および安定性

12 種類の添加用色素を添加した漬物を用

い、添加した 12 色素の作製後 7 日および 40 日後について、それぞれ定性試験を行った(n=5)。

② 選択色素添加試料の同等性および安定性

B. 3. 2) (2)に示す、3 種類の色素溶液に漬け込んだ漬物を用い、添加した色素の作製後 0 日および 60 日後について、それぞれ定性試験を行った(n=5)。

(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. 残留動物用医薬品

1) 鶏肉試料の安定性の確認

鶏肉(むねおよびもも肉)各 2 kg を基材とし、ブ里克サーを用いて 0.2 µg/g となるように SDD を添加して作製した試料について、作製翌日の SDD 濃度に対する冷凍約 70 日後の SDD 濃度を測定することにより、冷凍保存による安定性を確認した。その結果、むねおよびもも肉の安定性は、それぞれ 101.5%および 92.6%、RSD はそれぞれ 3.8%および 2.8%であり、十分な安定性が確認された。

同試料について、解凍を各 1 回行ったときの SDD 濃度に対する 2 および 3 回時の SDD 濃度を測定することにより、凍結融解による安定性を確認した。その結果、むね肉の安定性は 2 回で 96.0%、3 回で 98.0%であった(表 1)。一方、もも肉の安定性は 2 回で 89.4%、3 回で 88.0%であった(表 2)。むね肉に比べ、もも肉においては僅かながら低値を示したものの、両試料ともに 85%以上の安定性が確認された。

同試料について、冷蔵(4°C~8°C)開始時(0日時)のSDD濃度に対する4および7日後のSDD濃度を測定することにより、冷蔵保存による安定性を確認した。その結果、むね肉の安定性は冷蔵4日後で89.2%、7日後で94.4%であり、約1週間の冷蔵保存においても十分な安定性が確認された(表3)。一方、もも肉の安定性は冷蔵4日後で116.7%、7日後で131.6%であり、冷蔵日数の経過に伴って増加の傾向が認められた(表4)。冷蔵7日後において明らかな高値を示した要因は、HPLC(UV)測定においてSDDのピークが妨害ピークと重なったことであると確認された(図1~3)。この妨害ピークは固相抽出カラムにより前処理を行っても完全には除去されなかった。なお、両試料とも解凍1回時および冷蔵0日時において、測定SDD濃度はいずれも添加濃度とほぼ一致していた。

以上の安定性試験の結果から、むね肉の方がもも肉よりも調査試料として適していることが確認された。

2) 鶏肉(むね肉)試料の実際の作製に即した混合方法の検討

調査用試料の作製においては、20 kgの均一な試料が必要である。昨年度はミキサーを用い、10 kgを2回作製し、それら20 kgを混合して試料とした(図4)。しかし、ミキサーでの10 kg作製は、均一性を得るためには長時間の混合が必要であり、機械が熱くなるなど操作性に問題があった。そこで今回、ブリスサーを用いて2 kgの均一な試料を10個作製した後、それら20 kgをミキサーで混合して0.18 µg/g SDD添加試料とした(図5)。その結果、昨年度の作製に比べ、作製時間の短縮が可能となった。

今回の作製方法での均一性の確認のため、まず、作製した10個のブリスサー内の各

試料から5試料ずつ採取しSDD濃度を測定した結果、5試料の平均回収率(添加濃度に対する試料測定濃度の割合(%))は84~91%であり、全平均回収率は87.3%、RSDは2.8%であった(表5、図5)。10個のブリスサー間の均一性を詳細に確認するため、グループ間をn=10、グループ内をn=5として一元配置分散分析による解析を行った。その結果、F比は1.63であり、有意水準5%に対するF値2.12より小さいため、10個のブリスサー間で試料は均一であることが確認された(表5)。したがって、引き続き10個のブリスサー内の試料を合わせ(計20 kg)、混合する操作は短縮できた。それら20 kgを混合したミキサー内の試料について、ミキサー上部より10段階(A~J)に分け、それぞれの試料についてn=2で測定した。その結果、回収率は90.6%、RSDは5.1%、またF比は1.58であり、有意水準5%に対するF値3.02より小さいため、ミキサー内の試料も均一であることが確認された。作製後60日後の冷凍保存による安定性は94.6%、RSDは2.1%であり、十分な安定性が確認された。

以上の結果から、今回採用した作製方法はより効率的であり、作製試料も調査試料として十分に適していることが示唆された。

3) 豚肉基材の添加回収試験および均一性の確認

食肉基材としての豚肉の適用性を検討するため、まず異なる4部位の豚肉(ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉)のミンチ肉にそれぞれ0.2 µg/gとなるように10種のサルファ剤(SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SCPD、SIX、SMX、SDMXおよびSQ)混合液を添加して添加回収試験を行った(図6)。その結果、いずれの豚肉基材およびサルファ剤においても、70%以上の回収率を得ることができ、SDDについてはいずれの豚肉基材にお

いても 80%以上の回収率を得ることができた(表 6)。

豚肉(ヒレ肉)2 kg を基材とし、ブ里克サーを用いて各 0.2 $\mu\text{g/g}$ となるように 10 種のサルファ剤混合液を添加して試料を作製し、その均一性を測定した。その結果、いずれのサルファ剤においても 70%以上の回収率を得ることができた。SDD については 80%の回収率を得ることができ、RSD は 4.2%であった。また、各サルファ剤の F 比は 0.46~2.91 であり、いずれも有意水準 5%に対する F 値 3.02 より小さいため、均一であることが確認された(表 7)。サルファ剤の中には HPLC(UV)測定において基材由来の妨害ピークと重なるものがあったが、これら妨害ピークは固相抽出カラムの前処理を行うことで除去された(図 7、8)。

2. 着色料

1) 添加用色素と標準品との比較

12 種類の許可色素について、市販試薬と標準品を比較した結果、スポットは良好に検出され、*R_f* 値も標準品と一致した。添加用試薬および標準品のいずれから、青系と赤系のものに主色素以外のスポットが若干出現したが、定性分離に影響はなく、調査試料作製に使用できることが考えられた。

2) 溶解液の検討

色素抽出液を精製後、濃縮乾固した残留物を水を用いて溶解した結果、残留物の溶解が不十分であり、R3、R104 および R105 の検出が充分に出来なかった。一方、50v/v%エタノールでは、残留物を十分溶解でき、R3、R104 および R105 のスポットが良好に検出された。水で溶解した場合、キサントン系色素が十分に溶解されず、検出が悪くなったと考えられた。今後の検討においては、精製後、濃縮乾固した残留物を溶解する溶液として、50v/v%エタノールを用いることとした。

3) 精製条件の検討

a. ポリアミドカラム法による精製の結果、添加した 12 色素全てが良好に検出された。しかし操作において、酸性にした検液をポリアミドを充てんしたカラムに流し込んだ後、十分な流出速度が得られず、その後の洗浄、溶出操作にも長時間を有した。そこで、試料からの抽出物等の影響の少ない試料浸漬後溶液について同様に行ったところ、このような流速の低下はみられず、良好に溶液が得られた。これらから、試料からの抽出物の影響によりカラム内で詰り等が発生したため、流出速度が著しく低下したと考えられた。

b. ポリアミドバッチ法による精製の結果、HPTLC シリカゲル 60 の TLC では、Y5、R40、B1 および B2 のスポットが、また、50 HPTLC Plates Cellulose の TLC では、Y5、R40、B1 および G3 のスポットがテーリングし、これらの分離が不十分であった。また標準品の *R_f* 値と一致せず、定性が難しいことがわかった。バッチ法による洗浄では、ポリアミドに付着した試料由来の夾雑物の除去が不十分で、TLC において、分離の妨害となったと考えられた。

c. バッチ/カラム法による精製の結果、着色したポリアミドを詰めたカラムからの溶出時、良好な流出速度が得られた。また、TLC において、12 色素のスポットは良好に検出され、標準品の *R_f* 値とよく一致し、定性ができることが明らかとなった。

4) 抽出液の検討

抽出に用いる溶液を検討した結果、水、50v/v%エタノールおよびアンモニア・エタノール溶液のいずれでも、12 色素を抽出できた。今回用いた 3 基材については、キサントン系色素のうち R3、R104 および R105 は、アンモニア・エタノール溶液による抽出で、他の抽出液と比較してより色調が濃く、鮮やかに検

出される傾向があった。しかしながら R102 の検出は、アンモニア・エタノール溶液での抽出で、他の 2 抽出液と比べ、TLC において色調がうすかった。また、水と 50v/v%エタノールの抽出では、基材により、水の方が濃く検出される場合と、50v/v%エタノールの方が濃く検出される場合があった。

5) 大根基材の試料に用いる定性試験方法

大根漬けを基材に用い、色素添加した試料からの着色料の定性試験として、精製にはバッチ/カラム法を、濃縮乾固後の残留物の溶解には 50v/v%エタノールを用いることとした。また抽出操作に使用する溶液は、基材成分により受ける影響が様々な可能性があることから水、50v/v%エタノールおよびアンモニア・エタノール溶液の 3 種類の溶液を用いることとした。

6) 12 色素添加試料の同等性および安定性

12 種類の食用色素を添加した 3 種類の漬物の同等性および安定性について評価した結果、作製後 7 日後は、3 種類のいずれの色素添加試料からも 12 色素全てが良好に検出された。しかし作製 40 日後は、B2 を除く 11 色素は、3 種類の基材において全て良好に検出されたが、B2 は、検出されなかった。

7) 選択色素添加試料の同等性および安定性

B. 1. 2) (1)①の 12 色素添加用基材から「甘口たくあん」を基材に用いて、3~4 種類の選択色素を添加した異なる色素溶液 3 種に漬け込み、作製した試料の同等性および安定性について評価した。その結果、作製後 0 日および 60 日後においても、基材に添加した全ての色素が良好に検出された。

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同等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、実分析をふまえた調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

1. 残留動物用医薬品

1) 鶏肉(むねおよびもも肉)はいずれも作製試料の均一性、約 70 日間の冷凍保存および 3 回の凍結融解の安定性が確保されたことから調査試料として適切であると考えられたが、もも肉に関しては 7 日間冷蔵保存により HPLC (UV) 測定において妨害ピークが生じたため、むね肉の方がより適切な調査試料であることが確認され、平成 21 年度の外部精度管理調査試料として採用した。

2) 調査試料 20 kg の実作製において、2 kg を 10 個作製してからそれら 20 kg を混合する方法は、10 kg を 2 回作製してそれら 20 kg を混合する方法に比べて時間の短縮が可能となった。

3) 豚肉(ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉)においても鶏肉の場合と同様の測定法を用いて、10 種すべてのサルファ剤で 70%以上の回収率を得ることができた。SDD については 80%以上の回収率を得ることができた。豚肉(ヒレ肉)において、10 種すべてのサルファ剤について均一な試料を作製することができたため、今後の調査試料としての適用の可能性が示唆された。

2. 着色料

着色料の調査試料用基材は 3 年に亘り、しょうが漬けを用いてきた。新たな基材として、今回大根漬け(3 種)を用いる検討を行った。その結果、しょうが漬けとは基材成分が異なるため、定性試験において精製法などを変更した。また、抽出に用いる溶液により、TLC の結果が色調においてやや異なるものの、い

ずれの基材でも、添加した 12 色素が基材成分の影響を受けることなく良好に検出され、これら色素の添加は可能であると考えられた。また、B2 は、やや不安定であることを考慮し、B2 を除く 3～4 種類の色素を用い、大根漬けとして自然な色調となるよう混合し、大根漬を基材として作製したところ、色素が均一に含まれ、基材成分の影響なく定性試験が可能であり、安定性も確保できた。

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 鶏肉(むね肉)の凍結融解による安定性

添加薬剤:スルファジミジン 0.2 µg/g

解凍回数(回)	1	2	3
測定濃度	0.183	0.191	0.189
(µg/g)	0.199	0.195	0.186
	0.198	0.184	0.210
	0.203	0.189	0.201
	0.209	0.190	0.185
平均値(µg/g)	0.198	0.190	0.194
SD(µg/g)	0.00963	0.00396	0.0109
RSD(%)	4.9	2.1	5.6
安定性* (%)	100	96.0	98.0

$$* \text{安定性}(\%) = \frac{\text{2回または3回解凍時のスルファジミジン濃度平均値}}{\text{1回解凍時のスルファジミジン濃度平均値}} \times 100$$

表2 鶏肉(もも肉)の凍結融解による安定性

添加薬剤:スルファジミジン 0.2 µg/g

解凍回数(回)	1	2	3
測定濃度	0.203	0.170	0.170
(µg/g)	0.202	0.187	0.172
	0.207	0.192	0.175
	0.206	0.194	0.202
	0.221	0.185	0.194
平均値(µg/g)	0.208	0.186	0.183
SD(µg/g)	0.00766	0.00945	0.0144
RSD(%)	3.7	5.1	7.9
安定性* (%)	100	89.4	88.0

$$* \text{安定性}(\%) = \frac{\text{2回または3回解凍時のスルファジミジン濃度平均値}}{\text{1回解凍時のスルファジミジン濃度平均値}} \times 100$$

表3 鶏肉(むね肉)の冷蔵保存による安定性

添加薬剤:スルファジミジン 0.2 µg/g

冷蔵日数(日)	0	4	7
測定濃度	0.187	0.173	0.177
(µg/g)	0.198	0.185	0.175
	0.204	0.176	0.180
	0.194	0.186	0.196
	0.190	0.148	0.191
平均値(µg/g)	0.195	0.174	0.184
SD(µg/g)	0.00669	0.0154	0.00920
RSD(%)	3.4	8.9	5.0
安定性*(%)	100	89.2	94.4

$$* \text{安定性}(\%) = \frac{\text{4日または7日冷蔵保存時のスルファジミジン濃度平均値}}{\text{0日時のスルファジミジン濃度平均値}} \times 100$$

表4 鶏肉(もも肉)の冷蔵保存による安定性

添加薬剤:スルファジミジン 0.2 µg/g

冷蔵日数(日)	0	4	7
測定濃度	0.171	0.178	0.274
(µg/g)	0.167	0.193	0.217
	0.177	0.210	0.200
	0.180	0.223	0.241
	0.175	0.210	0.215
平均値(µg/g)	0.174	0.203	0.229
SD(µg/g)	0.00510	0.0175	0.0289
RSD(%)	2.9	8.6	12.6
安定性*(%)	100	116.7	131.6

$$* \text{安定性}(\%) = \frac{\text{4日または7日冷蔵保存時のスルファジミジン濃度平均値}}{\text{0日時のスルファジミジン濃度平均値}} \times 100$$

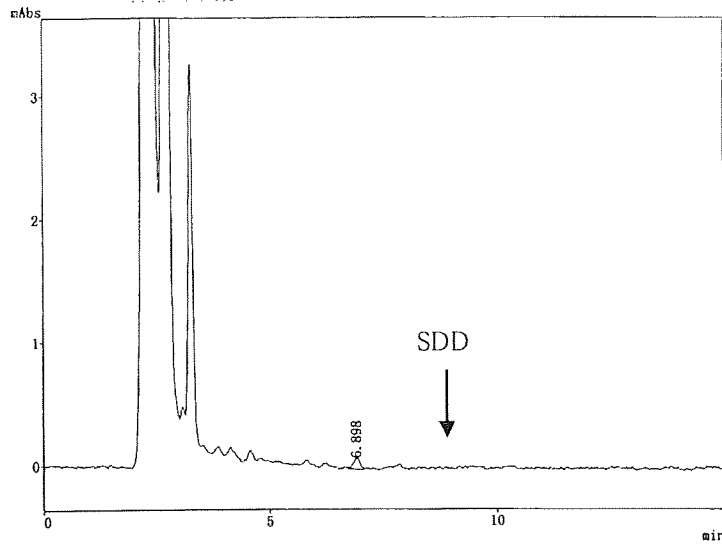


図1 冷蔵開始時(0日時)の鶏肉(もも肉)のブランク試料のクロマトグラム

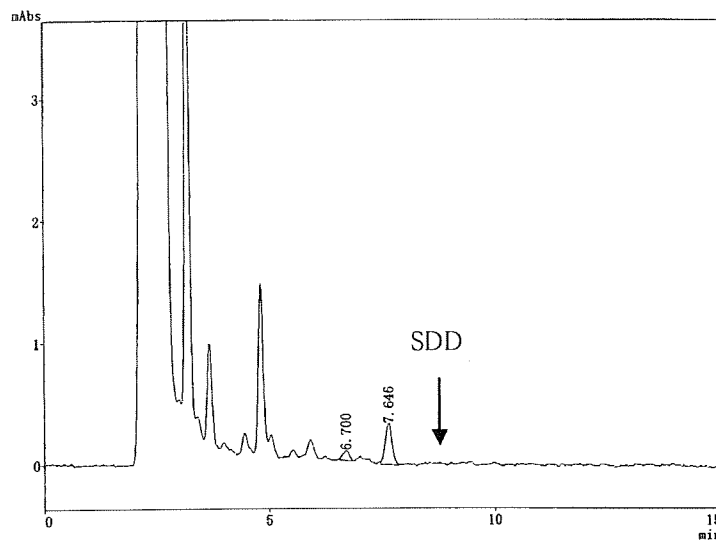


図2 冷蔵4日後の鶏肉(もも肉)のブランク試料のクロマトグラム

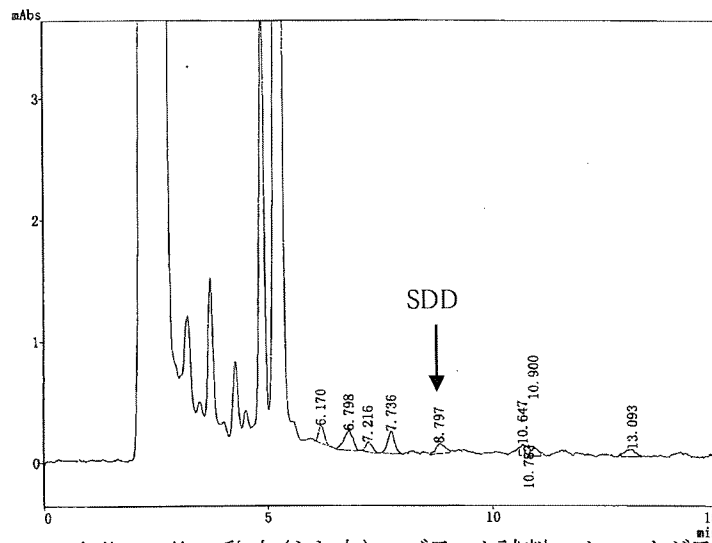


図3 冷蔵7日後の鶏肉(もも肉)のブランク試料のクロマトグラム

表5 ブリクサー内のむね肉試料における均一性試験の結果

添加薬剤:スルファジミジン 0.18 µg/g		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
試料											
試料濃度	(µg/g)	0.158	0.161	0.159	0.158	0.152	0.149	0.154	0.165	0.140	0.166
		0.153	0.153	0.154	0.151	0.165	0.143	0.173	0.164	0.160	0.162
		0.153	0.143	0.142	0.140	0.168	0.161	0.169	0.168	0.163	0.155
		0.157	0.162	0.160	0.165	0.161	0.162	0.164	0.161	0.165	0.170
		0.141	0.163	0.143	0.151	0.153	0.167	0.158	0.159	0.161	0.160
平均値 (µg/g)		0.152	0.156	0.151	0.153	0.159	0.156	0.163	0.163	0.157	0.162
RSD(%)		4.45	5.43	5.71	6.08	4.48	6.40	4.76	2.15	6.45	3.54
平均回収率 (%)		84.4	86.6	83.8	85.0	88.3	86.6	90.5	90.5	87.2	90.0
全平均回収率 (%)		87.3									
RSD(%)		2.85									
F比*		1.63									

*F比はグループ間をn=10、グループ内をn=5として一元配置分散分析を行った結果を示した。

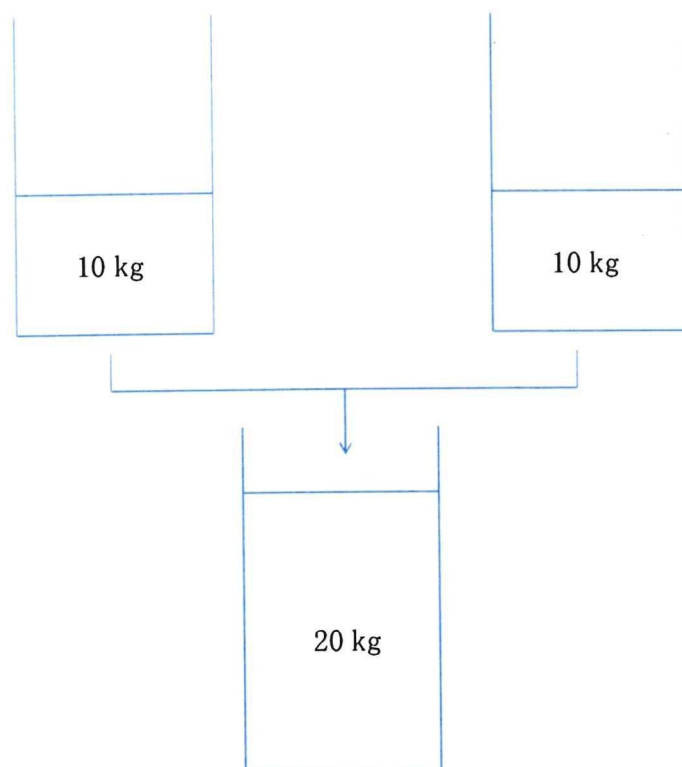


図4 ミキサーのみを用いた鶏肉試料20 kgの作製方法
(平成20年度 調査試料作製に採用)

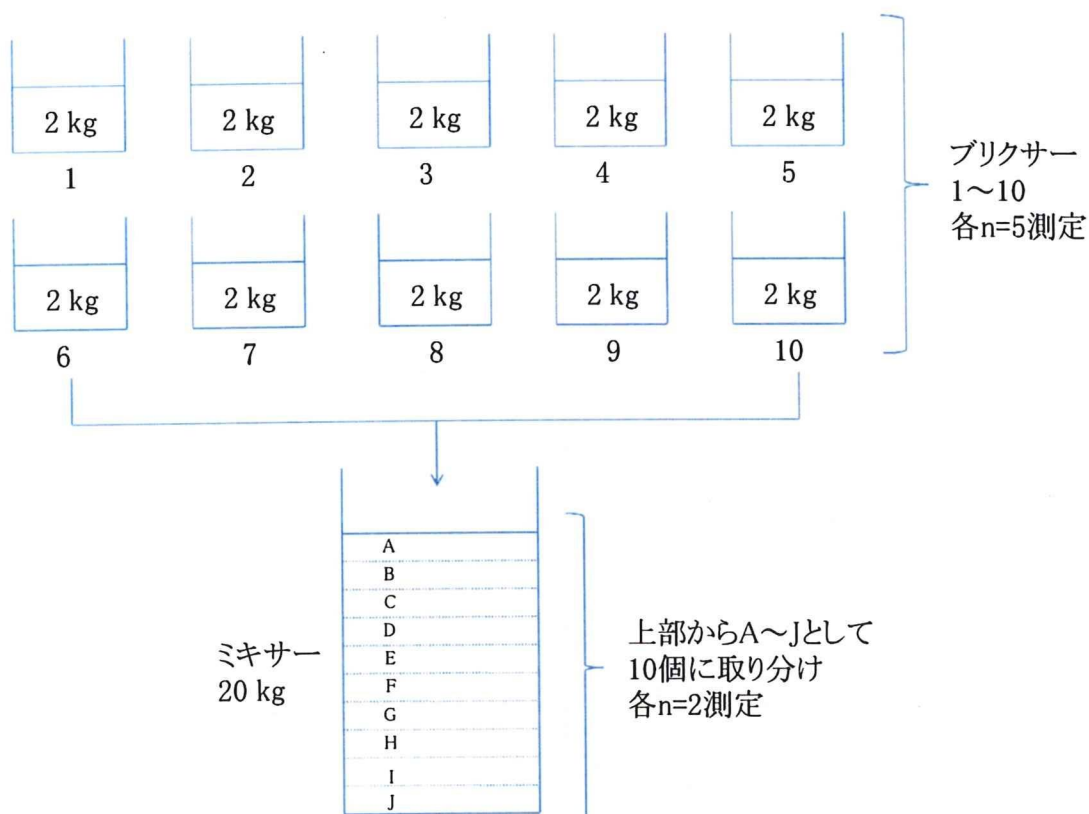


図5 ブレンダーおよびミキサーを用いた鶏肉試料20 kgの作製方法
(平成21年度 調査試料作製に採用)

表6 豚肉基材へのサルファア剤添加回収の検討

サルファア剤	ヒレ肉			カタロース肉			バラ肉		
	回収率 (%)	RSD** (%)	回収率 (%)	RSD** (%)	回収率 (%)	RSD** (%)	回収率 (%)	RSD** (%)	
スルファアジン	*90.4	2.27	*91.4	3.53	90.7	1.76	94.7	1.12	
スルファメラジン	85.4	1.42	89.6	2.97	93.1	2.99	95.9	1.04	
スルファジミジン	84.6	1.05	86.6	3.03	80.7	2.76	83.9	1.26	
スルファメキシピリダジン	84.8	3.12	86.1	2.24	81.8	1.56	85.0	1.89	
スルファモノメキシ	83.9	0.79	87.3	1.45	*93.9	9.90	*104.3	3.19	
スルファクロルピリダジン	*76.6	23.22	*78.5	7.54	86.3	0.91	89.7	1.86	
スルファイノキサゾール	81.2	1.40	83.6	2.95	79.5	3.84	82.0	3.46	
スルファメキサゾール	83.7	3.10	91.0	1.30	83.7	4.73	*85.8	1.10	
スルファジメキシ	79.6	1.29	82.7	3.64	79.9	8.21	79.3	3.75	
スルファキノキサリン	79.3	7.92	82.9	3.84	73.3	5.84	75.0	4.36	

* 薬剤のピークがバックグラウンドと重なったため、ブランク試料のバックグラウンドピークを差し引いて計算した。
 ** RSDは各n=5での測定値で算出した。

表7 豚肉(ヒレ肉)試料の均一性試験の結果*

サルファア剤	平均値±SD** (µg/g)			すべて固相抽出カラムで処理した。		
	平均値	±SD	F比	回収率 (%)	RSD (%)	F比
スルファアジン	0.146	± 0.00946	2.91	73.0	6.48	2.91
スルファメラジン	0.152	± 0.00965	2.19	76.0	6.35	2.19
スルファジミジン	0.160	± 0.00665	0.99	80.0	4.16	0.99
スルファメキシピリダジン	0.150	± 0.00914	1.30	75.0	6.09	1.30
スルファモノメキシ	0.158	± 0.01035	2.69	79.0	6.55	2.69
スルファクロルピリダジン	0.153	± 0.00827	2.20	76.5	5.41	2.20
スルファイノキサゾール	0.141	± 0.00774	2.57	70.5	5.49	2.57
スルファメキサゾール	0.157	± 0.00685	1.60	78.5	4.36	1.60
スルファジメキシ	0.162	± 0.00577	0.46	81.0	3.56	0.46
スルファキノキサリン	0.152	± 0.01258	1.72	76.0	8.28	1.72

* 異なる10個の容器から各2部位を採取して測定した。
 ** SDは容器間n=10の測定値で算出した。

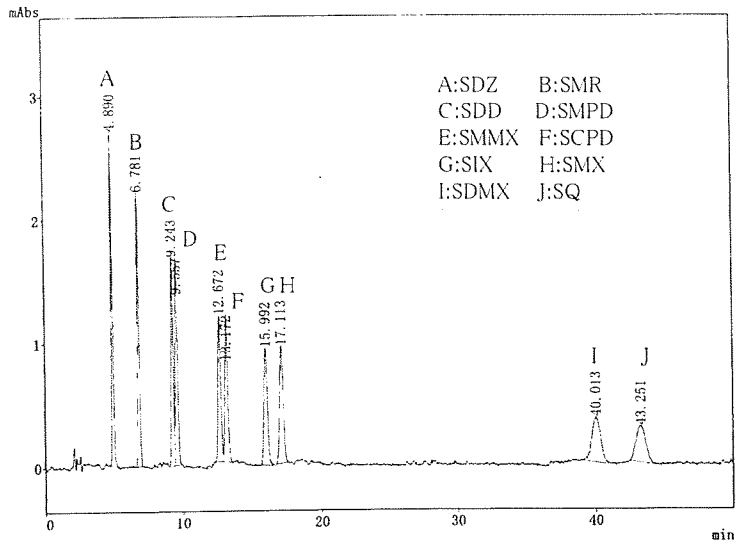


図6 10種のサルファ剤混合液のクロマトグラム

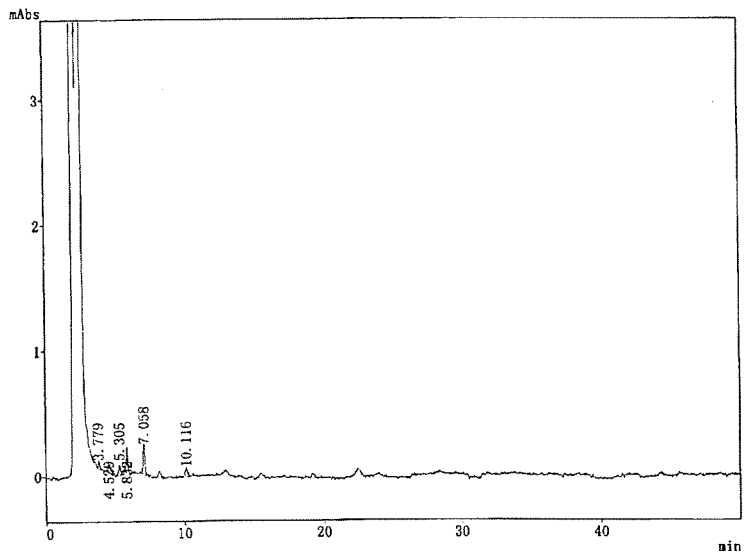


図7 豚肉(ヒレ肉)のブランク試料のクロマトグラム(固相抽出カラム処理後)

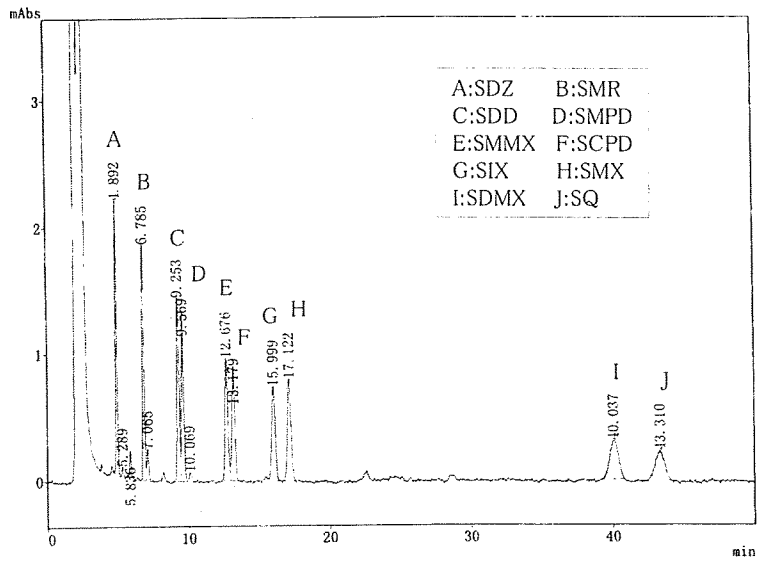


図8 豚肉(ヒレ肉)のサルファ剤添加試料のクロマトグラム(固相抽出カラム処理後)

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)
ーセレウス菌検査用調査試料およびビブリオ属菌検査用調査試料の
新規開発に関する予備的検討ー

主任研究者	小島 幸一	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 所長
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	坂田 憲昭	(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
	山田 健一	(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

セレウス菌検査用調査試料を作製することを目的とし、米飯を基材としたときの基材の物理化学的性状の確認、ならびにこれにセレウス菌を接種した際の菌数の安定性および選択培地上での反応性について確認した。その結果、生理食塩液または 15%NaCl 溶液を基材の作製に用いることによって接種菌の 28 日目までの安定性が確認された。また、15%NaCl 溶液で作製した基材では、その後 22°C で 24 時間保存することによっても大幅な菌数の上昇は認められなかった。さらに、採用した標準菌株の選択培地上での反応性は陽性試料では極めて良好であるが、陰性試料において非典型集落を認めるものと、全く集落形成を認めない 2 つのケースが確認された。

加えて、ビブリオ属菌検査用調査試料を作製することを目的とし、ビブリオ属菌の保存条件について Marine agar および Marine broth 中での安定性を確認した。その結果、*V. parahaemolyticus* では若干菌数の減少が認められるものの、比較的低温保存でも安定して接種菌を回収できることが明らかとなった。しかし、低濃度のビブリオ属菌を Marine broth に接種したところ、冷蔵保存によっても 28 日目にはほぼ死滅した。また、TCBS 寒天培地を用いた菌数測定を実施したところ、Marine agar と比較すると全ての TCBS 寒天培地において検出された菌数は少ないものであった。

以上のことから、セレウス菌検査用調査試料は 28 日目まで安定して接種菌を回収することができることから、この基材を調査試料として採用できる可能性が非常に高いものと考えられた。しかし、定性検査として実施する場合には、陰性対照の設定方法を検討する必要があることが示唆

された。一方、ビブリオ属菌検査用調査試料については比較的長期に亘って接種菌を回収できたことは大きな収穫であったものの、今後接種用基材の選択をすることが重要であり、かつ基材中での安定性を保証することが必要であると考えられた。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査(衛生指標菌および食中毒病因微生物検査)試料の作製にあたりとりわけ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」ならびに試験に用いる培地の組み合わせでの反応性が挙げられる。これまでに外部精度管理調査試料の定性検査用試料として、大腸菌群、E. coli、黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌の4種について提供してきた。しかしながら、食品検査における微生物検査はこれら以外にも多数存在することから、実際の微生物検査を見据えた調査項目の選定が必要である。また、外部精度管理調査では参加機関からの意見として、実際の食材に近いものを提供してほしいとのことであるため、単に検査対象菌種の安定性を保証し、寒天培地等を用いて検査対象菌のみを提供することはできない。そのため、接種菌の安定性を採用する食品基材中においても保証する必要がある。セレウス菌は、土壌、塵埃、汚水等に存在しており、食品の腐敗菌として広く知られていることに加え、耐熱性芽胞を形成するため、加熱処理することによっても完全に死滅させることが困難であることから、品質管理上大きな問題となりうる。さらに、本菌による食中毒は感染型と毒素型の両者が認められている。一方、ビブリオ属菌は、水中に多く生息しているが、耐塩性を有しているために海水中にも存在することから、魚介類の生食による食中毒の原因としても挙げられる。

外部精度管理調査用試料はその試料を用いて共同試験を実施することから、試料中の均一性と安定性が保証されなければならない。また、特に微生物検査の場合には通常採用される検査方法に基づいた定性検査を実施したときに、その選択培地上で明らかに陽性、陰性が調査試料の配布から1ヶ月間に亘って判定できることが求められる。

そのため、本年度はセレウス菌検査およびビブリオ属菌検査を対象とした調査試料作製を目標として、基礎的検討を行うこととした。

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菌株を用いた。

セレウス菌検査用

Bacillus cereus HIC 080117

Bacillus cereus HIC 090147

Bacillus subtilis HIC 080138

ビブリオ属菌検査用

Vibrio parahaemolyticus HIC 090153

Vibrio vulnificus HIC 090154

Vibrio haliotocoli HIC 090155

Vibrio fluvialis HIC 090156

なお、試験菌株は5継代以内のものを使用した。

2. セレウス菌検査用菌株の芽胞液作製

上記のセレウス菌検査用菌株をMnSO₄を含有する普通寒天培地に接種し、30~35℃で7

日間培養した。培養終了後、生理食塩液に懸濁させ、芽胞液を得た。

3. セレウス菌検査用基材の作製

市販の白米について121°C60分間のオートクレーブ滅菌を行った後、これに生理食塩液、15%NaCl溶液等を添加し、完全に水分が吸収され米飯状となったことを確認し、これをセレウス菌検査用基材(米飯)とした。

4. セレウス菌検査用試料における均一性および安定性の確認

セレウス菌検査用基材に試験菌を接種し、よく攪拌した後、28日間冷蔵保存した。保存開始時、保存7日目および28日目に試料を取り出し、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)寒天培地を用いて生菌数測定をそれぞれ実施した。なお、均一性の確認には試料5個を用い、それぞれ独立して1容器から2回の反復測定を行い同様に生菌数測定を実施した。均一性確認試験では菌数測定にSCD寒天培地とともに選択培地も使用した。なお、均一性確認試験においては冷蔵保存にて33日間まで実施した。また、試料から公定法に従い試料溶液を作製し、これについて選択培地を用いた定性検査を実施した。

5. ビブリオ属菌の選択培地上での反応の確認

ビブリオ属菌をMarine brothで24時間前培養した後、培養液の1白金耳を選択培地に画線し、集落形成の有無および形成集落の形状を確認した。

6. ビブリオ属菌の冷蔵保存と保存後の生菌数測定

ビブリオ属菌をMarine brothに接種し、冷蔵

または室温にて28日間保存した。保存開始時、保存3日目、7日目、14日目、21日目および28日目に試料を取り出し、Marine agarを用いて生菌数測定をそれぞれ実施した。なお、同様にTCBS寒天培地を用いた生菌数測定も実施した。

C. 研究結果

1. セレウス菌検査用基材の検討

外部精度管理調査試料を作製するうえで、実際の検査で使用されている形状の試料を提供することが最も望ましいと考えられる。そこで、セレウス菌検査用試料を作製するため、市販の白米を用い、これが基材として使用しうるかについて確認した。

現状では調査試料を作製する際に、あらかじめ基材を滅菌した後に対象試験菌を添加することにより、他の微生物の混入を防ぐこととしている。そのため、上記の市販白米をオートクレーブ処理することにより、基材の変性等が認められるかについて確認したところ、変質等は一切認められなかったことから、基材として使用可能であると判断した。そこで、次にオートクレーブ処理後の白米に生理食塩液を添加することにより吸水性を確認した。その結果、グリセリン含有生理食塩液では添加1時間後においても完全に白米に吸水されることはなかったが、それ以外の溶液では長くとも1時間以内に完全に吸水され米飯状となった(表1)。また、吸水後の基材を7日間冷蔵保存することでその形状を確認したところ、グリセリン含有生理食塩液では乾燥が認められたものの、それ以外の溶液では通常の米飯と同等かまたは若干水分量が少ない状況であった。さらに7日間の冷蔵保存後においても異臭の発生等は認められなかった(表2)。そのため、今後の検討ではこ

こで得られた米飯を試料用基材として採用した。

2. セレウス菌検査用試料における均一性および安定性の確認

これまでの検討結果から米飯を基材として使用できる可能性が示唆されたことから、これに *B. cereus* HIC 080117 を接種したときの経時的な菌数変化を検討した。生理食塩液 (MnSO_4 またはグリセリンを含む) または 15%NaCl 溶液を添加することにより作製した米飯基材に試験菌を接種することにより冷蔵保存での 28 日間までの安定性について確認したところ、いずれの溶液で作製した基材についても著しい菌数の減少はみとめられなかった。しかし、保存 28 日目に試料を取り出した後、22°C で 24 時間保存することにより、生理食塩液を添加した白飯では 2~3 オーダーの菌数の上昇が認められたが、グリセリン含有生理食塩液および 15%NaCl 溶液では大きな菌数の変動は認められなかった(図 1)。

本基材を用いることにより少なくとも 28 日間は安定な試料を作製できたものと判断されたことから、この試料における均一性について 5 本の試料を用いて確認した。その結果、菌種によって一部ばらつきが大きなものもあるが、総じてばらつきの少ない試料が作製できたことが確認された。なお、ばらつきについては 33 日目においても保存開始時と同等であった(図 2~図 4)。さらに、5 本の試料を用いたときの選択培地上での反応性についても併せて確認した。その結果、陽性対照菌である *B. cereus* の 2 菌株はいずれも全ての培地において陽性集落を形成した。これに対して陰性対照菌である *B. subtilis* では MYP 培地および PEMBA 培地において非典型集落を認めたものの、NGKG 培地では集落を形成しなかった(表 3)。

3. ビブリオ属菌の選択培地上での反応の確認

本年度の新規項目としてビブリオ属菌について調査試料を作製することを目標として、基礎検討を行った。ビブリオ属菌は非常に不安定であり、寒天培地上においても死滅することがある。外部精度管理調査試料として採用するためには、先に述べたように少なくとも 28 日間の安定性を確保する必要がある。そこで、使用菌株の選択培地上での性状確認と、Marine agar または Marine broth に接種した後の保存の可否について検討した。

初めにビブリオ属菌の選択培地である TCBS 寒天培地および酵素基質培地上での発育の有無と形成集落について確認した。その結果、*V. parahaemolyticus* および *V. fluvialis* では全ての選択培地上に集落形成を認めた。これに対して、*V. vulnificus* では酵素基質培地の 1 種で、TCBS 寒天培地の 2 種で集落形成を認めたが、それ以外の選択培地上には集落を形成しなかった。さらに *V. halotocoli* では全ての選択培地上に集落を形成しなかった(表 4)。

次に、全ての選択培地において集落形成を認めた *V. parahaemolyticus* および *V. fluvialis* の 2 菌種について Marine agar または Marine broth に接種した後、冷蔵または 22.5°C で保存し、長期間の菌の生存について確認した。その結果、*V. fluvialis* を Marine agar に接種し 138 日間冷蔵保存したときに接種菌が死滅したものの、それ以外の条件では全て 138 日目まで接種菌は生存した(表 5)。

4. ビブリオ属菌の冷蔵保存と保存後の生菌数測定