

厚生労働科学研究費補助金研究  
(食品の安心・安全確保推進研究事業)

【検査機関の信頼性確保に関する研究】

平成17年度  
総括・分担研究報告書

■主任研究者

財団法人 食品薬品安全センター 遠 藤 明

■分担研究者

大阪府立公衆衛生研究所 田 中 之 雄

社団法人 日本食品衛生協会 松 木 容 彦

星薬科大学 薬品分析化学教室 中 澤 裕 之

国立医薬品食品衛生研究所 米 谷 民 雄

国立医薬品食品衛生研究所 渡 邊 敬 浩

財団法人 食品薬品安全センター 大 島 赴 夫

平成18年(2006)4月

## 目 次

|   |     |
|---|-----|
| I. 総括研究報告                                     |     |
| 検査機関の信頼性確保に関する研究                              | 1   |
| 遠藤 明  |     |
| II. 分担研究報告                                    |     |
| 1. 農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の<br>精度管理に関する研究          | 25  |
| 田中之雄  |     |
| 2. 市販農薬標準品の純度比較に関する研究                         | 87  |
| 松木 容彦   |     |
| 3. 臭素系難燃剤による生体影響評価と分析法の<br>精度評価に関する研究         | 95  |
| 中澤 裕之   |     |
| 4. 食品中ダイオキシン類検査の外部精度管理用<br>適正調査試料の作成および評価法の検討 | 101 |
| 米谷 民雄   |     |
| 5. 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究               | 113 |
| 渡邊 敬浩   |     |
| 6. 食品外部精度管理調査における適性調査試料作製と<br>信頼性確保に関する研究     | 125 |
| 大島 赴夫   |     |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                           | 171 |
| IV. 研究成果の刊行物                                  | 175 |

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 17 年度

総括研究報告書

主任研究者 遠藤 明

平成 18 年（2006 年）4 月

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

検査機関の信頼性確保に関する研究

総括研究報告書（平成 17 年度）

主任研究者 遠藤 明 財団法人食品薬品安全センター 理事長

研究要旨

輸入食品の急増、国内における広域流通食品の増加により多種多様な食品を検査対象とした食品衛生検査が実施されており、食品の安全性を確保するためには、病原微生物、残留農薬、動物用医薬品、遺伝子組換え食品、アレルギー性物質、貝毒、ダイオキシン類を含む汚染有機化学物質など多くの検査項目についての確な検査が行われなければならない。検査の実施に当たっては、標準品の品質レベルや表示が適正でなければならない。国際標準化も開始され、併せて検査精度に関する検討も求められている。したがって、検査機関における検査結果の信頼性確保システムの構築は、必要不可欠な状況下であり、信頼性を担保するためには精度管理の実施体制を充実させる必要がある。加えて、食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領の改正に伴い、「検査の信頼性確保のための精度管理（内部精度管理及び外部精度管理）」を定期的実施するよう計画の作成が要求されている（平成 16 年 3 月 23 日付け食安監第 0323007 号）。精度管理の実施にあたっては、適正な評価のために適切な調査試料の作製が必要であり、より実際の食材に近い調査試料の開発が求められている。また、精度管理実施体制の整備や適正な精度管理用調査試料の開発と提供ならびに精度管理の実施は、検査機関の検査精度の確認ならびに検査結果の信頼性確保に重要な役割を果たし、食品の安心・安全確保に大きく寄与するものと考えられる。本年度は、1. 農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の精度管理に関する研究（田中分担研究）、2. 臭素系難燃剤による生体影響評価と分析法の精度評価に関する研究（中澤分担分）、3. 市販農薬標準品の純度比較に関する研究（松木分担分）、4. 食品中ダイオキシン類検査の外部精度管理用適正調査試料の作製および評価法の検討（米谷分担分）、5. 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究（渡邊分担分）、6. 食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料の作製と信頼性確保に関する研究（大島分担分）の 6 研究課題を実施したのでその成果を報告する。

分担研究者名＝田中之雄（大阪府立公衆衛生研究所食品化学課長）、中澤裕之（星薬科大学教授）、松木容彦（(社)日本食品衛生協会食品衛生研究所検査センター長）、米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所食品部長）、渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所研究員）、大島赴夫（(財)

食品薬品安全センター秦野研究所部長）

A. 研究目的

輸入食品や国内食品の流通段階においてヒトの健康に悪影響を与える恐れのある様々な危害物質等を行政検査により検査・確認し国民の食生活に安全と安心を提供することは食品安全確認行政の重要

な課題であり、その一貫として食品衛生に係る検査施設の検査精度や検査成績の信頼性を確保することは必要不可欠である。平成15年5月の食品衛生法の改正により一定の検査能力を有する民間法人にも食品衛生検査への参入が認められることとなり、多くの食品衛生検査機関から提出される検査成績の信頼性を確保するために食品衛生検査機関に対する外部精度管理体制の充実を図ることは重要な課題である。加えて、国内外を問わず環境汚染化学物質等の食品汚染は重大な社会的関心事であり、それら汚染物質による食品の汚染状況を把握し、その分析法の開発、検査法バリデーションの検討、並びに危害物質に係る精度管理の実施は、行政の取り組むべき重要かつ緊急な課題である。先の食品衛生法の一部改正に伴い導入された食品衛生検査機関に対する理化学的検査並びに微生物学的検査の外部精度管理調査については、その進めかたや得られた結果の基本的な評価方法について構築してきたが、実食材を基材とする高品質な調査試料の作製、適切な評価方法の選定、信頼性の高い認証値の付与などは、特に難しい課題として継続した検討が必要である。また、これまでの微生物学的検査調査結果より日常実施されている検査法の問題点も浮上してきている。貝毒検査、組換えDNA食品検査、食品中ダイオキシン類検査、並びにアレルギー食品検査に係る外部精度管理調査も基本的な問題点を解決しながら、精度管理体制に係わるより一層の充実化を図ることが必要である。これらに加えて残留農薬・動物用医薬品・飼料添加物のポジティブリスト制（平成18年5月29日施行）の施行に伴い、食品中の有機汚染物質（残留農薬、動物用医薬品、POPs、臭素系難燃剤など）の検討は、環境由来食品汚染物質のモニタリング、リスク評

価、分析法の検討とそのバリデーションにより国際的にも優れた水準の外部精度管理体制の構築が期待される。また、これら測定法の国際標準化に対応すべく市販農薬標準品について、それらの純度の確認ならびに比較検討を行い、標準品の純度を統一することは、検査精度や信頼性確保に大きく貢献する基本的な課題でもある。これらの検討により精度管理システムの整備、並びに精度管理のための適正調査試料の作製検討とその提供により食品衛生に係わる検査機関から提出される検査成績の信頼性確保をより充実させ、円滑な行政活動に資することが当研究班の目的である。

## B. 研究方法

1. 田中分担研究： トマトジュース、野菜ジュース、レッドピーマン、ジャガイモを基材として農薬（クロルピリホス、マラチオン、ダイアジノン、ジメトエート、フェニトロチオン、プロチオホス、ENP、シペルメトリン、フェンバレート等）を添加した試料を作製し、検査協力機関9機関に配布して検査を実施した。検査は2ラウンド実施し、第一ラウンドは指定農薬リスト10種類から3種選択して添加した試料、第二ラウンドは指定農薬リスト23種類から4種選択して添加した試料を作製して配布した。検査方法は、各機関で通常行っている標準操作手順書（SOP）に従って実施し、検査回数は5回とした。

結果の評価方法は、報告された定量値について統計処理（基本統計量、ヒストグラム、正規確立プロット、 $\bar{X}$  - R管理図、Z-スコア）により行った。2. 中澤分担研究： マウス繊維芽細胞（3T3-L1細胞）を化学物質を含む培地中でPre-cultureした後、インスリンと化学物質を含む培地で更に培養してGPDH（脂肪合成活性の指標）活性測定と細胞内蓄積中性脂肪量の測定を行った。また、培養

後の細胞を超音波破碎して細胞破碎液を作製し、破碎液中の DNA 定量並びに GPDH 活性の測定を行った。中性脂肪の測定は、リピッドアッセイキットを使用した。2) 分析の不確かさの評価— 試料の希釈系列調製時に用いたガラス器具の持つ不確かさと、試験者の熟練度に起因する不確かさを求め、一連の希釈操作で生じる合成標準不確かさを統計的に計算して評価した。3. 松木分担研究： 3大メーカーから販売されている残留農薬標準品パラチオンメチル、ピテルタノール、ピリミホスメチル、フェニトロチオン、ペンディメタリン、メプロニル、プレチラクロール、ビフェントリン、ホサロンの9物質を選択して検査対象とした。純度測定のための使用機器は、検出器の特性を考慮し、HPLC—紫外分光高度型検出器 (UV) 及び、GC—水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた。また、HPLC に多波長検出器 (PDA) を接続し、測定波長以外の波長で検出される不純物質の確認を行った。標準溶液 (被験溶液) の調製は、採取した標準品を各溶媒で 100mL 容褐色メスフラスコに移し入れ、100mL に定容し、1000 $\mu$ g/mL 溶液を調製し、被験溶液とした。また、溶解液は、GC 測定用標準溶液ではアセトン、HPLC 測定用標準溶液ではアセトニトリルとした。ただし、溶解できない場合には、その他の溶媒を用いて溶解性について検討する。なお、低濃度溶液は、被験溶液を適宜希釈して作製して被験溶液の 1 万分の 1 の低濃度溶液 (0.1 $\mu$ g/mL) を調整し、SN10 程度を満たすこととし、それより小さい場合には、0.5、1、2 $\mu$ g/mL と順次濃度を上げていき、SN10 程度を満たす濃度の溶液を低濃度溶液と定めた。GC による測定は、低濃度溶液、3社の被験溶液の順で、それぞれ5回、GC—FIDによる測定を行った。また、HPLCによる測定は、

同様に低濃度溶液、3社の被験溶液の順で、それぞれ5回、HPLC—UV—PDAによる測定を行った。試験結果の処理は、SN比の算出法により、被験物質ピークの前後30秒に現れるノイズの最大値 (E1) と最小値 (E2) との幅の2/5をノイズ幅 (N) とする。一方、ノイズの中央値 (C) をベースラインとし、ベースラインのノイズを元にピークトップ (D) を決めて、この幅をピーク高さ (S) とした。不純物質ピークの採否については、各被験物質の低濃度溶液を5回繰り返し測定して得られたピーク面積の平均値を基準とし、それ以上の面積を有するピークを不純物として採用した。含量の計算は、各被験溶液 (1000 $\mu$ g/mL 溶液) 又は直線性を示すまで希釈した溶液について得られた、HPLC 及び GC のクロマトグラム上の被験物質及び不純物質ピークの総面積に対する被験物質面積比を求め、5回の平均値を被験物質の含量 (%) とした。また、含量比較は、各標準品の HPLC 及び GC による測定より求められた含量と、各メーカーの純度表示値又は添付情報より得た標準品の純度表示値とを比較し、それらの表示値に対する含量比 (%) を求めた。4. 米谷分担研究： 魚 (ボラ) の筋肉部を採取後、均一に混合して粉末としたものを調査試料とし、分析機関 (7 機関) に配布して技能試験を実施した。結果の評価は、7 機関からの報告値について、全ての異性体ごとに、平均値、標準偏差 (SD)、相対標準偏差 (RSD)、並びに通常統計量と頑健な統計量を用いた2種の Z-スコアを計算して比較した。5. 渡邊分担研究： GM トウモロコシ (GA21 ならびに Mon810 系統) と非遺伝子組換えトウモロコシをそれぞれ高速遠心式粉碎機で粉碎後、均一に粉碎した各種トウモロコシを凍結乾燥し、GA21 と Mon810 を重量換算でそれぞれ 1%と

なるように調製した低濃度試料 (GA21L) と GA21 を 5%、Mon810 を 1% 含む高濃度試料 (GA21H) の 2 種の試料を作製した。これらを用いて、シリカゲル膜タイプキット法 (mini 法)、シリカベースレジックタイプキット法 (WIZARD 法)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド法 (CTAB 法)、シリカゲル膜タイプキット法 (MAXI 法) の 4 種 DNA 抽出法により抽出された DNA の質ならびに収量、DNA の分解の程度、定量 PCR 法による定量値について比較した。抽出した DNA の定量は吸光度測定、アガロースゲル電気泳動により画像解析、定量 PCR 法により測定されたコピー数に基づき行った。また、作製試料と各 DNA 抽出法と組み合わせで得られた定量値に正規性の確認された値に関しては Student t 検定、正規性の確認されなかった定量値に関しては U 検定を用いて有意差を検定した。

6. 大島分担研究：1) 理化学調査用試料の作製— 食品衛生外部精度管理用調査『重金属(カドミウム)検査、残留農薬(クロルピリホス、ダイアジノン)検査、残留動物用医薬品(フルベンダゾール)検査』試料について重金属では粉碎した白米、残留農薬ではほうれん草ペースト、残留動物用医薬品では液卵を基材として作製し、その均一性、安定性について検討した。2) 微生物検査用調査試料の作製— サルモネラ属菌検査用調査試料として液卵(殺菌鶏卵)を基材として作製し、検査における輸送の影響、ならびに基材中での添加菌の増殖抑制について検討し、長期安定な基材の開発を行った。なお、サルモネラ属菌の検査方法には、通知法(公定法)を採用し、増菌培養、確認培養で採用される培地の組み合わせによる添加菌の検出確認を行った。3) 貝毒検査用調査試料の作製— ホタテホモジネートを基材としたオカダ酸のろ紙スパイクによる

下痢性貝毒検査用調査試料の作製にあたり吸着オカダ酸の力価の低下を防止による安定試料の作製のため、①蛍光 HPLC 法によるろ紙中のオカダ酸の定量法の確立、②保存条件(室温、冷蔵、冷凍)によるろ紙吸着オカダ酸の経時変化、③ホタテ中腸腺及び剥き身ホモジネートを基材として試作試料とその長期安定性の検討を行った。なお、ろ紙吸着オカダ酸の蛍光 HPLC による測定は、ろ紙吸着オカダ酸をアセトン浸漬し超音波抽出を行い、蛍光化試薬(ADAM)を用いて蛍光誘導体として定量した。なお、ろ紙の種類による吸着の違いについても検討した。

4) アレルギー関連物質検査用調査試料の作製— アレルギー関連物質検査用試料の検査対象を卵蛋白とし、スナック菓子、ビスケット、クリームサンドクッキー、ハンバーグ、薄力粉、そば粉、スキムミルクについて基材としての適正を検討した。添加する卵蛋白としては、標準品および Egg Solids または Whole Egg Powder から調製した卵蛋白を添加し、化学的な蛋白質測定には 2-D Quant Kit、免疫学的方法による卵蛋白の測定ではモリナガ FASPEK 卵測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. II 卵を使用した。卵抽出液の安定性については、4℃または-80℃で 54 日間まで保存し、ELISA 法により測定して卵蛋白の調製時と比較検討した。

## C 研究結果

1. 田中分担研究： 調製した試料(ラウンド 1 ではトマトジュースには 3 種類の有機リン系農薬を、レッドピーマンには 2 種類の有機リン系および 1 種類のピレスロイド系農薬を添加、ラウンド 2 では野菜ジュースには 3 種類の有機リン系および 1 種類のピレスロイド系農薬、ジャガイモには 3 種類の有機リン系および 1 種類のピレスロイド系農薬を添加)中の各農薬検査項目は、設定添加量に対して

平均回収率 92%~112%、標準偏差 0.001~0.045、変動係数 1.00~8.64%であり、いずれの農薬についても変動係数が 10% 以内と小さいことから、設定濃度に近似した試料を調製することができた。また、一元配置分散分析を行った結果では試料間の有意差は見られず、均質性が確認され、有意確率の数値からラウンド 1 ではトマトジュースの方がレッドピーマンよりも均質性がよく、ラウンド 2 ではジャガイモの方が野菜ジュースよりも均質性がよいという結果であり、回収率に関して少なくとも 70%~120% の範囲を確保するには支障がないものと判断した。添加農薬の検出結果は、ラウンド 1 およびラウンド 2 に添加した農薬クロルピリホス、マラチオン、ダイアジノン、ジメトエート、フェニトロチオン、プロチオホス、EPN、シペルメトリン、フェンバレレートが全機関がすべて検出した。クロルピリホスの添加量 0.4 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.360 $\mu$ g/g (回収率 90.0%)、Xbar 管理図で下部境界線を越えたのは 2 機関、R 管理図で適正域を外れたのは 1 機関、Z-スコアは絶対値が 2 以上の機関はなく全機関において「良好」な結果であった。ダイアジノンの添加量 0.1 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.088 $\mu$ g/g (回収率 87.9%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 1 機関で下部境界線を越えたのは 3 機関、R 管理図で適正域を外れたのは 1 機関、Z-スコアは全機関において「良好」な結果であった。フェニトロチオンの添加量 0.25 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.256 $\mu$ g/g (回収率 102.5%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 2 機関で下部境界線を越えたのは 1 機関、R 管理図で適正域を外れたのは 1 機関、Z-スコアは全機関「良好」な結果であった。シペルメトリンの添加量 0.8 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.748 $\mu$ g/g (回収率

93.5%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 1 機関で下部境界線を越えたのは 1 機関、R 管理図と Z-スコアは全機関「良好」な結果であった。ジメトエートの添加量 0.4 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.442 $\mu$ g/g (回収率 110.4%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 3 機関で下部境界線を越えたのは 1 機関、R 管理図と Z-スコアは全機関「良好」な結果であった。ダイアジノンの添加量 0.1 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.090 $\mu$ g/g (回収率 90.4%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 1 機関で下部境界線を越えたのは 2 機関、R 管理図と Z-スコアは全機関「良好」な結果であった。クロルピリホスの添加量 0.4 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.355 $\mu$ g/g (回収率 88.7%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 1 機関で下部境界線を越えたのは 1 機関、R 管理図は全機関「良好」であったが、Z-スコアで  $2 < Z < 3$  となった機関を 1 機関認めた。ジメトエートの添加量 0.4 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.423 $\mu$ g/g (回収率 105.8%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 2 機関で、R 管理図で適正域を外れたのは 1 機関、Z-スコアは全機関「良好」な結果であった。シペルメトリンの添加量 0.5 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.449 $\mu$ g/g (回収率 89.8%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 1 機関、R 管理図は全機関「良好」であったが、Z-スコアで  $2 < Z < 3$  となった機関を 1 機関認めた。EPN の添加量 0.1 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.087 $\mu$ g/g (回収率 87.1%)、Xbar 管理図で下部境界線を越えたのは 1 機関、R 管理図で適正域を外れたのは 1 機関、Z-スコアは全機関「良好」な結果であった。クロルピリホスの添加量 0.2 $\mu$ g/g に対し、全機関の平均値は 0.170 $\mu$ g/g (回収率 84.8%)、Xbar 管理図で下部境界線を越えたのは 1 機関、R 管理



図は全機関「良好」であった。Z-スコアで  $2 < Z < 3$  となった機関を 1 機関認めた。マラチオンの添加量  $0.1 \mu\text{g/g}$  に対し、全機関の平均値は  $0.085 \mu\text{g/g}$  (回収率 84.6%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 1 機関で下部境界線を越えたのは 1 機関、R 管理図で適正域を外れたのは 1 機関、Z-スコアで  $2 < Z < 3$  となった機関を 1 機関認めた。プロチオホスの添加量  $0.1 \mu\text{g/g}$  に対し、全機関の平均値は  $0.076 \mu\text{g/g}$  (回収率 75.6%)、Xbar 管理図で下部境界線を越えたのは 4 機関、R 管理図と Z-スコアは全機関「良好」な結果であった。フェンバレレートの添加量  $0.05 \mu\text{g/g}$  に対し、全機関の平均値は  $0.048 \mu\text{g/g}$  (回収率 95.5%)、Xbar 管理図で上部境界線を越えたのは 1 機関で下部境界線を越えたのは 3 機関、R 管理図で適正域を外れたのは 1 機関、 $2 < Z < 3$  となった機関を 1 機関認めた。

2. 中澤分担研究：PBDEs および HBB は、化学物質を添加せずに培養したコントロールと同程度の GPDH 活性、中性脂肪量を示し、ダイオキシンやビスフェノール A に見られるような脂肪細胞への影響は認められなかったが、TBBPA は誘導促進剤を加えたものと同値の GPDH 活性を示したことから、脂肪細胞の分化に促進的に作用する可能性が示唆された。PBDEs (HpBDE #183、DeBDE #209) HBB および TBBPA は、ともに分化誘導剤添加時のような GPDH 活性を認めず、HpBDE #183、DeBDE #209、HBB、TBBPA は、脂肪細胞の分化を誘導する作用を持たないことを示唆した。しかし、分化誘導剤を添加後、インスリン存在下に TBBPA を添加、またはインスリン非存在下に TBBPA を添加した際の GPDH 活性は、脂肪細胞にインスリン存在下に TBBPA を添加すると、陽性コントロールよりも高値の GPDH 活性を示し、インスリン非存在下に TBBPA

を添加した場合についても、GPDH 活性の上昇を認めた。

分析の不確かさの評価については、試験者として大学部生 (1 年生、3 年生) および大学 4 年生以上 (大学院生及び教職員を含む) の以上 3 4 人を対象とし、20mL メスフラスコを使用して定容する際の熟練度を算出したが、学部 1 年生と 3 年生では大きいばらつきが認められたが、4 年生以上になると 1 年生、3 年生に比べて約 18~30% 程度にばらつきが小さくなった。このような傾向はホールピペットおよびメスピペットを用いた際のばらつきデータにおいても同様に認められた。また、検量線用の標準溶液を調製する際には、ガラス器具の公差及び熟練度がデータのばらつきに関与し、分析値の不確かさの要因となることがわかった。20 倍希釈の操作をホールピペットおよびメスピペットを使用した際、RSD はそれぞれ 0.63%、5.903% であり、メスピペットはホールピペットの約 10 倍の不確かさがあることがわかった。

3. 松木分担研究：純度及び各社の表示との比率を含量比として示した。各メーカーの純度表示値との比較においては、B 社のピリミホスメチルが LC、GC 分析の両者の結果において、表示値より 2% 以上下回った。また、GC 分析結果のみで表示純度より著しく低い値を示したのは、3 社とも、フェニトロチオン、ピリミホスメチル、ホサロンであった。LC においてのみ含量比が 2% 以上下回ったのは、A 社、C 社のビフェントリンであった。ちなみに、クロマト上の分解産物と思われるピークをあわせて含量を再算出すると、A 社 96.7%、B 社 94.4%、C 社 96.4% と幾分含量比が高くなるが、それでも各社の表示値に比しいずれも含量比は 2% 以上、下回る結果であった。

4. 米谷分担研究：PCDD、PCDF では、RSD%

が10%程度から100%以上の異性体があり、異性体間でばらつきが異なった。また、PCBについても、ほとんどが10%程度あるいは以下のRSD%であったが、2', 3, 4, 4', 5-PeCBは122%のRSDとなった。TEQのRSD%は8%であった。頑健な統計量から計算すると、100%を超えるような大きなRSD%は無くなった。異性体毎の通常のSDと頑健なSDの2つの方法で計算した平均値は、ほとんどの異性体で同程度の値であったが、OCDDと1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDFでは、頑健な平均値が通常の平均値よりも小さい結果となった。通常の統計量を用いて計算したZスコアには3を超える値は現れず、外部精度管理の評価では、全ての機関が問題ないと評価されるが、頑健な統計量により計算したZスコアでは、いくつかの異性体で3を大きく超えるZスコアが認められた。5. 渡邊分担研究：対象とした4種のDNA抽出法のそれぞれを用いて抽出されるDNAの収量、質およびそれらのばらつきについて明らかにするため、各抽出法を用いて共通試料からDNAを抽出し、測定した吸光度に基づき収量の算出および純度検定を行った。各抽出法を通して同数の小分け試料を用いたことから、GA21LならびにGA21Hを区別せず計12の試料として抽出法別DNA収量の平均値を算出した。その結果、MAXI法によるDNAの平均収量は43.21 $\mu$ gで最も高く、CTAB法ではDNA収量が2.81 $\mu$ gで最低であった。また、mini法、WIZARD法を用いた場合のDNAの平均収量はそれぞれ19.36 $\mu$ gおよび13.16 $\mu$ gであった。DNA収量のばらつきに関しては、CTAB法を用いてGA21試料から抽出を行った場合に、相対標準偏差(RSD)が30%程度の高いばらつきを示したが、その結果を除けばDNA抽

出法および試料の種類によらずRSDは20%を下回っており、安定した量のDNAが抽出されている結果であった。純度検定においては、OD260nm/280nm、260nm/230nmの比を求め、それぞれの値が1.8、2.0以上であることを良好な精製が行われたことの判断基準としたが、タンパク質残存の指標となるOD260nm/280nm比に関しては、すべてのDNA抽出法と試料の組み合わせにおいて基準を下回ることがなかったのに対し、糖類等の残存の指標とされるOD260nm/230nm比に関してはCTAB法およびWIZARD法を用いた場合に、すべての試料から得られたDNAについて基準を下回る結果であった。各抽出法により抽出されたDNA試料中に含まれるDNAの分子量分布について電気泳動法により分離し確認した結果では、24kbp付近のバンドを中心に低分子方向にむけて薄い帯をひく、いわゆるスミア状の電気泳動像がすべての抽出法および試料の組み合わせにおいて観察された。また、GA21LおよびGA21Hにおいて特に顕著であるが、WIZARD法により抽出したDNA試料を分離した場合には、その他の抽出法により抽出したDNA試料を分離した場合に比べ、スミアな像がわずかに濃く染色されており、WIZARD法を用いてDNAを抽出した場合、他の抽出法に比べてDNAの低分子量化が進みやすい傾向があることを示唆したが、極端に低分子量化したDNAのみが観察されるといった明確な差は認められなかった。GA21H(6点)から各抽出法により併行抽出されたDNA試料を対象に*SSIIB*コピー数を測定し比較した結果では、6点のDNA試料から計測されたコピー数のばらつきはMAXI法、mini法、CTAB法、WIZARD法についてそれぞれRSDが3.25、11.48、8.05、13.02%であった。DNA抽出法の異なりによるGMトウモロコシ定量値へ

の影響について擬似混入試料(GA21L および GA21H)を対象とし、CaM ならびに GA21 定量値を算出し比較した結果では、各試料、定量 PCR 法、および DNA 抽出法の組み合わせによって得られたそれぞれの定量値のばらつき(RSD)は、最大でも 13.3%であり、DNA 抽出法と定量 PCR 法の組み合わせによらず同一試料間での併行再現性は良好な結果であった。測定された CaM 内標比の平均±S. D. は MAXI 法で  $0.42 \pm 0.02$ 、mini 法で  $0.45 \pm 0.01$ 、CTAB 法で  $0.44 \pm 0.04$  であった。また、測定された GA21 内標比の平均±S. D. は MAXI 法で  $2.18 \pm 0.06$ 、mini 法で  $2.25 \pm 0.10$ 、CTAB 法で  $2.25 \pm 0.10$  であった。ついで、計測した測定値(コピー数)に基づき定量値を再計算した結果では、すべての試料および定量 PCR 法の組み合わせにおいて、mini 法および CTAB 法により得られた各定量値と対応する MAXI 法により得られた各定量値とのバイアスは再計算前に比べて小さくなり、最小が 8.2%、最大が 27.9%であった。しかし、再計算された定量値について MAXI 法と mini 法、あるいは CTAB 法の間で有意差検定を行った結果では、最もバイアスの小さかった GA21L から CTAB 法を用いて抽出した DNA 試料について算出された GA21 定量値を除き、依然として信頼区間 95%での有意差を認める結果であった。

6. 大島分担研究：1) 理化学検査のための適正試料の作製— 重金属(カドミウム)検査調査試料の作製については、カドミウム高濃度汚染米を作製して、米中のカドミウム濃度を測定した後、カドミウム無添加米と混合・攪拌および遠心粉碎機で粉碎・混合して作製した混合精米(予定作製濃度約 0.31ppm)について試料容器に小分けし、無作為に容器 10 個採取し、それぞれの容器について  $n=2$  でカドミウム濃度を測定して試料の均一性を検討した結果、作製予定濃度約

0.31ppm に対して作製した調査試料の濃度は、0.32ppm、標準偏差 0.002、変動係数 0.6%で、作製予定濃度に対して 96.9%と近似した濃度の試料であった。また、この時の F 比が、1.493 と 5%水準(F 値 3.02)より小さく、精度管理調査に使用する調査試料として均一な濃度を確保することができた。残留農薬(有機リン系農薬)検査試料の作製では、市販ほうれん草ペースト(収穫後、水蒸気処理してペースト状としたもの)に有機リン系農薬(クロルピリホスおよびダイアジノン)を添加して作製した。無作為に採取した 10 個の容器について繰り返し 2 回の濃度測定を行った結果、クロルピリホス濃度 0.010ppm、標準偏差 0.000、変動係数 3.85%およびダイアジノン濃度 0.040 ppm、標準偏差 0.001、変動係数 3.23%であった。それぞれの作製予定濃度(クロルピリホスおよびダイアジノンの作製予定濃度 0.010ppm、0.040ppm)に対して、いずれも 100%濃度の試料であり、F 比はそれぞれ 0.976 および 1.578 と 5%水準(F 値 3.02)と比較して小さく、容器間の濃度は均一であると判断された。安定性については、作製当日の濃度と比較して冷凍 50 月後でクロルピリホス  $103.3 \pm 3.10\%$ 、ダイアジノン  $100.1 \pm 2.2\%$ の安定性(残存率)であった。残留動物用医薬品(フルベンダゾール)検査調査試料の作製では、鶏の液卵に水を加えた後、フルベンダゾール(メタノール溶液)を加えて攪拌・混合し、残留動物用医薬品検査試料を作製した。試料容器に小分け後、容器 10 個を無作為に採取し、それぞれの容器について  $n=2$  でフルベンダゾール濃度を測定した結果、作製した試料の濃度は 0.193ppm、標準偏差 0.006、変動係数 3.11%と、作製予定濃度 0.240ppm に対して 80.4%と低い濃度であった。しかし、

F比が、1.47 と 5%水準 (F値 3.02) より小さく、容器間の試料濃度に相違はなく、調査試料として採用可能であった。

## 2) 微生物学検査のための適正試料の作製

— *S. Enteritidis* を液卵に添加して作製した調査試料では、輸送前の生菌数測定結果に比べて輸送後の生菌数は、いずれの菌液添加濃度においても減少する傾向を示し、発送前後の変動菌数を log 表示すると  $-0.37 \sim -0.56$  であった。添加菌数の最終濃度が約  $10^4 \text{cfu/mL}$  の場合、最も大きな減少傾向を示した。一方、*S. Typhimurium* を添加して作製した調査試料では、輸送前の生菌数測定結果に比べて輸送後の生菌数は、いずれの菌液添加濃度においても増加する傾向を示し、発送前後の変動菌数を log 表示すると  $0.03 \sim 0.38$  であった。添加菌数の最終濃度が約  $10^4 \text{cfu/mL}$  の場合、最も大きな増加傾向を示していた。試験対照として作製した *P. mirabilis* 添加試料では、*S. Enteritidis* を添加して作製した調査試料と同様に、輸送前の生菌数測定結果に比べて輸送後の生菌数は、約  $10^1 \text{cfu/mL}$  を除き、いずれの濃度においても減少傾向を示し、発送前後の変動菌数を log 表示すると  $-0.29 \sim -0.44$  であった。添加菌数の最終濃度が約  $10^4 \text{cfu/mL}$  の場合、最も大きな減少傾向を示していた。

殺菌液卵 (鶏卵) 25 g を秤量し、緩衝ペプトン水 (OXOID +  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  54mg/L) 225mL に加えて 10 倍希釈液作製し、これを  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で培養した結果、いずれの添加菌濃度 (約  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4 \text{cfu/mL}$ ) においても増菌を認めた。この培養液 1mL を選択増菌培地 [テトラオネート液体培地 10mL; ベクトン・デッキンソン (TT)、ラパポート・バシリアディス液体培地 10mL; OXOID (RV)] に添加して増殖確認を行った結果、全ての試料で添加菌の発育を確認した。確認

培地として DHL (栄研化学)、MLCB (日水製薬)、XLD (栄研化学)、ブルルアントグリーン寒天培地 (栄研化学)、ESサルモネラ II (栄研化学) 用い、TT および RV で選択増菌した培養液を塗抹して添加菌の発育確認を行った結果、*S. Typhimurium* 添加試料を TT および RV で増菌させた後、MLCB 寒天培地に塗抹した場合、集落形成はほとんど認められず、*S. Enteritidis* でも高濃度添加試料のみ発育集落を検出した。他の選択培地では、多くの場合発育集落を認めるが、RV で増菌させた後の培養液塗抹は添加菌の濃度が高濃度の試料のみ集落形成を認める結果であった。なお、確認培地は、いずれも  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $22 \pm 2$  時間培養した後に判定した。また、対照として用いた *P. mirabilis* は、XLD 寒天培地上での発育は認めるものの、他の確認培地上では発育集落を認めない。輸送後の調査試料を用いた検査は、輸送前の調査試料からのサルモネラ属菌の検査と同様に実施した。検出傾向は、輸送前の結果とほぼ同様の傾向を示していた。検査手順にしたがって得られた集落について、その生化学的性状を簡易同定キット (API) で確認した結果、いずれの調査試料からも添加菌である *S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*P. mirabilis* を確認し、外部汚染による発育集落でないことを確認した。3) 貝毒検査のための適正試料の作製— 下痢性貝毒の陽性サンプルの作成は公定法の安元バイオアッセイ法を用いて陰性を予め確認後、凍結保存してある陰性ホタテホモジネート試料に、毒性が出ると予想される濃度の市販のオカダ酸の標準品を一定量濾紙ディスクに添着後、風乾してサンプルビン中に密栓し作製した。陰性サンプルは濾紙ディスクをそのまま用いた。下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、濾紙ディスクに吸着させ

たオカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中に本来の力価が失われる可能性があり、陰性サンプルは長期冷凍保存するとマウスアッセイ変動の要因となることが危惧される。そこで①蛍光 HPLC 法によるオカダ酸の測定法の確立を行い、濾紙に吸着させたオカダ酸の定量法の確立を行う。②濾紙中に吸着させたオカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温の3条件について3ヶ月追跡調査する。③ホタテ中腸腺ホモジネート及び剥き身ホモジネートの長期（1年）冷凍保存サンプルについて精度管理調査用サンプルとして適切かどうか検討を加えた。蛍光 HPLC によるオカダ酸の測定は LEE 等の方法を一部変更した。測定機器を脂肪酸測定と共用するために、測定機器、カラム、溶離液、検出波長等の諸条件は全く同一設定にした。蛍光誘導体化はオカダ酸画分を濃縮乾涸後内部標準物質 100 $\mu$ L を加えて窒素気流中で乾涸し、ADAM 試薬 MeOH 溶液 100 $\mu$ L を添加し、常温、遮光下で3時間反応して HPLC 用のサンプルとした。測定結果はデカン酸による内部標準法で補正した結果、100ng ~ 50 $\mu$ g/mL の範囲で良好な直線性が得られた。濾紙に吸着させたオカダ酸の測定は、濾紙を 2mL のアセトンに浸漬して2 min 超音波抽出を行い、抽出液をエキクロディスク 13CR (0.45 $\mu$ m) で加圧濾過した。同じ操作を3回繰り返し3回分の濾液を合し、窒素気流下濃縮乾涸後、ADAM 化試料として濾紙ディスク中の吸着オカダ酸の測定は確立した。オカダ酸の回収率に変動の原因として、①平衡待ち時間、②メンブランフィルター、③濾紙の種類によって吸着能が異なるなどが考えられた。平衡待ち時間を変化させるとピーク高が変化し、測定値に大きな誤差を生じる事が危惧されたが、5 min ~ 15 min にはピーク高が一定になる事が明

らかになった。従って、安定したピーク高を得るために平衡待ち時間を 10 min と設定した。超音波抽出時に濾紙片が一部抽出液中に溶け出し白濁傾向が観察されたので、メンブランフィルターによる濾過を試みた。メンブランフィルターについては溶出液がアセトンであり、その溶剤の極性を考慮に入れて、非水系（有機系）のフィルター（エキクロディスク）と水系/非水兼用フィルター（クロマトディスク）について検討した結果、非水系のフィルターの方が良好な回収率を示し、バラツキも少ない結果であった。オカダ酸を吸着させる濾紙ディスクについてワットマン社製と東洋濾紙製について検討した結果、ワットマン社製の濾紙ディスクの方が回収率が良く、バラツキが少ない事が明らかとなった。以上をまとめるとオカダ酸測定上のバラツキの要因として、HPLC の平衡待ち時間、吸着濾紙の種類、精製時に用いるメンブランフィルターの種類等が今回の実験で示唆された。このように ADAM 試薬による蛍光誘導体化法には誤差を生じやすい要因が存在するが、測定には細心の注意を払って測定すれば、再現性の良い測定が可能であることが示唆された。濾紙吸着オカダ酸の回収率の経時変化を冷凍(-35 $^{\circ}$ C)、冷蔵(5 $^{\circ}$ C)、室温の3条件について3ヶ月追跡調査した。濾紙吸着オカダ酸をアセトンで抽出して、ADAM 試薬により蛍光誘導体化を行い、Flu-HPLC により測定して回収率を求めた (n=5)。回収率の測定頻度は1ヶ月までは毎週、1ヶ月と2ヶ月間は隔週に行いそして最後に3ヶ月を測定した。オカダ酸はどの条件でも経時的に緩徐に減少することが明らかになった。冷蔵及び冷凍条件下では3週間程度なら比較的安定であり、外部精度管理用サンプルとして使用の可能性が示唆された。また、常温保存では約3週間

回収率が 50%程度維持された。これまでの結果では、LD50 が 192 $\mu$ g/kg であるオカダ酸の添加濃度は、40 $\mu$ g を予想した。中腸腺では 40 $\mu$ g で毒性を発現する結果となったが、剥き身のサンプルでは 40 $\mu$ g 添加時に毒性が発現する時としない時があった。ほたて剥き身ホモジネートとほたて中腸腺ホモジネートを  $-70^{\circ}\text{C}$  で一年保管しマウスアッセイを行い精度管理用サンプルとして適するかどうか検討した結果、ほたて剥き身ホモジネートはマウスアッセイで陰性であったが、ほたて中腸腺ホモジネートは陽性であった。そこで中腸腺ホモジネートに水を等量加え攪拌後再度マウスアッセイを行ったところ陰性であった。剥き身に関しては  $-70^{\circ}\text{C}$  に保管すれば、1 年間は精度管理用基材として使用可能であることが示唆された。4) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製— 外部精度管理用試料に添加する既知量の卵タンパク質を含む液を得るため、試薬として入手可能な卵粉末 (Egg Solids および Whole Egg Powder) を使用して卵抽出液の作製を試みた。2 種類の卵粉末について粉末のサンプリング量を変えて抽出を行い、得られた抽出液のタンパク質量を 2-D Quant Kit および ELISA 法で測定した。2-D Quant Kit の測定値を添付文書のタンパク質量で序した抽出率は、2 つの卵粉末ともおよそ 80~90% で大きな差は認められなかった。一方、ELISA 法では Whole Egg Powder の抽出率が Egg Solids に比べて低く、抽出率はモリナガ FASPEK 卵測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 卵ともに約 40% であった。Egg Solids ではモリナガ FASPEK 卵測定キットの抽出率が FASTKIT エライザ Ver. II 卵に比べて低値を示し、モリナガ FASPEK 卵測定キットが 60~63%、FASTKIT エライザ Ver. II 卵が

73~78% であった。サンプリング量と抽出率の関係を検討した結果、2-D Quant Kit による抽出率は卵粉末に対する抽出用緩衝液の割合が多いほど(サンプリング量が少ないほど)高くなったが、ELISA 法ではこの傾向は認められなかった。ELISA 法の測定値を 2-D Quant Kit の測定値で除して回収率を計算した結果、サンプリング量 0.2g および 0.5g における FASTKIT エライザ Ver. II 卵の回収率は 85% 以上と良好であった。これらの結果から卵抽出液の作製は化学的方法による測定値と ELISA 法による測定値の乖離が少ない Egg Solids を用い、サンプリング量 0.2g で実施することとした。Egg Solids 0.2g を用いた抽出原液を約 200ng/ $\mu$ L に希釈した卵抽出液について、 $4^{\circ}\text{C}$  および  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存後に ELISA 法で測定し、保存前の測定値と比較した結果、いずれのキットのいずれの測定時点においても保存前の測定値に対する回収率は 94% 以上であり  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}$  いずれも保存後 54 日後までの安定性が確認された。厚生労働省の通知で陽性と判断される卵タンパク質量 (10 $\mu$ g/g) およびその半量を目安として添加試料を作製した。スナック菓子、ビスケット、クリームサンドクッキー、ハンバーグ、薄力粉、そば粉、スキムミルクに高濃度標準溶液 (卵標準品 二次希釈液) を 25 $\mu$ L または 50 $\mu$ L 添加した試料について、卵タンパク質量を ELISA 法で測定した。高濃度標準溶液を加えない試料の抽出液については 2-D Quant Kit による総タンパク質量の測定も行った。いずれの食材も卵タンパク質を添加しなかった試料では ELISA 法による測定値は検出限界以下であった。食材のうちスナック菓子、ビスケット、クリームサンドクッキー、ハンバーグは 2 つの ELISA 法キットともに添加タンパク質量に対する回収率がおおむね 80% 以上で

あり、ELISA 法キット間の測定値にも大きな差はなかった。一方これら食材に比べ、薄力粉、そば粉、スキムミルクは回収率がやや低く、この傾向は特に FASTKIT エライザ Ver. II 卵の測定値において顕著であり、ELISA キット間で測定結果に差が認められた。スナック菓子を除く食材ではいずれのキットにおいても添加タンパク質量が 5.9 $\mu\text{g}$  の回収率が 11.7 $\mu\text{g}$  の回収率を上回っていた。また、3 試料の測定値間の RSD はスナック菓子で 7~10% とやや大きかったが、その他の試料ではおおむね 5% 以下の結果であった。高濃度標準溶液の添加回収試験で回収率および RSD が良好であったクリームサンドクッキーおよびハンバーグに 200ng/ $\mu\text{L}$  に希釈した Egg Solids 抽出液を 25 $\mu\text{L}$  または 50 $\mu\text{L}$  (タンパク質量としてそれぞれ 5.0 および 10.0 $\mu\text{g}$  : 2-D Quant Kit の測定値から計算) を添加した試料について ELISA 法によりタンパク質量を測定し、回収率および再現性を検討した。さらに添加試料を  $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 ヶ月保存後にも同様に測定を行い、保存安定性を検討した。その結果、調製直後の測定値を添加タンパク質量で除した回収率は FASPEK 卵 測定キットでは高濃度標準溶液の添加回収試験の結果と比べやや低く 77~92%、FASTKIT エライザ Ver. II 卵ではやや高く 85~113% であった。また、試料間の RSD はいずれも 3.5% 以下と良好な再現性を示した。添加試料の保存後の測定値を保存前の測定値で除した回収率はモリナガ FASPEK 卵 測定キットではいずれも 100% 以上、FASTKIT エライザ Ver. II 卵ではいずれも 93% 以上であり、添加試料の安定性についても確認された。

#### D. 考 察

1. 田中分担研究： 試料調製方法の妥当性と試料の均質性、および安定性の確認

では、ラウンド 1 および 2 の各試料の測定値について一元配置分散分析を行った結果、試料間の有意差は見られないので均質性が確認され、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 ヶ月間冷凍保存した場合でも統計上の差異は認められなかったことから、少なくとも検査期間 (2-3 週間) 内の安定性にもんだいは無いものと判断した。各農薬の測定結果を機関別に評価すると、Xbar-R 管理図および Z-スコアによる評価で各検査項目において適正域に入っていない機関を認める。精度の違いを生じる要因を知るにあたり、重回帰分析などの多変量解析を用いるには、9 機関 (9 例) のデータだけでは、変量を細分類した場合、データ数がさらに少なくなるので、統計解析を行ってもその信頼性が低く相当問題があると考えられたため、ここではデータの絞込みや分類による探索的データ分析 (ビジュアルデータマイニング : 視覚化データ処理技術) の手法を用いて精度の傾向を探索した。全体を網羅したビジュアル表示から平均適正率 100% (全項目クリアしていた) を選択してズームインすると、平均適正率 100% (エクセレント) の機関の傾向が読み取れた。B 機関と C 機関の 2 機関が該当し、分析担当者の農薬検査の経験年数が長いこと (10 年、14 年)、アセトニトリルによる抽出溶媒で抽出回数を二回しており、最終検液が 2g/ml、検量線の濃度設定も少なめで GC に負荷の少ない方法を採用していることが認められた。平均適正率の軸を選択、次に 90% 台の範囲を選択して拡大すると平均適正率 90% 台の機関の傾向が読み取れた。A 機関、F 機関、I 機関の 3 機関が該当し、特にアセトニトリルによる一回だけの抽出が共通していた。この一回抽出が、適正率 90% 台程度の精度は出せるがパーフェクトにならない要因と推定した。平均適正率の軸を選択、次に 70%~80% 台の

範囲を選択して拡大すると平均適正率 70%~80% 台の機関の傾向が読み取れた。D 機関、E 機関、G 機関、H 機関の 4 機関が該当し、特に分析担当者の農薬検査の経験年数が 4 年以下であり、最終検液が 5g/ml 以上で GC に負荷が大きく、アセトニトリル抽出以外（アセトン、SFE）、GC/MS 以外（LC/MS）など機関特異的また使用機種特異的な方法が浮き彫りになった。これらがやや精度を下げている要因と推定した。二回の外部精度管理調査において管理図、Z-スコアなど客観的評価で全て適正であった 2 機関の試験法及びレポートを考察すると、B 機関では精製工程を長くしてマトリックスの影響を極力少なくすることに留意していた。C 機関では厚生労働省通知の一斉分析法であった。2 機関とも最新の農薬検査の内部精度管理（添加回収）データにおいてもよくバリデーションされていた。これらの機関の試験法は外部精度管理調査の結果から優れている結果を出しているため、食品の農薬検査に推奨できる試験法と言える。これらの機関の実演による研修や同じ本試験法を参考にすることで精度管理の向上に大きく寄与できるものと思われる。厚生労働省では農薬の一斉分析検査（スクリーニング検査）でも正確な精度の対応を求めており、さらにポジティブリスト制による農薬数の増加に伴い、より確実かつ効率的な農薬の検出、確認、定量が要求されている。近年 SCAN 法による定性定量を目的とした GC/MS データベース解析ソフトが開発されている。トリプルデータベース相対定量法（商品名：NAGINATA、西川計測、TDB 法と略す）は、農薬成分等の保持時間、マススペクトル及び検量線情報がデータベース化され定性定量ができるとされている。今回、外部精度管理試料の最終検液（1g/mL）を添加農薬の種類および添加量を知らせず

に分析機器メーカー 3 社に送付し、その 3 社と大阪府立公衆衛生研究所との 4 機関で、TDB 法による測定を行い、定性能力・定量性について検証した。4 機関による定量値は全般的に添加量より約 1.2~2 倍高い値を示した。TDB 法は、マトリックスなしの標準による検量線を使用しており、送付した最終検液がマトリックスの影響もあることからマトリックス標準を使用していない点を考慮すると、よく一致していると考えられた。フェンバレート（ピレスロイド系農薬）は、2 社が不検出となったが GC/MS（EI-SCAN）の感度の乏しさと沸点 300°C（4.9kPa）の高さなどが考えられ、最終検液（1g/ml）を倍にするか、SCAN より 50~100 感度の高い SIM 法を採用することで検出できるものと考えられる。以上の点から TDB 法は、定性能力が高く、定量性においても標準物質を測定し補正を行えば正確な値が得られることが示唆された。農薬の同定に補完的に利用することにより、農薬検査の有効な手段となり得るものと考えられる。GC のシステムチェック、データ解析の自動化などが出来ることから今後ますます重要視され、精度管理の一助になると考えられた。また農薬、化学物質による健康危機事例が発生したときのスクリーニング目的としても有用と思われる。

2. 中澤分担研究： BFRs の 3T3-L1 培養脂肪細胞に及ぼす影響を検討した結果、PBDEs および HBB は、ダイオキシンやビスフェノール A に見られるような脂肪細胞への影響は認められていないが、TBBPA は誘導促進剤を加えたものと同値の GPDH 活性を示し、脂肪細胞の分化に促進的に作用する可能性が考えられる。分化誘導剤を添加により分化が誘導され、前駆脂肪細胞が効率よく脂肪細胞へと分化する。分化誘導剤を添加する代わりに、当該化学物質を添加し、分化誘導作用の



有無を検討した結果では、PBDEs (HpBDE #183、DeBDE #209) HBB および TBBPA は、ともに分化誘導剤添加時のような GPDH 活性は見られなかった。このことから HpBDE #183、DeBDE #209、HBB、TBBPA は、脂肪細胞の分化を誘導する作用を持たないことを示唆する。しかしながら、分化誘導剤添加後、インスリン存在下に TBBPA を添加すると、陽性コントロールよりも、高値の GPDH 活性を示し、インスリン非存在下に、TBBPA を添加した場合でも、GPDH 活性の上昇を認める。オイルレッド O による染色の結果でも、GPDH 活性測定結果と同様に、インスリン存在下、および非存在下いずれでも TBBPA の添加により吸光度の高値を示す。これらの結果から、TBBPA がインスリンのように脂肪細胞内への脂肪蓄積を促進する作用を持つことが示唆される。

3. 松木分担研究：純度及び各社の表示との比率を含量比として示したが、表示値より低い値を示す傾向にあった。フェニトロチオンの GC 分析結果において含量比が 3 社ともに表示純度より著しく低い結果を示した要因としては、測定時の分解による影響が推測された。また、同条件で測定しているにも関わらず、分解物の生成比率が各社で異なる事例も見られ、製造過程や精製法の違いや用いている原材料の違いと推測された。なお、メプロニル、プレチラクロール、ピフェントリン、ホサロンの HPLC 測定については、今秋採用した各被験溶液の濃度では、ピークレスポンスの直線性のとれていない範囲なのであったことが判明したため、今回得られた含量は、正確さに欠ける可能性が高いため、再度検討が必要であると判断している。

4. 米谷分担研究：濃度の低い異性体が、必ずしも大きなばらつきを示すわけではなく、外れ値の存在が考えられた。ただ

し、参加機関数が少なく、Grubbs の検定等を用いて検定し、外れ値を除外して機関数を減らすことは適切ではないため、頑健な統計量の計算を行った。頑健な統計量は、外れ値を除外することなく、その影響を除いた平均値と標準偏差が求められる。1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF の結果では、機関 3 が他の 10 倍以上の値を報告している。この値を含めて、通常の方法で平均値を求めると 0.24 pg/g となるが、頑健な平均値は 0.073 pg/g であり、外れ値と考えられる機関 3 の結果の影響が除かれているが、SD は平均値よりも、外れ値の影響を受けやすいために、2 つの方法で求めた SD が一致していない異性体が多く見られる。通常の統計量を用いて計算した Z-スコアには 3 を超える値は現れず、外部精度管理の評価では、全ての機関が問題ないと評価される。しかし、頑健な統計量により計算した Z-スコアでは、いくつかの異性体で 3 を大きく超える Z-スコアが現れ、問題のある数値が明らかとなった。

5. 渡邊分担研究：DNA の収量、質およびそれらのばらつきについて 4 種の DNA 抽出法のそれぞれを用いて抽出される DNA を用いて比較検討したが、異なる DNA 抽出法を用いることにより DNA の収量が異なることが明らかとなったが、その主たる原因は各 DNA の抽出法に含まれる縮分操作であると考えられる。MAXI 法では 1g の試料から縮分操作を行うことなく DNA を抽出するが、CTAB 法、mini 法、WIZARD 法では、2g の試料を対象に抽出を開始し、抽出緩衝液を添加し均一化した混合液の一部を分取し、縮分操作が規定されている。CTAB 法、mini 法、WIZARD 法の縮分率は、おおよそ DNA の収量と相関していると考えられ、収量そのものは定量 PCR 法の結果に影響を及ぼすことがないと考えられる。

しかし、試料に複数系統の GM トウモロコシが含まれる場合、系統別の定量値を算出することを目的に繰り返し測定を行う時に、DNA 試料が不足ことも予測された。DNA 収量のばらつきについては、一部の結果を除けば DNA 抽出法および試料の種類によらず RSD は基準を下回っており、安定した量の DNA が抽出されていると判断された。純度検定では、タンパク質残存の指標となる OD 260 nm / 280 nm 比に関して、すべての DNA 抽出法と試料の組み合わせで基準を下回ることがなかったが、糖類等の残存指標とされる OD 260 nm / 230 nm 比に関しては CTAB 法および WIZARD 法を用いた場合に、すべての試料から得られた DNA について基準を下回った。抽出緩衝液中に含まれる EDTA が 230 nm 付近に強い吸光を有するため、これが残存した場合に OD 260 nm / 230 nm 比が低下することが指摘されている。また WIZARD 法では、抽出緩衝液に含まれるグアニジン塩酸が 230 nm に吸光を有することが知られており、これが残存したために OD 260 nm / 230 nm 比が低下したものと考えられた。抽出 DNA の分子量分布では、抽出された DNA が極度に分解し低分子量化していた場合、定量 PCR 法における鋳型となり得ず、内在性遺伝子もしくは GM 作物特異的 DNA 配列を正しく計測することができないと考えられる。DNA 試料中に含まれる DNA の分子量分布結果は、低分子方向にむけて薄い帯をひくスメア状の電気泳動像がすべての抽出法および試料の組み合わせにおいて観察され、WIZARD 法で DNA を抽出した場合、他の抽出法に比べて DNA の低分子量化が進みやすい傾向があることを示唆している。植物組織からインタクトな高分子量ゲノミック DNA の抽出を試みた場合、様々な分子量に分解

した DNA の存在を示すスメアな像は観察されないことから、これらの抽出法を用いて抽出された DNA 試料に含まれる DNA が部分的に分解し、様々な分子量の断片になっていることが示唆される。しかし、特定の DNA 抽出法によって低分子量化した DNA のみが観察されることがなかったことから、各 DNA 抽出法によって抽出される DNA の分子量分布の点において、定量 PCR 法の結果に重大な影響を与える要因は認められないと考えた。内在性遺伝子のコピー数比較において、定量 PCR 法を用いる場合、GM トウモロコシの定量値は、トウモロコシに普遍的に含まれる内在性遺伝子 (*SSI1b*) の測定値と GM トウモロコシに含まれる組換え DNA 配列の測定値 (コピー数) の比を求め、これに換算係数 (内標比) の逆数を乗じて算出される。今回実施したいずれの抽出法を用いても併行再現性よく *SSI1b* コピー数が測定される試料であることが示唆された。しかし、MAXI 法、mini 法、CTAB 法、WIZARD 法によって得られたコピー数の平均  $\pm$  S.D. には、最大コピー数と最小コピー数の差が約 15000 コピーあり、GM トウモロコシの定量値は *SSI1b* 測定値と組換え DNA 配列のコピー数比に基づき算出されるため、DNA 抽出法が異なることで計測される *SSI1b* 測定値に差が認められることと、DNA 抽出法が異なることで定量値に差が認められることは同義ではない。また、同一の DNA 抽出法で抽出された DNA 試料を 1 セットとして、セットごとに異なるランで測定したものであるため、ラン間のばらつきを含む可能性も否定できない。電気泳動の結果からは判断することのできない DNA 分子の状態、PCR に影響を及ぼす未知の不純物などが、特定の DNA 抽出法において *SSI1b* コピー数に影響を与えているのかもしれない。DNA 抽出法に応じて内標比は変動する可能性があるため、DNA 抽出法に依らない共通の内標比を換算係数として用いることによる誤差が系統的に生じる

ことを示唆している。しかし、DNA 抽出法に固有の内標比を用いてもなお、一般的な統計解析手法を用いて評価した場合には有意差が認められており、この結果からは、定量 PCR 法により得られる定量値の評価を行うためには、その目的に特化した評価基準を設定する必要があるのではないかと考えられた。定量 PCR 法において、特定の DNA 配列を計測するための基本原理である PCR には、酵素反応による高度な増幅過程が含まれる。このため、他の理化学的な分析方法により得られる計測値に比べ、温度や阻害物質などの要因変動による初期 DNA 配列計測値への影響が少なくないと考えられる。さらに、直接の分析対象物質である DNA は、分子量や化学修飾の状態が異なるヘテロジニアスな物質群として調製される。これらの点から考えれば、本研究で検討した DNA 抽出法を含む分析法自体の影響はもちろんのこと、試料については特に、品種、産地、生育状態、保存期間などにより試料中の成分さらには DNA そのものが大きく変化する可能性があるため、今後、十分な検討を行うべき課題であると考え。実際に本研究で調製した GA21L ならびに GA21H は、それぞれ重量混合比として 1% ずつの Mon810 と GA21 試料、1% の Mon810 試料と 5% の GA21 試料を含む擬似混入試料として調製したが、均一であることは確認されたものの、重量混合比を真値とした場合、いずれの DNA 抽出法を用いても妥当であると評価しうる定量値は得られていない。さらに、非常に難しいが、分析方法、試料、分析者等の複数の要因が組み合わされた場合の影響についても知見を蓄積し、これらの影響を不確かさとして加味した上で、評価手法を開発していくことが望ましいと思われる。定量 PCR 法により得られる定量値をより実際的に評価可能な手法の開発が進められることにより、新たに開発される定量 PCR 法の妥当性をより適切に評価すること、また外部精度管理

試験においてより適正な管理を行うことが可能となり、ひいては定量 PCR 法という分析方法の信頼性がさらに向上することが期待される。6. 大島分担研究：1) 理化学検査のための適正試料の作製— 予め作製したカドミウム高濃度精米の濃度を測定した後、カドミウム無添加精米を加えて作製予定濃度のカドミウム混合精米を作製する方法では、ほぼ作製予定濃度の調査試料を作製することができること、および小分けした試料容器間のカドミウム濃度の F 比(10 個の試料容器から  $n=2$  で採取して濃度を測定)が 1.49 (5% 水準 F 値 3.02) と、濃度の均一性も確保でき、当作製方法が、調査試料の作製方法として、適切であると判断した。市販ほうれん草(収穫後、水蒸気処理して加工したペースト状の製品)に有機リン系農薬(クロルピリホスおよびダイアジノン)を添加して、濃度の均一性および安定性(冷蔵、冷凍保存)を調べた。その結果、作製した有機リン系農薬検査調査試料の濃度は、クロルピリホスおよびマラチオンのいずれにおいても作製予定濃度に対して、100%濃度の調査試料を作製することができた。調査試料として作製予定濃度の試料を適切に作製できることが分かった。また、安定性は、作製当日の濃度と比較して冷凍 50 日後でクロルピリホス 103.3%およびダイアジノン 100.1%と、いずれも適切な調査試料を作製できることを確認できた。残留動物用医薬品の精度管理試料には食肉を採用する要望が多い。しかし、食肉に直接残留動物用医薬品を添加することが、濃度の均一性の観点から難しく、精度管理調査結果の評価を困難にしていた。そこで、液状の食材として残留動物用医薬品の規格基準がある液卵を使用して、これに残留動物用医薬品(フルベンダゾール)を添加する作製方法を検討した。市販の液卵は、クロ

マトグラムにフルベンダゾールの測定を妨害する成分の出現はなく、また、濃度の均一性も確保できた2) 微生物学検査のための適正試料の作製— 実食材を用いて、サルモネラ属菌検査のための調査試料(殺菌液卵)の作製し、接種菌量の設定、輸送による接種菌数の変動、公定法による添加菌の検出について検討した。サルモネラ属菌検査用調査試料として検討した殺菌液卵(鶏卵)は、液状であるため取り扱いや接種菌の均一化は容易であったが、試験菌が低温保存下でも発育増殖を示すため、増殖抑制を考慮して基材に安定化剤を添加する必要があった。低温で保存すれば接種菌量を調整することにより、調査試料中の菌数を期待する菌数範囲に留めることは可能であったが、今回のような基材の場合、菌の増殖抑制と基材の変質(腐敗臭の発生)防止のため安定化剤の添加は必須と考えられた。輸送前後において菌数測定を行った結果では、低濃度から高濃度接種試料中での生菌数に極端な変動は認められないものの、菌種によって増加傾向にあるものと減少傾向にあるものとが観察されており、標準菌の選択に注意が必要である結果となった。また、輸送による接種菌の変動、公定法による接種菌の検出についても、標準菌株の性状を十分考慮しなければならない結果であった。すなわち、前増菌培地に緩衝ペプトン水(OXOID + FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 54mg/L)、選択増菌にTT、RVを用いた場合、試験菌の発育は認められるが、選択培地上での試験菌の発育集落観察においては、MLCB培地での確認が困難であり、特にRVを選択増菌培地に採用して増菌を行った後、確認培地に移植して発育集落を観察すると、低濃度接種試料においてはいずれの確認培地(MLCB、DHL、XLD、ES Sal II)上でも、発育集落を認めることが困難であっ

た。また、接種菌量が多い試料からの確認検査においても、RVとMLCBの組み合わせは最も検出率の悪い結果であった。この結果は、輸送後の検体についても同様の傾向を示していた。3) 貝毒検査用調査試料の作製— 現在問題となることが予想される下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中に本来の力価が失われる可能性があり、また、陰性サンプルを長期冷凍保存するとマウスアッセイ変動の要因となることが危惧される。

測定法を検討する過程でオカダ酸の回収率に往々変動が観察された。その変動の原因に関して、①平衡待ち時間、②メンブランフィルター、③吸着濾紙の種類に関して若干の知見が得られた。そこで安定したピーク高を得るために、平衡待ち時間を10 minとした。オカダ酸測定上のバラツキの要因として、HPLCの平衡待ち時間、吸着濾紙の種類、精製時に用いるメンブランフィルターの種類等が今回の実験で示唆された。このようにADAM試薬による蛍光誘導体化法には誤差を生じやすい要因が存在するが、測定には細心の注意を払って測定すれば、再現性の良い測定が可能であることが判明した。下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中等に本来の力価が失われる可能性が危惧されている。濾紙吸着オカダ酸の回収率の経時変化を冷凍(-35℃)、冷蔵(5℃)、室温の3条件について3ヶ月追跡調査した。回収率の測定頻度は1ヶ月までは毎週、1ヶ月と2ヶ月間は隔週に行いそして最後に3ヶ月を測定した。今回の実験では結果をより早くモニターするために、オカダ酸はどの条件でも経時的に緩徐に減少することが明らかになった。冷蔵及び冷