

2013.2700/A

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25年度  
総括・分担報告書

### ■主任研究者

一般財団法人 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

齊 藤 貢 一

公益社団法人 日本食品衛生協会

村 山 三 徳

独立行政法人 産業技術総合研究所

鎗 田 孝

一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

渡 辺 卓 穂

平成26年(2014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25年度  
総括・分担報告書

■主任研究者

一般財団法人 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 齊 藤 貢 一

公益社団法人 日本食品衛生協会 村 山 三 徳

独立行政法人 産業技術総合研究所 鎗 田 孝

一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 渡 辺 卓 穂

平成26年(2014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	39
尾花 裕孝	
2. 食品中に残留するマイコトキシンの汚染実態と精度管理体制の構築に関する研究	81
斉藤 貢一	
3. 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	93
村山 三徳	
4. 外部精度管理調査試料の高信頼性分析に関する研究	119
鎗田 孝	
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	133
渡辺 卓穂	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	193
IV. 研究成果の刊行物・別刷	197

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 25 年度 総括研究報告書

主任研究者 小島 幸一

平成 26 年(2014 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 一般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

輸入食品の急増や流通食品の増加が進む中、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性があり、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する。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の汚染実態と精度管理体制の構築に関する研究（斉藤分担研究）、3. 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）、4. 外部精度管理調査試料の高信頼性分析に関する研究（鎗田分担研究）、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）、斉藤貢一（星薬科大学教授）、村山三徳（(公社)日本食品衛生協会食品衛生研究所化学試験部第一課長）、鎗田孝（(独)産業技術総合研究所上級主任研究員）、渡辺卓穂（(一財)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す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ノン分析法を用いた外部精度管理試験及び照射判定試験を実施した。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。常温長期保存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。外部精度管理試験は、参加機関の分析精度を調査し、常温長期保存試料と同様に照射履歴を判定し、照射検知の有効性を評価した。

ガンマ線照射は大阪府立大学にて行った。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、水面上より照射する試料を入れた容器を鎖で吊して沈め、一定時間線源容器内で放置することで照射を行った。線源容器は中央に試料容器を入れる空洞があり、周囲に棒状コバルト 60 線源を格納した。コバルト線源は照射線量率 (kGy/時間) が算出されているが、検証のために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。ラジオクロミックフィルムはナイロンフィルムに放射線照射により青く変色する色素 (hydroxyethyl pararosanine -CN) を混入したもので、照射後のフィルムの着色度を分光光度計で評価するものである。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。

常温長期保存試料として、レトルト牛丼 (約 180 g/個) を常温条件下でガンマ線照射を行った。当初予定していた照射線量は、1 kGy、2 kGy、3 kGy および 5 kGy の 4 線量であった。3 kGy を除く 3 線量については、各線量につき 8 個を 1 回で照射を行い、

3 kGy については、40 個を 2 回に分けて照射した。ラジオクロミックフィルムの吸光度より算出された平均照射線量は、0.6 kGy、1.9 kGy、2.7 kGy、4.5 kGy であった。照射の判別のため、照射レトルト牛丼 (2.7 kGy) には青シール、非照射レトルト牛丼には赤シールをそれぞれ貼付し、分析に使用するまで室温で保管した。

米国などで牛肉の殺菌目的で使用される線量は 1~2 kGy であり、それに比べると高い線量であるが、保存中に 2-アルキルシクロブタノンの分解があった場合、その過程を検証しやすくするために、実用線量よりはやや高めの値を選定した。

0 ヶ月及び 6 ヶ月時の常温長期保存試料 (レトルト牛丼) 中の 2-アルキルシクロブタノンの濃度を測定し、照射線量との関連性を評価した。分析には 4 種の線量 (0.6、1.9、2.7、4.5 kGy) を照射したレトルト牛丼を各線量 2 袋ずつ使用した。1 袋につき併行数 3 で測定を行い、2 袋の平均値を 0 ヶ月時の 2-DCB および 2-TCB の濃度とした。常温条件下長期保存での安定性として、照射レトルト牛丼 (照射線量 2.7 kGy) を試料として照射後 (0、1、2、3、4、6、8 および 10 ヶ月) の 2-DCB (2-ドデシルシクロブタノン) および 2-TCB (2-テトラデシルシクロブタノン) の濃度を追跡し、長期保存における安定性について評価した。測定方法は、2 袋を用い、1 袋から併行数 3 で分析を行った。2 袋の平均値を常温長期安定性試験結果のデータとして用いた。

外部精度管理試験では、配布した外部精度管理試料 3 種 (スモークサーモン; 非照射、チーズ; 1.6 kGy 照射、ピーナッツバター; 1.2 kGy 照射) のうち、照射履歴が

検出できたものについては、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、2-アルキルシクロブタン濃度等は示さず、ブラインド試験とした。分析法は提示法とし、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±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。

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。

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、外部精度管理試験においては度数分布表と 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、上部管理限界 (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の汚染実態と精度管理体制の構築に関する研究 (斉藤分担研究)

ELISA には、市販キット『RIDASCREEN® DON』(R-Biopharm 社製)を用いた。ELISA キットの測定原理は、抗 DON (デオキシニバレノール) モノクローナル抗体を用いた直接競合法である。すなわち、抗マウス IgG 捕捉抗体が固定化された 96 穴ウェルプレートに、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た。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 濃度を求めた。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。なお、キットに付属の標準液の最低濃度は、本実験に適用するには不十分であったことから、更に低濃度 (1.23 ng/mL) を別途調製し、ELISA キットに添付した。吸光度の測定については、各検査機関で日常的に使用しているプレートリーダーを用いることとし、データ処理についても、測定装置付属のデータ処理ソフトを用いて行うこととした。

外部精度管理試験は、室間再現精度を評価するために、市販のビールに DON を添加した精度管理用標準試料を作製した。DON 添加濃度は高濃度試料 (100 ng/mL) および低濃度試料 (10 ng/mL) とし、外部精度管理試験に参加する検査機関には濃度を伏せた



状態で（サンプル A およびサンプル B とし  
て）送付した。また、抽出・クリーンアッ  
プ操作は指定の方法とし、ビール 10 mL に  
ハイフロスーパーセル 2 g、アセトニトリ  
ル 40 mL を加え、1 時間混合する。その後、  
減圧ろ過を行い、ろ液を濃縮乾固する。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。なお、実  
験に必要なクリーンアップ用多機能カラム  
MycoSep®#227 およびハイフロスーパーセル  
も ELISA キットおよび標準試料と共に各検  
査機関に配布した。また、前処理による試  
料精製の有無による ELISA 測定への影響を  
調べるために、上記の前処理を行わずに、  
試料を水で希釈したものを直接 ELISA で測  
定する実験も並行して行うこととした。

### 3 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  
オンの定量を検討する試料として、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  
（GC/MS）は島津製作所製（QP2010Plus）を  
用いた。カラムは DB-5MS（0.25 mm φ × 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 mm φ × 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 を加え、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。

また、マラカイトグリーン（MG）およびロイコマラカイトグリーン（LMG）への食品添加物の影響は、0.2%亜硫酸水素ナトリウムおよび 0.2%過酸化水素水溶液をそれぞれ添加して混和後、LC/MS で変化を調べた。

#### 4 外部精度管理調査試料の高信頼性分析に関する研究（鎗田分担研究）

同位体希釈質量分析法（IDMS）の精確さの評価として、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号の通知試験法（一斉試験法）をベースとした IDMS 法について、外部精度管理調査試料の基材（検討中を含む）を用いた添加回収試験を行った。測定対象農薬とその標識体のピーク面積比の変動を基に、IDMS の精確さを評価するとともに、マトリックス効果の影響も評価した。また、実際の外部精度管理調査試料の分析として、前述の分析法と、別途妥当性を評価した分析法（食安発第 0124001 号の通知試験法（個別試験法）をベースとした IDMS 法）によって、平成 25 年度に実施した残留農薬検査 I の調査試料を分析し、その結果を参照値や参加機関の結果と比較した。

試料は、外部精度管理調査試料の基材（検討中を含む）であるとうもろこしペースト、にんじんペースト、枝豆ペースト、かぼちゃペーストと、平成 25 年度外部精

度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料であるとうもろこしペーストは、食品薬品安全センター秦野研究所より提供された。

IDMS の精確さ評価用として、9 種類の分析対象農薬およびその標識体を、各々の濃度が  $5.68 \mu\text{g/g}$  となるように Ac（アセトン）に希釈し、試料添加溶液とした。また、アラクロール  $0.238 \mu\text{g/g}$  を含む Ac 溶液を調製し、シリンジスパイク溶液とした。次に、試料添加溶液とシリンジスパイク溶液を混合することにより、測定対象農薬およびその標識体各  $1.25 \mu\text{g/g}$ 、アラクロール  $0.186 \mu\text{g/g}$  を含む校正標準液（マトリックス無）を調製した。さらに、後述の分析法 1 によって検討基材を前処理して調製したブランク溶液を、窒素気流で濃縮した後、校正標準液（マトリックス無）に転溶し、校正標準液（マトリックス有）を調製した。

外部精度管理調査試料分析用として、フェニトロチオン- $d_6$   $7.988 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス- $d_{10}$   $3.614 \mu\text{g/g}$  を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。また、Ac 中にアラクロール  $19.47 \mu\text{g/g}$  を含むシリンジスパイク溶液 A を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈して  $0.450 \mu\text{g/g}$  としたシリンジスパイク溶液 B を調製した。次に、Ac 中にフェニトロチオン  $14.11 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス  $7.336 \mu\text{g/g}$  を含む農薬混合液を調製し、これと内標準溶液、シリンジスパイク溶液 A を合わせて Ac に希釈し、フェニトロチオン  $1.413 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス  $0.739 \mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン- $d_6$   $1.698 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス- $d_{10}$   $0.7087 \mu\text{g/g}$ 、アラクロール  $0.476 \mu\text{g/g}$  を含む校正標準基液を調製した。さら

に、後述の分析法 1 および分析法 2 によってとうもろこしの検討基材を前処理して調製したブランク溶液を、各々窒素気流で濃縮した後に校正標準基液に転溶し、校正標準液（外部精度管理調査試料分析用）を調製した。以上の調製は質量比混合法によって行った。

IDMS の精確さの評価は分析法 1 について行った。また、外部精度管理調査試料の分析には分析法 1 および分析法 2 を適用した。

分析法 1 として、試料 5 g に試料添加溶液 0.55 mL または内標準溶液 0.4 mL を加えて静置した後、水 20 mL を加え 15 分間放置した。これに AN（アセトニトリル）50 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN 20 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。合わせたろ液から約 40 mL を分画し、塩化ナトリウム (NaCl) 10 g 及および、5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を加え、10 分間振とうした。とうもろこしペーストおよび枝豆ペーストの分析においては、あらかじめ AN 10 mL でコンディショニングした Agilent Technologies 製 Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ (1 g) を用いて、前記の AN 層と AN 2 mL を処理する操作を行った。得られた処理液を無水硫酸ナトリウムによって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol（トルエン）(3:1) 混液 2 mL に溶解した。Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> 固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) を AN/Tol (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらに AN/Tol (3:1) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を 1 mL 以下に濃縮し、Ac 10 mL

を加えた後再度 1 mL 以下に濃縮し、Ac 5 mL を加えた後に溶媒を除去した。残留物をシリンジスパイク溶液 1 mL（精確さ評価の場合）またはシリンジスパイク溶液 B0.8 mL（外部精度管理調査試料分析の場合）に溶解したものを試験溶液とした。得られた試験溶液中の分析対象農薬を GC/MS によって測定した。

分析法 2 として、試料 5 g に内標準溶液 0.4 mL を加えて静置した後、Ac 70 mL を加えて 3 分間細砕し、ケイソウ土を敷いたろ紙で吸引ろ過した。残留物に Ac 50 mL を加え 3 分間細砕した後、同様に操作して得られたろ液を合わせた。Ac を除去した後、あらかじめ飽和 NaCl 溶液 100 mL を入れた分液漏斗に移し、ナス型フラスコを洗った EA（酢酸エチル）/Hex（ヘキサン）(1:4) 混液 100 mL を合わせた。これを 5 分間振とうし、静置した。水層を分離後、EA/Hex (1:4) 混液 50 mL を加えて同様に振とうし、得られた EA および Hex 層を合わせた。無水硫酸ナトリウムによって脱水した後、EA と Hex を除去した。残留物に Hex 30 mL を加え分液漏斗に移した後、Hex 飽和 AN 30 mL を加えて 5 分間振とうして静置した。Hex 層に Hex 飽和 AN 30 mL を加えて同様の操作を 2 回繰り返し、得られた AN 層を合わせて濃縮・乾固し、残留物を Ac/Hex (1:1) 混液 5 mL に溶解させた。Agilent Technologies 製シリカゲル固相抽出カートリッジ (5 g) に無水硫酸ナトリウム 5 g を加え、Hex/Ac(1:1)混液 10 mL でコンディショニングした後、得られた抽出液を注入し、さらに Hex/Ac(1:1)混液 100 mL を注入した。溶出液を濃縮・乾固した後に少量の Ac に溶解し、シリンジスパイク溶液 A40 μL と

合わせ、窒素気流下で約 2 mL に濃縮したものを試験溶液とした。得られた試験溶液中の分析対象農薬を GC/MS によって測定した。

評価法として、農薬濃度は次式から求めた。

$$C = F_e \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{F_c \times M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}} \quad (1)$$

ただし、 $C$ ：試料中の農薬濃度、 $F_e$ ：前処理の精度に関わる係数 (= 1)、 $R_s$ ：試験溶液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 $R_c$ ：校正標準液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 $F_c$ ：校正標準液調製のばらつきに関わる係数 (= 1)、 $M_c$ ：校正標準液中の農薬混合液の質量、 $C$ ：農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 $P$ ：測定対象農薬の高純度標準品の純度、 $M_{sp(s)}$ ：試料に添加した内標準溶液の質量、 $M_s$ ：試料量、 $M_{sp(c)}$ ：校正標準液中の内標準溶液の質量、である。その不確かさは、(1) 式の各項の不確かさを評価し、これらを合成して求めた。

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 理化学検査のための適正調査試料の作製：

食品添加物検査として、着色料には果実ペースト、魚肉製品及び魚肉練り製品を、また保存料(ソルビン酸及びパラオキシ安息香酸エステル類)には、果実ペースト、魚肉練り製品を、また、別に魚肉練り製品

には市販品への添加ではなく魚のすり身(生)を用いた加熱加工からの試料作製を新たに試みた。残留農薬検査に使用する調査試料として、玄米、精米に4種の農薬を添加し、固体試料の基材として穀類粉末の利用の可能性を検討した。また、これまでの野菜ペーストに加えて新たに枝豆ペーストについても検討を加えた。

試料の作製は以下の通り行った。食品添加物の着色料としての果実ペーストは、いちごペースト及びバナナペーストを用い、許可されているタール色素 12 色を添加し、それらが検出可能であることを確認した。また、冷蔵及び冷凍保存し、保存条件の影響についての確認を行った。

いちごペースト及びバナナペーストを用い、各々ハンドミキサーを用い均質化した。12 色素液(水溶液、添加濃度各  $20 \mu\text{g/g}$ )を加え、ハンドミキサーで混合した。各々 200 g を量りとり、容器に入れ冷蔵及び冷凍した。

魚肉製品及び魚肉練り製品のしんじょう及びかまぼこは、ブレンダーを用いてペーストにした後、12 色素液(水溶液、添加濃度各  $20 \mu\text{g/g}$ )を添加し、よく混合した。各々 200 g を量りとり、容器に入れ冷蔵及び冷凍した。

鮭フレークは、同量の 12 色素液(水溶液、色素濃度各  $20 \mu\text{g/g}$ )に一晩浸漬し、水揚げした後容器に分注し、冷蔵及び冷凍した。

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。

試料 20 g をとり、50 mL の水、50 v/v% エタノールまたはアンモニア・エタノール

溶液を加え、水浴上で 30 分間加温した。冷後、綿ろ過した。アンモニアを含む場合は、ろ液を酢酸 (3→50) で中和した後、水浴上で濃縮して約 20 mL とし、検液とした。

検液を遠心管にとり、酢酸 (3→50) を加えて酸性 (pH 3~4) とし、良く混和した。次にポリアミド 0.6 g を加え、約 1 分間振り混ぜた後、3,500 回転/分で 5 分間遠心分離した。上澄液は捨て、残留物を酢酸 (3→50) 及び水で洗った。着色したポリアミドをカラムに充てんし、エタノール・アンモニア混液を加え、溶出してきた着色液を集めた。酢酸 (3→50) で中和した後、水浴上で濃縮乾固した。残留物に水 1 mL を正確に加えて溶かし、試料液とした。

あらかじめ活性化 (120°C、15 分間) した薄層板の下端より 1.5 cm のところに、試料液及び定性用標準液 (1000  $\mu$ g/mL) を直径約 3 mm 以下になるように、1 cm の間隔に塗布し、ドライヤー (冷風) を用いて風乾した。各薄層板に対応する展開溶媒を用い、薄層板の下端 0.5~1 cm を展開溶媒に浸し展開した。展開終了後、試料液及び定性用標準液それぞれから得られたクロマトグラムの色と *Rf* 値を、それぞれ比較観察した。

食品添加物の保存料の基材としての果実ペーストは、いちごペースト及びバナナペーストを用い、保存料各種を添加し、それらが定量用の調査試料として適用できるかを確認した。保存料として、ソルビン酸カリウム及び PHBA エステル類 (PHBA イソブチル、PHBA イソプロピル、PHBA エチル、PHBA ブチル及び PHBA プロピル) を用

いた。また、冷蔵及び冷凍保存し、保存条件の影響について確認を行った。

いちごペースト及びバナナペーストを採取し、各々ハンドミキサーを用い均質化した。ソルビン酸及び PHBA エステル類 (添加濃度: ソルビン酸カリウムとして各 0.335 g/kg、ソルビン酸として各 0.25 g/kg、PHBA エステル類各 0.1 g/kg) を加え、ハンドミキサーで混合した。各々 200 g を量りとり、容器に入れ冷蔵及び冷凍保存した。

魚肉練り製品のしんじょうは、ブrikサーを用いてペーストにした後、ソルビン酸 (添加濃度: ソルビン酸カリウムとして各 0.335 g/kg、ソルビン酸として各 0.25 g/kg) を添加し、よく混合した。各々 200 g を量りとり、容器に入れ冷蔵及び冷凍保存した。

かまぼこは、餅つき機を用いて魚すり身 (生) を混練した後、ソルビン酸 (添加濃度: ソルビン酸カリウムとして各 1.34 g/kg、ソルビン酸として各 1 g/kg) を添加し、再び良く混練し、必要個数に分けた。このすり身について均一性を確認した後、餅つき機の「蒸し」機能またはウィンディーオーブンにより、すり身を加熱してかまぼことし、それぞれチャック付ポリ袋に入れて冷蔵保存した。すり身の混合では 1 kg 及び 3 kg に対してソルビン酸カリウムを添加し、餅つき機の混合による均一性を確認した。さらに、餅つき機の「蒸し」機能を利用してすり身を蒸した場合の一個体内のソルビン酸の分布、並びに、餅つき機内の配置位置による均一性を確認した。また、ウィンディーオーブンでは、設定温度を 110°C とし、合計 20 個のすり身をオー

ブン内に配置し、加熱した時のソルビン酸の分布について検討した。

保存料の測定操作は、「食品中の食品添加物分析法」食安基発 0528 第 4 号(平成 22 年 5 月 28 日)の別添 2」に準じた。

果実ペーストは、冷蔵保存品は試料約 15 g を、冷凍保存品は試料約 5 g を精密に量り、それぞれ水 150 mL を加えて混和し、酒石酸溶液(15→100) 10 mL 及び食塩 80 g を加えた。これを、毎分約 5~10 mL の留出速度で水蒸気蒸留に付し、留液をとり 500 mL とした後、HPLC(UV)で測定した。

また、魚肉練り製品は、各試料について、しんじょう及びすり身はそのまま、すり身から加熱して作製したかまぼこは均質化した後、各々約 5 g を精密に量り、精製水約 150 mL を加えて混和した後、酒石酸溶液(15→100) 10 mL 及び食塩 80 g を加えた。これを、毎分約 5~10 mL の留出速度で水蒸気蒸留に付し、留液をとり 500 mL とした後、HPLC(UV)で測定した。

つぎに、農薬添加した玄米及び精米試料の均一化を行った。平成 24 年度において、以下の方法で作製した玄米試料を用い、10 バッチの試料を合わせ、ロッキングミキサーを用いて混合し、混合毎に均一性試験を行った。なお、混合は合計 3 回行った。その後、更に遠心粉碎機を用いて再粉碎し、均一性試験を行った。

粉体攪拌用フラスコ(2 L 容、以下、粉体フラスコ) 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(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フェニトロチオン 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アセトン溶液) 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、24 時間浸漬後、浸漬溶媒を減圧乾固し、さらに室温下で 3 日間乾燥し、小型粉碎を用いて粉碎後、均一性検討用試料(試料溶媒留去後理論値:ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、フェニトロチオン 0.2  $\mu\text{g}/\text{g}$ )とした。作製した試料は、ジップロックに入れ、冷蔵保存(6~10°C)した。

バッチ間の均一性を確認するために、粉体フラスコ 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(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フェニトロチオン 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アセトン溶液) 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、精米 600 g を量り入れ、同様に 5 分間、回転混合した後、以下、玄米の均一性検討用試料と同様に行い、10 個のバッチ間均一性の検討用作製試料とし(溶媒留去後理論値:ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、フェニトロチオン 0.2  $\mu\text{g}/\text{g}$ )、均一性試験を行った。更に遠心粉碎機を用いて再粉碎し、均一性試験を行った。なお、浸漬溶液を減圧乾固後、内容物を取り出した後の粉体フラスコ内壁面の残渣をヘキサン 50 mL で 5 回洗い込み、これらを合わせて減圧濃縮し、10 mL とした溶液について、各農薬濃度を測定した。

枝豆ペーストを用いて、標準液を均一に添加混合する条件として、水及び油分として大豆油を添加した試料材料に標準液を添加し、均一性を評価した。すなわち、ブ

リクサーを用いて均質化した枝豆ペースト 2 kg に、水を 0%、5%、10% 及び 20%、ならびに大豆油を 0%、2%、5% 及び 10% となるように各々添加後、更にブリクサーを用いて均質化した。これに添加用農薬混合標準液（ダイアジノン 2  $\mu\text{g/mL}$ 、クロルピリホス 60  $\mu\text{g/mL}$ 、マラチオン及びフェニトロチオン 100  $\mu\text{g/mL}$ 、アセトン溶液) 10 mL を正確に加え、更に、ブリクサーを用いて混合した。各々 200 g を量りとり、容器に入れ冷凍保存し、均一性検討用試料（理論値：ダイアジノン 0.01  $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス 0.3  $\mu\text{g/g}$ 、マラチオン及びフェニトロチオン 0.5  $\mu\text{g/g}$ ）とした。また、同様に前処理をした枝豆ペーストに水 5%、10% 及び 20%、ならびに大豆油を 2%、5% 及び 10% となるように各々添加後、添加用農薬混合標準液は添加せずと同様に操作し、得られた試料を、水 5%、10% 及び 20%、及び油 2%、5% 及び 10% ブランク試料とした。

残留農薬の測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編（2003）」に準じた。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  $n=2$  で以下のとおりに測定を行った。

試料 10 g を採取し、アセトン 100、50 及び 50 mL で 3 回オムニミキサーを用い抽出した。抽出液を合わせ、40°C 以下でアセトンを留去した。濃縮物に 10% 塩化ナトリウム水溶液 10 mL を合わせ、これに  $n$ -ヘキサン 100 mL を加え振とうした。 $n$ -ヘキサン層をとり、残った水層に酢酸エチル/ $n$ -ヘキサン (1 : 4) 100 mL を加え、上記の操作を 2 回繰り返す。酢酸エチル/ $n$ -ヘキサン (1 : 4) 層を  $n$ -ヘキサン層に合

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 分間放置後、40°C 以下で酢酸エチル/ $n$ -ヘキサンを留去した。残留物に  $n$ -ヘキサンを加えて溶解させ、正確に 10 mL とした後、GC (FPD) で測定した。なお、玄米及び精米試料の測定においては、試料採取後、水 20 mL を加え 2 時間膨潤させた後、アセトンによる抽出操作を行った。また、酢酸エチル/ $n$ -ヘキサンを留去後、以下の操作を行った。残留物をアセトニトリル飽和  $n$ -ヘキサン 30 mL に溶解し、 $n$ -ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて振とうした。アセトニトリル層をとり、残った  $n$ -ヘキサン層に  $n$ -ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、上記の操作を 2 回繰り返す。 $n$ -ヘキサン層を合わせた後、 $n$ -ヘキサンを留去した。残留物に  $n$ -ヘキサンを加えて溶解させ、正確に 10 mL とした後、GC (FPD) で測定した。なお、玄米及び精米中の各農薬の定量にはマトリックス添加検量線を、また枝豆中の定量には絶対検量線を用いた。

## 5.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製：

試験菌株は、枯草菌 6633 栄研（栄研化学株式会社）を使用した。寒天基材は、寒天（試薬）に安定化剤と精製水を加え、加熱溶解したものを容器に分注した。これを高圧蒸気滅菌処理した後、室温で放置することにより固化させ作製した。試験に使用するにあたり、固化した基材を 100°C で 30 分間加熱溶解した後、約 50°C に低下させ、これに試験菌液 0.1 mL を添加することによって調査試料を作製した。なお、寒天濃度の検討を行う場合には、0.60%、0.65%、0.70% および 0.75% とした。



一般細菌数測定として、調査試料 10 g を秤量し、これをストマッカー袋に加えた後、ペプトン食塩緩衝液 90 mL を添加した。これを 1 分間および 3 分間ストマッカーでホモジナイズ処理を行い、測定原液を調製した。この原液を生理食塩液で適宜希釈した後、1 mL を滅菌シャーレ 2 枚に分注し、標準寒天培地を 15~20 mL 加えて混釈平板とし、寒天が固化した後、35±1℃で 48±3 時間培養した。生菌数測定には、1 平板あたり 300 個以下の集落を形成する平板について出現した集落数を計測し、2 枚のシャーレの平均値を求め、これを一般細菌数とした。ストマッカー袋は細菌検査用ポリ袋(オルガノ)、ストマフィルター-NEO (GSI クレオス)、滅菌フィルターバッグ NB (サンセイ医療機材)、ピクソン 20 (エルメックス) およびサニスペックテストバッグ (サニーフーズ) を使用した。

### 5.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製検討：

そば粉は標準品規格に規定されている茨城県産そば粉および中国北方産そば粉、その他にダッタンそば粉を購入して使用した。添加用基材は原材料の欄にそばを使用した旨の表示が無い食材を選んで購入して使用した。そば粉からのタンパク質抽出は標準品規格に記載の方法に従って実施した。抽出液はメルカプトエタノールを含む抽出液 (0.5% SDS、2%メルカプトエタノール、0.5M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl、pH7.5) および、メルカプトエタノールを含まない抽出液 (0.5% SDS、0.5M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl、pH7.5) の 2 種類を使用した。また、抽出には振とう機：RECIPRO SHAKER NR-I および Double Shaker R-30 mini (以上

TAITEC)、遠心機：himac CF 16RX (日立工機株) を使用した。

そば粉から抽出したタンパク質の濃度は 2-D Quant Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス株) を用いて総タンパク質の定量を行い、特定原材料タンパク質の定量は ELISA 法により実施した。すなわち FASTKIT エライザ Ver. II そば (日本ハム株)、モリナガ FASPEK そば 測定キット (株森永生科学研究所) およびアレルギーアイ ELISA そば (プリマハム) のそれぞれの ELISA キットを使用した。また、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 (Bio-Tek Instruments, Inc.) を使用した。

試料の作製として、中国北方産そば粉からメルカプトエタノールを含まない抽出液を用いてタンパク質抽出を行い、そばタンパク質溶液を調製した。次に、こしあん、カスタードクリームおよびチョコレートクリームにそれぞれそばタンパク質溶液を添加し、フードプロセッサー：MK-K58 (松下電器産業株) で均質になるまで混合した後、遠沈管に分注して試料を作製した。ビスケットについては、ミルサー IFM-700G (岩谷産業株) を用いて粉碎し、遠沈管に 1 g ずつ分注した後、そばタンパク溶液を添加して試料を作製した。作製した試料はいずれも -20℃ で凍結保存した。

### 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：

陽性コントロールプラスミドはニッポンジーンより購入した GM コメ害虫抵抗性検査用陽性コントロールプラスミド及び GM パパイヤ系統別 DNA PRSV 陽性コントロー

ルプラスミドを使用した。非遺伝子組換え米は神奈川県内で購入した上新粉を使用した。

非遺伝子組換え米からの DNA 抽出には GM quicker2 (ニッポンジーン) を使用し、通知法に記載のプロトコールに従って抽出した。抽出後の DNA 溶液は水で 10 ng/ $\mu$ L に調製し、陽性コントロールプラスミドの希釈液として使用した。なお、遠心分離には多用途小型遠心機 CF16RX (日立工機 (株))、恒温槽には DryThermoUnit DTU-2B (TAITEC)、吸光度測定には Gene Quant pro (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を使用した。

コメ陽性コントロールプラスミドは希釈液に水または非遺伝子組換えコメ DNA を用いて、40、20、15、10、5、2.5 コピー/ウェルとなるよう希釈した。パパイヤ陽性コントロールプラスミドは水を用いて 40、20、10、5、2.5、1.25 コピー/ウェルとなるよう希釈した。

リアルタイム PCR は通知法に従い、安全性未審査の遺伝子組換え米検査では、コメ陽性対照遺伝子 (PLD) および遺伝子組換え米 3 系統 (CpTI、63Bt、NNBt) の 4 遺伝子、安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ検査では、パパイヤ陽性対照遺伝子 (Chy)、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター配列 (CaM) および遺伝子組換えパパイヤ 2 系統 (PRSV-YK、PRSV-SC) の 4 遺伝子について測定した。なお、測定は 1 濃度につき 6 ウェル併行で実施した。ただし、9600 Emulation mode および Standard mode の 2 種類のランモードで測定した。なお、リアルタイム PCR 装置は ABI PRISM™7900 96 well (Life Technologies Japan) を使用した。

判定は通知法に従って実施した。すなわち、Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースラインを (3 サイクルから 15 サイクル) 設定し、 $\Delta Rn$  のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として 0.2 に設定し、得られた Ct 値を確認した。遺伝子組換え米では 48 未満の Ct 値が得られた場合に、陽性と判定した。遺伝子組換えパパイヤでは 43 未満の Ct 値が得られた場合に陽性と判定した。

増幅効率、遺伝子組換え米では 40、20、15、10、5 コピー/ウェルの希釈液、遺伝子組換えパパイヤでは 40、20、10、5、2.5 コピー/ウェルの希釈液の測定結果を使用して算出した。ベースラインおよび Th. line は自動 (Automatic Ct) で設定した。なお、解析ソフトウェアは SDS v2.4.1 を使用した。

## C. D. 研究結果および考察

### 1 尾花分担研究

#### 1-1. 常温長期保存試料

昨年度までの研究および他の研究機関の検討から、2-アルキルシクロブタノン は冷凍条件下で安定であることが報告されているが、常温条件下での安定性については報告例が少ない。そこで常温長期保存試験を実施し、2-アルキルシクロブタノンの長期安定性について調査した。レトルト食品は、構造上細菌の混入が起こりにくい包装形態で、殺菌を目的とした食品照射の運用上実用性が高い包装形態であったこと、賞味期限の長い常温保存食であることから、本試験の対象試料とした。レトルト食品のうち、牛丼は脂肪を含み、照射後 2-アルキルシク

ロブタノンの長期追跡が可能であると予想されたため、レトルト牛丼を試料として予備検討を行った。

試料を湯浴で加温した後、フードプロセッサを用いて均一化した。試料 6 袋を用いて脂肪抽出量を比較した。試料採取量 5 g あたり脂肪抽出量は 0.17~0.35g であったことから、採取量を 5 g から 6.5 g に増加させ、必要な脂肪量を確保することとした。レトルト牛丼から脂肪を抽出し、添加回収試験を行ったところ、回収率、変動係数も良好であったため、レトルト牛丼は常温長期保存試験試料として十分使用できると考えられた。

照射線量と 2-アルキルシクロブタノン濃度には相関性が認められ、試料調製直後と 6 ヶ月後の回帰直線の傾きと y 切片を算出したところ、調製直後は 2-DCB で傾き 194、y 切片-17、2-TCB で傾き 208、y 切片-1 であり、照射 6 ヶ月後においては 2-DCB で傾き 208、y 切片-14、2-TCB で傾き 130、y 切片-8 であった。t 検定したところ、これらの回帰直線は照射時と 6 ヶ月時に差がないと判明した。

以上のことから、照射レトルト牛丼中の 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傾向が認められ、照射後 6 ヶ月後においてもその相関性に変化は認められなかった。照射 6 ヶ月後でも 2-DCB および 2-TCB の回帰直線に変化が認められなかったことから、2-アルキルシクロブタノンが試料中濃度の大小に関係なく安定であることが示唆された。また、これらの 2-アルキルシクロブタノン濃度は、冷凍状態で照射された試料と比較して高く、2-アルキルシクロブタノンの生成が温度にも依存す

ることが示された。

照射レトルト牛丼 (2.7kGy) 中の 2-アルキルシクロブタノン濃度の経時変化を照射直後から 10 ヶ月間追跡した。照射レトルト牛丼中の 2-アルキルシクロブタノン濃度と照射後経過期間の相関性は、回帰直線の傾きが 2-DCB ; -3、2-TCB ; -1 であった。この回帰直線の y 切片は、保存期間中の平均値 2-DCB (593 ng/g)、2-TCB (357 ng/g) と近似していた。また、2-DCB および 2-TCB 共に袋内では測定値のばらつきが小さいものの、袋間では大きな差が認められ (2-DCB ; 最小値 434 ng/g、最大値 760 ng/g、2-TCB ; 最小値 273 ng/g、最大値 445 ng/g)、最大値と最小値は 2-DCB で 1.75 倍、2-TCB で 1.63 倍であった。また、照射線量測定に用いたラジオクロミックフィルムの吸光度は、最小値 0.22、最大値 0.38 でありその差は約 1.7 倍であった。これは上記濃度差とほぼ一致し、レトルト牛丼の袋間の濃度差が照射線量に由来すると考えられた。牛丼照射時の照射線量算出に用いたラジオクロミックフィルムの吸光度の分布と保存期間中に測定したレトルト牛丼 (2.7 kGy 照射) 中の 2-アルキルシクロブタノン濃度の分布が類似していることから、袋間での 2-アルキルシクロブタノン濃度のばらつきは、照射線量のばらつきによると考えられた。また、常温保存期間中のレトルト牛丼中の 2-アルキルシクロブタノン濃度は、袋間の差はあるものの 10 ヶ月以上の長期にわたって安定であることが示唆された。

#### 1-2. 精度管理試料

精度管理試料として使用することが適当な食品を選択すべく、油脂を含む加工食品 (パルメザンチーズ、ピーナッツバター、

生ハム、サラミ、スモークサーモン)を候補として予備検討を行った。

はじめに各試料 5 g より脂肪を抽出し、脱脂操作以降に必要な量が確保できるか確認した。スモークサーモンはやや少なめであったが、抽出操作時の試料量を増やすことで十分な量を確保できると考えられた。次にクロマトグラム上で定量の支障となるような妨害成分の有無を確認すべく、精製操作後に 2-アルキルシクロブタノンを添加して測定した。その結果、いずれの試料も 2-アルキルシクロブタノンの測定が可能であることが判明した。さらにこれら候補食品へガンマ線の照射を行い、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、いずれの候補食品においても約 1 kGy の照射で 2-アルキルシクロブタノンの生成が確認できた。測定対象とした試料では、2-アルキルシクロブタノンの添加回収試験を行った。その結果、いずれの試料においても添加回収率は良好であり、その結果は平均して 80~116%の範囲であった。

これら試料のうち、ピーナッツバターは植物、スモークサーモンは魚であり、他の畜産品とは脂肪酸組成が異なり、脱脂操作時に油脂が分離しにくい性質があった。チーズは牛の脂肪由来と思われたが、脱脂操作時やクロマトグラム上では牛肉(ハンバーグ、牛丼)とやや異なるものであった。昨年の研究ではハンバーグパテを対象としており、本年は畜肉と異なる脂肪酸組成での試験とする目的で、チーズ、ピーナッツバター、スモークサーモンの 3 品目を精度管理試料に選択した。

照射された精度管理試料は調製後、2-アルキルシクロブタノンの濃度を測定し、照

射試料間の均一性を評価した。小分けされた照射試料(チーズおよびピーナッツバター各 19 個)からそれぞれ無作為に 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。このうち、チーズは容器 1、2 内での変動が大きく、全データの範囲は 2-DCB で 57、2-TCB で 20.4 であり、平均値の 25~30%であった。一方でピーナッツバターは容器内、容器間ともに変動は小さく、全データの範囲は 2-DCB で 10.5、2-TCB で 3.3 であり、平均値の 8~12%であった。チーズは粒状であり、照射試料全体を攪拌して均一化を図っても粒子間での混合はできなかった。脂肪抽出時の試料量は 5 g であり、多少の粒子間の濃度差は解消できると考えられたが、ピーナッツバターよりも変動は大きかった。

照射された精度管理試料は、試験期間終了時に 1 試料を無作為に抽出し、6 併行で測定した。これを均一性評価時の濃度と比較して、試験実施期間における 2-アルキルシクロブタノンの安定性を評価した。試料調製時と試験期間終了時(約 2.5 ヶ月後)において測定値に大きな差は無く、全ての試料で 100~109%の残存率であった。また試験期間終了時でも変動係数は小さく、試料内での均一性が確認された。

### 1-3. 常温長期保存試験

配布した照射(青)および非照射(赤)のレトルト牛丼を分析した結果、全機関が照射(青)レトルト牛丼のみから 2-アルキルシクロブタノンを検出した。各機関の平