

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2年度～令和4年度

総合研究報告書

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

研究代表者 渡辺 卓穂

令和5年(2023年)5月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	46

総合研究報告書

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

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、令和2年度から4年度において、1. 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究（渡辺研究分担）では、スプレードライヤを用いた残留農薬検査試料作製の最適化を行った。また、器具・容器包装の検査項目の基礎検討では、スプレードライヤでの作製及び有機溶媒を選定し、ABS及びASのキャスティングでの作製検討及び微生物検査については、一般細菌数測定検査用コメ基材の開発及び新規項目の検討を、2. 微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物の妥当性評価に関する研究（石井研究分担）では、E. coli定性試験法及び黄色ブドウ球菌試験法についてLODの推定をすることにより、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。

また、6種の食品添加物試験法（TBHQ試験法、サイクラミン酸試験法（固相抽出法及びスクリーニング法）、ソルビン酸試験法、二酸化硫黄及び亜硫酸試験法（アルカリ滴定法及び比色法）について、真度、併行精度及び室内精度等を測定し、妥当性評価の対象とすべき食品について考察した。また、「ソルビン酸試験法」及び「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法」について、室間共同試験により真度、併行精度及び室間精度等を検討したところ、対象としたすべての食品種で良好な結果が得られた。サイクラミン酸試験法については良好な真度及

び精度が得られなかった5種類の食品種について規定分析法の改良法及び新規分析法を検討した。3. アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究(村上研究分担)では、精度管理用試料の作製のために適正資材の安定性の検討を、4. 下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究(鎗田研究分担)では、検査試料の均質性評価と分析法の検討を、5. 分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用(大竹研究分担)では、課題1で作製した試料をIDMSを用いて分析値を付与し、5課題を実施した。

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

A. 研究目的

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

外部精度管理調査プログラムは、検査されているすべての検査項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目について

しか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は、試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査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：

1. 試料基材および試薬

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

気化室温度：250°C

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°C（1分）⇒125°C

（25°C/分）⇒300°C（10°C/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ミキサーで攪拌し、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。

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：

「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、食品衛生法において一般あるいは個別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有機溶媒への溶解性を検討した。その結果、ポリスチレン、ABS 及び AS のペレットが溶解する溶媒が明らかとなり、令和 2 年度はポリスチレンペレットを試料基材とし、試験対象物質をカドミウム及び鉛として、溶解溶媒にジクロロメタンを用いて、調査試料作製検討を行った。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 10 倍容量のジクロロメタンに、この標準品を添加して均質な

溶液を調製し、これにポリマーを添加し、混合して十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをシート作製容器に流し入れ、垂平に保ちながらジクロロメタンを自然乾燥にて揮発し、シート状の試料を得て、これらのカドミウム及び鉛含量を測定し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性を確認した。

令和3年度は前年度に引き続き、調査試料作製の基礎的検討を行った。試料基材及び試験対象物質は前年度と同様とし、今年度は新たな作製法としてスプレードライヤを用いて粉体の試料作製を試みた。添加に用いる標準品は前年度のシート状試料と同様に有機溶媒に溶解する SPEX 製カドミウム及び鉛（いずれも 5000 µg/g、Base Oil 75）を用いた。ポリマー質量に対して10倍容量のジクロロメタンに、この標準品を添加して均質な溶液とし、これにポリマーを添加して混合し、十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをスプレードライヤに供し、粉体状の試料を得て、これらのカドミウム及び鉛含量を測定し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性ならびに残留溶媒について検討した。

令和4年度は令和2年度の研究報告で良好な溶解性が確認できたポリスチレンペレット以外の基材であるABSペレット及びASペレットについて、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。試験対象物質は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。

1.3 アレルギー物質技能試験プログラムに関わる検討：

アレルギー物質技能試験プログラムのパイロットスタディとして初年度および次年度はそれぞれ2種の基材を用いて乳タンパク質を含有した試料を作製した。次年度の試料は初年度に検討を行った基材を使用した。最終年度は、1基材に3種の特定原材料を添加した試料を作製し、パイロットスタディに供した。

初年度、次年度においては各機関へ原則として、通知法準拠の3キット中、任意の2種類で測定を行うよう要請した。また、通知法非準拠の乳検出用キット1種についても随意で使用することとした。最終年度は卵、乳検出系ともに、指定したELISAキットの使用を要請した。

測定結果は試料ごと、また、測定キットごとにまとめ、ロバスト方式により統計値を算出した後、zスコアを算出した。測定結果

から得られた含有量を指標とした Xbar-R 管理図についてもあわせて解析を行った。

また、最終年度には市販加工食品を使用した外部精度管理調査用の試料を視野に 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、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。

試料基材および添加菌

1) 試料基材

白飯（アルファ米、市販品）を用いた。

2) 添加菌

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）を用いた。

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。

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。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°C 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。

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°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。

2) 添加菌液の調製

調査試料（弁当）では市販の枯草菌芽胞液を 20% (w/v) NaCl 溶液で約 2.5×10^6 cfu/mL に希釈したものを添加菌液とした。調査試料（冷凍食品）では 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、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

調査試料（弁当）では基材に 20% (w/v) NaCl 溶液 50 mL と添加菌液 1 mL を添加し、均質になるよう十分に攪拌したものを調査試料とした。調査試料（冷凍食品）では基材に 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ものを調査試料とした。調査試料は使用、または配付するまで冷蔵保存した。

調査試料の性能評価

調査試料（弁当）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。調査試料（冷凍食品）では冷凍試料（-15℃以下）と冷凍保存11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。

調査試料の品質評価

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。

調査試料のパイロットスタディ

パイロットスタディでは約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。

微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討：

添加する微生物の濃度を従来の1/100程度に抑え、従来の作製手順を踏襲した調査試料を作製し、この調査試料の生菌数の挙動および定性試験（公定法）を実施することで技能試験の品質への影響を検証した。

試料基材および添加菌

1) E. coli 検査用調査試料

試料基材はハンバーグ（市販品）、添加菌は *Escherichia coli* HIC 190367（陽性）、*Acinetobacter calcoaceticus* HIC 190366（陰性）を用いた。

2) 腸内細菌科菌群用調査試料

試料基材はハンバーグ（市販品）、添加菌は *Escherichia coli* HIC 190367（陽性）、*Pseudomonas aeruginosa* HIC 190371（陰性）を用いた。

3) サルモネラ属菌検査用調査試料

試料基材は液卵、添加菌は *Salmonella* sp. HIC 190364（陽性）、*Proteus mirabilis* HIC 190368（陰性）を用いた。

4) 大腸菌群検査用調査試料

試料基材はハンバーグ（市販品）、添加菌は *Klebsiella oxytoca* HIC 190365（陽性）、*Acinetobacter calcoaceticus* HIC 190366（陰性）、*Citrobacter freundii* HIC 190378（陽性）、*Enterobacter cloacae* HIC 190379（陽性）、*Aeromonas hydrophila* HIC 190377（陰性）、*Enterococcus faecalis* HIC 190381（陰性）の6菌種を用いた。

培地等

1) E. coli 検査

EC培地（日本製薬、日水製薬）、EMB培地（日水製薬）、乳糖ブイヨン培地（日水製薬）、グラム染色液（日水製薬）を用いた。

2) 腸内細菌科菌群検査

EEブイヨン（OXOID）、OF基礎培地（栄研化学）、チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙（日水製薬）を用いた。

3) サルモネラ属菌検査

ラポポートバシリアジス培地（日本製薬、OXOID）、テトラチオネート培地（日水製薬）、DHL 寒天培地（日水製薬）、XLD カンテン培地（日本製薬）、MLCB 寒天培地（日水製薬）、ブリリアントグリーン寒天培地（栄研化学）、CHROMagar Salmonella（CHROMagar）、ES サルモネラ寒天培地 II（栄研化学）、chromID Salmonella agar（バイオメリュー）を用いた。

4) 大腸菌群

BGLB 培地（日水製薬）、EMB 培地（日水製薬）、乳糖ブイヨン培地（日水製薬）、グラム染色液（日水製薬）を用いた。

5) 共通試薬等

精製水（日本薬局方）（小堺製薬）、緩衝ペプトン水（BPW）（ISO 組成）（日水製薬）、標準寒天培地（日水製薬）、SCD 培地（日本製薬）、その他、培地指定の添加剤等を用いた。

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、培養には恒温槽または恒温水槽を使用した。

調査試料の作製

1-1) ハンバーグ基材の滅菌

ハンバーグを沸騰水で15分間煮沸して油脂を除去した。新たな沸騰水で再度同様に煮沸後、滅菌用の容器に挿入し、121℃で75分間の高圧蒸気滅菌を行った。

1-2) 液卵基材の滅菌

NaCl 38.25 g、Tween80 45.0 g、精製水 3150 mL、グリセリン 450 gを十分に混和した後、高圧蒸気滅菌可能な樹脂製容器に80 mLずつ分注し、121℃で30分間の高圧蒸気滅

菌を行った。添加菌の添加当日に液卵20 mLを添加したものを液卵基材とした。

3) 添加菌の前培養

標準寒天培地で35.0℃、18-24時間培養し、SCD培地に1白金耳移植後35.0℃、18-24時間培養した。

4-1) ハンバーグ基材の調査試料作製

培養液1 mLをSCD培地99 mLに添加し、十分に混和して希釈培養液を作製した。希釈培養液全量をグリセリン加生食（グリセリン 100 g、NaCl 9.0 g、精製水 800 mL）に添加し、十分に混和したものを添加菌液とした。添加菌液にハンバーグを浸漬し、滅菌済容器に挿入した。これを調査試料とした。試験項目ごとに各菌6個作製し、大腸菌群検査用調査試料は異なる培養液で3セット（各菌6個×3セット）作製した。

4-2) 液卵基材の調査試料作製

培養液1 mLを生理食塩液99 mLに添加し、十分に混和して希釈培養液を作製した。希釈培養液10 mLを生理食塩液90 mLに添加し、十分に混和したものを添加菌液とした。添加菌液1 mLを液卵基材に添加し、十分に混和したものを調査試料とした。

調査試料の保管条件

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

調査試料の品質評価

各調査試料は25 g秤量し、225 mLの緩衝ペプトン水（BPW）を添加後にストマッカ

一で1分間処理した懸濁液を試験溶液とした。

1) 生菌数試験

冷蔵試料は添加直後、10、14（または15）および28（または29）日後の4回、生菌数測定を実施した。また常温試料は添加14（または15）および28（または29）日後の2回、生菌数測定を実施した。試験溶液1 mLをBPW 9 mLで段階希釈し、各希釈液1 mLを標準寒天培地で混釈平板培地にした ($n=2$)。これを35.0°C、18時間以上培養し、発育集落を計測して生菌数を算出した。

2) 定性試験

冷蔵試料は添加直後および28（または29）日後の2回、常温試料は28（または29）日後の1回実施した。E. coli 検査、サルモネラ属菌検査、大腸菌検査：試験操作は「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」（平成27年7月29日、食安発0729第4号）に従った。腸内細菌科菌群検査は「生食用食肉の腸内細菌科菌群の試験法について」（平成23年9月26日、食安発0926第1号）に従った。

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

微生物定性試験法における検出下限値の推定

E. coli 定性試験法、黄色ブドウ球菌定性試験法の検出下限値として、実施試験の50%が陽性となる菌量である LOD₅₀ (level of detection) の推定を行った。

(1) 手技によるばらつきの評価

Wilrich¹⁾らの試験方法を参考にして食品の代わりに希釈液を試料として LOD₅₀ を推定した。2倍段階希釈した5濃度の菌液を試料に接種し、各濃度につき $n=6$ で試験を実施し、陽性と判定された試料数の割合から LOD₅₀ を推定した。

試料への接種菌株は、BioBall HD 10K *Escherichia coli* NCTC9001（使用ロット番号 B5701、9146.0 CFU）および BioBall HD 10K *Staphylococcus aureus* NCTC10788（使用ロット番号 B6137、10506.0 CFU）（いずれも bioMérieux）を使用した。各試験法において試料の希釈倍率、培地への接種量が異なるため、培地中へ接種される菌量が1 CFU前後となるように、本製品を用いて次のとおりに接種菌液を調製した。本製品は1粒に約10,000 CFUの細菌が含まれており、E. coli 定性試験法では3粒をリン酸緩衝液(PB) (pH 7.2) (LSI メディエンス) 30 mLに、黄色ブドウ球菌定性試験法では4粒をPB 20 mLに懸濁したものを接種菌原液とした。接種菌原液をPBで2倍段階希釈を繰返し、2、4、8、16倍希釈したものを接種菌液とした。手技によるばらつきの評価では食品の代わりにE. coli 定性試験法ではPBを、黄色ブドウ球菌定性試験法では緩衝ペプトン水(BPW) (ISO 処方) (Oxioid) を試料として用いた。フィルター付きストマッキング袋に採取した試料25 mLに、接種菌原液または接種菌液をE. coli 定性試験法では2 mL、黄色ブドウ球菌定性試験法では1.5 mLずつ接種し、細菌接種試料とした。各試料中の菌濃度を高い方から d_1 - d_5 (CFU/mL) (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。各濃度の細菌接種試料について $n=6$ で試験を

実施した。細菌を接種しない試料(ブランク試料)についても $n=1$ 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(栄研化学)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、以降の試験は省略した。

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。選択分離寒天培地として 3%卵黄加マンニット食塩寒天培地(MSEYA)(栄研化学、卵黄液は極東製薬工業)を用い、10 倍希釈液を 0.1 mL ずつ MSEYA2 枚に接種、塗抹し、 $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ± 2 時間培養した。培養後、2 枚の MSEYA のいずれかに 1 コロニー以上の黄色ブドウ球菌の定型集落(黄色集落でその周囲に卵黄反応による白濁帯を示したもの)が発育した場合黄色ブドウ球菌試験陽性と判定し、以降の試験は省略した。両試験法とも一連の操作を 1 人の検査員で実施し、3 人の検査員で計 6 回実施した。

LOD_{50} の算出方法は ISO 16140-2:2016 に記載されており、その引用元である Wilrich¹⁾らの手法に準じて LOD_{50} を推定した。培地中への試料接種量を A_0 (g または mL) (g または mL) (g または mL)、試料中の菌濃度を d (CFU/g または CFU/mL) とし、ポアソン分布より導出した以下の式から LOD_{50} を推定した。

$$\text{LOD}_{50} = -\frac{\ln 0.5}{A_0 F}$$

E. coli 定性試験法では 100 倍希釈液 1 mL を 3 本の EC 発酵管に、黄色ブドウ球菌定性試験法では 10 倍希釈液 0.1 mL を 2 枚の選択分離寒天培地に接種していることから、培地への試料接種量である A_0 にはそれぞれ 0.03、0.02 を代入した。また、F 値は検出感度に影響を与える食品固有の値であり、食品中の菌濃度 d_i での陽性試料数 y_i を以下の方程式に代入し、その解により F 値を求めた。

$$\sum_{i=1}^5 \left(\frac{y_i d_i}{\exp(A_0 F d_i) - 1} - (6 - y_i) \right) = 0$$

(2) 食品試料ごとの LOD_{50} の推定

規格基準や旧衛生規範において成分規格が設定されている食品を試料として(1)と同様に LOD_{50} を推定した。E. coli 定性試験法ではオクラ、ホウレン草、ピラフ、からあげ、生うどん、白菜の塩漬けを、黄色ブドウ球菌定性試験法ではチャーハン、カレー、チーズケーキ、エッグタルト、生うどん、ソーセージを供試した。無菌的に各試料 25 g をフィルター付きストマッキング袋に採取し、(1)と同様に細菌接種試料の調製、各定性試験および LOD_{50} を推定した。事前に食品試料が E. coli 定性試験法では EC 発酵管でガスが産生せず、黄色ブドウ球菌定性試験法では MSEYA 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 MSEYA 上の定型集落発育の有無で結果を判定した。各試料について日を改め 2 回実施した。

(3) 試験室間での eLOD_{50} (estimated LOD_{50}) の比較

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 ISO 16140-3 : 2021 記載の算定表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 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。接種菌株は(1)と異なるロットの製品を使用した (E. coli : 使用ロット番号 B6556、9536.0 CFU、黄色ブドウ球菌 : 使用ロット番号 B6452、10518.0 CFU)。E. coli 定性試験法では PB6 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 倍段階希釈し、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(1)と同様に各試験を実施した。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 のほかにベアード・パーカー寒天培地 (BPA) も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 (BPA 上では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、ISO 16140-3 : 2021 記載の算定表を基に eLOD₅₀ を求め、LOD₅₀ と比較した。

食品添加物試験法の妥当性に関する研究

1. 評価対象とする食品添加物及び食品の種類を選定

(1) 対象食品添加物の選定

輸入時及び国内における令和元年度輸入食品違反事例等を参考として、違反事例が多く、優先的に検討すべき添加物を検討した。「TBHQ」、「サイクラミン酸」、「ソルビン酸」、「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類」の 4 種を選定した。

(2) 対象食品種の選定

食品添加物の使用量、試験法の特長、既報の真度、精度及び妨害ピークの有無等を考慮し、それぞれの食品添加物について妥当性評価を行うべき対象食品種を幅広く選定した。

2. 分析方法

規定分析法(通知試験法)に則って実施した。サイクラミン酸試験法については固相抽出による精製があるものと省略した方法(スクリーニング試験法)を実施した。二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法についてはアルカリ滴定法と比色法の2つの方法を実施した。

3. 性能評価基準

CODEX及びAOACのガイドラインで示されている性能評価基準を参考にした評価基準を作成し、評価を行った。

4. 添加回収試験

対象とする食品添加物が含有されていない食品を試料とした。試料は2. 分析方法に従って、試験溶液を調製し、分析に供した。測定を妨害するピークや滴定の妨害の有無を確認し、選択性を評価した。1人1日5回、2名で2日間(一部、3日間実施)添加回収試験を実施し、真度、併行精度及び室内精度を算出した。

なお、添加濃度は原則、それぞれの食品種の基準値濃度とした。指定外添加物の添加濃度は規定分析法の通知に記載のある精度管理時の添加濃度とした。

5. 室間共同試験

単一試験室における添加回収試験にお

いて良好な結果が得られた「ソルビン酸試験法」及び「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法」について室間共同試験を実施した。

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

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

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

6. 「サイクラミン酸試験法」改良法の検討
サイクラミン酸試験法で良好な回収率及び精度の得られなかったビスケット、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を検討した。

7. 「サイクラミン酸試験法」新規分析法の開発

「サイクラミン酸試験法」(規定分析法)では定量下限値レベルでの感度不足や、アセトニトリル水混液の移動相へヘキサン試験溶液を注入するため、注入量を増加させることが困難であり、また、連続分析における保持時間の変動、試験溶液の保存に工夫が必要であるなどの難点があることから、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と塩化ベンゾイルを反応させ、生じるN-シクロヘキシルベンズアミドを検出、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シクロヘキシルアミンへの分解及び塩化ベンゾイルによる誘導體化、生じたN-シクロヘキシルベンズアミド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）

本研究では、これまでに特定原材料（小麦・落花生）の定量で影響が確認されてきたポリフェノールの一種であるProanthocyanidin (PAC) を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行った。

2020年度は、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PACを含む試料について、測定阻害の影響を確認した。また、試料からの抽出効率を添加回収試験によって回収率として評価した。回収率の低下が確認された試料については、PACとの結合能が報告されている化合物を利用して、抽出法の改良について検討した。産地と加工法の異なるカカオまたはシナモンを含む食品について、ELISAキットの測定および抽出における夾雑物の影響を評価した。

2021年度は特定原材料の検査における試験室内における不確かさについて評価を行った。当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元

に、特定原材料の測定における試験室内での不確かさについて推定した。次に、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安定性について評価した。また、2試験室による室間共同試験用試料の評価を行った。

2022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。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。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 σ スコアを算出し、外れ値を評価した。外れ値の評価後に試料ごとの分析値から抽出法ごとの回収率を算出して評価を行った。

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 精確な分析法の検討

4.1.1 材料・試薬

二枚貝の可食部試料は市販品を、ホタテガイ中腸腺は産業技術総合研究所が2015年に主催した試験所間比較試験の検査試料を用いた。オカダ酸(OA)標準液とジノフィシストキシン-1(DTX1)標準液は産業技術総合研究所から、ジノフィシストキシン-2(DTX2)

標準液は National Research Council Canada から入手した。

4.1.2 マトリックス効果評価のための試料調製

(1) ホタテガイ可食部

食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」別紙 2 の「オカダ酸群分析操作例」（以下例示法）に準拠してホタテガイ可食部を前処理した。その際、加水分解及び中和処理した可食部を、さらに濃縮およびフィルターろ過することによって E 液を得た。また、固相抽出処理した可食部を、さらに濃縮およびフィルターろ過することによって C 液を得た。また、OA と DTX1 のメタノール溶液である M 液を得た。

(2) ホタテガイ中腸腺

まず、OA と DTX1 を 5 濃度レベル含むメタノール溶液 M1 液を調製した。また、例示法に準拠してホタテガイ中腸腺試料を処理した。その際、中腸腺試料を加水分解及び中和処理したものの一部を M1 液で置換し E1 液とした。また、加水分解及び中和処理したものを 4 倍希釈し、M1 液で置換して E2 液とした。一方、中腸腺試料を固相抽出したものの一部を M1 液で置換し C1 液とした。また、固相抽出したものを 4 倍希釈し、M1 液で置換して C2 液とした。

4.1.3 液体クロマトグラフィー-蛍光検出法 (HPLC-FD)

OA 群に 9-Anthryldiazomethane (ADAM) / メタノール溶液を加え、室温で 1 時間反応させて蛍光誘導体化した。

第 1 カラムにはジーエルサイエンス製

Inertsil diol、第 2 カラム（トラップカラム）にジーエルサイエンス製 Inertsil C4、第 3 カラムには野村化学製 Develosil C30-UG-5 を用いたスイッチング HPLC 装置を試作した。流路の切り替えは、6 方切換えバルブ 2 個によって行った。

4.1.4 固相抽出の検討条件

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

A 法：例示法に従って調製した可食部試料のヘキサン洗浄液 2.5 mL、水 2.5 mL、OA 群を 0.1 µg/mL 含む OA 群混合標準溶液 100 µL の混合液) をカートリッジに注入した。試料が入っていたねじ口試験管に 40 %メタノール 2.0 mL を加えて攪拌し、カートリッジに注入する操作を繰り返した。次に、水 4.0 mL、40 %メタノール 4.0 mL をカートリッジに順次注入した。さらに、90 %メタノール 5.0 mL をカートリッジに注入し、その溶出液を Fr. A とした。

B 法：例示法に従って調製した可食部試料のヘキサン洗浄液 2.5 mL、水 2.5 mL、OA 群混合標準溶液 100 µL の混合液をカートリッジに注入した。次に、試料が入っていたねじ口試験管に 90 %メタノール 1.0 mL を加えて攪拌し、カートリッジに注入する操作を繰り返した。さらに 90 %メタノール 3.0 mL をカートリッジに注入し、以上の操作で得られた溶液を合わせて Fr. B とした。

C 法：例示法に従って調製した可食部試料のヘキサン洗浄液 2.5 mL、水 2.5 mL、OA 群混合標準溶液 100 µL の混合液をカートリッ

ジに注入した。試料が入っていたねじ口試験管に40%メタノール2.0 mLを加えて攪拌し、カートリッジに注入する操作を繰り返した。次に、5%メタノール5.0 mL、アセトニトリル/メタノール(4:1)5.0 mLを順次カートリッジに注入した。さらに、アセトニトリル/メタノール(4:1)3.0 mLをカートリッジに注入し、その溶出液をFr. Cとした。

D法:例示法に従って調製した可食部試料のヘキサン洗浄液2.5 mL、水2.5 mL、OA群混合標準溶液100 µLの混合液をカートリッジに注入した。次に、試料が入っていたねじ口試験管にアセトニトリル/メタノール(4:1)1.0 mLを加えて攪拌し、カートリッジに注入する操作を繰り返し、さらにアセトニトリル/メタノール(4:1)3.0 mLをカートリッジに注入し、これらの溶出液をFr. Dとした。

4.1.5 固相抽出の検討条件

例示法に準拠して行った。

4.2 パイロットスタディ

4.2.1 材料・試薬

検査用試料の原料には市販のホタテガイ可食部(国内産)と、ホタテガイ中腸腺認証標準物質(NMIJ CRM7520-a)を用いた。OA群の標準物質は4.1.1と同じものを用いた。

4.2.2 検査試料の調製

ホタテガイの可食部をブレンダーで細断し、裏ごし、得られた試料を混合した。次に、ガラス瓶9個にホタテガイ中腸腺認証標準物質10 gと、その9倍量のホタテガイ可食部を加えて混合後、各瓶の内容物を合わせ

て混合した。これを5等分にした後、5 gずつプラスチック製バイアルに小分けした。

4.2.3 均質性の評価

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

4.2.4 均質性の評価

参加機関における検査試料の保存条件は、-20℃~-30℃とした。参加機関による分析期間中の安定性を評価するために、分析期間前後に検査試料を分析した。

4.2.5 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。

4.2.6 茨城大学における検査試料の分析

参加機関による分析と並行して、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、前述のHLBカートリッジを用いた固相抽出にLC-MS/MSを組み合わせる方法に、前処理前に既知量のOAとDTX1を添加する標準添加法を組み合わせ適用した。

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)

(1) 添加回収試験による一斉試験法およびQuEChERS法、超臨界流体抽出(SFE)法の評価

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランク玄米を粉碎したものを試料とし、そこに対象農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンをポジティブリストの基準濃度値（クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン：0.1 mg/kg，フェニトロチオン：0.2 mg/kg）になるように添加した。本試料を、IDMS を適用した一斉試験法および QuEChERS 法、SFE 法によって分析を行い、得られた結果を解析して各分析法の正確さを精密に評価・比較した。

(2) 残留農薬検査用玄米試料の分析

(1) で評価した分析法を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料（Lot 1（120℃）、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。

5.1 試料基材および試薬

(1) 試料

添加回収試験による一斉試験法および QuEChERS 法、SFE 法の評価には、粉碎して粉末とした市場流通品の玄米を用いた。分析により、当該玄米試料中の対象農薬は検出下限以下であることを確認した。また、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料（Lot 1（120℃）、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）、無水 Na_2SO_4 は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用いた。QuEChERS 法で用いた PSA、グラファイトカーボンブラック、C18 は Agilent Technologies 社製のものを用いた。他の試薬は試薬グレードを用い、水は超純水を用いた。

5.2 検量線溶液、内標準溶液、シリンジスパイク溶液

質量比混合法によって以下の溶液を調製した。

(1) 添加回収試験による一斉試験法および QuEChERS 法、SFE 法の評価用

クロルピリホス- d_{10} 、ダイアジノン- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、マラチオン- d_6 を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 A とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液 A を調製した。一方、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液 A を調製した。さらに、農薬混合溶液 A、内標準溶液 A、アラクロール溶液 A、Ac を混合することにより、検量線溶液 A を調製した。検量線溶液 A の各成分濃度は、3(1)および 3(2)に示す前処理法によ

って玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調製した。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体含有しないことを確認した玄米試料を 5.3(1) および 5.3(2)、5.3(3) 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 (QuEChERS 法用)、A-3 (SFE 法用) を調製した。

5.3 分析方法

添加回収試験による一斉試験法の評価では分析法 1、QuEChERS 法の評価では分析法 2、SFE 法の評価では分析法 3 を用いて玄米中の農薬を分析し、各分析法の評価を行った。また、残留農薬検査用玄米試料中の農薬分析には分析法 4、5、6 を用いた。

(1) 分析法 1 (一斉試験法、添加回収試験)

玄米試料 3 g に農薬混合溶液 A0.4 mL および内標準溶液 A0.4 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 (pH 7.0) 20 mL を加え、10 分間振とうした。その後、あらかじめ AN10 mL でコンディショニングした Agilent Technologies 製 Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ (1 g) を用いて、振とうによって得られた AN 層と AN2 mL を通液する処理を行った。得られた処理液を無水 Na₂SO₄ によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol (3:1) 混液 2 mL に溶解した。Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 固相抽出カートリッジ (500

mg/500 mg) を AN/Tol (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらに AN/Tol (3:1) 混液 20 mL を注入した。全抽出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 A 0.5 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*₀)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン-*d*₀)、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)。

(2) 分析法 2 (QuEChERS 法、添加回収試験)

玄米試料 1 g に農薬混合溶液 A0.1 mL および内標準溶液 A0.1 mL を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えて 1 分間振とう (手振り) した。これに 4 g の MgSO₄、1 g の NaCl を加え、1 分間振とう (手振り) した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液に固相剤を添加して 1 分間振とう (手振り) した。このとき固相剤として 300 mg の PSA、45 mg の グラファイトカ

ーボンブラック、300 mg の C18、900 mg の MgSO₄ を加えた。再び 3500 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固した。アラクロール溶液 B の 0.2 mL を添加して、GC/MS 測定用の試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を GC/MS によって測定した。測定条件は、分析法 1 と同じである。ただし、夾雑物によってクロマトグラムのピークが妨害されるため、定量に用いた m/z のうち、マラチオンを 285、マラチオン- d_6 を 291 とした。

(3) 分析法 3 (SFE 法、添加回収試験)

玄米試料 1 g に農薬混合溶液 A0.15 mL および内標準溶液 A0.15 mL を加えて静置した。これに約 10 g の 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。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 A 0.2 mL に溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を GC/MS によって測定した。測定条件は、分析法 1 と同じである。

(3) 分析法 4 (一斉試験法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

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

(4) 分析法 5 (QuEChERS 法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.1 mL を加えて静置した。これより後の工程は、分析法 2 と同様に実施した。

(5) 分析法 6 (SFE 法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.15 mL を加えて静置した。これより後の工程は、分析法 2 と同様に実施した。

5.4 評価方法

(1) 農薬濃度の算出

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

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

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

溶液の質量、 M_s ：試料量、 $M_{sp(c)}$ ：検量線溶液中の内標準溶液の質量、である。

(2) 添加回収試験による一斉試験法および QuEChERS 法の評価

式(1)に準じて一斉試験法(分析法1)および QuEChERS 法(分析法2)、SFE 法(分析法3)による分析値を算出した。得られた結果を、玄米試料への添加濃度(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン：0.1 mg/kg, フェニトロチオン：0.2 mg/kg)と比較することにより、一斉試験法の正確さを評価した。なお、マトリックスマッチ検量線溶液 A-1(一斉試験法用)および A-2(QuEChERS 法用)、A-3(SFE 法用)を用いた測定結果により評価を行ったが、比較のために、検量線溶液 A を用いた測定結果も算出した。

(3) 残留農薬検査用玄米試料の分析

式(1)に準じて一斉試験法(分析法4)および QuEChERS 法(分析法5)、SFE 法(分析法6)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。

C. D. 研究結果および考察

1 渡辺研究分担

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

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：

技能試験用試料として残留農薬検査について検討した。残留農薬は水溶性のものは少なく、有機溶媒を用いた作製の検討となった。これまで用いたスプレードライヤはいずれも水溶液用であり、有機溶媒を用いる場合は、窒素ガス密閉循環型

スプレードライヤがその作製には有効の装置である。本装置 CL-8i は予備検討に使用した L-8i の密閉系の装置であり、難水溶性物質の乾燥、造粒が可能であり、窒素循環させていることから酸化防止にもなり、残留農薬検査用試料作製には適した装置であると考えられた。基材としては重金属と同様の自家製玄米粉を用い、4種の農薬を添加し試料作製した。アトマイザーの回転数は20000rpmとし、重金属の条件を参考にして処理量は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。最初に溶媒は100%アセトニトリルを用い、玄米粉と懸濁させたとき農薬は玄米粉中への浸透は少なく、回収率が低くなった。そこで、水を添加することで回収率が改善するか検討した。

最初に、水20%を添加した80%アセトニトリル懸濁液に4種農薬(ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス)を添加し、噴霧温度(入口温度)を120℃、100℃、80℃で検討した結果、水を加えたために、大きな粒子の玄米粉の沈降が少なく、各噴霧温度においても100%アセトニトリルを用いた時と比べて回収率は高くなり改善した。農薬の回収率は噴霧温度が下がるほど高くなった。これは、温度により農薬が分解または気散している可能性が示唆された。ダイアジノンは沸点が120℃で添加農薬の中で一番沸点が低く、回収率も一番低かった。噴霧温度が120℃のとき回収率は8.9%となり、80℃では26%と回収率は改善した。一方、他の3農薬の回収率の挙動は、沸点がいずれも140℃以

上であることからほぼ同じとなった。噴霧温度が 80℃のとき回収率は 35%~40%程になり、最も回収率が良好であった。自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真から、噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなった。

次に、農薬の回収率をさらに高くするために水の比率を高くした。すなわち 40%アセトニトリルとした。これにより玄米粉中への農薬の浸透度が高くなると考えられる。80%アセトニトリルに比べいずれの農薬でも回収率は高くなった。回収率は噴霧温度が 80℃のときクロルピリホスは 60%以上と良好となった。マラチオンおよびフェニトロチオンも 50%以上となった。回収率は各農薬の沸点の高さの順となった。80%アセトニトリルに比べ噴霧温度による回収率の変化は小さかった。これは農薬の玄米粉中への浸透が増したためと考えられた。すなわち、噴霧温度による農薬の分解が少なくなったためと思われる。80%アセトニトリルのときと同様、噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなった。

さらに、40%アセトニトリル懸濁液の場合、さらに回収率は高くなった。これらの結果を踏まえ、さらに水の添加を増やし 20%アセトニトリル懸濁液を用い検討を行った。検討条件はこれまでと同様の条件で行った。すなわち、アトマイザの回転数：20000rpm、処理量 2kg/h、噴霧温度（入口温度）を 120℃、100℃、80℃で検討した。今回はさらに水を加えたために、大きな粒子の玄米粉の沈降が少なかった。また、各噴霧温度においても 40%アセトニトリルを用いた時と比べ

て回収率は高くなり改善した。農薬の回収率は噴霧温度が下がるほど高くなった。これは、温度により農薬が分解または気散している可能性が示唆された。これも前回と同様の傾向が認められた。ダイアジノン沸点が 120℃で添加農薬の中で一番沸点が低く、回収率も一番低かった。噴霧温度が 120℃のとき回収率は 47.5%となり、80℃では 69.8%と回収率は劇的に改善した。一方、他の 3 農薬の回収率の挙動は、沸点がいずれも 140℃以上であることからほぼ同じとなった。これは前回と同様の傾向であった。噴霧温度が 80℃のとき回収率は 70%~75%程になり、これまでで最も回収率が良好であった。以上のように、水の添加量を増やすことで回収率が改善したが、これ以上の水の添加は農薬の水の溶解性を考えると限界であると考えられた。何か溶解を補助するものを添加することでさらに水の添加量を増やすことも可能であるが実験系が複雑になることから本条件が最適であると考えられた。

次に、本条件である 20%アセトニトリル溶液での再現性試験を行った。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。

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：

令和2年度は、ポリスチレンペレットを試料基材として作製検討を行った。ポリマー質量に対して10倍容量のジクロロメタンに、有機溶媒に溶解するカドミウム及び鉛の標準品を添加して均質な溶液を調製し、これにポリマーを添加し、混合して十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをシート作製容器に流し入れ、垂平に保ちながらジクロロメタンを自然乾燥にて揮発させ、シート状の試料を得て、これらのカドミウム及び鉛含量を測定

し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性を確認した。1シートを20分画しそれぞれの分画について n=1 でカドミウム及び鉛を測定した結果、いずれも理論値に対して 94.1~102.7%の回収率が得られた。またこのときの相対標準偏差（n=20）はカドミウム及び鉛のいずれにおいても 5%以下であり、シート内のカドミウム及び鉛の均質性も良好であった。しかしながら、ポリマーの溶解溶媒に用いたジクロロメタンがポリマー質量当たり約 1~3%残存する可能性が明らかとなった。また、ジクロロメタンの残留量は、カドミウム及び鉛の濃度に影響する可能性が示唆され、本作製法においてはジクロロメタン残留量の管理及び除去法の検討が必要であると考えられたため、令和3年度は新たな作製法としてスプレードライヤを用いて粉体の試料作製を試みた。ポリマー質量に対して10倍容量のジクロロメタンに、この標準品を添加して均質な溶液とし、これにポリマーを添加して混合し、十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをスプレードライヤに供し、粉体状の試料を得て、これらのカドミウム及び鉛含量を測定し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性ならびに残留溶媒について検討した。シート状試料と同ポリマー含量（10 w/v%）では、スプレードライヤによる試料は糸状となり、均質な粉体試料が得られなかった。そこで、均質な粉体試料を得るためにポリマー含量やスプレードライヤに供する際のポリマー溶液の希釈溶媒についても検討した。その結果、新たに希釈溶媒として酢酸ブチルを用いて調製したポリマー含量 1 w/v%及び 5 w/v%溶

液から得られた試料は、5 w/v%では一部糸状試料が観察されたが、1 w/v%では均質な球状粒子の試料が得られた。しかし、球状粒子は非常に微細で帯電しやすく、試験操作上の観点から不適切であると考えられた。残留溶媒については、シート状試料ではジクロロメタンが部位により約 1~3% 残留する可能性が示唆されたが、スプレードライヤを用いて作製した結果、いずれの部位も定量下限未満の良好な結果が得られた。しかしながら酢酸ブチルは約 2% 残留しており、スプレードライヤにおける入口温度 100°C が溶媒沸点 126°C よりも低いことが原因の 1 つとして考えられた。カドミウム及び鉛含量において、いずれの作製条件で得られた試料もカドミウム及び鉛の理論作製濃度に対していずれの部位でも回収率 85~105% と均質で良好な結果が得られた。スプレードライヤに供するポリマー溶液のポリマー含量や溶液の種類、またスプレードライヤ装置の設定条件を変えることで外観上は均質な粉体試料が得られたが、調査試料としての適用はできないため、これらを用いた加工等更なる検討が必要であると考えられ、前年度の研究報告で良好な溶解性が確認できた他の基材についても同様の検討を行うこととし、令和 4 年度は、試料基材に 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、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、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。

1.3 アレルギー物質技能試験プログラムに関わる検討：

当該3か年で、毎年24～36機関がパイロットスタディに参加した。

キットごと及び試料ごとの解析結果においていずれの年度でもzスコアの絶対値が3以上となる機関が数機関認められた。また、回収率を指標とした \bar{X} 管理図では、最終年度で外れ機関が認められた。R管理図では、1回の解析で2機関が管理限界線を越えていたが、そのほかの解析においては、3年を通して、管理限界線を越えた機関は各解析結果ごとに0～1機関であり、すべての解析において安定した結果が得られた。したがって、初年度、次年度で調製した乳添加試料、および、最終年度に調製した複数の特定原材料添加試料は、外部精度管理調査試料として適切であると考えられた。

乳検出系においては、カゼインまたは複合抗原を標的としたELISAキットにおける測定値は、 β -ラクトグロブリン(β LG)

を標的とした2キットと明らかに差が認められ、 β LGを標的としたキットは、他の2キットと比較して明らかな低値を示した。任意のキットの使用を認めた初年度、次年度では β LG検出用キットを用いた機関はほとんどなかった。また、実務では通知法準拠のELIISAキット3種中2種のキットを使用することとなっており、 β LG検出用の通知法に準拠したキットは1種類のため、実際の検査業務においては、キットによる偽陰性となることはほとんどないと考えられる。基材によっては、キット間差が認められる場合もあったが、これも「2キット使用する」という通知法に従えば、食物アレルギーの検出には大きな影響はないと考えられる。

このように、パイロットスタディの結果から、参加機関では実際の検査業務においても実際の試料について適切な評価が行われているだろうことが推察された。最終年度には、卵または乳を含有した市販加工食品を用いて、実際の検査試料に近いincurred sampleの調製を行った。それぞれの試料は、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、より実際の業務に則した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（弁当）の性能評価

冷蔵試料の生菌数測定を添加菌の添加直後、保存開始から10、14、28、84日後の5回実施した。また常温試料の生菌数測定を保存開始から14、28日後の2回実施

した。いずれも1個の調査試料を使用し、秤量回数2回とした。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（弁当）の品質評価

パイロットスタディ用の調査試料を冷蔵保存し、その中から均質性確認試験および安定性確認用に無作為に各10個の調査試料を抽出した。均質性確認試験は2名の検査員が各1回ずつ生菌数測定を行い、実数の平均値、標準偏差、変動係数および一元配置分散分析を行った。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。

調査試料（弁当）のパイロットスタディ

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。実数解析の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。対数解析の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。

調査試料（冷凍食品）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。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 $\pm 0.5 \log \text{cfu/g}$ 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 $-0.06 \log \text{cfu/g}$ 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日後のいずれも冷凍試料とほぼ同等の生菌数を維持していた。

調査試料（冷凍食品）の品質評価

パイロットスタディ用の調査試料を冷凍保存し、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配置分散分析を行った。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0.06 log 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。

調査試料（冷凍食品）のパイロットスタディ

パイロットスタディ（冷凍食品）では、対象とした全 50 機関から結果を回収した。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。実数解析の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。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。対数解析の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。

微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討：

E. coli検査用調査試料

生菌数の挙動では、*Escherichia coli*（陽性）、*Acinetobacter calcoaceticus*（陰性）ともに冷蔵試料では添加直後から15日後以降の長期間において対数値1.0ポイント以内の減少傾向を示したことから、非常に安定な調査試料であることが示された。また常温試料では陽性、陰性試料ともに添加15日後の生菌数測定が可能であったことから、輸送時の温度上昇が起きても急激な菌数低下を認めない試料であることが示さ

れた。定性試験では、冷蔵試料、常温試料ともに添加直後、添加29日後のどちらにおいても正しく判定が可能であったことから、定性試験への影響は無いと判断した。

腸内細菌菌群検査用調査試料

生菌数の挙動では、*Escherichia coli* (陽性)、*Pseudomonas aeruginosa* (陰性)ともに冷蔵試料では添加直後から15日後以降の長期間において対数値1.0ポイント以内の減少傾向を示したことから、非常に安定な調査試料であることが示された。また常温試料では陽性、陰性試料ともに添加15日後の生菌数測定が可能であったことから、輸送時の温度上昇が起きても急激な菌数低下を認めない試料であることが示された。定性試験では、冷蔵試料、常温試料ともに添加直後、添加29日後のどちらにおいても正しく判定が可能であったことから、定性試験への影響は無いと判断した。

サルモネラ属菌検査用調査試料

生菌数の挙動では、*Salmonella sp.* (陽性)、*Proteus mirabilis* (陰性)ともに冷蔵試料では添加直後から15日後までの期間で対数値1.0ポイント以内の増減傾向を示したことから、非常に安定な調査試料であることが示された。また常温試料では陽性、陰性試料ともに添加15日後の生菌数測定が可能であったことから、輸送時の温度上昇が起きても急激な菌数低下を認めない試料であることが示された。定性試験では、冷蔵試料、常温試料ともに添加直後、添加29日後のどちらにおいても正しく判定が可能であ

ったことから、定性試験への影響は無いと判断した。

大腸菌群検査用調査試料

生菌数の挙動では、調査試料の作製から各菌3回繰り返し、その平均値で評価した。*Aeromonas hydrophila*を除く5菌種の冷蔵試料では添加直後から14日後以降の長期間において対数値1.0ポイント以内の増減傾向を示したことから、非常に安定な調査試料であることが示された。また常温試料では添加14日後の生菌数測定が可能であったことから、輸送時の温度上昇が起きても急激な菌数低下を認めない試料であることが示された。定性試験では、*A. hydrophila*を除く5菌種では冷蔵試料、常温試料ともに添加直後、添加28日後のどちらにおいても正しく判定が可能であったことから、定性試験への影響は無いと判断した。

なお *A. hydrophila* は添加菌数が不足していたことから、添加直後のみ試験を実施し、本検討から除外した。

2 石井研究分担

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

微生物定性試験法における検出下限値の推定

(1) 手技によるばらつきの評価

PBを試料として *E. coli* 定性試験をBPWを試料として黄色ブドウ球菌定性試験を実施した。試料中の菌量が少ないほど陽性試料数は減少する傾向を示した。一部で菌量と陽性試料数が逆転しているものが認めら

れたが、黄色ブドウ球菌定性試験法の方がより大きなばらつきがあった。陽性試料数から算出された LOD₅₀ および F 値は E. coli 定性試験法で 19-31 CFU/mL、0.75-1.2、黄色ブドウ球菌定性試験法で 29-49 CFU/mL、0.70-1.2 であった。

両試験法ともにサルモネラ属菌試験法のように採取した試料をそのまま増菌培養するのではなく、希釈操作が含まれることから、操作過程における手技によるばらつき、吸着などによる対象菌の損失の可能性を想定していた。F 値が 1 であるときに理想的なポアソン分布となることから、算出された F 値から判断すると、手技によるばらつきは微生物検査としては許容範囲であると考えられた。

(2) 食品試料ごとの LOD₅₀ の推定

E. coli 定性試験法における各食品試料の細菌接種試験を実施し、LOD₅₀ を算出した。各食品試料の LOD₅₀ は 14-27 CFU/g、F 値は 0.86-1.7 であった。

E. coli 定性試験法において PB を試料として用いたときの F 値との比較により、食品試料の影響による検出感度の低下は認められなかった。一方でピラフおよび白菜の塩漬けが 2 回の試験とも手技によるばらつきで得られた F 値の最大値の 1.2 以上であった。希釈液中の試料の状態が、ピラフで検出感度が PB を試料とした場合より大きくなった原因の一つとして推察された。諸藤ら（第 31 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集）は、生菌数試験において粉末試料の拡張不確かさ（標準偏差(log)×2(包含係数))は、液体試料のほぼ 2 倍であると報告した。ストマッキング後のピラフの希釈液は細かくなった試料により白濁しており、

粉末試料に近い状態になったことが検出感度に影響したのではないかと考えられた。同様に希釈液が白濁した生うどんは 1 回目の試験では F 値が 1.4 であったのに対し、2 回目の試験で F 値が 0.84 であった。2 回目の試験では試料中の菌量が少ない d₂の方が d₁の陽性試料数を上回っていた。希釈液中に濁りが多い検体ほど食品マトリクスによる効果でばらつきが生じ、検出感度に影響を与える可能性が示唆された。

白菜の塩漬けの F 値が PB を試料とした場合より大きくなった理由は不明であった。白菜の塩漬けは pH による影響を検討するため試験に供した。製品の漬け汁の pH は 5.3 であったのに対し、10 倍希釈液中の pH は 7.3 で、PB の pH とほぼ同じであった。そのため、EC 発酵管での培養に pH の影響はなかったと考えられた。

夾雑菌の存在、油分は E. coli 定性試験法における検出感度には影響を与えないと推察された。オクラ、ホウレン草は夾雑菌の存在（事前に生菌数を測定した結果はそれぞれ 1.2×10^4 、 3.2×10^4 CFU/g）、からあげは油分が検出感度に与える影響を考慮するために検討した。試験の結果から推定されたオクラ、ホウレン草、からあげの LOD₅₀ はそれぞれ 27、17、23 CFU/g であり、手技によるばらつきと比較して大きな差は認められなかった。

黄色ブドウ球菌定性試験法における各食品試料の細菌接種試験の結果から算出された LOD₅₀ を求めた。各食品試料の LOD₅₀ は 25-48 CFU/g、F 値は 0.72-1.4 であった。

黄色ブドウ球菌定性試験法においても食品試料の影響による検出感度の低下は認められなかった。黄色ブドウ球菌定性試験法

で用いた食品試料は調製した希釈液が濁っているものが多く、塗抹後の培地表面には食品試料の残渣が付着していた。油分やカレー中の香辛料、エッグタルトに含まれていたチョコレートの成分などが細菌の発育を抑制することが想像されたが、検出感度には影響がなかった。一方で、同一試料であっても1回目と2回目の試験に差がある試料が多かった。特にエッグタルトや生うどんの LOD₅₀ は1回目と2回目で2倍近い差があった。また、チャーハンの2回目の試験では d_1 から d_4 の陽性試料数はそれぞれ 4、6、0、2 であり d_1 と d_2 、 d_3 と d_4 が逆転していた。E. coli 定性試験法で考察したように希釈液中の濁りが検出感度に影響を与えたとも考えられるが、黄色ブドウ球菌試験法では試験法にも一因があると推察された。

手技によるばらつきを検討においても、接種菌量に対する陽性試料数の逆転は両試験法において認められたものの、黄色ブドウ球菌定性試験法の方がその度合いが目立っていた。黄色ブドウ球菌定性試験法では、試料の比重を 1 とした場合、選択分離寒天培地 2 枚への接種量である 0.2 mL は 10 倍希釈液 250 mL のわずかに 0.08% でしかない。そのため、本研究のように試料中の菌量が微量である場合、希釈液中の細菌の均一性、ピペット操作の精度の影響により試験結果にばらつきが生じてしまうのはやむを得ないと考えられた。

(3) 試験室間での eLOD₅₀ の比較

(2) で推定された LOD₅₀ が最大、最小であった食品試料を対象として試験室間での比較を行った。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。各試験室

において得られた eLOD₅₀ 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 LOD₅₀ 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 eLOD₅₀ ではオクラと同程度であった。LOD₅₀ 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。各試験室において得られた eLOD₅₀ 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。

食品添加物試験法の妥当性に関する研究

1. 評価対象とする食品添加物及び食品の種類の設定

(1) 対象食品添加物の選定

指定外添加物で最も違反件数の多かったのは酸化防止剤の TBHQ で、次に違反件数の多かったものは、甘味料のサイクラミン酸であった。

指定添加物の使用基準違反は保存料のソルビン酸(カリウム)、次に多かったものは漂白剤・保存料・酸化防止剤の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類であった。

以上の結果から、評価対象とする食品添

加物は指定外添加物の TBHQ 及びサイクラミン酸、指定添加物のソルビン酸、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類とした。

(2) 対象食品種の選定

1) TBHQ

TBHQ は指定外添加物であるが、海外ではさまざまな食品に使用が許可されていることや既報^{2,3)} から回収率の良好でない食品種を検討した結果、対象食品はごま油、ピーナツバター、煮干し、クッキー、ポテトチップス、イカ燻製、チリソースの 7 食品とした。

2) サイクラミン酸

サイクラミン酸についても指定外添加物で、海外では多種類の食品に使用されており、既報³⁻⁶⁾ で良好な回収率が得られないとされている。

以上のことから対象食品としてたくあん漬、らっきょう漬、ジャム、ビスケット、ぶどうジュース、米酢、みかんシロップ漬、チョコレートの 8 食品とした。

3) ソルビン酸(カリウム)

ソルビン酸は指定添加物であり使用基準が定められていることから、基準のある食品のうち、消費量の多い食品や、回収率が低いと報告されている⁷⁻⁹⁾ 食品種であるチーズ、ちくわ、さつま揚げ、ウインナー、マーガリン、らっきょう漬、ワイン、オレンジジュース、イカ燻製、ビスケットの 10 食品を対象食品とした。

4) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は指定添加物であり、使用基準が定められている食品のうち、消費量の多い食品等を考慮し、かんぴょう、干しトマト、干しマンゴー、干しブドウ、ワイン、甘納豆及び冷凍えびの 7

食品を対象食品とした。

2. 評価基準

真度及び精度を作成した性能基準に従って、評価を行った。

3. 添加回収試験

(1) TBHQ 試験法

真度は 82.8~139.7%であった。煮干しで 82.8%と最も低い真度であったが、操作中の TBHQ の損失に留意する必要があることが考えられた。ごま油やピーナッツバター試料では妨害ピークが観測され、追加精製等について検討する必要があると考えられた。

(2) サイクラミン酸試験法

1) サイクラミン酸試験法(固相カートリッジによる精製あり)

ビスケット試料では餅状になってしまい、抽出が困難であった。米酢試料はまったく回収されなかった。理由として、米酢の pH は約 3 であったことから、酸性条件下でサイクラミン酸が陰イオン交換カートリッジに保持されなかったことやあるいは ODS カラムに強固に結合し、溶出されなかったことが要因と考えられた。また、らっきょう漬は併行精度が 13.2%、室内精度は 29.4%とバラツキが大きかった。らっきょう漬の pH も約 4 程度であり、米酢と同様の理由によって固相カートリッジへの保持が不安定であったことが考えられた。

また、チョコレート試料では塩素化誘導体化時にエマルジョンが発生し、バラツキの大きい結果であった。たくあん漬け試料では真度が 79.2%と低い結果であったことから抽出時に十分に回収されていないも

のと考えられた。

2) サイクラミン酸試験法 (スクリーニング試験法)

規定分析法では、「スクリーニング試験として、カートリッジによる精製を行わず誘導体化、HPLC 分析を実施し、検出しない場合はこれを分析結果とすることができる。」としている。固相カートリッジ精製で十分に保持が不安定であった米酢、らっきょう漬け試料でそれぞれ真度が 108.5%、90.8%と改善された。

(3) ソルビン酸試験法

本検討では真度は 93.2~97.8%、併行精度は 0.5~3.9%、室内精度は 0.5~5.9%と良好な結果であった。

(4) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法

1) アルカリ滴定法

本検討では真度は 90.4~97.8%、併行精度は 1.2~4.1%、室内精度は 2.2~7.3%といずれも良好な結果であった。

2) 比色法

本試験のみ 1 日一人、 $n=5$ 回の添加回収試験を実施し、併行精度のみを検討した。比色法は、「約 0.1g/kg 以下の食品に用いる。」ため、試験溶液中濃度として 1 mg/L、試料中濃度としては 0.01 g/kg となるように添加回収試験を実施した。検討した試料の中で、冷凍エビが約 141%、ワインが約 184%と高い真度であった。ワインについては、亜硫酸不使用の表示のある他の製品や同一ワインの別ロットについても検討したが、同様に真度が高値を示した (data not shown)。干しマンゴーでは真度が約 113%、併行精度が約 17%と高値であった。以上の結果から試験溶液の希釈操作の追加や高値の真度、精度の試等につい

て今後、検討が必要であると考えられた。

5. 室間共同試験

(1) ソルビン酸試験法

ソルビン酸ではビスケット（添加濃度：0.01g/kg）の通知試験法で示された検量線濃度範囲で求めた平均回収率は88.5%であったが、それ以外は93.9~98.2%と良好な結果であった。併行相対標準偏差

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

(2) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法

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

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

6. サイクラミン酸規定分析法改良の検討

(1) ビスケット

ビスケットは規定分析法どおり前処理すると餅状になるため、改良法を検討した。加水量を規定分析法の2倍量程度（80mL）に増やし、混和及び攪拌することで餅状物質の生成が防止され、良好な回収率が得られた。また、1分間ホモジナイズ抽出することにより、固相抽出法及びスクリーニング法はそれぞれ94.3%及び94.5%と回収率の向上が認められた。

(2) チョコレート

遠心分離した上澄液を2倍、5倍希釈したところ平均回収率は、それぞれ91.2%、84.3%であり、エマルジョンは生じなかった。チョコレートの分析においては、エマルジョンの発生を防止することで回収率の改善が認められたことから、上澄液を適宜希釈したうえで固相抽出法を用いることで回収率の向上につながるものと考えられた。

(3) 米酢

固相抽出法では、tC18カートリッジに6割程度のサイクラミン酸がtC18カートリッジに吸着し、溶出されずに残存していたため、上澄液のpHを水酸化ナトリウム水溶液を用いて4、5、6、7及び8に調整し、tC18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ところ、平均回収率は順に72.9%、92.1%、89.0%、85.0%、89.2%となり、pHを5以上に調整することで回収率が改善された。

以上より、米酢の分析では、上澄液のpHを5~7に調整することが回収率の向上につながるものと考えられた。

(4) らっきょう漬

米酢と同様に上澄み液のpH調整5、6及

び7に調整し、サイクラミン酸の添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、順に86.8%、98.4%、98.1%であった。

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

(5) たくあん漬け

たくあん漬けにいても米酢同様に、上澄液のpH調整により回収率が改善されるか検討した。上澄液のpHを測定したところ5程度であったため、pHを6及び7に調整したが、平均回収率は、それぞれ85.6%と75.3%となり、回収率に大きな変動は認められなかった。そこで、ホモジナイズ抽出し、それから上澄液を調整したところ、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%と向上した。

7. サイクラミン酸新規分析法の開発

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（以下「BC」という。）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各段階における最適条件を検討した。

(1) 抽出・精製の検討

抽出・精製工程は、規定分析法を参考に検討した。昨年度まで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。

(2) サイクラミン酸からCAへの分解の検討

サイクラミン酸からCAへの分解条件については児島ら¹⁰⁾や一番ヶ瀬ら¹¹⁾がHCl酸性下でH₂O₂水と加水分解する方法について報告しており、児島らは、サイクラミン酸ナトリウム液(1000~10000 µg/mL) 2 mLに対し、HCl(1 mol/L) 0.5 mLとH₂O₂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H₂O₂水によって酸化をうけたと考察している。

以上の報告からHClの濃度と加熱時間の検討を行った。サイクラミン酸標準溶液(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、サイクラミン酸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。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。

(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-NH₂)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。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¹²⁾。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。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、アセトニトリル・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。しかし、定量下限値が規定分析法よりも5倍高くなったため、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

アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究

3.1 改良抽出法の適用範囲の確認

測定における評価の結果、小麦の測定では特定のタンパク質を対象としているキットでPACによる影響を受けやすい傾向が確認された。一方で、落花生の測定では複数のタンパク質を対象とするキットでPACによる影響を受けやすい傾向が確認された。抽出における影響を添加回収試験で評価した結果、十分な回収率が得られない試料が確認された。このため、PACに結合能を示すPolyvinylpyrrolidone (PVP)とGelatinを利用して抽出法の改良について検討した。カカオに標準溶液を添加して、重合度の異なるPVPを共存させて抽出を行ったところ、重合度の低いPVP K15を1%添加することによって、最も高い回収率が確認された。一方で、シナモンについてはPVPの添

加では十分な回収が確認されなかったが、Cold water fish skin 由来の Gelatin を 10 % 添加した場合には両キットで回収率の改善が確認された。

3.2 特定原材料の測定における不確かさの評価

検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における不確かさについて推定を行った。評価の結果、両キットの測定間と抽出間の精度は全ての項目で 10 % 以下となり、良好な結果を示した。一方で、室内再現精度については使用する試料とキットによって差異が確認された。

評価の結果、特定原材料の測定項目とキットの種類によって、日間変動が大きくなる場合が確認された。一方で、併行して抽出した管理試料や標準物質によって回収率を補正した場合には日間変動は軽減された。

3.3 試験室間試験用試料の調製と安定性の評価

改良抽出法の試験室間における評価のために試料を調製して安定性について評価したところ、試料は冷蔵保存で 84 日まで安定であった。調製した試料を 2 試験室の各 2 試験者で評価を行ったところ、測定者間に有意な変動が確認され、試験室間の変動は有意ではなかった。測定者間の変動は、測定日ごとの抽出条件の変化に起因する可能性もあるため、試験室間共同試験の際には抽出条件と測定条件を統一して実施する必要があると考えられた。調製した試料は測定阻害と改良抽出法の評価に適用できることが確認された。

3.4 試験室間共同試験

3.4.1 室間共同試験用試料の安定性評価

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。

3.4.2 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。

3.3.3 室間共同試験用試料の評価

試験室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

下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究

4.1 精確な分析法に関する検討

4.1.1 マトリックス効果の評価

(1) ホタテガイ可食部を用いた評価

M 試料、E 試料、C 試料の LC-MS/MS 測定を行ったところ、OA については、E 液および C 液の測定感度は M 液の測定感度よりも高かった。一方、DTX1 については統計的な有意差は認められなかったが、測定の再現精度は 10 %以上(相対値)あったため、より精度の高い分析法の開発が必要と考えられた。

(2) ホタテガイ中腸腺を用いた評価

各溶液の LC-MS/MS 測定の結果から、液中の OA および DTX1 とピーク面積との関係線を得た。その結果、中腸腺マトリックスによって LC-MS/MS の感度(すなわちイオン化の効率)が高くなるエンハンスメントが確認された。また、固相抽出処理をした場合、および、希釈倍率が高いほど、マトリックス効果の影響は小さくなった。これより、中腸腺試料中の OA と DTX1 をより正確に測定するためには、マトリックス効果の影響を除外する分析法の開発が必要であると考えられた。

以上の結果から、マトリックス効果の影響をより抑制可能と(2)と(3)の検討を多うことにした。

4.1.2 液体クロマトグラフィー-蛍光検出法(HPLC-FD)の検討

OA と DTX1 は特定の蛍光発色団を持たないため、ADAM を用いて蛍光誘導体化した。反応に供する ADAM 量や反応時間を検討し、最適な反応条件を確立した。

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

誘導体化物の保持容量を検討し、約 10 分間のトラップが可能であることを明らかにした。これらの検討結果を基にカラムスイッチング HPLC-FD 装置を試作し、OA 群の分離条件を検討した。その結果、第 1 カラムの 4~6 分をハートカットして第 2 カラムに導入し、その後切換えバルブを操作し、この分画を第 3 カラムに導入し、OA 蛍光誘導体化物を約 13 分に、DTX-1 蛍光誘導体化物を約 16 分に溶出させる測定条件を確立した。通常の HPLC-FD では、ADAM 由来成分と分析対象成分との分離が困難であるが、本法ではこれらを良好に分離することができた。

4.1.3 固相抽出条件の検討

(1) 固相抽出条件の比較

Fr. A、Fr. B、Fr. C、Fr. DをLC-MS/MSで測定した。A法によるFr. Aは、例示法に準拠した方法であるにも関わらずOA群の回収率は低く、その前の操作中に溶出したことが確認された。一方、B法とD法では、OA群はFr. BとFr. Dのみに溶出したことが確認された。

そこで、Fr. B と Fr. D について、LC-MS/MS におけるマトリックス効果の影響を評価した。その結果、Fr. D の OA 群の感度のみが標準液測定における感度と同等であり、顕著なマトリックス効果は認められなかった。

(2) 精確さの評価

そこで、D 法における添加回収試験を行った。添加濃度は、ホタテガイ試料中濃度として各 0.05 mg/kg とした。その結果、OA 群の回収率はほぼ 100 %であり、下痢性貝毒検査法における正確さの要求基準である 70~120 %に十分適合していることが示された。さらに、同法の室内精度を評価したところ 5.8~8.3 %であり、下痢性貝

毒検査法における精度の要求基準(20%以下)を十分満たしていた。

D法で前処理を行いLC-MS/MSで測定する方法によって、ホタテガイ可食部の認証標準物質(NMIJ CRM7521-a)を分析した。その結果、認証項目であるOAとDTX1の両方において、得られた分析値は認証値とその不確かさの範囲であり、実試料の分析においても本法の精確さが確認された。

4.1.2で検討したHPLC-FD法と、4.1.3で検討したHLBによる固相抽出とLC-MS/MSを組み合わせた方法の性能を比較したところ、特に感度において後者のほうが優れていた。そのため、以降の分析法の検討並びにパイロットスタディには、後者の分析法を適用することにした。

4.1.3 ホタテガイ以外への適用

HLBによる固相抽出とLC-MS/MSを組み合わせた方法がアサリ、カキ、ムラサキイガイ分析へ応用できるかを検討した。固相抽出後の試料溶液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。以上より、本法がホタテガイ以外の二枚貝試料の分析にも適用可能であることが示された。

4.2 パイロットスタディ

4.2.1 検査試料の調製の結果

ホタテガイ100匹分の可食部をブレンダーで細断し、試料約2.3kgを得た。この試料を裏ごしし、可食部に含まれる繊維質分を除去し、約1.8kgを回収した。この試料をポリ製広口瓶に入れて約1時間30分回転混合した。

ホタテガイ認証標準物質とホタテガイ可食部は、2段階に分けて混合した。はじめに、ホタテガイ中腸腺試料10gを精秤し、その9倍量のホタテガイ可食部を加えて混合した。次に、得られた9つの混合物をさらに混合し、混合物約770gを得た。この試料を回転混合させた後に5等分にし、各内容物をポリ製遠沈管5gずつ小分けした。

以上によって、検査試料123本を調製した。

4.2.2 検査試料の均質性

調製した検査試料から10本を無作為に選りだし、各瓶から異なる2か所を採取して分析した。得られた結果を一元配置分散分析によって評価したところ、瓶間のばらつきは有意ではない($p>0.05$)ことが確認された。ISO Guide35に準拠して算出した均質性に関する不確かさは、OAが5.6%、DTX1が5.9%であった。

4.2.3 検査試料の安定性

分析期間前後の分析結果に統計的に有意な差は見られなかった。安定性に関する不

確かさは、OA が 3.1 %、DTX1 が 8.4 %と算出された。

4.2.4 パイロットスタディの結果

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。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が23 %、DTX1が27 %であった。Horwitzの修正式を用いて算出したHorRat値はOAが105 %、DTX1が121 %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。

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。 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。

4.2.5 付与値の妥当性

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、本事業で確立した精確な分析方法によって、茨城大学において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）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、茨城大学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

要である。

5 大竹研究分担

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

5.1 分析方法の評価

添加回収試験において、分析法 1 の一斉試験法で得られた定量値と調製値の比を比較した結果、クロルピリホスが 101 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 97 %、マラチオンが 101 %となり、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、80~101 %と良好であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液を用いた場合の算出結果は、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 98 %、フェニトロチオンが 89 %、マラチオンが 98 %であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。よって、マトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であると考えられた。

分析法 2 の QuEChERS 法で得られた定量値と調製値の比は、クロルピリホスが 99 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 99 %、マラチオンが 101 %となり、QuEChERS 法によっても調製値通りの分析値が得られることが示された。さらに、各農薬の標識体の回収率も、71~77 %と良好であった。これより、本研究で対象とした玄米中の農薬に対して、簡易分析法にもかかわらず、QuEChERS 法によって十分に対象農薬が抽出され、正確な分析値が得られることが示された。なお一斉試験法と同様

に、マトリックスマッチングしていない検量線を用いた場合の比も算出した。簡易法である QuEChERS 法は一斉試験法よりも精製効果が低く、IDMS においてもマトリックス効果の影響をより強く受ける可能性があるため、本検討はより重要であった。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 98 %、フェニトロチオンが 87 %、マラチオンが 103 %であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。結果的には一斉試験法と大きな差は見られず、QuEChERS 法においてもマトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であるという結果が得られた。

分析法 3 の SFE 法で得られた定量値と調製値の比は、クロルピリホスが 100 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 99 %、マラチオンが 99 %となり、SFE 法によっても調製値通りの分析値が得られることが示された。さらに、各農薬の標識体の回収率も、72~83 %と良好であった。これより、本研究で対象とした玄米中の農薬に対して、SFE 法によって十分に対象農薬が抽出され、正確な分析値が得られることが示された。なお上記の分析法 1, 2 と同様に、マトリックスマッチングしていない検量線を用いた場合の比も算出した。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 99 %、フェニトロチオンが 96 %、マラチオンが 96 %であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてクロルピリホスとフェニトロチオンの測定結果に若干の偏りが生じることが確認された。結果的には一斉試験法と大きな

差は見られず、SFE 法においてもマトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であるという結果が得られた。

5.2 残留農薬検査用玄米試料の分析

(1) 2020 年度の結果

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 QuEChERS 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 QuEChERS 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 20~60 %程度と予想されるということであった(農薬の種類によって回収率は異なる)。本研究で得られた結果を用いて、調製時の回収率を計算した結果、30.1 %~63.3 %となった。これより、一斉試験法および QuEChERS 法の分析結果が、添加濃度と調製時の回収率から予測される濃度の範囲とよく一致していたことが示された。

(2) 2021 年度の結果

2020 年度と同様に、食品薬品安全センター秦野研究所より、残留農薬検査用玄米試料 (Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C) : 温度は噴霧温度を示す) が提供され、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、2020 度と同様に、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、2021 年度は調製時の回収率は 45～75 %程度と予想されるということであった（農薬の種類によって回収率は異なる）。本研究で得られた結果を用いて、調製時の回収率を計算した結果、46.5 %～71.6 %となった。これより、一斉試験法および SFE 法の分析結果が、添加濃度と調製時の回収率から予測される濃度の範囲とよく一致していたことが示された。以上より、玄米中の対象農薬について、本研究で検討した方法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。

(3) 2022 年度の結果

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、2021 年度の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、2021 度と同様に、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 2021 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

1 渡辺研究分担

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

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：

技能試験用試料としてスプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料を開発した。これまで、玄米粉を基材として重金属検査用試料がスプレードライヤを用い作製できることを示してきた。農薬は有機溶媒に溶けやすいことから、アセトニトリルを用い、玄

米粉に4種の農薬を添加して検討した。有機溶媒を用いることから、スプレードライヤは密閉系の装置であるCL-8iを用いて検討した。アセトニトリルが100%の場合は、農薬の回収率は著しく低かった。これは、アセトニトリルが玄米粉に浸透しづらいことが原因と分かった。そこで、水の添加割合を増やすことで、農薬が玄米粉中に浸透しやすくなり、回収率も高くすることができた。一方で、農薬は揮散しやすいので、入り口温度を極力低く設定し、120°Cから80°Cで検討した。その結果、80°Cの場合が最も回収率が高かった。しかし、これ以上温度を下げると、水分含量が高くなり、保存性が悪くなる可能性も考えられた。これらの結果より、20%アセトニトリルを用いたとき、噴霧温度は80°Cに設定したとき最も回収率が高かったため、これを最適条件に設定した。今後は、農薬の種類や使用する有機溶媒の種類により、条件の検討が必要であると思われる。

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：

「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、食品衛生法において一般あるいは個別規格となるプラスチックの材質ポリマーについて、調査試料作製検討を行った。ポリスチレンペレットを試料基材として作製検討を行った結果、シート状試料では試験対象物質が均質となる試料を作製できたが、作製工程で用いるジクロロメタンの残留が認められた。新たな作製方法として、スプレードライヤを用いる方法を試みたところ、均質な球状粒子の試料が得られた。しかしながら、これらは非常に微細で帯電しやすく、また、

作製工程で使用した酢酸ブチルの残留の可能性もあることから、調査試料への適用はできないと考えられた。新たな基材としてABS及びASペレットを用いてシート状試料の作製を検討した。ABSについては溶解溶媒にジクロロメタンを用い、残留溶媒量の目標基準の0.2w/w%以下を満たす試料の作製が期待できると考えられた。作製容器の検討では、溶解溶媒残存率においてガラス製、テフロン製及びステンレス製の3種の材質による作製容器間で差は認められなかったが、シート状試料の作製容器からの剥離性の観点から、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。今後は、均質性及び安定性の確認、ならびにGCによる残留溶媒測定を行い、パイロットスタディの実施へ繋がることを期待できる。

1.3 アレルギー物質技能試験プログラムに関わる検討：

当該3か年で毎年行ったパイロットスタディでは特定原材料、牛乳について計5種の基材において均質性及び安定性が良好であったことから、その品質が保証され、かつ、多検査施設において安定した結果が得られることが示された。したがって、これらの試料については、実際の外部精度管理調査において使用可能であるとの結論に至った。

また、複数の特定原材料に汚染された食品を想定した、2種の特定原材料を含有した試料についても、品質に問題がないこと、また、多施設でのパイロットスタディにおいても、良好な結果が得られ、今後の外部精度管理調査での供試が考えられた。

市販加工食品から調製した incurred samples は2施設間における再現性および

品質評価試験が良好であったことから、実際の検査業務試料を想定するものとしてパイロットスタディへの適用を考えている。

特定原材料の外部精度管理調査はそのまま、国民の健康被害防止につながる。このため、品質の安定した試料を安定に供給することは重要であるが、加工食品を基材とした調製では、メーカーによる加工食品の予期せぬ変更や、販売中止等の事態が起こるため、多数の試験試料を確保することは、非常に重要な課題である。本研究においては、必要とされている試料の確保の一端を担うことができたと考える。

今後は他の特定原材料についても試料の確保を行う必要があるだろう。

1.4 一般細菌数測定検査用調査試料の開発：

調査試料（弁当）

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。ただし、「弁当及びそうざいの衛生規範について」（第3次改正〔平成7年10月12日衛食第188号・衛乳第211号・衛化第119号〕）が2021年6月に廃止されたため、技能試験に供する際には「弁当」とは異なる見立てとする必要がある。

調査試料（冷凍食品）

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「弁当及びそうざいの衛生規範について」（第3次改正〔平成7年10月12日衛食第188号・衛乳第211号・

衛化第119号〕）に基づく「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。

微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討：

技能試験に用いる調査試料に求める要件として、①公定法の試験操作で陽性・陰性の判定が可能であること、②実際の食品検査に近いマトリクスの基材で冷蔵保存可能であること、③冷蔵下で微生物の添加から14日以上安定の安定性が認められること（添加直後と添加14日後の差が対数値で±1.0ポイント以内）、④冷蔵から22.5℃（常温）に移管後も生菌数が測定可能であること、の4条件を挙げた。

本研究において、E. coli 検査、腸内細菌科菌群検査及びサルモネラ属菌検査の調査試料では陽性、陰性菌ともに前述の4条件をクリアし、従来の添加菌濃度から低減した調査試料を技能試験に用いることの妥当性が示された。

添加菌濃度の低減と微生物の再検討を併行して実施した大腸菌群検査の調査試料では、*Aeromonas hydrophila*を除く5菌種において前述の4条件をクリアし、従来の添加菌濃度から低減した調査試料を技能試験に用いることの妥当性が示された。

なお、本検討で技能試験に用いることの妥当性が示されたため、2021年度から当財団の食品衛生外部精度管理事業での運用を開始し、特に問題は生じていない。

2 石井研究分担

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

微生物定性試験法における検出下限値の推定

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、これを目的とし検討を行った。本研究の結果から推定された食品試料ごとの 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。E. coli 定性試験法の培地への試料接種量は 0.03 g、黄色ブドウ球菌定性試験法は 0.02 g である。食品試料ごとの LOD₅₀ をそれぞれの試料接種量中の菌量に換算すると E. coli 定性試験法で 0.42-0.81 CFU、黄色ブドウ球菌定性試験法で 0.50-0.96 CFU であった。すなわち、1 個以上の細菌が培地中に接種されれば検出されたと考えられ、両試験法とも今回検討した食品試料については試料成分による検出感度への大きな影響を受けなかったと推察された。

また、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。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。

食品添加物試験法の妥当性に関する研究

TBHQ 試験法では規定分析法が適用可能な

食品はクッキー、ポテトチップ、いかくん及びチリソースで、適用不可能と考えられる食品はごま油及びピーナッツを含有する食品、煮干しであった。サイクラミン酸試験法（精製操作あり）では、適用可能な食品はぶどうジュース、みかんシロップ漬けで、適用できないと考えられる食品はたくあん漬け、らっきょう漬け、米酢、ジャム、ビスケット、チョコレートであった。サイクラミン酸試験法（スクリーニング試験法）では適用可能な食品はジャム、ぶどうジュース、米酢及びみかんシロップ漬けで、適用できないと考えられる食品はたくあん漬け、ビスケット及びチョコレートであった。ソルビン酸試験法及び二酸化硫黄及び亜硫酸試験法のアルカリ滴定法では本研究で検討した食品種すべてにおいて性能基準を満足する真度及び精度が得られ、適用可能な試料であると考えられた。

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

サイクラミン酸規定分析法で添加回収率や精度に問題が認められた 5 食品について、改良法を検討した。ビスケットについては、

加水量を 80 mL 程度にし、適宜、混和・攪拌さらに、ホモジナイズ抽出することで回収率が向上した。チョコレートについては、上澄液を希釈した後、固相抽出法で分析することで回収率が向上した。米酢とらっきょう漬けについては、上澄液の pH を中性付近に調整することにより回収率の向上が図られた。たくあん漬けについては、ホモジナイズ抽出が有効であった。

サイクラミン酸の新規分析法については、サイクラミン酸を加水分解後、塩化ベンゾイルと反応させて N-シクロヘキシルベンズアミドに誘導体化し 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。

3 村上研究分担

アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究

3 年間で改良抽出法の適用範囲を確認し、試料を調製して試験室間共同試験を実施した。28 試験室での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いた。本研究で実施した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ため、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、適切な科学的根拠を示すことができると思われる。

4 鎗田研究分担

下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究

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精確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した。分析方法として、カラムスイッチング HPLC-FD と、HLB カートリッジによる固相抽出と LC-MS/MS を組み合わせた分析法を検討し、両者の比較の結果、特に感度に関して後者が優れていることを確認した。これを受けて、パイロットスタディの実施において、後者の方法を適用して検査試料の均質性や安定性、付与値の妥当性を評価した。その結果、本事業において確立した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開発が望まれた。

5 大竹研究分担

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

添加回収試験によって正確さを確認した、一斉試験法および QuEChERS 法、SFE 法を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料 (Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C) : 温度は噴霧温度) を評価した。得られた分析結果は、各分析法間で差が見られず、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も概ね一致していた。これより、本研究の分析法により、信頼性が高い分析値が得られたことが示された。残留農薬検査用玄米試料の噴霧温度による農薬回収率には、バラつきが見

られたため、噴霧温度を確定させるためには、今後、噴霧条件等のさらなる検討が必要だと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 竹林 純, 高坂典子, 鈴木一平, 中阪聡亮, 平林尚之, 石見桂子, 梅垣敬三, 千葉 剛, 渡辺卓穂: 食品中の栄養成分検査の技能試験 (2017-2018), 食品衛生学雑誌, 61, 63-71 (2020)

2) 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)

3) 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) 渡辺卓穂: 技能試験 (残留農薬検査) について、第 43 回日本農薬学会農薬残留分析研究会、Web 開催、2020

2) 大竹貴光、飯島和昭: 農薬残留分析における精度管理～技能試験と認証標準物質の活用および不確かさの導入～、第 43 回日本農薬学会農薬残留分析研究会、Web 開催、2020

3) 岡元千明、今井浩一、吉田栄充、石井里枝、根本了、穂山浩: LC-MS/MS を用いた農産物

中のプロピリスルフロンの分析法の検討、第 57 回全国衛生化学技術協議会年会、誌上・Web 開催、2020

4) 池田真希, 久保田佳子, 八木真美, 佐藤夏岐, 西垣嘉人, 平林尚之, 高坂典子, 渡辺卓穂: 玄米試料を用いた重金属試験プログラムのパイロットスタディ, 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (web 開催) (東京) 2020

5) 若栗忍, 佐藤夏岐, 渡辺卓穂: アレルギー物質 (小麦タンパク質) を含む特定原材料検査のための技能試験プログラムのパイロットスタディ, 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (web 開催) (東京) 2020

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

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

8) 千葉雄介、藤原 茜、高瀬冴子、島田慎一、石井里枝: E. coli 定性試験法における検出下限値の推定、第 42 回日本食品微生物学会学術総会、Web 開催 (岡山) 2021

9) 千葉雄介、金井美樹、藤原 茜、荒島麻実、土井りえ、島田慎一、石井里枝: 黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定、第 117 回日本食品衛生学会学術講演

- 会、Web 開催（東京）2021
- 10) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康：ネギ中のネオニコチノイド系農薬分析における超臨界流体抽出法の評価、日本食品衛生学会第 117 回学術講演会、Web 開催、2021
- 11) 村上太郎、村野晃一、工藤鮎子、清田恭平、昌山敦、高取聡、山野哲夫：特定原材料検査の内部品質管理における課題と不確かさの推定：第 58 回全国衛生化学技術協議会年会、WEB 開催、2021.
- 12) 上原由理香、鳥居塚南、鎗田 孝：LC-MS/MS によるホタテガイ中下痢性貝毒(オカダ酸群)分析における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討、第 27 回 LC&LC/MS テクノプラザ (Web 開催) 2022.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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
- 17) 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.
- 18) 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
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.

G. 知的所有権の取得状況

なし

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
竹林 純, 高坂典子, 鈴木一平, 中阪聡亮, 平林尚之, 石見桂子, 梅垣敬三, 千葉 剛, 渡辺卓穂	食品中の栄養成分検査の技能試験 (2017-2018)	食品衛生学雑誌	61	63-71	2020
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
渡辺卓穂	技能試験（残留農薬検査）について	第43回日本農薬学会農薬残留分析研究会、Web開催	2020
大竹貴光、飯島和昭	農薬残留分析における精度管理～技能試験と認証標準物質の活用および不確かさの導入～	第43回日本農薬学会農薬残留分析研究会、Web開催	2020
岡元千明、今井浩一、吉田栄充、石井里枝、根本了、穂山浩	LC-MS/MSを用いた農産物中のプロピリスルフロンの分析法の検討	第57回全国衛生化学技術協議会年会、誌上・Web開催	2020

池田真希, 久保田佳子, 八木真美, 佐藤夏岐, 西垣嘉人, 平林尚之, 高坂典子, 渡辺卓穂	玄米試料を用いた重金属試験プログラムのパイロットスタディ	日本食品衛生学会創立 60 周年記念 第 116 回学術講演会 (web 開催)	2020
若栗忍, 佐藤夏岐, 渡辺卓穂	アレルギー物質 (小麦タンパク質) を含む特定原材料検査のための技能試験プログラムのパイロットスタディ	日本食品衛生学会創立 60 周年記念 第 116 回学術講演会 (web 開催)	2020
中村圭介, 大竹貴光, 羽成修康	Evaluation of the automatic extraction techniques for the determination of neonicotinoid pesticides in green onion,	The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) 、Web 開催	2021
村上太郎, 工藤鮎子, 村野晃一, 高取聡, 角谷直哉, 若栗忍, 渡辺卓穂	ELISA 法による特定原材料 (落花生) の測定における阻害因子の解析と改良抽出法の検討	日本食品化学学会 第 27 回総会・学術大会, WEB 開催	2021
千葉雄介, 藤原 茜, 高瀬冴子, 島田慎一, 石井里枝	E. coli 定性試験法における検出下限値の推定	第 42 回日本食品微生物学会学術総会, Web 開催	2021
千葉雄介, 金井美樹, 藤原茜, 荒島麻実, 土井りえ, 島田慎一, 石井里枝	黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定	第 117 回日本食品衛生学会学術講演会, Web 開催	2021
中村圭介, 大竹貴光, 羽成修康	ネギ中のネオニコチノイド系農薬分析における超臨界流体抽出法の評価	日本食品衛生学会第 117 回学術講演会, Web 開催	2021
村上太郎, 村野晃一, 工藤鮎子, 清田恭平, 昌山敦, 高取聡, 山野哲夫	特定原材料検査の内部品質管理における課題と不確かさの推定	第 58 回全国衛生化学技術協議会 年会, WEB 開催	2021
上原由理香, 鳥居塚南, 鎗田 孝	LC-MS/MS によるホタテガイ中下痢性貝毒(オカダ酸群)分析における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討	第 27 回 LC&LC/MS テクノプラザ (Web 開催)	2022
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マテリアル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マテリアル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