

度管理試料の PCR 1 反応液あたり(50 ng DNA)の害虫抵抗性遺伝子のコピー数を推定した。試料 A、試料 B、陽性対照プラスミドの 63Bt コメ検出用試験の測定において、Th.line を指数増幅部に設定してそれぞれ Ct 値を求め、試料と陽性対照プラスミドの差を n とした。次にリアルタイム PCR の増幅率を 2 と仮定して、 2^n を陽性対照プラスミドと試料のコピー数の相対値とし、相対値に陽性対照プラスミドのコピー数 500 を乗じ、試料のコピー数とした。その結果、試料 A は 7.6 コピー、試料 B は 84.2 コピーの組換え遺伝子を含むと算出された。また、試料 D についても CpTI コメ検出用試験の結果から同様にしてコピー数を推定したところ、49.4 コピーとなった。250K の陽性対照プラスミド(非売品)を段階希釈して測定し、63Bt コメ検出用試験、CpTI コメ検出用試験、コメ陽性対照用試験のそれぞれについて検量線を作成した。これに別プレートによる測定で得られた Ct 値を代入し、試料 A、試料 B、63Bt コメ DNA 溶液の 63Bt 遺伝子のコピー数、試料 D の CpTI 遺伝子のコピー数、および 63Bt コメ DNA 溶液のコメ陽性対照用遺伝子(PLD)のコピー数を求めた。その結果、63Bt 遺伝子のコピー数は試料 A では 11.6 コピー、試料 B は 103 コピー、試料 D の CpTI 遺伝子では 45.5 コピーと算出された。これらの値は陽性対照プラスミドとの Ct 値の差から計算したコピーと近似していた。また、63Bt コメ DNA 溶液の 63Bt コメ遺伝子のコピー数は 1093 コピー、コメ陽性対照用遺伝子のコピー数は 69110 コピーと計算された。さらに 63Bt コメにおける組換え DNA 配列と内在性遺伝子の存在比を 1:1 と仮定し、抽出原料の組換え米混入率を計算した結果、1.58%となった。

改正通知法における害虫抵抗性遺伝子組

換えコメ検出用の各検出系の検出下限(コピー数)を陽性対照プラスミドを用いて検討した。陽性対照プラスミドを nonGM コメ DNA 溶液で段階希釈し、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3 試験をそれぞれ 8 並行で測定し、実施した全ての反応で陽性と判定された最低濃度を検出下限とした。その結果、検出下限は 63Bt コメ検出用試験が 6.25 コピー、NNBt コメ検出用試験および CpTI コメ検出用試験が 12.5 コピーとなり、検出系による差はほとんどなかった。この結果は平成 20 年度に報告したリアルタイム PCR によるコメ最終確認試験の検出下限の 63Bt コメ検出用試験 750 コピー、NNBt コメ検出用試験 80 コピーに比べいずれも検出感度が上昇し、特に 63Bt コメ検出用試験で顕著だった。

外部精度管理調査結果を解析するため、Ct 値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、グラフの形状を検討した。試料 A および試料 B の 63Bt コメ検出用試験の Ct 値の正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示していた。試料 A で z-スコアが 2 を超えた機関番号 6 はリアルタイム PCR 装置に ABI7700 を使用しており、増幅曲線を確認したところベースラインの継続的増加が認められた。試料 D の CpTI コメ検出用試験では正規確率プロットを作成した結果、正規分布から大きくはずれた値が認められた。このため、2 シグマ処理(z-スコアの絶対値が 2 以上のデータを除く操作)を 2 回実施した。この結果、試料 D の正規確率プロットはひずみ、とがりが小さくなり、正規分布に近い形状となった。陽性対照プラスミドと試料の Ct 値の差を算出し、こ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て解析した。その結果、試料 A および試料 B の 63Bt コメ検出用試

験では正規確率プロットの形状はほとんど変化がなく、陽性対照プラスミドによる補正の効果は認められなかった。また、CpTI コメ検出用試験でも正規確率プロットの形状は若干の改善に留まり、補正の効果は明確ではなかった。

D. 考察

1 尾花分担研究

1.1 外部精度管理試料の作製

本年度は、加工食品を細切均一化したものに加えて、個々の原材料に遡って行う農薬分析の精度を検証した。また、測定値から食品規格への適否の判定を行った。複数の食材が混在する加工食品から、個別の原材料を対象とした精度管理試験はこれまでに例がない。そのため、精度管理試料として原材料に分別可能なもの確立が求められた。同時に、食品規格への適否の判定では、一定の難度を確保できるように、試料を考慮した。

上記の試験の趣旨に適う試料は、条件として①容易に分別可能、②原材料の全部または一部に農薬が添加され、かつ③添加農薬の均一性および安定性が保証されることが求められた。①を満たす条件としては、試料中で原材料の全部または一部が、その形状を保ち識別できる状態である。ポークビーンズは、大豆やハム等が液状のトマトの中で形状を保ち、過度に食材数が多くなく、試料として相応しい。そこで、ポークビーンズを模した食品を発案した。完全に試料が原材料に分別できることは、分析者が精度よく分析するには欠かせない。ポークビーンズは、水を加えればトマトから大豆及びハムを取り出し易いため、水で洗いながらネットで濾し採る方法を考案した。②は農薬ごとに添加する原材料や、その濃度を変えることを意味する。

原材料の一部に農薬を添加しても、他の原材料と混合すれば、移行することが想定された。これは、③の条件を満たせない要因になる。③の条件のうち均一性を満たすには、一部の原材料に添加した農薬が、原材料中で保持されなければならない。大豆は脂質に富むため、農薬を保持しやすく、脂質の乏しいトマトには移行しにくいと推定した。そこで、大豆に農薬を添加すべく含浸させることを発案し、トマトピューレおよびハムと混合して、ポークビーンズを試料として調製できるか検討した。均一性は、原材料ごとに分析するため、ポークビーンズ全体に加えて、大豆についても実施する必要がある。また、安定性は大豆からの農薬の滲出を抑制しなければならない。安定性は、大豆に含浸した農薬がトマトに移行することを考慮し、大豆およびトマトで評価した。③の均一性及び安定性は、②の農薬の添加条件と併せて検討を進めた。

農薬は水に溶解して、大豆浸漬することにより、効率的に含浸された。ポークビーンズを多数調製するため、浸漬した大豆から、一容器に120 gずつ抜き取っても、容器間で濃度は均一であった。添加農薬の均一性および安定性は、ポークビーンズおよび分別した大豆で評価したが、均一性はいずれも保証できた。安定性については、大豆から農薬がトマトピューレに滲出したものの、トマトにおいて調製直後に定量下限未満であった7農薬は、2か月後も定量下限未満であった。このことから、滲出に伴う付与値の変動は微小であり、安定性を保証できた。したがって、当該ポークビーンズは、精度管理試料として開発できた。原材料に分別可能な加工食品は、原材料ごとに分別する手法も取り入れた

農薬分析の精度管理試験が可能であることが実証された。

1.2 分析機器の再現性試験

標準溶液の連続測定では、試験対象農薬ごとに機関内でみたピーク面積比の変動係数は、10%を超える機関はなかった。標準溶液について、全機関の測定機器で良好な再現性が得られた。マトリックス標準溶液の連続測定では、試験対象農薬ごとに機関内でみたピーク面積比の変動係数は、G 機関の 3 農薬を除いて 10%以内であった。マトリックス標準溶液についても、概ね良好な再現性で測定できた。真度に対するマトリックスの影響を評価したところ、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、D 機関の 7 農薬が 120%を超え、1 農薬が 70%を下回った。D 機関では、試料由来のマトリックスが、分析の真度に影響した可能性が考えられた。原因として、マトリックスを調製するための脱脂及び精製が GCB/NH₂ のみであったことと、試験溶液の濃度 (1 g/mL) が、他機関に比べて高かったことが推測された。

1.3 外部精度管理試験

外部精度管理試験では、均一化法において D 機関のピリミカールおよびチオベンカルブ、E 機関のカルバリルが、R 管理図で適正域を外れ、精度が不良であったが、マトリックス標準溶液の連続測定では、いずれも変動係数は良好であった。E 機関のフェノブカルブ及び G 機関のカルバリルが、z-スコアで $|Z| < 2$ を超え、真度が不良であったが、いずれも変動係数は 4%未満で、精度は良好であった。これに対して、分別法では D 機関のチオベンカルブ、G 機関のカルバリルが、Xbar 管理図で適正域を外れた。これらは、マトリックス標準溶液の連続測定で、いずれも標準溶液に比べ、ピーク面積値

が相対的に低かった。そのため、大豆由来のマトリックスが真度に影響した可能性が考えられた。I 機関のフェノブカルブ及びジエトフェンカルブが、z-スコアで $|Z| < 2$ を超え、真度が不良であったが、いずれも変動係数は 2%未満で、精度は良好であった。ジエトフェンカルブは、マトリックス標準溶液の連続測定で、標準溶液に比べ、ピーク面積値が相対的に高かった。そのため、大豆由来のマトリックスが真度に影響した可能性が考えられた。均一化法の成績と比較すると、D および I 機関で、試料を分別して行った分析が、一部の添加農薬の真度に影響した可能性が推測された。なお試料を採取するため、既定量の水を用いた機関は、測定値を希釈率で適正に補正していた。

1.4 基準適合性の判定

加工食品の適合性では、各添加農薬の付与値に基づく分析値は、一律基準値 (0.01 ppm) よりも 0.03~0.08 ppm 高かった。また、各機関が算出した分析値と、付与値に基づく分析値の差は全ての農薬で 0.02 ppm 以内であった。そのため、ポークビーンズとしての判定は、分析精度の良否に影響されにくいと推察された。一方、大豆のカルバリルについて、付与値に基づく分析値は、基準値 (0.2 ppm) と一致した。E 機関を除く各機関の分析値は、基準値と一致した。E 機関の分析値は、端数処理により 0.3 ppm となり、基準値を超過したため、判定を不適合とした。そのため、E 機関は誤判定となった。カルバリルの添加濃度は、意図的なものではなかった。しかし、分析法の精度の僅かな差異で、判定が左右される条件設定は適切ではなかった。E 機関については、均一化法及び分別法で変動係数が 15%を超えた。測定値の変動が大きかったことが要因とみられた。なお、大豆のカルバリルについて、付与

値の信頼区間の上限値に基づく分析値でも、判定は適合となる。トマトは、全機関で全農薬の分析値が、基準値を大きく下回った。そのため、トマトの判定は分析精度の良否に影響されにくいと推測された。以上のことから、ポークビーンズは、加工食品としては全農薬で不適合であった。しかし、原材料としては、カルバリル及びピリミカーブが、大豆及びトマトの両方で適合であるため、加工食品の判定によらず、最終的には適合であった。大豆およびトマトのいずれかが、不適合であれば、最終判定は不適合となる。原材料の判定結果が、分析精度に左右されれば、最終判定も影響されることとなった。最終判定でも、E 機関のカルバリルは、分析精度が影響した。

2 中澤分担研究

「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 DON に関する調査結果を抜粋・統合して一覧表を作成したが、「定量限界以上の点数/調査点数」は、本研究で改めてデータを作成して考察を行った。原本では「定量限界未満の点数/調査点数」が示されていたが、調査点数に対する“汚染の割合”を知ることの方が、汚染実態調査の理にかなっていると考えたためである。その結果、小麦での汚染率は 36~84%、大麦では 37~100%となり、小麦よりも大麦での汚染率が高く、また経年変化を見ると減少よりむしろ増加傾向にあることが伺われた。もちろん、近年の分析法の進歩に伴って若干定量限界が下がったことも関係していると思われる。従来、DON による穀物汚染は主に小麦に対して向けられてきたが、国産麦類の DON 汚染に関して言えば、大麦にも大いに

注目する必要があると示唆された。次に、飼料原料(麦類)中の DON 濃度実態調査結果(平成 15~18 年度の統合)についても同様にデータの再考察を行った。この原料は概ね輸入したものとされているが、“食品”としての国産小麦・大麦の結果と同様に、平均値では基準値を下回っていたが、最高値はどちらも基準値を超えていた。また定量限界以上の点数割合は、いずれもほぼ 3 割であった。このような飼料用の麦類などは、本来ヒトの食用には使われないはずのものであるが、アフラトキシンで汚染されたいわゆる事故米穀が食用に転売されていたことなどもあり、工業用や飼料用としていた麦類が食用に転売される恐れが全く無いとは言い切れないことから、国産、輸入品を問わず、DON 汚染穀類を監視していく必要があると思われる。

市販 ELISA キットについて基本性能を確認したところ、50%阻害濃度(IC₅₀)値については 1日 2 回、5 日間繰り返し実験を行い、一元配置の分散分析により IC₅₀ 値の精度評価を行った。その結果、平均で 46.3 ng/mL、併行精度は 10.1%、室内再現精度は 14.3%であり、IC₅₀ 値付近の測定値は安定していることが示唆された。同様にマトリックス効果について確認したところ、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。このことから、ビールを試料とした ELISA では、煩雑な抽出・クリーンアップを行わずに PBS による希釈という簡便な前処理法が採用できると考えられた。

3 斉藤分担研究

今回確立した ELISA 法において、めんつ

ゆを用いたマトリックス効果について検討したところ、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。このことから、ELISAにおける、マトリックスの影響を除外するためのめんつゆの簡便な前処理法として、原液の希釈法が採用できると考えられた。次に、めんつゆの希釈倍率についての至適値を検討したところ、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。なお、実際の測定には製品の種類やロットの差による影響を考慮して、PBS希釈倍率は10倍希釈を採用した。

さらに分析のバリデーションにおいて一元配置法により、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、いずれも相対標準偏差の数値としては若干高めであったが、併行精度と室内再現精度の数値がほぼ同レベルであったこと、並びに本実験がプレート作製から行うELISAであることを考慮すると、スクリーニング法としてほぼ満足できる値であると思われた。

4 村山分担研究

添加物等の人為的化合物が検査に及ぼす影響を検討するため、動物用医薬品であるマラカイトグリーンに食品添加物である亜硝酸を添加したところ、マラカイトグリーンの青緑色は消失し、これは液体クロマトグラフ質量分析計で測定してもほぼ消失した。しかしながら、マラ

カイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンと亜硫酸との反応は安定しておらず、生成物の解析はできなかったことから、別要因でのもと考えられた。

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関する調査試料の作製では牛肉を基材として採用し、これにサルファ剤を添加することにより、回収率について検討したところ、使用する部位により回収率は異なり、また均一性についても同様の結果であった。これらの原因が基材中に含まれる脂質量や水分含量に基づく可能性が考えられたが、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。このことから、バラ肉は脂肪分が多く、ヒレ肉などと比較して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が困難であることが示唆された。これまで検討を行ってきた鶏肉および豚肉のサルファ剤の回収率が、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80~95%であったのに対し、牛肉を基材とした場合は、いずれの部位でも、10%程度低い傾向があった。

着色料に関する調査試料の作製では、ゼリー菓子を基材として採用したが、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ことから、作製工程がやや煩雑であるものの、固体試料の1つとして、ゼリー菓子が適用できると考えられた。一方、保存料の定

量検査に関する調査試料の作製では、大根漬けの3部位(外皮、外皮を除く外表面、中心部)および浸漬液でソルビン酸濃度はほぼ同等であったことから、いずれの部位にも均等にソルビン酸溶液が浸透したと考えられた。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。浸漬液中ソルビン酸濃度を他試料と比較すると、やや高い値を示したが、これは、浸漬液のみ水蒸気蒸留による抽出は行わず、水で希釈後測定したことによると考えられる。本基材について冷蔵保存を行ったところ、作製60日後においても、試料基材中のソルビン酸濃度は、いずれの部位においても安定しており、また、滲出液ともほとんど差が認められないことから、実際の試験検査時には、全部位を細切・均質化して用いるため、滲出液があった場合でも、濃度が変わることなく十分に定量試験として適用できることが示唆された。一方、シロップを基材とした場合には、ソルビン酸を添加した試料の安定性が、ソルビン酸カリウムを添加した試料と比較して著しく低下したことから、水溶液試料の場合、ソルビン酸よりソルビン酸カリウムを用いる方が、より安定した試料が作製できることが示唆された。

残留農薬検査用調査試料として採用したマッシュポテトは、安定剤として添加したペクチンおよびパールアガールのいずれでも、フェンスルホチオンの140%を超える回収率を除いては、いずれの農薬も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。今後は実作製の方法を確立し、引き続いて、複数回の凍結融解の安定性、冷蔵保存での安定性を確認する必要があると考える。

5.2 微生物学検査のための適正試料の作製:

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性を検討するための基礎的検討を行った。これまでの検討から確立したセレウス菌検査用米飯基材が長期間に亘って安定的に添加菌を回収することができることが明らかとなった。さらに、本基材を用いることにより各種選択性培地において陽性対照菌が典型集落を形成することを明らかとした。これらの事実は、外部精度管理調査試料として定性検査のみならず定量検査を含めて採用することが可能であることを示唆するものである。そこで、本研究では対照菌を接種した基材に温度負荷をかけることによっても安定的な菌数が得られるかについて確認することとした。その結果、少なくとも陽性対照菌では冷蔵から32.5℃までの広い温度範囲においても保存35日目まで安定的に菌数が回収できることが明らかとなった。外部精度管理調査試料では指定された輸送環境の維持や正しい温度での保存が求められるが、微生物検査を行う場合、特にこれらの点が厳密に管理される必要がある。しかし、配送業者においても配送時の温度管理を行っているとのことであるが、実際には冷蔵で送付したにも関わらず到着時の温度が10℃を超えていた等の報告もある。このことを踏まえると、輸送や保存条件の逸脱にも耐えうるような基材を開発することが望まれる。今回のように32.5℃にお

いても長期間に亘って安定した菌数が確保できたことは定量検査における菌数測定結果のばらつきを小さくするうえでも有効であると考えられる。これに対して陰性対照菌では 32.5°C では添加菌数の増加が認められた。セレウス菌では陽性菌の菌数測定を行うことから、定性検査において陰性と判定される場合には菌数測定が実施されることはない。そのため、菌数の増加が認められたとしても検査結果に対して影響を及ぼすことはないものと考えられるが、場合によっては偽陽性を疑うこともありうることから、なるべく陽性対照菌と同等の菌数確保が望ましい。少なくとも今回の検討では長期間に亘って温度負荷をかけた場合の菌数変動を観察したが、短時間であれば今回観察されたほどの菌数の増加は認められないと考えられることから、外部精度管理調査試料としては採用することは可能であると思われる。

一方、ビブリオ属菌検査では、これまでの検討から Marine broth に懸濁した陽性対照菌が室温において長期間に亘り安定的に回収できること、ならびにこうや豆腐を基材として採用したところ、菌液のみと同様に長期間の安定性が担保できることが明らかとなったが、冷蔵保存により著しい菌数減少が認められた。検査機関における検体の保存は一般的に冷蔵保存あるいは冷凍保存であることを考慮すると、この結果は調査試料を受領した検査機関において SOP には通常掲載されていない方法で保存する必要性を示唆している。外部精度管理調査は通常検査機関で実施している検体の保存方法に従って処理されることが望ましいことから、今回は冷凍保存における安定性について確認した。その結果、冷凍後 14 日目までは接種菌数と同等の菌数が得られたが、保存期間の延長に伴い菌数の減少が認められ

た。少なくとも今回の検討では凍結後 36 日目には 1~2 オーダー程度の菌数減少が認められたことから、本基材を定性検査として使用する場合には、実施が可能であるものと考えられた。しかしながら、送付前の調査試料作製期間を考慮すると、さらに長い時間の安定性が担保されることが望ましいことから、さらなる検討が必要であるものと考えられた。また、これまでの検討から室温では非常に安定であったが、この情報を調査試料の保存条件として記載することも可能ではあるが、誤って到着後に冷蔵あるいは冷凍保存される可能性も否定できないことから、これらの温度域での安定性が必要であると考えられる。

また、基材として採用候補として挙げているこうや豆腐は乾物であることから *Bacillus* 属といったグラム陽性菌が存在することが考えられる。そのため、検査対照菌以外の菌種について除去することを目的として、ナイシンのグラム陽性菌に対する効果を確認した。その結果、*S. aureus*、*B. subtilis* に対して抗菌効果を示したことから、ナイシンをこうや豆腐基材に添加することによりグラム陽性菌の発育を阻害できる可能性が示唆された。しかしながら、ナイシンをろ過滅菌あるいは高圧蒸気滅菌することによりナイシン無添加群と差異のない結果が得られたことから、高圧蒸気滅菌に伴う失活やメンブランフィルターへの吸着の可能性が考えられた。そのため、ナイシンの調製方法について今後検討する必要があるものと考えられた。

5.3 アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製:

ブランク試料における甲殻類タンパク質の含量について確認したところ、試料 3(ホワイトソース)、試料 7(ブロッコリー)の測定値は、いずれもキットの検出下限(0.31 µg/g)以下であ

ったが、試料 4(ハンペン)の測定値はいずれの測定においても 0.31 $\mu\text{g/g}$ 前後で、使用したハンペンは甲殻類タンパク質をわずかに含むことが示された。

共同試験において、試料 1 で R 管理図の UCL を超えた機関番号 2 は同じ抽出液を用いたと思われる甲殻類キット「マルハ」による測定では再現性に問題がないため、抽出液の希釈に問題があったと考えられた。試料 2 と試料 8 で R 管理図の UCL を超えた機関番号 4 は試料 8 では並行測定 of 3 ウェル間の再現性不良が原因と考えられたが、試料 2 では同一抽出の 3 ウェル間の再現性に問題はなく、原因は不明であった。また、試料 5 で R 管理図の UCL を超えた機関番号 10 も並行測定 of 3 ウェル間の再現性不良が原因と考えられた。

共同試験参加機関のそれぞれの試料測定における平均値の室間相対標準偏差は FA テスト EIA-甲殻類「ニスイ」で 8.10~16.47%、甲殻類キット「マルハ」では 6.88~15.65%と平成 22 年度とほぼ同等であった。しかし、両キットとも検量線用標準液の測定において並行測定 of 3 ウェルの吸光度の相対標準偏差が著しく大きい結果がいくつかの機関から報告された。これらの機関はいずれも特定原材料検査の経験が長く、また検量線用標準液の測定には抽出操作は関係しないこと、共同試験試料の測定ウェルでの吸光度の相対標準偏差は良好であったことから、測定操作ではなく測定キットのウェルに差を生ずる原因があった可能性も考えられた。

試料 1~3 は、添加液の種類に応じて予定通りエビ、カニ DNA を区別して検出できたことから、確認試験にも使用できる試料であることが示された。なお、動物検出用試験は基材のみの試料 3 では予定長の増幅物の有無は明

確ではなかった。一方、添加液を加えた試料 1 と試料 2 ではいずれも予定長の増幅物が確認でき、動物 DNA は添加液に由来したものと考えられた。

ハンペン基材のブランク試料である試料 4 の ELISA キットによる測定値はいずれも 0.31 $\mu\text{g/g}$ 前後であったことから、甲殻類タンパク質を含むことが示唆されており、検出されたエビ DNA は基材に由来するものと考えられた。以上の結果から、ハンペン基材は PCR での検知に十分なエビ DNA をあらかじめ含んでいるため、確認試験試料としては使用できないことが示された。

ブロッコリー基材では、エビ添加液を加えた試料 6、試料 8 において想定とは異なりエビ DNA が検出できなかったことから、これらの試料は確認試験試料としては使用できないことが明らかになった。

ブロッコリー基材はホワイトソース基材に比べて DNA 含量が約 30 倍多いため、PCR 反応液に加える DNA のうち添加液に由来する DNA が相対的に少なくなるのが、エビ DNA 不検出の一因であると考えられた。しかし、先に述べた通りブロッコリー基材の DNA 含量は特別ではないため、確認試験試料はブロッコリーのように DNA 含量が高い基材においてもエビタンパク質が 10 $\mu\text{g/g}$ を超える場合はエビ DNA を検出できることが求められる。また今回の不検出には基材以外に使用したエビ添加液の DNA 含量および質も関係していると考えられるため、共同試験試料とは別の原料から新たにエビ添加液を作製し、試料 6 と同じ濃度のエビタンパク質をブロッコリーに加えた試料を作製してエビ検出用試験の感度を検討することとした。当該試料では予定長の増幅物が検出でき、新たに調製したエビ抽出液は共同

試験試料調製に使用したエビ添加液に比べエビ DNA を多く含んでいることが分かった。従って、共同試験試料調製に使用したエビ添加液は DNA 含量が少ないかまたは変性しているものと考えられ、確認試験試料の作製には適当ではないことが明らかになった。以上の結果、エビ添加液の調製法を改めて検討する必要が生じた。

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:

改正通知法における害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用の各検出系の検出下限(コピー数)を陽性対照プラスミドを用いて検討した。陽性対照プラスミドを nonGM コメ DNA 溶液で段階希釈し、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3 試験をそれぞれ 8 並行で測定し、実施した全ての反応で陽性と判定された最低濃度を検出下限とした。その結果、検出下限は 63Bt コメ検出用試験が 6.25 コピー、NNBt コメ検出用試験および CpTI コメ検出用試験が 12.5 コピーとなり、検出系による差はほとんどなかった。過去に報告したリアルタイム PCR によるコメ最終確認試験の検出下限の 63Bt コメ検出用試験 750 コピー、NNBt コメ検出用試験 80 コピーに比べいずれも検出感度が上昇し、特に 63Bt コメ検出用試験で顕著だった。この原因としては、旧検知法では 63Bt コメ検出用試験と NNBt コメ検出用試験はプライマーを共用した Duplex PCR であったのに対し、改正通知法は 63Bt コメ検出用試験と NNBt コメ検出用試験をそれぞれ別の反応液で実施するようになったこと、NNBt コメ検出用試験に用いるプローブの蛍光色素が VIC (HEX) から FAM に変更されたこと、使用した陽性対照プラスミドが前回とは違うものであること、陽性判定の基準が変更になったことなどが影響していると

考えられた。

害虫抵抗性遺伝子組換えコメの検出に関して外部精度管理を行ったところ、試料 A で z-スコアが 2 を超えた機関番号 6 はリアルタイム PCR 装置に ABI7700 を使用しており、増幅曲線を確認したところベースラインの継続的増加が認められた。ベースラインの増加分は増幅による蛍光増加分から差し引かれるため、蛍光の増加が緩やかになり、Ct 値が大きくなったと考えられた。また、試料 B で z-スコアが 2 を超えた機関番号 17 は 63Bt 検出用試験の増幅曲線が波打って安定しないため、Ct 値の再現性が悪いこともあり、Ct 値が大きくなったものと考えられ、リアルタイム PCR 測定装置の点検および整備が必要と考えられた。一方同じく z-スコアが 2 を超えた機関番号 15 では特に問題は認められなかった。機関番号 31 は試料 A および試料 B で z-スコアが -2 以下となった。リアルタイム PCR による定性試験では Ct 値が小さい程検出感度が良いことを示すので、組換え遺伝子の検出に関しては問題がないと考えられるが、同じ 63Bt コメ検出用試験で 2 試料とも他の機関と比べて Ct 値が小さいため、測定の際に何らかの誤りがあった可能性も考えられた。

Ct 値をそのまま統計解析した場合、Ct 値は測定機器の特性や整備状況に依存した誤差を含むものと考えられた。この誤差を補正することを目的として陽性対照プラスミドと試料の Ct 値の差を算出し、こ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て解析した。その結果、試料 A および試料 B の 63Bt コメ検出用試験では正規確率プロットの形状はほとんど変化がなく、陽性対照プラスミドによる補正の効果は認められなかった。また、CpTI コメ検出用試験でも正規確率プロットの形状は

若干の改善に留まり、補正の効果は明確ではなかった。以上の結果から、定性試験の測定法がリアルタイム PCR 法の場合、あらかじめ Th.line を指数増幅領域に指定し、収集した Ct 値を解析することにより、外部精度管理参加機関における測定精度をより詳しく推定できると考えられた。また、DNA 抽出も含めたリアルタイム PCR 法による定性試験の Ct 値を解析する場合は、PCR 反応液に含まれる鋳型の量が機関によってばらつくことが予想されるため、組換え遺伝子の測定における Ct 値と陽性対照用遺伝子の測定における Ct 値の差をとるなどの補正が必要となる可能性も考えられた。

E. 結論

1 尾花分担研究

添加試料の原材料である大豆には、水溶液に溶解した農薬を均一かつ安定的に含浸させることができた。検討段階では、農薬の水-オクタノール分配係数と、大豆に含浸された濃度には相関関係がみられた。添加農薬のうち、相対的に脂溶性が高い農薬は、低いものよりも高濃度で含浸された。そのため農薬は水溶液から大豆の脂質に分配すると推測された。本研究で開発した精度管理試料は、複数の原材料の一部に被験物質が添加されている点で、従来の均一化された単一の食材試料とは異なる。複数の原材料からなる加工食品で、原材料ごとに分別する手法も取り入れた精度管理試験が可能であることが実証できた。

外部精度管理試験で、均一化法で全農薬が良好な結果を得たのは 6 機関であり、分別法は 5 機関であった。両法で共に良好なのは 5 機関で、分別法で良好であった機関と一致した。4 機関では、一つ以上の評価農薬で適正な範囲を外れた。均一化法で適正域から外

れた 3 機関のうち 2 機関は、均一化法で外れた真度又は精度の評価農薬は、分別法のそれと一致していた。農薬でみると、適正域から外れたのはプロポキスルを除いて 8 農薬あり、両法で外れたのは、カルバリル及びチオベンカルブであった。

基準適合性の判定で、加工食品の適合性、原材料の適合性及び最終判定で全農薬が付与値に基づく判定と一致したのは、8 機関であった。1 機関は原材料の適合性で、大豆のカルバリルのみが誤りであった。付与値に基づく分析値は、端数処理前が 0.24 ppm で、端数処理すると 0.2 ppm となり、基準値と一致した。分析法の精度の僅かな変動で、判定の正誤が決まった。

参加した協力機関は、加工食品中の農薬分析で、加工食品から分別した原材料を分析し、その結果に基づいて、食品規格への適否を適切に判定する能力を有することが認められた。

2 中澤分担研究

DON 汚染に関する調査報告についての再考察では、「定量限界以上の点数/調査点数」は、本研究で改めてデータを作成して考察を行ったところ、小麦よりも大麦での汚染率が高く、また経年変化を見ると減少よりもむしろ増加傾向にあることが伺われた。従来、DON による穀物汚染は主に小麦に対して向けられてきたが、国産麦類の DON 汚染に関して言えば、大麦にも大いに注目する必要があることが確認された。

市販の ELISA キットについてその基本性能を確認したところ、良好な直線性、併行精度と室内再現精度が得られ、「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」に沿った値であった。

以上のことから、本試験法が一般に測定結果のバラツキが大きいとされる ELISA であることを考慮すると、DON 汚染が危惧される食品(ビール)の実態調査においてスクリーニングとして適用可能であり、本研究を遂行することによって、国産・輸入食品など市場に流通する食品の安心・安全性評価に大いに寄与することが期待される。

3 齊藤分担研究

CPA に対する ELISA 法の確立を行い、これを用いためんつゆにおけるマトリックス効果について検討した。その結果、めんつゆを5倍以上希釈することによりPBSとほぼ同等の検量線が得られた。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から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。また、一元配置法により、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、併行精度は23.0～31.1%、室内再現精度は17.0～30.6%と、いずれも相対標準偏差の数値としては若干高めであったが、併行精度と室内再現精度の数値がほぼ同レベルであった。以上の結果から、本法は、CPA 汚染が危惧される食品の実態調査においてスクリーニングとして適用可能であり、本研究を遂行することによって、輸入食品など市場に流通する食品の安心・安全性評価や、今後の規制値導入の検討に際して重要な情報を提供することに大いに寄与することが期

待される。

4 村山分担研究

食品衛生法により食品中への残留が禁止されている動物用医薬品マラカイトグリーンと、食品添加物である亜硫酸を反応させることにより、マラカイトグリーンが消失することを見出した。

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では、新たな基材として作製検討をした牛肉試料は、これまでの鶏肉および豚肉と比較してブランク試料由来の夾雑ピークが多く、また添加したサルファ剤全体として回収率が低かった。しかしながら、ヒレ肉においては添加したすべてのサルファ剤について良好な均一性が得られ、調査試料としての適用の可能性があると考えられた。またカタ肉についても、残留基準のあるSDDの回収率および均一性ともに良好であることから、今後、この2部位について調査試料とするための更なる保存安定性の検討を要すると考える。

着色料では、新基材であるゼラチンを用いたゼリー菓子は、4種の色調の異なる試料を作製した。その結果、固体試料として、本基材は適用できることが示唆された。今後、調査試料としての必要量(約50～80 kg)を作製する場合の操作などを考慮した、実作製へ向けての作製方法の検討が必要である。

保存料に関する調査試料では、定量試験として、新たに固体試料である大根漬けを基材としてソルビン酸添加試料作製を試みた。

その結果、大根の部位によるソルビン酸濃度の違いはほとんどなく、良好な安定性が得られたことから、本基材はソルビン酸の定量試験用調査試料に適用できる可能性が示唆された。一方、シロップを基材として、ソルビン酸の定量試験用調査試料を作製する際、添加標準品としてソルビン酸およびソルビン酸カリウムを用いて作製した場合の安定性を検討した。その結果、シロップのような水溶液の場合は、ソルビン酸を標準品として添加すると、ソルビン酸カリウムと比較して安定性が著しく低下し、調査試料としてはソルビン酸カリウムの方が適していることが示唆された。また、基材成分によりいずれの標準品が適しているか異なる可能性も考えられた。

残留農薬検査に関する調査試料では、新たな基材としてマッシュポテトの適用の可能性を検討した結果、離水防止の目的で安定剤を添加することで解凍後の均質性が目視観察で明らかに改善された。安定剤として、ペクチンおよびパールアガーを用い 8 種農薬を添加して作製した試料の回収率は、1 農薬を除いて良好な結果であった。今後は実作製に近い量で農薬を添加・混合し、均一性を確認し、さらに複数回の凍結融解後の均一性および安定性を検討する必要があると考えた。

5.2 微生物学検査のための適正試料の作製:

外部精度管理調査における新規項目を導入することを目的として、セレウス菌検査およびビブリオ属菌検査に関する調査試料の作製を試みた。

セレウス菌用調査試料では、これまでに確立した米飯試料を用いて温度負荷をかけた際の添加菌数の変動について観察した。その結果、

陽性対照菌である *B. cereus* では 4°C から 32.5°C のいずれの温度範囲においても保存 35 日目まで安定的に菌数を得ることができた。これに対して、陰性対照菌では 32.5°C では添加菌が増加する傾向が認められたが、4°C での保存では菌数に大きな変動は認められなかった。

一方、ビブリオ属菌では冷凍保存時の安定性について検討したが、冷凍保存後 36 日目には 1~2 オーダーの菌数減少が認められた。この結果は本調査試料を定性検査用として使用することを前提とした場合には使用できる可能性が高いことを示唆している。しかし、保存期間の延長により菌数減少が認められていることを考慮すると、より一層の安定性を確保する必要があるものと考えられた。これまでの検討では冷蔵保存により著しい菌数減少が認められたことから、これと比較すると冷凍保存のほうが安定であるとも考えられるが、室温保存時の安定性を加味すると、まだ安定性を担保できたとはいえ切れない状況にある。さらにビブリオ属菌の検出を確実にするために、調査試料の作製の際に混入する可能性が考えられるグラム陽性菌を除去することを目的としてナイシンの効果について検討した。その結果、円筒平板を用いた抗菌試験では 400 ppm のナイシン存在下で *S. aureus* および *B. subtilis* において明らかな阻止円形成が認められた。しかし、ナイシンをろ過滅菌あるいは高圧蒸気滅菌した後に、グラム陽性菌を対象とした抗菌作用の確認では明らかな効果が認められなかった。これには高圧蒸気滅菌に伴う失活やメンブランフィルターへの吸着の可能性が考えられた。このことから、ナイシンを用いたグラム陽性菌の発育阻害を考慮するうえではその滅菌方法についても検討する必要性があ

るものと考えられた。

5.3 アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製:

共同試験では、エビ添加試料およびカニ添加試料を用いて外部精度管理調査の模擬試験を行った。調製した試料の均一性および試験期間内の安定性の確認、プロトコルの作成、試料の配布、報告書の回収に関しては昨年度と同様支障なく実施できることを確認した。また、ELISA 解析ソフトウェアのマイクロプレートマネージャーVer.5 の Logistic 4PL 解析は甲殻類キットの解析においても検量線の回帰が不十分なことが明らかになった。共同試験の統計解析では、Xbar が管理限界外となったのは 1 測定のみであった。しかし、検量線用標準液、試料液の測定は、両キット共に、ウェル間の吸光度の再現性が悪い測定が認められ、測定操作だけでなく、測定キットのウェルに差を生ずる原因があった可能性も考えられた。

共同試験試料について PCR 法による確認試験を実施した。ホワイトソースを基材とした試料では添加液の種類に応じてエビ、カニ DNA が想定通り検出され、確認試験試料としても使用可能と考えられた。ハンペンを基材とした試料ではカニを添加した試料でカニ DNA が想定どおり検出された。しかしブランク試料から基材に由来するエビ DNA が検出され、確認試験試料としては適当でないことが判明した。ブロッコリーを基材とした試料ではエビ添加液を甲殻類タンパク質として 10 $\mu\text{g/g}$ 加えた試料でもエビ DNA は検出できなかった。一方、別の原料から作製したエビ添加液を加えたブロッコリー試料ではエビ DNA が検出できた。この結果、今回共同試験試料の調製に用いたエビ添加液は含まれるエビ DNA の含量または質に問題があることが判明した。今後、確認試験試料に

添加するエビ添加液の調製を再検討する必要が生じた。

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:

害虫抵抗性遺伝子組換え米を検査対象とした外部精度管理調査において、調査試料の調製を検討し、作製試料について均一性試験を実施した。その結果、いずれも想定通り正しく検出され、また Ct 値の再現性も良好だったことから、予定どおり試料が調製できたものと考えられた。また、陽性対照プラスミドと試料の Ct 値から、各精度管理試料について 1 反応あたりの害虫抵抗性遺伝子のコピー数を推定した結果、試料 A は 7.6 コピー、試料 B は 84.2 コピー、試料 D は 49.4 コピーのそれぞれ組換え遺伝子を含むと算出された。改正通知法の害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用の各検出系の検出下限(コピー数)を陽性対照プラスミドを用いて検討した。その結果、63Bt コメ検出用試験は 6.25 コピー、NNBt コメ検出用試験および CpTI コメ検出用試験では 12.5 コピーとなり、63Bt コメおよび NNBt コメ検出用試験の検出感度が旧検知法に比べて上昇したほか、検出系による感度の差も無くなったことが明らかになった。

外部精度管理調査の際 Th.line を指定して収集した参加機関における Ct 値のデータ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、グラフの形状を検討した。その結果、試料 A および試料 B の 63Bt コメ検出用試験の Ct 値の正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示していた。この時、z-スコアが 2 以上となった機関のうちいくつかからは、Ct 値がはずれた原因が推定でき、Ct 値の解析により、外部精度管理参加機関における測定精度をより詳しく推定でき

る可能性が示された。一方、試料 D の CpTI コメ検出用試験では正規確率プロットを作成した結果、正規分布から大きくはずれた値が認められた。測定結果を詳細に検討した結果、正規分布を大きくはずれた機関のうち 3 機関はプローブに由来する FAM の蛍光初期値が低いことが観察され、反応液の調製を誤った可能性が高いと推察された。なお試料 D の正規確率プロットは、2 シグマ処理を 2 回実施後、正規分布に近いグラフとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

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 分担研究報告書

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

分担研究者 尾花 裕孝

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事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

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

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
研究分担者	尾花裕孝	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	永村桂一	岩手県環境保健研究センター
	上野英二	愛知県衛生研究所
	山下浩一	奈良県保健環境研究センター
	神藤正則	堺市衛生研究所
	久野恵子	和歌山県環境衛生研究センター
	佐々木珠生	広島市衛生研究所
	宅間範雄	高知県衛生研究所
	山口理香	北九州市環境科学研究所
	起橋雅浩	大阪府立公衆衛生研究所
	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所
	北川陽子	大阪府立公衆衛生研究所
	福井直樹	大阪府立公衆衛生研究所
	小阪田正和	大阪府立公衆衛生研究所
	柿本 葉	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

【背景・目的】食品衛生法において、加工食品中の農薬等の残留基準は、一部の加工食品を除いて一律基準(0.01 ppm)が適用される。同時に加工食品の原材料が食品規格に適合していれば、その加工食品の農薬等の残留値によらずに食品規格に適合するものとして扱われている。このため、加工食品で食品規格への適否を判定するには、加工食品全体のみならず、原材料ごとに農薬等の残留農薬を評価することが求められる。上記の法の運用趣旨に適する精度管理試料を考案し、外部精度管理試験を実施した。

【精度管理試料】精度管理試料となる模擬加工食品として、大豆、トマトピューレ、ハムからなるポークビーンズを考案した。農薬を含む水溶液に大豆を浸漬させると、農薬は大豆組織内に吸収され、安定に保持されることに着目し、これを精度管理試料の原材料に活用した。本研究における試験対象項目はプロポキスル、カルバリル、ピリミカーブ、フェノブカルブ、ジエトフェンカルブ、イソプロチオラン、プロピザミド、イソキサチオン及びチオベンカルブの 9 農薬を設

定した。当該農薬を含浸させた大豆を原材料としたポークビーンズを作製した。当該農薬は原材料の大豆中に局在しつつ、ポークビーンズ中で安定に保持された。ポークビーンズについて精度管理試料として備えるべき均一性ならびに安定性を検証したところ良好であった。加工食品中の農薬分析において、加工食品全体の分析のみならず、原材料ごとへの分別・分析工程を加味した、実用的な分析遂行能力を検証可能な新たな精度管理試料を考案することができた。

【外部精度管理試験】9機関の地方衛生研究所の協力を得て、上記の精度管理試料を活用した外部精度管理試験を実施した。試験は、ポークビーンズから検出した農薬の種類と測定値を回答することから始まり、次に原材料ごとに検出した農薬の種類と測定値を回答することを課題とした。さらにあらかじめ設定した加工係数(原材料ごとの加工による農薬の濃縮・希釈に関する係数)を加味した分析値を残留基準と比較し、食品規格への適否の判定も求めた。農薬の測定値については、Xbar-R 管理図により評価した。農薬の検出に関しては、一貫して全ての機関で適正な回答を得た。ポークビーンズを対象とした試験では、Xbar 管理図で全ての機関が適正な結果となったが、R 管理図で上部管理線を超過する機関が2つあった。分別した原料の大豆を対象とした試験では、Xbar 管理図で下部管理線を下回る機関が2つあった。R 管理図では、1機関が上部管理線を超過した。最終的に、検出された農薬について、ポークビーンズおよび原材料(大豆およびトマト)ごとに行った、食品規格への適合性判定では、1種の農薬を除き、全ての機関が正しい判定を導くことができた。

【結論】加工食品において原材料ごとに農薬分析し、食品規格への適合性判定の能力を評価できる精度管理試料の開発できた。参加した各機関は、加工食品中の農薬検査を行い、その結果に基づいて原材料ごとの食品規格への適合性を判定する能力を有することが認められた。

A. 研究目的

本研究は、外部精度管理試験を中心に加工食品の残留農薬分析の精度に影響する因子の探索及び向上を網羅的に試みる。食品衛生法第11条第1項に定める農薬等の残留基準は、一部の加工食品を除いて生鮮な農畜水産物ごとに設定されている。食品衛生法及び関連法令(以下「法令」という。)は、加工食品にも適用される。加工食品は、農薬等の残留基準の設定がなければ、原則的に食品衛生法第11条第3項により一律基準値(0.01 ppm)が適用される。しかし、加工食品における残留農薬等は、法令によって容易に規制できない要因がある。加工

食品は、農薬等の分析を妨げる多くの成分を含んでいるため、低濃度で残留する農薬等を分析するのは困難であった。これまでに分析機関では加工食品の農薬等の分析法の開発がなされ、精度管理試験で良好な精度が得られる等、一定の体制は整備されてきた。他方で法令は、加工食品で一律基準値を超えた場合は原材料について、農薬等の残留値が農畜水産物ごとに設定された残留基準に適合していれば、その加工食品全体の残留値によらずに、食品規格に適合するものとして扱う。すなわち、原材料には食品衛生法第11条第1項に定める農薬等の残留基準が適用される。このため、加工食

品における農薬等の分析では、加工食品全体のみならず、原材料ごとに分別して、食品規格への適否を判定することが求められる。

23年度は、単に均一化された加工食品だけでなく、個々の原材料に遡って、農薬分析の精度管理試験を行う。さらに行政判断を意識して、食品規格への適否の判定まで含めて検証する。これにより、個々の分析者の分析精度に影響する要因として、加工食品から原材料を分別する手技が加わることになる。本年度は以下の研究課題を検討した。

- 1.加工食品から原材料に分別でき、残留値に対する調理・加工の影響を考慮すれば、生鮮な農産物とみなして分析できる精度管理試料を開発する。
- 2.協力機関が用いる測定機器において、試料由来のマトリックスが、分析データの再現性、分析の真度及び精度に及ぼす影響を評価する。
- 3.開発した精度管理試料を用いて、添加した原材料、農薬および添加濃度は未知の条件で、外部精度管理試験を行い、分析精度を評価する。
- 4.3.で得られた分析結果に、法令を適用して、食品規格への適否の判定を行い評価する。

B. 研究方法

1. 実施機関

大阪府立公衆衛生研究所は、精度管理試料の開発、調製ならびに送付、試験対象項目の精度管理試料中での均一性ならびに安定性の保証、精度管理試験への参加、分析結果の解析、協力機関との連絡調整、報告書の作成およびその他研究遂行に係る

事務を行った。ただし、精度管理試料を開発及び調製した担当者は、協力機関と試験の実施条件を平等にし、試験結果の公正さを保つため、分析者として当該機関で行う精度管理試験に参加させなかった。

2. 協力機関

岩手県環境保健研究センター、愛知県衛生研究所、奈良県保健環境研究センター、堺市衛生研究所、和歌山県環境衛生研究センター、広島市衛生研究所、高知県衛生研究所及び北九州市環境科学研究所は、研究協力機関として精度管理試験に参画した。

3. 実施概要及び日程

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、分析機器の再現性試験、外部精度管理試験及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（以下「LC-MS/MS」という。）とした。分析機器の再現性試験は、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。外部精度管理試験は、細切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を評価した。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。

試験の実施内容は、8月1日に開催した第1回班会議で、協力機関に日程および具体的な試験方法と併せて説明し、試験の実施手順を定めた実施要領を配布した。混合標準溶液、精度管理試料として添加試料な

らびにブランク試料および試料分別に用いる金属製ザルならびにポリエチレン製ネットは、8月9日に協力機関に送付した。試験実施期間は8月9日から2か月とし、分析結果等の提出期限は10月7日とした。

4. 協力機関の農薬分析法及び測定条件

協力機関ごとの外部精度管理試験に用いた分析法は表 1-1、精度管理試料の分別法は表 1-2、分析フロー図は資料 1-1~9 に示した。抽出溶媒としてアセトニトリル+ヘキサンを用いたのは2機関、アセトニトリルは7機関であった。脱脂および精製は、アセトニトリル-ヘキサン分配+C18+GCB/PSAは1機関、アセトニトリル-ヘキサン分配+C18+PSAは1機関、C18+GCB/PSAは4機関(1機関はトマトピューレのみ GCB/PSA)、C18+PSAは1機関、GCB/NH₂は1機関、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)+シリカゲル+PSAは1機関が用いた。なお、LC-MS/MSの測定条件は資料 2-1~2 に示した。

5. 農薬混合標準溶液

協力機関の行政検査の対象農薬を考慮して、プロポキスル、カルバリル、ピリミカーブ、フェノブカルブ、ジエトフェンカルブ、イソプロチオラン、プロピザミド、イソキサチオンおよびチオベンカルブの9農薬を試験対象項目(以下「項目」という。)として設定した。項目の標準溶液は、林純薬工業にアセトンを溶媒とした各々10 ppmの混合標準溶液の調製を委託し、協力機関に配布した。協力機関は、混合標準溶液を分析機器の再現性試験および外部精度管理試験に使用した。精度管理試料の検討及び添加試料の調製には、プロポキスル(林純薬工業)、カルバリル、ピリミカーブ、フェノブカルブ、ジ

エトフェンカルブ、イソプロチオランおよびイソキサチオン(和光純薬工業)、プロピザミド(Dr.Ehrenstorfer GmbH)およびチオベンカルブ(関東化学)を使用した。また、内部標準物質としては、カルバリル-d7(林純薬工業株式会社)、フェノブカルブ-d3(林純薬工業株式会社)、イソキサチオン-d10(林純薬工業株式会社)およびチオベンカルブ-d10(CDN ISOTOPES INC.)を使用した。

6. 精度管理試料の調製及び送付方法

6-1. 大豆の分析法

大豆の分析法は資料 3-1 に示した。精度管理試料の大豆は、水を吸収しているため加水せずに抽出に供した。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 およびチオベンカルブ-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)の上に、あらかじめアセトニトリル 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および溶出液は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。

6-2. ポークビーンズの分析法

ポークビーンズの分析法は資料 3-1 に示した。ポークビーンズは、大豆:トマトピューレ:ロースハム=10:10:1 で構成されるが、その流動性が低いため細切均一化が困難であった。そこで、流動性を増すため、細切均一化前に加水することを検討した。加える水は試料重量の 1/2 倍に相当する量が最適であった。ポークビーンズはあらかじめ、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。

6-3. トマトピューレの分析法

トマトピューレの分析法は資料 3-2 に示した。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、フェノバルブ-d3、イソキサチオン-d10 およびチオベンカルブ-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。

6-4. 添加試料

添加試料に添加する農薬(以下、「添加農薬」という。)は、すべての項目とし、大豆

に添加することとした。大豆(アグリシステム株式会社)約 3000 g は、100°C で 24 時間乾燥させた。室温で放冷した後、大豆 2620 g に対して、添加農薬を各々 0.1 ppm になるよう調製した農薬混合水溶液(10%アセトンを含む)10.8 L に、4°C で 72 時間浸漬し含浸させた。大豆は超純水で 2 回洗浄して水をよく切り、添加試料に供した。添加試料は一容器につき当該大豆 120 g、トマトピューレ(カゴメ:生鮮トマトを 3 倍濃縮)120 g およびあらかじめ約 5 mm 角に細切したロースハム(伊藤ハム)12 g ずつを秤量して、ポリエチレン製容器に入れ混和させ、加熱及び調味料等の添加は行わず -20°C で凍結した。なお、本研究の実施に際しては、添加した原材料、添加農薬およびその濃度は、協力機関には通知しなかった。

6-5. ブランク試料

ブランク試料は、添加試料と同様に調製した。ただし大豆の浸漬は、添加試料に用いた農薬混合水溶液に替えて、10%アセトンを含む水とした。

6-6. 精度管理試料の保管及び発送

精度管理試料は調製した後、協力機関へ発送するまで -20°C で保管した。当該試料は、混合標準溶液と共に 8 月 9 日に協力機関に冷凍宅配便にて送付した。協力機関は、試験を実施するまで冷凍保管した。

7. 試験方法

7-1. 分析機器の再現性試験

試験溶液の調製に用いる溶媒および測定機器の条件は、各機関が外部精度管理試験に用いるものと同様にした。

7-1-1. 標準溶液の連続測定

協力機関は、混合標準溶液から調製した試験溶液を、5 回連続で測定し、ピーク面積