

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5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 今井 浩一
地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 新矢 将尚
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6年(2024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	34
1.3	特定原材料検査（卵）技能試験プログラムのパイロットスタディ	45
1.4	サルモネラ属菌検査用調査試料および一般細菌数測定検査用調査試料の開発	83
2.	食品添加物試験法及び動物用医薬品試験法の開発に関する研究	104
	今井 浩一	
3.	重金属類試験法の改良と妥当性評価に関する研究	131
	新矢 将尚	
4.	下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究	145
	鎗田 孝	
5.	残留農薬分析の外部精度管理に関する研究	158
	大竹 貴光	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	171

令和5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玄米粉を基材とした残留農薬検査試料を作製し、課題5に供した。また、ハウレンソウパウダーを基材として最適条件を検討した。器具・容器包装の検査項目の基礎検討では、一般規格の材質試験として、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、溶解溶媒にジクロロメタンを用いてシート状の試料作製を行った。微生物検査については、硫化水素（ H_2S ）非産生サルモネラ属菌を用いた調査試料の開発としてパイロットスタディを実施し、併せて前年度までに開発した一般細菌数測定用調査試料の実運用を通じた考察を実施した。2. 食品添加物試験法及び動物用医薬品試験法の開発に関する研究（今井研究分担）では、指定外添加物（甘味料）であるサイクラミン酸ナトリウムをたくあん漬けに添加して精度管理調査用試料を作製し、パイロットスタディとして12の参加機関に対して調査用試料を配布し、その報告値を解析した。併せて、サイクラミン酸試験法におけるホモジナイズ操作の追加の有用性を確認するためコラボスタディを実施したところ、水抽出法において添加回収試験における回収率向上した。さらに、サイクラミン酸の誘導体化における誘導体化剤を加えてから水

層を除去するまでに要する時間により、回収率が低下することを確認した。新規誘導体化剤を用いた分析法については、液-液分配による精製工程を追加することで夾雑ピークの影響を受けずに測定することが可能となった。3. 重金属類試験法の改良と妥当性評価に関する研究（新矢研究分担）では、マイクロウェーブ分解-ICP質量分析による試験法を検討し、その分析妥当性を確認した。4. 下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究（鎗田研究分担）では、調査試料の調製法を検討するとともに、0A群のLC-MS/MS測定を正確に定量するための精確な分析法を検討した。また、最適化された分析条件を用いて添加回収試験を行い、分析が良好な精確さを有することを確認した。5. 残留農薬分析の外部精度管理に関する研究（大竹研究分担）では、課題1で作製したハウレンソウパウダーを基材とした試料に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。また、玄米粉試料のピロロトスタディを実施し、より信頼性が高い参加者の技能評価を行うことができた。

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）、今井浩一（埼玉衛生研究所化学検査室長）、新矢将尚（（地独）大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品安全課課長）、鎗田 孝（茨城大学農学部教授、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：

パイロットスタディ用残留農薬検査用試料は自家製玄米粉を用い、玄米粉 2 kg を 20%アセトニトリル溶液 8 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。

また、検討用のハウレンソウパウダー 1 kg を 20%または 30%アセトニトリル溶液 9 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。これらの懸濁液には、ダイアジノン (0.40 μ g/g)、フェニトロチオン (0.20 μ g/g)、マラチオン (0.20 μ g/g) およびクロルピリホス (0.10 μ g/g) を添加した。

研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤ CL-8i を用いて作製した。すなわち、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、入口温度は 100°C に設定し、作製した。得られた玄米粉は平均粒子径を測定した。得られた玄米粉は課題 5 のパイロットスタディで使用予定である。また、ハウレンソウを基材とした残留農薬検査用試料は玄米粉と同様の測定条件で入口温度を 100°C 及び 80°C で検討し、課題 5 に供し、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。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、昨年度の検討結果より試料基材に ABS 及び AS のペレットを選択し、試験対象物質をカドミウム及び鉛として、溶解溶媒にジクロロメタンを用いて、ポリマー含量 10w/w% とし、シート状試料作製を行った。作製容器の材質の検討として、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 μ g/g, Base Oil 75) を用いた。作製したシート状試料につき、カドミウム及び鉛の濃度確認を行い、併せて溶解溶媒 (ジクロロメタン) の残存性についても検討した。

1.3 特定原材料検査 (卵) 技能試験プログラムのパイロットスタディ：

本年度は特定原材料を卵タンパク質として外部精度管理調査に関するパイロットスタディを実施した。

参加機関は公定法及び標準操作手順書に

従い、通知法準拠のキットを用いて試験し、得られた結果を提出することとした。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。

回収したデータについてメジアン・クリーニング (MC) 後、ロバスト方式による統計解析をキットごとおよび試料ごとに実施した。得られたロバスト平均値および標準偏差から \bar{x} -R 管理図を代用した方法による評価および \bar{x} -スコアの算出を行った。

1.4 サルモネラ属菌検査用試料および微生物学調査区分調査試料の開発：

サルモネラ属菌検査用調査試料の開発と一般細菌数用調査試料の実運用の考察を行った。

サルモネラ属菌検査用調査試料の開発では、基材はサルモネラ属菌検査用調査試料と同じ液卵基材を用い、添加菌は①*Proteus mirabilis* HIC 210396、②*Salmonella* sp. HIC 210393、③*Salmonella* sp. HIC 230403を用いた。①②は現在食品衛生外部精度管理で使用している菌株、③は H₂S 非産生株 (サルモネラ属菌陽性) である。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 (10℃以下) 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 28 日間保存までの生菌数の挙動を観察した。品質評価 (均質性確認) ではパイロットスタディ用に作製した調査試料から添加菌ごとに5個の配付用調査試料を用いて生菌数試験を行い、その平均値を添加濃度とした。また、そのうち2個を用いて定性試験を行った。なお分離培地は XLDA と ESⅡA を使用した。品質評価 (均質性確認) では添加菌

ごとに1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定性試験および生菌数測定を行った。パイロットスタディでは51機関の参加機関に対して調査試料を配付し、結果報告を回収および解析を行った。なお調査試料は添加菌名を伏せ、調査試料 No. 1、No. 2、No. 3 とラベルして配付した。

一般細菌数用調査試料の実運用の考察では、前年度までに開発した白飯基材 (見立て食材：冷凍食品) を食品衛生外部精度管理調査で実運用し、結果報告の回収および解析を行った。

2 食品添加物試験法及び動物用医薬品試験法に関する研究 (今井研究分担)

調査用試料の作製方法の検討について、たくあん漬けを基材として用い、最適な浸漬期間を検討した。本結果を基に調査用試料を作製し、均質性と安定性を評価した。

精度管理調査のパイロットスタディは、12の参加機関に調査用試料等を配布し、分析結果の報告を受けた。報告結果は、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が実施している食品衛生外部精度管理調査に倣い、従来方式 (算術平均値および標準偏差を用いた評価方法) とロバスト方式 (*Huber* の *proposal 2* による方法) で統計解析した。

ホモジナイズ抽出に関するコラボスタディは、サイクラミン酸法 (透析法及び水抽出法) に問わず、参加機関の分析法にホモジナイズ抽出工程を追加して分析し、その結果をパイロットスタディの報告結果と比較した。

誘導体化時間の検討は、誘導体化におけ

る各工程において試料を静置する時間を設け、その回収率への影響を比較した。

新規誘導体化剤を用いた分析法の改良は、検体としてオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレートを用い、昨年度報告した新規分析法に液-液分配による精製工程を導入し、その性能を評価した。

3 重金属類試験法の改良と妥当性評価に関する研究（新矢研究分担）

食品中の重金属類試験において、迅速かつ多元素分析可能なマイクロウェーブ分解-ICP 質量分析法を適用するために、マトリックスの異なる 3 種の認証標準物質を用いて、その最適条件の検討を行った。認証標準物質には、水分、脂質とも相応に含む試料として Crab Paste を、脂質の多い試料として Peanut Butter を、脂質をほとんど含まず水分が多い試料として Baby Food Composite を用いた。いずれの物質も 5 種の主要元素（Na、Mg、P、K、Ca）について認証値が付与されており、微量元素（Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Cd、Ba、Pb）の認証値は Crab Paste が 5 元素、Peanut Butter が 4 元素、Baby Food Composite が 7 元素であった。

試料をテフロン製分解容器に採り、硝酸および過酸化水素水を加えてマイクロウェーブ分解装置により加熱分解した。試料分解液を室温まで冷却後、超純水を加えて定容したものを試験原液とし、適宜希釈して測定液とした。ICP-MS による定量は内標準法で行い、標準モード（No Gas モード）、コリジョンモード（He モード）、およびリアクションモード（H₂ モード）で検討した。

妥当性評価は、分析者 2 名が併行数 2 で

3 日間の枝分かれ試験で実施した。「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度および室内再現精度を求めた。

4 下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究（鎗田研究分担）

4.1 調査試料の調製

(1) 材料・試薬

調査試料の調製には、ホタテガイ可食部（北海道産）と、オカダ酸（OA）およびジノフィシストキシン-1（DTX1）の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料（均質化済み）、OA 標準品（富士フィルム和光純薬、生化学用）および 1 μg/mL DTX1 溶液（メタノール溶液）（産業技術総合研究所）を用いた。他の試薬は、LC-MS 用または試薬特級品を用いた。

(2) 調製方法

ホタテガイ可食部を均質化した後、ホタテガイ中腸腺試料と 9:1（質量比）で混合し、さらに OA と DTX1 を添加した。この混合物をさらに混合及び縮分したのち、5 g ずつを小分け（瓶詰め）した。

4.2 精確な分析法の検討

(1) 材料・試薬

ホタテガイ試料には青森産のホタテガイを用いた。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。ジノフィシストキシン-2（DTX2）の認証標準物質（CRM-DTX2-b）は National Research Council から入手した。他の試薬は、LC-MS 用または試薬特級品を用いた。

(2) 前処理方法

厚生労働省の通知（平成 27 年食安基発 0306 第 4 号食安監発 0306 第 2 号）別紙のオカダ酸群分析操作例に従ってホタテガイ試料を抽出及び脱脂した。その後、次の固相抽出（SPE）法のいずれかによって精製を行った。

a. HLB カートリッジを用いた SPE

脱脂した処理液に水 2.5 mL を加えて攪拌した溶液を HLB カートリッジ（Waters 製）に注入した。次に、アセトニトリル/メタノール（4:1）5 mL をカートリッジに注入し、その流出液を回収した。その後、回収した溶液を窒素下で 2 mL に濃縮した。

b. ODS カートリッジを用いた SPE

脱脂した処理液に水 2.5 mL を加え攪拌した。この溶液を、あらかじめメタノール 5 mL と水を 5 mL でコンディショニングした ODS カートリッジ（ジーエルサイエンス製）に注入した。このカートリッジを水 5 mL、40 %（V/V）メタノール 3 mL で順次洗浄した後、90 %（V/V）メタノール 3 mL を注入し、その流出液を回収し 2 mL に濃縮した。

(3) LC-MS/MS測定

LC-MS/MS 測定には、島津製作所の UFLC 高速液体クロマトグラフ（ポンプ：LC-20AD、デガッサー：DGU-20A3、オートサンプラー：SIL-20ACHT、カラムオーブン：CTO-20AC、システムコントローラ：CBM-20A）と、質量分析計（Applied Biosystems 3200 Q TRAP）を用いた。

LC-MS/MS の測定条件として、次の 4 条件を検討した。

条件 A：A 液として水（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）、B 液として 95 %アセトニトリル（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）を用いたグラジエント溶離

条件 B：A 液として水（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）、B 液として 95 %メタノール（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）を用いたグラジエント溶離

条件 C：A 液として 2 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液、B 液としてアセトニトリルを用いたグラジエント溶離

条件 D：A 液として水（0.05 %アンモニウム）、B 液として 90 %アセトニトリル（0.05 %アンモニウム）を用いたグラジエント溶離

なお、いずれの条件においても MS の測定条件は別紙記載の条件に準じた。

5 残留農薬分析の外部精度管理に関する研究（大竹研究分担）

5.1 スプレードライヤ条件決定のための、ほうれんそう試料中残留農薬分析

(1) 添加回収試験による、ほうれんそう分析のための一斉試験法の評価

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ほうれんそう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：0.1 mg/kg、ダイアジノン：0.4 mg/kg、フェニトロチオン、マラチオン：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) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

一斉試験法と超臨界流体抽出法 (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ほうれんそう試料中の対象農薬を分析した。一斉試験法では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) および 2 (80 °C, アセトニトリル 20 %) の 2 種 (温度は噴霧温度を示す)、SFE では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) の試料を分析した。また、噴霧温度は同じで、アセトニトリルを 20 % から 30 % にして調製した試料 (Lot 3: 100 °C, アセトニトリル 30 %, Lot 4: 80 °C, アセトニトリル 30 %) も、一斉試験法によって分析した。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。

5.2 残留農薬分析のための玄米を用いた外部精度管理のパイロットスタディ

(1) パイロットスタディのための玄米試料の均質性評価

ISO Guide35 (標準物質—認証のための一般的及び統計的な原則) に基づき、食品薬品安全センター秦野研究所が調製した 117 本から無作為に選んだ 10 本について、2 回ずつ農薬濃度を分析した。分析法は、IDMS を適用した QuEChERS 法を用いた。

(2) パイロットスタディのための玄米試料中農薬の安定性評価

昨年度、本研究で分析を行った玄米試料中農薬 (スプレードライヤの噴霧温度は 100 °C の試料) を、約 1 年後に分析することで、長期安定性を評価した。分析には、同位体希釈質量分析法 (IDMS) を適用した

一斉試験法を用いた。

(3) パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

(1) で均質性が確認された玄米試料中の対象農薬の濃度を分析した。分析には、IDMS を適用した一斉試験法、QuEChERS 法、STQ 法を用い、不確かさの算出も行った。

(4) 残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

23 機関から参加申し込みがあった。これらの機関に対して、2024 年 2 月 16 日に、食品薬品安全センター秦野研究所より、試験試料を冷凍便により送付した (2024 年 2 月 19 日着とした)。参加機関は、独立した分析 (試料の抽出及び精製、GC/MS 等による機器測定等) を 2 回行い、得られた結果と、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、測定法等) を報告することが求められた。最終的に 22 機関が、分析結果を報告した。

C. D. 研究結果および考察

1 渡辺研究分担

1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発:

これまで玄米粉を基材とした残留農薬検査用試料の作製について種々検討した。特に玄米粉を懸濁させるアセトニトリル溶液の濃度について検討した結果、20% の時添加した 4 種農薬が最も回収率が良かったため、パイロットスタディ用残留農薬検査用試料として 20% アセトニトリル溶液に懸濁させスプレードライヤに供した。基材となる玄米粉の一次粒子径は 10 μm ~ 500 μm と幅広く、平均粒子径

は $221.5\mu\text{m}$ でさらに $500\mu\text{m}$ 付近にもピークが認められた。一方、スプレードライヤにより作製した玄米粉試料の顕微鏡写真から造粒した数ミクロンの粒子も多数認められ、平均粒子径は $188.6\mu\text{m}$ と基材の玄米粉試料よりやや平均粒子径は小さくなり、 $500\mu\text{m}$ 付近のピークは消失した。作製した試料は課題 5 に供し、均質性と安定性の確認のもとパイロットスタディに供する予定である。

玄米粉を基材として残留農薬検査用試料作製を検討し、添加した 4 種の農薬の回収率が良好な条件を見出した。その条件を参考に野菜を基材として適用するためにハウレンソウパウダーを用いた。このハウレンソウパウダーは玄米粉より粒子径は小さく均質なパウダーであり数 μm ~ $200\mu\text{m}$ の粒度分布で平均粒子径は $26.76\mu\text{m}$ であり、玄米粉において噴霧温度を低く設定したほうが各農薬の回収率は高くなることから、噴霧温度（入口温度）を 100°C と 80°C で比較検討した。懸濁溶媒には 20%アセトニトリル溶液を用いた。玄米粉の場合は 20%懸濁液としたが、ハウレンソウパウダーは平均粒子径が小さく、懸濁液としたとき粘性が高く作製に支障をきたす可能性があったため、10%懸濁液とした。その他の作製条件は玄米粉の場合と同様とした。噴霧温度の違いによる顕微鏡写真の比較と粒度分布の比較をしたところ、基材のハウレンソウパウダーは数ミクロンの微細な粒子が多数認められたのに対して、噴霧温度 100°C の場合は平均粒子径が $45.51\mu\text{m}$ 、 80°C の場合は $63.02\mu\text{m}$ と噴霧温度を下げると平均粒子径が大きくな

ることが分かった。しかしながら、温度を下げることで、乾燥が不十分となり、ハウレンソウパウダーが内壁に固着し、ハウレンソウの回収が悪くなった。そこで、水分量を減らすことで、乾燥を促進させることを考え、20%アセトニトリル溶液からさらに、30%アセトニトリル溶液とし、噴霧温度 100°C 、 80°C で比較検討を行った。アセトニトリル量を増やしても各パラメーターに変動は見られなかったが、20%アセトニトリルのとき、 80°C の残留溶媒は 12.2%であったのに対して、30%アセトニトリルでは 8.3%と 100°C のときの残留溶媒に近い値を示した。このことよりアセトニトリル量を多くすることで低い入口温度でも残留溶媒を低くすることができた。スプレードライヤで作製した試料の回収は 20%に比べ改善された。4 種農薬の回収率を課題 5 で評価した上で最適条件を決定する。噴霧温度の違いによる顕微鏡写真の比較と粒度分布の比較を 20%アセトニトリルの結果と比較すると、平均粒子径については同様の結果となり、アセトニトリル量の変化ではこれらの造粒には影響しないことが分かった。これらの結果を受け、課題 5 で最適条件を決定し、パイロットスタディ用試料として供する予定である。

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、昨年度の検討結果より食品衛生法において合成樹脂一般を対象とした一般規格の材質試験として、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、

溶解溶媒にジクロロメタンを用いてシート状の試料作製を行った。作製容器の材質の検討としては、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（10w/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）。これを各作製容器に流し入れた後、自然乾燥により溶解溶媒を揮発させ、更に減圧乾燥を行い、シート状の試料を得た。得られたシート状試料につき、カドミウム及び鉛の濃度確認を行い、併せて溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存性についても検討した。その結果、いずれのポリマー、作製容器の材質およびシート部位による濃度差はほとんど見られなかった。添加した重金属の回収率は、カドミウムは、ABSシートで82～92%、ASシートで86～88%であった。鉛は、ABSシートで82～90%、ASシートで82～84%であった。理論作製濃度（カドミウム及び鉛各50 µg/g）に対していずれの重金属も80%以上の回収が得られた。溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存率は、ABSシートで約1～2%であり、ステンレスバットの方が低い傾向であった。一方、ASシートでは約7～8%でABSシートと同様にステンレスバットの方が低い傾向を示した。また、重金属の濃度と溶解溶媒残存率との関係性をみたところ、明らかな相関性はみられず、理論上懸念される「溶解溶媒残存率が高い方が添加した重

金属濃度が低くなる傾向」はなかった。今後は、パイロットスタディとして外部精度管理調査研究に必要な試料数の作製実現性を検討することとした。

1.3 特定原材料検査（卵）技能試験プログラムのパイロットスタディ：

2種の試料を用いてパイロットスタディを行った。試料1には、昨年度、市販食品（卵含有コールスロッドレッシング）から調製した実試料を、試料2には従来の方法として標的となる特定原材料が不含であることが確認された基材であるイチゴジャムに卵タンパク質を添加し、作製した試料を調査試料とした。

本年度の参加機関は22機関で公定法に従い、原則、各機関は通知法準拠の市販3キットから2種のキットを用いて試験を行うこととしたが、1機関は1キットのデータだけの提出となった。本パイロットスタディではモリナガキット及び日本ハムキットが使用された。統計解析はキットごとおよび試料ごとにを行った。

その結果、MCで除外された機関は認められなかった。また、 \bar{X} 管理図では管理限界線の範囲を超えた機関は認められず、 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。 σ スコアの絶対値が3以上となった機関は全体で1機関であった。 R 管理図および σ スコアで外れ値を出した機関はすべて別機関であり、それぞれの機関は外れ値を出した試験系以外では範囲内となった。したがって、施設としての試験方法に問題はないと考えられた。

また、試料1の実試料と試料2の従来法による作製試料について比較したところ、特段の差は認められなかった。したがって、

市販食品から調製した実試料は外部精度管理調査試料として供試可能であると結論した。しかしながら、市販食品であるため、ロット間差、標的となる特定原材料の添加量等不明の点が多く、均質に調製を行うまでに時間がかかるため、調製方法の効率化が今後の課題と考えられる。

1.4 サルモネラ属菌検査用調査試料および一般細菌数測定検査用調査試料の開発：

サルモネラ属菌検査用調査試料の開発では、添加菌①、②、③の接種直後の濃度はそれぞれ 4.1×10^3 、 3.1×10^4 、 7.0×10^3 cfu/g であった。冷蔵試料では保管開始から 28 日後まで大きな菌数の増減は観察されなかった。また、10 日後に冷蔵から 22.5℃ に移管した常温試料でも 28 日目まで生菌数を算出でき、定性試験においても添加菌①が陰性、添加菌②が陽性（H₂S 産生+）、添加菌③が陽性（H₂S 非産生-）と判定され、調査試料の品質に問題ないと評価した。均質性確認において添加菌①、②、③の配付用調査試料の生菌数平均値（添加濃度）はそれぞれ 3.9×10^3 、 1.9×10^4 、 4.3×10^3 cfu/g であった。また、定性試験でも性能評価と同様の結果が得られたことから、配付用調査試料は均質であると評価した。配付から約 2 か月後に実施した安定性確認において添加菌①、②、③の生菌数は 3.0×10^2 、 3.5×10^2 、 7.1×10^2 cfu/g であった。均質性確認時の 1/10 程度に減少したが、定性試験の結果は均質性確認試験と同様の結果となったことから、定性試験を実施する上で影響がないと判断し、パイロットスタディ実施期間中の調査試料は安定であったと評価した。調査試料配付後に参加機関 51 機関から回収した結果報

告では、通常的外部精度管理調査で使用している添加菌①、②は 51 機関全てが正しく報告した。しかし、添加菌③は 51 機関中 3 機関がサルモネラ属菌陰性と判定した。添加菌③を誤判定した 3 機関のうち 2 機関は、クエン酸利用能陰性のためサルモネラ陰性と報告した。うち 1 機関は API20E 実施によりサルモネラ陽性であったが当該機関の手順書に従った判定でサルモネラ陰性と報告した。残り 1 機関はクエン酸利用能およびマロン酸利用能試験を実施し、非定型反応であることからサルモネラ陰性と報告した。経過記録書から、生化学的性状試験で 36 機関がクエン酸利用能試験を実施し、クエン酸利用能試験を実施していない 15 機関のうち 10 機関は簡易同定キットでクエン酸利用能を確認していたことが示された。またアンケート結果において、外部精度管理調査事業の今後の運用として、H₂S 産生/非産生サルモネラ属菌および陰性菌の 3 種のうち 2 種の組み合わせで実施する場合のアンケート調査を行ったところ、「どの組み合わせでもよい」が半数以上（58.8%）となった。また、「陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい」（27.5%）を含めると 80%以上が H₂S 非産生サルモネラ属菌の調査試料に前向きな回答であった。また、パイロットスタディに対するコメントとして、H₂S 非産生サルモネラ属菌のクエン酸利用能の定型反応が弱いといったコメントが散見された。本試験に使用するシモンズクエン酸培地はメーカーによる反応差や菌の接種量による偽陰性/偽陽性が出やすく、検査員の経験や技量が大きく影響する可能性が示唆された。

一般細菌数検査用調査試料の実運用の考察では、均質性確認試験で2名の検査員が各1回ずつ10個の調査試料の生菌数測定を行い、実数の平均値、標準偏差、相対標準偏差および一元分散分析を行った。また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 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。安定性確認試験では調査試料の作製から約2か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。調査試料配付後に参加機関から回収した結果報告では、実数解析においてデータ・クリーニングにより除外された機関は3機関、2シグマ処理で除外された機関は1機関であった。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X管理図においては1機関、R管理図においては9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13機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が5機関であった。データ・クリーニングにより除外された3機関はそれぞれ報告時の転記ミス、標準操作手順書に従って実施した結果検出限度値未満 ($< 3.00 \times 10^4$ /g) になった、フィルム培地の液状化により菌数の計測ができなかったことが原因であった。対数解析においてはデータ・クリーニングにより除外された機関は2機関、2シグマ処理で除外された機関は1機関であった。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4機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が3機関であった。

2 今井研究分担

たくあん漬けを基材としてサイクラミン酸の精度管理調査用試料作製を試みた。その結果、7日間の浸漬でたくあん漬けの部位毎のサイクラミン酸濃度を均一化でき、また、作成した試料を84日間冷凍保管した際の安定性も良好であった。以上より、たくあん漬けはサイクラミン酸の外部精度管理調査用試料に適応できる可能性が示唆された。

精度管理調査のパイロットスタディ調査用試料の均質性及び安定性は良好であった。また、参加機関の報告値は、従来方式およびロバスト方式で解析した。

サイクラミン酸試験法におけるホモジナイズ抽出工程の追加は、透析法では回収率を低下させ、水抽出法では向上させた。水抽出法における回収率をより向上させるため、ホモジナイズ抽出工程には更なる改良が必要と考えられた。

サイクラミン酸の誘導体化については、誘導体化剤を投入してから水層を除去するまでの工程に時間をかけることで回収率が低下した。試験溶液の調製時は、誘導体化の所要時間にも配慮することが重要と示唆された。

昨年度検討した新規誘導体化剤を用いた分析法に液-液分配工程を導入することにより、夾雑ピークを大幅に軽減することができた。検討した何れの試料においても、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。さらに、ブルーベリージャム等の4食品を用いた添加

回収試験の回収率は良好であった。

3 新矢研究分担

使用した認証標準物質 (Crab Paste、Peanut Butter、Baby Food Composite) のいずれにおいても、Na、Mg、K、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Cd、Ba、Pb の 12 元素は、検討したいずれの測定条件でも認証値とよく一致し、真度、併行精度および室内再現精度は目標値 ($0.01 < \text{濃度}(\text{mg/kg}) \leq 0.1$ の場合：真度 80～120%、併行精度 < 15%、室内精度 < 20%、 $0.1 < \text{濃度}(\text{mg/kg}) \leq 10$ の場合：真度 80～110%、併行精度 < 10%、室内精度 < 15%、 $10 < \text{濃度}(\text{mg/kg})$ の場合：真度 90～110%、併行精度 < 10%、室内精度 < 15%) を満たしていた。また、重み付け検量線を用いる方が検量線範囲は拡大し、妥当性も向上したこと、さらに希釈等による労力も低減されることから、本法では有効であると考えられた。

一方、P については No Gas モードのみ、P の He モードおよび Ca の H₂ モードでは、Peanut Butter と Baby Food Composite で分析妥当性が確認された。これら 2 元素はマトリックスの影響を受けやすいと考えられ、引き続き検討を行う必要がある。

4 鎗田研究分担

4.1 調査試料の調製

本研究で使用した OA の標準品は、あらかじめ LC-MS/MS とで測定することにより、分析の障害となりうる不純物を含んでいないことを確認した。

調査試料の調製には、ホタテガイ可食部約 1.7 kg を用いた。これをブレンダーで細断した後に裏ごしし、繊維質分等を除去し

た試料約 1.4 kg を得た。

均質化したホタテガイ可食部、ホタテガイ中腸腺試料、及び添加用の OA 及び DTX1 の混合溶液は、最終的に得られる試料中の OA 及び DTX1 ができるだけ均質に分布されるように、2 段階に分けて混合した。その結果、これらの混合試料を約 1.25 kg 得た。この混合物は、混合物の均質性に外観上の問題はないと判断された。

この試料を回転混合させた後に 5 等分に小分けした。さらに、各瓶から約 20 g ずつを別の瓶 10 本に合一した。次いで、各瓶から内容物 5 g ずつを 16 本のポリ製遠沈管に小分けした。

以上によって、調査試料 160 本を調製することができた。この試料は約 -60 °C で保管しており、来年度その均質性を評価する予定である。

4.2 分析法の検討

(1) 検出感度の比較

下痢性貝毒分析における一般的な LC-MS/MS では、酸性の水/アセトニトリルが移動相に用いられている (測定条件 A が該当)。一方、アセトニトリルの代替にメタノールを用いることにより、感度が上昇したという報告がある (測定条件 B が該当)。また、塩基性の移動相を用いることにより、測定感度が上昇したとする報告もある (測定条件 C および D が該当)。

そこで、これらの 4 条件によって OA、DTX1 および DTX2 の混合標準液を測定した。その結果、条件 A、C、D では、同じイオンチャンネルで検出される OA と DTX2 を含め、対象物質は良好に分離できた。一方、条件 B では、OA と DTX2 はベースライン分離することができなかった。

次に、4測定条件におけるLC-MS/MS測定
の感度を比較した。その結果、OA、DTX1、
DTX2のすべてについて、条件Cが最も優
れた感度を示した。条件Cの塩基性条件で
OA群の官能基が解離し、イオン化効率が
向上したためと考えられた。

(2) マトリックス効果の評価

HLBカートリッジまたはODSカートリ
ジを用いて前処理した使用溶液を用いて、
マトリックス効果の評価した。調製濃度
は、ホタテガイ試料中の相当量として各
0.05 ppmとした。これらの溶液と、同濃
度のOA群を含む標準溶液を条件A～Dで
測定した。一般的なLC-MS/MS条件である
条件Aでは、両前処理条件において、イオ
ン化抑制が認められた。一方、(1)で最も
優れた感度を示した条件Cは、HLBカート
リッジを用いた前処理では面積比が0.81
～0.87、ODS Bカートリッジを用いた前処
理では面積比は0.89～1.00であった。一
般に、面積比が0.8～1.2の範囲であれば
マトリックス効果によるイオン化促進や
イオン化抑制が許容されうると考えられ
ており、HLBとODSのいずれを用いた前処
理による試料溶液も、条件Cで測定するこ
とで正確に定量可能であることが示され
た。

(3) 添加回収試験

HLBカートリッジを用いた前処理と、検
討した条件の中で最も感度が高くて正確
であった測定条件Cを組み合わせた方法
について、添加回収試験を行った。その結
果、OA群のいずれについても下痢性貝毒
の機器分析法に求められる性能基準であ
る正確さ：70%～120%、及び併行精度：
15%以下を満たしており、精確さは良好で

あることが確認できた。

来年度は、本検討によって確立した分析法
をさらに高度化し、調製した調査試料の均
質性や安定性を正確に評価する予定である。

5 大竹研究分担

5.1 スプレードライヤ条件決定のための、 ほうれんそう試料中残留農薬分析

(1) 添加回収試験による一斉試験法の評価 (ほうれんそう試料)

一斉試験法による分析結果から、本方法
によって調製値通りの分析値が得られる
ことが示された。また各農薬の標識体の回
収率も、91～94%と良好であった(マトリ
ックスマッチ検量線を使用)。よって、本
方法によって残留農薬検査用ほうれんそ
う試料を用いた、農薬の噴霧条件検討のた
めの分析を行っても問題ないことが示さ
れた。

(2) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の 分析によるスプレードライヤ条件決定へ の寄与

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ほうれんそ
う試料の、Lot 1 (100℃, AN20%), 2
(80℃, AN20%), 3 (100℃, AN30%),
4 (80℃, AN30%) (温度は噴霧温度を示
す)の4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
(SFE法では、Lot 1の試料のみ分析)。分
析結果より、一斉試験法とSFE法の定量結
果はよく一致しており、(1)での添加回収
試験に加えて一斉試験法の妥当性を確認
できた。

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

mg/kg, ダイアジノン:0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン:0.2 mg/kg であった。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より、スプレードライヤの添加濃度に対する回収率の範囲は、80 °C (AN20 %) で 61 %から 78 %、100 °C (AN20 %) で 57 %から 74 %、80 °C (AN30 %) で 58 %から 76 %、100 °C (AN30 %) で 54 %から 74 %であった。昨年度までに、玄米試料でもスプレードライヤの条件検討を行ったが、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果の類似点は、以下の通りであった。①対象農薬のうち、フェニトロチオンの回収率が一番高かった。②各農薬において、100 °C よりも 80 °C の方が良い回収率が得られた。また、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果で異なる点は、以下の通りであった。①ほうれんそうでは、80 °C でのダイアジノンの回収率がクロルピリホスよりも高く (マラチオンと同程度であった)、クロルピリホスの回収率が一番低かった。②ほうれんそうでは、玄米に比べて多くの場合で回収率が上昇した (例えば、80 °C ではフェニトロチオンとダイアジノンで約 10 % 上昇した)。さらに、ほうれんそう試料において AN を 30 % とした場合、AN20 % のときと比較すると、マラチオンを除いて AN20 % の回収率がやや高くなった。噴霧温度や AN 濃度を確定させるためには、以上の結果を用い、他の条件も考慮して (試料調製時に用いる装置の壁面に粉末試料が付いてしまう等の作業面での条件も含む)、課題 1 において最終的に決定する。

5.2 残留農薬分析のための玄米を用い

た外部精度管理のパイロットスタディ

(1)パイロットスタディに用いる玄米試料の均質性評価

得られた分析結果を分散分析したところ、すべての対象農薬の瓶間濃度に統計的な有意差は見られず、試料が均質であることが示された。また、分散分析の結果を基に、瓶間均質性標準偏差 s_{bb}

$$\left(= \frac{MS_{among} - MS_{within}}{n} \right) \text{ と測定のはらつきに由}$$

来する $u_{bb} \left(= \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \cdot 4 \sqrt{\frac{2}{v_{MS_{within}}}} \right)$ を求めた。

その結果、均質性試験の不確かさは 0.58 % から 0.78 % と十分に小さく、パイロットスタディに用いるためには問題ない品質であることが示された。

(2)パイロットスタディに用いる玄米試料中の農薬の安定性評価

分析を行って得られた結果より、今回対象としたすべての農薬に対して、有意な濃度減少は見られなかった。よって、約 1 年間の安定性に問題ないことが示された。

(3)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

各分析法によって得られた結果を用いて、IDMS による精確な参照値と拡張不確かさを求めた。その結果、クロルピリホス: (0.065 ± 0.004) mg/kg, ダイアジノン: (0.217 ± 0.012) mg/kg, フェニトロチオン: (0.138 ± 0.008) mg/kg, マラチオン: (0.138 ± 0.008) mg/kg (参照値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数 $k=2$ から決定された拡張不確かさであり、約 95 % の信頼の水準をもつと推定される区間を示す) となった。これらの値と、参加者の中央値を用いて算出された参照値の比較

を、以下の(4)で行う。

(4) 残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ参加者の中央値を用いて算出された参照値は、以下のようになった。すなわち、クロルピリホス： (0.067 ± 0.007) mg/kg, ダイアジノン： (0.209 ± 0.021) mg/kg, フェニトロチオン： (0.140 ± 0.016) mg/kg, マラチオン： (0.141 ± 0.021) mg/kg となった。この結果と、IDMSによって得られた参照値(上記(3))を比較すると、よく一致していた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) ○Nakamura K., Otake T., and Hanari N: Quantitative determination of organophosphorus, pyrethroid, and dithiolane pesticide residues in brown rice using supercritical fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *Journal of AOAC International*, 106, 1532-1541 (2023).

2) 鳥居塚南, 上原由理香, 長谷川守文, 渡辺卓穂, 鎗田孝, 親水性-親油性バランス型充填剤を用いた簡便な固相抽出精製による二枚貝中オカダ酸群の精密定量, *分析化学*, 73, 185-191, (2024)

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: 特定原材料(小麦)の改良抽出法の室間共同試験による評価: 日本食品化学学会 第29回総会・学術大会, (富山), 2023.

2) 鎗田孝, 鳥居塚南, 上原由理香, 川口研, 渡辺卓穂, ホタテガイ中のオカダ酸群

分析に関する試験所間比較試験, 日本食品衛生学会第119回学術講演会(東京), 2023.

3) 梶原三智香, 中阪聡亮, 堀田実和, 高坂典子, 渡辺卓穂, 白飯を用いた一般細菌数測定検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ, 第119回日本食品衛生学会学術講演会(東京), 2023

4) 若栗忍, 渡辺卓穂: アレルゲン(卵及び牛乳タンパク質)含有試料を用いた特定原材料検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ, 第119回日本食品衛生学会学術講演会, (東京), 2023

5) 栗本悠可, 柳瀬望, 小玉玲菜, 鎗田孝, 分散固相抽出を利用した下痢性貝毒分析法の簡易化, 日本分析化学会関東支部第17回茨城地区分析技術交流会(水戸), 2023.

6) 中村圭介, 大竹貴光, 羽成修康: 超臨界流体抽出法を用いた玄米中農薬分析法の妥当性評価, 第46回農薬残留分析研究会, 長野, 2023.

7) 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)の改良抽出法についての室間共同試験による評価: AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第26回年次大会, (東京), 2023.

F. 知的所有権の取得状況

なし

令和5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

これまで玄米粉を用いた残留農薬検査用試料作製を検討してきた。その結果、スプレードライヤの噴霧温度（入口温度）を100℃に設定し、20%アセトニトリル溶液で20%玄米粉懸濁液とすることで、添加した4種（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）の農薬も回収率は良好であった。この条件により、パイロットスタディのための残留農薬検査用試料を作製し、課題5に供与した。課題5では、今後、均質性、安定性を確認し、パイロットスタディを実施する予定である。また、今年度は、残留農薬検査用の野菜を基材とした試料について作製検討した。基材にはハウレンソウパウダーを用いた。懸濁溶媒として玄米粉で用いた20%アセトニトリル溶液を使用した。ハウレンソウパウダーは玄米粉に比べ粘張度が高いため10%懸濁液とした。スプレードライヤの噴霧温度（入口温度）を100℃、80℃で比較検討した。80℃では出口温度がかなり下がってしまい粉体は壁面に固着し回収が困難であった。これら作製された試料は、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。次に、この固着を解消するために、アセトニトリルを増やし30%として検討したが、回収率など改善があまり認められなかった為20%アセトニトリル溶液を用い、入り口温度100℃で今後の検討を進めることとした。

A. 研究目的

これまで技能試験プログラム用試料は実試料に近い湿試料を開発し作成していた。湿試料の場合、長時間にわたる安定性を維持することは非常に困難であっ

た。野菜ペースト中の残留農薬や豚肉ペースト中の残留動物用医薬品などはその基材由来の成分や酵素などにより分解を受け易く、安定性を担保することが課題である。これら外部精度管理プログラム

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、紛体の外部精度管理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）をこの外部精度管理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。これまで、玄米粉を基材とした残留農薬検査用試料作製条件を検討し、20%アセトニトリル溶液が良好な回収を示すことを見出した。今回、噴霧温度を検討し、最適条件を検討し、パイロットスタディ用残留農薬検査用試料作製すると共に、ハウレンソウを基材とした残留農薬検査用試料の作製を行い、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。

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）および野菜ファインパウダーハウレンソウパウダー（三笠産業）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)および精製水(日本薬局方、小堺製薬)を用いた。

2. 使用機器

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。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。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。平均粒子径はマイクロトラックベル社製マイクロトラック MT3200 を用い測定した。

3. 懸濁溶液の調製

パイロットスタディ用残留農薬検査用試料は自家製玄米粉を用い、玄米粉 2 kg を 20%アセトニトリル溶液 8 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。

また、検討用のハウレンソウパウダー 1 kg を 20%または 30%アセトニトリル溶液 9 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。これらの懸濁液には、ダイアジノン (0.40 μ g/g)、フェニトロチオン (0.20 μ g/g)、マラチオン (0.20 μ

g/g) およびクロロピリホス (0.10 μ g/g) を添加した。

4. スプレードライヤによるパイロットスタディ用玄米粉試料作製

研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iを用いて作製した(図1)。すなわち、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、入口温度は100°Cに設定し、作製した。得られた玄米粉は平均粒子径を測定した。得られた玄米粉は課題5のパイロットスタディで使用予定である。また、ハウレンソウを基材とした残留農薬検査用試料は玄米粉と同様の測定条件で入口温度を100°C及び80°Cで検討し、課題5に供し、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。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パイロットスタディ用玄米粉試料作製

これまで玄米粉を基材とした残留農薬検査用試料の作製について種々検討した。特に玄米粉を懸濁させるアセトニト

リル溶液の濃度について検討した結果、20%の時添加した4種農薬が最も回収率が良かったため、パイロットスタディ用残留農薬検査用試料として20%アセトニトリル溶液に懸濁させスプレードライヤに供した。表1に作製条件を示す。基材となる玄米粉の一次粒子径は10 μ m~500 μ mと幅広くその顕微鏡写真と粒度分布は図2と図4に示す。平均粒子径は221.5 μ mでさらに500 μ m付近にもピークが認められた。一方、スプレードライヤにより作製した玄米粉試料の顕微鏡写真と粒度分布は図3と図5に示す。顕微鏡写真から造粒した数ミクロンの粒子も多数認められ、平均粒子径は188.6 μ mと基材の玄米粉試料よりやや平均粒子径は小さくなり、500 μ m付近のピークは消失した。作製した試料は課題5に供し、均質性と安定性の確認のもとパイロットスタディに供する予定である。

スプレードライヤによる残留農薬検査用ハウレンソウ試料の作製検討

玄米粉を基材として残留農薬検査用試料作製を検討し、添加した4種の農薬の回収率が良好な条件を見出した。その条件を参考に野菜を基材として適用するためにハウレンソウパウダーを用いた。このハウレンソウパウダーは玄米粉より粒子径は小さく均質なパウダーであり数 μ m~200 μ mの粒度分布で平均粒子径は26.76 μ mであり、顕微鏡写真と粒度分布は図6と図8に示す。玄米粉において噴霧温度を低く設定したほうが各農薬の回収率は高くなることから、噴霧温度(入口温度)を100°Cと80°Cで比較検討

した。懸濁溶媒には20%アセトニトリル溶液を用い、表2の条件で比較検討を行った。玄米粉の場合は20%懸濁液としたが、ハウレンソウパウダーは平均粒子径が小さく、懸濁液としたとき粘性が高く作製に支障をきたす可能性があったため、10%懸濁液とした。その他の作製条件は玄米粉の場合と同様とした。図7に噴霧温度の違いによる顕、微鏡写真の比較を、図9に噴霧温度の違いによる粒度分布の比較を示す。基材のハウレンソウパウダーは数ミクロンの微細な粒子が多数認められたのに対して、噴霧温度100℃の場合は平均粒子径が45.51 μm 、80℃の場合は63.02 μm と噴霧温度を下げると平均粒子径が大きくなることが分かった。しかしながら、温度を下げることで、乾燥が不十分となり、ハウレンソウパウダーが内壁に固着し、ハウレンソウの回収が悪くなった。そこで、水分量を減らすことで、乾燥を促進させることを考え、20%アセトニトリル溶液からさらに、30%アセトニトリル溶液とし、噴霧温度100℃、80℃で比較検討を行った。表3にスプレードライヤの条件を示す。アセトニトリル量を増やしても各パラメーターに変動は見られなかったが、20%アセトニトリルのとき、80℃の残留溶媒は12.2%であったのに対して、30%アセトニトリルでは8.3%と100℃のときの残留溶媒に近い値を示した。このことよりアセトニトリル量を多くすることで低い入口温度でも残留溶媒を低くすることができた。スプレードライヤで作製した試料の回収は20%に比べ改善された。4種農薬の回収率を課題5で評

価した上で最適条件を決定する。図10に噴霧温との違いによる顕微鏡写真の比較と図11にその粒度分布の比較を示す。これらを20%アセトニトリルの結果と比較すると、平均粒子径については同様の結果となり、アセトニトリル量の変化ではこれらの造粒には影響しないことが分かった。これらの結果を受け、課題5で最適条件を決定し、パイロットスタディ用試料として供する予定である。

E. 結論

スプレードライヤで作製するために玄米粉を基材とした残留農薬検査用試料は20%アセトニトリル溶液で懸濁させ、スプレードライヤの噴霧温度を100℃に設定することで、添加した農薬の回収率が最も高くなることが確認された。この条件でパイロットスタディ用試料を課題5に供与した。また、残留農薬検査用野菜試料としてハウレンソウパウダーを使用し、作製条件を検討した。その結果、ハウレンソウパウダーは粘張度が高いことから10%懸濁液として検討した。最終的に玄米粉と同様に溶媒は20%アセトニトリル溶液を用い、噴霧温度は100℃に設定し今後の研究に供することとした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 鳥居塚南, 上原由理香, 長谷川守文, 渡辺卓穂, 鎗田孝, 親水性-親油性バランス型充填剤を用いた簡便な固相抽出精

製による二枚貝中オカダ酸群の精密定量,
分析化学, 73、185-191 (2024)

2. 学会発表

1) 鎗田孝, 鳥居塚南, 上原由理香, 川口
研, 渡辺卓穂, ホタテガイ中のオカダ酸
群分析に関する試験所間比較試験, 日本
食品衛生学会第119回学術講演会 (東京),
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

機種名: CL-8i

実施日: 2023年8月22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 [%]		①13.0②13.1			
	液比重	-	1.04			
	見掛粘度 [mPa·s]		-			
	溶媒名	-	7セトトリル+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]		9.44				
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			
	入口温度 [°C]		100			
	出口温度 [°C]		62→52			
	サイクロン差圧 [kPa]		0.55			
	凝縮器出口温度 [°C]		18			
製品	平均粒子径 [μ m]		189/227			
	粒子形状	-	不定			
	残留溶媒 [%]		12.5/13.9			
	嵩密度 [g/ml]		0.52/0.51			
	サイクロン回収量 [g]		1,987			
※ ←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"> ・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。 ・製品分析結果は、開始後/終了時の順で記載した。 					

表1 スプレードライヤ条件 (パイロットスタディ用試料)

Lot No.		1	2	3	4	5
原液条件	原液名 -	ほうれん草懸濁液	←			
	固形分濃度 [%]	9.8	←			
	液比重 -	1.02	←			
	見掛粘度 [mPa·s]	176	←			
	溶媒名 -	アセトニトリル+H ₂ O	←			
	液色 -	緑	←			
	一次粒子径 [μ m]	≒10~100	←			
	液温度 [°C]	常温	←			
使用液量 [kg]	4.65	4.09				
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]	2.1	2.0			
	入口温度 [°C]	100	80			
	出口温度 [°C]	52	39			
	サイクロン差圧 [kPa]	0.68	0.70			
	凝縮器出口温度 [°C]	16	18			
製品	平均粒子径 [μ m]	46	63			
	粒子形状 -	不定	←			
	残留溶媒 [%]	8.3	12.2			
	嵩密度 [g/ml]	0.35	0.29			
サイクロン回収量 [g]	314.0	171.3				
※ ←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	B型粘度計 ローター: 62 / 60 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)				

表2 スプレードライヤ条件 (20%アセトニトリル、ほうれん草)

機種名: CL-8i

実施日: 2024年2月15日

Lot No.		1	2	3	4	5
原液条件	原液名	-	ほうれん草懸濁液	←	←	
	固形分濃度 [%]		10.1	←	←	
	液比重	-	0.93	←	←	
	見掛粘度 [mPa·s]		9	←	←	
	溶媒名	-	アセトニトリル+H ₂ O	←	←	
	液色	-	濃緑	←	←	
	液温度 [°C]		常温	←	←	
	使用液量 [kg]		2.96	3.48	2.46	
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]		3.0	2.0	←	
	入口温度 [°C]		120	100	80	
	出口温度 [°C]		61	53	44	
	サイクロン差圧 [kPa]		0.69	0.70	←	
	凝縮器出口温度 [°C]		14.6	16.8	16.9	
製品	平均粒子径 [μ m]		70	55	63	
	粒子形状	-	不定	←	←	
	残留溶媒 [%]		9.0	9.1	8.3	
	嵩密度 [g/ml]		0.31	0.34	0.30	
	サイクロン回収量 [g]		149.8	286.6	138.5	

※ ←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。

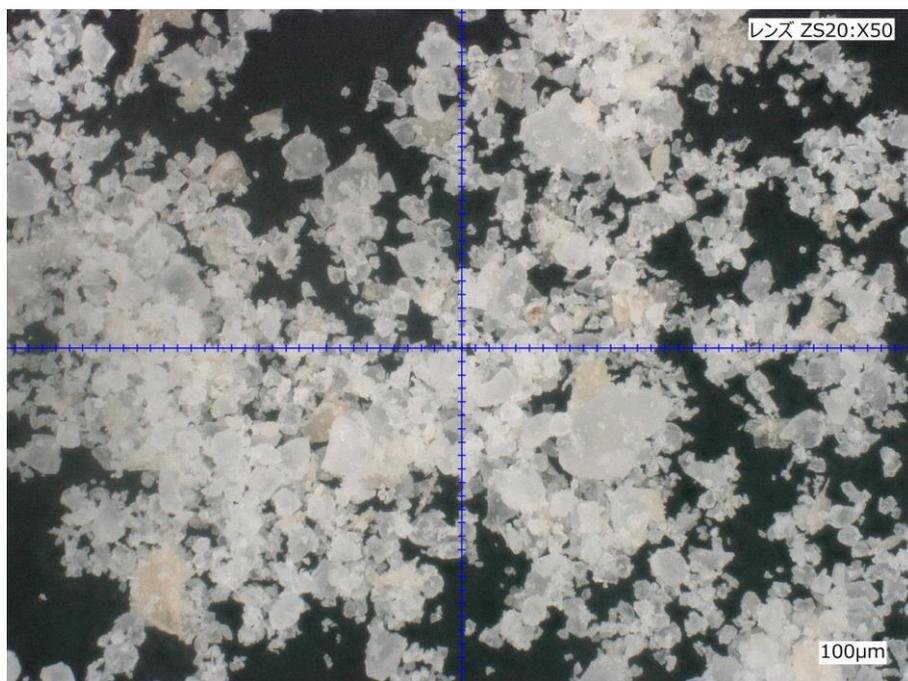
測定条件	固形分濃度	乾燥減量 恒温槽 105°C/3h
	残留溶媒	乾燥減量 恒温槽 105°C/2h
	液比重	容積重量法
	見掛粘度	B型粘度計 ローター: 61 / 60 rpm
	製品粒子径	レーザー粒度分布測定
製品嵩密度	100ml すり切り容器 (Non tap)	

備考	<ul style="list-style-type: none"> ・送液は天井部の高さより実施した。 ・溶媒噴霧はイオン交換水を用いた。
----	--

表3 スプレードライヤ条件 (30%アセトニトリル、ほうれん草)



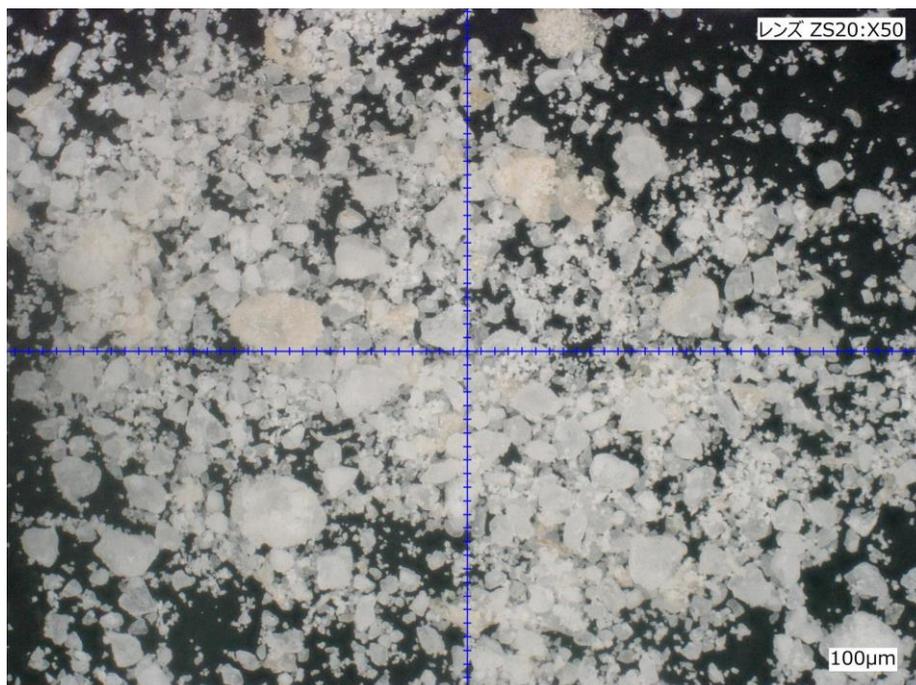
図1 窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iの外観



測定倍率 ×50

最小目盛 100 μ m

図2 基材として用いる玄米粉の顕微鏡写真



測定倍率 ×50

最小目盛 100 μ m

図3 スプレードライヤで作製した残留農薬検査用試料の顕微鏡写真

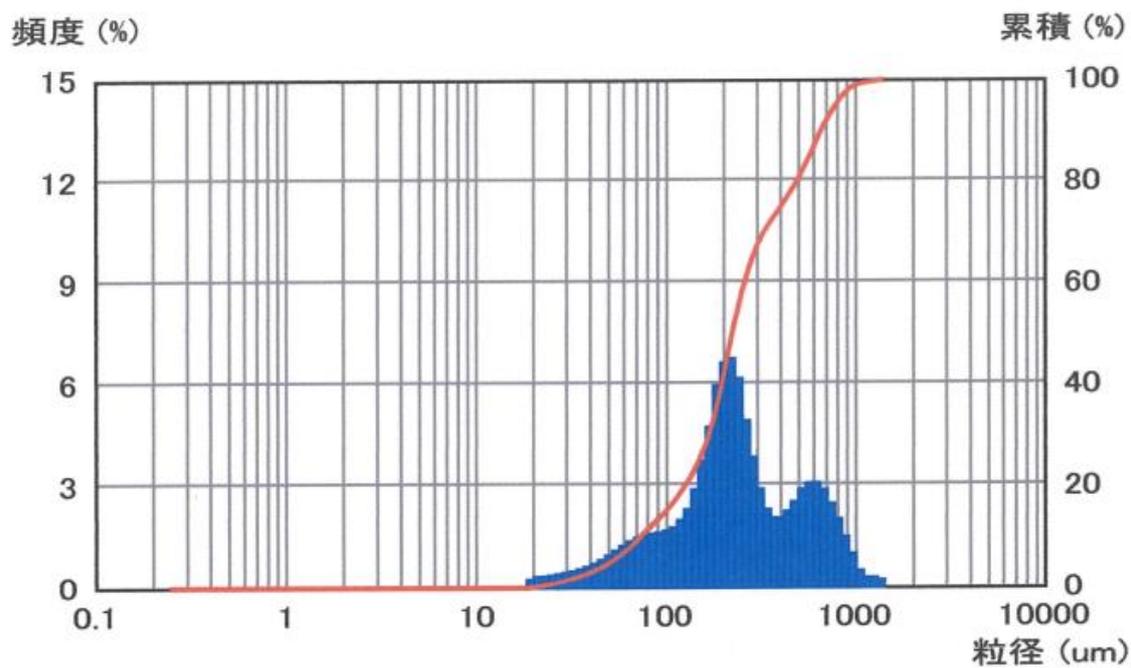


図4 基材として用いる玄米粉の粒度分布

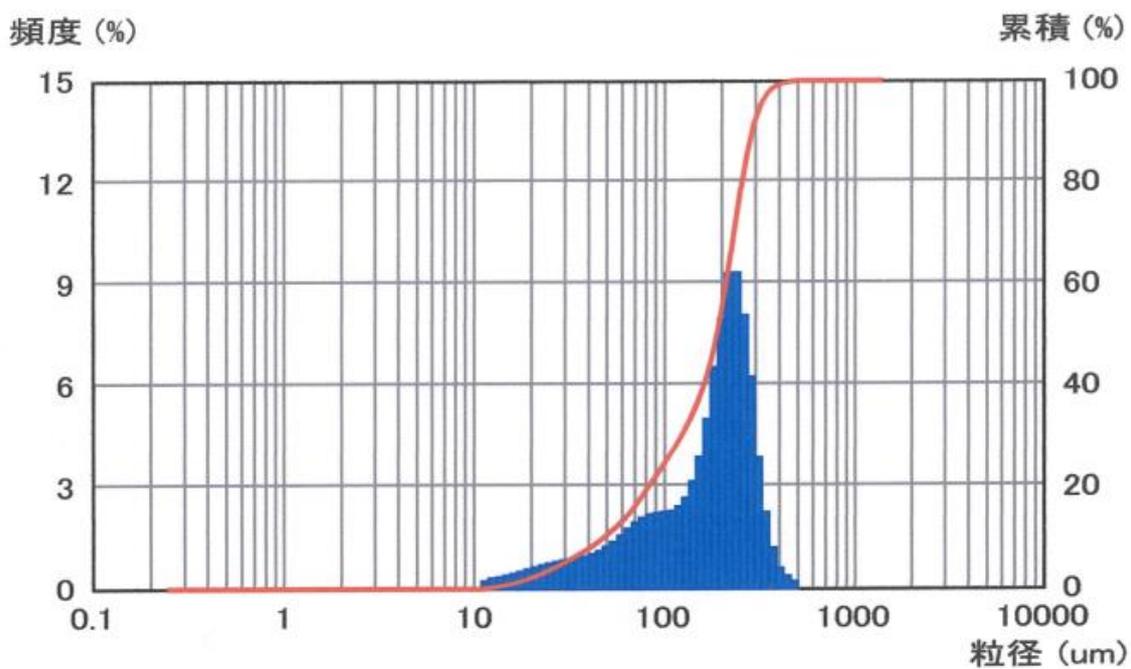
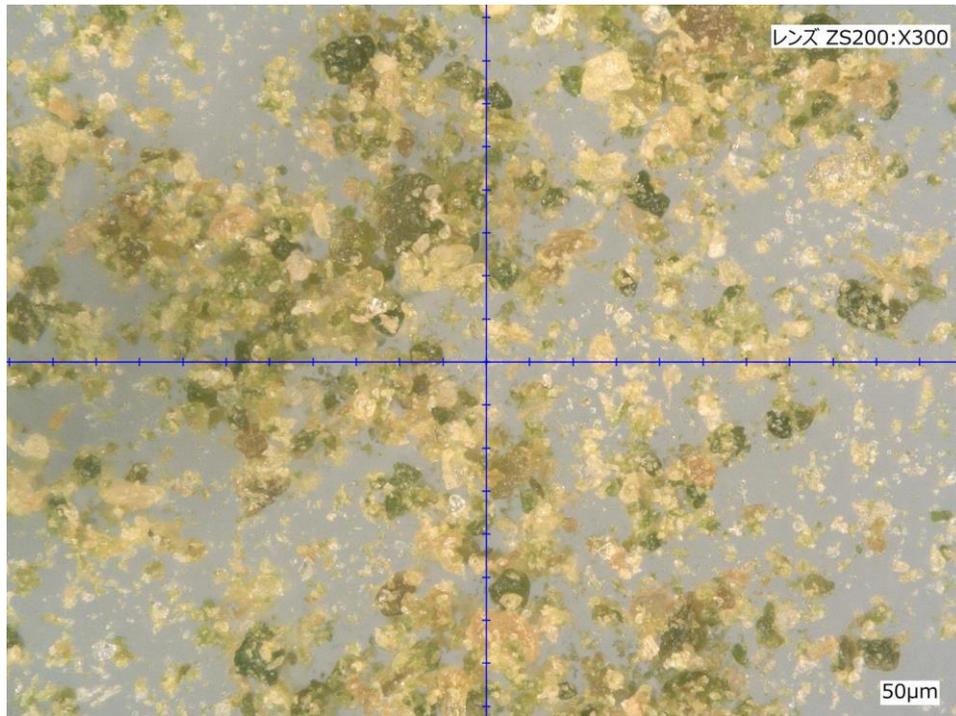


図5 スプレードライヤで作製した残留農薬検査用試料の粒度分布

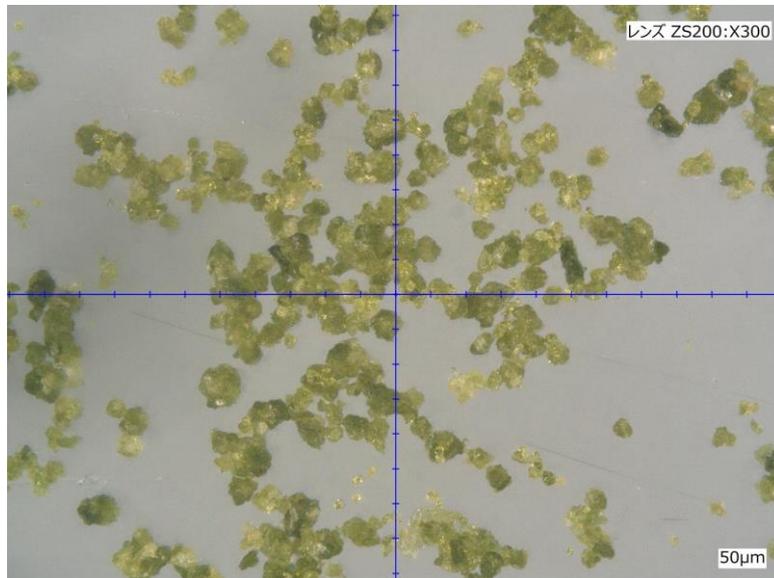


測定倍率 ×300

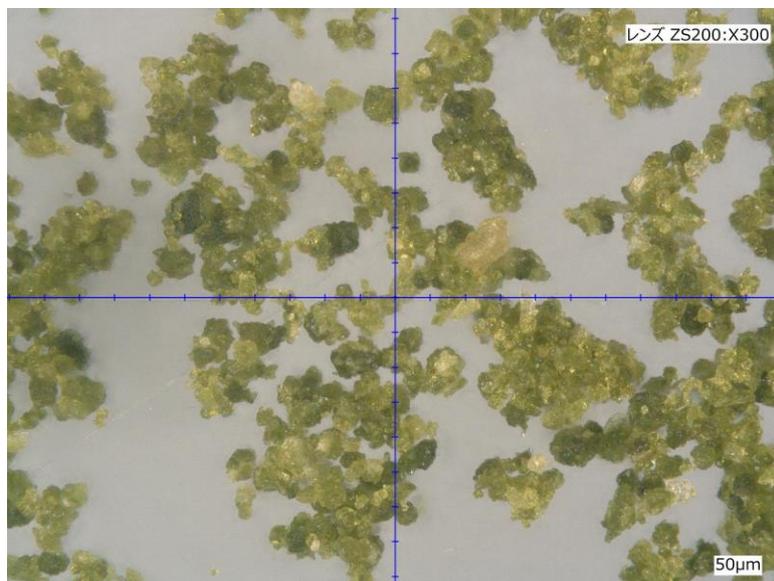
最小目盛 50 μ m

図6 ホウレンソウパウダーの顕微鏡写真

100℃



80℃



測定倍率 ×300

最小目盛 50 μ m

図7 噴霧温度の違いによる顕微鏡写真の比較 (20%アセトニトリル)

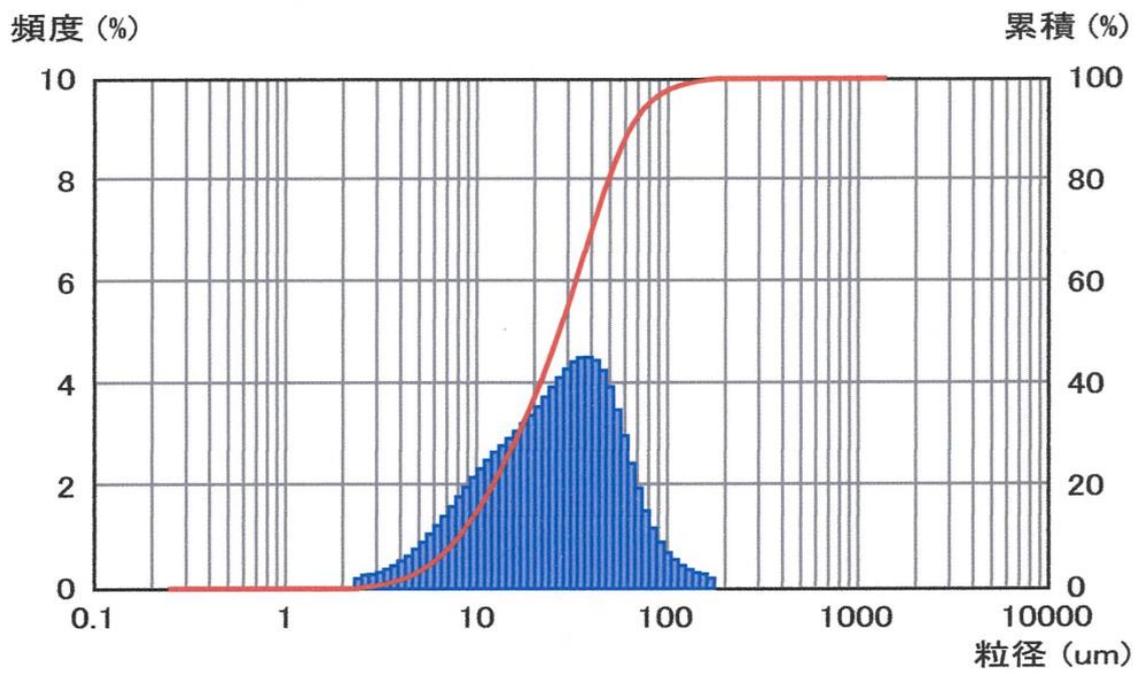


図8 ホウレンソウパウダーの粒度分布

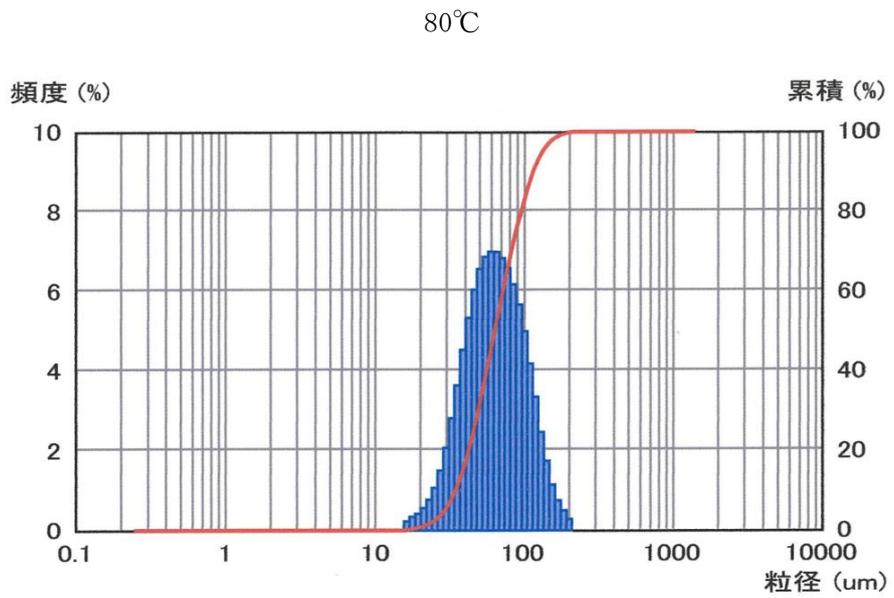
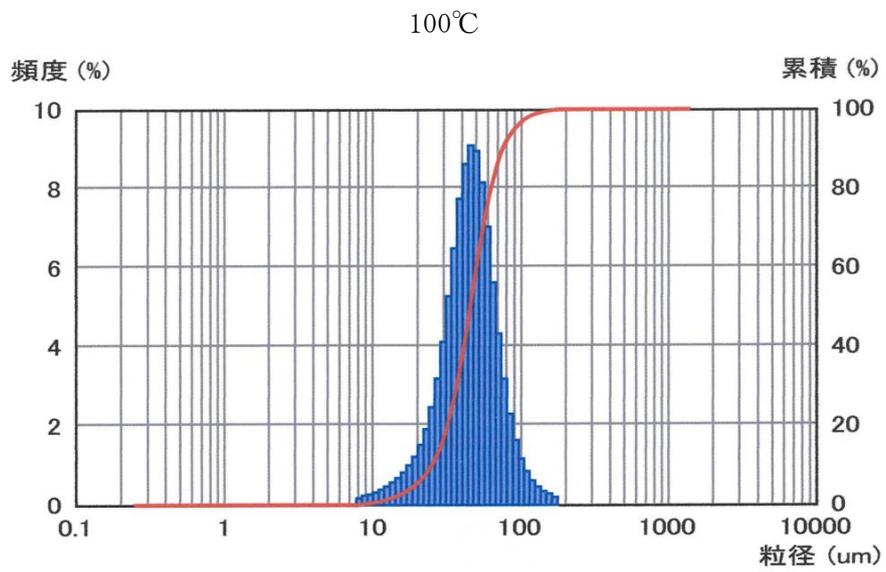
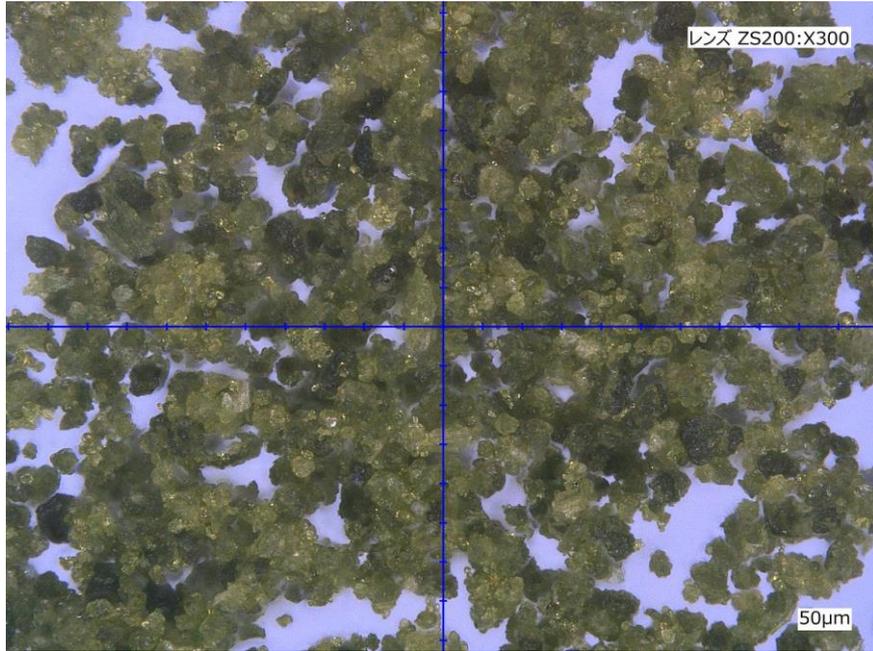
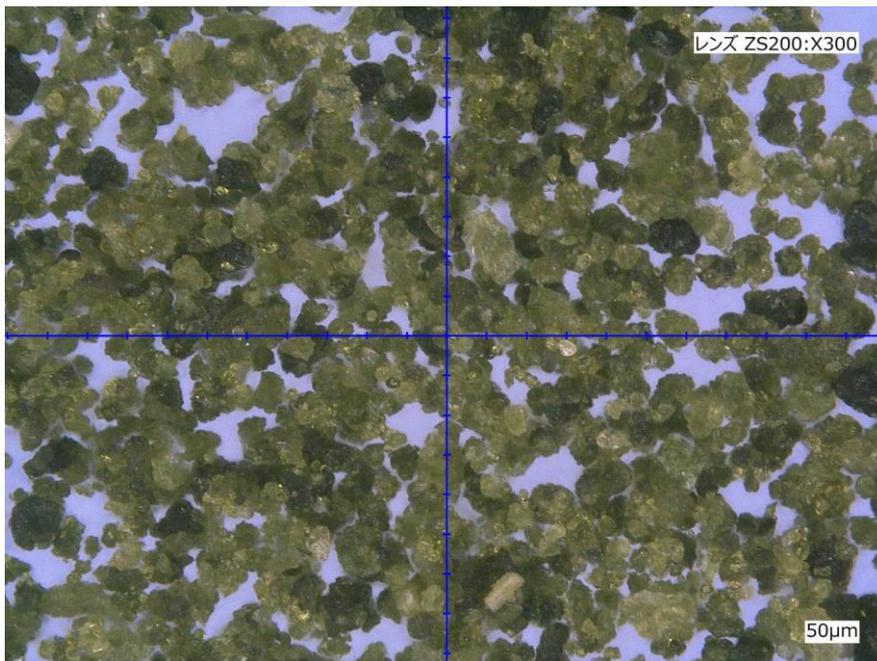


図9 噴霧温度の違いによる粒度分布の比較 (20%アセトニトリル)

100°C



80°C



測定倍率 ×300

最小目盛 50 μm

図10 噴霧温度の違いによる顕微鏡写真の比較 (30%アセトニトリル)

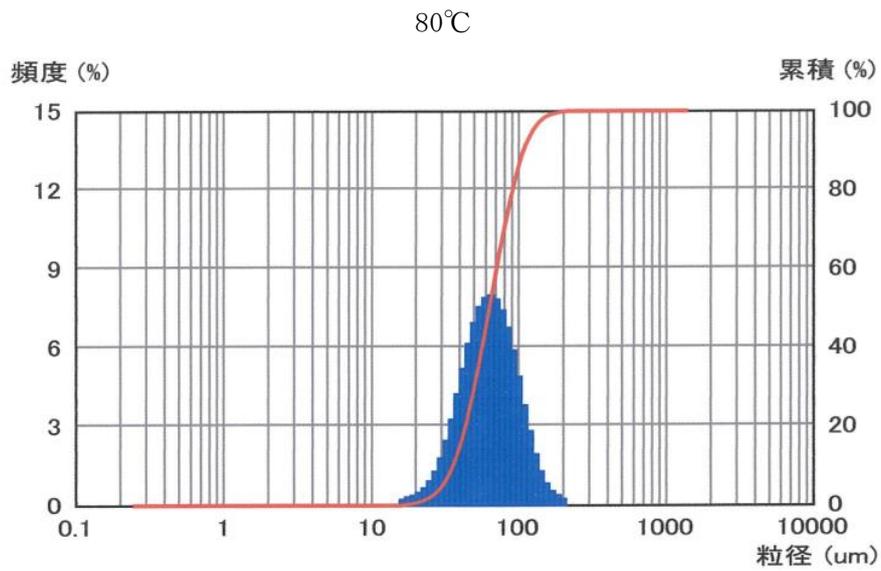
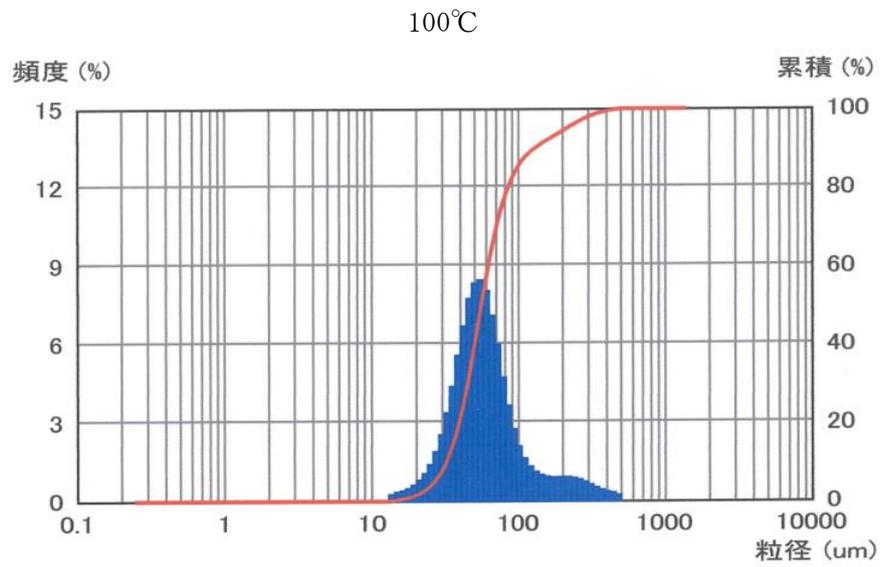


図11 噴霧温度の違いによる粒度分布の比較 (30%アセトニトリル)

令和5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質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。本研究では「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、昨年度の検討結果より食品衛生法において合成樹脂一般を対象とした一般規格の材質試験として、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、溶解溶媒にジクロロメタンを用いてシート状の試料作製を行った。作製容器の材質の検討としては、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（10w/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）。これを各作製容器に流し入れた後、自然乾燥により溶解溶媒を揮発させ、更に減圧乾燥を行い、シート状の試料を得た。得られたシート状試料につき、カドミウム及び鉛の濃度確認を行い、併せて溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存性についても検討した。その結果、いずれのポリマー、作製容器の材質およびシート部位による濃度差はほとんど見られなかった。添加した重金属の回収率は、カドミウムは、ABSシートで82～92%、ASシートで86～88%であった。鉛は、ABSシートで82～90%、ASシートで82～84%であった。理論作製濃度（カドミウム及び鉛各50 µg/g）に対していずれの重金属も80%以上の回収が

得られた。溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存率は、ABSシートで約1~2%であり、ステンレスバットの方が低い傾向であった。一方、ASシートでは約7~8%でABSシートと同様にステンレスバットの方が低い傾向を示した。また、重金属の濃度と溶解溶媒残存率との関係性をみたところ、明らかな相関性はみられず、理論上懸念される「溶解溶媒残存率が高い方が添加した重金属濃度が低くなる傾向」はなかった。今後は、パイロットスタディとして外部精度管理調査研究に必要な試料数の作製実現性を検討することとした。

A. 研究目的

厚生省告示第370号で規定される器具及び容器包装に関する規格基準には、「A 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料一般の規格」、「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」、「E 器具又は容器包装の用途別規格」及び「F 器具及び容器包装の製造基準」があり、この中でも「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」の合成樹脂製器具・容器包装の全合成樹脂に共通して規定される材質試験としてのカドミウム及び鉛の規格に着目した。昨年度の検討では、ABSペレット及びASペレットを用いてシート状試料の作製を試みた。ポリマー含量を変えることでポリマーの溶解に用いる有機溶媒（以下、溶解溶媒）残存率の低減化や作製容器の材質を選択することで外観上良好なシート試料の作製ができた。今年度はこれらの昨年度の結果から各ポリマーのシート状試料作製、作製容器内（1シート内）のカドミウム及び鉛の均質性確認、並びに残留溶媒測定を行った。

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、テフロンコーティングバット（外寸18.5 cm×14.0 cm×2.7 cm、オオモリ、以下、テフロンバット）及びステンレス製バット（外寸21.7 cm×17.6 cm×3.0 cm、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）、セラミックガラス板（アズワン）及び垂平器を用いた。

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）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

において、東京理化学器械製真空定温乾燥器 (VOS-310C) を用いた。

3. 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。ポリマー溶液をテフロンバット及びステンレスバットの作製容器にそれぞれ分注した後、ろ紙 (1枚) 及びセラミックガラス板の順で作製容器を覆い、局所排気装置内で自然乾燥により溶解溶媒を揮発させ、作製容器から取り出し、1枚のシート状の調査試料を作製した (理論作製濃度カドミウム及び鉛各50 µg/g)。

なお、昨年度の結果より、全体質量に対するポリマー質量の割合は、10w/w%とし、作製用容器への分注量は、ポリマー相当量として25 gとなるように分注した。また分注した作製容器は垂平に静置できるよう予め確認・調整した。シート状試料作製後は恒量 (秤量前後の質量差0.1w/w%以下) となるまで自然乾燥 (室温) し、それ以降はデシケータ (シリカゲル) 及び真空定温乾燥器を用いて減圧下で3回乾燥 (室温、5 hr/回) 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観察した。

4. 調査試料の作製容器内における濃度確認及び残留溶媒測定

調査試料について、作製容器内におけるカドミウム及び鉛の濃度確認及び残留溶媒測定を外部委託にて実施した。

分析試料は各ポリマー1容器 (1シート) につき $n=3$ (図2、シート状試料を9分画し、その両端と中央を含む) とした。また、カドミウム及び鉛の濃度と残留溶媒量との関係を調べるため、試料採取部位は可能な限り、近接した箇所から行うとした。

5. 材質別作製容器内のカドミウム及び鉛と溶解溶媒 (ジクロロメタン) 残存率の相関性

異なる作製容器の材質2種 (テフロンバット及びステンレスバット) を用いて作製した調査試料について、カドミウム及び鉛と溶解溶媒残存率の相関性を観察した。また、残留溶媒測定における重量分析法とGCによる機器分析法との結果の相関性についても同様に観察した。

(倫理面への配慮)

特定化学物質 (第2類分類) の使用に際し、使用者への暴露、環境への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. 調査試料の作製

得られたシート状試料について、テフロンバットは大きさ約11 cm×約15 cm、ステンレスバットは大きさ約14.5 cm×約18.5 cmであり、厚みは作製容器の材質及

びポリマーの種類に関わらず約1 mmであった。

2. 調査試料の作製容器内における均質性確認試験及び残留溶媒測定

1) 作製容器内におけるカドミウム及び鉛の濃度確認

結果を表1に示す。

分析試料は各ポリマー1容器（1シート）につき3分画（シートの両端と中央を含む3箇所）とし、外部委託先に送付した（ $n=3$ ）。送付の際は、残留溶媒の測定への影響を考慮して1片ずつアルミホイルで包み、チャック付ビニール袋に入れて送付した（常温便）。測定は外部委託先の方法（硫酸を用いた乾式灰化後、ICP-OESによる測定）により行った。測定結果からいずれのポリマー、作製容器の材質、シート部位による濃度差はほとんど見られなかった。回収率は、カドミウムは、ABSシートについて、テフロンバット86～92%、ステンレスバット82～90%、ASシートについて、テフロンバット86%及びステンレスバット86～88%であった。鉛は、ABSシートについて、テフロンバット84～90%、ステンレスバット82～88%、ASシートについて、テフロンバット84%及びステンレスバット82～84%であり、いずれの重金属もASシートの方がばらつきは小さかった。理論作製濃度（カドミウム及び鉛各50 $\mu\text{g/g}$ ）に対していずれも80%以上の回収が得られた。

2) 残留溶媒測定

結果を表1に示す。測定は外部委託先の方法（*N,N*-ジメチルホルムアミドで溶解後、GCによる測定）により行った。ABSシ

ートでは、テフロンバット1.92～2.14%、ステンレスバット1.32～1.80%であったが、ASシートでは、テフロンバット6.90～8.19%、ステンレスバット6.60～7.16%とABSシートと比較してやや高めの結果が得られた。また、いずれのポリマーでもステンレスバットで作製したシート状試料でテフロンバットより低い残存性を示す傾向が見られた。

3. 材質別作製容器内のカドミウム及び鉛と溶解溶媒（ジクロロメタン）残存率の相関性

1) 材質別作製容器内のカドミウム及び鉛と溶解溶媒（ジクロロメタン）残存率の相関性

結果を表1、図3及び4に示す。

材質の異なる作製容器内のカドミウム及び鉛の平均回収率は作製理論濃度の50 $\mu\text{g/g}$ に対して、ABSシートは、ステンレスバッド86%及び84%、テフロンバット90%及び86%、溶解溶媒残存率は、ステンレスバッド1.49%、テフロンバット1.99%であった。同様にASシートでは、カドミウム及び鉛について、ステンレスバッド86%及び84%、テフロンバット86%及び84%、溶解溶媒残存率は、ステンレスバッド6.88%、テフロンバット7.53%であった。残留溶媒はASよりABSの残存が明らかに少なく、作製容器よりもポリマーの性質が影響していることが考えられた。

また、これらについて相関性を確認したところ、ABSシートについて、カドミウム及び鉛の相関係数は0.8832、カドミウム及びジクロロメタンの相関係数は0.6070、鉛及びジクロロメタンの相関係

数は0.5094であった。一方ASシートは、カドミウム及び鉛の相関係数は1.0000、カドミウム及びジクロロメタンの相関係数は0.0416、鉛及びジクロロメタンの相関係数は0.0416であった。カドミウム及び鉛は共通で調製した試験溶液を測定に用いることから、強い相関が認められることは妥当と考えられた。一方、これらの重金属とジクロロメタンの関係性については、負の相関になることが予測されたが今回の測定結果ではABSシートで正の相関が見られた。今回は試料数が少なかつたため、今後は試料数を増やして同様に相関性を確認していく必要があると考えられた。カドミウム及び鉛の相関係数が1.0000になった要因の1つとして、値が揃った結果が多いことが考えられた。

2) 残留溶媒測定における重量分析法とGCによる機器分析法との結果の相関性結果を表2に示す。

ABSシートについて重量分析法では、ステンレス(0.54%)<テフロン(0.58%)、機器分析法では、ステンレス(1.49%)<テフロン(1.99%)と約0.5~2%の範囲でステンレス製の方が低い残存性を示す傾向は同様であった。一方、ASシートは重量分析法ではテフロン(0.61%)<ステンレス(0.64%)、機器分析法では、ステンレス(6.88%)<テフロン(7.53%)と方法の違いで残存量に約10倍の差があった。重量分析法では材質の違いによる差はみられなかったが、機器分析法ではABSシートと同様にステンレス製の方が低い残存性を示す傾向であった。

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を用い、オイル系の標準品を添加し、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シート状試料を作製した。ポリマー含量はいずれも10w/wとした。

シート状試料のカドミウム及び鉛の濃度確認を行った結果、1シート内は部位による濃度差はほとんど見られなかった。ASシートの方がばらつきは小さかったが、いずれのポリマーも80%以上の回収が得られ、全体的に良好な結果が得られた。残留溶媒測定では、ABSシートでは1.32~2.14%であったが、ASシートでは6.60~8.19%とやや高めの結果であった。また、いずれのポリマーにおいてもステンレスバットで作製したシート状試料の方が低い残存性を示す傾向が見られた。

以上より、今後は、ポリマーはABSペレット、ポリマー含量は10w/w、作製に用いる容器はステンレスバットとし、パイロットスタディを実施する際の試料必要量のスケールで作製の実現性を検討する。溶解溶媒の自然乾燥後は、室温下で減圧乾燥することによりシート状試料を作製し、作製容器間のばらつきを検討する。また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を統計学的手法により行い、パイロットスタディの実

施を計画する。

F. 健康危険情報

ポリマーの溶解溶媒に特定化学物質（第2類物質）である、ジクロロメタンを使用した。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

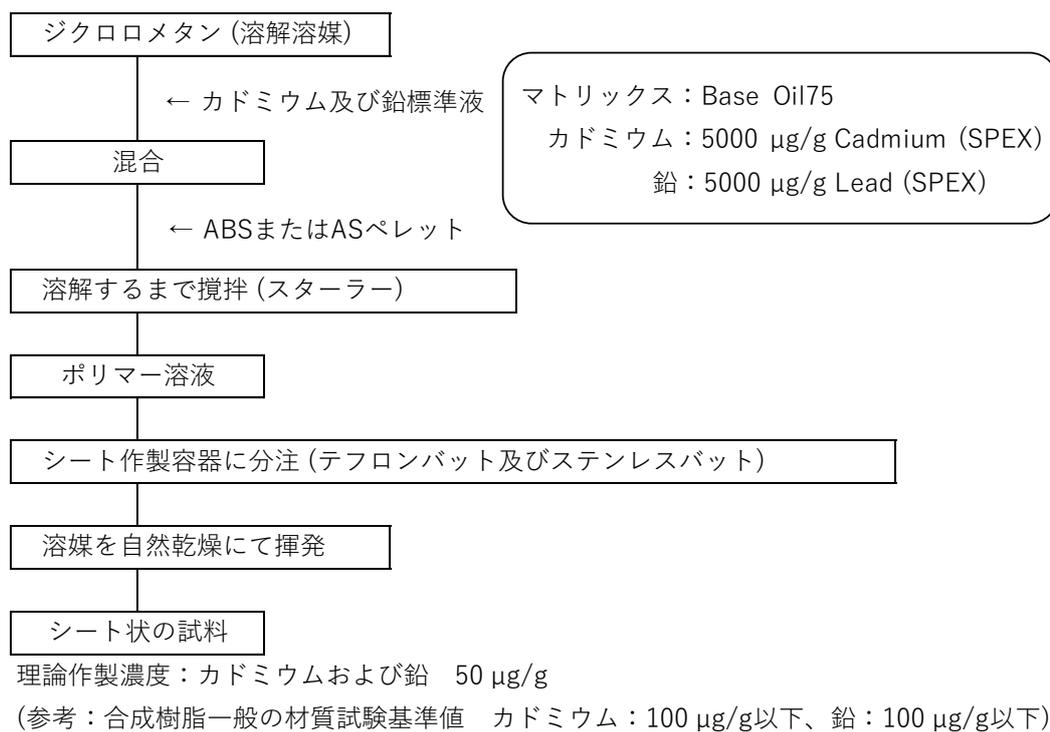


図1 シート状試料の作製法概要

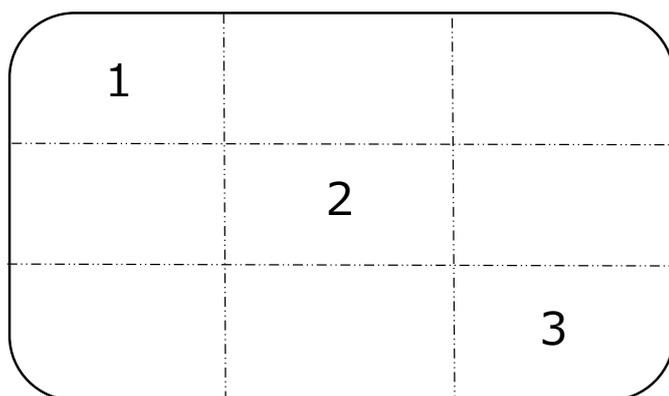


図2 シート状試料の分画および測定部位

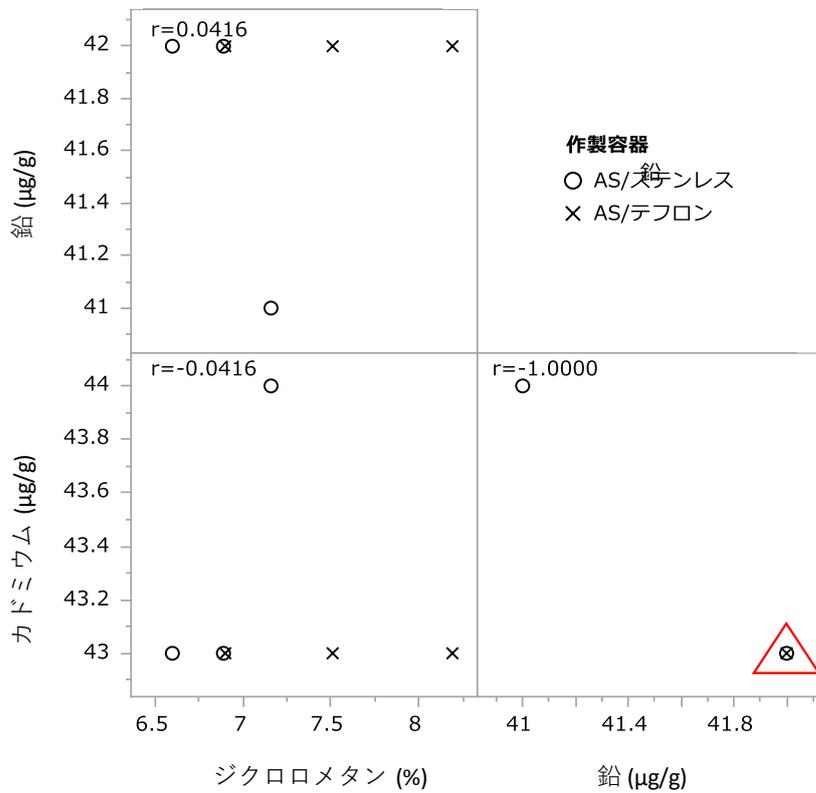


図4 材質別作製容器内のカドミウム及び鉛と溶解溶媒残存率の相関性 (AS)

△：5データ該当

内訳：AS/ステンレス、カドミウム：43、鉛：42 → 2データ

AS/テフロン、カドミウム：43、鉛：42 → 3データ

表1 材質別作製容器内のカドミウム及び鉛濃度と溶解溶媒（ジクロロメタン）残存率の相関性

	1	2	3	平均値	標準偏差	相対標準偏差 (%)
ステンレス	Cd (µg/g)	45 (90)	41 (82)	43 (86)	2.0	4.7
	Pb (µg/g)	44 (88)	41 (82)	42 (84)	1.5	3.6
	ジクロロメタン (%)	1.80	1.34	1.49	0.272	18.2
ABS	Cd (µg/g)	43 (86)	46 (92)	45 (90)	1.7	3.8
	Pb (µg/g)	42 (84)	45 (90)	43 (86)	1.5	3.5
	ジクロロメタン (%)	2.14	1.92	1.99	0.127	6.4
ステンレス	Cd (µg/g)	43 (86)	44 (88)	43 (86)	0.58	1.3
	Pb (µg/g)	42 (84)	42 (84)	42 (84)	0.58	1.4
	ジクロロメタン (%)	6.89	6.60	6.88	0.280	4.1
AS	Cd (µg/g)	43 (86)	43 (86)	43 (86)	0	0
	Pb (µg/g)	42 (84)	42 (84)	42 (84)	0	0
	ジクロロメタン (%)	7.51	8.19	7.53	0.645	8.6

カッコ内の数値は理論作製濃度50 µg/gに対する割合、百分率

シートNo.1、3：作製容器の端

シートNo.2：作製容器の中央

表2 残留溶媒 (ジクロロメタン) 測定における重量分析法と機器分析法の相関性

	ABS		AS	
	重量分析法 ^{*1}	機器分析法 ^{*2}	重量分析法 ^{*1}	機器分析法 ^{*2}
ステンレス	0.54	1.49	0.64	6.88
テフロン	0.58	1.99	0.61	7.53

*1：1シートの測定値 ($n=1$)

*2：3分画につき各 $n=1$ で測定した平均値 ($n=3$)

令和5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
ー特定原材料検査(卵)技能試験プログラムのパイロットスタディ(3)ー

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

研究要旨

食の多様化に伴い、国民の罹患する食物アレルギーのアレルゲンは変化しており、食品表示における特定原材料の規定も現状にあったものへと変更されている。

食品衛生検査施設等においては食品中の特定原材料を検出するために ELISA 法によるスクリーニング試験を行っている。ELISA 用キットは通知法に準拠しているが、個々の施設が適切な技能を有しているかの確認を行うため、外部精度管理が求められている。

外部精度管理調査において使用する試料として、市販食品から調製した実試料 (incurred sample) を用いる場合、より実際の検査試料に近い検体を提供できる反面、特定原材料の添加状況は不明で、ロット間差等の情報もないため、試料の調製に時間を要する。本研究では昨年度調製した実試料と従来実施している基材に特定原材料を添加し、調製する試料の2種類を外部精度管理調査研究の調査試料とし、パイロットスタディを行った。

参加 22 機関は 2 種の試料について特定原材料である卵について ELISA 法による測定を行った。各機関からの報告値は試料毎および測定キット毎にまとめ、メジアン・クリーニング (MC) に続いてロバスト方式により統計値の算出を行った。得られた数値から $Xbar-R$ 管理図を代用した解析および z -スコアの算出を実施した。

本研究において、MC により除外された機関は認められなかった。 $Xbar$ 管理図においては管理限界線の範囲を超える機関は認められず、 R 管理図では管理限界線を超える機関は全体で延べ 2 機関が認められた。また、 z -スコアの絶対値が 3 以上となる機関は全体で 1 機関が認められた。

実試料と従来法で作製した試料はともに、均質性および試験期間中の安定性が確認された。また、回収したデータにおいては両試料ともに各キットにおける標準偏差および相対標準偏差に大きな差は認められず、解析結果についてもほぼ等しい結果となった。したがって、今回供試した実試料は、外部精度管理調査の試料として問題がないことが示唆された。

A. 研究目的

日本における食の多様化に伴い、もともとの文化である和食から洋食が日常的となった。また、外食や持ち帰りにより、自分たちで調理をしない食事が当たり前となり、調理済みの食品の購入や、弁当等を利用する中食という概念も広がっている。

食の形態のみならず、実際に国民が摂取する食物も常に新しい品種が市場へ紹介され、多岐にわたっている。近年の食物アレルギーの症例に関する統計では、国民の食生活の変化がよくわかる結果となっており、それに合わせて、2023年には特定原材料に「くるみ」が追加された。さらに、2024年3月には特定原材料に準ずるものから「まつたけ」が削除され、「マカデミアナッツ」が登録された。しかしながら、卵、牛乳、小麦については食物アレルギーの症例調査において常に上位を占めており、これらの食物が多くの人に摂取されていることが推察できる。特にこれらの3品は市販の加工食品によく使用されていることから、我々の調査研究においても食品衛生検査施設等の試験実績において常に上位を占めている。

特定原材料検査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「アレルギーを含む食品の検査方法」に記載されているように、通知法に準拠したELISAキットを用いてスクリーニングを行うこととなっている。スクリーニング試験であるので、陽性検体の取りこぼしが起こることは避けなければならない。

キットのロット間差については、各施設で確認することは可能であるが、施設間差についての確認は難しい。

そのため外部精度管理調査により他施設と

の技能の比較を行い、必要に応じて手技の見直しを行うことは重要である。

我々がこれまで行ってきた外部精度管理調査に関するパイロットスタディでは、特定原材料不含の基材に、標的となる特定原材料を添加し、均質性の確認された試料を用いてきた。実際の検査では、検体となる市販食品の多くは熱や圧力等により加工されており、特定原材料の種類によってはこの工程で特性が変わることはこれまでに報告されている。このため実試料市販食品から調製した実試料 (incurred sample) を用いての外部精度管理調査は実際の試験状況に即していると考えられる。

本研究では、昨年、市販食品から調製し、均質性を確認させた実試料¹⁾を調査試料の一つとして供試し、比較として従来通りに特定原材料不含基材に特定原材料を添加して調製した試料を加え、外部精度管理調査のパイロットスタディを実施した。

B. 方法

1. 試薬及び食品

タンパク質含量の測定は、2-D Quant Kit (Cytiva) を用いた。

従来法で調製する試料には、基材にイチゴジャム (ソントン) を使用した。これに添加する特定原材料には、卵として乾燥全卵 (乾燥全卵 No.1、キューピータマゴ) を使用した。

また、昨年度調製した実試料はコールスロードレッシング (乳化液状ドレッシング、以下ドレッシング) から調製を行い、特定原材料は卵であった¹⁾。

2. ELISA 法

1) ELISA キット

特定原材料である卵の検出には、通知法に準拠した ELISA キットを使用した。

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、プリマハムキット]

2) 試験操作

ELISA 法は各キットの取扱説明書に従い実施した。

吸光度測定および濃度計算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.) を用いて行った。

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

基材のイチゴジャムは、ELISA 法により、標的タンパク質である卵が検出限界 (基材中 0.31 $\mu\text{g/g}$) 以下であることを確認した。

2) 添加用タンパク質の調製

i) 添加用卵タンパク質の調製

乾燥全卵を精製水と 1:3 で合わせ、均一になるよう十分懸濁し、これを添加用卵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のタンパク質

含量は、2-D Quant Kit により測定した。測定値から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 (従来法による試料)

基材に卵タンパク質を加え、ることで、従来法による試料を作製した。基材であるイチゴジャム中のタンパク質量が卵総タンパク質相当で 10.0 $\mu\text{g/g}$ となるように添加用卵タンパク質調製液を添加し、ロボ・クープブリクサー 5 プラス(エフ・エム・アイ)を用いて均質化した。

作製した試料は小分けにし、 -20°C で凍結保存して、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. 市販品から調製した外部精度管理調査試料 (実試料)

外部精度管理調査試料として供試する市販品から調製した実試料には、昨年度の厚労科研費で卵含有ドレッシングから調製した試料¹⁾を用いた。

品質評価試験として均質性についてはすでに確認済みであったことから、本年度は安定性試験のみを行った。

5. 品質評価方法

品質評価として従来法による試料については均質性および安定性の確認を、実試料については安定性の確認を行った。均質性試験および安定性試験は「2. ELISA 法」に記載の卵検出用キット 3 種類を用いて実施した。

従来法による試料の均質性確認は、試料送付前 (試料作製後 1 か月以内) に行った。調製した試料のうち 10 容器からサンプリングを行い、各サンプルについて $n=2$ で ELISA 法

により卵タンパク質濃度を測定した。均質性の評価は IUPAC に従った²⁾。使用した 3 キット中 2 キットで均質であった場合に試料が均質である、と判断した。

安定性試験については従来法による試料では調査期間終了後に $n=4$ で試料を測定し、各キットについて均質性試験における卵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。実試料については調査期間の前後に各 $n=4$ で試料を測定し、各キットについて調査期間前の卵タンパク質含有量に対する調査期間後の数値を計算し、安定性を評価した。

なお、使用したキットはすべて使用期限内であり、従来法による試料の均質性試験と安定性試験および実試料の安定性試験ではメーカーごとに同じロットを用いた。

6. 外部精度管理調査の実施

調査に参加した 22 機関には調査試料 [実試料 (ドレッシング): 試料 1、従来法による試料 (イチゴジャム): 試料 2] と実施要領を宅配便 (冷凍) で送付した。

測定は、通知法に従い、「2. ELISA 法」に記載の卵検出用 3 キットのうち、任意の 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) に従うこととした。試験は 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。各機関の試験結果は試料送付後、約 1 か月後を提出期限とした。

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」、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、「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」と述べられている。したがって、参加機関からの報告値は、試料別、測定キット別に前出のロバスト方式による平均値、標準偏差(SD) および相対標準偏差 (RSD) を算出した後、これらを付与値として解析を行った。

データ解析は、1)メジアン±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)、2) Huber の proposal 2^{2,3)} 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] による、各種統計量の算出、3) $Xbar-R$ 管理図を代用した方法と z -スコアによる方法を用いた評価、の 3 ステップを実施した。

また、 $Xbar$ 管理図の管理限界線の値は [ロバスト平均値±ロバスト平均値の 30%] とした。 z -スコアはロバスト方式による平均値および SD を用いて算出した。

また、参加機関から回収したアンケート結果のまとめも行った。

(倫理面への配慮)

基材、添加特定原材料ともに食材であるが、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

調査試料の均質性試験結果は表 1 に示した。

昨年度実施した試料 1 の均質性試験結果はキット間差が認められる結果となっている (モリナガ: $10.79 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$ 、日本ハム: $9.51 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$ 、プリマハム: $7.22 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$)。

試料 2 では、モリナガキットで最も低い含有量 ($7.79 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$) を示し、日本ハムキットとプリマキットではほとんど同じ結果となった (日本ハム: $9.27 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ 、プリマハム: $9.20 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$)。

一般的にキットの反応性の差は標的抗原の違い、または基材の影響によるものと考えられる。また、試料 1 では加工の影響による可能性も考えられたが、詳細については不明である。

試料の均質性については、試料 1 及び試料 2 ともにすべてのキットにおいて均質であるとの結果が得られた。したがって、両試料は均質であると判断した。

調査期間中の試料の安定性の結果は表 2 に示した。調査試料送付前の結果を 100 % としてそれぞれのキットについて算出した結果、試料 1 は 99.4~110.0 %、試料 2 は 101.3~103.9 % であり、どちらの試料についても調査期間中、安定であったと判断した。

2) 外部精度管理調査結果

参加 22 機関からの報告値を試料別かつ測定キット別に統計解析を行った

結果は表 3 に、データ分布は図 1 に示した。ほとんどの機関では通知法に記載の通り 2 キットについて試験を行っていたが、1 機関は

1 キットのデータだけを提出した。

モリナガキットを使用したのは 22 機関、日本ハムキットは 21 機関、プリマハムキットを使用した機関はなかった。

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および安定性試験の平均値と近い値を示した。また、測定値による RSD は、試料 1 では 6.33~7.90 %、試料 2 では 7.38~8.95 % であり、試料間、キット間ともに大きな差は認められなかった。

3) キット別集計結果

(1) モリナガキット

モリナガキットを用いて測定した 22 機関のデータにより算出された統計量を表 4 に示した。また、報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 2 に、試料 1 および試料 2 の結果および評価一覧を表 5 および表 6 に記載した。

a) 試料 1 の解析結果

モリナガキットによる試料 1 の測定では、MC で除外された機関は認められなかった。全機関の平均値は $11.89 \pm 0.94 \mu\text{g/g}$ (RSD 7.90 %) であった。 \bar{X} 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが、 R 管理図で上部管理限界線を超えた機関は 1 機関 (機関番号 14) 認められた (表 5、図 3)。この機関は同キットの試料 2 (表 6)、日本ハムキットの試料 1 および試料 2 (表 8 および表 9) では $R=0.47 \sim 0.62$ と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 以上の機関は認められなかった [表 5、図 5 a)]。

b) 試料 2 の解析結果

モリナガキットによる試料 2 の測定では、MC で除外された機関は認められなかった。

全機関の平均値は $8.60 \pm 0.63 \mu\text{g/g}$ (RSD 7.38 %) であった。 $Xbar$ 管理図で管理限界線を超えた機関はなかったが、 R 管理図で上部管理限界線を超えた機関は 1 機関 (機関番号 9) 認められた (表 6、図 4)。この機関は同キットの試料 1 (表 5)、日本ハムキットの試料 1 および試料 2 (表 8 および表 9) では $R=0.01 \sim 0.39$ と低値であったことから、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 以上の機関は認められなかった [表 6、図 5 b)]。

(2) 日本ハムキット

日本ハムキットを用いて測定した 21 機関のデータにより算出された統計量を表 7 に示した。また、報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 6 に、試料 1 および試料 2 の結果および評価一覧を表 8 および表 9 に記載した。

a) 試料 1 の解析結果

日本ハムキットによる試料 1 の測定では、MC で除外された機関は認められなかった。全機関の平均値は $9.65 \pm 0.61 \mu\text{g/g}$ (RSD 6.33 %) であった。 $Xbar$ 管理図および R 管理図で管理限界線外となった機関は存在しなかった (表 8、図 7)。

z -スコアの絶対値が 3 以上の機関は 1 機関 (機関番号 5) 認められた [表 8、図 9 a)]。当該機関は検量線 [図 15 c)] に異常は認められず、報告値付近の検量線における RSD は 2~3 % 程度、当該機関が提出した 2 つの報告値における 3 ウェル間の RSD は 1.13 % および 0.99 % と十分に小さい値を示した。また、同じキットで測定した試料 2 においても全機関中、最も高い報告値を示したが、 $|z\text{-スコア}|$ は 2 未満であった (表 9)。モリナガキットにおいては試料 1、試料 2 とも $|z\text{-スコア}| < 0.3$ とほぼ

平均に近い値を示し、問題は認められなかった (表 5 および表 6)。したがって、当該機関では日本ハムキット、特に試料 1 において z -スコアが高くなる傾向が認められたが、原因については不明であった。

b) 試料 2 の解析結果

日本ハムキットによる試料 2 の測定では、MC で除外された機関は認められなかった。全機関の平均値は $9.29 \pm 0.83 \mu\text{g/g}$ (RSD 8.95 %) であった。 $Xbar$ 管理図、 R 管理図および z -スコアのいずれにおいても管理限界線の機関は認められなかった。 [表 9、図 8、図 9 b)]

(3) プリマハムキット

本研究でプリマハムキットを用いた機関はいなかった。

(4) キットのロットと報告値について

使用キットのロットと報告値の関連については図 10 に示した。今回の外部精度管理調査研究では、モリナガキットにおいて 10 ロット、日本ハムキットにおいて 4 ロットが使用されていた。また、すべての機関はキットの使用期限内に試験を実施していた。

モリナガキット [図 10 a)] においては 1 機関のみが使用したロットは 6 ロット、2 機関が使用したロットは 2 ロットであった。したがって、各ロットにおいて得られた報告値が少なかったことから、ロット間差を比較することは難しいと考えられた。しかしながら、いずれのロットを用いた場合でも、試料 1 の報告値は試料 2 の報告値よりも高い値を示していた。

日本ハムキット [図 10 b)] では 1 機関のみが使用したロットは 2 ロット認められた。複数ロットを使用した 2 ロット (ロット番号の末尾 2 桁が 80 および 81) については顕著なロット間差は認められなかった。また、各ロットにおいて

試料 1 と試料 2 はほぼ同じ値を示していた。

(5) 検量線について

本調査研究では、参加機関が任意のロットを使用してデータの提出を行った結果、前出のように本年度はモリナガキットで 10 ロット、日本ハムキットで 4 ロットが使用された。

モリナガキットおよび日本ハムキットの全検量線を図 11 および図 12 に示した。また、各キットにおいて本調査研究で使用されたロットの情報は表 10 および表 11 に、各キットのロット別の検量線のグラフは図 13 および図 14 に示した。

モリナガキットではロットは多いがロット間差は特には認められなかった。上方で 95 %信頼区間外となった機関番号 19 と上方でかろうじて 95 %信頼区間内となった機関番号 16 については日本ハムキットの検量線においても他機関より吸光度が高く、機関番号 19 は最高濃度で上方の 95 %信頼区間とほぼ同じ値を示し、機関番号 16 では検量線全体が上方の 95 %信頼区間外となった。両機関は今回の調査研究において検量線の吸光度が他機関よりも高値を出す傾向にあった。しかしながら、両機関ともすべての試験系において $|z\text{-スコア}|$ は 2 未満であったことから、試験操作に問題はなないと考えられた。

また、モリナガキットの試料 1、日本ハムキットの試料 1 および試料 2 において $z\text{-スコア}$ がすべての機関の最低値を出した機関番号 20 ($|z\text{-スコア}|$ は 3 未満) ではどちらのキットにおいても検量線は 95 %信頼区間内にあった。線形は日本ハムキットでは最高濃度でやや低くなる傾向にあったが、報告値に関わる濃度域では問題は認められなかった。

検量線の線形は測定値に関わるため、背景データを比較して、明らかに異なる線形を示す

場合には、結果の判定に注意し、随時再試験を行うことが重要と考える。

(6) 報告値の相関性

a) 同一キットにおける試料間の報告値の相関性

各キットにおける試料 1 と試料 2 の報告値の相関を図 15 に示した。その結果、モリナガキットで 0.521 と中程度の相関が、日本ハムキットでは 0.831 と強い相関が認められた。また、モリナガキットではすべての機関において試料 1 は試料 2 よりも高い値を示した。日本ハムキットでは 3 機関以外はすべての機関で試料 1 は試料 2 よりも高い値を示したが、強い相関に表れているように、確率楕円がほぼ $y=x$ に沿って伸びており、各機関における試料 1 と試料 2 の報告値は近い値であった。また、2 機関が 95 %確率楕円を外れていた。

b) 同一試料におけるキット間の報告値の相関性

各試料におけるモリナガキットと日本ハムキット間の報告値の相関を図 16 に示した。試料 1 では相関係数が 0.131 でほとんど相関は認められなかったが、1 機関を除くすべての機関においてモリナガキットの報告値は日本ハムキットの報告値よりも高い値を示した。試料 2 では 0.237 と中程度の相関を示し、3/4 程度の機関において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も高い値を示した。また、どちらの試料についても同じ 1 機関 (機関番号 20) を除き、すべての機関が 95 %確率楕円内に位置していた。

この確率楕円から外れた機関は同一キットにおける試料間の相関性を見た日本ハムキットの相関図においても確率楕円から外れていた。当該機関は $Xbar$ 管理図および $z\text{-スコア}$ において外れ値ではなかったが、モリナガキッ

トで測定した試料 1、日本ハムキットで測定した試料 1 および試料 2 の結果でそれぞれ全期間中、最低値を示した。評価としては問題がなかったが、測定結果が恒常的に低値を示すと、陽性検体を偽陰性として検出する可能性が考えられることから、手技、使用機器の精度等の再確認が勧められる。

4) 検査手法のまとめ

各参加機関が検査に用いた手法を表 12 および表 13 に示した。担当者の経験年数は複数回答を行った 7 機関中 6 機関で、経験年数が 0 年の担当者がいた。これにより、例年通り、各機関では、経験の少ない担当者による手技の確認を積極的に行っていると考えられた。

検査手法では ELISA 法のための試料調製において全機関が振とう機による抽出および遠心分離を実施していたが、ろ過を行っていたのは 22 機関中 16 機関であった。抽出液等の希釈操作は全機関が手動で作業を行っていた。検量線の近似曲線の計算はすべ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を使用していた。

天秤の校正はすべての機関で頻度の差はあるものの実施していたが、ピペットについては校正を行わない機関があった。これらの機関においては他機関と比較して明らかに z -スコアがすべて低値、または高値、ウェル間の相対標準偏差が高いなどの事象が認められた場合は、ピペットの自家点検等を行い、精度を確認する必要があると考えられた。

個々のキットの操作方法では、本研究で使用されたモリナガキットと日本ハムキットの操作方法に大きな違いはなく、抽出から測定までの期間はいずれも 0 日 (抽出当日使用) がほとんどで、次に 1 日保存となっていた。抽出翌日 (1 日保存) に試験を行った機関は、すべて抽

出液を冷蔵保管していた。また、抽出から 4 日後に試験を行った機関では抽出液を冷凍保存していた。1 日以上保存を行った各機関の $|z$ -スコア| はすべて 3 未満であり、各機関は抽出から測定まで抽出液を適切に管理していたと考えられた。

操作法全般を通して、 $Xbar$ 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。

5) 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 (2022 年度) を表 14 および表 15 に示した。

検査項目については、卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類 (えび、かに) の特定原材料 6 種中、昨年度の実績が 0 種類から全種類 (6 種類) の機関数は 1~6 機関で、全 6 種について試験を行ったのは 6 機関であった。

回答のあった 20 機関における ELISA 試験の総実施件数は 25,600 件ほどで、うち卵、乳、小麦がそれぞれ全体の 20% 程度を、そば、落花生、甲殻類がそれぞれ 12~13% 程度を占めていた。これらは例年の結果と大きな変化はなかった。

ELISA 法による試験において、陽性と判定された試験数は 2040 試験 (8.0%) であり、総試験数に対する比率は昨年と同じであった。また、6 種中もっとも陽性率が高かったのは小麦で、試験数 5206 件に対し 17.0% が陽性であった。

確認試験としては 43 試験が行われており、甲殻類に対する確認試験が 16 試験ともっとも多く、次いで小麦の 9 試験であった。確認試験において陽性となった検体は各項目について 1~3 検体であった。

2. 外部精度管理調査試料としての実試料

外部精度管理調査試料として市販食品を用いる場合、市販食品は加工工程を経ており標的たんぱく質が変性している可能性があり、また、ロット間差の問題や多くは複数の材質の組み合わせであることなどから、均質に調製することは、単に基材へ標的タンパク質を添加した試料を調製するよりも困難であることが予想される。一方で、実際の検査業務の検体に近い試料であることから、実務における施設間差を検討する外部精度管理の試料としてはより適切であると考えられる。

安定した試料という点では検出対象である特定原材料の添加量がわからない市販食品由来の試料よりも、特定原材料不含の基材に適量の標的タンパク質を添加した従来の試料は、基材の影響を検出しやすく、また、加工工程のないことから、通常は添加した標的たんぱく質自体の極端な変性等は考えにくく、得られた結果は単純に施設間の技能を反映していると考えられる。

本研究で供試した実試料である試料 1 は、前述の通り昨年度、市販食品のドレッシングから調製し、均質性の確保がされている試料である。今回のパイロットスタディでは、均質性試験において実試料である試料 1 の RSD 値が、従来法で調製した調査試料である試料 2 の RSD 値とほぼ同じ値を示した。安定性試験における RSD 値についても同様で、品質に関して実試料は従来法で作製した試料とほぼ同等と考えられた。

また、両試料の解析結果を比較すると以下のようになった。

モリナガキットによる結果では、両試料とも、 \bar{X} 管理図、 z -スコアにおいて不満足の結果を示した機関はなく、 R 管理図ではそれぞ

れ 1 機関ずつが不満足の結果となった (表 5 及び表 6)。 R 管理図で不満足となったのは試料 1 と試料 2 で異なる機関であり、両機関とも他のキットでは問題がなかったことから、偶発的な要因と推察された。また、 z -スコアは、試料 1 では 1 機関を除き、試料 2 ではすべての機関で $|z\text{-スコア}|$ が 2 未満となった。この機関の z -スコアは 2.005 であり、試料 2 で最も高かった別機関の z -スコアが 1.952 であることから、両試料の結果に差は認められないと結論した。

日本ハムキットを用いた試験では試料 1 で 1 機関が $|z\text{-スコア}|$ が 3 以上となった。しかし、その他の機関および試料 2 ではすべての機関で、 z -スコアでの外れ値は認められなかった。また、試料 1 及び試料 2 についてすべての機関で \bar{X} 管理図および R 管理図で外れ値は認められなかった。日本ハムキットにおいて機関番号 20 は両試料で z -スコアが最低値となり、 $|z\text{-スコア}|$ は 2 以上 3 未満を示した。また、機関番号 5 及び機関番号 9 はどちらの試料でも z -スコアが最高値及び次に高い値を示した。両機関ともモリナガキットでは全体の中央に近い z -スコアであることから、両機関は日本ハムキットにおいて高めの結果を出したと考えられ、試料に起因した結果ではないことが推察された。

以上のように、本研究で使用した実試料である試料 1 と従来試料である試料 2 には試験試料としての差はほとんど認められず、実試料は外部精度管理試料として使用可能であることが示唆された。

市販食品を用いた実試料については添加量の情報がないため、複数食品のスクリーニングから実施する必要があり、また、外部精度管理調査試料として配布できるだけの量を

確保するためにロット間差等の確認も必須で、試料調製までに時間がかかる。今回対象となったドレッシングは乳化液状ドレッシングであり、均質化のしやすい形状であったが、現状としては定期的に行う試験の試料として市販加工食品を供試することが困難である。調製方法の効率化が今後の課題と考えられる。

E. 結論

本年度実施した外部精度管理調査に関するパイロットスタディでは、特定原材料として卵たんぱく質を含有した2試料を調査試料として用いた。試料1としては、昨年度、市販食品から調製した実試料 (incurred sample) を、試料2としては従来の方法で気合に卵タンパク質を添加し、作製した試料を採用した。

パイロットスタディでは参加22機関から回収したデータについてMC後、ロバスト方式による統計解析を実施した。解析はキットごとおよび試料ごとに行った。いずれの解析でも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 \bar{X} -R管理図を代用した方法による評価およびzスコアの算出を行った。

その結果、 \bar{X} -R管理図では管理限界線の範囲を超えた機関は認められず、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、zスコアの絶対値が3以上となった機関は全体で1機関であった。

試料1の実試料と試料2の従来法による作製試料について比較したところ、特段の差は認められなかった。

参考文献

1) 渡辺卓穂他、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、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(2023)

2) M. Thompson et al., 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).

3) Analytical Methods Committee, Robust statistics - How Not to Reject Outliers, Part 1. Basic concepts, Analyst, vol. 114, 1693-1697 (1989).

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)若栗忍、渡辺卓穂:アレルギー(卵及び牛乳タンパク質)含有試料を用いた特定原材料検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ、第119回日本食品衛生学会学術講演会、舟堀、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 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	試料 1*			試料 2		
	平均±SD (µg/g)	RSD (%)	均質性	平均±SD (µg/g)	RSD (%)	均質性
モリナガ	10.79±0.26	2.41	均質	7.79±0.14	1.80	均質
日本ハム	9.51±0.15	1.58	均質	9.27±0.20	2.16	均質
プリマハム	7.22±0.11	1.52	均質	9.20±0.14	1.52	均質

SD: 標準偏差、RSD: 相対標準偏差

n=10

* 試料 1 の均質性は昨年度実施

表 2 外部精度管理調査研究試料の安定性試験の結果

試料	キット メーカー	含量(µg/g)		安定性 (%)
		試験前	試験後	
		平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
試料 1	モリナガ	11.85 ± 0.12	11.77 ± 0.18	99.4 ± 1.6
	日本ハム	9.40 ± 0.11	10.00 ± 0.07	106.4 ± 0.8
	プリマハム	6.50 ± 0.08	7.15 ± 0.09	110.0 ± 1.3
試料 2	モリナガ	[7.79 ± 0.14]*	7.89 ± 0.13	101.3 ± 1.7
	日本ハム	[9.27 ± 0.20]*	9.47 ± 0.12	102.2 ± 1.2
	プリマハム	[9.20 ± 0.14]*	9.56 ± 0.11	103.9 ± 1.1

SD: 標準偏差

n=4

* 試料 2 は均質性の値を使用 (n=10)

表 3 参加機関の報告値による解析結果

試料	キット	有効機関数	平均値±SD (µg/g)	RSD (%)	卵添加量 (µg/g)
試料 1	モリナガ	22	11.89±0.94	7.90	— *
	日本ハム	21	9.65±0.61	6.33	
試料 2	モリナガ	22	8.60±0.63	7.38	10.0
	日本ハム	21	9.29±0.83	8.95	

SD: 標準偏差、RSD: 相対標準偏差

* 実試料 (incurred sample) のため未添加

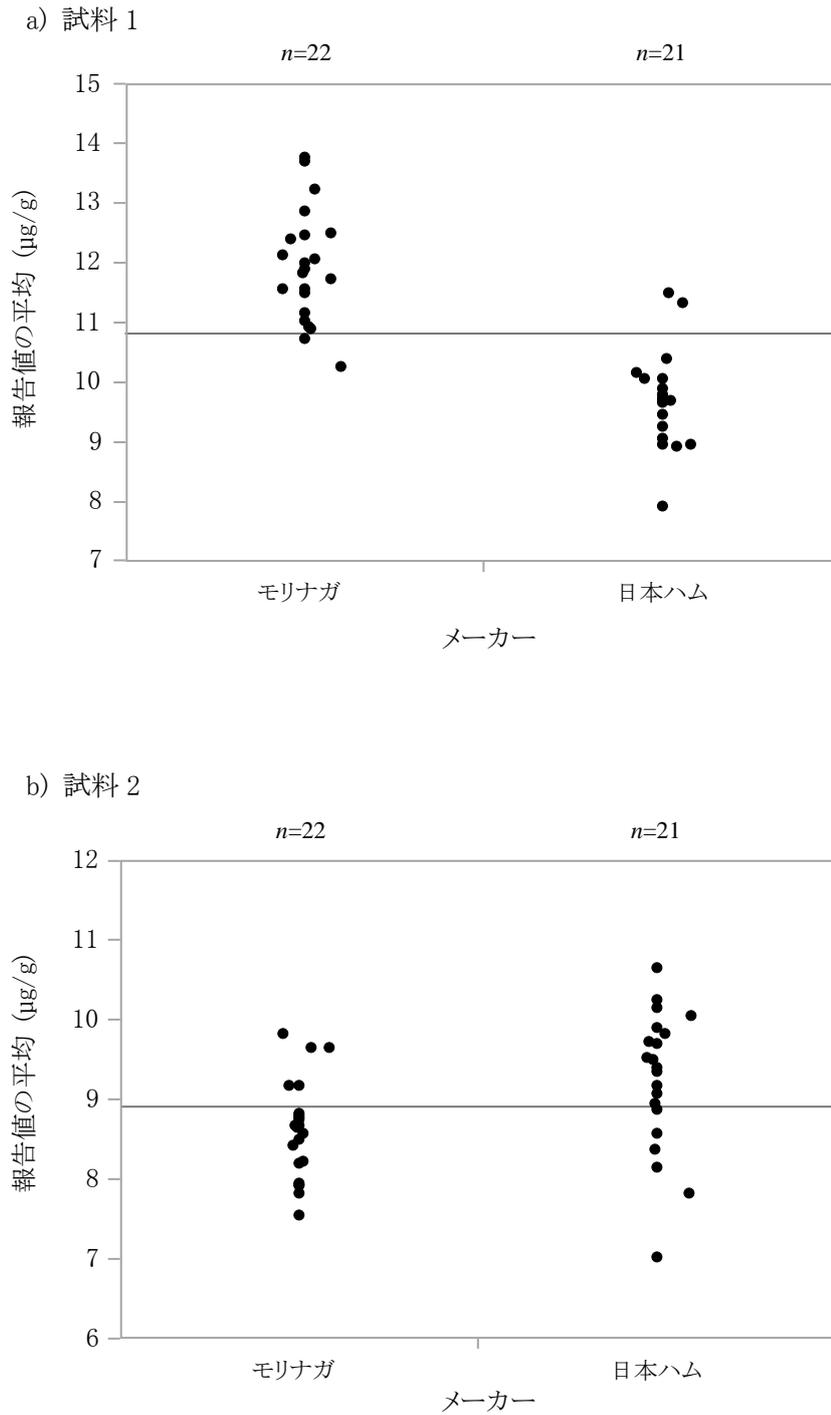


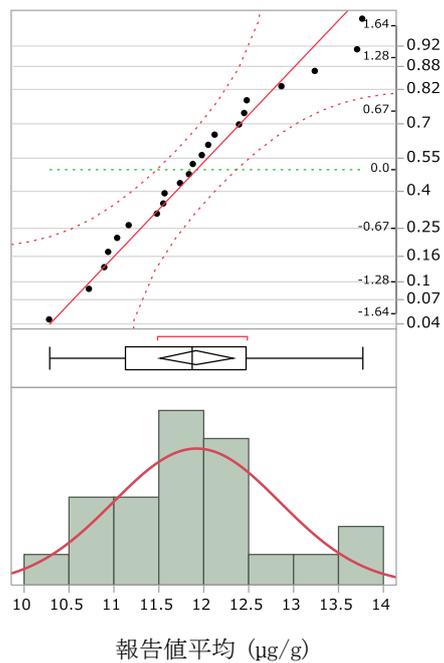
図 1 外部精度管理調査研究試料におけるキットごとのデータ分布

表 4 モリナガキットによる測定結果の統計量一覧

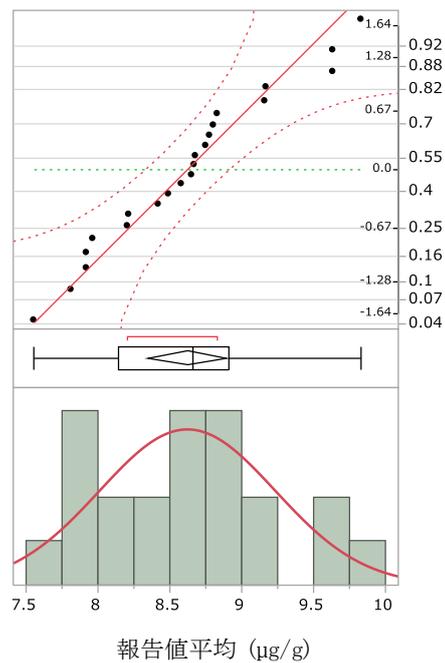
試料名		試料 1	試料 2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MC による除外機関		0	0
データ (有効機関) 数		22	22
測定 の 統計量	平均値 (µg/g)	11.89	8.60
	標準偏差 (µg/g)	0.94	0.63
	相対標準偏差 (%)	7.90	7.38
	第 1 四分位数 (Q1)* (µg/g)	11.1325	8.14375
	中央値 (メジアン)* (µg/g)	11.865	8.66
	第 3 四分位数 (Q3)* (µg/g)	12.46625	8.91375
	最大値* (µg/g)	13.775	9.83
	最小値* (µg/g)	10.28	7.555
	範囲* (µg/g)	3.495	2.275
測定 の 差	四分位範囲* (µg/g)	1.33375	0.77
	<i>R</i> の平均 (µg/g)	0.47	0.28
	上部管理限界 (µg/g)	1.54	0.91

* 出力値

a) 試料 1



b) 試料 2



(機関数 22)

図 2 モリナガキットを用いた測定によるヒストグラムおよび正規確率プロット

表 5 モリナガキットによる試料 1 の結果および評価一覧

機関 番号	試料 1 の報告値 ($\mu\text{g/g}$)		$Xbar$ 管理図		R 管理図		z -スコア	
	1	2	$Xbar$ ($\mu\text{g/g}$)	評価	R ($\mu\text{g/g}$)	評価	z -スコア	評価
20	10.36	10.20	10.280	満足	0.16	満足	-1.713	満足
18	11.45	9.99	10.720	満足	1.46	満足	-1.245	満足
8	10.91	10.88	10.895	満足	0.03	満足	-1.059	満足
13	11.25	10.64	10.945	満足	0.61	満足	-1.005	満足
6	11.11	10.96	11.035	満足	0.15	満足	-0.910	満足
9	11.17	11.16	11.165	満足	0.01	満足	-0.771	満足
10	11.51	11.47	11.490	満足	0.04	満足	-0.426	満足
19	11.69	11.42	11.555	満足	0.27	満足	-0.356	満足
1	11.47	11.67	11.570	満足	0.20	満足	-0.340	満足
4	11.60	11.88	11.740	満足	0.28	満足	-0.160	満足
15	11.82	11.87	11.845	満足	0.05	満足	-0.048	満足
7	11.83	11.94	11.885	満足	0.11	満足	-0.005	満足
21	12.37	11.60	11.985	満足	0.77	満足	0.101	満足
5	12.07	12.05	12.060	満足	0.02	満足	0.181	満足
22	12.55	11.70	12.125	満足	0.85	満足	0.250	満足
2	12.59	12.22	12.405	満足	0.37	満足	0.548	満足
3	12.23	12.69	12.460	満足	0.46	満足	0.606	満足
17	12.34	12.63	12.485	満足	0.29	満足	0.633	満足
16	13.02	12.73	12.875	満足	0.29	満足	1.048	満足
11	12.65	13.83	13.240	満足	1.18	満足	1.436	満足
14	14.88	12.55	13.715	満足	2.33	不満足	1.941	満足
12	13.62	13.93	13.775	満足	0.31	満足	2.005	満足

評価基準

$Xbar$ 管理図 満足: $LCL (8.323) \leq Xbar \leq UCL (15.457)$

R 管理図 満足: $0 \leq R \leq UCL (1.54)$

z -スコア 満足: $|z\text{-スコア}| < 3$

不満足: $Xbar < LCL$ または $UCL < Xbar$

不満足: $UCL < R$

不満足: $3 \leq |z\text{-スコア}|$

表 6 モリナガキットによる試料 2 の結果および評価一覧

機関 番号	試料 2 の報告値 ($\mu\text{g/g}$)		$Xbar$ 管理図		R 管理図		z -スコア	
	1	2	$Xbar$ ($\mu\text{g/g}$)	評価	R ($\mu\text{g/g}$)	評価	z -スコア	評価
13	7.50	7.61	7.555	満足	0.11	満足	-1.659	満足
19	7.81	7.82	7.815	満足	0.01	満足	-1.246	満足
6	8.01	7.83	7.920	満足	0.18	満足	-1.079	満足
18	8.01	7.83	7.920	満足	0.18	満足	-1.079	満足
1	7.80	8.12	7.960	満足	0.32	満足	-1.016	満足
11	8.58	7.83	8.205	満足	0.75	満足	-0.627	満足
8	8.16	8.27	8.215	満足	0.11	満足	-0.611	満足
16	8.42	8.41	8.415	満足	0.01	満足	-0.294	満足
20	8.60	8.39	8.495	満足	0.21	満足	-0.167	満足
4	8.34	8.82	8.580	満足	0.48	満足	-0.032	満足
22	8.44	8.86	8.650	満足	0.42	満足	0.079	満足
15	8.62	8.72	8.670	満足	0.10	満足	0.111	満足
9	9.26	8.09	8.675	満足	1.17	不満足	0.119	満足
10	8.74	8.76	8.750	満足	0.02	満足	0.238	満足
5	8.69	8.87	8.780	満足	0.18	満足	0.286	満足
14	8.57	9.04	8.805	満足	0.47	満足	0.325	満足
21	8.44	9.22	8.830	満足	0.78	満足	0.365	満足
17	8.98	9.35	9.165	満足	0.37	満足	0.897	満足
3	9.20	9.14	9.170	満足	0.06	満足	0.905	満足
7	9.59	9.69	9.640	満足	0.10	満足	1.651	満足
12	9.61	9.67	9.640	満足	0.06	満足	1.651	満足
2	9.85	9.81	9.830	満足	0.04	満足	1.952	満足

評価基準

$Xbar$ 管理図 満足: $LCL (6.020) \leq Xbar \leq UCL (11.180)$

R 管理図 満足: $0 \leq R \leq UCL (0.91)$

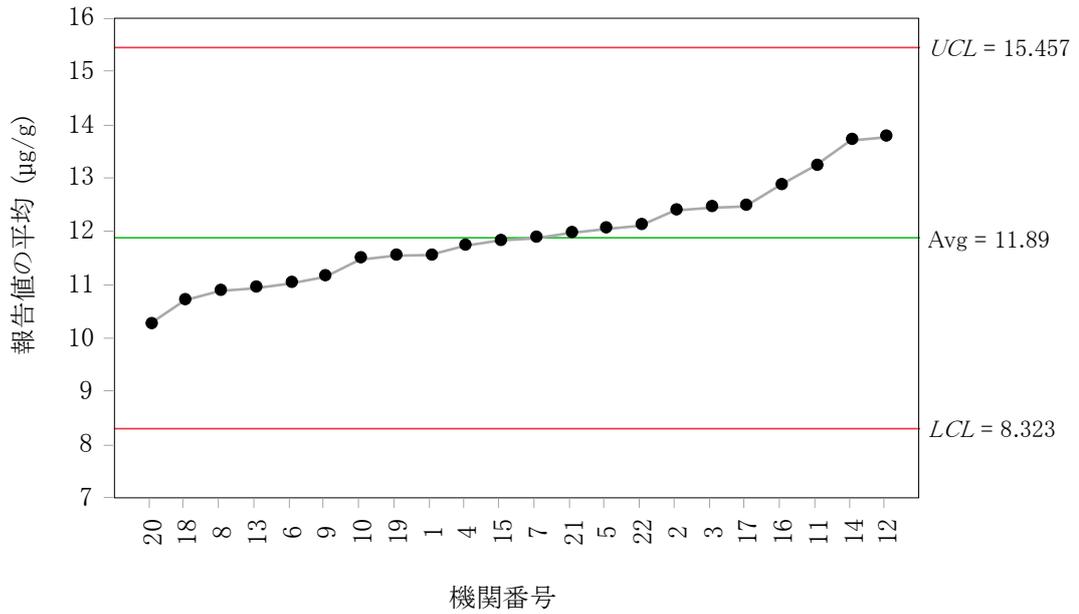
z -スコア 満足: $|z\text{-スコア}| < 3$

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

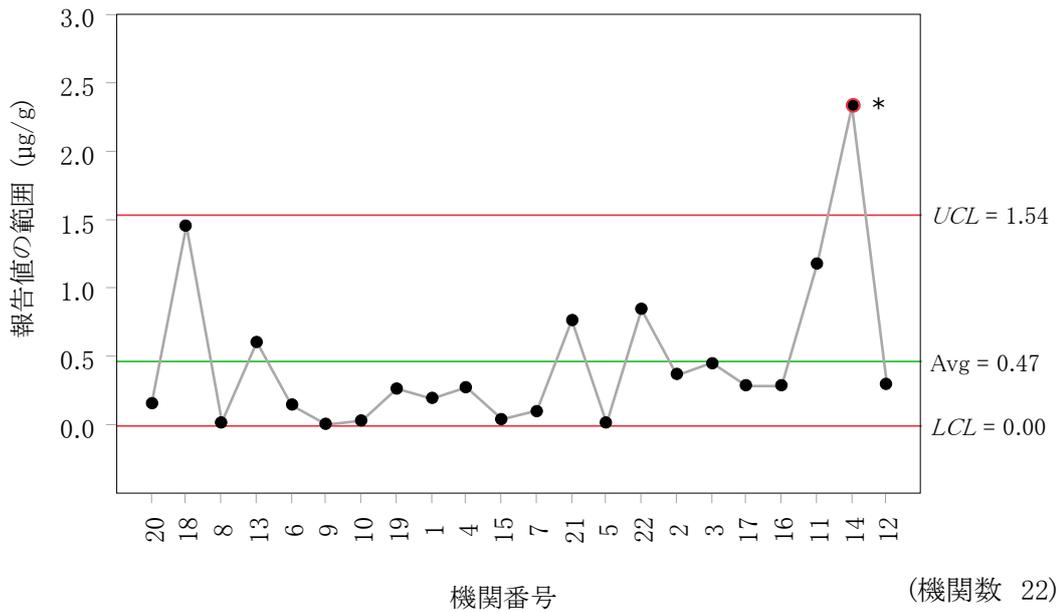
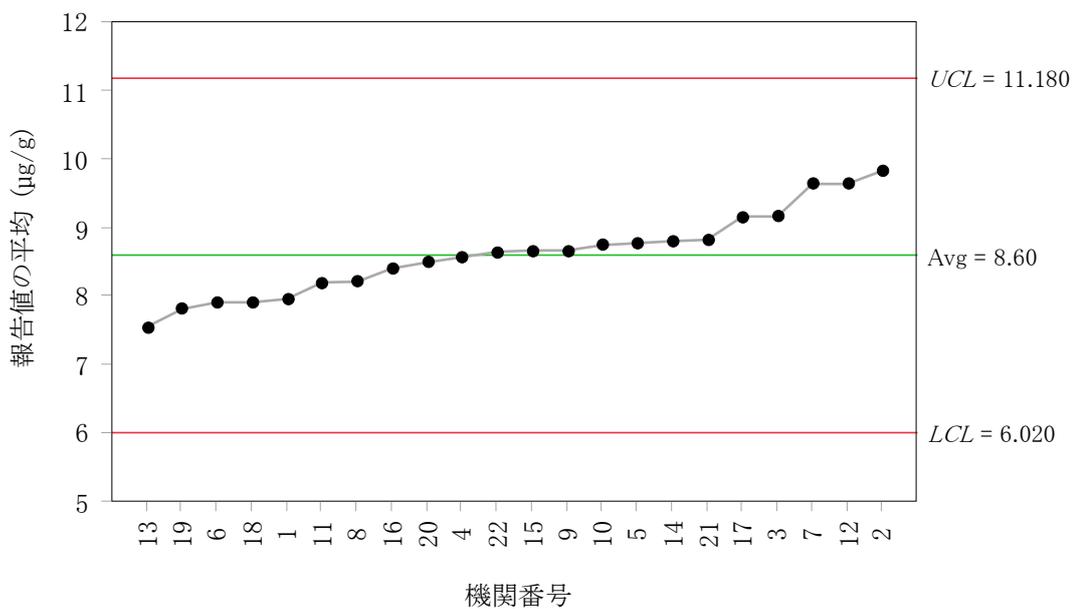


図3 モリナガキットを用いた試料1の測定結果 (\bar{X} - R 管理図)

\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

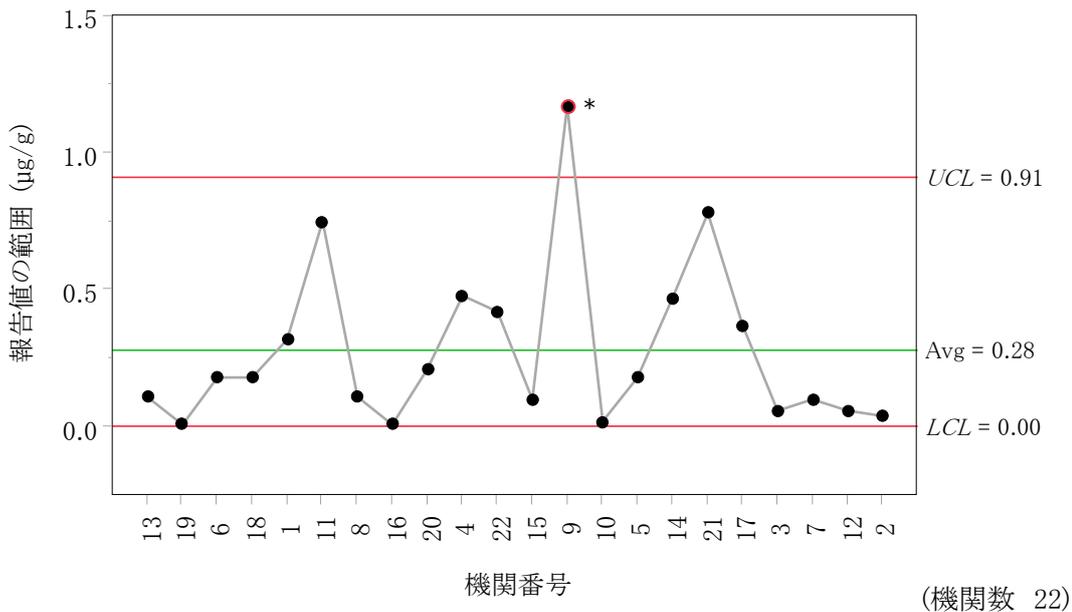
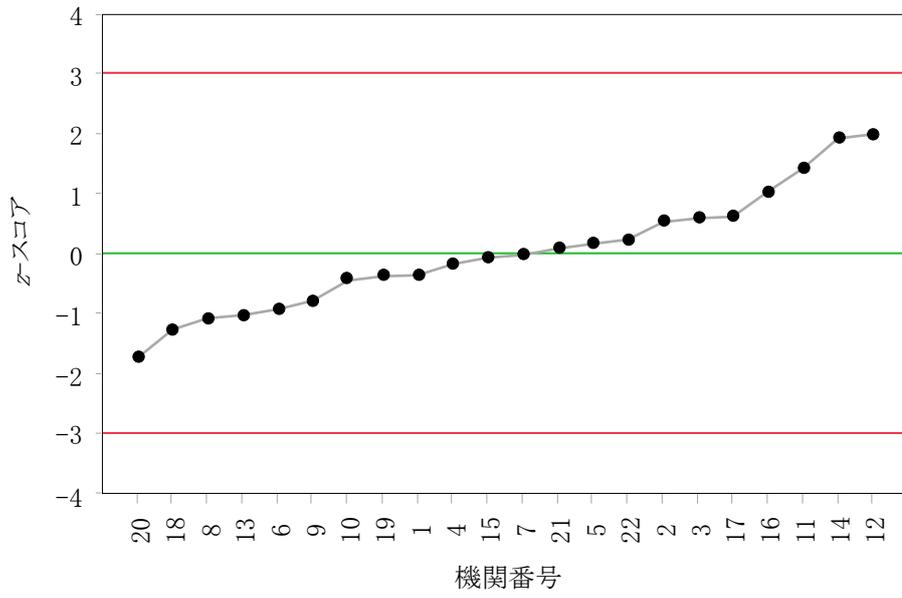


図4 モリナガキットを用いた試料2の測定結果 (\bar{X} - R 管理図)

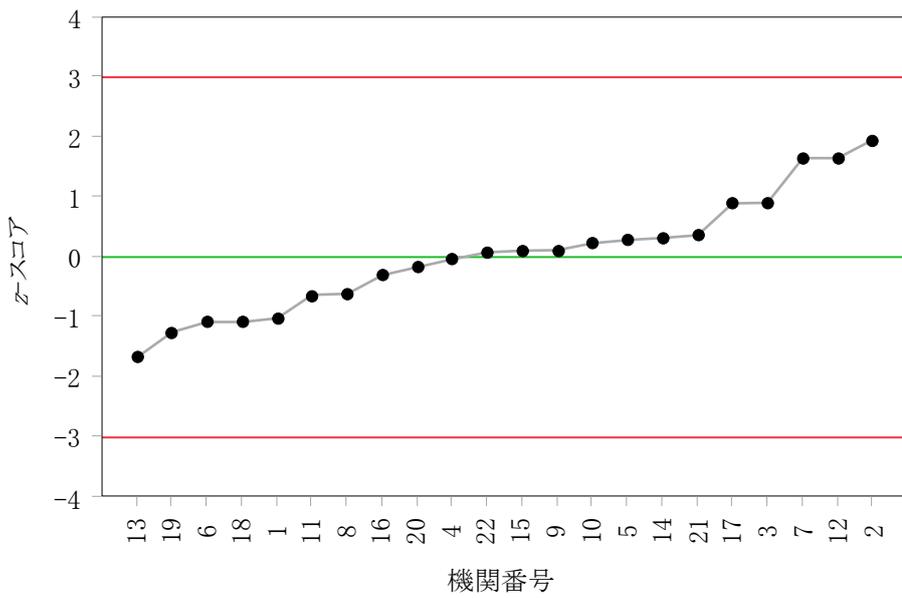
\bar{X} 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均 $\pm 30\%$

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) 試料 1



b) 試料 2



(機関数 22)

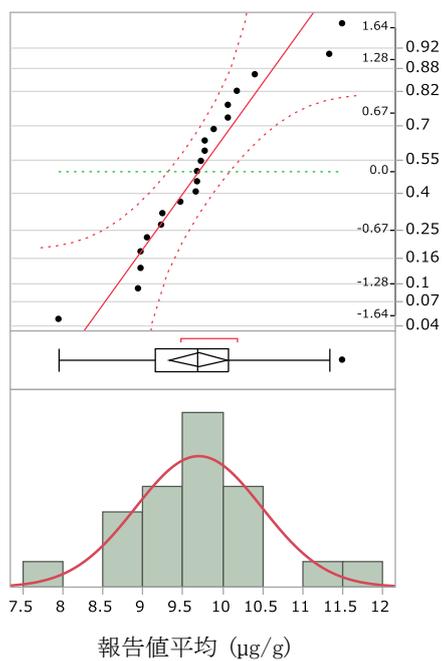
図 5 モリナガキットを用いた ELISA 法による測定結果 (Zスコア)

表 7 日本ハムキットによる測定結果の統計量一覧

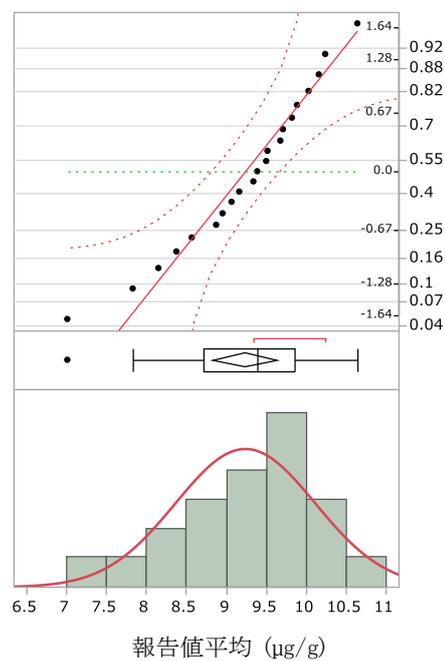
試料名		試料 1	試料 2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MC による除外機関		0	0
データ (有効機関) 数		21	21
測定の 統計量	平均値 (μg/g)	9.65	9.29
	標準偏差 (μg/g)	0.61	0.83
	相対標準偏差 (%)	6.33	8.95
	第 1 四分位数 (Q1)* (μg/g)	9.15	8.725
	中央値 (メジアン)* (μg/g)	9.69	9.39
	第 3 四分位数 (Q3)* (μg/g)	10.07	9.8575
	最大値* (μg/g)	11.51	10.645
	最小値* (μg/g)	7.94	7.015
	範囲* (μg/g)	3.57	3.63
	四分位範囲* (μg/g)	0.92	1.1325
測定の 差	R の平均 (μg/g)	0.42	0.28
	上部管理限界 (μg/g)	1.37	0.91

*: 出力値

a) 試料 1



b) 試料 2



(機関数 21)

図 6 日本ハムキットを用いた測定によるヒストグラムおよび正規確率プロット

表 8 日本ハムキットによる試料 1 の結果および評価一覧

機関 番号	試料 1 の報告値 ($\mu\text{g/g}$)		$Xbar$ 管理図		R 管理図		z -スコア	
	1	2	$Xbar$ ($\mu\text{g/g}$)	評価	R ($\mu\text{g/g}$)	評価	z -スコア	評価
20	8.26	7.62	7.940	満足	0.64	満足	-2.803	満足
4	9.02	8.88	8.950	満足	0.14	満足	-1.148	満足
18	9.42	8.53	8.975	満足	0.89	満足	-1.107	満足
19	8.98	8.98	8.980	満足	0.00	満足	-1.098	満足
10	9.15	8.97	9.060	満足	0.18	満足	-0.967	満足
12	9.49	8.99	9.240	満足	0.50	満足	-0.672	満足
22	8.97	9.54	9.255	満足	0.57	満足	-0.648	満足
15	9.71	9.24	9.475	満足	0.47	満足	-0.287	満足
3	9.93	9.41	9.670	満足	0.52	満足	0.033	満足
16	9.93	9.44	9.685	満足	0.49	満足	0.057	満足
14	10.00	9.38	9.690	満足	0.62	満足	0.066	満足
6	9.73	9.74	9.735	満足	0.01	満足	0.139	満足
7	10.08	9.47	9.775	満足	0.61	満足	0.205	満足
8	9.68	9.90	9.790	満足	0.22	満足	0.230	満足
17	10.10	9.68	9.890	満足	0.42	満足	0.393	満足
21	10.23	9.90	10.065	満足	0.33	満足	0.680	満足
1	9.81	10.34	10.075	満足	0.53	満足	0.697	満足
2	10.63	9.73	10.180	満足	0.90	満足	0.869	満足
13	10.52	10.29	10.405	満足	0.23	満足	1.238	満足
9	11.15	11.54	11.345	満足	0.39	満足	2.779	満足
5	11.64	11.38	11.510	満足	0.26	満足	3.049	不満足

評価基準

$Xbar$ 管理図 満足: $LCL (6.755) \leq Xbar \leq UCL (12.545)$

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: $Xbar < LCL$ または $UCL < Xbar$

不満足: $UCL < R$

不満足: $3 \leq |z\text{-スコア}|$

表9 日本ハムキットによる試料2の結果および評価一覧

機関 番号	試料2の報告値 ($\mu\text{g/g}$)		$Xbar$ 管理図		R 管理図		z -スコア	
	1	2	$Xbar$ ($\mu\text{g/g}$)	評価	R ($\mu\text{g/g}$)	評価	z -スコア	評価
20	7.14	6.89	7.015	満足	0.25	満足	-2.741	満足
16	7.90	7.77	7.835	満足	0.13	満足	-1.753	満足
19	8.27	8.03	8.150	満足	0.24	満足	-1.373	満足
10	8.35	8.41	8.380	満足	0.06	満足	-1.096	満足
18	8.56	8.59	8.575	満足	0.03	満足	-0.861	満足
22	8.44	9.31	8.875	満足	0.87	満足	-0.500	満足
4	9.26	8.65	8.955	満足	0.61	満足	-0.404	満足
15	9.08	9.05	9.065	満足	0.03	満足	-0.271	満足
6	9.24	9.09	9.165	満足	0.15	満足	-0.151	満足
3	9.62	9.07	9.345	満足	0.55	満足	0.066	満足
7	9.59	9.19	9.390	満足	0.40	満足	0.120	満足
14	9.27	9.74	9.505	満足	0.47	満足	0.259	満足
8	9.50	9.53	9.515	満足	0.03	満足	0.271	満足
2	9.60	9.78	9.690	満足	0.18	満足	0.482	満足
17	9.66	9.77	9.715	満足	0.11	満足	0.512	満足
12	9.94	9.71	9.825	満足	0.23	満足	0.645	満足
1	9.96	9.82	9.890	満足	0.14	満足	0.723	満足
13	10.11	9.98	10.045	満足	0.13	満足	0.910	満足
21	9.77	10.55	10.160	満足	0.78	満足	1.048	満足
9	10.31	10.19	10.250	満足	0.12	満足	1.157	満足
5	10.44	10.85	10.645	満足	0.41	満足	1.633	満足

評価基準

$Xbar$ 管理図 満足: $LCL(6.503) \leq Xbar \leq UCL(12.077)$

R 管理図 満足: $0 \leq R \leq UCL(0.91)$

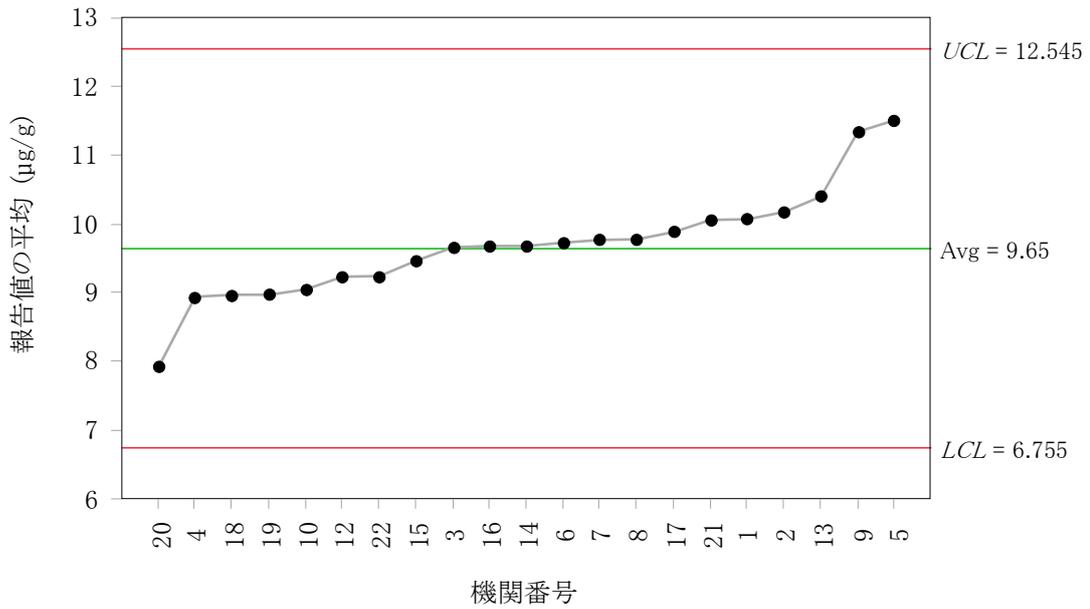
z -スコア 満足: $|z\text{-スコア}| < 3$

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

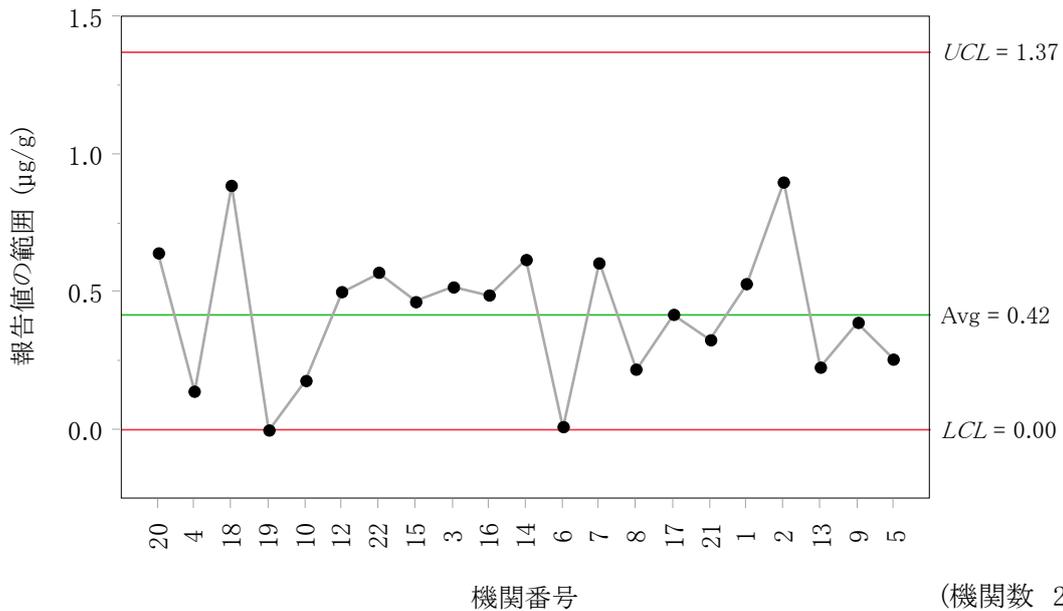
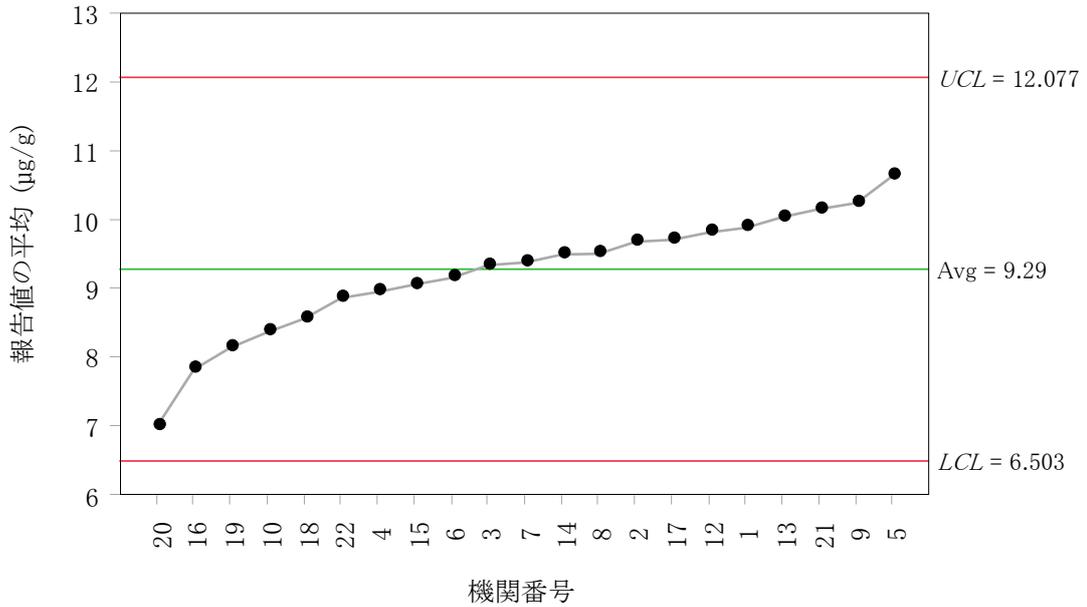


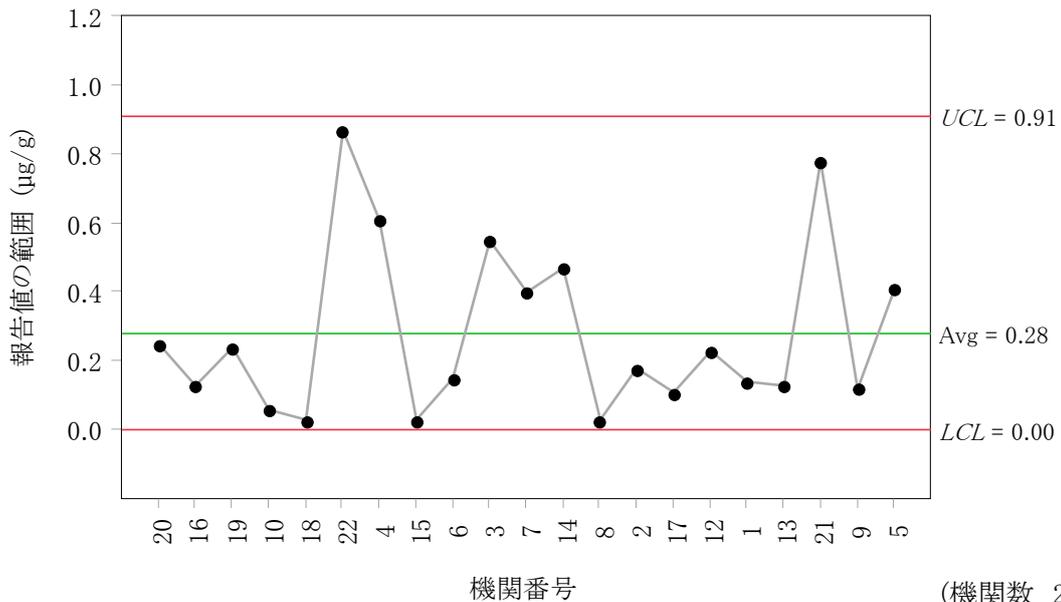
図7 日本ハムキットを用いた試料1の測定結果 (\bar{X} - R 管理図)

\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

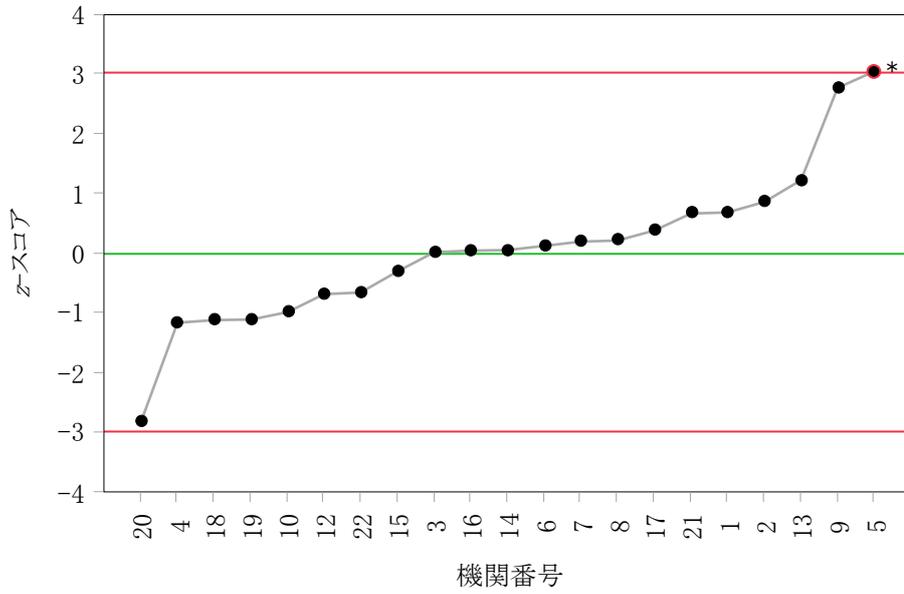


(機関数 21)

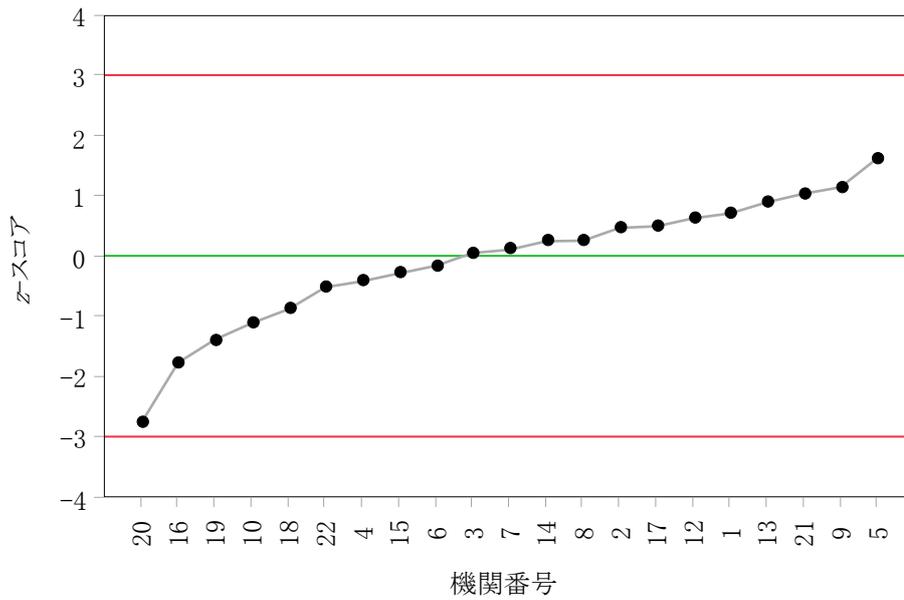
図8 日本ハムキットを用いた試料2の測定結果 (\bar{X} - R 管理図)

\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) 試料 1



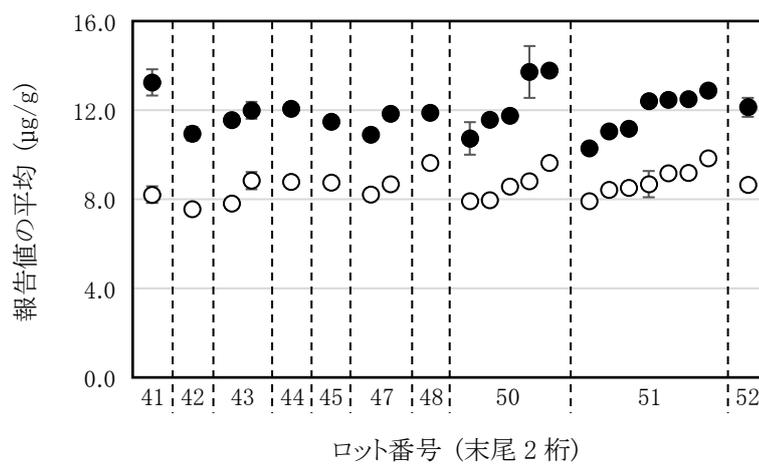
b) 試料 2



(機関数 21)

図9 日本ハムキットを用いた ELISA 法による測定結果 (Zスコア)

a) モリナガキット



b) 日本ハムキット

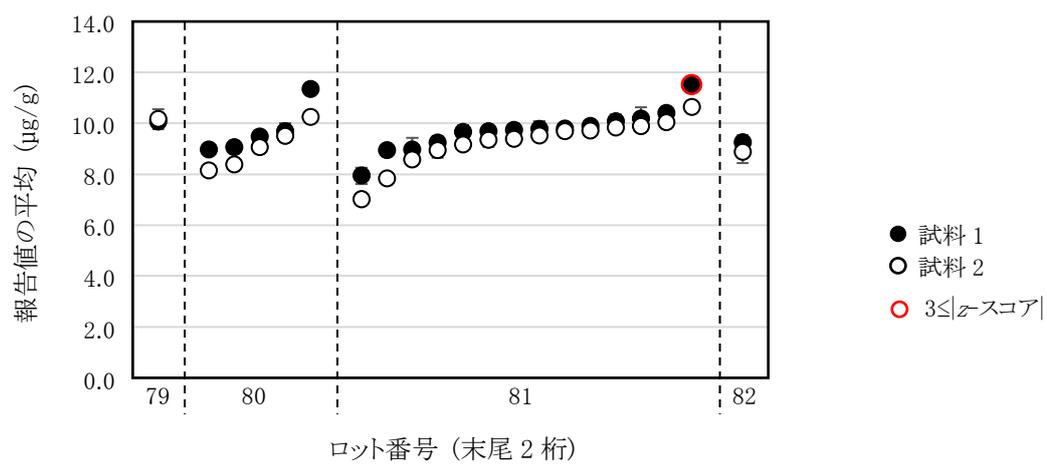


図 10 各キットで得られた報告値のロット間比較

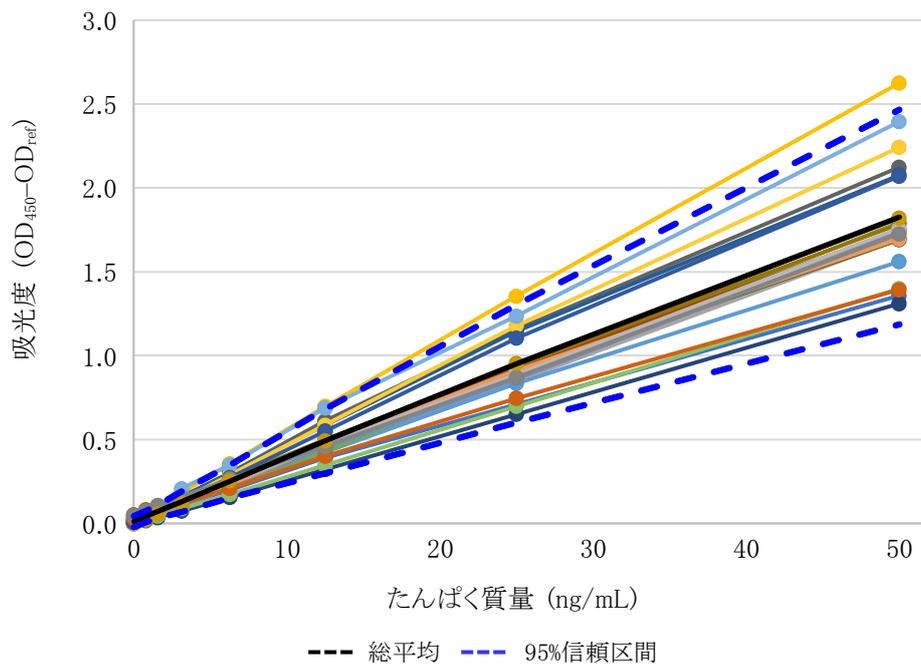


図 11 モリナガキットを用いた測定における検量線 (22 機関)
ロット別検量線は図 13 を参照

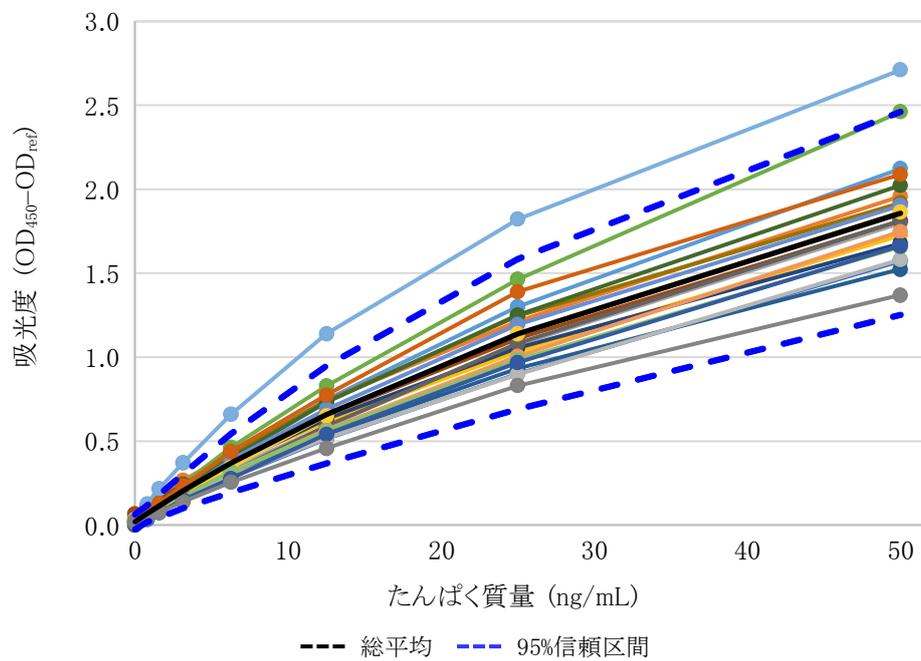
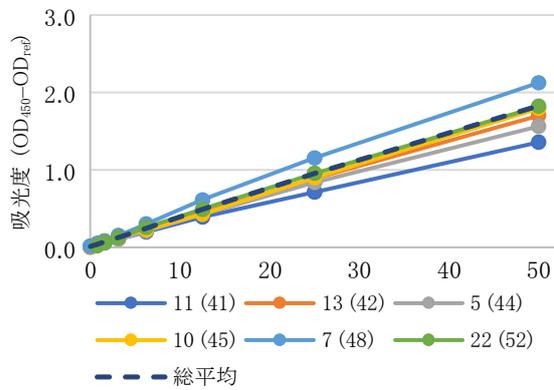


図 12 日本ハムキットを用いた測定における検量線 (21 機関)
ロット別検量線は図 14 を参照

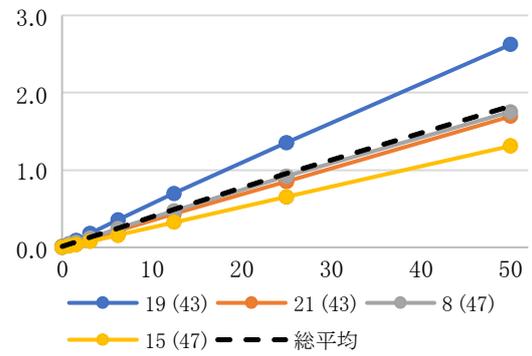
表 10 外部精度管理調査研究で使用されたモリナガキットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
22OCSFOA141	2023/10/7	1
22NOSFOA142	2023/11/1	1
22DESFOA143	2023/12/8	2
23FESFOA144	2024/2/2	1
23FESFOA145	2024/2/2	1
23APSFOA147	2024/4/6	2
23APSFOA148	2024/4/14	1
23JUSFOA150	2024/6/1	5
23JLSFOA151	2024/7/4	7
23AUSFOA152	2024/8/1	1

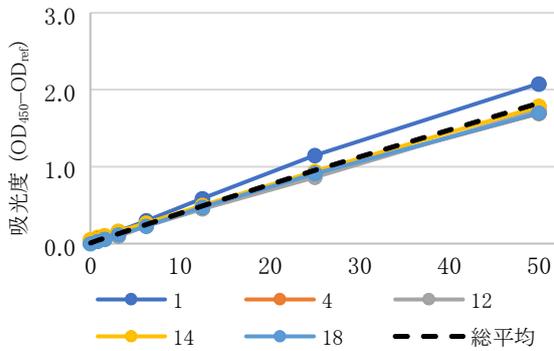
a) 22OCSFOA141, 22NOSFOA142,
23FESFOA144, 23FESFOA145,
23APSFOA148, 23AUSFOA152



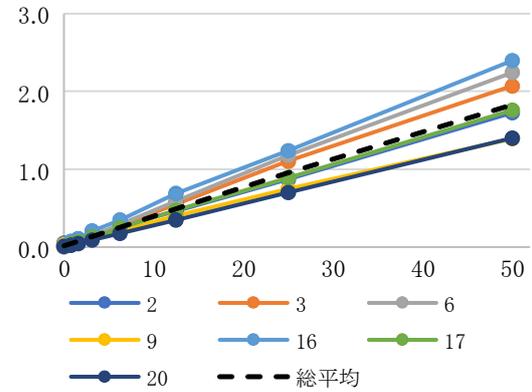
b) 22DESFOA143, 23APSFOA147



c) 23JUSFOA150



d) 23JLSFOA151



たんぱく質量 (ng/mL)

図 13 モリナガキットを用いた測定におけるロット別検量線

表 11 外部精度管理調査研究で使用された日本ハムキットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
FKEE2279	2023/10	1
FKEE2380	2023/12	5
FKEE2381	2024/4	14
FKEE2382	2024/6	1

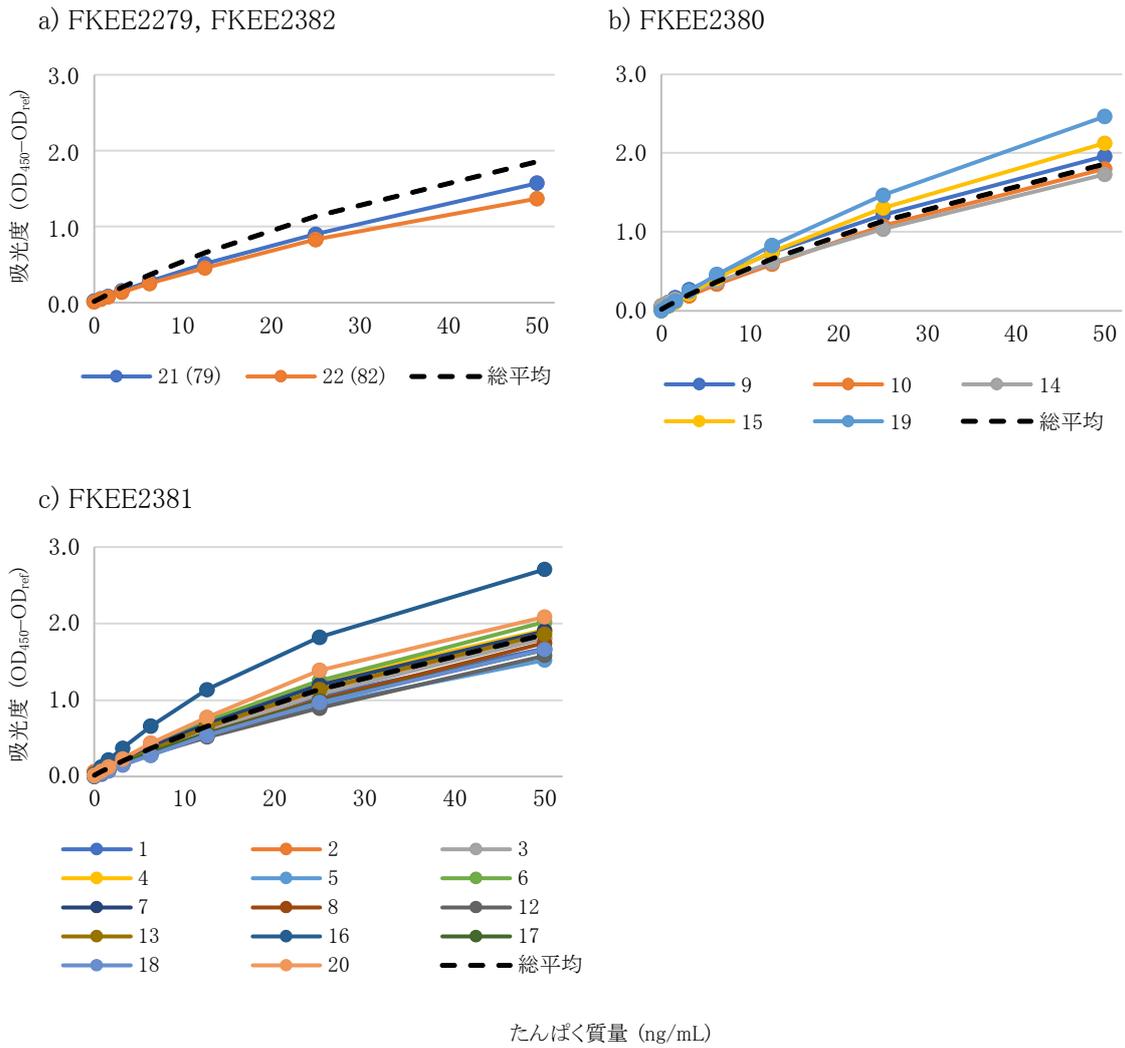
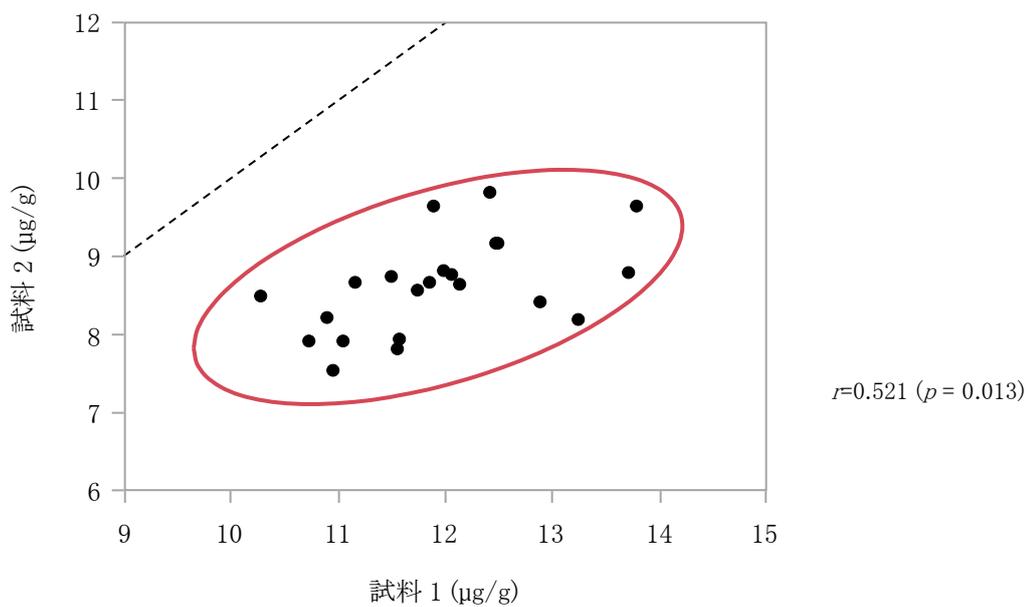


図 14 日本ハムキットを用いた測定におけるロット別検量線

a) モリナガキット (22 機関)



b) 日本ハムキット (21 機関)

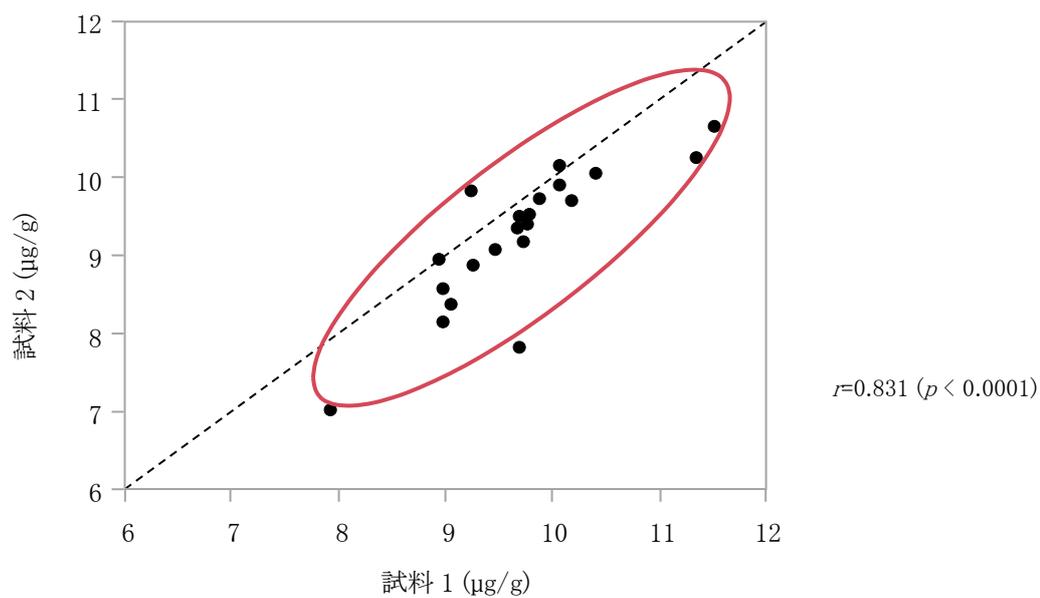
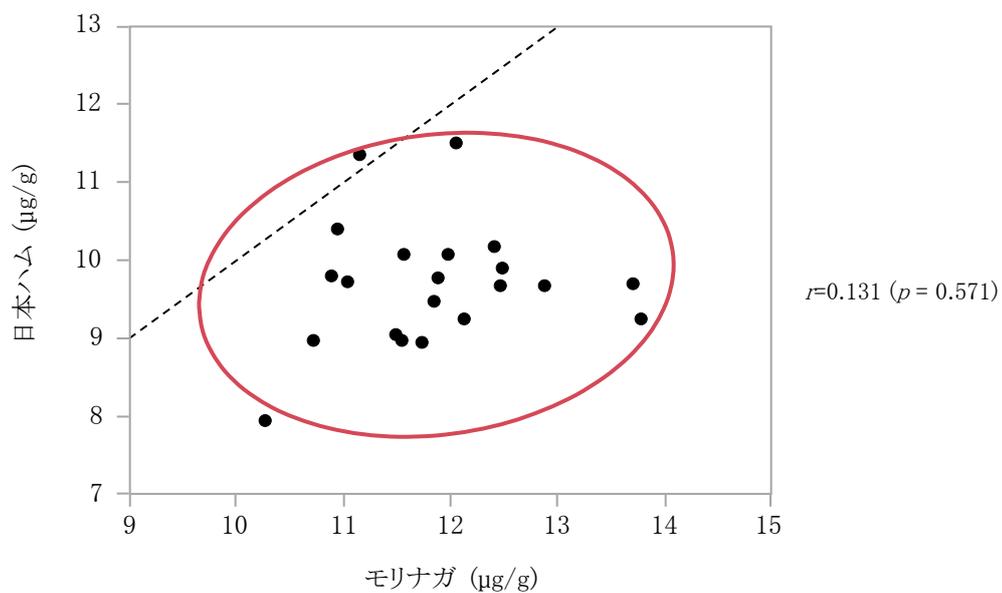


図 15 同一キットにおける試料間の報告値の相関性
図中の楕円は 95 % 確率楕円を示す。点線は $y = x$

a) 試料 1 (21 機関)



b) 試料 2 (21 機関)

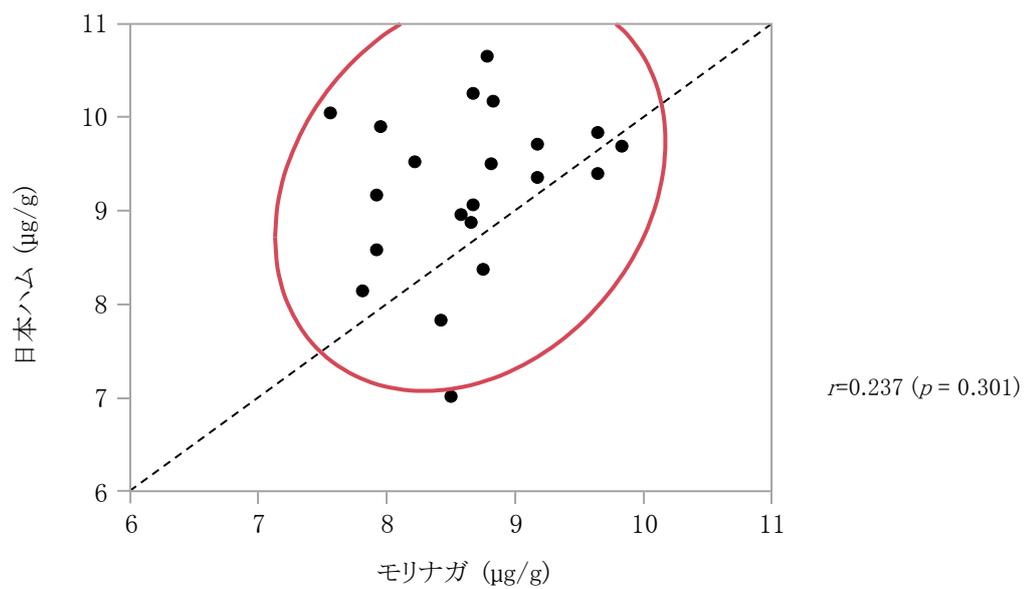


図 16 同一試料におけるキット間の報告値の相関性
図中の楕円は 95 % 確率楕円を示す。点線は $y = x$

表 12 2023 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
	11	4	4	6	2	1
抽出方法	振とう	その他				
	22	0				
振とう時間 (h)	12 未満	12 - 16 未満	16 - 20 未満	20 以上		
	0	8	12	2		
振とう速度 (rpm)	90 未満	90 - 110	110 超			
	0	22	0			
ろ過	実施	実施せず				
	16	6				
遠心分離	実施	実施せず				
	22	0				
抽出液等の 希釈操作	手動	自動				
	22	0				
試薬のプレート への添加 ^a	手動					
	連続分注				電動	自動
	マルチ ch		シングル ch			
	マルチ ch		マルチ ch		シングル ch	
	0		3		18	
洗浄方法	手動	自動				
	11	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
	2	9	2	6	1	2
検量線の 回帰法	4PL ^b	その他				
	22	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		
	12	2	1	7		
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	0	0		

a 複数回答有

b 4PL: 4 パラメーターロジスティック

(22 機関)

表 13 2023 年度 外部精度管理調査研究における各機関の操作手法 (キット別)

a) モリナガキット (22 機関)、使用ロット数 10 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	4	0	1	0
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	0	4	1	0	
試料添加時間 (分)	10 以内	10-20 以内	20-30 以内	30 超	
	15	7	0	0	
操作中の室温 (範囲)	20℃ 未満	20-30℃	30℃ 超		
	0	22	0		

b) 日本ハムキット (21 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
	16	4	0	1	0
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	0	4	0	1	
試料添加時間 (分)	10 以内	10-20 以内	20-30 以内	30 超	
	15	5	1	0	
操作中の室温 (範囲)	20℃ 未満	20-25℃	25℃ をはさむ上下	25-30℃	30℃ 超
	0	13	4	4	0

表 14 2022 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	2	1	2	4	2	3	6

(回答 20 機関)

表 15 2022 年度の参加機関の検査実績および使用キット

試験区分		特定原材料						
		卵	乳	小麦	そば	落花生	甲殻類	
ELISA 法	実施機関 (20 機関中)	15	16	14	11	9	11	
	総試験数	5073 (19.8%)	5432 (21.2%)	5206 (20.3%)	3232 (12.6%)	3225 (12.6%)	3428 (13.4%)	
	陽性検出機関	7	2	4	1	2	4	
	検出試験数	453	476	883	37	46	145	
	陽性率 (%)	8.9	8.8	17.0	1.1	1.4	4.2	
	使用キット [複数回答] (20 機関)							
		日本ハム	16	17	14	11	9	—
		モリナガ	16	17	14	10	8	—
		プリマハム	0	0	0	0	0	—
		ニッスイ	—	—	—	—	—	10
	マルハ	—	—	—	—	—	11	
確認試験	実施機関 (20 機関中)	2	1	3	1	2	3	
	総試験数	3	3	9	6	6	16	
	陽性検出機関	2	1	2	1	1	1	
	検出試験数	3	2	3	1	1	3	

令和5年度 特定原材料検査外部精度管理調査研究参加機関

宮城県保健環境センター

新潟市衛生環境研究所

千葉県衛生研究所

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 食品安全検査センター

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

三重県保健環境研究所

高知県衛生環境研究所

福岡市保健環境研究所

佐賀県衛生薬業センター

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所

一般財団法人 食品分析開発センターSUNATEC

日東ベスト株式会社

日本生活協同組合連合会

パルシステム生活協同組合連合会

株式会社 ゼンショーホールディングス

名古屋製酪株式会社 開発本部 バイオ開発室

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

星薬科大学

令和5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
－サルモネラ属菌検査用調査試料および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、微生物学調査では硫化水素（H₂S）非産生株を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料の開発および前年度までに開発した一般細菌数測定検査用調査試料の実運用を行った。

H₂S非産生株を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料の開発では51機関の参加機関に対してパイロットスタディを実施した。パイロットスタディでは当財団の食品衛生外部精度管理調査事業で通常使用している陽性菌、陰性菌に加え、H₂S非産生サルモネラ属菌の計3菌株を個別に添加した3本の調査試料を配付した。なおH₂S非産生株は2012年度の厚生労働科学研究費補助金にて実施したスクリーニング結果を参考に決定した。調査試料は性能評価を実施し、1か月間の冷蔵保存で安定していることを確認してから同一ロットの資材で配付用調査試料を作製し、参加機関に配付し報告値の回収および解析を実施した。なお配付用調査試料は配付前の均質性確認、報告期限後の安定性確認で調査試料の品質評価をした。一般細菌数測定検査用調査試料の実運用では2023年度の食品衛生外部精度管理調査事業の一般細菌数測定検査項目にて白飯基材の調査試料を配付し、報告値の回収、解析および改善点の検証を実施した。

H₂S非産生株を用いたサルモネラ属菌検査のパイロットスタディ用調査試料は性能評価、均質性確認、安定性確認ともに評価基準を満たしていた。ほとんどの参加機関が陽性、陰性を正しく判定したが、一部の参加機関でH₂S非産生株を陰性と判定した。なおH₂S非産生株を陰性と誤判定した機関はクエン酸能確認試験で非定型反応と判定したことが要因であった。一般細菌数測定検査の実運用では、389機関中2機関が生菌数を回答できなかった。1機関はフィルム培地の液状化により測定不能となったため、1機関は手順書に従った操作で検出限度値未満と判定したためであった。前者は当該フィルム培地と添加菌の相性が悪いことが要因であり、後者は調査試料の菌濃度が公定法（冷凍食品）の基準値の1/10程度であったことが要因であった。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査事業において、現在当財団で実施している微生物学調査区分のサルモネラ属菌検査ではH₂S産生 *Salmonella* sp. を陽性菌、*Proteus mirabilis* を陰性菌として配付している。サルモネラ属菌検査ではH₂S産生株、非産生株が公定法の検出対象であるが、H₂S非産生菌を用いた調査試料はまだ存在せず、外部精度管理調査の課題であった。今年度の研究ではH₂S非産生株を用いたサルモネラ属菌検査をパイロットスタディで実施し、運用上の問題点の洗い出しを目的とした。併せて前年度までに開発した一般細菌数測定検査の白飯基材で実運用を行い、改善点の検証を実施することを目的とした。

B. 方法

I. サルモネラ属菌検査

1. サルモネラ属菌検査-試料基材および添加菌

1) 試料基材

試料基材は液卵希釈液（市販の液卵を希釈液で1/5希釈した溶液）を用いた。

2) 添加菌

添加菌は①*Proteus mirabilis* HIC 210396、② *Salmonella* sp. HIC 210393、③ *Salmonella* sp. HIC 230403を用いた。①②は現在食品衛生外部精度管理で使用している菌株、③はH₂S非産生株（サルモネラ属菌陽性）である。

3) 培地等

後述で用いる培地名の略称は、[] で示す。

- ・精製水（日本薬局方）（小塚製薬）

- ・標準寒天培地 [SA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・SCD培地 [SCDB]（塩谷エムエス）
- ・NaCl（試薬特級、富士フィルム和光純薬）
- ・Tween 80（東京化成工業）
- ・0.04w/v% フェノールレッド溶液
（富士フィルム和光純薬）
- ・緩衝ペプトン水（ISO組成）[BPW]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地 [RVB]（塩谷エムエス）
- ・テトラチオネート培地 [TTB]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・よう化カリウム（試薬特級）
（富士フィルム和光純薬）（TTBに添加）
- ・よう素（試薬特級）
（富士フィルム和光純薬）（TTBに添加）
- ・DHL寒天培地 [DHLA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・XLD（キシロース・リジン・デソキシコール酸）寒天培地 [XLDA]
（塩谷エムエス）
- ・MLCB寒天培地 [MLCBA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・ブリリアントグリーン寒天培地
（栄研化学）滅菌後にスルファピリジン添加 [BGSA]
- ・Sulfapyridine（東京化成特級）
（東京化成工業）（BGSAに添加）
- ・N,N-Dimethylformamide
（東京化成特級）（東京化成工業）
（BGSAに添加）
- ・CHROMagar *Salmonella* [CHS]
（CHROMagar）
- ・ESサルモネラ寒天培地 II [ES II A]

- (栄研化学)
- chromID Salmonella agar [SM2A]
(バイオメリュー)
 - TSI寒天培地 [TSIA]
(島津ダイアグノスティクス)
 - LIM培地 [LIMA]
(島津ダイアグノスティクス)
 - Kovacs reagent (バイオメリュー)
 - サルモネラ免疫血清「生研」1号セット (デンカ)
 - API 20E (バイオメリュー)

2. サルモネラ属菌検査-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内で行い、培養には恒温槽または恒温水槽を使用した。

3. サルモネラ属菌検査-準拠する試験法

サルモネラ属菌検査は、「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年食安発0729第4号）に準拠して実施した（図1）。

調査試料25 gをBPW（ISO組成）225 mLで10倍希釈したものを試験溶液とした。これを37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養した。培養後のBPWから0.1 mLをRVBに、1 mLをTTBに移植し、42.0℃設定の恒温水槽で20-24時間培養した。培養後、各培養液からDHLA、XLDA、MLCBA、BGSA、CHS、ES II A、SM2Aに移植し、37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養した。培養後の発育集落の一部をTSIA（斜面培地）に画線、穿刺し、LIMA（高層培地）に穿刺した後、37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養し

た。LIMAは培養後の観察後にKovacs reagentを重層し、インドール反応を確認した。TSIAの発育集落の一部をSAに移植し、37.0℃設定の恒温槽で18時間以上培養し、その発育集落を用いてO血清群別試験を実施した。なお、H₂S非産生サルモネラ属菌はO血清群別試験と並行して簡易同定キット（API 20E）に供し、オキシダーゼ試験、クエン酸利用能試験、VP試験、ONPG試験を実施した。

一連の試験においてサルモネラの定型反応を示す場合に陽性、示さない場合に陰性と判定した。

なお、生菌数測定を要する場合は試験溶液をBPWで10倍段階希釈し、各希釈段から1 mLを2枚のシャーレに分取してSAで混釈平板培地にしたものを37.0℃設定の恒温槽で18時間以上培養し、計測した集落数をもとに生菌数を算出した。

4. サルモネラ属菌検査-調査試料作製

調査試料作製手順を図2に示した。

1) 基材の滅菌

NaCl 153 g、Tween80 180 g、精製水 12.6 L、グリセリン 1800 gを均質化し、80 mLずつ樹脂製容器（100 mL）に分注後、121℃30分で高圧蒸気滅菌をした。

2) 添加菌液の調製

凍結保存菌株をSAに移植し、35.0℃設定の恒温槽で24時間培養した。発育集落をSCD培地100 mLに1白耳移植し、35.0℃設定の恒温槽で24時間培養した。この培養液を生理食塩液で100倍希釈し、さらにフェノールレッド含有生食で10倍希釈したものを添加菌液とした。

フェノールレッド含有生食は1.8 % NaCl

溶液と0.04 w/v% フェノールレッド溶液を等量混和して作製した。

3) 調査試料の作製

滅菌後の基材に市販の無菌卵黄液20 mLおよび添加菌液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。なお添加菌は参加機関には開示せず、調査試料No. 1、No. 2、No. 3として作製した。

調査試料は使用、または配付するまで冷蔵保存した。

5. サルモネラ属菌検査-性能評価

1) 保存条件

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

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

2) 生菌数測定

冷蔵試料は添加菌の添加直後、保存開始から10、13、28日後に生菌数測定を行った。常温試料は保存開始から13、28日後に生菌数測定を行った。各ポイントで調査試料を1個使用した。

3) 定性試験

外部精度管理調査で通常使用している菌株（添加菌①および②）は、分離培地の選択においてXLD寒天培地とESサルモネラ寒天培地Ⅱを使用した。添加菌③は全工程で全ての培地を使用した。なお定性試験は添加菌の添加直後、保存開始から13、28日後に行った。

6. サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ（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

添加菌ごとに、配付用調査試料から系統的に抽出した5個の配付用調査試料を用いて生菌数試験を行い、その平均値を添加濃度とした。また、5個の配付用調査試料のうち2個を用いて定性試験を行った。なお分離培地はXLDAとESⅡAを使用した。

3) 安定性確認試験

添加菌ごとに、系統的に抽出した1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定性試験および生菌数測定を行った。

7. サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ（室間共同試験）

51機関の参加機関に対して配付用調査試料を冷蔵便で発送し、参加機関から検査結果を回収した。見立て食材を「殺菌液卵」とし、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1回とした。検査機関からの報告期限は2023年12月22日とした。なお、倫理面への配慮として、参加機関に配付する結果報告書では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。

Ⅱ. 一般細菌数測定検査（白飯）

1. 一般細菌数測定検査-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

後述で用いる培地名の略称は、[] で示す。

- ・精製水（日本薬局方）（小堺製薬）
- ・標準寒天培地 [SA]
（島津ダイアグノスティクス）
- ・SCD培地 [SCDB]（塩谷エムエス）
- ・NaCl（試薬特級、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. 一般細菌数測定検査-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内で行い、培養には恒温槽を使用した。

3. 一般細菌数測定検査-準拠する試験法

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SAで混釈平板培地にした後、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4）。

4. 一般細菌数測定検査-調査試料作製

調査試料作製手順を図5に示した。

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。

5. 一般細菌数測定検査-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系統的に抽出した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、相対標準偏差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外部精度管理調査の暫定値として使用した。

3) 安定性確認試験

系統的に抽出した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。

6. 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査

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、389機関を対象に外部精度管理調査を実施した。

検査機関には調査試料を1個ずつ配付した。見立て食材を「冷凍食品」とし、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。回収した報告値の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。なお、倫理面への配慮として、参加機関に配布する結果報告書では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

I. サルモネラ属菌検査

1. サルモネラ属菌検査-調査試料の性能評価

添加菌①、②、③の接種直後の濃度はそれぞれ 4.1×10^3 、 3.1×10^4 、 7.0×10^3 cfu/gであった。冷蔵試料では保管開始から28日後まで大きな菌数の増減は観察されなかった。また、10日後に冷蔵から22.5°Cに移管した常温試料でも28日目まで生菌数を算出でき、定性試験においても添加菌①が陰性、添加菌②が陽性（ H_2S 産生+）、添加菌③が陽性（ H_2S 非産生-）と判定され、調査試料の品質に問題ないと評価した（図3、表1）。

2. サルモネラ属菌検査-パイロットスタ ディ (品質評価)

均質性確認において添加菌①、②、③の配付用調査試料の生菌数平均値 (添加濃度) はそれぞれ 3.9×10^3 、 1.9×10^4 、 4.3×10^3 cfu/g であった。また、定性試験でも性能評価と同様の結果が得られたことから、配付用調査試料は均質であると評価した (表 2)。

配付から約 2 か月後に実施した安定性確認において添加菌①、②、③の生菌数は 3.0×10^2 、 3.5×10^2 、 7.1×10^2 cfu/g であった。均質性確認時の 1/10 程度に減少したが、定性試験の結果は均質性確認試験と同様の結果となったことから、定性試験を実施する上で影響がないと判断し、パイロットスタディ実施期間中の調査試料は安定であったと評価した (表 3)。

3. サルモネラ属菌検査-パイロットスタ ディ (室間共同試験)

対象とした全 51 機関から結果を回収した。結果は表 4 に、経過記録書の集計結果は表 5 に示した。また、アンケート結果を表 6 に示した。

1) 定性試験

通常的外部精度管理調査で使用している添加菌①、②は 51 機関全てが正しく報告した。しかし、添加菌③は 51 機関中 3 機関がサルモネラ属菌陰性と判定した。添加菌③を誤判定した 3 機関のうち 2 機関は、クエン酸利用能陰性のためサルモネラ陰性と報告した。うち 1 機関は API20E 実施によりサルモネラ陽性であったが当該機関の手順書に従った判定で

サルモネラ陰性と報告した。残り 1 機関はクエン酸利用能およびマロン酸利用能試験を実施し、非定型反応であることからサルモネラ陰性と報告した。

2) 経過記録書の集計結果

前増菌培地では BPW が多く、増菌培地では RVB と TTB の組み合わせでの使用が多かった。また、分離培地では DHLA と CHS を採用する検査機関が多く、2 種類の分離培地を採用している検査機関が多かった。この他、 H_2S の産生により判定する分離用寒天培地として MLCBA、 H_2S の産生によらない分離培地として ES II A を採用している検査機関も比較的多かった。また、生化学的性状試験において 36 機関がクエン酸利用能試験を実施し、クエン酸利用能試験を実施していない 15 機関のうち 10 機関は簡易同定キットでクエン酸利用能を確認していた。

3) アンケート結果

外部精度管理調査事業の今後の運用として、 H_2S 産生/非産生サルモネラ属菌および陰性菌の 3 種のうち 2 種の組み合わせで実施する場合のアンケート調査を行ったところ、「どの組み合わせでもよい」が半数以上 (58.8%) となった。また、「陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい」(27.5%) を含めると 80% 以上が H_2S 非産生サルモネラ属菌の調査試料に前向きな回答であった。

また、パイロットスタディに対するコメントとして、 H_2S 非産生サルモネラ属菌のクエン酸利用能の定型反応が弱いといったコメントが散見された。本試験に使用するシモンズクエン酸培地はメーカーによる反応差や菌の接種量による偽陰性

/偽陽性が出やすく、検査員の経験や技量が大きく影響する可能性が示唆された。

II. 一般細菌数測定検査（白飯）

1. 一般細菌数測定検査-品質評価

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系統的に各 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、相対標準偏差および一元分散分析を行った（表 7～8）。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 9）。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 か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 10～11）。

2. 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査

対象とした全 389 機関から結果を回収した。実数解析の結果は表 12 と図 6～図 8 に、対数解析の結果は表 13 と図 9～図 10 に、経過記録書の集計結果は表 14 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た機関は 3 機関、2 シグマ処理で除外された機関は 1 機関であった。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 1 機関、 R 管理図においては 9 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 13 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が 5 機関であった。

データ・クリーニングにより除外された 3 機関はそれぞれ報告時の転記ミス、標準操作手順書に従って実施した結果検出限度値未満 ($< 3.00 \times 10^4 / \text{g}$) になった、フィルム培地の液状化により菌数の計測ができなかったことが原因であった。前者は添加菌（市販）の濃度とコストを考慮して設定した調査試料の濃度が見立て食材（冷凍食品）の基準値の $1/10^\circ\text{C}$ であったことが要因であり、後者は枯草菌によるフィルム培地の液状化現象が起きたことが要因である。フィルム培地の液状化現象に関してはメーカー側でも把握しており、対応製品も販売されている。

2) 対数解析

データ・クリーニングにより除外された機関は 2 機関、2 シグマ処理で除外された機関は 1 機関であった。

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 4 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が 3 機関であった。

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。

E. 結論

H₂S非産生株を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料の開発では、ほとんどの参加機関で正しく報告したが、51機関中3機関（全体の約6%）が添加菌③においてクエン酸利用能試験陽性の判定ができず誤回答となった。調査試料としてはほぼ問題ないと考えられる結果であったが、クエン酸利用能試験で陽性となるH₂S非産生株の再検討を行うことを次年度の課題とする。

一般細菌数測定検査の実運用においては、2機関において生菌数を報告できない事例が発生した。枯草菌によるフィルム培地の液状化現象に関してはメーカー側でも把握しており、対応製品も販売されている。枯草菌は生菌数測定で検出する一般的な菌でもあることから、参加機関への危機管理啓蒙の意味も含め、菌株の変更は検討しない方針とする。一方、基準値を考慮した標準操作手順書で実施した機関で検出限度値未満となった件に関しては、対応として調査試料の生菌数の濃度を基準値以上に設定することが望まれるが、国内の市販芽胞菌液では高濃度芽胞液がないため、海外の芽胞液製品も含めた再検討を実施することを次年度の課題とする。

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) 白飯を用いた一般細菌数測定検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ：梶原三智香、中阪聡亮、堀田実和、高坂典子、渡辺卓穂（第119回日本食品衛生学会学術大会
2023. 10. 12～2023. 10. 13）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

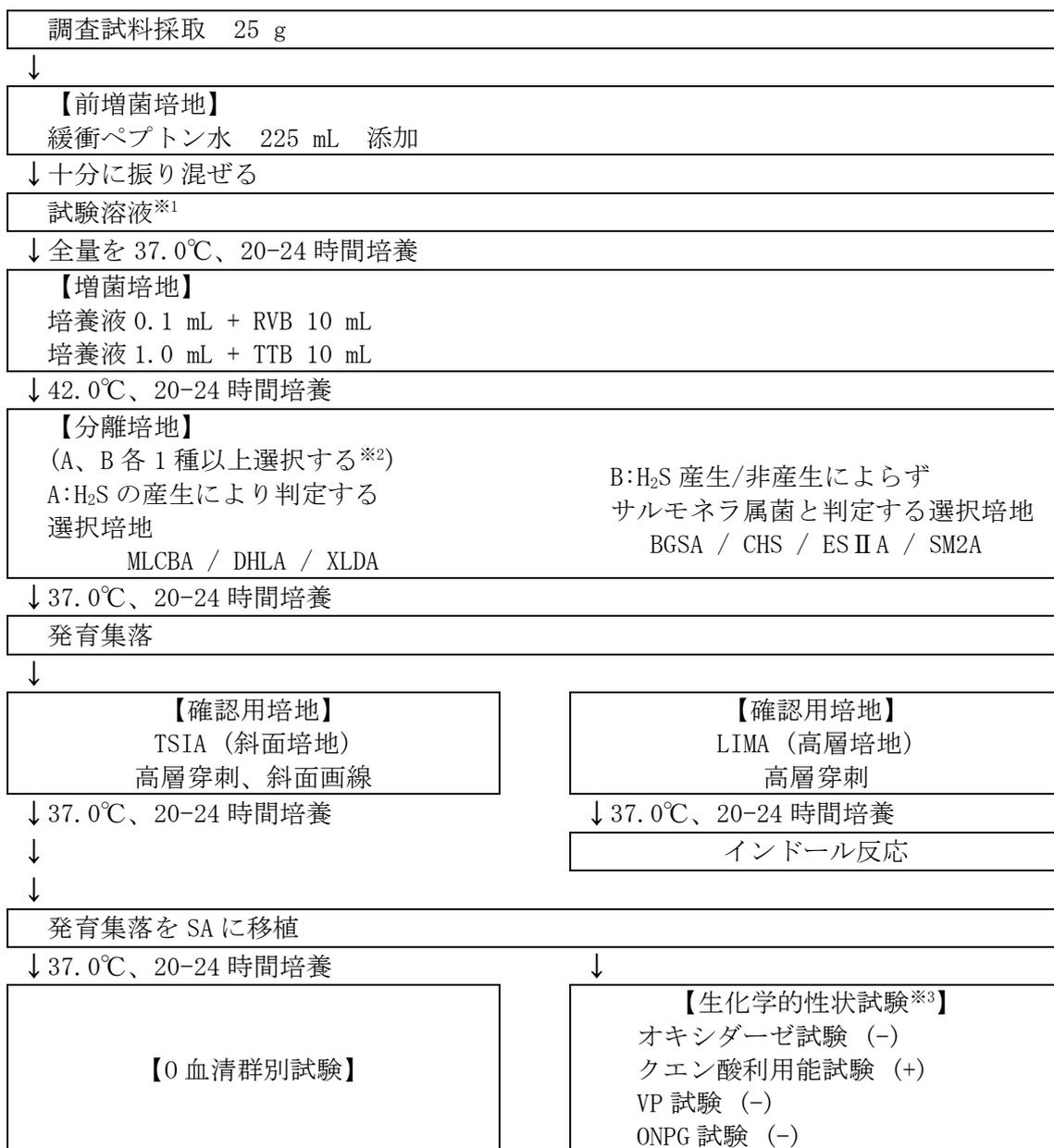
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

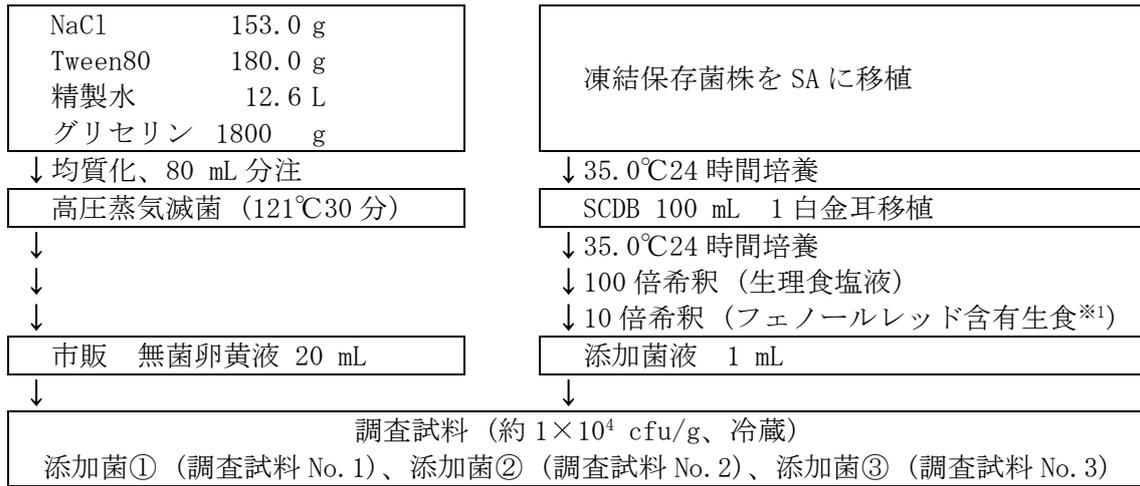


※1： 生菌数測定を要する場合は試験溶液の一部を10倍段階希釈し、SAで混積平板培地にした後、37.0℃で18時間以上培養して集落数の計測、生菌数の算出を実施した。

※2： 添加菌③、性能評価以外はXLDA、ES II Aのみを使用した。

※3： H₂S非産生サルモネラ属菌のみAPI 20Eを用いて実施した。

図1 サルモネラ属菌検査 試験手順



※1: 1.8% NaCl溶液と0.04 w/v% フェノールレッド溶液を等量混和して作製した。

図2 サルモネラ属菌検査 調査試料作製手順

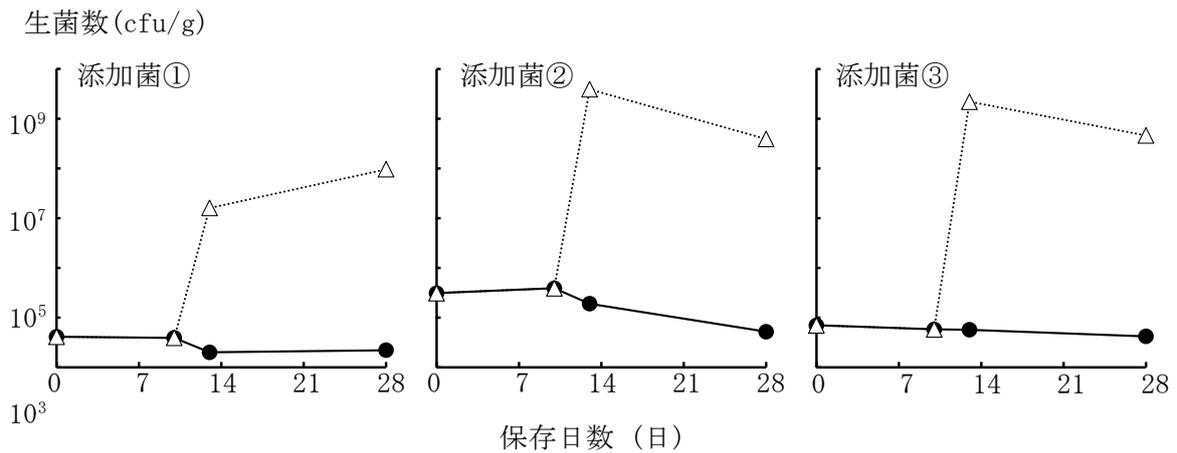


図3 サルモネラ属菌検査-性能評価 調査試料の生菌数の挙動

(●: 冷蔵試料、△: 常温試料)

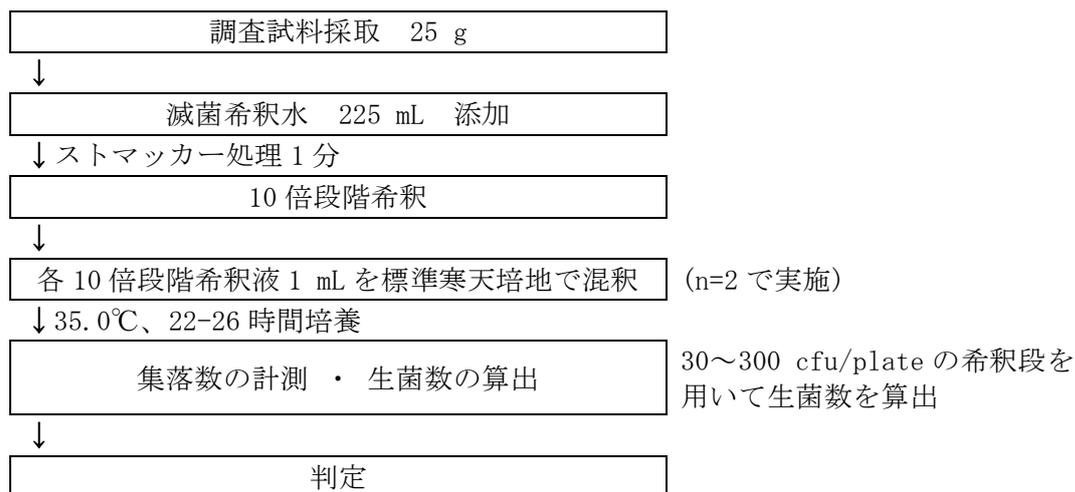
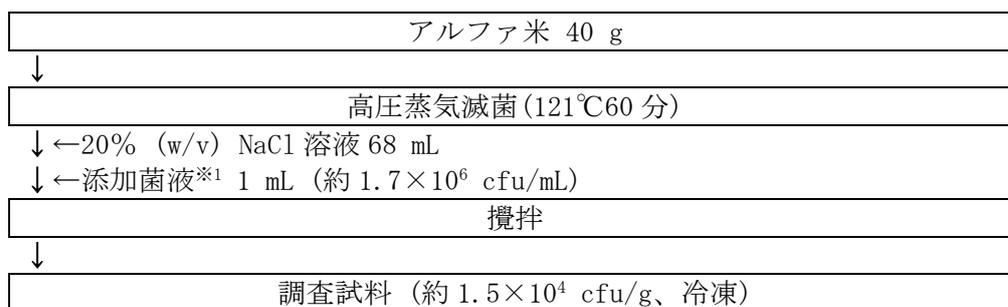


図4 一般細菌数測定検査 試験手順



※1： 0.04% (w/v) フェノールレッド溶液と 40% (w/v) 相当の NaCl を等量混合して作製した溶液で枯草菌芽胞液 (市販) を希釈し、約 1.7×10^6 cfu/mL に調整した。

図5 一般細菌数検査 調査試料作製手順

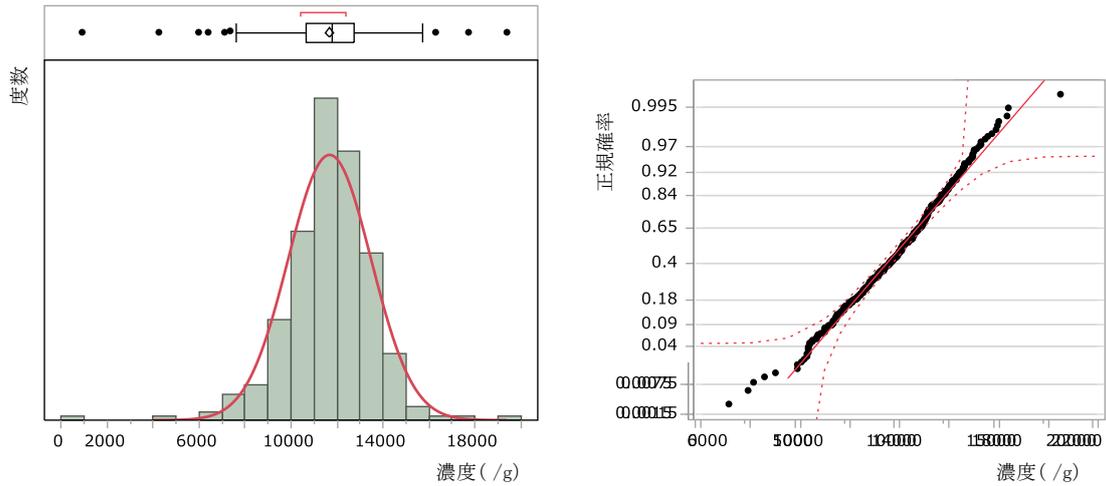


図6 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 実数解析のヒストグラムと正規確率プロット

有効機関：385 機関、データクリーニング除外機関：3 機関、2シグマ処理除外機関：1 機関

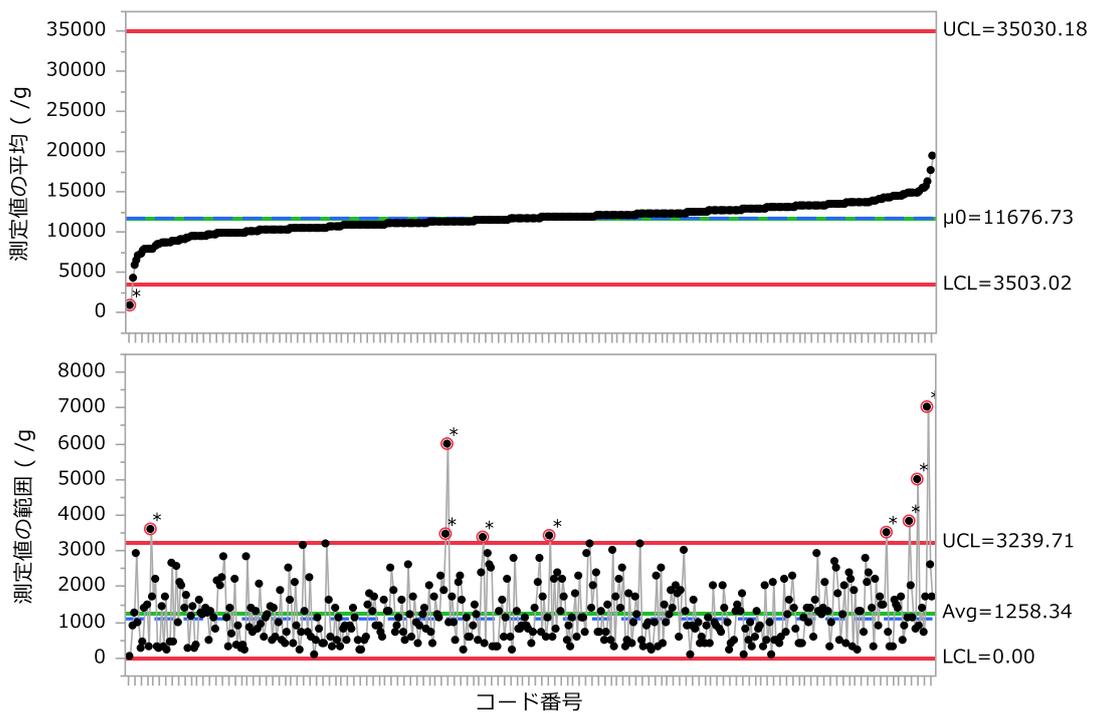


図7 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 実数解析の $\bar{X} - R$ 管理図

有効機関：385 機関、データクリーニング除外機関：3 機関、2シグマ処理除外機関：1 機関

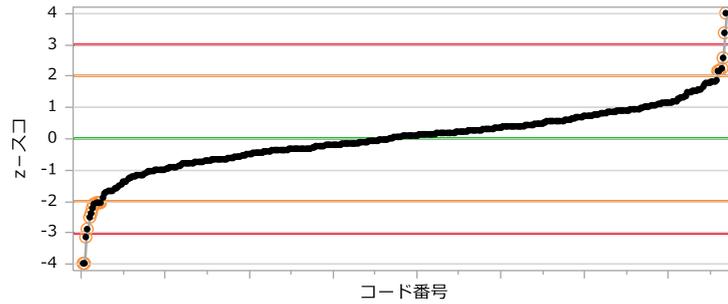


図8 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 実数解析のzスコアの順位
有効機関：385 機関、データクリーニング除外機関：3 機関、2シグマ処理除外機関：1 機関

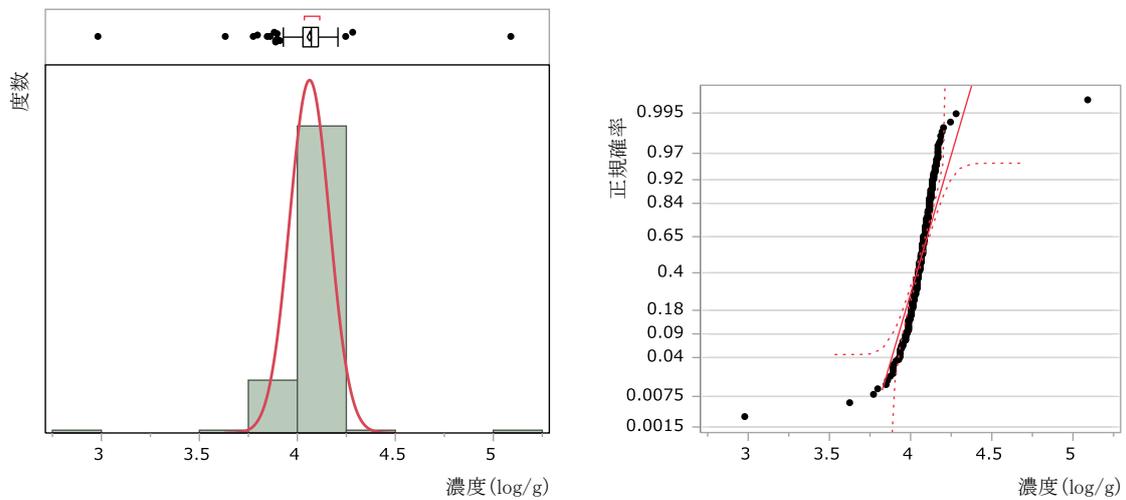


図9 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 対数解析のヒストグラムと正規確率プロット

有効機関：386 機関、データクリーニング除外機関：2 機関、2シグマ処理除外機関：1 機関

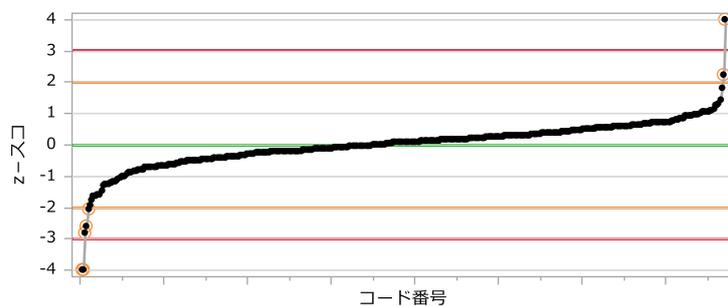


図10 一般細菌数測定検査-外部精度管理調査 対数解析のzスコアの順位
有効機関：386 機関、データクリーニング除外機関：2 機関、2シグマ処理除外機関：1 機関

表1 サルモネラ属菌検査-性能評価 調査試料の生菌数測定結果および定性試験結果

保管日数	添加菌①	添加菌②	添加菌③
接種菌液	5.5×10^5	2.3×10^6	2.5×10^5
A：冷蔵試料			
0 (添加直後)	4.1×10^3	3.1×10^4	7.0×10^3
10	3.9×10^3	3.9×10^4	5.8×10^3
13	2.0×10^3	1.9×10^4	5.7×10^3
28	2.2×10^3	5.2×10^3	4.2×10^3
B：常温試料			
13	1.6×10^6	3.9×10^8	2.2×10^8
28	9.6×10^6	3.9×10^7	4.6×10^7
定性試験判定 (0血清群別試験結果)	陰性 (該当なし)	陽性 (H ₂ S産生+) (04群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)

生菌数の単位：cfu/g

定性試験は冷蔵試料の保存0、13、28日目の試料について実施し、添加菌ごとに全て同じ結果となった。

表2 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ用調査試料の品質評価 (均質性確認試験)
配付用調査試料の生菌数測定結果および定性試験結果

調査試料	添加菌① 生菌数	添加菌② 生菌数	添加菌③ 生菌数
接種菌液	3.4×10^5	6.8×10^5	1.3×10^5
Sample1	5.2×10^3	1.9×10^4	3.9×10^3
Sample2	4.0×10^3	2.0×10^4	4.1×10^3
Sample3	4.1×10^3	1.7×10^4	4.1×10^3
Sample4	3.0×10^3	1.9×10^4	4.6×10^3
Sample5	3.0×10^3	1.8×10^4	4.9×10^3
生菌数平均値 (添加濃度)	3.9×10^3	1.9×10^4	4.3×10^3
定性試験判定 (0血清群別試験結果)	陰性 (該当なし)	陽性 (H ₂ S産生+) (04群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)
均質性確認試験の評価	均質である	均質である	均質である

生菌数の単位：cfu/g

定性試験はSample1、5について実施し、添加菌ごとに全て同じ結果となった。

各添加菌について、5個の生菌数に大きな差が認められず、定性試験結果が性能評価と同様の結果を得られた場合に均質であると評価した。

表3 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ用調査試料の品質評価（安定性確認試験）
配付用調査試料の生菌数測定結果および定性試験結果

調査試料	添加菌① 生菌数	添加菌② 生菌数	添加菌③ 生菌数
Sample1	3.0×10^2	3.5×10^2	7.1×10^2
定性試験判定 (0血清群別試験結果)	陰性 (該当なし)	陽性 (H ₂ S産生+) (04群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)
安定性確認試験の評価	安定であった	安定であった	安定であった

生菌数の単位：cfu/g

生菌数が計測でき、各添加菌の定性試験結果が均質性確認試験と同様の結果となったことからパイロットスタディ実施期間中の調査試料は安定であったと評価した。

表4 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ結果

添加菌	正答	機関数		正答率
		正	誤	
添加菌①	サルモネラ属菌陰性	51	0	100%
添加菌②	サルモネラ属菌陽性	51	0	100%
添加菌③	サルモネラ属菌陽性	48	3	94.1%

表5 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディ経過記録書の集計結果

経験年数	0-1年		2-4年		5-9年		10年以上		
	14		14		11		12		
試料採取量	1 g		10 g		25 g				
	0		0		51				
前増菌培地*	実施せず		L-システイン添加緩衝ペプトン水		緩衝ペプトン水				
	0		1		50				
増菌培地*	実施せず		テトラチオン酸塩培地		ラバポート培地		ラバポート・バシリアディス培地		セレナイトシスチン培地
	0		49		1		50		1
分離培地*	DHLA	MLCBA	XLDA	ES II A	BGA	CHS	SS寒天培地	X-SAL寒天培地	その他
	35	16	5	15	5	34	2	1	1
確認用培地*	実施せず		TSIA		LIMA		LIA培地(リジン鉄寒天培地)		その他
	0		51		49		2		2
O血清群別試験	実施		実施せず						
	51		0						
生化学的性状試験*	実施せず	オキシダーゼ試験	クエン酸利用能試験	VP試験	ONPG試験	マロン酸利用能試験	その他		
	7	41	36	38	27	28	6		
簡易同定キット*	実施せず	API20E	IDテスト・EB-20	BBLクリスタルE/NF	rapid ID 32 E	RapiD 20 E	VITEK 2	その他	
	21	11	10	0	2	3	2	3	

※：複数回答あり

表6-1 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディアンケート結果

外部精度管理調査のサルモネラ属菌検査用調査試料として、H₂S産生菌/H₂S非産生菌/サルモネラ陰性菌の3種から2種を採用するときの組み合わせについて

回答	機関数 (全体比)	
どの組み合わせでもよい	30	(58.8%)
陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい	14	(27.5%)
H ₂ S非産生菌は採用しないほしい	7	(13.7%)

表6-2 サルモネラ属菌検査-パイロットスタディアンケート結果
 サルモネラ属菌検査用調査試料についてのご意見、ご要望（抜粋）

非定型的サルモネラ属菌が疑われた場合においても、O抗原の血清学的試験を行うべきか。
クエン酸利用能試験で陰性を示すサルモネラ属菌も存在するようである。一方で、「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）」の注解には「サルモネラ属菌は…クエン酸利用能陽性、…である」との記述がある。非定型的サルモネラ属菌を疑ったもののクエン酸利用能が陰性であった場合、どのように判断すればよいか。また、クエン酸利用能以外の項目（オキシダーゼ試験・VP試験・ONPG試験）についても、陽性となった場合は、どのように判断すればよいか。
添加菌③の運動性が弱かった。
添加菌③のシモンズクエン酸ナトリウム培地での反応が弱かった。
日常検査でも陽性検体を扱う機会は少ないため、定型のサルモネラ属菌は毎回加えてほしい。
非定型菌の組み合わせは勉強になった。
H ₂ S非産生性 <i>Salmonella</i> 属菌検出を目的とした外部精度管理調査は今後とも（毎回でなくとも）実施すべきと考える。

表7 一般細菌数検査-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	1.2×10 ⁴	1.1×10 ⁴
②	1.1×10 ⁴	8.9×10 ³
③	1.2×10 ⁴	1.3×10 ⁴
④	1.1×10 ⁴	1.0×10 ⁴
⑤	9.2×10 ³	1.0×10 ⁴
⑥	1.4×10 ⁴	1.1×10 ⁴
⑦	1.5×10 ⁴	1.3×10 ⁴
⑧	1.5×10 ⁴	1.2×10 ⁴
⑨	1.2×10 ⁴	1.3×10 ⁴
⑩	1.3×10 ⁴	1.4×10 ⁴

生菌数の単位：cfu/g

表8 一般細菌数検査-品質評価（均質性確認試験 実数 分析値）

平均値	12000
標準偏差	1800
相対標準偏差	0.147%
一元分散分析 F値	3.011
一元分散分析 F値に対する有意確率（P値）	0.050

生菌数の単位：cfu/g

表9 一般細菌数検査-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	1.2×10^4	4.08	1.1×10^4	4.04	0.0007
②	1.1×10^4	4.04	8.9×10^3	3.95	0.0042
③	1.2×10^4	4.08	1.3×10^4	4.11	0.0006
④	1.1×10^4	4.04	1.0×10^4	4.00	0.0009
⑤	9.2×10^3	3.96	1.0×10^4	4.00	0.0007
⑥	1.4×10^4	4.15	1.1×10^4	4.04	0.0055
⑦	1.5×10^4	4.18	1.3×10^4	4.11	0.0019
⑧	1.5×10^4	4.18	1.2×10^4	4.08	0.0047
⑨	1.2×10^4	4.08	1.3×10^4	4.11	0.0006
⑩	1.3×10^4	4.11	1.4×10^4	4.15	0.0005
標準不確かさ ^{※1}	0.05		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10 一般細菌数検査-品質評価 (安定性確認試験 実数)

調査試料	生菌数
①	1.4×10^4
②	1.2×10^4
③	1.3×10^4
④	1.0×10^4
⑤	1.2×10^4
⑥	1.2×10^4
⑦	9.9×10^3
⑧	1.3×10^4
⑨	1.2×10^4
⑩	1.3×10^4

生菌数の単位：cfu/g

表 11 一般細菌数検査-品質評価 (安定性確認試験 実数 分析値)

平均値	12090
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（12000cfu/g）の±20%（9600～14400 cfu/g）の範囲にある時に適合と判定した。

表 12 一般細菌数検査-外部精度管理調査 (実数解析の結果)

回収機関数		389機関
データ・クリーニングによる除外		3機関
2シグマ処理による除外		1機関
データ数 (有効機関数)		385機関
付与値 (平均値)		11676.73 /g
標準偏差		1805.31 /g
相対標準偏差		15.46 %
\bar{x} 管理図による評価	$LCL : 3503.02 /g$ 、 $UCL : 35030.18 /g$	
	不満足 $\bar{x} < LCL$	1機関
	満足 $LCL \leq \bar{x} \leq UCL$	384機関
	不満足 $UCL < \bar{x}$	0機関
R 管理図による評価	$UCL : 3239.71 /g$	
	満足 $R \leq UCL$	376機関
	不満足 $UCL < R$	9機関
z -スコアによる評価		
	満足 $ z\text{-スコア} < 2$	367機関
	疑わしい $2 \leq z\text{-スコア} < 3$	13機関
	不満足 $3 \leq z\text{-スコア} $	5機関

LCL : 下部管理限界線、 UCL : 上部管理限界線

表 13 一般細菌数検査-外部精度管理調査 (対数解析の結果)

回収機関数			389機関
データ・クリーニングによる除外			2機関
2シグマ処理による除外			1機関
データ数 (有効機関数)			386機関
付与値 (平均値)			4.062477 log/g
標準偏差			0.102074 log/g
相対標準偏差			2.51 %
z-スコアによる評価	満足	$ z\text{-スコア} < 2$	379機関
	疑わしい	$2 \leq z\text{-スコア} < 3$	4機関
	不満足	$3 \leq z\text{-スコア} $	3機関

表 14 一般細菌数検査-外部精度管理調査 (経過記録書の集計結果)

経験年数	0-1年	2-4年	5-9年	10年以上	
	104	117	90	78	
試料採取量	10 g	25 g	その他		
	35	347	7		
解凍方法	解凍せず	流水 (水浴)	冷蔵庫	室温	その他
	170	65	89	53	12
解凍時間	30分未満	30-60分	61-120分	121-240分	241分以上
	92	55	30	24	18
希釈液	生理食塩水	ペプトン加生理食塩水	緩衝ペプトン水	リン酸緩衝希釈水	その他
	25	16	3	339	6
均質化方法	ストマッカー	ブレンダー	その他		
	366	12	11		
均質化処理時間	30秒	1分	2分	3分	その他
	35	328	14	6	6
使用培地	標準寒天培地	普通寒天培地	SCD寒天培地	その他	
	352	0	0	37	
使用培地タイプ	粉末培地	生培地	フィルム培地	その他	
	346	2	37	4	
培養温度	35°C	その他			
	369	20			
培養時間	24時間程度	48時間程度	その他		
	311	77	1		

令和5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

食品添加物試験法及び動物用医薬品試験法の開発に関する研究

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
研究分担者	今井 浩一	埼玉県衛生研究所
研究協力者	茂呂 紀寛	埼玉県衛生研究所

研究要旨

サイクラミン酸及びその塩類は、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。各検査機関は、厚生労働省から通知された試験法等に基づきサイクラミン酸及びその塩類の分析を実施し、その分析値の信頼性を確保するため精度管理を実施している。精度管理の手法の一つとして外部精度管理調査があるが、近年、サイクラミン酸及びその塩類を対象としたものは実施されていない。そこで、本研究では精度管理調査用試料を作製し、パイロットスタディを実施した。併せて、昨年度検討したサイクラミン酸通知試験法の改良法及び新規誘導体化剤を用いた分析法についても検討した。

パイロットスタディ用のたくあん漬け試料の品質評価を実施し、均質性及び安定性に問題がなく、本試料がパイロットスタディに十分に使用可能であることを確認した。パイロットスタディは、12の参加機関に対して調査用試料を配布し、報告値を解析した。昨年度の検討において、サイクラミン酸通知試験法の水抽出後におけるホモジナイズ操作の追加により、回収率の向上が確認された。そこで、その有用性を確認するためコラストアディを実施したところ、ホモジナイズ操作による影響は、その抽出法により異なり、透析法では回収率が低下し、水抽出法では向上した。さらに、サイクラミン酸の誘導体化に要する時間が添加回収試験での回収率に影響を及ぼすことが確認され、誘導体化剤を加えてから水層を除去するまでに要する時間により、回収率の低下が認められた。新規誘導体化剤を用いた分析法については、液-液分配による精製工程を追加することで夾雑ピークの影響を受けずに測定することが可能となった。

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れば、令和5年度はケーキ類、スナック菓子及びレトルト殺菌食品等から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」の別添や、令和5年10月23日付け健生食基発1023第1号及び健生食監発1023第1号「食品中の食品添加物分析法」の改正について」の別添6（以下「通知試験法」という。）が示されている。通知試験法の流れは図1のとおり。通知試験法は、試料からCYを抽出し、硫酸酸性下で次亜塩素酸ナトリウム溶液と反応させN,N-ジクロロシクロヘキシルアミンに誘導体化し、紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）で測定する方法である。

各検査機関は、通知試験法等を基に標準作業手順書を策定し、分析を実施している。そして、得られた分析値の信頼性を確保するため、精度管理を実施している。精度管理の手段のひとつとして外部精度管理調査が挙げられるが、近年、CY類を対象とした外部精度管理調査は行われていない。そこで、外部精度管理調査の一助とするため、本研究ではCY-Naを添加した精度管理調査用試料（以下「調査用試料」という。）を調製し、外部精度管理のパイロットスタディを実施することとした。

昨年度の検討において、たくあん漬けを用いた添加回収試験では水抽出後にホモジナイズ工程を追加することにより回収率が向上することが示唆されたことから、その有用性について確認するためコラボスタディを実施した。

また、添加回収試験における回収率がCYの誘導体化に要する時間と関連している可能性が考えられたことから、通知試験法におけるCYの各誘導体化工程における所要時間に対する回収率への影響について検討した。

昨年度、通知試験法と異なる誘導体化剤を用いた分析法（以下「新規分析法」という。）として、試料から抽出したCYを塩酸と過酸化水素でシクロヘキシルアミンに分解した後、水酸化ナトリウム塩基性下で塩化ベンゾイルと反応させN-シクロヘキシルベンズアミドに誘導体化し、HPLCで測定する方法を検討した。しかしながら、分析対象物質であるN-シクロヘキシルベンズアミドは230 nm付近に強い吸収を持つが、測定波長230 nmを用いて測定したところ、夾雑ピークが多く、より夾雑ピークの少ない254 nmで測定することとした。そこで、230 nmでの測定を可能とするため、新規分析法について改良を検討し、添加回収試験を実施した。

B. 方法

1. 試薬等

サイクラミン酸ナトリウム標準品：純度100.4%（富士フィルム和光純薬製）

蒸留水：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

塩酸：特級（関東化学製）

過酸化水素水（30%）：特級（富士フィルム和光純薬製）

塩化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

水酸化ナトリウム：特級（富士フィルム
和光純薬製）

塩化ベンゾイル：特級（富士フィルム和
光純薬製）

トリエチルアミン：特級（富士フィルム
和光純薬製）

逆相固相抽出カラム：Sep-Pak Vac
tC18 1 g/6 cc (Waters製)

強陰イオン交換固相抽出カラム：
Sep-Pak Vac Accell QMA 500 mg/6 cc
(Waters製)

2. 標準原液・標準溶液の調製

CY標準原液：CYの濃度が1000 µg/mLとな
るようにCY-Na標準品112.0mgを精秤し、水
を加えて正確に100 mLとした。

CY標準溶液：CYの濃度が100 µg/mLとな
るようにCY標準原液を水で希釈して調製
した。

検量線用標準溶液：CY標準溶液を適宜希
釈し、0.5～50 µg/mLの溶液を調製した。

添加用標準溶液：CY標準原液を使用した。

3. 機器

ホモジナイザー：ヒスコトロン NS-52
(マイクロテック・ニチオン製)

遠心機：Model 4000 (久保田商事製)

分析機器：1260 Infinity 2 (Agilent製)

4. HPLC分析条件

1) 調査用試料の作製及び通知試験法の追
加検討

移動相：アセトニトリル・水 (70:30)

カラム温度：40°C

カラム：TSKgel ODS-80Ts

4.6mm×15cm(5µm) (東ソー製)

流速：1.0 mL/分

注入量：20 µL

測定波長：314 nm

2) 新規分析法の改良

移動相：アセトニトリル・水 (60:40)

カラム温度：40°C

カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18

4.6mm×25 cm (5 µm) (Agilent製)^{*}

※ 定量を妨害する夾雑ピークを分離
するため、新規分析法では通知試験
法のものより長いカラムを使用した。

流速：1.0 mL/分

注入量：20 µL

測定波長：230 nm

5. 検量線及び定量

検量線用標準系列は、CYの濃度が0.5、1、
2、10、20、50 µg/mLとなるようにCY標準溶液
を水で希釈して調製した。定量は、絶対検量
線法により実施した。

6. 調査用試料の作製方法の検討

1) 基材

たくあん漬け (販売者：イオン株式会社)

2) 浸漬手順

調査用試料の浸漬手順は、平成23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) 分担研究報告書「食品外部
精度管理調査における適正調査試料作製
と信頼性確保に関する研究 (その1) - 理化学
的検査調査試料の作製に関する研究 -」
²⁾ 及び平成24年度同報告書「食品衛生外部
精度管理調査適正試料の作製検討と信頼
性確保に関する研究 (その1) - 理化学的検
査調査試料の作製に関する研究 -」³⁾にて

実施された大根漬けにソルビン酸を添加する研究に基づいて実施した。すなわち、たくあん漬け(長さ約10~15 cmの円柱状)は、縦長方向に4分割した。浸漬液は、CYとして0.2 g/kgとなるようにCY-Naに水を加えて調製した。そして、基材対浸漬液比が1:1(w/w)となるように4°Cで浸漬した。

3) 浸漬期間

浸漬期間は、1、2、3、7、14、21、28、84日間とした。浸漬後、たくあん漬けを浸漬液から取り出し、外皮、外皮を除く外表面及び中心部の3部位に分け、それぞれのCY濃度を分析した。あわせて、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液のCY濃度も分析した。

4) 試作品の品質評価

たくあん漬けを同重量の浸漬液(CYとして0.2 g/kg)に7日間浸漬し、浸漬液から取り出し、フードプロセッサーで細切均一化し、試作品とした。試作品のCY濃度を分析し、その結果を安定性試験の0日間とした。同様に試料を作製し、-20°Cにて保管した。保管期間は、28日間、56日間、84日間とした。冷凍保管後、CY濃度を分析し、安定性を確認した。試験溶液の調製は、通知試験法に従って、試料を水で抽出した後、1分間ホモジナイズ抽出し、定容し、誘導体化して測定した。なお、固相精製工程は、昨年度の検討において、たくあん漬けを用いた添加回収試験にて回収率低下が確認されたため、固相による精製工程は省略した。試験溶液調製法の概略を図2に示す。

7. 外部精度管理調査のパイロットスタディ

1) 調査用試料の作製

たくあん漬けを7日間浸漬し、浸漬液から取り出し、フードプロセッサーで細切均一化した。これを配布用容器(ポリスチレン/ポリエチレン製容器)に300 g程度分注し、発送まで-20°Cで保管した。

2) 調査用試料の品質評価

作製した調査用試料の均質性は、調査試料を作製・発送するまでの間に全調査用試料から10個の容器を無作為に抽出し、各容器から2部位を採取し、それぞれについて測定を行った後、一元分散分析することにより判断した。なお、均質性試験の結果を安定性試験の0日間のものとした。

また、調査用試料の安定性は、報告期限日以降に残存試料10個に対してCY濃度を分析し、上記の0日間の結果と比較することにより判定した。

3) パイロットスタディの実施

パイロットスタディの募集は令和5年11月~12月に行い、参加機関は計12機関であった。12月20日、調査用試料を宅配便(冷凍)にて、実施要領を電子メールにて送付した。分析結果の報告は令和6年2月29日までとした。

4) 報告結果の統計解析方法

報告結果は、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が実施している食品衛生外部精度管理調査⁴⁾に倣い、従来方式(算術平均値および標準偏差を用いた評価方法)とロバスト方式(*Huberのproposal 2*による方法)で統計解析した。

従来方式の手法では、データクリーニング(添加濃度の1/10以下及び10倍以上の報告値を含む機関の除外)後、 \bar{X} - R 管理図及び z -スコアによる解析を実施した。なお、本課題における \bar{X} 管理図では、総平均値の70%

及び120%をそれぞれ下部管理限界線（以下「LCL」という。）及び上部管理限界線（以下「UCL」という。）とした。

ロバスト方式の手法では、まずデータクリーニングを行い、次いで2次スクリーニングとしてメジアン・クリーニング（メジアン±メジアン×50%の範囲を超えたデータの除外）を行った後、Huberのproposal 2の推定方式⁵⁾⁶⁾による統計解析をMicrosoft Excelにより実施した。また、比較検証にはAMC開示のプログラムRobstat. xla Version 1.0を用いた。

なお、今回は小規模なパイロットスタディ（試験所数：12）であることから、その統計解析結果についてはあくまでも参考データに留めるものとした。

8. ホモジナイズ抽出に関するコラボスタディ（追加検討）

昨年度の検討により、たくあん漬けを用いた添加回収試験では水で抽出した後、ホモジナイズ抽出工程を追加することにより回収率が向上することが確認された。そこで、抽出工程にホモジナイズ操作を追加することで測定値に差異が生じるか否か検討した。抽出法として透析法を用いていた参加機関には、透析膜チューブに移す前にホモジナイズ抽出工程を、また、水抽出法を用いていた参加機関には、沸騰水浴での加熱と定容操作の間にホモジナイズ抽出工程を追加して分析するよう依頼した。コラボスタディの報告結果の判定は、パイロットスタディの報告結果との比較により行った。

9. 誘導体化時間の検討（追加検討）

添加回収試験において、CYの誘導体化に要する時間が回収率に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、回収率に影響を及ぼす原因を究明するため、誘導体化における各工程において試料を静置する時間を設け、その回収率への影響を比較した。

CYとして0.1 g/kgの水溶液を調製し、誘導体化における7つのタイミング（①次亜塩素酸ナトリウム試薬を入れた後、②1分間激しく振とうした後、③遠心分離した後、④水層を除去した後、⑤炭酸水素ナトリウム溶液を加えた後、⑥1分間振とうした後及び⑦遠心分離した後）のうちいずれか1つにおいて、室温にて30分（①～③は10分も実施）静置の工程を設け、影響を確認した。併せて、冷蔵庫にて30分静置を行う検討も行い、結果を比較した。検討した誘導体化における試料を静置する工程箇所の概略を図3に示す。

10. 新規分析法の改良

1) 試料

埼玉県内で市販されていたオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレートを用いた。

2) 試験溶液の調製

試料10 gを量り採り、水70 mLを加えて沸騰水浴中で必要に応じてガラス棒等で攪拌しながら15分間加熱した。冷却後、水を加えて正確に100 mLとした後、抽出液の一部を採取し、3,500 rpm、10分間遠心分離して上澄液10 mLを量り採り、Sep-Pak Vac tC18 (1 g/6 cc) 及びSep-Pak Vac Accell QMA (500 mg/6 cc) をこの順番に接続したものに負荷した。負荷液を捨てた後、水 10 mLで洗浄した。Sep-Pak Vac tC18 (1 g/6

cc) を除去した後、Sep-Pak Vac Accell QMA (500 mg/6 cc) を塩酸(1→100)10 mLで溶出させ、その溶出液を塩酸(1→100)で10 mLとして抽出液とした。

抽出液2 mLに8 mol/L塩酸0.5 mL及び3%過酸化水素水0.5 mLを加えて、沸騰水浴中で30分間加熱した。この分解液全量に塩化ナトリウム1 g、5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液2 mL及びアセトニトリル5 mLを加え、1分間振とうし、3,500 rpm、5分間遠心分離した。アセトニトリル層を採取し、0.1(v/v)%トリエチルアミン含有アセトニトリル溶液100 µL及び0.1(v/v)%塩化ベンゾイル含有アセトニトリル溶液200 µLを加え混和した。アセトニトリルを加え全量を6 mLとし、これを精製水で正確に10 mLとしたものを試験溶液とした。その概略を図4に示す。

3) 添加回収試験

添加用標準溶液をオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレートに添加し、3併行の添加回収試験を実施した。添加濃度は、令和6年3月8日付け厚生食基発0308第1号厚生食監発0308第1号「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第2版食品中の食品添加物分析法」の改正について別添1「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」(以下「妥当性ガイドライン」という。)に基づき、試料中20 µg/gとした。

C. D. 研究結果および考察

1. 浸漬期間の検討

たくあん漬けの浸漬期間によるCY濃度の経時変化の結果を表1~4及び図5に示し

た。

浸漬期間1日目における3部位のCY濃度は、外皮で 0.0853 ± 0.0128 g/kg、外皮を除く外表面で 0.0797 ± 0.0150 g/kg、中心部で 0.0844 ± 0.0144 g/kgであり、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液のCY濃度 0.126 ± 0.00376 g/kgより大幅に低かった。

その後、3部位の濃度は経時的に増加し、浸漬期間7日間におけるCY濃度は、外皮で 0.0973 ± 0.00137 g/kg、外皮を除く外表面で 0.101 ± 0.00290 g/kg、中心部で 0.100 ± 0.00244 g/kgとなり、いずれの部位にも均等にCYが浸透したと考えられた。また、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液についてもCY濃度を測定したところ、 0.100 ± 0.00355 g/kgであり、たくあん漬けの各部位とほぼ同濃度であった。

浸漬期間7日目以降における3部位の濃度は、概ね一定であり、浸漬期間84日目におけるCY濃度は、外皮で 0.0992 ± 0.00131 g/kg、外皮を除く外表面で 0.0976 ± 0.00172 g/kg、中心部で 0.0985 ± 0.00604 g/kg、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液で 0.0954 ± 0.00281 g/kgであった。

以上の結果より、調査用試料の作製にあつては、浸漬期間を7日間とすることとした。

2. 試作品の品質評価

試作品のCY濃度は表5に示したとおり 0.100 ± 0.00254 g/kgとなり、良好な結果が得られた。試作品の冷凍保管における安定性試験の結果を表6及び図6に示した。試料のCY濃度は、冷凍保存28日目で 0.0984 ± 0.00274 g/kg、56日目で

0.981±0.00141 g/kg、84日目で0.0985±0.000499 g/kgとなった。

試作品作製0日目におけるCY濃度を100%として28日目、56日目及び84日目での安定性を算出したところ、それぞれ98.1%、97.8%、98.1%となった。以上の結果より、冷凍保管84日間における安定性は保持されていると判断した。

3. 外部精度管理調査のパイロットスタディ

1) 調査用試料の品質評価

調査用試料の均質性試験の結果を表7、安定性試験の結果を表8に示した。均質性試験の結果(0日目)を一元配置分散分析によって評価したところ、測定値が0.0980±0.00215 g/kg、相対標準偏差(RSD(%))が2.2であり、容器間のばらつきは有意ではなく(P値>0.05)、調査用試料は十分に均質と判断した。

また、安定性試験の結果(82日目)は、測定値が0.0971±0.00212 g/kgであり、均質性試験での結果を100%として安定性を算出したところ、99.1%となった。このため、調査用試料は、調査期間中安定であったと判断した。

2) パイロットスタディ結果

I 結果の報告

すべての参加機関から期限内に結果を受領した。

II 参加機関の検査法

参加全12機関の抽出法は、透析法が3機関、水抽出法が9機関であった。分析機器は、HPLCを使用した機関が10機関であり、液体クロマトグラフ質量分析計(以下「LC-MS」という。)を使用した機関と液体クロマト

グラフタンデム質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)を使用した機関が各1機関であった。LC-MSを使用した機関とLC-MS/MSを使用した機関は、どちらも水抽出法を採用し、CYを誘導体化せずに測定していた。

参加機関が適用した分析法のうち、特徴的な事例を以下に記す。

i) 透析法

水酸化ナトリウム水溶液を透析内液及び透析外液とした機関が1機関あった。

ii) 水抽出法

水抽出を行う前、試料に水を加えて1分間振とうした機関が1機関あった。水抽出時の水量を通知試験法より多くした機関が3機関(70~100 mL)あった。加熱中にスパーテル等を用いて攪拌した機関が5機関あった。加熱後、水酸化ナトリウム水溶液でpH調整してからメスアップした機関が1機関あった。固相精製を実施しなかった機関が3機関(LC-MSを使用した機関とLC-MS/MSを使用した機関を含む)あった。

III 報告値の解析結果

報告値の解析結果について表10及び11、図7~10に示す。従来方式では、参加全12機関においてデータクリーニングで除外された機関はなかった。全機関の平均値±標準偏差は0.0947±0.00875 g/kg(RSD(%):9.2)であった。 \bar{X} 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが(図7)、 R 管理図で UCR (0.0137 g/kg)を超えた機関は1機関(0.0155 g/kg)確認された(図8)。また、 z -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかった(図9)。

一方、ロバスト方式では、データクリーニング及びメジアン・クリーニングで除外された機関はなかった。全機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は 0.0948 ± 0.00823 g/kg (RSD(%):8.7)であった。 z -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかったが、2以上3未満の機関は1機関 (-2.05) 認められた (図10)。

従来方式にて P 管理図で UCR を超えた機関とロバスト方式にて z -スコアの絶対値が2以上であった機関は同一の機関であった。ただし、当該機関からの報告値は、妥当性ガイドラインにおける真度及び精度の目標値 (真度 (%): 70~120、併行精度 (RSD(%)) < 10) を満たしていた。

4. ホモジナイズ抽出に関するコラボスタディ

各参加機関の分析法の抽出工程にホモジナイズ操作を追加することで測定値に差異が生じるか否か検討したところ、抽出法によってその影響が異なるものとなった。

まず、透析法ではホモジナイズ抽出操作を実施した場合の平均値は 0.0948 ± 0.00724 g/kgで、ホモジナイズ抽出操作を実施しなかった場合の平均値 0.101 ± 0.00910 g/kgと比較すると93.7%となり、平均値が低下した。その原因として、ホモジナイズ抽出工程による試料の損失が考えられた。参加機関から試料をホモジナイズすることで透析膜へ入れる際に試料量の損失が生じたとの意見が寄せられた。通知試験法では試料を約20 mLの透析内液と混和し、少量の透析内液を用いて透析膜チューブ内に移すこととなっている

ため、ホモジナイズ抽出工程において透析膜チューブに移す際のホモジナイザーや器具の洗いこみに使用できる透析内液の液量も少量となり、十分な回収が困難になったものと考えられる。ホモジナイズ抽出工程が回収率に負の影響を及ぼす結果となったことから、ホモジナイズ抽出工程は透析法に不向きであると考えられた。

一方、水抽出法では、ホモジナイズ抽出操作を実施した場合の平均値は 0.0948 ± 0.00725 g/kgで、ホモジナイズ抽出操作を実施しなかった場合の平均値 0.0925 ± 0.00796 g/kgと比較すると102.5%となり、有意な差があった ($p < 0.05$)。なお、平均値の向上が微増にとどまった要因として、まず透析法と同様にホモジナイズ抽出工程による試料の損失が考えられた。また、ホモジナイズ抽出工程による操作性の悪化も要因として考えられた。操作性については、複数の協力機関から「ホモジナイズ抽出工程で試料を微細にすることで抽出液が懸濁液となり、その後の上澄み採取時や固相精製時に障害となった」旨の意見が寄せられた。以上より、抽出工程後のホモジナイザー等の洗いこみや抽出液のろ過・遠心分離といった工程を設けるなど、ホモジナイズ抽出工程をより有用とするためには更なる改良を施す必要があるものと考えられた。

そして、各参加機関が通知試験法から様々な工夫を加えていたことも平均値を微増に留めた大きな要因と考えられた。昨年度の研究においても、水抽出時の水量増加や攪拌が添加回収試験における回収率向上につながることを確認された。本コラボスタディにおいても、複数の機関が水添

加量の増加や攪拌といったCYの抽出を良好にする手段を講じたことにより、ホモジナイズ抽出工程の影響が小さくなったものと考えられた。今回の各参加機関の分析法を参考に抽出時の改良について、引き続き検討することが回収率の更なる向上に繋がるものとする。

5. 誘導体化時間の検討

CYの誘導体化反応時間と回収率との検討結果を図11及び表11に示す。

まず室温での静置について、①次亜塩素酸ナトリウム試薬を入れた後から③遠心分離した後水層を除去した後までにおける静置では、経時的に回収率が低下していた。最も回収率を低下させたのは②1分間激しく振とうした後の静置であり、10分では77.9%、30分では48.7%であった。また、静置時間が長いほど回収率のばらつきも大きくなった。一方、④水層を除去した後以降の静置は回収率にほとんど影響を与えなかった。次に冷蔵での静置について、いずれの段階においても回収率に影響はみられなかった。

以上より、室温下での誘導体化では、水層を除去するまでに要する時間の長さがCYの回収率に影響することが確認された。回収率の低下やばらつき防止のため、水層除去までの工程を迅速に実施することが必要であると考えられた。また、試料数が多く処理に時間を要する場合や、処理中にやむを得ず試料を静置しなければならない場合は、試料を冷蔵保管することが望ましいものと考えられた。

標準溶液と同様、試料マトリックス存在下においても、誘導体化剤を投入してから

水層を除去するまでに要する時間が回収率に影響を及ぼしているか否かについて、たくあん漬け試料を用いて検討した。その結果、上記①と②の間に静置工程（30分）を設けた場合、3併行での添加回収試験の回収率は79.9%であった。試料マトリックス存在下においても誘導体化での水層を除去するまでに要する時間がCYの回収率に影響することが確認された。

なお、本現象の要因として、CYの誘導体であるN,N-ジクロロシクロヘキシルアミンの揮散が考えられたが、本研究においては原因の断定には至らなかった。

6. 新規分析法の改良

新規分析法の改良前後のクロマトグラムを図12に示す。液-液分配工程の導入により夾雑ピークを大きく軽減することができ、230 nmでの測定が可能と考えられた。

オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレート4食品を試料に用いて、10. 新規分析法の改良 2) 試験溶液の調製に従って3併行の添加回収試験（添加濃度：試料中20 µg/g）を実施した。各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図13に示した。検討した何れの試料においても、ブランク試料にCYの定量を妨害するピークは認められなかった。添加回収試験における真度及び併行精度の検討結果を表12に示した。オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレートの4試料の平均回収率は、それぞれ99.2%、100.4%、102.0%及び104.6%であり、すべての試料において良好な回収率であった。

N-シクロヘキシルベンズアミドは230 nm

付近に強い吸収を持つ。昨年度の検討では、液-液分配工程を実施しなかったため、夾雑ピークが多かったことから、夾雑ピークの少ない254 nmを用いて測定することとした。本検討では、液-液分配による精製工程を追加することで230 nmでの測定が可能となり、254 nmでの測定に比べ測定感度が上昇した。

7. 今後の展望

外部精度管理調査のパイロットスタディでは、調査用試料を冷凍した。これは、たくあん漬けを浸漬液から取り出して冷蔵保管すると1週間程度でカビが生えたためである。カビ発生を防止するための手段の一つとして、保存料の添加が考えられる。たくあん漬けに保存料を添加することについては、本研究の基となった平成23年度及び平成24年度の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）分担研究報告書にて、ソルビン酸を用いて検討なされている。このソルビン酸をCYと併せてたくあん漬けに添加することができれば、調査用試料の基材としての安定性を向上させ、かつ検査項目も増やすことができるため、より有用な調査用試料を作製できるものとする。

新規分析法の改良では、定量限界値に関する検討として定量限界濃度での添加回収試験やそのクロマトグラムにおけるS/Nの確認を行う予定である。また、検討した4食品以外の食品を用いた添加回収試験を実施し、新規分析法の性能評価について引き続き検討する予定である。

E. 結論

たくあん漬けを基材としてCYの精度管理調査用試料作製を試みた。その結果、7日間の浸漬でたくあん漬けの部位毎のCY濃度を均一化でき、また、作成した試料を84日間冷凍保管した際の安定性も良好であった。以上より、たくあん漬けはCYの外部精度管理調査用試料に適応できる可能性が示唆された。

精度管理調査のパイロットスタディ調査用試料の均質性及び安定性は良好であった。また、参加機関の報告値は、従来方式およびロバスト方式で解析した。

サイクラミン酸試験法におけるホモジナイズ抽出工程の追加は、透析法では回収率を低下させ、水抽出法では向上させた。水抽出法における回収率をより向上させるため、ホモジナイズ抽出工程には更なる改良が必要と考えられた。

CYの誘導体化については、誘導体化剤を投入してから水層を除去するまでの工程に時間をかけることで回収率が低下した。試験溶液の調製時は、誘導体化の所要時間にも配慮することが重要と示唆された。

昨年度検討した新規分析法に液-液分配工程を導入することにより、夾雑ピークを大幅に軽減することができた。検討した何れの試料においても、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。さらに、ブルーベリージャム等の4食品を用いた添加回収試験の回収率は良好であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

1) 違反事例 | 厚生労働省

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunit suite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yun yu_kanshi/ihan/index.html

2) 小島幸一、鈴木達也、渡辺卓穂、高坂

典子：平成23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）分担研究報告書「食品外部精度管理調査における適正調査試料作製と信頼性確保に関する

研究（その1）－理化学的検査調査試料の作製に関する研究－」（2012）

3) 小島幸一、渡辺卓穂、鈴木達也、高坂典子：平成24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）分担研究報告書「食品衛生外部精度管理調査適正試料の作製検討と信頼性確保に関する研究（その1）－理化学的検査調査試料の作製に関する研究－」（2013）

4) 一般社団法人食品薬品安全センター 秦野研究所：「2022年度 食品衛生外部精度管理調査結果報告書」（2023）

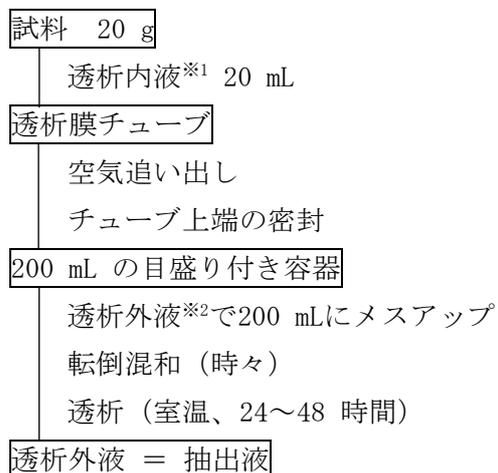
5) Analytical Methods Committee, Robust Statistics – How Not to Reject Outliers Part 1. Basic Concepts, Analyst, Vol. 114, 1693-1697(1998)

6) Huber, P. J., Robust Estimation of a Location Parameter, The Annals of Mathematical Statistics, Vol. 35, No. 1, 73-101(1964)

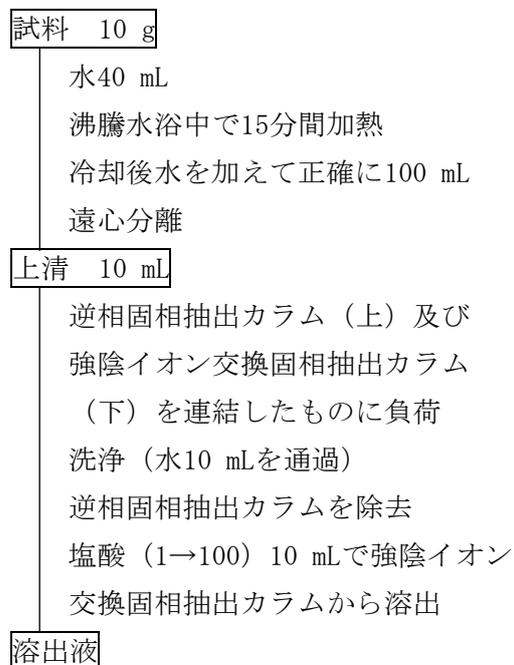
以下 図表等

図1 サイクラミン酸及びその塩類の分析法（通知試験法）

a 透析法



b 水抽出法



抽出液 10 mL 又は 溶出液全量

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
遠心分離
水層を除去

ヘキサン層

5 w/v %炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL
1分間振とう
遠心分離

試験溶液

※1 透析内液：塩化ナトリウム 100 g を 0.01 mol/L 塩酸に溶解して 1000 mL としたもの

※2 透析外液：0.01 mol/L 塩酸

図2 精度管理調査用試料の作製における分析法

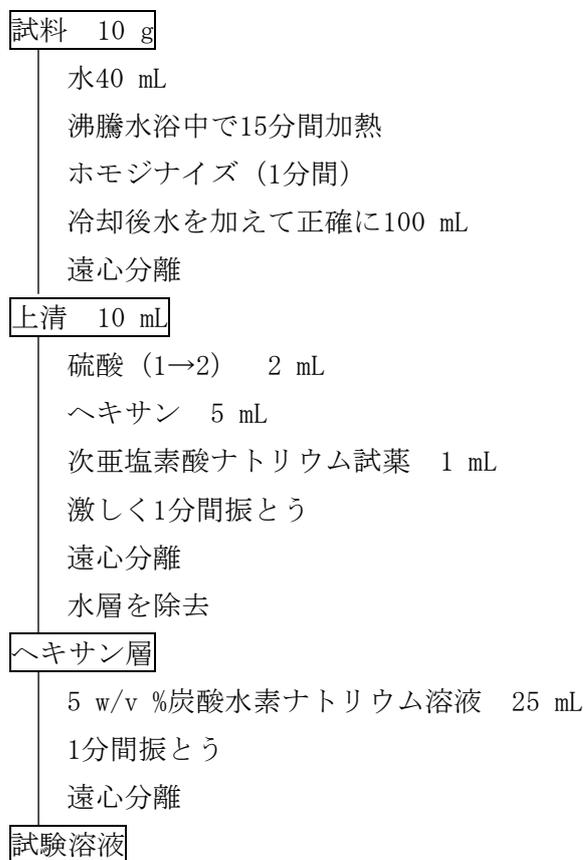


図3 誘導体化における試料の静置のタイミング

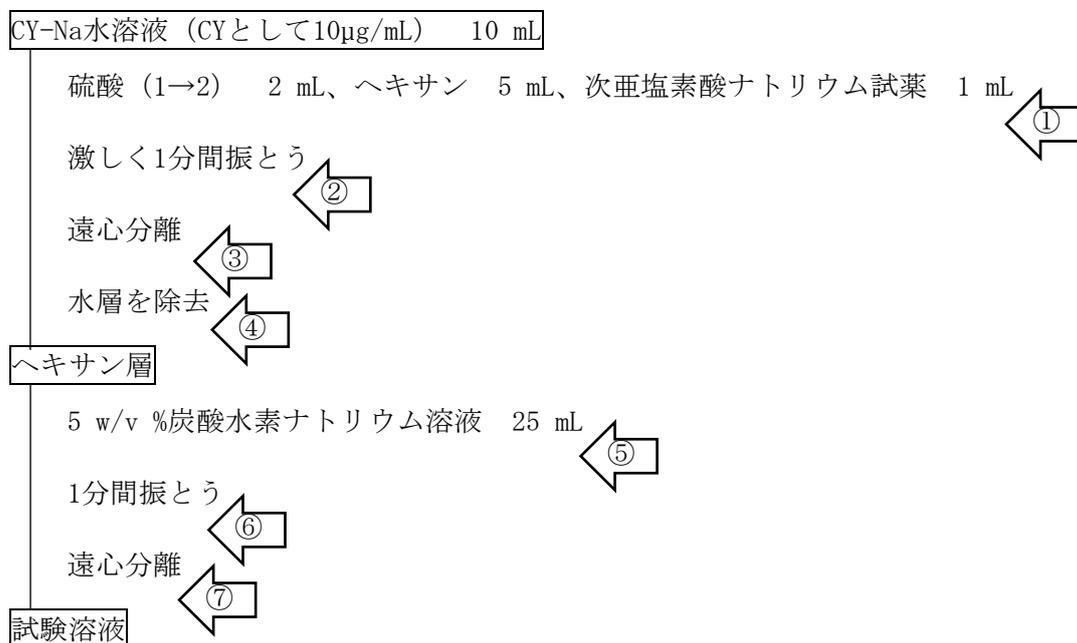


図 4 新規分析法の改良法

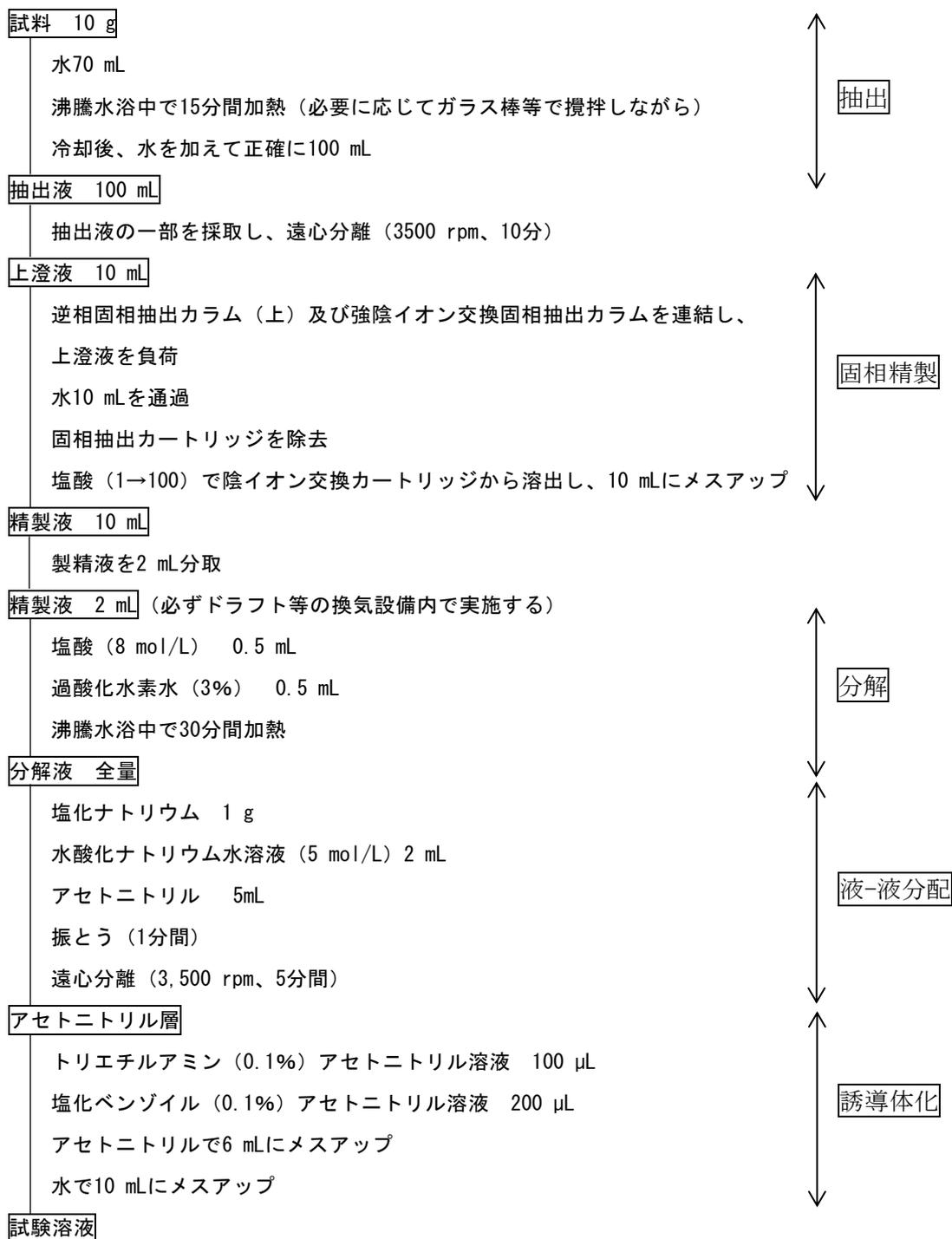


表 1 たくあん漬け（外皮）の CY 濃度の経時変化

浸漬期間	1 日目	2 日目	3 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目	84 日目
平均値 (g/kg)	0.0853	0.0866	0.0964	0.0973	0.0980	0.0998	0.0978	0.0992
SD (%)	0.0128	0.00229	0.00480	0.00137	0.00125	0.000916	0.00195	0.00131
RSD (%)	15.1	2.6	5.0	1.4	1.3	0.9	2.0	1.3
回収率 (%)	85.3	86.6	96.4	97.3	98.0	99.8	97.8	99.2

(n =5)

表 2 たくあん漬け（外皮を除く外表面）の CY 濃度の経時変化

浸漬期間	1 日目	2 日目	3 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目	84 日目
平均値 (g/kg)	0.0797	0.0879	0.0993	0.1006	0.0999	0.102	0.101	0.0976
SD (g/kg)	0.0150	0.00407	0.00295	0.00290	0.00399	0.00169	0.00136	0.00172
RSD (%)	18.8	4.6	3.0	2.9	4.0	1.7	1.3	1.8
回収率 (%)	79.7	87.9	99.3	100.6	99.9	102.1	101.2	97.6

(n =5)

表 3 たくあん漬け（中心部）の CY 濃度の経時変化

浸漬期間	1 日目	2 日目	3 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目	84 日目
平均値 (g/kg)	0.0884	0.0980	0.103	0.100	0.0986	0.102	0.101	0.0985
SD (g/kg)	0.0144	0.00279	0.00242	0.00243	0.00228	0.000400	0.00146	0.00604
RSD (%)	16.3	2.8	2.3	2.4	2.3	0.4	1.4	6.1
回収率 (%)	88.4	98.0	103.5	100.5	98.6	102.3	101.0	98.5

(n =5)

表 4 たくあん漬けを取り出した後の浸漬液の CY 濃度の経時変化

浸漬期間	1 日目	2 日目	3 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目	84 日目
平均値 (g/kg)	0.126	0.108	0.103	0.100	0.0990	0.100	0.0983	0.0954
SD (g/kg)	0.00376	0.00343	0.00324	0.00355	0.00183	0.00421	0.00157	0.00281
RSD (%)	3.0	3.2	3.1	3.6	1.9	4.2	1.6	2.9
回収率 (%)	126.4	108.4	103.3	100.0	99.0	99.7	98.3	95.4

(n =5)

図5 たくあん漬けの部位毎のCY濃度の経時変化

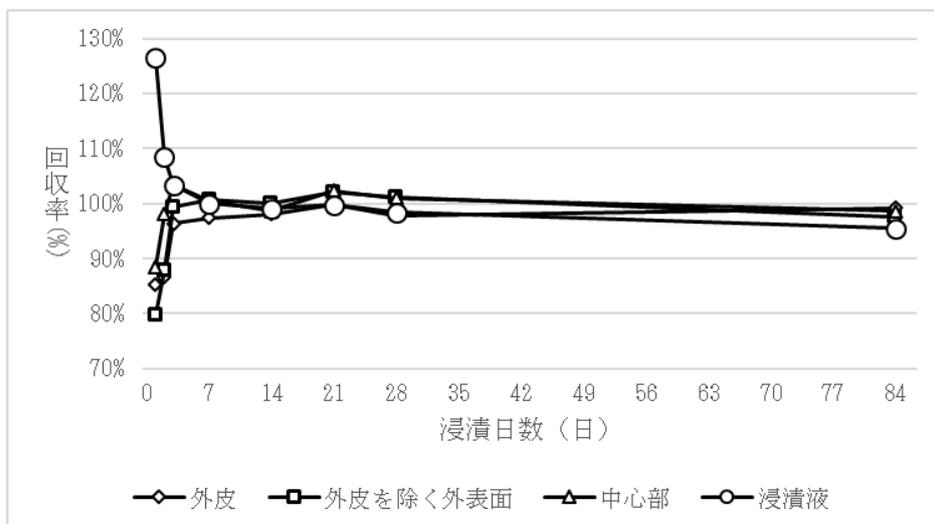


表 5 試作品の CY 濃度

	結果
平均値 (g/kg)	0.100
SD (g/kg)	0.00254
RSD (%)	2.5
回収率 (%)	100.3

(n =5)

表 6 試作品の冷凍保管における安定性試験結果

保管期間	0 日目	28 日目	56 日目	84 日目
平均値 (g/kg)	0.100	0.0984	0.0981	0.0985
SD (g/kg)	0.00254	0.00274	0.00141	0.000499
RSD (%)	2.5	2.78	1.44	0.51
安定性確認時の濃度/0 日目の濃度 (%)		98.1	97.8	98.1

(n =5)

図 6 試作品の冷凍保管における安定性試験結果

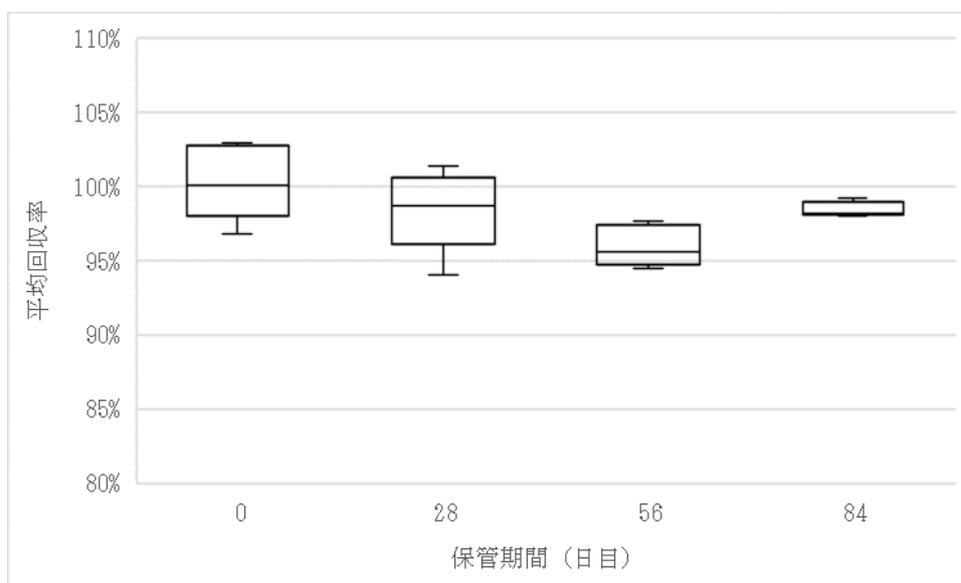


表 7 調査用試料の品質評価 (0 日目)

	結果
平均値 (g/kg)	0.0980
SD (g/kg)	0.00215
RSD (%)	2.2
<i>F</i> 値	1.20
<i>F</i> 値に対する有意確率 (<i>P</i> 値)	0.958
有意水準 5%点	3.02

F 値の自由度は (9, 10)

表 8 調査用試料の安定性試験結果 (82 日目)

	結果
平均値 (g/kg)	0.0971
SD (g/kg)	0.00212
RSD (%)	2.2
安定性確認時の濃度/均質性確認時の濃度 (%)	99.1

表9 従来方式による解析結果

回収機関数	12	
データクリーニングによる除外	なし	
データ数 (有効機関数)	12	
平均値 (g/kg)	0.0947	
標準偏差 (g/kg)	0.00875	
\bar{X} 管理図による評価	$LCL : 0.0663 \text{ g/kg}$ 、 $UCL : 0.114 \text{ g/kg}$	
	$\bar{x} < LCL$	0 機関
	$LCL \leq \bar{x} \leq UCL$	12 機関
	$UCL < \bar{x}$	0 機関
R 管理図による評価	$UCL : 0.0137 \text{ g/kg}$	
	$\bar{x} < LCL$	0 機関
	$LCL \leq \bar{x} \leq UCL$	11 機関
	$UCL < \bar{x}$	1 機関
z -スコアによる評価	$ z\text{-スコア} < 2$	12 機関
	$2 \leq z\text{-スコア} < 3$	0 機関
	$3 \leq z\text{-スコア} $	0 機関

LCL : 下部管理限界線、 UCL : 上部管理限界線

表10 ロバスト方式による解析結果

メジアン・クリーニングによる除外	なし	
データ数 (有効機関数)	12	
ロバスト平均値 (g/kg)	0.0948	
ロバスト標準偏差 (g/kg)	0.00823	
z -スコアによる評価	$ z\text{-スコア} < 2$	11 機関
	$2 \leq z\text{-スコア} < 3$	1 機関
	$3 \leq z\text{-スコア} $	0 機関

図7 従来方式での \bar{X} 管理図

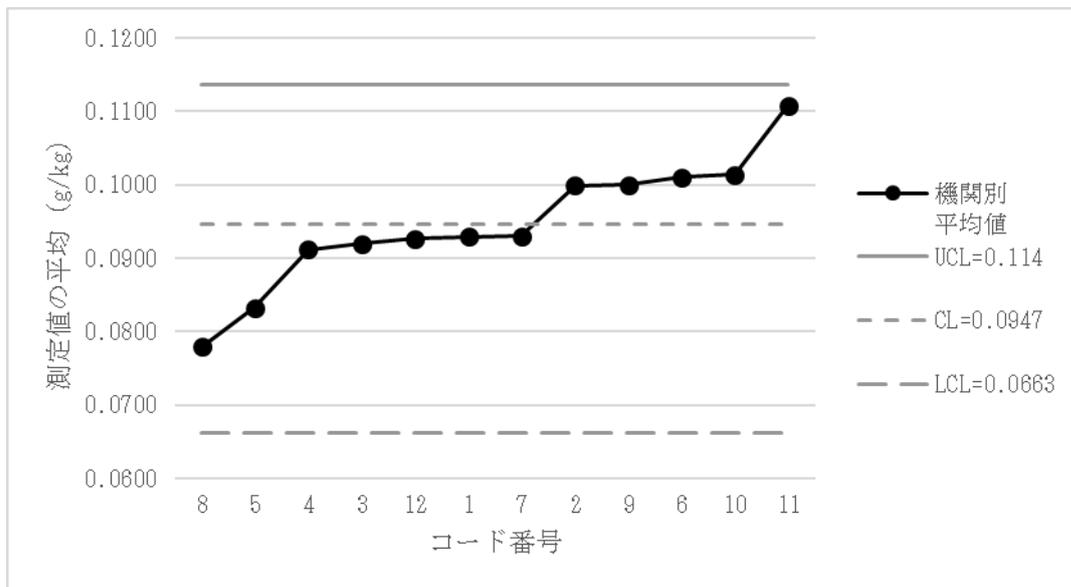


図8 従来方式でのR管理図

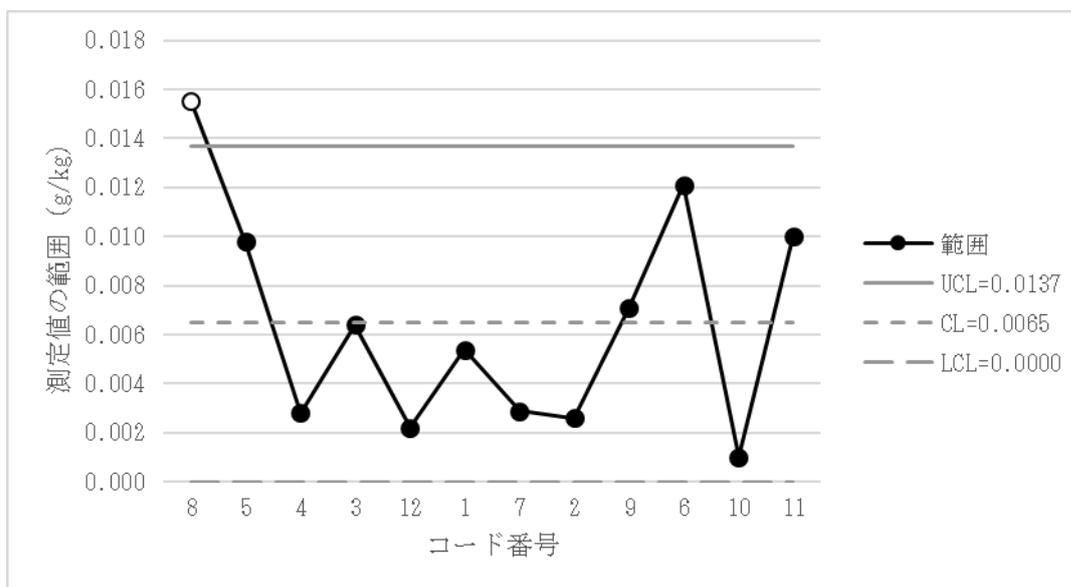


図9 従来方式での z-スコア

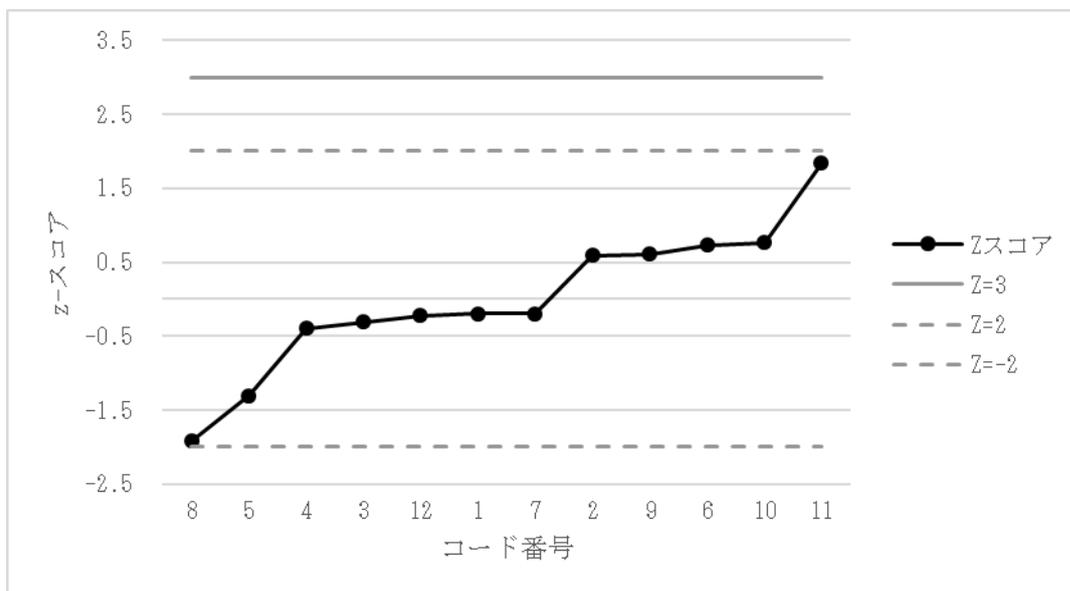


図10 ロバスト方式での z-スコア

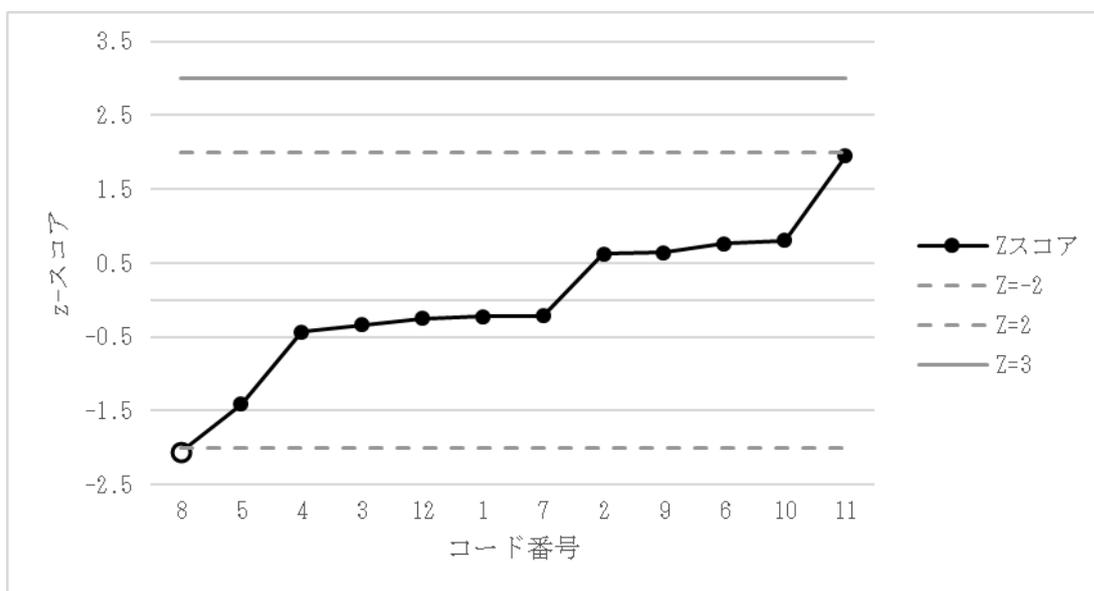


表 11 誘導体化における試料の静置と平均値

(0.1 g/kg にて検出)

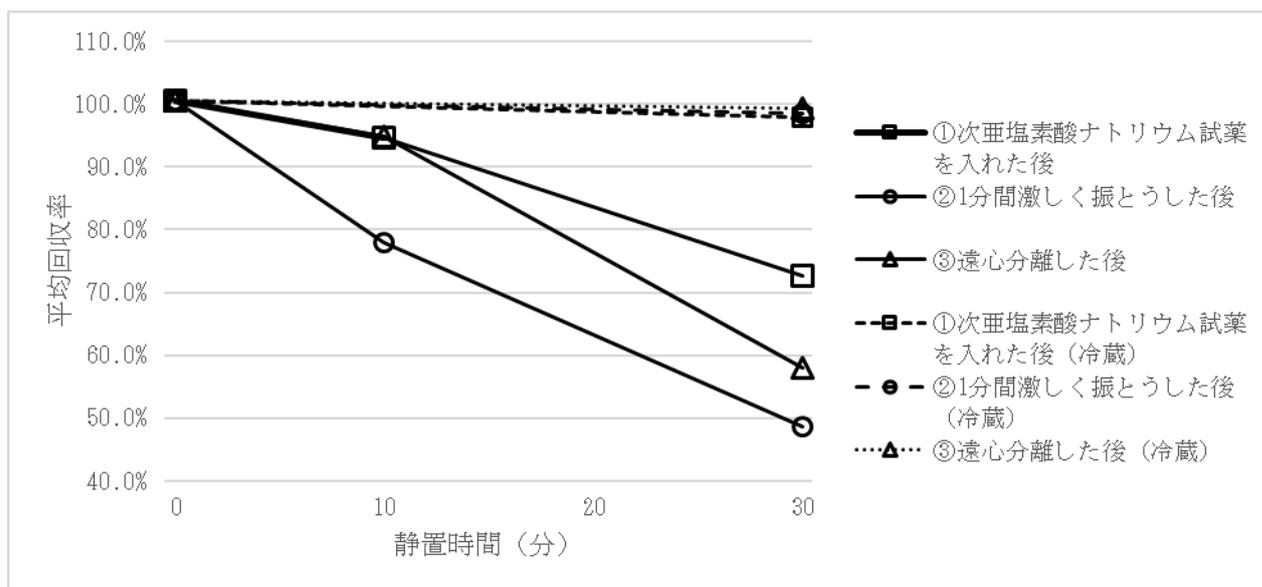
静置時間	0 分間	10 分間	30 分間	冷蔵 30 分間
①次亜塩素酸ナトリウム試薬を入れた後		0.0947 ±0.00359	0.0727 ±0.0112	0.0979 ±0.000341
②1分間激しく振とうした後		0.0779 ±0.00489	0.0487 ±0.00899	0.0986 ±0.000560
③遠心分離した後		0.0948 ±0.00189	0.0581 ±0.00373	0.0994 ±0.000737
④水層を除去した後	0.101 ±0.0014	N. T.	0.0965 ±0.000166	0.0996 ±0.00109
⑤炭酸水素ナトリウム溶液を加えた後		N. T.	0.0988 ±0.000792	0.0998 ±0.000646
⑥1分間振とうした後		N. T.	0.0998 ±0.000982	0.0989 ±0.000665
⑦遠心分離した後		N. T.	0.100 ±0.00128	0.100 ±0.00112

(n =3)

(g/kg)

N. T. : Not Tested

図 11 誘導体化における試料の静置と平均回収率 (①~③のみ)



(n =3)

図 12 新規分析法の改良前後のクロマトグラム

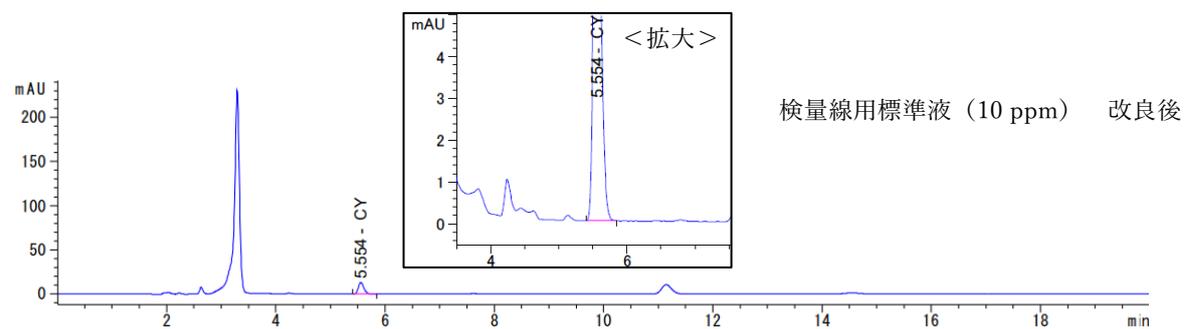
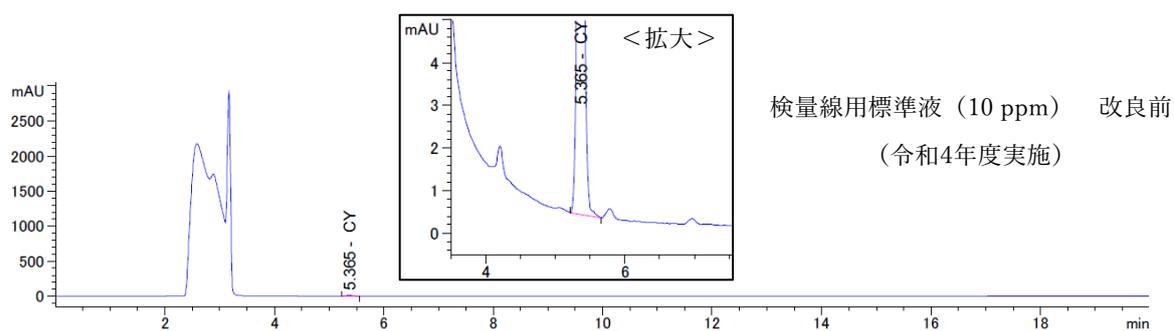
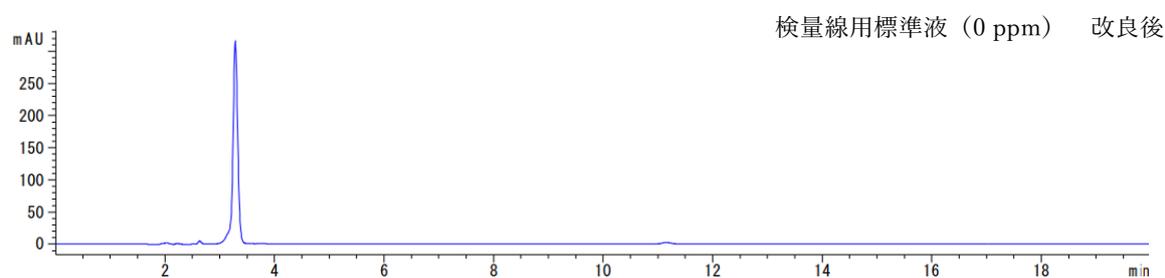
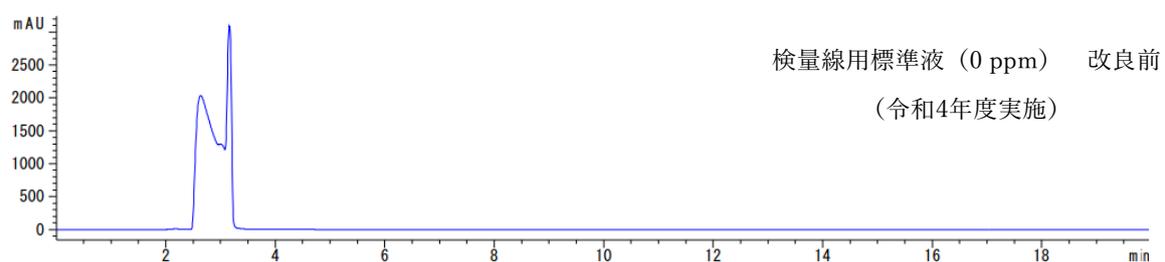
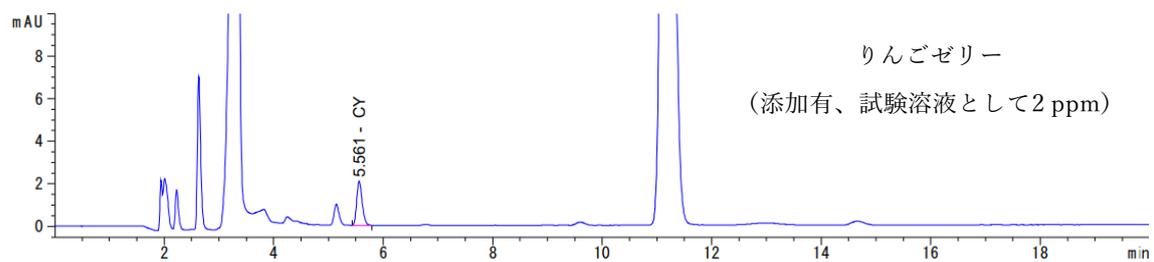
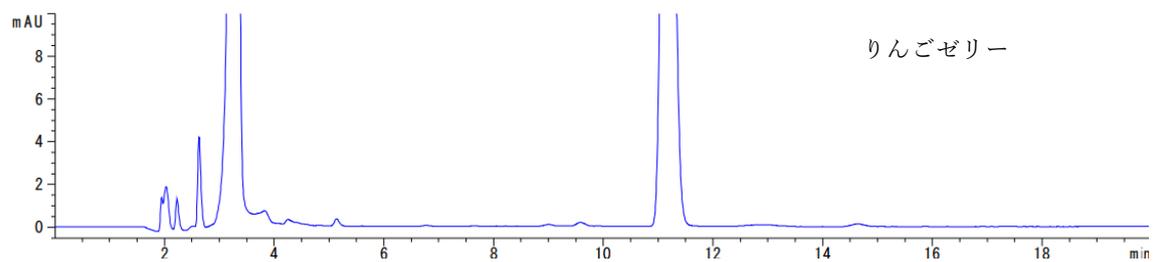
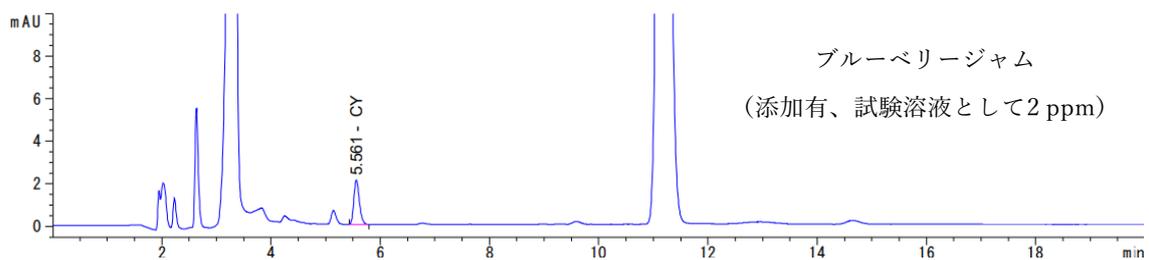
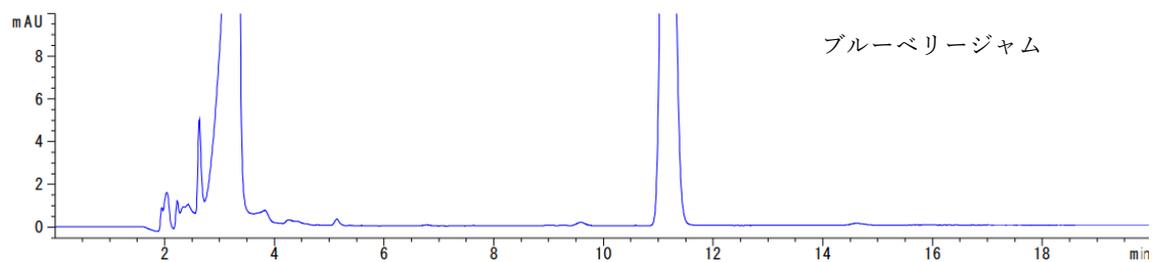


図 13 新規分析法（改良後）のクロマトグラム



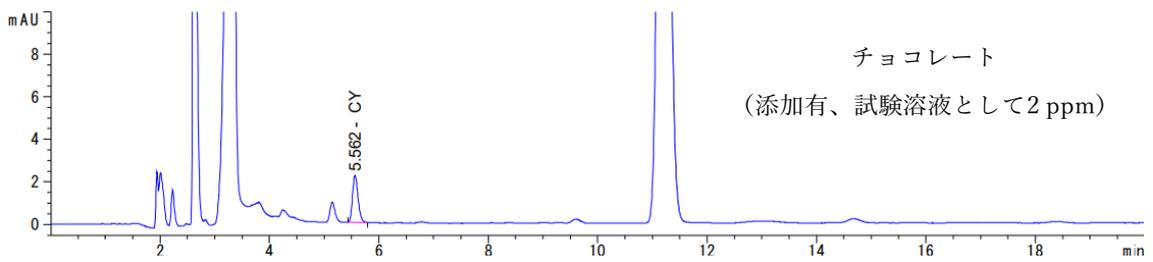
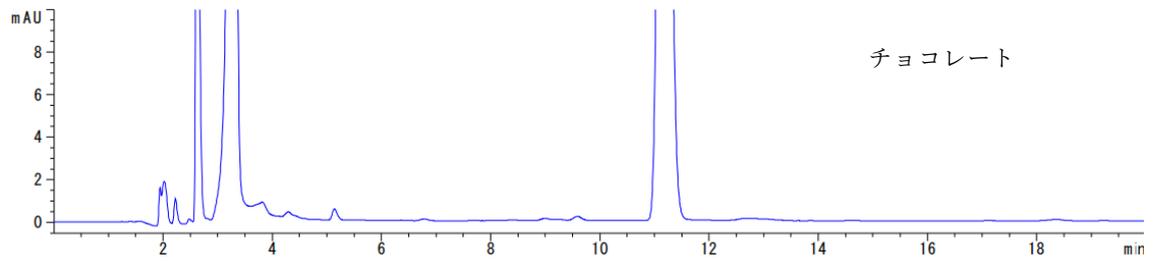
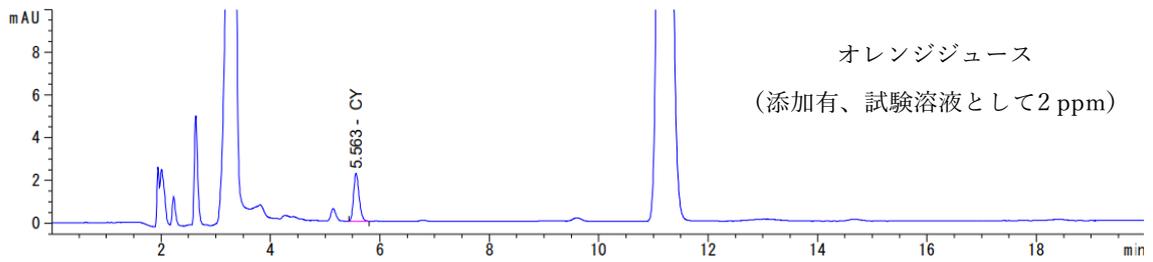
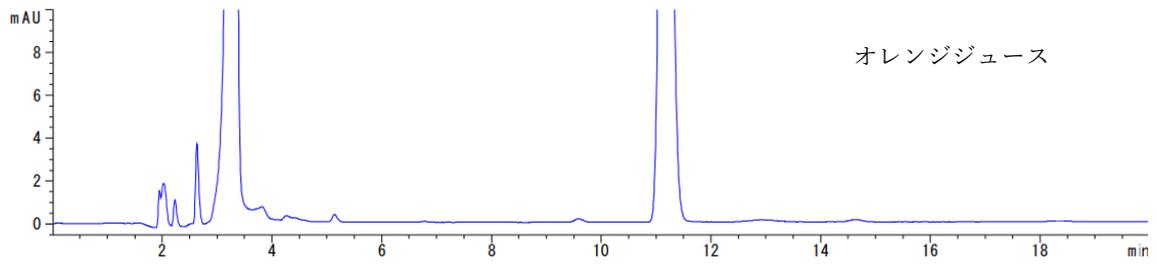


表 12 新規分析法における添加回収試験結果 (0.02 g/kg にて検出)

検体	ブルーベリー ジャム	りんごゼリー	オレンジ ジュース	チョコレート
平均値(g/kg)	0.0198	0.0201	0.0204	0.0209
SD(g/kg)	0.000862	0.00218	0.00126	0.00179
RSD(%)	4.3	10.9	6.2	8.6
回収率(%)	99.2	100.4	102.0	104.6

($n=3$)

令和5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

重金属類試験法の改良と妥当性評価に関する研究

研究代表者	渡辺 卓穂	（一財）食品薬品安全センター	秦野研究所 部長
研究分担者	新矢 将尚	（地独）大阪健康安全基盤研究所	課長
研究協力者	油谷 藍子	（地独）大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	村野 晃一	（地独）大阪健康安全基盤研究所	研究員
研究協力者	村上 太郎	（地独）大阪健康安全基盤研究所	主任研究員

研究要旨

食品中の重金属の基準値としては、食品衛生法において、米（玄米及び精米）中のカドミウムが0.4 mg/kg以下、清涼飲料水の規格では、ヒ素及び鉛は検出してはならないとされている。一方、諸外国では鉛やヒ素、カドミウム等の重金属類の食品への汚染防止や低減対策が進められており、コーデックス委員会が設定している基準値は日本のものより低く、対象とする食品も多くなっている。そのため、食品の輸出促進に向けては海外基準を考慮した、重金属類に関する食品の安全性確保が重要な課題となっている。食品中の重金属類試験については、マイクロウェーブ分解－誘導結合プラズマ（ICP）質量分析法が迅速に多元素を分析できるため有用であるが、その試験法の評価を行った報告は少ない。そこで本研究では、マトリックスの異なる3種の認証標準物質を用いて、マイクロウェーブ分解－ICP質量分析法による最適分析条件の検討と、分析妥当性の評価を行った。

本研究で使用した認証標準物質（Crab Paste、Peanut Butter、Baby Food Composite）のいずれにおいても、Na、Mg、K、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Cd、Ba、Pbの12元素は、検討したいずれの測定条件でも認証値とよく一致し、真度、併行精度および室内再現精度は目標値を満たしていた。また、重み付け検量線を用いる方が検量線範囲は拡大し、妥当性も向上したこと、さらに希釈等による労力も低減されることから、本法では有効であると考えられた。一方、PおよびCaについては、特定の測定条件でのみ分析妥当性が確認された。これら2元素はマトリックスの影響を受けやすいと考えられ、引き続き検討を行う必要がある。

今後は肉や魚介類を中心に、本法が多様なマトリックスに対応できるか確認するとともに、輸出食品（畜水産物を含む加工食品）における最適条件の検討と妥当性評

価を行う予定である。

A. 研究目的

日本において、食品中の金属に関する成分規格は、米のカドミウム (Cd)、清涼飲料水および粉末清涼飲料のヒ素 (As)、鉛 (Pb) およびスズ (Sn) がある。また、残留農薬基準として青果物の一部について As および Pb の基準値が設定されている。一方、諸外国では Pb や As、Cd といった重金属類の食品への汚染防止や低減対策が進められており、コーデックス委員会が設定している基準値は日本のものより低く、対象とする食品も多くなっている。そのため、食品の輸出促進に向けては海外基準を考慮した、重金属類に関する食品の安全性確保が、重要な課題である。

食品中の重金属類を分析する上で、現状の告示試験法では試料の酸分解を開放系で行うため、前処理に長い時間を要する。また測定法についても、比色法や原子吸光光度法を用いた元素ごとの方法が定められており、複数の元素を同時に分析することができないため労力を要する。食品中の重金属類試験については、マイクロウェーブ分解-誘導結合プラズマ (ICP) 質量分析法が、迅速に多元素を分析できるため非常に有用であり、すでに欧米では採用されている^{1,2)}。しかし、これまで試験法の評価を行った対象として調製粉乳³⁾ やチョコレート⁴⁾、トータルダイエット⁵⁾、穀類⁶⁾ 等があるが、その他多くの食品での報告は少なく、室間共同試験の報告も少ない^{7,8)}。特に、日本国内での報告が乏しい現状である。

本課題では、これまで報告されていない

食品においてマイクロウェーブ分解-ICP 質量分析法を適用すべく、その最適分析条件の検討と、分析妥当性の評価を行った。

B. 方法

1. 試料

試料には、重金属類の認証値が比較的多く、マトリックスの異なる3種類の認証標準物質を用いた。すなわち、水分、脂質とも相応に含む試料として“Crab Paste” (LGC standards 社製 Certified Reference Material LGC7164) を、脂質の多い試料として“Peanut Butter” (NIST製 SRM2387) を、脂質をほとんど含まず水分が多い試料として“Baby Food Composite” (NIST製 SRM2383a) を選択した。これら認証標準物質の成分組成を表1に示す。

いずれの標準物質も5種の主要元素 (Na、Mg、P、K、Ca) について認証値が付与されており、微量元素の認証値はCrab Pasteが5元素、Peanut Butterが4元素、Baby Food Compositeが7元素である。

2 試薬

次に示す試薬を用いた。

35元素混合標準溶液：SPEX社製XSTC-622B、各元素10mg/L

イットリウム (Y)、インジウム (In)、タリウム (Tl) 標準溶液：関東化学製、各1000 mg/L

硝酸：富士フィルム和光純薬製 有害金属測定用 (純度60%)、および関東化学製 ウ

ルトラピュア（純度60~62%）

過酸化水素水：関東化学製 ウルトラピュア（純度30~32%）

検量線用標準溶液は、35元素混合標準溶液を0.1mol/L硝酸を用いて0.05~1000 μ g/Lとなるように調製した。

内部標準元素溶液は、Y、In、Tlの各標準溶液を適宜混合し、0.1 mol/L硝酸を用いて50 μ g/Lとなるように調製した。試験溶液への添加はペリスタルティックポンプによる自動添加とした。

これらの溶液は超純水（メルク社製超純水製造装置 Milli-Q® IQ 7003）を用いて調製した。

3 マイクロウェーブ分解法

3.1. 装置

アントンパールジャパン社製 Multiwave Pro を用いた。

3.2. 試験溶液の調製

Crab PasteおよびPeanut Butterは500 mgを、Baby Food Compositeは2gをテフロン製分解容器に採り、有害金属測定用硝酸7 mL、過酸化水素水1 mLを加え、マイクロウェーブ分解装置により加熱分解した。加熱プログラムは、装置のアプリケーションを参考にして、800 W (Ramp:10 min) – 800 W (Hold:40 min)とした。この試料分解液を室温まで冷却後、超純水を加えて50 mLとし試験原液とした。これを超純水で2倍、10倍希釈したもの、0.1 mol/L硝酸で100倍、250倍希釈したものを試験溶液とした。これらの試験溶液は、50 mLポリプロピレン製チューブ（ジーエルサイエンス社製 Digi TUBEs）を用いて調製・保管し

た。

4. ICP質量分析法

4.1. 装置

アジレントテクノロジー社製 Agilent 7850 ICP-MS を用いた。

4.2. 測定条件

4.2.1. 標準モード (No Gas モード)

高周波出力：1.55 kW

プラズマガス流量：Ar 15.0 L/min

補助ガス流量：Ar 0.9 L/min

キャリアーガス流量：Ar 1.03 L/min

ネブライザポンプ回転速度：0.1 rpm

測定数：3 points/peak

積分時間：1.0 sec/point (Mn及びSrについては 0.1 sec/point)

測定質量数：表2に記載

4.2.2. コリジョンモード (He モード)

コリジョンガス流量：

He 4.3mL/min

測定元素・質量数：表2に記載

4.2.3. リアクションモード (H₂ モード)

リアクションガス流量：

H₂ 6.0 mL/min

測定元素・質量数：表2に記載

4.3. 定量

検量線用標準溶液および試験溶液をICP-MSで測定し、表2に示す内標準元素を用いて内標準法で定量した。

5. 妥当性評価

本法によりマトリックスの異なる3種類の認証標準物質中の元素を測定し、分析法の妥当性評価を実施した。分析者2名が併

行数2で3日間の枝分かれ試験で実施した。

「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁹⁾に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度および室内再現精度を求めた。

(倫理面への配慮)

食品の安全に関する研究であり、倫理面への配慮を必要としなかった。実験者および環境への配慮として、強酸の取扱いや排気は酸ドラフト内で行った。

C. 研究結果

1. 検量線および定量下限

各元素の測定質量数、測定モード、使用した内標準元素を表2に示す。内標準元素は、既報⁵⁾に準じて選定した。検量線の直線性については、いずれの元素・測定モードにおいても相関係数が0.996以上の良好な結果が得られた。検量線は、後述するように重み付けを行った方が、測定範囲が広がった。なお、測定液の定量下限は検量線の最低濃度とした。

2. 妥当性評価

2.1. Crab Paste (LGC7164)

2.1.1. 主要元素

Crab Pasteの測定および妥当性評価の結果を表3に示す。Na、Mg、Kについては、いずれの測定モードにおいても真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしており、さらにKのH₂モードを除いて測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っており、きわめて良好な結果であった。Pについては、No Gasモードのみ目標値を満たしていた。Caについてはどの質量数、どの測定モー

ドにおいても目標値を満たさなかった。

2.1.2. 微量元素

表3に示すように、Mn、Cu、Zn、Cd、Pbのいずれの元素も、検討した質量数および測定モードにおいて真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしており、さらにZnのNo Gasモードを除いて測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っており、きわめて良好な結果であった。

2.2. Peanut Butter (SRM2387)

2.2.1. 主要元素

Peanut Butterの測定および妥当性評価の結果を表4に示す。Na、Mg、Kについては、いずれの測定モードにおいても真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしていた。さらにNaのHeモード、Mgの全モード、KのHeモードでは測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っており、きわめて良好な結果であった。Pについては、H₂モードで真度が低くばらつきが大きかった一方で、No GasモードおよびHeモードでは目標値を満たし、きわめて良好な結果であった。Caについては質量数40および質量数44のH₂モードにおいて良好な結果が得られ、それ以外の質量数、測定モードでは目標値を満たさなかった。

2.2.2. 微量元素

表4に示すように、Mn、Fe、Cu、Znのいずれの元素も、検討した質量数および測定モードにおいて真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしており、さらにCuのHeモードを除いて測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っており、きわめて良

好な結果であった。

2.3. Baby Food Composite (SRM2383a)

2.3.1. 主要元素

Baby Food Compositeの測定および妥当性評価の結果を表5に示す。Na、Mg、Kについては、いずれの測定モードにおいても真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしており、さらにMgのNo Gasモードを除いて測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っており、きわめて良好な結果であった。Pについては、H₂モードで真度が低かった一方で、No GasモードおよびHeモードでは目標値を満たし、きわめて良好な結果であった。Caについてはどの質量数、どの測定モードにおいても目標値を満たさなかった。

2.3.2. 微量元素

表5に示すように、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Baのいずれの元素も、検討した質量数および測定モードにおいて真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしていた。さらにFeおよびBaについては測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っており、きわめて良好な結果であった。

2.4. 重み付け検量線の検討

2.4.1. 重み付け検量線

Baby Food Compositeは他の2種と異なり、主要元素と微量元素の濃度差が大きい。そのため、試験溶液を多段階希釈するか、検量線範囲を広くする必要がある。しかし、希釈段階が多くなると操作が煩雑になり、コンタミネーションが起こる可能性も生じる。一方、検量線範囲を広く取ると、濃度

による等分散性が満たされないことが問題となる。そこで、重み付け検量線により測定値と妥当性の再評価を行った。

2.4.2. 主要元素

重み付け検量線を用いたBaby Food Compositeの測定および妥当性評価の結果を表6に示す。Na、Mg、Kについては、いずれの測定モードにおいても真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしており、さらに測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っており、きわめて良好な結果であった。Pについては重み付けなしと変わらず、No GasモードおよびHeモードで目標値を満たし、きわめて良好な結果であった。Caについては質量数40のH₂モードにおいてのみ良好な結果が得られ、それ以外の質量数、測定モードでは目標値を満たさなかった。

2.4.3. 微量元素

表6に示すように、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Baのいずれの元素も、検討した質量数および測定モードにおいて真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしていた。さらにFeおよびBaのほか、MnのNo GasモードおよびCuのHeモードについても測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っており、きわめて良好な結果であった。

D. 考察

今年度を実施した妥当性評価の結果一覧を表7に示す。主要元素のうち、Na、Mg、Kについては、いずれの認証標準物質においても本法による分析妥当性が確認された。PについてはH₂モードの真度が著しく低か

った。これら主要元素の測定質量数には多原子イオンによる干渉が大きく、 H_2 リアクションにより改善されると考えられた。しかし、実際にはPと H_2 が反応しPの検出強度がNo Gasモードと比較して著しく低下した。またPの質量数 ($m/z=31$) には硝酸溶液のバックグラウンドに存在する多原子イオン NO^+ ($m/z=30$) に水素が付加した NOH^+ ($m/z=31$) が、Pの測定に影響を及ぼすことが知られている。これらの理由によりPの H_2 モードにおける定量性が低下したと考えられた。一方、Ca ($m/z=40$) については、 H_2 リアクションによりAr ($m/z=40$) のバックグラウンド干渉が回避される傾向が示された。

重み付け検量線を用いると、定量範囲が広がる (表 2) と同時に真度が改善され、Ca (H_2 モード) および微量元素の分析妥当性が向上した。本法では、重み付け検量線を用いる方が有効と考えられる。

E. 結論

水分や油分を考慮し、マトリックスの異なる食品3種の認証標準物質を用いて、マイクロウェーブ分解-ICP質量分析法による最適分析条件の検討と、分析妥当性の評価を行った。Crab Paste、Peanut Butter、Baby Food Compositeのいずれにおいても、Na、Mg、K、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Cd、Ba、Pbの12元素は、検討したいずれの測定条件でも認証値とよく一致し、真度、併行精度および室内再現精度は目標値を満たしていた。また、重み付け検量線を用いる方が検量線範囲は拡大し、妥当性も向上したこと、さらに希釈等による労力も低減されることから、本法では有効であると考

えられた。

一方、PについてはNo Gasモードのみ、PのHeモードおよびCaの H_2 モードでは、Peanut ButterとBaby Food Compositeにおいて分析妥当性が確認された。これら2元素はマトリックスの影響を受けやすいと考えられ、引き続き検討を行う必要がある。

今後は肉や魚介類を中心に、本法が多様なマトリックスに対応できるか確認するとともに、輸出食品 (加工食品、畜水産物を含む) における最適条件の検討と妥当性評価を行う予定である。

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

参考文献

1) US FDA. Elemental Analysis Manual 4.7, Version 1.2, 2020

2) BS EN 17851:2023, 2023

- 3) 藤崎浩二ら. *食品衛生学雑誌*, 52, 336-339, 2011
- 4) Lo Dico *et al.* *Food Chemistry*, 245, 1163-1168, 2018
- 5) 油谷藍子ら. *食品衛生学雑誌*, 57, 57-65, 2016
- 6) Barbosa *et al.* *Food Chemistry*, 175, 212-217, 2015
- 7) Pacquette and Thompson. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 101(2), 536-561, 2018
- 8) Gray and Cunningham. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 102(2), 590-604, 2019
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」平成 20 年 9 月 26 日食安発第 0926001 号

以下 図表

表 1 認証標準物質の成分組成

試料名	水分	灰分	脂質	たんぱく質	炭水化物	固形分
Crab Paste (LGC7164)	59.26	2.855	12.13	—	—	—
Peanut Butter (SRM2387)	—	3.10	51.6	22.2	25.0	99.2
Baby Food Composite (SRM2383a)	—	0.705	0.29	1.96	19.41	22.45

単位 : g/100g

表2 ICP-MSの測定質量数、測定モードおよび検量線範囲

元素	質量数 (m/z)	測定モード	内標準元素 (質量数 m/z)	検量線範囲 (ng/mL)		検量線範囲 (重み付けあり) (ng/mL)	
Na	23	No Gas	Y (89)	50	~ 1000	10	~ 1000
		H2		100	~ 1000	10	~ 1000
		He		50	~ 1000	10	~ 1000
Mg	24	No Gas	Y (89)	50	~ 1000	10	~ 1000
		H2		50	~ 1000	10	~ 1000
		He		50	~ 1000	10	~ 1000
P	31	No Gas	Y (89)	50	~ 1000	10	~ 1000
		H2		50	~ 1000	10	~ 1000
		He		50	~ 1000	10	~ 1000
K	39	No Gas	Y (89)	50	~ 1000	10	~ 1000
		H2		50	~ 1000	10	~ 1000
		He		50	~ 1000	10	~ 1000
Ca	40	H2	Y (89)	50	~ 1000	10	~ 1000
		No Gas		50	~ 1000	10	~ 1000
	43	H2		100	~ 1000	10	~ 1000
		He		50	~ 1000	10	~ 1000
	44	No Gas		50	~ 1000	10	~ 1000
		H2		50	~ 1000	10	~ 1000
44	He	100	~ 1000	10	~ 1000		
	Mn	No Gas	Y (89)	0.05	~ 10	0.5	~ 100
He		0.1		~ 10	0.5	~ 100	
Fe	56	He	Y (89)	10	~ 100	5	~ 100
		No Gas		Y (89)	0.05	~ 10	0.05
Co	59	He	Y (89)		0.05	~ 10	0.05
		No Gas		Y (89)	0.05	~ 10	0.05
Cu	63	No Gas	Y (89)		0.05	~ 10	0.5
		He		0.5	~ 10	0.5	~ 100
Zn	66	No Gas	Y (89)	0.5	~ 10	0.5	~ 100
		He		0.5	~ 10	0.5	~ 100
Sr	88	No Gas	Y (89)	0.5	~ 100	0.5	~ 100
		He		0.5	~ 100	0.5	~ 100
Cd	111	No Gas	In (115)	0.05	~ 10	0.05	~ 100
	114	No Gas		0.05	~ 10	0.05	~ 100
Ba	137	No Gas	In (115)	0.1	~ 10	0.05	~ 100
		He		0.05	~ 10	0.05	~ 100
Pb	207	No Gas	Tl (205)	0.1	~ 10	0.05	~ 100
	208	No Gas		0.05	~ 10	0.05	~ 100

表3 Crab Paste の妥当性評価結果

主要元素	質量数 (m/z)	測定モード	認証値(±不確かさ) (mg/100g)	測定値(総平均) (mg/100g)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
Na	23	No Gas	463 ± 45	<u>498</u>	107	1.26	2.75	◎
		H2		<u>501</u>	108	1.55	1.55	◎
		He		<u>506</u>	109	1.21	1.72	◎
Mg	24	No Gas	43.1 ± 3.8	<u>42.7</u>	99	0.85	5.48	◎
		H2		<u>41.4</u>	96	1.31	4.18	◎
		He		<u>42.2</u>	98	1.26	3.70	◎
P	31	No Gas	564 ± 40	608	108	6.23	6.23	○
		H2		174	31	10.5	12.4	×
		He		625	111	5.74	7.30	×
K	39	No Gas	179 ± 11	<u>187</u>	104	1.04	3.26	◎
		H2		191	107	1.63	1.81	○
		He		<u>188</u>	105	1.64	3.33	◎
Ca	40	H2	348 ± 35	397	114	11.9	13.0	×
		No Gas		252	72	13.1	13.1	×
	43	H2		<u>327</u>	94	12.2	13.2	×
		He		60	17	11.5	13.2	×
	44	No Gas		289	83	12.4	12.5	×
		H2		<u>358</u>	103	12.8	13.8	×
		He	107	31	10.8	16.4	×	
微量元素	質量数 (m/z)	測定モード	認証値(±不確かさ) (mg/kg)	測定値(総平均) (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
Mn	55	No Gas	3.28 ± 0.29	<u>3.46</u>	105	2.09	2.51	◎
		He		<u>3.41</u>	104	1.80	2.74	◎
Cu	63	No Gas	20.1 ± 2.4	<u>20.5</u>	102	1.84	2.63	◎
		He		<u>20.2</u>	100	1.86	3.43	◎
Zn	66	No Gas	56.8 ± 5.5	62.6	110	1.71	2.08	○
		He		<u>62.2</u>	109	1.49	1.92	◎
Cd	111	No Gas	9.20 ± 0.48	<u>9.43</u>	102	2.45	3.18	◎
	114	No Gas		<u>9.27</u>	101	2.88	3.66	◎
Pb	207	No Gas	0.0697 ± 0.0047	<u>0.0704</u>	101	2.69	4.85	◎
	208	No Gas		<u>0.0698</u>	100	2.65	3.55	◎

妥当性評価の目標値：

0.01 < 濃度(mg/kg) ≤ 0.1 … 真度：80~120%，併行精度 < 15%，室内精度 < 20%

0.1 < 濃度(mg/kg) ≤ 10 … 真度：80~110%，併行精度 < 10%，室内精度 < 15%

10 < 濃度(mg/kg) … 真度：90~110%，併行精度 < 10%，室内精度 < 15%

目標値を満たすものは○，さらに測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っている（下線）ものについては◎とした。

表4 Peanut Butter の妥当性評価結果

主要元素	質量数 (m/z)	測定モード	認証値(±不確かさ) (mg/kg)	測定値(総平均) (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
Na	23	No Gas		5264	108	2.98	5.92	○
		H2	4890 ± 140	5133	105	3.09	4.96	○
		He		<u>4985</u>	102	2.88	3.21	◎
Mg	24	No Gas		<u>1745</u>	104	1.66	6.05	◎
		H2	1680 ± 70	<u>1632</u>	97	1.56	3.00	◎
		He		<u>1651</u>	98	1.18	2.99	◎
P	31	No Gas		<u>3396</u>	101	1.78	3.44	◎
		H2	3378 ± 92	882	26	28.4	31.6	×
		He		<u>3332</u>	99	4.08	8.64	◎
K	39	No Gas		6561	108	1.79	3.52	○
		H2	6070 ± 200	6393	105	1.48	2.42	○
		He		<u>6262</u>	103	1.83	2.12	◎
Ca	40	H2		<u>428</u>	104	2.23	2.92	◎
		No Gas		249	61	4.76	26.3	×
	43	H2		319	77	6.24	19.8	×
		He	411 ± 18	50	12	3.34	53.7	×
	44	No Gas		323	78	1.88	5.87	×
		H2		372	91	2.54	2.66	○
		He		102	25	3.05	13.9	×
微量元素	質量数 (m/z)	測定モード	認証値(±不確かさ) (mg/kg)	測定値(総平均) (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
Mn	55	No Gas		<u>16.4</u>	102	2.41	3.42	◎
		He	16.0 ± 0.6	<u>15.7</u>	98	1.36	2.33	◎
Fe	56	He	16.4 ± 0.8	<u>16.3</u>	99	4.70	6.32	◎
Cu	63	No Gas		<u>4.85</u>	98	2.67	4.78	◎
		He	4.93 ± 0.15	4.65	94	1.55	3.86	○
Zn	66	No Gas		<u>26.2</u>	100	2.31	3.49	◎
		He	26.3 ± 1.1	<u>25.7</u>	98	1.63	3.07	◎

妥当性評価の目標値：

0.01 < 濃度(mg/kg) ≤ 0.1 … 真度：80~120%，併行精度 < 15%，室内精度 < 20%

0.1 < 濃度(mg/kg) ≤ 10 … 真度：80~110%，併行精度 < 10%，室内精度 < 15%

10 < 濃度(mg/kg) … 真度：90~110%，併行精度 < 10%，室内精度 < 15%

目標値を満たすものは○，さらに測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っている（下線）ものについては◎とした。

表5 Baby Food Composite の妥当性評価結果（重み付けなし）

主要元素	質量数 (m/z)	測定モード	認証値(±不確かさ) (mg/kg)	測定値(総平均) (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
Na	23	No Gas		<u>189</u>	97	1.39	1.61	◎
		H2	195 ± 29	<u>188</u>	96	1.45	1.93	◎
		He		<u>188</u>	97	1.89	2.50	◎
Mg	24	No Gas		217.0	102	1.31	1.80	○
		H2	212.2 ± 4.0	<u>216.0</u>	102	1.46	1.96	◎
		He		<u>216.0</u>	102	1.95	2.38	◎
P	31	No Gas		<u>450</u>	99	1.57	2.27	◎
		H2	453 ± 11	137	30	2.88	5.74	×
		He		<u>456</u>	101	3.23	4.43	◎
K	39	No Gas		<u>3056</u>	105	1.49	2.20	◎
		H2	2910 ± 220	<u>3070</u>	105	3.05	3.06	◎
		He		<u>3084</u>	106	1.60	2.41	◎
Ca	40	H2		305.1	89	1.78	29.76	×
		No Gas		210.7	62	1.51	3.91	×
	43	H2		241.0	70	5.84	10.23	×
		He	342.6 ± 5.0	54.8	16	3.86	5.05	×
	44	No Gas		251.8	73	1.94	3.76	×
		H2		283.2	83	1.40	1.71	×
		He		92.1	27	2.06	3.24	×
微量元素	質量数 (m/z)	測定モード	認証値(±不確かさ) (mg/kg)	測定値(総平均) (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
Mn	55	No Gas		0.895	93	1.40	1.91	○
		He	0.963 ± 0.064	0.880	91	1.37	1.69	○
Fe	56	He	4.42 ± 0.51	<u>3.91</u>	89	1.91	5.87	◎
Co	59	No Gas		0.042	86	4.17	6.82	○
		He	0.048 ± 0.005	0.039	82	4.34	6.56	○
Cu	63	No Gas		0.650	86	0.97	2.73	○
		He	0.758 ± 0.082	0.672	89	1.57	2.17	○
Zn	66	No Gas		1.99	89	3.98	4.33	○
		He	2.22 ± 0.18	1.97	89	3.44	4.73	○
Sr	88	No Gas		4.290	97	1.33	1.67	○
		He	4.445 ± 0.047	4.250	96	1.06	1.86	○
Ba	137	No Gas		<u>0.263</u>	95	1.51	2.37	◎
		He	0.278 ± 0.020	<u>0.264</u>	95	0.97	1.85	◎

妥当性評価の目標値：

0.01 < 濃度(mg/kg) ≤ 0.1 … 真度：80～120%，併行精度 < 15%，室内精度 < 20%

0.1 < 濃度(mg/kg) ≤ 10 … 真度：80～110%，併行精度 < 10%，室内精度 < 15%

10 < 濃度(mg/kg) … 真度：90～110%，併行精度 < 10%，室内精度 < 15%

目標値を満たすものは○，さらに測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っている（下線）ものについては◎とした。

表6 Baby Food Composite の妥当性評価結果（重み付けあり）

主要元素	質量数 (m/z)	測定モード	認証値(±不確かさ) (mg/kg)	測定値(総平均) (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
Na	23	No Gas		<u>186</u>	95	1.39	2.28	◎
		H2	195 ± 29	<u>185</u>	95	1.43	2.56	◎
		He		<u>187</u>	96	1.88	2.56	◎
Mg	24	No Gas		<u>211.9</u>	100	1.31	2.43	◎
		H2	212.2 ± 4.0	<u>212.1</u>	100	1.45	2.23	◎
		He		<u>213.3</u>	101	1.95	2.57	◎
P	31	No Gas		<u>449</u>	99	1.56	2.26	◎
		H2	453 ± 11	138	30	2.91	5.79	×
		He		<u>456</u>	101	3.14	5.02	◎
K	39	No Gas		<u>3087</u>	106	1.49	3.32	◎
		H2	2910 ± 220	<u>3021</u>	104	3.00	3.59	◎
		He		<u>3081</u>	106	1.59	3.86	◎
Ca	40	H2		<u>340.4</u>	99	1.41	2.28	◎
		No Gas		210.3	61	1.52	3.16	×
	43	H2		256.1	75	5.45	6.49	×
		He	342.6 ± 5.0	54.8	16	3.82	4.25	×
	44	No Gas		252.6	74	1.93	2.99	×
		H2		287.1	84	1.34	1.81	×
		He		91.6	27	2.07	2.09	×
微量元素	質量数 (m/z)	測定モード	認証値(±不確かさ) (mg/kg)	測定値(総平均) (mg/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内再現精度 (%)	判定
Mn	55	No Gas		<u>0.902</u>	94	1.41	1.68	◎
		He	0.963 ± 0.064	0.890	92	1.38	1.83	○
Fe	56	He	4.42 ± 0.51	<u>4.13</u>	93	1.92	2.09	◎
Co	59	No Gas		0.042	87	4.18	6.36	○
		He	0.048 ± 0.005	0.040	83	4.25	6.64	○
Cu	63	No Gas		0.655	86	0.97	2.44	○
		He	0.758 ± 0.082	<u>0.676</u>	89	1.57	2.20	◎
Zn	66	No Gas		2.00	90	3.97	4.04	○
		He	2.22 ± 0.18	1.98	89	3.44	4.35	○
Sr	88	No Gas		4.277	96	1.32	1.55	○
		He	4.445 ± 0.047	4.232	95	1.07	1.73	○
Ba	137	No Gas		<u>0.265</u>	95	1.51	2.12	◎
		He	0.278 ± 0.020	<u>0.268</u>	96	0.98	2.12	◎

妥当性評価の目標値：

0.01 < 濃度(mg/kg) ≤ 0.1 … 真度：80～120%，併行精度 < 15%，室内精度 < 20%

0.1 < 濃度(mg/kg) ≤ 10 … 真度：80～110%，併行精度 < 10%，室内精度 < 15%

10 < 濃度(mg/kg) … 真度：90～110%，併行精度 < 10%，室内精度 < 15%

目標値を満たすものは○，さらに測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っている（下線）ものについては◎とした。

表7 妥当性評価結果一覧

元素	質量数 (m/z)	測定モード	Crab Paste	Peanut Butter	Baby Food Composite (重み付けなし)	Baby Food Composite (重み付けあり)
Na	23	No Gas	◎	○	◎	◎
		H2	◎	○	◎	◎
		He	◎	◎	◎	◎
Mg	24	No Gas	◎	◎	○	◎
		H2	◎	◎	◎	◎
		He	◎	◎	◎	◎
P	31	No Gas	○	◎	◎	◎
		H2	×	×	×	×
		He	×	◎	◎	◎
K	39	No Gas	◎	○	◎	◎
		H2	○	○	◎	◎
		He	◎	◎	◎	◎
Ca	40	H2	×	◎	×	◎
		No Gas	×	×	×	×
	43	H2	×	×	×	×
		He	×	×	×	×
	44	No Gas	×	×	×	×
		H2	×	○	×	×
		He	×	×	×	×
Mn	55	No Gas	◎	◎	○	◎
		He	◎	◎	○	○
Fe	56	He	-	◎	◎	◎
Co	59	No Gas	-	-	○	○
		He	-	-	○	○
Cu	63	No Gas	◎	◎	○	○
		He	◎	○	○	◎
Zn	66	No Gas	○	◎	○	○
		He	◎	◎	○	○
Sr	88	No Gas	-	-	○	○
		He	-	-	○	○
Cd	111	No Gas	◎	-	-	-
	114	No Gas	◎	-	-	-
Ba	137	No Gas	-	-	◎	◎
		He	-	-	◎	◎
Pb	207	No Gas	◎	-	-	-
	208	No Gas	◎	-	-	-

妥当性評価の目標値を満たすものは○、さらに測定値が認証値の不確かさ範囲内に入っているものについては◎とした。

令和 5 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

下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究

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 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。技能試験を含む試験所間比較は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。わが国では、その検査法として、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、下痢性貝毒検査に関する技能試験については、現在のところ定常的に実施されている技能試験はなく、同検査の信頼性を確保するうえでの問題点となっていた。

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 年計画の初年度である令和 5 年度は、調査試料の調製法を検討するとともに、OA 群の LC-MS/MS 測定を正確に定量するための精確な分析法を検討した。

調査試料の調製法については、ホタテガイ可食部と中腸腺を均質化および混合したもの 5 g ずつ瓶詰することにより、調査試料 160 本を調製した。一方、精確な分析法の検討においては、移動相の組成等が異なる LC-MS/MS 条件 4 条件について、各々を最適化したのちに感度を比較するとともに、LC-MS/MS 測定におけるマトリックス効果の影響を評価した。さらに、最適化された分析条件を用いて添加回収試験を行い、分析が良好な精確さを有することを確認した。

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ニン-2 (DTX2)、これらのエステル誘導体 (DTX3) である (以下、これらを0A群と総称する)。

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、0A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 0A/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回避することは、輸出入国間での係争を回避するためにも重要といえる。

分析精度の管理手法の一つに技能試験がある。CodexのCAC/GL 27 (食品の輸出入規制にかかわる試験所の能力評価に関するガイドライン) における要求事項として適切な技能試験プログラムへの参加が挙げられている。また、ISO/IEC 17025 (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項) においても、試験結果の妥当性を確保する手順の一つとして、技能試験を含む試験所間比較への参加が挙げられている。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や試験所間比較はない。そのため、下痢性貝毒検査を行う試験所がISO/IEC17025の認定を取得する際には、技術的な障害となりうる。

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年計画の初年度である令和5年度は、パイロットスタディの調査試料の調製方法を検討し、実施に調製した。さらに、調製した調査試料を評価するためにはLC-MS/MSによる定量が不可欠であることから、高感度かつ精確な定量を可能とする分析方法を検討した。

B. 方法

1. 調査試料の調製

(1) 材料・試薬

検査用試料の調製には、ホタテガイ可食部 (北海道産) と、0AおよびDTX1の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料 (均質化済み)、0A標準品 (富士フィルム和光純薬、生化学用) および1 µg/mLDTX1溶液 (メタノール溶液) (産業技術総合研究所) を用いた。LC-MS/MSの移動相に用いた超純水は、純水製造装置Milli-Q Reference (ミリポア) によって調製した。他の試薬は、LC-MS用または試薬特級品を用いた。

(2) 調製方法

ホタテガイの可食部をブレンダーで細

断し、裏ごし器（1.4 mm）で裏ごしを行った。得られた試料をポリ製広口瓶に入れ、混合した。このポリ製広口瓶をポットミル機で約1.5時間回転混合させた。

7個のガラス瓶を用意し、1個のガラス瓶につきOAおよびDTX1の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料20 gを入れた。それぞれのガラス瓶に中腸腺の9倍量のホタテガイ可食部を加えた。さらに、あらかじめOA標準品と1 µg/mLDTX1溶液の混合溶液を適量添加した。それぞれのガラス瓶の内容物をスパチュラで混ぜ合わせた後、ポットミル機を用いて約30分回転混合した。得られた内容物を1つのポリ製広口瓶にあわせ、ポットミル機を用いた2.5時間回転混合した。

回転混合させた試料をおおよそ5等分に分け、各瓶の内容物を混合した。さらに各瓶の内容物を約20 gを取り出し、別のガラス瓶に入れ、混合した。この操作を10瓶について行った。その後、ガラス瓶の内容物をポリ製遠沈管に5gずつ小分けした。

(3) 分析方法

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

表1に示す。

2. 精確な分析法の検討

(1) 材料・試薬

ホタテガイ試料には青森産のホタテガイを用いた。

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（CRM-DTX2-b）はNational Research Council から入手した。試料調製やLC-MS/MSの移動相に用いた超純水は、純水製造装置Milli-Q Reference（ミリポア）によって調製した。他の試薬は、LC-MS用または試薬特級品を用いた。

(2) ホタテガイ試料の前処理方法

あらかじめブレンダーで処理したホタテガイ2.00 gを遠沈管にとり、メタノール9 mLを加えてホモジナイズした後に遠心分離し、上清をとった。沈殿物に90 % (V/V)メタノール9 mLを加えてホモジナイズした後に遠心分離し、上清をとった。得られた上清を合一し、さらに90 % (V/V)メタノールを加えて正確に20 mLとした。

得られた抽出液の2 mLに2.5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液250 µLを加え、76 °Cで40分間加水分解した。その後、2.5 mol/L塩酸を250 µLまたは300 µL加え中和し、*n*-ヘキサン2.5 mLによる脱脂処理を2回行った。

得られた処理液を次の2固相抽出（SPE）条件のいずれかで処理した。

a. HLBカートリッジを用いたSPE

脱脂した処理液に水2.5 mLを加えて攪拌した溶液をHLBカートリッジ (Waters社製Oasis PRiME HLB 200 mg) に注入し、その流出液は捨てた。次に、アセトニトリル/メタノール (4:1) 5 mLをカートリッジに注入し、流出液を回収した。その際、溶液の一部を用いて加水分解を行った試験管の内壁を洗った。その後、回収した溶液を窒素下で2 mLに濃縮した。

b. ODSカートリッジを用いたSPE

脱脂した処理液に水2.5 mLを加え攪拌した。この溶液を、あらかじめメタノール5 mLと水を5 mLを順次注入してコンディショニングしたODS カートリッジ (ジューエルサイエンス社製 Inert-Sep C18 200 mg) に注入し、その流出液は捨てた。次に、加水分解を行った試験管に40 % (V/V) メタノール2 mLを加えて攪拌し、得られた溶液をカートリッジに注入し、その流出液は捨てる操作を2回行った。さらに、カートリッジに水3 mL、40 % (V/V) メタノール3 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。次いで、90 % (V/V) メタノール3 mLをカートリッジに注入し、得られた流出液を回収し、窒素下で2 mLまで濃縮した。

(3) LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、1(3)と同じ装置を用いた。測定条件として、表1~4に示した条件A~Dを適用した。

(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、法令を遵守し、特定の区域での

みを行った。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. 調査試料の調製

調製する調査試料に含有するOAとDTX1の濃度を調整するために、市販のホタテガイ可食部に、OAとDTX1が含有されたホタテガイ中腸腺試料とOAおよびDTX1の混合溶液を適量混合することにした。その際、OAは生化学用の標準品を用いたため、あらかじめその希釈溶液をLC-MS/MSで測定し、不純物を確認した。その結果、下痢性貝毒の機器分析における一般的な測定条件では、OAやDTX1の溶出時間付近に不純物が認められないことを確認した。

調査試料の調製には、ホタテガイ可食部約1.7 kg (図1(a)(b))を用いた。これをブレンダーで細断した (図1(c)) 後に裏ごしし (図1(d))、繊維質分等を除去した試料約1.4 kgを得た。

一方、OA標準品適当量と1 µg/mLDTX1溶液適当量を混合し、添加用の混合溶液を得た。

均質化したホタテガイ可食部、ホタテガイ中腸腺試料、及び添加用の混合溶液は、最終的に得られる試料中のOA及びDTX1ができるだけ均質に分布されるように、2段階に分けて混合した。すなわち、ホタテガイ中腸腺試料20 gを精秤し、その9倍量のホタテガイ可食部と、それぞれの比に応じた混合溶液適当量を加えて混合し (図1(e)(f))、得られた7つの混合物をさらに混合した (図1(f))。さらに、各瓶の内容物を合わせ、約30分回転混合す

ることで（図2(g)）、混合試料約1.25 kgを得た。外観上混合物の均質性に問題はないと判断された。

回転混合させた試料を5等分に分けて内容物を混合した後、各瓶の内容物約20 gずつを別の瓶10本に合一した（図1(h)）。各瓶から内容物5 gずつを16本のポリ製遠沈管に小分けした（図1(i)(j)）。

以上によって、調査試料160本を調製することができた（図1(k)(1)）。これらは約-60℃で保管しており、来年度その均質性を評価する予定である。

2. 分析法の検討

(1) 検出感度の比較

下痢性貝毒分析における一般的な LC-MS/MS では、酸性の水/アセトニトリルが移動相に用いられている（測定条件Aが該当）。一方、アセトニトリルの代替にメタノールを用いることにより、感度が上昇したという報告がある（測定条件Bが該当）。また、塩基性の移動相を用いることにより、測定感度が上昇したとする報告もある（測定条件CおよびDが該当）。

そこで、これらの4条件によってOA、DTX1 および DTX2 の混合標準液を測定した。得られたクロマトグラムを図2に示す。測定条件A、C、Dでは、同じイオンチャンネルで検出されるOAとDTX2を含め、対象物質は良好に分離できた。一方、測定条件Bでは、OAとDTX2はベースライン分離することができなかった。

4測定条件におけるLC-MS/MS測定の感度を比較した（図3）。その結果、OA、DTX1、DTX2のすべてについて、測定条件

Cが最も優れた感度を示した。測定条件AやBでは酸性移動相を用いることでOA群の解離を抑制している。これに対し、測定条件Cでは塩基性条件で官能基は解離し、イオン化効率が改善されたためと考えられた。

(2) マトリックス効果の評価

B2(2)a および b で調製した溶液にOA群を添加した溶液を用いて、マトリックス効果の評価した。OA群の添加濃度は、ホタテガイ試料中の相当量として各0.05 ppmとした。これらの溶液と、同濃度のOA群を含む標準溶液を測定条件A～Dで測定した。標準溶液の測定におけるOA群のピーク面積を1とし、HLBおよびODSを用いたSPEによる処理液の測定におけるOA群の面積を比較した図を図4に示す。マトリックス効果がない場合には、標準溶液とホタテガイの処理液の測定における強度が等しくなるため、両者の面積比は1となる。一般的なLC-MS/MS条件である条件Aでは、HLB固相抽出溶液とODS固相抽出溶液の両方において、イオン化抑制が認められた。一方、(1)で最も優れた感度を示した測定条件Cは、HLBカートリッジを用いたSPE処理液に関する面積比が0.81～0.87、ODSカートリッジを用いたSPE処理液に関する面積比は0.89～1.00であった。一般に、面積比が0.8～1.2の範囲であればマトリックス効果によるイオン化促進やイオン化抑制が許容されうるとされており、HLBとODSのいずれのカートリッジを用いた場合でも、条件Cで測定することにより正確に定量可能であることが示唆さ

れた。

(3) 添加回収試験

HLB カートリッジを用いた SPE による前処理と、検討した条件の中で最も感度が高く、精確であった測定条件Cを組み合わせた方法について、添加回収試験を行った。添加濃度は、ホタテガイ試料中の相当量として各 0.05 ppm とした。得られた結果を表 5 に示す。0A 群のいずれについても、下痢性貝毒の機器分析法に求められる性能基準である正確さ：70 %～120 %、及び併行精度：15 %以下を満たしており、精確さは良好であることが確認できた。

以上の検討によって、従来よりも高感度かつ精確な下痢性貝毒分析法を開発した。この方法をさらに高度化すれば、今年度調製した試験所間比較の調査試料の均質性等を正確に評価することが可能と考えられる。

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年計画の初年度である令和5年度は、ホタテガイ可食部と中腸腺を原料とすることにより、検査用試料160本を調製することができた。また、調製した検査用試料を評価するためにはLC-MS/MSによる精確な定量が不可欠であることから、測定感度が高く、かつ、分析値の偏りの原因となるマトリックス効果の影響が少ない分析方法を確立した。今年度得られたこれらの成果を基に、来年度、調査試料の分

析に適用し、均質性等試験所間比較に不可欠な性能試験を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 鳥居塚南, 上原由理香, 長谷川守文, 渡辺卓穂, 鎗田孝, 親水性-親油性バランス型充填剤を用いた簡便な固相抽出精製による二枚貝中オカダ酸群の精密定量, 分析化学, 印刷中.

2. 学会発表

1) 鎗田孝, 鳥居塚南, 上原由理香, 川口研, 渡辺卓穂, ホタテガイ中のオカダ酸群分析に関する試験所間比較試験, 日本食品衛生学会第119回学術講演会(東京), 2023.

2) 栗本悠可, 柳瀬望, 小玉玲菜, 鎗田孝, 分散固相抽出を利用した下痢性貝毒分析法の簡易化, 日本分析化学会関東支部第17回茨城地区分析技術交流会(水戸), 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A

移動相	A液：水（2 mMギ酸アンモニウムおよび50 mMギ酸含有） B液：95 %アセトニトリル（2 mMギ酸アンモニウムおよび50 mMギ酸含有）
グラジエントプログラム	B：40 %（0 min）→40 %（2.5 min）→100 %（7.5 min）→100 %（14 min）
カラム	GL Sciences InertSustain C18（内径：2.1 mm、長さ：75 mm、粒径：2 μm）
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 μL
イオン化法	ESI(-)法
プリカーサーイオン 及びプロダクトイオン	OA・DTX2：m/z 803→255（定量用）、803→113（確認用） DTX1：m/z 817→255（定量用）、817→113（確認用）
カーテンガス（CUR）	10 psi
コリジョンガス（CAD）	8
イオンスプレー電圧（IS）	-4500 kV
スプレー温度（TEM）	600 °C
ネブライザーガス（GS1）	30 psi
ヒーターガス（GS2）	80 psi

表2 LC-MS/MSの測定条件B

移動相	A液：水（2 mMギ酸アンモニウムおよび50 mMギ酸含有） B液：95 %メタノール（2 mMギ酸アンモニウムおよび50 mMギ酸含有）
グラジエントプログラム	B：40 %（0 min）→100 %（10 min）→100 %（15 min）→40 %（15.5 min）
カラム	GL Sciences InertSustain C18（内径：2.1 mm、長さ：75 mm、粒径：2 μm）
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 μL
イオン化法	ESI(-)法
プリカーサーイオン 及びプロダクトイオン	OA・DTX2：m/z 803→255（定量用）、803→113（確認用） DTX1：m/z 817→255（定量用）、817→113（確認用）
カーテンガス（CUR）	10 psi
コリジョンガス（CAD）	8
イオンスプレー電圧（IS）	-4500 kV
スプレー温度（TEM）	600 °C
ネブライザーガス（GS1）	30 psi
ヒーターガス（GS2）	80 psi

表3 LC-MS/MSの測定条件C

移動相	A液：2 mM炭酸水素アンモニウム水溶液 B液：アセトニトリル
グラジエントプログラム	B：30 % (0 min)→95 % (8 min)→95 % (14 min)→30 % (15 min)
カラム	GL Sciences InertSustain C18 (内径：2.1 mm、長さ：75 mm、粒径：2 μm)
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 μL
イオン化法	ESI(-)法
プリカーサーイオン 及びプロダクトイオン	OA・DTX2：m/z 803→255 (定量用)、803→113 (確認用) DTX1：m/z 817→255 (定量用)、817→113 (確認用)
カーテンガス (CUR)	20 psi
コリジョンガス (CAD)	8
イオンスプレー電圧 (IS)	-4500 kV
スプレー温度 (TEM)	500 °C
ネブライザーガス (GS1)	30 psi
ヒーターガス (GS2)	50 psi

表4 LC-MS/MSの測定条件D

移動相	A液：水 (0.05 %アンモニウム) B液：90 %アセトニトリル (0.05 %アンモニウム)
グラジエントプログラム	B：30 % (0 min)→30 % (1 min)→100 % (8 min)→100 % (14 min)
カラム	Waters X-Bridge C18 (内径：2.1 mm、長さ：100 mm、粒径：3.5 μm)
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 μL
イオン化法	ESI(-)法
プリカーサーイオン 及びプロダクトイオン	OA・DTX2：m/z 803→255 (定量用)、803→113 (確認用) DTX1：m/z 817→255 (定量用)、817→113 (確認用)
カーテンガス (CUR)	20 psi
コリジョンガス (CAD)	8
イオンスプレー電圧 (IS)	-4500 kV
スプレー温度 (TEM)	500 °C
ネブライザーガス (GS1)	30 psi
ヒーターガス (GS2)	80 psi

表5 添加回収試験の結果

貝毒素	回収率（平均±標準偏差, %）
OA	104±2
DTX1	109±8
DTX2	82±4



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

図1 検査用試料の調製の記録写真

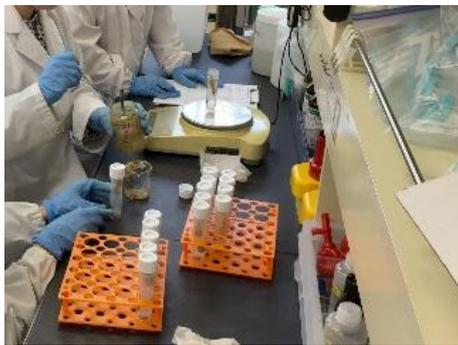
- (a) 原料として用いたホタテガイ可食部 (1)
- (b) 原料として用いたホタテガイ可食部 (2)
- (c) ホタテガイ可食部の均質化
- (d) 均質化したホタテガイ可食部の裏ごし
- (e) ホタテガイ可食部、中腸腺試料および添加用混合溶液の混合
- (f) 混合前 (左) 及び混合後 (右) の試料



(g)



(h)



(i)



(j)



(k)



(l)

図1 検査用試料の調製の記録写真（続き）

- (g) 合一した混合物の回転混合
- (h) 合一した混合物の縮分
- (i) 小分け(1)
- (j) 小分け(2)
- (k) 調製した調査試料(1)
- (l) 調製した調査試料(2)

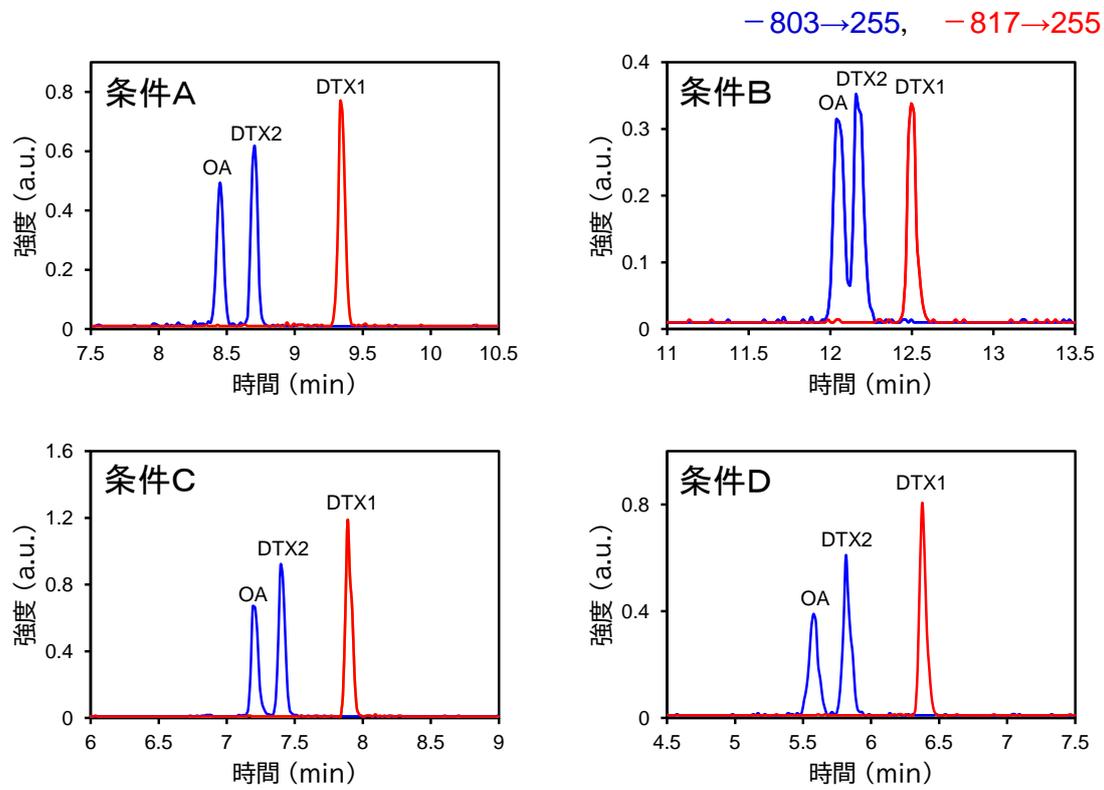


図2 異なるLC-MS/MS条件によって得られたクロマトグラム

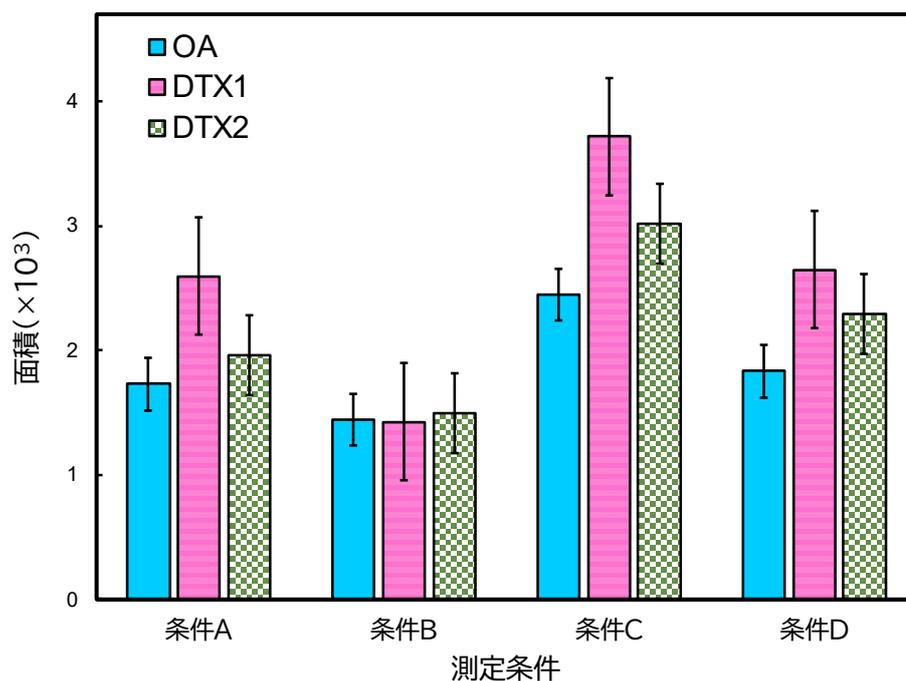


図3 異なる LC-MS/MS 条件における感度の比較

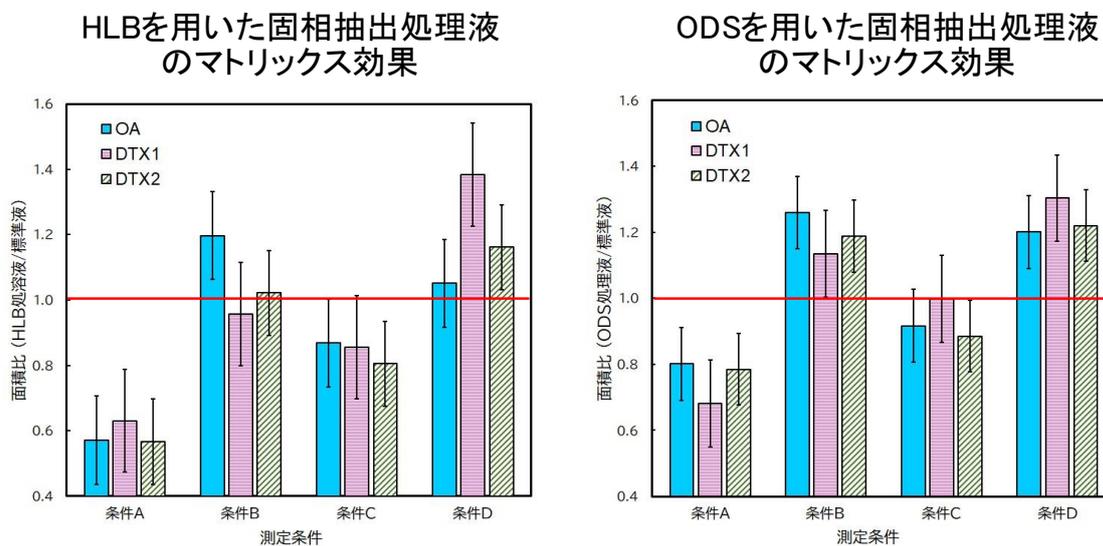


図4 異なる前処理条件と LC-MS/MS 条件におけるマトリクス効果の比較

令和5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

残留農薬分析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 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の農薬分析のための精確な方法を確立し、同調査の信頼性をより向上させることを目的として本研究を行っている。具体的には、「国際単位系にトレーサブルな同位体希釈質量分析法（IDMS）を用いた方法」により得られた信頼性が高い分析値との比較を行うことで、同調査の参加者が、より正確に技能評価できる外部精度管理調査の実現を目指すことが目的である。

今年度は、食品薬品安全センター 秦野研究所がスプレードライヤにより開発する残留農薬分析のための野菜試料の有効性を示すことを目的とし、IDMS を用いた方法により正確な分析値を付与した。これにより、試料調製のための噴霧条件決定に寄与した。また、前年度までに本研究で開発済の玄米試料を用いて、外部精度管理のパイロットスタディを実施することを目的とした。そのための準備として、まずは玄米試料中の農薬分析を行って得られた結果を基に、試料の均質性および試料中の農薬安定性を評価し、パイロットスタディに用いる試料として問題がないことを示した。また本パイロットスタディでは、参加者の中央値を用いた参照値だけでなく、われわれが IDMS による精確な分析値も参照値として付与した。これにより、より信頼性が高い参加者の技能評価を行うことができた。

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用いた同調査の実施を検討している。

今年度はまず、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する残留農薬分析のための野菜試料の有効性を示すために、ほうれんそう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、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、一斉試験法による分析結果の妥当性確認のため、両分析法による分析値の比較も行った。また、前年度までに本研究で開発済である玄米試料を用いて、外部精度管理のパイロットスタディを実施することも目的とした。そのための準備として、玄米試料中の農薬分析を行って得られた結果を基に、試料の均質性および試料中の農薬安定性を

評価し、実際のパイロットスタディに使用できるか否かの判断を行った。その後、パイロットスタディ用の玄米試料中農薬に正確な分析値と不確かさを付与し、パイロットスタディの参加機関の分析値を解析した結果と、比較等を行った。

B. 研究方法

(1) 添加回収試験による、ほうれんそう分析のための一斉試験法の評価

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ほうれんそう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:0.1 mg/kg, ダイアジノン:0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン: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) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

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ほうれんそう試料中の対象農薬を分析した。一斉試験法では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) および 2 (80 °C, アセトニトリル 20 %) の 2 種 (温度は噴霧温度を示す)、SFE では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) の試料を分析した。また、噴霧温度は同じで、アセトニトリルを 20 % から 30 % にして調製した試料

(Lot 3: 100 °C, アセトニトリル 30 %, Lot 4: 80 °C, アセトニトリル 30 %) も、一斉試験法によって分析した。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。

(3)パイロットスタディのための玄米試料の均質性評価

ISO Guide35 (標準物質—認証のための一般的及び統計的な原則) に基づき、食品薬品安全センター秦野研究所が調製した 117 本から無作為に選んだ 10 本について、2 回ずつ農薬濃度を分析した。分析法は、IDMS を適用した QuEChERS 法を用いた。

(4)パイロットスタディのための玄米試料中農薬の安定性評価

昨年度、本研究で分析を行った玄米試料中農薬 (スプレードライヤの噴霧温度は 100 °C の試料) を、約 1 年後に分析することで、長期安定性を評価した。分析には、IDMS を適用した一斉試験法を用いた。

(5)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

(3) で均質性が確認された玄米試料中の対象農薬の濃度を分析した。分析には、IDMS を適用した一斉試験法、QuEChERS 法、STQ 法を用い、不確かさの算出も行った。

(6)残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

23 機関から参加申し込みがあった。これらの機関に対して、2024 年 2 月 16 日に、食品薬品安全センター秦野研究所より、試験試料を冷凍便により送付した (2024 年 2 月 19 日着とした)。参加機関

は、独立した分析 (試料の抽出及び精製、GC/MS 等による機器測定等) を 2 回行い、得られた結果と、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、測定法等) を報告することが求められた。最終的に 22 機関が、分析結果を報告した。

1. 試料基材および試薬

(1) 試料

①ほうれんそう分析

添加回収試験による一斉試験法の評価には、粉碎して粉末とした市場流通品のほうれんそうを用いた。分析により、当該ほうれんそう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ほうれんそう試料 (Lot 1 (100 °C、アセトニトリル 20 %)、2 (80 °C、アセトニトリル 20 %)、3 (100 °C、アセトニトリル 30 %)、4 (80 °C、アセトニトリル 30 %) の 4 種、温度は噴霧温度を示す) も分析対象とした。

②玄米分析

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 (噴霧温度は 100 °C) を用いた。

(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。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。

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の評価および残留農薬検査用試料の分析用 (ほうれんそう試料)

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)から 3(3)に示す前処理法によって、ほうれんそう試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調製した。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認したほうれんそう試料を 3(1)から 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 を調製した。

(2) 均質性および安定性の評価並びにパイロットスタディのための残留農薬含有玄米試料の分析用

(1)と同様に、内標準溶液 B、農薬混合溶液 B、アラクロール溶液 B、検量線溶液 B、マトリックスマッチ検量線溶液 B を調製した。なお、検量線溶液 B 中の各成分濃度は、3(4)と 3(5)に示す前処理法によって残留農薬含有玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調製した。

3. 分析方法

添加回収試験による、ほうれんそうの一斉試験法の評価では分析法 1 を、残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析では分析法 2 (一斉試験法) と 3 (SFE 法) を用いて農薬を分析した。また残留農薬含有の玄米試料中の農薬分析には、分析法 4 (一斉試験法) , 5 (QuEChERS 法) , 6 (STQ 法) を用いた。

(1)分析法 1 (一斉試験法、添加回収試験、ほうれんそう試料の分析)

ほうれんそう試料0.5 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(pH7.0)20 mLを加え、10分間振とうした。AN層を無水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。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液A 0.5 mLに溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を、GC/MSによって測定した。測定条件は以下の通りである。装置：7890/5975c GC/MSシステム(Agilent Technologies 製)、カラム：DB-5ms(30 m×0.25 mm、膜厚0.25 μm、Agilent Technologies 製)、カラム温度：50 °Cで2分間保持した後、+20 °C/分で160 °Cまで昇温し、さらに+7 °C/分で300 °Cまで昇温し、10分間保持、注入口温度：250 °C、検出器温度：230 °C(イオン源)、注入方式：スプリットレス、キャリアガス：ヘリウム、注入量：1 μL、イオン化条件：EI、定量に用いた *m/z*：314(クロルピリホス)、324(クロルピリホス-*d*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)、160(アラクロール)。

(2)分析法2(一斉試験法、残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析)

残留農薬検査用ほうれんそう試料0.5 gに内標準溶液A0.4 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。

(3)分析法3(SFE法、残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料0.5 gに内標準溶液A0.4 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/Tol(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/Tol(3:1)混液20 mLを注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液A 0.5 mLに溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中のフェニトロチオンをGC/MSで、クロルピリホス、ダイアジノ

ン、及びマラチオン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。GC/MSの測定条件は分析法 1 と同じである。LC/MS/MS の測定条件は、以下の通りである。装置：LCMS-8030（島津製作所製）、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 $^{\circ}\text{C}$ 、試料注入量：10 μL 、溶離液 A：2 mM 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B：メタノール、流量：0.15 mL/min、グラジエント条件：溶離液 A の割合を 85% から 1.3 分間で 60% に減少させた後、60% で 3.3 分間保持し、 $-3\%/分$ で 50% まで減少させ、次に $-1.85\%/分$ で 45% まで減少させ、さらに $-3.2\%/分$ で 5% まで減少させた後に 10 分間保持した。イオン化方法：ESI、Q1 プレバイアス電圧：12~26 V、Q3 プレバイアス電圧：11~30 V コリジョンエネルギー：8~35 eV、DL 温度：300 $^{\circ}\text{C}$ 、ヒートブロック温度：500 $^{\circ}\text{C}$ 、定量に用いた m/z（プリカーサーイオン \rightarrow プロダクトイオン）：349.80 \rightarrow 96.95（クロルピリホス）、360 \rightarrow 98.95（クロルピリホス- d_{10} ）、304.90 \rightarrow 169.05（ダイアジノン）、315.00 \rightarrow 170.10（ダイアジノン- d_{10} ）、33.80 \rightarrow 99.00（マラチオン）、336.90 \rightarrow 99.00（マラチオン- d_6 ）、270.00 \rightarrow 238.05（アラクロール）。

(4) 分析法 4（一斉試験法、残留農薬含有の玄米試料の分析）

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。これに水 10 mL を加えて 15 分静置した後、AN25 mL を加

えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN10 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。これに NaCl 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）20 mL を加え、10 分間振とうした。その後、あらかじめ AN10 mL でコンディショニングした Agilent Technologies 製 Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ（1 g）を用いて、振とうによって得られた AN 層と AN2 mL を通液する処理を行った。得られた処理液を無水 Na_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 B 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、分析法 1 と同じである。

(5) 分析法 5（QuEChERS 法、残留農薬含有の玄米試料の分析）

玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.4 mL を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えて 1 分間振とう（手振り）した。これに 4 g の MgSO_4 、1 g の NaCl を加え、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、300 mg の C18、900 mg の MgSO_4 を加えた。再び 3500 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固した。

アラクロール溶液 B の 0.1 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。

(6)分析法6 (STQ法、残留農薬含有の玄米試料の分析)

玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.4 mL を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えて 1 分間振とう (手振り) した。これに 4 g の $MgSO_4$ 、1 g の $NaCl$ を加え、1 分間振とう (手振り) した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液 1 mL を分取し、あらかじめ Ac2 mL と AN2 mL でコンディショニングしたアイステイサイエンス製 C18 50 mg 固相抽出カートリッジを用いて通液し、AN0.2 mL で溶出した。得られた処理液に To10.4 mL を添加し、その試料を Ac2 mL と To1/AN (1:3)2 mL でコンディショニングしたアイステイサイエンス製 GCS-20 mg/PSA-30 mg により精製した (溶出には To1/AN (1:3)0.6 mL)。溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 B 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、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。

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) 添加回収試験による一斉試験法の評価 (ほうれんそう試料)

式(1)に準じて一斉試験法 (分析法 1) による分析値を算出した。得られた結果を、ほうれんそう試料への添加濃度 (クロルピリホス:0.1 mg/kg, ダイアジノン:0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン: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。

(3) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

式(1)に準じて一斉試験法 (分析法 2) および SFE 法 (分析法 3) による分析値を算出した (SFE 法では、Lot 1 (100 °C) の試料のみ分析)。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。

(4)パイロットスタディに用いる玄米試料の均質性評価

式(1)に準じて QuEChERS 法（分析法 5）による分析値を算出した。得られた分析結果を分散分析して、農薬濃度の瓶間のばらつきを評価した。また、均質性に関する標準不確かさは ISO Guide 35: 2017 に従って求めた。

(5) パイロットスタディに用いる玄米試料中の農薬の安定性評価

式(1)に準じて一斉試験法（分析法 4）による分析値を算出した。昨年度に得られた定量結果と、今回得られた約 1 年間保管後の定量結果を比較して、各農薬の安定性を評価した。

(6)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

不確かさは、式(1)の各項について評価した。校正用標準液やサロゲート溶液は分析法 1~3 を通じて同一のものを使用したため、式(1)における M_c 、 C_c 、 $M_{sp(c)}$ は分析法間で共通である。そこで、これらの不確かさの合成標準不確かさを $u(C_{com})$ とした。一方、 F_e 、 R_s/R_c 、 $M_{sp(s)}$ 、 M_s は適用した分析法あるいは測定毎に異なるために、これらの合成標準不確かさを $u(C_{ind,1})$ 、 $u(C_{ind,2})$ 、 $u(C_{ind,3})$ とした。ここで、添字の番号は分析法を示し、1 は一斉試験法、2 は QuEChERS 法、3 は STQ 法とした。 $u(C_{ind,1})$ 、 $u(C_{ind,2})$ 、 $u(C_{ind,3})$ の逆数を重みとして、分析法 1 と分析法 2、および 3 の平均値 C_{av} と、あわせて分析法毎に依存する項目の合成標準不確かさ $u(C_{ind})$ を算出した。分析法 1 と分析法 2 および 3 の結果の違いに関する不確か

さ $u(F_{method})$ として、一元配置分散分析により分析法間の標準偏差を求めた。さらに、 $u(C_{com})$ 、 $u(C_{ind})$ 、 $u(F_{method})$ を合成することにより、重み付き平均値の不確かさ $u(C_{av})$ を求めた。

(6) 残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

パイロットスタディの参加機関から得られた分析値を基に算出した中央値を、参照値として求めた。

（倫理面への配慮）

食の安全・安心に係わる研究であり、特に倫理面への配慮を必要としなかった。実験者および環境への配慮としては、特に有害な溶媒（ベンゼン等）を使用しなかった。

C. D. 研究結果および考察

(1) 添加回収試験による一斉試験法の評価（ほうれんそう試料）

分析法 1 で得られた定量値と調製値の比を表 1 に示す。この結果から、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、91~94 %と良好であった（マトリックスマッチ検量線を使用）。よって、本方法によって残留農薬検査用ほうれんそう試料を用いた、農薬の噴霧条件検討のための分析を行っても問題ないことが示された。

(2) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析によるスプレードライヤ条件決定への寄与

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ほうれんそう試料の、Lot 1 (100 °C, AN20 %), 2 (80 °C, AN20 %), 3 (100 °C, AN30 %), 4 (80 °C, AN30 %) (温度は噴霧温度を示す) の 4 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 (SFE 法では、Lot 1 の試料のみ分析)。得られた結果を表 2, 3 (マトリックスマッチ検量線を使用) に示す。これらより、一斉試験法と SFE 法の定量結果はよく一致しており、(1)での添加回収試験に加えて一斉試験法の妥当性を確認できた。

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 mg/kg, ダイアジノン:0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン:0.2 mg/kg であった。本研究で得られた結果 (表 2) を用いて、調製時の回収率を計算した結果を表 4 に示す。これより、スプレードライヤの添加濃度に対する回収率の範囲は、80 °C (AN20 %) で 61 %から 78 %、100 °C (AN20 %) で 57 %から 74 %、80 °C (AN30 %) で 58 %から 76 %、100 °C (AN30 %) で 54 %から 74 %であった。昨年度までに、玄米試料でもスプレードライヤの条件検討を行ったが、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果の類似点は、以下の通りであった。①対象農薬のうち、フェニトロチオンの回収率が一番高かった。②各農薬において、100 °Cよりも 80 °Cの方が良い回収率が得られた。また、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果で異なる点は、以下の通りであった。①ほうれんそうでは、80 °Cでのダ

イアジノンの回収率がクロルピリホスよりも高く (マラチオンと同程度であった)、クロルピリホスの回収率が一番低かった。②ほうれんそうでは、玄米に比べて多くの場合で回収率が上昇した (例えば、80 °Cではフェニトロチオンとダイアジノンで約 10 %上昇した)。さらに、ほうれんそう試料において AN を 30 %とした場合、AN20 %のときと比較すると、マラチオンを除いて AN20 %の回収率がやや高くなった。噴霧温度や AN 濃度を確定させるためには、以上の結果を用い、他の条件も考慮して (試料調製時に用いる装置の壁面に粉末試料が付いてしまう等の作業面での条件も含む)、課題 1 において最終的に決定する。

(3)パイロットスタディに用いる玄米試料の均質性評価

得られた分析結果を図 1 に示す。この結果を分散分析したところ、すべての対象農薬の瓶間濃度に統計的な有意差は見られず、試料が均質であることが示された。また、分散分析の結果を基に、瓶間

均質性標準偏差 s_{bb} ($=\frac{MS_{among}-MS_{within}}{n}$) と

測定のはらつきに由来する u_{bb}

$$\left(=\sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \cdot 4 \sqrt{\frac{2}{v_{MS_{within}}}}\right)$$

を求めたところ、表 5 の通りであった。この結果から、均質性試験の不確かさは 0.58 %から 0.78 %と十分に小さく、パイロットスタディに用いるためには問題ない品質であることが示された。

(4)パイロットスタディに用いる玄米試料中の農薬の安定性評価

得られた結果を表 6 に示す。この結果

より、今回対象としたすべての農薬に対して、有意な濃度減少は見られなかった。よって、約 1 年間の安定性に問題ないことが示された。

(5)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

各分析法によって得られた結果を用いて算出された、IDMS による精確な参照値と拡張不確かさを表 7 に示す。この値と、参加者の中央値を用いて算出された参照値の比較を、以下の(6)で行う。

(6) 残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

参加者の中央値を用いて算出された参照値を、表 8 に示す。表 7 に示した、IDMS によって得られた参照値と比較すると、よく一致していた。

E. 結論

IDMS を用いて高精度化した一斉試験法によって、食品薬品安全センター秦野研究所が調製したほうれんそう試料中農薬に精確な分析値を付与した。これは、スプレードライヤの噴霧条件を決定するための重要なデータとなる。最終的に噴霧温度や AN 濃度の条件を確定させるためには、他の条件も総合的に考慮して、課題 1 において決定する。玄米試料を用いた外部精度管理のパイロットスタディでは、試料中農薬の均質性と安定性を評価した。その結果、パイロットスタディに用いるには、十分優れた品質であったことが示された。また、この玄米試料を用いたパイロットスタディも実施した。参加者の中央値を用いた参照値だけでなく、われわれが、IDMS による精確な分析

値も参照値として付与した。これにより、より信頼性が高い参加者の技能評価を行うことができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) ○Nakamura K., Otake T., and Hanari N: Quantitative determination of organophosphorus, pyrethroid, and dithiolane pesticide residues in brown rice using supercritical fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry., Journal of AOAC International, 106, 1532-1541 (2023)

2. 学会発表

1) 中村圭介、太竹貴光、羽成修康：超臨界流体抽出法を用いた玄米中農薬分析法の妥当性評価、第46回農薬残留分析研究会、長野、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 一斉試験法による添加回収試験の結果（ほうれんそう試料中農薬）

対象農薬	調製値に対する分析値の比 (平均値±標準偏差, n=4, %)
クロルピリホス	100.1±1.2
ダイアジノン	98.9±0.7
フェニトロチオン	99.4±0.4
マラチオン	100.1±0.6

表2 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用ほうれんそう試料中の農薬濃度
(平均値±標準偏差, n=3, mg/kg, 温度は噴霧温度)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
	(100 °C, AN20 %)	(80 °C, AN20 %)	(100 °C, AN30 %)	(80 °C, AN30 %)
クロルピリホス	0.058±0.001	0.061±0.002	0.055±0.0002	0.058±0.001
ダイアジノン	0.226±0.001	0.271±0.003	0.217±0.002	0.244±0.007
フェニトロチオン	0.149±0.001	0.156±0.002	0.137±0.0006	0.143±0.004
マラチオン	0.133±0.005	0.135±0.005	0.147±0.003	0.152±0.004

表3 SFE法によって得られた残留農薬検査用ほうれんそう試料中の農薬濃度
(平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	Lot 1 (100 °C, AN20 %)
クロルピリホス	0.060±0.003
ダイアジノン	0.225±0.006
フェニトロチオン	0.148±0.006
マラチオン	0.131±0.004

表4 一斉試験法の分析結果を基にしたほうれんそう試料調製時の回収率
(平均値, n=3, %)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
	(100 °C, AN20 %)	(80 °C, AN20 %)	(100 °C, AN30 %)	(80 °C, AN30 %)
クロルピリホス	57.9	61.2	55.0	57.6
ダイアジノン	56.5	67.7	54.2	61.0
フェニトロチオン	74.3	78.0	68.4	71.4
マラチオン	66.6	67.4	73.6	76.2

表5 均質性評価試験における s_{bb} と u_{bb} (相対値)

対象農薬	s_{bb}	u_{bb}
クロルピリホス	0.00450	0.00583
ダイアジノン	0.00776	0.00369
フェニトロチオン	—	0.00705
マラチオン	—	0.00754

表6 玄米試料中農薬の安定性評価 (平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	分析日: 2022/8/15	分析日: 2023/7/26
クロルピリホス	0.062±0.0001	0.061±0.001
ダイアジノン	0.191±0.001	0.186±0.003
フェニトロチオン	0.130±0.001	0.130±0.001
マラチオン	0.122±0.001	0.125±0.003

表7 IDMSによる玄米試料中農薬の精確な参照値 (mg/kg)

対象農薬	参照値±拡張不確かさ
クロルピリホス	0.065±0.004
ダイアジノン	0.217±0.012
フェニトロチオン	0.138±0.008
マラチオン	0.138±0.008

(参照値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数 $k=2$ から決定された拡張不確かさであり、約95%の信頼の水準をもつと推定される区間を示す)

表8 参加機関の分析結果から算出した参照値 (mg/kg)

対象農薬	参照値±NIQR
クロルピリホス	0.067±0.007
ダイアジノン	0.209±0.021
フェニトロチオン	0.140±0.016
マラチオン	0.141±0.021

(参照値には中央値を用いた。またNIQRは、正規四分位数範囲を示す)

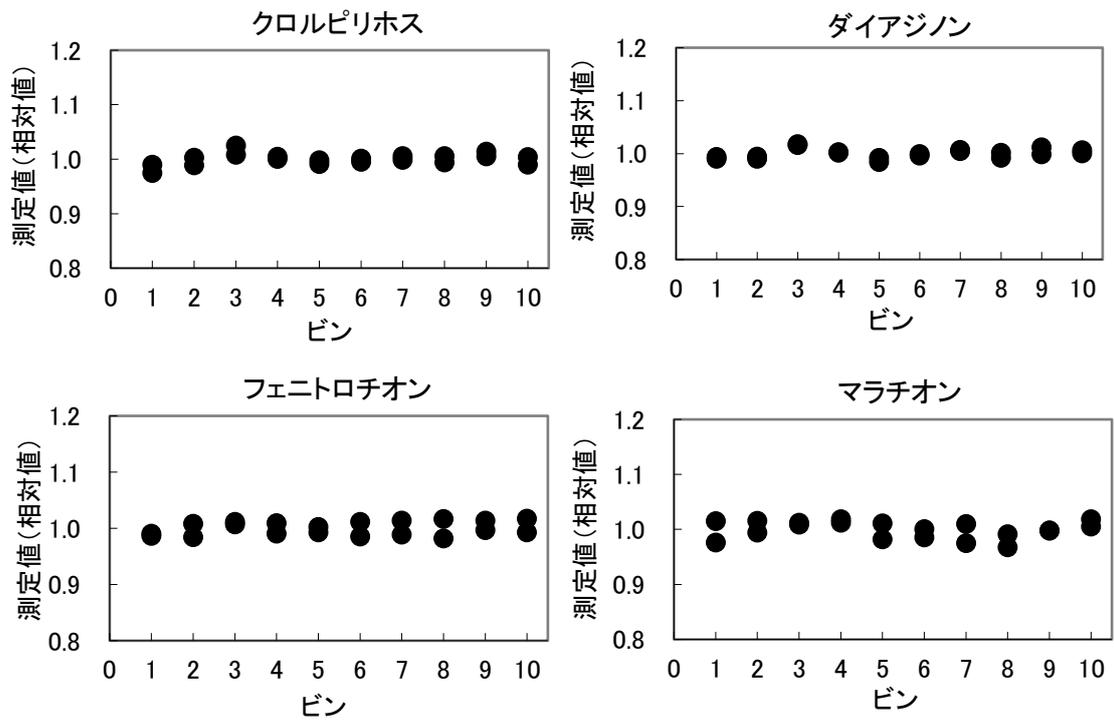


図1 均質性評価試験の結果

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
Nakamura K., Otake T., and Hanari N	Quantitative determination of organophosphorus, pyrethroid, and dithiolane pesticide residues in brown rice using supercritical fluid extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry	Journal of AOAC International	106	1532-1541	2023
鳥居塚南, 上原由理香, 長谷川守文, 渡辺卓穂, 鎗田孝	親水性-親油性バランス型充填剤を用いた簡便な固相抽出精製による二枚貝中オカダ酸群の精密定量	分析化学	73	185-191	2024

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	特定原材料（小麦）の改良抽出法の室間共同試験による評価	日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会	2023
鎗田孝, 鳥居塚南, 上原由理香, 川口研, 渡辺卓穂	ホタテガイ中のオカダ酸群分析に関する試験所間比較試験	日本食品衛生学会第 119 回学術講演会	2023
梶原三智香, 中阪聡亮, 堀田実和, 高坂典子, 渡辺卓穂	白飯を用いた一般細菌数測定検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ	日本食品衛生学会第 119 回学術講演会	2023
若栗忍, 渡辺卓穂	アレルギー（卵及び牛乳タンパク質）含有試料を用いた特定原材料検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ	日本食品衛生学会第 119 回学術講演会	2023

栗本悠可, 柳瀬望, 小玉 玲菜, 鎗田孝	分散固相抽出を利用した下痢性貝 毒分析法の簡易化	日本分析化学会関東支部第17回茨 城地区分析技術交流会	2023
中村圭介, 大竹貴光, 羽成 修康	超臨界流体抽出法を用いた玄米中 農薬分析法の妥当性評価	第46回農薬残留分析研究会	2023
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 についての室間共同試験による評 価	AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第26回年次大会	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5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5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 埼玉県衛生研究所・化学検査室長

(氏名・フリガナ) 今井 浩一・イマイ コウイチ

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) ・該当する口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6年3月1日

厚生労働大臣 殿

機関名 地方独立行政法人
大阪健康安全基盤研究所

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 朝野 和典

次の職員の令和5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 課長
(氏名・フリガナ) 新矢 将尚・シンヤ マサナオ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和6年3月13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
(公印省略)

次の職員の令和5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。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 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
- 研究者名 (所属部署・職名) 農学部・教授
(氏名・フリガナ) 鎗田 孝・ヤリタ タカシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

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5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。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 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
- 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。