

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)

【検査機関の信頼性確保に関する研究】

平成 28 年度
総括・分担報告書

研究代表者

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 渡辺 卓穂

研究分担者

大阪府立公衆衛生研究所 梶村 計志

星薬科大学 薬品分析化学教室 斉藤 貢一

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 鎗田 孝

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 渡辺 卓穂

平成 29 年(2017 年)5 月

目 次

・ 総括研究報告書	
検査機関の信頼性確保に関する研究	1
渡辺 卓穂	
・ 研究分担報告	
1. 残留分析の測定に与える食品成分の影響に関する研究	27
梶村 計志	
2. 食品中に残留するマイコトキシン分析に係る精度管理体制の構築に関する研究	70
斉藤 貢一	
3. 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究	80
鎗田 孝	
4. 食品衛生外部精度管理調査用適正試料（理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査）の作製検討と信頼性確保に関する研究	
渡辺 卓穂	
4.1 理化学的検査調査試料の作製に関する研究	94
4.2 一般細菌数測定検査用調査試料の改良に関する検討	110
4.3 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検討	116
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	148

検査機関の信頼性確保に関する研究

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

輸入食品及び国内の流通食品が急増する中、多種多様な食品を対象とした食品衛生検査が実施されている。食品の安全性を確保するためには、重金属、残留農薬、病原微生物、動物用医薬品、遺伝子組み換え食品、アレルギー性物質、カビ毒などの汚染物質を含む多くの検査項目について、どの検査機関で実施しても正確で同等の結果が得られることが必要である。そのためには、検査結果の信頼性を確保する必要性があり、このひとつとして精度管理が挙げられる。特に外部精度管理は、共通試料を各検査機関に配布した後、各検査機関で検査を実施し、この結果を解析することにより、評価を行う。そのため、共通試料として用いる外部精度管理調査試料における均一性や安定性の担保、さらにはより実際の食材に近い調査試料の提供が求められる。すなわち、精度管理実施体制の整備や適正な精度管理用調査試料の開発と、これに付随した精度管理の実施は、検査機関における検査精度の確認や信頼性の確保に大きな役割を果たすこととなり、結果として食品の安全性の確保に対して大きく貢献するものと考えられる。そこで本年度は、1. 残留分析の測定値に与える食品成分の影響に関する研究（梶村研究分担）、2. 食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究（斉藤研究分担）、3. 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究（鎗田研究分担）、4. 食品衛生外部精度管理調査用適正試料（理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査）の作製検討と信頼性確保に関する研究（渡辺研究分担）の4課題について実施した。

研究分担者名 = 梶村計志（大阪府立公衆衛生研究所副所長）、斉藤貢一（星薬科大学教授）、鎗田孝（（国研）産業技術総合研究所上級主任研究員）、渡辺卓穂（（一財）食品薬品安全センター秦野研究所食品衛生事業部長）

A. 研究目的

輸入食品や国内食品の流通段階において、ヒトの健康に悪影響を与える恐れのある様々な危害物質等を行政検査により検査、確認して国民の食生活に安全と安心を提供することは国民に対する食品安全確認行政の重要な課題である。その一貫として食品衛生に関わる検査施設の検査精度や検査成績の信頼性を確保することは必要不可欠で

ある。特に食品衛生検査機関から提出される検査成績の信頼性を確保するためには、継続的にその検査精度を確認することが求められる。精度管理体制の充実を図ることは極めて重要であり、加えて農薬のポジティブリスト制の導入、残留農薬検査における試験法の妥当性確認ガイドラインが設定されるなど、一層の体制強化が求められている。

食品衛生法の一部改正に伴い導入された食品衛生検査機関および食品衛生登録検査機関に対する理化学的検査ならびに微生物学的検査の外部精度管理調査について、その進め方や得られた結果の基本的な評価方法を構築してきたが、いまだ十分とは言えず、とりわけ新規項目の検討や新規基材の選択と高品質な調査試料の作製などについては、継続した検討が必要である。

他方、輸入食品の急増に伴い、検疫所をはじめとする輸出入関連の食品衛生検査機関において ISO/IEC17025 試験所認定取得のために技能試験（外部精度管理）への参加が必須となり、外部精度管理調査のより一層の充実が求められている。また、環太平洋パートナーシップ協定（TPP）の締結により輸出入に係る食品検査がなお一層拡大すると考えられる。近年、残留農薬検査には GC/MS や LC-MS/MS など質量分析が多用される一方で、食品マトリックスが測定系に影響を与えることが知られている。これらの検査対象物質を定量するにあたり、複雑な食品マトリックスの影響をどのように評価するかは、より正確な検査結果を得るうえでも非常に重要である。また、高信頼性分析により、外部精度管理で用いるマトリックスに依存しない絶対的な評価指標を得

ることも必要である。

アレルギー関連物質検査については 7 品目が指定されており、精度管理調査もさらに充実を図る必要がある。

食品衛生検査に関わる精度管理体制の構築は、食品の広範囲な流通により国内外を問わず、その分析精度を確認するうえでますます重要な課題として認識されている。食品衛生検査に関わる精度管理用調査試料の作製に加えて、アレルギー物質検査における精度管理体制の構築、マイコトキシンの分析法と精度管理体制の整備については、信頼性確保の面からも急務である。

これらの検討結果は、精度管理システムの整備ならびに精度管理のための適正調査試料の作製検討とその提供に生かされ、食品衛生に関する検査機関から提出される検査成績の信頼性確保を一層充実させ、円滑な行政活動に資することが当研究班の目的である。

B. 研究方法

1 残留分析の測定値に与える食品成分の影響に関する研究（梶村研究分担）

共同研究に先立ち、事前検討を行った。まず、事前検討 1 は、大阪府の検査条件におけるマトリックス効果の傾向を把握するため、大阪府の標準作業書の前処理法に従って処理した鶏卵及び一般的な牛乳のマトリックス溶液と 10%メタノール水溶液を用いて、同じ濃度範囲の希釈系列を各々作製し、LC-MS/MS で測定、検量線の傾きを比較した。以後、マトリックス溶液を用いて調整した希釈系列をマトリックス標準溶液、10%メタノール水溶液を用いて調整した希釈系列を溶媒標準溶液とする。

マトリックス溶液の調製は、2.0 g の食品試料をポリプロピレン製（PP 製）試験管に秤取し、8 mL のヘキサン飽和アセトニトリル、2%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリルで 2 回に分けて抽出した。新しい PP 製試験管に上清を合わせ、ヘキサン飽和アセトニトリルで 20 mL に定容した。その後、ヘキサン 10 mL を積層し、攪拌後遠心分離した。アセトニトリル層（抽出液）を 500 μ L 採取し、ジメチルスルホキシド 25 μ L を加え、遠心濃縮したものをマトリックス溶液とした。マトリックス溶液を用いて、最終標準品濃度が 1、5、10、20 ppb となるよう標準溶液を添加し、10%メタノール溶液で 500 μ L に調製したものをマトリックス標準溶液とした。なお、最終液中の食品試料濃度は 0.1 g/mL であった。鶏卵に関しては、別にアセトニトリル層を 2.5 mL 採取し、最終的に 500 μ L に調製した最終食品試料濃度 0.5 g/mL のマトリックス標準溶液も作製した。

測定に際しては、最終濃度 1、5、10、20 ppb となるように調製したマトリックス標準溶液を各 5 μ L 注入した場合（以後、注入量一定）と、牛乳のみ最終濃度 20 ppb のマトリックス標準溶液を用いて LC-MS/MS への注入量を変化させて濃度勾配を作ると同時に機器へのマトリックスの負荷絶対量を変化させた場合（以後、注入濃度一定）を実施し、得られた 2 種類の検量線について、マトリックス量が検量線の傾きに与える影響を観察した。

以後すべての検討において、マトリックス標準溶液の測定と同時に用時調製した溶媒標準溶液の測定も行った。

事前検討 2 では、食品中の成分組成の違

いがマトリックス検量線に与える影響を評価した。食品成分組成の異なる魚介類として、ブリ、サケ、カレイ、エビを選択した。また乳脂肪分の異なる乳として無脂肪乳（乳脂肪分 0.1%）と特濃乳（乳脂肪分 4.2%）を選択した。

魚介 4 種類について、事前検討 1 の方法でマトリックス標準溶液を作製し、検量線を作成した。乳 2 種類も同様に検量線を作成した。魚介類については、サルファ剤、キノロン剤、葉酸拮抗剤を、乳はサルファ剤と葉酸拮抗剤を分析した。また、乳に限り注入量一定と注入濃度一定の測定を実施した。

事前検討 3 として、共同試験に使用する試料の調製法を検討した。また、事前に実施したアンケートの結果から、実施機関及び全ての協力機関において検査が実施されているサルファ剤を測定対象物質とした。共同試験における共通食品試料としては均一な検体の調製が容易な牛乳と鶏卵を選択した。

冷凍での配送が必要なため、試料の凍結融解が検量線の傾きへ及ぼす影響を評価した。事前検討 1 で使用した鶏卵と市販の牛乳を使用し、未凍結の状態で事前検討 1 と同様に前処理したものの、2.0 g を PP 製試験管に秤取した後、一晚 -20 で凍結させた試料を、融解させた後に前処理したものの、複数回凍結融解を繰り返した後に前処理したものの 3 種類でマトリックス標準溶液を作製し、検量線の傾きを比較した。

さらに、マトリックス溶液を冷凍保存した際の安定性を確認した。事前検討 1 で示した方法でマトリックス溶液を調製し、PP 製試験管で冷凍保存した（-20 ）。調製直

後、1週間後、2週間後、4週間後にマトリックス標準溶液を調製し、検量線を作成して傾きを比較した。なお、それぞれの再測定時には、凍結保存マトリックス溶液に加え未凍結の同一食品試料から再調製したマトリックス標準溶液も並行して測定し凍結マトリックス溶液と比較した。

共同試験は以下の2種類を実施した。

- 1) 実施機関で前処理したマトリックス溶液(共通マトリックス溶液)を用いて検量線を作成し溶媒検量線と傾きを比較した。
- 2) 同一食品検体を、協力機関の合成抗菌剤検査標準作業書に沿って前処理したマトリックス溶液(独自マトリックス溶液)を用いて検量線を作成し溶媒検量線、1)で得られた検量線と傾きを比較した。

1)の試験では、同一組成で構成されているマトリックス溶液を異なる分析機器条件で測定することで、機器や分析条件(LCグラジエント条件やMS/MSのパラメーター)の違いがマトリックス効果に及ぼす影響について調査した。また、2)の試験では同一検体から異なる方法で得たマトリックス溶液に由来するマトリックス効果について評価し、前処理法の違いがもたらす影響の観察を狙いとした。共通のマトリックス溶液を用いて異なる実験室、異なる分析条件でマトリックス効果を評価した例はほとんど見当たらず、新たな知見が得られることが期待された。食品試料としては、ロット管理された食品試料で均一化が容易なこと、事前のアンケート結果から、ほとんどの協力機関においていずれかは検査を実施していることを理由に鶏卵と牛乳を選択した。分析対象とする動物用医薬品は実施機関及

び全ての協力機関で検査を実施している(標準作業書が作成されている)サルファ剤を選択した。

実施機関による共通マトリックス溶液の調製は、事前検討1で示した方法に従い、牛乳と鶏卵からマトリックス溶液を調製した。その後、PP製15 mL試験管に150 µLのマトリックス溶液を分注し、凍結後送付した。

実施機関及び協力機関において、標準品を常温に戻したのち50%メタノール水溶液を用いて検査で使用する検量線範囲等に応じて濃度を4点以上設定し、最終測定濃度の10倍の濃度になるよう希釈系列を作製した(溶液イ)。また、送付したマトリックス溶液を常温に戻し、10%メタノール水溶液を2550 µL加えて溶液口を調整した。そして、溶液イを溶液口で10倍希釈し、試料濃度0.1 g/mLのマトリックス標準溶液を調製し、検量線を作成した。以上の調製は可能な限りPP製の容器で行い、測定まで同一日に行うよう依頼した。分析対象のサルファ剤は、配布した標準品に含まれる薬剤のうち、良好な選択性をもって測定できるもののみを測定することとした。実施機関は協力機関に17種類の代表的なMRM条件を例示したが、他の条件も可とした。また、事前検討2と同様に分析の際には、注入量一定と注入濃度一定の2パターンの測定を実施した。その後、結果を実施機関が送付したワークシートに記入し返送した。

なお、実施機関及び協力機関は分析の実施まで標準品及びマトリックス溶液を冷凍保管した。分析は試料到着後1ヶ月以内に実施することとした。

協力機関による独自マトリックス溶液の

調製において、協力機関 A、B、C には牛乳を、協力機関 D、E、F には鶏卵を送付した。試料は各協力機関で通常サルファ剤の検査に運用されている検査標準作業書の前処理法に従って処理した。なお、牛乳や鶏卵を検査対象食品としていない場合は他の畜水産食品のサルファ剤の残留検査に用いる標準作業書に従って調製することとした。このとき、マトリックス標準溶液を作製するために、通常の最終液量の 0.9 倍の容量に調製し、共通マトリックス溶液の調製と同様に溶液イと 1:9 の割合で混合して独自マトリックス標準溶液を作製した。その後、共通マトリックス溶液の調製と同じ条件で分析し、結果を実施機関が送付したワークシートに記入し返送した。以上の調製から分析は可能な限り共通マトリックス溶液の調製も含めて同一日に実施するよう依頼した。さらに、協力機関には、可能であれば分析時間中のスキャンデータの取得を依頼した。すべての協力機関において使用機器は LC-MS/MS、イオン化法は ESI 法（ポジティブ）であった。

結果の評価として、事前検討及び共同試験において得られた検量線データは表計算ソフト上でその傾き値を算出した。マトリックス効果は溶媒標準溶液による検量線の傾き値を 100%とした際のマトリックス検量線の傾きのパーセント比（傾き比）を用いて評価した。

2 食品中に残留するマイコトキシン分析に係る精度管理体制の構築に関する研究（斉藤研究分担）

総 AFs および AF-M₁ の分析方法としては、抽出過程が異なるものの、SPDE を用いたク

リーンアップと蛍光誘導体化はほぼ同様に行った。本年度は、その外部精度管理試験を実施した。香辛料としては、市販の白コショウに AFs を添加し、精度管理試験用の標準試料を添加して、高濃度試料 A (20 ng/g) と低濃度試料 B (2 ng/g) の 2 種類を調製した。

チーズについては、市販の固形チーズに予め試料と同重量の抽出液を添加して、軽くホモジナイズして“泥状(スラリー状)”としたものに精度管理試験用の標準試料を添加して、高濃度試料 (1 ng/g) と低濃度試料 (0.1 ng/g) の 2 種類を調製した。

本試験に参加協力してもらった検査機関(8 機関)に当該試料と実験に必要な試薬類を配布し、また操作プロトコールを指定して分析を依頼した。室間精度管理のデータ解析には一元配置分散分析を行って相対標準偏差を算出し、更に HorRat (Horwitz ratio) 値も合わせて算出した。

3 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究（鎗田研究分担）

QuEChERS 法を評価するために、大豆粉末 CRM (7509-a) およびリンゴ粉末 CRM (7510-a) を試料とし、QuEChERS 法によって分析を行った。得られた結果は、CRM に付与されている認証値と比較した。抽出前に分析対象農薬の標識体を添加する IDMS を適用することにより、各分析法の正確さを精密に比較した。STQ 法の評価では、対象農薬が残留した玄米粉末を STQ 法によって分析し、昨年度本研究で得られた一斉試験法および QuEChERS 法による分析値と比較した。QuEChERS 法と同様に、IDMS を

適用することにより、各分析法の正確さを精密に比較した。

QuEChERS 法の評価では、分析法 1 を用いて大豆およびリンゴ中の農薬を分析した。また、STQ 法の評価においては玄米中の農薬を分析法 2 によって分析した。STQ 法の結果と比較するために、一斉試験法と QuEChERS 法でも玄米中農薬を分析した。

分析法 1 (QuEChERS 法 : 大豆とリンゴに適用) は、大豆試料の場合は 2 g、リンゴ試料の場合は 1 g を採取し、それぞれ内標準溶液 A または B の 0.4 mL を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えて 1 分間振とう (手振り) した。これに 4 g の MgSO₄、1 g の NaCl を加え、セラミックホモジナイザーを用いて 1 分間振とう (手振り) した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液 (6 mL) に固相剤を添加して 1 分間振とう (手振り) した。このとき固相剤として、大豆には 300 mg の PSA、45 mg のグラファイトカーボンブラック、300 mg の C18、900 mg の MgSO₄ を、リンゴには 150 mg の PSA、45 mg のグラファイトカーボンブラック、900 mg の MgSO₄ を加えた。再び 3500 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固した。シリンジスパイク溶液 A または B の 0.5 mL を添加して、GC/MS 測定用の試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を、GC/MS によって測定した。大豆では、ダイアジノン、フェニトロチオン、クロルピリホス、ペルメトリンを、リンゴではダイアジノン、フェニトロチオン、ペルメトリン、シペルメトリンを対象とした。

分析法 2 (STQ 法 : 玄米に適用) は玄米試

料の 5 g を採取し、内標準溶液 C または D の 0.4 mL を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えてホモジナイザーを用いて 2 分間細砕した。これに 4 g の MgSO₄、1 g の NaCl、1 g のクエン酸 3Na2 水和物、0.5 g のクエン酸水素 2Na1.5 水和物を加え、1 分間振とう (手振り) した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液 (1 mL) を精製した。すなわち、アイスティサイエンス製 C18-50 mg 固相ミニカートリッジ (Smart-SPE) を Ac2 mL および AN2 mL でそれぞれコンディショニングした後、前述の上澄み液を負荷し、さらに AN0.2 mL を注入した。溶出液には、ToI0.4 mL を添加した。アイスティサイエンス製 GCS-20 mg と PSA-30 mg の固相ミニカートリッジ (Smart-SPE) を連結させ、ここに 0.3 g の MgSO₄ を積層させたものにより、試料液をさらに精製した : Ac2 mL と AN/ToI (3:1) 混液 2 mL で、それぞれコンディショニングした後、試料液を負荷し、さらに AN/ToI (3:1) 混液 0.6 mL を添加した。得られた溶出液を窒素により乾固し、シリンジスパイク溶液 C または D の 0.5 mL を添加して、GC/MS 測定用および LC/MS 測定用の試料溶液とした。

農薬濃度の算出は、3 で示した分析方法で得られた結果を基に、以下の式によって農薬濃度を算出した。

$$C = F_e \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{F_c \times M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}} \quad (1)$$

ただし、C : 試料中の農薬濃度、F_e : 前処理の精度に関わる係数 (= 1)、R_s : 試料溶液測定における分析対象農薬の標識体に

に対する面積比、 R_c ：検量線溶液の測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 F_c ：検量線溶液の調製ばらつきに関する係数(= 1)、 M_c ：検量線溶液中の農薬混合液の質量、 C ：農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 P ：分析対象農薬の高純度標準品の純度、 $M_{sp(s)}$ ：試料に添加した内標準溶液の質量、 M_s ：試料量、 $M_{sp(c)}$ ：検量線溶液中の内標準溶液の質量、である。

QuEChERS 法の評価は、(1)式に準じて QuEChERS 法(分析法 1)による分析値を算出した。得られた結果を、大豆粉末 CRM (7509-a) およびリンゴ粉末 CRM (7510-a) の認証値と比較することにより、QuEChERS 法の正確さを評価した。なお、マトリックスマッチ検量線溶液 A およびマトリックスマッチ検量線溶液 B を用いた測定結果により評価を行ったが、比較のために、検量線溶液 A および検量線溶液 B を用いた測定結果も算出した。

STQ 法の評価は、(1)式に準じて STQ 法(分析法 2)による玄米中農薬の分析値を算出した。本結果と、昨年度の本研究による一斉試験法および QuEChERS 法で得られた結果を比較することにより、STQ 法の正確さを評価した。

4 食品衛生外部精度管理調査用適正試料(理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査)の作製検討と信頼性確保に関する研究(渡辺研究分担)

4.1 理化学検査のための適正調査試料の作製検討：

試料基材として市販の玄米及び精米のそれぞれ古米(平成 27 年産)以下、米類、

枝豆ペースト(新進)を用いた。

冷凍及び冷蔵保存における長期安定性(回収率)の評価について平成 27 年度から引き続き、基材に玄米及び精米それぞれ古米を用い、冷凍及び冷蔵保存における添加農薬の安定性(回収率)を検討し、比較評価した。

基材である米類をそれぞれ遠心粉砕機で粉砕し、粉末化後、直ちに 10 g をそれぞれ量り採り、添加用農薬混合標準液(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フェニトロチオン 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アセトン溶液) 1 mL を正確に加え、試料に十分浸潤させた(理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、フェニトロチオン 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$)。また、同様に粉砕、粉末化した米類それぞれに、添加用農薬混合標準液の代わりにアセトン 1 mL を添加し、ブランク試料とした。併せて、アセトンを添加しない米類粉末試料をアセトン無添加ブランク試料とした。

これらの試料について、各農薬の回収率、冷凍及び冷蔵保存(180、270 及び 360 日間)における安定性(回収率)を検討した(各 $n=3$)。

浸漬用溶媒の検討については粉体攪拌用フラスコ(2L 容)に各溶媒(ヘキサン、アセトン及び酢酸エチル)をそれぞれ 590 mL とり、これに添加用農薬混合標準液(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フェニトロチオン 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アセトン溶液) 10 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で 5 分間回転混合し、予め均質な浸漬用農薬混合標準液を調製した。これに、遠心粉砕機により粉砕・粉末化した玄

米（古米）500 gを量り入れ、同様に5分間回転混合した後、室温で遮光下24時間静置による浸漬を行った。浸漬後、浸漬溶媒を留去し、内容物をテフロンシート上に広げ、室温下で3日間乾燥し、浸漬溶媒検討用作製試料とした（溶媒留去後理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g）。この時の、溶媒留去の様子及び浸漬溶媒検討用作製試料の乾燥状態等を目視で観察し、浸漬用溶媒として適用可能な溶媒について検討した。なお、溶媒留去において、減圧濃縮装置のロータリーエバポレーターに球形ガラスフィルターあるいはロータリージョイントを接続し、粉体の冷却部への吸い込みを防止した。

バッチ内の均質性の検討（回転・揺動混合無し）については粉体攪拌用フラスコ（2L容）1個にアセトンを710 mLとり、これに添加用農薬混合標準液（ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン6 µg/mL、フェニトロチオン12 µg/mL、アセトン溶液）10 mLを正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で5分間回転混合し、予め均質な浸漬用農薬混合標準液を調製した。これに、遠心粉碎機により粉碎・粉末化した玄米（古米）600 gを量り入れ、以下、浸漬用溶媒の検討と同様に操作し、1個のバッチ内均質性の検討用作製試料（回転・揺動混合無し）とした（溶媒留去後理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g）。作製した試料は、約25 gずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、無作為に選んだ10袋について行った。

バッチ内の均質性の検討（回転・揺動混合有り）についてはバッチ内の均質性の検討（回転・揺動混合有り）と同様にして得られた乾燥試料すべてをロッキングミキサーにより回転・揺動混合し、1個のバッチ内均質性の検討用作製試料（回転・揺動混合有り）とした（溶媒留去後理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g）。作製した試料は、約25 gずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、無作為に選んだ10袋について行った。なお、浸漬溶媒を留去後、内容物を取り出した後の粉体攪拌用フラスコ内壁面の残渣をヘキサン50 mLで3回洗い込み、これらを合わせて減圧濃縮し、5 mLとした溶液について各農薬濃度を測定し、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率を算出した。

バッチ間の均質性の検討は、粉体攪拌用フラスコ（2L容）10個に各々アセトンを710 mLとり、これに添加用農薬混合標準液（ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン6 µg/mL、フェニトロチオン12 µg/mL、アセトン溶液）10 mLを各々正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で5分間回転混合した。これに、遠心粉碎機により粉碎・粉末化した玄米（古米）600 gを各々量り入れ、同様に5分間、回転混合した後、以下、バッチ内均質性の検討用作製試料（混合）と同様に行い、10個のバッチ間均質性の検討用作製試料とした（溶媒留去後理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g）。なお、ロッキングミキサーによる混合は、各バッチ毎に行った。作製した試料は、約

25 g ずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、1 バッチにつき無作為に選んだ1袋についてn=2で測定を行った。また、バッチ内均質性の検討用作製試料（回転・揺動混合有り）と同様に、各粉体攪拌用フラスコ内壁面残存農薬の残存率について測定した。

次に枝豆については、昨年度までの検討結果より、冷凍保存における凍結融解3回及び融解後冷蔵保存（14日間）の安定性を確認した結果、枝豆ペーストに水10%の添加が最も有効であることが明らかとなった。そこで今年度は、水10%添加の条件により、外部精度管理調査の実配付量である作製プロセスの確立の一環として、ブ里克サー5プラスを用いて複数バッチを作製し、バッチ間の均質（同等）性を検討した。

ブ里克サーを用いて均質化した枝豆ペースト1.8 kgに、水分添加量が10%となるように水を加え、さらにブ里克サーを用いて均質化した。これに添加用農薬混合標準液（ダイアジノン 2 µg/mL、クロルピリホス 60 µg/mL、マラチオン及びフェニトロチオン 100 µg/mL、アセトン溶液）10 mLを正確に加え、ブ里克サーを用いて混合した（理論値：ダイアジノン 0.01 µg/g、クロルピリホス 0.3 µg/g、マラチオン及びフェニトロチオン 0.5 µg/g）。更に、同様の操作をそれぞれ別のブ里克サー容器を用いて4回繰り返し行い、合計5バッチを作製した。次に、各容器内作製ペースト試料の上層部と下層部の各々を4分割し、計8分割とし冷凍した。これらのペースト試料から、1バッチにつき4分画をそれぞれ5バッチについて採取し、5バッチ間の均

質（同等）性を確認した。別に、枝豆ペーストに、水分添加量が10%となるように水を加え、添加用農薬混合標準液の代わりに同量のアセトンを添加し、同様に操作して得られた試料を、水10%ブランク試料とした。

試験方法として、測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編（2003）」に準じた。試料10.0 gを量り採り、オムニミキサーを用い、アセトン100 mLで1回、更に50 mLで2回抽出した。抽出液を合わせ、40°C以下でアセトンを留去した。濃縮物に飽和塩化ナトリウム溶液100 mLを合わせ、これにn-ヘキサン100 mLを加え振とうした。n-ヘキサン層をとり、残った水層に酢酸エチル/n-ヘキサン（1：4）100 mLを加え振とう後、酢酸エチル/n-ヘキサン（1：4）層を先のn-ヘキサン層に合わせた。上記の操作を2回繰り返した。得られた溶液に適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置後、ろ過し、得られたろ液を40°C以下で酢酸エチル/n-ヘキサンを留去した。残留物をアセトニトリル飽和n-ヘキサン30 mLに溶解し、n-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて振とうした。アセトニトリル層をとり、残ったn-ヘキサン層にn-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、上記の操作を2回繰り返し、アセトニトリル層を合わせた後、アセトニトリルを留去した。残留物にn-ヘキサンを加えて溶解させ、正確に10 mLとした後、GC(FPD)で測定した。

なお、玄米及び精米試料の測定においては、試料採取後、水20 mLを加え2時間膨潤させた後、アセトンによる抽出操作を

行った。各農薬の定量には絶対検量線を用いた。

4.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製検討：

試験菌株は、市販の枯草菌芽胞液（栄研化学）を使用した。ゼラチン試料の濃度は、冷蔵、固形の状態から24 前後（室温を想定）で1 時間程度で完全に溶解し、液体になる濃度を検討した。

ゼラチン濃度を1%から5%まで5段階に振り、寒天試料の寒天をゼラチンに代えて調製した。これを121 40 分間で高圧蒸気滅菌処理した後、5 以下で1 晩以上冷蔵した。

冷蔵後、完全に固化したゼラチンを24 前後の室温に放置し、1 時間ごとに基材形状の経過観察を実施した。

最適なゼラチン濃度で試料を10 本作製し、寒天試料と同様に、最終濃度が $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ CFU/mL 相当となるように試験菌を接種した。接種後、ゼラチン試料の生菌数の経時的变化を観察し、接種直後からの増減を確認した。なお、経時変化は接種から28 週間後（約4 ヶ月）とした。

なお、ゼラチン試料は室温で溶解したことを確認してから10mL をフィルターなしの検体袋に秤量し、ペプトン食塩緩衝液で10 倍段階希釈して生菌数測定に供した。

つぎに、試料を10 本作製し、試験菌を接種したゼラチン試料を用いて、フィルターなしの検体袋およびフィルター付き検体袋で生菌数測定を実施した。フィルター付き検体袋は、これまでの外部精度管理調査結果からばらつきが比較的少ないもの（A 社製）と多いもの（B 社製）の2 種を使用した。

また、フィルター付き検体袋については、ストマッカー1 分処理の後、検体とペプトン食塩緩衝液を投入した側（フィルター外部）とピペットを挿入する側（フィルター内部）の2 点について生菌数測定を実施した。

2017 年度の食品衛生外部精度管理調査で実際にゼラチン試料を運用し、前年度の寒天試料との比較および参加機関からのアンケート集計を実施した。これらの結果から、改善点を考察した。

4.3 アレルギー関連物質検査のための適正調査試料の作製検討：

かぼちゃペースト（市販品）および特定原材料を含まないとして市販されているベビーフードの2 種類を卵タンパク質添加用基材として使用した。添加用卵タンパク質溶液の調製では、全卵または鶏卵加工品として市販されている乾燥全卵粉末を注射用水（光製薬）で希釈し、添加用卵タンパク質溶液とした。

通知法改正前および通知法改正後のELISA キットにおける適用性確認用試料の調製は、全卵添加試料および乾燥全卵添加試料の2 種類を各基材について作製した。各基材を50 mL 遠沈管に1 g ずつ秤量し、添加用卵タンパク質溶液をそれぞれ10 μ g/g となるように加えた。パラフィルムを巻いた後、使用するまで-20 で凍結保存した。外部精度管理調査試料の調製は、乾燥全卵添加試料を各基材について作製した。各基材に添加用卵タンパク質溶液をそれぞれ10 μ g/g となるように加え、ロボ・クーブブリンクサー5 プラス（エフ・エム・アイ）で均質化して試料を作製した（2 kg）。それぞれの試料はいずれも遠沈管80 本に約10 g ずつ分注し、パラフィルムを巻いた後、-20

で凍結保存した。ベビーフード試料を試料 1、かぼちゃペースト試料を試料 2 とし、均質性および安定性はこれらの試料を用いて確認を行った。

通知法改正前および通知法改正後 ELISA キットにおける卵タンパク質添加試料の適用性評価では、通知法改正前の ELISA キットによる回収率のデータは平成 24 年度に行った外部精度管理調査における均質性の結果を示した。各測定データは以下の ELISA キットを使用して測定したものであり、通知法改正前と通知法改正後の ELISA キットにおける各試料の回収率を比較し、両者にどの程度の乖離が見られるかを確認することで評価した。

均質性の確認は、試料の作製直後と発送前の 2 時点について行った。調査試料のそれぞれについて 10 容器から $n=1$ でサンプリングして、ELISA 法による卵タンパク質濃度の測定を行い、平均値、標準偏差、変動係数を算出した後、濃度平均値から添加量に対する回収率を求め、2 時点におけるそれらの値をそれぞれ比較することで均質かどうかを判断した。また、試料作製から調査期間終了までに定期的に試料を測定し (0 日目、34 日目、69 日目、92 日目、126 日目および 194 日目、0 日目および 92 日目は $n=10$ 、その他は $n=4$)、安定性を 0 日目における濃度に対する割合として算出し確認した。なお、均質性および安定性はモリナガキット、日本ハムキットおよびプリマハムキットの 3 種類の ELISA キットについて測定した結果を示した。使用キットの使用期限の関係でロットが切り替わる際には、古いロットと新しいロットのキットを用いて同一試料の回収率を比較し、問題が無いことを確認した後使用した。また、吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダー EL 808IU、および計算ソフト

ウェア DeltaSoft JV Ver.1.80 (Bio-Tek Instruments, Inc.) を使用した。

外部精度管理調査の実施として、平成 24 年度に実施した外部精度管理調査の参加機関を対象に、地方衛生研究所を中心とした 29 機関に外部精度管理調査への参加を募った結果、18 機関が参加の意向を示した。そのため、平成 28 年 11 月 8 日にこれら 18 機関に対して 2 種類の試料と報告書書式を宅配便(冷凍)にて送付した。なお測定には、消費者庁食品表示課事務連絡「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(参考)」に記載されている卵測定用キット 3 種 (FASPEK エライザ II 卵、FASTKIT エライザ Ver. III シリーズ卵、アレルギーアイ ELISA II シリーズ卵) のうち、任意の 2 種類を使用し、測定法は測定キットのプロトコール通り、サンプリング数は 1 試料につき 2 抽出、ELISA 測定は 1 抽出につき 3 ウェル併行とした。また、報告書の回収期限は平成 28 年 12 月 9 日とした。

参加機関から回収した報告値は、消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」の別紙 5「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」の 4.「特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言」に「免疫化学反応に基づく定量法では、用いる抗体により定量値が異なることが予想される」とあることから、試料別、測定キット別に集計した。次にこのデータを統計解析システム JMP (SAS Institute Japan 株式会社) を用い、Xbar-R 管理図を代用した解析を実施した。なお、Xbar 管理図の管理限界線の値は (ロバスト平均値 \pm ロバスト平均値 $\times 50\%$) とした。これは、前述したガイドラインの 4. の提言にタンパク質の回収率が「50%以上、150%以下であること」と記

載されていることから、キットの測定誤差の範囲についてもこれ以下と考えられることによるものである。なお、添加回収率についてはこれまでの経験上、用いるキットにより異なる可能性があることから、各試料およびキットごとに算出したロバスト平均値を付与値とした解析を行うこととした。

ロバスト方式の統計は、Huber の proposal 2 の推定方式による統計をエクセル・マクロによるプログラム〔作成：システムサポート、大隅昇〕により行い、得られたロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いて z -スコアを算出した。さらに、アンケート結果についてもとりまとめ、検討を加えた。なお、今回の外部精度管理調査でモリナガキットを使用した機関は 18 機関、日本ハムキットを使用した機関は 18 機関、プリマハムキットを使用した機関は 0 機関であった。

C.D. 研究結果および考察

1 梶村研究分担

事前検討 1 では、鶏卵マトリックス溶液を用いて最終食品試料濃度を 0.1 g/mL 又は 0.5 g/mL とした場合の検量線の傾き比を検討した。それぞれ同一の抽出液から調製し、溶媒標準溶液で得られた検量線の傾きを 100%としたときのパーセント比（傾き比）を算出した。その結果、全体的な傾向としてサルファ剤と葉酸拮抗剤でイオン化抑制を確認した。さらに、食品試料濃度が 0.1 g/mL と比較すると 0.5 g/mL のほうがより大きなマトリックス効果を受けており、鶏卵分析時に観察されるマトリックス効果は食品抽出物由来であることが示唆された。

次に、牛乳マトリックス溶液を測定した際の検量線の傾き比を検討した。牛乳の場

合にはサルファ剤と葉酸拮抗剤に加えてキノロン剤についても傾き比を算出した。また、マトリックス効果を強く受けたスルファジアジン（溶出時間 3.16 分）スルファジミジン（溶出時間 8.33 分）と受けなかったスルファメトキサゾール（溶出時間 9.17 分）の散布図において、鶏卵の場合と同じく、牛乳でもサルファ剤分析時にはイオン化抑制効果が確認された。一方、キノロン剤に関しては、イオン化促進効果を観察した。また、牛乳に関しては注入量一定と注入濃度一定の 2 つの検量線を作成した。どちらの場合も観察されるマトリックス効果は同じで、傾き比にも大きな変化は見られなかった。しかし、散布図ではスルファジアジンにおいて注入濃度一定の低濃度領域で注入量一定より溶媒標準に近づく傾向が見られた。すなわち、牛乳においても鶏卵と同様にマトリックス負荷量の減少がマトリックス効果の改善につながる可能性がある。

マトリックス効果を受けやすい時間帯として、溶出時間 3~5 分と 8 分あたりが抽出された。大阪府の分析条件では、3~5 分における移動相の有機溶媒濃度は 10%、8 分では 25%強と比較的高極性の物質が溶出する時間帯であった。近年、動物用医薬品分析時のマトリックス成分として疑われているりん脂質は、極性の基質であるりん酸基を含む脂質であり、脂肪酸とアルコールからなる単純脂質より極性が高い。そのため、この時間帯のマトリックス効果の原因物質としてりん脂質の影響が疑われる。りん脂質は血漿などの臨床試料を分析する際のマトリックス効果の原因とされており、その除去ツールが各社より販売されている。こ

これらのツールを利用することで効果的なマトリックス効果低減策となる可能性がある。一方、この時間帯以外では傾き比が 90%を超える物質も見られ、これらの物質に限れば溶媒検量線による定量が十分可能であると推察された。

事前検討 2 で、組成の異なる魚介類のマトリックス効果への影響においては、マトリックス検量線を用いて検査を実施する場合、マトリックス溶液にはできる限り検体となる食品と成分組成の類似する食品を用いる必要がある。しかし、実際の検査の現場においては、明らかに成分組成の異なる食品を同時に検査することがしばしばある。その際、ある 1 種類の食品由来のマトリックス検量線の異なる組成の食品への適用可否を検討することは重要である。そこで、複数種の魚介類によるマトリックス効果の違いを評価した。

ブリ、サケ、カレイ、エビの検量線の傾き比を検討した。概ね牛乳の場合と同様に、サルファ剤でイオン化抑制効果を、キノロン剤でイオン化促進効果を認めた。一方で、魚種によるマトリックス効果の程度は医薬品の種類によって大きく異なった。スルファジアジン等のサルファ剤については、4 種類の魚介類で同程度の抑制を受けており、異なる魚種で作成したマトリックス検量線でも十分定量可能であると判断できる。一方、キノロン剤では、魚種により効果が大きく異なり、特にダノフロキサシン（溶出時間 9.37 分）では溶媒標準を中心に上下に散布図が分布した。すなわち、キノロン剤の検査では異なる魚種で作成したマトリックス検量線による定量は、真値を過小もしくは過大に見積もる可能性があるため、可

能な限り同じ魚種で作成したマトリックス検量線を用いるべきであろう。

組成の異なる乳のマトリックス効果への影響では、乳は一般的な牛乳であれば多少の差はあれ、食品成分組成はほぼ同一であると考えられる。一方、無脂肪乳や加工乳など成分の調製を行って商品化されているものが多種存在する。加工を施された乳は成分組成が異なることが想定されるため、今回、乳脂肪分を除去した無脂肪乳と脂肪分を上乗せした特濃乳を用いて検量線の傾き比を比較した。事前検討 1 と同様、3~5 分と 8~9 分にマトリックス効果を比較的強く受ける時間帯が存在した。また、3~5 分では乳の種類による差はほとんど見られなかったのに対し、溶出時間 8~9 分においては無脂肪乳より特濃乳のほうがより強くマトリックス効果を受けた。この結果より溶出時間 8~9 分のマトリックス効果には、試料に含まれる脂質量が影響していることが示唆された。注入濃度一定で分析したスルファジアジン（溶出時間 3.16 分）、スルファジミジン（溶出時間 8.33 分）及びスルファメトキサゾール（溶出時間 9.17 分）の散布図から、高濃度になるほど分析時のマトリックス負荷量が増大することになるが、スルファジアジンよりも後に溶出するスルファジミジンとスルファメトキサゾールにマトリックス負荷量増大に伴って線分の傾きが緩やかになる傾向を認めた。すなわち、この時間帯に溶出する動物用医薬品には、共溶出する脂質が影響することが推測される。しかし、マトリックス効果の差は前述した魚介類の場合に比べるとわずかであり、脂質量の異なる乳で作成したマトリックス検量線による定量結果への影響は無視でき

るだろう。

これまで鶏卵・牛乳・魚介類と種類の異なる食品試料から作成したマトリックス検量線の傾きを評価してきたが、サルファ剤に関してはいずれもイオン化抑制の傾向が観察された。反して、キノロン剤では、魚介類でイオン化促進効果が認められ、データは示さないが他の食品試料についてもキノロン剤はイオン化促進効果を受けることを経験しており、動物用医薬品分析時のマトリックス効果は食品よりも、医薬品の種類に依存することが推察された。

事前検討 3 の凍結保存によるマトリックス効果への影響では、畜水産食品のようなたんぱく質や脂質の含量が多い食品を凍結融解すると、たんぱく質の変性等により外見が変化していることがある。そこで凍結融解による外見上の変化がマトリックス標準溶液の検量線の傾きへ及ぼす影響を評価した。

同一検体から 2.0 g を秤量し、一方は秤量直後に、もう一方は一晚-20 で保存後に完全に融解して、マトリックス標準溶液を調製した。さらに、複数回凍結融解を繰り返した食品も使用してマトリックス検量線を作成し、鶏卵と牛乳の検量線傾き比を比較した。いずれも凍結による顕著な影響は見られず、サルファ剤分析においては試料の凍結は検量線に影響しないと考えられた。本項の結果より、鶏卵及び牛乳の検査時には事前に陰性を確認し、凍結保存した試料でマトリックス検量線を作成できることが確認された。

共通マトリックスの傾き比を検討した結果、共通マトリックスを用いて調製したマトリックス検量線と溶媒検量線の傾きの比

率を比較すると、同じマトリックス抽出液を測定しているにもかかわらず、イオン化抑制を示した機関（機関 B、E）とイオン化促進を示した機関（機関 A、C）が存在した。また機関 D、F では溶媒検量線との乖離は少なかった。

次に注入量一定と注入濃度一定の二種類の検量線を比較すると、鶏卵では大阪府と機関 A、B に注入量一定の場合、マトリックス効果の改善傾向が認められた。一方、機関 C では注入濃度一定のほうがマトリックス効果に改善傾向が認められた。牛乳に関しては機関 C で注入濃度一定の場合にマトリックス効果の改善傾向が見られたほかは目立った変化はなかった。

注入量一定の場合と注入濃度一定の場合で回帰直線の決定係数(R^2 値)を比較した。全ての分析で R^2 値は良好な結果を示したが、注入濃度一定と注入量一定の場合を比較すると、鶏卵では大阪府と機関 B、E、F で注入量一定の場合に検量線の直線性に改善傾向が見られ、機関 C で注入濃度一定の場合により良好な R^2 値を示した。機関 C では注入濃度を一定にすることでマトリックス効果が減少し、結果として直線性も改善したと推察した。牛乳に関しては、大阪府と機関 D、E、F に注入量一定の場合、マトリックス効果の減少が認められた。

また、マトリックス効果を大きく受ける時間帯は共通して分析できた 9 種類のサルファ剤には認められなかったが、機関 B が報告したスルファグアニジン（溶出時間 1.35 分）は強いイオン化抑制効果を受け、溶媒検量線と比較して鶏卵で 19%、牛乳では 32%の傾き比であった（データは示さない）。その他、極性の高い条件で速やかに溶

出するサルファ剤に関してもスルファグアニジンと同様の傾向を認め、マトリックス溶液に混在する水溶性の妨害物質が強く影響することが推察された。さらに、共通マトリックス溶液の分析において、イオン化抑制とイオン化促進両方の効果が認められたことから、今回の実験条件では、マトリックス効果の受け方は動物用医薬品の種類ではなく、分析条件(機器の種類、グラジエント条件など)により強く依存することが考えられた。

協力機関で独自に調製したマトリックス標準溶液の溶媒検量線に対する傾き比を検討した。また、同一食品由来の共通マトリックス溶液と独自マトリックス溶液の検量線の傾き比を比較した。なお、機関 A、B、C は牛乳を、機関 D、E、F では鶏卵を分析した。さらに、機関 A 及び C において強くマトリックス効果を受けた物質の散布図を検討した。

共通マトリックスの分析時にイオン化促進効果を受けていた機関 A 及び機関 C については、より強いイオン化促進効果を受けた。これら二つの機関では、共通マトリックスよりも濃い食品試料濃度(ともに 1 g/mL)の溶液を使用していた。その結果、分析時のマトリックス負荷量が増大し、より強くマトリックス効果を受けたものと推察された。また、共通マトリックスにおいて良好な結果を示した D 及び F については、同じく良好な結果を示した。これら 2 機関では、分析機器の条件やグラジエント条件が妨害物質の影響を十分排除できるものであったと推察された。

一方、比較的強いイオン化抑制効果を受けていた機関 B 及び機関 E では検量線の傾

き比が大幅に改善した。良好な結果を示した機関の前処理条件では抽出時における脱水剤の添加が共通していた。機関 B の共通マトリックス及び独自マトリックス分析時のスキャンデータを、変化がなかった機関 D の共通マトリックス及び独自マトリックス分析時のスキャンデータを示す。共通マトリックスと独自マトリックスで効果に差がなかった機関 D ではトータルイオンクロマトグラフに大きな変化は認められなかったが、大幅に改善した機関 B については、独自マトリックスで特に早い溶出時間の総イオン量が減少している。機関 B において溶出時間の早いスルファグアニジンが水溶性の妨害物質による強いマトリックス効果を受けていたことや共通マトリックスと独自マトリックス共にマトリックス効果の影響が少なかった機関 D、F についても前処理過程で脱水剤を使用していたことを勘案すると、脱水剤を添加することで水溶性の妨害物質の試験液への溶出を防いだことが良好な結果につながったと考えられた。機関 E は、サルファ剤に特化した通知法を採用しており、抽出溶媒にアセトニトリルやメタノールよりも極性が低く、水溶性物質を抽出しづらい酢酸エチルを使用していた。こちらの場合も抽出液への水溶性妨害物質の溶出を防いだことが良好な結果につながった可能性がある。

2 斉藤研究分担

香辛料中総 AFs 分析の室間再現精度は、昨年度までの本研究事業において開発した分析方法について、操作性および検出感度向上を目指して若干の改良を行うと共に、精度管理用の試料(香辛料)を作製し、複数

の外部検査機関(8 機関)に配布して分析法の室間再現精度を評価するための試験を実施した。

その結果、真度の評価として、全体的な回収率は、試料Aおよび試料B共に概ね70%程度であった。また、アフラトキシンの種類では、AF-G₂とB₂ではやや低め(61~71%)となったが、AF-G₁とB₁では約69~77%と良好であった。これは、使用したイムノアフィニティーゲルが、4種類に交差反応を示すことが製品上で謳われているが、食品衛生上、特に問題となるAF-B₁に強く反応するようになっていたため、構造式が類似したB₁とG₁の回収率がG₂とB₂に比べて高い値を示したものと推察された。

なお、B₁とG₁に関しては、今回の測定方法において“固相蛍光誘導体化法”を行ったが、良好な回収率が示されたことから、この手法も実用性の観点から問題ないことが示されたと考える。

精度の評価として、8検査機関の室間精度を相対標準偏差(RSD_R)で算出したところ、試料A(高濃度添加)では26%未満、他方、試料B(低濃度添加)では29%未満であった。更に、室間再現精度についてはHorRat値で評価することとした。なお、その評価として国際食品規格委員会(Codex Alimentarius Commission: CAC)では、許容範囲を2以内と定めている。その結果、試料Aでは1.13~1.18、他方、試料Bでは1.22~1.31であり、CACでの許容範囲以内であった。この結果から、本試験法の室間再現精度は良好であることが確認された。

また、各検査機関の実測データを評価すると、8機関中7機関は、同一試料2回トリアルの平均値が4種類のAFs全てにお

いて、“全検査機関の平均値 ± SD” にほぼ入っていた。残りの1機関も平均値 ± 2SD 以内にほぼ入っていた。検査機関の出す分析値の信頼性を評価するための、いわゆる「技能試験」において、JISでは付与された値(assigned value)からの偏りを表すzスコアの絶対値が、2以内であればその分析結果は「満足」と判断される。このことから、今回の外部精度管理試験に参加した各検査機関は、いずれも技能的に問題が無いことも確認された。

チーズ中AF-M₁分析の室間精度管理は、昨年度までの本研究事業において開発した分析方法について、その有用性・有効性を検証することを目的として、精度管理用の試料(チーズ)を作製し、複数の外部検査機関(8機関)に配布して分析法の室間精度管理試験を実施した。

その結果、真度の評価として、試料Aおよび試料Bの回収率は、概ね93%および104%程度であった。このことから、本研究で使用したイムノアフィニティーゲルは、総AFsと同様にAF-M₁にも十分な交差反応を示し、且つ本試験法にて開発したSPDEおよび固相蛍光誘導体化法が有効であることが確認された。

精度の評価として、8検査機関の室間精度を相対標準偏差で算出したところ、試料A(高濃度添加)では20%未満、他方、試料B(低濃度添加)では31%未満であった。これらをHorRat値で算出すると試料Aでは0.90、他方、試料Bでは1.41であり、いずれもCACで規定したHorRat値の許容範囲(2)内であった。

また、各検査機関の実測データを評価すると、8機関中5機関は、高濃度試料測定

の平均値が“全検査機関の平均値 ± SD”にほぼ入っており、残りの3機関もわずかに“平均値 ± SD”からはみ出してはいたが、“平均値 ± 2SD”には十分に入っていた。また、低濃度試料においても、8機関中6機関は、“平均値 ± SD”にほぼ入っており、残りの2機関も“平均値 ± 2SD”に十分に入っていた。以上の結果から、チーズ中 AF-M₁ 分析における本試験法の精度も良好であることが推察された。

3 鎗田研究分担

QuEChERS 法は、食品中の残留農薬一斉分析法として開発され、操作が迅速・簡便であることから、現在では食品試料のみならず、環境試料や生体試料などを対象として、世界中で使用されている。本研究においては、食品中の正確な農薬分析の検討に用いており、上述の通り今年度は大豆とリンゴを対象とした。QuEChERS 法(分析法1)で得られた定量値と認証値との比較を行った。この結果から、大豆およびリンゴ試料の両方に対して、QuEChERS 法の定量値が認証値の不確かさの範囲内であることが示された。これより、本研究で対象とした大豆およびリンゴ中の農薬に対して、簡易分析法にもかかわらず、QuEChERS 法によって十分に対象農薬が抽出され、正確な分析値が得られることが示された。これは、昨年度報告した玄米の結果と同様であった。なお、マトリックスマッチングしていない検量線 A (大豆用) および検量線 B (リンゴ用) を用いた場合、大豆のダイアジノンおよびフェニトロチオンで各々 7.7% と 11.1%、リンゴのフェニトロチオンで 11.2%、定量値が低くなった。

QuEChERS 法は一斉試験法よりも精製効果が低いと考えられたため、IDMS においてもマトリックス効果の影響をより強く受ける可能性がある。QuEChERS 法によってより正確な IDMS 分析を行うためには、今後マトリックス効果に関するより詳細な確認が必要である。

STQ 法は、QuEChERS 法と固相抽出法を組み合わせた残留農薬一斉分析法であり、株式会社アイステイサイエンスによって開発された QuEChERS の改良法である。操作が迅速・簡便であり、QuEChERS 法に比べて精製力がさらに優れていることから、日本国内の分析ラボにおいて、近年非常に多く使用されている。本法には、分析対象に応じて GC-A 法、GC-B 法、LC 法、MG 法が存在するが、今回は GC-A 法に IDMS 法を適用し、玄米試料中の農薬を対象として本法の正確さを精密に評価した(分析法2)。その結果、玄米中のすべての対象農薬において、STQ 法の分析値は一斉試験法および QuEChERS 法とよく一致していた。これは、STQ 法により玄米中の対象農薬が十分に抽出され、また精製されていたことを示しており、STQ 法を正確な分析に適用できる可能性が示された。今後は、より多くの食品や農薬を対象として、マトリックス効果の影響も含めた評価が必要であろう。

4 渡辺研究分担

4.1 理化学検査のための適正調査試料の作製検討:

玄米及び精米の冷凍及び冷蔵保存における長期安定性(回収率)の評価については、平成27年度から引き続き、基材自体の農薬添加試料としての適用性の確認と

して、粉碎・粉末化した米類(精米及び玄米のそれぞれ古米)に農薬を添加し冷凍及び冷蔵保存条件下での経日的安定性(平成27年度の農薬添加後0、14、34、60、90及び120日間に加え、本年度は180、270及び360日間)を検討したところ、精米及び玄米ともに明らかに冷蔵よりも冷凍保存の方が高い安定性を示し、さらに精米より玄米の方が良好な安定性が得られた。精米においては特にマラチオン及びフェニトロチオンの2農薬が冷凍と冷蔵保存で顕著な差が認められた。玄米の冷凍保存においては、4種農薬とも270日間経過時点で80%以上の回収率を示しており、また、マラチオン及びフェニトロチオンは冷凍保存360日間でも、90%以上の安定した回収率を示していた。このことから、玄米の冷凍保存においては、外部精度管理調査実施後の余剰試料を内部精度管理試料として活用できる可能性があると考えられた。

なお、それぞれの測定時点及び米の種類に応じてブランク試料についても同時に測定を行ったところ、一部の時点及び農薬において基材由来のピークが出現したため、それらを差し引いて回収率の算出を行った。またアセトンを添加しない米類ブランク試料と比較したところ、差は認められず、アセトンを添加後、長期冷凍保存することの影響はないと考えられた。

実作製における作製プロセスの確立及びその検証について浸漬用溶媒の検討を行った。昨年度までは、米を粒状で浸漬用農薬混合標準液に浸漬し、溶媒留去後乾燥・粉碎し、粉碎物を混合する方法で調製したが、今年度は、米を予め粉碎し粉末化した試料を用いて調製する方法を試みた。

調製に先立ち、浸漬用農薬混合標準液に用いる溶媒の検討を行った。玄米(古米)を3種の浸漬用溶媒(ヘキサン、アセトン及び酢酸エチル)に浸漬した後、ロータリーエバポレーターにより浸漬溶媒を留去し、自然乾燥させた時の、得られた作製試料の乾燥状態等について、目視により観察を行った。その結果、アセトンに浸漬した試料が最も溶媒の除去状態が良好であり、ヘキサン及び酢酸エチルによる試料は、溶媒の除去が不完全となる傾向があった。溶媒の一部が残留することは、溶液部分が濃縮されているため高濃度の農薬が一部の試料と接触し農薬が偏在する可能性が高く、また、アセトン浸漬試料と比べ、ヘキサン及び酢酸エチル浸漬試料は、溶媒留去時に突沸しやすいなど細心の注意と時間を要したため、実試料作製には不適と判断した。

以上の結果より、玄米粉体試料作製に用いる溶媒は、アセトンを採用することとした。

なお、溶媒留去において、減圧濃縮装置のロータリーエバポレーターに球形ガラスフィルターあるいはロータリージョイントを接続し、粉体の冷却部への吸い込みを防止した。その結果、溶媒の留去速度が低下するものの、粉末の飛散防止に高い効果があることがわかり、採用することで農薬の粉体試料への添加が可能となった。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合無し)については、粉碎・粉末化した玄米(古米)に農薬(アセトン溶液)を添加し、乾燥した試料につき、1バッチ内の均質性について評価した。

一元配置の分散分析の結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%

点よりも大きく、1 バッチ内の均質性は得られなかった。しかし、各農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 µg/g、フェントロチオン 0.2 µg/g)に対する回収率は 89~97%であり、添加した農薬は、バッチ内においては良好に玄米試料に移行したと考えられた。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合有り)については、バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合無)の結果よりバッチ内において、玄米試料に対する添加農薬の濃度にばらつきが生じていることが明らかとなったため、これを均質にするために、農薬添加後の乾燥試料をロッキングミキサーにより回転・揺動を混合し、1 バッチ内を均質とし、評価を行った。

その結果、いずれの農薬においても得られた F 値は有意水準 5%点よりも小さく、ロッキングミキサーによる混合により、1 バッチ内の試料は良好な均質性を得られることが明らかとなった。また、農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 µg/g、フェントロチオン 0.2 µg/g)に対する回収率は 88~101%であり、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率は 1%であることから、いずれの農薬も玄米試料に良好に移行し添加されたと考えられた。

バッチ間の均質性の検討については、バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合有)の方法で 1 バッチ内の均質性が確認できたため、さらに複数バッチを同様の方法で作製した場合のバッチ間の均質(同等)性を検討した。10 個の粉体攪拌用フラスコを用いて繰り返し 10 回の操作により農薬

添加粉末玄米試料を作製した。その結果、いずれの農薬においても得られた F 値は有意水準 5%点よりも小さく、10 バッチの試料について良好な均質性が得られ、バッチ間の同等性が明らかとなった。また、農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 µg/g、フェントロチオン 0.2 µg/g)に対する回収率は 89~98%であり、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率はいずれの粉体攪拌用フラスコ及び農薬で約 1%以下であることから、添加農薬は 10 バッチにおいて玄米試料に良好に移行し高い再現性で添加されたと考えられた。

作製試料の各農薬測定結果は、いずれのバッチにおいても回収率に同様の傾向がみられ、バッチ間で玄米試料への農薬添加の状態に差異は認められなかった。

一方、枝豆では、水 10%を添加した枝豆ペーストに農薬混合標準液を添加し、ブリクサー5 プラスを用いて混合した時の、1 バッチ内の均質性及び 5 バッチ間の均質(同等)性を評価した。

各バッチ内の均質性について評価した結果、作製試料の各農薬測定結果は、バッチ(容器)内のいずれのサンプリング部位においても、回収率に同様の傾向がみられ、バッチ内の作製試料は均質であることが明らかとなった。

5 バッチ間の均質性について評価した結果、いずれの農薬においても得られた F 値は有意水準 5%点よりも小さく、5 バッチの試料について良好な均質性が得られ同等であることが明らかとなった。また、ダイアジノンについては基材由来の夾雑物の影響があり、ブランク試料を差し引いて

算出したことから、他の農薬と比較して部位の違いによる回収率にばらつきがみられたが、農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン 0.01 µg/g、クロルピリホス及びマラチオン 0.3 µg/g、フェニトロチオン 0.5 µg/g)に対する回収率は 82~104%であり、満足できる結果であった。今回の 5 バッチによる合計作製量は 10 kg であるが、本作製操作を繰り返し行うことで、外部精度管理調査の実配付量を作製することが可能であると考えられた。

4.2 微生物学検査のための適性調査試料の作製検討：

5 種のゼラチンの濃度で調製したゼラチン試料を冷蔵後、室温(24 前後)にて放置し経過観察した結果、ゼラチン 1%および 2%では冷蔵しても固形にならなかった。また、4%では 1 時間後に溶解しているものの、若干粘土が高い状態であり、5%では 1 時間後では半固形の状態であったことから、1 時間後に液状化している条件に当てはまらなないと判断した。

以上のことから、ゼラチン濃度は 3%として以降の検討を実施することとした。

ゼラチン試料 10 本の生菌数平均値の経時的変化、併せて各測定時の標準偏差、変動係数および冷蔵から取り出した直後の外観を検討した結果、生菌数は接種直後(0 週)から 28 週目まで殆ど変動することがなかったため、安定であると判定した。また、変動係数も 0.05 から 0.07 の間にあり、検体間のばらつきも非常に少ないと考えられた。

併せて、冷蔵保管中にゼラチンが変性して液状に変化することもなかったことから、

安定性に特に問題はないと考えられた。

ゼラチン試料 10 本についてフィルターなし検体袋、2 社のフィルター付き検体袋を用いて生菌数測定を実施した結果、フィルターなし検体袋の生菌数平均値を 100%とした場合のフィルター付き検体袋の各生菌数測定値の比率は 80%以上であり、フィルターなし検体袋の生菌数とほぼ同等であると評価できた。

また、各項目の変動係数も 0.1 以下と低い数値であることから、フィルター付き検体袋を用いることによる生菌数への影響は低減化できると示唆された。

2015 年度および 2016 年度の食品衛生外部精度管理調査の統計結果を比較した結果、フィルター付き検体袋を使用する参加機関が大半である状況は 2015、2016 年度とも変わらないにもかかわらず、2016 年度の方が変動係数が低くなったことから、実際の運用からもゼラチン試料の方がフィルター付き検体袋の影響が生菌数結果に反映されにくいことが明らかとなった。

しかしながら、アンケート結果を集計したところ、ゼラチン試料を氷菓と同様に溶解操作できると明言されていなかったため、半固体の状態が無理やりピペットで 10mL 秤量した、試験中にだんだん液体になって操作しにくかった、氷菓は液状での操作となっているが固体なので仕方なく重量で秤量した、などの意見が見られた。氷菓と同じ操作で試験ができるので良い、といった意見もあったことから、溶解操作について明文化することで混乱を避ける必要があると考えられた。

4.3 アレルギー物質検査のための適正試

料の作製検討：

通知法改正前および通知法改正後の ELISA キットによる卵タンパク質添加試料の回収率の結果から全卵添加試料について、ベビーフード試料およびカボチャペースト試料共に、通知法改正前のデータは各社キット間でばらつきがあるものの、約 90～105%と良好な回収率が得られた。これに対し、通知法改正後のデータは改正前よりも測定値が低いものの 80%前後の良好な回収率が得られた。但し、各社キット間でばらつきがほとんどなかった点では改正前におけるデータと異なった。

また、通知法改正後のキットについては、全卵添加試料だけでなく、卵タンパク質を乾燥全卵粉末に変更した試料の回収率についても検討した。これは、乾燥全卵粉末は全卵よりも扱いやすく、長期保存が可能なため、安定した品質の外部精度管理調査試料を作製できると考えたためである。その結果、乾燥全卵添加試料は全卵添加試料よりも高い回収率が得られ、約 85～105%と良好であった。ただし、全卵添加試料は 3 種類のキット間で回収率がほとんど変わらなかったのに対し、乾燥全卵添加試料ではプリマハムキットの回収率が他の 2 種類のキットよりも高めに得られた。この傾向は、ベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料のいずれでも同じであった。

以上より、通知法改正後の ELISA キットで測定した卵タンパク質添加試料の回収率は、全卵添加試料および乾燥全卵粉末添加試料共に 80～110%の範囲内と良好であり、検討に用いた試料が同一でないため単純比較することはできないものの、通知法改正前の回収率と大きく乖離しなかったことから、通知法改正後の ELISA キットでもこれまで作製してきた卵タンパク質添加試料が適用可能であることが

示された。なお、これ以降の検討はより高い回収率が得られた乾燥全卵粉末添加試料について行った。

調査試料の均質性の結果で試料作製直後(0日目)と発送前(92日目)の添加量に対する回収率および変動係数をキットの種類ごとに比較すると、回収率、変動係数共に大きな相違は認められず、回収率では最大で 6.7%、変動係数では最大で 0.023 の変動幅であった。これらの変動幅は測定誤差の範囲内と考えられたために、作製した試料は均質であると判断した。ただし、測定値は測定キットごとに特徴的な回収率を示した。プリマハムキットでは約 110%台と高めの値を示したのに対し、モリナガキットでは約 80～90%、日本ハムキットでは約 75～85%と低めの回収率を示し、この傾向は試料が異なっても同様であった。

外部精度管理調査試料の安定性については、試料作製から調査期間終了までに定期的に試料を測定し(0日目、34日目、69日目、92日目、126日目および194日目、0日目および92日目はn=10、その他はn=4で測定)、特に、外部精度管理調査試料発送前の安定性は92日目、調査期間終了後の安定性は194日目に確認した。その結果、試料1および試料2の安定性は共に変動はあるものの90%～110%の範囲内であった。特に試料配付前と調査期間終了後では若干の低下がみられたものの、試料1および試料2のいずれにおいても全てのキットで安定性の変化率が10%以内であったことから測定誤差の範囲内と考えられた。従って、卵タンパク質添加試料1および試料2については194日目までの長期安定性が確認できた。なお、これらの結果から今回作製した試料は安定であり、外部精度管理試料として採用できるものと判断した。

外部精度管理調査結果において、参加機関の測定値を試料別かつ測定キット別に集計しその結果とデータ分布から、モリナガキットと日本ハムキットの測定値の分布について比較すると、わずかに日本ハムキットのほうが分布範囲が狭い傾向にあり、変動係数で比較するとモリナガキットが0.08~0.1、日本ハムキットが0.06~0.07と日本ハムキットのほうがわずかに小さかった。また、同一試料のキット間差は試料2のほうが大きかった。

キット別で集計した結果、モリナガキットを用いて測定した18機関の試料1において、回収した報告値のヒストグラム、正規確率プロット及びXbar-R管理図から、Xbar管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、R管理図で上部管理限界線を超えた機関が1機関あった。全18機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は $9.694 \pm 0.963 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づきzスコアを算出したところ、zスコアの絶対値が2以上の機関は1機関であり、絶対値が3以上の機関はなかったことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

モリナガキットを用いて測定した18機関の試料2において回収した報告値のヒストグラム、正規確率プロット及びXbar-R管理図からXbar管理図で管理限界線の範囲を超えたデータはなかったが、R管理図で上部管理限界線を超えた機関が1機関認められた。

全18機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は $9.136 \pm 0.750 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づきzスコアを算出したところ、zスコアの絶対値が2以上の機関は2機関であり、絶対値が3以上の機関はなかったことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

ELISA測定における吸光度の変動係数について、モリナガキットのELISA測定の併行精

度を、併行実施した3ウェルの吸光度の変動係数を指標として検討した。その結果、ほとんどの検査機関で変動係数は0.05未満であった。これに対してコード番号1の機関では他の検査機関と比較すると高い変動係数を示した。また、試料1ではコード番号8、12および16で抽出間での変動係数の差が大きい傾向にあった。同様に試料2ではコード番号1、8、17および18で抽出間での変動係数の差が大きい傾向にあった。

一方、日本ハムキットを用いて測定した18機関の試料1において回収した報告値のヒストグラム、正規確率プロット及びXbar-R管理図からXbar管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、R管理図で上部管理限界線を超えた機関が1機関認められた。全18機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は $8.893 \pm 0.553 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づきzスコアを算出したところ、zスコアの絶対値が2以上の機関は2機関であり、絶対値が3以上の機関はなかったことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

日本ハムキットを用いて測定した18機関の試料2において回収した報告値のヒストグラム、正規確率プロット及びXbar-R管理図からXbar管理図、R管理図の両者において管理限界線の範囲を超えた機関は認められなかった。全18機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は $8.003 \pm 0.522 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づきzスコアを算出したところ、zスコアの絶対値が2以上の機関は1機関であり、絶対値が3以上の機関はなかったことから、明らかな異常値ではないと考えられた。

日本ハムキットのELISA測定の併行精度を、併行実施した3ウェルの吸光度の変動係数を指標として検討した。その結果、ほとんどの検

査機関で変動係数は 0.05 未満であった。これに対して試料 1 ではコード番号 4 の抽出 2 において、試料 2 ではコード番号 2 の抽出 2 においてそれぞれ変動係数が 0.1 を超えていた。また、試料 1 ではコード番号 4、9、14、15、16 で抽出間の変動係数の差が大きい傾向にあった。同様に試料 2 ではコード番号 2、6、7、9、12 で抽出間の変動係数の差が大きい傾向にあった。一方、プリマハムキットを用いて測定した機関はいなかったため、統計解析は実施しなかった。

キットのロット間の測定値の比較について今回の外部精度管理調査において、日本ハムキットについては 1 ロットのみであったが、モリナガのキットにおいて合計 6 ロットが外部精度管理調査に用いられていた。そこで、モリナガキットにおけるロット間差について観察した。その結果、若干の測定値の変動はあるものの、試料 1、試料 2 のいずれにおいても明確なロット間差は認められなかった。

同一キット内の試料間の測定値の相関性については試料 1 と試料 2 の各機関における測定値のモリナガキット内および日本ハムキット内における相関性を検討した結果、モリナガでは相関係数が 0.914、日本ハムでは 0.823 といずれも非常に高い相関を認めた。

同様に試料ごとにキット間の相関性を検討した結果、試料 1 では相関係数が 0.598、試料 2 では 0.619 といずれも高い相関を認めた。

E. 結論

1 梶村研究分担

本研究において畜水産食品中の動物用医薬品の LC-MS/MS 分析におけるマトリックス効果について基礎的知見を得た。LC-MS/MS 分析ではイオン化抑制が観察される

ことが多いが、実施機関の事前検討では医薬品の種類によりイオン化抑制及びイオン化促進が共に観察された。また、比較的極性の高い物質が溶出する時間帯においてより強くマトリックス効果を受ける傾向が認められた。これは、畜水産食品分析におけるマトリックス効果の原因物質として極性の高いりん脂質が挙げられるという知見に沿うものであった。さらに、食品試料の種類や試料の保存状態を変えても、マトリックス効果はほぼ同程度であった。そのため、マトリックス効果によってイオン化が抑制されるか促進されるかは、畜水産食品の種類よりは、動物用医薬品の種類に依存すると考えていた。しかし、近畿地区 6 地研との共同試験から、共通マトリックス溶液を異なる分析条件で測定した結果、同じ医薬品でもイオン化の抑制と促進、どちらも観察された。さらに、同一食品試料から独自に調製したマトリックス溶液でも医薬品の受けるマトリックス効果の傾向は共通マトリックスと同様だったことから、畜水産食品中の動物用医薬品分析時のマトリックス効果は医薬品の種類のみではなく、液体クロマトグラフのグラジエント条件や質量分析計の各種パラメーターなどの分析条件も原因となることが示唆された。

複数の協力機関において共通マトリックスより独自に調製したマトリックスでマトリックス効果の改善が見られたが、いずれの機関も前処理時に脱水剤を使用していた。また、独自に調製したマトリックスの方がより強くマトリックス効果を受けた機関では分析時の最終食品試料濃度が共通マトリックスと比較して 10 倍以上高かった。以上から、畜水産食品中の動物用医薬品分析に

において、マトリックス効果を低減するには、前処理で可能な限り水溶性の妨害物質を排除すること、抽出液の食品試料濃度をできるだけ下げることが有用であることが示唆された。ただし、この対策は比較的極性の低い医薬品に対して限定的に有効なものである。例えば、 β -ラクタム系抗生物質のような高極性の医薬品の分析には、抽出溶媒も高極性のものにする必要があることから、高極性の医薬品を分析する際には今回は別の対策を講じる必要があるだろう。

最後に、本研究のような動物用医薬品の LC-MS/MS 分析におけるマトリックス効果について機関横断的に検討した例はほとんどなく、本研究で得られた知見が、今後より精度の高い検査法の開発に寄与することを期待する。

2 斉藤研究分担

食品中 AFs の分析に関して、従来の公定検査法では操作が煩雑であること、実験者への AFs の曝露が危惧されること、食品の種類によって夾雑物の種類や量が異なることから、前処理法を使い分けなければならないといった問題点があった。そこでこれらの問題点を克服するために、食品中 AFs の前処理法としてイムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法および固相蛍光誘導体化法を構築し、精度管理試験を実施した。その結果、白コショウ中の総 AFs 分析およびチーズ中 AF-M₁ 分析においていずれも良好な真度と精度が得られ、残留試験法として十分に実用性があることが示された。

本研究を実施することにより、現行の公定法に代わる微量分析が可能な信頼性の高い AFs および AF-M₁ の分析方法を示すこと

が可能となり、食品衛生に大いに寄与することが期待される。

3 鎗田研究分担

IDMS 法を適用することにより、日本の検査機関においても広く適用されている QuEChERS 法と STQ 法の抽出能力を精密に評価した。その結果、検討した試料及び農薬について一斉試験法の同等の抽出能力が認められたことから、同法の正確さが確認できた。

4 渡辺研究分担

4.1 理化学検査のための適正調査試料の作製検討：

新たに、固体試料である穀類の粉末試料を基材として、残留農薬検査のための試料作製を玄米及び精米のそれぞれ新米ならびに古米を用いて検討したところ、基材には玄米を使用し、保存は冷凍条件下で行うことで、適用できることが示唆された。また、長期安定性を検討したところ、玄米試料については冷凍保存により作製後 360 日間でも添加したいずれの農薬で約 80% 以上の回収率が得られ、外部精度管理調査実施後の余剰試料を内部精度管理試料として使用が可能であると考えられた。同一ロット試料の提供期間は長い方が使用する上で管理しやすく、特に内部精度管理用試料には、長期安定性の確保は重要である。また、粉体攪拌用フラスコ、球形ガラスフィルター、ロータリージョイント及びロッキングミキサーを用いることで再現性の高いかつ作製工程で汚染のリスクを極力低減できる実配付量の作製が可能であることが示唆された。枝豆ペーストを基材

として試料作製を試みた結果、基材成分である水分を10%添加し均質な基材とした後、農薬を添加混合することで、良好な均質性が得られ、1バッチで2 kgの作製を同様の方法で複数バッチ繰り返し実施することで実配付量の枝豆ペースト試料の作製が可能であることが示唆された。

4.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製検討：

ゼラチン試料は安定性に問題なく、参加機関の使用する器材による試験結果への影響も少ない点で寒天試料より一般細菌数用の試料として優れていると考えられた。また、実際の運用時に取扱いについて若干の補足を加えることで、外部精度管理調査用の試料としての品質をさらに向上できると考えられた。

4.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製検討：

卵添加試料を作製し、添加回収試験および安定性確認試験を行ったところ、通知法の改正後のキットにおいても過去に実施した際と類似の結果が得られた。また、かぼちゃペーストおよびベビーフードを用いた外部精度管理調査を試験的に18機関を対象に実施した。その結果、回収率を指標としたXbar管理図では管理限界線の範囲を超える機関は認められなかったが、一部の試料において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、ロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いたzスコアを算出したところ、zスコアの絶対値が2~3となる機関が1または2機関認められた。zスコアは平均値と標準偏差から算出されるため、そのデータ分布によってある一定

の割合でzスコアの絶対値が2以上となる可能性を含んでいる。しかし、今回限界外となった機関におけるzスコアはいずれも3未満であり、明らかな異常値として判断することはできないと考えられる。また、Xbar管理図における管理限界線を考慮してもこれらの機関が明らかな異常値とは判定できないことを示していると思われる。これに対して、参考として実施した吸光度の変動係数に基づいた解析では、一部の検査機関において繰り返し測定の際ばらつきが大きいことを示した。これらの機関がR管理図において限界外と判定されたわけではないが、内部精度管理の一環としてこれらのパラメーターを観察することで、ピペットの取り扱いを含めてより高い精度での検査の実施のための措置を講ずることが可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Akutsu, M. Yoshimitsu, Y. Kitagawa, S. Takatori, N. Fukui, M. Osakada, S. Yamaguchi, K. Kajimura, H. Obana, T. Watanabe, Evaluation of matrix-like effects in multiresidue pesticide analysis by GC/MS/MS, Journal of Separation Science, 40(6), 1293-1300 (2017)

2. 学会発表

1) 阿久津和彦, 吉光真人, 北川陽子, 高取聡, 福井直樹, 小阪田正和, 山口聡子, 並河幹夫, 伴創一郎, 大久保祥嗣, 中島涼,

丸山量子，角谷直哉，宮本伊織，山下浩一，
西山隆之，神藤正則，山本直美，高井靖智，
樋下勝彦，梶村計志，尾花裕孝，渡辺卓
穂：GC-MS(/MS)測定における農薬由来マト
リックス効果の検討 1 近畿地衛研 6 機関
における共同研究結果 : 第 111 回日本食
品衛生学会学術講演会，東京，2016

2) 吉光真人，阿久津和彦，北川陽子，高
取聡，福井直樹，小阪田正和，山口聡子，
並河幹夫，伴創一郎，大久保祥嗣，中島涼，
丸山量子，角谷直哉，宮本伊織，山下浩一，
西山隆之，神藤正則，山本直美，高井靖智，
樋下勝彦，梶村計志，尾花裕孝，渡辺卓
穂：GC-MS(/MS)測定における農薬由来マト
リックス効果の検討 2 近畿地衛研 6 機関
における共同研究結果 : 第 111 回日本食
品衛生学会学術講演会，東京，2016

H. 知的所有権の取得状況

なし

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）

検査機関の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

残留分析の測定値に与える食品成分の影響に関する研究

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 食品衛生事業部 部長

研究分担者 梶村計志 大阪府立公衆衛生研究所 食品化学課 課長

研究要旨

食品中に残留する農薬や動物用医薬品の分析において、試験液中の共存成分（マトリックス）により分析値が過小あるいは過大評価される場合があり、これらは「マトリックス効果」と呼ばれている。マトリックス効果は、分析値の信頼性に大きな影響を及ぼすため、制御方法の確立は重要である。本研究は、マトリックスが機器分析に与える影響に焦点をあて、マトリックス効果を引き起こす要因の解明及び制御法を検証する。平成 28 年度は、LC-MS/MS を用いた、動物用医薬品の残留分析時におけるマトリックス効果について近畿地区 6 地研と協力して、基礎的知見の収集を試みた。

事前検討として畜水産食品の分析時に観察されるマトリックス効果について検討した。食品試料として鶏卵、牛乳、魚介類（ブリ、サケ、カレイ、エビ）を、分析対象物質としてサルファ剤 17 種、葉酸拮抗剤 3 種、キノロン剤 10 種を選択した。大阪府の検査標準作業書に基づきマトリックス標準溶液を調製して検量線を作成し、傾きを溶媒検量線と比較したところ、サルファ剤、葉酸拮抗剤ではイオン化抑制を、キノロン剤ではイオン化促進を確認した。この傾向は、魚介類以外では試料中の成分が凍結や加工によって異なっても同じであり、動物用医薬品の分析時におけるマトリックス効果の程度は食品の種類よりも医薬品の種類に依存することが推察された。

次に近畿地区 6 地研の協力により、大阪府で鶏卵及び牛乳から調製した共通マトリックス溶液と、共通マトリックス溶液の調製に供したものと同一の食品より各機関の検査標準作業書に基づいて調製した独自マトリックス溶液でそれぞれ検量線を作製した。その傾きを溶媒検量線と比較し、分析条件や前処理条件の違いが検量線の傾きに及ぼす影響を機関横断的に評価した。共通マトリックス溶液を用いた分析では機関毎にイオン化抑制、イオン化促進、影響僅少と様々なマトリックス効果が観察された。すなわち、動物用医薬品分析時のマトリックス効果は分析条件に依存することが示唆された。また、独自マトリックス溶液の分析結果ではマトリックス効果が減少した機関と増大した機関が見られた。減少の要因としては脱水剤の追加、増大の要因としては最終液中の食品試料濃度の高さが考えられ、畜水産食品中の動物用医薬品分析において、マトリックス効果を低減するためには、前処理過程で水溶性の妨害物質を排除すること、抽出液の食品試料濃度を下げることが有用であると示唆された。

研究協力者	
伴埜行則	京都市衛生環境研究所
上田一穂	京都市衛生環境研究所
高尾恭平	京都市衛生環境研究所
大久保祥嗣	神戸市環境保健研究所
中島 涼	神戸市環境保健研究所
吉野共広	神戸市環境保健研究所
先山孝則	大阪市立環境科学研究所
上村聖子	大阪市立環境科学研究所
浅川大地	大阪市立環境科学研究所
山下浩一	奈良県保健研究センター
西山隆之	奈良県保健研究センター
田畑佳世	堺市衛生研究所
山本直美	堺市衛生研究所
高井靖智	和歌山県環境衛生研究センター
樋下勝彦	和歌山県環境衛生研究センター
永吉晴奈	大阪府立公衆衛生研究所
柿本健作	大阪府立公衆衛生研究所
小西良昌	大阪府立公衆衛生研究所
内田耕太郎	大阪府立公衆衛生研究所
山口瑞香	大阪府立公衆衛生研究所
吉田優子	大阪府立公衆衛生研究所

A. 研究目的

食品中に残留する農薬及び動物用医薬品等の分析では、試験液中の共存成分（マトリックス）が測定に大きく関与し、分析結果の信頼性に大きな影響を及ぼす。本研究では、食品成分等のマトリックスが残留分析の測定に与える影響に焦点を当て、原因の解明及び制御法を検証する。

食品成分が機器分析の測定値に影響を及ぼす現象は、一斉分析法の普及と関連して

いる。一斉分析法では、多様な物性を持つ化合物を同時に分析するため、的を絞った精製が困難であり、単一成分の分析法に比べて試験液の精製度は低くなる。このため、試験液中には多くのマトリックスが残存し、分析値への影響が大きくなると考えられる。一般にこのような現象は「マトリックス効果」と呼ばれており、質量分析計を用いた測定で顕著に観察される。

タンデム型を含むガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS(/MS)）では、GC注入口における試験液の気化やキャピラリーカラムへの導入の際にマトリックスによる影響を受けると考えられている。マトリックスが共存することにより、注入口における測定対象物質の吸着や熱分解が抑制され、シャープで良好なピーク形状となり、検出感度が上がる場合が多い。一方、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）では、測定対象物質がイオン化する際にマトリックスが共存した場合、測定対象物質のイオン化が抑制または促進され、過小あるいは過大な定量値を示すと考えられる。本研究では、協力機関との連携の下、マトリックス効果の主要な発現機構が基本的に異なる GC-MS(/MS)と LC-MS/MS についてマトリックス効果の特徴把握、原因の解明及び対策等の検討を実施し、より普遍的で効果的なマトリックス効果の制御法を検討する。また、得られた知見を協力機関と共有し、分析精度の向上に役立てることを目指す。

本研究では、平成 26 年度、平成 27 年度に、GC-MS(/MS)を用いた農産物中の残留農薬分析時のマトリックス効果について検証してきた。平成 28 年度は、LC-MS/MS を用

いた、畜水産食品中の残留動物用医薬品分析時のマトリックス効果に焦点を当てる。

GC-MS(/MS)で観察されるマトリックス効果及びそのメカニズムに関しては相応の知見が得られているのに対し、LC-MS/MS分析に関しては比較的知見が少ない。一般的にLC-MS/MS分析では試料が質量分析計に導入される際の気化・イオン化の段階において、目的物質と共存する妨害物質の影響でイオン化が抑制されるイオンサプレッションが生じると考えられている一方、GC-MS(/MS)に観察されるようなイオン化促進(イオンエンハンスメント)も見られる。LC-MS/MSのイオン化部は、液体を気化した上でイオン化しMS/MS部に導入するプロセスが必要なため、機器メーカーによって取り込み機構が異なる。そのため、妨害物質から受ける影響が一様でないことがマトリックス効果を複雑化する原因の一つだと考えられている。また、試料由来の要因としては、生体由来物質であるりん脂質が一因とされており、最近、りん脂質除去に着目した精製法が試薬メーカーより提案されている。

LC-MS/MSによる分析でマトリックス効果を回避する方法としては、前処理の工夫で妨害物質を除去すること、LC部において移動相やグラジエント条件を工夫し妨害物質との共溶出を防ぐこと、試験液を希釈することで共溶出する妨害物質の絶対量を減らすこと、内部標準物質を用いた相対検量線法によって定量することなどが考えられるが、ポジティブリスト制度の導入により多種類の医薬品を同時に、そして迅速に測定することが求められる現状において必ずしも効果的とはいえない。そのため分析対象物質を含有しない陰性試料を用いて検査と

併行して試験液を調製し、この試験液(マトリックス溶液)で作成したマトリックス検量線を用いて定量することでマトリックス効果を相殺することも多い。

上記のようにLC-MS/MS分析時におけるマトリックス効果の回避策は多岐にわたる。残留動物用医薬品の検査を行う地方衛生研究所ではこれらの回避策を柔軟に組み合わせながら信頼性の高い分析を実施している。しかし、それぞれの機関の対応策や得られた知見を共有化する試み、更には機関横断的な検討の例はほとんど見当たらない。そこで本研究では、近畿地区7地方衛生研究所で同一の前処理法で抽出した共通のマトリックス抽出液や同一の食品試料から機関独自に前処理したマトリックス標準溶液を用いて共通の動物用医薬品を測定し、各地研で観察されるマトリックス効果を把握することで、地研間の情報の共有化や有用なマトリックス効果低減策の構築に向けた基礎的知見の収集を試みた。

B. 研究方法

1. 実施機関

大阪府立公衆衛生研究所(以下、大阪府と略)は、食品試料や共通マトリックス溶液の調製及び配布試料の送付、分析結果の解析、協力機関との連絡調整、報告書の作成及び研究遂行に係る事務を行った。また研究に先立ち、事前検討を実施した。

2. 協力機関

京都市衛生環境研究所、神戸市環境保健研究所、大阪市立環境科学研究所、奈良県保健研究センター、堺市衛生研究所及び和歌山県環境衛生研究センターは、協力機関

として研究に参画した。

3. 実施日程

協力機関に今年度の試験内容及び事前検討の結果説明を行うため、班会議を平成 28 年 8 月 10 日に実施機関で開催した。共同試験に関わる試料、標準品及び実施要領を 8 月 31 日に宅配便（冷凍）で送付した。協力機関は測定を実施するまでの間、試料等を -20℃ 以下で保管した。分析結果等の提出期限は 9 月 30 日とした。

4. 事前検討

4.1. 試料・試薬

4.1.1. 食品試料

実施機関における事前検討には牛乳（無脂肪乳、特濃乳、一般的な牛乳）、鶏卵、ブリ、サケ、カレイ、エビを用いた。いずれも大阪府内の流通品を購入し、フードプロセッサ等を用いて細切混合後、分析対象の合成抗菌剤が残留しないことを確認した。

4.1.2. 標準品・試薬

標準品は林純薬製 PL 動物薬 LC/MS Mix 1（サルファ剤 + 葉酸拮抗剤）と PL 動物薬 LC/MS Mix 2（キノロン剤）、各成分 20 µg/mL（アセトニトリル溶液）を用いた。試薬はいずれも LC/MS 分析用相当グレードのものを使用した。それぞれの標準混合溶液に含まれる動物用医薬品の一覧及び大阪府の分析条件下で良好に分析できた薬剤については、その溶出時間を表 1 に示した。

4.2. 実施機関による事前検討

4.2.1 事前検討 1

共同研究に先立ち、事前検討を行った。まず、大阪府の検査条件におけるマトリッ

クス効果の傾向を把握するため、大阪府の標準作業書の前処理法に従って処理した鶏卵及び一般的な牛乳のマトリックス溶液と 10%メタノール水溶液を用いて、同じ濃度範囲の希釈系列を各々作製し、LC-MS/MS で測定、検量線の傾きを比較した。以後、マトリックス溶液を用いて調整した希釈系列をマトリックス標準溶液、10%メタノール水溶液を用いて調整した希釈系列を溶媒標準溶液とする。

マトリックス溶液の調製フローを図 1 に示した。すなわち、2.0 g の食品試料をポリプロピレン製（PP 製）試験管に秤取し、8 mL のヘキサン飽和アセトニトリル、2%ギ酸含有ヘキサン飽和アセトニトリルで 2 回に分けて抽出した。新しい PP 製試験管に上清を合わせ、ヘキサン飽和アセトニトリルで 20 mL に定容した。その後、ヘキサン 10 mL を積層し、攪拌後遠心分離した。アセトニトリル層（抽出液）を 500 µL 採取し、ジメチルスルホキシド 25 µL を加え、遠心濃縮したものをマトリックス溶液とした。マトリックス溶液を用いて、最終標準品濃度が 1、5、10、20 ppb となるよう標準溶液を添加し、10%メタノール溶液で 500 µL に調製したものをマトリックス標準溶液とした。なお、最終液中の食品試料濃度は 0.1 g/mL であった。鶏卵に関しては、別にアセトニトリル層を 2.5 mL 採取し、最終的に 500 µL に調製した最終食品試料濃度 0.5 g/mL のマトリックス標準溶液も作製した。

測定に際しては、表 2 に示すように、最終濃度 1、5、10、20 ppb となるように調製したマトリックス標準溶液を各 5 µL 注入した場合（以後、注入量一定）と、牛乳のみ最終濃度 20 ppb のマトリックス標準溶液

を用いて LC-MS/MS への注入量を変化させて濃度勾配を作ると同時に機器へのマトリックスの負荷絶対量を変化させた場合（以後、注入濃度一定）を実施し、得られた 2 種類の検量線について、マトリックス量が検量線の傾きに与える影響を観察した。

以後すべての検討において、マトリックス標準溶液の測定と同時に用時調製した溶媒標準溶液の測定も行った。

4.2.2 事前検討 2

食品中の成分組成の違いがマトリックス検量線に与える影響を評価した。食品成分組成の異なる魚介類として、ブリ、サケ、カレイ、エビを選択した。また乳脂肪分の異なる乳として無脂肪乳（乳脂肪分 0.1%）と特濃乳（乳脂肪分 4.2%）を選択した。

魚介 4 種類について、4.2.1 の方法でマトリックス標準溶液を作製し、検量線を作成した。乳 2 種類も同様に検量線を作成した。魚介類については、サルファ剤、キノロン剤、葉酸拮抗剤を、乳はサルファ剤と葉酸拮抗剤を分析した。また、乳に限り注入量一定と注入濃度一定の測定を実施した。

4.2.3 事前検討 3

共同試験に使用する試料の調製法を検討した。また、事前に実施したアンケートの結果から、実施機関及び全ての協力機関において検査が実施されているサルファ剤を測定対象物質とした。共同試験における共通食品試料としては均一な検体の調製が容易な牛乳と鶏卵を選択した。

冷凍での配送が必要なため、試料の凍結融解が検量線の傾きへ及ぼす影響を評価した。4.2.1 で使用した鶏卵と市販の牛乳を

使用し、未凍結の状態で 4.2.1. と同様に前処理したもの、2.0 g を PP 製試験管に秤取した後、一晚 -20 で凍結させた試料を、融解させた後に前処理したもの、複数回凍結融解を繰り返した後に前処理したものの 3 種類でマトリックス標準溶液を作製し、検量線の傾きを比較した。

さらに、マトリックス溶液を冷凍保存した際の安定性を確認した。4.2.1. で示した方法でマトリックス溶液を調製し、PP 製試験管で冷凍保存した（-20 ）。調製直後、1 週間後、2 週間後、4 週間後にマトリックス標準溶液を調製し、検量線を作成して傾きを比較した。なお、それぞれの再測定時には、凍結保存マトリックス溶液に加え未凍結の同一食品試料から再調製したマトリックス標準溶液も並行して測定し凍結マトリックス溶液と比較した。

5. 共同試験

5.1. 共同試験概要

共同試験は以下の 2 種類を実施した。

- 1) 実施機関で前処理したマトリックス溶液（共通マトリックス溶液）を用いて検量線を作成し溶媒検量線と傾きを比較した。
- 2) 同一食品検体を、協力機関の合成抗菌剤検査標準作業書に沿って前処理したマトリックス溶液（独自マトリックス溶液）を用いて検量線を作成し溶媒検量線、1) で得られた検量線と傾きを比較した。
 - 1) の試験では、同一組成で構成されているマトリックス溶液を異なる分析機器条件で測定することで、機器や分析条件（LC グラジエント条件や MS/MS のパラメーター）の違いがマトリックス効果に及ぼす影響に

ついて調査した。また、2)の試験では同一検体から異なる方法で得たマトリックス溶液に由来するマトリックス効果について評価し、前処理法の違いがもたらす影響の観察を狙いとした。共通のマトリックス溶液を用いて異なる実験室、異なる分析条件でマトリックス効果を評価した例はほとんど見当たらず、新たな知見が得られることが期待された。食品試料としては、ロット管理された食品試料で均一化が容易なこと、事前のアンケート結果から、ほとんどの協力機関においていずれかは検査を実施していることを理由に鶏卵と牛乳を選択した。分析対象とする動物用医薬品は実施機関及び全ての協力機関で検査を実施している(標準作業書が作成されている)サルファ剤を選択した。

5.2. 試料・試薬

5.2.1. 食品試料

鶏卵及び牛乳(一般的な牛乳)は大阪府内の市販品を購入した。鶏卵についてはブレンダーで攪拌混合後、牛乳についてはそのまま、50 mL容のPP製試験管に分注した。いずれの食品試料も使用まで-20℃で凍結保存した。

5.2.2. 標準品・試薬

同一ロットの林純薬製 PL 動物薬 LC/MS Mix 1 を調達し、食品試料と同時に2本ずつ配布した。その他試薬等については協力機関で通常の検査時に使用しているものを使用した。

5.2.3. 実施機関による共通マトリックス溶液の調製

4.2.1.で示した方法に従い、牛乳と鶏卵からマトリックス溶液を調製した。その後、PP製15 mL試験管に150 µLのマトリックス溶液を分注し、凍結後送付した。

実施機関及び協力機関において、標準品を常温に戻したのち50%メタノール水溶液を用いて検査で使用する検量線範囲等に応じて濃度を4点以上設定し、最終測定濃度の10倍の濃度になるよう希釈系列を作製した(溶液イ)。また、送付したマトリックス溶液を常温に戻し、10%メタノール水溶液を2550 µL加えて溶液口を調整した。そして、溶液イを溶液口で10倍希釈し、試料濃度0.1 g/mLのマトリックス標準溶液を調製し、検量線を作成した。以上の調製は可能な限りPP製の容器で行い、測定まで一日に行うよう依頼した。分析対象のサルファ剤は、配布した標準品に含まれる薬剤のうち、良好な選択性をもって測定できるもののみを測定することとした。実施機関は協力機関に17種類の代表的なMRM条件(表3)を例示したが、表3以外の条件も可とした。また、4.2.2.と同様に分析の際には、注入量一定と注入濃度一定の2パターンの測定を実施した。その後、結果を実施機関が送付したワークシート(図2、3)に記入し返送した。

なお、実施機関及び協力機関は分析の実施まで標準品及びマトリックス溶液を冷凍保管した。分析は試料到着後1ヶ月以内に実施することとした。

5.2.4. 協力機関による独自マトリックス溶液の調製

協力機関A、B、Cには牛乳を、協力機関D、E、Fには鶏卵を送付した。試料は各協

力機関で通常サルファ剤の検査に運用されている検査標準作業書の前処理法に従って処理した。なお、牛乳や鶏卵を検査対象食品としていない場合は他の畜水産食品のサルファ剤の残留検査に用いる標準作業書に従って調製することとした。このとき、マトリックス標準溶液を作製するために、通常の最終液量の 0.9 倍の容量に調製し、5.2.3.と同様に溶液イと 1:9 の割合で混合して独自マトリックス標準溶液を作製した。その後、5.2.3.と同じ条件で分析し、結果を実施機関が送付したワークシートに記入し返送した。以上の調製から分析は可能な限り 5.2.3.も含めて同一日に実施するよう依頼した。各機関の独自マトリックス溶液調製フローを図 4~9 に示した。

さらに、協力機関には、可能であれば分析時間中のスキャンデータの取得を依頼した。

6. 機器条件

6.1. 実施機関の分析機器条件

大阪府の分析機器条件を以下に示す。

使用機器：LC 部；Acquity UPLC I-Class (Waters 製)、MS 部；Xevo TQ-S (Waters 製) (LC 条件)

使用カラム：CORTECS C18 (粒子径 1.6 μm、内径 2.1 mm、カラム長 10 cm、Waters)

移動相：A 液；0.1% ぎ酸水溶液、B 液；0.1% ぎ酸含有メタノール溶液

グラジエント条件：B 液% 10%(0 min)→10%(5 min) 74%(17 min) 90%(20 min)→99%(25 min)；総分析時間 27 分

流速：0.2 mL/min

カラム温度：50

注入量：表 2 参照

(MS 条件)

イオン化方式：エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

MRM 条件：表 3 参照

イオン源温度：150

脱溶媒温度：400

6.2. 協力機関の分析機器条件

すべての協力機関において使用機器は LC-MS/MS、イオン化法は ESI 法 (ポジティブ) であった。大阪府も含めた各機関の分析機器の条件を表 4 に抜粋した。

7. 結果の評価

事前検討及び共同試験において得られた検量線データは表計算ソフト上でその傾き値を算出した。マトリックス効果は溶媒標準溶液による検量線の傾き値を 100%とした際のマトリックス検量線の傾きのパーセント比 (傾き比) を用いて評価した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 実施機関による事前検討

1.1. 事前検討 1

鶏卵マトリックス溶液を用いて最終食品試料濃度を 0.1 g/mL 又は 0.5 g/mL とした場合の検量線の傾き比を図 10 に示した。それぞれ同一の抽出液から調製し、溶媒標準溶液で得られた検量線の傾きを 100%としたときのパーセント比 (傾き比) を算出した。図に示した動物用医薬品は左から溶出時間順に並べたものである。全体的な傾向としてサルファ剤と葉酸拮抗剤でイオン化抑制を確認した。さらに、食品試料濃度が 0.1 g/mL と比較すると 0.5 g/mL のほうがより大きなマトリックス効果を受けており、鶏

卵分析時に観察されるマトリックス効果は食品抽出物由来であることが示唆された。

次に、牛乳マトリックス溶液を測定した際の検量線の傾き比を図 11 に示した。牛乳の場合にはサルファ剤と葉酸拮抗剤に加えてキノロン剤についても傾き比を算出した。また、マトリックス効果を強く受けたスルファジアジン（溶出時間 3.16 分）、スルファジミジン（溶出時間 8.33 分）と受けなかったスルファメトキサゾール（溶出時間 9.17 分）の散布図を図 12 に示した。鶏卵の場合と同じく、牛乳でもサルファ剤分析時にはイオン化抑制効果が確認された。一方、キノロン剤に関しては、イオン化促進効果を観察した。また、牛乳に関しては注入量一定と注入濃度一定の 2 つの検量線を作成した。どちらの場合も観察されるマトリックス効果は同じで、傾き比にも大きな変化は見られなかった。しかし、図 12 を見ると散布図ではスルファジアジンにおいて注入濃度一定の低濃度領域で注入量一定より溶媒標準に近づく傾向が見られた。すなわち、牛乳においても鶏卵と同様にマトリックス負荷量の減少がマトリックス効果の改善につながる可能性がある。

マトリックス効果を受けやすい時間帯として、溶出時間 3~5 分と 8 分あたりが抽出された。大阪府の分析条件では、3~5 分における移動相の有機溶媒濃度は 10%、8 分では 25%強と比較的高極性の物質が溶出する時間帯であった。近年、動物用医薬品分析時のマトリックス成分として疑われているりん脂質は、極性の基質であるりん酸基を含む脂質であり、脂肪酸とアルコールからなる単純脂質より極性が高い。そのため、この時間帯のマトリックス効果の原因物質

としてりん脂質の影響が疑われる。りん脂質は血漿などの臨床試料を分析する際のマトリックス効果の原因とされており、その除去ツールが各社より販売されている。これらのツールを利用することで効果的なマトリックス効果低減策となる可能性がある。一方、この時間帯以外では傾き比が 90%を超える物質も見られ、これらの物質に限れば溶媒検量線による定量が十分可能であると推察された。

1.2. 事前検討 2

1.2.1. 組成の異なる魚介類のマトリックス効果への影響

マトリックス検量線を用いて検査を実施する場合、マトリックス溶液にはできる限り検体となる食品と成分組成の類似する食品を用いる必要がある。しかし、実際の検査の現場においては、明らかに成分組成の異なる食品を同時に検査することがしばしばある。その際、ある 1 種類の食品由来のマトリックス検量線の異なる組成の食品への適用可否を検討することは重要である。そこで、複数種の魚介類によるマトリックス効果の違いを評価した。

ブリ、サケ、カレイ、エビの検量線の傾き比を図 13 に示した。概ね牛乳の場合と同様に、サルファ剤でイオン化抑制効果を、キノロン剤でイオン化促進効果を認めた。一方で、魚種によるマトリックス効果の程度は医薬品の種類によって大きく異なった。図 14 に示すように、スルファジアジン等のサルファ剤については、4 種類の魚介類で同程度の抑制を受けており、異なる魚種で作成したマトリックス検量線でも十分定量可能であると判断できる。一方、キノロン

剤では、魚種により効果が大きく異なり、特にダノフロキサシン（溶出時間 9.37 分）では溶媒標準を中心に上下に散布図が分布した。すなわち、キノロン剤の検査では異なる魚種で作成したマトリックス検量線による定量は、真値を過小もしくは過大に見積もる可能性があるため、可能な限り同じ魚種で作成したマトリックス検量線を用いるべきであろう。

1.2.2. 組成の異なる乳のマトリックス効果への影響

乳は一般的な牛乳であれば多少の差はあれ、食品成分組成はほぼ同一であると考えられる。一方、無脂肪乳や加工乳など成分の調製を行って商品化されているものが多種存在する。加工を施された乳は成分組成が異なることが想定されるため、今回、乳脂肪分を除去した無脂肪乳と脂肪分を上乗せした特濃乳を用いて検量線の傾き比を比較した。図 15 に示すように、1.1.と同様、3~5 分と 8~9 分にマトリックス効果を比較的強く受ける時間帯が存在した。また、3~5 分では乳の種類による差はほとんど見られなかったのに対し、溶出時間 8~9 分においては無脂肪乳より特濃乳のほうがより強くマトリックス効果を受けた。この結果より溶出時間 8~9 分のマトリックス効果には、試料に含まれる脂質量が影響していることが示唆された。図 16 に、注入濃度一定で分析したスルファジアジン（溶出時間 3.16 分）スルファジミジン（溶出時間 8.33 分）及びスルファメトキサゾール（溶出時間 9.17 分）の散布図を示した。この場合、高濃度になるほど分析時のマトリックス負荷量が増大することになるが、スルファジ

アジンよりも後に溶出するスルファジミジンとスルファメトキサゾールにマトリックス負荷量増大に伴って線分の傾きが緩やかになる傾向を認めた。すなわち、この時間帯に溶出する動物用医薬品には、共溶出する脂質が影響することが推測される。しかし、マトリックス効果の差は 1.2.1.で示した魚介類の場合に比べるとわずかであり、脂質量の異なる乳で作成したマトリックス検量線による定量結果への影響は無視できるだろう。

これまで鶏卵・牛乳・魚介類と種類の異なる食品試料から作成したマトリックス検量線の傾きを評価してきたが、サルファ剤に関してはいずれもイオン化抑制の傾向が観察された。反して、キノロン剤では、魚介類でイオン化促進効果が認められ、データは示さないが他の食品試料についてもキノロン剤はイオン化促進効果を受けることを経験しており、動物用医薬品分析時のマトリックス効果は食品よりも、医薬品の種類に依存することが推察された。

1.3. 事前検討 3

1.3.1. 凍結保存によるマトリックス効果への影響

畜水産食品のようなたんぱく質や脂質の含量が多い食品を凍結融解すると、たんぱく質の変性等により外見が変化していることがある。そこで凍結融解による外見上の変化がマトリックス標準溶液の検量線の傾きへ及ぼす影響を評価した。

同一検体から 2.0 g を秤量し、一方は秤量直後に、もう一方は一晩-20 で保存後に完全に融解して、マトリックス標準溶液を調製した。さらに、複数回凍結融解を繰

り返した食品も使用してマトリックス検量線を作成した。図 17 と図 18 に鶏卵と牛乳の検量線傾き比を示した。いずれも凍結による顕著な影響は見られず、サルファ剤分析においては試料の凍結は検量線に影響しないと考えられた。本項の結果より、鶏卵及び牛乳の検査時には事前に陰性を確認し、凍結保存した試料でマトリックス検量線を作成できることが確認された。

1.3.2. 共通マトリックスの調製と安定性

共同試験において、実施機関による試料の送付から測定結果の返送までを 1 ヶ月以内と設定した。この期間内において共通マトリックス溶液が冷凍保存で品質を保持できるか確認した。

調製直後、1 週間保存後、2 週間保存後、4 週間保存後の鶏卵マトリックス標準溶液（保存マトリックス）及び測定時に再度凍結していない鶏卵試料から調製したマトリックス標準溶液（再調製マトリックス）を分析し、検量線の傾きを算出した。表 5 に再調製マトリックス標準溶液の傾きに対する保存マトリックス標準溶液の傾き比を示した。なお、結果は鶏卵の注入量一定分析のものを示した。いずれの保存期間においても観察されたマトリックス効果は同程度であった。この傾向は鶏卵の注入濃度一定および牛乳の注入量一定と注入濃度一定、いずれの場合も同様であった。従って 1 ヶ月間マトリックス溶液を冷凍保存しても問題がないと結論付けた。

1.4. まとめ

様々な条件で調製したマトリックス標準溶液を用いて検量線を作成し、その傾きを

比較した。本項において確認した知見を以下に列記する。

- 1) マトリックス効果の程度は最終溶液中の食品試料濃度に依存した。
- 2) 妨害物質と共溶出すると想定される時間帯においてより強くマトリックス効果を受けた。また、その時間帯は比較的極性の高い薬剤が溶出する時間帯であった。
- 3) 鶏卵や牛乳では、試料由来成分の違いや凍結融解によるマトリックス効果への影響は小さいが、魚介類中のキノロン剤では医薬品によってマトリックス効果が大きく変動したため、異なる魚種を一種類の代表的なマトリックス検量線で定量することには問題がある。
- 4) サルファ剤や葉酸拮抗剤はイオン化抑制をキノロン剤はイオン化促進を受ける。この影響は試料の種類に依存せず動物用医薬品の種類によると考えられる。
- 5) 実施機関の分析前処理フローで得たマトリックス調製液は少なくとも 1 ヶ月間凍結環境下（-20℃）の保存で安定であった。

2. 共同試験結果

2.1. 協力機関における分析条件

2.1.1. LC-MS/MS 分析条件

表 4 に実施機関及び協力機関の LC-MS/MS 分析条件を示した。全 7 機関の使用機種は異なっていた。イオン化法は全ての機関がエレクトロスプレーイオン化法を用い、Multiple reaction monitoring 法 (positive) で測定した。分析カラムは大阪府を含む 6 機関が ODS カラムを使用し、機関 F のみ資生堂社の CAPCELL CORE ADME を使用した。

移動相は全ての機関でギ酸含有水溶液を水相として使用し、有機相はギ酸含有メタノール 3 機関、アセトニトリル 2 機関、ギ酸含有アセトニトリル 2 機関であった。流速、測定時間についても機関で大きな違いは見られなかった。

2.1.2. 独自マトリックス調製法

図 4~9 に協力機関の独自マトリックス調製法を示した。機関 D は厚生労働省の「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」を、機関 E は厚生労働省の「スルファキノキサリン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシシン、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スルファモノメトキシシン及びスルフィソゾール試験法 (畜水産物)」を用いた。その他の機関は機関独自に開発した前処理法を使用した。独自法では抽出過程においてアセトニトリルもしくはアセトニトリル/メタノール混液を使用し、続いてヘキサシンによる脱脂を実施していた。固相抽出による精製は独自試験法を用いた 4 機関中 3 機関で実施していた。

全ての協力機関において共通して分析可能であったサルファ剤は表 6 に示したように、スルファピリジン、スルファメラジン、スルファジミジン、スルファモノメトキシシン、スルファメトキシピリダジン、スルファクロロピリダジン、スルファメトキサゾール、スルファジメトキシシン、スルファキノキサリンの 9 種類であった。各協力機関の分析シーケンスを表 7~12 に示した。

2.2. 分析結果

2.2.1. 共通マトリックスの傾き比

表 13 及び表 14 に共通マトリックスを用いて調製したマトリックス検量線と溶媒検量線の傾きの比率を示した。同じマトリックス抽出液を測定しているにもかかわらず、イオン化抑制を示した機関 (機関 B、E) とイオン化促進を示した機関 (機関 A、C) が存在した。また機関 D、F では溶媒検量線との乖離は少なかった。

次に注入量一定と注入濃度一定の二種類の検量線を比較すると、鶏卵では大阪府と機関 A、B に注入量一定の場合、マトリックス効果の改善傾向が認められた。一方、機関 C では注入濃度一定のほうがマトリックス効果に改善傾向が認められた。牛乳に関しては機関 C で注入濃度一定の場合にマトリックス効果の改善傾向が見られたほかは目立った変化はなかった。

注入量一定の場合と注入濃度一定の場合で回帰直線の決定係数 (R^2 値) を比較した (表 15、表 16)。全ての分析で R^2 値は良好な結果を示したが、注入濃度一定と注入量一定の場合を比較すると、鶏卵では大阪府と機関 B、E、F で注入量一定の場合に検量線の直線性に改善傾向が見られ、機関 C で注入濃度一定の場合により良好な R^2 値を示した。機関 C では注入濃度を一定にすることでマトリックス効果が減少し、結果として直線性も改善したと推察した。牛乳に関しては、大阪府と機関 D、E、F に注入量一定の場合、マトリックス効果の減少が認められた。

また、マトリックス効果を大きく受ける時間帯は共通して分析できた 9 種類のサルファ剤には認められなかったが、機関 B が報告したスルファグアニジン (溶出時間

1.35 分)は強いイオン化抑制効果を受け、溶媒検量線と比較して鶏卵で 19%、牛乳では 32%の傾き比であった(データは示さない)。その他、極性の高い条件で速やかに溶出するサルファ剤に関してもスルファグアニジンと同様の傾向を認め、マトリックス溶液に混在する水溶性の妨害物質が強く影響することが推察された。さらに、共通マトリックス溶液の分析において、イオン化抑制とイオン化促進両方の効果が認められたことから、今回の実験条件では、マトリックス効果の受け方は動物用医薬品の種類ではなく、分析条件(機器の種類、グラジエント条件など)により強く依存することが考えられた。

2.2.2. 独自マトリックスの傾き比

表 17 及び表 18 に協力機関で独自に調製したマトリックス標準溶液の溶媒検量線に対する傾き比を示した。また、図 19 で同一食品由来の共通マトリックス溶液と独自マトリックス溶液の検量線の傾き比を比較した。なお、機関 A、B、C は牛乳を、機関 D、E、F では鶏卵を分析した。さらに、機関 A 及び C において強くマトリックス効果を受けた物質の散布図を図 20 に示した。

共通マトリックスの分析時にイオン化促進効果を受けていた機関 A 及び機関 C については、より強いイオン化促進効果を受けた。これら二つの機関では、共通マトリックスよりも濃い食品試料濃度(ともに 1 g/mL)の溶液を使用していた。その結果、分析時のマトリックス負荷量が増大し、より強くマトリックス効果を受けたものと推察された。また、共通マトリックスにおいて良好な結果を示した D 及び F については、

同じく良好な結果を示した。これら 2 機関では、分析機器の条件やグラジエント条件が妨害物質の影響を十分排除できるものであったと推察された。

一方比較的強いイオン化抑制効果を受けていた機関 B 及び機関 E では検量線の傾き比が大幅に改善した。良好な結果を示した機関の前処理条件では抽出時における脱水剤の添加が共通していた。図 21 に機関 B の共通マトリックス及び独自マトリックス分析時のスキャンデータを、図 22 に変化がなかった機関 D の共通マトリックス及び独自マトリックス分析時のスキャンデータを示す。共通マトリックスと独自マトリックスで効果に差がなかった機関 D ではトータルイオンクロマトグラフに大きな変化は認められなかったが、大幅に改善した機関 B については、独自マトリックスで特に早い溶出時間の総イオン量が減少している。機関 B において溶出時間の早いスルファグアニジンが水溶性の妨害物質による強いマトリックス効果を受けていたことや共通マトリックスと独自マトリックス共にマトリックス効果の影響が少なかった機関 D、F についても前処理過程で脱水剤を使用していたことを勘案すると、脱水剤を添加することで水溶性の妨害物質の試験液への溶出を防いだことが良好な結果につながったと考えられた。機関 E は、サルファ剤に特化した通知法を採用しており、抽出溶媒にアセトニトリルやメタノールよりも極性が低く、水溶性物質を抽出しづらい酢酸エチルを使用していた。こちらの場合も抽出液への水溶性妨害物質の溶出を防いだことが良好な結果につながった可能性がある。

2.3. まとめ

実施機関及び6機関の協力機関を得て、共通マトリックス溶液と同一食品試料から協力機関で独自に調製したマトリックス溶液を用いて検量線を作成し、得られたデータを比較した。本項において確認した知見を以下に列記する。

- 1) 共通マトリックスを異なる条件で分析した際、イオン化促進、イオン化抑制の両方のマトリックス効果を認めた。すなわち、マトリックス効果は動物用医薬品の種類より分析の条件により強く依存する傾向が示唆された。
- 2) 独自マトリックスの結果では、食品試料濃度が共通マトリックスより高い場合、マトリックス効果が増大した。
- 3) マトリックス効果の改善に脱水剤の使用が有効であることが示唆された。また、事前検討からも比較的水に溶けやすい妨害物質がマトリックス効果の原因であることが推察された。脱水剤を添加し、水溶性の妨害物質の溶出を防ぐことが改善策の一つであると考えられる。

E. 結論

本研究において畜水産食品中の動物用医薬品の LC-MS/MS 分析におけるマトリックス効果について基礎的知見を得た。LC-MS/MS 分析ではイオン化抑制が観察されることが多いが、実施機関の事前検討では医薬品の種類によりイオン化抑制及びイオン化促進が共に観察された。また、比較的極性の高い物質が溶出する時間帯においてより強くマトリックス効果を受ける傾向が認められた。これは、畜水産食品分析におけ

るマトリックス効果の原因物質として極性の高いりん脂質が挙げられるという知見に沿うものであった。さらに、食品試料の種類や試料の保存状態を変えても、マトリックス効果はほぼ同程度であった。そのため、マトリックス効果によってイオン化が抑制されるか促進されるかは、畜水産食品の種類よりは、動物用医薬品の種類に依存すると考えていた。しかし、近畿地区6地研との共同試験から、共通マトリックス溶液を異なる分析条件で測定した結果、同じ医薬品でもイオン化の抑制と促進、どちらも観察された。さらに、同一食品試料から独自に調製したマトリックス溶液でも医薬品の受けるマトリックス効果の傾向は共通マトリックスと同様だったことから、畜水産食品中の動物用医薬品分析時のマトリックス効果は医薬品の種類のみではなく、液体クロマトグラフのグラジエント条件や質量分析計の各種パラメーターなどの分析条件も原因となることが示唆された。

複数の協力機関において共通マトリックスより独自に調製したマトリックスでマトリックス効果の改善が見られたが、いずれの機関も前処理時に脱水剤を使用していた。また、独自に調製したマトリックスの方がより強くマトリックス効果を受けた機関では分析時の最終食品試料濃度が共通マトリックスと比較して10倍以上高かった。以上から、畜水産食品中の動物用医薬品分析において、マトリックス効果を低減するには、前処理で可能な限り水溶性の妨害物質を排除すること、抽出液の食品試料濃度をできるだけ下げることが有用であることが示唆された。ただし、この対策は比較的極性の低い医薬品に対して限定的に有効なもので

ある。例えば、 β -ラクタム系抗生物質のような高極性の医薬品の分析には、抽出溶媒も高極性のものにする必要があることから、高極性の医薬品を分析する際には今回とは別の対策を講じる必要があるだろう。

最後に、本研究のような動物用医薬品の LC-MS/MS 分析におけるマトリックス効果について機関横断的に検討した例はほとんどなく、本研究で得られた知見が、今後より精度の高い検査法の開発に寄与することを期待する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Akutsu, M. Yoshimitsu, Y. Kitagawa, S. Takatori, N. Fukui, M. Osakada, S. Yamaguchi, K. Kajimura, H. Obana, T. Watanabe, Evaluation of matrix-like effects in multiresidue pesticide analysis by GC/MS/MS, Journal of Separation Science, 40(6), 1293-1300 (2017)

2. 学会発表

1) 阿久津和彦, 吉光真人, 北川陽子, 高取聡, 福井直樹, 小阪田正和, 山口聡子, 並河幹夫, 伴創一郎, 大久保祥嗣, 中島涼, 丸山量子, 角谷直哉, 宮本伊織, 山下浩一, 西山隆之, 神藤正則, 山本直美, 高井靖智, 樋下勝彦, 梶村計志, 尾花裕孝, 渡辺卓穂: GC-MS(/MS)測定における農薬由来マトリックス効果の検討 1 近畿地衛研 6 機関における共同研究結果 : 第 111 回日本食

品衛生学会学術講演会, 東京, 2016

2) 吉光真人, 阿久津和彦, 北川陽子, 高取聡, 福井直樹, 小阪田正和, 山口聡子, 並河幹夫, 伴創一郎, 大久保祥嗣, 中島涼, 丸山量子, 角谷直哉, 宮本伊織, 山下浩一, 西山隆之, 神藤正則, 山本直美, 高井靖智, 樋下勝彦, 梶村計志, 尾花裕孝, 渡辺卓穂: GC-MS(/MS)測定における農薬由来マトリックス効果の検討 2 近畿地衛研 6 機関における共同研究結果 : 第 111 回日本食品衛生学会学術講演会, 東京, 2016

3) 阿久津 和彦, 吉光 真人, 北川 陽子, 高取 聡, 福井 直樹, 小阪田 正和, 山口 聡子, 梶村 計志, 尾花 裕孝: GC-MS/MS 測定における農薬由来マトリックス効果の検討 アナライトプロテクタント添加法の有効性 : 第 53 回全国衛生化学技術協議会年会, 青森, 2016

4) 吉光 真人, 阿久津 和彦, 北川 陽子, 高取 聡, 福井 直樹, 小阪田 正和, 山口 聡子, 梶村 計志, 尾花 裕孝: GC-MS/MS 測定における農薬由来マトリックス効果の検討 食品マトリックス存在下における挙動と制御 : 第 53 回全国衛生化学技術協議会年会, 青森, 2016

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. 本研究で使用した混合標準溶液に含まれる動物用医薬品一覧

LC Mix1	大阪府の条件下における保持時間(min)	LC Mix2	大阪府の条件下における保持時間(min)
スルファグアニジン		シプロフロキサシン	
スルファニルアミド		ダノフロキサシン	9.37
スルファセタミド		エンフロキサシン	
スルフィソミジン		フルメキン	13.93
スルファジアジン	3.16	マルボフロキサシン	7.73
スルファチアゾール	3.82	ミロキサシン	
スルファピリジン	4.59	ノルフロキサシン	
スルファメラジン	5.53	オフロキサシン	8.52
スルフィソゾールナトリウム	5.51	オルビフロキサシン	9.74
スルファジミジン	8.33	オキシリニック酸	11.9
スルファモノメトキシ	9.26	ピロミド酸	
スルファメキシピリダジン	8.55	サラフロキサシン	9.98
スルファクロルピリダジン	8.89	ジフロキサシン	9.78
スルファメキサゾール	9.17	ナリジクス酸	13.62
スルファドキシ	9.98		
スルファトロキサゾール	9.49		
スルファエトキシピリダジン	10.83		
スルフィソキサゾール			
スルファベンザミド	10.33		
スルファジメトキシ	11.58		
スルファキノキサリン	11.96		
スルファプロモメタジン	13.85		
スルファニトラン			
トリメトプリム	7.86		
ジアベリジン	6.55		
オルメトプリム	8.84		
ピリメタミン	11.68		

数値の記入がない薬剤は大阪府の分析条件では良好な選択性を得られなかったもの

表2. 事前検討における分析シーケンス (例)

試料名	試験液濃度 (ppb)	注入量 (μ L)	注入絶対量 (pg)	
0810std1	1	5.0	5	
0810std2	5	5.0	25	溶媒検量線 注入量一定
0810std3	10	5.0	50	
0810std4	20	5.0	100	
0810std4_1	20	0.1	2	
0810std4_2	20	0.5	10	溶媒検量線 注入濃度一定
0810std4_3	20	2.0	40	
0810std4_4	20	5.0	100	
0810std4_5	20	7.5	150	
0810std4_6	20	10.0	200	
0810Matrixstd1	1	5.0	5	
0810Matrixstd2	5	5.0	25	
0810Matrixstd3	10	5.0	50	
0810Matrixstd4	20	5.0	100	
0810Matrixstd4_1	20	0.1	2	マトリックス検量線 注入濃度一定
0810Matrixstd4_2	20	0.5	10	
0810Matrixstd4_3	20	2.0	40	
0810Matrixstd4_4	20	5.0	100	
0810Matrixstd4_5	20	7.5	150	
0810Matrixstd4_6	20	10.0	200	

表3. 大阪府の提示したサルファ剤測定マストランジション例

化合物	m/z
スルファジアジン	251 > 156
スルファチアゾール	256 > 156
スルファピリジン	250 > 156
スルファメラジン	265 > 92
スルフィソゾールナトリウム	240 > 156
スルファジミジン	279 > 186
スルファモノメトキシ	281 > 156
スルファメトキシピリダジン	281 > 92
スルファクロロピリダジン	285 > 156
スルファメトキサゾール	254 > 156
スルファドキシ	311 > 156
スルファトロキサゾール	268 > 92
スルファエトキシピリダジン	295 > 156
スルファベンザミド	277 > 156
スルファジメトキシ	311 > 156
スルファキノキサリン	301 > 156
スルファプロモメタジン	357 > 92

表 4 協同試験における分析機器の条件

機関名	LC/MS/MS		測定法	分析カラム		移動層	流速 (mL/min)	測定時間 (min)	
	メーカー	機種名		メーカー	カラム名				カラム温度 (°C)
A	Waters	Xevo TQ	ESI+	MRM	Waters	ACQUITY UPLC BEH C18	2mM 甲酸水溶液 2mM 甲酸アセトニトリル	0.4	22
B	Thermo	Quantum Discovery MAX	ESI+	MRM	シグマアルドリッチ	Ascentis Express C18	0.05% 甲酸水溶液 0.05% 甲酸メタノール	0.2 ~ 0.4	25
C	島津	LCMS-8030	ESI+	MRM	島津	Shim-pack HR-ODS	0.1% 甲酸水溶液 アセトニトリル	0.2	40
D	ABsciex	API4500Qtrap	ESI+	MRM	Waters	Xbridge C18	5% アセトニトリル含有 0.1% 甲酸水溶液 アセトニトリル	0.2	30
E	Agilent	6430	ESI+	MRM	化学物質評価機構	L-column ODS	0.1% 甲酸水溶液 0.1% 甲酸メタノール	0.2	29
F	Agilent	6460	ESI+	MRM	資生堂	CAPCELL CORE ADME	0.05% 甲酸水溶液 0.05% 甲酸アセトニトリル	0.3	28.5
大阪府	Waters	Xevo TQ-S	ESI+	MRM	Waters	CORTECS UPLC C18	0.1% 甲酸水溶液 0.1% 甲酸メタノール	0.2	27

表5 共通マトリックス溶液の安定性

	保存マトリックスの傾き/ 再調製マトリックスの傾き(%)		
	1週間後	2週間後	4週間後
スルファジアジン	98.3	100.4	100.6
スルファチアゾール	97.5	100.3	99.8
スルファピリジン	97.4	101.2	99.3
スルファメラジン	99.4	101.9	99.8
スルフィソゾール	97.8	101.7	101.0
スルファジミジン	99.9	101.9	100.5
スルファメトキシピリダジン	98.3	100.4	101.5
スルファクロルピリダジン	99.1	100.7	102.4
スルファメトキサゾール	99.9	103.1	103.3
スルファモノメトキシ	98.2	101.4	99.1
スルファトロキサゾール	100.6	102.9	100.9
スルファドキシ	98.5	101.6	96.8
スルファベンザミド	99.9	101.1	100.8
スルファエトキシピリダジン	99.1	99.9	98.7
スルファジメトキシ	98.4	101.1	99.4
スルファキノキサリン	99.7	100.6	97.3
スルファプロモメタジン	100.0	96.0	100.7

表6 各機関が測定したサルファ剤一覧

サルファ剤	A	B	C	D	E	F	大阪府
スルファグアニジン							
スルファニルアミド							
スルファセトアミド							
スルフィソシミジン							
スルファジアジン							
スルファチアゾール							
スルファピリジン							
スルファメラジン							
スルフィソゾールナトリウム							
スルファジミジン							
スルファモノメトキシシ							
スルファメキシピリダジン							
スルファクロピリダジン							
スルファメトキサゾール							
スルファドキシシ							
スルファトロキサゾール							
スルファエトキシピリダジン							
スルフィソキサゾール							
スルファベンザミド							
スルファジメトキシシ							
スルファキノキサリン							
スルファプロモメタジン							
スルファニトラン							

網掛け部は7機関で共通して測定できたサルファ剤

表7 協力機関Aのサンプル注入リスト

試料名	試験液濃度 (ppb)	注入量 (μ L)	注入絶対量 (pg)
KK16-STD-ACN-0.005	5	10.0	50
KK16-STD-ACN-0.01	10	10.0	100
KK16-STD-ACN-0.02	20	10.0	200
KK16-STD-ACN-0.04	40	10.0	400
KK16-STD-ACN-0.04-20	40	20.0	800
KK16-STD-ACN-0.04-10	40	10.0	400
KK16-STD-ACN-0.04-5	40	5.0	200
KK16-STD-ACN-0.04-2	40	2.0	80
ACN	0	10.0	0
H2O/ACN	0	10.0	0
KK16-STD-MeOH-0.005	5	10.0	50
KK16-STD-MeOH-0.01	10	10.0	100
KK16-STD-MeOH-0.02	20	10.0	200
KK16-STD-MeOH-0.04	40	10.0	400
KK16-STD-MeOH-0.04-20	40	20.0	800
KK16-STD-MeOH-0.04-10	40	10.0	400
KK16-STD-MeOH-0.04-5	40	5.0	200
KK16-STD-MeOH-0.04-2	40	2.0	80
ACN	0	10.0	0
H2O/ACN	0	10.0	0
KK16-EggSTD-0.005	5	10.0	50
KK16-EggSTD-0.01	10	10.0	100
KK16-EggSTD-0.02	20	10.0	200
KK16-EggSTD-0.04	40	10.0	400
KK16-EggSTD-0.04-20	40	20.0	800
KK16-EggSTD-0.04-10	40	10.0	400
KK16-EggSTD-0.04-5	40	5.0	200
KK16-EggSTD-0.04-2	40	2.0	80
ACN	0	10.0	0
H2O/ACN	0	10.0	0
KK16-MilkSTD-0.005	5	10.0	50
KK16-MilkSTD-0.01	10	10.0	100
KK16-MilkSTD-0.02	20	10.0	200
KK16-MilkSTD-0.04	40	10.0	400
KK16-MilkSTD-0.04-20	40	20.0	800
KK16-MilkSTD-0.04-10	40	10.0	400
KK16-MilkSTD-0.04-5	40	5.0	200
KK16-MilkSTD-0.04-2	40	2.0	80
ACN	0	10.0	0
H2O/ACN	0	10.0	0
KK16-7070MilkSTD-ACN-0.005	5	10.0	50
KK16-7070MilkSTD-ACN-0.01	10	10.0	100
KK16-7070MilkSTD-ACN-0.02	20	10.0	200
KK16-7070MilkSTD-ACN-0.04	40	10.0	400
KK16-7070MilkSTD-ACN-0.04-20	40	20.0	800
KK16-7070MilkSTD-ACN-0.04-10	40	10.0	400
KK16-7070MilkSTD-ACN-0.04-5	40	5.0	200
KK16-7070MilkSTD-ACN-0.04-2	40	2.0	80
ACN	0	10.0	0
H2O/ACN	0	10.0	0
KK16-7070MilkSTD-MeOH-0.005	5	10.0	50
KK16-7070MilkSTD-MeOH-0.01	10	10.0	100
KK16-7070MilkSTD-MeOH-0.02	20	10.0	200
KK16-7070MilkSTD-MeOH-0.04	40	10.0	400
KK16-7070MilkSTD-MeOH-0.04-20	40	20.0	800
KK16-7070MilkSTD-MeOH-0.04-10	40	10.0	400
KK16-7070MilkSTD-MeOH-0.04-5	40	5.0	200
KK16-7070MilkSTD-MeOH-0.04-2	40	2.0	80

表8 協力機関Bのサンプル注入リスト

試料名	試験液濃度 (ppb)	注入量 (μ L)	注入絶対量 (pg)
STD_youbai_1ppb_01	1	5.0	5
STD_youbai_5ppb_01	5	5.0	25
STD_youbai_10ppb_01	10	5.0	50
STD_youbai_20ppb_01	20	5.0	100
STD_youbai_20ppb_01_inj	20	0.1	2
STD_youbai_20ppb_05_inj	20	0.5	10
STD_youbai_20ppb_20_inj	20	2.0	40
STD_youbai_20ppb_50_inj	20	5.0	100
STD_youbai_20ppb_75_inj	20	7.5	150
STD_youbai_20ppb_100_inj	20	10.0	200
STD_megg_osaka_1ppb_01	1	5.0	5
STD_megg_osaka_5ppb_01	5	5.0	25
STD_megg_osaka_10ppb_01	10	5.0	50
STD_megg_osaka_20ppb_01	20	5.0	100
STD_megg_osaka_20ppb_01_inj	20	0.1	2
STD_megg_osaka_20ppb_05_inj	20	0.5	10
STD_megg_osaka_20ppb_20_inj	20	2.0	40
STD_megg_osaka_20ppb_50_inj	20	5.0	100
STD_megg_osaka_20ppb_75_inj	20	7.5	150
STD_megg_osaka_20ppb_100_inj	20	10.0	200
STD_mmilk_osaka_1ppb_01	1	5.0	5
STD_mmilk_osaka_5ppb_01	5	5.0	25
STD_mmilk_osaka_10ppb_01	10	5.0	50
STD_mmilk_osaka_20ppb_01	20	5.0	100
STD_mmilk_osaka_20ppb_01_inj	20	0.1	2
STD_mmilk_osaka_20ppb_05_inj	20	0.5	10
STD_mmilk_osaka_20ppb_20_inj	20	2.0	40
STD_mmilk_osaka_20ppb_50_inj	20	5.0	100
STD_mmilk_osaka_20ppb_75_inj	20	7.5	150
STD_mmilk_osaka_20ppb_100_inj	20	10.0	200
STD_mmilk_1ppb_01	1	5	5
STD_mmilk_5ppb_01	5	5	25
STD_mmilk_10ppb_01	10	5	50
STD_mmilk_20ppb_01	20	5	100
STD_mmilk_20ppb_01_inj	20	0.1	2
STD_mmilk_20ppb_05_inj	20	0.5	10
STD_mmilk_20ppb_20_inj	20	2	40
STD_mmilk_20ppb_50_inj	20	5	100
STD_mmilk_20ppb_75_inj	20	7.5	150
STD_mmilk_20ppb_100_inj	20	10	200

表9 協力機関Cのサンプル注入リスト

試料名	試験液濃度 (ppb)	注入量 (μ L)	注入絶対量 (pg)
溶媒検量線_STD1	5	10.0	50
溶媒検量線_STD2	10	10.0	100
溶媒検量線_STD3	50	10.0	500
溶媒検量線_STD4	100	10.0	1000
溶媒検量線_STD1_1	100	0.5	50
溶媒検量線_STD2_2	100	1.0	100
溶媒検量線_STD3_3	100	10.0	1000
溶媒検量線_STD4_4	100	15.0	1500
送付牛乳マトリックス検量線STD1	5	10.0	50
送付牛乳マトリックス検量線STD2	10	10.0	100
送付牛乳マトリックス検量線STD3	50	10.0	500
送付牛乳マトリックス検量線STD4	100	10.0	1000
送付牛乳マトリックス検量線STD1_1	100	0.5	50
送付牛乳マトリックス検量線STD2_2	100	1.0	100
送付牛乳マトリックス検量線STD3_3	100	10.0	1000
送付牛乳マトリックス検量線STD4_4	100	15.0	1500
送付鶏卵マトリックス検量線STD1	5	10.0	50
送付鶏卵マトリックス検量線STD2	10	10.0	100
送付鶏卵マトリックス検量線STD3	50	10.0	500
送付鶏卵マトリックス検量線STD4	100	10.0	1000
送付鶏卵マトリックス検量線STD1_1	100	0.5	50
送付鶏卵マトリックス検量線STD2_2	100	1.0	100
送付鶏卵マトリックス検量線STD3_3	100	10.0	1000
送付鶏卵マトリックス検量線STD4_4	100	15.0	1500
前処理牛乳マトリックス検量線STD1	5	10.0	50
前処理牛乳マトリックス検量線STD2	10	10.0	100
前処理牛乳マトリックス検量線STD3	50	10.0	500
前処理牛乳マトリックス検量線STD4	100	10.0	1000
前処理牛乳マトリックス検量線STD1_1	100	0.5	50
前処理牛乳マトリックス検量線STD2_2	100	1.0	100
前処理牛乳マトリックス検量線STD3_3	100	10.0	1000
前処理牛乳マトリックス検量線STD4_4	100	15.0	1500

表 1 0 協力機関Dのサンプル注入リスト

試料名	試験液濃度 (ppb)	注入量 (μ L)	注入絶対量 (pg)
Sstd_5ppb	5	5.0	25
Sstd_10ppb	10	5.0	50
Sstd_20ppb	20	5.0	100
Sstd_40ppb	40	5.0	200
Sstd_20ppb_1uL	20	1.0	20
Sstd_20ppb_2uL	20	2.0	40
Sstd_20ppb_5uL	20	5.0	100
Sstd_20ppb_7uL	20	7.0	140
Sstd_20ppb_10uL	20	10.0	200
Mstd_milk_5ppb	5	5.0	25
Mstd_milk_10ppb	10	5.0	50
Mstd_milk_20ppb	20	5.0	100
Mstd_milk_40ppb	40	5.0	200
Mstd_milk_20ppb_1uL	20	1.0	20
Mstd_milk_20ppb_2uL	20	2.0	40
Mstd_milk_20ppb_5uL	20	5.0	100
Mstd_milk_20ppb_7uL	20	7.0	140
Mstd_milk_20ppb_10uL	20	10.0	200
Mstd_egg_5ppb	5	5.0	25
Mstd_egg_10ppb	10	5.0	50
Mstd_egg_20ppb	20	5.0	100
Mstd_egg_40ppb	40	5.0	200
Mstd_egg_20ppb_1uL	20	1.0	20
Mstd_egg_20ppb_2uL	20	2.0	40
Mstd_egg_20ppb_5uL	20	5.0	100
Mstd_egg_20ppb_7uL	20	7.0	140
Mstd_egg_20ppb_10uL	20	10.0	200
Mstd_KIH_egg_5ppb	5	5.0	25
Mstd_KIH_egg_10ppb	10	5.0	50
Mstd_KIH_egg_20ppb	20	5.0	100
Mstd_KIH_egg_40ppb	40	5	200
Mstd_KIH_egg_20ppb_1uL	20	1	20
Mstd_KIH_egg_20ppb_2uL	20	2	40
Mstd_KIH_egg_20ppb_5uL	20	5	100
Mstd_KIH_egg_20ppb_7uL	20	7	140
Mstd_KIH_egg_20ppb_10uL	20	10	200

表 1 1 協力機関Eのサンプル注入リスト

試料名	試験液濃度 (ppb)	注入量 (μ L)	注入絶対量 (pg)
01_Yobai_STD_5	5	5.0	25
02_Yobai_STD_10	10	5.0	50
03_Yobai_STD_50	50	5.0	250
04_Yobai_STD_100	100	5.0	500
05_Yobai_STD_100_1	100	0.1	10
06_Yobai_STD_100_2	100	0.5	50
07_Yobai_STD_100_3	100	2.0	200
08_Yobai_STD_100_4	100	5.0	500
09_Yobai_STD_100_5	100	7.5	750
10_Yobai_STD_100_6	100	10.0	1000
11_Kyotsu_Milk_STD_5	5	5.0	25
12_Kyotsu_Milk_STD_10	10	5.0	50
13_Kyotsu_Milk_STD_50	50	5.0	250
14_Kyotsu_Milk_STD_100	100	5.0	500
15_Kyotsu_Milk_STD_100_1	100	0.1	10
16_Kyotsu_Milk_STD_100_2	100	0.5	50
17_Kyotsu_Milk_STD_100_3	100	2.0	200
18_Kyotsu_Milk_STD_100_4	100	5.0	500
19_Kyotsu_Milk_STD_100_5	100	7.5	750
20_Kyotsu_Milk_STD_100_6	100	10.0	1000
21_Kyotsu_Egg_STD_5	5	5.0	25
22_Kyotsu_Egg_STD_10	10	5.0	50
23_Kyotsu_Egg_STD_50	50	5.0	250
24_Kyotsu_Egg_STD_100	100	5.0	500
25_Kyotsu_Egg_STD_100_1	100	0.1	10
26_Kyotsu_Egg_STD_100_2	100	0.5	50
27_Kyotsu_Egg_STD_100_3	100	2.0	200
28_Kyotsu_Egg_STD_100_4	100	5.0	500
29_Kyotsu_Egg_STD_100_5	100	7.5	750
30_Kyotsu_Egg_STD_100_6	100	10.0	1000
31_Kobetsu_Egg_STD_5	5	5	25
32_Kobetsu_Egg_STD_10	10	5	50
33_Kobetsu_Egg_STD_50	50	5	250
34_Kobetsu_Egg_STD_100	100	5	500
35_Kobetsu_Egg_STD_100_1	100	0.1	10
36_Kobetsu_Egg_STD_100_2	100	0.5	50
37_Kobetsu_Egg_STD_100_3	100	2	200
38_Kobetsu_Egg_STD_100_4	100	5	500
39_Kobetsu_Egg_STD_100_5	100	7.5	750
40_Kobetsu_Egg_STD_100_6	100	10	1000

表 1 2 協力機関Fのサンプル注入リスト

試料名	試験液濃度 (ppb)	注入量 (μ L)	注入絶対量 (pg)
20160914st010	1	5.0	5
20160914st025	2.5	5.0	12.5
20160914st050	5	5.0	25
20160914st100	10	5.0	50
20160914st250	25	5.0	125
20160914st100-1	10	1.0	10
20160914st100-2	10	2.0	20
20160914st100-5	10	5.0	50
20160914st100-7	10	7.0	70
20160914st100-10	10	10.0	100
20160914st100-12	10	12.0	120
20160914milk010	1	5.0	5
20160914milk025	2.5	5.0	12.5
20160914milk050	5	5.0	25
20160914milk100	10	5.0	50
20160914milk250	25	5.0	125
20160914milk100-1	10	1.0	10
20160914milk100-2	10	2.0	20
20160914milk100-5	10	5.0	50
20160914milk100-7	10	7.0	70
20160914milk100-10	10	10.0	100
20160914milk100-12	10	12.0	120
20160915egg010	1	5.0	5
20160915egg025	2.5	5.0	12.5
20160915egg050	5	5.0	25
20160915egg100	10	5.0	50
20160915egg250	25	5.0	125
20160915egg100-1	10	1.0	10
20160915egg100-2	10	2.0	20
20160915egg100-5	10	5.0	50
20160915egg100-7	10	7	70
20160915egg100-10	10	10	100
20160915egg100-12	10	12	120
20160920_100-1	10	1.0	10
20160920_100-2	10	2.0	20
20160920_100-5	10	5.0	50
20160920_100-7	10	7	70
20160920_100-10	10	10	100
20160920_100-12	10	12	120
20160920_010	1	5.0	5
20160920_025	2.5	5.0	12.5
20160920_050	5	5.0	25
20160920_100	10	5.0	50
20160920_250	25	5.0	125

表13 溶媒検査線に対する共通マトリックス検査線の傾き比（鶏卵）

	濃度一定						大阪府
	A	B	C	D	E	F	
スルファピリジン	111.7%	57.3%	83.1%	84.2%	40.3%	89.1%	68.8%
スルファメラジン	99.4%	52.3%	125.4%	76.5%	37.3%	92.4%	66.1%
スルファジミジン	85.2%	57.3%	127.5%	81.0%	41.6%	93.6%	76.7%
スルファモノトキシシン	106.1%	59.6%	127.0%	98.1%	44.6%	93.5%	76.0%
スルファメトキシピリダジン	117.4%	58.3%	122.8%	82.4%	37.0%	92.1%	76.2%
スルファクロピリダジン	103.0%	51.8%	109.1%	99.6%	38.5%	97.4%	80.4%
スルファメトキサゾール	106.4%	43.7%	110.7%	99.3%	40.5%	95.4%	85.9%
スルファジメトキシシン	96.7%	59.3%	115.3%	89.0%	40.9%	94.0%	79.8%
スルファキノキサリン	106.3%	64.3%	108.8%	87.5%	46.4%	97.0%	81.0%
	注入量一定						大阪府
	A	B	C	D	E	F	
スルファピリジン	95.3%	64.5%	92.7%	81.9%	38.2%	92.0%	77.6%
スルファメラジン	94.6%	67.7%	167.7%	75.5%	34.4%	91.1%	75.7%
スルファジミジン	84.2%	58.9%	159.8%	80.1%	39.7%	94.0%	83.6%
スルファモノトキシシン	97.4%	57.7%	163.2%	97.0%	43.0%	94.8%	83.7%
スルファメトキシピリダジン	105.2%	62.5%	162.0%	83.7%	35.2%	91.7%	81.6%
スルファクロピリダジン	89.1%	59.5%	138.0%	100.2%	37.6%	96.9%	85.4%
スルファメトキサゾール	93.6%	43.9%	146.3%	107.3%	37.3%	98.5%	88.6%
スルファジメトキシシン	87.2%	65.5%	134.9%	92.9%	40.4%	93.8%	85.8%
スルファキノキサリン	99.1%	75.0%	127.4%	137.6%	45.2%	98.9%	86.7%

表14 溶媒検量線に対する共通マトリックス検量線の傾き比（牛乳）

	A	B	C	D	E	F	大阪府
濃度一定							
スルファピリジン	119.1%	55.7%	95.4%	104.5%	40.7%	88.4%	69.0%
スルファメラジン	114.4%	48.6%	136.4%	80.6%	38.2%	91.7%	65.4%
スルファジミジン	85.3%	66.2%	132.4%	80.0%	45.6%	94.0%	76.8%
スルファモノメトキシシ	97.3%	65.1%	120.2%	90.2%	48.0%	93.1%	76.9%
スルファメトキシピリダジン	98.5%	66.5%	115.5%	83.5%	39.3%	93.3%	76.0%
スルファクロピリダジン	98.3%	55.9%	107.1%	90.9%	41.4%	96.9%	80.4%
スルファメトキサゾール	102.7%	43.6%	107.9%	93.6%	40.6%	92.8%	85.5%
スルファジメトキシシ	93.0%	62.5%	115.0%	86.0%	42.9%	95.6%	81.1%
スルファキノキサリン	102.6%	68.8%	115.4%	92.7%	49.5%	97.1%	83.6%
注入量一定							
スルファピリジン	101.5%	61.2%	101.2%	92.9%	41.5%	95.6%	75.6%
スルファメラジン	101.3%	53.5%	166.3%	97.1%	38.6%	97.8%	76.2%
スルファジミジン	85.1%	63.0%	154.2%	81.5%	46.3%	99.7%	83.3%
スルファモノメトキシシ	99.2%	46.8%	145.9%	85.6%	48.5%	101.7%	83.0%
スルファメトキシピリダジン	96.4%	63.8%	139.2%	83.4%	40.2%	97.4%	81.1%
スルファクロピリダジン	91.1%	56.5%	131.6%	89.1%	41.9%	100.0%	85.6%
スルファメトキサゾール	93.5%	42.9%	134.4%	87.2%	41.3%	101.4%	88.8%
スルファジメトキシシ	91.7%	58.4%	127.5%	88.6%	46.9%	99.9%	86.4%
スルファキノキサリン	101.9%	63.3%	127.9%	87.0%	52.5%	102.5%	87.8%

表 15 共通マトリックス分析（鶏卵）における検量線の決定係数

	A		B		C		D		E		F		大阪府	
	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定		
スルファペリジン	0.9996	0.9986	0.9944	0.9938	1.0000	0.9982	0.9997	0.9994	0.9975	0.9974	0.9998	0.9997	0.9995	0.9994
スルファメラジン	0.9983	0.9994	0.9810	0.9975	1.0000	0.9989	0.9988	0.9996	0.9962	0.9969	0.9991	0.9999	0.9980	1.0000
スルファジミジン	0.9946	0.9982	0.9937	0.9990	0.9994	0.9971	0.9983	0.9996	0.9946	0.9961	0.9996	1.0000	0.9999	1.0000
スルファモノメトキシ	1.0000	0.9993	0.9988	0.9942	0.9999	0.9996	0.9991	0.9998	0.9975	0.9981	0.9996	0.9999	0.9990	0.9998
スルファメトキシピリダジン	0.9990	0.9969	0.9849	0.9950	0.9985	0.9960	0.9995	0.9986	0.9964	0.9979	0.9993	0.9999	0.9996	1.0000
スルファクロピリダジン	0.9998	0.9995	0.9943	0.9990	0.9999	0.9999	0.9973	0.9974	0.9961	0.9974	0.9998	1.0000	0.9996	1.0000
スルファメトキサゾール	0.9996	0.9995	0.9835	0.9997	1.0000	0.9999	0.9995	0.9969	0.9960	0.9985	0.9994	0.9999	0.9999	0.9998
スルファジメトキシ	0.9981	0.9984	0.9772	0.9881	0.9997	0.9989	0.9996	0.9989	0.9953	0.9969	0.9999	1.0000	0.9998	1.0000
スルファキノキサリン	0.9994	0.9994	0.9959	0.9999	1.0000	0.9995	0.9941	0.9887	0.9967	0.9978	0.9995	0.9998	0.9997	1.0000

表 16 共通マトリックス（牛乳）分析における検量線の決定係数

	A		B		C		D		E		F		大阪府	
	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定	濃度一定	注入量一定		
スルファピリジン	0.9975	0.9999	0.9937	0.9998	1.0000	0.9984	0.9989	0.9960	0.9990	0.9999	0.9994	0.9998	0.9996	0.9998
スルファメラジン	1.0000	0.9997	0.9875	0.9978	0.9987	0.9999	0.9940	1.0000	0.9987	1.0000	0.9995	0.9998	0.9963	0.9996
スルファジミジン	0.9912	0.9994	0.9973	0.9968	0.9995	0.9969	0.9991	1.0000	0.9988	0.9999	0.9996	0.9996	0.9997	0.9997
スルファモノストキシン	0.9997	0.9997	0.9995	0.9905	1.0000	1.0000	0.9970	0.9998	0.9994	1.0000	0.9990	0.9997	0.9987	0.9999
スルファトキシピリダジン	0.9991	0.9993	0.9985	0.9982	0.9992	0.9982	0.9994	0.9987	0.9991	0.9999	0.9995	0.9999	0.9995	0.9999
スルファクロロピリダジン	0.9988	0.9986	0.9990	0.9998	0.9999	1.0000	0.9993	1.0000	0.9994	0.9997	0.9995	0.9999	0.9990	1.0000
スルファトキサゾール	0.9999	0.9984	0.9989	0.9997	0.9997	1.0000	0.9993	0.9999	0.9978	1.0000	0.9999	0.9998	1.0000	0.9997
スルファトキシ	0.9958	0.9992	0.9960	0.9895	1.0000	0.9993	0.9991	0.9998	0.9972	1.0000	0.9998	0.9999	0.9997	0.9998
スルファキノキサリン	0.9996	0.9996	0.9997	0.9969	1.0000	0.9997	0.9989	0.9999	0.9990	0.9999	0.9993	0.9998	0.9997	0.9997

表 1 7 溶媒検量線に対する独自マトリックス検量線の傾き比（鶏卵）

	濃度一定		注入量一定			
	D	E	F	D	E	F
スルファピリジン	98.4%	86.5%	94.1%	89.7%	85.1%	93.3%
スルファメラジン	90.1%	95.9%	95.9%	88.5%	88.7%	95.5%
スルファジミジン	99.1%	97.2%	95.0%	92.4%	91.7%	95.8%
スルファモノメトキシ	103.8%	92.9%	91.4%	100.6%	87.7%	96.1%
スルファメトキシピリダジン	99.4%	92.4%	90.7%	97.1%	87.3%	93.0%
スルファクロロピリダジン	105.2%	93.2%	93.4%	98.7%	89.9%	95.3%
スルファメトキサゾール	103.1%	94.8%	92.0%	107.2%	84.4%	98.0%
スルファジメトキシ	99.7%	94.4%	96.8%	97.4%	86.9%	97.7%
スルファキノキサリン	106.0%	99.0%	98.7%	102.5%	90.7%	101.8%

表18 溶媒検量線に対する独自マトリックス検量線の傾き比（牛乳）

	濃度一定			注入量一定		
	A	B	C	A	B	C
スルファピリジン	353.3%	80.6%	87.7%	397.6%	74.3%	112.3%
スルファミラジン	83.3%	94.2%	180.3%	101.7%	80.9%	236.0%
スルファミジン	75.8%	91.9%	203.0%	82.3%	81.4%	250.9%
スルファミノメトキシ	95.9%	114.3%	159.5%	106.4%	78.5%	210.0%
スルファミトキシピリダジン	78.9%	97.8%	191.4%	97.0%	85.3%	236.6%
スルファミクロピリダジン	88.4%	91.4%	111.9%	92.6%	89.1%	147.4%
スルファミトキシゾール	141.4%	85.7%	119.4%	157.7%	67.4%	155.1%
スルファミトキシ	91.1%	90.3%	141.2%	85.2%	82.1%	171.1%
スルファミノキサリン	163.0%	87.8%	150.9%	172.8%	81.2%	177.9%

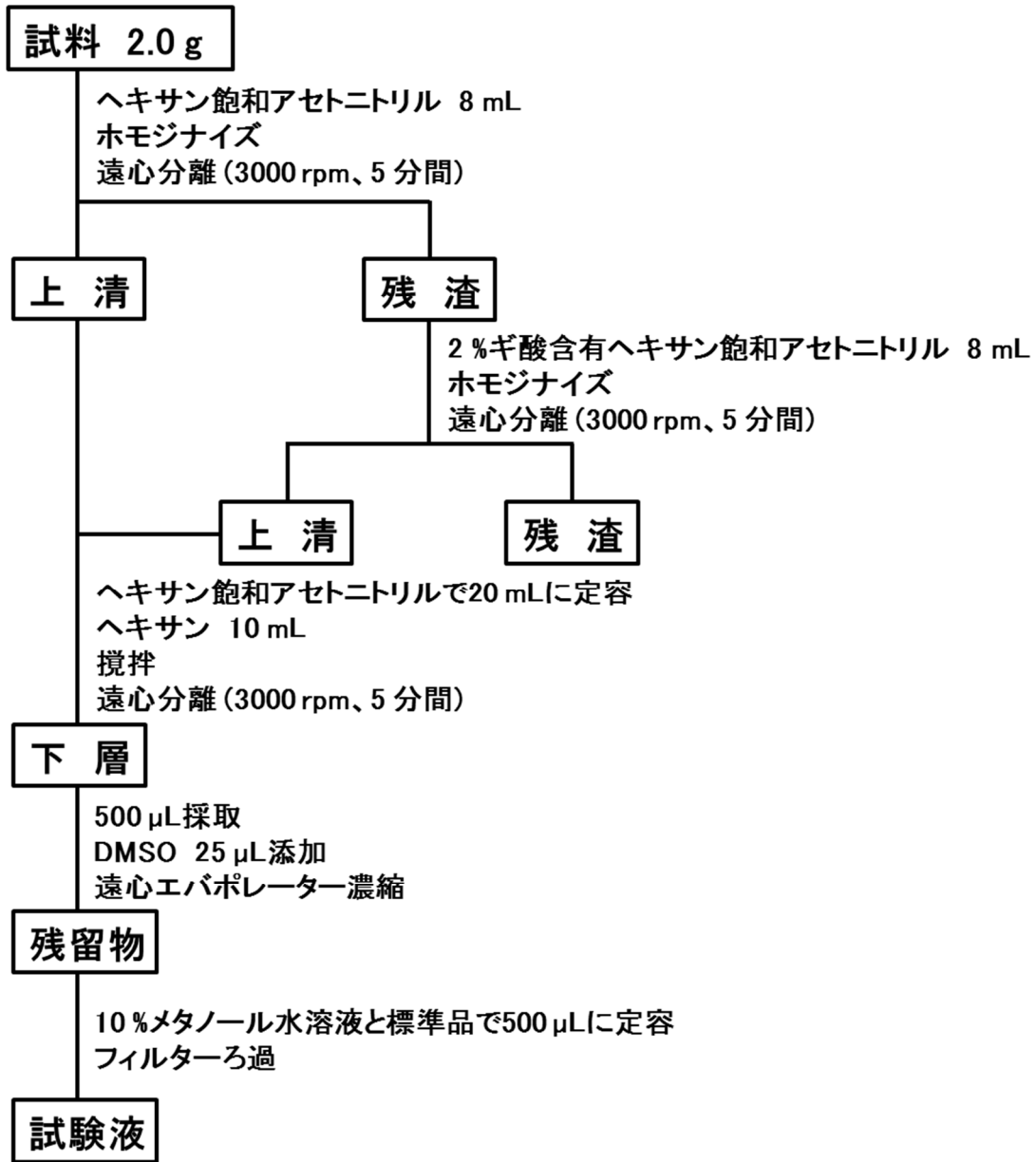


図1. 大阪府のサルファ剤分析前処理フロー

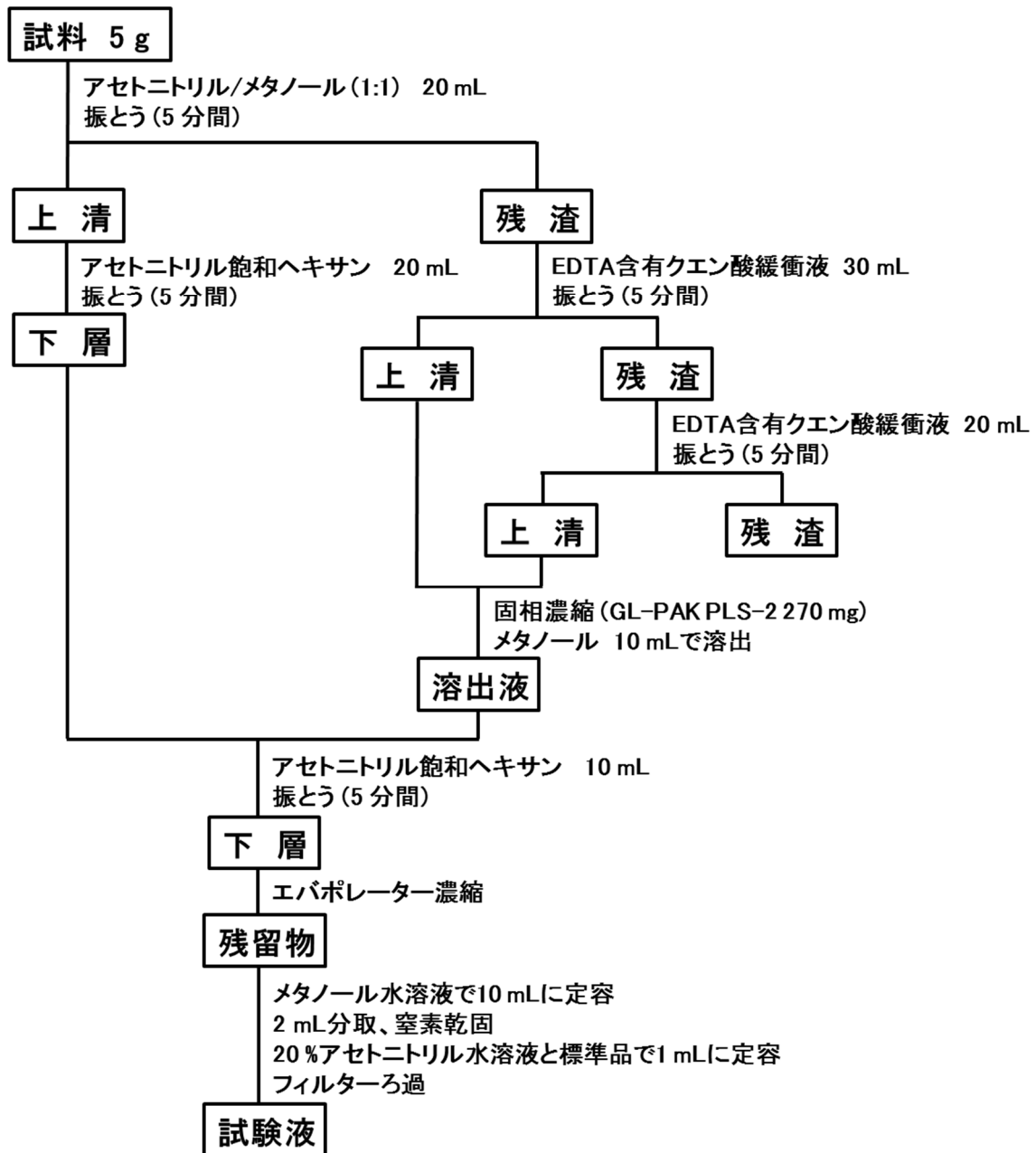


図4 協力機関Aの前処理フロー

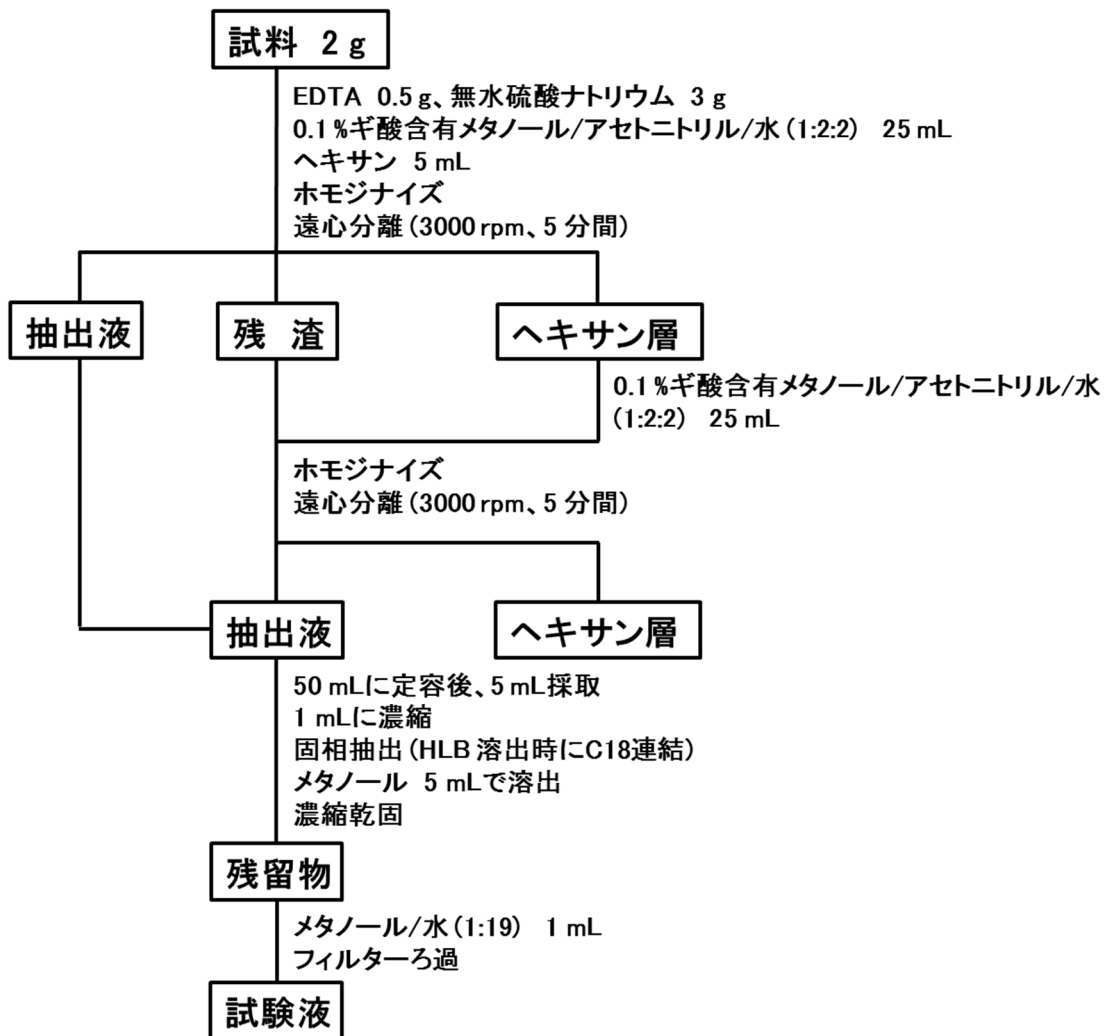


図5 協力機関Bの前処理フロー

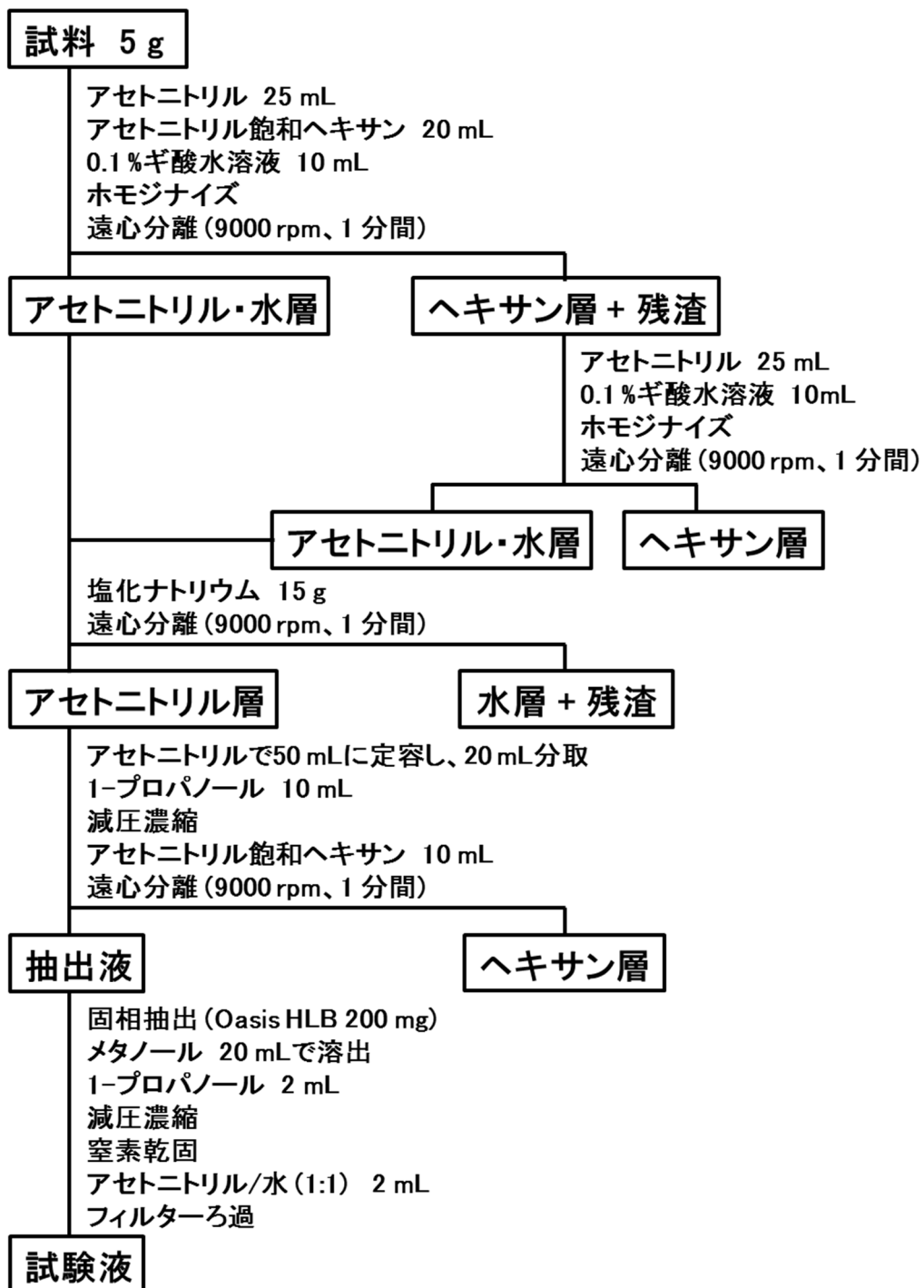


図6 協力機関Cの前処理フロー

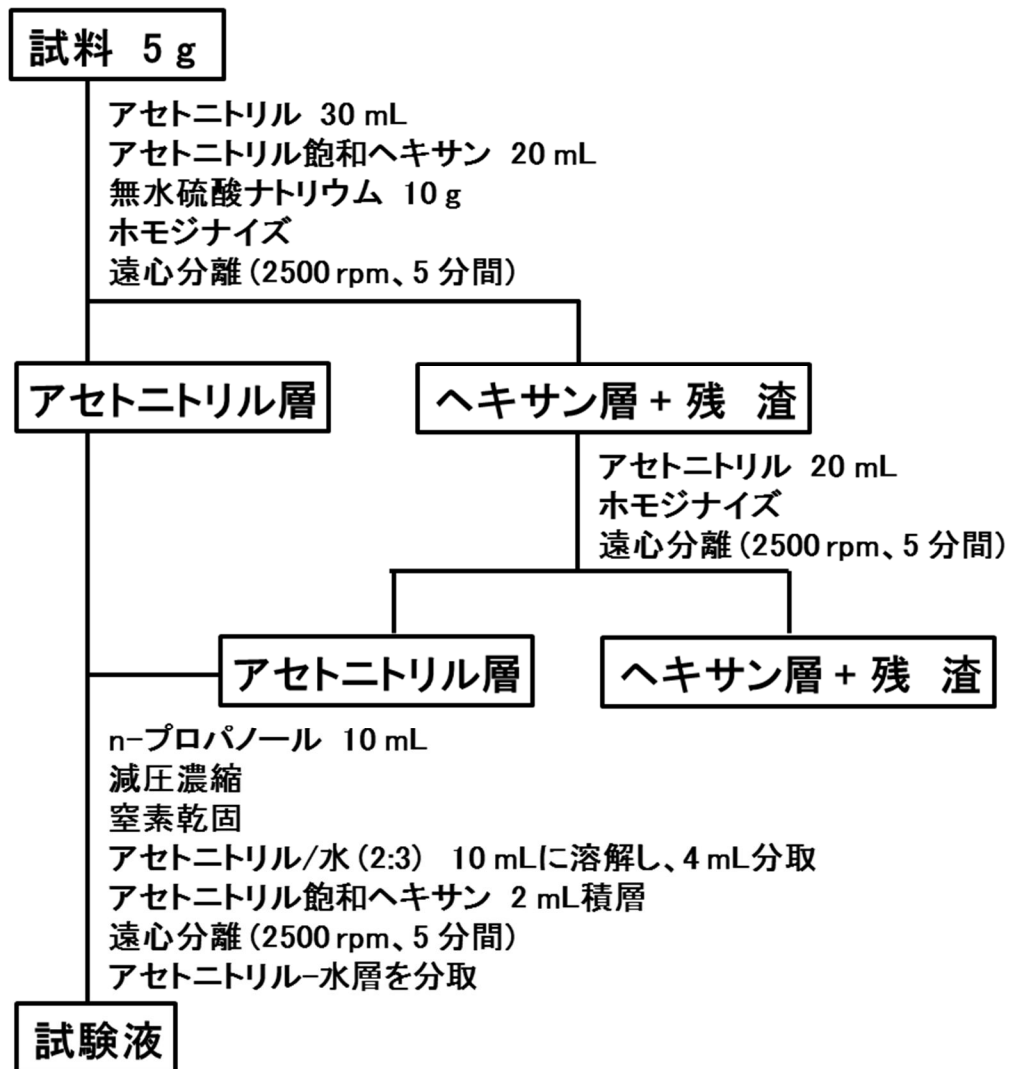


図7 協力機関Dの前処理フロー

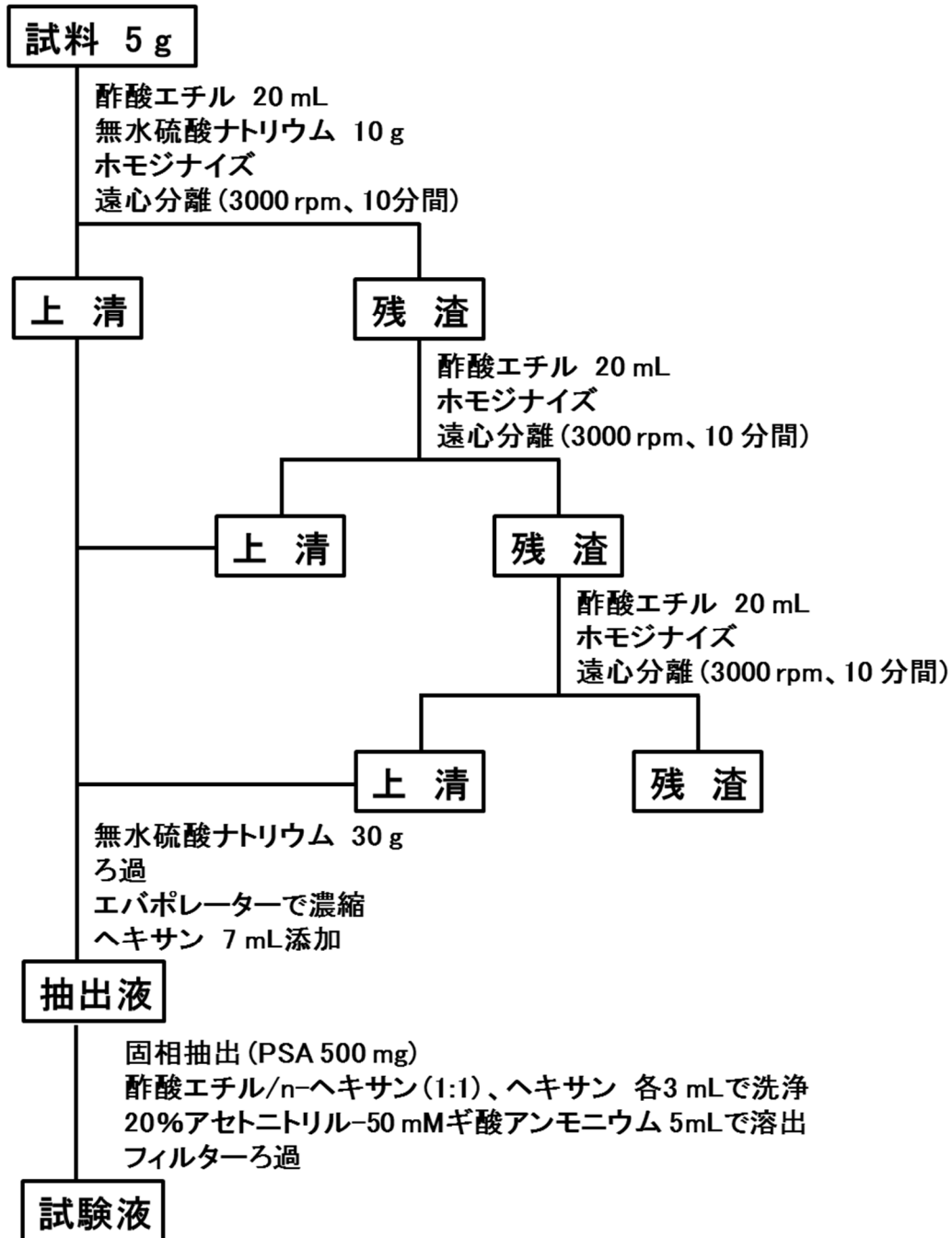


図8 協力機関Eの前処理フロー

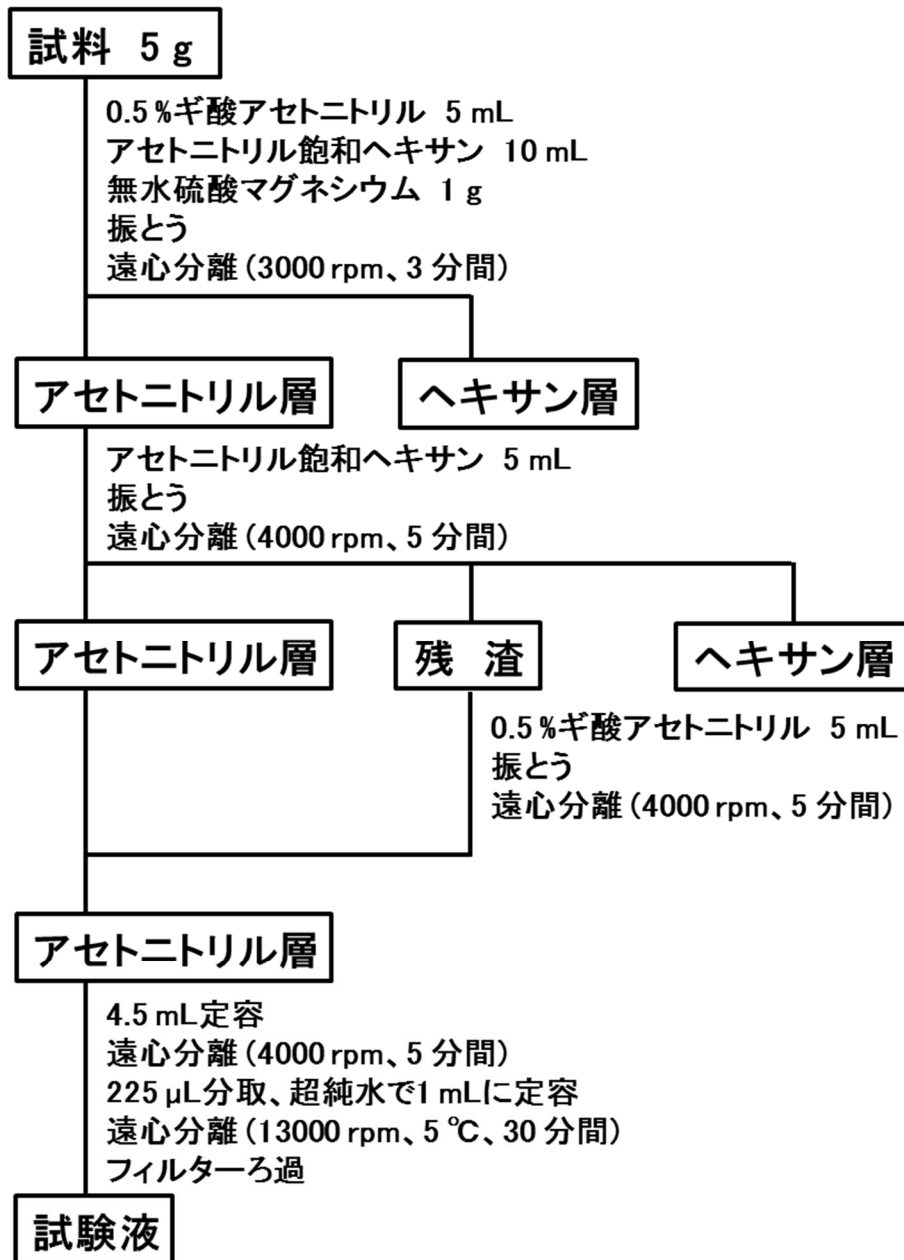


図9 協力機関Fの前処理フロー

■ 注入量一定 □ 注入濃度一定

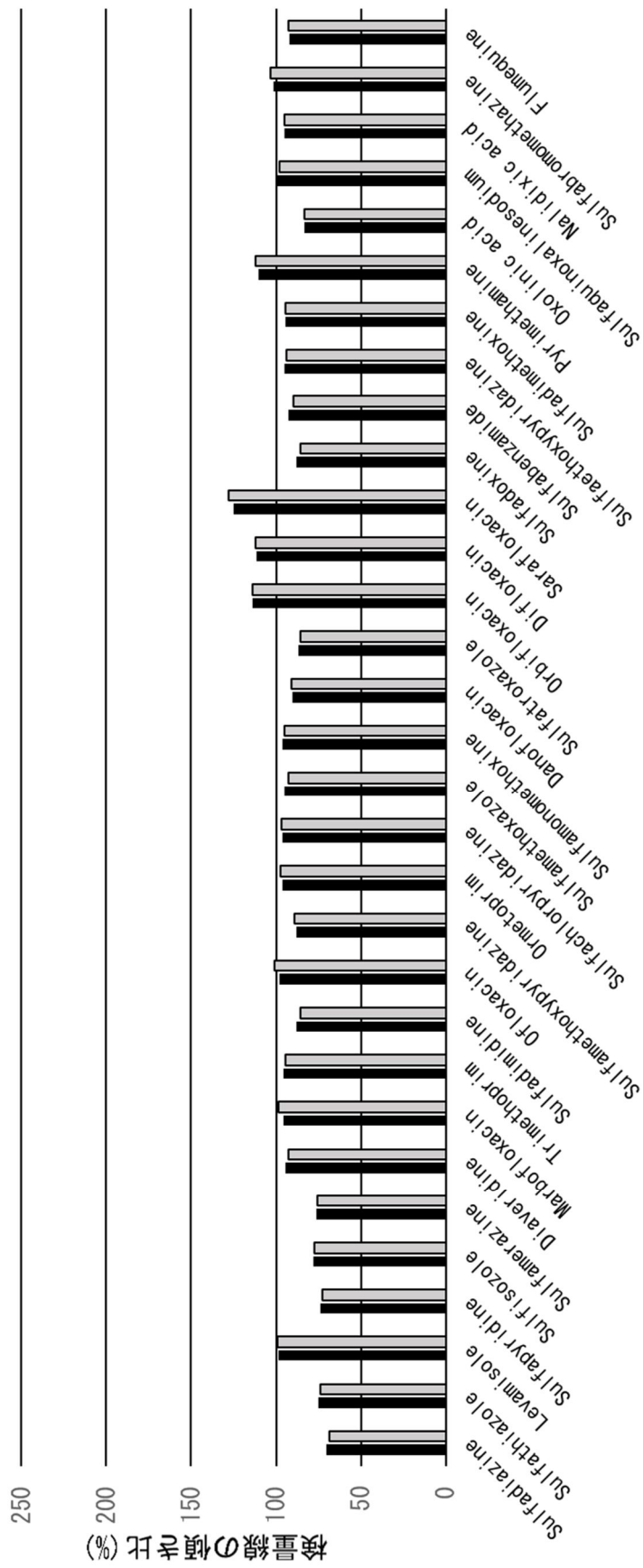


图 11 事前検討 1 における牛乳の検査線傾き比

平成 28 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）

検査機関の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究：固相分散抽出法および固相蛍光誘導体化法を用いた HPLC による食品中アフラトキシンの微量分析とその精度管理

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財)食品薬品安全センター
研究分担者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	黒川千恵子	さいたま市健康科学研究センター 生活科学課食品化学係
研究協力者	近藤 貴英	さいたま市健康科学研究センター 生活科学課食品化学係
研究協力者	石井 里枝	埼玉県衛生研究所 化学検査室
研究協力者	櫻井 光	横浜市衛生研究所 理化学検査研究課
研究協力者	橋口 成喜	川崎市健康安全研究所 食品担当
研究協力者	林 孝子	神奈川県衛生研究所 理化学部 食品化学グループ
研究協力者	谷口 賢	名古屋市衛生研究所 食品部
研究協力者	加藤美穂子	(株)フロンティア研究所

研究要旨

食品中アフラトキシン (AFs) の微量分析に際して、新たな前処理法を前年度までに構築したので、本年度の研究事業として外部精度管理を実施した。その際、総 AFs (G_1, B_1, G_2, B_2) 分析では白コショウを試料として、また、アフラトキシン M_1 (AF- M_1) 分析ではチーズを用いてそれぞれ精度管理用の試料を作製して同様に精度管理を実施した。その結果、総 AFs では、室間相対標準偏差 (RSD_R) は、高濃度添加試料 (20 ng/g) で 26% 未満、低濃度添加試料 (2 ng/g) では 29% 未満と良好であった。これらを HorRat 値で算出するとそれぞれ 1.13~1.18 および 1.22~1.31 であり、いずれも国際食品規格委員会 (CAC) で規定した HorRat 値の許容範囲 (2) 内であり、本試験法の室間再現精度は良好であることが確認された。

また AF- M_1 の分析結果として、 RSD_R は、高濃度添加試料 (1 ng/g) では 20% 未満、低濃度添加試料 (0.1 ng/g) では 31% 未満と良好であった。これらを HorRat 値で算出するとそれぞれ 0.90 および 1.40 であり、CAC で規定した HorRat 値の許容範囲内であった。本研究で開発された方法は、従来法に比べて閉鎖性の高い実験手法で行えることから、実験者への AFs の曝露が低減され、現行の公定法に代わる信頼性の高い分析方法を示すことが可能となった。

A. 研究目的

マイコトキシン的一种であるアフラトキシン (AFs) は、*Aspergillus* 属が産生するカビ毒で、主に AF-B₁、AF-B₂、AF-G₁ および AF-G₂ などがある。AFs の毒性としては、肝機能障害や肝細胞ガン、遺伝毒性などが挙げられ、特に AFB₁ は、天然物質中で最も強い発ガン性物質とも言われている。そのため、日本では全食品に対して、総 AFs (AF-B₁、AF-B₂、AF-G₁ および AF-G₂) で 10 µg/kg 以下に規制されている。しかし、食品中に残留する AFs が微量でも、発ガンのリスクは無視できないことから、規制値付近あるいはその濃度以下で AFs が残留している食品をモニタリングするためにも、簡便・迅速且つ精度の高い、食品中 AFs の微量分析法が必要とされている。

食品中アフラトキシン (AFs) の微量分析において、従来法では操作が煩雑であることや実験者への AFs の曝露が危惧されるといった問題点があった。そこで昨年度までの本研究事業において、これらの問題を解決するために、前処理法として、イムノアフィニティーゲルを用いた固相分散抽出 (SPDE) 法および固相蛍光誘導体化法を併用した分析法を考案した。また、2015 年 7 月 23 日に乳中のアフラトキシン M₁ (AF-M₁) の規制値が設定され、2016 年 1 月 23 日から適用されることになった。そこで、今後の規制値設定が予想される乳製品 (チーズ) においても、その対策としてこれまでに構築した香辛料中の AFs 分析法を基にして新たに実用的な試験法を構築した。

本年度は、これら 2 種類の構築した AFs の微量分析法について、精度管理用の試料 (香辛料およびチーズ) を作製し、複数の外

部検査機関 (8 機関) に配布して分析法の外部精度管理試験を実施することとした。

B. 研究方法

総 AFs および AF-M₁ の分析方法としては、抽出過程が異なるものの、SPDE を用いたクリーンアップと蛍光誘導体化はほぼ同様に行った。詳細は昨年度に報告済みのものがベースとなっている。概略のフローチャートを図 1 に示した。

本項では外部精度管理試験方法の概略を以下に示す。

(1) 外部精度管理試験

香辛料としては、市販の白コショウに AFs を添加し、精度管理試験用の標準試料を添加して、高濃度試料 A (20 ng/g) と低濃度試料 B (2 ng/g) の 2 種類を調製した。

チーズについては、市販の固形チーズに予め試料と同重量の抽出液を添加して、軽くホモジナイズして“泥状(スラリー状)”としたものに精度管理試験用の標準試料を添加して、高濃度試料 (1 ng/g) と低濃度試料 (0.1 ng/g) の 2 種類を調製した。

本試験に参加協力してもらった検査機関 (8 機関) に当該試料と実験に必要な試薬類を配布し、また操作プロトコールを指定して分析を依頼した。室間精度管理のデータ解析には一元配置分散分析を行って相対標準偏差を算出し、更に HorRat (Horwitz ratio) 値も合わせて算出した。

C. D. 研究結果および考察

(1) 香辛料中総 AFs 分析の室間再現精度

昨年度までの本研究事業において開発した分析方法について、操作性および検出感度向上を目指して若干の改良を行うと共に、

精度管理用の試料(香辛料)を作製し、複数の外部検査機関(8 機関)に配布して分析法の室間再現精度を評価するための試験を実施した。

その結果、真度の評価として、全体的な回収率は、試料Aおよび試料B共に概ね70%程度であった(表1)。また、アフラトキシンの種類では、AF-G₂とB₂ではやや低め(61~71%)となったが、AF-G₁とB₁では約69~77%と良好であった。これは、使用したイムノアフィニティーゲルが、4種類に交差反応を示すことが製品上で謳われているが、食品衛生上、特に問題となるAF-B₁に強く反応するようになっていたため、構造式が類似したB₁とG₁の回収率がG₂とB₂に比べて高い値を示したものと推察された。

なお、B₁とG₁に関しては、今回の測定方法において“固相蛍光誘導体化法”を行ったが、良好な回収率が示されたことから、この手法も実用性の観点から問題ないことが示されたと考える。

精度の評価として、8検査機関の室間精度を相対標準偏差(RSD_R)で算出したところ、試料A(高濃度添加)では26%未満、他方、試料B(低濃度添加)では29%未満であった(表2)。更に、室間再現精度についてはHorRat値で評価することとした。なお、その評価として国際食品規格委員会(Codex Alimentarius Commission : CAC)では、許容範囲を2以内と定めている。その結果、試料Aでは1.13~1.18、他方、試料Bでは1.22~1.31であり(表3)、CACでの許容範囲以内であった。この結果から、本試験法の室間再現精度は良好であることが確認された。

また、各検査機関の実測データを評価すると、8機関中7機関は、同一試料2回トラ

イアルの平均値が4種類のAFs全てにおいて、“全検査機関の平均値 ± SD”にほぼ入っていた(図2および図3)。残りの1機関も平均値 ± 2SD以内にほぼ入っていた。検査機関の出す分析値の信頼性を評価するための、いわゆる「技能試験」において、JISでは付与された値(assigned value)からの偏りを表すzスコアの絶対値が、2以内であればその分析結果は「満足」と判断される。このことから、今回の外部精度管理試験に参加した各検査機関は、いずれも技能的に問題が無いことも確認された。

(2) チーズ中AF-M₁分析の室間精度管理

昨年度までの本研究事業において開発した分析方法について、その有用性・有効性を検証することを目的として、精度管理用の試料(チーズ)を作製し、複数の外部検査機関(8 機関)に配布して分析法の室間精度管理試験を実施した。

その結果、真度の評価として、試料Aおよび試料Bの回収率は、概ね93%および104%程度であった(表4)。このことから、本研究で使用したイムノアフィニティーゲルは、総AFsと同様にAF-M₁にも十分な交差反応を示し、且つ本試験法にて開発したSPDEおよび固相蛍光誘導体化法が有効であることが確認された。

精度の評価として、8検査機関の室間精度を相対標準偏差で算出したところ、試料A(高濃度添加)では20%未満、他方、試料B(低濃度添加)では31%未満であった(表4)。これらをHorRat値で算出すると試料Aでは0.90、他方、試料Bでは1.41であり(表4)、いずれもCACで規定したHorRat値の許容範囲(2)内であった。

また、各検査機関の実測データを評価す

ると、8 機関中 5 機関は、高濃度試料測定の前平均値が “全検査機関の前平均値 ± SD” にほぼ入っており、残りの 3 機関もわずかに “前平均値 ± SD” からはみ出してはいたが、“前平均値 ± 2SD” には十分に入っていた(図 4-(A))。また、低濃度試料においても、8 機関中 6 機関は、“前平均値 ± SD” にほぼ入っており、残りの 2 機関も “前平均値 ± 2SD” に十分に入っていた(図 4-(B))。以上の結果から、チーズ中 AF-M₁ 分析における本試験法の精度も良好であることが推察された。

E. 結論

食品中 AFs の分析に関して、従来の公定検査法では操作が煩雑であること、実験者への AFs の曝露が危惧されること、食品の種類によって夾雑物の種類や量が異なることから、前処理法を使い分けなければならないといった問題点があった。そこでこれらの問題点を克服するために、食品中 AFs の前処理法としてイムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法および固相蛍光誘導体化法を構築し、精度管理試験を実施した。その結果、白コショウ中の総 AFs 分析およびチーズ中 AF-M₁ 分析においていずれも良好な真度と精度が得られ、残留試験法として十分に実用性があることが示された。

本研究を実施することにより、現行の公

定法に代わる微量分析が可能な信頼性の高い AFs および AF-M₁ の分析方法を示すことが可能となり、食品衛生に大いに寄与することが期待される。

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

Koichi SAITO, Junki ISHII, Misaki NANIWA, Saya NOBUMOTO, Rie ITO ; Trace Analysis of Aflatoxins in Spices by HPLC Coupled with Solid-Phase Dispersive Extraction Followed by Fluorescence Derivatization, and its Accuracy Management for Method Validation ; International Symposium of Mycotoxicology 2016 (ISMyc02016) (Nov.30-Dec.2/2016, Tokyo)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

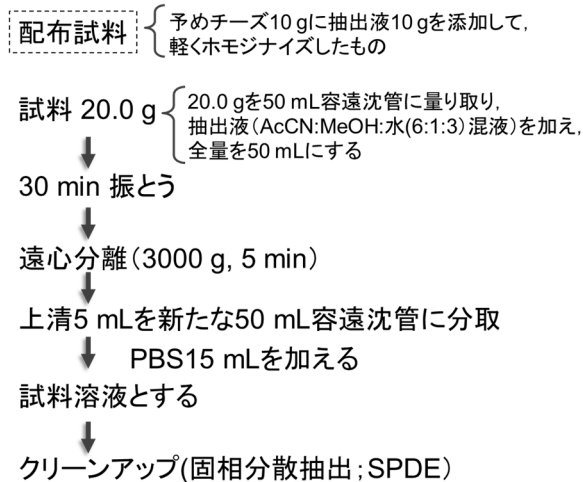
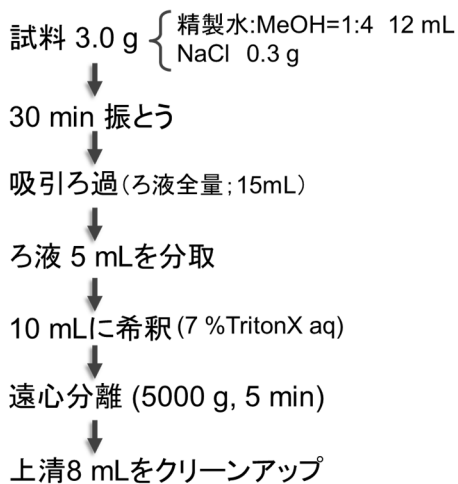
なし

2. 実用新案登録

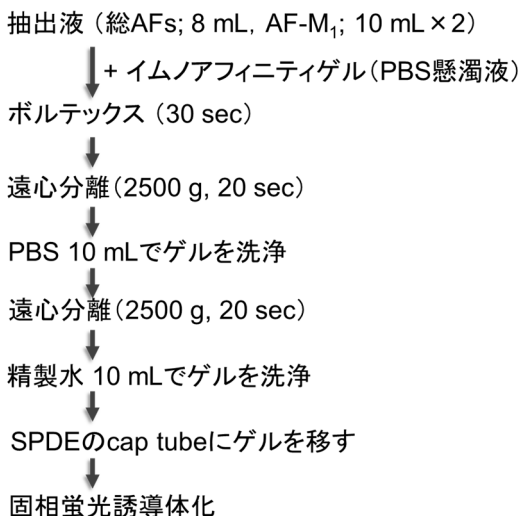
なし

3. その他

なし



(B)



(C)

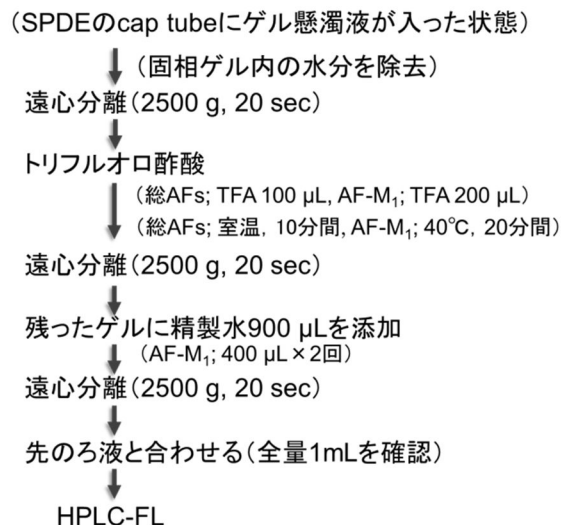


図1 香辛料中総AFsおよびチーズ中AF-M₁分析フローチャート

(A);抽出(香辛料), (A');抽出(チーズ), (B) クリーンアップ,
(C) 固相蛍光誘導体化

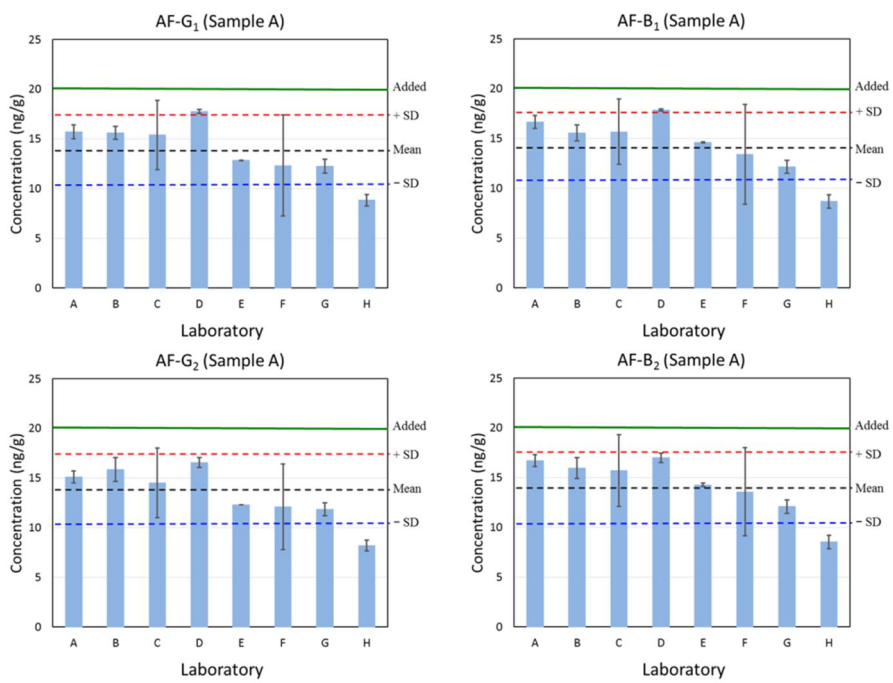


図2 室間精度管理試験結果（白コショウ，高濃度試料(20 ng/g)）
A-H；検査機関(各2回トライアル)

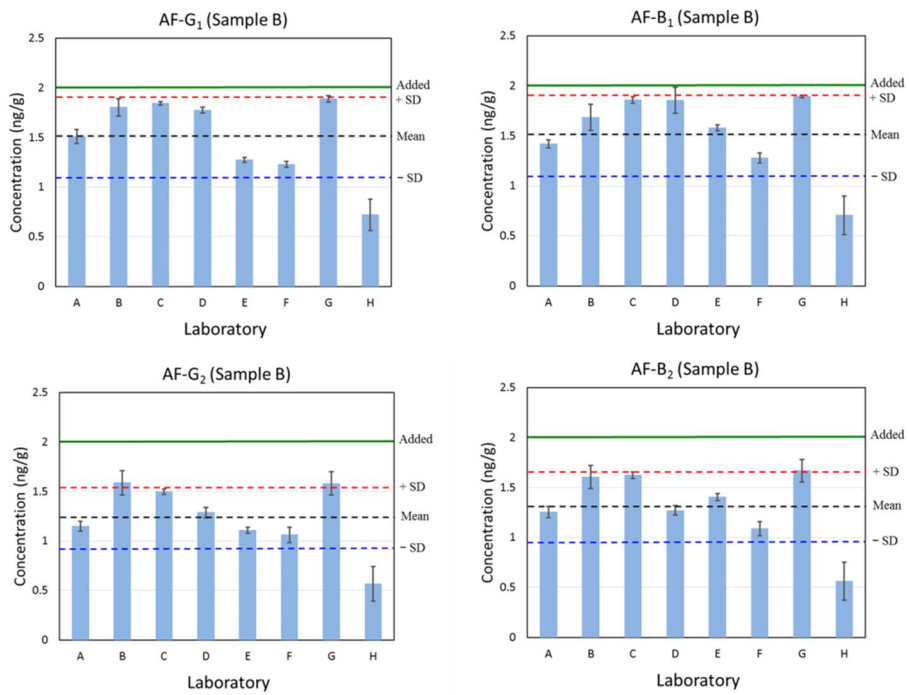


図3 室間精度管理試験結果（白コショウ，低濃度試料(2 ng/g)）
A-H；検査機関(各2回トライアル)

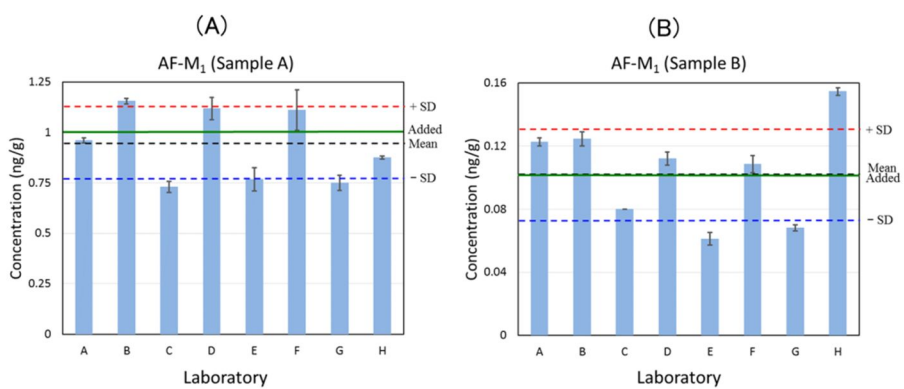


図4 室間精度管理試験結果(チーズ)
 (A); 高濃度試料(1 ng/g), (B); 低濃度試料(0.1 ng/g)
 A-H; 検査機関(各2回トライアル)

表 1 白コショウ中 AFs 分析の室間精度管理試験結果(平均回収率)

	Added (ng/g)	Average recovery (%)			
		AF-G ₁	AF-B ₁	AF-G ₂	AF-B ₂
Sample A	20	69.2	71.6	66.6	71.2
Sample B	2	75.3	76.7	61.5	65.5

(n=8 x 2)

表 2 白コショウ中 AFs 分析の室間精度管理試験結果(RSD: 相対標準偏差)

	RSD (%)			
	AF-G ₁	AF-B ₁	AF-G ₂	AF-B ₂
Sample A	25.9	25.2	25.7	24.8
Sample B	27.5	26.9	28.8	28.9

Sample A : 20 ng/g, Sample B : 2 ng/g

表 3 白コショウ中 AFs 分析の室間精度管理試験結果(HorRat 値)

	HorRat value *			
	AF-G ₁	AF-B ₁	AF-G ₂	AF-B ₂
Sample A	1.18	1.15	1.17	1.13
Sample B	1.25	1.22	1.31	1.31

Sample A : 20 ng/g, Sample B : 2 ng/g

*: Thompson's modification

表 4 チーズ中 AF-M₁ 分析の室間精度管理試験結果

	Added (ng/g)	Recovery (%)	RSD (%)	HorRat value *
Sample A	1	93.3	19.8	0.90
Sample B	0.1	103.9	30.9	1.40

(n=8 x 2)

*: Thompson's modification

検査機関の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究

研究代表者	渡辺 卓穂	（財）食品薬品安全センター秦野研究所 部長
研究分担者	鎗田 孝	（国研）産業技術総合研究所 グループリーダー
研究協力者	大竹 貴光	（国研）産業技術総合研究所 主任研究員

研究要旨

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ため、食品衛生法に基づく検査機関には外部精度管理調査への参加が求められている。一方、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043 では、技能試験の付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定が挙げられている。そこで、外部精度管理調査試料中農薬の正確な分析法を確立し、同調査の信頼性をより向上させることを目的として、同位体希釈質量分析法（IDMS）の適用を検討している。

昨年度の検討では、マトリックスマッチング法を適用した IDMS によって、平成 27 年度外部精度管理調査試料を分析することにより、その妥当性を検証した。その結果、分析対象の 2 農薬について、本法による定量値は調査試料の調製濃度とよく一致していた。また、外部精度管理調査においても多くの検査機関が適用している、簡易分析法の QuEChERS 法に IDMS 法を適用し、玄米試料中の農薬を対象として本法の正確さを精密に評価した。その結果、検討した 3 種類の農薬について、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号の通知試験法（一斉試験法）と同等の分析値が得られることを確認した。

今年度は、玄米以外の食品および異なる種類の農薬についても適用の可能性を検討すべく、試料に残留農薬分析用の大豆およびリンゴ認証標準物質（CRM）を用いて、IDMS 法により QuEChERS 法の精密な評価を行った。その結果、本法で得られた分析値は、大豆、リンゴとも CRM の認証値とよく一致していた。さらに、改良 QuEChERS 法として国内で特に多く使われている STQ 法について、技能試験の比較玄米試料を用いて評価を行ったところ、一斉試験法や QuEChERS 法と同等の分析値が得られた。

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。そのため、食品衛生法に基づく検査機関に

は様々な分析精度管理が求められており、その一つとして外部精度管理調査への参加が求められている。一方、外部精度管理調査を含む多くの技能試験では、付与値と

して参加機関の分析結果から算出した合意値を採用し、この値を基準として各参加機関の技能評価を行うことが一般的である。これに対し、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043: 2010 では、付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定が挙げられている。同位体希釈質量分析法 (IDMS) は、分析対象化合物の安定同位体置換化合物(標識体)を内標準に用いた定量法であり、極めて正確な(正確で精度がよい)分析を行うことができる方法である。そこで本研究では、同調査の信頼性をより向上させることを目的として、IDMS による食品中農薬の高信頼性分析を検討している。昨年度の検討では、マトリックスマッチング法を適用した IDMS によって、平成 27 年度外部精度管理調査試料を分析し、分析対象農薬のクロルピリホスとマラチオンについて、本法による定量値が調査試料の調製濃度とよく一致していたことを示した。また、外部精度管理調査においても多くの検査機関が適用している、簡易分析法の QuEChERS 法に IDMS 法を適用し、玄米試料中の農薬を対象として本法の正確さを精密に評価した。その結果、検討した 3 種類の農薬について、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号の通知試験法(一斉試験法)と同等の分析値が得られることを確認した。そこで本年度は、玄米以外の食品および異なる種類の農薬についても適用の可能性を検討すべく、試料に残留農薬分析用の大豆およびリンゴ認証標準物質 (CRM) を用い、IDMS により QuEChERS 法の精密な評価を行った。さらに、改良 QuEChERS 法として国内で特に多く使われ

ている STQ 法 (Solid Phase Extraction Technique with QuEChERS 法の略) について、玄米試料を用いて精密に評価を行った。

B. 研究方法

(1) QuEChERS 法の評価

大豆粉末 CRM (7509-a) およびリンゴ粉末 CRM (7510-a) を試料とし、QuEChERS 法によって分析を行った。得られた結果は、CRM に付与されている認証値と比較した。抽出前に分析対象農薬の標識体を添加する IDMS を適用することにより、各分析法の正確さを精密に比較した。

(2) STQ 法の評価

対象農薬が残留した玄米粉末を STQ 法によって分析し、昨年度本研究で得られた一斉試験法および QuEChERS 法による分析値と比較した。(1)と同様に、IDMS を適用することにより、各分析法の正確さを精密に比較した。

1. 試料基材および試薬

(1) 試料

QuEChERS 法の評価には、産業技術総合研究所が開発した、残留農薬分析用の大豆粉末 CRM (7509-a) およびリンゴ粉末 CRM (7510-a) を用いた。また STQ 法の評価には、産業技術総合研究所が平成 27 年度に実施した技能試験の比較試料である玄米粉末を用いた。対象農薬を含まない大豆、リンゴ、玄米試料には市場流通品を用いた。

(2) 標準品

測定対象農薬の高純度標準品として、和光純薬工業製ダイアジノン、フェニトロチ

オン、エトフェンプロックス、クロルピリホス、ペルメトリン、シペルメトリン、チアメトキサムを用いた。標識体の標準品として、林純薬工業製ダイアジノン- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、エトフェンプロックス- d_5 、クロルピリホス- d_{10} 、CIL 製ペルメトリン- $^{13}C_6$ 、シペルメトリン- $^{13}C_6$ 、Fluka 製チアメトキサム- d_3 を用いた。シリンジスパイク標準品として CIL 製イミダクロプリド- d_4 と GL サイエンス製アラクロールを用いた。

(3) 試薬

アセトニトリル (AN)、アセトン (Ac)、トルエン (Tol)、酢酸エチル (EA)、ヘキサン (Hex)、メタノール (MeOH)、無水 Na_2SO_4 は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用いた。QuEChERS 法で用いた PSA、グラファイトカーボンブラック、C18 は Agilent Technologies 社製のものを用いた。他の試薬は試薬級を用い、水は超純水を用いた。

2. 検量線溶液、内標準溶液、シリンジスパイク溶液

質量比混合法によって以下の溶液を調製した。

(1) QuEChERS 法の評価用

大豆の分析用にダイアジノン- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、クロルピリホス- d_{10} 、ペルメトリン- $^{13}C_6$ 、またリンゴの分析用にダイアジノン- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、ペルメトリン- $^{13}C_6$ 、シペルメトリン- $^{13}C_6$ を含む Ac 溶液を調製し、それぞれ内標準溶液 A および B とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を大豆およびリンゴ用に調

製し(それぞれアラクロール溶液 A および B)、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液 A および B を調製した。一方、大豆の分析用にダイアジノン、フェニトロチオン、クロルピリホス、ペルメトリンを Ac に溶解させ農薬混合溶液 A を調製し、リンゴの分析用にダイアジノン、フェニトロチオン、ペルメトリン、シペルメトリンを Ac に溶解させ農薬混合溶液 B を調製した。さらに、農薬混合溶液 A (または B)、内標準溶液 A (または B)、アラクロール溶液 A (または B)、Ac を混合することにより、検量線溶液 A (または B) を調製した (A は大豆、B はリンゴの分析用)。検量線溶液 A, B 中の各成分濃度は、3(1)に示す前処理法によって大豆またはリンゴの試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調整した。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認した大豆およびリンゴの試料を 3(1)に示す前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の検量線溶液 A (または検量線溶液 B) に溶解させることにより、マトリックスマッチ検量線溶液 A (大豆用) およびマトリックスマッチ検量線溶液 B (リンゴ用) を調製した。

(2) STQ 法の評価用

エトフェンプロックス- d_5 とフェニトロチオン- d_6 を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 C とした。また、アラクロールを Ac に溶解したアラクロール溶液 C を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液 C を調製した。一方、エ

トフェンプロックスとフェニトロチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液 C を調製した。さらに、農薬混合溶液 C、内標準溶液 C、アラクロール溶液 C、Ac を混合することにより、検量線溶液 C を調製した。検量線溶液 C 中の各成分濃度は、3(2)に示す前処理法によって玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調整した。

一方、チアメトキサム- d_3 を MeOH に溶解して内標準溶液 D を調製した。また、イミダクロプリド- d_4 を MeOH に溶解したイミダクロプリド- d_4 溶液を調製し、この一部を MeOH で希釈してシリンジスパイク溶液 D を調製した。一方、チアメトキサムを MeOH に溶解してチアメトキサム溶液を調製し、これと内標準溶液 D、イミダクロプリド- d_4 溶液、MeOH を混合することにより、検量線溶液 D を調製した。検量線溶液 D 中の各成分濃度は、3(2)に示す前処理法によって玄米試料を処理して得られる試料溶液中の農薬濃度と等しくなるように調整した。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体含有しないことを確認した玄米試料を 3(2)に示す前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の検量線溶液 C または検量線溶液 D に溶解させることにより、マトリックスマッチ検量線溶液 C (エトフェンプロックスとフェニトロチオン用)およびマトリックスマッチ検量線溶液 D (チアメトキサム用)を調製した。

3. 分析方法

QuEChERS 法の評価では、分析法 1 を用

いて大豆およびリンゴ中の農薬を分析した。また、STQ 法の評価においては玄米中の農薬を分析法 2 によって分析した。STQ 法の結果と比較するために、一斉試験法と QuEChERS 法でも玄米中農薬を分析しているが、これらの方法は昨年度の報告書に記載した通りである。

(1) 分析法 1 (QuEChERS 法：大豆とリンゴに適用)

大豆試料の場合は 2 g、リンゴ試料の場合は 1 g を採取し、それぞれ内標準溶液 A または B の 0.4 mL を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えて 1 分間振とう(手振り)した。これに 4 g の $MgSO_4$ 、1 g の NaCl を加え、セラミックホモジナイザーを用いて 1 分間振とう(手振り)した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液(6 mL)に固相剤を添加して 1 分間振とう(手振り)した。このとき固相剤として、大豆には 300 mg の PSA、45 mg のグラファイトカーボンブラック、300 mg の C18、900 mg の $MgSO_4$ を、リンゴには 150 mg の PSA、45 mg のグラファイトカーボンブラック、900 mg の $MgSO_4$ を加えた。再び 3500 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固した。シリンジスパイク溶液 A または B の 0.5 mL を添加して、GC/MS 測定用の試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を、GC/MS によって測定した。大豆では、ダイアジノン、フェニトロチオン、クロルピリホス、ペルメトリンを、リンゴではダイアジノン、フェニトロチオン、ペルメトリン、シペルメトリンを対象とした。測定条件は、以下の通

り。装置：6890/5973N GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム：DB-35MS (30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、Agilent Technologies 製)、カラム温度：50 で 1 分間保持した後、+20 /分で 180 まで昇温し、さらに +5 /分で 300 まで昇温し、10 分間保持、注入口温度：220、検出器温度：230 (イオン源)、注入方式：スプリットレス、キャリアガス：ヘリウム、注入量：1 μ L、イオン化条件：EI、定量に用いた m/z：304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン- d_{10})、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン- d_6)、314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス- d_{10})、183 (ペルメトリン)、189 (ペルメトリン- $^{13}C_6$)、181 (シペルメトリン)、187 (シペルメトリン- $^{13}C_6$)、160 (アラクロール)。

(2) 分析法 2 (STQ 法：玄米に適用)

玄米試料の 5 g を採取し、内標準溶液 C または D の 0.4 mL を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えてホモジナイザーを用いて 2 分間細砕した。これに 4 g の $MgSO_4$ 、1 g の NaCl、1 g のクエン酸 $3Na_2$ 水和物、0.5 g のクエン酸水素 $2Na_{1.5}$ 水和物を加え、1 分間振とう(手振り)した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液 (1 mL) を精製した。すなわち、アイスティサイエンス製 C18-50 mg 固相ミニカートリッジ (Smart-SPE) を Ac2 mL および AN2 mL でそれぞれコンディショニングした後、前述の上澄み液を負荷し、さらに AN0.2 mL を注入した。溶出液には、ToI0.4 mL を添加した。アイスティサイエンス製 GCS-20 mg と

PSA-30 mg の固相ミニカートリッジ (Smart-SPE) を連結させ、ここに 0.3 g の $MgSO_4$ を積層させたものにより、試料液をさらに精製した：Ac2 mL と AN/ToI (3:1) 混液 2 mL で、それぞれコンディショニングした後、試料液を負荷し、さらに AN/ToI (3:1) 混液 0.6 mL を添加した。得られた溶出液を窒素により乾固し、シリンジスパイク溶液 C または D の 0.5 mL を添加して、GC/MS 測定用および LC/MS 測定用の試料溶液とした。

試料溶液中のエトフェンプロックスとフェニトロチオンを、GC/MS によって測定した。測定条件は、以下の通り。装置：6890/5973N GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム：DB-35MS (30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、Agilent Technologies 製)、カラム温度：50 で 1 分間保持した後、+20 /分で 180 まで昇温し、さらに +5 /分で 300 まで昇温し、10 分間保持、注入口温度：60 で 0.5 分保持した後、+100 /分で 290 まで昇温し、23 分間保持、検出器温度：230 (イオン源)、注入方式：大量注入法 (アイスティサイエンス、LVI-S200)、キャリアガス：ヘリウム、注入量：10 μ L、イオン化条件：EI、定量に用いた m/z：163 (エトフェンプロックス)、168 (エトフェンプロックス- d_6)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン- d_6)、160 (アラクロール)。

一方、試料溶液 (LC 用) 中のチアメトキサムを LC/MS によって測定した。測定条件は以下の通り。装置：1260LC/6120MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム：Zorbax Eclipse Plus C18 (150 mm×2.1 mm、粒径 3.5 μ m、Agilent Technologies 製)、

カラム温度：40、溶離液 A：5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B：5 mmol/L 酢酸アンモニウム - メタノール(体積割合) 溶液、グラジエント条件：15 %B (0 分) 40 %B (1 分) 40 %B (3.5 分) 50 %B (3.6 分 ~ 6 分) 55 %B (6.1 分 ~ 8 分) 95 %B (8.1 分 ~ 17.5 分) 95 %B (30 分) 15 %B (30.1 分 ~ 35 分)、注入量：5 μ L、イオン化条件：ESI、定量に用いた m/z：211(チアメトキサム)、214(チアメトキサム- d_3)、213(イミダクロプリド- d_4)。

4. 評価方法

(1) 農薬濃度の算出

3 で示した分析方法で得られた結果を基に、以下の式によって農薬濃度を算出した。

$$C = F_e \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{F_c \times M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}} \quad (1)$$

ただし、 C ：試料中の農薬濃度、 F_e ：前処理の精度に関わる係数(= 1)、 R_s ：試料溶液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 R_c ：検量線溶液の測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 F_c ：検量線溶液の調製ばらつきに関わる係数(= 1)、 M_c ：検量線溶液中の農薬混合液の質量、 C ：農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 P ：分析対象農薬の高純度標準品の純度、 $M_{sp(s)}$ ：試料に添加した内標準溶液の質量、 M_s ：試料量、 $M_{sp(c)}$ ：検量線溶液中の内標準溶液の質量、である。

(2) QuEChERS 法の評価

(1)式に準じて QuEChERS 法(分析法 1)による分析値を算出した。得られた結果を、大豆粉末 CRM (7509-a) およびリンゴ粉末 CRM (7510-a)の認証値と比較することにより、QuEChERS 法の正確さを評価した。なお、マトリックスマッチ検量線溶液 A およびマトリックスマッチ検量線溶液 B を用いた測定結果により評価を行ったが、比較のために、検量線溶液 A および検量線溶液 B を用いた測定結果も算出した。

(3) STQ 法の評価

(1)式に準じて STQ 法(分析法 2)による玄米中農薬の分析値を算出した。本結果と、昨年度の本研究による一斉試験法および QuEChERS 法で得られた結果を比較することにより、STQ 法の正確さを評価した。

(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、特に有害な溶媒(ベンゼン等)を使用しなかった。

C. D. 研究結果および考察

1. QuEChERS 法の評価

QuEChERS 法は、食品中の残留農薬一斉分析法として開発され、操作が迅速・簡便であることから、現在では食品試料のみならず、環境試料や生体試料などを対象として、世界中で使用されている。本研究においては、食品中の正確な農薬分析の検討に用いており、上述の通り今年度は大豆とリンゴを対象とした。QuEChERS 法(分析法 1)で得られた定量値と認証値との比較を、表

1 (大豆) および表 2 (リンゴ) に示す。この結果から、大豆およびリンゴ試料の両方に対して、QuEChERS 法の定量値が認証値の不確かさの範囲内であることが示された。これより、本研究で対象とした大豆およびリンゴ中の農薬に対して、簡易分析法にもかかわらず、QuEChERS 法によって十分に対象農薬が抽出され、正確な分析値が得られることが示された。これは、昨年度報告した玄米の結果と同様であった。なお、マトリックスマッチングしていない検量線 A (大豆用) および検量線 B (リンゴ用) を用いた場合、大豆のダイアジノンおよびフェニトロチオンで各々 7.7 % と 11.1 %、リンゴのフェニトロチオンで 11.2 %、定量値が低くなった。QuEChERS 法は一斉試験法よりも精製効果が低いと考えられたため、IDMS においてもマトリックス効果の影響をより強く受ける可能性がある。QuEChERS 法によってより正確な IDMS 分析を行うためには、今後マトリックス効果に関するより詳細な確認が必要である。

2. STQ 法の評価

STQ 法は、QuEChERS 法と固相抽出法を組み合わせた残留農薬一斉分析法であり、株式会社アイステイサイエンスによって開発された QuEChERS の改良法である。操作が迅速・簡便であり、QuEChERS 法に比べて精製力がさらに優れていることから、日本国内の分析ラボにおいて、近年非常に多く使用されている。本法には、分析対象に応じて GC-A 法、GC-B 法、LC 法、MG 法が存在するが、今回は GC-A 法に IDMS 法を適用し、玄米試料中の農薬を対象として本法

の正確さを精密に評価した (分析法 2)。分析によって得られた代表的なクロマトグラムを、図 1~3 に示す。また、得られた定量値を表 3 にまとめる。表 3 には比較のため、一斉試験法および QuEChERS 法で得られた結果についても示した (これらの結果は、昨年度、本研究で得られたものである)。これより、玄米中のすべての対象農薬において、STQ 法の分析値は一斉試験法および QuEChERS 法とよく一致していた。これは、STQ 法により玄米中の対象農薬が十分に抽出され、また精製されていたことを示しており (図 1~3 においても、夾雑物質による対象農薬ピークへの阻害は、観察されなかった)、STQ 法を正確な分析に適用できる可能性が示された。今後は、より多くの食品や農薬を対象として、マトリックス効果の影響も含めた評価が必要であろう。

E. 結論

IDMS 法を適用することにより、日本の検査機関においても広く適用されている QuEChERS 法と STQ 法の抽出能力を精密に評価した。その結果、検討した試料及び農薬について一斉試験法の同等の抽出能力が認められたことから、同法の正確さが確認できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 鎗田孝、大竹貴光、青柳嘉枝、沼田雅彦、高津章子 (産業技術総合研究所) :

Difference between consensus value of participants' results and isotope-dilution mass spectrometric results in proficiency testing for pesticide residues in husked wheat、Analytical Sciences、Vol.32、pp.557-563、2016

2) 大竹貴光、鎗田孝、坂元智子、沼田雅彦、高津章子 (産業技術総合研究所) : Proficiency testing for quantification of pesticide residues in treated brown rice samples: comparison of performance of Japanese official multiresidue, modified QuEChERS, and QuEChERS methods、Journal of AOAC International、Vol.99、pp.821-829、2016

2. 学会発表

1) 大竹貴光、鎗田孝 (産業技術総合研究所) : 残留農薬分析用の食品標準物質を用いた同位体希釈質量分析法によるQuEChERS法の評価、第112回日本食品衛生学会学術講演会、北海道、2016

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 QuEChERS法によって得られた大豆 CRM 中農薬の分析結果

対象農薬	大豆 CRM		分析結果 (n=3)	
	認証値	拡張不確かさ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均値 \pm 標準偏差 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	マトリックスマッチングなし マトリックスマッチングあり
クロルピリホス		11.1 \pm 3.2	11.8 \pm 0.9	11.4 \pm 0.8
ダイアジノン		21.7 \pm 3.2	20.3 \pm 0.4	22.0 \pm 0.4
フェニトロチオン		88 \pm 21	72 \pm 1.4	81 \pm 1.5
ベルメトリン		20.1 \pm 4.3	21.5 \pm 0.7	21.2 \pm 0.7

表 2 QueChERS 法によって得られたリンゴ CRM 中農薬の分析結果

対象農薬	リンゴ CRM		分析結果 (n=3)	
	認証値	± 拡張不確かさ (ng/kg)	マトリックスマッチングなし (ng/kg)	マトリックスマッチングあり (ng/kg)
ダイアジノン	2.28	± 0.23	2.13	± 0.04
フェニトロチオン	3.14	± 0.53	2.77	± 0.06
シペルメトリン	1.55	± 0.31	1.55	± 0.11
ベルメトリン	2.81	± 0.60	2.63	± 0.05
				2.18 ± 0.04
				3.12 ± 0.07
				1.51 ± 0.10
				2.70 ± 0.05

表3 STQ 法, 一斉試験法, QuEChERS 法によって得られた玄米中農薬の分析結果

	平均値 ± 標準偏差 (mg/kg, n=4)		
	STQ 法	一斉試験法	QuEChERS 法
エトフェンプロックス	0.231 ± 0.005	0.236 ± 0.001	0.230 ± 0.005
フェニトロチオン	0.0985 ± 0.0017	0.0986 ± 0.0012	0.0983 ± 0.0048
チアメトキサム	0.140 ± 0.002	0.142 ± 0.002	0.142 ± 0.005

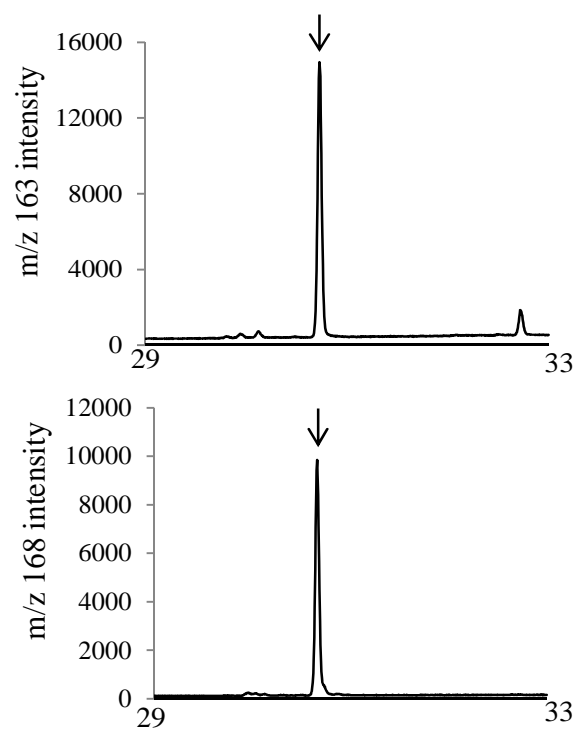


図 1 STQ 法によって得られた技能試験の比較玄米試料中エトフェンブロックスの GC/MS クロマトグラム (分析法 2, 上段: エトフェンブロックス、下段: エトフェンブロックス- d_5)

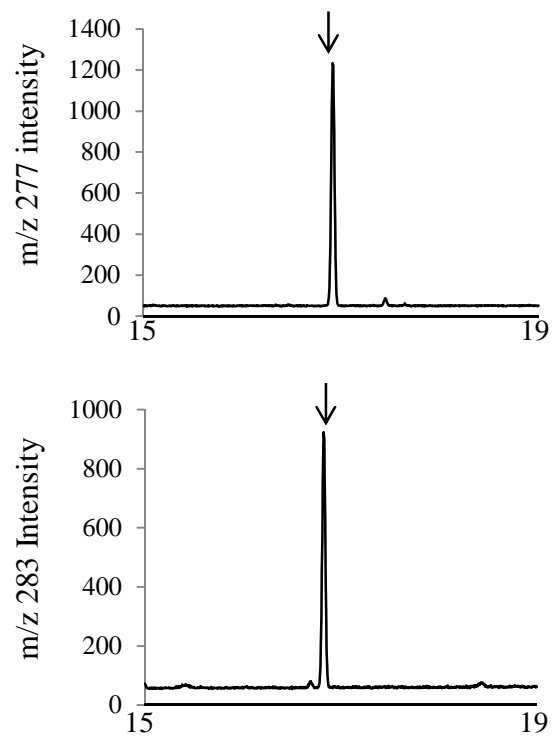


図2 STQ法によって得られた技能試験の比較玄米試料中フェニトロチオンのGC/MSクロマトグラム(分析法2, 上段: フェニトロチオン、下段: フェニトロチオン- d_6)

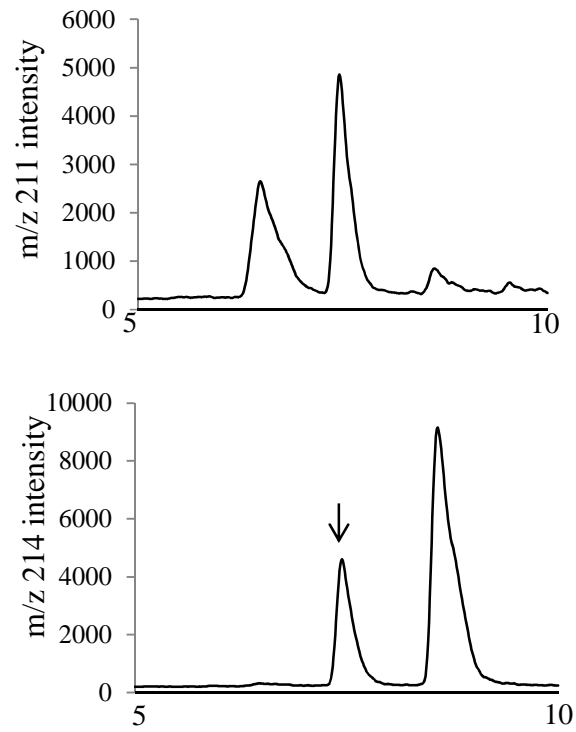


図 3 STQ 法によって得られた技能試験の比較玄米試料中チアメトキサムの LC/MS クロマトグラム (分析法 2, 上段: チアメトキサム、下段: チアメトキサム- d_3)

平成 28 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）

検査機関の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

食品衛生外部精度管理調査用適性試料の作製検討と
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

研究代表者	渡辺 卓穂	（一財）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	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 室長
	高坂 典子	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 室長
	佐藤 夏岐	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	久保田佳子	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	池田 真季	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

研究要旨

精度管理調査を行う上で、適正な調査試料作製は非常に重要であり、調査対象物質濃度の均質性及び調査期間中の濃度の安定性は必須である。そこで、実分析をふまえた新規基材の開発を検討し、今年度、実配付量の作製が可能となった。

固体試料として、米類（玄米及び精米）の適用性については、これまでに米類を粒状で農薬混合溶媒に浸漬後、浸漬溶媒を留去し、さらに乾燥・粉碎することで、添加農薬が均質となることが明らかとなっている。しかしこの方法は、農薬添加後の粒状試料を遠心粉碎機で粉碎する際、遠心粉碎機の細かな部分に微細試料が残留することにより汚染のリスクが考えられた。また粒状でなく粉末試料を用いて同様に作製した場合、浸漬溶媒を留去する際、減圧によりロータリー部分に粉末が吸引され、汚染の原因となることが危惧された。今年度はそれらのリスクを低減できるよう作製方法を改良し、スモールスケールでの作製方法から実配付量の作製検討をし、玄米を基材とした粉末固体試料の作製プロセスを確立できた。またこれらの冷蔵及び冷凍保存による長期安定性も継続して検討した。冷凍保存条件下では作製後 360 日間は添加した 4 種の農薬は高い安定性を示し、外部精度管理調査実施後、余剰試料を内部精度管理へ活用できる可能性も示唆された。

一方、作製実績のある水分量が多い従来の野菜ペーストに加えて、これらと比較してたんぱく質及び脂質量が高い枝豆を基材として検討を進めてきたが、今年度はスモールスケールから実配付量の作製プロセスを検証・確立した。均質化のために添加剤として水分 10%を加え、1 バッチ約 2kg の作製を複数バッチ作製し、それらの均質（同等）性が確認できた。

以上のことから、固体試料としては玄米を、また半固体試料として枝豆を基材に用いた新たな外部精度管理調査用試料の作製及び提供が可能となった。

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。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となり、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。また、試料の基材にもバリエーションが必要であり、新たな基材について検査対象物質の濃度が均一で安定な調査試料の開発を行っているところである。昨年に引き続き、残留農薬試料としては初めての固体試料として米類を、またこれまでのほうれんそうやにんじんなど水分量が多い従来の野菜ペーストに加えて、これらと比較してたんぱく質及び脂質量の高い枝豆ペーストについても検討を行っている。米類の試料作製プロセスでは、粒状への添加法から粉末試料への添加法へ変更し、昨年までの作製法を改良した上で、スモールスケールから実配付量作製の方法を検証・確立することを目的とした。

また、枝豆については、昨年までに油分を添加することで均質性のある試料を作製できることが明らかとなっており、今年度は、米類と同様にスモールスケールから実配付量の作製法を検証・確立することを目的とした。

1. 試料基材及び試薬

1) 試料基材

市販の玄米及び精米のそれぞれ古米（平成27年産）、以下、米類、枝豆ペースト（新進）

2) 標準品

ダイアジノン、クロルピリホス、馬拉チオン、フェニトロチオン
（Dr.Ehrenstorfer GmbH）

3) 試薬

蒸留水、アセトニトリル（HPLC用、和光純薬工業）、アセトン、ヘキサン、酢酸エチル（残留農薬・PCB試験用、和光純薬工業）、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム（試薬特級、和光純薬工業）

2. 使用機器及び測定条件

1) 試料作製用使用機器及び器材

ブrikサー5プラス（エフ・エム・アイ、以下、ブrikサー）、ロッキングミキサー RM-10-3（愛知電機）、遠心粉碎機（Retsch）、減圧濃縮器（東京理化学器械）、粉体攪拌用フラスコ（旭製作所）、球形ガラスフィルター（G1タイプ）（旭製作所）、ロータリージョイント（C-3型、G3フィルタータイプ）

2) 試料抽出用機器

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

3) 測定機器

リン検出器付きガスクロマトグラフ（以下GC(FPD)）：Agilent 7890A（アジレント・テクノロジー）

4) 測定条件

カラム：DB-210（内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 μm）、カラム流量：2.5 mL/min、カラム温度：60°Cで2分間保持し、その後毎分10°Cで昇温し、200°Cに到達後10分間保持、注入口温度：250°C、検出器温度：250°C、キャリ

アーガス：ヘリウム

3. 試料作製

1) 玄米及び精米

(1) 冷凍及び冷蔵保存における長期安定性（回収率）の評価

平成 27 年度から引き続き、基材に玄米及び精米それぞれの古米を用い、冷凍及び冷蔵保存における添加農薬の安定性（回収率）を検討し、比較評価した。

基材である米類をそれぞれ遠心粉碎機で粉碎し、粉末化後、直ちに 10 g をそれぞれ量り採り、添加用農薬混合標準液（ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 1 µg/mL、フェニトロチオン 2 µg/mL、アセトン溶液）1 mL を正確に加え、試料に十分浸潤させた（理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g）。また、同様に粉碎、粉末化した米類それぞれに、添加用農薬混合標準液の代わりにアセトン 1 mL を添加し、空白試料とした。併せて、アセトンを添加しない米類粉末試料をアセトン無添加空白試料とした。

これらの試料について、各農薬の回収率、冷凍及び冷蔵保存（180、270 及び 360 日間）における安定性（回収率）を検討した（各 n=3）。

(2) 実作製における作製プロセスの確立及びその検証

浸漬用溶媒の検討

粉体攪拌用フラスコ（2L 容）に各溶媒（ヘキサン、アセトン及び酢酸エチル）をそれぞれ 590 mL とり、これに添加用農薬混合標準液（ダイアジノン、ク

ロルピリホス及びマラチオン 5 µg/mL、フェニトロチオン 10 µg/mL、アセトン溶液）10 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で 5 分間回転混合し、予め均質な浸漬用農薬混合標準液を調製した。これに、遠心粉碎機により粉碎・粉末化した玄米（古米）500 g を量り入れ、同様に 5 分間回転混合した後、室温で遮光下 24 時間静置による浸漬を行った。浸漬後、浸漬溶媒を留去し、内容物をテフロンシート上に広げ、室温下で 3 日間乾燥し、浸漬溶媒検討用作製試料とした（図 1）（溶媒留去後理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g）。この時の、溶媒留去の様子及び浸漬溶媒検討用作製試料の乾燥状態等を目視で観察し、浸漬用溶媒として適用可能な溶媒について検討した。なお、溶媒留去において、減圧濃縮装置のロータリーエバポレーターに球形ガラスフィルターあるいはロータリージョイントを接続し、粉体の冷却部への吸い込みを防止した。

バッチ内の均質性の検討（回転・揺動混合無し）

粉体攪拌用フラスコ（2L 容）1 個にアセトンを 710 mL とり、これに添加用農薬混合標準液（ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 6 µg/mL、フェニトロチオン 12 µg/mL、アセトン溶液）10 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で 5 分間回転混合し、予め均質な浸漬用農薬混合標準液を調製した。これに、遠心粉碎機により粉碎・粉末化した玄米（古

米) 600 g を量り入れ、以下、と同様に操作し、1 個のバッチ内均質性の検討用作製試料(回転・揺動混合無し)とした(溶媒留去後理論値: ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g)。作製した試料は、約 25 g ずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、無作為に選んだ 10 袋について行った。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合有り)

と同様にして得られた乾燥試料すべてをロッキングミキサーにより回転・揺動混合し、1 個のバッチ内均質性の検討用作製試料(回転・揺動混合有り)とした(溶媒留去後理論値: ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g)。作製した試料は、約 25 g ずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、無作為に選んだ 10 袋について行った。なお、浸漬溶媒を留去後、内容物を取り出した後の粉体攪拌用フラスコ内壁面の残渣をヘキサン 50 mL で 3 回洗い込み、これらを合わせて減圧濃縮し、5 mL とした溶液について各農薬濃度を測定し、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率を算出した。

バッチ間の均質性の検討

粉体攪拌用フラスコ(2L 容) 10 個に各々アセトンを 710 mL とり、これに添加用農薬混合標準液(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 6 µg/mL、フェニトロチオン 12 µg/mL、アセトン溶液) 10 mL を各々正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温

下、常圧で 5 分間回転混合した。これに、遠心粉碎機により粉碎・粉末化した玄米(古米) 600 g を各々量り入れ、同様に 5 分間、回転混合した後、以下、バッチ内均質性の検討用作製試料(混合)と同様に行い、10 個のバッチ間均質性の検討用作製試料とした(溶媒留去後理論値: ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g)。なお、ロッキングミキサーによる混合は、各バッチ毎に行った。作製した試料は、約 25 g ずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、1 バッチにつき無作為に選んだ 1 袋について n=2 で測定を行った。また、バッチ内均質性の検討用作製試料(回転・揺動混合有り)と同様に、各粉体攪拌用フラスコ内壁面残存農薬の残存率について測定した。

2) 枝豆

昨年度までの検討結果より、冷凍保存における凍結融解3回及び融解後冷蔵保存(14日間)の安定性を確認した結果、枝豆ペーストに水10%の添加が最も有効であることが明らかとなった。そこで今年度は、水10%添加の条件により、外部精度管理調査の実配付量である作製プロセスの確立の一環として、ブ里克サー5プラスを用いて複数バッチを作製し、バッチ間の均質(同等)性を検討した。

ブ里克サーを用いて均質化した枝豆ペースト1.8 kgに、水分添加量が10%となるように水を加え、さらにブ里克サーを用いて均質化した。これに添加用農薬混合標準液(ダイアジノン2 µg/mL、クロルピリホス60 µg/mL、マラチオン及びフ

フェニトロチオン100 µg/mL、アセトン溶液) 10 mLを正確に加え、ブレンダーを用いて混合した(理論値: ダイアジノン 0.01 µg/g、クロルピリホス 0.3 µg/g、マラチオン及びフェニトロチオン0.5 µg/g)。更に、同様の操作をそれぞれ別のブレンダー容器を用いて4回繰り返すを行い、合計5バッチを作製した。次に、各容器内作製ペースト試料の上層部と下層部の各々を4分割し、計8分割とし冷凍した。これらのペースト試料から、1バッチにつき4分画(図2の各々丸数字)をそれぞれ5バッチについて採取し、5バッチ間の均質(同等)性を確認した(図2)。別に、枝豆ペーストに、水分添加量が10%となるように水を加え、添加用農薬混合標準液の代わりに同量のアセトンを添加し、同様に操作して得られた試料を、水10%ブランク試料とした。

4. 試験方法

測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編(2003)」に準じた。

試料10.0 gを量り採り、オムニミキサーを用い、アセトン100 mLで1回、更に50 mLで2回抽出した。抽出液を合わせ、40°C以下でアセトンを留去した。濃縮物に飽和塩化ナトリウム溶液100 mLを合わせ、これにn-ヘキサン100 mLを加え振とうした。n-ヘキサン層をとり、残った水層に酢酸エチル/n-ヘキサン(1:4) 100 mLを加え振とう後、酢酸エチル/n-ヘキサン(1:4)層を先のn-ヘキサン層に合わせた。上記の操作を2回繰り返した。得られた溶液に適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分

間放置後、ろ過し、得られたる液を40°C以下で酢酸エチル/n-ヘキサンを留去した。残留物をアセトニトリル飽和n-ヘキサン30 mLに溶解し、n-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて振とうした。アセトニトリル層をとり、残ったn-ヘキサン層にn-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、上記の操作を2回繰り返す、アセトニトリル層を合わせた後、アセトニトリルを留去した。残留物にn-ヘキサンを加えて溶解させ、正確に10 mLとした後、GC(FPD)で測定した。

なお、玄米及び精米試料の測定においては、試料採取後、水20 mLを加え2時間膨潤させた後、アセトンによる抽出操作を行った。各農薬の定量には絶対検量線を用いた。

(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。実験者及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) 玄米及び精米

(1) 冷凍及び冷蔵保存における長期安定性(回収率)の評価

平成27年度から引き続き、基材自体の農薬添加試料としての適用性の確認として、粉碎・粉末化した米類(精米及び玄米のそれぞれ古米)に農薬を添加し冷凍及び冷蔵保存条件下での経日的安定性(平成27年度の農薬添加後0、14、34、60、90及び120日間に加え、本年度は180、270及び360日間)を検討し

たところ、精米及び玄米ともに明らかに冷蔵よりも冷凍保存の方が高い安定性を示し、さらに精米より玄米の方が良好な安定性が得られた(図3、4)。精米においては特にマラチオン及びフェニトロチオンの2農薬が冷凍と冷蔵保存で顕著な差が認められた。玄米の冷凍保存においては、4種農薬とも270日間経過時点で80%以上の回収率を示しており、また、マラチオン及びフェニトロチオンは冷凍保存360日間でも、90%以上の安定した回収率を示していた。このことから、玄米の冷凍保存においては、外部精度管理調査実施後の余剰試料を内部精度管理試料として活用できる可能性があると考えられた。

なお、それぞれの測定時点及び米の種類に応じてブランク試料についても同時に測定を行ったところ、一部の時点及び農薬において基材由来のピークが出現したため、それらを差し引いて回収率の算出を行った。またアセトンを添加しない米類ブランク試料と比較したところ、差は認められず、アセトンを添加後、長期冷凍保存することの影響はないと考えられた。

(2) 実作製における作製プロセスの確立及びその検証

浸漬用溶媒の検討

昨年度までは、米を粒状で浸漬用農薬混合標準液に浸漬し、溶媒留去後乾燥・粉砕し、粉砕物を混合する方法で調製したが、今年度は、米を予め粉砕し粉末化した試料を用いて調製する方法を試みた。調製に先立ち、浸漬用農薬混合標準液に用いる溶媒の検討を行った。玄米

(古米)を3種の浸漬用溶媒(ヘキサン、アセトン及び酢酸エチル)に浸漬した後、ロータリーエバポレーターにより浸漬溶媒を留去し、自然乾燥させた時の、得られた作製試料の乾燥状態等について、目視により観察を行った。その結果、アセトンに浸漬した試料が最も溶媒の除去状態が良好であり、ヘキサン及び酢酸エチルによる試料は、溶媒の除去が不完全となる傾向があった。溶媒の一部が残留することは、溶液部分が濃縮されているため高濃度の農薬が一部の試料と接触し農薬が偏在する可能性が高く、また、アセトン浸漬試料と比べ、ヘキサン及び酢酸エチル浸漬試料は、溶媒留去時に突沸しやすいなど細心の注意と時間を要したため、実試料作製には不適と判断した。

以上の結果より、玄米粉体試料作製に用いる溶媒は、アセトンを採用することとした。

なお、溶媒留去において、減圧濃縮装置のロータリーエバポレーターに球形ガラスフィルターあるいはロータリージョイントを接続し、粉体の冷却部への吸い込みを防止した。その結果、溶媒の留去速度が低下するものの、粉末の飛散防止に高い効果があることがわかり、採用することで農薬の粉体試料への添加が可能となった。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合無し)

粉砕・粉末化した玄米(古米)に農薬(アセトン溶液)を添加し、乾燥した試料につき、1バッチ内の均質性について

評価した。

一元配置の分散分析の結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%点よりも大きく、1バッチ内の均質性は得られなかった(表1)。しかし、各農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g)に対する回収率は89~97%であり、添加した農薬は、バッチ内においては良好に玄米試料に移行したと考えられた(表1)。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合無有り)

の結果よりバッチ内において、玄米試料に対する添加農薬の濃度にばらつきが生じていることが明らかとなったため、これを均質にするために、農薬添加後の乾燥試料をロッキングミキサーにより回転・揺動を混合し、1バッチ内を均質とし、評価を行った。

その結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%点よりも小さく、ロッキングミキサーによる混合により、1バッチ内の試料は良好な均質性を得られることが明らかとなった(表2)。また、農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g)に対する回収率は88~101%であり、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率は1%であることから、いずれの農薬も玄米試料に良好に移行し添加されたと考えられた(表2、3)。

バッチ間の均質性の検討

の方法で1バッチ内の均質性が確認できたため、さらに複数バッチを同様の

方法で作製した場合のバッチ間の均質(同等)性を検討した。10個の粉体攪拌用フラスコを用いて繰り返し10回の操作により農薬添加粉末玄米試料を作製した。

その結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%点よりも小さく、10バッチの試料について良好な均質性が得られ、バッチ間の同等性が明らかとなった(表4)。

また、農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g)に対する回収率は89~98%であり、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率はいずれの粉体攪拌用フラスコ及び農薬で約1%以下であることから、添加農薬は10バッチにおいて玄米試料に良好に移行し高い再現性で添加されたと考えられた(表4、5)。

作製試料の各農薬測定結果は、いずれのバッチにおいても回収率に同様の傾向がみられ、バッチ間で玄米試料への農薬添加の状態に差異は認められなかった(図5)。

2) 枝豆

水10%を添加した枝豆ペーストに農薬混合標準液を添加し、ブrikサー5プラスを用いて混合した時の、1バッチ内の均質性及び5バッチ間の均質(同等)性を評価した。

各バッチ内の均質性について評価した結果、作製試料の各農薬測定結果は、バッチ(容器)内のいずれのサンプリング部位においても、回収率に同様の傾向がみられ、バッチ内の作製試料は均質であ

ることが明らかとなった(図6~9)。

5バッチ間の均質性について評価した結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%点よりも小さく、5バッチの試料について良好な均質性が得られ同等であることが明らかとなった(表6)。また、ダイアジノンについては基材由来の夾雑物の影響があり、ブランク試料を差し引いて算出したことから、他の農薬と比較して部位の違いによる回収率にばらつきがみられたが、農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン0.01 µg/g、クロルピリホス及びマラチオン0.3 µg/g、フェントロチオン0.5 µg/g)に対する回収率は82~104%であり、満足できる結果であった(表6)。今回の5バッチによる合計作製量は10 kgであるが、本作製操作を繰り返し行うことで、外部精度管理調査の実配付量を作製することが可能であると考えられた。

E. 結論

外部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質性及び調査期間中の濃度の安定性の確保は必須である。新たな基材を開発することも併せて必要であり、これらの事項を満たす調査試料の作製を目的とし、作製方法及び保存条件等を検討し、以下の結論を得た。

1. 玄米及び精米

新たに、固体試料である穀類の粉末試料を基材として、残留農薬検査のための試料作製を玄米及び精米のそれぞれ新米ならびに古米を用いて検討したところ、基材には玄米を使用し、保存は冷凍条件

下で行うことで、適用できることが示唆された。また、長期安定性を検討したところ、玄米試料については冷凍保存により作製後360日間でも添加したいずれの農薬で約80%以上の回収率が得られ、外部精度管理調査実施後の余剰試料を内部精度管理試料として使用が可能であると考えられた。同一ロット試料の提供期間は長い方が使用する上で管理しやすく、特に内部精度管理用試料には、長期安定性の確保は重要である。また、粉体攪拌用フラスコ、球形ガラスフィルター、ロータリージョイント及びロッキングミキサーを用いることで再現性の高いかつ作製工程で汚染のリスクを極力低減できる実配付量の作製が可能であることが示唆された。

2. 枝豆

枝豆ペーストを基材として試料作製を試みた結果、基材成分である水分を10%添加し均質な基材とした後、農薬を添加混合することで、良好な均質性が得られ、1バッチで2 kgの作製を同様の方法で複数バッチ繰り返し実施することで実配付量の枝豆ペースト試料の作製が可能であることが示唆された。

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

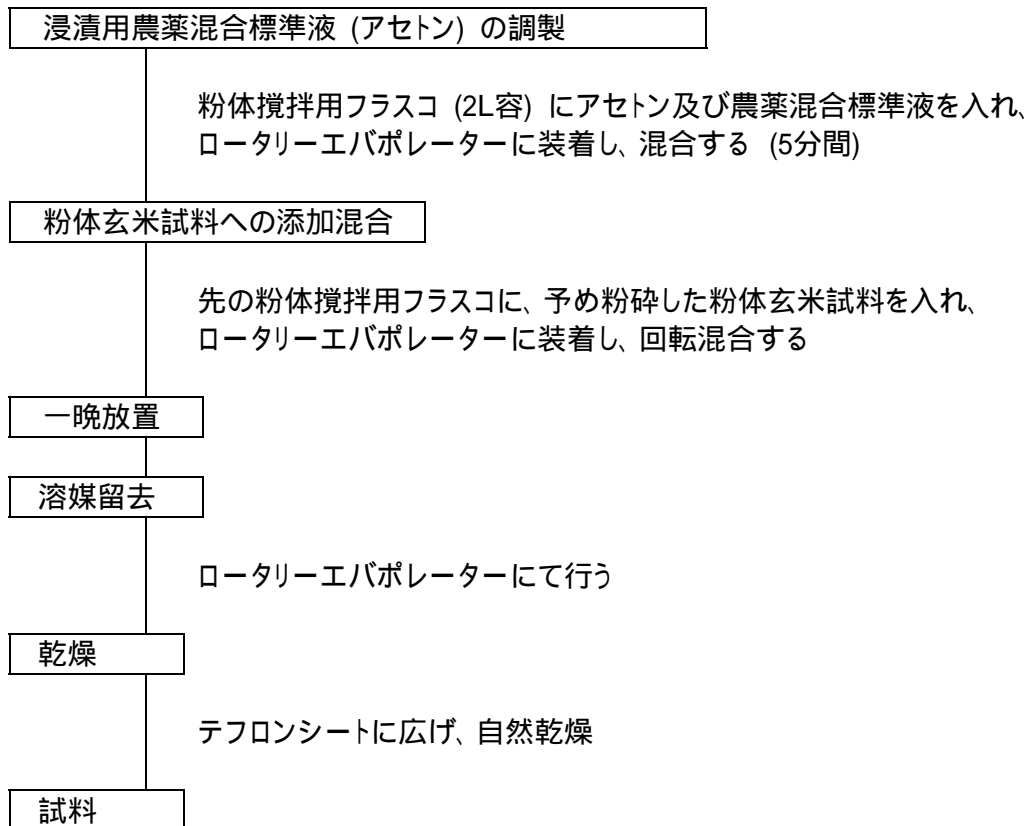


図1 粉体玄米試料への農薬の添加方法

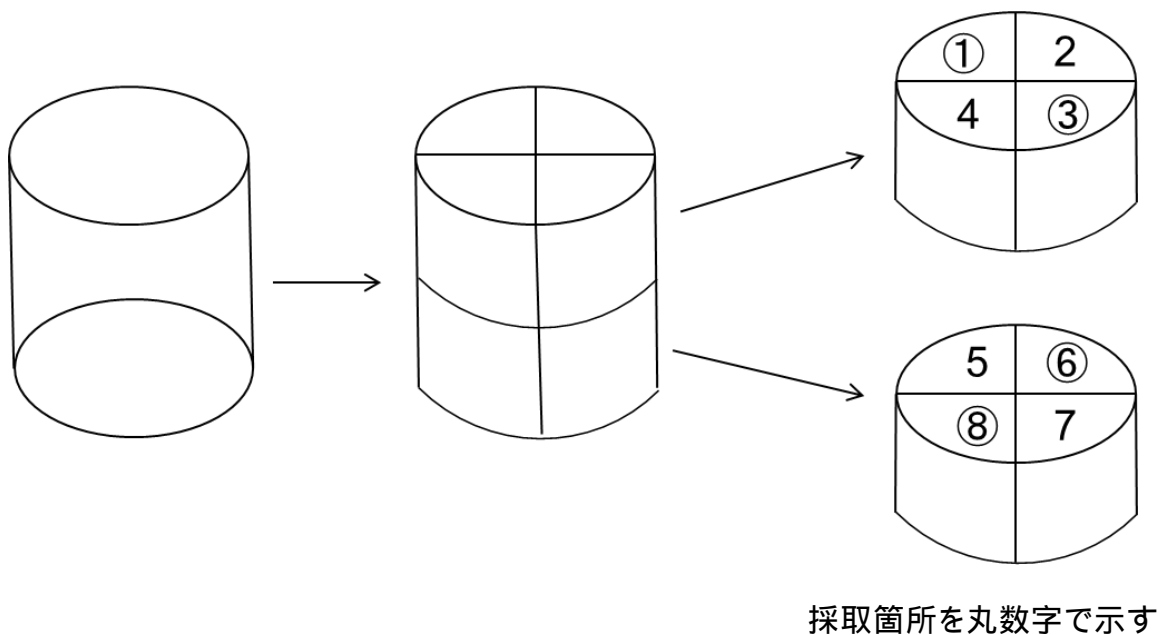


図2 ブリクサー5プラス容器 (1バッチ) 内試料採取箇所

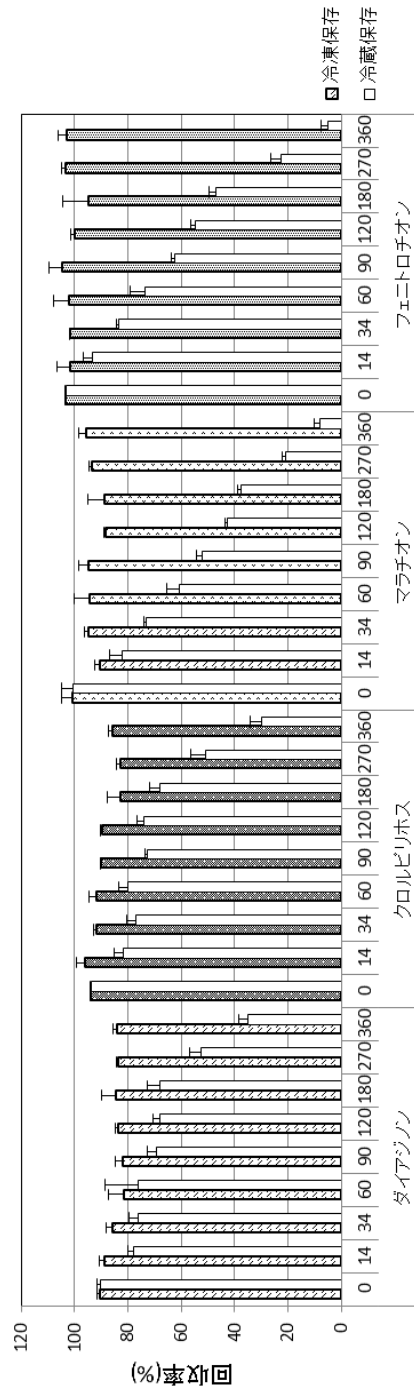


図3 精米(古米)に添加した各種農薬の冷凍及び冷蔵における回収率測定結果
(測定時点につき、各n=3)

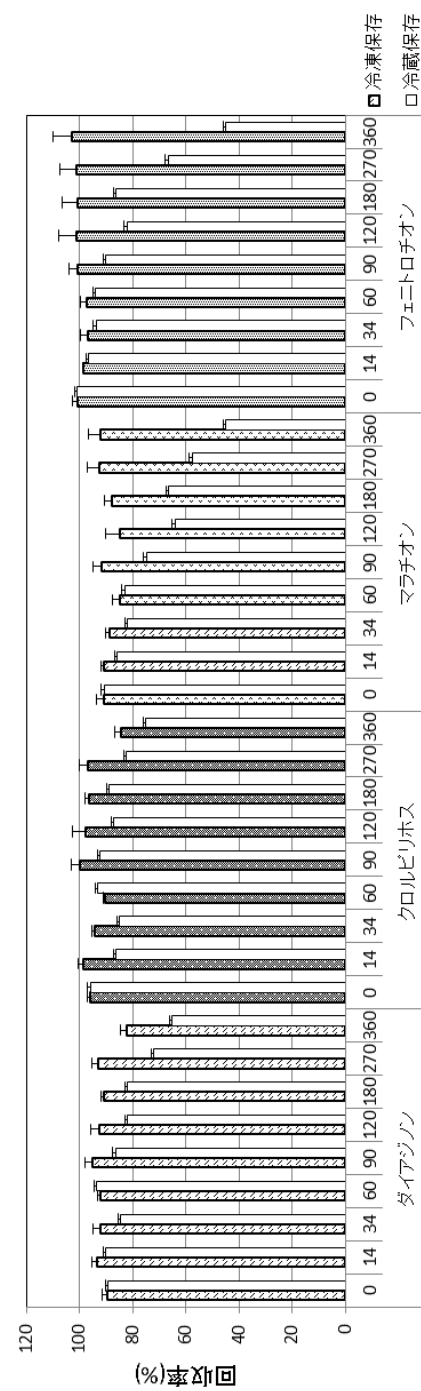


図4 玄米(古米)に添加した各種農薬の冷凍及び冷蔵における回収率測定結果
(測定時点につき、各n=3)

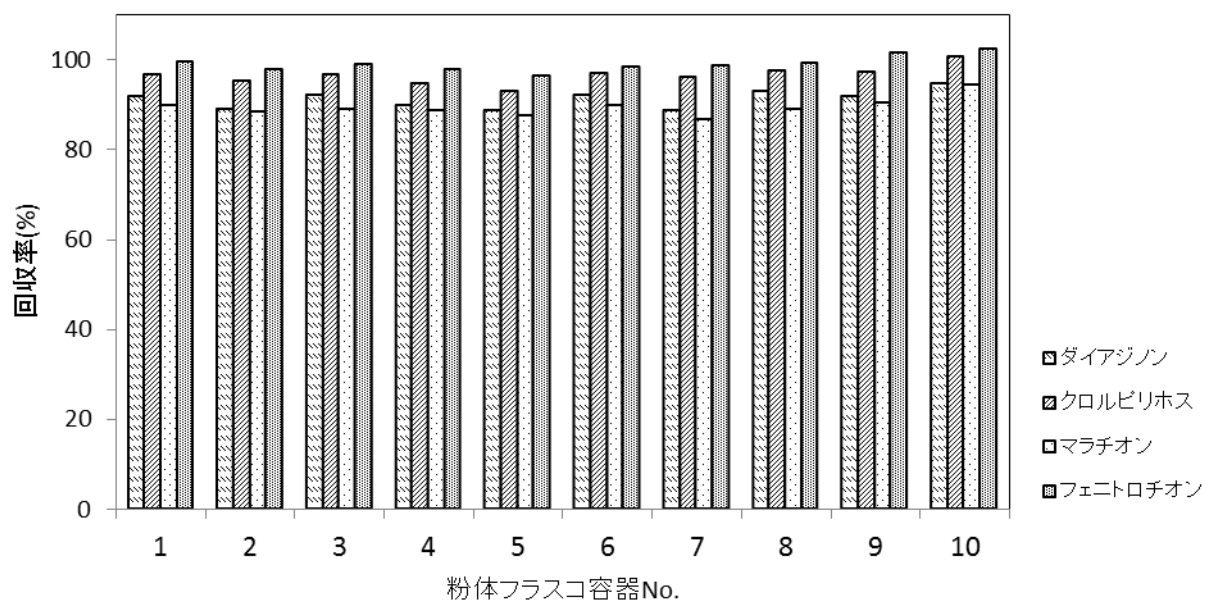


図5 粉体玄米試料への添加法によるバッチ間のばらつき評価
(n=2/容器)

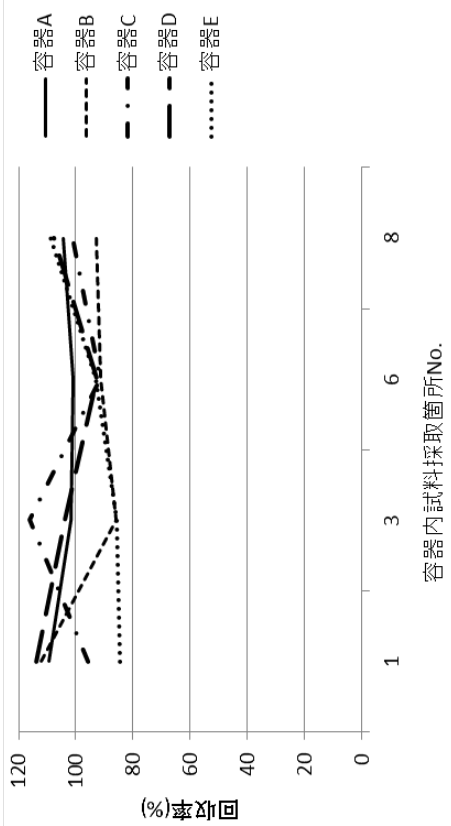


図6 枝豆ペーストのバッチ間の均質 (同等)性:ダイアジノン
(添加濃度 0.01 µg/g)

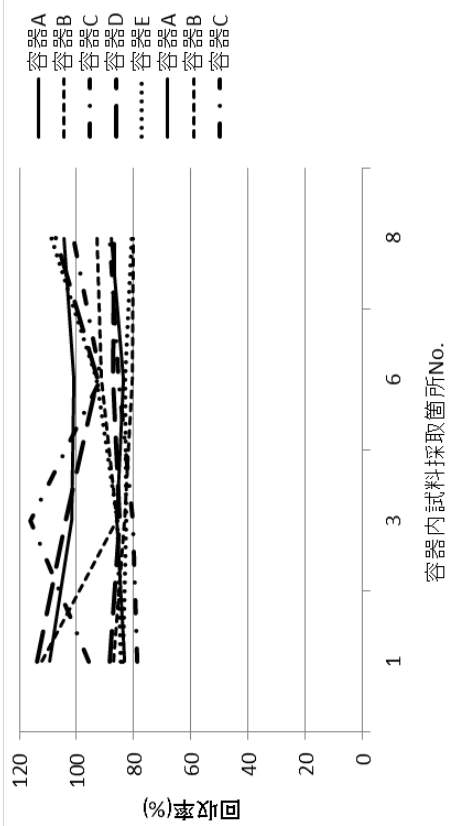


図7 枝豆ペーストのバッチ間の均質 (同等)性:クロルピリホス
(添加濃度 0.3 µg/g)

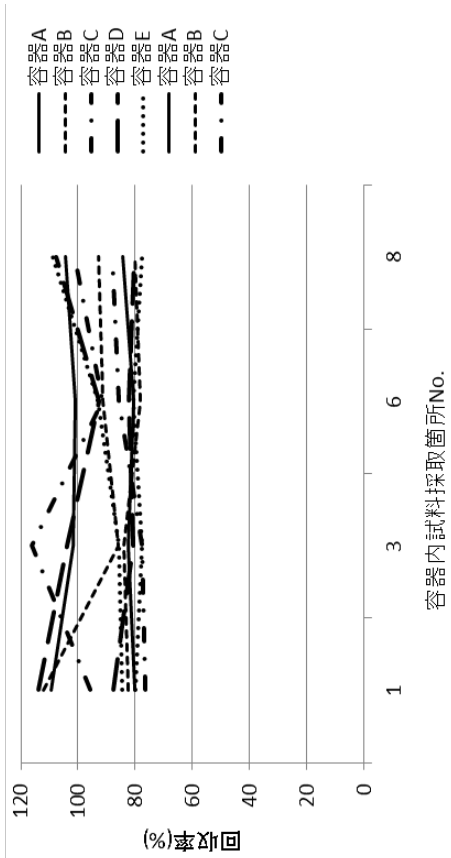


図8 枝豆ペーストのバッチ間の均質 (同等)性:マラチオン
(添加濃度 0.5 µg/g)

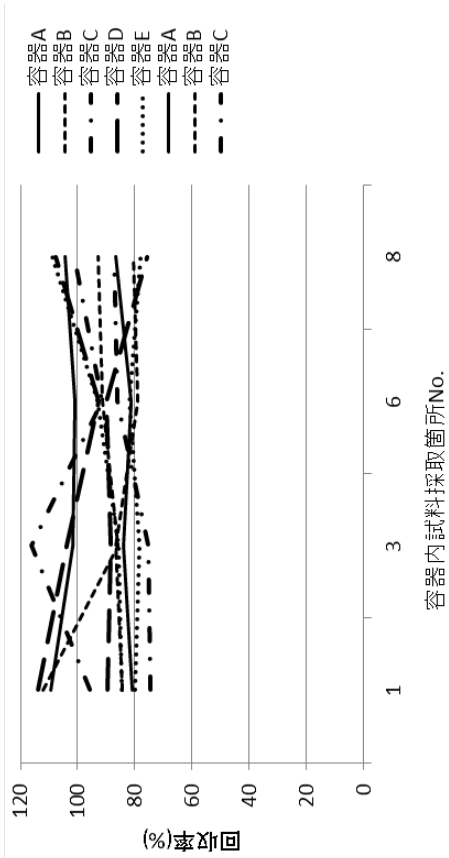


図9 枝豆ペーストのバッチ間の均質 (同等)性:フェニトロチオン
(添加濃度 0.5 µg/g)

表1 粉体玄米試料への添加法（回転・揺動混合無し、1バッチ）による均質性確認結果

[一元配置分散分析(F検定)]

添加農薬	平均値 (μg/g)	RSD (%)	回収率(%)	F値
ダイアジノン	0.0917	11.6	91.7	8.341
クロルピリホス	0.0944	7.91	94.4	13.413
マラチオン	0.0891	6.09	89.1	6.150
フェニトロチオン	0.1944	4.96	97.2	3.817

10試料につき各n=2

F境界値：3.020

表2 粉体玄米試料への添加法（回転・揺動混合有り、1バッチ）による均質性確認結果

[一元配置分散分析(F検定)]

添加農薬	平均値 (μg/g)	RSD (%)	回収率(%)	F値
ダイアジノン	0.0930	1.96	93.0	2.641
クロルピリホス	0.0960	2.19	96.0	2.623
マラチオン	0.0878	3.18	87.8	1.755
フェニトロチオン	0.2010	1.59	100.5	1.823

10試料につき各n=2

F境界値：3.020

表3 粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率（1バッチ）

添加農薬	農薬残存率 (%)
ダイアジノン	0.7
クロルピリホス	0.8
マラチオン	0.7
フェニトロチオン	0.7

$$\text{農薬残存率}(\%) = \frac{\text{粉体フラスコ内壁面への残存量}(\mu\text{g})}{\text{粉体フラスコ1個当たりの添加量}(\mu\text{g})} \times 100$$

表4 粉体玄米試料への添加法（回転・揺動混合有り、10バッチ）による均質性確認結果

[一元配置分散分析(F検定)]

添加農薬	平均値 (μg/g)	RSD (%)	回収率(%)	F値
ダイアジノン	0.0904	3.41	90.4	1.799
クロルピリホス	0.0954	3.54	95.4	1.968
マラチオン	0.0893	2.74	89.3	1.606
フェニトロチオン	0.1954	2.73	97.7	2.289
10バッチにつき各n=2			F境界値：3.020	

表5 粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率（10バッチ）

粉体攪拌用フラスコNo.	農薬残存率(%)			
	ダイアジノン	クロルピリホス	マラチオン	フェニトロチオン
1	0.9	0.9	1.0	0.9
2	1.1	1.1	1.1	1.1
3	0.8	0.9	0.9	0.9
4	1.0	1.0	1.0	1.0
5	0.6	0.6	0.7	0.6
6	1.1	1.1	1.3	1.2
7	0.6	0.6	0.7	0.6
8	0.7	0.7	0.8	0.7
9	0.7	0.7	0.8	1.0
10	0.5	0.5	0.6	0.6
平均値 (%)	0.8	0.8	0.9	0.9

$$\text{農薬残存率}(\%) = \frac{\text{粉体フラスコ内壁面への残存量}(\mu\text{g})}{\text{粉体フラスコ1個当たりの添加量}(\mu\text{g})} \times 100$$

表6 枝豆ペーストをブリクサー5プラスを用いて作製したバッチ間の同等性検討結果

[一元配置分散分析(F検定)]

添加農薬	平均値 (μg/g)	RSD (%)	回収率(%)	F値
ダイアジノン	0.0104	9.40	104.1	1.065
クロルピリホス	0.2556	3.54	85.2	1.875
マラチオン	0.2457	4.03	81.9	0.683
フェニトロチオン	0.3965	6.16	83.6	0.424

5バッチにつき各n=4

F境界値：3.055

平成 28 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）
検査機関の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

食品衛生外部精度管理調査用適正試料の作製検討と
信頼性確保に関する研究（その 2）

- 一般細菌数測定検査用調査試料の改良に関する検討 -

研究代表者	渡辺 卓穂	（一財）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	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	山田 健一	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	梶原三智香	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

研究要旨

これまで一般細菌数測定検査で運用している寒天を用いた試料では、試料を分取する際にフィルター付き検体袋を使用する場合、メーカーによってはストマッカー処理後の破砕された試料の一部がトラップされ、寒天に内包された試験菌がフィルターを通過できずに試験結果に影響する可能性が高いことが示唆されたことから、早急に対応する必要があった。そのため、一般細菌数測定検査用試料における新規基材の開発を行うこととした。

寒天に代わる試料として、見立て食材を「氷菓」とし、ゼラチンを用いた試料を検討した。ゼラチンを用いた試料の生菌数は 28 週間の安定性が確保され、フィルター付き検体袋のメーカー間でのばらつきが低く、併せて検体袋のフィルター内外での差も低かった。

実際に 2017 年度の外部精度管理の試料として配付した際の参加機関から回収した報告値の基本統計量は、外れ値を除いた場合の標準偏差および変動係数の数値が寒天状基材と比較すると大幅に低くなった。また、アンケートの集計結果ではゼラチンを溶解してから試験に供する操作が可能かよくわからず、操作が煩雑になったといった意見が数件見られた。

以上のことから、寒天試料に代わる試料としてゼラチン試料は有用であるが、運用にあたっては溶解してから試験に供する旨を明文化する必要があると考えられた。

A. 研究目的

新たに定量試験（一般細菌数）の新規調査用試料としてゼラチン試料の検討について実施した。

外部精度管理の参加機関へのこれまでのアンケート結果から、フィルター付き検体袋を用いた場合に、結果のばらつきが目立つこと、また数値のばらつく参加機関が使用するフィルター付き検体袋に一定の傾向が確認されたことから、それらのメーカーのフィルター付き検体袋を用いて生菌数測定を実施したところ、寒天試料に内包された試験菌がフィルターを通過できず、試験溶液がフィルター内外で均一になっていない可能性が高いと示唆された。

また、検体袋のメーカーに個別に確認したところ、ほぼ全てのメーカーにおいて検体袋に使用する不織布に明確な基準がないことが判明した。

これらのことから、フィルターを通過できる寒天試料を検討するより、液体で試験操作できる見立て食材を検討する方が妥当であると考え、見立て食材を「氷菓」として、冷蔵から室温の環境変化で固体から液体に溶解するゼラチンを用いた試料を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 試験菌株

試験菌株は、市販の枯草菌芽胞液（栄研化学）を使用した。

2. ゼラチン試料の濃度

ゼラチン試料の濃度は、冷蔵、固形の状態から 24 前後（室温を想定）で 1 時間程度で完全に溶解し、液体になる濃度を検討した。

ゼラチン濃度を 1% から 5% まで 5 段階に振り、寒天試料の寒天をゼラチンに代えて調製した。これを 121 40 分間で高圧蒸気滅菌処理した後、5 以下で 1 晩以上冷蔵した。

冷蔵後、完全に固化したゼラチンを 24 前後の室温に放置し、1 時間ごとに基材形状の経過観察を実施した。

3. ゼラチン試料の安定性の検討

前項で決定したゼラチン濃度で試料を 10 本作製し、寒天試料と同様に、最終濃度が $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ CFU/mL 相当となるように試験菌を接種した。接種後、ゼラチン試料の生菌数の経時的变化を観察し、接種直後からの増減を確認した。なお、経時変化は接種から 28 週間後（約 4 ヶ月）とした。

なお、ゼラチン試料は室温で溶解したことを確認してから 10mL をフィルターなしの検体袋に秤量し、ペプトン食塩緩衝液で 10 倍段階希釈して生菌数測定に供した。

4. ゼラチン試料でフィルター付き検体袋を用いた場合の影響の検討

前項と同様に試料を 10 本作製し、試験菌を接種したゼラチン試料を用いて、フィルターなしの検体袋およびフィルター付き検体袋で生菌数測定を実施した。フィルター付き検体袋は、これまでの外部精度管理調査結果からばらつきが比較的少ないもの（A 社製）と多いもの（B 社製）の 2 種を使用した。

また、フィルター付き検体袋については、ストマッカー 1 分処理の後、検体とペプトン食塩緩衝液を投入した側（フィルター外部）とピペットを挿入する側（フィルター内部）の 2 点について生菌数測定を実施した。

5. 外部精度管理調査試料としての運用

2017年度の外部精度管理で実際にゼラチン試料を運用し、前年度の寒天試料との比較および参加機関からのアンケート集計を実施した。これらの結果から、改善点を考察した。

C.D. 研究結果及び考察

1. ゼラチン試料の濃度

表1に5種のゼラチンの濃度で調製したゼラチン試料を冷蔵後、室温（24前後）にて放置し経過観察した結果を示した。ゼラチン1%および2%では冷蔵しても固形にならなかった。また、4%では1時間後に溶解しているものの、若干粘土が高い状態であり、5%では1時間後では半固形の状態であったことから、1時間後に液状化している条件に当てはまらないと判断した。

以上のことから、ゼラチン濃度は3%として以降の検討を実施することとした。

2. ゼラチン試料の安定性の検討

表2にゼラチン試料10本の生菌数平均値の経時的変化、併せて各測定時の標準偏差、変動係数および冷蔵から取り出した直後の外観を示した。

生菌数は接種直後（0週）から28週目まで殆ど変動することがなかったため、安定であると判定した。また、変動係数も0.05から0.07の間にあり、検体間のばらつきも非常に少ないと考えられた。

併せて、冷蔵保管中にゼラチンが変性して液状に変化することもなかったことから、安定性に特に問題はないと考えられた。

3. ゼラチン試料でフィルター付き検体袋を用いた場合の影響の検討

表3にゼラチン試料10本についてフィルターなし検体袋、2社のフィルター付き検

体袋を用いて生菌数測定を実施した結果を示した。

フィルターなし検体袋の生菌数平均値を100%とした場合のフィルター付き検体袋の各生菌数測定値の比率は80%以上であり、フィルターなし検体袋の生菌数とほぼ同等であると評価できる結果となった。

また、各項目の変動係数も0.1以下と低い数値であることから、フィルター付き検体袋を用いることによる生菌数への影響は低減化できると示唆された。

4. 外部精度管理調査試料としての運用

表4に2015年度および2016年度の外部精度管理調査の統計結果を示した。フィルター付き検体袋を使用する参加機関が大半である状況は2015、2016年度とも変わらないにもかかわらず、2016年度の方が変動係数が低くなったことから、実際の運用からもゼラチン試料の方がフィルター付き検体袋の影響が生菌数結果に反映されにくいことが明らかとなった。

しかしながら、アンケート結果を集計したところ、ゼラチン試料を氷菓と同様に溶解操作できると明言されていなかったため、半固体の状態で無理やりピペットで10mL秤量した、試験中にだんだん液体になって操作しにくかった、氷菓は液状での操作となっているが固体なので仕方なく重量で秤量した、などの意見が見られた。氷菓と同じ操作で試験ができるので良い、といった意見もあったことから、溶解操作について明文化することで混乱を避ける必要があると考えられた。

E. 結論

ゼラチン試料は安定性に問題なく、参加機関の使用する器材による試験結果への影

響も少ない点で寒天試料より一般細菌数用の試料として優れていると考えられた。また、実際の運用時に取扱いについて若干の補足を加えることで、外部精度管理調査用の試料としての品質をさらに向上できると考えられた。

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 ゼラチン試料のゼラチン濃度の検討

ゼラチン濃度	0 時間後	1 時間後	2 時間後	3 時間後	4 時間後	5 時間後
1%	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)
2%	液状 粘性(+)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)
3%	横倒しで壁面に固着した状態を保てる(弱)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)
4%	横倒しでも動かない	液状 粘性(+)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)
5%	横倒しでも全体が固い感じで動かない	固形、横倒しで崩れる	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)	液状 粘性(-)

試料を高圧蒸気滅菌処理後、1 晩以上冷蔵保管したものをを用いた。

表2 ゼラチン試料 生菌数平均値の経時的変化

保管期間(週)	生菌数	標準偏差	変動係数	外観
0	1.7×10^4	1.00×10^3	0.0588	
4	1.5×10^4	1.00×10^3	0.0667	固形
8	1.6×10^4	1.00×10^3	0.0625	固形
12	1.9×10^4	1.00×10^3	0.0526	固形
16	1.9×10^4	1.00×10^3	0.0526	固形
20	1.8×10^4	1.00×10^3	0.0556	固形
24	1.8×10^4	1.00×10^3	0.0556	固形
28	1.8×10^4	1.00×10^3	0.0556	固形

生菌数の単位：CFU/mL

ゼラチン試料 10 本の平均値を示した。

0 週目は冷蔵前で液状であることから、比較対象から除外した。

表3 フィルター付き検体袋のゼラチン試料への影響

試験項目	生菌数	標準偏差	変動係数	回収率(%)
フィルターなし	3.2×10^4	2.00×10^3	0.0625	
フィルター(A): 内側	2.7×10^4	1.00×10^3	0.0370	84.4
フィルター(A): 外側	2.6×10^4	2.00×10^3	0.0769	81.3
フィルター(B): 内側	2.6×10^4	1.00×10^3	0.0385	81.3
フィルター(B): 外側	2.8×10^4	2.00×10^3	0.0714	87.5

生菌数の単位：CFU/mL

ゼラチン試料 10 本の平均値を示した。

フィルター(A)：ばらつきの少ないメーカー、フィルター(B)：ばらつきが多いメーカー
試料を入れる側をフィルター外側、ピペットを挿入する側をフィルター内側と表記した。
フィルターなしの生菌数を 100%とした場合の回収率を示した。

表4 外部精度管理調査 一般細菌数統計結果

実施年度	参加機関数	フィルター付検体袋 使用機関数	生菌数	標準偏差	変動係数
2015 年度	351	328	30026.26 /g	9237.82	0.3077
2016 年度	337	258	26478.34 /mL	4089.01	0.1544

2016 年度は平均値から大きく外れた 2 機関を除外した 2シグマ処理後の統計値を転載した。
2015 年度は寒天基材、2016 年度はゼラチン基材を用いた試料を配付した。

平成 28 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）

検査機関の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

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検討

研究代表者 渡辺 卓穂 （一財）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 （一財）食品薬品安全センター 秦野研究所 室長
佐藤 夏岐 （一財）食品薬品安全センター 秦野研究所 研究員
若栗 忍 （一財）食品薬品安全センター 秦野研究所 研究員
久保田 佳子（一財）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、えび、かに）については食品への表示が義務付けられており、検査法が消費者庁から通知されている。特定原材料検査の検査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必要であり、その実施に向けて検討を行っている。特定原材料の中でも、特に卵タンパク質を測定対象とした外部精度管理調査については、平成 24 年度に 42 機関を対象に既に実施済みである。しかし、この調査は現在発出されている通知試験法とは異なる ELISA キットを用いて行われたため、これまで開発してきた卵タンパク添加試料が新規 ELISA キットに適用可能であるか不明であった。そこで、本年度は卵タンパク質添加試料について、通知法改正後の ELISA キットに適用可能かを評価した。さらに、平成 24 年度に行った外部精度管理調査に参加した地方衛生研究所を中心に 29 機関に参加を募り、参加を希望した 18 機関を対象に定量検査における外部精度管理調査を試験的に実施した。外部精度管理調査試料として 2 種類の基材（ベビーフードおよびかぼちゃペースト）に卵タンパク質を 10 $\mu\text{g/g}$ となるように添加した試料を調製し、それぞれの均質性を確認後、参加機関に配付した。なお、測定には消費者庁から提示されているキットから 2 種類を用いるよう依頼した。測定結果は試料ごと、測定キットごとにまとめ、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、添加回収試験における回収率を指標とした管理図についてもあわせて解析を行った。その結果、いずれの調査試料においても z-スコアが 2 以上の検査機関が 1~2 機関認められたが、いずれも z-スコアの絶対値は 3 未満であった。しかし、これらの検査機関について添加回収率を指標とした評価を行ったところ、全ての検査機関において管理限界線の範囲内であった。一方 R 管理図では試料 1 および試料 2 において 1 機関で限界外となった。

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月にアレルギー物質を含む原材料24品目について、食品への表示が推奨された。そのうち卵、乳、小麦、そば、落花生、平成20年に追加されたえび、かにの7品目は特定原材料と指定され、食品への表示が義務付けられている。これら特定原材料はいずれも検査法が通知されているため、検査の精度の適正化および向上のため外部精度管理を実施することが望ましいと考えられる。

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)が発出され、その後、食品衛生法に基づく表示の所管が消費者庁に移管された事に伴い、消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(消食表第286号、平成22年9月10日)および消費者庁食品表示課事務連絡「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(参考)」(平成22年9月10日)が発出された。さらに近年、通知法の一部が改正され、特定原材料の定量検査法であるELISA法に用いる抽出用緩衝液および標準品の組成が一部変更されたことに伴って〔毒物である2-メルカプトエタノール(2ME)が亜硫酸ナトリウムに変更された〕(消食表第36号、平成26年3月26日)、現在は「アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン」における定量検査法の評価基準を満たしたキットが各社から販売されている。

我々は昨年度までに特定原材料7品目すべてについて外部精度管理調査試料の調製

を検討し、落花生を除く6品目についてELISA法による定量検査法に対応可能な試料の試作を完了している。このうち、卵、乳、甲殻類(えび、かに)については検査機関の協力のもと、実際にELISA法による測定を対象とした外部精度管理調査の模擬試験を小規模で実施し、外部精度管理調査試料の妥当性、報告値の妥当性、検査手法の問題点等について検討を加えてきた。さらに、卵については外部精度管理調査の事業化に向けて、より大規模での模擬試験を実施済みである(平成24年度報告書参照)。しかし、これらの試料は、通知法改正前のELISAキットを用いて検討、開発したものであるため、通知法改正後のELISAキットにおいても適用可能かどうかを確認する必要があった。

そこで、本年度は卵添加試料の定量検査における外部精度管理調査に向けて、通知法改正後のELISAキットを使用して測定したデータを通知法改正前の過去のデータと比較することで、その適用性を評価した。さらに、ラージスケールで試料作製を行い、卵タンパク質添加試料を用いた外部精度管理調査を計画、実施したので報告する。

B. 研究方法

1. 基材

かぼちゃペースト(市販品)および特定原材料を含まないとして市販されているベビーフードの2種類を卵タンパク質添加用基材として使用した。これらについては、ELISA法により、あらかじめ卵を含まないことを確認した。

2. 添加用卵タンパク質溶液の調製

全卵または鶏卵加工品として市販されている乾燥全卵粉末を注射用水（光製薬）で希釈し、添加用卵タンパク質溶液とした。基材への添加量は、2-D Quant Kit（GEヘルスケアバイオサイエンス）による卵タンパク質の測定値に基づいて決定した。

3. 外部精度管理調査試料の調製

1) 通知法改正前および通知法改正後のELISAキットにおける適用性確認用試料の調製

全卵添加試料および乾燥全卵添加試料の2種類を各基材について作製した。

各基材を50 mL遠沈管に1 gずつ秤量し、添加用卵タンパク質溶液をそれぞれ10 µg/gとなるように加えた。パラフィルムを巻いた後、使用するまで-20℃で凍結保存した。

2) 外部精度管理調査試料の調製

乾燥全卵添加試料を各基材について作製した。各基材に添加用卵タンパク質溶液をそれぞれ10 µg/gとなるように加え、ロボ・クーブブリクサー5プラス（エフ・エム・アイ）で均質化して試料を作製した（2 kg）。それぞれの試料はいずれも遠沈管80本に約10 gずつ分注し、パラフィルムを巻いた後、-20℃で凍結保存した。ベビーフード試料を試料1、かぼちゃペースト試料を試料2とし、均質性および安定性はこれらの試料を用いて確認を行った。

4. 通知法改正前および通知法改正後ELISAキットにおける卵タンパク質添加試料の適用性評価

通知法改正前のELISAキットによる回収率のデータは平成24年度に行った外部精度管理調査における均質性の結果を示した。各測定データは以下のELISAキットを使用

して測定したものであり、通知法改正前と通知法改正後のELISAキットにおける各試料の回収率を比較し、両者にどの程度の乖離が見られるかを確認することで評価した。

通知法改正前ELISAキット

- ・モリナガ FASPEK エライザ卵（森永生化学研究所）
- ・FASTKIT エライザ Ver. II シリーズ卵（日本ハム）
- ・アレルゲンアイ ELISA シリーズ卵（プリマハム）

通知法改正後ELISAキット

- ・モリナガ FASPEK エライザ II 卵（森永生化学研究所）（以下、モリナガキット）
- ・FASTKIT エライザ Ver. III シリーズ卵（日本ハム）（以下、日本ハムキット）
- ・アレルゲンアイ ELISA II シリーズ卵（プリマハム）（以下、プリマハムキット）

5. 外部精度管理調査試料の均質性および安定性の検討

均質性の確認は、試料の作製直後と発送前の2時点について行った。調査試料のそれぞれについて10容器からn=1でサンプリングして、ELISA法による卵タンパク質濃度の測定を行い、平均値、標準偏差、変動係数を算出した後、濃度平均値から添加量に対する回収率を求め、2時点におけるこれらの値をそれぞれ比較することで均質かどうかを判断した。また、試料作製から調査期間終了までに定期的に試料を測定し（0日目、34日目、69日目、92日目、126日目および194日目、0日目および92日目はn=10、その他はn=4）、安定性を0日目における濃度に対する割合として算出し確認した。

なお、均質性および安定性はモリナガキ

ット、日本ハムキットおよびプリマハムキットの3種類のELISAキットについて測定した結果を示した。

使用キットの使用期限の関係でロットが切り替わる際には、古いロットと新しいロットのキットを用いて同一試料の回収率を比較し、問題が無いことを確認した後使用した。また、吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダーEL 808IU、および計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver.1.80 (Bio-Tek Instruments, Inc.) を使用した。

6. 外部精度管理調査の実施

平成24年度に実施した外部精度管理調査の参加機関を対象に、地方衛生研究所を中心とした29機関に外部精度管理調査への参加を募った結果、18機関が参加の意向を示した。そのため、平成28年11月8日にこれら18機関に対して2種類の試料と報告書書式を宅配便(冷凍)にて送付した。なお測定には、消費者庁食品表示課事務連絡「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(参考)」に記載されている卵測定用キット3種(FASPEK エライザII卵、FASTKIT エライザ Ver. III シリーズ卵、アレルギーアイ ELISA II シリーズ卵)のうち、任意の2種類を使用し、測定法は測定キットのプロトコール通り、サンプリング数は1試料につき2抽出、ELISA測定は1抽出につき3ウェル併行とした。また、報告書の回収期限は平成28年12月9日とした。

7. 外部精度管理調査結果の解析

参加機関から回収した報告値は、消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」の別紙5「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイ

ドライン」の4.「特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言」に「免疫化学反応に基づく定量法では、用いる抗体により定量値が異なることが予想される」とあることから、試料別、測定キット別に集計した。次にこのデータを統計解析システム JMP (SAS Institute Japan 株式会社) を用い、Xbar-R 管理図を代用した解析を実施した。なお、Xbar 管理図の管理限界線の値は(ロバスト平均値 \pm ロバスト平均値 \times 50%)とした。これは、前述したガイドラインの4.の提言にタンパク質の回収率が「50%以上、150%以下であること」と記載されていることから、キットの測定誤差の範囲についてもこれ以下と考えられることによるものである。なお、添加回収率についてはこれまでの経験上、用いるキットにより異なる可能性があることから、各試料およびキットごとに算出したロバスト平均値を付与値とした解析を行うこととした。

ロバスト方式の統計は、Huber の proposal 2 の推定方式による統計をエクセル・マクロによるプログラム〔作成：システムサポート、大隅昇〕により行い、得られたロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いて z-スコアを算出した。さらに、アンケート結果についてもとりまとめ、検討を加えた。なお、今回の外部精度管理調査でモリナガキットを使用した機関は18機関、日本ハムキットを使用した機関は18機関、プリマハムキットを使用した機関は0機関であった。

(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. 通知法改正前および通知法改正後の ELISA キットによる卵タンパク質添加試料の適用性評価

通知法改正前および通知法改正後の ELISA キットによる卵タンパク質添加試料の回収率の結果を図 1 に示した。

全卵添加試料について、ベビーフード試料およびカボチャペースト試料共に、通知法改正前のデータは各社キット間でばらつきがあるものの、約 90~105%と良好な回収率が得られた。これに対し、通知法改正後のデータは改正前よりも測定値が低いものの 80%前後の良好な回収率が得られた。但し、各社キット間でばらつきがほとんどなかった点では改正前におけるデータと異なった。

また、通知法改正後のキットについては、全卵添加試料だけでなく、卵タンパク質を乾燥全卵粉末に変更した試料の回収率についても検討した。これは、乾燥全卵粉末は全卵よりも扱いやすく、長期保存が可能なたため、安定した品質の外部精度管理調査試料を作製できると考えたためである。その結果、乾燥全卵添加試料は全卵添加試料よりも高い回収率が得られ、約 85~105%と良好であった。ただし、全卵添加試料は 3 種類のキット間で回収率がほとんど変わらなかったのに対し、乾燥全卵添加試料ではプリマハムキットの回収率が他の 2 種類のキットよりも高めに得られた。この傾向は、ベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料のいずれでも同じであった。

以上より、通知法改正後の ELISA キットで測定した卵タンパク質添加試料の回収率は、全卵添加試料および乾燥全卵粉末添加試料共に 80~110%の範囲内と良好であり、検討に用いた試料が同一でないため単純比較することはできないものの、通知法改正前の回収率と大きく乖離しなかったことから、通知法改正後の ELISA キットでもこれまで作製してきた卵タンパク質添加試料が適用可能であることが示された。

なお、これ以降の検討はより高い回収率が得られた乾燥全卵粉末添加試料について行った。

2. 外部精度管理調査試料の均質性

調査試料の均質性の結果を表 1 に示した。試料作製直後 (0 日目) と発送前 (92 日目) の添加量に対する回収率および変動係数をキットの種類ごとに比較すると、回収率、変動係数共に大きな相違は認められず、回収率では最大で 6.7%、変動係数では最大で 0.023 の変動幅であった。これらの変動幅は測定誤差の範囲内と考えられたために、作製した試料は均質であると判断した。ただし、測定値は測定キットごとに特徴的な回収率を示した。プリマハムキットでは約 110%台と高めの値を示したのに対し、モリナガキットでは約 80~90%、日本ハムキットでは約 75~85%と低めの回収率を示し、この傾向は試料が異なっても同様であった。

3. 外部精度管理調査試料の安定性

試料作製から調査期間終了までに定期的に試料を測定し (0 日目、34 日目、69 日目、92 日目、126 日目および 194 日目、0 日目および 92 日目は n=10、その他は n=4 で測定)、特に、外部精度管理調査試料発送前の安定性は 92 日目、調査期間終了後の安定性

は 194 日目に確認した(図 2)。

その結果、試料 1 および試料 2 の安定性は共に変動はあるものの 90%~110%の範囲内であった。特に試料配付前と調査期間終了後では若干の低下がみられたものの、試料 1 および試料 2 のいずれにおいても全てのキットで安定性の変化率が 10%以内であったことから測定誤差の範囲内と考えられた。従って、卵タンパク質添加試料 1 および試料 2 については 194 日目までの長期安定性が確認できた。なお、これらの結果から今回作製した試料は安定であり、外部精度管理試料として採用できるものと判断した。

4. 外部精度管理調査結果(回収データの分布)

参加機関の測定値を試料別かつ測定キット別に集計し集計結果を表 2 に示した。また、データ分布を図 3 に示した。モリナガキットと日本ハムキットの測定値の分布について比較すると、わずかに日本ハムキットのほうが分布範囲が狭い傾向にあり、変動係数で比較するとモリナガキットが 0.08~0.1、日本ハムキットが 0.06~0.07 と日本ハムキットのほうがわずかに小さかった。また、同一試料のキット間差は試料 2 のほうが大きかった。

5. キット別集計結果

1) モリナガキット

(1) 試料 1 の解析結果

モリナガキットを用いて測定した 18 機関の試料 1 における統計量を表 3 (左側) に示した。また、回収した報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 4 に、Xbar-R 管理図を図 5 に示した。Xbar 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかつ

たが、R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が 1 機関あった。

全 18 機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は $9.694 \pm 0.963 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 1 機関であり、絶対値が 3 以上の機関はなかった(図 6) ことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

(2) 試料 2 の解析結果

モリナガキットを用いて測定した 18 機関の試料 2 における統計量を表 3 (右側) に示した。また、回収した報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 7 に、Xbar-R 管理図を図 8 に示した。Xbar 管理図で管理限界線の範囲を超えたデータはなかったが、R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が 1 機関あった。

全 18 機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は $9.136 \pm 0.750 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 2 機関であり、絶対値が 3 以上の機関はなかった(図 9) ことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

(3) ELISA 測定における吸光度の変動係数

モリナガキットの ELISA 測定の併行精度を、併行実施した 3 ウェルの吸光度の変動係数を指標として検討した。その結果、ほとんどの検査機関で変動係数は 0.05 未満であった(図 10)。これに対してコード番号 1 の機関では他の検査機関と比較すると高い変動係数を示した。また、試料 1 ではコード番号 8、12 および 16 で抽出間での変動係数の差が大きい傾向にあった。同様に試料 2 ではコード番号 1、8、17 および 18

で抽出間での変動係数の差が大きい傾向にあった。

2) 日本ハムキット

(1) 試料 1 の解析結果

日本ハムキットを用いて測定した 18 機関の試料 1 における統計量を表 4 (左側) に示した。また、回収した報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 11 に、Xbar-R 管理図を図 12 に示した。Xbar 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が 1 機関あった。

全 18 機関のロバスト平均値 \pm ロバスト標準偏差は $8.893 \pm 0.553 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 2 機関であり、絶対値が 3 以上の機関はなかった (図 13) ことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

(2) 試料 2 の解析結果

日本ハムキットを用いて測定した 18 機関の試料 2 における統計量を表 4 (右側) に示した。回収した報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 14 に、Xbar-R 管理図を図 15 に示した。Xbar 管理図、R 管理図の両者において管理限界線の範囲を超えた機関はなかった。

全 18 機関のロバスト平均値 \pm ロバスト標準偏差は $8.003 \pm 0.522 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 1 機関であり、絶対値が 3 以上の機関はなかった (図 16) ことから、明らかな異常値ではないと考えられた。

(3) ELISA 測定における吸光度の変動係数

日本ハムキットの ELISA 測定の併行精度

を、併行実施した 3 ウェルの吸光度の変動係数を指標として検討した。その結果、ほとんどの検査機関で変動係数は 0.05 未満であった (図 17)。これに対して試料 1 ではコード番号 4 の抽出 2 において、試料 2 ではコード番号 2 の抽出 2 においてそれぞれ変動係数が 0.1 を超えていた。また、試料 1 ではコード番号 4、9、14、15、16 で抽出間の変動係数の差が大きい傾向にあった。同様に試料 2 ではコード番号 2、6、7、9、12 で抽出間の変動係数の差が大きい傾向にあった。

3) プリマハムキット

プリマハムキットを用いて測定した機関はいなかったため、統計解析は実施しなかった。

4) キットのロット間の測定値の比較

今回の外部精度管理調査において、日本ハムキットについては 1 ロットのみであったが、モリナガのキットにおいて合計 6 ロットが外部精度管理調査に用いられていた。そこで、モリナガキットにおけるロット間差について観察した。その結果、図 18 に示したとおり、若干の測定値の変動はあるものの、試料 1、試料 2 のいずれにおいても明確なロット間差は認められなかった。

5) 測定値の相関性

(1) 同一キット内の試料間の測定値の相関性

試料 1 と試料 2 の各機関における測定値のモリナガキット内および日本ハムキット内における相関性を検討し、結果を図 19 に示した。その結果、モリナガでは相関係数が 0.914、日本ハムでは 0.823 といずれも非常に高い相関を認めた。

(2) 同一試料のキット間の測定値の相関性

同様に試料ごとにキット間の相関性を検討し、結果を図 20 に示した。その結果、試料 1 では相関係数が 0.598、試料 2 では 0.619 といずれも高い相関を認めた。

6. 検査手法のまとめ

各参加機関が使用した検査手法をまとめて表 5 に示した。データに影響を及ぼす可能性が考えられるプレートの洗浄方法については、手動が 7 機関、自動が 11 機関であった。また、検量線の近似曲線については 4PL が 15 機関、5PL が 3 機関で採用されていた。さらに、全ての検査機関で試料溶液の分注は 10 分以内に行われていた。

7. 検査実績のまとめ

参考として参加機関における検査実績をまとめて表 6 に示した。

参加機関のうち 1 機関が登録検査機関であったため、この機関による検査実績が非常に多いものとなっていたが、特定原材料検査の件数は、乳が 960 件と最も多く、次いで卵、小麦の順であった。一方、落花生が試験数としては最も少なく、138 件であった。

E. 結論

卵添加試料を作製し、添加回収試験および安定性確認試験を行ったところ、通知法の改正後のキットにおいても過去に実施した際と類似の結果が得られた。また、かぼちゃペーストおよびベビーフードを用いた外部精度管理調査を試験的に 18 機関を対象に実施した。その結果、回収率を指標とした Xbar 管理図では管理限界線の範囲を超える機関は認められなかったが、一部の試料において 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、ロバス

ト平均値およびロバスト標準偏差を用いた z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 2~3 となる機関が 1 または 2 機関認められた。z-スコアは平均値と標準偏差から算出されるため、そのデータ分布によってある一定の割合で z-スコアの絶対値が 2 以上となる可能性を含んでいる。しかし、今回限界外となった機関における z-スコアはいずれも 3 未満であり、明らかな異常値として判断することはできないと考えられる。また、Xbar 管理図における管理限界線を考慮してもこれらの機関が明らかな異常値とは判定できないことを示していると思われる。これに対して、参考として実施した吸光度の変動係数に基づいた解析では、一部の検査機関において繰り返し測定のばらつきが大きいことを示した。これらの機関が R 管理図において限界外と判定されたわけではないが、内部精度管理の一環としてこれらのパラメータを観察することで、ピペットの取り扱いを含めてより高い精度での検査の実施のための措置を講ずることが可能であると考えられた。

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

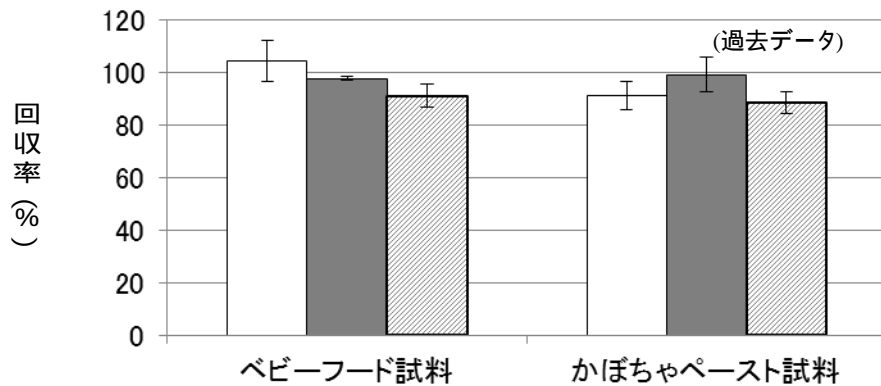
なし

3. その他

なし

通知法改正前 ELISA キット

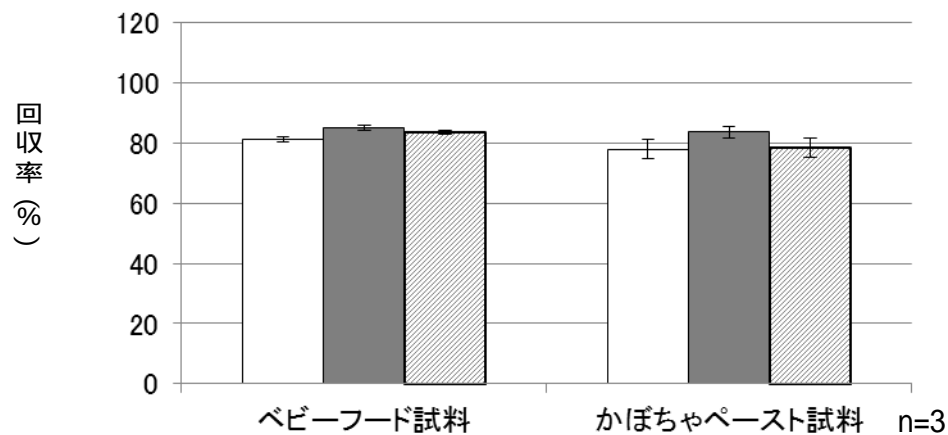
1) 全卵添加試料 (添加量: ベビーフード 8.6 $\mu\text{g/g}$, かぼちゃペースト 5.7 $\mu\text{g/g}$)



n=10

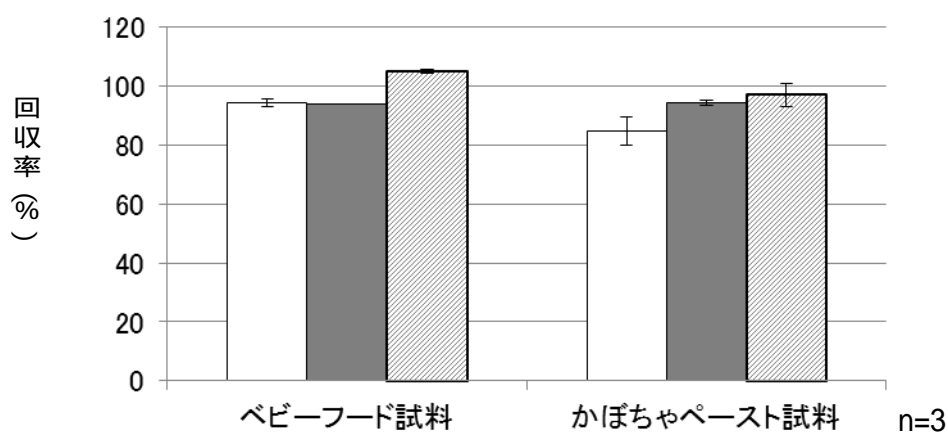
通知法改正後 ELISA キット

1) 全卵添加試料 (添加量 : 10.0 $\mu\text{g/g}$)



n=3

2) 乾燥全卵粉末添加試料 (添加量 : 10.0 $\mu\text{g/g}$)



n=3

□ 日本ハム, ■ モリナガ, ▨ プリマハム

図1 通知法改正前および通知法改正後の ELISA キットにおける回収率の比較

表 1 外部精度管理調査試料における均質性確認試験

a) 作製直後 (0 日目)

	試料 1			試料 2		
	モリナガ	日本ハム	プリマハム	モリナガ	日本ハム	プリマハム
平均値	8.681	8.392	11.698	8.332	8.167	11.349
標準偏差	0.379	0.399	0.196	0.228	0.346	0.264
変動係数	0.0436	0.0476	0.0167	0.0273	0.0424	0.0232
添加量 (µg/g)		10.0			10.0	
回収率 (%)	86.8	83.9	117.0	83.3	81.7	113.5

(n=10)

b) 発送前 (92 日目)

	試料 1			試料 2		
	モリナガ	日本ハム	プリマハム	モリナガ	日本ハム	プリマハム
平均値	9.261	8.089	11.639	8.825	7.504	10.913
標準偏差	0.440	0.447	0.505	0.394	0.429	0.361
変動係数	0.0475	0.0553	0.0434	0.0446	0.0572	0.0331
添加量 (µg/g)		10.0			10.0	
回収率 (%)	92.6	80.9	116.4	88.3	75.0	109.1

(n=10)

平均値、標準偏差、添加量の単位：µg/g

回収率：平均値/添加量×100

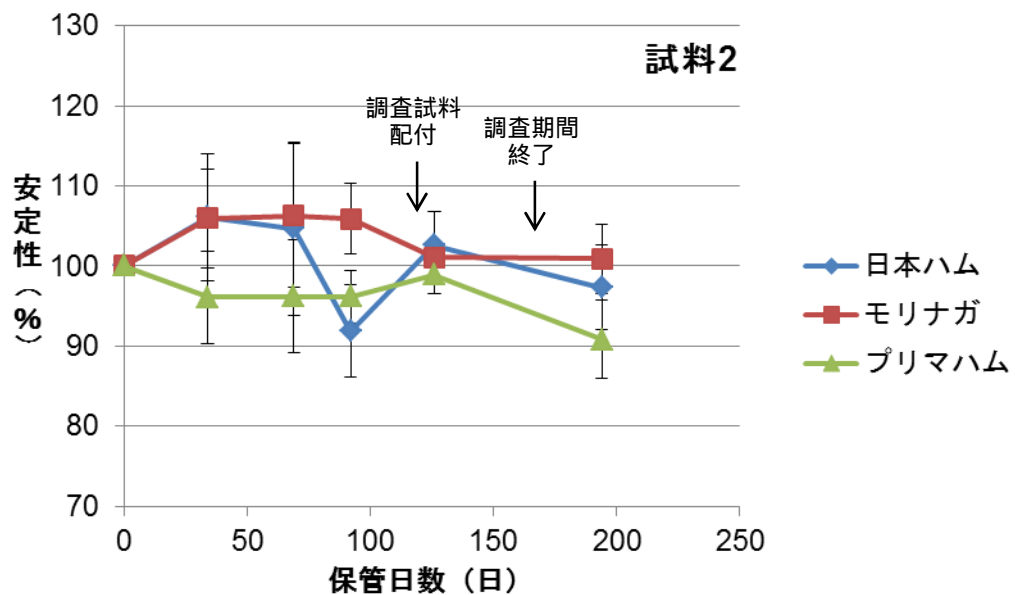
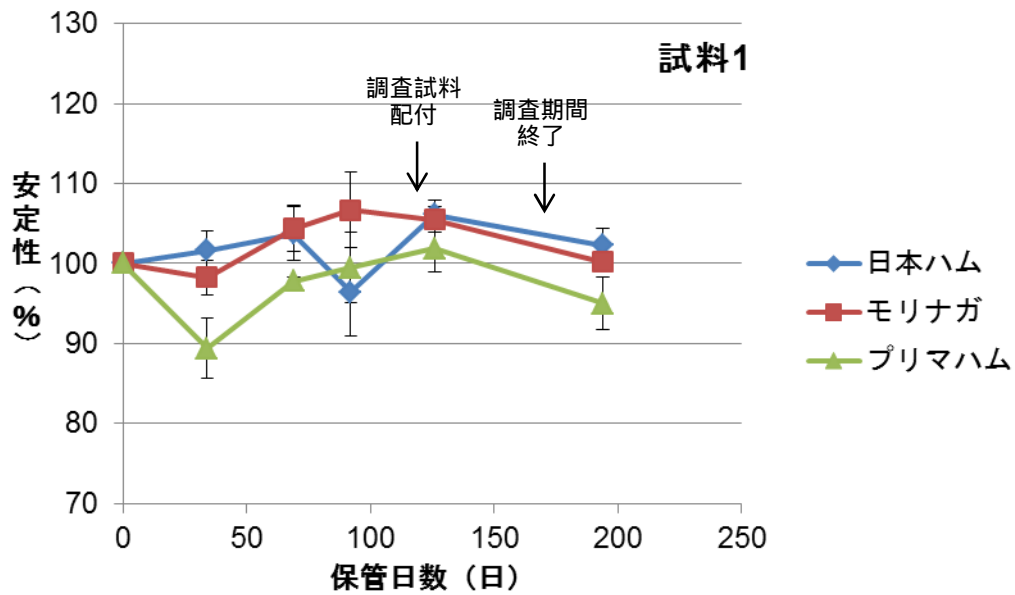


図2 外部精度管理調査試料の長期安定性

n=4 (34日目、69日目、126日目および194日目)、n=10 (0日目および92日目)

126日目および194日目の日本ハムキットおよびプリマハムキットの測定については、それ以前の測定で使用したELISAキットとは異なるロットのものを使用した。

表2 外部精度管理調査における報告値の平均値、変動係数および回収率

	試料 1			試料 2		
	モリナガ	日本ハム	プリマハム	モリナガ	日本ハム	プリマハム
データ数	18	18	0	18	18	0
平均値 (μg/g)	9.694	8.893	-	9.136	8.003	-
標準偏差(μg/g)	0.963	0.553	-	0.750	0.522	-
変動係数	0.0994	0.0622	-	0.0821	0.0653	-
添加量 (μg/g)		10.0			10.0	
回収率 (%)	96.9	88.9	-	91.4	80.0	-

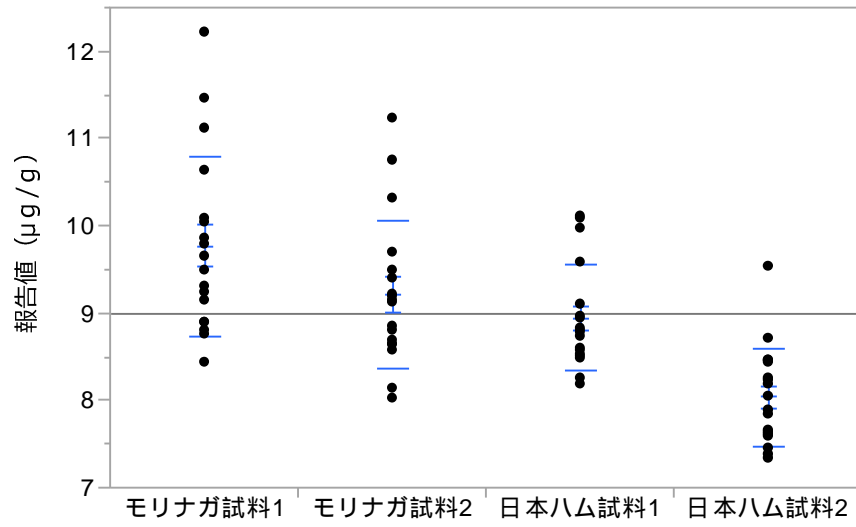


図3 外部精度管理調査での各試料におけるキットごとのデータ分布

表3 モリナガキットによる測定結果の統計量一覧

試料名		試料 1	試料 2
解析対象	統計量の種類	ロバスト方式	ロバスト方式
測定の平均値	データ数 (有効機能数)	18	18
	平均値	9.694	9.136
	分散	0.928	0.563
	標準偏差	0.963	0.750
	変動係数	0.0994	0.0821
	第1四分位数(Q1)	8.903	8.653
	中央値(メジアン)	9.583	9.148
	第3四分位数(Q3)	10.243	9.553
	最大値	11.098	10.230
	最小値	8.445	8.043
	範囲	2.653	2.187
	四分位範囲	1.34	0.9
測定の差	データ数	18	18
	Rの平均	0.555	0.336
	上部管理限界	1.813	1.098

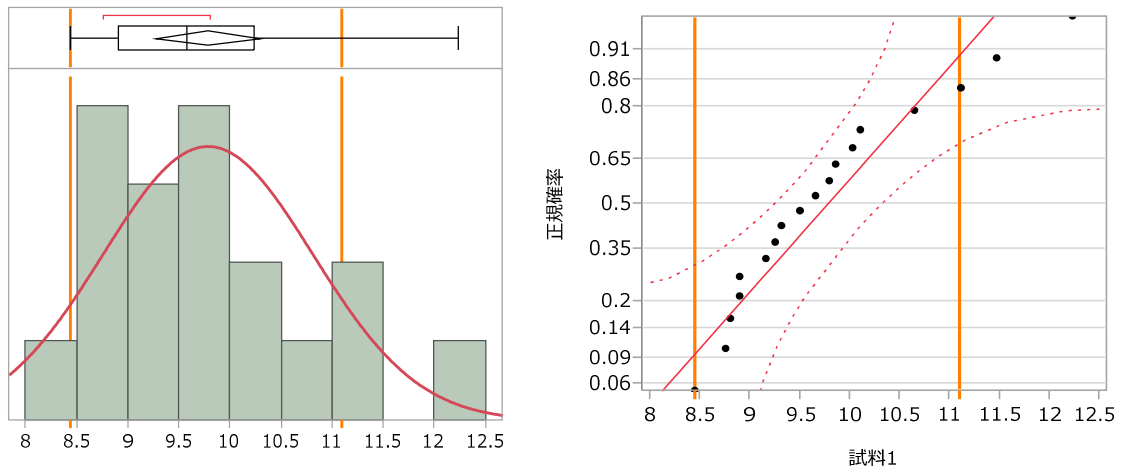


図4 試料1のモリナガキットによる測定におけるヒストグラムおよび正規確率プロット

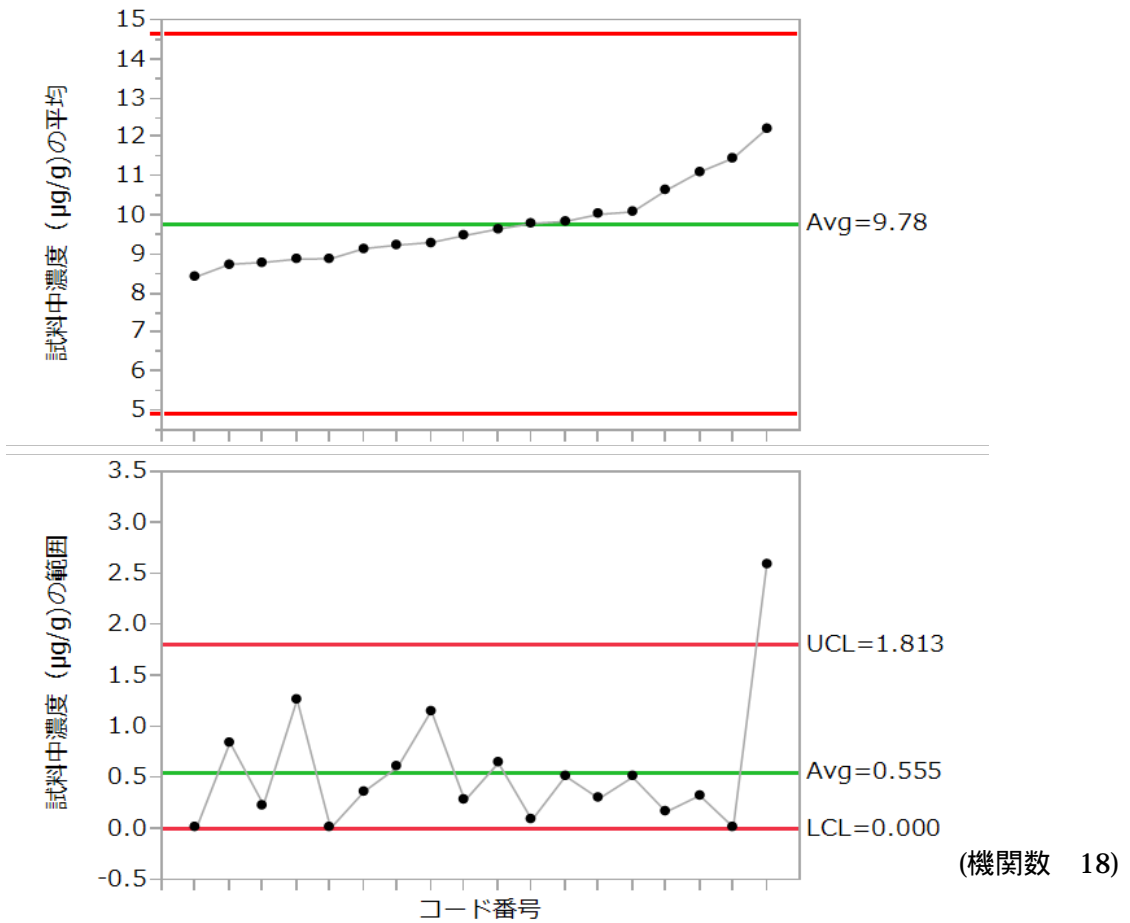
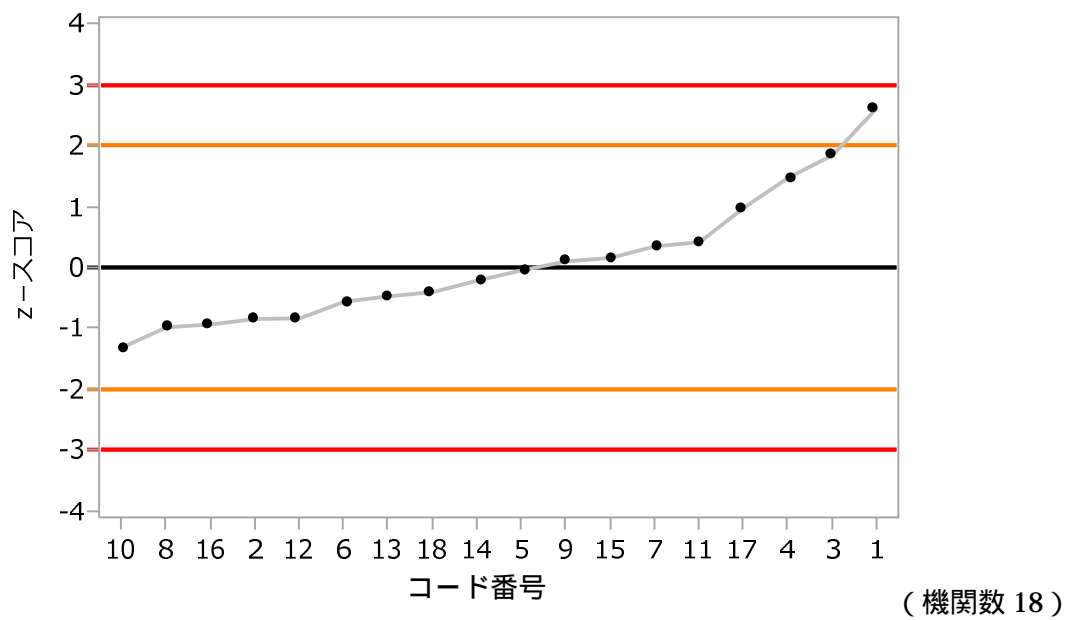


図5 試料1のモリナガキットによる測定におけるXbar-R管理図

データはXbarを基準に昇順で並べ替えた。Xbar管理図(上図)において上部管理限界線(UCL)はロバスト平均値の150%、下部管理限界線(LCL)はロバスト平均値の50%の値とした。R管理図(下図)における上部管理限界線(UCL)はRの平均値とJISハンドブックの係数 D_4 から算出した。



絶対値が 2 以上の z-スコアと順位

z-スコア -2 の順位	z-スコア	z-スコア 2 の順位	z-スコア
1	-	1	2.633

図 6 試料 1 のモリナガキットによる測定における z-スコアの順位

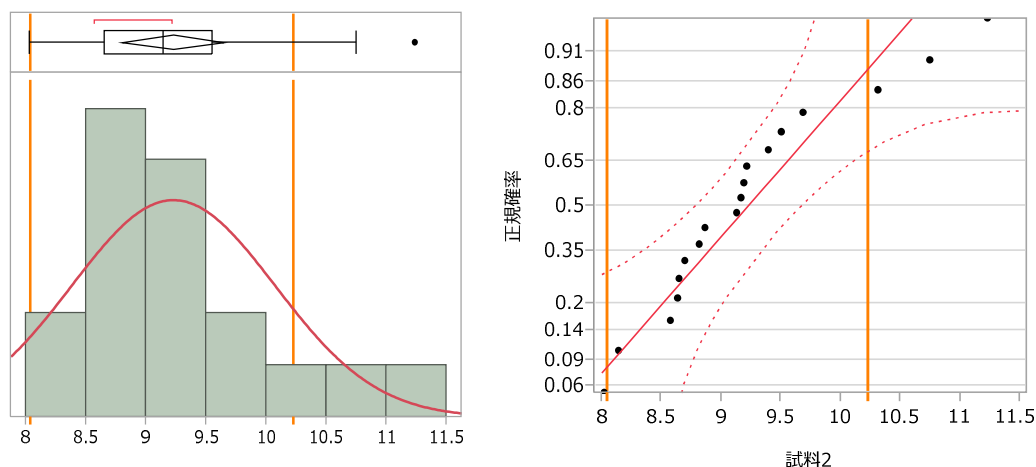


図7 試料2のモリナガキットによる測定におけるヒストグラムおよび正規確率プロット

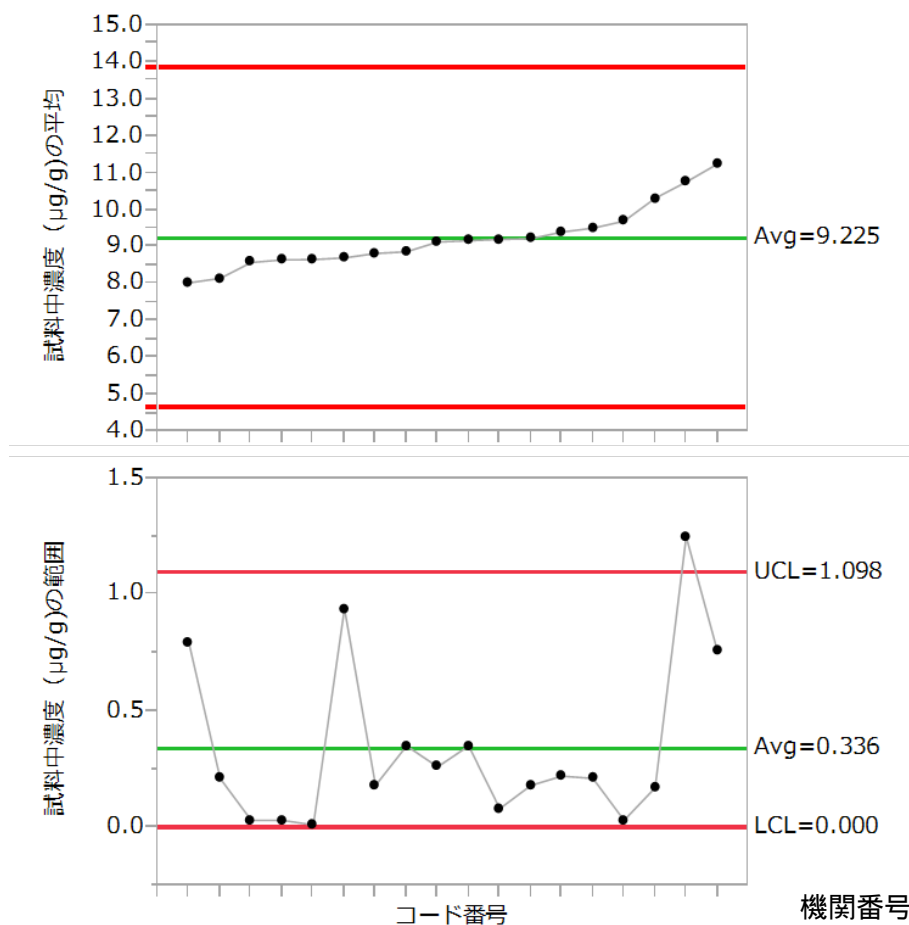
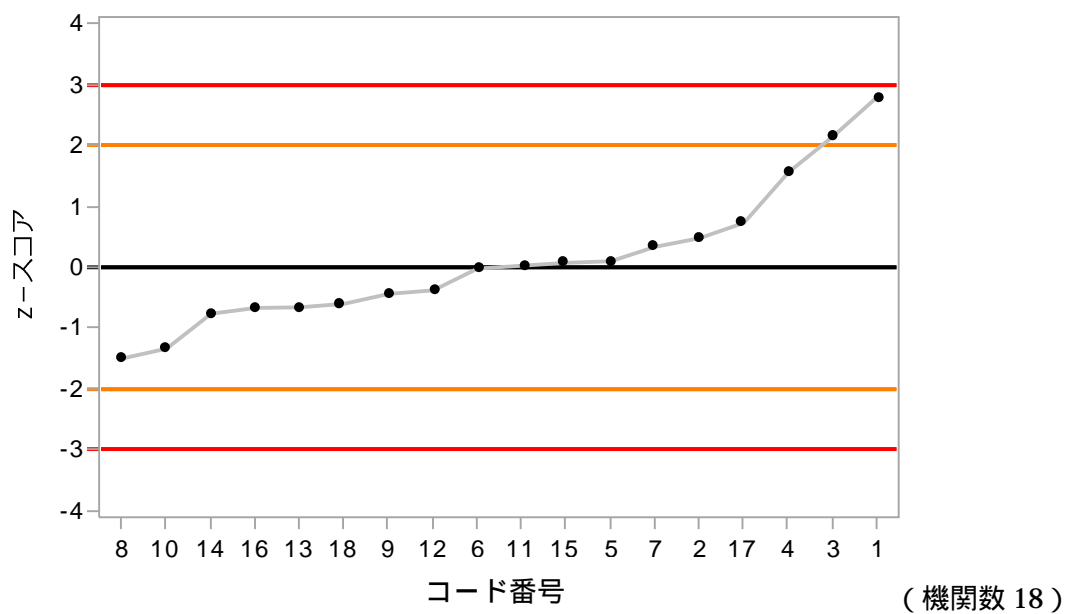


図8 試料2のモリナガキットによる測定におけるXbar-R管理図

データはXbarを基準に昇順で並べ替えた。Xbar管理図(上図)において上部管理限界線(UCL)はロバスト平均値の150%、下部管理限界線(LCL)はロバスト平均値の50%の値とした。R管理図(下図)における上部管理限界線(UCL)はRの平均値とJISハンドブックの係数 D_4 から算出した。



絶対値が 2 以上の z-スコアと順位

z-スコア -2 の順位	z-スコア	z-スコア 2 の順位	z-スコア
1	-	1	2.805
2	-	2	2.165

図 9 試料 2 のモリナガキットによる測定における z-スコアの順位

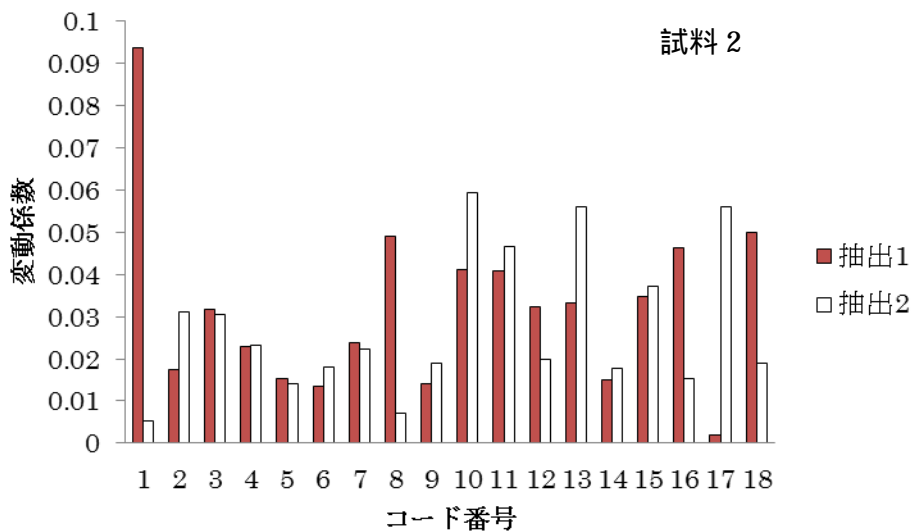
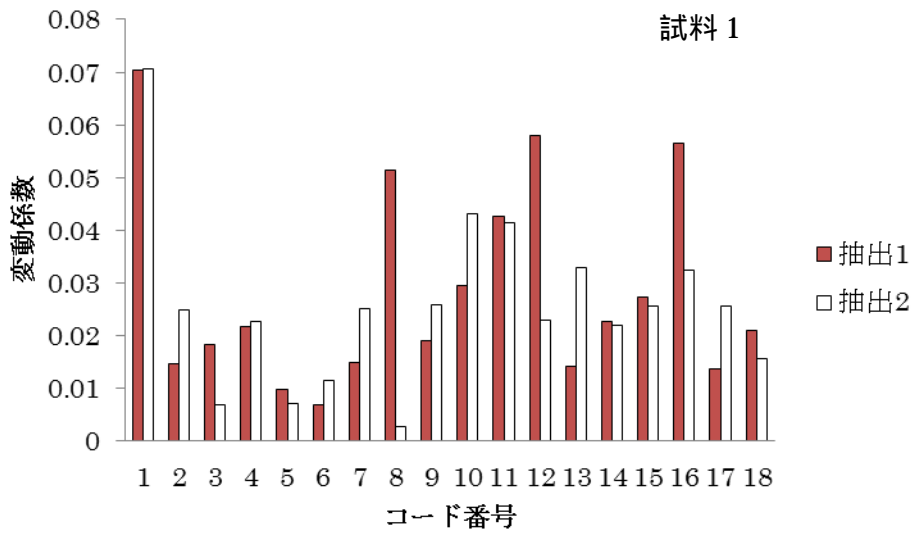


図 10 モリナガキットにおける吸光度の変動係数
 縦軸は 3 ウェルの吸光度の変動係数を示す。
 変動係数は無名数として示した。

表 4 日本ハムキットによる測定結果の統計量一覧

試料名		試料 1	試料 2
解析対象	統計量の種類	ロバスト方式	ロバスト方式
測定の平均値	データ数 (有効機能数)	18	18
	平均値	8.893	8.003
	分散	0.306	0.273
	標準偏差	0.553	0.522
	変動係数	0.0622	0.0653
	第 1 四分位数(Q1)	8.535	7.616
	中央値(メジアン)	8.803	7.968
	第 3 四分位数(Q3)	9.234	8.449
	最大値	9.699	8.764
	最小値	8.185	7.34
	範囲	1.514	1.424
	四分位範囲	0.699	0.833
測定の差	データ数	18	18
	R の平均	0.291	0.236
	上部管理限界	0.951	0.769

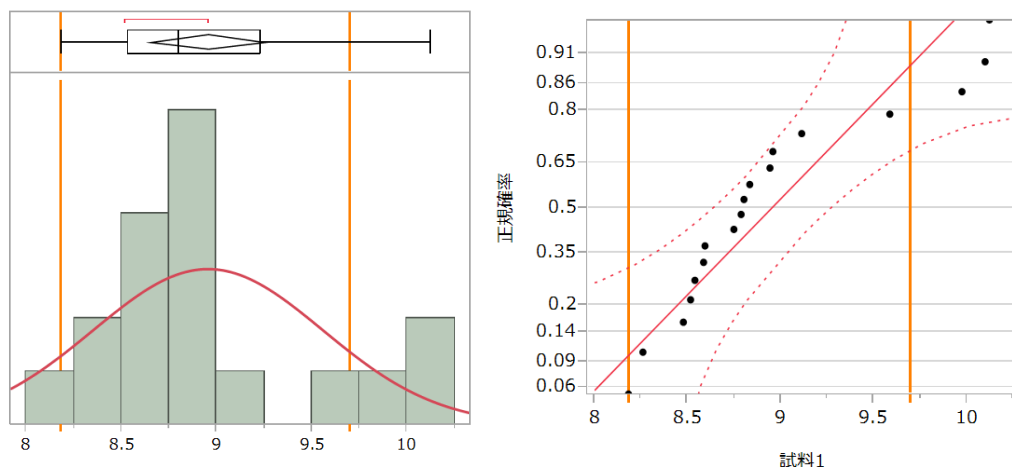


図 11 試料 1 の日本ハムキットによる測定におけるヒストグラムおよび正規確率プロット

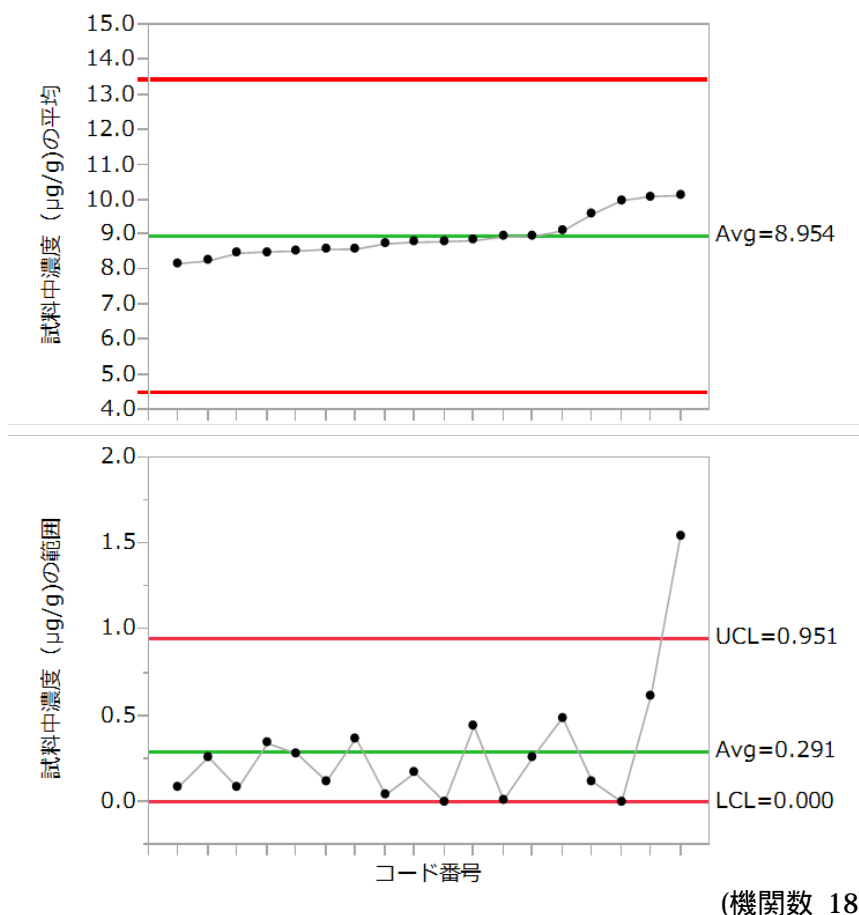
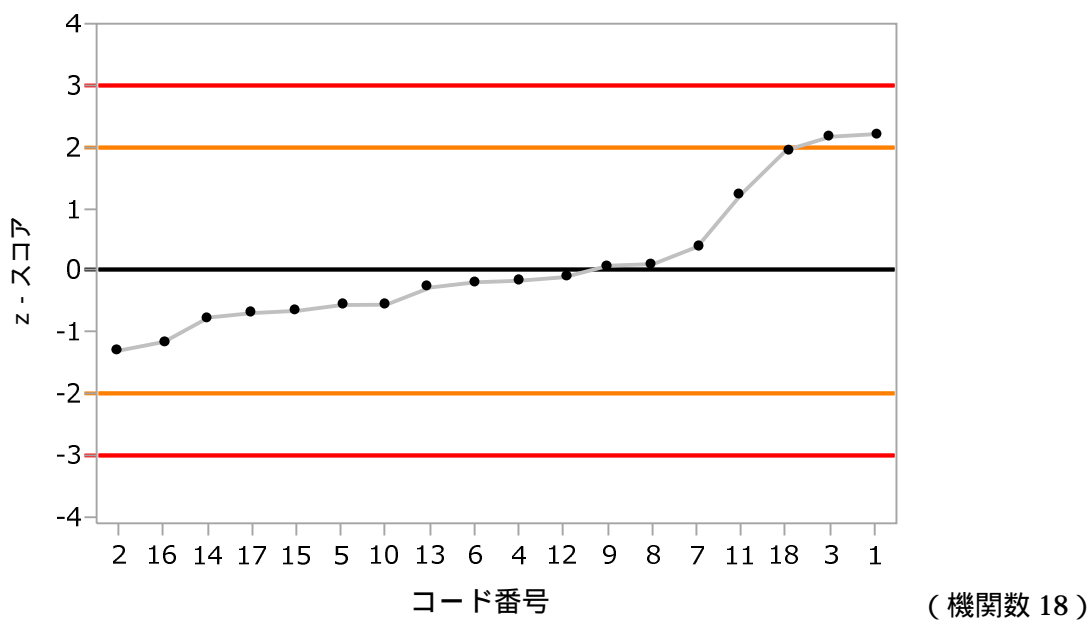


図 12 試料 1 の日本ハムキットによる測定における Xbar-R 管理図

データは Xbar を基準に昇順で並べ替えた。Xbar 管理図 (上図) において上部管理限界線 (UCL) はロバスト平均値の 150%、下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均値の 50% の値とした。R 管理図 (下図) における上部管理限界線 (UCL) は R の平均値と JIS ハンドブックの係数 D_4 から算出した。



絶対値が 2 以上の z-スコアと順位

z-スコア -2 の順位	z-スコア	z-スコア 2 の順位	z-スコア
1	-	1	2.237
2	-	2	2.183

図 13 試料 1 の日本ハムキットによる測定における z-スコアの順位

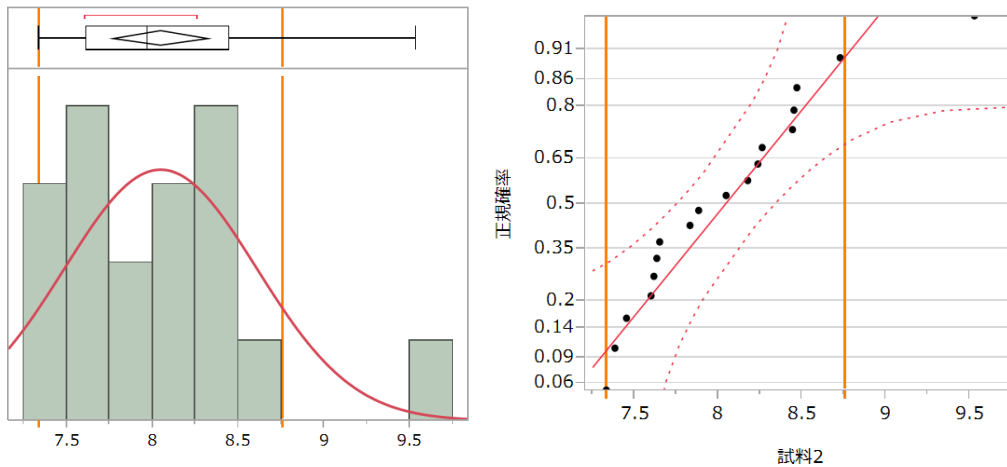


図 14 試料 2 の日本ハムキットによる測定におけるヒストグラムおよび正規確率プロット

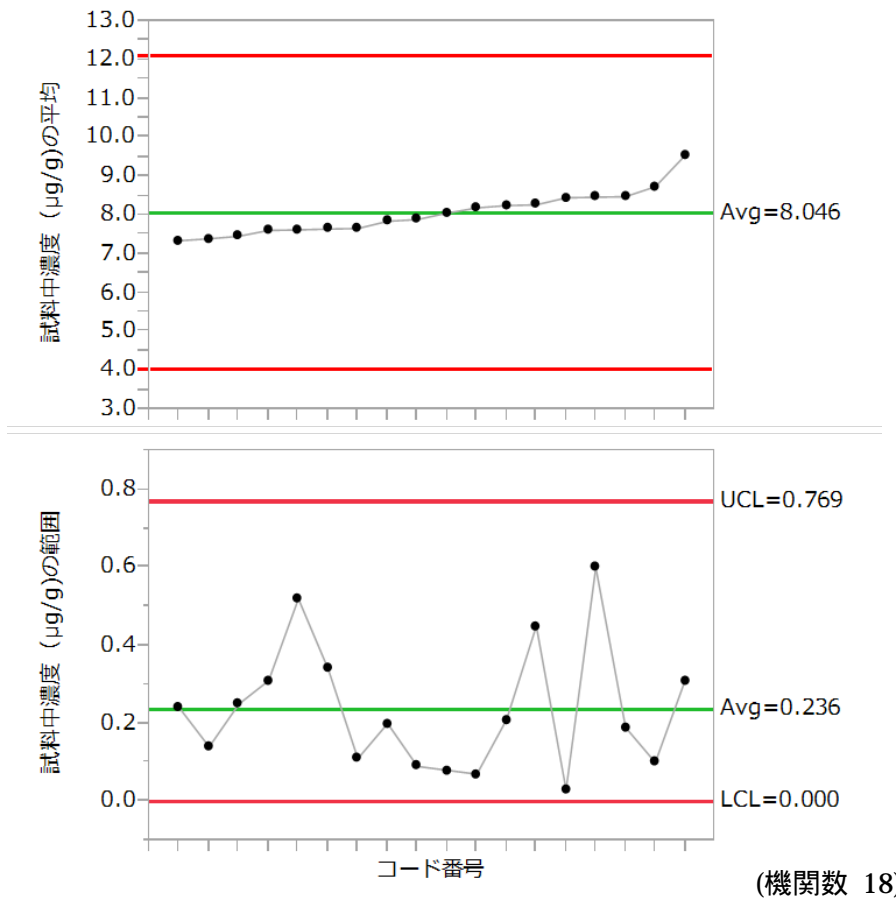
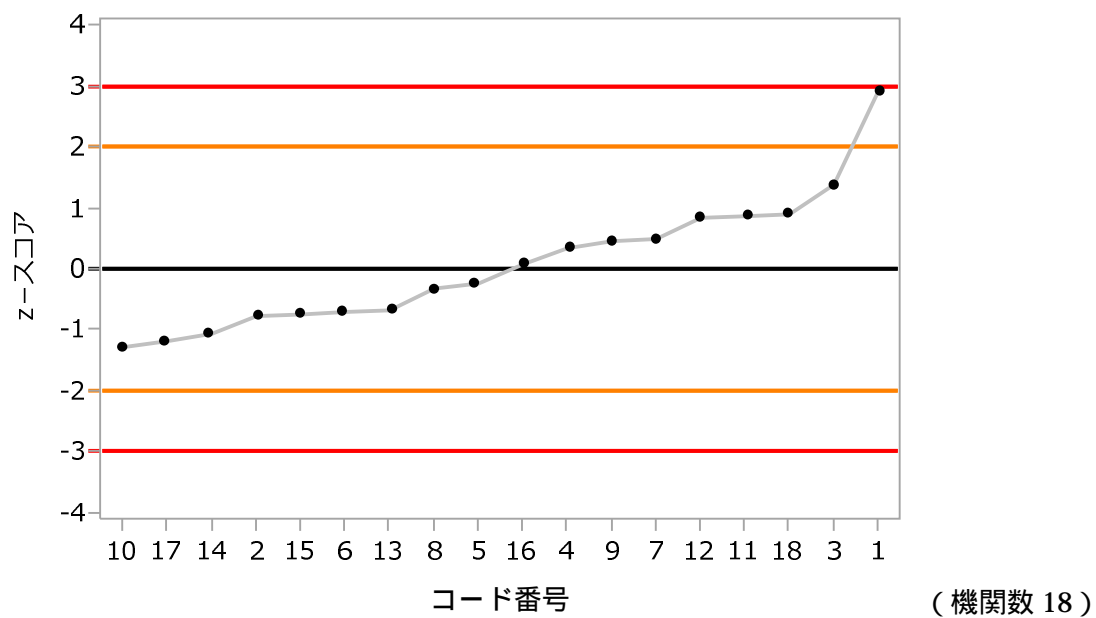


図 15 試料 2 の日本ハムキットによる測定における Xbar-R 管理図

データは Xbar を基準に昇順で並べ替えた。Xbar 管理図 (上図) において上部管理限界線 (UCL) は口バスト平均値の 150%、下部管理限界線 (LCL) は口バスト平均値の 50% の値とした。R 管理図 (下図) における上部管理限界線 (UCL) は R の平均値と JIS ハンドブックの係数 D_4 から算出した。



絶対値が 2 以上の z-スコアと順位

z-スコア -2 の順位	z-スコア	z-スコア 2 の順位	z-スコア
1	-	1	2.944

図 16 試料 2 の日本ハムキットによる測定における z-スコアの順位

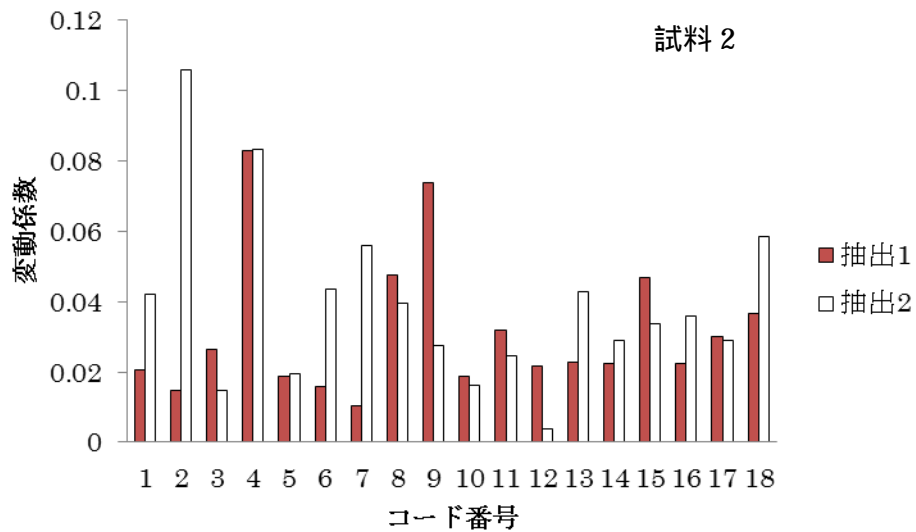
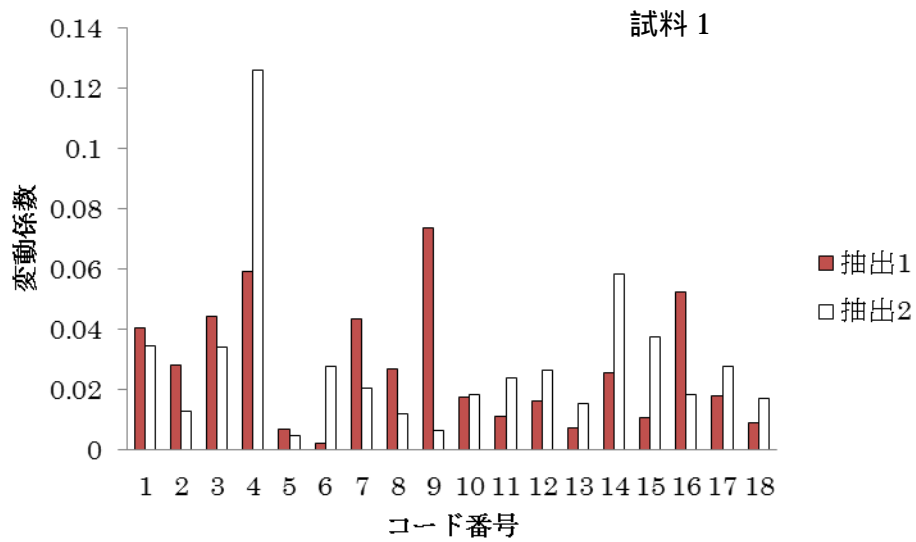


図 17 日本ハムキットにおける吸光度の変動係数
 縦軸は 3 ウェルの吸光度の変動係数を示す。
 変動係数は無名数として示した。

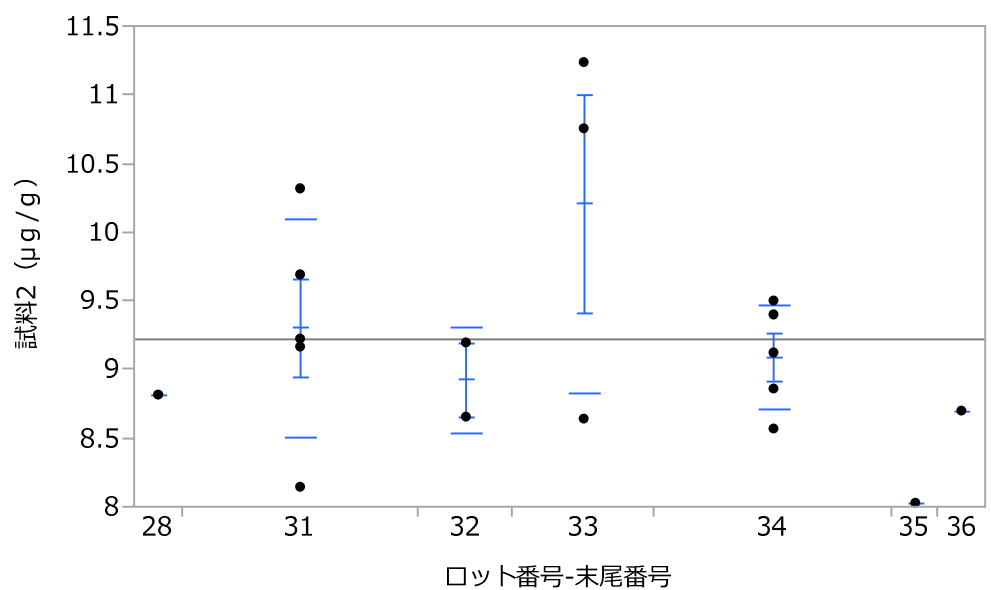
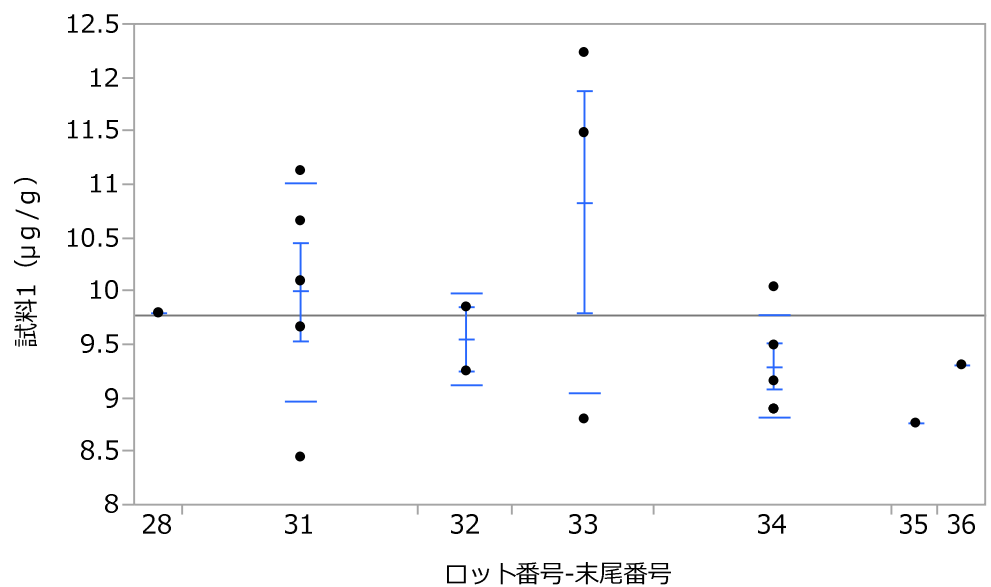


図 18 試料 1 および試料 2 のモリナガキットにおける測定値のロット間比較

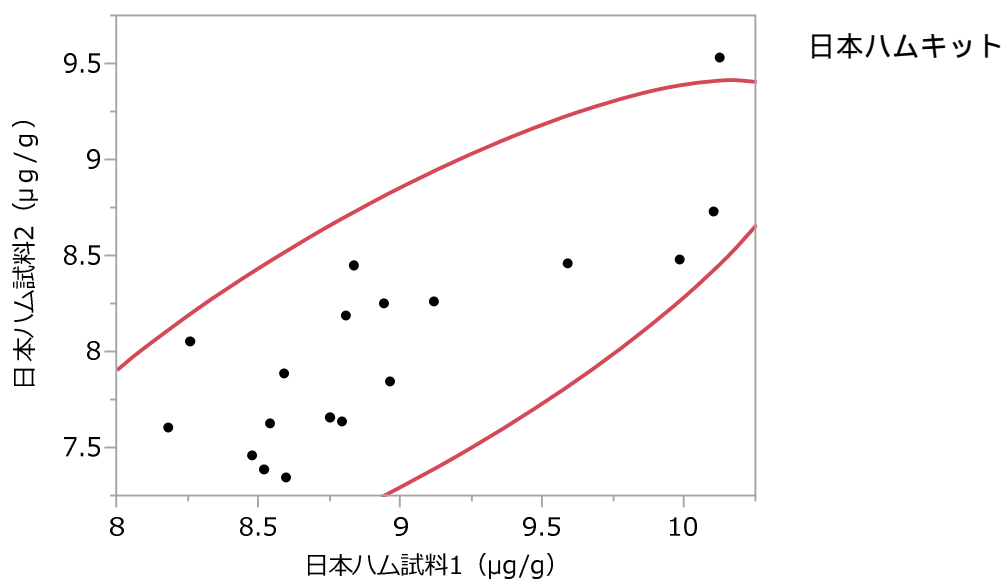
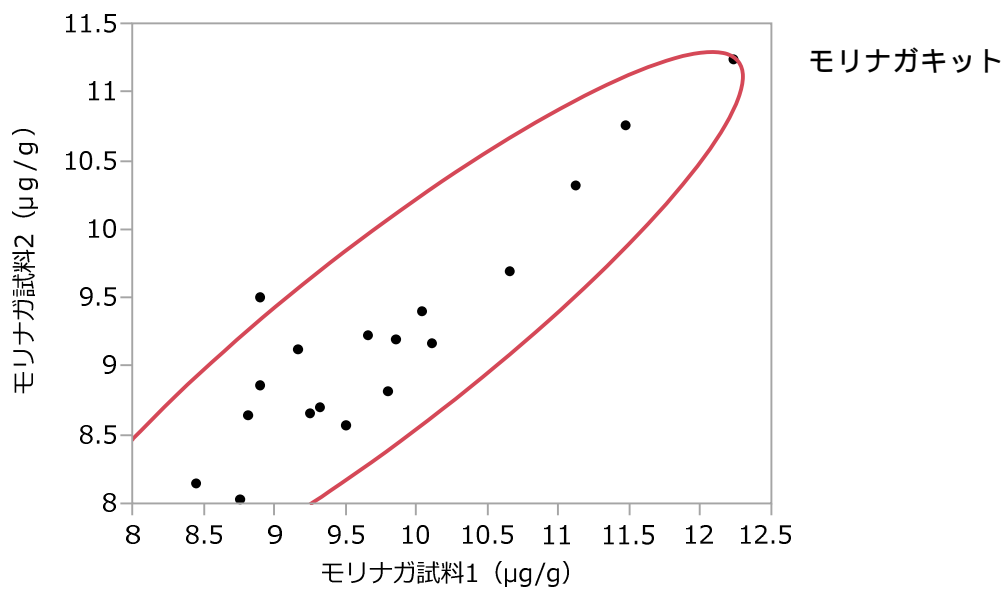


図 19 同一キット内における測定値の試料間の相関性
 図中の楕円は 95%の確率楕円を示す。

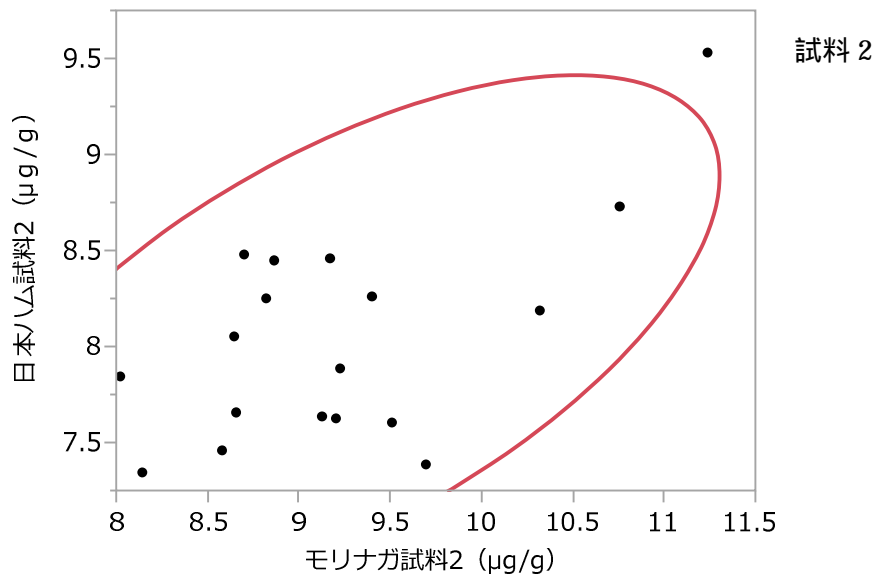
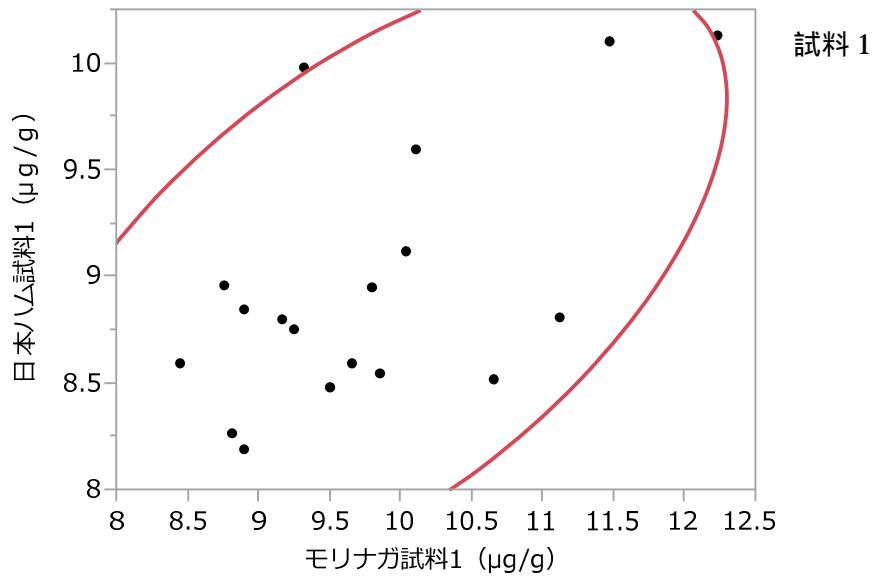


図 20 同一試料内での測定値のキット間の相関性
楕円は 95%の確率楕円を示す。

表5 外部精度管理調査における各検査機関で採用した検査手法の度数表

項目	合計	1	2	3
抽出方法	18	振とう 18	攪拌 0	
振とう時間 (時間)	18	< 14 0	14 < x 16 12	16 < 6
振とう速度 (rpm)	18	< 100 2	100 12	100 < 4
ろ過	18	実施 14	実施せず 4	
遠心分離	18	実施 18	実施せず 0	
抽出溶液等の希釈操作	18	手動 18	自動 0	
試薬の添加	18	マルチチャンネル ピペット 17	シングルチャンネル 連続分注ピペット 1	その他 0
洗浄方法	18	手動 7	自動 11	
検量線の回帰法	18	4PL 15	5PL 3	その他 0
抽出液の保存期間	18	0日 14	1日 1	2日以上 3
モリナガキット 測定操作	18	5 9	5 < x 10 9	10 < 0
操作中の室温	18	常時25 以下 14	25 を超える時間帯有り 4	
抽出液の保存期間	18	0日 14	1日 2	2日以上 2
日本ハムキット 測定操作	18	5 10	5 < x 10 8	10 < 0
操作中の室温	18	常時25 以下 15	25 を超える時間帯有り 3	

表6 参加機関における平成27年度の試験実績および使用キット

		特定原材料						
		卵	乳	小麦	そば	落花生	甲殻類	
ELISA	試験数	437	960	405	289	138	272	
	実施機関数	17	12	12	11	6	9	
	使用キット	日本ハム	15	11	11	9	5	-
		モリナガ	17	12	12	11	7	-
		プリマハム	2	1	1	2	2	-
		ニッスイ	-	-	-	-	-	9
マルハ	-	-	-	-	-	9		
確認試験	試験数	3	1	5	2	0	3	
	実施機関	7	1	44	2	0	16	

補足資料

平成 28 年度特定原材料検査外部精度管理調査参加機関

栃木県保健環境センター
群馬県食品安全検査センター
さいたま市健康科学研究センター
千葉県衛生研究所 (仁戸名研究室部門)
川崎市健康安全研究所
相模原市衛生研究所
新潟県保健環境科学研究所
新潟市衛生環境研究所
長野県環境保全研究所
岐阜県保健環境研究所
浜松市保健環境研究所
愛知県衛生研究所
三重県保健環境研究所
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
広島県立総合技術研究所 保健環境センター
山口県環境保健センター
福岡市保健環境研究所
一般財団法人 日本食品分析センター

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

誌上発表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
梶村計志： Kazuhiko Akutsu, Masato Yoshimitsu, Yoko Kitagawa, Satoshi Takatori, Naoki Fukui, Masakazu Osakada, Satoko Yamaguchi, Keiji Kajimura, Hirotaka Obana, Takaho Watanabe	Evaluation of the matrix-like effect in multiresidue pesticide analysis by gas chromatography with tandem mass spectrometry	J. Sep. Sci.	40	1293-1300	2017
鎗田孝： Takamitsu Otake, Takashi Yarita, Tomoko Sakamoto, Masahiko Numata, Akiko Takatsu	Proficiency Testing for Quantification of Pesticide Residues in Treated Brown Rice Samples: Comparison of Performance of Japanese Official Multiresidue, Modified QuEChERS, and QuEChERS Methods	J. AOAC Int	99	821-829	2016
Takashi Yarita, Takamitsu Otake, Yoshie Aoyagi, Masahiko Numata, Akiko Takatsu	Difference between Consensus Value of Participants' Results and Isotope-Dilution Mass Spectrometric Results in Proficiency Testing for Pesticide Residues in Husked Wheat	Anal. Sci.	32	557-563	2016

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
梶村計志： 阿久津和彦，吉光真人， 北川陽子，高取聡，福井 直樹，小阪田正和，山口 聡子，並河幹夫，伴創一 郎，大久保祥嗣，中島涼， 丸山量子，角谷直哉，宮 本伊織，山下浩一，西山隆 之，神藤正則，山本直美， 高井靖智，樋下勝彦， <u>梶 村計志</u> ，尾花裕孝，渡辺卓 穂	GC-MS(/MS)測定における農薬由来 マトリックス効果の検討 1 近畿 地衛研 6 機関における共同研究結 果	第 111 回日本食品衛生学会学術講 演会（東京）	2016
吉光真人，阿久津和彦， 北川陽子，高取聡，福井 直樹，小阪田正和，山口 聡子，並河幹夫，伴創一 郎，大久保祥嗣，中島涼， 丸山量子，角谷直哉，宮 本伊織，山下浩一，西山 隆之，神藤正則，山本直 美，高井靖智，樋下勝彦， 梶村計志，尾花裕孝，渡 辺卓穂	GC-MS(/MS)測定における農薬由来 マトリックス効果の検討 2 近畿 地衛研 6 機関における共同研究結 果	第 111 回日本食品衛生学会学術講 演会（東京）	2016
阿久津和彦，吉光真人， 北川陽子，高取聡，福井 直樹，小阪田正和，山口 聡子， <u>梶村計志</u> ，尾花裕 孝	GC-MS/MS 測定における農薬由来マ トリックス効果の検討 アナライ トプロテクタント添加法の有効性	第 53 回全国衛生化学技術協議会年 会（青森）	2016
吉光真人，阿久津和彦， 北川陽子，高取聡，福井 直樹，小阪田正和，山口 聡子， <u>梶村計志</u> ，尾花裕 孝	GC-MS/MS 測定における農薬由来マ トリックス効果の検討 食品マト リックス存在下における挙動と制 御	第 53 回全国衛生化学技術協議会年 会（青森）	2016
斉藤貢一 Koichi Saito, Junki Ishii, Misaki Naniwa, Saya Nobumoto, Rie Ito	Trace Analysis of Aflatoxins in Spices by HPLC Coupled with Solid-Phase Dispersive Extraction Followed by	International Symposium of Micototoxicology (Tokyo)	2016

	Fluorescence Derivatization for Method Validation		
鎗田孝： 鎗田孝、大竹貴光	残留農薬分析用の食品標準物質を用いた同位体希釈質量分析法による QuEChERS 法の評価	第 112 回日本食品衛生学会学術講演会（北海道）	2016