

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

【食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究】

令和 5 年度～令和 7 年度

総合研究報告書

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

研究代表者 渡辺 卓穂

令和 8 年(2026 年)5 月

目 次

I. 総合研究報告

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究	1
渡辺 卓穂	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	54
--------------------------	----

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）

総合研究報告書

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究代表者 渡辺 卓穂 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 副所長

研究要旨

輸入食品や国内食品の流通段階で健康危害リスクを及ぼすような種々の有害物質等を監視するために、行政検査は国民の食生活の安全を担保している。検査において、誤判定を避けるために、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。現在、食品の輸出の促進と輸入の増加により、誤判定の回避は輸出入国間での係争を回避するためにも重要である。これまで我々は、検査の信頼性を確保するために外部精度管理調査を検査施設に提供しており、ISO/IEC 17043認定取得をできたことで国際的にも認められた技能試験提供者となった。この外部精度管理調査（技能試験）を継続的に検査施設に提供することで、各検査機関の検査結果において信頼性の維持に寄与することができる。外部精度管理プログラムは、検査されているすべての項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目についてしか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査試料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。そこで、令和5年度から7年度において、1. 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究（梶原研究分担）では、ハウレンソウ及び玄米粉を基材としてスプレードライヤを用いた残留農薬検査試料を作製し、鶏むねパウダーを用いスプレードライヤで重金属及び残留動物薬検査用試料を作製した。器具・容器包装の材料試験としてABS及びAS作製の最適条件がわかりパイロットスタディを実施し、微生物検査については、一般細菌数測定検査用コメ基材の実運用とサルモネラ属菌検査における硫化水素非産生菌を用いたパイロットスタディの実施及びウェルシュ菌検査のパイロットスタディの実施を、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、サイクラミン酸検査用たくあん漬け基材の開発、均質性・安定性確認、パイロットスタディの実施及び新規誘導体化を用いた分析法の改良を、また、動物用医薬品4種（スルファジミジン、スルファメトキサゾール、エンロフロキサシン及びオキシリン酸）検査用鶏肉スプレードライ試料の均質性・安定性確認及びパイロットスタディの実施を、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、分析法の検討と精度管理用試料作製に資する基材の検討を、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、貝毒成分の

精確な分析法や試験所間比較試験のための調査試料の調製及び評価方法等の検討を、

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で作製した試料を、IDMSを用いて正確に評価するとともに外部精度管理のパイロットスタディを実施した。

研究分担者名＝渡辺卓穂（（一財）食品薬品安全センター秦野研究所副所長）、今井浩一（埼玉衛生研究所副所長）、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研究グループ長）

A. 研究目的

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

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

理調査の開発を困難にしている要因は、試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査用試料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。この粉体工学技術を残留農薬検査用試料作製に応用検討し、新規の基材開発を1～3年を通して行い、学術的に有用な方法を確立する。これらの試料は課題2、3及び5に供与し連携をとる。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。また、器具・容器包装では試料作製の最適条件を検討する。さらに、食品添加物、残留動物薬、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：

1. 試料基材および試薬

残留農薬検査用基材としてハウレンソウパウダー及び自家製玄米粉（宮城ひとめぼれを粉碎した）を用いた。また、重金属検査用基材及び残留動物薬検査用基材には日本加工食品株式会社製無添加国産鶏肉パウダー100 及び鶏むねパウダー100 を使用した。重金属（1000ppm ヒ素標準品、1000ppm カドミウム標準品、1000ppm 鉛標準品）にはいずれも関東化学製を使用した。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、クロチアニジン標準品、チアメトキサム標準品、チアクロプリド標準品）はいずれも Dr.Ehrenstorfer 製を用いた。また、残留動物薬（動物用医薬品混合標準液（20 μ g/mL メタノール溶液）、動物用医薬品混合標準品（キノロン剤 20 μ g/mL））はいずれも富士フイルム和光純薬製を用いた。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、小堺製薬）を用いた。

2. 使用機器および測定条件

残留農薬標準品の秤量にはザルトリウス社製電子天秤（MSA225S100DI）を用いた。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スプレードライヤ L-8i または OC-16 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 型または MC-65 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

残留農薬検査用試料はハウレンソウパウダー及び玄米粉を用い、20%懸濁溶液は、試料 1 kg を精製水 4 L に懸濁させたものを 2 回作製し、合わせてスプレードライヤに供した。また、重金属検査用試料は鶏肉パウダーを用い、10%懸濁溶液は、鶏肉パウダー 0.5 kg を精製水 4.5 L に懸濁させたものを 2 回作製し合わせてスプレードライヤに供した。また、鶏肉むねパウダーは 10%懸濁溶液としてスプレードライヤに供した。さらに、残留動物薬検査用試料は鶏肉パウダーを用い、20%懸濁溶液は鶏肉パウダー 1 kg を精製水 4 L に懸濁させたものを 2 回作製し合わせてスプレードライヤに供した。また、鶏肉むねパウダーは装置に OC-16 を用いて作製を行った。4kg の鶏肉むねパウダーは 20%懸濁溶液 20L を精製水で 2 倍に希釈し 10%懸濁溶液 40L としてスプレードライヤに供した。

4. スプレードライヤによる残留農薬検査用玄米粉試料作製

これまで研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤ CL-8i を用いて作製したが、本装置を用いて大量の試料を作製するためには多大な時間を要する。そこで、大量の試料作製が可能である水系の開放型の装置での作製検討を行った。農薬は水に溶けにくいことからこれまで有機溶媒を用い、入口温度 100℃で粉体作製を行ってきた。水が媒体となることから入口温度は 160℃とし、出口温度

80℃とし、玄米粉懸濁溶液は事前にホモミキサーで攪拌し、均一な懸濁溶液とし、原液タンクに移し、攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに 2.1 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 とした。得られた玄米粉は平均粒子径を測定し、顕微鏡下で粒子の観察を行った。得られた玄米粉は課題 5 に供与し、各農薬の濃度測定を行い、回収率から適正な作製条件を設定する。

5. スプレードライヤによる重金属検査用鶏肉パウダー試料作製

重金属検査用試料として、これまで玄米粉を基材として食品衛生外部精度管理調査に実運用されている。今回、鶏肉パウダーを入手することができたので、CODEX の基準を加味して、カドミウム、鉛、ヒ素を添加した試料の作製検討を行った。水が媒体となることから入口温度は 180℃とし、出口温度 100℃とし、鶏肉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 1.7 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 30000 rpm または 25000rpm とした。得られた鶏肉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。得られた鶏肉パウダーは課題 3 に供与し、各重金属の濃度測定を行い、回収率から適正な作製条件を設定する。

6. スプレードライヤによる残留動物用医薬品検査用鶏肉パウダー試料作製

食品衛生外部精度管理調査では、現在鶏肉（むね）ペーストを基材としてサルファ剤を添加して実施している。今回、鶏肉パウダーを入手することができたので、動物用医薬品標準溶液 37 物質を添加した試料の作製検討を行った。水が媒体となることから入口温度は 180℃とし、出口温度 100℃とし、鶏肉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 1.8 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 25000 rpm とした。得られた鶏肉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。得られた鶏肉パウダーは課題 2 に供与し、各残留動物用医薬品の濃度測定を行い、回収率から適正な作製条件を設定する。上記の装置 L-8i での作製に加えて、スケールアップするために OC-16 を用いた。アトマイザへの送液は L-8i の約十倍の 13.3kg/h で行った。ディスクは MC-65 を用いた。

1.2 器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討：

「器具・容器包装」を対象に新たな外部精度管理調査プログラムの実施を試みるべく、食品衛生法において合成樹脂一般を対象とした一般規格の材質試験として、試料基材には ABS ペレット及び AS ペレットを選択し、試験対象物質をカドミウム及び鉛として、溶解溶媒にジクロロメタンを用いてシ

ート状の試料作製を行った。作製容器の材質の検討としては、テフロンコーティングバット及びステンレス製バットを用いた。添加に用いる標準品は有機溶媒に溶解する SPEX 製カドミウム及び鉛（いずれも 5000 µg/g、Base Oil 75）を用いた。ポリマー質量に対して目的となるポリマー含量（10w/w%）に相当する容量の溶解溶媒に、この標準品を添加して均質な溶液とし、これにポリマーを添加して混合し、ポリマーを十分に溶解した（ポリマー溶液）。これを各作製容器に流し入れた後、自然乾燥により溶解溶媒を揮発させ、更に室温下、減圧乾燥を行いシート状の試料を得た。得られたシート状試料につき、カドミウム及び鉛の濃度確認を行い、併せて溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存率についても検討した。

令和 6 年度は前年度の検討結果から、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てカドミウム及び鉛の調査試料を作製し、作製容器内（1 シート）の均質性確認試験及び作製容器間（10 シート）の均質性及び安定性確認試験を実施した（理論作製濃度：カドミウム及び鉛 50 µg/g、基準値：カドミウム及び鉛ともに 100 µg/g）。また、作製容器間の均質性及び安定性確認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。さらにそれらを用いて、公的検査機関等（自治体及び登録検査機関）25 機関を対象に当該試料の外部精度管理調査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する一般規格の材質試験であるカドミウム及び鉛の定量検査として試験室間共同試験（パイロットスタディ）を実施した。

令和 7 年度は理論作製濃度をカドミウム 80 µg/g 及び鉛 120 µg/g に変えて前年度と同様に試料を作製し、これらのカドミウム及び鉛の均質性ならびに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として試験室間共同試験を行った。なお、理論作製濃度を基準値付近のカドミウム及び鉛で異なる高濃度に設定したことから、前年度と同様に、調査試料の品質評価として 1 個の作製容器内（1 シート）のカドミウム及び鉛の均質性確認試験、また、10 個の作製容器間（10 シート）のカドミウム及び鉛の均質性ならびに安定性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。均質性および安定性確認試験（硫酸を用いた乾式灰化後、ICP-OES による測定）ならびに残留溶媒測定（*N,N*-ジメチルホルムアミドで溶解後、GC による測定）はいずれも外部委託とした。また、パイロットスタディにおける解析・評価は、当財団が実施する食品衛生外部精度管理調査で採用している従来方式（算術平均値及び標準偏差を用いた評価方法）により行った（ $\bar{X}-R$ 管理図を代用する方法及び $\bar{X}$ -スコアによる方法の 2 法）。これとは別に、参考としてロバスト方式による解析で $\bar{X}$ -スコアの評価を行った。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。

1.3 アレルギー物質技能試験プログラムに関わる検討：

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

乾燥全卵を精製水と 1：3 で合わせ、均一になるよう十分懸濁し、これを添加用卵タンパク質調製液とした。また、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。

作製した卵タンパク質調製液のタンパク質含量は、2-D Quant Kit により測定した。測定値から調製液中のタンパク質量及び基材への添加量を算出した。また、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。

1. 外部精度管理調査試料の調製（従来法による卵試料）

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

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

2. 市販品から調製した外部精度管理調査試料（卵実試料）

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

品質評価試験として均質性についてはすでに確認済みであったことから、本年度は

安定性試験のみを行った。

3. 外部精度管理調査試料の調製（乳試料）

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・クープブリクサー5 プラス（エフ・エム・アイ）を用いて均質化した。

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

4. 品質評価方法

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

従来法による試料の均質性確認は、試料送付前（試料作製後 1 か月以内）に行った。調製した試料のうち 10 容器からサンプリングを行い、各サンプルについて $n=2$ で ELISA 法により卵タンパク質濃度を測定した。均質性の評価は IUPAC に従った²⁾。使用した 3 キット中 2 キットで均質であった場合に試料が均質である、と判断した。

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

定性を評価した。

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

5. 外部精度管理調査の実施

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

測定は、通知法に従い、「2. ELISA 法」に記載の卵検出用 3 キットのうち、任意の 2 種類を使用することとした。また、乳試料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。

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。

5. 外部精度管理調査結果の解析

通知法の別添「アレルゲンを含む食品の検査方法」、別添 4「アレルゲンを含む食品の検査方法を評価するガイドライン」の「4. 特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言」には異なるキットを評価する場合、「免疫化学反応に基づく定量法では、用いる抗体により定量値が異なることが予想される」と述べられている。したがって、参加機関からの報告値は、試料別、測定キット別に前出のロバ

スト方式による平均値、標準偏差(SD) および相対標準偏差 (RSD) を算出した後、これらを付与値として解析を行った。

データ解析は、1) メジアン±50 %の範囲を超える報告値を除外するメジアン・クリーニング (MC)、2) Huber の proposal 2^{2,3)} に基づいたロバスト方式の統計である、エクセル・マクロによるプログラム【作成：システムサポート、大隅昇】による、各種統計量の算出、3) $\bar{X}$ -R 管理図を代用した方法と σ スコアによる方法を用いた評価、の 3 ステップを実施した。

また、 $\bar{X}$ -R 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。 σ 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。

1.4 微生物学調査用調査試料の開発：

1.4.1 一般細菌数測定検査用調査試料の開発

初年度に実施した。前年度までに開発した調査試料（白飯、見立て食材：冷凍食品）を用いて2023年度外部精度管理調査を実施し、改善点を検討した。

1) 試料基材および添加菌

試料基材は、白飯（アルファ米、市販品）を用いた。

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

2) 培地等

精製水（日本薬局方）（小堺製薬）、標準寒

天培地（日水製薬）、SCD培地（日本製薬）、NaCl（和光特級、富士フイルム和光純薬）、滅菌希釈水 90mL（栄研化学）、0.04w/v% フェノールレッド溶液（富士フイルム和光純薬）を用いた。

3) 使用機器

調査試料、培地等の滅菌にはオートクレーブを使用した。試験操作は安全キャビネットまたはクリーンベンチ内で行い、培養には恒温槽を使用した。

4) 準拠する試験法

一般細菌数測定検査は、「食品、添加物等の規格基準」（昭和34年厚生省告示第370号）に準拠して実施した。調査試料25 gを滅菌希釈水225 mLで10倍希釈し、以降10倍段階希釈を適宜実施した。各10倍段階希釈液1 mLを2枚のシャーレに分取して混釈培地にした後、35.0℃設定の恒温槽で22-26時間培養した。集落数30～300 cfu/plate の希釈段を用いて生菌数を算出した。

5) 調査試料の作製

基材は、アルファ米40 gをレトルトパウチに秤量し、121℃60分間の高圧蒸気滅菌して作製した。無菌的に乾燥させた後、菌を添加するまで室温保存した。

添加菌液は、市販の枯草菌芽胞液を菌液希釈用溶液で希釈し、約 1.7×10^6 cfu/mLに希釈して作製した。なお0.04% (w/v) フェノールレッド溶液と40% (w/v) 相当のNaClを等量混合した溶液を菌液希釈用溶液とした。

調査試料は、基材に20% (w/v) NaCl溶液68

mLと添加菌液1 mLを添加し、均質になるよう十分に攪拌して作製した。調査試料は使用、または配付するまで冷凍保存した。

6) 調査試料品質評価

均質性確認試験は、配付用調査試料から系統的に抽出した10個の配付用調査試料を用いて2名の検査員が1回ずつ生菌数測定を行った。計20回の生菌数（実数）から平均値、標準偏差、相対標準偏差の算出および一元配置分散分析（Microsoft Excel）を行った。また併せてISO/TS 19036 : 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations を参考に標準不確かさの算出を行った。ここで算出した平均値は外部精度管理調査の暫定値として使用した。

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

7) 外部精度管理調査の実施

均質性確認で問題がないことを確認できた配付用調査試料を使用し、389機関を対象に外部精度管理調査を実施した。

検査機関には調査試料を1個ずつ配付した。見立て食材を「加熱後摂取冷凍食品（凍結直前加熱）」とし、試料処理および測定操作は各機関の方法で実施し、繰り返し試験数は3回とした。

回収した報告値の解析は当財団が実施している食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査で採用している従来方式（算術平均値および標準偏差を用いた評価方法）による手法を用いて実数での解析を行った。すなわち、各検査機関よりデータを回収後、データ・クリーニング（暫定値の1/100以下および100倍以上の報告値を除外）を行い、この範囲外となる報告値および欠測値のある報告値（3個未満）については、以後の解析対象から除外した。次いで各検査機関間、検査機関内の変動を $\bar{X}-R$ 管理図を代用する方法で観察した後、各検査機関からの報告値の平均値（機関別平均値）について、基本統計量、ヒストグラムおよび正規確率プロットよりデータ全体の様相を把握した。分布に極端な歪みや尖りが観察された場合には2シグマ（総平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差）以上の値を報告した検査機関を除外した後、同様の処理を行った（2シグマ処理）。最終的に各検査機関の z -スコアと $\bar{X}-R$ 管理図に基づいて各検査機関の解析を行った。さらに、各検査機関より回収したデータを対数に変換し、実数解析と同様に z -スコアに基づいて各検査機関の解析を行った。なお、実数解析および対数解析の z -スコアは参考に留めた。

また、経過記録書についてもとりまとめ、解析を行った。なお、倫理面への配慮として、参加機関に配布する結果報告書では検査機関をコード番号化し、調査に関する秘

密保持を図った。

1.4.2 硫化水素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

初年度、次年度で実施した。

1) 試料基材および添加菌

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。

添加菌は、① *Proteus mirabilis* HIC 210396（サルモネラ陰性）、② *Salmonella* sp. HIC 210393（サルモネラ陽性： H_2S 産生）、③ *Salmonella* sp. HIC 230403（サルモネラ陽性： H_2S 非産生）、④ *Salmonella* sp. HIC 240414（サルモネラ陽性： H_2S 非産生）、⑤ *Salmonella* sp. HIC 240430（サルモネラ陽性： H_2S 非産生）、⑥ *Morganella morganii* HIC 240415（サルモネラ陰性）を用いた。HICは当財団の菌株管理番号を示す。①から③は初年度、④から⑥は次年度の研究で使用した。①②は従来の食品衛生外部精度管理で使用している菌株、③⑤は管理番号が異なるが同一菌株である。

2) 培地等

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 [ES II A] (栄研化学)、chromID Salmonella agar [SM2A] (バイオメリュー) TSI寒天培地 [TSIA] (島津ダイアグノスティクス)、LIM培地 [LIMA] (島津ダイアグノスティクス)、Kovacs reagent (バイオメリュー)、サルモネラ免疫血清「生研」1号セット (デンカ)、API 20E (バイオメリュー)を使用した。なお[] 内に培地の略称を示した。

3) 使用機器

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

4) 準拠する試験法

「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。

調査試料25 gをBPW (ISO組成) 225 mLで10倍希釈したものを試験溶液とした。これを37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養した。培養後のBPWから0.1 mLをRVBに、1 mLをTTBに移植し、42.0℃設定の恒温水槽で20-24時間培養した。培養後、各培養液からDHLA、XLDA、MLCBA、BGSA、CHS、ES II A、SM2Aに移植し、37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養した。培養後の発育集落の一部をTSIA (斜面培地) に画線、穿刺し、LIMA (高層培地) に穿刺した後、37.0℃設定の恒温槽で20-24時間培養した。LIMAは培養後の観察後にKovacs reagentを重層し、インドール反応を確認した。TSIAの発育集落の一部をSAに移植し、37.0℃設定の恒温槽で18時間以上培養し、その発育集落を用いてO血清群別試験を実施した。なお、H₂S非産生サルモネラ属菌はO血清群別試験と並行して簡易同定キット (API 20E) 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。

5) 調査試料の作製

基材は、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分で高圧蒸気滅菌して作製した。

添加菌液は、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、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時間培養した後、この培養液を生理食塩液で100倍希釈してフェノールレッド含有生食で10倍希釈して作製した。なお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。調査試料は、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て作製した。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とした。調査試料は使用、または配付するまで冷蔵保存した。

6) 性能評価試験

調査試料の保存条件は、冷蔵保存（以下、「冷蔵試料」という）、冷蔵保存10日後に22.5℃に移送（以下、「常温試料」という）の2条件とした。常温試料は実際の調査試料配付を想定とし、保存中の温度変化を考慮して行う参考情報とした。

生菌数測定試験は、冷蔵試料は添加菌の添加直後、保存開始から10、13（または14）、28日後、常温試料は保存開始から13（または14）、28日後に実施した。各ポイントで調

査試料を1個使用した。

定性試験は、添加菌①②は分離培地の選択においてXLD寒天培地とESサルモネラ寒天培地Ⅱを使用した。③から⑥は全工程で全ての培地を使用した。なお定性試験は添加菌の添加直後、保存開始から13（または14）、28日後に行った。

7) 品質評価試験

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。

均質性確認試験は、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。

安定性確認試験は、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。

8) 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発送から約1か月後とした。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。

1.4.3 ウェルシュ菌検査用調査試料の開発

本研究は最終年度に実施した。

1) 試料基材および添加菌

試料基材は、野菜のポタージュを使用した。添加菌は、陰性菌として *Clostridium sporogenes* (以降Cs、①HIC 220400、②HIC 220401、③HIC 220402)、陽性菌として *Clostridium perfringens* (以降Cp、④HIC 250431、⑤HIC 250432、⑥HIC 250433) を使用した。なお性能評価では①～⑥の6菌株を使用し、スクリーニングを行った。パイロットスタディでは②および⑤の2菌株を使用した。

2) 培地等

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）、強化クロストリジア培地 [RCM培地]（塩谷エムエス）、強化クロストリジア寒天培地（強化クロストリジア培地100mLに1.5 gの寒天を添加した培地）[RCM寒天培地]、寒天、粉末（富士フイルム和光純薬）、NaCl（富士フイルム和光純薬）、グリセリン（富士フイルム和光純薬）、Bacto Peptone（Thermo Fisher Scientific）、緩衝ペプトン水（BPW ISO組成）[BPW]（島津ダイアグノスティクス）、マッシュポテト（カルビーポテト）、ニンジンペースト（新進）、カナマイシン含有卵黄加CW培地（極東製薬工業）、ハンドフォード改良培地（栄研化学）、Tryptose sulfite cycloserine寒天培地 [TSC寒天培地]（Merck）、TGC培地

（島津ダイアグノスティクス）、Lactose sulfite培地 [LS培地]、（Solabia Biokar Diagnostics）、Motility Nitrate培地 [NM培地]（Sigma-Aldrich）、Lactose Gelatin培地 [LG培地]（Sigma-Aldrich）、豚皮ゼラチン（Aタイプ）（新田ゼラチン）、嫌気性パウチ（嫌気性芽胞菌（ウェルシュ菌等）培養用）（スギヤマゲン）を使用した。なお [] 内に培地の略称を示した。

3) 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。嫌気培養には嫌気ジャー（スギヤマゲン）およびアネロパック・ケンキを使用した。

4) 準拠する試験方法

ウェルシュ菌検査は、「ウェルシュ菌標準試験法（集落数計数法）[ステージ1;原案]」（NIHSJ-24-ST1）および「食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018」（公益社団法人日本食品衛生協会、2018）を参考にして実施した。

流水（約20℃の水道水）に30分浸し、半解凍した調査試料を十分に混和して25 gを秤量した後、BPW 225 mLを加えて1分間のストマッカー処理を実施したものを試験溶液（10倍希釈溶液）とした。

ウェルシュ菌標準試験法（集落数計数法）[ステージ1;原案]（NIHSJ-24-ST1）を参考にした定性試験（以降、NIHSJ法）は、試験溶液を10倍段階希釈してTSC寒天培地で

混釈平板培地を作製し、37.0℃で18～24時間嫌気培養した。その後確認試験A、確認試験Bを実施した。確認試験AはTSC寒天培地上の黒色集落を1集落釣菌してFluid Thioglycollate (TGC) 培地 10 mLに移植し、37.0℃で18～24時間嫌気培養した。培養液0.1 mLをダーラム管を入れたLS培地 8 mLに移植し、46.0℃で18～24時間嫌気培養した。LS培地まで増殖を認め、LS培地の黒変とダーラム管内の1/4以上のガス産生を認めた場合にウェルシュ菌陽性とした。確認試験BはTSC寒天培地上の黒色集落を1集落釣菌してTSC寒天培地に画線し、同培地 10 mLを重ね後37.0℃で18～24時間嫌気培養した。増殖集落をNM培地 10 mLおよびLG培地 10 mLに移植し、37.0℃で24時間嫌気培養した。LG培地は5℃で1時間の冷却後、培地の固化が認められた場合は37.0℃で24時間の嫌気培養を追加実施した。NM培地が運動性陰性、亜硝酸塩還元陽性、さらにLG培地でガス産生、培地の黄変およびゼラチンの液状化を認めた場合にウェルシュ菌陽性と判定した。

食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版
2018：卵黄加CW培地（以降CW培地法）は、試験溶液およびその10倍段階希釈液をそれぞれカナマイシン含有卵黄加CW培地2枚に0.1 mLずつ塗抹し、37.0℃で18～24時間嫌気培養した。培地上に真珠様の光沢、白色ハローを伴う白色集落を認めた場合にウェルシュ菌陽性と判定した。

食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版

2018：パウチ法（以降パウチ法）は、試験溶液10 mLおよびハンドフォード改良培地 15 mLをパウチ袋に添加して素早く混和し、薄く固化させた後、開口部をシールして46.0℃で24時間好気培養した。1～3 mmの黒色集落を認めた場合にクロストリジウム陽性と判定した。さらにNIHSJ法、CW培地法の定性試験における典型反応をもってウェルシュ菌陽性の判定を実施した。

5) 調査試料の作製

基材は、ニンジンペースト（市販品）に対し、等量のマッシュポテト粉末（市販品）を安定化剤で10倍希釈したものを加えて十分攪拌し、50 gずつガラス製容器（100 mL）に分注後、121℃30分で高圧蒸気滅菌をして作製した。基材は無菌性確認後に-20℃以下で冷凍保存した。

基材の無菌性の確認は、基材10 gを秤量し、BPW 90 mLで10倍希釈した溶液を試験溶液として実施した。試験溶液 1 mLを4枚のシャーレに、10 mLを1枚のパウチ袋に分取し、前者はTSC寒天培地およびSA 20 mLで2枚ずつ混釈寒天平板培地とした。後者はハンドフォード改良培地 15 mLで混釈し、開口部をシールして固化させた。TSC寒天培地は37℃で24時間嫌気培養、標準寒天培地は37℃で24時間好気培養、ハンドフォード改良培地は46℃で24時間好気培養し、全ての培地に発育集落を認めない場合に無菌性適合と判定した。

添加菌液は、凍結保存菌株をRCM培地 10 mLに接種し、37.0℃で20～28時間嫌気培養後、

RCM培地で適宜希釈して添加菌液を調製した。

冷凍保存した基材に添加菌液 0.5 mLを添加し、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として作製した。

調査試料は使用、または配付するまで-20℃以下で冷凍保存した。

6) 性能評価試験

事前確認として、パイロットスタディに使用する添加菌株のスクリーニングおよび基材の性能評価を実施した。

添加菌液の調製法の検討として、Cs 3菌株およびCp 3菌株の凍結保存菌株をそれぞれRCM培地 10 mLに接種し、37℃で24時間または48時間嫌気培養した。培養液をBPWで10倍段階希釈し、希釈段ごとに2枚のシャーレでRCM寒天培地を用いて混釈平板培地を作製した。RCM寒天培地は37℃24時間嫌気培養後に生菌数測定を実施した。生菌数測定の結果から、調査試料の最終濃度が 10^3 cfu/g程度になるように性能評価に使用する添加菌の調製方法を決定した。

調査試料は、決定した調製法に従い調製した添加菌液0.5 mLを、冷凍保存した基材に添加して作製した。添加後は速やかに-20℃以下で冷凍保存した。

生菌数測定は、保存0日目/12日目/28日目の3ポイントで実施した。試験溶液を適宜BPWで10倍段階希釈し、希釈段ごとに2枚のシャーレに1 mL分取した。これをRCM寒天培地で混釈平板培地にした後、37℃で24時

間嫌気培養した。

定性試験は、保存12日目/28日目の2ポイントにおいて実施した。なおTSC寒天培地（NIHSJ法）およびハンドフォード改良培地（パウチ法）は典型集落の生菌数測定を並行して実施した。卵黄加CW培地は28日目のみ実施した。

生菌数測定結果および定性試験の反応を総合的に評価し、パイロットスタディに使用する添加菌を決定した。

7) 品質評価試験

均質性確認試験は、添加菌ごとに、系統的に抽出した5個の配付用調査試料を用いて実施した。すべての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個のうち2個を用いて定性試験を行った。なお生菌数測定はCpではTSC寒天培地、CsではRCM寒天培地を用い、試験溶液をBPWで10倍段階希釈した各希釈液を2枚のシャーレに分取し、各培地で混釈平板培地を作製したのち37℃で24時間嫌気培養した。

安定性確認試験は、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生菌数測定および定性試験を行った。

8) 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凍便（ヤマト運輸、クール宅急便、冷凍タイプ、-15℃以下）で発送し、参加機関から検査結果を回収した。調査試料は「野菜のポタージュ」として配付し、試料

処理および測定操作は各機関の方法で実施した。なお、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2026年1月6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。

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）

2.1 食品添加物試験法の開発に関する研究

2.1.1 パイロットスタディ調査の実施

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

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

2.1.2 通知試験法における誘導体化時間に関する検討

通知試験法における誘導体化時間について検討するため、誘導体化における各工程において試料を静置する時間を設け、その回収率への影響を比較した。

2.1.3 新規誘導体化法の改良に関する検討

新規誘導体化を用いた分析法について、

試料採取量、誘導体化する溶出液の量、液-液分配の回数及び減圧乾固による濃縮について検討し、改良を図った。検討した試験法を評価するため、試料としてオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの4試料を用い、5併行の添加回収試験を実施した。

2.2 動物用医薬品試験法の開発に関する研究

2.2.1 三層分離抽出法を用いた分析法の検討

三層分離抽出法を用いた動物用医薬品分析法について、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。

2.2.2 パイロットスタディ調査用試料の作製と分析法の検討

パイロットスタディ調査用試料に添加する動物用医薬品については、秦野研究所が現在実施している外部精度管理調査（残留動物用医薬品検査）の状況や、近年の検疫所における違反事例を参考に選定した。その後、秦野研究所に対し、パウダー状の鶏肉試料に選定した動物用医薬品を浸漬により添加し、スプレードライしたパイロットスタディ調査用試料の作製を依頼した。

パイロットスタディ調査用試料を分析するため、厚生労働省の発出したHPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲ（畜水産物）を基に、試料採取量や、吸引ろ過におけるけいそう土の効果等について検討した。検討した分析法の妥当性は、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン」に準じて確認した。

2.2.3 パイロットスタディ調査の実施

作製した調査用試料の均質性は、調査用試料を作製・発送するまでの間に全調査用試料から無作為に10容器を抽出し、各容器2部位を測定し、一元分散分析して判断した。なお、均質性試験の結果を安定性試験の0日間のものとした。調査用試料の安定性については、報告期限日以降である109日目に残存試料10容器を分析し、0日間結果と比較して判定した。パイロットスタディは、14機関の参加機関に対して実施した。報告は、スルファジミジン、スルファメトキサゾール、エンロフロキサシン及びオキシリン酸の4項目のうち、スルファジミジンを含む1項目以上とした。報告結果は、算術平均値、標準偏差及び相関図等を用いて評価した。

2.2.4 パイロットスタディ調査用試料における浸漬効果の検討

調査用試料の浸漬効果を検証するため、調査用試料1 gから試験溶液を調製し、ピーク面積を比較した（ $n=2$ ）。条件は、①非浸漬で抽出、②水4 mLで15分浸漬後に抽出、③抽出溶媒4 mLで15分浸漬後に抽出の3パターンとした。抽出は、抽出溶媒10 mLで2回抽出して濃縮・定容した溶媒抽出液を作製し、残渣を同条件でさらに2回抽出して2次・3次抽出液も作製した。抽出溶媒は水、

メタノール、アセトニトリル、各種混液、ヘキサン飽和アセトニトリル、酢酸エチル等、計8種を用いた。

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）

3.1 マイクロウェーブ分解—ICP 質量分析による試験法の妥当性評価

3.1.1 試料

食品中の重金属類試験において、迅速かつ多元素分析可能なマイクロウェーブ分解—ICP 質量分析法を適用するために、まずマトリックスの異なる3種の認証標準物質を用いて、その最適条件の検討を行った。認証標準物質には、水分、脂質とも相応に含む試料として Crab Paste（LGC 製 LGC7164）を、脂質の多い試料として Peanut Butter（NIST 製 SRM2387）を、脂質をほとんど含まず水分が多い試料として Baby Food Composite（NIST 製 SRM2383a）を用いた。

次に、近年輸出実績が増大傾向にある畜産肉を対象として、Bovine Liver（NIST 製 SRM1577c）、Pig Kidney（IRMM 製 ERM-BB186）、Bovine Muscle（IRMM 製 ERM-BB184）の3種の肉由来認証標準物質を用いた。

3.1.2 分析方法

試料 0.5～2 g をテフロン製分解容器に採り、硝酸 7 mL および過酸化水素水 1 mL を加えてマイクロウェーブ分解装置（アントンパールジャパン社製 Multiwave Pro）により加熱分解した。加熱プログラムは、800 W (Ramp:10 min) - 800 W (Hold:40 min) とした。試料分解液を室温まで冷却後、超純水を加えて 50 mL に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（アジレントテクノロジー社製 Agilent 7850 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。

3.1.3 妥当性評価

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。

3.2 肉試料の外部精度管理調査への適用性の検討

3.2.1 試料

市販されている、牛肉、豚肉、鶏肉および鶏むね肉のそれぞれ無添加パウダー食品を用いた。

3.2.2 肉試料の重金属類含有量調査

それぞれの粉末肉を、マイクロウェーブ分解-ICP 質量分析法により分析した。分析に供した試料量は 0.5 g とした。また、牛肉粉末を用いて添加回収試験（n=5）を行い、回収率を算出した。添加濃度は、Pb については CODEX 等の規制値である 0.10 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 0.50 mg/kg に設定した。

3.2.3 パイロットスタディ用検討試料の作製

鶏肉パウダーおよび鶏むね肉パウダーを基材とし、スプレードライヤ（大川原化工機）を用いてパイロットスタディ用試料を作製した。試料には Pb、Cd、As を添加し、設定濃度はそれぞれ 0.10 mg/kg、0.05 mg/kg、0.50 mg/kg とした。これらの作製試料は、課題 1 より供与された。試料の均質

性確認試験は一元配置分散分析により評価した。

4 下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究（鎗田研究分担）

4.1 精確な分析法の検討

4.1.1 材料・試薬

ホタテガイ試料には青森産のホタテガイと、令和 4 年度に実施した試験所間比較試験におけるホタテガイ調査試料を用いた。

1 ppm OA 溶液と 1 ppm ジノフィシストキシン-1 (DTX1) 溶液は産業技術総合研究所から入手した。ジノフィシストキシン-2 (DTX2) 認証標準物質は National Research Council から入手した。試料調製や LC-MS/MS の移動相には超純水を使用した。他の試薬は、LC-MS 用または試薬特級品を用いた。

4.1.2 前処理方法

ブレンダーで処理したホタテガイ 2 g を遠沈管にとり、必要に応じて OA と DTX1 添加溶液や内部標準物質 (DTX2) 溶液を添加した。この試料にメタノール 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 % (v/v) メタノール 9 mL を加えてホモジナイズした後に遠心分離し、上清をとった。得られた上清を合一し、さらに 90 % (v/v) メタノールを加えて正確に 20 mL とした。

得られた抽出液の 2 mL に 2.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 250 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 または 300 μ L 加え中和し、n-ヘキサン 2.5 mL による脱脂処理を 2 回行った。

得られた処理液を次の固相抽出 (SPE) 2

条件のいずれかで処理した。

A. HLB カートリッジを用いた SPE

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

B. ODS カートリッジを用いた SPE

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

4.1.3 LC/MS/MS 測定

島津製作所の UFLC 高速液体クロマトグラフと、質量分析計 (Applied Biosystems 3200 Q TRAP) を用いた。カラムには Cadenza CD-C18 カラム (内径 : 2 mm、長さ : 100 mm、粒子径 : 3 μ m) 他を用いた。移動相として、次の 4 条件を検討した。

[条件 I] 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 : B : 40 % (0 min) $\rightarrow$ 40 % (2.5 min) $\rightarrow$ 100 % (7.5 min) $\rightarrow$ 100 % (14 min)

[条件 II] A 液 : 水 (2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有)、B 液 : 95 %メタノール (2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有)、グラジエント : B : 40 % (0 min) $\rightarrow$ 100 % (10 min) $\rightarrow$ 100 % (15 min) $\rightarrow$ 40 % (15.5 min)

[条件 III] A 液 : 2 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液、B 液 : アセトニトリル、グラジエント : B : 30 % (0 min) $\rightarrow$ 95 % (8 min) $\rightarrow$ 95 % (14 min) $\rightarrow$ 30 % (15 min)

[条件 IV] A 液 : 水 (0.05 %アンモニア)、B 液 : 90 %アセトニトリル (0.05 %アンモニア)、グラジエント : 30 % (0 min) $\rightarrow$ 30 % (1 min) $\rightarrow$ 100 % (8 min) $\rightarrow$ 100 % (14 min)

SRM 測定におけるプリカーサーイオンとプロダクトイオンは、OA・DTX2 : m/z 803 $\rightarrow$ 255 (定量用)、803 $\rightarrow$ 113 (確認用)、DTX1 : m/z 817 $\rightarrow$ 255 (定量用)、817 $\rightarrow$ 113 (確認用) とした。

4.2 抽出方法の簡易化の検討

4.2.1 材料・試薬

4.2.1.1 と同じ材料・試薬を用いた。

4.2.2 分析法

ホタテガイ試料 2 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。

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。

4.2.3 LC/MS/MS 測定

4.1.3 と同じ装置及び測定条件を適用した。移動相には 4.1.3 の条件 I を適用した。

4.3 試験所間比較試験

4.3.1 調査試料の調製

(1) 材料・試薬

調査試料の調製には、ホタテガイ可食部（北海道産）と、OA および DTX1 が含有するホタテガイ中腸腺試料（均質化済み）、OA 標準品（富士フィルム和光純薬、生化学用）および 1 μ g/mL DTX1 溶液（産業技術総合研究所）を用いた。他の試薬等は 4.1.1 に準じた。

(2) 調製方法

ホタテガイの可食部をブレンダーで細断し、裏ごし器（1.4 mm）で裏ごしを行った。得られた試料をポリ製広口瓶に入れ、混合した。このポリ製広口瓶をポットミル機で約 1.5 時間回転混合させた。

7 個のガラス瓶を用意し、1 個のガラス瓶につきホタテガイ中腸腺試料 20 g を入れた。それぞれのガラス瓶に中腸腺の 9 倍量

のホタテガイ可食部を加えた。さらに、あらかじめ OA 標準品と 1 μ g/mL DTX1 溶液を混合した溶液を適量添加した。それぞれのガラス瓶の内容物をスパチュラで混ぜ合わせた後、ポットミル機を用いて約 30 分回転混合した。得られた内容物を 1 つのポリ製広口瓶にあわせ、ポットミル機を用いた 2.5 時間回転混合した。

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

4.3.2 均質性評価

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。

分析における試料前処理は、4.1.2 の通りに行った。その際、内部標準として DTX2 のメタノール溶液 500 μ L を加えた。また、SPE には方法 A を適用した。また、得られた試料溶液の LC-MS/MS 測定は、4.1.3 記載の装置及び測定条件（移動相：条件 I）によって行った。

4.3.3 安定性評価

参加機関における検査試料の保存条件は、 -20°C ～ -30°C とした。参加機関における比較試料の分析期間の前後、及び、分析期間中の 2 回（合計 4 回）、試料の安定性評価試験を行った。適用した分析法は 4.3.2 に準拠した。ただし、標準添加法を行うために、試料前処理時に、既知量の OA・DTX1 混合溶液を添加した。

4.3.4 パイロットスタディ

(1)実施方法

パイロットスタディの参加募集は令和 7 年 1 月から令和 7 年 3 月に行った。参加機関による分析期間は、令和 7 年 7～9 月とした。7 月 8 日に調査試料 3 瓶を各参加機関に送付した。9 月 12 日までに全ての参加機関から分析結果を受領した。

(2)解析方法

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

(3)茨城大学における調査試料の分析

茨城大学でも調査試料中の OA と DTX1 を定量した。適用した分析法は 4.3.3 の通りである。

5 残留農薬分析の外部精度管理に関する研究 (大竹研究分担)

5.1 スプレードライヤ条件決定のための、ほうれんそう試料中残留農薬分析

(1)添加回収試験による一斉試験法の評価 (ほうれんそう試料)

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランクほうれんそうを粉砕したものを試料とし、そこに対象農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンをポジティブリストの基準濃度値 (クロルピリホス:0.1 mg/kg, ダイアジノン:0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン:0.2 mg/kg) になるように添加した。本試料を、同位体希釈質量分析法 (IDMS) を適用した一斉試験法によって分析を行い、得られた結果を解析して各分析法の正確さを精密

に評価・比較した。

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

一斉試験法と超臨界流体抽出法 (SFE) を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用ほうれんそう試料中の対象農薬を分析した。一斉試験法では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) および 2 (80 °C, アセトニトリル 20 %) の 2 種 (温度は噴霧温度を示す)、SFE では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) の試料を分析した。また、噴霧温度は同じで、アセトニトリルを 20 % から 30 % にして調製した試料 (Lot 3: 100 °C, アセトニトリル 30 %, Lot 4: 80 °C, アセトニトリル 30 %) も、一斉試験法によって分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

5.2 残留農薬分析のための玄米を用いた外部精度管理のパイロットスタディ

(1)パイロットスタディに用いる玄米試料の均質性評価

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

(2)パイロットスタディに用いる玄米試料中の農薬の安定性評価

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

IDMS を適用した一斉試験法を用いた。

(3)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

5.2(1)で均質性が確認された玄米試料中の対象農薬の濃度を分析した。分析には、IDMS を適用した一斉試験法、QuEChERS 法、STQ 法を用い、不確かさの算出も行った。

(4)残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

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

5.3 玄米試料中農薬の長期安定性評価

(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。

5.4 スプレードライヤ条件決定のための、ほうれんそう試料中残留農薬分析

(1) 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。

5.5 残留農薬分析のための、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

(1)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

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。

(2)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

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。

(3)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

5.5(1)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。

(4) 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。

5.6 スケールアップを目的とした試料調製の条件検討

(1) 残留農薬検査用玄米試料の分析

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玄米試料中の対象農薬を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

C.D. 研究結果および考察

1 渡辺研究分担

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発：

これまで玄米粉を基材とした残留農薬検査用試料の作製について種々検討した。特に玄米粉を懸濁させるアセトニトリル溶液の濃度について検討した結果、20%の時添加した 4 種農薬が最も回収率が良かったため、パイロットスタディ用残留農薬検査用試料として 20%アセトニトリル溶液に懸濁させスプレードライヤに供した。基材となる玄米粉の一次粒子径は $10\mu\text{m}$ ~ $500\mu\text{m}$ と幅広く、平均粒子径は $221.5\mu\text{m}$ でさらに $500\mu\text{m}$ 付近にもピークが認められた。一方、スプレードライヤにより作製した玄米粉試料の顕微鏡写真から造粒した数ミクロンの粒子も多数

認められ、平均粒子径は $188.6\mu\text{m}$ と基材の玄米粉試料よりやや平均粒子径は小さくなり、 $500\mu\text{m}$ 付近のピークは消失した。作製した試料は課題 5 に供し、均質性と安定性の確認のもとパイロットスタディに供した。

玄米粉を基材として残留農薬検査用試料作製を検討し、添加した 4 種の農薬の回収率が良好な条件を見出した。その条件を参考に野菜を基材として適用するためにハウレンソウパウダーを用いた。このハウレンソウパウダーは玄米粉より粒子径は小さく均質なパウダーであり数 μm ~ $200\mu\text{m}$ の粒度分布で平均粒子径は $26.76\mu\text{m}$ であり、玄米粉において噴霧温度を低く設定したほうが各農薬の回収率は高くなることから、噴霧温度（入口温度）を 100°C と 80°C で比較検討した。懸濁溶媒には 20%アセトニトリル溶液を用い、比較検討を行った。玄米粉の場合は 20%懸濁液としたが、ハウレンソウパウダーは平均粒子径が小さく、懸濁液としたとき粘性が高く作製に支障をきたす可能性があったため、10%懸濁液とした。その他の作製条件は玄米粉の場合と同様とした。基材のハウレンソウパウダーは数ミクロンの微細な粒子が多数認められたのに対して、噴霧温度 100°C の場合は平均粒子径が $45.51\mu\text{m}$ 、 80°C の場合は $63.02\mu\text{m}$ と噴霧温度を下げると平均粒子径が大きくなることが分かった。しかしながら、温度を下げること、乾燥が不十分となり、ハウレンソウパウダーが内壁に固着し、ハウレンソウの回収が悪くなった。そこで、水分量を減らすことで、乾燥を促進させることを考え、20%

アセトニトリル溶液からさらに、30%アセトニトリル溶液とし、噴霧温度100℃、80℃で比較検討を行った。アセトニトリル量を増やしても各パラメーターに変動は見られなかったが、20%アセトニトリルのとき、80℃の残留溶媒は12.2%であったのに対して、30%アセトニトリルでは8.3%と100℃のときの残留溶媒に近い値を示した。このことよりアセトニトリル量を多くすることで低い入口温度でも残留溶媒を低くすることができた。スプレードライヤーで作製した試料の回収は20%に比べ改善された。4種農薬の回収率を課題5で評価した上で最適条件を決定した。これらを20%アセトニトリルの結果と比較すると、平均粒子径については同様の結果となり、アセトニトリル量の変化ではこれらの造粒には影響しないことが分かった。これらの結果を受け、課題5で最適条件を決定し、パイロットスタディ用試料として供した。

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。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。得られたホ

ウレンソウパウダーの平均粒子径は54 μ mであり30 μ m~100 μ m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、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1.2kg以上作製を目標とした。20%懸濁液は粘性が高く前は回収率が約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。平均粒子径は50 μ mであり、前回は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 μ m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。

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。試料の作製には有機溶媒を用いるために窒素ガス密閉循環型スプレードライヤを用い残留農薬の分解等を考慮し、入口温度 100℃で作製した。本作製法だと装置にかけるパワーには制限があり、大量の試料作製にはコストと時間がかかる。そこで、大量生産を目標に有機溶媒を用いず水系での作製を検討した。作製に用いるスプレードライヤは研究開発用の L-8i を用いた。試料は 20%懸濁溶液とし、有機リン系を 4 種類とネオニコチノイド系農薬を 3 種類最終濃度 0.4ppm で添加した。用いた玄米粉の粒子径は 500 μm 程で大きく、アトマイザーの接続部につまりが生じ一時中断した。やはり粒子径が大きいことと入口温度が高かったためと考えた。そこで、大きい粒子を小さくするためにホモキサーで約 1 時間攪拌した。ホモキサーで分散させることで粒子径が小さくなったのが確認された。そこで、入口温度 160℃、出口温度 80℃で運転を再開した。処理量は 2.1kg/hr であった。最終的に回収された玄米粉は本体回収で 622.5g、サイクロン回収で 125.5g であった。本体回収の平均粒子径は 211 μm であり、サイクロン回収の平均粒子径は 16 μm と微細であった。これまでは、本体回収のみであり、サイクロン回収は本体回収に含まれていた。今回は、本体回収のみで行うこととした。

重金属検査用試料として、これまでカドミウムの基準がある玄米粉を基材とした試料を作製しており、食品衛生外部精度管理調査の実運用に供している。現在、農産物の輸出を促進しており、肉類

の重金属検査用の試料作製を CODEX の基準に合わせて、カドミウム、鉛、ヒ素を添加した試料作製を検討した。基材として鶏肉パウダーを用いて作製検討した。全体的に一時粒子は玄米粉に比べて大きかった。そこで、10%懸濁溶液として作製検討した。大半の粒子径が 1000 μm 以上であることから、装置にかける前に 30 分間分散させることとした。しかしながら、ホモキサーでの分散はあまり効果がなく、送液を容易にするためにペリスタポンプを変更した。その結果、送液でのつまりはなくアトマイザに送液することができた。入口温度 180℃、出口温度 100℃で噴霧し、粉体を作製した。スプレードライヤで作製した粉体の粒子は不定形で粒度分布測定はできなかった。粒子はかなり粘着度が高く、装置の内壁に付着して回収は困難であった。回収率は約 30%であり、粉体は内壁に付着したものを回収した。先に用いた鶏肉パウダーは皮を含む鶏全体からのものであり、油分が多く乾燥せず装置の壁面に付着しやすかった。そこで、油分が少なく一時粒子径が小さい鶏むねパウダーを基材として用いた。前回と同様にまず 20%懸濁溶液として噴霧を行った。しかし、ペリスタポンプでつまりが発生したため、懸濁溶液を希釈し、10%懸濁溶液として噴霧を再開した。その結果、つまりは解消され粉体は回収された。スプレードライヤで作製したサイクロン捕集の鶏肉パウダーに見られた棒状の繊維質は認められず平均粒子径は 148 μm となった。得られた鶏むねパウダーは課題 3 に供与した。

先に重金属検査用鶏肉パウダー試料作

製を行い、一時粒子径が大きいことを確認し、事前に大きい粒子と油分を除き極力小さい粒子とし、今回は 20%懸濁溶液で作製検討した。添加した動物薬は試薬スタンダードミックスを用い、37 種の動物薬を最終濃度 0.2ppm で調製した。事前にホモキサーで攪拌してから粉体を作製した。しかし、20%懸濁液からつまりが生じ、10%懸濁液として噴霧を再開した。その結果、つまりは発生することなく、送液ができた。やはり、先に行った重金属検査用試料と同様に装置壁面に粉体が固着して回収は思わしくなかった。元の鶏肉パウダーに比べ不定形であるが繊維状のものはあまり見られなかった。回収率は前回より悪い約 10%であった。そこで、内壁に固着し、回収したものを試料とした。

先に重金属検査用試料として作製検討した鶏肉むねパウダーは鶏肉パウダーに比べ油分が少なく一時粒子径も小さく基材として適していると考えられた。ただし、処理できる濃度が 10%で L-8i での作製では回収できる量が数百グラムと少ないことから、処理量が約十倍の OC-16 を用いた。送液の配管も L-8i に比べ 1mm 太いことから、つまりの心配はなくさらに処理量が多いことからパイロットスタディで用いる試料量の回収が可能である。今回、鶏肉むねパウダーは 4kg 用い、回収は約 3.3kg 得られた。特につまり等も問題はなく順調に試料が回収された。先の重金属検査用試料と同様で、かつ平均粒子径もほぼ同様であった。得られた鶏むねパウダーは課題 2 に供与した。

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：

令和 5 年度は、基準値の 1/2 濃度を理論作製濃度としてシート状試料を作製し、カドミウム及び鉛の濃度確認を行った結果、1 シート内は部位による濃度差はほとんど見られなかった。ABS シートと比較して AS シートの方が濃度のばらつきは小さかったが、いずれのポリマーも 80%以上の回収が得られ、全体的に良好な結果が得られた。残留溶媒測定では、ABS シートでは 1.32~2.14%であり、AS シートでは 6.60~8.19%とやや高めの結果であった。また、いずれのポリマーにおいてもステンレスバットで作製したシート状試料の方が低い残存率を示す傾向が見られた。

以上より、ポリマーは ABS ペレット、ポリマー含量は 10w/w%、作製に用いる容器はステンレスバットとし、パイロットスタディのための試料必要量スケールでの作製実現性及び溶解溶媒を自然乾燥後さらに室温下で減圧乾燥して作製したシート状試料について作製容器間の濃度のばらつきを検討する必要があると考えられた。またこれらの均質性及び安定性確認を統計学的手法により行い、本調査試料を用いたパイロットスタディとして試験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）のカドミウム及び鉛の均質性確認試験を、また、10 個の作製容器間（10 シート）のカドミウム及び鉛の均質性及び安定性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。作製した試料は、1 個の作製容器内及び 10 個の作製容器間のいずれでもカドミウム及び鉛で良好な均

質性及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。残留溶媒測定では、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（均質性確認試験で用いた 10 試料からランダムに選択）も 1.65～1.99%であり、経時変化によって安定性確認試験時の測定結果ではより低い残存率となった。これら 3 試料間の残留溶媒量は、均質性確認試験時の結果と同様の傾向が見られた。この方法で作製した調査試料を用いて試験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。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及び鉛ともに $n=5$ 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。全体 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おり、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（フレーム方式）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ため、令和 7 年度は理論作製濃度を変えて前年度と同様に試料を作製し、これらのカドミウム及び鉛の均質性ならびに安定性確認試験を行い、本試料を用いたパイロットスタディとして試験室間共同試験を行った。なお、理論作製濃度を基準値付近の異なる高濃度に設定したことから、前年度と同様に、調査試料の品質評価として 1 個の作製容器内（1 シート）及び 10 個の作製容器間（10 シート）のカドミウム及び鉛の均質性ならびに安定性確認試験を行った。またこれらの試験と同時にジクロロメタンの残留溶媒測定を実施した。その結果、1 個の作製容器内及び 10 個の作製容器間のいずれでもカドミウム及び鉛で良好な均質性ならびに安定性が得られた。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、高濃度においても作製濃度のコントロールが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試験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昨年度と同様であり、妥当な結果が得られた。また、カドミウムでは試料採取量が 0.1 g 以上 0.3 g 未満で 1 機

関、0.5 g 以上 0.7 g 未満で 3 機関、1 g 以上で 21 機関であった。なお、25 機関中 1 機関が、カドミウムでは 1 g 以上であったが、鉛では 0.1 g～0.3 g と回答し、元素によって異なる試料採取量を採用していた。 $\bar{X}$ 管理図で管理限界外となった機関はカドミウムで 25 機関中 2 機関（8%）、鉛で 3 機関（12%）あり、いずれも低値側であった。最も低値を示した機関の機関別平均値はカドミウムで 55.9%、鉛で 40.8% であり、「器具及び容器包装に係る規格基準に関する試験法等の取扱いについて」（消食基第 362 号、令和 7 年 5 月 30 日、消費者庁食品衛生基準審査課長）（以下、通知）に示されるカドミウムおよび鉛の性能評価パラメータの目標値である真度（%）85%～110%からはいずれの元素も低く、50%程度であった。 R 管理図で管理限界外となった機関はカドミウムで 25 機関中 4 機関（16%）、鉛で 3 機関（12%）あり、最も $n=5$ のばらつきが大きかった機関の $n=5$ の相対標準偏差（%）は、カドミウムで 11%、鉛で 10%であり、通知に示されるカドミウムおよび鉛の性能評価パラメータの目標値である併行精度（RSD%）10%以下を満たさない機関があった。

全体 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。当機関は、前年度エネルギー分散型蛍光 X 線装置を使用した機関とは異なり、装置の原理は同様であるが簡易型の異なる装置であった。当該結果は、特にカドミウムにおいて $n=5$ の平均値は理論作製濃度とよく一致していたが、 R 管理図では管理限界外であり他機関と比較してばらつきが大きかった。鉛においては、全体で見

ると $n=5$ の平均値は高濃度側の測定値を報告しており、ばらつきは問題なかった。この結果は本調査研究では 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 13 機関で最も多く、次いで、ICP-OES が 9 機関、ICP-MS が 2 機関、蛍光 X 線装置が 1 機関であり、前年度と参加機関が異なるものの同様の傾向であった。本調査研究結果では、データ数は異なるが、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。

1.3 アレルギー物質技能試験プログラムに関わる検討：

当該 3 か年で、毎年 24～36 機関がパイロットスタディに参加した。

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

料は、外部精度管理調査試料として適切であると考えられた。

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

このように、パイロットスタディの結果から、参加機関では実際の検査業務においても実際の試料について適切な評価が行われているだろうことが推察された。最終年度には、卵または乳を含有した市販加工食品を用いて、実際の検査試料に近い incurred sample の調製を行った。それぞれの試料は、2 施設間において、卵、乳ともにモリナガキットによる ELISA 法で再現性の良い結果が得られたこと、両試料で均質性が確認できたことから、より実際の業務に則した外部精度管理調査用試料として使用できる可能性が考えられた。

1.4 一微生物学調査用調査試料の開発：

1.4.1 一般細菌数測定検査用調査試料の開発

1) 品質評価試験

調査試料は冷凍保存し、その中から均質性確認試験および安定性確認試験用に系統的に各 10 個の調査試料を抽出した。

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

2) 外部精度管路調査の実施

対象とした全 389 機関から結果を回収した。実数解析において、データ・クリーニングにより除外された機関は 3 機関、2 シグマ処理で除外された機関は 1 機関であった。正規確率プロットを確認したところ、概ね直線状にデータが分布しており、正規分布に従っていると考えられた。また管理限界外となった機関は $\bar{X}$ 管理図においては 1 機関、 R 管理図においては 9 機関であった。 Z -スコアによる解析では、 $2 \leq |Z\text{-スコア}| < 3$ に該当する機関が 13 機関、 $3 \leq |Z\text{-スコア}|$ に該当する機関が 5 機関であった。データ・クリーニングにより除外された 3 機関はそれぞれ報告時の転記ミス、標準操作手順書に従って実施した結果検出限度値未満 ($< 3.00 \times 10^4 / \text{g}$) になった、フィルム培地の液化化により菌数の計測ができなかったことが原因であった。前者は添加菌（市販）の濃度とコストを考慮して設定した調査試

料の濃度が見立て食材（冷凍食品）の基準値の 1/10 程度であったことが要因であり、後者は枯草菌によるフィルム培地の液状化現象が起きたことが要因である。フィルム培地の液状化現象に関してはメーカー側でも把握しており、対応製品も販売されている。

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

正規確率プロットを確認したところ、概ね直線状にデータが分布しており、正規分布に従っていると考えられた。また、 χ^2 スコアによる解析では、 $2 \leq |\chi^2 \text{スコア}| < 3$ に該当する機関が 4 機関、 $3 \leq |\chi^2 \text{スコア}|$ に該当する機関が 3 機関であった。

なお、実数解析と対数解析を比較したところ、いずれも概ね正規分布に従っていた。

1.4.2 硫化水素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

1) 性能評価試験

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

次年度において、添加菌④、⑤、⑥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⑥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④⑤が陽性（ H_2S 産生-、0 血清群別試験結果④09 群、⑤07 群）、添加菌⑥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。

2) 品質評価試験

初年度において、均質性確認試験における添加菌①、②、③の配付用調査試料の生菌数平均値（添加濃度）はそれぞれ 3.9×10^3 、 1.9×10^4 、 4.3×10^3 cfu/g であった。また、定性試験でも性能評価と同様の結果が得られたことから、配付用調査試料は均質であると評価した。配付から約 2 か月後に実施した安定性確認における添加菌①、②、③の生菌数は 3.0×10^2 、 3.5×10^2 、 7.1×10^2 cfu/g であった。均質性確認時の 1/10 程度に減少したが、定性試験の結果は均質性確認試験と同様の結果となったことから、定性試験を実施する上で影響がないと判断し、パイロットスタディ実施期間中の調査試料は安定であったと評価した。

次年度において、均質性確認における添加菌④、⑤、⑥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。配付から約 2 か月後に実施した安定性確認における添加菌④、

⑤、⑥の生菌数は 5.4×10^3 、 4.6×10^3 、 1.8×10^2 cfu/g であった。④、⑤は均質性確認時と同等、⑥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。

3) パイロットスタディ（室間共同試験）

(1) 結果報告

初年度は 51 機関が参加した。定性試験において通常の外部精度管理調査で使用している添加菌①、②は 51 機関全てが正しく報告した。しかし、添加菌③は 51 機関中 3 機関がサルモネラ属菌陰性と判定した。添加菌③を誤判定した 3 機関のうち 2 機関は、クエン酸利用能陰性のためサルモネラ陰性と報告した。うち 1 機関は API20E 実施によりサルモネラ陽性であったが当該機関の手順書に従った判定でサルモネラ陰性と報告した。残り 1 機関はクエン酸利用能およびマロン酸利用能試験を実施し、非定型反応であることからサルモネラ陰性と報告した。次年度は 50 機関が参加した。35 機関が正しく判定し、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

初年度は、前増菌培地では BPW が多く、増菌培地では RVB と TTB の組み合わせでの使用が多かった。また、分離培地では DHLA と CHS を採用する検査機関が多く、2 種類の分離培地を採用している検査機関が多かった。

この他、 H_2S の産生により判定する分離用寒天培地として MLCBA、 H_2S の産生によらない分離培地として ES II A を採用している検査機関も比較的多かった。また、生化学的性状試験において 36 機関がクエン酸利用能試験を実施し、クエン酸利用能試験を実施していない 15 機関のうち 10 機関は簡易同定キットでクエン酸利用能を確認していた。次年度は、緩衝ペプトン水（前増菌培地）、ラバポート・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）、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）、0 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たが、当該機関が使用したキットを使用したところ、インターナルコントロール DNA（ROX）

の結果を陽性と誤判定した可能性も示唆された。3 菌種とも陰性と判定した 1 機関は、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）、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。硫化水素非産生サルモネラ属菌 2 菌株（添加菌④：No. 1 および添加菌⑤：No. 2）、サルモネラ以外の 1 菌株（添加菌⑥：No. 3）を採用し、No. 2 は初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) アンケート調査

初年度は、外部精度管理調査事業で今後 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調査を行ったところ、「どの組み合わせでもよい」が半数以上（58.8%）となった。また、「陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい」（27.5%）を含めると 80%以上が H₂S 非産生サルモネラ属菌の調査試料に前向きな回答であった。また、パイロットスタディに対するコメントとして、H₂S 非産生サルモネラ属菌のクエン酸利用能の定型反応が弱いといったコメントが散見された。本試験に使用するシモンズクエン酸培地はメーカーによる反応差や菌の接種量による偽陰性/偽陽性が出やすく、検査員の経験や技量が大きく影響する可能性が示唆された。次年度は、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。

1.4.3 ウェルシュ菌検査用調査試料の開発

1) 性能評価試験

添加溶液の調製法の検討において、添加菌 6 菌株を RCM 培地で 37℃、24 時間または 48 時間嫌気培養した培養液の生菌数を RCM 寒天培地で測定し、添加菌液の培養時間と希釈率を決定した。Cs の HIC 22402 以外の 5 菌株は 24 時間培養で十分な生菌数を得られたため、この 5 菌株を用いて性能評価試験を実施した。また本結果より培養液の希釈率を 1~1000 倍の間でそれぞれ決定した。なお培養液の希釈は RCM 培地を使用した。無菌性が確認された冷凍基材を使用して調査試料を作製した。Cs2 菌株、Cp3 菌株の添加菌液を作製後、冷凍基材に添加菌液 0.5 mL を個別に添加して調査試料を作製した。調査試料は各菌 3 本作製し、菌を添加したのち速やかに-20℃以下で冷凍保存した。保存 0 日目/12 日目/28 日目の 3 ポイントで

生菌数測定を実施した。パイロットスタディで使用することを想定し、保存 0 日目と 12 日目の生菌数の対数値差が±1.0 log cfu/g 以内であることを評価基準としたところ、Cs の HIC 220400 は評価基準を下回り、それ以外の 4 菌株は評価基準に適合した。ただし Cp の HIC 250431 は保存 28 日目の生菌数が検出限界を下回ったため、安定性が疑わしいことからパイロットスタディへの使用は不適切と判断した。

保存 12 日目/28 日目に NIHSJ 法、パウチ法、CW 培地法を実施した。CW 培地法は保存 28 日目のみ実施した。

NIHSJ 法において、Cs の HIC 220400、HIC 220401 は TSC 寒天培地で増殖を認めず、最初の培地でウェルシュ菌陰性の判定が確定した。Cp の 3 菌株はすべての培地で典型反応を認め、陽性と判定した。Cs は 12 日目の試験において TSC 寒天培地以降の確認試験を生菌数測定の発育集落を移植して続けた。確認試験 A では TGC 培地に増殖を認め、LS 培地の黒変と微弱なガス産生を認めた。確認試験 B では TSC 寒天培地による純粋培養で増殖を認めなかったため、以降の試験を実施しなかった。Cs2 菌株において確認試験 A、B からウェルシュ菌陽性と誤判定される可能性は低いと示唆されたことから、28 日目では最初の TSC 寒天培地で増殖を認めない場合はウェルシュ菌陰性と判定し、試験終了とした。

パウチ法において、Cs の HIC 220400 は発育を認めなかった。HIC 250401 はおおよそ RCM 寒天培地の 1/100、Cp の 3 菌株は RCM 寒天培地と同程度か 1/10 以下の生菌数を認めた。培地が若干液化化し、集落の計測が困難であったことも集落が減少した要因と考

えられる。

CW 培地法において、Cs の 2 菌株は発育集落を認めなかった。Cp の HIC 250431 でも発育集落を認めなかった。Cp の HIC 250432 および HIC 250433 は典型反応を伴う発育集落を認めたが、平板培地 1 枚につき平均 2 集落程度と非常に少ない集落数であった。

生菌数試験および定性試験の結果から、Cs は安定した生菌数を示した HIC 220401、Cp は TSC 寒天培地で高い生菌数を維持し、定性試験も明瞭な典型反応を示した HIC 250432 を使用することとした。

2) 品質評価試験

均質性確認試験において調査試料 No. 1 (HIC 220401)、No. 2 (HIC 250432) の配付用調査試料の生菌数平均値 (添加濃度) はそれぞれ 1.8×10^2 、 4.7×10^3 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。

報告期限後 (配付から約 2 か月後) に実施した安定性確認試験において調査試料 No. 1、No. 2 の生菌数は 1.0×10^2 、 2.8×10^3 cfu/g であり、均質性確認試験と同等の結果となった。定性試験の結果も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。

3) パイロットスタディ (室間共同試験)

(1) 結果報告

50 機関が参加し、49 機関は正しく判定したが、1 機関が試料 No. 1 を陽性、試料 No. 2 を陰性と判定した。この原因は不明であるが、調査試料の取り違い、または誤記入が原因である可能性が考えられた。

調査試料は 12 月 1 日午後に当財団から発送し、12 月 2 日または 12 月 3 日に各参加機関に到着した。参加機関での到着日時とドライアイスの残存状況を確認したところ、12 月 3 日の到着を含め、45 機関 (90%) の機関でドライアイスの残存を確認できた。

ドライアイスの残存が確認できなかった機関、特に 12 月 2 日に到着した機関においては、輸送会社の取扱い不備や同梱したドライアイスのサイズのばらつきが影響した可能性のほか、機関に到着した時点ではドライアイスが残存しており、担当者が確認するまでに調査試料のみ取り出され、ドライアイス残存確認まで室温で放置されていたなどの扱いが影響した可能性が考えられた。50 機関から 10 機関を抽出して輸送中の温度変化をデータロガーで確認した結果、輸送中の温度は概ね -20°C 以下の範囲で推移していた。1 機関については当該検査機関が報告した到着日時 (12 月 2 日 16 時) までに 30°C を超える温度上昇が認められたが、配送業者の配達記録 (12 月 2 日 10 時 22 分) より、温度上昇より前に到着していたと考えられる。なお、配送業者の記録した配達日時における温度は -28.2°C であった。

また、本調査研究においては、逆に回答した 1 機関を含めて全ての参加機関がウェルシュ菌の発育を確認できていたことから、輸送上の問題はなかったと判断した。

(2) 経過報告書の集計結果

ウェルシュ菌検査法について、全体の 86% において SOP がある (31 機関)、または通常実施している試験法がある (12 機関) と回答し、ペプトン加生理食塩水等の希釈水で 10 倍希釈したのち、CW 培地法 (40 機関) またはパウチ法 (9 機関) による試験を実施

し、確認試験や同定試験で最終判定した。その他、1 機関が同定キットでの試験法を採用した。

CW 培地法をベースにした試験法を採用した 40 機関のうち、26 機関は TGC 培地と卵黄加 CW 寒天培地（または CW 寒天培地）を併用し、半数以上がグラム染色や同定キットによる確認試験を実施し、うち 8 機関は特定遺伝子の検出キットによりウェルシュ菌を判定した。

パウチ法をベースにした試験法を採用した 9 機関のうち、6 機関がハンドフォード改良培地、3 機関がクロストリジア測定用培地を用い、検出菌を卵黄加 CW 寒天培地、NM 培地、LG 培地などに移植して確認試験を実施してウェルシュ菌を判定した。さらにグラム染色や同定キットを併用した機関もあった。

本調査研究で、国内で採用されるウェルシュ菌検査の試験法が主に 2 通りであること、および採用する試験法による検出限界に大きな差があることが明確になった。アンケートで調査試料 No. 2 の接種菌数が少ない、または多いという意見が散見されたが、CW 培地法を使用した機関では発育集落が少なく判定が困難となり、一方パウチ法を採用した機関では菌が多すぎるため単離が困難となったことからの意見である。食品衛生検査指針に準拠した試験法を参照すると、CW 寒天培地では調査試料中の菌数の 1/100、パウチ法では等倍の集落数の発育が想定される。今回の調査試料の菌数からは、CW 寒天培地で 1 平板当たり約 50 cfu、ハンドフォード改良培地で 1 パウチ当たり約 5000 cfu の集落が得られると見込まれた。しかし実際には、各培地の選択性が強く作用し、ウ

ェルシュ菌の増殖も抑制されたため、各培地上の集落数は CW 寒天培地では約 5 cfu、ハンドフォード改良培地では約 500 cfu の集落数にとどまったものと推察される。培地特性により集落数に大きな差が生じることは当財団でも事前確認で把握しており、両培地で検出できる中間濃度として今回の濃度設定を決定したが、想定通りに両試験法で問題が生じる結果となった。

通常、ウェルシュ菌は食中毒発生後の検査が多く、定性試験を実施する場合は増菌培養を実施しているケースが多いと考えられ、CW 培地法はその観点から考えれば特に問題ない。一方、パウチ法は特別な機器等を必要としないため簡便、低コストであるが、培養後の単離には一定の手技が求められる。小型の嫌気培養キットが開発された現代において、パウチ法は将来的に参照法の扱いになることが予想され、ウェルシュ菌検査用調査試料は CW 寒天培地などの塗抹を前提とした試験法を想定して設計できるようになる可能性が高い。

なお、本調査研究では食品衛生検査指針に掲載されている NM 培地や LG 培地等を用いた確認試験が多数実施されていたが、本試験法の引用元である ISO 7973: 2004 はすでに廃止され、ISO/TS 15213-2:2023 に継承されるとともに、大幅な改正が行われている。また、ウェルシュ菌の定性試験ガイドラインとして ISO 15213 -3:2024 が発行されており、国際標準としてはこれらのガイドラインを意識していく必要もあると考えられる。ステージ 4 まで進んだ国内微生物標準試験法（ウェルシュ菌：定量）[NIHSJ-24] は、ISO 7973:2004 をベースに作成されていたが、最終案は公開されておらず、今後の動

向は不明である。

(3) アンケート調査

外部精度管理調査事業の今後の運用として、ウェルシュ菌検査を実施する場合のアンケート調査を行ったところ、「参加したい」「公定法となった場合は参加したい」を合わせると 92%がウェルシュ菌検査の調査試料に前向きな回答であった。

2 今井研究分担

2.1 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

食品添加物試験法の開発に関する研究

2.1.1 パイロットスタディ調査の実施

たくあん漬けを基材としてサイクラミン酸の精度管理調査用試料を作製するため、試作品による検討を実施した。たくあん漬けの浸漬期間によるサイクラミン酸濃度の経時変化について、浸漬期間1日目では、外皮、外皮を除く外表面、中心部におけるサイクラミン酸濃度には差があり、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液における濃度より大幅に低かった。その後、3部位の濃度は経時的に増加し、浸漬期間7日間において、いずれの部位にも均等にサイクラミン酸が浸透し、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液の濃度とほぼ同濃度となった。以上の結果より、調査用試料の作製にあつては、浸漬期間を7日間とすることとした。

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

ため、パイロットスタディを実施することとした。

精度管理調査のパイロットスタディ調査用試料の均質性試験の結果(0日目)を一元配置分散分析によって評価したところ、測定値が 0.0980 ± 0.00215 g/kg、相対標準偏差(RSD(%))が2.2であり、容器間のばらつきは有意ではなく(p 値 >0.05)、調査用試料は十分に均質と判断した。そして、安定性試験の結果(82日目)は、測定値が 0.0971 ± 0.00212 g/kgであり、均質性試験での結果を100%として安定性を算出したところ、99.1%となった。このため、調査用試料は、調査期間中安定であったと判断した。

また、参加機関の報告値は、従来方式およびロバスト方式で解析した。従来方式では平均値±標準偏差が 0.0947 ± 0.00875 g/kg(RSD: 9.2%)、 z -スコアが $-1.92 \sim 1.84$ であった。 $\bar{X}$ 管理図では全参加機関が管理限界線内であったが、 R 管理図では1機関が UCL を超えた。一方、ロバスト方式ではメジアン・クリーニングで除外された機関はなく、ロバスト平均値±ロバスト標準偏差が 0.0948 ± 0.00823 g/kg(RSD: 8.7%)、 z -スコアが $-2.05 \sim 1.95$ であった。

2.1.2 通知試験法における誘導体化時間に関する検討

サイクラミン酸の誘導体化については、室温では、「次亜塩素酸ナトリウム試薬を入れた後」から「遠心分離した後水層を除去した後」までにおける静置では、経時的に回収率が低下していた。最も回収率を低下させたのは「1分間激しく振とうした後」の静置であり、10分では77.9%、30分では48.7%であった。また、静置時間が長いほど回収率のばらつきも大きくなった。一方、

「水層を除去した後」以降の静置は回収率にほとんど影響を与えなかった。

また、冷蔵での静置について、いずれの段階においても回収率に影響はみられなかった。

2.1.3 新規誘導体化法の改良に関する検討

2022年度報告の方法と比較し、検体採取量を半分に抑える一方で、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既報の約5倍に増加した。また、液-液分配工程を設けたことにより、夾雑ピークを大幅に低減した。

添加回収試験における真度及び併行精度の検討結果について、オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びビスケットの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。

2.2 動物用医薬品試験法の開発に関する研究

2.2.1 三層分離抽出法を用いた分析法の検討

前処理法について、三層分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、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/3cc、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、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。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及びエリスロマイシンの真度は51.5%及び55.8%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。

2.2.2 パイロットスタディ調査用試料の作製と分析法の検討

パイロットスタディ調査用試料に添加する動物用医薬品については、秦野研究所が現在スルファジミジンの外部精度管理調査（残留動物用医薬品検査）を実施していることから、スルファジミジンをはじめとするサルファ剤を含む市販の混合標準液を選定した。さらに、サルファ剤がスプレードライ工程に対して適用不良である可能性に備え、近年検疫所における違反事例で件数が多いエンロフロキサシンを含む

キノロン剤混合標準液も選定した。そのうえで、秦野研究所に対し、パウダー状の鶏肉試料に動物用医薬品37成分を浸漬により添加したスプレードライ試料の作製を依頼した。

分析法については、一斉試験法Ⅲを基に、まず、試料採取量について検討した。試料採取量を一斉試験法Ⅲの5 gから1 gに水4 mLを加えて15分浸漬させることで、添加回収試験における回収率が良好となった。次に、吸引ろ過におけるけいそう土の有無による効果について検討したところ、今回の添加対象項目に限定すれば、添加回収試験の結果がほぼ同等であったことから、けいそう土を使用しないこととした。これらの検討を実施した分析法を「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン」に準じて妥当性を確認したところ、36項目が基準を満たすことが確認された。

2.2.3 パイロットスタディ調査の実施

調査用試料については、スルファジミジン、スルファメトキサゾール、エンロフロキサシン及びオキシリン酸の平均濃度±標準偏差 (μg/g) は、それぞれ 0.128 ± 0.003 、 0.142 ± 0.002 、 0.153 ± 0.004 及び 0.153 ± 0.003 (μg/g) であった。均質性については、一元配置分散分析により評価した結果、F値<F境界値 (3.020)、かつp値>0.05を満たしたことから、均質と判断した。安定性については、均質性における平均濃度と比較して、それぞれ100.0%、99.6%、97.0%及び99.7%であり、調査期間中の安定性に問題はなかったと判断した。

パイロットスタディについては、参加機関の試験溶液作製における抽出方法によって報告値に大きな幅が生じた。そのため、

14機関の参加機関を抽出方法に基づき、①水またはメタノールを用いない「非水抽出G (グループ)」、②抽出に水またはメタノールを用い、かつ試料を水で浸漬しない「水/メタノール含有抽出G」、③試料を水で浸漬した「浸漬G」に分類し、比較した。その結果、すべての調査対象項目において、各グループの平均値及び中央値は非水抽出G<水/メタノール含有抽出G<浸漬Gとなっていた。また、参加機関の3回測定の平均値を用い、Welchの2標本t検定 (両側検定) を実施し、多重比較についてはHolm補正を適用してグループ間の差を検討したところ、オキシリン酸では、水/メタノール含有抽出G - 浸漬Gは有意水準5%では有意差が認められなかったが (Holm補正後p値=0.13)、非水抽出G - 水/メタノール含有抽出G及び非水抽出G - 浸漬Gの各比較が有意であった (Holm補正後p値<0.05)。これらの結果より、調査用試料は「水の存在により抽出回収が改善する」という特性を有すると判断した。

2.2.4 パイロットスタディ調査用試料における浸漬効果の検討

調査用試料の浸漬効果を検証するため、調査用試料1 gから試験溶液を調製し、B 2のとおり、溶媒抽出液、2次抽出液及び3次抽出液を調製・測定し、確認した。その結果、溶媒としてアセトニトリル、ヘキサン飽和アセトニトリル及び酢酸エチルを用いた場合は、浸漬しない場合及び溶媒で浸漬した場合、十分に抽出されない傾向が確認された。一方、水で浸漬した場合であれば、酢酸エチルを用いた場合のキノロン系の一部の項目 (シプロフロキサシン等) を除き、回収率が大幅に向上する傾向が確

認された。

3 新矢研究分担

重金属類試験法の改良と妥当性評価に関する研究

3.1 マイクロウェーブ分解—ICP質量分析による試験法の妥当性評価

使用した認証標準物質（Crab Paste、Peanut Butter、Baby Food Composite）のいずれにおいても、Na、Mg、K、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Cd、Ba、Pbの12元素は、検討したいずれの測定条件でも認証値とよく一致し、真度、併行精度および室内再現精度は目標値（ $0.01 < \text{濃度}(\text{mg/kg}) \leq 0.1$ の場合：真度 80～120%、併行精度 < 15%、室内精度 < 20%、 $0.1 < \text{濃度}(\text{mg/kg}) \leq 10$ の場合：真度 80～110%、併行精度 < 10%、室内精度 < 15%、 $10 < \text{濃度}(\text{mg/kg})$ の場合：真度 90～110%、併行精度 < 10%、室内精度 < 15%）を満たしていた。また、重み付け検量線を用いる方が検量線範囲は拡大し、妥当性も向上したこと、さらに希釈等による労力も低減されることから、本法では有効であると考えられた。一方、PについてはNo Gasモードのみ、PのHeモードおよびCaのH2モードでは、Peanut ButterとBaby Food Compositeで分析妥当性が確認された。これら2元素はマトリックスの影響を受けやすいと考えられた。

肉由来の認証標準物質（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（ $1.023 \pm 0.064\%$ ）が高く、Bovine Muscle中のCd

においては認証値（ $0.0022 \pm 0.0004 \text{ mg/kg}$ ）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と考えられた。

3.2 肉試料の外部精度管理調査への適用性の検討

海外で規制値が設定されているPb、Cd、Asについては、牛、豚、鶏のいずれの粉末肉においても定量下限未満であり、これら重金属類を対象とした精度管理調査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。また添加回収試験（ $n=5$ ）の結果は、Pbについて $104 \pm 1.3\%$ 、Cdについて $99.2 \pm 3.9\%$ 、Asについて $103 \pm 2.5\%$ と良好な回収率が得られ、これら3元素の海外規制値レベルでの精度管理試料への適用可能性が確認された。

パイロットスタディ用検討試料には、比較的大量に入手しやすい鶏肉のパウダー食品を使用した。鶏肉パウダーを基材とした作製試料は、含まれる脂質によりスプレードライヤに供する懸濁液の粘性が高く、粒子径が不安定であり、噴霧された試料の乾燥が不完全であった。このため試料の大半は装置の壁に付着して回収量が少なくなり、また作製時の画分間で濃度のばらつきが大きかったことから、鶏肉パウダーはパイロットスタディには不適と考えられた。

一方、脂肪分の少ないむね肉を原料とする鶏むね肉パウダーを基材とした作製試料は、比較的安定して作製され、360gを回収した。回収した試料を約10gずつ35本に分注して、パイロットスタディ用検討試料とした。試料の均質性を確認するために、作

製数量 35 を 10 で除し、得られた数の倍数ずつに系統的に 10 本を抽出し、それぞれ分析 (n=2) に供した。分析結果は、Pb について 0.100 ± 0.002 mg/L、Cd について 0.051 ± 0.001 mg/L、As について 0.507 ± 0.009 mg/L であり、いずれも試料濃度の分布は設定濃度 (Pb、Cd、As についてそれぞれ 0.10 mg/kg、0.05 mg/kg、0.50 mg/kg) 付近に集中しており、ばらつきも小さかった。均質性の確認を一元配置分散分析により評価した結果、Pb、Cd、As の試料中濃度は、評価基準である F 値 (分散比) $< F$ 境界値かつ P 値 > 0.05 を満たし、いずれの元素においても良好な均質性が得られた。これらの結果より、パイロットスタディ用試料の基材には鶏むね肉パウダーが適していると考えられた。ただし、As 測定時の内標準元素に用いるイットリウム (Y) がスプレードライ操作中に混入していたことが疑われたため、内標準元素をロジウム (Rh) に変えることで作製試料の品質評価は満足された。

4. 鎗田研究分担

下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究

4.1 精確な分析法の検討

4.1.1 LC-MS/MS 条件の比較

(1) 分離及び感度

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

そこで、これらの 4 条件によって OA、DTX1 および DTX2 の混合標準液を測定した。OA と DTX2 との分離に関しては条件 I が最も良好であった一方、条件 II ではベースライン分離することができなかった。一方、測定感度については、OA、DTX1、DTX2 のすべてについて、条件 III が最も感度に優れ、条件 I もほぼ同等の感度を示した。

(2) マトリックス効果

SPE 条件 A および B で調製した溶液に OA 群を添加した溶液を用いて、マトリックス効果を評価した。すなわち、それぞれによって SPE 処理したホタテガイのブランク処理液に既知量の OA 群を添加し、同濃度の OA 群を含む標準液とともに LC/MS/MS 測定に供し、得られた面積を次式によって評価した。

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

その結果、測定条件 III では、HLB カートリッジを用いた SPE 処理と ODS カートリッジを用いた SPE 処理の両方において ME 値は 0.8~1.2 の範囲内となり、顕著なマトリックス効果の影響は認められなかった。

(3) 添加回収試験

SPE 条件 A を適用し、添加回収試験を行った。添加濃度は、ホタテガイ試料中の相当量として各 0.05 ppm とした。OA 群のいずれについても、下痢性貝毒の機器分析法に求められる性能基準である正確さ : 70 % ~ 120 %、及び併行精度 : 15 % 以下を満たしており、精確さは良好であることが確認できた。

4.1.2 酸添加ー加熱抽出法の検討

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 4.2.2 記載の試料前処理法に適用した。酸としては、0.5 %酢酸をメタノール溶液 9 mL に加え、これを 60 °C で 5 分間加熱した後に、OA 群の抽出を行った。

その結果、本法では酸の添加による OA 群の分解は認められなかった一方、添加回収試験の結果を 4.2.2 記載の試料前処理法による結果と比較したところ、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、酸添加及び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。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。ここで、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た。しかしながら、この比較においても両法による分析値に大きな違いは認められなかった。

4.2 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。ここで、加水分解処理なしの分析値は遊離型の DTX1 の濃度を示し、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。両分析結果の比較から、アセトニトリル中での加水分解によっても誘導体化物が DTX1 に分解されたことが示され、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、この方法によって調製した試料溶液の精製度合いを、前述の *ME* 値を指標として評価した。その結果、得られた処理液の *ME* 値は 0.8～1.2 の基準をわずかに超えた。ただし、この試料処理液をアセトニトリルで 10 倍に希釈した場合に、*ME* 値は 1.12～1.18 の範囲になった。

以上から、ここ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。

4.3 試験所間比較試験

4.3.1 調査試料の調製

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

調査試料の調製には、ホタテガイ可食部約 1.7 kg を用いた。これをブレンダーで細断した後に裏ごしし、繊維質分等を除去した試料約 1.4 kg を得た。一方、OA 標準品適当量と 1 µg/mL DTX1 溶液適当量を混合し、添加用の混合溶液を得た。

均質化したホタテガイ可食部、ホタテガイ中腸腺試料、及び添加用の混合溶液は、最終的に得られる試料中の OA 及び DTX1 ができるだけ均質に分布されるように、2 段階に分けて混合した。すなわち、ホタテガイ中腸腺試料 20 g を精秤し、その 9 倍量のホタテガイ可食部と、それぞれの比に応じた混合溶液適当量を加えて混合し、得られた 7 つの混合物をさらに混合した。さらに、各瓶の内容物を合わせ、約 30 分回転混合することで、混合試料約 1.25 kg を得た。回転混合させた試料を 5 等分に分けて内容物を混合した後、各瓶の内容物約 20 g ずつを別の瓶 10 本に合一した。各瓶から内容物 5 g ずつを 16 本のポリ製遠沈管に小分けした。

以上によって、調査試料 160 本を調製することができた。これらは約-60 °C で保管

した。

4.3.2 均質性評価

(1) 均質性評価試験の結果

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。合計 20 回の定量値のばらつきは、相対標準偏差として 4.2 % (OA) 及び 6.4 % であった。得られた結果を一元配置分散分析によって評価したところ、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。分散分析の結果を基に算出した瓶間均質性標準偏差 s_{bb} ($= \sqrt{\frac{MS_{among} - MS_{within}}{n}}$) と、測定

のばらつきに由来する u_{bb} ($= \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \sqrt{\frac{2}{v_{MS_{within}}}}$) を算出し、両者

のうちの大きい方を均質性に関する不確かさとした。結果として、OA については $u_{bb} = 5.6 \%$ 、DTX1 については $s_{bb} = 2.0 \%$ 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。

$$S_s \leq 0.3 \sigma$$

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、本研究の最終年度で

ある 2025 年度に実施した。そのため、均質性を評価した時点では、技能試験の結果として得られる σ は未知であった。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。その結果、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。

4.3.3 安定性評価

試験所間比較試験のパイロットスタディにおける調査試料の分析期間中及び前後に、茨城大学において調査試料中の OA と DTX1 濃度を定期的に定量した。OA と DTX1 の濃度変化に関する数学的モデルがないため、単純な直線回帰を仮定して定量値の変化を評価した。その結果、得られた回帰式の傾きは経過時間に対して有意とはいえなかった ($p: 0.05$)。また、類似試料の安定性に関するデータからも OA と DTX1 はこの温度で十分に安定であると考えられた。そこで、4 回の定量結果の相対標準偏差 (OA : 4.8 %、DTX1 : 1.2 %) を安定性に関する不確かさとした。

4.3.4 パイロットスタディ

(1) 参加機関の結果

試験所間比較試験のパイロットスタディには 22 機関が参加した。各参加機関には、異なる試料瓶を用いることにより、独立した 3 回の分析を行うことを求めた。参加機関にはクロマトグラムの提出を求

めたが、標準液と試験溶液 (試験試料を前処理した処理液) の両方において、明らかな妨害ピークが認められた機関はなかった。

AOAC ガイドライン (2005) に基づき、参加機関の報告値の外れ値検定を行った。Cochran 検定と Grubbs 検定を行ったところ、Grubbs 検定によって 1 機関の OA の報告値が棄却された。そこで、これら以外の報告値を用いて総平均 (平均値の平均) を求めた。さらに、一元配置分散分析の結果から、併行相対標準偏差 (併行精度) $RSDr$ として 4.6 % (OA) および 4.2 % (DTX1)、室間再現相対標準偏差 (室間精度) $RSDr$ として 17.4 % (OA) および 22.4 % (DTX1) を算出した。 $RSDr$ 値は Horwitz の修正式 (Thompson, 2000) から求めた予測値 $PRSDr$ に対して 79 % (OA) 及び 102 % (DTX1) であり、本試験結果のばらつきは妥当と考えられた。

(2) 付与値の算出

参加機関の報告値の中央値を本比較試験の付与値とした。外れ値を除いた参加機関の報告値の中央値を求めたところ、OA : 0.0263 mg/kg、DTX1 : 0.0359 mg/kg だった。一方、報告値のばらつきを表す正規四分位範囲は OA : 13.5 %、DTX1 : 20.4 % (中央値に対する相対値) であった。4.3.3 で算出した OA の安定性に関する不確かさが、正規四分位範囲の 0.3 倍を上回ったため、JIS Z8415 (ISO 13528) を参考にして、各物質における正規四分位範囲と、安定性に関する不確かさを合成して技能評価のための標準偏差を算出した。その結果は、OA : 0.0038 mg/kg、DTX1 : 0.0074 mg/kg だった。

(3) 技能評価

JIS Z8415 (ISO 13528) に基づき、次式より参加機関のパフォーマンスの指標である z スコアを算出した。その結果、0A について 2 機関の z スコアが 3.0 以上となり、0A について 1 機関、DTX1 については 2 機関の z スコアが 2 から 3 の範囲であった。 z スコアが 3 以上の機関の分析方法や結果を精査したが、定量計算における計算ミスや、LC-MS/MS におけるクロマトグラムに異常は認められず、原因の解明には至らなかった。

(4) 付与値の評価

茨城大学において、標準添加法と内部標準法を組み合わせた定量法により調査試料を分析した。さらに、この方法による分析値を、付与値及び調査試料の調製値（ただし、ホタテガイ試料に添加した 0A の純度等は評価していない）と比較した。本法による定量値は調製値とおおむね一致していたのに対して、付与値はこれらの値よりも小さかった。参加機関による分析では 0A や DTX1 の回収率が補正されないことが原因の一つと考えられた。ただし、原因の特定にはさらなる検討が必要であった。

5. 大竹研究分担

残留農薬分析の外部精度管理に関する研究

5.1 スプレードライヤ条件決定のための、ほうれんそう試料中残留農薬分析

(1) 添加回収試験による一斉試験法の評価（ほうれんそう試料）

一斉試験法による分析結果から、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、91～94 %と良好であった（マトリ

ックスマッチ検量線を使用)。よって、本方法によって残留農薬検査用ほうれんそう試料を用いた、農薬の噴霧条件検討のための分析を行っても問題ないことが示された。

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

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用ほうれんそう試料の、Lot 1 (100 °C, AN20 %), 2 (80 °C, AN20 %), 3 (100 °C, AN30 %), 4 (80 °C, AN30 %) (温度は噴霧温度を示す) の 4 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法および SFE 法によって分析した (SFE 法では、Lot 1 の試料のみ分析)。分析結果より、一斉試験法と SFE 法の定量結果はよく一致しており、(1) での添加回収試験に加えて一斉試験法の妥当性を確認できた。

食品薬品安全センター秦野研究所によると、添加濃度はクロルピリホス:0.1 mg/kg, ダイアジノン:0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン:0.2 mg/kg であった。本研究で得られた結果を用いて、調製時の回収率を計算した結果より、スプレードライヤの添加濃度に対する回収率の範囲は、80 °C (AN20 %) で 61 %から 78 %, 100 °C (AN20 %) で 57 %から 74 %, 80 °C (AN30 %) で 58 %から 76 %, 100 °C (AN30 %) で 54 %から 74 %であった。昨年度までに、玄米試料でもスプレードライヤの条件検討を行ったが、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果の類似点は、以下の通りであった。①対象農薬のうち、フェニトロチオンの回収率が一番高か

った。②各農薬において、100℃よりも80℃の方が良い回収率が得られた。また、玄米（AN20％）とほうれんそう（AN20％）の結果で異なる点は、以下の通りであった。①ほうれんそうでは、80℃でのダイアジノンの回収率がクロルピリホスよりも高く（マラチオンと同程度であった）、クロルピリホスの回収率が一番低かった。②ほうれんそうでは、玄米に比べて多くの場合で回収率が上昇した（例えば、80℃ではフェニトロチオンとダイアジノンで約10％上昇した）。さらに、ほうれんそう試料においてANを30％とした場合、AN20％のときと比較すると、マラチオンを除いてAN20％の回収率がやや高くなった。噴霧温度やAN濃度を確定させるためには、以上の結果を用い、他の条件も考慮して（試料調製時に用いる装置の壁面に粉末試料が付いてしまう等の作業面での条件も含む）、課題1において最終的に決定する。

5.2 残留農薬分析のための玄米を用いた外部精度管理のパイロットスタディ

(1)パイロットスタディに用いる玄米試料の均質性評価

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

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

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

その結果、均質性試験の不確かさは0.58％から0.78％と十分に小さく、パイロット

スタディに用いるためには問題ない品質であることが示された。

(2)パイロットスタディに用いる玄米試料中の農薬の安定性評価

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

(3)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

各分析法によって得られた結果を用いて、IDMSによる精確な参照値と拡張不確かさを求めた。その結果、クロルピリホス： (0.065 ± 0.004) mg/kg, ダイアジノン： (0.217 ± 0.012) mg/kg, フェニトロチオン： (0.138 ± 0.008) mg/kg, マラチオン： (0.138 ± 0.008) mg/kg（参照値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数 $k=2$ から決定された拡張不確かさであり、約95％の信頼の水準をもつと推定される区間を示す）となった。これらの値と、参加者の中央値を用いて算出された参照値の比較を、以下の(4)で行う。

(4)残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

参加者の中央値を用いて算出された参照値は、以下のようになった。すなわち、クロルピリホス： (0.067 ± 0.007) mg/kg, ダイアジノン： (0.209 ± 0.021) mg/kg, フェニトロチオン： (0.140 ± 0.016) mg/kg, マラチオン： (0.141 ± 0.021) mg/kg となった。この結果と、IDMSによって得られた参照値（上記(3)）を比較すると、よく一致していた。

5.3 玄米試料中農薬の長期安定性評価

(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。

5.4 スプレードライヤ条件決定のための、ほうれんそう試料中残留農薬分析

(1) 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, フェニトロチオン、マラチオン：0.2 mg/kgであった。本研究で得られた結果を用いて、調製時の回収率を計算した結果より、スプレードライヤの添加濃度に対する回収率の範囲は、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。

5.5 残留農薬分析のための、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

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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(4)で行う。

(4) 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。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。

5.6 スケールアップを目的とした試料調製の条件検討

(1) 残留農薬検査用玄米試料の分析

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用玄米試料(チャンバー部とサイクロン部)に含まれる対象農薬を、一斉試験法および STQ 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、添加濃度はすべての対象農薬について 0.4 mg/kg であった。本研究で得られた結果より、サイクロン部におけるネオニコチノイド系農薬を除き、スプレードライヤの添加濃度に対する回収率の範囲は、チャンバー部で 37 %から 61 %、サイクロン部で 29 %から 48 %であった。これまでも、スプレードライヤの条件検討を行ってきたが、回収率に多少の差は見られたものの、今回も問題になるような低い回収率ではなく想定内であったと考えられる。一方でサイクロン部におけるネオニコチノイド系農薬では、回収率が 258 %から 294 %となった。同じ試料を複数回分析しても同様の結果となったため、分析の問題ではなく、元々の試料に何らかの問題があったと考える(調製過程でのコンタミや濃縮が考えられるが、詳細は不明である)。

そもそも、サイクロン部の試料は抽出・精製操作がやりづらく、精製後も脂成分が残ったことから、上記の回収率の問題がなくても技能試験試料に用いるには不向きであると考えられた。今回の結果からは、これまでと同様の回収率であり、ハンドリングにも優れるチャンバー部の試料が技能試験試料として適していると結論される。

E. 結論

1 梶原研究分担

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発：

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

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 $46\mu\text{m}$ の微細な粉体が作製できた。また、

これまで残留農薬検査用試料の作製には、有機溶媒を用いていたため、窒素ガス密閉循環型スプレードライヤを用いていたが、大量に作製するためには水系の開放系スプレードライヤを用いる必要がある。そこで、水系での作製を検討した。残留農薬検査用試料の作製には玄米粉を基材として、ネオニコチノイド系及び有機リン系農薬を添加し、装置に L-8i を使用して作製した。また、重金属検査用及び残留動物薬検査用として基材に鶏肉パウダーを用い検討した。鶏肉パウダーは一次粒子径が大きく、鶏肉由来の大きな繊維状の粒子が多数混在しており、10%懸濁溶液として噴霧し粉体を回収したが、油分が多くスプレードライヤ本体の内壁に付着し、回収率は 30%ほどであった。そこで、油分の少ないむね肉のみを材料とした鶏むねパウダーを用い、重金属検査用及び残留動物検査用試料の回収率が改善され容易に作製が行えるようになった。さらに、大量作製をするために大型のスプレードライヤ OC-16 を用いて残留動物薬検査のパイロットスタディ用試料の必要量を得ることができた。

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、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、食品衛生法において一般あるいは個別規格となるプラスチックの材質ポリマーについて、全合成樹脂に共通して規定される材質試験におけるカドミウム及び鉛の定量試験としての調査試料作製検討を行った。

試料基材に ABS ペレット及び AS ペレットを、また試料基材の溶解溶媒にジクロロメタンを用い、オイル系の標準品を添加し、作製容器にテフロンバット及びステンレスバットを用いてシート状試料を作製した。ポリマー含量はいずれも 10w/w%とした。

作製したシート状試料のカドミウム及び鉛の濃度確認を行った結果、1 容器（1 シート）及び 10 容器（10 シート）間で均質性を確認したところ、いずれのポリマーも良好な均質性が得られた。しかしながら、残留溶媒測定では、ABS シート（約 1~2%）より AS シート（約 7~8%）は高い残存率を示し、適用は難しいと考えられた。また、いずれのポリマーにおいてもステンレスバットで作製したシート状試料の方が低い溶媒残存率を示す傾向が見られた。以上より、試料作製は、ポリマーは ABS ペレット、ポリマー含量は 10w/w%、作製に用いる容器はステンレスバットとし、パイロットスタディを実施する際の試料必要量のスケールも考慮して作製の実現性を検討した。理論作製濃度を基準値の 1/2 濃度としたカドミウム及び鉛が同濃度の作製、ならびに基準値付近のカドミウム及び鉛で異なる高濃度の作製を 2 年に亘り実施し、それぞれ均質性及び安定性確認試験を行った後、当該試料を用いてパイロットスタディとして試験室間共同試験を行った。異なる調査試料で、いずれも許容範

囲内の溶媒残存率であり、均質性及び安定性も良好であった。ま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。これらの調査試料を用いて行った 2 回のパイロットスタディではいずれも正規確率プロット中のデータ分布においても両元素とも概ね直線状に分布しており、妥当な結果が得られた。各検査機関が採用した方法では、試料採取量が 0.1 g 以上 0.3 g 未満、0.5 g 以上 0.7 g 未満ならびに 1 g 以上（最多）と多様であり、また、使用された測定装置は原子吸光分光光度計、ICP-OES、ICP-MS 及び蛍光 X 線装置と多種に及んだが、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。 $\bar{X}$ -R 管理図で管理限界外となった機関は両元素で 10～15%程度あったが、作製した 1 容器（1 シート）及び 10 容器（10 シート）間で良好な均質性が得られていることから、いずれも参加検査機関の試料の前処理から定量までのプロセスに問題があった可能性が示唆された。本調査研究では、通知に示されるカドミウム及び鉛の性能評価パラメータの目標値を満たさない機関があった。器具及び容器包装の規格基準に係る試験検査を実施する機関においては、本通知に示される性能評価パラメータの目標値を参考に試験が行われていると考えられるが、本通知は、発出されて 1 年も経過しておらず、各検査機関では十分な管理体制が整っていない可能性が考えられる。精度管理の一環としても本研究で行った調査試料の作製及び試験室間共

同試験は意義のあるものとする。

以上の結果より、本研究で作製した調査試料の当該項目における外部精度管理調査への適用は問題ないと考えられるが、作製量の拡大や、より効率的な作製方法の検討、さらには新たな器具・容器包装検査項目の検討を行い、より多くの検査機関が継続して参加できるよう本調査研究を引続き行っていくことが必要と考えられる。

1.3 アレルギー物質技能試験プログラムに関わる検討：

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

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

市販加工食品から調製した incurred samples は 2 施設間における再現性および品質評価試験が良好であったことから、実際の検査業務試料を想定するものとしてパイロットスタディへの適用を考えている。

特定原材料の外部精度管理調査はそのまま、国民の健康被害防止につながる。このため、品質の安定した試料を安定に供給することは重要であるが、加工食品を基材とした調製では、メーカーによる加工食品の予期せぬ変更や、販売中止等の事態が起こる

ため、多数の試験試料を確保することは、非常に重要な課題である。本研究においては、必要とされている試料の確保の一端を担うことができたと考える。

今後は他の特定原材料についても試料の確保を行う必要があるだろう。

1.4 一微生物学調査用調査試料の開発：

1.4.1 一般細菌数測定検査用調査試料の開発

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

1.4.2 硫化水素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

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

次年度は 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④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⑤⑥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、0 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、当該箇所が改善されれば本調査試料を外部精度管理試料に適用することが可能になると示唆された。

1.4.3 ウェルシュ菌検査用調査試料の開発

ウェルシュ菌検査のパイロットスタディでは、50 機関中 1 機関が何らかの理由で誤判定した。採用した試験法は食品衛生検査指針に掲載されている CW 寒地培地を用いる方法とパウチ法の 2 通りが多く、これらの方法を採用した機関ではウェルシュ菌を疑う場合に追加試験を実施していた。2 通りの試験法は検出限度値に大きな差があるため、現状では外部精度管理調査での運用は難しいことが明確となった。外部精度管理調査事業にウェルシュ菌を適用するためには、国際標準法（NIHSJ 法）などで国内の公定法が定められることが最低条件であると考えられる。

2 今井研究分担

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：

食品添加物試験法の開発に関する研究

たくあん漬けを基材としたサイクラミン酸の精度管理調査用試料は、均質性及び安定性が良好であった。12 機関が参加したパイロットスタディの結果、全機関が従来方式およびロバスト方式で満足できるパフォーマンスであった。また、新規誘導体化分析法を 2022 年度の検討から改良し、夾雑ピークの低減、HPLC ピーク面積の増大及び良好な添加回収試験結果を得た。

動物用医薬品試験法の開発に関する研究

三層分離抽出法において、抽出時の pH 緩衝液添加等について検討した結果、鶏肉ペーストを用いた添加回収試験で 97 成分が良好であった。また、動物用医薬品を添加した鶏肉スプレードライ試料の分析方法を検討し、36 成分の妥当性を確認した。スルファジミジン等 4 成分を対象としてパイロットスタディを実施し、均質性及び安定性は良好であり、参加機関数は 14 であった。検討の結果、「水の存在により抽出回収が改善する」と示唆されたため、報告値を抽出方法別に評価した。次回は、試料への一律の浸漬処理後に測定実施する方針を検討している。

3 新矢研究分担

重金属類試験法の改良と妥当性評価に関する研究

水分や油分を考慮したマトリックスの異なる食品 3 種の認証標準物質および肉由来の 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。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。本法により市販粉末肉の重金属類を調査した結果、海外で規制値が設定されている Pb、Cd、As は定量下限未満であり、精度管理調査のブランク試料として適用可能であることが確認された。鶏むね肉パウダーを基材として Pb、Cd、As を添加し、スプレードライで作製したパイロットスタディ用検討試料は、Pb、Cd、As のいずれも設定された濃度を示しており、良好な均質性が確認された。今後はパイロットスタディの実施に向けて、スケールアップした体系の確立と、試料の均質性および安定性の評価が求められる。

4. 鎗田研究分担

下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究

下痢性貝毒検査に関する試験所間比較試験を実施するために必要な分析方法を開発するとともに、実際にパイロットスタディを実施した。

精確な分析方法として、HLB カートリッジによる固相抽出が有効であることを示すとともに、その後に行う LC-MS/MS 条件も比較検討し、感度や分離に優れた測定条件を考察した。一方、簡便な前処理を行うためには、従来法で用いるメタノールの代替として、アセトニトリルを抽出溶媒に用いる方法が有効であることを示した。これらの検討を受けて、試験所間比較試験のパイロットスタディにおいては、内部標準法や標準添加法を適用することで、分析精度をさら

に向上させた。

試験所間比較試験のパイロットスタディの実施においては、本研究で検討した調査試料の調製方法や均質性評価方法や安定性評価方法、付与値の算出方法、分析結果の解析方法に特段の問題がないことが確認された。ただし、安定性の評価結果が付与値の不確かさに影響を与えたことから、今後より高精度な分析法の開発が望まれた。

5 大竹研究分担

残留農薬分析の外部精度管理に関する研究

IDMS を用いて高精度化した一斉試験法や簡易分析法によって、スプレードライヤの噴霧条件を決定するための玄米およびほうれんそう試料中農薬分析や、玄米試料中農薬の長期安定性の評価を行った。玄米試料および、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、試料中農薬の均質性と安定性を評価し、試料が十分優れた品質であったことを示した上で実施し、われわれが IDMS による正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. 研究発表

1. 論文発表

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

(2023).

2) 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)

3) 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).

4) 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).

5) Otake, T., Machida, K., and Nakamura, K.: Evaluation of modified QuEChERS using small-scale SPE for the analysis of organophosphorus pesticides in spinach. Journal of AOAC International, accepted (2025) DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaf033>

6) 細谷まい、内田華那、若栗忍、桑野志穂美、伊藤里恵、岩崎雄介、渡辺卓穂、穂山浩：卵由来タンパク質の外部精度管理サンプルの作製とパイロットスタディ、食衛誌、67(1)、

2. 学会発表

1) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：特定原材料(小麦)の改良抽出法の室間共同試験による評価：日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会，（富山），2023.

2) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：特定原材料(小麦)の改良抽出法についての室間共同試験による評価：AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会，（東京），2023.

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

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

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

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

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

8) 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（愛知），2024.

9) 油谷藍子，村野晃一，村上太郎，新矢将尚：特定原材料(小麦)の改良抽出法の室間共同試験による評価：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.

10) 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

11) 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

12) 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

13) 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（堺市）2024

14) 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

機種の影響: 第 61 回全国衛生化学技術協議会年会 (大阪)、2024.

15) 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.

16) 栗本悠可, 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.

17) 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

18) 柳瀬望, 高坂典子, 渡辺卓穂, 鎗田孝, 下痢性貝毒検査の試験所間比較のためのホタテガイ試料の評価, AOAC International Japan Section 第 28 回年次大会 (東京), 2025.

19) 柳瀬望, 鎗田孝, 下痢性貝毒分析における分散固相抽出法を用いた簡易クリーンアップ法の開発, 日本分析化学会関東支部第 19 回茨城地区分析技術交流会 (水戸), 2025.

20) 大竹貴光, 町田香織, 平林尚之, 渡辺卓穂: ほうれんそう粉末を用いた有機りん系農薬分析の技能試験結果の概要、第 48 回農薬残留分析研究会、東京、2025

21) 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 法による食肉等元素分析法の妥当性評価, 日本食品衛生学会第 121 回学術講演会, 東京 (2025) .

22) 池田真季, 平林尚之, 高坂典子, 中阪聡亮, 梶原三智香, 渡辺卓穂: ABS 試料を用いた器具・容器包装検査用技能試験プログラムのパイロットスタディ、日本食品衛生学会第 121 回学術講演会, 東京 (2025) .

23) 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 121 回学術講演会, 東京 (2025) .

G. 知的所有権の取得状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

誌上発表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura K., Otake T., and Hanari N.; 106, (2023).	Quantitative determination of organophosphorus, pyrethroid, and dithiolane pesticide residues in brown rice using supercritical fluid extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry.	Journal of AOAC International,	106	1532-1541	2023
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
Shibata T., Nakasaka T., Narushima J., Taguchi C., Sugino M., Yoshida S., Soga K., Kajiwara M., Watanabe T. and Kondo K 65, 61-66 (2024).	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キサ酸群の精密定量	分析化学	73	185-191	2024
Otake, T., Machida, K., and Nakamura, K.	Evaluation of modified QuEChERS using small-scale SPE for the analysis of organophosphorus pesticides in spinach.	Journal of AOAC International	DOI: https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaf033		2025
細谷まい、内田華那、若栗忍、桑野志穂美、伊藤里恵、岩崎雄介、渡辺卓穂、穂山浩	卵由来タンパク質の外部精密度管理サンプルの作製とパイロットスタディ	食衛誌	67	8-15	2026

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂	特定原材料（小麦）の改良抽出法の室間共同試験による評価	日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会	2023
村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂	特定原材料（小麦）の改良抽出法についての室間共同試験による評価	AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会	2023
鎗田孝, 鳥居塚南, 上原由理香, 川口研, 渡辺卓穂,	ホタテガイ中のオキサ酸群分析に関する試験所間比較試験	日本食品衛生学会第 119 回学術講演会	2023
梶原三智香、中阪聡亮、堀田実和、高坂典子、渡辺卓穂	白飯を用いた一般細菌数測定検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ	日本食品衛生学会第 119 回学術講演会	2023
若栗忍、渡辺卓穂	アレルギー（卵及び牛乳タンパク質）含有試料を用いた特定原材料検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ	日本食品衛生学会第 119 回学術講演会（web 開催）	2023
中村圭介、大竹貴光、羽成修康	超臨界流体抽出法を用いた玄米中農薬分析法の妥当性評価	第 46 回農薬残留分析研究会	2023

栗本悠可, 柳瀬望, 小玉玲菜, 鎗田孝	分散固相抽出を利用した下痢性貝毒分析法の簡易化	日本分析化学会関東支部第17回茨城地区分析技術交流会	2023
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
油谷藍子, 村野晃一, 村上太郎, 新矢将尚	特定原材料 (小麦) の改良抽出法の室間共同試験による評価: 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
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
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	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
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ペ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影響	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
栗本悠可, 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
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	2024
柳瀬望, 高坂典子, 渡辺卓穂, 鎗田孝	下痢性貝毒検査の試験所間比較のためのホタテガイ試料の評価	AOAC International Japan Section 第28回年次大会	2025

柳瀬望、鎗田孝	下痢性貝毒分析における分散固相抽出法を用いた簡易クリーンアップ法の開発	日本分析化学会関東支部第19回茨城地区分析技術交流会	2025
大竹貴光、町田香織、平林尚之、渡辺卓穂	ほうれんそう粉末を用いた有機りん系農薬分析の技能試験結果の概要	第48回農薬残留分析研究会	2025
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法による食肉等元素分析法の妥当性評価	日本食品衛生学会第121回学術講演会	2025
池田真季、平林尚之、高坂典子、中阪聡亮、梶原三智香、渡辺卓穂	ABS試料を用いた器具・容器包装検査用技能試験プログラムのパイロットスタディ	日本食品衛生学会第121回学術講演会	2025
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121回学術講演会	2025