

泳動を行った。

DAS59132 の検出下限は、DAS59132 トウモロコシ抽出 DNA の希釈として DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液に対し 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、検討した。

リアルタイム PCR による 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。

DAS59132 陽性コントロールは、DAS59132 トウモロコシから抽出した DNA 溶液を GMO 共通 No Template Control-ColE1/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。

外部精度管理調査結果のまとめとして外部精度管理調査結果は、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。

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では、定性 PCR では、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。そこで、Bt10 の測定に

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。

リアルタイム PCR では、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、増幅曲線を作成し、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。

平成 22 年度は、外部精度管理調査試料として、ブラジル産不分別ダイズ、契約栽培ダイズであるカナダ産雪乃白姫ダイズを、それぞれ超遠心粉砕機 ZM200 で粉砕して用いた。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 抽出は DNeasy Plant Mini Kit または GM quicker を使用し、通知に従って実施した。恒温槽には DryThermoUnit DTU-2B、遠心分離には多用途小形遠心機 CF16RX を使用した。

定量 PCR は通知に従い、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-ColE1/TE-および TaqMan Universal PCR Master Mix を使用して実施した。リアルタイ

ム PCR 装置には 7900HT Fastリアルタイム PCR システム 96 ウェルを使用した。

DNA 濃度の測定は、260 nm における UV 吸収法を行い、UV 吸収スペクトルの測定は UV-1700 を使用した。蛍光光度法による濃度の測定には測定試薬に Quant-iT™ dsDNA High Sensitivity Assay kit および Varioskan Flash 多機能マイクロプレートリーダーを使用した。

アガロースゲル電気泳動は ultraPURE™ Agarose-1000、50×TAE (遺伝子工学研究用)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、電気泳動槽には、Mupid 2x を、画像解析にはプリントグラフを使用して実施した。

C 研究結果

1. 尾花分担研究

分析法の開発は、厚生労働省が加工食品のリン系農薬分析法として通知した方法をもとに、先の B. の 1. において示した方法を構築した。通知法には精製操作がないので、脱脂および精製操作を加え、低濃度の農薬分析に耐えられる方法として参加機関へ提示した。また、平成 21 年度は試料の水分含量に合わせて、抽出操作時の無水硫酸ナトリウムを減らす修正を行った。平成 22 年度には、それまで好成績を収めた参加機関の分析法を参考にし、アセトニトリル/ヘキサン混液での抽出を行い、より簡便化を図った。

外部精度管理調査試料は、分析対象物質の均質性および一定期間における安定性が保証された試料を調製する必要がある。レトルトカレーにおいて発生した問題点は、試料の凍結保存後に融解を行ったため、試料中の油脂が固化し、農薬の偏在化が発生す

ることであった。そこで農薬を均一に分布させるため、試料の調製および採取において、加温し油脂を融解後再均質化することで改善を試みた。その結果、容器間の回収率の差は縮小し、真度および精度はともに良好となった。均一性試験の結果、各農薬の回収率は 54~83%、変動係数は 4.1~6.1%であった。この結果から一元配置分散分析によって容器間/容器内の分散比を算出したところ、試料が均一であると判定した。安定性試験の結果、残存率は、96.4~107.5%となり、精度管理の実施期間中の安定性は確認された。

パンケーキは生地の状態では流動性があるため、添加した農薬を均一に混合しやすく、かつ加熱後は固まるため、凍結融解しても油脂が分離することなく、精度管理試料として適すると考えられた。しかし、生地は加熱調理で水分が蒸発するため重量が減少し、また熱に対する農薬の安定性について確証が乏しいため、試料調製試験を行って農薬の挙動を確認した。その結果、加熱調理時間を 4 分間(表 2 分+裏 2 分)とした。調製した外部精度管理調査試料について均質性試験を実施した。添加した各農薬の回収率は 79~117%、変動係数は 4.3~19.2%であった。この結果から一元配置分散分析によって容器間/容器内の分散比を算出したところ、試料が均一であると判定した。安定性試験の結果、残存率は、0 週目と比較してやや減少傾向が認められたが、8 週間後の残存率は 90%程度であり、大幅な減少は確認されなかった。

冷凍餃子においては、流動性が低いため、添加した農薬を均一に分散させるまでの攪拌時間の目安が必要であった。そこで、試

料の混和状態の指標として合成着色料を加え、色調が均一になるまで混和を行った。この試料の均一性試験を実施した結果、各農薬の回収率は80~99%、変動係数は4.4~9.3%であった。この結果から一元配置分散分析によって容器間/容器内の分散比を算出したところ、試料が均一であると判定した。安定性試験の結果、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。

再現性試験結果は、GC-MSにおいて平成20年度は食品マトリックスが共存しない標準品だけを測定し、5農薬が3~5機関で10%以上の変動係数を示した。平成21年度は標準品で3機関のべ7農薬、マトリックス標準液で4機関のべ13農薬が10%以上の変動係数を示した。平成22年度は標準品で4機関のべ8農薬、マトリックス標準液で2機関のべ4農薬が10%以上の変動係数を示した。

LC-MS/MSにおいては、平成21年度の標準品で1機関1農薬、マトリックス標準液で2機関のべ2農薬が10%以上の変動係数を示した、平成22年度は標準品で2機関のべ2農薬が10%以上の変動係数を示した。それ以外は安定して測定できており、非常に良好な再現性が得られた。

平成20年度の内部精度管理試験の結果、大部分は良好な分析結果を得られたが、4機関において、回収率が70~120%、変動係数が20%以下とならなかった農薬が見られた。また、2機関では、GC-MSと

LC-MS/MSのうち一方で異常に高い回収率が得られた。

外部精度管理調査を行い、平均回収率と変動係数を算出した。平成20、21年度はXbar-R管理図や、zスコアによる評価を行った。平成20年度においては、各農薬の添加濃度である50または100 ng/gに対し、全機関を通じた平均回収率はGC-MSで74~99%、LC-MS/MSで71~97%であった。全ての測定農薬で全項目が適正範囲に入ったのは2機関のみであり、その他の7機関では一つ以上の項目が適正範囲に入らなかった。

平成21年度においては、各農薬の添加濃度である80~120 ng/gに対し、全機関を通じた平均回収率はGC-MSで97~105%、LC-MS/MSで85~108%であった。GC-MS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-MS/MS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。

平成22年度は、添加農薬とその濃度を明らかにしない2試料を試験検体とした。2種類の試料共に誤検出例はなく、全機関が添加農薬を適切に検出した。また検出値も1機関を除く8機関は添加理論値に近く、回収率に換算すると、3例を除き、GC-MSで70~106%、LC-MS/MSで74~107%の範囲内であった。変動係数はGC-MS、LC-MS/MSともに全機関で小さく、10%を超

えたのは 5 例だけであった。また、2 試料の測定値と測定値差を算出し、それらの z-スコアを用いて複合評価を行ったところ、GC-MS では 3 例が、LC-MS/MS では 4 例が疑わしいという結果になった。

サンプリング試験として、平成 21 年度に農薬濃度が不均一な試料を配布し、参加機関が均一性を保ったサンプリングが可能か検証した。その結果、各農薬の添加濃度 80~120 ng/g に対し、全機関を通じた平均回収率は GC-MS で 93~102%、LC-MS/MS で 84~102%であった。GC-MS 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。LC-MS/MS では 6 機関が全農薬において良好な結果を示し、他の 3 機関でのべ 14 農薬が不良であった。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 2 機関においてのべ 3 農薬が、変動係数が 15%を超えるか、R 管理図で適正域を外れた。LC-MS/MS では 1 機関において 2 農薬の変動係数が 15%を超えた。

システム評価は、一連の加工食品試料の測定前後における、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することにより各機関の GC-MS システム評価を行った。GC 注入口、カラム注入口側、カラム検出器側の変動要因を調査したところ、カラム注入口の指標が変化し、レトルトカレー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。

2. 中澤・斉藤分担研究

平成 20 年度は、LC-UV および LC/TOF-MS による CPA 測定条件の検討を実施した。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: 25 mM 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わかった。

試料前処理法の検討では、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。

菌体培養ろ液からの CPA の検出と同定で

は、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わかった。

平成 21 年度は、食品中 CPA 測定について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。

平成 22 年度は、標準マテリアル作製について CPA 濃度のコントロールしやすさを考慮し、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。また、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。その結果、併行精度、室内再現精度および室間再現精度は、併行精度において低濃度試料と高濃度試料の両者とも標準偏差が 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。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。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 µg/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。

農産物からの CPA 分析法の検討では、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。抽出溶媒としてアセトニトリル、酢酸エチルおよびメタノールを検討したところ、メタノー

ルでの回収率が最も優れていた。また、その至適濃度は、50%メタノールにおいて良好な回収率を示した。抽出温度は、25℃(室温)で良好な回収率が得られ、夾雑物由来のピークが減少した LC-UV クロマトグラムが得られた。抽出サイクル数は、2 サイクル目以降の抽出液から CPA の溶出は確認できなかったことから、1 回の抽出操作で十分であった。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、良好であった。これにより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. 松木・村山分担研究

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、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 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、アセトン/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 (アセトン/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て行った。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、溶媒としてアセトン/ヘキサン(1:1 v/v)混合液を用いたが、アセトン/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、アセトン/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℃で 1ヶ月と 3ヶ月間保管した。

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、アセトン/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 レベルのアセトン/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-MS 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、ろ過してアセトン/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-MS 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 μ g/mL レベル) と調製初期に直接アセトン/ヘキサンにより 1000 倍希釈して得られた低濃度調製溶液との GC-MS 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 21 年度は、調製直後に比較して 10% 以上の減少が認められた試料では、-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かった。

平成 22 年度は、農薬混合標準液中での農薬標準品の安定性について 14 ヶ月までの経時変化を測定した結果、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 農薬であったことから、試験した農薬混合標準液の各農薬は -20℃ 保存において 14 ヶ月まで安定性が確認された。

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 ヶ月では 0 農薬で 10% 以上の減少が認められた。-20℃ 保存群と同様に、14 ヶ月以前で減少が認められた農薬は NAGINATA の定量誤差によると考えられるため、4℃ 保存においても 14 ヶ月まで安定性が確認された。

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 ヶ月では 1 農薬で 10% 以上の減少が認められた。-20℃ 保存群と同様に、14 ヶ月以前で減少が認められた農薬は NAGINATA の定量誤差によると考えられるため、40℃ 保存においては thiometon を除いて 14 ヶ月まで安定性が確認された。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。

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 農薬に 10% 以上の減少が認められた。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、各農薬ともに目視で不溶物は確認できなかった。

4. 大島分担研究

(1) 理化学検査のための適正試料の作製:

平成 20 年度は、鶏ササミ肉ペーストに、水分添加量が 10、20、30、40%、SDD が 0.1 mg/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%では 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。

脂質量の異なる鶏ムネ、モモ肉ペーストに、水分添加量が 0、10 および 20%、SDD が 0.2 $\mu\text{g/g}$ になるように添加混合し、ばらつきを調べた。回収率は、ムネ肉で 87.0、95.0、90.5%、RSD は 4.0、7.4、4.4%であった。モモ肉は、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ムネ肉およびモモ肉は、SDD の回収率はいずれも 80%以上で、ばらつきも小さかった。水無添加のササミ、ムネおよびモモ肉の脂質は、0.7、7.3、13.5%であった。ササミ肉は、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。脂質が多いムネ、モモ肉は水無添加でも均一になることがわかった。水無添加のムネ肉およびモモ肉の 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ササミ、ムネ、モモのペースト試料(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%水添加鶏ササミ肉の冷凍(-20~-24 $^{\circ}\text{C}$)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 $^{\circ}\text{C}$)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。

平成 21 年度は、残留動物用医薬品として鶏肉試料では、鶏肉(ムネおよびモモ肉)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、ムネおよびモモ肉では、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 濃度に対し、複数回時の SDD 濃度を測定した結果は、ムネ肉は 2 回で 96.0%、3 回で 98.0%であった。一方、モモ肉の安定性は 2 回で 89.4%、3 回で 88.0%であった。冷蔵(4~8 $^{\circ}\text{C}$)開始時の SDD 濃度に対する 4 および 7 日後の SDD 濃度は、ムネ肉で 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、モモ肉の安定性は冷蔵 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(ムネ肉)試料の実際の作製に即し

た混合方法の検討では、ブrik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 µg/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。

ブrikサー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、カカ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。

平成22年度は、豚肉試料の均一性試験について一元配置分散分析を行ったところ、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(SDZ、SMR、SDD、SMPD、SDMXおよびSQ)において均一性が認められなかった。各基材の脂質量および水分量を測定したところ、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。また、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。

豚肉試料の冷凍保存安定性試験は、均一性試験の約100日後に測定した結果、3種の基材について確認したところ、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。一部のサルファ剤を除き、100日間の冷凍保存では試料中のサルファ剤の安定性は良好であった。

豚肉試料の冷蔵保存安定性試験は、試料解凍初日を冷蔵0日目とし、測定後の試料を冷蔵保存し、続いて冷蔵4日および7日目についても同様に測定を行った結果、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。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。

豚肉試料の凍結融解後の安定性試験の結果、いずれの基材においても、凍結融解を繰り返すことで安定性が低下する傾向が認められたものの、2回目の解凍では90%以上の安定性が確保されていた。3回目の解凍では、ヒレ肉においてはSDD(82.8%)およびSCPD(84.5%)、カタ肉においてはSCPD(83.4%)、バラ肉においてはSDZ(82.2%)、SMR(84.5%)、SIX(76.8%)およびSCPD(83.7%)について、85%を僅かながら下回ったものの、他のサルファ剤においては85%以上の安定性を確保することができた。

着色料の検討では、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、*R_f*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*R_f*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:

平成20年度は、最初に芽胞形成菌の寒天培地上での集落形成を確認した。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。

セレウス菌検査に用いる基材の選定では、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 $10^{2\sim3}$ 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。

標準菌株の再検討では、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℃で 3～10 日間培養した後、65 または 70℃で 15～30 分間熱処理を行うなど、いくつかの手法があった。

平成 21 年度は、市販白米のオートクレーブ処理による変性等を確認し、変質等は一切認められない事を確認した。

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は、生理食塩液($MnSO_4$ 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。また、各基材について著しい菌数の減少は認めなかった。しかし、保存 28 日目に 22℃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 $10^3 \sim 10^4$ 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 $10^8 \sim 10^9$ 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。

平成 22 年度は、セレウス菌検査用基材作製における食塩濃度の影響について検討した。*B. cereus* の 4 菌株、および陰性対照の *B. subtilis* および *B. megaterium* について 28 日目まで 22.5°C 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。特に 15% の滅菌食塩液を用いた際には、*B. subtilis* HIC 100165 においては接種菌数と同等の菌数であった。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。MYP 寒天培地および PEMBA 寒天培地上で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。

ビブリオ属菌検査用調査試料の選択と安定性については、こうや豆腐または麩を乾燥状態でオートクレーブ処理を行うか、あるいは麩に 2%ゼラチン加 Marine broth を加えた後にオートクレーブ処理を行った。これに乾燥状態でオートクレーブ処理したものには 2%ゼラチン加 Marine broth を添加した後、菌液を添加した。2%ゼラチン加 Marine broth を添加してオートクレーブ処理を行った麩については、そのまま菌液のみを添加した。なお、いずれの基材についても基材、添加液量および菌液の合計が 100g となるようにした。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り、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。

ビブリオ属菌の増菌後の冷蔵保存では、こうや豆腐を用いることによって長期間に亘ってビブリオ属菌を安定的に基材中に生残

させることが可能となった。そこで、こうや豆腐を用い、冷蔵保存による接種菌の安定性を検討した。約 10^5 cfu/g となるように菌液接種後 22.5℃で保存、菌液接種後 3 日間 22.5℃で保存した後に冷蔵保存、菌液接種後冷蔵保存の 3 条件で試験をした結果、いずれの菌株においても 22.5℃保存以外の条件では長期的に菌数を保持することはできなかった。なお、今回の試験では *V. fluvialis* を 22.5℃で保存した場合に長期保存することはできなかった。特に、22.5℃にて増菌培養を行った後に冷蔵保存を行うことによっても接種菌の減少が認められたことから、現状では冷蔵保存により接種菌の安定化を図ることは難しいものと考えられた。また、メーカーの異なる TCBS 寒天培地 5 種と酵素基質培地を用いた菌数測定を行ったところ、*V. parahaemolyticus* ではいずれの培地においても Marine agar と比較すると若干低いものの、ほぼ同等の菌数が得られた。これに対して、*V. fluvialis* の場合、一部の TCBS 寒天培地において Marine agar で認められた菌数と比較して、 10^3 オーダー以上低く認められたものがあつた。

(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、はじめに粉碎方法とタンパク質抽出率の関連性について検討した。昨年調製した粉末検体を更に機械的に粉碎してタンパク質量を比較した結果、そばでは、1 mm のスクリーンを使用して超遠心粉碎機で粉碎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ブレーターにより粉碎した粉末では 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。

そば試料作製の検討では、モリナガ FASPEK そば 測定キットの回収率はマイクロディスクメンブレーターで 100%前後、0.2 mm のスクリーンを使用し粉砕したもので約 90%と、マイクロディスクメンブレーターで粉砕したそば粉末の回収率が 0.2 mm 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、マイクロディスクメンブレーターで粉砕したそば粉末のほうが 0.2 mm のスクリーンのものより回収率が高かった。

落花生試料作製の検討では、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クメンブレーター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。

小麦抽出液作製の検討では、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 (4.0~6.0 mg/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。

食材への原材料添加による添加回収および安定性試験の結果では、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%、167.6%、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 週後に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。

そば、落花生、小麦添加試料の定性検査法の検討では、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わかった。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なかった。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、カボチャペーストとも植物、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。

卵試料作製の検討では、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ブ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。

平成21年度は、共同試験試料の均一性および安定性について検討した。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、一元配置の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%の範囲であった。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。

共同試験結果について、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 \bar{X} 管理図において \bar{X} がUCLおよび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 \bar{X} が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。

計算ソフトウェアの問題点として、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。

共同試験アンケートのまとめでは、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。

牛乳試料作製の検討では、ブリクサーを用いて約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。

平成22年度は、乳を測定対象とした配付前の均一性試験では、添加試料(試料1、試料3、試料5、試料7、試料8)について、いずれも一元配置の分散分析で均一と判定された。通知に従った定量検査法の評価基準の回収率は、50~150%の範囲内であった。共同試験終了後の安定性は、配布前に実施した均一性試験の89.0~109.9%の範囲であった。また空白試料(試料2、試料4、試料6)の測定値は、キットの検出下限(0.31 $\mu\text{g/g}$)以下であった。

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 \bar{X} 管理図で \bar{X} がUCLおよび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。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機関番号3における測定値が \bar{X} 管理図のLCLを下回り z -スコアが -2 以下となった。機関番号3を除いて再解析した結果は、全機関で絶対値は2未満であった。またR管理図では再解析を含めて、UCLを超えた機関はなかった。

モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試

料3において \bar{X} が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3ではFASTKIT エライザ Ver. II 牛乳の全試料の \bar{X} がLCLを下回り、 z -スコアが -2 以下となった。また、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットでも \bar{X} がLCLを下回り、 z -スコアが -2 以下だった試料8を含め全試料で報告値が参加機関の中で最も低かった。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では空白試料のみでなく添加試料でもウェル間で再現性の不良が認められた。機関番号2は、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試料8のR管理図でUCLを超えた。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わかった。

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%(機関番号3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。今回、この基準に従ってバリデートされたキットで基準内の測定値が得られたことから、共同試験試料は外部精度管理調査試料として適切であったことが示されたと考えられた。

共同試験に使用したモリナガ FASPEK 牛乳 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 の検量線の吸光度と濃度のプロットを検討した結果、卵キットと同じく、マイクロプレートマネージャーVer.5の4PL解析

は濃度計算に適さないと判断された。

えび・かに 試料の作製検討結果は、甲殻類③を除き、2-D Quant kit の測定値に対する回収率は低いものの検討した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6種類の食材に添加して甲殻類タンパク質を測定し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。両キットの測定結果について一元配置の分散分析を行った結果、食材4、食材6のいずれも均一と判定された。また、この試料を-20℃で9週間保存後の測定結果は、良好な安定性を示した。

(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、外部精度管理調査に使用するコメ加工品について、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 quicker 2(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 µg、タイ産ビーフンBは0.1 µg、台湾産ビーフンAは0.6 µg、台湾産ビーフンBは0.4 µg、上新粉Aは2.8 µg、上新粉Bは3.4 µg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泳動度であった。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泳動度が異なっていた。

コメ加工品からのDNA抽出方法の検討では、上新粉BからDNAをGM quicker 2(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 quicker 2(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。

定性PCR、リアルタイムPCRの検出下限では、定性PCRで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。

外部精度管理調査の結果では、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、いずれも全てで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、原液の 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。

コメ加工品からの DNA 抽出方法の検討では、DNA 収量として 15 種類のコメ加工品からの DNA 収量を平均すると GM quicker 2 (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わかった。

GM quicker 2 (通知法) で抽出した DNA 溶液の濃度は、PCR に用いる濃度の 10 ng/ 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10 ng/μL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 quicker 2(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 quicker 2(通知法)よりもかなり多かった。

陽性対照プライマー対による定性PCRでは、台湾産ビーフンBはGM quicker 2(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。

平成21年度は、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、この陽性コントロールを水で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って検出された。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 値に影響するとの指摘を受けたため、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。