

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

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の作製の最適条件が分かった。器具・容器包装の検査項目の基礎検討では、溶解に用いる有機溶媒の選定が完了し、作製条件が最適化された。微生物検査については、一般細菌数測定検査試料として白飯を開発し、パイロットスタディを実施した。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の妥当性評価に関する研究（石井研究分担）では、単一試験室で推定したE. coli及び黄色ブドウ球菌定性試験法における検出下限値について、試験室間での比較を行った結果、推定した定量下限値は妥当な数値であると考えられた。厚生労働省から通知されているサイクラミン酸試験法（規定分析法）の適用が困難である食品群について改良法を検討するとともに、新しい誘導体化法を用いた新規分析法を開発し、3種の食品群に適用したところ、添加回収率、感度及び夾雑物ピークとの分離等において良好な結果が得られた。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、小麦の改良抽出法の試験室間共同試験を実施し、改良試験法の妥当性を確認した。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）では、開発した分析法は性能基準を満たすことが確認さ

れた。また、外部精度管理のパイロットスタディを実施し付与値の妥当性を評価した。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）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、スプレードライヤ作製条件を評価した。

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（埼玉衛生研究所化学検査室長）、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。玄米粉懸濁液は事前に攪拌し、均一な懸濁液とし、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°C、100°C、80°C 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、得られた玄米粉は課題 5 において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一般規格となるプラスチックの材質ポリマーについて、今年度新たに試料基材に ABS 及び AS のペレットを用い、試料作製のための基礎的検討を行った。これらのペレットについて、最初に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。溶解性の検討結果から、それぞれの試料基材に適した溶解溶媒を選択し、それぞれポリマー含量（5、10、20w/w%）を変えてポリマー溶液を調製しシート状試料の作

製検討を行った。いずれの場合も、乾燥後のシート状試料質量は約 25g となるように作製容器への流し込み量を調整した。作製容器の検討としては、ガラス製グラタン皿、テフロンコーティングバット及びステンレス製バットを用いた。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。作製したシート状試料については成形性についての目視観察の他、溶解溶媒残存率について、重量分析を行った。

1.3 特定原材料検査（卵及び乳）技能試験プログラムのパイロットスタディ及び市販食品による実試料（incurred sample）作製：

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、かぼちゃペーストを基材として卵タンパク質及び乳タンパク質を各 10.0 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、2つの特定原材料それぞれを通知法準拠のキットであるモリナガキット及び日本ハムキットの 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。

また、市販加工食品を使用した外部精度管理調査用の試料としての incurred sample の作製を行った。ELISA 法には卵、乳ともにモリナガキットのみを使用した。

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）

2.1 微生物定性試験法における検出下限値の推定

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、各試験室におけるE. coli及び黄色ブドウ球菌定性試験法におけるeLOD₅₀（estimated LOD₅₀）を算出した。E. coli定性試験法では冷凍食品の規格基準に規定された試験法、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について検討した。食品試料としてはこれまでの研究において推定されたLOD₅₀が最大、最少であった試料（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。3倍段階希釈したそれぞれの試験対象菌液を接種した食品試料について試験を実施し、陽性と判定された試料数の割合からISO 16140-3:2021に記載されている表を基にeLOD₅₀を算出した。両試験法に用いた培地等は各試験室で通常用いている製品により実施した。

2.2 食品添加物試験法の妥当性に関する研究

規定分析法の適用が困難であったビスケット及びたくあん漬けを対象とし、ホモジナイズ抽出操作を加えることによる添加回収率の改善について検討した。

また、規定分析法のHPLC分析における感度及び連続分析における保持時間の変動等を改善するために、新たな誘導体化法による新規分析法の開発を試みた。サイクラミン酸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。求電子剤である塩化ベンゾイルと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、試料からのサイクラミン酸の抽出・精製、サイクラミン酸からCAへの分解及びCAの塩化ベンゾイルによる誘導体化、生じたN-CBAの分析等の各段階において最適条件を検討し、食品への適用性を検討した。

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）

特定原材料（小麦）の改良抽出法の試験室間における評価のために、精度管理用試料として市販されている森永生化学研究所製のQC Material 小麦とカカオパウダーを混合して試験室間共同試験用試料を調製した。調製した試料は試料調製後 112 日まで冷蔵庫内で保存し、室間共同試験の評価期間中と終了後に安定性を評価した。

改良抽出法の試験室間共同試験の協力依頼を送付し、参加申込のあった合計 28 試験室に配布試料を送付した。評価結果は分布を確認後、ロバスト方式により統計値を算出した。また、算出したロバスト平均値とロバスト標準偏差から \bar{x} -スコアを算出し、外れ値を評価した。外れ値の評価後、調製した試料ごとに定量値に対する回収率を算出し、抽出法ごとに評価を行った。

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 HLB精製/LC-MS/MSのホタテガイ以外への適用

(1) 材料・試薬

ムラサキイガイ、カキ、アサリは市販品を

用いた。1 ppm OA 溶液と 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。他の試薬は特級グレード、HPLC グレード、または LC-MS グレードのいずれかを用いた。

(2) 試料の分析方法

二枚貝試料 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、昨年度本事業で確立した方法によって行った。具体的には、加水分解処理を行い、さらにヘキサソール洗浄を行った貝試料の抽出液（約 2.5 mL）水 2.5 mL を加え攪拌し、HLB カートリッジ（Waters 社製 Oasis PRiME HLB 200 mg）に注入し、流出液を捨てた。次に、アセトニトリル/メタノール（4：1）5.0 mL をカートリッジに注入し、得られた溶液を回収した。その際、少量のアセトニトリル/メタノール（4：1）で、抽出液が入っていたねじ口試験管の内壁を洗った。得られた溶出液を窒素下で 2 mL まで濃縮させ、試料溶液とした。

LC-MS/MS の測定条件は、昨年度の本事業で適用した方法に準拠した。

4.2 外部精度管理のパイロットスタディ

(1) 材料・試薬

検査試料は、本事業で令和 2 年度に調製し、令和 3 年度に均質性を評価したホタテガイ試料を使用した。試薬類は 4.1(1) と同じものを使用した。

(2) パイロットスタディの実施

パイロットスタディは令和 4 年 7～9 月に実施した。参加機関の分析結果は、専用のエクセルファイルによって受領した。

(3) 安定性評価試験

参加機関における検査試料の保存条件は、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度とした。分析期間における検査試料の安定性を評価するために、茨城大学において、分析期間前後に検査試料を分析した。適用した分析法は、4.1(2)の通りである。

(4) 報告値の解析

参加機関から報告された分析結果は、JIS Z8405 (ISO 13528) 及び AOAC ガイドライン(AOAC Int., 2005)に準じて解析した。

(5) 茨城大学における検査試料の分析

茨城大学でも検査試料を分析した。前処理操作における分析対象物質の回収率や LC-MS/MS におけるマトリックス効果の影響を補正するために、前処理前の検査試料に既知量の OA と DTX1 を添加する標準添加法と、4.1(2)の分析法を組み合わせで適用した。

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)

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 ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$), 2 ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$), 3 ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$) の3種で昨年度と同じ条件、温度は噴霧温度を示す) 中の対象農薬4種(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 Na_2SO_4 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_{10} 、ダイアジノン- d_{10} 、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 NaCl10 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 でコンデューションした 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 Na_2SO_4 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)、158 (マラチオン)、164 (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 0.13 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高速液体クロマトグラフ / タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) によって測定した。測定条件は、以下の通りである。装置：ACQUITY UPLC-Xevo TQ system (Waters 製)、カラム：L-column3 C18 (粒子径：3 μm、カラムサイズ：150 mm×2.1 mm i. d.、化学物質評価研究機構製)、カラム温度：40 °C、試料注入量：4 μL、溶離液 A：1 mM 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B：1 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液、流量：0.2 mL/min、グラジエント条件：溶離液 A の割合を 85% から 1 分間で 60% に減少させた後、60% で 2.5 分間保持し、-4%/分で 50% まで減少させ、次に -2.5%/分で 45% まで減少させ、さらに -4.2%/分で 5% まで減少させた後に 7.5 分間保持した。イオン化方法：ESI、キャピラリー電圧：3.0 kV、コーン電圧：20~30 V、コリジョンエネルギー：15~30 eV、イオン源温度：150 °C、脱溶媒温度：650 °C、定量に用いた *m/z* (プリカーサーイオン→プロダクトイオン)：350→97 (クロルピリホス)、360→99

(クロルピリホス- d_{10})、305→169 (ダイアジノン)、315→170 (ダイアジノン- d_{10})、278→125 (フェニトロチオン)、284→131 (フェニトロチオン- d_6)、331→127 (マラチオン)、337→127 (マラチオン- d_6)、270→162 (アラクロール)。

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。

なお分析法1と2は、昨年度に添加回収試験により正確さが精密に評価され、両方法で得られた分析結果もよく一致していた。これより、これらの分析法によって正確な分析値が得られることは、すでに十分に示されている。

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:

回収率の改善のために水を添加し、回収率を比較した結果、水の比率を高くすることで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)は回収率が改善された。すなわち、20%アセトニトリル溶液を用いた場合、4種農薬の回収率は最も高かった(課題5の結果より)。また、噴霧温度は120℃の時、いずれの農薬も回収率は最も低かった。これは、噴霧温度が高いと農薬が気化し、回収率を下げていると考えられた。4種農薬の中で最も沸点の低いダイアジノンの回収率がもっとも低かった。今回の再現性の試験においても同様の傾向が認められた。噴霧温度を下げることで回収率は改善した。今回の再現性試験は前回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℃、100℃、80℃で検討した。回収率が最も高かったのはフェニトロチオンであり、この結果は課題5で示してある。前回は、クロルピリホスが最も回収率が高かった。この結果が逆転したのは、運転条件の出口温度影響している可能性が考えられた。また、粉体の平均粒子径にも差が認められた。すなわち、前回作製したときは平均粒子径が250~280 μmであったのに対し今回は粒子径が約200 μmと小さかった。また、残留溶媒(%)も今回は前回に比べ低かったためこれらが再現性に影響した可能性は否定できない。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。今回作製した噴霧温度の違いによる顕微鏡写真から、いずれの顕微鏡写真も同様の粒子形状であり不定形であった。次に、前回の測定と今回の測定による噴霧温度の違いによる粒度分布の比較した結果、平均粒子径は今回（2022年7月測定）の方が小さいことが確認された。特に、80℃の時、前回（2021年7月測定）は二峰性の分布を示したのに対して、今回は平均粒子径が約200 μm で50 μm から400 μm まで分布していた。

以上より、今回の条件が適正であると考えられるが、スプレードライヤ条件が同じであっても若干の条件の際が認められ、それが粒子径や回収率に影響を与えることが分かった。ただし、詳細については検討する余地があるが、玄米粉を基材として用い、20%アセトニトリル溶液で懸濁させた場合、これら4種の農薬に対しては本条件が最適であると考えられた。今後は本条件でのさらなる検討が必要であると思われるが、作製された本残留農薬用試料の安定性を確認し、さらにこれを用いたパイロットスタディを実施する予定である。

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：

今年度は、食品衛生法において一般規格とな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ポリマーの溶解に用いる有機溶媒の選定、ポリマー含量別のシート状試料作製及び作製容器について検討した。その結果、試料基材にはABSペレット及びAS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ABSペレットにはジクロロメタン、ASペレットにはクロロホルムを用いてシート状の試料作製を行った。作製容器の検討としては、ガラス製グラタン皿、テフロンコーティングバット及びステンレス製バットを用いた。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 $\mu\text{g/g}$ 、Base Oil 75）を用いた。ポリマー含量（5、10、20w/w%）に相当する容量の溶解溶媒に、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、十分に溶解した（ポリマー溶液）。これを作製容器に流し入れた後、溶解溶媒を揮発させ、シート状の試料を得た。ポリマー溶液については、ポリマーの溶解性を、また、シート状試料については成形性について目視観察した。これらの溶解溶媒残存率については、重量分析を行った。なお、いずれのポリマー含量でも、成形後のシート状試料の質量が約25gとなるようにポリマー溶液を作製容器に流し込んだ。いずれのポリマーもポリマー含量5w/w%は揮発させる溶媒量が多く成形に時間を要すること、更に調査試料としての配付量を確保するためにはシート状試料作製容器に分注する量が多くなること、また20w/w%はポリマーの溶解に時間を要する上に溶媒が揮発しにくいことなどから、10w/w%が最も良好であると考えられた。ポリマー含量別シート状試料作製後の溶解溶媒残存率は、自然乾燥下、作製約2週間後でABSシート状試料は約0.2~0.6w/w%、ASシート状試料では約1.6~5.7w/w%となり、ポリマー間で残存率に差がみられた。これらについて更に減圧乾燥を行った結果、ABSシート状試料

はいずれのポリマー含量も 0.1w/w%未満、AS シート状試料は約 0.9~4.1w/w%となり、溶媒残留率は減少した。乾燥条件を問わず、ポリマー含量が高い方が溶解溶媒の残存率が高かった。また、ABS シート状試料に比べて AS シート状試料の方が溶解溶媒の残存率が高くなる傾向がみられたが、これは、用いた溶媒の沸点がジクロロメタン 39.6°C 及びクロロホルム 61.2°C であることから、これら溶解溶媒の特性の違いが要因の 1 つとして考えられた。ABS シート状試料は残留溶媒量の目標値である 0.2w/w%以下の基準を満たしたが、AS シート状試料はいずれのポリマー含量も満たすことが出来なかったため、今後更なる検討が必要と考えられた。作製容器の検討では、溶解溶媒残存率において 3 種の作製容器間で差は認められなかった。シート状試料の容器からの剥離性の観点から、作製容器は、ガラス製よりテフロン製あるいはステンレス製の方が適していると考えられた。以上より、今後は、ポリマー含量は 10w/w%、作製に用いる容器はテフロンコーティングバットあるいはステンレス製バットとし、溶解溶媒の自然乾燥後は、室温あるいは加温下で減圧乾燥することによりシート状試料を作製し、更にはこれらのカドミウム及び鉛の均質性及び安定性の確認試験の実施、ならびに AS シート試料については残留溶媒量の低減化の検討が必要である。

1.3 特定原材料検査 (卵及び乳) 技能試験プログラムのパイロットスタディ及び市販食品による実試料 (incurred sample) 作製:

標的となる特定原材料が不含であることが確認されたかぼちゃペーストに卵タンパ

ク質及び乳タンパク質を添加し作製し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 24 機関 (1 機関は乳検出系のデータのみ) で、使用されたモリナガキット及び日本ハムキットについて統計解析を行った。

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 2 機関、R 管理図で管理限界線を超えた機関は全体で 2 機関認められた。z-スコアの絶対値が 3 以上となり、外れ値を示した機関は延べ 3 機関であった。また、Xbar 管理図と z-スコアの両方で同時に外れたデータはなかった。

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。

また、卵または乳を含有した市販加工食品から外部精度管理調査用試料としての incurred samples の調製を行ったところ、両特定原材料につき、それぞれ適当な食品をスクリーニングすることができた。また、それぞれに選択した食品から作製した試料は、2 施設間において、卵、乳ともにモリナガキットによる ELISA 法で再現性の良い結果が得られたこと、両試料で均質性が確認できたことから、外部精度管理調査用試料として使用できる可能性が考えられた。

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

2.1 微生物定性試験法における検出下限値の推定:

各試験室において得られた $e\text{LOD}_{50}$ は、*E. coli*定性試験法ではオクラで14~48 CFU/g、ピラフで21~40 CFU/g、黄色ブドウ球菌定

性試験法では、チャーハンで 23~108 CFU/g、ソーセージで 16~40 CFU/g であった。LOD₅₀ との比は 0.49~2.9 倍であった。

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、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 3%卵黄加マンニト食塩寒天培地を使用した試験室とベアードパーカー寒天培地を使用した試験室があったが、結果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。

2.2 食品添加物試験法の妥当性に関する研究：

規定分析法で良好な添加回収率が得られなかったビスケット及びたくあん漬けについて、ホモジナイズ抽出操作を加えたところ、良好な回収率が得られた。ビスケットでは固相抽出法及びスクリーニング法でそれぞれ 94.3%及び 94.5%、たくあん漬けで 93.9%及び 102.8%であった。

新規分析法の検討においては、各段階に

おける最適条件を検討したところ、試料に水 70mL を加え、沸騰水中で抽出し、抽出液の一部について固相 (C18) カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジで精製した。精製液の一部に、塩酸と過酸化水素水を加え、沸騰水中で 30 分間、分解し、CA を得た。水酸化ナトリウム存在下、塩化ベンゾイルを添加し、誘導体化した後、塩酸で中和し、試験溶液とした。本法を用いて添加回収試験を行ったところ、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で 104~109%と良好な結果であった。また、感度及び夾雑物ピークとの分離も良好であった。

3 村上研究分担

3.1 試料の安定性の評価

調製した試料は試料調製後 112 日まで冷蔵庫内で保存し、室間共同試験の評価期間中と終了後に安定性を評価した。試料調製後 112 日まで回収率の低下は確認されず、試験室間共同試験の評価期間中に調製した試料は安定であることが確認された。

3.2 評価結果の統計解析

改良抽出法の試験室間共同試験の協力依頼を送付し、参加申込のあった合計 28 試験室に配布試料を送付した。評価結果は分布を確認後、ロバスト方式により統計値を算出した。また、算出したロバスト平均値とロバスト標準偏差から z-スコアを算出し、外れ値を評価した。評価の結果 FASPEK と FASTKIT の各キットで z-スコアが-3 未満の機関が 1 機関ずつ確認された。

3.3 室間共同試験用試料の評価

試間共同試験用試料を通常法で分析した際の回収率のロバスト平均とロバスト標準偏差は FASTKIT で 12.8±2.3%、FASPEK で

16.1 ± 4.7 %と回収率の低下が確認された。一方で、改良抽出法では FASTKIT で 92.7 ± 12.1 %、FASPEK で 96.0 ± 8.4 %と回収率の改善が確認された。試験室間共同試験による評価結果は通知法に示された定量検査法の評価基準である 50-150 %の回収率と 25%以下の室間精度を満たしており、室間共同試験によって改良抽出法の妥当性が確認された。

4 鎗田研究分担

4.1 HLB精製/LC-MS/MSのホタテガイ以外への適用

昨年度本事業で確立した方法 (HLB精製を組み合わせたLC-MS/MS) がアサリ、カキ、ムラサキイガイ分析へ応用できるかを検討した。精製後の試料をLC-MS/MSによって測定した際のマトリックス効果を評価するために、貝試料の前処理液を添加した標準溶液と、メタノールを溶媒とした標準溶液をLC-MS/MSにより分析した。その結果、マトリックス効果はアサリ101 %~106 %、カキ101 %~112 %、ムラサキイガイ109 %~115 %であり、LC-MS/MSにおけるイオン化抑制やイオン化増強が許容できる程度に抑えられたことが示された。

さらに、添加回収試験によって、HLB精製を組み合わせたLC-MS/MSの精確さを評価した。OA群の回収率と標準偏差は87.4 %~106.5 %と3.5 %~10.8 %であり、下痢性貝毒の機器分析法に求められる性能基準 (70 %~120 %、15 %以下) を満たすことが確認された。

4.2 外部精度管理のパイロットスタディ

検査試料の安定性を評価するために、参加機関における比較試料の分析期間の前後に、

茨城大学において検査試料を分析した。その結果を統計解析した結果、安定性に関する (標準) 不確かさ (各濃度に対する相対標準偏差) はOAが3.1 %、DTX1が8.4 %と算出された。

パイロットスタディでは、異なる試料瓶を用いることにより、独立した3回の分析を行うことを参加機関に求めた。参加機関の報告値 (平均値、外れ値を除外) の室間再現相対標準偏差 (室間精度) は、OA:23 %、DTX1:27 %であり、参加機関間の分析値のばらつきは良好であった。

さらに、参加機関の結果の中央値を付与値としてzスコアを算出し、各機関の技能を評価した。その結果、29機関参加機関のうち3機関の結果が、“不満足”と評価された。パイロットスタディにおける付与値の妥当性を評価するため、4.1に記載した分析法にさらに標準添加法を組み合わせた方法により、検査試料を分析した。その結果、得られた分析結果は、検査試料の調製値 (原料として使用中腸線認証標準物質中の OA 及び DTX1 の認証値と、検査試料に対する質量分率から算出) と良好に一致した。一方、付与値とその技能評価標準偏差は、標準添加法による分析結果よりも低かった。参加機関の分析値は、前処理過程における分析対象物質の回収率が考慮されていないことが原因であると考えられたが、今後より詳細な検討が必要である。

5 大竹研究分担

スプレードライヤ法によって玄米に噴霧した農薬の回収率について、再現性を確認することを目的として、分析を行った。具体的には、食品薬品安全センター秦野研究所が調製し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し、検討条件は昨年度と同じである)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、これまでのデータを基に、調製時の回収率は45~75%程度と予想された(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、41.1%~69.4%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概ね一致していたことが示され、本研究の分析法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。また、噴霧温度の各条件の分析結果を比較してみると、添加濃度に対する回収率は80°Cでもっとも高く、58%から69%であった。農薬別に見てみると、どの噴霧温度でもダイアジノンの回収率が一番低く、フェニトロチオンが一番高かった(クロルピリホスとマラチオンは同程度であった)。どの農薬でも、120°Cでの回収率をもっとも低くなったのは昨年度と同じ傾向であったが、80°Cと100°Cは傾向が異なっていた。噴霧温度を確定させるためには、今後、さらなる検討が必要だと考えられる。

E. 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) T. Yarita, S. Inagaki, Characterization of diarrhetic shellfish toxins in the *Mizuhopecten yessoensis* (Scallop) midgut gland by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), Analytical Letters, Taylor & Francis, 56, 531-540, 2023.

2. 学会発表

1) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂: 精度管理用試料を利用した特定原材料(小麦)の測定阻害評価と改良抽出法についての検討: 日本食品化学学会 第28回総会・学術大会, (東京), 2022.

2) 鎗田孝, 上原由理香, 鳥居塚南, 渡辺卓穂, 下痢性貝毒検査に関する試験所間比較試験のためのホタテガイ試料の調製と評価, 日本食品化学学会 第28回総会・学術大会(東京), 2022.

3) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂: 特定原材料(小麦)の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製: AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第25回年次大会, (東京), 2022.

4) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、

若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：特定原材料(小麦)の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製：第59回全国衛生化学技術協議会年会，(神奈川県)，2022.

5)鳥居塚南，上原由理香，渡辺卓穂，鎗田孝，下痢性貝毒の機器分析法における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討，日本食品衛生学会第118回学術講演会(長崎)，2022.

6)中村圭介，大竹貴光，羽成修康：玄米中の有機りん系農薬，ピレスロイド系農薬，及びジチオラン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118回学術講演会，(長崎)，2022.

7)大竹貴光，青柳嘉枝，鎗田孝：凍結粉碎した穀類試料中の冷凍条件における農薬の安定性評価、第45回日本農薬学会農薬残留分析研究会，(香川)(ハイブリッド開催)，2022.

8)J. Takebayashi, N. Takasaka, I. Suzuki, T. Nakasaka, Y. Kumai, N. Hirabayashi, T. Chiba, T. Watanabe: Current state and issues of laboratory nutrition analysis for nutrition labeling in Japan: an assessment of performance data from proficiency testing schemes in 2017-2021: 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo JAPAN, (Tokyo) 2022.

9)細谷まい、内田華那、伊藤里恵、若栗忍、渡辺卓穂、穉山浩：外部精度管理調査研究のための卵タンパク質のアレルギー物質を含む実試料調製及び均一性試験：日本薬学会第143年会、(北海道)2023.

10)内田華那、細谷まい、伊藤里恵、若栗忍、渡辺卓穂、穉山浩：外部精度管理調査研究のための乳タンパク質のアレルギー物質

を含む実試料調製及び均一性試験：日本薬学会第143年会、(北海道)2023.

F. 知的所有権の取得状況

なし