

令和4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およ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	埼玉県衛生研究所
研究協力者	今井 浩一	埼玉県衛生研究所
	千葉 雄介	川口市保健所
	茂呂 寛貴	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。ISO 16140-3:2021 では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。しかし、わが国では E. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法が広く活用されているにも関わらず、試験法に LOD₅₀ が設定されていないため、試験法導入時の性能評価ができないのが現状である。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、E. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法の LOD₅₀ の推定を試みた。令和3年度までの研究により推定された LOD₅₀ は E. coli 定性試験法で 14~27 CFU/g、黄色ブドウ球菌定性試験法で 25~48 CFU/g であった。令和4年度は LOD₅₀ が最大、最小であった食品試料について、5 試験室による試験室間での比較を行った。両試験法とも推定した LOD₅₀ に対していずれの試験室においても ISO 16140-3 : 2021 に規定された許容限界である 4 倍以内の結果であったことから、推定した LOD₅₀ は妥当な数値であったと考えられた。

一方、サイクラミン酸、サイクラミン酸ナトリウム及びサイクラミン酸カルシウムは我が国では使用が認められていない指定外添加物（甘味料）である。これらの試験法は厚生労働省から通知（規定分析法）されており、令和2年度は8種の食品群について適用性を検討した。そのうち「ビスケット」、「チョコレート」、「米酢」、「らっきょう漬け」及び「たくあん漬け」の5食品群で、回収率等の面で改良する必要があると考えられた。令和3年度はこれら5食品群について改良法を報告した。令和4年度はさらに「ビスケット」及び「たくあん漬け」について、令和4年度に報告した改良法に加え、ホモジナイズ抽出が有効であることを確認した。また、規定分析法では、定量下限値レベルでの感度や連続注入による保持時間の変動等が問題となったことから、新たな誘導体化法による新規分析法を開発した。オレ

ンジジュース、ブルーベリージャム及びりんごゼリーを対象とし、適用性を検討した。いずれの試料においても感度、夾雑ピークとの分離及び回収率（104～109%）等、良好な結果が得られた。

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

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/IEC17025 : 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。微生物定性試験において「陰性」は培地中で発育し得る細菌が0であり、「陽性」は1以上であることを示す。しかし、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、試料中に細菌が存在していても、確実に検出できるとは限らない。また、培地への接種前に試料の希釈を要する試験法の場合、その手技からの影響による誤差や、粘性などの試料の特性によっても検出感度に

影響を及ぼす可能性が考えられる。したがって、この値以上の細菌が存在していれば確実に検出可能である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。

日本の公定法は、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌等、一部の試験において食品からの微生物標準試験法検討委員会により標準試験法として妥当性確認が行われ、公定法として採用されている。一方、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。また黄色ブドウ球菌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。

E. coliおよび黄色ブドウ球菌定性試験法は我が国では2021年に廃止された衛生規範などで広く用いられてきた。食品衛生法上のE. coliは44.5℃で発育し、乳糖を分解してガスを産生する細菌群である。細菌学分類学上の*Escherichia coli*と必ずしも一致しないが、動物の糞便汚染指標として用いられてきた。また、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おり、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用いられてきた。

衛生規範の廃止により食品衛生法に基づく衛生指標はなくなり、各事業者による自主基準による衛生管理が求められるようになった。一方で、すべての事業者が独自の衛生基準を設定するのは難しく、旧衛生規範を参考にしたE. coli および黄色ブドウ球菌定性試験法は今後も活用されると考えられる。しかし、妥当性確認が不十分であることから、LOD₅₀が設定されておらず試験法導入時の性能評価ができないのが現状である。そこで本研究ではE. coliおよび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。

令和3年度までの研究により、単一試験室において推定されたLOD₅₀はE. coli定性試験法で14~27 CFU/g、黄色ブドウ球菌定性試験法で25~48 CFU/gであった。令和4年度はLOD₅₀が最大、最小であった食品試料について、5試験室による共同試験を行い、試験室間での比較により単一試験室において推定されたLOD₅₀が妥当な数値であったか検討した。

B. 方法

群馬県食品安全検査センター、越谷市衛生試験所、千葉市環境保健研究所、横浜市衛生研究所に御協力をいただき、ISO 16140-3 : 2021のプロトコル1を参考にして5試験室による共同試験を実施し、推定されたLOD₅₀と各試験室におけるeLOD₅₀を比較した。プロトコル1に記載されている手法とは、LOD₅₀と同程度の細菌接種試料を $n=4$ 、LOD₅₀の3倍濃度を $n=4$ 、LOD₅₀の9倍濃度を $n=1$ およびブラン

ク試料を $n=1$ で試験を実施し、陽性と判定された試料数を表1 (ISO 16140-3 : 2021から抜粋) に当てはめることで、実施した試験法のeLOD₅₀を算出するものである。なお、LOD₅₀の算出法と比べ、試料数が少ないことからISO 16140-3 : 2021においてeLOD₅₀ (推定されたLOD₅₀) と定義されている。試料には各試験法で推定されたLOD₅₀が最大または最小であった食品を用いて検討を行った。E. coli定性試験法ではオクラとピラフ、黄色ブドウ球菌定性試験法ではチャーハンとソーセージを供試した。試料への接種菌株は、BioBall HD 10K *Escherichia coli* NCTC9001 (使用ロット番号B6556、9536.0 CFU) およびBioBall HD 10K *Staphylococcus aureus* NCTC10788 (使用ロット番号B6452、10518.0 CFU) (いずれもbioMérieux) を使用した。E. coli定性試験法ではリン酸緩衝液(PB) 6 mLに4粒または2粒を懸濁し、それぞれオクラ、ピラフ用の接種菌原液とした。黄色ブドウ球菌定性試験法では6粒または3粒を懸濁し、それぞれチャーハン、ソーセージ用の接種菌原液とした。接種菌原液をPB6 mLで3段階階希釈し、3倍および9倍希釈したものを接種菌液とした。フィルター付きストマッキング袋に採取した試料25 gに、接種菌原液または接種菌液を1 mLずつ接種し、細菌接種試料とした。試料中の菌濃度を高い方から d_1-d_3 (CFU/g) (供試菌株の試験成績書を基に算出した試験ごとの菌濃度を各表の注釈に記載) とした。細菌接種試料の調製は各試験室で行った。菌濃度 d_1 CFU/gの細菌接種試料は $n=1$ で、 d_2 、 d_3 CFU/gは $n=4$

で、ブランク試料も $n=1$ で実施した。

E. coli定性試験法は冷凍食品の規格基準に規定された試験法を用いた。細菌接種試料にPB225 mLを加えてストマッキング後、その10 mLをPB90 mLに加えて混和し、100倍希釈液とした。3本のEC発酵管に100倍希釈液各1 mLを接種し、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で 24 ± 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。

黄色ブドウ球菌定性試験法では食肉製品の規格基準に規定された試験法を用いた。細菌接種試料にBPW225 mLを加えてストマッキングし10倍希釈液を調製した。10倍希釈液を0.1 mLずつ選択分離寒天培地（3%卵黄加マンニット食塩寒天培地(MSEYA)またはベアード・パーカー寒天培地(BPA)）2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枚の選択分離寒天培地のいずれかに1コロニー以上の黄色ブドウ球菌の定型集落（MSEYA：黄色集落でその周囲に卵黄反応、BPA：黒色または灰色集落で周囲に透明帯、集落辺縁に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た。

培地等は各試験室で通常用いている製品により試験を実施した。黄色ブドウ球菌定性試験の公定法では選択分離寒天培地としてMSEYAとBPAが選択可能であるため、各試験室で通常使用しているものを用いて実施した。事前に食品試料がE. coli定性試験法ではEC発酵管でガス産生せず、黄色ブドウ球菌定性試験法では選択分離寒天培地上で定型集落が発育しないことを確認していたため、EC発酵管の

ガス産生の有無または選択分離寒天培地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。陽性と判定した試料数に応じて、ISO16140-3：2021から抜粋した表1を基に $e\text{LOD}_{50}$ を求め、 LOD_{50} と比較した（例：試料中の菌濃度 d_1 の陽性試料数が1、 d_2 が3、 d_3 が2のとき、 $e\text{LOD}_{50}=1.3 \times \text{LIL}(\text{Low inoculation level})=1.3 \times d_3$ (CFU/g)）。

C. D. 研究結果および考察

オクラおよびピラフを試料としてE. coli定性試験を行った結果を表2に示した。各試験室において得られた $e\text{LOD}_{50}$ は、オクラで14-48 CFU/g、ピラフで21-40 CFU/gであった。ピラフの LOD_{50} は14 CFU/gでオクラの27 CFU/gと比べると2倍程度の差があったが、各試験室の $e\text{LOD}_{50}$ ではオクラと同程度であった。 LOD_{50} との比はオクラで0.52-1.8倍、ピラフで1.5-2.9倍であった。

各試験室で使用したPBはLSIメディアエンス製のインスタント緩衝溶液(pH 7.2)が2施設で、LSIメディアエンス製のインスタント緩衝溶液(pH 7.4)、栄研化学製のバッグドメディアリン酸緩衝希釈水225および自家調製したものが各1施設であった。EC培地は全施設で粉末製品から調製しており、栄研化学製が4施設、日水製薬製が1施設であった。

チャーハンおよびソーセージを試料として黄色ブドウ球菌定性試験を実施した結果を表3に示した。各試験室において得られた $e\text{LOD}_{50}$ は、チャーハンで23-108 CFU/g、ソーセージで16-40 CFU/gであった。 LOD_{50} との比はチャーハンで0.49-2.3倍、ソーセージで0.66-1.6倍

であった。

各試験室で使用した選択分離寒天培地はMSEYAが3施設でBPAは2施設であった。MSEYAは3施設とも栄研化学製の粉末培地から調製しており、卵黄液には極東製薬工業製、OXOID製、自家調製品をそれぞれ用いていた。BPAは2施設とも生培地を使用しており、それぞれ日水製薬製、bioMérieux製であった。また、選択分離寒天培地への接種にはいずれの施設でもメスピペットを用いており、その容量は1 mLが2施設、2.2 mL、2 mL、0.1 mLが各1施設であった。

各試験室で得られたeLOD₅₀をLOD₅₀と比較すると、いずれも4倍以内であった。ISO 16140-3：2021では、試験性能の検証時に算出されたeLOD₅₀が、LOD₅₀の4倍以内であることを許容限界として規定している。本研究で推定したLOD₅₀に対して、試験室間比較において得られたeLOD₅₀は4倍以内であったことから、推定したLOD₅₀は妥当な数値であると考えられた。また、以上から試験室間において両試験法とも同程度の試験性能を有すると推察された。

試験室間比較では技術の差だけではなく、異なる培地間での比較も期待した。E. coli定性試験法では使用した培地に偏りはあったものの、異なる希釈液、培地を用いてもeLOD₅₀に大きな差はなかった。黄色ブドウ球菌定性試験法では選択分離寒天培地としてMSEYAを使用した試験室とBPAを使用した試験室があったが、eLOD₅₀に大きな差はなかった。また、0.1 mLを測定するピペットの容量により差が生じる可能性も考えていた。

全試験室でマイクロピペットではなく、メスピペットを使用しており、その容量は0.1 mLから2.2 mLと幅広かったが大きな影響はなかったと考えられた。

E. 結論

共同試験による試験室間で比較により、単一試験室において推定されたE. coli定性試験法、黄色ブドウ球菌定性試験法のLOD₅₀が妥当な数値であったと推察された。

本研究ではE. coliおよび黄色ブドウ球菌定性試験法を対象として、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研究を行った。本来LOD₅₀は妥当性確認時に設定するものである。しかし、E. coli定性試験は衛生指標菌として国内では広く実施されているが、海外では腸内細菌科菌群試験が主流として実施されている。近年国際的な整合性を主眼として公定法の見直しが行われている中で、E. coli定性試験法の妥当性確認は当面実施されないものと考えられる。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、すでにNIHSJ法として本研究で用いた集落計数法のほかに最確数法が妥当性確認されている。しかし、いずれの試験法も定量試験法であるため、今後定性試験法として妥当性確認し、LOD₅₀が設定される見込みはないと予想される。また、最確数法による選択増菌培養は集落計数法より検出率が高いと報告されている^{1,2)}。しかし、食品衛生法において採用されている黄色ブドウ球菌試験法は集落計数法のみであったことから、これまで集

落計数法が定性試験法として広く用いられてきた。また、最確数法は集落計数法と比べ試料接種量が100倍以上となり、従前行われてきた基準値と比べ非常に厳しくなるため、集落計数法が今後も定性試験法として用いられていくと推察される。以上より、両試験法とも定性試験法として当面はLOD₅₀が規定されないと考えられる。しかし、今後ISO/IEC 17025 : 2017が普及し、試験法の性能評価が求められる中で、各試験法の性能の目安が必要になると考え、本研究によりその目安を提示した。

ISO 16140-3 : 2021には妥当性確認が実施されていない食品カテゴリーに対する検証の手法も記載されている。培地への接種試料中の菌数が1 CFUであるときをLOD₅₀とみなして、本研究と同様の手法により検証して得られたeLOD₅₀がその4倍以内、すなわち4 CFU以下を許容範囲としている。共同試験によって得られたeLOD₅₀は試料接種量中の菌数に換算するとE. coli 定性試験法で0.42-1.4 CFU、黄色ブドウ球菌定性試験法で0.32-2.2 CFUであったため、4 CFU以下の許容範囲を十分に満たしており、今回の検討結果では試験性能の目安がなくても検証は可能であった。しかし、もし4 CFU以上となってしまう場合、試験室内の手法、技量の問題なのか、試験法自体の問題なのかの判断が難しい。試験法ごとにどの程度の性能が求められるかを明らかにする必要があると考える。本研究の結果を、各試験室での試験性能の検証における一つの指標として活用していただけることを期待している。

参考文献

- 1) 松村浩介ら：日食微誌，26，23-27 (2009).
- 2) 中峰 松ら：日食微誌，23，217-222 (2006).

食品添加物試験法の妥当性評価法

A. 研究目的

サイクラミン酸（以下「CY」という。）、サイクラミン酸ナトリウム（以下「CY-Na」という。）及びサイクラミン酸カルシウムは、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CY類が検出され、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4年度では健康食品や調味料、レトルト殺菌食品、漬物等からCY類が検出されている¹⁾。

CY類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。

規定分析法の妥当性評価のための検討として、一昨年度は、8種類の食品に対し添加回収試験を実施した。その結果、「ビスケット」、「チョコレート」、「米酢」、「らっきょう漬け」及び「たくあん漬け」の5食品について、改良法の検討が必要と考えられた。このため、昨年度は、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、らっきょう漬け及びたくあん漬けはpHの調整等についての検討を行った。

その際、ビスケット及びたくあん漬けの検討において、CYが試料に吸着した可能性が示唆されたことから、今年度は、ホモジナイザーを用いた規定分析法の改良法を検討することとした。

規定分析法は、簡便で有用な測定法であるが、先述のとおり試料の種類によって添加回収率が低くなることがある。また、感度についての難点もあり、装置によっては測定が難しいこともある。これは、CYの誘導体であるN,N-ジクロロシクロヘキシルアミン（以下「N,N-DCCA」という。）を測定対象としていることと、試験溶液がヘキサン溶液であることによる。規定分析法では、CYをN,N-DCCAに誘導体化し、ヘキサンに転溶媒し、高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）によって測定することとなっているが、これは、CYが吸収波長をもたず、紫外外部吸収検出器で検出することができないためである。しかし、N,N-DCCAの吸収もそれほど強いものではなく、規定分析法における定量下限（試料中濃度として0.01 g/kg）の試験溶液のピーク面積も小さい。また、移動相（アセトニトリル（以下「ACN」という。）・水混液（70:30）にヘキサン溶液である試験溶液を注入するため、注入量が多すぎると連続注入時の保持時間が変動することから、注入量を増加させることは困難である。加えて、N,N-DCCAは揮発性が高く、誘導体化後速やかに測定することが望ましく、試験溶液の保存には工夫が必要である。以上のような難点を解消するため、規定分析法と異なる誘導体化法を用いた新規分析法を検討した。

B. 方法

1. 規定分析法の改良の検討

規定分析法は、下記概略図のとおりである。

試料 10 g

水40 mL
沸騰水浴中で15分間加熱
冷却後水を加えて正確に100 mL…①
①の一部を採取し、遠心分離
(3500 rpm、10分)

上澄液 10 mL…②

固相抽出カートリッジ（上）及び陰イオン交換カートリッジ（下）を連結し、②を負荷
水10 mLを通過
固相抽出カートリッジを除去
塩酸（1→100）10 mLで陰イオン交換カートリッジから溶出

精製液 全量

硫酸（1→2） 2 mL
ヘキサン 5 mL
次亜塩素酸ナトリウム試薬 1 mL
激しく1分間振とう
水層を除去

ヘキサン層

5%炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL
1分間振とう

試験溶液

なお、固相抽出カートリッジとして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。

昨年度の検討より、ビスケットにおいては、加熱時にビスケットが餅状になったもの（以下「餅状物質」という。）が生成し、CYが餅状物質内に囚われたことにより、添加回収試験における回収率が低値となったものと考えられた。また、たくあん漬けについては、水中で加熱することにより、CYがたくあん漬けに吸着した可能性が示唆された。このため、規定分析法における加熱工程とメスアップ工程の間にホモジナイザーで餅状物質やたくあん漬けを粉碎・均一化（1分間）する工程を追加し、固相抽出法とスクリーニング法における回収率を確認した。

添加回収試験の試料としては、昨年度と同じ食品（別ロット品）について、CYが含有されていないことを確認した後、用いた。試験は、n=2で行った。添加濃度は、100 µg/gとした。

2. 新規分析法の開発

(1) 試料

試料は、埼玉県内で市販されていた1) オレンジジュース、2) ブルーベリージャム、3) りんごゼリーを用いた。ブルーベリージャムとりんごゼリーは、ホモジナイザーで均一化してから使用した。

(2) 試薬、試液

サイクラミン酸ナトリウム標準品：純度100.1%（富士フィルム和光純薬製）
N-シクロヘキシルベンズアミド標準品：

純度95%（Angene Chemical製）及び純度99.9%（FluoroChem製）

ACN：HPLC用（関東化学製）

塩酸：特級（関東化学製）

塩酸（8 mol/L）：少量の水に塩酸16 mLを加え、更に水を加えて24 mLとする。

過酸化水素水（30%）：特級（富士フィルム和光純薬製）

過酸化水素水（3%）：過酸化水素水（30%）10 mLに水を加えて100 mLとする。

塩化ベンゾイル：特級（富士フィルム和光純薬製）

塩化ベンゾイル（1%）ACN溶液：塩化ベンゾイル1 mLにACNを加えて100 mLとする。

水酸化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

水酸化ナトリウム（2 mol/L）：水酸化ナトリウム40 gを水に溶かして500 mLとする。

トリエチルアミン：特級（富士フィルム和光純薬製）

シクロヘキシルアミン：特級（富士フィルム和光純薬製）

(3) 検量線用標準液の調製

標準原液：CY-Na112 mgを正確に量り、水を加え正確に100 mLとする。

標準溶液（用時調製）：標準原液10 mLを量り、水を加え正確に100 mLとする（この液1 mLは、CY100 µgを含む）。

検量線用標準溶液（用時調製）：100 µg/mL標準溶液 0, 5, 10, 20, 50 mLを量り、水を加え正確に100 mLとする（これらの液1 mLは、CY 0, 5, 10, 20 µg及び

50 µgを含む)。

(4) 装置

HPLC : Agilent 1260

ホモジナイザー : ヒスコトロン (マイクロテック・ニチオン製)

(5) HPLC測定条件

移動相 : ACN・水 (60:40)

カラム温度 : 40°C

カラム : zorbax Eclipse Plus C18 4.6×25cm (5µm) (Agilent)

流速 : 1.0 mL/分

測定時間 : 20分

注入量 : 20 µL

測定波長 : 190~400 nm

モニター波長 : 254nm (定量) ,
230nm, 265nm

(6) 検量線

検量線用標準溶液それぞれ2 mLを後述する(9) 試験溶液の調製 ウ 分解及びエ 誘導体化 の項に従って操作したのち、HPLCで測定し、ピーク面積からCYの検量線を作成する。

(7) 定量

試験溶液をHPLCで測定し、得られたピーク面積と検量線から試験溶液中のCY濃度 (µg/mL) を求め、次式によって試料中のCY含量 (µg/g) を計算する。

CY含量 (µg/g) = (A×100)/W

A : 試験溶液中のCY濃度 (µg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

(8) 添加試料の調製

試料10.0 gに標準溶液(100 µg/mL)2 mLを添加しよく混合した後、30分間放置した。

(9) 試験溶液の調製

ア 抽出

試料をそのまま、あるいは細切もしくは粉砕機で粉砕後、10.0 gを精密に量り、水70 mLを加えて沸騰水浴中で15分間、必要に応じてガラス棒等で攪拌しながら加熱する。冷却後、水を加えて正確に100 mLとし、抽出液とする。

イ 精製

抽出液の一部を採取し、3500 rpmで10分間遠心分離して上澄液10 mLを正確に量り採り、固相抽出カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジをこの順番に接続したものに負荷する。水10 mLで洗浄した後、固相抽出カートリッジを除去する。陰イオン交換カートリッジを塩酸(以下「HCl」という。)(1→100)で溶出させ、溶出液を10mLにメスアップし精製液とする。

ウ 分解

精製液2 mLを正確に採り、これにHCl (8 mol/L) 0.5 mLと過酸化水素水(以下「H₂O₂水」という。)(3%) 0.5 mLを加え、沸騰水浴中で30分間加熱し加水分解し、分解液とする。

エ 誘導体化

分解液全量に水酸化ナトリウム(以下「NaOH」という。)(2 mol/L) 4.5 mLと塩化ベンゾイル(以下「BC」という。)(1%) ACN溶液 2 mLを加え、振とうする。HCl (8 mol/L) でpHを中性付近に調

整し、水で10 mLにメスアップして試験溶液とする。

(10) 反応式 (図1)

(11) 試験溶液の調製法概略 (図2)

C. D. 研究結果および考察

1. 規定分析法の改良の検討

ビスケットでは、加熱・放冷後に餅状物質が生成した。餅状物質をホモジナイザーで1分破碎したところ、餅状物質が消失し、均一な溶液となった。平均回収率は、固相抽出法が94.3%、スクリーニング法が94.5%となった。(表4)

たくあん漬けにおいても、同様にホモジナイズし、それから上澄液を調製したところ、平均回収率は、固相抽出法が93.9%、スクリーニング法が102.8%となった。(表5)

以上より、ビスケットの分析では、昨年度に考察したように加水量を増やしたり、混和・攪拌したりしながら上澄液の調製を行うことに加え、餅状物質をホモジナイズすることも有効であると考えられた。また、たくあん漬けについても、ホモジナイズは回収率の向上につながるものと考えられた。

2. 新規分析法の検討

(1) 誘導体の検討

新規分析法については、規定分析法と同様にHPLCにて測定でき、かつ、感度も同等かそれ以上あり、そして、移動相と試験溶液がACN・水混液となるような方法を開発することとした。この条件を満た

した方法について論文を検索したところ、Li²⁾らの報告が挙げられた。報告では、シリンジに試料、過マンガン酸カリウム及びシリカゲルの混合物を充填し、HClを浸透させ、プランジャーによる加圧下で2-クロロシクロヘキサノンに誘導体化し、HPLC (モニター波長: 310 nm) で測定していた。そのため、Liらの報告を基に検討を開始したが、感度や誘導体化率等の点で規定分析法に比べて良好な結果が得られなかったことから別の誘導体化法を検討することとした。

CYの分解産物であるシクロヘキシルアミン (以下「CA」という。) のアミノ基には求核性があるため、これを活かした置換反応による誘導体化法を検討した。求電子剤であるBCとCAを反応させ、生じるN-シクロヘキシルベンズアミド (以下「N-CBA」という。) を検出、定量する方法を検討することとし、誘導体化の最適条件を検討した。N-CBAの標準物質を2メーカー (Angene Chemical製、FluoroChem製) から購入し、検出波長や保持時間を確認した。両社の標準品をACN・水混液に溶解し、規定分析法のHPLC条件で測定したところ、230 nm付近に強い吸収を持つことを確認した (図3—1及び4)。

(2) 測定条件の検討

カラム、カラム温度、流速は規定分析法に基づき設定した。

移動相は、規定分析法に基づくACN・水混液 (70:30) ではN-CBAの保持時間が約4分で夾雑ピークとの分離に難があった。一方、ACN・水混液 (60:40) では保持時間は約5.4分で夾雑ピークとの分離は良好

であったため、こちらを採用することとした。

注入量は、20 μL とした。規定分析法の倍の量ではあるが、試験溶液がACNと水の混液であるため、連続注入時でも保持時間の変動及びピーク形状の悪化は認められなかった。

モニター波長には、254 nm、230 nm及び265 nmの3波長を用いた。N-CBAは230 nm付近に強い吸収を有しているものの、同時に夾雑ピークも多く確認されたため、より夾雑ピークの少ない254 nmにおけるピーク面積から検量線を作成することとした。

(3) CAとBCを用いた誘導体化の検討

CAとBCの反応は求核アシル置換反応であり、CAのアミノ基 (R-NH_2) がBCのC=O結合に付加し、中間体を経て、BCの塩素基 (R-Cl) が脱離する³⁾。(図1) BCは酸塩化物 (R-COCl) であり、強く分極しているため反応性が高い³⁾。はじめに10 mLのACN中にてCA (1 μmol) をBC (1 μmol) と反応させたところ、生成物のピークはN-CBAの標準溶液のピークと保持時間が一致し、スペクトルも一致した。しかし、N-CBAの標準溶液から作成した検量線で定量し、分子量に基づいて変換率を算出したところ、67.9%であった。これは、本誘導体化では副生成物として塩化水素が生成し、この塩化水素がCAと酸塩基反応を起こして反応性が低下したことによるものと考えられた。そこで、トリメチルアミン (以下「TA」という。) で塩基性条件にして誘導体化を行った。ここで、CAの分子量に対するBCとTAの必要量を推定す

るため、10 mLのACN中にてCA (1 μmol) をTA (0~50 μmol) 下でBC (1~50 μmol) と反応させたところ、TA (1~50 μmol) 下ではほぼ全量のCAがN-CBAに誘導体化した。(表6) なお、BCは量が多いと夾雑ピークが増え、TAは量が多いとベースラインが安定せず、かつ夾雑ピークも少々見受けられるようになった。

次に、ACN・水混液中にてCAをTA下でBCと反応させたところ、BCが水によって加水分解され安息香酸になり、誘導体化率が低下した。そこでBCを過量に添加したところ、BCの量が多すぎた場合、ACN・水混液がACN層と水層の2層に分離した。このため、分解液を希釈・分取し、これに分離しない程度の量のBCを加えることとした。

また、分解液を塩基性条件にするための試薬として、先の検討で使用したTAではなく扱いやすいNaOHを用いて検討したところ、十分に誘導体化されたことから、以後の検討ではNaOHを採用した。

なお、本誘導体工程では塩素ガスが発生する為、安全上の観点から、ドラフト内で操作を行った。

(4) CYからCAへの分解の検討

CYからCAへの分解条件について検討したところ、児島ら⁴⁾や一番ヶ瀬ら⁵⁾がHCl酸性下で H_2O_2 水と加水分解する方法について報告しており、児島らは、CY-Na液 (1000~10000 $\mu\text{g/mL}$) 2 mLに対しHCl (1 mol/L) 0.5 mLと H_2O_2 水 (3%) 0.5 mLを加え沸騰水浴中で2時間加熱したところ、CAの生成率は約80%であり、生成したCAの約20%が H_2O_2 水によって酸化をうけたと考察してい

る。

以上を基にHClの濃度と加熱時間の検討を行った。CY標準溶液(100 µg/mL) 2 mLに対しHCl(1~12 mol/L) 0.5 mLとH₂O₂水(3%) 0.5 mLを加え沸騰水浴中で加熱(15~60分)し、水で10 mLとした。その後、分解液から1 mL分取し、NaOHで塩基性とした後、ここにBC(1%) ACN溶液1 mLを加えて反応させ、水で5 mLにメスアップし、試験溶液とした。N-CBAの標準原末から希釈系列を調製し、検量線を作成し、試験溶液の濃度を測ることでCYの加水分解率を算出・比較したところ、2 mol/L以上の濃度のHClで60分間加熱すれば、9割以上のCYが加水分解することが明らかとなった。(表7)そこで、試料マトリクスの影響や操作性を考慮し、試料2 mLに対し、HCl(8 mol/L) 0.5 mLを加えて酸性とし、H₂O₂水(3%) 0.5 mLを加え沸騰水浴中で30分加水分解する操作を採用した。

また、本分解工程では塩素ガスが発生する為、安全上の観点から、ドラフト内で操作を行った。

(5) 抽出・精製の検討

これまでの標準溶液で検討した誘導体化の最適条件が試料マトリクス存在下においても適用可能か、ブルーベリージャムのブランク試料を用いて分解・誘導体化したところ、クロマトグラムに夾雑ピークが多数生じてしまった。このため、精製工程を追加で検討した。

抽出・精製工程は、B.1に示した規定分析法を参考に検討した。昨年度の検討結果を踏まえ、新規分析法では、加水量を70 mLとし、必要に応じて加熱時にガラス

棒等で攪拌することとした。また、規定分析法では精製液を全量使用するが、新規分析法では、HCl(1→100)で陰イオン交換カートリッジから溶出し、10 mLにメスアップすることとし、精製液のうち2 mLのみ使用することとした。

以上を基にブルーベリージャムを用いて添加回収試験($n=2$ 、添加濃度100 µg/g)を行ったところ、回収率は101.0%と良好であり、夾雑ピークも認められなかった。しかし、抽出・精製工程を追加したことにより、定量下限値が規定分析法よりも5倍高くなった。このため、誘導体化工程における分解液の分取工程を削除し、分解液は塩基性にした後、BCで誘導体化し、pH調整後に10 mLにメスアップすることとし、最終的な添加回収試験を行うこととした。

(6) 添加回収試験

添加回収試験の試料としては、規定分析法を用いてCYが含有されていないことを確認した後、オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリーを用い、B.2.のとおり試験した。試験は $n=2$ で行い、添加濃度は20 µg/gとした。

ア 保持時間、スペクトル

N-CBAの標準原末を2メーカーから(Angene Chemical製、Fluorochem製)購入し、秤量後、60%ACN溶液に溶解してN-CBA標準溶液を調製した。N-CBA標準溶液と検量線用標準溶液、試料の試験溶液の保持時間、スペクトルを比較したところ、3者は一致した(図3-1及び4)。

イ 検量線

相関係数 (r) は0.99942であり、良好であった。また、検量線の定量下限値相当 (試料中濃度としてCY 10 μ g/g) のピークのS/N比は15.8であり、本HPLCを用いて規定分析法における定量下限 (試料中濃度としてCY 10 μ g/g) を測定した際のピークの平均S/N比 (11程度) と同程度であった。

ウ 添加回収試験

(ア) 新規分析法

オレンジジュース、ブルーベリージャム及びりんごゼリーを用いて添加回収試験を実施したところ、平均回収率は順に104.0%、114.5%、108.8%となり良好であった。(表8)。今後は、ビスケットやチョコレートといった、より夾雑物質が多いと考えられる食品でも添加回収試験を実施し、新規分析法を評価する必要がある。

(イ) 規定分析法等との比較

新規分析法の性能を評価するため、規定分析法の誘導体化法を用いた以下の3種類の添加回収試験を実施し、平均回収率を比較した (図3-1及び3-2)。

まず、水、オレンジジュース、ブルーベリージャム及びりんごゼリーを用い、規定分析法のとおり試験溶液を調製し、添加回収試験 ($n=2$ 、添加濃度20 μ g/g) を行った。平均回収率は、順に97.4%、98.0%、90.1%及び85.7%であった。

次に、先の4種の試料を用い、新規分析法で採用した抽出工程に基づき抽出し、その後は規定分析法のとおり試験溶液

を調製し、添加回収試験 ($n=2$ 、添加濃度20 μ g/g) を行った。平均回収率は、順に99.4%、102.5%、93.5%及び90.3%となり、規定分析法に比べ平均回収率に若干の向上が見られた。

最後に、抽出工程に加え、精製工程も新規分析法のものに変更し、その後は規定分析法のとおり試験溶液を調製し、添加回収試験 ($n=2$ 、添加濃度20 μ g/g) を行った。平均回収率は、順に102.5%、101.3%、94.4%及び90.1%となり、抽出のみ変更したものと同程度であった。

新規分析法における添加回収試験の結果は、上記の結果と比べても遜色ないのであった。今回の検討から、新規分析法と規定分析法は同等の性能を有するものと考えられた (表9)。

(7) 今後の展望

新規分析法の定量下限値は、現時点では規定分析法のものと同等である。ただし、N-CBAは常温で不揮発性であるため、濃縮工程を設けることで定量下限値を下げられる可能性がある。N-CBA及びCAは、これらをACN・水混液に溶解させ、溶液をNaOHで塩基性にして飽和量の塩化ナトリウムを加え水層とACN層に分離させたとき、全量ACN層に移行する。N-CBAはそのまま、CAはACN中で誘導体化した後ACNをエバポレーターや窒素吹付で濃縮すれば、より濃度の高い試験溶液を調製することが可能と考えられる。また、今回、検討した食品群以外の食品に対する適用性についても、引き続き検討する。

E. 結論

CYの規定分析法の改良については、添加回収試験における回収率に問題が認められたビスケット、たくあん漬けについて検討を行った。両食品とも、試料自体がCYを吸着したため、添加回収試験における回収率が低下していた。このため、抽出工程における加熱・冷却からメスアップまでの間にホモジナイザーを用いて試料を粉碎したところ、両食品とも回収率は向上した。以上より、ホモジナイザーで試料を粉碎することは、回収率の向上につながると考えられた。

CYの新規分析法については、CYを加水分解後、BCと反応させてN-CBAに誘導体化しHPLCで測定する方法を開発した。新規分析法と規定分析法と比較したところ、感度は同程度であり、3種類の食品を用いた添加回収試験の結果も良好であった。今後は、様々な食品で添加回収試験を実施し、性能を評価していく。合わせて、本分析法を改良（定量下限値等）するため、引き続き検討していく。

参考文献

1)

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html

2) Jianjun Li et al, :On-cartridge derivatisation using matrix solid phase dispersion for the determination of cyclamate in foods. Analytica Chimica Acta, 972, 46-53 (2017)

3) J. McMurry著 伊東椒、児玉三明ほか訳『マクマリー有機化学（中）第9版』株式会社東京化学同人, p. 803-807

(2017)

4) 児島昭次、一番ヶ瀬尚：人工甘味料に関する研究（第2報）サイクラミン酸ナトリウムの比色定量 その1. 薬学雑誌, 83, 1108~1114 (1963)

5) 一番ヶ瀬尚、児島昭次：人工甘味料に関する研究（第1報）サイクラミン酸ナトリウム、ズルチンおよびサッカリンナトリウムのペーパークロマトグラフィー. 薬学雑誌, 82, 1616-1620 (1962)

<本報告における略語一覧>

ACN：アセトニトリル

BC：塩化ベンゾイル

CA：シクロヘキシルアミン

CY：サイクラミン酸

CY-Na：サイクラミン酸ナトリウム

H₂O₂水：過酸化水素水

HCl：塩酸

HPLC：高速液体クロマトグラフ

NaOH：水酸化ナトリウム

N-CBA：N-シクロヘキシルベンズアミド
N, N-DCCA：N, N-ジシクロヘキシルアミン

規定分析法：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

餅状物質：加熱時にビスケットが餅状になったもの

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 千葉雄介・金井美樹・藤原 茜・高瀬冴子・荒島麻実・土井りえ・島田慎一・石井里枝：E. coliおよび黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値の推定，日食微誌，39(4)，132-140(2022)

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

なし

以下 図表等

表1 各濃度の菌接種濃度の陽性試料数に基づく eLOD₅₀ (estimated LOD₅₀) の算出表
(ISO 16140-3:2021 より抜粋)

高濃度 (d_1 CFU/g)	中間濃度 (d_2 CFU/g)	低濃度 (d_3 CFU/g)	ブランク	eLOD ₅₀ (CFU/g)
1/1 ^{*1}	4/4	4/4	0/1	<1.0×LIL ^{*2}
1/1	4/4	3/4	0/1	=0.5×LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	=0.7×LIL
1/1	4/4	1/4	0/1	=1.0×LIL
1/1	4/4	0/4	0/1	=1.5×LIL
1/1	3/4	4/4	0/1	=0.7×LIL
1/1	3/4	3/4	0/1	=1.0×LIL
1/1	3/4	2/4	0/1	=1.3×LIL
1/1	3/4	1/4	0/1	=1.7×LIL
1/1	3/4	0/4	0/1	=2.3×LIL
1/1	2/4	4/4	0/1	=1.1×LIL
1/1	2/4	3/4	0/1	=1.5×LIL
1/1	2/4	2/4	0/1	=1.9×LIL
1/1	2/4	1/4	0/1	=2.6×LIL
1/1	2/4	0/4	0/1	=3.7×LIL
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result
1/1	1/4	3/4	0/1	=2.1×LIL
1/1	1/4	2/4	0/1	=2.8×LIL
1/1	1/4	1/4	0/1	=4.0×LIL
1/1	1/4	0/4	0/1	=6.3×LIL
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result
1/1	0/4	3/4	0/1	=3.0×LIL
1/1	0/4	2/4	0/1	=4.3×LIL
1/1	0/4	1/4	0/1	=6.7×LIL
1/1	0/4	0/4	0/1	=14.0×LIL

*1 陽性試料数／試験実施試料数

*2 LIL: Low inoculation level (低濃度における菌濃度 d_3 CFU/g)

表2 オクラ (A)およびピラフ (B)を試料とした E. coli 定性試験法共同試験における陽性試料数および eLOD₅₀

(A)

試験室	菌接種試料中の菌量			ブランク 試料	eLOD ₅₀ (CFU/g)	eLOD ₅₀ /LOD ₅₀ * ³
	d_{1A} * ¹	d_{2A}	d_{3A}			
A	1/1* ²	3/4	1/4	0/1	48	1.8
B	1/1	4/4	3/4	0/1	14	0.52
C	1/1	4/4	1/4	0/1	28	1.0
D	1/1	3/4	2/4	0/1	37	1.4
E	1/1	4/4	1/4	0/1	28	1.0
平均					31	1.2

(B)

試験室	接種試料中の菌量			ブランク 試料	eLOD ₅₀ (CFU/g)	eLOD ₅₀ /LOD ₅₀ * ³
	d_{1B} * ¹	d_{2B}	d_{3B}			
A	1/1* ²	1/4	2/4	0/1	40	2.9
B	1/1	3/4	1/4	0/1	24	1.7
C	1/1	2/4	1/4	0/1	37	2.6
D	1/1	2/4	3/4	0/1	21	1.5
E	1/1	2/4	1/4	0/1	37	2.6
平均					32	2.3

*1 接種試料中の菌量： $d_{1A} = 254$ 、 $d_{2A} = 85$ 、 $d_{3A} = 28$ 、 $d_{1B} = 127$ 、 $d_{2B} = 42$ 、 $d_{3B} = 14$ CFU/g.

*2 陽性試料数／試験実施試料数

*3 E. coli 定性試験法の LOD₅₀ はオクラで 27 CFU/g、ピラフで 14 CFU/g

表3 チャーハン (A)およびソーセージ (B)を試料とした黄色ブドウ球菌定性試験法共同試験における陽性試料数および eLOD₅₀

(A)

試験室	接種試料中の菌量			ブランク 試料	eLOD ₅₀ (CFU/g)	eLOD ₅₀ /LOD ₅₀ ^{*3}
	d_{1A} ^{*1}	d_{2A}	d_{3A}			
A	1/1 ^{*2}	4/4	2/4	0/1	33	0.69
B	1/1	3/4	1/4	0/1	80	1.7
C	1/1	4/4	3/4	0/1	23	0.49
D	1/1	4/4	3/4	0/1	23	0.49
E	1/1	3/4	0/4	0/1	108	2.3
平均					53	1.1

(B)

試験室	接種試料中の菌量			ブランク 試料	eLOD ₅₀ (CFU/g)	eLOD ₅₀ /LOD ₅₀ ^{*3}
	d_{1B} ^{*1}	d_{2B}	d_{3B}			
A	1/1 ^{*2}	3/4	1/4	0/1	40	1.6
B	1/1	4/4	2/4	0/1	16	0.66
C	1/1	3/4	2/4	0/1	30	1.2
D	1/1	4/4	2/4	0/1	16	0.66
E	1/1	4/4	1/4	0/1	23	0.95
試料					25	1.0

*1 接種試料中の菌量 : $d_{1A} = 421$ 、 $d_{2A} = 140$ 、 $d_{3A} = 47$ 、 $d_{1B} = 210$ 、 $d_{2B} = 70$ 、 $d_{3B} = 23$ CFU/g.

*2 陽性試料数/試験実施試料数

*3 黄色ブドウ球菌定性試験法の LOD₅₀ はチャーハンで 48 CFU/g、ソーセージで 25 CFU/g

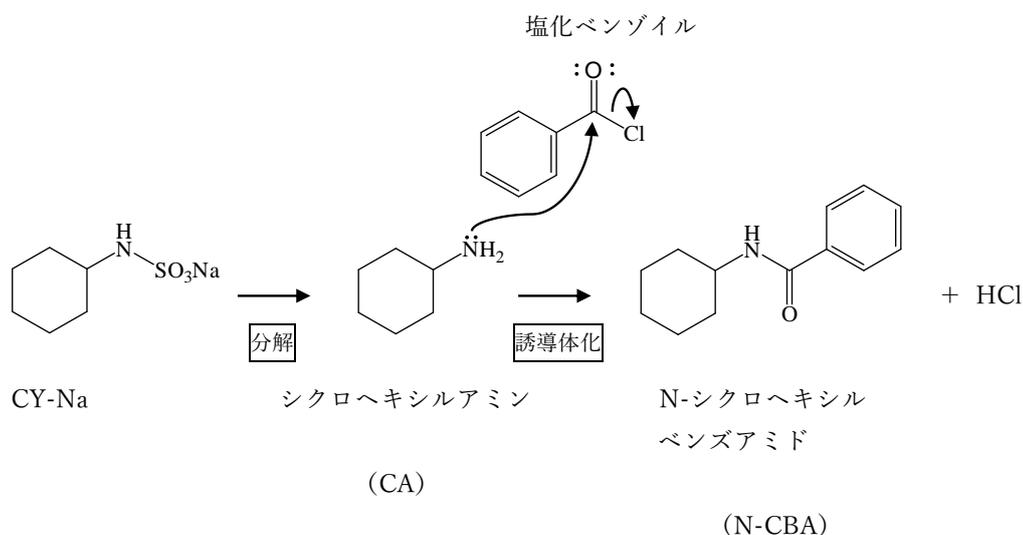


図1 誘導体化反応

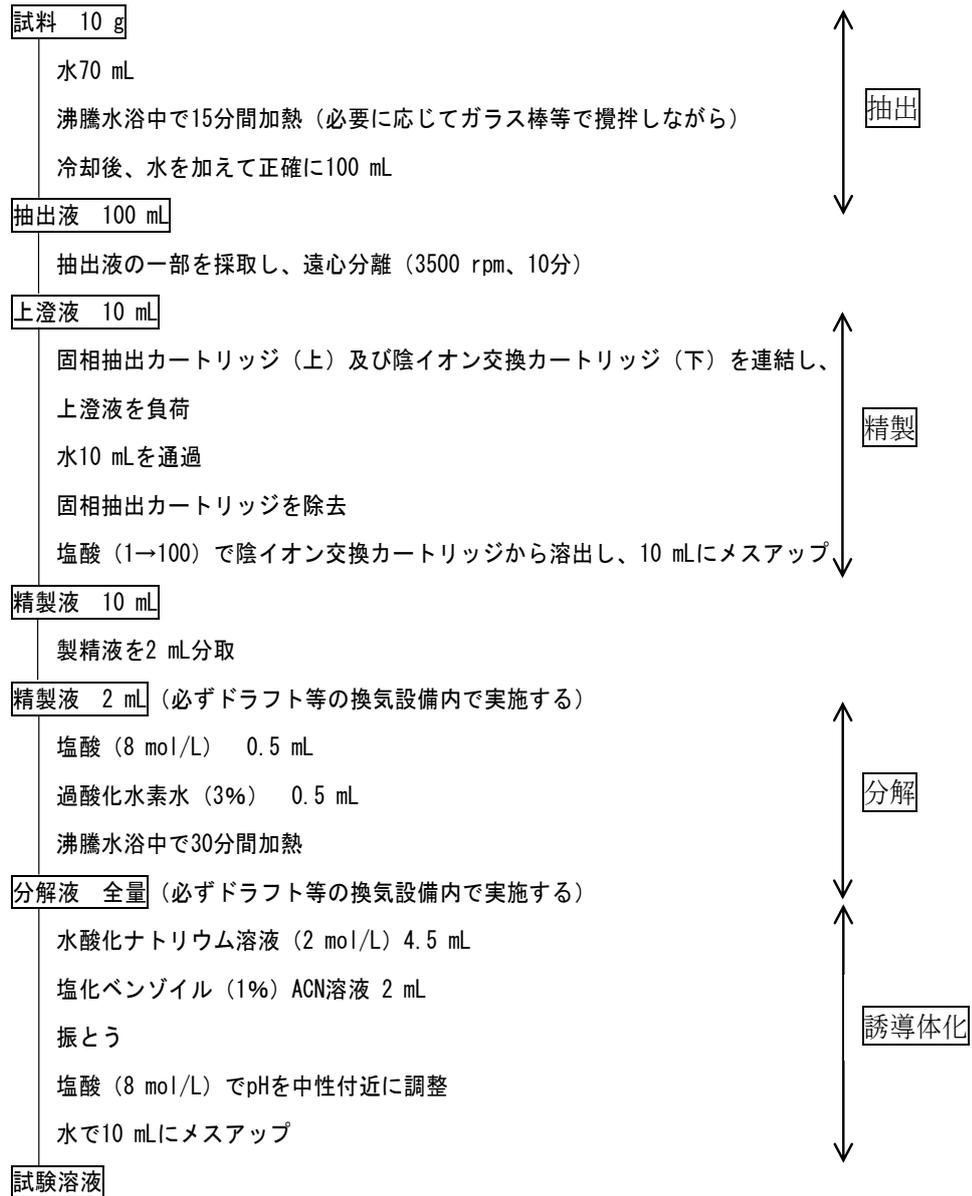


図2 試験溶液の調製法概略

表4 ビスケット 添加回収試験結果

	固相抽出法	スクリーニング法
平均回収率 (%)	94.3	94.5

$n = 2$

表5 たくあん漬け 添加回収試験結果

	固相抽出法	スクリーニング法
平均回収率 (%)	93.9	102.8

$n = 2$

表6 CA (1 μmol) に TA と BC の量を変えて添加した際の N-CBA への変換率 (%)

		TA (μmol)					
		0	1	2	10	20	50
BC (μmol)	1	67.9	102.	103.2	103.4	102.3	101.0
	2	67.7	102.0	101.7	101.5	103.8	103.9
	5	76.9	101.2	102.4	102.5	102.5	102.9
	10	72.7	101.9	102.4	101.2	96.3	97.5
	20	84.9	102.2	101.7	100.5	99.7	97.8
	50	84.8	101.4	101.4	100.3	99.1	98.9

$n = 1$

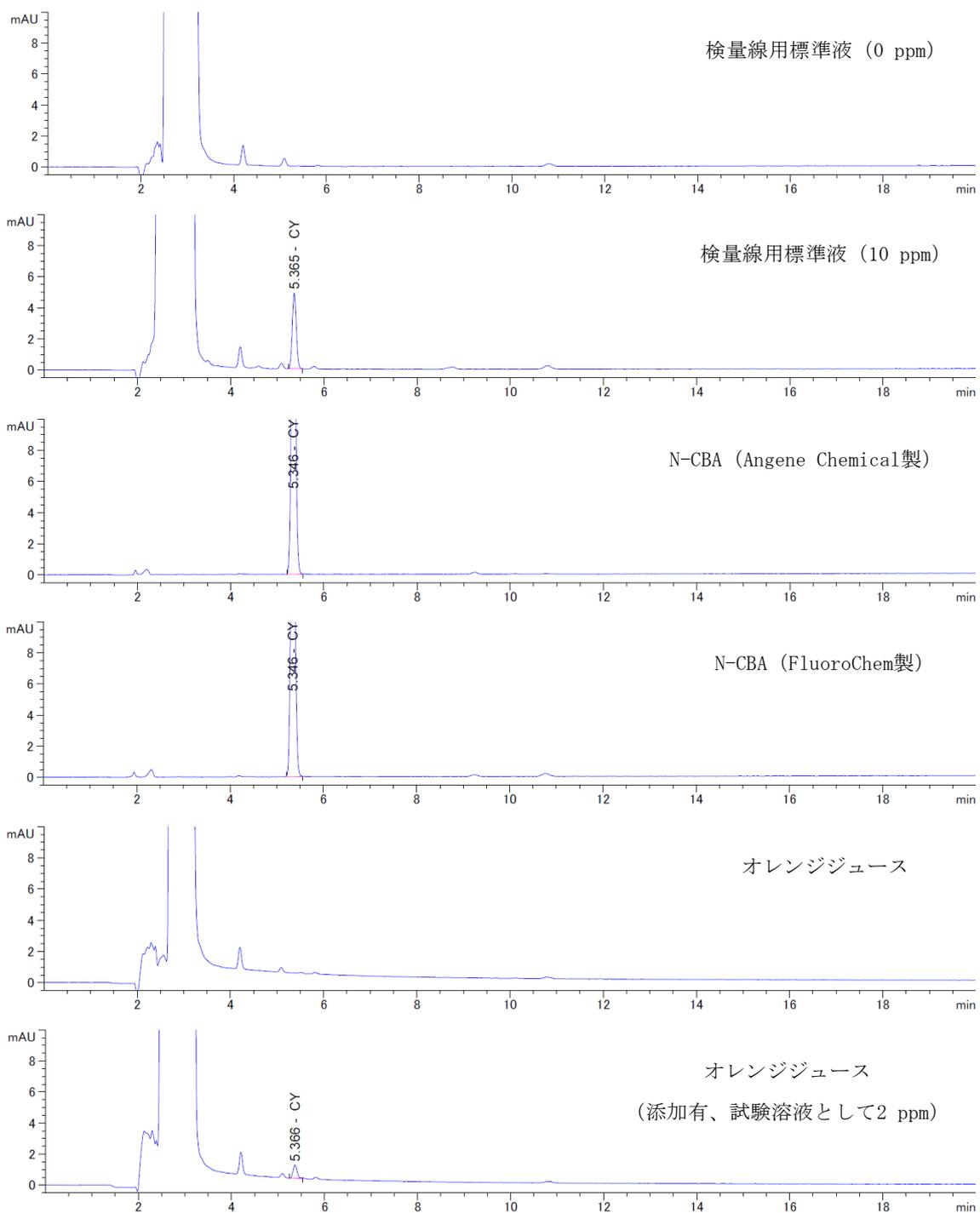


図3-1 標準溶液及びオレンジジュース試験溶液のクロマトグラム

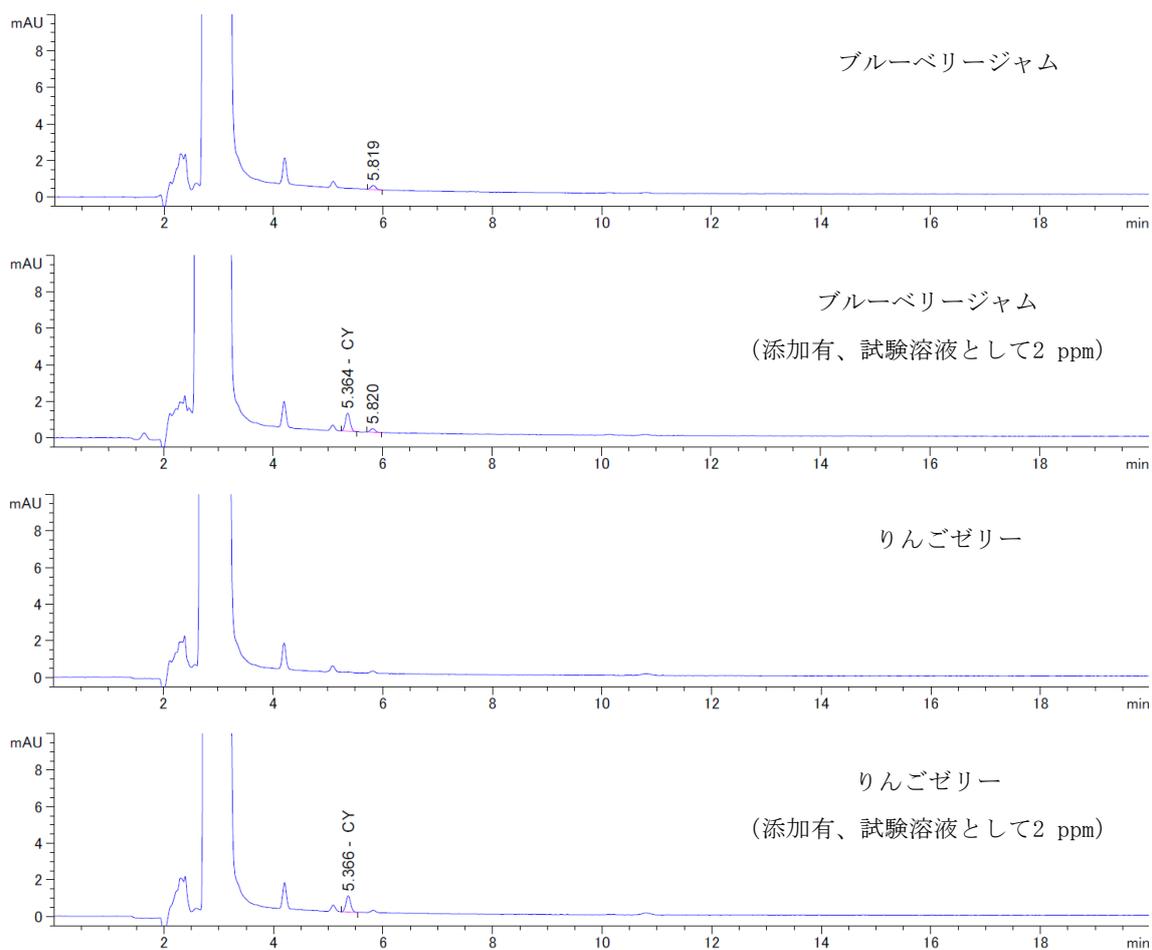
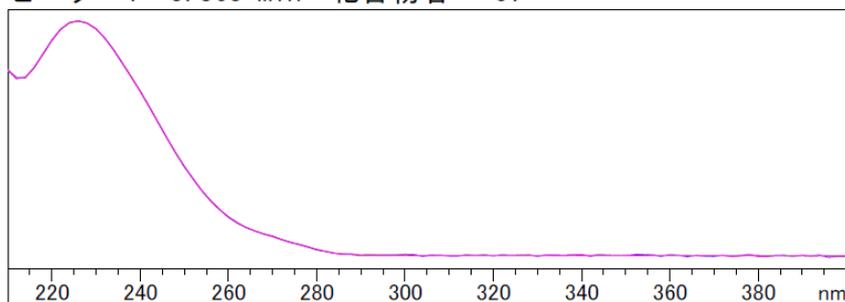


図 3 - 2 ブルーベリージャム及びりんごゼリー
試験溶液のクロマトグラム

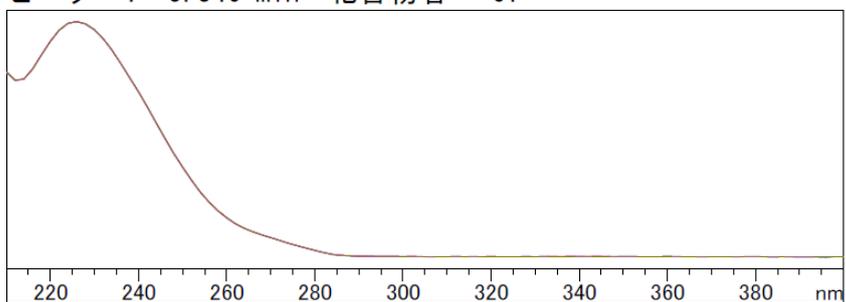
検量線用標準液 (10 ppm)

ピーク :1 5.365 min 化合物名 : CY



N-CBA (Angene Chemical 製)

ピーク :1 5.346 min 化合物名 : CY



N-CBA (FluoroChem 製)

ピーク :1 5.346 min 化合物名 : CY

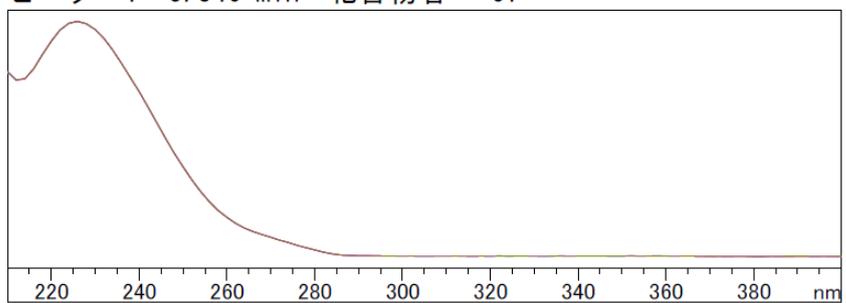


図4 各メーカーの標準溶液のスペクトル

表7 CYの加水分解率 (%)

		塩酸 (mol/L)					
		1	2	4	6	8	12
加熱時間 (分)	15	30.7	39.3	59.1	59.7	81.9	86.8
	30	42.8	72.9	84.9	88.7	89.8	91.2
	45	69.9	85.3	90.2	89.8	89.8	89.3
	60	69.9	92.6	93.7	85.8	94.5	90.3

$n = 1$

表8 新規分析法の添加回収試験結果

平均回収率 (%)	
オレンジジュース	104.0
ブルーベリージャム	114.5
りんごゼリー	108.8

$n = 2$

表9 規定分析法等の添加回収試験における平均回収率 (%)

	水	オレンジ ジュース	ブルーベリー ジャム	りんご ゼリー
規定分析法	97.4	98.0	90.1	85.7
抽出のみ変更	99.5	102.5	93.5	90.3
抽出・精製を変更	102.5	101.3	94.4	90.1

$n=2$