

200939022A

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21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 齊 藤 貢 一

社団法人 日本食品衛生協会 村 山 三 徳

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22年(2010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21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 齊 藤 貢 一

社団法人 日本食品衛生協会 村 山 三 徳

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22年(2010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	21
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	93
の検討と精度管理体制の構築に関する研究	
斉藤 貢一	
3. 残留農薬・動物用医薬品などの試験に係る標準品の	101
品質評価と精度管理体制の構築に関する研究	
村山 三徳	
4. 食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料の	115
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	189
IV. 研究成果の刊行物	193

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 21 年度 総括研究報告書

主任研究者 小島 幸一

平成 22 年（2010 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 21 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、理化学検査、組換え DNA 技術応用食品検査、アレルギー物質検査など様々な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。そのため検査機関における検査結果の信頼性を確保することは、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。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、食品の安全・安心の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 2 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（斉藤分担研究）、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（村山分担研究）、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。

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）、斉藤貢一（星薬科大学准教授）、村山三徳（（社）日本食品衛生協会食品衛生研究所化学試験部第一課長）、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

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・確認して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。精度管理体制の充実を図ることは極めて重要であり、加えて農薬のポジティブリスト制も導入されたことに伴い、一層の体制強化が求められてきている。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、十分とは言えず、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、アレルギー物質も食品衛生法の一部改正により5品目から7品目（えび、かにが追加）となり、精度管理調査もさらに充実を図る必要がある。これらに加え食品中に含まれる微量危害物質（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。しかし、使用する標準品の純度によっては測定値が大きな影響を受ける可能性も否めない。そのため市販の農薬や動物用医薬品について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。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、アレルギー物質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。「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）により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およ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. 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）

調査試料は調製段階で流動性があり、調理後は流動性が失われるパンケーキを食品試料に使用した。外部精度管理試料の調製方法を検証後、パンケーキに10種類の農薬を添加したものを外部精度管理試料とし、無添加のパンケーキを対照用試料とした。添加試料と無添加試料を組み合わせたものを不均一試料とし、サンプリング試験に用いた。測定機器はGC-MSおよびLC-MS/MSを使用した。なお、参加実施機関9機関（8協力機関）で本試験を実施した。

加工食品中の農薬分析法は、例示分析法で行い、フードプロセッサーで均一化した試料を遠心分離し、上清を濃縮留去した。アセトニトリル層はGCB/PSA固相カラムに負荷し、残ったヘキサン層に再びヘキサン飽和アセトニトリルを加え、アセトニトリル層を同じGCB/PSA固相カラムに負荷した。固相カラムからの通過液は40℃以下で減圧濃縮後、アセトンに溶解してGC用試験液とした。このうち0.25 mLを窒素気流下で乾固し、25%メタノールで1 mL（試料相当0.25 g/mL）に溶解したものをLC-MS/MS用試験液とした。

農薬標準品はエスプロカルブ、クロルピリホス、ジエトフェンカルブ、ブプロフェジン、クレソキシムメチル、テブフェンピラド、フェナリモル、ピテルタノール、イミダクロプリド、テブフェノジドの10種類を選択して添加した。また、GCシステム評価試料として、NAGINATAクライテリアサンプル Mix（シマジン、ペンタクロロフェノール、クロルピリホスメチル、フェニトロチオン、2,4-ジニトロ

アニリン、クロルピリホス、イソキサチオン、カプタホール、その他アルカン類等合計 51 種類含有ジクロロメタン溶液) を使用した。

外部精度管理試料はブランク試料と同様に調製し、攪拌機でパンケーキ生地を攪拌する際に農薬を添加した。

不均一試料は外部精度管理試料より 4 倍濃い濃度で調製したパンケーキ 1 個と、無添加パンケーキ 3 個を一組とし、ジップロック袋に密封した。

試験方法は、分析機器の再現性試験として、標準品を各機関の分析法で GC-MS および LC-MS/MS を用いて 5 回測定した。ひとつのデータのピーク面積を 100 とし、残りをその比で示し、各農薬の平均と変動係数および Z スコアを求めた。

ブランク試料の抽出液を用いて上記と同濃度のマトリックス標準液を調製し、同様に 5 回測定した。ひとつのデータのピーク面積を 100 とし、残りをその比で示し、各農薬の平均と変動係数および Z スコアを求めた。

外部精度管理試験は、外部精度管理試料を並行数 5 で GC-MS および LC-MS/MS で測定し、測定値、平均回収率とその変動係数および Z スコアを求めた。

サンプリング試験は、不均一試料を粉碎均一化し、並行数 5 で GC-MS および LC-MS/MS で測定した。測定値、平均回収率とその変動係数および Z スコアを求めた。

GC システム評価試料測定は、GC-MS を用いて、標準品や一連の加工食品試料を測定する前と後に NAGINATA クライテリアサンプル Mix をスキャンモードで測定し、シマジン (m/z 201)、ペンタクロロフェノール (266)、クロルピリホスメチル (286)、フェニトロチオン (277)、2, 4-ジニトロアニリン (183)、クロルピリホス (314)、イソキサチオン (105)、カプタホール (79) の各マスクロマトグラム上のピーク面積、高さの変化を比で求めた。

マトリックス効果調査は、再現性試験で行ったマトリックス標準液の平均ピーク面積を、

標準液の平均ピーク面積で除し百分率で求めた。

評価方法は、各機関から報告された値について、基本統計量と Z スコアの算出を行い、外部精度管理試験においては Xbar-R 管理図の作成を行った。

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 (斉藤分担研究)

LC-UV・PDA による測定法は、LC 装置として HITACHI L-6300 ポンプおよび JASCO MD-910 多波長検出器、分析用カラムは DIONEX 社製 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 を用い、移動相に アセトニトリル : 25mM リン酸緩衝液 (pH6.0) = (7:3) を用いた。

試料は液状調味料 (めんつゆ) を用い、試料の調製法としては、シクロピアゾン酸 (CPA) 産生菌として *Penicillium commune* (NRBC5363, 6327, 7224, 7746) および液状調味料から分離した菌株 (K-18) を用いた。めんつゆに菌を接種して培養後、自然ろ過によって菌を分離し、ろ液をそのまま測定用試料とした。菌体はメタノールで抽出後、遠心分離しメタノール抽出液とした。その後、減圧濃縮により溶媒留去したものを測定用試料とした。

CPA に対するウサギポリクローナル抗体の作製は、CPA と活性化 KLH とを反応させて CPA ポリクローナル抗体作製用の抗原 (CPA-KLH) を調製し、ウサギに Freund's Complete Adjuvant や Freund's Incomplete Adjuvant と等量混和したエマルジョンを数回投与した。抗体価の上昇を ELISA にて確認し、抗 CPA 抗体として血清を得た。

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 (村山分担研究)

残留農薬混合標準液中での残留農薬標準品の安定性は、76 種の農薬標準品について各

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〔アセトン/ヘキサン（1：1 v/v）（以下AH）に溶解〕になるように濃度を調製した。

混合標準液中での残留農薬の安定性は、上記で調製した76種の残留農薬混合標準液を用いた。また、溶媒は、AHで混合して用いた。

試験法は、絶対濃度として10mg/L（AHに溶解）に調製した混合標準溶液を、-20℃、4℃、40℃および60℃の各保存温度で3ヶ月、6ヶ月および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・評価方法は、GC/MSはNAGINATAクライテリアサンプルMixにより、装置状態を一定水準に保った。また、各農薬は保存期間および保存温度の設定条件毎に試料数をn=5として面積値を測定した。

残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性は、溶媒としてアセトニトリル/ヘキサン（1：1 V/V）混合液を用いたが、アセトニトリルおよびヘキサンは残留農薬分析用を使用した。

試験法は、残留農薬標準品原体10mgを精密にメスフラスコ（10mL）に秤量し、AHに溶解後、定容（1000μg/mL相当）し、農薬標準原液を作製した。農薬標準原液を遠心分離後、溶液をスクリーキャップ付きスピッツ管に移し、遮光して4℃および-20℃下で1ヶ月、3ヶ月間、冷蔵庫又は冷凍庫に保管した。

低濃度農薬標準液調製（基準液）は、初期調製時に残留農薬標準品原体10mgをメスフラスコ（1000mL）に精密に秤量後、AHで溶解し、得られた希釈農薬標準液をGC測定に供した。

GC/MS測定による繰り返し測定における精度の確認は、安定性が高い農薬を用いて、10μg/mLレベルのAH溶解液を調製して測定（n=5）を行い、室内精度を求めた。

GCによる農薬標準原液の溶解レベルについての確認は、調製初期に作製した農薬標準原液については、スピッツ管へ採取した

0.5mL溶液をろ過後、4℃および-20℃で保存した。各農薬標準原液の測定時（1ヶ月、3ヶ月）ごとにスピッツ管を室温状態に戻して標準原液の一部をそれぞれ採取後、ろ過してAHで100倍に希釈し、測定用試料とした。この測定用試料をGC測定（n=3）に供した。

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は、それぞれ、採取後、速やかに4℃および-20℃の保管庫へ戻し保管を継続した。

溶解性の評価は、農薬標準原液の調製直後、4℃および-20℃保存後の農薬標準原液について、遠心分離後またはフィルターろ過後に、結晶等の析出物等の有無を目視で確認した。

試験開始時に調製した農薬標準原液および各保存時期の農薬標準原液のそれぞれから採取した一定量を100倍希釈して得られた各測定用希釈標準液（10μg/mLレベル）と調製初期に直接AHにより1000倍希釈して得られた低濃度調製溶液とのGC測定結果（n=3）の比較を行った。また、評価は、調製初期の測定値（ピーク面積）と各保存時期における保存液（4℃、-20℃）のそれぞれの測定値（ピーク面積）の差の比較により溶解性の良否の状態を評価した。

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）

（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試料基材および試薬は、市販の鶏肉（むねおよびもも肉）および豚肉（ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉）を用い、標準品としてはスルファジミジン（SDD）、スルファジアジン、スルファメラジン、スルファメトキシピリダジン、スルファモノメトキシ、スルファクロル

ピリダジン、スルファメトキサゾール、スルファジメトキシシンおよびスルファキノキサリン、スルフィソキサゾールを用いた。

試薬は、メタノール、アセトニトリルおよび蒸留水については高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用を、*n*-ヘキサン、無水硫酸ナトリウムおよびリン酸一ナトリウム二水塩は試薬特級を用い、HPLC 用のカラムは、固相抽出カラム (Sep-Pak® アルミナ N カートリッジ) を用いた。

残留動物用医薬品試料調製は、ミンチ肉の作製に BLIXER-5Plus とロボ・クープミキサー R-23 (以下ミキサー) を用い、試料抽出にはオムニミキサーを、また測定は HPLC を用いた。

BLIXER-5Plus を用いて各部位のミンチ肉をペーストにすると同時に SDD またはサルファ剤混合液 (メタノール溶液) を添加して混合後、約 80 g ずつ分注して冷凍 (-24°C ~ -20°C) し試料とした。また、同量の基材に同割合のメタノールを添加して、ブランク試料を作製した。

残留動物用医薬品の試験方法は、「食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編 (2003)」に準じた。

着色料の基材は、漬物 (大根漬け) とし、12 色素添加用には甘口たくあん、べったらおよび紀の郷を用い、選択色素添加用としては甘口たくあんを用いた。

着色料の標準品は、食用赤色 2 号 (R2)、食用赤色 3 号 (R3)、食用赤色 40 号 (R40)、食用赤色 102 号 (R102)、食用赤色 104 号 (R104)、食用赤色 105 号 (R105)、食用赤色 106 号 (R106)、食用青色 1 号 (B1)、食用青色 2 号 (B2)、食用黄色 4 号 (Y4)、食用黄色 5 号 (Y5) および食用緑色 3 号 (G3)

を用いた。

着色料の試料調製のための試薬は、日本薬局方注射用水、28%アンモニア水、アセトニトリル、エタノール (99.5%)、酢酸、無水硫酸ナトリウム、酢酸エチル、アセトン、3-メチル-1-ブタノールおよびメタノールでは試薬特級を、ポリアミド C-100 (カラムクロマトグラフ用)、HPTLC シリカゲル 60、TLC シリカゲル 60 RP-18 F254、および 50 HPTLC Plates Cellulose を用いた。薄層クロマトグラフィー (以下 TLC) の展開溶媒は、メタノール/アセトニトリル/5% 硫酸ナトリウム (3 : 3 : 10) を用いた。

着色料の試料作製は、添加用色素 12 種類を異なる 3 種の大根基材の漬物に添加後、良好に検出された色素のうち複数色素を選択し、漬物として自然な色調となる組み合わせおよび濃度を調整し、同等性と安定性の確認を行った。選択色素添加については、円柱状の漬物を縦に 4 分割し、色調① (オレンジ系)、色調② (赤系)、色調③ (茶系) を各添加用色素を添加した水溶媒系に浸漬した。

着色料の試験方法のうち、添加用色素と標準品の比較については、調査試料作製のために用いる添加用色素 (市販品) 12 種類について、その適用性を確認するため定性試験を行い、標準品と比較検討した。また、試験方法および測定方法は「食品衛生検査指針 食品添加物編 (2003)」の第 9 章 着色料の項に準じた。

(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、セレウス菌検査用に *Bacillus cereus* HIC 080117、*Bacillus cereus* HIC 090147、*Bacillus subtilis* HIC 080138、ビブリオ属菌

検査用に *Vibrio parahaemolyticus* HIC 090153、*Vibrio vulnificus* HIC 090154、*Vibrio cholerae* HIC 090155、*Vibrio fluvialis* HIC 090156 を用いた。

セレウス菌検査用菌株の芽胞液作製は、 $MnSO_4$ を含有する普通寒天培地に接種し、30~35°Cで7日間培養した。培養後、生理食塩液に懸濁させ、芽胞液を作製した。

市販の白米を121°C、60分間のオートクレーブ滅菌後、これに生理食塩液、15%NaCl溶液等を個別に添加し、完全に水分が吸収され米飯状となったことを確認し、セレウス菌検査用基材とした。

セレウス菌検査用試料における均一性および安定性の確認は、セレウス菌検査用基材に試験菌を接種後、攪拌して28日間冷蔵保存した。保存開始時、保存7日目および28日目に試料を取り出し、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト (SCD) 寒天培地を用いて生菌数測定を行った。均一性確認試験は、試料5個を用い、それぞれ独立して1容器から2回の反復測定で生菌数を確認した。なお、均一性確認試験は冷蔵保存にて33日間まで実施した。また、選択培地を用いた定性検査も実施した。

ビブリオ属菌の選択培地上での反応の確認は、Marine brothで24時間前培養した後、培養液の1白金耳を選択培地に画線し、集落形成の有無および形成集落の形状を確認した。

ビブリオ属菌の冷蔵保存と保存後の生菌数測定は、Marine brothに接種し、冷蔵または室温に保存後、保存開始時、3日目、7日目、14日目、21日目および28日目に試料を取り出し、Marine agarならびにTCBS寒天培地により生菌数測定を実施した。

(3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製検討：

特定原材料タンパク質の定量は、卵タンパク質の測定ではモリナガ FASPEK 卵測定キット

およびFASTKIT エライザ Ver. II卵、牛乳タンパク質の測定ではモリナガ FASPEK 牛乳測定キットおよびFASTKIT エライザ Ver. II牛乳を用いてELISA法により実施した。なお、吸光度測定はマイクロプレートリーダーを用いて試料中の特定原材料タンパク質の濃度を求めた。

ウエスタンブロットによる確認試験は、電気泳動ゲルにQ-PAGE mini、泳動用にTris-BESバッファー、電気泳動槽にSTC-808を用いた。転写膜にHybond-Pを使用し、トランスブロットSDセルを用いた。免疫染色には牛乳ウエスタンブロットキット(カゼイン)、牛乳ウエスタンブロットキット(β -ラクトグロブリン)、VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit、Alkaline Phosphatase Substrate kit IVを使用した。

添加に使用した特定原材料については、卵の全卵を水で希釈、また牛乳はスキムミルク粉末(生化学用)を水に溶解し、0.8 μ mのフィルターでろ過したものを使用した。全卵およびスキムミルクのタンパク質含量は2-D Quant Kitで測定した。

精度管理試料の調製は、添加用基材に特定原材料を直接加え、BLIXER-5Plusで均質化して作製、またはあらかじめ1gずつ秤取した食材に特定原材料を一定量ずつ分注のいずれかの方法で作製し、試料は-20°Cで保存した。なお、特定原材料タンパク質含量を用いて一元配置による分散分析を実施し、均一性を検討した。

共同試験の実施は、卵を測定対象として試料8種類(試験試料1~試験試料8)をキットとともに試験方法および報告書様式に関する文書を添付して送付した。

参加機関から回収した測定値についてはXbar-R管理図を作成して解析した。また、アンケート結果についてもとりまとめ、検討を加えた。

(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. 使用材料

外部精度管理試料およびDAS59132陽性対照

の作製は、DAS59132 トウモロコシ、nonGM トウモロコシおよびGM トウモロコシ系統別DNA Bt10 陽性コントロールプラスミドを用いた。

2. DNA 抽出

nonGM トウモロコシおよびDAS59132 トウモロコシの DNA 抽出は、DNeasy Plant Maxi Kit を使用し、抽出した DNA は 10 ng/ μ L に調製して用いた。

3. Bt10 検出下限の検討

3. 1 Bt10 陽性対照プラスミドの希釈

nonGM トウモロコシから抽出した DNA 溶液を用いて Bt10 を n=8 または n=16 で測定し、検出下限を検討した。

3. 2 定性 PCR による Bt10 の測定

Bt10 の測定は、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について（一部改正）」（通知と記載する）に従い、陽性対照用（Zein n-5'および Zein n-3'）、Bt10 検出用（JSF5 および JSR5）および Bt10 確認用（Bt10LS-5' および Bt10LS-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。PCR 増幅物は ultraPURE™ Agarose-1000、50×TAE（遺伝子工学研究用）により作製した 2%アガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid 2plus を使用してアガロースゲル電気泳動を行った。

4. DAS59132 検出下限の検討

4. 1 DAS59132 トウモロコシ抽出 DNA の希釈

DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液を nonGM トウモロコシ DNA 溶液を用いて段階希釈した液について n=12 でリアルタイム PCR による DAS59132 検出用試験を行い、検出下限を検討した。

4. 2 リアルタイム PCR による DAS59132 の測定

DAS59132 の測定は通知に従い、DAS59132 検出用プライマー対（32f および 32r）および DAS59132 検出用プローブ、マスターミックスには TaqMan Universal PCR Master Mix を使用して実施した。リアルタイム PCR の結果は、Amplification plot を確認し、指数関数的な増幅が確認された場合は、Th. Line をベースライ

ンのノイズ幅より上側の ΔRn 0.2~0.5 の間に設定し、Th. Line と増幅曲線が交わる Ct 値を求め、38 未満の Ct 値が得られた場合に陽性と判定した。

5. DAS59132 陽性コントロールの調製

DAS59132 トウモロコシから抽出した DNA 溶液を GMO 共通 No Template Control-CoIE1/TE を用いて 20 倍希釈したものおよびこれを水で 10 倍希釈した液を作製し、n=10 で DAS59132 検出用試験を行い、Ct 値が 38 未満となる指数関数的な増幅が得られるか検討した。

6. 外部精度管理調査結果のまとめ

外部精度管理調査の結果は、試料ごとに Bt10 の測定、DAS59132 の測定のそれぞれに分けてまとめた。

7. 外部精度管理調査結果に影響を与えたと考えられる測定条件の検証

7. 1 定性 PCR

外部精度管理調査において PCR 酵素の変更が検査結果に影響をおよぼした可能性が考えられたため 3. 2 の Bt10 の測定において、AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase の代わりに、Platinum® Taq DNA Polymerase（Invitrogen）、TaKaRa Ex Taq®（通常品）、TaKaRa Ex Taq®（Hot Start Version）（以上 Takara Bio）のいずれかの酵素を用いて比較検討した。

7. 2 リアルタイム PCR

DAS59132 陽性コントロールについてプライマー・プローブ濃度を変更して DAS59132 を測定し、増幅曲線を検討し、リアルタイム PCR 装置の蛍光感度の調整の影響を検討するため蛍光感度調整後に DAS59132 トウモロコシ DNA の結果と比較した。

C 研究結果

1. 尾花分担研究

1. 1 外部精度管理試料の調製

パンケーキは添加した農薬を均一化し易い試料であるが、過熱に対する農薬の安定性の確認が乏しいため、農薬の挙動を調査する必要がある。パンケーキを秤量後、均一化し、農薬分

析を行い、濃度および重量残存率を算出した。各農薬の調理後重量あたりの濃度は、15分間以下の加熱では全ての農薬でほぼ 100 ng/g 付近でとどまり、30分間以上でも半数の農薬が同程度に収まった。

1. 2 外部精度管理試料の均質性試験

均質性試験は、無作為に6個を選択し、例示分析法に従い、添加した 10 種類の農薬濃度を測定した。各農薬濃度(添加濃度 80~120 ng/g)は 63.1~140.0 ng/g、回収率は 79~117%、変動係数は 4.3~19.2%であった。また一元配置分散分析を行った結果は、すべての農薬において有意水準 0.05 を上回り均質性が確認された。

1. 3 外部精度管理試料の安定性試験

-20℃において約 2 カ月間凍結保存した外部精度管理試料について残存率を測定した結果、フェナリモル(47.4%)、ビテルタノール(53.9%)およびエスプロカルブ(68.7%)を除いて、7 種類の農薬の残存率は、70%以上であり試料中の農薬の安定性を確認した。また、冷凍保存 0、1、2、4、8 週間後に分析した結果、4 週間後以降は、0 週目と比較してやや減少傾向が見られたが、8 週間後の残存率は 90%程度であり、大幅な減少は確認できなかった。

2. 再現性試験結果

GC-MS では、標準品連続測定においては E、H、I の 3 機関でのべ 7 農薬、マトリックス標準液連続測定においては E、G、H、I の 4 機関でのべ 13 農薬で変動係数が 10%以上であった。のべ測定農薬数の約 86%は変動係数が 10%未満であり、概ね良好な再現性が得られた。

LC-MS/MS では、標準品連続測定においては I 機関で 1 農薬、マトリックス標準液連続測定においては C、I 機関でのべ 2 農薬で変動係数が 10%以上であったが、それ以外は安定して測定できた。LC-MS/MS については、変動係数が 10%を超えた例は両試験中でのべ 3 農薬のみで、のべ測定数の 8~9 割は変動係数が 5%未満と非常に良好な再現性が得られた。

3. 外部精度管理試験結果

外部精度管理試験結果は、各農薬の添加濃度

80~120 ng/g に対し、平均回収率は GC で 97~105%、LC で 85~108%であった。GC では 9 機関中の 6 機関が全ての農薬で Xbar、R、Z スコアの評価項目において良好な結果を示した。残り 3 機関でのべ 9 農薬がいずれかの評価項目で不適であったが、これは全機関の測定農薬数(9 機関×8 農薬)のうち約 13%であった。LC では 4 機関が全ての評価項目で良好な結果を示した。他の 5 機関でのべ 17 農薬が不良であったが、全機関の測定農薬数(9 機関×10 農薬)のうち約 19%であった。

4. サンプルング試験結果

参加機関のサンプルング試験と Xbar-R 管理図の結果では、各農薬の添加濃度 80~120ng/g に対し、平均回収率は GC で 93~102%、LC で 84~102%であった。GC では 9 機関中 6 機関が全ての農薬で Xbar、R、Z スコアの評価項目において良好な結果であった。残り 3 機関でのべ 4 農薬がいずれかの評価項目で不適であったが、これは全機関の測定農薬数(9 機関×8 農薬)のうち約 6%であった。LC では 6 機関が全農薬において良好な結果を示した。他の 3 機関でのべ 14 農薬が不良であったが、全機関の測定農薬数(9 機関×10 農薬)のうち約 16%であった。試料の均一化を評価するために、5 試行間の変動係数と R 管理図について特に注目した。その結果、GC-MS では E 機関においてテブフェンピラドとフェナリモルの変動係数が 15%を超えた。このうちテブフェンピラドは R 管理図においても適正域を外れた。また、I 機関においてはブプロフェジンが R 管理図で適正域を外れた。LC-MS/MS では I 機関においてイミダクロプリドとテブフェノジドの変動係数が 15%を超えた。

5. GC システム評価

各機関の GC-MS システム評価試料について各物質のピーク面積とピーク高さの変化率を求め、ピーク面積変化率対ピーク高さ変化率の比を用いてピーク形状の変化を数値化した。その結果、GC-MS システム評価試料に含まれる物質のうち、イソキサチオンとカプタホールは GC 注入口、シマジン、ペンタクロロフェノール、2,4-ジニ

トロアニリンはカラム注入口側、フェニトロチオンはカラム検出器側の評価に用いられている (D 機関でペンタクロロフェノール、H 機関でカプタホールが測定不能)。

2. 齊藤分担研究

食品中 CPA 測定は、逆相モードと陰イオン交換モードを併せ持つ DIONEX 社製 Acclaim® Mixed-Mode WAX-1 を使用したが、LC-UV で測定する限りにおいては、理論段数やピーク形状など、検討したカラムの中で最も良好なカラム性能を示した。定性用検出器として PDA、定量用には UV を用いることで高感度かつ高精度で検出が可能となり、検量線は 0.1~10 µg/mL の間で良好な直線性を得ることができた。

前処理方法は、酢酸エチルでの回収率が最も優れていた。また精製水では両者に差は認められなかったが、めんつゆでは、NaCl 添加によって回収率が向上した。めんつゆを試料として pH 変化による抽出率への影響を検討した結果、夾雑物由来ピークが pH9 以上で著しく減少したことから、溶媒抽出は pH9 以上にて調整することとした。固相抽出では、HLB と MCX において良好な回収率が得られたが、溶出液濃縮の容易さから固相には HLB を用いることとした。

CPA 産生についての分析・調査では、LC-UV クロマトグラム上、CPA の保持時間と一致するピークが検出された場合、PDA 検出器で UV スペクトルを測定することで、CPA の同定を容易に行うことが可能となった。また、一菌株 (NRBC6327) で培養後のろ液および菌体から CPA 産生が確認された。

抗 CPA ウサギ血清の作製では、免疫開始 35 日目では CPA に対する反応性が著しく低く、また CPA に対する特異抗体の産生量も少なかったが、投与開始後 154 日目の採血血清のうちで FS0015 のウサギ個体は血清希釈 1/3200 の OD450 が 1.0 を超えていた。

3. 村山分担研究

調製直後に比較して 10%以上の減少が認められた試料は、-20℃保存群では3ヶ月で2農薬、6ヶ月で4農薬、4℃保存群では3ヶ月で15農薬、6ヶ月で31農薬、40℃保存群では3ヶ月で2農薬、6ヶ月で21農薬、60℃保存群では3ヶ月で39農薬、6ヶ月で47農薬であった。保存温度が低いほど安定である傾向はあるが、4℃保存群は40℃保存群よりも10%以上減少した農薬の数が多い。また、残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性については、研究方法に従い継続中である。

4. 大島分担研究

(1) 理化学検査のための適正試料の作製：

1. 残留動物用医薬品

鶏肉試料では、鶏肉 (むねおよびもも肉) に SDD を添加し、作製翌日の SDD 濃度に対する冷凍 70 日後の SDD 濃度を測定することで冷凍保存による安定性を確認した。その結果、むねおよびもも肉では、それぞれ回収率が 101.5%および 92.6%、RSD はそれぞれ 3.8%および 2.8%であった。

同試料を 1 回解凍したときの SDD 濃度に対する複数回時の SDD 濃度を測定した結果、むね肉は 2 回で 96.0%、3 回で 98.0%であった。一方、もも肉の安定性は 2 回で 89.4%、3 回で 88.0%であった。冷蔵 (4℃~8℃) 開始時の SDD 濃度に対する 4 および 7 日後の SDD 濃度は、むね肉で 89.2%、および 94.4%であり、約 1 週間の冷蔵保存でも安定性が確認された。一方、もも肉の安定性は冷蔵 4 日後で 116.7%、7 日後で 131.6%であり、冷蔵日数の経過に伴って増加を認めた。

鶏肉 (むね肉) 試料の実際の作製に即した混合方法の検討では、ブリークサーを用いて均一にミンチを作製しミキサーで混合し

て 0.18 $\mu\text{g/g}$ SDD 添加試料として測定した結果、作製時間の短縮が可能となった。

BLIXER-5Plus を用いて作製した試料の均一性の確認は、SDD 濃度について平均回収率が 84~91%、全平均回収率は 87.3%、RSD は 2.8%であった。一元配置分散分析による解析を行った結果、F 比は 1.63 で、有意水準 5%に対する F 値 2.12 より小さく、試料は均一であることが確認された。

豚肉基材の添加回収試験および均一性の確認では、4 部位の豚肉（ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉）を用い、10 種のサルファ剤混合液を添加して添加回収試験を行った。その結果、いずれの豚肉基材およびサルファ剤でも 70%以上の回収率を得、SDD についてはいずれの豚肉基材でも 80%以上の回収率であった。

豚肉（ヒレ肉）での均一性を測定した結果、いずれのサルファ剤においても 70%以上の回収率を得た。SDD は 80%の回収率を得、RSD は 4.2%であった。また、各サルファ剤の F 比は 0.46~2.91 であり、いずれも有意水準 5%に対する F 値 3.02 より小さく、均一であることが確認された。

2. 着色料

添加用色素（12 種類）と標準品との比較結果においてスポットは良好に検出され、*Rf* 値が標準品と一致した。

色素抽出液を精製後、濃縮乾固し、水に溶解した結果では、残留物があり、特に R3、R104 および R105 の検出が充分でなかった。一方、50v/v%エタノールでは、残留物を十分溶解でき、R3、R104 および R105 のスポットが良好に検出された。

精製条件の結果は、ポリアミドカラム法による精製で 12 色素全てが良好に検出され

た。ポリアミドバッチ法では、HPTLC シリカゲル 60 の TLC で、Y5、R40、B1 および B2 のスポットが、また、50 HPTLC Plates Cellulose の TLC では、Y5、R40、B1 および G3 のスポットがテーリングし、これらの分離が不十分であった。また、標準品の *Rf* 値とは一致せず、定性が難しいことがわかった。バッチ/カラム法では、着色したポリアミドを詰めたカラムで良好な流出速度が得られた。

抽出に用いる溶液の検討では、水、50v/v%エタノールおよびアンモニア/エタノール溶液のいずれでも、12 色素を抽出できた。しかしながら R102 の検出は、アンモニア/エタノール溶液での抽出で、他の 2 抽出液と比べ、TLC において色調が薄かった。

添加用色素 12 種類を添加した 3 種類の漬物の同等性および安定性について評価した結果、作製 7 日後は、3 種類のいずれの色素添加試料からも 12 色素全てが良好に検出された。しかし作製 40 日後には、11 色素は 3 種類の基材において全て良好に検出されたが、B2 は検出されなかった。

選択色素添加試料の同等性および安定性について、甘口たくあんを基材に用いて、3~4 種類の選択色素を添加した異なる色素溶液 3 種に漬け込み、作製した試料の同等性および安定性について評価した結果、作製 0 日および 60 日後のいずれにおいても、基材に添加した全ての色素が良好に検出された。

(2) 微生物学検査のための適正試料の作製検討：

市販白米のオートクレーブ処理による変性等を確認した結果、変質等は一切認められなかった。

オートクレーブ処理後、生理食塩液の添加で白米の吸水性を確認した結果、グリセリン含有生理食塩液では添加1時間後でも完全に吸水されなかったが、その他の溶液では1時間以内に完全に吸水され、米飯状となった。7日間冷蔵保存した吸水後の基材について、その形状を確認したところ、グリセリン含有生理食塩液では乾燥が認められたが、それ以外の溶液では通常の米飯と同等かまたは若干水分量が少ない状況であった。さらに7日間冷蔵保存後においても異臭の発生等は認められなかった。

セレウス菌検査用試料の均一性および安定性の確認を生理食塩液 (MnSO₄ またはグリセリンを含む) または 15%NaCl 溶液を添加することにより作製した米飯基材に試験菌を接種し、冷蔵保存で28日間まで安定であることを確認したが、各基材について著しい菌数の減少を認めなかった。しかし、保存28日目に22°Cで24時間保存すると、生理食塩液添加白飯では2~3オーダーの菌数の上昇を認めた。しかし、グリセリン含有生理食塩液および15%NaCl溶液では大きな菌数の変動は認められなかった。

試料の均一性確認結果では、菌種によってはばらつきの大きなものもあるが、総じてばらつきの少ない試料が作製できた。なお、ばらつきについては33日目においても保存開始時と同等であった。

試料の選択培地上での反応性については、陽性対照菌2菌株はいずれも全ての培地において陽性集落を形成したが、陰性対照菌 *B. subtilis* は MYP 培地および PEMBA 培地において非典型集落を認めたものの、NGKG 培地では集落を形成しなかった。

使用菌株の選択培地上での性状確認と、Marine agar または Marine broth に接種した後の保存の可否については、*V. parahaemolyticus* および *V. fluvialis* では全ての選択培地上に集落形成を認めた。これに対して、*V. vulnificus* では酵素基質培地、ならびに TCBS

寒天培地で集落形成を認めるが、それ以外の選択培地上では集落形成を認めなかった。また *V. haliotocoli* では全ての選択培地で集落を形成しなかった。

全ての選択培地において集落形成を認めた *V. parahaemolyticus* および *V. fluvialis* の2菌種について Marine agar または Marine broth に接種した後、冷蔵または22.5°Cで保存し、長期間の菌の生存の確認では、*V. fluvialis* を Marine agar に接種し138日間冷蔵保存したときには接種菌が死滅した。それ以外の条件では全て138日目まで接種菌は生存した。

試験菌を 10³~10⁴ cfu/mL で Marine broth に接種した後、冷蔵または22.5°Cで28日間保存し、接種後3、7、14、21および28日目に菌数測定すると、*V. parahaemolyticus* では冷蔵保存の28日目において、*V. fluvialis* では冷蔵保存の14日目を以降において接種菌が死滅する傾向が認められた。一方、22.5°Cで保存したものは3日目において10⁸~10⁹ cfu/mL まで菌数が上昇した後、その菌数を保存28日目まで維持する傾向が認められた。さらに、22.5°Cでの保存時において、選択培地である TCBS 寒天培地を用いたときの菌数が Marine agar における算出菌数と同等であるのかを確認すると、Marine agar で測定した場合には28日目まで安定的に接種菌を回収することができたが、選択培地である TCBS 寒天培地の5種全てで Marine agar と比較すると1オーダー以上低い菌数が得られた。

(3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製検討

1. 共同試験試料の均一性および安定性

添加した卵の回収率の確認を兼ねて均一性試験を実施したが、一元配置による分散分析で均一と判定された。また、回収率も定量検査法の評価基準に示されている回収率50%~150%の範囲内であった。また、共同試験の測定期間終了後に安定性試験を実施したが、配布前に測定した均一性試験の測定値の87.3~111.8%の範

圃であった。なお、ブランク試料の測定では、いずれの試料でも卵タンパク質は検出されなかった。FASTKIT エライザ Ver. II 卵 では試料 1 および試料 4 でキットの検出下限(0.313 $\mu\text{g/g}$) 以下であったが、試料 8 (クッキー) では 0.66 $\mu\text{g/g}$ と検出下限を上回る卵タンパク質が検出された。

2. 共同試験結果

ブランク試料では、FASTKIT エライザ Ver. II 卵による測定で卵タンパク質を検出した機関が多かったが、検出限界以下の測定値と報告しない機関もあったため、統計値の算出は行わなかった。卵を添加した試料の報告値の集計結果は、試料 2、試料 3 および試料 6 では Xbar 管理図において Xbar が上部管理線 (UCL) および下部管理線 (LCL) の範囲外および Z スコアの絶対値が 2 以上となった機関はなかった。一方、試料 5 および試料 7 では FASTKIT エライザ Ver. II 卵 による測定でそれぞれ 1 機関 (同一機関) の Xbar が下部管理線 (LCL) の範囲外および Z スコアの絶対値が 2 以上となった。

なお全機関の全試料で、R 管理図において UCL を超えた測定値はなく、併行精度は良好であった。

3. 計算ソフトウェアの測定値に対する影響

計算ソフトウェアによっては報告値と再計算結果に差が認められ、解析に使用するソフトウェアにより定量値が変わることがわかった。一部機関において特定のソフトウェアで再計算値との乖離が特に大きいこともわかった。

4. 共同試験アンケートのまとめ

共同試験を実施した 10 機関の特定原材料検査業務の経験年数はいずれも 4 年以上であった。また、ELISA 法による年間の検査件数の総計は、卵、乳がそれぞれ約 1000 件、その他の特定原材料はその半分程度であった。確認試験の実施件数は、ELISA 法の件数と比例しているものの、その約 20 分の 1 程度で、全く実施していない機関も 3 機関あった。

5. 牛乳試料作製の検討

混合用のミキサーとして BLIXER-5Plus を用

いて約 2kg のスケールで試料を調製した。添加基材としてはカボチャペーストおよびハンバーグを用い、それぞれにスキムミルクを水で溶解したものを加えて均一になるように混合し、試料を作製した。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。この試料を -20°C で 16 週間保存後の測定結果を保存前の測定値と比較した結果、良好な安定性を示した。いずれの抗体でも添加試料についてはカゼインまたは β -ラクトグロブリンのバンドが全例で検出できた。

(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：

nonGM トウモロコシ DNA 溶液を用いて Bt10 陽性コントロールプラスミドを段階希釈した液について、Bt10 検出用試験および確認用試験を実施した結果、4000 倍希釈では Bt10 検出用が確認できたが、8000 倍希釈ではいずれの試験系でも増幅物が確認できなかった。

リアルタイム PCR による DAS59132 検出用試験を行った結果、DAS59132 トウモロコシの含量に換算して 0.05% (2000 倍希釈) までは実施した全ての測定で 38 未満の Ct 値が得られる指数関数的な増幅が認められたが、0.025% (4000 倍希釈) では Ct 値が 38 以上となる測定も認められた。

DAS59132 陽性コントロールおよび参加機関での希釈を想定してこれを水で 10 倍希釈した液について、DAS59132 検出用試験を実施した結果、全測定で Ct 値が 38 未満となる指数関数的な増幅が得られ、DAS59132 陽性コントロールおよびその 10 倍希釈液が陽性対照として使用できることが明らかになった。

Bt10 陽性対照用試験では 1 測定を除き、いずれの試料も全ての測定で予定長の増幅物が確認された。いずれも Bt10 陰性試料である試料 A、試料 B、試料 2 および試料 3 の Bt10 検出用試験では、試料 A で 1 測定、試料 B で 2 測定、試料 3 の 2 測定の計 5 測定で予定長の増幅物が誤つ

て検出された。しかし、いずれの試料も全参加機関で Bt10 陰性と判定された。Bt10 陽性試料である試料 1 の Bt10 検出用試験による増幅では、全測定で予定長の増幅物が検出された。しかし Bt10 確認用試験では 1 機関の 2 測定で予定長の増幅物が検出できず、この機関を除く 41 機関が Bt10 陽性と判定した。陽性対照用試験ではいずれの試料も 38 未満の Ct 値が得られる指数関数的増幅が全参加機関の全測定で認められた。いずれも DAS59132 陰性試料である試料 B、試料 1、試料 2 の DAS59132 検出用試験では全測定で指数関数的増幅は認められず、全参加機関で DAS59132 陰性と判定された。DAS59132 陽性試料である試料 A、試料 3 の DAS59132 検出用試験では、試料 A は全測定で 38 未満の Ct 値が得られる指数関数的増幅が認められた。試料 3 では 1 測定を除き全測定で指数関数的増幅が認められたが、Ct 値が 38 以上となった測定が 10 測定あった。しかし試料 3 の測定のうち実施した 4 測定全てで Ct 値が 38 以上となった機関はなかったため、試料 A、試料 3 とも全機関で DAS59132 陽性と判定された。

外部精度管理調査の結果、1 機関が Bt10 陽性試料である試料 1 の Bt10 確認用試験による測定で 2 測定とも予定長の増幅物を検出しなかった。この機関は PCR 酵素として AmpliTaq Gold™ ではなく、TaKaRa Ex Taq® を使用していることが判明し、PCR 酵素が測定結果に与える影響を検討した。Bt10 検出用試験では、TaKaRa Ex Taq® (通常品) を除くホットスタート酵素の 3 種で n=10 で実施した測定の全てで予定長の増幅物が検出されたが、TaKaRa Ex Taq® (通常品) で予定長の増幅物が検出されたのは 2 測定のみであった。Bt10 確認用試験においても、同じく TaKaRa Ex Taq® (通常品) を除く 3 つのホットスタート酵素では n=10 で実施した測定の全てで予定長の増幅物が検出された。しかし TaKaRa Ex Taq® (通常品) で予定長の増幅物が検出されたのは 5 測定であった。また、TaKaRa Ex Taq® (通常品) による増幅では Bt10 検出用試験および Bt10 確認用試験による測定ともに

非特異的な増幅が多く認められた。一方、TaKaRa Ex Taq® (Hot Start Version) および Platinum® Taq DNA Polymerase では非特異的バンドが認められる場合があるものの、全測定で予定長の増幅物が検出できた。

リアルタイム PCR 法による DAS59132 の測定において、試料 3 の DAS59132 検出用試験で指数関数的増幅を確認したが Ct 値が 38 以上であった機関が 9 機関あった。そのうち 1 機関は 4 測定のうち 2 測定の Ct 値が 38 以上であった。さらに DAS59132 陽性コントロールの増幅曲線の収束位置が他の機関に比べて低く、Ct 値も他機関に比べ大きかった。このためプライマー・プローブの濃度に通知の濃度と誤差が生じた場合の影響を DAS59132 陽性コントロールを用いて、DAS59132 検出用試験について検討した結果、プライマー・プローブの濃度を通知の 0.75 倍に調製した場合は、通知の濃度の測定結果と比べてサイクル数の後半部分の ΔR_n が低くなり、Th. Line 0.2 における Ct 値は通知の濃度結果よりも約 0.2 高くなった。一方、プライマー・プローブの濃度を通知の 1.25 倍とした場合は、サイクル数の後半部分の ΔR_n が高くなり、Th. Line 0.2 における Ct 値は通知の濃度結果よりも約 0.3 低くなった。

リアルタイム PCR 装置の蛍光感度が Ct 値に影響すると指摘を受けたため、感度調整後に測定を行った結果、感度調整前と比べ、Ct 値が 38 未満となった測定数は 0.025% および 0.0125% 濃度では増加したが、感度調整の影響は顕著ではなかった。感度調整後に測定した 0.05% DAS59132 トウモロコシ DNA 希釈液と同一バッチを使用し、感度調整前に実施した均一性および安定性試験では、Ct 値 38 以上の測定が 40 測定中 7 測定と調整後の測定と同程度の頻度で認められた。

D. 考察

1. 尾花分担研究

1) 各機関での検討

メタノール濃度の真度に及ぼす影響では、現在の一斉分析法は試験液を GC と LC に分割し、

検出器毎に測定農薬を分担するのが一般的であるが、可能な農薬はあえてGCとLCの質量分析計で測定した。したがって、一部機関では、試験期間中にLC-MS/MSでの測定条件の検討も行った。一連の検討結果からは、通常GCで測定するような水溶性の低い農薬は、LCで測定する際の溶解液に十分注意をする必要があることが示唆された。

内部標準法と外部標準法の比較では、GC-MSで内部標準を用いた方がより大きな定量値が得られ、平均で1.2倍であり、変動係数も平均で0.3倍と非常に小さくなった。LC-MS/MSにおいては定量値の変化はほとんどなく、変動係数の変化も一定でなかった。このことよりGC-MSでは、内部標準が分析操作上の誤差を補正し、良好な再現性が得られたと考えられた。

スキャン測定とMRM測定と比較では、フェナリモルのスキャン測定結果でMS/MS測定結果と比較して定量値が低下し、変動係数が大きかった。エスプロカルブやテブフェンピラドでも、MS/MS測定により変動係数が低下する傾向が見られた。これは、スキャン測定では、対象測定物質をイオン化する際に、マトリックス由来の多量のイオンが存在したため、測定値や変動係数が影響を受けたが、MS/MS測定することにより、その他のイオンの影響を排除できたと考えられた。

精製カラムの検討では、パンケーキ試料を用いてあらかじめ前処理法を検討し、各種固相カラムの検討を行った機関からは、ブランク抽出液をGC-MSでスキャン測定したが、脂肪酸類と思われる夾雑物が見られ、これらのピーク強度が最も低かったSAX/PSAカラムを選択した。

2) 外部精度管理試料の調製

農薬を含む生地は、焼く工程で高温に曝されるため、焼く前の生地と焼き上げたパンケーキ中では、その濃度に変化を生じる可能性が考えられた。生地を加熱調理すると水分が蒸発して重量が減少するため、調理されたパンケーキ中では農薬が濃縮され、濃度が上昇することが推測された。また、生地を高温で焼く際に、添加

された農薬自体が変質し、減少することも推測された。

160℃で4分間焼く場合、焼き上げたパンケーキ重量は、焼く前の生地と比べて10%以上減少した。一方、同条件での農薬濃度は、焼き上げたパンケーキでも焼く前の生地中の濃度と同等であった。これは予想に反して、生地に含まれる農薬が、加熱による水分蒸発と同時に、その一部が揮発するものと考えられた。加熱時間が30分以上の場合、20種類の農薬の一部に急速な濃度の減少がみられた。これは、パンケーキ中に残留する農薬が熱によって分解したためとみられる。しかし、実際は4分間の加熱であり、焼く工程を経ても、生地への添加濃度をそのまま調製した試料の濃度とみなせると結論づけた。

3) 再現性試験およびマトリックス効果

GC-MSにおける変動係数を機関毎に比較すると、変動係数が大きくなったHとI機関のマトリックス標準液連続測定では、1回目のマトリックス注入によってGC注入口の不活性部分がマスキングされ、2回目以降の測定値が大きくなったと考えられた。E、G、H、Iの4機関についてはマトリックス標準液の変動係数の方が大きかったが、これらはマトリックスによってGCシステムが影響を受けたと考えられた。また全機関共通でエスプロカルブ、クロルピリホス、フェナリモル、ビテルタノールは変動が大きく、マトリックスの影響があると考えられた。

再現性試験として標準品連続測定とマトリックス標準液連続測定結果を比較すると、GC-MSにおいてはマトリックスの影響により多くの機関で全農薬が微増、ビテルタノールは突出して増加という傾向であった。これは使用しているGC機器がMRM測定若しくは、イオントラップ型GC-MSによるスキャン測定で、他機関と異なっているためと考えられた。LC-MS/MSでは7機関でほぼ変化無し、残り2機関で微増となりパンケーキ由来のマトリックスの影響は少ないものと考えられた。

4) 外部精度管理試験

今年度は前年度と比較して全評価項目が良好であった機関数が増加していることから、参加機関が加工食品中の農薬分析に慣れてきており、分析精度が向上してきていると考えられる。一方で、適正範囲外となる農薬の約85%が3機関に集中しており、2機関ではLCの結果が類似した傾向を示していた。この2機関はGCでの試験結果が概ね良好であり、前処理法自体に大きな問題点はないと考える。そこで、LC用に試験液を調製する工程を比較したところ、LC試験溶液中のメタノール比率が異なることが判明した。2機関では25%メタノール、その他7機関が100%となっていた。各機関の検討結果が示した通り、クロロピリホス、エスプロカルブ、テブフェンピラドは不良な結果が得られており、含水率が高い試験液ではこれらの農薬の溶解が不十分で測定値の低下や範囲の増大の原因になったと考えられた。なお、安定性試験の結果は、フェナリモル、ビテルタノールおよびエスプロカルブの残存率が70%を下回ったが、再試験では全て90%付近の残存率であった。各機関の測定値は添加濃度付近であったことから、外部精度管理試料に問題はなかったと考えられた。

5) サンプルング試験

サンプルング試験については評価結果が良好であり、外部精度管理試験よりも適正範囲外となる評価項目は少なかった。2機関はLCで共に4農薬以上が不良となり、試験液中のメタノール濃度の影響で外部精度管理試験と同様の結果が得られたと考えられた。変動係数や範囲に関しては、外部精度管理試験と比較して著しく変化した例はなかった。このことから、各機関で行われている試料均一化は適切であったと考えられた。

6) 各種精度管理試験結果の比較

多くの機関で非常に精度良く測定できたことがわかり、再現性試験結果と、外部精度管理試験およびサンプルング試験結果が個別のグループを作る例が見られたが、これは分析操作中の回収率低下によってもたらされたと考えられる。

7) GC-MS と LC-MS/MS の結果比較

各農薬の中で、クレソキシムメチルは特に測定値が相関係数1の斜線付近に集中しており、GC-MS と LC-MS/MS の測定値が一致し易い農薬であったことが示された。ブプロフェジン、フェナリモルでもこれに準ずる傾向が見られ、斜線より離れている測定値もあったが、全体としては斜線の上下にはほぼ均等に分布していた。エスプロカルブ、クロロピリホス、テブフェンピラド、ビテルタノールでは、中央の斜線より下側に点が集中する傾向が見られ、GC-MS 測定値の方が大きな値が得られ易いことが示された。LC-MS/MS は、GC-MS と比較して再現性試験での変動係数が小さく、マトリックス効果も小さい結果が得られた。

8) GC システム評価

2,4-ジニトロアニリンでピーク形状指数が1.2を超えた機関はなく、パンケーキが昨年度のレトルトカレーよりもGCシステムに及ぼす影響が少なかったと考えられる。また、ほぼ全ての評価物質で測定値は増大しており、ピーク面積や高さが共に増大していた。この変化率は面積や高さが共に一致する傾向にあり、ピーク形状が大幅に悪化した例としてはフェニトロチオンとI機関のペンタクロロフェノールのみであった。これはパンケーキマトリックスによってカラムが劣化したことを示している。しかし、これら以外は全体的にピーク形状の変化は少なく、パンケーキ試料の注入によるGCシステムへの影響は小さいと考えられた。

2. 斉藤分担研究

各種固相抽出による検討では、HLB と MCX で良好な回収率が得られた。しかし、溶出液濃縮の容易さ等を考慮して、固相にはHLBを用いることとした。めんつゆ以外の食品試料を処理するにあたりHLB単独ではクリーンアップが不十分な場合、HLB と MCX を併用することでより効果的なクリーンアップができると考えられた。実試料からのCPA検出では、食品のように一般家庭においても長期間保管

される食品中で *P. commune* に汚染された場合には CPA 産生の可能性があることが推察された。また、抗ウサギ CPA ポリクローナル抗体作製の基礎的検討で、長期間の免疫により CPA に対する抗体が産生されていることが確認できた。

3. 村山分担研究

農薬混合標準液の6ヶ月までの経時変化の測定結果を調製直後の濃度を100とした相対値で比較した。4℃保存群の4農薬については、3ヶ月で10%以上減少したものの、6ヶ月目の減少は10%未満となっており12ヶ月までの推移を確認後、解析する。

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、オクタノール/水分配係数等の溶解性を示すパラメーターと絡めて解析を行う計画である。

4. 大島分担研究

(1) 理化学検査のための適正試料の作製：

残留動物用医薬品の検討は、鶏肉（むねおよびもも肉）試料の安定性で、むね肉がもも肉よりも調査試料として適していることが確認された。また、むね肉試料を用いる場合、今回の作製方法が効率的であり、調査試料として十分適合することが示唆された。

豚肉（ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉）基材の添加回収試験および均一性の確認は、10種のサルファ剤混合液を添加して実施したが、いずれの豚肉基材およびサルファ剤の組み合わせでも70%以上の回収率を得ることができ、特にSDDについてはいずれの豚肉基材においても80%以上の回収率を得ることができた。サルファ剤の中にはHPLC-UV測定において基材由来の妨害ピークと重なるものがあったが、これら妨

害ピークは固相抽出カラムの前処理を行うことで除去された。

着色料の検討では、添加色素と標準品との比較で、青系と赤系のものに主色素以外のスポットが若干出現したが、定性分離に影響はなく、調査試料作製に使用できると考えられた。溶解液の検討では、濃縮乾固した残留物の溶解液としては50v/v%エタノールが適切であった。

着色量の試料からの抽出物等の影響の少ない浸漬後溶液について検討したが、試料からの抽出物の影響によりカラム内で詰り等が発生したため、流出速度が著しく低下したと考える。また、ポリアミドバッチ法による精製の結果からバッチ法による洗浄では、ポリアミドに付着した試料由来の夾雑物の除去が不十分で、TLCにおいて分離を妨害したと考えられた。バッチ/カラム法による精製の結果は、TLCにおいて12色素のスポットは良好に検出されており標準品のRf値とよく一致し、定性が可能であった。抽出液の検討は、今回用いた3基材では、キサンテン系色素のうちR3、R104およびR105が、アンモニア/エタノール溶液による抽出で、他の抽出液と比較してより色調が濃く、鮮やかに検出される傾向があった。

(2) 微生物学検査のための適正試料の作製：

外部精度管理用試料は、日常の検査試料と類似の形状を持つ試料が求められ、白米等を用いる基材の開発が期待されている。そこで、市販の白米を基材とした有効性の確認、セレウス菌接種後の均一性および安定性の確認、またセレウス菌検査での定性検査と定量検査を併せて外部精度管理試料として耐えうるか確認した。市販白米をオートクレーブ処理後、吸水した米飯