

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

総括研究報告書

研究代表者 渡辺 卓穂 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 部長

研究要旨

輸入食品や国内食品の流通段階で健康危害リスクを及ぼすような種々の有害物質等を監視するために、行政検査は国民の食生活の安全を担保している。検査において、誤判定を避けるために、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。現在、食品の輸出の促進と輸入の増加により、誤判定の回避は輸出入国間での係争を回避するためにも重要である。これまで我々は、検査の信頼性を確保するために外部精度管理調査を検査施設に提供しており、ISO/IEC 17043認定取得をできたことで国際的にも認められた技能試験提供者となった。この外部精度管理調査（技能試験）を継続的に検査施設に提供することで、各検査機関の検査結果において信頼性の維持に寄与することができる。外部精度管理プログラムは、検査されているすべての項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目についてしか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査試料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。そこで、今年度は、1. 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究（渡辺研究分担）では、スプレードライヤの検討及び器具・容器包装の検査項目の基礎検討を、2. 微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物の妥当性評価に関する研究（石井研究分担）では、E. coli定性試験法についてLODの推定を試みた。また、6種の食品添加物試験法について、真度、併行精度及び室内精度等を測定し、妥当性評価の対象とすべき食品について考察した。3. アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究（村上研究分担）では、分析法の改良を、4. 下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究（鎗田研究分担）では、検査試料の調製法の検討を、5. 分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用（大竹研究分担）では、課題1で作製した試料をIDMSを用いて分析値を付与し、5課題を実施した。

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

究員)

A. 研究目的

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

外部精度管理調査プログラムは、検査されているすべての検査項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目についてしか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は、試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査用試料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。この粉体工学技術を残留農薬検査用試料作製に応用検討し、新規の基材開発を1~3年を通して行い、学術的に有用な方法を確立する。微生物学検査では、基材の改善を行い、新規の検査

項目を開発すると共に対象菌の検出下限値を掌握する。また、新たに、調査項目になかった器具・容器包装の検査項目の基礎検討を行う。さらに、食品添加物、貝毒及びアレルギー物質検査試料を検討し、開発されたこれらの調査試料は研究分担において外部精度管理調査パイロットスタディとして最終年までに実施し、実行可能性を検討する。

これらの研究は、リスク管理をより堅実なものとし、健康危害の未然防止や食品の輸出入の係争回避に直結する成果が期待でき、検査機関においては、ISO/IEC 17025 認定取得の補助となる。従って、現在の食品流通において必要かつ早急に着手すべきである。実施する5つの研究課題は、互いに密接に連携し、相互に研究成果をフィードバックし進行することが特色である。

B. 研究方法

1 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究(渡辺研究分担)

1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発:

残留農薬用試料は基材に自家製玄米粉を用い、玄米粉1kgをアセトニトリルまたはアセトニトリル/水4Lに懸濁させ、スプレードライヤに供した。作製検討に用いたスプレードライヤは大川原化工機株式会社製研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤ CL-8i を用いた。玄米粉懸濁溶液は事前に攪拌し、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2kg/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20000rpmに

設定した。また、入り口温度は 120℃、100℃、80℃で作製温度を検討した。得られた玄米粉はマイクロトラックベル社製マイクロトラック MT3200 を用い平均粒子径を測定した。また、得られた玄米粉はガスクロマトグラフ質量分析計で 4 種の農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス）を測定した。また、作製した玄米粉は顕微鏡下で粒子の観察を行った。

1.2 器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討：

「器具・容器包装」を対象に新たな外部精度管理調査プログラムの実施を試みるべく調査試料作製の基礎的検討を行った。

まず、食品衛生法において個別規格があるプラスチックの材質ポリマーから 9 製品（PET 樹脂 2 種、発泡スチロール 2 種、ポリスチレン、ABS、AS、ポリプロピレン及びポリエチレン）について、作製上の必要要件である有機溶媒 19 種類（フェノール、1,1,2,2-テトラクロロエタン、1,2-ジクロロベンゼン、*o*-クロロフェノール、ジクロロ酢酸、ヘキサシ、アセトン、テトラヒドロフラン、ジクロロメタン、メチルシクロヘキサン、2,2,4-トリメチルペンタン、ヘプタン、キシレン、酢酸ブチル、クロロホルム、シクロヘキサン、トルエン、4-メチル-2-ペンタノン及び 2-ブタノン）への溶解性を検討した。

今年度は溶解を確認できたものから、ポリスチレンペレットを試料基材に選定し、試験対象物質を全合成樹脂に共通して規定される材質試験のカドミウム及び鉛とし、溶解溶媒にジクロロメタンを用いて、作製検討を行った。添加に用いる標準品は有機溶

媒に溶解する SPEX 製カドミウム及び鉛（いずれも 5000 µg/g、Base Oil 75）を用いた。ポリマー質量に対して 10 倍容量のジクロロメタンに、この標準品を添加して均質な溶液を調製し、これにポリマーを添加し、混合して十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをシート作製容器に流し入れ、垂平に保ちながらジクロロメタンを自然乾燥にて揮発し、シート状の試料を作製した。得られたシートについてカドミウム及び鉛含量を測定し、理論作製濃度（50 µg/g）への回収率及び均質性ならびに残留溶媒（ジクロロメタン）量を確認した。作製条件として、①ポリマー溶液調製（ポリマー含量）、②作製容器へのポリマー溶液分注量、③作製したシート内の均質性評価、④溶解溶媒除去条件及び⑤残留溶媒（ジクロロメタン）、カドミウム及び鉛含量について検討した。検討した作製条件により調査試料を作製し、品質評価（均質性確認）を行った。

1.3 特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ：

基材であるベビーフードおよび 10%精製水含有こしあんに乳タンパク質を 10 µg/g 添加した 2 種類の試料を用い、定量試験法である ELISA 法により外部精度管理調査研究を実施した。参加機関は、原則として消費者庁から提示されている 3 キット（モリナガ（カゼイン）キット、日本ハムキット、プリマハムキット）中、任意の 2 種類で測定を行うこととした。余力のある機関は、モリナガ（βLG）キットについても試験をお願いした。

回収した結果は、測定キット、試料ごとに解

析を行った。測定値についてメジアン・クリーニング (MC) を行った後、ロバスト方式により統計値を算出し、z-スコアを求めた。また、Xbar-R 管理図を用いた解析も行った。

1.4 微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討：

これまで運用してきた E. coli 検査、腸内細菌科菌群検査、サルモネラ属菌検査および大腸菌群検査の 4 項目において、外部精度管理事業の品質向上を目指すため、添加する微生物の濃度を「食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号、以下「公定法」という）に記載された成分規格に近い濃度まで低減した調査試料の開発を実施した。

E. coli 検査、腸内細菌科菌群検査、サルモネラ属菌検査の調査試料開発では、調査試料作製手順および採用微生物はそのままに、添加菌液の濃度を従来の 1/100 にした調査試料を用いた。大腸菌群では 6 菌種の微生物を用いて同様に作製した調査試料を用いた。調査試料は約 1 か月間、冷蔵または 22.5℃で保存し、生菌数測定および公定法に従った定性試験を実施して試験結果への影響を確認し、その妥当性を評価した。

なお、調査試料の妥当性を評価する基準は①公定法の試験操作で陽性・陰性の判定が可能であること、②実際の食品検査に近いマトリクスの基材で冷蔵保存が可能であること、③冷蔵保存で微生物の添加から 14 日以上安定性が認められること（添加直後と添加 14 日後の差が対数値で±1.0 ポイント以内）、④冷蔵から 22.5℃（常温）に移管後も生菌数が測定可能であること（輸送時の温度上昇で急激に菌数が低下しない）、

の 4 条件とした。

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

微生物定性試験法における検出下限値の推定

2 倍段階希釈した *Escherichia coli* 菌液を食品試料（オクラ、ハウレン草、エビピラフ、からあげ、生うどん、白菜の浅漬け）に接種し、E. coli 試験法を各濃度 n=6 で実施し、陽性と判定された試料数から LOD₅₀ を算出した。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。LOD₅₀ 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 Wilrich¹⁾らの手法に準じて LOD₅₀ を推定した。

食品添加物試験法の妥当性に関する研究

輸入時及び国内における令和元年度輸入食品違反事例を基に、「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 6 種の試験法を対象として、食品添加物の使用量、試験法の特性等を考慮し、妥当性評価を行うべき代表的対象食品種を選定した。CODEX 及び AOAC のガイドラインで示されている性能評価基準を参考に、評価を行った。指定添加物は基準値濃度を、指定外添加物は定量下限値濃度の 2 倍量を添加し、添加回収試験を実施し、選択性、真度、併行精度及び室内精度を算出した。

3 アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究（村上研究分担）

本研究では、これまでに特定原材料（小麦・落花生）の定量で影響が確認されてきた

ポリフェノールの一種である Proanthocyanidin (PAC) を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行った。今年度は ELISA による小麦と落花生の定量について、カカオとシナモン中の夾雑物による測定阻害と試料からの回収率を評価した。回収率の低下が確認された試料については、PAC との結合能が報告されている化合物を利用して抽出法を改良した。また、各試料に適した化合物を確認後に、抽出条件を最適化した。

4 下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究（鎗田研究分担）

4.1 検査用試料の調製と評価

(1) 材料・試薬

検査用試料の調製には、ホタテガイ可食部（国内産）と、OA および DTX1 の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料（均質化済み）を用いた。

1 µg/mL OA 溶液と 1 µg/mL DTX1 溶液（いずれも溶媒はメタノール）は産業技術総合研究所から入手した。他の試薬は LC-MS 用、高速液体クロマトグラフィー用、または試薬特級を用いた。

(2) 調製方法

ホタテガイの可食部をブレンダーで細断し、裏ごし、得られた試料を混合した。次に、ガラス瓶 9 個に OA および DTX1 の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料 10 g と、その 9 倍量のホタテガイ可食部を加えて混合後、各瓶の内容物を合わせて混合した。これを 5 等分にした後、5g ずつプラスチック製バイアルに小分けした。

(3) 分析方法

調製した検査用試料中の OA と DTX1 の測定は、食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」別紙 2 の「オカダ酸群分析操作例」に準拠して行った。

4.2 マトリックス効果の影響評価

(1) 材料・試薬

マトリックスとして、4.1 において検査用試料の原料に用いたホタテガイ可食部（国内産）と、産業技術総合研究所が 2015 年に主催した試験所間比較試験における試験試料であるホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた。他の試薬は 4.1(1) と同じである。

(2) ホタテガイ可食部を用いた検討用試料の調製

異なる分析前処理過程によってホタテガイ可食部を処理した E 液および C 液と、ホタテガイ可食部由来のマトリックスを含まない M 液の 3 種類の検討用試料を調製した。E 液は、ホタテガイ可食部 2 g を 4.1(3) の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理したものを、さらに濃縮およびフィルターろ過することによって得た。C 液は、ホタテガイ可食部 2 g を 4.1(3) の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理、ヘキサン洗浄および固相抽出処理したものを、さらに濃縮およびフィルターろ過することによって得た。M 液は OA と DTX1 をメタノールで希釈することにより得た。

(3) ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた検討用試料の調製

異なる分析前処理過程および濃度によってホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を処理した E1 液、E2 液、C1 液、C2 液と、試験

所間簡比較試料由来のマトリックスを含まない M1 液の 5 種類の検討用試料を調製した。なお、各液は OA と DTX1 含有濃度が異なる 5 種類の溶液群から構成される。

M1 液は、OA を 0、5、10、15、20 ng/mL、DTX1 を 0、16、32、48、64 ng/mL 含む 5 種類のメタノール溶液である。E1 液は、試験所間比較試料 0.5 g を 4.1(3) の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理し、2.5 mL に調整したものの一部を M1 液で置換することにより得た。E2 液は、2.5 mL に調整した E1 液の一部を 4 倍に希釈し、さらに M1 液で置換することによって得た。C1 液は、試験所間比較試料 0.5 g を 4.1(3) の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理、ヘキササン洗浄、固相抽出処理し、2.5 mL に調整したものの一部を M1 液で置換することにより得た。C2 液は、2.5 mL に調整した C1 液の一部を 4 倍に希釈し、さらに M1 液で置換することによって得た。

(4) LC-MS/MS 測定

(2) および (3) で調製した各液の LC-MS/MS 測定は、4.1(3) と同じ条件で行った。

5 分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用 (大竹研究分担)

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランク玄米を粉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、フェントロチオン、マラチオンをポジティブリストの基準濃度値(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン: 0.1 mg/kg, フェントロチオン: 0.2 mg/kg) になるように添加した。本試料を、IDMS を適用した一斉試験法および QuEChERS 法によって分析を

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。さらに、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料 (Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C) の 3 種、温度は噴霧温度を示す) 中の対象農薬を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

試薬は、アセトニトリル (AN)、アセトン (Ac)、トルエン (Tol)、無水 Na₂SO₄ は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用いた。QuEChERS 法で用いた PSA、グラファイトカーボンブラック、C18 は Agilent Technologies 社製のものを用いた。他の試薬は試薬グレードを用い、水は超純水を用いた。

質量比混合法によって標準液を調製した。クロルピリホス-*d*₁₀、ダイアジノン-*d*₁₀、フェントロチオン-*d*₆、マラチオン-*d*₆ を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液を調製した。一方、クロルピリホス、ダイアジノン、フェントロチオン、マラチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液を調製した。さらに、農薬混合溶液、内標準溶液、アラクロール溶液、Ac を混合することにより、検量線溶液を調製した。次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認した玄米試料を後述の前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の検量線溶液に溶解させることにより、マトリックスマッチ検量

線溶液を調製した。

分析法1(一斉試験法)では、玄米試料3gに農薬混合溶液0.4mL(添加回収試験の場合のみ)および内標準溶液0.4mLを加えて静置した。これに水10mLを加えて15分静置した後、AN25mLを加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にAN10mLを加えて細砕した後、吸引ろ過した。これにNaCl10gと0.5mol/Lリン酸緩衝液(pH7.0)20mLを加え、10分間振とうした。その後、あらかじめAN10mLでコンディショニングしたAgilent Technologies製Bond Elut C18固相抽出カートリッジ(1g)を用いて、振とうによって得られたAN層とAN2mLを通液する処理を行った。得られた処理液を無水Na₂SO₄によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol(3:1)混液2mLに溶解した。Supelco製ENVI-Carb/LC-NH₂固相抽出カートリッジ(500mg/500mg)をAN/Tol(3:1)混液10mLでコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらにAN/Tol(3:1)混液20mLを注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液0.5mLに溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を、GC/MSによって測定した。測定条件は以下の通りである。装置:7890/5975c GC/MSシステム(Agilent Technologies製)、カラム:DB-5ms(30m×0.25mm、膜厚0.25μm、Agilent Technologies製)、カラム温度:50℃で2分間保持した後、+20℃/分で160℃まで昇温し、さらに+7℃/分で300℃まで昇温し、

10分間保持、注入口温度:250℃、検出器温度:230℃(イオン源)、注入方式:スプリットレス、キャリアガス:ヘリウム、注入量:1μL、イオン化条件:EI、定量に用いたm/z:314(クロルピリホス)、324(クロルピリホス-d₁₀)、304(ダイアジノン)、314(ダイアジノン-d₁₀)、277(フェニトロチオン)、283(フェニトロチオン-d₆)、158(マラチオン)、164(マラチオン-d₆)、188(アラクロール)。

分析法2(QuEChERS法)では、玄米試料1gに農薬混合溶液0.1mL(添加回収試験の場合のみ)および内標準溶液0.1mLを加えて静置した。水10mLを加えてさらに15分間静置し、AN10mLを加えて1分間振とう(手振り)した。これに4gのMgSO₄、1gのNaClを加え、1分間振とう(手振り)した。この抽出液を3500rpmで5分間遠心分離し、上澄み液に固相剤を添加して1分間振とう(手振り)した。このとき固相剤として300mgのPSA、45mgのグラファイトカーボンブラック、300mgのC18、900mgのMgSO₄を加えた。再び3500rpmで5分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固した。アラクロール溶液の0.2mLを添加して、GC/MS測定用の試料溶液とした。試料溶液中の対象農薬をGC/MSによって測定した。測定条件は、分析法1と同じである。ただし、夾雑物によってクロマトグラムのピークが妨害されるため、定量に用いたm/zのうち、マラチオンを285、マラチオン-d₆を291とした。

分析で得られた結果を基に、以下の式によって農薬濃度を算出した。

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

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

添加回収試験においては、式(1)に準じて算出した一斉試験法(分析法1)およびQuEChERS法(分析法2)の分析値を、玄米試料への添加濃度(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン: 0.1 mg/kg, フェニトロチオン: 0.2 mg/kg)と比較することにより、正確さを評価した。残留農薬検査用玄米試料の分析においては、式(1)に準じて算出した一斉試験法(分析法1)およびQuEChERS法(分析法2)による分析値を、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

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:

水 20%を添加した 80%アセトニトリル懸濁液に 4 種農薬(ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス)を添加し、昨年度作製した条件で行った。す

なわち、アトマイザの回転数: 20000rpm、処理量 2kg/h、噴霧温度(入口温度)を 120°C、100°C、80°Cで検討した。表 1~4 に各農薬の回収率の変化を示す。また、図 3 に噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率を示す。今回は水を加えたために、大きな粒子の玄米粉の沈降が少なかった。また、各噴霧温度においても 100%アセトニトリルを用いた時と比べて回収率は高くなり改善した。農薬の回収率は噴霧温度が下がるほど高くなった。これは、温度により農薬が分解または気散している可能性が示唆された。ダイアジノンは沸点が 120°Cで添加農薬の中で一番沸点が低く、回収率も一番低かった。噴霧温度が 120°Cのとき回収率は 8.9%となり、80°Cでは 26%と回収率は改善した。一方、他の 3 農薬の回収率の挙動は、沸点がいずれも 140°C以上であることからほぼ同じとなった。噴霧温度が 80°Cのとき回収率は 35%~40%程になり、最も回収率が良好であった。図 4 には自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真を示す。図 5~7 には噴霧温度を 120°Cから 80°Cまで変化させたときの粒度分布と顕微鏡写真を示す。噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなった。アセトニトリルが 80%であり、まだ有機溶媒濃度が高いことから、懸濁液中の玄米粉が凝集して沈降する傾向が高った。そこでホモミキサーを用いて凝集を抑えた。

次に、農薬の回収率をさらに高くするために水の比率を高くした。すなわち 40%アセトニトリルとした。これにより玄米粉中への農薬の浸透度が高くなると考えられる。表 5~8 に各農薬の回収率を、図 8 に噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率を示す。また、図 9 には自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写

真を図 10~12 には各温度で噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真を示す。80%アセトニトリルに比べいずれの農薬でも回収率は高くなった。回収率は噴霧温度が 80℃のときクロルピリホスは 60%以上と良好となった。マラチオンおよびフェニトロチオンも 50%以上となった。回収率は各農薬の沸点の高さの順となった。80%アセトニトリルに比べ噴霧温度による回収率の変化は小さかった。これは農薬の玄米粉中への浸透が増したためと考えられた。すなわち、噴霧温度による農薬の分解が少なくなったためと思われる。80%アセトニトリルのときと同様、噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなった。

以上より、作製溶媒の水の比率が大きくなると回収率も高くなり、また、噴霧温度を下げることで、さらに回収率が高くなることが分かった。さらに水の比率を高くすることは農薬の溶解性によるので、本条件が適正であると思われる。今後は本条件での再現性を確認する必要がある。

1.2 器具・容器包装の原材料の材質別規格に関する調査試料作製検討：

試料基材及び溶解溶媒の選定は、各ポリマー 0.1 g に各溶解溶媒 1 mL を加え、室温または 65℃の水浴中での溶解性を観察したところ、PET 樹脂については、フェノール系ハロゲン溶媒との混液を除き、使用したほとんどの溶解溶媒に溶解しなかった。また、溶解してもシート成形後の状態が不良または溶媒臭が残り、使用に不適切であった。ポリプロピレンペレット及びポリエチレンペレットは、いずれの溶媒にも溶解不可であった。ジクロロメタンあるいはクロロホルム

に溶解を確認できたポリスチレン、発泡スチロール、ABS、及び AS の各ペレットのうち、試料基材にポリスチレンペレットを、また溶解溶媒にジクロロメタンを選定した。作製条件①ポリマー溶液調製（ポリマー含量）では、ポリマー含量を約 5、10、15、20w/v%としたところ、溶解溶媒の揮発状態から、約 10w/v%を選択した。

作製条件②作製容器へのポリマー溶液分注量では、シート作製容器（ポリプロピレン製トレー）にポリマー溶液を 50、100、200、300、500 g ずつ分注し、自然乾燥による溶媒揮発後のシート成形の状態を観察した結果、100 g 及び 200 g の分注が良好であった。調査試料としての配付量を確保することを考慮し、200 g の分注（ポリマー質量 20 g）とした。

作製条件③作製したシート内の均質性評価では、大きさの異なる大、小の作製用トレーに分注し、シートを作製したところ、トレー大に分注して得られたシート 2 枚につき各々 3 分画し、各分画を各々細切均質化し、各 n=1 で測定を行った結果、各シートにおける 3 分画についてのばらつきはいずれも 5%以下であり、シート内のカドミウム及び鉛濃度はおおよそ均質であると考えられた。トレー小に分注して得られたシート 3 枚は、いずれもシートが厚い部分（約 1 mm）と薄い部分（約 0.5 mm）が生じていた。それらの厚い部分と薄い部分に切り分け、各々細切均質化し、各 n=1 で測定を行った結果、カドミウム及び鉛濃度はいずれも、シートが厚い部分の回収率が薄い部分と比較して低い結果であった。シートを自然乾燥して溶媒を揮発する際に、薄い部分と厚い部分では乾燥の程度に差があり、厚い部分には

溶解溶媒が残存しているため、実質採取した試料量が少なくなり、回収率の低下の要因となったと考えられた。

作製条件④溶解溶媒除去条件では、溶解溶媒の除去にドライヤー、ウィンディオープン、電子レンジ及びホットプレートを用いて加温乾燥したところ、いずれも質量には変化はなく、加温による処理は効果が認められなかった。そこで、常温における処理方法について検討した。真空乾燥器で5時間真空乾燥（常温）した結果、顕著な効果は認められなかったが、デシケーター（シリカゲル）内静置では残留溶媒（ジクロロメタン）量が減少し、デシケーター（シリカゲル）内放置の効果が確認できた。しかし、シート成形後デシケーター（シリカゲル）内で約1か月放置後の調査試料にシート質量の減少はほぼ見られず、溶解溶媒除去は限界に達したと考えられた。

作製条件⑤残留溶媒（ジクロロメタン）、カドミウム及び鉛含量では、作製したシートの厚い部位と薄い部位について、ジクロロメタン、カドミウム及び鉛含量を各部位に付き $n=2$ で測定した。その結果、ジクロロメタン含量は、シートが厚い3部位について2.19~3.41%、また薄い2部位について1.29~2.45%であり、シートが厚い試験部位の方が薄い試験部位よりジクロロメタン含量が高い傾向であった。一方、カドミウム及び鉛含量については、いずれの厚さの試験部位においても理論作製濃度 $50 \mu\text{g/g}$ に対して、カドミウムが92~98%、鉛は88~98%の良好な回収率であったが、シートが薄い試験部位と比較して厚い試験部位の方が、ジクロロメタン含量が高く、一方でカドミウム及び鉛含量は低い傾向が明らかとなり、

シート中のジクロロメタン含量がカドミウム及び鉛含量（濃度）に影響を及ぼすことが示唆された。

ジクロロメタンが約1~3%残留する可能性は考えられたが、シートの厚みが均質となるよう作製し、1シート内のカドミウム及び鉛濃度を測定し、均質性の確認をした。1シートを20分画しそれぞれの分画について $n=1$ でカドミウム及び鉛濃度を測定した。その結果、ポリマー質量当たり添加標準溶液測定濃度に対する回収率は94.1~102.7%であり、このときの相対標準偏差 ($n=20$) は5%以下であったことから、シート内のいずれのカドミウム及び鉛濃度も均質であると考えられた。

今後は、残留溶媒含量をより低くする方法を検討する。更に複数ロット間のばらつきの検討の他、スプレードライヤを用いる別の作製方法による可能性も含めて検討を行う必要があると考えられた。

1.3 特定原材料検査（乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ：

今年度の参加機関31機関中、モリナガ（カゼイン）キット使用機関は30機関、日本ハムキット使用機関は31機関であった。使用機関が各1機関であったプリマハムキットとモリナガ（ β LG）キットについては参加機関が少なかったため、解析を行わなかった。

解析の結果、MCにより除外された機関はなかった。zスコアの絶対値が3以上となる機関は各解析ごとに0~1機関認められた。Xbar管理図では管理限界線の範囲を超える機関はなく、R管理図で管理限界線を超える機関は各解析ごとに0~1機関認められた。

したがって、ほとんどの参加機関で精度の高い試験が行われていると考えられた。

1.4 微生物調査試料添加菌濃度の低減に関する検討：

E.coli 検査、腸内細菌科菌群検査において、また大腸菌群検査の1菌種を除く5菌種において、①公定法の試験操作で陽性・陰性の判定が可能であること、②実際の食品検査に近いマトリクスの基材で冷蔵保存が可能であること、③冷蔵保存で微生物の添加から14日以上安定性が認められること（添加直後と添加14日後の差が対数値で±1.0ポイント以内）、④冷蔵から22.5℃（常温）に移管後も生菌数が測定可能であること（輸送時の温度上昇で急激に菌数が低下しない）、の4条件をクリアし、調査試料としての妥当性が認められた。

2 石井研究分担

微生物定性試験法における検出下限値の推定

食品衛生法で定められた冷凍食品の E. coli 試験法の LOD₅₀ 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た。

食品添加物試験法の妥当性に関する研究

TBHQ 試験法では規定分析法が適用可能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。

サイクラミン酸試験法（精製操作あり）で

は、適用可能な食品はぶどうジュース、みかんシロップ漬けで、適用不能な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。

サイクラミン酸試験法（スクリーニング試験法）では適用可能な食品はジャム、ぶどうジュース、米酢及びみかんシロップ漬けであった。適用不能な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。

今後適用不能が食品種と試験法の組み合わせについて改良法を検討していく予定である。

3 村上研究分担

測定阻害についての評価では、産地や品種が異なるカカオとシナモンについて、これまでの報告と同様に小麦と落花生の測定への阻害が確認された。カカオについては重合度の異なる

Polyvinylpyrrolidone (PVP) を共存させて抽出を行った結果、重合度の低い PVP K15 を添加することによって小麦と落花生で回収率が改善された。一方で、シナモンについては PVP の添加のみでは十分な回収率が得られなかったが、Cold water fish skin 由来の Gelatin を利用することによって回収率の改善が確認された。今後は精度管理用試料の作成のために、適正資材と安定性について確認を

行う必要がある。最終的には、改良した検査法を複数機関による評価することにより、より信頼性の高い検査法の確立に繋がると考える。

4 鎗田研究分担

4.1 検査用試料の調製と評価

(1) 検査試料の調製の結果

ホタテガイ 100 匹分の可食部約 2.4 kg をブレンダーで細断し、試料約 2.3 kg を得た。さらにこの試料を裏ごしし、可食部に含まれる繊維質分を除去した。回収した試料量は約 1.8 kg であった。この試料をポリ製広口瓶に入れて約 1 時間 30 分回転混合した。均質化したホタテガイ可食部とホタテガイ中腸腺試料は、2 段階に分けて混合した。はじめに、ホタテガイ中腸腺試料 10 g を精秤し、その 9 倍量のホタテガイ可食部を加えて混合した。次に、得られた 9 つの混合物をさらに混合し、混合物約 770 g を得た。この混合物の均質性に関して外観上の問題はないと判断された。

そこで、回転混合させた試料をおおよそ 5 等分にした後、各ガラス瓶の内容物をポリ製遠沈管 5g ずつ小分けした。

以上によって、検査用試料 123 本を調製することができた。

(2) 検査用試料の分析の結果

本報告書では、検査用試料の分析結果は、調製値に対する相対値としてのみ記載している。これは、実測値を記した場合にはパイロットスタディにおいて参加機関の技能を正確に評価できなくなるためである。

(1) で調製した検査試料中の OA ホタテガイ中腸腺試料中の OA と DTX1 濃度を測定し、調製値と比較した。その結果、OA と DTX1 そ

れぞれの調製濃度を 1 としたときの測定結果は、1.6(OA) および 1.4(DTX1) であった。分析回数が少ないために (n=2) 断定まではできないが、分析値が何らかの誤差要因を含んでいることが考えられた。その候補として LC-MS/MS 測定におけるマトリックス効果が考えられたので、これを検証することにした。

4.2 マトリックス効果の影響評価

(1) ホタテガイ可食部を用いた評価結果

M 試料、E 試料、C 試料の LC-MS/MS 測定を行ったところ、OA については、E 液および C 液の測定感度は M 液の測定感度よりも高かった。一方、DTX1 については、E 液および C 液の測定感度は M 液の測定感度よりも低く、4.1(2) の結果とは反対の傾向を示した。しかしながら、M 液の感度と、E 液および C 液の感度の違いに統計的な有意差は認められなかった。E 液と C 液の感度にも有意差は認められず、少なくとも測定感度に関してはヘキササン洗浄および固相抽出処理の明確な効果はみられなかった。ただし、いずれの測定結果においても、測定の再現精度は 10 %以上(相対値)あったため、LC-MS/MS と相補的に使用可能な正確測定法の開発が必要と考えられた。

(2) ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた評価結果

ホタテガイ中の下痢性貝毒検査では、可食部ではなく中腸腺を分析することにより、OA 群が基準値以下であるかを判定することも可能である。この方法は、OA 群が中腸腺に濃縮されることを利用したものである。分析操作においては、抽出および加水分解後の精製操作を省略し、希釈のみを行うことにより LC-MS/MS 測定が可能になる利点

がある。しかし、この分析方法においても LC-MS/MS 測定におけるマトリックス効果が測定結果に影響しうると考えられた。そこで、中腸腺から調製した試験所間比較試料をマトリックスとして、検証を行った。

各溶液の KC-MS/MS 測定の結果から、液中の OA および DTX1 とピーク面積との関係線を得た。関係線の傾きの差があれば、LC-MS/MS の感度が異なることを示唆している。本測定条件においては、中腸腺マトリックスによって LC-MS/MS の感度（すなわちイオン化の効率）が高くなるエンハンスメントが確認された。また、固相抽出処理をした場合、および、希釈倍率が高いほど、マトリックス効果の影響は小さくなった。しかし、いずれの関係線の傾きについても、試験所間比較試料由来のマトリックスを含まない M1 液の関係線の傾きとは、有意な違いがみられた。

以上より、中腸腺試料中の OA と DTX1 を正確に測定するためには、マトリックス効果の影響を除外する必要があることが確認できた。

5 大竹研究分担

添加回収試験において、分析法 1 で得られた定量値と調製値の比を比較した結果、クロルピリホスが 102 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 97 %、マラチオンが 103 % となり、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、80~86 % と良好であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液を用いた場合の算出結果は、クロルピリホスが 104 %、ダイアジノンが 99 %、フェニトロチオンが

89 %、マラチオンが 98 % であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。よって、マトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であると考えられた。

同様に、分析法 2 の QuEChERS 法で得られた定量値と調製値の比は、クロルピリホスが 99 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 99 %、マラチオンが 101 % となり、QuEChERS 法によっても調製値通りの分析値が得られることが示された。さらに、各農薬の標識体の回収率も、71~77 % と良好であった。これより、本研究で対象とした玄米中の農薬に対して、簡易分析法にもかかわらず、QuEChERS 法によって十分に対象農薬が抽出され、正確な分析値が得られることが示された。なお一斉試験法と同様に、マトリックスマッチングしていない検量線を用いた場合の比も算出した。簡易法である QuEChERS 法は一斉試験法よりも精製効果が低いと考えられたため、IDMS においてもマトリックス効果の影響をより強く受ける可能性があるため、本検討はより重要となる。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 98 %、フェニトロチオンが 87 %、マラチオンが 103 % であり、マトリックスマッチ検量線溶液との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。結果的には一斉試験法と大きな差は見られず、QuEChERS 法においてもマトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であるという結果が得られた。

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用玄米試料の、Lot 1 (120 °C)、2 (100 °C)、3 (80 °C) (温度

は噴霧温度を示す) の 3 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法および QuEChERS 法によって分析した。得られた結果より、クロマトグラムにおいて対象農薬のピークに夾雑物による妨害が見られず、一斉試験法と QuEChERS 法の定量結果もよく一致していた。食品薬品安全センター秦野研究所によると、添加濃度はクロルピリホス: 0.1, ダイアジノン: 0.4, フェニトロチオン: 0.2, マラチオン: 0.2 (単位は mg/kg) であり、調製時の回収率は 20~60 %程度と予想されるということであった (農薬の種類によって回収率は異なる)。本研究で得られた結果を用いて、調製時の回収率を計算した結果、30.1 %~63.3 %となった。これより、一斉試験法および QuEChERS 法の分析結果が、添加濃度と調製時の回収率から予測される濃度の範囲とよく一致していたことが示された。以上より、玄米中の対象農薬について、本研究で検討した方法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

開催) (東京) 2020

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

F. 知的所有権の取得状況

なし