

201234016A

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24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 渡 辺 卓 穂

平成25年(2013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24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 渡 辺 卓 穂

平成25年(2013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	35
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	81
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	91
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	101
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	119
渡辺 卓穂	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	219
IV. 研究成果の刊行物・別刷	223

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 24 年度 総括研究報告書

主任研究者 小島 幸一

平成 25 年(2013 年)5 月

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

輸入食品の急増や国内での流通食品の増加により、種々の食品を対象とした食品衛生検査が実施されている。食品の安全性を確保するためには、残留農薬、病原微生物、動物用医薬品、遺伝子組み換え食品、アレルギー性物質、貝毒などの汚染物質を含む多くの検査項目について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必要である。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提供が求められる。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（渡辺分担研究）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）、渡辺卓穂（（財）食品薬品安全センター秦野研究所食

品衛生事業部長）

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有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

することは国民に対する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を構築してきたが、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。また、加工食品の安全性について社会的関心が高い中で、原材料の放射線照射の検知の有無を確実にする精度管理体制の強化も必要となる。

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、加工食品の原材料に対する放射線照射の検知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。

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）

加工食品の放射線照射検知の精度に影響する因子を探索し、加工食品を対象に放射線照射検知の精度管理体制を構築するため、開発した 2-アルキルシクロブタン分析法を用いた添加回収試験、外部精度管理試験及び照射判定試験の 3 試験を実施した。測定機器は、質量分析器付きガスクロマトグ

ラフ (GC/MS) とした。添加回収試験は、提示した分析法の真度並びに精度を評価した。外部精度管理試験は、参加機関の分析精度を調査し、照射判定試験は、外部精度管理試験で得た測定値を基に、通知試験法の判定基準に準じた項目に基づき照射履歴を判定し、照射検知の有効性を評価した。

精度管理試料として 3 種類 (非照射、0.8 kGy 照射、2.0 kGy 照射) のハンバーグパテ、添加試験用のハンバーグパテ (非照射) を用い、標準品には 2-ドデシルシクロブタノン (2-DCB) 及び 2-テトラデシルシクロブタノン (2-TCB) を、内部標準として 2-シクロヘキシルシクロヘキサノンを使用した。

添加回収試験では、提示法によりハンバーグパテより脂肪を抽出し、この脂質 0.2 g に対して 50 ng/g となるよう 2-DCB 及び 2-TCB を添加し、併行数を 5 として GC-MS で測定し、回収率、標準偏差、変動係数を求めた。脂肪抽出法及び精製法は以下に従って行った。フードプロセッサー等で均一化したハンバーグパテ 5 g を乳鉢に採取し、同量のケイソウ土を加えた後、乳棒を用いて試料の水分が十分ケイソウ土に吸収されるまで混和した。これをポリプロピレン製 (PP 製) 50 mL の遠心管にうつし、*n*-ヘキサン 30 mL を添加し、手振りで 1 分間振とう抽出を行った。遠心 (3000 rpm, 5 分間) 後、ヘキサン層をあらかじめ重量を測定した 100 mL ナスフラスコにろ紙を用いてろ過した。次に、残渣に *n*-ヘキサン 20 mL を添加し、同様に手振りで振とう抽出、遠心を行った。更に、ヘキサン層を合わせ、エバポレーターを用いて濃縮した。濃縮後、ナスフラスコを 70°C の恒温槽内で 30 分間加温し、抽出脂肪中の *n*-ヘキサンを完全に除

去し、ナスフラスコの重量を測定し、脂肪抽出量を算出した。次に、ガラス製スクリー管に抽出脂肪 0.2 g を採取した。これにアセトン 2 mL を加えてボルテックスミキサーで混合し脂肪を溶解させた。そこへアセトニトリル 1 mL を添加し、再度ボルテックスミキサーで混合した。これを -20°C の冷凍庫で 30 分間冷却後、遠心 (2000 rpm, 5 分間, 0°C) し、上澄液を重量既知のガラス製試験管に採取し、ブロックヒーター等で 40°C に加温して窒素気流下にて緩やかに濃縮した。試験管重量の差から抽出物の脱脂後重量を算出した後、残渣を *n*-ヘキサン 2 mL に溶解した。これを *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニングをした自家調製 (以下手製) シリカゲルカラムに負荷し、*n*-ヘキサン 10 mL、2% ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン溶液 5 mL で洗浄後、2% ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン溶液 10 mL で溶出した。溶出液をブロックヒーター等で 40°C に加温して窒素気流下で緩やかに濃縮した。濃縮液を少量の *n*-ヘキサンで洗い込みながら濃縮用試験管に移し、40°C 以下で窒素ガスを吹き付けて溶媒を完全に除き、100 ng/mL 内部標準溶液 0.2 mL に溶解したものを試験溶液とした。

外部精度管理試料のガンマ線照射は大阪府立大学で以下の通り行った。照射施設には照射プールの底に線源を収納した容器があり、水面上より鎖で照射する試料を入れた容器を沈め、一定時間線源容器内に放置することで照射を行った。試料は市販のハンバーグパテを用い、照射食品試料を作製した。試料に照射された放射線の線量は、ラジオクロミックフィルム (FWT 社製、FWT-60-1P) を用いて算出した。試料に照射

を行う際に、複数枚のラジオクロミックフィルムを容器に混在させ、試料と同じ条件で放射線を照射した。照射後にラジオクロミックフィルムの吸光度を測定し、あらかじめ既知の線量で照射したフィルムから作成した検量線を用い照射線量を算出し、その平均値を実際の照射線量とした。配布した外部精度管理試料 3 種（赤：0.8 kGy 照射、黄：非照射、青：2.0 kGy 照射）をそれぞれ併行数 5 で測定し、脂肪当たり濃度、標準偏差、変動係数、範囲を求めた。各機関へは照射履歴、照射線量、アルキルシクロブタノン濃度等は示さず、ブラインド試験とした。分析法は提示法に準じるものを用い、測定機器の条件は各機関が用いるものとした。

照射履歴の判定は厚生労働省通知試験法に準じて以下の判定項目を設定し、全てを満たす場合に陽性と判定した。

- (1) 標準溶液と同じ保持時間に、 m/z 98 及び m/z 112 に S/N 比 3 以上のピークを認める。
- (2) m/z 98 及び m/z 112 で観測されるピーク面積の比は、 m/z 98 において近似した面積を与える検量線用標準溶液ピークから得られる m/z 98 及び m/z 112 のピーク面積比の $\pm 20\%$ 以内である。
- (3) 保持時間付近で m/z 95 から m/z 115 の範囲でスキャン測定を行うとき、 m/z 98 及び m/z 112 が主要イオンである。
- (4) 上記 1 から 3 の項目を満たした場合の定量値が検量線用標準溶液の S/N 比 3 から求めた濃度以上である。

外部精度管理調査においては各機関から報告された値について、基本統計量の算出を行い、度数分布表と Xbar-R 管理図の作成

を行った。外部精度管理試験の目標値は中央値とし、報告値を昇順にした際の 4 番目、5 番目の平均値を使用した。Xbar 管理図において真度の適正域は、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号）で、添加濃度に対する目標値とされる 70~120% を準用し、下部管理限界 (LCL) は 70%、上部管理限界 (UCL) は 120% として、この区域内を良好と判定した。R 管理図では管理限界の為の係数を $n=5$ の 2.114 とし、UCL を設定した。なお、これらの数値の計算には Microsoft Excel を使用した。

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）

ビールからの抽出・クリーンアップは以下の操作を行った。ビール 10 mL にハイフロースーパーセル 2 g、アセトニトリル 40 mL を加え、1 時間混合した。その後、減圧ろ過を行い、ろ液を濃縮乾固した。アセトニトリルと水の混合溶液 (84 : 16) 10 mL で残留物を再溶解し、クリーンアップ用多機能カラム MycoSep[®]#227 を用いて精製し、ELISA 用の試験溶液とした。GC/MS 法に供する際には、トリメチルシリル (TMS) 化を行った。すなわち、試験溶液から 1 mL を分取し、内標準物質 (IS) として 500 ppb の $^{13}\text{C}_{15}$ -DON を 200 μL 添加し、窒素乾固した。残留物に TMS 誘導体化試薬 (BSTFA : TMCS : TMSI = 3 : 2 : 3) 100 μL を加え、80°C で 1 時間反応させて TMS 化を行った。その後、ヘキサン 1000 μL と水 750 μL を加えて振とう抽出し、ヘキサン層を GC/MS 法の試験

溶液とした。

ELISA には、市販キット「DON」(株フロンティア研究所製) および「RIDASCREEN® DON」(R-Biopharm 社製)を用いた。

一方、機器分析による測定条件を以下に示す。GC/MS には Agilent 社製 GC6890 および 5973MSD を使用した。GC カラムには DB-5MS (Agilent 社製; 30 m×0.25 mm i. d., 0.25 μm) を用い、昇温プログラムは 40°C (1 min)→20°C/min→280°C (3 min)→20°C/min→300°C (5 min)とした。IS として ¹³C₁₅-DON を用い、DON の定量イオンを m/z 235、確認イオンを m/z 512、および IS の定量用イオンを m/z 304 と設定し、SIM モードにて検出した。

真度、併行精度および室内再現精度などの分析法バリデーションのために、市販のビールを対象として添加回収試験を行った。抽出・クリーンアップ操作は上記抽出・クリーンアップに準じて行った。DON 添加濃度は高濃度 (100 ng/mL) および低濃度 (10 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)

CPA のウサギポリクローナル抗体は、フロンティアサイエンス社から購入した。

CPA conjugate は以下のように作製した; アセトン 0.25mL に CPA 2.5mg を溶解し、1,1-カルボニルジイミダゾール 2.5mL を加え、室温で 1 時間反応させた。その後、精製水 0.2 mL を加えて反応を停止させた。次

に 0.1 M の炭酸水素ナトリウム溶液 0.5 mL で溶解したポリリジン 2.5 mg を加え、4°C で 24 時間攪拌した。その後、0.1M の PBS (pH 7.2) で 24 時間透析した後、1 mg/mL になるよう PBS で希釈・調製した。また、市販 CPA conjugate との比較検討を行った。CPA-ポリリジン conjugate (1 μg/ml Carbonate Buffer pH8.5) 100 μL をグライナー社製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 μL 加え、1 時間放置してブロッキングを行った後、0.02 % Tween20-PBS で 3 回洗浄を行い、CPA 測定用 ELISA プレートを調製した。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 (1~1000 ng/mL) したものと、ブランクとしての PBS の、計 8 種類を用いた。ELISA プレートに希釈系列を 50 μL 加え、続いて第一抗体 (CPA ウサギ抗血清: 25000 倍希釈) を 100 μL 加え、1 時間反応させた。反応後、B/F 分離を行い、第二抗体 (Anti Rabbit IgG (H+L)、HRP conjugate: 6000 倍希釈) を 100 μL 加えて 1 時間放置し、ウェ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、テトラメチルベンチジン (TMB) 100 μL を加え、15 分間放置して発色させた後、1 N 硫酸 100 μL を加えて反応を停止し、直ちにプレートリーダーを用いて波長 450 nm (リファレンス波長 590 nm) で吸光度を測定した。

LC 装置には、日立社製 655A-12 (HITACHI L-500 LC Controller 付き) を、検出器には島津製作所製 SPD-6AV を用い、測定波長は 220nm とした。LC カラムには、DIONEX 社製 Acclaim® Mixed-Mode WAX-1 (4.6 mm i. d.

× 150 mm、5 μm)を用い、移動相にはアセトニトリル：25mM リン酸緩衝液(pH6.0) = (7:3)を用いた。カラム温度は 40℃、移動相流速は 1 mL/min とし、試料注入量は 20 μL とした。

食品試料には、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属などのカビによる汚染が考えられる食品としてピーナッツを選択した。試料調製操作手順としては、抽出に高速溶媒抽出法(ASE)を採用し、装置には DIONEX 社製 ASE-300 を用いた。ASE 用の抽出セル(33mL 容)の底部に円筒ろ紙を挿入し、ハイフロースーパーセル(珪藻土)約 1 g を積層した後、予めミルで粉碎した試料 2.5 g にハイフロースーパーセル 3.0 g を加えて混和したものを充填した。さらに、ハイフロースーパーセルを抽出セルの入り口部分まで満たし、ASE-300 に設置した。ASE 操作条件は、抽出溶媒 50%メタノール、抽出温度 25℃(室温)、圧力 1500 psi とし、抽出サイクル 1 回とした。得られた抽出液を減圧下で乾固し、1%メタノール 1 mL で再溶解したものを固相分散抽出法(SPDE)でクリーンアップした。SPDE の操作手順は以下に従った。SPDE の固相には Waters 社製 Oasis® HLB(30 mg)を用い、キャップチューブ内で分散後、ろ過フィルター™でろ過(2500 g, 10 sec)し、精製水で洗浄(1mL×3)後、メタノールで溶出(1mL×3)した。この溶出液を減圧下で乾固した後、1%メタノールで 1mL に定容し、試験溶液とした。

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、ピーナッツを選択し、試料溶液の調製に従って調製した原液および PBS で適宜希釈したものを測定

用試料とし、ELISA および LC-UV を用いて測定した。CPA 添加濃度は 10 μg/g とし、一日に 2 回測定を併行して繰り返し、これを 6 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)

クロルピリホス、フルトラニル、マラチオンの定量に用いた試料として、測定対象農薬が残留していない冷凍ほうれんそうを用いた。ガスクロマトグラフ質量分析計

(QP2010Plus) は島津製作所製を用いた。カラムは DB-5MS (0.25 mmφ×30 m, 膜厚 0.25 μm (Agilent J&W 製) を使用した。また、クロルピリホス個別試験法には炎光光度検出器付きガスクロマトグラフ

(GC-2010) (島津製作所製) を用いた。カラムには DB-5 (0.53 mmφ×10 m, 膜厚 1.5 μm (Agilent J&W 製) を使用した。

試験法は GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)、厚生労働省通知法を用いた。すなわち、試料 20.0 g を量り採り、これにアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL 加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。得られた抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g および 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH7.0) 20 mL を加え、振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を

除去した。残留物にアセトニトリルおよびトルエン（3：1）混液 2 mL を加えて溶かした。グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）に、アセトニトリルおよびトルエン（3：1）混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上述操作で得られた溶液を注入した後、アセトニトリルおよびトルエン（3：1）混液 20 mL を注入し、全溶出液を 40℃以下で 1 mL 以下に濃縮した。これにアセトン 10 mL を加えて 40℃以下で 1 mL 以下に濃縮し、再度アセトン 5 mL を加えて濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトンおよび n-ヘキサン（1：1）混液に溶かして、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

クロルピリホス個別試験法は以下の操作法に従った。試料 20.0 g を量り採り、これにアセトン 100 mL を加え、3 分間細砕した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50 mL を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でアセトンを除去した。これをあらかじめ飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に移した。酢酸エチルおよび n-ヘキサン（1：4）混液 100 mL を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせた。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチルおよび n-ヘキサンの層を 300 mL の三角フラスコに移した。水層に酢酸エチルおよび n-ヘキサン（1：4）混液 50 mL を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチルおよび n-

ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせた。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過した。次いで n-ヘキサン 20 mL を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返した。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で酢酸エチルおよび n-ヘキサンを除去した。この残留物にアセトンおよび n-ヘキサン（1：1）混液 5 mL を加えて溶かした。内径 15 mm、長さ 300 mm のクロマトグラフ管にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル（粒径 63～200 μm）5 g をアセトンおよび n-ヘキサン（1：1）混液に懸濁させたもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約 5 g を入れ、カラムの上端に少量のアセトンおよび n-ヘキサン（1：1）混液が残る程度までアセトンおよび n-ヘキサン（1：1）混液を流出させた。このカラムに上述操作で得られた溶液を注入した後、アセトンおよび n-ヘキサン（1：1）混液 100 mL を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトンおよび n-ヘキサンを除去した。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に 5 mL とし、これを試験溶液とした。

サイクラミン酸の定量にはサイクラミン酸を含まない粉末食品を用いた。LC/MS によるサイクラミン酸の定量には Agilent 製液体クロマトグラフ質量分析計 6460 Triple Quad LC/MS を用いた。また、HPLC-UV 測定では島津製作所製 LC-20A Series を用いた。LC/MS によるサイクラミン酸の定量は第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 変法に従った。すなわち、試料 10.0 g を

量り採り、これに蒸留水 30~40 mL を加えて沸騰水浴上で 15 分間加熱した。冷却後、蒸留水を加えて正確に 100 mL とした。遠心分離 (3000rpm 5 分間) 後、上澄液を試験溶液とした。HPLC-UV によるサイクラミン酸の定量は第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 に従った。すなわち、試料 10.0 g を量り採り、これに蒸留水 30~40 mL を加えて沸騰水浴上で 15 分間加熱した。冷却後、蒸留水を加えて正確に 100 mL とし、遠心分離 (3000rpm 5 分間) した。あらかじめメタノール 10 mL および蒸留水 10 mL を通過させコンディショニングした Sep-Pack plus C18 Environment 900 mg カートリッジと Bond Elut Jr SAX 500 mg カートリッジの順番に接続したものに上述操作で得られた抽出液を負荷した。流下後、蒸留水 10 mL で洗浄した。Sep-Pack plus C18 Environment 900 mg カートリッジを取り外した後、Bond Elut Jr SAX 500 mg カートリッジに塩酸 (1→100) 10 mL を負荷した。上述操作で得られた溶出液に硫酸溶液 2 mL および正確に n-ヘキサン 5 mL を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム試液 (有効塩素 2.5%以上) 1 mL を加えて 1 分間激しく振とうした。水層 (下層) を除去後、ヘキサン層 (上層) に 5%炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL を加えて 1 分間振とうした。下層を除去した後、上層を分取し試験溶液とした。

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 (渡辺分担研究)

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rikサーを用いて各部位のミンチ肉 (ヒレ、カタ及びバラ) をそれぞれ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) および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) のいずれも 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、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。これらを用い、各サルファ剤について、14 日間の冷蔵保存 (6°C~10°C) 安定性 (ヒレ肉のみ) および試料の 3 回繰り返し凍結融解による安定性をヒレ及びカタで検討した。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。

食品添加物検査用調査試料の作製では、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 0.680 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、調査試料とした。長期冷蔵保存 (6°C~10°C) 安定性は作製後 135 日までの経時変化を検討した。また、同様に分割した漬物を、ソルビン酸濃度が

0.680 g/kg になるように調製した溶液(水溶液)に、基材対浸漬液比が 1:1、1:1.5 および 1:2 (w/w) となるように浸漬した(約 1 週間、冷暗所)。浸漬後、溶液から取り出し、基材対浸漬溶液比の検討試料とした。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、粉体攪拌用フラスコ(1L 容)に各溶媒(ヘキサン、アセトン、20%含水アセトンおよび酢酸エチル)をそれぞれ 400 mL とり、これに添加用農薬混合標準液(テルブホス 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 10 $\mu\text{g/mL}$ 、フェニトロチオン 20 $\mu\text{g/mL}$ 、アセトン溶液) 3 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、常圧で、5 分間回転混合した。これに、玄米 300 g を量り入れ、同様に 5 分間回転混合した後、室温で遮光下 24 時間放置した(溶媒留去後理論値:テルブホス 0.005 $\mu\text{g/g}$ 、ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン 0.2 $\mu\text{g/g}$)。浸漬後、浸漬溶媒を減圧乾固し、さらに室温下で 3 日間乾燥し、粉碎後、浸漬溶媒検討用作製試料とした。作製した試料は、ジップロックに入れ、冷蔵保存(6°C~10°C)した。また、粉体攪拌用フラスコ(2L 容)10 個に酢酸エチルをそれぞれ 700 mL とり、これに添加用農薬混合標準液 6 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、常圧で、5 分間回転混合した。これに、玄米 600 g を量り入れ、同様に 5 分間回転混合した後、以下、浸漬溶媒検討用作製試料と同様に行い、10 個のバッチ間均一性の検

討用作製試料とした。測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編(2003)」に準じた。

浸漬用溶媒の検討では、溶媒ごとに得られた試料につき n=5 で、また、バッチ間の均一性の検討では、10 バッチ間につきそれぞれ n=2 で測定を行った。

重金属検査用調査試料の作製では、予めカドミウム濃度を測定した高濃度玄米(2.10 $\mu\text{g/g}$) およびブランク玄米(0.0273 $\mu\text{g/g}$)を用い、以下のとおりに条件を変えてロッキングミキサーを用いて混合し、試料を作製した。混合後、内容物を容器からなるべく混合終了時の状態で取り出し、10 個の容器に分注した。

条件 1: 高濃度玄米 40 g + ブランク玄米 360 g(高濃度玄米希釈率:質量で 10 倍)、混合時間 0.5 分間

条件 2: 高濃度玄米 40 g + ブランク玄米 360 g(高濃度玄米希釈率:質量で 10 倍)、混合時間 10 分間

条件 3: ①=高濃度玄米 200 g + ブランク玄米 200 g、②=①+ブランク玄米 400 g、③=②+ブランク玄米 800 g、④=③+ブランク玄米 1600 g、各混合時間①~③: 5 分間および④: 20 分間、①から④の順で、等倍希釈を繰り返し 4 回実施(高濃度玄米希釈率:質量で 16 倍)し、それぞれの条件で得られた試料 10 個につき n=2 で、測定を行い、一元配置の分散分析により、均一性の確認を行った。カドミウム濃度の測定は、公定法に従い、硝酸および硫酸を用いて湿式分解後、DDTC-MIBK 法で原子吸光度計により測定を行った。

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℃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℃にて保存した後、さらに4℃、22.5℃または32.5℃で35日間保存した。なお、7日ごとに経目的にソイビーン・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℃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、Marine brothに2%ゼラチンを加えて滅菌した後、対象菌1白金耳を接種した。これを37℃で24時間培養したものを試験菌液とした。なお、ナイシンを用いる系では、2%ゼラチンを添加したMarine brothを滅菌した後、上澄みの一部にナイシンを0.5 g/Lとなるように溶解し、これをろ過して用いた。

マッシュポテト基材はMarine brothを添加することにより作製し、これに対象菌液を添加した後、28日間冷蔵保存した。ハンバーグ基材は、2回のボイルおよび121℃で75分間オートクレーブ処理した後、対象菌液にハンバーグを浸漬することにより作製し、これを7日間冷蔵保存した。まぐろ切り身は、表面をアルコール噴霧、次亜塩素酸ナトリウム処理あるいは無処理のいずれかを行った後、対象菌液に浸漬した。これを7日間冷蔵保存した。なお、生菌数測定はMarine agarを用い、37℃で24~48時間培養することにより行った。まぐろ基材に

おける選択培地の反応性の検討では、菌液接種7日後に選択培地に接種し、形成された集落を観察した。なお、選択培地は、CHROMagar Vibrio、ビブリオ寒天培地、X-VP寒天培地およびTCBS寒天培地を用いた。

一般細菌数測定検査におけるストマッカー一袋の影響を検討するための試料作製は以下のように行った。一般細菌数測定用調査試料(平成24年度配布試料)を混合することにより均質化した後、10 gを秤量し、これを6種類のストマッカー一袋に入れた後、生理食塩液90 mLを添加し、1分間のストマッカー処理を行ったものを試料溶液とした。必要に応じて10倍段階希釈を行い、標準寒天培地を用いてn=2で生菌数測定を行った。なお、培養は35.5℃で24時間後および48時間後とした。

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:

試験試料は、あらかじめ卵を含まないことを確認した基材に薄めた卵液を加え、ミキサーで均質化して濃度の異なる3種類の試料を作製した。それぞれの試料はいずれも遠沈管約100本に分注し、-20℃で凍結保存した。なお、卵液の基材への添加量は、2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)による卵タンパク質の測定値に基づいて決定した。

調製試料のそれぞれについて10容器からn=2でサンプリングして実施したELISA法による卵タンパク質の測定値を一元配置による分散分析により解析し、均一性を確認した。また、試料発送前と試験期間終了後に試料を測定し、安定性を検討した。

外部精度管理調査では、過去に実施した共同試験の協力機関および各都道府県、政

令指定都市の衛生研究所 73 機関を対象として、試験への参加を募った結果、42 機関が参加の意向を示した。平成 24 年 9 月 4 日付にて、これら 42 機関に 3 種類の試料と報告書書式を宅配便（冷凍）にて送付した。なお測定には、消費者庁食品表示課事務連絡「アレルギー物質を含む食品の検査方法について（参考）」に記載されている卵測定用キット 3 種（モリナガ FASPEK 卵測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 卵、アレルギーアイ ELISA 卵）のうち、任意の 1 種類以上を使用し、測定法は測定キットのプロトコール通り、サンプリング数は 1 試料につき 2 抽出、ELISA 測定は 1 抽出につき 3 ウェル併行で実施とした。

統計処理は以下のように行った。参加機関から回収した報告値は消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」の別紙 5「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」の 4.「特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言」に「免疫化学反応に基づく定量法では、用いる抗体により定量値が異なることが予想される」とあることから、試料別、測定キット別に集計した。次にこのデータを統計解析システム JUSE-QCAS（㈱日本科学技術研修所）を用い、Xbar-R 管理図を代用した解析を実施した（以下従来方式とする）。

ロバスト方式の統計は、Huber の proposal 2 の推定方式による統計をエクセル・マクロによるプログラム（作成：村石明彦、システムサポート：大隅昇）により実行し、得られた平均値、標準偏差を用いて z-スコアを計算した。さらに、アンケート結果についてもとりまとめ、検討を加え

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は、いずれも国立医薬品食品衛生研究所から提供を受けた安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ DAS59132 系統（DAS59132 トウモロコシ）および非遺伝子組換えトウモロコシ（nonGM トウモロコシ）を使用した。DAS59132 トウモロコシは受領した粉砕物をそのまま、穀粒として提供された nonGM トウモロコシは 500 μ m のスクリーンを装着した超遠心粉砕機 ZM200（レッチェ）にて粉砕後、粉末試料の調製および DNA 溶液試料の調製に使用した。

粉末試料は、DAS59132 トウモロコシ粉末と nonGM トウモロコシ粉末を 1 対 1000 の重量比で混合し、0.1% 試料（試料 2）を調製した。また、nonGM トウモロコシ粉末を試料 1 とした。DNA 溶液試料は、DAS59132 トウモロコシ粉末から通知に従って 10 ng/ μ L の DNA 溶液を抽出し、これを同様に抽出した nonGM DNA 溶液で希釈し、試料 C（0.5% DNA 溶液試料）、試料 A（0.05% DNA 溶液試料）を作製した。また、nonGM DNA 溶液を試料 B とした。

また、DAS59132 検出用試験用の陽性コントロールプラスミドが市販されていないため、DNA 溶液試料の調製に使用した DAS59132 トウモロコシ 10 ng/ μ L DNA 溶液を No Template Control -ColE1/TE（ニッポンジーン）を用いて希釈し、0.5% と 5% の陽性コントロールを調製した。なお、DNA 抽出には多用途小形遠心機 CF16RX（日立工機）、DryThermoUnit DTU-2B（TAITEC）、Gene Quant pro（GE ヘルスケアバイオサイエン

ス)の各装置を使用した。

外部精度管理調査参加機関にはトウモロコシ粉末試料 2 試料(試料 1 および試料 2、各 1 本)、DNA 溶液試料 3 試料(試料 A、試料 B および試料 C、各 1 本)、陽性コントロール(0.5%、5%各 1 本)を、実施要領および報告書書式とともに送付し、厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知(食安発第 0618001 号、平成 20 年 6 月 18 日)に従って試験を実施するよう依頼した。

すなわち参加機関は、通知に従って粉末試料から抽出した DNA と、DNA 溶液試料のそれぞれについてトウモロコシ陽性対照用試験および DAS59132 検出用試験のリアルタイム PCR 測定を実施する。次にそれぞれの PCR 測定について Amplification plot を確認し、指数関数的な増幅が確認された場合は、Ct 値が 38 未満か否かにより、陰性試料または陽性試料の別を判定した。

また通知法とは別に、リアルタイム PCR 結果を Th. line を 0.2 に設定して解析し、Ct 値が得られた場合はその値について報告するよう依頼した。

各参加機関の測定結果は試料ごとにまとめ、正答率を算出した。また、各測定の Ct 値データは、試料 A、試料 C については DAS59132 検出用試験、試料 2 については DAS59132 検出用試験およびトウモロコシ陽性対照用試験について、統計解析システム JUSE-QCAS(株)日本科学技術研修所)を用いて統計処理した。すなわち Xbar-R 管理図を代用した解析を実施し、ヒストグラム、正規確率プロット、Xbar-R 管理図および z-スコア管理図を作成した。さらに試料 2 についてはトウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値の差について

も同様に統計処理を実施した。

また、陽性コントロールの Ct 値についてもまとめ、0.5%の陽性コントロールについては DAS59132 の調製濃度が同じである試料 C の Ct 値との相関についても検討した。

C. 研究結果

1 尾花分担研究

1.1 2-アルキルシクロブタノン分析法

市販の牛肉を均一化し、乳鉢に 5 g を採取した。これに同量の珪藻土を添加し、乳棒でよくすりつぶしたものを試料とした。この試料を通知試験法で用いられている *n*-ヘキサンと脂質の抽出に一般的に用いられている 20%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサンをを用いて 30 mL で 4 回抽出した。抽出方法は手振りとホモジナイザーで行い、脂質の抽出量の比較を行った。条件(A) *n*-ヘキサンで手振り(1分)、(B) *n*-ヘキサンでホモジナイザー(1分)、(C) 20%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサンでホモジナイザー(1分)の下、4 回抽出後のヘキサン抽出物の重量は、全ての条件で 0.68g と同じであった。4 回抽出後の脂質抽出量を 100%とし、抽出回数と累積抽出率の関係から、いずれの条件においても 2 回抽出で十分な抽出が可能であった。ホモジナイザーの洗浄等の操作が省略できることから抽出は手振りとし、溶媒は抽出溶媒の調製の簡便性を考慮し、*n*-ヘキサンを使用することとした。

市販の牛肉から抽出した脂肪を試料とした。ガラス製のスクリー管に試料 0.2 g を採取し、2-DCB 及び 2-TCB を各々 0.2 μ g 添加した。これに 7 種類(A~F)の条件でアセトン及びアセトニトリルを添加し、脱脂条件の検討を行った。試料にアセトンを

添加し脂肪を溶解させた後、アセトニトリルをさらに添加し、ボルテックスミキサーで混合した。その後-20℃で30分間冷却し、遠心(3000 rpm, 10分間, 0℃)した。有機層を重量既知の試験管に採取し、窒素気流下にて緩やかに濃縮した。試験管重量の差から脱脂後重量を算出し、脱脂効果の比較を行った。さらに残渣を100 ng/mL 内部標準溶液5 mLで溶解し調製した試験溶液をGC-MSで分析し、回収率を算出した。その結果、アセトニトリルの含量が増加するにつれ、脱脂効果は高まったが、回収率は下がる傾向が認められた。シリカゲルカラム(1 g)で脱脂可能な脂質量の上限が約50 mgであることを考慮し、脱脂条件は、アセトン2 mL、アセトニトリル1 mLで行うこととした。

市販の固相シリカゲルカラム(1 g)を用いて、精製条件の検討を行った。市販の牛肉から脂肪を抽出し、脱脂を行った残渣を試料とした。試料(約0.02 g)に2-DCB及び2-TCBを各々0.015 µg添加し、*n*-ヘキサン0.5 mLに溶解した。これをAgilent社、Varian社、Supelco社、Waters社製のシリカゲル固相カラムに負荷し、*n*-ヘキサン10 mLで洗浄後、2%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン溶液で2 mLずつフラクションを採取した。各フラクションを窒素気流下にて緩やかに濃縮乾固し、100 ng/mL 内部標準溶液0.3 mLで溶解したものを試験溶液とし、GC-MSで分析後、回収率の算出を行った。各社の回収率は、2-DCBが66~130%、2-TCBが83~99%と概ね良好な結果と考えられた。しかしながら、GC-MSのマスキングマトグラムを確認すると、分析時間内に連続した妨害ピークが多く存在した。特に *m/z* 112の

妨害ピークが大きく、定性面で問題があった。妨害ピークの原因として、市販用の固相カラムのハウジング由来の成分が考えられた。そこで、市販の粉末状シリカゲルを用いて手製のミニカラムを作成し、市販の固相カラムとの比較を行った。

牛脂肪0.04 gに2-DCB及び2-TCBを各々0.08 µg添加し、*n*-ヘキサン1 mLで溶解したものを試料とした。これを*n*-ヘキサン10 mLコンディショニングした手製のシリカゲルカラムに負荷し、*n*-ヘキサン10 mLで洗浄後、2%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン溶液15 mLを用いて1 mLずつフラクションを採取した。各フラクションを窒素気流下にて緩やかに濃縮し、100 ng/mL 内部標準溶液1 mLで溶解したものをGC/MSで分析し、手製シリカゲルカラムにおける2-アルキルシクロブタノンの溶出画分を確認し、回収率を算出した。2-アルキルシクロブタノンは2%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン8~13 mLの画分に溶出し、この範囲に添加量が全て溶出したことを確認した。脂肪含量によってフラクションが若干前後することを加味し、手製のシリカゲルを用いた精製条件は、*n*-ヘキサン10 mLでコンディショニング、*n*-ヘキサン溶液で負荷(約2 mL)、*n*-ヘキサン10 mL及び2%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン5 mLを洗浄画分として廃棄し、2%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン10 mLを採取画分とした。また、精製後のクロマトグラムは、市販の固相カラムと比較して、妨害ピークが減少し、良好であった。

開発した2-アルキルシクロブタノン分析法を用いて、通知試験法で示された分析法妥当性ガイドラインへの適応を室内精度管理試験により評価した。試料は非照射のハ

ンバーグパテ及び鶏唐揚げを用いた。各試料から脂肪を抽出し、これを陰性試料とした。また、抽出した脂肪に 2-DCB 及び 2-TCB を各々 50 ng/g 添加し、陽性試料とした。陰性試料を本分析法に従って操作し、判定項目に従って判定した。これを 1 日 2 併行 2 日間くり返し、陰性判定結果とした。陽性試料についても、同様に分析法に従って操作し、これも判定項目に従って判定した。これを 1 日 4 併行 4 日間くり返し、陽性判定結果とした。その結果から、各試料とも 4 個の陰性判定結果全てが陰性であり、16 個の陽性判定結果が全て陽性であった。全ての試料について 4 項目の判定基準を満たしたため、本分析法は試験方法として妥当であると考えられた。

開発した分析法を用いて、照射試料を対象に 2-アルキルシクロブタノンの分析を行った。照射は大阪府立大学にて行った。試料は市販の牛肉、豚肉及び鶏唐揚げを用いた。ガンマ線の照射線量は 2 種の線量を用いて照射を行った。ラジオクロミックフィルムの吸光度より算出した 2 種の照射線量は、各々 1.0 kGy 及び 2.6 kGy であった。試料はあらかじめ冷凍しておき、照射後に解凍し、フードプロセッサーを用いて均一化した。その後、分析法に従って操作を行い、生成した 2-アルキルシクロブタノンの定量を行った。その結果、非照射の牛肉、豚肉及び鶏唐揚げから 2-アルキルシクロブタノンは検出されなかった。また、全ての照射した牛肉、豚肉及び鶏唐揚げから 2-DCB 及び 2-TCB が検出された。併行数 3 で行った際の RSD は、1.0 kGy 照射の 2-DCB の 15% を除いて 10% 未満であり、良好な結果と考えられた。標準溶液、非照射牛肉、照射牛

肉のマスキロマトグラムから、放射線照射により生成した 2-アルキルシクロブタノンは照射線量依存的に増加することが確認できた。

1.2 均一性評価

照射された精度管理試料は調製後、直ちに本分析法を用いて照射試料間の均一性を評価した。18 個のハンバーグパテから無作為に 6 試料を抽出し、1 試料につき 2 併行で測定した。一元配置分散分析により、各々の 2-アルキルシクロブタノンの定量値から算出した分散比は F 境界値を下回った。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。

1.3 安定性評価

照射試料は、本分析法を用いて試験の実施期間における 2-アルキルシクロブタノンの安定性を評価した。発送前と試験期間終了時に照射 1 試料を無作為に抽出し、6 併行で測定した。発送前と試験期間終了時(約 2.5 ヶ月後)において測定値に大きな差は無く、全ての 2-アルキルシクロブタノンで、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。

1.4 添加回収試験

参加機関の添加回収試験結果から、平均回収率として 67~122% であったが、概ね精度管理試験の真度の判定区間である 70~120% の範囲であり、変動係数も全て 16% 未満、大半が 10% 未満であった。

1.5 外部精度管理試験

参加機関の外部精度管理試験結果より度数分布表を作成し、また \bar{X} -R 管理図を作成した。これを評価方法の基準で判定した。各試料の評価結果を以下に示す。

(1) 0.8 kGy 照射試料

2-DCB の目標値 62.2 ng/g に対し、8 機関の平均値は 58.1 ng/g であった。Xbar 管理図は C 機関が適正域を外れた。R 管理図は G 機関が適正域を外れた。2-TCB の目標値 84.3 ng/g に対し、8 機関の平均値は 79.7 ng/g であった。Xbar 管理図は 2 機関が適正域を外れた。R 管理図は G 機関が適正域を外れた。

(2) 2.0 kGy 照射試料

2-DCB の目標値 170 ng/g に対し、8 機関の平均値は 161 ng/g であった。Xbar 管理図は 2 機関が適正域を外れた。R 管理図は G 機関が適正域を外れた。2-TCB の目標値 236 ng/g に対し、8 機関の平均値は 239 ng/g であった。Xbar 管理図は 2 機関が適正域を外れた。R 管理図は全機関が適正域内であった。

1.6 照射履歴判定

参加機関の照射履歴判定結果から、全ての機関で全てのピークの S/N 比は 3 以上であり、2 つのモニターイオンのピーク面積比も標準品と比較して±20%の範囲内であった。主要イオンの判定では一部で 40%台が見られたが、50%は「目安」とされる目標値であり、それに準ずるものとして陽性と判定された。

2 中澤分担研究

予試験として、ビールの抽出・精製を行わずに PBS 希釈のみで ELISA による添加回収試験を行ったところ、高濃度 (100 ppb) においては「DON」および「RIDASCREEN® DON」のいずれのキットも平均回収率は 90%以上であり、精度管理試験においても、併行再現性および室内再現性は共に 15%以下と良

好な結果が得られた。「RIDASCREEN® DON」を使用した添加回収試験での平均回収率は、低濃度 (10 ppb) および高濃度 (100 ppb) のいずれも 90%以上であり、試料中の検出限界は 3 ng/mL と、高感度な微量分析が可能となった。また、精度管理試験でも併行再現性および室内再現性共に 25%以下と良好な結果が得られた。また、ELISA と同一試料を用いて GC/MS 法を検討した結果、IS を用いて良好な回収率が得られた。

3 斉藤分担研究

自家調製した ELISA プレート固相化用の CPA conjugate と市販品を比較検討した結果、自家調製した CPA conjugate は市販品と比べて感度的にも同等であることが確認されたので、本年度の研究においては、自家調製した CPA conjugate を用いて実験を行った。

ELISA の基本的操作条件は前年度に検討した内容に準拠し、ピーナッツ分析における添加回収試験を実施した。CPA 標準品 0.01 ng/mL~10000 ng/mL の範囲において、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、1 ng/mL~100 ng/mL の範囲で良好な直線性が得られた。また、試料溶液のシグモイド曲線も標準品とほぼ一致し、1 ng/mL~100 ng/mL の範囲でマトリックスの妨害を受けることなく、測定可能であることが示された。

構築した ELISA の妥当性を検証するために、添加回収試験 (試料中濃度 10 μg/g) 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、ELISA の検量線測定範囲の 1、10

および 100 ng/g の 3 点について平均回収率から真度の信頼性を検証したところ、1 ppb では低めの値 (56.3%) であったが、 IC_{50} 付近の 10ppb と検量線範囲上限の 100ppb では、69.3% および 95.0% と、ほぼ満足できる良好な値が得られた。これらの結果から、実試料での測定値については、10~100ppb の範囲で信頼性があることが確認された。

4 村山分担研究

GC/MS による定量の例として GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物) によるほうれんそう中のクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンを絶対検量線法およびマトリックス検量線法により定量した。測定対象農薬を含まないことを確認したほうれんそうに対して、各農薬それぞれを 0.02 ppm 相当添加回収した。また、マトリックス検量線法のマトリックス標準溶液は、試験溶液と同時に調製したマトリックス試験溶液と標準溶液を 1 : 1 で混合調製し、同じ検査員が異なる日時に実施した 2 回の試行の結果、絶対検量線法による回収率は 119~200% でありマトリックス効果によるレスポンスの増強を受けた。各農薬それぞれを 0.02 ppm 相当添加回収した試験溶液のクロマトグラム上では妨害ピークは認められないので、いわゆるマトリックス効果による影響であると考えられた。一方、マトリックス検量線法による回収率は 78~106% であり、レスポンスの増強は相殺されているが、試行 2 において回収率がいずれも 80% 以下になった。また、質量分析計以外の検出器を用いた例として炎光光度検出器付きガスクロマトグラフィー (GC-FPD) によるクロルピリホスの添加回収試験を行った。GC/MS

と同様に 0.02 ppm 相当添加したとき、異なる検査員が異なる日時に実施した結果、回収率は 94~105% の範囲内、RSD は 3.28% であり、回収率、再現性ともに良好であった。クロルピリホスを 0.02 ppm 相当添加回収した試験溶液のクロマトグラムは GC/MS と比較して、夾雑ピークおよびベースラインの変動が目立つが、いずれもクロルピリホスの定量を妨害しなかった。

サイクラミン酸は塩素処理誘導体化して HPLC-UV にて定量する方法が第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 に記載されているが、乾燥粉末食品等の一部では添加回収率が 0~30% 程度に低下する場合がある。このような場合には HPLC-UV に代わり LC/MS により定量することがあるが、マトリックス効果が現れやすい。そこで、標準溶液添加法について検討した。その結果、絶対検量線法によっても 80~90% の回収率が得られ、標準溶液添加法により回収率、再現性ともに向上した。20 ppm 標準添加試験溶液に 20 ppm 相当の標準溶液を 1 : 1 で混合した溶液のクロマトグラムで、妨害ピークは認められなかった。

5 渡辺分担研究

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、凍結融解の影響を検討したところ、SMX (2 回目 : 約 90%、3 回目 : 約 100%) および SQ (2 回目 : 約 98%、3 回目 : 約 120%) の 3 回目の上昇傾向の原因は、腐敗による夾雑物の影響と考えられた。また、カタ肉