

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19年度
総括・分担報告書

■ 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

国立医薬品食品衛生研究所

町井研士

財団法人 食品薬品安全センター

大島赴夫

平成20年(2008年)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	-----	27
精度管理に関する研究		
田中 之雄		
2. ELISA 法によって得られる測定値の信頼性評価	-----	155
に関する研究		
中澤 裕之		
3. 市販農薬標準品の純度比較に関する研究	-----	161
松木 容彦		
4. 食品中ダイオキシン類検査の外部精度管理用	-----	171
適正調査試料の作成および評価法の検討		
米谷 民雄		
5. 1)組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究	-----	183
2)フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究		
渡邊 敬浩		
6. 貝毒検査の外部制度管理用適正試料の作製と	-----	211
信頼性確保に関する研究		
町井 研士		
7. 食品外部精度管理調査における適性調査試料作製と	-----	241
信頼性確保に関する研究		
大島 赴夫		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	281
IV. 研究成果の刊行物	-----	285

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 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 遠藤 明

平成 20 年（2008 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 19 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的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ず、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)」を定期的を実施するよう計画の作成が要求されている。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、研究 3 年目の最終年度となるが、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. ELISA 法によって得られる測定値の信頼性評価に関する研究(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. 1)組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究、並びに追加試験として 2)フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究(渡邊分担分)、6. 貝毒検査の外部精度管理用適正試料の作製と信頼性確保に関する研究(町井分担分)、7. 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 7 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)、町井研士(国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第 2 室長)、大島赴夫((財)食品薬品安全センター秦野研究所食品衛生事業

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有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、その一環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、輸入食品中の残留農薬を始めとし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、それらの汚染や汚染物質による食品の汚染状況の把握、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: ほうれんそう及びとうもろこしの冷凍磨砕マイクロペースト状食材を基材とし、農薬はクロルピリホスメチル、プロモホス、ジクロホップメチル、フェンブコナゾール、 γ -BHC、クロルピリホス、ダイアジノン、シフルフェナミド、シメコナゾール、メキシフェノシドを用いて試料を作製した。なお、低濃度の試料としては、ほうれんそうでは、クロルピリホスメチル 0.030 ppm、プロモホス 0.008 ppm、ジクロホップメチル 0.017 ppm、フェンブコナゾール 0.010 ppm、 γ -BHC 0.015 ppm、クロルピリホス 0.007 ppm、ダイアジノン 0.010 ppm となるように添加し、とうもろこしではシフルフェナミド 0.020 ppm、シメコナゾール 0.015 ppm、メキシフェノシド 0.010 ppm を添加し、検査協力機関 9 機関に配布して検査を実施した。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。なお、ほうれんそうはGC/MS測定、とうもろこしはLC/MS/MS測定で行なう事とした。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、正規確率プロット、 \bar{X} bar-R 管理図、z-スコア)により行った。

2. 中澤分担研究: 1) ELISA における測定値変動要因の検討— 抗マウス IgGHRP 抗体と酵素基質液(テトラメチルベンジジン)をマイクロプレートに滴下して発色させ、a) 実験者のピペット操作等の熟練度による測定値への影響、b) エッジ効果の有無、c) 日内変動および日差変動について測定し、評価した。

2) 食品試料測定における ELISA の測定値精度評価— 魚肉をアセトニトリルでホモジナイズ後、遠心分離にて上清を回収した。アセトニ

トリル飽和ヘキサンを加えて脱脂し、フィルターでろ過して濃縮乾固させた。リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) に懸濁して、アフィニティーカラムで精製し、ニューキノロン測定用マイクロプレートを用いて測定し、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 15 物質 (イソキサチオン、イソキサチオンオキソン、イプロベンホス、キントゼン、ジクロラン、ジフェナミド、シマジン、ジメタメリン、ダイムロン、ピリダフェンチオン、フサライド、フルミオキサジン、プロフェノホス、ベンフラリン、ホスメット) 計 45 種について検討した。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。

標準溶液の調製は、採取した標準品を各溶媒で 100 mL 容褐色メスフラスコに移し入れ、100 mL に定容し、1000 µg/mL 溶液を調製して被験溶液とした。なお、通常用いる溶解液は、GC 測定用標準溶液ではアセトン、HPLC 測定用標準液ではアセトニトリルとした。

低濃度溶液の調製は、3 社のうち任意に選択した 1 社の被験溶液 1 mL をホールピペットで 100 mL 容褐色メスフラスコに取り、各溶媒で定容した。さらに、1 mL ホールピペットで 100 mL 容褐色メスフラスコに取り、各溶媒で定容し、被験物質の 1 万分の 1 の低濃度溶液 (0.1 µg/mL) を調整した。なお、原則として低濃度溶液は、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 µg/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て実施した。

4. 米谷分担研究: タチウオの筋肉部を凍結乾燥して均一に混合した粉末検体を試料とし、ダイオキシン類分析機関 6 か所に試料を配布して精度管理を実施した。なお、報告された分析結果の比較及び統計解析についても合わせて実施した。また、分析対象は WHO で TEF

と定められた、PCDD、PCDF 及び dioxin like PCB 類とした。

技能試験結果の評価として、6 参加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) を求めた。なお、参加機関が少なく、外れ値が含まれていても一般的な検定方法を適用して除くことが困難であることから、頑健な平均、標準偏差、相対標準偏差についても求めた。さらに、通常の統計量と頑健な統計量を用いて 2 種類の z-スコアを計算し、比較を行った。

5. 渡邊分担研究: 1) 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究- 定量 PCR 機器として ABI 社製、ABIRISM7500、7700、7900HT を用い、食安発第 0629002 号 3.1.2 項に記載された定量 PCR 法に準拠し、検量線用標準プラスミドより得られるダイズ内在性遺伝子 (*Le1*) および遺伝子組換えダイズ (RRS) 特異的 DNA 配列を測定した。なお、1 つの定量 PCR 機器当たり 4 回繰り返し試験し、検量線の濃度 (コピー数) および測定値解析法に含まれる要因について検討する場合には、1 プレート当たり 5 本の検量線が作成できるように計画した。また、測定は 1 つの定量 PCR 機器当たり 3 回繰り返し測定した。

平成 17 年度に厚生労働省により実施された組換え DNA 技術応用食品検査外部精度管理において報告された検量線データを機器別に抽出し、ベースライン補正ならびに、Th. line の各パラメーターを *GiMlet* 上で変動させて解析し、結果を Ct 値あるいはその変換値であるコピー数または規定のコピー数に対する bias として示した。

2) フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究- カワハギ、ナシフグ、シロサバフグ、トラフグの各種未加工食品を DNA 抽出用食品として用い、凍結乾燥品の粉末試料として使用した。また、食安輸発第 1017004 号に示された DNA 抽出法の適用範囲を拡大する目的で抽出緩衝液等の液量を変更して実施した。

DNA 抽出法の評価は、4 種の魚試料を用い、

同一試験者により、1日当たり各試料2点併行の抽出試験を5日繰り返すにより行った。また、定性PCRは、食安輸発第1017004号にしたがった。

精製後のPCR増幅産物の吸光度(O.D.260 nm)の吸光値1を33 ng/mL DNAとして計算し、DNAシーケンサーにより自動決定された塩基配列データの修正およびアラインメントによる共通配列の決定にはGENETYX ver.9を用いた。

分析法および分析手順の適用可能性の評価については、陽性としてフグ6種(トラフグ、カラスフグ、マフグ、シマフグ、シロサバフグ、クロサバフグ)、アンコウ、ウマズラハギ、カワハギを陰性対照として試験を実施した。また、判定基準については、相同性検索の結果が明らかとなって各フグ種および陰性試料間での塩基の相同性および、分析結果に含まれる読み間違え塩基の率を勘案し、誤判定を下す危険性の低い判定基準を検討した。

6. 町井分担研究: ホタテホモジネートを基材とし、一定量のオカダ酸を小径ろ紙(φ13 mm)にスパイクしたものを下痢性貝毒検査用試料(96 μg/120 g ホモジネート)として7検査協力機関に試料を配布(各 n=5)し、試験を実施した。なお、下痢性貝毒検査用調査試料の作製については、各検査施設に試料を郵送する前に、試料の安定性、均一性について検討した。また判定は、食品衛生検査指針により20 g未満のマウス3匹を用いマウス腹腔内に投与し、24時間以内に死亡マウスが2匹以上を陽性とした。

7. 大島分担研究: 1) 理化学調査用試料の作製— ①有機リン系残留農薬について、基材をかぼちゃ及びえだまめの2種類を用い比較検討を行なった。残留農薬としては、クロルピリホス及びフェニトロチオンを使用し、かぼちゃペーストでは5 kgに農薬のアセトン溶液5 mLを加えて攪拌後、クロルピリホス0.15 ppm、フェニトロチオン0.25 ppmとなるように小分けして凍結保存した。また、えだまめペーストについ

ては、10 kgに2種農薬のアセトン溶液10 mLを添加し、攪拌して小分けしたもの(クロルピリホス0.15 ppm、フェニトロチオン0.25 ppm)を凍結保存した。測定方法は、試料20 gを用いてガスクロマトグラフ(GC-17A、昇温)を用い常法にしたがって行なった。

②残留動物用医薬品検査の基材の検討については、基材として食肉(鶏のササミ肉)を用い、動物用医薬品としてはサルファ剤8種(スルファジジン(SDZ)、スルファメラジン(SMR)、スルファジミジン(SDD)、スルファメキシピリダジン(SMPD)、スルファモノメキシシン(SMMX)、スルファメキサゾール(SMXZ)、スルファジメキシシン(SDMX)、スルファキノキサリン(SQ))を用いて行なった。試料の調製は、鶏ササミ肉をミンチにした後、マルチミルグラインダーで無水添加ペースト及び10%水添加ペーストに8種サルファ剤を含むメタノール溶液を加え攪拌した。なお、作製予定濃度は、低濃度試料(0.1 μg/g)、高濃度試料(1 μg/g)に作製し、回収率及び均一性を調べた。また、10%水添加ペーストにスルファジミジンを含むメタノール溶液を添加した系は、作製予定濃度0.1 μg/gで作製した。測定方法は食品衛生法に準拠し、高速液体クロマトグラフを用いて実施した。

2) 微生物学検査のための適正試料の作製検討— 使用菌株は、(財)食品薬品安全センター秦野研究所保存の *Staphylococcus aureus* HIC11011、*S.epidermidis* HIC11012 を用いた。黄色ブドウ球菌検査用試料の作製として、蒸し鶏、とりそばろ、ミートボール、ハンバーグの4種を基材として用い、高圧蒸気滅菌器により滅菌をした後、10⁸ colony forming units(cfu)/mLの菌液に浸漬し、性状の変化、生菌数の確認、加熱食肉製品中の生菌数と黄色ブドウ球菌検査を常法ならびに公定法にしたがって実施した。

3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製検討— 小麦、そば及び落花生を対象に特定原材料タンパク質の定量はELISA法により行なった。総タンパク質の定量はケルテ

ックオート 1035 型を用いたケルダール法により測定した。なお、窒素係数は小麦粉 5.83、そば粉 6.31、落花生粉 5.46 を用いた。小麦、そば、落花生の試料作製は、小麦一次標準粉末(オリエンタル酵母(株))及び市販の小麦、そばは標準品規格のそばを製粉会社より購入、落花生は千葉県産の落花生を農家より購入して試料とした。また、精度管理用試料として添加基材にそれぞれの試料粉末を混合してフードプロセッサで均一化して作製した。

C 研究結果

1. 田中分担研究: 試料調製方法の妥当性と試料の均質性について精度管理試料の各農薬について測定した結果、設定添加量に対して 87.3~111.2%の平均回収率と変動係数 2.2~5.8%であり、いずれの変動係数も 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、各々の農薬添加濃度の有意確率は、0.05 と比べて添加濃度に差が認められないことから均一な濃度であることを確認した。

試料の安定性は、各試料を配布後-20℃で2か月間の保存試験を行い、 γ -BHC、メキシフェノンドが 5%有意確率で2か月保存後の定量値が小さい結果となった。またプロモホスは反対に大きな結果を示した。しかし「精度管理の一般ガイドライン」による回収率は 70~120%の範囲内を確保していることから精度管理試料として支障がないものと判断した。

外部精度管理調査における参加機関の分析方法は、厚労省一斉分析法に準じた方法が4機関、愛知県法・兵庫県法・SFE法が各1機関、QuEChERS法変法が2機関で実施された。

ほうれんそうに添加した農薬(クロルピリホスメチル、ジクロホップメチル、フェンブコナゾール、プロモホス)、とうもろこしに添加した農薬(シフルフェナミド、シメコナゾール、メキシフェノンド)は全ての機関で適正に検出した。また、各農薬の全体の平均値は良好な結果が得られた。

ほうれんそう(GC/MS)に関する各農薬の X bar-R 管理図、z-スコアによる評価、X bar-R 管理図、z-スコアによる食品毎の評価については、クロルピリホスメチルで添加量 0.030 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は 0.0300 $\mu\text{g/g}$ (回収率 100.1%)、X bar 管理図は全て「良好」であった。R 管理図で適正域を外れたのは1機関、z-スコアの絶対値が2以上の機関が1機関であった。ジクロホップメチルでは添加量 0.017 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は 0.0168 $\mu\text{g/g}$ (回収率 99.1%)、X bar 管理図は全て「良好」であった。R 管理図で適正域を外れたのは1機関、z-スコアは「良好」であった。フェンブコナゾールでは、添加量 0.010 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は 0.0126 $\mu\text{g/g}$ (回収率 126.5%)と高めの値を示し、X bar 管理図とz-スコアでは適正域を外れた機関が2機関あった。また、R 管理図で適正域を外れたのは1機関であった。プロモホスでは、添加量 0.008 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は 0.0754 $\mu\text{g/g}$ (回収率 94.3%)、X bar 管理図およびz-スコアは全て「良好」であった。R 管理図で適正域を外れたのは1機関であった。 γ -BHCでは、添加量 0.015 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は 0.0130 $\mu\text{g/g}$ (回収率 86.6%)、X bar 管理図、R 管理図、z-スコアは全ての機関で「良好」であった。クロルピリホスでは、添加量 0.007 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は 0.00687 $\mu\text{g/g}$ (回収率 98.1%)、X bar 管理図は全て「良好」であった。R 管理図で適正域を外れたのは1機関、z-スコアは「良好」であった。ダイアジノンでは、添加量 0.010 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は 0.00932 $\mu\text{g/g}$ (回収率 93.2%)、X bar 管理図は全て「良好」であった。R 管理図で適正域を外れたのは1機関、z-スコアは「良好」であった。

とうもろこし(LC/MS/MS)については、シフルフェナミドでは、添加量 0.020 $\mu\text{g/g}$ に対し、LC/MS/MSによる全機関の平均値は 0.0195 $\mu\text{g/g}$ (回収率 97.6%)、X bar 管理図、R 管理図、

z-スコアは全ての機関で「良好」であった。シメコナゾールでは、添加量 0.015 µg/g に対し、LC/MS/MS による全機関の平均値は 0.0146 µg/g(回収率 97.4%)、X bar 管理図、z-スコアは全て「良好」であったが、R 管理図で適正域を外れたのは 2 機関あった。メキシフェノシドでは、添加量 0.010 µg/g に対し、LC/MS/MS による全機関の平均値は 0.00871 µg/g(回収率 87.1%)、X bar 管理図、z-スコアは全て「良好」であった。R 管理図で適正域を外れたのは 1 機関あった。

R 管理図で適正域を超えた機関の分析データ(n=5)の再現性について、サロゲート物質による内標準法での補正を行った。機関 G のサロゲート物質の δ-BHC-¹³C6、クロルピリホス-d10、ダイアジノン-d10 と補正前の添加農薬毎の挙動は、GC/MS では 1 回目の測定値が一番低く、測定 2 回目が一番高い値を示し、3~5 回目がおぼ同等であった。δ-BHC-¹³C6 で補正した場合、クロルピリホスの RSD は内標準による補正前では 16.94 であったが、補正後は 3.28 と精度の向上が認められた。サロゲート物質を用いた内標準法は分析操作での損失の補正、信頼性を高める上で効果的方法と考えられた。

2. 中澤分担研究: 1) ELISA における測定値変動要因の検討ー 実験者のピペット操作等の熟練による測定値への影響については、相対標準偏差(RSD)が平均して学部学生 14.1%、大学院生 8.3%、熟練者 6.6%となり、操作の習熟により測定値のバラツキを抑えられることが分かった。また、エッジ効果の有無については、プレート全体で平均して RSD が 4.2%となり、エッジ部分を除いた場合では 3.5%となった。ニューキノロン測定用マイクロプレートを用いて同様の検討を行ったところ、プレート全体では 11.1%、エッジ部分を除いた場合では 9.5%となった。これらの結果から、わずかではあるがエッジ効果の存在が確認され、特に抗原抗体反応を行うプレートの方が、基質・酵素反応だけのプレートよりもその影響が顕著に現れること

が分かった。

日内変動および日差変動については、RSD が 1.9~5.4% (n=6)であり、日差変動では 2.3~3.6%(n=4)となり、日内・日差変動についてはいずれも大きな有意差が認められなかった。したがって、ELISA の測定値の変動に影響を及ぼすことが予想される要因について比較したと結果として、エッジ効果<日差変動<日内変動<手技が示唆された。

2) 食品試料測定における ELISA の測定値精度評価ー エンロフロキサシン標準品とエンロフロキサシンを添加した抽出液を用いて検量線を作成し比較したところ、試料をクリーンアップし、マトリクス由来の夾雑成分をできるだけ多く除くほど、実試料に標準品を添加した検量線が、標準品の検量線に近づくことがわかった。またクリーンアップに関しては、脱脂回数が多い方がより標準品に近い検量線を描いた。

3. 松木分担研究: 個別試験法が定められている標準品 7 種について比較を行ったところ、3 社の標準品 21 種中、4 種ではメーカーの表示した純度が通知法の個別試験法で規定された純度を満たしていなかった。GC 又は HPLC で測定した純度との割合を含量比として表し、測定値の室間誤差として±2%までのばらつきを許容範囲の基準として評価したところ、HPLC における純度測定結果においては、15 物質の標準品 45 種中、44 種(98%)、GC における純度測定結果においては、35 種中、31 種(89%)については、表示された純度と同等の測定結果が得られた。各メーカーから提供された標準品について HPLC 及び GC を用いて測定した時、両機器の純度結果が 2.0%以上の違いが見られた標準品は、35 種中 6 種あり、純度測定に用いる分析機器の違いによって得られる純度に大きな違いが生じることが示された。また、我々が測定した純度結果に基づき、通知法に規定された純度との比較をおこなったところ、HPLC における純度測定結果においては、標準品 21 種中、3 種が通知法で規定された純度を満たしていなかったが、GC における

純度測定結果では、比較した標準品 15 種全てが、通知法に規定された純度を満たしていた。

4. 米谷分担研究：6 参加機関全てから分析結果が報告された。各機関の分析値及び全ての分析結果の平均値、SD、RSD (%で表示)、頑健な平均値、頑健な SD、頑健な統計量から計算した RSD%を示した。また、報告値から計算した TEQ の統計量も示した。なお、通常の統計量から計算した zスコア、ならびに頑健な統計量に基づいて計算した zスコアについても結果を示した。

5. 渡邊分担研究：5-1. 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究、1) 定量 PCR 機器の精度－RRS を対象とした定量 PCR 法を一例に、規定量の測定試料をプレートの全ての well で同時に測定し、得られる測定値のばらつきを評価した結果、ABI PRISM 7500 を定量 PCR 機器に用いた場合には、*LeI* ならびに RRS 特異的 DNA 配列の測定に共通して、Ct 値の大きさに 12 well を 1 サイクルとした周期性が認められた。ABI 7700 に関しては、*LeI* を測定した場合に、well 番号の始まりと終わり、96 well プレートで言い換えるとプレート短辺の両端から得られる Ct 値が小さくなる結果(グラフとしては well 番号 45 付近を頂点とした弓状)が得られた。PCR 効率(m)については、原理的に達成される最大効率の 2.0 に対し、ABI PRISM 7500 を用いて *LeI* を測定した場合には約 1.8 と最小であり、それ以外では、測定の異常によると考えられる well を除き約 2.0 となった。

ABI PRISM 7500 では well 間のばらつきが大きく、最大値と最小値の差は 550 コピーほどであった。また *LeI* を ABI PRISM 7700 を用いて測定した場合に観察された Ct 値の変動についても、プレートの中心部でのコピー数が低いという結果に反映されており、最大値と最小値の差は 500 コピーほどであった。なお、ABI PRISM 7900HT により RRS 特異的 DNA 配列を測定した場合に、well 間のコピー数のばらつき

は最小となり、コピー数の最大値と最小値の差は 200 コピーほどであった。

2) ベースライン補正方法の検討－*GiMlet* には、各 well から得られた Rn 値の大きさに応じてベースライン作成に使用するデータの採取内容を変更し、独立して補正するためのアルゴリズムを組み入れた。一例とし、本アルゴリズムにより解析した結果を示すが、ABI PRISM 7700 により測定された Ct 値は、定量 PCR 法に規定されたベースライン補正を行った場合には、同一の well であっても繰り返し測定間での Ct 値に明らかな差が認められたのに対し、アルゴリズムを使用して再解析することにより、その差が小さくなった。この結果は、繰り返し測定間でベースラインが変動しており、新たなベースライン補正方法によりその変動の影響が解消あるいは軽減されていることを示唆している。また、他の定量 PCR 機器により得られた測定値についても、若干ではあるが、Ct 値のばらつきが小さくなっていた。

3) 検量点および Th. line 解析条件が測定値の精度に与える影響－各検量点に規定されたコピー数の真値について真値と解析の結果得られた測定値(コピー数)との bias (%)を算出し、bias の大きさを区分とした頻度をヒストグラムに示した。その結果、1,500 コピー以上のプラスミドを含む検量点については、規定コピー数と測定値(実測コピー数)との bias が、絶対値として 15%以内となる頻度が高く、特に、ある一定以上の大きさの Th. line 値により解析された場合に、より小さな bias が観測される頻度が高くなった。また、ある一定以上に大きな Th. line 値により解析した結果を検量点間で比較した結果、高コピー数の検量点ほど、特定の bias が観察される頻度が高くなり、これは実測コピー数のばらつきが小さくなることを意味している。20 ならびに 125 コピー、特に 20 コピーのプラスミドを含む検量点に顕著であるが、bias は一様に分布しており、高コピー数を含む検量点のように規定コピー数を中心とした分布は見られなかった。また、Th. line 値と特定の大きさの

bias が観察される頻度との相関は、検量点に含まれるコピー数が少ないほど弱かった。外部精度管理調査において報告された検量線データを定量 PCR の機種別に抽出し、上記と同様に解析した結果、検量点に含まれるプラスミドのコピー数に依存したばらつきや、測定値のばらつきが小さくなる Th. line 値については、一試験室一試験者により実施した試験の結果に一致した解析結果が得られた。また、適切な Th. line 値を設定しても、なお測定値のばらつきが小さくならないなど、試験室間データの特性も明らかになった。

5-2. フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究、1) DNA 抽出法の改良および評価—食安輸発第 1017004 号により示された DNA 抽出法に規定された量の凍結乾燥試料を試験に供した場合、試料が抽出用緩衝液によって十分に膨潤しなかった。試料が十分に膨潤せず、均一な細胞溶解液が得られないことにより、DNA 収量が安定しない事が考えられたため、抽出緩衝液 (Buffer ATL) 量を 360 μ L に変更し、この変更にあわせてその後添加される Buffer AL およびエタノール量を同じ比率で増加させた。Proteinase K 溶液ならびに RNase A 溶液については増量せずに実施した。加温処理後の遠心操作は、13,000G に変更して実施した。変更後の条件に従い予備試験を実施した結果、質、量ともにその後の試験操作の実施に十分と判断される DNA が抽出されたことから、本法を改良 DNA 抽出法とした。

改良 DNA 抽出法の評価は、トラフグ、クサフグ、シロサバフグ、カワハギの4種の魚試料を用い、一試験室内で同一試験者が、1日当たり2点の試料からの併行抽出を5日間繰り返すことよって行った。得られた DNA 収量について分散分析を行い、併行精度および室内精度を算出した。カワハギにおいては、室内精度が40%を超え、DNA 収量の日間変動が大きい結果であったが、これを除いた併行精度、室内精度は全試料を通じて20%を下回っており、DNA 収量の安定性は良好であった。また、分

析法および分析手順の適用可能性の評価において使用された6種のフグおよびカワハギ、ウマヅラハギ、アンコウからも安定した量の DNA が抽出され、予測断片長に合致した PCR 増幅産物が大きな量的変動もなく得られた。

2) ラベリング反応およびシーケンシング— 鋳型 DNA 濃度について、16SarL を反応に用いる場合には、20、40、80 ng/reaction の3点、16SbrH を用いる場合には、5、10、20 ng/reaction の3点について検討した。また、両プライマーの T_m 値を考慮したサーマルサイクラー条件のうちアニーリング温度について、16SarL を用いる場合には、47ならびに50 $^{\circ}$ C、16SbrH を用いる場合には50ならびに53 $^{\circ}$ Cについても検討した。その結果、シーケンスデータ取得の可否を判断条件にしても、16SbrH と16SarL とでは、至適ラベリング条件が異なることが明らかとなった。ただし、アニーリング温度を両プライマーのそれぞれに個別に設定してしまうと、反応を同時に行えなくなることから、共通して良好な結果が得られた50 $^{\circ}$ Cを規定条件とした。それに対し、16SarL を用いる場合には80 ng/reaction、16SbrH を用いる場合には20 ng/reaction を鋳型 DNA の規定量とすることが妥当であると考えられた。しかし、複数の魚種由来の PCR 増幅産物を用いたその後の検討により、16SarL を用いたラベリング反応に80 ng の鋳型 DNA を供した場合には、シーケンサーにより自動決定される塩基配列データ (後述する一次シーケンスデータ) として誤った塩基が決定される割合が高まることが観察された。

3) シーケンスデータのトリミングおよび相同性検索— DDBJ を介して BLAST 検索を実行した結果、*Takifugu rubripes* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GenBank アクセッション番号 AY679677) として登録されている DNA 配列との間に100% (446/446 bp) の相同性が確認された。その他にも *Takifugu rubripes* 16S ribosomal RNA gene に関する DNA 塩基配列が複数登録されているため、それらについても同じ相同性で検索された。同一の DNA 配列に関

する複数の登録を除くと、*Takifugu porphyreus* (マフグ) mitochondrial gene for 16S rRNA (GenBank アクセション番号AB199323)との相同性が次いで高く、99%(444/446 bp)であった。また、26種のフグから採集された16SarLおよび16SbrHのプライマー対によって増幅するDNA領域の標本塩基配列を対象に、GENETYX ver.9 上で相同性検索を実施することでも同じ結果が得られた。

4) 分析法および分析手順の適用可能性の評価— 本研究において規定したラベリング反応条件および一次シーケンスデータの解析方法の適用可能性について、トラフグ以外のフグ種6種および陰性試料となる3種の魚種を用いて検討した。その結果、全ての被検試料から一次シーケンスデータが得られた。また、アライメントを明らかに不正確にするような二次シーケンスデータは得られなかった。さらに、最終シーケンスデータのBLAST検索および遺伝情報処理ソフト上で標本配列を用いて行った相同性検索の結果を示した。その結果、トラフグ、およびカワハギについては、最終シーケンスデータ(それぞれの塩基数は、トラフグが446 bp、カワハギが441bp)に100%の相同性を有するDNA配列がGenBank上に登録されており、それらが検索されたことにより、被検試料をトラフグおよびカワハギと同定できると考えられた。シマフグに関しては、GenBank上では一塩基置換のため99%の相同性を有する配列として検索されたが、シマフグ標本配列との相同性が100%(446/446 bp)であったことから、被検試料をシマフグとして同定できると考えられた。また、カワハギについては標本配列との相同性検索の結果としても示されているとおり、各フグ種に含まれる該当DNA配列との相同性は、85%以下と低く、十分に低い相同性を判定基準とした場合にも、カワハギをフグ種として同定する誤判定のリスクは低いと考えられた。マフグやシロサバフグに観察されたように、最終シーケンスデータに実験的なエラーは含まれていないと考えられるものの、相同性検索に供したDNA

配列中には他のフグ種との間に差が認められず、特定のフグ種として同定することが不可能な場合があることも明らかになった。アンコウならびにウマヅラハギについては、GenBank上に登録されておらずまた標本配列も採取していなかったために、相同性に基づく同定ができなかったが、少なくとも他の魚種と誤って同定されることはなく、また各フグ種の該当DNA配列との相同性は85%以下であった。カラスフグに関しては、カラスフグ標本配列との相同性が99%(446/448 bp)であったため、最終シーケンスデータに実験的なエラーが含まれており、特定フグ種として同定することはできないと考えられた。

6. 町井分担研究: オカダ酸(OA)の各種保存による回収率は、グラフは縦軸に回収率、横軸に時系列を示し、n=5の回収率は箱髭図で示した。その結果、冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも24週間安定であった。60週経過後の試料はHPLCレベルでは10%程度の減少傾向を示すが、マウスバイオアッセイ(MBA)では陽性を示した。また、バイアル室温及び冷凍、アセトン溶液冷凍が3匹中2匹死亡(陽性)であるが、他はMBAで3/3死亡した。

OAの加熱試験の結果は、50℃では48時間安定で、100℃では経時的に回収率が減少し48時間後には30%程度まで減少した。また、グラフより100℃加熱時に半減期が24時間であることが推定された。120℃では8時間で30%以下に回収率が減少し、150℃および200℃では1時間の加熱処理で回収率が0%であった。

超音波、マイクロウェーブ、UVによるOAの暴露では、OAの回収率は微減傾向を示すものの比較的安定であることが示唆された。

試験協力各機関へ陰性試料、陽性試料各1検体を送りMBAにより下痢性貝毒陰性検査を行なった結果、協力7機関全てにおいて陰性、陽性の判断は正しく出された。陰性試料に関しては、全ての機関で3匹中全て生存し、陽性試料においては、5機関では3匹中3匹死亡、2機関では3匹中2匹死亡であった。

7. 大島分担研究: 1) 理化学検査のための適正試料の作製— ①有機リン系残留農薬調査試料の検討では、有機リン系農薬(クロルピリホス、フェニトロチオン)を添加したかぼちゃペースト及びえだまめペーストの小分けした容器から無作為に10個ずつ採取し、それぞれ2回繰り返し測定し、均一性を調べた結果、かぼちゃペーストではクロルピリホスおよびフェニトロチオンはそれぞれ87.3%、75.6%の回収率を示した。F値はクロルピリホス2.74、フェニトロチオン1.88であった。えだまめペーストでは、回収率はクロルピリホス63.2%、フェニトロチオン82.6%となり、F比はそれぞれクロルピリホス1.10、フェニトロチオン1.23であった。これらのF比は、いずれの場合でも5%水準(F値3.02)より小さくなり、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。しかし、えだまめペーストでは、クロルピリホスの回収率が70%以下となり、CVも10%以上と調査試料としては適当でないことが示唆された。一方、フェニトロチオンはF比、回収率、CVはいずれも許容を満たしていた。かぼちゃペーストおよびえだまめペーストにクロルピリホスおよびフェニトロチオンを添加し作成後、49日間の冷凍保管における安定性を調べた結果、作製当日の濃度に対する作製49日後の濃度は、かぼちゃペーストではクロルピリホス97.8%、フェニトロチオン107.8%であった。一方、えだまめペーストではクロルピリホス112.0%、フェニトロチオン61.1%となると共に、CVはそれぞれ11.8%、30.3%となり、調査試料として不適切であることがわかった。

②残留動物用医薬品のための調査試料基材の基礎的検討では、鶏ササミ肉をミンチに、サルファ剤8種(SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMX、SDMX、SQ)を添加混合し、均一性を確認した結果、水無添加基材ではサルファ剤8種(SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMX、SDMX、SQ)の回収率はそれぞれ67.5、64.4、72.6、62.8、71.6、69.0、70.7および74.7%と低い回収率を示した。また、CVは約

10%とばらつきが大きくなった。また均一性を示すF比は、SDD、SMPDおよびSDMXで5%水準より小さくなったが、他のサルファ剤は5%水準を超え、均一性が認められなかった。一方、10%水添加した基材では、水無添加に比べサルファ剤の回収率は約10%程良好となった。また、CVについては、いずれのサルファ剤でも6%以下とばらつきは改善され、F比は0.32~1.66と均一な基材となった。さらに10%水添加基材を用い、8種サルファ剤を添加した低濃度試料(0.1 ppm)を作製し、回収率と均一性を確認した結果、いずれのサルファ剤も約80%以上の回収率を示し、CVは全体的にやや大きい。F比はいずれも5%水準より小さい値となり、均一性のあることが確認された。国内基準のあるSDDについて公定法に準拠し、10%水添加ペースト肉にSDDを0.1 ppmおよび0.05 ppm添加し、個別分析法により回収率の比較を行った結果、SDDのクロマトグラムならびにブランクのクロマトグラム上にSDDを妨害するピークは認められなかった。0.1 ppmおよび0.05 ppm添加した場合の回収率はそれぞれ80.0%、78.2%であった。また、CVも5.4%、2.9%と良好となった。

2) 微生物学検査のための適正試料の作製検討— 調査試料の高圧蒸気滅菌後における物性変化について、基材中に存在する他の微生物の影響を防ぐため、あらかじめ作製前に基材の高圧蒸気滅菌処理を行い、市販の蒸し鶏、とりそばろ、ミートボールの計3種の加熱食肉製品を対象に行なった。その結果、とりそばろでは滅菌処理後に広範囲に炭化が認められたことから物性の点で基材としては適さないものと判断された。これに対して蒸し鶏では滅菌後の容器に脂肪分、水分の貯留が認められたが、概ね試料としての変質は少ないものであった。さらにミートボールでは一部に黒変が認められたものの、基材として採用するには問題ないと判断された。また、冷蔵保存14日後の基材の無菌性について確認したところ、ミートボールの一部で菌の増殖が認められた。

調査試料の冷蔵保存時の安定性については、滅菌処理後の3種の加熱食肉製品(蒸し鶏、ミートボール、ハンバーグ)およびマッシュポテトに *S.aureus* あるいは *S.epidermidis* を接種した後、冷蔵保存した際の菌数変化について35日目まで観察した。約 10^8 cfu/mL の菌液に試料を漬け込んだ後、それぞれの検体における生菌数の測定結果は、約 $10^6 \sim 10^7$ cfu/g であった。これを冷蔵保存することにより、全ての基材において菌数減少が認められたが、35日後において *S.aureus* では初発菌数と比べて1オーダーから2オーダー、*S.epidermidis* では2オーダーから3オーダーの菌数減少が認められた。また、全ての基材の中ではマッシュポテト、およびハンバーグが比較的安定な推移であった。

調査試料からの黄色ブドウ球菌の検出について調査試料に菌液を接種した後、少なくとも35日間は接種菌数が確保されていることが明らかとなったことから、菌液接種後35日目に各調査試料について黄色ブドウ球菌検査を公定法に従って行ったところ、全ての *S.aureus* 接種試料において、卵黄加マンニット食塩寒天培地上に典型的な陽性集落の形成を認めた。また、得られた陽性集落の生化学的性状を簡易同定キットを用いて行ったところ、*S.aureus* を確認し、外部汚染による発育集落ではないことを確認した。

3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製検討

①小麦試料作製の検討、①-1. 高濃度標準液の食材への添加回収試験—小麦を含有しない食材(肉団子、カボチャペースト、離乳食1、離乳食2、離乳食3、みそ)に高濃度標準液(小麦用)(オリエンタル酵母株)を添加した試料について、小麦タンパク質をモリナガ FASPEK 小麦測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で測定し、添加したタンパク質量に対する回収率を求めた。その結果いずれも食材のみでは小麦タンパク質は検出されなかった。しかし、キット間の回収率には大きな

差があり、モリナガ FASPEK 小麦測定キットでは98.4~106.9%であったのに対し、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦では53.6~62.1%だった。また、同時に測定した高濃度標準液の回収率にも両キットで同様の差が認められた。

①-2. 小麦抽出液作製の検討—入手可能だった13種の小麦粉のそれぞれについて標準品規格に基づいた抽出を行い、抽出液の標準品規格への適合性その他を検討した。また、比較のためオリエンタル酵母株より譲渡を受けた小麦一次標準粉末についても、同様に抽出を行った。検討した小麦粉13種のうち6種のタンパク質濃度が標準品規格(4.0~6.0 mg/mL)を外れた。

市販小麦粉と小麦一次標準粉末の抽出液について SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動像を比較した結果、皮の部分を除いて製粉した通常的小麦粉の泳動像は全粒粉である小麦一次標準粉末とは特に低分子領域で異なっていた。一方、全粒粉では、石臼挽きハルユタカ全粒粉、石臼挽(春よ恋100%)全粒粉の泳動像が小麦一次標準粉末と比較的類似していた。

これら抽出液をモリナガ FASPEK 小麦測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で測定し、2-D Quant Kit によるタンパク質の測定値と比較した結果、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦の2-D Quant Kit に対する回収率は57.9~124.5%と幅が大きかったが、100%に近いものもあった。一方、モリナガ FASPEK 小麦測定キットでは回収率が全般に高く、123.9~195.8%と全て100%を超え、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦の測定値の1.5~2倍であった。

ケルダール法による分析結果と2-D Quant Kit によるタンパク質濃度を比較して抽出率を求めた結果、抽出率はおおむね90%以上で、小麦粉のタンパク質は標準品規格の抽出法によりほぼ抽出されていた。また、2-D Quant Kit および FASTKIT エライザ Ver. II 小麦の測定値が抽出液の小麦タンパク質の濃度を反映し

ていることが分かった。

①-3. ハルユタカ抽出液添加試料の添加回収および安定性試験— SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像が小麦一次標準粉末の電気泳動像と類似していた石臼挽きハルユタカ全粒粉の抽出液を通知の高濃度標準液の調製法に準じて 20 倍希釈し、ハルユタカ高濃度標準液とし、添加回収試験を実施した。添加食材はオリエンタル酵母製高濃度標準液による添加回収試験でも使用した肉団子とした。肉団子 1 g を試験容器にとり、ハルユタカ高濃度標準液をタンパク質量として 4.65 μg (2-D Quant Kit の測定値から計算) 加えて添加試料を調製し、 -20°C で保存した。添加試料の小麦タンパク質を保存前および 1、4、12 週後にモリナガ FASPEK 小麦 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた。保存前の回収率はモリナガ FASPEK 小麦 測定キットで 154.4%、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で 75.3%と①-1、①-2 の結果と同様に ELISA キット間で 2 倍の差が認められた。保存後の測定値を保存前の測定値で除して求めた回収率は、いずれのキットのいずれの時点でも 100%以上で、添加試料の -20°C における安定性が、12 週後まで確認された。

なお、各時点における両キットの測定値の RSD (n=3) は、全て 6%以内だったこと、添加試料と同時に測定したハルユタカ高濃度標準液 (-80°C 保存) の測定時点間の変動係数がいずれも 5%以下であったことから、本試験の同時再現性およびアッセイ間の再現性に問題はなかったものと考えた。

①-4. 食材への原材料添加による添加回収および安定性試験— SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像が小麦一次標準粉末の電気泳動像と類似していた石臼挽きハルユタカ全粒粉を 1%CMC に懸濁したものを肉団子またはみそに混合して添加試料を作製した。小麦タンパク質の添加量は 5 $\mu\text{g}/\text{g}$ (標準品規格による抽出液の 2-D Quant Kit による測定値から推

定) とした。添加タンパク質量を基準にして求めた保存前の回収率はみそ、肉団子でそれぞれモリナガ FASPEK 小麦測定キットが 197.4%、170.6%、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で 96.4%、50.6%とハルユタカ抽出液添加試料の測定結果と同様に、両キット間で 2 倍以上の差が認められた。添加試料を -20°C で保存して 1、4、12 週後に測定し、これを保存前の測定値で除して求めた回収率はいずれも 100%以上で、添加試料の -20°C における安定性が 12 週後まで確認された。また、添加試料について均一性試験は実施していないが、モリナガ FASPEK 小麦 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦ともに各時点における測定値の RSD (n=3) は、1 時点を除き全て 10%以内だったことから、ある程度均一性が確認できた。

2. そば試料作製の検討、②-1. 高濃度標準液の食材への添加回収試験— そばを使用していない食材 (クッキー1、クッキー2、せんべい、インスタントラーメン、おかゆ) に高濃度標準液 (そば用) (オリエンタル酵母株) を添加した試料について、そばタンパク質をモリナガ FASPEK そば 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II そばで測定し、添加したタンパク質量に対する回収率を求めた。せんべいを除く添加食材の回収率はモリナガ FASPEK そば 測定キットでは 78.0~89.3%、FASTKIT エライザ Ver. II そばでは 93.8~114.3%と良好であった。また、せんべいを除き、いずれの食材でも食材のみではそばタンパク質は検出されなかった。せんべいは食材のみでもモリナガ FASPEK そば 測定キットで 1.7 $\mu\text{g}/\text{g}$ の測定値が得られたほか、添加食材の回収率は両キットともに他の食材に比べて高値を示した。

②-2. そば抽出液作製の検討— 標準品規格に従って抽出したそば標準品原液についてタンパク質濃度を 2-D Quant Kit で測定した結果、3.3 mg/mL で標準品規格 (2.8~4.2 mg/mL) に適合した。また、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像も標準品規格に適合していることを確認した。そば標準品原液を標準品規

格に従って 20 倍希釈して自家製そば高濃度標準液とした後、そばタンパク質の濃度をモリナガ FASPEK そば 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II そばで測定し、2-D Quant Kit による測定値と比較して回収率を求めると共に、高濃度標準液(そば用)(オリエンタル酵母株)の測定結果とも比較した結果、自家製そば高濃度標準液のモリナガ FASPEK そば 測定キットによる回収率は 81.1%、FASTKIT エライザ Ver. II そばでは 118.4%と良好で、高濃度標準液(そば用)(オリエンタル酵母株)の回収率とも類似していた。

②-3. 自家製そば高濃度標準液添加試料の添加回収および安定性試験— クッキー2、またはインスタントラーメン 1 g を試験容器にとり、これに自家製そば高濃度標準液をタンパク質量として 6.58 μg (2-D Quant Kit の測定値から計算) 加えて添加試料を調製し、 -20°C で保存した添加試料について、そばタンパク質を保存前および 1、4、12 週後にモリナガ FASPEK そば 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II そばで測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた。モリナガ FASPEK そば 測定キットでは回収率が全期間を通して、クッキー2、インスタントラーメン共に 77.2~90.6%の範囲でほぼ一定であった。一方、FASTKIT エライザ Ver. II そばでは回収率が 105.8~151.2%と変動が大きかった。両キットの測定値の同時再現性は、RSD (n=3) が全て 5.1%以内、保存前および 1、4、12 週で添加試料と同時に測定した自家製そば高濃度標準液 (-80°C 保存) の測定値を指標とした変動係数もモリナガ FASPEK そば 測定キットでは 2.8%と良好であった。一方、FASTKIT エライザ Ver. II そばの自家製そば高濃度標準液測定値の RSD は 13.2%と大きく、アッセイ間の測定精度に問題が認められた。

②-4. 食材への原材料添加による添加回収および安定性試験— そば粉をあずきあん、または CMC 溶液に加えてそば粉添加試料を作製し、 -20°C で保存した。そば粉の添加量は使

用したそば粉を標準品規格により抽出した抽出液の 2-D Quant Kit による測定値から推定し、そばタンパク質として 5 および 8 $\mu\text{g}/\text{g}$ とした。そば粉添加あんおよび CMC 懸濁液のそばタンパク質を保存前および 1、4、12 週後にモリナガ FASPEK そば 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II そばで測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた。その結果、モリナガ FASPEK そば 測定キットの回収率は CMC 懸濁液が 106.0~115.6%、あんが 114.9~130.6%と全期間を通してほぼ一定で、標準品規格の抽出液からの予測値とも大きく違わなかった。一方 FASTKIT エライザ Ver. II そばでは CMC 懸濁液、あんともに回収率が標準品規格の抽出液からの予測値を大幅に上回ったほか、保存により増加する傾向も認められた。また、そば粉のタンパク質含量をケルダール法により測定し結果、そば粉からの標準品規格によるタンパク質の抽出率は 64.4%に留まることが分かり、今回作製したそば粉添加試料のそばタンパク質の含量が予定した含量よりも高かったことが、FASTKIT エライザ Ver. II そばの回収率が大きくなった原因のひとつと考えた。

3. 落花生試料作製の検討、③-1. 高濃度標準液の食材への添加回収試験— 落花生を含まない食材(クッキー1、クッキー2、せんべい、インスタントラーメン、おかゆ)に高濃度標準液(落花生用)(オリエンタル酵母株)を添加した試料について落花生タンパク質を、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、添加したタンパク質量に対する回収率を求めた結果、添加食材の落花生タンパク質の回収率はせんべいを除き、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは 75.8~89.9%であったが、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生ではおかゆを除き、100%以上となり、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットに比べて高い回収率を示した。同時に測定した高濃度標準液の回収率はモリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは 80.5%、FASTKIT エラ

イザ Ver. II 落花生では 85.2%と差がなかったので両キットで認められた回収率の差は添加食材のマトリックスの影響によるものと考えた。

③-2. 落花生抽出液作製の検討— 落花生粉を標準品規格に従って抽出した落花生標準品原液についてタンパク質量を 2-D Quant Kit で測定した結果、3.7 mg/mL で、標準品規格 (3.6~5.3 mg/mL) に適合した。また、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像も標準品規格に適合していることを確認した。次に落花生標準品原液を標準品規格に従って 20 倍希釈して自家製落花生高濃度標準液とした後、落花生タンパク質の濃度をモリナガ FASPEK 落花生測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、2-D Quant Kit による測定値と比較して回収率を求めると共に、高濃度標準液(落花生用) (オリエンタル酵母(株))の測定結果とも比較した結果、自家製落花生高濃度標準液のモリナガ FASPEK 落花生測定キットによる回収率は 105.3%、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生では 72.6%で、同時に測定した高濃度標準液(落花生用)の回収率とは若干異なっていた。

③-3. 自家製落花生高濃度標準液添加試料の添加回収および安定性試験— クッキー 2 を 1 g ずつ試験容器にとり、これに自家製落花生高濃度標準液をタンパク質量として 3.74 μg (2-D Quant Kit の測定値から計算) 加えて添加試料を調製し、 -20°C で保存した。添加試料の落花生タンパク質を保存前および 1、4、12 週後にモリナガ FASPEK 落花生測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた。モリナガ FASPEK 落花生測定キットでは回収率が全期間を通して 110%前後とほぼ一定であった。一方、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生では 92.0~115.5%と変動が大きかった。両キットの同時再現性は RSD (n=3) が全て 5.1%以内、保存前および 1、4、12 週で添加試料と同時に測定した自家製落花生高濃度標準液 (-80°C 保存) の測定値を指標とし

た変動係数も、モリナガ FASPEK 落花生測定キットでは 4.3%と良好であった。一方、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生の自家製落花生高濃度標準液測定値の RSD は 11.0%と大きく、アッセイ間の測定精度に問題が認められた。

③-4. 食材への原材料添加による添加回収および安定性試験— 落花生粉をあずきあん、または CMC 溶液に加えて落花生粉添加試料を作製後、 -20°C で保存し、落花生粉の添加量は落花生粉の標準品規格による抽出液の 2-D Quant Kit による測定値から推定し、落花生タンパク質として 5 および 8 $\mu\text{g/g}$ となる量とした。落花生粉添加あん、および CMC 懸濁液の落花生タンパク質をモリナガ FASPEK 落花生測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた結果、モリナガ FASPEK 落花生測定キットの回収率は CMC 懸濁液が 88.8~103.0%、あんが 101.0~114.2%と全期間を通してほぼ一定で、標準品規格の抽出液からの予測値とも大きく違わなかった。一方 FASTKIT エライザ Ver. II 落花生では CMC 懸濁液の回収率が 67.6~83.4%と 100%以下だったのに対し、あんでは 122.4~170.6%と 100%を上回った。

D. 考察

1. 田中分担研究： 精度管理調査試料の GC/MS 測定でフェンブコナゾールの精度 (正確度・精密度) が良くなかった原因として、他の添加農薬に比べ保持時間が遅く、ほうれんそう由来の妨害ピークが近くに認められたことによることがあげられる。また、標準のクロマトグラムのテーリング傾向によりマトリックスマッチングした定量あるいは内部標準物質による補正を行わないと精度が良くないものと考えられた。また z-スコア評価に疑問点が示唆された機関 ($2 < |Z| < 3$) の検査結果および検査方法を精査した結果、GC/MS 測定用検査液の溶媒揮散の可能性等いくつかの検査作業上の課題が明らかとなった。

GC/MS を用いた方法では、ポジティブリスト制度により食品中に残留基準が設定された残留農薬の一斉分析のうち約 300 種類近くの農薬が採用されている。GC/MS-SIM 測定が一律基準における感度をクリアできることから広く用いられているが、GC/MS-SCAN 法による定性定量を目的とした農薬データベース等を搭載した GC/MS 解析法も実用化されている。本外部精度管理試料の農薬無添加及び添加ほうれんそうを分析機器メーカー 3 社に送付し、スプリットレス及び大量注入による農薬データベース解析法により定性能力・定量性についても検証した結果、データベース解析法はスクリーニングを目的とした健康危機管理体制の構築に有用であることが示唆された。

ポジティブリスト制度により設定される残留農薬約 800 種類のうち、3 分の 1 近くが HPLC や LC/MS を用いた方法となっている。また、LC/MS/MS も高感度分析可能な機器として汎用されている。そのうち LC/TOF/MS は精密質量測定が高感度で可能なことから実試料においてはスクリーニングなど標準物質が無い状況下での正確な化合物の確認に有効である。また、これらがヒットした化合物の詳細(化学物質名、組成式、精密質量、保持時間、誤差など)の表示も可能である。例えば、チアベンダゾール $C_{10}H_{17}N_3S$ の場合、 $M+H^+$ の理論的精密質量は $m/z202.0433$ となり、実測値 $m/z202.0430$ とほぼ近似した値を示した。なお、9 参加協力機関が検出した定量値・ピーク形状は概ね良かったことから、ほぼ良好な状態の GC/MS による測定が行われていたと推察した。また、9 機関とも信頼性のあるデータが得られる要因である「正確な標準品」を用いて「適正な分析法」を実施し「良好な状態の装置」で分析が行われており、ほとんどの化合物で問題点の無いことが示唆された。

GC/MS 対象農薬では 244 農薬(異性体等含む 274 種類)、LC/MS/MS 対象農薬 118 農薬(異性体等含む 127 種類)が、機器の測定感度から一律基準を満足していた。添加回収率で

は農産物 28 種類(延べ 47 種類)について延べ 352 農薬の回収率の良否が確認できた。本研究は地方衛生研究所の相互協力体制、情報の共有、精度管理を含む技術能力の向上等、極めて有効となりうることを示しており、今後の精度(正確度・精密度)を維持・向上し農薬検査の拡大の方向性を可能とすることが期待された。

国際精度管理手法との整合性において、本研究は、できる限り国際規格で定められた精度管理手法との整合性を考慮しながら①国際規格との整合の必要性、②試験所間比較の国際的手法、③検査法の検出限界と定量限界について ISO/IEC 17025、ISO/IEC Guide 43 等にしたいが実施した。

その結果、検査に用いる分析法の検出限界は、IUPAC では「合理的な確実性 (reasonable certainty) を持って検出できる最小の測定値」、米国化学会では「分析が確実に検出 (reliably detect) できる最低濃度」と定義されている。‘合理的な確実性’あるいは‘確実に検出’と言っても、具体的にどのように値を導き出せば良いのかという問題がある。この点については、IUPAC 及び米国化学会のどちらも、分析で発生する偶然誤差を統計的に処理し、一定の危険率を見込んだ上で、ブランクと区別できる最も低い濃度を導き出す方法を採用している。従って、検査結果は必ず偶然誤差を含んでいるということを、常に考慮しておくことが重要である。

食品検査で議論される定量限界についても、同様に検査に用いる分析法の持つ偶然誤差を把握することによって、定量値の精度を担保することで定義されている。定量値と偶然誤差(標準偏差、 σ)の関係は、低濃度では誤差の絶対値 σ は小さいが、定量値に占める誤差の割合(相対標準偏差、RSD)は大きい。定量限界は、誤差の割合を一定値以下で保証できる最低濃度として定義され、一般にその割合を 10% に決めることが多い。具体的には、標準偏差 σ の 10 倍の濃度 (10σ) に定量限界濃度を

設定する。これにより、定量限界濃度での RSD は、 $\sigma/10\sigma=10\%$ となり、その濃度以上では、ばらつきの割合 RSD を 10%以下に保つことができる。なお、クロマトグラフィーを用いた場合の定量限界値の設定に広く用いられている「S/N=10」は、偶然誤差をクロマトグラムのノイズと仮定して定量限界を設定しているものである。しかしながら、近年の分析装置の進歩は著しく、コンピューターによる平滑化(スムージング処理)などにより、正しい評価に支障を生じる可能性がある。そのため、S/N から定量限界を設定する場合は、低濃度での繰返し試験を行い、その標準偏差から設定した定量限界を予め確認しておくことが検査結果の信頼性確保上望ましい。

2. 中澤分担研究: 1) ELISA における測定値変動要因の検討— それぞれ検討した ELISA の測定値の変動に影響を及ぼすことが予想される要因について比較したところ、エッジ効果<日差変動<日内変動<手技となった。標準品を用いた場合、ELISA 法による測定値のバラツキの最大の要因は、手技の習熟度に依存することが明らかとなった。またより測定値の精度を上げるためには、エッジ部分の測定値を除いたほうが良いことがわかった。

2) 食品試料測定における ELISA の測定値精度評価— ELISA 法の測定にはマトリックス成分、特に脂質が影響することから、脱脂が重要であることがわかった。しかし、実試料の検量線には、脂質以外の夾雑成分の関与が考えられ、従来の固相抽出法である Oasis MCX により精製法と、更にアフィニティーカラムで処理した場合のいずれにおいても十分な精製効果は得られなかった。今後、試料精製に関しては更なる検討が必要であった。

3. 松木分担研究: 今回の純度測定においては、使用する分析機器の種類により純度結果が異なり、いずれの結果を用いるかにより規定された純度を満たす場合と満たさない場合が生じることが示唆された。検査機関においては、検査に用いる標準品の純度はメーカー表示値

の信頼を前提にしており、また定量分析における標準品は、定量値算出の基になっており、その表示純度は定量値の信頼性の根幹を成している。さらに、行政検査等においては測定の結果が違反の有無の判定に用いられることから、表示される純度の正確性が重要であると考える。

4. 米谷分担研究: PCDD、PCDF では、機関間の RSD%が 10%程度から 90%程度まで広い範囲の値を示し、異性体間で室間精度が異なっていた。また、PCB については、ほとんどの異性体の室間精度は 20%RSD 程度であったが、2',3,4,4',5-PeCB は 150%の RSD となった。TEQ の RSD%は 7%であった。大きなばらつきを示す異性体の濃度が必ずしも低い傾向は認められなかった。この原因として、参加試験機関が少ないため得られる標準偏差が変動しやすいことも考えられるが、その他の原因として外れ値の存在が疑われた。技能試験において、参加者の値から平均・標準偏差を求める際には、検定を行って外れ値を除くことが行われるが、今回の試験では参加機関数が少なく、検定により外れ値を除くことは適切ではない。そこで、外れ値の存在が予想されるときに用いられる頑健な統計を用いて頑健な統計量の計算を行った。頑健な統計によれば、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。通常の統計計算では 147%という大きな室間精度を示した 2',3,4,4',5-PeCB の分析結果について、頑健な統計量から RSD%を計算すると、19%となった。6か所の参加機関中 1 機関が、他の機関の 10 倍程度の値を報告しているため、通常の計算では大きな平均及び標準偏差が得られるが、頑健な平均は通常の平均の 1/2 以下、標準偏差も 1/10 以下となり、外れ値の影響が除かれている。2',3,4,4',5-PeCB は、例年の調査で室間精度が大きく、妨害ピークとの分離が困難等の分析上問題のある異性体の可能性がある。しかし、この異性体の毒性等価係数は小さいことから、外れ値を報告した機関の TEQ は、異

性体濃度の差から予想されるような大きな差は見られていない。その他の異性体では、3,4,4',5-TCBにおいて、頑健なRSDが通常のRSDの1/3程度の値となった。他の異性体では、通常の統計量と頑健な統計量はほぼ一致した。

通常の統計量を用いて計算したzスコアと、頑健な統計量を用いて計算したzスコアを示す。通常の統計量を用いて計算した各異性体の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、機関3の2',3,4,4',5-PeCBが45という極端に大きな値となった。この機関の3,4,4',5-TCBのzスコアは-7.9であり、2つの異性体で不満足な結果を報告している。機関3のTEQのzスコアは-2となり、明らかに問題があるとは言えないものの、良好とは言えない結果となった。

平成16~18年の3年間に行った技能試験に、延べ9か所の試験機関が参加した。3回の技能試験で用いた試料は、全て魚筋肉部の凍結乾燥粉末で、TEQはそれぞれ5.5 pg/g、1.7 pg/g、25.9 pg/gであった。それぞれのTEQの室間精度は、RSD表示で7.7%、4.8%、6.2%であり、濃度によらず同程度であった。全ての年で10%以下の室間精度であり、参加機関においては良好な精度が保持されている。

図中の1~4の試験機関は全ての年度で参加しており、6~9は1年だけの参加である。3年間連続して参加した4機関の中で、1と4は全ての異性体で満足なzスコアとなった。2は最初の年度には大きなzスコアとなった異性体が見られたが、2年目以降は良好な結果となった。これに対し、機関3は毎年1-2種の異性体で大きなzスコアとなった。1年だけの参加機関は、大きなzスコアを示す異性体が多く見られる傾向があった。

個々の異性体の結果と同じく、単年度の参加機関は大きなzスコアとなる傾向が見られた。参加頻度の少ない機関は、分析経験が少ない

可能性が高く、それが結果に反映していると考えられる。

5. 渡邊分担研究: 5-1. 組換えDNA技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究、① 定量PCR機器の精度— 定量PCR機器により得られる測定値の精度が良好でなければ、それに基づき算出される組換えDNA技術応用食品の定量値のばらつきの根本的な原因となる。また、定量PCRでは、96 wellプレートに分析試料を含む反応試薬を分注し、これをPCRにより増幅しながら、増幅に伴い生じる蛍光を測定する。この際、96 wellプレート上のwellの位置に依らず均等な増幅反応と蛍光の測定が行われることが、定量PCR機器により得られる測定値の精度を良好に保つ上での前提となる。例えば、周期幅が96 wellプレート長辺のwell数(12)に一致し、ABI PRISM 7500の蛍光検出の仕様が、プレート全体を一括して非駆動型のCCDカメラによって検出するものであるため、蛍光検出に関する機器の仕様を反映した結果だと考えられた。また、ABI 7700に関しては、PCRの温度制御を行うサーマルサイクラーは、クーラントを使用し、また温度制御は、設定温度と実測温度との間に一定の幅を持たせた仕様となっている。このため、サーマルサイクラー部の温度制御の特性を反映した結果だと考えられた。

PCR効率(m)については、原理的に達成される最大効率の2.0に対し、ABI PRISM 7500を用いて*LeI*を測定した場合には約1.8と最小であり、それ以外については、測定の異常によると考えられるwellを除き約2.0となった。*GiMlet*を用いた解析により得られたPCR効率が2.0を中心としたばらつきをもった値であることは、本アプリケーションに組み込まれた算出のアルゴリズムが正しく機能した結果である。また、ABI PRISM 7500を用いた*LeI*コピー数の測定のように、96全てのwellを通じて、また繰り返し測定して常にPCR効率が2.0を明らかに下回っていると判断されたならば、これを目安として反応系を改良することも考えられる。一