

ノン及びエトプロホス各 0.1  $\mu\text{g/g}$ 、ブタミホス、ジメトエート及びフェンスルホチオン各 0.2  $\mu\text{g/g}$  となるように添加し、ハンドミキサーを用いて十分混合した。調製した試料は、ジップロックに入れ、冷凍保存した。得られた試料につき添加した農薬の濃度を測定し、均一性の検討を行った。

測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編 (2003)」に準じた。

測定機器にはリン検出器付きガスクロマトグラフ (以下 GC (FPD)) を、測定条件はカラム: DB-210 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ )、カラム流量: 2.5 mL/min、カラム温度: 60°C で 2 分間保持し、その後毎分 10°C で昇温し、200°C に到達後 10 分間保持、注入口温度: 250°C、検出器温度: 250°C、キャリアーガス: ヘリウムを用いた。

平成 24 年度は、基材として、新たに玄米の適用性を検討した。試料材料には、ひとめぼれ、水稻うるち玄米 (宮城県産) を用いた。

農薬添加溶媒に玄米を浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた玄米を乾燥・粉砕することで作製する方法を検討した。はじめに、適切な浸漬用溶媒を検討するため、ヘキサン、アセトン、20%含水アセトン及び酢酸エチルを用い、それぞれの農薬添加混合溶液に玄米を浸漬し、上記の方法で作製した試料について添加回収試験を行った。また、この方法で適切な浸漬用溶媒を選択し実試料作製時に粉体攪拌用フラスコで調製した場合のバッチ間の均一性を検討した。

浸漬用溶媒の検討は以下の方法で行った。粉体攪拌用フラスコ (1 L 容) に各溶

媒 (ヘキサン、アセトン、20%含水アセトン及び酢酸エチル) 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、クロルピリホス及びマラチオン 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。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、粉砕後、浸漬溶媒検討用 (試料溶媒留去後理論値: テルブホス 0.005  $\mu\text{g/g}$ 、ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 0.1  $\mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン 0.2  $\mu\text{g/g}$ ) 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。

バッチ間の均一性の検討は、以下の方法で行った。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 (テルブホス 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 10  $\mu\text{g/mL}$ 、フェニトロチオン 20  $\mu\text{g/mL}$ 、アセトン溶液) 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、浸漬溶媒検討用試料と同様に行い、10 個のバッチ間均一性の検討用試料とした (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、クロルピリホス及びマラチオン 0.1  $\mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン 0.2  $\mu\text{g/g}$ )。

H25 年度は、H24 年度において作製した

玄米試料を用い、10バッチの試料を合わせ、ロック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。

また、精米についても同様に作製し10個のバッチ間均一性の検討を行った(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 $0.1 \mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン $0.2 \mu\text{g/g}$ )。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。

残留農薬検査用調査試料として野菜ペーストを用いてきたが、新たに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を検討した。水及び油分として大豆油の濃度を変えて添加した試料材料に標準液を添加し、均一性を評価した。

ブrik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rik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rik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に同様に操作し、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。

重金属検査調査試料は、カドミウム添加玄米を作製してきたが、高濃度米とブランク玄米を混合する方法は手動で行ってきた。平成24年度においては、これらの操作の効率化のため、粉体用混合機であるロックミキサーを用いて混合の検討を行った。予め濃度を測定した高濃度玄米

( $2.1 \mu\text{g/g}$ )及びブランク玄米( $0.0273 \mu\text{g/g}$ )を用い、以下のとおりに条件を変えてロックミキサーを用いて混合し、混合後、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分間及び条件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分間及び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)の2条件で混合を検討した。

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

及び硫酸を用いて湿式分解後、DDTC-MIBK法で原子吸光光度計により測定を行った。

試料材料には玄米（銘柄：ひとめぼれ、水稻うるち玄米、宮城県産）を標準品はカドミウム標準液（化学分析用）を、試薬は、精製水（以下、水）は日本薬局方注射用水を、硝酸及び硫酸は有害金属測定用を、

（+）-酒石酸ナトリウムカリウム四水和物（以下、酒石酸カリウムナトリウム）、4-メチル-2-ペンタノン（以下、MIBK）、*N,N*-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物、硫酸アンモニウム及びアンモニア水は原子吸光分析用を用いた。プロモチモールブルー及びエタノール（95）は試薬特級を用いた。

試料作製用には、ロッキングミキサー（RM-10G）を試料前処理用には、ケルダール分解装置を、測定機器には原子吸光分光光度計（AA-6800）を、原子吸光光度法条件には、使用ガス：可燃性ガス（アセチレン）及び支燃性ガス（空気）、ランプ：カドミウム中空陰極ランプ、波長：228.8 nm、スリット幅：2.0 nmを用いた。

## 6.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製：

セレウス菌検査及びビブリオ属菌検査を対象とした調査試料作製を目標として、基材を用いた接種菌の安定性に関する検討を行った。また、一般細菌数測定用基材として使用されている寒天状基材におけるストマッカー袋の影響についても検討した。

試験菌株として、秦野研究所に保存してある以下の7菌株を用いた。セレウス菌検査用として、*Bacillus cereus* HIC 080115、*Bacillus cereus* HIC 080117、*Bacillus cereus* HIC

100172、*Bacillus subtilis* HIC 100165、*Bacillus megaterium* HIC 080136、ビブリオ属菌検査用として、*Vibrio parahaemolyticus* HIC 090153、*Vibrio fluvialis* HIC 090156を用いた。

上記のセレウス菌検査用菌株を  $MnSO_4$  を含有する普通寒天培地に接種し、32.5°Cで7日間培養した。培養終了後、生理食塩液に懸濁させ、芽胞液を得た。セレウス菌検査用試料における安定性の確認には、セレウス菌検査用基材を7日間4°Cにて保存した後、さらに4°C、22.5°Cまたは32.5°Cで35日間保存した。なお、7日ごとに経日的にソイビーン・カゼイン・ダイジェスト（SCD）寒天培地を用いた生菌数測定を行った。生菌数測定は32.5°Cで24時間培養した後の形成集落数を計測することにより算出した。ビブリオ属菌の基材中での安定性の確認には、ビブリオ属菌を2%ゼラチン加 Marine broth で24時間前培養した後、2%ゼラチン加 Marine broth で $10^3$ 倍希釈したものを試験菌液とした。試験菌液20 mL、基材及び2%ゼラチン加 Marine broth を加え、合計重量が100 gとなるようにした。これを-20°Cにて保存し、経時的に Marine agar を用いて生菌数測定を行った。ビブリオ属菌検査用調査試料に添加するナイシンのグラム陽性菌に対する効果の検討では、*S. aureus*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa*、*E. coli* の重層寒天平板を作製した。これに力価試験用ステンレスカップを4か所に設置し、これに400 ppm 及び3.125 ppm のナイシン溶液を250  $\mu$ Lずつ注入した。寒天培地を37°Cで24時間培養した後、寒天培地上の阻止円形成を確認した。また、滅菌方法の影響では、400 ppm のナイシンを含む Marine broth を作製し、これをろ過滅菌した後、高圧蒸気滅菌した。これらの溶液に *S. aureus*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa*、*E. coli*、*V.*

*parahaemolyticus* または *V. fluvialis* を  $10^6$  cfu/mL となるように添加し、これを 37°C で保存した。保存開始日、1 日目、6 日目にそれぞれ SCD 寒天培地または Marine agar を用いて生菌数測定を実施した。なお、試験対照としてナイシンを含まない Marine broth を用いた。

ビブリオ属菌検査用調査試料に添加する菌液の調製には、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°C 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、これをろ過した。ビブリオ属菌検査用調査試料における基材の検討は、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 回のボイル及び 121°C 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°C 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 寒天培地及び 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袋の影響については、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°C で 24 時間後及び 48 時間後とした。

さらに使用する寒天のメーカーに基づく差異が存在するかについても検討した。寒天基材の作製については、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% 及び 0.75% とした。一般細菌数測定は、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 分間及び 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、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $48 \pm 3$  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)、サニスペックテストバッグ (サニーフーズ) を使用した。

### 6.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製 :

エビ、カニ添加試料を用いて共同試験を実施したほか、共同試験試料について通知の PCR 法による確認試験試料としても適用可能か検討した。すなわち ELISA 法による甲殻類タンパク質 (エビ・カニタンパク質) の定量には FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬 株)、甲殻類キット「マルハ」(株マルハニチロ 食品) を使用し、各々のキットの取扱説明書に従って操作した。なお、吸光度測定及び濃度計算にはマイクロプレートリーダー EL 808IU、及び計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver.1.80 (Bio-Tek Instruments, Inc.) を使用した。特定原材料タンパクはカニまたはエビを含む市販の食品素材それぞれから調製し、カニ添加液及びエビ添加液とした。カニ添加液、エビ添加液の総タンパク質濃度は 2-D Quant Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を使用して測定した。添加用基材には市販のホワイトソース、ハンペン及びブロッコリーペーストを使用した。

共同試験試料は、添加用基材に上記の添加液を加え、BLIXER-5Plus (エフ・エム・アイ) またはグランドミックス GM300 (レッチェ) で均質化して作製した。なお、試料 1、試料 5 にはカニ添加液を、試料 2、試料 6、試料 8 にはエビ添加液を添加した。また、作製した試料は遠沈管に分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

共同試験の参加機関は、神奈川県衛生研究所、千葉県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、広島県保健環境センター、川崎市衛生研究所、横浜市衛

生研究所、財団法人日本食品分析センター、財団法人食品環境検査協会、財団法人日本冷凍食品検査協会、株式会社ファスマックの計 11 機関である。甲殻類を測定対象とした試料 8 種類及び FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」、甲殻類キット「マルハ」各 1 キットを試験方法及び報告書様式に関する文書と共に宅配便 (冷蔵及び冷凍) で共同試験参加機関に送付した。

参加機関から回収した報告書は、測定値について統計解析システム JUSE-QCAS (日本科学技術研修所) を用い Xbar-R 管理図による解析を行った。この際、Xbar 管理図の上下管理限界線は (平均値  $\pm 2 \times$  標準偏差) とした。また、アンケート結果についてもとりまとめ、検討を加えた。

PCR 法による確認試験では、DNA 抽出はイオン交換樹脂タイプのキット (Genomic-Tip 20/G, QIAGEN) を用い、遠心機に himac CF 16RX (日立工機)、恒温槽に DryThermoUnit DTU-2B (TAITEC)、吸光度測定に Gene Quant pro (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を使用して実施した。PCR 増幅は植物検出用 (CP03-5'、CP03-3')、エビ検出用 (ShH12-05'、ShH13-03')、カニ検出用 (CrH16-05'、CrH11-03') (以上いずれもファスマック)、動物検出用 (AN1-5'、AN2-5'、AN-3') (北海道システムサイエンス) の各プライマー、PCR 酵素に AmpliTaq Gold (Life Technologies) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies) により通知に従って実施した。PCR 増幅液は ultraPUREAgarose-1000 (Life Technologies)、 $50 \times$  TAE (遺伝子工学研究用、ニッポンジーン) により作製したアガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid-2x (ADVANCE) を使用して電気

泳動し、増幅物の有無を確認した。なお、アガロースゲルのエチジウムブロミド染色は前染色により実施し、サイズマーカーには 20bp DNA Ladder または 100bp DNA Ladder(以上 TAKARA)、画像解析にはプリントグラフ(ATTO)を使用した。

外部精度管理の本格的実施に向けて、実施可能な規模の確認のため、卵添加試料を用いた外部精度管理の模擬試験を参加機関の範囲を拡大して計画、実施した。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、 $-20^{\circ}\text{C}$ 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。試料の均一性及び安定性の検討では、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。

なお、均一性及び安定性はモリナガ FASPEK 卵測定キット(森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II 卵(日本ハム)及びアレルゲンアイ ELISA 卵(プリマハム)のそれぞれの ELISA キット測定について検討した。また、吸光度測定及び濃度計算にはマイクロプレートリーダー EL 808IU、及び計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver. 1. 80 (Bio-Tek Instruments)を使用した。

卵添加試料を用いた外部精度管理調査を実施した。過去に実施した共同試験の協力

機関及び各都道府県、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。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、アレルゲンアイ 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。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、 $\bar{X}$ -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)。なお、 $\bar{X}$ -R 管理図の上下管理限界線は(メジアン $\pm$ メジアン $\times 50\%$ )とした。これは、前述したガイドラインの 4. の提言にタンパク質の回収率が「50%以上、150%以下であること」と記載されており、キットの測定誤差の範囲はこれ以下と考えられること、及び以下に示すロバスト方式による統計でメジアンの 50%以下、150%以上のデータを除外するメ

ジャンククリーニング操作が必要であることによる。

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。なお、今回の外部精度管理調査でモリナガ FASPEK 卵測定キットを使用した機関は 39 機関、FASTKIT エライザ Ver. II 卵を使用した機関は 31 機関、アレルギーアイ ELISA 卵を使用した機関は 4 機関であった。

より安定的なそば試料の作製を目的として、そばタンパク質溶液添加試料の作製について検討するとともに、小規模での配布量を想定した試料調製を試みた。そば粉は標準品規格に規定されている茨城県産そば粉及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）及び、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 及び Double Shaker R-30 mini（以上 TAITEC）、遠心機：himac CF 16RX（日立工機）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）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）、モリナガ FASPEK そば 測定キット（森永生科学研究所）及びアレルギーアイ 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、吸光度測定及び濃度計算にはマイクロプレートリーダー EL 808IU、及び計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver. 1.80（Bio-Tek Instruments）を使用した。

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及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：MK-K58（松下電器産業）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）を用いて粉砕し、遠沈管に 1 g ずつ分注した後、そばタンパク質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°C で凍結保存した。

#### 6.4 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正試料の作製：

害虫抵抗性遺伝子組換え米を検討対象として、外部精度管理の際にあらかじめ Threshold line（Th.line）を指定し、参加機関における Ct 値のデータを収集した。63Bt コメ DNA 溶液及び CpTI プラスミド溶液はいずれも国立医薬品食品衛生研究所から供与を受け使用した。あらかじめ害虫抵抗性遺伝子組換えコメを含まないことを確認した米粉から GM quicker2（ニッポンジー

ン) を使用し改正通知法のプロトコールに従って DNA 溶液を抽出し、nonGM コメ DNA 溶液とした。なお、遠心分離には多用途小形遠心機 CF16RX (日立工機)、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。リアルタイム PCR は改正通知法に従い、コメ陽性対照用試験はコメ陽性対照用プライマー対 (KVM159 及び KVM160) 及びコメ陽性対照用プローブ (TM013)、63Bt コメ検出用試験は Bt コメ検出用プライマー対 (T51-SF 及び OsNOS-R2)、及び 63Bt コメ検出用プローブ (GM63-Taq)、NNBt コメ検出用試験は Bt コメ検出用プライマー対 (T51-SF 及び OsNOS-R2)、及び NNBt コメ検出用プローブ (NGMr-Taq)、CpTI コメ検出用試験は CpTI コメ検出用プライマー対 (CpTi-1F 及び CpTi-1R)、及び CpTI コメ検出用プローブ (CpTi-P) を、マスターミックスには TaqMan Universal PCR Master Mix を使用して実施した。なお、リアルタイム PCR 装置には 7900HT リアルタイム PCR システム 96 ウェル (以上いずれも Life Technologies Japan) を使用した。リアルタイム PCR の結果は指数関数的な増幅が観察された場合、Th.line を 0.2 から 0.5 に設定して Ct 値を求め、38 未満の Ct 値が得られた場合、陽性と判定した。

各試料の害虫抵抗性遺伝子のコピー数は陽性対照プラスミドのコピー数を 500、増幅率を 2 と仮定し、同じプレートで測定したリアルタイム PCR における試料と陽性対照プラスミドの Ct 値の差から計算した。また、陽性対照プラスミドの段階希釈液の測定結果から、63Bt コメ、CpTI コメ、コメ陽

性対照用の各検出系の検量線を作成し、これに別プレートで得られた Ct 値を代入する方法によっても計算した。

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

解析の対象を DNA 溶液試料のみから、粉末試料にも拡大し、DNA 抽出による誤差が Ct 値に与える影響及びその対処法についても検討した。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) 及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  $\mu\text{m}$  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、粉末試料の調製及び 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  $\text{ng}/\mu\text{L}$  の DNA 溶液を抽出し、

これを同様にして抽出した 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。

DAS59132 検出用で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/ $\mu$ 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。

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 及び試料 2、各 1 本)、DNA 溶液試料 3 試料 (試料 A、試料 B 及び試料 C、各 1 本)、陽性コントロール (0.5%、5%各 1 本) を、実施要領及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及び 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。

外部精度管理調査結果の統計処理として、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 検出用試験及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 (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 管理図及び 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。

現在所有している陽性コントロールプラスミドが入手可能な安全性未審査の遺伝子組換え米及びパパイヤの各遺伝子について、9600 emulation mode 及び Standard mode (通常のペルチェ素子プレート加熱冷却方式のモード。9600 emulation mode よりも温度の切り替えにかかる時間が短い。) の 2 種類のランモードで ABI7900 を使用し、リアルタイム PCR 測定を行い、結果を比較した。

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。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) 及び遺伝子組換え米 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) 及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 及び 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 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。ベースライン及び 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. 研究結果及び考察

### 1 尾花分担研究

平成 23 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、測定値から食品規格への適否の判定を行った。こ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原材料の全部又は一部に農薬が添加され、かつ③添加農薬の均一性及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又は一部が、その形状を保ち識別できる状態である。そこで、ポークビーンズを模した食品を発案し、分別に際しては、液状のトマトから大豆及びハムを、水で洗いながらネットで濾し採る方法を考案した。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考えられ、②、③の条件に合致すると推定した。乾燥大豆を農薬の水溶液に浸漬することによって添加を行った。添加農薬の均一性及び安定性は、ポークビーンズ及び分別した大豆で評価し、微量の農薬がトマトピューレに移行したものの、共に試験に影響ないと判断した。農薬の添加方法が乾燥大豆への浸透であったため、大豆中の濃度、ポークビーンズ中の濃度は当初不明であった。そのため、経験的・定義付け分析法による合意値をもって決定することとした。分析法の検証は、ブランク試料における内部標準物質を用いた添加回収試験によ

り、既知の添加濃度に対する添加回収率で行った。付与値は、ポークビーンズ、分別した大豆及びトマトについて決定するため、添加回収試験はブランク試料、大豆及びトマトで、各々5 併行で3 回繰り返し行った。ブランク試料及び大豆の試験は、添加濃度を100 ng/gとした。トマトの試験は、添加濃度をトマトピューレ換算で70 ng/gとした。定量下限値はカルバリルについて、ブランク試料、大豆（生鮮状態に換算）及びトマト（生鮮状態に換算）で、各々3.0 ng/g、4.0 ng/g 及び4.6 ng/g であり、カルバリルを除く項目については、各々1.8 ng/g、2.4 ng/g 及び2.8 ng/g であった。ブランク試料、大豆及びトマトにおける各々の添加回収率は概ね100%であり、当該分析法は付与値を決定する上で、妥当と判断した。次に付与値を決定するため、当該分析法によりポークビーンズ、分別した大豆及びトマトを、添加試料5 容器につき2 併行で、3 回測定した。大豆及びトマトの測定値は、試料容器内での濃度で算出した。区間推定により、測定値はその95%信頼区間を算出し、付与値は各々の区間中央値を採用した。

平成23年度の分析機器の再現性試験において、標準溶液の連続測定では、協力機関ごとのピーク面積比の平均値は94.6～114.8%、変動係数は0.5～8.9%及びZスコアは-1.8～1.7であった。ピーク面積比の機関内の変動係数が10%を超える機関はなかった。マトリックス標準溶液の連続測定では、ピーク面積比の平均値は93.0～111.5%、変動係数は0.4～12.0%及びZスコアは-1.8～1.8であった。G機関でプロポキシル、フェノブカルブ及びイソキサチオンで、ピーク面積比の機関内の変動係数が

10%を超えた。また、標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比率は、D機関の7項目が120%を超え、1項目が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/NH<sub>2</sub>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。その他の機関は、全項目が70%～120%の範囲内であった。以上のことから標準溶液、マトリックス標準溶液共に概ね良好な再現性で測定できた。

平成23年度の外部精度管理試験において、ポークビーンズ全体を均一化した場合では、全ての機関が添加農薬を検出し、平均回収率の平均値は82.7～92.3%であり、Xbar 管理図におけるLCLの70%からUCLの120%の範囲を超える機関はなかった。R管理図では、D機関のピリミカブ及びチオベンカルブ、E機関のカルバリルが適正域から外れた。Zスコアは、E機関でフェノブカルブ2.3及びG機関でカルバリル-2.1となった。これら以外の6機関では、Xbar 管理図、R管理図及びZスコアの評価で全項目が良好であった。分別した大豆の場合でも、全ての機関が添加農薬を検出し、回収率の平均値は82.6～93.5%であった。Xbar 管理図におけるLCLの70%を下回ったのは、D機関でチオベンカルブ57.0%及びG機関でカルバリル68.1%であった。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。R管理図では、E機関のカルバリル、

イソプロチオラン、プロピザミド、イソキサチオン及びチオベンカルブが適正域から外れた。Zスコアは、D機関でチオベンカルブ-2.2、E機関でカルバリル 2.0、G機関でプロピザミド-2.0、及びI機関でフェノブカルブ 2.1並びにジエトフェンカルブ 2.1となった。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。均一化した場合の成績と比較すると、D及び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。これら以外の5機関では、Xbar管理図、R管理図及びZスコアの評価で全項目が良好であった。

基準適合性の判定は、ポークビーンズの全機関の判定は全項目について不適合となり、付与値に基づく判定と一致した。大豆の場合はE機関がカルバリルを不適合としたことを除いて、付与値に基づく判定と一致した。またトマトが全項目で適合となった。大豆のカルバリルについて、付与値は基準値(0.2 ppm)と一致し、E機関を除く各機関は適合と判定したが、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。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、測定値の変動が大きかったことが要因とみられた。ポークビーンズは、加工食品としては全項目で不適合であった。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

依らず、最終的には適合であった。大豆及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。

平成24年度に開発した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、陽性試料には2-DCB及び2-TCBを各々50 ng/g添加した。これらを本分析法に従って操作し、陰性試料は1日2併行2日間くり返し、陽性試料は1日4併行4日間繰り返した。これら全ての試料について、陰性又は陽性の判定が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。

本分析法は、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、必要な含水フロリジルの重量が36g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。本研究では、簡便で迅速な2-アルキルシクロブタノン分析法を開発した。抽出方法はn-ヘキサンによる振とう抽出を採用した。あらかじめ試料をケイソウ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り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、パスツ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是否定できないが、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させ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及び簡便な方法であった。この分析法を用いて、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。

本研究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外周部は線量が高く、線源から遠い試料容器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、外部精度管理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とした。平成 24 年度に調製したハンバーグパテは、原材料が牛肉と塩のみであり、実質的に牛肉を対象とした試験であった。平成 25 年度には、脂肪酸組成の異なる試料を選択すべく、パルメザンチーズ、ピーナッツバター、生ハム、サラミ、スモークサーモンで予備検討を行った。これら試料は、いずれもガンマ線の照射で 2-アルキルシクロブタノンが生成し、添加回収試験も良好であった。これら試料のうち、ピーナッツバターは植

物由来製品、スモークサーモンは魚由来製品であり、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。そこで平成 25 年度はチーズ、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。

平成 24 年度に行った協力機関の添加回収試験では、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。

平成 24 年度に行った外部精度管理試験では、非照射群（黄）から 2-アルキルシクロブタノン類を検出した機関は無かった。低線量照射群（赤：0.8 kGy）では、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。高線量照射群（青：2.0 kGy）では、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。協力機関のうち、C 機関は全ての測定値が最も小さかったため、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った。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%前後であった。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ったため、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 を使用している点であった。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った。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った。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った。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。

平成 25 年度に行った外部精度管理試験では、協力機関がスモークサーモン、チーズ（照射）、ピーナッツバター（照射）を分析した結果、全機関が照射された試料のみから 2-アルキルシクロブタノンを検出した。チーズ（1.6 kGy 照射）では、2-DCB の目標値 172 ng/g に対し、8 機関の平均値は 181 ng/g であった。Xbar 管理図は 4 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。2-TCB の目標値 73.6 ng/g に対し、8 機関の平均値は 84.8 ng/g であった。Xbar 管理図は 3 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。ピーナッツバター（1.2 kGy 照射）では、2-DCB の目標値 89.0 ng/g に対し、8 機関の平均値は 86.3 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 1 機関が適正域を外れた。2-TCB の目標値 42.4 ng/g に対し、8 機関の平均値は 42.9 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 1 機関が適正域を外れた。照射履歴判定では、全ての機関で全てのピークの S/N 比は 3 以上であり、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 つのモニターイオンのピーク面積比は、7

機関においては標準品と比較して±20%の範囲内であったが、1 機関ではレトルト牛井測定時に妨害成分の影響で 2-DCB の  $m/z$  112 の面積値が大きくなり、標準品の面積比より約 50% 増加した。しかし、2-TCB では面積比に問題はなく、照射履歴の判定は正確に行えた。

魚や植物に含まれる脂肪は、不飽和度が高めであり脱脂操作時に沈殿が生成しにくい性質がある。また、チーズは牛乳脂肪由来ではあるが発酵食品のため、動物性脂肪とやや異なる挙動を見せた。そのため、今回用いた試料では、低温での遠心分離でも下層が固化せず、液状のまま二層に分離することがあり、上層の採取時に下層が混ざる可能性が高い。逆にこれを避けようとする上層を取り残す可能性がある。これらが今回の試験での数値のばらつきの要因のひとつとなった可能性がある。H 機関では脱脂時に下層の混入を極力避けたため、分析値が低くなった可能性が挙げられた。そこで、残った試料を用いて再度試験を実施し、脱脂時に上層を十分に採取した結果、チーズで 2-DCB が 191 ng/g、2-TCB が 100 ng/g、ピーナッツバターで 2-DCB が 101 ng/g、2-TCB が 49 ng/g となり、均一性確認時の数値に近い値が得られた。F 機関では、全ての定量値が過大となり、チーズとピーナッツバターの両方で Xbar 管理図の上部限界を超え、レトルト牛井の報告値も最大であった。検量線作成時に問題があったと考え、聞き取り調査をした結果、検量線作成時に標準溶液を窒素吹き付けで乾固し、試料と同様に内部標準液で溶解する操作を行ったことが判明した。この際に 2-アルキルシクロブタノンの損失があったことが考えら

れたが、実験的に再現することができず、原因究明はできなかった。

平成 25 年度に実施した常温長期保存試験では、常温で照射されたレトルト牛井において、照射線量依存的に 2-アルキルシクロブタノン濃度が増加した。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。また、照射 6 ヶ月後でも 2-DCB 及び 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。また照射レトルト牛井 (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。照射レトルト牛井中の 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。また、協力機関が照射及び非照射のレトルト牛井を分析した結果、全機関が照射レトルト牛井のみから 2-アルキルシクロブタノンを検出した。各機関の平均値は 2-DCB で 336~759 ng/g、2-TCB で 172~426 ng/g であった。この濃度は、照射後 10 ヶ月間追跡した値の分布範囲と比較し、5 機関が 1 項目以上で範囲外であった。今回は、試料調製後に密封する技術が無かったことと、定性分析が主であることから、照射後の均一化操作を行わなかった。そのため、分析値のばらつきが大きかったと考えられる。しかし、長期保存における 2-アルキルシクロブタノンの安定性は確認でき、また全機関が当該試験において照射試料を正しく判定できることが判明した。

照射履歴の判定については、平成 24 年度、25 年度共に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。平成 24 年度の赤色ハンバーグパテは約 0.8 kGy、青色ハンバーグパテは約 2 kGy の照射であり、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。また平成 25 年度の脱脂操作が容易でない試料でも、2-アルキルシクロブタノンの測定と照射履歴の判定可能であったことから、当該分析法は汎用性が高いことが示唆された。本研究の精度管理試験などで照射した線量は、諸外国での照射実態を考慮して 2.7 kGy 以下であった。従って本研究成果は、今後食品照射が許可された場合、十分に活用できる情報と考えられる。

## 2 中澤・斉藤分担研究

既報 DON 調査報告の解析のうち、大麦については、平成 14~16 年度及び平成 18 年度に基準値を超えていた。DON はフザリウム属真菌が産生するものであることから、温度や湿度など気候条件によってその発育に変動があったためと推察された。「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、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示唆された。

次に、農林水産省により「食品の安全性に関する有害化学物質のサーベイランス・モニタリング中期計画」（平成18年4月20日公表）として行われた、「麦類加工品のかび毒含有実態調査」を精査した。その結果、特にDONに着目してみたところ、検出割合は極めて低く、0~6%程度であった。更に、検出されたものについても、ほとんどが定量限界値レベルであった。農林水産省の報告では、これらのデータを、大人1人、1日当たりの平均的な食品の摂食量（「平成18年国民健康・栄養調査報告」（厚生労働省））の平均値等を用いて、大人1人、1日当たりの平均的な摂取量を試算した結果、合計で0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日であり、耐受摂取量（1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日）に対する割合としては、8.0%となり、国民の健康に悪影響を及ぼすことはない結論されている。

しかし、この計算の基にしたデータは平均値（検出限界未満の濃度を検出限界とし、検出限界以上かつ定量限界未満の濃度を定量限界として算出）を用いている。リスク評価の観点からは、検出された最高値のデータを用いて曝露評価を行うことも必要と思われた。実際に検出された各品目の最高値を用いてDON摂取量を再計算したところ、

耐受摂取量に対する割合は2.7%となり、平均値で算出した場合に比べて約1.6倍となった。また、合計摂取量に対するそれぞれの品目の摂取量割合を新たに算出したところ、ビール単独で43.2%に達することが分かった。

そこで本研究では、DON曝露の影響が大きい食品としてビールに着目した。なお、DONが検出されたビールは20検体中でわずか1検体であり、且つ定量限界レベルであった。しかし、食品としてのビールの1日当たりの摂取量は「国民栄養調査報告」から58.6 g/日とされているが、これは、性別や年齢に関係なく平均化されてはじき出された数値であり、ビール趣向のある成人男性の場合、ビールの1日当たりの摂取量は58.6 g/日よりもはるかに大きく、それに伴ってDON摂取量も増大することが推測される。また、ビールの原料は大麦であるが、大麦でのDON汚染率が近年、上昇傾向にあることから、ビールに対する着目は妥当なものと思われた。

平成24年度は、DON測定用ELISAキットの選定を行い、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』及び『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、併行再現性及び室内再現性は共に15%以下と良好な結果が得られた。これは「食品中に残留する農薬などに関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（平成19年；厚生労働省）に沿った値であった。また、IC<sub>50</sub>値の比較（『DON』：46 ppb、『RIDASCREEN® DON』：20 ppb）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。

前処理（抽出・クリーンアップ）の検討を行った結果、低濃度（20 ppb）では回収率が悪く、ばらつきも大きくなったため、前処理としてアセトニトリル抽出及びクリーンアップ用多機能カラム MycoSep®#227 による試料精製法を検討した。その結果、『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）及び高濃度（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、併行再現性及び室内再現性を評価するために、精度管理試験として添加回収試験を行った。その結果、低濃度と高濃度添加のいずれにおいても、標準品とほぼ一致するシグモイド曲線が得られた。また、高濃度（100ppb）添加及び低濃度（10ppb）における平均回収率（最確値）はそれぞれ 93.8%、96.8%と良好な値が得られたが、併行精度は高濃度添加で 1.3%であったのに対して、低濃度添加では 23.8%とばらつきが大きくなった。しかし試料精製を行わずに PBS 希釈のみで行うよりも最確値、併行精度及び室内再現精度は良好であったことから、本研究で構築した試料前処理を行うことで、低濃度での測定が可能と推察された。

平成 25 年度は、構築した方法を用いて外部精度管理試験を実施した。ELISA キットの性能と実験者の技術レベル評価を行った結果、DON 標準品による検量線（シグモイド曲線）から  $IC_{50}$  値を算出し、検査機関間で比較することで、ELISA キットの性能と実

験者の技術レベルを評価した。参加した 7 検査機関間の  $IC_{50}$  値の平均値は 16.4 ng/mL であり、7 検査機関中 5 機関が標準偏差 (SD: 3.5 ng/mL) 以内 ( $|z\text{-Score}| < 1$ ) に、また残りの 2 機関の値も標準偏差の 2 倍以内 ( $|z\text{-Score}| < 2$ ) に収まっていたことから、用いた ELISA キットの性能に問題は無く、また、各検査機関において本実験に従事した実験者の技術レベルにも問題がないことが確認された。

また、高濃度添加試料の精度管理結果、高濃度添加試料の室間再現精度については、指定の前処理を行った場合、いずれの検査機関のデータも添加濃度より若干低めではあったが、添加濃度と平均値（最確値）との乖離は 20% 未満であり、また残渣の  $z\text{-Score}$  は全て  $|z| < 2$  の範囲に収まっていたことから、室間再現精度実験として信頼性の高い満足できる結果が得られた。

一方、前処理を行わなかった場合、添加濃度と最確値との乖離は 10% 程度と良好な結果が得られ、7 検査機関中 5 機関の測定残渣 ( $z\text{-Score}$ ) は、 $|z| < 1$  であった。残りの 2 機関も若干高めではあったが、 $|z| < 2$  の範囲に収まっており、スクリーニング法としてほぼ満足できる結果が得られた。したがって、ビール中に DON が高濃度で汚染されている場合には、試料精製を行うことなく水で希釈する処理のみで信頼性の高い ELISA 測定を行えることが示唆された。

次に、低濃度添加試料の精度管理を行った結果、低濃度添加試料の室間再現精度については、前処理を行った場合、高濃度添加の結果と同様に、7 機関中 5 機関は測定残渣が  $|z| < 1$ 、残りの 2 機関も  $|z| < 2$  の範囲に収まっていた。しかし、添加濃度と

最確値との乖離は80%程度と比較的大きく、7検査機関中でのばらつきも最大値/最小値で約3倍の開きが認められた。

“前処理なし”の測定結果はいずれの検査機関も $|z| < 2$ の範囲に収まっていたが、添加濃度と最確値との乖離は約200%と大きくなった。これら低濃度添加試料において測定精度が低下した理由として、添加レベルは用いたELISAキットの検量線範囲内ではあったが、マトリックス由来の“擬陽性”となる夾雑物の影響を受けたことが推察された。これは“前処理あり”の方が“前処理なし”に比べて添加濃度と最確値との乖離が比較的小さいこと、また、最確値そのものも、“前処理なし”と“前処理なし”との比が2倍に近い値が示されたことから裏付けられると推察された。

以上の結果から、低濃度試料では精度が低下したものの、前処理操作を行うことで、DON濃度が10 ppb以上のビール試料であれば、ELISAでのスクリーニングが可能であることが示唆された。

### 3 斉藤分担研究

平成23年度は、ELISAの最適化を行った。抗体はウサギを動物種としたポリクローナル抗体を作製し、間接競合法によるELISA構築を目指した。固相化に用いるCPA-conjugateのキャリアタンパク質には、KLHを用い、CPA-conjugateの濃度について $1 \mu\text{g/mL} \sim 5 \mu\text{g/mL}$ の範囲で検討したところ、 $1 \mu\text{g/mL}$ では発色が不十分であり、また、 $3 \mu\text{g/mL}$ と $5 \mu\text{g/mL}$ では、発色の度合いは $5 \mu\text{g/mL}$ の方が強かったが、測定感度は $3 \mu\text{g/mL}$ の方が良好であったことから、分析コストも考慮して低濃度の $3 \mu\text{g/mL}$ を

採用することにした。次に、第一抗体の濃度について12500倍希釈～50000倍希釈の範囲で検討したところ、12500倍希釈と25000倍希釈が、50000倍希釈よりも良好な感度を示した。12500倍希釈と25000倍希釈ではほぼ同等の結果が得られたが、コスト面を考慮して25000倍希釈を採用した。第二抗体の濃度について1500倍希釈～6000倍希釈の範囲で検討したところ、1500倍希釈、3000倍希釈、6000倍希釈のいずれも良好な検量線が得られたが、6000倍希釈では発色が弱かったため、3000倍希釈を採用した。

以上の条件で、CPA標準品 $0.001 \text{ ng/mL} \sim 1000 \text{ ng/mL}$ の範囲で、縦軸に $B/B_0$ を、横軸を濃度の対数とした片対数グラフで検量線をプロットしたところ、逆シグモイド曲線が得られ、更に $1 \text{ ng/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$ の範囲で良好な直線性が得られた。ELISA法の検出限界を、逆シグモイド曲線と接線を作図する方法(薬学雑誌(2005), 125(3), 323-325)から求めたところ、 $0.4 \text{ ng/mL}$ であり、また50%阻害濃度( $IC_{50}$ )値は $16.7 \text{ ng/mL}$ であった。

実試料をELISAで分析した場合のマトリックス効果の影響について検討するため、めんつゆの前処理法について検討した。その結果、前処理クリーンアップが十分な液液抽出と固相抽出法を併用した場合はもちろん、液液抽出または試料原液の希釈(10倍希釈)だけでも、それぞれ作成したマトリックス検量線は、マトリックスが存在しないCPA標準品の検量線と良好に一致した。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。めんつゆ原液、原液を PBS で 5 倍、10 倍、及び 100 倍希釈したものを調製し、これらで CPA 標準品を希釈して希釈系列を作製し、実験を行った。その結果、めんつゆ原液では、マトリックスの影響を強く受けて検量線を描くことが困難であったが、5 倍以上希釈したものでは、いずれも PBS で希釈系列を調製した場合と同等な検量線が得られた。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。

なお、ELISA に供する試験溶液としたメタノール-PBS 混液中の、メタノール濃度について検討した。0.5%、1%、10%を調製して希釈系列を作製し、実験を行ったところ、いずれの濃度でも良好な検量線が得られた。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。

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

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こと、なら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。

なお、検量線測定範囲の 5、10、50 及び 100 ng/mL を横軸に取り、対応する各標準偏差の値を縦軸にプロットすると U 字型の再帰曲線が得られた。この場合、極小値はほぼ 10~50 ng/mL の範囲であり、上記の標準品を用いた実験で得られた  $IC_{50}$  付近と一致したことから、ELISA における定量値は  $IC_{50}$  付近 (10-50 ng/mL) が最も精度が高いことが確認された。

自家調製した ELISA プレート固相化用の CPA-conjugate と市販品とを比較検討した結果、CPA の ELISA 測定において要となるプレートへの固相化のための CPA-conjugate については、市販品の場合、製造ロットによって若干感度や純度のバラツキがあることがこれまでの本研究で散見された。そこで、CPA とポリリジンとの conjugate を自家調製して、市販品との性能比較を検討した。CPA 標準品 (1.0 ng/mL ~ 1000 ng/mL) を用いてそれぞれの conjugate を用いた際の検量線を作成したところ、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。そこで、自家調製した CPA-conjugate を用いて実験を行った。

ELISA のバリデーション及び実試料分析におけるマトリックス効果の影響を検討した。ELISA の基本的操作条件は先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/B<sub>0</sub> を、横軸を濃度の対数とした片対