

令和元年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究

総括研究報告書

研究代表者 渡辺 卓穂 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 部長

研究要旨

厚生労働省は、食品の安全の担保と向上に加え健康危害リスクを管理することを目的に、有害物質等の上限濃度を規定した食品規格を策定し、その実効のために検査を実施する。検査での誤判定を避けるために、各試験所による分析値の品質保証が必須である。誤判定の回避は食品貿易上も重要であり、各国間での整合がCodex委員会等を通じて求められている。

本研究では、分析値の品質保証に関する取組みの指針となる業務管理要領を改訂し、品質保証に組み込まれる要素である新たな技能試験プログラムを開発する。業務管理要領は、平成8年の通知後抜本的な改訂がされていない。その間、基礎とされた国際的な品質保証の規格(当時、ISO Guide 25)は3回の改訂を重ね、現版はISO/IEC17025-2017である。そのため、現在の業務管理要領は国際的な品質保証への要求と大きく乖離しており国際整合を図るため、ISO/IEC17025の最新版を基礎とする改訂を検討する。また、改訂された業務管理要領が我が国の試験所における品質保証にどのような影響を与えるかを検証する。技能試験プログラムは、検査される全ての分析項目に対し開発されているのが理想であるが、困難さのため一部の分析項目しか開発されていない。この現実を踏まえ、新規技能試験プログラムを開発すると共に既存のプログラムの改善を図る。また、パイロットスタディにより実効性を検証し、新規プログラムとしての導入を検討する。そこで、今年度は、1. 国際整合性を踏まえた業務管理要領案の開発に関する研究（渡邊研究分担）、2. ISO/IEC 17025認定取得に向けた試験所の検討に関する研究（石井研究分担）、3. 既存技能試験プログラムの改善及び新規技能試験プログラムの導入に関する研究（渡辺研究分担）、4. 新規技能試験プログラムの開発及び統計学的評価に関する研究（松田研究分担）、5. 新規技能試験プログラム用試料の開発に関する研究（井部研究分担）の5課題について実施した。

研究分担者名 = 渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所室長）、石井里枝（埼玉衛生研究所副所長）、渡辺卓穂（(一財)食品薬品安全センター秦野研究所公益事業部長）、松田りえ子（国立医薬品食品衛生研究所客員研究

員、井部明広（実践女子大学教授）

A. 研究目的

厚生労働省は、食品の安全の担保と向上に加え健康危害リスクを管理すること目的

に、有害物質等の上限濃度を規定した食品規格を策定し、その実効のために検査を実施する。検査においては、誤判定を避けるために、各試験所による分析値の品質保証が必須である。誤判定の回避は食品貿易上も重要であり、輸出入国間での係争を回避するためにも各国間での整合が Codex 委員会等を通じて求められている。

本研究では、分析値の品質保証に関する取組みの指針となる業務管理要領を改訂する。また、品質保証に組み込まれる要素である技能試験プログラムを新たに開発する。業務管理要領は、平成 8 年の通知後抜本的な改訂がされていない。その間、基礎とされた国際的な品質保証の規格(当時、ISO Guide 25)は 3 回の改訂を重ね、現版は ISO/IEC17025-2017 である。そのため、現在の業務管理要領は国際的な品質保証への要求と大きく乖離しており国際整合を図るためにも、ISO/IEC17025 の最新版を基礎とする改訂を検討する。また、改訂された業務管理要領が我が国の試験所における品質保証にどのような影響を与えるか、ISO/IEC 17025 による認定取得に向けた試験所の課題を精査することによって、実行可能性も含め検証する。技能試験プログラムは、検査される全ての分析項目に対し開発されていることが理想であるが、困難さのため一部の分析項目しか開発されていない。新規技能試験プログラムの開発を困難にしている大きな要因は、新規試料開発における技術的課題と少数データの統計的評価方法の不在にある。試料開発に関しては、貝毒及び動物用医薬品等を分析項目とする新規試料を開発する。さらに粉体工学技術を導入し、保存安定性や均質性に優れた試料の開発も検

討し、学術的にも有益な成果を得る。少数データの評価を可能にする新たな統計的評価方法の構築を検討した。上記 2 つに大別される研究は、厚生労働省によるリスク管理をより堅実なものとし、健康危害の未然防止や食品貿易時の係争回避に直結する成果が期待されるため、必要かつ早急に着手すべきであり、当研究班の目的である。

B. 研究方法

1 国際整合性を踏まえた業務管理要領案の開発に関する研究(渡邊研究分担)

食品と飼料を対象とする微生物試験の一般必要事項を示した国際規格 (ISO 7218; [Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations])に含まれる内容を、微生物分析分野における内部品質管理の考え方の基礎とした。

微生物分析分野における内部品質管理への取組を決める上で必要な方法論等の基礎とすべき文書は見つからなかった。そこで専門家の協力を得て、少なくとも科学的な誤りが無く、実行可能性が担保された内部品質管理に関する考え方や方法(若しくは方法論)を示すことを目的として検討した。検討結果に基づき、内部品質管理ガイドラインを更新した。内部品質管理ガイドラインに新たに含まれることとなった、微生物分析分野における取組内容の一部は、食品衛生検査指針・微生物編(2018 年) 5 章「精度管理」(pp49-59)と整合している。

微生物分析分野における内部品質管理の開発による更新の他、内部品質管理ガイドライン全体をレビューした。その際には、試験所の能力への国際的な要求水準また、国

際的に整合した用語の定義を、Codex 委員会が発行するガイドライン(CAC/GL 27; Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of foods、CAC/GL 70; Guidelines for settling disputes over analytical (test) results、CAC/GL 72; Guidelines of analytical terminology、CAC/GL 83; Principles for the use of sampling and testing in international food trade 等)を用いて改めて調べた。また、新たに追加した「モニタリング」の用語の定義では、ISO 9001:2015 による定義を参考にした。

2 地方自治体試験所への ISO/IEC 17025 に準拠した業務管理導入に関する研究 (石井研究分担)

2.1 ISO/IEC 17025に準拠した業務管理導入に対する課題等の抽出

「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」(平成9年1月16日衛食第8号) ISO/IEC 17025:2017及びガイドライン案を比較検討し、地方自治体の食品衛生検査施設においてガイドライン案に沿って業務管理を実施する際の課題やその解決策等を検討した。

2.2 信頼性確保部門責任者及び内部監査員等の養成講習会の実施方法及び実施内容についての検討

令和2年2月6日、一般社団法人RMA所属の森曜子氏を講師として招聘し、模擬内部監査員養成研修会を実施した。そして、効果的な研修会の実施方法及び内容についての検討を行った。

2.3 技能試験への参加

令和元年10月8日～11月25日に(一財)食品薬品安全センターで安定性及び均一性の改善を目的に開発されたカドミウムを含む玄米(粉末)試料について研究協力機関8機関及び地方自治体検査機関11機関の合計19機関が参加し、技能試験を実施した。

3 既存技能試験プログラムの改善及び新規技能試験プログラムの導入に関する研究 (渡辺研究分担)

3.1 残留農薬技能試験プログラムのパイロットスタディ:

新たな作製方法としてスプレードライヤを用い、玄米(粉末)を試料基材として、重金属技能試験用カドミウム添加玄米の作製を試みた。更にこれを用い、本研究の研究分担協力機関である公的検査機関21機関を対象に当該試料の技能試験用試料としての妥当性を確認するため、パイロットスタディとして当該試料を用いたカドミウム濃度測定の間共同試験を行った。併せて、水分含量の測定を依頼した。参加機関から得られた結果について、統計解析を行い、技能試験を行うための調査試料としての妥当性を検討した。

3.2 アレルギー物質技能試験プログラムのパイロットスタディ:

小麦タンパク質を10 µg/g 添加した試料(基材としてベビーフードおよび10%精製水含有こしあん)を用い、定量試験法であるELISA法について外部精度管理調査研究を実施した。参加機関は、原則として消費者庁から提示されている3キット(モリナガキット、日本ハムキット、プリマハムキット)中任意の2種類で測定を行うこととした。参加機関から得た測定結果は測

定キットごと、および試料ごとにまとめ、ロバスト方式により統計値を算出した後、z-スコアを算出した。また、測定結果から得られた含有量を指標とした *Xbar-R* 管理図を用いた解析も行った。

3.3 スプレードライヤを用いた新規技能試験用試料の作製検討：

1. 試料基材および試薬

試料基材として市販の米粉(日本製粉)自家製玄米粉(宮城ひとめぼれを粉碎した)を用いた。標準品としてカドミウム標準溶液(1000 mg/L 溶液、化学分析用、関東化学)を用いた。また、試料調製には注射用蒸留水(日本薬局方、以下、水、光製薬)を使用した。玄米粉の分解には、硝酸 1.38(有害金属測定用、以下、硝酸、関東化学)および硝酸 1.42(Ultrapur-100、以下、高純度硝酸、関東化学)を用いた。

2. 使用機器および測定条件

玄米粉の秤量にはメトラート社製電子天秤(PR803)を、分解には電子レンジ(RE-T2、シャープ)およびホットプレート(NP-6型、柴田科学)を用いた。玄米粉中のカドミウムは島津製作所製原子吸光光度計(島津 AA6800)を使用した。原子吸光光度法測定条件を以下に示す。

(1) フレーム方式

使用ガス：可燃性ガス(アセチレン)

：支燃性ガス(空気)

ランプ：Cd；カドミウム中空陰極ランプ

波長：Cd；228.8 nm

点灯モード：BGC-D₂法

スリット幅：2.0 nm

3. 標準溶液の調製

原子吸光光度計では検量線作成用とし

て、カドミウム標準溶液は 0.05 ~ 0.4 μg/mL の範囲で、電気加熱方式は 5 ~ 40 ng/mL で調製した。

4. 試料溶液の調製

カドミウム 0.5 mg/kg 添加試料

試料を精密に量り取り、硝酸を用いた湿式分解法により分解を行った。分解後、0.1 mol/L 硝酸溶液を加えて残留物を溶解し、更に 0.1 mol/L 硝酸溶液を加えて全量を一定容量とし試料溶液とした。なお、各元素の添加濃度により、適宜 0.1 mol/L 硝酸溶液で希釈した。これを原子吸光光度計測定用試料とした。

5. 試料の作製

試料基材には自家製玄米粉(宮城ひとめぼれを粉碎した)を用い、20%懸濁溶液を作製した。すなわち、玄米粉 30 kg を 0.125 mg/L カドミウム 120 L に懸濁させた(玄米粉の理論作製濃度：0.5 mg/kg)。これをスプレードライヤに供した。

6. スプレードライヤによる玄米粉試料作製条件

スケールアップに用いたスプレードライヤは大川原化工機株式会社製 ODA-30 を用いた。玄米粉懸濁溶液は 100 L ポット(内径 47 cm、高さ 60 cm)に精製水 54 kg(18 kg × 3)を入れ、カドミウム標準溶液 500 mL を攪拌しながら加えた。その後、玄米粉を 15 kg 加え、10 分間羽攪拌を実施した。その後、作製した玄米粉懸濁液を 30 分間ホモミキサーで分散させた(回転数：約 5000 rpm)。分散後、200 L ポットに移した。この操作をもう一度実施し、作製した液を 200 L ポットに入れ、一つの液とした。洗いこみ用精製水を 12 kg 測り、それを米粉の分散に

使用した 100 L ポットに入れ、洗いこみを行った後、200 L ポットに加えた。作製した玄米粉懸濁液を一晩羽攪拌した。この懸濁溶液を攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに 30 kg/h で送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクは MC-125 型を使用した。回転数は 18000 rpm に設定した。また、入り口温度は 180 、出口温度は 100 とした。得られた玄米粉はマイクロトラックベル社製マイクロトラック MT3200 を用い平均粒子径を測定した。また、得られた玄米粉は原子吸光光度計でカドミウムを測定し、その玄米粉中のカドミウムの均質性を確認した。また、作製した玄米粉は顕微鏡下で粒子の観察を行った。

4 新規技能試験プログラムの開発及び統計学的評価に関する研究（松田研究分担）

4.1 ヒスタミン技能試験パイロットスタディ

2 種類の試料を作製した。試料 1 は市販さば味噌煮缶、試料 2 は市販さば水煮缶にヒスタミン二塩酸塩を添加した。

試料の均質性を確認するために、作製した試料からランダムに 10 個を抜き取り、それぞれの内容物を均質化し、それぞれから 2 試験試料を採取し、性能確認した分析法によりヒスタミン濃度を測定した。

国内の試験所から参加者を募集し、魚加工品中ヒスタミン分析技能試験のパイロットスタディを実施した。参加試験所には試料 1 と 2 を宅配便により送付した。分析回数は 1 回とした。

均質とみなされる試料を、一試験所において LC-MS 法、LC-蛍光法、キット法の 3 分

析法で分析し、結果を比較した。

4.2 一般生菌数技能試験パイロットスタディ

市販の魚肉すり身を均質化して試料とした。

試料の均質性を確認するために、作製した試料からランダムに 10 個を抜き取り、それぞれの内容物を均質化し、それぞれから 2 試験試料を採取し、一般生菌数を測定した。

国内の試験所から参加者を募集し、一般生菌数分析技能試験のパイロットスタディを実施した。鍵のかかる容器に試料とドライアイスを入れ、参加試験所には宅配便(冷凍)により送付した。試料温度の変化を記録するためのロガーも同梱した。分析回数は 1 回とし、使用した分析法の概略も報告することとした。

5 新規技能試験プログラム用試料の開発に関する研究（井部研究分担）

5.1 さばを基材としたヒスタミン技能試験のための試料開発

常温で長期間保存することを目的とした殺菌を施すために、ヒスタミンの熱安定性試験を行った。

市場に流通する缶詰めには味付けがされていることが多く、このような試料においてもマトリクスの影響を受けずに正確にヒスタミンを測定することができるか確認するために、さばの水煮とさばのみそ煮の 2 つの試料を作製した。両試料ともヒスタミンの濃度は 100 $\mu\text{g/g}$ とした。

技能試験に用いた残りの試料からそれぞ

れランダムに 10 缶を抜き取り、安定性の評価を行った。安定性評価の実施時期は試料調整から 2 ヶ月後の技能試験パイロットスタディ終了時に行った。

5.2 魚肉すり身を基材とした一般生菌数技能試験のための試料開発

昨年度の予備検討において良好な結果を得た添加物入りの魚すり身(柳都入船 製)を用いて 130 機関を対象とした技能試験パイロットスタディ試料の作製を行った。用いたすり身の原材料は、ぐち、いとより、卵白、でん粉、砂糖、食塩、みりん、酒精、調味料(アミノ酸等)、リン酸塩(Na)であった。さらに、「感染症発生動向調査事業等においてゆうパックで検体を送付する際の留意事項」(平成 24 年 3 月 15 日付 健感発第 0315 第 1 号)に従って試料の輸送方法を検討した。輸送時の温度上昇により技能試験試料に問題が生じないかモニタリングするために、発送時から 10 分間隔で温度をモニタリングし全ての機関が試料を受領するまでの期間の温度をモニタリングした。

安定性試験は技能試験開始時の 1 月 22 日と試験終了時の 2 月 3 日に行った。

C.D. 研究結果および考察

1 渡邊研究分担

本研究により開発された内部品質管理ガイドラインを別添として示す。本項ではまず、本ガイドラインの開発時に行ったいくつかの考察を示す。次いで、別添に示したガイドラインの最終化の段階で協力研究

者から寄せられた意見のうち、本ガイドラインへの理解を深め、取組内容を自ら考える機会となる意見とそれらへの個人的な意見を述べる。

1)内部品質管理の前提

内部品質管理は、分析結果の品質を保証するための一連の取組のうちの1つである。統計的管理状態の確立が内部品質管理実施の前提となる。ある試験所がある分析結果を得るために運用する分析システムについて、統計的管理状態の確立を試みる場合、その分析システムを構成する種々の要素が異なる程度で寄与する。種々の要素のうち、特に寄与率が大きい要素は分析法の性能であろう。食品分析分野でも、化学物質を対象とし機器分析を行う分野(理化学分析分野)では、分析法の性能を評価し妥当性を確認することが日常となっている。この分析法の性能評価と妥当性確認を通じて、統計的管理状態の確立に重要な情報が取得される。一方、現在の微生物分析分野においては、分析法の性能が統計的管理状態の確立に資する内容で明らかにされることは少ないと聞いている。微生物分析の場合には、分析法の純粋な性能の観点からだけでなく、分析の目的の観点(例えば ALOP; Appropriate Level of Protection等を指標として)からも取得すべき情報があるのではないだろうか。分野において蓄積され踏襲されてきた取組方や考え方、その結果として成立した慣習等があることも理解されるため、単純な考察から軽率な意

見を提出する意図はない。しかし、内部品質管理において使用する試料への添加濃度を定める上で不可欠な検出下限への取り決めや推定方法の指示がないと言った意見も聞かれる。また「陰性」との判断に対する科学的な説明がない場合もあると聞く。一方、食品衛生検査指針・微生物編(2018年)には微生物分析法の妥当性確認(バリデーション)と性能検証(ベリフィケーション)の解説がされており、国立医薬品食品衛生研究所が中心となり標準試験法(NIHSJ法)の整備が進められていることが紹介されている。この後、これら分析法の標準化や妥当性確認への取組が進められるのに伴い、内部品質管理の適正な実施についてもより適切に検討することができるようになるものと期待する。

2)内部品質管理の観点から分析活動を整理する重要性

微生物分析分野に限ることではないが、内部品質管理の狙いは主に2つある。1つは分析システムの統計的管理状態が維持されていることをモニターし、そこからの逸脱を発見(予測)し、必要に応じて改善等の措置をとり、品質の保証された分析結果を生産し続けられるようにすることである。もう1つは、一時に生産される分析結果が妥当であることを、併行分析する管理用試料の分析結果から確認することである。妥当であることが確認された後でなければ、分析結果を分析依頼者(顧客)に提供することはできない。理化学分析の場合、一時に

生産される分析結果とは、1つのランによって生産される分析結果である。一般的な説明とするならば、管理用試料の分析によって、統計的管理状態からの逸脱がないことを検証・保証することが可能な範囲(時間や要員、機器等の変化の範囲)で生産される分析結果ということができるだろう。この範囲を明確にすることができなければ、効果的な内部品質管理への十分な取組は期待できない。統計的管理状態からの逸脱がないことを検証・保証する範囲をまず明確にし、次にその範囲で一時に生産される分析結果の数に応じた精緻さでモニターするための内部品質管理分析の実施頻度を検討することになる。範囲が常に一定ではないという意見が聞こえてきそうだが、内部品質管理の観点からは、品質を適正に保証できるように、分析結果の生産体制を見直すべきであるとししか言うことができない。

3)ガイドライン最終化で挙げられた意見

・その1；

管理用試料についてISO guide 80: 2014を引用して紹介すべきである。

個人の見解；解説文等において紹介する。

・その2；

培養器ごとに分析結果(微生物の増殖の程度)を確認すべきである。

個人の見解；培養器は分析システムの一部である。複数の培養器を用いる場合、それらを1つの分析システムに組み込まれた要素と捉えるのか、複数の分析システムに属

する独立した要素と捉えるのかによって、管理への考え方も変わりうる。内部品質管理用試料の分析結果によって、検査用試料から得られた分析結果の品質を同時に保証するという考え方が、内部品質管理の基本にある。各試験所における分析システムの捉え方並びに上記の考え方を踏まえて検討していただきたい。

・その3；

二重試験の実施について詳細を示すべきである。

個人の見解；二重試験は、ガイドライン本文中に二重分析として説明している。つまり、「同一試料から分析に必要な量で2つの部分を分取し併行分析する」行為である。

・その4；

微生物試験の特性上、ランの構成数によって管理用試料の分析数等を設定するのは適当ではない。培地作成のロットや培養器が異なる場合にそれぞれ管理用試料を分析する方が内部品質管理の意味がある。

個人の見解；2への見解を踏まえて、考察していただきたい。

・その5；

実際の検査用試料からどのような結果が得られるかは分からないため、管理用試料を二重試験することのほうがばらつきの把握には有用である。

個人の見解；実際の検査用試料のマトリクス(食品成分と共存する細菌の種類と量)が、分析結果にどのような影響を与えるか分からないからこそ、それらを二重試験すべき

と考えることもできる。もちろん、管理用試料が検査用試料に同一もしくは類似している場合には、それを二重試験することで、検査用試料から得られる分析結果のばらつきの管理に資する情報が得られる。この前提あるいは条件が満たされずまた、満たされないことをリスクと捉えるのであれば、検査用試料の二重試験を積極的に行うことを考えるべきであろう。

・その6；

規格値の5倍量ではなく、検出限界の5倍量を添加すべきである。

個人の見解；検出限界の値がどの様に推定されるかにもよるが、その値がポアソン分布に従うような低値であった場合、意図した数量で確実に添加することが困難となる。本質的には、各微生物試験において、「陰性」と判定する場合、なにを根拠としているかを明確にする必要があると考える。ある試験において、十分に信頼できる確率で「陰性」あるいは「陽性」を区別するためには、それに必要な分析法の性能を明らかにすることと、併行試験数を増やすといった試験手順の設計が必要である。ただし、一意に決まるものではなく、フィットネスフォーパースを踏まえ専門家によって議論されるべき課題であろうと考える。

・その7；

ランの長さを20を指標として区別することは、微生物試験にはなじまない。

個人の見解；内部品質管理の対象となる最

小単位は1つのランである。1つのランで取得された分析結果が、内部品質管理用試料の分析結果に基づき妥当であると判断された場合に、依頼者に提供される。この基本的な考え方を踏まえて、ランごとに統計的管理状態が確認されることは重要だと考える。ランの長さは試験所の考え方や能力によっても異なるであろうから、ガイドライン案に示された数(20)は、あくまで例と捉えればよい(そもそも、20という数に科学的根拠はない。リスクへの一般的な感覚によるのだろう)。大事なことは、ランの長さに応じて、内部品質管理によるモニターの精緻さについて配慮することである。

・その8；
分析法の妥当性確認は内部品質管理の前提である。しかし微生物試験に関しては、この妥当性確認のための指標となる性能規準の値等に合意がない。またそのことに関連し、マトリクスにより試験結果が大きく影響を受けると考えられる場合が多々あるが、試験法の変更は多くの場合認められていない。

個人の見解；微生物分析分野の今後にとっても大きな課題であると認識はできるが、内部品質管理のガイドライン中で取り扱うべき内容ではないと考える。分析法に限らず内部品質管理に関しても、たくさんの意見や考え方があるだろうと想像するが、それらが今後、有効にとりまとめられ実用になることを期待し、本ガイドラインにはその出発点となる考え方や具体例を示し

た。

4) 今後への期待

食品衛生検査指針・微生物編(2018年) 5章「精度管理」の著者等も言及しているが、内部品質管理の方法(論)は唯一無二というわけではなく、複数が考えられかつ、それぞれに一長一短があるだろう。よって、単独の方法で試験検査全体を保証することは不可能である。内部品質管理における取組を設計・構築する際には、各方法の特徴(利点・欠点)を十分に理解した上で複数の方法を適切に組み合わせ、できる限り異常を見逃すことのないよう工夫することが重要である。

本研究において開発した内部品質管理ガイドラインに含めた考え方や取組が、十分であるとは考えていない。しかし、科学的に誤りは無く、合理的であり、実行可能性にも配慮されている。本ガイドラインに示された内容を上回る内部品質管理が試験所により実施されることを妨げるものではない。そのことは、「試験所は、国際的に認められた他の考え方や具体的な内容に沿って、自らの試験所の活動により適した内容となるよう検討した上で、内部品質管理に取組むべきである。」という文章により明示されている。そもそも、どの様な内容で内部品質管理を実施すべきかは、その試験所の活動内容と、品質保証への取組方針によって変わる。品質保証への取組方針が“ゆるすぎる”ならば、検査への信頼は得られないであろうし、“きつすぎる”なら

ば、試験活動そのものが立ちゆかなくなるだろう。「分析結果の品質保証は、試験所にとって本質的な組織インフラであり、全ての信頼できる分析結果の基礎となる。」ことを十分に理解し、外部専門家等によりもたらされる意見や情報も考慮材料として、フィットネスフォーパースを踏まえて専門家として判断をしつつ、顧客からの信頼につながる合理的で効果的な内部品質管理に取り組んでいただきたい。

2 石井研究分担

2.1 ISO/IEC 17025 に準拠した業務管理導入に対する課題等の抽出

課題及び解決策等は「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領改正（以下、業務管理要領改正）」及び「食品衛生に関連した検査等を実施する試験所の能力の一般必要事項と分析結果の品質保証に関するガイドライン（案）（以下、ガイドライン案）」に対する意見」としてまとめ、令和元年10月15日に厚生労働省医薬・生活衛生局 食品監視安全課長宛て提出した。また、11月11日に地方衛生研究所全国協議会会長とともに食品監視安全課長を訪問し、提出した意見書の内容について説明を行った。

2.2 信頼性確保部門責任者及び内部監査員等の養成講習会の実施方法及び実施内容についての検討

令和2年2月6日に一般社団法人RMA所属の森曜子氏を講師に「地方自治体食品衛生検査施設における内部監査」と題して研修を実施した。

この研修の受講を通して、今後、地方自治体の食品衛生検査施設においてどのような養成研修会効果的であるかを検討し、以下の項目についてまとめた。

1)日程、2)場所、3)スケジュール、4)対象者、5)内容、6)講師、7)資格制度、8)運用等に関する意見、9)その他

2.3 技能試験への参加

実施結果の詳細については、分担研究「既存技能試験試料の改善及び新規技能試験プログラムの導入に関する研究」（渡辺班）の報告書に記載のとおりである。

3 渡辺研究分担

3.1 残留農薬技能試験プログラムのパイロットスタディ：

スプレードライヤにより作製した試料を用い、パイロットスタディを行った。作製した試料の均質性および安定性について、良好な結果が得られた。ブランク試料中カドミウム濃度および作製工程に応じた水分含量を考慮し、調査試料の理論作製濃度を算出した。得られた算出値に対し、各検査機関平均値がよく一致した。さらに回収した検査機関の全データについて、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」の評価基準を参考に回収率やばらつきを観察した。理論作製濃度に対する各検査機関平均値の回収率を論じる際は、スプレードライヤによる作製の特性上、基材由来のカドミウム濃度およびカドミウム添加量について作製工程に応じた水分換算が必要となったが、これを算出することにより検査機関平均値は概ね算出した理論作製濃度に一致した。また、機関間で前処理方

法や測定機器等の採用手法の相違があるものの、「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」の評価基準を満たす結果が得られた。併せて、国際的ガイドラインの室間共同試験による分析法の妥当性評価において指標となる HorRat (R) を算出した結果、水分換算の有無に関わらず、いずれも 0.5~2 を満たす妥当な結果が得られた。以上のことから、各検査機関が一般的に用いる各種試験法に対応可能な堅牢性を有する技能試験用試料として妥当であることが示唆された。

3.2 アレルギー物質技能試験プログラムのパイロットスタディ：

本年度の参加機関は 26 機関であり、うち、モリナガキット使用機関は 26 機関、日本ハムキット使用機関は 24 機関、プリマハムキット使用機関は 2 機関であった。各キットおよび試料ごとに解析を行ったが、プリマハムキットについては参加機関が少なかったことからキットごとの解析を行わなかった。

解析結果においてメジアン・クリーニングにより除外される機関は全体を通して 1 機関であった。また、z-スコアの絶対値が 2~3 および 3 以上となる機関が数機関認められた。Xbar 管理図では管理限界線の範囲を超える機関は 2 機関、R 管理図で管理限界線を超える機関が 1 機関認められた。

また、検量線が全体の集団から外れている場合は、測定値が外れ値を示すことがあり、背景データの検量線から明らかな乖離が認められる場合は結果の解釈に注意が必要であると考えられた。

3.3 スプレードライヤを用いた新規技能試験用試料の作製検討：

スプレードライヤによる玄米粉試料のスケールアップ

昨年度までに、玄米粉を用い 20 %懸濁液で試料作製できることが分かった。今年度は玄米粉で実際の作製量にスケールアップすることを試みた。予備検討では 10 kg の作製検討を行い、良好な結果が示された。これまでの検討には、市販の玄米粉を用いていたが、安定供給品でないことから、今後、販売されない可能性もあり、自家製の玄米粉を用い検討することとした。市販の玄米粉（宮城ひとめぼれ）をスクリーンサイズ 1.0 mm で遠心粉碎し、自家製玄米粉とした。図 1 に市販玄米粉と自家製玄米粉の粒子径分布と顕微鏡写真の比較を示す。自家製玄米粉のほうが市販玄米粉に比べ全体的にやや粒子径が大きいものの作製には影響ないと考えられた。そこで、自家製玄米粉を用い実際の作製量である 30 kg で検討を行った。スケールアップのために用いた大型のスプレードライヤ ODA-30 の外観を図 2 に示す。ODA-30 はこれまで検討用に用いた L-8i に比べ、直径が約 4 倍であり、試料の処理量は格段と多くなる。実際に作製する量に匹敵する量として 30 kg を作製検討した。すなわち、20%玄米粉懸濁液（最終作製理論濃度：0.5 mg/kg）150 L を試料とした。試料懸濁液は、図 3 に示す手順で作製した。スプレードライヤに供する前にさらに均一にするためにホモミキサーで十分に攪拌した。今回の検討に用いた玄米粉は、市販の玄米を自家粉碎したものであり、原液処理量は装置の性能から 35 kg/h（実測 32.2 kg/h）とし、ディスクは MC-125

を、その回転数は、18000rpmを、入口温度、出口温度はそれぞれ180 および96 とした(図4)。スプレードライヤで作製した自家製玄米粉は図5に示すように平均粒子径86 μmと市販の玄米粉に比べ平均粒子径は小さくなった。市販玄米粉を用いて作製した時と比べ、はるかに小さい粒子径となった。市販玄米粉のときと比べ、自家製玄米粉は、プレ攪拌(羽根攪拌)(10分) ホモミキサーを用いた本攪拌(30分、5000rpm)およびスプレードライヤに導入する前にプレ攪拌と同様羽根攪拌を1時間行った。これにより、原液は細かい粒子へと分散していることが確認された。よって、スプレードライヤへ導入する前の攪拌により、粒子径は小さくなることから、攪拌条件をコントロールする必要があると考えられた。また、表2に示すように一元配置分散分析を行ったところ均質性が確認された。仕込み濃度を0.5 mg/kgに設定し、ブランク濃度が0.106 mg/kg(水分換算)であり、水分換算後の仕上がり濃度は0.692 mg/kgとなった。実測値が0.655 mg/kgであり、回収率を計算すると約95%であった。次に、さらに同様の自家製玄米粉を用い、再現性の検討を行った。均質性確認の結果を表3に示す。カドミウムの仕込み濃度は同様の0.5 mg/kgとして水分換算後の仕上がり濃度は理論値の0.677 mg/kgとなった。実測値は表3に示すように0.638 mg/kgとなり、回収率は約94%となり、先に作製した結果とほぼ同等であり、表4に示すように均質性も確認された。図6、7に経時的にサンプリングされた試料の顕微鏡

写真と粒子径分布を示す。Lot1 ~ の順でサンプリングした。サンプリング初期(Lot1)では粒子径の小さいものが認められ、徐々に大きな粒子径のものができることがわかり、最終的には10~20 μm および100~200 μmの粒子径の玄米粉となった。以上の結果より、自家製玄米粉を用い、技能試験用試料の作製にスプレードライヤを用いることが可能であることが確認された。本法を用いることでこれまで、玄米粉を用いた重金属検査用試料作製にはおおよそ3ヶ月を要していたが、本法では1週間程で作製することが可能となった。また、技能試験用としての品質には問題なく、簡便に目的濃度のものを作製することができることも大きな利点となり、従来の作製法に替わるものであることが示された。ただし、水分量が通常の1/3程の約5%となるため、取り扱いには注意する必要がある。

4 松田研究分担

4.1 ヒスタミン技能試験パイロットスタディ

作製した試料からランダムに10個を抜き取り、ヒスタミンを2回分析した結果を分散分析し、繰り返し及び試料間の標準偏差を計算し、結果をThe International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories4)に示されているRecommendation 7及び8に従って評価した。両試料は技能試験に適切な均質性を有すると評価した。

99か所の試験所から参加の申し込みがあ

り、95 試験所から結果が報告された。分析方法は、各試験所が日常的に行っている方法とした。報告された試料 1 及び試料 2 のヒスタミン濃度の報告数、平均値、ロバスト平均値、標準偏差、ロバスト標準偏差、推定標準偏差を求めた。ロバスト平均値およびロバスト標準偏差は Algorithm A により計算した。さらにロバスト平均値から Thompson による Horwitz 式の修正式を用いて求めた室間標準偏差を、推定標準偏差とした。

ロバスト平均値とロバスト標準偏差から報告値の z-スコアを計算した。 $|z| \geq 2$ で満足と評価された試験所数は試料 1 では 81、試料 2 では 82、 $2 < |z| < 3$ で疑わしいと評価された試験所数は試料 1 では 4、試料 2 では 5、 $|z| < 3$ で不満足と評価された試験所数は、試料 1 では 10、試料 2 では 8 であった。

ヒスタミン分析法として LC-蛍光法を使用した試験所が最も多かった。蛍光誘導体化試薬としてオルトフタルアルデヒドを使用した試験所が 12 か所、ダンシルクロライドを使用した試験所が 16 か所、フルオレスカミンを使用した 18 か所、AccQ-Tag を使用した試験所が 1 か所であった。キット法を使用した試験所数は 2 番目に多く、25 試験所中 22 試験所が、キッコーマンバイオケミファ社製チェックカラーヒスタミンを使用した。その他に、2 試験所が MBL 社製ヒスタマリン EIA キットを、1 試験所が R-Biopharm 社製 RIDA スクリーンヒスタミンを使用した。LC-MS 法を採用した試験所数は 16 で、10 試験所が誘導体化せず測定、ダンシル誘導体化した試験所が 2 か所、Py-Tag (2,4,6-トリエチル-3,5-ジメチルピリリ

ウムトリフルオロメタンスルホン酸塩) 誘導体化を行った試験所が 1 か所あった。また、条件の記載が不足しているため誘導体化の有無が不明な試験所が 2 か所あった。

上記の他に、UV 検出器による LC 法を採用した試験所が 5 か所あり、その内の 1 試験所は LC-TOF-MS による確認を実施していた。オルトフタルアルデヒドで誘導体化する蛍光法を採用した試験所は 2 か所あった。

使用した試験所数の多かった LC-蛍光法、LC-MS 法、キット法で得られたヒスタミン濃度報告値のロバスト標準偏差には大きな違いは認められなかった。ロバスト平均を比較すると、LC-蛍光法が他の 2 つの方法よりもやや大きい、有意の差とは認められなかった。

一か所の試験所で、LC-蛍光法(ダンシル)、LC-MS 法、キット法によって得られた結果においても、LC-蛍光法の結果の平均値はキット法と比較して 10%程度大きかった。しかし、試行数が少なく、LC-蛍光法の結果の標準偏差が大きかったため、その差は有意ではなかった。

4.2 一般生菌数技能試験パイロットスタディ

作製した試料からランダムに 10 個を抜き取り、一般生菌数を 2 回分析した結果 (cfu/g) の常用対数を分散分析し、繰り返しの分散と試料間の標準偏差を計算した。

ヒスタミン技能試験パイロットスタディ試料と同じく、The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories⁴⁾ に示されている Recommendation 7 及び 8 により試料の均質性の評価を行った。一般生菌数分析結果に

は Horwitz 式が適用できないため、微生物試験の一般的な室間精度とされている 0.25 を σ_p として使用した。試料の一般生菌数の常用対数は Recommendation 7 と 8 の条件を満足したため、試料は技能試験に適切な均質性を有すると評価した。

130 か所の試験所から参加の申し込みがあり、全ての試験所から結果が報告された。分析方法は、各試験所が日常的に行っている方法とした。

報告された試料の一般生菌数 (cfu/g) を常用対数に変換した値を報告値とした。報告値の平均値、ロバスト平均値、標準偏差、ロバスト標準偏差を求めた。ロバスト平均値およびロバスト標準偏差は Algorithm A により計算した。報告値の平均値は 3.77、ロバスト平均値は 3.79 であり、ロバスト平均値と平均値はほぼ一致した。報告値の常用対数の標準偏差は 0.39、ロバスト標準偏差は 0.36 であり、ロバスト標準偏差は標準偏差よりやや小さくなった。標準偏差ロバスト標準偏差とともに、微生物試験結果を常用対数化した際の一般的な室間標準偏差と言われている 0.25 を大きく上回った。

報告値、ロバスト平均値、ロバスト標準偏差から z -スコアを計算した。 $|z| \geq 2$ で満足と評価された試験所数は 123、 $2 < |z| < 3$ で疑わしいと評価された試験所数は 6、 $|z| \geq 3$ で不満足と評価された試験所数は 1 であった。

参加試験所が採用した条件の報告値への影響を検討した。

到着時に試料が半解凍であった結果は少数 (6) であるが、凍結していたと報告された結果との平均値の違いは見られなかった一方、分布の幅が大きかった。同梱したロガ

ーで測定した温度は、全ての試料で試料到着まで 0 以下であった。試料採取量の平均値への大きな影響は見られなかった。ペプトンを加えた希釈水による平均値 (3.82) は、生理食塩水を希釈水としたときの平均値 (3.65) よりやや高く、有意の差があった。一方、希釈水を生理食塩水とした場合と、リン酸緩衝液とした場合の平均値 (3.80) には有意の差はみられなかった。標準寒天培地を使用した結果とフィルム等の培地調整を行わない方法で得られた結果に、平均値の違いは認められなかったが、培地調整を行わなかった結果の方が分布の幅が小さかった。

5 井部研究分担

I. さばを基材としたヒスタミン技能試験のための試料開発

ヒスタミンの加熱による安定性は 50, 100, 150 $\mu\text{g/g}$ の 3 つの濃度帯で確認した。添加したヒスタミン二塩酸塩の量から計算される理論値はそれぞれ、50.79, 100.16, 150.29 $\mu\text{g/g}$ であり、均質化、製缶、加熱と一連の処理を行った試料を測定した結果は、それぞれ 48.09, 93.62, 141.20 $\mu\text{g/g}$ であった。以上より、均質化処理と 121 で 15 分間の加熱操作を行った試料のヒスタミン残存率は 94.7, 93.5, 94.0 % であり、濃度による差は確認されなかった。

試料 1 は市販のさばみそ煮缶詰 13.70 kg を基材とし 139 缶、試料 2 は市販のさば水煮缶詰 13.94 kg を基材とし 150 缶の試料を得た。ヒスタミン二塩酸塩の添加量から計算され

る試料 1 のヒスタミン理論値 99.01 $\mu\text{g/g}$ 、試料 2 のヒスタミン理論値 98.50 $\mu\text{g/g}$ に対して、実際の測定値はそれぞれ 93.66, 99.74 $\mu\text{g/g}$ であった。技能試験試料として安定性の評価は技能試験に用いた残試料(試料 1 は 30 缶、試料 2 は 41 缶)からランダムに 10 缶抜き取りそれぞれ 2 回の繰り返し試験を行い均質性試験と同様に行った。試料 1 のヒスタミン濃度は安定性試験時には均質性試験時から平均値が 3 $\mu\text{g/g}$ 程度減少し、有意な差が見られたが Horwitz 式から予測される試験所間の標準偏差が 7 $\mu\text{g/g}$ 程度、技能試験の室間標準偏差は 10 $\mu\text{g/g}$ 程度であることから、技能試験の結果の評価には影響が小さいと考えられた。試料 1 については基材にみそ煮を使用しているため、調味料の影響によりヒスタミンが減少したことも考えられるが、残試料数が少なかったため、さらに長期の安定性試験が実施できず十分な原因追及には至らなかった。

II. 魚肉すり身を基材とした一般生菌数技能試験のための試料開発

食品衛生法に従い 25 g のサンプリングを 2 回行えるよう、1 容器あたりに 70 g 以上試料を充填した 186 個の一般生菌数技能試験試料を得た。技能試験用の試料は作製時の 12 月 12 日から試験所に送付する 1 月 21 日まで二次容器の状態での -20℃ で保存した。

均質性の評価は作製した試料 186 個からランダムに 10 個抜き取りそれぞれ 2 回の繰り返し試験を行い The International

Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories に従って評価したところ、均質であると評価された。

安定性試験は技能試験開始時の 1 月 22 日と試験終了時の 2 月 3 日に、それぞれランダムに 3 個の試料を抜き取り、2 回の繰り返し試験を行い、微生物試験の一般的な標準偏差と言われている 0.25 を判断基準として採用した。試料調整時から試験開始時、試験終了時の常用対数値はそれぞれ 4.635, 4.438, 4.115 と試験開始時から試験終了時の 2 週間においても常用対数値で 0.323 減少しており、試料は安定ではないと評価された。昨年度実施した予備検討においては約 1 ヶ月間安定であったことから考えると、使用したすり身の自然汚染菌の種類、性質による影響ではないかと考えられる。大規模な技能試験を実施するにあたり安定性が担保された試料を供給するには、意図的に特定の食中毒菌を添加するなどの改善を行う必要がある。

今後食中毒菌の定量試験を実施する事も視野に入れ、「感染症発生動向調査事業等においてゆうパックで検体を送付する際の留意事項」(平成 24 年 3 月 15 日付 健感発第 0315 第 1 号)に従って試料の発送作業を行った。4 重包装までの梱包段階は問題なく行うことができた。しかし、試料の輸送に関しては日本郵便株式会社と打合せを重ね発送の準備までは整えたが、最終的にはドライアイスを満たした郵送物は受け入れてもらうことができず、ヤマト運輸株式会社の冷凍便により試

料を輸送することとなった。微生物の大規模な技能試験を行うに当たっては、試料調整に加えて、輸送方法等のインフラについても十分に検討しなければならないことが確認された。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 池田真希, 久保田佳子, 佐藤夏岐, 八木真美, 平林尚之, 高坂典子, 渡辺卓穂: 枝豆試料を用いた残留農薬技能試験プログラムのパイロットスタディ, 第115回日本食品衛生学会学術講演会(東京)2019

2) 若栗忍, 佐藤夏岐, 渡辺卓穂: アレルギー物質(小麦タンパク質)を含む特定原材料検査のための技能試験プログラムのパイロットスタディ, 第115回日本食品衛生学会学術講演会(東京)2019

3) 松田りえ子, 荒川史博, 納谷隆行, 大城直雅: ホタテガイ中オカダ酸分析技能試験プログラムの開発及び統計学的評価、AOAC Japan section シンポジウム(東京)2019

4) 松田りえ子, 荒川史博, 畝山智香子: 豚肉中エンロフロキサシン分析技能試験プログラムの開発、日本食品衛生学会第115回学術講演会(東京)2019

5) 吉田栄充, 山元梨津子, 大坂郁恵, 井上裕子, 大門拓実, 高橋京子, 近藤貴英, 笹本剛生, 石井里枝: 「ボトムアップ方式を用いた放射性セシウム検査における不確かさの推定」令和元年度全国衛生化学技術協議会研究会(広島)2019

6) 石井里枝, 山元梨津子, 大坂郁恵, 吉田栄充, 井上裕子, 大門拓実, 高橋京子, 近藤貴英, 笹本剛生: 「電子天びんの内部校正及び不確かさ算出の検討」令和元年度全国衛生化学技術協議会研究会(広島)2019

7) 大坂郁恵, 山元梨津子, 吉田栄充, 井上裕子, 大門拓実, 高橋京子, 近藤貴英, 笹本剛生, 石井里枝: 「トップダウン方式による不確かさ算出方法の検討」令和元年度全国衛生化学技術協議会研究会(広島)2019

8) 荒川史博, 松田りえ子, 井部明広: 一般生菌数の技能試験を行うにあたっての予備検討, AOAC International Japan section 第22回年次大会(東京)2019

F. 知的所有権の取得状況

なし