

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 6 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	梶原 三智香
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 7 年(2025 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	14
	梶原 三智香	
1.1	スプレードライヤを用いた残留農薬用試料の開発	14
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	26
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	52
1.4	サルモネラ属菌検査用調査試料の開発	90
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	103
	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	134
	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	144
	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6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（梶原研究分担）では、スプレードライヤを用いてハウレンソウパウダーを基材としたパイロットスタディ用残留農薬検査試料を作製し、課題5に供した。器具・容器包装の検査項目の基礎検討では、試料基材にABSペレット、測定対象物質をカドミウム及び鉛、溶解溶媒にジクロロメタンを用いて作製したシート状試料を用いて室間共同試験（パイロットスタディ）を実施した。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、参加した50機関のうち、35機関のみが正しく判定した。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について、新規誘導体剤を用いた分析法の開発を行ってきた。本年度は、昨年度までに報告した抽出操作及び固相精製操作における課題について追加検討した。また、HPLC測定感度を向上させるため、固相精製後の溶出液全量を誘導体化した結果、HPLC測定におけるピーク面積は、昨年度と比較して約5倍に増大した。検討した試験法について、試料としてブルーベリージャム等を用いて添加回収試験を実施した結果、真度及び併行精度は目標値に適合していた。

また、頑健性の高い動物用医薬品の試験法を開発するため、LC-MS/MSを用いた動物用医薬品の試験法のLC-MS/MS測定条件及び前処理法について検討した。本年度は、酸性条件下で分解しやすい動物用医薬品の真度を向上させることを目的として、抽出時におけるギ酸添加及び抽出液へのpH緩衝液の添加について検討した。検討した試験法について、鶏肉ペースト試料を用いて添加回収試験を実施した結果、測定対象項目129項目中97項目の真度及び併行精度が目標値に適合していた。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肉試料において検討し、その分析妥当性を確認した。また、市販粉末肉の有害重金属類含有量を調査し、外部精度管理ブランク試料としての適用性を確認できた。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、オカダ酸（OA）群の精確な分析方法として、昨年度開発した分析法に酸添加/高温抽出法を適用し、実試料分析における有効性を示した。また、アセトニトリルを抽出溶媒に用いた分析法も検討し、従来法で必要であった固相抽出精製を要しない簡便な分析が可能であることを示した。さらに、昨年度調製した試験所間比較試験の調査試料の均質性評価試験を実施し、良好な均質性を有することを示した。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で作製した玄米中農薬の2年間の安定性評価をした結果、いずれの農薬も濃度が減少傾向にあるが、分析値の保証はせず、均質な精度管理試料として使用可能であった。また、パイロットスタディに用いるほうれんそう試料の均質性は良好であり、試験期間中の安定性は問題なかった。パイロットスタディの結果、IDMSによる精確な参照値を参加者の中央値と比較すると、マラチオンを除きおおそ一致していた。詳細は今後の検討が必要である。

研究分担者名＝梶原三智香（（一財）食品薬品安全センター秦野研究所室長）、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上級主任研究員）

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認する。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（梶原研究分担）

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ハウレンソウパウダーを用い、10%懸濁溶液は、ハウレンソウパウダー1 kgを30%アセトニトリル溶液4 Lに懸濁させ、スプレードライヤに供した。また、20%懸濁溶液は、ハウレンソウパウダー2 kgを30%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。さらに、15%懸濁溶液はハウレンソウパウダー1.5 kgをこれらの懸濁液に30%アセトニトリル溶液8.5 Lに懸濁させ、ダイアジノン ($0.40 \mu\text{g/g}$)、フェニトロチオン ($0.20 \mu\text{g/g}$)、マラチオン ($0.20 \mu\text{g/g}$) およびクロルピリホス ($0.10 \mu\text{g/g}$) 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、ハウレンソウパウダー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1.1～2 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℃に設定し、作製した。得られたハウレンソウパウダーは平均粒子径を測定し、顕微鏡下で粒子の観察を行った。得られたハウレンソウパウダーは課題5のパイロットスタディで使用した。

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 ペレット、作製容器にステンレス製バットを用いることで濃度確認では1シート内の部位による

濃度差が小さく良好な結果が得られ、ポリマーの溶解に用いる有機溶媒（以下、溶解溶媒）残存率を室温下で減圧乾燥することにより低減化が可能であることが示唆された。今年度はこれらの結果から ABS ペレットのシート状試料を作製し、パイロットスタディとして室間共同試験を行った。なお、調査試料の品質評価として 1 個の作製容器内（1 シート）のカドミウムおよび鉛の均質性の確認試験、また、10 個の作製容器間（10 シート）のカドミウムおよび鉛の均質性および安定性の確認試験を行うと同時にジクロロメタンの残留溶媒測定を実施した。添加に用いる標準品は SPEX 製カドミウム及び鉛（いずれも 5000 µg/g、Base Oil 75）、溶解溶媒には、ジクロロメタンを用いた。

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乳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、こちらで指定した通知法準拠の市販キット 2 種を用いて試験し、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 σ スコアの算出を行った。

1.4 サルモネラ属菌検査用試料の開発：

サルモネラ属菌検査用調査試料の開発として、2023 年度に引き続きパイロットスタ

ディを実施した。

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 50 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、H₂S 非産生サルモネラ属菌 2 菌株およびサルモネラ陰性菌 1 菌株の計 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 2023 年度の厚生労働科学研究費補助金にて実施したパイロットスタディに使用した 1 菌株と、別途スクリーニング試験でクエン酸利用能試験の反応が比較的わかりやすい 1 菌株を選択、採用した。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）

サイクラミン酸試験法の新規誘導体化剤を用いた分析法について、昨年度までに報告した抽出操作及び固相精製操作における課題を改善するため、試料採取量を検討した。また、HPLC 測定感度を向上させるため、誘導体化する溶出液の量、液-液分配の回数、減圧乾固による濃縮の影響について検討した。検討した試験法を評価するため、試料としてブルーベリージャム等の 4 食品を用いて 5 併行の添加回収試験を実施した。

動物用医薬品の試験法開発は、測定対象成分、LC-MS/MS 条件及び前処理法について

検討した。測定対象成分は、過去の報告及び他地方衛生研究所の検査実績を参考に選定し、各成分のピーク感度 (S/N) 等を確認した。LC-MS/MS条件は、SRM条件、分析カラム及び移動相条件を検討した。前処理法は、三層分離抽出法に基づき、抽出時のギ酸の有無、抽出液へのpH緩衝液の添加の有無、抽出回数、抽出液の濃縮条件、及び精製に用いる固相ミニカラム等について検討した。検討した試験法について、鶏肉ペースト試料を用いて5併行の添加回収試験を実施した。

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)

近年輸出実績が増大傾向にある畜産肉を対象とし、前年度に検討したマイクロウェーブ分解-ICP 質量分析法を適用し、3 種の認証標準物質 (Bovine Liver、Pig Kidney、Bovine Muscle) を用いて分析妥当性の評価を行った。付与されている認証値は、Bovine Liver が Pb、Cd、As を含む 20 元素、Pig Kidney が Pb、Cd を含む 7 元素、Bovine Muscle が Cd、As を含む 7 元素であった。また、市販肉 (牛肉、豚肉および鶏肉のそれぞれ無添加パウダー食品、ならびに無添加国産牛の干し肉) の有害重金属類含有量を調査し、外部精度管理調査に資するか検討を行った。

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。

市販肉試料の添加回収試験では、粉末にした牛干し肉を用い、Pb については 0.1 mg/kg、Cd については 0.05 mg/kg、As については 0.5 mg/kg になるよう添加して回収率を求めた。

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 抽出方法の精確化の検討

本法は、昨年度開発した分析法の抽出操作を改良した方法である。

抽出操作の概略を以下に示す。ホタテガイ試料 2.0 g に 0.5 %酢酸/メタノール溶液 9 mL を加え、60 °C で 5 分間加熱した後にホモジナイズし、遠心分離によって上清を得た。沈殿物に 0.5 %酢酸/メタノール溶液 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 を、昨年開発した方法によって加水分解、ヘキサン洗浄、HLB カートリッジによる精製を順次行い、試料溶液を得た。さらに、この試料溶液を LC-MS/MS によって測定し、含有する OA 群を定量した。

4.2 抽出方法の簡易化の検討

本法は、下痢性貝毒分析法の抽出溶媒に

広く使用されているメタノールの代替に、アセトニトリルを用いた方法である。

ホタテガイ試料 2.0 g にアセトニトリル 9 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離によって上清を得た。沈殿物に 90 %アセトニトリル 9 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離によって上清をとり、前述の上清と合わせ、90 %アセトニトリルを加えて 20 mL とした。このうちの 2 mL に 2.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 250 μ L を加え、76 $^{\circ}$ C で 40 分間加水分解し、さらに 2.5 mol/L 塩酸を 250 μ L 加え中和した。得られた処理液に塩化ナトリウムを 3 g 加えて塩析させ、有機層をとった。水層にアセトニトリルを 9 mL 加えて振とうして有機層をとり、前述の有機層と合わせた後、アセトニトリルによって適当倍に希釈して試料溶液を得た。この試料溶液を LC-MS/MS によって測定し、含有する OA 群を定量した。

4.3 均質性評価試験

昨年度の本事業で調製した調査試料から 10 本を無作為に選択し、各瓶について 2 回ずつ、合計 20 サブサンプルを分析した。分析には、昨年度開発した分析法に内標準法を適用した方法を適用した。

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）

(1) 玄米中農薬の長期安定性評価

2022 年度及び 2023 年度に、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 $^{\circ}$ 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（今回で 3 年目）。分析には、IDMS を適用した一斉試験法を用いた。

(2) 試料調製の条件検討のための残留農

薬検査用ほうれんそう試料の分析

IDMS を適用した一斉試験法を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用ほうれんそう試料中の対象農薬を分析した。試料の調製条件は、噴霧温度：100 $^{\circ}$ C、懸濁液濃度：20 %、溶媒のアセトニトリル濃度：30 vol%であった。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ほうれんそう試料の均質性評価

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 150 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 を適用した一斉試験法を用いた。

(4) パイロットスタディのためのほうれんそう試料中農薬の安定性評価

パイロットスタディの試験期間前後における農薬の安定性を評価した。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ほうれんそう試料中農薬の値付け

(3) で均質性が確認されたほうれんそう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、STQ 法を用い、不確かさの算出も行った。

(6) 残留農薬含有のほうれんそう試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

30 機関から参加申し込みがあった。これらの機関に対して、2025 年 2 月 17 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。

(2025 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 30 機関が、分析結果を報告した。

C.D. 研究結果および考察

1 梶原研究分団

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てきた。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 μm の粒度分布で平均粒子径は 26.76 μm である。昨年度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。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。しかし、処理量が少ないことから、最終的に玄米粉と同様に 20%懸濁溶液を用い検討した。昨年度、噴霧温度（入口温度）を 100℃、懸濁溶媒には 30%アセトニトリル溶液を用い良好な結果が得られたことから同一の条件で検討を行った。すなわち、昨年度最適化した条件の 20%懸濁液で再度作製した。20%懸濁液は粘性が高くまた、粒子径の大きなハウレンソウパウダーは乾燥が不完全でありアトマイザから噴霧されると装置の壁に線状

に付着した。得られたハウレンソウパウダーの平均粒子径は 54 μm であり 30 μm ~100 μm の微細な粉体を得られた。しかし、粉体の回収率は約 60%であり、パイロットスタディを行う必要量には達しなかった。そこで、再度 2 倍量の作製を行うこととした。パイロットスタディの必要量である 1.2 kg 以上作製を目標とした。20%懸濁液は粘性が高く前回は回収率が約 60%であったが、今回はそれを下回る 56%であり、得られた粉体は 660g と低かった。この原因としては、前回のハウレンソウパウダーに比べ今回用いたパウダーは粘性がやや高く、処理量が前回の 1.7kg/h に対して 1.1kg/h と低かったためと考えられた。得られたパウダーの平均粒子径は 50 μm であり、前回作製した時とほぼ同様の粒子径であった。これまでの結果から、20%懸濁液では収量は期待できるが、粘性が高いことから処理量を低くする必要があり結局得られる粉体の回収が低く必要量に達しなかった。そこで、粘性を加味して 15%懸濁液を用いることとした。基本的な条件はこれまでの条件と同一であるが、処理量は 2kg/h が達成できた。それにより回収された粉体は 1267g であり、回収率は 90%と良好であり、必要量は確保できた。得られた粉体の平均粒子径は 46 μm となり、20%懸濁液の場合と同様の粒子径が得られた。得られたハウレンソウパウダーは、課題 5 に供与し、パイロットスタディのために、均質性、安定性試験に供した。

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：

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 ABS ペレット、測定対象物質をカドミウム及び鉛、溶解溶媒にジクロロメタンを用いて作製したシート状試料を用いて室間共同試験（パイロットスタディ）を実施し以下の結論を得た。作製した試料は、1 個の作製容器内および 10 個の作製容器間のいずれでもカドミウムおよび鉛で良好な均質性および安定性が得られた。作製直後に行った均質性確認試験で得られた各濃度（平均値）は理論作製濃度に対し、いずれも回収率 80% 以上であり、作製濃度のコントロールも可能であると考えられた。この方法で作製した調査試料を用いて室間共同試験を実施した結果、正規確率プロット中のデータ分布においてもいずれの測定対象物質でも概ね直線状に分布しており、妥当な結果が得られたと考えられた。また、試料採取量が 0.1 g 以上 0.3 g 未満で 3 機関、0.5 g 以上 0.7 g 未満で 3 機関あり、公定法の 1 g より少量であったが、いずれの機関でもカドミウムおよび鉛ともに $n=5$ のばらつきに問題なく、 $n=5$ の平均値も妥当な結果であった。今回の 25 機関中、1 機関がエネルギー分散型蛍光 X 線装置による定量値を報告していたが、特に鉛において理論作製濃度とよく一致していた。カドミウムにおいても全体で見ると高濃度側の測定値を報告しており、理論作製濃度に近似する傾向があった。この傾向は 1 機関のみのデータであり、今後も蛍光 X 線装置によるデータの蓄積は必要である。全体 25 機関で使用された測定装置は原子吸光分光光度計（フレイム方

式）が 12 機関で最も多く、次いで、ICP-OES が 9 機関、ICP-MS が 3 機関、蛍光 X 線装置が 1 機関であった。データ数は異なるが本調査研究結果では、原子吸光分光光度計、ICP-OES および ICP-MS の装置において、報告値に明らかな差は認められなかった。これらの結果より、本作製による調査試料は外部精度管理用調査試料として各機関が一般的に用いる各種試験法に対応可能な堅牢性を有し、十分に適用できることが示唆された。

以上より、今後は、理論作製濃度を変えて同様に試料を作製し、これらのカドミウムおよび鉛の均質性および安定性の確認試験を行い、本試料を用いたパイロットスタディの実施を計画する。

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：

特定原材料として乳を添加した 2 種の試料を用いてパイロットスタディを行った。

標的となる特定原材料が不含であることを確認したとうもろこしペーストとベビーフードを基材とし、これらに乳タンパク質を添加して作製した試料を調査試料とした（試料 1：とうもろこしペースト、試料 2：ベビーフード）。

参加 24 機関は公定法に従い、こちらで指定した 2 種のキットを用いて試験を行った。回収したデータの統計解析はキットごとおよび試料ごとに行った。

その結果、MC で除外された機関は認められなかった。また、全 4 試験系中 $\bar{X}$ 管理図及び R 管理図で管理限界線を超えた機関はそれぞれ 1 機関認められた。 z -スコアの絶対値が 3 以上となった機関はのべ 2 機関であった。

R 管理図で外れ値を出した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。

zスコアで外れ値を出した機関はどちらも同じ機関であり、当該機関は残りの2種の試験系においてzスコアは範囲内であるものの片方は全体中最高値を、もう片方は最低値を示した。以上の結果から、当該機関は試験操作または使用機器に何らかの問題がある可能性が考えられた。

1.4 サルモネラ属菌検査用調査試料の開発：

サルモネラ属菌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。参加した50機関のうち、35機関が正しく判定した。14機関がNo.1を陰性と誤判定、1機関がNo.2を陰性と誤判定、1機関がNo.3を陽性と誤判定した。さらに3種とも陰性、3種とも陽性と判定した機関がそれぞれ1機関、3種とも誤判定した機関はなかった。本調査研究においてTSI培地でガス産生が認められないことを理由に陰性と判定した機関が一定数存在していた。これらの機関においては硫化水素非産生サルモネラ属菌を検出できないリスクを含んでいる可能性が示唆された。食品衛生上の硫化水素非産生サルモネラ属菌が原因となる事故割合は不明であるが、公定法の求める水準に対し、サルモネラ属菌検査に対する知見が不足している検査機関が想定より多いことが懸念される結果となった。

2 今井研究分担

サイクラミン酸試験法の新規誘導体化剤

を用いた分析法について、ビスケット試料を用い、試料採取量を従来の10gから5gに減らして検討した結果、抽出操作時の加熱中の攪拌が容易となり、ダマも生じなかったことから、固相ミニカラムの目詰まりは発生しなかった。

溶出液全量を誘導体化し、試験溶液の最終容量を5mLとする方法を検討した。昨年度の方法と比較して検体採取量を半分に抑えた一方で、誘導体化に使用するシクロヘキシルアミンの量を5倍に増加させ、さらに誘導体化後の液量を2倍に濃縮した。その結果、HPLCクロマトグラムにおけるピーク面積は昨年度と比べて約5倍に増加した。添加回収試験では、検討した何れの試料においても、ブランク試料にサイクラミン酸の定量を妨害するピークは認められなかった。真度は93.2～103.9%、併行精度は0.3～4.3%であり、目標値に適合していた。

動物用医薬品の一斉分析法について、147成分のSRM条件を設定した。分析カラムは、6種類のカラムを比較し、L-column ODS (2.1 x 100 mm、3 μm、(一財)化学物質評価研究機構製)が最も多くの成分においてMSの感度(S/N)とピーク形状が良好であったため採用した。移動相は、蒸留水、アセトニトリル及びギ酸のグラジエント溶出とした。測定対象成分は、S/N、ピーク形状及び検量線の相関係数が良好であった129成分とした。前処理法について、三層離抽出法を用いた方法について検討した。ギ酸を加えずに抽出したところ、酸性条件下で分解しやすいベンジルペニシリンやエリスロマイシン等の成分の抽出率は良好であったが、テトラサイクリン系等の成分の抽出率が目標値に適合しなかった。次いで1回目の抽出では

ギ酸を添加せず、2 回目の抽出でギ酸を添加したところ、ベンジルペニシリン等が抽出液中で分解した。そこで 1 回目の抽出液に pH 緩衝液として酢酸アンモニウム溶液を加えた後 2 回目の抽出液をあわせたところ、ベンジルペニシリン等は分解しなかったが、テトラサイクリン系の抽出率が目標値に適合しなかった。最終的に、3 回目の抽出操作を追加し、抽出液を合わせることにした。この抽出液を窒素気流下で濃縮した後、固相精製ミニカラムを用いて精製することとした。濃縮は、5 mL の抽出液を 2 mL まで実施することとした。固相精製に用いる固相ミニカラムは、4 種類から検討し、Oasis PRiME HLB (60mg/3 cc、Waters 製) が最も多くの成分で良好な回収率であったため採用した。

検討した試験法について鶏肉ペースト試料を用いて添加回収試験を実施した結果、測定対象成分 129 成分中 97 成分の真度及び併行精度が目標値に適合した。一方、酸性条件下で分解しやすい成分であるベンジルペニシリンの真度は約 50%と検討前に比べ大幅に改善されたが、引き続き改良が必要と考えられた。

3 新矢研究分担

使用した認証標準物質 (Bovine Liver、Pig Kidney、Bovine Muscle) のいずれにおいても、測定した元素濃度は認証値とほぼ一致し、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。ただし、Bovine Liver 中の K においては認証値が高く、Bovine Muscle 中の Cd においては認証値が低かったことから、検討した条件では妥当性を確認できなかった。外部精度管理において多

元素を設定する場合には、それぞれの濃度範囲に留意して、引き続き検討を行う必要がある。

一方、重金属類を調査した市販肉試料においては、海外で規制値が設定されている Pb、Cd、As が含まれていないか、As がわずかに含まれる程度であり、重金属類の精度管理におけるブランク試料として有効であることが示唆された。これら 3 元素の海外規制値レベルでの添加回収試験の結果は良好であり、本分析法による市販粉末肉の精度管理試料への適用可能性が確認された。

来年度は粉末肉を用いた外部精度管理試料の作製方法の検討やその品質評価を行い、パイロットスタディとしての室間共同試験に向けた検討を行う予定である。

4 鎗田研究分担

4.1 抽出方法の精確化の検討

検討した方法によって添加回収試験を行った。その結果、酸の添加による OA 群の分解は認められず、良好な回収率が得られた。実試料分析に必要な分析種の抽出力は、添加回収試験に必要な抽出力よりも高い。そのため、令和 4 年度に実施したホタテガイ中 OA 群の試験所間比較試験の調査試料も分析した。その結果、自然に毒化された DTX1 について、検討した酸添加/高温抽出法による結果が従来法よりも良好と考えられた。試験所間比較に試験において参照値を付与する際には、この方法を採用することが有効である。

4.2 抽出方法の簡易化の検討

はじめに、アセトニトリルを抽出溶媒とした場合でも OA 群が加水分解されるかを検証し、溶媒の種類に関わらず同等の分析

結果が得られることを確認した。

そこで、この方法による精製の程度を、マトリックス効果 (ME) を指標として評価した。なお、 ME 値は次式から求めた。

$$ME = \frac{\text{[試料溶液の OA 群の面積]}}{\text{[標準液の OA 群の面積]}}$$

検討した分析による ME 値は、一般的な許容範囲とされる 0.8~1.2 をわずかに超えた。そこで、3 種類の分散固相抽出による精製を検討したが、PSA を用いた場合には OA 群の回収率が低下し、ODS や HLB (相当品) を用いた場合はマトリックス効果の低減は認められなかった。一方で、検討した分析法による処理液をさらにアセトニトリルで希釈した場合に ME 値が 0.8~1.2 になることが確認されたため、処理液を希釈のみすることにした。以上より、本法は従来必要とされている固相抽出処理を要しない簡易な分析法であることが示された。

4.3 均質性評価試験

調査試料から無作為に選んだ 10 本について、各瓶内の 2 か所を採取して分析した。得られた分析結果を ISO Guide 35 に則り統計処理し、均質性に関する不確かさを評価した。その結果、瓶間均質性標準偏差 s_{bb} ($=$

$$\sqrt{\frac{MS_{\text{among}} - MS_{\text{within}}}{n}})$$
 と、測定の際につき

$$\text{由来する } u_{bb} (= \sqrt{\frac{MS_{\text{within}}}{n}} \sqrt{\frac{2}{v_{MS_{\text{within}}}}})$$
 は OA

について 0.26 % 及び 2.0 %、DTX1 について 5.6 % 及び 1.5 % であった (いずれも分析値の平均に対する相対値)。 s_{bb} と u_{bb} の大きい方を均質性に関する標準不確かさとした。

JIS Z 8405 では、外部精度管理に用いる調査試料の均質性に関して、試料間標準

偏差 (S_s) と技能評価のために標準偏差 (σ) が次式を満たすことを求めている。

$$S_s \leq 0.3 \sigma$$

今回均質性を評価した調査試料を用いた試験所間比較試験は 2025 年度に実施予定である。そのため調査試料の予備分析結果を Horwitz の修正式に代入することによって、試験所の結果のばらつきの予測値を求めた。結果として、調製した調査試料は、試験所間比較試験における試験所の結果のばらつきの予測値の 0.3 倍以下であることが示された。すなわち、本調査試料は試験所間比較試験での使用のために十分な均質性を有することが示された。

5 大竹研究分担

(1) 玄米中農薬の長期安定性評価

2022 年度及び 2023 年度に得られた結果と比較すると、ダイアジノンとクロルピリホスは濃度が減少傾向であり、フェントロチオンは今年度に特に濃度が減少したことがわかった。一方、マラチオンも濃度が減少しているようにも思える結果であったが、分析のバラツキの範囲内である可能性もあり、これまでの結果からは濃度減少しているかどうかを明確に判断できないと考えられる。以上から、もし技能試験後に玄米試料を精度管理用試料として使用する場合、例えば分析値の保証はせずに均質な精度管理試料として使用してもらう等であれば、使用可能であると考えられる。

(2) 試料調製の条件検討のための残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用ほうれんそう

試料（試料の調製条件は、噴霧温度：100℃、懸濁液濃度：20%、溶媒のアセトニトリル濃度：30 vol%）の4種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法によって分析した。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, フェントロチオン、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、51%から67%であった。昨年度も、スプレードライヤの条件検討を行ったが、回収率に多少の差は見られたものの、問題になるような低い回収率となる結果はなかった。そこで、試料のハンドリングや収量が良い条件を優先に選択するのが適切であると考え、パイロットスタディに用いる試料は、噴霧温度：100℃、懸濁液濃度：15%、溶媒のアセトニトリル濃度：30 vol%の条件で調製することとした。

(3)パイロットスタディに用いるほうれんそう試料の均質性評価

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から、均質性試験の不確かさは0.49%から1.38%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ほうれんそう試料中の農薬の安定性評価

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、試験期間中の安定性

に問題ないことが示された。

(5)パイロットスタディ用ほうれんそう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算出した。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) 残留農薬含有のほうれんそう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と、IDMSによって得られた参照値を比較すると、マラチオンを除きおおそ一致していた。マラチオンの分析値の差の原因は、マトリックス効果や校正用標準溶液の種類の違い等が考えられたが、詳細は今後の検討が必要である。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とにより、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Shibata T., Nakasaka T., Narushima J., Taguchi C., Sugino M., Yoshida S., Soga K., Kajiura M., Watanabe T. and Kondo K: Laboratory Performance Study of the Japanese Official Method to Detect Genetically Modified Papaya Line PRSV-YK., Food Hygiene and Safety Science, 65, 61-66 (2024).

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)

3) Otake T., Nakamura K., Hirabayashi N. and Watanabe T: A reliable quantification of organophosphorus pesticides in brown rice samples for proficiency testing use in Japanese official analytical method, QuEChERS, and modified QuEChERS combined with isotope dilution mass spectrometry, Journal of Pesticide Science, 49, 179-185 (2024)

2. 学会発表

1) 若栗忍、伊藤里恵、内田華那、細谷まい、岩崎雄介、穂山浩、渡辺卓穂: 市販品を含むアレルゲン(卵タンパク質)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120回学術講演会(愛知), 2024.

2) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康、平林尚之、渡辺卓穂: スプレードライヤを用いて調製した玄米試料中の有機りん系農薬を対象とした超臨界流体抽出の評価: 日本食品衛生学会第120回学術講演会(愛知), 2024.

3) 梶原三智香、中阪聡亮、堀田実和、高坂典子、渡辺卓穂: 硫化水素非産生株を用いたサルモネラ属菌検査の技能試験プログラム開発: 第120回日本食品衛生学会学術講演会(愛知)、2024

4) 茂呂寛紀、今井浩一、石井里枝、渡辺卓穂: 新規誘導体化剤を用いたサイクラミン酸分析法の検討: 第120回日本食品衛生学会学術講演会(愛知)、2024

5) 油谷藍子、村野晃一、村上太郎、新矢将尚: マイクロウェーブ分解-ICP-MS法による食品中元素分析法の妥当性評価, 日本食

品衛生学会第120回学術講演会(愛知), 2024.

6) 大竹貴光、中村圭介、平林尚之、渡辺卓穂: 技能試験の玄米試料に含まれる有機リン系農薬に対する信頼性が高い定量値の付与: 日本農薬学会第47回農薬残留分析、第41回農薬環境学会 共同研究会(徳島)、2024.

7) 柴田識人、田口千恵、曾我慶介、菅野陽平、細川葵、梶原三智香、渡辺卓穂、杉野御祐、成島純平、吉場聡子、安達玲子、近藤一成: 安全性未審査遺伝子組み換えパパイヤ検知法におけるDNAポリメラーゼとPCR機種との組み合わせの影響: 第61回全国衛生化学技術協議会年会(大阪)、2024.

8) 茂呂寛紀、今井浩一、石井里枝、高坂典子、渡辺卓穂: 食品添加物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(サイクラミン酸): 第61回全国衛生化学技術協議会年会(大阪)、2024.

9) 柳瀬望、小玉玲菜、栗本悠可、鎗田孝、下痢性貝毒分析における精確なLC-MS/MS測定のための移動相の検討, 日本分析化学会関東支部第18回茨城地区分析技術交流会(水戸), 2024.

10) 栗本悠、柳瀬望、中居杏瑞、鎗田孝、アセトニトリル抽出を用いた迅速な下痢性貝毒分析法の開発, 日本分析化学会関東支部第18回茨城地区分析技術交流会(水戸), 2024.

F. 知的所有権の取得状況

なし

令和6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)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	副所長
研究分担者	梶原 三智香	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長
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

前年度、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。検討の結果、10%懸濁液を用い30%アセトニトリル溶液を使用し、スプレードライヤの噴霧温度（入口温度）を100℃に設定した。今年度は課題5で使用するパイロットスタディ用試料作製を行った。まず昨年度設定した条件から、必要量を確保するために20%懸濁液を用いて検討した。その結果、懸濁液の粘性が高く処理量が少なくパイロットスタディに必要な量が確保できなかった。そこで、同様の条件で倍量の懸濁液を用い再度作製したが、用いたロットのハウレンソウパウダーの粘性が高く処理量をさらに少なく設定する必要がある、やはり必要量に達しなかった。つぎに、ハウレンソウパウダーの粘性を考慮し、15%懸濁液で作製を行ったところ処理量は2kg/h確保でき、パイロットスタディに必要な量の作製ができ、さらに平均粒子径も46 μ mと微細な粉体の作製ができ、課題5に供与することができた。

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製していた。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。現在食品衛生外部精度管理用調査試料として実運用している。昨年度、ハウレンソウパウダーを基材とした残留農薬検査用試料作製条件を検討し、ハウレンソウは玄米粉に比べ粘性が高いことから 10%懸濁液として検討した。そこで、今年度はパイロットスタディに供するため良好な回収ができる条件を検討し課題 5 に提供した。

B. 方法

1. 試料基材および試薬

試料基材として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、富士フイルム和光純薬）および精製水（日本薬局方、小堀製薬）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ハウレンソウパウダーを用い、10%懸濁溶液は、ハウレンソウパウダー 1 kg を 30%アセトニトリル溶液 4 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。また、20%懸濁溶液は、ハウレンソウパウダー 2 kg を 30%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。さらに、15%懸濁溶液はハウレンソウパウダー 1.5 kg をこれらの懸濁液に 30%アセトニトリル溶液 8.5 L に懸濁させ、ダイアジノン（ $0.40 \mu\text{g/g}$ ）、フェニトロチオン（ $0.20 \mu\text{g/g}$ ）、マラチオン（ $0.20 \mu\text{g/g}$ ）およびクロルピリホス（ $0.10 \mu\text{g/g}$ ）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ハウレンソウ試料作製

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、ハウレンソウパウダー懸濁液は事前にホモミキサーで攪拌し、均一な懸濁液とし、原液タンクに移し、攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに2 kg/hで送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクはMC-50型を使用した。回転数は20000 rpmに、入口温度は100℃に設定し、作製した。得られたハウレンソウパウダーは平均粒子径を測定し、顕微鏡下で粒子の観察を行った。得られたハウレンソウパウダーは課題5のパイロットスタディで使用した。

(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ハウレンソウ試料作製検討

これまで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てきた。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 μm の粒度分布で平均粒子径は26.76 μm であり、顕微鏡写真と粒度分布は図6と図8に示す。昨年度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。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。しかし、処理量が少ないことから、最終的に玄米粉と同様に20%懸濁液を用い検討した。昨年度、噴霧温度(入口温度)を100℃、懸濁液媒には30%アセトニトリル溶液を用い良好な結果が得られたことから表1の条件で検討を行った。すなわち、昨年度最適化した条件の20%懸濁液で再度作製した。

20%懸濁液は粘性が高くまた、粒子径の大きなハウレンソウパウダーは乾燥が不完全でありアトマイザから噴霧されると装置の壁に線状に付着した。得られたハウレンソウパウダーの顕微鏡写真と粒度分布を図1と2に示す。パウダーの平均粒子径は54 μm であり30 μm ~100 μm の微細な粉体が得られた。しかし、粉体の回収率は約60%であり、パイロットスタディを行う必要量には達しなかった。そこで、表2に示すように同一の条件で、再度2倍量の作製を行うこととした。パイロットスタディの必要量である1.2 kg以上作製を目標とした。20%懸濁液は粘性が高く前回は回収率が約60%であったが、今回はそれを下回る56%であり、得られた粉体は660gと低かった。この原因としては、前回のハウレンソウパウダーに比べ今回用いたパウダーは粘性がやや高く、処理量が前回の1.7kg/hに対して1.1kg/hと低かったためと考えられた。粒度分布と粒子の顕微鏡写真を図3と図4に示す。平均粒子径は50 μm であり、前回作製した時とほぼ同様の粒子径であった。

これまでの結果から、20%懸濁液では収量は期待できるが、粘性が高いことから処理量を低くする必要があり結局得られる粉体の回収が低く必要量に達しなかった。そこで、粘性を加味して15%懸濁液を用いることとし表3に測定条件を示す。基本的な条件はこれまでの条件と同一であるが、処理量は2kg/hが達成できた。それにより回収された粉体は1267gであり、回収率は90%と良好であり、必要量は確保できた。得られた粉体の平均粒子径は46 μ mとなり、20%懸濁液の場合と同様の粒子径が得られた(図5、図6)。得られたハウレンソウパウダーは、課題5に供与し、パイロットスタディのために、均質性、安定性試験に供した。

E. 結論

パイロットスタディを行うためにハウレンソウパウダーを基材とした残留農薬検査用試料を作製した。ハウレンソウパウダーは懸濁させた場合粘性が高いことから10%懸濁液で作製を試みたが、回収量が少ないことから20%懸濁液で再度作製した。しかしながら、粘性が高いことから処理量が少なく満足できる回収が得られなかった。そこで、懸濁液の粘性を考慮して15%懸濁液を用いることとした。その結果、パイロットスタディに必要な量は確保でき、平均粒子径46 μ mの微細な粉体が作製できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Otake, T., Nakamura, K., Hirabayashi, N., and Watanabe, T.: A reliable quantification of organophosphorus pesticides in brown rice samples for proficiency testing using Japanese official analytical method, QuEChERS, and modified QuEChERS combined with isotope dilution mass spectrometry. Journal of Pesticide Science, 49, 179-185 (2024)

2. 学会発表

1) 大竹貴光、中村圭介、平林尚之、渡辺卓穂：技能試験の玄米試料に含まれる有機りん系農薬に対する信頼性が高い定量値の付与、第47回農薬残留分析・第41回農薬環境科学合同研究会、徳島、2024
2) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康、平林尚之、渡辺卓穂：スプレードライヤを用いて調製した玄米試料中の有機りん系農薬を対象とした超臨界流体抽出法の評価、日本食品衛生学会第120回学術講演会、愛知、2024

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: 2024年7月2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 [%]	20.0				
	液比重	- 1.06				
	見掛粘度 [mPa・s]	1654				
	溶媒名	- アセトニトリル+H ₂ O				
	液色	- 濃緑				
	一次粒子径 [μm]	10~100				
	液温度 [°C]	常温				
使用液量 [kg]	4.16					
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]	1.7				
	入口温度 [°C]	100				
	出口温度 [°C]	64				
	サイクロン差圧 [kPa]	0.70				
	凝縮器出口温度 [°C]	19.9				
製品	平均粒子径 [μm]	54				
	粒子形状	- 不定				
	残留溶媒 [%]	5.5				
	嵩密度 [g/ml]	0.49				
	サイクロン回収量 [g]	532.4				
※ ←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: 63 / 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	・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1 スプレードライヤ試料作製条件 (20%懸濁液、30%アセトニトリル)

機種名: CL-8i

実施日: 2024年9月13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 [%]	20.2				
	液比重	- 1.05				
	見掛粘度 [mPa・s]	2,799				
	溶媒名	- アセトニトリル+H ₂ O				
	液色	- 濃緑				
	一次粒子径 [μ m]	10~100				
	液温度 [°C]	常温				
使用液量 [kg]	5.91					
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]	1.1				
	入口温度 [°C]	100				
	出口温度 [°C]	70				
	サイクロン差圧 [kPa]	0.70				
	凝縮器出口温度 [°C]	19.8				
製品	平均粒子径 [μ m]	50				
	粒子形状	- 球、不定				
	残留溶媒 [%]	5.3				
	嵩密度 [g/ml]	0.56				
	サイクロン回収量 [g]	665.5				
※ +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: 64 / 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	・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。					
	・原液処理量は1.1kg/hとなったが、一時的な測定値の最高は1.5kg/h程度であった。見掛粘度が高いため、送液が不安定であった。噴霧終了の1時間前にポンプの回転数を上げ、その後に回収した製品はLot2と表記した。					
	・試験終了後に、塔内の付着品の払落としを行い、623.7gを回収した。					

表2 スプレードライヤ試料作製条件 (20%懸濁液、30%アセトニトリル)

機種名: CL-8i

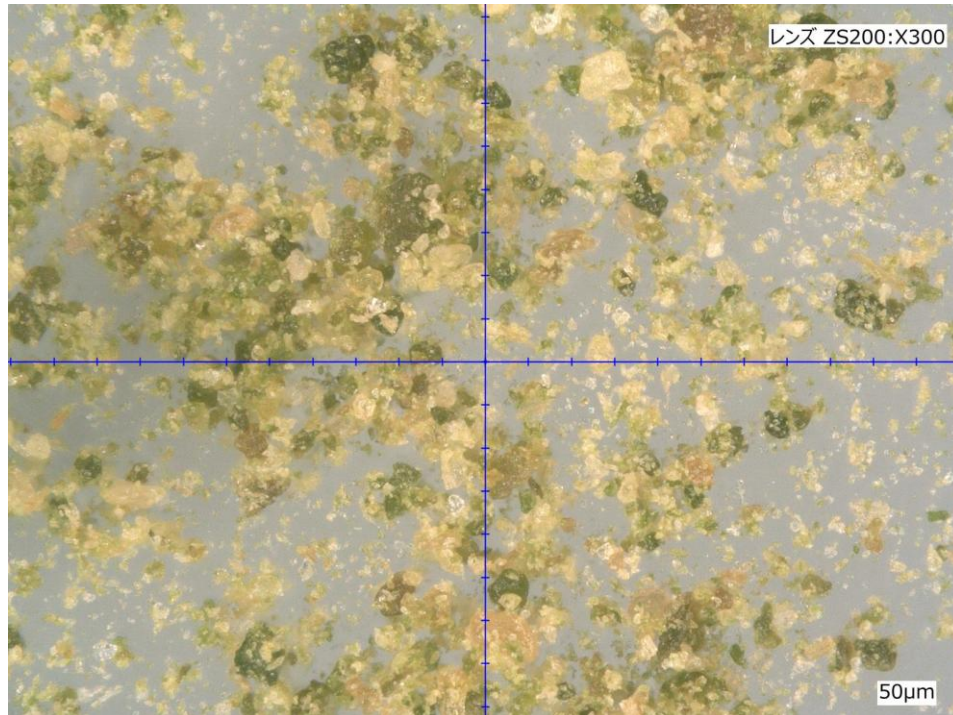
実施日: 2024年10月9日

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 [%]	15.2				
	液 比 重 -	1.03				
	見 掛 粘 度 [mPa・s]	304				
	溶 媒 名 -	H2O +7セニトリル				
	液 色 -	深緑				
	一 次 粒 子 径 [μ m]	10~50				
	液 温 度 [°C]	常温				
使 用 液 量 [kg]	9.2					
運転条件	デ イ ス ク 型 式 -	MC-50				
	回 転 数 [rpm]	20,000				
	原 液 処 理 量 [kg/h]	2.01				
	入 口 温 度 [°C]	100				
	出 口 温 度 [°C]	56→55				
	サ イ ク ロ ン 差 圧 [kPa]	0.60				
	凝 縮 器 出 口 温 度 [°C]	15				
製品	平 均 粒 子 径 [μ m]	46				
	粒 子 形 状 -	不定形				
	残 留 溶 媒 [%]	7.1				
	嵩 密 度 [g/ml]	0.45				
	サイクロン回収量 [g]	1267.33				
※ ←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)				
備考	・試験終了後に乾燥室内の払落し、後雑製品の回収を実施した。回収量は以下のとおりである。 乾燥室内払落し品:194.7g、後雑製品:16.26g					

表3 スプレードライヤ試料作製条件 (15%懸濁液、30%アセトニトリル)



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 ×300

最小目盛 50 μm

図2 ホウレンソウパウダーの顕微鏡写真

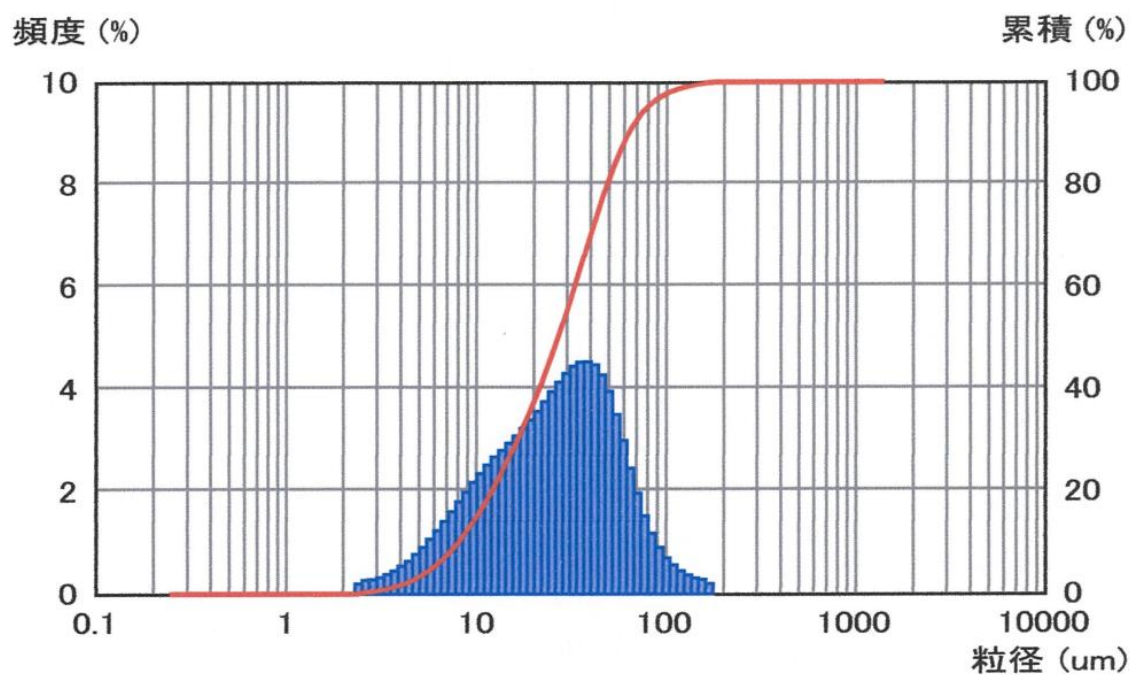
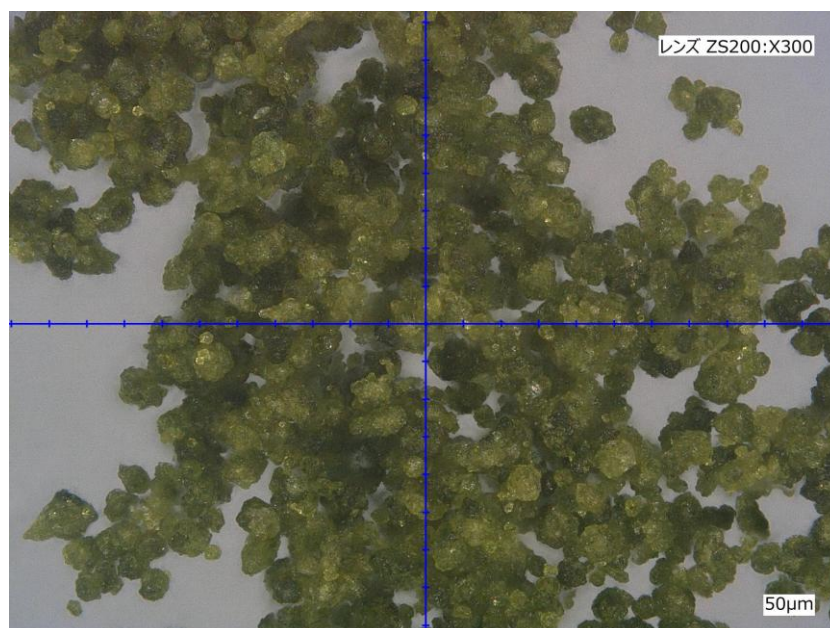


図3 ホウレンソウパウダーの粒度分布



測定倍率 ×300

最小目盛 50 μ m

図4 スプレードライヤで作製したホウレンソウパウダーの顕微鏡写真（1回目）

（20%懸濁液、30%アセトニトリル）

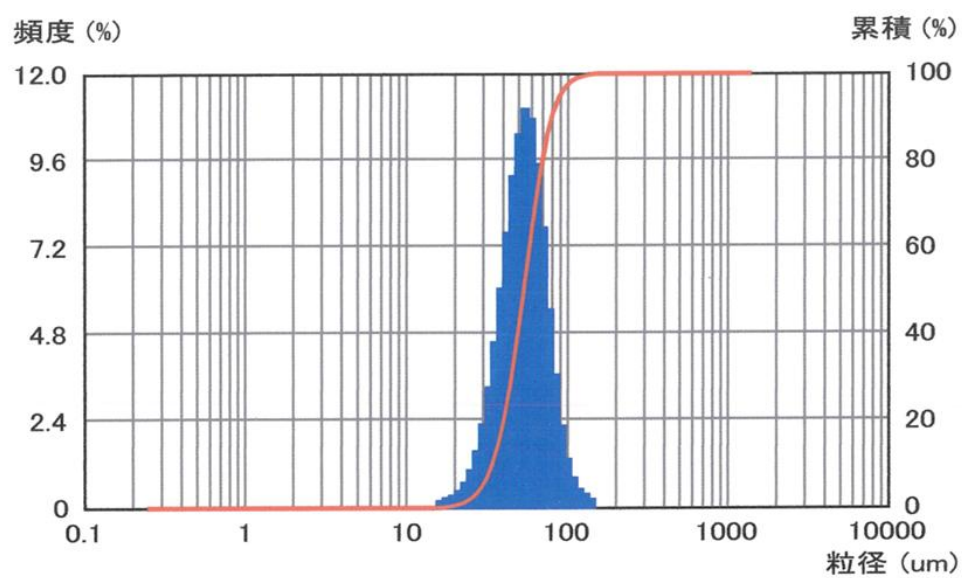
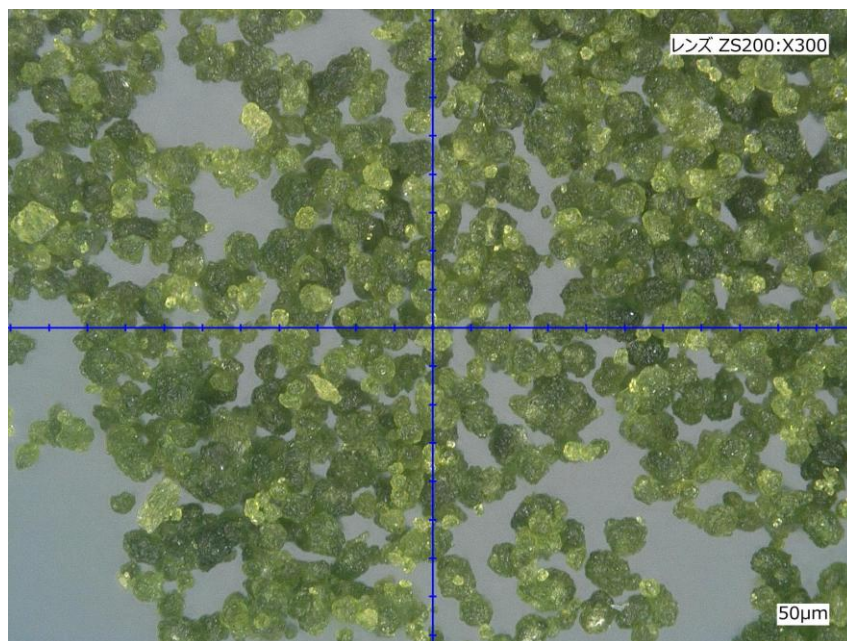


図5 スプレードライヤで作製したホウレンソウパウダーの粒度分布（1回目）

（20%懸濁液、30%アセトニトリル）



測定倍率 ×300

最小目盛 50 μm

図6 スプレードライヤで作製したハウレンソウパウダーの顕微鏡写真（2回目）
（20%懸濁液、30%アセトニトリル）

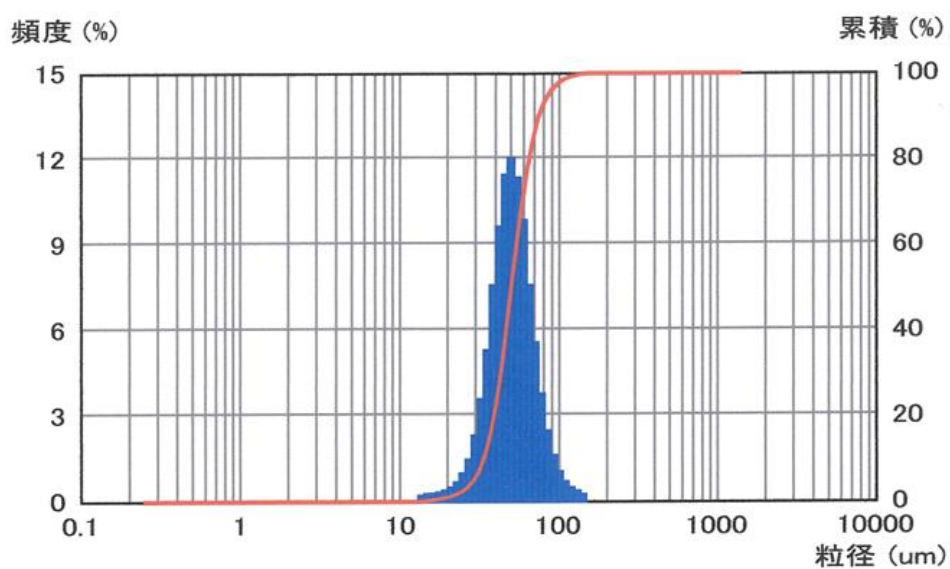


図7 スプレードライヤで作製したハウレンソウパウダーの粒度分布（2回目）
（20%懸濁液、30%アセトニトリル）

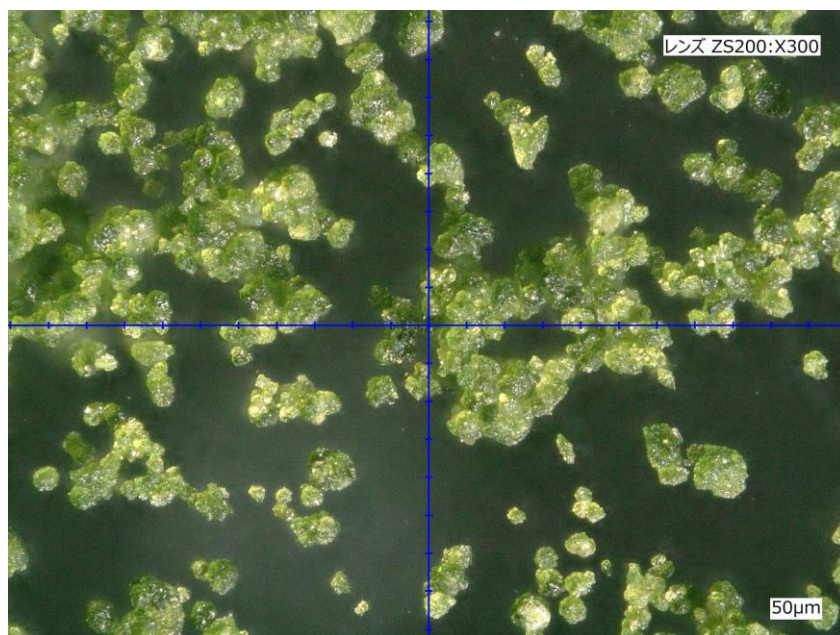


図8 スプレードライヤで作製したハウレンソウパウダーの顕微鏡写真
(15%懸濁液、30%アセトニトリル)

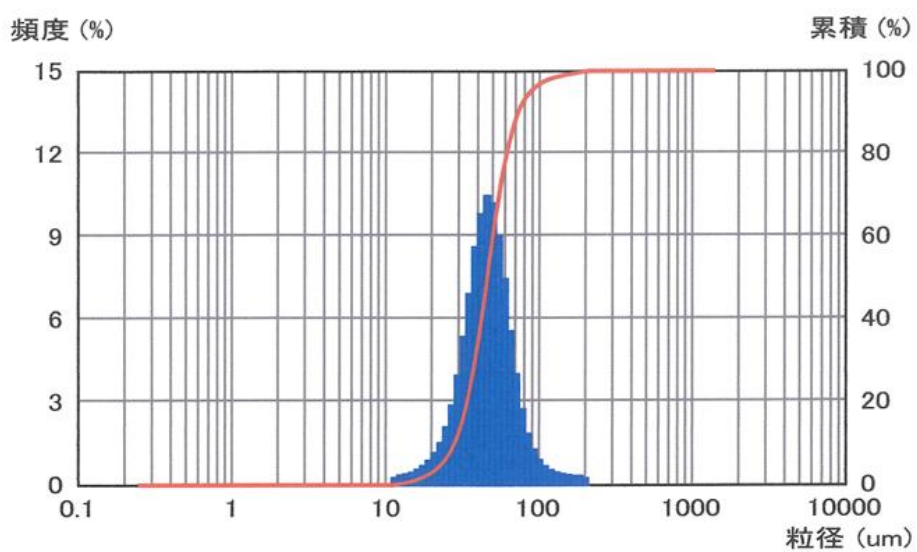


図9 スプレードライヤで作製したハウレンソウパウダーの粒度分布
(15%懸濁液、30%アセトニトリル)

令和 6 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)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	副所長
研究分担者	梶原 三智香	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長
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、カドミウムおよび鉛の調査試料を作製し、作製容器内（1 シート）内の均質性確認試験および作製容器間（10 シート間）の均質性および安定性確認試験を実施した。また、作製容器間の試験に用いた試料については溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存率についても確認した。さらに今年度はそれらを用い、公的検査機関等（自治体および登録検査機関）25 機関を対象に当該試料の技能試験用試料としての妥当性を確認するため、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カドミウムおよび鉛の定量検査として室間共同試験（パイロットスタディ）を実施した。その結果、1 シート内の均質性確認試験におけるカドミウムおよび鉛は $42.8 \mu\text{g/g} \pm 1.18 \mu\text{g/g}$ ($n=10$) および $43.4 \mu\text{g/g} \pm 0.72 \mu\text{g/g}$ ($n=10$)、10 シート間の均質性確認試験では $43.0 \mu\text{g/g} \pm 1.45 \mu\text{g/g}$ ($n=10$) および $43.2 \mu\text{g/g} \pm 1.08 \mu\text{g/g}$ ($n=10$)、安定性確認試験では $42.1 \mu\text{g/g} \pm 1.65 \mu\text{g/g}$ ($n=10$) および $42.1 \mu\text{g/g} \pm 1.30 \mu\text{g/g}$ ($n=10$) であり、いずれもカドミウムおよび鉛で良好な均質性および安定性が得られ、理論作製濃度（カドミウムおよび鉛各 $50 \mu\text{g/g}$ ）に対していずれの重金属も 80%以上の回収が得られた。また溶解溶媒の残存率は、均質性確認試験では 2.17～3.13%、安定性確認試験では 1.65～1.99%といずれも低い残存性が示された。パイロットスタディで 25 機関から回収したデータの統計解析および評価法は、当財団が実施している食

品衛生外部精度管理調査で採用している手法を用いた。すなわち、各検査機関の報告値の機関別平均値の平均値を付与値として、得られた標準偏差を用いて算出する z -スコアおよび $\bar{X}-R$ 管理図を代用する方法により評価した。 z -スコアについては参考として、ロバスト方式による解析も行った。解析の結果、機関間で前処理方法や測定機器等の採用手法の相違があるものの、ヒストグラムにおいては概ね正規分布を示し、正規確率プロット中のデータ分布においてもいずれの測定対象物質でも概ね直線状に分布しており、妥当な結果が得られたと考えられた。以上より、本作製による調査試料は外部精度管理用調査試料として、各機関が一般的に用いる各種試験法に対応可能な堅牢性を有し、十分に適用できることが示唆された。今後は、理論作製濃度を変えたパイロットスタディを検討する。

A. 研究目的

厚生省告示第370号で規定される器具及び容器包装に関する規格基準には、「A 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料一般の規格」、「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」、「E 器具又は容器包装の用途別規格」及び「F 器具及び容器包装の製造基準」があり、この中でも「D 器具若しくは容器包装又はこれらの原材料の材質別規格」の合成樹脂製器具・容器包装の全合成樹脂に共通して規定される材質試験としてのカドミウムおよび鉛の規格に着目した。昨年度の検討では、ABSペレットおよびASペレットを用いて作製したシート状試料のカドミウムおよび鉛の濃度確認および残留溶媒測定を行った。検討結果から、試料基材にABSペレット、作製容器にステンレス製バットを用いることで濃度確認では1シート内の部位による濃度差が小さく良好な結果が得られ、残留溶媒測定では、ポリマーの溶解に用いる有機溶媒（以下、溶解溶媒）残存率を室温下で減圧乾燥することにより低減化が可能であることが示唆された。今年度はこれらの結果から

ABSペレットのシート状試料を作製し、パイロットスタディとして室間共同試験を行った。なお、調査試料の品質評価として1個の作製容器内（1シート）のカドミウムおよび鉛の均質性の確認試験、また、10個の作製容器間（10シート）のカドミウムおよび鉛の均質性および安定性の確認試験を行うと同時にジクロロメタンの残留溶媒測定を実施した。

B. 方法

1. 試料基材、器材、試薬および標準品

試料基材に、ABS ペレットとしてデンカABS（電気化学工業）を用いた。

器材として作製容器に、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）および垂平器を用いた。

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) およびタニタ製デジタルクッキングスケール (KD-321) を、減圧乾燥には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、これにカドミウムおよ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。ポリマー溶液をステンレスバットの作製容器に一定量を分注した後、ろ紙 (1枚) およ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た。その後、作製容器から取り出し、減圧乾燥し、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および鉛各 50 µg/g)。

作製用容器への分注量は、乾燥後、ポリマー相当量として 25 g となるように分注し、分注した作製容器は垂平に静置できるように予め確認・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) およ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。

4. 調査試料の品質評価

1) 1シート内の均質性確認試験

調査試料について1容器 (1シート) 内の均質性について確認した。分析試料は1容器 (1シート) を10分画 (図2) し、外部委託先に送付した (測定は1分画につき、 $n=2$)。送付の際は、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。均質性の確認は、Journal of AOAC International, Vol. 76, No. 4, 926-940 (1993) の方法に従い、一元配置分散分析 (F検定) により評価した (Microsoft Excel)。

2) 10シート間の均質性確認試験および安定性確認試験

調査試料について、均質性 (作製直後) および安定性確認試験 (検査機関からのデータ回収後) を実施した。分析試料は1容器 (1シート) を10分画し、各シートにつき1分画を外部委託先に送付した (測定は1分画につき、 $n=2$)。送付は、4.1) と同様とした (常温便)。測定および均質性の確認は 4.1) と同様とし、安定性の確認は、JIS Z 8405:2021 (ISO 13528:2015) 試験所間比較による技能試験のための統計的方法、附属書B (規定) 試料の均質性試験および安定性確認試験、B.5 安定性確認の評価基準により評価した。

3) 調査試料の残留溶媒測定

分析試料は4.2) で用いた試料と同一とし、均質性確認試験時は1分画につき、 $n=1$ で測定することとし、安定性確認試験時はランダムに選択した3分画とした。送付は、4.1) と同様とし（常温便）、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。

5. パイロットスタディ（室間共同試験）

器具・容器包装検査のパイロットスタディとして公的機関等25機関を対象に室間共同試験を実施した。検査機関には調査試料を1セット（約2 g/シート、3シート）ずつ配付〔2024年10月29日発送、ヤマト運輸宅急便コンパクト〕した。測定対象物質はカドミウムおよび鉛とし、いずれか一方での参加も可能とした。試料処理および測定操作は各機関の方法で実施することとし、併行分析数を5とした。検査結果報告、経過記録およびアンケートは専用フォームでの電子回収とし、測定結果の生データは専用の返信用封筒で回収した。なお、検査結果等の提出期限は2024年12月13日とした。

6. データの解析

解析は当財団が実施している食品衛生外部精度管理調査で採用している以下①に述べる従来方式による手法を主に、参考として、②ロバスト方式による解析を行った。また、経過記録およびアンケートについてもとりまとめ、解析を行った。

①従来方式（算術平均値および標準偏差を用いた評価方法）

各検査機関よりデータを回収後、データ・クリーニング（添加量の1/10以下および10倍以上の報告値を除外）を行い、この範囲外となる報告値および欠測値のある報告値（5個未満）については、以後の解析対象から除外した。次いで各検査機関間および検査機関内の変動について $\bar{X}-R$ 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について、基本統計量、順序統計量、ヒストグラムおよび正規確率プロットを作成することによりデータ全体の様相を把握した。分布に極端な歪みや尖りが観察された場合には2シグマ（総平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差）以上の値を報告した検査機関を除外した後、同様の処理を行った。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。

②ロバスト方式（Huber's H15のロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いた評価方法）

①で得られた解析対象データについて、IUPAC、AOAC、ISO等により提唱されているロバスト統計量のうち、Huber's Proposal 2を用いたロバスト方式により、メジアン $\pm$ メジアン $\times 50\%$ の範囲を超える報告値を除外した後、ロバスト統計量に基づく z -スコアを算出し、各検査機関の評価（参考値）を行った。

（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、環境への発散およ

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. 研究結果および考察

1. 調査試料の作製

シート状試料を10容器分（10シート）作製し、1容器（1シート）につき10分画とした。調査試料1個当たり約6 gとなるようにシート状試料を切り出し薬包紙で包み、チャック付ビニール袋に入れて包装した。

2. 調査試料の品質評価

1 シート内の均質性確認試験の結果を表1に、10シート間の均質性確認試験の結果を表2に、また10シート間の安定性確認試験の結果を表3に示す。

1) 1シート内の均質性確認試験

一元配置分散分析による1シート内の均質性の判定は、評価基準であるF値<F境界値（3.020）、かつP-値>0.05を満たし、均質であると判断した。

2) 10シート間の均質性確認試験および安定性確認試験

一元配置分散分析による調査試料の均質性の判定は、評価基準であるF値<F境界値（3.020）、かつP-値>0.05を満たし、10個の異なる容器で作製したシートは同等であり本作製で均質であると判断した。また、検査機関からの結果回収後に実施した安定性確認試験では、JIS Z 8405:2021（ISO 13528:2015）附属書B.5 安定性確認の評価基準の評価式が成立したため調査期間中の安定性にも問

題はなかったと判断した。

3) 調査試料の残留溶媒測定

結果を表4～5に示す。

測定結果より、均質性確認試験時の10試料は2.17～3.13%とばらつきは小さく、いずれのシートも95%以上の溶媒は揮散したと考えられた。安定性確認試験時の3試料も1.65～1.99%であり、均質性確認試験時の結果と同様の傾向が見られた。経時変化によって安定性確認試験時の測定結果でより低い残存率となった。

3. 室間共同試験

対象とした全25機関から結果を回収した。測定対象物質はカドミウムおよび鉛のうち、いずれか一方での参加も可能としたが、すべての機関において両測定対象物質の結果が報告された。解析の結果および評価一覧を図3～10および表6～7に、報告値の相関性を図11に示す。

4. データの解析

25機関から回収した結果より解析を行った。カドミウムの結果を表6に、鉛の結果を表7に示す。いずれにおいても、データ・クリーニングおよび欠測値により除外される機関はなかった。

① 従来方式

2シグマ処理により両測定対象物質において同一の1機関が低値側で除外された。

他の24機関について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（図5、8）。

カドミウムについて、 $\bar{X}$ 管理図において低値側で管理限界外となった2機関の機関別平均値は理論作製濃度の50 $\mu\text{g/g}$ に対し

て32.16 µg/g、33.86 µg/gといずれも70%未満であった。この機関はR管理図でも同様に管理限界外であり、各検査機関 ($n=5$) 内の最大値と最小値の差は管理限界線4.5 µg/gに対して22.6 µg/gおよび18.4 µg/gと約4~5倍の値が報告された。一方、鉛についても、 $\bar{X}$ 管理図、R管理図ともにカドミウムと同一の2機関が低値側で管理限界外となった。この2機関の機関別平均値は理論作製濃度の50 µg/gに対して31.74 µg/gおよび32.52 µg/g、各検査機関 ($n=5$) 内の最大値と最小値の差は16.3 µg/gおよび16.7 µg/gであり、2機関ともに $n=5$ の各測定値において、カドミウムと同様の濃度の傾向が見られた。 $\bar{X}$ -R管理図において2機関が $\bar{X}$ 管理図およびR管理図のいずれも管理限界外となった。両機関の共通点としてカドミウムおよび鉛で共通の前処理をしており、試料1 g以上を採取し、乾式灰化法において、450°Cで約20時間の灰化を行っていた。均質性確認試験において機関に配付した試料全体の代表となるよう抽出した試料において、良好な均質性が確認されていることから、これらは前処理を含む定量のプロセスに問題があった可能性が考えられた。

機関別平均値について、ヒストグラムおよび正規確率プロットを作成した (図3~4)。図中のデータ分布を観察したところ、いずれの測定対象物質においても概ね直線状に分布しており、おおよそ正規分布であると考えられた。

z -スコアは、機関別平均値の平均値を付与値としてみなし、この平均値と従来方式における参加機関の標準偏差を用

いて算出した。その結果、管理限界外機関数は、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$ に該当する機関がカドミウムで3機関、鉛で2機関であった。これら該当機関のうち2機関はカドミウムおよび鉛いずれも管理限界外であった。カドミウムにおいて1機関が高値側で z -スコアが管理限界外となったが、カドミウムに対応する鉛の報告値には相関が見られず、カドミウムにおいて、 $n=5$ の報告値とも理論作製濃度を上回った原因は明らかにならなかった。なお、いずれにおいても $|z\text{-スコア}| \geq 3$ に該当する機関はなかった。

報告値の相関性について、カドミウムと鉛の両方で正の相関が認められ、類似した傾向の測定値 (すなわちカドミウムにおいて平均値よりも高い値を報告した検査機関では、鉛においても高い値を報告した、あるいは両方で低めの値を報告した) となる検査機関が多かった。なお、カドミウムと鉛ともに管理限界外となった検査機関は、 z -スコア、 $\bar{X}$ 管理図ともに2機関認められた。

② ロバスト方式

ロバスト方式についても①と同様にヒストグラムおよび正規確率プロットを作成した (図3~4)。なお、ロバスト方式の図中の青線は、解析手順に従い一定範囲を超えたデータを置換した後の最小値および最大値を示す。ロバスト方式により解析した結果、いずれもメジアン・クリーニングで1機関が除外され、当該機関は①従来方式で2シグマ処理により除外された機関と同一であった。得られたロバスト平均値を付与値としてみなし、この平均値とロバスト標準偏差を用いて z -ス

コアを算出したところ、管理限界外機関数は、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$ に該当する機関がカドミウム、鉛ともに2機関、 $|z\text{-スコア}| \geq 3$ に該当する機関がカドミウムで2機関であり、鉛では該当する機関はなかった。

なお参考として、表8～10に本調査研究における採用手法の質問内容一覧および表11～13に採用手法の度数表を示す。

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、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、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室間共同試験（パイロットスタディ）を実施し以下の結論を得た。

作製した試料は、1個の作製容器内および10個の作製容器間のいずれでもカドミウムおよび鉛で良好な均質性および安定性が得られた。作製直後に行った均質性確認試験で得られた各濃度（平均値）は理論作製濃度に対し、いずれも回収率80%以上であり、作製濃度のコントロールも可能であると考えられた。この方法で作製した調査試料を用いて室間共同試験を実施した結果、正規確率プロット中のデータ分布においてもいずれの測定対象物質でも概ね直線状に分布しており、妥当な結果が得られたと考えられた。また、試料採取量が0.1 g以上0.3 g未満で3機関、0.5 g以上0.7 g未満で3機関あり、公定法

の1 gより少量であったが、いずれの機関でもカドミウムおよび鉛ともに $n=5$ のばらつきに問題なく、 $n=5$ の平均値も妥当な結果であった。今回の25機関中、1機関がエネルギー分散型蛍光X線装置による定量値を報告していたが、特に鉛において理論作製濃度とよく一致していた。カドミウムにおいても全体で見ると高濃度側の測定値を報告しており、理論作製濃度に近似する傾向があった。この傾向は1機関のみのデータであり、今後も蛍光X線装置によるデータの蓄積は必要である。全体25機関で使用された測定装置は原子吸光分光光度計（フレイム方式）が12機関で最も多く、次いで、ICP-OESが9機関、ICP-MSが3機関、蛍光X線装置が1機関であった。データ数は異なるが本調査研究結果では、原子吸光分光光度計、ICP-OESおよびICP-MSの装置において、報告値に明らかな差は認められなかった。これらの結果より、本作製による調査試料は外部精度管理用調査試料として各機関が一般的に用いる各種試験法に対応可能な堅牢性を有し、十分に適用できることが示唆された。

以上より、今後は、理論作製濃度を変えて同様に試料を作製し、これらのカドミウムおよび鉛の均質性および安定性の確認試験を行い、本試料を用いた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

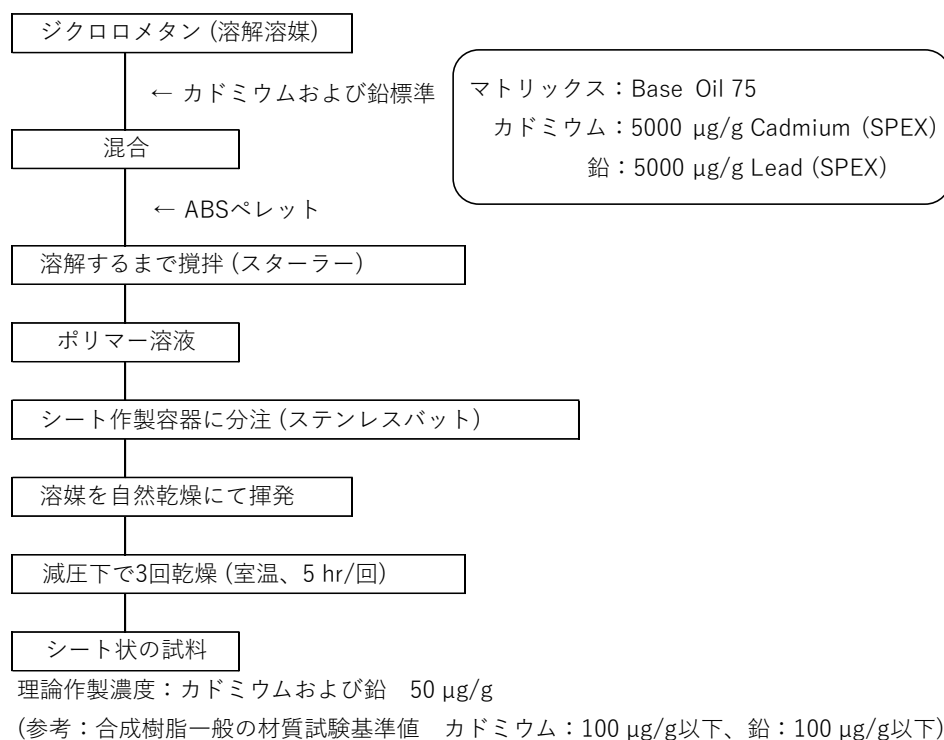


図1 シート状試料の作製法概要

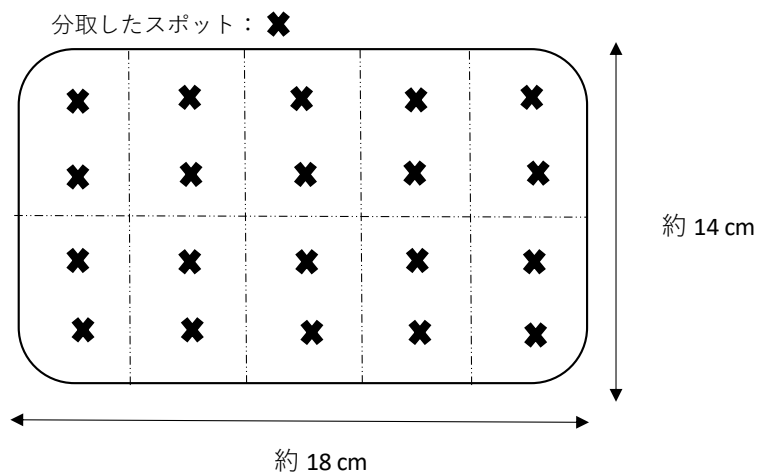
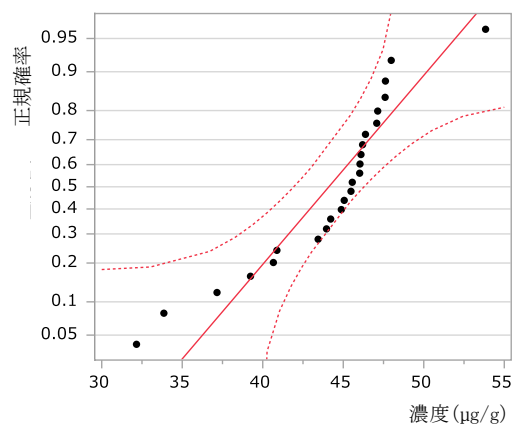
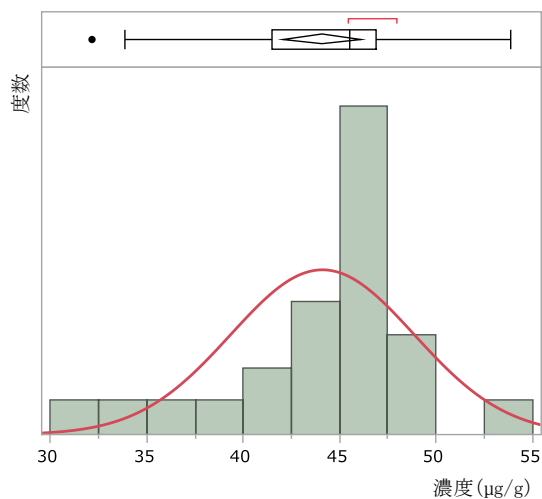
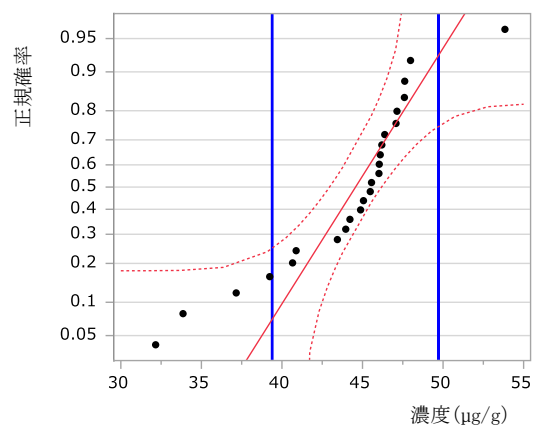
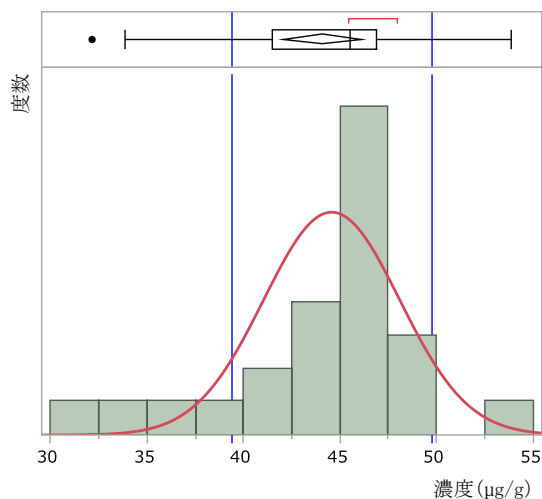


図2 1個の作製容器内 (1シート) の均質性確認試験用の分画
および採取したスポット



(有効機関数:24機関)
(2シグマ処理除外機関数:1機関)

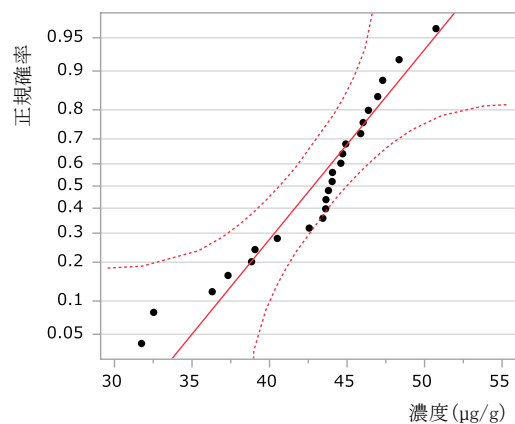
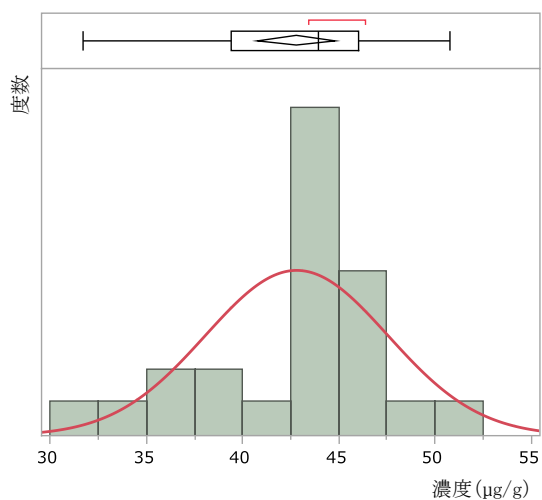
従来方式



(有効機関数:24機関)
(メジアン・クリーニング除外機関数:1機関)

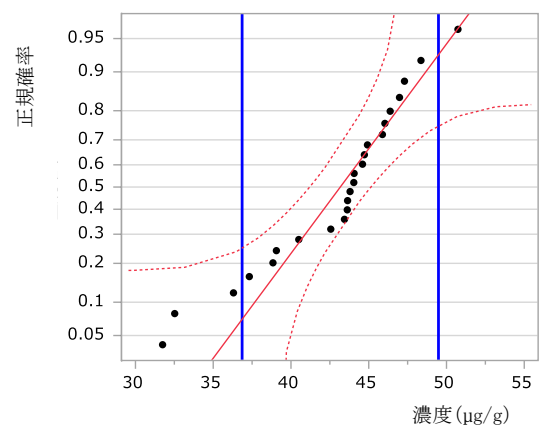
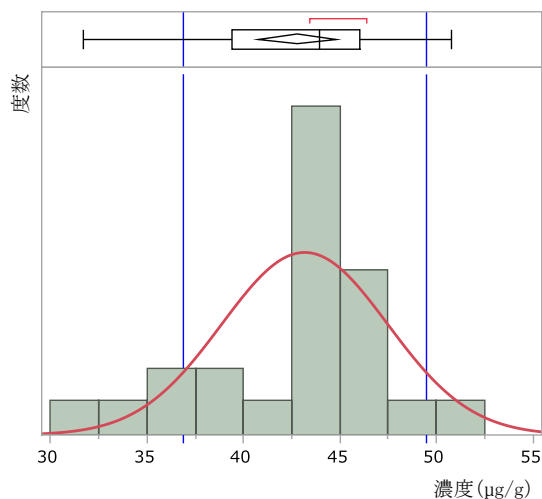
ロバスト方式

図3 カドミウムの定量におけるヒストグラムおよび正規確率プロット



(有効機関数:24機関)
(2シグマ処理除外機関数:1機関)

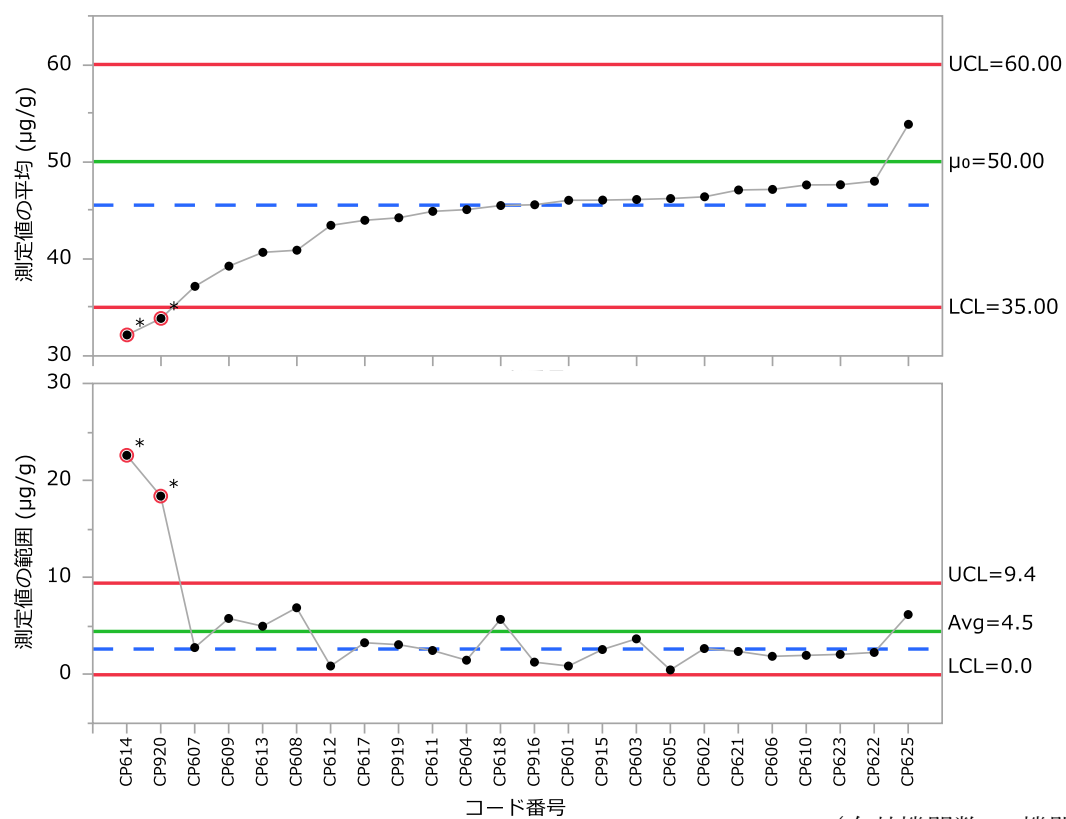
従来方式



(有効機関数:24機関)
(メジアン・クリーニング除外機関数:1機関)

ロバスト方式

図4 鉛の定量におけるヒストグラムおよび正規確率プロット



(有効機関数:24機関)

(2シグマ処理除外機関数:1機関)

$\bar{X}$ 管理図における μ_0 は添加濃度 (50.0 $\mu\text{g/g}$)、UCL は上部管理限界線 (添加濃度の 120 % : 60.00 $\mu\text{g/g}$)、LCL は下部管理限界線 (添加濃度の 70 % : 35.00 $\mu\text{g/g}$)、 R 管理図における UCL は管理限界線を示す。

図 5 カドミウムの定量における $\bar{X}-R$ 管理図

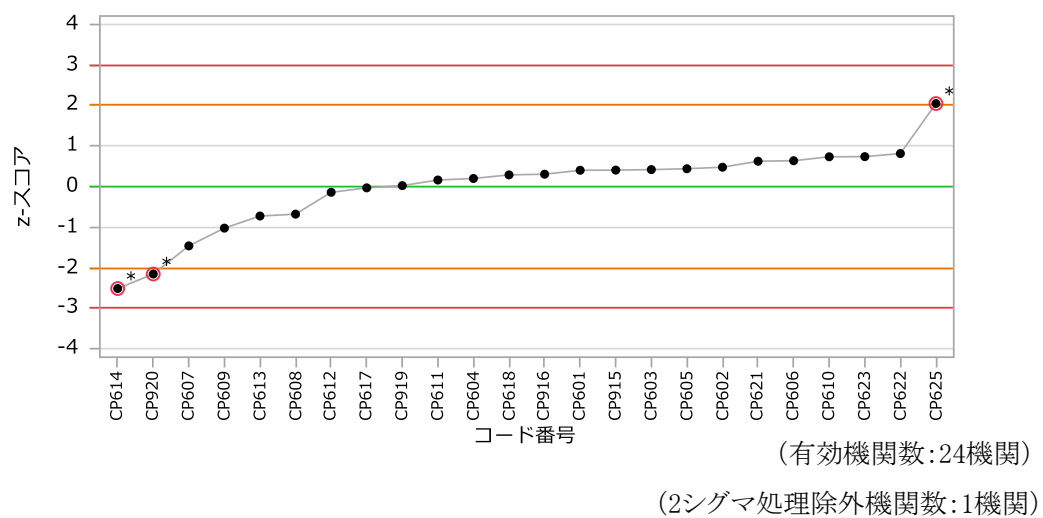


図6 カドミウムの定量における従来方式での z スコアの順位

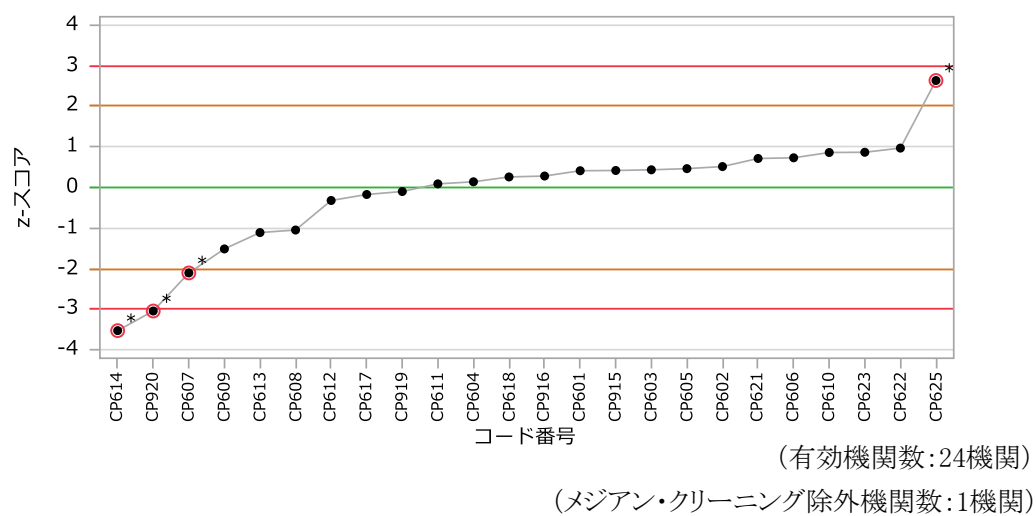
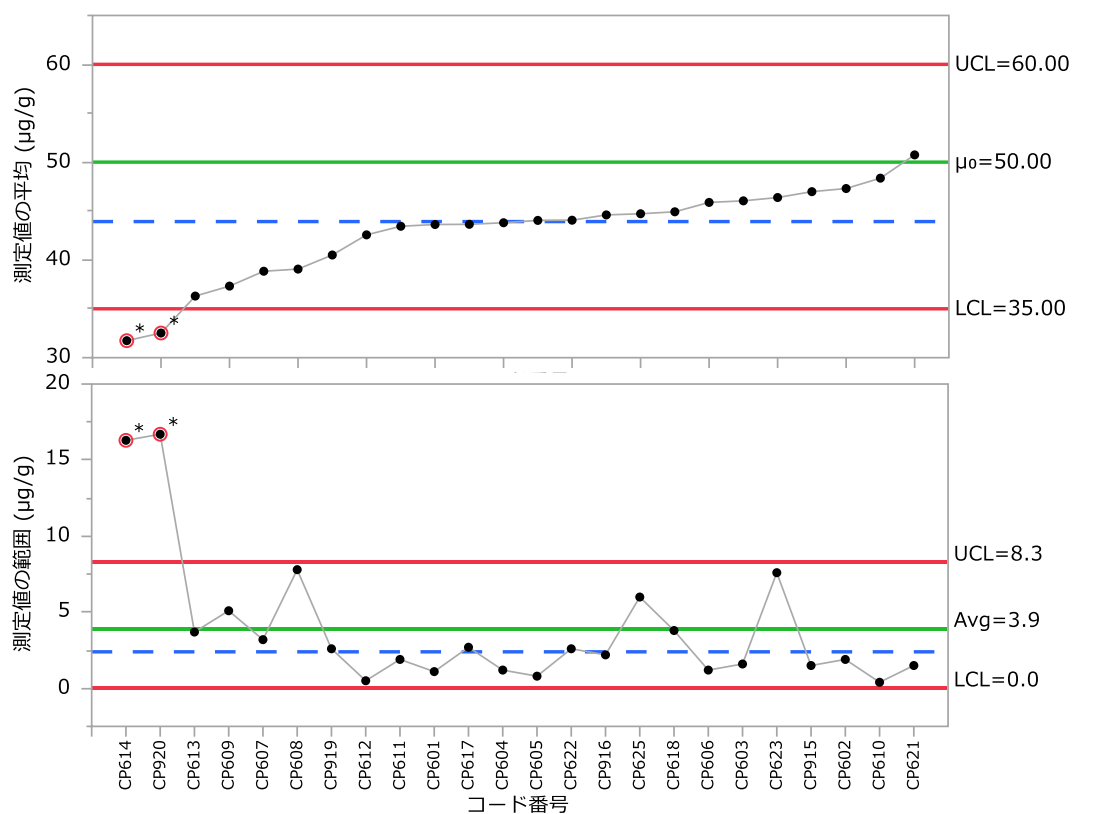


図7 カドミウムの定量におけるロバスト方式での z スコアの順位



(有効機関数:24機関)

(2シグマ処理除外機関数:1機関)

$\bar{X}$ 管理図における μ_0 は添加濃度 (50.0 $\mu\text{g/g}$)、UCL は上部管理限界線 (添加濃度の 120 % : 60.00 $\mu\text{g/g}$)、LCL は下部管理限界線 (添加濃度の 70 % : 35.00 $\mu\text{g/g}$)、 R 管理図における UCL は管理限界線を示す。

図 8 鉛の定量における $\bar{X}-R$ 管理図

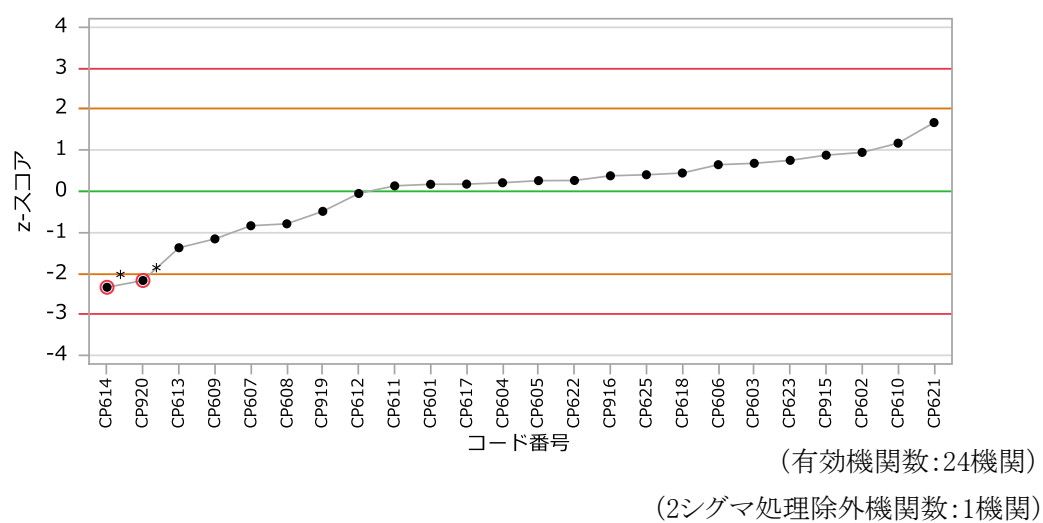


図 9 鉛の定量における従来方式での z スコアの順位

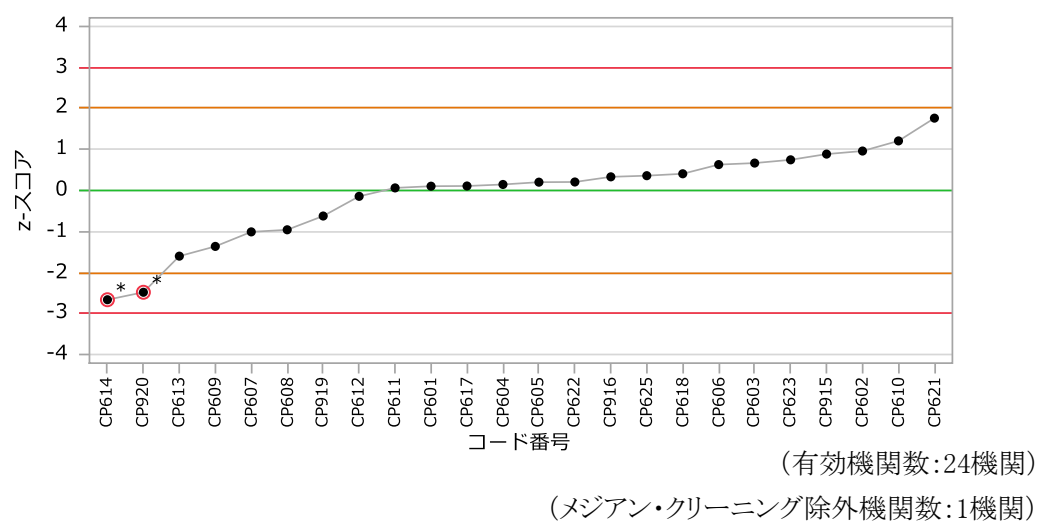


図 10 鉛の定量におけるロバスト方式での z スコアの順位

表1 1シート内の均質性確認試験結果

	カドミウム	鉛
理論作製濃度 (μg/g)	50	50
平均濃度 (μg/g)	42.8	43.4
標準偏差 (μg/g)	1.2	0.7
相対標準偏差 (%)	2.8	1.7
回収率 ^{*1} (%)	86	87
F値	2.463	0.392
P-値	0.088	0.913
F境界線	3.020	3.020

1シートを10分画し、各 $n=2$ で測定

*1：平均濃度を理論作製濃度で除した百分率、%

表2 作製容器間の均質性確認試験結果

	カドミウム	鉛
理論作製濃度 (μg/g)	50	50
平均濃度 (μg/g)	43.0	43.2
標準偏差 (μg/g)	1.5	1.1
相対標準偏差 (%)	3.4	2.5
回収率 ^{*1} (%)	86	86
F値	0.706	1.093
P-値	0.694	0.442
F境界線	3.020	3.020

1シートを10分画し、各シート1分画について各 $n=2$ で測定

*1：平均濃度を理論作製濃度で除した百分率、%

表3 作製容器間の安定性確認試験結果

	カドミウム	鉛
理論作製濃度 (μg/g)	50	50
平均濃度 (μg/g)	42.1	42.1
標準偏差 (μg/g)	1.7	1.3
相対標準偏差 (%)	3.9	3.1
F値	2.503	2.712
P-値	0.085	0.068
F境界線	3.020	3.020
均質性と安定性の 平均濃度差 ^{*2}	0.9	1.1
$0.3\sigma_{pt}$ ^{*2}	1.44	1.41
評価式の成立/不成立 ^{*2}	成立	成立

データ回収後に10試料につき、各 $n=2$ で測定

*2：JIS Z 8405:2021 (ISO 13528:2015) 附属書B B.5 安定性確認の評価基準 の評価式による
 $| \text{均質性と安定性の平均濃度差} | \leq 0.3\sigma_{pt}$ の評価式が成立する場合、安定性があると評価した
 σ_{pt} には検査機関の標準偏差（従来方式）を用いた

表4 均質性確認試験時の残留溶媒測定結果

シート No.	残存率 (%)
1	2.93
2	2.17
3	3.13
4	2.73
5	2.62
6	2.91
7	3.05
8	3.00
9	2.97
10	2.84
平均値 (%)	2.84

10シートにつき、各n=1で測定

表5 安定性確認試験時の残留溶媒測定結果

シート No.	残存率 (%)
1	1.78
2	1.99
3	1.65
平均値 (%)	1.81

均質性確認試験時の試料をランダムに3シート選択し、各n=1で測定

表6 カドミウムの定量における各検査機関の報告値および評価

	コード番号	報告値1 (μg/g)	報告値2 (μg/g)	報告値3 (μg/g)	報告値4 (μg/g)	報告値5 (μg/g)	$\bar{x}$ (μg/g)	$\bar{x}$ 評価	R (μg/g)	R 評価	Z-スコア (従来法)	Z-スコア評価 (従来法)	Z-スコア (ロバスト法)	Z-スコア評価 (ロバスト法)
1	CF624†	10.9	11.3	11.9	11.8	10.5	11.28	不満足	1.4	満足	(-6.9)	不満足	(-9.4)	不満足
2	CF614	21.7	41.4	21.6	31.9	44.2	32.16	不満足	22.6	不満足	-2.5	疑わしい	-3.5	不満足
3	CF920	29.1	40.0	23.6	34.6	42.0	33.86	不満足	18.4	不満足	-2.2	疑わしい	-3.0	不満足
4	CF607	36.0	36.4	38.8	36.8	37.8	37.16	満足	2.8	満足	-1.5	満足	-2.1	疑わしい
5	CF609	38.8	37.2	37.0	42.8	40.4	39.24	満足	5.8	満足	-1.0	満足	-1.5	満足
6	CF613	39.7	40.7	40.5	43.7	38.7	40.66	満足	5.0	満足	-0.7	満足	-1.1	満足
7	CF608	39.1	39.0	40.6	39.8	45.9	40.88	満足	6.9	満足	-0.7	満足	-1.0	満足
8	CF612	43.3	43.1	44.0	43.3	43.5	43.44	満足	0.9	満足	-0.1	満足	-0.3	満足
9	CF617	42.6	45.4	44.7	45.0	42.1	43.96	満足	3.3	満足	0.0	満足	-0.2	満足
10	CF919	45.5	43.7	42.4	44.4	45.1	44.22	満足	3.1	満足	0.0	満足	-0.1	満足
11	CF611	45.6	45.1	45.4	45.2	43.1	44.88	満足	2.5	満足	0.2	満足	0.1	満足
12	CF604	45.9	45.3	44.8	44.4	44.9	45.06	満足	1.5	満足	0.2	満足	0.1	満足
13	CF618	43.5	47.2	49.0	44.4	43.3	45.48	満足	5.7	満足	0.3	満足	0.3	満足
14	CF916	44.8	45.8	45.6	46.1	45.5	45.56	満足	1.3	満足	0.3	満足	0.3	満足
15	CF601	46.5	46.1	46.1	45.8	45.6	46.02	満足	0.9	満足	0.4	満足	0.4	満足
16	CF915	45.2	44.9	45.1	47.5	47.5	46.04	満足	2.6	満足	0.4	満足	0.4	満足
17	CF603	46.9	47.8	44.1	47.0	44.7	46.10	満足	3.7	満足	0.4	満足	0.4	満足
18	CF605	46.2	45.9	46.4	46.2	46.3	46.20	満足	0.5	満足	0.4	満足	0.5	満足
19	CF602	47.1	45.7	47.5	46.8	44.8	46.38	満足	2.7	満足	0.5	満足	0.5	満足
20	CF621	47.1	47.9	48.2	45.8	46.4	47.08	満足	2.4	満足	0.6	満足	0.7	満足
21	CF606	45.9	47.0	47.4	47.6	47.8	47.14	満足	1.9	満足	0.6	満足	0.7	満足
22	CF610	48.0	48.0	46.0	48.0	48.0	47.60	満足	2.0	満足	0.7	満足	0.9	満足
23	CF623	46.7	47.8	47.8	48.8	47.0	47.62	満足	2.1	満足	0.7	満足	0.9	満足
24	CF622	48.0	49.3	48.2	47.4	47.0	47.98	満足	2.3	満足	0.8	満足	1.0	満足
25	CF625	55.3	57.7	52.9	51.5	51.8	53.84	満足	6.2	満足	2.0	疑わしい	2.6	疑わしい

†は2シグマ処理またはメジアン・クリーニングにて除外された機関、(Z-スコア)は参考値

$\bar{x}$ 評価 満足: $LCL \leq \bar{x} \leq UCL$ 不満足: $\bar{x} < LCL$ または $UCL < \bar{x}$

R 評価 満足: $R \leq UCL$ 不満足: $UCL < R$

Z-スコア評価 満足: $|Z-スコア| < 2$ 、疑わしい: $2 \leq |Z-スコア| < 3$ 、不満足: $3 \leq |Z-スコア|$

表7 鉛の定量における各検査機関の報告値および評価

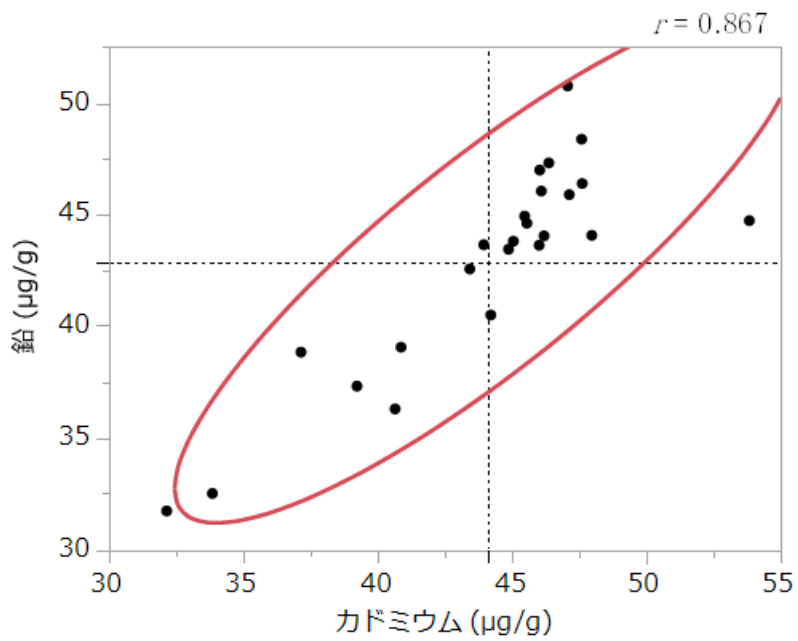
	コード番号	報告値1 (μg/g)	報告値2 (μg/g)	報告値3 (μg/g)	報告値4 (μg/g)	報告値5 (μg/g)	$\bar{x}$ (μg/g)	$\bar{x}$ 評価	R (μg/g)	R 評価	Z-スコア (従来法)	Z-スコア評価 (従来法)	Z-スコア (ロバスト法)	Z-スコア評価 (ロバスト法)
1	CP624	13.9	14.9	16.1	15.6	13.9	14.88	不満足	2.2	満足	(-5.9)	不満足	(-6.6)	不満足
2	CP614	23.1	39.4	23.2	33.8	39.2	31.74	不満足	16.3	不満足	-2.3	疑わしい	-2.7	疑わしい
3	CP920	26.3	39.4	24.1	32.0	40.8	32.52	不満足	16.7	不満足	-2.2	疑わしい	-2.5	疑わしい
4	CP613	38.5	37.3	34.8	35.1	35.8	36.30	満足	3.7	満足	-1.4	満足	-1.6	満足
5	CP609	37.0	35.8	35.3	40.4	38.1	37.32	満足	5.1	満足	-1.2	満足	-1.4	満足
6	CP607	37.6	38.9	38.9	38.0	40.8	38.84	満足	3.2	満足	-0.8	満足	-1.0	満足
7	CP608	37.7	37.1	38.3	37.3	44.9	39.06	満足	7.8	満足	-0.8	満足	-1.0	満足
8	CP919	41.8	39.8	39.2	40.6	41.1	40.50	満足	2.6	満足	-0.5	満足	-0.6	満足
9	CP612	42.9	42.4	42.4	42.4	42.7	42.56	満足	0.5	満足	-0.1	満足	-0.1	満足
10	CP611	44.3	43.6	42.4	44.0	42.9	43.44	満足	1.9	満足	0.1	満足	0.1	満足
11	CP601	44.2	43.7	43.6	43.1	43.5	43.62	満足	1.1	満足	0.2	満足	0.1	満足
12	CP617	42.7	44.7	44.2	44.6	42.0	43.64	満足	2.7	満足	0.2	満足	0.1	満足
13	CP604	44.3	43.9	44.0	43.1	43.7	43.80	満足	1.2	満足	0.2	満足	0.1	満足
14	CP605	44.1	44.4	44.1	43.6	44.0	44.04	満足	0.8	満足	0.3	満足	0.2	満足
15	CP622	43.5	43.1	43.4	44.6	45.7	44.06	満足	2.6	満足	0.3	満足	0.2	満足
16	CP916	43.7	45.9	45.1	44.4	43.9	44.60	満足	2.2	満足	0.4	満足	0.3	満足
17	CP625	40.8	45.8	43.7	46.5	46.8	44.72	満足	6.0	満足	0.4	満足	0.4	満足
18	CP618	44.8	45.7	46.6	44.7	42.8	44.92	満足	3.8	満足	0.4	満足	0.4	満足
19	CP606	45.2	45.8	46.2	45.8	46.4	45.88	満足	1.2	満足	0.6	満足	0.6	満足
20	CP603	46.3	46.8	46.4	45.5	45.2	46.04	満足	1.6	満足	0.7	満足	0.7	満足
21	CP623	44.4	45.4	51.2	43.6	47.3	46.38	満足	7.6	満足	0.8	満足	0.7	満足
22	CP915	47.3	47.6	47.4	46.1	46.5	46.98	満足	1.5	満足	0.9	満足	0.9	満足
23	CP602	48.4	47.4	46.8	47.4	46.5	47.30	満足	1.9	満足	0.9	満足	1.0	満足
24	CP610	48.2	48.2	48.6	48.6	48.2	48.36	満足	0.4	満足	1.2	満足	1.2	満足
25	CP621	50.1	50.6	50.5	50.9	51.6	50.74	満足	1.5	満足	1.7	満足	1.8	満足

†は2シグマ処理またはメジアン・クリーニングにて除外された機関、(Z-スコア)は参考値

$\bar{x}$ 評価 満足: $LCL \leq \bar{x} \leq UCL$ 不満足: $\bar{x} < LCL$ または $UCL < \bar{x}$

R 評価 満足: $R \leq UCL$ 不満足: $R > UCL$

Z-スコア評価 満足: $|Z-スコア| < 2$ 、疑わしい: $2 \leq |Z-スコア| < 3$ 、不満足: $3 \leq |Z-スコア|$



(有効機関数 : 24 機関)

図 11 器具・容器包装検査における報告値の相関性

図中の楕円は 2 変量正規分布と見なしたときの信頼度 95 % の確率楕円を示す。

表 8 本調査研究における採用手法の質問内容一覧 -1/3

- [Q1] 検査機関の情報（コード番号、検査機関名、ご担当者 部署・氏名）
- [Q2] 参加する項目の選択
① カドミウム ② 鉛
- [Q3] 検査結果入力（カドミウム検査結果 1～5、鉛検査結果 1～5、単位:μg/g）
検査結果は、統計処理の都合上、数字 3 桁でご入力ください（例:7.77、0.777、0.0777）
- [Q4] 主担当者の当該試験に係わる経験年数（月数は切り捨て）
① 0～1 年 ② 2～4 年 ③ 5～9 年 ④ 10 年以上
- [Q5] 検査期間（調査試料を採取した日、検査が終了した日）
- 前処理方法**
- 【 [Q2] で ① カドミウム および ② 鉛 の両方を選択した場合 】
- [Q6] 調査対象物質の前処理方法
① 共通の前処理方法 ② 調査対象物質ごとに異なる前処理方法
※[Q7]～[Q15] の回答が調査対象物質により異なる場合は、② を選択してください。[Q16] にて異なる前処理方法の詳細をご入力ください。
- [Q7] 試料採取量
① 0.1 g 未満 ② 0.1 g 以上 0.3 g 未満 ③ 0.3 g 以上 0.5 g 未満 ④ 0.5 g 以上 0.7 g 未満
⑤ 0.7 g 以上 1 g 未満 ⑥ 1 g 以上
- [Q8] 使用した容器の種類
① ガラス製 ② 白金製 ③ 石英製 ④ その他
- [Q9] 試料の前処理等（複数選択可）
① 湿式灰化法 【⇒[Q10]へ】 ② 乾式灰化法 【⇒[Q11] および [Q12]へ】
③ マイクロ波分解法 【⇒[Q10]へ】 ④ その他
- 【 [Q9] で ① 湿式灰化法、③ マイクロ波分解法 を選択した場合 】
- [Q10] 使用した酸の種類全て（複数選択可）
① 硝酸 ② 硫酸 ③ 過塩素酸 ④ 塩酸 ⑤ 過酸化水素 ⑥ その他
- 【 [Q9] で ② 乾式灰化法 を選択した場合 】
- [Q11] 乾式灰化における温度と時間
※複数の温度と時間の組合せで試験した場合は、以下の例に倣って入力:「150℃で 2 時間、450℃で 5 時間」の場合、温度入力欄に「150、450」、時間入力欄に「2、5」と入力
- 【 [Q9] で ② 乾式灰化法 を選択した場合 】
- [Q12] 試験溶液の調製に供した残留物について、炭塊残存の有無
① 有 ② 無
- [Q13] 残留物に加えた塩酸（1→2）の蒸発乾固の方法
① 水浴上 ② ホットプレート上 ③ その他

表 9 本調査研究における採用手法の質問内容一覧 -2/3

〔Q14〕 試験溶液中の不溶物の処理

- ① 不溶物なし ② ろ過 ③ 遠心分離 ④ その他

〔Q15〕 測定用溶液に用いた酸溶液の種類および濃度 (単位: mol/L)

【〔Q6〕で② 調査対象物質ごとに異なる前処理方法 を選択した場合】

〔Q16〕 調査対象物質ごとに異なる前処理方法について、調査対象物質名、該当する設問番号および回答をご入力ください。

※カドミウム、鉛に参加し、鉛の前処理方法（試料採取量）が異なる場合の入力例：
鉛 〔Q7〕⑤ 0.7 g 以上 1 g 未満

測定方法

【〔Q2〕で① カドミウム を選択した場合】

〔Q17〕 カドミウムの測定に用いた測定波長または質量数

- ① 214.438 nm ② 214.439 nm ③ 226.502 nm ④ 228.8 nm (228.80 nm) ⑤ 228.802 nm
⑥ m/z 111 ⑦ その他

【〔Q2〕で② 鉛 を選択した場合】

〔Q18〕 鉛の測定に用いた測定波長または質量数

- ① 220.4 nm (220.40 nm) ② 283.3 nm (283.30 nm) ③ m/z 208 ④ その他

【〔Q2〕で① カドミウム および ② 鉛 の両方を選択した場合】

〔Q19〕 調査対象物質の測定条件

- ① 共通の測定条件 ② 調査対象物質ごとに異なる測定条件

※〔Q20〕～〔Q32〕の回答が調査対象物質により異なる場合は、② を選択してください。〔Q33〕にて異なる測定条件の詳細をご入力ください。

〔Q20〕 使用機器 (種類)

- ① 原子吸光分光光度計 (フレイム方式、以下、FAAS) 【⇒〔Q21〕および〔Q22〕へ】
② 原子吸光分光光度計 (電気加熱方式、以下、GFAAS) 【⇒〔Q21〕、〔Q22〕および〔Q23〕へ】
③ 誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (以下、ICP-OES) 【⇒〔Q21〕、〔Q24〕および〔Q25〕へ】
④ 誘導結合プラズマ質量分析計 (以下、ICP-MS) 【⇒〔Q21〕および〔Q26〕へ】
⑤ その他 【⇒〔Q21〕へ】

〔Q21〕 使用機器 (メーカー・型式)

【〔Q20〕で① FAAS、② GFAAS を選択した場合】

〔Q22〕 バックグラウンド補正方法

- ① 使用しなかった ② D_2 法 ③ ゼーマン法 ④ SR法 ⑤ その他

【〔Q20〕で② GFAAS を選択した場合】

〔Q23〕 マトリックス修飾剤について (複数選択可)

- ① 使用しなかった ② マグネシウム ③ パラジウム ④ ニッケル
⑤ リン酸二水素アンモニウム ⑥ アスコルビン酸 ⑦ その他

【〔Q20〕で③ ICP-OES を選択した場合】

〔Q24〕 バックグラウンド補正について

- ① 使用しなかった ② 使用した

表 10 本調査研究における採用手法の質問内容一覧 -3/3

【 [Q20] で ③ ICP-OES を選択した場合 】

[Q25] プラズマの観測方式 (観測方向)

① 横方向 ② 軸方向 ③ その他

【 [Q20] で ④ ICP-MS を選択した場合 】

[Q26] コリジョン／リアクションモードについて

① 使用しなかった ② 使用した

測定パラメータ

[Q27] 定量計算法

① 絶対検量線法 ② 標準添加法 ③ 内標準法 ④ その他

[Q28] 検量線作成における原点について

① 原点強制通過 ② 濃度ゼロとした溶液を測定し、その実測値を採用している

③ 原点用としての溶液は特に測定していない ④ その他

[Q29] 検量線濃度範囲 (最低濃度および最高濃度)

※ゼロ点を含めないでください。なお検量線の作成において、横軸に標準品の絶対量を用いている場合は、濃度 (μg/mL) に換算してください。

[Q30] 濃度の点数 (ゼロ点を含めないでください。なお標準添加法の場合、標準液無添加のポイントは含めないでください。)

① 1 点 ② 2 点 ③ 3 点 ④ 4 点 ⑤ 5 点 ⑥ 6 点 ⑦ 7 点以上

[Q31] 回帰式

① 一次式 ② 二次式 ③ その他

[Q32] 重み付け

① 実施せず ② 実施

【 [Q19] で ② 調査対象物質ごとに異なる測定条件 を選択した場合 】

[Q33] 調査対象物質ごとに異なる測定条件について、調査対象物質名、該当する設問番号および回答をご入力ください。

※カドミウム、鉛に参加し、鉛の測定条件 (検量線の濃度の点数) が異なる場合の入力例 : 鉛 [Q30] ③ 3 点

[Q34] 検査結果算出式

[Q35] 調査試料の破損の有無

① 破損あり【⇒[Q36]へ】 ② 破損なし

【 [Q35] で ① 破損あり を選択した場合 】

[Q36] 具体的な破損の状況

[Q37] 調査試料の送付方法

① 適切 ② 不適切【⇒[Q38]へ】

【 [Q37] で ② 不適切 を選択した場合 】

[Q38] 具体的な問題点

[Q39] 器具・容器包装検査の外部精度管理調査研究試料についてのご意見、ご要望

[Q40] 日頃の内部精度管理について (複数選択可)

① 行っていない ② 添加回収試験 ③ 認証標準物質 (CRM) の分析 ④ その他

[Q41] その他ご意見

表11 本調査研究における採用手法の度数表 -1/3

測定のカテゴリ	合計	1	2	3	4	5	6	7
経験年数	25	0～1年	2～4年	5～9年	10年以上			
		3	9	7	6			
試料採取量	25	0.1 g 未満	0.1 g ～ 0.3 g	0.3 g ～ 0.5 g	0.5 g ～ 0.7 g	0.7 g ～ 1 g	1 g 以上	
		0	3	0	3	0	19	
容器の種類	25	ガラス製	白金製	石英製	その他			
		13	2	6	4			
試料の前処理等	28	湿式灰化法	乾式灰化法	マイクロ波分解法	その他			
		7	18	2	1			
湿式灰化法、 マイクロ波分解法の場合： 酸の種類	17	硝酸	硫酸	過塩素酸	塩酸	過酸化水素	その他	
		6	7	0	4	0	0	
乾式灰化法の場合： 炭塊の残存	18	有	無					
		12	6					
塩酸 (1→2) の蒸発乾固	25	水浴上	ホットプレート上	その他				
		11	11	3				
カドミウムの定量： 測定波長または質量数	25	214.438 nm	214.439 nm	226.502 nm	228.8 nm (228.80 nm)	228.802 nm	m/z 111	その他
		0	3	1	16	1	3	1
鉛の定量： 測定波長または質量数	25	220.4 nm (220.40 nm)	283.3 nm (283.30 nm)	m/z 208	その他			
		4	11	3	7			

複数回答を含む

表12 本調査研究における採用手法の度数表 -2/3

測定のカテゴリ	合計	1	2	3	4	5	6	7
使用機器	25*1	FAAS	GFAAS	ICP-OES	ICP-MS	その他		
		12	0	9	3	1		
FAAS の場合: バックグラウンド補正	12	使用しなかった	D ₂ 法	ゼーマン法	SR 法	その他		
		1	5	6	0	0		
ICP-OES の場合: バックグラウンド補正	9	使用しなかった	使用した					
		3	6					
ICP-OES の場合: プラズマの観測方式	9	横方向	軸方向	その他				
		0	9	0				
ICP-MS の場合: コリジョン/リアクションモード	3	使用しなかった	使用した					
		0	3					
定量計算法	25	絶対検量線法	標準添加法	内標準法	その他			
		20	0	5	0			
検量線の原点	25	原点強制通過	濃度ゼロの溶液を測定	測定せず	その他			
		1	19	4	1			
カドミウムの定量: 検量線濃度の点数 (ゼロ点を含めない)	25	1点	2点	3点	4点	5点	6点	7点以上
		1	1	6	10	6	1	0
鉛の定量: 検量線濃度の点数 (ゼロ点を含めない)	25	1点	2点	3点	4点	5点	6点	7点以上
		1	1	5	11	6	1	0

*1:その他の1機関はエネルギー分散型蛍光X線装置を使用

表13 本調査研究における採用手法の度数表 -3/3

測定のカテゴリ	合計	1	2	3	4
回帰式	25*1	一次式	二次式	その他	
		23	2	0	
重み付け	25	実施せず	実施		
		24	1		
日頃の内部精度管理	28	行っていない	添加回収試験	CRM の分析	その他
		2	17	6	3

複数回答を含む、*1:1 機関が添加物質ごとに回帰式を設定

令和 6 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	副所長
研究分担者	梶原 三智香	(一財)食品薬品安全センター秦野研究所	室長
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

食物アレルギーについての定期的な実態調査の結果、症例数が多い原因食物については特定原材料として表示が必要とされ、対象食物については定期的に見直しが行われている。そして、食品表示が正しく行われない場合、予期せぬ食物アレルギーの原因となることも報告されている。

食品衛生検査施設等では通知法に従って ELISA 法を用いたスクリーニング試験により食品中の特定原材料の検出を行っており、業務管理の一環として外部精度管理調査への参加が求められている。外部精度管理調査は、同一の試料について多機関が試験を行い、得られた結果から各機関の評価を行うものであるため、使用する試料の質が重要である。本研究では作製した試料が外部精度管理調査に適しているかどうかについてパイロットスタディにより検討を行った。

特定原材料として乳を含有した 2 種の試料を参加機関へ提供し、乳検出用の ELISA キットによる測定を依頼した。データを回収した 24 機関から得られた報告値を試料毎および測定キット毎にまとめた。各系についてメジアン・クリーニング(MC)を行った後に、ロバスト方式により統計値を算出した。得られた数値から $\bar{X}$ -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。

その結果、すべての解析系において、MC により除外された機関は認められなかった。 $\bar{X}$ 管理図及び R 管理図では管理限界線の範囲を超える機関はそれぞれ 1 機関認められた。また、 z -スコアの絶対値が 3 以上となる機関は全体で 2 機関が認められ、うち 1 機関は $\bar{X}$ 管理図で管理限界線を越える結果を示した。

本研究で供試した 2 種の試料は、品質評価試験の結果、均質性および試験期間中の安定性が確認された。解析の結果、両試料ともに片方のキットで相対標準偏差(RSD)が 10%を超えたが、別キットの RSD は 8~9%程度であった。 $\bar{X}$ -R 管理図および z -スコアについて試料間で特段の差は認められず、品質評価試験と合わせて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

食物アレルギーについては定期的に全国規模での実態調査が行われ、食品表示に関わる特定原材料の見直しが行われている。近年では国民の食生活の変化に合わせて、食物アレルギーを引き起こす食品の種類に変動が認められている。特に、木の実類については国内の消費量の増加に伴い、アレルギー患者数が増加する傾向にある^{1,2)}。このため、2023年には「特定原材料」に「くるみ」が追加され、2024年3月には「特定原材料に準ずるもの」に「マカデミアナッツ」が登録された。また、2025年度には「カシューナッツ」と「ピスタチオ」がそれぞれ「特定原材料」及び「特定原材料に準ずるもの」として追加される予定である。また、全国の実態調査に関する報告書^{1,2)}では18歳未満の誤食解析においては牛乳を原因食物とする結果が上位を占めており、食品表示ミスにおける誤食では牛乳が1位を占めていた。

特定原材料の食品表示はそのまま国民の健康維持へとつながる。そのため、食品中の特定原材料の同定は重要であり、特に表示のない特定原材料が食品中へ混入していた場合は、重篤な健康被害を引き起こす可能性がある。

食品中の特定原材料については消費者庁次長通知「食品表示基準について」(平成27年3月30日消食表第139号)(以下、通知法)、別添「アレルゲンを含む食品の検査方法」に記載されているように、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。

食品の検査施設では前述のELISAキットにより特定原材料についての試験を行っているが、他機関との比較は行われず、施設間差

について確認を行うことは難しい。ELISA試験じゃスクリーニング試験であることから、陽性検体を陰性と判定することは避けなければならない。一方で、すべての検体について確認試験であるPCR法を適用するのは現実的ではない。

そのため外部精度管理調査による他施設との技能の比較を行うことで、定期的に手技の見直しを行うことは重要である。

本研究では、特定原材料を不含の市販食品を基材に特定原材料として乳を添加して調製した2種の試料を用い、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、TaKaRa BCA Protein Assay Kit (タカラバイオ) を用いた。基材として市販のとうもろこしペースト(新進)および具たっぷりグーグーキッチン 鮭の豆乳リゾット(以下ベビーフード、和光堂)を使用した。基材に添加する特定原材料は乳として、スキムミルク粉末(生化学用、富士フイルム和光純薬)を使用した。

2. ELISA 法

1) ELISA キット

特定原材料である乳の検出には、下記の通知法に準拠したELISAキット、3種および通知法に非準拠のELISAキット、1種の合計4種を使用した。

乳タンパク質検出用キット(通知法準拠)

- FASTKITエライザVer. III 牛乳(日本ハム)(以下、日本ハムキット)
- モリナガFASPEK エライザII 牛乳(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牛乳(β -ラクトグロブリン)(プリマハム)(以下、プリマハムキット)

乳タンパク質検出用キット(通知法非準拠)

- モリナガFASPEK エライザII 牛乳(β -ラクトグロブリン)(森永生科学研究所)(以下、モリナガ(β LG)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

基材のとうもろこしペースト及びベビーフードは、ELISA 法により、標的タンパク質である乳が検出限界 (基材中 $0.31 \mu\text{g/g}$) 以下であることを確認した。

2) 添加用タンパク質の調製

i) 添加用乳タンパク質の調製

スキムミルク粉末を 50 mL 容ポリプロピレン製チューブに 0.2 g 分取し、これに 0.6% ドデシル硫酸ナトリウム (Sigma-Aldrich, Merck) および 0.1 mol/L 亜硫酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬) を含有する PBS (pH 7.4, Gibco, Thermo Fisher Scientific) を 20 mL 添加、ブレンダーで十分攪拌後、室温で 1 晩振盪した。調製液は遠心 ($10,000 \times g$, 30 min)

後、上清を $0.8 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、添加用乳たんぱく質液とした。

ii) タンパク質量の測定

作製した添加用乳タンパク質調製液は、TaKaRa BCA Protein Assay Kit によりタンパク質含量を測定した。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

基材に乳タンパク質を加えることで、調査試料を作製した。基材であるとうもろこしペーストまたはベビーフードにタンパク質量が乳総タンパク質相当で $10.0 \mu\text{g/g}$ となるように添加用乳タンパク質調製液を添加し、ロボ・クーブブリスサー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。

5. 品質評価方法

品質評価としては均質性試験および安定性試験を「2. ELISA 法」に記載の乳検出用キット 4 種類を用いて実施した。

均質性の確認は、試料送付前 (試料作製後 1 か月以内) に行った。

試験は各試料から系統的に抽出した 10 容器について各キット、 $n=1$ でサンプリングし、ELISA 法により乳たんぱく質濃度の測定を行った。測定値から平均値、標準偏差、相対標準偏差を算出した後、相対標準偏差が 5% 以下である場合に均質と判断した。通知法に準拠した 3 種の ELISA キットにおいて、2 種以上で均質と評価された場合に調査試料は均質であると判断した。

安定性確認試験は調査期間終了後 (試料

作製から約 3.5 か月後) に保存しておいた試料 4 容器から各キット、 $n=1$ の測定により行った。均質性試験における濃度に対する割合として安定性を算出し、調査期間中の試料の安定性を確認した。安定性の確認には各キットで同一ロットを使用し、測定した濃度の平均が、80～120 %の範囲内であれば安定と判定することとした。通知法に準拠した 3 種のキットにおいて、2 種以上のキットで安定と判定された場合に調査試料は調査期間中、安定であったと判断した

なお、使用したキットはすべて使用期限内であり、均質性試験と安定性試験で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

調査に参加した機関には調査試料 [試料 1:とうもろこしペースト、試料 2:ベビーフード] と実施要領を宅配便(冷凍)で送付した。

また、各機関においては通知法準拠の 3 キットのうちモリナガキットと日本ハムキットの 2 種類を測定に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^{3,4)} 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) $\bar{X}$ -R 管理図を代用した方法と z -スコアによる方法を用いた評価、の 3 段階で実施した。

また、 $\bar{X}$ 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。

試料 1 の均質性試験ではモリナガキットと日本ハムキットはほぼ同じ、プリマキットでは低値を示した(モリナガ: $9.55 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$ 、日本ハム: $9.92 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$ 、プリマハム: $7.19 \pm 0.17 \mu\text{g/g}$)。また、モリナガ(βLG) は $8.00 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$ とプリマハムと近い値を示した。

試料 2 では、日本ハムキットは 4 キット中最高値を示した ($12.11 \pm 0.44 \mu\text{g/g}$)。モリナガキットは日ハムキットよりもやや低い値を示し、プリマハムキットは 4 キット中最低値を示した (モリナガ: $11.28 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$ 、プリマハム: $7.20 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$)。モリナガ(βLG) は $9.40 \pm 0.24 \mu\text{g/g}$ を示した。

試料 1 と試料 2 を比較すると、プリマハムキット以外では試料 2 で高値を示した。また、試料 1 ではモリナガキットと日本ハムキットの測定値では大きな差は認められなかったが、試料 2 では明らかに日ハムキットで高値を示し、基材の影響が考えられた。

なお、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。均質性の結果を 100 % として 4 キット、それぞれについて算出した結果、試料 1 は 96.3~108.6 %、試料 2 は 99.2~109.4 % であり、両試料ともに調査期間中、安定であったと判断した。

2) 外部精度管理調査結果

参加を表明した 25 機関に試料を送付し、うち 24 機関からデータを回収した。各機関の報告値は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。24 機関中 23 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い、1 機関は 1 キット

について試験を行った。したがって、モリナガキットを使用したのは 23 機関、日本ハムキットは 24 機関となった。

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品質評価のための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、測定値における RSD は、モリナガキットでは試料 1 では 8.9 %、試料 2 では 11.1 %、日本ハムキットでは試料 1 が 8.0 %、試料 2 が 10.5 % であった。試料 1、試料 2 ともキット間差は認められなかったが、どちらのキットにおいても試料 2 では試料 1 よりも大きな RSD を示した。

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 23 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 $10.37 \pm 0.92 \mu\text{g/g}$ (RSD 8.9 %) であった。 $\bar{X}$ 管理図および R 管理図では管理限界線外の機関は認められなかった。 z -スコアの絶対値が 3 以上の機関は 1 機関 (機関番号 22) 認められた [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 $11.30 \pm 0.90 \mu\text{g/g}$ (RSD 8.0 %) であった。 $\bar{X}$ 管理図および z -スコアが管理限界線を超えた機関は 1 機関 (機関

番号 22) 認められた(表 6、図 5)。この機関は同キットの試料 1 [表 5、図 6 b)] においても z -スコアが管理限界線外であった。

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 21) 認められた (表 6、図 4)。当該機関は、2 つの測定値における 3 ウェル間の相対標準偏差は 1.0~1.3 %程度あったこと、また、ほかの試験系では全て R 管理図の管理限界線内であった。したがって、管理限界線を外れたのは偶発的なものと考えられた。

(2) 日本ハムキット

日本ハムキットを用いて測定した 24 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 $9.97 \pm 1.11 \mu\text{g/g}$ (RSD 11.1 %) であった。 $\bar{X}$ 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外となった機関は認められなかった (表 8、図 7)。

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 $12.11 \pm 1.27 \mu\text{g/g}$ (RSD 10.5 %) であった。 $\bar{X}$ 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) 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 8 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 機関だけが使用したロットは 3 ロット、2 機関が使用したロットは 1 ロットであった。ロット間差については、各ロットの供試数が少ないことから明確な結果は得られなかった。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 の報告値よりも高値を示した。

日本ハムキット [図 10 b)] では全てのロットで複数機関の使用が認められた。しかしながら、4 ロット中 3 ロットでは使用が 3~4 機関であり、ロット間差の確認はできなかった。また、全ての機関において試料 1 よりも試料 2 が高値を示した。

(4) 検量線について

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。本調査研究においては、使用キットについてロットの指定を行わなかったため、両キットとも複数のロットが使用されていた。

モリナガキットでは 8 ロットが使用されたが、ロット当たりの使用機関数が少なかったことから、ロット間差は確認できなかった。検量線で 95 %信頼区間外となった機関は 2 機関で上方に外れた機関番号 17 の z -スコアは試料 1 で -1.082、試料 2 で -1.517 と問題のない値を示したが、全機関中、試料 1 は下から 3 番目、試料 2 は下から 2 番目の低値を示した。下方へ外れた機関番号 13 の z -スコアは試料

1、試料とも z -スコアの絶対値が 1 未満であり、試験への影響は認められなかった。

日本ハムキットでは 4 ロットが使用された。検量線で 95 %信頼区間外となった機関はモリナガキット同様に上方に外れた機関番号 17 のみで、 z -スコアは試料 1 で -0.779 、試料 2 で -0.736 と数値的には問題のない値であったが、それぞれ全機関中下から 4 番目及び 6 番目の値を示し、モリナガキット同様、低めの z -スコアであった。検量線が上方へずれることで、吸光度から換算されるタンパク質量は低値を示すことが考えられる。したがって、当該機関の z -スコアが両キットで低値を示したのは検量線が影響している可能性も示唆された。

また、日本ハムキットにおいて、機関番号 22 は他の機関の検量線と異なる線形を示した [図 15 c)]。当該機関の z -スコアは試料 1 で -2.509 、試料 2 で 2.681 を示し、 $|z\text{-スコア}|$ は 3 未満であったが、各試験系においてそれぞれ全機関中で最低値及び最高値を示した。また、同機関はモリナガキットにおける検量線は 95 %信頼区間内であったが、 z -スコアは両試料で 3 以上となり判定は「不満足」であった。

通常、各機関は、検量線の線形等については背景データと比較することになるが、外部精度管理調査では他機関との比較が可能であることから、各機関の検量線が (背景データも含め)、明らかに他機関と異なっている場合、統計結果のいかんによらず実験操作の確認を行い、修正することも必要と考えられた。

(5) 複数の統計結果で管理限界線外となった機関について

機関 22 はモリナガキットの試料 1 では z -スコアで、また試料 2 では z -スコアと $Xbar$ 管理図で上方へ管理限界線外となった。日本ハムキットの試料 2 においても z -スコアは全機関

中、最高値 (z -スコア $= 2.681$) を示した。一方、日本ハムキットの試料 1 では z -スコアは全機関中、最低値 (z -スコア $= -2.509$) を示した。これまでに、キットによって高値/低値を出す場合や、すべての試験系で高値/低値を出す場合などは観察されてきた。しかしながら、本調査における当該機関の結果はモリナガキットにおいては両試料とも全機関中、最高値であり、日本ハムキットでは片方が最高、もう片方が最低と、キット間、試料間で異なる結果となり、試験操作又は使用機器に何らかの問題がある可能性が考えられた。

また、当該機関の検量線は、前項で記載の通り、モリナガキットでは他機関と比較して問題は認められなかった [図 14 c)] が、日本ハムキットの検量線では他機関と異なる線形が認められた [図 15 c)]。日本ハムキットの検量線では高濃度 $12.5 \sim 50 \text{ ng/mL}$ における相対標準偏差は全体平均が $2.0 \sim 2.7 \%$ であるのに対し、当該機関は同濃度における相対標準偏差が $4.3 \sim 4.5 \%$ と 2 倍程度高い値を示した。また、モリナガキットにおける試料 1 及び試料 2 の相対標準偏差は $0.5 \sim 1.7 \%$ および $0.5 \sim 1.0 \%$ 程度であったが、日本ハムキットにおける試料 1 の相対標準偏差は 11.00% 及び 3.61% とウェル間での変動が大きかった。これらのことから当該機関は、やや試験操作が不安定な傾向にあると考えられた。

(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

各キットにおける試料 1 と試料 2 の報告値の相関を図 16 に示した。その結果、相関係数はモリナガキットで 0.664 と中程度の相関が、日本ハムキットでは 0.363 と弱い相関が認められた。また、両キットともすべての機関において試料 2 は試料 1 よりも高い値を示した。さら

に、どちらの試料についても 2 機関が、95 % 確率楕円から外れていた。

b) 同一試料におけるキット間の報告値の相関

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 17 に示した。試料 1 では相関係数が -0.226 でほとんど相関は認められなかった。試料 2 の相関係数は 0.619 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 1 機関 (同一機関) を除き、すべての機関が 95 % 確率楕円内に位置していた。

確率楕円から外れた 1 機関については同一キットにおける試料間の相関性を見たモリナガキット及び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。

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機関があるため、延べ総数は 30 となった。うち、経験年数が 0 年であった機関が 10、経験年数が 1 年であった機関が 9 とほぼ 2/3 の機関で 1 年以下の経験を持つ担当者が試験を行っていた。このことから例年通り各機関とも、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ことが示唆された。

検査手法では全機関が振とう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 24 機関中 15 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通知法で推奨されている 4 パラメーターロジスティックを使用していた。天秤の校正は校正を行わないと回答した 1 機関を除

き、すべての機関で年に 1 回以上の頻度で実施していたが、ピペットについては校正を行わない機関が複数認められた (6/24)。これらの機関のうち数機関では検量線が 95 % 信頼区間外又はぎりぎり 95 % 信頼区間線であり、また、 z -スコアが「満足」の評価となっているが、全機関中で低値もしくは高値を出している機関が存在した。これらの機関については、適宜ピペットの点検等を考慮する必要があるかもしれない。

個々のキットの操作方法では、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認められなかった。抽出から測定までの期間は両キットとも例年通り、0 日 (抽出当日使用) がほとんどであり、保存後に使用した機関は 1 機関以外、1 日保存後に試験を行っていた。また、抽出液を保存後に試験を行った機関は、抽出液を冷蔵保管していた。保存後試験を行った各機関の $|z\text{-スコア}|$ 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、 $\bar{X}$ 値、 R 値および z -スコアが外れる要因となるような操作は認められなかった。

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 (2023 年度) を表 14 および表 15 に示した。2023 年 3 月に特定原材料としてくるみが追加されたため、今回からくるみの試験結果が表記されている。したがって、検査項目は、卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみ、甲殻類 (えび、かに) の特定原材料 7 種となった。昨年度の実績は 6 種類を行った機関が 6 機関と最も多く、全 7 種について試験を行ったのは 4 機関であった。

参加 24 機関中回答のあった 22 機関にお

ける ELISA 試験の総実施件数は 8,500 件強、うち卵、乳、小麦がそれぞれ全体の 24～30 %程度で、合わせて 80 %ほどを占めていた。新たに特定原材料に指定されたくるみについては 2 %程度の試験数となった。また、陽性と判定された試験数は 443 試験であり、総試験数に対する比率 5 %程度であった。また、7 種中もっとも陽性が多かったのは小麦の 131 件、続いて、乳と小麦が 123 件ずつであった。陽性率としては 5～6 %であった。

確認試験は 9 試験が行われ、小麦が 4 試験、卵、甲殻類が 2 試験ずつ、落花生が 1 試験であった。確認試験において小麦、卵、甲殻類で陽性の検体が認められた。

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、特定原材料として乳たんぱく質を含有した 2 試料を調査試料として用いた。基材は試料 1 にとうもろこしペーストを、試料 2 にベビーフードを用いた。試料作製は基材に乳タンパク質を添加することで行った。

パイロットスタディでは 24 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。

評価は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および z -スコアにより行った。

その結果、モリナガキットでは 1 機関において試料 1 及び試料 2 の両試料で z -スコアの絶対値が 3 以上となり、また、試料 2 では $\bar{X}$ 管理図でも管理限界線の範囲を超える結果となった。さらに同キットでは試料 2 において R

管理図で管理限界線を超えた機関が 1 機関認められた。

日本ハムキットでは $\bar{X}$ 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を超える機関は認められなかった。

F. 参考文献

- 1) 海老澤元宏他. “即時型食物アレルギーによる健康被害に関する全国実態調査”. 令和 3 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書. 消費者庁, 令和 4 年 3 月.
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_sanitation/allergy/assets/food_labeling_cms204_220601_01.pdf, (参照 2025-3-19)
- 2) 海老澤元宏他. “即時型食物アレルギーによる健康被害に関する全国実態調査”. 令和 6 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書. 消費者庁, 令和 6 年 9 月.
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_sanitation/allergy/assets/food_labeling_cms204_241031_1.pdf, (参照 2025-3-19)
- 3) 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).
- 4) Analytical Methods Committee, Robust statistics - How Not to Reject Outliers, Part 1. Basic concepts, Analyst, vol. 114, 1693-1697 (1989).

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 外部精度管理調査試料の均質性試験の結果

キットメーカー	試料 1			試料 2		
	平均±SD ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	均質性	平均±SD ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	均質性
モリナガ	9.55±0.13	1.4	均質	11.28±0.26	2.3	均質
日本ハム	9.92±0.42	4.2	均質	12.11±0.44	3.6	均質
プリマハム	7.19±0.17	2.4	均質	7.20±0.09	1.3	均質
[参考]						
モリナガ(βLG)	8.00±0.31	3.9	均質	9.40±0.24	2.6	均質

SD:標準偏差、RSD:相対標準偏差

n=10

表 2 外部精度管理調査研究試料の安定性試験の結果

キットメーカー	試料 1			試料 2		
	含有量		安定性	含有量		安定性
	平均±SD ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	平均±SD (%)	平均±SD ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	平均±SD (%)
モリナガ	9.70±0.10	1.0	101.5±1.0	11.18±0.24	2.1	99.2±2.2
日本ハム	10.30±0.33	3.2	103.8±3.4	13.25±0.69	5.2	109.4±5.7
プリマハム	6.93±0.10	1.4	96.3±1.3	6.91±0.20	2.9	96.0±2.8
[参考]						
モリナガ(βLG)	8.69±0.11	1.3	108.6±1.3	10.12±0.14	1.4	107.7±1.5

SD:標準偏差

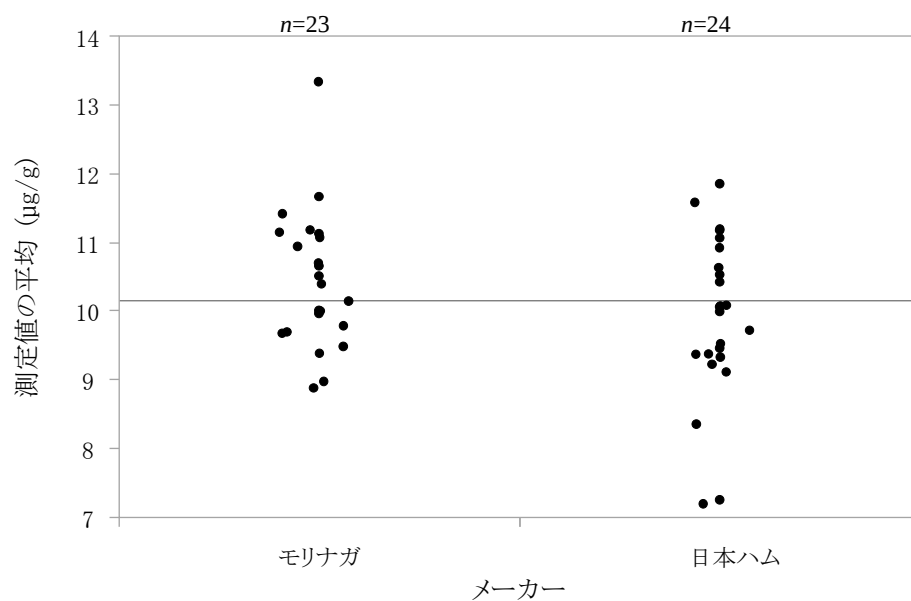
n=4

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	使用ロット数	平均値±SD ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)
試料 1	モリナガ	23	8	10.37±0.92	8.9
	日本ハム	24	4	9.97±1.11	11.1
試料 2	モリナガ	23	8	11.30±0.90	8.0
	日本ハム	24	4	12.11±1.27	10.5

SD:標準偏差、RSD:相対標準偏差

a) 試料 1



b) 試料 2

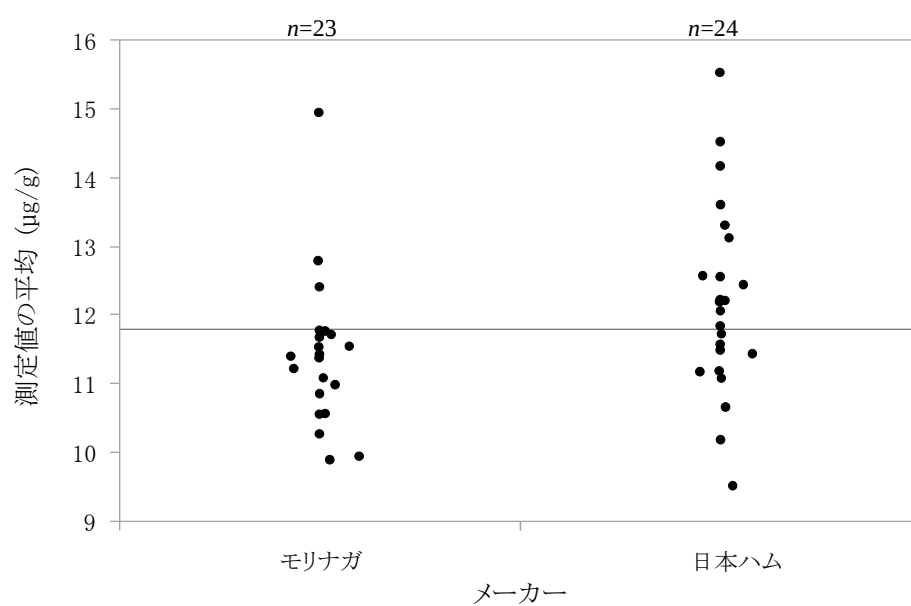


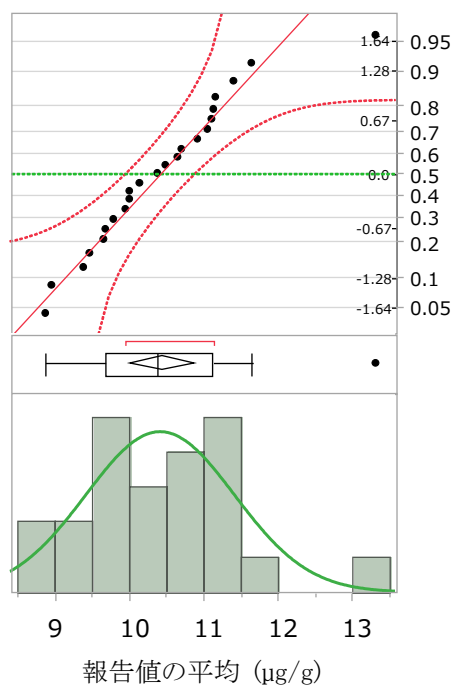
図 1 外部精度管理調査研究試料におけるキットごとのデータ分布

表 4 モリナガキットによる測定結果の統計量一覧

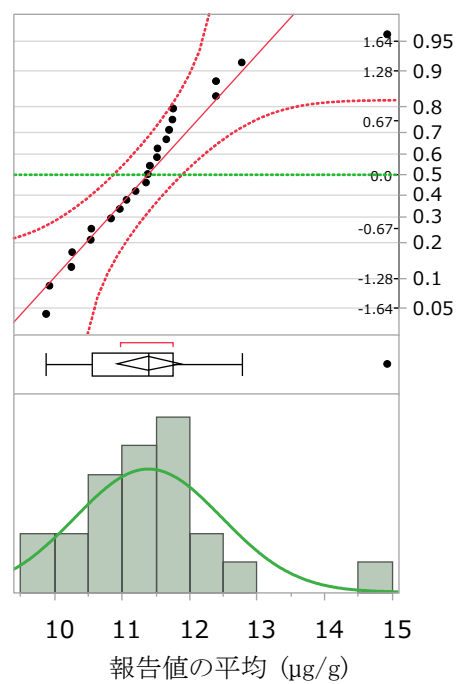
試料名		試料 1	試料 2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MC による除外機関		0	0
データ (有効機関) 数		23	23
測定の 統計量	平均値 (μg/g)	10.37	11.30
	標準偏差 (μg/g)	0.92	0.90
	相対標準偏差 (%)	8.9	8.0
	中央値 (メジアン)* (μg/g)	10.385	11.39
	最大値 * (μg/g)	13.325	14.935
	最小値 * (μg/g)	8.87	9.885
	範囲 * (μg/g)	4.455	5.05
測定の 差	R の平均 (μg/g)	0.24	0.23
	上部管理限界 (μg/g)	0.78	0.75

* 出力値

a) 試料 1



b) 試料 2



(機関数 23)

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

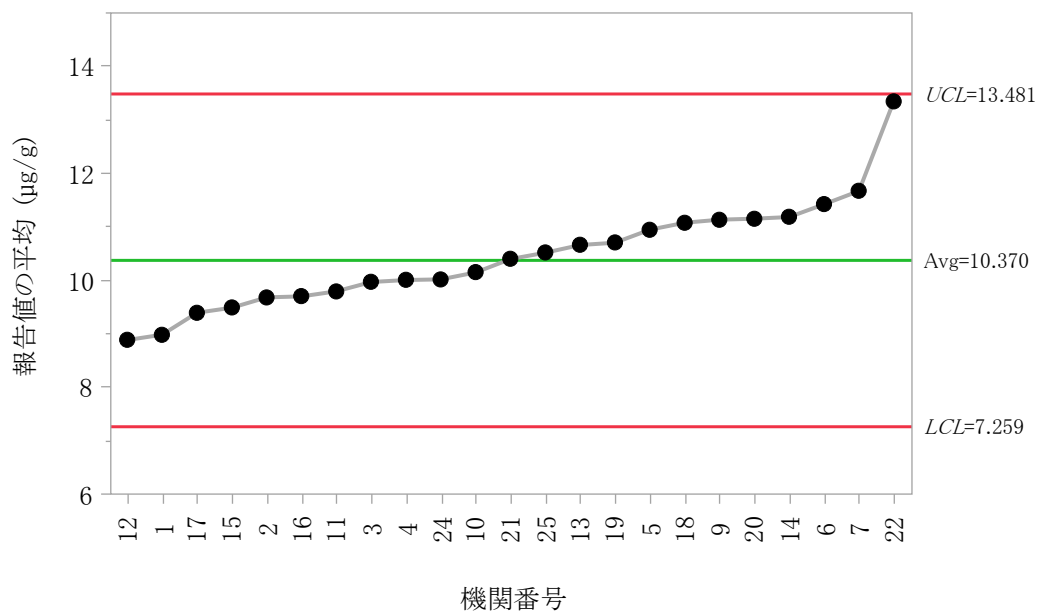
表 5 モリナガキットによる試料 1 の結果および評価一覧

機関 番号	試料 1 の報告値 ($\mu\text{g/g}$)		$\bar{X}$ 管理図		R 管理図		z スコア	
	1	2	$\bar{X}$ ($\mu\text{g/g}$)	評価	R ($\mu\text{g/g}$)	評価	z スコア	評価
12	8.96	8.78	8.870	満足	0.18	満足	-1.630	満足
1	8.86	9.07	8.965	満足	0.21	満足	-1.527	満足
17	9.21	9.54	9.375	満足	0.33	満足	-1.082	満足
15	9.41	9.54	9.475	満足	0.13	満足	-0.973	満足
2	9.66	9.67	9.665	満足	0.01	満足	-0.766	満足
16	9.69	9.68	9.685	満足	0.01	満足	-0.745	満足
11	9.94	9.61	9.775	満足	0.33	満足	-0.647	満足
3	9.84	10.07	9.955	満足	0.23	満足	-0.451	満足
4	9.94	10.04	9.990	満足	0.10	満足	-0.413	満足
24	10.26	9.74	10.000	満足	0.52	満足	-0.402	満足
10	10.41	9.86	10.135	満足	0.55	満足	-0.255	満足
21	10.68	10.09	10.385	満足	0.59	満足	0.016	満足
25	10.67	10.33	10.500	満足	0.34	満足	0.141	満足
13	10.63	10.66	10.645	満足	0.03	満足	0.299	満足
19	10.66	10.72	10.690	満足	0.06	満足	0.348	満足
5	10.91	10.95	10.930	満足	0.04	満足	0.609	満足
18	11.09	11.03	11.060	満足	0.06	満足	0.750	満足
9	11.19	11.04	11.115	満足	0.15	満足	0.810	満足
20	10.91	11.36	11.135	満足	0.45	満足	0.832	満足
14	10.86	11.48	11.170	満足	0.62	満足	0.870	満足
6	11.27	11.54	11.405	満足	0.27	満足	1.125	満足
7	11.74	11.57	11.655	満足	0.17	満足	1.397	満足
22	13.25	13.40	13.325	満足	0.15	満足	3.212	不満足
評価基準								
$\bar{X}$ 管理図	満足: $LCL (7.259) \leq \bar{X} \leq UCL (13.481)$				不満足: $\bar{X} < LCL$ または $UCL < \bar{X}$			
R 管理図	満足: $0 \leq R \leq UCL (0.78)$				不満足: $UCL < R$			
z スコア	満足: $ z\text{-スコア} < 3$				不満足: $3 \leq z\text{-スコア} $			

表 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 ($\mu\text{g/g}$)		$\bar{X}$ 管理図		R 管理図		z -スコア	
	1	2	$\bar{X}$ ($\mu\text{g/g}$)	評価	R ($\mu\text{g/g}$)	評価	z -スコア	評価
1	9.91	9.86	9.885	満足	0.05	満足	-1.572	満足
17	10.00	9.87	9.935	満足	0.13	満足	-1.517	満足
3	10.36	10.16	10.260	満足	0.20	満足	-1.156	満足
11	10.10	10.44	10.270	満足	0.34	満足	-1.144	満足
15	10.50	10.59	10.545	満足	0.09	満足	-0.839	満足
4	10.64	10.47	10.555	満足	0.17	満足	-0.828	満足
16	10.73	10.96	10.845	満足	0.23	満足	-0.506	満足
24	11.29	10.66	10.975	満足	0.63	満足	-0.361	満足
10	11.36	10.79	11.075	満足	0.57	満足	-0.250	満足
19	11.29	11.13	11.210	満足	0.16	満足	-0.100	満足
5	11.33	11.40	11.365	満足	0.07	満足	0.072	満足
21	11.81	10.97	11.390	満足	0.84	不満足	0.100	満足
20	11.39	11.45	11.420	満足	0.06	満足	0.133	満足
18	11.47	11.58	11.525	満足	0.11	満足	0.250	満足
14	11.63	11.44	11.535	満足	0.19	満足	0.261	満足
13	11.65	11.68	11.665	満足	0.03	満足	0.406	満足
7	11.84	11.57	11.705	満足	0.27	満足	0.450	満足
25	11.82	11.69	11.755	満足	0.13	満足	0.506	満足
6	11.78	11.75	11.765	満足	0.03	満足	0.517	満足
9	12.36	12.44	12.400	満足	0.08	満足	1.222	満足
2	12.07	12.73	12.400	満足	0.66	満足	1.222	満足
12	12.92	12.64	12.780	満足	0.28	満足	1.644	満足
22	14.94	14.93	14.935	不満足	0.01	満足	4.039	不満足
評価基準								
$\bar{X}$ 管理図	満足: $LCL (7.910) \leq \bar{X} \leq UCL (14.690)$				不満足: $\bar{X} < LCL$ または $UCL < \bar{X}$			
R 管理図	満足: $0 \leq R \leq UCL (0.75)$				不満足: $UCL < R$			
z -スコア	満足: $ z\text{-スコア} < 3$				不満足: $3 \leq z\text{-スコア} $			

a) $\bar{X}$ 管理図



b) R 管理図

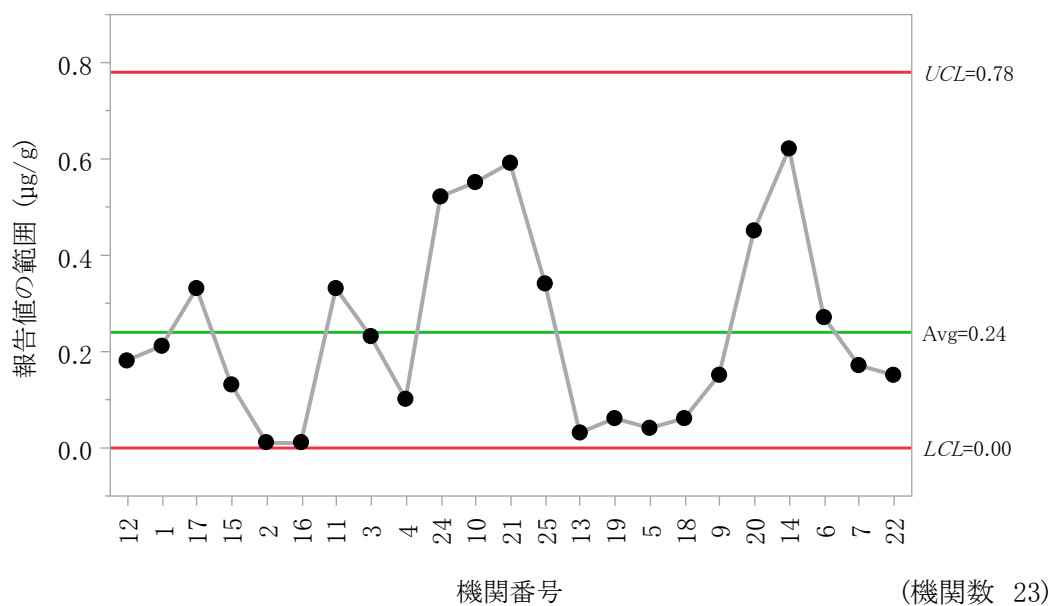
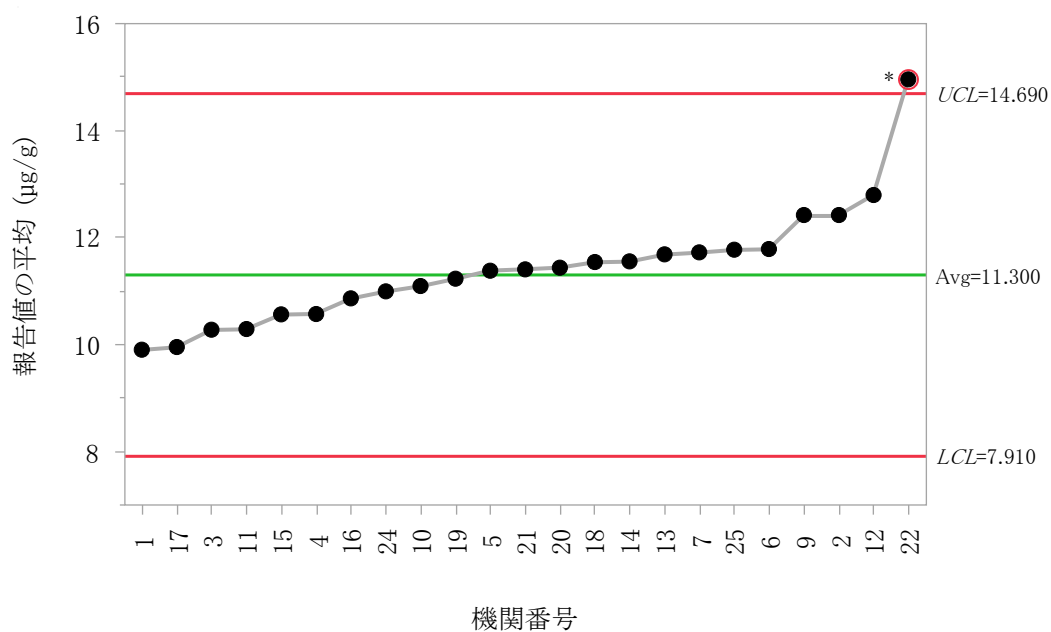


図3 モリナガキットを用いた試料1の測定結果 ($\bar{X}$ - R 管理図)

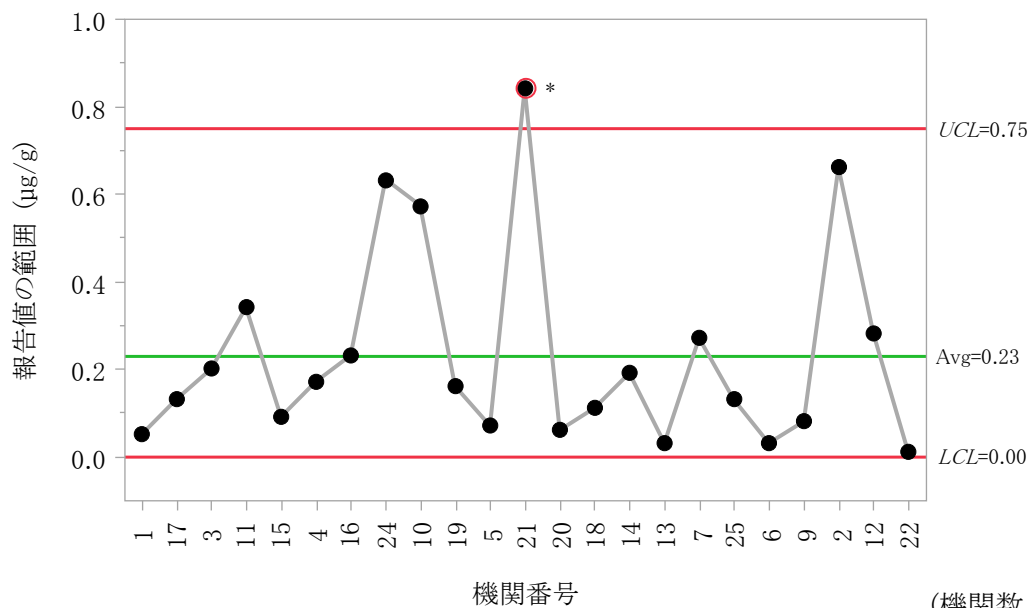
$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均 $\pm 30\%$

R 管理図 (b) の UCL および LCL は R の平均値と JIS ハンドブックの係数 $D_4 (=3.267)$ から算出

a) $\bar{X}$ 管理図



b) R 管理図



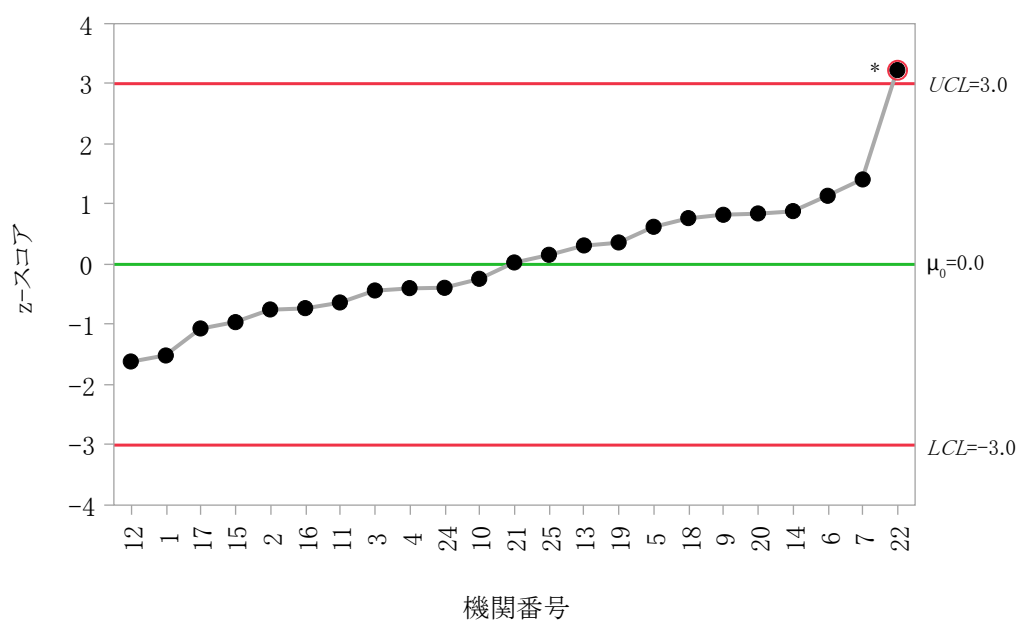
(機関数 23)

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)

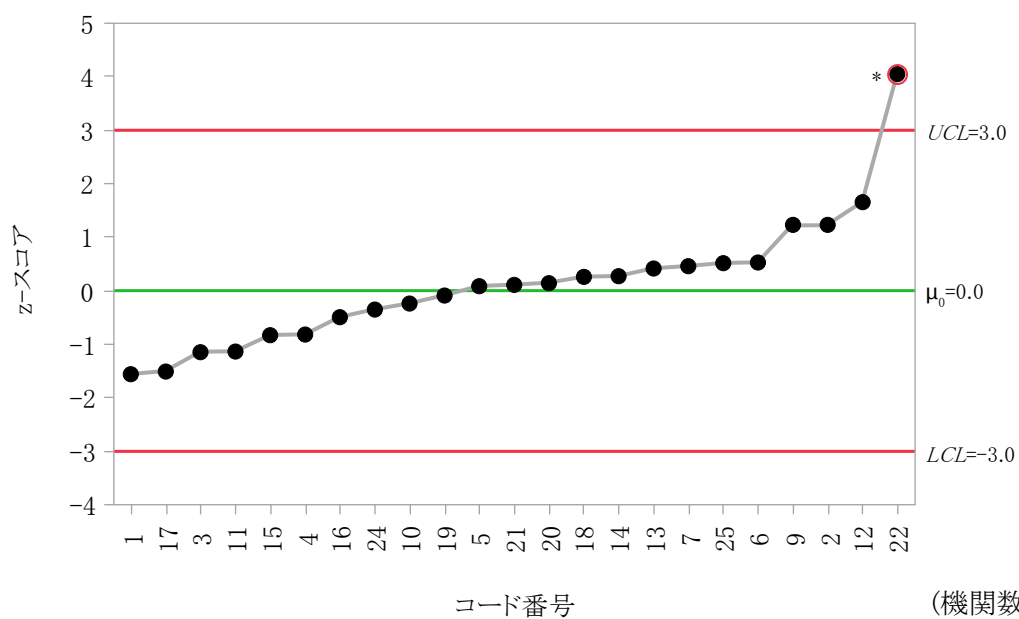
$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均 $\pm 30\%$

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 23)

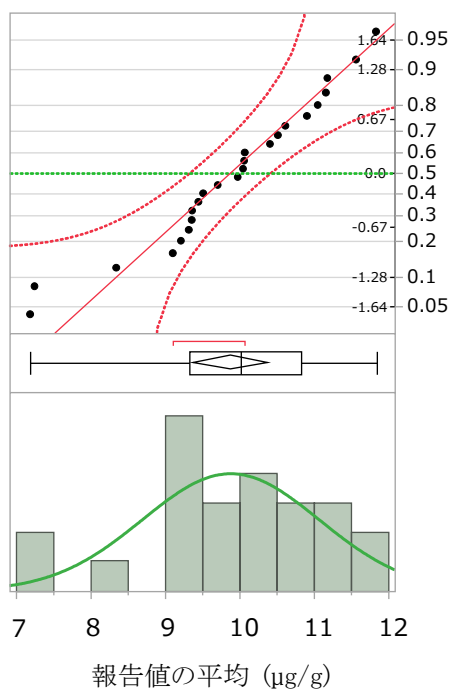
図 5 モリナガキットを用いた ELISA 法による測定結果 (z-スコア)

表 7 日本ハムキットによる測定結果の統計量一覧

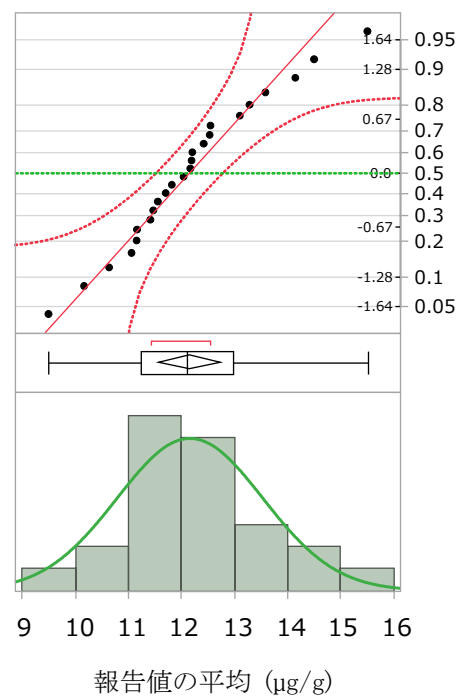
試料名		試料 1	試料 2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
MC による除外機関		0	0
データ (有効機関) 数		24	24
測定の 統計量	平均値 (μg/g)	9.97	12.11
	標準偏差 (μg/g)	1.11	1.27
	相対標準偏差 (%)	11.1	10.5
	中央値 (メジアン)* (μg/g)	10.02	12.115
	最大値 * (μg/g)	11.84	15.515
	最小値 * (μg/g)	7.185	9.505
	範囲 * (μg/g)	4.655	6.01
測定の 差	R の平均 (μg/g)	0.58	0.69
	上部管理限界 (μg/g)	1.89	2.25

*: 出力値

a) 試料 1



b) 試料 2



(機関数 24)

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

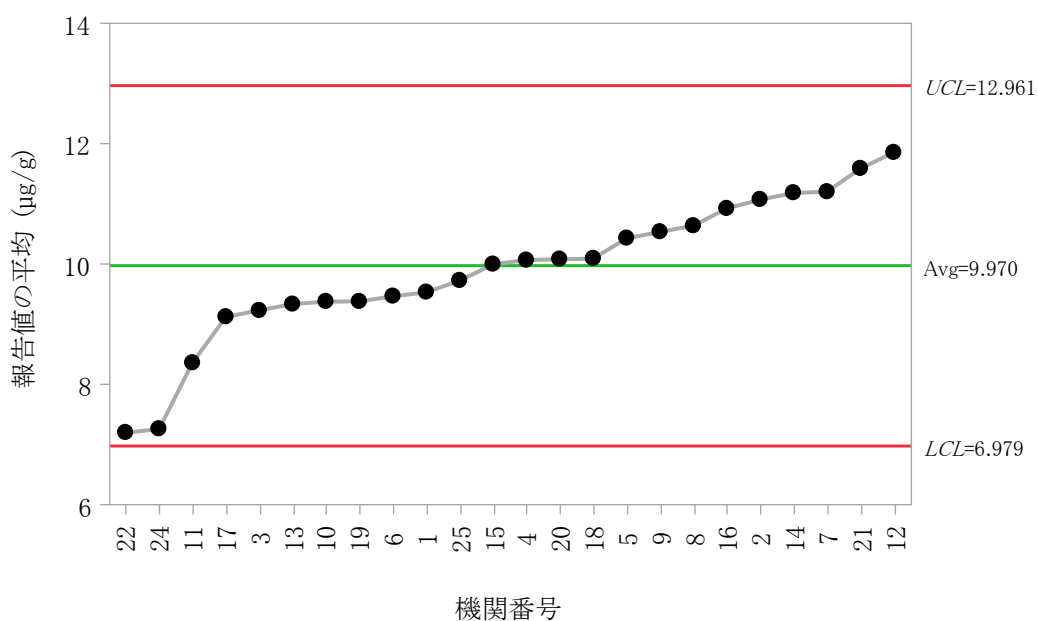
表 8 日本ハムキットによる試料 1 の結果および評価一覧

機関 番号	試料 1 の報告値 ($\mu\text{g/g}$)		$\bar{X}$ 管理図		R 管理図		z -スコア	
	1	2	$\bar{X}$ ($\mu\text{g/g}$)	評価	R ($\mu\text{g/g}$)	評価	z -スコア	評価
22	7.01	7.36	7.185	満足	0.35	満足	-2.509	満足
24	7.21	7.28	7.245	満足	0.07	満足	-2.455	満足
11	7.91	8.78	8.345	満足	0.87	満足	-1.464	満足
17	9.49	8.72	9.105	満足	0.77	満足	-0.779	満足
3	9.39	9.04	9.215	満足	0.35	満足	-0.680	満足
13	9.86	8.78	9.320	満足	1.08	満足	-0.586	満足
10	9.71	9.01	9.360	満足	0.70	満足	-0.550	満足
19	9.69	9.04	9.365	満足	0.65	満足	-0.545	満足
6	9.86	9.04	9.450	満足	0.82	満足	-0.468	満足
1	9.14	9.89	9.515	満足	0.75	満足	-0.410	満足
25	9.48	9.94	9.710	満足	0.46	満足	-0.234	満足
15	9.91	10.05	9.980	満足	0.14	満足	0.009	満足
4	9.64	10.46	10.050	満足	0.82	満足	0.072	満足
20	9.91	10.22	10.065	満足	0.31	満足	0.086	満足
18	10.73	9.42	10.075	満足	1.31	満足	0.095	満足
5	10.70	10.13	10.415	満足	0.57	満足	0.401	満足
9	10.19	10.85	10.520	満足	0.66	満足	0.495	満足
8	11.09	10.15	10.620	満足	0.94	満足	0.586	満足
16	10.65	11.17	10.910	満足	0.52	満足	0.847	満足
2	11.24	10.87	11.055	満足	0.37	満足	0.977	満足
14	10.67	11.66	11.165	満足	0.99	満足	1.077	満足
7	11.27	11.10	11.185	満足	0.17	満足	1.095	満足
21	11.48	11.66	11.570	満足	0.18	満足	1.441	満足
12	11.79	11.89	11.840	満足	0.10	満足	1.685	満足
評価基準								
$\bar{X}$ 管理図		満足: $LCL (6.979) \leq \bar{X} \leq UCL (12.961)$			不満足: $\bar{X} < LCL$ または $UCL < \bar{X}$			
R 管理図		満足: $0 \leq R \leq UCL (1.89)$			不満足: $UCL < R$			
z -スコア		満足: $ z\text{-スコア} < 3$			不満足: $3 \leq z\text{-スコア} $			

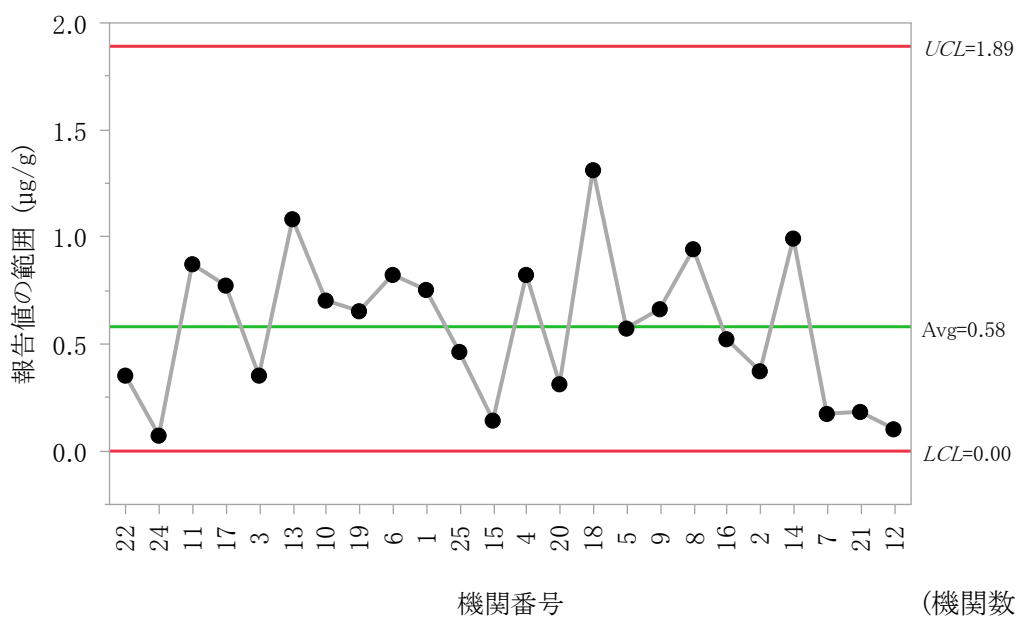
表 9 日本ハムキットによる試料 2 の結果および評価一覧

機関 番号	試料 2 の報告値 ($\mu\text{g/g}$)		$\bar{X}$ 管理図		R 管理図		z -スコア	
	1	2	$\bar{X}$ ($\mu\text{g/g}$)	評価	R ($\mu\text{g/g}$)	評価	z -スコア	評価
24	10.34	8.67	9.505	満足	1.67	満足	-2.051	満足
11	10.09	10.26	10.175	満足	0.17	満足	-1.524	満足
25	10.84	10.46	10.650	満足	0.38	満足	-1.150	満足
10	11.44	10.70	11.070	満足	0.74	満足	-0.819	満足
15	11.22	11.11	11.165	満足	0.11	満足	-0.744	満足
17	10.99	11.36	11.175	満足	0.37	満足	-0.736	満足
13	11.53	11.32	11.425	満足	0.21	満足	-0.539	満足
19	11.99	10.97	11.480	満足	1.02	満足	-0.496	満足
3	12.56	10.57	11.565	満足	1.99	満足	-0.429	満足
1	11.14	12.29	11.715	満足	1.15	満足	-0.311	満足
14	11.53	12.13	11.830	満足	0.60	満足	-0.220	満足
5	11.69	12.41	12.050	満足	0.72	満足	-0.047	満足
6	12.25	12.11	12.180	満足	0.14	満足	0.055	満足
20	11.83	12.57	12.200	満足	0.74	満足	0.071	満足
9	12.03	12.40	12.215	満足	0.37	満足	0.083	満足
4	12.50	12.36	12.430	満足	0.14	満足	0.252	満足
12	12.72	12.37	12.545	満足	0.35	満足	0.343	満足
18	12.13	12.99	12.560	満足	0.86	満足	0.354	満足
8	13.52	12.70	13.110	満足	0.82	満足	0.787	満足
7	12.92	13.67	13.295	満足	0.75	満足	0.933	満足
21	14.15	13.04	13.595	満足	1.11	満足	1.169	満足
16	13.87	14.44	14.155	満足	0.57	満足	1.610	満足
2	14.23	14.79	14.510	満足	0.56	満足	1.890	満足
22	15.97	15.06	15.515	満足	0.91	満足	2.681	満足
評価基準								
$\bar{X}$ 管理図		満足: $LCL(8.477) \leq \bar{X} \leq UCL(15.743)$			不満足: $\bar{X} < LCL$ または $UCL < \bar{X}$			
R 管理図		満足: $0 \leq R \leq UCL(2.25)$			不満足: $UCL < R$			
z -スコア		満足: $ z\text{-スコア} < 3$			不満足: $3 \leq z\text{-スコア} $			

a) $\bar{X}$ 管理図



b) R 管理図



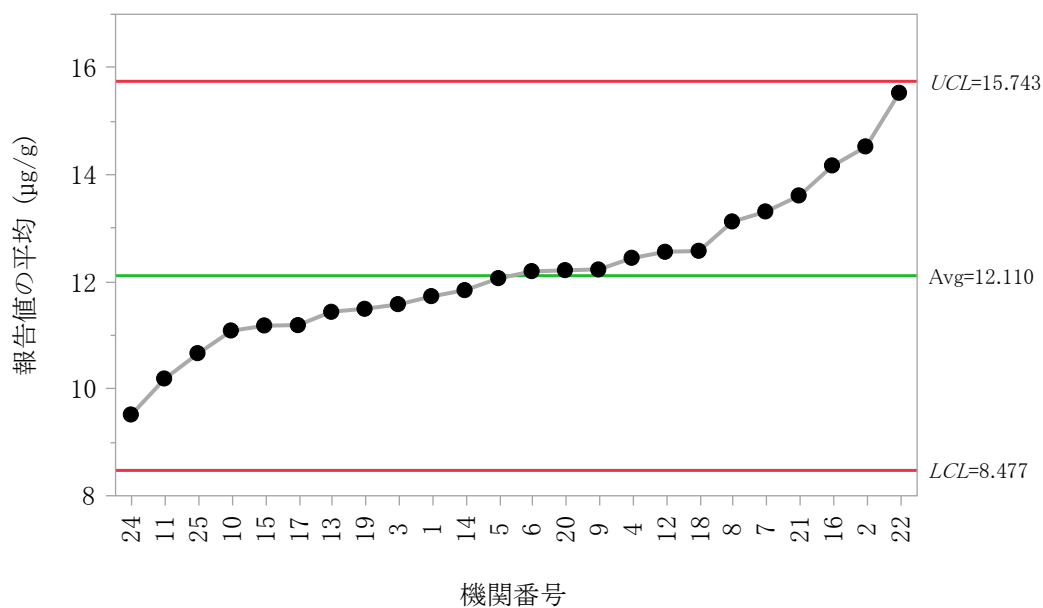
(機関数 24)

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)

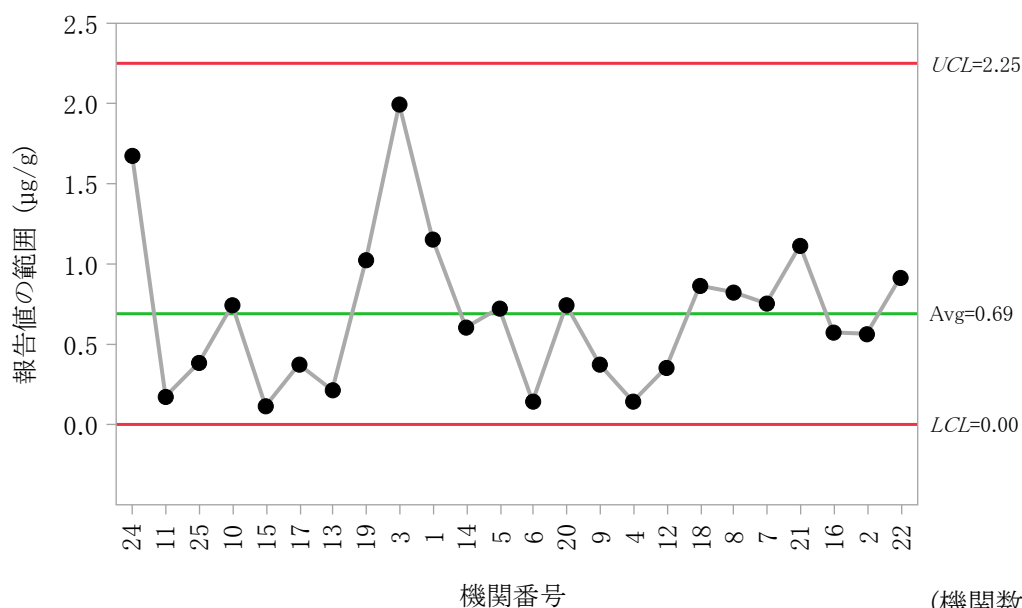
$\bar{X}$ 管理図 (a) の上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (LCL) はロバスト平均 $\pm 30\%$

R 管理図 (b) の UCL および LCL は R の平均値と JIS ハンドブックの係数 $D_4 (=3.267)$ から算出

a) $\bar{X}$ 管理図



b) R 管理図

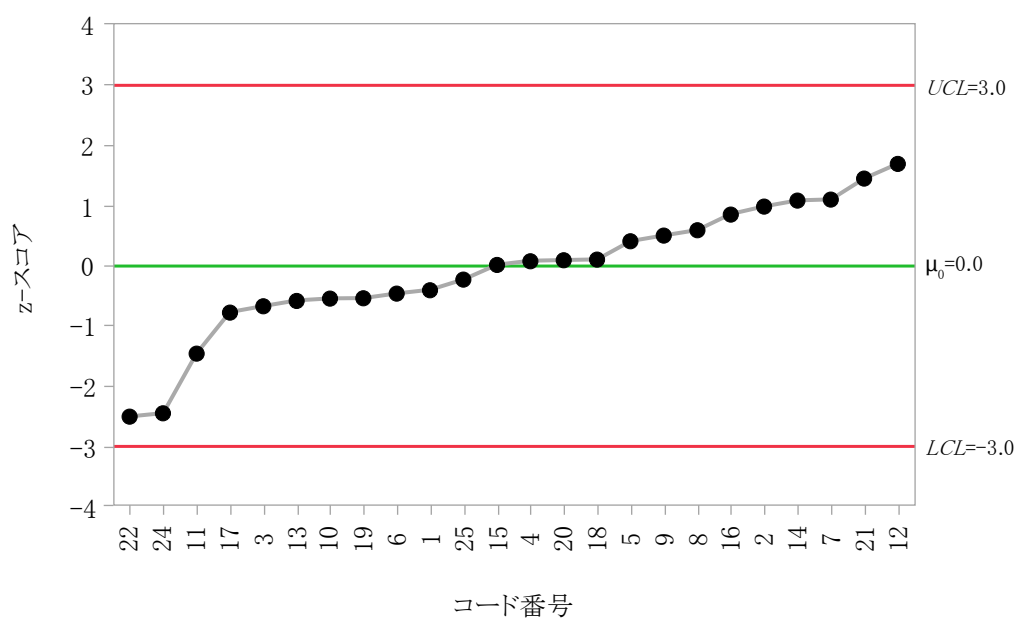


(機関数 24)

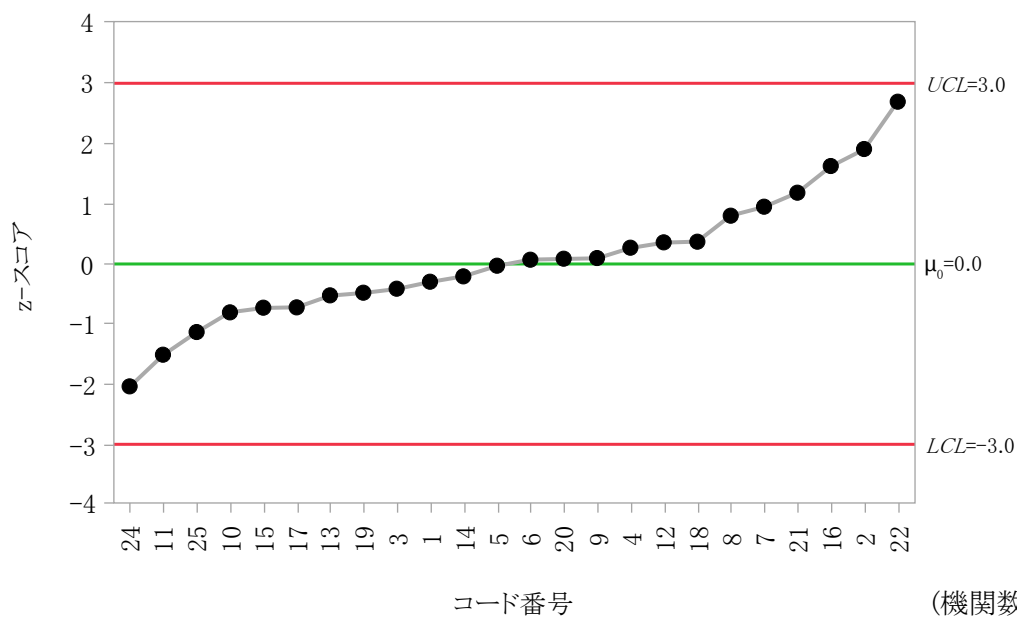
図8 日本ハムキットを用いた試料2の測定結果 ($\bar{X}$ - R 管理図)

$\bar{X}$ 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 $\pm 30\%$
 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



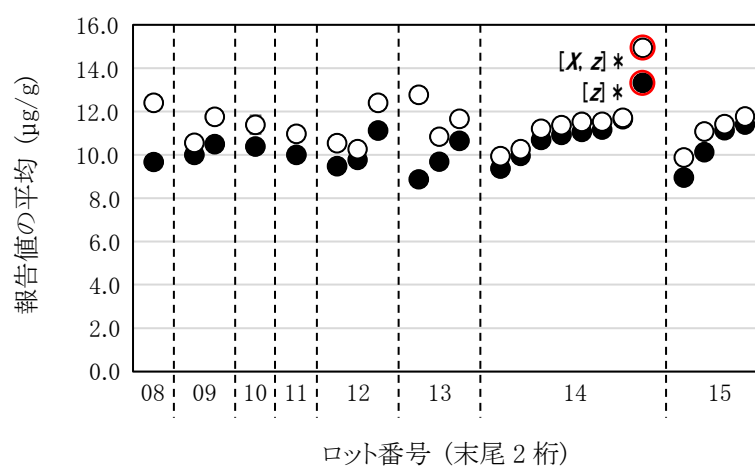
b) 試料 2



(機関数 24)

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

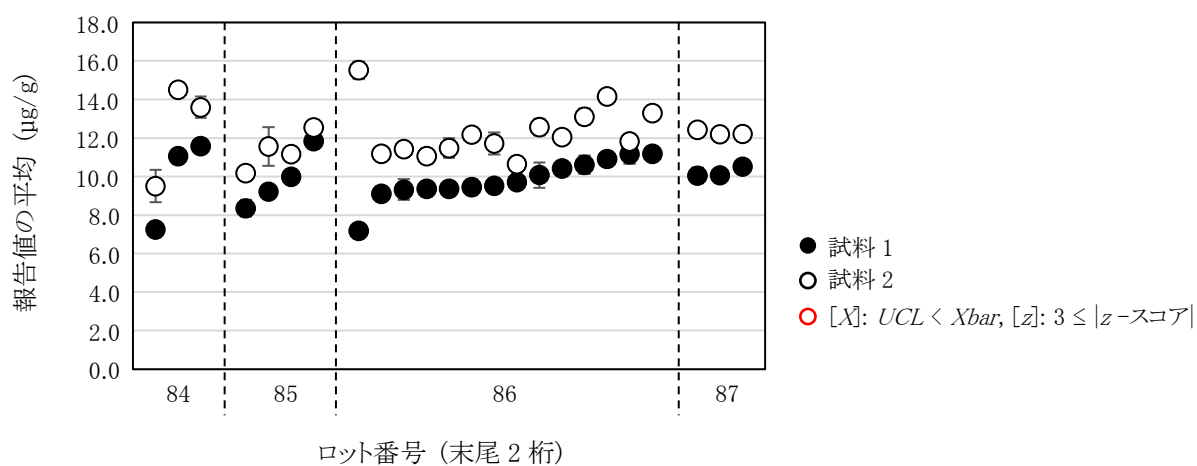


図 10 各キットで得られた報告値のロット間比較

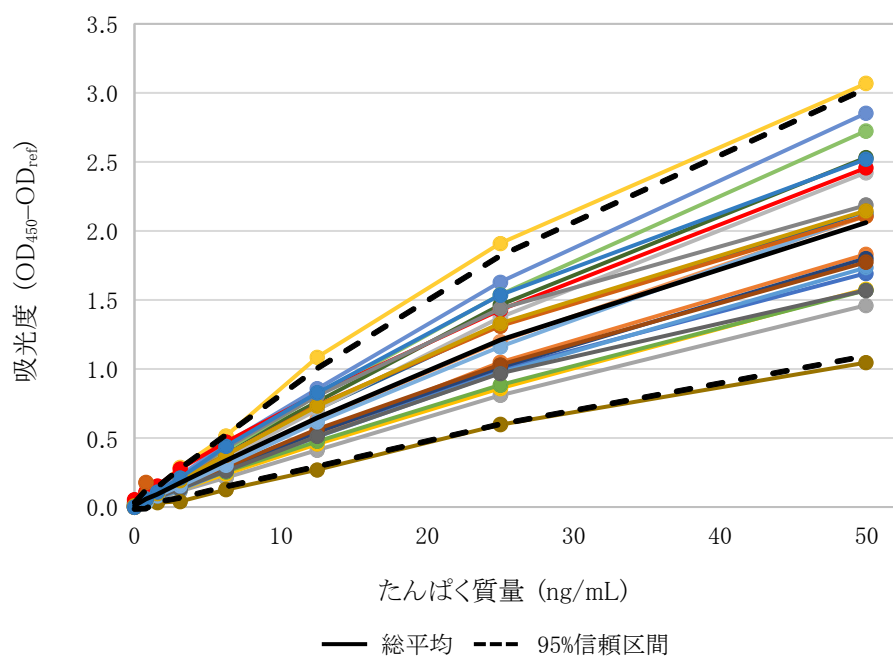


図 11 モリナガキットを用いた測定における検量線 (23 機関)
ロット別検量線は図 13 を参照

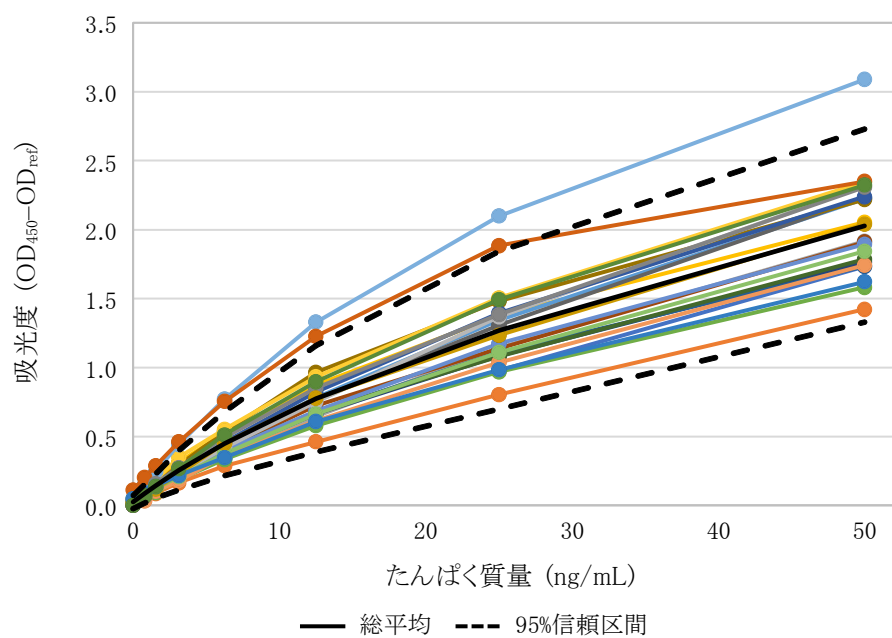


図 12 日本ハムキットを用いた測定における検量線 (24 機関)
ロット別検量線は図 14 を参照

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
23OCSFTM008	2024.10.4	1
23DESFTM009	2024.12.7	2
24JASFTM010	2025.1.25	1
24MASFTM011	2025.3.6	1
24APSFTM012	2025.4.14	3
24MYSFTM013	2025.5.19	3
24JLSFTM014	2025.7.11	8
24AUSFTM015	2025.8.19	4

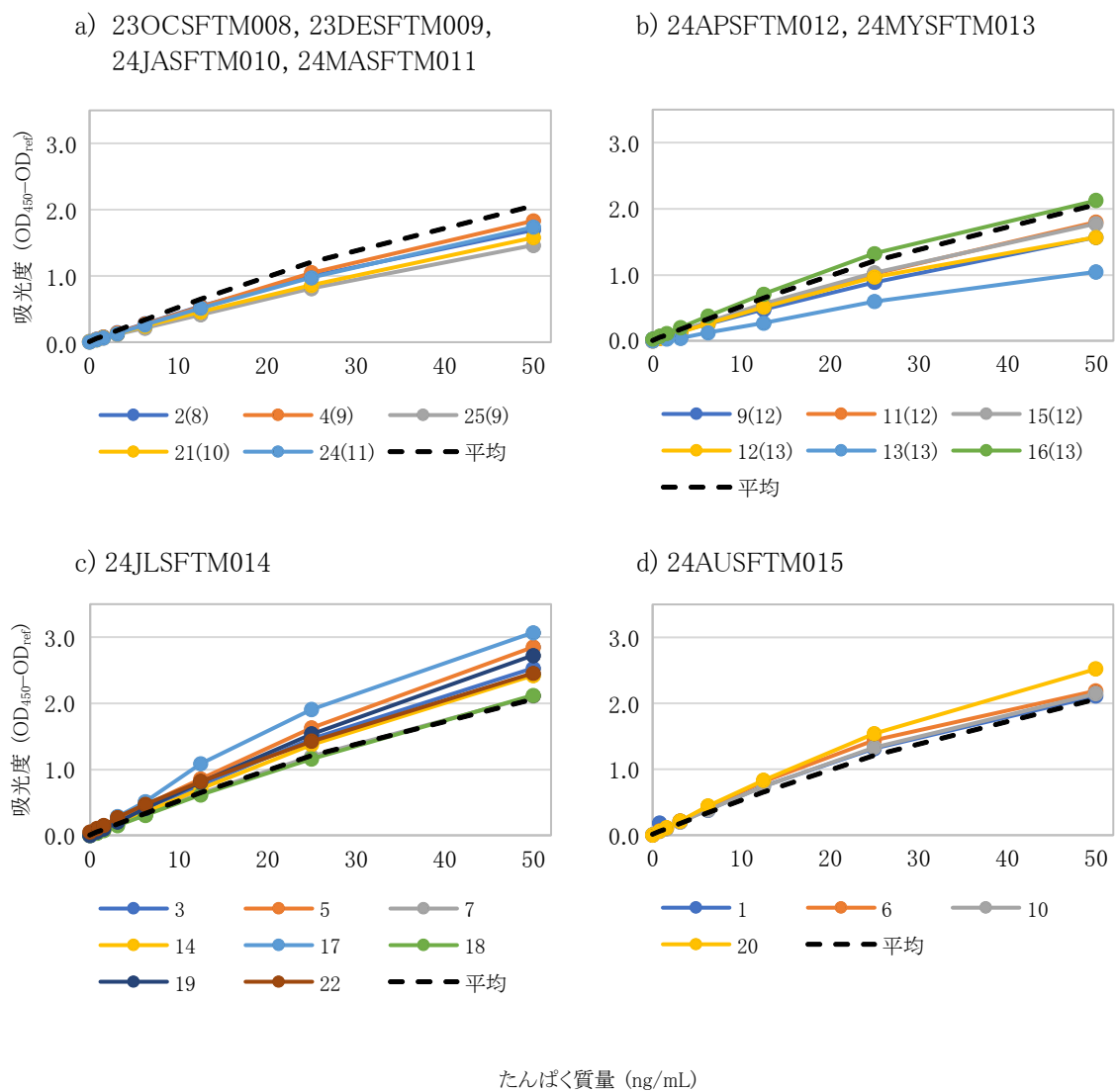


図 13 モリナガキットを用いた測定におけるロット別検量線

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
FKEM2484	2024.12	3
FKEM2485	2025.2	4
FKEM2486	2025.4	14
FKEM2487	2025.6	3

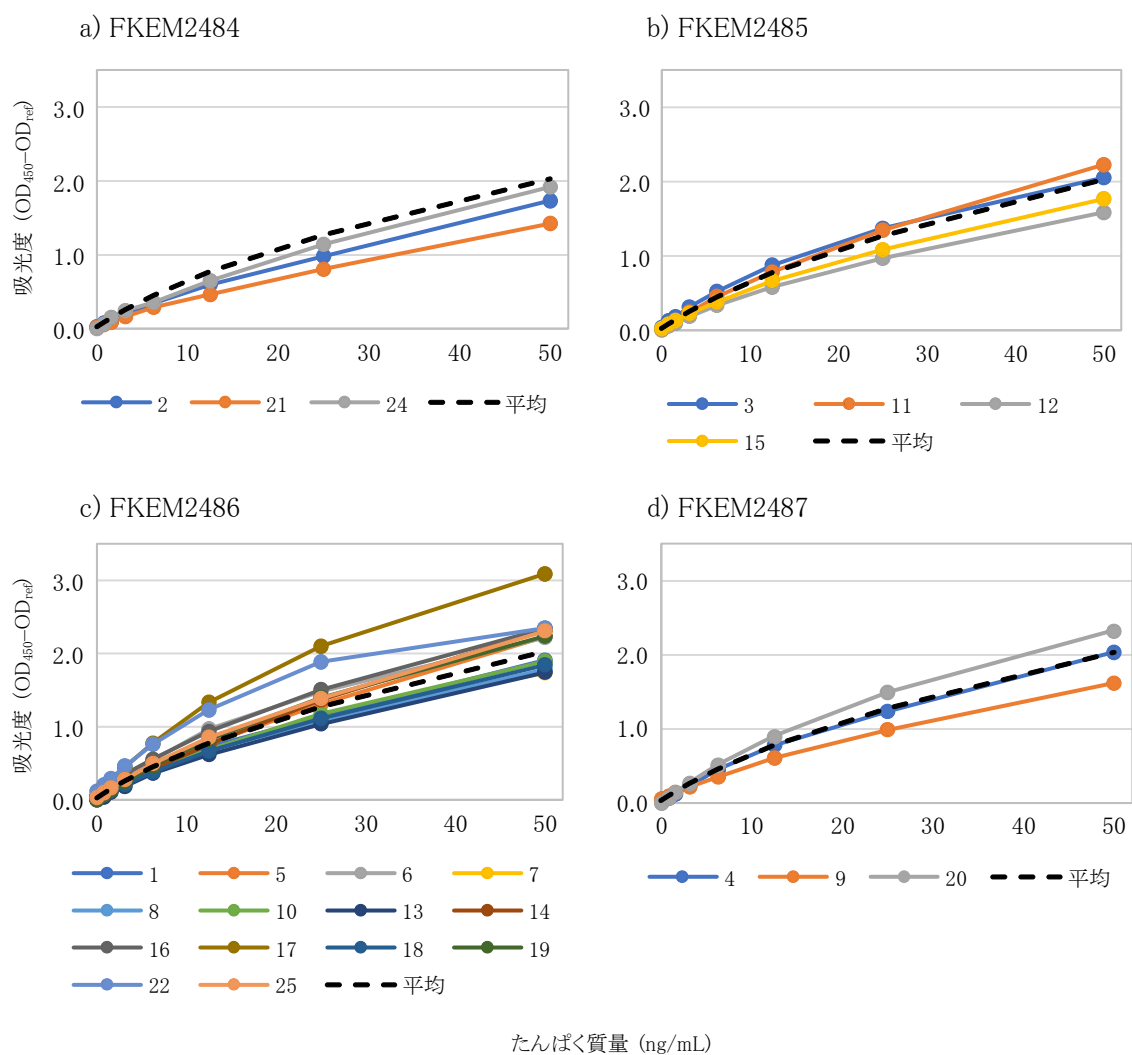
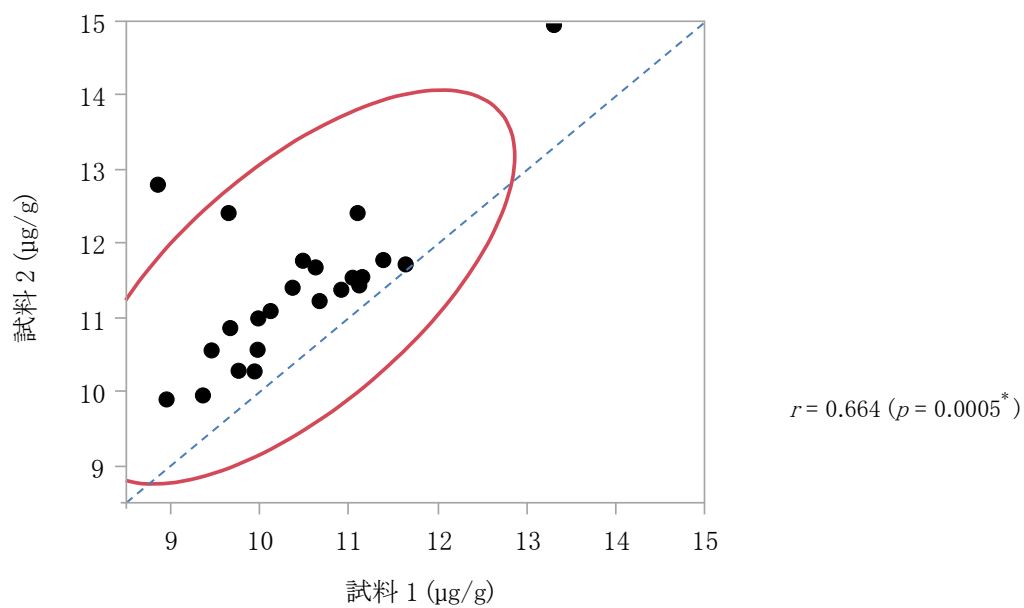


図 14 日本ハムキットを用いた測定におけるロット別検量線

a) モリナガキット (23 機関)



b) 日本ハムキット (24 機関)

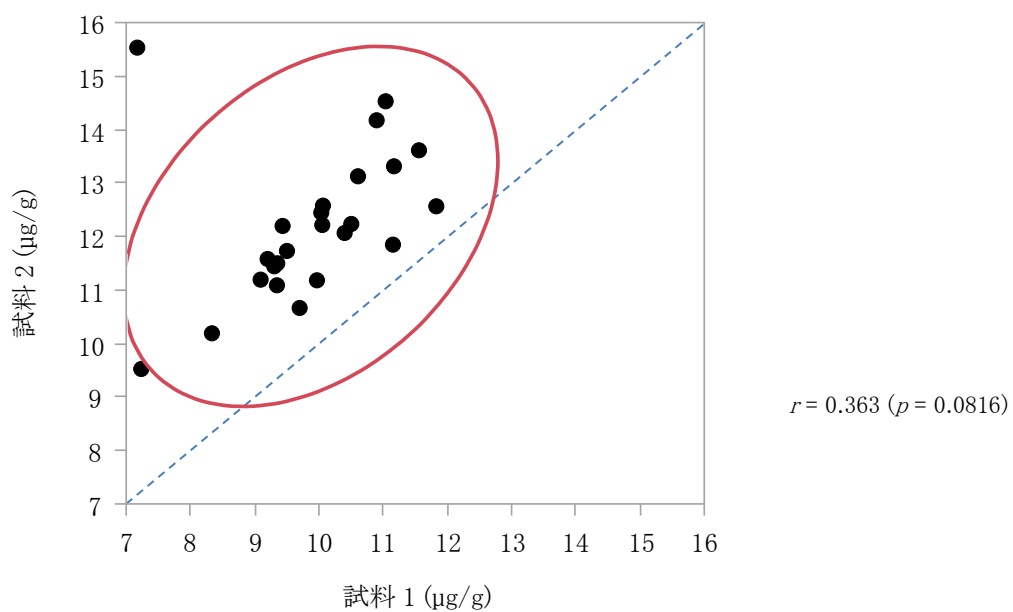
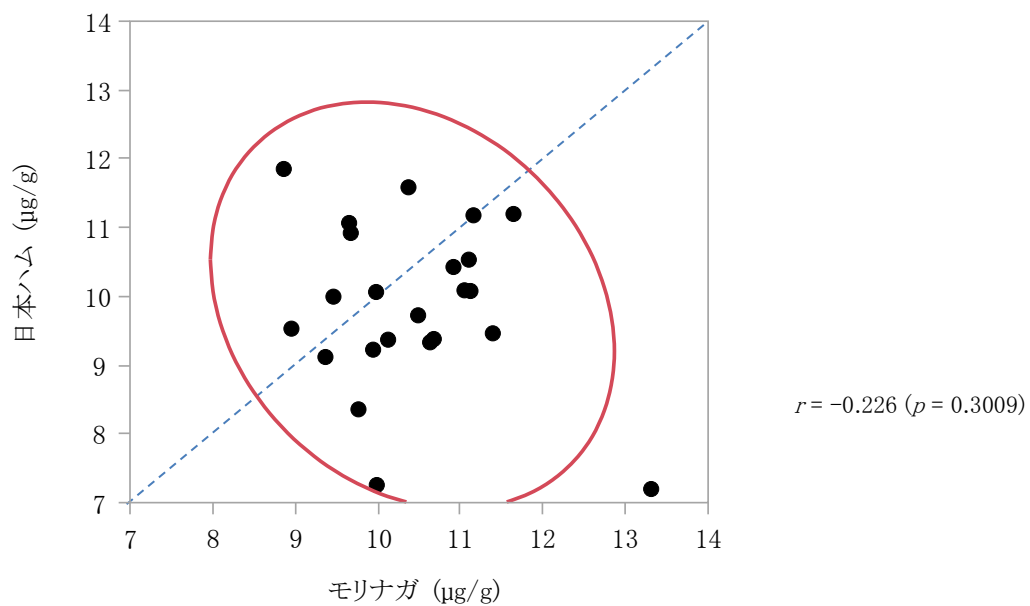


図 15 同一キットにおける試料間の報告値の相関性
図中の楕円は 95 % 確率楕円を示す。点線は $y = x$

a) 試料 1 (23 機関)



b) 試料 2 (23 機関)

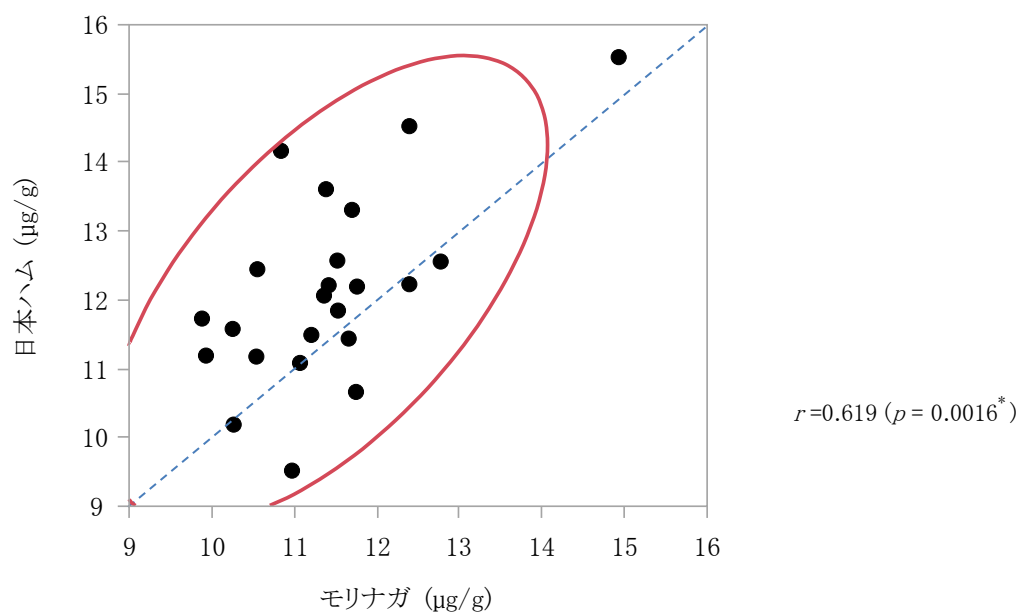


図 16 同一試料におけるキット間の報告値の相関性
図中の楕円は 95 %確率楕円を示す。点線は $y = x$

表 12 2024 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
	10	9	4	6	1	0
抽出方法	振とう	その他				
	24	0				
振とう時間 (h)	12 未満	12 - 16 未満	16 - 20 未満	20 以上		
	0	10	13	1		
振とう速度 (rpm)	90 未満	90 - 110	110 超			
	0	24	0			
ろ過	実施	実施せず				
	15	9				
遠心分離	実施	実施せず				
	24	0				
抽出液等 の希釈操作	手動	自動				
	24	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	シングル ch		
	2	4	14	6	0	0
洗浄方法 ^a	手動	自動				
	12	13				
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
	3	9	4	6	1	1
検量線の 回帰法	4PL ^b	その他				
	24	0				
ピペット校正	年 1 回以上	2-3 年に 1 回程度	不定期	行わない		
	10	4	4	6		
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		
	23	0	0	1		

a 複数回答有

(24 機関)

b 4PL: 4 パラメーターロジスティック

表 13 2024 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（23 機関）、使用ロット数 8 ロット

項目	回答区分				
	1	2	3	4	5
抽出液の 保存期間（日）	0	1	2	3-7	> 7
	19	4	0	0	0
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	0	4	0	0	
試料添加時間 （分）	10 以内	10-20 以内	20-30 以内	30 超	
	16	5	2	0	
操作中の室温 （範囲）	20℃ 未満	20-30℃	30℃ 超		
	0	23	0		

b) 日本ハムキット（24 機関）、使用ロット数 4 ロット

項目	回答区分				
	1	2	3	4	5
抽出液の 保存期間（日）	0	1	2	3-7	> 7
	20	3	1	0	0
抽出液の 保存条件	室温	冷蔵	冷凍(-50℃以上)	冷凍(-50℃未満)	
	0	4	0	0	
試料添加時間 （分）	10 以内	10-20 以内	20-30 以内	30 超	
	16	6	2	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	16	5	3	0

表 14 2023 年度の特定原材料 7 種（卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみ、甲殻類）の検査実績
（種類数）

	特定原材料 7 種中の実施種類数							
	0	1	2	3	4	5	6	7
実施機関数	1	1	1	4	2	3	6	4

(回答 22 機関)

表 15 2023 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	くるみ	甲殻類
ELISA	実施機関 (22 機関)	18	17	18	16	13	4	16
	総試験数 (8565 試験)	2564 (29.9 %)	2405 (28.1 %)	2089 (24.4 %)	404 (4.7 %)	344 (4.0 %)	201 (2.3 %)	558 (6.5 %)
	陽性検出機関 (22 機関)	6	7	4	3	2	1	4
	検出試験数	131	123	123	8	10	4	44
	使用キット (機関) [複数回答]							
	日本ハム	19	17	18	16	13	5	—
	モリナガ	19	17	18	15	12	4	—
	プリマハム	1	0	0	0	0	—	—
	島津*	—	—	—	—	—	0	16
	マルハ	—	—	—	—	—	—	16
確認試験	実施機関 (22 機関)	2	0	3	0	1	0	2
	総試験数	2	0	4	0	1	0	2
	陽性検出機関 (22 機関)	2	0	1	0	0	0	2
	検出試験数	2	0	1	0	0	0	2

* 旧ニッスイ

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

青森県衛生研究所
宮城県保健環境センター
千葉県衛生研究所
さいたま市健康科学研究センター 生活科学課
長野県環境保全研究所
静岡県環境衛生科学研究所
愛知県衛生研究所
豊田市保健所
滋賀県衛生科学センター
三重県保健環境研究所
京都府保健環境研究所
京都市衛生環境研究所
神戸市健康科学研究所
香川県環境保健研究センター
高知県衛生環境研究所
山口県環境保健センター
福岡市保健環境研究所
佐賀県衛生薬業センター
公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所
一般財団法人 食品環境検査協会 東京事業所
一般財団法人 食品分析開発センターSUNATEC
名古屋製酪株式会社開発本部バイオ開発室
日東ベスト株式会社
ユーロフィン・フード・テストイング株式会社

令和6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
ーサルモネラ属菌検査用調査試料の開発(4)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50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、H₂S非産生サルモネラ属菌2菌株およびサルモネラ陰性菌1菌株の計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2023年度の厚生労働科学研究費補助金にて実施したパイロットスタディに使用した1菌株と、別途スクリーニング試験でクエン酸利用能試験の反応が比較的わかりやすい1菌株を選択、採用した。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。参加した50機関のうち、35機関が正しく判定した。14機関がNo. 1を陰性と誤判定、1機関がNo. 2を陰性と誤判定、1機関がNo. 3を陽性と誤判定した。さらに3種とも陰性、3種とも陽性と判定した機関がそれぞれ1機関、3種とも誤判定した機関はなかった。本調査研究においてTSI培地でガス産生が認められないことを理由に陰性と判定した機関が一定数存在していた。これらの機関においては硫化水素非産生サルモネラ属菌を検出できないリスクを含んでいる可能性が示唆された。食品衛生上の硫化水素非産生サルモネラ属菌が原因となる事故割合は不明であるが、公定法の求める水準に対し、サルモネラ属菌検査に対する知見が不足している検査機関が想定より多いことが懸念される結果となった。

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 2023 年度の結果をもとに採用菌株を一部変更して 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。

B. 方法

1. 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*Salmonella* sp. HIC 240414、②*Salmonella* sp. HIC 240430、③*Morganella morganii* HIC 240415を用いた。①②はH₂S非産生株（サルモネラ属菌陽性）、③はサルモネラ陰性株である。

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、富士フイルム和光純薬）

- ・Tween 80（東京化成工業）
- ・0.04w/v% フェノールレッド溶液
（富士フイルム和光純薬）
- ・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）
（富士フイルム和光純薬）（TTBに添加）
- ・よう素（試薬特級）
（富士フイルム和光純薬）（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 [ESⅡA]
（栄研化学）
- ・chromID *Salmonella* agar [SM2A]
（バイオメリュウ）
- ・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)
- ・ SC培地 (島津ダイアグノスティクス)
- ・ SC培地 (極東製薬)

2. 使用機器

調査試料、培地等の滅菌にはオートクレーブを使用した。試験操作は安全キャビネット内で行い、培養には恒温槽または恒温水槽を使用した。

3. 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DHLLA、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) およびSC培地に供し、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. 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. 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し、保存中の温度変化を考慮して行う参考情報とした。

2) 生菌数測定

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

3) 定性試験

全工程で公定法に記載された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14、28日後に行った。

6. 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. パイロットスタディ（室間共同試験）

50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2024年12月20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。

C. D. 研究結果および考察

1. 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 9.8×10^3 、 7.5×10^3 、 9.9×10^3 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添加菌③以外は28日目まで生菌数を算出できた。定性試験においては添加菌①②が陽性（H₂S 産生+、O 血清群別試験結果①09 群、②07 群）、添加菌③が陰性と判

定されたことから、添加菌濃度を調整することで添加 28 日後でも定性試験は確実に実施可能と判断し、調査試料の品質に影響は生じないと評価した（図 3、表 1）。

2. 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 9.9×10^3 、 6.2×10^3 、 2.8×10^5 cfu/g であった。また、定性試験でも分離培地などで増殖能に若干の差があったものの、性能評価と同様の判定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 5.4×10^3 、 4.6×10^3 、 1.8×10^2 cfu/g であった。①、②は均質性確認時と同等、③は均質性確認時の 1/100 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判定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. パイロットスタディ（室間共同試験）

対象とした全 50 機関から結果を回収した。結果は表 4 に、経過記録書の集計結果は表 5 および表 6 に示した。また、アンケート結果を表 7 に示した。

1) 定性試験

50 機関が参加し、35 機関が正しく判定した。14 機関が No. 1 を陰性と誤判定、1 機関が No. 2 を陰性と誤判定、1 機関が No. 3

を陽性と誤判定した。さらに 3 種とも陰性、3 種とも陽性と判定した機関がそれぞれ 1 機関、3 種とも誤判定した機関はなかった。

2) 経過記録書の集計結果

採用された培地等に関する度数を表 5、表 6 に示した。なお、今回の調査では、緩衝ペプトン水（前増菌培地）、ラパポート・バシリアデイス培地/テトラチオン酸塩培地の組み合わせ（増菌培地）、DHL 寒天培地/クロモアガーサルモネラの組み合わせ（分離培地）、TSI 培地/LIM 培地の組み合わせ（確認用培地）、O 血清群別試験、生化学的性状試験（オキシダーゼ試験、クエン酸利用能確認試験、VP 試験、ONPG 試験の 4 種；簡易同定キットによる確認を含む）を採用する検査機関が多く、推定を含め 17 機関がこの工程および培地で実施した。

このほか、硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地として MLCB 寒天培地、硫化水素の産生によらない分離培地として ES サルモネラ寒天培地Ⅱ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 33 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 17 機関のうち 13 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 菌種とも陽性と判定した 1 機関は、侵入性因子関連遺伝子 *invA* の検出陽性を理由にサルモネラ属菌であることを判定していた。当財団では、当該試験の実績がないため確証はないが、No. 3 はコンタミネーションによる誤判定の可能性が高いと考えられる。

3 菌種とも陰性と判定した 1 機関は、緩衝ペプトン水（増菌培地）、ラパポート・バシリアディス培地/テトラチオン酸塩培地の組み合わせ（増菌培地）、MLCB 培地/ブリリアントグリーン寒天培地の組み合わせ（分離培地）、TSI 培地/LIM 培地の組み合わせ（確認用培地）の工程で試験を実施し、各試験結果は他の参加検査機関と大きな差は認められなかったが、通常サルモネラ属菌の定型反応ではないことを理由に陰性と判定していた。当該検査機関の判定基準では、硫化水素非産生性のサルモネラ属菌の検出は困難であると考えられる。

本調査研究において TSI 培地でガス産生が認められないことを理由に陰性と判定した機関が一定数存在していた。これらの機関においては硫化水素非産生サルモネラ属菌を検出できないリスクを含んでいる可能性が示唆された。食品衛生上の硫化水素非産生サルモネラ属菌が原因となる事故割合は不明であるが、公定法の求める水準に対し、サルモネラ属菌検査に対する知見が不足している検査機関が想定より多いことが懸念される結果となった。

また、0 血清群別試験を実施した機関のうち 1 機関は No. 1 を 07 群、No. 2 を 09 群と報告しており、最終判定では陽性/陰性の誤判定はなかったが、検体の取り違いやラベルミスなどの誤操作が発生していた可能性が示唆された。

0 血清群別試験を実施し、正誤を問わず 0 群別結果が得られた機関のうち、2 機関が No. 1 を陰性と誤答していた。2 機関とも確認用培地（TSI 培地/LIM 培地）などの

結果からサルモネラ属菌陰性と判定していたが、「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌 及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」（平成 27 年 7 月 29 日、食安発 0729 第 4 号）に記載の通り、0 血清群別試験にて凝集が認められたものは陽性と判定したほうがよいと考えられる。

本調査研究では、硫化水素非産生サルモネラ属菌 2 菌株（No. 1 および No. 2）、サルモネラ以外の 1 菌株（No. 3）を採用した。なお No. 2 は 2023 年度の調査研究でも採用した菌株である。No. 1 は当財団においてクエン酸利用能を判定しやすい硫化水素非産生サルモネラ属菌株をスクリーニングして採用した。しかし、当財団の事前試験において No. 1 は No. 2 より途中工程の選択寒天培地に対する増殖が弱いことを確認しており、本調査研究においても No. 1 を誤判定した機関が全体の約 3 割であったため、実運用に適さないことを裏付ける結果となった。

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、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」

「陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい」を合わせると 94%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。

E. 結論

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では、50機関中15機関（全体の30%）が何らかの理由で誤判定した。特に添加菌①については誤答率が高く、調査試料には適さないと考えられたが、添加菌②③は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。ただし、一部の機関の操作手順では、O血清群別試験の結果でサルモネラ陽性を示しても生化学的性状試験で定型反応を示さない場合に陰性と判定することとなっている。これが見直されない限り、H₂S非産生サルモネラを用いた外部精度管理を実施した場合にこれらの機関は正答できない可能性が高い。

なお、判定基準に関しては公定法の記載順にも誤解を招く要因があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 硫化水素非産生株を用いたサルモネラ属菌検査の技能試験プログラム開発：

梶原三智香、中阪聡亮、堀田実和、高坂典子、渡辺卓穂（第120回日本食品衛生学会学術大会 2024. 11. 7～2024. 11. 8）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

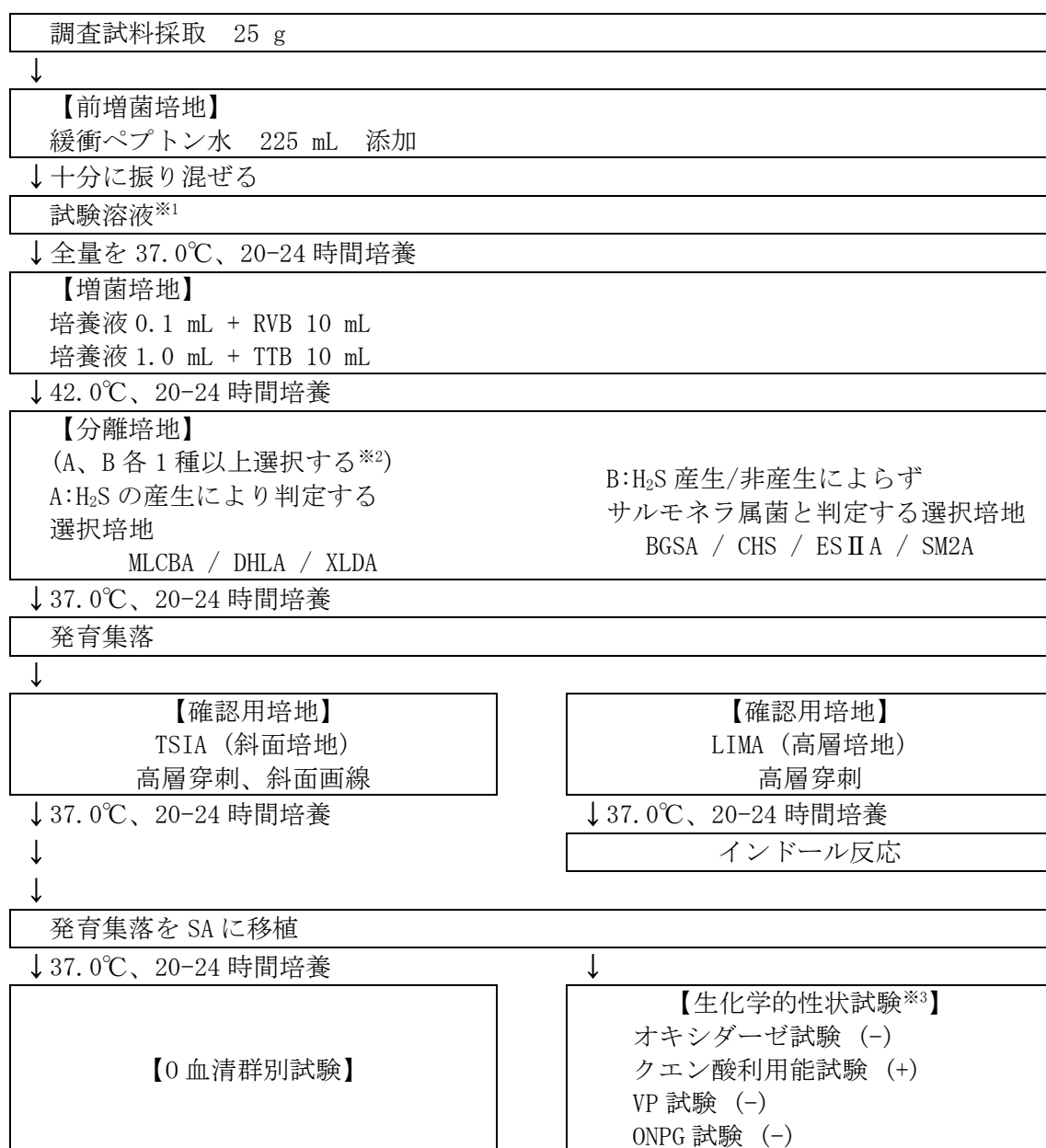
なし

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で混釈平板培地にした後、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： 性能評価以外はXLDA、ESⅡAのみを使用した。

※³： API 20Eを用いて実施した。クエン酸利用能試験はSC培地（37.0℃、24時間培養）を併用した。

図1 サルモネラ属菌検査 試験手順

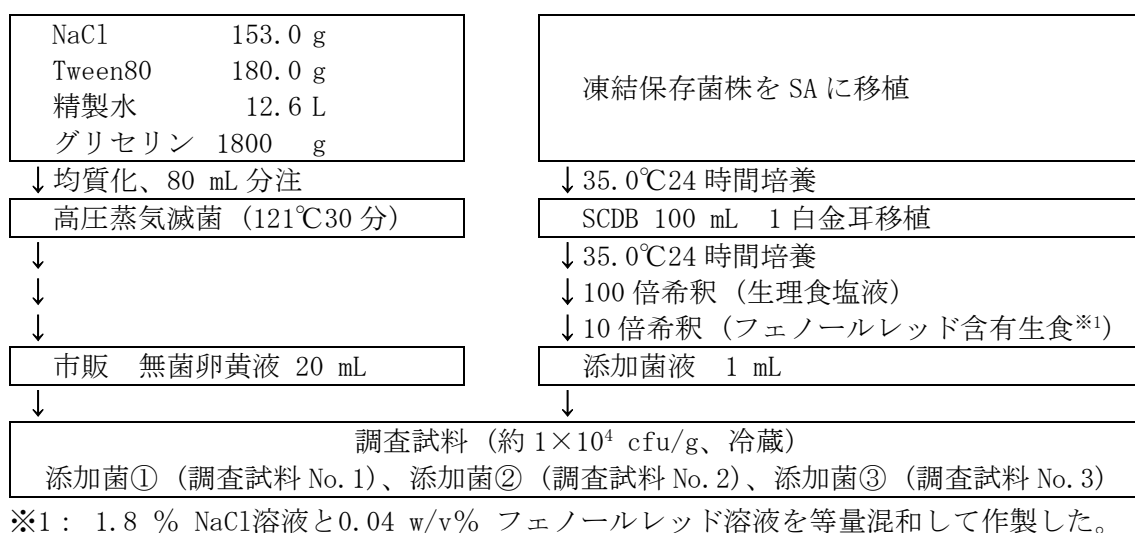


図2 サルモネラ属菌検査 調査試料作製手順

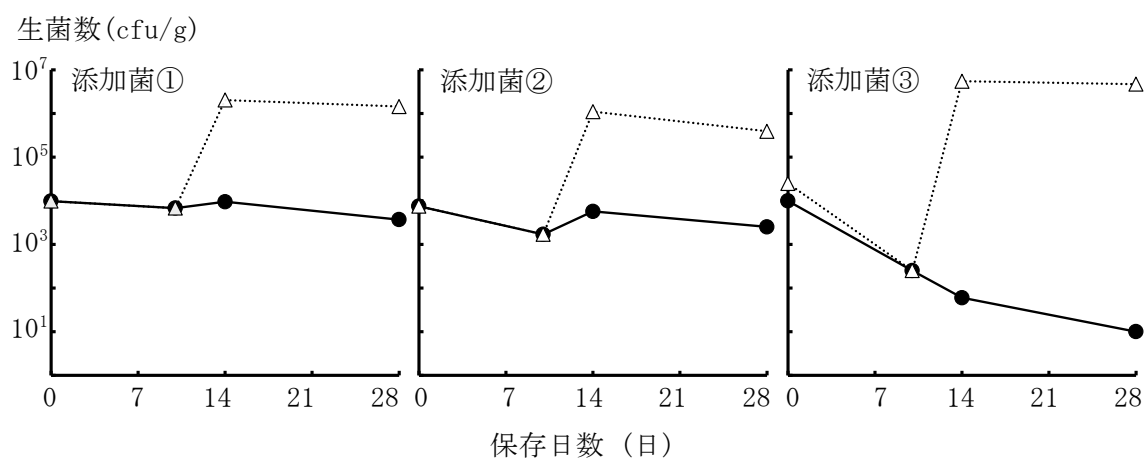


図3 性能評価 調査試料の生菌数の挙動

(●: 冷蔵試料、△: 常温試料)

表1 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	1.2×10^6	4.7×10^5	8.4×10^5
A：冷蔵試料			
0（添加直後）	9.8×10^3	7.5×10^3	9.9×10^3
10	6.8×10^3	1.7×10^3	2.5×10^2
14	9.5×10^3	5.7×10^3	6.0×10^1
28	3.7×10^3	2.5×10^3	<10
B：常温試料			
14	2.0×10^6	1.1×10^6	5.5×10^6
28	1.4×10^6	3.9×10^6	4.7×10^6
定性試験判定 (0血清群別試験結果)	陽性 (H ₂ S産生-) (09群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)	陰性 (該当なし)

生菌数の単位：cfu/g

定性試験は冷蔵試料の保存 0、14、28 日目の試料について実施し、添加菌ごとに全て同じ判定結果となった。

表2 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	1.1×10^6	9.7×10^5	6.5×10^7
Sample1	1.0×10^4	6.9×10^3	3.0×10^5
Sample2	1.0×10^4	5.2×10^3	2.6×10^5
Sample3	1.1×10^4	6.6×10^3	2.2×10^5
Sample4	9.3×10^3	6.8×10^3	2.2×10^5
Sample5	9.2×10^3	5.3×10^3	3.9×10^5
生菌数平均値（添加濃度）	9.9×10^3	6.2×10^3	2.8×10^5
定性試験判定 (0血清群別試験結果)	陽性 (H ₂ S産生-) (09群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)	陰性 (該当なし)
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判定結果となった。

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 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	5.4×10^3	4.6×10^3	1.8×10^2
定性試験判定 (0血清群別試験結果)	陽性 (H ₂ S産生-) (09群)	陽性 (H ₂ S産生-) (07群)	陰性 (該当なし)
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判定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 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	サルモネラ属菌陽性	36	14	72%
添加菌②	サルモネラ属菌陽性	49	1	98%
添加菌③	サルモネラ属菌陰性	49	1	98%

表5 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		10		11		15		
試料採取量	1 g		10 g		25 g				
	1		1		48				
前増菌培地*	実施せず		EEMブイヨン		mTSB（変法トリプトンソイブロス）		緩衝ペプトン水		
	1		1		1		47		
増菌培地*	実施せず		テトラチオン酸塩培地		ラバポート・バシリアディス培地		その他		
	1		48		47		2		
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
	28	16	5	10	5	33	1	1	2
確認用培地*	実施せず		TSIA		LIMA		その他		
	2		48		47		4		
0血清群別試験	実施	実施せず							
	44	6							
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		
	10	40	33	32	25	21	4		
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	
	17	7	17	0	1	2	5	3	

※：複数回答あり

表6 0血清群別試験結果の集計結果（44機関実施、複数回答あり）

添加菌	正答	陰性判別不能	0多価	04群	06群	07群	09群	その他
添加菌①	09群	9	24	0	0	1	31	1
添加菌②	07群	1	28	1	0	38	1	
添加菌③	該当なし	42	0	0	1	0	0	2※

※：未実施

表7-1 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	26	(52%)
陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい	21	(42%)
H ₂ S非産生菌は採用しないほしい	3	(6%)

表7-2 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）

「Q15. 検査結果判定の根拠」の補足…試料No. 1について0血清群別試験で09群（+）でしたが、TSI、LIMにて非定型反応が3項目でみられたため、今回陰性と判定しました。
試料1は2と比較し、DHL寒天培地及びクロモアガーサルモネラに生えた集落は小さく、発育が弱いと感じた。
この調査へ初参加できた。判定に苦慮したが検査技術向上に役立ったので参加機会を広げて欲しい。
硫化水素非産生のサルモネラは普段あまり扱うことがなく、今回は大変勉強になりました。しかし、当所において外部精度管理は経験年数の浅い職員がサルモネラの検査を学習する機会でもあるため、試料が2種類の場合は硫化水素を産生する定型的な菌を使用していただきたいです。
試料No. 2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。
「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について（平成27年7月29日食安発0729第4号）」において「サルモネラ属菌は…クエン酸利用能陽性、…である」との記述があるが、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。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苦慮している。
試料NO. 1について。陰性としたが、自己学習のためTSI寒天培地とLIM培地以外の生化学的性状試験を行ったところ、定型的なサルモネラ属菌の性状を示し、0血清型別で09群に凝集が認められ、市販の同定用キットでもサルモネラ属菌の可能性が示された。以上から、試料NO. 1もサルモネラ属菌である可能性があるが、本市では非定型の性状を2つ以上示した場合を陰性と判定することとしているので、陰性と判定した。
試料NO. 2について。運動性及びクエン酸利用能が弱く判定に苦慮した。クエン酸利用能については複数釣菌したうち24時間以内に陽性となったのは一部であった。サルモネラ属菌は、定型的性状から2個以上外れることは稀であるとされているため、精度管理で使用する株は、1つの非定型性状以外は明らかに定型的な性状であることが望ましい。
今回のNo. 1、No. 2のように生化学的性状が硫化水素産生性以外の性状においても定型外の株は判断が難しくなるため避けた方がよいと思います。
リジン（－）株も含めて欲しい。
硫化水素非産生菌の試験の機会をいただき大変勉強になりました。硫化水素非産生菌は現在国内での検出例は少ないと聞いていますが、報告書等に検出状況のデータを参考までに入れていただけると助かります。
今回の試料は判断が非常に難しかったが勉強になりました。報告書を楽しみにしています。

令和6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。本研究では、厚生労働省から通知された試験法とは異なる試験法の開発を行ってきた。本年度は、昨年度までに報告した抽出操作及び固相精製操作における課題について追加検討した。その結果、試料採取量を変更することで、これらの課題について改善することが可能であった。さらに、HPLC 測定感度を向上させるため、固相精製後の溶出液全量を誘導体化することで、HPLC 測定におけるピーク面積は、昨年度と比較して約5倍に増大した。検討した試験法について、試料としてブルーベリージャム、りんごゼリー、オレンジジュース及びビスケットを用い、5 併行の添加回収試験を実施した結果、真度は 93.2～103.9%、併行精度は 0.3～4.3(RSD%)と良好であった。

動物用医薬品については、食品マトリクスとの結合が強い薬剤や物理化学的な性質が異なる様々な薬剤があるため、一斉分析では十分な真度が得られないことがある。そこで、頑健性の高い動物用医薬品の試験法を開発するため、LC-MS/MS を用いた動物用医薬品の試験法の LC-MS/MS 条件及び前処理法について検討した。最近報告された三層分離抽出法は、ギ酸酸性条件下で抽出を行うため、ベンジルペニシリンやエリスロマイシン等の酸性条件下にて分解しやすい動物用医薬品の真度が低いという課題があった。本年度は、酸性条件下で分解しやすい動物用医薬品の真度を向上させることを目的として、抽出時におけるギ酸添加及び抽出液への pH 緩衝液の添加について検討した。検討した試験法について、試料として鶏肉ペーストを用い、5 併行で添加回収試験を実施した結果、測定対象成分 129 成分中 97 成分が真度 70～120%及び併行精度（RSD%）15 未満を満たした。ベンジルペニシリンやエリスロマイシンの真度は約 50%と検討前に比べ大幅に改善されたが、引き続き試験法の改良が必要と考える。

I. 食品添加物試験法の開発に関する検討

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6年度は複数の検疫所での検査において中華菓子、もものシロップ漬け乾燥マンゴー等からCY類が検出されている¹⁾。

CY類の検査法については、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。

本研究では、児島らのCYをシクロヘキシルアミン（以下「CA」という。）に分解し、キンヒドロロンで呈色させ定量する分析法²⁾に基づき、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。）を開発した。即ち、試料から抽出したCYを塩酸と過酸化水素でCA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（以下「BC」という。）と反応させ*N*-シクロヘキシルベンズアミド（以下「*N*-CBA」という。）に誘導体化した後、測定する方法である。

本年度は、本法について試験溶液の調製過程における水抽出操作及び固相精製操

作における課題の改善とHPLC測定感度の向上を図るべく検討を実施した。

B. 方法

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、りんごゼリー及びビスケットの加工食品4種を用いた。

2. 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 vol%）：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）

逆相固相ミニカラム：Sep-Pak Plus tC18 Environmental Cartridges（Waters製）

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

3. 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。

4. 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)

減圧機：ULBAC MDA-006

ロータリーエバポレーター：Vacuum Pump V-700、Vacuum Controller V-850、Rotavapor R-210及びHeating Bath B-491 (BUCHI製)

分析機器：1260 Infinity 2 (Agilent製)

5. HPLC分析条件

移動相：アセトニトリル及び水 (3:2) 混液

カラム温度：40℃

カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18

4.6mm×25 cm (5 µm) (Agilent製)

流速：1.0 mL/分

注入量：20 µL

測定波長：230 nm

6. 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。

7. 試験溶液の調製法

通知試験法及び新規分析法における試験溶液の調製法の概略を図1及び図2に示す。新規分析法における試験溶液の調製法は下記のとおりである。

試料5 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、抽出液とした。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 Plus tC18 Environmental Cartridges (メタノール10 mL及び水10 mLの順に通過させコンディショニングしたもの) 及び Sep-Pak Vac Accell QMA (500 mg/6 cc) (メタノール10 mL、(1→100) 塩酸 10mL 及び水10 mLの順に通過させコンディショニングしたもの) をこの順番に接続し、負荷した。負荷液を捨てた後、水 10 mLで洗浄した。Sep-Pak Plus tC18 Environmental Cartridges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、溶出液とした。

溶出液全量に12 mol/L塩酸 2 mL及び30 vol%過酸化水素水0.25 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5 g、10 mol/L水酸化ナトリウム溶液3 mL及びアセトニトリル15 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分取した後、下層に再度アセトニトリル15 mLを加え、1分間振とうし、3,500 rpm、5分間遠心分離した。このアセトニトリル層を先のアセトニトリル層とあわせ、0.1 vol%トリエチルアミン含有アセトニトリル 0.3 mL及び1 vol%塩化ベンゾイル含有アセトニ

トリル 0.1 mLを加え混和し、これをロータリーエバポレーターで減圧乾固した。ここにアセトニトリル及び水 (3:2) 混液を加え、5 mLに定容したものを試験溶液とした。

8. 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、りんごゼリー及びビスケットの4食品に添加し、5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. 昨年度の試験溶液調製法からの変更点

(1) 試料採取量の調整による水抽出操作及び固相精製操作の改善

昨年度までの検討において、試験溶液の調製操作における課題として、以下の2点を報告している。

1点目は抽出操作における課題である。本研究では通知試験法を参考に、水を加え加熱することで試料中のCYを抽出させる方法を採用している。しかし、これまでの検討において、ビスケットなどの食品を試料とした場合、加熱操作中に試料が団子状になることで、試料中のCYが水中に十分抽出されず、添加回収試験における真度の低下が認められた。この問題への対策として、

加熱中にガラス棒等で攪拌する方法が有効であったが、一部のビスケットでは抽出液の粘度が高く、攪拌に労力を要したり、攪拌を続けてもダマが生じるケースもあった。また、別の対策として、加熱後にホモジナイザーを用いて抽出液を均一化する操作も有効であることが確認された。

2点目は、固相精製操作における課題である。本研究では、固相精製する場合、真空マニホールドを用い、吸引しながら上澄液を固相ミニカラムへ負荷する方法(以下「吸引方式」という。)で行っている。しかし、これまでの検討において、ビスケットやチョコレートといった食品を試料とした場合、逆相固相ミニカラムの目詰まりが生じてしまい、溶出が困難となる事例が確認された。この問題への対策として、抽出液の上澄液を希釈してから固相精製する方法が有効であった。また、一部の試料では、吸引方式で目詰まりした場合でも、シリンジポンプを用いて手動で加圧する方法(以下「加圧方式」という。)に切り替えることで固相精製を続行することが可能であった。しかし、加圧方式は多検体処理には時間と労力を要するため、効率的な操作ではないと考える。

以上2点の課題を解決するため、本年度は試料採取量を従来の10 gから5 gに減らして検討した。試料としてビスケットを用いて検討した結果、試料採取量を減少させることで、加熱中の攪拌が容易となり、ダマも生じなかったことから、固相精製操作においても逆相固相ミニカラムの目詰まりは発生しなかった。

(2) HPLC測定における感度向上のための検討

昨年度の報告では、10 mLに定容した溶出液から2mLを採取し、*N*-CBAに誘導体化した後、10 mLに定容したものを試験溶液として使用していた。概略は図3のとおりである。本年度は、HPLCのクロマトグラムにおけるピーク感度を向上させることを目的として、溶出液全量を誘導体化し、試験溶液の最終容量を5 mLとする方法を検討した。昨年度の方法と比較して検体採取量を半分に抑えた一方で、誘導体化に使用するCAの量を5倍に増加させ、さらに誘導体化後の液量を2倍に濃縮した。その結果、HPLCクロマトグラムにおけるピーク面積は昨年度と比べて約5倍に増加した（図4）。なお、この変更に伴い、溶出液の液量増加にあわせて各反応試薬の量及び濃度を適切に増量した。

さらに、昨年度は液-液分配の回数を1回としていたが、その後の検討により水層に約10%のCYが残留していることが判明したため、液-液分配の回数を2回に増やした。

液-液分配を2回実施した結果、アセトニトリル層の総量が約30 mLとなった。そのため、誘導体化した後にロータリーエバポレーターを用いた減圧乾固操作を追加し、溶液を濃縮した。その後、アセトニトリル及び水（3:2）混液で5 mLに定容し、試験溶液とした。

なお、本検討では、CYをCAに分解する操作において、溶出液全量を使用するため、分解から液-液分配までを50 mLPP製遠沈管を用いて検討を行った。しかし、50 mLPP製遠沈管を用いた場合、*N*-CBAと同一の保持時間に夾雑ピークが出現することが確認

された。そこで、CYからCAへの分解操作において、ガラス製15 mL試験管を使用し、分解後に冷却して50 mL PP製遠沈管に分解液を移し、液-液分配したところ、夾雑ピークは出現しなかった。以上の結果より、分解操作においてはガラス製試験管を使用することとした。

2. 添加回収試験

オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの4食品を用いて、5併行の添加回収試験を実施した。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5～8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1に示した。オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの4試料の真度は、それぞれ96.9%、93.2%、103.9%及び94.5%、併行精度はそれぞれ4.1%、0.3%、1.8%及び4.3%であり、すべての試料において良好な結果であった。

E. 結論

昨年度検討した新規分析法について、本年度は試料採取量を半減させることで、溶出操作及び固相精製操作における課題を改善した。また、溶出液全量を誘導体化し、液-液分配の回数を1回増加させるとともに、減圧乾固による濃縮操作により、試験溶液のクロマトグラムにおけるピーク面積が約5倍に増大した。検討した何れの試料においても、ブランク試料に定量を妨害するピークは認められなかった。さらに、

オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの4食品に適用した結果、真度93.2～103.9%、併行精度0.3～4.3%は目標値に適合していた。

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

日本食品衛生学会第120回学術講演会（愛知県）、2024年11月7～8日、新規誘導体化剤を用いたサイクラミン酸分析法の検討
第61回全国衛生化学技術協議会年会（堺市）、2024年11月21～22日、食品添加物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（サイクラミン酸）

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

II. 動物用医薬品試験法の開発に関する研究

動物用医薬品については、食品マトリクスとの結合が強い薬剤や物理化学的な性質が異なる様々な薬剤があるため、一斉分析では十分な真度が得られないことがあ

る。畜水産物中の動物用医薬品を対象とした一斉分析法では、アセトニトリルなどの高極性溶媒を抽出に用いた報告が多く、それらの脂肪を溶解することの難しい抽出法では抽出効率の点で課題があった。最近、アセトン及びアセトニトリルにより抽出を行い、その後、*n*-ヘキサンによる脱脂精製、アセトニトリルへの分配及び塩析効果による精製を同時に行う三層分離抽出法が報告された³⁾⁴⁾。本研究では、頑健性の高い動物用医薬品の試験法を検討することを目的として、LC-MS/MSを用いた動物用医薬品の一斉試験法について検討する。本年度は、酸性条件下で分解しやすい成分について検討し、検討した一斉分析法について、鶏肉ペースト試料を対象とした添加回収試験を実施した。

B. 方法

1. 試料

埼玉県内で市販されていた鶏むね肉のペーストを用いた。

2. 試薬等

混合標準品：富士フイルム和光純薬製の動物用医薬品混合標準溶液PL-1-3及びPL-2-1を用いた（計45成分）。

標準品：関東化学製、MedChemExpress製、Dr. Ehrenstorfer製及び富士フイルム和光純薬製の標準品を用いた（計102成分）。

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）

メタノール：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

ジメチルスルホキシド：特級（関東化学製）

アセトン：残留農薬試験・PCB試験用（関東化学製）

n-ヘキサン：残留農薬試験・PCB試験用（関東化学製）

ギ酸：【移動相用】LC-MS/MS用（和光純薬製）【抽出用】特級（和光純薬製）

エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウムに水和物（以下「ETDA-2Na・2H₂O」という。）：特級（関東化学製）

酢酸アンモニウム：特級（和光純薬製）

塩酸：特級（関東化学製）

塩化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

固相ミニカラム：Oasis PRiME HLB（60 mg/3 cc, Waters製）

3. 標準原液・標準溶液の調製

標準原液：必要に応じて標準品をジメチルスルホキシドで溶解したのち、1,000 µg/mLとなるようにメタノールまたはアセトニトリルで定容した。

混合標準溶液：各標準原液1 mLを混合し、アセトニトリルで200 mLに定容した（各5 µg/mL）。この溶液4 mLと各混合標準品1 mLを混合し、アセトニトリルで20 mLに定容し、1,000 ng/mLの混合標準溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：混合標準溶液を用時に希釈し、0.5～20 ng/mLの溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：混合標準溶液を用時に希釈し、100 ng/mLの溶液を調製し、使用した。

4. 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 6200（久保田商事製）

減圧機 ULBAC MDA-006

LC-MS/MS

MS：Xevo TQ-S（AWaters製）

LC：ACQUITY UPLC

5. LC-MS/MS分析条件

表2及び表3に示す。

6. 試験溶液の調製法

概略を図9に示す。

試料5.0 gを正確に50 mL PP製遠沈管に採取し、ETDA-2Na・2H₂O 1 gおよびアセトン6 mLを加えて、1分間、ホモジナイズした。次いで、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mL、アセトニトリル飽和*n*-ヘキサン10 mL、塩化ナトリウム3 gおよびセラミックホモジナイザー1個を加えて1分間振とう後、3,040×*g*、10℃で5分間遠心分離し、三液相（上層、中間層及び下層）及び沈殿物に分離した溶液の上層を除き、中間層を採取した。採取した中間層に1 mol/L酢酸アンモニウム溶液を10 mL加えた。残留物（下層及び沈殿物）にギ酸0.5 mL、アセトン5 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mL及びアセトニトリル飽和*n*-ヘキサン10 mLを加え、同様に振とう及び遠心分離した。上層を除いた後、この中間層を先の中間層と酢酸アンモニウム溶液の混液に合わせた。残留物に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mL及びアセトニトリル飽和*n*-ヘキサン10 mLを加え、同様に振とう及び遠心分離した。上層を除いた後、この中間層を

先の中間層と酢酸アンモニウム溶液の混液に合わせた。この混液に水を加えて50 mLにした後、3,040×g、10℃で5分間遠心分離した。上層を捨て、水を加えて50 mLに定容し、抽出液とした。

抽出液を15 mL PP製遠沈管に5 mL採取し、窒素気流下、40℃で2 mL以下になるまで濃縮した。濃縮した後、水で5 mLとした。

Oasis PRiME HLB (60 mg/3 cc, Waters 製) にメタノール及び水各5mLを順次注入し、各流出液は捨てた。この固相ミニカラムに先の液を全量注入し、負荷液は捨てた後、水5 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、メタノール5 mLで溶出し、溶出液を全量採取した。

溶出液に水2 mLを加えたのち、窒素気流下、40℃下で5 mL以下になるまで濃縮した。濃縮後、水で5 mLに定容し、試験溶液とした。

7. 添加回収試験

試料に各分析種の濃度が0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加し、30分静置後、6. 試験溶液の調製法に従って、5併行の添加回収試験を行い、真度及び併行精度を評価した。

C. D. 研究結果および考察

1. LC-MS/MS条件の検討

各標準品は、大門らの報告³⁾、齊藤らの報告⁴⁾及び地方衛生研究所の検査状況を基づき、147成分を選定した。

MS条件は、一部は当所SOPを参考に、一部はインフュージョン法及びQuan Optimize 法によりSRM条件を設定した。

分析カラムとして、L-column ODS (2.1 x

100 mm、3 µm、(一財) 化学物質評価研究機構製)、Atlantis dC18 (2.1 x 150 mm、3 µm、Waters製)、Atlantis T3 (2.1 x 150 mm、3 µm、Waters製)、Inertsil Ph-3 (2.1 x 150 mm、3 µm、GL Science製)、Kinetex Biphenyl (2.1 x 100 mm、5 µm、Phenomenex 製)、YMC-Triart Diol-HILIC (2.1 x 150 mm、S-3 µm、12 nm、栄伸ケミカル製) の6 種類について、ピーク形状やMS検出器の感度について比較した。その結果、L-column ODS (2.1 x 100 mm、3 µm、(一財) 化学物質評価研究機構製) が最も多くの成分においてMSの感度 (S/N) とピーク形状が良好となったため、本カラムを採用した。

移動相は、蒸留水、アセトニトリル及びギ酸とした。移動相のギ酸濃度について、0.1及び0.2 vol%の溶液について検討し、より多くの成分でピーク形状が良好であった0.2 vol%を採用した。また、各成分のDwell Timeが十分となるようグラジエント条件を設定した。

2. 測定対象成分の選定

添加回収試験では、試料に各測定対象成分の濃度が0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加した。この試料から調製される試験溶液の濃度は1 ng/mLとなる。この濃度の1/2である0.5 ng/mLの混合標準溶液 (147成分) を調製し、検討したLC-MS/MS条件で測定を行った。その結果、S/Nが10未満の7成分 (セフロキシム、ラサロシド、モネンシン、モランテル代謝産物A、チルミコシン、セファロニウム及びロキササルソン) と、ピークが2峰に別れた8成分 (5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン、アンピシリン、セファピリン、ジアベ

リジン、ジシクラニル、フラルタドン、レバミゾール及びオルメトプリム)を除外することとした。次に、検量線用混合標準液を調製し、相関係数(r)が0.990未満の3成分(セフキノム、ネオスピラマイシン及びスピラマイシン)を除外することとした。これらの18成分を除いて最終的な測定対象成分数は129成分とした。

3. 試験溶液の調製

(1) 既存の三層分離抽出法を用いた検討

本年度は、大門らの報告³⁾及び齊藤らの報告⁴⁾に基づき試験溶液の調製法を検討した。

大門らの試験溶液調製法は図10のとおりである。大門らの試験溶液調製法は、アセトンによる高効率の抽出、 n -ヘキサンによる脱脂精製、アセトニトリルへの分配及び塩析効果による精製を同時に行う三層分離抽出法を用いた一斉分析法である。

一方、齊藤らの試験溶液調製は図11のとおりである。齊藤らの試験溶液調製法は、大門らの試験溶液調製法に濃縮操作と固相ミニカラムによる精製操作を追加したことで、感度を向上させた一斉分析法である。

これらの一斉分析法に基づき、鶏むね肉ペーストに各測定対象成分の濃度が0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加し、3併行の添加回収試験を実施した。その結果、何れの一斉分析法においても真度70～120%を満たさない成分が複数確認されたが、特にベンジルペニシリンとエリスロマイシンの真度はどちらも10%未満と極めて低値であった。この点に関しては、これらの成分が酸性条件下で分解したことが主

な要因であると推察される。

ベンジルペニシリン以外にも動物用医薬品には酸性条件下で分解しやすい成分が存在することが知られている。そこで、本年度は、酸性条件下で分解しやすい成分の真度を向上させることを目指し、大門らの報告³⁾及び齊藤らの報告⁴⁾を基に試験溶液の調製法を検討した。

(2) 抽出操作の検討

試料として水5 gを用い、0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加し、齊藤らの試験溶液調製法における水で50mLに定容する抽出操作までを実施し、その抽出液を測定した。その結果、ベンジルペニシリン及びエリスロマイシンの真度はそれぞれ62.7%、3.7%と低い値を示した。この結果は、抽出時にギ酸を加えたことが原因と考えられた。そこで、ギ酸でpHを6、5、4及び3に調製した10 ng/mLの混合標準溶液を測定した。その結果、ベンジルペニシリンの平均濃度はそれぞれ95.7%、95.4%、91.0%及び55.7%、エリスロマイシンはそれぞれ114.0%、113.4%、85.1%及び6.6%となり、試験溶液がギ酸によりpH4以下となると平均濃度が低下する傾向が確認された。なお、本検討において、カラムや装置への影響を考え、pHを3未満にした溶液については検討を実施しなかった。

この結果を踏まえ、ギ酸を加えずに抽出を行った。その結果、ベンジルペニシリンとエリスロマイシンの真度は96.3%、95.2%と大幅に改善した。一方、セファゾリンの真度は20.4%と低下する結果が得られた。

ベンジルペニシリンとセファゾリンの両者の真度を良好な値にすることを目的

に、1回目の抽出ではギ酸を加えず、2回目の抽出でギ酸0.1 mL添加する条件で検討を行った。その結果、ベンジルペニシリンの真度は82.8%と良好な値を示したが、エリスロマイシンとセファゾリンの真度はそれぞれ13.0%と33.2%と十分な改善が得られなかった。さらに、先の検討にて調製した抽出液を測定24時間後に再測定したところ、ベンジルペニシリンの真度が7.0%と大幅に低下していることが確認された。この結果は、大門らの報告³⁾に記載されているとおり、一部のギ酸が水層から中間層に移行したことが原因であると考えられる。

中間層への移行が生じにくい酸としては、塩酸や硫酸が候補として挙げられる。10 vol%ギ酸5 mLのpHと同じpHとなる塩酸濃度を確認した結果、0.02 mol/L塩酸5 mLでおおよそ一致した。そこで、1回目の抽出時にギ酸に代わりに0.02 mol/L塩酸5 mL加える条件で抽出液を調製し、検討を行った。その結果、ベンジルペニシリンエリスロマイシンの真度は44.8%、22.9%とギ酸を使用した場合と同様に低い値を示した。ベンジルペニシリン以外の成分についても、ギ酸の代わりに塩酸を使用した場合には複数の成分で真度の低下が見られ、特にセファゾリンは1%未満となった。セファゾリン等の真度が低値となった原因については現時点では究明には至っていないが、真度の確保には塩酸ではなくギ酸を用いることが有効であると考えられた。

そこで、ギ酸を使用しつつも抽出液のpHを5~7程度に保つことを目的に、pH緩衝液を用いる方法を検討した。具体的には、1回目の抽出ではギ酸を加えずに実施し、得られた中間層を分取した後、その中間層にpH

緩衝液を加える方法とした。続いて、2回目の抽出はギ酸を加えて実施し、得られた中間層を先ほどの1回目の中間層に合わせる操作を行う方法である。pH緩衝液としてはさまざまな選択肢があるが、本検討では抽出液をそのままLC-MS/MSに注入することを想定し、揮発性を持ちながらpHを5以上に調整可能な酢酸アンモニウムを採用した。酢酸アンモニウムの濃度及び添加量については、抽出液中のギ酸の濃度が大門らの報告³⁾に基づき1 vol%程度と算出されること、さらに試料に由来する成分がpH緩衝作用を妨害する可能性があることを考慮した。そのため、十分なpH緩衝作用が維持する目的で、1回目の抽出で分取した中間層に1 mol/L酢酸アンモニウム溶液を10 mL添加する条件とした。この方法で抽出を行った結果、ベンジルペニシリン及びエリスロマイシンの真度はそれぞれ93.4%、95.6%と良好な値を示したが、テトラサイクリン系の成分の真度はやや低く、特にテトラサイクリンの真度は59.9%にとどまった。

この結果からテトラサイクリン系の抽出が不十分であると判断し、抽出回数を2回から3回に増やすこととした。抽出回数の増加に伴い、各抽出操作で使用する溶媒の量を調整した。1回目の抽出では、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルとアセトンの量を大門らの方法や齊藤らの方法と比較してそれぞれ半量の5 mLと6 mLとした。2回目の抽出では、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLに代えて、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLとアセトン6 mLを用いる条件とした。3回目の抽出では、2回目の残留物に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLとアセトニトリル飽和*n*-ヘキサン10

mLを加える条件とした。中間層については、1回目の中間層に1 mol/L酢酸アンモニウム溶液10 mLを加えた上で、2回目以降の中間層を順次あわせる方法とした。この条件で抽出液を調製し、各成分の真度を確認したところ、テトラサイクリン系の成分の真度に若干の向上がみられ、テトラサイクリンの真度は78.7%となった。

さらに抽出回数を増やすことで、テトラサイクリン系の真度が向上する可能性が考えられた。しかし、抽出回数を増やすことにより、抽出液に占める有機溶媒比率が高くなり、その結果、後続の固相精製操作において悪影響を及ぼす可能性がある判断した。このため、抽出回数を現状の3回とすることとした。

(3) 濃縮操作の検討

齊藤らの試験溶液調製法における水で50mLに定容する直前に混合標準溶液を添加し、定容したもの（10 ng/mL）から5 mLを採取し、窒素気流下、40℃で1.5 mL以下となるよう濃縮した。これを50 vol%メタノールで5 mLに定容したものを測定した。その結果、ベンジルペニシリンとエリスロマイシンに加え、アレスリン、ビチオノール及びテメホスの真度はそれぞれ0.7%、2.6%、26.2%、54.0%及び35.8%と低い値を示した。

アレスリン以下3成分について、濃縮操作におけるギ酸の影響を調べるため、先の操作からギ酸を添加しない条件で溶液を調製し測定を行った。しかし、測定結果に大きな変化は見られず、真度はそれぞれ23.5%、55.9%及び25.7%であった。

一方、5 mLの抽出液を2.5 mLまで濃縮し

た場合、真度はそれぞれ79.5%、89.3%、78.4%となり、さらに、2 mLまで濃縮した場合にはそれぞれ67.4%、84.2%、59.7%に低下する結果が得られた。

抽出液は、理論上アセトン12 mLとアセトニトリル20 mLを水で50mLに定容したものであり、その組成比は6:10:9と近似される。この抽出液を固相ミニカラム精製に用いる場合、抽出液中の有機溶媒が固相ミニカラムの保持能力に与える影響を考慮する必要がある。このため、5 mLの抽出液を濃縮し、1.8 mL未満、具体的には1.5 mL以下に減容することは有効であると考えられる。しかしながら、アレスリン等の成分が濃縮操作中に揮散することや、1.5 mLまで濃縮するために長時間を要することを考慮した結果、本年度の検討では5 mLの抽出液を2 mL以下まで濃縮し、その後、これを水で5mLに定容して次の固相精製操作に用いることとした。

さらに、アレスリン、クロサンテル、ジョサマイシン、エマメクチンB1a及びエマメクチンB1a異性体等の成分は、濃縮操作において使用した15 mL PP製遠沈管の内壁に一部が吸着することが確認された。このため、濃縮及び定容後に容器を約10秒間超音波処理し、容器内壁に吸着した成分を剥離させた後、固相ミニカラムに負荷することとした。また、固相ミニカラムの洗浄に用いる水5 mL及び溶出に用いるメタノール5 mLについても、濃縮時に使用した15 mL PP製遠沈管に入れ、同様に約10秒間超音波処理してから使用することとした。

(4) 固相精製操作の検討

固相ミニカラムは、Oasis HLB（60 mg/3

cc, Waters製)、Oasis HLB (150 mg/6 cc, Waters製)、Oasis PRiME HLB (60 mg/3 cc, Waters製)、PLS3-20 (AiSTi SCIENCE製) について検討した。いずれの固相ミニカラムもコンディショニング方法は共通とし、メタノール5 mLと水5 mLを順次注入し、流出液を捨てる操作を行った。その後、混合標準溶液を水で希釈して1 ng/mLとしたものを5 mL注入し、負荷液を捨てた。溶出操作については、齊藤らの報告⁴⁾を基に、メタノール1 mL及び0.5 vol%ギ酸含有メタノール1 mLを順次注入し、得られた溶出液を採取した。齊藤らの報告⁴⁾では、溶出液を濃縮した後に定容しているが、濃縮操作が真度へ与える影響を排除するため、本検討では溶出液を濃縮せず、そのまま水で5 mLに定容して測定を行った。その結果、多くの成分において、ほぼ同等の真度を示したものの、一部の成分（クロサンテルやミロキサシン等）では、PLS3でのみ極端に真度が低下する現象が確認された。このため、本年度の検討ではPRiME HLBを使用することとした。Oasis HLB 60mgは、PRiME HLB及びPLS3に次いで真度が良好であった。同150 mgについては、複数の成分がメタノール1 mL及び0.5 vol%ギ酸含有メタノール1 mLだけでは固相から溶出しきれず、追加でメタノール5 mLすることで溶出が確認される成分もあった。それでもなお、一部の成分は固相に保持されたままであることが確認された。

PRiME HLBからの溶出液については、齊藤らの報告⁴⁾に基づきギ酸含有メタノールを使用した場合、ベンジルペニシリンやエリスロマイシンがギ酸によって分解されることが確認された。そこで、PRiME HLBの

溶出液については、メタノール5 mLを用いることとした。

4. 添加回収試験

添加回収試験には鶏むね肉ペーストを用い、試料として0.01 µg/gとなるよう混合標準溶液を添加した。

選択性については、ベンゾカインを除き、検討に用いたブランク試料からは定量を妨害するピークは確認されなかった。

試料マトリックスによる測定への影響については、イベルメクチン、リンコマイシン及びチアベンダゾールで顕著な増強効果が、フロルフェニコールアミン及びリファキシミンで顕著な減弱効果が見られたが、他の成分では顕著なマトリックス効果は確認されなかった。

5併行の添加回収試験の結果、真度70～120%及び併行精度(RSD%)<15を満たしたものは129成分中97成分であった(表4)。

しかしながら、酸性条件下で分解しやすい成分であるベンジルペニシリンとエリスロマイシンの真度は51.5%と55.8%であった。そこで、固相ミニカラム精製前の抽出液について測定した結果、ベンジルペニシリンとエリスロマイシンの抽出率は50.8%と96.0%であった(表5)。以上の結果より、ベンジルペニシリンは抽出操作に改善の余地があり、エリスロマイシンは抽出操作がおおむね良好だが、その後の濃縮操作及び固相精製操作に課題があるものと考えられた。

これらの結果を踏まえ、試験溶液調製法の各操作について引き続き検討を進める必要がある。

E. 結論

本研究では、頑健性の高い動物用医薬品の試験法を開発するための検討を行った。本年度は、酸性条件下で分解しやすい成分（ベンジルペニシリンやエリスロマイシン）の真度を向上させることを目指し、大門らの報告³⁾及び齊藤らの報告⁴⁾を基に三層分離抽出を用いた試験溶液の調製法を検討した。その一環として、鶏むね肉ペーストを用いた添加回収試験を5併行で実施した結果、測定対象成分129成分中97成分で良好な結果を得ることができた。

一方で、酸性条件下で分解しやすい成分の真度については、目標とした良好な真度には達せず、50%程度に留まった。しかし、検討前の10%未満の真度と比較すると大幅な改善が見られた。本研究で得られた結果を踏まえ、引き続き試験法の改良に取り組み、より良い結果を目指していきたいと考えている。

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) 茂呂寛紀、今井浩一、石井里枝、高坂典子、渡辺卓穂：食品添加物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（サイクラミン酸）：第61回全国衛生化学技術協議会年会（大阪）、2024.

2) 茂呂寛紀、今井浩一、石井里枝、渡辺卓穂：新規誘導体化剤を用いたサイクラミン酸分

析法の検討：第120回日本食品衛生学会学術講演会（愛知）、2024

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/yunyu_kanshi/ihan/index.html

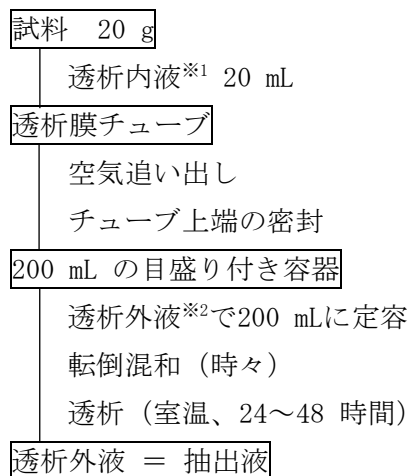
2) 児島昭次，一番ヶ瀬尚：人工甘味料に関する研究(第2報)サイクラミン酸ナトリウムの比色定量 その1，薬学雑誌，83，1108～1114（1963）

3) 大門拓実、立岡秀、高橋邦彦、濱田佳子：三層分離抽出を利用した食肉および水産物中の動物用医薬品迅速一斉分析法の検討、食品衛生学雑誌、61巻3号、95-102（2020）

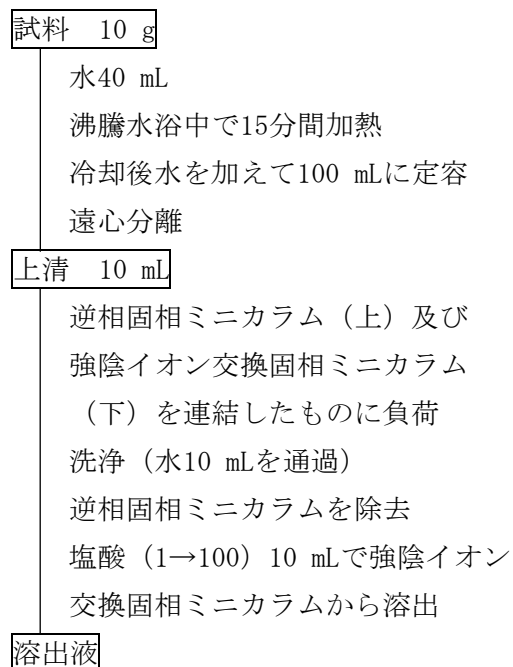
4) 齊藤直樹，中代智菜美，高橋良平，小林保志，今井浩一：LC-MS/MSを用いた三層分離抽出法による動物用医薬品一斉分析法の検討、第120回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集、102（2024）

以下 図表等

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
n-ヘキサン 5 mL
次亜塩素酸ナトリウム試薬 1 mL
1分間振とう
遠心分離
水層を除去

n-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1 サイクラミン酸及びその塩類の分析法（通知試験法）

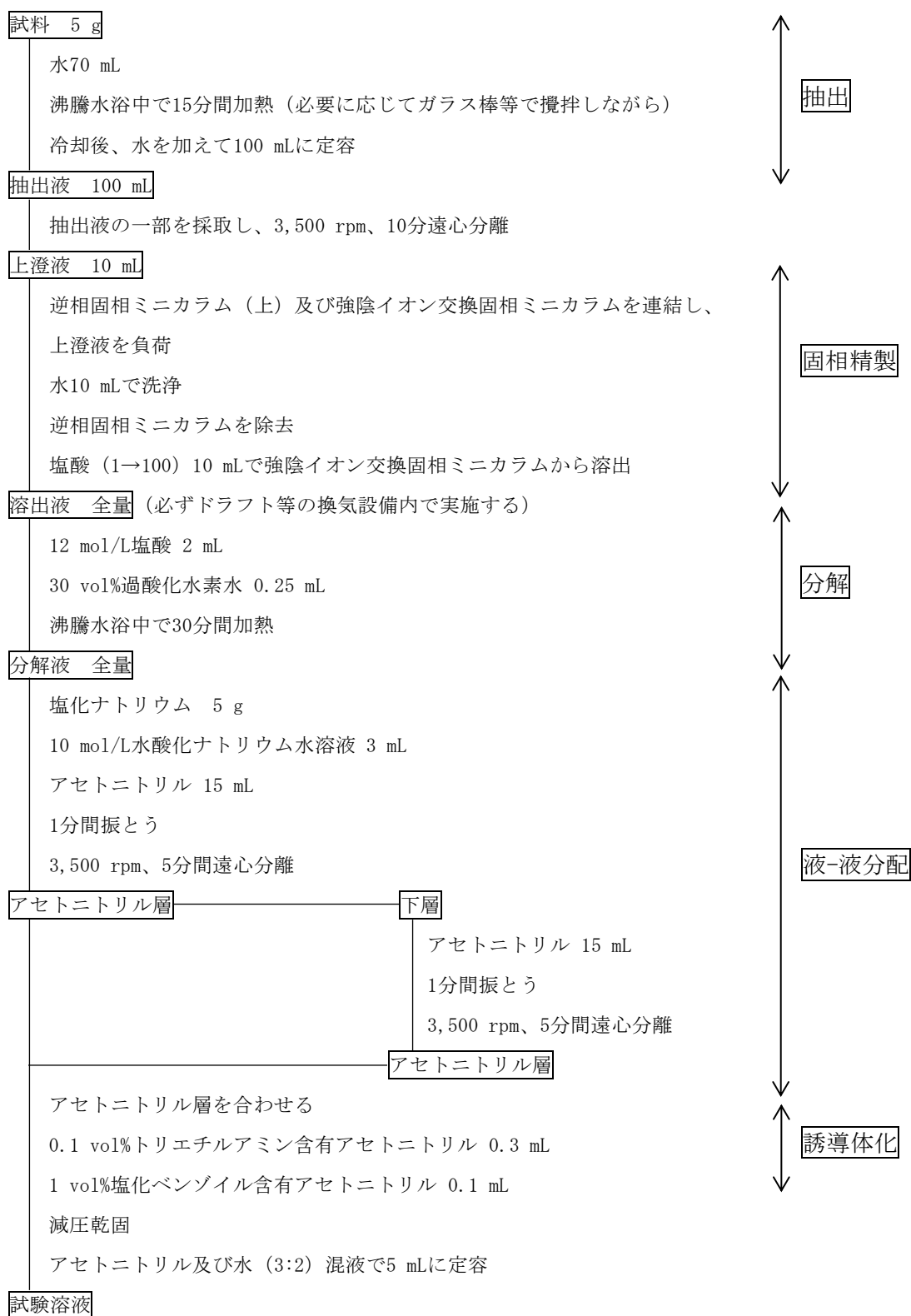


図2 新規分析法の改良法

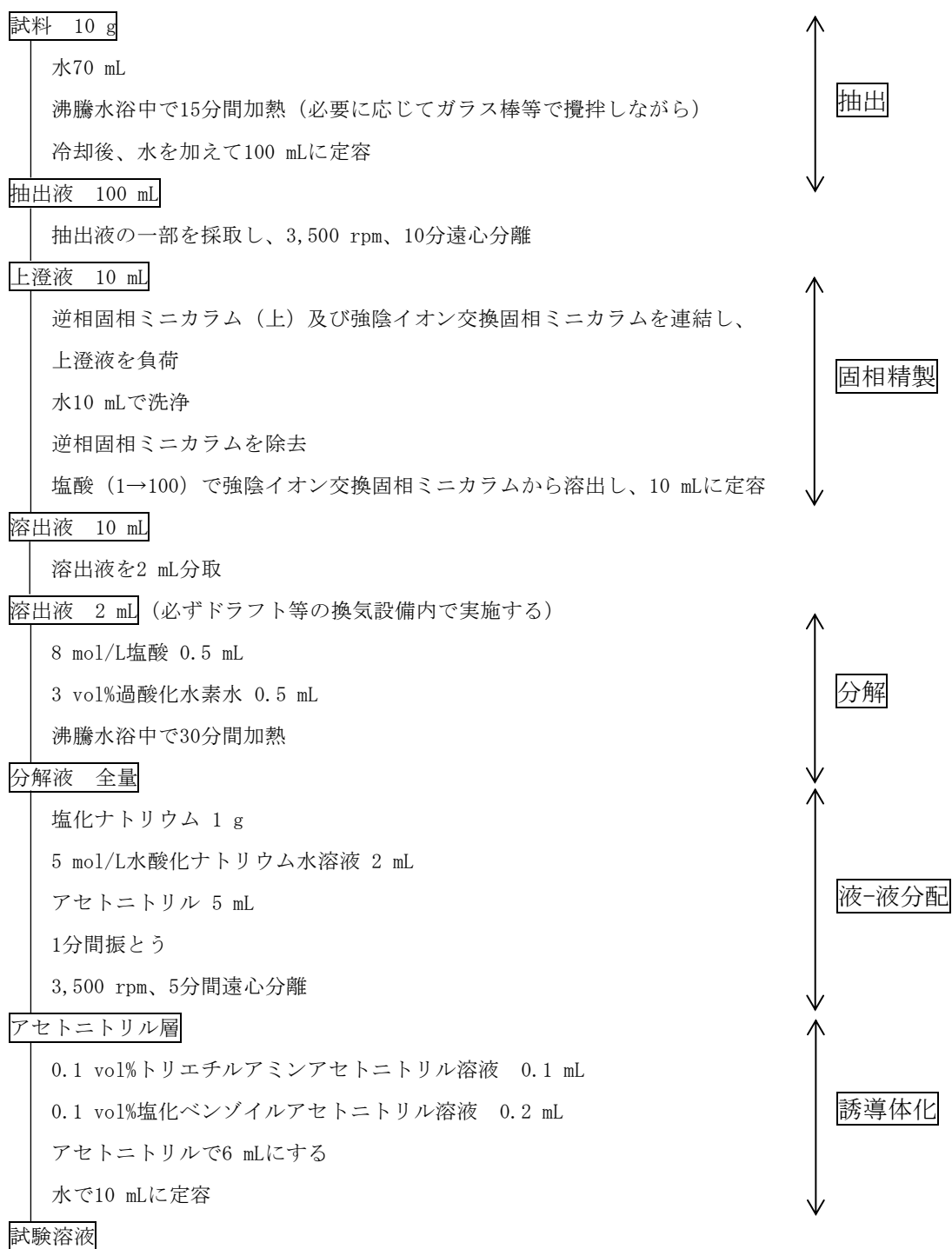
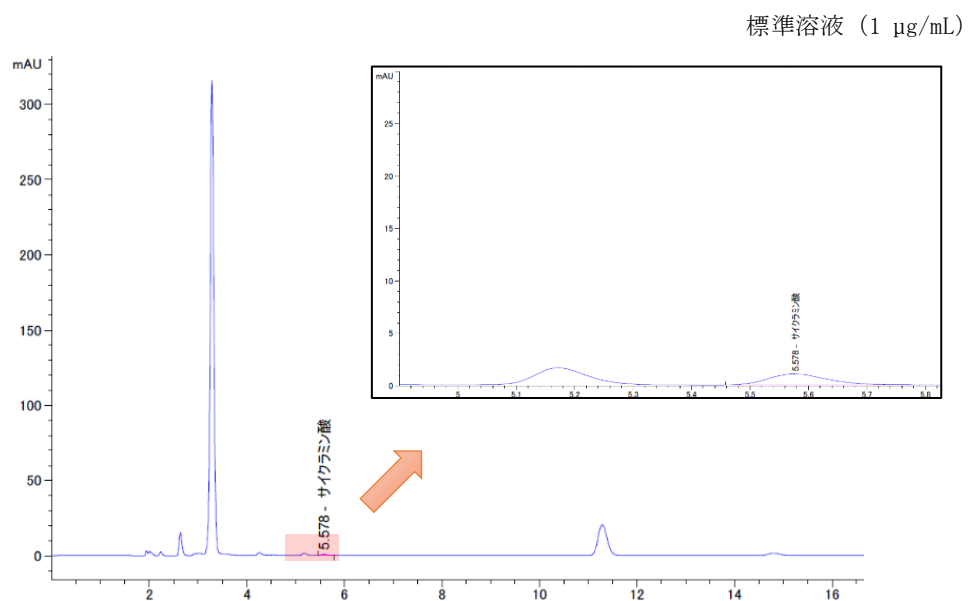


図3 昨年度の試験溶液調製法

改良前（令和5年度実施）



改良後（令和6年度実施）

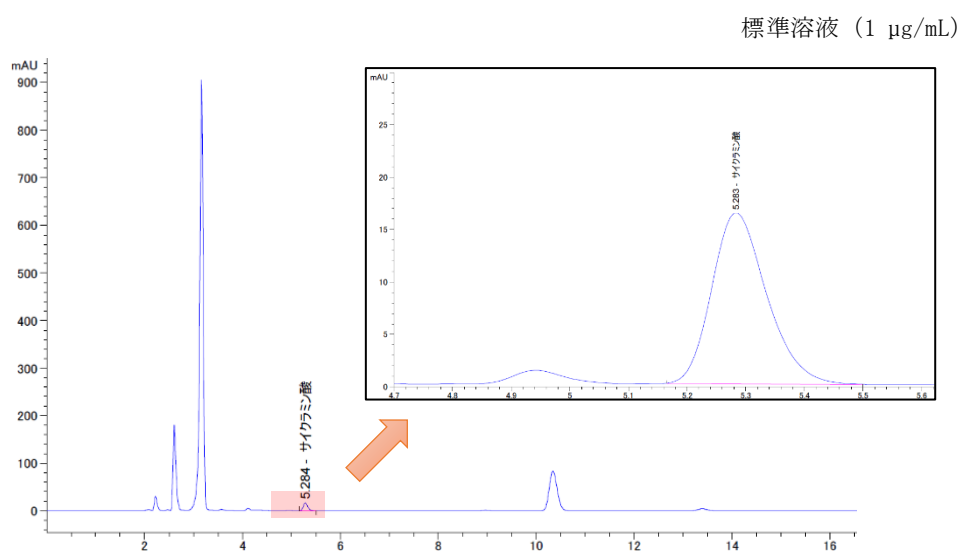
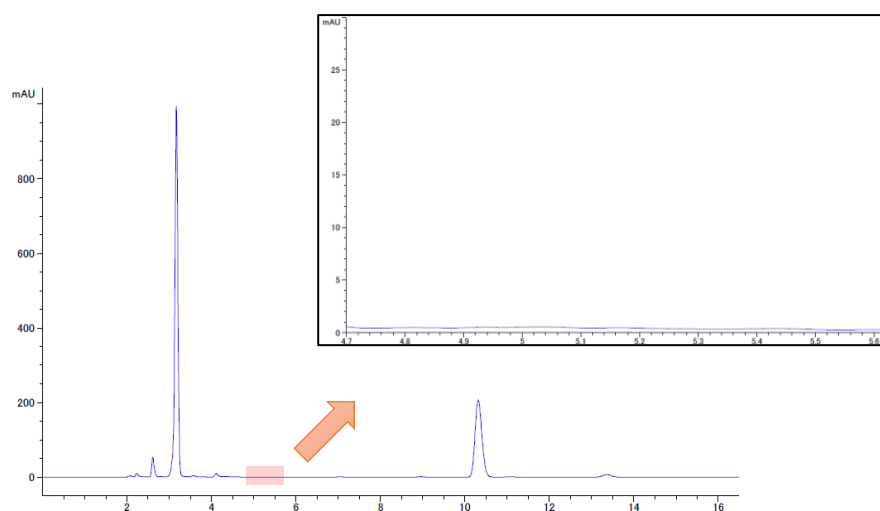
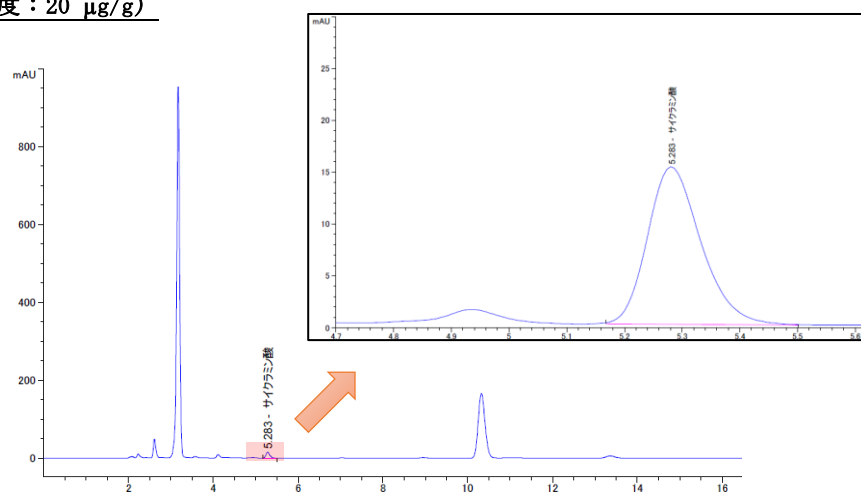


図4 改良前後の新規分析法のクロマトグラム

ブランク試料



添加試料（添加濃度：20 $\mu\text{g/g}$ ）



標準溶液（1 $\mu\text{g/mL}$ ） ※ 添加回収試験における回収率100%相当の濃度

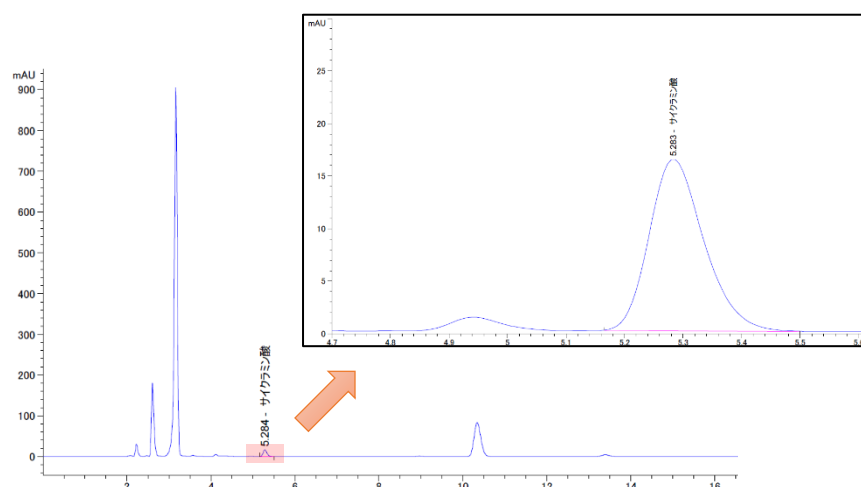
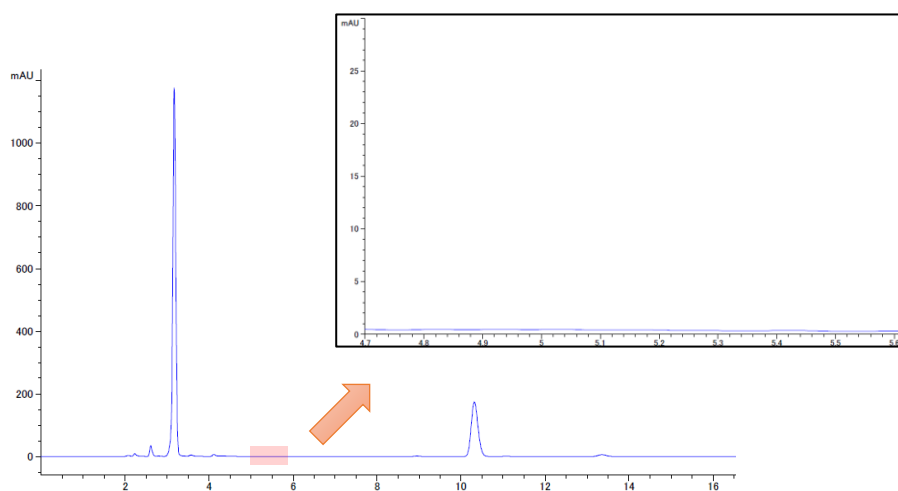
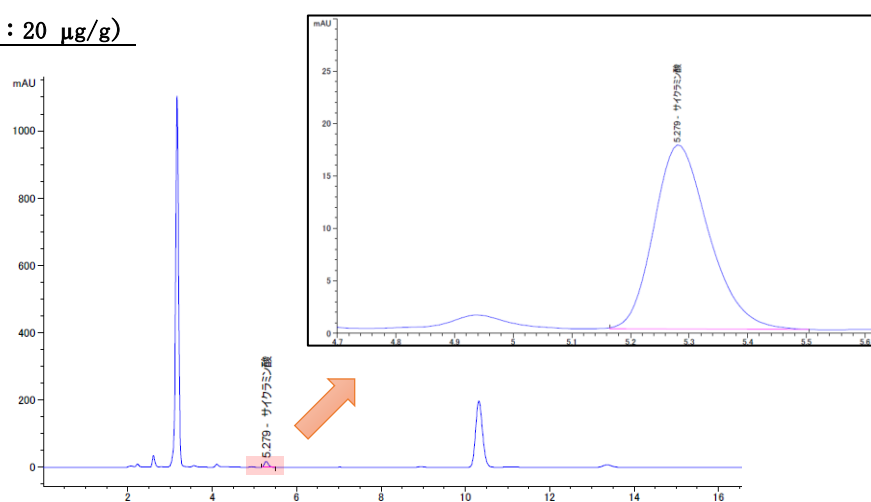


図5 オレンジジュースのクロマトグラム

ブランク試料



添加試料 (添加濃度: 20 $\mu\text{g/g}$)



標準溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$) ※ 添加回収試験における回収率100%相当の濃度

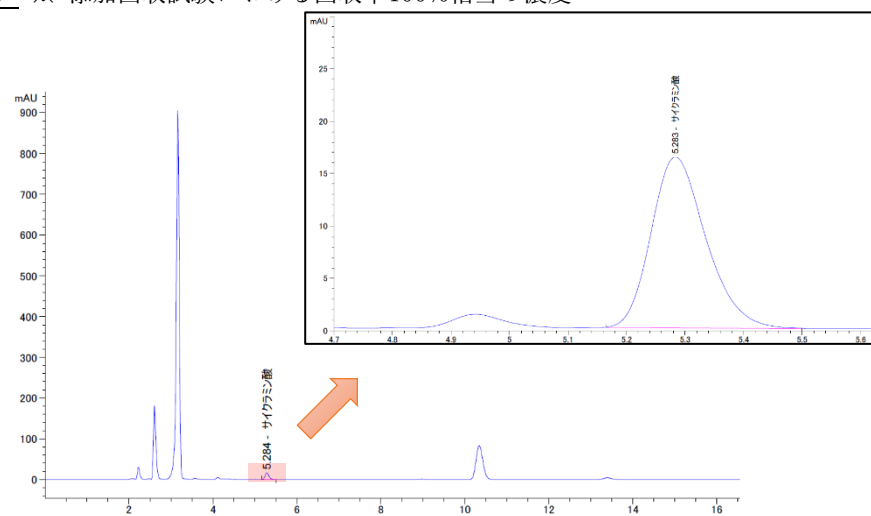
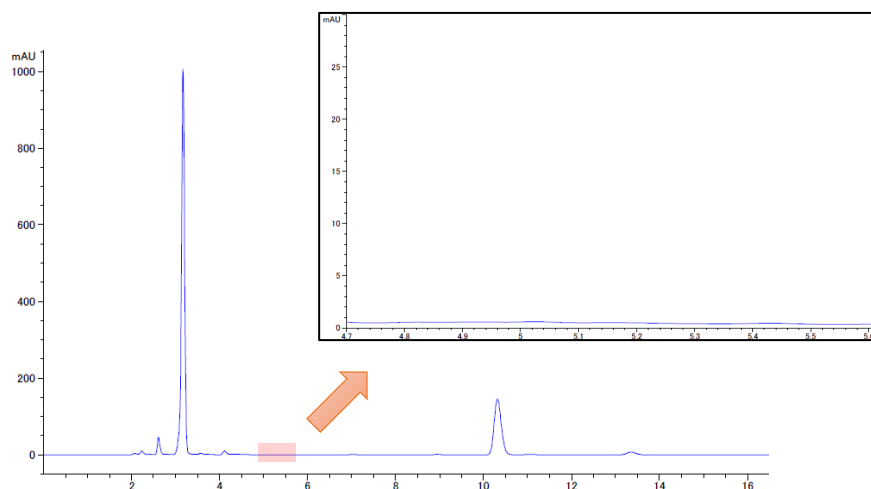
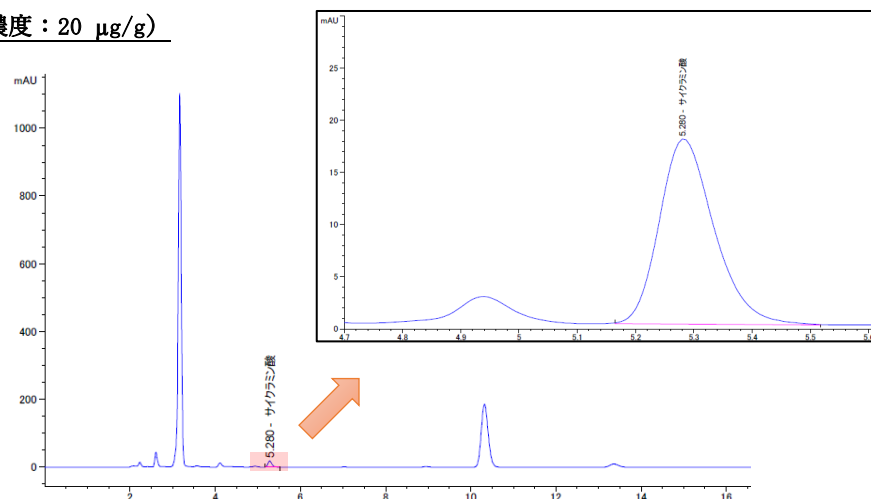


図6 ブルーベリージャムのクロマトグラム

ブランク試料



添加試料 (添加濃度: 20 $\mu\text{g/g}$)



標準溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$) ※ 添加回収試験における回収率100%相当の濃度

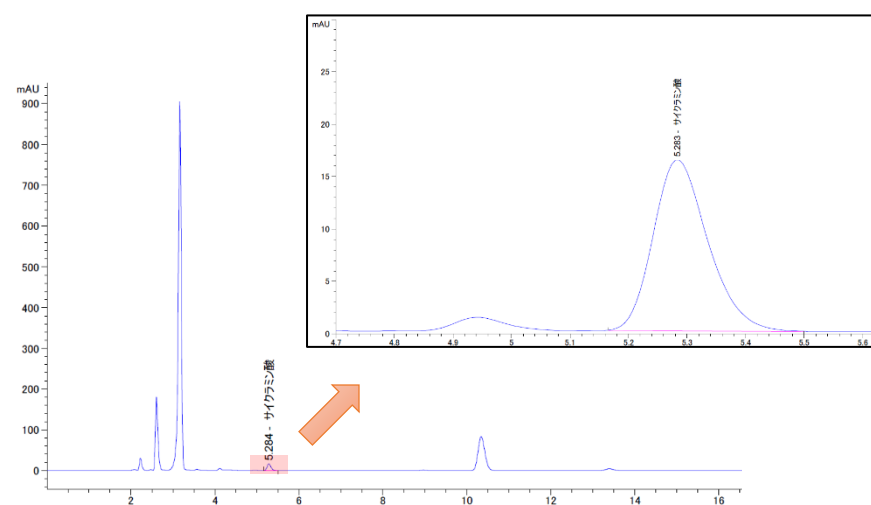
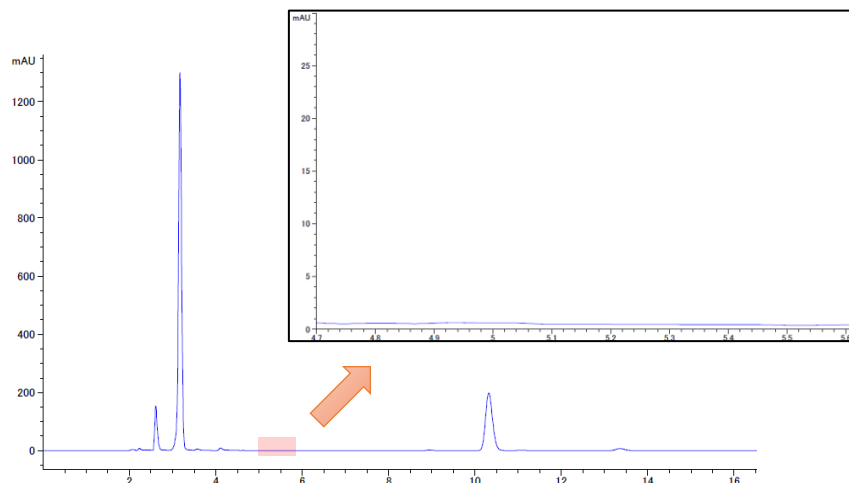
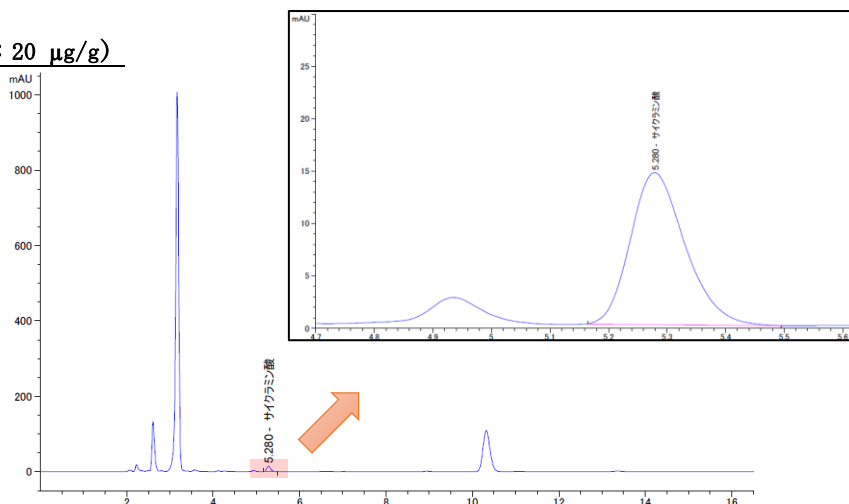


図7 りんごゼリーのクロマトグラム

ブランク試料



添加試料（添加濃度：20 $\mu\text{g/g}$ ）



標準溶液（1 $\mu\text{g/mL}$ ） ※ 添加回収試験における回収率100%相当の濃度

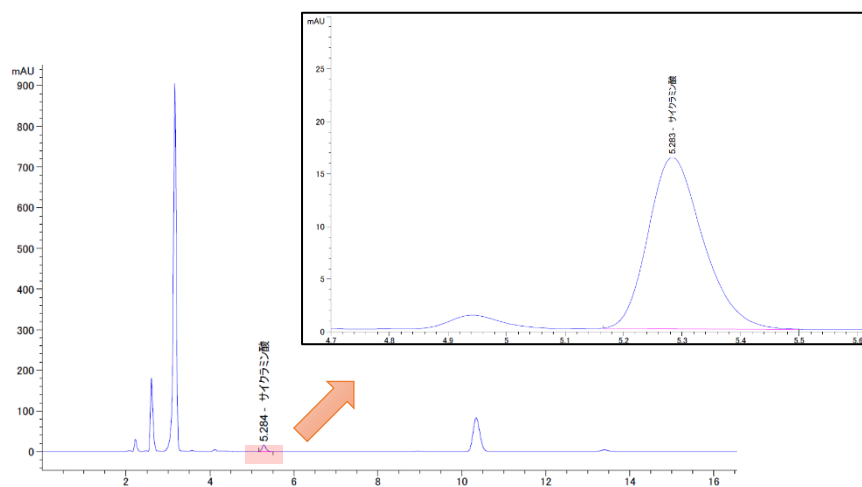


図8 ビスケットのクロマトグラム

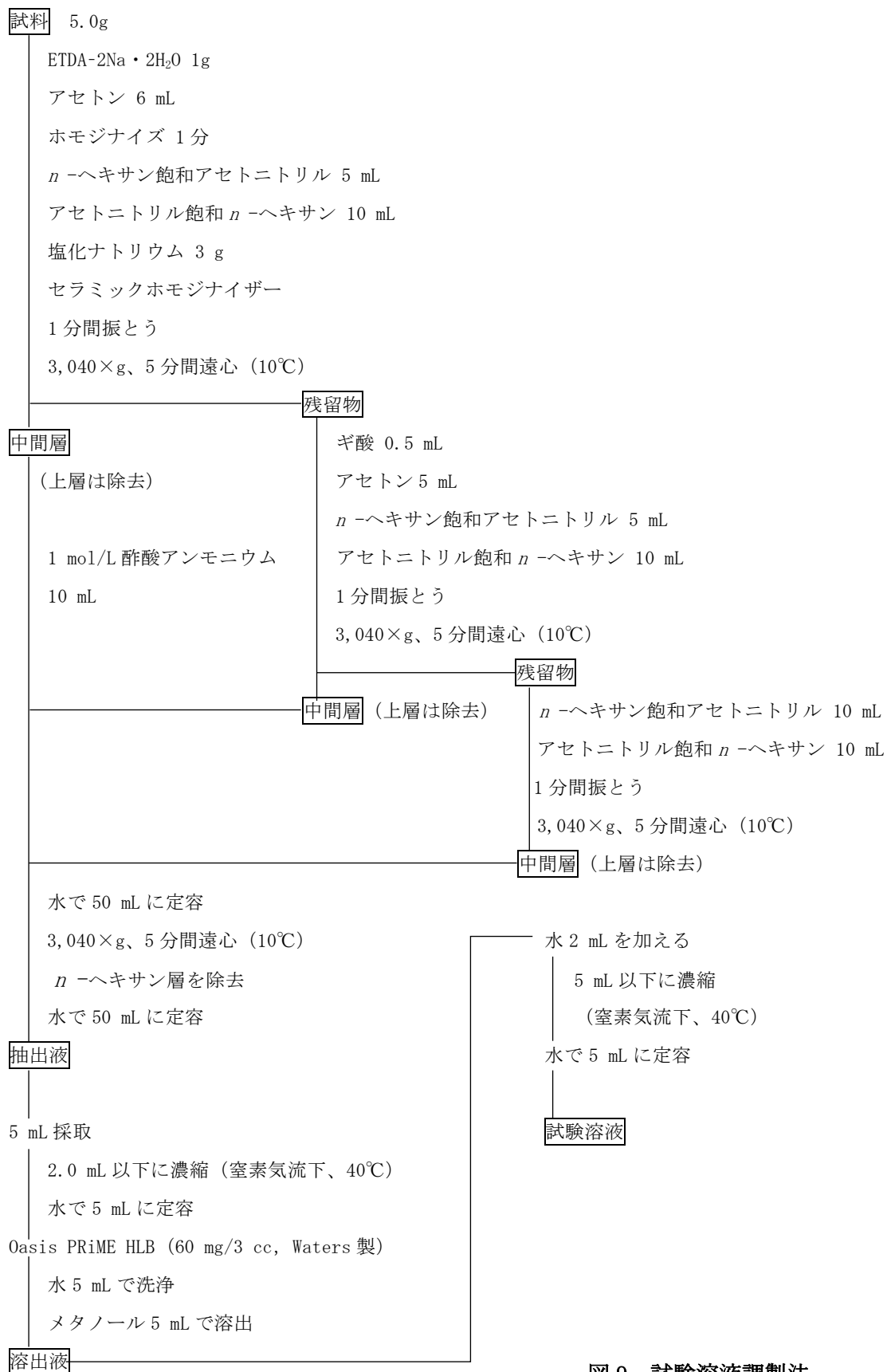


図 9 試験溶液調製法

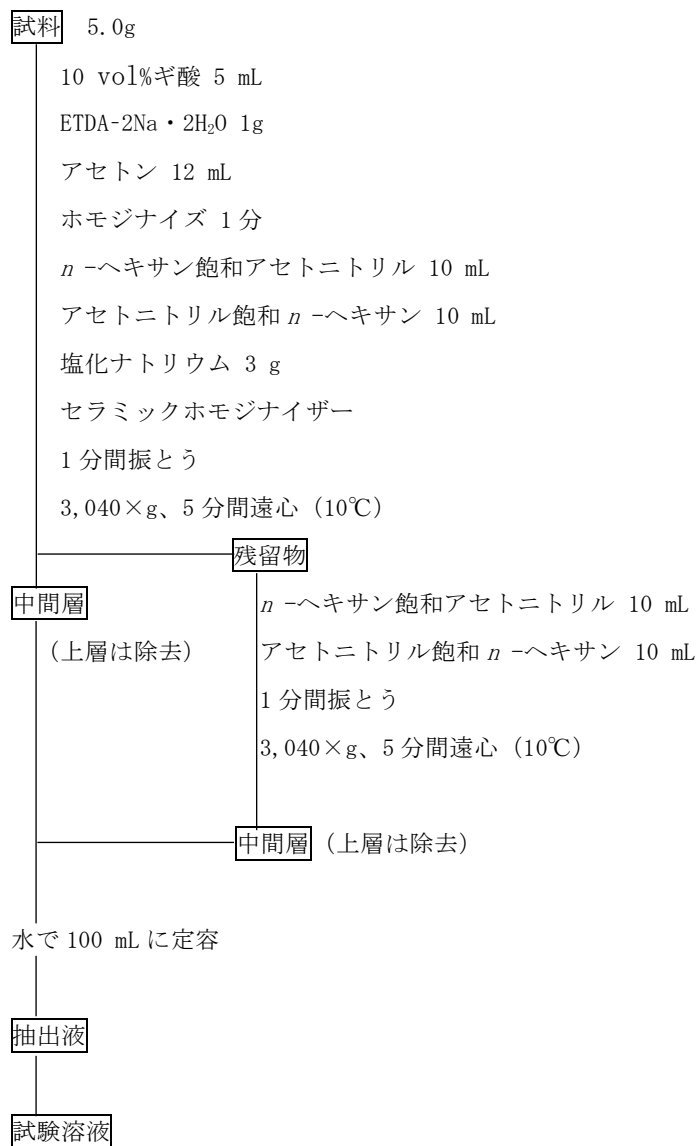


図 10 大門らの試験溶液調製法

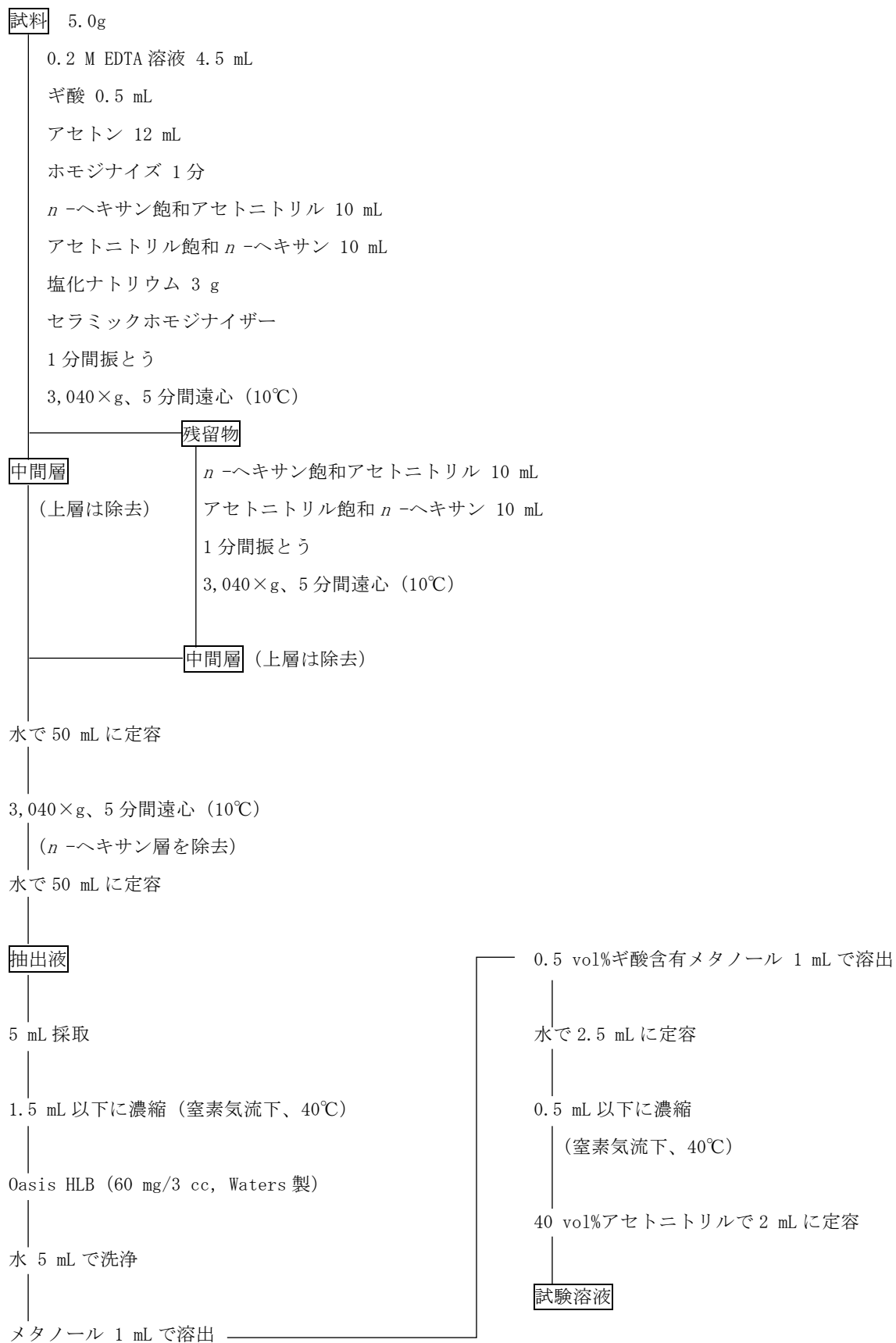


図 11 齊藤らの試験溶液調製法

表 1 新規分析法における添加回収試験結果

検体	オレンジ ジュース	ブルーベリー ジャム	りんごゼリー	ビスケット
真度 (%)	96.9	93.2	103.9	94.5
併行精度 (RSD%)	4.1	0.3	1.8	4.3
20 µg/g 添加				(<i>n</i> =5)

表 2 LC-MS/MS 条件

LC 条件

装置	ACQUITY UPLC H-Class (Waters 製)			
カラム	L-Column ODS (3 µm, 2.1×100 mm, 化学物質評価研究機構製)			
移動相	A : 蒸留水 B : アセトニトリル C : 0.2 vol% ギ酸			
グラジエント条件	時間	A	B	C
	(分)	(%)	(%)	(%)
	0	85	5	10
	16	45	45	10
	20	5	85	10
	26	5	85	10
	26.1	85	5	10
	35	85	5	10
流速	0.2 mL/min			
カラム温度	40°C			
注入量	2 µL			
測定時間	35 分			

MS 条件

装置	Xevo TQ-S (Waters 製)
イオン化モード	ESI (Positive / Negative)
キャピラリー電圧	1.0 kV
ソース温度	150°C
デゾルベーション温度	500°C
コーンガス流量	150 L/hr
デゾルベーションガス流量	1000 L/hr

表 3 SRM 条件

No.	化合物名	定量			定性			No.	化合物名	定量			定性		
1	2-Acetylmino-5-nitrothiazole	186	>	139	186	>	96	34	Emamectin Bla	887	>	158	887	>	82
2	6a_Methylprednisolone	375	>	357	375	>	161	35	Emamectin Bla Isomer	887	>	158	887	>	82
3	Aklomide	201	>	155	201	>	184	36	Enlofloxacin	360	>	316	360	>	245
4	Allethrin	303	>	135	303	>	93	37	Erythromycin	734	>	158	734	>	83
5	Altrenogest	311	>	227	311	>	269	38	Ethopadate	238	>	206	238	>	136
6	Azaperol	330	>	121	330	>	149	39	Famphur	326	>	93	326	>	217
7	Azaperone	328	>	165	328	>	95	40	Febantel	447	>	415	447	>	383
8	Benzocaine	166	>	138	166	>	77	41	Fenbendazole	300	>	159	300	>	268
9	Benzylpenicillin	335	>	160	335	>	176	42	Fenobucarb	208	>	95	208	>	152
10	Betamethasone	393	>	373	393	>	355	43	Florfenicol	356	>	185	356	>	336
11	Bithionol	355	>	163	355	>	194	44	Florfenicol amine	248	>	230	248	>	130
12	Bromacil	261	>	205	261	>	188	45	Flubendazole	314	>	282	314	>	123
13	Carazolol	299	>	116	299	>	194	46	Flumequine	262	>	244	262	>	202
14	Carprofen	272	>	226	272	>	228	47	Flunixin	297	>	279	297	>	264
15	Cefazolin	455	>	323	455	>	156	48	Furazolidone	226	>	122	226	>	95
16	Cefoperazone	646	>	143	646	>	530	49	Halofuginone	416	>	100	416	>	138
17	Chloramphenicol	321	>	152	321	>	121	50	Hydrocortisone	363	>	121	363	>	91
18	Chlortetracycline	479	>	444	479	>	462	51	Ivermectin Bla	897	>	753	897	>	329
19	Ciprofloxacin	332	>	288	332	>	314	52	Josamycin	829	>	174	829	>	600
20	Clenbterol	277	>	203	277	>	132	53	Ketoprofen	255	>	105	255	>	209
21	Clopidol	192	>	87	192	>	101	54	Lincomycin	407	>	126	407	>	359
22	Clorsulon	378	>	342	378	>	142	55	Mafoprazine	402	>	193	402	>	150
23	Closantel	661	>	127	661	>	345	56	Marbofloxacin	363	>	72	363	>	320
24	Clostebol	323	>	131	323	>	305	57	Mebendazol	296	>	264	296	>	105
25	Cloxacillin	436	>	160	436	>	277	58	Mecillinam	326	>	167	326	>	139
26	Danofloxacin	358	>	96	358	>	82	59	Melengestrol acetate	397	>	279	397	>	337
27	Dexamethason	393	>	373	393	>	355	60	Meloxicam	352	>	115	352	>	141
28	Diclazuril	405	>	334	405	>	299	61	Menbutone	259	>	241	259	>	185
29	Dicloxacillin	470	>	160	470	>	311	62	Miloxacin	264	>	246	264	>	215
30	Difloxacin	400	>	299	400	>	356	63	Mirosamicin	728	>	158	728	>	116
31	Di flubenzron	311	>	141	311	>	158	64	Morantel	221	>	123	221	>	111
32	Dinitolmide	224	>	181	224	>	151	65	Nafceillin	415	>	199	415	>	171
33	Doxycycline	445	>	428	445	>	154	66	Nalidixic acid	233	>	215	233	>	187

No.	化合物名	定量		定性		No.	化合物名	定量		定性	
67	Nicarbazin	301	> 137	301	> 107	99	Sulfamethoxazole	254	> 92	254	> 156
68	Nifrustyrenate	258	> 214	258	> 114	100	Sulfamethoxypyridazine	281	> 92	281	> 156
69	Nitroxinil	289	> 127	289	> 162	101	Sulfamoidapsone	328	> 311	328	> 108
70	Norfloxacin	320	> 276	320	> 302	102	Sulfamonomethoxine	281	> 92	281	> 156
71	Novobiocin	613	> 189	613	> 218	103	Sulfanitran	334	> 136	334	> 270
72	Ofloxacin	362	> 318	362	> 261	104	Sulfapyridine	250	> 92	250	> 156
73	Oleandomycin	688	> 158	688	> 544	105	Sulfaquinoxaline	301	> 156	301	> 92
74	Orbifloxacin	396	> 295	396	> 352	106	Sulfathiazole	256	> 156	256	> 92
75	Oxacillin	402	> 160	402	> 243	107	Sulfatoroxazole	268	> 92	268	> 156
76	Oxfendazole	316	> 159	316	> 191	108	Sulfisozole	240	> 92	240	> 156
77	Oxfendazole Sulfon	332	> 159	332	> 300	109	Temephos	467	> 125	467	> 419
78	Oxibendazol	250	> 218	250	> 148	110	Tetracycline	445	> 410	445	> 154
79	Oxolinic acid	262	> 244	262	> 216	111	Thiabendazole	202	> 131	202	> 175
80	Oxytetracycline	461	> 426	461	> 444	112	Thiabendazole_5_OH	218	> 147	218	> 191
81	Phenoxymethylpenicillin	351	> 160	351	> 114	113	Thiamphenicol	354	> 185	354	> 79
82	Praziquantel	313	> 203	313	> 174	114	Tiamulin	494	> 192	494	> 119
83	Prednisolone	361	> 147	361	> 343	115	Tolfenamic_acid	262	> 244	262	> 209
84	Prifinium	307	> 86	307	> 91	116	Trichlorfon	257	> 109	257	> 221
85	Pyrantel	207	> 150	207	> 136	117	Triclabendazole	359	> 344	359	> 274
86	Pyrimethamine	249	> 177	249	> 233	118	Triclabendazole Sulfone	391	> 242	391	> 312
87	R35475	256	> 123	256	> 95	119	Trimethoprim	291	> 123	291	> 230
88	Rifaximin	787	> 754	787	> 151	120	Tripelennamine	256	> 211	256	> 91
89	Sarafloxacin	386	> 342	386	> 299	121	Tylosin	917	> 174	917	> 88
90	Sulfabenzamide	277	> 156	277	> 108	122	Valnemulin	565	> 263	565	> 164
91	Sulfabromomethazine	357	> 156	357	> 92	123	Virginiamycin M1	526	> 508	526	> 105
92	Sulfacetamide	215	> 156	215	> 92	124	Virginiamycin S1	824	> 205	824	> 177
93	Sulfachlorpyridazine	285	> 156	285	> 92	125	Warfarin	309	> 163	309	> 251
94	Sulfadiazine	251	> 156	251	> 92	126	Xylazine	221	> 147	221	> 164
95	Sulfadimethoxine	311	> 156	311	> 92	127	Zeranol	321	> 277	321	> 91
96	Sulfadimidine	279	> 92	279	> 186	128	a-Trenbolone	271	> 199	271	> 253
97	Sulfadoxine	311	> 156	311	> 92	129	b-Trenbolone	271	> 199	271	> 253
98	Sulfamerazine	265	> 92	265	> 156						

表 4 添加回收試驗結果

No.	化合物名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	No.	化合物名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	89.4	5.8	34	Emamectin Bla	114.0	1.3
2	6a_Methylprednisolone	99.8	4.3	35	Emamectin Bla Isomer	105.7	1.3
3	Aklomide	97.2	6.9	36	Enlofloxacin	109.4	6.0
4	Allethrin	18.9	14.1	37	Erythromycin	55.8	5.1
5	Altrenogest	79.6	2.7	38	Ethopadate	97.5	2.6
6	Azaperol	91.9	21.0	39	Famphur	96.7	2.0
7	Azaperone	102.8	16.4	40	Febantel	77.6	2.8
8	Benzocaine	151.0	7.4	41	Fenbendazole	92.6	2.5
9	Benzylpenicillin	51.5	10.8	42	Fenobucarb	81.3	3.1
10	Betamethasone	99.9	5.8	43	Florfenicol	91.6	6.8
11	Bithionol	44.3	11.9	44	Florfenicol amine	0.0	-
12	Bromacil	92.8	2.7	45	Flubendazole	102.0	4.2
13	Carazolol	106.4	2.1	46	Flumequine	94.4	3.5
14	Carprofen	80.1	12.0	47	Flunixin	87.6	1.4
15	Cefazolin	76.5	4.4	48	Furazolidone	92.1	11.6
16	Cefoperazone	77.3	15.6	49	Halofuginone	71.8	6.0
17	Chloramphenicol	93.6	13.0	50	Hydrocortisone	101.7	6.9
18	Chlortetracycline	40.2	12.9	51	Ivermectin Bla	417.4	7.7
19	Ciprofloxacin	118.9	2.5	52	Josamycin	104.8	3.2
20	Clenbterol	98.4	2.2	53	Ketoprofen	103.3	1.1
21	Clopidol	31.2	39.8	54	Lincomycin	0.0	-
22	Clorsulon	103.5	5.4	55	Mafopezine	113.6	2.4
23	Closantel	48.1	12.9	56	Marbofloxacin	100.7	6.0
24	Clostebol	86.3	5.6	57	Mebendazol	99.0	1.4
25	Cloxacillin	67.1	4.8	58	Mecillinam	27.4	30.3
26	Danofloxacin	86.3	9.5	59	Melengestrol acetate	83.8	3.5
27	Dexamethason	81.5	5.0	60	Meloxicam	80.8	5.5
28	Diclazuril	104.5	4.6	61	Menbutone	87.7	10.4
29	Dicloxacillin	104.6	5.1	62	Miloxacin	87.5	1.7
30	Difloxacin	85.0	10.4	63	Mirosamicin	108.6	1.8
31	Diqlubenzron	86.6	2.6	64	Morantel	95.8	7.0
32	Dinitolmide	121.6	20.3	65	Nafcillin	65.2	6.4
33	Doxycycline	41.0	6.7	66	Nalidixic acid	94.5	2.9

No.	化合物名	真度 (%)	并行精度 (RSD%)	No.	化合物名	真度 (%)	并行精度 (RSD%)
67	Nicarbazin	69.4	5.7	99	Sulfamethoxazole	94.7	1.7
68	Nifrustyrenate	74.1	10.7	100	Sulfamethoxyipyridazine	89.5	2.9
69	Nitroxinil	90.4	5.6	101	Sulfamoidapsone	94.1	3.1
70	Norfloxacin	76.3	12.4	102	Sulfamonomethoxine	95.9	2.3
71	Novobiocin	64.9	6.3	103	Sulfanitran	97.2	5.5
72	Ofloxacin	101.4	4.8	104	Sulfapyridine	89.8	2.5
73	Oleandomycin	98.4	2.4	105	Sulfaquinoxaline	94.7	1.7
74	Orbifloxacin	98.7	1.9	106	Sulfathiazole	88.0	1.4
75	Oxacillin	64.3	5.4	107	Sulfatoroxazole	95.7	1.8
76	Oxfendazole	95.4	0.8	108	Sulfisozole	93.0	4.2
77	Oxfendazole Sulfon	100.1	1.4	109	Temephos	37.4	9.6
78	Oxibendazol	104.8	1.5	110	Tetracycline	39.6	8.3
79	Oxolinic acid	93.4	2.5	111	Thiabendazole	102.5	1.2
80	Oxytetracycline	36.2	12.3	112	Thiabendazole_5_OH	130.1	10.6
81	Phenoxymethylpenicillin	52.7	14.0	113	Thiamphenicol	116.6	16.2
82	Praziquantel	95.9	1.6	114	Tiamulin	126.2	1.4
83	Prednisolone	94.0	5.7	115	Tolfenamic_acid	60.0	2.9
84	Prifinium	109.8	48.3	116	Trichlorfon	82.1	10.7
85	Pyrantel	109.4	5.8	117	Triclabendazole	76.6	3.9
86	Pyrimethamine	88.8	2.5	118	Triclabendazole Sulfone	92.7	2.9
87	R35475	100.2	1.4	119	Trimethoprim	84.1	3.7
88	Rifaximin	3.1	109.5	120	Tripelennamine	117.2	10.9
89	Sarafloxacin	115.9	2.6	121	Tylosin	101.5	1.7
90	Sulfabenzamide	90.9	2.0	122	Valnemulin	101.3	2.1
91	Sulfabromomethazine	92.2	2.5	123	Virginiamycin M1	100.3	2.7
92	Sulfacetamide	70.4	13.3	124	Virginiamycin S1	99.9	6.9
93	Sulfachlorpyridazine	95.4	1.3	125	Warfarin	102.5	3.1
94	Sulfadiazine	92.9	1.0	126	Xylazine	102.6	4.0
95	Sulfadimethoxine	97.5	1.2	127	Zeranol	106.5	7.3
96	Sulfadimidine	90.0	2.1	128	a-Trenbolone	95.3	1.9
97	Sulfadoxine	97.5	2.1	129	b-Trenbolone	89.8	2.9
98	Sulfamerazine	91.4	2.5				

表 5 各化合物の抽出率

No.	化合物名	抽出率 (%)	併行精度 (RSD%)	No.	化合物名	抽出率 (%)	併行精度 (RSD%)
1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	81.4	6.4	34	Emamectin Bla	119.7	1.5
2	6a_Methylprednisolone	88.1	7.5	35	Emamectin Bla Isomer	116.5	1.6
3	Aklomide	73.2	4.3	36	Enlofloxacin	131.0	6.1
4	Allethrin	40.9	4.1	37	Erythromycin	96.0	3.8
5	Altrenogest	86.9	3.0	38	Ethopadate	99.6	1.6
6	Azaperol	130.2	2.2	39	Famphur	101.2	1.5
7	Azaperone	147.6	1.4	40	Febantel	81.2	1.8
8	Benzocaine	95.0	0.5	41	Fenbendazole	99.5	0.4
9	Benzylpenicillin	50.8	12.4	42	Fenobucarb	85.2	2.3
10	Betamethasone	103.9	5.2	43	Florfenicol	83.8	14.2
11	Bithionol	65.8	6.9	44	Florfenicol amine	3.8	137.5
12	Bromacil	94.7	0.8	45	Flubendazole	101.3	3.0
13	Carazolol	112.4	2.3	46	Flumequine	95.0	1.5
14	Carprofen	90.2	14.4	47	Flunixin	87.2	1.3
15	Cefazolin	72.5	17.9	48	Furazolidone	146.8	5.4
16	Cefoperazone	81.4	36.4	49	Halofuginone	73.4	6.4
17	Chloramphenicol	98.1	6.8	50	Hydrocortisone	94.5	4.0
18	Chlortetracycline	40.7	8.8	51	Ivermectin Bla	139.3	12.4
19	Ciprofloxacin	130.6	1.1	52	Josamycin	107.0	2.8
20	Clenbterol	98.6	3.9	53	Ketoprofen	103.1	0.7
21	Clopidol	102.2	10.1	54	Lincomycin	2.1	61.0
22	Clorsulon	100.5	10.2	55	Mafoprozine	119.2	4.6
23	Closantel	72.6	6.1	56	Marbofloxacin	111.7	2.3
24	Clostebol	90.9	3.0	57	Mebendazol	96.4	2.1
25	Cloxacillin	69.0	5.9	58	Mecillinam	55.8	7.8
26	Danofloxacin	96.7	3.9	59	Melengestrol acetate	92.2	1.9
27	Dexamethason	74.4	7.6	60	Meloxicam	82.5	5.3
28	Diclazuril	101.7	3.5	61	Menbutone	92.9	11.0
29	Dicloxacillin	82.4	14.6	62	Miloxacin	92.1	0.9
30	Difloxacin	97.3	2.9	63	Mirosamicin	109.7	1.8
31	Diqlubenzron	92.1	2.1	64	Morantel	105.2	5.9
32	Dinitolmide	135.1	19.6	65	Nafcillin	69.3	4.6
33	Doxycycline	49.6	7.5	66	Nalidixic acid	95.6	2.0

No.	化合物名	抽出率 (%)	併行精度 (RSD%)	No.	化合物名	抽出率 (%)	併行精度 (RSD%)
67	Nicarbazin	81.1	7.0	99	Sulfamethoxazole	89.2	1.2
68	Nifrustyrenate	97.3	9.3	100	Sulfamethoxypyridazine	87.1	4.2
69	Nitroxinil	96.1	4.8	101	Sulfamoidapsone	96.7	8.9
70	Norfloxacin	85.3	5.2	102	Sulfamonomethoxine	85.0	2.0
71	Novobiocin	73.2	10.9	103	Sulfanitran	96.5	3.0
72	Ofloxacin	114.1	2.9	104	Sulfapyridine	86.0	2.9
73	Oleandomycin	99.1	2.6	105	Sulfaquinoxaline	88.1	1.7
74	Orbifloxacin	100.4	3.2	106	Sulfathiazole	76.4	2.5
75	Oxacillin	63.1	6.4	107	Sulfatoroxazole	98.6	1.6
76	Oxfendazole	87.6	2.1	108	Sulfisozole	86.9	4.3
77	Oxfendazole Sulfon	94.7	1.3	109	Temephos	86.6	4.2
78	Oxibendazol	109.4	0.6	110	Tetracycline	35.2	8.8
79	Oxolinic acid	97.7	2.1	111	Thiabendazole	112.0	2.6
80	Oxytetracycline	27.2	12.7	112	Thiabendazole_5_OH	162.4	10.8
81	Phenoxyethylpenicillin	58.1	16.3	113	Thiamphenicol	117.8	11.7
82	Praziquantel	95.7	1.1	114	Tiamulin	118.7	2.2
83	Prednisolone	91.6	4.1	115	Tolfenamic_acid	76.1	1.5
84	Prifinium	80.0	33.8	116	Trichlorfon	111.7	1.8
85	Pyrantel	113.1	2.3	117	Triclabendazole	86.1	0.9
86	Pyrimethamine	88.8	3.1	118	Triclabendazole Sulfone	97.3	2.0
87	R35475	99.8	2.8	119	Trimethoprim	86.1	4.5
88	Rifaximin	31.8	65.9	120	Tripelennamine	147.5	2.4
89	Sarafloxacin	121.0	3.1	121	Tylosin	106.1	2.9
90	Sulfabenzamide	90.1	2.6	122	Valnemulin	102.9	1.3
91	Sulfabromomethazine	91.5	0.7	123	Virginiamycin M1	101.7	3.0
92	Sulfacetamide	117.4	5.7	124	Virginiamycin S1	97.8	4.9
93	Sulfachlorpyridazine	86.0	1.9	125	Warfarin	111.9	2.2
94	Sulfadiazine	84.1	3.3	126	Xylazine	104.4	6.9
95	Sulfadimethoxine	96.8	1.6	127	Zeranol	99.7	5.8
96	Sulfadimidine	88.1	1.9	128	a-Trenbolone	94.4	3.6
97	Sulfadoxine	94.6	1.5	129	b-Trenbolone	91.8	3.1
98	Sulfamerazine	82.5	0.9				

令和6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	副所長
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り、前年度に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。今年度は本法を畜産肉へ適用して分析妥当性の評価を行った。また、市販されており入手可能な肉試料の重金属類含有量を調査し、外部精度管理調査に資するか検討を行った。

本研究で使用した認証標準物質（Bovine Liver、Pig Kidney、Bovine Muscle）のいずれにおいても、測定した元素濃度は認証値とほぼ一致し、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、重金属類を調査した市販肉試料においては、海外で規制値が設定されているPb、Cd、Asが含まれていないか、Asがわずかに含まれる程度であり、重金属類の精度管理におけるブランク試料として有効であることが示唆された。これら3元素の海外規制値レベルでの添加回収試験の結果は良好であり、本分析法による市販粉末肉の精度管理試料への適用可能性が確認された。

今後は粉末肉を用いた外部精度管理試料の作製方法の検討やその品質評価を行い、パイロットスタディとしての室間共同試験に向けた検討を行う予定である。

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（MW）分解－誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）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)}。本課題では、昨年度に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、MW分解－ICP-MS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。3種の認証標準物質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、本法の有効性が示された。

今年度は、近年輸出実績が増大傾向にある畜産肉を対象とし、MW分解－ICP-MS法を適用して分析妥当性の評価を行った。また、市販されており入手可能な肉試料の重金属類含有量を調査し、外部精度管理調査に資するか検討を行った。

B. 方法

1. 試料

1.1. 肉由来の認証標準物質

試料には、海外において肉類で規制されているPb、Cd、Asを中心として重金属類の認証値が比較的多い、3種類の認証標準物質を選択した。すなわち、牛の肝臓“Bovine Liver”（NIST製 SRM1577c）、豚の腎臓“Pig Kidney”（IRMM製 ERM-BB186）、牛の筋肉“Bovine Muscle”（IRMM製ERM-BB184）を使用した。認証値は、Bovine LiverがPb、Cd、Asを含む20元素、Pig KidneyがPb、Cdを含む7元素、Bovine MuscleがCd、Asを含む7元素である。

1.2. 乾燥肉

均質な食肉試料を調製するために、市販されている乾燥肉を入手した。食肉のみを原料とする、牛肉、豚肉および鶏肉のそれぞれを100%粉末にした無添加パウダー食品、ならびに無添加国産牛の干し肉を使用した。

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：富士フイルム和光純薬製 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 µg/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 µg/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 試料の前処理

3.1. 試料の粉碎

認証標準物質および無添加パウダー肉は粉末状であったため、そのまま使用した。干し肉は、岩谷産業社製ミルサー IFM-800 を用いて粉碎した。

3.2. MW分解

それぞれの試料について、0.5 g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、MW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、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、500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 DigiTUBEs）を用いて調製・保管した。

4. 試料の測定

4.1. ICP-MS

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 1 に示す内標準元素を用いて内標準法で定量した。

4.4. 水分含量の測定と補正

水分含量の測定には、加熱乾燥にヤマト科学社製定温乾燥機DVS403、秤量にメトラ・トレド社製電子天秤ME204T/00を使用した。予め加熱、放冷したアルミカップに粉末肉試料1 gを秤量し、135 °C、2時間乾燥して放冷後に秤量、以後恒量になるまで加熱、放冷、秤量の操作を繰り返した。

5. 妥当性評価

本法により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」³⁾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。

6. 肉試料を用いた添加回収試験

粉末にした牛干し肉0.5 gに、諸外国で牛肉に対して規制されているPb、Cd、Asを添加し、上述の前処理および測定を実施した。添加濃度は、PbについてはCODEX等の規制値である0.1 mg/kg、CdについてはEU等の規制値である0.05 mg/kg、Asについては香港の規制値である0.5 mg/kgになるように設定した。試験は5回行い、回収率を算出した。

(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. D. 研究結果および考察

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1に示す。測定モードは、前年度にマトリックスの異なる3種類の認証標準物質において妥当性が確認されたモードを選択した。検量線の直線性については、いずれの元素においても相関係数

が0.9997以上の良好な結果が得られた。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. Bovine Liver (SRM1577c)

Bovine Liverの測定および妥当性評価の結果を表2に示す。Kを除く16元素については、真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしていた。Kについては、真度がわずかに目標値を超えていたが、試料中濃度が高かったために、洗浄してもメモリーが少しずつ蓄積して上振れしたと考えられた。元素によっては、供試する試料量や希釈倍率の検討が必要と考えられる。なお、認証値が定量下限未満であったAg、Mo、Ni、および測定が困難であるSは、今回の対象から除外した。

2.2. Pig Kidney (ERM-BB186)

Pig Kidneyの測定および妥当性評価の結果を表3に示す。認証値のある8元素すべてにおいて、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Mn、Fe、Cu、Zn、Se、Pb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。

2.3. Bovine Muscle (ERM-BB184)

Bovine Muscleの測定および妥当性評価の結果を表4に示す。Cdを除く7元素において、真度、併行精度、室内再現精度の目標値を満たしていた。そのうち、Mn、Fe、Zn、As、Se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。Cdについては、認

証値が定量下限を下回っていたため、真度が小さくなったと考えられた。低濃度のCdを分析するためには、供試する試料量や希釈倍率の検討が必要と考えられる。

3. 肉試料の重金属類含有量

牛肉、豚肉、鶏肉の各パウダー食品および牛干し肉の分析結果を表5に示す。値はいずれも2回測定の平均値である。各パウダー食品において、V、Co、As、Cd、Pbはいずれも定量下限未満であった。牛干し肉においては、VとCdが定量下限未満であり、総じて牛肉パウダーよりやや高い元素含有量を示した。これらの肉試料は、CODEXやEUなど海外で規制値が設定されているPb、Cd、Asが含まれていないか、Asがわずかに含まれる程度であり、重金属類の精度管理におけるブランク試料として有効であることが示唆された。

今回の含有量調査結果が妥当な値か判断するために、食品成分表（八訂2023増補）に掲載されている生肉中の元素濃度と比較した。乾燥肉と生肉では水分含量が異なるため、乾燥重量当りに換算して求めた元素含有量を表6に示す。検討に用いた牛肉、豚肉、鶏肉のいずれの試料においても、分析値の元素ごとのオーダーは食品成分表とほぼ一致しており、一般的な肉試料を代表していると考えられた。したがって、本研究で使用した粉末乾燥肉を、肉由来の精度管理用試料の基材へ適用することは妥当であると考えられた。

4. 肉試料を用いた添加回収試験

添加回収試験の結果を表7に示す。牛干し肉にはAsがわずかに含有されていたため、

元の含有量を減算して添加回収率を算出した。いずれの元素も真度（平均回収率）は99.2～104%、ばらつき（変動係数）は1.3～3.9%の範囲にあり、良好な結果が得られた。

以上の結果より、粉末乾燥肉の精度管理試料へ適用可能性が確認された。

E. 結論

畜産肉を対象としてMW分解－ICP-MSを適用し、3種の認証標準物質（Bovine Liver、Pig Kidney、Bovine Muscle）を用いて分析妥当性の評価を行った。いずれの認証標準物質においても、測定した元素濃度は認証値とほぼ一致し、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。ただし、Bovine Liver中のKにおいては認証値が高く、Bovine Muscle中のCdにおいては認証値が低かったことから、検討した条件では妥当性を確認できなかった。外部精度管理において多元素を設定する場合には、それぞれの濃度範囲に留意して、引き続き検討を行う必要がある。

一方、重金属類を調査した市販肉試料においては、海外で規制値が設定されているPb、Cd、Asが含まれていないか、Asがわずかに含まれる程度であり、重金属類の精度管理におけるブランク試料として有効であることが示唆された。これら3元素の海外規制値レベルでの添加回収試験の結果は良好であり、本分析法による市販粉末肉の精度管理試料への適用可能性が確認された。

今後は粉末肉を用いた外部精度管理試料の作製方法の検討やその品質評価を行い、パイロットスタディとしての室間共同試験に向けた検討を行う予定である。現在、食

肉中の重金属が値付けされた認証標準物質は日本国内で製造されていない。また、海外からの輸入に関しては家畜伝染病予防法により輸入が非常に困難である。それゆえ、日本国内で容易に入手できる食肉の認証標準物質に資する試料を作製することは、日本における食肉中の重金属類分析法の発展につながると考えられる。

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

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

油谷藍子, 村野晃一, 村上太郎, 新矢将尚:
マイクロウェーブ分解-ICP-MS法による
食品中元素分析法の妥当性評価, 日本食品
衛生学会第120回学術講演会, 愛知 (2024)

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) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通

以下 図表

表1 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)
Na	23	He	Y (87)	50 ~ 1000
Mg	24	He	Y (88)	5 ~ 100
P	31	He	Y (89)	50 ~ 500
K	39	He	Y (89)	50 ~ 1000
Ca	40	H2	Y (89)	5 ~ 100
V	51	He	Y (89)	0.1 ~ 5
Cr	52	He	Y (89)	0.5 ~ 10
Mn	55	He	Y (89)	0.5 ~ 10
Fe	56	He	Y (89)	50 ~ 1000
Co	59	He	Y (89)	0.05 ~ 5
Cu	63	No Gas	Y (89)	5 ~ 100
Zn	66	No Gas	Y (89)	5 ~ 500
As	75	H2	Y (89)	0.05 ~ 5
Se	78	He	Y (89)	1 ~ 50
Sr	88	No Gas	Y (89)	0.5 ~ 100
Cd	111	No Gas	In (115)	0.05 ~ 5
Pb	208	No Gas	Tl (205)	0.05 ~ 5

表 2 Bovine Liver の妥当性評価結果

主要元素	質量数 (<i>m/z</i>)	測定 モード	認証値 (%)		測定値(総平均) (%)		真度 (%)	併行精度 (%)	室内 再現精度 (%)	判定
Na	23	He	0.2033	± 0.0064	<u>0.1983</u>		98	1.9	3.0	◎
P*	31	He	1.175	± 0.027	1.127		96	2.8	5.0	○
K	39	He	1.023	± 0.064	1.135		111	2.0	6.3	×

主要元素	質量数 (<i>m/z</i>)	測定 モード	認証値 (mg/kg)		測定値(総平均) (mg/kg)		真度 (%)	併行精度 (%)	室内 再現精度 (%)	判定
Mg	24	He	620	± 42	<u>592</u>		96	2.2	3	◎
Ca	40	H2	131	± 10	<u>130</u>		100	1.5	6.4	◎

微量元素	質量数 (<i>m/z</i>)	測定 モード	認証値 (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	He	10.46	± 0.47	<u>10.04</u>		96	1.9	4.5	◎
Fe	56	He	197.94	± 0.65	194.98		99	1.8	4.7	○
Co	59	He	0.300	± 0.018	<u>0.307</u>		102	2.2	3.2	◎
Cu	63	No Gas	275.2	± 4.6	269.4		98	1.9	5.4	○
Zn	66	No Gas	181.1	± 1.0	183.1		101	1.8	2.5	○
Se	78	He	2.031	± 0.045	1.915		94	4.3	5.1	○

微量元素	質量数 (<i>m/z</i>)	測定 モード	認証値 (μg/kg)		測定値(総平均) (μg/kg)		真度 (%)	併行精度 (%)	室内 再現精度 (%)	判定
V	51	He	8.17	± 0.66	9.78		120	5.9	12	○
Cr	52	He	53	± 14	<u>53</u>		101	6.6	14	◎
As	75	H2	19.6	± 1.4	18.1		92	10	11	○
Sr	88	No Gas	95.3	± 4.2	90.6		95	2.2	7.1	○
Cd	111	No Gas	97.0	± 1.4	92.7		96	2.4	4.5	○
Pb	208	No Gas	62.8	± 1.00	59.5		95	1.9	2.2	○

妥当性判定基準：

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%

判定基準を満たすものは○，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（下線）については◎とした。

* P については参考値

表3 Pig kidney の妥当性評価結果

微量元素	質量数 (<i>m/z</i>)	測定 モード	認証値 (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	He	7.26	±	0.25	<u>7.05</u>	97	2.5	5.8	◎
Fe	56	He	255	±	13	<u>244</u>	96	1.1	2.8	◎
Cu	63	No Gas	36.5	±	1.8	<u>35.1</u>	96	1.8	5.3	◎
Zn	66	No Gas	134	±	5.0	<u>132</u>	99	1.8	3.2	◎
Se	78	He	10.3	±	0.9	<u>9.59</u>	93	5.0	5.0	◎
Cd	111	No Gas	1.09	±	0.05	1.03	95	2.7	2.8	○
Pb	208	No Gas	0.040	±	0.005	<u>0.039</u>	98	6.8	8.0	◎

妥当性判定基準：

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%

判定基準を満たすものは○，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（下線）については◎とした。

表4 Bovine muscle の妥当性評価結果

微量元素	質量数 (<i>m/z</i>)	測定 モード	認証値 (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	He	0.276	±	0.013	<u>0.287</u>	104	2.5	5.8	◎
Fe	56	He	75	±	4	<u>75</u>	100	1.1	2.8	◎
Cu	63	No Gas	2.31	±	0.09	2.14	93	1.8	5.3	○
Zn	66	No Gas	146	±	7.0	<u>144</u>	98	1.8	3.2	◎
As	75	H2	0.0234	±	0.0026	<u>0.021</u>	90	5.0	5.0	◎
Se	78	He	0.45	±	0.04	<u>0.43</u>	96	2.7	2.8	◎
Cd	111	No Gas	0.0022	±	0.0004	0.0016	74	6.8	8.0	×

妥当性判定基準：

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%

判定基準を満たすものは○，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（下線）については◎とした。

表5 肉試料の重金属類含有量

微量元素	質量数 (<i>m/z</i>)	測定 モード	鶏肉パウダー (mg/kg)	豚肉パウダー (mg/kg)	牛肉パウダー (mg/kg)	牛干し肉 (mg/kg)	定量下限 (mg/kg)
Na	23	He	2064	982	1148	1378	5
Mg	24	He	645	757	743	848	0.5
P	31	He	5037	5936	5034	7046	5
K	39	He	8146	10352	7463	13726	5
Ca	40	H2	223	173	247	111	0.5
V	51	He	ND	ND	ND	ND	0.01
Cr	52	He	0.121	0.133	0.091	0.317	0.05
Mn	55	He	0.247	0.258	0.337	0.311	0.05
Fe	56	He	80.6	35.6	26.9	98.8	5
Co	59	He	ND	ND	ND	0.033	0.005
Cu	63	No Gas	2.21	2.65	1.56	2.53	0.5
Zn	66	No Gas	265	76.9	44.0	135	0.5
As	75	H2	ND	ND	ND	0.022	0.005
Se	82	He	0.221	1.181	0.693	0.431	0.1
Sr	88	No Gas	0.261	0.149	0.242	0.062	0.05
Cd	111	No Gas	ND	ND	ND	ND	0.005
Pb	208	No Gas	ND	ND	ND	0.011	0.005
水分 (%)			3.25	5.83	4.45	9.77	

ND：定量下限未満

表6 水分補正を行った肉試料の重金属類含有量および食品成分表（八訂）との比較

	肉試料分析結果 (mg/100g-dw)				食品成分表（生肉）八訂2023増補 (mg/100g-dw)		
	鶏肉パウダー	豚肉パウダー	牛肉パウダー	牛干し肉	鶏肉	豚肉	牛肉
Na	119	104	216	153	113	155	114
Mg	77	80	68	94	43	61	46
P	520	630	527	781	296	525	364
K	771	1099	853	1521	431	933	680
Ca	25.6	18.4	23.3	12.3	21.6	11.7	9.7
Mn	0.035	0.027	0.026	0.034	0.027	0.029	0.000
Fe	2.78	3.78	8.43	11.0	2.43	1.46	2.18
Cu	0.162	0.281	0.231	0.280	0.189	0.262	0.170
Zn	4.55	8.17	27.7	15.0	4.58	7.87	11.9
水分 (%)	3.25	5.83	4.45	9.77	62.9	65.7	58.8

表7 牛干し肉を用いた添加回収試験結果

	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			変動係数 (%)
As	0.5	103	±	2.5	2.4
Cd	0.05	99.2	±	3.9	3.9
Pb	0.1	104	±	1.4	1.3

回収率：平均回収率±標準偏差 (n=5)

令和 6 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 2 年目である令和 6 年度は、前年度に引き続き OA 群の精確な分析方法を検討するとともに、昨年度調製した調査試料の均質性を評価した。均質性評価の結果は、調査試料の安定性評価試験のデータの一部にもなる。精確な分析方法の検討では、昨年度開発した分析法に酸添加/高温抽出法を適用した結果、抽出が困難である実試料分析において有効である可能性を示した。また、新たにアセトニトリルを抽出溶媒に用いた分析法を検討した結果、従来法で行われていた固相抽出精製を必要としない、簡便な分析法を確立できた。一方、調査試料の均質性評価について、ISO Guide 35 に基づいた評価試験を実施したところ、試験所間比較試験での使用に十分な均質性を有することが示された。

A. 研究目的

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

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

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、OA群に対する選択性や感度の低さなどの欠点があった。このような背景のもと、2015年3月に下痢性貝毒の公定検査法として液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（LC-MS/MS）による機器分析法が導入された。これと同時に規制値も変更され、それまでの可食部1 gあたりの毒量が0.05 MU（マウスユニット）であった規制値が、可食部につき0.16 mg OA/kgに変更された。

食品分析で得られる分析値は、分析方法や分析装置など様々な要因によって正しい値から偏ってしまう。そのため、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。さらに、食品の輸出が促進され、輸入量も増加している状況に鑑みれば、食品分析によって規制値の誤判定を回避することは、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2年目である令和6年度は、OA群の精確な分析方法を検討するために、特に従来の前処理方法を精確化するとともに、新たにアセトニトリルを抽出溶媒に用いる精製工程が少ない簡易な抽出方法も検討した。さらに、昨年度に調製したパイロットスタディの調査試料の均質性を評価した。なお、均質性試験の分析結果は、安定性の評価試験のデータにも使用される。

B. 方法

1. 抽出方法の精確化の検討

(1) 材料・試薬

ホタテガイ試料には流通している国内産ホタテガイを用いた。また、令和4年度に実施したホタテガイ中OA群の試験所間比較試験における調査試料も用いた。

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) 検討した分析法（分析法1）

本法は、昨年度開発した分析法の抽出操作を改良した方法である。その概要を図1のフローチャートに示す。また、操作手順を以下に示す。

a. 抽出及び加水分解操作

ホタテガイ試料2.0 gを遠沈管にとり、0.5 %酢酸/メタノール溶液9 mLを加えた。これを60 °Cで5分間加熱した後にホモジナイズし、遠心分離によって上清を得た。沈殿物に0.5 %酢酸/メタノール溶液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 μ L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 μ L加えて中和した。

b. 精製操作

得られた処理液に*n*-ヘキサン2.5 mLを加え脱脂を行った。さらに、この処理を繰り返した。

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、試料溶液とした。

c. LC-MS/MS測定

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

2. 抽出方法の簡易化の検討

(1) 材料・試薬

1(1)と同じ材料および試薬を用いた。

(2) 検討した分析法（分析法2）

本法は、下痢性貝毒分析法の抽出溶媒に広く使用されているメタノールの代替に、アセトニトリルを用いた方法である。その概要を図2のフローチャートに示す。また、操作手順を以下に示す。

a. 抽出及び加水分解操作

ホタテガイ試料2.0 gを遠沈管にとり、アセトニトリル9 mLを加えた。これをホモジナイズし、遠心分離によって上清を得た。沈殿物に90 %アセトニトリル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 %アセトニトリルを加えて正確

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 μ Lを加え、76 $^{\circ}$ Cで40分間加水分解した。その後、2.5 mol/L塩酸を250 μ L加え中和した。

b. 精製操作

得られた処理液に塩化ナトリウムを3 g加えてから液/液分配し、有機層をとった。水層にアセトニトリルを9 mL加えてから液/液分配し、有機層をとった。得られた有機層を合わせ、アセトニトリルによって適当倍率に希釈し、試料溶液とした。

c. LC-MS/MS測定

得られた試料溶液のLC/MS/MS測定は、1(2)cと同じ装置を用い、同じ測定条件で行った。

3. 均質性評価試験

(1)材料・試薬

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

(2)均質性評価試験の方法

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

分析には、昨年度開発した分析法に内標準法を適用した方法を適用した。その操作手順を以下に示す。

a. 抽出及び加水分解操作

調査試料2.0 gを遠沈管にとり、内標準としてDTX2のメタノール溶液500 μ Lを加

えた。さらに、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 %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 %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 μ Lを加え、76 $^{\circ}$ Cで40分間加水分解した。その後、2.5 mol/L塩酸を250 μ L加え中和した。

b. 精製操作

得られた処理液を1(2)bに記した手順で精製し、試料溶液を得た。

c. LC-MS/MS測定

得られた試料溶液のLC/MS/MS測定は、1(2)cと同じ装置を用い、同じ測定条件で行った。

(倫理面への配慮)

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

C. D. 研究結果および考察

1. 抽出方法の精確化の検討

昨年度開発した分析法は、公定法と同じ手順でOA群をメタノールで抽出し加水分解した後に、HLBカートリッジを用いて簡易かつ高精度に精製する方法である。一方で、最近、ホタテガイ試料からのOA群の抽出において、酸を添加したメタノ

ールを用い、さらに抽出液を加熱することによって高効率に抽出できることが報告された。そこで本研究においても、この酸添加/加熱抽出法を昨年度開発した分析法に適用し、その効果を検証した。

ホタテガイ試料にOA群を各0.05 mg/kgになるように添加した試料を用いて添加回収試験を行った結果を表2に示す。今回検討した方法（分析法1）では、酸の添加によるOA群の分解は認められず、昨年度開発した分析法と同様に良好な結果が得られた。添加回収試験では実試料と比較して比較的容易にOA群の抽出が可能であることもあり、酸添加/加熱の効果は明確には認められなかった。

そこで、OA群の抽出がより困難と考えられる試料として、令和4年度に実施したホタテガイ中OA群の試験所間比較試験の調査試料も分析した。その結果を表3に示す。なお、この調査試料にはDTX2は含まれていないため、OAとDTX1のみを測定対象とした。その結果、両法による分析値に大きな違いは認められなかった。この試料のOAはそのほとんどが標準試料を添加して濃度調整されたものであるのに対し、ODTX1は自然に毒化されたものであるため、より高い抽出力が必要と考えられる。このDTX1では今年度検討した分析法の結果がより良好と考えられた。そのため、試験所間比較に試験において参照値を付与する際に、この方法を採用することが望ましいと考えられた。

2. 抽出方法の簡易化の検討

一般的な下痢性貝毒分析ではメタノールを抽出溶媒に用いる。これに対し、残

留農薬分析ではアセトニトリルを抽出溶媒に利用し、塩析をすることによって精製を行う方法が適用されている。そこで、下痢性貝毒分析においてもアセトニトリルを抽出溶媒にすることで、抽出後の精製過程を簡略化することを検討した。

はじめに、アセトニトリルを抽出溶媒とした場合でもOA群の加水分解が進むかを検証した。令和4年度に実施したホタテガイ中OA群の試験所間比較試験の調査試料にはDTX1の誘導体化物が含有されている。そこで、この調査試料を加水分解処理する分析法と、しない分析法で分析しDTX1を定量した。さらに、比較のためにメタノールを抽出溶媒として同様に分析した。その結果を表4に示す。加水分解処理なしの分析値は遊離型のDTX1の濃度を示すのに対し、加水分解処理ありの分析値は遊離型+エステル型のDTX1の濃度を示す。これより、アセトニトリル中での加水分解によっても、メタノール中と同程度に誘導体化物がDTX1に分解されたことが示唆された。すなわち、アセトニトリルを用いた場合でも従来法と比較可能な分析値を得ることが可能と考えられた。

次に、分析法2による精製の程度を、マトリックス効果（*ME*）を指標として評価した。その際、比較のために分析法2による処理液をさらに分散固相抽出によっても精製した溶液を調製し（分散固相抽出剤としてはPSA、ODS、HLB（相当品）を使用）、*ME* 値を比較した。なお、*ME* 値は次式から求めた。

$$ME = \frac{[\text{試料溶液の OA 群の面積}]}{[\text{標準液の OA 群の面積}]}$$

その結果を図3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、 ME 値は 1 となる。一般に、 ME 値が 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いる。分析法 2 による処理液をさらに PSA 処理して得た試料溶液の ME 値はこの基準を満たした。ただし、この処理による OA 群の回収率を評価したところ、PSA の使用量とともに回収率は低くなり、有効な ME 値を与える処理量では OA 群の回収率は 10 %以下になることが示された。

一方で図 3 に示されるように、分析法 2 による試料溶液の ME 値は、0.8~1.2 の基準をわずかに超えた。また、ODS や HLB 相当品を用いた分散固相抽出処理ではマトリックス効果の低減に効果がないことも示された。そこで、分析法 2 の処理液をアセトニトリルで希釈することにより、マトリックス効果の低減を図った。結果として、希釈倍率が高くなるほど ME 値は小さくなり、10 倍希釈した場合に 1.12~1.18 になることが示された。

そこで、この方法を用いて 4 種類のホタテガイ試料を用いた添加回収試験を行った。その結果を表 5 に示す。いずれの試料においても OA 群の回収率は良好であり、本法の正確さと精度が良好であることが示された。

以上のように、本研究で検討したアセトニトリルを抽出溶媒に使用した分析法 2 は、試料溶液の希釈が可能な残留濃度が比較的高いホタテガイ試料の分析において、従来必要とされている固相抽出処

理を必要としない簡易な分析を可能とすることが示された。

3. 均質性評価試験

(1) 不確かさの算出

調製した調査試料から 10 本を無作為に選びだし、各瓶から異なる 2 か所を採取して分析した。その結果を図 4 に示す。得られた結果を一元配置分散分析によって評価したところ、OA については瓶間のばらつきは有意ではなかったが、DTX1 は有意であることが示された (P : 0.05)。ただし、均質性の有意性は適用した分析法の精度にも影響されるため、次の検討において、均質性に関する不確かさを評価することにした。

認証標準物質の生産に関する国際基準である ISO Guide 35 に則り、均質性に関する不確かさを評価した。その結果、分散分析の結果を基に算出した瓶間均質性

$$\text{標準偏差 } s_{bb} \left(= \sqrt{\frac{MS_{\text{among}} - MS_{\text{within}}}{n}} \right)$$

と、測定のばらつきに由来する u_{bb} ($=$

$$\sqrt{\frac{MS_{\text{within}}}{n}} \sqrt{\frac{2}{v_{MS_{\text{within}}}}})$$

を表 6 に示す。両者

のうちの大きい方を均質性に関する不確かさとすることとし、結果として OA については u_{bb} を、DTX1 については s_{bb} を均質性に関する不確かさとした。

(2) 算出した不確かさの評価

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

る。

$$S_s \leq 0.3\sigma$$

今回均質性を評価した調査試料を用いた試験所間比較試験は 2025 年度に実施予定である。そのため、技能試験の結果として得られる σ は未知である。そこで、調査試料の予備分析結果を Horwitz の修正式に代入することによって、試験所の結果のばらつきの予測値を求めた。調査試料中の 0A 群の予備分析結果を示すことになるために、本報告書では具体的な分析値の明示は割愛する。結果として、調製した調査試料は、試験所間比較試験における試験所の結果のばらつきの予測値の 0.3 倍以下であることが示された。すなわち、本調査試料は試験所間比較試験での使用のために十分な均質性を有することが示された。

E. 結論

本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査パイロットスタディを実施することを最終目的としている。3年計画の2年目である令和6年度は、前年度に引き続き0A群の精確な分析方法を検討するとともに、昨年度調製した調査試料の均質性を評価した。均質性評価の結果は、調査試料の安定性評価試験のデータの一部にもなるものである。

精確な分析方法の検討では、昨年度開発した分析法に酸添加/高温抽出法を適用した。その結果、特に抽出が困難である実試料分析において検討した方法が有効である可能性が示された。また、新たにアセトニトリルを抽出溶媒に用いる分析工程が少ない簡易な抽出方法も検討した。

その結果、従来法で行われていた固相抽出精製を必要としない、簡便な分析法が確立できた。この方法は、残留濃度が比較的高いホタテガイ試料の分析に有効であると考えられた。

一方、調査試料の均質性評価については、ISO Guide 35に基づいた評価を実施したところ、試験所間比較試験での使用に十分な均質性を有することが示された。

本研究では2025年度に、試験所間比較試験のパイロットスタディを実施する予定である。本年度までに調査試料の調製と均質性評価は完了しており、パイロットスタディは円滑に実施可能である。一方で、参加機関の分析値の評価を正確に行うためには、本年度検討した分析法をさらに精確化する等、更なる分析法開発にも取り組む必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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(4, 5), 185-191 (2024).

2. 学会発表

- 1) 柳瀬望, 小玉玲菜, 栗本悠可, 鎗田孝, 下痢性貝毒分析における精確なLC-MS/MS測定のための移動相の検討, 日本分析化学会関東支部第18回茨城地区分析技術交流会(水戸), 2024.
- 2) 栗本悠, 柳瀬望, 中居杏瑞, 鎗田孝,

アセトニトリル抽出を用いた迅速な下痢性貝毒分析法の開発，日本分析化学会関東支部第18回茨城地区分析技術交流会（水戸），2024.

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

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 分析法 1 による添加回収試験の結果

適用した分析法	回収率 (%) (平均±標準偏差, $n=3$)		
	OA	DTX1	DTX2
昨年度開発した方法	101±2	100±2	97±4
今年度開発した方法 (分析法 1)	94±1	96±2	97±1

表3 分析法 1 による調査試料*の分析結果

適用した分析法	回収率 (%) (平均±標準偏差, $n=3$)	
	OA	DTX1
昨年度開発した方法	100±3	100±3
今年度開発した方法 (分析法 1)	101±1	103±3

*R4 年度実施の試験所間比較試験における調査試料

表 4 加水分解処理の有無による調査試料*中 DTX1 の定量値の比較

抽出溶媒 (分析法)	加水分解処理	DTX1 の分析値 (μg/kg) (平均±標準偏差, <i>n</i> =4)
メタノール (昨年度開発した方法)	無	11±2
	有	33±7
アセトニトリル (分析法 2)	無	9±2
	有	29±5

*R4 年度実施の試験所間比較試験における調査試料

表5 分析法 2 による添加回収試験の結果

試料	回収率 (%) (平均±標準偏差, <i>n</i> =3)		
	OA	DTX1	DTX2
A	105±14	111±4	116±4
B	107±13	102±9	96±7
C	105±5	104±3	99±8
D	102±6	108±9	99±6

表 6 調査試料の均質性に関する不確かさ評価

不確かさ要因	相対標準不確かさ (%)	
	OA	DTX1
s_{bb}	0.26	5.6
U_{bb}	2.0	1.5

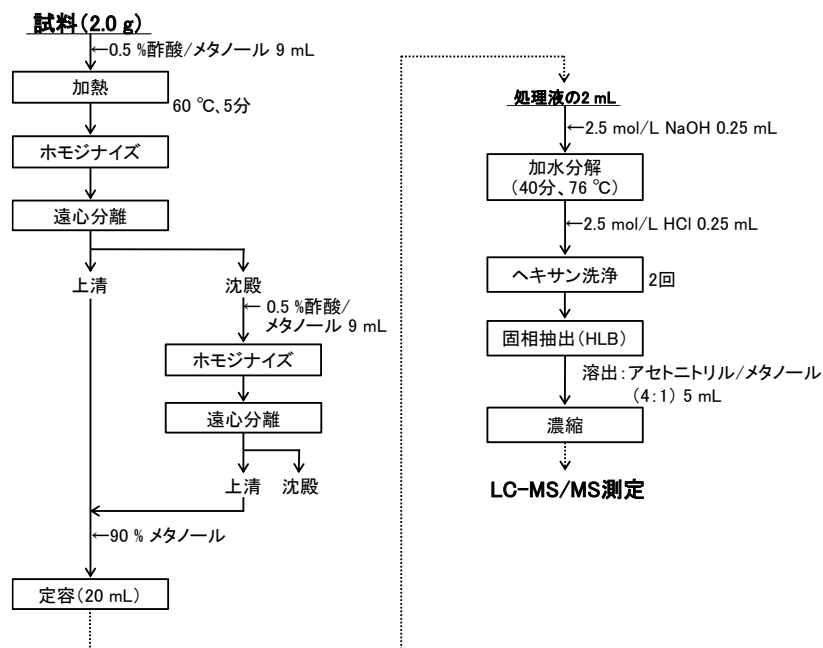


図1 分析法 1 のフローチャート

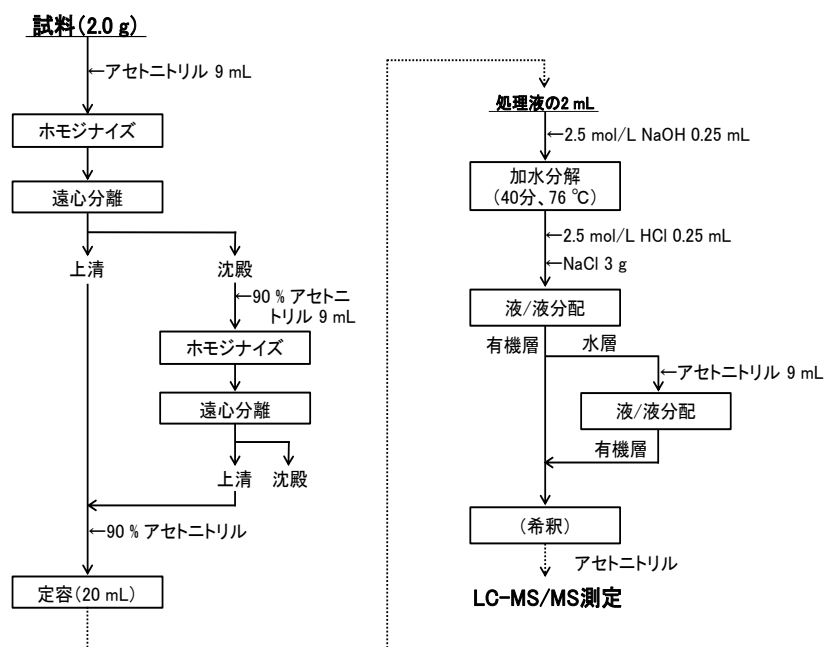


図2 分析法 2 のフローチャート

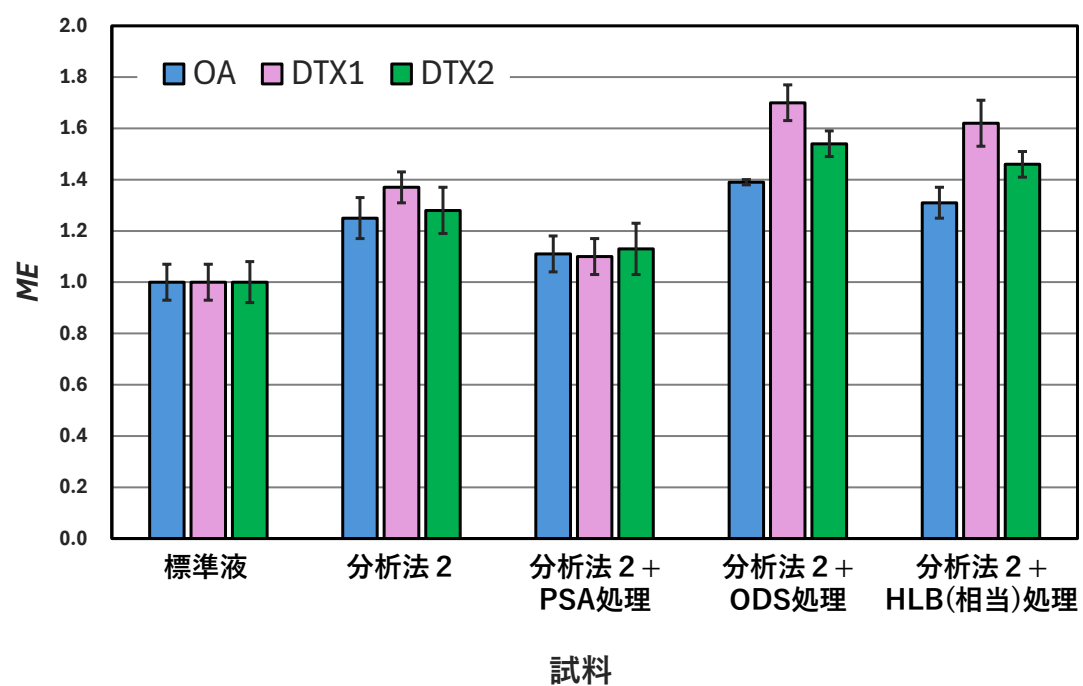


図 3 各種分析法によって精製処理した試験溶液のマトリックス効果

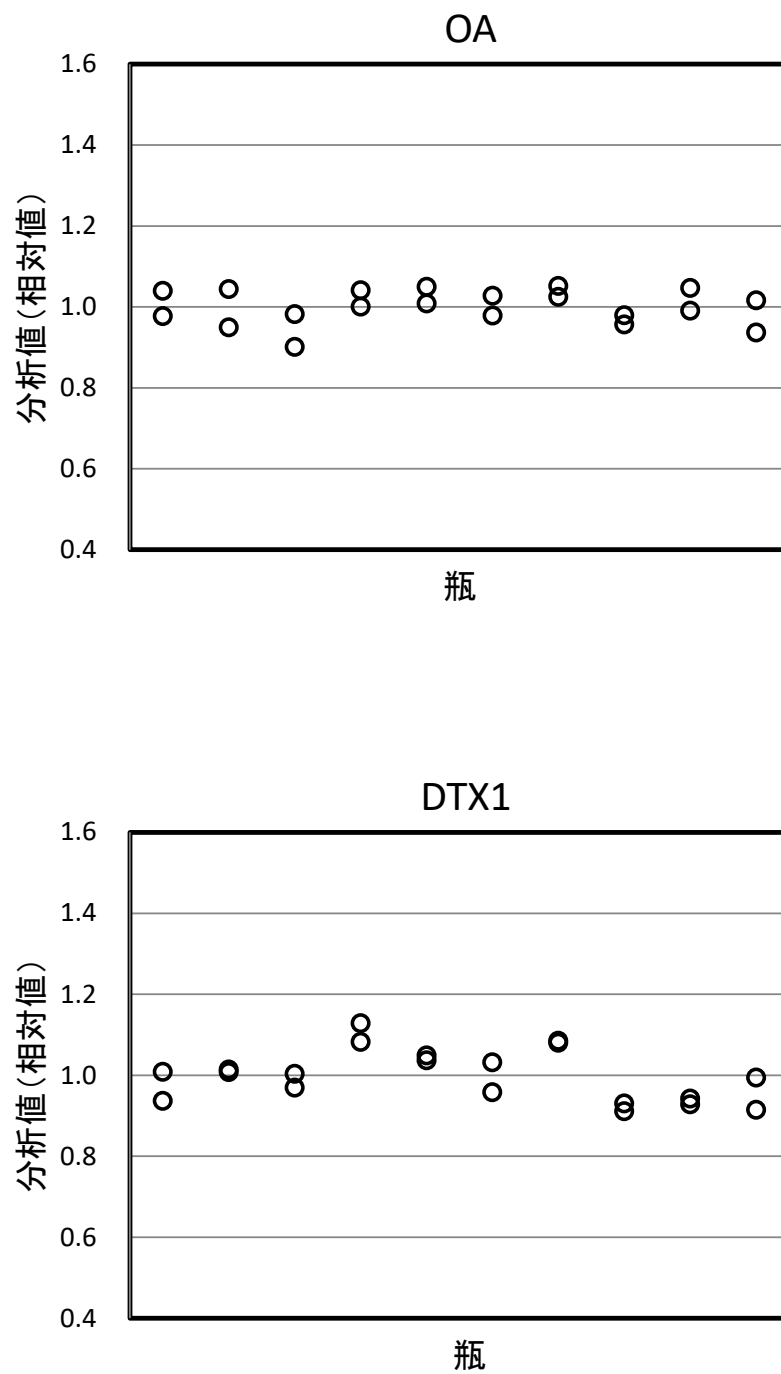


図 4 調査試料の均質性評価における分析結果

令和 6 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 副所長
研究分担者	大竹 貴光	（国研）産業技術総合研究所 上級主任研究員
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した玄米試料中の農薬について、長期の安定性試験を実施して農薬濃度のモニタリングを行った。また、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、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ほうれんそう中の農薬に対し、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。ここで決定した噴霧条件で調製したほうれんそう試料を用いて、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、ほうれんそう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、外部精度管理のパイロットスタディで用いた玄米試料中のクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを対象とし、長期安定性評価を行った。評価のための分析では、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で、長期安定性を正しく評価した。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、同様に正確な分析値を付与することで、試料調製のための噴霧条件決定に寄与することを目的とした。さらに、ここで決定した噴霧条件で調製したほうれんそう試料を用いて、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、ほうれんそう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ほうれんそう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) 玄米中農薬の長期安定性評価

2022 年度及び 2023 年度に、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 (今回で 3 年目)。分析には、IDMS を適用した一斉試験法を用いた。

(2) 試料調製の条件検討のための残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

IDMS を適用した一斉試験法を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用ほうれんそう試料中の対象農薬を分析した。試料の調製条件は、噴霧温度: 100 °C、懸濁液濃度: 20 %、溶媒のアセトニトリル濃度: 30 vol%であった。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ほうれんそう試料の均質性評価

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150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を適用した一斉試験法を用いた。

(4)パイロットスタディのためのほうれんそう試料中農薬の安定性評価

パイロットスタディの試験期間前後における農薬の安定性を評価した。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ほうれんそう試料中農薬の値付け

(3)で均質性が確認されたほうれんそう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、STQ法を用い、不確かさの算出も行った。

(6)残留農薬含有のほうれんそう試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

30機関から参加申し込みがあった。これらの機関に対して、2025年2月17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（2025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30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℃）を用いた。

②ほうれんそう試料

試料調製の条件検討のための分析では、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用ほうれんそう試料（噴霧温度：100℃、懸濁液濃度：20%、溶媒のアセトニトリル濃度：30 vol%）を分析対象とした。またパイロットスタディに関する分析でも、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（噴霧温度：100℃、懸濁液濃度：20%、溶媒のアセトニトリル濃度：30 vol%）を用いた。

(2) 標準品

測定対象農薬の高純度標準品として、富士フイ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 法で用いた分散固相剤は、Supel QuE チューブ (無水 MgSO_4 : 150 mg, PSA: 50 mg, C18: 50 mg, 活性炭: 50 mg; シグマアルドリッチ) 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) 玄米中農薬の長期安定性評価用

クロルピリホス- d_{10} 、ダイアジノン- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、マラチオン- d_6 を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 A とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液 A を調製した。一方、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液 A を調製した。さらに、農薬混合溶液 A、内標準溶液 A、アラクロール溶液 A、Ac を混合することにより、検量線溶液 A を調製した。検量線溶液 A の各成分濃度は、3(1) に示す前処理法によって、玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調製した。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体含有しないことを確認したほう

れんそう試料を 3(1) に示す前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の検量線溶液 A 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) 試料調製の条件検討、及びパイロットスタディのための均質性および安定性の評価並びに値付けを目的としたほうれんそう試料の分析用

(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(2) と 3(3) に示す前処理法によって残留農薬含有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。

3. 分析方法

玄米中農薬の長期安定性評価の一斉試験法による評価では分析法 1 (一斉試験法) を、ほうれんそう試料中農薬の分析では分析法 2 (一斉試験法)、3 (STQ 法) を用いた。

(1) 分析法 1 (一斉試験法、玄米試料の分析)

玄米試料 3 g に内標準溶液 A 0.4 mL を加えて静置した。これに水 10 mL を加えて 15 分静置した後、AN 25 mL を加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN 10 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。これに NaCl 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 AN 10 mL でコンディショニングした Agilent Technologies 製 Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ (1 g) を

用いて、振とうによって得られたAN層とAN2 mLを通液する処理を行った。得られた処理液を無水Na₂SO₄によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol (3:1) 混液 2 mLに溶解した。Supelco製ENVI-Carb/LC-NH₂固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) をAN/Tol (3:1) 混液10 mLでコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらにAN/Tol (3:1) 混液20 mLを注入した。全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)、285 (マラチオン)、291 (マラチオン-*d*₆)、160 (アラクロール)。

(2) 分析法2 (一斉試験法、ほうれんそう試料の分析)

ほうれんそう試料0.5 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 と同じであった。

(3) 分析法3 (STQ法、残留農薬含有の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 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 MgSO₄、1 g の NaCl を加え、1 分間振とう (手振り) した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液 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ィサイエンス製 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 Tol10.4 mL を添加し、その試料を Ac2 mL と Tol1/AN (1:3)2 mL でコンディショニングしたアイスティサイエンス製 GCS-20 mg/PSA-30 mg により精製した (溶出には Tol1/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 と同じであった。

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) 玄米中農薬の長期安定性評価

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。得られた結果は、2022 年及び 2023 年に得られた農薬の分析結果と比較した。

(3) 試料調製の条件検討のための残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

一斉試験法を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤに

より開発した残留農薬検査用ほうれんそう試料中の対象農薬を分析した（試料の調製条件は、噴霧温度：100 °C、懸濁液濃度：20 %、溶媒のアセトニトリル濃度：30 vol%）。得られた結果は、昨年度までの結果や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ほうれんそう試料の均質性評価

式(1)に準じて一斉試験法（分析法 2）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ほうれんそう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 2）による分析値を算出した。パイロットスタディの試験期間の前後における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ほうれんそう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 2, 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 $u(C_{ind,1})$ 、 $u(C_{ind,2})$ 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 STQ 法とした。 $u(C_{ind,1})$ 、

$u(C_{ind,2})$ の逆数を重みとして、一斉試験法と STQ 法の平均値 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。一斉試験法と STQ 法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) ほうれんそう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) 玄米中農薬の長期安定性評価

今回得られた結果と、2022 年度及び 2023 年度に得られた結果を図 1 に示す。これより、ダイアジノンとクロルピリホスは濃度が減少傾向であり、フェニトロチオンは今年度に特に濃度が減少したことがわかった。一方、マラチオンも濃度が減少しているようにも思えるが、分析のバラツキの範囲内である可能性もあり、これまでの結果からは濃度減少しているかどうかを明確に判断できないと考えられる。以上から、もし技能試験後に

玄米試料を精度管理用試料として使用する場合、例えば分析値の保証はせずに均質な精度管理試料として使用してもらう等であれば、使用可能であると考えられる。

(2) 試料調製の条件検討のための残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用ほうれんそう試料（試料の調製条件は、噴霧温度：100 °C、懸濁液濃度：20 %、溶媒のアセトニトリル濃度：30 vol%）の 4 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法によって分析した。得られた結果を表 1（マトリックスマッチ検量線を使用）に示す。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 1）を用いて、調製時の回収率を計算した結果を表 2 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、51 %から 67 %であった。昨年度も、スプレードライヤの条件検討を行ったが、回収率に多少の差は見られたものの、問題になるような低い回収率となる結果はなかった。そこで、試料のハンドリングや収量が良い条件を優先に選択するのが適切であると考え、パイロットスタディに用いる試料は、噴霧温度：100 °C、懸濁液濃度：15 %、溶媒のアセトニトリル濃度：30 vol%の条件で調製することとした。

(3) パイロットスタディに用いるほうれんそう試料の均質性評価

得られた分析結果を図 2 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 $s_{bb} \left(= \frac{MS_{among} - MS_{within}}{n} \right)$ と

測定 の ば ら つ き に 由 来 す る u_{bb}

$\left(= \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \sqrt{\frac{2}{v_{MS_{within}}}} \right)$ を求めたところ、

表 3 の通りであった。この結果から、均質性試験の不確かさは 0.49 % から 1.38 % 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ほうれんそう試料中の農薬の安定性評価

得られた結果を表 4 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、試験期間中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ほうれんそう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 5 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) 残留農薬含有のほうれんそう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 6 に示す。表 5 に示した、IDMS によって得られた参照値と比較すると、マラチオンを除いて、おおよそ一致

していた。マラチオンの分析値の差の原因は、マトリックス効果や校正用標準溶液の種類の違い等が考えられたが、詳細は今後の検討が必要である。

E. 結論

IDMS を用いて高精度化した一斉試験法によって、玄米試料中農薬の長期安定性を評価した。今回が 3 年目であるが、引き続きモニタリングを行う予定である。また同方法により、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った。決定した噴霧条件によって調製した、ほうれんそう試料を用いた外部精度管理のパイロットスタディでは、まず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。またパイロットスタディにおいては、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Otake, T., Nakamura, K., Hirabayashi, N., and Watanabe, T.: A reliable quantification of

organophosphorus pesticides in brown rice samples for proficiency testing using Japanese official analytical method, QuEChERS, and modified QuEChERS combined with isotope dilution mass spectrometry. Journal of Pesticide Science, 49, 179-185 (2024)

2. 学会発表

1) 大竹貴光、中村圭介、平林尚之、渡辺卓穂：技能試験の玄米試料に含まれる有機りん系農薬に対する信頼性が高い定量値の付与、第47回農薬残留分析・第41回農薬環境科学合同研究会、徳島、2024

2) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康、平林尚之、渡辺卓穂：スプレードライヤを用いて調製した玄米試料中の有機りん系農薬を対象とした超臨界流体抽出法の評価、日本食品衛生学会第120回学術講演会、愛知、2024

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用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	調製条件
	噴霧温度: 100 °C、懸濁液濃度: 20 %、 溶媒のアセトニトリル濃度: 30 vol%
クロルピリホス	0.051±0.0005
ダイアジノン	0.210±0.001
フェニトロチオン	0.129±0.001
マラチオン	0.134±0.004

表2 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	調製条件
	噴霧温度: 100 °C、懸濁液濃度: 20 %、 溶媒のアセトニトリル濃度: 30 vol%
クロルピリホス	50.9
ダイアジノン	52.4
フェニトロチオン	64.3
マラチオン	67.1

表3 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	—	0.00769
ダイアジノン	—	0.00491
フェニトロチオン	—	0.00705
マラチオン	—	0.01375

表4 ほうれんそう試料中農薬の安定性評価 (平均値±標準偏差, n=4, mg/kg)

対象農薬	分析日: 2025/1/29	分析日: 2025/4/1
クロルピリホス	0.071±0.001	0.070±0.002
ダイアジノン	0.248±0.001	0.249±0.001
フェニトロチオン	0.141±0.001	0.141±0.001
マラチオン	0.126±0.001	0.128±0.003

表5 IDMSによるほうれんそう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	0.071±0.004
ダイアジノン	0.250±0.009
フェントロチオン	0.141±0.005
マラチオン	0.126±0.007

(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6 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± <i>NIQR</i>
クロルピリホス	0.080±0.012
ダイアジノン	0.246±0.030
フェントロチオン	0.153±0.024
マラチオン	0.154±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)

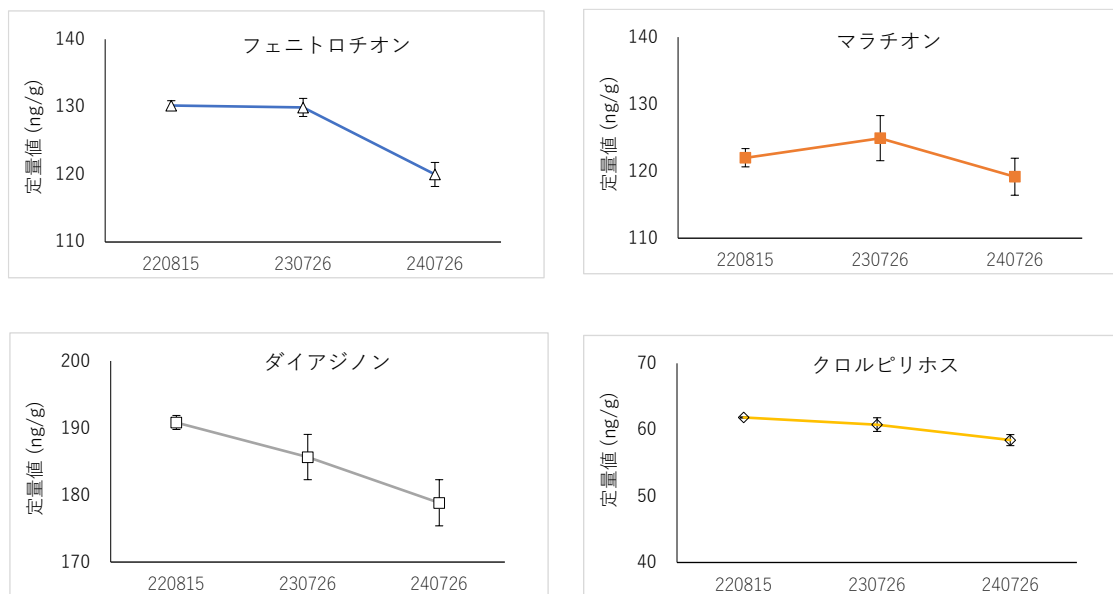


図1 玄米中農薬の長期安定性評価の結果

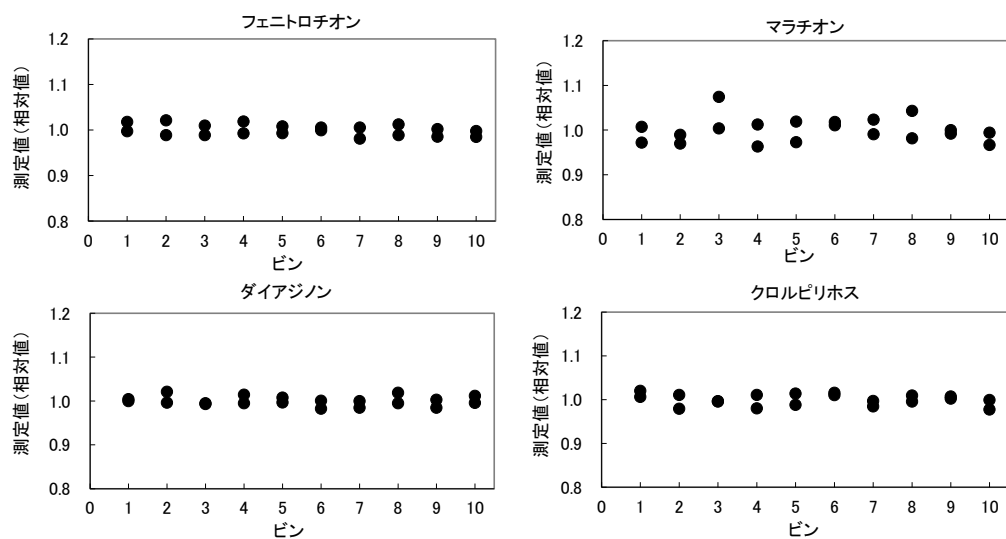


図2 均質性評価試験の結果

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
Shibata T., Nakasaka T., Narushima J., Taguchi C., Sugino M., Yoshida S., Soga K., Kajiwar M., Watanabe T. and Kondo K	Laboratory Performance Study of the Japanese Official Method to Detect Genetically Modified Papaya Line PRSV-YK.	Food Hygiene and Safety Science	65	61-66	2024
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
Otake T., Nakamura K., Hirabayashi N. and Watanabe T	A reliable quantification of organophosphorus pesticides in brown rice samples for proficiency testing use in Japanese official analytical method, QuEChERS, and modified QuEChERS combined with isotope dilution mass spectrometry	Journal of Pesticide Science	49	179-185	2024

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
若栗忍、伊藤里恵、内田華那、細谷まい、岩崎雄介、穂山浩、渡辺卓穂	市販品を含むアレルギー（卵タンパク質）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 120 回学術講演会	2024
中村圭介、大竹貴光、羽成修康、平林尚之、渡辺卓穂	スプレードライヤを用いて調製した玄米試料中の有機りん系農薬を対象とした超臨界流体抽出の評価	日本食品衛生学会第 120 回学術講演会	2024

梶原三智香、中阪聡亮、堀田実和、高坂典子、渡辺卓穂	硫化水素非産生株を用いたサルモネラ属菌検査の技能試験プログラム開発	日本食品衛生学会第 120 回学術講演会	2024
茂呂寛紀、今井浩一、石井里枝、渡辺卓穂	新規誘導体化剤を用いたサイクラミン酸分析法の検討	日本食品衛生学会第 120 回学術講演会	2024
油谷藍子、村野晃一、村上太郎、新矢将尚	マイクロウェーブ分解-ICP-MS 法による食品中元素分析法の妥当性評価	日本食品衛生学会第 120 回学術講演会	2024
大竹貴光、中村圭介、平林尚之、渡辺卓穂	技能試験の玄米試料に含まれる有機リン系農薬に対する信頼性が高い定量値の付与	日本農薬学会第 47 回農薬残留分析、第 41 回農薬環境学会 共同研究会	2024
柴田識人、田口千恵、曾我慶介、菅野陽平、細川葵、梶原三智香、渡辺卓穂、杉野御祐、成島純平、吉場聡子、安達玲子、近藤一成	安全性未審査遺伝子組み換えパパイヤ検知法における DNA ポリメラーゼと PCR 機種を組み合わせたの影響	第 61 回全国衛生化学技術協議会年会	2024
茂呂寛紀、今井浩一、石井里枝、高坂典子、渡辺卓穂	食品添加物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 (サイクラミン酸)	第 61 回全国衛生化学技術協議会年会	2024
柳瀬望、小玉玲菜、栗本悠可、鎗田孝	下痢性貝毒分析における精確な LC-MS/MS 測定のための移動相の検討	日本分析化学会関東支部第 18 回茨城地区分析技術交流会	2024
栗本悠、柳瀬望、中居杏瑞、鎗田孝	アセトニトリル抽出を用いた迅速な下痢性貝毒分析法の開発	日本分析化学会関東支部第 18 回茨城地区分析技術交流会	2024

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6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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 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6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) 公益事業部研究管理室・室長
(氏名・フリガナ) 梶原 三智香 (カジワラ ミチカ)

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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 7 年 3 月 3 日

厚生労働大臣 殿

機関名 埼玉県衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本多 麻夫

次の職員の令和6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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 地方独立行政法人
大阪健康安全基盤研究所

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 朝野 和典

次の職員の令和6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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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6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) 応用生物学野・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)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 計量標準総合センター・上級主任研究員
- (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 有 無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
			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）	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：					

(※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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。