程が含まれる。このため、他の理化学的な分析方法により得られる計測値に比べ、温度や阻害物質などの要因変動による初期 DNA 配列計測値への影響が少なくないと考えられる。さらに、直接の分析対象物質である DNA は、分子量や化学修飾の状態が異なるヘテロジーニアスな物質群として調製される。これらの点から考えれば、本研究で検討したDNA抽出法を含む分析法自体の影響はもちろんのこと、試料については特に、品種、産地、生育状態、保存期間などにより試料中の成分さらにはDNA そのものが大きく変化する可能性があるため、今後、十分な検討を行うべき課題であると考える。実際に本研究で調製した GA21L ならびに GA21H は、それぞれ重量混合比として1%ずつの Mon810 と GA21 試料、1%の Mon810 試料と 5%の GA21 試料を含む擬似混入試料として調製したが、均一であることは確認されたものの、重量混合比を真値とした場合、いずれの DNA 抽出法を用いても妥当であると評価しうる定量値は得られていない。さらに、非常に難しいが、分析方法、試料、分析者等の複数の要因が組み合わされた場合の影響についても知見を蓄積し、これらの影響を不確かさとして加味した上で、評価手法を開発していくことが望ましいと思われる。定量 PCR 法により得られる定量値をより実際的に評価可能な手法の開発が進められることにより、新たに開発される定量PCR 法の妥当性をより適切に評価すること、また外部精度管理試験においてより適正な管理を行うことが可能となり、ひいては定量 PCR 法という分析方法の信頼性がさらに向上することが期待される。大豆混合粉体試料を用いた検討において抽出した DNA の質について確認したところ、IA3006 およびタンレイをマトリックスとして使用した場合に RRS 粉体試料の混合率に係わらず基準を下回る結果が得られており、これらの品種からは OD260 nm/230 nm の比を低下させる要因を除去することが難しいと示唆された。また、同一品種の混合粉体試料から併行抽出した3点間のDNA濃度のばらつきは、リュウホウおよびあやこがねを除き 20.0%を下回った。さらに併行抽出時のばらつきと比較して品種間でのばらつきのほうが大きかったことから、マトリックスに使用した大豆の品種によって DNA の収量が変動する可能性が示唆された。混合粉体試料について、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、定量値は RRS 粉体の重量混合比に比べて高い値で算出されたが、この bias の大きさはマトリックスとした non-GM 大豆の品種に係わらず一定して正の方向に向かっており、さらに RRS の混合率に係わらず同品種の non-GM 大豆では、その大きさが同程度になる傾向があった。これには使用した大豆試料に含まれる水分やその他の成分の組成比など、試料に由来する要因と DNA 抽出法あるいは定量 PCR 法の手法に依存した要因に大別されると考えられた。しかしながら、全ての品種についてカールフィッシャー法により水分含量を測定したところ、RRS 粉体試料のほうが全ての non-GM 大豆粉体試料よりも高い値を示したことから、粉体試料の水分含量が定量値に影響を及ぼす要因であるとは考えることができなかった。一方、DNA 抽出法を改変 GM quicker 法から mini 法へと変更して同様に実施したが、得られた結果に大きな差は認められなかった。このことから、少なくとも改変 GM quicker 法と mini 法を比較する限りでは、定量 PCR 法により得られる定量値に対する影響には DNA 抽出法は含まれているとは考えられなかった。しかし両抽出法は、ともにシリカ膜

へのDNAの吸着を基本原理とするDNA抽出法であることから、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)を使用する方法や、イオン交換タイプのカラムを使用する方法等、他のDNA抽出法についても今後、検討する必要があるものと考えられた。DNA濃度を吸光度測定法と蛍光測定法で比較すると、吸光度測定法で大きなばらつきを示したが、吸光度に基づきDNA濃度を算出した場合、OD260 nmに吸光を有するDNA以外の物質が、算出されるDNA濃度およびそのばらつきに影響を与えること、その影響の大きさには品種依存性が認められることが確認された。また、混合DNA試料について定量PCR法を実施し、その定量値を真値と比較したところ、そのbiasは最大で-12.9%であり、その大きさおよび方向には明確な品種依存性は認められなかった。このことから、各大豆試料よりDNAを個別に抽出した後、DNA重量比としてRRSを混合した場合には、混合率に合致した定量値が得られ、そのばらつきの大きさは定量PCR法に原理的に含まれるばらつきの範囲内であると考えられた。蛍光測定法により測定したDNA濃度に基づきDNA収量による定量値の補正を行ったところ、約半数の試料でbiasの低下が認められたが、一部の試料ではbiasが大きくなるものも認められた。このことから品種依存的なDNA収量の差以外にも定量値に影響を及ぼす要因が存在することが考えられた。さらに定量PCR装置の精度について検討を行った。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*Le1*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*Le1*コピー数の測定のように(Fig.2D)、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。一方で2.0を大きく超えるPCR効率が

算出されたwellでは、PCRにより増幅されたDNA断片の量を正確に反映していない強度の蛍光が生じているか、蛍光の検出異常が推測される。また、特定のwellから理論値との差異が大きなPCR効率が繰り返し得られる場合には、特にリアルタイムPCR機器に含まれるサーマルサイクラーや蛍光検出部の異常が疑われる。組換えDNA技術応用食品の分析における最終的な分析結果は、Ct値を検量線に内挿し、変換することで得られるコピー数に基づく定量値である。本研究では、機器ごとに検量線を作成し、該当するCt値を内挿することでコピー数に変換した。それでもなお、機器間でコピー数に差が生じた結果は、検量線の傾きやばらつきが各機器により異なることを意味しており、定量値に対する影響については、検量線の信頼区間の推定といった今後の検討により、明らかにすべき課題である。反応系と定量PCR機器の組み合わせによっては、PCR効率が理論値を明らかに下回る場合があることおよび、特定のwellにおいて理論値との大きな差異が観察された場合には、PCRあるいは蛍光検出の異常が疑われることについて言及したが、得られた測定値の大きさやそのばらつきが、機器の仕様に起因する変動の幅に含まれているのか、含まれず異常な値であるのかを判断するための基準がない。また、定量PCR法に使用される反応系の改良についても同様である。今後、最終的な分析結果である定量値に許容される不確かさの検討とあわせ、明確な基準を設定することにより、定量PCR機器の管理手法の一つとして、内部精度管理等に役立てられることが期待される。また、ベースライン補正の方法についても検討した。Ct値を得るまでの解析手順には、reporter色素由来の蛍光値をreference色素の蛍光値によって除した値（Rn値）をベースライン補正することが含まれている。また、定量PCR法では、どのようなRn値が得られた場合にも、一定の条件で作成されたベースラインによって全てのwellから得られた値を一様に補正することが指示されている。これは機器付属のソフトウェア一上の制限によるものであると考えられ、本来的には、反応や測定が進行するに従って、ベースラインが変動する可能性も考えられることから、得られたRn値の大きさを指標として補正に使用するベースラインを変更すべきと考える。*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。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。このように、ベースライン補正の方法を変更することによって、得られる測定値の精度が向上する可能性が示された。続いて、検量点およびTh. Line解析条件が測定の精度に与える影響について検討した。食安発第0629002号により通知されている組換えDNA技術応用食品を対象とした定量PCR法では、0、20、125、1,500、20,000、250,000コピーの濃度に調製された6点の検量点から検

量線を作成し、これに被検査試料から得られた Ct 値を内挿してコピー数に変換する。また、Ct 値を得るためには、横軸をサイクル数としてΔRn 値をプロットした amplification plot curve に対して「ΔRn値が指数関数的に増加している領域に Th. line を引く」事が規定されている。これは、Ct値が amplification plot curve と Th. line との交点として得られ、「ΔRn値が指数関数的に増幅している領域」つまりは、PCR 効率(実際には検出される蛍光強度の増加率)が安定し、増幅対象となったDNA配列の初期量が正確に反映されているサイクル数を Ct 値としているためである。従って、Th. line の設定に当たっては、DNA 配列の初期量を真度よく推定するために、「ΔRn 値が指数関数的に増幅している領域」をどのように決定するかが重要である。また、Th. line 設定の方法を規定した上で、各検量点から得られる測定値のばらつきを明らかにすることが、検量線の信頼区間の推定、ひいては検量線に内挿することで得られる被検査試料のコピー数の不確かさを推定する上で必要である。低コピー数のプラスミドは、連続量ではなく離散量として考えられるべき測定量であり、試薬溶液中での分布は、ポアソン分布あるいは二項分布に従うため、そこから分取され、定量 PCR の反応系に加えられたプラスミドの数は、当該分布に従ってばらつき、結果として、得られる測定値のばらつきは大きくなり、頻度の分布は一様になるのではないかと考えられる。本研究により、Th. line 値が、測定値のばらつきに影響を与える要因の一つであることが明確に示されが、どのような値に設定すべきかについては、一般化して示すことができない。これは、使用する定量系(プライマーならびにプローブ)、試薬、定量 PCR 機器により、その最適値が変動すると考えられるためである。最適な Th. line 値に関しては、各試験者が検量線作成時に本研究で行われたような解析を実施し、規定コピー数を目安にするなどして、用時設定すべきと考える。また、低コピー数のプラスミドを含む検量点を検量線の作成に使用することで、当該検量点に含まれる原理的なばらつきにより、検量線が不正確となり、結果、測定値の真度を下げる結果につながりかねない。今後、検量線の信頼区間等の検討を通じて定量値への影響を明確にすることにより、検量点として規定すべき最小コピー数について明らかにすべきと考える。**2)フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究－** 本分析法に規定された実験条件およびデータ解析条件に従うことにより、1) 100%の相同性を有する DNA 配列が一魚種についてのみ検索された場合には、被検試料を当該魚種として同定することが可能であること、2)複数の魚種から 100%の相同性を有する DNA 配列が検索された場合には、そのいずれかの魚種であっても特定魚種の同定には至らないこと、3)100%の相同性を有する DNA 配列が検索されない場合には、最終シーケンスデータに実験的なエラーが含まれていると考えられ、なお同定が必要な場合にはさらにシーケンスデータを精査することが必要なこと、4)100%の相同性を有するDNA 配列が検索されずかつ、検索された DNA 配列の相同性が一定以下である結果に基づき、特定魚種

ではないと判定可能な場合があることが示された。1 ～ 3) に関しては、被検試料由来の当該DNA 配列がGenBank に登録されているあるいは採取されており、それらには誤りが含まれていないことを前提としている。また、4)については、本研究で検討したカワハギ、アンコウ、およびウマヅラハギと各フグ種との比較および、各フグ種間の比較結果に基づいて考えれば、90%以下の相同性を判断基準とすることによって、先に挙げた 3 魚種を少なくともフグ種と誤判定することはないと考える。

6.町井分担研究: 遮光バイアルにオカダ酸を吸着させた後、冷凍、冷蔵および室温にて保存したところ、どの保存条件においても少なくとも6か月間は安定であることが明らかとなった。このことから、外部精度管理試料として用いる場合には、いずれの条件でも保存ができるものと考えられた。また、オカダ酸の吸着したバイアルに温度をかけることにより加熱試験を行ったところ、120℃を超える条件下において著しく回収率が低下することが明らかとなったことから、通常の外部精度管理を行ううえで、輸送ならびに分析手順において予測される温度に対しては安定であるものと考えられた。さらに 3 機関において貝ホモジネートとろ紙ディスクを用いた下痢性貝毒検査を行ったところ、十分量のオカダ酸が含まれていると考えられたにも係わらず、1 機関において、3 匹中 2 匹の死亡が認められたに留まった。これ以外の機関では全ての動物の死亡が確認された。このことから、ろ紙への毒素の含浸方法あるいは新たな添加方法について検討する必要があるものと考えられた。さらに投与時間帯によりマウスの感受性が異なるという現象が認められていることから、この点についてさらなる検討が必要であると考えている。下痢性貝毒の陽性サンプルについて、公定法の安元バイオアッセイ法を用いて検討した。試作試料の安定性・均一性を検討し協力 7 機関にサンプルを配布して検査を行なった結果では、マウスの死に方に違いはあるものの全て適合という結果であった。この結果は、バイオアッセイの持つ難しさと考える。また、アンケート調査では、試料の劣化を防ぐ目的で、各機関に到着後-70℃程度での保管を希望したが、-30℃冷凍庫しか所持していない機関もあった。しかし、その機関での試験は、試料到着後 8 日目で実施されたが、結果に問題を認めなかった。近年、高い毒値を示す例が少なく、十分量の適切な毒値を持つ試料の作製が出来ていない。従ってこの点についても考慮する必要があるものと思われる。

7.大島分担研究:1)理化学検査のための適性試料の作製－ あらかじめ作製したカドミウム高濃度精米の濃度を測定した後、カドミウム無添加精米を加えて作製予定濃度のカドミウム混合精米を作製する方法では、ほぼ作製予定濃度の調査試料を作製することができること、および小分けした試料容器間のカドミウム濃度のF比(10 個の試料容器から n=2 で採取して濃度を測定)が 1.49(5%水準 F値 3.02)と、濃度の均一性も確保でき、当作製方法が、調査試料の作製方法として、適切であると判断した。また、市販かぼちゃペーストおよびサツマイモペーストに有機リン系農薬を添加して、濃度の均一性および安定性を確認した。その結果、かぼちゃペーストではいずれの添加農薬においても高い回収率が得られた。これに対してサツマイモペーストではかぼちゃペーストと比較すると低いものの、回収率は 84～94%であり、試料を適切に作製できることが明らかとなった。また、安定性について確認したところ、100 日まで安定であることが確認できた。同様

に市販ほうれん草(収穫後、水蒸気処理して加工したペースト状の製品)に有機リン系農薬(クロルピリホスおよびダイアジノン)を添加して、濃度の均一性および安定性(冷蔵、冷凍保存)を検討した。その結果、作製した有機リン系農薬検査調査試料の濃度は、クロルピリホスおよびマラチオンのいずれにおいても作製予定濃度に対して、100%濃度の調査試料を作製することができた。調査試料として作製予定濃度の試料を適切に作製できることが分かった。 また、安定性は、作製当日の濃度と比較して冷凍50日後でクロルピリホス103.3%およびダイアジノン100.1%と、いずれも適切な調査試料を作製できることを確認できた。さらに、かぼちゃペースト、えだまめペーストを用い、回収率、均一性、安定性についてクロロピリホス、フェニトロチオンについて検討した。えだまめペーストは調査試料として不適切であったが、かぼちゃペーストにクロロピリホス、フェニトロチオンを添加した調査試料は、今回回収率が低かったものの十分な期間の安定性が確認された。しかし、えだまめペーストについては、不十分な原因について詳細な検討が必要であると考えられた。一方、残留動物用医薬品の精度管理試料として食肉を採用する要望が高い。そこで豚肉のミンチにサルファ剤を加えることによる回収率について検討した。その結果、ほとんどのサルファ剤で作製予定濃度よりも低い値となり、かつばらつきも大きいものであった。このことから今後、ペースト状の肉にサルファ剤を添加し、混合する方法、および肉をやわらかくするための水添加等が必要であるものと考えられた。そこで、新たに鶏ササミ肉を用いた残留動物用医薬品検査用試料の作製を試みた。水を添加することで均一な基材の作製が可能となり、いずれのサルファ剤も約 80%以上の回収率を示した。その内国内基準のあるSDD で良好な結果が得られていることから、今後は 10%水添加トリササミペーストを基材とするSDD を調査試料として用いることで詳細な検討を加えたい。**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のための調査試料(殺菌液卵)を作製し、接種菌量の設定、輸送による接種菌数の変動、公定法による添加菌の検出について検討した。サルモネラ属菌検査用調査試料として検討した殺菌液卵(鶏卵)は、液状であるため取り扱いや接種菌の均一化は容易であったが、試験菌が低温保存下でも発育増殖を示すため、増殖抑制を考慮して基材に安定化剤を添加する必要があった。低温で保存すれば接種菌量を調整することにより、調査試料中の菌数を期待する菌数範囲に留めることは可能であったが、今回のような基材の場合、菌の増殖抑制と基材の変質(腐敗臭の発生)防止のため安定化剤の添加は必須と考えられた。輸送前後において菌数測定を行った結果では、低濃度から高濃度接種試料中での生菌数に極端な変動は認められないものの、菌種によって増加傾向にあるものと減少傾向にあるものとが観察されており、標準菌の選択に注意が必要である結果となった。また、輸送による接種菌の変動、公定法による接種菌の検出についても、標準菌株の性状を十分考慮しなければならない結果であった。すなわち、前増菌培地に緩衝ペプトン水(OXOID + $FeSO_4 \cdot 7H_20$ 54 mg/L)、選択増菌に TT、RV を用いた場合、試験菌の発育は認められるが、選択培地上での試験菌の発育集落観察においては、MLCB 培地での確認が困難であり、特に RV を選択増菌培地に採用して増菌を行った後、確認培地に移植して発育集落を観察すると、低濃度接種試料においては

いずれの確認培地（MLCB、DHL、XLD、ES Sal II）上でも、発育集落を認めることが困難であった。また、接種菌量が多い試料からの確認検査においても、RVとMLCBの組み合わせは最も検出率の悪い結果であった。この結果は、輸送後の検体についても同様の傾向を示していた。同様に大腸菌群検査のための調査試料を試作し、高圧蒸気滅菌後の物性変化および菌液接種後の接種菌の変動、公定法による接種菌の検出について検討した。大腸菌群検査用調査試料の基材として市販の4種の魚肉練り製品を採用した。各基材を高圧蒸気滅菌することにより、かまぼこでは形状の大きな変化が認められたが、その他の基材では大きな形状の変化や褐変は認められなかった。このことから滅菌処理した後に試料を作製することを前提として考えた場合にはかまぼこは調査試料として不向きであると考えられた。そこで、これらの基材に *K.oxytoca* あるいは *A. calcoaceticus* を接種した後の菌数変化について観察したところ、菌液接種後 28 日目まで比較的安定して接種菌を回収することができた。さらに 28 日目に公定法に従って大腸菌群検査を実施したところ、液体培地中での増菌、ガス産生および選択培地上での典型集落の形成が認められた。このことから今回作製した魚肉練り製品を対象とした大腸菌群検査用調査試料は外部精度管理調査に十分に耐えうるものと考えられた。しかしながら、大腸菌群数検査を考慮すると、より接種菌数の少ない状態で安定な基材または接種方法を検討する必要があると考えられた。さらに黄色ブドウ球菌検査を行うための調査試料を試作し、高圧蒸気滅菌処理後の物性変化、冷蔵保存時の接種菌の安定性および公定法による添加菌の検出について検討を行った。黄色ブドウ球菌検査用調査試料として加熱食肉製品を採用し、蒸し鶏、とりそぼろ、ミートボールについて検討を行ったが、とろそぼろを除く 2 種については滅菌方法を考慮することにより高圧蒸気滅菌処理後の変形ならびに変色を最小限に抑えることができることが明らかとなった。また、これまでの結果から、試験菌液に安定化剤を添加することにより低温保存においても接種菌の死滅を少なくすることができることが明らかとなっていたため、本研究においても安定化剤を添加したが、初発菌数に比べて最大で、3～4 オーダーの菌数減少が認められた。大腸菌検査等においてハンバーグを採用した場合には、比較的菌数は安定しており、反対に増加傾向も認められていたことを考慮すると、黄色ブドウ球菌の場合には菌液調製における溶液組成や菌数の接種方法についても変更する必要があるものと考えられた。本来であれば試験菌の接種後に大幅な菌数変動がないものが望ましいと考えられるが、外部精度管理調査において最も懸念すべき事項は検査期間中に対象微生物が検出できなくなることである。この点から判断した場合、本研究において試作した調査試料は作製後 35 日目においても対象微生物を公定法により検出することができ、かつその生菌数は 10^4 cfu/g 程度であったことから、長期間の保存においても定性検査を行ううえでは大きな問題はないものと考えられた。しかしながら、検査法として黄色ブドウ球菌数検査も存在することから、今後接種菌の変動が小さい基材あるいは接種方法について検討する必要性があるものと考えられた。また、今回蒸し鶏を基材として用いて検討を加えてきたが、他の基材と比較すると、接種菌数の減少傾向が最も強いものであった。これまで、冷蔵保存することにより基材中の水分量が低下することによ

り、菌数減少が著しくなることが認められていることを考慮すると、菌数と水分活性との関係から蒸し鶏はもともと水分保持能力が高くなかったために、冷蔵保存後の安定性が他の基材と比較すると劣っていた可能性も考えられた。3)

アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製－ 卵抽出液の作製に用いた Whole Egg Powder については Williams らが PBS による抽出率を BCA 法(化学的方法)により測定しており、表示タンパク質量に対する抽出率が 24.8%であったと報告している。さらにこの低抽出率の原因として、乾燥した卵白、卵黄の溶解性が低いことおよび放射線照射滅菌によりタンパク質の構造が変化した可能性を指摘している。サンプリング量、抽出方法、タンパク質の測定方法等が異なるため単純に比較はできないが、本実験では、Watanabe らの報告[2]に基づいて、抽出溶媒に 5%SDS および 2% メルカプトエタノールを加えてタンパク質の可溶化を計っており、化学的方法による Whole Egg Powder の抽出率は 80% 程度と Williams らよりも高かった。しかし、ELISA 法による抽出率は化学的方法による抽出率の約半分の 40%であった。一方、Egg Solids では化学的方法による抽出率は 85%程度、ELISA 法による抽出率はモリナガ FASPEK 卵 測定キットで 60～63%、FASTKIT エライザ Ver.Ⅱ卵で 73～78%と化学的方法による抽出率との差が小さかった。Egg Solids では照射滅菌が行われていないことから、Williams らに従えば、2つの卵粉末の間でみられた ELISA 法における抽出率の差は、照射滅菌によるタンパク質の構造変化に基づく可能性が高いと考えられた。Egg Solids 抽出液においてはモリナガ FASPEK 卵 測定キットの測定値は FASTKIT エライザ Ver.Ⅱ卵の測定値と比べ抽出率にして約 15%低かった。この ELISA キット間で見られた抽出率の差は ELISA キットの標準液(高濃度標準液を希釈したもの)の抽出に使用された卵検体と、Egg Solids のタンパク質の組成が同一ではないため、それぞれのキットの抗体に対する反応性が異なったことによるものと考えられた。以上卵試料により 2-D Quant Kit と ELISA 法、さらに ELISA 法間でも測定値が異なる場合があることが明らかになり、それぞれの測定値を十分把握した上で精度管理試料を調製する必要があると考えられた。高濃度標準溶液の添加回収試験で使用し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 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かった。薄力粉、そば粉、スキムミルクにおいては 2-D Quant Kit により測定した基材のタンパク質濃度が他の食材よりも高かったため卵タンパク質の抽出が妨害された可能性や、いずれも粉末で表面積が大きいため添加したタンパク質がマトリックスに吸着し抽出されにくくなった可能性等が考えられた。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 μg の回収率が 11.7 μg の回収率を上回っていた。FASTKIT エライザ Ver.Ⅱ卵の測定では、ビスケット、クリームサンドクッキー、ハンバーグで、高濃度抽出液を加えない試料の吸光度が検量線の「0」の吸光度よりも少し高いのが観察されたが、これ以外の食材およびモリナガ FASPEK 卵 測定キットでは吸光度の増加は認められなかった。従って、添加量による回収率の差は食材中含まれる微量の卵タンパク質の影響よりも食材のマトリックスの影響によるものと考えられた。卵抽出液を使用した添加

回収および保存の検討ではモリナガ FASPEK 卵 測定キットの添加量に対する回収率が低めであった。これは基材に添加するタンパク質量を 2-D Quant Kit の測定値に基づいて決めたため、表1に示したモリナガ FASPEK 卵 測定キットの 2-D Quant Kit に対する回収率 70％が影響したためと考えられた。一方 2-D Quant Kit の測定値に対する回収率が良かった FASTKIT エライザ Ver.Ⅱでは本試験でも回収率が 85% 以上と良好であり、Egg Solid 抽出液を用いて添加回収試験を行う場合には FASTKIT エライザ Ver.Ⅱの測定値が回収率の良し悪しを判断する指標になるものと考えられた。卵と同様に、乳を使用した旨の表示のない食材に高濃度標準溶液（牛乳標準品、二次希釈液）を添加し、その回収率等について検討したところ、一部回収率の低い食材も認められたものの、クッキー、クラッカーおよびパイで 70%以上の回収率が認められた。さらに 3 測定間の RSD を考慮するとクッキーおよびクラッカーの 2 種が牛乳用抽出液添加用基材として使用可能であると考えられた。乳抽出液の作製をスキムミルク粉末、スキムミルクおよび Whole Milk Powder を用いて行い、そのタンパク質量を化学的方法および ELISA 法で測定したところ、Whole Milk Powder で ELISA 法による抽出率、回収率が 10%以上低かった。さらにこの抽出液について SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、Whole Milk Powder ではレーン全体が染色され、バンドがクリアではなかった。また、Whole Milk Powder が放射線滅菌されていたことを考慮すると、放射線照射に伴いタンパク質の構造が変化した可能性が考えられた。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して作製した試料について、その安定性を確認したところ、－20℃保存により 12 週まで安定であることが確認された。さらに－20℃で 2 ヶ月保存した試料についてウェスタンブロット法による確認試験を行ったところ、スキムミルク添加模擬食材の抽出液はカゼイン抗体および β －ラクトグロブリン抗体のいずれにおいても食材への添加量として 5μg/g に相当する重層量までバンドを確認することができた。同様に自家製抽出液（卵）を添加したクッキーを作製し、－20℃で約 1 ヶ月保存後に抽出したものについてウェスタンブロット法により確認したところ、自家製抽出液（卵）添加クッキーでも 5μg/g に相当する添加量までバンドを確認することができた。小麦、そば、落花生について検討を試みた。小麦試料では、標準品規格に従った小麦粒の入手が困難であったことから代替品を用いて検討をしたが、規格品 13 種の内 6 種でタンパク質規格が適合せず、モリナガ FASPEK 小麦キットによる測定値も高い値として示された。家庭用小麦粉は主に小麦粒の中心部を使用し、外皮およびそれに近い部分は使用しないため、小麦粒全体を粉砕した小麦一次標準粉末とはグリアジン含量が大きく違っている可能性が考えられた。しかし、モリナガ FASPEK 小麦 測定キットは小麦一次標準粉末抽出液においても 2-D Quant Kit のタンパク質濃度に対して家庭用小麦粉と同様に高い回収率を示していることから、これ以外の可能性も含めさらに検討が必要と考えられた。そば試料作製においては、全ての試料で標準品規格に適合していたが、添加食材の回収率は特に FASTKIT エライザ Ver.Ⅱそばで比較的高い値を示しており、精度管理試料として配布する際には工夫が必要と思われる。

落花生については、標準品規格に適合しているが、添加回収率が添加量を上回った結果となった。これは、落花生粉のタンパク質の含量

の予測が正しくなかったことにより、落花生粉添加あんで回収率が大きくなった可能性が考えられた。しかし、安定性も含め使用可能なものと判断した。

E. 結論

1.田中分担研究: 第1回調査では、外部精度管理試料調製方法の妥当性ならびに調製試料の均質性および安定性について検討を行った。調製した試料は満足な定量値が得られており、試料調製方法の妥当性が確認された。5検体から得られた定量値に対し一元配置の分散分析を行った結果、検体間の有意差は認められず、試料の均質性が確認された。また、－20℃で1 ヶ月間保存した場合にも定量値に変動が見られず、試料の安定性が確認された。外部精度管理試験の結果からは、添加農薬について全機関が正確に言い当てた。全体の平均値では良好な結果が得られた一方で、Xbar-R管理図を代用する方法および検査精度の相対的な判定に有効なZ-スコアで評価したところ、各検査項目で適正でないと判断された機関があった。これらの要因について探索的データ分析(ビジュアルデータマイニング)の手法を用いて解析したところ、特に担当者の農薬検査の経験年数、アセトニトリル抽出回数、最終検液・検量線濃度などGCへの負荷(リスク)の程度、機関特異的また使用機種特異的な問題などが関与して精度に影響を及ぼしていることがうかがえた。このように2回実施した外部精度管理調査より、内部精度管理では解明できない情報が得られ、各検査機関の標準作業書(SOP)のバイアスや測定値の傾向などを捉えることができた。検査水準の把握ならびに分析技術の確認・向上の契機にすることが期待される結果を得た。第2回調査では、外部精度管理では、均質性、安定性を確認したかぼちゃ、にんじん、ほうれん草の精度管理試料に、一律基準値付近の低濃度の添加農薬を含めた12種類の結果は、全機関が添加農薬を全て検出した。また、各農薬の全体の平均値は良好な結果であった。また一部の機関でXbar－R管理図およびzースコアにおいて適正域に入らなかったが、前年度と比較するとかなり良好な結果が得られた。GC/MSとLC/MS/MSでその測定値を比較すると、LC/MS/MSの測定値がGC/MSと同程度あるいはそれ以上の精度の高い結果が得られた。一方、内部精度管理ではそれぞれの機関が妥当な分析法により検査が実施されていることが示され、30農薬の添加回収率は、厚生労働省一斉分析法における添加回収のA評価と一致した。しかし、内部精度管理で得られた結果と外部精度管理調査の結果は一致しなかった。さらにクライテリアサンプルを用いた検討では、各機関において良好な状態のGC/MSにより測定が行われていたものと判断された。第3回調査では、均質性、安定性を確認したほうれんそう(GC/MS)及びとうもろこし(LC/MS/MS)の精度管理試料に、0.01ppm付近の10種類の添加農薬のGC/MS及びLC/MS/MSによる分析結果は、全機関が添加農薬をすべて正しく検出した。各農薬の全体の平均値は0.01ppm付近でも良好な結果が得られた。Xbar-R管理図、Zスコアによる評価で適正域に入っていない機関も認められたが、総合成績では前年度と比較してかなり良好な結果が得られた。適正域に入っていない機関も安定同位体(サロゲート物質)を内標準として補正した結果、再現性において良好な結果が得られた。いずれの機関も信頼性のあるデータが得られる要因「正確な(一定の)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、ほとんどの添加農薬の測定データで信頼性に関する問題点は無かった。ポジティブリスト制導入に呼応した農産物中の一斉分析法による参画機関の測定感度、添加回収率等の技術情報を相互に交換し、GC/MS対象農薬では244農薬(異性体等含む274種類)及びLC/MS/MS対象農薬180農薬(異性体等含む189種類)が、機器の測定感度から一律基準値(0.01ppm)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の確認ができた。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に極めて有効であった。

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に関する検討ー PBDEs(HpBDE #183、DeBDE #209)、HBBおよびTBBPAの脂肪細胞の分化に及ぼす影響を検討した結果、いずれの化学物質も、細胞の分化自体を誘導する作用を有していないことが示唆された。しかし、分化誘導刺激を与えて脂肪細胞へと分化させた後、TBBPAを添加すると、インスリン非存在下においてもGPDH活性の上昇が認められた。このことから、TBBPAが脂肪細胞内への脂肪蓄積を促進する作用を有していることが示唆された。また、測定器具由来のデータのばらつきなど基礎的な精度管理問題を考察するために、メスフラスコやピペットを用いた室内再現精度を測定した。その結果、使用する器具による測定値のばらつき及び個々の試験者の技量の差に起因する測定値のばらつきが観察された。本研究では、従来あまり省みられてこなかった測定器具由来のデータのばらつきなど基礎的な精度管理問題を考察することによって新たな知見が得られ、今後の精度管理に有益な情報を提供することができ、更に測定データの精度向上も期待される。**2)ベンゾフェノン類の環境・生体汚染モニタリングと分析評価に関する検討ー** ベンゾフェノン類の環境・生体曝露調査を行ったところ、スターバー抽出法を用いることにより簡便かつ高感度に対象物質を測定することが可能となり、河川水ならびに尿試料中からベンゾフェノン類を検出した。これらは恒常的に曝露されているものと考えられた。この分析法が確立されることにより、環境、食品等における汚染を把握するうえで有効に活用されることが期待される。また、ボルネオールを対象とした純度試験およびキラル純度試験を行い、ボルネオール中の不純物がイソボルネオールであることを確認した。また純度は概ね表示どおりであった。キラル純度試験では、ボルネオールおよびイソボルネオールのラセミ体として存在しているものがあったが、R体、S体の表記のある標準品では概ね表示どおりの結果であった。**3)ELISA法によって得られる測定値の信頼性評価に関する検討ー** マイクロプレートにおける酵素・基質発色反応や、ニューキノロン測定用マイクロプレートを用いて、主に測定値の変動に影響を及ぼす要因について検討した。その結果, ELISA法の精度を上げるために、ピペット操作に習熟し、エッジ部分の値を除外すること、また抽出液作成の段階で、精製を行い、脱脂回数を増やすことが重要であった。

3.松木分担研究: 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。本研究においては、国内メーカー3 社より市販されている農薬標準品 44 物質(129 種)について、メーカー表示純度と我々が設定した条件で純度を比較した結果、HPLC で測定した純度においては 88%が、GC では 85%がほぼ同等な純度を示しており、比較的良好な結果が示された。しかし、我々がひとつの標準品に対して複数の分析機器種(HPLC、GC)を用いて純度を測定した結果においては、分析する機器種によって違いが認められ、異なる分析手法を用いた場合、異なる不純物が検出されたり、あるいは不純物の割合が異なってくる可能性が示され、標準品の純度表示にあたっては、測定原理の異なるような複数の分析機器を用いて多方面から検証することの重要性が確認された。一方、通知法の個別試験法において規定されている純度を満たしていない純度表示を有する標準品が 104 種中 14 種認められた。標準品を購入する際に標準品の純度に関する情報については、カタログ等から得ることができない場合(特に並行輸入販売品)も多いことから、提供後に初めて通知法に規定されている純度を満たしていないことが判明することも、少なからず起こりうると思われる。メーカーには、全ての食品の輸入規制緩和策にともない、途上国からの輸入品目が急増している昨今、検査対象農薬種が急増し、それに対応するため標準品の品質には細心の注意を払っているものと思われるが、メーカーとしては、検査頻度が少ない農薬や分解しやすい農薬、あるいは本体と類似した物理化学的性状を有する不純物があるような農薬における精製のためのコストの問題が大きいと思われる。しかしながら、行政上の対処を行うことから、通知法の中で標準品の純度について規定されている以上、それを満たした標準品が必要であり、今後とも引き続きメーカー側の一層の努力を期待したい。また並行して、標準品の純度に関する情報が、カタログ等から明確になるような整備を求めたい。

4.米谷分担研究: 3回の技能試験の結果から、TEQ が 1.7 ～26 pg/g 程度の魚試料において、TEQ の試験室間の変動は 4.8%～7.7%であることが示され、我が国における食品中のダイオキシン類分析値の信頼性が保証された。全国的に食品中のダイオキシンを分析する機関数が減少しており、技術水準の高い機関が残ったとも考えられる。しかし、異性体によっては他機関と大きく外れた報告値があり、5～7 箇所という少数の機関から統計量を求めると、外れ値が影響し大きな SD を与える場合があった。その結果として、外れ値と思われる値を報告した機関のzースコアも 3 以下となり、問題点が見いだされない結果となった。頑健な統計量を用いることにより、外れた値には 3 を超えるzースコアが計算された。外部精度管理の目的は、他機関と比較して分析上の問題点を見いだし、是正していくことである。この目的から、参加数機関数が少なく、外れ値の発生が予想されるような分析の外部精度管理においては、頑健な統計量による評価の方が望ましいと考えられる。

5.渡邉分担研究: 1)組換え DNA 応用技術食品検査の信頼性確保に関する研究ー DNA 抽出法が定量 PCR 法により得られる GM トウモロコシ定量値に与える影響について明らかにすることを目的に、公定分析法に規定されている 4 種の DNA 抽出法について、DNA の質、収量、DNA 分解の程度、および GM トウモロコシ定量値について詳細な解析を行った。その結果、CTAB 法と WIZARD 法において、DNA の質の評価基準とされる吸光度比のうち、260

nm/ 230 nm 比が顕著に低下することが示された。また、DNAの収量に関しては、4種のDNA抽出法の間でばらつきに差は認められなかったが、CTAB 法を用いた場合の平均収量が明らかに少なくなることが示された。さらに、電気泳動により分離し得られた像から判断するかぎり、DNA 分解の程度に明確な差は認められなかった。MAXI 法により得られた定量値を比較中心とて、一般的な統計解析手法により有意差を検定した結果、mini 法ならびに CTAB 法を用いて得られる定量値との間に有意差が認められた。定量値の算出に使用される換算係数である内標比が DNA 抽出法ごとに変動し、定量値に大きな影響を与える可能性が考えられたため、各DNA抽出法により調製したDNAごとに内標比を計測し、それらを用いて定量値を再解析した。しかし、再解析された定量値を検定してもなお、一般的な統計解析手法を用いた場合には有意差が認められた。これらの結果から、DNA抽出法が異なることによる定量値への影響を評価するためには、それに特化した評価手法が必要ではないかと考えられた。さらに、本研究で検討した DNA 抽出法を含む分析方法の全体、試料、分析者等複数の要因が定量値に与える影響を不確かさとして加味した上で評価手法を開発していくことが、新たに開発される定量 PCR 法の妥当性をより適切に評価するため、また外部精度管理試験においてより適正な管理をおこなうためには必要であると考えられた。同様に遺伝子組換え大豆(RRS)を対象とした定量PCR法により得られる定量値に RRS が混入する際のマトリックスとなるnon-GM大豆の品種が及ぼす影響について明らかにすることを目的に検討を行った。その結果、使用した10種のnon-GM大豆の全てにおいて得られる定量値がRRSの粉体重量混合率に比べて、高い値になることが明らかとなった。また、各大豆品種から抽出される DNAの収量に明らかな差異が認められた。さらに、DNA重量の比としてRRS混合率を規定した試料を測定して得られた定量値は規定した混合率と一致した。これらの結果から、粉体重量と定量 PCR 法の直接の分析対象物質であるDNA重量との間で混合率が保持されていない可能性が考えられた。しかし、DNA の収量を考慮しても、定量値と粉体重量混合率との間に大きな差が認められる試料の存在も明らかとなった。本研究において示唆された可能性について明らかにするためには、試料とする大豆品種を増やすとともに、基本原理を異とするDNA抽出法を用いるなどして、さらに検討することが必要であると考えられる。リアルタイムPCRにより得られる一義的な測定量である蛍光データを、より高い自由度をもって解析するためのアプリケーション(*GiMlet*)を開発した。組換えDNA技術応用食品を対象とした定量 PCR 法により得られる蛍光データを *GiMlet* により解析した結果、使用する定量 PCR 機器の性能あるいは仕様が原因となり、well 間で測定値が変動する可能性が示された。今後、機器の上を判定するための基準を明確にする事によって、定量 PCR 機器の管理手法の一つとして、内部精度管理等に役立てられることが期待される。また、Ct 値を取得する際に設定される Th. line 値が測定値にばらつきを生じる一要因であり、適切な値を設定すべきであることが示された。さらに、検量線を構成する検量点として、低コピー数のプラスミドを規定した場合、そこに含まれる原理的なばらつきにより、検量線の正確性が損な

われる可能性が示唆された。2)**フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究**－食安輸発第 1017004 号により示されたフグ鑑別試験法の適用拡大を目的に、より頑健性の高い改良 DNA 抽出法を開発し、評価した。また、相同性検索に供される最終シーケンスデータを得るためのラベリング反応条件およびデータトリミング方法を確立し、3種の陰性試料ならびに 6 種のフグ種への適用可能性について検討した。その結果、改良 DNA 抽出法を用いることにより、多種の魚凍結乾燥試料から安定した収量で DNA を抽出可能であることが示された。また、確立されたラベリング反応条件を用いることにより、アライメントに支障を来すことのない一次シーケンスデータが得られることが示された。さらに、最終シーケンスデータを相同性検索に供して得られた結果から、一次シーケンスデータのトリミング方法の妥当性が示された。本研究に用いた、3 種の陰性試料および 6 種のフグ種試料から得られた結果に基づき、フグ種鑑別に係る判定基準が以下のとおり提案された。

1) 100%の相同性を有するDNA 配列が一魚種についてのみ検索された場合には、被検試料を当該魚種として同定する。

2)複数の魚種から100%の相同性を有するDNA 配列が検索された場合には、そのいずれかの魚種であっても特定魚種であると同定することはできない。

3)100%の相同性を有するDNA 配列が検索されない場合には、最終シーケンスデータに実験的なエラーが含まれていると考えられ、なお同定が必要な場合にはさらにシーケンスデータを精査する。

4)100%の相同性を有するDNA 配列が検索されずかつ、検索されたDNA 配列の相同性が一定以下である結果に基づき、特定魚種ではないとする。

なお、本判定基準は、被検試料由来の当該 DNA 配列がGenBank に登録されているあるいは採取されており、それらには誤りが含まれていないことを前提としているため、未登録の DNA 配列については分析者による採取、ひいては登録をすることにより、判定精度を高めるための努力が必要である。現在、より多数のフグ種、および他機種シーケンサーへの適用可能性について検討を進めている。さらに、それらの結果に基づき策定した共同試験プロトコルに従い、2 機関による分析法の妥当性評価試験を計画している。

6.町井分担研究： 1)遮光バイアルにアセトン溶液で密栓及び遮光バイアルに吸着したオカダ酸は冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも6ヶ月間安定であることが明らかとなり、1年3ヶ月経過後のサンプルはHPLCレベルで微減傾向を示したが、マウスアッセイでは力価の残存が観察された。現在更に長期に亘り観察中である。2)昨年までの知見で濾紙に吸着したオカダ酸はどの条件でも回収率は経時的に緩徐に減少することが明らかであったが、冷蔵及び冷凍条件下では3週間比較的安定であった。3)以上より実際に使用を予定している冷凍条件はどの条件でも外部精度管理用サンプルとして使用可能である事が示唆された。4)オカダ酸の熱に対する耐性を検討するため、50℃について経時的に回収率を求めたところ、48時間安定であり、通常の分析及び輸送等に影響の無い事が示唆された。5)OAは120℃を境に急激に分解が始まる可能性が示唆された。そこで、OAの加熱時間を1時間に固定して、温度を100℃～150℃に可変させ、回収率を求めると、回収率はシグモイド状に減少し、半減期は

120℃～130℃と推定され、150℃では完全に分解する事が明らかとなった。6)今回加熱時間と加熱温度の相関に関する基礎的データが得られたので、加熱時間と分解の予測の可能性が示唆され、今後のリファレンスマテリアル作製に大きく寄与すると考えられる。7)小型挽肉器を導入し、貝の身の細切を試みた。従来用いていたフードプロセッサーに比し、細切されきれずに残る、残渣となるようなものが比較的少なく、効率良く、良好な細切物が得られた。また、この細切物は、この後の抽出作業においても扱いやすく、特に問題が発生せず、実用上推奨されるものと判断された。8)下痢性貝毒検査の経験豊富な試験所の試験室による同一ロット試料の性能調査で、その結果、協力7機間全てにおいて陰性、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。死亡までの時間については、夜間に死亡した個体では死後硬直の具合などから推定した時間での回答を求めたため、詳細な考察は出来ないが、試料送付前の確認試験においては、2～5時間であったが、協力各機関からの回答では、1時間から22時間の範囲でばらつきが見られ、同一機関でも大きくばらつく例が見られた。このことから、濾紙への毒素の含浸法の更なる検討、或いは新たな添加法の検討、また、別の観点からは、マウスへの毒素の注射法の実際についての聞き取り調査、或いは指導についても検討する必要性も考えられた。今後は安定してオカダ酸含有試料を供給できる条件について更に検討を加える予定である。更に、毒性の評価をより正確に行うために、LC-MS等による活性成分の多成分同時分析法を導入することも不可欠である。

7.大島分担研究:1)理化学検査のための適性試料の作製ー あらかじめカドミウムを添加して作製した玄米のカドミウム濃度を測定し、これにカドミウム無添加玄米を加えて希釈し、遠心粉砕機で粉砕・混合する方法が、目的とする作製予定濃度の試料を作製できること、および均一性が確保できる方法であることが明らかとなった。収穫後に水蒸気処理を行ったほうれん草のペースト(スープ用食材の市販品)に有機リン系農薬(クロルピリホスおよびダイアジノン)を添加してハンドミキサーで攪拌して作製する方法により、均一な濃度の試料を作製できることが分かった。また、今回検討した水蒸気処理したほうれん草では、冷蔵、冷凍保存してもクロルピリホスおよびダイアジノン濃度が、ほぼ安定であることが分かった。かぼちゃおよびサツマイモペーストを使用し、有機リン系農薬6種を添加することにより、均一な濃度の試料を作製できることがわかった。かぼちゃとサツマイモペーストで比較すると、回収率ならびに再現性の点からかぼちゃペーストを採用した。なお、この試料は安定性も確認され、適正な試料であることがわかった。同様に収穫後に水蒸気処理を行ったかぼちゃ及びえだまめペースト(ミクロペースト状食材)を使用し、有機リン系農薬2種(クロルピリホス、フェニトロチオン)を添加混合し、かぼちゃペーストで均一な濃度の試料を作製できることが分かったが、えだまめペーストでは、これら有機リン系農薬の基材として風適当であることがわかった。また、かぼちゃペーストに添加した農薬の安定性も確認され、精度管理調査における適正な試料であることがわかった。鶏ササミ肉をミンチし、マルチグラインダーを使用し、サルファ剤8種(SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMXZ、SDMX、SQ)を添加混合し、試料作製し、基材

に10 %水添加することで良好な均一性が得られた。また、SDDを調査試料とすることが可能である事を示唆した。**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用試料として殺菌液卵(鶏卵)を選択し調査試料作製、並びに接種菌の推移、検出方法について検討した。サルモネラ属菌検査のための調査試料として殺菌液卵(鶏卵)を採用して検討した結果、安定化剤の添加によって4℃保存下で約4週間、接種菌の死滅は抑制することが可能であった。しかしながら、調査試料を宅配便にて輸送する場合、実験室での一定温度保存と異なり、温度変化が大きく、基材中の試験菌が増殖または死滅するリスクが高い。輸送条件を出来るだけ一定温度にして、配布が可能であれば、特に生菌数の変動に大きな影響を及ぼさないものと考えるが、温度管理は非常に困難を極める。したがって、輸送の温度条件に極端に依存しない調査試料が必要となる。検査実施施設からは、添加菌量を低濃度にして欲しいとの要望もあるため、10^1/mLレベルから10^4/mLレベルまでの接種菌量を設定して輸送前後における生菌数の変動と添加菌の検出確認を行った。殺菌液卵を基材としたサルモネラ属菌検査試料は、前増菌培地や選択増菌培地中で試験菌の十分な発育を認め、サルモネラ属菌検査用調査試料として配布することは可能である。しかしながら、基材への低接種菌数(10^1/mLレベル)では、秤量が25gであるため、理論上は前増菌倍地中に約10^2個オーダーの菌が添加されていることになるが、選択増菌または確認培地の培地の性能によっては十分な検出菌数で無い場合も考えられる。実際問題として菌種によってはRVで選択増菌した後、MLCB培地を仮に選択した場合、検出できないリスクが非常に高い。液卵のサルモネラ属菌検査における推奨培地の記載は、緩衝ペプトンによる前増菌、TTやRVでの選択増菌、DHL、ESサルモネラまたはESサルモネラⅡのような確認培地が示されているが、食肉ではMLCBやDHLなど硫化水素産生確認を指標にした培地が記載されている。調査試料中の菌数を一定範囲のコントロールすることが出来、輸送による菌数変動を極力小さくして調査試料を配布しても、選択される培地の組み合わせによっては添加した試験菌が検出できない場合も生じる。調査試料中の接種菌数をある程度確保し、輸送によって大きな変動を生じないようは調査試料の作製は、基本的な事項ではあるが、選択される標準菌株の性状も検査成績に対して重要な影響を与える要因となっており、加えて検査施設において選択される検査法や培地の種類によっても検査成績が大きく異なる場合があることを留意しなければならない結果であった。今後の食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、食品の規格基準に示されている食品カテゴリーを参考とした調査試料作製のための実食材の選択とそれらを基材とした均一で安定な調査試料作製を継続して検討する必要があり、これまで問題とされてきている「指定された特定微生物に対する検査方法の適正とその検査方法の検証」、「標準菌株の選択と採用検査方法による特定微生物の検出の検証」、「調査試料の輸送条件における試験菌数の変動」など様々な局面を考慮して、外部精度管理調査の目的に応じて適切な標準菌株を選択し、日常の検査試料に近い調査試料を提供することにより、さらに向上した精度管理の実施が遂行されるものと考える。魚肉練り製品を対象とした調査試料を作製すべく、市販製品に対象菌を接種することにより、その安定性および基本性状について検討した。

4種の魚肉練り製品を高圧蒸気滅菌し、その物性の変化について確認したところ、一部の試料で形状の変形が認められたが、3種について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。そこで、これらの試料に菌液を接種し、菌数変動を観察したところ、菌液接種後7日目に増菌が認められたものの、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。さらに、菌液接種後28日目において公定法に従い大腸菌群検査を行った結果、*K. oxytoca*接種群においてBGLB培地での増菌、ガス産生が認められ、その後の選択培地上での典型集落の形成を認めた。以上のことから、今回試作した魚肉練り製品は大腸菌群検査に十分に耐えうるものと判断された。しかし、今後の食品衛生外部精度管理調査の実施にあたり、食品の規格基準に示されている食品カテゴリーを参考とした調査試料作製のための実食材の選択と、それらを基材とした均一かつ安定した調査試料の作製を今後も継続して検討する必要があるものと考えられた。これにより、日常の検査試料に近似した調査試料を提供することが可能となり、さらに向上した精度管理の実施が遂行されると考えられる。黄色ブドウ球菌検査用調査試料として蒸し鶏、とりそぼろおよびミートボールを採用し、高圧蒸気滅菌処理後の物性変化について確認したところ、とりそぼろでは著しい炭化が認められたため、基材として採用することは難しいと判断されたが、これ以外の2種の基材については若干の褐変が認められるものの大きな物性の変化は認められなかった。そこで、これらの2種の基材に他の試験においても実績のあるハンバーグならびにマッシュポテトを用い、これらを試験菌液（*S. aureus*あるいは*S. epidermidis*）に漬け込み、これを冷蔵保存することにより接種菌の安定性について検討した。その結果、全ての基材において菌液接種後35日目まで初発菌数に比べて菌数は減少傾向にあるものの、公定法によっても接種菌を検出することは十分に可能であった。さらに新規で採用したミートボールおよび蒸し鶏では菌数と水分活性との関係からマッシュポテトと比較した場合に安定性は低かったが、菌液の接種方法等を検討することにより、より安定した菌数を確保できるものと考えられた。

以上のことから今回試作した加熱食肉製品は、黄色ブドウ球菌検査用調査試料として接種菌の安定性について考慮する必要はあるものの、外部精度管理調査試料として使用しうるものと考えられた。しかしながら、今後の食品衛生外部精度管理調査の実施にあたり、食品の規格基準に示されている食品カテゴリーを参考とした調査試料作製のための実食材の選択とそれらを基材とした均一かつ安定な調査試料の作製を継続して検討する必要があり、これまでに問題とされてきている「指定された特定微生物に対する検査方法の適正とその検査方法の検証」、「標準菌株の選択と採用検査方法による特定微生物の検出の検証」、「調査試料の輸送条件における試験菌数の変動」など様々な局面を考慮して、外部精度管理調査の目的に応じて適切な標準菌株を選択し、日常の検査試料に近似した調査試料を提供することにより、さらに向上した精度管理の実施が遂行されるものと考えられる。**3)アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製－** 2 種の卵粉末からタンパク質を抽出し、化学的方法と ELISA 法によりタンパク質を測定した結果、Egg Solids で両者の測定値の乖離が小さかったため Egg Solids を用いて卵抽出液を作製することとした。Egg Solids の抽出液を使用し、2 種の食材に

ついて実施した添加回収および保存の検討の結果、いずれの試料においても試料間の再現性、添加回収率ともに良好であり、－20℃、1ヶ月間の保存の安定性についても確認できたことから、精度管理に対応できる試料が作製できたと考えられた。スキムミルク粉末を用いて自家製抽出液（乳）を作製することにより、化学的方法およびELISA法のいずれにおいても回収率が良く、しかも変性が少ないことが確認された。自家製抽出液（乳）は－80℃で12週まで、これを添加した食材は－20℃で12週まで安定であることが確認された。ウェスタンブロット法にも対応できるように調製し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した試料でも－20℃で 12 週まで安定であることが確認され、ウェスタンブロット法では、カゼイン抗体、β－ラクトグロブリン抗体とも 5μg/g までバンドが検出できた。一方、自家製抽出液（卵）を添加した試料について安定性を検討した結果、－20℃で 14 週までの保存安定性が確認できた。また、ウェスタンブロット法にも対応できるように、マッシュポテト基材に全卵の水溶液を混合して調製した試料では、ELISA 法において－20℃で 12 週までの安定性が確認でき、さらにウェスタンブロット法では卵白アルブミン抗体、オボムコイド抗体とも 5μg/g までバンドが検出できた。以上のことから、自家製抽出液（乳）あるいは（卵）を添加した試料およびマッシュポテト基材は、精度管理試料として使用できるものと考えられた。小麦試料の作製に関する検討では、厚生労働省の通知法、標準品規格に従った小麦粒が入手できなかったため、小麦一次標準粉末の代替品を検索することとし、入手可能な小麦粉について標準品規格による抽出液の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、2-D Quant Kit、モリナガ FASPEK 小麦 測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. Ⅱ小麦によるタンパク質濃度の測定、ケルダール法による小麦粉のタンパク質含量の測定を実施し、標準品規格と比較した。その結果、試験した小麦粉は抽出液のタンパク質濃度が規格に適合しないものが約半数あったほか、いずれもモリナガ FASPEK 小麦 測定キットの測定値が小麦粉のタンパク質含量よりも高く測定されるなど、小麦一次標準粉末の代替品として適当なものは見つからなかった。その中で 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用いて以下の検討を行なった。ハルユタカ高濃度標準液または石臼挽きハルユタカ全粒粉を食材に添加したものを-20℃で保存し、回収率および保存安定性を検討した。その結果、添加試料は回収率ではELISAキット間で2倍の差が認められたが、同時再現性、アッセイ間再現性とも良好で、-20℃、12 週間の安定性が確認できた。

そば試料の作製に関する検討では、標準品規格に従って自家製一次標準粉末および自家製高濃度標準液を調製し、標準品規格に適合していることを確認した。自家製高濃度標準液を添加した試料を作製し-20℃で保存したものについてそばタンパク質を測定した結果、モリナガ FASPEK そば 測定キットでは添加回収率が良好で保存安定性も 12 週まで確認でき、使用可能な高濃度標準液添加試料が調製できたと考えられた。一方、自家製一次標準粉末を添加した食材においては回収率が添加量を大幅に上回った。そば粉のタンパク質含量をケルダール法により測定した結果、標準品規格の抽出液から予測したそば粉のタンパク質含量が実際と異なっていることが分かった。

落花生試料の作製に関する検討では、標準

品規格に従って自家製一次標準粉末および自家製高濃度標準液を調製し、標準品規格に適合していることを確認した。自家製高濃度標準液を添加した食材を作製し-20℃で保存したものについて落花生タンパク質を測定した結果、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは添加回収率は良好で保存安定性も 12 週まで確認でき、使用可能な高濃度標準液添加試料が調製できたと考えられた。一方、自家製一次標準粉末を添加した食材においては回収率が添加量を上回った。落花生粉のタンパク質含量をケルダール法により測定した結果、標準品規格の抽出液から予測した落花生粉のタンパク質含量が実際と異なっていることが分かった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

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

研究成果に関する刊行物一覧表