

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

総括研究報告書

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

研究要旨

輸入食品や国内食品の流通段階で健康危害リスクを及ぼすような種々の有害物質等を監視するために、行政検査は国民の食生活の安全を担保している。検査において、誤判定を避けるために、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。現在、食品の輸出の促進と輸入の増加により、誤判定の回避は輸出入国間での係争を回避するためにも重要である。これまで我々は、検査の信頼性を確保するために外部精度管理調査を検査施設に提供しており、ISO/IEC 17043認定取得をできたことで国際的にも認められた技能試験提供者となった。この外部精度管理調査（技能試験）を継続的に検査施設に提供することで、各検査機関の検査結果において信頼性の維持に寄与することができる。外部精度管理プログラムは、検査されているすべての項目に対して開発されていることが理想であるが、調査試料作製の困難さから、一部の検査項目についてしか開発されていない。新規の外部精度管理調査の開発を困難にしている要因は試料の安定性や均質性を担保することの技術的課題にある。本研究では、外部精度管理調査プログラムの改善と開発を目的に、これまで、均質で安定な外部精度管理調査試料の開発にスプレードライヤを用いることが有用であることを見出した。そこで、今年度は、1. 外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究（渡辺研究分担）では、スプレードライヤを用いた残留農薬検査試料作製の検討及び器具・容器包装の検査項目の基礎検討及び微生物検査については、新規の定性検査の開発を、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、黄色ブドウ球菌試験法についてLODの推定を試みた。また、「ソルビン酸試験法」及び「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法」について、室間共同試験により真度、併行精度及び室間精度等を検討したところ、対象としたすべての食品種で良好な結果が得られた。さらに、サイクラミン酸試験法については令和2年度の単一試験室での検討結果で良好な真度及び精度が得られなかった5種類の食品種について規定分析法の改良法を検討した。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、精度管理用試料の作製のために適正資材の安定性の検討を、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、検査試料の均質性評価と分析法の検討を、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副所長）、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1 kgをアセトニトリル/水4 Lに懸濁させ、20%アセトニトリル懸濁液とし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 2 kg/h で送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクは MC-50 型を使用した。回転数は 20000 rpm に設定した。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：

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について、作製上の必要要件である有機溶媒への溶解性を検討した。その結果、試料基材にはポリスチレンペレットを選択し、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。これらのシート状試料は、試験対象物質の良好な均質性が得られたが、ポリスチレンペレットの溶解溶媒に用いたジクロロメタンの残留が認められた。また、残留溶媒除去法の確立が困難だったことから、今年度は新たな作製法としてスプレードライヤを用いて粉体の試料作製を試みた。添加に用いる標準品はシート状試料と同様に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とし、これにポリマーを添加して混合し、十分にポリマーを溶解した（ポリマー溶液）。これをスプレードライヤに供し、粉体状の試料を得て、これらの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について検討した。

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：

本年度の外部精度管理調査に関するパイロットスタディでは、検討の結果安定性が確認されたとうもろこしペースト及びイチゴジャムを基材としてスキムミルクより調製した乳タンパク質を 9.0 µg/g 添加した試料を作製した。参加機関は公定法及び各機関の標準操作手順書に従い、消費者庁から提示されている 3 キット（モリナガキット、日本ハムキット、プリマハムキット）中、2 種類を用いて測定を行い、結果を提出するよう要請した。サンプリング数は 1 試料につき 2 抽出、ELISA 測定は 1 抽出につき 3 ウェル併行とした。

回収した結果は、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た。結果は Xbar-R 管理図および z-スコアにより評価を行った。

1.4 一般細菌数測定検査用調査試料の開発：

食品衛生外部精度管理調査、微生物学調査では主に一般細菌数測定検査に用いる基材開発を行った。

一般細菌数測定検査の新規基材として白飯（見立て食材：弁当）を用い、妥当性確

認として①性能評価、②品質評価、③パイロットスタディの実施による運用確認を行った。

性能評価では冷蔵試料（0～10℃）と冷蔵保存10日後に22.5℃へ移送した試料（常温試料）の2通りの調査試料について、最大84日間保存までの生菌数の挙動を観察した。

品質評価ではパイロットスタディ用に作製した調査試料から採取した10個の調査試料を2名の検査員でそれぞれ生菌数測定を行い、配付前の品質評価（均質性確認試験）および報告期間後までの品質評価（安定性確認試験）を行った。なお均質性確認試験では公表する暫定値の算出に加えてISO/TS 19036 : 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations を用いた標準不確かさの算出を行った。

パイロットスタディでは49機関の参加機関に対して調査試料を配付し、報告値を回収して解析を行った。

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

黄色ブドウ球菌定性試験を対象として実施試験の50%が陽性となる菌量である LOD_{50} （level of detection）の推定を行った。ブランク試料を用いた繰り返し試験を行い手技による LOD_{50} のバラツキを評価した。また6種の食品試料（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）について LOD_{50} を推定した。2倍段階希釈した *Staphylococcus aureus* 菌液を試料に接種し、黄色ブドウ球菌定性試験法を各濃度 $n=6$ で実施し、陽性と判定された試料数から LOD_{50} を算出した。黄色ブドウ球菌試験法は、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食肉製品の黄色ブドウ球菌試験法に準じた。 LOD_{50} の算出方法はISO 16140-2:2016およびその引用元であるWilrichら（J AOAC Int., 92(6), 1763-72（2009）.）の手法に準じて LOD_{50} を推定した。

食品添加物試験法の妥当性に関する研究

「ソルビン酸試験法」については6機関で10食品種を、「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食品種を対象に室間共同試験を実施した。

同一ロットの食品を配布し、通知試験法に従って、基準値が設定されている場合には基準値濃度に、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添加して1食品当たり2試料を定量した。

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。サイクラミン酸試験法については、ビスケット、チョコレート、米酢、らっきょう漬け及びたくわん漬けの5食品を対象食品として、100 $\mu\text{g/g}$ 濃度にサイクラミン酸を添加し、1日2併行にて改良法を検討した。

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。今年度は特定原材料の検査における試験室内における不確かさについて評価を行った。当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における不確かさについて推定を行った。また、改良抽出法の試験室間における評価のために精度管理用試料を作成し、試料の安定性について評価した。

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 均質性評価のための分析法の開発

(1) 材料・試薬

ホタテガイは市販の殻付きホタテガイを使用した。1 ppm OA 溶液（溶媒：メタノール）と 1 ppm DTX1 溶液（溶媒：メタノール）は産業技術総合研究所から入手した。DTX2 認証標準物質は National Research Council Canada から入手した。他の試薬は LC-MS 用、HPLC 用または特級を用いた。

(2) ホタテガイ試料の前処理方法

ホタテガイを開殻した後、可食部をブレンダーで細かく刻んだ。この試料 2 g を食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号の別紙 2 に従って前処理した。ただし、固相抽出による精製は、本件研究で開発した

方法（後述）で行った。

(3) 固相抽出条件の検討方法

ODS カートリッジ（ジューエルサイエンス社製 Inert-Sep C18 500 mg）を用いた方法 2 法と、HLB カートリッジ（Waters 社製 Oasis PRiME HLB 200 mg）を用いた方法 2 法を検討した。各法の詳細は分担報告書に記載するが、ここでは最も良好な結果を示した方法（D法）の手順を示す。

D法：(2)に従って調製したヘキサン洗浄液 2.5 mL、水 2.5 mL、OA 群混合標準溶液 100 µL の混合液をカートリッジに注入し、溶出液を Fr. D1 とした。次に、試料が入っていたねじ口試験管にアセトニトリル/メタノール（4：1）1.0 mL を加えて攪拌し、カートリッジに注入した。この操作を繰り返した。さらにアセトニトリル/メタノール（4：1）3.0 mL をカートリッジに注入し、これらによって得られた溶液を合わせて Fr. D2 とした。さらにアセトニトリル/メタノール（4：1）3.0 mL をカートリッジに注入し、得られた溶液を Fr. D3 とした。

(4) LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、島津製作所のUFLC高速液体クロマトグラフ（ポンプ：LC-20AD、デガッサー：DGU-20A3、オートサンプラー：SIL-20ACHT、カラムオープン：CTO-20AC、システムコントローラ：CBM-20A）と、質量分析計（Applied Biosystems 3200 Q TRAP）を用いた。カラムはCadenza CD-C18カラム（内径：2 mm、長さ：100 mm、粒子径：3 µm）を用いた。LC-MS/MSの測定条件は、食安基発 0306 第 4 号・食安監発 0306 第 2 号の別紙 2 に準拠した。

4.2 検査試料の均質性評価

(1) 材料・試薬

検査試料は、昨年度の本事業で調製したものを使用した。試薬類は4.1(1)と同じものを使用した。

(2)均質性評価試験の方法

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

4.3 液体クロマトグラフィー蛍光検出法の検討

(1)材料・試薬

HPLC用または特級試薬を用いた。

(2)誘導体化法

9-Anthryldiazomethane (ADAM) 2 mg にアセトン 100 μ L とメタノール 900 μ L を順次加えた。インサート付 200 μ L バイアルに試料 100 μ L をとり、窒素気流下で乾固した。これに前述の ADAM 溶液 200 μ L を加え、室温、暗所で1時間反応させた。

(3)カラムスイッチング HPLC 装置

島津製作所製のポンプ2台、デガッサー、カラムオープン、蛍光検出器、およびレオダイン製インジェクターと6方切換えバルブ2個より構成させた。第1カラムにはジーエルサイエンス製 Inertsil diol 5 μ m (4.6 mm i. d. \times 250 mm) を、第2カラム (トラップカラム) にはジーエルサイエンス製 Inertsil C4 5 μ m (3.0 mm i. d. \times 150 mm) を、第3カラムには野村化学製 Develosil C30-UG-5 (3.0 mm i. d. \times 250 mm) を用いた。

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碎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、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) 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 SFE 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 $^{\circ}$ C), 2 (100 $^{\circ}$ C), 3 (80 $^{\circ}$ 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 (To1)、メタノール (Me)、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。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*₀、ダイアジノン-*d*₀、フェニトロチオン-*d*₆、マラチオン-*d*₆ を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。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、フェニトロチオン、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 3 g に農薬混合溶液 0.4 mL (添加回収試験の場合のみ) および内標準溶液 0.4 mL を加えて静置した。これに水 10 mL を加えて 15 分静置した後、AN25 mL を加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN10 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。これに NaCl 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL を加え、10 分間振とうした。その後、あらかじめ AN10 mL でコンディショニングした Agilent Technologies 製 Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ (1 g) を用いて、振とうによって得られた AN 層と AN2 mL を通液する処理を行った。得られた処理液を無水 Na₂SO₄ によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/To1 (3:1) 混液 2 mL に溶解した。Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) を AN/To1 (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらに AN/To1 (3:1) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 0.5 mL に溶解させ、試料溶液とした。

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

昇温し、10 分間保持、注入口温度：250 °C、検出器温度：230 °C (イオン源)、注入方式：スプリットレス、キャリアガス：ヘリウム、注入量：1 μL、イオン化条件：EI、定量に用いた *m/z*：314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス-*d*₁₀)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン-*d*₁₀)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-*d*₆)、285 (マラチオン)、291 (マラチオン-*d*₆)、188 (アラクロール)。

分析法 2 (SFE 法) では、玄米試料 1 g に農薬混合溶液 0.15 mL (添加回収試験の場合のみ) および内標準溶液 0.15 mL を加えて静置した。これに約 10 g の Na₂SO₄ を加え、ステンレス製の 15 mL 抽出管 (日本分光製) に試料を導入し、日本分光製の超臨界抽出装置 (ポンプ 1：PU-2080-CO₂、ポンプ 2：PU-2080 Plus、ミキサー：MX-2080-32、オープン：CO-2065 Plus、背圧調整弁：BP-2080 Plus) を用いて抽出を行った。抽出条件は以下の通りである；溶媒：25%(v/v)Me/超臨界二酸化炭素、温度：80 °C、圧力：25 MPa、溶媒流量：2.5 mL/min、抽出時間：20 min。抽出液を、抽出装置出口に接続した ODS カラム (日本分光製、PES-10-1/16) に通液した後、ナス型フラスコに回収した。回収した抽出液を、あらかじめ AN/To1 (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) に注入し、さらに AN/To1 (3:1) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 0.2 mL に溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を GC/MS によって測定した。測定条件は、分析法 1 と同じ

である。

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SFE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, フェントロチオン: 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SFE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 渡辺研究分団

1.1 スプレードライヤを用いた残留農薬検査用試料の開発:

前年度に、80%アセトニトリル懸濁液に4種農薬(ダイアジノン、フェントロチ

オン、マラチオン、クロルピリホス)を添加し、同一条件で作製した。その結果、それぞれの農薬の回収率は噴霧温度80%で25%~40%となり、噴霧温度を下げることで回収率は改善した。さらに40%アセトニトリル懸濁液の場合、さらに回収率は高くなった。これらの結果を踏まえ、今年度はさらに水の添加を増やし20%アセトニトリル懸濁液を用い検討を行った。検討条件はこれまでと同様の条件で行った。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。今回はさらに水を加えたために、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40%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。これも前回と同様の傾向が認められた。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47.5%となり、80°Cでは69.8%と回収率は劇的に改善した。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。これは前回と同様の傾向であった。噴霧温度が80°Cのとき回収率は70%~75%程になり、これまでで最も回収率が良好であった。以上のように、水の添加量を増やすことで回収率が改善したが、これ以上の水の添加は農薬の水の溶解性を考えると限界であると考えられた。何か溶解

を補助するものを添加することでさらに水の添加量を増やすことも可能であるが実験系が複雑になることから本条件が最適であると考えられた。

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：

シート状試料作製と同ポリマー含量 10 w/v%で作製した結果、試料の外観は糸状となり、均質な粉体試料が得られなかった。新たに希釈溶媒として酢酸ブチルを用いて調製したポリマー含量 1 w/v%及び 5 w/v%溶液から得られた試料は、5 w/v%では一部糸状試料が観察されたが、1 w/v%では均質な球状粒子の試料が得られた。しかし、球状粒子は非常に微細で帯電しやすく、試験操作上の観点から不適切であると考えられた。

シート状試料ではジクロロメタンが部位により約 1~3%残留する可能性が示唆されたが、スプレードライヤを用いて試料を作製した結果、いずれの部位も定量下限未満の良好な結果が得られた。しかしながら希釈溶媒として使用した酢酸ブチルは約 2%残留しており、スプレードライヤにおける入口温度 100℃が溶媒沸点 126℃よりも低いことが原因の 1 つとして考えられた。

カドミウム及び鉛含量において、ポリマー含量 10 w/v%及び 5 w/v%溶液から得ら

れたいずれの試料もカドミウム及び鉛の理論作製濃度に対していずれの部位でも回収率 85~105%と均質で良好な結果が得られた。

スプレードライヤに供するポリマー溶液やスプレードライヤ装置の設定条件を変えることで外観上は均質な粉体試料が得られたが、これらは帯電しやすく調査試料としての適用はできないため、これらを用いた加工等更なる検討が必要であると考え。今後は更に前回の研究報告で良好な溶解性が確認できた他の基材についても同様の検討を行う。

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：

パイロットスタディに先立ち、基材検討を行った。とうもろこしペースト及びイチゴジャムに乳タンパク質を添加し、小スケールで作製した試料について 1 か月、3.5 か月及び 8 か月の安定性を確認した。その結果、両試料とも試験結果回収までを想定した作製後 3.5 か月を超え、8 か月まで安定である結果が得られた。上記 2 基材を用いた調査試料を用いてパイロットスタディを実施した。

パイロットスタディへの参加機関は 36 機関で、すべての機関がモリナガキット及び日本ハムキットを使用したことから、これら 2 キットについて統計解析を行った。プリマハムキットとモリナガ(β LG)キットについては使用が各 1 機関と少なかったため、解析を行わなかった。

その結果、MC で除外された機関は認められなかった。Xbar 管理図では管理限界線の範囲を超える機関は 1 機関、R 管理図で管理限界線を超えた機関は全体でのべ 5 機関

認められた。Xbar 管理図で外れたデータは、z-スコアの絶対値も 3 以上となり、外れ値を示した。

以上の結果からほとんどの機関で、十分にコントロールされた試験が行われていることが推察された。

1.4 一般細菌数測定検査用調査試料の開発：

調査試料の性能評価において、冷蔵試料の生菌数測定を添加菌の添加直後、保存開始から 10、14、28、84 日後の 5 回実施した。また常温試料の生菌数測定を保存開始から 14、28 日後の 2 回実施した。いずれも 1 個の調査試料を使用し、秤量回数 2 回とした。冷蔵試料は保存開始から 84 日後まで非常に安定した生菌数を維持し、各実施日の生菌数の差も $\pm 0.5 \log \text{cfu/g}$ の範囲内であった。また添加菌添加直後と 28 日後の生菌数平均値差は $0.03 \log \text{cfu/g}$ であった。参考情報として実施した常温試料も、保存開始 14、28 日後のいずれも冷蔵試料とほぼ同等の生菌数を維持していた。

調査試料の品質評価では、パイロットスタディ用の調査試料は冷蔵保存し、その中から均質性確認試験および安定性確認用に無作為に各 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、変動係数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 カ月後に均

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。

パイロットスタディでは、対象とした全 49 機関から結果を回収した。実数解析では、データ・クリーニングにより除外される機関はなく、2 シグマ処理は実施しなかった。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 0 機関、R 管理図においては 2 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 1 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が 1 機関であった。相対標準偏差は 15.65 % であり、ゼラチン基材を調査試料とする食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査における過去 5 年間（2017 年度～2021 年度）の相対標準偏差（11～18 %）と大差のないものであった。対数解析では、データ・クリーニングにより除外される機関はなく、2 シグマ処理は実施しなかった。

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、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 2 機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関はなかった。相対標準偏差は 1.52 % であり、ゼラチン基材を調査試料とする食品衛生外部精度管理調査 一般細菌数測定検査における過去 5 年間（2017 年度～2021 年度）の相対標準偏差（1.0～2.3 %）と大差のないものであった。

なお、実数解析と対数解析を比較した

ところ、対数解析のほうがより正規分布に従っていた。一般的に微生物学的技能試験は対数解析を行っているものが多く、国際的に見ても今後の外部精度管理調査では対数解析を採用したほうがよいと考えられた。

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

手技によるバラツキの評価における黄色ブドウ球菌定性試験法の LOD₅₀ は 29～49 CFU/mL であった。また、食品試料ごとの 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。

今後複数の試験室による共同試験を行い、推定した LOD₅₀ を評価する予定である。

食品添加物試験法の妥当性に関する研究

「ソルビン酸試験法」で検討対象とした 10 種類の食品及び「二酸化硫黄及び亜硫酸塩試験法」で検討対象とした 6 種の食品はすべて室間共同試験で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として適当であると考えられた。

サイクラミン酸規定分析法改良の検討ではビスケット試料は加水量を増やし、適宜混和・攪拌することにより、チョコレートでは上澄液を 2 倍程度希釈することによ

り、たくわん漬けでは固相抽出カートリッジへの負荷液の pH 調整では顕著な回収率向上の効果は認められなかったが、米酢及びらっきょう漬けでは pH6～7 に調整することにより回収率の改善が図られた。

3 村上研究分担

当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における不確かさについて推定を行った。評価の結果、両キットの測定間と抽出間の精度は全ての項目で 10%以下となり、良好な結果を示した。一方で、室内再現精度については使用する試料とキットによって差異が確認された。室間共同試験用の試料の調製法について検討した結果、試料は調製後 84 日まで安定であり、測定阻害と改良抽出法の評価に適用できることが確認できた。このため、最終年度は試験室数を増やして改良抽出法の試験室間共同試験を実施する予定である。

4 鎗田研究分担

4.1 均質性評価のための分析法の開発

(1) 固相抽出条件の最適化

検討した 4 法で得た各フラクションを LC-MS/MS で測定した。このうち D 法については、すべての OA 群が Fr. D2 に溶出したことを確認した。

(2) マトリックス効果の評価

D 法による処理液 (Fr. D2) について、LC-MS/MS におけるマトリックス効果の影響を評価した。その結果、OA 群の感度は標準液測定における感度と同等であり、顕著なマトリックス効果は認められなかった。一方、他

の固相抽出条件によって得たフラクションでは、マトリックス効果を除去することはできなかつた。これより、検討した固相抽出条件の中ではD法が精確な測定のために最も有効であると考えられた。

(3) 正確さと再現性の評価

確立した分析法によって添加回収試験を行った。添加濃度は、ホタテガイ試料中濃度として各 0.05 mg/kg とした。その結果、0A 群の回収率はほぼ 100 % であり、下痢性貝毒検査法における正確さの要求基準である 70~120 % に十分適合していることが示された。

各日2回の分析を3日間行うことにより、室内精度を評価した。その結果、得られた室内精度は相対値として 5.8~8.3 % であり、下痢性貝毒検査法における精度の要求基準 (20 % 以下) を十分満たしていた。

4.2 検査試料の均質性評価

調製した検査試料から10本を無作為に選りだし、各瓶から異なる2か所を採取して分析した。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、瓶間のばらつきは有意ではない (P 値 >0.05) ことが確認された。

認証標準物質の生産に関する国際基準である ISO Guide 35 に則り、均質性に関する不確かさを評価した。その結果、相対標準偏差として、0A : 5.6 %、DTX1 : 5.9 % と算出された。この結果は、試験所間の分析結果のばらつきの予測値 (検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算出) よりも十分小さかつた。すなわち、昨年度調製した検査試料は、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 液体クロマトグラフィー蛍光検出法の検討

第1カラム、第2カラム及び第3カラムにおける 0A 群の保持挙動を検討し、その結果を基にカラムスイッチング条件を確立した。この条件において、まず、第1カラムの 4~6 分をハートカットして、トラップカラムへ導入した。その後、切換バルブを操作し、この分画を第3カラムに導入したところ、0A 蛍光誘導体化合物は約 13 分に、DTX-1 蛍光誘導体化合物は約 16 分に溶出した。ADAM を用いた誘導体化においては、誘導体試薬由来の成分と分析対象成分との分離が困難である場合があるが、本法ではこれらを良好に分離することができた。

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 100 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 97 %、マラチオンが 99 % 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、95~101 % 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 102 %、ダイアジノンが 96 %、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SFE法で得られた定

量値と調製値の比は、クロルピリホスが 100 %、ダイアジノンが 100 %、フェニトロチオンが 99 %、マラチオンが 99 %となり、SFE 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、72~83 %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、SFE 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。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 99 %、フェニトロチオンが 96 %、マラチオンが 96 %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クロルピリホスとフェニトロチオンの測定結果に若干の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、SFE 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 SFE 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 SFE 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 45~75 %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、46.5 %~71.6 %となった。これより、一斉試験法および SFE 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

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
- 3) 村上太郎、工藤鮎子、村野晃一、高取聡、角谷直哉、若栗忍、渡辺卓穂: ELISA 法による特定原材料 (落花生) の測定における阻害因子の解析と改良抽出法の検討: 日本食品化学学会 第 27 回総会・学術大会, WEB 開催, 2021.
- 4) 村上太郎、村野晃一、工藤鮎子、清田恭平、昌山敦、高取聡、山野哲夫: 特定原材料検査の内部品質管理における課題と不確かさの推定: 第 58 回全国衛生化学技術協議会年会, WEB 開催, 2021.

- 5) 上原由理香, 鳥居塚南, 鎗田 孝 : LC-MS/MS によるホタテガイ中下痢性貝毒(オカダ酸群)分析における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討, 第 27 回 LC&LC/MS テクノプラザ (Web 開催) 2022.
- 6) 中村圭介, 大竹貴光, 羽成修康 : ネギ中のネオニコチノイド系農薬分析における超臨界流体抽出法の評価、日本食品衛生学会第 117 回学術講演会、Web 開催、2021
- 7) 中村圭介, 大竹貴光, 羽成修康 : Evaluation of the automatic extraction techniques for the determination of neonicotinoid pesticides in green onion、The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021)、Web 開催、2021

F. 知的所有権の取得状況

なし