

令和3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
研究分担者	石井 里枝	埼玉県衛生試験所
研究協力者	成澤 一美	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
	茂呂 茂寛	埼玉県衛生研究所

研究要旨

ISO/IEC 17025:2017 では試験法の導入前に試験性能の検証を要求している。黄色ブドウ球菌試験法は、定量試験法として妥当性確認されているが、定性試験法としての検出下限値は評価されていない。黄色ブドウ球菌定性試験法は手洗い不足等による人的な食品汚染の衛生指標として広く活用されているが、その性能評価をするための指標が存在しない。そこで本研究では比較可能な試験性能の指標を求めることを目的として、黄色ブドウ球菌定性試験法を対象に実施試験の50%が陽性となる菌量である LOD₅₀ (level of detection) の推定を試みた。食品試料を用いない手技によるバラツキの評価における LOD₅₀ は 29~49 CFU/mL であった。食品試料としてチャーハン、カレー、チーズケーキ、エッグタルト、生うどん、ソーセージを用い、単一試験室により食品試料ごとの LOD₅₀ を推定した。検討により推定された LOD₅₀ は 25~48 CFU/g であり、手技によるバラツキと比較しても食品試料による検出感度の低下は認められなかった。食品試料ごとの LOD₅₀ を培地への試料接種量である 0.02 g 中の菌量に換算すると 0.50~0.96 CFU となる。すなわち、1個以上の菌が培地中に接種されれば検出されたと考えられ、試験性能としては十分な検出感度を有していると推察された。

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は検査対象の食品について採用している試験法の妥当性を確認する必要がある。現在、厚生労働省でも食品添加物試験法について妥当性評価ガイドラインの策定について検討がなされている。対象食品は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、食品添加物に関しては使用される加工食品は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、妥当性評価を行う対象食品の選定は難しい。昨年度、「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。今年度はその中で、単一試験室の検討において、多くの食品で比較的良好な真度及び精度が得られた2つの試験法（ソルビン酸試験法、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法）について添加回収試験による室間共同試験によって評価を行った。また、昨年度、多くの食品種で満足のいく真度及び精度が得られなかったサイクラミン酸試験法について、その原因を検討し、改良法を考察したので報告する。

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

得られた試験結果が信頼性の高いことを示すためには、科学的根拠のある妥当性確認が行われている試験法を用いて検査を行う必要がある。ISO 17468:2016およびISO 16140-2:2016において微生物試験法の妥当性確認には定性試験法で10施設、定量試験法で8施設以上における共同試験の必要性が記載されていることから、個々の試験室で妥当性確認を行うことは難しい。したがって妥当性確認された試験法とは、公定法や第三者認証を受けた試験法ということとなる。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、試験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LOD₅₀ (level of detection) を用いている。妥当性確認時に規定したLOD₅₀を基に、試験所で検証により算出したeLOD₅₀ (estimated LOD₅₀) を比較することで、試験性能を比較することができる。

本研究では令和2年度にE. coli定性試験法についてLOD₅₀の推定を行い報告した。今年度は黄色ブドウ球菌試験法を対象としてLOD₅₀の推定を行った。黄色ブドウ球菌試験法は食品からの微生物標準試験法検討委員会により妥当性確認が行われ、食肉製品の規格基準における公定法として採用されている。しかし本試験法は定量試験法として妥当性確認が行われているため、定性試験法としてLOD₅₀については検討がなされていない。わが国では2021年に廃止された衛生規範などで定性試験法として広く用いられてきた。黄色ブドウ球菌は健康なヒトの鼻腔、咽頭、手指、腸管内などに分布している。

そのため、手洗い不足などによる人的な食品汚染の衛生指標として、黄色ブドウ球菌定性試験法は今後も活用されることが考えられるが、その性能評価をするための指標が存在しない。そこで本研究では黄色ブドウ球菌定性試験法のLOD₅₀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検討を行った。

B. 方法

1. 手技によるバラツキの評価

食品の代わりに緩衝ペプトン水 (BPW) (ISO処方) (Oxiod) を試料として用い、手技によるバラツキを評価した。試料への接種菌株は、BioBall HD 10K *Staphylococcus aureus* NCTC10788 (bioMérieux) (使用ロット番号: B6137、10506.0 CFU) を使用した。本製品は1粒に約10000 CFUの *Staphylococcus aureus* が含まれており、4粒を滅菌リン酸緩衝液 (PB) (pH 7.2) (LSIメディエンス) 20 mLに懸濁したものを接種菌原液とした。接種菌原液をPB10 mLで2倍段階希釈を繰返し、2、4、8、16倍希釈したものを接種菌液とした。滅菌ストマッカー一袋に採取した試料25 mLに、接種菌原液または接種菌液を1.5 mLずつ接種し、菌接種試料とした。試料中の菌濃度を高い方から $d_1 \sim d_5$ (CFU/mL) とした。

食肉製品の規格基準に規定された試験法を用いて、各濃度の菌接種試料について $n=6$ で黄色ブドウ球菌定性試験を実施した。菌を接種しない試料 (ブランク試料) も $n=1$ で実施した。菌接種試料に BPW25 mLを加えてストマッキングし10倍希釈液を調製した。選択分離培地として

3%卵黄加マンニット食塩寒天培地

(MSEYA) (栄研化学、卵黄液は極東製菓工業) を用い、10倍希釈液を0.1 mLずつ MSEYA2枚に接種、塗抹し、 $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ± 2 時間培養した。培養後、2枚の MSEYAのいずれかに1コロニー以上の黄色ブドウ球菌の定型集落 (黄色集落でその周囲に卵黄反応による白濁帯を示したもの) が発育した場合黄色ブドウ球菌試験陽性と判定し、以降の試験は省略した。一連の操作を1人の検査員で実施し、3人の検査員で2回ずつ実施した。

LOD₅₀の算出方法はISO 16140-2:2016 およびその引用元であるWilrich¹⁾らの手法に準じた。ポアソン分布より導出された以下の式からLOD₅₀を推定した。

$$LOD_{50} = -\frac{\ln 0.5}{0.02F}$$

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 での黄色ブドウ球菌試験の陽性試料数 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。

$$\sum_{i=1}^5 \left(\frac{y_i d_i}{\exp(0.02F d_i) - 1} - (6 - y_i) d_i \right) = 0$$

2. 食品試料ごとの LOD₅₀ の推定

対象とした食品試料として、チャーハン、カレー、チーズケーキ、エッグタルト、生うどん、ソーセージを供試した。無菌的に各試料25 gをストマッカー一袋に採取し、B. 方法の1. と同様に菌接種試料の調製、黄色ブドウ球菌試験および LOD₅₀の推定をした。事前に食品試料が黄色ブドウ球菌試験陰性であることを確認

していたため、MSEYA上の黄色ブドウ球菌の定型集落発育の有無で結果を判定した。各試料について日を改め2回実施した。

C. D. 研究結果および考察

1. 手技によるバラツキの評価

食品の代わりにBPWを試料として繰返し試験、異なる検査員間による結果を比較することで、手技によるバラツキについて検討した。3人の検査員で2回ずつ試験を実施した結果を表1に示した。試料中の菌量が少ないほど陽性試料数は減少する傾向を示したが、一部で菌量と陽性試料数が逆転しているものも認められた。菌量が最も多い d_1 での陽性試料数は5と6が多く、ほとんどの試料が陽性と判定された。一方で菌量が少ない d_4 、 d_5 の陽性試料数は0～2であり、陰性の試料がほとんどであった。 d_2 と d_3 の陽性試料数で試験試料数の半分程度である2～4が多かった。陽性試料数から算出された LOD_{50} は29～49 CFU/mL、 F 値は0.70～1.2であった。 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MSEYAへの接種菌量は理想的なポアソン分布に近づく。算出された F 値から判断すると、手技によるバラツキは微生物検査としては許容範囲であると考えられた。

2. 食品試料ごとの LOD_{50} の推定

各食品試料の菌接種試験の結果および算出された LOD_{50} を表2に示した。いずれの試料でも試料中の菌濃度に対する陽性試料数はBPWを試料として用いた場合と同様で、試料中の菌量が少ないほど陽性試料数は減少する傾向であった。各食品試料の LOD_{50} および F 値はチャーハンで48

CFU/g、0.73、カレーで42 CFU/g、0.83、チーズケーキで37 CFU/g、0.95、エッグタルトで48 CFU/g、0.72、生うどんで37 CFU/g、0.93、ソーセージで25 CFU/g、1.4であった。

BPWを試料として得られた F 値と比較すると、食品マトリクスによる検出感度の低下が認められた試料はなかった。本実験で用いた食品試料は調製した希釈液が濁っているものが多く、塗抹後の培地表面には食品試料の残渣が付着していた。油分やカレー中の香辛料、エッグタルトに含まれていたチョコレートの成分などが菌の発育を抑制することを考えていたが、検出感度には影響がなかった。一方で、同一試料であっても1回目と2回目の試験に差がある試料が多かった。特にエッグタルトや生うどんの LOD_{50} は1回目と2回目で2倍近い差があった。また、チャーハンの2回目の試験では d_1 から d_4 の陽性試料数はそれぞれ4、6、0、2であり d_1 と d_2 、 d_3 と d_4 が逆転していた。接種菌量に対する陽性試料数の逆転はBPWを試料とした場合にも認められたことから、食品試料の影響よりも試験法に原因があると推察された。試料の比重を1とした場合、MSEYA 2枚への接種量である0.2 mLは10倍希釈液250 mLのわずか0.08%でしかない。そのため、本研究のように試料中の菌量が微量である場合、希釈液中の菌の均一性、ピペット操作の精度の影響により試験結果にバラツキが生じてしまうのはやむを得ないと考えられた。田中らは細菌数試験において、「平均値±拡張不確かさ」は1/2～2倍と報告している²⁾。本研究により個々の試験によって算出さ

れた F 値は0.52~1.5であり、試験法が異なるものの、細菌数試験でのバラツキと比較すると許容できる程度であると推察された。

E. 結論

本研究では黄色ブドウ球菌定性試験法を対象として、 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求めることを目的とし検討を行った。本研究の結果から推定された食品試料ごとの LOD_{50} は25~48 CFU/gであった。黄色ブドウ球菌定性試験法は調製した試料の10倍希釈液を2枚のMSEYAに0.1 mLずつ接種することから、培地への試料接種量は0.02 gとなる。食品試料ごとの LOD_{50} を0.02 g中の菌量に換算すると0.50~0.96 CFUとなる。すなわち、1個以上の菌が培地中に接種されれば検出されたと考えられ、試験性能としては十分な検出感度を有していると推察された。

ISO 16140-3:2021では、参照試験法の導入時には、妥当性確認時の結果と比較し、 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、各試験室における黄色ブドウ球菌定性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) 田中ら：日本食品微生物学会雑誌, 27, 158-162 (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のある場合には、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。現在、その同等性の判断基準を示す妥当性評価ガイドラインについて厚生労働省が検討を進めている。

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、食品添加物は多種多様の食品に使用されており、また、同じ食品種であっても製造者ごとにそのマトリクスも異なる。多種多品目について収去検査を行っている自治体の試験所において妥当性評価に用いる対象食品をどのような基準で選定したらよいか判断することは難しい。また、検討中のガイドラインにも対象食品の選定については言及がない。

昨年度、単一試験室での添加回収実験によって、6種の規定分析法を対象に真度及び精度のデータから試験法の妥当性等を確認し、適用可能な食品、適用不可能な食品、あるいは、個人の技量等によってバラツキが出るような食品種を明らかにした。その結果、ソルビン酸試験法では、10種の食品種に基準値レベル等を添加した場合の真度は93.2~97.8%、併

行精度は0.5～3.9%、室内精度は0.5～4.2%であった。二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法では7種の食品種に基準値レベルの添加回収実験を行い、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%と比較的良好な結果が得られた。選択した食品種は多岐に及んでおり通常の収去検査においても搬入の頻度が多いものと考えられ、これらの食品種を妥当性評価の際の対象食品として選択することは妥当であると考えられた。今年度は室間共同試験により検証を試みた。

サイクラミン酸は、日本では使用が禁止されている甘味料である。しかし、諸外国では甘味料として使用されているため、輸入された食品からサイクラミン酸が検出され、食品衛生法違反となる事例が報告されている。厚生労働省の違反事例速報によると、令和3年度では菓子や健康食品、調味料、漬物等からサイクラミン酸が検出されている¹⁾。

サイクラミン酸の検査法については、平成15年8月29日付け食安監発第0829009号「サイクラミン酸に係る試験法について」の別添（以下「規定分析法」という。）が示されているところである。昨年度は、規定分析法の妥当性評価のための検討として、8種類の食品に対し添加回収試験を実施した。その結果から「ビスケット」、「チョコレート」、「米酢」、「らっきょう漬け」、「たくわん漬け」の5食品について、改良法の検討が必要と考えられた。5食品の問題点は、以下のとおりである。ビスケットは、加熱時に餅状となり、抽出が困難であった。チョコ

レートは、併行精度と室内精度に改善の余地が見られ、原因としてエマルジョンの発生などが考えられた。米酢は、まったく添加回収されず、原因として、山口²⁾らが報告したようにサイクラミン酸がカートリッジに吸着したことなどが考えられた。らっきょう漬けは平均回収率が低くバラツキも大きかった。たくわん漬けは、平均回収率が低値であった。

そこで、今年度、先述の問題の原因を究明し、改良法を検討するため、ビスケットは加熱抽出時の加水量等の調節、チョコレートはエマルジョン対策、米酢、らっきょう漬け、たくわん漬けはpHの調整等について検討を行った。

B. 方法

1. 室間共同試験による検証

神奈川県衛生研究所、川口市保健所、群馬県食品安全検査センター、神戸市健康科学研究所、名古屋市衛生研究所、奈良県保健研究センター、横浜市衛生研究所に御協力をいただき、ソルビン酸試験法については6機関で10食品種（①チーズ、②ちくわ、③さつま揚げ、④ウインナー、⑤マーガリン、⑥らっきょう漬け、⑦ワイン、⑧オレンジジュース、⑨イカ燻製及び⑩ビスケット）を、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法については8機関で6食品種（①干しかんぴょう、②干しトマト、③干しブドウ、④ワイン、⑤甘納豆及び⑥冷凍えび）を対象に検討した。

同一ロットの対象食品を配布し、通知試験法（令和元年6月28日発 薬生食監発

06281第1号「食品中の食品添加物分析法の改正について」通知に記載の「保存料安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム 2. 分析法（液体クロマトグラフィー）」及び「漂白剤 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類 2. 分析法A（アルカリ滴定法）」に従って、基準値が設定されている場合には基準値濃度、基準値が設定されていない場合には定量下限値濃度になるように標準溶液を添加して各機関1食品について2試料で濃度を定量した。ソルビン酸については添加後、30分程度放置してから分析操作を実施した。二酸化硫黄及び亜硫酸塩類については揮発しやすいため、添加後、直ちに操作を開始した。定量下限値濃度に添加した試料（ソルビン酸試験法のオレンジジュース及びビスケット）については通知試験法で示されている濃度範囲の検量線並びに添加濃度付近の検量点で構成する低濃度用検量線による定量値をそれぞれ求め、併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差等を比較した。

それぞれの機関から提出された定量値についてCochran検定、single Grubbs検定及びpaired Grubbs検定によって外れ値検定を行い、一元配置分散分析によって平均値、併行相対標準偏差、室間再現相対標準偏差及びHorRat値等を求めた。

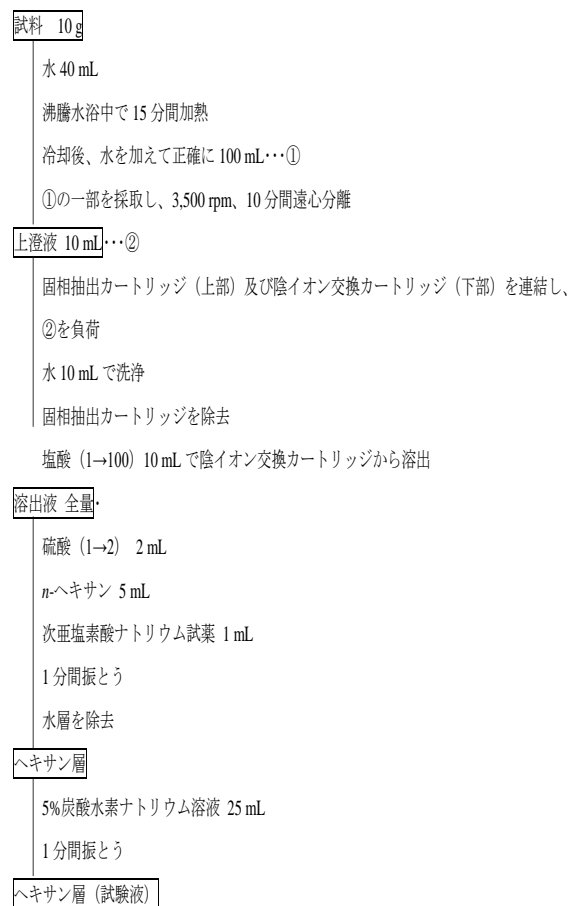
2. サイクラミン酸試験法の検討

(1) 分析方法

規定分析法に基づき試験液を調製した。規定分析法は、下記概略図のとおりである。

なお、固相抽出カートリッジ（以下

<概略図>



「tC18 カートリッジ」という。)として Sep-pak Vac tC18 1 g/6 cc (Waters) を、陰イオン交換カートリッジとして Sep-Pak Vac Accell QMA 500 mg/6 cc (Waters) を使用した。

また、本報告書ではカートリッジを用いて精製する方法を「固相抽出法」、用いない方法を「スクリーニング法」と表記した。

(2) 添加回収試験

試料は、サイクラミン酸が含有されていないことを確認した後、昨年度と同じ食品（別ロット品）を用いた。添加回収試験は、1人1日2回、1名で1日間行い、必要に応じて追加検討を実施した。

添加濃度は、100 µg/gとした。

C. D. 研究結果および考察

1. 室間共同試験による検証

各機関からのソルビン酸の添加回収試験の分析値を表1に、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の分析値を表2に示す。

これらの結果を元に算出した室間共同試験結果を表3-1~3に示す。

AOAC等では室間共同試験での試験室数は最低でも8機関以上としているが、ソルビン酸試験法では通知試験法（水蒸気蒸留法）を採用している試験機関が少なく、直接溶媒抽出法や透析法を採用し、疑義が生じた時のみ水蒸気蒸留法で確認するという試験機関が多く、6機関での共同試験で実施した。

(1) ソルビン酸試験法

ソルビン酸ではビスケット（添加濃度：0.01g/kg）の通知試験法で示された検量線濃度範囲で求めた平均回収率は88.5%であったが、それ以外は93.9~98.2%と良好な結果であった。併行相対標準偏差（ RSD_r ）は0.49~2.4%、室間再現相対標準偏差（ RSD_R ）は通知試験法で示された検量線濃度範囲で求めたビスケット及びオレンジジュース（いずれも添加濃度：0.01g/kg）がそれぞれ18%及び14%であった以外は1.8~8.4%であった。通知試験法の濃度範囲の検量線では高濃度側の検量点の影響を受け、低濃度の定量値にバラツキが認められたことから、定量下限値付近の定量には低濃度付近の検量点だけを用いることにより精度良く定量できるものと考えられた。

HorRat値は0.3~1.6であった。AOACガイドライン³⁾では「HorRat 値が0.5<

HorRat ≤ 1.5は通常、期待される範囲内、1.5 < HorRat ≤ 2の場合は、通常期待されるより大きい RSD_R が得られた理由について考察が必要」と記載されている。HorRat値がマーガリンとチーズでそれぞれ0.3、及び0.4であり、 RSD_R が1.8%及び2.0%とバラツキが小さかったためと考えられる。また、ビスケットの通知試験法で示された濃度範囲の検量線を用いた定量値でHorRat値が1.6であったが、 RSD_R も18%と高値であった。

(2) 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法では冷凍エビで1か所の試験機関がバラツキが大きく外れ値となった。平均回収率は91.0~95.2%、 RSD_r は1.0~2.6%、 RSD_R は3.6~5.4%であった。HorRat値は0.5~1.2と良好な結果であった。

2. サイクラミン酸試験法の検討

(1) ビスケット

ビスケットが餅状になったもの（以下「餅状物質」という。）の生成による回収率への影響について、混和及び攪拌等の操作を行わず、上澄液を調製し、試料採取前後でサイクラミン酸を添加し、その回収率に差異があるか検討した。ただし、冷却し、水で100 mLに定容時の転倒混和操作については実施した。すなわち、ビスケットが舞わないよう静かに水40 mLを加え、加水後に混和を行わず、加熱・放冷中に攪拌を行わずに試験液を調製した。サイクラミン酸（下部）に上から粉碎したビスケットを添加した場合、餅状物質が生成し、平均回収率は、固相抽出法が6.0%、スクリーニング法が5.8%となった。同様に、粉碎したビスケ

ット（下部）に上からサイクラミン酸を添加した場合、餅状物質が生成し、平均回収率は、固相抽出法、スクリーニング法ともに20.8%となった。餅状物質の生成により、回収率の低下が認められ、サイクラミン酸に粉碎したビスケットを添加した場合の回収率が著しく低下していたことから、餅状物質の影響により、均一な上澄液が得られていない可能性が考えられた。以上の結果より、餅状物質の生成を防止する操作が回収率の改善に有効であると推察された。

次に、混和及び攪拌による餅状物質の生成抑制効果について検討するため、ビスケットにサイクラミン酸を添加し、水40 mLを加えて転倒混和し、加熱・冷却中にガラス棒で攪拌を行って試験液を調製した。その結果、餅状物質の生成は少量となり、平均回収率は、固相抽出法が79.0%、スクリーニング法が86.3%まで改善されていた。

しかしながら、規定分析法の加水量40 mLでは、加熱中にビスケットは固いペースト状になり、ガラス棒での攪拌に労力を要した。そこで、加水量を規定分析法の2倍量の80 mLとして、混和及び攪拌による餅状物質の生成の有無について検討した。ビスケットにサイクラミン酸を添加し、ビスケットが舞わないよう静かに水80 mLを加え、加水後に混和せず、また、加熱・放冷中に攪拌を行わずに試験液を調製した。ただし、冷却し、水で100 mLに定容時の転倒・混和操作については実施した。その結果、混和及び攪拌操作を行わなくても、加水量を80 mLとすることで餅状物質が生成したものの、規

定分析法どおり水40 mLで実施した際に生成した餅状物質と比べると半分程度の量となった。また、平均回収率は固相抽出法が74.6%、スクリーニング法が74.2%となった。一方、ビスケットにサイクラミン酸を添加し、ビスケットが舞わないよう静かに水80 mLを加え、加水後に混和し、加熱・冷却中に攪拌を実施した。その結果、餅状物質は生成せず、平均回収率は、固相抽出法が101.9%、スクリーニング法が102.3%と良好な結果となった。また、加熱中のガラス棒での攪拌も容易であった。以上の結果より、加水量を規定分析法の2倍量程度に増やし、混和及び攪拌することで餅状物質の生成が防止され、良好な回収率が認められた。

加水量を160 mLにしたところ、混和・攪拌を行わずとも餅状物質は生成しなかった。その後、上澄液20 mLを量り取り、試験液を調製したところ、平均回収率は、スクリーニング法が97.8%となった。しかし、固相抽出法が59.9%と低値になったため、追加で検討を実施した

(n=5)が、平均回収率は49.2%と低値のままであった。この点に関しては、カートリッジへの通液量が規定分析法の2倍の20 mLであったことが影響を及ぼしたと考えられたものの、原因の究明には至らなかった。

以上より、ビスケットの分析では、加水量を80 mL程度に増やし、混和・攪拌しながら上澄液の調製を行うことが回収率の向上につながるものと考えられた（表6）。

（2）チョコレート

試験液のエマルジョンについて、昨年度

の検討で生成したエマルジョンは今年度の検討した固相抽出法ではほぼ認められず、生じた場合も少量であったため測定に支障はなかった。一方、スクリーニング法ではエマルジョンが生じた。規定分析法には、「エマルジョン生成により試験液を採取できない場合は、エマルジョン部分を遠沈管に採取し、必要な場合は適量の硫酸ナトリウムを添加し、遠心分離後、上澄液を採取する。」とある。このため、エマルジョン部分を3,500 rpmで遠心分離し、10分ごとにエマルジョンの消失を確認したところ、合計60分間遠心分離したところでエマルジョンの消失を認め、平均回収率は102.9%となった。また、硫酸ナトリウムを3 g添加し、3,500 rpmで1分間遠心分離したところ、エマルジョンは消失し、平均回収率は108.0%となった(表7)。

次に、固相抽出法において上澄液に添加したところ、平均回収率は64.2%となり、昨年度の結果に比べて低くなった。一方、上澄液10 mLをtC18カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジを接続したものに負荷した際の流下液(以下「流出液」という。)からはサイクラミン酸は検出されず、水10 mLを通過させた際の流下液(以下「洗浄液」という。)のみ検出され、その量は、添加量の29.2%であった。この点に関しては、規定分析法では、「タール色素等、比較的極性の高い化合物が多く含まれている場合、陰イオン交換カートリッジの交換能力を超えてしまうことがある。このようなときは、遠心分離して得られた上澄液を適宜、希釈してからカートリッジに負荷させるよう

にする」とあることから、遠心分離した上澄液を2倍、5倍希釈して平均回収率を検討した。その結果、上澄液を2倍希釈または5倍希釈した平均回収率は、それぞれ91.2%、84.3%であった。また、上澄液を希釈した場合、エマルジョンは生じなかった(表8)。以上より、チョコレート分析においては、エマルジョンの発生を防止することで回収率の改善が認められたことから、上澄液を適宜希釈したうえで固相抽出法を用いることは、エマルジョンの発生防止と回収率の向上につながるものと考えられた。

(3) 米酢

固相抽出法では、溶出液にサイクラミン酸を添加したところ、平均回収率は95.8%であった。続いて、上澄液にサイクラミン酸を添加したところ、平均回収率は32.0%となったことから、tC18カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジによる精製段階で著しく損失している可能性が考えられた(表9)。そこで、サイクラミン酸のカートリッジ精製工程での消失がtC18カートリッジによるものであるか否かについて検討した。tC18カートリッジにより消失したサイクラミン酸を調べるため、tC18カートリッジのみを用いた検証を実施した。サイクラミン酸を上澄液に添加し、tC18カートリッジに負荷した際の負荷液と、水10 mLで洗浄した洗浄液をあわせた液からはサイクラミン酸が40.7%回収されていた。一方、負荷後のtC18カートリッジをメタノール10 mLで溶出し、その溶出液を誘導体化したところ、66.2%あたるサイクラミン酸が回収された(表10)。以上の

結果より、6割程度のサイクラミン酸がtC18カートリッジに溶出されずに残存していたことが明らかとなった。この点に関しては、分子型のサイクラミン酸がtC18カートリッジに吸着した可能性が考えられた。tC18カートリッジに残存したサイクラミン酸が分子型であった場合、上澄液のpHを調整することが回収率の改善につながる。上澄液のpHが約3であったため、水酸化ナトリウム水溶液を用いて上澄液のpHを4、5、6、7及び8に調整し、サイクラミン酸を添加し、tC18カートリッジと陰イオン交換カートリッジで精製、その後誘導体化したところ、平均回収率は順に72.9%、92.1%、89.0%、85.0%、89.2%となり、pHを5以上に調整することで回収率が改善された(表11)。

以上より、米酢の分析では、上澄液のpHを5~7に調整することが回収率の向上につながるものと考えられた。なお、サイクラミン酸のpKaは1.71⁴⁾、上澄液のpHは約3であった。米酢の影響を無視して単純に計算すれば、pH 3の水におけるサイクラミン酸の分子型とイオン型の存在比は約1:20となる。このため、分子型のサイクラミン酸による影響は小さいものと考えられることになり、先述のとおりpHの調整によって回収率は向上したものの、そもそもサイクラミン酸がtC18カートリッジに残存した原因の特定には至らなかった。

(4) らっきょう漬け

溶出液にサイクラミン酸を添加したところ、平均回収率は90.9%であった。続いて、上澄液に添加したところ、平均

回収率は82.7%であった。米酢同様に、負荷後のtC18カートリッジをメタノール10 mLで溶出し、その溶出液を誘導体化したところ、13.6%にあたるサイクラミン酸がtC18カートリッジから回収された。なお、連結したカートリッジの流出液、洗浄液からは検出されなかった(表12)。このため、米酢と同じく上澄み液をpH調整することとした。上澄液のpHを測定したところ、約3.3であった。米酢の結果に基づきpHを5、6及び7に調整し、サイクラミン酸の添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、順に86.8%、98.4%98.1%であった(表13)。

以上より、らっきょう漬けについて、上澄液のpHを6~7に調整することが回収率の向上につながるものと考えられた。

(5) たくわん漬け

スクリーニング法について、試料及び上澄液に添加したところ、平均回収率は、それぞれ74.0%、95.0%であった。よって、サイクラミン酸は、たくわん漬けと水中で加熱することによりたくわん漬け由来のマトリクスに吸着する可能性が示唆された(表14)。次に、固相抽出法からの溶出液にサイクラミン酸を添加したところ、平均回収率は100.5%であった。また、上澄液に添加したところ、平均回収率は76.4%であった。この結果から、固相抽出過程においてもサイクラミン酸の回収が妨げられることが示唆された

(表15)。このため、米酢同様に、上澄液のpH調整により回収率が改善されるか検討した。上澄液のpHを測定したところ5程度であったため、pHを6及び7に調整したが、平均回収率は、それぞれ85.6%と

75.3%となり、回収率に大きな変動は認められなかった(表16)。

E. 結論

単一試験室の検討で真度及び精度良く測定可能であった「ソルビン酸試験法」で検討対象とした10種類(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、イカ燻製及びビスケット)の食品及び「二酸化硫黄及び亜硫酸塩試験法」で検討対象とした6種(干しかんぴょう、干しトマト、干しブドウ、ワイン、甘納豆及び冷凍えび)の食品について室間共同試験によって試験法の性能を評価した。いずれの食品種においても真度及び精度良く測定が可能であったことから、妥当性評価の対象食品種として適当であると考えられた。

サイクラミン酸規定試験法の改良については昨年度の検討にて規定分析法における添加回収率や精度に問題が認められると考えられた5食品について、改良のための検討を行った。

ビスケットについては、規定分析法のとおり水40 mLを加えて沸騰水浴中で15分加熱すると、餅状になり、回収率を低下させる。このため、固相抽出法、スクリーニング法ともに加水量を80 mL程度にし、適宜混和・攪拌することが回収率の向上につながると考える。

チョコレートについては、スクリーニング法ではエマルジョンが生じた。また、固相抽出法では回収率が低く、tC18カートリッジが詰まる現象も多発した。このため、上澄液を希釈した後、固相抽

出法で分析することが回収率の向上につながると考える。

米酢とらっきょう漬けについては、上澄液のpHによりサイクラミン酸がtC18カートリッジに保持され、回収率が低下したと考えられた。このため、上澄液のpHを中性付近に調整することにより回収率の向上が図られた。

たくわん漬けについては、現時点では有効な改善には至らず、更なる検討が必要であった。

今後は、引き続き改良法の検討を行うとともに、新規分析法の検討も行っていく予定である。

参考文献等

- 1) https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html
- 2) 山口ら：大阪府公衆衛生研究所報，49，7-10（2017）
- 3) AOAC Int.：Appendix D in Official Methods of Analysis of AOAC Int. 18 ed.，Gaithersburg, MD, USA（2005）
Available from http://eoma.aoac.org/app_d.pdf
- 4) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/275#section=Dissociation-Constants>

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 千葉雄介、藤原 茜、高瀬冴子、島田慎一、石井里枝：E. coli 定性試験法における検出下限値の推定、第42回日本食品微生物学会学術総会、Web開催（岡山）2021
- 2) 千葉雄介、金井美樹、藤原 茜、荒島麻実、土井りえ、島田慎一、石井里枝：黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定、第117回日本食品衛生学会学術講演会、Web開催（東京）2021

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

以下 図表

表1 食品マトリクス非存在下における黄色ブドウ球菌定性試験の陽性試料数および

LOD₅₀

d_1^{*1}	試料中の菌量					F	LOD ₅₀ (CFU/mL)
	d_2	d_3	d_4	d_5	ブランク		
5/6 ^{*2}	3/6	4/6	2/6	0/6	0/1	0.82	42
6/6	4/6	3/6	1/6	2/6	0/1	1.1	30
4/6	4/6	4/6	0/6	1/6	0/1	0.70	49
5/6	2/6	5/6	1/6	0/6	0/1	0.73	48
6/6	5/6	2/6	2/6	1/6	0/1	1.2	29
6/6	4/6	2/6	1/6	1/6	0/1	0.93	37

*1 試料中の菌量： $d_1 = 126$ 、 $d_2 = 63$ 、 $d_3 = 32$ 、 $d_4 = 16$ 、 $d_5 = 7.9$ CFU/mL

*2 陽性試料数/試験実施試料数

表2 食品ごとの黄色ブドウ球菌定性試験の陽性試料数および LOD₅₀

食品	試料中の菌量					F	LOD ₅₀ (CFU/g)	
	d_1^{*1}	d_2	d_3	d_4	d_5			ブランク
チャーハン								
1回目 ^{*2}	6/6 ^{*3}	3/6	3/6	0/6	1/6	0/1	0.81	43
2回目	4/6	6/6	0/6	2/6	0/6	0/1	0.66	53
combined ^{*4}							0.73	48
カレー								
1回目	6/6	4/6	3/6	1/6	1/6	0/1	1.0	33
2回目	6/6	3/6	2/6	0/6	0/6	0/1	0.65	53
combined							0.83	42
チーズケーキ								
1回目	5/6	4/6	2/6	2/6	1/6	0/1	0.83	42
2回目	5/6	5/6	5/6	1/6	0/6	0/1	1.1	32
combined							0.95	37
エッグタルト								
1回目	5/6	2/6	3/6	0/6	0/6	0/1	0.52	67
2回目	5/6	6/6	2/6	1/6	1/6	0/1	0.99	35
combined							0.72	48
生うどん								
1回目	5/6	4/6	1/6	2/6	0/6	0/1	0.68	51
2回目	6/6	4/6	5/6	1/6	1/6	0/1	1.3	26
combined							0.93	37
ソーセージ								
1回目	6/6	6/6	3/6	2/6	0/6	0/1	1.5	24
2回目	6/6	5/6	3/6	2/6	1/6	0/1	1.3	26
combined							1.4	25

- *1 試料中の菌量 $d_1 = 126$ 、 $d_2 = 63$ 、 $d_3 = 32$ 、 $d_4 = 16$ 、 $d_5 = 7.9$ CFU/g
- *2 各食品試料について日を改めて2回試験を実施
- *3 陽性試料数/試験実施試料数
- *4 combined は2回の試験結果を同一の分布として LOD₅₀ を算出

表3 ソルビン酸 添加回収試験結果

食品	試料量 (g)	添加濃度 (g/kg)	A機関		B機関		C機関		D機関		E機関		F機関	
			分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)	
			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
チーズ	5	3.0	2.92	2.93	2.97	2.98	2.89	2.93	2.90	2.84	2.93	2.91	2.80	2.82
ちくわ	5	2.0	1.88	1.90	2.02	2.02	1.92	1.96	1.90	1.83	1.88	1.87	1.86	1.84
さつま揚げ	5	2.0	1.86	1.88	2.01	2.04	1.98	1.99	1.97	1.98	1.91	1.93	1.93	1.93
ウインナー	5	2.0	1.99	1.98	2.03	2.05	1.95	1.92	1.98	1.98	1.94	1.93	1.90	1.92
マーガリン	5	1.0	1.01	0.989	0.981	0.982	0.976	0.991	1.01	0.988	0.966	0.960	0.961	0.966
らっきょう漬	5	0.50	0.472	0.484	0.506	0.509	0.519	0.515	0.513	0.507	0.466	0.468	0.454	0.447
ワイン	5	0.20	0.192	0.202	0.198	0.197	0.192	0.193	0.205	0.193	0.182	0.183	0.196	0.199
オレンジジュース (低濃度検量線)	5	0.01	0.00965	0.00963	0.0101	0.0101	0.00990	0.00999	0.0111	0.0111	0.00948	0.00960	0.00861	0.00854
オレンジジュース	5	0.01	0.00991	0.00988	0.00967	0.00969	0.00866	0.00875	0.0118	0.0118	0.00931	0.00944	0.00786	0.00791
イカ燻製	5	1.5	1.47	1.44	1.36	1.38	1.46	1.41	1.47	1.47	1.44	1.43	1.44	1.43
ビスケット (低濃度検量線)	5	0.01	0.00932	0.00931	0.00966	0.00932	0.00977	0.00943	0.0103	0.0102	0.00931	0.00917	0.00837	0.00830
ビスケット	5	0.01	0.00948	0.00946	0.00928	0.00894	0.00853	0.00818	0.0110	0.0109	0.00915	0.00900	0.00602	0.00621

表4 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類 添加回収試験結果

食品	試料量 (g)	添加濃度 (g/kg)	A機関		B機関		C機関		D機関	
			分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)	
			1	2	1	2	1	2	1	2
干しかんぴょう	0.2	5.0	5.04	5.01	4.67	4.50	4.51	4.49	4.99	4.83
干しトマト	5	2.0	1.88	1.89	1.85	1.91	1.89	1.89	1.79	1.81
干しブドウ	5	1.5	1.37	1.37	1.44	1.41	1.44	1.44	1.39	1.32
ワイン	20	0.35	0.354	0.352	0.327	0.320	0.317	0.318	0.327	0.322
甘納豆	1	0.10	0.0960	0.0960	0.0874	0.0922	0.0959	0.0895	0.0896	0.0896
冷凍えび	1	0.10	0.0928	0.0928	0.0902	0.0960	0.0895	0.0895	0.0832	0.102

食品	試料量 (g)	添加濃度 (g/kg)	E機関		F機関		G機関		H機関	
			分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)		分析結果 (g/kg)	
			1	2	1	2	1	2	1	2
干しかんぴょう	0.2	5.0	5.12	5.13	4.62	4.72	4.42	4.45	4.76	4.83
干しトマト	5	2.0	1.96	1.93	1.91	1.90	1.67	1.68	1.80	1.79
干しブドウ	5	1.5	1.48	1.48	1.40	1.46	1.30	1.30	1.34	1.31
ワイン	20	0.35	0.350	0.350	0.318	0.305	0.315	0.314	0.334	0.334
甘納豆	1	0.10	0.0960	0.0944	0.0928	0.0896	0.0835	0.0803	0.0911	0.0927
冷凍えび	1	0.10	0.0896	0.0944	0.0960	0.0976	0.0835	0.0867	0.0927	0.0911

表 5 - 1 室間共同試験結果 (ソルビン酸)

	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
データ解析に有効な試験室数	6	6	6	6	6	6
外れ値になった試験室数	0	0	0	0	0	0
添加濃度(g/kg)	3.0	2.0	2.0	2.0	1.0	0.5
平均値(g/kg)	2.90	1.91	1.95	1.96	0.98	0.48
併行標準偏差 S_r (%)	0.023	0.025	0.013	0.013	0.010	0.0046
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.064	0.070	0.035	0.035	0.028	0.013
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	0.79	1.3	0.65	0.64	1.0	0.95
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.058	0.066	0.056	0.048	0.018	0.027
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.16	0.18	0.16	0.13	0.049	0.076
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	2.0	3.5	2.9	2.4	1.8	5.6
HorRat	0.4	0.7	0.6	0.5	0.3	0.9

表 5 - 2 室間共同試験結果 (ソルビン酸)

	ワイン	いか燻製	オレンジ ジュース (低濃度検量線)	オレンジ ジュース	ビスケット (低濃度検量線)	ビスケット
データ解析に有効な試験室数	6	6	6	6	6	6
外れ値になった試験室数	0	0	0	0	0	0
添加濃度(g/kg)	0.20	1.5	0.01	0.01	0.01	0.01
平均値(g/kg)	0.194	1.43	0.0098	0.0096	0.0094	0.0088
併行標準偏差 S_r (%)	0.0046	0.018	0.000048	0.000049	0.00016	0.00016
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.013	0.051	0.00013	0.00014	0.00044	0.00045
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	2.4	1.3	0.49	0.51	1.7	1.8
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.0070	0.037	0.00082	0.0013	0.0006	0.0016
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.020	0.10	0.0023	0.0037	0.0018	0.0045
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	3.6	2.5	8.4	14	6.7	18
HorRat	0.5	0.5	0.7	1.2	0.6	1.6

表 5 - 3 室間共同試験結果 (二酸化硫黄及び亜硫酸塩類)

	干しかんぴょう	干しトマト	干しブドウ	ワイン	甘納豆	冷凍えび
データ解析に有効な試験室数	8	8	8	8	8	7
外れ値になった試験室数	0	0	0	0	0	1
添加濃度(g/kg)	5.0	2.0	1.5	0.35	0.10	0.10
平均値(g/kg)	4.76	1.85	1.39	0.33	0.09	0.091
併行標準偏差 S_r (%)	0.067	0.018	0.026	0.0039	0.0024	0.0020
併行許容差 $2.8S_r$ (%)	0.19	0.051	0.073	0.011	0.0066	0.0055
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	1.4	1.0	1.9	1.2	2.6	2.2
室間再現標準偏差 S_R (%)	0.25	0.087	0.066	0.016	0.0047	0.0033
室間再現許容差 $2.8S_R$ (%)	0.71	0.24	0.18	0.045	0.013	0.0092
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	5.4	4.7	4.7	4.9	5.1	3.6
HorRat	1.2	0.9	0.9	0.7	0.6	0.5

表6 ビスケット 添加回収試験結果

加水量 (mL)	混和・攪拌	餅状物質	平均回収率(%)		標準品添加 のタイミング
			固相抽出法	スクリーニング法	
40	なし	生成	20.8	20.8	試料採取後
40	なし	生成	6.0	5.8	試料採取前
40	あり	生成 (少量)	79.0	86.3	試料採取後
80	なし	生成	74.6	74.2	試料採取後
80	あり	なし	101.9	102.3	試料採取後
160	なし	なし	59.9		試料採取後
160	なし	なし	49.2 [*]		試料採取後

n=2

※n=5 のデータから算出

表7 チョコレート 添加回収試験結果 (スクリーニング法)

添加対象	エマルジョン対策	平均回収率(%)
上澄液	遠心分離 (3500 rpm、60 分間)	102.9
	硫酸ナトリウム+遠心分離(3500 rpm、1 分間)	108.0

n=2

表8 チョコレート 添加回収試験結果 (固相抽出法)

添加対象	反応操作対象	平均回収率(%)	備考
溶出液	溶出液	88.0	
	溶出液	64.2 [*]	
上澄液	流出液	0.0	
	洗浄液	29.2	
試料	溶出液	91.2	上澄液 2 倍希釈
		84.3	上澄液 5 倍希釈

n=2

※ n=2、3 回のデータから算出

表 9 米酢 添加回収試験結果（固相抽出法）

添加対象	測定対象	平均回収率(%)	備考
溶出液	試験液	95.8	
上澄液		32.0	

n =2

表 10 米酢 添加回収試験結果（tC18 カートリッジのみ使用）

添加対象	反応操作対象	平均回収率(%)	備考
上澄液	流出液+洗浄液	40.7*	
	tC18 カートリッジからの溶出液	66.2	溶出液：メタノール

n =2

※ n =5 のデータから算出

表 11 米酢 添加回収試験結果（固相抽出法、pH 調整あり）

添加対象	測定対象	上澄液の pH	平均回収率(%)	備考
上澄液	試験液	4	72.9	
		5	92.1	
		6	89.0	
		7	85.0	
		8	89.2	

n =2

表 12 らっきょう漬け 添加回収試験結果（固相抽出法）

添加対象	反応操作対象	平均回収率(%)	備考
溶出液	溶出液	88.0	89.2
上澄液	溶出液	82.7	
	tC18 カートリッジからの溶出液	13.6*	溶出液：メタノール
	流出液	0.0	
	洗浄液	0.0	

n =2

※ 検量線下限未満の値を含む平均値であるため参考値とする

表 1 3 らっきょう漬け 添加回収試験結果（固相抽出法、pH 調整あり）

添加対象	測定対象	上澄液の pH	平均回収率(%)	備考
		5	86.8	
上澄液	試験液	6	98.4	
		7	98.1	

$n=2$

表 1 4 たくわん漬け 添加回収試験結果（スクリーニング法）

添加対象	測定対象	平均回収率(%)	備考
試料	試験液	74.0	
上澄液		95.0	

$n=2$

表 1 5 たくわん漬け 添加回収試験結果（固相抽出法）

添加対象	測定対象	平均回収率(%)	備考
溶出液	試験液	100.5	
上澄液		76.4	

$n=2$

表 1 6 たくわん漬け 添加回収試験結果（固相抽出法、pH 調整あり）

添加対象	測定対象	上澄液の pH	平均回収率(%)	備考
		6	85.6	
上澄液	試験液	7	75.3	

$n=2$