

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20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秦野研究所

小 島 幸 一

■分担研究者

大阪府立公衆衛生研究所

尾 花 裕 孝

星薬科大学 薬品分析化学教室

中 澤 裕 之

社団法人 日本食品衛生協会

松 木 容 彦

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

大 島 赴 夫

平成21年(2009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】

平成20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秦野研究所

小 島 幸 一

■分担研究者

大阪府立公衆衛生研究所

尾 花 裕 孝

星薬科大学 薬品分析化学教室

中 澤 裕 之

社団法人 日本食品衛生協会

松 木 容 彦

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

大 島 赴 夫

平成21年(2009年)4月

目 次

I. 総括研究報告書	
検査機関の信頼性確保に関する研究 -----	1
小島 幸一	
II. 分担研究報告	
1. 食品中に含まれる微量農薬の分析法と ----- 23	
精度管理体制の構築に関する研究	
尾花 裕孝	
2. 食品中に含まれるマイコトキシン検査法 ----- 119	
の検討と精度管理体制の構築に関する研究	
中澤 裕之	
3. 残留農薬・動物用医薬品などの試験に係る標準品の ----- 125	
品質評価と精度管理体制の構築に関する研究	
松木 容彦	
4. 食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料の ----- 137	
作製検討と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 -----	199
IV. 研究成果の刊行物 -----	201

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 20 年度 総括研究報告書

主任研究者 小島 幸一

平成 21 年（2009 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20年度）

主任研究者 小島 幸一 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 所長

研究要旨

食品の安全性を確保するためには、微生物学検査（生菌数検査、病原微生物検査など）、理化学検査（重金属検査、食品添加物検査、残留農薬検査、動物用医薬品検査など）、組換えDNA技術応用食品検査、アレルギー物質検査など多くの検査項目についての確かな検査が行われなければならない。特に、残留農薬や動物用医薬品では、一斉分析法が平成18年5月より実施されており、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。また、検査機関における検査結果の信頼性を確保するシステム構築は、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年目の内の1年目となるが、ここでは1. 食品中に含まれる微量農薬の分析法と精度管理体制の構築に関する研究（尾花分担研究）、2. 食品中に含まれるマイコトキシン検査方法の検討と精度管理体制の構築に関する研究（中澤分担研究）、3. 残留農薬・動物用医薬品などの試験に係る標準品の品質評価と精度管理体制の構築に関する研究（松木分担研究）、4. 食品衛生外部精度管理調査用適正試料（理化学検査・微生物学検査・アレルギー物質検査・組換えDNA技術応用食品検査）の作製検討と信頼性確保に関する研究（大島分担研究）の4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＝尾花裕孝（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）、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危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心と安全を提供することは食品安全確認行政の重要な課題である。その一貫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。特に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は、繰り返しその検査精度を確認することが求められる。これら精度管理体制の充実を図ることは重要であり、加えて平成18年5月より農薬のポジティブリスト制も導入された事に伴い、一層の体制強化が必要となっている。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精度管理調査について、その進め方や得られた結果の基本的な評価方法に関しては構築してきたが、新規項目の検討や新規基材の選択と高品質な調査試料の作製などについては、継続した検討が必要である。組換えDNA技術応用食品検査では、標準品を持たない組換えDNA技術応用食品も検出されており、標準プラスミドや組換えタンパク質を代用品とした検査法も導入されてきている。また、アレルギー食品検査に係る精度管理調査も基本的な問題点を解決しながら、より一層の充実を図ることが必要である。これらに加え食品中に含まれる微量有害物質（微量農薬、マイコトキシン）の分析法については、検査結果のバラツキを抑えることにより、その結果が信頼性の高いものとなることに加え、国際的にも優れた水準の精度管理に関する検討と精度管理体制の構築が期待される。また、機器分析では標準品を用いて作成した検量線から測定値を算出することを考慮すると、使用する標準品の純度により測定値が大きな影響を受ける可能性がある。そのため市販の農薬、動物用医薬品、抗菌剤、マイコトキシンなどについて、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。食品衛生検査に係る精度管理（Proficiency test）体制の構築は、食品の広範囲な流通により国内外を問わず、その分析精度を確認する上でますます重要な課題として認識されている。国内の状況

を把握した上で国際的な動向にも対応しうる精度管理用調査試料の作製を行うことは必要不可欠であり、食品衛生検査機関の検査精度の信頼性を確保する上で大きな意味を持つ。また、食品衛生検査に係る精度管理用調査試料の作製検討に加えて、アレルギー食品検査ならびに組換えDNA技術応用食品検査における精度管理体制の構築、食品中に存在する微量農薬およびマイコトキシンの分析法と精度管理体制の整備については、信頼性確保の面からも急務である。特に食品中の農薬及び動物用医薬品の残留基準については、ポジティブリスト制の施行がなされている。加えて「食品中に残留する農薬等に関する妥当性評価ガイドライン」（平成19年11月15日食安発第1115001号）による標準的方法による評価を行うことになっていることから、農薬等の分析法についても更なる検討が必要である。汎用される市販農薬や動物用医薬品の標準物質についても分析法のバリデーションを検討し、これらの精度管理に関する基礎的検討を実施することは食品衛生検査機関の検査精度の向上及び信頼性確保に大きく貢献するものである。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. 尾花分担研究

基材としてはレトルトカレーを採用し、農薬についてはアセチルコリンエステラーゼ阻害活性を有する有機リン系またはカーバメート系農薬から15種類（メタミドホス、アセフェート、ジメトエート、トルクロホスメチル、マラチオン、イソフェンホス、エトプロホス、エトリムホス、Z-ジメチルピピンホス、エディフェンホス、ピラクロホス、フェノブカルブ、ベンダイオカルブ、ピリミカブ、

カルバリル) を選択して試験を実施した。測定方法については、ガスクロマトグラフ-マススペクトルメトリー (GC-MS) 法および液体クロマトグラフ-マススペクトルメトリー-マススペクトルメトリー (LC-MS/MS) 法で測定した。協力検査機関 9 機関の評価法は、基本統計量と Z スコア、ならびに \bar{X} -R 管理図を用いて行った。

また、精度管理用試料の調製はステンレスバケツに水を入れて 80~90℃ に加温し、レトルトカレーのバックを包装容器のまま 5 分間加温した。容器から取り出したカレーはフードプロセッサに移して破碎した。その後、湯煎しながら 60℃ に保温した、攪拌機付属のステンレス容器へ移し、5 分間攪拌して内部精度管理用試料とした。外部精度管理用試料は攪拌機で攪拌しながら農薬をホールピペツトで正確に加えて調製した。

2. 中澤分担研究

LC-UV による測定法の検討は、LC 装置に HITACHI L-6300 ポンプおよび JASCO MD-910 多波長検出器を用いて実施した。分析用カラムには、DIONEX 社製 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 (4.6 mm i.d. x 150 mm) を、移動相にはアセトニトリル : 25mM リン酸緩衝液 (pH6.0) = (7:3) を用いた。カラム温度は 40℃、移動相流速は 1ml/min とし、試料注入量は 10 μ l とした。

LC/TOF-MS による測定法の検討は、LC に Waters 社製 alliance HT 2795 シリーズを、TOF-MS に Waters 社製 LCT Premier XE を用いた。LC カラムには、東京化成工業社製 TCI Dual ODS-AX 10 (2.0mm I.D. x 150 mm) を用い、カラム温度を 40℃ とした。移動相には、アセトニトリル : ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH6.0) = (7:3) を用い、流速を 0.2ml/min とした。TOF-MS におけるイオン化にはエレクトロスプレーイオン化法のネガティブイオンモードを採用した。精密質量の補正には、lock mass 方式を採用し、質量校正用標準物質としてロイシンエンケファリンを用いた。

試料および試料調製法の検討は、試料として CPA 産生菌である *Penicillium commune* の数種の菌株を用い、温度条件を変えて培養した菌体および培養ろ液を用いた。また、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属などのカビによる汚染が考えられる食品として調味料を用いた。菌体、培養ろ液および調味料の抽出には有機溶媒による液-液抽出法を採用し、クリーンアップのための固相抽出カートリッジには、Waters Oasis MAX または MCX を用いた。

3. 松木分担研究

残留農薬混合標準液中での残留農薬標準品の安定性についての検討は、農薬原料 76 種について各残留農薬原体の純度保証値に基づき、純度補正し、絶対濃度として 10mg/L となるようアセトン/ヘキサン (1:1 v/v) に溶解して濃度を調製した。調製した残留農薬 76 種の混合標準液については、混合、均質化し、調製後、一定量ずつアンブルに分注し、必要量を各協力研究者に頒布した。混合標準液中での残留農薬の安定性に関する検討は、上記 76 種の残留農薬混合標準液を用いた。測定は、GC-MS を用いて行った。試験法は、絶対濃度として 10mg/L となるようアセトン/ヘキサン (1:1 v/v) に溶解して調製した残留農薬混合標準液を -20℃、4℃ 及び 40℃ の各保存温度で 3 ヶ月、6 ヶ月及び 9 ヶ月保存後、各保存液中の農薬を GC-MS で測定した。安定性の確認・評価方法については、GC-MS は NAGINATA クライテリアサンプルにより各農薬は保存期間及び保存温度の設定条件毎に試料数を n=5 とし面積値を測定した。評価方法は、繰り返しのある二元配置分散分析で解析した。

残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性についての検討は、残留農薬標準品原末を関東化学(株)から入手して用いた。試薬はアセトニトリル/ヘキサン (1:1) 混合液を使用した。使用機器は、ガスクロマトグラフを用いて行った。農薬標準原液の調製手順につい

ては、記載法に従って調製した。また、農薬標準原液の保存時の取り扱い、測定用溶液 0.5ml を採取した後の残りの農薬標準原液の保管操作に当たって、それぞれ採取後、速やかに 4℃及び -20℃の保管庫へ戻し保管を継続した。溶解性の評価については、農薬標準原液の調製初期、4℃及び -20℃保存後（1ヶ月、3ヶ月）の農薬標準原液それぞれについて、遠心分離後の又はフィルターろ過後に、結晶等の残渣物あるいは析出物等の有無を目視で確認した。また溶解性の評価については、調製初期の測定値と各保存時期における保存液（4℃、-20℃）のそれぞれの測定値の差の比較により溶解性の良否状態を評価した。

4. 大島分担研究

(1) 理化学検査のための適正試料の作製— 残留動物用医薬品の検査に使用する調査試料として、食肉（鶏肉：ササミ、むね、もも）のミンチ肉にスルファジミジン（SDD）を添加して、基材としての鶏肉の利用を検討した。各部位のミンチ肉をロボ・クープミキサーを使用してペーストにし、これらに水および SDD を添加して良く混合した。水分添加量が作製量全体の 10、20、30、40% となるように水を加えたささみ肉ペーストに、SDD を添加した。これとは別に水分添加量を 10%、20% としたささみ肉ペーストに、SDD が水添加 10% では 0.1 µg/g、20% では 0.2 µg/g になるよう添加した。脂質量がささみと異なる他部位については、水分添加量を 0、10、20% としたむねおよびもも肉ペーストに SDD を添加して調製し、水分無添加のささみ、むね、ももについて、脂質をソックスレー抽出法で測定を行った。なお、測定操作は、食品衛生法に準拠して行い、高速液体クロマトグラフを用いて測定した。また、保存料の検討に

LC-MS/MS を用いて同定確認した。試料中のソルビン酸（以下 SOA）、安息香酸（以下 BA）の測定は、高速液体クロマトグラフにより実施した。また、2 亜硝酸ナトリウムと SDD の混合物についても同様に測定した。

(2) 微生物学検査のための適正試料の作製検討— 試験菌株は、秦野研究所保存の以下の 7 菌株を用い、*B. subtilis* ATCC 6633 は市販の芽胞液を用いた。

Bacillus cereus HIC 080115

Bacillus cereus HIC 080116

Bacillus cereus HIC 080117

Bacillus subtilis ATCC 6633

Bacillus subtilis HIC 080138

Bacillus megaterium HIC 080136

Bacillus sphaericus HIC 080137

対象微生物の選択培地上での反応性の確認は、各菌株を NGKG 寒天培地および MYP 寒天培地に接種し、形成した集落およびその周辺部の色調を観察した。

使用基材は、市販の白米およびマッシュポテトを用い、オートクレーブ処理を行った。なお、白米基材についてはオートクレーブ処理後の物性を確認した。基材の作製後の物性については目視ならびに滅菌スパーテルを用いた攪拌により確認した。

上記菌株をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト（SCD）寒天培地に接種し、30~35℃で 7 日間培養した。培養終了後、熱処理を繰り返して行い芽胞液とした。

(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— 特定原材料タンパク質の定量は ELISA 法（小麦タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 小麦 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦、そばタンパク質の測定にはモリナガ FASPEK そば 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II そば、落花生タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 落花生 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生、

卵タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 卵測定キット、FASTKIT エライザVer. II 卵により実施した。また、450nm/630nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定し、4パラメーターにより作成した検量線から試料中の特定原材料タンパク質の濃度を求めた。

小麦粉末、そば粉末、落花生粉末の抽出液のタンパク質濃度は 2-D Quant Kit を用いて定量した。

抽出液の電気泳動は SDS-PAGE mini を用いて行った。プロットは転写膜に Hybond-P を使用し、トランスブロット SD セル (BIO-RAD) を用いて実施した。免疫染色には卵ウエスタンブロットキット (卵白アルブミン)、卵ウエスタンブロットキット (オボムコイド)、VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit、Alkaline Phosphatase Substrate kit IV (以上 VECTOR) を使用した。

小麦、そば、落花生添加食材からの DNA 抽出は CTAB 法、シリカゲル膜タイプキット法、イオン交換樹脂タイプのキットのそれぞれで実施した。定性 PCR は植物検出用 (CP03-5', CP03-3')、小麦検出用 (Wtr01-5', Wtr10-3')、そば検出用 (FAG19-5', FAG22-3')、落花生検出用 (agg04-5', agg05-3') の各プライマー対および AmpliTaq Gold を使用し、GeneAmp PCR System 9700 により実施した。定性 PCR 増幅物の電気泳動は ultraPURE Agarose-1000、50×TAE により作製した 2% アガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid α を使用して実施した。なお、エチジウムブロミド染色は前染色により実施し、サイズマーカーには 20bp DNA Ladder、画像解析にはプリントグラフを使用した。

小麦粉末、そば粉末、落花生粉末の標準品規格による抽出および特定原材料添加食材からのタンパク質の抽出には、振とう機: RECIPRO SHAKER NR-I および Double Shaker R-30 mini および遠心機: himac CF 16RX を使用した。

そば試料は標準品規格に規定されているそ

ばを製粉会社から購入し、通知に従って混合後、超遠心粉砕機 ZM200 またはマイクロディスマンブレーター II を用いて粉砕したものを使用した。また、落花生試料についても標準品規格に従って脱脂後、分析粉砕器 R-8 またはマイクロディスマンブレーターを用いて粉砕したものを使用した。卵試料は購入した全卵を水で希釈して使用した。

添加基材には原材料の欄に添加予定の特定原材料を使用した旨の表示が無い食材を選んで購入して使用した。

精度管理試料の調製は、先の添加用基材に特定原材料を直接加え、フードプロセッサー MK-K58、または BLIXER-5Plus で均一化して調製した。

(4) 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正試料の作製検討

1) コメ加工品からの DNA 抽出には、以下のキットおよびプロトコルを使用し、GM quicker2 は、通知のプロトコルに従った。Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples は付属の手順書に記載された 2 種類のの方法、すなわち通常のプロトコルと APPENDIX A 法 (Modified Protocol for Low DNA Samples) に従った。DNeasy Plant Maxi Kit は、JAS 分析試験ハンドブックに記載されたトウモロコシからの DNA 抽出方法に従った。

2) 定性 PCR は通知に従い、陽性対照用 (SPSF および SPSR)、Cry1Ac 検出用 (AC-3F および AC-3R)、Bt コメ検出用 (Oscry1Ac-F および OsNOS-R2)、Bt コメ確認用 (actACS3F および actACS3R) の各プライマー対および、AmpliTaq Gold™ を使用し、GeneAmp PCR System 9700 により実施した。定性 PCR の増幅物は ultraPURE™ Agarose-1000、50×TAE により作製した 3% アガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid α を使用してアガロースゲル電気泳動を行った。

3) リアルタイム PCR は通知に従い、コメ陽性対照用試験はコメ陽性対照用プライマー

対 (SPSF および SPSR) およびコメ陽性対照用プローブ (SPS-Taq、FAM dye)、Bt コメ検出用試験は最終確認 Bt コメ検出用プライマー対 (T51-SF および OsNOS-R2)、63Bt コメ検出用プローブ (GM63-Taq、FAM dye) および NNBt コメ検出用プローブ (NGMr-Taq、VIC dye) を、マスターミックスには TaqMan Universal PCR Master Mix を使用して実施した。

4) 外部精度管理調査試料調製の予備検討は、以下の方法に従って実施した。

i) タイ産ビーフン2種、台湾産ビーフン2種および国産上新粉2種の計6種のコメ加工品を使用した。GM quicker2 (通知法) を用いてDNAを抽出し、陽性対照用プライマー対による定性PCRを実施した。このうち、陽性対照用プライマー対による増幅が確認できたものについて、さらに Cry1Ac 検出用、Bt コメ検出用および Bt コメ確認用プライマー対による定性PCRを行い、中国産安全性未審査遺伝子組換え米の混入および非特異的な増幅バンドの有無について確認した。

ii) i) に記載の3種類のDNA抽出キットを使用し4種類の抽出方法で、上新粉BからDNAを抽出した。

iii) 上新粉Bから Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を使用してDNAを抽出し、10ng/ μ LのコメDNA溶液を調製した。このコメDNA溶液を用いて陽性対照プラスミド溶液 (GM コメ Bt コメ陽性コントロールプラスミド、ニッポンジーン) を2倍から16000倍まで段階希釈した溶液について定性PCRをn=16で行い、陽性対照用プライマー対による増幅の確認およびCry1Ac検出用、Bt コメ検出用、Bt コメ確認用プライマー対による増幅バンドの検出下限を検討した。

iv) iii) と同様にして調製した10ng/ μ LのコメDNA溶液で、陽性対照プラスミド溶液を段階希釈した溶液についてリアルタイムPCRをn=8で行い、コメ陽性対照用試験における

1.5倍以上の増幅の確認、およびBtコメ検出用試験における63BtコメおよびNNBtコメのそれぞれについて検出下限を検討した。

v) i) で使用したコメ加工品6種類に加え、国産コメ1種類、タイ産ビーフン2種類、タイ産ライスペーパー1種類、ベトナム産ビーフン3種類、ベトナム産ライスペーパー1種類、国産中華おこげ1種類の合計15種類のコメ加工品を使用した。上新粉はそのまま、それ以外の試料はそれぞれ孔径1.0mmのスクリーンを装着した超遠心粉碎機ZM200で粉碎しコメ加工品粉砕物試料とした。

コメ加工品から、GM quicker2 (通知法) および Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) のそれぞれの方法を使用してDNAを抽出し、収量およびO.D. 260とO.D. 280の吸光度比を比較した。また、陽性対照用プライマー対による定性PCRを行い、Sucrose Phosphate Synthase (SPS) 遺伝子検出の可否を確認した。

C 研究結果

1. 尾花分担研究

外部精度管理用試料の均質性試験結果は、各農薬濃度が33.7~83.4ng/gであり、変動係数は4.1~6.1%で、全ての農薬について変動係数が10%以下であった。また、一元配置分散分析を行った結果では、カルバリルを除く農薬は有意水準0.05を上回り、均質性が確認された。

安定性試験では、農薬15種類について濃度を測定したが、アセフェートを除く14種類の農薬の残存率は96.4~107.5%で、精度管理実施中の安定性は確認された。

各農薬の外部精度管理を行った結果を以下に示す。

(1) メタミドホス: GC-MSによる回収率の平均値は74.2%、Xbar管理図は3機関で適正域を外したが、R管理図、Zスコアでは全ての機関で「良好」であった。LC-MS/MSによる回収率の平均値は70.8%、Xbar管理図は3

機関で適正域を外したが、R管理図・Zスコアでは全ての機関で「良好」であった。

(2) アセフェート： GC-MSによる回収率の平均値は89.5%で、Xbar管理図・R管理図で各々1機関が適正域を外したが、Zスコアは全機関が「良好」であった。LC-MS/MSでは回収率が80.5%、Xbar管理図で3機関が適正域を外したが、R管理図、Zスコアは全機関で「良好」であった。

(3) ジメトエード： GC-MSによる回収率の平均値は87.9%で、Xbar管理図・Zスコアは全機関が「良好」であったが、R管理図で1機関が適正域を外した。LC-MS/MSでは回収率の平均値が88.2%、Xbar管理図で1機関が適正域を外したが、R管理図、Zスコアは全機関で「良好」であった。

(4) トルクロホスメチル： GC-MSによる回収率の平均値は86.4%で、Xbar管理図・R管理図・Zスコアは全機関が「良好」であった。LC-MS/MSでは回収率の平均値が78.3%、Xbar管理図で3機関が適正域を外したが、R管理図、Zスコアは全機関で「良好」であった。

(5) マラチオン： トルクロホスメチル： GC-MSによる回収率の平均値は94.4%で、Xbar管理図・Zスコアは全機関が「良好」であったが、R管理図で1機関が適正域を外した。LC-MS/MSでは回収率の平均値が85.8%、Xbar管理図、Zスコアは全機関で「良好」であったが、R管理図は1機関で適正域を外した。

(6) イソフェンホス： GC-MSによる回収率の平均値は95.1%で、Xbar管理図・Zスコアは全機関が「良好」であったが、R管理図は1機関で適正域を外した。LC-MS/MSでは回収率の平均値が85.2%、Xbar管理図で2機関が適正域を外し、R管理図は1機関が適正域を外したが、Zスコアは全機関で「良好」であった。

(7) エトプロホス： GC-MSによる回収率の平均値は89.8%で、Xbar管理図は全機関で

「良好」であったが、R管理図は1機関で適正域を外れ、Zスコアは絶対値2以上の機関が1機関存在した。LC-MS/MSでは回収率の平均値が90.9%、Xbar管理図・R管理図は1機関が適正域を外し、Zスコアも「不良」であった。

(8) エトリムホス： GC-MSによる回収率の平均値は78.2%で、Xbar管理図は3機関で適正域を外し、R管理図は1機関で適正域を外した。Zスコアは全機関が「良好」であった。LC-MS/MSでは回収率の平均値が73.3%、Xbar管理図は3機関で適正域を外し、Zスコアは1機関が「不良」であった。R管理図は全機関で「良好」であった。

(9) ジメチルピピンホス： GC-MSによる回収率の平均値は84.5%で、Xbar管理図・Zスコアは全機関が「良好」であった。R管理図は2機関で適正域を外した。LC-MS/MSでは回収率の平均値が80.2%、Xbar管理図は1機関で適正域を外し、Zスコアも「不良」であった。R管理図は全機関で「良好」であった。

(10) エディフェンホス： GC-MSによる回収率の平均値は89.1%で、Xbar管理図・Zスコアは全機関が「良好」であった。R管理図は1機関で適正域を外した。LC-MS/MSでは回収率の平均値が80.1%、Xbar管理図・Zスコアとも全機関で「良好」であった。R管理図は1機関で適正域を外した。

(11) ピラクロホス： GC-MSによる回収率の平均値は94.1%で、Xbar管理図は2機関で適正域を外し、R管理図は1機関で適正域を外した。Zスコアは全機関が「良好」であった。LC-MS/MSでは回収率の平均値が83.7%、Xbar管理図で2機関が適正域を外し、Zスコアは1機関で「不良」であった。R管理図は全機関で「良好」であった。

(12) フェノブカルブ： GC-MSによる回収率の平均値は99.0%で、Xbar管理図・Zスコアは全機関が「良好」であったが、R管理図は1機関で適正域を外した。LC-MS/MSでは回収率の平均値が96.9%、Xbar管理図・R管理

図・Zスコアは全機関で「良好」であった。

(13) ベンダイオカルブ：フェノブカルブ：GC-MSによる回収率の平均値は91.6%で、Xbar管理図で1機関が適正域を外し、R管理図も1機関で適正域を外した。Zスコアは全機関が「良好」であった。LC-MS/MSでは回収率の平均値が85.6%、Xbar管理図・R管理図で1機関のみ適正域を外れた。Zスコアは全機関で「良好」であった。

(14) ピリミカーブ：GC-MSによる回収率の平均値は93.9%で、Xbar管理図・Zスコアは全機関で「良好」であった。R管理図は1機関で適正域を外れ、Zスコアは絶対値2以上の機関が1機関存在した。LC-MS/MSでは回収率の平均値が88.5%、Xbar管理図・R管理図・Zスコアも「良好」であった。

(15) カルバリル：GC-MSによる回収率の平均値は86.6%で、Xbar管理図は2機関で適正域を外れ、R管理図は1機関で適正域を外れた。Zスコアは全機関で「良好」であった。LC-MS/MSでは回収率の平均値が87.2%で、Xbar管理図・R管理図は1機関で適正域が外れ、Zスコアも「不良」であった。

2. 中澤分担研究

(1) LC-UV および LC/TOF-MS による CPA 測定条件の検討：LC-UV法により CPA 標準品を用いて移動相の検討を行った結果、移動相としてギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウム緩衝液を用いた場合には、CPAの保持時間は最短でも一時間以上となり、これらの緩衝液の使用は実用的ではなかった。

リン酸緩衝液ではアセトニトリル：25mMリン酸緩衝液 (pH6.0) = 7:3 において CPA の保持時間は約 12 分となり、その際、理論段数 7092 およびシンメトリー係数 0.83 と、分離状態も良好であった。

LC/TOF-MS法による検討において LC 条件を検討したところ、CPA は保持時間約 6.4 分 (保持比 2.2) に溶出されることが分かった。

(2) 試料前処理法の検討：実試料分析を想定して溶媒抽出および固相抽出による回収率

の検討を行った結果、いずれの溶媒を用いた場合でも、直接抽出法の方が珪藻土カラムを用いる方法に比べて高い回収率を示した。有機溶媒としては酢酸エチルを用いた液-液抽出 (直接抽出法) において回収率 99% を得た。抽出時の液性は、pH7 で最も高い回収率を示したことから、液-液抽出に際しては中性で行うこととした。また、逆相モードの HLB において CPA は保持されなかったが、逆相モードと陰イオン交換モードを併せ持つ MAX、および逆相モードと陽イオン交換モードを併せ持つ MCX においていずれも保持され、1%ギ酸含有酢酸エチルで溶出した際に MAX では 80%、MCX では 52% の回収率を得た。

(3) 菌体培養ろ液からの CPA の検出と同定：構築した分析法を試料に適用したところ、*Penicillium commune* の菌体と培養ろ液 11 検体中 5 検体において CPA の存在が疑われるピークが検出された。また、*Penicillium commune* には CPA を産生する株としない株があり、更に培養温度によっても CPA 産生に差が生じることが分かった。

3. 松木分担研究

残留農薬混合標準液中の残留農薬標準品の安定性については、市販農薬標準品 76 種を用いて各 10mg/L レベルの混合標準液を調製し、2mL アンプル、200 本を得、安定性試験に供したが、混合標準液中での残留農薬の安定性は保持時間が近接し一斉分析が困難なこともあることから、分離能が高く、定性分析能に優れた GC-MS を用いた。しかし、GC-MS は、イオン化の再現性が低いため、これに加え精度管理・相対定量ソフトウェアの NAGINATA を搭載した GC-MS を用いて定量性を高めた。これにより、保持時間、イオン化、装置状態を一定に保ち、内標準法で測定を行うことで、装置の日間変動を最小限に抑えることができた。このような機能を備えた GC-MS を用いて測定し、測定データについては、SPSS (Statistical Package for Social Science) を用いて繰り返しのある二元配置

の分散分析による解析を行った。

残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性については、使用した76種農薬の溶解液への溶解性の検討を3協力検査機関で分担、実施することとした。農薬の定量分析に当たってGC-MS測定では、NAGINATAを搭載し機器の変動要因を相殺して測定データの変動を抑えたが、GC測定時には、物理化学的に安定で適切な農薬を選択して測定試料の前後に挿入し、この農薬の面積の変動によりGC検査機器の日間変動を確認した。

4. 大島分担研究

(1) 理化学検査のための適正試料の作製—

鶏ささみ肉ペーストに、水分添加量が10、20、30、40%、SDDが0.1 µg/gになるように添加混合しSDD濃度を測定したが、その回収率は81.1、91.9、89.0および89.8%といずれも80%以上で、RSDは1.3、3.4、4.3および3.5%と5%以下で、ばらつきも小さかった。しかし、水分添加量30および40%は粘性が低くなるが肉の形態はとらずサンプルとしては不適切であった。

水分添加量を10%および20%として均一性を検討した結果では、F比は、水分添加量10%で14.4、20%で2.4と、10%でF値3.02より大きく、均一性が得られなかったが、20%は均一性も良く、外部精度管理調査試料として用いることが可能であることがわかった。

脂質量の異なる鶏むね、もも肉ペーストに、水分添加量が0、10および20%、SDDが0.2 µg/gになるように添加混合し、ばらつきを調べた。回収率は、むね肉で87.0、95.0、90.5%、RSDは4.0、7.4、4.4%であった。もも肉は、100.0、98.5、100.5%、RSDは4.5、4.6、3.5%であった。

水無添加および水添加のむね肉およびもも肉は、SDDの回収率はいずれも80%以上で、ばらつきも小さかった。水無添加のささみ、むね肉およびもも肉の脂質は、0.7、7.3、13.5%であった。ささみ肉は、水無添加および水添加10%では粘性があり、混合が困難で

均一になりにくい、脂質が多いむね、もも肉は水無添加でも均一になることがわかった。水無添加のむね肉およびもも肉のF比は、2.36および1.64で均一であり、調査試料の基材として用いることが可能であった。

水添加量を変えた鶏ささみ、むね、もものペースト試料(SDD無添加)について、SDD添加試料と同様に操作し、高速液体クロマトグラフで測定したところ、妨害となるピークはみられなかった。

安定性について検討した結果、20%水添加鶏ささみ肉の冷凍(-20~-24℃)保存後における安定性は、作製当日の濃度に対する86日後の濃度は98.6%で、冷蔵保存(4~8℃)で、3および7日後は96.8、108.6%であった。冷凍、解凍(冷蔵庫内で解凍)を繰り返した場合、1回解凍した濃度に対して、2および3回で103.5および103.0%であった。

防腐剤(保存料)による安定性の検討では、安息香酸とソルビン酸を用いたが、それらのピークは、SDDのピークと保持時間が近い、使用には適さないことがわかった。

(2) 微生物学検査のための適正試料の作製検討—

1) 芽胞形成菌の寒天培地上での集落形成の確認: 栄養型の*B. cereus* HIC 080115、HIC 080116、HIC 080117および*B. subtilis* ATCC 6633 芽胞型をNGKG寒天培地(3社)ならびにMYP寒天培地(1社)に接種したところ、*B. cereus*の3菌株についてはいずれの選択培地においても良好な発育が認められ、かつコロニー周辺の赤変や白い帯の形成も認められた。これに対して、*B. subtilis*ではNGKG寒天培地において24時間培養では3社ともほとんど発育しなかったが、MYP寒天培地では良好な発育が認められたものの、典型集落の形成はなかった。

しかしながら、48時間の培養によりいずれの培地においても擬陽性と判定できる集落の形成を認めた。

2) セレウス菌検査に用いる基材の選定:

初めに、米:水の比率を1:0.8から1:1.4まで変え、これらをオートクレーブ処理した後の性状について確認した。その結果、1:1.2以上の水分比のときにオートクレーブ直後の形状は通常の米飯と同等となったが、これを1日室温にて放置することにより、全体が固まってしまい、これに菌液を添加しても攪拌が全く行えない状況となった。そのため、これまでに外部精度管理調査試料として使用実績のあるマッシュポテトに菌液を接種したときの、菌数変化について確認することとした。その結果、芽胞液調製7日後の菌数が明らかに減少している菌株が認められた。芽胞を形成しなかった *B. cereus* HIC 080116 を除いた2菌株および *B. subtilis* をマッシュポテトに接種したところ、接種7日目以降の生残菌数が約 $10^2 \sim 3$ cfu/g であり、ほぼこの菌数で接種後57日目まで推移した。さらに、陰性対照として使用した *B. subtilis* は選択培地上において赤色の帯がE社では48時間の培養によって、A社では24時間の培養によっても観察された。

3) 標準菌株の再検討: 初めに陰性対照菌について同定を行い、さらにNGKG寒天培地上での発育を確認した。その結果、栄養型の *B. sphaericus* HIC 080137 では陰性集落(赤色または黄色の集落で周辺部に白い帯なし)の発育が認められたが、*B. megaterium* HIC 080136 では選択培地上に集落形成が全く認められなかった。また、*B. sphaericus* は簡易同定キットのAPI CHBおよびAPI 20Eにおいてもほとんど陽性反応を示さなかったことから、仮に集落を検出したとしても同定を行うことは困難であると考えられた。一方、芽胞の作製方法について文献検索を行ったところ、芽胞形成

率を高めるために硫酸マンガンを添加した普通寒天培地あるいは土壌エキス寒天培地を用い、35°Cで3~10日間培養した後、65°Cまたは70°Cで15~30分間熱処理を行なうなど、いくつかの手法があった。

(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) 粉砕方法とタンパク質抽出率の関連性の検討: 昨年調製した粉末検体を更に機械的に粉砕してタンパク質量を比較した結果、そばでは、1mmのスクリーンを使用して超遠心粉砕機で粉砕した粉末からのタンパク質の抽出率が52.6%だったのに対し、マイクロディスマンプレートにより粉砕した粉末では90.9%と抽出率が大きく改善した。しかし、落花生、小麦では若干の改善に留まった。

2) そば試料作製の検討: モリナガ FASPEK そば測定キットの回収率はマイクロディスマンプレートで100%前後、0.2mmのスクリーンを使用して粉砕したもので約90%と、マイクロディスマンプレートで粉砕したそば粉末の回収率が0.2mmのスクリーンよりも高かった。FASTKIT エライザ Ver. II そばでも回収率はかなり高めであったが、マイクロディスマンプレートで粉砕したそば粉末のほうが0.2mmのスクリーンのものより回収率が高かった。

3) 落花生試料作製の検討: モリナガ FASPEK 落花生測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生とも回収率はマイクロディスマンプレートで粉砕した落花生粉末とケミカル粉砕器で粉砕した落花生粉末でほとんど差がなかった。

4) 小麦試料作製の検討

i) 小麦抽出液作製の検討: 2種の全粒粉について標準品規格による抽出液のタンパク質濃度を2-D Quant Kitで測定した結果、Naturart 薄力粉が標準品規格(4.0~6.0mg/mL)に適合し、モリナガ FASPEK 小麦測定キットとFASTKIT エライザ Ver. II 小麦の測定値の差も小さかった。

ii) 食材への原材料添加による添加回収および安定性試験： 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ハンバーグ、カボチャペーストでそれぞれモリナガ FASPEK 小麦測定キットが 171.8%、1676%、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で 138.8%、153.6%と回収率は高いものの、昨年検討したハルユタカと比べキット間の測定値の乖離が少なくなった。調製試料は-20°Cで保存し、4および10週後も保存前と同様に測定し、保存後の測定値を保存前の測定値で除して安定性を検討した結果では、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦 はいずれも 85%以上、モリナガ FASPEK 小麦 測定キットでも 77%以上であった。

5) そば、落花生、小麦添加試料の定性検査法の検討： DNA 収量は添加基材で比較した場合、ハンバーグ、カボチャペースト、あずきあんの順に、抽出法で比較した場合は Genomic-Tip 20/G、DNeasy Plant Mini kit、CTAB 法の順に多かった。基材のみから抽出した DNA 試料について植物プライマーによる PCR を実施した結果、ハンバーグの DNeasy Plant Mini kit による抽出液で予定長の増幅物が確認できないものがあったが、これ以外はすべて検出され、今回用いた基材には元々植物成分が含まれていることが分かった。確認のため実施した小麦、落花生、そばのプライマーを用いた PCR で予定長の増幅物が確認された基材は無かった。小麦を添加した試料では、カボチャペーストの CTAB 法の抽出液で、植物、小麦プライマーとも増幅物を確認できないものもあったが、カボチャペーストの CTAB 法以外による抽出液、およびハンバーグの全抽出液で、植物、小麦プライマーによる予定長の増幅物を確認できた。落花生を添加した試料では、あずきあんの CTAB 法による抽出液で、落花生プライマーによる増幅物を確認できなかったが、これ以外はあずきあん、かぼちゃペーストとも植物、落花生プライマーによる予定長の増幅物を確認できた。そばを

添加した試料では、カボチャペーストの DNeasy Plant Mini kit および CTAB 法による抽出液で、植物プライマーまたはそばプライマーによる予定長の増幅物を確認できないもの、あずきあんの CTAB 法の抽出液で、植物プライマーによる予定長の増幅物を確認できないものがあった。

6) 卵試料作製の検討： 調製した試料を 10 個に分割し、それぞれから n=2 でサンプリングして得た抽出液の卵タンパク質をモリナガ FASPEK 卵 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II 卵 で測定した。両キットの測定結果についてそれぞれ、一元配置による分散分析を行った結果、カボチャペースト、ハンバーグのいずれも均一と判定された。また、この試料を-20°Cで18週間保存後の測定結果を保存前の測定値と比較したが、良好な安定性を示した。さらに、18週間保存後の試料についてウエスタンプロットによる確認試験を実施した結果、ELISA キットの検体抽出液では抽出液に含まれる Bovine Serum Albumin (BSA) のバンドが余分に検出されているが、どちらの抽出法でも卵白アルブミン、オボムコイドのバンドを全抽出液について検出できた。

(4) 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正試料の作製検討

1) 外部精度管理調査

i) 外部精度管理調査に使用するコメ加工品の検討： 原材料表示にコメを使用した旨の記載があるコメ加工品 6 種類 (タイ産ビーフン 2 種、台湾産ビーフン 2 種および上新粉 2 種) からの DNA 収量を調べるため、GM quicker2 (通知法) を使用して DNA を抽出した。収量には大きな差があり、タイ産ビーフン A は 2.4 μ g、タイ産ビーフン B は 0.1 μ g、台湾産ビーフン A は 0.6 μ g、台湾産ビーフン B は 0.4 μ g、上新粉 A は 2.8 μ g、上新粉 B は 3.4 μ g であった。

定性 PCR の結果、台湾産ビーフン B 以外の DNA は SPS 遺伝子の増幅バンドが検出でき

た。

上新粉AはBt コメ検出用、Bt コメ確認用プライマー対によるPCRで非特異的な増幅バンドが見られ、特にBt コメ確認用プライマー対では目的の遺伝子と紛らわしい易動度であった。タイ産ビーフンAと上新粉Bにおいても非特異的な増幅バンドが見られたが、いずれも目的遺伝子の増幅バンドとは易動度が異なっていた。

ii) コメ加工品からのDNA抽出方法の検討:

上新粉BからDNAをGM quicker2(通知法)、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples(通常のプロトコールとAPPENDIX A法)、およびDNeasy Plant Maxi Kitの、3種類のDNA抽出キットの計4種類の方法で抽出した結果からGenomic DNA Extraction Kit for Food Samples(APPENDIX A法)による抽出DNAはGM quicker2(通知法)で抽出したDNAと、質および精製度が同等であると判断し、DNA溶液試料を調製するためのコメDNAの抽出にはGenomic DNA Extraction Kit for Food Samples(APPENDIX A法)を使用することとした。

iii) 定性PCR、リアルタイムPCRの検出下限:

定性PCRでは、Cry1Ac検出用、Bt コメ検出用およびBt コメ確認用の各プライマー対を用いて16並行で行ったPCR反応が全て陽性となる1反応あたりの陽性対照プラスミドのコピー数を検討した。Cry1Ac検出用プライマー対では、5コピーのDNA溶液は全ての反応で増幅バンドが認められたが、2.5コピーでは2反応で確認できなかった。Bt コメ検出用プライマー対では、165コピーのDNA溶液は全ての反応で増幅バンドが認められたが、80コピーでは3反応で確認できなかった。Bt コメ確認用プライマー対では、5コピーのDNA溶液は全ての反応で増幅バンドが認められたが、2.5コピーでは5反応で確認できなかった。この結果、Cry1Ac検出用プライマー対は5コピー、Bt コメ検出用プライマー対は165コピー、およびBt コメ確認用プライマー対

は5コピーが、検出下限と考えられた。

以上の結果から、全てのプライマー対による増幅バンドが期待できる170コピーを高濃度定性PCR用DNA溶液試料、Cry1Ac検出用とBt コメ確認用の2種類のプライマー対による増幅バンドが期待できる8.5コピーを低濃度定性PCR用DNA溶液試料とした。

リアルタイムPCRについては、Bt コメ検出用試験のDuplex PCRを16並行で行い、結果について63Bt コメ検出用とNNBt コメ検出用のそれぞれのプローブについてマルチコンポーネント解析し、全ての反応で1.5倍以上の増幅が確認できるコピー数を検討した。63Bt コメ検出用プローブは、750コピーのDNA溶液では全ての反応で1.5倍以上の増幅が見られたが、336コピーのDNA溶液では5反応が1.5倍未満だった。NNBt コメ検出用プローブでは、80コピーのDNA溶液では全ての反応で1.5倍以上の増幅が見られたが、40コピーのDNA溶液では2反応が1.5倍未満だった。この結果、63Bt コメ検出用プローブは750コピー、NNBt コメ検出用プローブは80コピーが、検出下限と考えられた。

iv) 外部精度管理調査の結果: 高濃度定性PCR用DNA溶液試料は、参加した33機関全てでBt コメ陽性試料と判定された。プライマー対ごとでは、Cry1Ac検出用およびBt コメ確認用の1測定を除き、いずれのプライマー対によるPCRでも全て予定長の増幅バンドが確認された。

低濃度定性PCR用DNA溶液試料についても、参加した33機関全てでBt コメ陽性試料と判定された。プライマー対ごとでは、Bt コメ確認用プライマー対によるPCRで予定長の増幅バンドが検出されたのは、66反応中62反応であったが、2反応とも増幅バンドが確認できなかった機関はなかった。Bt コメ検出用プライマー対で予定長の増幅バンドが見られたのは、66反応中18反応のみであった。Cry1Ac検出用プライマー対によるPCRでは、いずれも全て予定長の増幅バンドが認めら

れた。

高濃度リアルタイムPCR用DNA溶液試料は、参加した33機関全てでBt コメ陽性と判定された。プローブ別でも、63Bt コメ検出用およびNNBt コメ検出用のプローブのいずれも原液と1/2濃度全てで、1.5倍以上の増幅が確認された。

低濃度リアルタイムPCR用DNA溶液試料も、33機関全てでBt コメ陽性と判定された。プローブごとでは、63Bt コメ検出用プローブでは、原液では66反応中3反応で、1/2濃度では4反応で1.5倍未満であった。しかし原液と1/2濃度の計4反応の全てを1.5倍未満と報告した機関はなかった。一方、NNBt コメ検出用プローブでは、原液、1/2濃度のいずれも66反応全てで1.5倍以上の増幅が確認された。

2) コメ加工品からのDNA抽出方法の検討

i) DNA収量：15種類のコメ加工品からのDNA収量を平均するとGM quicker2 (通知法) は4.03 μ g、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A法) は5.23 μ gであり、ほとんど違いはなかったが、コメ加工品ごとにDNA収量を比較すると、大きく異なることが分かった。

GM quicker2 (通知法) で抽出したDNA溶液の濃度は、PCRに用いる濃度の10ng/ μ L未満のものもあったが、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A法) は、15種類全てで10ng/ μ L以上の濃度が確保できた。コメ加工品ごとにDNA収量を比較すると、タイ産ビーフンA、タイ産ビーフンC、タイ産ビーフンD、ベトナム産ビーフンBおよび中華おこげの5種類はGM quicker2 (通知法) を使用すると、より高収量であった。その他の10種類はGenomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A法) を使用すると、より高収量であった。特に、ライスペーパーからのDNA収量はGM quicker2 (通知法) よりもかなり多かった。

ii) 陽性対照プライマー対による定性PCR：

台湾産ビーフンBはGM quicker2 (通知法)、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A法) の抽出液ともにSPS遺伝子は検出できなかった。台湾産ビーフンBのDNA収量は、いずれの抽出法でも少なかったが、原材料表示から、米、コーンスターチ、小麦粉、乳化剤、増粘剤としてのCMCを含んでおり、添加物の種類が今回検討した15種類の中では最も多いことが明らかになった。

ベトナム産ライスペーパーも、いずれの抽出法を用いた場合もSPS遺伝子が検出できなかった。しかしGenomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A法) ではDNA収量は低い一方、PCR反応に十分なDNA濃度が得られたが、SPS遺伝子は不検出であった。この他の試料は、いずれのキットを使用して抽出したDNAを用いても、SPS遺伝子が検出できた。

D. 考察

1. 尾花分担研究

加工食品中の農薬の分析法では、脱脂操作が重要な手順の一つと考えられる。GC-MS測定では、スキャン測定の結果、精製不足が原因であると思われるターメリック類やオイゲノールの強度の非常に強いピークが確認されている。LC-MS/MS測定では、注入する最終溶液を含水状態にすると、測定結果の変動が大きくなるのが複数あり、含水状態となったために水に不溶な成分が析出し、農薬を吸着しているのではないかと考えられた。

外部精度管理用試料の調製においては、均質性の確保からレトルトカレーを選じたが、輸送にあたって冷凍した際に解凍後の油脂成分と水分の融点の違いから、油脂の固化による均質性の喪失が問題で、脂溶性の高い農薬の均一性が保てないことが判明した。その結果、回収率が70%に満たない農薬もあった。しかし、カルバリルは均一性を示さなかったものの、その他は回収率が良好なため試料全

体としては均一性であると判断した。

内部精度管理試験と外部精度管理試験を比較すると、回収率が100%から離れるにつれて変動係数が大きくなる傾向が見られる。実施した7機関ではGC-MSとLC-MS/MSに大きな差は認められていない。また、いずれの方法でも回収率が100%付近に分布している傾向が見られている。各農薬中でジメチルピロホスホスは特に点が中央の斜線付近に集中しており、GC-MSとLC-MS/MSの測定値が一致しやすい、定量値に影響の出にくい農薬であったことが示された。

今回の結果から、GCシステムはマトリックスが注入されることによって安定化し、その後耐久性が持続する範囲で性能を維持し、やがて性能が低下することが示唆された。また、LC-MS/MSで測定しているマトリックス濃度は機関によって異なるが、今回の結果では機関間のマトリックス効果の共通性は見出せなかった。これは、分析法が全機関で同じではなく、またLCの移動相条件も共通でなかったため、マトリックスの状態にも差が生じたと考えられた。

2. 中澤分担研究

LC-UV法によりCPA標準品を用いて移動相の検討を行った。LCカラムは、特性として逆相モードと陰イオン交換モードを併せ持つことから、移動相中の有機溶媒としてアセトニトリルを、他方、カウンターイオンとしてギ酸、酢酸またはリン酸を用いてCPAの溶出挙動を検討したが、ギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウム緩衝液を用いた場合は、これらの緩衝液の使用は実用的ではない。しかし、リン酸緩衝液ではアセトニトリル:25mMリン酸緩衝液(pH6.0)=7:3においてCPAの保持時間は短縮され、分離状態も良好となっている。一方、LC/TOF-MSでは、LC-UVで用いた条件下ではMSへの適用は困難であり、MSを検出手段として用いる際には、LCカラムとしてAcclaim Mixed-Mode WAX-1と同様に逆相モードと陰イオン交換モードの特性を併せ持

つ、保持力の弱いDual ODS-AX10を用い方が良いと思われる。MSの測定条件として、CPA標準品のイオン化について検討しているが、エレクトロスプレーイオン化法を用いた場合、ネガティブイオンモードでもポジティブイオンモードでも検出は可能であったが、ネガティブイオンモードの方が、より高感度に検出されることが分かった。

試料の前処理方法として、溶媒抽出では酢酸エチル、ジエチルエーテル、クロロホルム等の有機溶媒を検討し、また液-液抽出法としても直接抽出する方法と、珪藻土カラムを用いる方法で検討したが、直接抽出法の方が高い回収率を示す結果となっている。有機溶媒としては、酢酸エチルを用いた液-液抽出(直接抽出法)において高回収率を得ており、CPAは酸性物質であることから、抽出時の液性を考慮したが、pH7.0で最も高い回収率を示していた。

逆相モードのHLBにおいてCPAは保持されなかったが、逆相モードと陰イオン交換モードを併せ持つMAX、および逆相モードと陽イオン交換モードを併せ持つMCXの有用性が考えられる。したがって、実試料の抽出・クリーンアップに際して、溶媒抽出および固相抽出(MAXとMCX)を併用することで、効果的なクリーンアップができると考えられた。

構築した分析法を試料に適用し、*Penicillium commune*の菌体と培養ろ液11検体中5検体においてCPAの存在が疑われるピークが検出されており、LC/TOF-MSによってCPAと合致する精密質量が得られていることから、更にCPA産生条件等も検討することでより正確な試験法が期待できると考える。

3. 松木分担研究

当初、神奈川県の実地検査に係る検査実施標準作業書に採用されている農薬84種を対象に、混合標準液中での安定性の検討を進めることを想定したが、これらの対象農薬には、化学物質審査規制法における第1種特定化学物質の8化合物(*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、アル

ドリ、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロル-*exo*-エポキシド、ヘプタクロル-*endo*-エポキシド)が含まれており、これらの農薬は、国内での製造許可等の取得には多大な時間を要することから試験実施が困難と考えられ、今回は、これら8種の農薬成分を除いた76種を混合組成に設定した。混合液に用いる76種は、ポジティブリスト制度における一斉試験法に該当する農薬成分であり、既に各試薬メーカーから一部については混合標準液として販売されている成分であることから、各農薬原体の安定性については、メーカーで保証された範囲内で確保されていると考えて取り扱うこととした。また、これらの農薬原料の純度は、残留農薬分析用の純度基準から外れ、かなり純度の低い農薬も含まれることから(純度98%以下:18種)、各試薬メーカーが提供している検査成績書に記載されている純度保証値に基づいて純度を補正し、農薬ごとに、実際の対象農薬の含有量が計算上、10mg/Lの濃度になるよう調製し、濃度の均質化を図った。

76種の農薬を一斉に分析する場合、保持時間が近接する76種の農薬をGC-FID等の個別検出器を用いての一斉分析は困難であることから、分離能が高く、定性分析能に優れたGC-MSを用いる必要がある。しかし、GC-MSは、イオン化の再現性が低いため、安定同位体のような適正な内部標準等の物質を使用しない場合には、定量における正確性には欠けることが指摘されている

今回、調査対象とした農薬76種は、一斉分析法に用いられる農薬ではあるが、必要に応じて検査機関ではこれらの農薬についての個別分析法での検査も実施されている。また、各検査機関においては、通常、分析者各自で、農薬原体を用いて標準液の調製を行っており、その手法としては、一旦、高濃度の各農薬の標準原液を作製し、各定量に際して、用事調製により低濃度の標準液を作製する、というような手順が一般的である。したがって、溶

解性試験においては、特に、農薬原体の高濃度標準原液作製時の溶解性に着目して調べる必要があった。日間変動の相対標準変動(2~3%を想定)を基準として、高濃度標準液の溶解性について解析、評価を行うことも必要である。

4. 大島分担研究

(1) 理化学検査のための適正試料の作製:

鳥ささみ肉ペーストに水分を添加して作製した試料では、水無添加の試料に比べて安定した回収率や均一性に優れた試料であった。特に安定性については、20%含水試料で-20~24℃で保存すると86日後でも98.6%の濃度が回収されておりクロマトグラム上でもSDDに対する妨害ピークは認められていない。また、防腐剤の効果についての検討では、SDDは亜硝酸ナトリウムによりジアゾ化されると考えられる。また鶏肉中には、アミノ酸をはじめ亜硝酸ナトリウムと反応する物質が種々存在し、SDDがどのような物質に分解されているかについては、食品の安全、衛生上、今後検討する必要がある。したがって、現状では亜硝酸ナトリウムを保存料として使用することが難しいと思われる。

(2) 微生物学検査のための適正試料の作製:

セレウス菌検査では最終的にNGKG寒天培地またはMYP寒天培地上に形成される集落の形状を確認することにより、その判定が行われるが、時折、得られた集落について結果をどう判断するか苦慮することがある。そのため、外部精度管理調査を行ううえでは、陽性対照、陰性対照のいずれにおいても、選択培地上で明らかに鑑別できる菌種を採用する必要がある。そこで、*B. cereus* 3菌株、陰性対照の*B. subtilis* 1菌株について、選択培地上での集落形成を観察したところ、*B. cereus*については、いずれの3菌株ともNGKG寒天培地およびMYP寒天培地のいずれにおいても典型集落が観察された。また、メーカーごとに判定のしやすさ等に差が認められた。しかし、これらの芽胞液を作製したところ、

作製後1週間の時点で菌数の減少が認められた。このことは、使用した菌株の芽胞形成能が低いか、あるいは作製した芽胞液中に一部栄養型(65°Cでの熱処理によっても死滅しない)が残存している可能性が考えられた。そのため、芽胞液として高頻度にかつ高い濃度で回収するためには、その作製方法について検討する必要があることが示唆された。

一方、陰性対照では、これまでの調査試料には選択培地上に陰性集落を形成するものを採用してきた。しかしながら、今回の *B. subtilis* では NGKG 寒天培地上に集落形成が認められないか、あるいは認められた場合でも菌株によっては擬陽性を示すことがあった。このことは、陰性対照の設定方法を再考する必要があることを示している。すなわち、陰性対照菌が選択培地上では発育しないものの、他の一般栄養培地(普通寒天培地等)に接種することにより発育するものである。これにより、検査担当者は調査試料中に菌が添加されていないのではなく、発育しない菌種であると判断することができる。今回の検討においてもいくつかの陰性対照菌種を設定し、選択培地上での発育確認を行ったが、発育を認めない菌種もあった。このことから、セレウス菌検査における陰性対照について選択培地上での陰性集落形成を指標とすることは、使用候補菌種の選別において大きな障壁となる可能性もあることから、現状では選択培地上で明らかに陰性と判断されることを優先して選定する必要があると考えられた。

またこれと並行して、調査試料用基材の選定を行うため、白米を候補として使用した。現在、外部精度管理調査試料として用いている基材は、全て事前にオートクレーブ処理を行い、添加菌以外の菌種の影響を排除することとしている。そのため、オートクレーブ処理後の物性変化ならびその後の基材としての安定性は外部精度管理調査を行ううえで非常に重要な要因となる。そこで、白米に水を添加し、これについてオートクレーブ処理を行

ったところ、処理当日についてはある程度の柔らかさが確保されていたにも関わらず、翌日にはすでに全体が固まり、菌液を添加しても混合することができない状況であった。そのため、白米を外部精度管理調査試料用基材として採用することは非常に難しいものと判断した。今後は芽胞の作製方法を検討するとともに、栄養型菌をマッシュポテト等に添加することによって安定な調査試料を作製することができるか否かについて確認する必要があるものと考えられた。

(3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製:

1) 粉碎方法とタンパク質抽出率の関連性の検討: 小麦、そばについては、昨年度使用した粉末をマイクロディスメンブレーターIIでさらに細かく粉碎したものを、落花生試料については標準品規格の落花生粉を分析粉碎机R-8で粉碎したものを、およびこれをマイクロディスメンブレーターIIでさらに細かく粉碎したもののそれぞれを作製し、標準品規格によって抽出し、抽出液のタンパク質量をケルダール法のタンパク質量と比較した。その結果では、抽出率が大きく改善していたが、落花生、小麦では若干の改善に留まった。

2) そば試料作製の検討: 標準品規格に従って調製した自家製そば一次標準粉末をさらに0.2mmのスクリーンを使用して超遠心粉碎机で粉碎したものとおよびこれをさらにマイクロディスメンブレーターで粉碎したものを1% CMC 溶液に懸濁し、あずきあんおよびカボチャペーストに加えてそば粉添加試料を作製した。そばの添加量はマイクロディスメンブレーターにより粉碎したそば粉末を標準品規格により抽出した抽出液のタンパク質量を基準とした。本年度の検討では安定性はいずれのキットでも100前後で、細かく粉碎したそば粉末を使用したことにより、より安定性の高い試料が作製できたものと考えられた。

3) 落花生試料作製の検討: 標準品規格に従って調製した自家製落花生一次標準粉末を