

施により分析者の技術の維持、向上を図ることが必須である。また、問題が認められた場合にその解決を図るためには、分析結果やそのばらつきに影響を与える要因について明らかにすることが重要である。

前述の通知法において安全性審査を終了した GM トウモロコシの定量分析法としては、定量 PCR 法が定められている。また定量 PCR 法における直接の分析対象物質となる DNA を抽出・精製する方法については、3 種の方法(シリカゲル膜タイプキット法; mini 法、シリカベースレジジンタイプキット法; WIZARD 法、セチルトリメチルアンモニウムブロミド法; CTAB 法)が併記されている。一方で、定量 PCR 法の妥当性検証試験においては、上記 3 種の DNA 抽出法とは異なる方法(シリカゲル膜タイプキット法; MAXI 法)が DNA 抽出法として採用されており、さらに定量 PCR 法における定量値算出に使用される換算係数(内標比; 内在性遺伝子と GM 作物に特異的な DNA 配列のコピー数の比)には、MAXI 法により抽出した DNA 試料を用いた共同試験の結果として得られた実測値が規定されている。上述の通り、定量 PCR 法により GM トウモロコシの定量分析を行う場合には、4 種の DNA 抽出法を選択することが可能であるが、これら DNA 抽出法の違いが分析結果に与える影響についてはこれまでに明らかにされていない。

本研究においては、精度管理上管理すべき要因の一つとして、異なる DNA 抽出法が分析結果に与える影響について明らかにすることを目的とし、各 DNA 抽出法を用いて抽出された DNA の質ならびに収量、DNA 分解の程度、さらに定量 PCR 法により得られた分析結果(定量値)について詳細な解析を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料の調製

GM トウモロコシ(GA21 ならびに Mon810 系統)試料は厚生労働省医薬

食品局食品安全部監視安全課を通じ、米国モンサント社より入手した。また、擬似混入試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換え(non-GM)トウモロコシ試料(米国産トウモロコシ)は、米国の商事会社を通じて入手した。入手した全てのトウモロコシ試料を 500 μm のスクリーンを取り付けた高速遠心式粉砕器を用いて粉砕した。均一に粉砕した各種トウモロコシ試料を凍結乾燥処理した後、GA21 ならびに MON810 系統の粉砕試料はそれぞれ、100%GM トウモロコシ試料(GA21 試料および MON810 試料)として用いた。また、Non-GM トウモロコシ試料については、定量 PCR 法を用いた分析を行い、0.4%程度の GM トウモロコシの混入(MON810 系統)を確認した上で、マトリクス試料として用いた。マトリクス試料に対し、GA21 ならびに MON810 試料を重量換算でそれぞれ 1.0%となるよう混合した試料を低濃度試料(GA21L)、GA21 試料を 5.0%、MON810 試料を 1.0%となるよう混合した試料を高濃度試料(GA21H)とした。なお、これら擬似混入試料は小分け試料とした後に、平成 16 年度に実施した外部精度管理試験において配付試料した試料であり、その均一性、安定性が確認されている。

B-2. DNA 抽出

Mon810 試料、GA21 試料、GA21L および GA21H の計 4 種の試料を共通の試料として用い、mini 法、WIZARD 法、CTAB 法および MAXI 法を用いて DNA を抽出・精製した。各 DNA 抽出法は、食安発第 0517001 号もしくは JAS 分析ハンドブックに記載されている方法に従った。MAXI 法を用いた場合には、各試料について、1 点あたり 1g となるように秤量分取した小分け試料 6 点(計 24 点)から DNA を抽出した。その他の DNA 抽出法を用いた場合には、GA21L および

GA21H に関しては 6 点、MON810 試料ならびに GA21 試料に関しては 3 点、計 18 点の小分け試料から DNA を抽出した。

また、抽出した DNA の吸光度を 200 nm から 320 nm の波長域で連続的に測定し、O.D. 230 nm、260 nm、280 nm での吸光値をそれぞれ記録した。260 nm/280 nm および 260 nm/230 nm の比を求めることで精製度の確認をおこなった。また、O.D. 260 nm の吸光値 1 を 50 ng DNA として DNA 濃度を算出した。

B-3. 電気泳動

各試料、各 DNA 抽出法の組み合わせにより抽出された DNA をアガロースゲル電気泳動により分離した。電気泳動時には 0.7% の濃度で調製したアガロースゲル(6 cm X 11 cm)、 λ -HindIII digest マーカーを用いた。20 ng/ μ L の濃度に調製した各 DNA 試料液 15 μ L と Loading Buffer 2 μ L をよく混合させた後、各ウェルにアプライし、100 V 定圧で約 1 時間泳動した。泳動終了後のゲルは、エチジウムブロミド溶液中(150 ng/mL)で 30 分間染色し、その後、水中で 30 分間脱染色した。脱染色後のゲルを UV 照射装置上で画像解析した。

B-4. 定量 PCR 法

食安発第 0517001 号に記載の方法に準拠した。すなわち、CaM 定量値および CaM 内標比は、P35S-1 オリゴヌクレオチドセットと SSIib-3 オリゴヌクレオチドセット、GA21 定量値および GA21 内標比は、GA21-3 オリゴヌクレオチドセットと SSIib-3 オリゴヌクレオチドセットをそれぞれ組み合わせ、GM トウモロコシプラスミドセットを共通のキャリブレーションスタンダードとして用いる定量 PCR 法により測定されたコピー数に基づき算出した。

なお、擬似混入試料については、MAXI 法を用いた場合、抽出された DNA 試料に対して 2 回の繰り返し測定、それ以外の DNA 抽出法を用いた場合

には、1 回の測定を行った。内標比を計測することを目的とした場合には、MAXI 法については 2 回、それ以外の DNA 抽出法については 3 回の繰り返し測定を各 DNA 試料を対象に行った。

B-5. 統計解析

有意差検定は、内標比を計測するための DNA 試料の調製に使用され、定量 PCR 法の妥当性検証試験に諮られた MAXI 法により得られた結果との比較として行った。

まず、擬似混入試料と各 DNA 抽出法の組み合わせにより得られた定量値のそれぞれについて正規性を確認した。正規性が確認されなかった一群の定量値に関しては、U 検定により有意差を検定した。正規性の確認された一群の定量値に関しては、MAXI 法と他の DNA 抽出法との間で一元配置の分散分析を行い、等分散を確認した後に、Student t 検定を用いて有意差を検定した。

C.D. 研究結果および考察

C.D.-1. DNA の収量、質およびそれらのばらつき比較

本研究において対象とした 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 μ g で最も高く、これに対し、CTAB 法での DNA 収量が 2.81 μ 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 μ g および 13.16 μ g であった(表 1)。

上記の通り、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 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。これに対し、CTAB 法、mini 法、WIZARD 法のいずれにおいても、2g の試料を対象に抽出を開始するものの、抽出緩衝液を添加し均一化した混合液の一部を分取し、それ以降の操作を行うという縮分操作が規定されている。CTAB 法、mini 法、WIZARD 法の縮分率はそれぞれ 1/75、1/13.27、1/40、であり、おおよそ DNA の収量と相関していると考えられた。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が、試料に複数系統の GM トウモロコシが含まれており、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場合などには、DNA 試料が不足する可能性があることが予測された。

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 (R.S.D.) 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 R.S.D. は 20% 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。

純度検定においては、O.D. 260 nm / 280 nm、260 nm / 230 nm 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。表 1 に示したとおり、タンパク質残存の指標となる O.D. 260 nm / 280 nm 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 O.D. 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。CTAB 法に関しては、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 O.D. 260 nm / 230 nm 比が低下することが指摘されている。また WIZARD 法に関しては、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、O.D. 260 nm / 230 nm 比が低下したものと考えられた。

C.D.-2. 抽出 DNA の分子量分布

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。このため、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明らかにするため、電気泳動法により分離し確認した。その結果、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いた。この結果は、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ている。しかし、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 (Fig.1)。

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、Fig.1 にみられる 24kbp 付近のバンドが強く観察され、様々な分子量に分解した DNA の存在を示す、スミアな像は観察されない。検討を行ったいずれの DNA 抽出法を用いた場合にもスミアな像が観察されたことは、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を示唆している。しかし、前述のとおり、特定の DNA 抽出法によって低分子量化した DNA のみが観察されるといった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られた。

C.D.-3. 内在性遺伝子のコピー数比較

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。この分析法において、同一試料から同一の DNA 抽出法を用いて抽出された DNA 試料から測定される *SSI1b* 測定値は、基本的には安定して一定の値を示すと考えられる。また、理論的には規定質量の DNA に含まれる内在性遺伝子のコピー数は一定であるため、計測されるコピー数に DNA 抽出法による差異は生じないと考えられる。そこで、6 点の GA21H から各抽出法により併行抽出された DNA 試料を対象に *SSI1b* コピー数を測定し、比較した。その結果、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 R.S.D.が 3.25、11.48、8.05、13.02%であった(表 2)。この結果は、平成 16 年度の GM トウモロコシを対象とした外部精度管理の結果から解析された 28 機関で認められたばらつきの平均値(R.S.D.として 12.19%)と同等、もしくはそれ以下であり、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を抽出可能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±S.D.はそれぞれ 34464±1120、26426±3035、28314±2281、23908±3112 コピーであり、最大コピー数と最小コピー数の差は約 15000 コピー

であった(表 2)。先述の通り、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、表 2 にまとめたデータは、同一の DNA 抽出法により抽出された 6 点の 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。さらには、図 1 に示した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。

C.D.-4. 通知記載の内標比を用いて算出された GM トウモロコシ定量値の比較

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を評価するため、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。その結果、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(R.S.D.)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であることが明らかになった(表 3)。

MAXI 法は、通知記載の内標比を計測するための共同試験および、定量 PCR 法の妥当性検証試験に採用された DNA 抽出法であるため、本研究で検討した 4 種の DNA 抽出法の中で最も検証の進められている DNA 抽出法であると考えられる。そこで、MAXI 法により得られた各定量値と、その他の DNA 抽出法により得られた定量値のうち対応する定量値とを比較し、その差をバイアスとして算出した。その結果、WIZARD 法と MAXI 法により得られた各定量値のバイアスは、すべての試料と定量 PCR 法の組み合わせを通して、±10%以内であった。これに対し、mini 法および CTAB 法の

それぞれと、MAXI 法により得られた各定量値のバイアスは、試料および定量 PCR 法の組み合わせによって大きさに差が認められるが、最小が 12.2%、最大が 33.9%であった(表 3)。さらに、3 種の DNA 抽出法により得られた各定量値と、それぞれに対応する MAXI 法により得られた定量値との間で有意差検定を行った結果、mini 法および CTAB 法で得られたすべての定量値と MAXI 法で得られた定量値との間に、信頼区間 95%での有意差が認められた(表 4)。

C.D.-5. DNA 抽出法別内標比の計測と定量値の再計算

MAXI 法と比較した場合、mini 法および CTAB 法により得られた定量値が WIZARD 法により得られた定量値に比べバイアスが大きく、かつ、試料と定量 PCR 法の組み合わせのすべてを通じて高値であった結果は、mini 法および CTAB 法により得られる定量値に系統誤差が含まれていることを示唆している。表 3 に示したすべての定量値は、通知に記載された内標比を用いて算出しており、先述のとおり、この内標比は MAXI 法を用いて抽出された DNA 試料を対象とした共同試験により計測された換算係数である。このため、mini 法と CTAB 法により抽出された DNA を対象として計測される内標比が、MAXI 法により抽出された DNA を対象として計測される内標比とは異なっていた場合、系統誤差を生じる最大の要因になり得るのではないかと考えられた。そこで、擬似混入試料調製時に添加した 100%GM トウモロコシ試料(Mon810 ならびに GA21 試料)から mini 法および CTAB 法を用いて抽出した DNA 試料を対象に内標比を計測した。また、測定に使用した定量 PCR 機器の影響により、厳密には通知記載の内標比とは異なる内標比が計測される可能性が考えられたため、MAXI 法により 100%GM トウモロコシ試料から抽出した DNA 試料についても同様に内標比を測定した。その結果、通知記載の CaM 内標比が 0.39 であるのに対し、測定され

た CaM 内標比の平均±S.D は MAXI 法で 0.42±0.02、mini 法で 0.45±0.01、CTAB 法で 0.44±0.04 であった。一方、通知記載の GA21 内標比が 2.01 であるのに対し、測定された GA21 内標比の平均±S.D は MAXI 法で 2.18±0.06、mini 法で 2.25±0.10、CTAB 法で 2.25±0.10 であった(表 5)。ついで、測定された内標比および、表 3 にまとめた定量値を算出するために計測した測定値(コピー数)に基づき定量値を再計算した結果、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(表 6)。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、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%での有意差が認められた(表 7)。

C.D.-6. 定量値の評価手法

表 3 に示したとおり、通知記載の内標比を換算係数として用いた場合、mini 法、CTAB 法により得られる定量値は MAXI 法により得られる定量値に対し 12.2%~33.9%のバイアスを示し、一般的な統計解析手法に従って評価した場合、有意差が認められた(表 4)。また、表 6 に示したとおり、DNA 抽出法に固有の値として内標比を新たに計測し、その値を用いて定量値を再計算した場合、通知記載の内標比を用いた場合に比べ観察されるバイアスが小さくなった。これらの結果は、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。しかし表 7 に示したとおり、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。すなわち、本研究において使用した Student t 検定や、U 検定といった一般的な統計解析手法およびそこで設定される有意水準と、定量 PCR 法により得られる定量値の差異を評価すべき方法および水準とが合致しておらず、 α 過誤が起きているのではないと思われる。

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られる。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。

E. 結論

DNA 抽出法が定量 PCR 法により得られる GM トウモロコシ定量値に与える影響について明らかにすることを目的に、公定分析法に規定されている 4 種の DNA 抽出法について、DNA の質、収量、DNA 分解の程度、および GM トウモロコシ定量値について詳細な解析を行った。その結果、CTAB 法と WIZARD 法において、DNA の質の評価基準とされる吸光度比のうち、260 nm/230 nm 比が顕著に低下することが示された。また、DNA の収量に関しては、4 種の DNA 抽出法の間でばらつきに差は認められなかったが、CTAB 法を用いた場合の平均収量が明らかに少なくなることが示された。さらに、電気泳動により分離し得られた像から判断する限り、DNA 分解の程度に明確な差は認められなかった。

MAXI 法により得られた定量値を比較中心として、一般的な統計解析手法により有意差を検定した結果、mini 法ならびに CTAB 法を用いて得られる定量値との間に有意差が認められた。定量値の算出に使用される換算係数である内標比が DNA 抽出法ごとに変動し、定量値に大きな影響を与える可能性が考えられたため、各 DNA 抽出法により調製した DNA ごとに内標比を計測し、それらを用いて定量値を再解析した。しかし、再解析された定量値を検定してもなお、一般的な統計解析手法を用いた場合には有意差が認められた。これらの結果から、DNA 抽出法が異なることによる定量値への影響を評価するためには、それに特化した評価手法が必要ではないかと考えられた。さらに、本研究で検討した DNA 抽出法を含む分析方法の全体、試料、分析者等複数の要因が定量値に与える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、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ため、また外部精度管理試験においてより適正な管理をおこなうためには必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

菊地博之、渡邊敬浩、笠間菊子、和久井千世子、松木容彦、穠山浩、米谷民雄：遺伝子組換えパパイヤ(55-1)定性検査法を対象とした外部精度管理試験結果の解析。食品衛生学雑誌、**46** (1) 21-27 (2005)

笠間菊子、渡邊敬浩、鈴木達也、菊地博之、時下祥子、坂田こずえ、松木容彦、日野明寛、穠山浩、米谷民雄：遺伝子組換えダイズ(ラウンドアップ・レディー・大豆 40-3-2 系統)の定量検査法の外部精度管理試験。食品衛生学雑誌、**46** (6) 270-276 (2005)

渡邊敬浩、笠間菊子、菊地博之、鈴木達也、時下祥子、坂田こずえ、松木容彦、日野明寛、穠山浩、米谷民雄：遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験。食品衛生学雑誌、**47** (1) 15-27 (2006)

渡邊敬浩、時下祥子、笠間菊子、鈴木達也、大島赴夫、菊地博之、日野明寛、穠山浩、米谷民雄：遺伝子組換えトウモロコシ(GA21 ならびに MON810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験。食品化学学会誌、submitted

2.学会発表

渡邊敬浩、菊地博之、笠間菊子、鈴木達

也、大島赴夫、日野明寛、穠山浩、米谷民雄：遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810)定量検査法の外部精度管理について。第42回全国衛生化学技術協議会年会 (2005 年 11 月 17~18 日;東京)

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

表 1. DNA の収量、質およびそれらのばらつき

Method	Sample	Number of test portions	DNA (μg)	R.S.D. (%)	Ratio	
					260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
MAXI	GA21L	6	43.28 \pm 4.07	9.41	1.84 \pm 0.00	2.14 \pm 0.03
	GA21H	6	43.13 \pm 1.64	3.81	1.84 \pm 0.00	2.16 \pm 0.02
	GA21	6	33.58 \pm 6.75	20.09	1.86 \pm 0.00	2.25 \pm 0.03
	Mon810	6	35.93 \pm 2.09	5.82	1.87 \pm 0.01	2.29 \pm 0.02
mini	GA21L	6	19.03 \pm 1.63	8.57	1.83 \pm 0.01	2.03 \pm 0.02
	GA21H	6	19.69 \pm 2.98	15.13	1.84 \pm 0.14	2.03 \pm 0.06
	GA21	3	18.22 \pm 0.67	3.65	1.83 \pm 0.02	2.29 \pm 0.02
	Mon810	3	17.15 \pm 0.28	1.63	1.81 \pm 0.00	2.36 \pm 0.03
CTAB	GA21L	6	2.80 \pm 0.10	3.63	1.81 \pm 0.02	1.66 \pm 0.06
	GA21H	6	2.81 \pm 0.26	9.35	1.81 \pm 0.01	1.65 \pm 0.10
	GA21	3	2.05 \pm 0.67	32.47	1.88 \pm 0.06	1.42 \pm 0.18
	Mon810	3	2.30 \pm 0.31	13.58	1.87 \pm 0.01	1.58 \pm 0.06
WIZARD	GA21L	6	12.91 \pm 0.54	4.20	1.78 \pm 0.02	0.32 \pm 0.14
	GA21H	6	13.41 \pm 0.30	2.22	1.80 \pm 0.01	0.22 \pm 0.04
	GA21	3	14.37 \pm 0.25	1.75	1.80 \pm 0.01	0.22 \pm 0.04
	Mon810	3	16.08 \pm 0.41	2.53	1.81 \pm 0.01	0.20 \pm 0.04

図 1. 抽出 DNA の分子量分布



Agarose gel electrophoresis of DNAs extracted from four kinds of powder samples including GA21H*, GA21L**, GA21 and MON810.

Lane M, molecular marker λ *Hind*III; lanes 1, 5, 9 and 13, DNAs extracted with the maxi method; lanes 2, 6, 10 and 14, DNAs extracted with the mini method; lanes 3, 7, 11 and 15, DNAs extracted with the CTAB method; lanes 4, 8, 12 and 16, DNAs extracted with the WIZARD method.

*GA21H is mixed powder sample containing 5% GA21 and 1% MON810 line.

**GA21L is mixed powder sample containing each GA21 and MON810 line in 1% concentration.

表 2. 内在性遺伝子のコピー数比較

Sample	DNA extraction method	Number of measurments	Repeat number of measurments	Copy number of <i>SSIb</i>	R.S.D. (%)
GA21 H	MAXI	6	2	34464±1120	3.25
	mini	6	1	26426±3035	11.48
	CTAB	6	1	28314±2281	8.05
	WIZARD	6	1	23908±3112	13.02

表 3. 通知記載の内標比を用いて算出された GM トウモロコシ定量値

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurments	GMO Amount (%)	R.S.D. (%)	Bias (%)
CaM	GA21L	MAXI	12	1.58±0.20	12.7	
		mini	6	1.95±0.19	9.8	23.7
		CTAB	6	2.05±0.19	9.1	30.2
		WIZARD	6	1.61±0.21	13.3	2.4
	GA21H	MAXI	12	1.61±0.16	9.8	
		mini	6	1.99±0.20	9.9	24.0
		CTAB	6	2.15±0.19	8.7	33.9
		WIZARD	6	1.65±0.15	9.2	2.6
GA21	GA21L	MAXI	12	1.34±0.09	6.4	
		mini	5	1.56±0.09	5.6	16.5
		CTAB	6	1.50±0.15	9.8	12.2
		WIZARD	6	1.35±0.08	6.1	0.9
	GA21H	MAXI	12	6.38±0.35	5.5	
		mini	6	7.44±0.28	3.8	16.5
		CTAB	6	7.63±0.50	6.6	19.6
		WIZARD	6	5.95±0.38	6.4	-6.8

表 4. 各 DNA 抽出法を用いて得られた定量値の有意差検定(通知記載内標比)

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurments	F	Critical value of F	t value	Critical value of t	U	Critical value of U
CaM	GA21 L	mini	6	1.099	4.704	3.778	2.120		
		CTAB	6	1.158	4.704	4.856	2.120		
		WIZARD	6	0.879	4.704	0.368	2.120		
	GA21H	mini	6	0.641	4.704	4.499	2.120		
		CTAB	6	0.711	4.704	6.505	2.120		
		WIZARD	6	1.093	4.704	0.532	2.120		
GA21	GA21 L	mini	5	0.978	5.936	4.805	2.131		
		CTAB	6	0.341	4.704	2.991	2.120		
		WIZARD	6	1.099	4.704	0.295	2.120		
	GA21 H	mini	6	1.592	4.704	6.339	2.120		
		CTAB	6	0.497	4.704			4	14
		WIZARD	6	0.853	4.704	2.385	2.120		

表 5. DNA 抽出法個別内標比の測定

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurments		Conversion factor	R.S.D. (%)
			Samples	Runs		
CaM	Mon810	MAXI	6	2	0.42±0.02	5.7
		mini	3	3	0.45±0.01	3.1
		CTAB	3	3	0.44±0.04	8.1
GA21	GA21	MAXI	6	2	2.18±0.06	2.6
		mini	3	3	2.25±0.10	4.3
		CTAB	3	3	2.25±0.10	4.3

表 6. DNA 抽出法個別内標比を用いて再計算された GM トウモロコシ定量値

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurments	Amount (%)	R.S.D. (%)	Bias (%)
CaM	GA21L	MAXI	12	1.46±0.19	12.7	
		mini	6	1.69±0.17	9.8	15.5
		CTAB	6	1.82±0.17	9.1	24.3
	GA21H	MAXI	12	1.49±0.15	9.8	
		mini	6	1.73±0.17	9.9	15.7
		CTAB	6	1.91±0.17	8.7	27.9
GA21	GA21L	MAXI	12	1.23±0.08	6.4	
		mini	5	1.39±0.08	5.6	12.9
		CTAB	6	1.33±0.13	9.8	8.2
	GA21H	MAXI	12	5.88±0.33	5.5	
		mini	6	6.64±0.25	3.8	12.9
		CTAB	6	6.79±0.45	6.6	15.4

表 7. 各 DNA 抽出法を用いて得られた定量値の有意差検定 (DNA 抽出法個別内標比)

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurments	F	Critical value of F	t value	Critical value of t	U	Critical value of U
CaM	GA21 L	mini	6	1.262	4.704	2.512	2.120		
		CTAB	6	1.271	4.704	3.956	2.120		
	GA21H	mini	6	0.736	4.704	3.030	2.120		
		CTAB	6	0.780	4.704	5.434	2.120		
GA21	GA21 L	mini	5	1.042	5.936	3.780	2.131		
		CTAB	6	0.367	4.704	2.056	2.120		
	GA21 H	mini	6	1.695	4.704	4.982	2.120		
		CTAB	6					6	14

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

分担研究報告書

食品外部精度管理調査における適性調査試料作製と信頼性確保に関する研究

- （その 1）理化学的検査調査試料の作製に関する研究
- （その 2）食品基材中のサルモネラ属菌の安定性確保に関する検討
- （その 3）貝毒検査の外部精度管理用適正調査試料の作製と
信頼性確保に関する研究
- （その 4）食品中のアレルギー関連物質検査の外部精度管理に関する
調査試料の作製検討

分担研究者 大島 赴夫

分担研究報告書(平成17年度)

食品外部精度管理調査における適性調査試料作製と
信頼性確保に関する研究(その1)

—理化学的検査調査試料の作製に関する研究—

主任研究者	遠藤 明	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	理事長
分担研究者	大島 赴夫	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	部長
協力研究者	福原 克治	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	室長補佐

研究要旨

食の安全・安心を確保するための手段としてリスクアナリシスがある。そのなかでもリスクアセスメントを実施するためには、信頼できる試験・検査結果に基づいたデータが必須である。試験・検査結果の信頼性を確保する規格として国際的にはISO17025(試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項)が認知されている。わが国では、食品衛生法に基づく「登録検査機関における製品検査のための業務管理要綱」及び「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要綱」が通知され、それぞれの検査機関は、業務管理について具体的事項を定め、試験・検査等の信頼性の確保が求められている。試験・検査等の信頼性の確保のためには、精度管理調査(内部、外部)が重要な項目である。この精度管理調査を実施するに当たり、検査対象物質の濃度が均一で、検査期間において濃度が安定である調査試料が求められる。このような目的で、検査対象物質の濃度が均一で安定な調査試料の開発を検討・研究した報告は極めて少ない。

今年度は、重金属(カドミウム)、残留農薬(有機リン系農薬:クロルピリホスおよびダイアジノン)および残留動物用医薬品(フルベンダゾール)の検査における調査試料について検討した。重金属検査試料として粉碎した精米、残留農薬検査試料としてほうれん草および残留動物用医薬品検査試料として液卵を使用し、それぞれの濃度の均一性および安定性について検討した。

その結果、いずれの検討試料についても適切な結果が得られ、重金属、残留農薬および残留動物用医薬品の検査に使用できる調査試料を開発することができた。

A. 研究目的

食品衛生検査を実施している検査機関の外部精度管理調査に使用する「調査試料」の作製方法を確立することを目的として、以下の検討を実施した。

B. 研究方法

1. 重金属(カドミウム)検査試料

重金属(カドミウム)検査に使用する

調査試料として、精米にカドミウムを添加して、そのカドミウム濃度の均一性および安定性について調べた。

1) 試料基材および試薬

精米:ひとめぼれ、宮城県産、生産年2004年、硝酸、硫酸:有害金属測定用、関東化学株式会社、カドミウム標準液(1000 ppm):原子吸光分析用、関東化

学株式会社、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム (DDTC)、メチルイソブチルケトン (MIBK)：原子吸光分析用、和光純薬工業株式会社、酒石酸カリウムナトリウム：試薬特級、和光純薬工業株式会社、硫酸アンモニウム：原子吸光分析用、和光純薬工業株式会社、水：日局注射用水、光製薬株式会社

2) 試料作製

①カドミウム高濃度添加精米（添加精米）

硝酸酸性カドミウム溶液（2ppm）70 L を採り、精米 20kg を浸漬し、混和・攪拌して 24 時間静置した。この間 10 回、良く攪拌した。浸漬溶液から精米を取り出し、ろ紙上に厚さ約 1cm 以下に広げ、ろ紙上に 5 日間放置して風乾した（添加精米）。これを遠心粉砕機で粉砕後、無作為に精米 10 g を採取してカドミウム濃度（n=10）を測定した。

②カドミウム無添加精米

市販の精米を遠心粉砕機で粉砕後に無作為に精米 10 g を採取してカドミウム濃度を測定した。

③混合精米

①カドミウム添加精米および②カドミウム無添加精米を混合した後、遠心粉砕機で粉砕して混合精米を作製した（作製予定濃度約 0.31 ppm）。これをポリプロピレン製容器に小分けし、無作為に精米 10 g を採取してカドミウム濃度を測定した。容器に小分けした残りの試料を冷蔵庫に保管して濃度の安定性を調べた。

3) 測定法

試料 10 g をケルダール分解フラスコに量り、硝酸 40 mL を添加して、加熱、分解した。硝酸による激しい反応が終了後、硫酸 20 mL を加え、溶液が暗色にな

ったら硝酸を 2~3 mL 追加して溶液が透明になるまで加熱を繰り返した。分解液を水で希釈しながらメスフラスコに移し、100 mL に定容した。カドミウム無添加精米については 50 mL に定容した。この試料液 10 mL（カドミウム無添加精米については 50 mL）を採り、DDTC-MIBK 法により抽出を行い、原子吸光光度法により以下の条件でカドミウムを測定した。

原子吸光光度計の条件

原子吸光光度計 AA-660 株式会社 島津製作所

使用ガス 可燃性ガス；アセチレン
支燃性ガス；空気

ランプ 中空陰極ランプ

波長 カドミウム；228.8 nm

2. 残留農薬（有機リン系農薬）検査試料

ほうれん草を使用して、残留農薬（有機リン系農薬）検査に使用する調査試料の作製法について検討した。

1) 試料基材および試薬

ほうれん草（マイクロペースト状食材）：株式会社 新進、クロルピリホスおよびダイアジノン：残留農薬分析用、関東化学株式会社、ヘキサンおよびアセトニトリル：残留農薬分析用、和光純薬工業株式会社

2) 試料作製

ほうれん草の冷凍品を一昼夜、冷蔵庫中で解凍して、その 5 kg を速やかにテフロンコーティングステンレス容器（20 L 容）に採り、これに有機リン系農薬（クロルピリホスおよびダイアジノン）のアセトン溶液を添加した。ハンドミキサーで 5 分間ずつ 3 回攪拌した後、ポリプロピレン製容器に小分けにした（作製予定濃

度 クロルピリホス 0.010 ppm およびダイアジノン 0.040 ppm)。小分けした容器から無作為に 10 個ずつ採取して、それぞれ繰り返し 2 回、有機リン系農薬を測定した。小分けした残りの容器は、冷蔵庫および冷凍庫に保管してそれぞれ濃度の安定性を調べた。

3) 測定法

試料 20 g を秤量して分液ロートに採り、アセトン 100 mL を加えて 5 分間振とう・抽出した。ろ過を行い、残渣に新たなアセトン 100 mL を加えて 5 分間振とう・抽出を行い先のろ液と合わせて、約 25 mL まで減圧濃縮した。濃縮液に 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えた後、20%酢酸エチル含有ヘキサン 100 mL ずつで、2 回、振とう・抽出（10 分間）した。有機溶媒層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下（40℃以下）で濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をアセトン：ヘキサン＝1：1 混液 10 mL で溶解した。この溶液 5 mL をあらかじめアセトン：ヘキサン＝1：1 混液 10 mL で洗浄した活性炭カートリッジカラム（SUPERUCO 6 mg）に供した。次いでカラムをアセトン：ヘキサン＝1：1 混液 10 mL で溶出して溶出液を合わせて溶媒を留去し、残渣をヘキサン 2 mL に溶解してガスクロマトグラフに供した。

ガスクロマトグラフ条件

ガスクロマトグラフ：島津製作所 GC-17A（炎光光度型検出器付）

カラム：DB-210（内径 0.25 mm、長さ 30 mm、膜厚 0.25 μm）

注入口温度：250℃、検出器温度：325℃

カラムオープン温度：60℃（2 min）、

昇温 10℃/min、280℃（5 min）キャリアーガス：ヘリウム、流量：1.1 mL/min 線速度：29 cm/sec、水素：100 kpa 空気：70 kpa、試料導入：スプリットレス

3. 残留動物用医薬品（フルベンダゾール）検査試料

残留動物用医薬品の検査に使用する調査試料として、液卵にフルベンダゾールを添加して、濃度の均一性と安定性について検討した。

1) 基材および試薬

液卵：市販の鶏液卵、フルベンダゾール：残留動物用医薬品検査用、関東化学株式会社、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノール、無水硫酸ナトリウム：試薬特級、和光純薬工業株式会社、アセトニトリル、メタノール：高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業株式会社

2) 試料作製

水約 1 kg にフルベンダゾールを含むメタノール溶液（20 μg/mL）96mL および液卵 4kg を加え良く攪拌した。全量の水で 8 kg に調整し良く攪拌した後、ポリエチレン製容器に約 25 g ずつ分注した。フルベンダゾール作製予定濃度は、0.240 ppm とした。

3) 測定法

測定操作は食品衛生法に準拠した。液卵 2.5 g を採取して酢酸エチル 50 mL ずつで 2 回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、濃縮乾固した。残渣をアセトニトリル 50 mL で溶解した後、アセトニトリル飽和ヘキサン 50 mL ずつ 2 回抽出して、油脂分を除去した。アセトニトリル層を濃縮乾固し、高速液体クロマトグラフの移動相 4 mL に溶解して、高速液体クロマトグラフで測定し

た。

高速液体クロマトグラフ条件

高速液体クロマトグラフ：島津製作所 LC-10A、検出器：島津製作所 SPD-10A、検出波長：313 nm、カラム：mightysil RP-18(H)(150×4.6 mm)、移動相：アセトニトリル：メタノール 7：13、流量：1.0 mL/min、カラムオーブン：40°C

(倫理面への配慮)

食の安全・安心に係わる研究であり、特に倫理面への配慮を必要としなかった。実験者および環境への配慮としては、有害な溶媒（ベンゼン等）を使用しなかった。

C. 研究結果

1. 重金属（カドミウム）検査調査試料の作製

カドミウム高濃度米を作製して、濃度を測定（表 1）した後、カドミウム無添加米（表 2）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 0.31 ppm）については、小分けにした容器から無作為に容器 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濃度の均一性を調べた。その結果、作製予定濃度約 0.31 ppm に対して、作製した調査試料の濃度は、0.32 ppm、標準偏差 0.002、変動係数 0.6%と、作製予定濃度に対して 96.9%と近似した濃度の試料を作製することができた。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（表 3）。

2. 残留農薬（有機リン系農薬）検査試料の作製

調査試料は、市販のほうれん草（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、クロルピリホスの濃度が、0.010 ppm、標準偏差 0.000、変動係数 3.85%およびダイアジノンの濃度が、0.040 ppm、標準偏差 0.001、変動係数 3.23%であった（表 4）。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 0.010 ppm、0.040 ppm）に対して、いずれも 100%濃度の試料を作製することができた。また、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 ± 3.10%、ダイアジノン 100.1 ± 2.2%の安定性（残存率）であった。

3. 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

鶏の液卵に水を加えた後、フルベンダゾールの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。小分け用容器に分注後、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調べた。その結果、作製した試料の濃度は、0.193 ppm、標準偏差 0.006、変動係数 3.11%と、作製予定濃度 0.240 ppm 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（表 5）。

D. 考察

1. 重金属（カドミウム）検査調査試料の作製

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。

2. 農作物の残留農薬（有機リン系農薬）検査調査試料の作製

市販のほうれん草し（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。

3. 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

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。

E. 結論

精度管理調査においては、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須であり、外部調査および内部調査を問わず、いかに適正な調査試料が提供できるかが重要な課題である。適正な調査試料を使用した調査であれば、最適な調査結果を得ることができる。この様な観点から以下の結論を得た。

1. あらかじめカドミウムを添加して作製した精米にカドミウム無添加精米を加えて、遠心粉碎機で粉碎・混合する方法が、目的とする作製予定濃度の試料が作製できること、および濃度の均一性が確保できる適切な方法であることが分かった。

2. 収穫後に水蒸気処理を行ったほうれん草のペースト（スープ用食材の市販品）に有機リン系農薬（クロルピリホスおよびダイアジノン）を添加してハンドミキサーで攪拌して作製する方法によ

り、均一な濃度の試料を作製できることが分かった。また、今回検討した水蒸気処理したほうれん草では、冷蔵、冷凍保存してもクロルピリホスおよびダイアジノン濃度が、ほぼ安定であることが分かった。

3. 液卵に残留動物用医薬品（フルベンダゾール）を添加する方法で、濃度の均一性および安定性において適切な調査試料を作製できることが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
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

表1 カドミウム高濃度添加精米中のカドミウム濃度

単位 ppm			
試料番号	測定		
1	2.18	平均値	2.19
2	2.17	標準偏差	0.03
3	2.19	変動係数	1.4
4	2.20		
5	2.14		
6	2.21		
7	2.23		
8	2.21		
9	2.17		
10	2.20		

表2 カドミウム無添加精米中のカドミウム濃度

単位 ppm			
試料番号	測定		
1	0.044	平均値	0.046
2	0.045	標準偏差	0.00137
3	0.048	変動係数	2.2
4	0.046		
5	0.048		
6	0.045		
7	0.046		
8	0.046		
9	0.047		
10	0.045		

表3 混合精米中のカドミウム濃度の均一性

単位 ppm				
試料番号	測定①	測定②		
1	0.316	0.318	平均値	0.320
2	0.321	0.322	標準偏差	0.002
3	0.322	0.318	変動係数	0.6
4	0.321	0.318	F比	1.4931
5	0.318	0.321		
6	0.318	0.318	有意水準 5%	3.02
7	0.321	0.318		
8	0.318	0.318		
9	0.322	0.318		
10	0.322	0.322		

表4 ほうれん草中の農薬濃度の均一性

クロルピリホス 単位 ppm			ダイアジノン 単位 ppm		
試料番号	測定①	測定②	試料番号	測定①	測定②
1	0.0108	0.0108	1	0.0422	0.0407
2	0.0109	0.0100	2	0.0390	0.0391
3	0.0107	0.0099	3	0.0396	0.0381
4	0.0111	0.0099	4	0.0404	0.0388
5	0.0109	0.0110	5	0.0406	0.0404
6	0.0107	0.0106	6	0.0374	0.0408
7	0.0102	0.0102	7	0.0403	0.0421
8	0.0100	0.0103	8	0.0408	0.0402
9	0.0105	0.0099	9	0.0417	0.0403
10	0.0102	0.0101	10	0.0413	0.0407
平均値	0.010		平均値	0.040	
標準偏差	0.000		標準偏差	0.001	
変動係数	3.85		変動係数	3.23	
F比	0.976		F比	1.578	
有意水準 5%	3.02		有意水準 5%	3.02	

表5 液卵のフルベンダゾール濃度の均一性

単位 ppm		
試料番号	測定①	測定②
1	0.1904	0.1934
2	0.1901	0.1988
3	0.2018	0.1902
4	0.1903	0.1953
5	0.1873	0.1877
6	0.2009	0.2003
7	0.1869	0.1854
8	0.1959	0.1835
9	0.2014	0.1921
10	0.1962	0.1905
平均値	0.193	
標準偏差	0.006	
変動係数	3.11	
F比	1.47	
有意水準 5%	3.02	