

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

【食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に  
関する研究】

令和3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

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  
埼玉県衛生研究所 石井 里枝  
地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 村上 太郎  
茨城大学 鎗田 孝  
国立研究開発法人産業技術総合研究所 大竹 貴光

令和4年(2022年)5月

## 目 次

I.	総括研究報告書	
	食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究	1
	渡辺 卓穂	
II.	研究分担報告	
1.	外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究	15
	渡辺 卓穂	
1.1	スプレードライヤを用いた残留農薬用試料の開発	15
1.2	器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討	31
1.3	特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ	45
1.4	一般細菌数測定検査用調査試料の開発	95
2.	微生物定性試験における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の 妥当性評価法に関する研究	110
	石井 里枝	
3.	アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究	129
	村上 太郎	
4.	下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究	142
	鎗田 孝	
5.	分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用	158
	大竹 貴光	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	169

令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査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 副所長

#### 研究要旨

輸入食品や国内食品の流通段階で健康危害リスクを及ぼすような種々の有害物質等を監視するために、行政検査は国民の食生活の安全を担保している。検査において、誤判定を避けるために、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。現在、食品の輸出の促進と輸入の増加により、誤判定の回避は輸出入国間での係争を回避するためにも重要である。これまで我々は、検査の信頼性を確保するために外部精度管理調査を検査施設に提供しており、ISO/IEC 17043認定取得をできたことで国際的にも認められた技能試験提供者となった。この外部精度管理調査（技能試験）を継続的に検査施設に提供することで、各検査機関の検査結果において信頼性の維持に寄与することができる。外部精度管理プログラムは、検査されているすべての項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目についてしか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査試料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。そこで、今年度は、1. 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究（渡辺研究分担）では、スプレードライヤを用いた残留農薬検査試料作製の検討及び器具・容器包装の検査項目の基礎検討及び微生物検査については、新規の定性検査の開発を、2. 微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物の妥当性評価に関する研究（石井研究分担）では、黄色ブドウ球菌試験法についてLODの推定を試みた。また、「ソルビン酸試験法」及び「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法」について、室間共同試験により真度、併行精度及び室間精度等を検討したところ、対象としたすべての食品種で良好な結果が得られた。さらに、サイクラミン酸試験法については令和2年度の単一試験室での検討結果で良好な真度及び精度が得られなかった5種類の食品種について規定分析法の改良法を検討した。3. アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究（村上研究分担）では、精度管理用試料の作製のために適正資材の安定性の検討を、4. 下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究（鎗田研究分担）では、検査試料の均質性評価と分析法の検討を、5. 分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用（大竹研究分担）では、課題1で作製した試料をIDMSを用いて分析値を付与し、5課題を実施した。

研究分担者名＝渡辺卓穂（（一財）食品薬品安全センター秦野研究所副所長）、石井里枝（埼玉衛生研究所副所長）、村上太郎（（地独）大阪健康安全基盤研究所主任研究員）、鎗田 孝（茨城大学農学部准教授、大竹貴光（（国研）産業技術総合研究所主任研究員）

## A. 研究目的

輸入食品や国内食品の流通段階で健康危害リスクを及ぼすような種々の有害物質等を監視するために、行政検査は国民の食生活の安全を担保している。検査において、誤判定を避けるために、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。現在、食品の輸出の促進と輸入の増加より、誤判定の回避は輸出入国間での係争を回避するためにも重要である。これまで申請者は、検査の信頼性を確保するために外部精度管理調査を検査施設に提供しており、ISO/IEC 17043 認定取得をできたことで国際的にも認められた技能試験提供者となった。この外部精度管理調査（技能試験）を継続的に検査施設に提供することで、各検査機関の検査結果において信頼性の維持に寄与することができる。

外部精度管理調査プログラムは、検査されているすべての検査項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目についてしか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は、試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査用試

料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。この粉体工学技術を残留農薬検査用試料作製に応用検討し、新規の基材開発を1～3年を通して行い、学術的に有用な方法を確立する。微生物学検査では、基材の改善を行い、新規の検査項目を開発すると共に対象菌の検出下限値を掌握する。また、新たに、調査項目になかった器具・容器包装の検査項目の基礎検討を行う。さらに、食品添加物、貝毒及びアレルギー物質検査試料を検討し、開発されたこれらの調査試料は研究分担において外部精度管理調査パイロットスタディとして最終年までに実施し、実行可能性を検討する。

これらの研究は、リスク管理をより堅実なものとし、健康危害の未然防止や食品の輸出入の係争回避に直結する成果が期待でき、検査機関においては、ISO/IEC 17025 認定取得の補助となる。従って、現在の食品流通において必要かつ早急に着手すべきである。実施する5つの研究課題は、互いに密接に連携し、相互に研究成果をフィードバックし進行することが特色である。

## B. 研究方法

### 1 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究（渡辺研究分担）

#### 1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発：

残留農薬用試料は基材に自家製玄米粉を用い、玄米粉1 kgをアセトニトリル/水4 Lに懸濁させ、20%アセトニトリル懸濁液としスプレードライヤに供した。作製検討に用いたスプレードライヤは大川原化工機株

式会社製研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤ CL-8i を用いた。玄米粉懸濁溶液は事前に攪拌し、均一な懸濁溶液とし、原液タンクに移し、攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに 2 kg/h で送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクは MC-50 型を使用した。回転数は 20000 rpm に設定した。また、入り口温度は 120℃、100℃、80℃で作製温度を検討した。得られた玄米粉はマイクロトラックベル社製マイクロトラック MT3200 を用い平均粒子径を測定した。また、得られた玄米粉はガスクロマトグラフ質量分析計で 4 種の農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス）を測定した。また、作製した玄米粉は顕微鏡下で粒子の観察を行った。

### 1.2 器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討：

食品衛生法において個別規格があるプラスチックの材質ポリマーについて、作製上の必要要件である有機溶媒への溶解性を検討した。その結果、試料基材にはポリスチレンペレットを選択し、試験対象物質をカドミウム及び鉛として、溶解溶媒にジクロロメタンを用いてシート状の試料作製を行った。これらのシート状試料は、試験対象物質の良好な均質性が得られたが、ポリスチレンペレットの溶解溶媒に用いたジクロロメタンの残留が認められた。また、残留溶媒除去法の確立が困難だったことから、今年度は新たな作製法としてスプレードライヤを用いて粉体の試料作製を試みた。添加に用いる標準品はシート状試料と同様に有機溶媒に溶解する SPEX 製カドミウム及び鉛（いずれも 5000 µg/g、Base Oil 75）を用いた。

ポリマー質量に対して 10 倍容量のジクロロメタンに、この標準品を添加して均質な溶液とし、これにポリマーを添加して混合し、十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをスプレードライヤに供し、粉体状の試料を得て、これらのカドミウム及び鉛含量を測定し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性ならびに残留溶媒について検討した。

### 1.3 特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ：

本年度の外部精度管理調査に関するパイロットスタディでは、検討の結果安定性が確認されたとうもろこしペースト及びイチゴジャムを基材としてスキムミルクより調製した乳タンパク質を 9.0 µg/g 添加した試料を作製した。参加機関は公定法及び各機関の標準操作手順書に従い、消費者庁から提示されている 3 キット（モリナガキット、日本ハムキット、プリマハムキット）中、2 種類を用いて測定を行い、結果を提出するよう要請した。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。

回収した結果は、測定キット、試料ごとに解析を行った。測定値についてメジアン・クリーニング（MC）を行った後、ロバスト方式により統計値を算出した。結果は Xbar-R 管理図および z-スコアにより評価を行った。

### 1.4 一般細菌数測定検査用調査試料の開発：

食品衛生外部精度管理調査、微生物学調査では主に一般細菌数測定検査に用いる基材開発を行った。

一般細菌数測定検査の新規基材として白飯（見立て食材：弁当）を用い、妥当性確

認として①性能評価、②品質評価、③パイロットスタディの実施による運用確認を行った。

性能評価では冷蔵試料 (0~10℃) と冷蔵保存 10 日後に 22.5℃へ移送した試料 (常温試料) の 2 通りの調査試料について、最大 84 日間保存までの生菌数の挙動を観察した。

品質評価ではパイロットスタディ用に作製した調査試料から採取した 10 個の調査試料を 2 名の検査員でそれぞれ生菌数測定を行い、配付前の品質評価 (均質性確認試験) および報告期間後までの品質評価 (安定性確認試験) を行った。なお均質性確認試験では公表する暫定値の算出に加えて ISO/TS 19036 : 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations を用いた標準不確かさの算出を行った。

パイロットスタディでは 49 機関の参加機関に対して調査試料を配付し、報告値を回収して解析を行った。

## 2 微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の妥当性に関する研究 (石井研究分担)

### 微生物定性試験法における検出下限値の推定

黄色ブドウ球菌定性試験を対象として実施試験の 50% が陽性となる菌量である LOD<sub>50</sub> (level of detection) の推定を行った。ブランク試料を用いた繰り返し試験を行い手技による LOD<sub>50</sub> のバラツキを評価した。また 6 種の食品試料 (チャーハン、カレー、チ

ーズケーキ、エッグタルト、生うどん、ソーセージ) について LOD<sub>50</sub> を推定した。2 倍段階希釈した *Staphylococcus aureus* 菌液を試料に接種し、黄色ブドウ球菌定性試験法を各濃度 n=6 で実施し、陽性と判定された試料数から LOD<sub>50</sub> を算出した。黄色ブドウ球菌試験法は、食品衛生法における食品、添加物等の規格基準に定められている食肉製品の黄色ブドウ球菌試験法に準じた。LOD<sub>50</sub> の算出方法は ISO 16140-2:2016 およびその引用元である Wilrich ら (J AOAC Int., 92(6), 1763-72 (2009).) の手法に準じて LOD<sub>50</sub> を推定した。

### 食品添加物試験法の妥当性に関する研究

「ソルビン酸試験法」については 6 機関で 10 食品種を、「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法」については 8 機関で 6 食品種を対象に室間共同試験を実施した。

同一ロットの食品を配布し、通知試験法に従って、基準値が設定されている場合には基準値濃度に、基準値が設定されていない場合には定量下限値濃度になるように添加して 1 食品当たり 2 試料を定量した。

それぞれの機関から提出された定量値について Cochran 検定、single Grubbs 検定及び paired Grubbs 検定によって外れ値検定を行い、一元配置分散分析によって平均値、併行相対標準偏差、室間再現相対標準偏差及び HorRat 値等を求めた。サイクラミン酸試験法については、ビスケット、チョコレート、米酢、らっきょう漬け及びたくわん漬けの 5 食品を対象食品として、100 µg/g 濃度にサイクラミン酸を添加し、1 日 2 併行にて改良法を検討した。

### 3 アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究（村上研究分担）

本研究では、これまでに特定原材料（小麦・落花生）の定量で影響が確認されてきたポリフェノールの一種であるProanthocyanidin (PAC) を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行った。今年度は特定原材料の検査における試験室内における不確かさについて評価を行った。当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における不確かさについて推定を行った。また、改良抽出法の試験室間における評価のために精度管理用試料を作成し、試料の安定性について評価した。

### 4 下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究（鎗田研究分担）

#### 4.1 均質性評価のための分析法の開発

##### (1) 材料・試薬

ホタテガイは市販の殻付きホタテガイを使用した。1 ppm OA 溶液（溶媒：メタノール）と 1 ppm DTX1 溶液（溶媒：メタノール）は産業技術総合研究所から入手した。DTX2 認証標準物質は National Research Council Canada から入手した。他の試薬は LC-MS 用、HPLC 用または特級を用いた。

##### (2) ホタテガイ試料の前処理方法

ホタテガイを開殻した後、可食部をブレンダーで細かく刻んだ。この試料 2 g を食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号の別紙 2 に従って前処理した。ただし、固相抽出による精製は、本件研究で開発した

方法（後述）で行った。

##### (3) 固相抽出条件の検討方法

ODS カートリッジ（ジールサイエンス社製 Inert-Sep C18 500 mg）を用いた方法 2 法と、HLB カートリッジ（Waters 社製 Oasis PRiME HLB 200 mg）を用いた方法 2 法を検討した。各法の詳細は分担報告書に記載するが、ここでは最も良好な結果を示した方法（D 法）の手順を示す。

D 法：(2) に従って調製したヘキサン洗浄液 2.5 mL、水 2.5 mL、OA 群混合標準溶液 100  $\mu$ L の混合液をカートリッジに注入し、溶出液を Fr. D1 とした。次に、試料が入っていたねじ口試験管にアセトニトリル/メタノール（4：1）1.0 mL を加えて攪拌し、カートリッジに注入した。この操作を繰り返した。さらにアセトニトリル/メタノール（4：1）3.0 mL をカートリッジに注入し、これらによって得られた溶液を合わせて Fr. D2 とした。さらにアセトニトリル/メタノール（4：1）3.0 mL をカートリッジに注入し、得られた溶液を Fr. D3 とした。

##### (4) LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、島津製作所のUFLC高速液体クロマトグラフ（ポンプ：LC-20AD、デガッサー：DGU-20A3、オートサンプラー：SIL-20ACHT、カラムオープン：CTO-20AC、システムコントローラ：CBM-20A）と、質量分析計（Applied Biosystems 3200 Q TRAP）を用いた。カラムはCadenza CD-C18カラム（内径：2 mm、長さ：100 mm、粒子径：3  $\mu$ m）を用いた。LC-MS/MSの測定条件は、食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号の別紙 2 に準拠した。

#### 4.2 検査試料の均質性評価

##### (1) 材料・試薬

検査試料は、昨年度の本事業で調製したものを使用した。試薬類は4.1(1)と同じものを使用した。

#### (2)均質性評価試験の方法

検査試料10本を無作為に選択し、各瓶について2回ずつ、合計20サブサンプルを分析した。

### 4.3 液体クロマトグラフィー蛍光検出法の検討

#### (1)材料・試薬

HPLC用または特級試薬を用いた。

#### (2)誘導体化法

9-Anthryldiazomethane (ADAM) 2 mg にアセトン 100  $\mu$ L とメタノール 900  $\mu$ L を順次加えた。インサート付 200  $\mu$ L バイアルに試料 100  $\mu$ L をとり、窒素気流下で乾固した。これに前述の ADAM 溶液 200  $\mu$ L を加え、室温、暗所で1時間反応させた。

#### (3)カラムスイッチング HPLC 装置

島津製作所製のポンプ2台、デガッサー、カラムオープン、蛍光検出器、およびレオダイン製インジェクターと6方切換バルブ2個より構成させた。第1カラムにはジーエルサイエンス製 Inertsil diol 5  $\mu$ m (4.6 mm i. d.  $\times$  250 mm) を、第2カラム (トラップカラム) にはジーエルサイエンス製 Inertsil C4 5  $\mu$ m (3.0 mm i. d.  $\times$  150 mm) を、第3カラムには野村化学製 Develosil C30-UG-5 (3.0 mm i. d.  $\times$  250 mm) を用いた。

### 5 分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用 (大竹研究分担)

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランク玄米を粉碎したものを試料とし、そこに対象農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、フェ

ニトロチオン、マラチオンをポジティブリストの基準濃度値 (クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン: 0.1 mg/kg, フェニトロチオン: 0.2 mg/kg) になるように添加した。本試料を、IDMS を適用した一斉試験法および SFE 法によって分析を行い、得られた結果を解析して各分析法の正確さを精密に評価・比較した。さらに、食品薬品安全センター 秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料 (Lot 1 (120  $^{\circ}$ C), 2 (100  $^{\circ}$ C), 3 (80  $^{\circ}$ C) の3種、温度は噴霧温度を示す) 中の対象農薬を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

試薬は、アセトニトリル (AN)、アセトン (Ac)、トルエン (To1)、メタノール (Me)、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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。他の試薬は試薬グレードを用い、水は超純水を用いた。

質量比混合法によって標準液を調製した。クロルピリホス- $d_{10}$ 、ダイアジノン- $d_{10}$ 、フェニトロチオン- $d_6$ 、マラチオン- $d_6$  を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液を調製した。一方、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液を調製した。さらに、農薬混合溶液、内標準溶液、アラクロール溶液、Ac を混合することにより、検量線溶液を調製した。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玄米試料を後述の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を調製した。

分析法 1 (一斉試験法) では、玄米試料 3 g に農薬混合溶液 0.4 mL (添加回収試験の場合のみ) および内標準溶液 0.4 mL を加えて静置した。これに水 10 mL を加えて 15 分静置した後、AN25 mL を加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN10 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。これに NaCl 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL を加え、10 分間振とうした。その後、あらかじめ AN10 mL でコンディショニングした Agilent Technologies 製 Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ (1 g) を用いて、振とうによって得られた AN 層と AN2 mL を通液する処理を行った。得られた処理液を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/To1 (3:1) 混液 2 mL に溶解した。Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) を AN/To1 (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらに AN/To1 (3:1) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 0.5 mL に溶解させ、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。測定条件は以下の通りである。装置 : 7890/5975c GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム : DB-5ms (30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 μm、Agilent Technologies 製)、カラム温度 : 50 °C で 2 分間保持した後、+20 °C/分で 160 °C まで昇温し、さらに +7 °C/分で 300 °C まで

昇温し、10 分間保持、注入口温度 : 250 °C、検出器温度 : 230 °C (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 μL、イオン化条件 : EI、定量に用いた *m/z* : 314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス-*d*<sub>0</sub>)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン-*d*<sub>0</sub>)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-*d*<sub>6</sub>)、285 (マラチオン)、291 (マラチオン-*d*<sub>6</sub>)、188 (アラクロール)。

分析法 2 (SFE 法) では、玄米試料 1 g に農薬混合溶液 0.15 mL (添加回収試験の場合のみ) および内標準溶液 0.15 mL を加えて静置した。これに約 10 g の Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加え、ステンレス製の 15 mL 抽出管 (日本分光製) に試料を導入し、日本分光製の超臨界抽出装置 (ポンプ 1 : PU-2080-CO<sub>2</sub>、ポンプ 2 : PU-2080 Plus、ミキサー : MX-2080-32、オープン : CO-2065 Plus、背圧調整弁 : BP-2080 Plus) を用いて抽出を行った。抽出条件は以下の通りである ; 溶媒 : 25% (v/v) Me / 超臨界二酸化炭素、温度 : 80 °C、圧力 : 25 MPa、溶媒流量 : 2.5 mL/min、抽出時間 : 20 min。抽出液を、抽出装置出口に接続した ODS カラム (日本分光製、PES-10-1/16) に通液した後、ナス型フラスコに回収した。回収した抽出液を、あらかじめ AN/To1 (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) に注入し、さらに AN/To1 (3:1) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 0.2 mL に溶解させ、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。測定条件は、分析法 1 と同じ

である。

分析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。

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

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、 $M_c$ : 検量線溶液中の農薬混合液の質量、 $C_c$ : 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。

添加回収試験においては、式(1)に準じて算出した一斉試験法(分析法1)およびSFE法(分析法2)の分析値を、玄米試料への添加濃度(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン: 0.1 mg/kg, フェニトロチオン: 0.2 mg/kg)と比較することにより、正確さを評価した。残留農薬検査用玄米試料の分析においては、式(1)に準じて算出した一斉試験法(分析法1)およびSFE法(分析法2)による分析値を、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

## C. D. 研究結果および考察

### 1 渡辺研究分担

#### 1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発:

前年度に、80%アセトニトリル懸濁液に4種農薬(ダイアジノン、フェニトロチ

オン、マラチオン、クロルピリホス)を添加し、同一条件で作製した。その結果、それぞれの農薬の回収率は噴霧温度80%で25%~40%となり、噴霧温度を下げることで回収率は改善した。さらに40%アセトニトリル懸濁液の場合、さらに回収率は高くなった。これらの結果を踏まえ、今年度はさらに水の添加を増やし20%アセトニトリル懸濁液を用い検討を行った。検討条件はこれまでと同様の条件で行った。すなわち、アトマイザの回転数: 20000rpm、処理量 2kg/h、噴霧温度(入口温度)を120°C、100°C、80°Cで検討した。今回はさらに水を加えたために、大きな粒子の玄米粉の沈降が少なかった。また、各噴霧温度においても40%アセトニトリルを用いた時と比べて回収率は高くなり改善した。農薬の回収率は噴霧温度が下がるほど高くなった。これは、温度により農薬が分解または気散している可能性が示唆された。これも前回と同様の傾向が認められた。ダイアジノンは沸点が120°Cで添加農薬の中で一番沸点が低く、回収率も一番低かった。噴霧温度が120°Cのとき回収率は47.5%となり、80°Cでは69.8%と回収率は劇的に改善した。一方、他の3農薬の回収率の挙動は、沸点がいずれも140°C以上であることからほぼ同じとなった。これは前回と同様の傾向であった。噴霧温度が80°Cのとき回収率は70%~75%程になり、これまでで最も回収率が良好であった。以上のように、水の添加量を増やすことで回収率が改善したが、これ以上の水の添加は農薬の水の溶解性を考えると限界であると考えられた。何か溶解

を補助するものを添加することでさらに水の添加量を増やすことも可能であるが実験系が複雑になることから本条件が最適であると考えられた。

以上より、作製溶媒の水の比率が大きくなると回収率も高くなり、また、噴霧温度を下げることで、さらに回収率が高くなることが分かった。さらに水の比率を高くすることは農薬の溶解性によるので、本条件が適正であると思われる。今後は本条件での再現性を確認する必要がある。

## 1.2 器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討：

シート状試料作製と同ポリマー含量 10 w/v%で作製した結果、試料の外観は糸状となり、均質な粉体試料が得られなかった。新たに希釈溶媒として酢酸ブチルを用いて調製したポリマー含量 1 w/v%及び 5 w/v%溶液から得られた試料は、5 w/v%では一部糸状試料が観察されたが、1 w/v%では均質な球状粒子の試料が得られた。しかし、球状粒子は非常に微細で帯電しやすく、試験操作上の観点から不適切であると考えられた。

シート状試料ではジクロロメタンが部位により約 1~3%残留する可能性が示唆されたが、スプレードライヤを用いて試料を作製した結果、いずれの部位も定量下限未満の良好な結果が得られた。しかしながら希釈溶媒として使用した酢酸ブチルは約 2%残留しており、スプレードライヤにおける入口温度 100℃が溶媒沸点 126℃よりも低いことが原因の 1 つとして考えられた。

カドミウム及び鉛含量において、ポリマー含量 10 w/v%及び 5 w/v%溶液から得ら

れたいずれの試料もカドミウム及び鉛の理論作製濃度に対していずれの部位でも回収率 85~105%と均質で良好な結果が得られた。

スプレードライヤに供するポリマー溶液やスプレードライヤ装置の設定条件を変えることで外観上は均質な粉体試料が得られたが、これらは帯電しやすく調査試料としての適用はできないため、これらを用いた加工等更なる検討が必要であると考え。今後は更に前回の研究報告で良好な溶解性が確認できた他の基材についても同様の検討を行う。

## 1.3 特定原材料検査(乳)技能試験プログラムのパイロットスタディ：

パイロットスタディに先立ち、基材検討を行った。とうもろこしペースト及びイチゴジャムに乳タンパク質を添加し、小スケールで作製した試料について 1 か月、3.5 か月及び 8 か月の安定性を確認した。その結果、両試料とも試験結果回収までを想定した作製後 3.5 か月を超え、8 か月まで安定である結果が得られた。上記 2 基材を用いた調査試料を用いてパイロットスタディを実施した。

パイロットスタディへの参加機関は 36 機関で、すべての機関がモリナガキット及び日本ハムキットを使用したことから、これら 2 キットについて統計解析を行った。プリマハムキットとモリナガ( $\beta$ LG)キットについては使用が各 1 機関と少なかったため、解析を行わなかった。

その結果、MC で除外された機関は認められなかった。Xbar 管理図では管理限界線の範囲を超える機関は 1 機関、R 管理図で管理限界線を超えた機関は全体でのべ 5 機関

認められた。Xbar 管理図で外れたデータは、z-スコアの絶対値も 3 以上となり、外れ値を示した。

以上の結果からほとんどの機関で、十分にコントロールされた試験が行われていることが推察された。

#### 1.4 一般細菌数測定検査用調査試料の開発：

調査試料の性能評価において、冷蔵試料の生菌数測定を添加菌の添加直後、保存開始から 10、14、28、84 日後の 5 回実施した。また常温試料の生菌数測定を保存開始から 14、28 日後の 2 回実施した。いずれも 1 個の調査試料を使用し、秤量回数 2 回とした。冷蔵試料は保存開始から 84 日後まで非常に安定した生菌数を維持し、各実施日の生菌数の差も  $\pm 0.5 \log \text{cfu/g}$  の範囲内であった。また添加菌添加直後と 28 日後の生菌数平均値差は  $0.03 \log \text{cfu/g}$  であった。参考情報として実施した常温試料も、保存開始 14、28 日後のいずれも冷蔵試料とほぼ同等の生菌数を維持していた。

調査試料の品質評価では、パイロットスタディ用の調査試料は冷蔵保存し、その中から均質性確認試験および安定性確認用に無作為に各 10 個の調査試料を抽出した。均質性確認試験は 2 名の検査員が各 1 回ずつ生菌数測定を行い、実数の平均値、標準偏差、変動係数および一元分散分析を行った。また均質性確認試験では試験結果をもとに標準不確かさを算出した。標準不確かさは  $0.05 \log \text{cfu/g}$  と非常に小さい数値であり、調査試料として問題ないと評価した。安定性確認試験は調査試料の作製から約 2 カ月後に均

質性確認試験と同様に試験を実施した後、実数の平均値を算出した。

パイロットスタディでは、対象とした全 49 機関から結果を回収した。実数解析では、データ・クリーニングにより除外される機関はなく、2 シグマ処理は実施しなかった。正規確率プロットを確認したところ、概ね直線状にデータが分布しており、正規分布に従っていると考えられた。また管理限界外となった機関は  $\bar{X}$  管理図においては 0 機関、R 管理図においては 2 機関であった。z-スコアによる解析では、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  に該当する機関が 1 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$  に該当する機関が 1 機関であった。相対標準偏差は 15.65 % であり、ゼラチン基材を調査試料とする食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査における過去 5 年間（2017 年度～2021 年度）の相対標準偏差（11～18 %）と大差のないものであった。対数解析では、データ・クリーニングにより除外される機関はなく、2 シグマ処理は実施しなかった。

正規確率プロットを確認したところ、概ね直線状にデータが分布しており、正規分布に従っていると考えられた。また、z-スコアによる解析では、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  に該当する機関が 2 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$  に該当する機関はなかった。相対標準偏差は 1.52 % であり、ゼラチン基材を調査試料とする食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査における過去 5 年間（2017 年度～2021 年度）の相対標準偏差（1.0～2.3 %）と大差のないものであった。

なお、実数解析と対数解析を比較した

ところ、対数解析のほうがより正規分布に従っていた。一般的に微生物学的技能試験は対数解析を行っているものが多く、国際的に見ても今後の外部精度管理調査では対数解析を採用したほうがよいと考えられた。

## 2 石井研究分担

### 微生物定性試験法における検出下限値の推定

手技によるバラツキの評価における黄色ブドウ球菌定性試験法の LOD<sub>50</sub> は 29～49 CFU/mL であった。また、食品試料ごとの LOD<sub>50</sub> は 25～48 CFU/g であり、手技によるバラツキと比較しても食品試料による検出感度の低下は認められなかった。

食品試料ごとの LOD<sub>50</sub> を培地への試料接種量である 0.02 g 中の菌量に換算すると 0.50～0.96 CFU となる。すなわち、1 個以上の菌が培地中に接種されれば検出されたと考えられ、試験性能としては十分な検出感度を有していると推察された。

今後複数の試験室による共同試験を行い、推定した LOD<sub>50</sub> を評価する予定である。

### 食品添加物試験法の妥当性に関する研究

「ソルビン酸試験法」で検討対象とした 10 種類の食品及び「二酸化硫黄及び亜硫酸塩試験法」で検討対象とした 6 種の食品はすべて室間共同試験で真度及び精度良く測定が可能であったことから、妥当性評価の対象食品として適当であると考えられた。

サイクラミン酸規定分析法改良の検討ではビスケット試料は加水量を増やし、適宜混和・攪拌することにより、チョコレートでは上澄液を 2 倍程度希釈することによ

り、たくわん漬けでは固相抽出カートリッジへの負荷液の pH 調整では顕著な回収率向上の効果は認められなかったが、米酢及びらっきょう漬けでは pH6～7 に調整することにより回収率の改善が図られた。

## 3 村上研究分担

当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における不確かさについて推定を行った。評価の結果、両キットの測定間と抽出間の精度は全ての項目で 10%以下となり、良好な結果を示した。一方で、室内再現精度については使用する試料とキットによって差異が確認された。室間共同試験用の試料の調製法について検討した結果、試料は調製後 84 日まで安定であり、測定阻害と改良抽出法の評価に適用できることが確認できた。このため、最終年度は試験室数を増やして改良抽出法の試験室間共同試験を実施する予定である。

## 4 鎗田研究分担

### 4.1 均質性評価のための分析法の開発

#### (1) 固相抽出条件の最適化

検討した 4 法で得た各フラクションを LC-MS/MS で測定した。このうち D 法については、すべての OA 群が Fr. D2 に溶出したことを確認した。

#### (2) マトリックス効果の評価

D 法による処理液 (Fr. D2) について、LC-MS/MS におけるマトリックス効果の影響を評価した。その結果、OA 群の感度は標準液測定における感度と同等であり、顕著なマトリックス効果は認められなかった。一方、他

の固相抽出条件によって得たフラクションでは、マトリックス効果を除去することはできなかつた。これより、検討した固相抽出条件の中ではD法が精確な測定のために最も有効であると考えられた。

### (3) 正確さと再現性の評価

確立した分析法によって添加回収試験を行った。添加濃度は、ホタテガイ試料中濃度として各 0.05 mg/kg とした。その結果、0A 群の回収率はほぼ 100 % であり、下痢性貝毒検査法における正確さの要求基準である 70~120 % に十分適合していることが示された。

各日2回の分析を3日間行うことにより、室内精度を評価した。その結果、得られた室内精度は相対値として 5.8~8.3 % であり、下痢性貝毒検査法における精度の要求基準 (20 % 以下) を十分満たしていた。

## 4.2 検査試料の均質性評価

調製した検査試料から10本を無作為に選りだし、各瓶から異なる2か所を採取して分析した。得られた結果を一元配置分散分析によって評価したところ、瓶間のばらつきは有意ではない ( $P$ 値 $>0.05$ ) ことが確認された。

認証標準物質の生産に関する国際基準である ISO Guide 35 に則り、均質性に関する不確かさを評価した。その結果、相対標準偏差として、0A : 5.6 %、DTX1 : 5.9 % と算出された。この結果は、試験所間の分析結果のばらつきの予測値 (検査試料の予備分析結果を Horwitz の修正式に代入することによって算出) よりも十分小さかつた。すなわち、昨年度調製した検査試料は、試験所間比較試験での使用のために十分な均質性を有することが示された。

## 4.3 液体クロマトグラフィー蛍光検出法の検討

第1カラム、第2カラム及び第3カラムにおける 0A 群の保持挙動を検討し、その結果を基にカラムスイッチング条件を確立した。この条件において、まず、第1カラムの 4~6 分をハートカットして、トラップカラムへ導入した。その後、切換バルブを操作し、この分画を第3カラムに導入したところ、0A 蛍光誘導体化合物は約 13 分に、DTX-1 蛍光誘導体化合物は約 16 分に溶出した。ADAM を用いた誘導体化においては、誘導体試薬由来の成分と分析対象成分との分離が困難である場合があるが、本法ではこれらを良好に分離することができた。

## 5 大竹研究分担

添加回収試験において、分析法1で得られた定量値と調製値の比を比較した結果、クロルピリホスが 100 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 97 %、マラチオンが 99 % となり、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、95~101 % と良好であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液を用いた場合の算出結果は、クロルピリホスが 102 %、ダイアジノンが 96 %、フェニトロチオンが 89 %、マラチオンが 98 % であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。よって、マトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であると考えられた。

同様に、分析法2のSFE法で得られた定

量値と調製値の比は、クロルピリホスが 100 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 99 %、マラチオンが 99 %となり、SFE 法によっても調製値通りの分析値が得られることが示された。さらに、各農薬の標識体の回収率も、72~83 %と良好であった。これより、本研究で対象とした玄米中の農薬に対して、SFE 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。なお一斉試験法と同様に、マトリックスマッチングしていない検量線を用いた場合の比も算出した。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 99 %、フェニトロチオンが 96 %、マラチオンが 96 %であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてクロルピリホスとフェニトロチオンの測定結果に若干の偏りが生じることが確認された。結果的には一斉試験法と大きな差は見られず、SFE 法においてもマトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であるという結果が得られた。

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用玄米試料の、Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C) (温度は噴霧温度を示す) の 3 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法および SFE 法によって分析した。得られた結果より、クロマトグラムにおいて対象農薬のピークに夾雑物による妨害が見られず、一斉試験法と SFE 法の定量結果もよく一致していた。食品薬品安全センター秦野研究所によると、添加濃度はクロルピリホス: 0.1, ダイアジノン: 0.4, フェニトロチオン: 0.2, マラチオン: 0.2 (単位は mg/kg) であり、調製時の回収率は 45~75 %程度と予想されるという

ことであった (農薬の種類によって回収率は異なる)。本研究で得られた結果を用いて、調製時の回収率を計算した結果、46.5 %~71.6 %となった。これより、一斉試験法および SFE 法の分析結果が、添加濃度と調製時の回収率から予測される濃度の範囲とよく一致していたことが示された。以上より、玄米中の対象農薬について、本研究で検討した方法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 千葉雄介、藤原 茜、高瀬冴子、島田慎一、石井里枝：E. coli 定性試験法における検出下限値の推定、第 42 回日本食品微生物学会学術総会、Web 開催 (岡山) 2021
- 2) 千葉雄介、金井美樹、藤原 茜、荒島麻実、土井りえ、島田慎一、石井里枝：黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定、第 117 回日本食品衛生学会学術講演会、Web 開催 (東京) 2021
- 3) 村上太郎、工藤鮎子、村野晃一、高取聡、角谷直哉、若栗忍、渡辺卓穂：ELISA 法による特定原材料 (落花生) の測定における阻害因子の解析と改良抽出法の検討：日本食品化学学会 第 27 回総会・学術大会、WEB 開催, 2021.
- 4) 村上太郎、村野晃一、工藤鮎子、清田恭平、昌山敦、高取聡、山野哲夫：特定原材料検査の内部品質管理における課題と不確かさの推定：第 58 回全国衛生化学技術協議会年会、WEB 開催, 2021.

- 5) 上原由理香, 鳥居塚南, 鎗田 孝 : LC-MS/MS によるホタテガイ中下痢性貝毒(オカダ酸群)分析における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討, 第 27 回 LC&LC/MS テクノプラザ (Web 開催) 2022.
- 6) 中村圭介, 大竹貴光, 羽成修康 : ネギ中のネオニコチノイド系農薬分析における超臨界流体抽出法の評価、日本食品衛生学会第 117 回学術講演会、Web 開催、2021
- 7) 中村圭介, 大竹貴光, 羽成修康 : Evaluation of the automatic extraction techniques for the determination of neonicotinoid pesticides in green onion、The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021)、Web 開催、2021

#### F. 知的所有権の取得状況

なし



令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

—スプレードライヤを用いた残留農薬用試料の開発(1)—

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	副所長
研究協力者	高坂 典子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	平林 尚之	(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**

初年度、玄米粉中の残留農薬については、100%アセトニトリルにダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン及びククロルピリホスを溶解させ、玄米粉を加え懸濁攪拌させ、スプレードライヤの噴霧温度（入口温度）を120℃、100℃、80℃で比較検討したが、回収率は5%～25%と非常に低かったことから、昨年度は、水を加え、80%アセトニトリル溶液、40%アセトニトリル溶液を検討した結果、水の量を増やすことで回収率が改善できることが分かった。今年度は、さらに水の量を増やし20%アセトニトリル溶液で作製検討した。作製条件は、これまでと同様に行い回収率を比較した。回収率は改善され、入り口温度が80℃のとき、いずれの農薬も回収率は70%以上であった。作製された試料は、課題5に供与した。

**A. 研究目的**

これまで技能試験プログラム用試料は実試料に近い湿試料を開発し作成していた。湿試料の場合、長時間にわたる安定性を維持することは非常に困難であった。野菜ペースト中の残留農薬や豚肉ペースト中の残留動物用医薬品などはその基材由来の成分や酵素などにより分解を受け易く、安定性を担保することが課題である。これら技能試験プログラム用試

料は、安定性ばかりではなく、均質性も求められ、両者を満たされなければ試料として用いることができない。一方、湿試料に比べ乾試料は安定性が良いことは知られており、安定性を期待する試料として紛体の乾試料を用いて技能試験も行われている。そこで、紛体の技能試験プログラム用試料の開発を目的とした。

乾燥した紛体の作製には、試料の分解を考慮すると凍結乾燥法が有力である

が、多量の試料を作製するためには向かない。また、紛体と紛体を混合しても、粒子径が同じでなければ均質なものはできない。そこで、液体原料を熱風中に噴霧して液滴の比表面積を増加させ短時間で水分を蒸発させる乾燥法であるスプレードライヤ（噴霧乾燥法）をこの技能試験プログラム用試料作製に応用できないか検討した。スプレードライヤは 20 世紀初めに脱脂粉乳の乾燥に用いられ発達した技術であり、種々の食品に応用されている。通常は液体原料に適用された技術であるが、我々は、玄米粉を用い、カドミウム溶液に懸濁させて作製条件の検討を行い、技能試験用試料として用いることができることを示した。今年度は、同一の玄米粉を用い、残留農薬用試料作製に応用し、基礎的検討を行った。

## B. 方法

### 1. 試料基材および試薬

試料基材として自家製玄米粉（宮城ひとめぼれを粉砕した）を用いた。農薬（ダイアジノン標準品、フェニトロチオン標準品、マラチオン標準品、クロルピリホス標準品）はいずれも Dr.Ehrenstorfer 製を用いた。また、溶解、抽出にアセトニトリル（HPLC 用、富士フイルム和光純薬）、トルエン（富士フイルム和光純薬）、ヘキサン（残留農薬用、富士フイルム和光純薬）、アセトン（残留農薬用、富士フイルム和光純薬）および水（HPLC 用、富士フイルム和光純薬）を用いた。

### 2. 使用機器および測定条件

残留農薬標準品の秤量にはザルトリウス社製電子天秤（MSA225S100DI）を用い

た。農薬の測定には島津製作所社製 GC/MS-QP2010 を使用した。カラムは DB-5MS（Agilent J&W）を用い、以下の測定条件で行った。

GC/MS 測定条件

カラムオープン温度:50℃

気化室温度:250℃

注入モード:スプリットレス

サンプリング時間:1.5 分

線速度:47.2 cm/秒

スプリット比:15:1

温度プログラム:50℃ (1 分) ⇒125℃ (25℃/分) ⇒300℃ (10℃/分) 10 分

### 3. 標準溶液の調製

農薬の標準原液は、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンおよびクロルピリホスについて、それぞれの農薬標準原液を調製した。すなわち、各標準品を当該成績書の純度に基づき換算し、100.0 mg となるよう精密に量りとり、これにアセトンを加えて溶かし、正確に 100 mL として各農薬の標準原液（1000 µg/mL）とした。

### 4. 試料溶液の調製

GC/MS 用試料

試料 10.0 g に水 20 mL 加え、15 分間放置し、アセトニトリル 40 mL 添加し、3 分間ホモジナイズした。ホモジナイザー（GLH-115）のシャフトを少量のアセトニトリルで洗い、ホモジナイズした試料と合わせ、ホモジナイズした試料を吸引ろ過した（受器:100 mL 容メスフラスコ、桐山ロート、No. 5A ろ紙）。残渣をろ紙ごと回収（スパーテル、ピンセット等を用いて抽出容器に戻した）し、アセトニトリル 20 mL を添加、攪拌後、再

度3分間ホモジナイズした。シャフトを少量のアセトニトリルで洗い、ホモジナイズした試料と合わせ、吸引ろ過し、抽出容器内及び残渣をアセトニトリルで洗い込み、ろ液を全て合わせ、アセトニトリルで正確に100 mLとした。分液ロートに抽出液20 mLを正確にとり、振とう機で10分間振とうした。30分以上静置した後、分離した下層（水）を除去し、予めC18ミニカラムをアセトニトリル10 mLでコンディショニングした。このカラムを吸引マニホールドにセットし、分離したアセトニトリル層を注入した。さらに、アセトニトリル2 mLを注入し、全溶出液を回収した。脱水後（15分間放置、この間3回程度振り混ぜた）、無水硫酸ナトリウムを綿栓ろ過によりろ別した（受器：100 mL容ナス型フラスコ）。得られたろ液を40°C以下（設定35°C）で濃縮乾固した。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液2 mLに溶解後、超音波処理した。精製には、予めGC/NH<sub>2</sub>ミニカラムをアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液10 mLでコンディショニングした。抽出液全量（約2 mL）をGC/NH<sub>2</sub>カラムに負荷し（受器：50 mL容ナス型フラスコ）、ナス型フラスコ内をアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液10 mLで洗い、この液をGC/NH<sub>2</sub>カラムに負荷することを2回繰り返した（10 mL×2回）。次に溶出液を40°C以下（35°C設定）で1 mL以下に濃縮し、これにアセトン10 mLを加えて40°C以下（35°C設定）で1 mL以下に濃縮、再度アセトン5 mLを加えて濃縮した溶媒を除去した。残留物に

A/H混液2 mLを正確に加えて溶解後、超音波処理して試験溶液及び空試験溶液とし（試料基材1 g/mL相当）し、試料溶液及び空試料溶液は共栓試験管（10 mL容）に移し、測定日まで冷蔵庫で保管した。

## 5. 試料の作製

残留農薬用試料は自家製玄米粉を用い、玄米粉1 kgをアセトニトリルまたはアセトニトリル/水4 Lに懸濁させ、スプレードライヤに供した。

### 5. スプレードライヤによる玄米粉試料作製条件

作製検討に用いたスプレードライヤは大川原化工機株式会社製研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iを用いた。玄米粉懸濁溶液は事前に攪拌し、均一な懸濁溶液とし、原液タンクに移し、攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに2 kg/hで送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクはMC-50型を使用した。回転数は20000 rpmに設定した。また、入り口温度は120°C、100°C、80°Cで作製温度を検討した。得られた玄米粉はマイクロトラックベル社製マイクロトラックMT3200を用い平均粒子径を測定した。また、得られた玄米粉はガスクロマトグラフ質量分析計で4種の農薬を測定した。また、作製した玄米粉は顕微鏡下で粒子の観察を行った。

（倫理面への配慮）

食品の安全に関する研究であり、倫理面への配慮をする必要はなかった。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. スプレードライヤによる玄米粉試料作製検討

技能試験用試料として残留農薬検査について検討した。残留農薬は水溶性のものは少なく、有機溶媒を用いた作製の検討となった。これまで用いたスプレードライヤはいずれも水溶液用であり、有機溶媒を用いる場合は、窒素ガス密閉循環型スプレードライヤがその作製には有効の装置である。本装置 CL-8i は予備検討に使用した L-8i の密閉系の装置であり、難水溶性物質の乾燥、造粒が可能であり、窒素循環させていることから酸化防止にもなり、残留農薬検査用試料作製には適した装置であると考えられた。そこで、前回まで基材としては重金属と同様の自家製玄米粉を用い、4種の農薬を図1に示すように試料作製した。図2には用いたスプレードライヤ CL-8i の外観を示す。本装置を用い、アトマイザーの回転数は 20000rpm とし、処理量は 2kg/h に設定し、入口温度を 120℃、100℃、80℃の3条件で検討を行った。前回用いた溶媒はアセトニトリルであり、玄米粉と懸濁させたとき玄米粉の沈降速度が速くペリスタポンプで上方へ送液中に玄米粉粒子が沈降するスピードが速く、微細な粒子が先に導入されて、大きな粒子が遅れて導入されることがわかった。また、吸い込み口を下げると、大きな粒子も導入されるため、回収量が多くなることも確認された。よって、攪拌や導入口の位置など検討する必要があることがわかった。重金属の作製において

は水を溶媒として用いたのに対して、農薬は有機溶媒を使用していることから玄米粉への溶媒の浸透度の違いがあり、農薬は玄米粉中への浸透は少なく、回収率が低くなったと考えられた。そこで、前年度は水を添加することで回収率が改善するか検討した。すなわち、80%アセトニトリル懸濁液に4種農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス）を添加し、昨年度作製した条件で行った。その結果、それぞれの農薬の回収率は噴霧温度 80%で 25%～40%となり、噴霧温度を下げることで回収率は改善した。さらに 40%アセトニトリル懸濁液の場合、さらに回収率は高くなった。これらの結果を踏まえ、今年度はさらに水の添加を増やし 20%アセトニトリル懸濁液を用い検討を行った。検討条件はこれまでと同様の条件で行った。すなわち、アトマイザーの回転数：20000rpm、処理量 2kg/h、噴霧温度（入口温度）を 120℃、100℃、80℃で検討した。表1～4に各農薬の回収率の変化を示す。また、図3に噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率を示す。今回はさらに水を加えたために、大きな粒子の玄米粉の沈降が少なかった。また、各噴霧温度においても 40%アセトニトリルを用いた時と比べて回収率は高くなり改善した。農薬の回収率は噴霧温度が下がるほど高くなった。これは、温度により農薬が分解または気散している可能性が示唆された。これも前回と同様の傾向が認められた。ダイアジノンは沸点が 120℃で添加農薬の中で一番沸点が低く、回収率も一番低かった。噴霧温度が 120℃のとき回

収率は 47.5%となり、80℃では 69.8%と回収率は劇的に改善した。一方、他の 3 農薬の回収率の挙動は、沸点がいずれも 140℃以上であることからほぼ同じとなった。これは前回と同様の傾向であった。噴霧温度が 80℃のとき回収率は 70%~75%程になり、これまでで最も回収率が良好であった。以上のように、水の添加量を増やすことで回収率が改善したが、これ以上の水の添加は農薬の水の溶解性を考えると限界であると考えられた。何か溶解を補助するものを添加することでさらに水の添加量を増やすことも可能であるが実験系が複雑になることから本条件が最適であると考えられた。図 4 には自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真を示す。図 5~7 には噴霧温度を 120℃から 80℃まで変化させたときの粒度分布と顕微鏡写真を示す。前回の条件では、噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなったが、今回はほぼ同じであった。

以上より、作製溶媒の水の比率が大きくなると回収率も高くなり、また、噴霧温度を下げることで、さらに回収率が高くなることが分かった。さらに水の比率を高くすることは農薬の溶解性によるので、本条件が適正であると思われる。今後は本条件での再現性を確認する必要がある。

## E. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

表1 噴霧温度によるダイアジノンの回収率の変化 (20%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g) <sup>*1</sup>	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	92.90323	10.027	100	20	2	2	0.185306133	0.185
	1-2	94.82663	10.035	100	20	2	2	0.188991789	0.188
	1-3	99.34631	10.043	100	20	2	2	0.1978419	0.197
	SD (μg/g)								0.006244998
									0.00624
	RSD (%)								3.2842105
									3.3
2 (100°C)	2-1*	139.26679	10.002	100	20	2	2	0.278477884	0.278
	2-2*	129.61868	10.005	100	20	2	2	0.259107806	0.259
	2-3*	129.97713	10.043	100	20	2	2	0.258841243	0.258
	SD (μg/g)								0.011269428
									0.0113
	RSD (%)								4.2641509
									4.3
3 (80°C)	3-1*	135.54152	10.043	100	20	2	2	0.269922374	0.269
	3-2*	143.41026	10.038	100	20	2	2	0.285734728	0.285
	3-3*	141.99973	10.020	100	20	2	2	0.283432595	0.283
	SD (μg/g)								0.008717798
									0.00872
	RSD (%)								3.125448
									3.1

表2 噴霧温度によるフェニトロチオンの回収率の変化 (20%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g)*1	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	58.22484	10.027	100	20	2	2	0.116136112	0.116
	1-2	59.55646	10.035	100	20	2	2	0.118697479	0.118
	1-3	63.21035	10.043	100	20	2	2	0.125879419	0.125
	SD (μg/g)								0.004725816
									0.00473
	RSD (%)								3.9416667
									3.9
2 (100°C)	2-1*	79.11733	10.002	100	20	2	2	0.158203019	0.158
	2-2	73.68078	10.005	100	20	2	2	0.147287916	0.147
	2-3	72.45477	10.043	100	20	2	2	0.144289097	0.144
	SD (μg/g)								0.007371115
									0.00737
	RSD (%)								4.9133333
									4.9
3 (80°C)	3-1	72.48685	10.043	100	20	2	2	0.144352982	0.144
	3-2*	76.00201	10.038	100	20	2	2	0.151428591	0.151
	3-3*	76.70595	10.020	100	20	2	2	0.153105689	0.153
	SD (μg/g)								0.004725816
									0.00473
	RSD (%)								3.1744966
									3.2

表3 噴霧温度によるマラチオンの回収率の変化 (20%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g)*1	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	52.11532	10.027	100	20	2	2	0.103949975	0.103
	1-2	53.78666	10.035	100	20	2	2	0.107198127	0.107
	1-3	56.92402	10.043	100	20	2	2	0.113360589	0.113
	SD (μg/g)								0.005033223 0.00503
	RSD (%)								4.6574074 4.7
2 (100°C)	2-1*	75.86752	10.002	100	20	2	2	0.151704699	0.151
	2-2	69.86697	10.005	100	20	2	2	0.139664108	0.139
	2-3	68.96018	10.043	100	20	2	2	0.137329842	0.137
	SD (μg/g)								0.007571878 0.00757
	RSD (%)								5.3309859 5.3
3 (80°C)	3-1	70.73012	10.043	100	20	2	2	0.140854565	0.140
	3-2	73.47464	10.038	100	20	2	2	0.146392987	0.146
	3-3	74.81082	10.020	100	20	2	2	0.149322994	0.149
	SD (μg/g)								0.004582576 0.00458
	RSD (%)								3.1586207 3.2



表4 噴霧温度によるクロルピリホスの回収率の変化 (20%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号 (Lot No.)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g) <sup>*1</sup>	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	28.50415	10.027	100	20	2	2	0.056854792	0.0568
	1-2	29.62863	10.035	100	20	2	2	0.059050583	0.0590
	1-3	30.96518	10.043	100	20	2	2	0.0616652	0.0616
	SD (μg/g)								0.0024028
									0.00240
	RSD (%)								4.0609137
									4.1
2 (100°C)	2-1	38.07941	10.002	100	20	2	2	0.076143591	0.0761
	2-2	35.63433	10.005	100	20	2	2	0.071233043	0.0712
	2-3	35.50728	10.043	100	20	2	2	0.070710505	0.0707
	SD (μg/g)								0.0029838
									0.00298
	RSD (%)								4.0990371
									4.1
3 (80°C)	3-1	35.90524	10.043	100	20	2	2	0.071503017	0.0715
	3-2	36.86035	10.038	100	20	2	2	0.073441622	0.0734
	3-3	36.50188	10.020	100	20	2	2	0.072858044	0.0729
	SD (μg/g)								0.0009849
									0.000985
	RSD (%)								1.3567493
									1.4

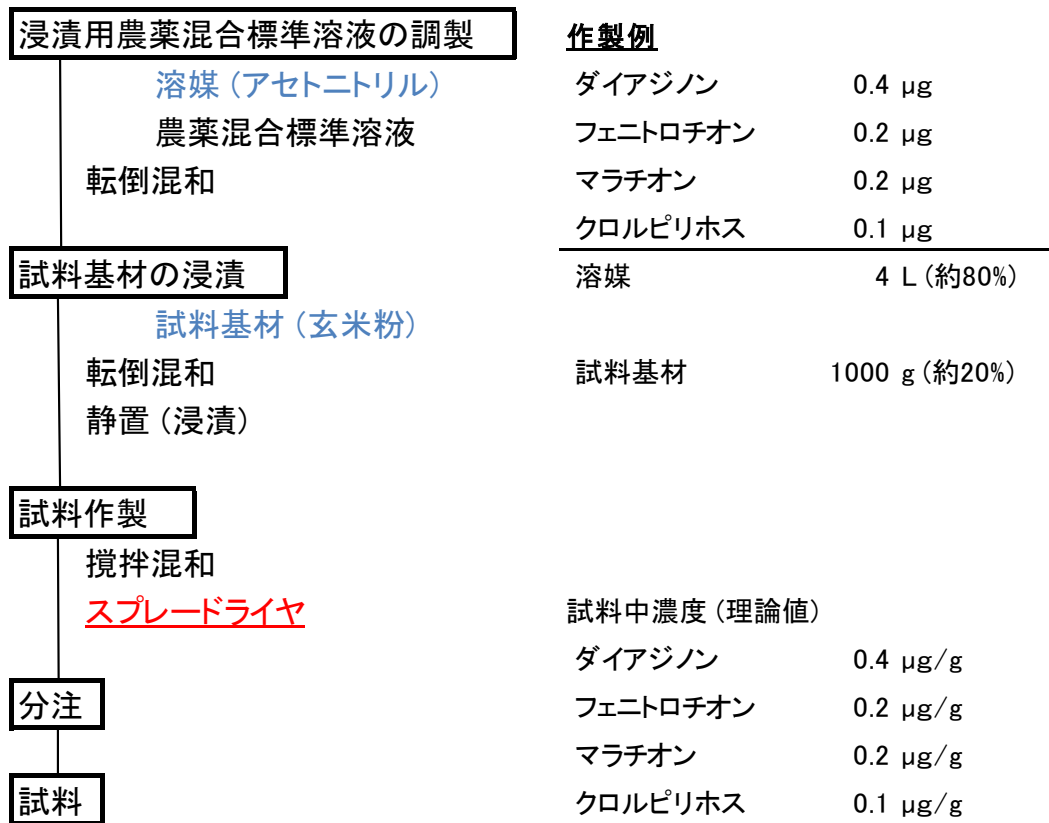


図1 スプレードライヤによる技能試験用残留農薬検査試料作製スキーム



図2 窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iの外観

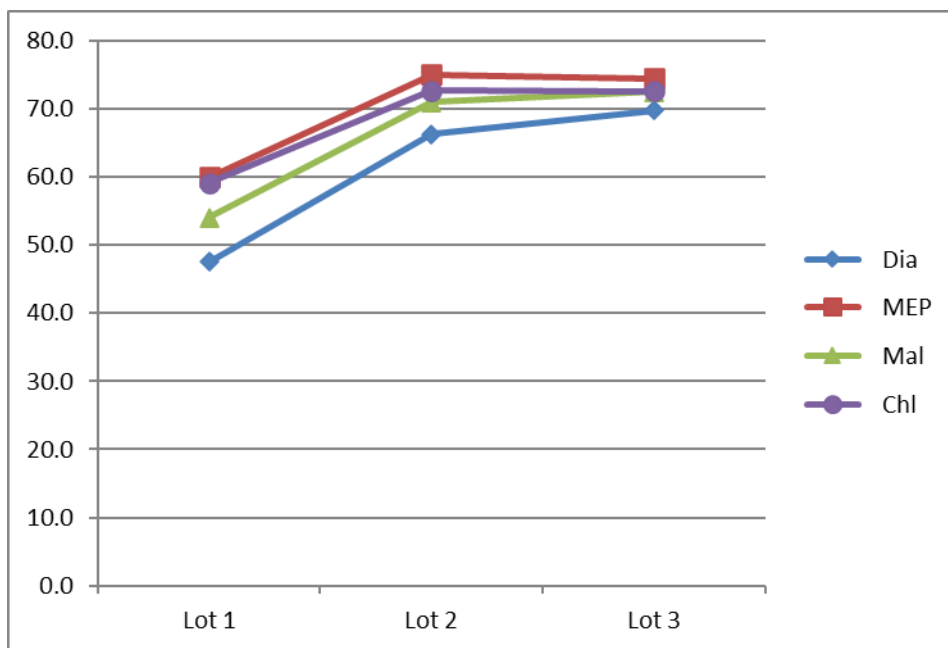


図3 噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率の比較 (20%アセトニトリル)

Lot1:120°C、Lot2:100°C、Lot3:80°C

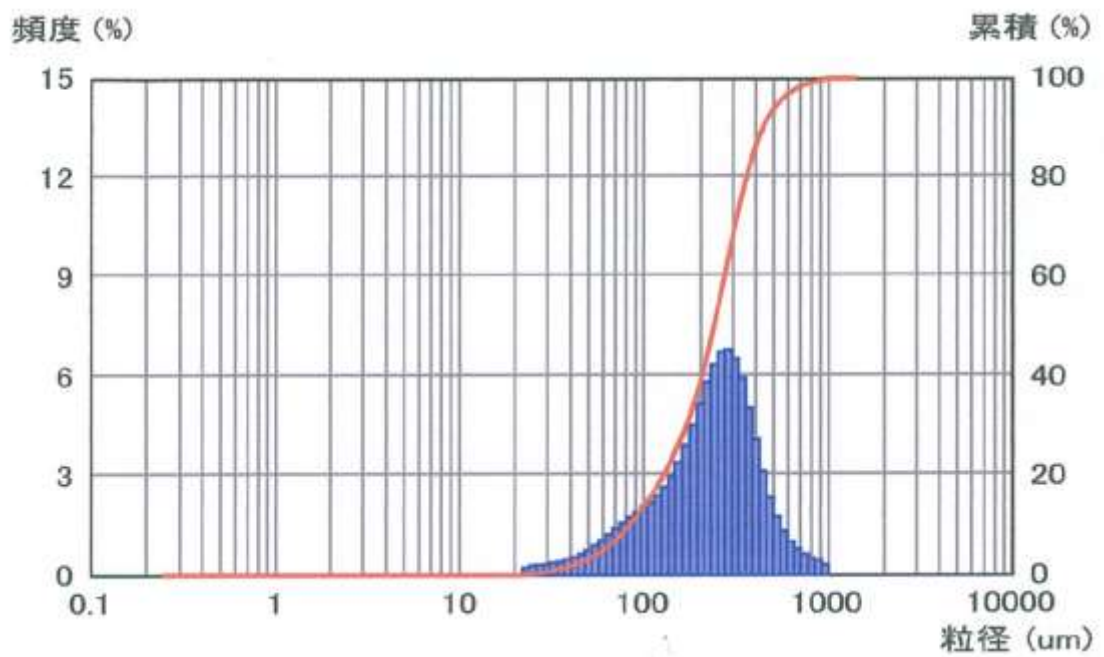
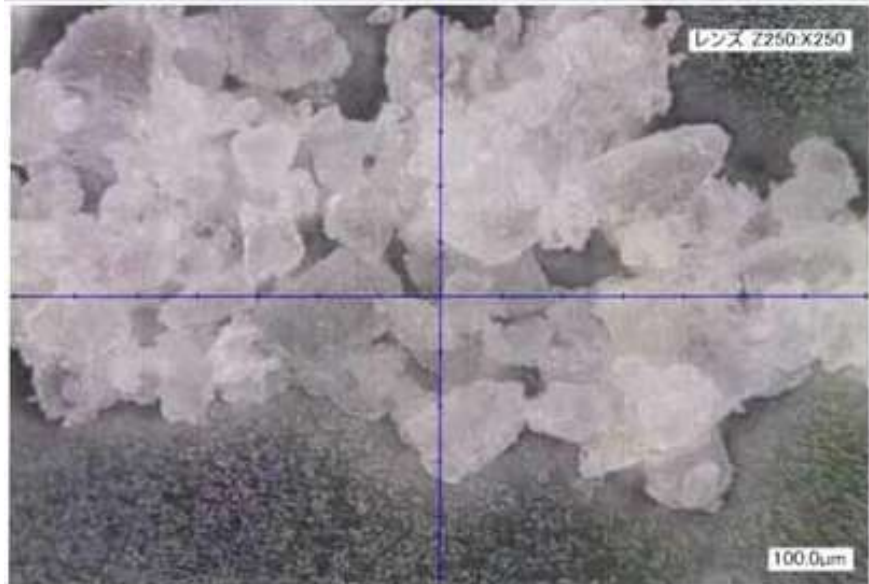


図4 自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真

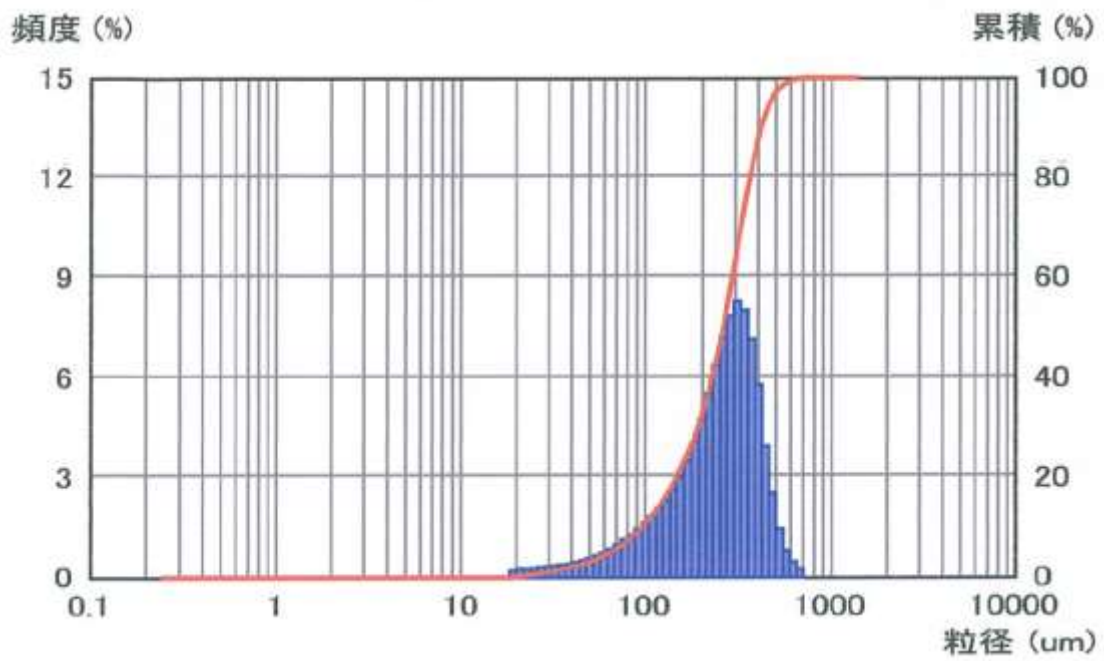
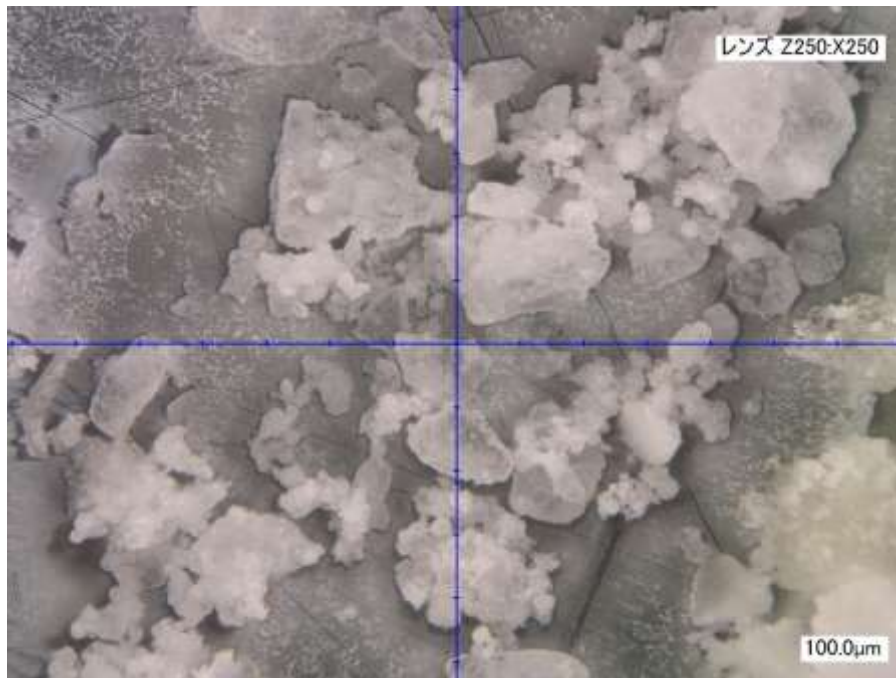


図5 120°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

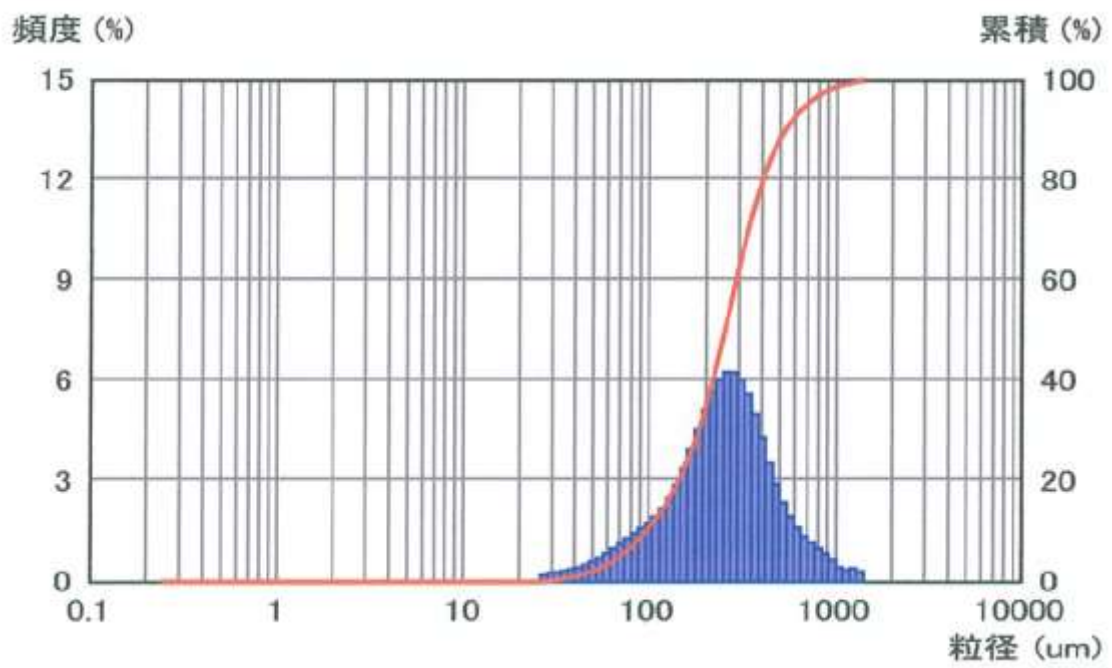
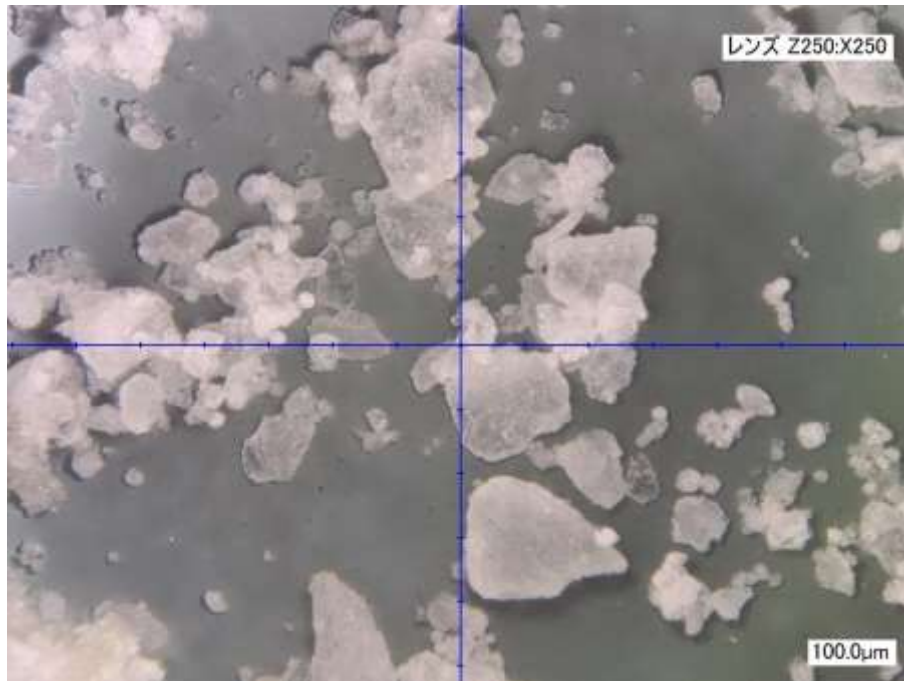


図6 100°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

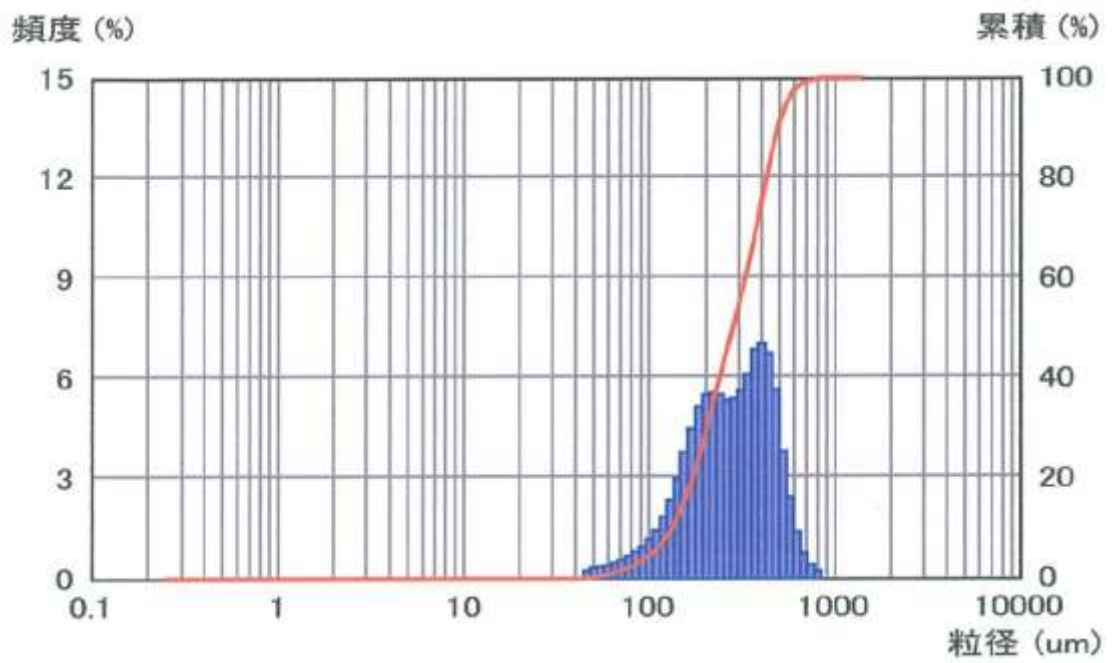
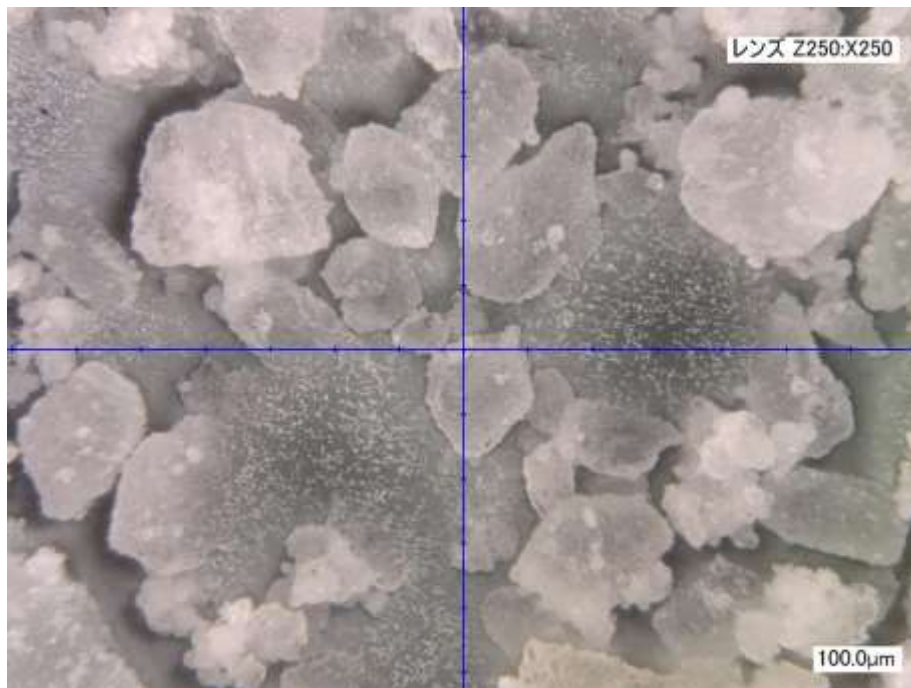


図7 80°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真



令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究  
－器具・容器包装の原材料の材料別規格に関する調査試料作製検討(2)－

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	副所長
研究分担者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	副所長
研究協力者	高坂 典子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	平林 尚之	(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
	西垣 嘉人	(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

食品衛生法第4条6項に、食品衛生とは、食品、添加物、器具及び容器包装を対象とする飲食に関する衛生をいうと定義されており、器具・容器包装は食品衛生の3本柱の1つと言える。これまでは、この食品衛生法第7条1項及び第10条の規定に基づき制定される「食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）」で定める食品中の残留農薬基準や添加物の使用（残留）基準を参考に外部精度管理調査のための実施プログラムを検討してきた。昨年度「器具・容器包装」を対象に新たな外部精度管理調査プログラムの実施を試みるべく調査試料作製の基礎的検討を開始し、食品衛生法において個別規格があるプラスチックの材質ポリマーについて、作製上の必要要件である有機溶媒への溶解性を検討した。その結果、試料基材にはポリスチレンペレットを選択し、試験対象物質をカドミウム及び鉛として、溶解溶媒にジクロロメタンを用いてシート状の試料作製を行った。これらのシート状試料は、試験対象物質の良好な均質性が得られたが、ポリスチレンペレットの溶解溶媒に用いたジクロロメタンの残留が認められた。また、残留溶媒除去法の確立が困難だったことから、今年度は新たな作製法としてスプレードライヤを用いて粉体の試料作製を試みた。添加に用いる標準品はシート状試料と同様に有機溶媒に溶解するSPEX製カドミウム及び鉛（いずれも5000 µg/g、Base Oil 75）を用いた。ポリマー質量に対して10倍容量のジクロロメタンに、この標準品を添加して均質な溶液とし、これにポリマーを添加して混合し、十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをスプレードライヤに供し、粉体状の試料を得て、これらのカドミウム及び鉛含量を測定し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性ならびに残留溶媒について検討した。シート状試料と同ポリマー含量（10 w/v%）では、スプレードライヤによる試料は糸状となり、均質な粉体試料が得られなかった。そこで、均質

な粉体試料を得るためにポリマー含量やスプレードライヤに供する際のポリマー溶液の希釈溶媒についても検討した。その結果、新たに希釈溶媒として酢酸ブチルを用いて調製したポリマー含量 1 w/v%及び 5 w/v%溶液から得られた試料は、5 w/v%では一部糸状試料が観察されたが、1 w/v%では均質な球状粒子の試料が得られた。しかし、球状粒子は非常に微細で帯電しやすく、試験操作上の観点から不適切であると考えられた。残留溶媒については、シート状試料ではジクロロメタンが部位により約 1~3%残留する可能性が示唆されたが、スプレードライヤを用いて作製した結果、いずれの部位も定量下限未満の良好な結果が得られた。しかしながら酢酸ブチルは約 2%残留しており、スプレードライヤにおける入口温度 100℃が溶媒沸点 126℃よりも低いことが原因の 1 つとして考えられた。カドミウム及び鉛含量において、いずれの作製条件で得られた試料もカドミウム及び鉛の理論作製濃度に対していずれの部位でも回収率 85~105%と均質で良好な結果が得られた。スプレードライヤに供するポリマー溶液のポリマー含量や溶液の種類、またスプレードライヤ装置の設定条件を変えることで外観上は均質な粉体試料が得られたが、調査試料としての適用はできないため、これらを用いた加工等更なる検討が必要であると考えられた。

## A. 研究目的

厚生省告示第370号で規定される器具及び容器包装に関する規格基準には、「A 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料一般の規格」、「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」、「E 器具又は容器包装の用途別規格」及び「F 器具及び容器包装の製造基準」があり、この中でも「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」の合成樹脂製器具・容器包装の全合成樹脂に共通して規定される材質試験としてのカドミウム及び鉛の規格に着目した。昨年度の検討において、ポリスチレンペレットの溶解溶媒として用いたジクロロメタンの作製シートへの残留が約1%でほぼ一定となり、これ以上の除去が困難なことから、調査試料の作製検討として新たにスプレードライヤを用いたポリスチレン粉体の作製を試みた。各作製条件で得られ

た試料中の残留溶媒、カドミウム及び鉛の含量を測定し、品質評価を行った。

## B. 方法

### 1. 試料基材、器材、試薬及び標準品

ポリスチレン（以下、PS）ペレットとして PSJ-ポリスチレン（PS ジャパン）を用いた。

調査試料作製用器材に、ガラス製の 5 L メデューム瓶（蓋：PP 製）を用いた。

試料基材溶解溶媒（以下、溶解溶媒）として、ジクロロメタン（試薬特級、富士フイルム和光純薬）、酢酸ブチル（試薬特級、富士フイルム和光純薬）を用いた。10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液の希釈溶媒の検討として、メタノール（試薬特級、富士フイルム和光純薬）、ヘキサン（試薬特級、富士フイルム和光純薬）、アセトン（試薬特級、富士フイルム和光純薬）、メチルシクロヘキサン（和光

特級、富士フィルム和光純薬)、2,2,4-トリメチルペンタン (イソオクタン、試薬特級、富士フィルム和光純薬)、シクロヘキサン (和光特級、富士フィルム和光純薬)、ヘプタン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、酢酸ブチル (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、クロロホルム (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、トルエン (試薬特級、富士フィルム和光純薬)、4-メチル-2-ペンタノン (メチルイソブチルケトン、試薬特級、富士フィルム和光純薬) 及び 2-ブタノン (メチルエチルケトン、試薬特級、富士フィルム和光純薬) を用いた。

ポリマーに添加する標準品として、カドミウムは 5000 µg/g Cadmium (Base Oil 75、SPEX CertiPrep)、鉛は 5000 µg/g Lead (Base Oil 75、SPEX CertiPrep) を用いた。

## 2. 使用機器

調査試料作製用機器として、Fisher Scientific 製 マグネチックスターラー (Isotemp) を、秤量には、メトラー・トレド製電子天秤 (PR803) を用いた。

10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液の希釈溶媒の検討には、ボルテックスミキサーを用いた。

試料中のジクロロメタン及び酢酸ブチルの残留溶媒、カドミウム及び鉛の測定は外部委託にて実施した。ジクロロメタン及び酢酸ブチルの残留溶媒測定は、島津製作所製ガスクロマトグラフ (GC2010Plus)、カドミウム及び鉛の測定は、アジレント・テクノロジー製誘導結合プラズマ発光分析装置 (Agilent 5800 ICPE-OES) 用いた。

スプレードライヤ試料の作製には、大川原化工機株式会社製研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iを用いた。また、得られたスプレードライヤ試料の観察に、デジタル顕微鏡を用いた。

## 3. 作製条件の検討

### 1) 10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液の希釈溶媒の検討

スプレードライヤに供する際の10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液を希釈するための溶媒の検討を行った。検討には、B. 1. 試料基材、器材、試薬及び標準品に示した溶媒を用い、それぞれ10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液と等倍及び3倍希釈を行い、溶解性を目視観察した。希釈後、分離した溶媒については以後の希釈操作及び観察を行わず、3倍希釈直後において溶解した溶媒のみ5日後の溶解性についても観察をした。

### 2) スプレードライヤに供するポリマー含量の検討

ポリマー含量の検討を以下のとおりに行った。

10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液及び10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液と、B. 3. 1) より選択した溶媒 (以下、希釈溶媒) を、ポリマー含量が1 w/v %及び5 w/v %となるよう混合し、スプレードライヤに供して、得られた試料を観察した。

### 3) スプレードライヤを用いた試料の作製条件

作製法の概略を図1に、スプレードライヤ運転条件を表2に示す。

試料基材のポリマー質量に対して10倍容量のジクロロメタンをとり、これにカドミウム及び鉛標準液を添加し、均質な標準溶液添加溶解溶媒を調製した。これにポリマーを添加し、混合溶解して均質なポリマー溶液を調製した。このポリマー溶液（ポリマー含有10 w/v%）またはスプレードライヤに供する前に希釈溶媒で、ポリマー含量が1 w/v%及び 5 w/v%となるよう混合したものを原液タンクに移し、攪拌しながら3.5 ～ 3.7 kg/hで送液した。運転条件はディスク型またはノズル式を用い、ディスク型の場合はMC-50型、回転数25000 rpm、ノズル式の場合はRJ-10型、噴霧ガス圧力0.10～0.20 Mpaとした。入口温度は100℃または140℃で検討した。また、得られた試料について、ジクロロメタン及び酢酸ブチル含量とカドミウム及び鉛の含量（理論作製濃度50 µg/g）を測定した。作製した試料は顕微鏡下で粒子の観察も行った。

#### 4. 試料の品質評価

##### 1) 試料中残留溶媒の測定

スプレードライヤを用いて作製した試料について、溶解に使用した溶媒としてジクロロメタンおよび酢酸ブチルの残留量（含量）を確認した。測定は、スプレードライヤにより生成されたおおよその時系列に従い、6～7分画とした6～7試験部位について、スプレードライ試料中の残留溶媒含量について評価した。なお、ジクロロメタン及び酢酸ブチル含量測定については、食品衛生法上の登録検査機関に外部委託した。

##### 2) 試料の均質性評価

スプレードライヤを用いて作製した試料について、カドミウム及び鉛の含量を、残留溶媒の測定に用いた同様の試験部位について測定を行い、試験部位の違いによるばらつきと回収率について評価した。なお、カドミウム及び鉛含量の測定については、食品衛生法上の登録検査機関に外部委託した。

（倫理面への配慮）

特定化学物質（第2類分類）の使用に際し、使用者への暴露、発散及び漏洩の防止に努めた。

#### C. D. 研究結果および考察

##### 1. 作製条件の検討

1) 10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液の希釈溶媒の検討

10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液及び希釈溶媒として12種類の有機溶媒について検討した結果を表1に示す。

等倍希釈を行ったところ、メタノールでは混合後直ちに分離し、ポリマーが沈降した。また、ヘキサン、アセトン、メチルシクロヘキサン、2,2,4-トリメチルペンタン（イソオクタン）、シクロヘキサン及びヘプタンは混合後白濁したが、ボルテックスミキサーで混合することにより溶解した。酢酸ブチル、クロロホルム、トルエン、4-メチル-2-ペンタノン（メチルイソブチルケトン）及び2-ブタノン（メチルエチルケトン）ではいずれも混合後直ちに溶解した。混合後、溶解した11種について更に3倍希釈したところ、希釈直後の観察でヘキサン、2,2,4-トリメチルペンタン（イソオクタン）及びヘプタ

ンで分離が認められた。スプレードライヤに供するまでの日数を調製後最大5日間と仮定し、その間の溶解性の確認を行ったところ、3倍希釈した溶媒のうち、アセトンを除いたすべての溶媒で溶解性に問題ないことが確認できた。スプレードライヤに供することから沸点、溶媒の取り扱い等を踏まえ、希釈後混合溶媒の沸点が最も高いと推定される酢酸ブチルを選択した。

以上の結果より、今年度は試料基材としてPSペレットを、溶解溶媒としてジクロロメタン、希釈溶媒として酢酸ブチルを用いてスプレードライヤを用いた試料の作製検討を行った。

## 2) スプレードライヤに供するポリマー含量の検討

B. 3. 1)に示す方法を用いてスプレードライヤに供した。

## 3) スプレードライヤを用いた試料の作製検討

材質試験（器具・容器包装）の調査試料作製としてスプレードライヤに供するポリマー溶液について検討した。昨年度まではPSシートを作製し、残留溶媒測定（ジクロロメタン含量）、PSシート内の均質性確認試験（カドミウム及び鉛含量の測定）及び溶解溶媒除去法について検討を実施した。今年度は重金属検査、残留農薬検査の試料作製として検討を実施していたスプレードライヤを用いた試料作製の検討を行った。残留農薬検査の試料作製と同様、有機溶媒を用いる場合は、窒素ガス密閉循環型スプレードライヤがその作製には有効の装置である。本装置 CL-8i は密閉系の装置であり、難水

溶性物質の乾燥、造粒が可能であり、窒素循環させていることから酸化防止にもなり、ポリマー溶液を用いた試料作製にも適した装置であると考えられた。試料基材としてPSペレットを、添加物質としてカドミウム及び鉛を用い、図1に示すように試料を作製した。図2には用いたスプレードライヤ CL-8i の外観を示す。本装置を使用することで、溶媒も回収でき、ジクロロメタンの沸点が低いいため入口温度は低く設定できる。そこで、ディスク型の場合はアトマイザーの回転数は25000 rpm とし、重金属検査及び残留農薬検査の条件を参考にして処理量は3.5～3.7 kg/h に設定し、入口温度100℃または140℃で検討を行った。ノズル式の場合は、噴霧ガス圧力0.10～0.20 Mpa に設定し、入口温度100℃または140℃で検討を行った。

## ①10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液

ディスク型及びノズル式の運転条件を用いて試料を作製した。ディスク型は、処理量3.7 kg/h、回転数25000 rpm、入口温度140℃で検討を行った。ノズル式は2条件を検討し、1条件目は処理量3.6 kg/h、噴霧ガス圧力0.10 Mpa、入口温度140℃で検討を行い、2条件目は処理量3.7 kg/h、噴霧ガス圧力0.10 Mpa、入口温度100℃で検討を行った。その結果、ディスク型は噴霧開始直後に糸状となった。ノズル式の1条件目もディスク型と同様に糸が凝集し綿状となり、2条件目も粒子形状に変化は認められなかった。これら運転条件のうち、より効率的に試料を回収することができたノズル式

の2条件目の試料について品質評価を実施した。

#### ②5 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:1)

ディスク型及びノズル式の運転条件を用いて試料を作製した。ディスク型は、処理量3.5 kg/h、回転数25000 Mpa、入口温度100℃で検討を行い、ノズル式は、処理量3.6 kg/h、噴霧ガス圧力0.20 Mpa、入口温度100℃で検討を行った。その結果、5 w/v%は一部糸状部分が残る試料となったが、5 w/v%、10 w/v%では溶媒が早くに揮散するため糸状の乾物試料となったことが考えられた。また、2つの運転条件のうち、より効率的に試料を回収することができたノズル式の試料について品質評価を実施した。

#### ③1 w/v%ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:9)

ノズル式の運転条件を用いて、処理量3.6 kg/h、噴霧ガス圧力0.20 Mpa、入口温度100℃で検討を行った。その結果、ポリマー含量5 w/v%、10 w/v%時に見られた試料が糸状となる現象は改善され、球状粒子の試料が得られた。しかし、ポリマー溶液12.88 kgを用いて得られた試料は4.8 gと少量であり、用いたポリマー溶液のほとんどがバグフィルターから回収された。

### 3. 試料の品質評価

ジクロロメタン及び酢酸ブチル含量とカドミウム及び鉛含量の測定

#### ①10 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液

結果を表3に示す。

ジクロロメタン含量は、スプレードラ

イヤにより生成されたおおよその時系列に従い、6分画とした6試験部位について各n=1で測定した結果、いずれの試験部位においても定量下限未満 (0.1%未満) であり、昨年度検討したPSシートにおけるジクロロメタン含量 (1.29~3.41%) より大幅に減少できた。

一方、カドミウム含量は、6試験部位について各n=1で測定した結果は47~48 µg/gであり、ばらつきは小さかった。また、鉛含量については45~46 µg/gであり、カドミウムと同様にばらつきは小さかった。

カドミウム及び鉛含量については、いずれの試験部位においても理論作製濃度50 µg/gに対して、カドミウムが94~96%、鉛は90~92%の良好な回収率であった。

#### ②5 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:1)

結果を表4に示す。

ジクロロメタン含量は、スプレードライヤにより生成されたおおよその時系列に従い、7分画とした7試験部位について各n=2で測定した結果、いずれの試験部位においても定量下限未満 (0.2%未満) であり、酢酸ブチル含量は、2.32~2.77%であった。

一方、カドミウム含量は、7試験部位について各n=2で測定した結果は42~57 µg/gであり、10 w/v%の結果よりもばらつきが大きかった。また、鉛含量について測定した結果は41~60 µg/gであり、カドミウムと同様に10 w/v%の結果よりもばらつきが大きかった。

カドミウム及び鉛含量については、いずれの試験部位においても理論作製濃度

50 µg/gに対して、カドミウムが88～102%、鉛は85～105%の回収率であった。

以上の結果より、ポリマー含量5 w/v%の試験部位と比較して10 w/v%の試験部位のほうが、ジクロロメタン含量、カドミウム及び鉛含量のすべてにおいて良好な結果が得られた。5 w/v%では希釈溶媒として酢酸ブチルを添加したが、溶媒の沸点が126℃と高いため酢酸ブチルが残留したと考えられた。一方でカドミウム及び鉛含量はポリマー含量が低くなると試験部位間でのばらつきが大きくなる傾向が認められた。

#### ③1 w/v%ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:9)

得られた試料が細かい球状粒子のため帯電しやすく、試験操作上の汚染等が考えられることから、品質評価は実施しないこととした。

### F. 健康危険情報

ポリマーの溶解溶媒にジクロロメタン等の特定化学物質（第2類物質）を使用した。安全保護具を着用の上、局所排気装置内で操作を行った。

### 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

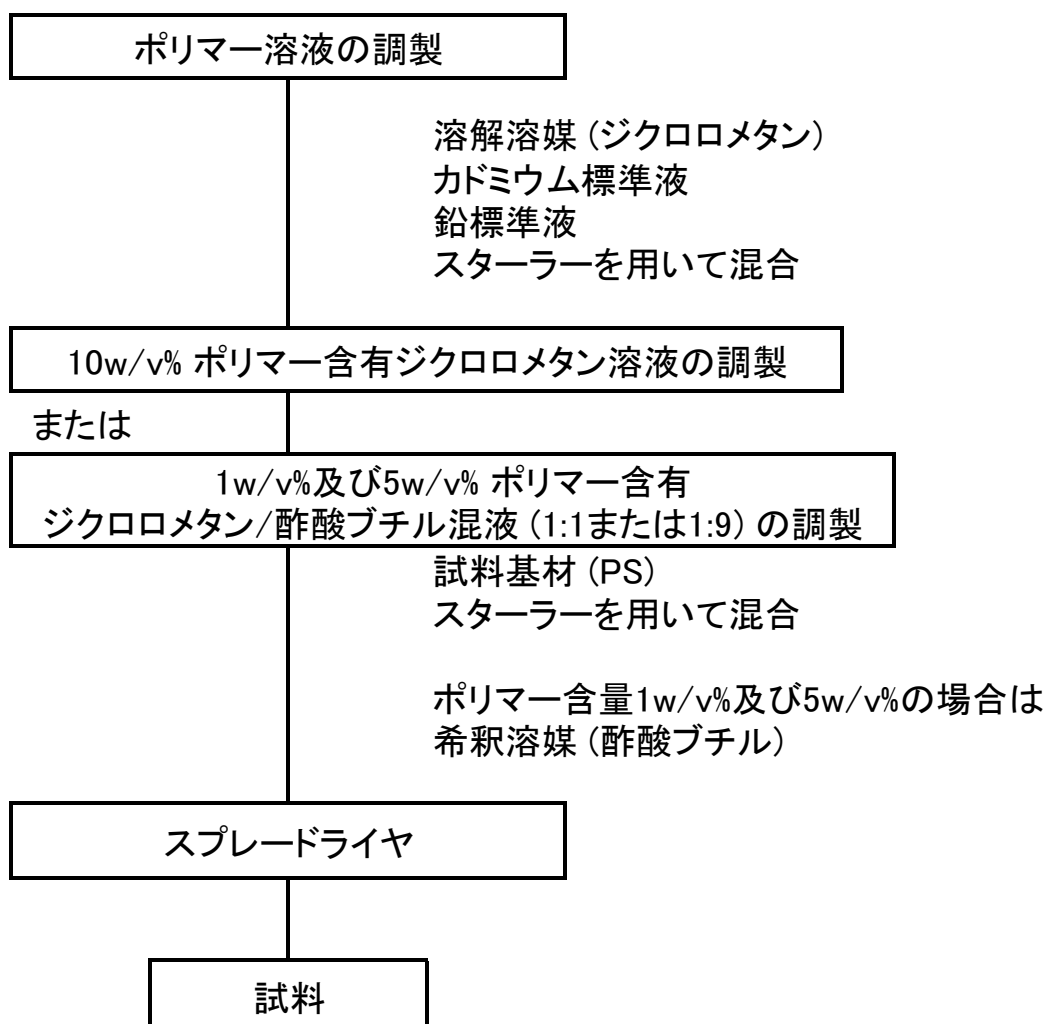


図1 スプレードライヤ試料作製法概要

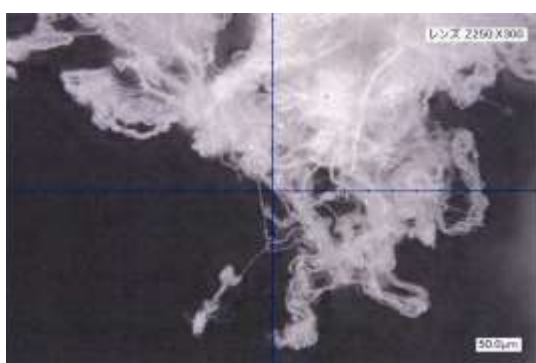




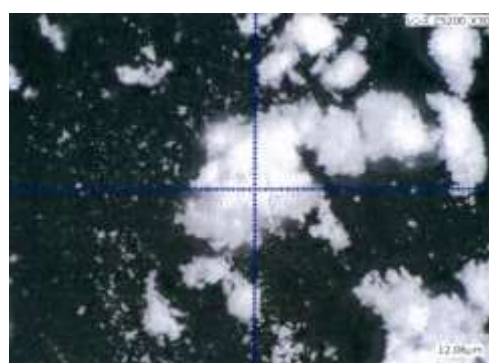
図2 窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iの外観



10 w/vポリマー含有ジクロロメタン溶液 (回収品)



5 w/vポリマー含有ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:1)



1 w/vポリマー含有ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:9)

図3 各スプレードライ試料の回収品または顕微鏡写真

表1 10w/v%ポリマー含有ジクロロロメタン溶液の希釈溶媒の検討

溶媒名	沸点 (°C)	結果			評価
		等倍希釈	3倍希釈(直後)	3倍希釈(5日後)	
メタノール	64.7	分離、沈降	—	—	不可
ヘキサン	69	白濁後、溶解	白濁、分離	—	不可
アセトン	56	白濁後、溶解	白色(澄明)	分離	不可
メチルシクロヘキサン	100	白濁後、溶解	○	○	可
2,2,4-トリメチルペンタン(イソオクタン)	99	白濁後、溶解	白濁、分離	—	不可
シクロヘキサン	81	白濁後、溶解	○	○	可
ヘプタン	98	白濁後、溶解	白濁、分離	—	不可
酢酸ブチル	126	○	○	○	優
クロロホルム	61	○	○	○	良
トルエン	111	○	○	○	優
4-メチル-2-ペンタン(メチルイソブチルケトン)	115	○	○	○	優
2-ブタノン(メチルエチルケトン)	80	○	○	○	良

表2 スプレードライヤ条件

運転条件		①			②		③
ディスク型	型式	MC-50	—	—	MC-50	—	—
	回転数 (rpm)	25000	—	—	25000	—	—
ノズル式	型式	—	RJ-10	RJ-10	—	RJ-10	RJ-10
	噴霧ガス圧力 (MPa)	—	0.10	0.10	—	0.20	0.20
入口温度 (°C)		140	140	100	100	100	100
出口温度 (°C)		94	89	77	73	63	64

- ① 10 w/v% ポリマー含有ジクロロメタン溶液
- ② 5 w/v%ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:1)
- ③ 1 w/v%ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:9)

表3 10w/v%ポリマー含有ジクロロメタン溶液 残留溶媒、カドミウム及び鉛の測定結果

試験部位	ジクロロメタン	Cd		Pb	
	含量 (%)	試料中濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)	試料中濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)
1	$\leq 0.1$	47	94	45	90
2	$\leq 0.1$	48	96	46	92
3	$\leq 0.1$	48	96	46	92
4	$\leq 0.1$	48	96	46	92
5	$\leq 0.1$	48	96	46	92
6	$\leq 0.1$	48	96	45	90
平均値		48	96	46	91
標準偏差		0.41	0.82	0.52	1.03
相対標準偏差 (%)		0.85	0.85	1.13	1.13

スプレードライヤ:ノズル式

各 $n=1$ 測定

回収率:濃度を理論作製濃度 ( $50 \mu\text{g/g}$ ) で除した百分率

表4 5 w/v%ポリマー含有ジクロロメタン/酢酸ブチル混液 (1:1) 残留溶媒、カドミウム及び鉛の測定結果

試験部位	併行 分析数	ジクロロメタン		酢酸ブチル		Cd			Pb		
		含量 (%)	含量 (%)	含量 (%)	平均值 (%)	試料中濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	試料中濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)	試料中濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	試料中濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 (%)
1	1	$\leq 0.2$	2.63	2.70	2.70	46	45.5	91	46	45	90
	2	$\leq 0.2$	2.77			44			44		
2	1	$\leq 0.2$	2.68	2.685	2.685	42	44	88	41	42.5	85
	2	$\leq 0.2$	2.69			44			44		
3	1	$\leq 0.2$	2.52	2.56	2.56	46	46	92	46	45.5	91
	2	$\leq 0.2$	2.6			46			45		
4	1	$\leq 0.2$	2.69	2.56	2.56	45	45	90	43	43.5	87
	2	$\leq 0.2$	2.57			45			44		
5	1	$\leq 0.2$	2.6	2.575	2.575	46	45	90	45	44	88
	2	$\leq 0.2$	2.55			44			43		
6	1	$\leq 0.2$	2.44	2.485	2.485	45	51	102	45	52.5	105
	2	$\leq 0.2$	2.53			57			60		
7	1	$\leq 0.2$	2.33	2.325	2.325	45	45.5	91	45	45	90
	2	$\leq 0.2$	2.32			46			45		
平均値		—		2.56		46	46	92	45	45	91
標準偏差		—		0.13		2.29	2.29	4.58	3.28	3.28	6.57
相対標準偏差 (%)		—		5.08		4.98	4.98	4.98	7.29	7.29	7.22

スプレードライヤ：ノズル式

各n=2測定

回収率：濃度を理論作製濃度 (50  $\mu\text{g/g}$ ) で除した百分率

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究  
－特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ(3)－

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	副所長
研究分担者	渡辺 卓穂	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	副所長
研究協力者	若栗 忍	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

### 研究要旨

本来、健康を支える食物を摂取することにより重篤な反応を起こす食物アレルギーは摂取量や体調、運動などで、突発的に発症する場合がある。過去に食物アレルギー反応を起こしている場合は、各自が何を摂取するかを選択することで危険を回避することが可能であるが、予期せぬ混入等により、必ずしも正しい表示が行われていない場合もあり、食品衛生検査施設等における検査業務は健康被害防止の重要な要因である。特定原材料のスクリーニング法である ELISA 法の精度管理は、予期せぬ食物アレルギー防止のために重要な課題であり、そのため、外部精度管理調査を行う上での適切な試料の供給することは必須である。

本年度はパイロットスタディには乳タンパク質を 9.0  $\mu\text{g/g}$  添加した試料（基材：とうもろこしペースト及びイチゴジャム）を用い、定量試験法である ELISA 法について外部精度管理調査研究を実施した。参加機関は 36 機関で、公定法と各機関の標準操作手順書に則り試験を行うこととした。参加機関からの結果は試料、および測定キットごとにまとめ、メジアン・クリーニン（MC）後、ロバスト方式を用いて統計値を算出し、それらの数値から  $\bar{x}$  スコアを算出した。また、 $\bar{X}$ 管理図による解析も同時に行った。

その結果、MC により除外された機関はなく、また、 $\bar{x}$  スコアの絶対値が 3 以上となる機関は各解析ごとに 0～1 機関認められた。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線の範囲を超える機関はなく、 $R$ 管理図では管理限界線を超える機関は各解析ごとに 1～2 機関認められた。

また、パイロットスタディの試料作製に先立ち、試料作製に関する予備検討を行った。

## A. 研究目的

本来、健康を支える食物摂取により重篤な反応を起こす食物アレルギーは摂取量や体調、運動などで、突発的に発症する可能性がある。過去に食物アレルギー反応を起こしている場合は、各自が何を摂取するかを選択することで危険を回避できることが多い。しかしながら、加工食品においては実際に何が入っているか、外見から判断することはほぼ不可能である。

アレルギーを引き起こす食物を全て網羅することは難しいが、疫学調査により、国民の健康への影響が大きいものについては特定原材料及び特定原材料に準ずるものとして指定され、表示の義務化や推奨が行われている。また、これらは適宜見直しが行われて、変化する国民の食生活に合わせ、適切な更新がなされている。

しかしながら、原材料管理時や加工時における予期せぬ混入等により、必ずしも正しい表示が行われていない場合もある。このため、食品衛生検査施設等において検査が行われているが、この検査業務は健康被害防止の重要な要因である。

表示義務がある特定原材料の加工食品中の検査法としてスクリーニング法であるELISA法による定量試験及び確認試験であるPCR法またはウェスタンブロッティング法による定性試験が消費者庁次長通知「食品表示基準について」（平成27年3月30日消食表第139号）（以下、通知法）、別添「アレルギーを含む食品の検査方法」に記載されており、その試験に際しては精度管理の一般ガイドラインに準じ、適切に業務管理

を実施することが求められている。

スクリーニング試験では取りこぼしがないことが求められ、ELISA法の精度を管理することは、予期せぬ食物摂取によるアレルギー発症を防止するための重要な課題の一つである。また、試験技能を確認する方法として外部精度管理調査を行うこと、そして、そのための適切な試料を安定供給することは必須である。

本年度は、外部精度管理調査に関するパイロットスタディにおいて、昨年度に続き、特定原材料は乳を用いて試料の作製を行い、参加機関から回収したデータの解析を行った。

## B. 方法

### 1. 基材

基材にはとうもろこしペースト（新進）、ファミリーカップイチゴジャム（以下イチゴジャム、ソントン）を使用した。

これら基材は、ELISA法を用いて、標的タンパク質である乳が検出限界（基材中0.31 µg/g）以下であることを確認した。ELISA法に使用したキットについては「4. ELISA法」参照。

### 2. 各種添加溶液の調製

#### 1) 添加用乳タンパク質の調製

特定原材料の乳検出用試料作製を行った。

添加用の乳タンパク質にはスキムミルク（富士フィルム和光純薬工業）を使用した。

スキムミルクを50-mLチューブに0.2 g分取後、0.6% SDS, 0.1 mol/L 亜硫酸ナトリウム含有PBS (pH 7.4) を20 mL添加し、室温下で1晩振盪した。懸濁液は遠心(10,000×g、30 min)後、上清を0.8 µm



フィルターを用いてろ過し、添加用乳タンパク質調製液とした。

## 2) タンパク質量の測定

乳タンパク質調製液のタンパク質量は、2-D Quant Kit (Cytiva)を用いて測定した。得られたタンパク質量から調製液濃度及び添加量を計算し、適当量を各基材に添加した。添加量は総乳タンパク質量相当とした。

## 3. 試料調製

### 1) 外部精度管理調査試料の予備検討

外部精度管理調査試料の予備検討として300 g 程度の小スケールで試料を作製し、安定性を確認した。

乳タンパク質としてスキムミルクを用い、とうもろこしペースト及びイチゴジャムを基材として検討用の試料を作製した。

添加用乳タンパク質調製液を10 µg/gとなるように添加量を計算後、各基材に加えた後、フードプロセッサー (MK-K58、National) を用いて均質化し、試料を作製した。各試料を小分けにし、-20°Cで凍結保存した。

### 3) 外部精度管理調査試料の調製

外部精度管理調査試料には、検討済みのとうもろこしペースト及びイチゴジャムを基材に使用し、これにそれぞれ総乳タンパク量で9.0 µg/gとなるように添加用乳タンパク質溶液を添加した。

基材は、ロボ・クープブリクサー5プラス (エフ・エム・アイ) で均質化後、添加用乳タンパク質溶液を添加した。

作製した試料は約10 gずつ小分けにし、-20°Cで凍結保存した。とうもろこしペースト試料を試料1、イチゴジャム試料

を試料2とし、調査研究試料とした。また、これらの試料について均質性および安定性の確認を行った。

## 4. ELISA法

特定原材料の乳タンパク質検出には、通知法のバリデーション要件を満たすELISAキットを使用した。また、バリデーション要件を満たしていないが、森永生科学研究所のβ-ラクトグロブリン検出キットも使用した。

### 1) 乳タンパク質検出用キット

- FASTKITエライザVer. III牛乳(日本ハム) (以下、日本ハムキット)
- モリナガFASPEK エライザII 牛乳(カゼイン) (森永生科学研究所) (以下、モリナガキット)
- モリナガFASPEK エライザII 牛乳(β-ラクトグロブリン) (森永生科学研究所) (以下、モリナガ (BLG) キット)
- アレルゲンアイELISA II牛乳(β-ラクトグロブリン) (プリマハム) (以下、プリマハムキット)

### 2) 外部精度管理調査試料の予備検討

「3. 試料調製」「1) 外部精度管理調査試料の予備検討」で作製した試料は作製後1か月、3.5か月及び8か月に「1) 乳タンパク質検出キット」に記載の4種キットを用い、ELISA法による測定を行い、安定性を確認した。

## 5. 外部精度管理調査試料の均質性および安定性

外部精度管理調査用試料の品質評価として均質性および安定性の確認を行った。

均質性の確認は、試料送付前 (試料作

製後1か月以内)に行った。各試料つき、それぞれ $n=10$ でサンプリングを行い、ELISA法による乳タンパク質濃度を測定した。平均値、標準偏差、変動係数を算出した後、均質性を判断した。

また、安定性は調査期間後である、試料作製後3.5か月に $n=4$ で試料を測定し、各キットについて均質性試験における乳タンパク質含有量に対する数値を計算し、安定性を評価した。

均質性試験および安定性試験は日本ハムキット、プリマハムキット、モリナガキット、およびモリナガ (BLG) キットの4種類のELISAキットを用いて測定した。使用したキットはすべて使用期限内であり、均質性と安定性で同ロットを使用した。

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 (Bio-Tek Instruments, Inc.) 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

調査に参加した36機関へは調査試料と実施要領を宅配便(冷凍)にて送付した。

測定は、公定法に従い原則として、日本ハムキット、プリマハムキット、モリナガキットのうち、任意の2種類を使用することとした。また、通知法に未収載であるが、モリナガ(BLG)キットの測定についても任意での提出を依頼した。

試験操作は公定法及び各機関の標準操作手順書(SOP)に従い、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

の回収期限は試料送付後、約1か月とした。

## 7. 外部精度管理調査結果の解析

異なるキットで評価する場合の注意として通知法の別添「アレルギーを含む食品の検査方法」中、別添4「アレルギー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」との記載がある。したがって、参加機関から提出された測定値は、試料別、測定キット別に算出したロバスト平均値を付与値として解析を行った。

データ解析として、最初に、メジアン $\pm 50\%$ の範囲を超える報告値を除外するメジアン・クリーニング(MC)を行った。次にHuberのproposal 2<sup>1,2)</sup>に基づいたロバスト方式の統計である、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、各種統計量を算出した。

また、 $\bar{X}$ - $R$ 管理図を代用した方法と $z$ -スコアによる方法を用いて評価を行った。

$\bar{X}$ 管理図の管理限界線の値はこれまでの結果より[ロバスト平均値 $\pm$ ロバスト平均値の30%]とした。

また、 $z$ -スコアはロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いて算出した。

更に、アンケート結果をとりまとめ、検討を加えた。

参加36機関全ての機関で、モリナガキット及び日本ハムキットを使用してい

た。さらに、プリマハムキット及びモリナガ (BLG) キットを使用した機関はそれぞれ1機関と使用機関数が少なかったことからキットごとの統計解析を行わなかった。

#### (倫理面への配慮)

基材、添加特定原材料ともい食材であるが、調査試料であることから、試料の残余や廃棄物は速やかに焼却処分とした。

各機関へ送付した外部精度管理調査試料については、検査終了後の保管および廃棄は、各機関のSOPに従って実施することとした。

### C. D. 研究結果および考察

#### 1. 外部精度管理調査のパイロットスタディ

##### 1) 外部精度管理調査試料の均質性

均質性試験の結果を表1に示した。

試料1はモリナガキットと日本ハムキットで約10.6~12.1  $\mu\text{g/g}$ と高値、プリマキットとモリナガ (BLG) キットでは約6~7  $\mu\text{g/g}$ 程度と低値となった。また、モリナガキットは日本ハムキットよりも1.5  $\mu\text{g/g}$ 高い値を示した。

試料2ではモリナガと日本ハムキットでは測定値が約13  $\mu\text{g/g}$ と高値、プリマキットとモリナガ (BLG) キットでは約7.5~8.5  $\mu\text{g/g}$ 程度と低値を示した。

カゼインを標的とするモリナガキットと、カゼインを含む複合抗原を標的とする日本ハムキット<sup>3)</sup>では、測定で高値が、BLGを標的抗原とするプリマキット及びモリナガ (BLG) キットは低値が得られた。

これはこれまでに得られている結果と同次であった。

また、どのキットにおいても試料2の値が高めを示したが、モリナガキット及びプリマキットでは差は1  $\mu\text{g/g}$ 未満であったのに対し、日本ハムキット及びモリナガ (BLG) キットでは2  $\mu\text{g/g}$ 以上の差が認められた。このことから基材によってはキットの反応に若干お影響を与えたことが示唆された。

相対標準偏差は試料1で2.5~4.5%、試料2では3.8~4.6%と、すべて5%以下であり、キット間、試料間ともに大きな差は認められなかった。

異常の結果より、試料1、2ともに全てのキットにおいて均質と判断した。

#### 2) 外部精度管理調査試料の安定性

安定性は、調査期間後(作製後約3.5か月)に行った(表2)。均質性試験での結果を100%として安定性を算出したところ、試料1および試料2ではそれぞれ92~104%および91~106%の範囲内であり、両試料とも調査期間中、安定であったと判定した。

また、それぞれの試料における各キットの反応性は均質性試験の結果とほぼ等しかった。

#### 3) 外部精度管理調査結果(回収データの集計結果)

参加機関の報告値を集計した結果については表3に示した。また、データ分布を図1に示した。全36機関がモリナガキット及び日本ハムキットを使用しており、この2キットの結果については、キットごと、試料ごとに統計解析を行った。プリマハ

ムキットおよびモリナガ (BLG) キットを使用した機関はそれぞれ1機関であったことから統計解析を行わず、参考値として扱うこととした。

全体の結果を見ると、当センターにおける品質評価試験に類似した結果となり、モリナガキットでは2試料でほぼ等しい値を示したのに対して、日本ハムキットでは2  $\mu\text{g/g}$ 以上の差が認められ、試料2で高値を示した。

各1機関が使用したプリマキット及びモリナガ (BLG) キットでは差は1  $\mu\text{g/g}$ 未満及び1.5  $\mu\text{g/g}$ 以上とこちらも品質評価試験と同様の傾向を示した

相対標準偏差は全体で7.38~9.40%とキット、試料の違いによる顕著な差は認められなかった。

#### 4) キット別集計結果

##### (1) モリナガキット

モリナガキットを使用した36機関のデータから算出した統計量を表4に示した。また、報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図2に、試料1および試料2の結果および評価一覧を表5および表6に記載した。

##### a) 試料1の解析結果

モリナガキットを使用した36機関において、MCで除外された機関はなかった。36機関の平均値±標準偏差は12.74±0.94  $\mu\text{g/g}$  (相対標準偏差7.38%) であった。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関は1機関存在した (図3)。

また、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかった [図5、a)]。

##### b) 試料2の解析結果

モリナガキットを使用した36機関において、MCで除外された機関はなかった。全機関の平均値±標準偏差は12.75±1.03  $\mu\text{g/g}$  (相対標準偏差8.08%) であった。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関は1機関存在した (図4)。

また、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかった [図5、b)]。

##### (2) 日本ハムキット

日本ハムキットを使用した36機関のデータから算出した統計量を表7に示した。また、報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図6に、試料1および試料2の結果および評価一覧を表8および表9に記載した。

##### a) 試料1の解析結果

日本ハムキットを使用した36機関において、MCで除外された機関は存在せず、全機関の平均値±標準偏差は10.18±0.90  $\mu\text{g/g}$  (相対標準偏差8.84%) であった。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関は2機関存在した (図7)。

また、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかった [図9、a)]。

##### b) 試料2の解析結果

日本ハムキットを使用した36機関において、MCで除外された機関は存在せず、全期間の平均値±標準偏差は12.45±1.17  $\mu\text{g/g}$  (相対標準偏差9.40%) であった。 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線外の機関は1機関認められた。 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関は1機関存在した (図8)。

また、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の機関は1機関認められた [図9、b)]。

### (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1機関であった。したがって、統計解析は行わず、当該機関のデータのみを列挙した (表10)。

### (4) モリナガ ( $\beta$ LG) キット

モリナガ ( $\beta$ LG) キットを用いて測定した機関は1機関であった。したがって、統計解析は行わず、当該機関のデータのみを列挙した (表11)。

### (5) キットのロットと測定値について

各機関が使用したロットと報告値の関連について図10に示した。本パイロットスタディにおいて、使用するキットのロット制限はなく、各機関が、適当なロットを使用した。その結果、モリナガキットでは8ロット、日本ハムキットでは5ロットと、それぞれ複数のロットが使用されていた。また、プリマハムキット及びモリナガ ( $\beta$ LG) キットのデータはそれぞれ1機関、1ロットであった。全ての機関はキットの使用期限内に試験を実施していた。

モリナガキット [図10 a)] では1機関だけが使用したロットは3ロット、2機関および3機関が使用したロットは各1ロットであった。全体の分布からは明確なロット差は認められなかった。また、ほとんどの機関において試料1と試料2の報告値に大きな差は認められなかった。

日本ハムキット [図10 b)] では1機関のみ使用したロットはなく、2機関と3機関が使用したロットが各1ロットであった。また、報告値の明確なロット差は認めら

れなかったが、全ての機関において試料1よりも試料2の報告値が明らかに高値を示し、基材の違いによる施設間再現性は良好であることが示唆された。今回、 $z$ -スコアで3以上となったのは日本ハムキットで末尾2桁が「66」のロットを使用した機関番号10の試料2のみで、同機関の試料1の $z$ -スコアは1未満で、また、同ロットを使用した他機関の報告値は他のロットと比べて大きな差が認められないことから、機関番号10の外れ値は使用したキットに由来するものではないと考えられた。

プリマハムキット [図10 c)] およびモリナガ ( $\beta$ LG) キット [図10 d)] についてはデータ提出機関が各1機関、使用されたロットは各1ロットであった。これら2キットについては試験機関が少なかったことから、参考として、当センターの品質評価試験で得られた、2データを追加した。どちらのキットにおいても、各試料ごとの測定値は3データでほぼ同じであり、安定した結果が得られた。

また、モリナガ ( $\beta$ LG) キットでは日本ハムキット同様、試料1で試料2よりも低値が認められた。

### (6) 検量線と $z$ -スコアについて

前述の通り、本年度はモリナガキットおよび日本ハムキットでは、それぞれ8ロットおよび5ロットが、プリマハムキットおよびモリナガ ( $\beta$ LG) キットでは各1機関、1ロットが使用された。

モリナガキットおよび日本ハムキットの全検量線は図11および図12に示した。[総平均 $\pm$ 2SD] から外れた検量線はモリナガキットで1機関、日本ハムキットで2機関認められた。

また、プリマハムキットおよびモリナガ (BLG) キットの検量線と使用したロットの情報は、それぞれ図13と表12および図14と表13に示した。これらのキットでは参加機関のデータ数が少なかった事から、当センターで品質評価試験より得られた検量線をもとに示した。それぞれのキットにおける3つのデータの線形から、どちらのキットにおいても機関差はないことが推察された。

モリナガキットと日本ハムキットについてはロットの情報とロット別の検量線のグラフをそれぞれ表14と図15、および表15と図16に示した。

モリナガキットでは使用機関数の多かった3ロット (ロットの下2桁が「00~02」、使用機関数8~11) [図15 c)~e)] では、検量線の傾向に若干の差が認められた。ロット「00」では1機関を除いて総平均よりも下方に、ロット「01」では1検体を除いて総平均付近から上方へ、ロット「02」については、ほぼ総平均付近に集まっていた。しかしながら、測定値については、図10 a) のように、ロット間差は認められなかった。したがって、各ロットの使用機関数が十分ではなかったが、ロット毎に検量線の傾向が若干変わるが、測定に影響のあるものではないことが推察された。

日本ハムキットの検量線についてはロット間差は特には認められなかった。

個別のデータでは、両キットで検量線が上方に外れていた機関番号16では、試験時の試薬または抽出溶液の溶解性が不良であったとの報告があり、いずれのキットまたは試料においても全ての参加機

関中で下から2~4番目の測定値を示していた [図15 c)、図16 a)]。しかしながら、当該機関の $z$ -スコアの絶対値は、2未満と良好であった。その他、モリナガキットでは [総平均 $\pm$ 2SD] の上限とほぼ同じ位置を示した機関が1機関認められた。また、日本ハムキットでは上限とほぼ同じ位置を示した機関及び下方へ外れた機関がそれぞれ1機関認められた。これらの機関において $z$ -スコアはすべて範囲内であった。

検量線の異常が認められた機関で $z$ -スコアに問題が認められる場合がある。したがって、 $z$ -スコアに偏りが認められる機関の検量線について検討した。

機関番号12は、いずれのキットまたは試料においても全ての参加機関中で下から1~2番目の報告値 ( $z$ -スコア:-1.821~-2.126) を示しており、全機関中で恒常的に低値を出していることが考えられた。しかしながら、検量線はほぼ総平均と同じ位置を示していた [図15 e)、図16 e)]。

機関番号21は、モリナガキットによる試料1の報告値 ( $z$ -スコア:0.426) 以外は、全ての参加機関中で下から3~5目の報告値 ( $z$ -スコア:-1.450~-1.379) を示していた。しかしながら、検量線は総平均に近い位置を示していた [図15 d)、図16 c)]。このことから、当該機関は恒常的に低値を出しているが、モリナガキットによる試料1の測定時にやや不安定な個別操作があった可能性も考えられた。

機関番号26ではいずれのキットまたは試料においても全ての参加機関中で上から1~3番目の報告値 ( $z$ -スコア:1.468~2.126) を示し検量線は、ほぼ総平均と同じ位置を示していた [図15 d)、図16 b)]。

当該機関は全体と比較して恒常的に高値を出していることが考えられた。

今までに複数回、外部精度管理調査に参加しており、全体と比較して、常に低値または高値を示している機関は、精度管理の一助として全体の作業手順の再検討を適宜行うことも必要だろう。

また、日本ハムキットにおいて試料2のz-スコアが上方へ外れ値を示した機関番号10ではモリナガキット、日本ハムキットのいずれにおいても検量線は総平均よりも上方に認められたが、[総平均±2SD]内にあり、問題ないと考えられた。さらに、機関番号10のモリナガキットの試料1と試料2、および日本ハムキットの試料1のz-スコアは0.096、0.286および-0.056と十分に小さく、日本ハムキットにおける測定では片方の試料でのみ外れていることから、個別操作に問題があったのではないかと考えられた。

今回は、検量線が[総平均±2SD]から外れた機関においてz-スコアは「満足」と判定された。また、検量線における若干のロット差は、メーカーにより管理されている範囲と考え、報告値に影響はないと推察された。しかしながら、得られた検量線が背景データから明らかに異なった場合は注意が必要だろう。

## (7) 測定値の相関性

### a) 同一キットにおける試料間の測定値の相関性

複数機関が使用したモリナガキットおよび日本ハムキットについて、試料1と試料2の報告値の相関を図17に示した。その結果、相関係数はモリナガキットで0.701と強い相関が、日本ハムキットでは0.684

と中程度の相関が認められた。また、モリナガキットでは確率楕円がほぼ $y=x$ 上に伸びており、各機関における試料1と試料2の報告値がほぼ等しかったと考えられる。日本ハムキットでは、すべての機関が $y=x$ よりも下方であり、全ての機関で試料1の報告値が試料2の報告値よりも低値となった。したがって、キットのロットに関わらず、試料1はモリナガキットで日本ハムキットよりも高値を出すことが確認された。

### b) 同一試料におけるキット間の測定値の相関性

各試料におけるモリナガキットと日本ハムキット間の報告値の相関を図18に示した。試料1では相関係数が0.337と弱い相関を、試料2では0.410と中程度の相関を示した。試料1では各点は、比較的まとまってプロットされており、これは、どちらのキットにおいても、ほとんどの機関で近い報告値を得たためと考えられる。また、試料1ではすべての機関においてモリナガキットが高値を示した。

試料2ではモリナガキットの報告値と日本ハムキットの報告値は $y=x$ 線を中心に広がった楕円を示し、また2機関が95%確率楕円から大きく外れていた。全体的には2キットの報告値は近い値であった。

## 5) 回収データの確認

各参加機関からデータを回収後、提出された生データと報告書のデータ確認を行った。報告書のデータの記載ミスが数件認められた。各参加機関においては、正しいデータを提出することも外部精度管理であることを再度認識し、本調査研究をきっかけに日常的に正しいデータを

提出するための体制を見直していただければ、と考える。

## 6) 検査手法のまとめ

各参加機関が検査に用いた方法を表16および表17に示した。担当者の経験年数は2年以内が6割程度であり、これまでのパイロットスタディ同様、経験年数の少ない担当者の積極的な外部精度管理調査への参加がうかがわれた。また、複数の担当者により試験を行っている旨の記載が5機関で認められた。

検査手法では全機関が振とう機による抽出および遠心分離を実施、ろ過は27機関が実施していた。抽出液等の希釈操作は1機関が自動で行っていたが他の35機関は手動で作業を行っていた。また、プレートへの試薬の添加も35機関が手動で行っており、その際、ほとんどの機関（28機関）でマルチチャンネルピペットを使用していた。プレートの洗浄方法は、手動が14機関、自動が21機関、手動と自動の両方を使用している機関が1機関と、自動洗浄を行っている機関が半数以上を占めた。検量線の近似曲線の計算は全ての機関が推奨されている4パラメーターロジスティック（4PL）を使用していた。

個々のキットの操作方法では、複数機関が使用したモリナガキットと日本ハムキットの操作方法に大きな違いはなく、抽出から測定までの期間はいずれも0日（抽出当日使用）がほとんどで、次に1日保存となっていた。抽出日に試験を行わなかった機関では、提出された記録から、2キット分の抽出を同時に行い、測定はキットごとに日にちをずらして行っている機関が認められた。使用時まで抽出液を

保存する際の条件は、どちらのキットでも冷蔵が多く、室温保存した機関はいなかった。更に5日以上保存後に使用した機関は、すべて冷凍保存を行っており、 $z$ -スコアも  $|z\text{-スコア}| < 2$ であったことから、各機関は抽出から測定まで抽出液を適切に管理していたと考えられる。

操作法全般を通して、 $\bar{X}$ 値、 $R$ 値および $z$ -スコアが外れる要因となるような操作は認められなかった。

## 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（2020年度）を表18および表19に示した。

検査項目については、卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類（えび、かに）の特定原材料6種中、昨年度の実績が0種類から全種類（6種類）の機関数は3～6機関と、試験項目数の極端な偏りは認められなかった。

ELISA法では、29機関の総実施件数は20,000件ほどで、うち卵、乳、小麦がそれぞれ全体の21～24%程度、続いてそば、落花生が12～13%、甲殻類は7%程度であった。例年通り、卵、乳、小麦は残りの3種よりも検査数が多く、これは加工食品中での使用頻度が高いためと考えられる。

ELISA法による試験中、陽性と判定された試験数は1649試験（8.0%）であった。また、実施された確認試験75試験において陽性は17試験（22.7%）であった。他の特定原材料と比べて小麦、落花生は確認試験数は多かったが、陽性となった検体数は他の特定原材料と大きな違いは認められなかった。

## 2. 試料用基材の検討

乳検出のための試料作製を行うに際し、



試料用基材の検討を行った。

乳タンパク質には安定している試薬のスキムミルクを使用した。

新規基材としてとうもろこしペースト及びイチゴジャムを用い、乳タンパク質を添加し、試料を作製後、4種類の乳タンパク質用ELISAキットにより安定性の検討を行った。

作製後1か月、3.5か月及び8か月に測定を行い、安定性について経時的に測定した。結果は図19に示す。

とうもろこしペースト、イチゴジャムともに、モリナガキット及び日本ハムキットにおいては高値を、プリマハムキット及びモリナガ（BLG）キットでは低値を示した。これはこれまでの結果と同様であり、標的抗体の違いによるものと考えられた。

個別の基材については日本ハムキット及びモリナガ（BLG）キットにおいて、とうもろこしペーストはイチゴジャムよりも2 µg/g程度低値を示し、モリナガキットにおいては1 µg/g程度低値を示した。プリマキットでは両試料は、ほぼ同じ値を示した。

安定性については両試料ともすべてのキットで8か月後に88%以上であったことから、十分に安定しており、調査試料として使用可能であると結論し、本年度の調査試料基材とした。

一般的に基材特異的な検出力の違いは知られており、公定法が示す通り、複数のキットを用いてのスクリーニングは実使用において重要である。今回の調査試料に供試した2基材は、参加機関が用いたモリナガキットと日本ハムキットで試料

検討と同様にキット間差のある結果（試料1において日本ハムキットで差が認められ、試料2では両キットでほぼ同じであった）が得られており、参加機関の技能を調査するには優れた試料であったと考える。

## E. 結論

本年度の外部精度管理調査に関するパイロットスタディは、乳タンパク質を添加した2試料を用いて36機関を対象に実施した。

パイロットスタディの試料に用いる基材中での乳タンパク質の安定性を検討した。その結果、基材であるとうもろこしペースト及びイチゴジャム中で乳タンパク質は安定であったことから、試料基材として採用した。

パイロットスタディでは参加機関から回収したデータをMC後、統計解析した。いずれの解析においてもMCによる除外機関は認められなかった。

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 $\sigma$ スコアを算出、また、 $\bar{X}$ - $R$ 管理図を代用した方法により評価を行った。

解析は各キットおよび試料ごとに行ったところ、 $\sigma$ スコアの絶対値が3以上となった機関は全体で1機関であった。

また、 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線の範囲を超える機関は1機関、 $R$ 管理図で管理限界線を超えた機関は全体でのべ5機関認められた。

## F. 参考文献

- 1) The International Harmonized Protocol for the Proficiency

Testing of Analytical Chemistry  
Laboratories (IUPAC Technical  
Report), Pure Appl. Chem., Vol. 78,  
No. 1, 145-196 (2006).

- 2) Analytical Methods Committee  
(1989): Robust statistics - How Not  
to Reject Outliers, Part 1. Basic  
concepts, Analyst, vol. 114, 1693-  
1697.
- 3) FAST NEWS Vol.1 (改訂第二版、2017)  
日本ハム株式会社中央研究所

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### I. 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 外部精度管理調査試料の均質性試験における各キットの結果

キット メーカー	含有量 (µg/g)			
	試料1		試料2	
	平均 ± SD	相対標準偏差 (%)	平均 ± SD	相対標準偏差 (%)
モリナガ	12.08 ± 0.48	4.0	12.80 ± 0.52	4.1
日本ハム	10.58 ± 0.48	4.5	13.00 ± 0.60	4.6
プリマハム	7.08 ± 0.30	4.2	7.63 ± 0.31	4.1
[参考] モリナガ (βLG)	6.42 ± 0.16	2.5	8.50 ± 0.32	3.8

(n=10)

表2 外部精度管理調査研究試料の安定性試験の結果

キット メーカー	試料1		試料2	
	含有量 (µg/g)	安定性 (%)	含有量 (µg/g)	安定性 (%)
	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
モリナガ	12.56 ± 0.09	104.0 ± 0.8	13.04 ± 0.20	101.9 ± 1.5
日本ハム	11.57 ± 0.36	109.4 ± 3.4	13.75 ± 0.06	105.8 ± 0.5
プリマハム	6.56 ± 0.25	92.6 ± 3.4	6.96 ± 0.33	91.2 ± 4.3
[参考] モリナガ (BLG)	6.22 ± 0.05	96.9 ± 0.8	8.58 ± 0.17	101.0 ± 2.1

(n=4)

表3 外部精度管理調査研究報告結果のロバスト解析による結果

1) 試料1

	モリナガ	日本ハム	プリマハム*	[参考] モリナガ (BLG)*
データ数 (有効機関数)	36	36	( 1 )	[ 1 ]
平均値 (µg/g)	12.74	10.18	( 6.96 )	[ 6.25 ]
標準偏差 (µg/g)	0.94	0.90	—	—
相対標準偏差 (%)	7.38	8.84	—	—
添加量 (µg/g)	9.0			

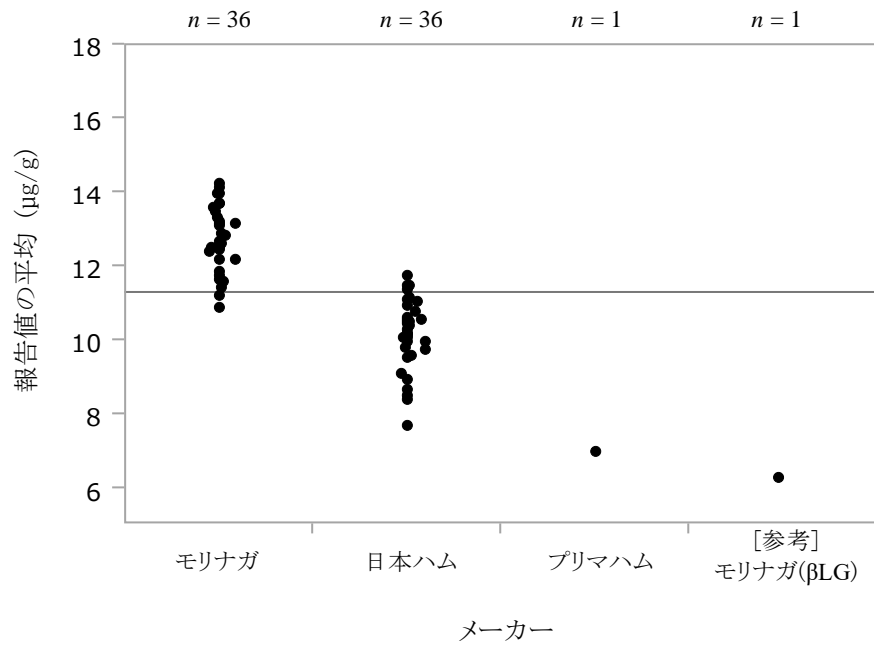
\* プリマハムおよびモリナガ (BLG) キットは1機関のため統計解析は行わなかった。  
数値は参考データ

2) 試料2

	モリナガ	日本ハム	プリマハム*	[参考] モリナガ (BLG)*
データ数 (有効機関数)	36	36	( 1 )	[ 1 ]
平均値 (µg/g)	12.75	12.45	( 7.56 )	[ 8.09 ]
標準偏差 (µg/g)	1.03	1.17	—	—
相対標準偏差 (%)	8.08	9.40	—	—
添加量 (µg/g)	9.0			

\* プリマハムおよびモリナガ (BLG) キットは1機関のため統計解析は行わなかった。  
数値は参考データ

a) 試料1



b) 試料2

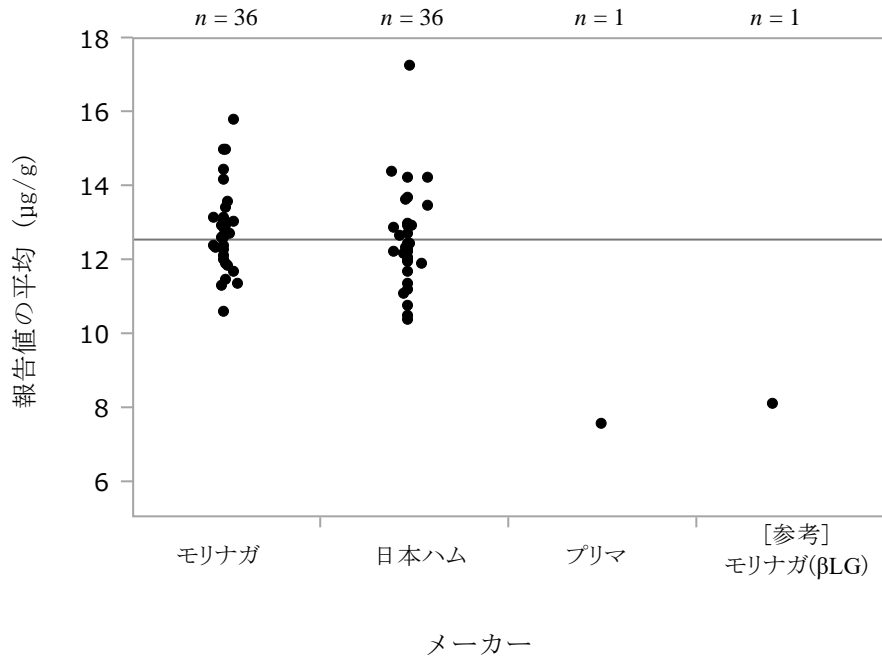


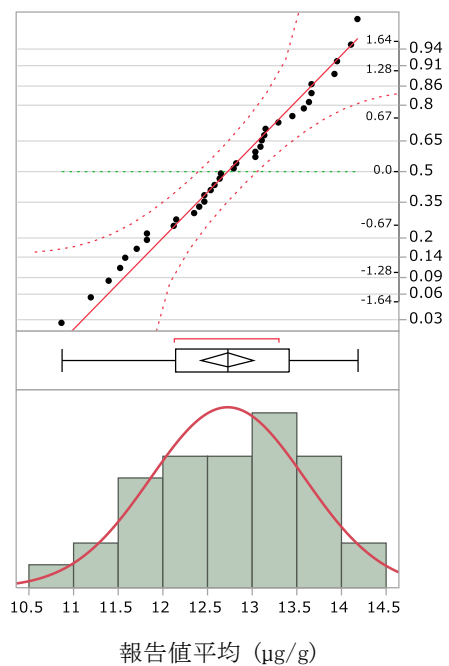
図1 外部精度管理調査研究試料におけるキットごとのデータ分布

表4 モリナガキットによる測定結果の統計量一覧

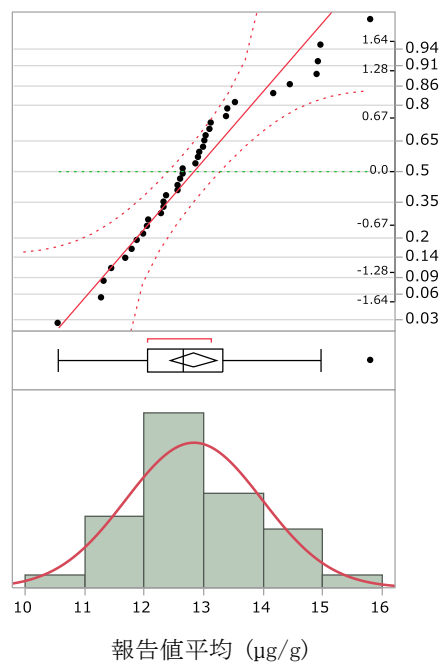
試料名		試料1	試料2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MCによる除外機関		0	0
データ（有効機関）数		36	36
測定 の 統計量*	平均値	12.74	12.75
	標準偏差	0.94	1.03
	相対標準偏差	7.38	8.08
	第1四分位数（Q1）	12.13875	12.06375
	中央値（メジアン）	12.7275	12.66
	第3四分位数（Q3）	13.42	13.33
	最大値	14.185	15.805
	最小値	10.865	10.56
	範囲	3.32	5.245
	四分位範囲	1.28125	1.26625
測定 の 差*	Rの平均	0.31	0.29
	上部管理限界	1.01	0.95

\*：単位は相対標準偏差では%、それ以外では $\mu\text{g/g}$

a) 試料1



b) 試料2



(機関数 36)

図2 モリナガキットを用いた測定によるヒストグラムおよび正規確率プロット

表5-1 モリナガキットによる試料1の結果および評価一覧

機関 番号	試料1の報告値 *		Xbar管理図		R管理図		Zスコア	
	1	2	Xbar*	評価	R*	評価	Zスコア	評価
12	11.55	10.18	10.865	満足	1.37	不満足	-1.995	満足
16	11.10	11.30	11.200	満足	0.20	満足	-1.638	満足
14	11.69	11.10	11.395	満足	0.59	満足	-1.431	満足
13	11.56	11.50	11.530	満足	0.06	満足	-1.287	満足
27	12.01	11.16	11.585	満足	0.85	満足	-1.229	満足
6	11.80	11.62	11.710	満足	0.18	満足	-1.096	満足
5	11.72	11.93	11.825	満足	0.21	満足	-0.973	満足
17	11.82	11.83	11.825	満足	0.01	満足	-0.973	満足
8	12.21	12.06	12.135	満足	0.15	満足	-0.644	満足
2	12.20	12.10	12.150	満足	0.10	満足	-0.628	満足
25	12.55	12.16	12.355	満足	0.39	満足	-0.410	満足
19	12.69	12.14	12.415	満足	0.55	満足	-0.346	満足
23	12.49	12.44	12.465	満足	0.05	満足	-0.293	満足
32	12.51	12.44	12.475	満足	0.07	満足	-0.282	満足
30	12.69	12.40	12.545	満足	0.29	満足	-0.207	満足
35	12.55	12.61	12.580	満足	0.06	満足	-0.170	満足
18	12.75	12.54	12.645	満足	0.21	満足	-0.101	満足
20	12.75	12.57	12.660	満足	0.18	満足	-0.085	満足
28	12.88	12.71	12.795	満足	0.17	満足	0.059	満足
10	12.57	13.09	12.830	満足	0.52	満足	0.096	満足
31	13.23	12.86	13.045	満足	0.37	満足	0.324	満足
33	13.10	13.00	13.050	満足	0.10	満足	0.330	満足
7	13.15	13.06	13.105	満足	0.09	満足	0.388	満足
9	13.23	12.99	13.110	満足	0.24	満足	0.394	満足
21	13.04	13.24	13.140	満足	0.20	満足	0.426	満足
1	13.19	13.14	13.165	満足	0.05	満足	0.452	満足
4	13.37	13.23	13.300	満足	0.14	満足	0.596	満足
22	13.07	13.85	13.460	満足	0.78	満足	0.766	満足
24	13.86	13.31	13.585	満足	0.55	満足	0.899	満足
15	13.69	13.59	13.640	満足	0.10	満足	0.957	満足

\*:単位 μg/g

評価基準

Xbar管理図 満足:  $LCL(8.918) \leq Xbar \leq UCL(16.562)$

R管理図 満足:  $0 \leq R \leq UCL(1.01)$

Zスコア 満足:  $|Zスコア| < 3$

不満足:  $Xbar < LCL$  または  $UCL < Xbar$

不満足:  $UCL < R$

不満足:  $3 \leq |Zスコア|$



表5-2 モリナガキットによる試料1の結果および評価一覧

機関 番号	試料1の報告値 *		$\bar{X}$ 管理図		$R$ 管理図		$Z$ スコア	
	1	2	$\bar{X}$ *	評価	$R$ *	評価	$Z$ スコア	評価
11	13.78	13.57	13.675	満足	0.21	満足	0.995	満足
29	13.61	13.75	13.680	満足	0.14	満足	1.000	満足
34	14.39	13.46	13.925	満足	0.93	満足	1.261	満足
36	14.15	13.77	13.960	満足	0.38	満足	1.298	満足
26	14.23	14.01	14.120	満足	0.22	満足	1.468	満足
3	14.40	13.97	14.185	満足	0.43	満足	1.537	満足

\*:単位  $\mu\text{g/g}$

評価基準

$\bar{X}$ 管理図 満足:  $LCL (8.918) \leq \bar{X} \leq UCL (16.562)$

$R$ 管理図 満足:  $0 \leq R \leq UCL (1.01)$

$Z$ スコア 満足:  $|Z\text{スコア}| < 3$

不満足:  $\bar{X} < LCL$  または  $UCL < \bar{X}$

不満足:  $UCL < R$

不満足:  $3 \leq |Z\text{スコア}|$

表6-1 モリナガキットによる試料2の結果および評価一覧

機関 番号	試料2の報告値 *		Xbar管理図		R管理図		zスコア	
	1	2	Xbar*	評価	R*	評価	zスコア	評価
12	10.39	10.73	10.560	満足	0.34	満足	-2.126	満足
14	11.21	11.35	11.280	満足	0.14	満足	-1.427	満足
21	11.71	10.95	11.330	満足	0.76	満足	-1.379	満足
16	11.38	11.51	11.445	満足	0.13	満足	-1.267	満足
27	11.78	11.59	11.685	満足	0.19	満足	-1.034	満足
29	12.15	11.45	11.800	満足	0.70	満足	-0.922	満足
32	12.08	11.69	11.885	満足	0.39	満足	-0.840	満足
23	12.18	11.82	12.000	満足	0.36	満足	-0.728	満足
13	12.01	12.11	12.060	満足	0.10	満足	-0.670	満足
25	12.03	12.12	12.075	満足	0.09	満足	-0.655	満足
4	12.43	12.14	12.285	満足	0.29	満足	-0.451	満足
20	12.48	12.18	12.330	満足	0.30	満足	-0.408	満足
6	12.21	12.47	12.340	満足	0.26	満足	-0.398	満足
5	12.28	12.46	12.370	満足	0.18	満足	-0.369	満足
19	12.53	12.60	12.565	満足	0.07	満足	-0.180	満足
8	12.64	12.49	12.565	満足	0.15	満足	-0.180	満足
30	12.71	12.50	12.605	満足	0.21	満足	-0.141	満足
9	12.70	12.61	12.655	満足	0.09	満足	-0.092	満足
28	12.64	12.69	12.665	満足	0.05	満足	-0.083	満足
17	12.34	13.40	12.870	満足	1.06	不満足	0.117	満足
34	13.07	12.74	12.905	満足	0.33	満足	0.150	満足
35	12.89	12.96	12.925	満足	0.07	満足	0.170	満足
31	13.18	12.82	13.000	満足	0.36	満足	0.243	満足
2	13.05	13.00	13.025	満足	0.05	満足	0.267	満足
10	13.37	12.72	13.045	満足	0.65	満足	0.286	満足
15	13.28	12.94	13.110	満足	0.34	満足	0.350	満足
18	13.35	12.92	13.135	満足	0.43	満足	0.374	満足
7	13.38	13.41	13.395	満足	0.03	満足	0.626	満足
33	13.40	13.42	13.410	満足	0.02	満足	0.641	満足
11	13.52	13.55	13.535	満足	0.03	満足	0.762	満足

\*:単位 μg/g

評価基準

Xbar管理図 満足:  $LCL(8.925) \leq Xbar \leq UCL(16.575)$

R管理図 満足:  $0 \leq R \leq UCL(0.95)$

zスコア 満足:  $|z\text{スコア}| < 3$

不満足:  $Xbar < LCL$  または  $UCL < Xbar$

不満足:  $UCL < R$

不満足:  $3 \leq |z\text{スコア}|$

表6-2 モリナガキットによる試料2の結果および評価一覧

機関 番号	試料2の報告値 *		Xbar管理図		R管理図		zスコア	
	1	2	Xbar*	評価	R*	評価	zスコア	評価
3	14.34	14.01	14.175	満足	0.33	満足	1.383	満足
22	14.16	14.74	14.450	満足	0.58	満足	1.650	満足
1	14.73	15.10	14.915	満足	0.37	満足	2.102	満足
26	14.90	14.98	14.940	満足	0.08	満足	2.126	満足
24	14.98	14.96	14.970	満足	0.02	満足	2.155	満足
36	16.23	15.38	15.805	満足	0.85	満足	2.966	満足

\*:単位  $\mu\text{g/g}$

評価基準

Xbar管理図 満足:  $LCL (8.925) \leq Xbar \leq UCL (16.575)$

不満足:  $Xbar < LCL$  または  $UCL < Xbar$

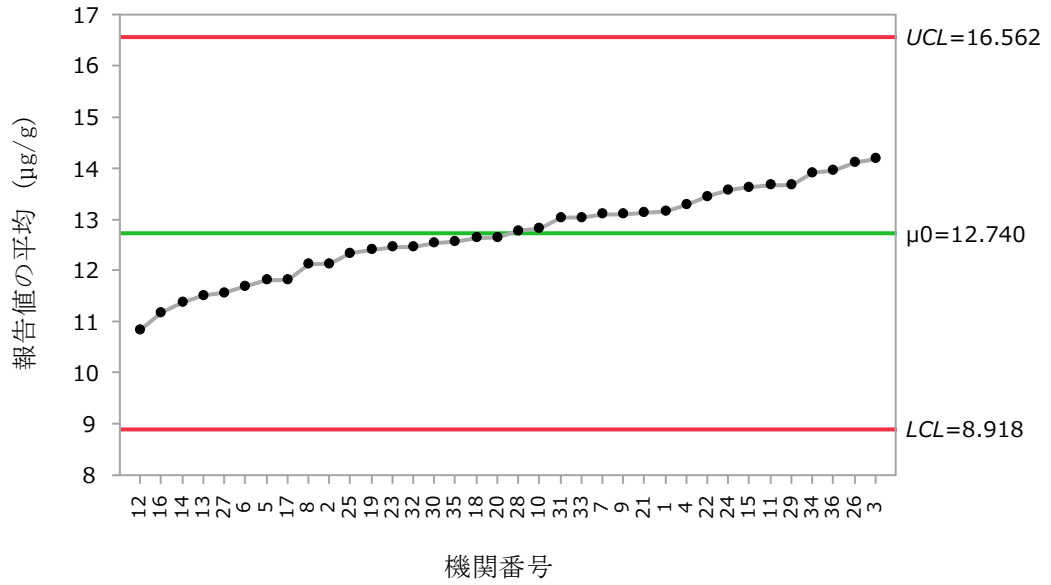
R管理図 満足:  $0 \leq R \leq UCL (0.95)$

不満足:  $UCL < R$

zスコア 満足:  $|z\text{スコア}| < 3$

不満足:  $3 \leq |z\text{スコア}|$

a)  $\bar{X}$ 管理図



b)  $R$ 管理図

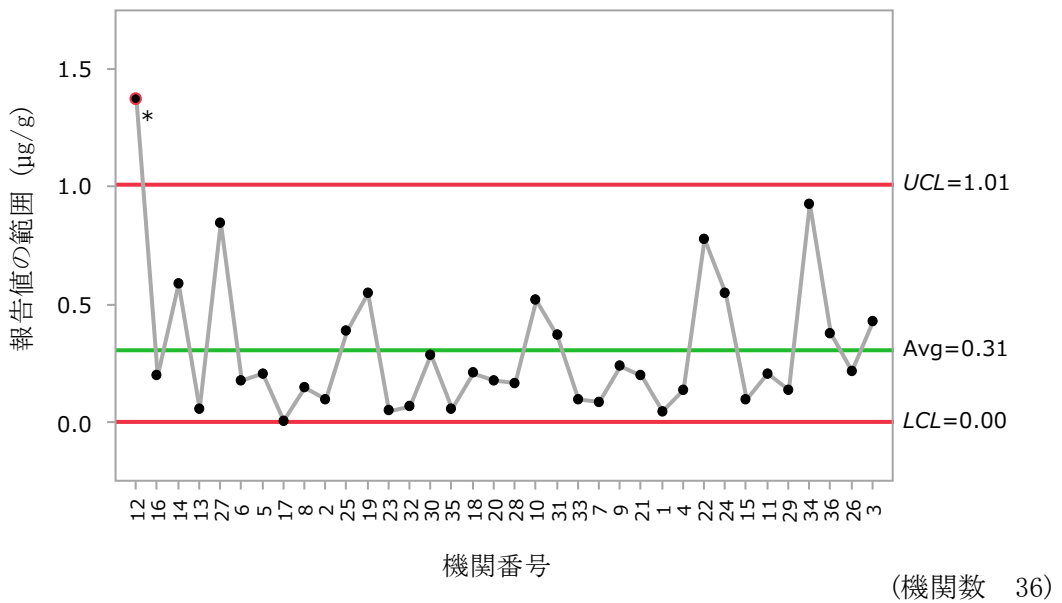
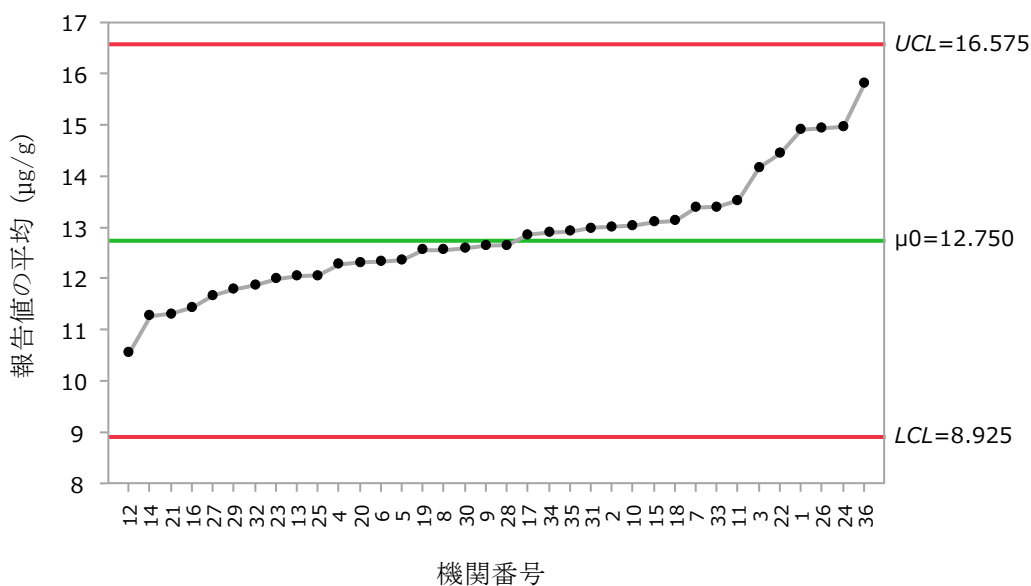


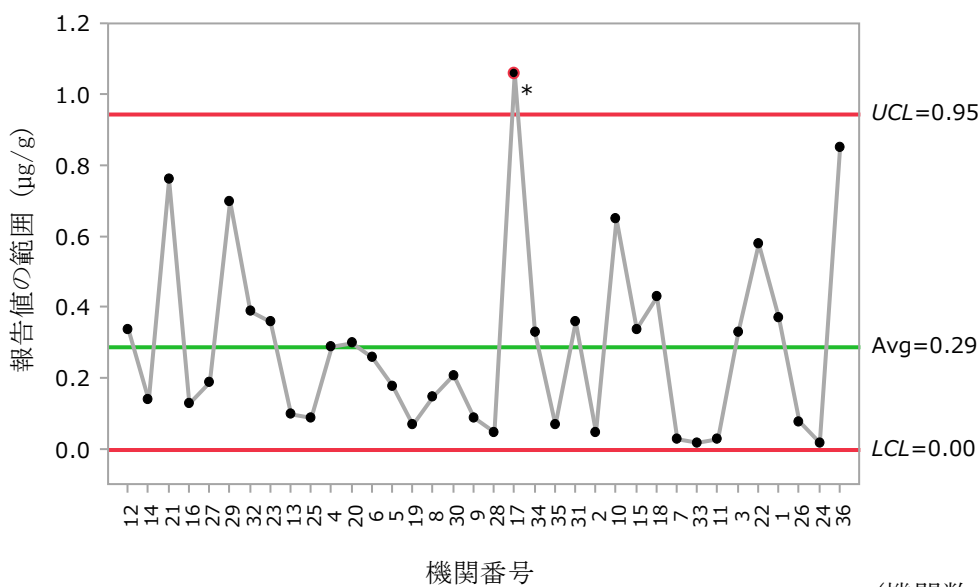
図3 試料1のモリナガキットを用いた測定による  $\bar{X}$ - $R$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均±30%  $R$ 管理図 (b) のUCLおよびLCLは $R$ の平均値とJISハンドブックの係数 $D_4$ (=3.267) から算出

a)  $\bar{X}$ 管理図



b)  $R$ 管理図

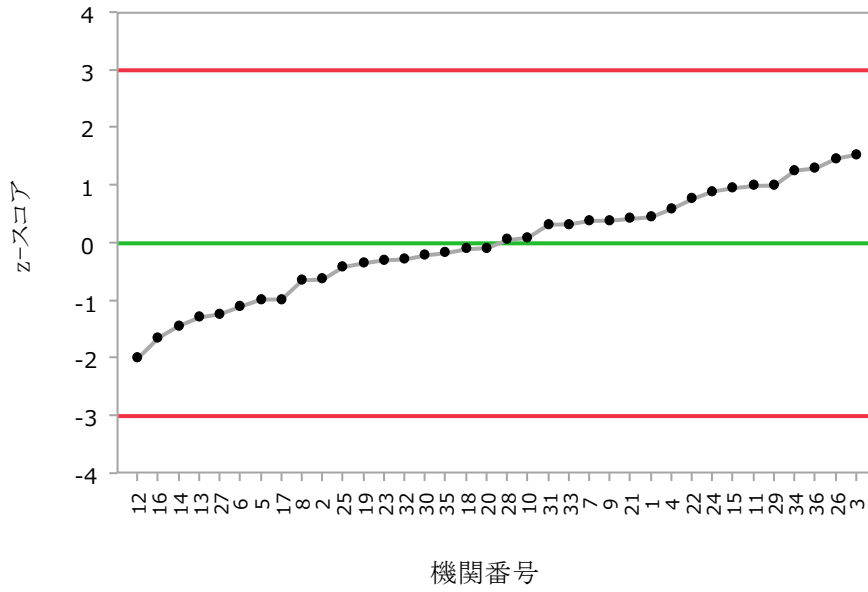


(機関数 36)

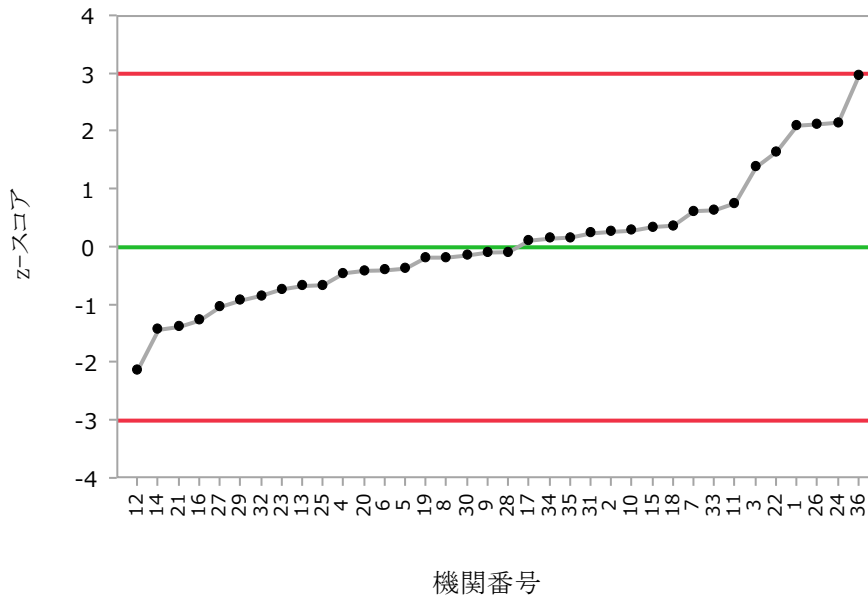
図4 試料2のモリナガキットを用いた測定による $\bar{X}$ - $R$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均 $\pm 30\%$   
 $R$ 管理図 (b) のUCLおよびLCLは $R$ の平均値とJISハンドブックの係数 $D_4 (=3.267)$  から算出

a) 試料1



b) 試料2



(機関数 36)

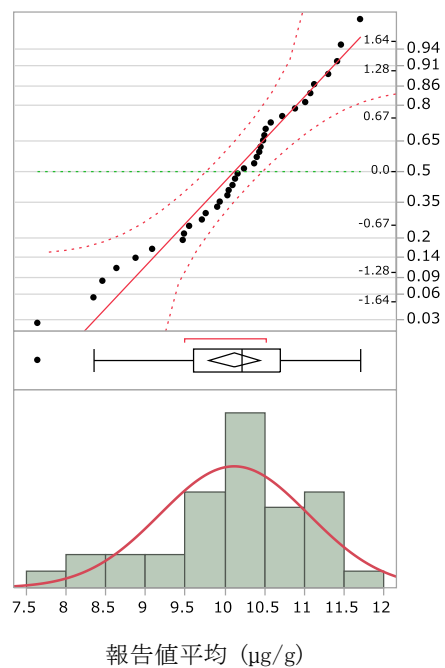
図5 モリナガキットを用いた測定によるzスコア

表7 日本ハムキットによる測定結果の統計量一覧

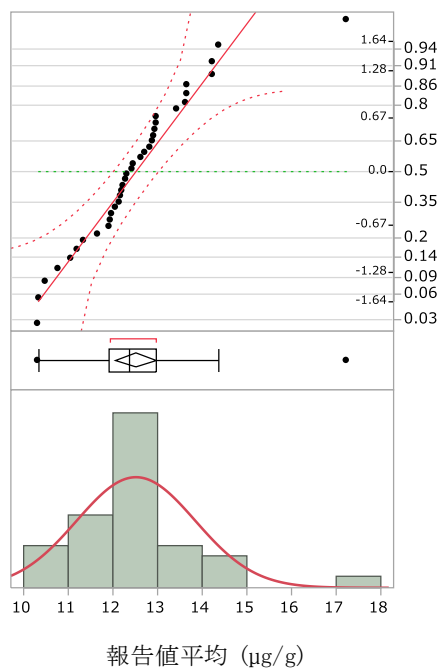
試料名		試料1	試料2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MCによる除外機関		0	0
データ（有効機関）数		36	36
測定 の 統計量*	平均値	10.18	12.45
	標準偏差	0.90	1.17
	相対標準偏差	8.84	9.40
	第1四分位数 (Q1)	9.5975	11.90875
	中央値 (メジアン)	10.21	12.365
	第3四分位数 (Q3)	10.7	12.96375
	最大値	11.715	17.245
	最小値	7.635	10.32
	範囲	4.08	6.925
	四分位範囲	1.1025	1.055
測定 の 差*	Rの平均	0.50	0.40
	上部管理限界	1.63	1.31

\*：単位は相対標準偏差では%、それ以外では $\mu\text{g/g}$

a) 試料1



b) 試料2



(機関数 36)

図6 日本ハムキットを用いた測定によるヒストグラムおよび正規確率プロット



表8-1 日本ハムキットによる試料1の結果および評価一覧

機関 番号	試料1の報告値 *		Xbar管理図		R管理図		zスコア	
	1	2	Xbar*	評価	R*	評価	zスコア	評価
35	7.78	7.49	7.635	満足	0.29	満足	-2.828	満足
12	8.10	8.60	8.350	満足	0.50	満足	-2.033	満足
16	8.53	8.38	8.455	満足	0.15	満足	-1.917	満足
5	8.32	8.96	8.640	満足	0.64	満足	-1.711	満足
21	8.41	9.34	8.875	満足	0.93	満足	-1.450	満足
28	8.70	9.47	9.085	満足	0.77	満足	-1.217	満足
19	9.79	9.17	9.480	満足	0.62	満足	-0.778	満足
34	9.22	9.78	9.500	満足	0.56	満足	-0.756	満足
36	8.75	10.36	9.555	満足	1.61	満足	-0.694	満足
14	9.94	9.51	9.725	満足	0.43	満足	-0.506	満足
9	9.73	9.80	9.765	満足	0.07	満足	-0.461	満足
18	9.87	9.96	9.915	満足	0.09	満足	-0.294	満足
27	9.82	10.07	9.945	満足	0.25	満足	-0.261	満足
33	10.06	10.03	10.045	満足	0.03	満足	-0.150	満足
29	11.40	8.70	10.050	満足	2.70	不満足	-0.144	満足
20	9.84	10.36	10.100	満足	0.52	満足	-0.089	満足
10	10.21	10.05	10.130	満足	0.16	満足	-0.056	満足
30	10.04	10.29	10.165	満足	0.25	満足	-0.017	満足
6	10.09	10.42	10.255	満足	0.33	満足	0.083	満足
4	10.21	10.56	10.385	満足	0.35	満足	0.228	満足
17	11.32	9.50	10.410	満足	1.82	不満足	0.256	満足
3	10.33	10.57	10.450	満足	0.24	満足	0.300	満足
2	10.46	10.45	10.455	満足	0.01	満足	0.306	満足
7	10.50	10.47	10.485	満足	0.03	満足	0.339	満足
24	10.40	10.60	10.500	満足	0.20	満足	0.356	満足
31	10.54	10.49	10.515	満足	0.05	満足	0.372	満足
32	10.49	10.67	10.580	満足	0.18	満足	0.444	満足
23	10.65	10.83	10.740	満足	0.18	満足	0.622	満足
1	11.07	10.71	10.890	満足	0.36	満足	0.789	満足
22	11.58	10.46	11.020	満足	1.12	満足	0.933	満足

\*:単位  $\mu\text{g/g}$

評価基準

Xbar管理図 満足:  $LCL(7.126) \leq Xbar \leq UCL(13.234)$

R管理図 満足:  $0 \leq R \leq UCL(1.63)$

zスコア 満足:  $|z\text{-スコア}| < 3$

不満足:  $Xbar < LCL$  または  $UCL < Xbar$

不満足:  $UCL < R$

不満足:  $3 \leq |z\text{-スコア}|$

表8-2 日本ハムキットによる試料1の結果および評価一覧

機関 番号	試料1の報告値 *		Xbar管理図		R管理図		zスコア	
	1	2	Xbar*	評価	R*	評価	zスコア	評価
25	10.69	11.48	11.085	満足	0.79	満足	1.006	満足
8	11.34	10.94	11.140	満足	0.40	満足	1.067	満足
11	11.29	11.35	11.320	満足	0.06	満足	1.267	満足
15	11.36	11.48	11.420	満足	0.12	満足	1.378	満足
13	11.50	11.43	11.465	満足	0.07	満足	1.428	満足
26	11.19	12.24	11.715	満足	1.05	満足	1.706	満足

\*:単位  $\mu\text{g/g}$

評価基準

Xbar管理図 満足:  $LCL (7.126) \leq Xbar \leq UCL (13.234)$

不満足:  $Xbar < LCL$  または  $UCL < Xbar$

R管理図 満足:  $0 \leq R \leq UCL (1.63)$

不満足:  $UCL < R$

zスコア 満足:  $|z\text{-スコア}| < 3$

不満足:  $3 \leq |z\text{-スコア}|$

表9-1 日本ハムキットによる試料2の結果および評価一覧

機関 番号	試料2の報告値 *		Xbar管理図		R管理図		zスコア	
	1	2	Xbar*	評価	R*	評価	zスコア	評価
12	10.21	10.43	10.320	満足	0.22	満足	-1.821	満足
35	10.20	10.48	10.340	満足	0.28	満足	-1.803	満足
16	10.57	10.41	10.490	満足	0.16	満足	-1.675	満足
21	10.83	10.70	10.765	満足	0.13	満足	-1.440	満足
19	10.97	11.13	11.050	満足	0.16	満足	-1.197	満足
27	11.40	10.98	11.190	満足	0.42	満足	-1.077	満足
14	11.75	10.92	11.335	満足	0.83	満足	-0.953	満足
5	11.38	11.92	11.650	満足	0.54	満足	-0.684	満足
36	11.59	12.21	11.900	満足	0.62	満足	-0.470	満足
28	11.53	12.34	11.935	満足	0.81	満足	-0.440	満足
30	12.02	11.91	11.965	満足	0.11	満足	-0.415	満足
4	12.43	11.70	12.065	満足	0.73	満足	-0.329	満足
6	12.23	12.04	12.135	満足	0.19	満足	-0.269	満足
23	12.35	12.01	12.180	満足	0.34	満足	-0.231	満足
34	12.08	12.33	12.205	満足	0.25	満足	-0.209	満足
31	12.14	12.29	12.215	満足	0.15	満足	-0.201	満足
9	12.08	12.47	12.275	満足	0.39	満足	-0.150	満足
20	12.21	12.42	12.315	満足	0.21	満足	-0.115	満足
29	12.04	12.79	12.415	満足	0.75	満足	-0.030	満足
18	12.52	12.37	12.445	満足	0.15	満足	-0.004	満足
24	12.56	12.70	12.630	満足	0.14	満足	0.154	満足
33	12.83	12.60	12.715	満足	0.23	満足	0.226	満足
13	13.12	12.55	12.835	満足	0.57	満足	0.329	満足
7	12.95	12.84	12.895	満足	0.11	満足	0.380	満足
11	13.00	12.83	12.915	満足	0.17	満足	0.397	満足
32	12.66	13.20	12.930	満足	0.54	満足	0.410	満足
3	13.10	12.82	12.960	満足	0.28	満足	0.436	満足
17	13.29	12.64	12.965	満足	0.65	満足	0.440	満足
15	13.51	13.37	13.440	満足	0.14	満足	0.846	満足
22	13.51	13.76	13.635	満足	0.25	満足	1.013	満足

\*:単位  $\mu\text{g/g}$

評価基準

Xbar管理図 満足:  $LCL(8.715) \leq Xbar \leq UCL(16.185)$

不満足:  $Xbar < LCL$  または  $UCL < Xbar$

R管理図 満足:  $0 \leq R \leq UCL(1.31)$

不満足:  $UCL < R$

zスコア 満足:  $|z\text{-スコア}| < 3$

不満足:  $3 \leq |z\text{-スコア}|$

表9-2 日本ハムキットによる試料2の結果および評価一覧

機関 番号	試料2の報告値 *		Xbar管理図		R管理図		zスコア	
	1	2	Xbar*	評価	R*	評価	zスコア	評価
1	13.64	13.66	13.650	満足	0.02	満足	1.026	満足
2	13.48	13.82	13.650	満足	0.34	満足	1.026	満足
25	13.42	15.01	14.215	満足	1.59	不満足	1.509	満足
26	14.60	13.84	14.220	満足	0.76	満足	1.513	満足
8	14.88	13.89	14.385	満足	0.99	満足	1.654	満足
10	17.19	17.30	17.245	不満足	0.11	満足	4.098	不満足

\*:単位  $\mu\text{g/g}$

評価基準

Xbar管理図 満足:  $LCL (8.715) \leq Xbar \leq UCL (16.185)$

不満足:  $Xbar < LCL$  または  $UCL < Xbar$

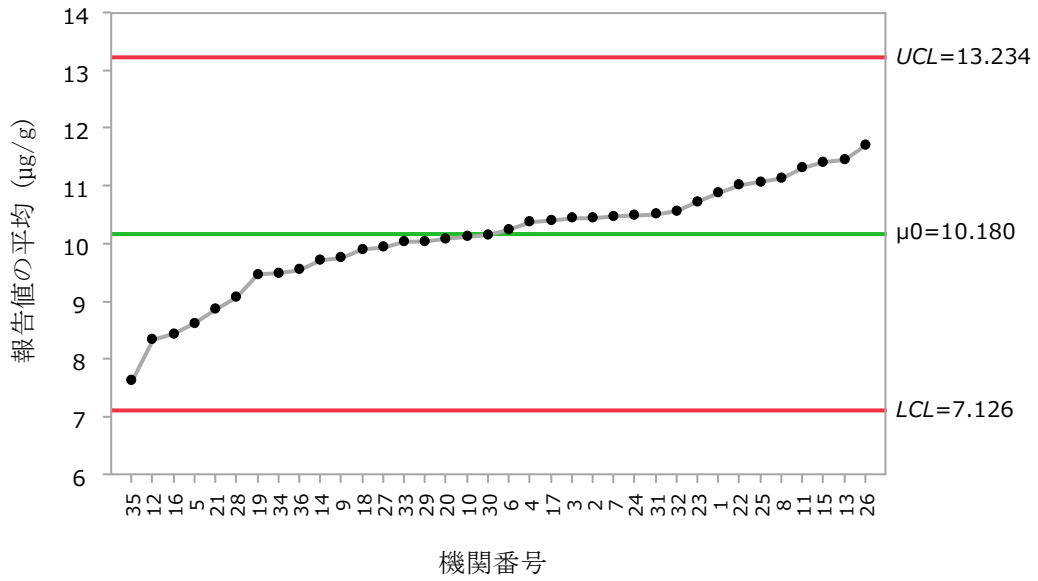
R管理図 満足:  $0 \leq R \leq UCL (1.31)$

不満足:  $UCL < R$

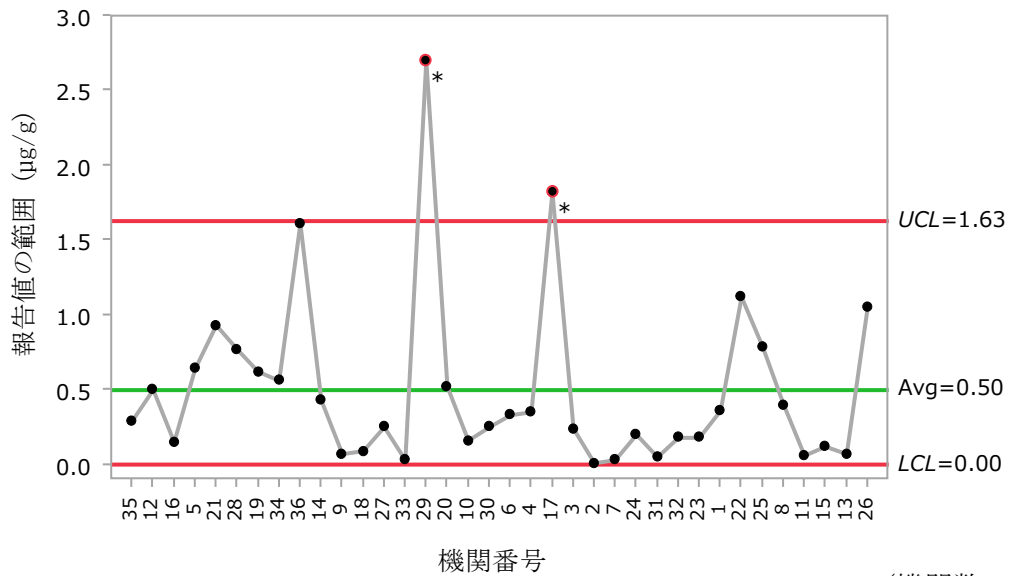
zスコア 満足:  $|z\text{-スコア}| < 3$

不満足:  $3 \leq |z\text{-スコア}|$

a)  $\bar{X}$ 管理図



b)  $R$ 管理図

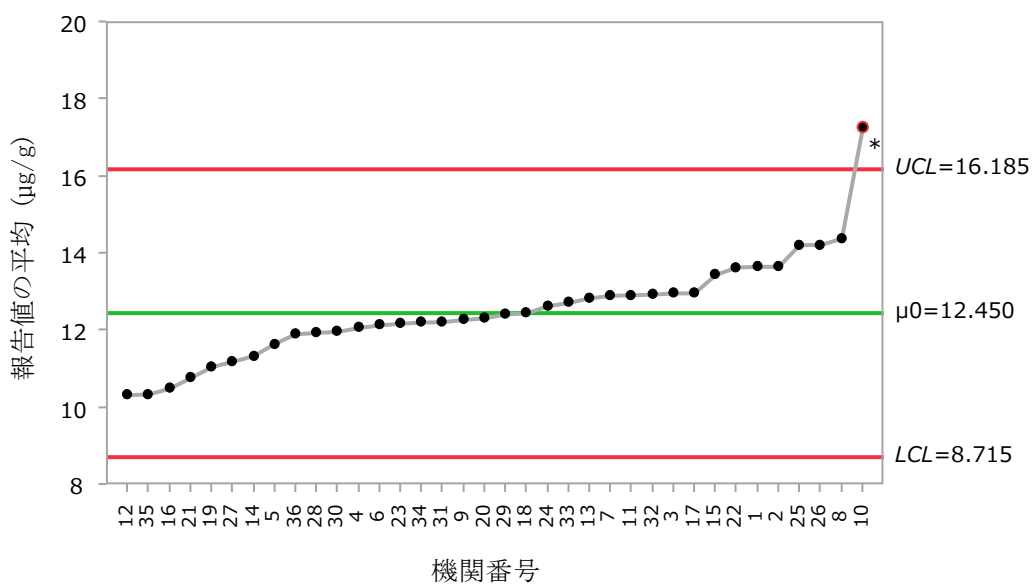


(機関数 36)

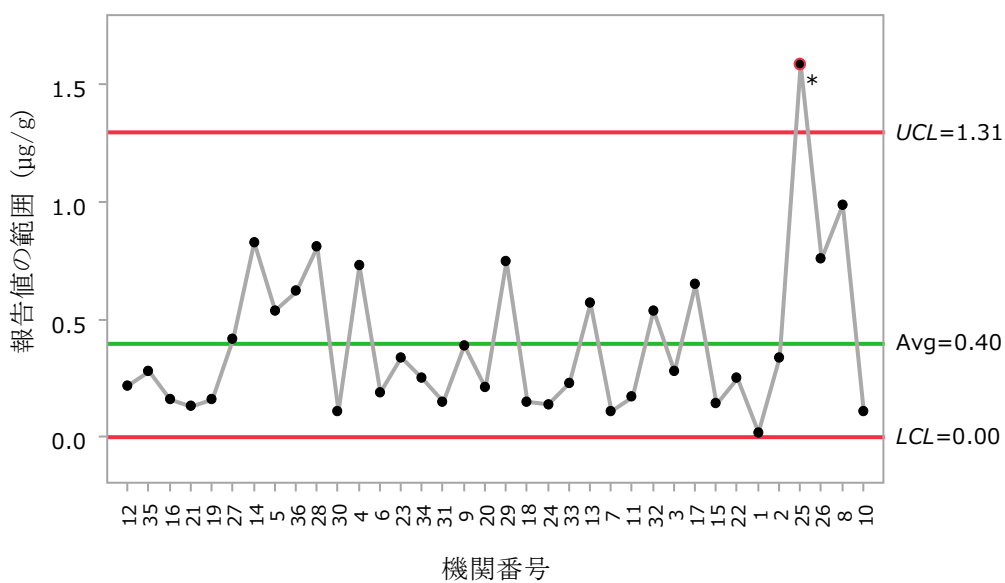
図7 試料1の日本ハムキットを用いた測定による  $\bar{X}$ - $R$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均 $\pm$ 30%  
 $R$ 管理図 (b) の UCL および LCL は  $R$  の平均値と JIS ハンドブック の係数  $D_4 (=3.267)$  から算出

a)  $\bar{X}$ 管理図



b)  $R$ 管理図

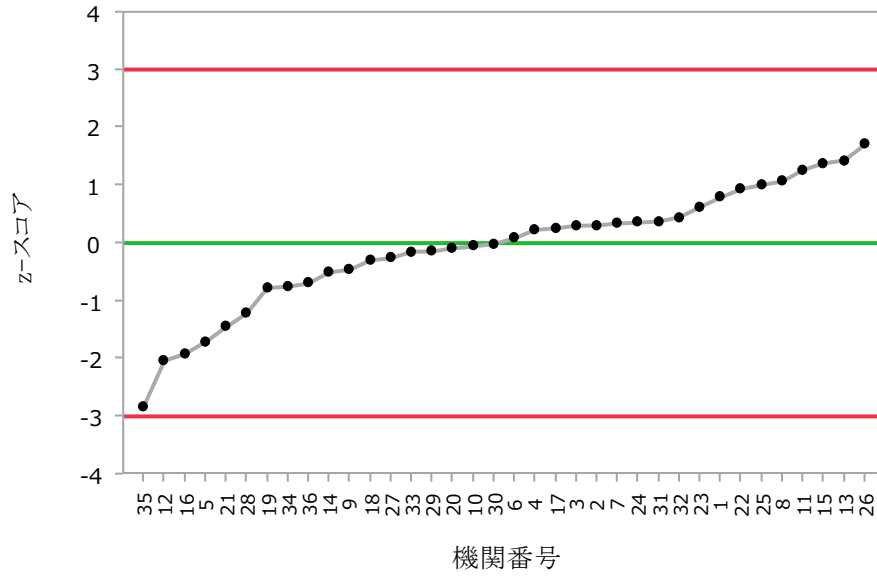


(機関数 36)

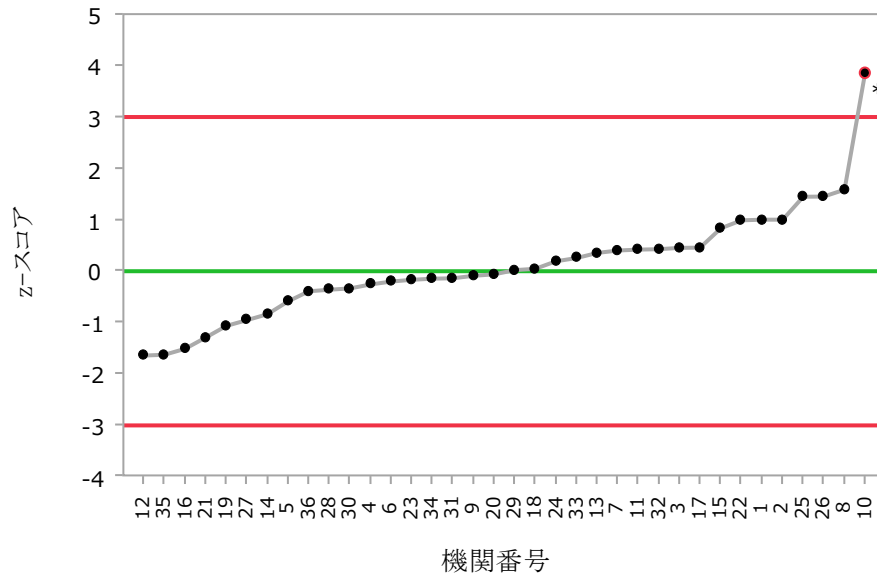
図8 試料2の日本ハムキットを用いた測定による  $\bar{X}$ - $R$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均±30%  $R$ 管理図 (b) のUCLおよびLCLは $R$ の平均値とJISハンドブックの係数 $D_4$ (=3.267) から算出

a) 試料1



b) 試料2



(機関数 36)

図9 日本ハムキットを用いた測定によるzスコア

表10 プリマハムキットによる結果一覧

機関番号	試料番号	報告値 *		$Xbar^*$	$R^*$
		1	2		
6	試料1	7.09	6.83	6.960	0.26
	試料2	7.59	7.52	7.555	0.07

\*:単位  $\mu\text{g/g}$

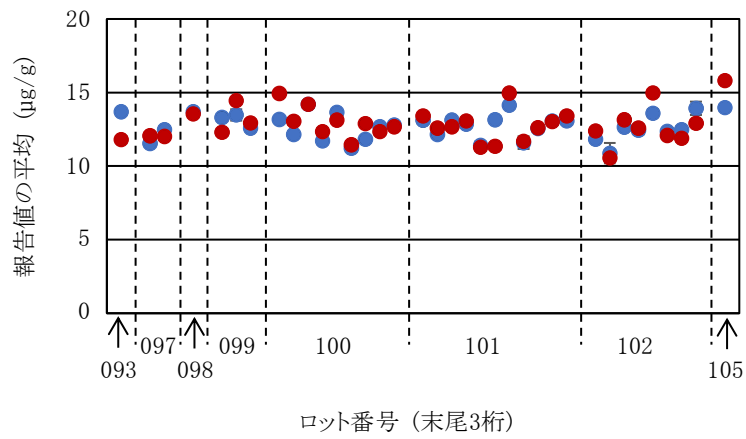
表11 モリナガ (BLG) キットによる結果一覧

機関番号	試料番号	報告値 *		$Xbar^*$	$R^*$
		1	2		
A	試料1	6.40	6.09	6.245	0.31
	試料2	8.05	8.13	8.090	0.08

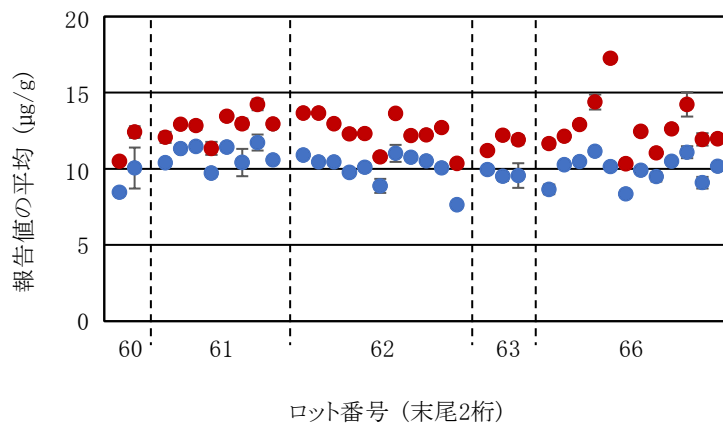
\*:単位  $\mu\text{g/g}$



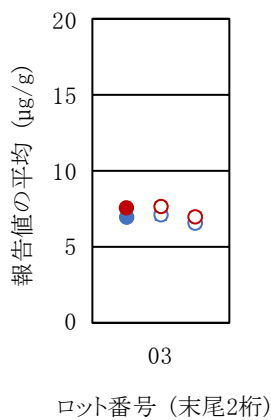
a) モリナガキット



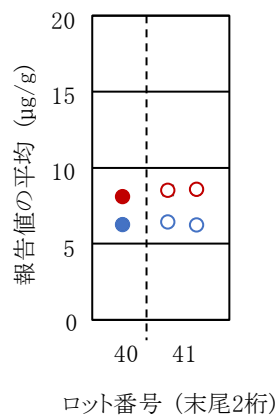
b) 日本ハムキット



c) プリマハムキット



d) モリナガ (BLG) キット



- 試料1
- 試料2
- 食薬センター試料1
- 食薬センター試料2

図10 各キットで得られた報告値のロット間比較

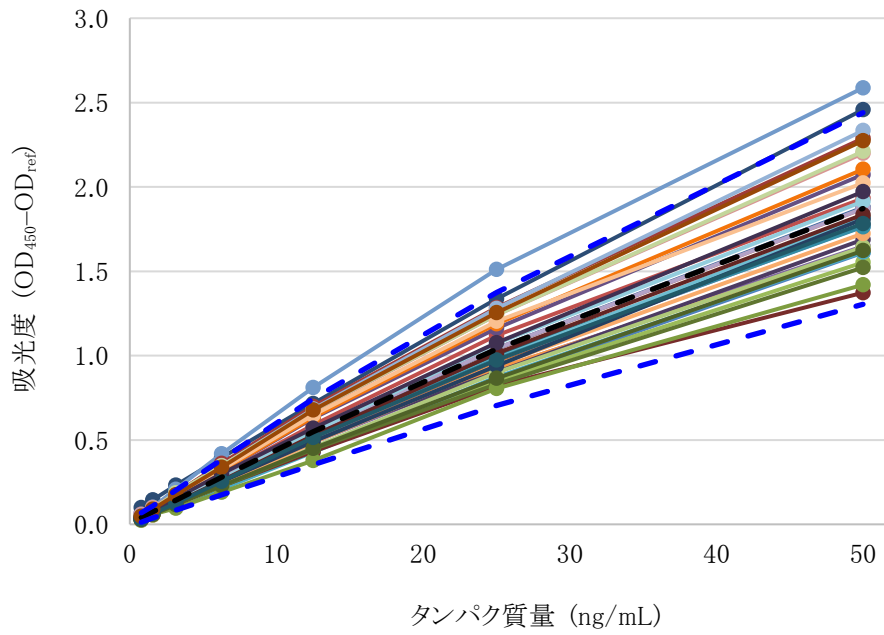


図11 モリナガキットを用いた測定における検量線 (36機関)  
 ロット別検量線は図4615を参照  
 --- 総平均 --- 平均±2SD

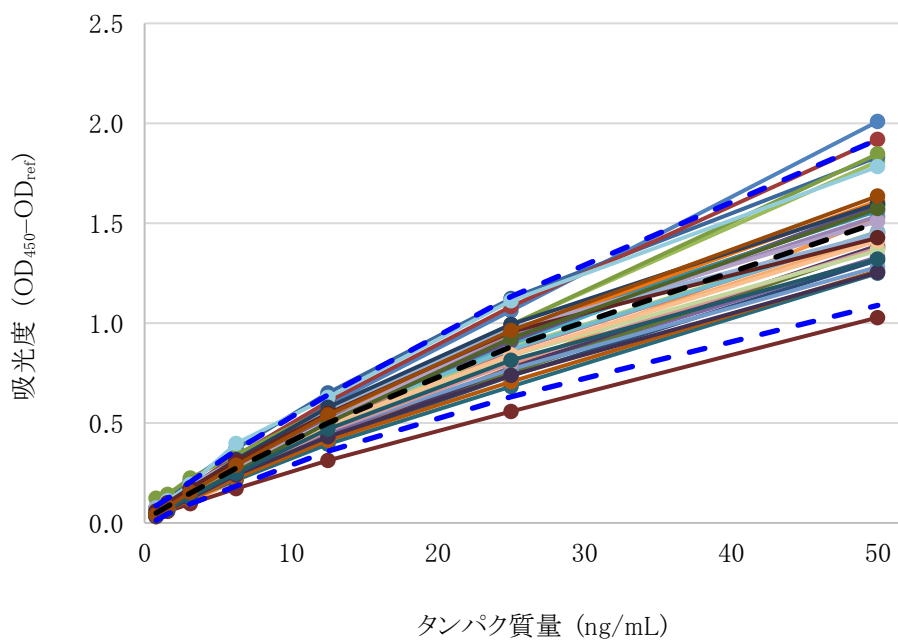


図12 日本ハムキットを用いた測定における検量線 (36機関)  
 ロット別検量線は図4716を参照  
 --- 総平均 --- 平均±2SD

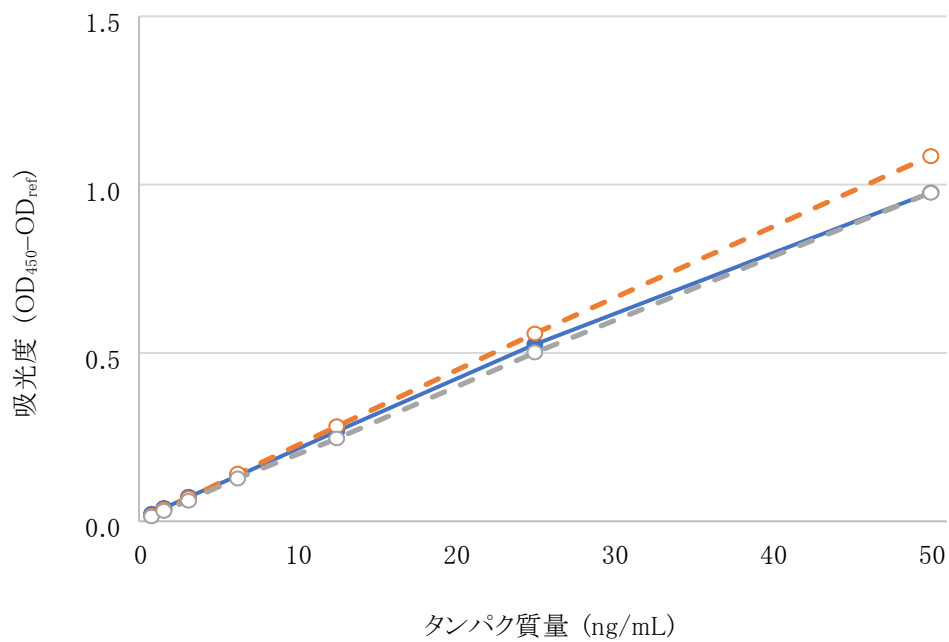


図13 プリマハムキットを用いた測定における検量線  
 (Lot: 2103WHS, 1機関および食薬センター2試験)  
 ● 機関番号6    ○ 食薬センター1    ○ 食薬センター2

表12 外部精度管理調査研究で使用されたプリマハムキットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
2103WHS	2022/1	1

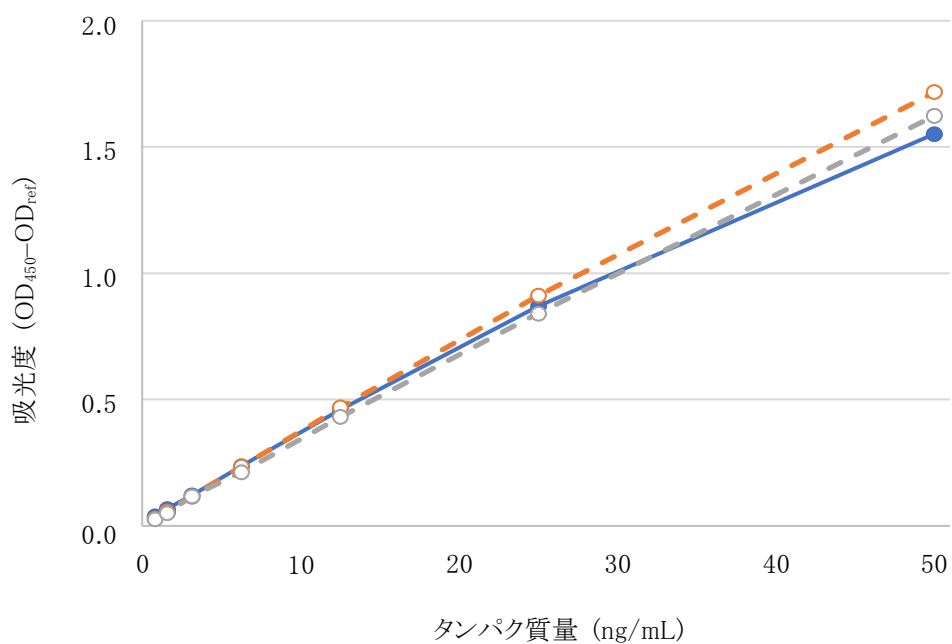


図14 モリナガ (BLG) キットを用いた測定における検量線  
 (1機関 [lot: 21MASFBL040] および食薬センター2試験 [lot: 21MYSFBL041])  
 ● 機関番号A    ○ 食薬センター1    ○ 食薬センター2

表13 外部精度管理調査研究で使用されたモリナガ (BLG) キットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
21MASFBL040	2022/3/10	1

表14 外部精度管理調査研究で使用されたモリナガキットの  
ロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
21JASFCS093	2022/1/21	1
21APSFCS097	2022/4/1	2
21APSFCS098	2022/4/14	1
21MYSFCS099	2022/5/7	3
21MYSFCS100	2022/5/17	9
21JUSFCS101	2022/6/3	11
21JUSFCS102	2022/6/3	8
21OCSFCS105	2022/9/30	1

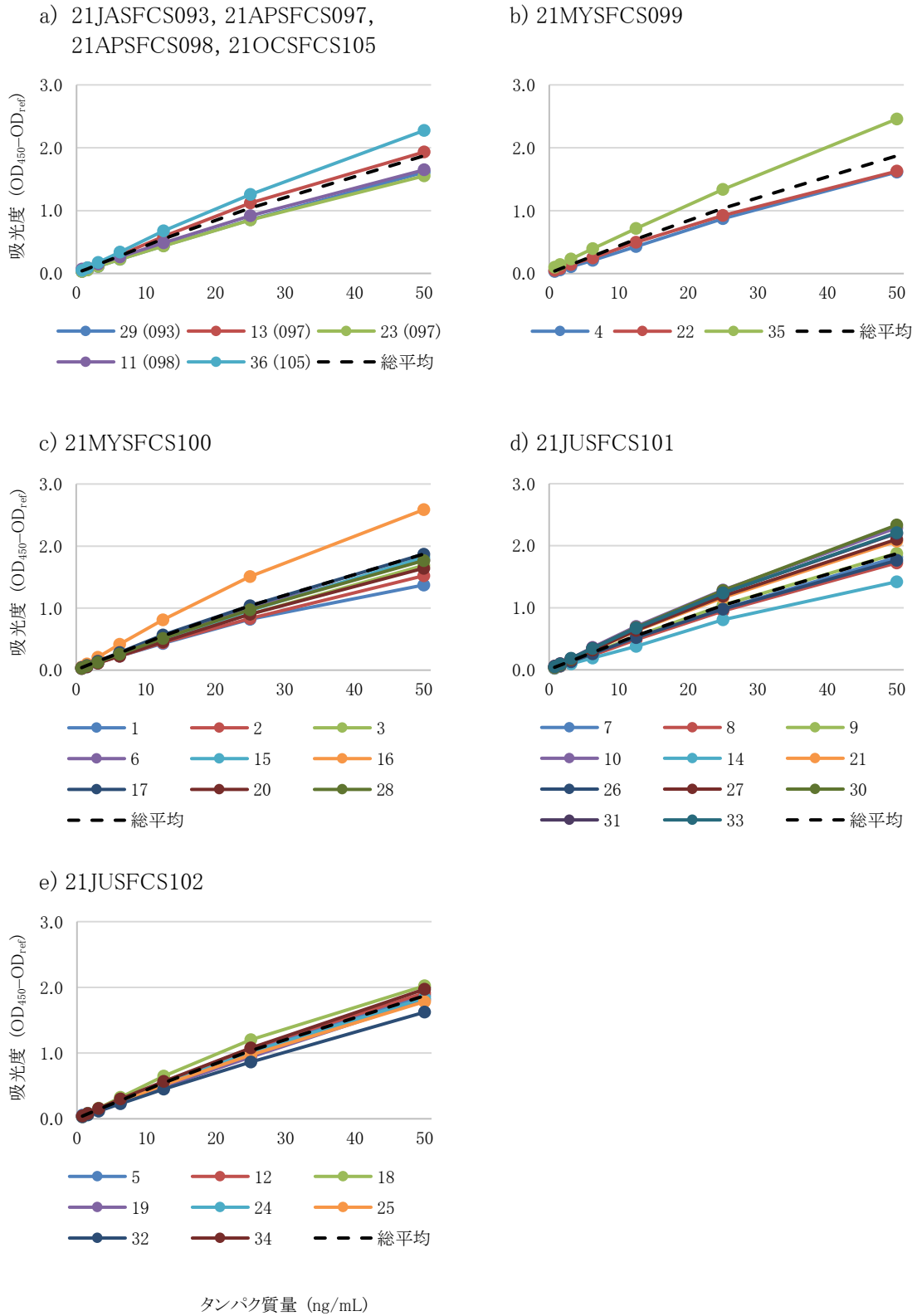


図15 モリナガキットを用いた測定におけるロット別検量線

表15 外部精度管理調査研究で使用された日本ハムキットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
FKEM2160	2021/10	2
FKEM2161	2021/12	8
FKEM2162	2022/4	11
FKEM2163	2022/6	3
FKEM2166	2022/4	12

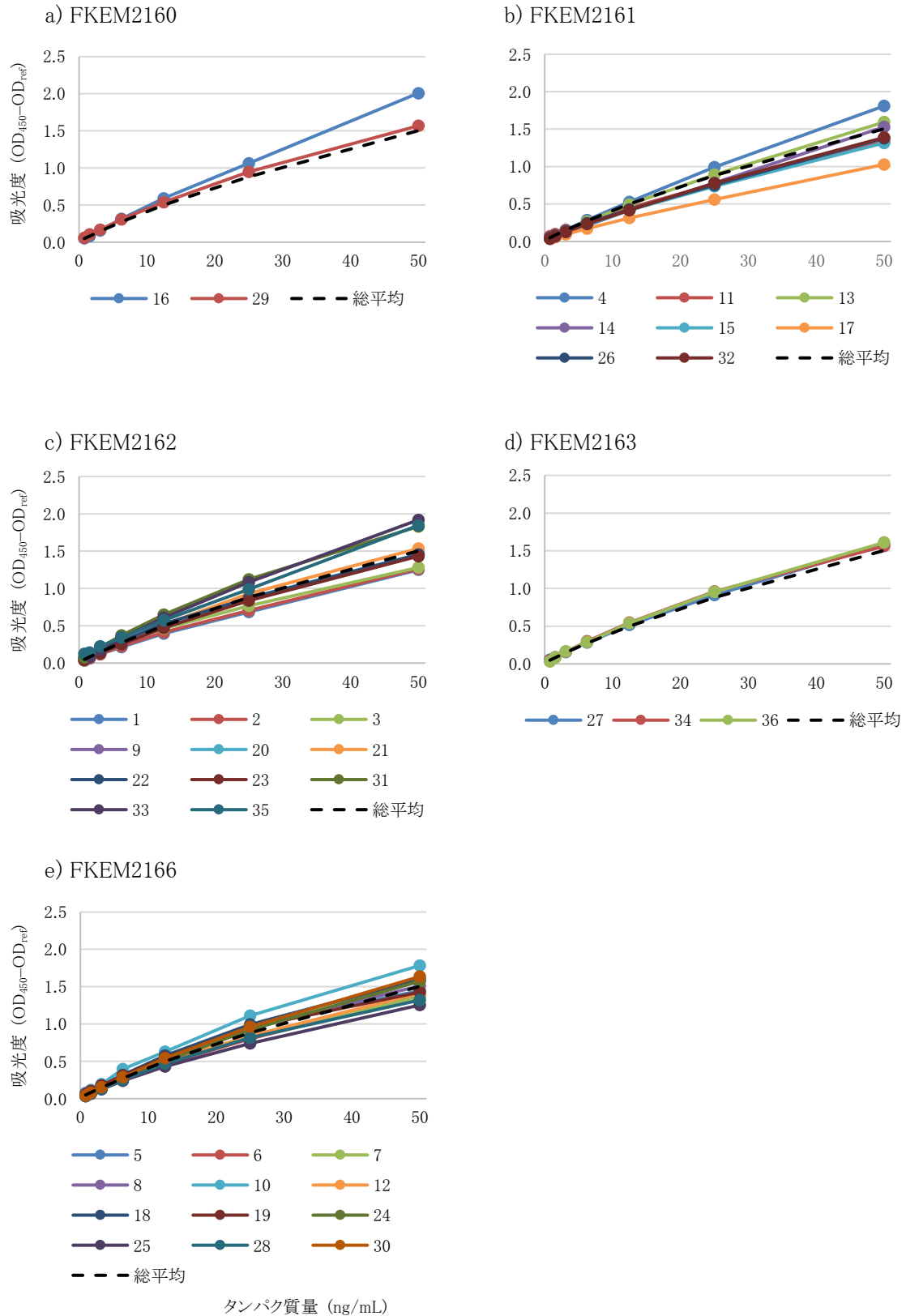
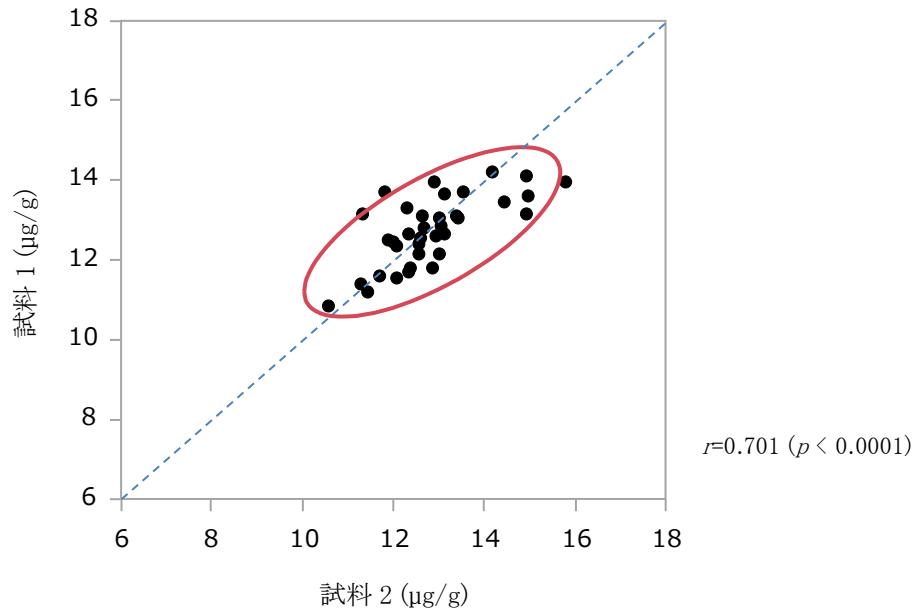


図16 日本ハムキットを用いた測定におけるロット別検量線



a) モリナガキット (36機関)



b) 日本ハムキット (36機関)

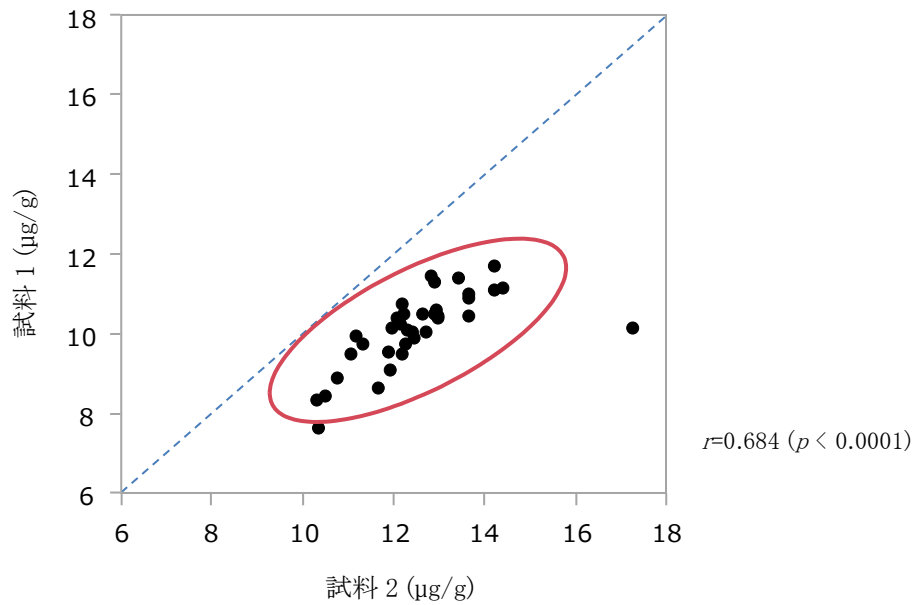
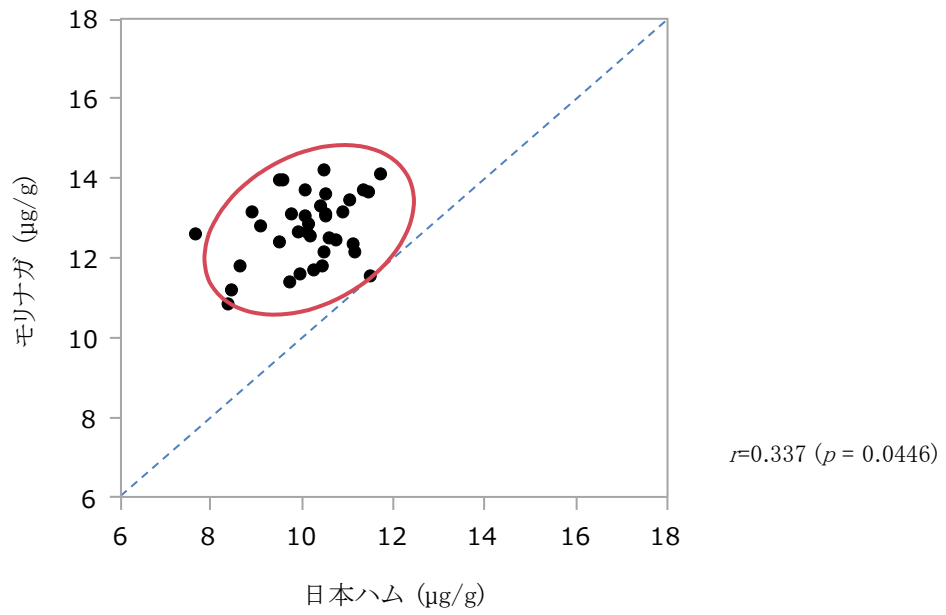


図17 同一キットにおける試料間の相関性

図中の楕円は95%の確率楕円を示す。点線は $y = x$

a) 試料1 (36機関)



b) 試料2 (36機関)

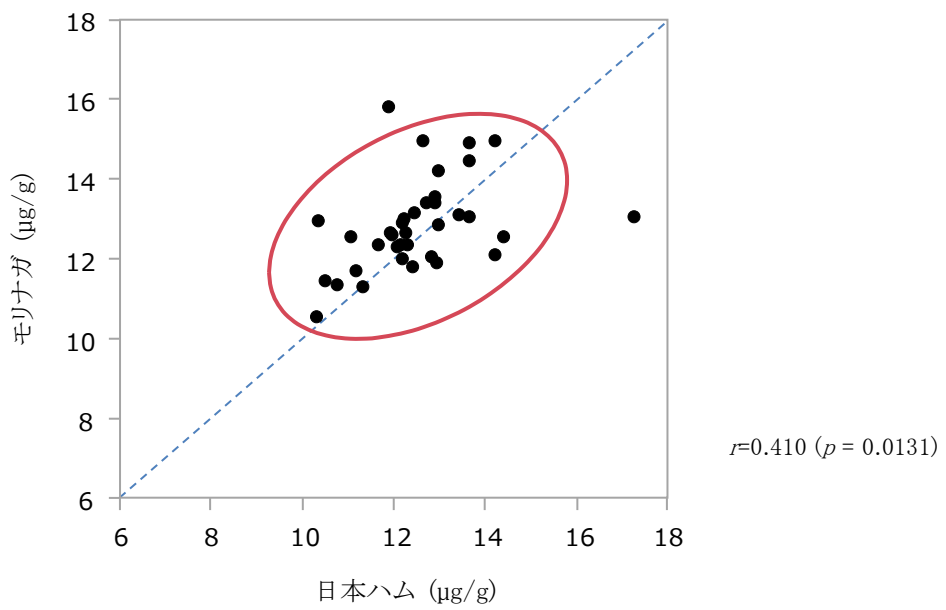


図18 同一試料におけるキット間の相関性

図中の楕円は95%の確率楕円を示す。点線は $y = x$

表16 令和3年度 外部精度管理調査研究における各機関の採用手法（全般）

項目	1	2	3	4	5	6
経験年数 <sup>a</sup>	0	1	2	3-5	6-10	10超
	11	6	6	11	2	3
抽出方法	振とう	その他				
	36	0				
振とう時間 (h)	12未満	12-16未満	16-20未満	20以上	その他	
	0	5	27	3	1	
振とう速度 (rpm)	90未満	90-110	110超			
	1	34	1			
ろ過	実施	実施せず				
	27	9				
遠心分離	実施	実施せず				
	36	0				
抽出液等の希釈操作	手動	自動				
	35	1				
試薬のプレート への添加	手動			電動		自動
	連続分注		マルチch	シングルch	電動 連続分注 シングルch	自動
	マルチch	シングルch				
	2	2	28	2	1	1
14	21	1				
洗浄方法	手動	自動	手動/自動			
	7	11	8	7	3	
マイクロプレート リーダーのメーカー	TECAN	ThermoFisher	Corona	Bio-Rad	Bio Tek	
検量線の 回帰法	4PL <sup>b</sup>	その他				
	36	0				
ピペット校正	年1回以上	2-3年に1回程度	不定期	行わない		
	20	1	7	8		
天びん校正	年1回以上	2-3年に1回程度	不定期	行わない		
	31	1	3	1		

a 複数回答有

b 4PL: 4パラメーターロジスティック

(36機関)

表17 令和2年度 外部精度管理調査研究における各機関の操作手法（キット別）

a) モリナガキット（36機関）、使用ロット数 8ロット

項目	回答区分				
	1	2	3	4	5
抽出液の 保存期間（日）	0	1	2	3-7	> 7
	28	5	1	1	1
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	0	6	2	0	
試料添加時間 （分）	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	
	28	5	2	1	
操作中の室温 （範囲）	20℃未満	20-30℃	30℃超		
	0	36	0		

b) 日本ハムキット（36機関）、使用ロット数 5ロット

項目	回答区分				
	1	2	3	4	5
抽出液の 保存期間（日）	0	1	2	3-7	> 7
	24	8	0	4	0
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	0	8	3	1	
試料添加時間 （分）	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	
	30	4	1	1	
操作中の室温 （範囲）	20℃未満	20-25℃	25℃をはさむ上下	25-30℃	30℃超
	0	26	6	4	0

c) プリマハムキット（1機関）、使用ロット数 1ロット

項目	回答区分				
	1	2	3	4	5
抽出液の 保存期間（日）	0	1	2	3-7	> 7
	1	0	0	0	0
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	—	—	—	—	
試料添加時間 （分）	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	
	1	0	0	0	
操作中の室温 （範囲）	20℃未満	20-25℃	25℃をはさむ上下	25-30℃	30℃超
	0	1	0	0	0

d) モリナガ（βLG）キット（1機関）、使用ロット数 1ロット

項目	回答区分				
	1	2	3	4	5
抽出液の 保存期間（日）	0	1	2	3-7	> 7
	0	0	0	0	1
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	0	0	1	0	
試料添加時間 （分）	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	
	1	0	0	0	
操作中の室温 （範囲）	20℃未満	20-30℃	30℃超		
	0	1	0		

表18 2020年度の特定原材料6種（卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類）の検査実績  
種類数

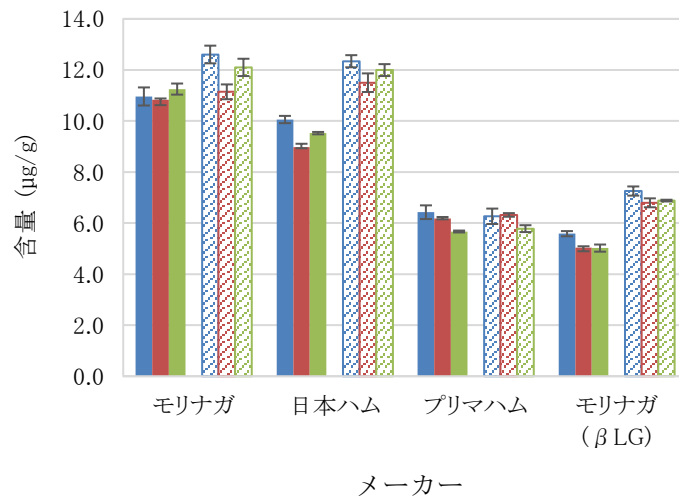
	特定原材料6種中の実施種類数						
	0	1	2	3	4	5	6
実施機関数	4	3	3	5	6	3	5

(回答29機関)

表19 2020年度の参加機関の検査実績および使用キット

試験区分		特定原材料					
		卵	乳	小麦	そば	落花生	甲殻類
ELISA法	実施機関 (29機関)	20	22	14	12	10	15
	総試験数	4793 (23.3 %)	4631 (22.5 %)	4403 (21.4 %)	2642 (12.8 %)	2624 (12.7 %)	1510 (7.3 %)
	陽性検出機関 (29機関)	3	4	4	2	2	6
	検出試験数	385	473	726	15	15	35
	陽性率 (%)	8.0	10.2	16.5	0.6	0.6	2.3
		使用キット [複数回答] (33機関)					
	日本ハム	23	26	16	16	14	—
	モリナガ	24	26	18	15	13	—
	プリマハム	2	2	3	1	1	—
	ニッスイ	—	—	—	—	—	18
	マルハ	—	—	—	—	—	18
確認試験	実施機関 (29機関)	2	2	3	1	1	3
	総試験数	7	5	32	4	24	3
	陽性検出機関 (29機関)	1	2	2	0	1	2
	検出試験数	4	4	6	0	1	2

a) 含量



b) 安定性

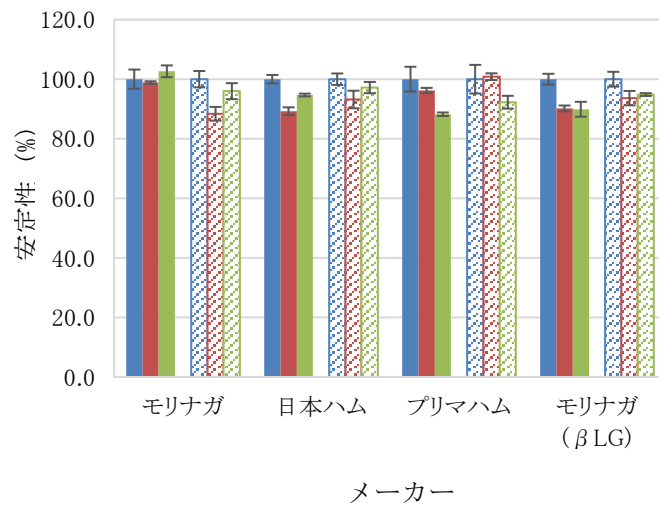


図19 外部精度管理調査予備検討用試料の含量及び安定性の経時的変化  
 とうもろこしペースト ■ 1か月 ■ 3.5か月 ■ 8か月  
 イチゴジャム ■ 1か月 ■ 3.5か月 ■ 8か月

令和3年度 特定原材料検査外部精度管理調査研究参加機関

青森県環境保健センター  
宮城県保健環境センター  
新潟市衛生環境研究所  
千葉県衛生研究所  
東京都健康安全研究センター  
杉並保健所  
中央区保健所  
川崎市健康安全研究所  
長野県環境保全研究所  
石川県保健環境センター  
岐阜県保健環境研究所  
愛知県衛生研究所  
名古屋市衛生研究所  
豊田市保健所 保健衛生課 衛生試験所  
三重県保健環境研究所  
滋賀県衛生科学センター  
京都市衛生環境研究所  
地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター  
神戸市健康科学研究所  
岡山県環境保健センター  
山口県環境保健センター  
香川県環境保健研究センター  
佐賀県衛生薬業センター  
福岡市保健環境研究所  
一般財団法人 食品分析開発センター SUNATEC  
一般財団法人 食品環境検査協会  
日本生活協同組合連合会 商品検査センター  
アスザックフーズ株式会社  
オリエンタル酵母工業株式会社 長浜工場 長浜ライフサイエンスラボラトリー  
株式会社 生活品質科学研究所  
株式会社 つくば食品評価センター  
テーブルマーク株式会社  
日東富士製粉株式会社

日東ベスト株式会社  
株式会社ファスマック  
星薬科大学薬学部



令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

—一般細菌数測定検査用調査試料の開発(4)—

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 副所長
研究分担者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所副所長
研究協力者	高坂 典子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 室長
	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
	中阪 聡亮	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	堀田 実和	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

#### 研究要旨

食品衛生外部精度管理調査、微生物学調査では主に一般細菌数測定検査に用いる基材開発を行った。

一般細菌数測定検査の新規基材として白飯（見立て食材：弁当）を用い、妥当性確認として①性能評価、②品質評価、③パイロットスタディの実施による運用確認を行った。

性能評価では冷蔵試料（0～10℃）と冷蔵保存10日後に22.5℃へ移送した試料（常温試料）の2通りの調査試料について、最大84日間保存までの生菌数の挙動を観察した。

品質評価ではパイロットスタディ用に作製した調査試料から採取した10個の調査試料を2名の検査員でそれぞれ生菌数測定を行い、配付前の品質評価（均質性確認試験）および報告期間後までの品質評価（安定性確認試験）を行った。なお均質性確認試験では公表する暫定値の算出に加えてISO/TS 19036：2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations を用いた標準不確かさの算出を行った。

パイロットスタディでは49機関の参加機関に対して調査試料を配付し、報告値を回収して解析を行った。

性能評価はポイントごとの2回の生菌数の範囲、および接種日と冷蔵28日目の生菌数の差をもとに妥当性を評価した。品質評価（均質性確認試験）の評価基準は算出した標準不確かさが0.1以下であることとし、品質評価（安定性確認試験）の評価基準は平均値が均質性確認試験の平均値の±20%の範囲であることとした。パイロットスタディの評価基準は報告値（実数）の変動係数が30%未満であることとした。

全ての評価基準を満たしたため、白飯は一般細菌数測定検査の基材として妥当であると評価した。

## A. 研究目的

食品衛生管理の外部精度管理事業において、現在当財団で実施している微生物学区分の一般細菌数測定検査では現在ゼラチン基材を氷菓と見立てて配付している。公定法に従うと液状にした調査試料を用いた試験法であることから、参加機関の報告値はばらつきが小さくなり、結果として常識的に考えて異常値ではない報告値でもZスコア±3を超えるという問題が生じている。見立て食材を固形に変更することでこの問題は軽減できると推測できることから、今年度の研究では固形の基材開発とパイロットスタディによる運用上の問題点の洗い出しを目的とした。

## B. 方法

### 1. 試料基材および添加菌

#### 1) 試料基材

試料基材は白飯（アルファ米、市販品）を用いた。

#### 2) 添加菌

添加菌は*Bacillus subtilis*（枯草菌芽胞液、栄研化学、製品コードNo. LK1000）を用いた。

#### 3) 培地等

- ・精製水（日本薬局方）（小塚製薬）
- ・標準寒天培地（日水製薬）
- ・SCD培地（日本製薬）
- ・NaCl（和光特級、富士フィルム和光純薬）

### 2. 使用機器

調査試料、培地等の滅菌にはオートクレーブを使用した。試験操作は安全キャ

ビネットまたはクリーンベンチ内で行い、培養には恒温槽を使用した。

### 3. 準拠する試験法（一般細菌数測定検査）

一般細菌数測定検査は、「弁当及びそうざいの衛生規範について」（第3次改正〔平成7年10月12日衛食第188号・衛乳第211号・衛化第119号〕）に準拠して実施した。以下にその測、k m定手順を示した。なお、この試験法は「食品衛生法等の一部を改正する法律」（平成30年法律第46号）の施行に伴い2021年6月1日に廃止されたものである。

調査試料25 gを生理食塩水225 mLで10倍希釈し、以降10倍段階希釈を適宜実施した。各10倍段階希釈液1 mLを2枚のシャーレに分取して混積培地にした後、35.0℃設定の恒温槽で45～51時間培養した。集落数30～300 cfu/plate の希釈段を用いて生菌数を算出した（図1）。

### 4. 調査試料の作製

#### 1) 基材の滅菌

アルファ米30 gをガラス瓶に秤量し、121℃60分間の高圧蒸気滅菌を行った。品温が室温程度に下がってから蓋を閉め、菌を添加するまで室温保存した。

#### 2) 添加菌液の調製

市販の枯草菌芽胞液を20% (w/v) NaCl溶液で約 $2.5 \times 10^6$  cfu/mLに希釈したものを添加菌液とした。

#### 3) 調査試料の作製

基材に20% (w/v) NaCl溶液50 mLと添加菌液1 mLを添加し、均質になるよう十分に攪拌した。これを調査試料とした。

調査試料は使用、または配付するまで冷蔵保存した（図2）。

## 5. 調査試料の性能評価

### 1) 保存条件

調査試料の保存条件は①冷蔵保存（以下、「冷蔵試料」という）、②冷蔵保存10日後に22.5℃に移送（以下、「常温試料」という）の2条件とした。

常温試料は実際の調査試料配付を想定とし、保存中の温度変化を考慮して行う参考情報とした。

### 2) 生菌数測定

冷蔵試料は添加菌の添加直後、保存開始から10、14、28、84日後に生菌数測定を行った。常温試料は保存開始から14、28日後に生菌数測定を行った。各ポイントで調査試料は1個使用し、秤量回数2回とした（表1）。

結果をもとに、①冷蔵の測定ポイントごとの2つの生菌数の対数値差が $\pm 0.5 \log \text{ cfu/g}$ 以内、②冷蔵保存の添加直後と28日目の各平均値の差が $\pm 1.0 \log \text{ cfu/g}$ 以内、の2条件を評価基準とした。

## 6. 調査試料の品質評価

### 1) 配付用調査試料の作製

4項に示した方法で配付用調査試料を作製し、その一部を用いて品質評価を行った。

### 2) 均質性確認試験

配付用調査試料から無作為に抽出した10個の配付用調査試料を用いて2名の検査員が1回ずつ生菌数測定を行った。計20回の生菌数（実数）から平均値、標準偏差、変動係数の算出および一元配置分散

分析（Microsoft Excel）を行った。また併せてISO/TS 19036 : 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations を参考に標準不確かさの算出を行った。

ここで算出した平均値はパイロットスタディの暫定値として使用した。

なお、算出した標準不確かさ $0.1 \log \text{ cfu/g}$ 以内であることを評価基準とした。

### 3) 安定性確認試験

無作為に抽出した10個の配付用調査試料を用いて、作製から約2か月後に均質性確認試験と同様の生菌数測定を行った。計20回の生菌数（実数）から平均値の算出を行った。

安定性確認試験で得られた平均値（実数）が均質性確認試験で得られた平均値（実数）の $\pm 20\%$ 以内であることを評価基準とした。

## 7. パイロットスタディ（室間共同試験）

### 1) 調査試料の配付と報告値の回収

均質性確認で問題がないことを確認できた配付用調査試料を使用し、パイロットスタディを実施した。

一般細菌数測定検査のパイロットスタディとして参加募集を行い、49機関を対象にパイロットスタディ（以下、室間共同試験）を実施した。検査機関には調査試料を1個ずつ配付した [2021年11月26日発送、チルドゆうパック]。見立て食材を「弁当」として試料処理および測定操作は各機関の方法で実施し、繰り返し試験数は3回とした。検査機関からの報告値

提出期限は2021年12月24日とした。

## 2) データ解析

解析は当財団が実施している食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査で採用している従来方式（算術平均値および標準偏差を用いた評価方法）による手法を用いて実数での解析を行った。すなわち、各検査機関よりデータを回収後、データ・クリーニング（暫定値の1/100以下および100倍以上の報告値を除外）を行い、この範囲外となる報告値および欠測値のある報告値（5個未満）については、以後の解析対象から除外した。次いで各検査機関間、検査機関内の変動を $\bar{X}-R$ 管理図を代用する方法で観察した後、各検査機関からの報告値の平均値（機関別平均値）について、基本統計量、ヒストグラムおよび正規確率プロットを作成することによりデータ全体の様相を把握した。分布に極端な歪みや尖りが観察された場合には2シグマ（総平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差）以上の値を報告した検査機関を除外した後、同様の処理を行った（2シグマ処理）。最終的に各検査機関の $z$ -スコアと $\bar{X}-R$ 管理図に基づいて各検査機関の解析を行った。さらに、各検査機関より回収したデータを対数に変換し、実数解析と同様に $z$ -スコアに基づいて各検査機関の解析を行った。なお、実数解析および対数解析の $z$ -スコアは参考に留めた。

また、経過記録書についてもとりまとめ、解析を行った。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮として、検査機関をコード番号化し、調査に関する秘密保持を図

った。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 調査試料の作製

アルファ米 30 g をガラス瓶に秤量し、121°C 60 分間の高圧蒸気滅菌を行った。品温が室温程度に下がってから蓋を閉め、菌を添加するまで室温保存した。

添加菌液は市販の枯草菌芽胞液を 20% (w/v) NaCl 溶液で約  $2.5 \times 10^6$  cfu/mL に調製したものを使用した。基材に 20% (w/v) NaCl 溶液 50 mL と添加菌液 1 mL を添加し、均質になるよう十分に攪拌し、これを調査試料とした。

調査試料は使用、または配付するまで冷蔵保存した。

### 2. 調査試料の性能評価

冷蔵試料の生菌数測定を添加菌の添加直後、保存開始から 10、14、28、84 日後の 5 回実施した。また常温試料の生菌数測定を保存開始から 14、28 日後の 2 回実施した。いずれも 1 個の調査試料を使用し、秤量回数 2 回とした（表 1）。

冷蔵試料は保存開始から 84 日後まで非常に安定した生菌数を維持し、各実施日の生菌数の差も  $\pm 0.5 \log$  cfu/g の範囲内であった。また添加菌添加直後と 28 日後の生菌数平均値差は  $0.03 \log$  cfu/g であった（表 2~4、図 3）。

参考情報として実施した常温試料も、保存開始 14、28 日後のいずれも冷蔵試料とほぼ同等の生菌数を維持していた（表 2~3、図 3）。

### 3. 調査試料の品質評価

パイロットスタディ用の調査試料は冷蔵保存し、その中から均質性確認試験および安定性確認用に無作為に各 10 個の調査試料を抽出した。

均質性確認試験は 2 名の検査員が各 1 回ずつ生菌数測定を行い、実数の平均値、標準偏差、変動係数および一元分散分析を行った（表 5～6）。また均質性確認試験では試験結果をもとに標準不確かさを算出した（表 7）。標準不確かさは  $0.05 \log \text{ cfu/g}$  と非常に小さい数値であり、調査試料として問題ないと評価した。安定性確認試験は調査試料の作製から約 2 カ月後に均質性確認試験と同様に試験を実施した後、実数の平均値を算出した（表 8～9）。

### 4. パイロットスタディ（室間共同試験）

対象とした全 49 機関から結果を回収した。実数解析の結果は表 10 と図 4～図 6 に、対数解析の結果は表 11 と図 7～図 8 に、経過記録書の集計結果は表 12 に示した。

#### ① 実数解析

データ・クリーニングにより除外される機関はなく、2 シグマ処理は実施しなかった。

正規確率プロットを確認したところ、概ね直線状にデータが分布しており、正規分布に従っていると考えられた。また管理限界外となった機関は  $\bar{X}$  管理図においては 0 機関、 $R$  管理図においては 2 機関であった。 $z$ -スコアによる解析では、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  に該当する機関が 1 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$  に該当す

る機関が 1 機関であった。

相対標準偏差は 15.65 % であり、ゼラチン基材を調査試料とする食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査における過去 5 年間（2017 年度～2021 年度）の相対標準偏差（11～18 %）と大差のないものであった。

#### ② 対数解析

データ・クリーニングにより除外される機関はなく、2 シグマ処理は実施しなかった。

正規確率プロットを確認したところ、概ね直線状にデータが分布しており、正規分布に従っていると考えられた。また、 $z$ -スコアによる解析では、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  に該当する機関が 2 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$  に該当する機関はなかった。

相対標準偏差は 1.52 % であり、ゼラチン基材を調査試料とする食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査における過去 5 年間（2017 年度～2021 年度）の相対標準偏差（1.0～2.3 %）と大差のないものであった。

なお、実数解析と対数解析を比較したところ、対数解析のほうがより正規分布に従っていた。一般的に微生物学的技能試験は対数解析を行っているものが多く、国際的に見ても今後の外部精度管理調査では対数解析を採用したほうがよいと考えられた。

### 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

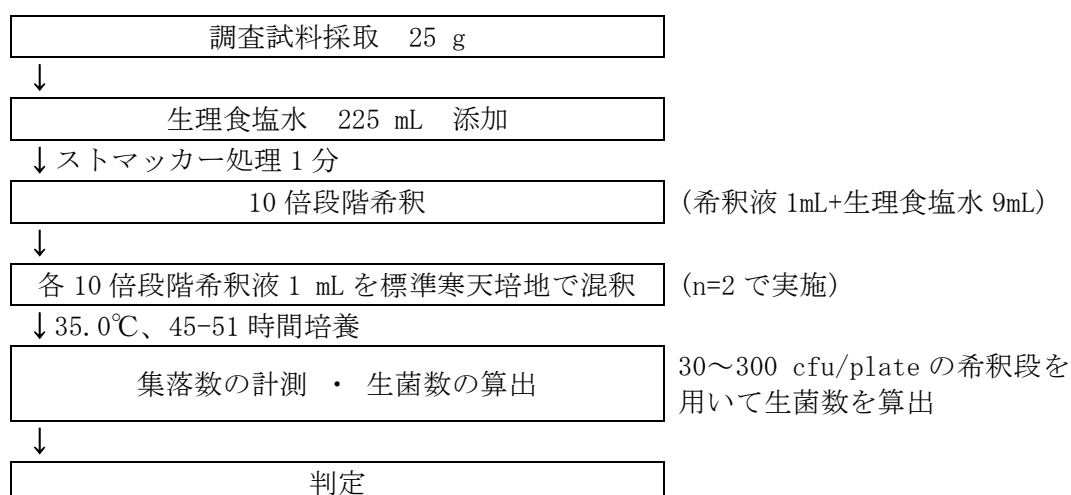


図 1 一般細菌数測定検査 試験手順

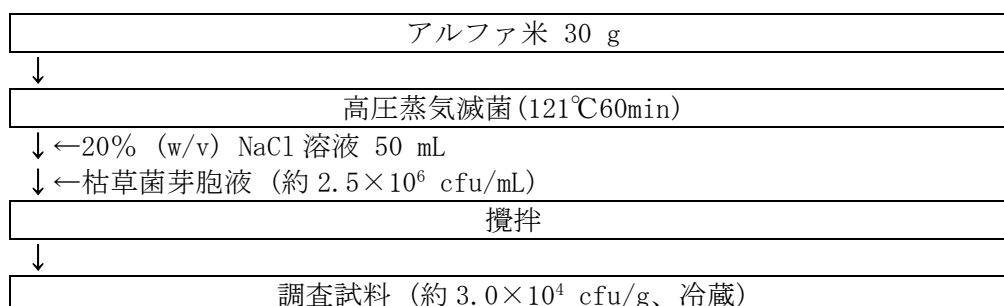


図 2 調査試料 作製手順

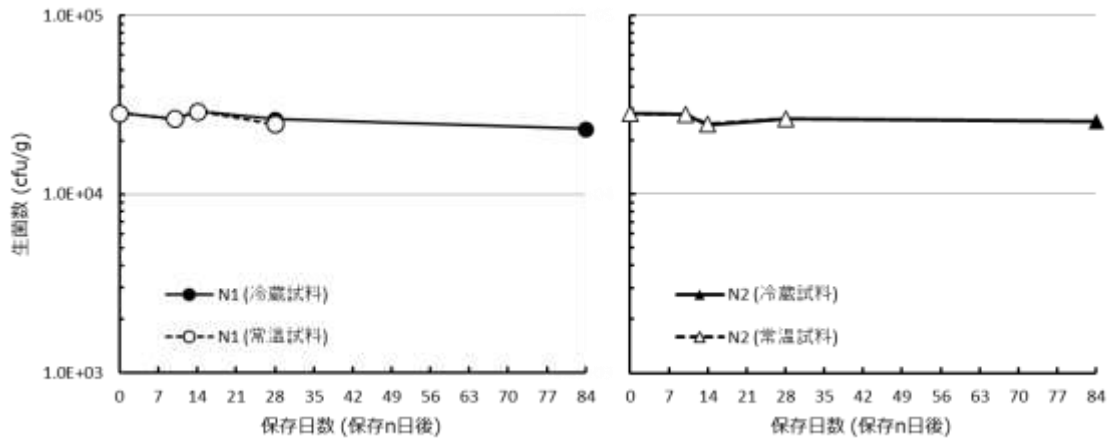


図3 調査試料の性能評価（生菌数の挙動、左図：N1 右図：N2）

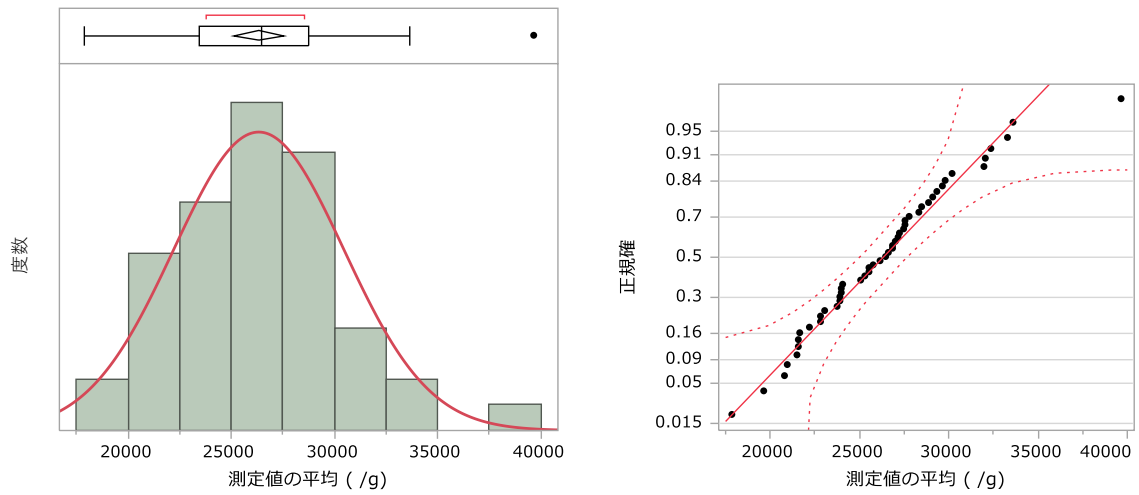


図4 パイロットスタディ 実数解析のヒストグラムと正規確率プロット



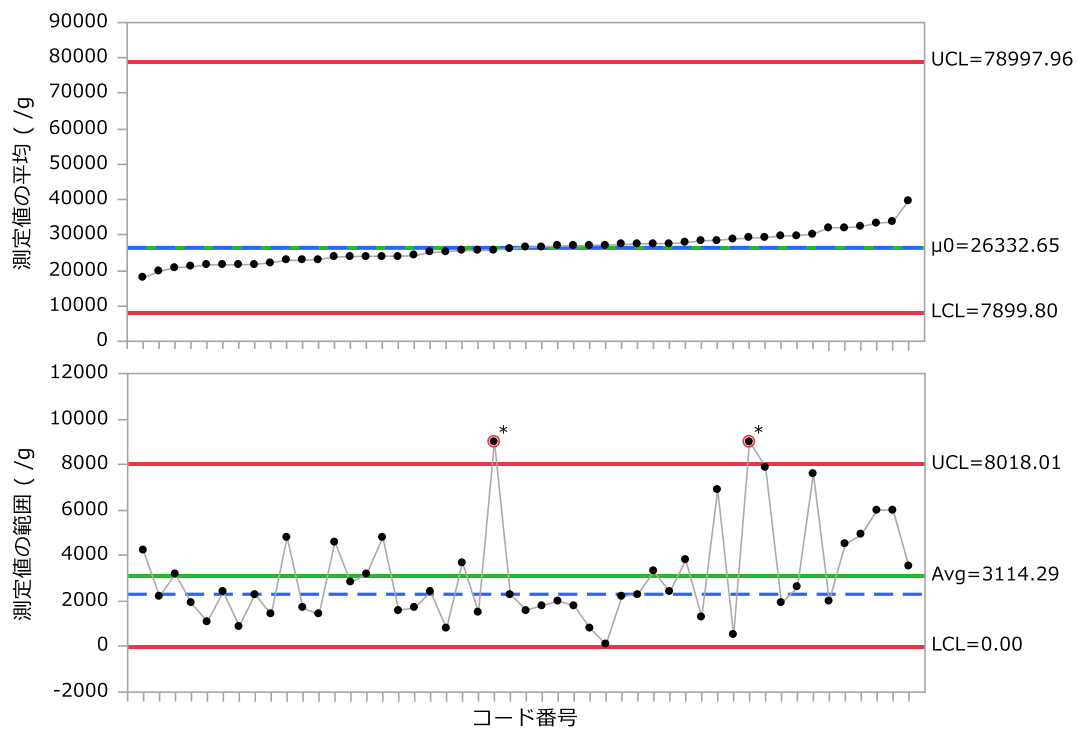


図5 パイロットスタディ 実数解析の $\bar{X}-R$ 管理図

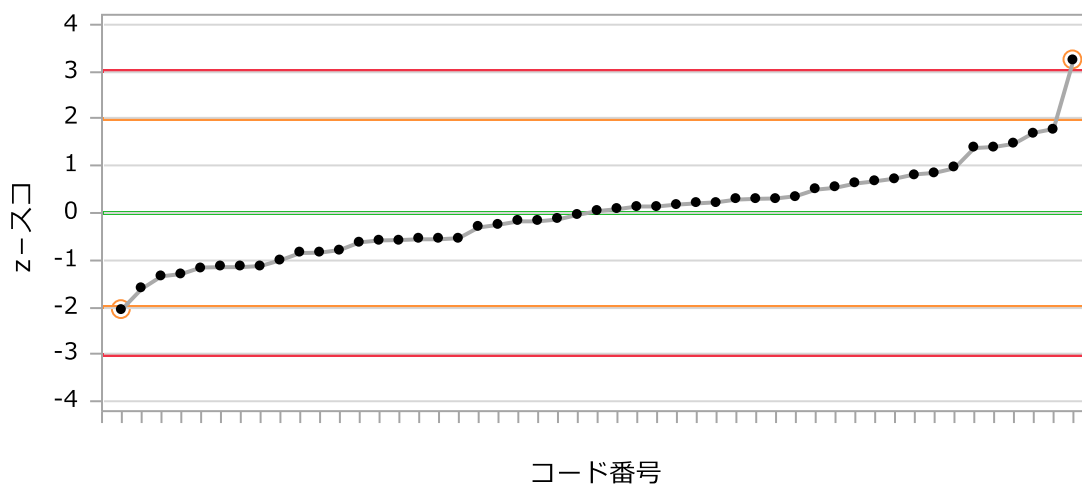


図6 パイロットスタディ 実数解析のz-スコアの順位

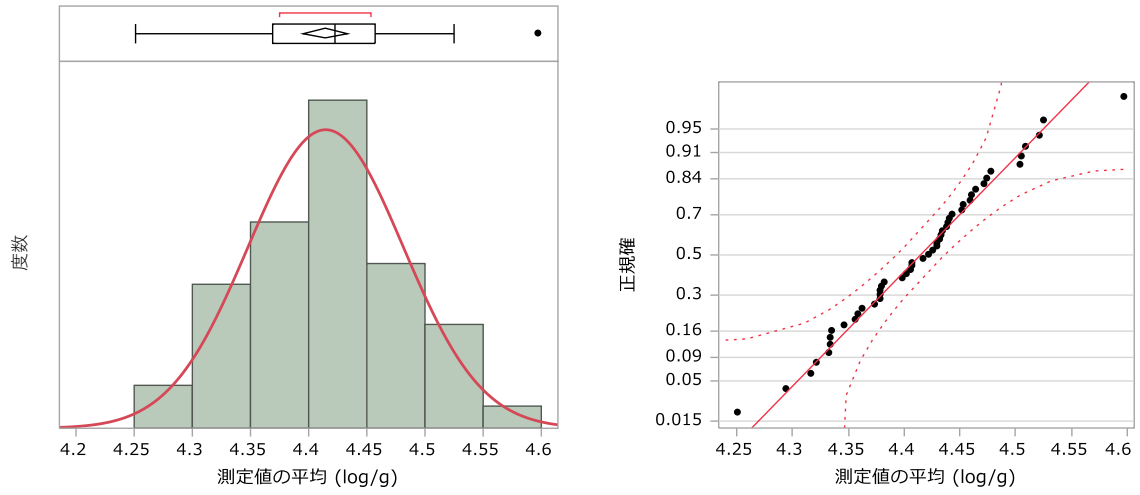


図7 パイロットスタディ 対数解析のヒストグラムと正規確率プロット

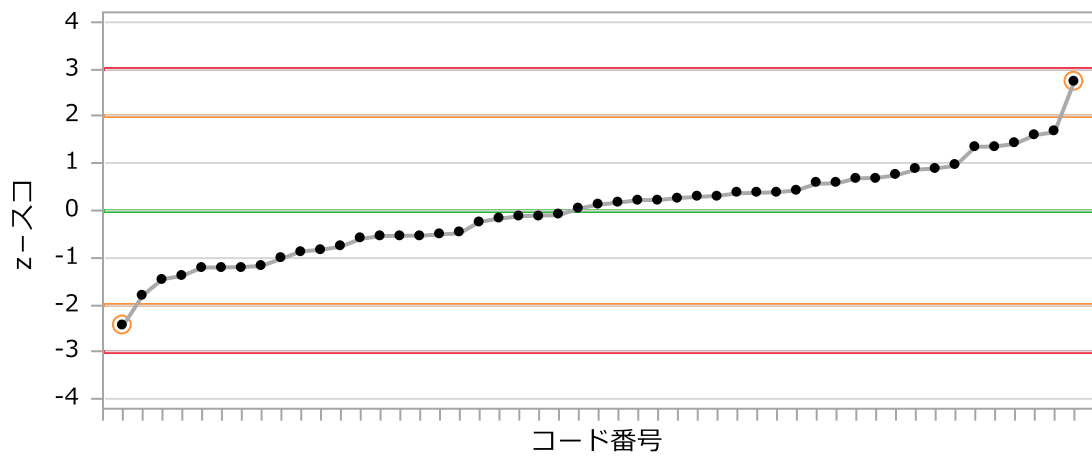


図8 パイロットスタディ 対数解析のz-スコアの順位

表1 調査試料の品質評価 保存条件および試験内容

保存日数	冷蔵試料	温度変化試験
		(22.5℃ (常温試料) )
0 (添加直後)	○ (添加後、冷蔵せずに試験実施)	
10	○	(冷蔵から 22.5℃に移動)
14	○	○
28	○	○
84	○	—

各ポイントで調査試料1個を使用、秤量回数は2回とした。

表2 調査試料の性能評価 結果 (実数)

保存日数	N1		N2	
	冷蔵試料	常温試料	冷蔵試料	常温試料
0 (添加直後)	$2.8 \times 10^4$	—	$2.8 \times 10^4$	—
10	$2.6 \times 10^4$	—	$2.8 \times 10^4$	—
14	$2.9 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$
28	$2.6 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$
84	$2.3 \times 10^4$	—	$2.6 \times 10^4$	—

生菌数の単位：cfu/g

N1、N2は秤量n回目を示した。

表3 調査試料の性能評価 (対数)

保存日数	N1		N2	
	冷蔵試料	常温試料	冷蔵試料	常温試料
0 (添加直後)	4.45	—	4.45	—
10	4.42	—	4.45	—
14	4.46	4.46	4.39	4.39
28	4.42	4.39	4.42	4.42
84	4.37	—	4.41	—

生菌数の単位：log cfu/g

N1、N2は秤量n回目を示した。

表4 調査試料の性能評価（評価結果）

冷蔵試料 保存日数	生菌数 <sup>※1</sup>		A-B	平均値 <sup>※2</sup>	評価① <sup>※3</sup>	評価② <sup>※4</sup>	
	A	B					
0（添加直後）	4.45	4.45	0.00	4.45	適合	—	—
10	4.42	4.45	0.03	4.44	適合	—	—
14	4.46	4.39	0.07	4.43	適合	—	—
28	4.42	4.42	0.00	4.42	適合	0.03	適合
84	4.37	4.41	0.04	4.39	適合	—	—

生菌数の単位：log cfu/g

※1： A、生菌数A、Bは表3の冷蔵試料 N1、N2の数値を転記した。

※2： A、Bの平均値を示した。

※3： A、Bの冷蔵の生菌数（対数値）の差が±0.5 log cfu/g以内である場合に適合とした。

※4： [添加直後の平均値] - [28日目の平均値] を算出し、その数値が±1.0 log cfu/g以内である場合に適合とした。

表5 調査試料の品質評価（均質性確認試験 実数）

調査試料	生菌数（検査員 A）	生菌数（検査員 B）
①	$2.5 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$
②	$2.5 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$
③	$2.7 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$
④	$2.5 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$
⑤	$2.6 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$
⑥	$2.4 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$
⑦	$2.5 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$
⑧	$2.6 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$
⑨	$2.3 \times 10^4$	$2.9 \times 10^4$
⑩	$2.7 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$

生菌数の単位：cfu/g

表6 調査試料の品質評価（均質性確認試験 実数 分析値）

平均値	27000
標準偏差	2400
変動係数	0.089
一元分散分析 F 値	0.303
一元分散分析 F 値に対する優位確率	0.957

生菌数の単位：cfu/g

表 7 調査試料の品質評価 (均質性確認試験 標準不確かさの算出)

調査試料	検査員 A		検査員 B		$\frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$
	生菌数 ( $x_{iA}$ )	$\log_{10}(x_{iA})$ ( $y_{iA}$ )	生菌数 ( $x_{iB}$ )	$\log_{10}(x_{iB})$ ( $y_{iB}$ )	
①	$2.5 \times 10^4$	4.40	$2.9 \times 10^4$	4.46	0.0021
②	$2.5 \times 10^4$	4.40	$2.6 \times 10^4$	4.41	0.0001
③	$2.7 \times 10^4$	4.43	$2.9 \times 10^4$	4.46	0.0005
④	$2.5 \times 10^4$	4.40	$2.6 \times 10^4$	4.41	0.0001
⑤	$2.6 \times 10^4$	4.41	$2.7 \times 10^4$	4.43	0.0001
⑥	$2.4 \times 10^4$	4.38	$3.2 \times 10^4$	4.51	0.0078
⑦	$2.5 \times 10^4$	4.40	$2.9 \times 10^4$	4.46	0.0021
⑧	$2.6 \times 10^4$	4.41	$3.2 \times 10^4$	4.51	0.0041
⑨	$2.3 \times 10^4$	4.36	$2.9 \times 10^4$	4.46	0.0051
⑩	$2.7 \times 10^4$	4.43	$2.8 \times 10^4$	4.45	0.0001
標準不確かさ <sup>※1</sup>	0.05		log cfu/g		
均質性確認試験の評価 <sup>※2</sup>	適合				

生菌数の単位 : cfu/g (実数)、log cfu/g (対数)

※1 : 標準不確かさ  $S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (y_{iA} - y_{iB})^2 / 2}{10}}$

※2 : 標準不確かさの算出値が 0.1 log cfu/g 以下である時に適合と判定した。

表 8 調査試料の品質評価 (安定性確認試験 実数)

調査試料	生菌数 (検査員 A)	生菌数 (検査員 B)
①	$2.6 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$
②	$2.7 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$
③	$2.6 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$
④	$2.9 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$
⑤	$2.7 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$
⑥	$2.6 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$
⑦	$2.8 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$
⑧	$2.6 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$
⑨	$2.8 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$
⑩	$2.6 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$

生菌数の単位 : cfu/g

表 9 調査試料の品質評価 (安定性確認試験 実数 分析値)

平均値	25200
安定性確認試験の評価 <sup>※1</sup>	適合

生菌数の単位：cfu/g

※1：均質性確認試験の平均値 (27000 cfu/g) の±20% (21600～32400 cfu/g) の範囲にある時に適合と判定した。

表 10 パイロットスタディ 実数解析の結果

回収機関数	49	
データ・クリーニングによる除外	なし	
2シグマ処理による除外	なし	
データ数 (有効機関数)	49	
付与値 (平均値)	26332.65 /g	
標準偏差	4121.36 /g	
相対標準偏差	15.65 %	
$\bar{X}$ 管理図による評価	$LCL : 7899.80 /g, UCL : 78997.96 /g$	
	不満足	$\bar{x} < LCL$ 0機関
	満足	$LCL \leq \bar{x} \leq UCL$ 49機関
$R$ 管理図による評価	不満足	$UCL < \bar{x}$ 0機関
	$UCL : 8018.01 /g$	
$z$ -スコアによる評価	満足	$R \leq UCL$ 47機関
	不満足	$UCL < R$ 2機関
	満足	$ z\text{-スコア}  < 2$ 47機関
	疑わしい	$2 \leq  z\text{-スコア}  < 3$ 1機関
	不満足	$3 \leq  z\text{-スコア} $ 1機関

$LCL$  : 下部管理限界線、 $UCL$  : 上部管理限界線

表 11 パイロットスタディ 対数解析の結果

回収機関数	49	
データ・クリーニングによる除外	なし	
2シグマ処理による除外	なし	
データ数 (有効機関数)	49	
付与値 (平均値)	4.415 log/g	
標準偏差	0.067 log/g	
相対標準偏差	1.52 %	
$z$ -スコアによる評価	満足	$ z\text{-スコア}  < 2$ 47機関
	疑わしい	$2 \leq  z\text{-スコア}  < 3$ 2機関
	不満足	$3 \leq  z\text{-スコア} $ 0機関

表 12 パイロットスタディ 経過記録書の集計結果

経験年数	1年以下	2年～4年	5年～9年	10年以上		
	8	21	9	11		
試料採取量	10 g	25 g				
	12	37				
希釈液	生理食塩水	ペプトン加 生理食塩水	緩衝ペプトン水	ペプトン食塩 緩衝液	リン酸緩衝 希釈水	リン酸緩衝 生理食塩水
	5	16	0	0	21	7
均質化方法	ストマッカー	ブレンダー				
	49	0				
ストマッカー袋 フィルター有無	フィルター有	フィルター無				
	49	0				
均質化処理時間	30秒	1分	2分	3分		
	0	43	6	0		
使用培地	標準寒天培地	普通寒天培地	SCD寒天培地			
	49	0	0			
使用培地タイプ	粉末培地	生培地	フィルム培地			
	48	1	0			
培養温度	35±1℃					
	49					
培養時間	24時間程度	48時間程度	その他			
	3	46	0			

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の  
妥当性評価法に関する研究

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
研究分担者	石井 里枝	埼玉県衛生試験所
研究協力者	成澤 一美	埼玉県衛生研究所
	島田 慎一	埼玉県衛生研究所
	今井 浩一	埼玉県衛生研究所
	千葉 雄介	埼玉県衛生研究所
	茂呂 茂寛	埼玉県衛生研究所

#### 研究要旨

ISO/IEC 17025:2017 では試験法の導入前に試験性能の検証を要求している。黄色ブドウ球菌試験法は、定量試験法として妥当性確認されているが、定性試験法としての検出下限値は評価されていない。黄色ブドウ球菌定性試験法は手洗い不足等による人的な食品汚染の衛生指標として広く活用されているが、その性能評価をするための指標が存在しない。そこで本研究では比較可能な試験性能の指標を求めることを目的として、黄色ブドウ球菌定性試験法を対象に実施試験の50%が陽性となる菌量である LOD<sub>50</sub> (level of detection) の推定を試みた。食品試料を用いない手技によるバラツキの評価における LOD<sub>50</sub> は 29~49 CFU/mL であった。食品試料としてチャーハン、カレー、チーズケーキ、エッグタルト、生うどん、ソーセージを用い、単一試験室により食品試料ごとの LOD<sub>50</sub> を推定した。検討により推定された LOD<sub>50</sub> は 25~48 CFU/g であり、手技によるバラツキと比較しても食品試料による検出感度の低下は認められなかった。食品試料ごとの LOD<sub>50</sub> を培地への試料接種量である 0.02 g 中の菌量に換算すると 0.50~0.96 CFU となる。すなわち、1個以上の菌が培地中に接種されれば検出されたと考えられ、試験性能としては十分な検出感度を有していると推察された。

食品添加物、残留農薬等については食品衛生法で規格基準が定められており、各自治体では食の安全を確保するために食品衛生監視指導計画に則り、流通している食品等について収去検査が行われている。自治体の各試験所では検査対象の食品について採用している試験法の妥当性を確認する必要がある。現在、厚生労働省でも食品添加物試験法について妥当性評価ガイドラインの策定について検討がなされている。対象食品は試験所へ搬入される食品を対象として妥当性評価がなされるべきであるが、食品添加物に関しては使用される加工食品は多種多様であること、ま



た、同じ食品種であっても製造者ごとに食品のマトリクスが異なることから、妥当性評価を行う対象食品の選定は難しい。昨年度、「食品中の食品添加物分析法」で通知されている6つの試験法について単一試験室における添加回収試験を実施し、妥当性評価の対象とするべき代表的食品種について考察した。今年度はその中で、単一試験室の検討において、多くの食品で比較的良好な真度及び精度が得られた2つの試験法（ソルビン酸試験法、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法）について添加回収試験による室間共同試験によって評価を行った。また、昨年度、多くの食品種で満足のいく真度及び精度が得られなかったサイクラミン酸試験法について、その原因を検討し、改良法を考察したので報告する。

## 微生物定性試験法における検出下限値の推定

### A. 研究目的

得られた試験結果が信頼性の高いことを示すためには、科学的根拠のある妥当性確認が行われている試験法を用いて検査を行う必要がある。ISO 17468:2016およびISO 16140-2:2016において微生物試験法の妥当性確認には定性試験法で10施設、定量試験法で8施設以上における共同試験の必要性が記載されていることから、個々の試験室で妥当性確認を行うことは難しい。したがって妥当性確認された試験法とは、公定法や第三者認証を受けた試験法ということとなる。ISO/IEC 17025:2017では「試験室が新たな試験法を導入する際に、その方法を適切に実施できることを検証すること」とあり、試験法の導入前に試験性能の検証が求められている。

一般に定性試験の性能評価には検出下限値が使われるが、微生物試験においては試料中の微生物分布が均一でなく、採取部位に対象菌が含まれる確率が検出の可否を決めるため、確実に検出可能な下

限値を求めるのは難しい。ISO 16140-3:2021では、単一試験室における参照試験法導入時の検証手順が定められており、微生物定性試験法の性能評価の指標として、実施試験の50%が陽性となる菌量であるLOD<sub>50</sub> (level of detection) を用いている。妥当性確認時に規定したLOD<sub>50</sub>を基に、試験所で検証により算出したeLOD<sub>50</sub> (estimated LOD<sub>50</sub>) を比較することで、試験性能を比較することができる。

本研究では令和2年度にE. coli定性試験法についてLOD<sub>50</sub>の推定を行い報告した。今年度は黄色ブドウ球菌試験法を対象としてLOD<sub>50</sub>の推定を行った。黄色ブドウ球菌試験法は食品からの微生物標準試験法検討委員会により妥当性確認が行われ、食肉製品の規格基準における公定法として採用されている。しかし本試験法は定量試験法として妥当性確認が行われているため、定性試験法としてLOD<sub>50</sub>については検討がなされていない。わが国では2021年に廃止された衛生規範などで定性試験法として広く用いられてきた。黄色ブドウ球菌は健康なヒトの鼻腔、咽頭、手指、腸管内などに分布している。

そのため、手洗い不足などによる人的な食品汚染の衛生指標として、黄色ブドウ球菌定性試験法は今後も活用されることが考えられるが、その性能評価をするための指標が存在しない。そこで本研究では黄色ブドウ球菌定性試験法の $LOD_{50}$ を推定することにより、比較可能な試験性能の指標を求めることを目的とし検討を行った。

## B. 方法

### 1. 手技によるバラツキの評価

食品の代わりに緩衝ペプトン水 (BPW) (ISO処方) (Oxioid) を試料として用い、手技によるバラツキを評価した。試料への接種菌株は、BioBall HD 10K *Staphylococcus aureus* NCTC10788 (bioMérieux) (使用ロット番号: B6137、10506.0 CFU) を使用した。本製品は1粒に約10000 CFUの *Staphylococcus aureus* が含まれており、4粒を滅菌リン酸緩衝液 (PB) (pH 7.2) (LSIメディエンス) 20 mL に懸濁したものを接種菌原液とした。接種菌原液をPB10 mL で2倍段階希釈を繰返し、2、4、8、16倍希釈したものを接種菌液とした。滅菌ストマッカー一袋に採取した試料25 mL に、接種菌原液または接種菌液を1.5 mL ずつ接種し、菌接種試料とした。試料中の菌濃度を高い方から  $d1 \sim d5$  (CFU/mL) とした。

食肉製品の規格基準に規定された試験法を用いて、各濃度の菌接種試料について  $n=6$  で黄色ブドウ球菌定性試験を実施した。菌を接種しない試料 (ブランク試料) も  $n=1$  で実施した。菌接種試料に BPW225 mL を加えてストマッキングし10倍希釈液を調製した。選択分離培地として

3%卵黄加マンニット食塩寒天培地

(MSEYA) (栄研化学、卵黄液は極東製菓工業) を用い、10倍希釈液を0.1 mL ずつ MSEYA2枚に接種、塗抹し、 $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  で  $48 \pm 2$  時間培養した。培養後、2枚の MSEYA のいずれかに1コロニー以上の黄色ブドウ球菌の定型集落 (黄色集落でその周囲に卵黄反応による白濁帯を示したもの) が発育した場合黄色ブドウ球菌試験陽性と判定し、以降の試験は省略した。一連の操作を1人の検査員で実施し、3人の検査員で2回ずつ実施した。

$LOD_{50}$  の算出方法は ISO 16140-2:2016 およびその引用元である Wilrich<sup>1)</sup> らの手法に準じた。ポアソン分布より導出された以下の式から  $LOD_{50}$  を推定した。

$$LOD_{50} = -\frac{\ln 0.5}{0.02F}$$

ここで、 $F$  値は検出感度に影響を与える食品固有の値であり、食品中の菌濃度  $d_i$  での黄色ブドウ球菌試験の陽性試料数  $y_i$  を以下の方程式に代入し、その解により  $F$  値を求めた。

$$\sum_{i=1}^5 \left( \frac{y_i d_i}{\exp(0.02F d_i) - 1} - (6 - y_i) d_i \right) = 0$$

### 2. 食品試料ごとの $LOD_{50}$ の推定

対象とした食品試料として、チャーハン、カレー、チーズケーキ、エッグタルト、生うどん、ソーセージを供試した。無菌的に各試料25 g をストマッカー一袋に採取し、B. 方法の1. と同様に菌接種試料の調製、黄色ブドウ球菌試験および  $LOD_{50}$  の推定をした。事前に食品試料が黄色ブドウ球菌試験陰性であることを確認

していたため、MSEYA上の黄色ブドウ球菌の定型集落発育の有無で結果を判定した。各試料について日を改め2回実施した。

#### C. D. 研究結果および考察

##### 1. 手技によるバラツキの評価

食品の代わりにBPWを試料として繰返し試験、異なる検査員間による結果を比較することで、手技によるバラツキについて検討した。3人の検査員で2回ずつ試験を実施した結果を表1に示した。試料中の菌量が少ないほど陽性試料数は減少する傾向を示したが、一部で菌量と陽性試料数が逆転しているものも認められた。菌量が最も多い $d_1$ での陽性試料数は5と6が多く、ほとんどの試料が陽性と判定された。一方で菌量が少ない $d_4$ 、 $d_5$ の陽性試料数は0～2であり、陰性の試料がほとんどであった。 $d_2$ と $d_3$ の陽性試料数で試験試料数の半分程度である2～4が多かった。陽性試料数から算出された $LOD_{50}$ は29～49 CFU/mL、 $F$ 値は0.70～1.2であった。 $F$ 値は検出感度に与える影響の度合いを示しており、1に近いほどMSEYAへの接種菌量は理想的なポアソン分布に近づく。算出された $F$ 値から判断すると、手技によるバラツキは微生物検査としては許容範囲であると考えられた。

##### 2. 食品試料ごとの $LOD_{50}$ の推定

各食品試料の菌接種試験の結果および算出された $LOD_{50}$ を表2に示した。いずれの試料でも試料中の菌濃度に対する陽性試料数はBPWを試料として用いた場合と同様で、試料中の菌量が少ないほど陽性試料数は減少する傾向であった。各食品試料の $LOD_{50}$ および $F$ 値はチャーハンで48

CFU/g、0.73、カレーで42 CFU/g、0.83、チーズケーキで37 CFU/g、0.95、エッグタルトで48 CFU/g、0.72、生うどんで37 CFU/g、0.93、ソーセージで25 CFU/g、1.4であった。

BPWを試料として得られた $F$ 値と比較すると、食品マトリクスによる検出感度の低下が認められた試料はなかった。本実験で用いた食品試料は調製した希釈液が濁っているものが多く、塗抹後の培地表面には食品試料の残渣が付着していた。油分やカレー中の香辛料、エッグタルトに含まれていたチョコレートの成分などが菌の発育を抑制することを考えていたが、検出感度には影響がなかった。一方で、同一試料であっても1回目と2回目の試験に差がある試料が多かった。特にエッグタルトや生うどんの $LOD_{50}$ は1回目と2回目で2倍近い差があった。また、チャーハンの2回目の試験では $d_1$ から $d_4$ の陽性試料数はそれぞれ4、6、0、2であり $d_1$ と $d_2$ 、 $d_3$ と $d_4$ が逆転していた。接種菌量に対する陽性試料数の逆転はBPWを試料とした場合にも認められたことから、食品試料の影響よりも試験法に原因があると推察された。試料の比重を1とした場合、MSEYA 2枚への接種量である0.2 mLは10倍希釈液250 mLのわずか0.08%でしかない。そのため、本研究のように試料中の菌量が微量である場合、希釈液中の菌の均一性、ピペット操作の精度の影響により試験結果にバラツキが生じてしまうのはやむを得ないと考えられた。田中らは細菌数試験において、「平均値±拡張不確かさ」は1/2～2倍と報告している<sup>2)</sup>。本研究により個々の試験によって算出さ

れた $F$ 値は0.52~1.5であり、試験法が異なるものの、細菌数試験でのバラツキと比較すると許容できる程度であると推察された。

## E. 結論

本研究では黄色ブドウ球菌定性試験法を対象として、 $LOD_{50}$ を推定することにより比較可能な試験性能の指標を求めることを目的とし検討を行った。本研究の結果から推定された食品試料ごとの $LOD_{50}$ は25~48 CFU/gであった。黄色ブドウ球菌定性試験法は調製した試料の10倍希釈液を2枚のMSEYAに0.1 mLずつ接種することから、培地への試料接種量は0.02 gとなる。食品試料ごとの $LOD_{50}$ を0.02 g中の菌量に換算すると0.50~0.96 CFUとなる。すなわち、1個以上の菌が培地中に接種されれば検出されたと考えられ、試験性能としては十分な検出感度を有していると推察された。

ISO 16140-3:2021では、参照試験法の導入時には、妥当性確認時の結果と比較し、 $LOD_{50}$ が4倍未満であることが許容限界とされている。本研究の結果が、各試験室における黄色ブドウ球菌定性試験法の性能評価の指標として活用されることが期待される。

## 参考文献

- 1) Wilrich C. et al: J AOAC Int., 92(6), 1763-72 (2009).
- 2) 田中ら：日本食品微生物学会雑誌, 27, 158-162 (2010).

## 食品添加物試験法の妥当性評価法

### A. 研究目的

食品添加物試験法は平成12年3月30日付け衛化第15号通知「食品中の食品添加物分析法」（令和元年6月28日改正）で示されており、別添1 試験 8には「食品添加物分析法各条に掲げる食品添加物分析法（「以下「規定分析法」という。）に代わる方法で、それが規定分析法以上の精度のある場合には、その分析法を用いることができる。ただし、その結果に疑いのある場合には、規定分析法で最終の判定を行う。」と規定されている。現在、その同等性の判断基準を示す妥当性評価ガイドラインについて厚生労働省が検討を進めている。

採用している食品添加物試験法の妥当性を評価しようとする場合、対象とすべき食品は試験所へ実際に搬入される食品について実施されるべきであるが、食品添加物は多種多様の食品に使用されており、また、同じ食品種であっても製造者ごとにそのマトリクスも異なる。多種多品目について収去検査を行っている自治体の試験所において妥当性評価に用いる対象食品をどのような基準で選定したらよいか判断することは難しい。また、検討中のガイドラインにも対象食品の選定については言及がない。

昨年度、単一試験室での添加回収実験によって、6種の規定分析法を対象に真度及び精度のデータから試験法の妥当性等を確認し、適用可能な食品、適用不可能な食品、あるいは、個人の技量等によってバラツキが出るような食品種を明らかにした。その結果、ソルビン酸試験法では、10種の食品種に基準値レベル等を添加した場合の真度は93.2~97.8%、併

行精度は0.5～3.9%、室内精度は0.5～4.2%であった。二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法では7種の食品種に基準値レベルの添加回収実験を行い、真度は90.4～97.8%、併行精度は1.2～4.1%、室内精度は2.2～7.3%と比較的良好な結果が得られた。選択した食品種は多岐に及んでおり通常の収去検査においても搬入の頻度が多いものと考えられ、これらの食品種を妥当性評価の際の対象食品として選択することは妥当であると考えられた。今年度は室間共同試験により検証を試みた。

サイクラミン酸は、日本では使用が禁止されている甘味料である。しかし、諸外国では甘味料として使用されているため、輸入された食品からサイクラミン酸が検出され、食品衛生法違反となる事例が報告されている。厚生労働省の違反事例速報によると、令和3年度では菓子や健康食品、調味料、漬物等からサイクラミン酸が検出されている<sup>1)</sup>。

サイクラミン酸の検査法については、平成15年8月29日付け食安監発第0829009号「サイクラミン酸に係る試験法について」の別添（以下「規定分析法」という。）が示されているところである。昨年度は、規定分析法の妥当性評価のための検討として、8種類の食品に対し添加回収試験を実施した。その結果から「ビスケット」、「チョコレート」、「米酢」、「らっきょう漬け」、「たくわん漬け」の5食品について、改良法の検討が必要と考えられた。5食品の問題点は、以下のとおりである。ビスケットは、加熱時に餅状となり、抽出が困難であった。チョコ

レートは、併行精度と室内精度に改善の余地が見られ、原因としてエマルジョンの発生などが考えられた。米酢は、まったく添加回収されず、原因として、山口<sup>2)</sup>らが報告したようにサイクラミン酸がカートリッジに吸着したことなどが考えられた。らっきょう漬けは平均回収率が低くバラツキも大きかった。たくわん漬けは、平均回収率が低値であった。

そこで、今年度、先述の問題の原因を究明し、改良法を検討するため、ビスケットは加熱抽出時の加水量等の調節、チョコレートはエマルジョン対策、米酢、らっきょう漬け、たくわん漬けはpHの調整等について検討を行った。

## B. 方法

### 1. 室間共同試験による検証

神奈川県衛生研究所、川口市保健所、群馬県食品安全検査センター、神戸市健康科学研究所、名古屋市衛生研究所、奈良県保健研究センター、横浜市衛生研究所に御協力をいただき、ソルビン酸試験法については6機関で10食品種（①チーズ、②ちくわ、③さつま揚げ、④ウインナー、⑤マーガリン、⑥らっきょう漬け、⑦ワイン、⑧オレンジジュース、⑨イカ燻製及び⑩ビスケット）を、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法については8機関で6食品種（①干しかんぴょう、②干しトマト、③干しブドウ、④ワイン、⑤甘納豆及び⑥冷凍えび）を対象に検討した。

同一ロットの対象食品を配布し、通知試験法（令和元年6月28日発 薬生食監発

06281第1号「食品中の食品添加物分析法の改正について」通知に記載の「保存料安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム 2. 分析法（液体クロマトグラフィー）」及び「漂白剤 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類 2. 分析法A（アルカリ滴定法）」に従って、基準値が設定されている場合には基準値濃度、基準値が設定されていない場合には定量下限濃度になるように標準溶液を添加して各機関1食品について2試料で濃度を定量した。ソルビン酸については添加後、30分程度放置してから分析操作を実施した。二酸化硫黄及び亜硫酸塩類については揮発しやすいため、添加後、直ちに操作を開始した。定量下限濃度に添加した試料（ソルビン酸試験法のオレンジジュース及びビスケット）については通知試験法で示されている濃度範囲の検量線並びに添加濃度付近の検量点で構成する低濃度用検量線による定量値をそれぞれ求め、併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差等を比較した。

それぞれの機関から提出された定量値についてCochran検定、single Grubbs検定及びpaired Grubbs検定によって外れ値検定を行い、一元配置分散分析によって平均値、併行相対標準偏差、室間再現相対標準偏差及びHorRat値等を求めた。

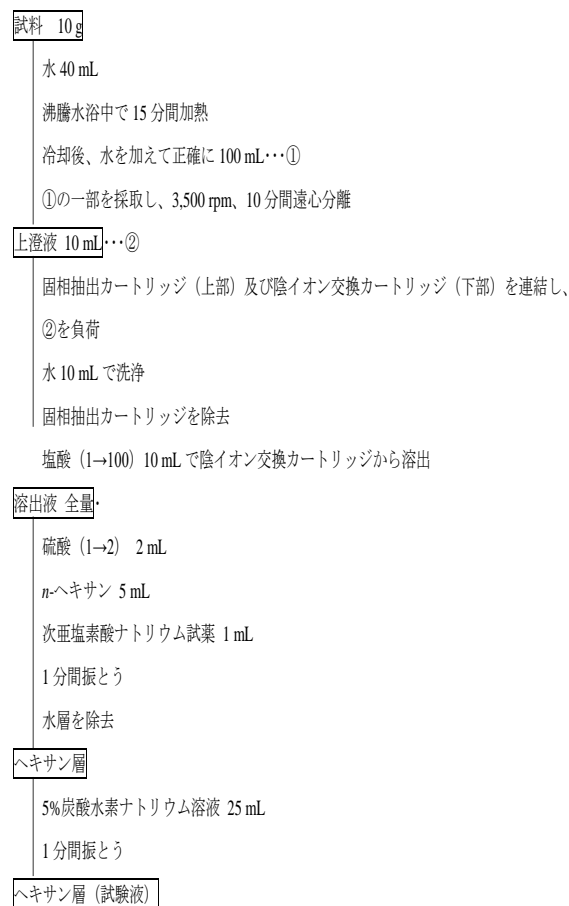
## 2. サイクラミン酸試験法の検討

### (1) 分析方法

規定分析法に基づき試験液を調製した。規定分析法は、下記概略図のとおりである。

なお、固相抽出カートリッジ（以下

<概略図>



「tC18 カートリッジ」という。)として Sep-pak Vac tC18 1 g/6 cc (Waters) を、陰イオン交換カートリッジとして Sep-Pak Vac Accell QMA 500 mg/6 cc (Waters) を使用した。

また、本報告書ではカートリッジを用いて精製する方法を「固相抽出法」、用いない方法を「スクリーニング法」と表記した。

### (2) 添加回収試験

試料は、サイクラミン酸が含有されていないことを確認した後、昨年度と同じ食品（別ロット品）を用いた。添加回収試験は、1人1日2回、1名で1日間行い、必要に応じて追加検討を実施した。

添加濃度は、100 µg/gとした。

#### C. D. 研究結果および考察

##### 1. 室間共同試験による検証

各機関からのソルビン酸の添加回収試験の分析値を表1に、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の分析値を表2に示す。

これらの結果を元に算出した室間共同試験結果を表3-1~3に示す。

AOAC等では室間共同試験での試験室数は最低でも8機関以上としているが、ソルビン酸試験法では通知試験法（水蒸気蒸留法）を採用している試験機関が少なく、直接溶媒抽出法や透析法を採用し、疑義が生じた時のみ水蒸気蒸留法で確認するという試験機関が多く、6機関での共同試験で実施した。

##### (1) ソルビン酸試験法

ソルビン酸ではビスケット（添加濃度：0.01g/kg）の通知試験法で示された検量線濃度範囲で求めた平均回収率は88.5%であったが、それ以外は93.9~98.2%と良好な結果であった。併行相対標準偏差（ $RSD_r$ ）は0.49~2.4%、室間再現相対標準偏差（ $RSD_R$ ）は通知試験法で示された検量線濃度範囲で求めたビスケット及びオレンジジュース（いずれも添加濃度：0.01g/kg）がそれぞれ18%及び14%であった以外は1.8~8.4%であった。通知試験法の濃度範囲の検量線では高濃度側の検量点の影響を受け、低濃度の定量値にバラツキが認められたことから、定量下限値付近の定量には低濃度付近の検量点だけを用いることにより精度良く定量できるものと考えられた。

HorRat値は0.3~1.6であった。AOACガイドライン<sup>3)</sup>では「HorRat 値が0.5<

HorRat ≤ 1.5は通常、期待される範囲内、1.5 < HorRat ≤ 2の場合は、通常期待されるより大きい $RSD_R$ が得られた理由について考察が必要」と記載されている。HorRat値がマーガリンとチーズでそれぞれ0.3、及び0.4であり、 $RSD_R$ が1.8%及び2.0%とバラツキが小さかったためと考えられる。また、ビスケットの通知試験法で示された濃度範囲の検量線を用いた定量値でHorRat値が1.6であったが、 $RSD_R$ も18%と高値であった。

##### (2) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法では冷凍エビで1か所の試験機関がバラツキが大きく外れ値となった。平均回収率は91.0~95.2%、 $RSD_r$ は1.0~2.6%、 $RSD_R$ は3.6~5.4%であった。HorRat値は0.5~1.2と良好な結果であった。

##### 2. サイクラミン酸試験法の検討

##### (1) ビスケット

ビスケットが餅状になったもの（以下「餅状物質」という。）の生成による回収率への影響について、混和及び攪拌等の操作を行わず、上澄液を調製し、試料採取前後でサイクラミン酸を添加し、その回収率に差異があるか検討した。ただし、冷却し、水で100 mLに定容時の転倒混和操作については実施した。すなわち、ビスケットが舞わないよう静かに水40 mLを加え、加水後に混和を行わず、加熱・放冷中に攪拌を行わずに試験液を調製した。サイクラミン酸（下部）に上から粉碎したビスケットを添加した場合、餅状物質が生成し、平均回収率は、固相抽出法が6.0%、スクリーニング法が5.8%となった。同様に、粉碎したビスケ

ット（下部）に上からサイクラミン酸を添加した場合、餅状物質が生成し、平均回収率は、固相抽出法、スクリーニング法ともに20.8%となった。餅状物質の生成により、回収率の低下が認められ、サイクラミン酸に粉碎したビスケットを添加した場合の回収率が著しく低下していたことから、餅状物質の影響により、均一な上澄液が得られていない可能性が考えられた。以上の結果より、餅状物質の生成を防止する操作が回収率の改善に有効であると推察された。

次に、混和及び攪拌による餅状物質の生成抑制効果について検討するため、ビスケットにサイクラミン酸を添加し、水40 mLを加えて転倒混和し、加熱・冷却中にガラス棒で攪拌を行って試験液を調製した。その結果、餅状物質の生成は少量となり、平均回収率は、固相抽出法が79.0%、スクリーニング法が86.3%まで改善されていた。

しかしながら、規定分析法の加水量40 mLでは、加熱中にビスケットは固いペースト状になり、ガラス棒での攪拌に労力を要した。そこで、加水量を規定分析法の2倍量の80 mLとして、混和及び攪拌による餅状物質の生成の有無について検討した。ビスケットにサイクラミン酸を添加し、ビスケットが舞わないよう静かに水80 mLを加え、加水後に混和せず、また、加熱・放冷中に攪拌を行わずに試験液を調製した。ただし、冷却し、水で100 mLに定容時の転倒・混和操作については実施した。その結果、混和及び攪拌操作を行わなくても、加水量を80 mLとすることで餅状物質が生成したものの、規

定分析法どおり水40 mLで実施した際に生成した餅状物質と比べると半分程度の量となった。また、平均回収率は固相抽出法が74.6%、スクリーニング法が74.2%となった。一方、ビスケットにサイクラミン酸を添加し、ビスケットが舞わないよう静かに水80 mLを加え、加水後に混和し、加熱・冷却中に攪拌を実施した。その結果、餅状物質は生成せず、平均回収率は、固相抽出法が101.9%、スクリーニング法が102.3%と良好な結果となった。また、加熱中のガラス棒での攪拌も容易であった。以上の結果より、加水量を規定分析法の2倍量程度に増やし、混和及び攪拌することで餅状物質の生成が防止され、良好な回収率が認められた。

加水量を160 mLにしたところ、混和・攪拌を行わずとも餅状物質は生成しなかった。その後、上澄液20 mLを量り取り、試験液を調製したところ、平均回収率は、スクリーニング法が97.8%となった。しかし、固相抽出法が59.9%と低値になったため、追加で検討を実施した

(n=5)が、平均回収率は49.2%と低値のままであった。この点に関しては、カートリッジへの通液量が規定分析法の2倍の20 mLであったことが影響を及ぼしたと考えられたものの、原因の究明には至らなかった。

以上より、ビスケットの分析では、加水量を80 mL程度に増やし、混和・攪拌しながら上澄液の調製を行うことが回収率の向上につながるものと考えられた（表6）。

## （2）チョコレート

試験液のエマルジョンについて、昨年度



の検討で生成したエマルジョンは今年度の検討した固相抽出法ではほぼ認められず、生じた場合も少量であったため測定に支障はなかった。一方、スクリーニング法ではエマルジョンが生じた。規定分析法には、「エマルジョン生成により試験液を採取できない場合は、エマルジョン部分を遠沈管に採取し、必要な場合は適量の硫酸ナトリウムを添加し、遠心分離後、上澄液を採取する。」とある。このため、エマルジョン部分を3,500 rpmで遠心分離し、10分ごとにエマルジョンの消失を確認したところ、合計60分間遠心分離したところでエマルジョンの消失を認め、平均回収率は102.9%となった。また、硫酸ナトリウムを3 g添加し、3,500 rpmで1分間遠心分離したところ、エマルジョンは消失し、平均回収率は108.0%となった(表7)。

次に、固相抽出法において上澄液に添加したところ、平均回収率は64.2%となり、昨年度の結果に比べて低くなった。一方、上澄液10 mLをtC18カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジを接続したものに負荷した際の流下液(以下「流出液」という。)からはサイクラミン酸は検出されず、水10 mLを通過させた際の流下液(以下「洗浄液」という。)のみ検出され、その量は、添加量の29.2%であった。この点に関しては、規定分析法では、「タール色素等、比較的極性の高い化合物が多く含まれている場合、陰イオン交換カートリッジの交換能力を超えてしまうことがある。このようなときは、遠心分離して得られた上澄液を適宜、希釈してからカートリッジに負荷させるよう

にする」とあることから、遠心分離した上澄液を2倍、5倍希釈して平均回収率を検討した。その結果、上澄液を2倍希釈または5倍希釈した平均回収率は、それぞれ91.2%、84.3%であった。また、上澄液を希釈した場合、エマルジョンは生じなかった(表8)。以上より、チョコレート分析においては、エマルジョンの発生を防止することで回収率の改善が認められたことから、上澄液を適宜希釈したうえで固相抽出法を用いることは、エマルジョンの発生防止と回収率の向上につながるものと考えられた。

### (3) 米酢

固相抽出法では、溶出液にサイクラミン酸を添加したところ、平均回収率は95.8%であった。続いて、上澄液にサイクラミン酸を添加したところ、平均回収率は32.0%となったことから、tC18カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジによる精製段階で著しく損失している可能性が考えられた(表9)。そこで、サイクラミン酸のカートリッジ精製工程での消失がtC18カートリッジによるものであるか否かについて検討した。tC18カートリッジにより消失したサイクラミン酸を調べるため、tC18カートリッジのみを用いた検証を実施した。サイクラミン酸を上澄液に添加し、tC18カートリッジに負荷した際の負荷液と、水10 mLで洗浄した洗浄液をあわせた液からはサイクラミン酸が40.7%回収されていた。一方、負荷後のtC18カートリッジをメタノール10 mLで溶出し、その溶出液を誘導体化したところ、66.2%あたるサイクラミン酸が回収された(表10)。以上の

結果より、6割程度のサイクラミン酸がtC18カートリッジに溶出されずに残存していたことが明らかとなった。この点に関しては、分子型のサイクラミン酸がtC18カートリッジに吸着した可能性が考えられた。tC18カートリッジに残存したサイクラミン酸が分子型であった場合、上澄液のpHを調整することが回収率の改善につながる。上澄液のpHが約3であったため、水酸化ナトリウム水溶液を用いて上澄液のpHを4、5、6、7及び8に調整し、サイクラミン酸を添加し、tC18カートリッジと陰イオン交換カートリッジで精製、その後誘導体化したところ、平均回収率は順に72.9%、92.1%、89.0%、85.0%、89.2%となり、pHを5以上に調整することで回収率が改善された(表11)。

以上より、米酢の分析では、上澄液のpHを5~7に調整することが回収率の向上につながるものと考えられた。なお、サイクラミン酸のpKaは1.71<sup>4)</sup>、上澄液のpHは約3であった。米酢の影響を無視して単純に計算すれば、pH 3の水におけるサイクラミン酸の分子型とイオン型の存在比は約1:20となる。このため、分子型のサイクラミン酸による影響は小さいものと考えられることになり、先述のとおりpHの調整によって回収率は向上したものの、そもそもサイクラミン酸がtC18カートリッジに残存した原因の特定には至らなかった。

#### (4) らっきょう漬け

溶出液にサイクラミン酸を添加したところ、平均回収率は90.9%であった。続いて、上澄液に添加したところ、平均

回収率は82.7%であった。米酢同様に、負荷後のtC18カートリッジをメタノール10 mLで溶出し、その溶出液を誘導体化したところ、13.6%にあたるサイクラミン酸がtC18カートリッジから回収された。なお、連結したカートリッジの流出液、洗浄液からは検出されなかった(表12)。このため、米酢と同じく上澄み液をpH調整することとした。上澄液のpHを測定したところ、約3.3であった。米酢の結果に基づきpHを5、6及び7に調整し、サイクラミン酸の添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、順に86.8%、98.4%98.1%であった(表13)。

以上より、らっきょう漬けについて、上澄液のpHを6~7に調整することが回収率の向上につながるものと考えられた。

#### (5) たくわん漬け

スクリーニング法について、試料及び上澄液に添加したところ、平均回収率は、それぞれ74.0%、95.0%であった。よって、サイクラミン酸は、たくわん漬けと水中で加熱することによりたくわん漬け由来のマトリクスに吸着する可能性が示唆された(表14)。次に、固相抽出法からの溶出液にサイクラミン酸を添加したところ、平均回収率は100.5%であった。また、上澄液に添加したところ、平均回収率は76.4%であった。この結果から、固相抽出過程においてもサイクラミン酸の回収が妨げられることが示唆された

(表15)。このため、米酢同様に、上澄液のpH調整により回収率が改善されるか検討した。上澄液のpHを測定したところ5程度であったため、pHを6及び7に調整したが、平均回収率は、それぞれ85.6%と

75.3%となり、回収率に大きな変動は認められなかった(表16)。

## E. 結論

単一試験室の検討で真度及び精度良く測定可能であった「ソルビン酸試験法」で検討対象とした10種類(チーズ、ちくわ、さつま揚げ、ウインナー、マーガリン、らっきょう漬け、ワイン、オレンジジュース、イカ燻製及びビスケット)の食品及び「二酸化硫黄及び亜硫酸塩試験法」で検討対象とした6種(干しかんぴょう、干しトマト、干しブドウ、ワイン、甘納豆及び冷凍えび)の食品について室間共同試験によって試験法の性能を評価した。いずれの食品種においても真度及び精度良く測定が可能であったことから、妥当性評価の対象食品種として適当であると考えられた。

サイクラミン酸規定試験法の改良については昨年度の検討にて規定分析法における添加回収率や精度に問題が認められると考えられた5食品について、改良のための検討を行った。

ビスケットについては、規定分析法のとおり水40 mLを加えて沸騰水浴中で15分加熱すると、餅状になり、回収率を低下させる。このため、固相抽出法、スクリーニング法ともに加水量を80 mL程度にし、適宜混和・攪拌することが回収率の向上につながると考える。

チョコレートについては、スクリーニング法ではエマルジョンが生じた。また、固相抽出法では回収率が低く、tC18カートリッジが詰まる現象も多発した。このため、上澄液を希釈した後、固相抽

出法で分析することが回収率の向上につながると考える。

米酢とらっきょう漬けについては、上澄液のpHによりサイクラミン酸がtC18カートリッジに保持され、回収率が低下したと考えられた。このため、上澄液のpHを中性付近に調整することにより回収率の向上が図られた。

たくわん漬けについては、現時点では有効な改善には至らず、更なる検討が必要であった。

今後は、引き続き改良法の検討を行うとともに、新規分析法の検討も行っていく予定である。

## 参考文献等

- 1) [https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryou/shokuhin/yunyu\\_kanshi/ihan/index.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html)
- 2) 山口ら：大阪府公衆衛生研究所報，49，7-10（2017）
- 3) AOAC Int.：Appendix D in Official Methods of Analysis of AOAC Int. 18 ed.，Gaithersburg, MD, USA（2005）  
Available from [http://eoma.aoac.org/app\\_d.pdf](http://eoma.aoac.org/app_d.pdf)
- 4) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/275#section=Dissociation-Constants>

## 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

- 1) 千葉雄介、藤原 茜、高瀬冴子、島田慎一、石井里枝：E. coli 定性試験法における検出下限値の推定、第42回日本食品微生物学会学術総会、Web開催（岡山）2021
- 2) 千葉雄介、金井美樹、藤原 茜、荒島麻実、土井りえ、島田慎一、石井里枝：黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定、第117回日本食品衛生学会学術講演会、Web開催（東京）2021

#### 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

以下 図表

表1 食品マトリクス非存在下における黄色ブドウ球菌定性試験の陽性試料数および

LOD<sub>50</sub>

$d_1^{*1}$	試料中の菌量					F	LOD <sub>50</sub> (CFU/mL)
	$d_2$	$d_3$	$d_4$	$d_5$	ブランク		
5/6*2	3/6	4/6	2/6	0/6	0/1	0.82	42
6/6	4/6	3/6	1/6	2/6	0/1	1.1	30
4/6	4/6	4/6	0/6	1/6	0/1	0.70	49
5/6	2/6	5/6	1/6	0/6	0/1	0.73	48
6/6	5/6	2/6	2/6	1/6	0/1	1.2	29
6/6	4/6	2/6	1/6	1/6	0/1	0.93	37

\*1 試料中の菌量： $d_1 = 126$ 、 $d_2 = 63$ 、 $d_3 = 32$ 、 $d_4 = 16$ 、 $d_5 = 7.9$  CFU/mL

\*2 陽性試料数/試験実施試料数

表2 食品ごとの黄色ブドウ球菌定性試験の陽性試料数および LOD<sub>50</sub>

食品	試料中の菌量					F	LOD <sub>50</sub> (CFU/g)	
	$d_1^{*1}$	$d_2$	$d_3$	$d_4$	$d_5$			ブランク
チャーハン								
1回目*2	6/6*3	3/6	3/6	0/6	1/6	0/1	0.81	43
2回目	4/6	6/6	0/6	2/6	0/6	0/1	0.66	53
combined*4							0.73	48
カレー								
1回目	6/6	4/6	3/6	1/6	1/6	0/1	1.0	33
2回目	6/6	3/6	2/6	0/6	0/6	0/1	0.65	53
combined							0.83	42
チーズケーキ								
1回目	5/6	4/6	2/6	2/6	1/6	0/1	0.83	42
2回目	5/6	5/6	5/6	1/6	0/6	0/1	1.1	32
combined							0.95	37
エッグタルト								
1回目	5/6	2/6	3/6	0/6	0/6	0/1	0.52	67
2回目	5/6	6/6	2/6	1/6	1/6	0/1	0.99	35
combined							0.72	48
生うどん								
1回目	5/6	4/6	1/6	2/6	0/6	0/1	0.68	51
2回目	6/6	4/6	5/6	1/6	1/6	0/1	1.3	26
combined							0.93	37
ソーセージ								
1回目	6/6	6/6	3/6	2/6	0/6	0/1	1.5	24
2回目	6/6	5/6	3/6	2/6	1/6	0/1	1.3	26
combined							1.4	25

- \*1 試料中の菌量  $d_1 = 126$ 、 $d_2 = 63$ 、 $d_3 = 32$ 、 $d_4 = 16$ 、 $d_5 = 7.9$  CFU/g
- \*2 各食品試料について日を改めて2回試験を実施
- \*3 陽性試料数/試験実施試料数
- \*4 combined は2回の試験結果を同一の分布として LOD<sub>50</sub> を算出

表3 ソルビン酸 添加回収試験結果

食品	試料量 (g)	添加濃度 (g/kg)	A機関		B機関		C機関		D機関		E機関		F機関	
			分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)	
			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
チーズ	5	3.0	2.92	2.93	2.97	2.98	2.89	2.93	2.90	2.84	2.93	2.91	2.80	2.82
ちくわ	5	2.0	1.88	1.90	2.02	2.02	1.92	1.96	1.90	1.83	1.88	1.87	1.86	1.84
さつま揚げ	5	2.0	1.86	1.88	2.01	2.04	1.98	1.99	1.97	1.98	1.91	1.93	1.93	1.93
ウインナー	5	2.0	1.99	1.98	2.03	2.05	1.95	1.92	1.98	1.98	1.94	1.93	1.90	1.92
マーガリン	5	1.0	1.01	0.989	0.981	0.982	0.976	0.991	1.01	0.988	0.966	0.960	0.961	0.966
らっきょう漬	5	0.50	0.472	0.484	0.506	0.509	0.519	0.515	0.513	0.507	0.466	0.468	0.454	0.447
ワイン	5	0.20	0.192	0.202	0.198	0.197	0.192	0.193	0.205	0.193	0.182	0.183	0.196	0.199
オレンジジュース (低濃度検量線)	5	0.01	0.00965	0.00963	0.0101	0.0101	0.00990	0.00999	0.0111	0.0111	0.00948	0.00960	0.00861	0.00854
オレンジジュース	5	0.01	0.00991	0.00988	0.00967	0.00969	0.00866	0.00875	0.0118	0.0118	0.00931	0.00944	0.00786	0.00791
イカ燻製	5	1.5	1.47	1.44	1.36	1.38	1.46	1.41	1.47	1.44	1.44	1.43	1.44	1.43
ビスケット (低濃度検量線)	5	0.01	0.00932	0.00931	0.00966	0.00932	0.00977	0.00943	0.0103	0.0102	0.00931	0.00917	0.00837	0.00830
ビスケット	5	0.01	0.00948	0.00946	0.00928	0.00894	0.00853	0.00818	0.0110	0.0109	0.00915	0.00900	0.00602	0.00621

表4 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類 添加回収試験結果

食品	試料量 (g)	添加濃度 (g/kg)	A機関		B機関		C機関		D機関	
			分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)	
			1	2	1	2	1	2	1	2
干しかんぴょう	0.2	5.0	5.04	5.01	4.67	4.50	4.51	4.49	4.99	4.83
干しトマト	5	2.0	1.88	1.89	1.85	1.91	1.89	1.89	1.79	1.81
干しブドウ	5	1.5	1.37	1.37	1.44	1.41	1.44	1.44	1.39	1.32
ワイン	20	0.35	0.354	0.352	0.327	0.320	0.317	0.318	0.327	0.322
甘納豆	1	0.10	0.0960	0.0960	0.0874	0.0922	0.0959	0.0895	0.0896	0.0896
冷凍えび	1	0.10	0.0928	0.0928	0.0902	0.0960	0.0895	0.0895	0.0832	0.102

食品	試料量 (g)	添加濃度 (g/kg)	E機関		F機関		G機関		H機関	
			分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)	
			1	2	1	2	1	2	1	2
干しかんぴょう	0.2	5.0	5.12	5.13	4.62	4.72	4.42	4.45	4.76	4.83
干しトマト	5	2.0	1.96	1.93	1.91	1.90	1.67	1.68	1.80	1.79
干しブドウ	5	1.5	1.48	1.48	1.40	1.46	1.30	1.30	1.34	1.31
ワイン	20	0.35	0.350	0.350	0.318	0.305	0.315	0.314	0.334	0.334
甘納豆	1	0.10	0.0960	0.0944	0.0928	0.0896	0.0835	0.0803	0.0911	0.0927
冷凍えび	1	0.10	0.0896	0.0944	0.0960	0.0976	0.0835	0.0867	0.0927	0.0911

表5-1 室間共同試験結果 (ソルビン酸)

	チーズ	ちくわ	さつま揚げ	ウインナー	マーガリン	らっきょう漬け
データ解析に有効な試験室数	6	6	6	6	6	6
外れ値になった試験室数	0	0	0	0	0	0
添加濃度(g/kg)	3.0	2.0	2.0	2.0	1.0	0.5
平均値(g/kg)	2.90	1.91	1.95	1.96	0.98	0.48
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.023	0.025	0.013	0.013	0.010	0.0046
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.064	0.070	0.035	0.035	0.028	0.013
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	0.79	1.3	0.65	0.64	1.0	0.95
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.058	0.066	0.056	0.048	0.018	0.027
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.16	0.18	0.16	0.13	0.049	0.076
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	2.0	3.5	2.9	2.4	1.8	5.6
HorRat	0.4	0.7	0.6	0.5	0.3	0.9

表5-2 室間共同試験結果 (ソルビン酸)

	ワイン	いか燻製	オレンジ ジュース (低濃度検量線)	オレンジ ジュース	ビスケット (低濃度検量線)	ビスケット
データ解析に有効な試験室数	6	6	6	6	6	6
外れ値になった試験室数	0	0	0	0	0	0
添加濃度(g/kg)	0.20	1.5	0.01	0.01	0.01	0.01
平均値(g/kg)	0.194	1.43	0.0098	0.0096	0.0094	0.0088
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.0046	0.018	0.000048	0.000049	0.00016	0.00016
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.013	0.051	0.00013	0.00014	0.00044	0.00045
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	2.4	1.3	0.49	0.51	1.7	1.8
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.0070	0.037	0.00082	0.0013	0.0006	0.0016
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.020	0.10	0.0023	0.0037	0.0018	0.0045
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	3.6	2.5	8.4	14	6.7	18
HorRat	0.5	0.5	0.7	1.2	0.6	1.6

表5-3 室間共同試験結果 (二酸化硫黄及び亜硫酸塩類)

	干しかんぴょう	干しトマト	干しブドウ	ワイン	甘納豆	冷凍えび
データ解析に有効な試験室数	8	8	8	8	8	7
外れ値になった試験室数	0	0	0	0	0	1
添加濃度(g/kg)	5.0	2.0	1.5	0.35	0.10	0.10
平均値(g/kg)	4.76	1.85	1.39	0.33	0.09	0.091
併行標準偏差 $S_r$ (%)	0.067	0.018	0.026	0.0039	0.0024	0.0020
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.19	0.051	0.073	0.011	0.0066	0.0055
併行相対標準偏差 $RSD_r$ (%)	1.4	1.0	1.9	1.2	2.6	2.2
室間再現標準偏差 $S_R$ (%)	0.25	0.087	0.066	0.016	0.0047	0.0033
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.71	0.24	0.18	0.045	0.013	0.0092
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ (%)	5.4	4.7	4.7	4.9	5.1	3.6
HorRat	1.2	0.9	0.9	0.7	0.6	0.5

表6 ビスケット 添加回収試験結果

加水量 (mL)	混和・攪拌	餅状物質	平均回収率(%)		標準品添加 のタイミング
			固相抽出法	スクリーニング法	
40	なし	生成	20.8	20.8	試料採取後
40	なし	生成	6.0	5.8	試料採取前
40	あり	生成 (少量)	79.0	86.3	試料採取後
80	なし	生成	74.6	74.2	試料採取後
80	あり	なし	101.9	102.3	試料採取後
160	なし	なし	59.9		試料採取後
160	なし	なし	49.2 <sup>*</sup>		試料採取後

n=2

※n=5 のデータから算出

表7 チョコレート 添加回収試験結果 (スクリーニング法)

添加対象	エマルジョン対策	平均回収率(%)
上澄液	遠心分離 (3500 rpm、60 分間)	102.9
	硫酸ナトリウム+遠心分離(3500 rpm、1 分間)	108.0

n=2

表8 チョコレート 添加回収試験結果 (固相抽出法)

添加対象	反応操作対象	平均回収率(%)	備考
溶出液	溶出液	88.0	
	溶出液	64.2 <sup>*</sup>	
上澄液	流出液	0.0	
	洗浄液	29.2	
試料	溶出液	91.2	上澄液 2 倍希釈
	溶出液	84.3	上澄液 5 倍希釈

n=2

※ n=2、3 回のデータから算出



表 9 米酢 添加回収試験結果（固相抽出法）

添加対象	測定対象	平均回収率(%)	備考
溶出液	試験液	95.8	
上澄液		32.0	

n =2

表 10 米酢 添加回収試験結果（tC18 カートリッジのみ使用）

添加対象	反応操作対象	平均回収率(%)	備考
上澄液	流出液+洗浄液	40.7*	
	tC18 カートリッジからの溶出液	66.2	溶出液：メタノール

n =2

※ n =5 のデータから算出

表 11 米酢 添加回収試験結果（固相抽出法、pH 調整あり）

添加対象	測定対象	上澄液の pH	平均回収率(%)	備考
上澄液	試験液	4	72.9	
		5	92.1	
		6	89.0	
		7	85.0	
		8	89.2	

n =2

表 12 らっきょう漬け 添加回収試験結果（固相抽出法）

添加対象	反応操作対象	平均回収率(%)	備考
溶出液	溶出液	88.0	89.2
上澄液	溶出液	82.7	
	tC18 カートリッジからの溶出液	13.6*	溶出液：メタノール
	流出液	0.0	
	洗浄液	0.0	

n =2

※ 検量線下限未満の値を含む平均値であるため参考値とする

表 1 3 らっきょう漬け 添加回収試験結果（固相抽出法、pH 調整あり）

添加対象	測定対象	上澄液の pH	平均回収率(%)	備考
		5	86.8	
上澄液	試験液	6	98.4	
		7	98.1	

$n=2$

表 1 4 たくわん漬け 添加回収試験結果（スクリーニング法）

添加対象	測定対象	平均回収率(%)	備考
試料	試験液	74.0	
上澄液		95.0	

$n=2$

表 1 5 たくわん漬け 添加回収試験結果（固相抽出法）

添加対象	測定対象	平均回収率(%)	備考
溶出液	試験液	100.5	
上澄液		76.4	

$n=2$

表 1 6 たくわん漬け 添加回収試験結果（固相抽出法、pH 調整あり）

添加対象	測定対象	上澄液の pH	平均回収率(%)	備考
		6	85.6	
上澄液	試験液	7	75.3	

$n=2$

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究

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	副所長
研究分担者	村上 太郎	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	清田 恭平	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	昌山 敦	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	柿本 葉	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	村野 晃一	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	研究員
研究協力者	山崎 朋美	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	研究員

**研究要旨**

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質は特定原材料として消費者庁からの通知（通知法）により、Enzyme-linked Immunosorbent Assay（ELISA）を用いて測定される。検査対象となる加工食品中の原材料は多種多様であり、その夾雑物によって測定が影響を受ける場合もある。本研究では、これまでに特定原材料（小麦・落花生）の定量で影響が確認されてきたポリフェノールの一種であるProanthocyanidin（PAC）を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行う。今年度は特定原材料の検査における試験室内における不確かさについて評価を行った。当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における試験室内での不確かさについて推定した。評価の結果、特定原材料の測定項目とキットの種類によって、日間変動が大きくなる場合が確認された。一方で、併行して抽出した管理試料や標準物質によって回収率を補正した場合には日間変動は軽減された。次に、改良抽出法の試験室間における評価のために精度管理用試料を調製して安定性について評価したところ、試料は冷蔵保存で84日まで安定であった。調製した精度管理用試料を2試験室の各2試験者で評価を行ったところ、測定者間に有意な変動が確認され、試験室間の変動は有意ではなかった。測定者間の変動は、測定日ごとの抽出条件の変化に起因する可能性もあるため、試験室間共同試験の際には抽出条件と測定条件を統一して実施する必要があると考えられた。調製した精度管理用試料は測定阻害と改良抽出法の評価に適用できることが確認できたため、最終年度は改良抽出法の試験室間共同試験について試験室数を増やして評価を行うことによって、より信頼性の高い検査法の確立に繋げる。

## A. 研究目的

食品表示法による食品表示基準（平成27年3月30日消食表第139号）では、28品目の原材料がアレルギーを含む食品として加工食品への表示が推奨されている<sup>1</sup>。28品目の原材料のうち卵、乳、小麦、そば、落花生、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。

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質の測定には、消費者庁による通知（以下、通知法）によって、**Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)** がスクリーニング法として利用されている<sup>1)</sup>。ELISAでは検査対象となるタンパク質に対する抗体の特異性を利用し、多くの原材料との交差性の有無が確認されているため、一般的には信頼性が高い。しかしながら、加工食品には多種多様な原材料が使用されており、その夾雑物が特定原材料の定量に影響を与える場合がある。

本課題では、これまでの研究の中で小麦と落花生の定量への影響が確認されてきたポリフェノールの一種であるプロアントシアニジン（**Proanthocyanidin**：以下PAC）を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行う<sup>2)</sup>。

今年度は特定原材料の検査における試験室内における不確かさについて評価を行った。当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における不確かさについて推定を行った。また、改良抽出法の試験室間における評価のために精度管理用試料を調製し、試料の安定性について評価した。

## B. 方法

### 1. 試料

#### 1.1. 管理試料

森永生科学研究所製の多糖類と酒粕を原料とした精度管理用試料QC Material牛乳、卵、小麦を管理試料として使用した。

#### 1.2. 測定阻害評価用試料

表1に生産国と加工法が異なるカカオを含む食品10試料（ココアパウダー5試料、ローストカカオ豆3試料、カカオニブ2試料）を示す。試料は量販店もしくはインターネット通信販売サイトから購入し、測定阻害の評価のために使用した。ローストカカオ豆などの粉状ではない試料はフードプロセッサ（岩谷産業：IFM-700）によって粉碎後に冷凍庫で保存した。その他の試料は室温で保存した。

### 2 試薬

**Polyvinylpyrrolidone**（以下PVP）K15は東京化成工業製の試薬を使用した。特定原材料の分析には日本ハム中央研究所製の**FASTKIT Ver. III**キット（FASTKIT）もしくは、森永生科学研究所製の**FASPEK II**キット（FASPEK）を使用した。

### 3 標準品

通知法に示されている標準品規格に記載の方法に従って、国産生落花生（千葉半立種）から調製した標準溶液を添加回収試験用に使用した。

### 4. 特定原材料の定量

特定原材料の分析は通知法に従って実施

した。吸光度の測定はマイクロプレートリーダーMultiskan FC (Thermo) を使用し、ソフトウェアSkanIt Ver.2.51 (Thermo) を使用して、試料中のタンパク質濃度を計算した。

## 5 特定原材料検査における不確かさの評価

### 5.1 評価対象

本研究では牛乳、卵、小麦、落花生の4項目を評価対象とした。管理試料が市販されている牛乳と卵と小麦は森永生科学研究所製QC Materialを管理試料として使用した。管理試料が市販されていない落花生については、添加回収試験によって評価を行った。

### 5.2. 管理試料による評価

QC Materialの品質報告書には、FASPEKによる分析値のみが記載されているため、FASPEKについてはQC Materialの品質報告書に示されている平均値に対する回収率を評価し、FASTKITはQC Materialの分析値の精度のみを評価した。

### 5.3. 添加回収試験による評価

管理試料が市販されていない落花生については、通知法の標準品規格を参考に調製した標準溶液によって添加回収試験で評価を行った。添加用の陰性試料としては難消化性デキストリンを含む健康食品を選定した。各試料に標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率を評価した。

### 5.4 不確かさの評価

日常検査値の不確かさの推定ソフト

(日本臨床検査標準協議会ver. 5.52) によって、2段枝分かれ分散分析で各要因の分散を推定し、相対標準偏差 (RSD<sub>w</sub>; 測定間、RSD<sub>s</sub>; 抽出間、RSD<sub>a</sub>; 日間) を推定した<sup>3)</sup>。また、各要因の不確かさから各検査キットの室内再現精度 (RSD<sub>L</sub>) を評価した。

## 6. 精度管理用試料の調製と評価

### 6.1. 測定阻害についての評価

QC Material小麦にカカオ含む試料を等量50 mL遠沈管内で混合した試料について、通常の抽出液とPVP K15を1 % (w/v) 含む抽出液で抽出を行い、併行して抽出したQC Material小麦の分析値に対する回収率を評価した。

### 6.2. 精度管理用試料の混合比率の最適化

QC Material小麦に、試料2のココアパウダーを10、25、50、75、90 % (w/w) となるように50 mL遠沈管内で混合した試料を評価に使用した。試料は通常の抽出液によって抽出し、併行して抽出したQC Material小麦の分析値に対する回収率を評価した。

### 6.3. 精度管理用試料の抽出法比較

改良法の抽出法の比較のために、あらかじめPVP K15を抽出液に溶解した場合とPVP K15を最終濃度が1 % (w/v) となるように50 mL遠沈管内に加えた場合の評価を行った。表2に示す配合割合で各試料を50 mL遠沈管内で混合した試料について抽出法ごとの比較を行った。試料1、3、4は通常の抽出液で、試料2はPVP K15を1 % (w/v) となるように溶解した抽出液で抽出を行った。抽出後の評価試料の分析値は

併行して抽出したQC Material小麦の分析値と各評価試料のQC Material小麦の採取量から回収率を算出して評価した。

#### 6.4. 精度管理用試料の安定性の評価

試料の安定性の評価のために、表3に示す配合割合で各試料を50 mL遠沈管内で混合した試料を冷蔵庫内で保存した。保存時の温度変動の確認のため、庫内の温度を温度カードロガー（CHINO：MR5300）によって、1時間ごとに記録した。保存後0、7、28、84日後に精度管理用試料を抽出し、FASPEKとFASTKITの両キットで分析した。抽出後の評価試料の分析値は併行して抽出したQC Material小麦の分析値と各評価試料のQC Material小麦の採取量から回収率を算出して評価した。安定性の評価はFASPEK、FASTKITともに同じロットのキットを使用した。

#### 6.5. 精度管理用試料の試験室間評価

安定性を確認した精度管理用試料について、当研究所の2試験室で評価を行った。表4に示す試料について、各試験室2名による評価を行った。試験室間評価はFASPEK、FASTKITともに同じロットのキットを使用した。評価結果を2元配置の分散分析によって、抽出間、測定者間、試験室間の変動について評価した

（倫理面への配慮）

本研究では実験動物や生体試料などの取扱いはないため、倫理面に配慮する研究には該当しない。

### C. D. 研究結果および考察

#### 1. 特定原材料検査における不確かさの

## 評価

#### 1.1. 管理試料による評価

牛乳と卵と小麦のキットごとの回収率と各要因の相対不確かさを表5-1,2に示す。FASPEKの回収率についてはいずれの項目でもアレルギーを含む食品の検査方法を評価するガイドラインで示された評価基準の50–150 %の範囲内に収まった<sup>1)</sup>。両キットのRSD<sub>w</sub>とRSD<sub>s</sub>は全ての項目で10 %以下となり、過去の報告における精度と同等の精度を示した<sup>4), 5)</sup>。一方で、RSD<sub>d</sub>については特定のタンパク質を測定対象とするFASPEKと比較して、複数のタンパク質を測定対象とするFASTKITでの変動が大きかった。RSD<sub>d</sub>の要因には測定キットのLotが異なることに由来する要因も含まれているため、管理試料の品質報告書の分析値によって回収率の補正を行ったFASPEKではRSD<sub>d</sub>が軽減されたと推察される。また、いずれの項目でもRSD<sub>L</sub>もFASTKITと比較してFASPEKが低い傾向が確認された。

#### 1.2. 添加回収試験による評価

落花生では、健康食品を陰性試料に選定して添加回収試験を実施したところ、回収率は50–150 %の範囲内に収まった（表5-1,2）。添加回収試験では試料由来のマトリクスが回収率に影響を及ぼす場合もあるため、内部品質管理に適した試料を事前に確認する必要がある。両キットのRSD<sub>w</sub>とRSD<sub>s</sub>は全ての項目で10 %以下となった。添加回収試験では、併行して抽出した標準溶液の濃度で回収率の補正を行うことによってLotが異なることに由来する要因が補正されたため、両キットでRSD<sub>d</sub>は軽減された。RSD<sub>L</sub>も両キットで20 %以内となり、

管理試料で評価した場合と同等の精度を示した。

## 2. 精度管理用試料の調製と評価

### 2.1. 測定阻害についての評価

図1に示すように、カカオを含む食品に QC Material小麦を混合して通常の抽出液で抽出した場合には、いずれの試料でも回収率の低下が確認された。小麦グリアジンを対象とするFASPEKでは、10試料中8試料で小麦が検出されず、カカオの夾雑物による影響を受けやすい傾向が確認された。一方で、改良抽出法では両キットの全ての試料で回収率の上昇が確認された。全ての試料で回収率の改善が確認されたため、2.2以降の評価では試料2のオランダ製のココアパウダーを使用した。

### 2.2. 精度管理用試料の混合比率の最適化

試料2のココアパウダーの比率を変えて混合した試料について評価を行った結果、FASPEKでは25 % (w/w) 以上混合した試料で、FASTKITでは90 % (w/w) 以上混合した試料で小麦タンパク質が検出されなかった。QC Material小麦の採取量を減らした場合には試料の均質性によって評価結果が影響を受ける可能性があるため、2.3以降の評価ではQC Material小麦とココアパウダーを等量混合した試料について評価を行った。

### 2.3 精度管理用試料の抽出法の比較

改良法の抽出法の比較のために、PVP K15をあらかじめ抽出液に溶解した場合とPVP K15を最終濃度が1 % (w/v) となるように50 mL遠沈管内に加えた場合の評価を行った。図2に示すように、PVP K15を

あらかじめ抽出液に溶解した試料2の回収率とPVP K15を最終濃度が1 % (w/v) となるように50 mL遠沈管内に加えた試料3の回収率はFASPEKとFASTKITのいずれのキットでも回収率の差異は確認されなかった。PVP K15は水溶性のポリマーであり、室温での抽出時に容易に溶解するため、あらかじめ抽出液に添加しない場合にも抽出液に溶解し測定阻害に対する効果が確認された。このため、安定性評価と試験室間評価では50 mL遠沈管内でPVP K15を混合した試料で検討を行った。

### 2.4 精度管理用試料の安定性評価

精度管理用試料の保存後0、7、28、84日後に精度管理用試料を抽出し、FASPEK、FASTKITの両キットで評価した結果を図3に示す。回収率の算出のために使用するQC Material小麦の分析値は評価期間内に相対標準偏差としてFASPEKで12.6 %、FASTKITで4.3 %の変動が確認された。QC Materialの製造元である森永生科学研究所での評価では、QC Material卵と乳の安定性については、4 °C保管において製造後30カ月間にわたり、製造後測定値の10%以内の変動に抑えられていることが報告されている<sup>6)</sup>。評価期間内のQC Material小麦の変動は森永生科学研究所による乳と卵での変動と同程度の変動が確認された。一方で、併行して分析した精度管理用試料のQC Material小麦の分析値に対する回収率は調製後84日まで低下は確認されなかった。また、冷蔵庫内で試料を保存した際のデータロガーで記録した平均温度は3.3 °C、最低温度1.7 °C、最高温度5.1 °Cであった。調製した試料は冷蔵で保存することによって

調製後84日まで評価できることが確認された。

## 2.5 精度管理用試料の試験室間評価

当研究所の2試験室の各2試験者で、精度管理用試料を調製後60日以内に抽出して評価を行った。評価者A,B,C,Dの評価結果を図4に示す。各キットの回収率の平均値と標準偏差はFASPEKで $10.5 \pm 2.1\%$ 、FASTKITで $19.8 \pm 2.8\%$ と回収率の低下が確認された。一方で、改良抽出法ではFASPEKで $95.7 \pm 3.3\%$ 、FASTKITで $92.3 \pm 6.6\%$ と回収率の改善が確認された。評価結果を2元配置の分散分析によって、抽出間、測定者間、試験室間の変動について評価した。評価の結果、測定者間に有意な変動が確認され、試験室間の変動は有意ではなかった。測定者間の変動は、測定日ごとの抽出条件の変化に起因する可能性もあるため、試験室間共同試験の際には抽出条件と測定条件を統一して実施する必要があると考えられた。

## E. 結論

今年度は試験室内での特定原材料の検査における不確かさを推定し、室間共同試験用の試料の調製法について検討した。調製した試料は84日まで安定であり、測定阻害と改良抽出法の評価に適用できることが確認できた。このため、最終年度は試験室数を増やして改良抽出法の試験室間共同試験を実施する予定である。改良した検査法を複数機関による室間共同試験で評価することができれば、改良法の適切な科学的根拠を示すことに繋がると考える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 村上太郎、工藤鮎子、村野晃一、高取聡、角谷直哉、若栗忍、渡辺卓穂：ELISA法による特定原材料（落花生）の測定における阻害因子の解析と改良抽出法の検討：日本食品化学学会 第27回総会・学術大会、WEB開催、2021.

2) 村上太郎、村野晃一、工藤鮎子、清田恭平、昌山敦、高取聡、山野哲夫：特定原材料検査の内部品質管理における課題と不確かさの推定：第58回全国衛生化学技術協議会年会、WEB開催、2021.

## 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

## 引用文献

1) 消費者庁「食品表示基準について」（平成27年3月30日消食表第139号、別添アレルギー関係）

2) Taro Satsuki-Murakami, Ayuko Kudo, Atsushi Masayama, Masami Ki, Tetsuo Yamano. *Food Control* 84, 70–74, 2018

3) 細萱茂実 他, 臨床化学 34, 40-46,



2005

4) 紀雅美 他, 大阪市立環科研報告 75,

35-39, 2012

5) 昌山 敦 他, 大阪市立環科研報告 78 ,

37-41, 2016

6) 桑原香織 他, 食衛誌 60 , 113-117

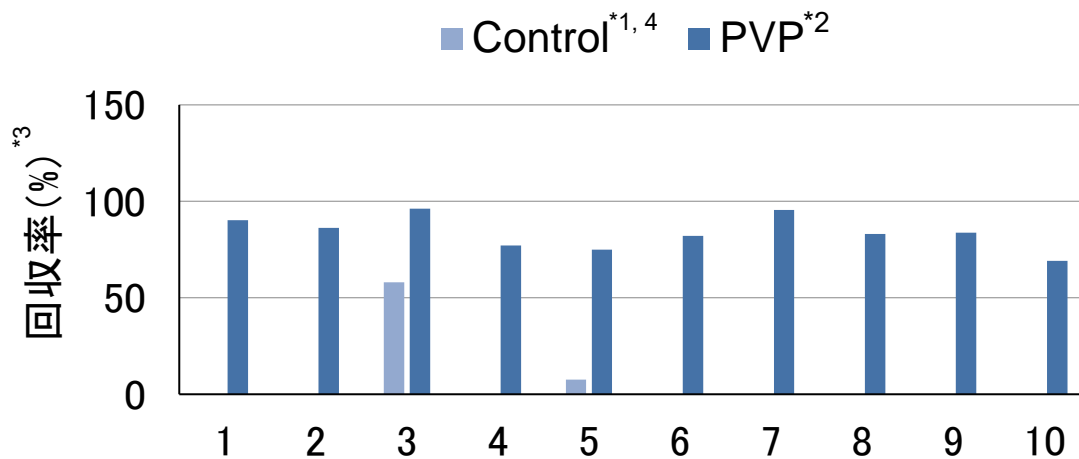
(2019)

以下 図表

表1 測定阻害評価用試料

	試料	生産国
1	ココアパウダー	オランダ
2	ココアパウダー	オランダ
3	ココアパウダー	マレーシア
4	ココアパウダー	マレーシア
5	ココアパウダー	フランス
6	ローストカカオ豆	タイ
7	ローストカカオ豆	エクアドル
8	ローストカカオ豆	インドネシア
9	カカオニブ	トーゴ
10	カカオニブ	コロンビア

## FASPEK



## FASTKIT

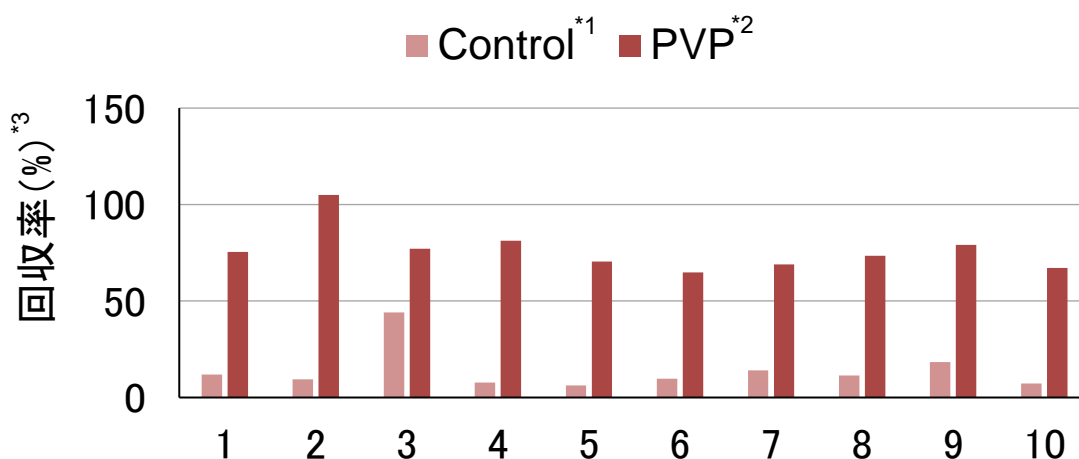


図1 測定阻害評価用試料の評価

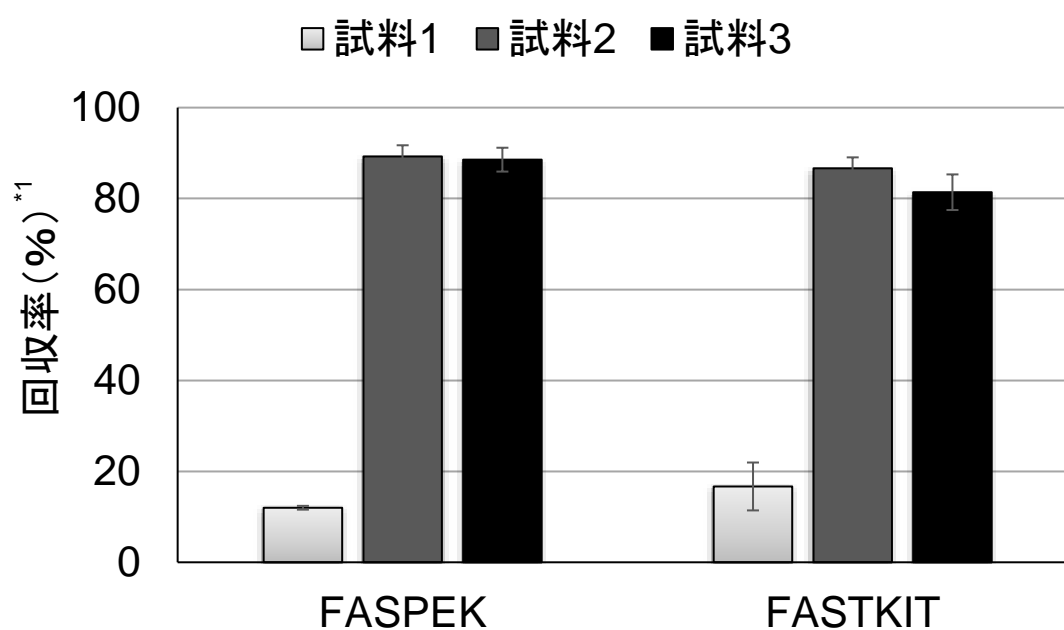
- \*1 キットの抽出液によって抽出
- \*2 抽出液にPVPを1% (w/v) 添加して抽出
- \*3 併行して抽出したQC material小麦の分析値に対する回収率
- \*4 試料1, 2, 4, 6-10は検出限界以下のため回収率は算出不可

**表 2 抽出法比較用試料**

試料	調製方法	抽出	併行数
試料 1	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g	通常法	3
試料 2	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g	改良法 <sup>*1</sup>	3
試料 3 <sup>*2</sup>	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g+PVP K15 0.19 g	通常法	3
試料 4	QC Material 小麦 1 g	通常法	1

<sup>\*1</sup> 抽出液に PVP K15 を 1% (w/v) 添加

<sup>\*2</sup> 抽出液を加えた後の PVP K15 の濃度 1% (w/v)



**図2 精度管理用試料の抽出法比較**

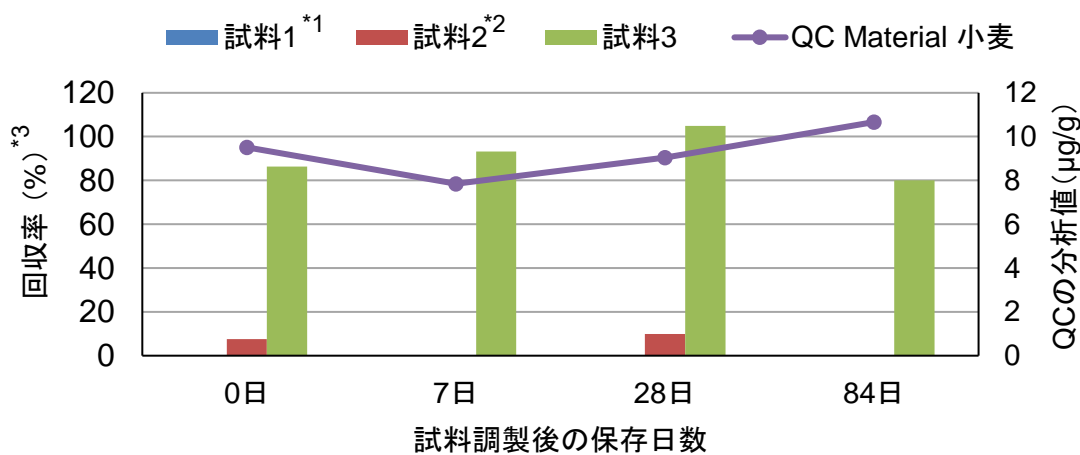
<sup>\*1</sup> 併行して抽出した試料4 (QC material小麦) に対する回収率

**表 3 安定性評価用試料**

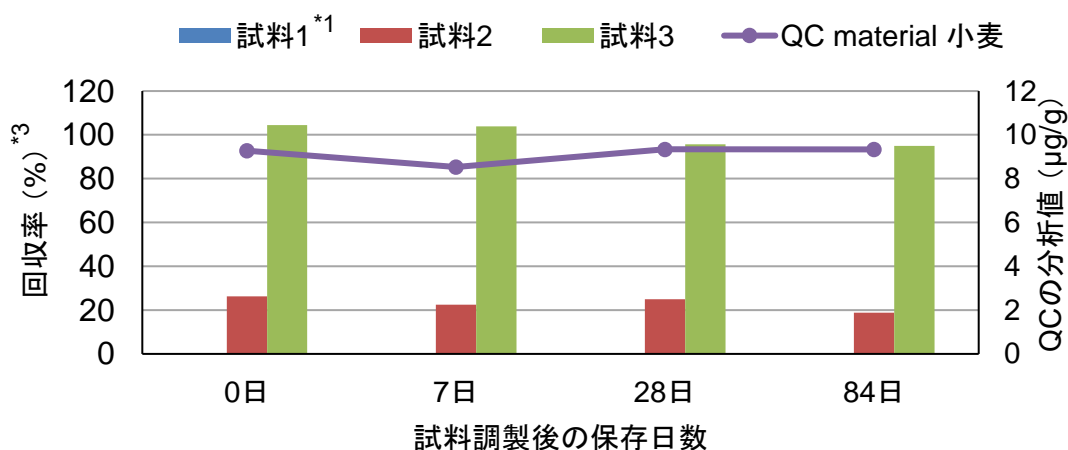
No.	調製方法	併行数
試料 1	カカオ 1 g	2
試料 2	カカオ 0.5 g+QC Material 0.5 g	2
試料 3*	カカオ 0.5 g+QC Material 0.5 g+PVP K15 0.19 g	2
試料 4	QC Material 小麦 1 g	2

\*抽出液を加えた後の PVP K15 濃度 1 % (w/v)

**FASPEK**



**FASTKIT**



**図3 精度管理用試料の安定性評価**

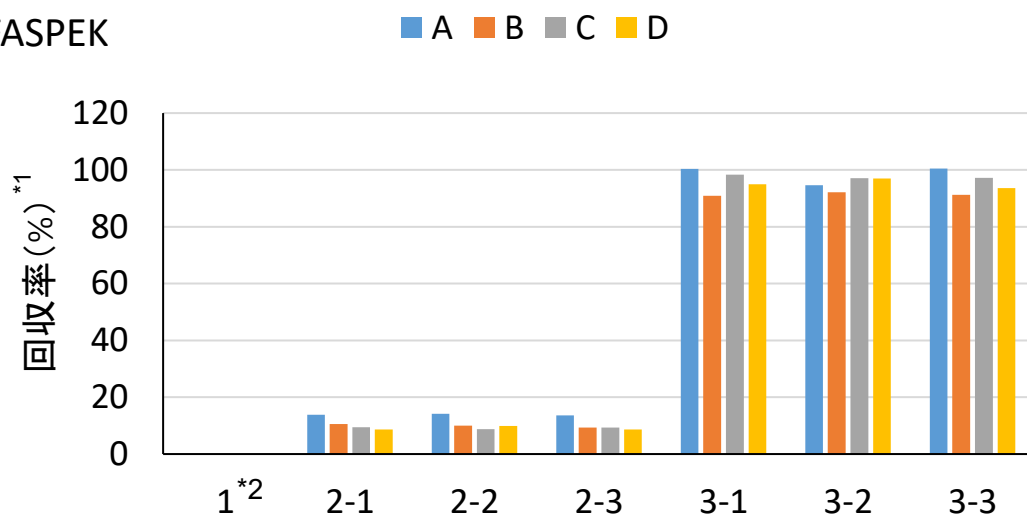
- \*1 試料1は検出限界以下のため回収率は算出不可
- \*2 試料2の7日、84日は検出限界以下のため回収率は算出不可
- \*3 QC Material小麦の分析値と採取量から算出した各試料の回収率

**表 4 試験室間評価用試料**

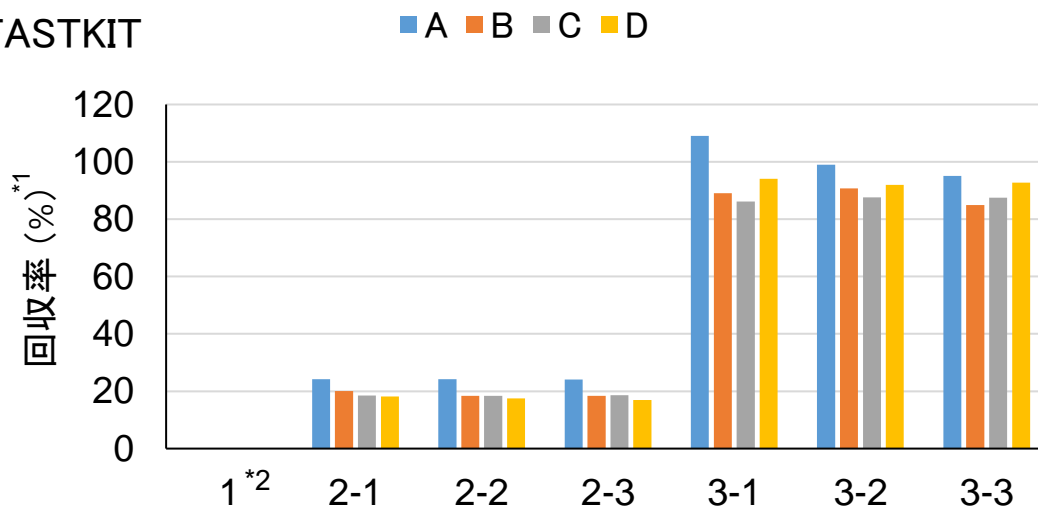
No.	調製方法	併行数
試料 1	カカオ 1 g	1
試料 2	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g	3
試料 3*	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g+PVP K15 0.19 g	3
試料 4	QC Material 小麦 1 g	1

\*抽出液を加えた後の PVP K15 濃度 1% (w/v)

**FASPEK**



**FASTKIT**



**図 4 精度管理用試料の試験室間評価**

\*1 QC Material小麦の分析値と採取量から算出した各試料の回収率

\*2 試料1は検出限界以下のため回収率は算出不可

表 5-1 FASPEK での回収率と相対不確かさ

項目	精度管理	相対不確かさ (%)				回収率 (%)
		$RSD_w^{*1}$	$RSD_s^{*2}$	$RSD_d$	$RSD_L$	
卵	管理試料	3.8	2.7	11.6	12.5	100.8
乳	管理試料	3.1	0.6	10.1	10.5	97.1
小麦	管理試料	6.4	1.3	14.4	15.8	96.7
落花生	添加回収試験	4.0	0.0	16.0	16.5	104.8

表 5-2 FASTKIT での回収率と相対不確かさ

項目	精度管理	相対不確かさ (%)				回収率 (%)
		$RSD_w^{*1}$	$RSD_s^{*2}$	$RSD_d$	$RSD_L$	
卵	管理試料	3.1	3.2	17.5	18.1	NA
乳	管理試料	2.2	3.4	19.5	19.9	NA
小麦	管理試料	5.9	7.7	31.7	33.2	NA
落花生	添加回収試験	4.7	3.7	18.4	19.3	102.2

\*1 3 well の測定から算出

\*2 3 併行もしくは 5 併行の抽出から算出

NA : 品質報告値が入手できないため算出不可

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究

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 副所長  
研究分担者 鎗田 孝 茨城大学農学部 准教授  
研究協力者

### 研究要旨

食品に関わる検査機関では、得られる分析値の信頼性を確保するために、分析の精度管理が必須である。技能試験は試験所間比較試験などの外部精度管理は分析の精度管理手法の一つであり、Codex CAC/GL 27の要求事項であるほか、ISO/IEC 17025では試験結果の妥当性を確保する手順の一つに挙げられている。

下痢性貝毒は下痢、吐気、嘔吐、腹痛などの症状をともなう食中毒の一種であり、オカダ酸（OA）、ジノフィシストキシン-1（DTX1）、ジノフィシストキシン-2（DTX2）、これらのエステル誘導体（DTX3）を毒素とする。下痢性貝毒の検査法として、わが国では2015年3月に液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（LC-MS/MS）による機器分析法が導入された。しかしながら、現在定常的に実施されている下痢性貝毒検査のための外部精度管理はなく、この検査の信頼性を確保するうえでの問題点となっている。

そこで、本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理のパイロットスタディとして、試験所間比較試験を実施することにした。3年計画の初年度である令和2年度は、検査試料を調製するとともに、OA群のLC-MS/MS測定では分析値がマトリックス効果の影響を受けることを実証した。これを受けて令和3年度は、検査用試料の均質性を評価するための分析法を確立するとともに、その方法によって前年度調製した検査用試料の均質性を評価した。また、マトリックス効果の影響を受けない正確な分析を行うために、液体クロマトグラフィー蛍光検出法（HPLC-FLD）を検討した。

その結果、調製した検査試料がパイロットスタディでの使用のために十分に均質であることを確認するとともに、カラムスイッチング法を適用したHPLC-FLDを開発した。

### A. 研究目的

れた二枚貝をヒトが摂取することにより  
下痢性貝毒は、有毒渦鞭毛藻で汚染さ 下痢、吐気、嘔吐、腹痛などの症状が引



き起こされる食中毒である。主な毒素は、オカダ酸 (OA)、ジノフィシストキシン-1 (DTX1)、ジノフィシストキシン-2 (DTX2)、これらのエステル誘導体 (DTX3) である (以下、これらをOA群と呼ぶ)。

わが国では、下痢性貝毒の検査にマウス毒性試験が適用されてきた。しかし、この方法には実験動物を使用することに対する倫理的な懸念があり、また、OA群に対する選択性や感度の低さなどの欠点があった。このような背景のもと、2015年3月に下痢性貝毒の公定検査法として液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による機器分析法が導入された。これと同時に規制値も変更され、それまでの可食部1 gあたりの毒量が0.05 MU (マウスユニット) であった規制値が、可食部につき0.16 mg OA/kgに変更された。

食品分析で得られる分析値は、分析方法や分析装置など様々な要因によって正しい値から偏ってしまう。そのため、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。さらに、食品の輸出が促進され、輸入量も増加している状況に鑑みれば、食品分析によって規制値の誤判定を防ぐことは、輸出入国間での係争を回避するためにも重要といえる。

分析精度の管理手法の一つに技能試験がある。CodexのCAC/GL 27 (食品の輸出入規制にかかわる試験所の能力評価に関するガイドライン) における要求事項として適切な技能試験プログラムへの参加が挙げられている。また、ISO/IEC 17025 (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項) においても、試験結果の妥当性を確保する手順の一つとして、技能

試験を含む試験所間比較への参加などが挙げられている。わが国では、外部精度管理調査プログラムにおいて、残留農薬、食品添加物、重金属等の技能試験が行われている。これに対し、下痢性貝毒検査については、現在のところ定常的に実施されている技能試験はなく、下痢性貝毒検査の信頼性を確保するうえでの問題点となっている。

そこで、本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査パイロットスタディを実施することにした。3年計画の初年度である令和2年度は、ホタテガイを原料として検査試料を調製するとともに、OA群のLC-MS/MS測定では分析値がマトリックス効果の影響を受けることを実証した。これを受けて令和3年度は、検査試料の均質性を評価するための分析法を確立するとともに、その方法によって前年度調製した検査試料の均質性を評価した。また、マトリックス効果の影響を受けない正確な分析を行うために、液体クロマトグラフィー蛍光検出法 (HPLC-FLD) を検討した。

## B. 方法

### 1. 均質性評価のための分析法の開発

#### (1) 材料・試薬

ホタテガイは市販の殻付きホタテガイを使用した。

LC-MS用アセトニトリル及びギ酸、高速液体クロマトグラフィー用メタノール、試薬特級ヘキサン、水酸化ナトリウム、塩酸は富士フィルム和光純薬から入手した。LC-MS用ギ酸アンモニウムはSigma Aldrichから入手した。1 ppm OA溶液 (溶

媒：メタノール）と1 ppm DTX1溶液（溶媒：メタノール）は産業技術総合研究所から入手した。DTX2 認証標準物質は National Research Council Canadaから入手した。試料調製やLC-MS/MSの移動相には純水製造装置Milli-Q Reference（ミリポア）によって精製した超純水を用いた。

### (2) ホタテガイ試料の前処理方法

ホタテガイを開殻した後、可食部をブレンダーで細かく刻んだ。この試料2 gを食安基発0306第4号・食安監発0306第2号の別紙2に従って前処理した。ただし、固相抽出による精製は、本件研究で開発した方法（後述）で行った。

### (3) 固相抽出条件の検討方法

ODSカートリッジ（ジーエルサイエンス社製Inert-Sep C18 500 mg）を用いたA法とB法、HLBカートリッジ（Waters社製Oasis PRiME HLB 200 mg）を用いたC法及びD法を検討した（図1）。

A法：メタノール10 mLと水10 mLによってカートリッジをコンディショニングした。(2)に従って調製したヘキサン洗浄液2.5 mL、水2.5 mL、OA群混合標準溶液100 µL（1 ppm OA溶液、1 ppm DTX1溶液、DTX2 認証標準物質を混合希釈して調製、各成分濃度：0.1 µg/mL）の混合液をカートリッジに注入し、溶出液をFr. A1とした。次に、試料が入っていたねじ口試験管に40 %メタノール2.0 mLを加えて攪拌し、カートリッジに注入した。この操作を繰り返し、得られた溶出液をFr. A2とした。さらに水4.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液をFr. A3とした。次に、40 %

メタノール4.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液をFr. A4とした。さらに90 %メタノール5.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液Fr. A5とした。さらにメタノール3.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液をFr. A6とした。

B法：メタノール10 mLと水10 mLによってカートリッジをコンディショニングした。(2)に従って調製したヘキサン洗浄液2.5 mL、水5.0 mL、OA群混合標準溶液100 µLの混合液をカートリッジに注入し、溶出液をFr. B1とした。次に、試料が入っていたねじ口試験管に90 %メタノール1.0 mLを加えて攪拌し、カートリッジに注入した。この操作を繰り返した。さらに90 %メタノール3.0 mLをカートリッジに注入し、以上の操作で得られた溶液を合わせてFr. B2とした。さらに、メタノール3.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液をFr. B3とした。

C法：(2)に従って調製したヘキサン洗浄液2.5 mL、水2.5 mL、OA群混合標準溶液100 µLの混合液をカートリッジに注入し、溶出液をFr. C1とした。次に、試料が入っていたねじ口試験管に40 %メタノール2.0 mLを加えて攪拌し、カートリッジに注入した。この操作を繰り返し、得られた溶出液をFr. C2とした。さらに5 %メタノール5.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液をFr. C3とした。さらにアセトニトリル/メタノール（4：1）5.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液をFr. C4とした。さらにアセトニトリル/メタノール（4：1）3.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液をFr. C5とした。

D法：(2)に従って調製したヘキサン洗

浄液2.5 mL、水2.5 mL、0A群混合標準溶液100 µLの混合液をカートリッジに注入し、溶出液をFr. D1とした。次に、試料が入っていたねじ口試験管にアセトニトリル/メタノール（4：1）1.0 mLを加えて攪拌し、カートリッジに注入した。この操作を繰り返した。さらにアセトニトリル/メタノール（4：1）3.0 mLをカートリッジに注入し、これらによって得られた溶液を合わせてFr. D2とした。さらにアセトニトリル/メタノール（4：1）3.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液をFr. D3とした。

#### (4) LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、島津製作所のUFLC高速液体クロマトグラフ（ポンプ：LC-20AD、デガッサー：DGU-20A3、オートサンプラー：SIL-20ACHT、カラムオーブン：CTO-20AC、システムコントローラ：CBM-20A）と、質量分析計（Applied Biosystems 3200 Q TRAP）を用いた。カラムはCadenza CD-C18カラム（内径：2 mm、長さ：100 mm、粒子径：3 µm）を用いた。LC-MS/MSの測定条件を表1に示す。

## 2. 検査試料の均質性評価

### (1) 材料・試薬

検査試料は、昨年度の本事業で調製したものを使用した。試薬類は1(1)と同じものを使用した。

### (2) 均質性評価試験の方法

検査試料10本を無作為に選択し、各瓶について2回ずつ、合計20サブサンプルを分析した。分析は「1. 均質性評価のため

の分析法の開発」で最適化した分析法を適用して行った。

## 3. 液体クロマトグラフィー蛍光検出法の検討

### (1) 材料・試薬

誘導体化試薬である9-Anthryldiazomethane (ADAM) はフナコシから入手した。HPLC用のアセトニトリルはSigma Aldrichから入手した。試薬特級ギ酸アンモニウム及びギ酸は富士フィルム和光純薬から入手した。その他の試薬類は1(1)と同じものを使用した。

### (2) 誘導体化法

10 mL褐色バイアルにADAM 2 mgをはかりとり、アセトン100 µLと、メタノール900 µLを順次加え、0.2 % ADAMメタノール溶液とした。ADAMのはかりとった量に応じてアセトンとメタノールの添加量を変えた。

インサート付200 µLバイアルに試料100 µLをとり、窒素気流下で乾固した。これに0.2 % ADAMメタノール溶液200 µLを加え、室温、暗所で1時間反応させた。

### (3) カラムスイッチングHPLC装置

試作したカラムスイッチングHPLC装置の概略を図2に示す。装置は、いずれも島津製作所製のポンプ（LC-10ADVP）2台、デガッサー（DGU-14A）、カラムオーブン（CTO-10ASVP）、蛍光検出器（RF-10AXL）、およびレオダイン製インジェクター（7725i）と6方切換バルブ（7000）2個より構成させた。第1カラムにはジーエルサイエンス製Inertsil diol 5 µm（4.6 mm i. d. × 250 mm）を、第2カラム（トラップ

カラム)にはジーエルサイエンス製 Inertsil C4 5  $\mu\text{m}$  (3.0 mm i. d.  $\times$  150 mm) を、第3カラムには野村化学製 Develosil C30-UG-5 (3.0 mm i. d.  $\times$  250 mm)を用いた。

(倫理面への配慮)

研究に使用した貝毒や化学物質の取り扱いは、法令を遵守し、特定の区域でのみ行った。実験廃棄物は定められた方法に従い、必要に応じて専門業者に搬出した。

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 均質性評価のための分析法の開発

#### (1) 固相抽出条件の最適化

A~D法の各フラクションをLC-MS/MSで測定した。各フラクションは液量が異なるため、得られたピーク面積値は液量によって補正した。得られたピーク面積の合計を100%としたときの各フラクションにおけるピーク面積の割合を表2~5に示す。ODSカートリッジを利用した既往法であるA法では、OA群の溶出面分であるはずのFr. A5だけでなく、Fr. A2~Fr. A4においても溶出が確認された。そこで、抽出液中のメタノール比を低くし、40%メタノールによる洗浄を行わなかったところ(B法)、すべてのOA群はFr. B2に溶出した。一方、HLBカートリッジを利用した既往法であるC法では、OA群の溶出面分であるはずのFr. C4だけでなく、Fr. C2とFr. C3においても溶出が確認された。そこで、40%メタノールによる洗浄等を行わなかったところ(D法)、すべてのOA群はFr. D2に溶出した。以上の結果から、以降の検討はB法

とD法について行うことにした。

#### (2) マトリックス効果の評価

B法による処理液(Fr. B2)及びD法による処理液(Fr. D2)について、LC-MS/MSにおけるマトリックス効果の影響を評価した。具体的には、まずホタテガイ可食部(ブランク)をB法及びD法によって処理するとともに、ヘキササン洗浄と固相抽出を行わなかった未精製抽出液を調製した。これらに溶液中の濃度が各5 ng/mLとなるようにOA群を添加し、LC-MS/MS測定に供した。得られたOA群の面積を、同時に測定した標準溶液(溶媒:メタノール)による面積と比較した。その結果を図3に示す。ODSカートリッジを用いた固相抽出を施したB法処理液の測定では、標準溶液を測定した場合に比べいずれのOA群の感度も低かった。すなわち、LC-MS/MSのイオン化においてイオンサプレッションが認められた。その程度は、固相抽出を施さなかった未精製抽出液と同程度であったことから、マトリックス効果の低減効果においては、ODSカートリッジは有効ではないと考えられた。これに対し、HLBカートリッジを用いた固相抽出を施したD法処理液の測定では、OA群の感度は標準液測定における感度と同等であり、顕著なマトリックス効果は認められなかった。以上の結果から、検討した固相抽出条件の中ではD法が精確な測定のために最も有効であると考えられた。そこで、以降の検討はD法による固相抽出を適用して行った。

### (3) 正確さと再現性の評価

確立した分析法によって添加回収試験を行った。添加濃度は、ホタテガイ試料中濃度として各 0.05 mg/kg とした。その結果を表 6 に示す。上段の結果は、加水分解後の試料に OA 群を添加した試料を用いた結果であり、「精製工程」だけの回収率を示す。精製工程における OA 群の損失が認められないことが示された。一方、下段の結果は、ホタテガイ試料に OA 群を添加した資料を用いて分析全工程を行った結果である。その結果もほぼ 100 % であり、下痢性貝毒検査法における正確さの要求基準である 70~120 % に十分適合していることが示された。

各日 2 回の分析を 3 日間行うことにより、室内精度も評価した。その結果を表 7 に示す。得られた結果は相対標準偏差として 5.8~8.3 % であった。なお、この算出課程において計算されるグループ内分散は計算上負であった。すなわち、計算上は併行精度も表 7 と同じ値となる。下痢性貝毒検査法における精度の要求基準は併行精度：15 % 以下、室内精度：20 % 以下であるが、開発した分析法の精度はこれらの基準を十分満たしていることが示された。

外部精度管理で使用する検査試料は十分均質かつ安定であることが必要である。そして、その均質性や安定性を正確に評価するためには、試料の不均質さや不安定さの程度よりも室内精度が十分優れている分析法が不可欠である。本研究で調製した検査試料は生物由来の固形試料であるため、試料の均質性は数%~十数%であることが予想される。したがっ

て、本研究で開発した分析法は、検査試料の均質性や安定性を正確に評価するために適当な精度を有していると考えられた。

## 2. 検査試料の均質性評価

### (1) 不確かさの算出

調製した検査試料から 10 本を無作為に選びだし、各瓶から異なる 2 か所を採取して分析した。その結果を図 4 に示す。得られた結果を一元配置分散分析によって評価したところ、瓶間のばらつきは有意ではない (P 値>0.05) ことが確認された。

次に、認証標準物質の生産に関する国際基準である ISO Guide 35 に則り、均質性に関する不確かさを評価した。その結果、分散分析の結果を基に算出した瓶間均質性標準偏差  $s_{bb}$  ( =  $\sqrt{\frac{MS_{among} - MS_{within}}{n}}$  ) と、測定のばらつ

きに由来する  $u_{bb}$  ( =  $\sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \sqrt{\frac{2}{v_{MS_{within}}}}$  )

を表 8 に示す。なお、 $s_{bb}$  は計算上負の値となったため 0 とした。両者のうちの大きい方を均質性に関する不確かさとすることから、各 OA 群について、 $u_{bb}$  を均質性に関する不確かさとした。

### (2) 算出した不確かさの評価

JIS Z 8405 では、外部精度管理に用いる検査試料の均質性に関して、試料間標準偏差 ( $S_s$ ) と技能評価のために標準偏差 ( $\sigma$ ) が次式を満たすことを求めている。

$$S_s \leq 0.3\sigma$$

今回均質性を評価した検査試料を用いた試験所間比較試験は 2022 年度に実施予定である。そのため、技能試験の結果として得られる  $\sigma$  は未知である。そこで、検査試料の予備分析結果を Horwitz の修正式に代入することによって、試験所の結果のばらつきの予測値を求めた。検査試料中の OA 群の予備分析結果を示すことになるために、本報告書では具体的な予測値の明示は割愛する。結果として、調製した検査試料は、試験所間比較試験における試験所の結果のばらつきの予測値の 0.3 倍以下であることが示された。すなわち、本検査試料は試験所間比較試験での使用のために十分な均質性を有することが示された。

### 3. 液体クロマトグラフィー蛍光検出法の検討

OA と DTX1 は特定の蛍光発色団を持たないため、ADAM を用いて蛍光誘導体化した。分離カラムとしてカラムスイッチング HPLC の第 3 カラムとして使用する Develosil C30-UG-5 (3.0 mm i.d. × 250 mm)、移動相として 95 %アセトニトリル (2 mM ギ酸アンモニウム及び 50 mM ギ酸含有) を用いて、OA および DTX1 の ADAM 誘導体化物の溶出時間を特定した。

次に、第 1 カラムである Inertsil diol における OA 群の蛍光誘導体化物の保持挙動を検討し、移動相中の有機溶媒濃度が少ないほど溶出時間が増加することを明らかにした。さらに、第 2 カラムである Inertsil C4 における OA 群の蛍光誘導体化物の保持容量を検討し、約 10

分間のトラップが可能であることを明らかにした。これらの検討結果を基にカラムスイッチング HPLC の分離条件を検討した結果、図 5 に示すような流路切り替え法を考案するとともに、その操作条件として表 9 の装置条件を確立した。この条件において、まず、第 1 カラムの 4~6 分をハートカットして、トラップカラムへ導入した。その後、切換えバルブを操作し、この分画を第 3 カラムに導入したところ、OA 蛍光誘導体化物は約 13 分に、DTX-1 蛍光誘導体化物は約 16 分に溶出した (図 6)。ADAM を用いた誘導体化においては、誘導体試薬由来の成分と分析対象成分との分離が困難である場合があるが、本法ではこれらを良好に分離することができた。ただし、その感度は LC-MS/MS と比較して高くはないため、試験所間比較で使用する検査試料の均質性評価のためには、より高感度化が必要であると考えられた。

### E. 結論

本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査パイロットスタディを実施することを最終目的としている。3年計画の2年目である令和3年度は、ホタテガイ中のOA群の精密な分析法を確立するとともに、昨年度調製したホタテガイ検査試料の均質性評価試験に適用した。その結果、検査試料の均質性は良好であることが示された。一方、一般的なLC-MS/MS法ではマトリックス効果が分析値の正確さに影響することから、カラムスイッチング技術を用いたHPLC-蛍光検出法を検討し、分析条件を確立した。

本研究では来年度に、試験所間比較試験のパイロットスタディを実施する予定である。本年度までに検査試料の調製と均質性評価は完了しており、パイロットスタディは円滑に実施可能である。一方で、参加機関の分析値の評価を正確に行うためには、本年度検討した分析法2法を候補として、さらに正確な分析法の開発に取り組む必要がある。

#### 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

1) 上原由理香, 鳥居塚南, 鎗田 孝: LC-MS/MSによるホタテガイ中下痢性貝毒(オカダ酸群)分析における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討, 第27回 LC&LC/MSテクノプラザ (Web開催) 2022.

#### 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 LC-MS/MS の測定条件

パラメータ	操作条件
移動相	A : 水 (2 mMギ酸アンモニウム及び50 mMギ酸含有) B : 95 %アセトニトリル (2 mM ギ酸アンモニウム及び 50 mM ギ酸含有)
グラジエント条件	B: 40 %(2 分)→+5 %/分(14 分)→100 %(20 分)→60 %/分(21 分)→40 %(25 分)
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 µL
イオン化法	ESI(-)
プリカーサーイオンおよびプロダクトイオン	OA: 803→255(定量用)、803→113(確認用) DTX-1: 817→255(定量用)、817→113(確認用))

表 2 A法における OA 群の溶出挙動

フラクション	溶出の割合 (面積比, %)		
	OA	DTX1	DTX2
Fr.A1	0	0	0
Fr.A2	72 ± 1	0	35 ± 6
Fr.A3	18 ± 2	1 ± 1	32 ± 4
Fr.A4	10 ± 2	80 ± 3	33 ± 5
Fr.A5	0	20 ± 2	0
Fr.A6	0	0	0



表 3 B法における OA 群の溶出挙動

フラクション	溶出の割合 (面積比, %)		
	OA	DTX1	DTX2
Fr.B1	0	0	0
Fr.B2	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Fr.B3	0	0	0

表 4 C法における OA 群の溶出挙動

フラクション	溶出の割合 (面積比, %)		
	OA	DTX1	DTX2
Fr.C1	0	0	0
Fr.C2	45 ± 23	7 ± 9	35 ± 24
Fr.C3	8 ± 2	3 ± 1	8 ± 1
Fr.C4	47 ± 23	90 ± 9	57 ± 23
Fr.C5	0	0	0

表 5 D法における OA 群の溶出挙動

フラクション	溶出の割合 (面積比, %)		
	OA	DTX1	DTX2
Fr.D1	0	0	0
Fr.D2	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Fr.D3	0	0	0

表 6 添加回収試験の結果

評価した工程	回収率 (%)		
	OA	DTX1	DTX2
精製工程のみ	106.3 ± 7.6	96.9 ± 5.5	102.4 ± 3.8
分析全工程	98.0 ± 4.0	91.5 ± 4.7	100.7 ± 6.9

表 7 室内精度の評価結果

	RSD (%)		
	OA	DTX1	DTX2
室内精度	5.8	7.1	8.3

表 8 検査試料の均質性に関する不確かさ評価

不確かさ要因	相対標準不確かさ (%)	
	OA	DTX1
$s_{bb}$	0	0
$u_{bb}$	5.6	5.9

表 9 カラムスイッチング HPLC の装置条件

パラメータ	操作条件
移動相 1 (第 1 カラム用)	95 %アセトニトリル (2 mM ギ酸アンモニウム及び 50 mM ギ酸含有) ー水 (6 : 4)
移動相 2 (第 3 カラム用)	95 %アセトニトリル (2 mM ギ酸アンモニウム及び 50 mM ギ酸含有)
カラム温度	40 °C
流量	0.425 mL/min (移動相 1 及び移動相 2 とも)
注入量	5 µL
励起波長	365 nm
蛍光波長	412 nm
第 2 カラムによるトラップ時間	5 分

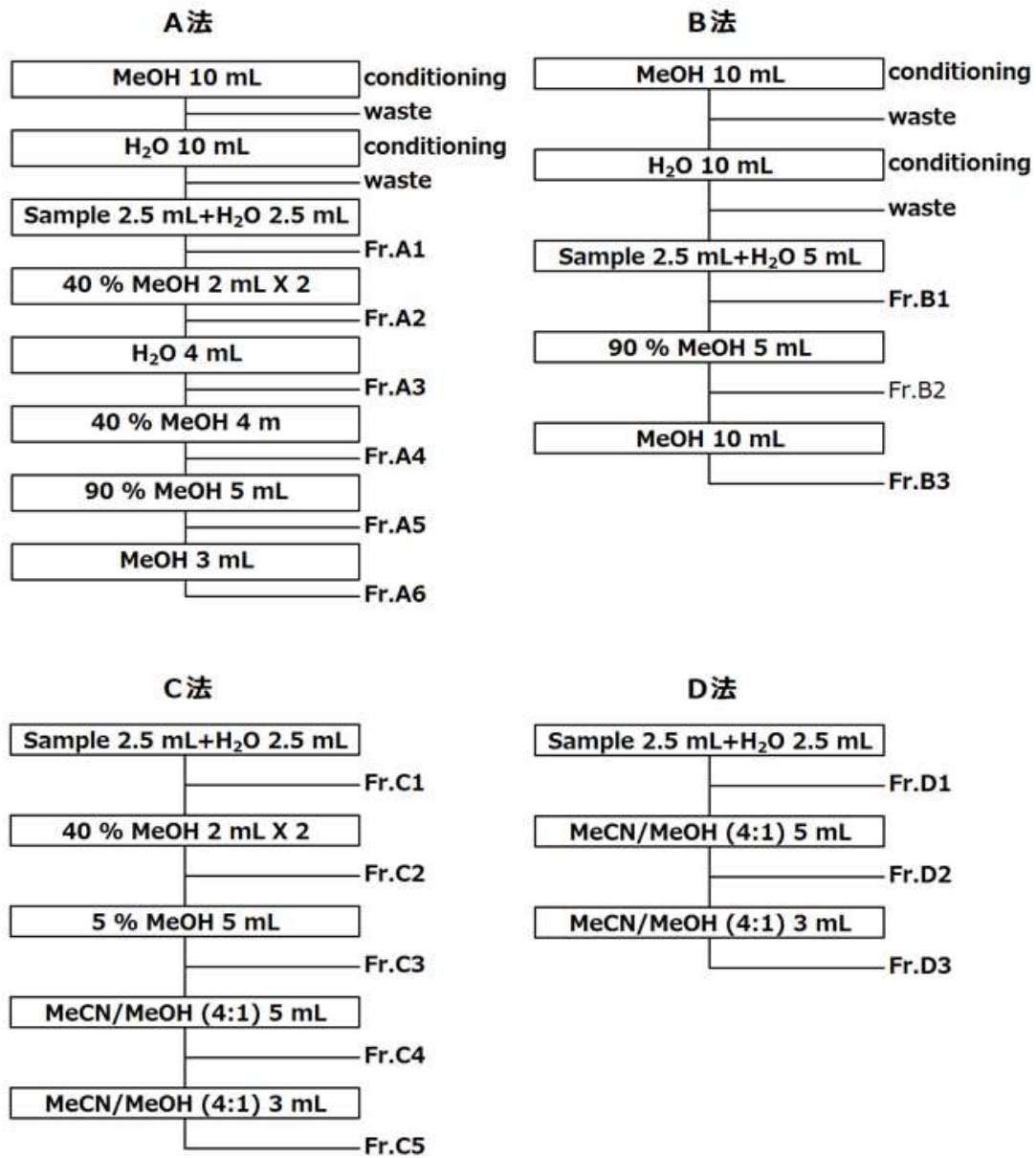


図1 固相抽出の操作フロー  
 MeOH : メタノール、MeCN : アセトニトリル

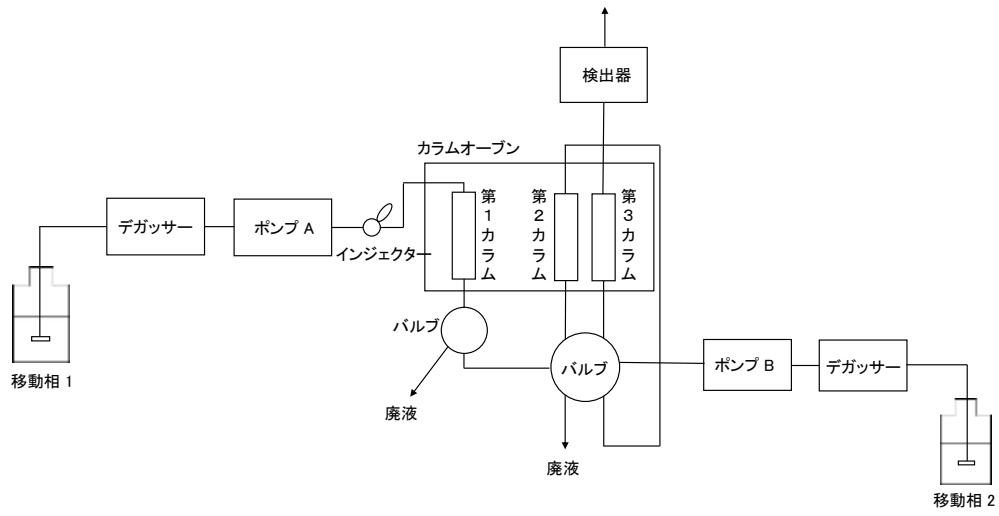


図2 カラムスイッチング HPLC 装置の概略図

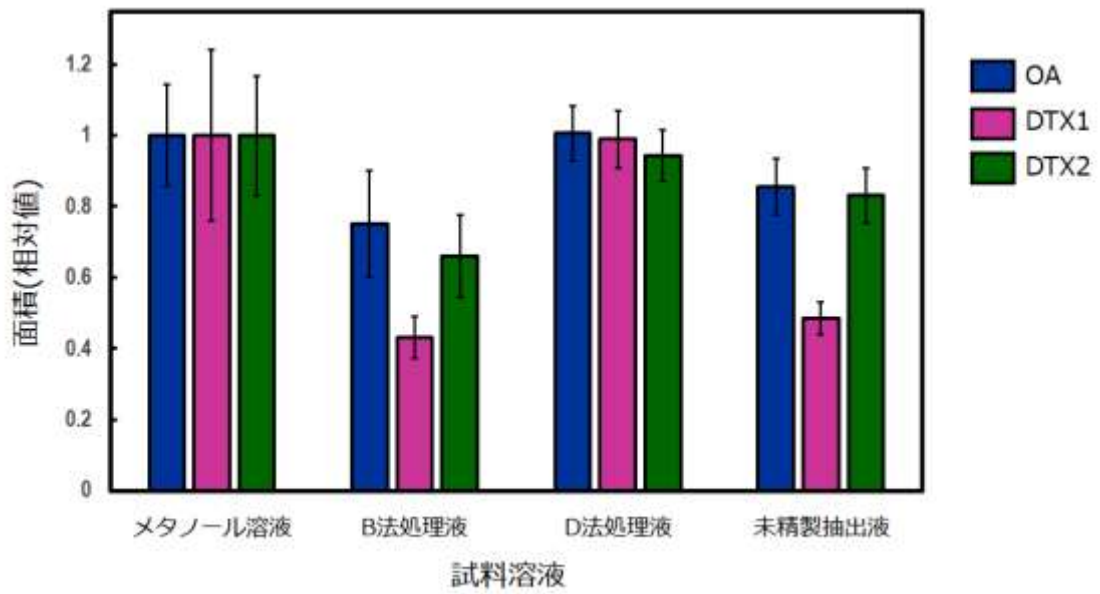


図3 精製法の違いがマトリックス効果に及ぼす影響

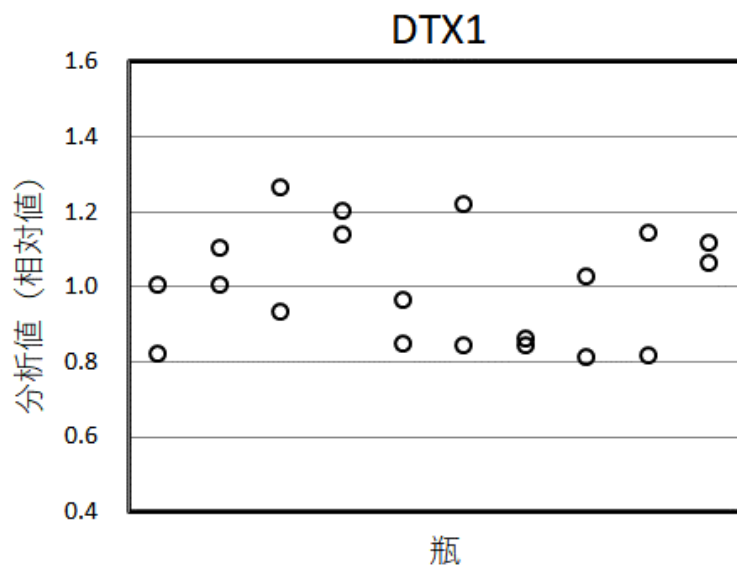
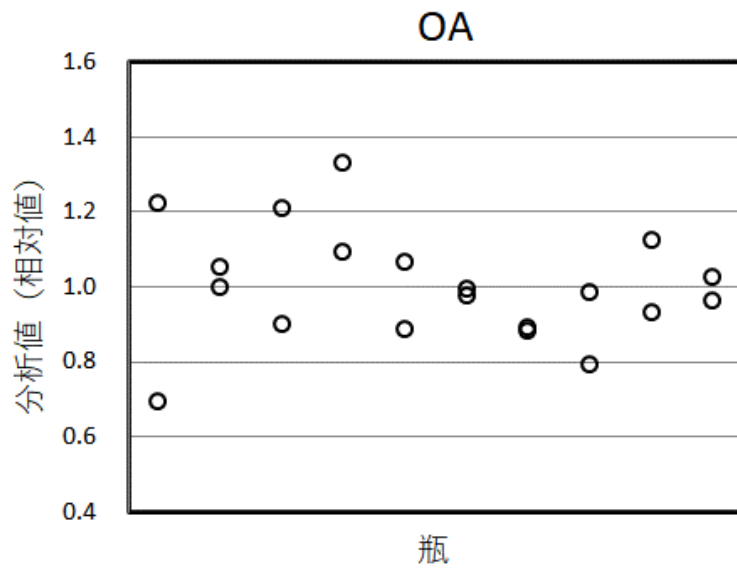
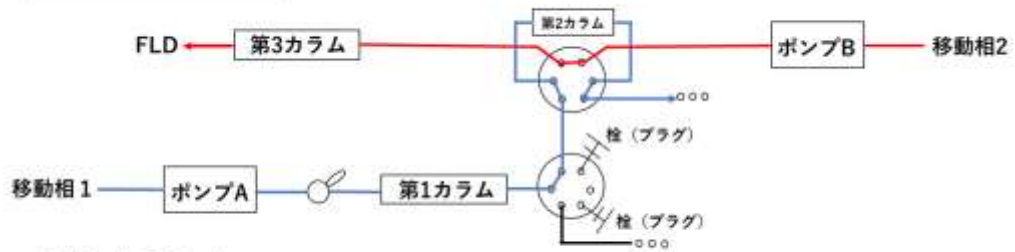


図4 検査試料の均質性評価における分析結果

■ トラップするとき



■ 分析するとき

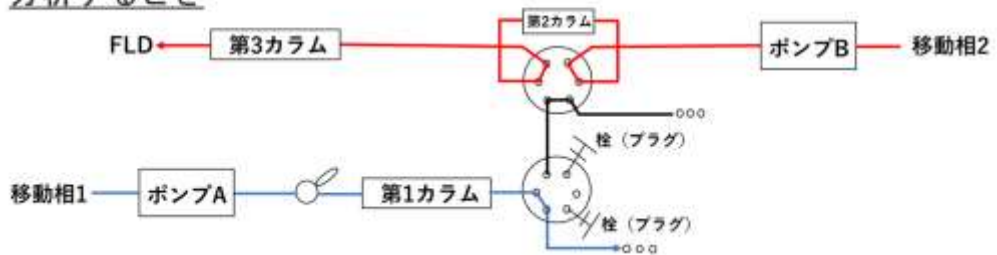


図5 カラムスイッチング HPLC における流路切り替えの概略

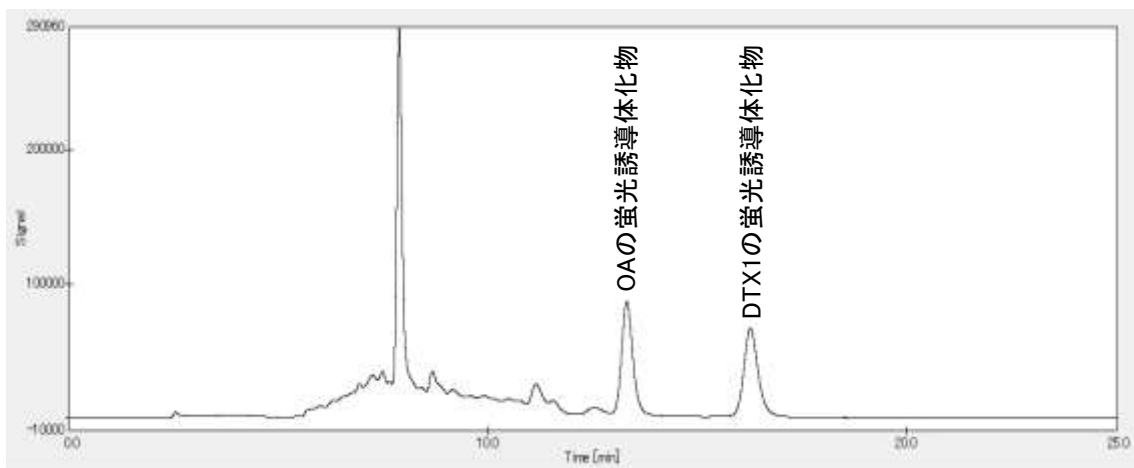


図6 カラムスイッチング HPLC による OA および DTX1 の分離

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用

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 副所長
研究分担者	大竹 貴光	(国研) 産業技術総合研究所 主任研究員
研究協力者	中村 圭介	(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。

今年度は、食品薬品安全センター 秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料中のクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを対象とし、同位体希釈質量分析法（IDMS）を用いて高精度化した「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）」および環境負荷の低い自動抽出法である超臨界流体抽出法（SFE）を利用した分析法により分析値を付与した。なお本法を適用するにあたり、添加回収試験により正確さを精密に評価し、対象農薬について一斉試験法と SFE 法で同等の分析値が得られることも確認した。

### 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 (JIS Q 17043:2011) 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、極めて精確な(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。

今年度も引き続き、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料中のクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを対象とし、IDMSを用いて高精度化した「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)」により、正確な分析値を付与することを目的とした。加えて、環境負荷の低い自動抽出法である超臨界流体抽出法(SFE)を利用した分析法の条件検討を行い、SFEでも玄米試料の分析を行うことを目的とした。また分析値を付与するにあたり、添加回収試験により正確さを精密に評価した。食品中残留農薬分析にIDMSを適用した場合でも、検量線(傾き)が試料中のマトリックスに影響されることが過去の研究で明らかとなっているため、この評価において、マトリックスマッチング法を適用したIDMSの正確さについても検討した。

## B. 研究方法

### (1) 添加回収試験による一斉試験法およびSFE法の評価

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランク玄米を粉碎したものを試料とし、そこに対象農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンをポ

ジティブリストの基準濃度値(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン: 0.1 mg/kg, フェニトロチオン: 0.2 mg/kg)になるように添加した。本試料を、IDMSを適用した一斉試験法およびSFE法によって分析を行い、得られた結果を解析して各分析法の正確さを精密に評価・比較した。

### (2) 残留農薬検査用玄米試料の分析

(1)で評価した分析法を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料(Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C)の3種, 温度は噴霧温度を示す)中の対象農薬を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

## 1. 試料基材および試薬

### (1) 試料

添加回収試験による一斉試験法およびSFE法の評価には、粉碎して粉末とした市場流通品の玄米を用いた。分析により、当該玄米試料中の対象農薬は検出下限以下であることを確認した。また、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料(Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C)の3種, 温度は噴霧温度を示す)も分析対象とした。

### (2) 標準品

測定対象農薬の高純度標準品として、富士フィルム和光純薬製ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン(以上TraceSure)、クロルピリホス(Traceable Reference Material)を用いた。標識体

の標準品として、林純薬工業製クロルピリホス- $d_{10}$ 、フェニトロチオン- $d_6$ 、Toronto Research Chemicals 製マラチオン- $d_6$ とダイアジノン- $d_{10}$ を用いた。シリンジスパイク標準品としてジーエル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 (To1)、メタノール (Me)、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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。他の試薬は試薬グレードを用い、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) 添加回収試験による一斉試験法および SFE 法の評価用

クロルピリホス- $d_{10}$ 、ダイアジノン- $d_{10}$ 、フェニトロチオン- $d_6$ 、マラチオン- $d_6$ を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 A とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液 A を調製した。一方、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液 A を調製した。さらに、農薬混合溶液 A、内標準溶液 A、アラクロール溶液 A、Ac を混合することにより、検量線溶液 A を調製した。検量線溶液 A の各成分濃度は、3(1) および 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製した。

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玄米試料を 3(1) および 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 A 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-1 (一斉試験法用) および A-2 (SFE 法用) を調製した。

### (2) 残留農薬検査用玄米試料の分析用

(1) と同様に、内標準溶液 B、農薬混合溶液 B、アラクロール溶液 B、検量線溶液 B、マトリックスマッチ検量線溶液 B-1 (一斉試験法用) および B-2 (SFE 法用) を調製した。なお、検量線溶液 B 中の各成分濃度は、3(3) および 3(4) に示す前処理法によって残留農薬検査用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製した。

## 3. 分析方法

添加回収試験による一斉試験法の評価では分析法 1 を、SFE 法の評価では分析法 2 を用いて玄米中の農薬を分析し、各分析法の評価を行った。また、残留農薬検査用玄米試料中の農薬分析には分析法 3, 4 を用いた。

### (1) 分析法 1 (一斉試験法、添加回収試験)

玄米試料 3 g に農薬混合溶液 A 0.4 mL および内標準溶液 A 0.4 mL を加えて静置した。これに水 10 mL を加えて 15 分静置した後、AN 25 mL を加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN 10 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。これに NaCl 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を

加え、10分間振とうした。その後、あらかじめAN10 mLでコンディショニングしたAgilent Technologies製Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ (1 g) を用いて、振とうによって得られたAN層とAN2 mLを通液する処理を行った。得られた処理液を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol (3:1) 混液 2 mLに溶解した。Supelco製ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub>固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) をAN/Tol (3:1) 混液10 mLでコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらにAN/Tol (3:1) 混液20 mLを注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液A 0.5 mLに溶解させ、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。測定条件は以下の通りである。装置：7890/5975c GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム：DB-5ms (30 m×0.25 mm、膜厚0.25 μm、Agilent Technologies 製)、カラム温度：50 °Cで2分間保持した後、+20 °C/分で160 °Cまで昇温し、さらに+7 °C/分で300 °Cまで昇温し、10分間保持、注入口温度：250 °C、検出器温度：230 °C (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 μL、イオン化条件：EI、定量に用いた *m/z*：314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス-*d*<sub>10</sub>)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン-*d*<sub>10</sub>)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-*d*<sub>6</sub>)、285 (マラチオン)、291 (マラチオン-*d*<sub>6</sub>)、188 (アラクロール)。

(2) 分析法 2 (SFE 法、添加回収試験)

玄米試料 1 g に農薬混合溶液 A0.15 mL および内標準溶液 A0.15 mL を加えて静置した。これに約 10 g の Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加え、ステンレス製の 15 mL 抽出管 (日本分光製) に試料を導入し、日本分光製の超臨界抽出装置 (ポンプ 1：PU-2080-CO<sub>2</sub>、ポンプ 2：PU-2080 Plus、ミキサー：MX-2080-32、オープン：CO-2065 Plus、背圧調整弁：BP-2080 Plus) を用いて抽出を行った。抽出条件は以下の通りである；溶媒：25%(v/v)Me/超臨界二酸化炭素、温度：80 °C、圧力：25 MPa、溶媒流量：2.5 mL/min、抽出時間：20 min。抽出液を、抽出装置出口に接続した ODS カラム (日本分光製、PES-10-1/16) に通液した後、ナス型フラスコに回収した。回収した抽出液を、あらかじめ AN/Tol (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> 固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) に注入し、さらに AN/Tol (3:1) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 A 0.2 mL に溶解させ、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。測定条件は、分析法 1 と同じである。

(3) 分析法 3 (一斉試験法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 3 g に内標準溶液 B0.4 mL を加えて静置した。これより後の工程は、分析法 1 と同様に実施した。

(4) 分析法 4 (SFE 法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.15 mL を加えて静置した。これより

後の工程は、分析法2と同様に実施した。

#### 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。

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

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、 $M_c$ ：検量線溶液中の農薬混合液の質量、 $C_c$ ：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) 添加回収試験による一斉試験法およびSFE法の評価

式(1)に準じて一斉試験法（分析法1）およびSFE法（分析法2）による分析値を算出した。得られた結果を、玄米試料への添加濃度（クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン：0.1 mg/kg、フェニトロチオン：0.2 mg/kg）と比較することにより、各分析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-1（一斉試験法用）および A-2（SFE法用）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 を用いた測定結果も算出した。

##### (3) 残留農薬検査用玄米試料の分析

式(1)に準じて一斉試験法（分析法3）およびSFE法（分析法4）による分析値を算出した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

（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. 一斉試験法の評価

分析法1で得られた定量値と調製値の比を表1に示す。この結果から、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、95～101%と良好であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液 A を用いた場合の算出結果は、クロルピリホスが102%、ダイアジノンが96%、フェニトロチオンが89%、マラチオンが98%であり、マトリックスマッチ検量線溶液 A-1 との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。よって、マトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であると考えられた。

##### 2. SFE法の評価

SFE法は、抽出溶媒として超臨界流体を用いる抽出法であり、抽出操作の自動化が可能であることから、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、使用されている。また、抽出溶

媒として主に超臨界二酸化炭素を用いるため、その他の有機溶媒を用いる抽出法と比較して環境への負荷が低いという特徴がある。さらに、同じく超臨界流体を用いた機器分析法である超臨界流体クロマトグラフ-質量分析法とオンライン接続することで、抽出から測定までを一括で行えるシステムも開発されており、国内で今後普及する可能性が高いことから、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た。SFE 法（分析法 2）で得られた定量値と調製値の比を、表 1 に示す。この結果から、SFE 法によっても調製値通りの分析値が得られることが示された。さらに、各農薬の標識体の回収率も、72~83 %と良好であった。これより、本研究で対象とした玄米中の農薬に対して、SFE 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。なお一斉試験法と同様に、マトリックスマッチングしていない検量線 A を用いた場合の比も算出した。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 99 %、フェニトロチオンが 96 %、マラチオンが 96 %であり、マトリックスマッチ検量線溶液 A-2 との結果と比べてクロルピリホスとフェニトロチオンの測定結果に若干の偏りが生じることが確認された。結果的には一斉試験法と大きな差は見られず、SFE 法においてもマトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であるという結果が得られた。

### 3. 残留農薬検査用玄米試料の分析

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用玄米試料の、

Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C) (温度は噴霧温度を示す) の 3 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法および SFE 法によって分析した。得られた結果を表 2, 3 (マトリックスマッチ検量線を使用) に、代表的なクロマトグラムを図 1, 2 に示す。これらより、クロマトグラムにおいて対象農薬のピークに夾雑物による妨害が見られず、一斉試験法と SFE 法の定量結果もよく一致していた。食品薬品安全センター秦野研究所によると、添加濃度はクロルピリホス: 0.1, ダイアジノン: 0.4, フェニトロチオン: 0.2, マラチオン: 0.2 (単位は mg/kg) であり、調製時の回収率は 45~75 %程度と予想されるということであった (農薬の種類によって回収率は異なる)。本研究で得られた結果 (表 2, 3) を用いて、調製時の回収率を計算した結果を表 4, 5 に示す。これより、一斉試験法および SFE 法の分析結果が、添加濃度と調製時の回収率から予測される濃度の範囲とよく一致していたことが示された。以上より、玄米中の対象農薬について、本研究で検討した方法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。

### E. 結論

IDMS を用いて高精度化した一斉試験法と SFE 法の正確さを、添加回収試験により精密に評価し、対象農薬について両方法で同等の分析値が得られることが確認できた。このとき、マトリックスマッチ検量線を用いることが適切であることも示された。これらの分析法によって、食品薬品安全センター秦野研究所が調製し

た玄米試料中農薬に正確な分析値を付与  
することができた。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康：ネギ中のネオニコチノイド系農薬分析における超臨界流体抽出法の評価、日本食品衛生学会第117回学術講演会、Web開催、2021

2) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康：Evaluation of the automatic extraction techniques for the determination of neonicotinoid pesticides in green onion、The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021)、Web開催、2021

**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 一斉試験法およびSFE法による添加回収試験の結果

対象農薬	調製値に対する分析値の比 (平均値±標準偏差, n=4, %)	
	一斉試験法	SFE 法
クロルピリホス	99.6±0.9	100.0±0.6
ダイアジノン	99.7±0.3	100.2±0.5
フェニトロチオン	97.3±1.6	99.4±0.6
マラチオン	98.8±2.8	98.9±1.5

表2 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の農薬濃度 (平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	0.058 ± 0.002	0.068 ± 0.001	0.066 ± 0.001
ダイアジノン	0.186 ± 0.006	0.250 ± 0.004	0.248 ± 0.002
フェニトロチオン	0.118 ± 0.003	0.143 ± 0.004	0.137 ± 0.003
マラチオン	0.108 ± 0.004	0.134 ± 0.002	0.131 ± 0.002

表3 SFE法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の農薬濃度 (平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	0.059 ± 0.002	0.069 ± 0.001	0.068 ± 0.002
ダイアジノン	0.187 ± 0.005	0.248 ± 0.002	0.254 ± 0.008
フェニトロチオン	0.112 ± 0.003	0.137 ± 0.002	0.137 ± 0.003
マラチオン	0.103 ± 0.003	0.134 ± 0.004	0.133 ± 0.003

表4 一斉試験法の分析結果を基にした試料調製時の回収率 (平均値±標準偏差, n=3, %)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	58.3 ± 2.5	68.8 ± 1.1	65.5 ± 1.5
ダイアジノン	46.5 ± 1.6	62.6 ± 1.0	62.0 ± 0.4
フェニトロチオン	59.2 ± 1.6	71.6 ± 2.0	68.4 ± 1.7
マラチオン	53.8 ± 2.0	67.1 ± 1.1	65.6 ± 0.9

表5 SFE法の分析結果を基にした試料調製時の回収率 (平均値±標準偏差, n=3, %)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	59.2 ± 1.5	69.0 ± 0.8	68.2 ± 2.0
ダイアジノン	46.8 ± 1.2	62.1 ± 0.6	63.5 ± 2.0
フェニトロチオン	56.2 ± 1.6	68.7 ± 1.0	68.7 ± 1.8
マラチオン	51.4 ± 1.7	67.1 ± 2.1	66.3 ± 1.7



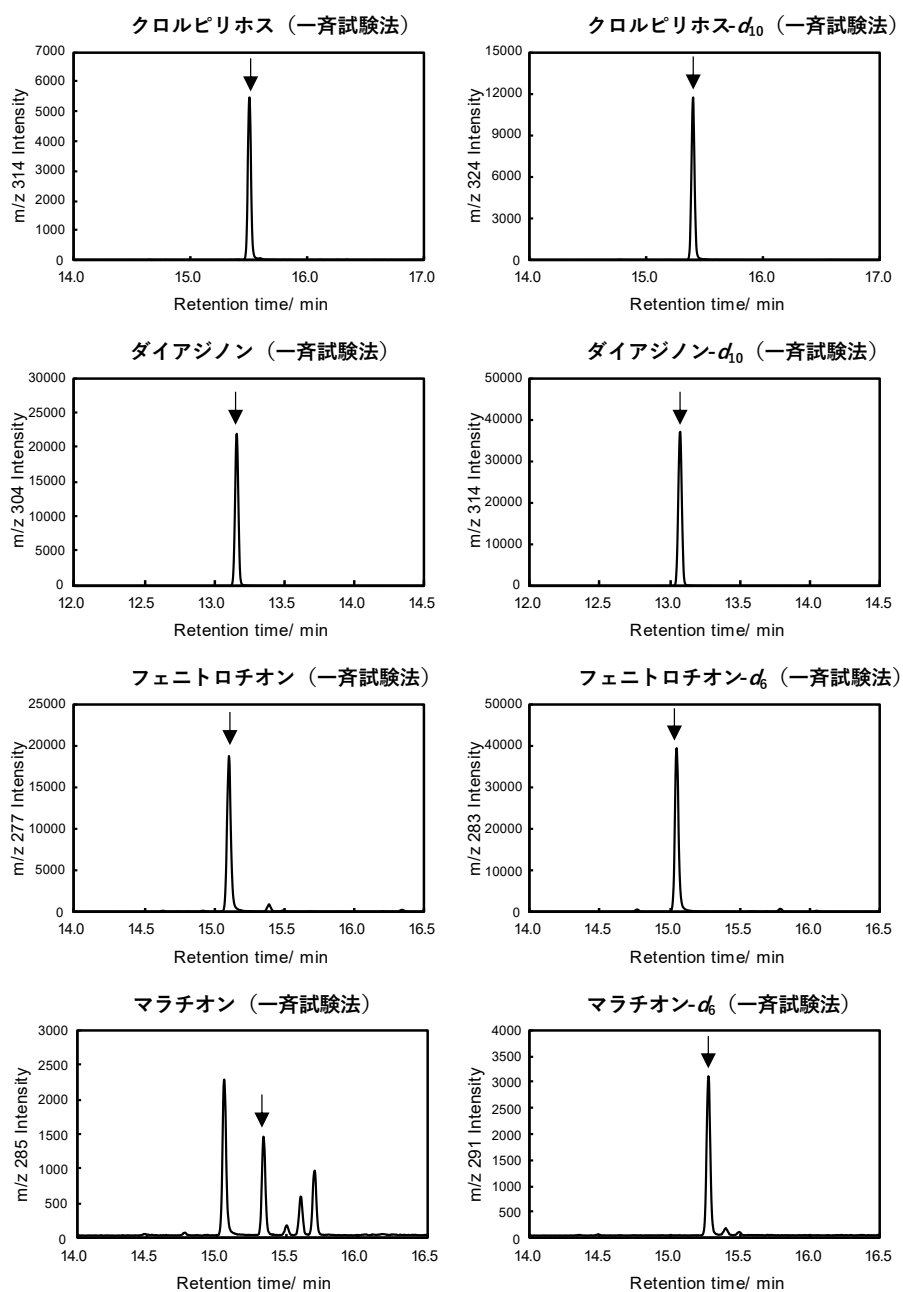


図1 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬のGC/MSクロマトグラム

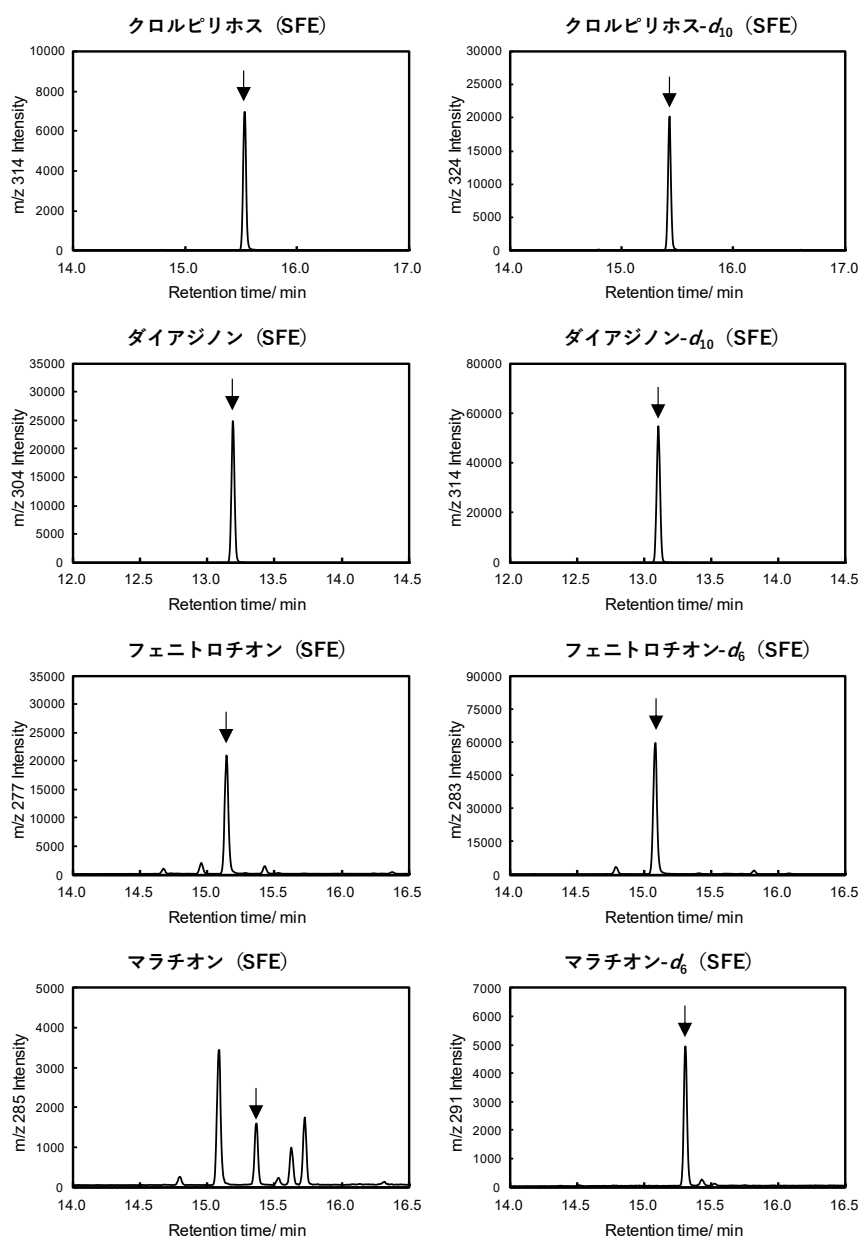


図2 SFE法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬のGC/MSクロマトグラム

## 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
なし					

### 学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
千葉雄介、藤原 茜、高瀬 冴子、島田慎一、石井里枝	E. coli 定性試験法における検出下限値の推定	第 42 回日本食品微生物学会学術総会 (Web 開催)	2021
千葉雄介、金井美樹、藤原 茜、荒島麻実、土井りえ、島田慎一、石井里枝	黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定	第 117 回日本食品衛生学会学術講演会 (Web 開催)	2021
中村圭介、大竹貴光、羽成 修康	ネギ中のネオニコチノイド系農薬分析における超臨界流体抽出法の評価	第 117 回日本食品衛生学会学術講演会 (Web 開催)	2021
村上太郎、工藤鮎子、村野 晃一、高取聡、角谷直哉、若栗忍、渡辺卓穂	ELISA 法による特定原材料 (落花生) の測定における阻害因子の解析と改良抽出法の検討	日本食品化学学会 第 27 回総会・学術大会 (WEB 開催)	2021
村上太郎、村野晃一、工藤 鮎子、清田恭平、昌山敦、高取聡、山野哲夫	特定原材料検査の内部品質管理における課題と不確かさの推定	第 58 回全国衛生化学技術協議会 年会 (WEB 開催)	2021
中村圭介、大竹貴光、羽成 修康	Evaluation of the automatic extraction techniques for the determination of neonicotinoid pesticides in green onion	The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) (Web 開催)	2021
上原由理香、鳥居塚南、鎗 田 孝	LC-MS/MS によるホタテガイ中下痢性貝毒(オカダ酸群)分析における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討	第 27 回 LC&LC/MS テクノプラザ (Web 開催)	2022

その他

令和4年 3月10日

厚生労働大臣 殿

機関名 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 小島 幸一

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 副所長

(氏名・フリガナ) 渡辺 卓穂 (ワタナベ タカホ)

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年 3月 1日

厚生労働大臣 殿

機関名 埼玉県衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 本多 麻夫

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 埼玉県衛生研究所 副所長兼食品微生物検査室長  
(氏名・フリガナ) 石井 里枝 イシイ リエ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年 3月 4日

厚生労働大臣 殿

機関名 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 朝野 和典

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生化学部 食品化学2課 主任研究員

(氏名・フリガナ) 村上 太郎 (ムラカミ タロウ)

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

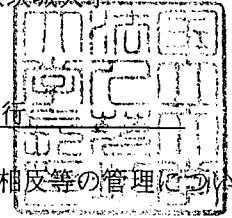
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立大学法人茨城大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 太田 寛行



次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部署・職名) 農学部・准教授  
(氏名・フリガナ) 鎗田 孝・ヤリタ タカシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



令和4年 3月 10日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人産業技術総合研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 石村 和孝



次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部署・職名) 計量標準総合センター 主任研究員  
(氏名・フリガナ) 大竹 貴光 (オオタケ タカミツ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。