

201131038A

厚生労働科学研究費補助金
(食品の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23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

中 澤 裕 之

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

鈴 木 達 也

平成24年(2012年)5月

厚生労働科学研究費補助金
(食品の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23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 中 澤 裕 之

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 鈴 木 達 也

平成24年(2012年)5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. 加工食品中の残留農薬分析及び放射線照射検知の 精度管理体制の構築に関する研究	33
尾花 裕孝	
2. 食品中に残留するマイコトキシンに関する精度管理体制の構築に関する研究	109
中澤 裕之	
3. 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と 精度管理体制の構築に関する研究	119
斉藤 貢一	
4. 食品中の残留農薬等試験検査におけるマトリックスの影響評価に関する研究	129
村山 三徳	
5. 食品衛生外部精度管理調査用適正試料(理化学検査、微生物学検査、 アレルギー物質検査、組換え DNA 技術応用食品検査)の作製検討と 信頼性確保に関する研究	147
鈴木 達也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	229
IV. 研究成果の刊行物・別刷	235

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

平成 23 年度 総括研究報告書

主任研究者 小島 幸一

平成 23 年(2012 年)4 月

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

総括研究報告書

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、国内では様々な検査が実施されている。行政指導等がこれらの検査結果をもとに行われることを考慮すると、これらの検査結果はどの検査機関で実施しても同等の結果が得られることが望ましい。そのためには、検査結果の信頼性を確保する必要があるが、このひとつとして精度管理が挙げられる。特に外部精度管理は、共通試料を各検査機関に配布した後、各検査機関で検査を実施し、この結果を解析することにより、評価を行う。そのため、共通試料として用いる外部精度管理調査試料における均一性や安定性の担保、さらにはより実際の食材に近い調査試料の開発が求められる。すなわち、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、これに付随した精度管理の実施は、検査機関における検査精度の確認や信頼性の確保に大きな役割を果たすこととなり、結果として食品の安心・安全の確保に対して大きく貢献するものと考えられる。そこで本年度は、1.加工食品中の残留農薬分析及び放射線照射検知の精度管理体制の構築に関する研究(尾花分担研究)、2. 食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究(中澤分担研究)、3. 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と精度管理体制の構築に関する研究(斉藤分担研究)、4. 食品中の残留農薬等試験検査におけるマトリックスの影響評価に関する研究(村山分担研究)、5. 食品衛生外部精度管理調査用適正試料(理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査、組換えDNA技術応用食品検査)の作製検討と信頼性確保に関する研究(鈴木分担研究)の5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衛生化学部長)、中澤裕之(星薬科大学教授)、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)、鈴木達也((財)食品薬品安全センター秦野研究所外部精度管理調査室長)

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、継続的に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、いまだ十分とは言えず、とりわけ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(マイコトキシン等)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。さらには、これらの検査対象物質を定量するにあたり、複雑な食品マトリックスの影響をどのように評価するかは、より正確な検査結果を得るうえでも非常に重要である。そのため、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すす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。これらの検討結果は、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生かされ、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一層充実させ、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 加工食品中の残留農薬分析及び放射線照射検知の精度管理体制の構築に関する研究(尾花分担研究)

加工食品の残留農薬分析の精度に及ぼす因子を明らかにするために、8機関を対象に分析機器の再現性試験、外部精度管理試験および基準適合性の判定の3試験を実施した。測定機器は、タンデム型質量分析器付き液体クロマトグラフィー(LC-MS/MS)とした。分析機器の再現性試験では、使用するLC-MS/MSの分析精度およびその分析の真度ならびに精度に及ぼすマトリックスの影響を評価した。外部精度管理試験では、均一化した精度管理試料および分別した原材料の分析精度を検討し、分別の手法が分析精度に及ぼす影響について評価した。基準適合性の判定は、外部精度管理試験で得た測定値を基に、法令に定める残留基準に照らして食品規格への適否

を判定し、判定に及ぼす分別の手法の影響を評価した。

精度管理試料としてポークビーンズを採用し、原材料の検査としては大豆およびトマトピューレを用いた。なお、試料への添加農薬としてプロポキスル、カルバリル、ピリミカブ、フェノブカルブ、ジエトフェンカルブ、イソプロチオラン及びイソキサチオン、プロピザミドおよびチオベンカルブを使用した。大豆における試料溶液の調製は以下に従って行った。大豆は細切均一化した後、10.0 g をポリプロピレン製遠心管に採取し、内部標準物質としてカルバリル-d7、フェノブカルブ-d3、イソキサチオン-d10 及びチオベンカルブ-d10 を各々100 ng/g で添加した。これにアセトニトリル 20 mL を加えて、ホモジナイザーで1分間攪拌抽出した。これに塩化ナトリウム 1 g および無水硫酸マグネシウム 4 g を加えて、直ちに1分間振とう攪拌し遠心分離(3000 rpm, 10分間)を行った。アセトニトリル層 8 mL を予めアセトニトリル/トルエン(3/1)混液 30 mL で平衡化した ENVI-Carb II /PSA(500/500 mg)の上に、予めアセトニトリル 10 mL で平衡化して連結した C18 (500 mg)カラムに負荷し、はじめにアセトニトリル 10 mL で溶出した。次に C18 カラムを除き、ENVI-Carb II /PSA をアセトニトリル/トルエン(3/1)混液 30 mL で溶出した。負荷した際の通過液及び溶出液は 100 mL ナス型フラスコに捕集し、減圧濃縮した。窒素気流下で乾固後、メタノールで 2 mL に定容した。これを超純水で 4 倍希釈して試験溶液とした。ポークビーンズにおける試料溶液の調製は以下に従って行った。ポークビーンズは予め、その重量の 1/2 相当量の超純水を加えて、ミルで細切均一化した。その後は、大豆の分析法と同様に精製し、試験溶液を調製した。トマトピューレにおける試料溶液

の調製は以下に従って行った。トマトピューレは、10.0 g をポリプロピレン製遠心管に採取し、内部標準物質としてカルバリル-d7、フェノブカルブ-d3、イソキサチオン-d10 及びチオベンカルブ-d10 を各々100 ng/g で添加した。これにアセトニトリル 20 mL を加えて、ホモジナイザーで1分間攪拌抽出した。これに塩化ナトリウム 1 g 及び無水硫酸マグネシウム 4 g を加えて、直ちに1分間振とう攪拌し遠心分離(3000 rpm, 10分間)を行った。アセトニトリル層 8 mL をあらかじめアセトニトリル/トルエン(3/1)混液 30 mL で平衡化した ENVI-Carb II /PSA(500/500 mg)に負荷した。通液後、アセトニトリル/トルエン(3/1)混液 30 mL で溶出した。負荷した際の通過液及び溶出液は 100 mL ナス型フラスコに捕集し、減圧濃縮した。窒素気流下で乾固後、メタノールで 2 mL に定容した。これを超純水で 4 倍希釈して試験溶液とした。

分析機器の再現性試験では、混合標準溶液およびマトリックス溶液から調製した試料溶液について5回の連続測定を行い、ピーク面積を算定した。

外部精度管理試験では、協力機関において均一化法および分別法の2種により実施した。すなわち、均一化法では全量を採取し、細切均一化した上で、項目を測定して測定値を求めた。分別法では添加試料1容器の全量を採取し大豆、トマト及びハムに分別し、ハムを除く大豆及びトマトを細切均一化した上で、項目を測定して測定値を求めた。なお、測定回数はそれぞれ5回とした。これらについて食品規格への適否を判定した。また、Xbar 管理図およびzスコアによる評価も行った。

2 食品中に残留するマイコトキシンに関する精度管理体制の構築に関する研究(中澤分

担研究)

平成 14 年～20 年度にかけて農林水産省が行った「国産穀類中のかび毒含有実態調査」を基にして、これらの中から特に小麦(玄麦)と大麦(玄麦)中のデオキシニバレノール(DON)に関する調査結果を抜粋・統合して一覧表を作成した。その際、「定量限界以上の点数/調査点数」については、原本には示されていないため、改めて算出した。飼料原料については、同省が平成 15 年～18 年度に行った、「飼料原料(麦類中)の DON 濃度実態調査結果」について同様に抜粋して一覧表を作成した。

また、「麦類加工品中のかび毒含有実態調査結果(平成 19、20 年度)」についても同様に処理し、さらに、麦類加工品からの DON 摂取量については、検出された最高値を用いて再計算し、耐容摂取量に対する割合など、リスク評価を改めて行った。

ELISA には、抗 DON モノクローナル抗体を用いた市販キット『DON』(株)フロンティア研究所製)を用いた。概略は以下の通りである。「抗マウス IgG 捕捉抗体が固定化された 96 穴ウエルプレートに、DON 標準品(または検体)、次に HRP 標識 DON を加え、最後に抗 DON 抗体を順次加えて競合反応させる。得られた HRP-DON-抗体複合体の酵素(HRP)活性を測定することにより、検体中の DON 濃度を求める。」なお、実際の使用方法はキット付属の取扱説明書に準じて行った。

真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションのために添加回収試験を行った。測定対象の食品試料には、市販のビールを選択した。液状試料であることから、抽出やクリーンアップ等を行わず、前処理はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)による希

釈のみとした。DON 添加濃度は 100 ng/mL とし、一日に 2 回測定を併行して繰り返し、これを 5 日間行って得られたデータを一元配置分散分析法で統計解析した。

3 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と精度管理体制の構築に関する研究(斉藤分担研究)

シクロピアゾン酸(CPA)に対するウサギポリクローナル抗体の作製は、W.Yu らの方法に準じて行った。すなわち、CPA と活性化 Keyhole limpet hemocyanin (KLH)とを反応させて CPA ポリクローナル抗体作製の抗原(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。その後、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。

CPA-KLH conjugate (1 μ g/ml Carbonate Buffer pH8.5) 50 μ L をマイクロプレートに加え、2 時間放置して固相化を行った。1%スキムミルク-PBS を 360 μ L 加え、1 時間放置してブロッキングを行った後、0.02% Tween-20-PBS で 3 回洗浄を行い、CPA 測定用 ELISA プレートを調製した。ELISA プレートに希釈系列を 50 μ L および第一抗体(CPA ウサギ抗血清)を 100 μ L 加え、1 時間反応させた。希釈系列は、CPA 標準品 1000 ng/mL を調製し、この液を、適宜 PBS で希釈したものと、ブランクとしての PBS の、計 8 種類を用いた。反応後、B/F 分離を行い、第二抗体 (Anti Rabbit IgG(H+L)、HRP conjugate) を 100 μ L 加え 1 時間放置し、ウエルに結合した第一抗体に第二抗体を反応させた。その後、再び B/F 分離を行い、TMB 100 μ L を加え、10 分間放置して発色させた

後、1 N 硫酸 100 μ L を加え反応を停止し、直ちにプレートリーダーを用いて波長 450 nm で測定した。

試料として液状調味料(めんつゆ)を用いた。試料のクリーンアップとしては、①原液の希釈のみ、②液液抽出および③液液抽出+固相抽出の3種類の手法をそれぞれ行った。原液の希釈はPBSで行い、また液液抽出では試料 5 mL の pH を 1N NaOH で 9.0 に調整し、精製水で 10 mL にメスアップし NaCl 5 g を加えた。酢酸エチル 10 mL を加えて振とう抽出し、5°C、10000 g で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。この操作を 3 回繰り返し、合わせた上清を減圧濃縮により溶媒除去し、1%メタノールで再溶解した。固相抽出では、前記の 1%メタノールで再溶解したものを Oasis HLB カートリッジ (1 cc) を用いて固相抽出し、再び減圧濃縮により溶媒除去し、1%メタノール-PBS の混液で再溶解したものを測定用試料とした。

真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションのために添加回収試験を行った。食品試料には、液状調味料として市販のめんつゆを選択し、原液を PBS で 10 倍希釈したものを測定用試料とした。CPA 添加濃度は 1000 ng/mL とし、一日に 2 回測定を併行して繰り返し、これを 5 日間行って得られたデータを一元配置法で統計解析した。

4 食品中の残留農薬等試験検査におけるマトリックスの影響評価に関する研究(村山分担研究)

マラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンのアセトニトリル溶液に亜硫酸水素ナトリウム水溶液(SO₂として 1~1000 ppm 相

当)を加え、液体クロマトグラフ質量分析計により、マラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンの挙動を確認した。

5 食品衛生外部精度管理調査用適正試料(理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査、組換え DNA 技術応用食品検査)の作製検討と信頼性確保に関する研究(鈴木分担研究)

5.1 理化学的検査のための適正調査試料の作製:

残留動物用医薬品検査用調査試料の作製では、ブリク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サルファ剤混合標準溶液(メタノール溶液)を添加し、よく混合した(添加濃度:スルファジミジン(SDD)、スルファジアジン(SDZ)、スルファメラジン(SMR)、スルファメトキシピリダジン(SMPD)、スルファモノメトキシ(SMMX)、スルファクロルピリダジン(SCPD)、スルファメトキサゾール(SMX)、スルファジメトキシ(SDMX)、スルファキノキサリン(SQ)およびスルフィンキサゾール(SIX)いずれも 0.2 μ g/g)。これらを約 80 g ずつ容器に分注して冷凍(-24°C~-20°C)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、ブランク試料を作製した。これらの各サルファ剤の回収率、均一性および冷凍保存(約 60 日)における安定性を検討した。なお、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。

食品添加物検査のうち着色料の定性検査用調査試料の作製では、複数色素を選択し、ゼリー菓子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、ゼラチン濃度が異なる 2 種類のゼリー菓子に添加し、

それらが検出可能であるかを確認した。また、均一性(n=5)の確認を行った。水 75 mL をとり、ゼラチン 18 g および 21 g を各々振り入れ、膨潤させた。別の容器に、水あめ 30 g、精製白糖 50 g およびトウモロコシ油 2 g を量り、以下に示す濃度に調製した色素液(水溶液) 50 mL を加え、水浴上で加熱した。内容物が溶解後、膨潤させたゼラチンを入れ、再び水浴上で穏やかに加熱しながら混合し、完全にゼラチンを溶かした(ゼラチン濃度:約 8%および約 9%)。放冷後、200 g を量りとり、容器に入れ冷蔵した。測定操作は、「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。

食品添加物検査のうち保存料の定量検査用調査試料の作製では、(1) 漬物(大根漬け)として、長さ約 10~15 cm の円柱状の漬物を縦長方向に 4 分割し、ソルビン酸濃度が 0.52 g/kg になるように調製した溶液(水溶液)に、約 1 週間、冷暗所で浸漬した。浸漬後、溶液から取り出し、作製試料とした。(2) シロップとして、市販のシロップを基材とし、ソルビン酸およびソルビン酸カリウムを添加標準品とした。シロップ含有量はいずれも 50%とし、水を用いて希釈して試料を作製し、それぞれの均一性および冷蔵保存(約 45 日間)における安定性を検討した(ソルビン酸濃度はいずれも 0.95 g/kg)。また、市販のシロップを基材として使い、シロップ含有量を 10、30 および 50%に、それらのソルビン酸濃度を 0.95 g/kg として、それぞれ試料を作製した。更に、シロップ含有量を 50%とした場合のソルビン酸濃度を 0.40、0.60 および 0.75 g/kg に変えて、それぞれ試料として作製した。作製は水を用いて希釈し、ソルビン酸カリウムを添加混合し

て行った。安定性は、冷蔵保存(約 45 日間)後、試験に供した。測定操作は、「食品衛生検査指針 食品添加物編(2003)」の第 1 章 保存料の項に準じた。

残留農薬検査用調査試料の作製では、マッシュポテト 45 g を量り、水 150 mL を加え、マッシュポテトを十分膨潤させた後、スパチュラで混合した。安定剤溶液全量を、溶液が熱い状態で加え、沸騰水(熱い状態) 10 mL を用いて洗い込む操作を 2 回行い、十分混合後、放冷した。各々 250 g を量り、クロルピリホス、フェニトロチオン、マラチオン、ダイアジノンおよびエトプロホス各 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、ブタミホス、ジメエートおよびフェンスルホチオン各 0.2 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し、ハンドミキサーを用いて十分混合した。調製した試料は、ジップロックに入れ、冷凍保存した。測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編(2003)」に準じた。

5.2 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、市販の白米について、121°C で 60 分間のオートクレーブ滅菌を行った後、これに 15% NaCl 溶液に懸濁した各種芽胞液を添加し、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。基材を 7 日間 4°C にて保存した後、さらに 4°C、22.5°C または 32.5°C で 35 日間保存した。なお、7 日ごとに経日的にソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)寒天培地を用いた生菌数測定を行った。生菌数測定は 32.5°C で 24 時間培養した後の形成集落数を計測することにより算出した。

ビブリオ属菌検査用調査試料の作製では、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、2%ゼラチン加 Marine broth で 10^3 倍希釈したものを試験菌液とした。試験菌液 20mL、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 -20°C 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 71 日までとした。保存終了後、基材を取り出し Marine broth またはアルカリペプトン水に懸濁することで 10 倍希釈溶液を作製した。なお、10 倍希釈溶液の作製では冷凍保存した基材について1時間の室温放置による解凍、または解凍なしの2種の方法を採用した。生菌数測定は Marine agar を用いて行った。また、*S. aureus*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa*、*E. coli* の重層寒天平板を作製した。これに力価試験用ステンレスカップを4か所に設置し、これに 400 ppm および 3.125 ppm のナイシン溶液を 250 μL ずつ注入した。寒天培地を 37°C で 24 時間培養した後、寒天培地上の阻止円形成を確認した。さらに、400 ppm のナイシンを含む Marine broth を作製し、これをろ過滅菌した後、高圧蒸気滅菌した。これらの溶液に *S. aureus*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa*、*E. coli*、*V. parahaemolyticus* または *V. fluvialis* を 10^6 cfu/mL となるように添加し、これを 37°C で保存した。保存開始日、1 日目、6 日目にそれぞれ SCD 寒天培地または Marine agar を用いて生菌数測定を実施した。なお、試験対照としてナイシンを含まない Marine broth を用いた。

5.3 アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製検討:

特定原材料の定量では、ELISA 法による甲殻類タンパク質(エビ・カニタンパク質)の定量には 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

扱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。特定原材料タンパクはカニまたはエビを含む市販の食品素材それぞれから調製し、カニ添加液およびエビ添加液とした。カニ添加液、エビ添加液の総タンパク質濃度は 2-D Quant Kit を使用して測定した。

共同試験では、市販のホワイトソース、ハンペンおよびブロックリーペーストを基材として採用し、これにカニまたはエビ添加液を加えて調製した。これを 11 機関に送付し、検査結果を得た。返送された結果について Xbar-R 管理図による解析を行った。

PCR 法による確認では、DNA 抽出はイオン交換樹脂タイプのキットを用いて実施した。PCR 増幅は植物検出用 (CP03-5'、CP03-3')、エビ検出用 (ShH12-05'、ShH13-03')、カニ検出用 (CrH16-05'、CrH11-03')、動物検出用 (AN1-5'、AN2-5'、AN-3') の各プライマー、PCR 酵素に AmpliTaq Gold を使用し、GeneAmp PCR System 9700 により通知に従って実施した。PCR 増幅液は ultraPUREAgarose-1000、 $50\times$ TAE により作製したアガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid-2x を使用して電気泳動し、増幅物の有無を確認した。なお、アガロースゲルの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 または 100bp DNA Ladder、画像解析にはプリントグラフを使用した。

5.4 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:

DNA 試料として、63Bt コメ DNA 溶液および CpTI プラスミド溶液はいずれも国立医薬品食

品衛生研究所から供与を受け使用した。また、あらかじめ害虫抵抗性遺伝子組換えコメを含まないことを確認した米粉から GM quicker2 を使用し、改正通知法のプロトコールに従って DNA 溶液を抽出し、nonGM コメ DNA 溶液とした。リアルタイム PCR は改正通知法に従い、コメ陽性対照用試験はコメ陽性対照用プライマー対 (KVM159 および KVM160) およびコメ陽性対照用プローブ (TM013)、63Bt コメ検出用試験は Bt コメ検出用プライマー対 (T51-SF および OsNOS-R2)、および 63Bt コメ検出用プローブ (GM63-Taq)、NNBt コメ検出用試験は Bt コメ検出用プライマー対 (T51-SF および OsNOS-R2)、および NNBt コメ検出用プローブ (NGMr-Taq)、CpTI コメ検出用試験は CpTI コメ検出用プライマー対 (CpTi-1F および CpTi-1R)、および CpTI コメ検出用プローブ (CpTi-P) 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。なお、リアルタイム PCR の結果は指数関数的な増幅が観察された場合、Th.line を 0.2 から 0.5 に設定して Ct 値を求め、38 未満の Ct 値が得られた場合、陽性と判定した。

外部精度管理調査のリアルタイム PCR 結果は、試料および検出系に分けてまとめ、試料ごとに正答率を算出した。また、外部精度管理調査の際、あらかじめ Th.line を 0.2 および 0.5 に指定し、各測定における Ct 値のデータを収集した。そのうち試料 A、試料 B、試料 D の害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験の Ct 値およびこの値と陽性対照プラスミドの Ct 値との差について正規確率プロットおよび Z-スコア管理図を作成し、リアルタイム PCR 法による定性試験の結果の評価法について検討した。

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

作製した調査試料における各農薬の回収率について確認したところ、大豆では内部標準物質で補正した回収率が 95~106%、変動係数が 0.8~7.0%、ポークビーンズでは、内部標準物質で補正した回収率が 100~107%、変動係数が 1.6~3.7%、トマトピューレでは、内部標準物質で補正した回収率が 96~102%、変動係数が 1.6~5.8%といずれも良好であった。また、当該トマトピューレを 7 倍希釈したものをを用いて、添加濃度を 10 ng/g として行った結果は、回収率が 95~111%、変動係数が 1.0~4.8%と良好であった。また、調査試料を作製するにあたり、アセトンを含む水に大豆を浸漬させたところ、大豆は吸水した。次に、項目を各々 0.1 ppm に調製した農薬混合水溶液 (10%アセトンを含む) に、予め乾燥させた大豆を 4°C で 72 時間浸漬した。その結果、大豆には全農薬を含浸させることができた。その濃度は、約 60~160 ng/g の範囲となり、農薬間で差があった。浸漬させる大豆の量に依らず、再現よく含浸させる条件を検討した。その結果、大豆の重量に対して、農薬混合水溶液の濃度及び分量の比率を一定にすれば、全項目の濃度について良好な再現性で含浸させることができた。ポークビーンズは原材料ごとに正確に分析するには、簡便かつ確実に分別することが必要である。ポークビーンズは、固形と液状の原材料から成り、確実に分別するには、水で大豆及びロースハムに付着したトマトピューレを洗い落とすことを考案した。分別に用いる水は、分析法の定量下限を考慮して、過度に多くならないよう検討した。その結果、ポリエチレン製排水口用水切りネット (横 18 cm、縦 25 cm)、ビーカー 4

個(300 mL×1、500 mL×2、1000 mL×1)、金属製ザル、ピンセットおよび超純水 720 mL を用いる方法を考案した。試料は予め 30°C で 2 時間解凍した。300 mL ビーカーに敷いたネットに試料を全量移し、トマトピューレを濾し取った。次に 500 mL ビーカーに入れた 280 mL の超純水に、ネットに入った試料を移し、上下に攪拌しながら 1 分間洗浄した。さらに、500 mL ビーカーで同様に洗浄した。試料はネットから金属製ザルに移し、軽く水を切った後、ピンセットで大豆及びロースハムを選別した。一方、トマトピューレは、160 mL の超純水で 1000 mL ビーカーに洗い込み、分析用試料とした。分別に用いた水は、トマトピューレ重量の 6 倍に相当する 720 mL となるため、トマトピューレは 7 倍に希釈された。さらに、トマトピューレ中での試験対象農薬の安定性を検証した。トマトピューレに 100 ng/g となるよう添加し、-20°C で凍結した後、2 ヶ月間の残存率を検討した。すべての農薬の残存率は 80% 以上であった。また、精度管理試料中での農薬の安定性について検証した。ポークビーンズ全体および分別した大豆において、2 ヶ月間の残存率は、ポークビーンズ全体で 97~105%、大豆で 98~106% であった。したがって、精度管理試料中での農薬の安定性が確認できた。添加農薬の試料容器間の均一性を評価した。評価は外部精度管理試験で、試料が均一化法及び分別法に使用されるため、ポークビーンズ及び分別した大豆で行った。なお分別したトマトは、外部精度管理試験で評価対象から外したため、評価は行わなかった。添加試料 5 容器を無作為に選択し、一容器につき 2 併行で測定した。一元配置分散分析により、すべての添加農薬で有意水準は 0.05 を上回った。したがって、容器間に濃度の差が認められず、均一性が確認された。

同様に試験の実施期間における添加農薬の安定性を評価した。評価は均一性評価と同様に、ポークビーンズおよび分別した大豆で行った。添加試料 5 容器を無作為に選択し、一容器につき 2 併行で測定した。その結果、調製 2 か月後においてすべての添加農薬で、90% を上回る残存率であり、変動係数の著しい変化も認められず、安定性が確認された。

1.2 分析機器の再現性試験

標準溶液の連続測定を行ったところ、協力機関ごとのピーク面積比の平均値は 94.6~114.8%、変動係数は 0.5~8.9% および z-スコアは -1.8~1.7 であった。ピーク面積比の機関内の変動係数が 10% を超える機関はなかった。一方、マトリックス標準溶液の連続測定では、協力機関ごとのピーク面積比の平均値は 93.0~111.5%、変動係数は 0.4~12.0% 及び z-スコアは -1.8~1.8 であった。G 機関でプロポキスル、フェノブカルブ及びイソキサチオンで、ピーク面積比の機関内の変動係数が 10% を超えた。また、標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比率は、64.1~398.7% であった。D 機関でプロポキスル 264.5%、カルバリル 180.4%、ピリミカブ 323.5%、フェノブカルブ 156.7%、ジエトフェンカルブ 198.2%、イソプロチオラン 398.7% およびイソキサチオン 189.0% となって 120% を超え、チオベンカルブ 64.1% で 70% を下回り、マトリックスの影響が顕著であった。その他の機関は、全農薬が 70%~120% の範囲内であった。

1.3 外部精度管理試験

均一化法では、全ての機関が、添加農薬を検出した。平均回収率の平均値は 82.7~92.3% であり、Xbar 管理図における下部管理限界の 70% から上部管理限界の 120% の範囲を超える機関はなかった。R 管理図では、D 機関のピリ

ミカーブおよびチオベンカルブ、E 機関のカルバリルが適正域から外れた。zスコアは、E 機関でフェノブカルブ 2.3 及び G 機関でカルバリル-2.1 となり、 $2 \leq |Z| < 3$ となった。機関内の変動係数は、D 機関でチオベンカルブ 11.9% 及び E 機関でカルバリル 18.2% となり 10% を超えた。したがって、A、B、C、F、H および I 機関では、Xbar 管理図、R 管理図及び zスコアの評価で全農薬が良好であった。R 管理図で D 機関の 2 項目、E 機関の 1 項目について適正域を外れた。zスコアで、E および G 機関で 1 項目について、他機関の測定値と比較して、ずれが生じたため、分析法に疑問点が示唆された。D 機関は併行精度、G 機関は相対的な精度、E 機関は併行精度及び相対的な精度について不適となった。一方、分別法では、全ての機関が、添加農薬を検出した。大豆の平均回収率の平均値は 82.6~93.5% であり、Xbar 管理図における下部管理限界の 70% を下回ったのは、D 機関でチオベンカルブ 57.0% および G 機関でカルバリル 68.1% であった。上部管理限界の 120% を超える試験対象農薬はなかった。R 管理図では、E 機関のカルバリル、イソプロチオラン、プロピザミド、イソキサチオン及びチオベンカルブが適正域から外れた。zスコアは、D 機関でチオベンカルブ-2.2、E 機関でカルバリル 2.0、G 機関でプロピザミド-2.0、及び I 機関でフェノブカルブ 2.1 並びにジエトフェンカルブ 2.1 となり、 $2 \leq |Z| < 3$ となった。機関内の変動係数は、E 機関でカルバリル 15.4% およびイソキサチオン 11.1% となり 10% を超えた。したがって、A、B、C、F および H 機関では、Xbar 管理図、R 管理図および zスコアの評価で全農薬が良好であった。Xbar 管理図で D 機関の 1 項目、G 機関の 1 項目について適正域を外れた。R 管理図で E 機関の 5 項目につい

て適正域を外れた。zスコアで、D、E および G 機関の 1 農薬、I 機関の 2 農薬について他機関の測定値と比較して、ずれが生じたため、分析法に疑問点が示唆された。D および G 機関は真度及び相対的な精度、E 機関は併行精度及び相対的な精度、I 機関は相対的な精度について不適となった。

1.4 基準適合性の判定

加工食品の適合性としてポークビーンズの付与値に基づく判定は、全農薬が不適合となった。全機関の判定は全農薬について不適合となり、付与値に基づく判定と一致した。一方、原材料の適合性として大豆がカルバリル、ピリミカーブを除く農薬で不適合となり、トマトが全農薬で適合となった。E 機関が大豆で、カルバリルを不適合としたことを除いて、全機関の判定は、付与値に基づく判定と一致した。以上のことから、最終結果として付与値に基づく判定では、カルバリル、ピリミカーブを除く農薬が不適合となった。協力機関の判定は、E 機関のカルバリルで不適合の判定を除いて、その他の農薬は、付与値に基づく判定と一致した。

2 中澤分担研究

農林水産省は、DON による国産麦類汚染が明らかとなった平成 13 年の翌年(平成 14 年度)から毎年度、マイコトキシンによる穀類の汚染実態を把握するための調査を実施している。本研究では、これらの調査結果の中から平成 20 年度までの 7 年間分のデータを抜粋し、改めて DON による穀類の汚染を一覧表として作成した。調査試料点数は年度によって大きく異なっていたが、汚染濃度について年度別の平均値を見ると、小麦では 0.013~0.067 mg/kg、大麦では 0.032~0.56 mg/kg であった。“リスク評価”というスタ

ンスから、検出された最高値について着目して見た。すると、小麦については、平成14年度に基準値を超える2.1mg/kgが検出されていたが、その後、平成15～20年にかけては基準値を超えるものはなかった。他方、大麦については、平成14～16年度および平成18年度に基準値を超えていた。

ELISA キットには、国産のもので比較的入手が容易なフロンティア研究所製の「DON」を用いた。この ELISA キットでは、直接競合反応を利用しているため、操作を迅速に行えることも特徴である。キット付属の DON 標準品 8.23 ng/mL ～6000 ng/mL の範囲で、縦軸に B/B₀を、横軸を濃度の対数とした片対数グラフで検量線をプロットしたところ、逆シグモイド曲線が得られ、更に 10 ng/mL～100 ng/mL の範囲で良好な直線性が得られた。なお、ELISA の検出限界を、逆シグモイド曲線と接線を作図する方法から求めたところ、平均(n=6)で 14.4 ng/mL、標準偏差は 6.8 ng/mL となり、バラツキの大きい値となった。

実試料を ELISA で分析した場合のマトリックス効果の影響について検討するため、試料にビールを選び、その前処理法について検討した。その結果、試料原液の希釈だけでも、それぞれ作成したマトリックス検量線は、マトリックスが存在しない DON 標準品の検量線と良好に一致した。

本研究で用いた市販 ELISA キットの妥当性を検証するため、添加回収試験を行って、真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションを行った。その際、添加濃度は 100 ng/mL と低濃度での評価を試みた。これは、従来の ELISA による小麦中 DON 調査などにおいては、基準値(1.1

mg/kg)を勘案して行われてきたのに対し、より低濃度汚染を検出することを想定したためである。

検量線測定範囲の 11.11、33.33 および 100 ng/mL の3点について平均回収率から真度の差を検証したところ、81.6～116.3%であり、この範囲での測定値に信頼性があることが確認された。

また、一元配置分散分析法により、上記測定ポイントにおける併行精度と室内再現精度を求めたところ、併行精度および室内再現精度は最低濃度(11.11 ng/mL)の際には若干高めであったが、33.33 および 100 ng/mL では、併行精度と室内再現精度の数値はいずれも 15%未満であり、「食品中に残留する農薬などに関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成19年;厚生労働省)に沿った値であった。なお、上記の IC₅₀ 値(46.3 ng/mL)とその再現性結果と照らし合わせると、ELISA における定量値は IC₅₀ 付近が最も精度が高いことが確認された。

3 斉藤分担研究

ELISA 測定法の至適条件の検討を行ったところ、CPA-conjugate の濃度は 3 μg/mL、第一抗体の濃度は 25000 倍希釈、第二抗体の濃度は 3000 倍希釈であった。以上の条件で、CPA 標準品 0.001 ng/mL～1000 ng/mL の範囲で、縦軸に B/B₀を、横軸を濃度の対数とした片対数グラフで検量線をプロットしたところ、逆シグモイド曲線が得られ、更に 1 ng/mL～100 ng/mL の範囲で良好な直線性が得られた。ELISA 法の検出限界を、逆シグモイド曲線と接線を作図する方法から求めたところ、0.4 ng/mL であり、また 50%阻害濃度(IC₅₀)値は 16.7 ng/mL であった。

実試料を ELISA で分析した場合のマトリックス効果の影響について検討するため、試料に液状調味料のめんつゆを選び、その前処理法について検討した。その結果、前処理クリーンアップが十分な液液抽出と固相抽出法を併用した場合はもちろん、液液抽出または試料原液の希釈(10 倍希釈)だけでも、それぞれ作成したマトリックス検量線は、マトリックスが存在しない CPA 標準品の検量線と良好に一致した。次に、めんつゆの希釈倍率についての至適値を検討した。めんつゆ原液、原液を PBS で 5 倍希釈したもの、10 倍希釈したもの、および 100 倍希釈したものを調製し、これらで CPA 標準品を希釈して希釈系列を作製し、実験を行った。その結果、めんつゆ原液では、マトリックスの影響を強く受けて検量線を描くことが困難であったが、5 倍以上希釈したものでは、いずれも PBS で希釈系列を調製した場合と同等な検量線が得られた。さらに、ELISA に供する試験溶液としたメタノール-PBS 混液中の、至適メタノールの濃度について検討した。0.5 %、1 %、10 %メタノールを調製して希釈系列を作製し、実験を行ったところ、いずれの濃度でも良好な検量線が得られた。

構築した ELISA の妥当性を検証するために、添加回収試験を行って、真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションを行った。その結果、検量線測定範囲の 5、10、50 および 100 ng/mL の 4 点について平均回収率から真度の差を検証したところ、ほぼ同等の値が得られ、この範囲での測定値に信頼性があることが確認された。

4 村山分担研究

マラカイトグリーンに亜硫酸を加えると、マ

ラカイトグリーンの青緑色が直ちに消えた。なお、液体クロマトグラフ質量分析計により測定したところ、マラカイトグリーンはほぼ消失していた。

5 鈴木分担研究

5.1 理化学検査のための適正試料の作製検討:

残留動物用医薬品検査における牛肉試料の均一性を確認したところ、ヒレ肉では全てのサルファ剤において均一性が認められた。得られたブランク試料のクロマトグラムにおいて、5 種類のサルファ剤(SDZ、SMR、SMMX、SCPD および SMX)の保持時間付近に基材由来の夾雑ピークが認められ、バックグラウンドとして試料のピークエリアから差し引いて計算した。また、添加量の 0.2 $\mu\text{g/g}$ に対する回収率は、70~80%とやや低かったが、70%を下回るサルファ剤はなかった。

カタ肉では、4 種類のサルファ剤(SDZ、SMR、SIX および SQ)において均一性が認められなかったが、他のサルファ剤(SDD、SMPD、SMMX および SCPD)においては均一性が認められた。また試料のバックグラウンドとして、ヒレ肉と同じ 5 種類のサルファ剤において、ブランク試料を差し引いて濃度の計算を行った。添加量に対する回収率は、SDZ が 57%と著しく低かったが、その他では、71~87%であった。

バラ肉では、10 種類中 6 種類のサルファ剤(SDZ、SDD、SMPD、SCPD、SIX および SQ)において均一性が認められなかったが、他のサルファ剤(SMR、SMMX、SMX および SDMX)においては均一性が認められた。クロマトグラムについては、ヒレ肉およ

びカタ肉とは異なるサルファ剤 (SMPD) の保持時間付近にバックグラウンドとなるピークが認められたが、その他の 4 種類のサルファ剤 (SDZ, SMR, SMMX および SCPD) はヒレ肉およびカタ肉と同様に夾雑ピークが認められ、ブランク試料のバックグラウンドのピークを差し引いて計算した。添加量に対する回収率は、SIX が 69%、SQ が 68%と 70%を下回った。その他のサルファ剤は、70～87%であった。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 (20.3%) >カタ肉 (11.0%) >ヒレ肉 (5.7%)となり、水分量については逆にヒレ肉 (69.6%) >カタ肉 (69.3%) >バラ肉 (55.1%)となった。牛肉試料の冷凍保存安定性試験は、作製後直ちに冷凍保存した試料について、均一性試験の約 60 日後に、均一性試験同様、10 容器を選択し、それぞれの容器につき $n=2$ で各サルファ剤濃度を測定した。得られた結果について、均一性試験時の各サルファ剤濃度に対する割合 (安定性 (%)) を算出した。3 種の基材について、冷凍約 60 日後の安定性を確認したところ、ヒレ肉における SIX (79.1%)、カタ肉における SDZ (135.7%) およびバラ肉における SDZ (105.4%) 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 85～99%の安定性が得られた。ブランク試料のクロマトグラムについては、3 部位によるいずれの基材においても、SDZ、SMMX および SCPD の 3 種類のサルファ剤でバックグラウンドの差し引き計算が必要であった。また得られた F 値は、カタ肉の SMR (5.93) および SDD (3.59) を除き、いずれのサルファ剤および基材でも、3.02 より小さかった。しかしながら、いずれのサルファ剤お

よび基材についても、均一性試験時と比較して、RSD (%) は大きくなる傾向であった。また F 値は、1 を下回るサルファ剤がカタ肉およびバラ肉にみられた。

着色料の定性検査では、複数色素を選択し、4 種の色調について、それぞれゼラチン濃度を変えて作製し、均一性を確認した ($n=5$)。その結果、いずれの試料からも、抽出、精製においてゼラチンの妨害を受けることなく、添加色素が正しく検出された。

保存料の調査試料作製として、市販の大根漬けを、ソルビン酸カリウム水溶液 (ソルビン酸濃度として 0.52 g/kg) に 1 週間浸漬して得られた試料の外皮、外皮を除く外表面および中心部の 3 部位について、試料作製 0 日および冷蔵保存 60 日後のソルビン酸濃度を測定した。その結果、作製 0 日後 (作製直後) において、大根漬けの 3 部位についてのソルビン酸濃度は、外皮で 0.525 ± 0.006 g/kg、外皮を除く外表面で 0.517 ± 0.005 g/kg および中心部で 0.517 ± 0.002 g/kg であり、浸漬液のソルビン酸濃度 0.52 g/kg (理論値) とほぼ同濃度であった。また、試料を取り出した後の浸漬液についてもソルビン酸濃度を測定したところ、 0.530 ± 0.004 g/kg であった。さらに、冷蔵保存 60 日後に、同様にソルビン酸濃度を測定して安定性を検討した結果、いずれの部位においても作製当日に対し 97～100%の安定性を示した。さらに、大根漬試料と同期間、同様に保存した浸漬液および保存中に大根漬試料から滲出した液 (以下、滲出液) についても、ソルビン酸濃度を測定した結果、両液とも約 0.52 g/kg であった。同様に、市販のシロップを基材とし、シロップ含有量を 50%とし、保存

料であるソルビン酸およびソルビン酸カリウムを添加して試料を作製し、安定性の検討を行った。その結果、作製後、冷蔵保存約 30 日後でソルビン酸添加試料の安定性は 90%、約 60 日後で 77%と低下する傾向があった。一方、ソルビン酸カリウム添加試料では、約 30 日後で 99%、約 60 日後で 98%と、良好な安定性を確保することができた。

残留農薬検査用調査試料では、マッシュポテトを基材として採用し検討した。なお、本基材は乾燥材料に水を添加して作製し冷凍するため、解凍時に離水する現象があり、均質な試料が得られなかったことから、離水防止の目的で、試料の安定剤となる添加物の検討を行った。安定剤には、ペクチン及びパールアガーを用いた。それぞれの添加剤につき、2 濃度の添加量で試料作製をしたところ、解凍後の状態は、いずれの添加剤および濃度でも、水分と基材が分離することなく、目視では、ほぼ均質な解凍試料が得られた。そこで、それぞれの添加剤につき、添加剤濃度の高い試料について、添加農薬の回収率および均一性(n=5)を検討した。その結果、クロルピリホス、フェントロチオン、マラチオン、ダイアジノンおよびエトプロホスの 0.1 µg/g、ならびにブタミホス、ジメトエートおよびフェンスルホチオン 0.2 µg/g の添加濃度に対しペクチンおよびパールアガーのいずれでも、フェンスルホチオンの 140%を超える回収率を除いては、83~105%の良好な結果であった。しかしながら、RSD(%)は、4~12%と、農薬により差がみられ、添加した安定剤の違いは、ほとんどみられなかった。クロマトグラムについては、ブランク試料に、添加農薬の測定を妨害するピーク

は認められなかった。

5.2 微生物学検査のための適性試料の作製検討:

セレウス菌検査用調査試料の作製では、定量検査を踏まえた輸送時の温度変化の影響を考慮し、冷蔵保存後に各種温度で継続的に保存した際の米飯基材中の試験菌数変動を観察することとした。すなわち、セレウス菌検査に使用することを前提とした陽性対照菌または陰性対照菌を米飯基材に添加した後、冷蔵保存にて 7 日間、その後冷蔵、22.5°C または 32.5°C で 35 日間保存した際の菌数変動を確認した。その結果、陽性対照菌では *B. cereus* HIC 080115 および HIC 100172 ではいずれの保存条件下においても 35 日目まで安定した菌数が得られた。これに対して、*B. cereus* HIC 080117 ではわずかに減少傾向が認められたが、いずれの保存温度においても大きな差異は認められなかった。一方、陰性対照菌では使用した *B. subtilis* HIC 100165、枯草菌 6633 (E-MN11)、*B. megaterium* HIC 080136 のいずれにおいても 32.5°C 保存で著しい菌数の増加が認められた。さらに *B. subtilis* HIC 100165 では 22.5°C での保存においても著しい菌数の増加が認められた。

ビブリオ属菌検査用調査試料の作製では、凍結保存時の菌数変動について観察した。その結果、凍結後 14 日目では接種菌数とほぼ同等の菌数が残存していたが、さらに保存期間を延長することにより、36 日目では 1~2 オーダーの減少が認められ、保存 71 日目にはほとんど検出されなかった。また、凍結後の基材について、解凍せずに液体培地中に添加した場合と、1 時間の室温放置により解凍した場合との生残菌数の差異について観察したが、大きな差異は認められなかった。さらに、グラ

ム陽性菌に対して抗菌効果を示すナイシンの影響について確認した。すなわち、*S. aureus*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa*、*E. coli*の合計4菌種を用いて、日本薬局方に記載されている力価試験、円筒平板法と同様の手法で Marine broth に懸濁したナイシンの効果を確認した。その結果、400 ppm のナイシンが *S. aureus* および *B. subtilis* に対して抗菌効果を示したが、*P. aeruginosa* および *E. coli* では阻止円の形成が認められなかった。また、ナイシンのろ過滅菌または高圧蒸気滅菌処理後に基材中において同様の抗菌効果を示すかについて検討した。すなわち、Marine broth 中で最終濃度が 400 ppm となるように調製したナイシンをろ過滅菌または高圧蒸気滅菌した後に、*S. aureus*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa*、*E. coli*、*V. parahaemolyticus* および *V. fluvialis* に対する影響を観察したところ、いずれの菌種に対しても抗菌効果を示さなかった。

5.3 アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製検討:

甲殻類タンパク質を測定対象とした共同試験試料について、配付前に添加量の回収率の確認を兼ねて均一性試験を実施した。その結果、添加試料(試料1、試料2、試料5、試料6、試料8)についてはいずれも一元配置の分散分析で均一と判定された。回収率はカニ添加液を加えた試料1と試料5の甲殻類キット「マルハ」による測定で50%を下回ったが、このほかの測定では通知(消食表第286号)の定量検査法の評価基準に示された回収率50%~150%の範囲内であった。一方、共同試験の実施期間終了後に行った安定性試験の測定値はカニ添加液を加えた試料の甲殻類キット「マルハ」による測定値も含め、均一性試験の88.0~112.5%の範囲と良好であった。

共同試験結果の統計解析に先立って参加機関が使用した ELISA 計算ソフトウェアを確認した。その結果、平成 21 年度に問題を指摘したソフトウェア(マイクロプレートマネージャー Ver.5)を使用している機関が 3 機関あることが判明した。これら 3 機関の ELISA の吸光度についてマイクロプレートマネージャー Ver.5 の Logistic 4PL 解析と Logistic 5PL 解析 (Rodbard) を実施し、解析結果を比較した。その結果、甲殻類の測定においても卵、乳と同様、Logistic 4PL 解析では回帰曲線が吸光度のプロットからはずれていたほか、計算結果も最大 10% 程度差があることが明らかになった。このためこれら 3 機関については Logistic 5PL による解析の結果を以下の解析に使用することとした。

添加試料の FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」による測定では試料 8 を除き Xbar 管理図において Xbar が管理限界線(UCL または 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。なお Xbar が管理限界線の範囲外となった機関番号 1 について報告書を確認したが問題となる点は見つからなかった。これに対して R 管理図では、上部管理限界線(UCL)を超えた機関が試料 1、試料 2、試料 5、試料 8 でそれぞれ 1 機関ずつ認められた。

試料 1~8 の共同試験試料のそれぞれから、通知に記載の抽出法のうちイオン交換樹脂タイプのキット(Genomic-Tip 20/G)を使用してそれぞれ 3 並行で DNA を抽出した。DNA 収量は用いた基材によって大きく異なり、ハンペン基材はホワイトソース基材に比べて約 8 倍、ブロッコリー基材はホワイトソース基材に比べて約 30 倍多かったが、260 nm/280nm の吸光度比は 1.61~1.95 で、いずれの DNA 原料液

も通知の基準(1.2~2.5)を満たしていた。基材により DNA 収量の差が大きかったため、以前 PCR による確認試験を実施した平成 20 年度と DNA 収量を比較した。平成 20 年度に使用した基材ではハンバーグの DNA 収量が約 100 µg とブロッコリーと同程度であったほか、あずきあんの DNA 収量はホワイトソースと同程度に少なく、今回認められた DNA 収量の差は特別ではないことが明らかになった。

ホワイトソース基材における DNA 抽出確認用の植物検出用試験では全 DNA 試料で予定長の増幅物が確認された。エビ検出用試験ではエビ添加液を加えた試料 2 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認されたが、これ以外では予定長の増幅物は認められなかった。カニ検出用試験ではカニ添加液を加えた試料 1 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認されたが、これ以外では予定長の増幅物は認められなかった。ハンペン基材では、DNA 抽出確認用の植物検出用試験および動物検出用試験は共に全 DNA 試料で予定長の増幅物が確認された。カニ検出用試験ではカニ添加液を加えた試料 4 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認された一方、試料 5 では予定長の増幅物は認められずカニについては想定通りの結果であった。しかし、エビ検出用試験では試料 4、試料 5 共にエビ添加液を加えていないにもかかわらず、試料 4 の抽出 2 を除く全抽出でエビ DNA の増幅物が確認された。ブロッコリー基材では、DNA 抽出確認用の植物検出用試験では全試料の全抽出で予定長の増幅物が確認され、カニ検出用試験では増幅物が認められず想定通りの結果だった。しかし、エビ検出用試験では、ブランク試料の試料 7 も含め非特異的増幅が認められた一方、エビ添加液を加えた試料 6、試料 8 で予定長の増幅物は検出できな

かった。また、動物検出用試験でも予定長の増幅物の有無は明確ではなかった。エビタンパク質を表示義務の下限である約 10 µg/g 加えて調製した試料 2 と試料 6 のうちホワイトソースを基材とした試料 2 ではエビ DNA が検出されたが、ブロッコリーを基材とした試料 6 では検出できなかった。

5.4 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:

外部精度管理調査試料の調製に先立ち、63Bt コメ DNA 溶液を nonGM コメ DNA 溶液で段階希釈して 63Bt コメ検出用試験を行い、増幅の有無を検討した。その結果 1600 倍希釈まで全ての反応で増幅が確認されたが Ct 値および増幅曲線についても検討を加えた結果、希釈率が 100 倍以上では Ct 値のバラツキが大きいことおよび増幅曲線の安定性も良くないことがわかった。一方、供与された 63Bt コメ DNA 溶液の量には限りがあるため、増幅曲線が安定し Ct 値の再現性が期待できる 10 倍希釈液および増幅曲線の安定性、Ct 値の再現性は期待できないが、陽性の判定は十分期待できる 100 倍希釈液を調製することとし、10 倍希釈液を試料 B (63Bt 高濃度)、100 倍希釈を試料 A (63Bt 低濃度)とした。次に CpTI プラスミド溶液を Ct 値が試料 A と同程度となるよう nonGM コメ DNA 溶液により希釈し、試料 D とした。さらに、nonGM コメ DNA 溶液を試料 C とした。調製した各試料について均一性試験を実施した。その結果、コメ陽性対照用試験では全試料の全測定で陽性となったほか、試料 A の 63Bt コメ検出用試験、試料 B の 63Bt コメ検出用試験、試料 D の CpTI コメ検出用試験の全測定で陽性の結果が得られた。また、これ以外に陽性となった測定はなかった。

陽性対照プラスミドと試料の Ct 値から、各精