

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4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5年(2023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	16
	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	16
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	29
1.3	アレルギー物質技能試験プログラムに関わる検討	41
1.4	一般細菌数測定検査用調査試料の開発	89
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	104
	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	128
	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	141
	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	155
	大竹 貴光	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	164

令和4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の作製の最適条件が分かった。器具・容器包装の検査項目の基礎検討では、溶解に用いる有機溶媒の選定が完了し、作製条件が最適化された。微生物検査については、一般細菌数測定検査試料として白飯を開発し、パイロットスタディを実施した。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の妥当性評価に関する研究（石井研究分担）では、単一試験室で推定したE. coli及び黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値について、試験室間での比較を行った結果、推定した定量下限値は妥当な数値であると考えられた。厚生労働省から通知されているサイクラミン酸試験法（規定分析法）の適用が困難である食品群について改良法を検討するとともに、新しい誘導体化法を用いた新規分析法を開発し、3種の食品群に適用したところ、添加回収率、感度及び夾雑物ピークとの分離等において良好な結果が得られた。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、小麦の改良抽出法の試験室間共同試験を実施し、改良試験法の妥当性を確認した。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）では、開発した分析法は性能基準を満たすことが確認さ

れた。また、外部精度管理のパイロットスタディを実施し付与値の妥当性を評価した。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）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、スプレードライヤ作製条件を評価した。

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（埼玉衛生研究所化学検査室長）、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。玄米粉懸濁液は事前に攪拌し、均一な懸濁液とし、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、得られた玄米粉は課題 5 において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一般規格となるプラスチックの材質ポリマーについて、今年度新たに試料基材に ABS 及び AS のペレットを用い、試料作製のための基礎的検討を行った。これらのペレットについて、最初に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。溶解性の検討結果から、それぞれの試料基材に適した溶解溶媒を選択し、それぞれポリマー含量（5、10、20w/w%）を変えてポリマー溶液を調製しシート状試料の作

製検討を行った。いずれの場合も、乾燥後のシート状試料質量は約 25g となるように作製容器への流し込み量を調整した。作製容器の検討としては、ガラス製グラタン皿、テフロンコーティングバット及びステンレス製バットを用いた。添加に用いる標準品は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。作製したシート状試料については成形性についての目視観察の他、溶解溶媒残存率について、重量分析を行った。

1.3 特定原材料検査（卵及び乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ及び市販食品による実試料（incurred sample）作製：

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、かぼちゃペーストを基材として卵タンパク質及び乳タンパク質を各 10.0 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、2つの特定原材料それぞれを通知法準拠のキットであるモリナガキット及び日本ハムキットの 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。

また、市販加工食品を使用した外部精度管理調査用の試料としての incurred sample の作製を行った。ELISA 法には卵、乳ともにモリナガキットのみを使用した。

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）

2.1 微生物定性試験法における検出下限値の推定

ISO 16140-3:2021のプロトコル1を参考

にして、5試験室による共同試験を実施し、各試験室におけるE. coli及び黄色ブドウ球菌定性試験法におけるeLOD₅₀ (estimated LOD₅₀) を算出した。E. coli定性試験法では冷凍食品の規格基準に規定された試験法、黄色ブドウ球菌定性試験法では食肉製品の規格基準に規定された試験法について検討した。食品試料としてはこれまでの研究において推定されたLOD₅₀が最大、最少であった試料（E. coli定性試験法ではオクラとピラフ、黄色ブドウ球菌定性試験法ではチャーハンとソーセージ）を供試した。3倍段階希釈したそれぞれの試験対象菌液を接種した食品試料について試験を実施し、陽性と判定された試料数の割合からISO 16140-3:2021に記載されている表を基にeLOD₅₀を算出した。両試験法に用いた培地等は各試験室で通常用いている製品により実施した。

2.2 食品添加物試験法の妥当性に関する研究

規定分析法の適用が困難であったビスケット及びたくあん漬けを対象とし、ホモジナイズ抽出操作を加えることによる添加回収率の改善について検討した。

また、規定分析法のHPLC分析における感度及び連続分析における保持時間の変動等を改善するために、新たな誘導体化法による新規分析法の開発を試みた。サイクラミン酸の分解産物であるシクロヘキシルアミン（以下「CA」という。）のアミノ基には求核性があるため、これを活かした置換

反応による誘導体化法を検討した。求電子剤である塩化ベンゾイルとCAを反応させ、生じるN-シクロヘキシルベンズアミド（以下「N-CBA」という。）を検出、定量する方法を検討することとし、試料からのサイクラミン酸の抽出・精製、サイクラミン酸からCAへの分解及びCAの塩化ベンゾイルによる誘導体化、生じたN-CBAの分析等の各段階において最適条件を検討し、食品への適用性を検討した。

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）

特定原材料（小麦）の改良抽出法の試験室間における評価のために、精度管理用試料として市販されている森永生化学研究所製のQC Material 小麦とカカオパウダーを混合して試験室間共同試験用試料を調製した。調製した試料は試料調製後 112 日まで冷蔵庫内で保存し、室間共同試験の評価期間中と終了後に安定性を評価した。

改良抽出法の試験室間共同試験の協力依頼を送付し、参加申込のあった合計 28 試験室に配布試料を送付した。評価結果は分布を確認後、ロバスト方式により統計値を算出した。また、算出したロバスト平均値とロバスト標準偏差から \bar{x} -スコアを算出し、外れ値を評価した。外れ値の評価後、調製した試料ごとに定量値に対する回収率を算出し、抽出法ごとに評価を行った。

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 HLB精製/LC-MS/MSのホタテガイ以外への適用

(1) 材料・試薬

ムラサキイガイ、カキ、アサリは市販品を

用いた。1 ppm OA 溶液と 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。他の試薬は特級グレード、HPLC グレード、または LC-MS グレードのいずれかを用いた。

(2) 試料の分析方法

二枚貝試料 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、昨年度本事業で確立した方法によって行った。具体的には、加水分解処理を行い、さらにヘキサソール洗浄を行った貝試料の抽出液（約 2.5 mL）水 2.5 mL を加え攪拌し、HLB カートリッジ（Waters 社製 Oasis PRiME HLB 200 mg）に注入し、流出液を捨てた。次に、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、得られた溶液を回収した。その際、少量のアセトニトリル/メタノール（4:1）で、抽出液が入っていたねじ口試験管の内壁を洗った。得られた溶出液を窒素下で 2 mL まで濃縮させ、試料溶液とした。

LC-MS/MS の測定条件は、昨年度の本事業で適用した方法に準拠した。

4.2 外部精度管理のパイロットスタディ

(1) 材料・試薬

検査試料は、本事業で令和 2 年度に調製し、令和 3 年度に均質性を評価したホタテガイ試料を使用した。試薬類は 4.1(1) と同じものを使用した。

(2) パイロットスタディの実施

パイロットスタディは令和 4 年 7~9 月に実施した。参加機関の分析結果は、専用のエクセルファイルによって受領した。

(3) 安定性評価試験

参加機関における検査試料の保存条件は、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度とした。分析期間における検査試料の安定性を評価するために、茨城大学において、分析期間前後に検査試料を分析した。適用した分析法は、4.1(2)の通りである。

(4) 報告値の解析

参加機関から報告された分析結果は、JIS Z8405 (ISO 13528) 及び AOAC ガイドライン(AOAC Int., 2005)に準じて解析した。

(5) 茨城大学における検査試料の分析

茨城大学でも検査試料を分析した。前処理操作における分析対象物質の回収率や LC-MS/MS におけるマトリックス効果の影響を補正するために、前処理前の検査試料に既知量の OA と DTX1 を添加する標準添加法と、4.1(2)の分析法を組み合わせで適用した。

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)

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 ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$), 2 ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$), 3 ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$) の3種で昨年度と同じ条件、温度は噴霧温度を示す) 中の対象農薬4種(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 Na_2SO_4 は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用いた。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 NaCl10 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 でコンデューションした 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_2SO_4 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*₁₀)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン-*d*₁₀)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-*d*₆)、158 (マラチオン)、164 (マラチオン-*d*₆)、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 0.13 mL を加えて静置した。これに約 10 g の Na₂SO₄ 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-CO₂、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高速液体クロマトグラフ / タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) によって測定した。測定条件は、以下の通りである。装置：ACQUITY UPLC-Xevo TQ system (Waters 製)、カラム：L-column3 C18 (粒子径：3 μm、カラムサイズ：150 mm×2.1 mm i. d.、化学物質評価研究機構製)、カラム温度：40 °C、試料注入量：4 μL、溶離液 A：1 mM 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B：1 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液、流量：0.2 mL/min、グラジエント条件：溶離液 A の割合を 85% から 1 分間で 60% に減少させた後、60% で 2.5 分間保持し、-4%/分で 50% まで減少させ、次に -2.5%/分で 45% まで減少させ、さらに -4.2%/分で 5% まで減少させた後に 7.5 分間保持した。イオン化方法：ESI、キャピラリー電圧：3.0 kV、コーン電圧：20~30 V、コリジョンエネルギー：15~30 eV、イオン源温度：150 °C、脱溶媒温度：650 °C、定量に用いた *m/z* (プリカーサーイオン→プロダクトイオン)：350→97 (クロルピリホス)、360→99

(クロルピリホス- d_{10})、305→169 (ダイアジノン)、315→170 (ダイアジノン- d_{10})、278→125 (フェニトロチオン)、284→131 (フェニトロチオン- d_6)、331→127 (マラチオン)、337→127 (マラチオン- d_6)、270→162 (アラクロール)。

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。

なお分析法1と2は、昨年度に添加回収試験により正確さが精密に評価され、両方法で得られた分析結果もよく一致していた。これより、これらの分析法によって正確な分析値が得られることは、すでに十分に示されている。

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:

回収率の改善のために水を添加し、回収率を比較した結果、水の比率を高くすることで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)は回収率が改善された。すなわち、20%アセトニトリル溶液を用いた場合、4種農薬の回収率は最も高かった(課題5の結果より)。また、噴霧温度は120℃の時、いずれの農薬も回収率は最も低かった。これは、噴霧温度が高いと農薬が気化し、回収率を下げていると考えられた。4種農薬の中で最も沸点の低いダイアジノンの回収率も最も低かった。今回の再現性の試験においても同様の傾向が認められた。噴霧温度を下げることで回収率は改善した。今回の再現性試験は前回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℃、100℃、80℃で検討した。回収率が最も高かったのはフェニトロチオンであり、この結果は課題5で示してある。前回は、クロルピリホスが最も回収率が高かった。この結果が逆転したのは、運転条件の出口温度影響している可能性が考えられた。また、粉体の平均粒子径にも差が認められた。すなわち、前回作製したときは平均粒子径が250~280 μmであったのに対し今回は粒子径が約200 μmと小さかった。また、残留溶媒(%)も今回は前回に比べ低かったためこれらが再現性に影響した可能性は否定できない。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。今回作製した噴霧温度の違いによる顕微鏡写真から、いずれの顕微鏡写真も同様の粒子形状であり不定形であった。次に、前回の測定と今回の測定による噴霧温度の違いによる粒度分布の比較した結果、平均粒子径は今回（2022年7月測定）の方が小さいことが確認された。特に、80℃の時、前回（2021年7月測定）は二峰性の分布を示したのに対して、今回は平均粒子径が約200 μm で50 μm から400 μm まで分布していた。

以上より、今回の条件が適正であると考えられるが、スプレードライヤ条件が同じであっても若干の条件の際が認められ、それが粒子径や回収率に影響を与えることが分かった。ただし、詳細については検討する余地があるが、玄米粉を基材として用い、20%アセトニトリル溶液で懸濁させた場合、これら4種の農薬に対しては本条件が最適であると考えられた。今後は本条件でのさらなる検討が必要であると思われるが、作製された本残留農薬用試料の安定性を確認し、さらにこれを用いたパイロットスタディを実施する予定である。

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：

今年度は、食品衛生法において一般規格とな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ポリマーの溶解に用いる有機溶媒の選定、ポリマー含量別のシート状試料作製及び作製容器について検討した。その結果、試料基材にはABSペレット及びAS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ABSペレットにはジクロロメタン、ASペレットにはクロロホルムを用いてシート状の試料作製を行った。作製容器の検討としては、ガラス製グラタン皿、テフロンコーティングバット及びステンレス製バットを用いた。添加に用いる標準品は有機溶媒に溶解するSPEX製カドミウム及び鉛（いずれも5000 $\mu\text{g/g}$ 、Base Oil 75）を用いた。ポリマー含量（5、10、20w/w%）に相当する容量の溶解溶媒に、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、十分に溶解した（ポリマー溶液）。これを作製容器に流し入れた後、溶解溶媒を揮発させ、シート状の試料を得た。ポリマー溶液については、ポリマーの溶解性を、また、シート状試料については成形性について目視観察した。これらの溶解溶媒残存率については、重量分析を行った。なお、いずれのポリマー含量でも、成形後のシート状試料の質量が約25gとなるようにポリマー溶液を作製容器に流し込んだ。いずれのポリマーもポリマー含量5w/w%は揮発させる溶媒量が多く成形に時間を要すること、更に調査試料としての配付量を確保するためにはシート状試料作製容器に分注する量が多くなること、また20w/w%はポリマーの溶解に時間を要する上に溶媒が揮発しにくいことなどから、10w/w%が最も良好であると考えられた。ポリマー含量別シート状試料作製後の溶解溶媒残存率は、自然乾燥下、作製約2週間後でABSシート状試料は約0.2~0.6w/w%、ASシート状試料では約1.6~5.7w/w%となり、ポリマー間で残存率に差がみられた。これらについて更に減圧乾燥を行った結果、ABSシート状試料

はいずれのポリマー含量も 0.1w/w%未満、AS シート状試料は約 0.9~4.1w/w%となり、溶媒残留率は減少した。乾燥条件を問わず、ポリマー含量が高い方が溶解溶媒の残存率が高かった。また、ABS シート状試料に比べて AS シート状試料の方が溶解溶媒の残存率が高くなる傾向がみられたが、これは、用いた溶媒の沸点がジクロロメタン 39.6°C 及びクロロホルム 61.2°C であることから、これら溶解溶媒の特性の違いが要因の 1 つとして考えられた。ABS シート状試料は残留溶媒量の目標値である 0.2w/w%以下の基準を満たしたが、AS シート状試料はいずれのポリマー含量も満たすことが出来なかったため、今後更なる検討が必要と考えられた。作製容器の検討では、溶解溶媒残存率において 3 種の作製容器間で差は認められなかった。シート状試料の容器からの剥離性の観点から、作製容器は、ガラス製よりテフロン製あるいはステンレス製の方が適していると考えられた。以上より、今後は、ポリマー含量は 10w/w%、作製に用いる容器はテフロンコーティングバットあるいはステンレス製バットとし、溶解溶媒の自然乾燥後は、室温あるいは加温下で減圧乾燥することによりシート状試料を作製し、更にはこれらのカドミウム及び鉛の均質性及び安定性の確認試験の実施、ならびに AS シート試料については残留溶媒量の低減化の検討が必要である。

1.3 特定原材料検査 (卵及び乳) 技能試験プログラムのパイロットスタディ及び市販食品による実試料 (incurred sample) 作製:

標的となる特定原材料が不含であることが確認されたかぼちゃペーストに卵タンパ

ク質及び乳タンパク質を添加し作製し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 24 機関 (1 機関は乳検出系のデータのみ) で、使用されたモリナガキット及び日本ハムキットについて統計解析を行った。

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 2 機関、R 管理図で管理限界線を超えた機関は全体で 2 機関認められた。z-スコアの絶対値が 3 以上となり、外れ値を示した機関は延べ 3 機関であった。また、Xbar 管理図と z-スコアの両方で同時に外れたデータはなかった。

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。

また、卵または乳を含有した市販加工食品から外部精度管理調査用試料としての incurred samples の調製を行ったところ、両特定原材料につき、それぞれ適当な食品をスクリーニングすることができた。また、それぞれに選択した食品から作製した試料は、2 施設間において、卵、乳ともにモリナガキットによる ELISA 法で再現性の良い結果が得られたこと、両試料で均質性が確認できたことから、外部精度管理調査用試料として使用できる可能性が考えられた。

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は無作為に各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

2.1 微生物定性試験法における検出下限値の推定：

各試験室において得られた $e\text{LOD}_{50}$ は、*E. coli*定性試験法ではオクラで14~48 CFU/g、ピラフで21~40 CFU/g、黄色ブドウ球菌定

性試験法では、チャーハンで 23~108 CFU/g、ソーセージで 16~40 CFU/g であった。LOD₅₀ との比は 0.49~2.9 倍であった。

ISO 16140-3:2021 では、試験性能の検証時に算出された eLOD₅₀ が LOD₅₀ の 4 倍以内であることを許容限界として規定している。本研究で推定した LOD₅₀ に対して、試験室間比較において得られた eLOD₅₀ は 4 倍以内であったことから、推定した LOD₅₀ は妥当な数値であると考えられた。

また、試験室間比較では技術の差だけではなく、異なる培地間での比較も期待した。E. coli 定性試験法では使用した培地に偏りはあったものの、異なる希釈液、培地を用いても eLOD₅₀ に大きな差はなかった。黄色ブドウ球菌定性試験法では選択分離寒天培地として 3%卵黄加マンニト食塩寒天培地を使用した試験室とベアードパーカー寒天培地を使用した試験室があったが、結果に大きな差はなかった。また、0.1 mL を測定するピペットの容量により差が生じる可能性も考えていた。全試験室でマイクロピペットではなく、メスピペットを使用しており、その容量は 0.1 mL から 2.2 mL と幅広かったが大きな影響はなかったと考えられた。

2.2 食品添加物試験法の妥当性に関する研究：

規定分析法で良好な添加回収率が得られなかったビスケット及びたくあん漬けについて、ホモジナイズ抽出操作を加えたところ、良好な回収率が得られた。ビスケットでは固相抽出法及びスクリーニング法でそれぞれ 94.3%及び 94.5%、たくあん漬けで 93.9%及び 102.8%であった。

新規分析法の検討においては、各段階に

おける最適条件を検討したところ、試料に水 70mL を加え、沸騰水中で抽出し、抽出液の一部について固相 (C18) カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジで精製した。精製液の一部に、塩酸と過酸化水素水を加え、沸騰水中で 30 分間、分解し、CA を得た。水酸化ナトリウム存在下、塩化ベンゾイルを添加し、誘導体化した後、塩酸で中和し、試験溶液とした。本法を用いて添加回収試験を行ったところ、オレンジジュース、ブルーベリージャム及びりんごゼリーで 104~109%と良好な結果であった。また、感度及び夾雑物ピークとの分離も良好であった。

3 村上研究分担

3.1 試料の安定性の評価

調製した試料は試料調製後 112 日まで冷蔵庫内で保存し、室間共同試験の評価期間中と終了後に安定性を評価した。試料調製後 112 日まで回収率の低下は確認されず、試験室間共同試験の評価期間中に調製した試料は安定であることが確認された。

3.2 評価結果の統計解析

改良抽出法の試験室間共同試験の協力依頼を送付し、参加申込のあった合計 28 試験室に配布試料を送付した。評価結果は分布を確認後、ロバスト方式により統計値を算出した。また、算出したロバスト平均値とロバスト標準偏差から z-スコアを算出し、外れ値を評価した。評価の結果 FASPEK と FASTKIT の各キットで z-スコアが-3 未満の機関が 1 機関ずつ確認された。

3.3 室間共同試験用試料の評価

試間共同試験用試料を通常法で分析した際の回収率のロバスト平均とロバスト標準偏差は FASTKIT で 12.8±2.3%、FASPEK で

16.1 ± 4.7 %と回収率の低下が確認された。一方で、改良抽出法では FASTKIT で 92.7 ± 12.1 %、FASPEK で 96.0 ± 8.4 %と回収率の改善が確認された。試験室間共同試験による評価結果は通知法に示された定量検査法の評価基準である 50-150 %の回収率と 25%以下の室間精度を満たしており、室間共同試験によって改良抽出法の妥当性が確認された。

4 鎗田研究分担

4.1 HLB精製/LC-MS/MSのホタテガイ以外への適用

昨年度本事業で確立した方法 (HLB精製を組み合わせたLC-MS/MS) がアサリ、カキ、ムラサキイガイ分析へ応用できるかを検討した。精製後の試料をLC-MS/MSによって測定した際のマトリックス効果を評価するために、貝試料の前処理液を添加した標準溶液と、メタノールを溶媒とした標準溶液をLC-MS/MSにより分析した。その結果、マトリックス効果はアサリ101 %~106 %、カキ101 %~112 %、ムラサキイガイ109 %~115 %であり、LC-MS/MSにおけるイオン化抑制やイオン化増強が許容できる程度に抑えられたことが示された。

さらに、添加回収試験によって、HLB精製を組み合わせたLC-MS/MSの精確さを評価した。OA群の回収率と標準偏差は87.4 %~106.5 %と3.5 %~10.8 %であり、下痢性貝毒の機器分析法に求められる性能基準 (70 %~120 %、15 %以下) を満たすことが確認された。

4.2 外部精度管理のパイロットスタディ

検査試料の安定性を評価するために、参加機関における比較試料の分析期間の前後に、

茨城大学において検査試料を分析した。その結果を統計解析した結果、安定性に関する (標準) 不確かさ (各濃度に対する相対標準偏差) はOAが3.1 %、DTX1が8.4 %と算出された。

パイロットスタディでは、異なる試料瓶を用いることにより、独立した3回の分析を行うことを参加機関に求めた。参加機関の報告値 (平均値、外れ値を除外) の室間再現相対標準偏差 (室間精度) は、OA:23 %、DTX1:27 %であり、参加機関間の分析値のばらつきは良好であった。

さらに、参加機関の結果の中央値を付与値としてzスコアを算出し、各機関の技能を評価した。その結果、29機関参加機関のうち3機関の結果が、“不満足”と評価された。パイロットスタディにおける付与値の妥当性を評価するため、4.1に記載した分析法にさらに標準添加法を組み合わせる方法により、検査試料を分析した。その結果、得られた分析結果は、検査試料の調製値 (原料として使用中腸線認証標準物質中の OA 及び DTX1 の認証値と、検査試料に対する質量分率から算出) と良好に一致した。一方、付与値とその技能評価標準偏差は、標準添加法による分析結果よりも低かった。参加機関の分析値は、前処理過程における分析対象物質の回収率が考慮されていないことが原因であると考えられたが、今後より詳細な検討が必要である。

5 大竹研究分担

スプレードライヤ法によって玄米に噴霧した農薬の回収率について、再現性を確認することを目的として、分析を行った。具体的には、食品薬品安全センター秦野研究所が調製し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し、検討条件は昨年度と同じである)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、これまでのデータを基に、調製時の回収率は45~75%程度と予想された(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、41.1%~69.4%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概ね一致していたことが示され、本研究の分析法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。また、噴霧温度の各条件の分析結果を比較してみると、添加濃度に対する回収率は80°Cでもっとも高く、58%から69%であった。農薬別に見てみると、どの噴霧温度でもダイアジノンの回収率が一番低く、フェニトロチオンが一番高かった(クロルピリホスとマラチオンは同程度であった)。どの農薬でも、120°Cでの回収率をもっとも低くなったのは昨年度と同じ傾向であったが、80°Cと100°Cは傾向が異なっていた。噴霧温度を確定させるためには、今後、さらなる検討が必要だと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 千葉雄介・金井美樹・藤原 茜・高瀬冴子・荒島麻実・土井りえ・島田慎一・石井里枝: E. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定, 日食微誌, 39(4), 132-140(2022)

2) T. Yarita, S. Inagaki, Characterization of diarrhetic shellfish toxins in the *Mizuhopecten yessoensis* (Scallop) midgut gland by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), Analytical Letters, Taylor & Francis, 56, 531-540, 2023.

2. 学会発表

1) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂: 精度管理用試料を利用した特定原材料(小麦)の測定阻害評価と改良抽出法についての検討: 日本食品化学学会 第28回総会・学術大会, (東京), 2022.

2) 鎗田孝, 上原由理香, 鳥居塚南, 渡辺卓穂, 下痢性貝毒検査に関する試験所間比較試験のためのホタテガイ試料の調製と評価, 日本食品化学学会 第28回総会・学術大会(東京), 2022.

3) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂: 特定原材料(小麦)の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製: AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第25回年次大会, (東京), 2022.

4) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、

若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：特定原材料(小麦)の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製：第59回全国衛生化学技術協議会年会，(神奈川)，2022.

5) 鳥居塚南，上原由理香，渡辺卓穂，鎗田孝，下痢性貝毒の機器分析法における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討，日本食品衛生学会第118回学術講演会(長崎)，2022.

6) 中村圭介，大竹貴光，羽成修康：玄米中の有機りん系農薬，ピレスロイド系農薬，及びジチオラン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118回学術講演会，(長崎)，2022.

7) 大竹貴光，青柳嘉枝，鎗田孝：凍結粉碎した穀類試料中の冷凍条件における農薬の安定性評価、第45回日本農薬学会農薬残留分析研究会，(香川)(ハイブリッド開催)，2022.

8) J. Takebayashi, N. Takasaka, I. Suzuki, T. Nakasaka, Y. Kumai, N. Hirabayashi, T. Chiba, T. Watanabe: Current state and issues of laboratory nutrition analysis for nutrition labeling in Japan: an assessment of performance data from proficiency testing schemes in 2017-2021: 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo JAPAN, (Tokyo) 2022.

9) 細谷まい、内田華那、伊藤里恵、若栗忍、渡辺卓穂、穉山浩：外部精度管理調査研究のための卵タンパク質のアレルギー物質を含む実試料調製及び均一性試験：日本薬学会第143年会、(北海道)2023.

10) 内田華那、細谷まい、伊藤里恵、若栗忍、渡辺卓穂、穉山浩：外部精度管理調査研究のための乳タンパク質のアレルギー物質

を含む実試料調製及び均一性試験：日本薬学会第143年会、(北海道)2023.

F. 知的所有権の取得状況

なし

令和4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
	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

玄米粉を用いた残留農薬検査用試料作製においては、一昨年度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。昨年度は、さらに水の量を増やし20%アセトニトリル溶液で入り口温度が80℃のとき、いずれの農薬も回収率は50%～70%と良好であった。そこで、今年度は、20%アセトニトリル溶液で再現性を検討した。作製された試料は、課題5に供与し、IDMSにより精度の高い測定により、分析値を供与した。その結果、昨年度の結果と比較するといずれの農薬でも、噴霧温度120℃で回収率が最も低かったのは同様の傾向であったが、噴霧温度が100℃と80℃でその傾向は異なった。しかしながら、いずれの農薬でも噴霧温度が80℃のとき、回収率が最も高かった。この条件で次回作製し、パイロットスタディに供する予定である。

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、重金属検査用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。昨年度は 20%アセトニトリル溶液を用い、噴霧温度 80℃でいずれの農薬でも回収率が良好であった。そこで、今年度は、同一の玄米粉を用い、同一条件で再現性の検討を行った。

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碎した）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、富士フィルム和光純薬）、トルエン（富士フィルム和光純薬）、ヘキサン（残留農薬用、富士フィルム和光純薬）、アセトン（残留農薬用、富士フィルム和光純薬）および水（HPLC 用、富士フィルム和光純薬）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/NH₂ 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/NH₂ 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/NH₂ 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ホモキサーで攪拌し、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、得られた玄米粉は課題5でIDMSを用いて高度化した一斉試験法により正確な分析値を付与した。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

スプレードライヤによる玄米粉試料作製の再現性

残留農薬検査用技能試験試料の作製について検討した。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。

用いた溶媒はアセトニトリルであり、いずれの農薬も溶解した。これまでアセトニトリル溶液として 100%から水を添加し 80%、40%及び 20%溶液として検討した。アセトニトリルの比率が多いと、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、アセトニトリル濃度が高いと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、回収率の改善のために水を添加し、回収率を比較した結果、水の比率を高くすることで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)は回収率が改善された。すなわち、20%アセトニトリル溶液を用いた場合、4種農薬の回収率は最も高かった(課題5の結果より)。また、噴霧温度は 120℃の時、いずれの農薬も回収率は最も低かった。これは、噴霧温度が高いと農薬が気化し、回収率を下げていると考えられた。4種農薬の中で最も沸点の低いダイアジノンの回収率がもっとも低かった。今回の再現性の試験においても同様の傾向が認められた。噴霧温度を下げることで回収率

は改善した。今回の再現性試験は前回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℃、100℃、80℃で検討した。回収率が最も高かったのはフェニトロチオンであり、この結果は課題5で示してある。前回は、クロルピリホスが最も回収率が高かった。この結果が逆転したのは、運転条件の出口温度影響している可能性が考えられた。また、粉体の平均粒子径にも差が認められた。すなわち、前回作製したときは平均粒子径が250～280 μm であったのに対し今回は粒子径が約200 μm と小さかった。また、残留溶媒（%）も今回は前回に比べ低かったためこれらが再現性に影響した可能性は否定できない（図3、図4）。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5には今回作製した噴霧温度の違いによる顕微鏡写真を示す。いずれの顕微鏡写真も同様の粒子形状であり不定形であった。次に、図6～8に前回の測定と今回の測定による噴霧温度の違いによる粒度分布の比較を示す。平均粒子径は今回（2022年7月測定）の方が小さいことが確認された。特に、80℃の時、前回（2021年7月測定）は二峰性の分布を示したのに対して、今回は平均粒子径が約200 μm で50 μm から400 μm まで分布

していた。

以上より、今回の条件が適正であると考えられるが、スプレードライヤ条件が同じであっても若干の条件の際が認められ、それが粒子径や回収率に影響を与えていることが分かった。ただし、詳細については検討する余地があるが、玄米粉を基材として用い、20%アセトニトリル溶液で懸濁させた場合、これら4種の農薬に対しては本条件が最適であると考えられた。今後は本条件でのさらなる検討が必要であると思われるが、作製された本残留農薬用試料の安定性を確認し、さらにこれを用いたパイロットスタディを実施する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

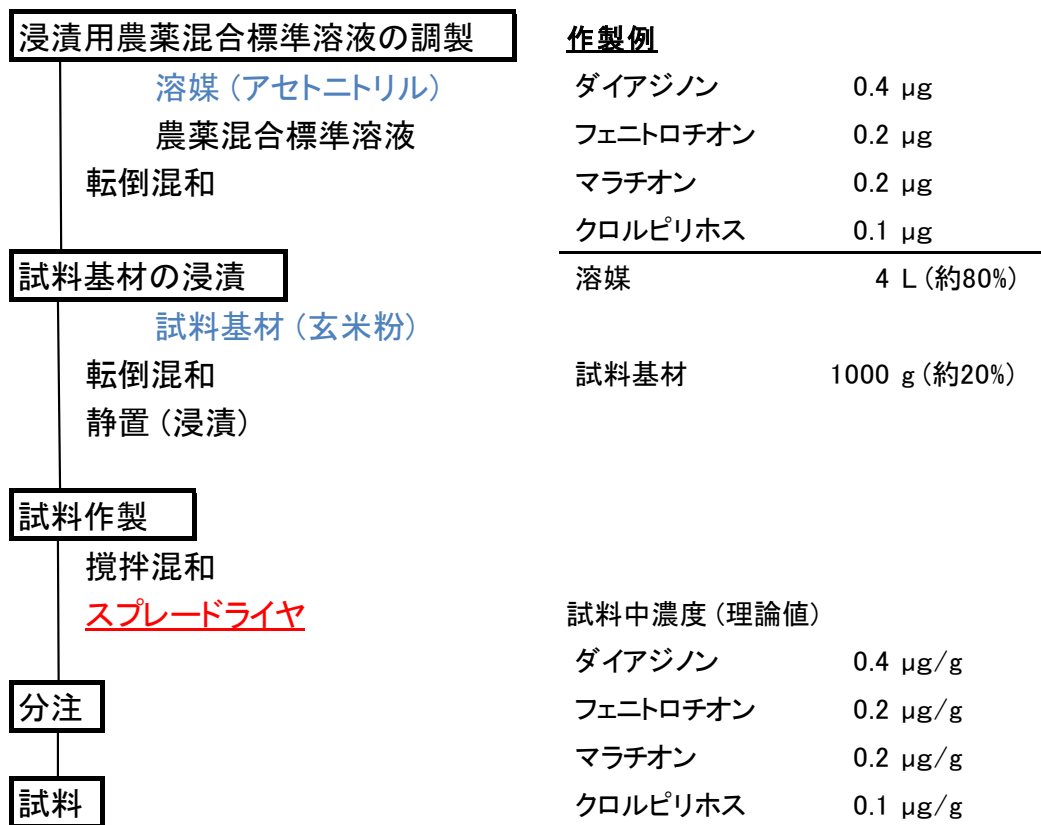


図1 スプレードライヤによる技能試験用残留農薬検査試料作製スキーム

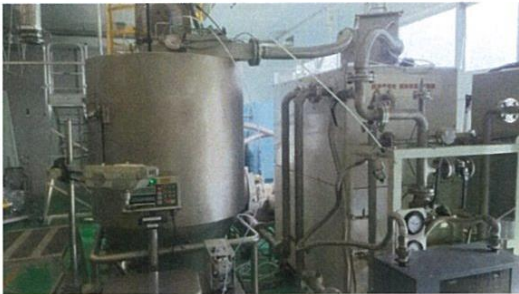


図2 窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iの外観

機種名:CL-8i

実施日:2021年7月28日

Lot No.		1	2	3	4	5
原液条件	原液名 -	米粉懸濁液	←	←		
	固形分濃度 [%]	16.5	←	←		
	液比重 -	1.03	←	←		
	見掛粘度 [mPa·s]	-	-	-		
	溶媒名 -	アセトニル+H ₂ O	←	←		
	液色 -	薄茶	←	←		
	一次粒子径 [μ m]	≒10~500	←	←		
	液温度 [°C]	常温	←	←		
使用液量 [kg]	1.86	1.71	1.02			
運転条件	ディスク型式 -	MC-50	←	←		
	回転数 [rpm]	20,000	←	←		
	原液処理量 [kg/h]	2.5	2.3	2.0		
	入口温度 [°C]	120	100	80		
	出口温度 [°C]	65	43	35		
	サイクロン差圧 [kPa]	0.50	0.32	0.35		
	凝縮器出口温度 [°C]	3.1	10.2	10.0		
製品	平均粒子径 [μ m]	258	252	279		
	粒子形状 -	不定	←	←		
	残留溶媒 [%]	11.3	19.3	24.0		
	嵩密度 [g/ml]	0.56	0.48	0.56		
	サイクロン回収量 [g]	379.78	321.52	162.16		
※ ←記号は同左を示す。-記号は測定不能または測定不要を示す。						
測定条件	固形分濃度	乾燥減量 恒温槽 105°C/3h				
	残留溶媒	乾燥減量 恒温槽 105°C/2h				
	液比重	容積重量法				
	見掛粘度	未測定 ローター: / rpm				
	製品粒子径	レーザー粒度分布測定				
製品嵩密度	100ml すり切り容器 (Non tap)					
備考	<ul style="list-style-type: none"> ・原液の分析結果は原液の沈降性が激しいため参考値とする。 ・比較用として持参されたサンプルは、形状確認と粒度分布測定を実施した。 					

図3 スプレードライヤ条件 (2021年7月測定)

機種名 : CL-8i

実施日 : 2022年7月13日

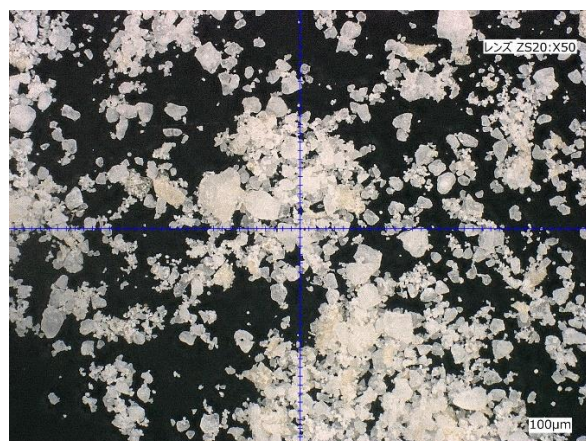
Lot No.		1	2	3	4	5
原液条件	原液名 -	米粉懸濁液	←	←		
	固形分濃度 [%]	①14.1②13.3	←	←		
	液比重 -	1.04	←	←		
	見掛粘度 [mPa·s]	-	-	-		
	溶媒名 -	アセトニトリル+H ₂ O	←	←		
	液色 -	薄茶	←	←		
	一次粒子径 [μ m]	≒10~500	←	←		
	液温度 [°C]	常温	←	←		
使用液量 [kg]	1.15	1.52	2.02			
運転条件	ディスク型式 -	MC-50	←	←		
	回転数 [rpm]	20,000	←	←		
	原液処理量 [kg/h]	2.3	←	2.2		
	入口温度 [°C]	120	100	80		
	出口温度 [°C]	66	57	44		
	サイクロン差圧 [kPa]	0.55	0.54	←		
	凝縮器出口温度 [°C]	16	17	16		
製品	平均粒子径 [μ m]	186	213	195		
	粒子形状 -	不定	←	←		
	残留溶媒 [%]	10.0	10.3	14.2		
	嵩密度 [g/ml]	0.51	0.53	0.50		
	サイクロン回収量 [g]	173.83	273.54	466.63		

※ ←記号は同左を示す。-記号は測定不能または測定不要を示す。

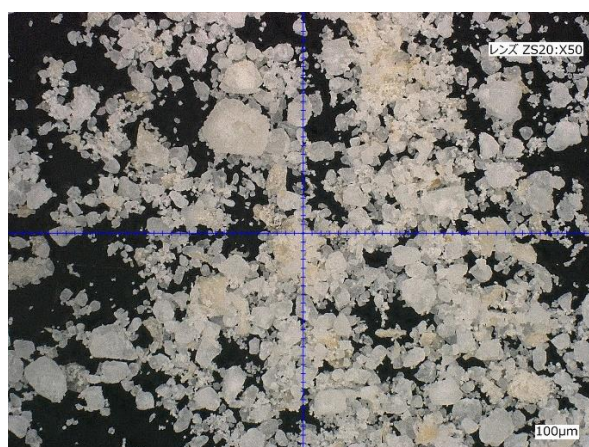
測定条件	固形分濃度	乾燥減量 恒温槽 105°C/3h
	残留溶媒	乾燥減量 恒温槽 105°C/2h
	液比重	容積重量法
	見掛粘度	未測定 ローター: / rpm
	製品粒子径	レーザー粒度分布測定
製品嵩密度	100ml すり切り容器 (Non tap)	

備考	・送液は天井部高さより行い、原液は羽根攪拌を実施した。
	・原液の分析結果は原液の沈降性が激しいため参考値とする。
	・比較用として持参されたサンプルは、形状確認と粒度分布測定を実施した。

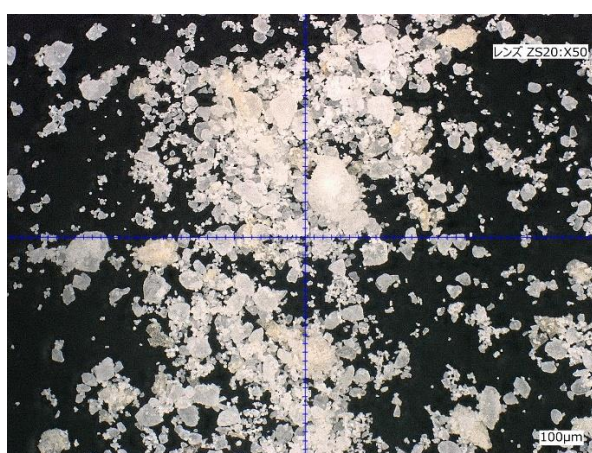
図4 スプレードライヤ条件 (2022年7月測定)



120°C



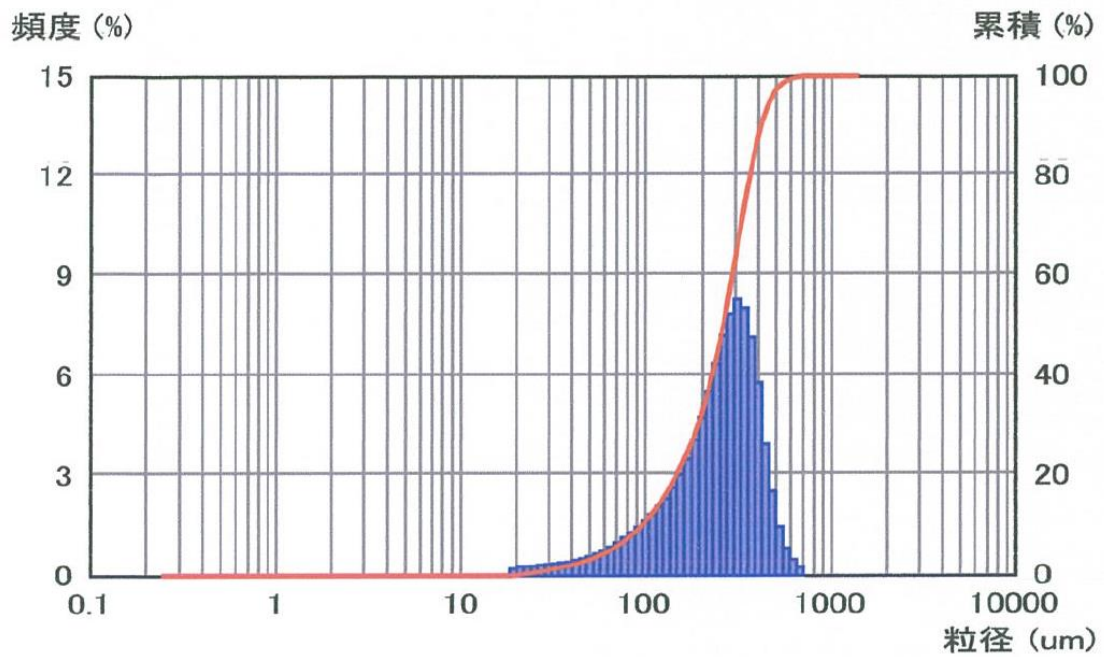
100°C



80°C

図5 噴霧温度の違いによる粒子の顕微鏡写真の比較

2021年7月測定



2022年7月測定

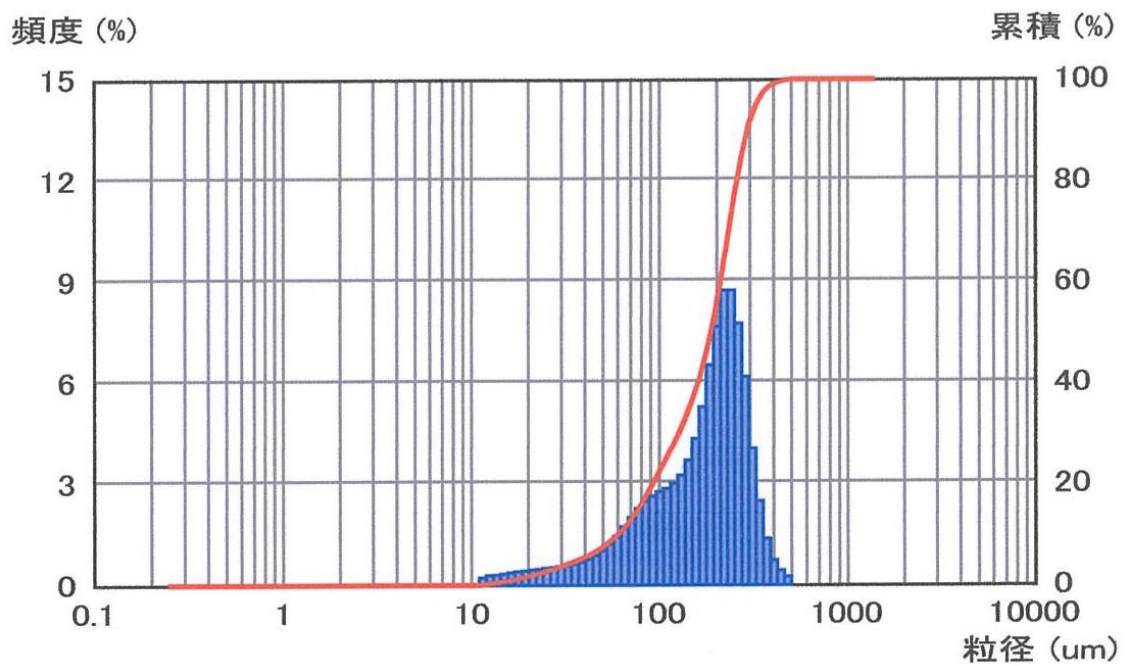
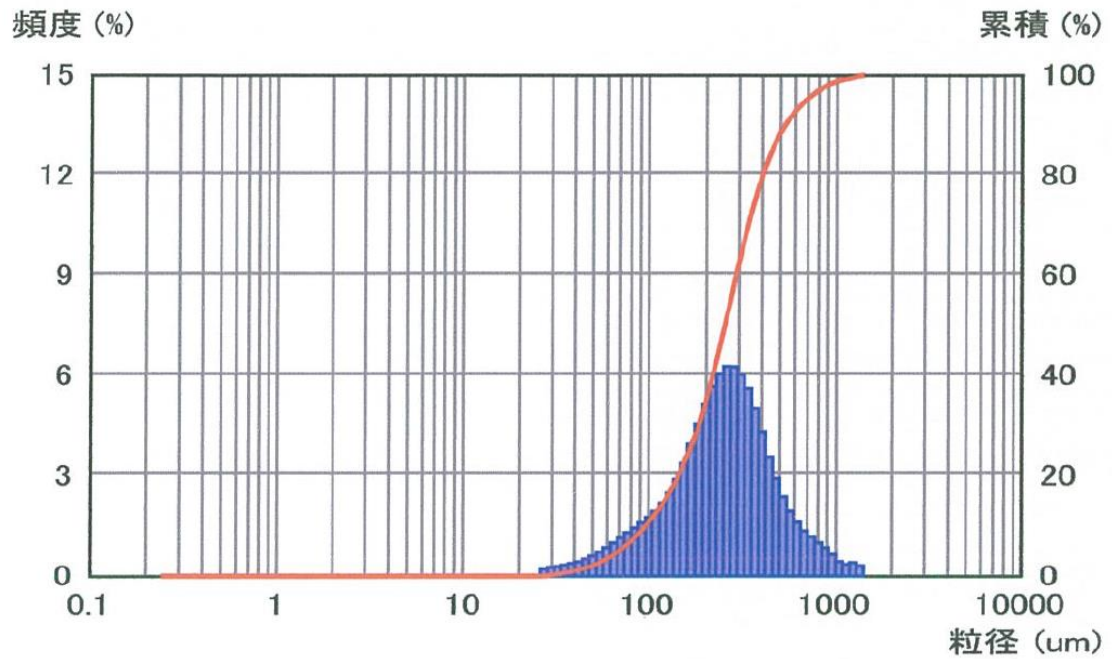


図6 120°Cで噴霧したときの粒度分布の比較

2021年7月測定



2022年7月測定

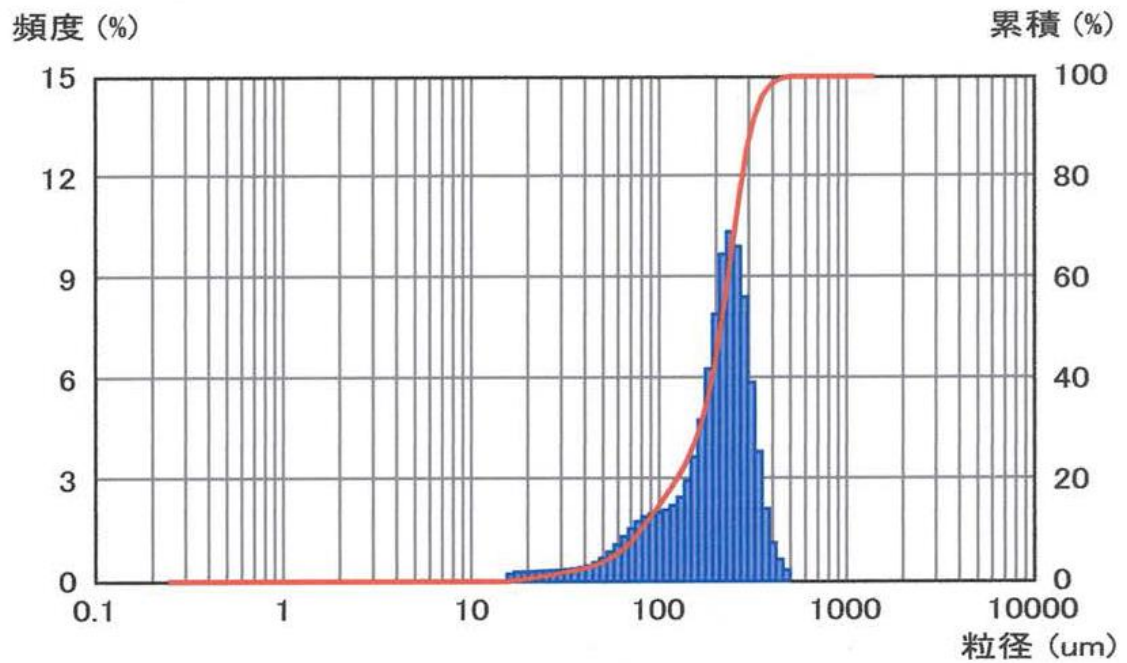
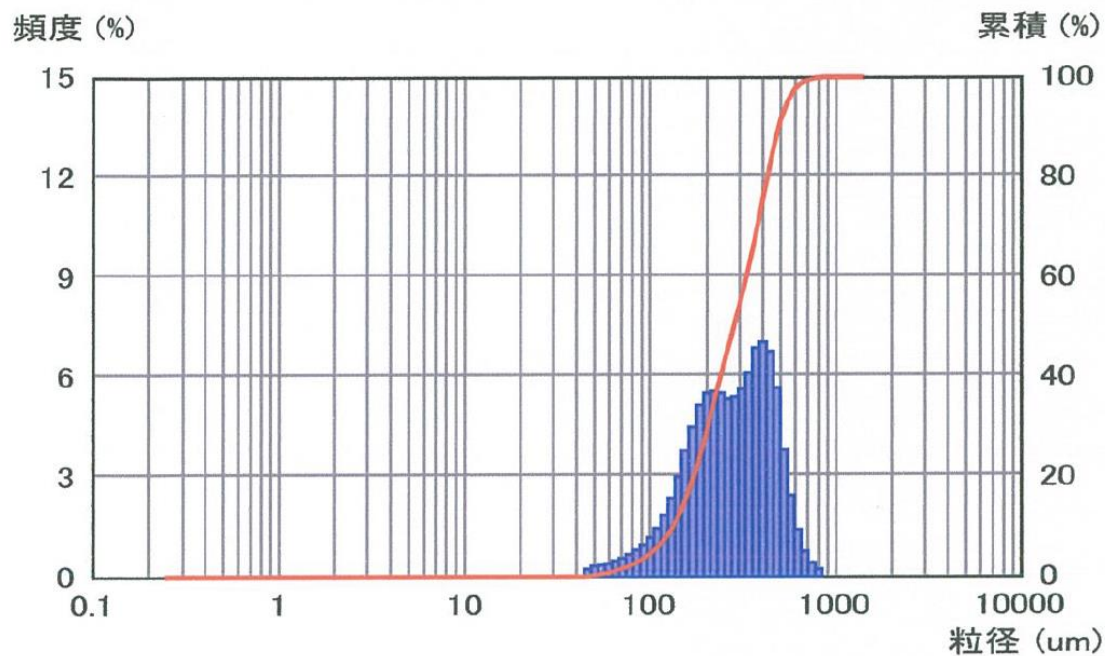


図7 100°Cで噴霧したときの粒度分布の比較

2021年7月測定



2022年7月測定

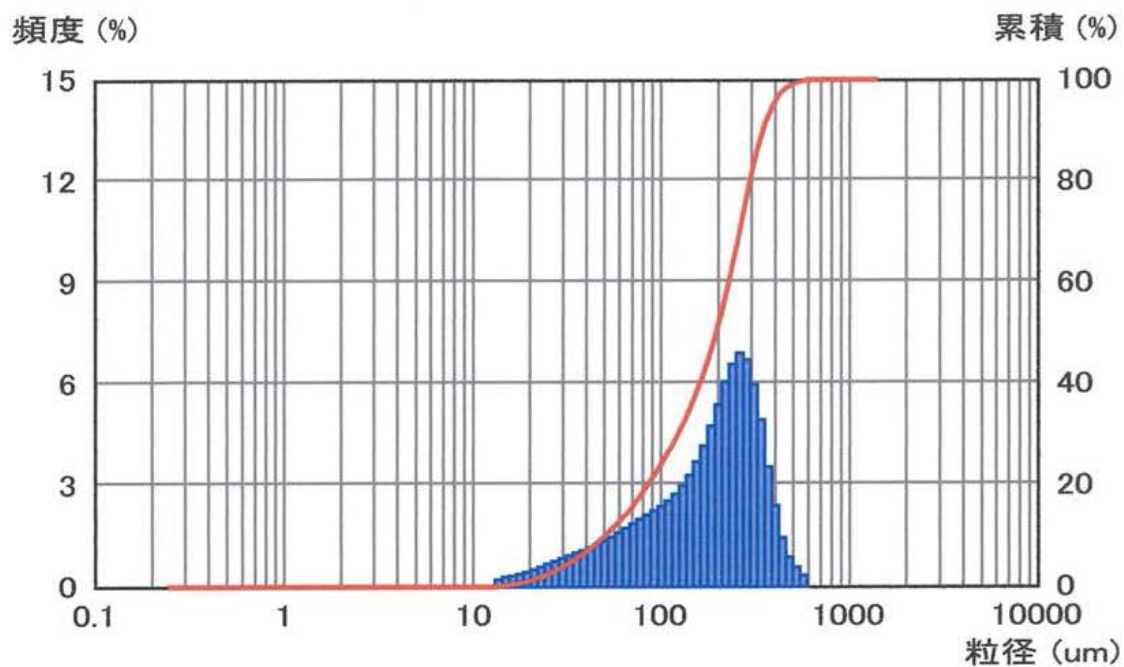


図7 80℃で噴霧したときの粒度分布の比較

令和4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
	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。令和2年度より「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た。今年度は、食品衛生法において一般規格とな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ポリマーの溶解に用いる有機溶媒の選定、ポリマー含量別のシート状試料作製及び作製容器について検討した。その結果、試料基材にはABSペレット及びAS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ABSペレットにはジクロロメタン、ASペレットにはクロロホルムを用いてシート状の試料作製を行った。作製容器の検討としては、ガラス製グラタン皿、テフロンコーティングバット及びステンレス製バットを用いた。添加に用いる標準品は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目的となるポリマー含量（5、10、20w/w）に相当する容量の溶解溶媒に、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、ポリマーを十分に溶解した（ポリマー溶液）。これを作製容器に流し入れた後、溶解溶媒を揮発させ、シート状の試料を得た。ポリマー溶液については、ポリマーの溶解性を、また、シート状試料については成形性について目視観察した。これらの溶解溶媒残存率については、重量分析を行った。いずれのポリマーもポリマー含量5w/wは揮発させる溶媒量が多く成形に時間を要すること、更に調査試料としての配付量を確保するためにはシート状試

料作製容器に分注する量が多くなること、また 20w/w%はポリマーの溶解に時間を要する上に溶媒が揮発しにくいことなどから、10w/w%が最も良好であると考えられた。ポリマー含量別シート状試料作製後の溶解溶媒残存率は、自然乾燥下、作製約 2 週間後で ABS シート状試料は約 0.2~0.6w/w%、AS シート状試料では約 1.6~5.7w/w%となり、ポリマー間で残存率に差がみられた。これらについて更に減圧乾燥を行った結果、ABS シート状試料はいずれのポリマー含量も 0.1w/w%未満、AS シート状試料は約 0.9~4.1w/w%となり、いずれも最大約 1w/w%減少した。乾燥条件を問わず、ポリマー含量が高い方が溶解溶媒の残存率が高かった。また、ABS シート状試料に比べて AS シート状試料の方が溶解溶媒の残存率が高くなる傾向がみられたが、これは、用いた溶媒の沸点がジクロロメタン 39.6°C 及びクロロホルム 61.2°C であることから、これら溶解溶媒の特性の違いが要因の 1 つとして考えられた。ABS シート状試料は残留溶媒量の目標値である 0.2w/w%以下の基準を満たしたが、AS シート状試料はいずれのポリマー含量も満たすことが出来なかったため、今後更なる検討が必要と考えられた。作製容器の検討では、溶解溶媒残存率において 3 種の作製容器間で差は認められなかった。いずれのシート状試料においても、ガラス製グラタン皿を用いた場合は、シート状試料を取り出す際に周囲に切り込みを入れる必要があったが、テフロンコーティングバットの場合は自然乾燥の過程で作製容器からシート状試料が自然に剥がれたこと、ならびにステンレス製バットを用いた場合も同様に作製容器から容易に取り出せたことから、作製容器は、テフロンコーティングバットあるいはステンレス製バットの方が適していると考えられた。以上より、今後は、ポリマー含量は 10w/w%、作製に用いる容器はテフロンコーティングバットあるいはステンレス製バットとし、溶解溶媒の自然乾燥後は、室温あるいは加温下で減圧乾燥することによりシート状試料を作製し、これらのカドミウム及び鉛の均質性及び安定性の確認試験の実施、更に AS シート試料については残留溶媒量の低減化の検討が必要である。

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、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。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と判断

し、新たな合成樹脂ペレット（以下、ポリマー）とポリマーの溶解に用いる有機溶媒（以下、溶解溶媒）の選定、ポリマー含量別のシート状試料作製及び作製容器の検討を行った。

B. 方法

1. 試料基材、器材、試薬及び標準品

試料基材に、ABS ペレットとしてデンカABS（電気化学工業）及びAS ペレットとしてSTYLAC™-AS（旭化成ケミカルズ）を用いた。

器材として作製容器に、ガラス製グラタン皿（IWAKI、以下、ガラス皿）、テフロンコーティングバット（オオモリ、以下、テフロンバット）及びステンレス製バット（アズワン、以下、ステンレスバット）を用いた。同じく器材としてシート状の試料作製に、ろ紙（No.2、ADVANTEC）及びセラミックガラス板（アズワン）を用いた。

試料基材の溶解溶媒に、ジクロロメタン（試薬特級、富士フイルム和光純薬）及びクロロホルム（試薬特級、富士フイルム和光純薬）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）及びタニタ製デジタルクッキングスケール（KD-321）を

用いた。また、溶解溶媒残存率の検討において、東京理化工機製真空定温乾燥機（VOS-310C）を用いた。

3. 作製条件の検討

1) 各ポリマーに対する溶解溶媒の選定

令和2年度の本研究報告における検討結果から、各ポリマーの溶解溶媒を選定した。

2) ポリマー溶液調製（ポリマー含量）の検討

ABSペレット及びASペレットについて、B. 3. 1) より選択した溶解溶媒を用い、ポリマー質量に対する溶解溶媒量を検討した。

全体質量に対するポリマー質量の割合として、5、10、20w/w%となるよう混合して、溶解性及びシート状試料の成形性について目視観察した。

作製用容器への分注量は、いずれのポリマー質量の割合の場合も、ポリマー含量25 gとなるよう、500、250、125 gとした。

3) 各ポリマー含量における溶解溶媒残存率の検討

シート状試料作製後は自然乾燥（室温）、恒量（秤量前後の質量差0.1w/w%以下）と判断した以降はデシケーター（シリカゲル）及び真空定温乾燥器を用いて乾燥した。乾燥中、経時的にシート状試料の質量を秤量し、溶解溶媒残存率について検討した。

4) 作製容器の検討

ABSペレット及びASペレットについて、B. 3. 2) より選択したポリマー含量及びポリマー溶液分注量をもとにシート状試

料を作製し、成形性について目視観察、ならびに溶解溶媒の残存率について検討した。なお、作製用容器はステンレスバット及びテフロンバットを用いた。

4. 調査試料の作製

作製法の概略を図1に示す。試料基材のポリマー質量に対して目的となる容量の溶解溶媒をとり、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、溶解して均質なポリマー溶液を調製した。ポリマー溶液を作製容器に分注し、自然乾燥により溶解溶媒を揮発させ、シート状の調査試料を作製した（理論作製濃度 50 µg/g）。

（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。有機溶媒を取扱う際は、ドラフト内等、局所排気装置を使用し、保護具を着用して極力暴露に留意して行った。

C. D. 研究結果及び考察

1. 作製条件の検討

1) 各ポリマーに対する溶解溶媒の選定

令和2年度の研究報告からABSペレット及びASペレットの結果を抜粋したものを表1に示す。

シート状の成形を試みた結果、揮発に時間を要する等、揮発不良の有機溶媒の組み合わせでは、成形後の状態が表面の不均質（気泡やうろこ状模様）やシートの反り等の成形不良となるものが多かつ

た。シート状に成形後の状態が不良であると揮発も不良となる結果が約半数あったが、成形が不良であっても揮発が良好となる結果も多くみられた。操作性や安全性を踏まえ、室温下で溶解する溶媒を選定することが適切であると考え、より有害性が低い溶解溶媒であっても溶媒に加温を必要とするものを除外し、揮発性や成形性が良好であった溶解溶媒として、健康影響及び環境への有害性を十分考慮しつつ、ABSペレットにはジクロロメタンを、また、ASペレットにはクロロホルムを用いて調査試料作製検討を行った。

2) ポリマー溶液調製（ポリマー含量）の検討

結果及び概要を表2、3に示す。まず、溶解溶媒に対してポリマー質量の割合が5、10、20w/w%となるポリマー溶液を調製した後、ガラス皿に分注し、ろ紙及びセラミックガラス板で蓋をし、自然乾燥による溶媒揮発後のシート状成形の状態を目視観察した。いずれのポリマー含量でも、成形後のシート状試料の質量が約25 gとなるようにポリマー溶液を作製容器に流し込んだ。その結果、いずれのポリマーも5w/w%は揮発させる溶媒量が多く成形に時間を要すること、更に調査試料としての配付量を確保するためにはシート状試料作製容器に分注する量が多くなること、また20w/w%はポリマーの溶解に時間を要する上に溶媒が揮発しにくいことなどから、10w/w%が最も良好であると考えられた。

3) 各ポリマー含量における溶解溶媒残存率の検討

自然乾燥下におけるシート状試料の質

量変化の結果を図2に示す。作製後約1週間の溶解溶媒残存率はABSシート状試料では、ポリマー含量5、10、20w/w%についてそれぞれ約0.6、0.9および1.6w/w%であった。一方、ASシート状試料では、ポリマー含量5、10、20w/w%で約27.9、4.7および10.3w/w%となり、ポリマー間で残存率に差がみられた。作製後約2週間でABSシート状試料では、ポリマー含量5、10、20w/w%で約0.2、0.4および0.6w/w%であった。一方、ASシート状試料では、ポリマー含量5、10、20w/w%で約1.6、2.9および5.7w/w%となり、その1週間経過後においても、質量の変化はみられなかった（秤量前後の質量差0.1w/w%以下）ことから恒量と判断し、以降の溶解溶媒残存率の検討は作製容器からシート状試料を取り出し、デシケータ（シリカゲル）中、更に減圧下（常温）の真空定温乾燥器で行うこととした。

デシケータ（シリカゲル）及び真空定温乾燥器におけるシート状試料の質量変化の結果を図3に示す。1回につき3時間の減圧乾燥を計3回行った結果、ABSシート状試料はいずれのポリマー含量も0.1w/w%未滿、ASシート状試料の残存率は、ポリマー含量5、10、20w/w%で約0.9、1.7%および4.1w/w%となり、いずれのポリマーも減圧乾燥前に比べて最大約1w/w%減少した。

乾燥条件を問わず、ポリマー含量が高い方が溶解溶媒の残存率が高かった。また、ABSシート状試料に比べてASシート状試料の方が溶解溶媒の残存率が高くなる傾向がみられたが、これは、用いた溶媒の沸点がジクロロメタン39.6°C及びクロロホルム61.2°Cであることから、これら

溶解溶媒の特性の違いが要因の1つとして考えられた。

残留溶媒の限度値としては、食品・食品添加物等規格基準では、ポリスチレン中の揮発性物質（スチレン、トルエン、エチルベンゼン、イソプロピルベンゼン及びプロピルベンゼンの合計）として、5 mg/g以下、また発泡ポリスチレン（熱湯を用いるものに限る）では、2 mg/g以下とされている。一方、第十八改正日本薬局方の一般試験法、残留溶媒の項において、ジクロロメタン及びクロロホルムは「クラス2の溶媒」（医薬品中の残留量を規制すべき溶媒）に分類され、その残留濃度限度値はそれぞれ、ジクロロメタンは600 ppm及びクロロホルムは60 ppmとなっている。しかし、本試料は口から摂取するものではないことや、毒性及び環境への有害性を考慮して、2000 ppm（0.2w/w%）以下であることを目標とした。この目標値に対し、ABSシート試料中のジクロロメタンは目標の基準を満たしたが、ASシート試料中のクロロホルムはいずれのポリマー含量でも基準を満たさなかった。今後は、GCによる残留溶媒の定量及び加温による減圧乾燥等、更に残留溶媒量を低減する検討が必要である。

4) 作製容器の検討

ABSペレット及びASペレットについて、C.D. 1. 2) よりポリマー含量10w/w%、作製容器にテフロンバット及びステンレスバットを用いて検討を行った。その結果を図4に示す。溶解溶媒残存率は作製後約1週間でテフロンバットは、ABSシート状試料では約1.1w/w%、ASシート状試料では約4.6w/w%、ステンレスバットは、ABSシ

シート状試料では約1.6w/w%、ASシート状試料では約24.2w/w%であった。また、作製後約2週間でテフロンバットは、ABSシート状試料では約0.9w/w%、ASシート状試料では約3.3w/w%、ステンレスバットは、ABSシート状試料では約0.9w/w%、ASシート状試料では約3.9w/w%であったことから、作製後約1週間の時点ではテフロンバットを用いることで効率的に溶解溶媒を揮発できると考えられたが、作製後約2週間の時点では2種の容器間で差はみられなかった。また、ガラス皿を用いて作製した同ポリマー含量の作製後約2週間での溶解溶媒残存率が、ABSシート状試料では約0.4w/w%、ASシート状試料では約2.9w/w%であることから3種の作製容器間において差は認められなかった。

いずれのシート状試料においても、ガラス皿を用いた場合は、シート状試料を取り出す際に周囲に切り込みを入れる必要があったが、テフロンバットの場合は自然乾燥の過程で作製容器からシート状試料が剥がれたこと、ならびにステンレスバットを用いた場合も同様に作製容器から容易に取り出せたことから、作製容器の材質は、テフロン製あるいはステンレス製の方が適していると考えられた。

E. 結論

「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「器具・容器包装」の規格として、全合成樹脂に共通して規定される材質試験におけるカドミウム及び鉛の外部精度管理調査プログラム用調査試料の作製を検討した。試料基材にABSペレット及びASペレットを、

また試料基材の溶解溶媒にジクロロメタン及びクロロホルムを用い、オイル系の標準品を添加し、作製容器にガラス皿、テフロンバット及びステンレスバットを用いてシート状試料を作製した。ポリマー含量（5、10、20w/w%）と作製容器へのポリマー溶液分注量について検討した結果、いずれのポリマーも5w/w%は揮発させる溶媒量が多く成形に時間を要すること、更に調査試料としての配付量を確保するためにはシート状試料作製容器に分注する量が多くなること、また20w/w%はポリマーの溶解に時間を要する上に溶媒が揮発しにくいことなどから、10w/w%が最も良好であると考えられた。

シート状試料のポリマー含量別の溶解溶媒残存率は、作製後約2週間の自然乾燥下でABSシート状試料が約0.2～0.6w/w%、ASシート状試料では約1.6～5.7w/w%となり、ポリマー間で残存率に差がみられた。その後、減圧乾燥（常温）を行った結果、ABSシート状試料はいずれのポリマー含量も0.1w/w%未満、ASシート状試料は約0.9～4.1w/w%となり、いずれも最大約1w/w%減少した。乾燥条件を問わず、ポリマー含量が高い方が溶解溶媒の残存率が高かった。また、ABSシート状試料に比べてASシート状試料の方が溶解溶媒の残存率が高くなる傾向がみられたが、これは、用いた溶媒の沸点がジクロロメタン39.6℃及びクロロホルム61.2℃であることから、これら溶解溶媒の特性の違いが要因の1つとして考えられた。作製容器について検討した結果、作製後約1週間の時点ではテフロンバットを用いることで効率的に溶解溶媒を揮発でき

ると考えられたが、作製後約 2 週間の時点ではテフロンバット及びステンレスバットの容器間で差はみられなかった。また、ガラス皿を用いて作製した同ポリマー含量の作製後約 2 週間での溶解溶媒残存率も同様の結果であることから 3 種の作製容器間において差は認められなかった。いずれのシート状試料においても、ガラス皿を用いた場合は、シート状試料を取り出す際に周囲に切り込みを入れる必要があったが、テフロンバットの場合は自然乾燥の過程で作製容器からシート状試料が剥がれたこと、ならびにステンレスバットを用いた場合も同様に作製容器から容易に取り出せたことから、作製容器の材質は、テフロン製あるいはステンレス製の方が適していると考えられた。

以上より、今後は、ポリマー含量は 10w/w%、作製に用いる容器はテフロンコーティングバットあるいはステンレス製バットとし、溶解溶媒の自然乾燥後は、室温あるいは加温下で減圧乾燥することによりシート状試料を作製し、これらのカドミウム及び鉛の均質性及び安定性の確認試験の実施、更に AS シート試料については残留溶媒量の低減化の検討が必要である。

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

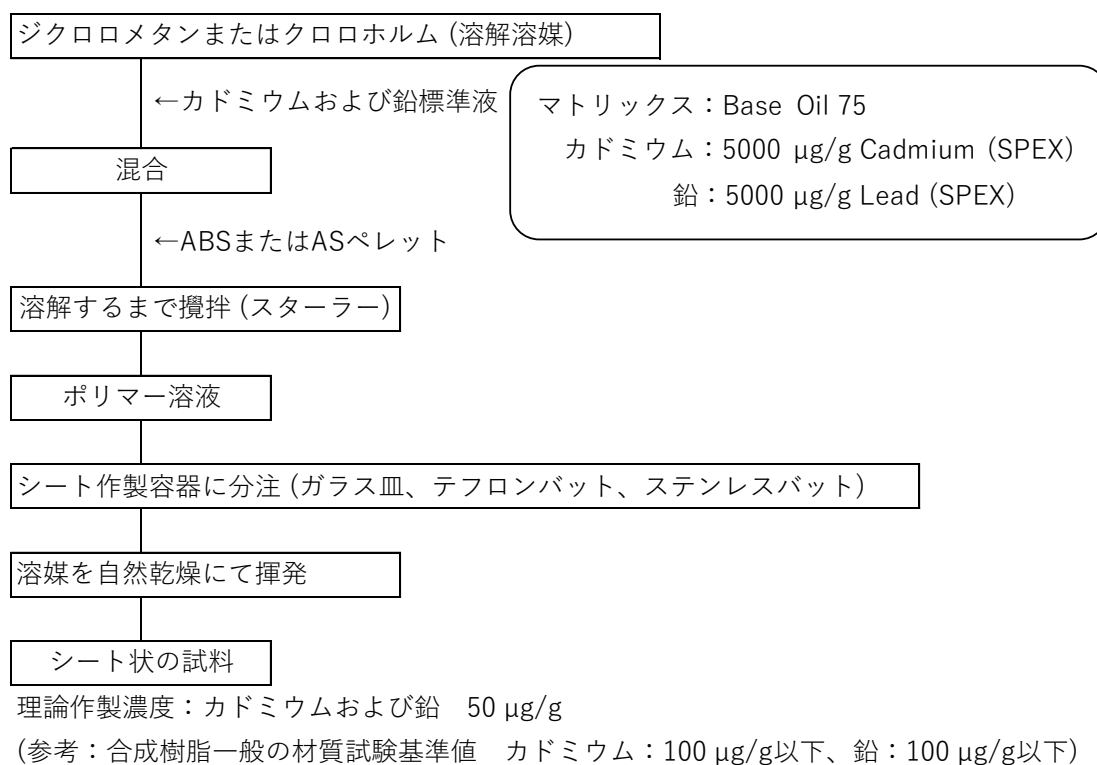


図1 シート状試料作製法概要

表1 各ポリマーにおける溶解溶媒の選定

	ABS				AS			
	室温	65°C	成形	揮発	室温	65°C	成形	揮発
ヘキサン	×	×	—	—	×	×	—	—
アセトン	○	—	不良	良好	×	○	不良	良好
テトラヒドロフラン	×	○	良好	不良	×	○	良好	不良
ジクロロメタン	○	—	良好	良好	—	—	—	—
シクロヘキサン	×	×	—	—	×	×	—	—
キシレン	×	×	—	—	×	×	—	—
酢酸ブチル	×	○	不良	良好	×	○	不良	良好
クロロホルム	○	—	不良	不良	○	—	不良	不良
トルエン	×	×	—	—	×	○	不良	不良
4-メチル-2-ペンタノン	×	○	不良	不良	×	○	不良	不良
2-ブタノン	×	○	不良	不良	×	○	不良	不良

溶媒はいずれもJIS試薬特級以上、富士フィルム和光純薬製

○：溶解、×：溶解不可、—：未実施

溶解条件：溶媒1 mLに細かく破碎したポリマー0.1 gを加え、室温および65°Cで溶解状態を観察

室温：室温静置で時々攪拌

65°C：水浴(65°C)中に浸漬し、時々攪拌

表2 各ポリマー含量によるポリマー溶液作製検討

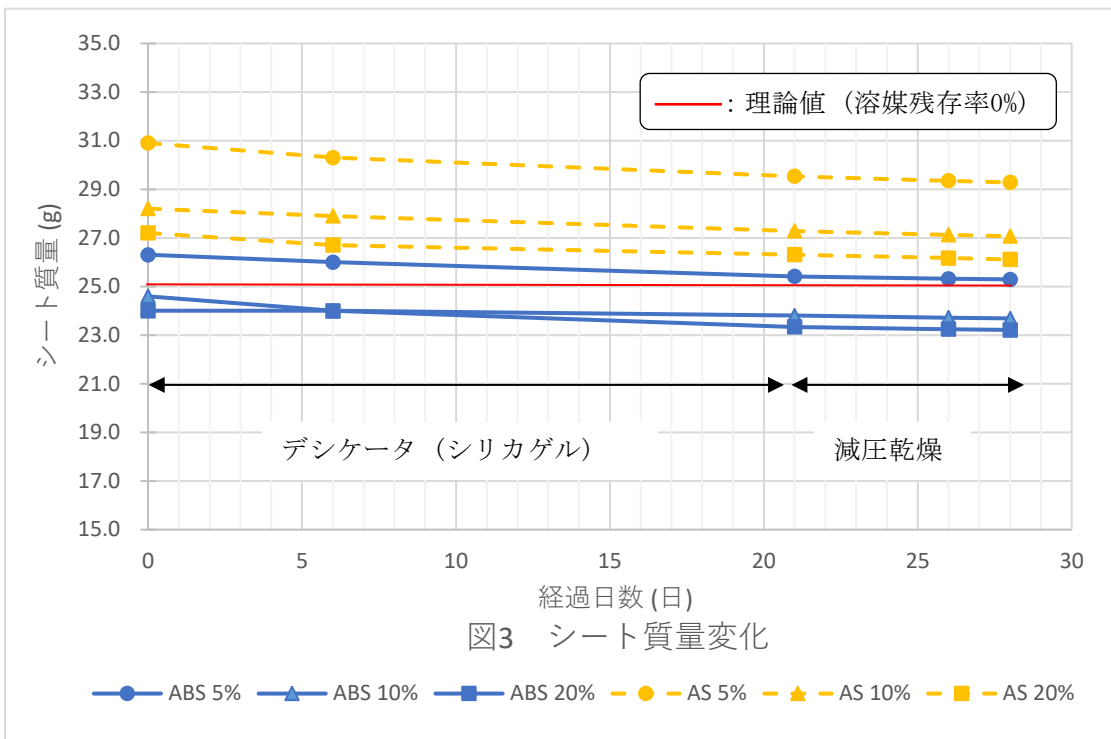
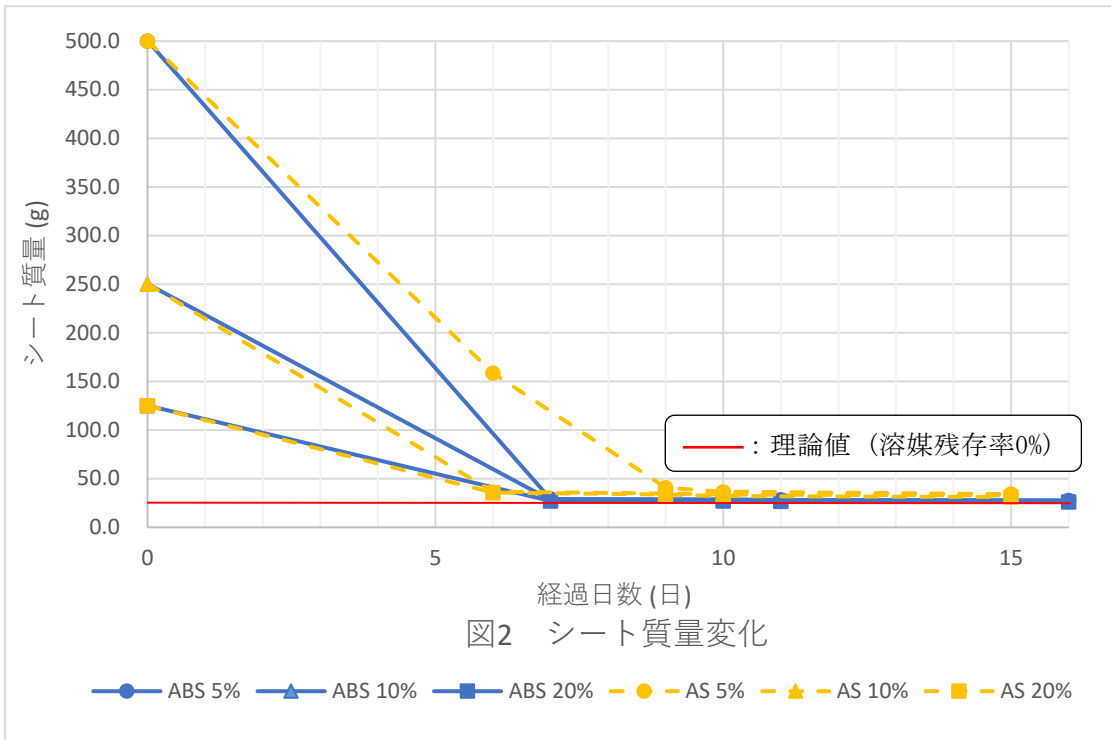
ポリマー 種類	ABS			AS		
	5	10	20	5	10	20
溶解溶媒	ジクロロメタン			クロロホルム		
溶解時間 (hr)	0.5	3.5	3.5	3	6	6.5
ポリマー溶液	<ul style="list-style-type: none"> ・すべての含量で溶解 ・色調：乳白色 			<ul style="list-style-type: none"> ・すべての含量で溶解 ・色調：無色透明 ・ABSと比較して高粘性 		

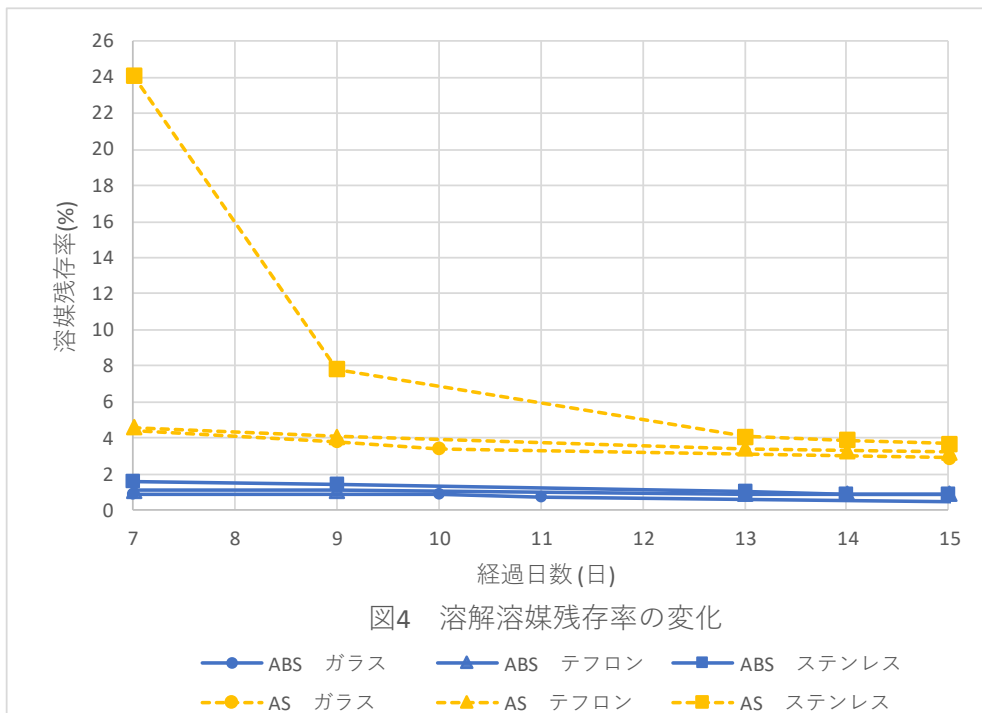
表3 シート作製容器への分注概要

ポリマー種類	ポリマー含量 (%)	溶解溶媒量 (g)	溶解	Cd、Pb溶液合計添加質量 (g)	ポリマー添加量 (g)	ポリマー溶液質量* (g)	Cd、Pb添加	分注量 (g)	1シート中ポリマー実質量 (g)
ABS	5	570	7.5	30.0	607.5	500.0	24.698		
	10	270	7.5	30.0	307.5	250.0	24.404		
	20	120	7.5	30.0	157.5	125.0	23.825		
AS	5	570	8.0	30.0	608.0	500.0	24.684		
	10	270	8.0	30.0	308.0	250.0	24.367		
	20	120	8.4	30.0	158.4	125.0	23.693		

ポリマー含量：25g

*：溶解溶媒、Cd、Pbおよびポリマーの合計実質量





令和4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
－アレルギー物質技能試験プログラムに関わる検討（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	部長
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	部長
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
研究協力者	穂山 浩	星薬科大学 薬学部 薬品分析化学研究室	教授
研究協力者	伊藤 里恵	星薬科大学 薬学部 薬品分析化学研究室	准教授
研究協力者	内田 華那	星薬科大学 薬学部 薬品分析化学研究室	
研究協力者	細谷 まい	星薬科大学 薬学部 薬品分析化学研究室	

研究要旨

食物アレルギーは特定の食物に対する生体反応であるが、その原因となる食物アレルゲンは、疫学的研究の結果、食生活の変化に対応して年々変化しており、それに伴って表示義務のある特定原材料及びそれに準ずるものについては随時見直しが行われている。

食品衛生検査施設等においてはELISA法により特定原材料のスクリーニングを行っているが、施設間差については、個々の施設で確認することは難しい。試験技能を確認するために外部精度管理調査を行う必要があるが、その際、使用する試料の品質が重要となる。

本年度のパイロットスタディでは1つの基材に2種の特定原材料を添加した試料を作製（基材：かぼちゃペースト、特定原材料：卵及び乳）し、ELISA法により外部精度管理調査研究を行った。参加機関は24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 z -スコアを算出した。また、 \bar{X} - R 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、 z -スコアの絶対値が3以上となる機関は各解析ごとに0～2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2機関認められた。 R 管理図では管理限界線を超える機関は各解析ごとに0～1機関認められた。

また、より実際の検査に近い試料を開発する目的で市販品からの incurred sample の調製を行い、作製した試料の均質性および複数施設間での再現性について確認した。

A. 研究目的

食物アレルギーは特定の食物に対する生体反応であるが、その原因となる食物アレルゲンは、疫学的研究の結果、食生活の変化に対応して年々変化していることが報告されている。この結果に合わせて新しい特定原材料及びそれに準ずるものについて追加の指定が行われる。追加指定された食物を取り扱うメーカーでは表示義務に従う必要がある。しかしながら、特に加工食品中の特定原材料の有無に関する正しい評価が行われない場合、適切な食品表示が行われないばかりでなく、消費者の健康被害を引き起こす結果ともなる。そして、国民に対する健康被害と国民への豊かな食生活の提供という2つのバランスをとるためにも、食品中の特定原材料について正確に評価すること必須である。

加工食品において表示義務のある特定原材料のスクリーニング試験としてのELISA法による定量試験及び確認試験としての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については消費者庁次長通知「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「アレルゲン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。

ELISA法で使用されるキットについては通知に準拠したものが市販されており、検査施設ではそれらのキットを用いて試験を行っているが、実際に測定した値について施設間差があるかどうかは個々の施設では確認することは難しい。

各施設における試験技能を確認するために、外部精度管理調査を行う必要があるがそこで使用する試料の品質が確保されていないと、外部精度管理自体が成立しない。したがって、外部精度管理調査のための適切な試料を確保することは非常に重要である。

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、特定原材料である卵と乳の2種類を同時に添加した試料の作製を行い、参加機関から回収したデータの解析を行った。

また、通常検査機関が取り扱う加工食品中の特定原材料はその加工過程において加熱処理等の操作がなされていること、また、より通常の検査で取り扱う試料に近づけるため、市販食品からのincurred sample作製を試みた。

B. 方法

1. 試薬及び食品

タンパク質含量は、2-D Quant Kit (Cytiva)により測定した。

パイロットスタディの試料に用いる基材は、かぼちゃペースト（新進）を使用した。

特定原材料として、卵は乾燥全卵（乾燥全卵 No. 1、キューピータマゴ）を、乳はスキムミルク（生化学用、富士フィルム和光純薬工業）を使用した。

実試料（incurred sample）のスクリーニングにはいずれも特定原材料表示のある食品から、卵検出用として24食品、乳検出用として8食品を供試し、外部精度管理調査試料を想定したincurred sample調製には、卵検出用としてコーンスロートレッシング（CoD）を、乳検出用として

クッキーを用いた。

2. ELISA法

特定原材料の検出には、通知法に準拠したELISAキットを使用した。また、通知法準拠ではないが、乳については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) 卵タンパク質検出用キット

- FASTKITエライザVer. III 卵(日本ハム) [以下、日本ハム卵キット]
- FASPEK エライザII 卵 (卵白アルブミン)(森永生科学研究所) [以下、モリナガ卵キット]
- アレルゲンアイELISA II 卵 (オボアルブミン)(プリマハム) [以下、プリマハム卵キット]

2) 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、日本ハム乳キット]
- FASPEK エライザII 牛乳(カゼイン)(森永生科学研究所) [以下、モリナガ乳キット]
- 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、プリマハム乳キット]

通知法非準拠

- 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(β LG)キット]

3) 試験操作

ELISA法は各キットの取扱説明書に従った。

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。また、検量線外のデータについては検量線から得られた4パラメーターロジスティック(4PL)の式から外挿を行った。

3. パイロットスタディ用外部精度管理調査試料の作製

1) 基材の確認

基材のかぼちゃペーストは、ELISA法により、標的タンパク質である卵および乳が検出限界(基材中0.31 $\mu\text{g/g}$)以下であることを確認した。

2) 各種添加溶液の調製

i) 添加用卵タンパク質の調製

乾燥全卵を精製水と十分懸濁し、これを添加用卵タンパク質調製液とした。

ii) 添加用乳タンパク質の調製

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 \times 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。

ii) タンパク質量の測定

作製した卵タンパク質調製液及び乳タンパク質調製液のタンパク質量は、2-D Quant Kitにより測定した。各調製液中のタンパク質量及び基材への添加量を算出した。

3) 外部精度管理調査試料の調製

基材のかぼちゃペーストに添加用卵タンパク質溶液および添加用乳タンパク質溶液をそれぞれ総タンパク質量で10.0

µg/gとなるようにを添加した。それをロボ・クーブブリクサー5プラス（エフ・エム・アイ）を用いて均質化し、試料とした。

作製した試料は小分けにした後、-20°Cで凍結保存し、これをパイロットスタディ用試料とした。また、この試料について均質性および安定性の確認を行った。

4. 市販品からの外部精度管理調査試料 (incurred sample) の調製

原材料表示において卵又は乳の表示順位の低い市販食品を入手し、粉碎、又は原体を十分均一になるよう調製した。ELISA法で標的特定原材料の含有量を測定することでスクリーニングを行った。

ELISAキットは卵検出にはモリナガ卵キット、乳検出にはモリナガ乳キットを用いた。

スクリーニング結果から卵検出用にはCoD、乳検出用にはクッキーを選択した。適当な媒体でカットオフ値である10 µg/g付近となるよう調製し、これをincurred sampleとした。卵検討用では、卵含有量を測定したCoDを卵不含のCoDで3倍希釈することで、試料中の卵濃度を調整した。乳検討用では、乳含有量を測定したクッキーに精製水を適量加えて試料中の乳濃度を調製した（クッキー：精製水=3：2）。

また、濃度調整の際、ロット間差についても検討した。卵検出系ではの卵含有CoD 3ロットと卵不含のCoD 3ロットを組み合わせて、9種類の検討用試料を作製し、ELISAの反応性について検討した。乳検出系については選択したクッキーにつ

いて12ロット入手し、これらの検討を行った。

なお、incurred sampleの検討は2施設で行った。施設1では試料のスクリーニングおよび試料作製（含量測定あり）を行い、施設2では施設1で得られた結果の再現性確認と均質性試験を行った

5. 品質評価方法

1) パイロットスタディ用試料

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、各サンプルについて $n=1$ でELISA法による卵または乳タンパク質濃度を測定した。平均値、標準偏差（SD）、相対標準偏差（RSD）を算出した後、均質性について判断した。

また、安定性は調査期間後（試料作製後4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。

パイロットスタディ用試料については均質性試験および安定性試験は「2. ELISA法」に記載の卵検出用3キット、および乳検出用4キットについて行った。また、使用したキットはすべて使用期限内であり、均質性試験と安定性試験で同ロットを使用した。

2) Incurred samples

Incurred samplesの品質評価として均質性の確認を行った。

均質性確認では各試料つき、それぞれ $n=10$ でサンプリングを行い、各サンプル

について $n=2$ でELISA法による卵または乳タンパク質濃度の測定を行った。均質性の評価はIUPACに従った¹⁾。

Incurred samplesのELISA法には卵または乳の検出にモリナガ卵キットまたはモリナガ乳キットを用いた。

6. 外部精度管理調査の実施

調査に参加した24機関へは調査試料と実施要領を宅配便（冷凍）により送付した。

測定は、通知法に従い、原則として、卵、乳ともに、日本ハムキットとモリナガキットの2種類を使用することとした。

試験操作は通知法及び各機関の標準操作手順書（SOP）に従うこと、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。報告書は試料送付後、約1か月後を期限とした。

7. 外部精度管理調査結果の解析

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」には、異なるキットを評価する場合の注意として「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。このため、参加機関から報告された値は、試料別、測定キット別にロバスト平均値を算出し、これを付与値として解析を行った。

データ解析として、1) 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）を行う、2)

Huberのproposal 2^{1,2)}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、各種統計量を算出する、3) \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う、3ステップを行った。

また、 \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。

Z -スコアはロバスト平均値およびロバストSD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。

(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. 外部精度管理調査に関わるパイロットスタディ

1) 外部精度管理調査試料の品質評価

均質性試験の結果（表1）、卵検出系では含有量が9.25~11.92 $\mu\text{g/g}$ とキット間で若干の差が認められた。

一般的に、ELISA法におけるキット間の検出感度の違いの主な原因としては抗原の違いや、基材による影響が知られてい

る。また、ロット間差も要因の一つと考えられる。しかしながら、本試験においては含有量の差は抗原の違いに起因するのか、基材に由来するのかは不明であった。

また、乳検出系では、カゼインを抗原とするモリナガ乳キットと、カゼイン、 β -ラクトグロブリンを含む複合抗原を用いている日本ハム乳キット³⁾では高値（10.63～12.43 $\mu\text{g/g}$ ）を、 β LGを抗原としているプリマハム乳キットとモリナガ（ β LG）キットでは低値（6.31～6.75 $\mu\text{g/g}$ ）を示した。したがって、この明らかな値の差は、抗原による差と考えられた。また、モリナガ乳キットは日本ハム乳キットよりも若干高い値を示したが、何に起因するのかは不明であった。

均質性の評価に関わるRSDは卵検出系では1.2～2.3%、乳検出系では2.9～3.5%と、いずれも5%以下であり、さらに、キット間、標的たんぱく質間ともに大きな差は認められなかった。したがって、いずれの系においても均質と判断した。

安定性は、均質性試験での結果を100%として算出した（表2、表3）。卵および乳検出系において安定性は、それぞれ99.7～102.3%および95.8～105.1%の範囲であり、当該試料は調査期間中、安定であったと判断した。

3) 外部精度管理調査結果（回収データの集計結果）

参加24機関（1機関は乳検出系のデータのみを提出）の報告値を特定原材料別かつ測定キット別に集計し、統計解析を行った。

結果は表4に、データ分布は図1に示した。

卵検出系、乳検出系ともに各機関の測定値から算出した平均は、どのキットにおいても均質性試験の平均値とほぼ同じ値を示した。RSDは、検出系に関わらずモリナガキットで約6.5%、日本ハムキットで約13%とキットのメーカー間で差が認められた。

4) 個別集計結果

(1) 卵検出系キット

卵検出系キットを用いて測定した23機関のデータから算出された統計量を表5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、モリナガ卵キットおよび日本ハム卵キットの結果および評価一覧を表6および表7に記載した。

a) モリナガ卵キットの解析結果

モリナガ卵キットの測定において、MCで除外された機関はなかった。全機関のロバスト平均 \pm SDは9.62 \pm 0.63 $\mu\text{g/g}$ （RSD 6.55%）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〔表6および図3 a)〕。 R 管理図では1機関が上部管理限界線を超えていた〔機関番号7、表6および図3 b)〕が、日本ハム卵キットおよび乳検出系では管理限界線内であったことから、基本操作ではなく、個別操作に問題があったと考えられる。

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〔機関番号13、表6および図5 a)〕。当該機関はモリナガ乳キットにおいても z -スコアの絶対値が3以上を示した。

b) 日本ハム卵キットの解析結果

日本ハム卵キットの測定において、MCで除外された機関はなかった。全機関のロバスト平均値 \pm SDは10.64 \pm 1.35 $\mu\text{g/g}$ （RSD 12.69%）であった。 \bar{X} 管理図では2機関が管理限界線を超えていた〔機関

番号16および機関番号18、表7および図4 a)]。両機関とも他の3キットでは \bar{X} 管理図および z -スコアともに範囲内であったことから、外れ値は個別操作に起因するものと考えられた。

R 管理図では1機関が上部管理限界線を超えていた [機関番号4、表7および図4 b)]。当該機関は報告値の1つで3ウェル間のRSDが20 %以上であった [図10 b)]。この機関は日本ハム乳キットにおいても報告値の片方で、3ウェル間のRSDが20 %を超えていた [図10 d)]。同機関は試料の調製において遠心分離およびろ過を実施していなかった。供試した試料は抽出液中で懸濁となるため、不均一な粒子が影響した可能性も考えられたが、モリナガキットにおいては卵、乳ともRSDは低かったことから、日本ハムキット特有の操作に起因することも考えられた。通知法では「ELISA法を用いて得られた測定結果において、3ウェル間のCV値（本報告書中のRSDに相当）が20 %以上を示した場合には、再度ELISA操作以降の操作を行う。」との記載があることから、RSDが規定の数値以上である場合は、正確な評価のためにも、再試験の実施も必要と考える。

日本ハム卵キットの解析において、 z -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかった [表7および図5 b)]。

(2) 乳検出系キット

乳検出系キットを用いた24機関のデータから算出された統計量を表8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、モリナガ乳キットおよび日本ハム乳キットの結果および評価一覧を表9および表10に記載した。

a) モリナガ乳キットの解析結果

モリナガ乳キットの測定において、MCで除外された機関は認められなかった。全機関のロバスト平均値 \pm SDは 12.85 ± 0.83 $\mu\text{g/g}$ (RSD 6.46 %) であった。 \bar{X} 管理図、および R 管理図で管理限界線外の機関は認められなかった (表9および図7)。

z -スコアの絶対値が3以上の機関は2機関認められた [機関番号1および機関番号13、表9および図9 a)]。機関番号1は他の3キットでは z -スコアに問題がなかったことから、外れ値は個別操作に起因するものと考えられた。機関番号13はモリナガ卵キットでも z -スコアの絶対値が3以上であったが、日本ハムキットでは、卵検出系、乳検出系ともに z -スコアに問題は認められなかった。したがって、外れ値はモリナガキットの操作過程に起因する可能性が考えられた。

b) 日本ハム乳キットの解析結果

日本ハム乳キットを用いた24機関において、MCで除外された機関は認められなかった。全機関のロバスト平均値 \pm SDは 10.81 ± 1.39 $\mu\text{g/g}$ (RSD 12.86 %) であった。 \bar{X} 管理図、 R 管理図で管理限界線外となった機関は認められなかった (表10および図8)。

また、 z -スコアの絶対値が3以上の機関も認められなかった [表10および図9 b)]。

(5) キットのロットと測定値について

本調査研究では、キットのロットは指定していないことから、各キット、複数のロットが使用された。ロットと報告値の関係については図11に示した。今回の調査研究では、モリナガキットにおいて卵、乳ともに8ロット (モリナガ卵キットではそのほかにロット不明1機関)、日本ハムキットにおいてはともに4ロットと複数のロットが

使用されていた。また、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。そして、すべてのキットにおいてロット間に顕著な差は認められなかった。

報告値の範囲は、卵、乳検出系ともに4ロット使用した日本ハムキットで8ロット使用したモリナガキットより広がった。そしてRSDが10%以上となった日本ハム卵キットでは σ スコアの外れは認められなかったが、30%を管理限界とした $Xbar$ 管理図において外れ値が認められる結果となった。

(6) 検量線について

各キットの検量線について、卵検出系は図12～図15、表11および表12に、乳検出系は図16～図19、表13および表14に示した。

卵検出系におけるモリナガ卵キットでは検量線の平均値およびSDを基にして得られた95%信頼区間から外れた機関は1機関（機関番号12）であった。同機関は他の3キットにおいても95%信頼区間の上限を外れた、もしくはほぼ上限に位置しており、他機関と比較して本研究においては常に高めの吸光度を示していた。また当該機関の σ スコアの絶対値は全て3未満であったが、その測定値は全機関中、常に低めであった。他にも95%信頼区間の上限および下限付近の機関はあったが、その σ スコアの絶対値は3未満であった。

日本ハム卵キットでは、上記の機関番号12に加え、機関番号1も95%信頼区間の上限に近い位置であった。しかしながら、どちらの機関も σ スコアの絶対値は1未満であった。機関番号4は高濃度で95%信頼区間の下限を外れており、線形が乱れていた。この機関は検量線の3高濃度においてRSDが16～24%と高く、前出の通り測定値の3ウェル間のRSDも高値を示していた（ σ スコアの絶対値は1.5未満

であったが、 R 管理図では外れ値を示した）。さらに、日本ハム乳キットにおいても中間濃度で95%信頼区間の下限付近を示し、線形も乱れていた。検量線ではRSDが15%を超える濃度もあり、試料の測定値におけるRSDも高値を示し、試験操作が安定していないようであった。しかしながら、当該機関は、モリナガキットでは卵、乳検出系ともに、検量線の線形ならびにRSD、および試料の測定値のRSDも問題は認められなかった。したがって、今回の調査研究だけの問題であるのか、常時キット間で結果に差があるのかをこれまでの背景データ等により確認して、必要であれば、機関内で試験操作の見直しを行うことが重要であろう。

乳検出系におけるモリナガ乳キットでは検量線に関して前出の機関番号12のほかにも95%信頼区間の上限および下限に近い機関はあったが、その σ スコアの絶対値は1未満であった。

日本ハム乳キットでは前出の機関番号4および12のほかにも、機関番号1が95%信頼区間の上限を外れ、低濃度において線形が乱れていた（ σ スコアの絶対値は1.5未満）。同機関は全てのキットにおいて、検量線が常に上方に位置していた。

以上の結果から、 σ スコアについては検量線に由来するような問題は認められなかった。しかしながら検量線が他機関と比較して恒常的に上方または下方に位置しており、かつ、 σ スコアが全体に対して常にどちらかに偏っている場合は、これまでの結果を確認するとともに、今後の外部精度管理調査の結果にも注意が必要だろう。

(7) 報告値の相関性

卵または乳検出系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20に示

した。

卵検出系では7割程度の機関で日本ハムキットの報告値がモリナガキットの報告値より高値を示した。

乳検出系では1機関を除く23機関でモリナガキットにおいて日本ハムキットよりも高値を示した。

また、卵検出系において日本ハムキットでは測定値が7～13 $\mu\text{g/g}$ と約6 μg の範囲に分布、モリナガキットでは7.5～10.5 $\mu\text{g/g}$ と約3 μg の範囲に分布していた。乳検出系では、日本ハムキットでは約4 μg の範囲に、モリナガキットでは約5 μg の範囲に分布していたが、モリナガキットで広範囲となったのはZスコアの絶対値が3以上である測定値が95%確率楕円に含まれていたため、その点を除くと約3 μg の範囲となり、卵同様、日本ハムキットの方がモリナガキットよりも広範囲に分布していた。

5) 回収データの確認

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および報告書の記載内容の確認を行った。その結果、報告書のデータの記載ミスが数件認められた、大きな問題は認められなかった。提出データの書式は、各機関の報告書作成方式と違うことから、確認ミスが起こったと考えられるが、必要な記載を正確に行うことはデータの信頼性にもかかわるため、データを提出するまでが外部精度管理であることを再確認して、正しい測定のみならず正しいデータの提出のための体制を確立していただければ、と考える。

6) 検査手法のまとめ

各機関が検査に用いた手法を表15および表16に示した。担当者の経験年数は2年以内が5割程度であり、これまでの調査研究同様、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2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を実施、振とう時間は12-20時間であった。ろ過は2/3の機関が、遠心は1機関以外すべての機関が実施していた。遠心を行っていなかった機関は、ろ過も行っていなかった。試薬のプレートへの添加では、手動で行った機関のほとんどはマルチチャンネルピペットを使用していた。

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。

ピペット校正を年に1回以上行っている機関は全体の2/3以下であったが、天秤の校正はほとんどの機関が年に1回以上行っていた。ELISA試験は微量の操作が重要であるため、ピペットおよび天秤の校正を適宜行うことは必要と考える。

試験に用いられた4種のキット間で、操作手法に大きな違いは認められなかった。

抽出液については、多くの機関が抽出当日に使用しており、次に多かったのが1日保存であった。提出された記録から、抽出日に試験を行わなかった機関では、多くの場合、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た。抽出液を保存する際の条件は、冷蔵が多く、長期保存では冷凍保存を行っていた。本調査研究では \bar{X} 管理図またはZスコアにおける外れ値と保存日数には明確な関連は認められなかった。

操作全般を通し、 \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

参考としてアンケートで回答のあった参加機関における検査実績（2021年度）を表17および表18にまとめた。

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1～5機関であり、試験項目数の極端な偏りは認められなかった。

ELISA法では、18機関の総実施件数は18,000件ほどで、各特定原材料の試験件数は甲殻類を除く5種についてそれぞれが全体の17～20%程度であり、甲殻類のみ10%程度であった。

ELISA法による18,220試験中、陽性と判定された試験数は2092試験（11.5%）であった。また、実施された確認試験77試験において陽性は22試験（28.6%）であった。確認試験は小麦が23件と最も多かったが、陽性となった検体数は5件であった。一方、甲殻類では19件中10件と半数以上が、陽性であった。

2. Incurred samplesの検討

1) 卵含有試料

卵含有incurred sample作製のため、スクリーニングを行った24試料の結果を表19、a)に示す。24試料中6試料が50 µg/g未満で卵が検出された。卵含有量及び取り扱いやすさから、CoDをincurred sampleとして調製を行った。試料中の卵濃度は原材料に卵の表示のないCoDを用いて希釈して調整した。調整に際し、ロット間差を確認するために、卵含有CoDおよび卵不含CoDともに3ロットずつを組み合わせ、調整後の卵含有量を測定したところ、どの組み合わせにおいても大きな差は認められず、安定した調製方法であると

考えられた[図21、a)]。incurred sampleは試料で調製し、施設2で、均質性試験を行った(表20)。施設1及び施設2でのELISA法による測定結果はほぼ等しい値を示し、複数施設間で安定した試験結果が得られることが確認された。また、均質性試験の結果、調製した試料は均質であることが示された。したがって、本研究で調製した卵検出用のincurred sampleは外部精度管理調査研究の調査試料として使用できる可能性が考えられた。

2) 乳含有試料

卵含有incurred sample作製のため、スクリーニングを行った8試料の結果を表19、b)に示す。8試料中乳含有量がカットオフ値である10 µg/g以上であり、調製のしやすさからクッキーをincurred sampleとして調製を行った。

試料としての扱いやすさを考え、乳濃度の調製には精製水を用いて、流体試料とした。

また、クッキーのロット間差について確認した結果、最高で2倍近くの差が認められ、ロットにより乳含量に差があることがわかった(図21)。したがって調製時には、十分均質化を行った。Incurred sampleは、施設1において調製を行い、施設2で均質性試験を行った(表20)。施設1及び施設2でのELISA法による測定結果はほぼ等しい値を示し、複数施設間で安定した試験結果が得られることが確認された。また、均質性試験の結果、調製した試料は均質であることが示された。したがって、本研究で調製した乳検出用のincurred sampleは外部精度管理調査研究の調査試料として使用できる可能性が考えられた。

3) 外部精度管理調査試料としての incurred samples

今回調製したincurred samplesは複数の施設で安定した値が検出され、また、均質であ

ることが示されたため、今後は、食品表示における外部精度管理調査での調査試料としての適用を目指す。

調製した試料の品質評価においては安定性の確認がまだ十分になされておらず、今後の課題とされる。

食品表示における特定原材料検査では、ELISA法によるスクリーニングに関して外部精度管理調査が行われている。その際に使用するELISAキットは卵、乳ともに、今回、incurred sampleを調製に用いたキットのほか、2キットが通知法に準拠している。外部精度管理調査における実試料とするためには、これらのキットに対しての反応性も確認する必要がある。

さらに、市販食品は予告なく仕様が変更されたり、製造中止になったりすることがあり、また、生産ラインにより、標的食品中の特定原材料量が一定しない事も想定される。

例えば今回乳検出用のincurred sampleとして供試したクッキーのようにロット間差が大きい食品もあり、毎回、同じ食品を同じ方法で調製するだけでは、必ずしも、外部精度管理調査試料として適切な試料が得られるわけではないと考えられる。

しかしながら、実際に市場に流通している市販食品を使用することで、より実践に即した試料の提供が可能となるので、市販加工食品を使用したincurred sampleの外部精度管理調査への適用は重要であると考えられる。

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、1試料中に卵と乳、2つの特定原材料を添加した試料を作製

し、24機関を対象に実施した。

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SDから z -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、 z -スコアの絶対値が3以上となった機関は全体で延べ3機関であり、1機関では2試験系で z -スコアの絶対値が3以上であった。

また、 \bar{X} -管理図では管理限界線の範囲を超えた機関は2機関、 R -管理図で管理限界線を超えた機関は全体で2機関認められた。

また、市販食品を用いて外部精度管理調査のための試料としてincurred sampleの作製を行った。得られた2試料はどちらも均質性及び2施設間での再現性に問題がなく、外部精度管理調査研究の調査試料として使用できる可能性が考えられた。

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)

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

1) 細谷まい, 内田華那, 伊藤里恵, 若栗忍, 渡辺卓穂, 穂山浩: 外部精度管理調査研究のための卵タンパク質のアレルギー物質を含む実試料調製及び均一性試験, 日本薬学会第143年会(北海道) 2023

2) 内田華那, 細谷まい, 伊藤里恵, 若栗忍, 渡辺卓穂, 穂山浩: 外部精度管理調査研究のための乳タンパク質のアレルギー物質を含む実試料調製及び均一性試験, 日本薬学会第143年会(北海道) 2023

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の結果

キットメーカー	含有量 (µg/g)			
	卵		乳	
	平均 ± SD	RSD (%)	平均 ± SD	RSD (%)
モリナガ	9.25 ± 0.18	1.9	12.43 ± 0.42	3.4
日本ハム	10.56 ± 0.24	2.3	10.63 ± 0.31	2.9
プリマハム	11.92 ± 0.14	1.2	6.59 ± 0.22	3.3
[参考] モリナガ (βLG)	—————		6.66 ± 0.23	3.5

SD:標準偏差、RSD:相対標準偏差 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	含有量 (µg/g)			
	卵		乳	
	平均 ± SD	RSD (%)	平均 ± SD	RSD (%)
モリナガ	9.22 ± 0.20	2.2	12.56 ± 0.47	3.7
日本ハム	10.67 ± 0.16	1.5	11.17 ± 0.24	2.1
プリマハム	12.19 ± 0.21	1.7	6.31 ± 0.09	1.4
[参考] モリナガ (βLG)	—————		6.74 ± 0.16	2.4

SD:標準偏差、RSD:相対標準偏差 n=4

表3 外部精度管理調査研究試料の調査期間中の安定性

キットメーカー	安定性 (%)	
	卵	乳
	平均 ± SD	平均 ± SD
モリナガ	99.7 ± 2.2	101.0 ± 3.8
日本ハム	101.0 ± 1.5	105.1 ± 2.2
プリマハム	102.3 ± 1.8	95.8 ± 1.3
[参考] モリナガ (βLG)	—————	101.2 ± 2.3

SD:標準偏差

表4 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) 卵検出系

	モリナガ	日本ハム
データ数 (有効機能数)	23	23
平均値 (μg/g)	9.62	10.64
標準偏差 (μg/g)	0.63	1.35
相対標準偏差 (%)	6.55	12.69
添加量 (μg/g)	10.0	

2) 乳検出系

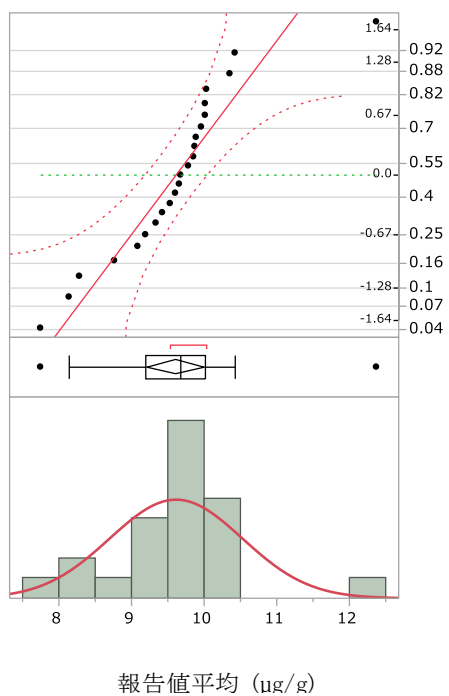
	モリナガ	日本ハム
データ数 (有効機能数)	24	24
平均値 (μg/g)	12.85	10.81
標準偏差 (μg/g)	0.83	1.39
相対標準偏差 (%)	6.46	12.86
添加量 (μg/g)	10.0	

表5 ELISA法による卵たんぱく質量測定結果の統計量一覧

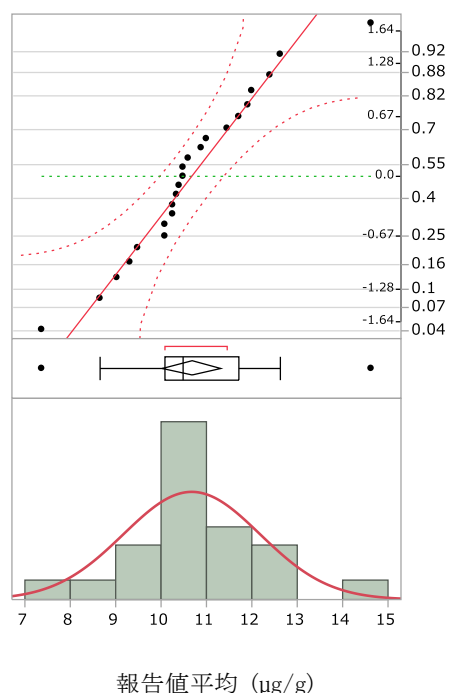
キットのメーカー名		モリナガ	日本ハム
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MCによる除外機関		0	0
データ（有効機関）数		23	23
測定 の 統計量*	平均値	9.62	10.64
	標準偏差	0.63	1.35
	相対標準偏差	6.55	12.69
	第1四分位数 (Q1)	9.195	10.075
	中央値 (メジアン)	9.68	10.48
	第3四分位数 (Q3)	10.01	11.715
	最大値	12.38	14.64
	最小値	7.745	7.36
	範囲	4.635	7.28
	四分位範囲	0.815	1.64
測定 の 差*	Rの平均	0.39	0.60
	上部管理限界	1.27	1.96

*：単位は相対標準偏差では%、それ以外では $\mu\text{g/g}$

a) モリナガキット



b) 日ハムキット



(機関数 23)

図2 卵検出用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6 モリナガキットによる卵検出の結果および評価一覧

機関 番号	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
19	7.83	7.66	7.745	満足	0.17	満足	-2.976	満足
14	8.31	7.97	8.140	満足	0.34	満足	-2.349	満足
15	8.32	8.25	8.285	満足	0.07	満足	-2.119	満足
12	8.87	8.66	8.765	満足	0.21	満足	-1.357	満足
11	9.06	9.13	9.095	満足	0.07	満足	-0.833	満足
21	9.05	9.34	9.195	満足	0.29	満足	-0.675	満足
4	9.89	8.80	9.345	満足	1.09	満足	-0.437	満足
20	9.34	9.51	9.425	満足	0.17	満足	-0.310	満足
3	9.29	9.79	9.540	満足	0.50	満足	-0.127	満足
10	9.72	9.51	9.615	満足	0.21	満足	-0.008	満足
18	9.91	9.41	9.660	満足	0.50	満足	0.063	満足
5	9.90	9.46	9.680	満足	0.44	満足	0.095	満足
9	9.60	9.98	9.790	満足	0.38	満足	0.270	満足
22	10.06	9.66	9.860	満足	0.40	満足	0.381	満足
2	9.86	9.89	9.875	満足	0.03	満足	0.405	満足
8	9.69	10.10	9.895	満足	0.41	満足	0.437	満足
17	9.99	9.94	9.965	満足	0.05	満足	0.548	満足
1	10.15	9.87	10.010	満足	0.28	満足	0.619	満足
16	9.66	10.36	10.010	満足	0.70	満足	0.619	満足
7	10.88	9.18	10.030	満足	1.70	不満足	0.651	満足
24	10.45	10.25	10.350	満足	0.20	満足	1.159	満足
6	10.44	10.43	10.435	満足	0.01	満足	1.294	満足
13	12.72	12.04	12.380	満足	0.68	満足	4.381	不満足

*:単位 $\mu\text{g/g}$

評価基準

Xbar管理図 満足: $LCL(6.734) \leq Xbar \leq UCL(12.506)$

R管理図 満足: $0 \leq R \leq UCL(1.27)$

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7 日本ハムキットによる卵検出の結果および評価一覧

機関 番号	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
18	7.42	7.30	7.360	不満足	0.12	満足	-2.430	満足
14	8.54	8.76	8.650	満足	0.22	満足	-1.474	満足
11	9.05	9.02	9.035	満足	0.03	満足	-1.189	満足
5	9.76	8.87	9.315	満足	0.89	満足	-0.981	満足
12	9.52	9.46	9.490	満足	0.06	満足	-0.852	満足
19	10.34	9.81	10.075	満足	0.53	満足	-0.419	満足
22	9.83	10.35	10.090	満足	0.52	満足	-0.407	満足
6	10.24	10.27	10.255	満足	0.03	満足	-0.285	満足
24	9.81	10.71	10.260	満足	0.90	満足	-0.281	満足
8	10.44	10.24	10.340	満足	0.20	満足	-0.222	満足
21	10.37	10.45	10.410	満足	0.08	満足	-0.170	満足
17	10.46	10.50	10.480	満足	0.04	満足	-0.119	満足
20	11.01	9.98	10.495	満足	1.03	満足	-0.107	満足
3	10.33	10.89	10.610	満足	0.56	満足	-0.022	満足
15	10.75	11.00	10.875	満足	0.25	満足	0.174	満足
10	10.74	11.27	11.005	満足	0.53	満足	0.270	満足
7	11.79	11.12	11.455	満足	0.67	満足	0.604	満足
13	11.99	11.44	11.715	満足	0.55	満足	0.796	満足
1	11.73	12.13	11.930	満足	0.40	満足	0.956	満足
9	11.71	12.32	12.015	満足	0.61	満足	1.019	満足
2	12.50	12.30	12.400	満足	0.20	満足	1.304	満足
4	10.24	15.00	12.620	満足	4.76	不満足	1.467	満足
16	14.30	14.98	14.640	不満足	0.68	満足	2.963	満足

*:単位 $\mu\text{g/g}$

評価基準

Xbar管理図 満足: $LCL(7.448) \leq Xbar \leq UCL(13.832)$

R管理図 満足: $0 \leq R \leq UCL(1.96)$

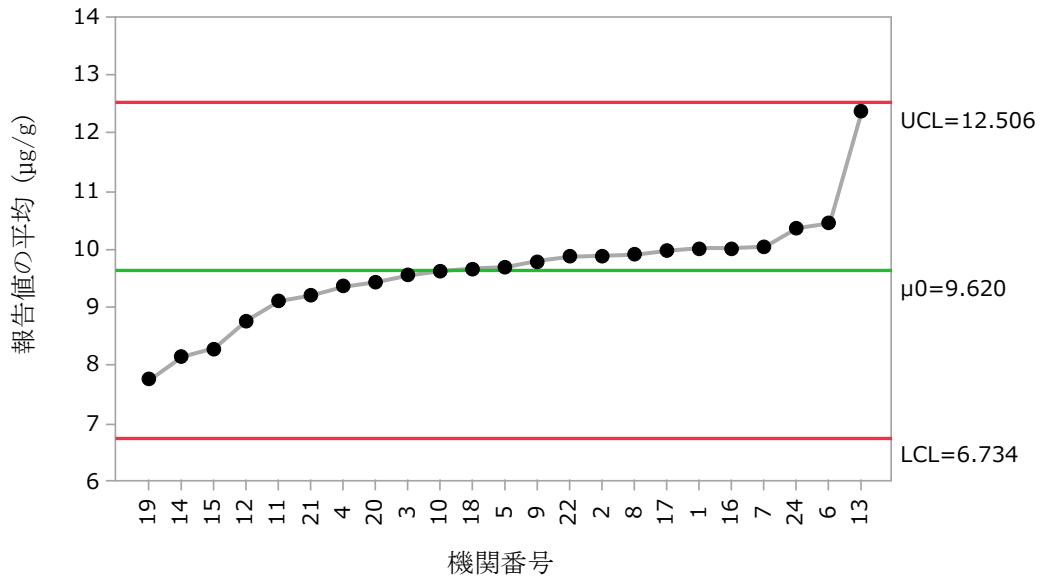
zスコア 満足: $|z\text{スコア}| < 3$

不満足: $Xbar < LCL$ または $UCL < Xbar$

不満足: $UCL < R$

不満足: $3 \leq |z\text{スコア}|$

a) \bar{X} 管理図



b) R 管理図

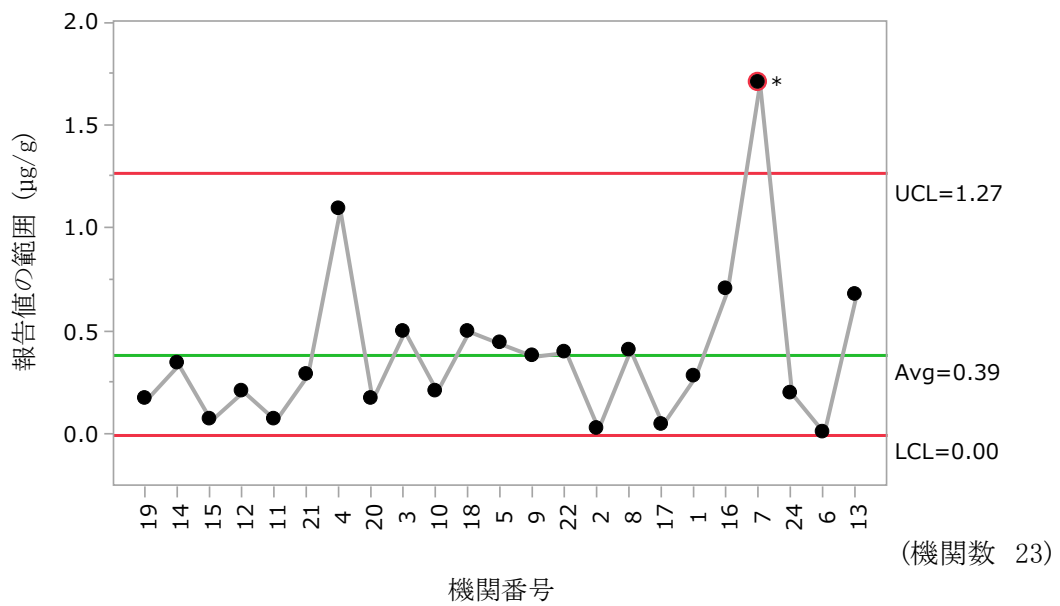
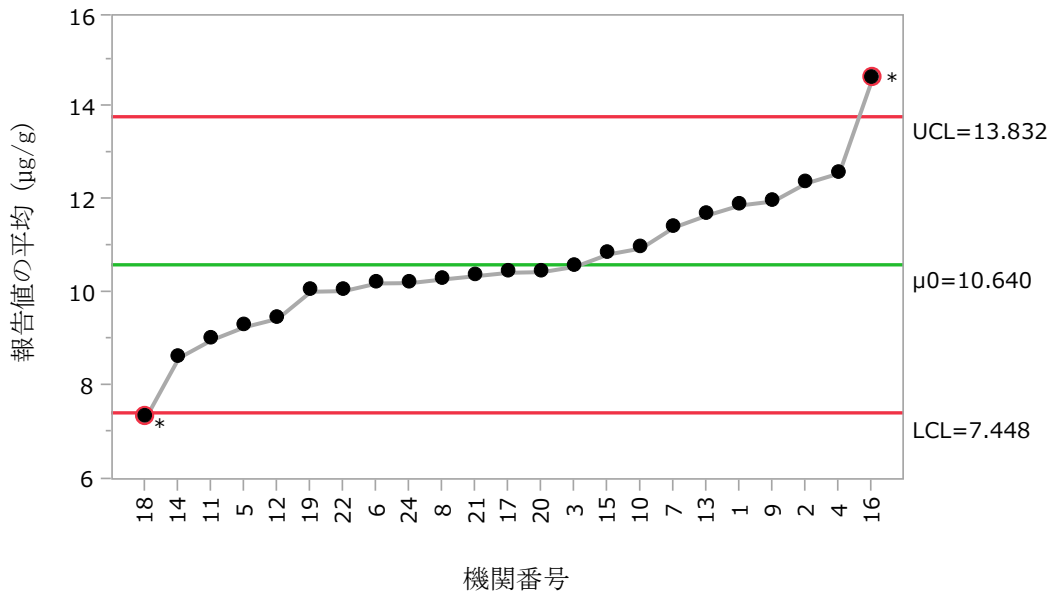


図3 モリナガキットを用いた卵たんぱく質量測定結果 (\bar{X} - R 管理図)

\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

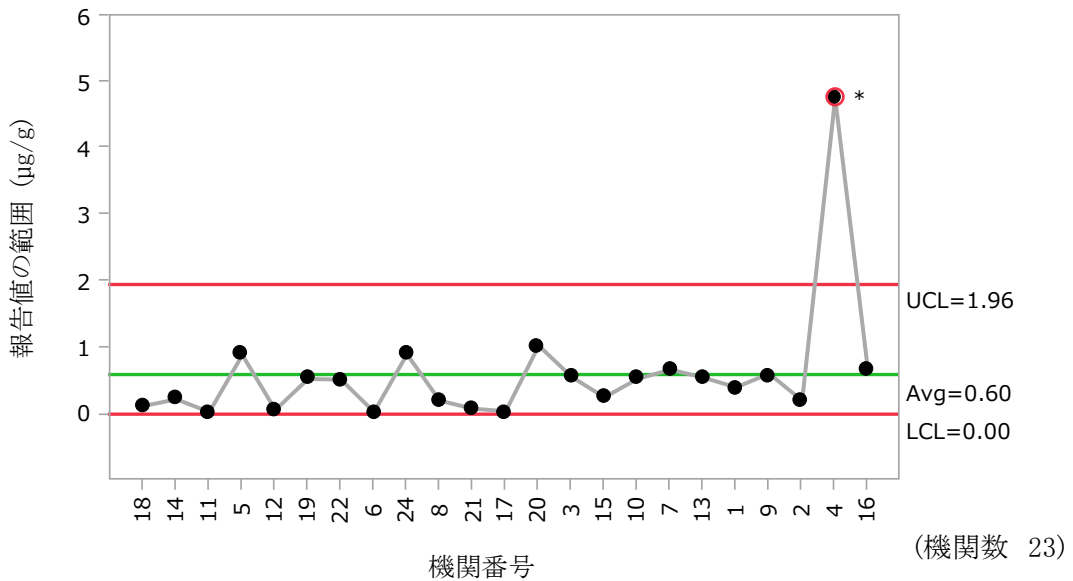
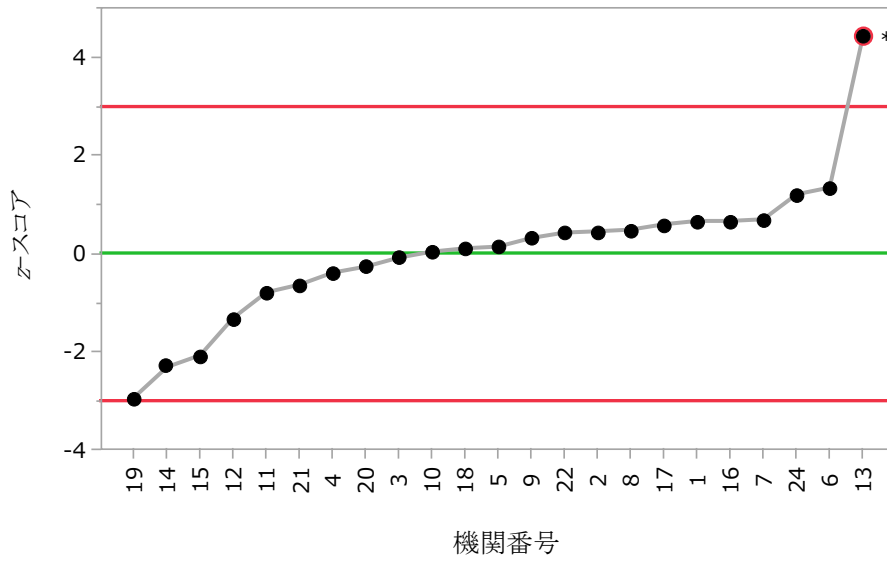


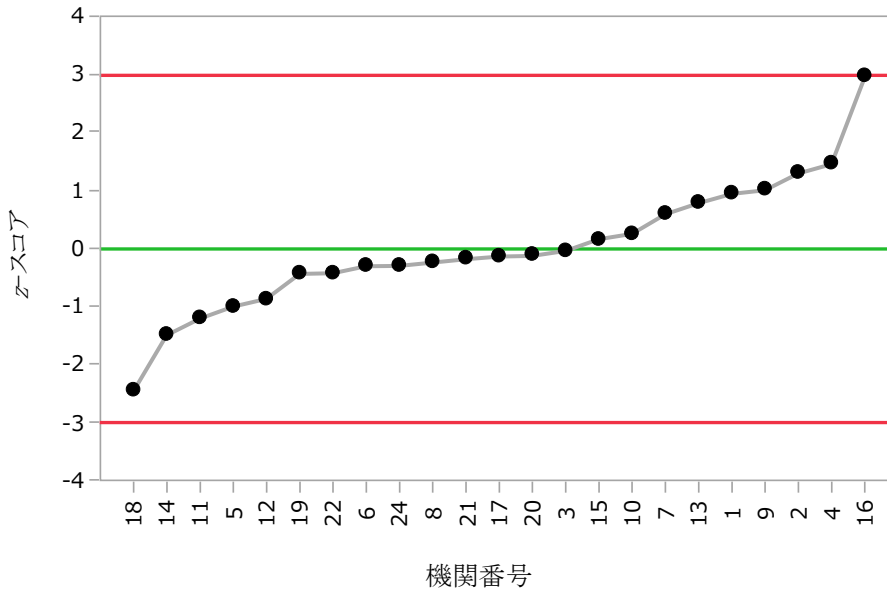
図4 日本ハムキットを用いた卵たんぱく質量測定結果 (\bar{X} - R 管理図)

\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) モリナガキット



b) 日本ハムキット



(機関数 23)

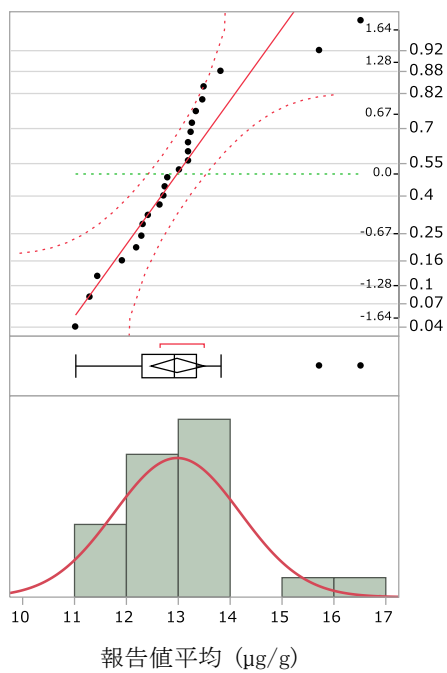
図5 ELISA法による卵たんぱく質量測定結果 (Zスコア)

表8 ELISA法による乳たんぱく質量測定結果の統計量一覧

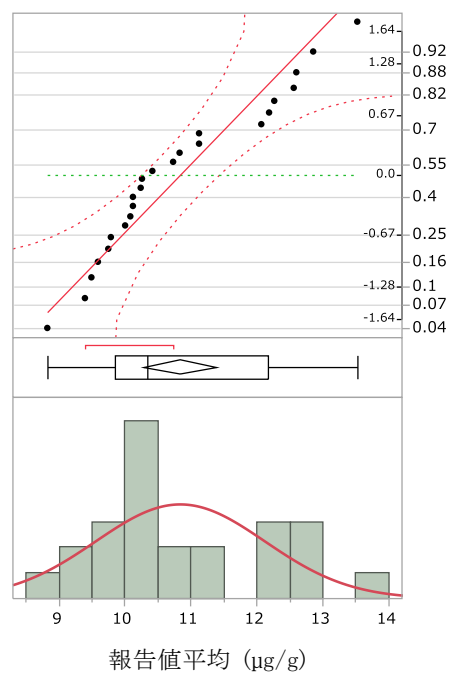
キットのメーカー名		モリナガ	日本ハム
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MCによる除外機関		0	0
データ（有効機関）数		24	24
測定 の 統計量*	平均値	12.85	10.81
	標準偏差	0.83	1.39
	相対標準偏差	6.46	12.86
	第1四分位数 (Q1)	12.30875	9.85125
	中央値 (メジアン)	12.9225	10.35
	第3四分位数 (Q3)	13.34125	12.1675
	最大値	16.535	13.53
	最小値	11.015	8.825
	範囲	5.52	4.705
	四分位範囲	1.0325	2.31625
測定 の 差*	Rの平均	0.39	0.42
	上部管理限界	1.27	1.37

*：単位は相対標準偏差では%、それ以外では $\mu\text{g/g}$

a) モリナガキット



b) 日本ハムキット



(機関数 24)

図6 乳検出用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9 モリナガキットによる乳検出の結果および評価一覧

機関 番号	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	10.94	11.09	11.015	満足	0.15	満足	-2.211	満足
19	11.35	11.26	11.305	満足	0.09	満足	-1.861	満足
14	11.41	11.46	11.435	満足	0.05	満足	-1.705	満足
23	11.80	12.05	11.925	満足	0.25	満足	-1.114	満足
21	12.59	11.79	12.190	満足	0.80	満足	-0.795	満足
18	12.57	12.03	12.300	満足	0.54	満足	-0.663	満足
11	12.52	12.15	12.335	満足	0.37	満足	-0.620	満足
4	12.57	12.28	12.425	満足	0.29	満足	-0.512	満足
24	13.06	12.25	12.655	満足	0.81	満足	-0.235	満足
2	12.39	13.06	12.725	満足	0.67	満足	-0.151	満足
5	13.16	12.32	12.740	満足	0.84	満足	-0.133	満足
6	12.98	12.64	12.810	満足	0.34	満足	-0.048	満足
10	13.14	12.93	13.035	満足	0.21	満足	0.223	満足
20	13.03	13.37	13.200	満足	0.34	満足	0.422	満足
22	13.33	13.07	13.200	満足	0.26	満足	0.422	満足
7	13.01	13.40	13.205	満足	0.39	満足	0.428	満足
16	13.30	13.20	13.250	満足	0.10	満足	0.482	満足
3	13.16	13.41	13.285	満足	0.25	満足	0.524	満足
8	13.64	13.08	13.360	満足	0.56	満足	0.614	満足
17	13.31	13.65	13.480	満足	0.34	満足	0.759	満足
9	13.28	13.70	13.490	満足	0.42	満足	0.771	満足
15	13.51	14.14	13.825	満足	0.63	満足	1.175	満足
1	15.94	15.52	15.730	満足	0.42	満足	3.470	不満足
13	16.41	16.66	16.535	満足	0.25	満足	4.440	不満足

*:単位 μ g/g

評価基準

$Xbar$ 管理図 満足: $LCL(8.995) \leq Xbar \leq UCL(16.705)$

R 管理図 満足: $0 \leq R \leq UCL(1.27)$

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10 日本ハムキットによる乳検出の結果および評価一覧

機関 番号	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
19	8.52	9.13	8.825	満足	0.61	満足	-1.428	満足
12	9.44	9.37	9.405	満足	0.07	満足	-1.011	満足
18	9.48	9.51	9.495	満足	0.03	満足	-0.946	満足
3	9.37	9.81	9.590	満足	0.44	満足	-0.878	満足
11	9.70	9.79	9.745	満足	0.09	満足	-0.766	満足
21	9.71	9.89	9.800	満足	0.18	満足	-0.727	満足
24	10.47	9.54	10.005	満足	0.93	満足	-0.579	満足
23	10.45	9.71	10.080	満足	0.74	満足	-0.525	満足
6	10.05	10.19	10.120	満足	0.14	満足	-0.496	満足
14	10.09	10.17	10.130	満足	0.08	満足	-0.489	満足
5	10.56	9.92	10.240	満足	0.64	満足	-0.410	満足
20	9.92	10.62	10.270	満足	0.70	満足	-0.388	満足
13	10.62	10.24	10.430	満足	0.38	満足	-0.273	満足
8	10.86	10.61	10.735	満足	0.25	満足	-0.054	満足
2	11.34	10.35	10.845	満足	0.99	満足	0.025	満足
10	11.27	11.00	11.135	満足	0.27	満足	0.234	満足
22	10.95	11.32	11.135	満足	0.37	満足	0.234	満足
9	12.26	11.91	12.085	満足	0.35	満足	0.917	満足
7	12.19	12.20	12.195	満足	0.01	満足	0.996	満足
15	12.32	12.21	12.265	満足	0.11	満足	1.047	満足
1	13.05	12.09	12.570	満足	0.96	満足	1.266	満足
17	12.78	12.44	12.610	満足	0.34	満足	1.295	満足
16	12.64	13.10	12.870	満足	0.46	満足	1.482	満足
4	13.97	13.09	13.530	満足	0.88	満足	1.957	満足

*:単位 $\mu\text{g/g}$

評価基準

\bar{X} 管理図 満足: $LCL(7.567) \leq \bar{X} \leq UCL(14.053)$

R 管理図 満足: $0 \leq R \leq UCL(1.37)$

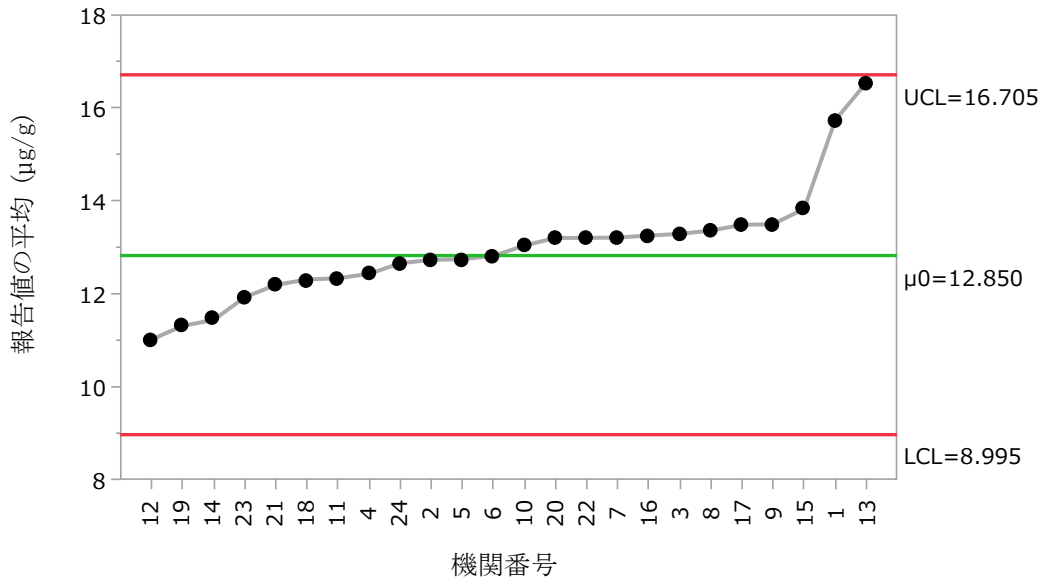
z -スコア 満足: $|z\text{-スコア}| < 3$

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

不満足: $UCL < R$

不満足: $3 \leq |z\text{-スコア}|$

a) \bar{X} 管理図



b) R 管理図

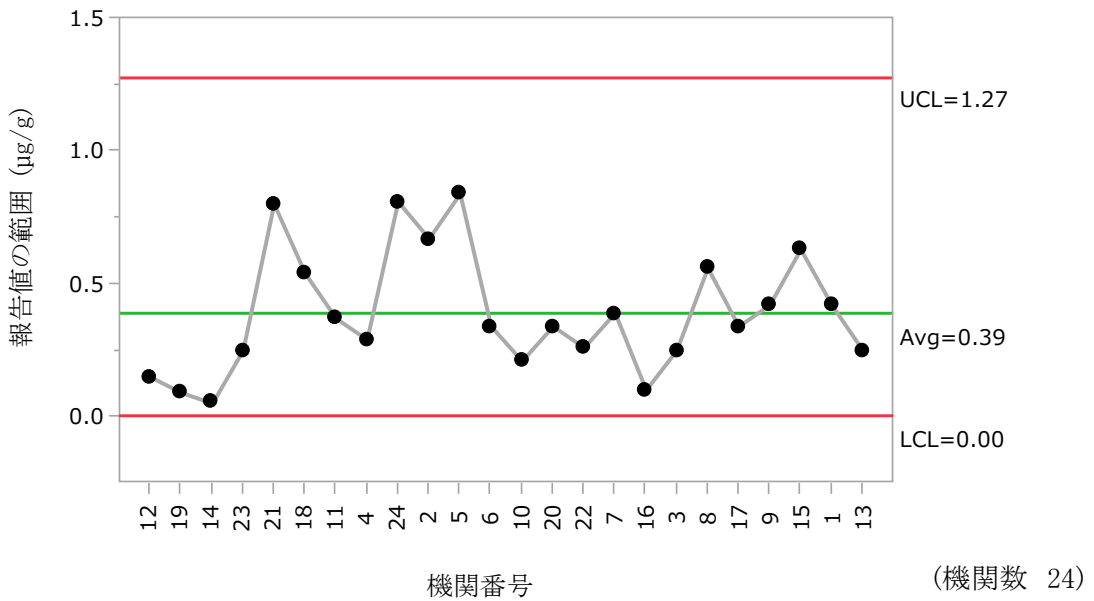
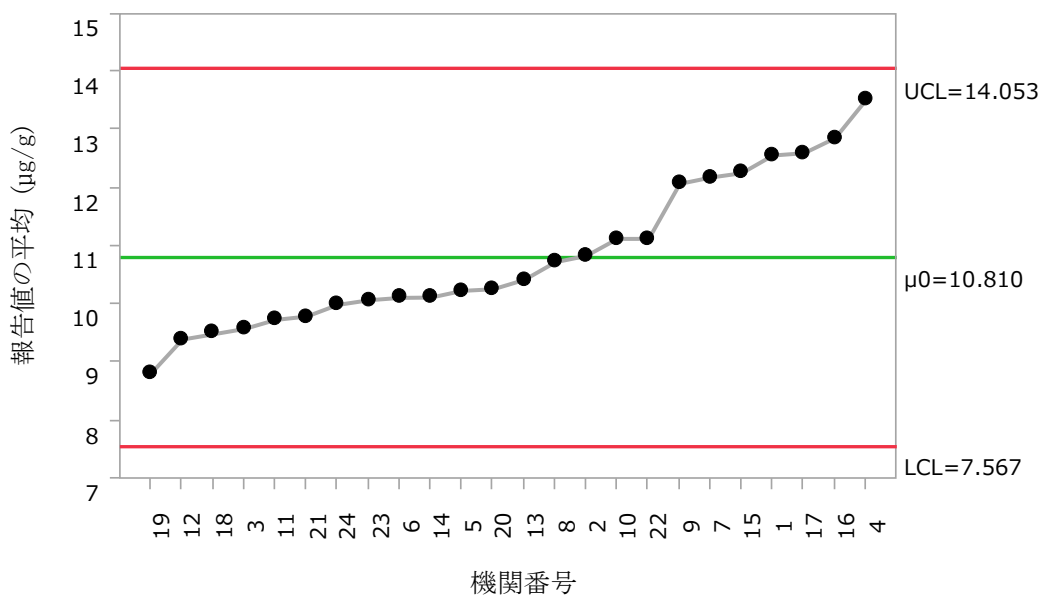


図7 モリナガキットを用いた乳たんぱく質量測定結果 (\bar{X} - R 管理図)

\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

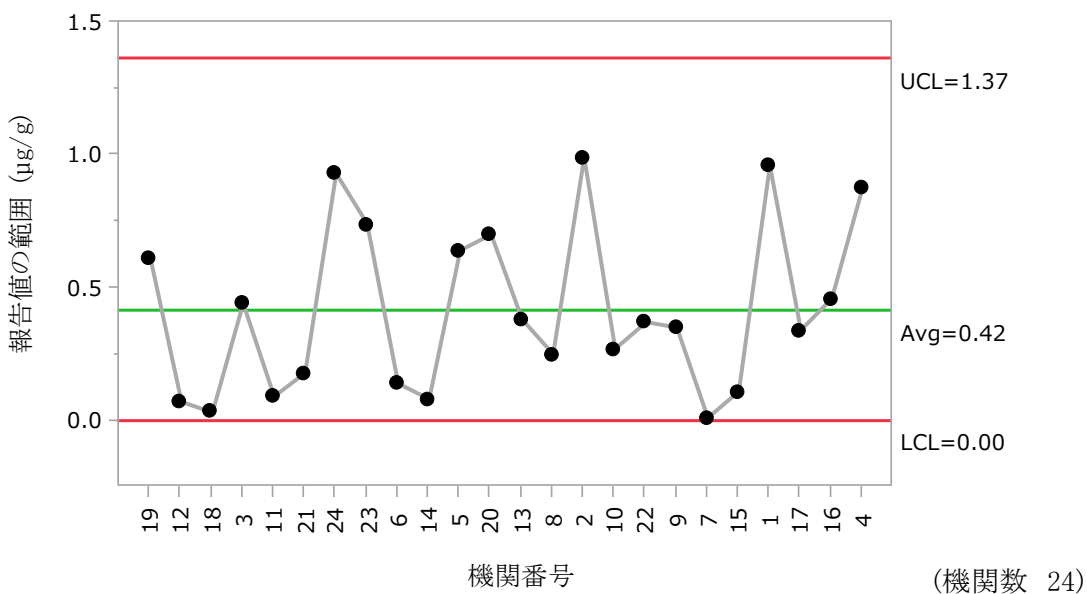
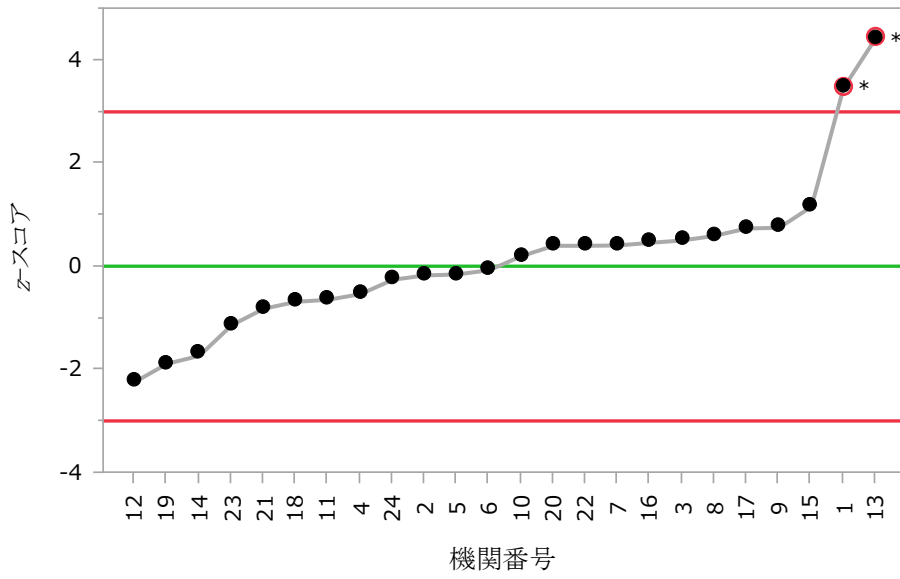


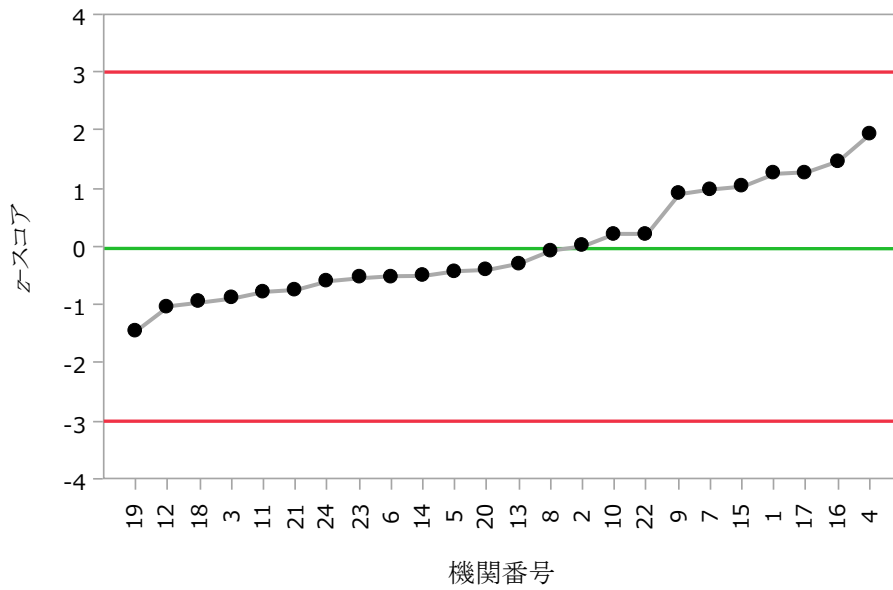
図8 日本ハムキットを用いた乳たんぱく質量測定結果 (\bar{X} - R 管理図)

\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) モリナガキット



b) 日本ハムキット



(機関数 24)

図9 ELISA法による乳たんぱく質量測定結果 (Zスコア)

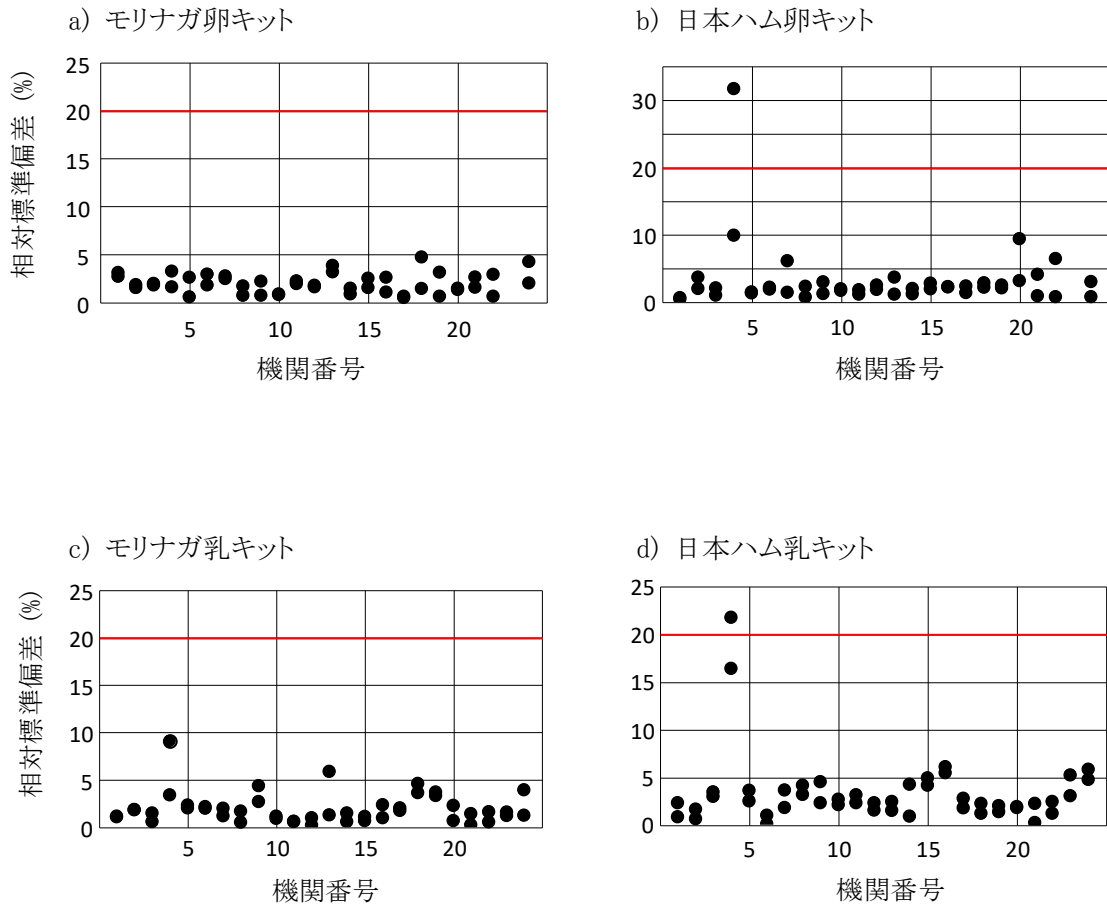
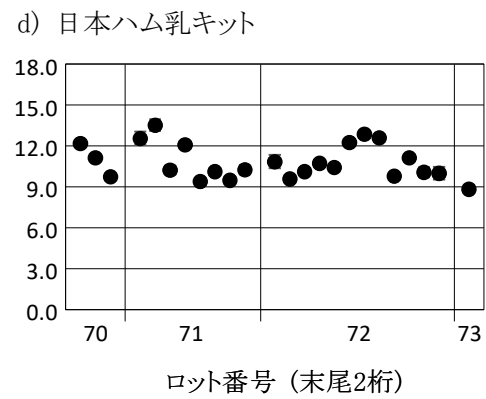
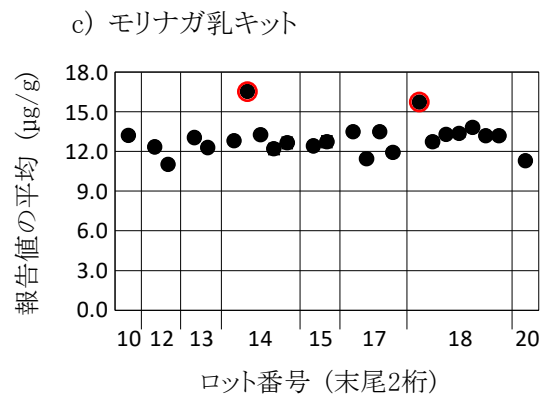
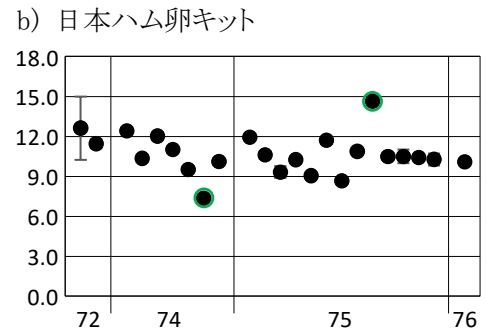
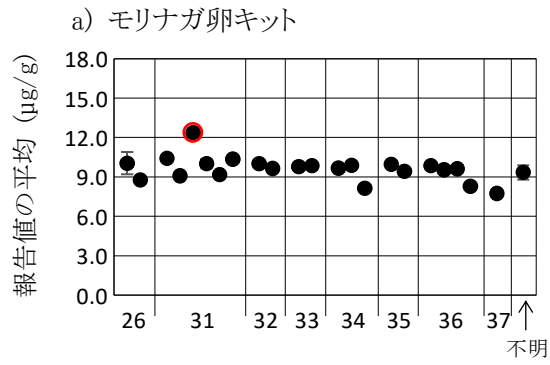


図10 各測定値における3ウェル間の相対標準偏差



○ $|z\text{-スコア}| \geq 3$ ○ \bar{X} 管理図で管理限界線外

図11 各キットで得られた報告値のロット間比較

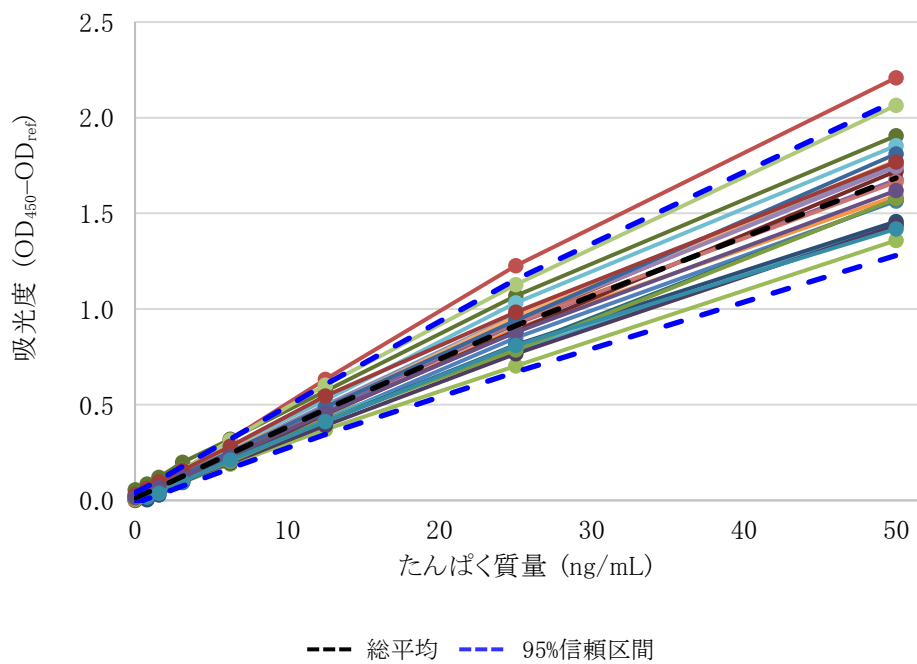


図12 モリナガ卵キット を用いた測定における検量線 (23機関)
 ロット別検量線は図14を参照

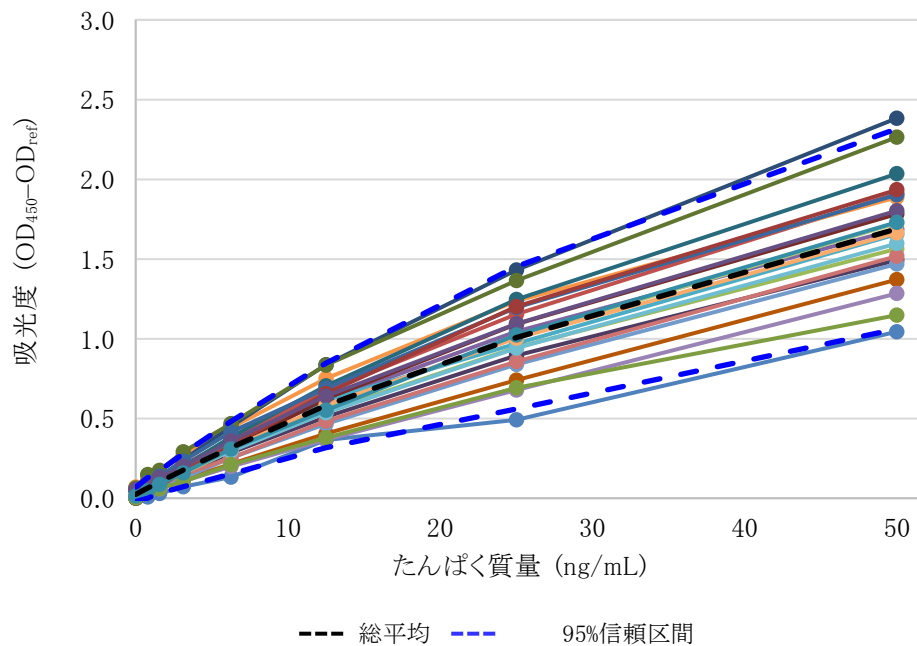


図13 日本ハム卵キットを用いた測定における検量線 (23機関)
 ロット別検量線は図15を参照

表11 外部精度管理調査研究で使用されたモリナガ卵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
22JASFOA126	2023.1.5	2
22MASFOA131	2023.3.10	6
22APSFOA132	2023.4.4	2
22APSFOA133	2023.4.20	2
22MYSFOA134	2023.5.9	3
22MYSFOA135	2023.5.20	2
22JUSFOA136	2023.6.7	4
22JLSFOA137	2023.7.22	1
不明	—	1

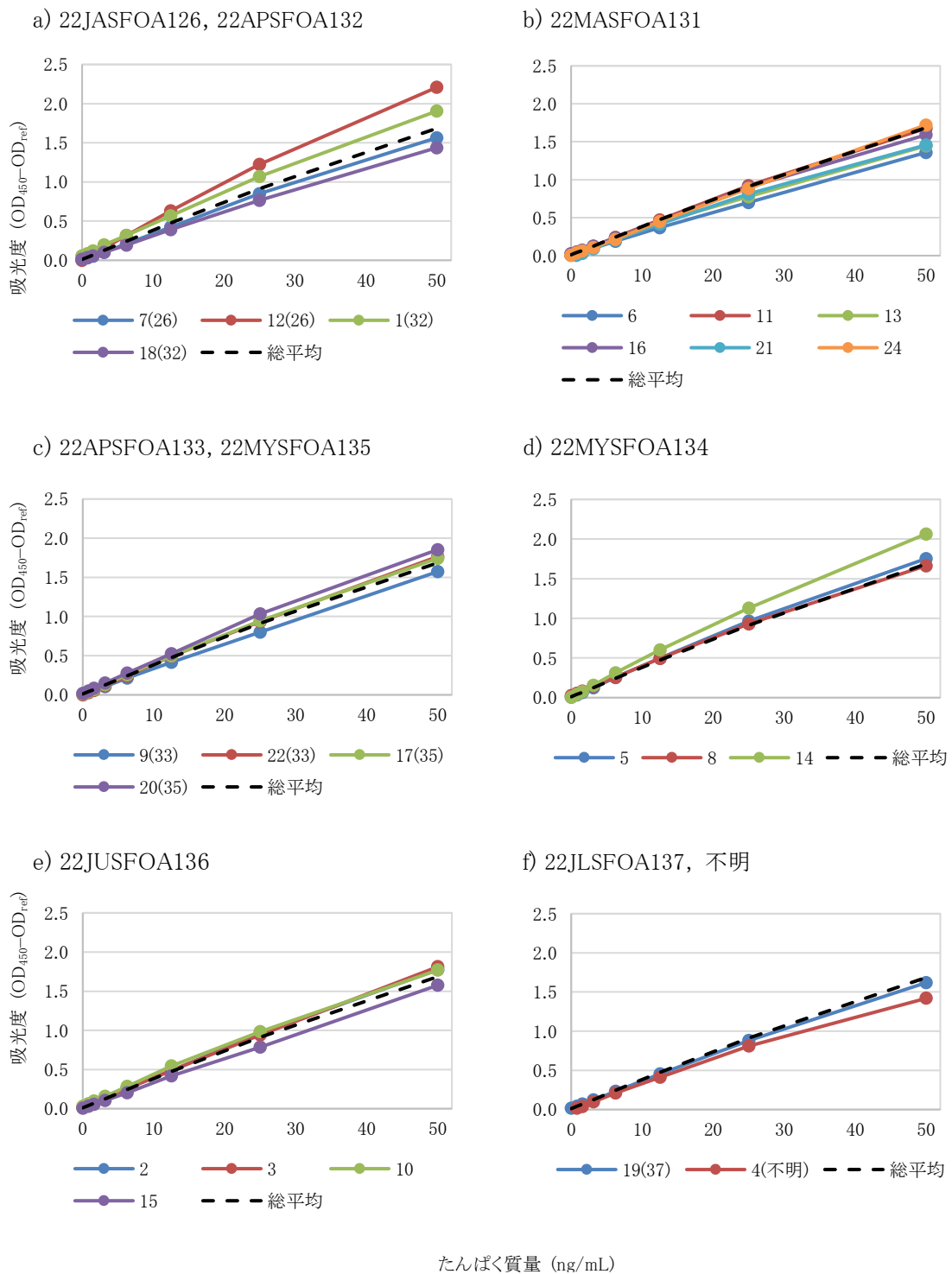


図14 モリナガ卵キットを用いた測定におけるロット別検量線

表12 外部精度管理調査研究で使用された日本ハム卵キットの
ロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
FKEE2272	2022.11	2
FKEE2274	2023.1	7
FKEE2275	2023.3	13
FKEE2276	2023.5	1

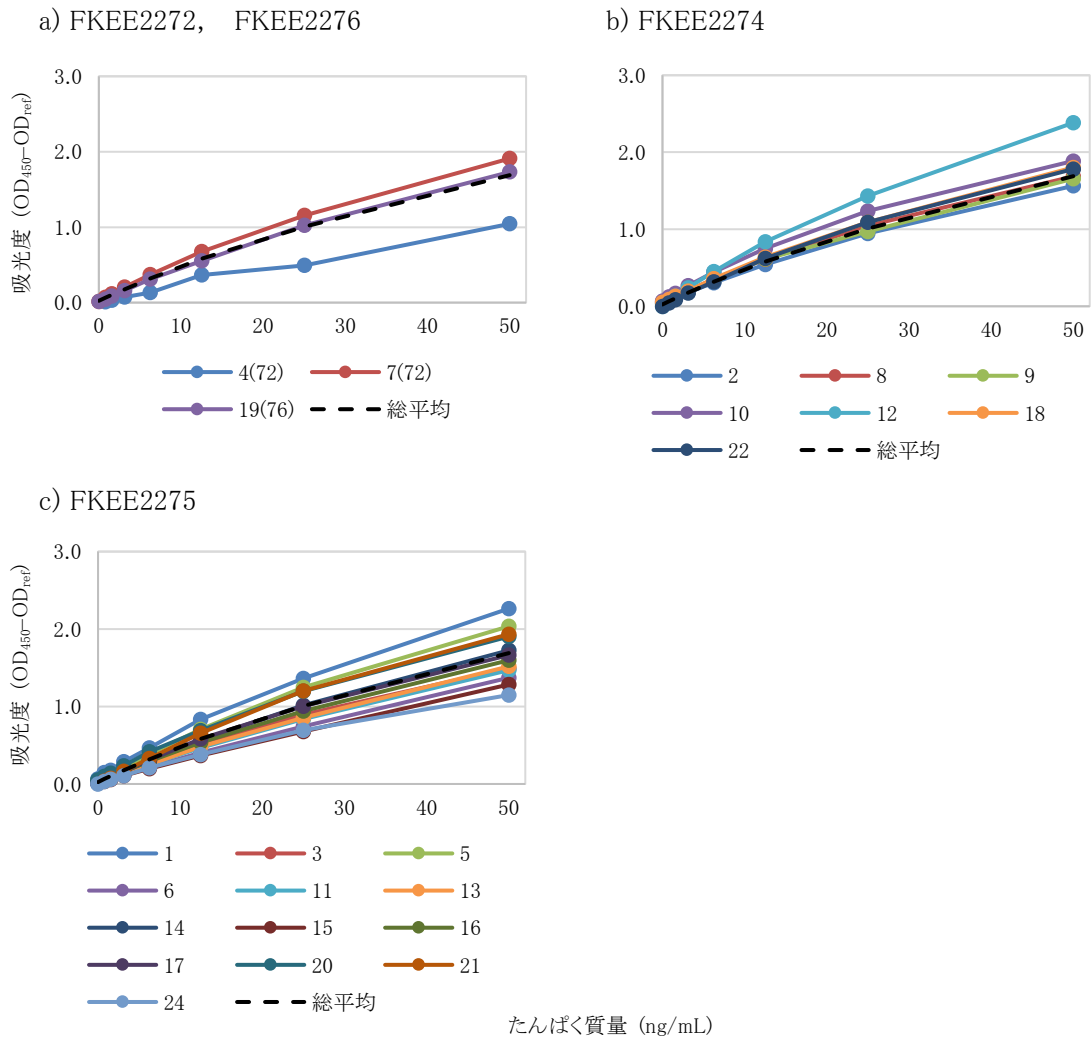


図15 日本ハム卵キットを用いた測定におけるロット別検量線

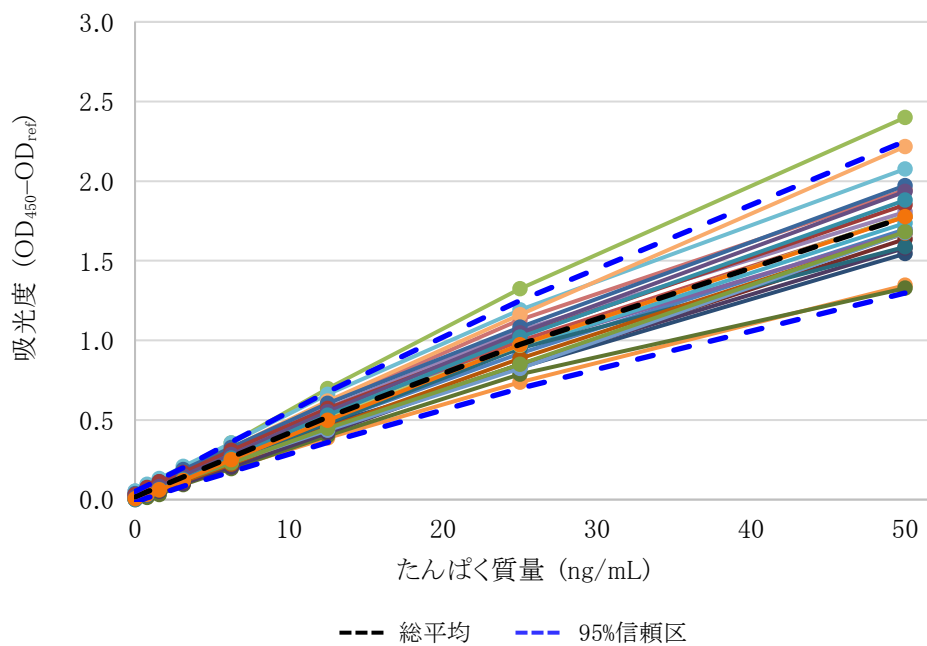


図16 モリナガ乳キットを用いた測定における検量線 (24機関)
ロット別検量線は図18を参照

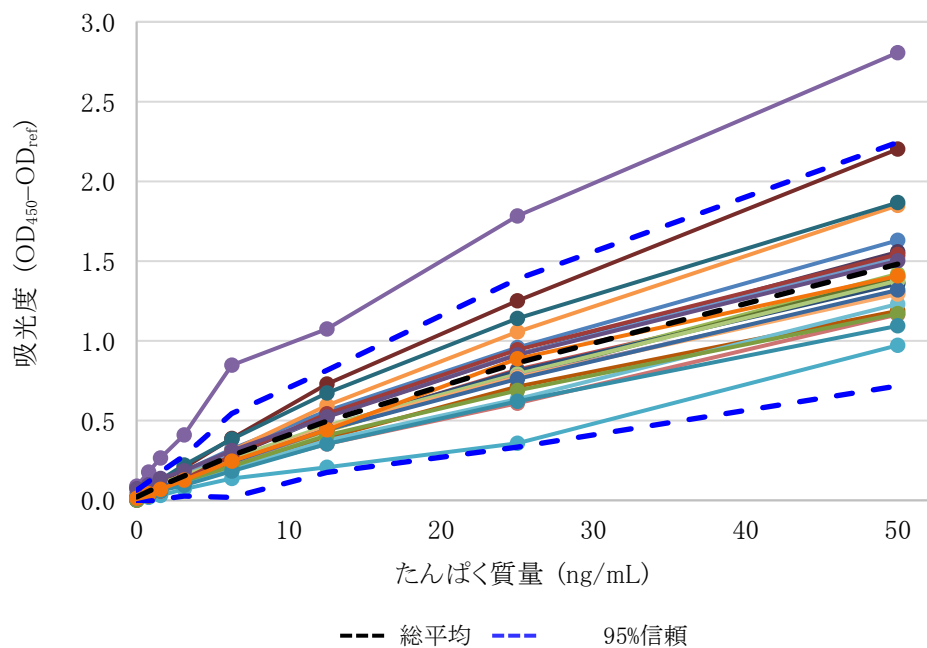


図17 日本ハム乳キットを用いた測定における検量線 (24機関)
ロット別検量線は図19を参照

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

ロット	使用期限	使用機関数
22JASFCS110	2023/1/11	1
22FESFCS112	2023/2/4	2
22MASFCS113	2023/3/1	2
22MASFCS114	2023/3/7	5
22MASFCS115	2023/3/23	2
22MYSFCS117	2023/5/12	4
22JUSFCS118	2023/6/6	7
22AUSFCS120	2023/8/4	1

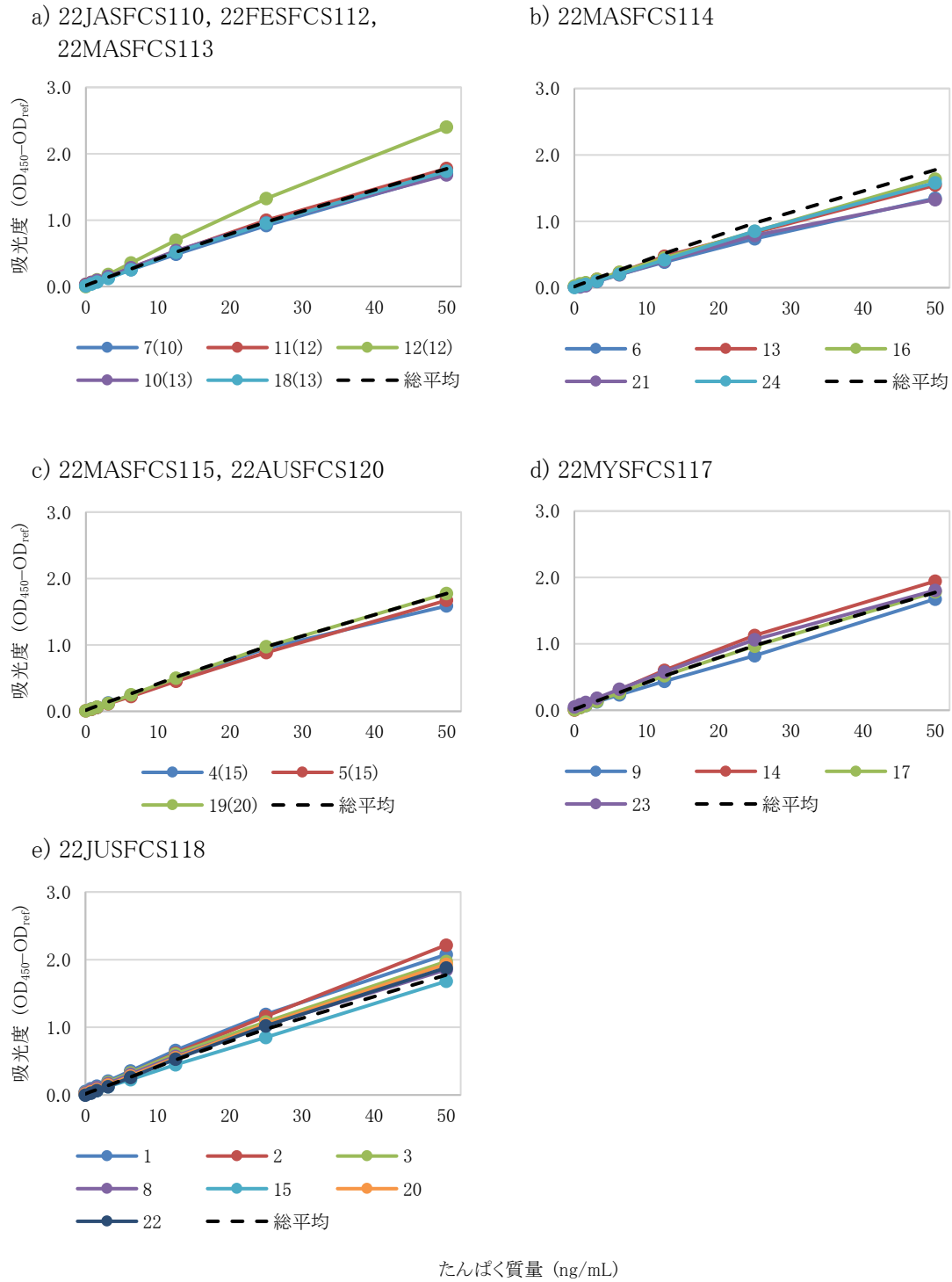


図18 モリナガ乳キットを用いた測定におけるロット別検量線

表14 外部精度管理調査研究で使用された日本ハム乳キットの
ロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
FKEM2270	2022.11	3
FKEM2271	2023.1	8
FKEM2272	2023.3	12
FKEM2273	2023.4	1

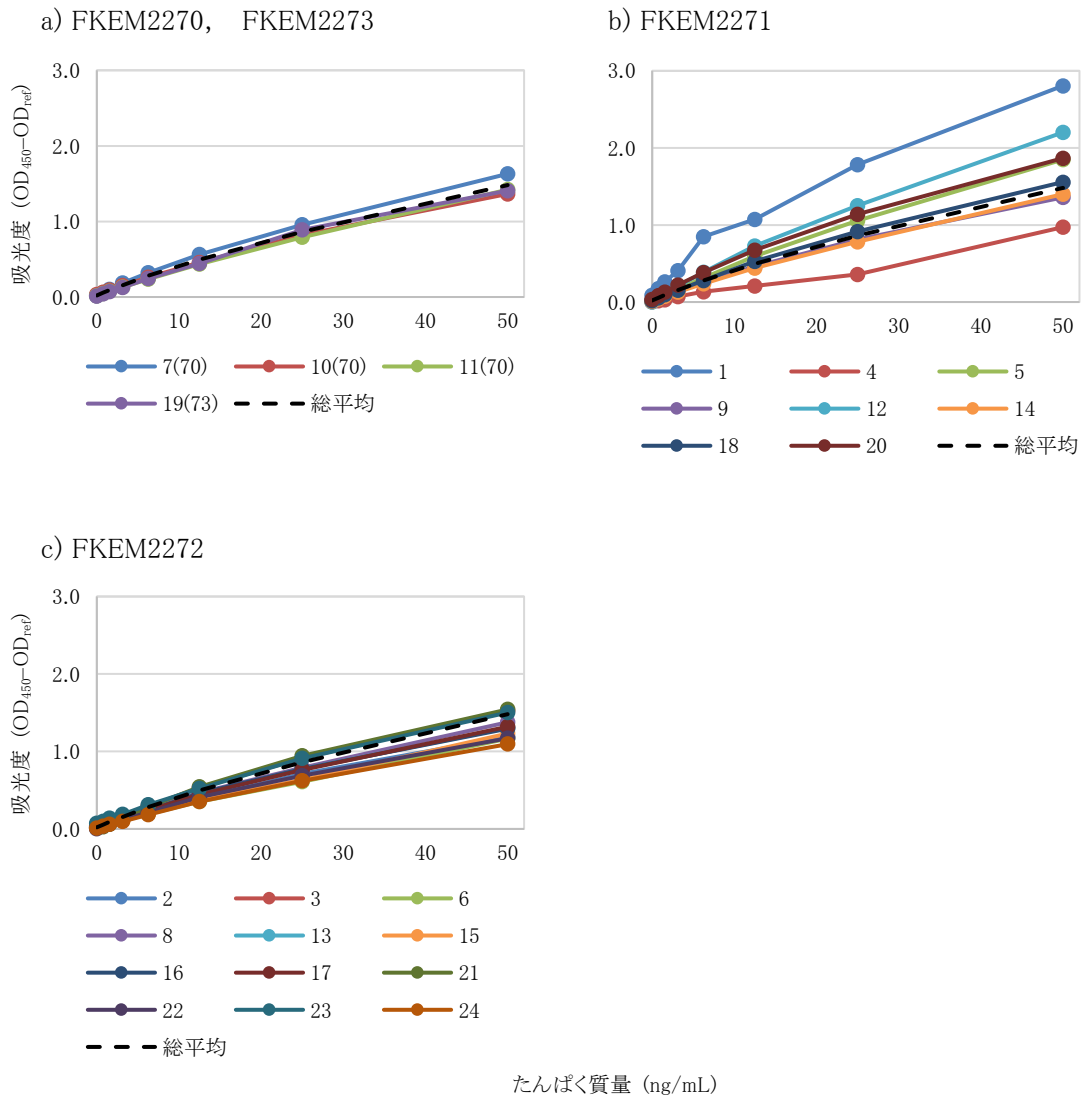
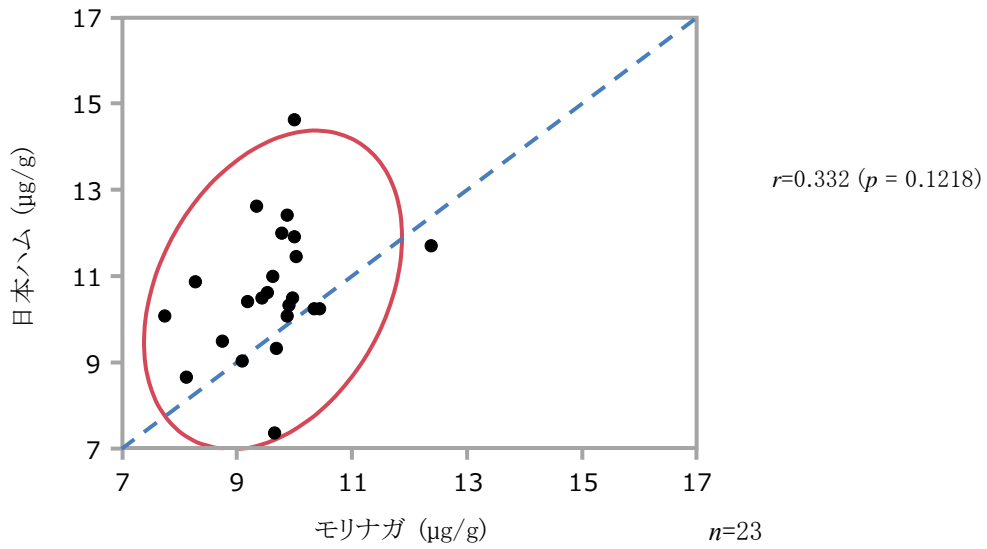


図19 日本ハム乳キットを用いた測定におけるロット別検量線

a) 卵検出系



b) 乳検出系

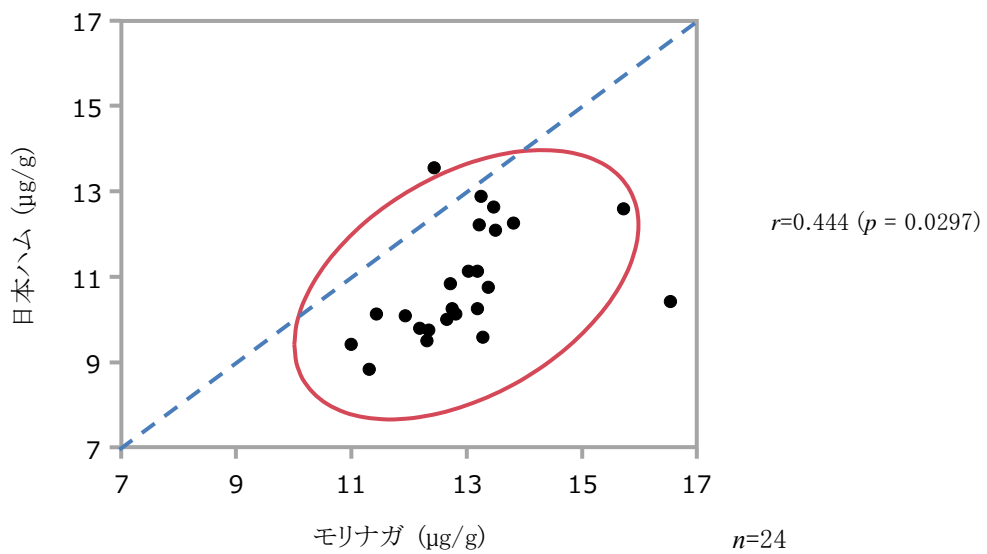


図20 同一特定原材料におけるキット間の報告値の相関性

図中の楕円は95%確率楕円を示す。点線は $y = x$

表15 2022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 ^a	0	1	2	3 - 5	6 - 10	10超
	5	5	3	8	2	3
抽出方法	振とう	その他				
	24	0				
振とう時間 (h)	12未満	12 - 16未満	16 - 20未満	20以上		
	0	6	18	0		
振とう速度 (rpm)	90未満	90 - 110	110超	不明		
	0	22	1	1		
ろ過	実施	実施せず				
	16	8				
遠心分離	実施	実施せず				
	23	1				
抽出液等の 希釈操作	手動	自動				
	23	1				
試薬のプレート への添加 ^a	手動				電動	
	連続分注		マルチch	シングルch	連続分注 シングルch	自動
	マルチch	シングルch				
	0	0	20	3	0	2
手動		自動				
洗浄方法	13	11				
マイクロプレート リーダーのメーカー	TECAN	ThermoFisher	Corona	Bio-Rad	Bio Tek	その他
	1	5	8	6	2	2
検量線の 回帰法	4PL ^b	その他				
	24	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		
	14	1	6	3		
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		
	21	1	2	0		

a 複数回答有

b 4PL: 4パラメーターロジスティック

(24機関)

表16 2022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) モリナガ卵キット (23機関)、使用ロット数 8ロット+不明1

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
	15	6	0	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	1	1	
試料添加時間 (分)	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	不明
	18	4	0	0	1
操作中の室温 (範囲)	20℃未満	20-30℃	30℃超		
	0	23	0		

b) 日本ハム卵キット (23機関)、使用ロット数 4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
	15	6	0	1	1
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	1	6	1	0	
試料添加時間 (分)	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	不明
	18	4	0	0	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	18	3	2	0

c) モリナガ乳キット (24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
	17	6	1	0	0
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	0	7	0	0	
試料添加時間 (分)	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	不明
	18	5	0	0	1
操作中の室温 (範囲)	20℃未満	20-30℃	30℃超		
	0	24	0		

d) 日本ハム乳キット (24機関)、使用ロット数 4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
	14	7	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)	
	1	8	1	0	
試料添加時間 (分)	10以内	10-20以内	20-30以内	30超	不明
	18	4	1	0	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	19	4	1	0

表17 2021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	2	3	3	1	1	5

(回答19機関)

表18 2021年度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 (18機関)	10	8	10	7	6	9
総試験数	3630 (19.9%)	3150 (17.3%)	3087 (16.9%)	3267 (17.9%)	3264 (17.9%)	1822 (10.0%)
陽性検出機関 (18機関)	2	3	3	2	2	4
検出試験数	456	449	896	74	107	110
陽性率 (%)	12.6	14.3	29.0	2.3	3.3	6.0
使用キット [複数回答] (22機関)						
日本ハム	15	14	14	11	9	—
モリナガ	14	13	14	10	9	—
プリマハム	1	0	1	0	0	—
ニッスイ	—	—	—	—	—	11
マルハ	—	—	—	—	—	12
確認試験						
実施機関 (18機関)	2	1	3	1	1	4
総試験数	7	5	23	9	14	19
陽性検出機関 (18機関)	1	1	2	0	1	3
検出試験数	5	1	5	0	1	10

表19 Incurred samples作製のためのスクリーニング結果

a) 卵検出用

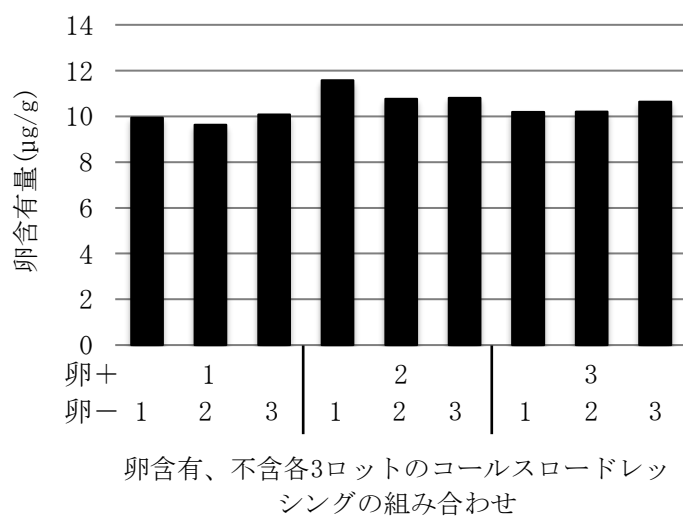
試料	卵含量(μg/g)
焼菓子1	33.67
焼菓子2	3.01
油菓子	3.96
パスタソース	48.92
ピザソース	0.27
コールスロードレッシング	33.05
11試料	≥ 50
7試料	検出限界以下

b) 乳検出用

試料	乳含量(μg/g)
スナック菓子1	0.04
スナック菓子2	0.20
スナック菓子3	> 50
チョコレート	> 50
乾燥スープ	0.19
プレッツェル	45.1
クッキー	19.0
ビスケット	> 50

図21 Incurred samples用試料のロット間差

a) 卵検出用



b) 乳検出

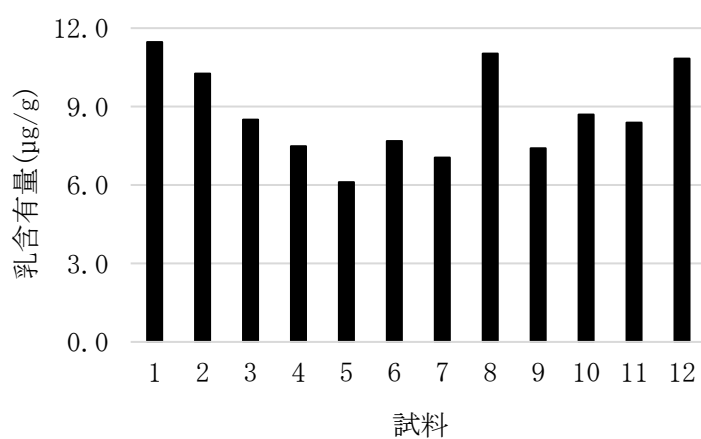


表20 Incurred samplesのモリナガキットを用いた2施設間での測定含量の比較および均質性

特定原材料	食品名	施設1	施設2	
		含量 (µg/g)	含量 (µg/g)	均質性
卵	コールスロドレッシング	9.8±0.60	10.79±0.26	均質
乳	クッキー	8.3±0.21	7.00±0.36	均質

令和4年度 特定原材料検査外部精度管理調査研究参加機関

千葉県衛生研究所

杉並保健所 生活衛生課 衛生検査係

川崎市健康安全研究所

長野県環境保全研究所

岐阜県保健環境研究所

愛知県衛生研究所

豊田市保健所 保健衛生課 衛生試験所

滋賀県衛生科学センター

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

香川県環境保健研究センター

山口県環境保健センター

福岡市保健医療局保健環境研究所

佐賀県衛生薬業センター

公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所

一般社団法人 新潟県環境衛生中央研究所

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

株式会社エムビックらいふ 環境分析センター

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

ユーロフィンQKEN株式会社

名古屋製酪株式会社

日東富士製粉株式会社

株式会社ハウス食品分析テクノサービス

星薬科大学薬学部

令和4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 部長
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：冷凍食品）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。

性能評価では冷凍試料（ -15°C 以下）と冷凍11日後に 22.5°C 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50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、および接種日と冷凍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 $\pm 20\%$ 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）
- ・滅菌希釈水 90mL（栄研化学）
- ・0.04w/v% フェノールレッド溶液（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、「食品、添加物等の規格基準」（昭和34年厚生省告示第370号）に準拠して実施した。以下にその測定手順を示した。

調査試料25 gを滅菌希釈水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22-26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40 gをレトルトパウチに秤量し、121℃60分間の高圧蒸気滅菌を行った。無菌的に乾燥させた後、菌を添加するまで室温保存した。

2) 添加菌液の調製

0.04% (w/v) フェノールレッド溶液と40% (w/v) 相当のNaClを等量混合した溶液を菌液希釈用溶液とした。

市販の枯草菌芽胞液を菌液希釈用溶液で希釈し、約 1.7×10^6 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68 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凍保存した（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冷凍保存（以下、「冷凍試料」という）、②冷凍保存11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

冷凍試料は添加菌の添加直後、保存開始から11、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冷凍試料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冷凍試料の添加直後と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 $0.1 \log \text{ cfu/g}$ 以下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、50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 [2022年11月25日発送、飛脚クール便]。見立て食材を「冷凍食品」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2022年12月23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（3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 40 g をレトルトパウチに秤量し、121°C 60 分間の高圧蒸気滅菌を行った。無菌的に乾燥させた後、菌を添加するまで室温保存した。

0.04% (w/v) フェノールレッド溶液と40% (w/v) 相当のNaClを等量混合した溶液を菌液希釈用溶液とした。

市販の枯草菌芽胞液を菌液希釈用溶液で希釈し、約 1.7×10^6 cfu/mL に希釈したものを添加菌液とした。基材に20% (w/v) NaCl 溶液 68 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凍保存した。

2. 調査試料の性能評価

冷凍試料の生菌数測定を添加菌の添加直後、保存開始から11、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）。

冷凍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 $-0.06 \log$ 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日後のいずれも冷凍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凍保存し、その中から均質性確認試験および安定性確認試験用に無作為に各 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 $0.06 \log \text{ cfu/g}$ 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 50 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 1 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 2 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 14.62 % 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、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が 1 機関であった。

相対標準偏差は 1.76 % 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、いずれも概ね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。

E. 結論

これらの結果から、本調査試料は技能

試験に供するにあたって十分な均質性と安定性を有し、実数解析、対数解析のいずれの解析においても参加機関を正しく評価できると考えられた。昨年度実施した「弁当及びそご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〕）に基づく「弁当」とは異なる見立てとして、「冷凍食品」での運用が可能と考えられた。

本調査試料は2022年度にISO/IEC 17043の微生物技能試験認定範囲に追加した。2023年度の外部精度管理調査にて実運用を開始する見込みである。

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

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

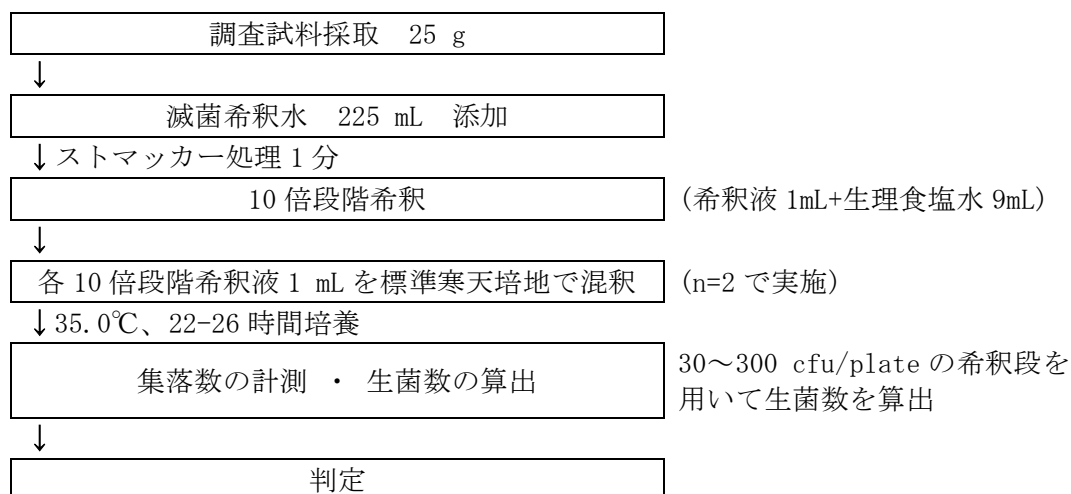


図 1 一般細菌数測定検査 試験手順

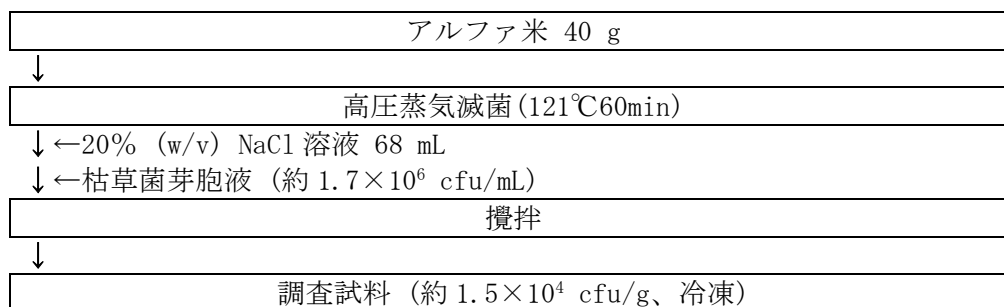


図 2 調査試料 作製手順

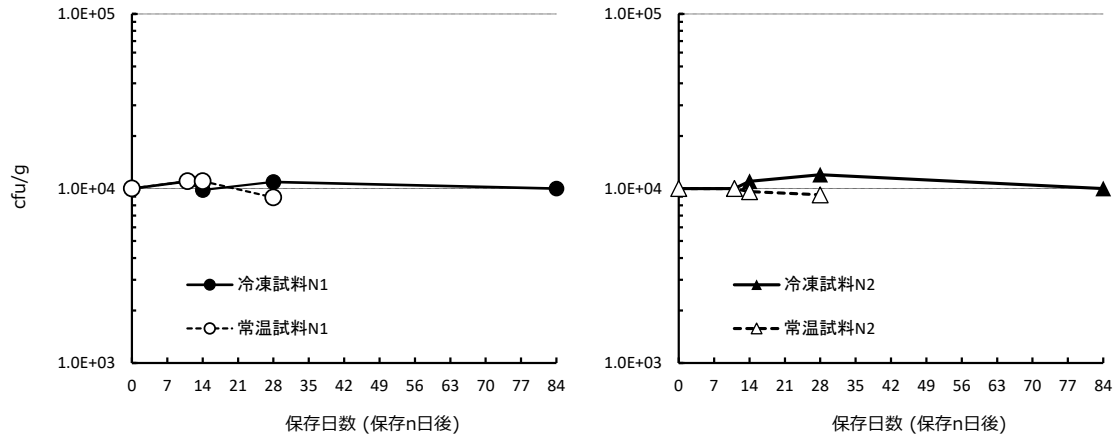


図3 調査試料の性能評価（生菌数の挙動、左図：N1 右図：N2）

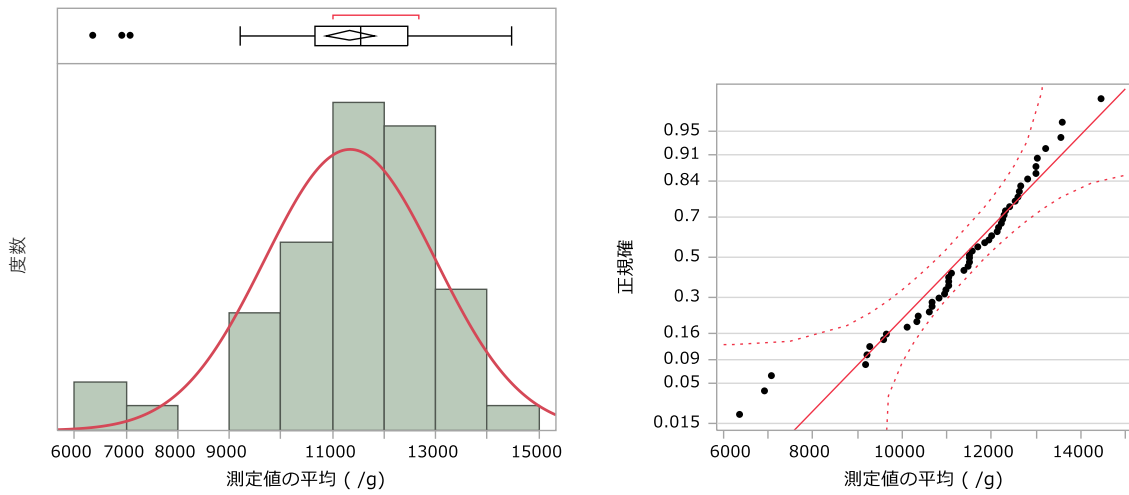


図4 パイロットスタディ 実数解析のヒストグラムと正規確率プロット

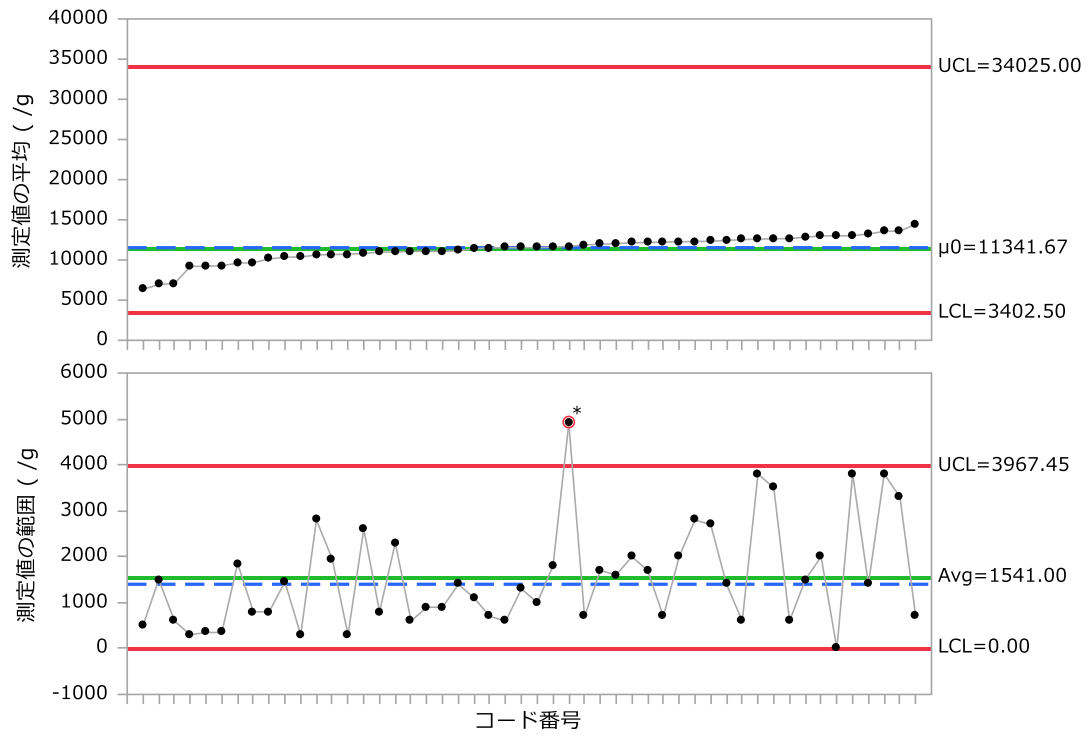


図5 パイロットスタディ 実数解析の $\bar{X}-R$ 管理図

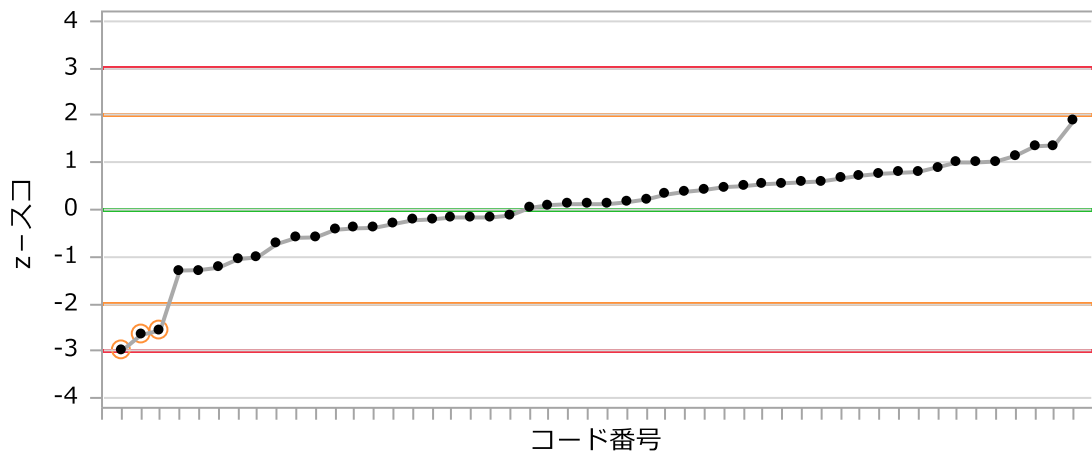


図6 パイロットスタディ 実数解析のz-スコアの順位

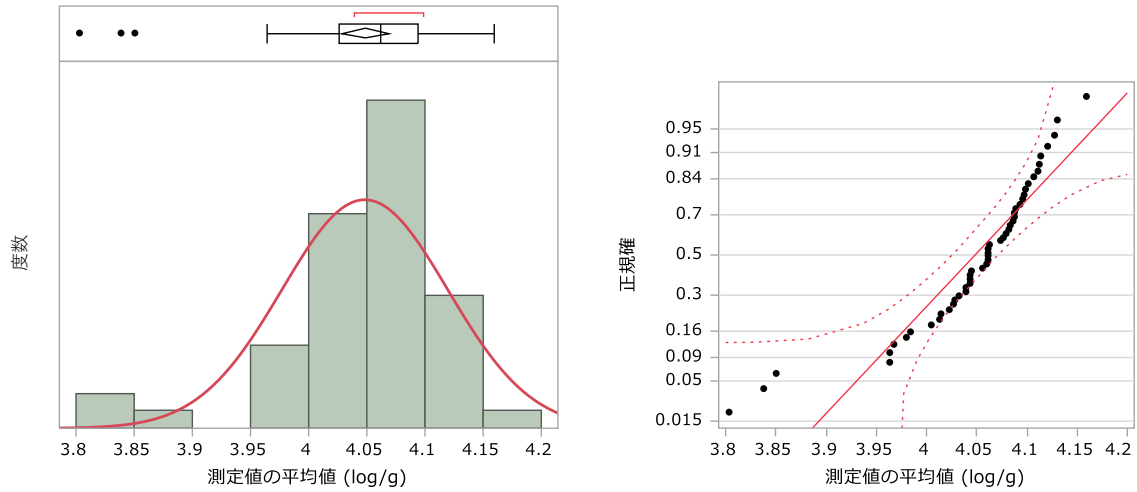


図7 パイロットスタディ 対数解析のヒストグラムと正規確率プロット

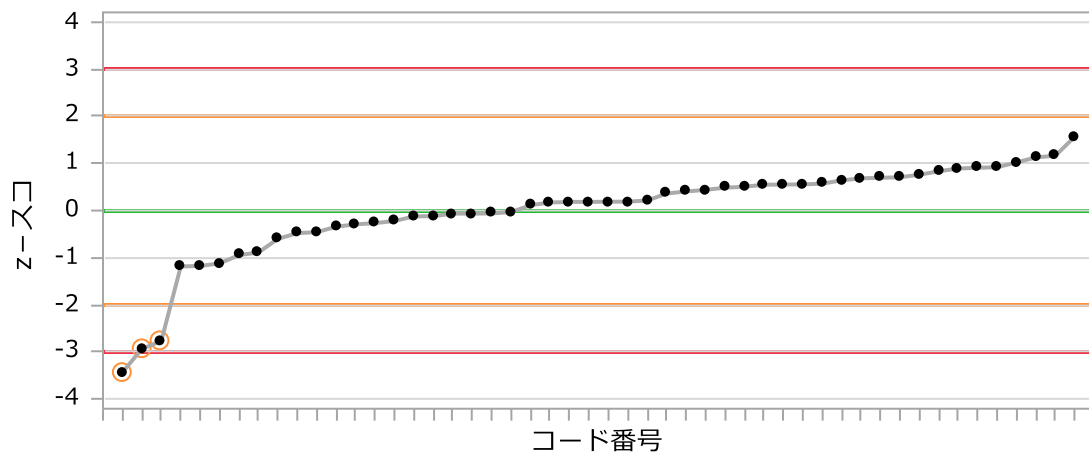


図8 パイロットスタディ 対数解析のz-スコアの順位

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	冷凍試料	温度変化試験
		(22.5℃ (常温試料))
0 (添加直後)	○ (添加後、冷凍せずに試験実施)	
11	○	(冷凍から 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	
	冷凍試料	常温試料	冷凍試料	常温試料
0 (添加直後)	1.0×10^4	—	1.0×10^4	—
11	1.1×10^4	—	1.0×10^4	—
14	9.8×10^3	1.1×10^4	1.1×10^4	9.6×10^3
28	1.1×10^4	8.9×10^3	1.2×10^4	9.2×10^3
84	1.0×10^4	—	1.0×10^4	—

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	
	冷凍試料	常温試料	冷凍試料	常温試料
0 (添加直後)	4.00	—	4.00	—
11	4.04	—	4.00	—
14	3.99	4.04	4.04	3.98
28	4.04	3.95	4.08	3.96
84	4.00	—	4.00	—

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）

冷凍試料 保存日数	生菌数 ^{※1}		A-B	平均値 ^{※2}	評価① ^{※3}	評価② ^{※4}	
	A	B					
0（添加直後）	4.00	4.00	0.00	4.00	適合	—	—
11	4.04	4.00	0.04	4.02	適合	—	—
14	3.99	4.04	-0.05	4.02	適合	—	—
28	4.04	4.08	-0.04	4.06	適合	-0.06	適合
84	4.00	4.00	0.00	4.00	適合	—	—

生菌数の単位：log cfu/g

※1： A、生菌数A、Bは表3の冷凍試料 N1、N2の数値を転記した。

※2： A、Bの平均値を示した。

※3： A、Bの冷凍の生菌数（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	9.3×10^3	8.8×10^3
②	1.1×10^4	8.6×10^3
③	9.6×10^3	7.1×10^3
④	1.0×10^4	1.1×10^4
⑤	1.0×10^4	9.2×10^3
⑥	1.1×10^4	9.9×10^3
⑦	1.1×10^4	8.9×10^3
⑧	8.7×10^3	9.1×10^3
⑨	1.1×10^4	7.6×10^3
⑩	1.1×10^4	8.5×10^3

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	9565
標準偏差	1200
変動係数	0.125
一元分散分析 F値	0.492
一元分散分析 F値に対する有意確率	0.850

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	9.3×10^3	3.97	8.8×10^3	3.94	0.0003
②	1.1×10^4	4.04	8.6×10^3	3.93	0.0057
③	9.6×10^3	3.98	7.1×10^3	3.85	0.0086
④	1.0×10^4	4.00	1.1×10^4	4.04	0.0009
⑤	1.0×10^4	4.00	9.2×10^3	3.96	0.0007
⑥	1.1×10^4	4.04	9.9×10^3	4.00	0.0010
⑦	1.1×10^4	4.04	8.9×10^3	3.95	0.0042
⑧	8.7×10^3	3.94	9.1×10^3	3.96	0.0002
⑨	1.1×10^4	4.04	7.6×10^3	3.88	0.0129
⑩	1.1×10^4	4.04	8.5×10^3	3.93	0.0063
標準不確かさ ^{※1}	0.06		log cfu/g		
均質性確認試験の評価 ^{※2}	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	9.2×10^3	1.2×10^4
②	9.0×10^3	9.2×10^3
③	1.0×10^4	1.1×10^4
④	1.0×10^4	1.0×10^4
⑤	9.2×10^3	9.9×10^3
⑥	9.5×10^3	1.0×10^4
⑦	9.1×10^3	8.5×10^3
⑧	8.6×10^3	9.4×10^3
⑨	8.4×10^3	1.0×10^4
⑩	1.0×10^4	9.2×10^3

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	9610
安定性確認試験の評価 ^{※1}	適合

生菌数の単位：cfu/g

※1：均質性確認試験の平均値 (9565cfu/g) の±20% (7652～11478 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	50
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)	50
付与値 (平均値)	11341.67 /g
標準偏差	1658.32 /g
相対標準偏差	14.62 %
\bar{X} 管理図による評価	$LCL : 3402.50 /g, UCL : 34025.00 /g$
不満足	$\bar{x} < LCL$ 0機関
満足	$LCL \leq \bar{x} \leq UCL$ 50機関
不満足	$UCL < \bar{x}$ 0機関
R 管理図による評価	$UCL : 3967.45 /g$
満足	$R \leq UCL$ 49機関
不満足	$UCL < R$ 1機関
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} $ 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	50
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)	50
付与値 (平均値)	4.048 log/g
標準偏差	0.071 log/g
相対標準偏差	1.76 %
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} $ 1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
	22	7	10	11
試料採取量	10 g	25 g		
	0	50		
希釈液	リン酸 緩衝希釈水	ペプトン加 生理食塩水	その他	
	46	2	2	
均質化方法	ストマッカー	ブレンダー		
	50	0		
均質化処理時間	30 秒	1 分	2 分	
	1	48	1	
使用培地	標準寒天培地	普通寒天培地	SCD 寒天培地	
	50	0	0	
使用培地タイプ	粉末培地	生培地	フィルム培地	
	50	0	0	
培養温度	35±1℃			
	50			
培養時間	24 時間程度	48 時間程度	その他	
	47	3	0	

令和4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およ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	埼玉県衛生研究所
研究協力者	今井 浩一	埼玉県衛生研究所
	千葉 雄介	川口市保健所
	茂呂 寛貴	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。ISO 16140-3:2021 では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 LOD₅₀ (level of detection) を用いている。しかし、わが国では E. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法が広く活用されているにも関わらず、試験法に LOD₅₀ が設定されていないため、試験法導入時の性能評価ができないのが現状である。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、E. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法の LOD₅₀ の推定を試みた。令和3年度までの研究により推定された LOD₅₀ は E. coli 定性試験法で 14~27 CFU/g、黄色ブドウ球菌定性試験法で 25~48 CFU/g であった。令和4年度は LOD₅₀ が最大、最小であった食品試料について、5 試験室による試験室間での比較を行った。両試験法とも推定した LOD₅₀ に対していずれの試験室においても ISO 16140-3 : 2021 に規定された許容限界である 4 倍以内の結果であったことから、推定した LOD₅₀ は妥当な数値であったと考えられた。

一方、サイクラミン酸、サイクラミン酸ナトリウム及びサイクラミン酸カルシウムは我が国では使用が認められていない指定外添加物（甘味料）である。これらの試験法は厚生労働省から通知（規定分析法）されており、令和2年度は8種の食品群について適用性を検討した。そのうち「ビスケット」、「チョコレート」、「米酢」、「らっきょう漬け」及び「たくあん漬け」の5食品群で、回収率等の面で改良する必要があると考えられた。令和3年度はこれら5食品群について改良法を報告した。令和4年度はさらに「ビスケット」及び「たくあん漬け」について、令和4年度に報告した改良法に加え、ホモジナイズ抽出が有効であることを確認した。また、規定分析法では、定量下限値レベルでの感度や連続注入による保持時間の変動等が問題となったことから、新たな誘導体化法による新規分析法を開発した。オレ

ンジジュース、ブルーベリージャム及びりんごゼリーを対象とし、適用性を検討した。いずれの試料においても感度、夾雑ピークとの分離及び回収率（104～109%）等、良好な結果が得られた。

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/IEC17025 : 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。微生物定性試験において「陰性」は培地中で発育し得る細菌が0であり、「陽性」は1以上であることを示す。しかし、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、試料中に細菌が存在していても、確実に検出できるとは限らない。また、培地への接種前に試料の希釈を要する試験法の場合、その手技からの影響による誤差や、粘性などの試料の特性によっても検出感度に

影響を及ぼす可能性が考えられる。したがって、この値以上の細菌が存在していれば確実に検出可能である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LOD₅₀ (level of detection) を用いている。

日本の公定法は、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌等、一部の試験において食品からの微生物標準試験法検討委員会により標準試験法として妥当性確認が行われ、公定法として採用されている。一方、E. coli等の衛生指標菌などは整備が進んでいない試験法が多い。また黄色ブドウ球菌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LOD₅₀については検討がなされていない。

E. coliおよび黄色ブドウ球菌定性試験法は我が国では2021年に廃止された衛生規範などで広く用いられてきた。食品衛生法上のE. coliは44.5℃で発育し、乳糖を分解してガスを産生する細菌群である。細菌学分類学上の*Escherichia coli*と必ずしも一致しないが、動物の糞便汚染指標として用いられてきた。また、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おり、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用いられてきた。

衛生規範の廃止により食品衛生法に基づく衛生指標はなくなり、各事業者による自主基準による衛生管理が求められるようになった。一方で、すべての事業者が独自の衛生基準を設定するのは難しく、旧衛生規範を参考にしたE. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法は今後も活用されると考えられる。しかし、妥当性確認が不十分であることから、LOD₅₀が設定されておらず試験法導入時の性能評価ができないのが現状である。そこで本研究ではE. coliおよび黄色ブドウ球菌定性試験法のLOD₅₀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。

令和3年度までの研究により、単一試験室において推定されたLOD₅₀はE. coli定性試験法で14~27 CFU/g、黄色ブドウ球菌定性試験法で25~48 CFU/gであった。令和4年度はLOD₅₀が最大、最小であった食品試料について、5試験室による共同試験を行い、試験室間での比較により単一試験室において推定されたLOD₅₀が妥当な数値であったか検討した。

B. 方法

群馬県食品安全検査センター、越谷市衛生試験所、千葉市環境保健研究所、横浜市衛生研究所に御協力をいただき、ISO 16140-3 : 2021のプロトコル1を参考にして5試験室による共同試験を実施し、推定されたLOD₅₀と各試験室におけるeLOD₅₀を比較した。プロトコル1に記載されている手法とは、LOD₅₀と同程度の細菌接種試料を $n=4$ 、LOD₅₀の3倍濃度を $n=4$ 、LOD₅₀の9倍濃度を $n=1$ およびブラン

ク試料を $n=1$ で試験を実施し、陽性と判定された試料数を表1 (ISO 16140-3 : 2021から抜粋) に当てはめることで、実施した試験法のeLOD₅₀を算出するものである。なお、LOD₅₀の算出法と比べ、試料数が少ないことからISO 16140-3 : 2021においてeLOD₅₀ (推定されたLOD₅₀) と定義されている。試料には各試験法で推定されたLOD₅₀が最大または最小であった食品を用いて検討を行った。E. coli定性試験法ではオクラとピラフ、黄色ブドウ球菌定性試験法ではチャーハンとソーセージを供試した。試料への接種菌株は、BioBall HD 10K *Escherichia coli* NCTC9001 (使用ロット番号B6556、9536.0 CFU) およびBioBall HD 10K *Staphylococcus aureus* NCTC10788 (使用ロット番号B6452、10518.0 CFU) (いずれもbioMérieux) を使用した。E. coli定性試験法ではリン酸緩衝液(PB) 6 mLに4粒または2粒を懸濁し、それぞれオクラ、ピラフ用の接種菌原液とした。黄色ブドウ球菌定性試験法では6粒または3粒を懸濁し、それぞれチャーハン、ソーセージ用の接種菌原液とした。接種菌原液をPB6 mLで3段階階希釈し、3倍および9倍希釈したものを接種菌液とした。フィルター付きストマッキング袋に採取した試料25 gに、接種菌原液または接種菌液を1 mLずつ接種し、細菌接種試料とした。試料中の菌濃度を高い方から d_1-d_3 (CFU/g) (供試菌株の試験成績書を基に算出した試験ごとの菌濃度を各表の注釈に記載) とした。細菌接種試料の調製は各試験室で行った。菌濃度 d_1 CFU/gの細菌接種試料は $n=1$ で、 d_2 、 d_3 CFU/gは $n=4$

で、ブランク試料も $n=1$ で実施した。

E. coli定性試験法は冷凍食品の規格基準に規定された試験法を用いた。細菌接種試料にPB225 mLを加えてストマッキング後、その10 mLをPB90 mLに加えて混和し、100倍希釈液とした。3本のEC発酵管に100倍希釈液各1 mLを接種し、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養した。1本以上のEC発酵管にガス産生が認められた場合、E. coli試験陽性と判定した。

黄色ブドウ球菌定性試験法では食肉製品の規格基準に規定された試験法を用いた。細菌接種試料にBPW225 mLを加えてストマッキングし10倍希釈液を調製した。10倍希釈液を0.1 mLずつ選択分離寒天培地（3%卵黄加マンニット食塩寒天培地(MSEYA)またはベアード・パーカー寒天培地(BPA)）2枚に接種、塗抹し、 $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ± 2 時間培養した。培養後、2枚の選択分離寒天培地のいずれかに1コロニー以上の黄色ブドウ球菌の定型集落（MSEYA：黄色集落でその周囲に卵黄反応、BPA：黒色または灰色集落で周囲に透明帯、集落辺縁に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た。

培地等は各試験室で通常用いている製品により試験を実施した。黄色ブドウ球菌定性試験の公定法では選択分離寒天培地としてMSEYAとBPAが選択可能であるため、各試験室で通常使用しているものを用いて実施した。事前に食品試料がE. coli定性試験法ではEC発酵管でガス産生せず、黄色ブドウ球菌定性試験法では選択分離寒天培地上で定型集落が発育しないことを確認していたため、EC発酵管の

ガス産生の有無または選択分離寒天培地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。陽性と判定した試料数に応じて、ISO16140-3：2021から抜粋した表1を基に $e\text{LOD}_{50}$ を求め、 LOD_{50} と比較した（例：試料中の菌濃度 d_1 の陽性試料数が1、 d_2 が3、 d_3 が2のとき、 $e\text{LOD}_{50}=1.3 \times \text{LIL}(\text{Low inoculation level})=1.3 \times d_3$ (CFU/g)）。

C. D. 研究結果および考察

オクラおよびピラフを試料としてE. coli定性試験を行った結果を表2に示した。各試験室において得られた $e\text{LOD}_{50}$ は、オクラで14-48 CFU/g、ピラフで21-40 CFU/gであった。ピラフの LOD_{50} は14 CFU/gでオクラの27 CFU/gと比べると2倍程度の差があったが、各試験室の $e\text{LOD}_{50}$ ではオクラと同程度であった。 LOD_{50} との比はオクラで0.52-1.8倍、ピラフで1.5-2.9倍であった。

各試験室で使用したPBはLSIメディアエンス製のインスタント緩衝溶液(pH 7.2)が2施設で、LSIメディアエンス製のインスタント緩衝溶液(pH 7.4)、栄研化学製のバッグドメディアリン酸緩衝希釈水225および自家調製したものが各1施設であった。EC培地は全施設で粉末製品から調製しており、栄研化学製が4施設、日水製薬製が1施設であった。

チャーハンおよびソーセージを試料として黄色ブドウ球菌定性試験を実施した結果を表3に示した。各試験室において得られた $e\text{LOD}_{50}$ は、チャーハンで23-108 CFU/g、ソーセージで16-40 CFU/gであった。 LOD_{50} との比はチャーハンで0.49-2.3倍、ソーセージで0.66-1.6倍

であった。

各試験室で使用した選択分離寒天培地はMSEYAが3施設でBPAは2施設であった。MSEYAは3施設とも栄研化学製の粉末培地から調製しており、卵黄液には極東製薬工業製、OXOID製、自家調製品をそれぞれ用いていた。BPAは2施設とも生培地を使用しており、それぞれ日水製薬製、bioMérieux製であった。また、選択分離寒天培地への接種にはいずれの施設でもメスピペットを用いており、その容量は1 mLが2施設、2.2 mL、2 mL、0.1 mLが各1施設であった。

各試験室で得られたeLOD₅₀をLOD₅₀と比較すると、いずれも4倍以内であった。ISO 16140-3：2021では、試験性能の検証時に算出されたeLOD₅₀が、LOD₅₀の4倍以内であることを許容限界として規定している。本研究で推定したLOD₅₀に対して、試験室間比較において得られたeLOD₅₀は4倍以内であったことから、推定したLOD₅₀は妥当な数値であると考えられた。また、以上から試験室間において両試験法とも同程度の試験性能を有すると推察された。

試験室間比較では技術の差だけではなく、異なる培地間での比較も期待した。E. coli定性試験法では使用した培地に偏りはあったものの、異なる希釈液、培地を用いてもeLOD₅₀に大きな差はなかった。黄色ブドウ球菌定性試験法では選択分離寒天培地としてMSEYAを使用した試験室とBPAを使用した試験室があったが、eLOD₅₀に大きな差はなかった。また、0.1 mLを測定するピペットの容量により差が生じる可能性も考えていた。

全試験室でマイクロピペットではなく、メスピペットを使用しており、その容量は0.1 mLから2.2 mLと幅広かったが大きな影響はなかったと考えられた。

E. 結論

共同試験による試験室間で比較により、単一試験室において推定されたE. coli定性試験法、黄色ブドウ球菌定性試験法のLOD₅₀が妥当な数値であったと推察された。

本研究ではE. coliおよび黄色ブドウ球菌定性試験法を対象として、LOD₅₀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研究を行った。本来LOD₅₀は妥当性確認時に設定するものである。しかし、E. coli定性試験は衛生指標菌として国内では広く実施されているが、海外では腸内細菌科菌群試験が主流として実施されている。近年国際的な整合性を主眼として公定法の見直しが行われている中で、E. coli定性試験法の妥当性確認は当面実施されないものと考えられる。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、すでにNIHSJ法として本研究で用いた集落計数法のほかに最確数法が妥当性確認されている。しかし、いずれの試験法も定量試験法であるため、今後定性試験法として妥当性確認し、LOD₅₀が設定される見込みはないと予想される。また、最確数法による選択増菌培養は集落計数法より検出率が高いと報告されている^{1,2)}。しかし、食品衛生法において採用されている黄色ブドウ球菌試験法は集落計数法のみであったことから、これまで集

落計数法が定性試験法として広く用いられてきた。また、最確数法は集落計数法と比べ試料接種量が100倍以上となり、従前行われてきた基準値と比べ非常に厳しくなるため、集落計数法が今後も定性試験法として用いられていくと推察される。以上より、両試験法とも定性試験法として当面はLOD₅₀が規定されないと考えられる。しかし、今後ISO/IEC 17025 : 2017が普及し、試験法の性能評価が求められる中で、各試験法の性能の目安が必要になると考え、本研究によりその目安を提示した。

ISO 16140-3 : 2021には妥当性確認が実施されていない食品カテゴリーに対する検証の手法も記載されている。培地への接種試料中の菌数が1 CFUであるときをLOD₅₀とみなして、本研究と同様の手法により検証して得られたeLOD₅₀がその4倍以内、すなわち4 CFU以下を許容範囲としている。共同試験によって得られたeLOD₅₀は試料接種量中の菌数に換算するとE. coli 定性試験法で0.42-1.4 CFU、黄色ブドウ球菌定性試験法で0.32-2.2 CFUであったため、4 CFU以下の許容範囲を十分に満たしており、今回の検討結果では試験性能の目安がなくても検証は可能であった。しかし、もし4 CFU以上となってしまう場合、試験室内の手法、技量の問題なのか、試験法自体の問題なのかの判断が難しい。試験法ごとにどの程度の性能が求められるかを明らかにする必要があると考える。本研究の結果を、各試験室での試験性能の検証における一つの指標として活用していただけることを期待している。

参考文献

- 1) 松村浩介ら：日食微誌，26，23-27 (2009).
- 2) 中峰 松ら：日食微誌，23，217-222 (2006).

食品添加物試験法の妥当性評価法

A. 研究目的

サイクラミン酸（以下「CY」という。）、サイクラミン酸ナトリウム（以下「CY-Na」という。）及びサイクラミン酸カルシウムは、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CY類が検出され、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4年度では健康食品や調味料、レトルト殺菌食品、漬物等からCY類が検出されている¹⁾。

CY類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。

規定分析法の妥当性評価のための検討として、一昨年度は、8種類の食品に対し添加回収試験を実施した。その結果、「ビスケット」、「チョコレート」、「米酢」、「らっきょう漬け」及び「たくあん漬け」の5食品について、改良法の検討が必要と考えられた。このため、昨年度は、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、らっきょう漬け及びたくあん漬けはpHの調整等についての検討を行った。

その際、ビスケット及びたくあん漬けの検討において、CYが試料に吸着した可能性が示唆されたことから、今年度は、ホモジナイザーを用いた規定分析法の改良法を検討することとした。

規定分析法は、簡便で有用な測定法であるが、先述のとおり試料の種類によって添加回収率が低くなることがある。また、感度についての難点もあり、装置によっては測定が難しいこともある。これは、CYの誘導体であるN,N-ジクロロシクロヘキシルアミン（以下「N,N-DCCA」という。）を測定対象としていることと、試験溶液がヘキサン溶液であることによる。規定分析法では、CYをN,N-DCCAに誘導体化し、ヘキサンに転溶媒し、高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）によって測定することとなっているが、これは、CYが吸収波長をもたず、紫外外部吸収検出器で検出することができないためである。しかし、N,N-DCCAの吸収もそれほど強いものではなく、規定分析法における定量下限（試料中濃度として0.01 g/kg）の試験溶液のピーク面積も小さい。また、移動相（アセトニトリル（以下「ACN」という。）・水混液（70:30））にヘキサン溶液である試験溶液を注入するため、注入量が多すぎると連続注入時の保持時間が変動することから、注入量を増加させることは困難である。加えて、N,N-DCCAは揮発性が高く、誘導体化後速やかに測定することが望ましく、試験溶液の保存には工夫が必要である。以上のような難点を解消するため、規定分析法と異なる誘導体化法を用いた新規分析法を検討した。

B. 方法

1. 規定分析法の改良の検討

規定分析法は、下記概略図のとおりである。

試料 10 g

水40 mL
沸騰水浴中で15分間加熱
冷却後水を加えて正確に100 mL…①
①の一部を採取し、遠心分離
(3500 rpm、10分)

上澄液 10 mL…②

固相抽出カートリッジ（上）及び陰イオン交換カートリッジ（下）を連結し、②を負荷
水10 mLを通過
固相抽出カートリッジを除去
塩酸（1→100）10 mLで陰イオン交換カートリッジから溶出

精製液 全量

硫酸（1→2） 2 mL
ヘキサン 5 mL
次亜塩素酸ナトリウム試薬 1 mL
激しく1分間振とう
水層を除去

ヘキサン層

5%炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL
1分間振とう

試験溶液

なお、固相抽出カートリッジとして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。

昨年度の検討より、ビスケットにおいては、加熱時にビスケットが餅状になったもの（以下「餅状物質」という。）が生成し、CYが餅状物質内に囚われたことにより、添加回収試験における回収率が低値となったものと考えられた。また、たくあん漬けについては、水中で加熱することにより、CYがたくあん漬けに吸着した可能性が示唆された。このため、規定分析法における加熱工程とメスアップ工程の間にホモジナイザーで餅状物質やたくあん漬けを粉砕・均一化（1分間）する工程を追加し、固相抽出法とスクリーニング法における回収率を確認した。

添加回収試験の試料としては、昨年度と同じ食品（別ロット品）について、CYが含有されていないことを確認した後、用いた。試験は、n=2で行った。添加濃度は、100 µg/gとした。

2. 新規分析法の開発

(1) 試料

試料は、埼玉県内で市販されていた1) オレンジジュース、2) ブルーベリージャム、3) りんごゼリーを用いた。ブルーベリージャムとりんごゼリーは、ホモジナイザーで均一化してから使用した。

(2) 試薬、試液

サイクラミン酸ナトリウム標準品：純度100.1%（富士フィルム和光純薬製）
N-シクロヘキシルベンズアミド標準品：

純度95%（Angene Chemical製）及び純度99.9%（FluoroChem製）

ACN：HPLC用（関東化学製）

塩酸：特級（関東化学製）

塩酸（8 mol/L）：少量の水に塩酸16 mLを加え、更に水を加えて24 mLとする。

過酸化水素水（30%）：特級（富士フィルム和光純薬製）

過酸化水素水（3%）：過酸化水素水（30%）10 mLに水を加えて100 mLとする。

塩化ベンゾイル：特級（富士フィルム和光純薬製）

塩化ベンゾイル（1%）ACN溶液：塩化ベンゾイル1 mLにACNを加えて100 mLとする。

水酸化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

水酸化ナトリウム（2 mol/L）：水酸化ナトリウム40 gを水に溶かして500 mLとする。

トリエチルアミン：特級（富士フィルム和光純薬製）

シクロヘキシルアミン：特級（富士フィルム和光純薬製）

(3) 検量線用標準液の調製

標準原液：CY-Na112 mgを正確に量り、水を加え正確に100 mLとする。

標準溶液（用時調製）：標準原液10 mLを量り、水を加え正確に100 mLとする（この液1 mLは、CY100 µgを含む）。

検量線用標準溶液（用時調製）：100 µg/mL標準溶液 0, 5, 10, 20, 50 mLを量り、水を加え正確に100 mLとする（これらの液1 mLは、CY 0, 5, 10, 20 µg及び

50 µgを含む)。

(4) 装置

HPLC : Agilent 1260

ホモジナイザー : ヒスコトロン (マイクロテック・ニチオン製)

(5) HPLC測定条件

移動相 : ACN・水 (60:40)

カラム温度 : 40°C

カラム : zorbax Eclipse Plus C18 4.6×25cm (5µm) (Agilent)

流速 : 1.0 mL/分

測定時間 : 20分

注入量 : 20 µL

測定波長 : 190~400 nm

モニター波長 : 254nm (定量) ,
230nm, 265nm

(6) 検量線

検量線用標準溶液それぞれ2 mLを後述する(9) 試験溶液の調製 ウ 分解及びエ 誘導体化 の項に従って操作したのち、HPLCで測定し、ピーク面積からCYの検量線を作成する。

(7) 定量

試験溶液をHPLCで測定し、得られたピーク面積と検量線から試験溶液中のCY濃度 (µg/mL) を求め、次式によって試料中のCY含量 (µg/g) を計算する。

CY含量 (µg/g) = (A×100)/W

A : 試験溶液中のCY濃度 (µg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

(8) 添加試料の調製

試料10.0 gに標準溶液(100 µg/mL)2 mLを添加しよく混合した後、30分間放置した。

(9) 試験溶液の調製

ア 抽出

試料をそのまま、あるいは細切もしくは粉砕機で粉砕後、10.0 gを精密に量り、水70 mLを加えて沸騰水浴中で15分間、必要に応じてガラス棒等で攪拌しながら加熱する。冷却後、水を加えて正確に100 mLとし、抽出液とする。

イ 精製

抽出液の一部を採取し、3500 rpmで10分間遠心分離して上澄液10 mLを正確に量り採り、固相抽出カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジをこの順番に接続したものに負荷する。水10 mLで洗浄した後、固相抽出カートリッジを除去する。陰イオン交換カートリッジを塩酸(以下「HCl」という。)(1→100)で溶出させ、溶出液を10mLにメスアップし精製液とする。

ウ 分解

精製液2 mLを正確に採り、これにHCl (8 mol/L) 0.5 mLと過酸化水素水(以下「H₂O₂水」という。)(3%) 0.5 mLを加え、沸騰水浴中で30分間加熱し加水分解し、分解液とする。

エ 誘導体化

分解液全量に水酸化ナトリウム(以下「NaOH」という。)(2 mol/L) 4.5 mLと塩化ベンゾイル(以下「BC」という。)(1%) ACN溶液 2 mLを加え、振とうする。HCl (8 mol/L) でpHを中性付近に調

整し、水で10 mLにメスアップして試験溶液とする。

(10) 反応式 (図1)

(11) 試験溶液の調製法概略 (図2)

C. D. 研究結果および考察

1. 規定分析法の改良の検討

ビスケットでは、加熱・放冷後に餅状物質が生成した。餅状物質をホモジナイザーで1分破碎したところ、餅状物質が消失し、均一な溶液となった。平均回収率は、固相抽出法が94.3%、スクリーニング法が94.5%となった。(表4)

たくあん漬けにおいても、同様にホモジナイズし、それから上澄液を調製したところ、平均回収率は、固相抽出法が93.9%、スクリーニング法が102.8%となった。(表5)

以上より、ビスケットの分析では、昨年度に考察したように加水量を増やしたり、混和・攪拌したりしながら上澄液の調製を行うことに加え、餅状物質をホモジナイズすることも有効であると考えられた。また、たくあん漬けについても、ホモジナイズは回収率の向上につながるものと考えられた。

2. 新規分析法の検討

(1) 誘導体の検討

新規分析法については、規定分析法と同様にHPLCにて測定でき、かつ、感度も同等かそれ以上あり、そして、移動相と試験溶液がACN・水混液となるような方法を開発することとした。この条件を満た

した方法について論文を検索したところ、Li²⁾らの報告が挙げられた。報告では、シリンジに試料、過マンガン酸カリウム及びシリカゲルの混合物を充填し、HClを浸透させ、プランジャーによる加圧下で2-クロロシクロヘキサノンに誘導体化し、HPLC (モニター波長: 310 nm) で測定していた。そのため、Liらの報告を基に検討を開始したが、感度や誘導体化率等の点で規定分析法に比べて良好な結果が得られなかったことから別の誘導体化法を検討することとした。

CYの分解産物であるシクロヘキシルアミン (以下「CA」という。) のアミノ基には求核性があるため、これを活かした置換反応による誘導体化法を検討した。求電子剤であるBCとCAを反応させ、生じるN-シクロヘキシルベンズアミド (以下「N-CBA」という。) を検出、定量する方法を検討することとし、誘導体化の最適条件を検討した。N-CBAの標準物質を2メーカー (Angene Chemical製、FluoroChem製) から購入し、検出波長や保持時間を確認した。両社の標準品をACN・水混液に溶解し、規定分析法のHPLC条件で測定したところ、230 nm付近に強い吸収を持つことを確認した (図3—1及び4)。

(2) 測定条件の検討

カラム、カラム温度、流速は規定分析法に基づき設定した。

移動相は、規定分析法に基づくACN・水混液 (70:30) ではN-CBAの保持時間が約4分で夾雑ピークとの分離に難があった。一方、ACN・水混液 (60:40) では保持時間は約5.4分で夾雑ピークとの分離は良好

であったため、こちらを採用することとした。

注入量は、20 μL とした。規定分析法の倍の量ではあるが、試験溶液がACNと水の混液であるため、連続注入時でも保持時間の変動及びピーク形状の悪化は認められなかった。

モニター波長には、254 nm、230 nm及び265 nmの3波長を用いた。N-CBAは230 nm付近に強い吸収を有しているものの、同時に夾雑ピークも多く確認されたため、より夾雑ピークの少ない254 nmにおけるピーク面積から検量線を作成することとした。

(3) CAとBCを用いた誘導体化の検討

CAとBCの反応は求核アシル置換反応であり、CAのアミノ基 (R-NH_2) がBCのC=O結合に付加し、中間体を経て、BCの塩素基 (R-Cl) が脱離する³⁾。(図1) BCは酸塩化物 (R-COCl) であり、強く分極しているため反応性が高い³⁾。はじめに10 mLのACN中にてCA (1 μmol) をBC (1 μmol) と反応させたところ、生成物のピークはN-CBAの標準溶液のピークと保持時間が一致し、スペクトルも一致した。しかし、N-CBAの標準溶液から作成した検量線で定量し、分子量に基づいて変換率を算出したところ、67.9%であった。これは、本誘導体化では副生成物として塩化水素が生成し、この塩化水素がCAと酸塩基反応を起こして反応性が低下したことによるものと考えられた。そこで、トリメチルアミン (以下「TA」という。) で塩基性条件にして誘導体化を行った。ここで、CAの分子量に対するBCとTAの必要量を推定す

るため、10 mLのACN中にてCA (1 μmol) をTA (0~50 μmol) 下でBC (1~50 μmol) と反応させたところ、TA (1~50 μmol) 下ではほぼ全量のCAがN-CBAに誘導体化した。(表6) なお、BCは量が多いと夾雑ピークが増え、TAは量が多いとベースラインが安定せず、かつ夾雑ピークも少々見受けられるようになった。

次に、ACN・水混液中にてCAをTA下でBCと反応させたところ、BCが水によって加水分解され安息香酸になり、誘導体化率が低下した。そこでBCを過量に添加したところ、BCの量が多すぎた場合、ACN・水混液がACN層と水層の2層に分離した。このため、分解液を希釈・分取し、これに分離しない程度の量のBCを加えることとした。

また、分解液を塩基性条件にするための試薬として、先の検討で使用したTAではなく扱いやすいNaOHを用いて検討したところ、十分に誘導体化されたことから、以後の検討ではNaOHを採用した。

なお、本誘導体化工程では塩素ガスが発生する為、安全上の観点から、ドラフト内で操作を行った。

(4) CYからCAへの分解の検討

CYからCAへの分解条件について検討したところ、児島ら⁴⁾や一番ヶ瀬ら⁵⁾がHCl酸性下で H_2O_2 水と加水分解する方法について報告しており、児島らは、CY-Na液 (1000~10000 $\mu\text{g/mL}$) 2 mLに対しHCl (1 mol/L) 0.5 mLと H_2O_2 水 (3%) 0.5 mLを加え沸騰水浴中で2時間加熱したところ、CAの生成率は約80%であり、生成したCAの約20%が H_2O_2 水によって酸化をうけたと考察してい

る。

以上を基にHClの濃度と加熱時間の検討を行った。CY標準溶液（100 µg/mL）2 mLに対しHCl（1～12 mol/L）0.5 mLとH₂O₂水（3%）0.5 mLを加え沸騰水浴中で加熱（15～60分）し、水で10 mLとした。その後、分解液から1 mL分取し、NaOHで塩基性とした後、ここにBC（1%）ACN溶液1 mLを加えて反応させ、水で5 mLにメスアップし、試験溶液とした。N-CBAの標準原末から希釈系列を調製し、検量線を作成し、試験溶液の濃度を測ることでCYの加水分解率を算出・比較したところ、2 mol/L以上の濃度のHClで60分間加熱すれば、9割以上のCYが加水分解することが明らかとなった。（表7）そこで、試料マトリクスの影響や操作性を考慮し、試料2 mLに対し、HCl（8 mol/L）0.5 mLを加えて酸性とし、H₂O₂水（3%）0.5 mLを加え沸騰水浴中で30分加水分解する操作を採用した。

また、本分解工程では塩素ガスが発生する為、安全上の観点から、ドラフト内で操作を行った。

(5) 抽出・精製の検討

これまでの標準溶液で検討した誘導体化の最適条件が試料マトリクス存在下においても適用可能か、ブルーベリージャムのブランク試料を用いて分解・誘導体化したところ、クロマトグラムに夾雑ピークが多数生じてしまった。このため、精製工程を追加で検討した。

抽出・精製工程は、B.1に示した規定分析法を参考に検討した。昨年度の検討結果を踏まえ、新規分析法では、加水量を70 mLとし、必要に応じて加熱時にガラス

棒等で攪拌することとした。また、規定分析法では精製液を全量使用するが、新規分析法では、HCl（1→100）で陰イオン交換カートリッジから溶出し、10 mLにメスアップすることとし、精製液のうち2 mLのみ使用することとした。

以上を基にブルーベリージャムを用いて添加回収試験（*n*=2、添加濃度100 µg/g）を行ったところ、回収率は101.0%と良好であり、夾雑ピークも認められなかった。しかし、抽出・精製工程を追加したことにより、定量下限値が規定分析法よりも5倍高くなった。このため、誘導体化工程における分解液の分取工程を削除し、分解液は塩基性にした後、BCで誘導体化し、pH調整後に10 mLにメスアップすることとし、最終的な添加回収試験を行うこととした。

(6) 添加回収試験

添加回収試験の試料としては、規定分析法を用いてCYが含有されていないことを確認した後、オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリーを用い、B.2.のとおり試験した。試験は*n*=2で行い、添加濃度は20 µg/gとした。

ア 保持時間、スペクトル

N-CBAの標準原末を2メーカーから（Angene Chemical製、Fluorochem製）購入し、秤量後、60%ACN溶液に溶解してN-CBA標準溶液を調製した。N-CBA標準溶液と検量線用標準溶液、試料の試験溶液の保持時間、スペクトルを比較したところ、3者は一致した（図3-1及び4）。

イ 検量線

相関係数 (r) は0.99942であり、良好であった。また、検量線の定量下限値相当 (試料中濃度としてCY 10 μ g/g) のピークのS/N比は15.8であり、本HPLCを用いて規定分析法における定量下限 (試料中濃度としてCY 10 μ g/g) を測定した際のピークの平均S/N比 (11程度) と同程度であった。

ウ 添加回収試験

(ア) 新規分析法

オレンジジュース、ブルーベリージャム及びりんごゼリーを用いて添加回収試験を実施したところ、平均回収率は順に104.0%、114.5%、108.8%となり良好であった。(表8)。今後は、ビスケットやチョコレートといった、より夾雑物質が多いと考えられる食品でも添加回収試験を実施し、新規分析法を評価する必要がある。

(イ) 規定分析法等との比較

新規分析法の性能を評価するため、規定分析法の誘導体化法を用いた以下の3種類の添加回収試験を実施し、平均回収率を比較した (図3-1及び3-2)。

まず、水、オレンジジュース、ブルーベリージャム及びりんごゼリーを用い、規定分析法のとおり試験溶液を調製し、添加回収試験 ($n=2$ 、添加濃度20 μ g/g) を行った。平均回収率は、順に97.4%、98.0%、90.1%及び85.7%であった。

次に、先の4種の試料を用い、新規分析法で採用した抽出工程に基づき抽出し、その後は規定分析法のとおり試験溶液

を調製し、添加回収試験 ($n=2$ 、添加濃度20 μ g/g) を行った。平均回収率は、順に99.4%、102.5%、93.5%及び90.3%となり、規定分析法に比べ平均回収率に若干の向上が見られた。

最後に、抽出工程に加え、精製工程も新規分析法のものに変更し、その後は規定分析法のとおり試験溶液を調製し、添加回収試験 ($n=2$ 、添加濃度20 μ g/g) を行った。平均回収率は、順に102.5%、101.3%、94.4%及び90.1%となり、抽出のみ変更したものと同程度であった。

新規分析法における添加回収試験の結果は、上記の結果と比べても遜色ないのであった。今回の検討から、新規分析法と規定分析法は同等の性能を有するものと考えられた (表9)。

(7) 今後の展望

新規分析法の定量下限値は、現時点では規定分析法のものと同等である。ただし、N-CBAは常温で不揮発性であるため、濃縮工程を設けることで定量下限値を下げられる可能性がある。N-CBA及びCAは、これらをACN・水混液に溶解させ、溶液をNaOHで塩基性にして飽和量の塩化ナトリウムを加え水層とACN層に分離させたとき、全量ACN層に移行する。N-CBAはそのまま、CAはACN中で誘導体化した後ACNをエバポレーターや窒素吹付で濃縮すれば、より濃度の高い試験溶液を調製することが可能と考えられる。また、今回、検討した食品群以外の食品に対する適用性についても、引き続き検討する。

E. 結論

CYの規定分析法の改良については、添加回収試験における回収率に問題が認められたビスケット、たくあん漬けについて検討を行った。両食品とも、試料自体がCYを吸着したため、添加回収試験における回収率が低下していた。このため、抽出工程における加熱・冷却からメスアップまでの間にホモジナイザーを用いて試料を粉碎したところ、両食品とも回収率は向上した。以上より、ホモジナイザーで試料を粉碎することは、回収率の向上につながると考えられた。

CYの新規分析法については、CYを加水分解後、BCと反応させてN-CBAに誘導体化しHPLCで測定する方法を開発した。新規分析法と規定分析法と比較したところ、感度は同程度であり、3種類の食品を用いた添加回収試験の結果も良好であった。今後は、様々な食品で添加回収試験を実施し、性能を評価していく。合わせて、本分析法を改良（定量下限値等）するため、引き続き検討していく。

参考文献

1)

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html

2) Jianjun Li et al, :On-cartridge derivatisation using matrix solid phase dispersion for the determination of cyclamate in foods. *Analytica Chimica Acta*, 972, 46-53 (2017)

3) J. McMurry著 伊東椒、児玉三明ほか訳『マクマリー有機化学（中）第9版』株式会社東京化学同人, p. 803-807

(2017)

4) 児島昭次、一番ヶ瀬尚：人工甘味料に関する研究（第2報）サイクラミン酸ナトリウムの比色定量 その1. *薬学雑誌*, 83, 1108~1114 (1963)

5) 一番ヶ瀬尚、児島昭次：人工甘味料に関する研究（第1報）サイクラミン酸ナトリウム、ズルチンおよびサッカリンナトリウムのペーパークロマトグラフィー. *薬学雑誌*, 82, 1616-1620 (1962)

<本報告における略語一覧>

ACN：アセトニトリル

BC：塩化ベンゾイル

CA：シクロヘキシルアミン

CY：サイクラミン酸

CY-Na：サイクラミン酸ナトリウム

H₂O₂水：過酸化水素水

HCl：塩酸

HPLC：高速液体クロマトグラフ

NaOH：水酸化ナトリウム

N-CBA：N-シクロヘキシルベンズアミド
N, N-DCCA：N, N-ジシクロヘキシルアミン

規定分析法：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

餅状物質：加熱時にビスケットが餅状になったもの

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 千葉雄介・金井美樹・藤原 茜・高瀬冴子・荒島麻実・土井りえ・島田慎一・石井里枝：E. coliおよび黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定，日食微誌，39(4)，132-140(2022)

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

以下 図表等

表1 各濃度の菌接種濃度の陽性試料数に基づく eLOD₅₀ (estimated LOD₅₀) の算出表
(ISO 16140-3:2021 より抜粋)

高濃度 (d_1 CFU/g)	中間濃度 (d_2 CFU/g)	低濃度 (d_3 CFU/g)	ブランク	eLOD ₅₀ (CFU/g)
1/1 ^{*1}	4/4	4/4	0/1	<1.0×LIL ^{*2}
1/1	4/4	3/4	0/1	=0.5×LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	=0.7×LIL
1/1	4/4	1/4	0/1	=1.0×LIL
1/1	4/4	0/4	0/1	=1.5×LIL
1/1	3/4	4/4	0/1	=0.7×LIL
1/1	3/4	3/4	0/1	=1.0×LIL
1/1	3/4	2/4	0/1	=1.3×LIL
1/1	3/4	1/4	0/1	=1.7×LIL
1/1	3/4	0/4	0/1	=2.3×LIL
1/1	2/4	4/4	0/1	=1.1×LIL
1/1	2/4	3/4	0/1	=1.5×LIL
1/1	2/4	2/4	0/1	=1.9×LIL
1/1	2/4	1/4	0/1	=2.6×LIL
1/1	2/4	0/4	0/1	=3.7×LIL
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result
1/1	1/4	3/4	0/1	=2.1×LIL
1/1	1/4	2/4	0/1	=2.8×LIL
1/1	1/4	1/4	0/1	=4.0×LIL
1/1	1/4	0/4	0/1	=6.3×LIL
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result
1/1	0/4	3/4	0/1	=3.0×LIL
1/1	0/4	2/4	0/1	=4.3×LIL
1/1	0/4	1/4	0/1	=6.7×LIL
1/1	0/4	0/4	0/1	=14.0×LIL

*1 陽性試料数／試験実施試料数

*2 LIL: Low inoculation level (低濃度における菌濃度 d_3 CFU/g)

表2 オクラ (A)およびピラフ (B)を試料とした E. coli 定性試験法共同試験における陽性試料数および eLOD₅₀

(A)

試験室	菌接種試料中の菌量			ブランク 試料	eLOD ₅₀ (CFU/g)	eLOD ₅₀ /LOD ₅₀ * ³
	d_{1A} * ¹	d_{2A}	d_{3A}			
A	1/1* ²	3/4	1/4	0/1	48	1.8
B	1/1	4/4	3/4	0/1	14	0.52
C	1/1	4/4	1/4	0/1	28	1.0
D	1/1	3/4	2/4	0/1	37	1.4
E	1/1	4/4	1/4	0/1	28	1.0
平均					31	1.2

(B)

試験室	接種試料中の菌量			ブランク 試料	eLOD ₅₀ (CFU/g)	eLOD ₅₀ /LOD ₅₀ * ³
	d_{1B} * ¹	d_{2B}	d_{3B}			
A	1/1* ²	1/4	2/4	0/1	40	2.9
B	1/1	3/4	1/4	0/1	24	1.7
C	1/1	2/4	1/4	0/1	37	2.6
D	1/1	2/4	3/4	0/1	21	1.5
E	1/1	2/4	1/4	0/1	37	2.6
平均					32	2.3

*1 接種試料中の菌量： $d_{1A} = 254$ 、 $d_{2A} = 85$ 、 $d_{3A} = 28$ 、 $d_{1B} = 127$ 、 $d_{2B} = 42$ 、 $d_{3B} = 14$ CFU/g.

*2 陽性試料数／試験実施試料数

*3 E. coli 定性試験法の LOD₅₀ はオクラで 27 CFU/g、ピラフで 14 CFU/g

表3 チャーハン (A)およびソーセージ (B)を試料とした黄色ブドウ球菌定性試験法共同試験における陽性試料数および eLOD₅₀

(A)

試験室	接種試料中の菌量			ブランク 試料	eLOD ₅₀ (CFU/g)	eLOD ₅₀ /LOD ₅₀ ^{*3}
	d_{1A} ^{*1}	d_{2A}	d_{3A}			
A	1/1 ^{*2}	4/4	2/4	0/1	33	0.69
B	1/1	3/4	1/4	0/1	80	1.7
C	1/1	4/4	3/4	0/1	23	0.49
D	1/1	4/4	3/4	0/1	23	0.49
E	1/1	3/4	0/4	0/1	108	2.3
平均					53	1.1

(B)

試験室	接種試料中の菌量			ブランク 試料	eLOD ₅₀ (CFU/g)	eLOD ₅₀ /LOD ₅₀ ^{*3}
	d_{1B} ^{*1}	d_{2B}	d_{3B}			
A	1/1 ^{*2}	3/4	1/4	0/1	40	1.6
B	1/1	4/4	2/4	0/1	16	0.66
C	1/1	3/4	2/4	0/1	30	1.2
D	1/1	4/4	2/4	0/1	16	0.66
E	1/1	4/4	1/4	0/1	23	0.95
試料					25	1.0

*1 接種試料中の菌量 : $d_{1A} = 421$ 、 $d_{2A} = 140$ 、 $d_{3A} = 47$ 、 $d_{1B} = 210$ 、 $d_{2B} = 70$ 、 $d_{3B} = 23$ CFU/g.

*2 陽性試料数/試験実施試料数

*3 黄色ブドウ球菌定性試験法の LOD₅₀ はチャーハンで 48 CFU/g、ソーセージで 25 CFU/g

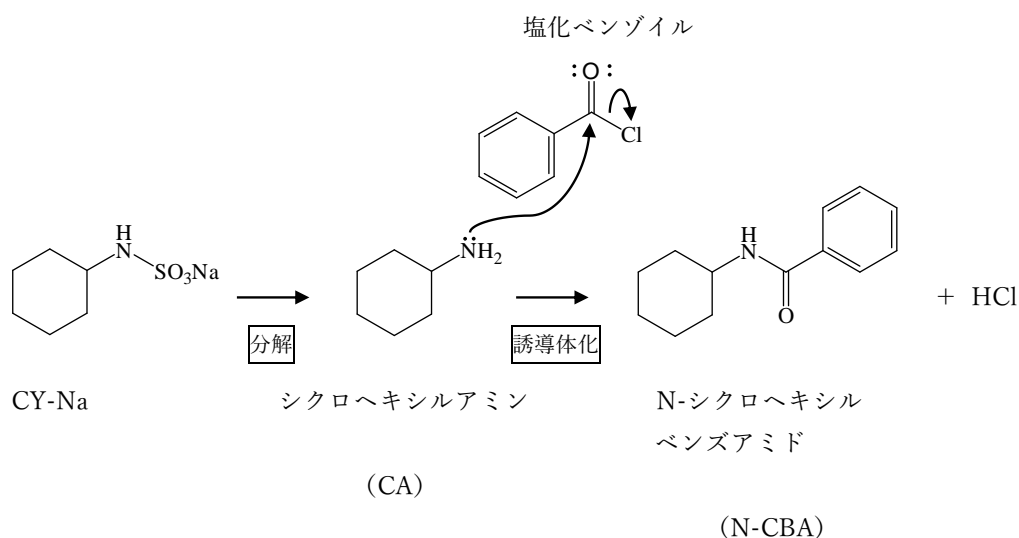


図1 誘導体化反応

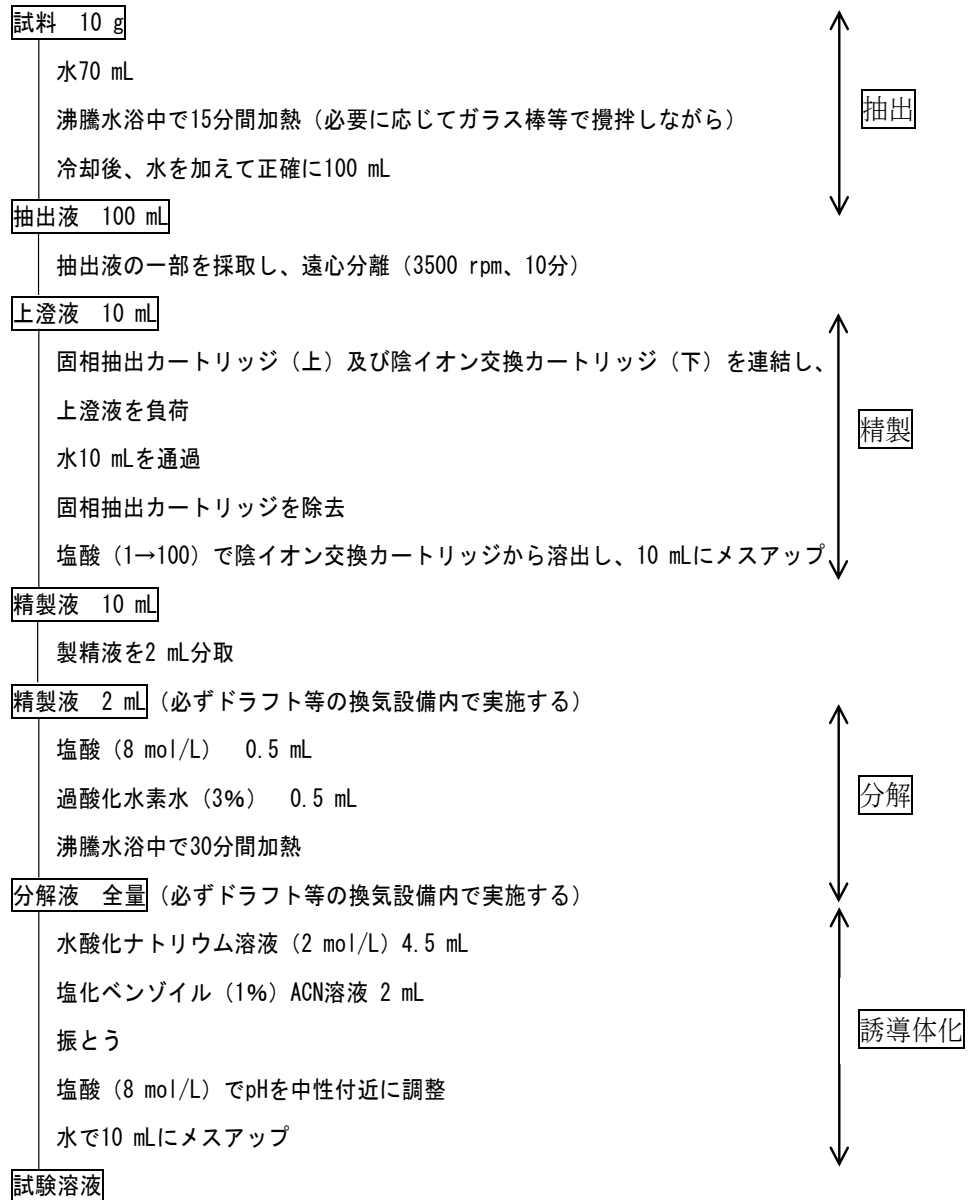


図2 試験溶液の調製法概略

表4 ビスケット 添加回収試験結果

	固相抽出法	スクリーニング法
平均回収率 (%)	94.3	94.5

$n = 2$

表5 たくあん漬け 添加回収試験結果

	固相抽出法	スクリーニング法
平均回収率 (%)	93.9	102.8

$n = 2$

表6 CA (1 μmol) に TA と BC の量を変えて添加した際の N-CBA への変換率 (%)

		TA (μmol)					
		0	1	2	10	20	50
BC (μmol)	1	67.9	102.	103.2	103.4	102.3	101.0
	2	67.7	102.0	101.7	101.5	103.8	103.9
	5	76.9	101.2	102.4	102.5	102.5	102.9
	10	72.7	101.9	102.4	101.2	96.3	97.5
	20	84.9	102.2	101.7	100.5	99.7	97.8
	50	84.8	101.4	101.4	100.3	99.1	98.9

$n = 1$

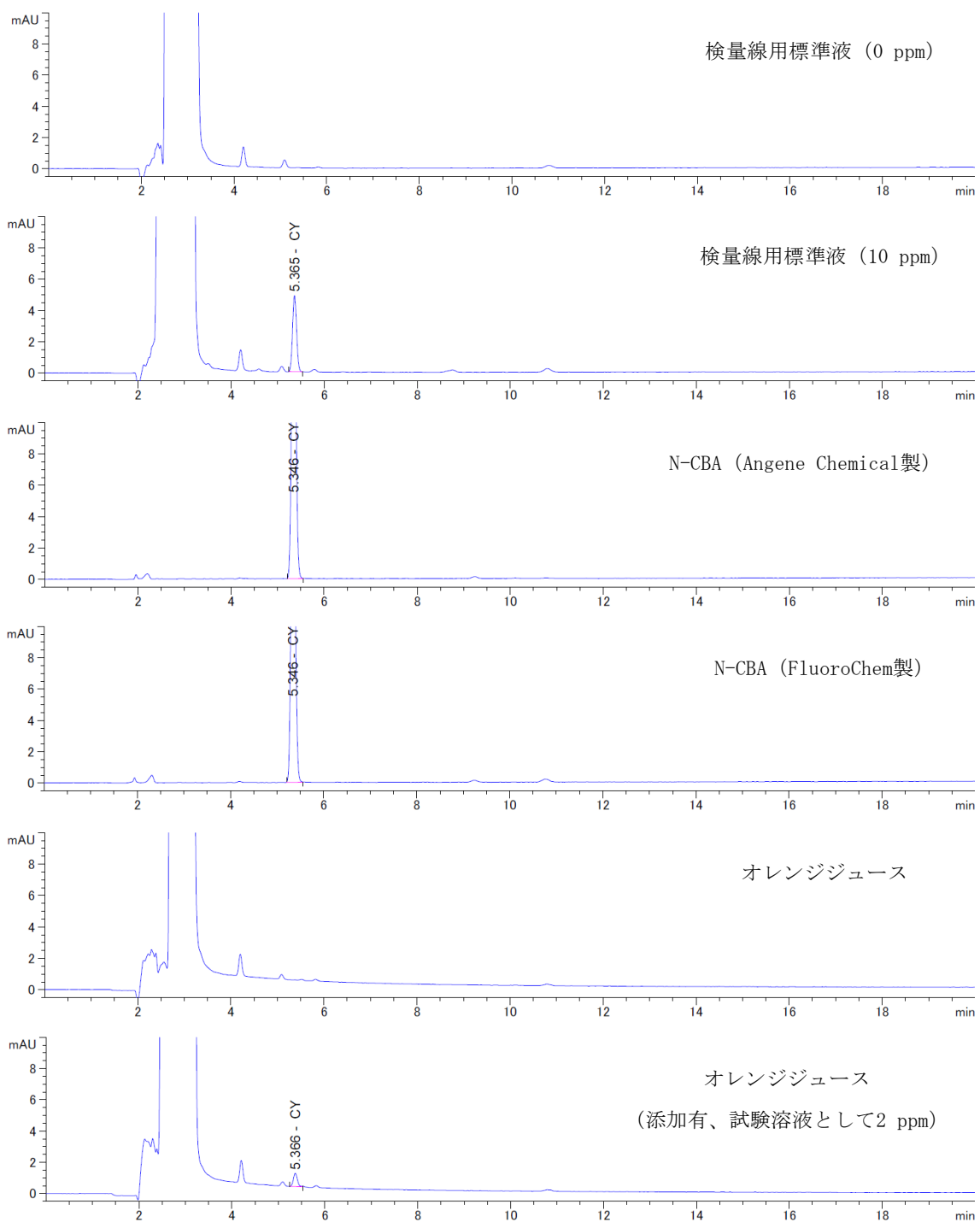


図3-1 標準溶液及びオレンジジュース試験溶液のクロマトグラム

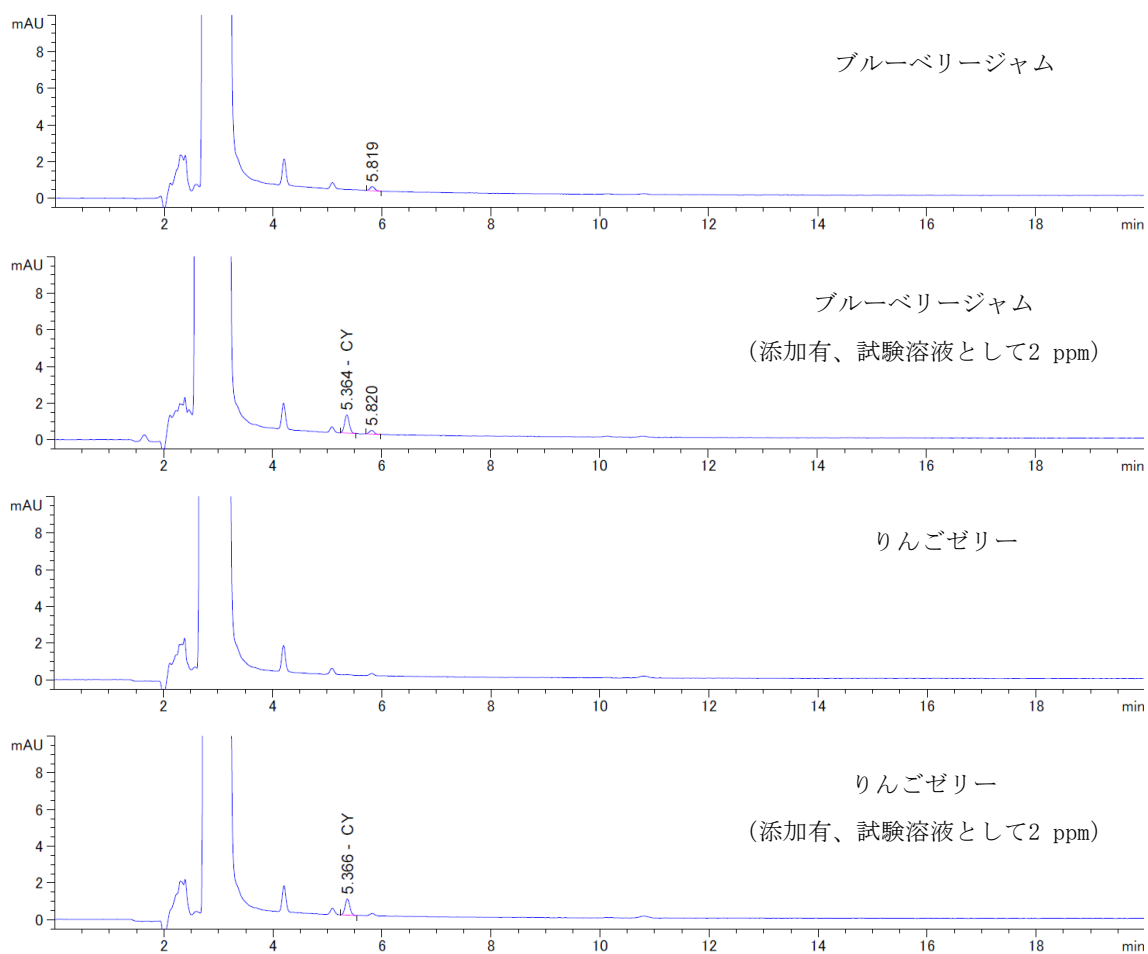
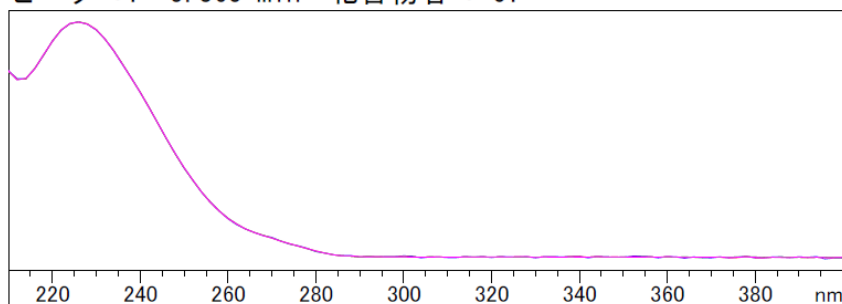


図 3 - 2 ブルーベリージャム及びりんごゼリー
試験溶液のクロマトグラム

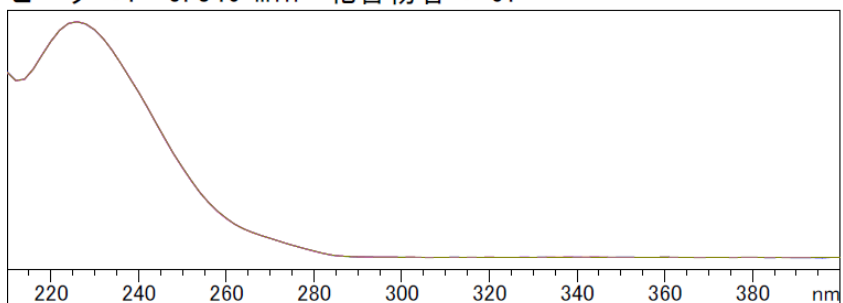
検量線用標準液 (10 ppm)

ピーク :1 5.365 min 化合物名 : CY



N-CBA (Angene Chemical 製)

ピーク :1 5.346 min 化合物名 : CY



N-CBA (FluoroChem 製)

ピーク :1 5.346 min 化合物名 : CY

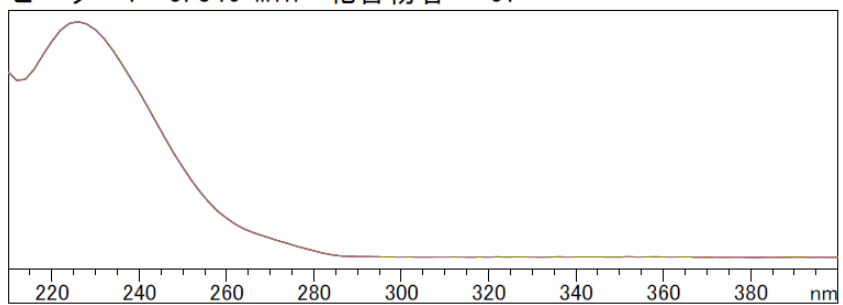


図4 各メーカーの標準溶液のスペクトル

表7 CYの加水分解率 (%)

		塩酸 (mol/L)					
		1	2	4	6	8	12
加熱時間 (分)	15	30.7	39.3	59.1	59.7	81.9	86.8
	30	42.8	72.9	84.9	88.7	89.8	91.2
	45	69.9	85.3	90.2	89.8	89.8	89.3
	60	69.9	92.6	93.7	85.8	94.5	90.3

$n = 1$

表8 新規分析法の添加回収試験結果

平均回収率 (%)	
オレンジジュース	104.0
ブルーベリージャム	114.5
りんごゼリー	108.8

$n = 2$

表9 規定分析法等の添加回収試験における平均回収率 (%)

	水	オレンジ ジュース	ブルーベリー ジャム	りんご ゼリー
規定分析法	97.4	98.0	90.1	85.7
抽出のみ変更	99.5	102.5	93.5	90.3
抽出・精製を変更	102.5	101.3	94.4	90.1

$n=2$

令和4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	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	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	山崎 朋美	(地独) 大阪健康安全基盤研究所	研究員

研究要旨

加工食品中の特定原材料のスクリーニング試験は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的一种である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（小麦）の改良抽出法の試験室間における評価のために、室間共同試験用試料を調製して試験室間共同試験による評価を行った。

改良抽出法の試験室間における評価のために、精度管理用試料として市販されている森永生化学研究所製のQC Material小麦とカカオパウダーを混合して配布試料を調製した。配布試料の安定性について評価したところ、試料は調製後112日まで回収率の低下は確認されず、試験室間共同試験の評価期間中に安定であることが確認された。

改良抽出法の試験室間共同試験の協力依頼を送付し、参加申込のあった合計28試験室に室間共同試験用試料を送付した。評価結果は分布を確認後、ロバスト方式により統計値を算出した。また、算出したロバスト平均値とロバスト標準偏差から z -スコアを算出し、外れ値を評価した。評価の結果FASPEKとFASTKITの各キットで z -スコアが-3未満の機関が1機関ずつ確認された。

配布試料を通常法で分析した際の回収率のロバスト平均とロバスト標準偏差はFASTKITで $12.8 \pm 2.3\%$ 、FASPEKで $16.1 \pm 4.7\%$ と回収率の低下が確認された。一方で、改良抽出法ではFASTKITで $92.7 \pm 12.1\%$ 、FASPEKで $96.0 \pm 8.4\%$ と回収率の改善が確認された。試験室間共同試験による評価結果は通知法に示された定量検査法の評価基準である50-150%の回収率と25%以下の室間精度を満たしており、室間共同試験によって改良抽出法の妥当性が確認された。本評価結果は今後のアレルギー物質のスクリーニング検査法の改定の際には、適切な科学的根拠として活用できると考えられる。

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¹⁾。28品目の原材料のうち卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに、くるみ の8品目は特定原材料に指定され、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¹⁾。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、その夾雑物により特定原材料の測定が影響を受ける場合もある。

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²⁾。

今年度は特定原材料（小麦）の改良抽出法の試験室間における評価のために、室間共同試験用試料を調製して評価を行った。

B. 方法

1. 試料

1.1. 標準物質

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小麦を標準物質として使用した

1.2. 試料

令和3年度に測定阻害について評価を行ったカカオを原材料とする試料の中でオランダ産ココアパウダーを試料調製のために使用した。試料は量販店で購入し、試料調製まで室温で保存した。

2 試薬

Polyvinylpyrrolidone（以下PVP）K15は東京化成工業製の試薬を使用した。小麦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. 小麦の定量

ELISAによる小麦の定量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）によって試料中の小麦の濃度を計算した。

4. 試験室間共同試験用試料の調製と保存

表1に示す割合で、QC Material小麦とカカオパウダーを50 mL遠沈管内で試料を混合して冷蔵庫内で保存した。保存期間中の温度変動の確認のため、庫内の温度を温度ロガー（CHINO：MR5300）によって、1時間ごとに記録した。

5. 試験室間共同試験用試料の安定性の評価

試料の安定性の評価のために、室間共同試験の評価期間中（56日）と終了後（112日）に保存した試料を抽出し、FASPEKとFASTKITの両キットで分析した。分析値は試料調製日に抽出した試料抽出液の分析値と比較して、試料の冷蔵保存による安定性を評価した。安定性の評価にはFASPEK、FASTKITともに同じLotのキットを使用して分析を行った。

6. 試験室間共同試験

6.1. 試験室間共同試験の実施

令和4年4月に改良抽出法の室間共同試験の協力依頼を送付し、4月28日までに参加申込のあった合計28試験室に5月31日に実施要領と試料1-4を各2試料ずつ宅配便（冷蔵）で送付した。評価結果の回収期限は6月30日として、通知法によって定量を実施した各試料の定量値の報告を受けた。試料抽出液は各評価機関に冷凍保存を依頼した。

6.2. 評価に使用したキットと器材

試料抽出液の分析には、評価機関のうち17機関には、FASPEK（Lot No. 22FESFGD099）とFASTKIT（Lot No. FKEW2169）のキットを送付して評価に使用した。残りの11機関は各試験室が購入したキットを使用した。また、室間共同試験用試料を送付する際に、ひだ折りろ紙（ADVANTEC製5C、150 mm）を同封し、試料抽出時の遠心分離後のろ過を依頼した。

6.3. 評価結果の解析

評価結果の分布の確認のために、統計解析システムJMP（ver.17.0.0、SAS Institute

Japan）によって、ヒストグラムと箱ひげ図と正規確率プロットを作成した。また、評価結果の統計解析には z -スコアによる方法を用いた。ロバスト方式の統計は、Huberのproposal 2の推定方式による統計をエクセル・マクロによるプログラム（作成：システムサポート、大隅昇）により実施した。各機関の試料4の定量値からロバスト平均値とロバスト標準偏差を算出して、 z -スコアによって評価した。

6.4. Lot間差の検証

各試験室でキットを購入した11評価機関のうち8評価機関は、いずれかのキットが配布したキットと異なるLotによって評価が実施された。これらの評価機関には冷凍保存された試料抽出液の送付を依頼した。宅配便（冷凍）で送付された試料抽出液は当研究所で冷凍保存後、評価機関の終了後に解凍して、配布したキットと同じLotのキットで測定を行った。報告値と再測定値の比較を行って、キットのLot間差による定量値への影響を検証した。

6.5 室間共同試験用試料の評価

室間共同試験用試料の各試料はそれぞれ次のように評価を行った。試料1は陰性試料として取り扱い、疑陽性について評価した。また、試料2と3は、試料4の定量値に対する回収率を算出し、抽出法ごとに評価した。

（倫理面への配慮）

本研究では実験動物と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. 室間共同試験用試料の安定性評価

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4.0 °C、最低温度2.4 °C、最高温度6.3 °Cであり、保存期間中の冷蔵庫内の温度の大きな変動は確認されなかった。保存した試料を調製後56、112日に抽出して評価した結果、試料調製後112日まで試料4のQC Material小麦の分析値の変動は確認されなかった（図1）。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11.3 %、FASTKITで2.8 %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での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³⁾。評価期間中の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。また、試料2と試料3の回収率の低下も確認されなかったため、調製した試料は室間共同試験の評価期間中に安定であることが確認された（図1）。

2. 室間共同試験

2.1. 評価結果の解析

各評価機関から報告を受けた試料4の報告値をヒストグラムおよび正規確率プロットによって評価結果の分布の確認を行った（図2、表2、3）。次に、評価結果からロバスト平均値とロバスト標準偏差を算出して、 z -スコアによる評価を行った（図3）。FASPEKとFASTKITの各キットで z -スコアが-3未満の機関が1機関ずつ確認された。

2.2 Lot間差の検証

配布したキットといずれかが異なるLotのキットによって評価を実施された評価機関には試料抽出液の送付を依頼し、当研究所で配布したキットと同じLotのキットにより測定を行った。各評価機関と当研究所の測定値を図4に示す。評価機関23-27、29では測定値に有意な差異は確認されなかった。一方で、 z -スコアによる評価で外れ値として確認された評価機関18、22の測定値は有意な差異が確認された。これらのことから、室間共同試験においてキットのLot間差による影響は少なかったと考えられた。一方で、外れ値が確認された機関では試料の抽出操作もしくは試料抽出液の保存の際の操作によって、測定値が影響を受けた可能性があることが示唆された。

2.3 室間共同試験用試料の評価

2.3.1 陰性試料

陰性試料としてカカオパウダーのみを含む試料1について評価を行った。全ての評価機関で試料はN.D.（検出限界0.31 $\mu\text{g/g}$ 未満）と判定された。

2.3.2 通常法

カカオパウダーとQC Material小麦を当重量混合した試料2について、通常の抽出法によって評価を行った。試料2の回収率のロバスト平均と標準偏差はFASTKITで $12.8 \pm 2.3 \%$ 、FASPEKで $16.1 \pm 4.7 \%$ となり、通常の抽出液ではカカオ中のPACによって回収率の低下が確認された（表4）。

2.3.3 改良抽出法

カカオパウダーとQC Material小麦を当重

量混合した試料3について、PVP K15を1% (w/v) 含む改良抽出法によって評価を行った。試料3の回収率のロバスト平均と標準偏差はFASTKITで $92.7 \pm 12.1\%$ 、FASPEKで $96.0 \pm 8.4\%$ と改良抽出法による回収率の改善が確認された(表4)。前年度に検討を行った通り、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て測定阻害に対する効果が確認された。

E. 結論

室間共同試験による改良抽出法の評価結果は通知法¹に示された定量検査法の評価基準である50-150%の回収率と25%以下の室間精度を満たしており、室間共同試験によって改良抽出法の妥当性が確認された。

本評価結果は今後のアレルギー物質のスクリーニング検査法の改定の際には、適切な科学的根拠として活用できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：精度管理用試料を利用した特定原材料(小麦)の測定阻害評価と改良抽出法についての検討：日本食品化学学会 第28回総

会・学術大会, 5月19~20日、東京ビックサイト(東京都), 2022.

2) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：特定原材料(小麦)の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製：AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION第25回年次大会, 7月15日、東京大学 弥生講堂・一条ホール(東京都), 2022.

3) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：特定原材料(小麦)の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製：第59回全国衛生化学技術協議会年会, 10月31日~11月1日、キングスカイフロント川崎(神奈川), 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

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 アレルゲン関係)

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

3) 桑原香織 他, 食衛誌 60, 113-117 (2019)

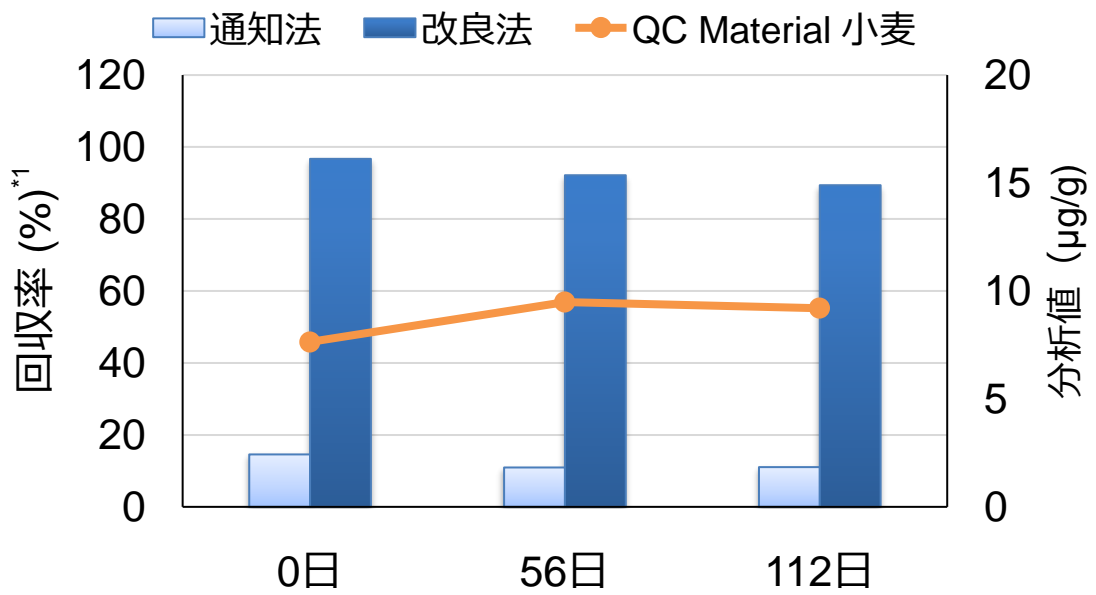
以下 图表

表1 室間共同試験用試料の調製法

番号	試料区分	試料	配合割合
1	陰性試料	カカオパウダー	1 g
2	通常法	カカオパウダー	0.5 g
		QC Material小麦	0.5 g
3	改良抽出法	カカオパウダー	0.5 g
		QC Material小麦	0.5 g
		Polyvinylpyrrolidone K15 ^{*1}	0.19 g
4	試験室間評価	QC Material小麦	0.5 g

*1 東京化成工業製 平均分子量10000

a) FASPEK



b) FASTKIT

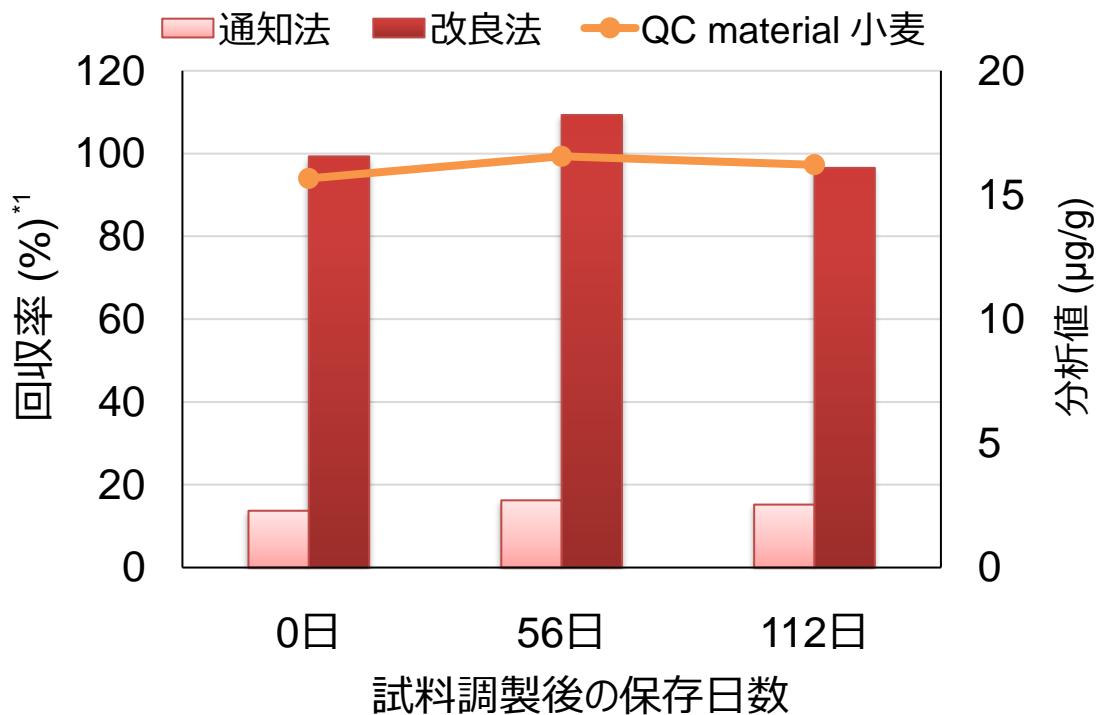


図1 室間共同試験用試料の安定性評価

*1 QC Material小麦の分析値と各試料の採取量から算出した回収率

a) FASPEK

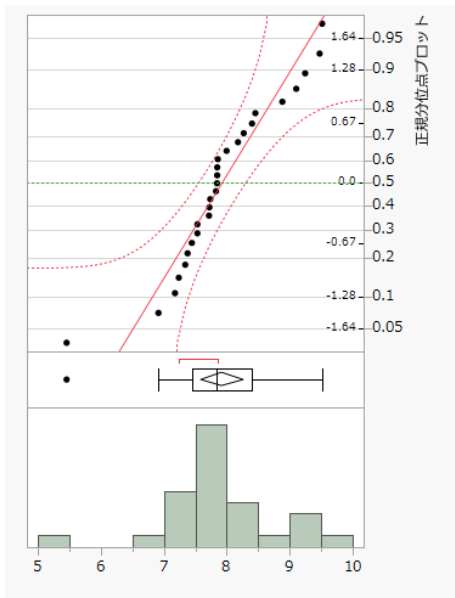


表2 FASPEKによる評価の統計量

ロバスト平均値	7.940
ロバスト分散	0.514
ロバスト標準偏差	0.717
変動係数(%)	9.032
第1四分位数	7.467
中央値	7.846
第3四分位数	8.380
最大値	8.997
最小値	6.884

b) FASTKIT

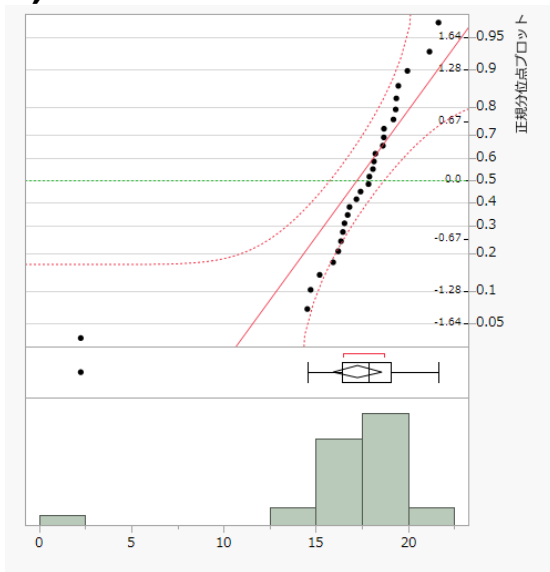


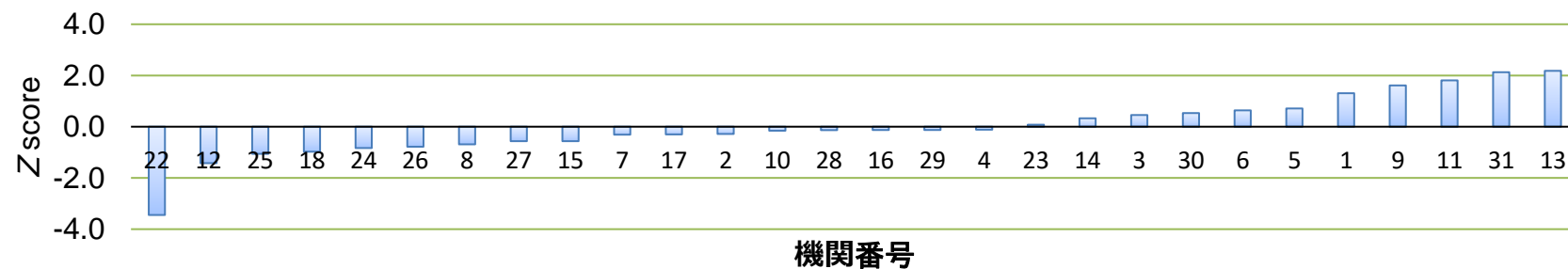
表3 FASTKITによる評価の統計量

ロバスト平均値	17.634
ロバスト分散	3.728
ロバスト標準偏差	1.931
変動係数(%)	10.950
第1四分位数	16.386
中央値	17.876
第3四分位数	19.076
最大値	20.478
最小値	14.790

図2 試料4 (QC Material小麦) の分析値の確率分布^{*1}

^{*1} 試料4の平均値のヒストグラムと箱ひげ図および正規確率プロット

a) FASPEK



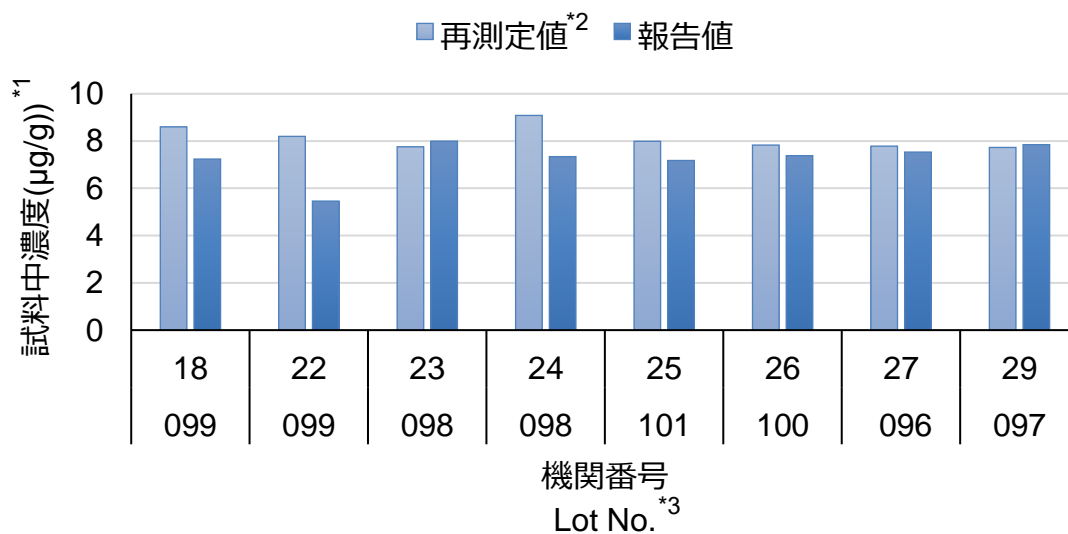
b) FASTKIT



図3 各評価機関の試料4(QC Material小麦)のz-スコア*1

*1 HuberのH15法によるロバスト平均値とロバスト標準偏差から算出

a) FASPEK



b) FASTKIT

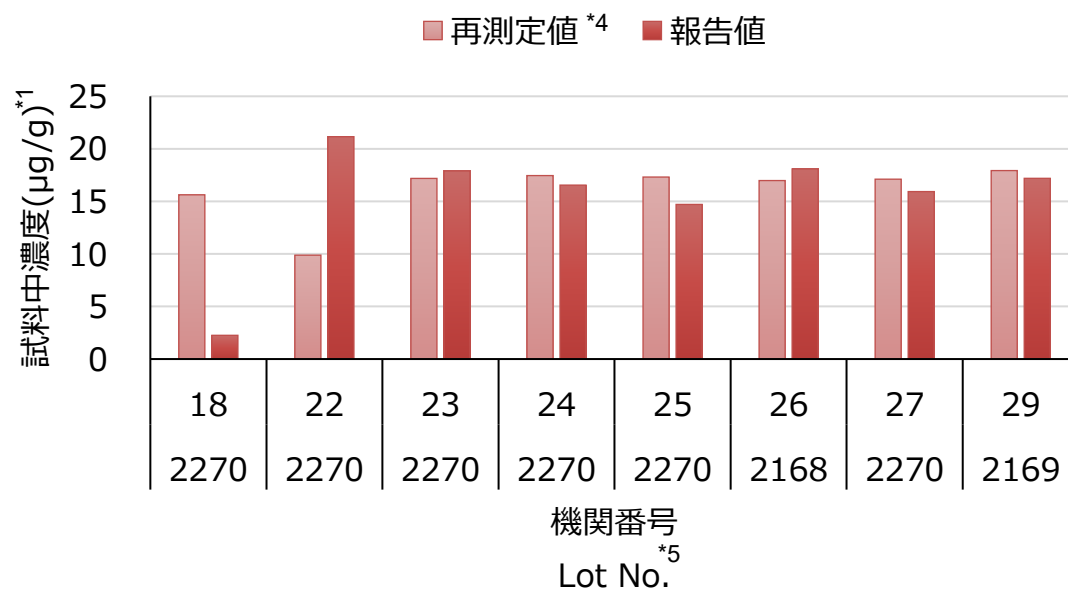


図4 キットのLot間差についての評価

- *1 試料4 (QC Material小麦) の分析値の平均
- *2 試料抽出液をFASPEK (Lot No. 22FESFGD099) で再測定した分析値
- *3 各評価機関で使用されたFASPEKのLot番号の下3桁
- *4 試料抽出液をFASTKIT (Lot No. FKEW2169) で再測定した分析値
- *5 各評価機関で使用されたFASTKITのLot番号の下4桁

表 4 室間共同試験用試料の評価結果

キット	試料 1 陰性試料		試料 2 通常法		試料 3 改良抽出法	
	含有量*1	回収率*2	含有量*1	回収率*2	含有量*1	回収率*2
	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)
FASPEK	N.D.	N.A.*3	1.3 ± 0.4	16.1 ± 4.7	7.6 ± 0.7	96.0 ± 8.4
FASTKIT	N.D.	N.A.*3	2.3 ± 0.4	12.8 ± 2.3	16.4 ± 2.1	92.7 ± 12.1

*1 各試料のロバスト平均値とロバスト標準偏差

*2 試料 4 (QC Material 小麦) の分析値と各試料の採取量から算出した回収率

*3 検出限界以下のため算出不可

補足資料

令和4年度試験室間共同試験研究協力機関

岩手県環境保健研究センター
青森県環境保健センター
一般財団法人 東京顕微鏡院 食と環境の科学センター
一般財団法人 食品環境検査協会
日東富士製粉株式会社
テーブルマーク株式会社
杉並保健所
川崎市健康安全研究所
森永製菓株式会社
株式会社ファスマック
千葉県衛生研究所
株式会社 生活品質科学研究所 中央研究所
日本生協連 商品検査センター
株式会社 三遠食品分析センター
愛知県衛生研究所
豊田市保健所
一般財団法人 食品分析開発センターSUNATEC
滋賀県衛生科学センター
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 関西総合検査センター
京都市衛生環境研究所
神戸市健康科学研究所
兵庫県立健康科学研究所
岡山県環境保健センター
福岡市保健環境研究所
新潟市衛生環境研究所
宮城県保健環境センター

令和4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、試験所間比較試験において分析試料とする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。さらに令和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）と、親水性及び親油性化合物用固相抽出充填剤を充填したHLBカートリッジによる精製を行うLC-MS/MSを検討し、特に検出感度において後者がより優れていることを確認した。

以上を受けて、3年計画の最終年度である令和4年度は、HLBを用いたクリーンアップがホタテガイ以外の2枚貝分析にも適用可能であるかを検証するとともに、令和2年度に調製した検査試料を用いてパイロットスタディを実施した。その結果、本研究で確立した検査試料の調製法並びに評価法を適用することにより、貝毒検査機関の技能を評価できることが確認された。

A. 研究目的

下痢性貝毒は、有毒渦鞭毛藻で汚染された二枚貝をヒトが摂取することにより下痢、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試験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のパイロットスタディを実施することにした。3年計画の一年目である令和2年度は、パイロットスタディにおける分析試料とする検査試料を、ホタテガイを原料として調製した。また、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) と、親水性及び親油性化合物用固相抽出充填剤であるHLBカートリッジを用いた精製を行うLC-MS/MSを検討し、特に検出感度において後者がより優れていることを確認した。

以上の成果を受け令和4年度は、HLBを用いたクリーンアップがホタテガイ以外の二枚貝であるムラサキガイ、カキ、ア

サリの分析にも適用可能であるかを検証し、良好な結果を得た。また、令和2年度に調製した検査試料を用いて、外部精度管理のパイロットスタディを実施した。貝毒検査機関29機関の参加を受け、分析値のばらつきを評価するとともに、各機関の能力を試験的に評価した。その結果、本研究で確立した検査試料の調製法並びに評価法を適用することにより、貝毒検査機関の技能を評価できることが確認された。

B. 方法

1. HLB精製/LC-MS/MSのホタテガイ以外への適用

(1) 材料・試薬

ムラサキイガイ、カキ、アサリは市販の殻付き試料を使用した。

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、塩酸は富士フイ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) 試料の前処理方法

二枚貝試料を開殻した後、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、HLBカートリッジ（Waters社製Oasis PRiME HLB 200 mg）を用いて、次の通りに行った。加水分解処理を行い、さらにヘキサン洗浄を行った貝試料の抽出液（約2.5 mL）水2.5 mLを加え攪拌し、HLBカートリッジに注入し、流出液を捨てた。次に、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、得られた溶液を回収した。その際、少量のアセトニトリル/メタノール（4：1）で、抽出液が入っていたねじ口試験管の内壁を洗った。得られた溶出液を窒素下で2 mLまで濃縮させ、試料溶液とした。

(3) LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、島津製作所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 μm）を用いた。LC-MS/MSの測定条件を表1に示す。

2. 外部精度管理のパイロットスタディ

(1) 材料・試薬

検査試料は、本事業で令和2年度に調製し、令和3年度に均質性を評価したホタテガイ試料を使用した。試薬類は1(1)と同じものを使用した。

(2) パイロットスタディの実施

パイロットスタディの参加募集は令和3年10月から令和4年2月に行った。

参加機関による分析期間は、令和4年7～9月とした。7月1日に、機関番号を記した「分析試料送付のご案内」及び、取扱注意事項を記した「分析試料の取り扱いについて（注意事項）」とともに検査試料3瓶を冷凍便により送付した。また同日、結果報告用のファイルを電子メールによって送付した。また、この結果報告用のファイルに誤記があったため、これを修正したファイルを7月8日に電子メールによって送付した。9月26日までに全ての参加機関から分析結果を受領した。

(3)安定性評価試験

参加機関における検査試料の保存条件は、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度とした。分析期間における検査試料の安定性を評価するために、茨城大学において、分析期間前後検査試料を分析した。適用した分析法は、B1(2)及び(3)の通りである。

(4)報告値の解析

参加機関から報告された分析結果は、JIS Z8405 (ISO 13528) 及びAOACガイドライン(AOAC Int., 2005)に準じて統計的に解析した。

(5)茨城大学における検査試料の分析

茨城大学でも検査試料を分析した。分析法は適用した分析法は、B1(2)に準拠したが、前処理操作における分析対象物質の回収率やLC-MS/MSにおけるマトリックス効果の影響を補正するために、前処理前の検査試料に既知量のOAとDTX1を添加

する、標準添加法を適用した。また、LC-MS/MS測定は島津製作所LCMS-8060を用いて行った。

(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. HLB精製/LC-MS/MSのホタテガイ以外への適用

(1)マトリックス効果の評価

HLB 精製を組み合わせた LC-MS/MS については、これまでにホタテガイを試料に用いて妥当性確認を行った。この方法がアサリ、カキ、ムラサキイガイ分析へ応用できるかを検討した。精製後の試料を LC-MS/MS によって測定した際のマトリックス効果の評価するために、B1(2)の方法によって各試料を処理した溶液を添加した標準溶液（マトリックス添加標準溶液）と、メタノールを溶媒とした標準溶液を LC-MS/MS により分析した。標準溶液中の OA 群の面積に対する各マトリックス添加標準溶液中の OA 群の面積（相対値）を表した結果を図 1 に示す。マトリックス効果はアサリ 101 %～106 %、カキ 101 %～112 %、ムラサキイガイ 109 %～115 %であった。マトリックス効果は 80 %～120 %の範囲にある場合、イオン化抑制やイオン化増強が許容できると考えられる。アサリ、カキ、ムラサキイガイすべての試料において、マトリックス

効果が 80 %～120 %の範囲内であったことから、分析値がマトリックス効果の影響を受けないことが示唆された。

(2) 真度と併行精度の評価

添加回収試験によって、HLB 精製を組み合わせた LC-MS/MS の精確さを評価した。得られた結果を表 2 に示す。各試料の OA 群の回収率と標準偏差は 87.4 %～106.5 %と 3.5 %～10.8 %であり、下痢性貝毒の機器分析法に求められる性能基準 (70 %～120 %、15 %以下) を満たすことが確認された。

2. 外部精度管理のパイロットスタディ

(1) 安定性の評価

参加機関における比較試料の分析期間の前後に、茨城大学において検査試料を分析した。その結果、分析の併行精度に対して有意 ($p>0.05$) ではないものの、DTX1の分析値が減少した (図2)。ただし、類似試料の安定性に関するデータからは OAとDTX1はこの温度で十分に安定であると考えられた。分散分析の結果から安定性に関する (標準) 不確かさ (各濃度に対する相対標準偏差) を算出したところ、OAが3.1 %、DTX1が8.4 %であった。

(2) 参加機関の結果

a. 参加機関の分析法と結果

全参加機関に対して、適用した分析方法 (機器の校正に用いた校正用標準、抽出・精製法、測定法) の報告を求めた。参加機関は厚生労働省から通知された機器分析法によって検査試料を分析することを原則としたが、精製法や測定法は、

例示されている方法 (別紙 2 の方法) には限定されなかった。参加機関が適用した分析法のうち、特徴的な事例を記す。精製過程においては ODS 以外のカートリッジを用いた固相抽出を行った機関が 12 機関あり (うち 1 機関は ODS と併用)、なかでも 8 機関は Waters 製 Oasis PRiME HLB を使用していた。一方、3 機関は固相抽出による精製を省略していた。また、LC 分離における移動相としては、ギ酸及びギ酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリルを使用した機関が多かったが、ギ酸のみを加えた水/アセトニトリル、アンモニア水を添加した水/アセトニトリルを使用した機関もあった。また、ギ酸を加えた水/メタノールや水/アセトニトリル/メタノールを使用した機関もあった。

各参加機関には、異なる試料瓶を用いることにより、独立した 3 回の分析を行うことを求めた。報告値 (平均値) の分布を図 3 に示す。なお、参加機関にはクロマトグラムの提出も求めたが、標準液と試験溶液 (試験試料を前処理した処理液) の両方において、明らかな妨害ピークが認められた機関はなかった。

b. 併行精度と室間精度

AOAC ガイドライン (AOAC Int., 2005) に基づき、参加機関の報告値の外れ値検定を行った。Cochran 検定 (室内変動の検定) と Grubbs 検定 (室間変動の検定) を行ったところ、Cochran 検定において 2 機関の OA の報告値と、1 機関の DTX1 の報告値が棄却された。

そこで、これら以外の報告値を用いて総

平均（平均値の平均）を求めた。さらに、一元配置分散分析の結果から併行相対標準偏差（併行精度） RSD_r と室間再現相対標準偏差（室間精度） RSD_R を算出した。その結果を表3にまとめる。 RSD_R の値は、Horwitz の修正式（Analyst, 2000）から求めた予測値 $PRSD_R$ に対して 105 % (OA) 及び 121 % (DTX1) であり、参加機関間の分析値のばらつきは良好であることが確認された。

(3) 付与値の算出

技能試験における付与値の算出方法にはいくつかある。その一つである中央値（メジアン）を用いる方法は、機関数が少ない場合の付与値の算出方法として頑健であると考えられている。そこで、参加機関の報告値の中央値を、本比較試験の付与値とした。外れ値を除いた参加機関の報告値の中央値を求めたところ、OA : 0.0189 mg/kg、DTX1 : 0.0373 mg/kg だった。これらの値は、検査試料の調製値（原料として使用中腸線認証標準物質中の OA 及び DTX1 の認証値と、検査試料に対する質量分率から算出）とおおよそ一致していた。

報告値のばらつきを表す正規四分位範囲は OA : 16.9 %、DTX1 : 25.1 %（中央値に対する相対値）であった。これに対し、令和3年に評価した均質性に関する（標準）不確かさと、(1)で算出した DTX1 の安定性に関する（標準）不確かさが、それぞれの物質における正規四分位範囲の 0.3 倍を上回った。そこで、JIS Z8415 (ISO 13528) を参考にして、各物質における正規四分位範囲、均質性に関

する不確かさ（標準偏差）、安定性に関する不確かさ（標準偏差）を合成することにより、技能評価のための標準偏差を算出した。算出の過程を表4に示す。また、最終的に算出した付与値と技能評価のための標準偏差を表5に示す。

(4) 技能評価

JIS Z8415 (ISO 13528) に基づき、次式より参加機関のパフォーマンスの指標である z スコアを算出した。

$$z = (x - X) / \sigma$$

ここに、 x : 参加機関の報告値
 X : 付与値
 σ : 技能評価のための標準偏差

参加機関の z スコアの分布を図4に示す。

算出された z スコアを基に、各機関のパフォーマンスは次のように評価できる。

$$|z| \leq 2.0 :$$

“満足な” パフォーマンス

$$2.0 < |z| < 3.0 :$$

“疑わしい” パフォーマンス

$$3.0 \leq |z| :$$

“不満足な” パフォーマンス

結果として、OA について3機関、DTX1 については1機関の z スコアが 3.0 以上となり、OA について3機関、DTX1 については1機関の z スコアが 2 から 3 の範囲であった。 z スコアが 3 以上の機関の分析方法や結果を精査したところ、定量計算における計算ミスや、LC-MS/MS における測定感度の不足が原因として考えられた。

(5) 参照値の評価

パイロットスタディにおける参加者の

分析値（中央値）から算出した付与値の妥当性を評価するため、本研究で開発した分析法にさらに標準添加法を組み合わせた方法により、検査試料を分析した。分析は、参加機関による分析期間中に4回行った。得られた検量線の一例を図5に、また、4回の分析結果を表6にまとめる。

分析期間中に有意な分析値の変化は見られず、安定性評価試験においてみられた分析値の変化は、分析対象物の濃度の変化に起因しないことが示唆された。

一方、この分析結果は、検査試料の調製値（原料として使用した中腸線認証標準物質中のOA及びDTX1の認証値と、検査試料に対する質量分率から算出）は、調製値が試料中の水分量の変化を考慮していないことを考慮する必要はあるものの、良好に一致していた。一方、付与値とその技能評価標準偏差は、標準添加法による分析結果よりも低かった。参加機関の分析値は、前処理過程における分析対象物質の回収率が考慮されていないことが原因であると考えられたが、今後より詳細な検討が必要である。

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を実施するために必要な分析方法を開発するとともに、実際に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年計画の最終年度である令和4年度は、HLBを用いたクリーンアップがムラサキイガイ、カキ、アサリの分析にも適用可能であるかを検証するとともに、パイロットスタディを主催し、本研究の検討結果の有用性を検証

した。その結果、分析法については、適用した貝試料に対する妥当性が確認されたことから、ホタテガイ以外の検査試料への適用も可能であることが明らかになった。一方、パイロットスタディにおいては、検査試料の調製方法、均質性及び安定性の評価方法、付与値の算出方法、分析結果の解析方法に特段の問題がないことが確認された。ただし、均質性及び安定性の評価結果が付与値の不確かさに影響を与えたことから、今後より高感度な分析法の検討が必要であることも明らかになった。

本研究の成果を基に下痢性貝毒検査における分析精度管理がより高まることを期待したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Yarita, S. Inagaki, Characterization of diarrhetic shellfish toxins in the *Mizuhopecten yessoensis* (Scallop) midgut gland by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), *Analytical Letters*, Taylor & Francis, 56, 531-540, 2023.

2. 学会発表

1) 鎗田孝, 上原由理香, 鳥居塚南, 渡辺卓穂, 下痢性貝毒検査に関する試験所間比較試験のためのホタテガイ試料の調製と評価, 日本食品化学学会 第28回総会・学術大会 (東京), 2023.

2) 鳥居塚南, 上原由理香, 渡辺卓穂, 鎗田孝, 下痢性貝毒の機器分析法における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討, 日本食品衛生学会第118回学術講演会(長崎), 2023.

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 アサリ、カキ、ムラサキイガイ試料による添加回収試験の結果

	回収率 (%)		
	OA	DTX1	DTX2
アサリ	95.6±4.6	97.6±10.8	96.2±5.0
カキ	87.4±5.7	96.1±5.3	89.0±5.1
ムラサキイガイ	96.1±3.5	106.5±5.8	106.5±7.8

表3 参加機関の報告値から算出した総平均、併行相対標準偏差 (RSD_r)、
室間再現相対標準偏差 (RSD_R)

分析対象物質	総平均 (mg/kg)	RSD_r (%)	RSD_R (%)
OA	0.0197	6.1	23
DTX1	0.0372	4.5	27

表4 技能評価のための標準偏差（相対値）の算出

分析対象物質	正規四分 位範囲	均質性に関す る不確かさ	均質性に関す る不確かさ	技能評価のた めの標準偏差
OA	16.9	5.6	3.1	18.0
DTX1	25.1	5.9	8.4	27.1

各値は付与値に対する相対値(%)

表5 付与値と技能評価のための標準偏差

分析対象物質	付与値 (mg/kg)	技能評価のための 標準偏差 (mg/kg)
OA	0.0189	0.0034
DTX1	0.0373	0.0101

表6 標準添加法による検査試料の分析結果

分析対象物質	分析値 (mg/kg)				
	1回目	2回目	3回目	4回目	平均±標準偏差
OA	0.0246	0.0264	0.0263	0.0244	0.0254±0.0010
DTX1	0.0436	0.0449	0.0447	0.0413	0.0436±0.0016

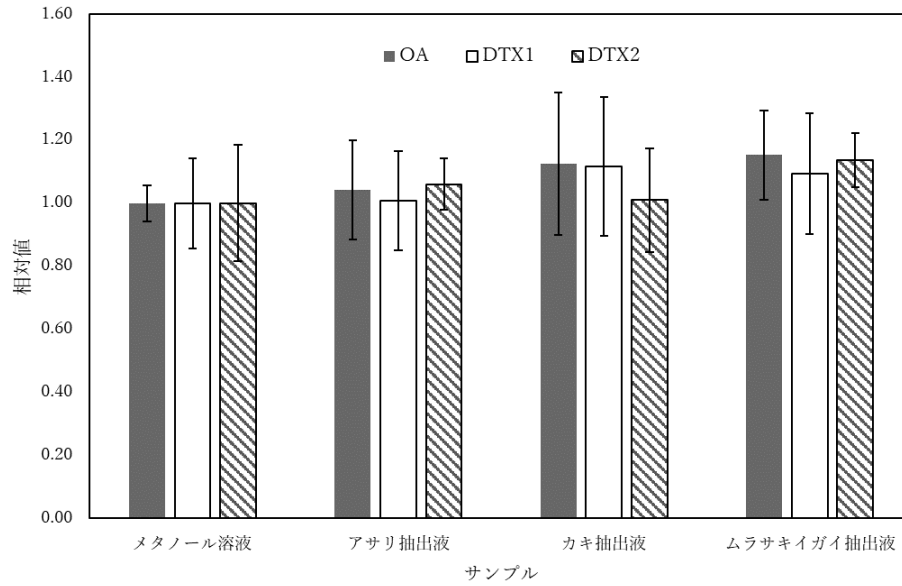


図 1 HLB 精製を行ったアサリ、カキ、ムラサキガイ試料の LC-MS/MS におけるマトリックス効果

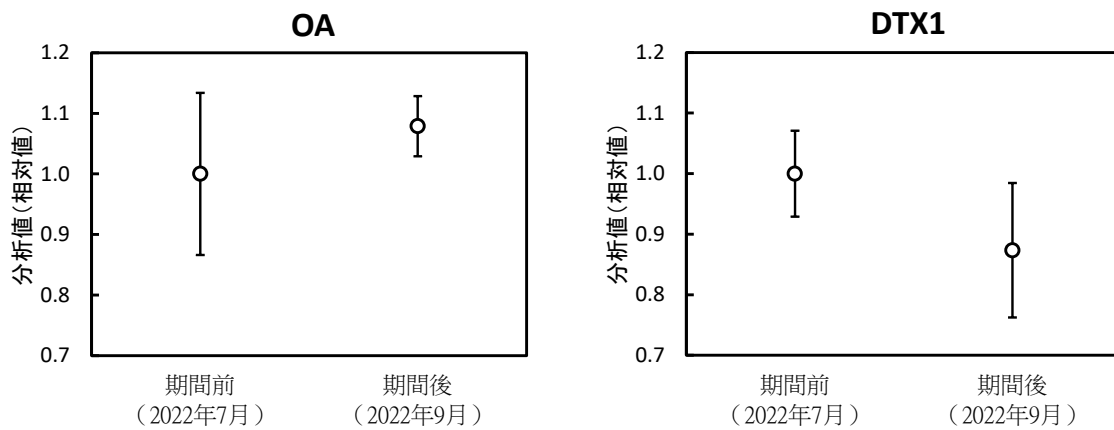


図 2 比較試料の安定性試験の結果

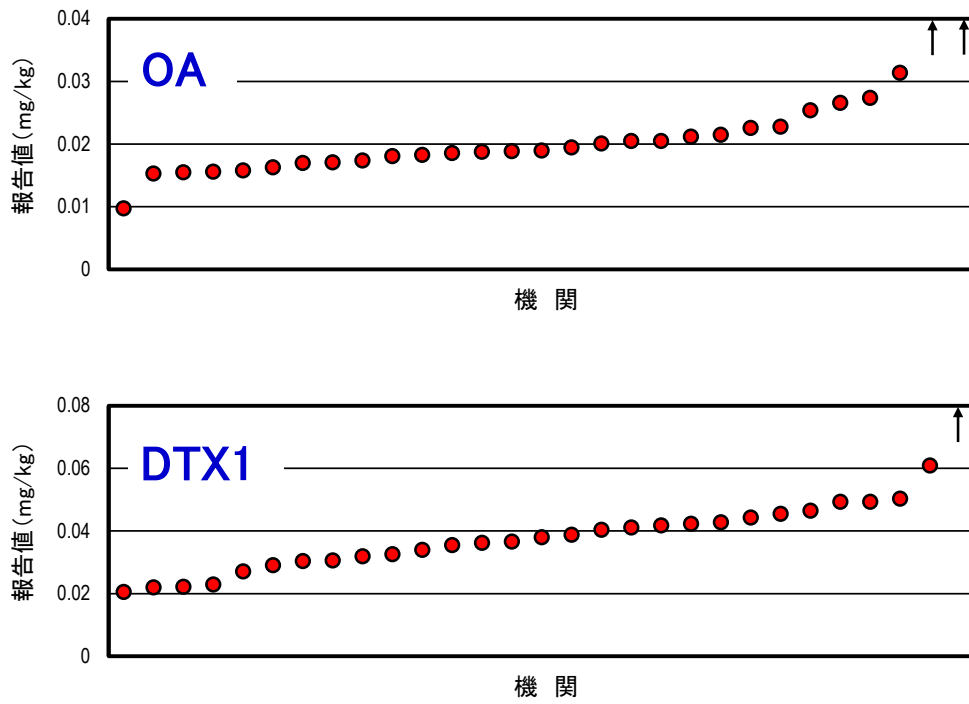


図3 参加機関の報告値（平均値）の分布
 (全報告値を横軸方向に昇順にならべた)

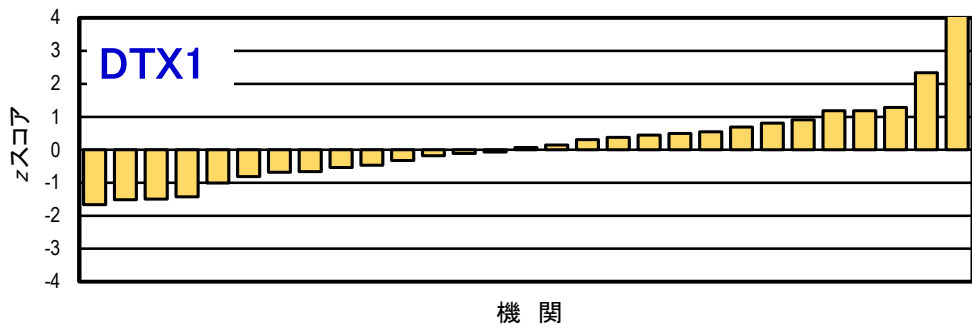
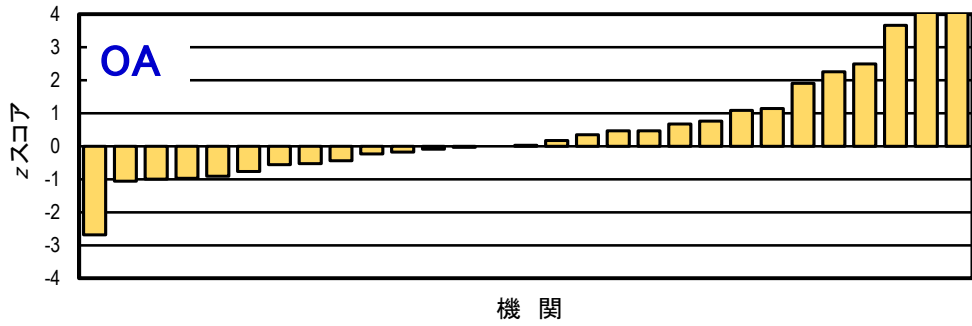


図4 参加機関の技能評価の結果
(参加機関のzスコアを昇順にならべた)

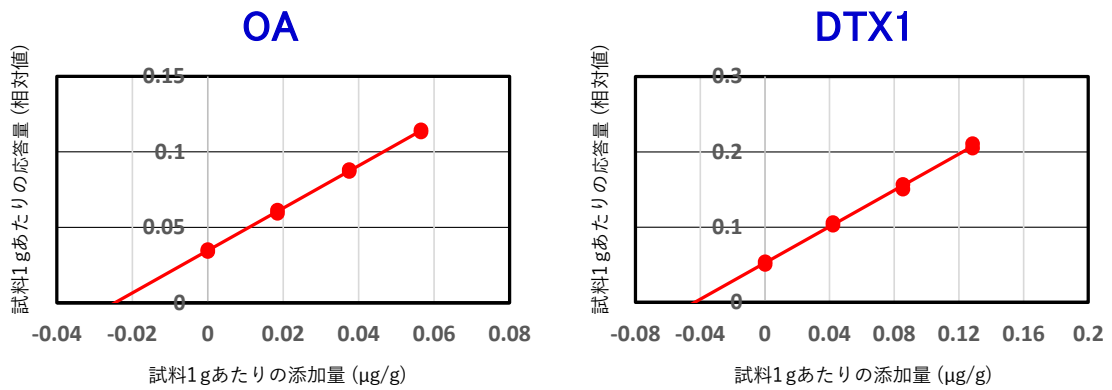


図5 標準添加法によって得られた検量線の一例

令和4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 部長
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精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、昨年度の再現性を確認することを目的として、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。

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。

今年度は、昨年度の再現性を確認することを目的として、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、これまでの本研究で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、昨年度と同様に、環境負荷の低い自動抽出法である超臨界流体抽出法（SFE）を利用した分析も実施した。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おり、昨年度本研究でも評価した結果から、今年度もマトリックスマッチング法を適用したIDMSによって分析を行った。

B. 研究方法

昨年度、高精度化し、妥当性を評価した一斉試験法と SFE 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℃）、2（100℃）、3（80℃）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

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℃）、2（100℃）、3（80℃）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（Tol）、メタノール（Me）、無水 Na_2SO_4 は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用いた。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、残留農薬検査用玄米試料の分析のため、以下のように溶液を調製した。

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 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。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体含有しないことを確認した玄米試料を 3(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。

3. 分析方法

残留農薬検査用玄米試料中の農薬分析には、以下の分析法 1, 2 を用いた。

(1) 分析法 1 (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 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 110 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 AN 10

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 AN 2 mL を通液する処理を行った。得られた処理液を無水 Na_2SO_4 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 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 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間保持した後、+20 $^{\circ}\text{C}$ /分で 160 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、さらに +7 $^{\circ}\text{C}$ /分で 300 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、10 分間保持、注入口温度：250 $^{\circ}\text{C}$ 、検出器温度：230 $^{\circ}\text{C}$ (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_{10})、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン- d_{10})、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン- d_6)、285 (マラチオン)、291 (マラチオン- d_6)、188 (アラクロール)。

(2) 分析法 2 (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 A 0.13 mL を加えて静置した。これに約 10 g の Na_2SO_4 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_2 、ポンプ 2：PU-2080 Plus、ミキサー：MX-2080-32、オーブン：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。全抽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高速液体クロマトグラフ／タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) によって測定した。測定条件は、以下の通りである。装置：ACQUITY UPLC-Xevo TQ system (Waters 製)、カラム：L-column3 C18 (粒子径：3 μm 、カラムサイズ：150 mm \times 2.1 mm i. d.、化学物質評価研究機構製)、カラム温度：40 °C、試料注入量：4 μL 、溶離液 A：1 mM 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B：1 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液、流量：0.2 mL/min、グラジエ

ント条件：溶離液 A の割合を 85% から 1 分間で 60% に減少させた後、60% で 2.5 分間保持し、-4%/分で 50% まで減少させ、次に -2.5%/分で 45% まで減少させ、さらに -4.2%/分で 5% まで減少させた後に 7.5 分間保持した。イオン化方法：ESI、キャピラリー電圧：3.0 kV、コーン電圧：20~30 V、コリジョンエネルギー：15~30 eV、イオン源温度：150 °C、脱溶媒温度：650 °C、定量に用いた m/z (プリカーサーイオン→プロダクトイオン)：350→97 (クロルピリホス)、360→99 (クロルピリホス- d_{10})、305→169 (ダイアジノン)、315→170 (ダイアジノン- d_{10})、278→125 (フェニトロチオン)、284→131 (フェニトロチオン- d_6)、331→127 (マラチオン)、337→127 (マラチオン- d_6)、270→162 (アラクロール)

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。

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

ここで、 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) 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

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1, 2（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1, 2）を用いて、調製時の回収率を計算した結果を表3, 4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概ね一致していたことが示され、本研究の分析法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。また、噴霧温度の各条件の分析結果を比較してみると、添加濃度に対する回収率は80 °Cでもっとも高く、58%から69%であった。農薬別に見てみると、どの噴霧温度でもダイアジノンの回収率が一番低く、フェニトロチオンが一番高かった（クロルピリホスとマラチオンは同程度であった）。どの農薬でも、120 °Cでの回収率がもっとも低くなったのは昨年度と同じ傾向であったが、80 °Cと100 °Cは傾向が異なっていた。噴霧温度を確定させるためには、今後、さらなる検討が必要だと考えられる。

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。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、マラチオンの回収率を昨年度の結果と比較すると、どの農薬でも、120 °Cでの回収率がもっとも低くなったのは同じ傾向であったが、80 °Cと100 °Cは傾向が異なっ

ていた。噴霧温度を確定させるためには、今後、さらなる検討が必要だと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康：玄米中の有機りん系農薬，ピレスロイド系農薬，及びジチオラン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118回学術講演会、長崎、2022

2) 大竹貴光、青柳嘉枝、鎗田孝：凍結粉碎した穀類試料中の冷凍条件における農薬の安定性評価、第45回日本農薬学会農薬残留分析研究会、香川（ハイブリッド開催）、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 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	0.055 ± 0.0002	0.062 ± 0.0001	0.066 ± 0.0003
ダイアジノン	0.164 ± 0.001	0.191 ± 0.001	0.230 ± 0.001
フェニトロチオン	0.117 ± 0.001	0.130 ± 0.001	0.139 ± 0.0003
マラチオン	0.107 ± 0.001	0.122 ± 0.001	0.132 ± 0.001

表2 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	0.051 ± 0.004	0.064 ± 0.002	0.067 ± 0.001
ダイアジノン	0.163 ± 0.006	0.184 ± 0.008	0.228 ± 0.006
フェニトロチオン	0.120 ± 0.003	0.128 ± 0.005	0.142 ± 0.005
マラチオン	0.105 ± 0.005	0.121 ± 0.002	0.133 ± 0.004

表3 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	55.1 ± 0.2	61.8 ± 0.1	66.1 ± 0.2
ダイアジノン	41.1 ± 0.4	47.7 ± 0.5	57.5 ± 0.3
フェニトロチオン	58.7 ± 0.5	65.1 ± 0.5	69.4 ± 0.2
マラチオン	53.3 ± 0.4	61.0 ± 0.8	66.2 ± 0.5

表4 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	51.5 ± 4.1	63.8 ± 1.6	67.2 ± 1.3
ダイアジノン	40.7 ± 1.4	46.1 ± 1.9	57.1 ± 1.4
フェニトロチオン	60.0 ± 1.5	63.8 ± 2.6	71.1 ± 2.6
マラチオン	52.6 ± 2.7	60.3 ± 0.9	66.4 ± 1.8

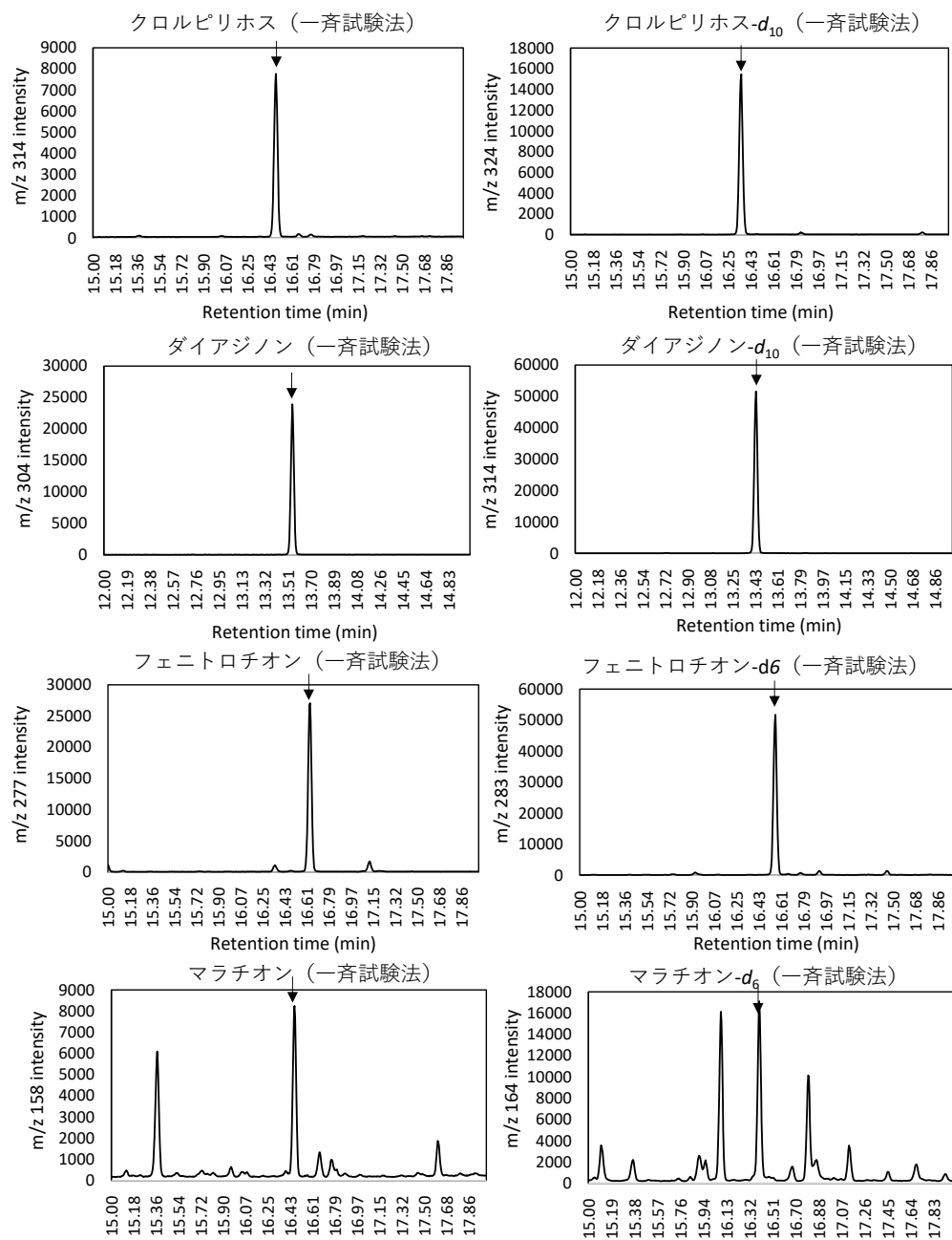


図1 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬のGC/MSクロマトグラム

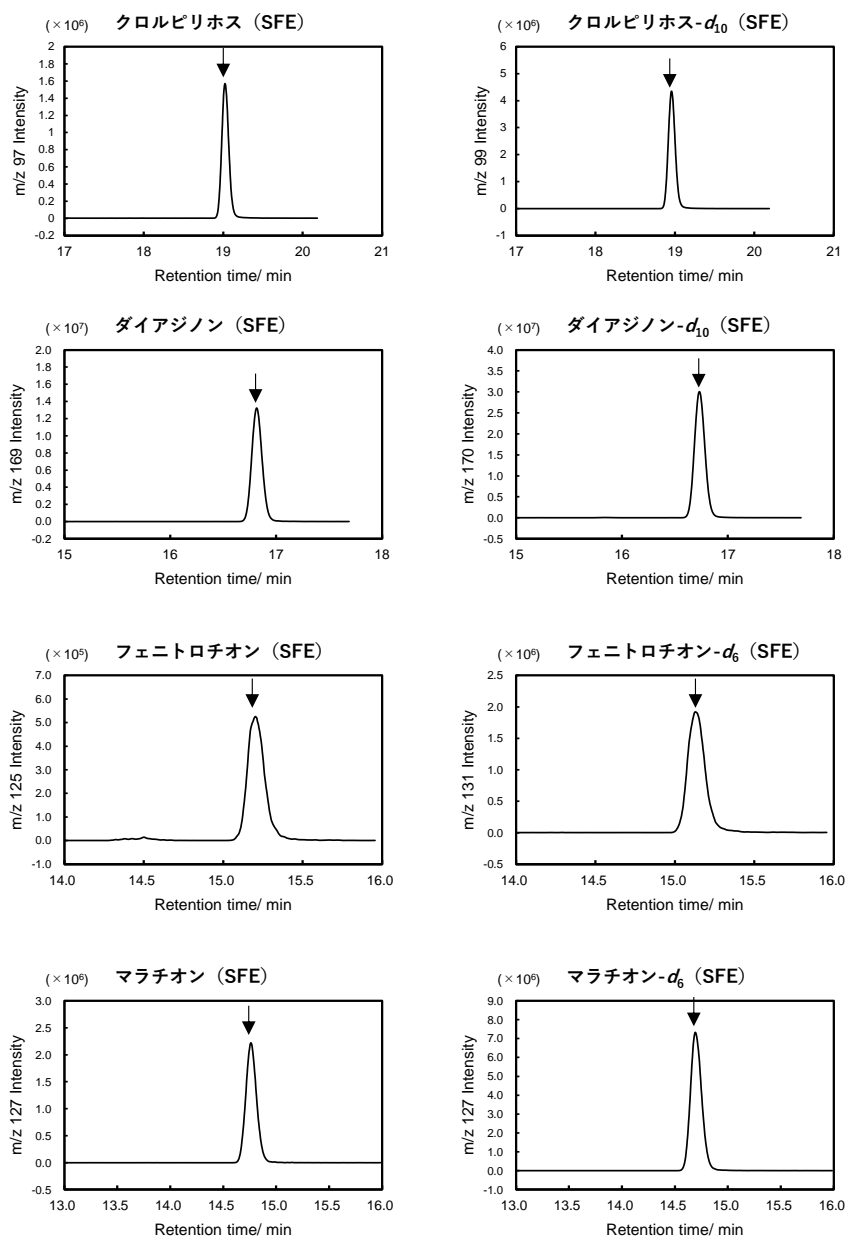


図 2 SFE 法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬の LC/MS/MS クロマトグラム

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
千葉雄介, 金井美樹, 藤原 茜, 高瀬冴子, 荒島麻実, 土井りえ, 島田慎一, 石井里枝	E. coli および黄色ブドウ球菌定 性試験法における検出下限値の 推定	日食微誌	39	132-140	2022
T. Yarita, S. Inagaki	Characteri-zation of diarrhetic shellfish toxins in the <i>Mizuhopecten yessoensis</i> (Scallop) midgut gland by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)	Analytical Letters	56	531-540	2023

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
村上太郎、村野晃一、山崎 朋美、柿本葉、若栗忍、高 取聡、角谷直哉、渡辺卓穂	精度管理用試料を利用した特定原 材料（小麦）の測定阻害評価と改 良抽出法についての検討	日本食品化学学会 第 28 回総会・ 学術大会	2022
鎗田孝, 上原由理香, 鳥居 塚南, 渡辺卓穂	下痢性貝毒検査に関する試験所間 比較試験のためのホタテガイ試料 の調製と評価	日本食品化学学会 第 28 回総会・ 学術大会	2022
村上太郎、村野晃一、山崎 朋美、柿本葉、若栗忍、高 取聡、角谷直哉、渡辺卓穂	特定原材料（小麦）の改良抽出法 の評価に向けた室間共同試験用試 料の調製	AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 25 回年次大会	2022
中村圭介、大竹貴光、羽成 修康	玄米中の有機りん系農薬、ピレス ロイド系農薬、及びジチオラン系 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 118 回学術講 演会	2022

鳥居塚南, 上原由理香, 渡辺卓穂, 鎗田孝	下痢性貝毒の機器分析法における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討	日本食品衛生学会第 118 回学術講演会	2022
大竹貴光, 青柳嘉枝, 鎗田孝	凍結粉碎した穀類試料中の冷凍条件における農薬の安定性評価	第 45 回日本農薬学会農薬残留分析研究会	2022
村上太郎, 村野晃一, 山崎朋美, 柿本葉, 若栗忍, 高取聡, 角谷直哉, 渡辺卓穂	特定原材料 (小麦) の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製	第 59 回全国衛生化学技術協議会年会	2022
J. Takebayashi, N. Takasaka, I. Suzuki, T. Nakasaka, Y. Kumai, N. Hirabayashi, T. Chiba, T. Watanabe	Current state and issues of laboratory nutrition analysis for nutrition labeling in Japan: an assessment of performance data from proficiency testing schemes in 2017-2021	22 nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo JAPAN, (Tokyo)	2022
細谷まい, 内田華那, 伊藤里恵, 若栗忍, 渡辺卓穂, 穂山浩	外部精度管理調査研究のための卵タンパク質のアレルギー物質を含む実試料調製及び均一性試験	日本薬学会第 143 年会	2023
内田華那, 細谷まい, 伊藤里恵, 若栗忍, 渡辺卓穂, 穂山浩	外部精度管理調査研究のための乳タンパク質のアレルギー物質を含む実試料調製及び均一性試験	日本薬学会第 143 年会	2023

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4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。

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4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) 化学検査室 ・ 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。

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4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 食品安全課 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。

令和5年 3月 10日

厚生労働大臣 殿

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4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。

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 和彦

次の職員の令和4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。