

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

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

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 部長
研究分担者	石井 里枝	埼玉県衛生試験所
研究協力者	吉田 栄充	埼玉県衛生研究所
	島田 慎一	埼玉県衛生研究所
	今井 浩一	埼玉県衛生研究所
	千葉 雄介	埼玉県衛生研究所

#### 研究要旨

微生物定性試験法の検出下限値として $LOD_{50}$ を推定することにより、比較可能な試験性能の指標を定めることを目的とし、食品衛生法の冷凍食品の規格基準に定められたE. coli試験法を対象として検討を行った。2倍段階希釈した*Escherichia coli*菌液を食品試料に接種し、E. coli試験法を各濃度 $n=6$ で実施した結果、陽性と判定された試料数から $LOD_{50}$ を算出した。食品試料は、オクラ、ホウレン草、エビピラフ、からあげ、生うどん、白菜の浅漬けを対象として供試した。本研究の結果、得られた $LOD_{50}$ は14~27 cfu/gであった。この菌濃度はEC発酵管への接種菌量に換算すると0.42~0.81 cfuであることから、E. coli試験法は高い検出感度であることを示した。

食品添加物、残留農薬等については食品衛生法で規格基準が定められており、各自治体では食の安全を確保するために食品衛生監視指導計画に則り、流通している食品等について収去検査が行われている。自治体の各試験所で採用している試験法は、それぞれの試験所ですでに発出されている妥当性評価ガイドラインに則って、その妥当性を確認している。しかし、食品添加物試験法の妥当性評価のためのガイドラインは適用する加工食品の多様性もあり、未だ、発出されていない。

妥当性評価の対象とすべき食品は基本的に試験所へ搬入される食品を対象として妥当性評価がなされるべきであるが、食品添加物は使用される加工食品が多種多様であること、また、同じ食品種であっても製造者ごとに食品のマトリクスが異なることから、多種類の食品を対象としてモニタリング検査を行っている自治体の試験所にとって、対象食品の選定は難しい。

そこで、今回、「食品中の食品添加物分析法」で通知されている6つの試験法について単一試験室における添加回収試験を実施し、妥当性評価の対象とするべき代表的食品種について考察した。

## 微生物定性試験法における検出

### 下限値の推定

#### A. 研究目的

食品の微生物基準は、定められた試験法によって検出される微生物を対象とした定義法であり、基準適合性試験は公定法に則る必要がある。ISO/IEC 17025:2017では「試験室が新たな試験法を導入する際に、その方法を適切に実施できることを検証すること」とあり、公定法の導入前に試験性能の検証が求められている。

一般に、定性試験の性能評価には検出下限値が使われるが、微生物試験においては、試料中の微生物分布が均一でなく、採取部位に対象菌が含まれる確率が検出の可否を決めるため、確実に検出可能な下限値を求めるのは難しい。ISO 16140-3:2021では、単一試験室における参照試験法導入時の検証手順が定められており、微生物定性試験法の性能評価の指標として、実施試験の50%が陽性となる菌量である $LOD_{50}$  (level of detection) を用いている。妥当性確認時に算出した $LOD_{50}$ と比較することにより、試験所で導入した試験法が要求される性能を満たしているか検証することができる。

日本の公定法は、サルモネラ、黄色ブドウ球菌等、一部の試験において標準試験法として妥当性確認が行われたが、E. coli等の衛生指標菌などは整備が進んでいない試験法が多い。また、妥当性確認された標準試験法においても、 $LOD_{50}$ が明記されておらず、試験性能の比較ができない。

そこで本研究では、微生物定性試験法の $LOD_{50}$ を推定することにより、比較可能な試験性能の指標を求めることを目的とした。令和2年度はE. coli試験法を対象として $LOD_{50}$ の推定を行った。E. coliは、冷凍食品、食肉製品、生食用かき、弁当及びそうざい、生めん類、漬物と幅広い食品分類に基準が設けられており、2019年度の埼玉県における食品衛生法に基づく微生物除去検査では、619検体中312検体でE. coli試験を実施している。E. coli試験法は食品分類によって異なる試験方法が記載されているが、本研究では、冷凍食品の規格基準に定められた試験法を対象として検討を行った。

#### B. 方法

##### 1. 試験法概要

2倍段階希釈した*Escherichia coli*菌液を食品試料に接種し、E. coli試験法を各濃度 $n=6$ で実施した結果、陽性と判定された試料数から $LOD_{50}$ を算出した。

##### 2. 菌接種試料の調製

対象とした食品試料は、食品衛生法においてE. coliの基準が定められている食品区分から、夾雑菌の存在、油分、pH等を考慮し、オクラ、ホウレン草、エビピラフ、からあげ、生うどん、白菜の浅漬けを供試した。各試料の詳細は表1に記載した。からあげは食肉製品を使用した。本研究では加熱そうざいとして試験に供した。

試料への接種菌株は、BioBall HD 10K *Escherichia coli* NCTC9001 (ビオメリュー社)を使用した。本製品は1粒に約10000 cfu (使用ロットのメーカー規定

値は9146 cfu)の*E. coli*が含まれており、3粒を滅菌リン酸緩衝液 (pH7.2) (株式会社LSIメディエンス製20倍濃縮液から調製) 30 mLに懸濁したものを接種菌原液とした。接種菌原液を滅菌リン酸緩衝液15 mLで2倍段階希釈を繰り返して、2、4、8、16倍希釈し接種菌液とした。滅菌ストマッカー袋に採取した試料25 gに、接種菌原液又は接種菌液を2 mLずつ接種した。すなわち、接種後の試料中の菌量 ( $d_1 \sim d_5$ ) をそれぞれ73、37、18、9.1、4.6 cfu/gとなるよう調製した。手技によるバラつきの検討には、食品の代わりにリン酸緩衝液25 mLを試料として用いた。

### 3. *E. coli*試験

試験方法は、食品衛生法における食品、添加物等の規格基準に定められている冷凍食品の*E. coli*の試験法に準じた。菌接種試料25 gに滅菌リン酸緩衝液225 mLを加えてストマッキング後、その10 mLを滅菌リン酸緩衝液90 mLに加えて混和し、100倍希釈液とした。3本のEC発酵管 (栄研化学株式会社製粉末培地から調製) に100倍希釈液各1 mLを接種し、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で $24 \pm 2$ 時間培養した。1本以上のEC発酵管にガス産生が認められた場合、*E. coli*試験陽性と判定した。菌接種試料1検体につき各濃度 $n=6$ で試験を実施した。さらに、日を変えて同様の試験を繰り返した。

### 4. $LOD_{50}$ の推定

$LOD_{50}$ の算出方法はISO 16140-2:2016記載されており、その引用元であるWilrich<sup>1)</sup>らの手法に準じて $LOD_{50}$ を推定した。ポアソン分布より導出した以下の式から

$LOD_{50}$ を推定した。

$$LOD_{50} = -\frac{\ln 0.5}{0.03F}$$

ここで、F値は検出感度に影響を与える食品固有の値であり、食品中の菌濃度 $d_i$ での*E. coli*試験の陽性試料数 $y_i$ を以下の方程式に代入し、その解によりF値を求めた。

$$\sum_{i=1}^5 \left( \frac{y_i d_i}{\exp(0.03F d_i) - 1} - (6 - y_i) d_i \right) = 0$$

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 手技によるバラつきの検討

食品への菌添加試験を実施する前に、食品試料の代わりに滅菌リン酸緩衝液を用いて、繰り返す試験、異なる試験担当者間による結果を比較することで、手技によるバラつきについて検討した。1人の試験担当者が4回、2人の担当者が1回ずつ試験を実施した。その結果、F値は0.75~1.2、 $LOD_{50}$ は19~31 cfu/mLであった

(表2)。F値は検出感度に与える影響の度合いを示しており、1に近いほどEC発酵管への接種菌量は理想的なポアソン分布に近づく。F=1のとき、 $LOD_{50}$ は23

cfu/gと算出される。F=1のときの $LOD_{50}$ と比較すると今回の結果は0.83~1.3倍であった。以下の実験では19~31 cfu/gを $LOD_{50}$ の基準として、2回の試行の両方がこの範囲に収まらなかった場合、食品マトリクスによる影響があると判定した。

### 2. 食品マトリクスごとの $LOD_{50}$ の推定

食品ごとの*E. coli*試験の陽性試料数及び $LOD_{50}$ を表3に示した。 $LOD_{50}$ が最大であったのはオクラで27 cfu/g、最小はエビピラフで14 cfu/gであった。エビピラフ、白菜の塩漬け $LOD_{50}$ が2回の試行とも

19 cfu/g未満であり、食品マトリクスの影響により検出感度が高くなったと考えられた。

諸藤ら<sup>2)</sup>によれば、生菌数試験において粉末試料の拡張不確かさは、液体試料のほぼ2倍と報告している。ストマッキング後のエビピラフの希釈液は細かくなった試料により白濁しており、粉末試料に近い状態になったことが検出感度に影響したのではないかと考えられた。同様に希釈液が白濁した生うどんは、2回目の試行で判定基準内に収まっているが、試料中の菌量が少ない $d_2$ の方が、 $d_1$ の陽性検体数を上回っており、食品マトリクスによる不確かさが影響したと考えられた。白菜の塩漬けはpHによる影響を検討するため試験に供したが、製品中のpHは5.3であったのに対し、10倍希釈液中のpHは7.3で緩衝液のpHになっていたため、EC発酵管での培養にpHの影響はなかったと考えられ、検出感度が高くなった理由は不明であった。

オクラ、ホウレン草は夾雑菌の存在、からあげは油分が検出感度に与える影響を考えて検討したが、手技による変動と比較して大きな差は認められなかった。この結果から、夾雑菌の存在、油分はE. coli試験における検出感度には影響を与えないと推察された。

他の微生物定性試験であるサルモネラ属菌試験は、試料25 gと培地225 mLを混和し、そのまま培養するため、採取した食品中に含まれた菌が損なわれずに培養される。一方、E. coli試験法は10倍希釈液調製後、さらに100倍希釈液を調製し、そこからEC発酵管に接種するため、より

多くの手順を経ることから、作業工程にて対象菌が減少することが想定された。しかし、 $F=1$ のときと比較すると0.60～1.2倍であり、食品によってはより少ない菌量でも検出可能であった。

## E. 結論

本研究で供試した食品試料においては、食品衛生法で定められた冷凍食品のE. coli試験法の $LOD_{50}$ は14～27 cfu/gであった。この菌濃度はEC発酵管への接種菌量に換算すると0.42～0.81 cfuであり、EC発酵管中に1個以上の菌が存在すれば、検出可能であると推察され、定性試験の検出感度としては十分であると考えられる。

ISO 16140-3:2021では、参照試験法の導入時には、バリデーション時の結果と比較し、 $LOD_{50}$ が4倍未満であることが許容限界とされている。本研究の結果が、各試験室におけるE. coli試験法の性能評価の指標として活用されることが期待される。

## 参考文献

- 1) Wilrich C. et al: J AOAC Int., 92(6), 1763-72 (2009).
- 2) 諸藤ら: 第31回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 61(2010)

## 食品添加物試験法の妥当性評価法

### A. 研究目的

食品添加物試験法は平成12年3月30日付け衛化第15号通知「食品中の食品添加物分析法」(令和元年6月28日改正)で示されており、別添1 試験 8には「食品

添加物分析法各条に掲げる食品添加物分析法（「以下「規定分析法」という。）に代わる方法で、それが、規定分析法以上の精度ある場合には、その分析法を用いることができる。ただし、その結果に疑いのある場合には、規定分析法で最終の判定を行う。」と規定されている。しかし、その同等性の判断基準を示す妥当性評価ガイドライン等は現在のところ厚生労働省から発出されていない。

食品衛生法にかかる試験法の妥当性評価のためのガイドラインとして、平成19年11月15日食安発1115001号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」が厚生労働省から初めて示された。本ガイドラインでは残留農薬及び動物用医薬品を分析対象物質としている。また、その後、「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」（平成20年9月26日付け食安発第0926001号）、「総アフラトキシンの試験法 II 妥当性評価の方法」（平成23年8月16日付け食安発0816第1号）、「食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドライン」（平成26年12月22日付け食安発1222第7号）などが厚生労働省から示されている。それぞれ玄米中のカドミウムや通知試験法で示す食品中の金属、食品中のアフラトキシンの、清涼飲料水、粉末清涼飲料、寒天及び穀類に含有される有害物質を対象としている。概して食品の汚染物質であり、その含有される濃度はmg/kg以下のレベルである。

一方、食品添加物については、一般的に使用される濃度は概ね100～5000 mg/kg 程度であり、既発のガイドライン

の評価基準を外挿することは適当ではないと考えられた。

採用している食品添加物試験法の妥当性を評価しようとする場合、対象とすべき食品は試験所へ実際に搬入される食品について実施されるべきであるが、食品添加物が使用される加工食品は多種多様であり、また、同じ食品種であっても製造者ごとにその食品のマトリクスも異なる。多品目のモニタリング検査を行っている自治体の試験所では妥当性評価の対象食品について、どのような判断基準で選定するか悩ましいところである。

そこで、今回、規定分析法について、添加回収試験等を行い、真度及び精度のデータから試験法の頑健性等を確認し、適用できる食品、できない食品、あるいは、個人の技量や分析実施時の試験室環境の雰囲気によって結果に違いが出るような食品種を明らかにし、妥当性評価の対象とすべき代表的な食品を選定することを試みた。

## B. 方法

### 1. 評価対象とする食品添加物及び食品の種類を選定

#### （1）対象食品添加物の選定

輸入時及び国内における令和元年度輸入食品違反事例<sup>1)</sup>を基に、違反事例が多く、優先的に検討すべき添加物を検討した。「TBHQ」、「サイクラミン酸」、「ソルビン酸」、「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類」の4種を選定した。

#### （2）対象食品種の選定

食品添加物の使用量、試験法の特性、既報<sup>2～14)</sup>で示されている真度、精度及び

妨害ピークの有無等の報告内容を考慮し、それぞれの食品添加物について妥当性評価を行うべき対象食品種を幅広く選定した。

## 2. 分析方法

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

## 3. 性能評価基準

CODEX及びAOACのガイドライン<sup>15,16)</sup>で示されている性能評価基準を参考に、表4の性能基準に従って評価を行った。

## 4. 添加回収試験

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

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

## C. D. 研究結果および考察

### 1. 評価対象とする食品添加物及び食品の種類を選定

#### (1) 対象食品添加物の選定

指定添加物は、対象食品や使用基準が

定められており、食品の加工・製造業者はそれを遵守しなければならない。また、指定外添加物は日本では使用が認められていない添加物であるが、海外等で使用が認められているものもあり、輸入食品等で違反事例が散見されている。いずれも毎年、検疫所や自治体等の検査で違反が発見され、自主回収等の措置が講じられている。

令和元年度の検疫所及び国内で発見された輸入食品の食品添加物の違反事例は154件であり、そのうち指定外添加物が59件、指定添加物の使用基準違反は95件であった。

指定外添加物で最も違反件数の多かったのは酸化防止剤のTBHQで25件であり、含有されていたのは菓子類(14件)、野菜加工品(5件)等であった。次に違反件数の多かったものは、甘味料のサイクラミン酸が12件で、食品の種類は多岐にわたっていた。続いてヨウ素強化剤のヨウ素化塩が8件で菓子類から検出された。

指定添加物の使用基準違反95件の内訳は保存料のソルビン酸(カリウム)が37件で、食品は酒類(9件)、菓子類(8件)、調味料(4件)等であった。次に多かったものは漂白剤・保存料・酸化防止剤の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の15件であり、食品はえび(3件)、乾燥野菜・果実(3件)、漬物(3件)等に使用されていた。次に甘味料のアセスルファムカリウムが11件と続き、食品は糖類(7件)、水産物・農産物加工品(3件)であった。次が保存料の安息香酸ナトリウムで7件であり、食品は多岐にわたっていた。

以上の結果から、評価対象とする食品

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

## (2) 対象食品種の選定

### 1) TBHQ

TBHQは指定外添加物であるが、海外ではさまざまな食品に使用が許可されていることから、さまざまな食品で違反事例として検出されている。令和元年度の違反事例では菓子や野菜加工品での違反事例が多かったため、これらを中心に対象食品を検討した。

一方、野村らはゴマやピーナッツバターを含む食品では食品由来成分によって分析が妨害されると報告している<sup>2)</sup>。また、竹内らは煮干し、さきいか等で十分な回収率が得られないことを報告している<sup>3)</sup>。これらのことから、対象食品はごま油、ピーナッツバター、煮干し、クッキー、ポテトチップス、イカ燻製、チリソースの7食品とした。

### 2) サイクラミン酸

サイクラミン酸も指定外添加物であり、海外では多種類の食品に使用されており、令和元年度の違反事例においても、菓子類、スープ類、調味料などさまざまな食品種から検出されている。

一方、竹内らはたくわんで十分な回収率が得られなかったことや<sup>3)</sup>、山口らはジャム、ビスケット、チョコレートでは85～110%の回収率が得られたが、漬物類（しょうゆ漬け、ニンニクの酢漬け、キャベツの葡萄酒漬け、らっきょうの酢漬け、たくわん漬け）では25～65%の低い回収率であったことを報告している<sup>4)</sup>。山田らはぶどうジュースでは精製に用い

る固相カートリッジのロットによって回収率にばらつきで出ることやヘキサソンの分離時にエマルジョンが形成されることを報告している<sup>5)</sup>。山口らは食酢ではサイクラミン酸がODSカラムに吸着されることを報告している<sup>6)</sup>。以上のことから対象とする食品はたくわん漬け、らっきょう漬け、ジャム、ビスケット、ぶどうジュース、米酢、みかんシロップ漬け、チョコレートの8食品とした。

### 3) ソルビン酸(カリウム)

ソルビン酸は指定添加物であり使用基準が定められていることから、基準のある食品のうち、消費量の多い食品等を中心に選定した。

小川らは水蒸気蒸留法と透析法を比較し、ちくわやか燻製品で透析法と比較して、蒸留法では回収率が低かったと報告している<sup>7)</sup>。また、山上らはさつま揚げ、ウインナーで回収率が約80～85%程度であったこと報告している<sup>8)</sup>。佐藤らは蒸留の留出速度が遅いと蒸留に時間がかかるだけでなく妨害物質が増加する傾向があることや、さきいかの回収率が、約88%と低いことを報告している<sup>9)</sup>。以上のことから、チーズ、ちくわ、さつま揚げ、ウインナー、マーガリン、らっきょう漬け、ワイン、オレンジジュース、イカ燻製、ビスケットの10食品を対象食品とした。

### 4) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は指定添加物であり、使用基準が定められている食品のうち、消費量の多い食品等を考慮し、選定した。また、鈴木らは乾燥果実では、留出に十分な時間が必要であるこ

とを報告している<sup>10)</sup>。以上のことからかんぴょう、干しトマト、干しマンゴー、干しブドウ、ワイン、甘納豆及び冷凍えびの7食品を対象食品とした。

## 2. 評価基準

CODEXのガイドライン<sup>15)</sup>では対象物質の濃度として1000 mg/kg以下では真度95～105%、室内精度12%以下、AOACのガイドライン<sup>16)</sup>では1000 mg/kg濃度で真度は90～108%、併行精度は3%未満、室内精度は6%未満と基準が示されている。これらの評価基準を参考に、真度及び精度の性能基準の目安を表4のとおり仮定し、評価を行った。

## 3. 添加回収試験

各添加物の添加回収試験結果を表5～10に示す。

### (1) TBHQ試験法

TBHQ試験法の添加回収試験結果を表5に示す。真度は82.8～139.7%であった。竹内ら<sup>3)</sup>が報告しているように煮干しで82.8%と最も低い真度であった。操作中のTBHQの損失に留意する必要があることが考えられた。また、ごま油では139.7%の真度であったが、これはピーク近傍に観測される妨害ピークによるものと考えられた。ごま油では試験溶液注入後、約53、67、85分に、ピーナッツバター試料では約20分後に大きな夾雑ピークが出現し、分析カラムの洗浄等の操作が必要であった。野村ら<sup>2)</sup>もこれらの食品では食品由来成分による夾雑ピークが出現し、回収率の算出は不能であったと報告している。今後、これらの試料では追加精製等について検討する必要があると考えられた。

### (2) サイクラミン酸試験法

#### 1) サイクラミン酸試験法(固相カートリッジによる精製あり)

サイクラミン酸試験法の添加回収試験結果を表6に示す。規定分析法では試料10 gに対して水40 mLを添加し、沸騰水浴上で15分間加熱抽出することになっているが、ビスケット試料では餅状になってしまい、抽出が困難であった。試料量を少なくする、あるいは必要に応じて、80 mL程度の水の添加が必要と考えられた。今回は抽出時にガラス棒で攪拌しながら抽出操作を行った結果を示した。

また、米酢試料はまったく回収されなかった。理由として、米酢のpHは約3であったことから、酸性条件下でサイクラミン酸が陰イオン交換カートリッジに保持されなかったことやあるいはODSカラムに強固に結合し、溶出されなかったことが要因と考えられた。また、らっきょう漬けは回収されたものの真度が83.3%、併行精度が13.2%、室内精度は29.4%と真度も低くかつバラツキも大きかった。らっきょう漬けのpHも約4程度であり、米酢と同様の理由によって固相カートリッジへの保持が不安定であったことが考えられた。これらの試料では固相負荷時のpH調整により、真度及び精度の改善が図られるか今後、検討が必要であると考えられた。それ以外の試料では真度は87.2～93.4%であった。

また、チョコレート試料では塩素化誘導体化時にエマルジョンが発生し、併行精度が10.5%、室内精度が30.0%と高い結果であった。エマルジョンの発生防止等の改善により、精度の向上を図ってい



く必要があった。

ジャムについては、真度は性能基準を満たしたものの、併行精度及び室内精度は性能基準を超えた。後述するスクリーニング試験法では精度のバラツキは小さい結果であったことから、固相カートリッジ精製時にその原因があると考えられた。

たくわん漬け試料では真度が79.2%と低い結果であった。後述するスクリーニング試験法でも同様に真度が低かったことから抽出時に十分に回収されていないものと考えられた。

2) サイクラミン酸試験法 (スクリーニング試験法)

サイクラミン酸試験法(スクリーニング試験法)の添加回収試験結果を表7に示す。規定分析法では、「スクリーニング試験として、カートリッジによる精製を行わず誘導体化、HPLC分析を実施し、検出しないう場合はこれを分析結果とすることができる。」としている。固相カートリッジ精製で十分に保持が不安定であった米酢、らっきょう漬け試料でそれぞれ真度が108.5%、90.8%と改善された。一方、チョコレートでは93.4%の真度が、112.0%となるなど夾雑物によると思われる影響が観測された。

(3) ソルビン酸試験法

ソルビン酸試験法の添加回収試験結果を表8に示す。

平成22年5月28日付け食安基発第0528第3号により、「安息香酸および安息香酸ナトリウム、ソルビン酸およびその塩類ならびにデヒドロ酢酸ナトリウムの分析法」が改正された。佐藤は、従来法に比

べ、改正法は試料量を1/10へと減少させ、酒石酸溶液の量を増やすことによりイカ燻製試料では若干、低い真度であるが、その他の食品種では十分な真度が得られることになったと解説している<sup>9)</sup>。本検討においてはイカ燻製も含めて真度は93.2~97.8%、併行精度は0.5~3.9%、室内精度は0.5~5.9%と良好な結果であった。

(4) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法

1) アルカリ滴定法

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法(アルカリ滴定法)の添加回収試験結果を表9に示す。規定分析法の解説にアルカリ滴定法ではマイクロバーナーの炎の強弱や窒素ガスの通気流量によって、真度に差がみられるとの記載があるが、本検討では真度は90.4~97.8%、併行精度は1.2~4.1%、室内精度は2.2~7.3%といずれも良好な結果であった。

2) 比色法

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法(比色法)の添加回収試験結果を表10に示す。本試験のみ1日一人、n=5回の添加回収試験を実施し、併行精度のみを検討した。比色法は、通知の「1. 分析法の概要」に「約0.1g/kg以下の食品に用いる。」と記載があり、本検討では原則、基準値濃度を添加することとしていたが、検量線の濃度範囲が0.4~2 mg/Lであることを考慮して、試験溶液中濃度として1 mg/L、試料中濃度としては0.01 g/kgとなるように添加回収試験を実施した。検討した試料の中で、冷凍エビが約141%、ワインが約184%と高い真度であった。ワインについては、亜硫酸不使用

の表示のある他の製品や同一ワインの別ロットについても検討したが、同様に真度が高値を示した (data not shown)。干しマンゴーでは真度が約113%、併行精度が約17%と高値であった。以上の結果から試験溶液の希釈操作の追加や高値の真度、精度の試等について今後、検討が必要であると考えられた。

## E. 結論

TBHQ試験法では規定分析法が適用可能と考えられる食品はクッキー、ポテトチップ、いかくん及びチリソースであった。適用できないと考えられる食品はごま油及びピーナッツを含有する食品、煮干しであった。ごま油やピーナッツ含有の食品試料については追加精製が必要と考えられた。煮干しでは操作中のTBHQの損失防止を検討する必要があると考えられた。

サイクラミン酸試験法(精製操作あり)では、適用可能と考えられる食品はぶどうジュース、みかんシロップ漬けであった。適用できないと考えられる食品はたくわん漬け、らっきょう漬け、米酢、ジャム、ビスケット、チョコレートであった。米酢や漬物などの酸性試料では固相カートリッジへの負荷時のpH調整が必要であること、抽出時に添加する水を吸収するような試料(ビスケット等)では添加する水分量について検討が必要であること、チョコレート等では誘導体化時にエマルジョンを発生するためそれらの抑制について検討する必要があることが示唆された。

サイクラミン酸試験法(スクリーニング

試験法)では適用可能と考えられる食品はジャム、ぶどうジュース、米酢及びみかんシロップ漬けであった。適用できないと考えられる食品はたくわん漬け、ビスケット及びチョコレートであった。らっきょう漬けについては併行精度のみ性能基準を満足しなかった。

ソルビン酸試験法及び二酸化硫黄及び亜硫酸試験法のアルカリ滴定法では今回、検討した食品種すべてにおいて良好な真度及び精度が得られ、性能基準を満足する結果が得られ、適用可能な試料であると考えられた。

今後はTBHQ試験法、サイクラミン酸試験法及び二酸化硫黄の比色法の検討の結果、適用が困難と考えられた試料について試験法の改良等を検討していく予定である。

## 参考文献等

- 1) [https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryou/shokuhin/yunyu\\_kanshi/ihan/index.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html)
- 2) 野村ら：大阪府立公衆衛生研究所報, 50, 14-18 (2012).
- 3) 竹内ら：三重県保健環境研究所報, 55, 86-89 (2010).
- 4) 山口ら：大阪市環境科学研究所報告, 72, 13-18 (2010).
- 5) 山田ら：神奈川県衛生研究所研究報告, 33, 94-96 (2003).
- 6) 山口ら：大阪府公衆衛生研究所報, 49, 7-10 (2011).
- 7) 小川ら：東京都健康安全研究センター年報, 68, 171-175 (2017).
- 8) 山上ら：山梨県衛生環境研究所年報,

- 54, 49-51 (2010). なし
- 9) 佐藤：食品衛生研究, 60, 7-14 (2010).
- 10) 鈴木ら：福島県衛生研究所報, 33, 46-49 (2015).
- 11) 朝倉ら：日本食品化学学会誌, 24, 82-87 (2017).
- 12) 辻ら：食品衛生学会誌, 34, 303-313 (1993).
- 13) 関戸ら：神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 38-40 (2007).
- 14) 久保田ら：日本食品化学学会誌, 17, 54-61 (2010).
- 15) PROCEDURAL MANUAL, Eighteenth edition (Codex Alimentarius Commission) (2008).
- 16) AOAC Int, AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002).

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

以下 図表

表1. 食品試料の分類、菌添加前の生菌数及び E. coli 試験の結果

食品	食品区分	生菌数	E. coli 試験
オクラ	冷凍食品 凍結前未加熱加熱後摂取	$1.2 \times 10^4$ cfu/g	陰性
ハウレン草	冷凍食品 凍結前未加熱加熱後摂取	$3.2 \times 10^4$ cfu/g	陰性
エビピラフ	冷凍食品 凍結前未加熱加熱後摂取	300 cfu 未満	陰性
からあげ	冷凍食肉製品 加熱後包装	300 cfu 未満	陰性
生うどん*	生めん類	$7.2 \times 10^3$ cfu/g	陰性
	生めん	$5.6 \times 10^3$ cfu/g	陰性
白菜の塩漬け*	漬物	$3.1 \times 10^3$ cfu/g	陰性
	浅漬	$6.4 \times 10^3$ cfu/g	陰性

\* 生うどんと白菜の塩漬けは試行した2回の試験で別ロットの製品を使用したため、ロットごとに菌添加前の生菌数及び E. coli 試験を実施

表2. 食品マトリクス非存在下における繰返し試験、試験担当者ごとの E. coli 試験の陽性試料数結果及び LOD<sub>50</sub>

担当者	陽性試料数 (y)					F 値	LOD <sub>50</sub> (cfu/mL)
	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>4</sub>	d <sub>5</sub> *		
A	6	3	1	1	1	0.82	28
A	6	4	1	1	1	0.95	24
A	5	5	4	1	0	1.1	21
A	5	5	1	2	1	0.98	24
B	6	3	2	0	0	0.75	31
C	6	4	4	0	1	1.2	19

\* 試料中の菌量 : d<sub>1</sub>=73 cfu/mL、d<sub>2</sub>=37 cfu/mL、d<sub>3</sub>=18 cfu/mL、d<sub>4</sub>=9.1 cfu/mL、d<sub>5</sub>=4.6 cfu/mL

表3. 食品ごとの E. coli 試験の陽性試料数及び LOD<sub>50</sub>

食品	試行数	陽性試料数(y)					F 値	LOD <sub>50</sub> (cfu/g)
		d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>4</sub>	d <sub>5</sub> * <sup>1</sup>		
オクラ	1	5	4	3	2	0	0.97	24
	2	5	3	2	1	1	0.75	31
	combined* <sup>2</sup>						0.86	27
ホウレン草	1	6	5	2	0	1	1.1	21
	2	5	5	4	5	0	1.6	14
	combined						1.4	17
エビピラフ	1	6	4	5	1	1	1.5	15
	2	6	6	3	2	1	1.9	12
	combined						1.7	14
からあげ	1	5	5	1	2	0	0.89	26
	2	6	3	2	3	1	1.1	21
	combined						1.0	23
生うどん	1	5	4	4	3	2	1.4	17
	2	4	6	1	2	0	0.84	28
	combined						1.1	21
白菜の塩漬け	1	6	4	4	3	1	1.6	14
	2	6	5	4	1	0	1.4	16
	combined						1.5	15

\*1 試料中の菌量 : d<sub>1</sub>=73 cfu/g、d<sub>2</sub>=37 cfu/g、d<sub>3</sub>=18 cfu/g、d<sub>4</sub>=9.1 cfu/g、d<sub>5</sub>=4.6 cfu/g

\*2 combined は 2 回の試行を同一の分布として LOD<sub>50</sub> を算出

表4 性能基準

濃度	真度 (%)	併行精度 (RSD <sub>r</sub> , %)	室内精度 (RSD <sub>R</sub> , %)
≥1 g/kg	90~108	6≥	12≥
1 g/kg≥	85~110	8≥	16≥

表5 TBHQ 添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
調味料	ごま油	0.20	139.7	0.4	0.4
ジャム類	ピーナッツバター	0.20	84.4	2.4	3.9
魚乾製品	煮干し	0.20	82.8	2.2	3.0
菓子	クッキー	0.20	89.6	1.3	2.6
菓子	ポテトチップス	0.20	89.5	0.9	6.4
菓子	イカ燻製	0.20	90.1	1.2	2.2
調味料	チリソース	0.20	85.8	3.7	3.7

表6 サイクラミン酸（精製操作あり）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
漬物	たくわん漬け	0.20	79.2	6.4	6.4
酢漬け漬物	らっきょう漬け	0.20	83.3	13.2	29.4
ジャム類	ジャム	0.20	88.6	8.5	16.7
菓子類	ビスケット	0.20	84.6	9.7	11.9
清涼飲料水	ぶどうジュース	0.20	92.3	4.3	10.0
調味料	米酢	0.20	0.0	-	-
果実加工品	みかんシロップ漬け	0.20	87.2	3.3	8.1
菓子	チョコレート <sup>※1</sup>	0.20	93.4	10.5	30.0

※1：n=5 3日間のデータから算出

N. T.：試験不能

表7 サイクラミン酸（スクリーニング法）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
漬物	たくわん漬け	0.20	74.3	4.3	6.2
酢漬け漬物	らっきょう漬け	0.20	90.8	12.7	14.1
ジャム類	ジャム	0.20	104.5	5.1	8.2
菓子類	ビスケット	0.20	104.2	4.1	4.1
清涼飲料水	ぶどうジュース	0.20	96.4	2.8	4.5
調味料	米酢	0.20	108.5	5.8	6.8
果実加工品	みかんシロップ漬け	0.20	89.1	4.3	5.0
菓子	チョコレート	0.20	112.0	6.0	24.5

※1：n=5 3日間のデータから算出

N. T.：試験不能

表8 ソルビン酸（カリウム）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
乳製品	チーズ	3.0	93.7	0.8	0.8
魚肉練り製品	ちくわ	2.0	94.4	0.5	3.5
魚肉練り製品	さつま揚げ	2.0	96.7	0.5	0.8
食肉製品	ウインナー	2.0	95.8	0.5	0.5
油脂	マーガリン	1.0	96.8	0.9	0.9
酢漬けの漬物	らっきょう漬け	0.5	93.2	3.9	5.9
果実酒	ワイン	0.20	97.8	1.7	2.1
清涼飲料水	オレンジジュース	0.20	96.7	2.4	4.2
菓子	イカ燻製	1.5	95.0	0.9	1.4
菓子	ビスケット	0.2	94.0	1.8	1.8

表9 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（アルカリ滴定法）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
かんぴょう	干しかんぴょう	5.0	92.0	1.2	2.2
乾燥果実	干しトマト	2.0	94.6	1.6	5.0
乾燥果実	干しマンゴー	2.0	97.8	1.6	7.3
乾燥果実	干しブドウ	1.5	96.6	2.2	2.2
果実酒	ワイン	0.35	90.4	3.1	3.1
菓子	甘納豆	0.10	92.8	3.9	3.9
えび	冷凍えび	0.10	93.7	4.1	4.4

表10 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（比色法）の添加回収試験結果

種類	食品	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (%)
かんぴょう	干しかんぴょう	0.01	88.9	7.7
乾燥果実	干しトマト	0.01	88.1	6.5
乾燥果実	干しマンゴー	0.01	112.9	17.4
乾燥果実	干しブドウ	0.01	84.1	5.3
果実酒	ワイン	0.01	184.3	7.0
菓子	甘納豆	0.01	110.1	5.3
えび	冷凍えび	0.01	140.7	6.9