

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、13,000 g 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 日間繰り返すことを行った。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ー 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°C、16SbrH を用いる場合には 50 ならびに 53°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°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ー 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 アクセッション番号 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ー 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 441 bp）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: オカダ酸の各種保存による回収率は、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、マウスアッセイでは陽性を示した。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 3/3 死亡した。オカダ酸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 によるオカダ酸の暴露では、オカダ酸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 検体を送りマウスバイオアッセイ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性試料の作製— 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 0.31 ppm)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 0.31 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、RSD 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。また、重金属検査用試料の作製において、使用するカドミウム溶液の酸濃度について検討したところ、0.005 mol/L、0.01 mol/L の硝酸濃度においても浸漬液中のカドミウム濃度の約 1.2 倍となったが、0.1 mol/L では浸漬液中カドミウム濃度の約 1/3 となった。さらに浸漬時間を 6、24、48 時間としてカドミウム濃度を測定したところ、いずれの時間においてもカドミウム濃度に差は認められなかった。以上のことから、浸漬液の酸濃度を 0.01 mol/L、浸漬時間を 24 時間としたところ、予定作製濃度である 0.41 ppm に対して、実測値は 0.405 ± 0.004 ppm となり、作製予定濃度に近似した値が得られた。さらに 120 日後におけるカドミウム濃度は作製当日の $99.5 \pm 0.8\%$ であり、十分な安定性が確認された。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 0.010 ppm、

標準偏差 0.000、RSD 3.85% およびダイアジノン濃度 0.040 ppm、標準偏差 0.001、RSD 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 0.010 ppm、0.040 ppm)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。同様に有機リン系農薬を添加したかぼちゃおよびサツマイモペーストにおける均一性を確認したところ、かぼちゃペーストではいずれの農薬についても 92~106% の回収率であった。これに対してサツマイモペーストでは回収率が 84~94% であった。またそれぞれのペーストの物性として比較を行うと、かぼちゃペーストではハンドミキサーを用いた攪拌を行うことができたが、サツマイモペーストでは含水量が少なく、ハンドミキサーでは攪拌することができなかった。このため、かぼちゃペーストを基材として採用した。またこれに添加する農薬はクロルピリホスならびに EPN とし、作製当日に対する 100 日後の濃度はクロルピリホスが 95.0%、EPN が 96.0% であり、十分な安定性が確認された。さらに、有機リン系農薬(クロルピリホス、フェントロチオン)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ン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、フェントロチオン 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、フェントロチオン 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、RSD 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、フェントロチオンは F 比、回収率、RSD 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ン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%、フェントロチオン 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%、フェントロチオン 61.1%となると共に、RSD 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。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 0.193 ppm、標準偏差 0.006、RSD 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。また、鶏ササミ肉の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、RSD 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、RSD 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。国内基準のあるスルファジジン(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、RSD も 5.4%、2.9%と良好となった。2)微生物学検査のための適性試料の作製— サルモネラ属菌検査として、*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~-0.56 であった。添加菌数の最終濃度が約 10^4 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 0.03~0.38 であった。添加菌数の最終濃度が約 10^4 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 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~-0.44 であった。添加菌数の最終濃度が約 10^4 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) 25g を秤量し、緩衝ペプトン水 (OXOID + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 54 mg/L) 225 mL 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 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 [テトラチオネート液体培地 10 mL; 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 10 mL; 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 ± 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。大腸菌群検査用調査試料として市販の魚肉練り製品に接種することにより調査試料を試作するため、4 種の魚肉練り製品を高圧蒸気滅菌処理し、その物性変化を観察したところ、かまぼこで形状の変化および変色が認められたが、これ以外の試料では若干の褐変が認められるものの、大きな物性変化は認められなかった。しかしながら、2 種のちくわでは高圧蒸気滅菌する際の設置方法により著しく変形することが明らかとなった。また、4 種の魚肉練り製品に *K. oxytoca* または *A. calcoaceticus* を接種した後、これを冷蔵保存したときの接種菌の安定性について菌数測定を行うことにより確認したところ、ちくわ B を除く 3 種の試料では菌液接種後 7 日目において *K. oxytoca*、*A. calcoaceticus* の両者において約 2 オーダーの菌数増加が認められ、その後 28 日目まで安定して接種菌を回収することができた。これに対してちくわ B は *A. calcoaceticus* では菌液接種後 28 日目まで安

定して接種菌を回収することができたが、*K. oxytoca* では経時的に減少する傾向にあり、28 日目には菌液接種時と比較して約 1 オーダーの減少が認められた。さらにこれら 4 種の調査試料について菌液接種後 28 日目に大腸菌検査を実施したところ、培地中での増菌、ガス産生および選択培地上での典型集落の形成を認めたことから、接種菌を公定法に従って検査した場合に、明らかに検出できることを確認した。さらに、追う諸気宇ブドウ球菌検査における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、卵黄加マンニツ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— 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 0.2 g および 0.5 g 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 0.2 g で実施することとした。Egg Solids 0.2g を用いた抽出原液を約 200 ng/ μ L に希釈した卵抽出液について、4°C および -80°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°C、-80°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 μ 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 μ L または 50 μ 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 μ g の回収率が 11.7 μ 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 200 ng/ μ L に希釈した Egg Solids 抽出液を 25 μ L または 50 μ L (タンパク質量としてそれぞれ 5.0 および 10.0 μ 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°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。また、乳を使用した旨の表示のない食材に牛乳高濃度標準溶液を添加し、回収率からマトリックスの影響について検討した

ところ、クッキー、クラッカー、パイでは添加タンパク質量に対する回収率がいずれの ELISA キットでも 70%以上であり、キット間の測定値にも大きな差はなかった。また 3 測定間の RSD はパイにおいて FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳で大きかった。試料添加用の牛乳抽出液を作製するために、スキムミルク粉末より抽出を行ったが、抽出率、回収率ともにほとんど差がなかった。これについて SDS-PAGE を行ったところ、牛乳のパターンと類似したバンドが認められた。さらに、得られた自家製抽出液について -80℃で保存したときの安定性について確認したところ、12 週目においても回収率は 94%以上であり、-80℃における安定性を確認することができた。マッシュポテト基材にスキムミルク粉末の水溶液を混合することにより調製した試料について回収率を求めたところ、モリナガ FASPEK 牛乳測定キットでは 93.5%、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳では 74.9%であったが、-20℃で保存することにより 12 週まで安定性を確認することができた。一方、Egg Solids 抽出液をハンバーグおよびクリームサンドクッキーに添加した際の安定性について確認したところ、-20℃において 14 週まで安定であることが確認された。さらにマッシュポテト基材に全卵の水溶液を混合して作製した試料についても同様に -20℃での安定性を確認したところ、1、4、12 週のいずれにおいても回収率は 90%以上であり、12 週までは安定であることが確認された。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。小麦抽出液の作製結果を以下に示す。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(4.0~6.0mg/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ることおよび 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。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に関する結果を以下に示す。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 1g 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。食材への原材料添加による添加回収および安定性試験の結果を以下に示す。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。そば試料作製における高濃度標準液の食材への添加回収を行った。すなわち、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 $\mu\text{g/g}$ 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。そば抽出液の作製を行った結果を以下に示す。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。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に関する結果を以下に示す。クッキー2、またはインスタントラーメン 1g 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。食材への原材料添加による添加か異種および安定性試験に関する結果を以下に示す。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 $\mu\text{g/g}$ 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。さらに、落花生試料についても検討を加えた。初めに高濃度標準液を食材へ添加した際の回収試験を行った。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。そこで、落花生抽出液の作製について検討した。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。さらに、自家製落花生高濃度標準液を添加した際の回収ならびに安定性について検討した。クッキー2を1g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 μ g(2-D Quant Kitの測定値から計算)加えて添加試料を調製し、-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。同様に食材への原材料を添加した際の

回収率および安定性についても検討した。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：第 1 回調査における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°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、 \bar{X} -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り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 $2\ \text{g/mL}$ 、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 $5\ \text{g/mL}$ 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け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(1 g/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(4.9 kPa)の高さなどが考え

られ、最終検液(1 g/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。第2回調査における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、それぞれの試料の測定値について一元配置分散分析を行った結果、試料間で有意差が認められなかったことから均質性が確認され、-20°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内は安定であることが確認された。GC/MSによる測定結果を解析すると、一部に $\bar{X} - R$ 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た。これに対して LC/MS/MS による測定結果では、適正域に入っていない機関がわずかに認められたものの、全体で良好な結果であった。GC/MS と LC/MS/MS による測定値の比較では、LC/MS/MS の測定値が GC/MS の測定値と同等あるいはそれ以上の精度であった。これは LC/MS/MS を採用した機関の全てが GC/MS を採用した機関よりも最終液が 2~20 倍も希釈されていたことから、食品マトリックスが薄められたことや MS/MS によりマトリックス由来のイオンが排除されたことで定量性、再現性において信頼性の高い結果が得られたもの

と考えられた。また、外部精度管理の精度を RSD で評価すると、かぼちゃおよびにんじんは全機関で 10%以下であったが、ほうれん草では 3 機関でクロルピリホス 0.01 ppm で 15%程度、他の 6 機関は 10%程度であった。さらに添加濃度による変動は認められず、Horwitz の各濃度の RSD と比較しても良好であった。前年度から SOP の変更があった 3 機関は、前年度の適正率 81.3%から今年度の適正率 95.8%、同じく 70.9%から 91.7%、同じく 91.7%から 100%と本年度の成績がさらに良くなっていることから、適切な分析法を用いることで検査精度の正確さ・精密さに寄与していることが示唆された。内部精度管理と外部精度管理の関係をみるために平均回収率を指標として観察すると、内部精度管理と外部精度管理で同様の平均回収率を示さないことがあった。すなわち、分析法は同じで、添加量が既知と未知の違いで結果が異なっているケースが認められ、「精度管理の一般ガイドライン」の 70~120%の範囲を確保するに止まらず、真値に近づけるような分析法の開発を行うことも精度の向上につながるものと思われる。また今回、関東化学の農薬混合液 31 および 32 の同一ロットを使用した。その結果、各機関とも検量線の濃度範囲が数 ppb~数 100 ppb の 3 点以上の検量線濃度で行っており、10 ppm の市販の農薬混合標準液からほぼ同程度の濃度に調製されていた。農薬混合標準液を使用したことにより、標準品による各機関の検査精度のばらつきによるファクタが少なくなり、検査精度に大きく寄与したものと思われる。また、ポジティブリスト制に対応した数多くの標準品からの調製、保存、スペース、時間の短縮等のメリットがあるので、検査機関では農薬標準混合液の活用が多くなるものと思われる。リファレンス機関によって認証された農

薬混合標準液がさらに望まれる。また、各機関に GC/MS システム評価用試料(クライテリアサンプル)を配布し、精度管理調査試料測定前と測定後のピーク形状とピーク強度を各機関から提出してもらったが、多くの対象物質において定量値、ピーク形状も良かったことから、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される。なお、一部の対象物質では装置の程度の目安がよくない機関もあったが、これには添加農薬の劣化に対する感受性が高いことによる可能性が考えられた。これらのことから、精度管理を維持向上するためにはこのような評価用試料を用いて分析装置の管理に留意することも重要であると思われる。外部精度管理調査試料の最終液(1 g/mL)をブラインドで分析機器メーカーに送付し GC/MS 農薬データベース解析法(TDB 法)による測定を行ったところ、各メーカーで定量値は全般的によく一致していた。このことから TDB による相対定量法の実用性があることが確認できた。定量性においても添加農薬のうち 2、3 種類が少し一致しない定量値が得られているが、TDB 補正等を併用することにより定量値が一致することが示唆された。TDB 法は農薬のスクリーニングとして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うるものと考えられる。第 3 回調査における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、実測地 $m/z202.0430$ とほぼ近似した値を示した。なお、9 参画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/IEC17025、ISO/IEC Guide43 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択している。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) 臭素系難燃剤の生体影響評価および分析精度に関する検討—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。2) 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管理に関する検討—スターバー抽出法を用いたベンゾフェノン類の測定について河川水を対象に行ったところ、極めて簡便かつ高感度に測定することができ、化学物質のモニタリングに有用な手法であると示唆された。また、尿試料について測定したところ、ng/mLレベルで検出されたことから、恒常的に曝露されている可能性が示唆された。ベンゾフェノン類のヒトへの残留調査を行うことにより、ヒトへの曝露状況レベルを把握することができる。現在は未だリスク評価が十分行われていないが、その理由のひとつに測定方法の整備および精度管理システムが未だ不十分な点が挙げられる。特に血液や尿など生体試料中のベンゾフェノン類についてはその残留量が極めて微量であることが予想され

るため、従来の測定方法では得られたデータの精度が問題視されることがあった。そのため高感度かつ高精度な分析法を確立することにより、環境、食品、医薬品など様々な経路を通じた汚染を把握するために有効に活用されることが期待される。一方、ボルネオール純度試験では、概ね表示どおりの値が得られた。同様にキラル純度試験では一部ラセミ体として存在すること、ならびに R 体、S 体の指定がある標準品については、概ね表示どおりの値が得られることが明らかとなった。ボルネオール以外にも光学異性体を指定する食品香料があり、これらについても純度試験およびキラル純度試験を行う必要があるものと推察される。3) 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。4)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：厚生労働省より通知された「食品に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品の成分である物質の試験法」(以下、

「通知法」とする)において規定されている各標準品の純度と各メーカーより提供された標準品の添付文書等に表示された純度を比較し、通知法に規定された純度を満たしていなかった割合は 105 種中 14 種であり、うち 1 種については添付資料等が添付されていなかったため、純度を確認することができなかった。同様に、各メーカーから提供された標準品について、本研究において設定した条件で純度を測定し、各標準品に表示された純度と GC または HPLC で測定した純度との割合を含量比として表し、室間誤差として $\pm 2.0\%$ 以内を測定のばらつき許容範囲とし、含量比がその範囲内だった割合は、HPLC では 128 種中 115 種であり、GC では 105 種中 88 種であった。なお、設定した GC の条件下での純度測定中に熱分解等が生じたことにより著しく低い結果が得られた標準品については、今回の比較から除外した。また、HPLC により測定した純度が通知法に規定された純度を満たしていなかったのは、128 種中 17 種であり、同様に GC により測定した純度が通知法に規定された純度を満たしていなかったのは、104 種中 10 種であった。さらに通知法の個別試験法に規定された純度と測定した純度に 2% 以上の違いが生じたのは 104 種中 14 種であった。

4.米谷分担研究：第 1 回調査では、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、1 機関が他の 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、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。第 2 回調査においても同様であり、頑健な統計量を計算した。その結果、2',3,4,4',5-PeCB の分析結果は通常の統計計算では RSD が 155%であったのに対して、頑健な統計計算では 55%となった。5 機関の参加機関のうち 1 機関で他の機関の 10 倍以上の値を報告しているため、通常の計算方法では大きな平均および標準偏差が得られるが、頑健な平均は通常の前平均の 1/2 以下、標準偏差は 1/3 程度となり、外れ値の影響が除かれた。なお、2',3,4,4',5-PeCB は昨年度の調査においても大きな室間精度を与えており、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、今回使用したカレイ試料ではこの異性体の濃度は 20 pg/g で比較的小さく、また毒性等価係数も小さいことから、TEQ への影響は見られなかった。通常の統計量を用いて z-スコアを算出すると、3 を超える機関は認められなかったことから、外部精度管理の評価では全く問題がないと評価されるが、頑健な統計量で計算された z-スコアでは 2',3,4,4',5-PeCB で 15 を超える機関が 1 機関認められ、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、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、参加試験室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前平均の 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あり、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。3 年間連続して参加した 4 機関の中で、2 機関は全ての異性体で満足な z-スコアとなった。1 機関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、もう 1 機関は毎年 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: 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— トウモロコシにおける 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 1 g 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、2 g 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±SD 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