

201033004A

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22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 斉 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23年(2011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22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23年(2011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. 食品中に含まれる残留有害物質のうち低い安全性基準値の	73
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 貢一	
3. 残留農薬標準品の溶解性及び安定性に関する研究	83
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	125
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・別刷	203

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 22 年度 総括研究報告書

主任研究者 小島 幸一

平成 23 年（2011 年）4 月

検査機関の信頼性確保に関する研究

総括研究報告書

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、理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査、組換え DNA 技術応用食品検査を含め、様々な検査が確実に実施されなければならない。そのためには検査機関における検査結果の信頼性を担保することが、非常に重要であり、そのためにも国内での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これらに基づいた精度管理の実施は、検査機関の検査精度の確認ならびに信頼性確保に重要な役割を果たし、食品の安心・安全の確保に大きく寄与するものと考えられる。そこで本年度は、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.食品中に含まれる残留有害物質のうち低い安全性基準値の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.残留農薬標準品の溶解性及び安定性に関する研究(村山分担研究)および 4.食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料(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 研究課題について実施した。

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副所長)

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

ことは国民の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関わ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の導入、残留農薬検査における試験法の妥当性確認ガイドラインが設定されるなど、一層の体制強化が求められる。

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ついて構築してきたが、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、アレルギー関連物質検査についても 7 品目が指定されており、精度管理調査もさらに充実を図る必要がある。これらに加えて食品中に含まれる微量危害物質(残留農薬、マイコトキシン)の分析法については、検査結果のばらつき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が考えられる。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、その安定性を確認することは、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。食品衛生検査に関わる精度管理体制の構築は、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うえでますます重要な課題として認識されている。食品衛生検査に関わる精度管理用調査試料の作製に加えて、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となっていることから、農薬等についてもさら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ならびに精度管理のための適正調査試料の作製検討とその提供により食品衛生に関す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)

冷凍餃子に 5 種類の農薬を添加したものを外部精度管理調査試料とし、無添加のものを対照試料とした。測定には GC-MS および LC-MS/MS を用いることとし、研究協力機関である 8 機関に調査試料を配布した。

加工食品中の農薬分析法では、例示分析法により行った。すなわち、フードカッターで均一化した試料にアセトニトリル、ヘキサンを加え、攪拌抽出した後、遠心分離を行い、アセトニトリル層を GCB/PSA 固相カラムに負荷した。残ったヘキサン層に再びアセトニトリルを加え、振盪抽出した。アセトニトリル層を同じ GCB/PSA 固相カラムに負荷し、固相カラムからの通過液を 40℃以下で減圧濃縮後、アセトンに溶解して GC-MS 用試験液とした。このうち

一部を窒素気流下で乾固した。これをメタノールに溶解し、水を加えたものを LC-MS/MS 用試験液とした。

試料への添加農薬はジメトエート、クロルピリホス、ジエトフェンカルブ、クレソキシムメチル、イミダクロプリドとした。また、GC-MS システム評価試料として、林純薬 NAGINATA クライテリアサンプル Mix II (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、フェントロチオン、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;各 1 µg/mL、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 2 種類(添加濃度が異なる)用意し、農薬の添加に際しては、合成着色料の黄色 4 号または青色 2 号を添加し、試料の識別および均一化の指標とした。なお、2 種の試料間の農薬の濃度比は 4:5 とした。

分析機器の再現性試験では、標準品を各機関の分析法に従って GC-MS および LC-MS/MS で 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を求めた。また、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。上記同様、各農薬の平均と変動係数を求めた。

外部精度管理調査では、外部精度管理試料 2 種(黄、青)をそれぞれ並行数 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を求めた。

GC-MS システム評価試料測定では、NAGINATA クライテリアサンプル Mix II 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)、フェントロチオン(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)の各マスプロ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では、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平均測定値を基に、機関ごとに 2 種の試料(黄、青)の測定値和と差を求め、機関間 z-スコア(ZB)と機関内 z-スコア(ZW)を算出した。この ZB、ZW を用いて散布図を作成し、ユーデンプロットの手法による複合評価を行った。ZB=ZW=0 を中心とする半径|Z|=2 の円内を良好、半径|Z|=3 の円外を不良とし、2つの円の間を疑わしい、と判定した。なお、これらの数値の計算には Microsoft Excel を使用した。

2 食品中に含まれる残留有害物質のうち低い安全性基準値の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)

標準マテリアルの作製では、*Penicillium commune* をめんつゆに接種し、4°C にて 4 ヶ月間静置培養した後、自然ろ過によって菌体および培養ろ液に分離し、ろ液を試料とした。これにシクロピアゾン酸(CPA)を添加し、3 種類の濃度の標準マテリアルとした。作製した標準マテリアルを用いて、併行精度、室内再現精度および室間再現精度を検討した。なお、室間再現性試験には 3 機関が参加した。

めんつゆからの抽出には有機溶媒(酢酸エチル)による液液抽出を行い、クリーンアップとして固相抽出を行った。一方、ピーナッツおよび乾燥とうもろこしの試料調製操作手順として

は、抽出に高速溶媒抽出法(ASE)を採用した。

CPA 測定には LC 装置を用い、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。

3 残留農薬標準品の溶解性及び安定性に関する研究(村山分担研究)

農薬混合標準液中での農薬標準品の安定性では、76 種の農薬標準品に関しては、試薬販売メーカーが試験成績書として示している各農薬原体の純度保証値に基づき、純度補正した。一方、混合標準液中での農薬の安定性では、76 種の農薬混合標準液を用いた。絶対濃度として 10mg/L(アセトン/ヘキサン(1:1 v/v)に溶解)に調製した混合標準溶液を、-20°C、4°C、40°C及び 60°Cの各保存温度で 3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月及び 14 ヶ月保存後、各保存液中の農薬を GC-MS で測定した。

農薬標準品の溶解液への溶解性に関する検討では、農薬標準品原体を精密にメスフラスコに秤量し(n=3)、アセトン/ヘキサン(1:1 v/v)に溶解後、定容(1000µg/mL 相当)にし、農薬標準原液を作製した。分注後、遮光下 4°C及び-20°Cで、各々1 週間、4 週間保管した。

調製初期に作製した農薬標準原液(1000µg/mL)については、目視にて不溶物が認められる場合は、遠心分離またはメンブランフィルターでろ過した後、アセトン/ヘキサン(1:1 v/v)で 100 倍に希釈、定容し、測定用試料(10µg/mL 相当)とすることとした。また、4°Cおよび-20°Cで保存した各農薬標準原液については、測定時(1 週間、4 週間)ごとに、スピッツ管を室温状態に戻した後に、調製初期に作製した農薬標準原液と同様に、目視にて不溶物を確認後、上澄液をアセトン/ヘキサン

(1:1 v/v)で 200 倍に希釈、定容し、測定用試料(5µg/mL 相当)とすることとした。

溶解性の確認では、農薬標準原液の調製初期、4°C及び-20°Cで保存後(1 週間、4 週間)の農薬標準原液それぞれについて、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。なお、測定用試料(n=2)および基準標準溶液を GC-MS で測定、比較した。

4 食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料(理化学検査・微生物学検査・アレルギー検査・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)

4.1 理化学的検査のための適正調査試料の作製:

基材として豚肉(ヒレ、カタおよびバラ肉)を3度挽いたミンチ肉を、サルファ剤標準品としてスルファジミジン(以下 SDD)、スルファジアジン(以下 SDZ)、スルファメラジン(以下 SMR)、スルファメキシピリダジン(以下 SMPD)、スルファメトキシシン(以下 SMMX)、スルファクロルピリダジン(以下 SCPD)、スルファメキサゾール(以下 SMX)、スルファジメトキシシン(以下 SDMX)およびスルファキノキサリン(以下 SQ)、スルフイソキサゾール(以下 SIX)を使用した。

試料はブ里克サーを用いて豚肉の各部位のミンチ肉をペーストにすると同時に各 20 µg/mL に調製したサルファ剤混合液(メタノール溶液)を添加し、よく混合した(添加濃度: 0.20 µg/g)。これらを容器に分注して冷凍し、試料とした。同様にして、ほぼ同量の基材に同割合のメタノールを添加して、ブランク試料とした。

測定操作は、「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。

すなわち、試料を採取し、アセトニトリルで 3 回オムニミキサーを用い抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、アセトニトリル飽和 n-ヘキサンを加え振とうした。アセトニトリル層を採り、残った n-ヘキサン層に n-ヘキサン飽和アセトニトリルを加え振とうし、先に採取したアセトニトリル層と合わせ、40℃以下で濃縮乾固した。残留物をメタノールおよびアセトニトリル:水(19:1)で溶解し、予めアセトニトリル:水(19:1)でコンディショニングした固相抽出カラムに注入した。その流出液は捨て、さらに固相抽出カラムにアセトニトリル:水(17:3)を注入し、その流出液を採り、40℃以下で濃縮乾固した。残留物を 0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液:アセトニトリル(17:3)で溶解させ、フィルターでろ過した後、HPLC (UV)で測定した。

基材中の脂質量の測定はエーテル抽出法により行った。すなわち、試料を採取し、無水硫酸ナトリウムを加え、ジエチルエーテルで 3 回オムニミキサーを用いて抽出した。1 晩放置後、エーテル層を採り、さらに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、濃縮乾固して得られた残留物重量を脂質量とした。

基材中の水分量の測定は常圧加熱乾燥法により行った。すなわち、試料を蒸発皿に採取し、適量の水およびけい砂を加えて混合した。65℃で加温し、添加した水分がほぼなくなった状態から 105℃で 5 時間乾燥した。得られた残留物重量を、採取した重量から差し引いた量を水分量とした。

4.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製:

セレウス菌検査用調査試料の作製では、基材として市販の白米を使用した。これを 121℃ 60 分間のオートクレーブ滅菌を行った後、これ

に 10% NaCl 溶液、12.5% NaCl 溶液または 15% NaCl 溶液を添加し、完全に水分が吸収され米飯状となったことを確認し、これをセレウス菌検査用基材(米飯)とした。またセレウス菌については芽胞液を作製し、これを使用した。

セレウス菌検査用基材に試験菌を接種し、よく攪拌した後、28 日間 22.5℃で保存した。保存開始時、保存 7 日目、14 日目および 28 日目に試料を取り出し、試料から試料溶液を作製した後、この試料溶液についてソイビーン・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それぞれ実施した。同様に NGKG 寒天培地、MYP 寒天培地、PEMBA 寒天培地およびコンパクトドライにも保存後に調製した試料溶液を添加し、培地上での集落形成等の定性反応を観察した後、菌数測定を行った。なお、生菌数測定は n=1 で行った。

定性反応における判定は典型集落を形成する場合に「+」、典型集落ではない集落が認められるか、または生育しなかった場合に「-」とした。

セレウス菌検査用菌株を $MnSO_4$ を含有する普通寒天培地に接種し、30~35℃で 7 日間培養した。培養終了後、生理食塩液に懸濁させ、芽胞液を得た。また、市販の白米について 121℃、60 分間のオートクレーブ滅菌を行った後、これに 10%NaCl 溶液、12.5% NaCl 溶液または 15% NaCl 溶液を添加し、完全に水分が吸収され米飯状となったことを確認し、これをセレウス菌検査用基材(米飯)とした。

ビブリオ属菌の基材中での安定性では、ビブリオ属菌を 2%ゼラチン加 Marine broth で 24 時間前培養した後、希釈したものを試験菌液とした。試験菌液、基材および 2%ゼラチン加 Marine broth を加え、合計重量が 100g となるようにした。これを 22.5℃にて保存し、経時的

に Marine agar を用いて生菌数測定を行った。なお、保存期間は 104 日までとした。また、こうや豆腐を用いた基材にビブリオ属菌の 2 種を添加した後、22.5°C にて約 100 日間保存したもののについて TCBS 寒天培地および酵素基質培地を用いて集落の確認および生菌数測定を行った。

4.3 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以下の ELISA キットを用いて実施した。すなわち、乳タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 牛乳測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳、えび・かに タンパク質の測定には FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」、甲殻類キット「マルハ」を使用し、各々のキットの取り扱い説明書に従って操作した。なお、吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダー EL 808IU、および計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver.1.80 を使用した。

添加した特定原材料として、乳たんぱく質にはスキムミルクを使用し、これを水に溶解し、0.8 μ m のフィルターでろ過したものを食材に添加した。えび・かに タンパク質は甲殻類を含む市販の食品素材から調製した抽出液を使用した。スキムミルクおよび甲殻類を含む食品素材のタンパク質含量は 2-D Quant Kit を使用して測定した。また、添加用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または野菜ペーストを使用した。

精度管理試料は基材に特定原材料を加え均一化して作製した。作製した試料は遠沈管に分注し、4°C または -20°C で保存した。作製した精度管理試料は乳を測定対象とした試料 8 種類およびモリナガ FASPEK 牛乳 測定キ

ット、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 各 1 キットを 11 機関に送付することにより行った。なお、評価は Xbar-R 管理図を作成して統計解析した。この際、Xbar 管理図の上下管理限界線は平均値 \pm 2 \times 標準偏差とした。

4.4 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:

試料は、ブラジル産不分別ダイズ、雪乃白姫ダイズをそれぞれ 200 μ m のスクリーンを装着した超遠心粉碎機を使用して粉碎した後、これらの粉末について定量 PCR 法により RRS 含量を測定し、その結果に基づいてブラジル産不分別ダイズ粉末と雪乃白姫ダイズ粉末を混合し濃度の異なる 2 試料を調製した。

購入試料は、定量 PCR 法または ELISA 法による測定値が示されている RRS を含む市販のダイズ粉末 3 種を使用した。

DNA 抽出を DNeasy Plant Mini Kit または GM quicker を使用し、通知のプロトコールに従って実施した後、定量 PCR を実施した。すなわち、通知に従い、ダイズ内在性 DNA Le1 オリゴヌクレオチドセット、GM ダイズ (RRS) 系統別 DNA RRS オリゴヌクレオチドセット、GM ダイズ (RRS) プラスミドセット-ColEI/TE-および TaqMan Universal PCR Master Mix を使用して実施した。

260 nm における UV 吸収による DNA 濃度の測定には、GeneQuant pro、UV 吸収スペクトルの測定には、UV-1700 を使用した。

アガロースゲル電気泳動は ultraPURE™ Agarose-1000、50 \times TAE により作製したエチジウムブロミドを含むアガロースゲルを用いて実施した。

C. 研究結果

1 尾花分担研究

1.1 外部精度管理調査試料の作製

冷凍餃子に有機リン系農薬 11 種類を添加した後、混和したが一定の均一性が確保できなかったことから、合成着色料を添加し、これを指標として混和を行った。その結果、すべての農薬について有意水準 5% に対する棄却限界値よりも小さかったことから、試料は均一であると判定した。

1.2 外部精度管理調査試料の均一性試験

協力機関への試料送付前に均一性試験を行った。添加した 5 種類の農薬の回収率は 80~99%、変動係数は 4.4~9.3% であった。さらに一元配置の分散分析を行ったところ、全ての農薬において有意水準 5% に対する棄却限界値よりも小さかったことから、試料は均一であると判定した。

1.3 外部精度管理調査試料の安定性試験

試料調製後、 -20°C で約 2 ヶ月間凍結保存した外部精度管理調査試料について分析を行った。その結果、試料(黄)における 5 種類の農薬の残存率は 93.5~104.1% と良好であった。試料(青)における残存率は 84.0~94.2% とやや低めであったが、均一性試験時の分析値の範囲内であった。以上のことから、精度管理試験期間中の試料中の農薬の安定性は確認された。

1.4 再現性確認試験

GC-MS では、標準品連続測定においては 4 機関でのべ 8 農薬、マトリックス標準液連続測定においては 2 機関で、のべ 4 農薬で変動係数が 10% 以上であった。のべ測定農薬数の約 83% は変動係数が 10% 未満であり、概ね良好な再現性が得られていた。

LC-MS/MS では、標準品連続測定におい

て、2 機関で、のべ 2 農薬の変動係数が 10% 以上であったが、マトリックス標準液連続測定においては、全機関の全ての農薬で変動係数が 10% 未満であった。LC-MS/MS については、のべ測定数の 8 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。

1.5 外部精度管理調査結果

2 種類の試料共に誤検出例は無く、全機関が添加農薬を適切に検出した。一部の機関ならびに対象農薬を除き、検出値は添加理論値に近似しており、GC-MS で 70~106%、LC-MS/MS で 74~107% の範囲内であった。また、各機関の結果より ZB、ZW を算出したところ、GC-MS ではジメトエート:G(該当機関)、クロルピリホス:G、ジエトフェンカルブ:D が、LC-MS/MS ではジメトエート:H、クロルピリホス:D、ジエトフェンカルブ:F、クレソキシムメチル:I が疑わしいという結果になった。

1.6 GC-MS システム評価

一連の試料の測定前後における、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、全機関を通じてピーク形状指数はほぼ 0.9~1.1 の範囲内に収束しており、一連の試験前後で大幅なピーク形状の変化がなかったことが示された。

2 斉藤分担研究

標準マテリアルの作製は、CPA 濃度のコントロールしやすさを考慮して、菌自体は増殖したものの CPA 産生が認められなかったものを試料として用いることにした。なお、CPA 添加濃度は検量線範囲内で測定できる低濃度と高濃度を設定した。

内部精度管理および外部精度管理として併

行精度、室内再現精度および室間再現精度を検討した。その結果、併行精度については、低濃度試料と高濃度試料のいずれにおいても標準偏差が5%以内、また、室内再現精度においては低濃度試料と高濃度試料の標準偏差が共に10%以内と、良好な結果が得られた。一方、室間再現精度は低濃度試料においてやや高めを示したが、高濃度試料では5%未満と良好な結果が得られた。

農産物(ピーナッツ、乾燥とうもろこし)中CPA定量分析法の構築に関して特に抽出方法について検討した。なお、本分析では迅速な前処理を目指して抽出方法にASEを採用した。そこで、ASE操作条件の最適化を行うために、抽出溶媒の種類および濃度、温度、抽出サイクル等の違いによる回収率を比較検討した。その結果、抽出溶媒:50%メタノール、抽出温度:25℃(室温)、抽出サイクル:1サイクルが最適であった。検討した分析法を用いて添加回収試験を行ったところ、ピーナッツおよび乾燥トウモロコシの両試料とも、CPA 溶出付近には妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られ、回収率は両試料とも約80%、相対標準偏差6%未満と、良好な結果が得られた。また、実試料として輸入品のピーナッツ、乾燥トウモロコシおよびピスタチオの分析を行ったところ、いずれの試料からもCPAは検出されなかった。

3 村山分担研究

3.1 農薬混合標準液中での農薬標準品の安定性についての検討

農薬混合標準溶液の14ヶ月までの経時変化について検討したところ、10%以上の減少が認められたのは、-20℃保存群では3ヶ月で2農薬、6ヶ月で4農薬、9ヶ月で1農薬、

14ヶ月で0農薬であった。しかしながら、NAGINATAの定量誤差を考慮すると今回使用した各農薬は-20℃保存において14ヶ月まで安定であると判定した。一方、4℃保存群では3ヶ月で25農薬、6ヶ月で31農薬、9ヶ月で2農薬、14ヶ月で0農薬で10%以上の減少が認められた。4℃においてもNAGINATAの定量誤差を考慮すると安定であると判定した。

40℃保存群では3ヶ月で2農薬、6ヶ月で21農薬、9ヶ月で4農薬、14ヶ月で1農薬で10%以上の減少が認められた。なお、本保存群においてもNAGINATAの定量誤差を考慮すると安定であると判定した。

60℃保存群では3ヶ月で39農薬、6ヶ月で46農薬、9ヶ月で50農薬、14ヶ月で41農薬で10%以上の減少が認められ、これらは有意であった。

3.2 農薬標準品の溶解液への溶解性についての検討

溶解用溶媒は残留農薬の一斉試験法で用いられるアセトン/ヘキサン(1:1 v/v)として、通常より10倍濃度の高い標準原液を調製し、冷凍あるいは冷蔵保存した。調製段階において、目視で不溶物を確認することはできなかった。各農薬ともに目視で不溶物を確認できず、溶解しているものと考えられた。

4 大島分担研究

4.1 理化学検査のための適正試料の作製検討:

豚肉試料について冷凍保存後の均一性確認試験を実施したところ、ヒレおよびカタ肉では全てのサルファ剤において均一性が認められた。しかしバラ肉では、10種中6種のサルファ剤において均一性が認められなかった。そこ

で、各基材について脂質量および水分量の測定を行ったところ、脂質量についてはバラ肉(34.0%)>カタ肉(22.2%)>ヒレ肉(6.8%)となり、水分量については逆にヒレ肉(71.4%)>カタ肉(58.1%)>バラ肉(48.8%)となった。なお、いずれの基材においてもほぼ全てのサルファ剤について80~90%の回収率を得た。

同様に100日間冷凍保存した後の安定性試験を行った。その結果、カタ肉におけるSQ(82.7%)およびバラ肉におけるSDD(83.9%)を除き、いずれの基材においても全てのサルファ剤について85%以上の安定性が得られた。一方、冷蔵7日までの安定性について確認したところ、ヒレ肉では、冷蔵4日目においてはSIX(83.2%)を除き、95~100%の安定性であり、冷蔵7日目においてはSCPD(81.5%)、SIX(37.9%)およびSMX(83.3%)を除き、85%以上の安定性が確認された。一方、カタ肉では、冷蔵4日目の時点でSDZ(105.7%)を除き、安定性は80~90%となり、SMR(84.4%)、SIX(77.7%)、SMX(82.3%)およびSDMX(83.6%)については85%を下回った。また、冷蔵7日目においてはSDZ(104.5%)を除く他のサルファ剤についても80%を下回るまでに低下した。バラ肉では、冷蔵4日目においてはSIX(77.6%)を除き、約90%以上の安定性であり、冷蔵7日目においてはSDZ(73.2%)、SIX(16.1%)、SMX(81.5%)を除き85%以上の安定性が確認された。

4.2 微生物学検査のための適性試料の作製検討:

セレウス菌検査における基材作製を行う際に白米に添加する食塩濃度について検討した。その結果、*B. cereus*の4菌株および陰性対照である*B. subtilis*および*B. megaterium*について28日目まで22.5℃で保存した際に菌数測定をSCD寒天培地で測定したところ、*B.*

*cereus*の4菌株についてはいずれの食塩濃度においても28日目まで接種菌数とほぼ同等の菌数が得られた。これに対して、*B. subtilis*の2菌株および*B. megaterium*では食塩濃度に依存した菌数上昇の抑制が認められた。さらにNGKG寒天培地、MYP寒天培地、PEMBA寒天培地およびコンパクトドライを用いた典型集落の形成の有無および菌数測定を行ったところ、*B. cereus*の4菌株についてはいずれの選択培地においても典型集落の形成を認め、かつ平板上の集落数から算出した生菌数はSCD寒天培地における結果とほぼ同等であった。これに対して、陰性対照菌である*B. megateirum*では、いずれの選択培地においても集落形成を認めなかったが、*B. subtilis*の2菌株については、NGKG寒天培地およびコンパクトドライでは典型集落の形成を認めなかったが、MYP寒天培地およびPEMBA寒天培地上には典型集落は認めないものの、非典型集落の形成を認めた。

ビブリオ属菌検査では、基材としてこうや豆腐および麩を用いた。これらについて22.5℃にて保存したところ、こうや豆腐については、*V. parahaemolyticus*、*V. fluvialis*のいずれにおいても一度 10^8 オーダーまで菌数が上昇した後、 10^7 オーダーまで減少し、その後一定となる傾向が認められた。しかも、菌数は菌液接種後104日目まで持続した。これに対して、麩では*V. parahaemolyticus*の場合に菌液接種後21日目には検出限界以下にまで減少した。*V. fluvialis*についても同様であったが、菌液接種後29日目において 10^4 オーダーまで菌数が減少した。一方、冷蔵保存した場合には長期間の安定性を得ることはできなかった。

4.3 アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製検討:

乳を測定対象とした共同試験試料の均一性について、5種の添加試料で行ったところ、いずれの試料についても均一であると判定した。また、回収率も50~150%の範囲内であった。なお、ブランク試料3種の測定値は、いずれもキットの検出下限以下であった。

本試料を用いて共同試験を行ったところ、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットによる添加試料の測定では試料3、試料8を除き Xbar 管理図において Xbar が上部管理限界線 (UCL) および下部管理限界線 (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が、R 管理図では、UCL を超えた機関が各試料につき各々 1 機関ずつ認められた。一方、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳による測定では全添加試料で 1 機関の測定値が Xbar 管理図の LCL を下回り、z-スコアが -2 以下となった。また、共同試験参加機関の添加試料測定における室間精度 (RSD_R) はモリナガ FASPEK 牛乳測定キットでは 5.35~12.81%、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳で 15.06~18.89% (1 機関を除くと 9.22~13.58) でいずれも測定キットのバリデーション基準 25% 以下を満たしていた。

昨年度の本研究報告で ELISA の吸光度データからの濃度計算結果が使用する計算ソフトウェアにより異なり、DeltaSoft JV Ver.1.80 の計算値を対照として参加機関が使用した各計算ソフトウェアを比較した場合、マイクロプレートマネージャー Ver.5 の乖離が特に大きいことを報告した。そこで、卵試料の測定データを用い、マイクロプレートマネージャー Ver.5 の 4PL 解析について詳細に検討したところ、吸光度と濃度のプロットから検量線がずれていることが

明らかになった。

さらに、えび・かに 試料調製にあたり、食材に添加する甲殻類タンパク質の調製法を検討した。3種の食品素材から甲殻類タンパク質の抽出を行ったところ、3種全てから FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」によって甲殻類タンパク質が検出された。この抽出液をそれぞれ 6種類の食材に添加して甲殻類タンパク質を測定し、添加液に対する回収率を求めた結果、回収率は 82~120% といずれも良好だった。また、基材に上記抽出液を添加することにより作製した試料の均一性について確認したところ、均一であると判定された。

4.4 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:

外部精度管理調査結果について検証したところ、試料 1 の定量 PCR 法による報告値の平均は 6.41% で表示濃度と同程度であったが、ELISA 法による報告値は 4.02% で定量 PCR 法に比べて 2% 以上低かった。試料 2 の ELISA 法による報告値は表示濃度と近く、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値の差も小さかった。試料 3 の ELISA 法による報告値は表示濃度よりも高かったが、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値の差は小さかった。試料 4 と試料 5 は ELISA 法では予定濃度と報告値はほぼ等しく、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値間の差も小さかった。しかし、定量 PCR 法の報告値は DNA 収量から算出した定量 PCR 法の予定濃度と比べ試料 4 は 0.8% 以上、試料 5 は 2% 以上低かった。

外部精度管理における DNA の見かけの収量を抽出法間で単純に比較した場合、DNeasy Plant Mini Kit の DNA 収量は、GM quicker のそれに比べ 2 倍以上だった。レクチンコピー数の報告値は GM quicker が DNeasy

Plant Mini Kit に比べ約 3 倍高く、DNA 抽出法が DNA 収量および定量 PCR 測定におけるレクチンのコピー数に影響していることが明らかになった。このことから抽出法の影響について確認するため、GM quicker と DNeasy Plant Mini Kit を用いて外部精度管理調査試料 1 と試料 4 から DNA を抽出したところ、260 nm の吸光度から求めた DNA 収量は、DNeasy Plant Mini Kit の方が GM quicker に比べ試料 1 では 2.7 倍、試料 4 では 1.7 倍多かった。そのため、抽出した DNA を 20 ng/μL に調整し、定量 PCR に供してレクチンのコピー数を測定した。その結果、試料 1、試料 4 とも GM quicker による DNA では DNeasy Plant Mini Kit に比べ 2 倍以上多いコピー数が測定され、外部精度管理調査と同様の結果が得られた。

DNA 定量法による DNA 濃度の差について検討するため、DNA 抽出液について蛍光光度法による濃度の測定を Quant-iT™ dsDNA High Sensitivity Assay kit を使用して行い、UV 吸収法による DNA 濃度と比較した。その結果、GM quicker では蛍光光度法による定量値の UV 吸収法に対する回収率が試料 1 では約 58%、試料 4 では約 62%となり、定量値が約 40% 減少した。一方、DNeasy Plant Mini Kit では蛍光光度法による定量値の UV 吸収法に対する回収率は試料 1 では約 13%、試料 4 では約 29% で、定量値が大きく減少し、UV 吸収法による DNA 濃度との差が GM quicker と比べて大きかった。そこで、上記の結果を踏まえ 20 ng/μL に調整した DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker 抽出液を蛍光光度法で定量し、この結果から GM quicker 抽出液の濃度を DNeasy Plant Mini Kit の蛍光光度法による濃度に調整した。これらの DNA 溶液について定量 PCR によりレクチンのコピー数を測定した結果、抽出

法によるレクチンコピー数の差は大きく減少した。

D. 考察

1 尾花分担研究

1.1 再現性試験およびマトリクス効果

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 2 機関のマトリクス標準液連続測定は、2 回目以降に大幅に面積値が大きくなった。これは、1 回目のマトリクス注入によって 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。3 機関では、マトリクス補正以前から再現性が良好であった。4 機関では、変動係数は一部または全ての農薬で、マトリクス標準品の方が小さく、マトリクスによって再現性が向上することが示された。また、マトリクス効果を確認したところ、GC-MS においてはマトリクスの影響により、1 機関を除く 8 機関で全農薬が感度増大、ジメエートでより顕著、という傾向であった。LC-MS/MS では 5 機関でほぼ変化無しであったが、3 機関では一部または全ての農薬で感度低下がみられた。また、1 機関ではクレソキシムメチルで感度がほぼ倍増した。以上のことより、餃子由来のマトリクスの影響は大きく、GC-MS や LC-MS/MS での測定には何らかの補正が必要な場合が多い、と考えられた。

1.2 外部精度管理試験

検査結果を回収率で判断した場合、不良となる機関は 3 農薬のみであったが、ユーデンプロットによる 2 試料での機関内 z-スコアおよび機関間 z-スコアによる複合評価を行ったところ、8 機関中 5 機関の 7 項目で疑わしいと判定された。今回用いた評価法では、分析した際の回収率が 2 試料間で大きく異なる場合、

その機関の精度に問題があるとして「疑わしい」という判定となる。ここで、仮に一方の試料の均一性が十分でない場合、その試料の見かけ上の回収率が大きく異なり、疑わしいと判定されるため、2 試料の均一性が非常に重要となる。表 2 に示した均一性試験結果では、両試料共に均一であると結論づけているが、試料(青)の容器 3 は他よりもやや低い値を示している。しかし、その傾向は全農薬を通じて同一であり、一部農薬の回収率が高いまたは低いといった事象の理由とはなりにくいと考えられた。また、 z -スコアの算出根拠となる標準偏差が、標本数が少ないため小さくなりすぎる場合があり、他の農薬や別の検出器の値と比較して、良好と判定される範囲が狭くなる例が見られた。一方で、2 試料共に回収率が低い傾向を示した H 機関の場合は、機関間 z -スコア(ZB)が-1.0~-1.7と低くなったが、機関内 z -スコア(ZW)ではジメトエート以外は-0.1~1.3 で良好の範囲内であった。以上の結果を 70~120%を良好と判定した場合と比較すると、測定値和は大きく分散し、ZB の評価がやや甘くなる例があったのに対し、測定値差は小さく ZW の評価がやや厳しい例があった。

1.3 精度管理試験結果の比較

再現性試験と外部精度管理試験の結果について観察したところ、多くの機関で測定値が集中しており、非常に精度良く測定できたことがわかる。1 機関の GC-MS では、標準品の再現性試験のみ変動係数が大きく、試料中のマトリックス効果によって変動係数が低く抑えられる傾向が示された。他の 1 機関では再現性試験結果と、外部精度管理試験結果が個別のグループを形成したが、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た。

1.4 GC-MS と LC-MS/MS の結果比較

各農薬共に良好な回収率を示していたが、クロルピリホスにおいては GC-MS 測定がやや分散しており、横に長い分布を見せた。しかし、全般的に分析値は一致する傾向を見せており、過去 2 年間の同様のデータと比較しても、非常に良好な相関を示した。

1.5 GC-MS システム評価

ピーク形状が大幅に悪化した例は 1 機関のペンタクロロフェノール、他の 1 機関の 2,4-ジニトロアニリン(共にピーク形状指数 1.6)のみであった。これらはカラム注入口側の指標物質であり、餃子マトリックスによってカラムが劣化していることが示された。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、餃子試料の注入による GC-MS システムへの影響は小さいと考えられた。

2 齊藤分担研究

作製した標準マテリアルについて、室内再現精度および室間再現精度について確認したところ、室内再現精度においては低濃度試料と高濃度試料の標準偏差が共に 10%以内と、良好な結果が得られた。これに対して、室間再現精度は低濃度試料においてやや高めを示したが、高濃度試料では 5%未満と良好な結果が得られた。今回の室間再現精度試験においては、参加機関数が 3 機関と少なく、1 機関の結果が大きく外れたため、全体の標準偏差も大きく偏ってしまったと推察された。しかし、各試験機関の検量線はいずれも 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の間で相関係数(r)=0.999 以上の良好な直線性を得ることができたこと、また高濃度試料において標準偏差は満足すべき値が得られたことから、構築した CPA 分析法および作製した標準マテリアルも共に十分な実用性が

あるものと判断した。

また、農産物からの CPA 分析について検討したところ、ASE による抽出を行い、抽出溶媒：50%メタノール、抽出温度：25℃(室温)、抽出サイクル：1 サイクルが最適であった。この方法を用いてピーナッツおよび乾燥とうもろこしを用いて添加回収試験を行ったところ、CPA の溶出付近に妨害ピークは認められず、回収率も約 80%以上と良好な結果が得られた。今回の研究では、トライアルのため実施試料数が少なかったが、今後、食品試料数や対象物を増やすことで、CPA 汚染の実態調査に貢献できるものと思われる。また、本法を CPA 汚染が危惧される食品に適用することで安全性評価を行うことが可能と考えられ、今後、実用的な分析法としての活用が期待される。

3 村山分担研究

農薬混合標準品について -20℃、4℃、40℃および 60℃での安定性について確認したところ、-20℃および 4℃では全ての農薬について 14 ヶ月までの安定性が確認された。これに対して 40℃保存では thiometon を除いて 14 ヶ月まで安定性が確認されたが、thiometon は 3 ヶ月目で 10%減少し、その後も経時的に減衰して 14 ヶ月で 40%減少した。また、60℃では 3 ヶ月で 39 農薬、6 ヶ月で 46 農薬、9 ヶ月で 50 農薬、14 ヶ月で 41 農薬で 10%以上の減少が認められた。とりわけ化学的に安定である有機塩素系農薬には減衰が認められず、単独でも安定性の低い農薬が減少しやすい傾向にあった。また、6、9、14 ヶ月の経時変化がプラトーになる農薬が認められ、プラトーとなる濃度も様々であることから、標準溶液中の農薬の減衰は、単純な分解のみならず、他の化合物との反応、複合体の形成等、相互作用が関

与していると考えられる。

4 大島分担研究

4.1 理化学検査のための適正試料の作製検討：

ヒレ、カタ肉およびバラ肉を用いて、サルファ剤の均一性について確認したところ、バラ肉で 10 種中 6 種のサルファ剤において均一性が確認できなかった。バラ肉は脂質量が最も多く、水分量が最も少なかった。そのため、ヒレおよびカタ肉と同様の混合方法では均一な試料を作製することは不可能であることが示唆された。

冷蔵保存による安定性について検討したところ、ヒレおよびバラ肉の結果を比較すると、多くのサルファ剤においてバラ肉の方が高い回収率を得た。ヒレ、カタおよびバラ肉における SDZ、バラ肉における SMR においては、HPLC 測定における各サルファ剤のピークがバックグラウンドピークと重なったため、差し引いて算出した。また、いずれの基材においても、SIX は時間経過とともに他のサルファ剤と比較して大きく安定性が低下した。これは基材中の物質との相互作用による影響と考えられた。いずれの現象も冷凍保存安定性試験時には認められなかった。冷蔵保存安定性の結果、バラ肉がヒレおよびカタ肉に比べ高い安定性を有しているとは判断できるが、均一性試験の結果よりバラ肉は不适当であるため、カタ肉に比べて冷蔵保存安定性が良好であったヒレ肉が調査試料用基材としてはより適していることが示唆された。また、調査試料として、ヒレ肉における添加サルファ剤としては、冷蔵保存日数を最大 4 日間と規定することにより、SDZ および SIX を除き、適用可能であり、冷蔵保存日数を最大 7 日間と規定することにより、SDZ、SCPD、

SIX および SMX を除き、適用可能であると考えられた。

4.2 微生物学検査のための適正試料の作製:

セレウス菌検査における陰性対照菌では選択培地上で典型集落を認める場合と、非典型集落を認める場合の 2 とおりが観察された。外部精度管理調査を行う場合、陽性対照菌については公定法により当該検査を実施した場合に明らかに陽性と判定される必要があり、かつ陰性対照菌についても必ず陰性と判定される必要がある。今回用いた菌株では上記の要件を満たしているものの、陰性対照菌において選択培地上で集落形成を認めない事例が認められた。外部精度管理調査を行う場合、調査試料について検査を実施した際に選択培地上に集落が認められなかった場合、参加者は菌が調査試料に接種されていないのではと考える可能性もある。そのため、セレウス菌検査に関する外部精度管理調査を実施する場合にはいくつかの選択培地上で非典型集落を形成する *B. subtilis* は極めて当方の意図として適した菌種であるのかもしれない。ただし、全ての選択培地上で非典型集落を形成するわけではないので、その部分をどのように配慮するかが問題となる。しかし、この陰性対照菌に関する事例を除くと、温度変化に非常に強く、かつ接種菌が安定して回収できることは外部精度管理調査試料として採用するには十分な要件であると考えられた。今後は菌数濃度を低くした際の安定性について検討し、より実用的な基材の開発が必要であると考えられた。

一方、ビブリオ属菌検査用調査試料に関する検討では、こうや豆腐および麩を基材として選択することにより、培地成分を含んだ状態で基材中で添加菌を安定化させることができるの

ではないかと考え、これらの基材を用いたときの添加菌の安定性について観察した。その結果、こうや豆腐を用いることにより陽性対照菌、陰性対照菌ともに 104 日間の長期に亘って添加菌を回収することができたことから、こうや豆腐は基材として採用できる可能性が考えられた。ビブリオ属菌は魚介類等から多く検出されることを考慮すると今回のこうや豆腐は適切ではないかもしれない。しかし、食材中での安定化を図ることは最終的な実食材への適用を図るうえで非常に重要なことであるものとする。すなわち、培地成分のみならず食材中に含まれる構成成分等との相互作用により添加菌の安定性が変化する可能性は十分に考えられる。そのためにも、こうや豆腐のように比較的単純な構成成分から成る食材から開始することで、今後より多くの知見を得るための足がかりになればと考えている。さらに、安定性の確認において一度 10^8 オーダーまで増菌してから安定化する傾向が認められたため、外部精度管理調査を実施する際に用いる輸送および保存の温度条件である冷蔵保存における菌数の変化について確認した。しかし、増菌の有無に関わらず冷蔵保存することにより著しい菌数の減少が認められたことから、現時点においてこうや豆腐を用いて作製したビブリオ属菌検査用調査試料は冷蔵保存を行うことはできないものと判断した。

4.3 アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製:

乳を対象とした調査試料の作製を行い、これを用いた共同試験を実施したところ、z-スコアが 2 以上となった機関において以下の事例が認められた。

モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試料 3 において Xbar が上部管理限界線 (UCL) を

超えzスコアが2以上となった機関番号1では、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試料1、試料5のR管理図でもUCLを超えた。機関番号1からは、測定中にマイクロプレートウォッシャーが故障し、途中から手動で洗浄を行ったとの報告があり、洗浄の偏りにより測定値の異常、再現性の低下が起こったものと考えられた。機関番号3は、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットのいずれの測定値も低いこと、両キットとも使用した試料抽出液は共通であることから、試料の抽出操作に何らかの問題があった可能性が考えられた。また、報告書を詳細に検討した結果、ブランク試料の測定においてウェル間の再現性不良が認められたため、マイクロプレートの洗浄不良があった可能性も考えられた。機関番号11は、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試料3と試料7のR管理図でUCLを超えた。機関番号11ではブランク試料のみでなく添加試料でもウェル間で再現性不良が認められた。このため、マイクロプレートの洗浄の偏りに加え、使用したピペットの分注精度に問題があった可能性も考えられた。以上の結果、外部精度管理調査により、特定原材料検査の測定操作のみでなく、機器や器具の性能、管理状況も推定できることが分かった。

4.4 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:

外部精度管理調査結果から、試料1の定量PCR法による報告値の平均は6.41%で表示濃度と同程度であったが、ELISA法による報告値は4.02%で定量PCR法に比べて2%以上低かった。試料1のELISA法による報告値が定量PCR法と比べ低かった理由としては、RRSのCP4EPSPSタンパク質の発現量が組換えDNAの量に比べて少なかった、または混合の過程

でCP4EPSPSタンパク質が変性または消失した等の可能性が考えられた。しかし原料を含め調製方法の詳細が不明なため、原因を特定することはできなかった。また、試料4および試料5の定量PCR法による報告値は原料のDNA抽出量から算出した予定濃度と異なり、ELISA法の平均値と同程度であった。この結果、品種の異なるダイズを混合した粉末からのDNA抽出量は、単純に元のダイズのDNA抽出量の比を反映していない可能性が示唆された。

外部精度管理調査試料からDNAを抽出したところ、260nmの吸光度から求めたDNA収量は、DNeasy Plant Mini Kitの方がGM quickerに比べ約2倍多かった。なお、両抽出法とも最初のサンプリング量は1gであるが、このうちシリカゲルカラムに負荷しDNA溶出に供するサンプル量は、DNeasy Plant Mini Kitで0.03g、GM quickerで0.05gと、GM quickerの方が多いため、収量の差はさらに大きいと考えられた。

DNeasy Plant Mini KitとGM quickerのDNA濃度が異なっていた可能性が示唆されたことから、これらとUV吸収法によるDNA濃度とを比較したところ、GM quickerの抽出DNAでは測定法間で定量値の差が小さいことから260nmの吸収は多くが二本鎖DNAに由来すると考えられた。一方、DNeasy Plant Mini Kitでは蛍光光度法による定量値がUV吸収法を大きく下回ることから、抽出液に二本鎖DNA以外に260nmに吸収を持つ物質が多く含まれていることが示唆された。

RRSを含め通知の定量PCR法は混入率の計算に全て内標比を使用しているため、PCR反応液に含まれるDNAの量の変動はある程度許容されるが、内標比を用いない定性PCR

法では PCR 反応液に含まれる二本鎖 DNA の量により検出下限が変動することが予想される。このため複数の DNA 抽出法がある場合、定性 PCR の反応液を調製する際は、DNA 濃度を二本鎖 DNA 濃度として測定し、PCR 反応液に含まれる二本鎖 DNA 濃度を一定にすることを考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

1 尾花分担研究

対象農薬 25 種類のブラインド試験であったが、全機関とも誤検出は無く、報告値も 160 農薬(農薬×試料×検出器×機関)中 150 農薬は回収率として 70~120%の範囲であり、残りの 10 農薬を含めても 60~122%の範囲であり、非常に良好な結果であった。2 試料の外部精度管理試験を ZW、ZB で複合評価した結果、全ての評価項目で良好な判定結果を得た機関は A、B、C の 3 機関であった。また、全体では評価可能であった 80 項目(農薬×検出器×機関)中の 9 割以上が良好であり、全般的に高い精度を示した。また、再現性試験、外部精度管理試験を通じて変動係数も小さく、各検査機関で測定機器の維持管理が適切に行われていると考えられた。

本研究の協力機関は、その多くが 3 年間継続して参加しており、その技術蓄積のために非常に良好な結果が得られたと考えられた。加工食品は生鮮食品以外の全てを指すため、数種類の試料で十分な精度管理試験が行えるとは到底考えられない。また、分析法も確立されていないために、仮に低回収率となっても要因分析が困難である。しかし、同一試料を用いた共同試験を行い、分析結果を照合することは、分析技術の向上に大いに役立つと思われる。

2 齊藤分担研究

市販のめんつゆに *Penicillium commune* を接種・培養し、この試料中の CPA 濃度を確認した上で、CPA 標準品を添加して試料中の濃度調整(低濃度、高濃度の 2 種類)をすることにより標準マテリアルを作製した。これを用いて内部精度管理および外部精度管理を実施したところ、併行精度については、低濃度試料と高濃度試料のいずれにおいても標準偏差が 5%以内、また、室内再現精度においては低濃度試料と高濃度試料の標準偏差が共に 10%以内と、良好な結果が得られた。また、室間再現精度は低濃度試料においてやや高めを示したが、高濃度試料では 5%未満と良好な結果が得られた。以上のことから、本標準マテリアルは十分に実用性のあるものと考えられた。

また、農産物中の CPA 濃度を測定するため、ASE による抽出を行い、至適条件を検討した。この検討した分析法を用いて添加回収試験を行ったところ、ピーナッツおよび乾燥トウモロコシの両試料とも、CPA 溶出付近には妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られ、回収率は両試料とも約 80%、相対標準偏差 6%未満と、良好な結果が得られた。

3 村山分担研究

農薬混合標準液の -20、4、40 および 60°C における保存試験の結果、-20 および 4°C 保存群では 14 ヶ月まで各農薬は安定であることが分かった。40°C においては、thiometon を除いて 14 ヶ月まで安定性が確認された。60°C 保存群では 14 ヶ月で半数以上の農薬で 10%以上の減少が認められた。

農薬の溶解性の尺度として log Kow を参考にして、12 種類の農薬について通常の 10 倍高濃度の標準原液を調製し、-20 および 4°C で