

令和5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玄米粉を基材とした残留農薬検査試料を作製し、課題5に供した。また、ハウレンソウパウダーを基材として最適条件を検討した。器具・容器包装の検査項目の基礎検討では、一般規格の材質試験として、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、溶解溶媒にジクロロメタンを用いてシート状の試料作製を行った。微生物検査については、硫化水素（ H_2S ）非産生サルモネラ属菌を用いた調査試料の開発としてパイロットスタディを実施し、併せて前年度までに開発した一般細菌数測定用調査試料の実運用を通じた考察を実施した。2. 食品添加物試験法及び動物用医薬品試験法の開発に関する研究（今井研究分担）では、指定外添加物（甘味料）であるサイクラミン酸ナトリウムをたくあん漬けに添加して精度管理調査用試料を作製し、パイロットスタディとして12の参加機関に対して調査用試料を配布し、その報告値を解析した。併せて、サイクラミン酸試験法におけるホモジナイズ操作の追加の有用性を確認するためコラボスタディを実施したところ、水抽出法において添加回収試験における回収率向上した。さらに、サイクラミン酸の誘導体化における誘導体化剤を加えてから水

層を除去するまでに要する時間により、回収率が低下することを確認した。新規誘導体化剤を用いた分析法については、液-液分配による精製工程を追加することで夾雑ピークの影響を受けずに測定することが可能となった。3. 重金属類試験法の改良と妥当性評価に関する研究（新矢研究分担）では、マイクロウェーブ分解-ICP質量分析による試験法を検討し、その分析妥当性を確認した。4. 下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究（鎗田研究分担）では、調査試料の調製法を検討するとともに、OA群のLC-MS/MS測定を正確に定量するための精確な分析法を検討した。また、最適化された分析条件を用いて添加回収試験を行い、分析が良好な精確さを有することを確認した。5. 残留農薬分析の外部精度管理に関する研究（大竹研究分担）では、課題1で作製したハウレンソウパウダーを基材とした試料に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。また、玄米粉試料のパイロットスタディを実施し、より信頼性が高い参加者の技能評価を行うことができた。

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）、今井浩一（埼玉衛生研究所化学検査室長）、新矢将尚（（地独）大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品安全課課長）、鎗田 孝（茨城大学農学部教授、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：

パイロットスタディ用残留農薬検査用試料は自家製玄米粉を用い、玄米粉 2 kg を 20%アセトニトリル溶液 8 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。

また、検討用のハウレンソウパウダー 1 kg を 20%または 30%アセトニトリル溶液 9 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。これらの懸濁液には、ダイアジノン ($0.40 \mu\text{g/g}$)、フェントロチオン ($0.20 \mu\text{g/g}$)、マラチオン ($0.20 \mu\text{g/g}$) およびクロルピリホス ($0.10 \mu\text{g/g}$) を添加した。

研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤ CL-8i を用いて作製した。すなわち、玄米粉懸濁溶液は事前にホモミキサーで攪拌し、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、入口温度は 100°C に設定し、作製した。得られた玄米粉は平均粒子径を測定した。得られた玄米粉は課題 5 のパイロットスタディで使用予定である。また、ハウレンソウを基材とした残留農薬検査用試料は玄米粉と同様の測定条件で入口温度を 100°C 及び 80°C で検討し、課題 5 に供し、IDMS を用いて高度化した一斉試験法により正確な分析値を付与した。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、昨年度の検討結果より試料基材に ABS 及び AS のペレットを選択し、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、ポリマー含量 $10\text{w/w}\%$ とし、シート状試料作製を行った。作製容器の材質の検討として、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。作製したシート状試料につき、カドミウム及び鉛の濃度確認を行い、併せて溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存性についても検討した。

1.3 特定原材料検査（卵）技能試験プログラムのパイロットスタディ：

本年度は特定原材料を卵タンパク質として外部精度管理調査に関するパイロットスタディを実施した。

参加機関は公定法及び標準操作手順書に

従い、通知法準拠のキットを用いて試験し、得られた結果を提出することとした。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。

回収したデータについてメジアン・クリーニング（MC）後、ロバスト方式による統計解析をキットごとおよび試料ごとに実施した。得られたロバスト平均値および標準偏差から $\bar{X}$ -R 管理図を代用した方法による評価および σ -スコアの算出を行った。

1.4 サルモネラ属菌検査用試料および微生物学調査区分調査試料の開発：

サルモネラ属菌検査用調査試料の開発と一般細菌数用調査試料の実運用の考察を行った。

サルモネラ属菌検査用調査試料の開発では、基材はサルモネラ属菌検査用調査試料と同じ液卵基材を用い、添加菌は①*Proteus mirabilis* HIC 210396、②*Salmonella* sp. HIC 210393、③*Salmonella* sp. HIC 230403を用いた。①②は現在食品衛生外部精度管理で使用している菌株、③は H_2S 非産生株（サルモネラ属菌陽性）である。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（10℃以下）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28日間保存までの生菌数の挙動を観察した。品質評価（均質性確認）ではパイロットスタディ用に作製した調査試料から添加菌ごとに5個の配付用調査試料を用いて生菌数試験を行い、その平均値を添加濃度とした。また、そのうち2個を用いて定性試験を行った。なお分離培地はXLDAとESⅡAを使用した。品質評価（均質性確認）では添加菌

ごとに1個の配付用調査試料を用いて、作製から約2か月後に均質性確認試験と同様の定性試験および生菌数測定を行った。パイロットスタディでは51機関の参加機関に対して調査試料を配付し、結果報告を回収および解析を行った。なお調査試料は添加菌名を伏せ、調査試料No. 1、No. 2、No. 3とラベルして配付した。

一般細菌数用調査試料の実運用の考察では、前年度までに開発した白飯基材（見立て食材：冷凍食品）を食品衛生外部精度管理調査で実運用し、結果報告の回収および解析を行った。

2 食品添加物試験法及び動物用医薬品試験法の開発に関する研究（今井研究分担）

調査用試料の作製方法の検討について、たくあん漬けを基材として用い、最適な浸漬期間を検討した。本結果を基に調査用試料を作製し、均質性と安定性を評価した。

精度管理調査のパイロットスタディは、12の参加機関に調査用試料等を配布し、分析結果の報告を受けた。報告結果は、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が実施している食品衛生外部精度管理調査に倣い、従来方式（算術平均値および標準偏差を用いた評価方法）とロバスト方式（Huberの*proposal 2*による方法）で統計解析した。

ホモジナイズ抽出に関するコラボスタディは、サイクラミン酸法（透析法及び水抽出法）に問わず、参加機関の分析法にホモジナイズ抽出工程を追加して分析し、その結果をパイロットスタディの報告結果と比較した。

誘導体化時間の検討は、誘導体化におけ

る各工程において試料を静置する時間を設け、その回収率への影響を比較した。

新規誘導体化剤を用いた分析法の改良は、検体としてオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレートを用い、昨年度報告した新規分析法に液-液分配による精製工程を導入し、その性能を評価した。

3 重金属類試験法の改良と妥当性評価に関する研究（新矢研究分担）

食品中の重金属類試験において、迅速かつ多元素分析可能なマイクロウェーブ分解-ICP 質量分析法を適用するために、マトリックスの異なる 3 種の認証標準物質を用いて、その最適条件の検討を行った。認証標準物質には、水分、脂質とも相応に含む試料として Crab Paste を、脂質の多い試料として Peanut Butter を、脂質をほとんど含まず水分が多い試料として Baby Food Composite を用いた。いずれの物質も 5 種の主要元素（Na、Mg、P、K、Ca）について認証値が付与されており、微量元素（Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Cd、Ba、Pb）の認証値は Crab Paste が 5 元素、Peanut Butter が 4 元素、Baby Food Composite が 7 元素であった。

試料をテフロン製分解容器に採り、硝酸および過酸化水素水を加えてマイクロウェーブ分解装置により加熱分解した。試料分解液を室温まで冷却後、超純水を加えて定容したものを試験原液とし、適宜希釈して測定液とした。ICP-MS による定量は内標準法で行い、標準モード（No Gas モード）、コリジョンモード（He モード）、およびリアクションモード（H₂ モード）で検討した。

妥当性評価は、分析者 2 名が併行数 2 で

3 日間の枝分かかれ試験で実施した。「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従って、一元配置の分散分析により真度、併行精度および室内再現精度を求めた。

4 下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究（鎗田研究分担）

4.1 調査試料の調製

(1) 材料・試薬

調査試料の調製には、ホタテガイ可食部（北海道産）と、オカダ酸（OA）およびジノフィシストキシン-1（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）、OA 標準品（富士フイルム和光純薬、生化学用）および 1 µg/mL DTX1 溶液（メタノール溶液）（産業技術総合研究所）を用いた。他の試薬は、LC-MS 用または試薬特級品を用いた。

(2) 調製方法

ホタテガイ可食部を均質化した後、ホタテガイ中腸腺試料と 9:1（質量比）で混合し、さらに OA と DTX1 を添加した。この混合物をさらに混合及び縮分したのち、5 g ずつを小分け（瓶詰め）した。

4.2 精確な分析法の検討

(1) 材料・試薬

ホタテガイ試料には青森産のホタテガイを用いた。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。ジノフィシストキシン-2（DTX2）の認証標準物質（CRM-DTX2-b）は National Research Council から入手した。他の試薬は、LC-MS 用または試薬特級品を用いた。

(2) 前処理方法

厚生労働省の通知（平成 27 年食安基発 0306 第 4 号食安監発 0306 第 2 号）別紙のオカダ酸群分析操作例に従ってホタテガイ試料を抽出及び脱脂した。その後、次の固相抽出（SPE）法のいずれかによって精製を行った。

a. HLB カートリッジを用いた SPE

脱脂した処理液に水 2.5 mL を加えて攪拌した溶液を HLB カートリッジ（Waters 製）に注入した。次に、アセトニトリル/メタノール（4:1）5 mL をカートリッジに注入し、その流出液を回収した。その後、回収した溶液を窒素下で 2 mL に濃縮した。

b. ODS カートリッジを用いた SPE

脱脂した処理液に水 2.5 mL を加え攪拌した。この溶液を、あらかじめメタノール 5 mL と水を 5 mL でコンディショニングした ODS カートリッジ（ジーエルサイエンス製）に注入した。このカートリッジを水 5 mL、40 %（V/V）メタノール 3 mL で順次洗浄した後、90 %（V/V）メタノール 3 mL を注入し、その流出液を回収し 2 mL に濃縮した。

(3) 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、カラムオーブン：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。

LC-MS/MS の測定条件として、次の 4 条件を検討した。

条件 A：A 液として水（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）、B 液として 95 %アセトニトリル（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）を用いたグラジエント溶離

条件 B：A 液として水（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）、B 液として 95 %メタノール（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）を用いたグラジエント溶離

条件 C：A 液として 2 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液、B 液としてアセトニトリルを用いたグラジエント溶離

条件 D：A 液として水（0.05 %アンモニウム）、B 液として 90 %アセトニトリル（0.05 %アンモニウム）を用いたグラジエント溶離

なお、いずれの条件においても MS の測定条件は別紙記載の条件に準じた。

5 残留農薬分析の外部精度管理に関する研究（大竹研究分担）

5.1 スプレードライヤ条件決定のための、ほうれんそう試料中残留農薬分析

(1) 添加回収試験による、ほうれんそう分析のための一斉試験法の評価

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ほうれんそう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：0.1 mg/kg、ダイアジノン：0.4 mg/kg、フェニトロチオン、マラチオン：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。

(2) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

一斉試験法と超臨界流体抽出法 (SFE) を用いて、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ほうれんそう試料中の対象農薬を分析した。一斉試験法では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) および 2 (80 °C, アセトニトリル 20 %) の 2 種 (温度は噴霧温度を示す)、SFE では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) の試料を分析した。また、噴霧温度は同じで、アセトニトリルを 20 % から 30 % にして調製した試料 (Lot 3: 100 °C, アセトニトリル 30 %, Lot 4: 80 °C, アセトニトリル 30 %) も、一斉試験法によって分析した。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。

5.2 残留農薬分析のための玄米を用いた外部精度管理のパイロットスタディ

(1) パイロットスタディのための玄米試料の均質性評価

ISO Guide35 (標準物質—認証のための一般的及び統計的な原則) に基づき、食品薬品安全センター秦野研究所が調製した 117 本から無作為に選んだ 10 本について、2 回ずつ農薬濃度を分析した。分析法は、IDMS を適用した QuEChERS 法を用いた。

(2) パイロットスタディのための玄米試料中農薬の安定性評価

昨年度、本研究で分析を行った玄米試料中農薬 (スプレードライヤの噴霧温度は 100 °C の試料) を、約 1 年後に分析することで、長期安定性を評価した。分析には、同位体希釈質量分析法 (IDMS) を適用した

一斉試験法を用いた。

(3) パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

(1) で均質性が確認された玄米試料中の対象農薬の濃度を分析した。分析には、IDMS を適用した一斉試験法、QuEChERS 法、STQ 法を用い、不確かさの算出も行った。

(4) 残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

23 機関から参加申し込みがあった。これらの機関に対して、2024 年 2 月 16 日に、食品薬品安全センター秦野研究所より、試験試料を冷凍便により送付した (2024 年 2 月 19 日着とした)。参加機関は、独立した分析 (試料の抽出及び精製、GC/MS 等による機器測定等) を 2 回行い、得られた結果と、適用した分析方法 (機器の校正に用いた校正用標準、抽出・精製法、測定法等) を報告することが求められた。最終的に 22 機関が、分析結果を報告した。

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:

これまで玄米粉を基材とした残留農薬検査用試料の作製について種々検討した。特に玄米粉を懸濁させるアセトニトリル溶液の濃度について検討した結果、20% の時添加した 4 種農薬が最も回収率が良かったため、パイロットスタディ用残留農薬検査用試料として 20% アセトニトリル溶液に懸濁させスプレードライヤに供した。基材となる玄米粉の一次粒子径は 10 μ m ~ 500 μ m と幅広く、平均粒子径

は $221.5\mu\text{m}$ でさらに $500\mu\text{m}$ 付近にもピークが認められた。一方、スプレードライヤにより作製した玄米粉試料の顕微鏡写真から造粒した数ミクロンの粒子も多数認められ、平均粒子径は $188.6\mu\text{m}$ と基材の玄米粉試料よりやや平均粒子径は小さくなり、 $500\mu\text{m}$ 付近のピークは消失した。作製した試料は課題 5 に供し、均質性と安定性の確認のもとパイロットスタディに供する予定である。

玄米粉を基材として残留農薬検査用試料作製を検討し、添加した 4 種の農薬の回収率が良好な条件を見出した。その条件を参考に野菜を基材として適用するためにハウレンソウパウダーを用いた。このハウレンソウパウダーは玄米粉より粒子径は小さく均質なパウダーであり数 μm ～ $200\mu\text{m}$ の粒度分布で平均粒子径は $26.76\mu\text{m}$ であり、玄米粉において噴霧温度を低く設定したほうが各農薬の回収率は高くなることから、噴霧温度（入口温度）を 100°C と 80°C で比較検討した。懸濁溶媒には 20%アセトニトリル溶液を用いた。玄米粉の場合は 20%懸濁液としたが、ハウレンソウパウダーは平均粒子径が小さく、懸濁液としたとき粘性が高く作製に支障をきたす可能性があったため、10%懸濁液とした。その他の作製条件は玄米粉の場合と同様とした。噴霧温度の違いによる顕微鏡写真の比較と粒度分布の比較をしたところ、基材のハウレンソウパウダーは数ミクロンの微細な粒子が多数認められたのに対して、噴霧温度 100°C の場合は平均粒子径が $45.51\mu\text{m}$ 、 80°C の場合は $63.02\mu\text{m}$ と噴霧温度を下げると平均粒子径が大きくな

ることが分かった。しかしながら、温度を下げることで、乾燥が不十分となり、ハウレンソウパウダーが内壁に固着し、ハウレンソウの回収が悪くなった。そこで、水分量を減らすことで、乾燥を促進させることを考え、20%アセトニトリル溶液からさらに、30%アセトニトリル溶液とし、噴霧温度 100°C 、 80°C で比較検討を行った。アセトニトリル量を増やしても各パラメーターに変動は見られなかったが、20%アセトニトリルのとき、 80°C の残留溶媒は 12.2%であったのに対して、30%アセトニトリルでは 8.3%と 100°C のときの残留溶媒に近い値を示した。このことよりアセトニトリル量を多くすることで低い入口温度でも残留溶媒を低くすることができた。スプレードライヤで作製した試料の回収は 20%に比べ改善された。4 種農薬の回収率を課題 5 で評価した上で最適条件を決定する。噴霧温度の違いによる顕微鏡写真の比較と粒度分布の比較を 20%アセトニトリルの結果と比較すると、平均粒子径については同様の結果となり、アセトニトリル量の変化ではこれらの造粒には影響しないことが分かった。これらの結果を受け、課題 5 で最適条件を決定し、パイロットスタディ用試料として供する予定である。

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、昨年度の検討結果より食品衛生法において合成樹脂一般を対象とした一般規格の材質試験として、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、

溶解溶媒にジクロロメタンを用いてシート状の試料作製を行った。作製容器の材質の検討としては、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。ポリマー質量に対して目的となるポリマー含量（10w/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、ポリマーを十分に溶解した（ポリマー溶液）。これを各作製容器に流し入れた後、自然乾燥により溶解溶媒を揮発させ、更に減圧乾燥を行い、シート状の試料を得た。得られたシート状試料につき、カドミウム及び鉛の濃度確認を行い、併せて溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存性についても検討した。その結果、いずれのポリマー、作製容器の材質およびシート部位による濃度差はほとんど見られなかった。添加した重金属の回収率は、カドミウムは、ABS シートで 82～92%、AS シートで 86～88%であった。鉛は、ABS シートで 82～90%、AS シートで 82～84%であった。理論作製濃度（カドミウム及び鉛各 50 µg/g）に対していずれの重金属も 80%以上の回収が得られた。溶解溶媒（ジクロロメタン）の残存率は、ABS シートで約 1～2%であり、ステンレスバットの方が低い傾向であった。一方、AS シートでは約 7～8%で ABS シートと同様にステンレスバットの方が低い傾向を示した。また、重金属の濃度と溶解溶媒残存率との関係性をみたところ、明らかな相関性はみられず、理論上懸念される「溶解溶媒残存率が高い方が添加した重

金属濃度が低くなる傾向」はなかった。今後は、パイロットスタディとして外部精度管理調査研究に必要な試料数の作製実現性を検討することとした。

1.3 特定原材料検査（卵）技能試験プログラムのパイロットスタディ：

2 種の試料を用いてパイロットスタディを行った。試料 1 には、昨年度、市販食品（卵含有コールスロートレッシング）から調製した実試料を、試料 2 には従来の方法として標的となる特定原材料が不含であることが確認された基材であるイチゴジャムに卵タンパク質を添加し、作製した試料を調査試料とした。

本年度の参加機関は 22 機関で公定法に従い、原則、各機関は通知法準拠の市販 3 キットから 2 種のキットを用いて試験を行うこととしたが、1 機関は 1 キットのデータだけの提出となった。本パイロットスタディではモリナガキット及び日本ハムキットが使用された。統計解析はキットごとおよび試料ごとにを行った。

その結果、MC で除外された機関は認められなかった。また、 $\bar{X}$ 管理図では管理限界線の範囲を超えた機関は認められず、 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。 σ スコアの絶対値が 3 以上となった機関は全体で 1 機関であった。 R 管理図および σ スコアで外れ値を出した機関はすべて別機関であり、それぞれの機関は外れ値を出した試験系以外では範囲内となった。したがって、施設としての試験方法に問題はないと考えられた。

また、試料 1 の実試料と試料 2 の従来法による作製試料について比較したところ、特段の差は認められなかった。したがって、

市販食品から調製した実試料は外部精度管理調査試料として供試可能であると結論した。しかしながら、市販食品であるため、ロット間差、標的となる特定原材料の添加量等不明の点が多く、均質に調製を行うまでに時間がかかるため、調製方法の効率化が今後の課題と考えられる。

1.4 サルモネラ属菌検査用調査試料および一般細菌数測定検査用調査試料の開発：

サルモネラ属菌検査用調査試料の開発では、添加菌①、②、③の接種直後の濃度はそれぞれ 4.1×10^3 、 3.1×10^4 、 7.0×10^3 cfu/g であった。冷蔵試料では保管開始から 28 日後まで大きな菌数の増減は観察されなかった。また、10 日後に冷蔵から 22.5℃ に移管した常温試料でも 28 日目まで生菌数を算出でき、定性試験においても添加菌①が陰性、添加菌②が陽性（H₂S 産生+）、添加菌③が陽性（H₂S 非産生-）と判定され、調査試料の品質に問題ないと評価した。均質性確認において添加菌①、②、③の配付用調査試料の生菌数平均値（添加濃度）はそれぞれ 3.9×10^3 、 1.9×10^4 、 4.3×10^3 cfu/g であった。また、定性試験でも性能評価と同様の結果が得られたことから、配付用調査試料は均質であると評価した。配付から約 2 か月後に実施した安定性確認において添加菌①、②、③の生菌数は 3.0×10^2 、 3.5×10^2 、 7.1×10^2 cfu/g であった。均質性確認時の 1/10 程度に減少したが、定性試験の結果は均質性確認試験と同様の結果となったことから、定性試験を実施する上で影響がないと判断し、パイロットスタディ実施期間中の調査試料は安定であったと評価した。調査試料配付後に参加機関 51 機関から回収した結果報

告では、通常的外部精度管理調査で使用している添加菌①、②は 51 機関全てが正しく報告した。しかし、添加菌③は 51 機関中 3 機関がサルモネラ属菌陰性と判定した。添加菌③を誤判定した 3 機関のうち 2 機関は、クエン酸利用能陰性のためサルモネラ陰性と報告した。うち 1 機関は API20E 実施によりサルモネラ陽性であったが当該機関の手順書に従った判定でサルモネラ陰性と報告した。残り 1 機関はクエン酸利用能およびマロン酸利用能試験を実施し、非定型反応であることからサルモネラ陰性と報告した。経過記録書から、生化学的性状試験で 36 機関がクエン酸利用能試験を実施し、クエン酸利用能試験を実施していない 15 機関のうち 10 機関は簡易同定キットでクエン酸利用能を確認していたことが示された。またアンケート結果において、外部精度管理調査事業の今後の運用として、H₂S 産生/非産生サルモネラ属菌および陰性菌の 3 種のうち 2 種の組み合わせで実施する場合のアンケート調査を行ったところ、「どの組み合わせでもよい」が半数以上（58.8%）となった。また、「陽性菌と陰性菌の組み合わせであればよい」（27.5%）を含めると 80% 以上が H₂S 非産生サルモネラ属菌の調査試料に前向きな回答であった。また、パイロットスタディに対するコメントとして、H₂S 非産生サルモネラ属菌のクエン酸利用能の定型反応が弱いといったコメントが散見された。本試験に使用するシモンズクエン酸培地はメーカーによる反応差や菌の接種量による偽陰性/偽陽性が出やすく、検査員の経験や技量が大きく影響する可能性が示唆された。

一般細菌数検査用調査試料の実運用の考察では、均質性確認試験で2名の検査員が各1回ずつ10個の調査試料の生菌数測定を行い、実数の平均値、標準偏差、相対標準偏差および一元分散分析を行った。また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 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。安定性確認試験では調査試料の作製から約2か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。調査試料配付後に参加機関から回収した結果報告では、実数解析においてデータ・クリーニングにより除外された機関は3機関、2シグマ処理で除外された機関は1機関であった。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X管理図においては1機関、R管理図においては9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13機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が5機関であった。データ・クリーニングにより除外された3機関はそれぞれ報告時の転記ミス、標準操作手順書に従って実施した結果検出限度値未満 ($< 3.00 \times 10^4$ /g) になった、フィルム培地の液化化により菌数の計測ができなかったことが原因であった。対数解析においてはデータ・クリーニングにより除外された機関は2機関、2シグマ処理で除外された機関は1機関であった。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4機関、 $3 \leq |z\text{-スコア}|$ に該当する機関が3機関であった。

2 今井研究分担

たくあん漬けを基材としてサイクラミン酸の精度管理調査用試料作製を試みた。その結果、7日間の浸漬でたくあん漬けの部位毎のサイクラミン酸濃度を均一化でき、また、作成した試料を84日間冷凍保管した際の安定性も良好であった。以上より、たくあん漬けはサイクラミン酸の外部精度管理調査用試料に適応できる可能性が示唆された。

精度管理調査のパイロットスタディ調査用試料の均質性及び安定性は良好であった。また、参加機関の報告値は、従来方式およびロバスト方式で解析した。

サイクラミン酸試験法におけるホモジナイズ抽出工程の追加は、透析法では回収率を低下させ、水抽出法では向上させた。水抽出法における回収率をより向上させるため、ホモジナイズ抽出工程には更なる改良が必要と考えられた。

サイクラミン酸の誘導体化については、誘導体化剤を投入してから水層を除去するまでの工程に時間をかけることで回収率が低下した。試験溶液の調製時は、誘導体化の所要時間にも配慮することが重要と示唆された。

昨年度検討した新規誘導体化剤を用いた分析法に液-液分配工程を導入することにより、夾雑ピークを大幅に軽減することができた。検討した何れの試料においても、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。さらに、ブルーベリージャム等の4食品を用いた添加

回収試験の回収率は良好であった。

3 新矢研究分担

使用した認証標準物質 (Crab Paste、Peanut Butter、Baby Food Composite) のいずれにおいても、Na、Mg、K、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Sr、Cd、Ba、Pb の 12 元素は、検討したいずれの測定条件でも認証値とよく一致し、真度、併行精度および室内再現精度は目標値 ($0.01 < \text{濃度}(\text{mg/kg}) \leq 0.1$ の場合：真度 80～120%、併行精度 < 15%、室内精度 < 20%、 $0.1 < \text{濃度}(\text{mg/kg}) \leq 10$ の場合：真度 80～110%、併行精度 < 10%、室内精度 < 15%、 $10 < \text{濃度}(\text{mg/kg})$ の場合：真度 90～110%、併行精度 < 10%、室内精度 < 15%) を満たしていた。また、重み付け検量線を用いる方が検量線範囲は拡大し、妥当性も向上したこと、さらに希釈等による労力も低減されることから、本法では有効であると考えられた。

一方、P については No Gas モードのみ、P の He モードおよび Ca の H₂ モードでは、Peanut Butter と Baby Food Composite で分析妥当性が確認された。これら 2 元素はマトリックスの影響を受けやすいと考えられ、引き続き検討を行う必要がある。

4 鎗田研究分担

4.1 調査試料の調製

本研究で使用した OA の標準品は、あらかじめ LC-MS/MS とで測定することにより、分析の障害となりうる不純物を含んでいないことを確認した。

調査試料の調製には、ホタテガイ可食部約 1.7 kg を用いた。これをブレンダーで細断した後に裏ごしし、繊維質分等を除去し

た試料約 1.4 kg を得た。

均質化したホタテガイ可食部、ホタテガイ中腸腺試料、及び添加用の OA 及び DTX1 の混合溶液は、最終的に得られる試料中の OA 及び DTX1 ができるだけ均質に分布されるように、2 段階に分けて混合した。その結果、これらの混合試料を約 1.25 kg 得た。この混合物は、混合物の均質性に外観上の問題はないと判断された。

この試料を回転混合させた後に 5 等分に小分けした。さらに、各瓶から約 20 g ずつを別の瓶 10 本に合一した。次いで、各瓶から内容物 5 g ずつを 16 本のポリ製遠沈管に小分けした。

以上によって、調査試料 160 本を調製することができた。この試料は約 -60 °C で保管しており、来年度その均質性を評価する予定である。

4.2 分析法の検討

(1) 検出感度の比較

下痢性貝毒分析における一般的な LC-MS/MS では、酸性の水/アセトニトリルが移動相に用いられている (測定条件 A が該当)。一方、アセトニトリルの代替にメタノールを用いることにより、感度が上昇したという報告がある (測定条件 B が該当)。また、塩基性の移動相を用いることにより、測定感度が上昇したとする報告もある (測定条件 C および D が該当)。

そこで、これらの 4 条件によって OA、DTX1 および DTX2 の混合標準液を測定した。その結果、条件 A、C、D では、同じイオンチャンネルで検出される OA と DTX2 を含め、対象物質は良好に分離できた。一方、条件 B では、OA と DTX2 はベースライン分離することができなかった。

次に、4 測定条件における LC-MS/MS 測定感度を比較した。その結果、OA、DTX1、DTX2 のすべてについて、条件 C が最も優れた感度を示した。条件 C の塩基性条件で OA 群の官能基が解離し、イオン化効率が向上したためと考えられた。

(2) マトリックス効果の評価

HLB カートリッジまたは ODS カートリッジを用いて前処理した使用溶液を用いて、マトリックス効果の評価した。調製濃度は、ホタテガイ試料中の相当量として各 0.05 ppm とした。これらの溶液と、同濃度の OA 群を含む標準溶液を条件 A～D で測定した。一般的な LC-MS/MS 条件である条件 A では、両前処理条件において、イオン化抑制が認められた。一方、(1) で最も優れた感度を示した条件 C は、HLB カートリッジを用いた前処理では面積比が 0.81～0.87、ODS B カートリッジを用いた前処理では面積比は 0.89～1.00 であった。一般に、面積比が 0.8～1.2 の範囲であればマトリックス効果によるイオン化促進やイオン化抑制が許容されうると考えられており、HLB と ODS のいずれを用いた前処理による試料溶液も、条件 C で測定することで正確に定量可能であることが示された。

(3) 添加回収試験

HLB カートリッジを用いた前処理と、検討した条件の中で最も感度が高く正確であった測定条件 C を組み合わせた方法について、添加回収試験を行った。その結果、OA 群のいずれについても下痢性貝毒の機器分析法に求められる性能基準である正確さ：70 %～120 %、及び併行精度：15 %以下を満たしており、精確さは良好で

あることが確認できた。

来年度は、本検討によって確立した分析法をさらに高度化し、調製した調査試料の均質性や安定性を正確に評価する予定である。

5 大竹研究分担

5.1 スプレードライヤ条件決定のための、ほうれんそう試料中残留農薬分析

(1) 添加回収試験による一斉試験法の評価（ほうれんそう試料）

一斉試験法による分析結果から、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、91～94 %と良好であった（マトリックスマッチ検量線を使用）。よって、本方法によって残留農薬検査用ほうれんそう試料を用いた、農薬の噴霧条件検討のための分析を行っても問題ないことが示された。

(2) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析によるスプレードライヤ条件決定への寄与

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ほうれんそう試料の、Lot 1 (100 °C, AN20 %), 2 (80 °C, AN20 %), 3 (100 °C, AN30 %), 4 (80 °C, AN30 %) (温度は噴霧温度を示す) の 4 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 (SFE 法では、Lot 1 の試料のみ分析)。分析結果より、一斉試験法と SFE 法の定量結果はよく一致しており、(1) での添加回収試験に加えて一斉試験法の妥当性を確認できた。

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

mg/kg, ダイアジノン:0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン:0.2 mg/kg であった。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より、スプレードライヤの添加濃度に対する回収率の範囲は、80 °C (AN20 %) で 61 % から 78 %, 100 °C (AN20 %) で 57 % から 74 %, 80 °C (AN30 %) で 58 % から 76 %, 100 °C (AN30 %) で 54 % から 74 % であった。昨年度までに、玄米試料でもスプレードライヤの条件検討を行ったが、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果の類似点は、以下の通りであった。①対象農薬のうち、フェニトロチオンの回収率が一番高かった。②各農薬において、100 °C よりも 80 °C の方が良い回収率が得られた。また、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果で異なる点は、以下の通りであった。①ほうれんそうでは、80 °C でのダイアジノンの回収率がクロルピリホスよりも高く (マラチオンと同程度であった)、クロルピリホスの回収率が一番低かった。②ほうれんそうでは、玄米に比べて多くの場合で回収率が上昇した (例えば、80 °C ではフェニトロチオンとダイアジノンで約 10 % 上昇した)。さらに、ほうれんそう試料において AN を 30 % とした場合、AN20 % のときと比較すると、マラチオンを除いて AN20 % の回収率がやや高くなった。噴霧温度や AN 濃度を確定させるためには、以上の結果を用い、他の条件も考慮して (試料調製時に用いる装置の壁面に粉末試料が付いてしまう等の作業面での条件も含む)、課題 1 において最終的に決定する。

5.2 残留農薬分析のための玄米を用い

た外部精度管理のパイロットスタディ

(1)パイロットスタディに用いる玄米試料の均質性評価

得られた分析結果を分散分析したところ、すべての対象農薬の瓶間濃度に統計的な有意差は見られず、試料が均質であることが示された。また、分散分析の結果を基に、瓶間均質性標準偏差 s_{bb}

$$\left(=\frac{MS_{among}-MS_{within}}{n}\right) \text{ と測定のばらつきに由}$$

来する $u_{bb} \left(=\sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \cdot 4\sqrt{\frac{2}{v_{MS_{within}}}}\right)$ を求めた。

その結果、均質性試験の不確かさは 0.58 % から 0.78 % と十分に小さく、パイロットスタディに用いるためには問題ない品質であることが示された。

(2)パイロットスタディに用いる玄米試料中の農薬の安定性評価

分析を行って得られた結果より、今回対象としたすべての農薬に対して、有意な濃度減少は見られなかった。よって、約 1 年間の安定性に問題ないことが示された。

(3)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

各分析法によって得られた結果を用いて、IDMS による精確な参照値と拡張不確かさを求めた。その結果、クロルピリホス: (0.065±0.004) mg/kg, ダイアジノン: (0.217±0.012) mg/kg, フェニトロチオン: (0.138±0.008) mg/kg, マラチオン: (0.138±0.008) mg/kg (参照値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数 $k=2$ から決定された拡張不確かさであり、約 95 % の信頼の水準をもつと推定される区間を示す) となった。これらの値と、参加者の中央値を用いて算出された参照値の比較

を、以下の(4)で行う。

(4) 残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ参加者の中央値を用いて算出された参照値は、以下のようになった。すなわち、クロルピリホス： (0.067 ± 0.007) mg/kg, ダイアジノン： (0.209 ± 0.021) mg/kg, フェニトロチオン： (0.140 ± 0.016) mg/kg, マラチオン： (0.141 ± 0.021) mg/kg となった。この結果と、IDMSによって得られた参照値(上記(3))を比較すると、よく一致していた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) ○Nakamura K., Otake T., and Hanari N: Quantitative determination of organophosphorus, pyrethroid, and dithiolane pesticide residues in brown rice using supercritical fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry., Journal of AOAC International, 106, 1532-1541 (2023).

2) 鳥居塚南, 上原由理香, 長谷川守文, 渡辺卓穂, 鎗田孝, 親水性-親油性バランス型充填剤を用いた簡便な固相抽出精製による二枚貝中オカダ酸群の精密定量, 分析化学, 73, 185-191, (2024)

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：特定原材料(小麦)の改良抽出法の室間共同試験による評価：日本食品化学学会 第 29 回総会・学術大会, (富山), 2023.

2) 鎗田孝, 鳥居塚南, 上原由理香, 川口研, 渡辺卓穂, ホタテガイ中のオカダ酸群

分析に関する試験所間比較試験, 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(東京), 2023.

3) 梶原三智香、中阪聡亮、堀田実和、高坂典子、渡辺卓穂、白飯を用いた一般細菌数測定検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ、第 119 回日本食品衛生学会学術講演会(東京)、2023

4) 若栗忍、渡辺卓穂：アレルゲン(卵及び牛乳タンパク質)含有試料を用いた特定原材料検査の技能試験プログラムのためのパイロットスタディ、第 119 回日本食品衛生学会学術講演会、(東京)、2023

5) 栗本悠可, 柳瀬望, 小玉玲菜, 鎗田孝, 分散固相抽出を利用した下痢性貝毒分析法の簡易化, 日本分析化学会関東支部第 17 回茨城地区分析技術交流会(水戸), 2023.

6) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康：超臨界流体抽出法を用いた玄米中農薬分析法の妥当性評価、第 46 回農薬残留分析研究会、長野、2023.

7) 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)の改良抽出法についての室間共同試験による評価：AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会, (東京), 2023.

F. 知的所有権の取得状況

なし