

平成 22 年度実施分では、ダイズ原料の RRS 混入率を定量 PCR 法により測定した結果、RRS 混入率は雪乃白姫ダイズが 0.0%、ブラジル産不分別ダイズが 79.3%であった。これらを混合して外部精度管理調査試料を作製した。

外部精度管理調査参加機関から報告された測定値は、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。

外部精度管理調査において定量 PCR 法の参加機関が使用した DNA 抽出法は 1 機関を除き DNeasy Plant Mini Kit または GM quicker 2 であった。参加機関の DNA 収量と、定量 PCR 測定における遺伝子のコピー数のうち内在性遺伝子であるレクチンのコピー数を DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker 2 のそれぞれについてまとめ、DNeasy Plant Mini Kit の DNA 収量は、GM quicker 2 のそれに比べ 2 倍以上だった。

レクチンコピー数の結果、試料 1、試料 4 とも GM quicker 2 による DNA では DNeasy Plant Mini Kit に比べ 2 倍以上多いコピー数

が測定された。

抽出した DNA の UV 吸収スペクトルを比較した結果、試料 1、試料 4 ともに抽出法間でスペクトルに差は認められず、O.D.260/O.D.280 の比も全て 1.7~2.0 の範囲内であった。両者とも高分子のゲノミック DNA のバンドが観察されたが、等量の DNA を泳動したにもかかわらず、GM quicker 2 のゲノミック DNA のバンドは DNeasy Plant Mini Kit に比べて濃いことが判明し、調整した溶液の DNA 濃度が異なっていた可能性が示された。

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 濃度と比較した結果、GM quicker 2 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 2 と比べて大きかった。

GM quicker 2 と DNeasy Plant Mini Kit による抽出 DNA を蛍光光度法での測定結果に基づきアガロースゲル電気泳動を行った結果、両者の高分子のゲノミック DNA のバンドの濃さはほぼ等しくなった。この時、スメアについては抽出法間で差は認めらなかった。

濃度を調整した 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ていた。

トウモロコシにおける DNA 抽出法間およ

び DNA 定量法間の差の検討結果は、トウモロコシにおいても、GM quicker 2 では蛍光光度法による DNA 濃度が UV 吸収法の 65% だったのに対し、DNeasy Plant Mini Kit では蛍光光度法による DNA 濃度が UV 吸収法の 37% と大幅に減少した。

#### D. 考察

##### 1. 尾花分担研究

加工食品中の農薬分析で重要と考えられた脱脂操作は、参加機関により GPC とアセトニトリル/ヘキサン分配に分かれたが、各機関の分析条件が異なるため比較が困難であった。脱脂操作の比較検討を行ったが、回収率の差となるような違いは見られなかった。Xbar、R、z-スコアの項目全てが良好であった 3 機関は、分析法が例示した方法より精製工程が多い分析法を用いていた。今回使用した試料では、例示した方法よりも精製操作を追加した機関では、より試験液中のマトリックスが少なく、精度の良い測定が可能であったと思われる。参加機関への聞き取り調査の結果、GC-MS の測定においては、スキャン測定の結果ターメリック類やオイゲノールと思われる強度の非常に強いピークが確認されたなど、精製不足を指摘する報告が多く寄せられた。LC-MS/MS の測定においては、注入する最終溶液を含水状態にすると、測定結果の変動が大きくなるとの報告が複数あった。これは含水状態となったために水に不溶な成分が析出し、農薬が不均一に分散しているのではないかと考えられた。カレー中の農薬分析は、各機関の内部および外部精度管理試験において、測定対象の農薬の回収率の変動係数は、概ね 20% 以内に収まっており、加工食品の残留農薬分析の主

目的がモニタリングであることを考慮すれば、残留傾向を把握するには良好な精度であったと考えられる。

本試験では、可能な農薬はあえて GC と LC の質量分析計で測定した。そのため、LC-MS/MS へ注入する溶液組成の相違による測定結果への影響が見られた。水溶性が高い農薬は含水率 100% の試験液でも十分測定できるが、水溶性が低い農薬は、メタノール濃度が低下すると、器壁やマトリックスへ吸着すると考えられることから、回収率の低下や測定値が変動したものと考えられた。その影響はマトリックスが含まれる方が顕著であった。一連の検討結果から、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、ということが示唆された。

外部精度管理調査試料の調製では、当初外部精度管理調査用の試料を調製する際に、その均質性の確保が大きな問題になると考えられた。複数の食材から構成される加工食品を均質に混和するには、食材に流動性が必要であると考え、平成 20 年度にはレトルトカレーを選択した。しかし、実際に添加して均質化を行い、輸送条件の再現のために凍結すると、油脂成分と水分の融点の違いから、油脂の固化物が発生して、均質性が失われた。その結果、脂溶性の高い農薬の均一性が保てないことが判明した。このため、サンプリング時に再均質化する手法として、加温して攪拌することを各機関に依頼した。

平成 21 年度に用いたパンケーキでは、凍結融解しても均一性が保たれると考えられたが、焼き上げたパンケーキの重量は、焼く前の生地のものに比べて 10% 以上減少した。一方、同条件での農薬の濃度については、

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。4 分間の加熱は短時間であり、調理後重量あたりの濃度が変化の小さい範囲内にあるために、それが精度管理に及ぼす影響は無視できると考えられた。以上のことから、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。

平成 22 年度に用いた冷凍餃子では、合成着色料を添加して攪拌時間の目安とした。黄・青の 2 試料共に均一性確認時の成績は適正範囲であったが、試料(青)の方は試料(黄)より劣っていた。このことから、流動性が低い試料は、添加後の均一化に十分な注意が必要であると考えられた。

再現性試験では、同一標準品の連続測定という操作から、当初は大きな変動はないと考えていたが、実際には 10% 以上の変動係数を示した例もあった。いくつかの機関では精度管理試験よりも大きな変動を示していたが、一部の機関では測定機器の安定化の為に試料を数回測定し、その後にデータ取得を行って安定した測定値を得ており、測定機器の維持管理には十分注意する必要があることが示された。

平成 21、22 年度に標準液とマトリックス標準液の再現性試験を行った結果、GC-MS においては、変動係数が比較的大きい機関のマトリックス標準液連続測定は、一部の農薬で 2 回目以降に大幅に面積値が大きくなっていた。これは、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クングされ、2 回目以降の測定値が大きくなったと考えられた。一部の機関では標準液とマトリックス標準液のい

ずれも再現性が良好であったが、変動係数はマトリックス標準品の方が小さく、マトリックスによって再現性が向上する例が示された。別の機関ではマトリックス標準液の変動係数の方が大きく、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。GC-MS においてはマトリックスの影響により、多くの機関で検出感度が増大する傾向があった。LC-MS/MS では検出感度は変化がない場合が多かったが、一部でマトリックスによるイオン化阻害、促進を受ける例があった。以上のことから、加工食品由来のマトリッ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。

外部精度管理試験は、平成 20 年度では、添加濃度を通知して外部精度管理試験を行ったが、GC-MS で 3 機関、LC-MS/MS で 2 機関が全ての評価項目において良好な結果を示し、全機関を通じて GC-MS、LC-MS/MS 併せて約 80% の農薬が良好な結果であった。平成 21 年度はこれと比較して全ての評価項目が良好であった機関数が増加し、全機関を通じて GC-MS、LC-MS/MS 併せて約 84% の農薬が良好な結果であった。このことから、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た。一方で、外部精度管理試験結果が適正範囲外となった農薬の約 85% が 3 機関に集中しており、さらにこのうち 2 機関は LC-MS/MS の結果が類似した傾向を示していた。この 2 機関では GC-MS での試験結果が概ね良好であったことから、前処理法自体に大きな問題点がないと考えられた。そこで、LC-MS/MS 用に試験液を調製する工程に着目し、全機関の比較を行ったところ、LC-MS/MS 試験溶液中のメタノール比率が他機関とは異なることが判明した。2

機関は25%メタノール、その他7機関が100%となっていた。含水率が高い試験液では水溶性の低い一部の農薬において、試験溶液での溶解が不十分であり、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。

平成22年度の試験結果を、回収率の70~120%の枠で判定した場合、1機関で回収率が全体的に低かったが、それ以外の8機関ではのべ3農薬しか不良となる結果はなかった。これを、ユーデンプロットの手法を用い、2試料の測定値和と差を用いてZBとZWによる複合評価を行った場合、上記8機関中5機関の7項目が疑わしいと判定された。このうち1農薬は、GC-MSとLC-MS/MSの測定値がほぼ一致しているにも関わらずGC-MSのみが疑わしいと判定されており、GC-MSのZW算出根拠となる測定値差の標準偏差が小さく、他の項目よりも厳しい判定がされたためと考えられた。ここで用いた評価法では、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。一方で、2試料共に回収率が低い傾向を示した機関の場合は、ZBが-1.0~-1.7と低くなったが、ZWではジメエート以外は-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。

GC-MSとLC-MS/MSの測定値を比較したところ、農薬によって測定値が一致し易いものと、一方の検出器の方が高めあるいは低めに出る傾向があるものとに分かれた。LC-MS/MSはGC-MSと比較して、再現性

試験では変動係数が小さく、マトリックス効果も小さいという結果が得られている。このことよりLC-MS/MSは測定上の問題が少ないと思われるが、平成20年度の回収率はGC-MSより低い。この点に関する原因は明らかではないが、気体中からイオン化させるGCよりも、移動相のバリエーションが豊富で、かつ物質が多い液体からイオン化させるLCの方が、様々な要因を含むためと考えられる。また、GC測定用溶液から微量を分取し、溶媒置換を行ってLC測定溶液を調製した場合にLC-MS/MSでの低回収率が得られた例があった。このことから、微量溶液の溶媒置換操作は十分注意する必要があること、また回避する手段がある場合には行わない方がよいことが示された。

当初、サンプリング試験において平均測定値は重視していなかったが、Xbar-R管理図や、zスコアによる評価を行った結果は良好であり、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。また、2機関のLC測定では、外部精度管理試験と同様に4農薬以上が不良となり、試験液中のメタノール濃度が影響した結果であると考えられた。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、各機関で行われた試料均一化は適切であったと考えられた。

GCシステム評価においては一般的に、新品のカラムやインサートガラスを用いると、試料の一部が吸着され、見かけ上の感度が減少することがある。このような場合、食品抽出液等のマトリックスを数回注入し、安定化を図った後に使用する。あまり変化のなかった機関は新しいカラムを安定化後使用しており、感度の減少傾向を示した機関は、長期間検査で使用した

カラムを用いていた。また別の機関は、安定化操作を行わずに新しいカラムを使用したため、1回目に評価試料を測定した後に、レトルトカレーマトリックスの注入によってカラムが安定化し、その後測定した2回目の評価試料測定で著しいピーク強度の増大を示した。これらのことから、GCシステムはマトリックスが注入されることによって安定化し、その後耐久性が持続する範囲で性能を維持し、やがて性能が低下することが示唆された。

平成20年度のレトルトカレーを使用した試験の際には、4機関でカラム注入口側の汚れを示す2,4-ジニトロアニリンのピーク形状指数が1.3~1.7となり、ピークの高さよりも幅が拡大していた。平成21年度は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た。平成22年度は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。このことから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. 中澤・斉藤分担研究

平成20年度は、LC-UV法によりCPA標準品を用いて移動相の検討を行った。LCカラムは、特性として逆相モードと陰イオン交換モードを併せ持つことから、移動相中の有機溶媒としてアセトニトリルを、また、カウンターイオンとしてギ酸、酢酸またはリン酸を用いてCPAの溶出挙動を検討したが、ギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウム緩衝液は実用的ではなかった。しかし、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の保持時間が短縮され、分離も良好となった。一方、LC/TOF-MSでは、LC-UV法で用いた条件ではMSへの適用は困難であり、MSを検出手段として使用する場合には、LCカラムとしてAcclaim Mixed-Mode WAX-1と同様に逆相モードと陰イオン交換モードの特性を併せ持つ保持力の弱いDual ODS-AX10を用いたほうが良いと考えられた。一方、MSの測定条件としてCPA標準品のイオン化について見当たったところ、エレクトロスプレーイオン化法を用いた場合、ネガティブイオンモードでもポジティブイオンモードでも検出は可能であったが、ネガティブイオンモードのほうが、より高感度に検出されることが明らかとなった。

試料の前処理方法として、抽出溶媒では有機溶媒を検討し、また液-液抽出法としても直接抽出する方法と珪藻土カラムを用いる方法について検討したが、直接抽出法のほうが高い回収率を示した。また、有機溶媒としては、酢酸エチルを用いた液-液抽出法(直接抽出法)において高回収率を得た。

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

平成21年度では、各種固相抽出による検討で、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。

平成 22 年度は、標準マテリアル作製に関して、新鮮な市販品(液状調味料:めんつゆ)と、すでに菌に汚染されたもののマトリックスの違いについて検討したが、菌に汚染されたものでは液性が変動すること、更に夾雑物がより増加することが LC-UV 測定によりわかった。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)を行った。昨年度の研究結果から、各菌株の CPA 産生能については把握してあったが、媒体としてのめんつゆの成分や、培養温度など環境条件によって CPA 産生能が異なることが考えられた。今回の標準マテリアル作製に関しては、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。

内部・外部精度管理としては、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が、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、良好な結果を得ている。構築した CPA 分析法および作製した標準マテリアルの両者は、共に十分な実用性があるものと判断した。

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、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。本法は自動化が可能なことも利点であった。

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では、50%メタノールにおいて良好な回収率が得られ、抽出温度として 25°C(室温)が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ことから、抽出温度は 25°C(室温)とした。また、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た。

### 3. 松木・村山分担研究

平成 20 年度は、当初、神奈川県の商品検査に係る検査実施標準作業書に採用されている農薬 84 種を対象に、混合標準液中での安定性の検討を進めることを想定したが、これらの対象農薬には、化学物質審査規制法における第 1 種特定化学物質の 8 化合物(*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、アルドリン、エンドリ

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

76 種の農薬を一斉に分析する場合、保持時間が近接する 76 種の農薬を GC-FID 等の個別検出器を用いる一斉分析は困難であることから、分離能が高く、定性分析能に優れた GC-MS を用いる必要がある。しかし、GC-MS は、イオン化の再現性が低いため、安定同位体のような適正な内部標準等の物質を使用しない場合には、定量における正確性には欠けることが指摘されている

今回、調査対象とした農薬 76 種は、一斉分析法に用いられる農薬ではあるが、必要に応じて検査機関ではこれらの農薬についての個別分析法での検査も実施されている。また、各検査機関においては、通常、分析

者各自で、農薬原体を用いて標準液の調製を行っており、その手法としては、一旦、高濃度の各農薬の標準原液を作製し、各定量に際して、用事調製により低濃度の標準液を作製する、というような手順が一般的である。したがって、溶解性試験においては、特に、農薬原体の高濃度標準原液作製時の溶解性に着目して調べる必要があった。日間変動の相対標準変動(2~3%を想定)を基準として、高濃度標準液の溶解性について解析、評価を行うことも必要である。

平成 21 年度は、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、解析した。

平成 22 年度は、農薬混合標準液の 14 ヶ月までの経時変化測定結果を示した。-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、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、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、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 農薬と温度が上昇するごとに 10%以上の減少が認められた。これは、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た。また、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、冷蔵保存した際の溶解性試験結果を示しているが、いずれの調製段階においても、目視で不溶物を確認することはできていない。ただし、dimethoateの4℃、4週間保存で110%、chlorfenvinphos-Zの-20℃および4℃で4週間保存したとき120%を超えている結果であるが、保存中に溶媒が蒸発して濃縮がおきた形跡はなく、原因は不明である。

また、定量下限付近で相対標準偏差が20%以上ある場合には、測定条件の再検討、メンテナンス等が必要と考えられた。

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

平成21年度実施した残留動物用医薬品の検討では、鶏肉(ムネおよびモモ肉)

試料の安定性で、ムネ肉がモモ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、ムネ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。

平成22年度に実施した均一性試験において、作製後に分注して冷凍保存した試料について、容器から10容器を選択し、各n=2で各サルファ剤濃度を測定したが、バラ肉は脂肪分が多く水分量が少ないため、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。

冷凍保存安定性試験は、作製後より冷凍保存した試料について、均一性試験の約100日後に、均一性試験同様、10容器を選択し、各n=2で各サルファ剤濃度を測定した結果、一部のサルファ剤を除き、100日間の冷凍保存において試料中のサルファ剤の安定性を確認できた。

豚肉試料の冷蔵保存安定性の確認では、いずれにおいても、SIXは時間経過とともに他と比較して大きく安定性が低下していた。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ていない。しかし、これらサルファ剤を調査対象に適用するのは難しいと考えられた。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判断できるが、均一性試験の結果よりバラ肉は不相当であるため、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。

豚肉試料の凍結融解安定性の確認では、解凍の回数による各サルファ剤濃度平均値の割合(%)として算出したが、精度の高い調査試料の確保には、凍結融解回数を2回までと規定することが適切であると考えられた。

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、キサントゲン系色素のうち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:

平成20年度実施した試験において、セレウス菌検査では最終的にNGKG寒天培地またはMYP寒天培地上に形成される集落の形状を確認することにより、その判定が行われるが、時折、得られた集落について結果をどう判断するか苦慮することがある。そのため、外部精度管理調査を行う上では、陽性対照、陰性対照のいずれにおいても、選択培地上で明らかに鑑別できる菌種を採用する必要がある。そこで、*B. cereus* 3菌株、陰性対照の*B. subtilis* 1菌株について、選択培地上での集落形成を観察したところ、*B. cereus* については、いずれの3菌株ともNGKG寒天培地およびMYP寒天培地のいずれにおいても典型集落が観察された。また、培地のメーカーごとに判定のしやすさ等に差が認められた。しかし、これらの芽胞液を作製したところ、作製後1週間の時点で菌数の減少が認められた。このことは、使用した菌株の芽胞形成能が低いか、あるいは作製した芽胞液中に一部栄養型(65℃での熱処理によっても死滅しない)が残存している可能性が考えられた。そのため、芽胞液として高頻度にかつ高い濃度で回収するためには、その作製方法について検討する必要があることが示唆された。

一方、陰性対照では、これまでの調査試

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

またこれと並行して、調査試料用基材の選定を行うため、白米を候補として使用した。現在、外部精度管理調査試料として用いている基材は、全て事前にオートクレーブ処理を行い、添加菌以外の菌種の影響を排除することとしている。そのため、オートクレーブ処理後の物性変化ならびにその後の基材としての安定性は外部精度管理調査を行う上で非常に重要な要因となる。そこで、白米に水を添加し、これについてオートクレーブ処理を行ったところ、処理当日についてはある程度の柔らかさが確保されていたにも関わらず、翌日にはすでに全体が固まり、菌液を添

加しても混合することができない状況であった。そのため、白米を外部精度管理調査試料用基材として採用することは非常に難しいものと判断した。

しかし、平成 21 年度は、外部精度管理用試料として期待される日常の検査試料と類似の形状を持つ試料として、白米等を用いる基材の開発を試みた。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、吸水した米飯が基材として有用であり、接種したセレウス菌も冷蔵保存することにより、比較的安定的に 28 日間まで回収できることが明らかとなった。また、15% NaCl 溶液を用いることで保存温度の変化にも強い試料の作製が可能になった。外部精度管理調査における試料の輸送は、少なくとも 2~3 日程度の期間を考慮しなければならず、温度変化に強い検体は輸送時における環境変化でも菌数の変動が少ないことを示す。このことは安定な調査結果を得るためにも重要であると考えられる。一方、定性検査を指標とした場合、陽性対照菌として使用した 2 菌種は、いずれの選択培地においても陽性集落を認めたものの、陰性対照菌として使用した *B. subtilis* は使用する選択培地により全く集落形成を認めないことがあった。したがって、外部精度管理調査では添加菌をどのように設定するかは非常に難しい問題である。しかし、セレウス菌検査における陰性対照菌は少なくとも MYP 培地および PEMBA 培地において非典型集落を認めることから、菌数としては少なくとも確保できていると言える。そのため、

NGKG 培地において集落が形成されなくとも、標準寒天培地等を用いた菌数測定や塗抹培養を行うことにより実際に試料中に対象菌が存在していることは確認できることから、現状で採用することが可能であると考えられた。

ビブリオ属菌は、不安定な菌であるため冷凍以外で長期間の保管が難しい菌種である。標準菌株の培養に Marine agar および Marine broth を用いて冷蔵および 22.5°C での保存の可否について検討した。その結果、いずれの温度でもビブリオ属菌の生存が 138 日間まで確認された。基材への菌の接種を踏まえて Marine broth 中に  $10^3$  cfu/mL 程度の菌数を接種した際の保存について確認した結果、冷蔵保存では 28 日目ではほとんどの菌は死滅し、安定的に接種菌を回収できなかった。しかし 22.5°C 保存では、3 日目に  $10^8$  cfu/mL 程度まで菌数が上昇するものの、その後は安定した菌数が回収された。Marine agar と TCBS 寒天培地での菌数測定について比較した結果では、Marine agar で菌数測定をした場合、経時的に安定した菌数が回収されるが、TCBS 寒天培地の場合は Marine agar での菌数測定に比べて 1 オーダー以上の差が認められた。このことは TCBS 寒天培地を用いて定量検査した場合と検査結果に大きな相違を生じる可能性を示唆する。TCBS 寒天培地を使用する場合は、用いる菌種により菌数が大きく変動することを考慮しなければならず、ビブリオ属菌検査用試料が開発できても定量検査を実施するには問題が残ることが示唆された。

平成 22 年度は、外部精度管理調査にセレウス菌とビブリオ属菌検査に関する調査試料を導入することを目標として、基材作製な

らびに基材中での安定化の基礎的検討を行った。セレウス菌では、予防的措置として温度変化に強い調査試料を作製することは検査結果のばらつきの回避にも有効な手段であると考えられた。今回の結果は、輸送に伴う温度の変化あるいは受け取り後の保管条件の逸脱等においても菌数変化の影響を受けにくいことを示しており、生菌数測定を行う外部精度管理調査試料としては有利な点であると考えられる。*B. cereus* の 4 菌株では 10～15%のいずれの食塩濃度でも 22.5°C で 28 日間の菌数の変動はほとんど認められなかった。これに対して、陰性対照菌である *B. subtilis* および *B. megaterium* では食塩濃度に依存した増菌抑制効果を認めた。さらに、定性検査において陽性対照菌では使用した全ての培地で典型集落を形成し、加えて菌数は SCD 寒天培地において認められる菌数とほぼ同等であった。一方、陰性対照菌では選択培地上で典型集落を認める場合と、そうでない場合の 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明らかに陽性と判定される必要があり、陰性対照菌についても必ず陰性と判定されることが必要である。今回用いた菌株では、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。しかしながら、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、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のに十分可能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、長期間の保管が可能であった Marine agar および Marine broth を安定化のための基礎とし、幾つかの基材のうち、吸

水性の高いこうや豆腐を用いて陽性対照菌、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、こうや豆腐が基材として採用できる可能性を示唆した。しかし、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こうや豆腐は適切ではないかもしれない。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。また、増菌の有無に関わらず冷蔵保存することによって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ている。また培地の種類によっては、この現象は培地メーカーによっても菌液単独の状態では菌数に大きな変動として観察されていることから、基材との相互作用に基づくものではなく、あくまでもメーカーごとの反応性の相違に基づくものと考えられた。

### (3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製:

平成 20 年度は、粉碎方法とタンパク質抽出率の関連性の検討として、小麦、そばについては、昨年度使用した粉末をマイクロディスマンブレーター II でさらに細かく粉碎したもの、落花生試料については標準品規格の落花生粉を分析粉碎机 R-8 で粉碎したもの、およびこれをマイクロディスマンブレーター II でさらに細かく粉碎したもののそれぞれを作製し、標準品規格によって抽出し、抽出液のタンパク質量をケルダール法のタンパク質量と比較した。その結果では、抽出率が大きく改善していたが、落花生、小麦では若干の改善に留まった。

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

落花生試料作製の検討については、標準品規格に従って調製した自家製落花生一次標準粉末をさらにケミカル粉碎机で粉碎したもの、およびマイクロディスマンブレーターで粉碎したものを 1% CMC に懸濁後、あずきあん、カボチャペーストに加えて落花生添加試料を作製した。落花生添加試料の落花生タンパク質を調製直後に 18 週まで概ね 90~110% の範囲に収まっており、落花生を細かく粉碎したことにより、より安定性の高い試料が作製できたものと考えられた。

小麦試料作製の検討では、Naturart 薄力粉を 1% CMC に懸濁後、ハンバーグまたはカボチャペーストに混合して小麦添加試料を作製し検討したが、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℃ の保存で昨年に比べ安定であると判断できた。

そば、落花生、小麦添加試料の定性検査法の検討では、先に調製したそば添加カボチャペーストおよびあずきあん、落花生添加

カボチャペーストおよびあずきあん、小麦添加カボチャペーストおよびハンバーグ、さらに各基材(ハンバーグ、カボチャペースト、あずきあん)について、PCR 法による特定原材料の検出の可否を検討した。小麦、落花生、そばの各特定原材料を添加した試料について定性 PCR による確認試験を行った結果、DNA 抽出法ごとに見た場合、いずれの試料も Genomic-Tip 20/G を用いた抽出液では添加した特定原材料、植物に由来する増幅物を 100%確認できた。また DNeasy Plant Mini kit でもそばの植物プライマーの 1 つを除いて特定原材料、植物に由来する増幅物を確認できた。一方、CTAB 法では、小麦を添加したカボチャペースト、落花生を添加したあずきあんなどで、検出率が低かった。

卵試料作製の検討では、卵試料は過去に調製量 200 g 程度の試作レベルで添加試料を作製し、回収率、安定性等の検討を実施した。しかし、外部精度管理の実施を想定した場合、配布量および参加機関数にもよるが、さらに多くの試料が必要なことは明らかである。このため本年は新たに混合用のミキサーとして BLIXER-5Plus を導入し、これを使用して約 3 kg のスケールで試料を調製した。その結果、外部精度管理調査実施に向けて、均一かつ確認試験にも対応した試料を大量に作製することが可能になったものと考えた。

平成 21 年度は、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、試料 8 (クッキー)では検出下限を上回る卵タンパク質が検出された。このクッキーには製造工場が卵を使用している旨の表示があり、製造過程で卵の混入があったものと考えられた。

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)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。報告書を詳細に検討すると、FASTKIT エライザ Ver. II 卵 による測定で標準溶液も含め吸光度が他機関に比べて高いことがわかった。また、同機関のモリナガ FASPEK 卵 測定キットによる測定では、測定値および吸光度とも問題が認められなかった。両キットの測定に用いた抽出液は同じものなので抽出操作には問題がないものと考えられ、FASTKIT エライザ Ver. II 卵 による測定の際に抽出液の希釈、キット試薬の希釈、発色時間のいずれかにおいて操作ミスがあったのではないかと推察された。この事例のほかに、試験を通して計算ソフトウェアの設定ミスに気付いた機関もあり、外部精度管理の実施が特定原材料検査の精度の向上に役立つ可能性が改めて示された。

確認試験の実施件数は、ELISA 法の件数に比例しているもののその約 20 分の 1 程度で、実施していない機関も 3 機関あり、特定原材料検査に関する外部精度管理を計画する場合、まず ELISA 法による測定を対象とする試験から始めることがよいと考えられた。

ハンバーグ試料では基材のみでもカゼインと混同しやすい位置にはっきりしたバンドが認められており確認試験用の試料についてはさらに検討が必要であると考えられた。

平成 22 年度は、共同試験結果の統計解析に先立ち、マイクロプレートマネージャー Ver.5 の Logistic 5PL 解析は、吸光度と濃度のプロットと検量線が一致しており、濃度の計算に使用できることを確認している。これにより、外部精度管理調査では、特定原材料検査の測定操作のみならず、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<sub>R</sub>)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%以下を満たしており、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。

今回共同試験に協力いただいた 11 機関の特定原材料検査業務の経験年数はいずれも 5 年以上であった。また、ELISA 法による年間の検査件数の総計では、乳が 965 件と最も多かったが、えび・かにについては約 4 倍に増加しており、早急に えび・かに を含む外部精度管理調査試料調製の検討を進める必要があると考えられた。また、えび・かにの試料作製については、食材に添加する甲殻類タンパク質の調製法を検討したが、ELISA 法による外部精度管理について使用可能な試料を作製することができたと考えている。

#### (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の検討を行った。外部精度管理調査に使用するコメ加工品を選択する条件として、検査目的の遺伝子の混入がないこと、コメ内在性遺伝子 (SPS 遺伝子) が検出されること、および定性 PCR で検査目的の遺伝子の増幅物に近い移動度の非特異的な増幅バンドがないことも 3 点が必須であ

る。また、DNA 溶液試料の作製にはマトリックスとして使用する DNA、すなわち遺伝子組換え米を含まないコメ DNA 溶液が大量に必要となる。そのため、抽出の際に試料の前処理が容易であること、および抽出される DNA 量が多いことも条件とした。タイ産ビーフン B と台湾産ビーフン A は抽出量の、台湾産ビーフン B は抽出量および SPS 遺伝子不検出の、上新粉 A は非特異的な増幅バンド検出の観点から、外部精度管理調査試料の原料としては不適切であると考えた。残るタイ産ビーフン A と上新粉 B のうち、実際に中国産遺伝子組換え米混入事例があり、上新粉に比べて加工度が高いビーフンが DNA 抽出操作の信頼性確認用の試料として適切であると考え、タイ産ビーフン A をコメ加工品粉砕物試料として用いることとした。コメ加工品の種類および抽出法によって DNA の収量が異なることが明らかとなった。通知の方法では、DNA 収量が少ないものが多かったため、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて 15 種類のコメ加工品から DNA を抽出し、GM quicker 2 (通知法) を用いて抽出した DNA による結果と比較した。その結果、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を使用することにより、GM quicker 2 (通知法) では十分な量の DNA を得られなかった加工品からの収量を増やせる場合があることが明らかとなった。また、コメ加工品ごとにより高収量の DNA が得られるキットが異なることが示されたため、検査対象に適したキットを選択することによって、より多くの加工品から遺伝子組換え食品の検出が可能になるものと考えられた。また、上記で抽出した DNA について陽性対照プライ

マー対による PCR を行い、SPS 遺伝子の検出の可否を確認した。抽出される DNA の量および総 DNA に占めるコメ DNA の割合が少なく、その結果 SPS 遺伝子が検出できない可能性が考えられた。このうち、GM quicker 2(通知法)は DNA 収量が極めて低く、260 nm の吸収は検出限界以下であったため、PCR 反応に十分な濃度の DNA が存在しないことが、SPS 遺伝子の検出不可能にした原因のひとつであると考えられた。さらに Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法)を用いて抽出した DNA は、定性 PCR における SPS 遺伝子の検出に関しては、GM quicker 2(通知法)を使用した場合と同等であることが明らかとなった。しかし、抽出 DNA の収量は平均して高く、GM quicker 2(通知法)で吸光度測定に十分な量の DNA が抽出できなかった加工品からでも、吸光度測定ができる量の DNA 抽出が可能であった。従って、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法)は、コメ加工品からの DNA 抽出方法としてかなり有効な方法のひとつであると考えられた。

平成 21 年度において更に穂山らは、DAS59132 試験法の多機関バリデーションの中でトウモロコシ粉末試料では DAS59132 トウモロコシの含量が重量混合比で 0.05% 試料まで全機関で陽性と判定されたことを報告している(第 45 回全国化学技術協議会講演要旨集, 2008)。しかし、DAS59132 トウモロコシおよび nonGM トウモロコシの抽出 DNA 溶液を混合して作製した 0.01% (10000 倍希釈) DNA 溶液試料で一部の機関において Ct 値が 38 以上となる測定があったことを報告している。このため、DAS59132 トウモロコシ

シ DNA 溶液について 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リアルタイム PCR による DAS59132 検出用試験で検出下限を検討したところ、DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液の検出下限が 0.05% と考えられた。

Bt10 の検出下限および DAS59132 の検出下限の検討結果に基づき DNA 溶液試料を穂山らの報告に従ってトウモロコシ粉末試料として外部精度管理調査を実施した。1 機関の Bt10 確認用試験における測定を除き、陽性試料においては全て想定通りの結果が得られたため、外部精度管理調査試料の濃度の設定は適切であったものと考えられた。

試料 1 を陰性と報告した機関では、TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> (通常品)を使用したと判明し、誤った結果を報告した原因はホットスタート酵素を使用しなかったことにあるものと考えられた。通常の PCR 酵素を用いた PCR では 1 サイクル目の昇温過程においてプライマーが鑄型 DNA と非特異的にハイブリッドを形成したり、プライマー同士がハイブリッドを形成したりするため、非特異的増幅物が生じやすい。また通知の Bt10 測定法はホットスタート酵素の使用を前提としているため最初の熱変性の時間が長く設定されており、酵素が失活した可能性も考えられた。これらの理由で陰性と報告した機関では Bt10 の検出感度が低下したものと考えられた。

リアルタイム PCR における増幅曲線の収束位置には、リアルタイム PCR 装置の蛍光感度よりもプライマー・プローブの濃度の影響が大きいことが明らかになった。DAS59132 の測定に使用するプライマー・プローブはキットとしては市販されておらず、機関ごとにメーカーに合成を依頼することとな

るため、バッチは全て異なっている。このため、メーカーによる差も含め、プライマー・プローブの濃度に誤差が生じやすいと考えられる。

平成 22 年度に、外部精度管理調査を実施した結果では、試料 1 の ELISA 法 (4.02%) による報告値が定量 PCR 法 (6.41%) と比べて低い値を示している。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が、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。試料 4 および試料 5 の定量 PCR 法による報告値については、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とから、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。

外部精度管理調査における DNA 収量およびレクチンコピー数については、定量 PCR 法の参加機関が使用した DNA 抽出法として 1 機関を除き DNeasy Plant Mini Kit または GM quicker 2 であるが、DNA の抽出法が DNA 収量および定量 PCR 測定におけるレクチンコピー数に影響していることは明らかである。

DNA 収量およびレクチンコピー数に対する DNA 抽出法の影響では、外部精度管理調査試料 1 と試料 4 から DNA を抽出した。260 nm の吸光度から求めた DNA 収量は、DNeasy Plant Mini Kit の方が GM quicker 2 に比べ試料 1 では 2.7 倍、試料 4 では 1.7 倍と多いが、両抽出法とも最初のサンプリン

グ量は 1 g であり、シリカゲルカラムに負荷する事を考慮すると、収量の差はさらに大きくなるものと考えられた。

抽出 DNA の質は、同量の鋳型 DNA を用いたにもかかわらず、定量 PCR におけるレクチンコピー数に抽出法による差が認められ、両法で抽出した DNA の質の違いを検討した。アガロースゲル電気泳動を行った結果では、両者とも高分子のゲノミック DNA のバンドが観察されたが、等量の DNA を泳動したにもかかわらず、GM quicker 2 のゲノミック DNA のバンドは DNeasy Plant Mini Kit に比べて濃いことが判明し、調整した溶液の DNA 濃度が異なっていた可能性が示された。

DNA 定量法による DNA 濃度の差については、アガロースゲル電気泳動の結果、20 ng/ $\mu$ L に調整した DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker 2 の DNA 濃度が異なっている可能性が示唆されている。GM quicker 2 の抽出 DNA では測定法間で定量値の差が小さいことから 260 nm 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 260 nm 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。

GM quicker 2 と DNeasy Plant Mini Kit による抽出 DNA を蛍光光度法での測定結果に基づき 7 ng/ $\mu$ L に調整後、アガロースゲル電気泳動を行った。両者の高分子のゲノミック DNA のバンドの濃さはほぼ等しくなった。またこの時、スメアについては抽出法間で差は認められず、DNA の断片化の程度には抽出法間で差はないものと考えられた。



定量 PCR のコピー数は蛍光光度法による二本鎖 DNA の量を反映していると考えられ、UV 吸収法により DNA 濃度を調整した場合、DNeasy Plant Mini Kit による抽出 DNA では GM quicker 2 による抽出 DNA に比べ、レクチンコピー数が低く測定されることが判明した。なお、RRS サイズの定量 PCR 法は DNeasy Plant Mini Kit とほぼ同じ性能の DNeasy Plant Maxi Kit により抽出した DNA を用いて設定されたので、実際には GM quicker 2 抽出液を UV 吸収法で濃度を調整し定量 PCR を行った場合 PCR 反応液の鋳型 DNA の濃度が測定法の想定よりも高くなっていると考えられた。

定量 PCR のコピー数は二本鎖 DNA の量に依存すると考えられること、抽出 DNA の 260 nm の吸収から求められた定量値と蛍光光度法による二本鎖 DNA の定量値は大きく異なる場合があり、これは抽出法に依存していることが判明した。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る。

最後に、トウモロコシでもサイズと同じ傾向が認められており、観察された定量値の差は、DNA 抽出法に由来することが示唆された。

## E. 結論

### 1. 尾花分担研究

平成 20 年度の外部精度管理試験結果で、全ての測定項目で良好な結果を得た機関は 2 機関だけであった。それ以外の機関では、一つ以上の農薬がいずれかの測定機器で Xbar 管理図、R 管理図、z-スコアのいずれかが適正範囲外となった。このことは、今回の試料に選択したレトルトカレーが脂肪や香辛料を多量に含むため、最も測定困難と思われる部類の試料であったこと、また、メタミドホスやアセフェートのように極性が高く、一斉分析法での分析の難易度が高い農薬が含まれていたことが原因として考えられる。GC システム評価試料で大きな変動が見られた機関があることから、今回の試料を連続して測定し、安定した分析結果を得ることは容易ではないと考えられる。本研究で使用した分析法は通常業務で使用している方法でないため、使用した分析方法に習熟する時間的余裕がなかったことも大きな要因であると考えられた。

平成 21 年度の外部精度管理試験結果で、全ての農薬で良好な判定結果を得た機関は 3 機関、サンプリング試験結果では 5 機関であった。それ以外の機関では、一つ以上の評価項目がいずれかの測定機器で適正範囲外となった。これは前年度の試験結果よりも良好であり、パンケーキ試料が主に牛乳、卵と小麦粉という単純な構成であり、前年度のレトルトカレーより夾雑物が少なく、測定が比較的容易な加工食品であったことも要因の一つと考えられる。また、前年度の試験で好成績であった、抽出にヘキサソールとアセトニトリルを使用する分析法を採用する機関数が増加し、その多くが良好な結果を得たこ

とも要因の一つと考えられる。

平成 22 年度は対象農薬 25 種類のブラインド試験を実施したが、全機関とも誤検出はなく、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 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、一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. 中澤・斉藤分担研究

平成 20 年度から平成 22 年度までの実験より CPA 分析では LC-UV による汎用性の高いスクリーニング測定が行えた。また、LC/TOF-MS を用いることで、さらに高精度の分析が行えることが示された。

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なり、今後、実用的な分析法として活用されることが期待される。

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。

さらに、めんつゆを用いた標準マテリアルを作製し、これを用いて室間変動等を確認したが、十分に実用性のあるものが作製できたものと判断した。

## 3. 松木・村山分担研究

農薬の一斉分析においては、市販の混合標準溶液には含まれないような検査対象を含めて測定することが必要である。その場合には、分析者自らが混合溶液の調製およびその溶液中での農薬の安定性についての確認が必要と考える。本検討結果は、検査機関の分析者に対して、安定性の確認試験等を行う上での貴重な情報が提供でき、ひいては、検査の信頼性向上に寄与できるものと考えられる。

一般的な標準液の保存条件下、あるいは過酷な保存条件下での混合液中での各農

薬の安定性に関わるデータが入手できることから、試薬メーカーに対しては混合標準液調製時における調製時または保存時における農薬の安定性に影響を与える要因に関する情報提供ができるものとする。さらに、混合農薬標準品液の調製法や使用者への提供の見直しあるいは、今後より高品質な残留農薬混合標準液の調製における貴重な情報提供についても可能となる。

検査機関においては、試薬メーカーから購入する混合標準液の作製方法や品質管理の現状が把握でき、また、混合標準品の保管管理や定量時における精度管理上の注意を促すこともできる。今後の各検査機関での精確な検査結果の確保にも繋がること期待できる。

残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性については、個別分析法を用いた農薬検査を実施している各検査機関の現場において、農薬の標準原液や標準液を調製する時の溶解液への農薬の溶解性に関する情報の提供ができる。また、溶解状態の確認の必要性、重要性が認識でき、今後の各検査機関でのより精確な検査遂行に寄与できると考える。

平成 21 年度の農薬混合標準液の -20、4、40、60℃における保存試験の結果、-20℃保存群中では 3ヶ月で 2 農薬、6ヶ月で 4 農薬、4℃保存群中では 3ヶ月で 15 農薬、6ヶ月で 31 農薬、40℃保存群中では 3ヶ月で 2 農薬、6ヶ月で 21 農薬、60℃保存群中では 3ヶ月で 39 農薬、6ヶ月で 47 農薬において 10%以上の減少が観察された。

平成 22 年度は、農薬混合標準液の -20、4、40、60℃における保存試験の結果、-20 および 4℃保存群では 14ヶ月まで各農薬は

安定であることがわかった。40℃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℃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℃で保存して溶解性を調べた結果、不溶および保存中に析出している兆候は認められなかった。

#### 4. 大島分担研究

##### (1) 理化学検査のための適正試料の作製:

精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。平成 20 年度の検討から、鶏肉(ササミ、ムネ、モモ)を 3 度挽きペーストにすることによって、スジおよび脂肪が均一である肉を得ることができ、ロボ・クープ・ミキサーで肉ペーストと SDD を混合することにより、肉を基材とした調査試料を作製することができた。鶏ササミ肉ペーストは粘性があり、水を 20% 添加することにより、均一性が得られた。冷凍保存 86 日、冷蔵保存 7 日、3 回の冷凍・解凍においても安定であり、平成 20 年度の外部精度管理調査用試料として採用した。鶏ムネおよびモモ肉ペーストは脂肪含有により、水無添加で均一性が得られた。今後の調査試料とすることが可能であることが示された。ソルビン酸および安息香酸は、測定を妨害する可能性があり、亜硝酸ナトリウムは SDD を分解するため、使用できないことが確認された。

平成 21 年度の残留動物用医薬品の検討では、鶏肉(ムネおよびモモ肉)はいずれ

れも作製試料の均一性、ならびに 70 日間の冷凍保存および 3 回の凍結融解の安定性試験で、その安定性が確保されたことから、調査試料として適切であると考えられた。また、モモ肉では冷蔵保存 7 日目で妨害ピークを観察しており、ムネ肉の方がより適切な調査試料であると考えられる。また、豚肉(ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉)においても 10 種すべてのサルファ剤で 70% 以上の回収率を得ることができた。特に SDD については 80% 以上の回収率を得ており、今後調査試料としての可能性が示唆された。

平成 22 年度は、豚肉基材として異なる 3 部位(ヒレ、カタおよびバラ肉)を採用し、それぞれについて 10 種のサルファ剤を添加した試料を作製し、均一性、冷凍保存安定性、冷蔵保存安定性および凍結融解安定性を確認した。均一性試験の結果、ヒレおよびカタ肉は均一性が確認されたが、バラ肉については均一性が確保されなかった。また、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安定性が高く、次いでヒレ肉が高い安定性を有していることが示唆された。冷凍保存安定性および凍結融解安定性試験の結果は、いずれの基材においても安定性は良好であった。これらのことから、ヒレ肉が調査試料として適切であることを確認した。冷蔵保存安定性がヒレおよびカタ肉に比べて良好であったバラ肉を用いた均一な試料の作製方法は、今後検討する必要があると考えられた。

着色料に関する検討では、新たな基材として大根漬(3 種)を用いて定性試験等を検討したが、抽出に用いる溶液により、TLC の結果が色調においてやや異なるものの、

いずれの基材でも添加した 12 色素が基材成分の影響を受けることなく良好に検出され、これら色素の添加試料は使用可能であると考えられた。

## (2) 微生物学検査のための適正試料の作製:

平成 20 年度は、使用した標準菌株(*B. cereus* HIC 080115、HIC 080116、HIC 080117、いずれも栄養型)および市販の *B. subtilis* ATCC 6633 芽胞液を用いて NGKG 寒天培地および MYP 寒天培地上での集落形成を確認した。*B. cereus* についてはいずれの菌株も典型集落の形成を認めた。これに対して、*B. subtilis* では NGKG 寒天培地上に発育集落はほとんど認められなかったが 48 時間培養により擬陽性と判定しうる集落の形成を認めた。一方、MYP 寒天培地上には陰性集落の発育を認めたものの、これについても培養時間を延長することにより擬陽性集落を認めた。なお、NGKG 寒天培地については 3 社について実施したが、判定のしやすさ等に差があるものの、概して同様の反応性を示した。以上のことから *B. cereus* については外部精度管理試料として適用できると考えられたが、*B. cereus* の芽胞液を作製したところ、作製後 1 週間の時点で菌数の減少が認められた。このことは芽胞液として安定した回収が得られていないことを示しており、芽胞液の作製方法について検討することに加え、栄養型で菌液調製をしたときのマッシュポテト中での安定性についても検討する必要があるものと考えられた。セレウス菌は芽胞形成菌であることを考慮すると、芽胞状態で調査試料を作製したほうが、調査試料の安定性という点では有利であると考えられ