

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～平成 19 年度
総合研究報告書

財団法人 食品薬品安全センター
主任研究者 遠藤 明

平成 20 年 (2008 年) 4 月

目 次

I. 総合研究報告	
検査機関の信頼性確保に関する研究 -----	1
遠藤 明	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	57
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	65

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～平成 19 年度

総合研究報告書

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)

(総合)研究報告書

検査機関の信頼性確保に関する研究

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。検査の実施にあたっては、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、必要不可欠な状況にあり、信頼性を担保するうえでの精度管理の実施体制を充実させる必要がある。さらに、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(内部精度管理および外部精度管理)」を定期的を実施するように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、適正な評価のための適切な調査試料が必要であるが、これには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、およびこれを用いた精度管理の実施は、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・安全確保に大きく貢献するものと考えられる。本研究では、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管理に関する研究、3.ベンゾフェノン類による環境・生体汚染モニタリングと分析法の精度評価および食品香料のキラル純度評価に関する研究、4. 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(以上、中澤分担研究)、5.市販農薬標準品の純度比較に関する研究(松木分担研究)、6.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(米谷分担研究)、7.組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究、8.フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究(以上、渡邊分担研究)、9.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(町井分担研究)、10.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(大島分担研究)の 10 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二室長)、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、その一貫として食品衛生に係わる検査施設の精度管理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のひとつであり、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、検査方法のバリデーションの検討、ならびに有害物質等に係わ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として挙げられる。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ならびに微生物学的検査の外部精度管理調査については、その進め方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における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、ならびにアレルギー食品検査に係わる外部精度管理調査も基本的な問題点を解決しながら、精度管理体制のより一層の充実化を図ることが必要であると考えられる。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)に伴い、食品中の有機汚染物質(残留農薬、動物用医薬品、臭素系難燃剤、ベンゾフェノン類など)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、これらの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、なら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：第1回調査では、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、フェントロチ

オン、プロチオホス、EPN、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 種を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 種を選択して添加した試料を作製して配布した。第 2 回調査では、かぼちゃ、にんじんおよびほうれん草ペーストを基材として農薬(アトラジン、チオベンカルブ、ブプロフェジン、メタラキシル、エチオン、プロピサミド、マラチオン、メタラキシル、テルブホス等)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。また同様に野菜ペーストに 0.1 ppm となるように農薬混合標準液を添加した内部精度管理試料を作製し、検査協力機関に送付した。第 3 回調査では、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。なお、内部精度管理試料については 1 食材につき 3 機関とした。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、結果の評価方法

は、報告された定量値について統計処理を行い、これについて \bar{X} -R 管理図、 z -スコアにより行った。

2.中澤分担研究:1)臭素系難燃剤の生体影響評価—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さらに培養して 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 定量ならびに 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不確かさを統計的に計算して評価した。3)スターバー抽出法によるベンゾフェノン類の測定—ポリジメチルシロキサンがコーティングされたガラス製攪拌子を用いて対象物質を抽出し(スターバー抽出法)、加熱脱着装置の搭載された GC/MS で測定した。4)食品香料の純度試験—市販されているボルネオールおよびイソボルネオール(計 7 種)の標準品を検査対象とし、純度試験は GC—水素炎イオン化検出器(FID)を用いた。なお評価方法は各標準品 100 mg を正確に量り取り、アセトン 100 mL に溶解させ、これを被験物質溶液とした。各被験物質溶液について得られた GC のクロマトグラム上の被験物質および不純物ピークの総面積に対する被験物質面積比を求め、計 5 回の平均値を含量(%)とした。5)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。6)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：標準品はメーカー3社から市販されているものを入手し用いた。

H17年度

パラチオンメチル、ビテルタノール、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(9物質、27種)

H18年度

メラクロール、メタミドホス、フルシトリネート、フェンバレレート、フェノブカルブ、トルクロホスメチル、ピラクロホス、メフェナセット、フルバリネート、ピリミジフェン、フェナリモル、テニルクロール、デルタメトリン、ジフェノコナゾール、クロプロフロファム、イミベンコナゾール、アセタミプリド、エトプロホス、クロルフェンビンホス、ピリフェノックス(20物質、57種)

H19年度

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、ジメタメトリン、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、ベンフルラリン、ホスメット(15物質、45種)

1)使用機器及び測定条件

(1)使用機器

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)を純度測定に用いることとした。また、HPLCにおいては、多波長検出器(PDA)を用いて、測定波長波長以外の波長で検出される不純物質の確認を行った。

(2)測定条件

GC—FID

注入モード:スプリットレス

注入口温度:300℃

カラム:キャピラリカラム 内径0.32 mm、長さ30 m、膜圧 1.5 μm

カラムオープン温度:180℃(1分)→10℃/分→300℃(17分)

キャリアガス:ヘリウム

流量:1.0 mL/分

注入量:1 μL

なお、昇温プログラム中に標準品のピークが溶出しないう場合は、必要に応じてキャリアガス流量を上げて対応した。また、溶出時間が早すぎる被験物質については、初期温度を下げて溶出時間の調節を行った。

HPLC—UV

カラム:WakoPak Navi C-18 内径 4.6 mm、長さ 250 mm

カラム温度:40℃

移動相:10%アセトニトリル→90%アセトニトリルにリニアで20分かけてグラジエント後10分溶出。

流速:1.0 mL/分

測定波長:各標準品の極大波長及び200 nm

注入量:20 μL

多波長検出器:200—600 nm

なお、このプログラム中に標準品のピークが溶出しないう場合は、90%アセトニトリルで溶出するまで流しその溶出時間から10分モニタリングした。溶出時間が早すぎる場合には、グラジエント条

件を変更し、溶出時間を調節した。

2)標準溶液の調製

(1)標準品の秤取

0.1 mg 以下まで測定できる精密天秤を使用し、マイクロ秤量ロート(ホウ珪酸ガラス製)に約 100 mg を精密に量りとる。但し、粘性が高い等の理由で、必要量が採取できない場合には、10 mg を下回らない範囲で、秤取量を減らした。

(2)標準溶液(被験溶液)の調製

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、被験溶液とする((1)で秤取量を減らしている場合には、それに応じて、定容量を変え、1000 µg/mL 溶液を調製した)。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した。

(3)低濃度溶液の調製

3 社のうち任意に選択した 1 社の被験溶液 1mL をホールピペットで 100 mL 容褐色メスフラスコに取り、各溶媒で定容する。さらに、そこから 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、被験溶液の 1 万分の 1 の低濃度溶液(0.1 µg/mL)を調整した。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た。

4.米谷分担研究：魚(ボラ、カレイ、あるいはタチウオ)の筋肉部を均一に混合し粉末としたものを調査試料とし、分析機関(5 機関)に配布して技能試験を行った。結果の評価は、5 機関からの報告値について頑健な平均、標準偏

差、相対標準偏差を求めた。なお、頑健な統計量の算出には ISO 5725 Part-5 の algorithm A を用いた。また通常の統計量と頑健な統計量を用いた 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)GM トウモロコシから抽出した DNA の収量および質の確認—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)、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。

2)GM 大豆から抽出した DNA の収量および質の確認—GM 大豆および non-GM 大豆をそれぞれ高速遠心粉碎機で粉碎した後、凍結乾燥を行った。混合粉体試料の作製は GM 大豆に各種 non-GM 大豆を加え 1%および 5%の重量比となるように調製した。混合 DNA 試料は、GM 大豆粉体試料および各種 non-GM 大豆粉体試料

から DNA をそれぞれ抽出し、1%および 5%となるように DNA 重量として混合することにより調製した。なお、DNA の抽出には GM quicker 法もしくは DNeasy Plant Mini Kit を用いた方法を改変して行った。Non-GM 大豆 10 種および GM 大豆から抽出した DNA についてアガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドで染色した後、UV 照射装置上で画像解析を行った。さらに定量 PCR 法による定量値の比較を行った。3) 定量 PCR 機器の精度、ベースライン補正に関する検討—定量 PCR 機器として ABI 社製、ABI PRISM 7500、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。4) 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 日繰り返しにより行った。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.260nm) の吸光値 1 を 33ng/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、カワハギを陰性対象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い塩基の率を勘案し、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: 下痢性貝毒検査用調査試料の作製のため、バイアルあるいはろ紙にオカダ酸を吸着させた後、これを冷凍、冷蔵、室温の 3 種の条件下で保存した後、蛍光 HPLC 法およびマウスバイオアッセイにより測定した。また、オカダ酸の加熱処理は、ヒーティングブロック内にバイアルを静置することにより行った。なお、このときの加熱温度は 50~150°C、加熱時間は 48 時間以内とした。加熱処理後の回収率は n=5 で測定することにより行った。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 (φ 13 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

— 重金属(カドミウム)検査試料はカドミウム高濃度添加玄米を作製し、カドミウム濃度を原子吸光光度法により測定した後、これにカドミウム無添加玄米を混合し、粉碎することにより作製した。有機リン系残留農薬検査用試料の作製は、かぼちゃおよびサツマイモペーストを用いた。これに EPN、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、フェンチオン、マラチオンを加え、攪拌することにより作製した。また、クロルピリホスおよびダイアジノンを含む残留農薬検査用試料はほうれん草ペーストを用いて作製した。クロルピリホスおよびフェニトロチオンを含む残留農薬検査用試料の作製はかぼちゃおよびえだまめを用いて作製した。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。一方、えだまめペーストでは、10 kg 容量に 2 種の農薬のアセトン溶液 10mL を添加し、攪拌後小分けしたものを凍結保存した。なお、均一性の測定はガスクロマトグラフ法を用いた。残留動物用医薬品検査用試料は、ミンチ状とした食肉にサルファ剤 8 種(スルファジアジン、スルファメラジン、スルファジミジン、スルファモノトキシシ、スルファメトキサゾール、スルファジメトキシシ、スルファキノキサリン、スルファメキシピダジン)を含むメタノール溶液を添加し、よく混合することにより作製した。

すなわち、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および 10%水添加ペーストに 8 種のサルファ剤を含むメタノール溶液を加えて攪拌した。同様に、フルベンダゾールを含んだ残留動物用医薬品検査用試料は液卵を基材として作製した。なお、測定法は食品衛生法に準拠し、高速液体クロマトグラフにより行った。2)微生物学調査用試料の作製— サルモネラ属菌検査用調査試料として液卵(殺菌鶏卵)を基材として採用し、サルモネラ属菌の検査方法は、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。大腸菌群検査用調査試料として市販の 4 種の魚肉練り製品(ちくわ 2 種、つみれ、かまぼこ)を採用し、これに *Klebsiella oxitoca* または *Acinetobacter calcoaceticus* を接種し、冷蔵で 28 日間保存した。これらの調査試料について経時的に生菌数測定を行った。また菌液接種 28 日後については公定法に従い大腸菌群検査を行い、各種培地での増菌の有無、ガス産生等について確認した。黄色ブドウ球菌検査では、*Staphylococcus aureus* HIC11011、*Staphylococcus 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、とりそぼろ、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した後、 10^8 colony forming units/mL の菌液に浸漬し、性状の変化、生菌数の確認、加熱食肉製品中の黄色ブドウ球菌検査を常法に従って実施した。3)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タンパク質とし、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。な

お、添加する卵タンパク質として、標準品およびEgg solidタンパク質の定量は化学的方法には2-D Quant Kitを使用した。また、免疫化学的方法(ELISA法)は卵タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 卵測定キット(卵白アルブミン)、FASTKIT エライザ Ver. II 卵を、牛乳タンパク質の測定には、モリナガ FASPEK 牛乳測定キット(カゼイン)、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳を使用し、通知法に従って操作した。精度管理試料の作製は以下のとおりとした。すなわち、卵はEgg Solids、乳はスキムミルク粉末を厚生労働省の通知の標準品規格に従って抽出し、自家製抽出液とした。次に、食材をフードプロセッサーで均一化後、1 gを50 mL容の遠沈管に量り取り、自家製抽出液をタンパク質量として約5または10 μg 添加した。牛乳については高濃度標準溶液を同様に添加した試料も作製した。また別途、市販の乾燥マッシュポテト、ゲル化剤およびPBSを混合した模擬食材に全卵またはスキムミルク粉末の水溶液を卵または牛乳タンパク質量として約10 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように添加して調製した。また、小麦、そばおよ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㈱)および市販の小麦、そばは標準品規格のそばを製粉会社より購入し、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。さらに、精度管理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ーで均一化して作製した。

C. 研究結果

1. 田中分担研究: 第1回調査において調製した試料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、試料間の有意差は認められず、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ほうがレッドピーマンよりも均質性がよく、ラウンド2ではジャガイモのほう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に添加した農薬であるクロルピリホス、マラチオン、ダイアジノン、プロチオホス、ジメトエート、フェニトロチオン、EPN、シペルメリン、フェンバレレートが全機関が全て検出した。ラウンド1でトマトジュースを採用した場合、クロルピリホスの添加量0.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ に対し、全機関の平均値は0.360 $\mu\text{g}/\text{g}$ (回収率90.0%)、Xbar管理図では下部管理線を超えたのは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 $\mu\text{g}/\text{g}$ に対し、全機関の平均値は0.088 $\mu\text{g}/\text{g}$ (回収率87.9%)、Xbar管理図で上部管理線を超えたのは1機関で下部管理線を超えたのは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」であった。フェニトロチオンの添加量0.25 $\mu\text{g}/\text{g}$ に対し、全機関の平均値は0.256 $\mu\text{g}/\text{g}$ (回収率102.5%)、Xbar管理図で上部管理線を超えたのは2機関、下部管理線を

超えたのは1機関、R管理図で適正域をはずれたのは1機関、zスコアは全機関で「良好」な結果であった。ラウンド1でレッドピーマンを採用した場合、シペルメトリンの添加量 0.8 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.748 µg/g (回収率 93.5%)、Xbar 管理図で上部管理線を超えたのは1機関で下部管理線を超えたのは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 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.442 µg/g (回収率 110.4%) Xbar 管理図で上部管理線を超えたのは3機関で下部管理線を超えたのは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 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.090 µg/g (回収率 90.4%)、Xbar 管理図で上部管理線を超えたのは1機関で下部管理線を超えたのは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。ラウンド2で野菜ジュースの場合、クロルピリホスの添加量 0.4 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.355 µg/g (回収率 88.7%)、Xbar 管理図で上部管理線を超えたのは1機関で下部管理線を超えたのは1機関、R管理図は全機関で「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 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.423 µg/g (回収率 105.8%)、Xbar 管理図で上部管理線を超えたのは2機関、R管理図で適正域を外れたのは1機関、zスコアは全機関で「良好」であった。シペルメトリンの添加量 0.5 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.449 µg/g (回収率 89.8%)、Xbar 管理図で上部管理線を超えたのは1機関、R管理図は全機関で「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 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.087 µg/g (回収

率 87.1%)、Xbar 管理図で下部管理線を超えたのは1機関、R管理図で適正域を外れたのは1機関、zスコアは全機関で「良好」であった。ラウンド2でジャガイモの場合、クロルピリホスの添加量 0.2 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.170 µg/g (回収率 84.8%)、Xbar 管理図で下部管理線を超えたのは1機関、R管理図は全機関「良好」であった。また 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 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.085 µg/g (回収率 84.6%)、Xbar 管理図で上部管理線を超えたのは1機関で下部管理線を超えたのは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 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.076 µg/g (回収率 75.6%)、Xbar 管理図で下部管理線を超えたのは4機関、R管理図とzスコアは全機関「良好」であった。フェンバレートの添加量 0.05 µg/g に対し、全機関の平均値は 0.048 µg/g (回収率 95.5%)、Xbar 管理図で上部管理線を超えたのは3機関、R管理図で適正域を外れたのは1機関 zスコアで $2 < z < 3$ となった機関を1機関認めた。第2回調査において調製した試料中の各農薬検査項目は、設定添加量に対して平均回収率 91.5~98.9%、変動係数 1.5~6.7%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。また試料の均一性について一元配置分析を行ったところ、試料間に有意差は認められず均一性が確認された。添加農薬の検出については、かぼちゃ(アトラジン、チオベンカルブ、ブプロフェジン、メタラキシル)、にんじん(エチオン、プロピサミド、マラチオン、メタラキシル)、ほうれん草(クロルピリホス、テルブホス、フルシ

トリネート)より全機関が正しく検出した。また、それぞれの機関の5回測定値の平均値に異常値は認められなかった。かぼちゃペースト中のアトラジンのGC/MSによる測定値は添加量に対して95%を示し、zスコアが1機関で2以上であったが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して106.7%を示し、R管理図において1機関が適正域を外れた。チオベンカルブのGC/MSによる測定値は添加量に対して104.7%を示し、R管理図において1機関が適正域を外れたが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して109.7%を示し、R管理図において1機関が適正域を外れた。ブプロフェジンのGC/MSによる測定値は添加量に対して85.8%を示し、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して89.7%を示した。なお、結果は両者において全機関で結果は良好であった。メタラキシルのGC/MSによる測定値は添加量に対して94.3%を示し、zスコアが1機関で2以上であったが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して101.6%を示し、R管理図において1機関が適正域を外れた。にんじんペースト中のエチオンのGC/MSによる測定値は添加量に対して82.4%を示し、R管理図において1機関が適正域を外れたが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して86.1%を示し、R管理図において1機関が適正域を外れた。プロピサミドのGC/MSによる測定値は添加量に対して85.9%を示し、R管理図およびzスコアにおいて1機関が適正域を外れたが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して94.4%を示し、全機関で結果は良好であった。マラチオンのGC/MSによる測定値は添加量に対して82.8%を示し、LC/MS/MSの測定値は添加量に対して87.3%を示した。なお、両者において全機関で結果は良好であった。メタラキシルの

GC/MSによる測定値は添加量に対して91.1%を示し、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して98.1%を示した。なお、両者において全機関で結果は良好であった。ほうれん草中のクロルピリホスのGC/MSによる測定値は添加量に対して102.8%を示し、Xbar管理図、R管理図およびzスコアで1機関が適正域を外れたが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して86.5%を示し、全ての機関で結果は良好であった。テルブホスのGC/MSによる測定値は添加量に対して104.5%を示し、Xbar管理図において2機関が上部境界線を超えたが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して90.6%を示し、全機関が結果は良好であった。フルシトリネートのGC/MSによる測定値は添加量に対して84.0%を示し、Xbar管理図において1機関が上部境界線を超えたが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して83.8%を示し、全機関が結果は良好であった。メタラキシルのGC/MSによる測定値は添加量に対して90.1%を示し、R管理図で1機関が適正域を外したが、LC/MS/MSによる測定値は添加量に対して100.5%を示し、Xbar管理図およびR管理図で1機関が適正域を外れた。また内部精度管理として添加回収試験を行ったところ、かぼちゃでは平均回収率が90.3~101.8%、にんじんでは80.8~97.0%、ほうれん草では91.8~97.6%と良好であった。さらにこのときのHorRat値は1未満であり、各機関の分析法の妥当性が確認された。第3回調査における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中の各濃度について測定した結果、設定添加量に対して87.3~111.2%の平均回収率であり、かつ変動係数は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。なお、試料の安定性は、各試料を配布後に -20°C で2ヶ月間の保存試験を行い、 γ -BHC、メキシフェノジドが5%有意確率で2ヵ月後の定量値が小さい結果となった。一方、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。ほうれん草にブラインドした農薬(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)、トウモロコシに添加した農薬(シフルフェナミド、シメコナゾール、メトキシフェノジド)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。ほうれん草(GC/MS)に関する各農薬のXbar-R管理図、Zスコアによる評価、Xbar-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 $0.030\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は $0.0300\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率100.1%)、Xbar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 $0.017\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は $0.0168\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率99.1%)、Xbar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 $0.010\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機

関の平均値は $0.0126\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率126.5%)と高めの値を示し、Xbar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 $0.008\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は $0.0754\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率94.3%)、Xbar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 $0.015\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は $0.0130\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率86.6%)、Xbar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 $0.007\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は $0.00687\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率98.1%)、Xbar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 $0.010\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は $0.00932\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率93.2%)、Xbar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。トウモロコシ(LC/MS/MS)については、シフルフェナミドでは、添加量 $0.020\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、LC/MS/MSによる全機関の平均値は $0.0195\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率97.6%)、Xbar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 $0.015\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、LC/MS/MSによる全機関の平均値は $0.0146\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率97.4%)、Xbar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。メトキシフェナミドでは、添加量 $0.010\text{ }\mu\text{g/g}$ に対し、LC/MS/MSによる全機関の平均値は $0.00871\text{ }\mu\text{g/g}$ (回収率87.1%)、Xbar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- $^{13}\text{C}_6$ 、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回目がほぼ同等であった。 δ -BHC- $^{13}\text{C}_6$ 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) 臭素系難燃剤の生体影響評価および分析精度の検討—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

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34人を対象とし、20 mL 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。2) スターバー抽出法によるベンゾフェノン類の測定—河川水についてベンゾフェノン(BP)類を測定したところ、BP-10 は検出限界以下であったが、BP は 21.0 および 22.8 pg/mL、BP-3 は 8.9 および 12.0 pg/mL が検出された。一方、尿試料を用いて同様に測定したところ、BP-3 が ND~12.0 ng/mL、BP-10 が ND~1.5 ng/mL、BP-OH が ND~3.7 ng/mL であった。3) 食品香料の純度試験—ボルネオールおよびイソボルネオールについて純度試験を行ったところ、概ね表示値に近い値となった。また関東化学のボルネオールに含まれる不純物質はイソボルネオールであることを確認した。同様にキラル純度試験を行ったところ、和光純薬工業および関東化学製ボルネオールはボルネオールおよびイソボルネオールのラセミ体で、シグマアルドリッチのイソボルネオールはイソボルネオールのラセミ体として存在していることを確認した。また表示名に R 体、S

体の指定がある標準品については、概ね表示値どおりの結果となった。4) ELISA における測定値変動要因の検討— 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。5) 食品試料測定における ELISA の測定値精度評価— 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、マトリッ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: 測定濃度を決定するにあたり、直線性の確認を以下のように実施した。す

なわち、3 社のうち任意に選択した 1 社の被験溶液を適宜希釈し、10~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を調製して検量線を作成し、直線性を確認した。なお、10~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で直線性が得られない場合には、直線性の得られる範囲を確認し、直線性の得られる最も高い濃度の溶液を被験溶液とした。その場合、低濃度溶液は原則として被験溶液の 1 万分の 1 とし、SN10 程度を満たすことが出来ないものについては、順次濃度を上げて SN10 が得られる濃度を低濃度溶液とした。被験溶液の測定は以下の方法で行った。すなわち GC では、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。被験溶液によるキャリアオーバーを事前に確認したがクロマトグラム上では見られなかったため、溶媒のみによるブランクランは行わなかった。また HPLC による測定では、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。被験溶液によるキャリアオーバーを事前に確認したがクロマトグラム上では見られなかったため、溶媒のみによるブランクランは行わなかった。得られた結果の SN 比は、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) とし、さらにノイズの中央値 (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。また、不純物質ピークは各被験物質の低濃度溶液を 5 回繰り返して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。得られた結果より含量を算出する方法は以下に示した。すなわち、各被験溶液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 および 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、各標準品の HPLC および GC による測定より求められた純度と、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: 第 1 回調査では、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。第 2 回調査では、PCDD, PCDF では RSD%が数%程度から 70%以上の異性体があり、異性体間で室間精度が異なった。また、PCB についてはほとんどが 30%程度の RSD%であったが、2',3,4,4',5-PeCB は 150%の RSD となった。TEQ の RSD は 4%であった。頑健な統計量を計算すると、2',3,4,4',5-PeCB の RSD%は 55%となった。このとき 5 機関中 1 機関で他の機関の 10 倍以上の値を報告していた。また

その他の異性体では他の機関とかけ離れた値を報告した機関はなく、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で問題ないと評価されたが、頑健な統計量により計算した z-スコアでは 1 機関の 2',3,4,4',5-PeCB が 15 を超える値となり、この機関の分析結果が満足できるレベルにないことが示された。第 3 回調査では、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: 1)GM 大豆からの DNA 収量と質の検討— 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 μg で最も高く、CTAB 法では DNA 収量が 2.81 μg 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 μg および 13.16

μg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、OD 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が、タンパク質残存の指標となるOD 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OD260 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、24 kbp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、スメ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 ± 0.02 、mini法で 0.45 ± 0.01 、CTAB法で 0.44 ± 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 ± 0.06 、mini法で 2.25 ± 0.10 、CTAB法で 2.25 ± 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。2)GMトウモロコシからのDNA収量と質の検討— 10種の

non-GM 大豆および RRS 粉体試料から改変 GM quicker 法を用いて DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行った結果、19 kbp 以上の明瞭なバンドが観察されるとともに、そのバンドから低分子方向に薄い帯をひくスメアが観察された。また、品種間でバンドの強度ならびにスメアの程度に明瞭な差は認められなかった。RRS を 1%または 5%で含む 10 品種の non-GM 大豆をマトリクスとした混合粉体試料から上記方法により DNA を抽出した。さらに DNA の質を評価するために 200~320 nm の波長域で吸光度を測定し、OD260 nm/280 nm の比(タンパク質残存の指標)、OD260 nm/230 nm の比(糖類残存の指標)を使用して判断した。その結果、タンパク質については IA3006 およびタンレイをマトリクスとする試料を除く試料については 1.8 を超える結果が得られたことから、タンパク質については良好な精製が行われたと判断できた。一方、糖類については IA3006 およびタンレイ、あやこがねをマトリクスとした試料で基準を下回る結果となり、特に IA3006 およびタンレイでは RRS の混合比率に係わらず基準を下回る結果が得られた。また吸光度から算出した DNA 濃度はあやこがねおよび SO880 で混合率に係わらず、他の品種よりも濃度が高くなる傾向が認められた。なお、あやこがねならびに SO880 については吸光度測定法と蛍光測定法で DNA 濃度に大きな差が認められた。1%および 5%混合粉体試料を対象にそれぞれ抽出した DNA 試料液を用いて定量 PCR 法を実施したところ、全試料において RRS の重量混合比よりも高い値で算出された。このとき真値と定量値の差異が最も大きいものはリュウホウをマトリクスとした試料で最大となり、152.8%であった。一方、DNA 重量として混合率を規定した混合 DNA 試料における

OD260 nm/280 nm 比は全試料で 1.8 を上回り、OD260 nm/230 nm 比についてはミヤギシロメ、あやこがねおよびリュウホウを除いて 2.0 を上回った。混合粉体試料と同様に混合 DNA 試料についても定量 PCR 法により測定を行ったところ、真値と定量値の際は最大で-12.9%(5% PS-36 試料)であったが、その大きさと方向に品種依存性は認められなかった。3) 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、*Le1* 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、*Le1* を測定した場合には、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 *Le1* 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 *Le1* 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、プレートを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。4) 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るのに対し、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った。5) 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 が観測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 が観測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。6) フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究、①DNA 抽出法の改良および評価— 食安輪発第 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