

においては、SDZが2回目で約60%となり、他のサルファ剤と比較してやや低い安定性であった。3回目では、ヒレ肉同様腐敗が原因と考えられる回収率（濃度）の上昇傾向が4種のサルファ剤（SDZ、SMX、SDMXおよびSQ）に見られた。他6種のサルファ剤（SMR、SDD、SMPD、SMMX、SCPDおよびSIX）では3回までで80%以上の安定性があった。

牛肉試料（ヒレ肉）中の残留動物用医薬品の安定性を確認したところ、作製後における回収率は添加量の0.2 $\mu\text{g/g}$ に対し、約81~87%といずれも良好であり、これを100%として、冷蔵14日間の安定性を検討した。ヒレ肉では、SIXにおいて冷蔵7日後に顕著な減少が認められ、更に14日後には10%以下にまで減少し、安定性は認められなかった。その他9種のサルファ剤（SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SCPD、SMX、SDMXおよびSQ）においては7日後で約76~94%、14日後で約58~74%の安定性であり、やや減少傾向が認められた。また、2種の部位（ヒレ及びカタ）について、凍結融解に対する安定性を確認したところ、ヒレ肉においては、SMXおよびSQを除く8種のサルファ剤については、概ね凍結融解ごとに漸減傾向が認められたが、3回目までで85%以上と、良好な安定性であった。

漬物（大根漬け）中保存料（ソルビン酸）の長期冷蔵保存安定性を検討した結果、60日後までは94%以上の安定性が認められ、90日後で91%、135日後で86%と緩やかな減少傾向となったが、作製4ヶ月後で85%以上の安定性が確認できた。また、基材である漬物（大根漬け）およびソルビ

ン酸添加浸漬溶液について、浸漬比を変えて試料を作製し、回収率を確認した。その結果、基材/浸漬溶液=1:1、1:1.5および1:2（w/w）の回収率はそれぞれ96.7%、95.0%および94.1%となり、わずかではあるが、基材比率が高い程、回収率が良好となる結果が得られた。

これまで調査試料に用いてきた野菜ペーストに加えて、新たな基材として、玄米の適用性を検討した。玄米を4種の浸漬用溶媒（*n*-ヘキサン、アセトン、20%含水アセトンおよび酢酸エチル）に浸漬し、乾燥後粉砕した試料中の各農薬の回収率を確認した。その結果、各農薬の添加濃度（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 $\mu\text{g/g}$ ）に対し、各浸漬溶媒における回収率は、それぞれヘキサンでは47~91%、アセトンでは38~86%、20%含水アセトンでは62~95%、酢酸エチルでは53~97%となった。

重金属試験調査試料に用いるカドミウム添加玄米試料の混合に、ロッキングミキサー（RM-10G）を用いた結果、最も短時間の混合でも理論値の0.234 $\mu\text{g/g}$ に対し、変動係数2.4%の範囲で100%の回収率が得られた。

5.2 微生物学検査のための適性試料の作製検討：

セレウス菌検査用基材の作製では、*B. subtilis*を陰性対象菌として選択し、これを米飯基材に接種したときの、食塩濃度について検討した。自家調製した芽胞液を作製する際の食塩濃度を15%、20%および25%として、これを米飯基材に添加するこ

とにより調査試料を作製した。調査試料を7日間の冷蔵保存後に、引き続き冷蔵保存あるいは22.5℃、32.5℃にて保存したときの生菌数の変動について確認した。その結果、食塩濃度が15%のときには22.5℃以上の保存温度において、約3オーダーの増菌が認められたが、食塩濃度を20%以上とすることにより、接種した陰性対象菌は接種濃度とほぼ同等の菌数で接種後35日目まで推移した。同様に市販の芽胞液を同濃度の食塩存在下で米飯試料中の菌数変動を観察したところ、食塩濃度が20%以上のときに温度負荷に伴う増菌が99日目まで認められなかった。また、陽性対象菌を含めた安定性について確認した。すなわち、陽性対象菌では食塩濃度を15%、陰性対象菌では食塩濃度を20%としたとき、菌液添加後、22.5℃または32.5℃で42日間保存したときの菌数変動を確認した。その結果、いずれの温度条件下においても陽性対象菌、陰性対象菌ともに安定した菌数の推移を認めた。

ビブリオ属菌検査用調査試料では、基材中にナイシンを添加することによりグラム陽性菌の発育を阻害することが可能であるかについて検討した。すなわち、ナイシンを含む2%ゼラチン加 Marine broth を用いて試験菌液を調製し、これをこうや豆腐に添加することにより調査試料を作製した。これを室温で24時間放置した後、引き続き冷蔵保存したときの菌数測定を経日的に行った。グラム陽性菌としては *B. subtilis* および *S. aureus* を用いた。同様にビブリオ属菌に対する影響の有無についても検討した。その結果、いずれのグラム陽性菌に対してもナイシンの明らかな効果は認めら

れなかった。同様にビブリオ属菌に対しての影響も認められなかった。

ビブリオ属菌検査用調査試料では、これまでの検討においてこうや豆腐を用いることによりビブリオ属菌検査を安定して実施できる可能性を示唆したが、他の基材についても検討した。すなわち、黄色ブドウ球菌検査等においてこれまでに実績のあるマッシュポテト基材、大腸菌群検査等においてこれまでに実績のあるハンバーグ基材ならびに水産物であるまぐろ切り身を用いて、基材としての採用の可否について検討した。なお、マッシュポテト基材についてはビブリオ属菌の性質を考慮し、Marine broth を用いて作製した。これらの基材に対照菌を接種し、経日的に生残菌数について観察したところ、いずれの基材も7日以内に1オーダー以上の菌数減少が認められた。また、まぐろ切り身では菌液接種後の表面の観察も行ったが、経日的に著しい変化が認められた。さらにアルコール等で前処理したまぐろ切り身に接種した対象微生物について選択培地を用いた反応性について確認したところ、残存微生物による偽陽性が認められ、陽性対象菌であっても選択培地によっては陰性と判定されるものもあった。

平成24年度の外部精度管理調査の一般細菌数測定検査において、例年よりも大きな変動係数が認められたことに加え、低めの値を報告する検査機関が多かった。本年度に配布した調査試料は例年と同様の寒天状基材であり、寒天のロット差に基づく濃度のわずかな調整はあるものの、作製方法は変更していないが、当財団で実施した均一性確認試験における変動係数も大きかった。さらに、参加機関よりストマッカー袋

を変更して検査を実施したところ、得られた結果が異なった旨の報告を受けたことに伴い、6種のストマッカー袋を使用したときの調査試料中の一般細菌数測定検査を実施した。フィルターの材質やメッシュサイズがメーカーごとに異なるようであったが、詳細の情報は得られなかった。これらのストマッカー袋を用いることにより、最も回収率が高いものと比較して約40%の回収率に留まる製品もあった。

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：

共同試験試料の均一性及び安定性は、試験試料の卵タンパク質をモリナガ FASPEK 卵測定キット（モリナガキット）、FASTKIT エライザ Ver. II 卵（日本ハムキット）、アレルギーアイ ELISA 卵（プリマハムキット）の各キットを用いて測定した。均一性は、試料1、試料2、試料3のいずれも、3種類のキットによる測定結果のそれぞれについて、一元配置による分散分析で均一と判定された。しかし測定値は同一試料でもキットごとに差があった。特に日本ハムキットは試料1では卵タンパク質添加量に対する回収率が80%台と低かったのに対し、試料2では回収率が100%以上となり、試料1と試料2では添加量と測定値の関係が逆転する結果が得られた。

一方、各試料の測定期間終了後の測定値の、配付前の測定値に対する割合（安定性）は94.5～113.0%の範囲であった。

精度管理調査結果については、モリナガキットによる測定値は一部の機関を除き、いずれの試料でも報告値の分布範囲が狭く、機関間差が小さかった。一方、日本ハムキットによる報告値はモリナガキットに比べ

広範囲に分布しており、特に試料1で機関間の報告値のバラツキが大きく、相対標準偏差はモリナガキットの2倍の20%以上に達した。プリマハムキットは使用した機関が少なかったため、報告値のバラツキが他の2キットと比べて差があるかについては明らかではなかった。

モリナガキットを用い試料1を測定し、平均値および標準偏差を用いてzスコアを計算した結果、従来方式で全39機関の統計値から算出したzスコアでは、絶対値が2以上の機関は3機関、そのうち3以上は1機関であったが、2 σ 処理2回実施後では絶対値が2以上の機関が4機関、そのいずれも絶対値は3以上となった。また、ロバスト方式統計値では絶対値が2以上の機関は4機関、そのうち3以上の機関は3機関であった。試料2の場合、従来方式による全39機関の統計値から算出したzスコアでは、絶対値が2以上の機関は2機関、そのうち3以上は1機関であったが、2 σ 処理実施後の統計値では絶対値が2以上の機関は3機関、そのうち3以上が2機関となった。また、ロバスト方式統計値では、メジアンクリーニング実施のいかんにかかわらず、zスコアの絶対値が2以上の機関は3機関、そのうち3以上は2機関であった。また、試料3では、従来方式による全39機関の統計値から算出したzスコアでは、絶対値が2以上の機関は2機関、そのうち3以上は1機関であったが、2 σ 処理実施後では絶対値が2以上の機関が2機関でいずれも絶対値は3以上となった。また、ロバスト方式統計値では、メジアンクリーニング実施のいかんにかかわらず、絶対値が2以上の機関は2機関でいずれも絶対値は3以上であつ

た。

一方、日本ハムキットを用いて試料 1 を測定した結果、従来方式の統計およびロバスト方式統計から算出した z-スコアのいずれにおいても、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 1 機関で、3 以上となる機関はなかった。試料 2 では、従来方式による 31 機関の統計値から算出した z-スコアでは、絶対値が 2 以上の機関は 2 機関で 3 以上の機関はなかったが、 2σ 処理実施後では絶対値が 2 以上の機関が 2 機関、そのうち 3 以上は 1 機関となった。また、ロバスト方式統計値では絶対値が 2 以上の機関は 2 機関で 3 以上となる機関はなかった。試料 3 では、従来方式による 31 機関の統計値から算出した z-スコアでは、絶対値が 2 以上の機関は 1 機関で 3 以上の機関はなかったが、 2σ 処理実施後では絶対値が 2 以上の機関が 2 機関、そのうち 3 以上は 1 機関となった。ロバスト方式統計値による z-スコアでは絶対値が 2 以上の機関は 2 機関、そのうち 3 以上は 1 機関であった。

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：

外部精度管理の判定結果から、DAS59132 トウモロコシの検出に関しては全機関が陽性試料および陰性試料を正しく判定し、正答率は 100% だった。

調査結果の解析において、DNA 溶液試料は DNA 抽出および濃度調整の操作が含まれないため PCR 反応液に含まれる鋳型の量には機関間の差が少なく、Ct 値はほぼ一定になると予想される。このため、試料 A、試料 C については Ct 値をそのまま用いて解析した。試料 A および試料 C の統計解析結果のうち、ヒストグラムおよび正規確率プロ

ットを検討した結果、いずれの試料においてもひずみ、とがりは共に小さく、一部のデータを除いて正規分布に近い形状を示した。

試料 A の Xbar 管理図、z-スコア管理図では、機関番号 23、機関番号 30、機関番号 32 が、R-管理図では機関番号 8 が管理限界外の値となった。試料 C の Xbar 管理図、z-スコア管理図では、機関番号 23、機関番号 30 が、R-管理図では機関番号 8 が管理限界外の値となった。

D. 考察

1 尾花分担研究

1.1 2-アルキルシクロブタノン分析法の検討

2-アルキルシクロブタノン分析の基本的な操作は、脂肪抽出、脂質成分を除く精製、GC/MS 測定と 3 工程に大別される。現在厚生労働省から通知されている分析法は、脂肪抽出にソックスレー抽出法を用いるため、抽出に長時間を要すること、併行処理数がソックスレー装置に制限される等の問題点がある。さらに、精製方法として含水フロリジルを用いたオープンカラムを採用しているが、フロリジルを 550°C で 5 時間活性化したのち、水を加えて一晩放置という作製方法であるため、調製に長時間が必要であること、1 試料に必要な含水フロリジルの重量が 36 g と多量であり、併行処理数を増加させるのが困難であること等の問題点もあった。現在、他機関でも 2-アルキルシクロブタノンの分析法が検討されているが、脂肪抽出に高速溶媒抽出法 (ASE) や超臨界抽出法 (SFE) 等の方法を用いて抽出時間の短縮及び溶媒使用量の削減を図っている。

しかし、特殊な装置を用いる方法であるため、どの機関でも採用可能な方法ではなく、多検体を同時処理する精度管理試験方法には不向きであった。本研究では、上記のような分析法の問題点を解決すべく、簡便で迅速な2-アルキルシクロブタノン分析法の構築を行った。

抽出方法はn-ヘキサンによる振とう抽出を採用した。あらかじめ試料を珪藻土と混合することにより、試料中の水分が吸収され、試料のヘキサンへの浸透性が高まった。この方法により脂肪抽出に要する時間は、6検体で約2時間であり、ソックスレー抽出装置を用いた場合（約1日）と比較して時間が大幅に短縮された。

精製方法は、脱脂とカラム精製の2工程で行った。脱脂にはアセトンに溶解後アセトニトリルと混合することが効果的であったが、アセトニトリル含量が増加するにつれ回収率が低下する傾向が認められたため、アセトンとアセトニトリルの比を2:1とする条件とした。また、試料を冷凍することによってさらに脱脂効果が高まった。カラム精製においては、当初市販の固相カラムの使用を試みたが、妨害ピークが除去しきれないため、パストールピペットを超小型オープンカラムとして使用し、手製のシリカゲルカラムで行うこととした。手製であることの煩雑さは否定できないが、通知試験法と比較して活性化の必要性がないこと、安価であること、作製に特殊な器具が必要ないこと、容易に併行処理数を増加することが可能であること等の利点があった。また、精製から試験液の調製に要する時間も約6時間であった。これはフロリジルの活性化のみで約2日を必要とする通知法に比

べて迅速かつ簡便な方法であった。

構築した分析法を用いて、通知試験法に準じて性能評価試験のための室内精度管理試験を行った。その結果、判定項目すべてを満たした。そこで、他機関についても本方法を用いて、内部精度管理試験を実施した。即ち、非照射のハンバーグパテから脂質を抽出し、抽出した脂質に対し、2-DCB及び2-TCBを添加し、回収試験を行った。添加濃度は、室内精度管理試験と同じ50 ng/gとした。その結果、各機関の2-DCBの平均回収率は67~103%（中央値80%）、2-TCBの平均回収率は69~122%（中央値91%）であった。また、RSDもF機関の2-DCBの15.9%を除き10%以下であり、良好な結果と考えられた。以上のことから、今回検討した2-アルキルシクロブタノン分析法は、照射食品の検知法として有用であると考えられた。

1.2 照射試料調製

今回の照射履歴検知に使用する試料として、アルキルシクロブタノン類を添加した試料を調製することは、実際の照射試料と存在形態が異なるため採用しなかった。アルキルシクロブタノン類は脂質成分中に生成する物質であり、食品の脂質含有率、組成、また照射線量によって各アルキルシクロブタノン類の生成量も異なる。ガンマ線は試料の周囲より照射されるが、ガンマ線の当たり方は必ずしも均一でなく、一般的にコバルト線源に距離が近い部位は線量が高く、中心部は低くなると考えられる。本来ならば照射履歴は定性試験であり、必ずしも定量は必要でないが、過去にアルキルシクロブタノン類の分析で共同試験が行われたことがないこと、参加機関は分析経験

が無いこと等から、本試験では照射した試料を混合し、均一な試料を調製することにした。予備試験の結果では、フードプロセッサで細切した試料を攪拌機で混合しても、小分けした試料間のアルキルシクロブタノン類は均一でなかった。おそらくは試料の粘度が非常に高いため、攪拌機では十分に混和できなかつたと考えられた。そこで攪拌機使用後に手で細長く伸ばし、二つ折りする作業を10回以上繰り返し、最後に細長い状態で端から必要量ずつ小分けする作業を行った。これにより均一な試料が調製できた。

1.3 精度管理試験

参加機関のGC/MS測定条件と精製条件及び代表的なクロマトグラムから、各機関は大きな変更をせずに提示した分析法を使用し、測定条件も入手したシリカゲルの違いや所有する機器の差異にとどまっていることがわかった。8機関のうち、C機関は全ての測定値が最も小さかつたため、測定に関しての問題点を聞き取り調査した。原因は不明であるが内部標準のピーク強度が日によって大きく変動する例があつた。標準品のクロマトグラムと試料のクロマトグラムで強度が大きく異なり、GC/MS測定時に何らかの問題が発生したと考えられた。さらに添加回収試験の測定時には、試料中の2-アルキルシクロブタノンが添加濃度と同じ濃度の標準品に比べて、ピーク面積値で50%前後しかなく、内部標準の面積値は70%前後であつた。このため、何らかの理由で操作上の回収率が実際は50%であるところ、内部標準のピーク強度の変動で70%になった可能性が示唆された。外部精度管理試料測定時では、内部標準のピーク強度変化は

見られなかつたため、低い回収率での結果が得られたと考えられた。他に他機関と異なる点は、測定機器にGC/MS/MSを使用していたことがあり、タンデム型のMS/MSはイオン源から検出器までがシングル四重極のMSよりも距離が長く、SIM測定を行った場合は感度的に不利であることが要因と考えられた。

G機関はXbar管理図において3項目で最大値であり、R管理図においては常に最大値であり、また添加回収試験結果も最大値であつた。度数分布表においては2-TCBで極端に右端に離れて位置し、測定値がかさ上げされる傾向とそれが不安定である傾向が見られた。その要因として非照射試料でのブランクピークが報告されており、これにより定量値がかさ上げされた可能性が高かつた。しかし中央値との差が試料によって大きく異なるため、それ以外に何か別の要因があると考えられた。G機関が他機関と大きく異なる点は、大量注入に対応した仕様のGC/MSを使用していること、注入口の昇温を行っていることであつた。さらに聞き取り調査の結果、ヘキサン抽出液を濃縮した残渣重量が5併行間で差が大きく、複数の担当者で試験を行っていたため、濃縮度合いに差が出たと判断した。そこで重量の重い試料のみ乾燥器に入れる時間を延長して、残渣重量が近い値になるよう作業したと判明した。これらのうちいずれが明確な原因とは断定できないが、脂肪重量を変化させることは、脂肪当たり濃度の算出に大いに関わることであるため、少なくとも範囲が大きくなる原因であり、過度の加温による重量減少は濃度増加の要因と推察された。

照射履歴の判定については、全機関が誤回答なく照射された試料を陽性、非照射の試料を陰性と判定した。判定項目の主要イオン比については「50%を目安とする」となっており、機械的に50%で判定せず、50%に近い値をもって陽性と判定された。今回の照射線量は約0.8 kGy および約2 kGy であり、一般的に肉類で効果のある照射量の範囲であった。これらが問題なく判定されたことは、照射履歴の検知という観点では良好な結果であったと言える。

2 中澤分担研究

「DON」および「RIDASCREEN® DON」の IC_{50} 値の比較から、「RIDASCREEN® DON」がビール分析用のELISAとして、より高感度測定に適していることが分かった。しかし、低濃度(20 ppb)では回収率が悪く、バラツキも大きくなったため、前処理としてアセトニトリル抽出および多機能カラムによる試料精製法を検討した。その結果、PBS希釈のみで行うよりも低濃度での測定が可能となった。また、ELISAと同一試料を用いてGC/MS法を比較検討したところ、絶対検量線法により添加回収試験を行うと結果にバラツキが認められた。そこでISとして $^{13}C_{15}$ -DONを添加することにより、低濃度(10 ng/mL)、高濃度(100 ng/mL)共に平均回収率が100%に近い値が得られ、精度管理試験でも併行精度および室内再現精度は共に10%以下と良好な結果が得られた。

3 斉藤分担研究

ピーナッツの試料調製操作手順としては、平成22年度の報告と同様に、抽出にASEを採用した。実試料をELISAで分析した場合

のマトリック効果の影響について検討したところ、ASE抽出だけではクリーンアップが不十分であったため、Oasis® HLBを用いた固相抽出法を検討した。しかし、固形試料の場合、粉碎した際の微粒子が抽出液に移行して固相抽出カートリッジを目詰まりさせることがあったため、この問題点を克服するための方法として固相分散抽出法(SPDE; 参考資料: 日本法科学技術学会 第16回学術集会講演要旨集 p.36)を採用した。SPDEには固相抽出カートリッジOasis® HLBの充填剤(30mg)を用いた。その結果、SPDEでは抽出液が目詰まりすることなく、また、試料溶液で作製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ピーナッツの簡便な前処理法として、ASEとSPDEが有効であると考えられた。なお、ELISAに供する試験溶液としたメタノール-PBS混液中の、至適メタノール濃度については、前年度と同様に、メタノールが抗体に及ぼす影響を考慮し、低濃度の1%メタノールを採用した。

構築されたELISA法の分析法バリデーションにおいて、一元配置法により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3.3~5.6%といずれの測定ポイントとも良好であったが、室内再現精度は1ppbの測定ポイントでは140.9%と変動が大きくなったが、10ppbおよび100ppbでは39.7%および49.7%と、いずれも室内再現精度の相対標準偏差の数値としては若干高めであった。しかし、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。なお、ELISA 測定で用いた同一試料について、LC-UV により再測定を行い、同様に一元配置法で真度、併行精度および室内再現精度を求めたところ、真度(回収率)は 76.8%、併行精度は 3.9%、室内再現精度は 5.8%となり、ELISA と同様に添加回収率はやや低めであったものの、併行精度、室内再現精度のいずれも良好な結果が得られた。

4 村山分担研究

GC/MS によるマトリックス検量線法は検量線作成用標準溶液と、試験溶液のマトリックスの種類、濃度を等しくする事により、マトリックス効果の度合いを等しくして、定量精度を高める方法であるが、今回の結果より試験法の頑健性の程度により、同一試料から同時並行で抽出精製してもマトリックスに差が出る可能性が示唆された。

今回実施した標準溶液添加法のご概念は以下の様である。すなわち、サイクラミン酸を 20 ppm 相当含む試験溶液に対して、0、20、40 ppm 相当の標準溶液を 1 : 1 で混合した時、それぞれのレスポンスは $(20+0) / 2=10$ 、 $(20+20) / 2=20$ 、 $(20+40) / 2=30$ ppm 相当であることが期待されるので、回帰分析結果から $y=0$ に外挿することにより試験溶液中の濃度を求めることができる。マトリックス検量線法では先に述べたとおり、試験溶液と検量線作成用標準溶液のマトリックスはそれぞれ別に作成するため、試験法の頑健性の程度により、同一試料から同時並行で抽出精製してもマトリックスに差が出る可能性があるが、標準溶液添加法では試験溶液が均一である限りマトリックスに差が出る事はない。また、マト

リックス検量線用のマトリックスを別途調製する必要がない。標準溶液添加法では、試料数の増加に伴いクロマトグラフィーの測定回数が増加するが、人手を省ける上に、より正確な結果が得られる点で、標準溶液添加法はマトリックス検量線法より優れていることが確認された。

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：

残留農薬検査用調査試料として新たに採用した玄米の浸漬用溶媒として含水アセトンが最も良好な回収率を示したが、含水であることから試料作製に他の 3 溶媒に比べて溶媒留去時に突沸しやすいなど注意と時間を要するため、実試料作製には不適と判断した。他の 3 溶媒の中では、作業面、回収率および標準偏差の点から、酢酸エチルが最適と考えられた。また、農薬別では、いずれの浸漬溶媒でもマラチオンが他の農薬に比べて低い回収率であった(47~63%)。また、テルブホスはいずれの浸漬溶媒においても他の農薬と比べて標準偏差が大きかった(3~17%)。なお、作製に用いた玄米は予めクロマトグラムについて、添加農薬の測定を妨害するピークは認められないことを確認した。浸漬用溶媒に酢酸エチルを選択し、10 回繰り返し作製で得られた 10 バッチの試料間の均一性を検討した。一元配置の分散分析の結果、いずれの農薬においても F 値は F 境界値より大きく、均一性は得られなかった。今後は、ロッキングミキサーを用いて混合し、均一性を確認するとともに、冷蔵保存安定性を検討することが必要であると考

えられた。

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定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、定量検査を実施するうえでの菌数変動の安定性をより高いものとし、輸送温度帯が指定した範囲を超えた場合にも安定した菌数が得られることを目的として、これまでにこれらの見解が得られていない陰性対象菌を用いて調査試料の作製条件について検討した。自家調製した芽胞液を基材に添加する際の食塩濃度を15～25%とし、温度負荷を与えた場合、食塩濃度が20%以上のときに陰性対象菌においても温度負荷による接種菌の増殖は認められなかった。これは市販の芽胞液を用いたときも同様であった。このことから、陽性対象菌、陰性対象菌のいずれも基材に添加する際の食塩濃度を20%以上とすることで、温度負荷に対しても極めて安定な基材を作製できたと考えられた。微生物検査において、検査対象となる微生物が保存条件等により増殖することもあれば死滅することもするという性質

上、安定した結果を得られるように定量検査を実施することは非常に難しい。これをセレウス菌検査用調査試料では芽胞を用いることで安定性を確保することができたが、外部精度管理調査試料は各検査機関に配布することにより検査が実施されるので、輸送の影響も加味しなければならない。そのため、今回冷蔵保存後の温度負荷によっても菌数変動のほとんどない調査試料を作製することができたことは、輸送時の温度逸脱があった場合においても検査実施に影響を与えないことを示すことから、非常に意義があると思われる。

ビブリオ属菌では、こうや豆腐を基材として確立したが、こうや豆腐は乾物であるがゆえに、*Bacillus* 属といったグラム陽性菌が存在している可能性が高い。そのため、基材を滅菌する際に、芽胞として残存する可能性も否定できないことから、グラム陽性菌に対して選択的に作用すると考えられるナイシンの効果を確認することは、作業効率、あるいは最終的にビブリオ属菌のみが基材中に存在している状況を作り出すために有効な手段であると考えられる。そこで、基材にビブリオ属菌あるいはグラム陽性菌を添加する際に、ナイシンを含有するMarine brothを添加したときの添加菌の挙動を確認したところ、ビブリオ属菌の増殖に対して影響を及ぼすことはなかったが、使用したグラム陽性菌のいずれもナイシンを添加することによっても添加菌の減少は認められなかった。このことから、こうや豆腐基材を用いる際に混入の可能性があるグラム陽性菌をコントロールするという目的のためにはナイシンは不適切であると考えられた。また、ビブリオ属菌は魚介類に

多く存在することが知られているが、魚介類は滅菌することができないことから、基材として採用するためには、いくつかのステップを経て決定する必要がある。そのため、これまでに外部精度管理調査試料として確立したマッシュポテトやハンバーグが基材として適応できるのか否かについて確認した。また、魚介類のひとつとしてまぐろ切り身を用いて、ビブリオ属菌検査用調査試料としての採用の可能性について検討した。しかしながら、いずれも対象菌を添加してから1週間以内に1オーダー以上の添加菌の減少が認められ、かつまぐろ切り身においては基材の著しい変質も認められた。さらに、まぐろ切り身において選択培地による反応性を確認したところ、基材中にもともと存在していた微生物種が偽陽性を示すこと、ならびに陽性対象菌を接種したにも関わらず陰性と判定されることがあった。このことは、基材中のビブリオ属菌以外の混入があった場合には、検査結果に対して影響を及ぼす可能性が高いことが考えられた。陽性対象菌を接種したにも関わらず陰性の可能性が示唆されたことは、他の微生物種との増菌率の相違により、添加した陽性対象菌の検出に影響を及ぼした可能性も考えられた。

このことから、今回使用した3種の基材はビブリオ属菌検査を実施するうえでは不適切であると考えられた。外部精度管理調査試料として採用するためには、少なくとも1か月以上、定性検査を行う上で必要な菌数が基材中で残存していなければならない。そのため、今後も引き続いて対象菌の安定化を図るため、添加剤や基材との相性等について検討する必要があるものと考え

られた。一般的にビブリオ属菌は冷蔵保存時の安定性が低いことから、冷凍など保存条件の異なる状況での検討も必要かもしれない。

また、一般細菌数測定検査では平成24年度の外部精度管理調査結果を踏まえて、ストマッカー袋のメーカーごとの検査結果について比較検討した。その結果、最も低い回収率が得られたストマッカー袋での菌数測定結果は、最も高かった回収率に対して約40%の値を示した。通常ストマッカー袋のフィルターは、検査対象物の表面に付着している微生物をストマッカー処理することにより希釈溶液中に懸濁させ、フィルターを通して菌濃度を平衡化し、これに検査対象物の残渣をフィルターの内側に移行させないことを目的として採用されている。外部精度管理調査における一般細菌数測定用調査試料は、溶解した寒天基材中に *B. subtilis* 芽胞液を添加した後に固化させることにより作製している。すなわち、ストマッカー処理後に残存した寒天粒子中に芽胞液の一部が取り込まれた状態となる可能性がある。そのため、残存した粒子が一部のストマッカー袋のフィルターを通過できなかったために、差が認められた可能性が考えられた。

5.3 アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製：

モリナガキットのELISA測定の併行精度を、併行実施した3ウェルの吸光度の相対標準偏差を指標として検討した。検量線用標準液の測定における相対標準偏差を、濃い方から5濃度についてまとめた。機関番号28は5濃度中4濃度で相対標準偏差が

15%を超え、併行精度が著しく不良だった。また、機関番号 17、18、29 では 5 濃度中 3 濃度以上で相対標準偏差が 5%を超え、機関番号 9、17、21、27 においては、10%を超える測定が認められるなど、併行精度に問題がある機関が散見された。試料測定における併行精度は、併行実施した 3 ウェル相対標準偏差の試料ごとの平均値を用いて検討した。その結果、機関番号 17 は 3 試料とも、機関番号 29、30、38 では 3 試料中 2 試料で相対標準偏差が 5%を超え、併行精度に問題がある可能性が示唆された。モリナガキットを用いた精度管理試料の測定において、いずれかの統計で少なくとも 1 試料の z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関は、5 機関あった。このうち機関番号 6 および機関番号 28 は全試料で z-スコアの絶対値が 2 以上となった。機関番号 28 は、検量線 7 濃度のうち 5 濃度で相対標準偏差が 15%以上と ELISA の併行精度が悪く、検量線が正しく設定できていない可能性が考えられ、これが定量値に影響したものと考えられた。機関番号 6 の併行精度は良好で、検量線の吸光度も他の機関と同程度であった。また、当該機関は日本ハムキットによる測定にも参加しているが、日本ハムキットのデータは良好であるため、モリナガキット測定の際、試料の希釈を誤った可能性が高いと考えられた。機関番号 34 は、試料 1 で z-スコアが 2 以上で、さらに R 管理図でも管理限界を超えていた。しかし、ELISA 測定の併行精度は良好であったため、試料のサンプリングに問題があった可能性が考えられた。試料 2 で z-スコアが 2 以上となった機関番号 18 については検量線の併行精度に若干問題が認められたため、これが

測定値に影響した可能性が考えられた。しかし、試料 1 で z-スコアが -2 以下となった機関番号 16 についてはその原因は明らかではなかった。このほか、機関番号 11 は試料 2 の R が管理限界を超えた。当該機関は日本ハムキットによる試料 2 の測定でも R が管理限界を超えており、試料 2 のサンプリングに問題があったものと考えられた。

日本ハムキットの ELISA 測定の併行精度を、併行実施した 3 ウェルの吸光度の相対標準偏差を指標として検討した。検量線用標準液の測定における相対標準偏差を、濃い方から 5 濃度についてまとめた。機関番号 2、6、9、27、30 では 5 濃度中 3 濃度で相対標準偏差が 5%を超え、併行精度に問題がある可能性が示唆された。試料測定における併行精度は、併行実施した 3 ウェルの相対標準偏差の試料ごとの平均値を用いて検討した。その結果、機関番号 14 は 3 試料中 2 試料で相対標準偏差が 5%を超え(うち 1 試料は 10%以上)、併行精度に問題がある可能性が示された。日本ハムキットを用いた精度管理試料の測定において、いずれかの統計で少なくとも 1 試料の z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関は、3 機関であった。このうち機関番号 14 は試料 1 および試料 2 で z-スコアが -2 以下となった。当該機関はモリナガキットによる測定にも参加しているが、モリナガキットの測定結果に比べ、試料 1、試料 2 の測定の相対標準偏差が大きく、併行精度が結果に影響した可能性が考えられた。機関番号 19 は試料 2 および試料 3 で z-スコアが 2 以上となったほか、試料 3 では R 管理図でも管理限界を超えた。また、試料 2 の 2 併行の測定値の差 R は管理限界を超えてはいないものの

比較的大きかった。一方 ELISA 測定の併行精度はそれ程悪くないため、試料のサンプリングに問題があった可能性が考えられた。機関番号 9 は、試料 3 で z-スコアが 2 以上となった。当該機関は検量線の併行精度に若干問題が認められたため、これが測定値に影響した可能性が考えられた。

モリナガキット、日本ハムキットの両キットを用いて測定した 28 機関のうち、モリナガキットで 2σ 処理の対象となった 1 機関を除く 27 機関について試料ごとに相関性を検討した。いずれも中位～低位の相関に留まり、試料 3 を除き、同一キット内の試料間の相関に比べて相関係数が低く、ELISA 測定値に対する検量線の影響が大きいことが推察された。また、低いながらも相関性が認められることから、共通操作である、抽出、ピペット操作、プレートの洗浄操作、プレートリーダーの位置調整などの参加機関に特有な測定誤差の影響が否定できないことも示唆された。

各参加機関が使用した検査手法をまとめると、プレートの洗浄はウォッシャーを使用した機関とそれ以外の機関数が共に 21 機関であった。なお、検量線の併行精度に問題が認められた、機関番号 9、17、18、21、27、28、29 はいずれもウォッシャーを使用していたことから、これらの機関ではウォッシャーが適正に使用されていない可能性も考えられた。ELISA 計算ソフトウェアは通知通り 4-パラメーター解析 (4PL) を使用した機関が最も多く 30 機関であった。また、平成 21 年度報告書で問題を指摘し、平成 23 年 10 月 23 日、消費者庁食品表示課から業務連絡が発出されているソフトウェア (マイクロプレートマネージャー

Ver. 5) を使用した 9 機関は、全て業務連絡に従って 5-パラメーター (5PL) 解析を実施していた。一方、通知とは異なり、4 次多項式を使用した機関が 3 機関あった。このうち 2 機関は ELISA 解析専用ではないソフトウェアを使用していると考えられ、試料の濃度によっては 4PL により再解析した結果と乖離が認められた。このほか、ろ過の有無、ELISA 試薬の添加方法、抽出液の保存期間、試料溶液の分注時間、操作中の室温に関しては測定結果への影響は明らかではなかった。

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：

定性試験では検出下限付近のコピー数を含む試料の測定結果において、検出の有無は確率の問題となるため、正しく判定するためには繰り返しの数を多く設定する必要がある。しかし、通知法では繰り返しの数が指定されており、外部精度管理調査では試料の濃度を検出下限付近に設定すると陰性だった場合、結果の解釈が難しくなると考えられた。このため、平成 23 年度の外部精度管理調査試料は検出下限付近の濃度設定を避け、低濃度試料でも検出下限の 10 倍以上の濃度とした。このため、陽性試料に関しては難易度が低くなり、結果として正答率は全試料とも 100% となった。従って、判定結果のみから参加機関の検出感度を確認することは困難であった。

粉末試料でも、PCR 測定に供する DNA 溶液の濃度は同じであるが、これには抽出および濃度調整による機関間差が含まれてくるため、PCR 反応の Ct 値が DNA 溶液試料に比べてばらつくことが予想された。しかし、

DNA 濃度の誤差は、同じ DNA 溶液を試料とするトウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値に同程度の誤差として現れると考えられるため、両者の差を解析することにより、DNA 濃度の誤差を補正できる可能性が考えられた。まず、試料 2 のトウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施し、ヒストグラムおよび正規確率プロットを検討した。その結果、いずれの試験においてもひずみ、とがりは小さかったが、データの分布は右側に裾を引いた形となった。DNA 抽出のばらつきの指標となると考えられる R-管理図では機関番号 11 が両試験で、機関番号 1 および機関番号 23 がいずれか一方の試験で管理限界外の値となり、これらの機関では DNA の 2 抽出間の再現性が悪かったことが明らかになった。次に、DAS59132 検出用試験と、トウモロコシ陽性対照用試験の Ct 値の差を求め、この差について統計解析を実施した。ヒストグラムおよび正規確率プロットを検討した結果、Ct 値をそのまま用いた場合に比べて、ひずみ、とがりが小さくなり、グラフの形状が正規分布に近づいた。また、R-管理図で管理限界外の値となったのは機関番号 1 のみで、機関番号 11 および機関番号 23 では DNA 抽出のばらつきを相殺できたと考えられた。機関番号 1 は Ct 値のばらつきが大きいのは DAS59132 検出用試験のみであり、ばらつきの原因が DNA 抽出以外にあることが明らかになった。試料 2 の Ct 値をそのまま統計処理した z-スコア管理図では、機関番号 14 および機関番号 23 が、トウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験で共に z-スコアが 2 を超え、抽出

DNA 溶液の濃度が薄かった可能性が示された。一方、Ct 値の差を用いた z-スコア管理図では、機関番号 14 および機関番号 23 のいずれも z-スコアは 2 以内となり、PCR 測定には問題がないことが示された。また、Ct 値の差を用いた z-スコア管理図で絶対値が 2 を超えた機関番号 13 および機関番号 20 は、Ct 値をそのまま統計処理した場合には z-スコアは 2 以内と問題はなく、トウモロコシ陽性対照用試験または DAS59132 検出用試験のいずれかの PCR 測定に問題があった可能性が考えられたが、原因は不明であった。

E. 結論

1 尾花分担研究

今回提示したアルキルシクロブタノンの分析法は通知試験法よりも簡便であり、全機関が初めて行う試験でありながら、試料と標準品を受領してから結果を報告するまで約 2.5 ヶ月という短期間で使用できたことから、汎用性が高く有用であると考えられた。外部精度管理試験は、Xbar-R 管理図では一部管理限界を超える報告値があったが、原因がある程度予測されるものもあり、試験法自体に問題があるとは考え難かった。本来の照射履歴検知は定性が最重要であり、未知試料 3 種の組合せで、全機関が誤回答なく判定できたことから、全体として良好な結果が得られたと考えられる。

2 中澤分担研究

本研究結果から、ビールの前処理法を再検討することによって、スクリーニング法としての ELISA の有用性が確認され、更に、GC/MS 法を併用することで高感度且つ高精度な定性・定量性が確保された。

3 齊藤分担研究

本法は、CPA 汚染が危惧される食品(ピーナッツ)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

1. GC/MS によるクロルピリホス等の定量においては、GC-FPD によるクロルピリホス個別試験法と比べて定量精度、再現性ともに劣っていた。GC/MS においては、絶対検量線法による回収率が 119~200%であったが、マトリックス検量線法による回収率は 78~106%であり、厚生労働省が示している精度管理ガイドライン(平成 9 年 4 月 1 日)、試験法妥当性評価ガイドライン(平成 22 年 12 月 24 日)に規定されている真度 70~120%の範囲内であった。

2. LC/MS によるサイクラミン酸の定量は食品衛生法においては、標準溶液添加法により簡便かつ高精度に定量を行う事ができた。標準溶液添加法は人手を省ける上に、より正確な結果が得られる点で、マトリックス検量線法より優れていた。

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：

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同等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。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料を作製することを目的とし、実分析をふまえた調査試料の

作製を検討し、以下の結論を得た。

残留動物用医薬品では、新たな基材として作製検討をした牛肉試料は、ヒレ肉においては SIX を除く添加したサルファ剤について冷蔵保存 7 日後までは概ね良好な安定性が得られた。凍結融解安定性についても、ヒレ肉、カタ肉ともに 3 回目で一部のサルファ剤に見かけ上回収率が上がる傾向があったが、基準値がある SDD についてはいずれの基材でも 80%以上の安定性があり、調査試料としての適用の可能性があると考えられた。

食品添加物検査調査試料では、漬物(大根漬け)を基材としたソルビン酸の長期安定性を確認した。その結果、作製後 60 日間は良好な安定性であり、その後緩やかに減少する傾向が認められたが、作製後約 135 日でも 85%以上の安定性が確認できた。また、基材対浸漬溶液比では、1:1 が最も理論値に近い濃度となり、添加濃度コントロールの点からも最も適していると考えられた。

残留農薬検査に関する調査試料では、新たな基材として玄米の適用の可能性について、5 種の農薬を添加して検討した。試料作製には浸漬溶媒に酢酸エチルが適していると考えられたが、一部の農薬で回収率やばらつきに問題があった。

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陰性対象菌につ

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、基材作製溶液中の食塩濃度を20%以上とすることにより、22.5℃あるいは32.5℃で保存した場合においても安定した菌数を認めた。このことより、食塩濃度を20%とすることにより、陽性対象菌および陰性対象菌の両者において温度変化に強い安定な調査試料を作製することができたものと判断した。

一方、ビブリオ属菌ではこうや豆腐以外の基材についても検討するべく、外部精度管理調査において既実績のあるマッシュポテト、ハンバーグおよび魚介製品としてまぐろ切り身を用いて検討したが、いずれの基材も添加菌を安定して回収することができなかったことから、これらの基材については調査試料の候補として採用することは現状では難しいものと判断した。ビブリオ属菌は一般的に冷蔵保存においても安定性を確保することが難しいことから、冷凍保存といった別の温度帯での保存を含めて検討する必要があるものと考えられた。また、こうや豆腐基材のより確実な作製を行うために、グラム陽性菌の増殖抑制を目的としてナイシンの効果について検討したが、ビブリオ属菌に対して影響を与えなかったことに加え、グラム陽性菌に対しても顕著な効果は認められず、ナイシンを添加することの意義を見出すには至らなかった。

さらに、平成24年度の一般細菌数測定検査に関する外部精度管理調査において、例年と比較すると大きな変動係数が得られたことに伴い、その原因について検討したところ、ストマッカー袋のメーカーにより大きな差異が生じることが明らかとなった。今後、ストマッカー袋のメーカー間の詳細

なデータについて把握するため、様々な基材中に微生物を添加することによっても同様の差異が認められるのかについて検討する必要があるものと考えられた。これにより、一般細菌数測定検査におけるより一層の検査精度の向上に貢献できるものと思われる。さらには、回収菌数のばらつきが少ない調査試料を作製するため、基材の構成成分について改良する必要性を示唆した。

5.3 アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製：

卵添加試料を用いて外部精度管理調査を試験的に実施した。実施に先立って行った事前調査では案内状を送付した73機関のうち半数を超える42機関が参加を申し込み、特定原材料検査の外部精度管理に対する需要が大きいことが明らかになった。しかし、現行の人員および機材では1試料につき100検体の作製が限度である。今後、広く外部精度管理を実施するためには、試料の調製規模をさらに拡大するため、人員および機材の拡充を図る必要があることが明らかになった。

調製した試料は均一性および試験期間内の安定性が確認され、プロトコールおよび試料の配布、報告書の回収に関しては特に問題は認められなかった。

また、卵タンパク質の測定結果はいくつかの機関を除いておおむね適正と考えられたが、ELISAの吸光度の相対標準偏差が著しく大きい機関がいくつか認められ、これらの機関ではピペット注入精度、プレートの洗浄操作、プレートリーダーの位置調整等について再度確認する必要があると考えられた。

さらに、ELISA解析ソフトウェアに通知

に指定されている 4PL 解析（マイクロプレートマネージャー Ver. 5 の 5PL を除く）以外の解析法を使用している機関があることが判明し、試料の濃度によっては 4PL により再解析した結果と乖離が認められたことから、適切な ELISA 解析ソフトウェアを用意することが必要と考えられた。

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 C の DAS59132 検出用試験の Ct 値のヒストグラム、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、粉末試料では、Ct 値をそのまま用いてヒストグラム、正規確率プロットを作成した結果、形状が正規分布とは多少異なっていた。トウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値の差を用いることにより DNA 濃度の誤差の補正を試みた結果、ヒストグラム、正規確率プロットの形状はより正規分布に近くなった。また、Ct 値をそのまま解析した時、z-スコアが 2 以上であった機関は、いずれも 2 未満となり、限界外の値となった原因が、DNA 濃度にあったことが確認できた。

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 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 24 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

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
分担研究者	尾花裕孝	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	菅原隆志	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
	古田雅一	大阪府立大学
	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
	柿本 葉	大阪府立公衆衛生研究所
	山口聡子	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

【背景・目的】冷凍ギョーザ中毒事例以降、加工食品中の安全性についての社会的な関心が高い。アジアを含む諸外国では食品の殺菌等を目的に、国内で禁止されている食品の放射線照射が実施されている。香辛料等農産物については検疫所で検査されているが、その加工食品については対象とされていない。本研究は、加工食品の原材料照射の検知において、アルキルシクロブタノン類を検知指標として選び、照射の有無を確実に区別できる精度管理体制の構築を目的とする。そのために簡便かつ精度が高い分析法を開発し、地方衛生研究所の協力を得て外部精度管理試験を実施する。

【分析法開発】2-アルキルシクロブタノンは、脂肪成分に放射線を照射した時に特異的に生成する物質である。2-アルキルシクロブタノン分析は、脂肪抽出、脂質成分を除く精製、GC/MS 測定 of 3 工程に大別される。厚労省通知試験法は脂肪抽出の操作に長時間を要し、脱脂などの精製も時間を要する。そのため本研究のような多数の検体を同時処理する精度管理試験には不向きであり、研究の必要条件を満たす分析法を構築する必要があったので、まず独自の 2-アルキルシクロブタノン分析法を開発した。脂肪抽出では、試料への溶媒で

あるヘキサンの浸透性を高めるために、試料と珪藻土をよく混合し試料の水分を除いて振とう抽出する方法を構築し、迅速性、簡便性、効率性を満たすことができた。精製は2段階とし、脂肪抽出液を-20℃に冷やすことにより穏やかに大部分の脂肪を沈殿除去した。さらにシリカゲルカラムにより精製し、GC-MS測定妨害となる成分を除いた。開発した分析法を、一般的な添加回収試験及び通知試験法に従い妥当性を評価した結果、良好な結果が得られた。さらにガンマ線を照射した牛肉、豚肉や鶏唐揚げ試料を分析したところ、線量依存的に2-アルキルシクロブタノンの生成を確認し、検知法として実用性が高いことを確認した。

【外部精度管理試験】8機関の地方衛生研究所の協力を得て、外部精度管理試験を実施した。対象食品は加熱前状態のハンバーグパテを使用し、陽性試料は大阪府立大学の放射線照射施設で2種を作製した。これと非照射の陰性試料の合計3種を、食用タール色素で着色の上、外部精度管理試料とした。参加機関は3種の試料を提示した分析法を用いて試験し、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)の脂肪当たり濃度と、照射履歴の陽性または陰性の判定を行った。参加機関が同時に行った添加回収試験結果は、67~122%と概ね良好であった。各機関より報告された2-アルキルシクロブタノン類の測定値については、 \bar{X} -R管理図により平均値と範囲を評価した。 \bar{X} 管理図では中央値を目標値としたが、8機関の平均値もその93~102%の範囲内であった。8機関中3機関が1項目以上で管理限界を超えた。内訳は1機関が平均値で1項目のみ、1機関は平均値で4項目全て、1機関は平均値で2項目と範囲で3項目であった。しかし、照射履歴の判定に関しては、全ての機関で適正な回答を得た。

【結論】食品照射検知を全く経験したことがない各機関が実施した外部評価精度管理試験においても、誤検知などが全く無い結果を得ることができたことから、開発した照射検知法は高精度であるだけでなく、実用性も極めて高いと判断できる。安定性に問題が少ない化学物質を検知指標としたことにより、原材料を加熱調理した加工食品においても、放射線照射検知の精度管理体制の基礎を構築できた。

A. 研究目的

食の安全確保において重要課題である食中毒の多くは、微生物に汚染された食品を摂食することによる。食品の生産・流通における微生物管理手法として食品照射が優れた手段であることは、食品照射を実施している諸外国で実証されている。日本ではジャガイモの発芽抑制以外には食品照射は認められておらず、諸外国で照射された食品については輸入することができない。その検証のために、国は照射食品の検知法

を通知し、検疫所などでは通知法を用いて監視しているが、加熱調理や混合していない単品の農畜水産物を念頭にした検査法であるために、多種類の食品が混在し、複雑な調理過程を経た加工食品に関しては検査態勢の有効性や頑健性が検証されていない。諸外国で照射実績が最も多いのは香辛料であり、その公定分析法として熱ルミネセンス法(TL法)が定められている。この方法は、食品に付着する鉱物質に残る照射エネルギーを、鉱物質の加熱により発光現象

として検出する方法である。TL法は非加熱の単一食品には適用できる手法であるが、多くの加工食品のように、製造工程で加熱調理を含み、複合原材料が混在する場合には適用しにくい検査法である。他に照射によって食品中に生じるラジカルを検出する核磁気共鳴法（ESR法）もあるが、この方法も加熱によりラジカルが分解消滅する可能性が高い。一方放射線照射特異的に生成する化学物質を検知指標にする2-アルキルシクロブタノン法は、一般的な加熱調理の温度では2-アルキルシクロブタノン類が分解しないことが確認されており、加工食品を対象とした食品照射検知の指標としては優れている。そこで本研究では、2種類の2-アルキルシクロブタノン類を照射検知の指標として選び、加工食品を対象とした照射検知の精度管理体制の構築を目的に研究を実施する。

2-アルキルシクロブタノンは放射線照射によって生じるラジカル反応を経て、脂肪成分から照射特異的に生じ、前駆脂肪酸の側鎖に応じた構造を示す（図1）。2-アルキルシクロブタノンは脂肪を起源とするために、多くの動物性食品の照射検知に向いている。農産物でも比較的脂肪の多いナッツなど種実類、玄米、豆類などでの分析例がある。2-アルキルシクロブタノンが食品照射の検知指標として優れているのは、日常環境中には存在しない物質であるため、試料ブランク値を考える必要が無く、分析的に2-アルキルシクロブタノンを検出したと判断できれば、その試料は放射線照射を受けたと判断できることである。TL法やESR法では非照射食品においてもブランク値が検出されるために、照射検知の判断に

はカットオフ値の設定が必要である。2-アルキルシクロブタノンは他の照射検知指標に比べ、行政処分などが必要な場合の科学的根拠としての優位性が高い。食品中の2-アルキルシクロブタノン分析の基本的な操作は、脂肪抽出、脂質成分を除く精製、GC-MS測定の3工程に大別される。これらの工程は動物性食品中の農薬や汚染物の分析法と基本的に同じ手順であり、これらを日常的に行っている衛生研究所など食品の衛生検査機関にはなじみ深い分析法である。本研究では8カ所の衛生研究所の参加を得て、外部精度管理試験を実施するが、日常業務で蓄えた知識や技術を応用的に検証するには、非常に適した事例であると考えられる。

2-アルキルシクロブタノン分析の精度管理については、欧州の公定法であるEN1785の妥当性評価の一環として、鶏肉、豚肉、鮭、チーズに照射して外部精度管理試験が実施されている。厚生労働省もEN1785に準じた方法を2-アルキルシクロブタノンの通知試験法として採用している。しかし、複数の食品が混在する、或いは、加熱調理された加工食品を用いた外部精度管理試験は実施された例がない。

本研究では、検査精度、簡便性、及び頑健性が優れた独自の2-アルキルシクロブタノン分析法を開発し、室内試験による妥当性評価を実施する。さらに外部精度管理試験を実施することにより、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、加工食品中を対象に放射線照射検知の精度管理体制を構築する。本年度は以下の研究課題を検討した。

1. 公定分析法とは異なった観点から、迅速性、簡便性、頑健性に優れた加工食品中