

201033004B

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～平成22年度
総合研究報告書

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

主任研究者 小 島 幸 一

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20年度～平成22年度
総合研究報告書

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所
主任研究者 小 島 幸 一

平成23年(2011年)4月

目 次

I. 総合研究報告	
検査機関の信頼性確保に関する研究	1
小島 幸一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
III. 研究成果の刊行物・別刷	73

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～平成 22 年度

総合研究報告書

主任研究者 小島 幸一

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)

総合研究報告書

検査機関の信頼性確保に関する研究

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確実に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非常に重要であり、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、適正な評価を行う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。このような、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・安全の確保に大きく寄与するものとする。ここでは、平成 20 年度から平成 22 年度までの 3 年間に実施した以下の 4 研究課題、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(中澤・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(松木・村山分担研究)、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)について報告した。

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)、中澤裕之(星薬科大学教授)、斉藤貢一(星薬科大学准教授)、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)、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危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。特に食品衛生検査施設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施設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構築してきたが、未だ十分とは言えず、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となるような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。また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施設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係る

検査施設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)

加工食品を用いた精度管理試料として、平成 20 年度は流動性が高い市販のレトルトカレーを、平成 21 年度は固体試料としてパンケーキを、平成 22 年度は複合試料として市販冷凍餃子を使用し、各種精度管理試料の調製を行った。

参画した研究協力機関は、岩手県環境保健研究センター、新潟県保健環境科学研究所、愛知県衛生研究所、奈良県保健環境研究センター、神戸市環境保健研究所、広島市衛生研究所、徳島県保健環境センター(平成 20、21 年度)、高知県衛生研究所(平成 22 年度)、北九州市環境科学研究所の計 9 機関の地方衛生研究所であった。

平成 20 年度はレトルトカレーを加温した後にフードプロセッサで細切均一化し、対照試料とした。外部精度管理調査試料はこれに農薬を添加し、攪拌機でよく混和して均一化した。

平成 21 年度はホットケーキミックス粉と牛乳と卵をよく攪拌して生地を作製し、外部精度管理調査試料には農薬を添加して攪拌機で均一化した。これをホットプレート上で加熱調理し、放冷後にフードプロセッサで細切均一化し、対照試料および外部精度管理調査試料を調製した。また、加熱調理後に細切均一化していない無添加試料 3 枚と添加試料 1 枚を 1 組とし、サンプリング用試料と

した。

平成 22 年度は冷凍餃子をフードプロセッサで細切均一化し、対照用試料とした。外部精度管理用試料は、これに農薬と均一化の指標として合成着色料を添加し、攪拌機でよく混和して均一化した。なお、外部精度管理用は 2 種類(黄・青)調製し、添加農薬の濃度差を 4:5 となるようにした。

全ての添加試料は均一化後に分析を行い、一元配置分散分析法によりその均一性を確認した。また、調製後約 2 ヶ月後に分析し、添加農薬の安定性を調査した。

参加機関の農薬分析法は任意としたが、参考として分析法を示した。平成 20~21 年度に例示した方法は、以下のとおりとした。すなわち、抽出溶媒に酢酸エチルを用い、抽出後に溶媒を置換してヘキサン/アセトニトリル分配を行って脂質を除去した。精製操作は、これまで生鮮食品の前処理に用いられてきたグラファイトカーボン(GCB)/PSA の固相カラムを用いた。また、試料を 5g とし、汎用遠心管を使用することにより作業効率の向上を図った。平成 22 年度に例示した方法は、平成 20、21 年度で好成績を収めた参加機関の分析法を参考とし、アセトニトリルとヘキサンが混在した状態で抽出を行い、抽出と脱脂を同時に行った。精製操作以降はそれ以前と同様とした。

添加農薬としては、平成 20 年度は有機リン系、カーバメート系農薬などよりメタミドホス、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-ジメチルビンホス、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、ピリミカルブ、カルバリルの 15 種類を選択した。平成 21 年度はエスプロカル

ブ、クロルピリホス、ジエトフェンカルブ、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、ビテルタノール、イミダクロプリド、テブフェンジドの10種類を選択した。平成22年度は上記25農薬よりジメエート、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、イミダクロプリドの5種を選択した。以上は、必要に応じて市販混合溶液の使用あるいは指定標準品混合液を委託調製した。測定用の標準液は、大阪府から各機関に同一品を提供した。GC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を使用した。標準溶液は分析試料と共に参加機関へ冷凍宅配便で送付した。

試験方法は、分析機器の再現性試験では、配布した標準品を各機関の分析法において0.1 µg/gの濃度に調製し、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およびzスコアを求めた。また、配布し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。なおこの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、マトリックス効果を百分率で求めた。

平成20年度には内部精度管理試験を実施した。配布した無添加試料と標準品を用いて添加回収試験を行った。添加濃度は100 ng/g(エトプロホス、エトリムホスは50 ng/g)とした。試料秤量後に添加を行い、直ちに分析を開始した。測定機器はGC-MSおよびLC-MS/MSとした。試行数は5以上と

し、測定値、平均回収率とその変動係数、Zスコアを求めた。

外部精度管理試験では、配布した外部精度管理試料を試行数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。平成20年度は添加農薬と濃度を通知した。平成21年度は添加農薬と濃度範囲、平成22年度は添加農薬の範囲と濃度範囲のみを通知した。

平成21年度にはサンプリング試験を実施した。配布した不均一試料を粉碎均一化し、試行数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。各機関へは、「添加濃度0.2 µg/g未滿」と通知しており、濃度未知のブラインドテストとなった。

評価方法は、平成20、21年度の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。Xbar管理図では70~120%の区域で良好との判定をした。R管理図では管理限界の為の係数を2.114とし、上部管理限界(UCL)を設定した。zスコアは絶対値2以下で良好とした。平成22年度は、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。試料間の測定値和は真度、測定値差は精度の指標と考えられるが、判定基準のZB、ZWは平均値と標準偏差を算出根拠に用いた。このZB、ZWを用いて散布図を作成し、ユード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。

2. 食品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(中澤・斉藤分担研究)

マイコキシン検査法、特にシクロピアゾン酸(CPA)を題材とし平成 20 年度から平成 22 年度の 3 年間研究を進めてきた。まず平成 20 年度は、LC-UV、LC/TOF-MS による CPA の分析法の構築を試みた。

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:25 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) = 7:3 を用いた。カラム温度は 40°C、移動相流速は 1 mL/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 (2.0 mm I.D. x 150 mm) を用い、カラム温度を 40°C 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 0.2 mL/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。

平成 21 年度は、LC-UV・PDA による測定法並びに ELISA による検出のための抗体作製を試みた。

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:25 mM 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、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除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。

平成 22 年度は、CPA の標準マテリアル作製と精度管理並びに標準マテリアル作製の

妥当性評価を試みた。

標準マテリアルの作製は、CPA 産生菌として *Penicillium commune* (NRBC5363、6327、7224、7746) および分離した菌株 (K-18) を用い、これらの菌株を市販のめんつゆに接種して 4℃、4 ヶ月間静置培養した。培養後、菌体と培養ろ液に分離し、ろ液を試料とした。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)を行った。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、内部・外部精度管理試料に用いた。なお、室間再現性試験には 3 機関が参加した。

CPA 測定は、LC 装置として日立社製 655A-12 (HITACHI L-500 LC Controller 付き) を、検出器には島津製作所製 SPD-6AV を用い、測定波長は 220nm とした。LC カラムには、DIONEX 社製 Acclaim® Mixed-Mode WAX-1 (4.6 mm i.d. × 150 mm、5 μm) を用い、移動相にはアセトニトリル:25 mM 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 1 mL/min とし、試料注入量は 20 μL とした。

試料溶液の調製は、液状調味料からの抽出には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。ピーナッツおよび乾燥とうもろこし試料の調製操作手順は、抽出に高速溶媒抽出法(ASE)を採用し、装置には DIONEX 社製 ASE-300 を用いた。ASE 用の抽出セル(33 mL 容)の底部に円筒ろ紙を挿入し、珪藻土約 1 g を積層した後、粉碎した試料 2.5 g に珪藻土 3.0 g を加えて混和したものを充填した。さらに、珪藻土を抽出セルの入り口部分まで満たし、ASE-300 に設置した。ASE 操作条件は、抽

出溶媒 50%メタノール、抽出温度 25℃(室温)、抽出サイクル 1 回とした。得られた抽出液に精製水を加えて全量 50 mL とした。試料抽出液の一定量(10 mL)を減圧下で乾固し、1%メタノール 1 mL で再溶解したものを Waters 社製 Oasis® HLB カートリッジ(30 mg、1 cc)に負荷し、カートリッジを精製水 3 mL で洗浄後、メタノール 3 mL で溶出した。この溶出液を減圧下で乾固した後、メタノールで 1 mL に定容し、試験溶液とした。

3. 残留農薬標準品の溶解性及び安定性に関する研究(松木・村山分担研究)

残留農薬標準品の品質評価のために、長期に渡る残留農薬標準品ならびに残留農薬混合標準品の安定性について検討した。平成 20 年度は、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、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 10 mg/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 10 mg/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℃および 40℃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。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は、測定用溶液 0.5 mL 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℃ および -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℃ および -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、遠心分離後また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。

平成 21 年度は、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、76 種の農薬標準品による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 10 mg/L [アセトン/ヘキサン(1:1 v/v)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、アセトニトリル/ヘキサンで混合して用いた。

試験法は、絶対濃度として 10 mg/L (アセ

トニトリル/ヘキサンに溶解) 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ごとに試料数を 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 10 mg を精密にメスフラスコ(10 mL)に秤量し、アセトニトリル/ヘキサンに溶解後、定容(1000 µg/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、溶液をスクル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。

低濃度農薬標準液の調製は、初期調製時に残留農薬標準品原体 10 mg をメスフラスコ(1000 mL)に精密に秤量後、アセトニトリル/ヘキサンで溶解し、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、10 µg/mL レベルのアセトニトリル/ヘキサン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、スピッツ管へ採取した 0.5 mL 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、ろ過してアセトニトリル/ヘキサンで 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 0.5 mL 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(10 µg/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。

平成 22 年度では、農薬混合標準液中での農薬標準品の安定性について、76 種標準品を用い、農薬混合標準液の調液は、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、絶対濃度が 10 mg/L になるよう濃度を調整した。溶解溶媒は、残留農薬試験・PCB 試験用アセトンおよびヘキサンを使用した。農薬混合

標準液の頒布は、調製した農薬 76 種の混合標準液について、一定量ずつアンプルに分注した。

混合標準液中での農薬の安定性は、一昨年度調製した農薬混合標準液を用いた。試薬等は、アセトン、ヘキサン、アセトニトリルおよびヘキサン(1:1)混合液を用いた。

ガスクロマトグラフ質量分析計および測定条件は、精度管理・相対定量ソフトウェア NAGINATA を搭載した Agilent 6890N GC および Agilent 5975C MSD を使用した。

NAGINATA 用測定条件は、注入量 2 µL、注入方法はスプリットレス、注入口温度 250℃、キャリアガスは定圧力モード、キャリアガス圧力はクロロピリホスメチルの保持時間が 16.593 分になるように自動校正し、ページ時間 2 分、カラムは HP-5MS 30 m×0.25 mm×0.25 µL、昇温条件として 70℃(2 分)→25℃/分→150℃→3℃/分→200℃→8℃/分→280℃(10 分)→20℃/分→300℃(0 分)、ポストランは 300℃(5 分)、GC インターフェイス温度は 280℃、イオン源温度は 230℃、四重極温度は 150℃、測定モードは Scan (*m/z* 35~550)、SIM で行った。

試験法は、絶対濃度として 10 mg/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℃、4℃、40℃および 60℃の各保存温度で 3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月および 14 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、各農薬の保存期間および保存温度の設定条件ごとに試料数を n=5 として面積値を測定した。

農薬標準品は、農薬標準品原末を用いて農薬標準品の溶解性について検討した。試薬は、アセトニトリル/ヘキサン(1:1)混合液

を使用した。

ガスクロマトグラフと分析条件は、島津製作所 GC-2010、検出器は MS、カラムは DB-5 ID0.25 mm×30 cm(0.25 μ m)、オープン温度は 50 $^{\circ}$ C(1min)→25 $^{\circ}$ C/min→125 $^{\circ}$ C→300 $^{\circ}$ C(10 $^{\circ}$ C/min)、注入口温度は 250 $^{\circ}$ C、注入法はスプリットレスで実施した。

試験法は、農薬標準品原体 10 mg を精密にメスフラスコに秤量し、アセトン/ヘキサン(1:1 v/v)に溶解後、1000 μ g/mL 相当にし、農薬標準原液を作製し、スクリーキャップ付きスピッツ管に 2 mL ずつ分注して遮光下 4 $^{\circ}$ C および -20 $^{\circ}$ C で、各々 1 週間、4 週間保管することとした。農薬基準原液の調製は、アセトン/ヘキサン(1:1 v/v)で溶解、定容し、農薬基準原液とした。溶液をスクリーキャップ付きスピッツ管に 10 mL ずつ分注し、遮光下 -20 $^{\circ}$ C で保管した。

測定用試料および基準標準溶液の調製は、調製初期に作製した農薬標準原液(1000 μ g/mL)については、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(10 μ g/mL 相当)とすることとした。また、4 $^{\circ}$ C および -20 $^{\circ}$ 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(5 μ g/mL 相当)とすることとした。

農薬基準原液(100 μ g/mL)については、スピッツ管を室温状態に戻した後に、アセトン/ヘキサン(1:1 v/v)で 10、20 倍に希釈、定容し、基準標準溶液(10、5 μ g/mL 相当)とした。

溶解性の評価と手順は、農薬標準原液の調製初期、4 $^{\circ}$ C および -20 $^{\circ}$ C 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:

鶏肉並びに豚肉の各種部位を用い、保存料やサルファ剤の長期安定性、ならびに均一性について検討した。平成 20 年度は、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、ムネ、モモ)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ササミ肉ペーストに、SDD を添加した。これとは別に水分添加量を 10%、20%としたササミ肉ペーストに、SDD が水添加 10%では 0.1 μ g/g、20%では 0.2 μ g/g になるよう添加した。脂質量がササミと異なる他部位については、水分添加量を 0、10、20%としたムネおよびモモ肉ペーストに SDD を添加して調製し、水分無添加のササミ、ムネ、モモについて、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(HPLC)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および安息香酸の測定は、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。

平成 21 年度は、残留動物用医薬品の試料基材および試薬について、市販の鶏肉（ムネおよびモモ肉）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 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）、スルファモノメキシシ（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）、スルファジメキシシ（以下 SQ）、スルファキノキサリンおよびスルフイソキサゾール（以下 SIX）を用いて試験を実施した。

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 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（以下、ブrikサー）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。

ブrikサー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～-20℃）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。

残留動物用医薬品検査に関する調査試料の検討は平成 22 年度も継続して実施した。市販の豚肉（ヒレ、カタおよびバラ肉）を 3 度挽いたミンチ肉を試料基材とし、標準品（サルファ剤 10 種）、SDD、SDZ、SMR、SMPD、SMMX、SCPD、SMX、SDMX、SQ および SIX を使用薬剤として用いて試験を行った。

試薬は、メタノール、アセトニトリルおよび蒸留水、n-ヘキサン、無水硫酸ナトリウム、リン酸一ナトリウム二水塩およびジエチルエーテル、けい砂を用いた。

カラムは、固相抽出カラム：Sep-Pak[®] アルミナ N カートリッジ、フィルター：エキクロディスク 25（0.45 μm 孔径）を使用した。

試料の調製および測定には、試料作製用混合機にブrikサー、試料抽出用機器は、オムニミキサー、減圧濃縮器、測定機器には、HPLC LC-10A、検出器は SPD-10A を用いた。また、測定条件として、カラムは Mightysil RP-18(H)（150×4.6 mm、5 μm）、移動相は 0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液：アセトニトリル（17:3）、流速は 0.8 mL/min、カラム温度は 40℃で実施した。

試料作製は、ブrikサーを用いて豚肉の各部位のミンチ肉ペーストにサルファ剤混合液を 20 mL 添加（0.20 μg/g）し、よく混合した。これらを約 80 g ずつ容器に分注して冷凍（-24～-20℃）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。

試験方法としては、試料からのサルファ剤の抽出として、「食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編（2003）」に準じ

HPLC(UV)で測定した。

基材の脂質量の測定は、エーテル抽出法に従い、エーテル層を濃縮乾固して得られた残留物重量を脂質量とした。

基材の水分量の測定は、常圧加熱乾燥法(乾燥助剤法)で行い、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。

平成21年度は着色料に関する検討も行った。着色料の基材は、漬物(大根漬)とし、12色素添加用には甘口たくあん、べつ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_s 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)を各添加用色素に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:

Bacillus cereus 並びにビブリオ属菌の新しい精度管理用試料の開発として以下の実験を実施した。平成 20 年度は、試験菌株として秦野研究所保存の以下の7菌株、*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 を用い、*B. subtilis* ATCC 6633 は市販の芽胞液を用いた。

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。

平成 21 年度は、試験菌株として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 halioticoli* 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、MnSO₄ 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℃、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、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。

平成 22 年度は、試験菌株としてセレウス菌検査用に *Bacillus cereus* HIC 080115、*Bacillus cereus* HIC 080117、*Bacillus cereus* HIC 090147、*Bacillus cereus* HIC 100172、*Bacillus subtilis* HIC 080138、*Bacillus subtilis* HIC 100165、*Bacillus megaterium* HIC 080136 を、ビブリオ属菌検査用として *Vibrio parahaemolyticus* HIC 090153、*Vibrio fluvialis* HIC 090156 を用いた。なお、試験菌株は、すべて 5 継代以内のものを使用した。

セレウス菌検査用菌株の芽胞液作製は、普通寒天培地で 7 日間培養後、生理食塩液に懸濁させ、芽胞液を得た。

セレウス菌検査用基材の作製は、白米をオートクレーブ滅菌した後、これに 10% NaCl 溶液、12.5% NaCl 溶液または 15% NaCl 溶液を添加し、これをセレウス菌検査用基材(米飯)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、基材に試験菌を接種後、よく攪拌して 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、SCD 寒天培地を用いて生菌数測定を実施した。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。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。

ビブリオ属菌の基材中での安定性の確認は、2%ゼラチン加 Marine broth で前培養した後、2%ゼラチン加 Marine broth で10倍希釈したものを試験菌液とした。試験菌液に基材および2%ゼラチン加 Marine broth を加えて合計重量が100gとなるようにした。これを22.5℃にて保存し、経時的に104日まで生菌数測定を行った。

ビブリオ属菌の各種選択培地上での菌数測定は、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℃にて約100日間保存したものについて 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。

(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:

平成20年度は、特定原材料タンパク質の定量として 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、450 nm/630 nm 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。ブロッティングは転写膜に 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クメンブレーター 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クメ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な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 MK-K58、またはブレンダーで均一化して調製した。

平成 21 年度は、特定原材料タンパク質の定量として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、試料中の特定原材料タンパク質の濃度はマイクロプレートリーダーを用いて吸光度測定を行って求めた。

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 μm 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、ブレンダーで均質化して作製、またはあらかじめ 1 g 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。

共同試験の実施では、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。

平成 22 年度は、特定原材料タンパク質の定量として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。

添加に使用した特定原材料は、乳たんぱく質にはスキムミルクを使用し、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

材から抽出液を調製した。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。

添加用基材は、特定原材料を使用した旨の表示がない食材または野菜ペーストを使用した。

精度管理調査試料は、添加用基材に特定原材料を加え、ブrikサーまたはグラインドミックス GM300 で均質化して作製した。作製した試料は遠沈管に分注し、4℃または -20℃で保存した。

試料の均一性および安定性の検討は、試料分注後、10 容器から $n=2$ でサンプリングして ELISA キットにより特定原材料タンパク質を測定し、一元配置による分散分析を実施して均一性を検討した。安定性は乳試料では共同試験終了後に、えび・かに試料では9週間後に試料を再度測定し、均一性試験の結果を比較した。

共同試験の実施は、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 キットを試験方法および報告書様式に関する文書と共に宅配便(冷蔵および冷凍)で共同試験参加機関に送付した。なお、測定期間は1ヶ月間とした。参加機関から回収した報告書は、Xbar-R 管理図を作成して統計解析した。なお、共同試験は、11 機関で実施した。

(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:

平成20年度は、コメ加工品からのDNA抽出として、以下のキットおよびプロトコールを使用し、GM quicker 2 は、通知のプロトコールに従った。Genomic DNA Extraction Kit

for Food Samples は付属の手順書に記載された2種類の手法、すなわち通常のプロトコールと 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。

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。

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。

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 quicker 2 (通知法) を用いて DNA を抽出し、陽性対照用プライマ

一对による定性 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、10 ng/ 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 10 ng/ 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 1.0 mm のスクリーンを装着した超遠心粉砕機 ZM200 で粉砕しコメ加工品粉砕物試料とした。

コメ加工品から、GM quicker 2 (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 260 nm と 280 nm 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。

平成 21 年度は、使用材料として外部精度管理試料および DAS59132 陽性対照の作製に 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。

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。

Bt10 検出下限は、Bt10 陽性対照プラスミドの希釈に 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、検討した。

定性 PCR による 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)」(以下、通知) 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