

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。

実試料分析における抽出クリーンアップ法の検討した結果、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) を採用した。SPDE には固相抽出カートリッジ Oasis[®] HLB の充填剤 (30 mg) 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、低濃度の 1%メタノールを採用した。

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 μ g/g)

で、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。ELISA の検量線測定範囲の 1、10 及び 100 ng/g の 3 点について平均回収率から求めた真度の信頼性は 1 ppb では低めの値 (56.3%) であったが、IC₅₀ 付近の 10 ppb と検量線範囲上限の 100 ppb では、69.3%及び 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、10~100 ppb の範囲で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 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 1 ppb の測定ポイントでは 140.9%と変動が大きくなったが、10 ppb 及び 100 ppb では 39.7%及び 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、併行精度及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

4-1. GC/MS によるクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンの定量

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及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。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 で混合調整した。同じ検査員が異なる日時に 2 回試行した。

その結果、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ている事が分かった。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る。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% 以下になっている。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、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を示している。

別の検査員がにんじんで同じ試験を実施して、絶対検量線法、マトリックス検量線法、標準溶液添加法を比較した結果、絶対検量線法による結果は回収率 164~201% であり、ほうれんそうの結果と差はなかったが、マトリックス検量線法による結果は回収率 123~138% であり、ほうれんそうの結果よりプラス側にバイアスがかかっている。

一方、標準溶液添加法による結果は回収率 95~107% であり、最も 100% に近い回収率が得られた。

さらに別の検査員が添加量を 10 倍の 0.2 ppm としてにんじんで同じ試験を実施した。当該試験においても、標準溶液添加法による補正結果は良好であった。

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の結果を行い、GC/MS と同様に 0.02 ppm 相当添加回収した結果で、異なる検査員が異なる日時に実施した。その結果、回収率は 94~105% の範囲内、RSD は 3.28% であり、回収率、再現性ともに良好な結果であった。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、狭雑ピーク及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。

4-2. LC/MS によるサイクラミン酸の定量

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。

今回の検討では、絶対検量線法によって 82~124% の回収率が得られたが、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い。

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られる。

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。

4-3. MG 及び LMG への食品添加物の影響調査

MG の 20 $\mu\text{g/mL}$ アセトニトリル溶液は濃い青緑色であるが、0.2%SO₂ 水溶液を加えると直ちに退色し、6 時間後には MG は初期の 30% にまで減少し、保持時間 11.8 分に大きなピークが生じた。このピークの質量スペクトルには $[\text{M}-\text{H}_2\text{SO}_3-\text{H}^+]=411+$ が認められることから、MG-SO₂ 付加体の生成が考えられた。

MG に 0.2% H₂O₂ 水溶液を加えた系においては 6 時間後もピーク強度、質量スペクトルに変化は認められなかった。

LMG に 0.2% SO₂ 水溶液を加え、6 時間後には LMG は初期より 5% 程度減少し、保持時間 11.8 分にピークが生じた。このピークの質量スペクトルには MG の擬分子イオン $[\text{M}-\text{H}^+]=329+$ の他に $[\text{M}-\text{SO}_3-\text{H}^+]=409+$ が認められた。

LMG に 0.2% H₂O₂ 水溶液を加えた場合、6 時間後には LMG は初期より 3% 程度減少し、保持時間 10.2 分にピークが生じた。このピークの質量スペクトルには MG の擬分子イオン $[\text{M}-\text{H}^+]=329+$ の他に水付加体イオンであると考えられる $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}^+]=347+$ が確認された。

5 鎗田分担研究

4 種の基材を用いて評価した IDMS の精確さを評価した。分析対象農薬の回収率は、添加した農薬量に対して 76~93% であったのに対し、IDMS による測定値は校正標準液 (マトリックス有) を用いた場合で 99.3~102.8%、校正標準液 (マトリックス無) を用いた場合で 87.5~100.5% であった。標識体を内標準に用いる IDMS では、試料の前処理過程における分析対象農薬の回収率 (損失) が補正されるために、真度の高い分析値が得られたものと考えられた。一方、併行精度についても、分析対象農薬の回収率測定ではおおよそ 4% 以下であったのに対し、IDMS 測定の併行精度はほとんど分析対象農薬について 1.5% 以下であり、IDMS の方がより良好な再現性が得られた。以上から、IDMS を適用することにより、外部精度管理調査試料中の分析対象農薬を精確に分析できることが示された。

なお、IDMS では GC/MS 測定におけるマ

トリックス効果も補正することができると考えられているが、校正標準液のマトリックスの有無によって異なる分析結果が得られた。得られたピークの一例として、にんじん基材中のイソキサチオンとその標識体のクロマトグラムから他の測定試料と比較して、校正標準液（マトリックス無）では標識体のピークが相対的に小さくなる傾向があった。その原因は明らかではないが、IDMSを適用した場合でも、マトリックスマッチングを施した校正標準液を用いた方が、より真度の高い分析結果が得られるものと考えられた。

正確さを確認した分析法1と、別途正確さを確認した分析法2によって、平成25年度外部精度管理調査（残留農薬検査I）の調査試料を分析した。フェニトロチオンの分析値は分析法1が0.476~0.499 $\mu\text{g/g}$ 、分析法2が0.488~0.506 $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホスの分析値は分析法1が0.244~0.252 $\mu\text{g/g}$ 、分析法2が0.237~0.244 $\mu\text{g/g}$ であり（すべて $n=5$ ）、両法の結果はほぼ一致していた。そこで、分析法毎に(1)式の F_s 、 R_s 、 R_c 、 $M_{sp(s)}$ 、 M_s に係わる不確かさから算出した合成標準不確かさを重みとして、重み付け平均値とその不確かさを算出した。その結果はフェニトロチオン：(0.495 \pm 0.019) $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス：(0.245 \pm 0.014) $\mu\text{g/g}$ （重み付け平均値 \pm 拡張不確かさ（包含係数：2））であった。

以上の結果を外部精度管理調査の結果と比較した。調査試料の調製における分析対象農薬の添加濃度は、フェニトロチオンが0.5 $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホスが0.24 $\mu\text{g/g}$ であり、IDMSによる分析結果はこれと良く

一致した。一方、外部精度管理調査の参加機関の結果から決定した付与値（ 2σ 処理後の従来方式による）は、フェニトロチオンが(0.458 \pm 0.123) $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホスが(0.224 \pm 0.057) $\mu\text{g/g}$ （平均値 \pm 標準偏差の2倍）であった。IDMSによる分析値はこれより約8%高かった。この原因としては、参加機関のほとんどが、試料前処理における分析対象農薬の回収率（損失）を補正していないためと考えられた。また、参加機関間のばらつき（標準偏差）に対して、IDMSによる分析結果の不確かさはフェニトロチオン：15%、クロルピリホス：25%であり、IDMSによる分析値の不確かさは充分小さいことが示された。

6 渡辺分担研究

6.1 理化学検査のための適正試料の作製検討：

10種類のサルファ剤を添加して牛肉試料の均一性の確認を行った。作製後、冷凍保存した試料について、分注した容器から10容器を選択し、それぞれの容器につき $n=2$ で各サルファ剤濃度を測定した。得られた結果より一元配置の分散分析を行ったところ、ヒレ肉では全てのサルファ剤において均一性が認められた。ブランク試料のクロマトグラムにおいて、5種類のサルファ剤（SDZ、SMR、SMMX、SCPD及びSMX）の保持時間付近に基材由来の夾雑ピークが認められ、バックグラウンドとして試料のピークエリアから差し引いて計算した。また、添加量の0.2 $\mu\text{g/g}$ に対する回収率は、70~80%とやや低かったが、70%を下回るサルファ剤はなかった。

カタ肉では、4種類のサルファ剤（SDZ、

SMR、SIX 及び SQ) は均一性が認められなかったが、他のサルファ剤 (SDD、SMPD、SMMX 及び SCPD) は均一性が認められた。また試料のバックグラウンドとして、ヒレ肉と同じ 5 種類のサルファ剤において、ブランク試料を差し引いて濃度の計算を行った。添加量に対する回収率は、SDZ が約 57% と著しく低かったが、その他では、71~87% であった。

バラ肉では、10 種類中 6 種類のサルファ剤 (SDZ、SDD、SMPD、SCPD、SIX 及び SQ) は均一性が認められなかったが、他のサルファ剤 (SMR、SMMX、SMX 及び SDMX) は均一性が認められた。クロマトグラムについては、ヒレ肉及びカタ肉とは異なるサルファ剤 (SMPD) の保持時間付近にバックグラウンドとなるピークが認められたが、その他の 4 種類のサルファ剤 (SDZ、SMR、SMMX 及び SCPD) はヒレ肉及びカタ肉と同様に夾雑ピークが認められ、ブランク試料のバックグラウンドのピークを差し引いて計算した。添加量に対する回収率は、SIX が約 69%、SQ が約 68% と 70% を下回った。その他のサルファ剤は、約 70~87% であった。

各基材について脂質量及び水分量の測定を行ったところ、脂質量についてはバラ肉 (20.3%) > カタ肉 (11.0%) > ヒレ肉 (5.7%) となり、水分量については逆にヒレ肉 (69.6%) > カタ肉 (69.3%) > バラ肉 (55.1%) となった。以上の結果から、バラ肉は脂肪分が多く、ヒレ肉などと比較して水分量が少ないため、ヒレ及びカタ肉と同様の混合方法では均一な試料を作製することが困難であることが示唆された。これまで検討を行ってきた鶏肉及び豚肉

のサルファ剤の回収率が、いずれの基材においてもほぼ全てのサルファ剤について約 80~95% であったのに対し、牛肉を基材とした場合は、いずれの部位でも、約 10% 程度低い傾向があった。

牛肉試料の冷凍保存安定性は、作製後より 60 日間冷凍保存した試料について、均一性試験と同様に、各サルファ剤濃度を測定した。その結果、3 種の基材について、ヒレ肉における SIX (79.1%)、カタ肉における SDZ (135.7%) 及びバラ肉における SDZ (105.4%) を除き、いずれの基材においても全てのサルファ剤について 85~99% の安定性が得られた。ブランク試料のクロマトグラムについては、3 部位によるいずれの基材においても、SDZ、SMMX 及び SCPD の 3 種類のサルファ剤で差し引き計算が必要であった。また、カタ肉の SMR (5.93) 及び SDD (3.59) を除き、いずれのサルファ剤及び基材でも、良好な均一性が得られた。しかしながら、いずれのサルファ剤及び基材についても、均一性試験時と比較して、RSD (%) は大きくなる傾向であり、また、F 値は 1 を下回るサルファ剤がカタ肉及びバラ肉にみられた。このことから、更に牛肉試料の冷蔵保存及び凍結融解の安定性を確認する必要があると考えられた。

牛肉試料 (ヒレ肉) の冷蔵保存安定性の検討では、分注した容器から 5 容器を選択し、それぞれの容器につき n=1 で各サルファ剤濃度を測定した。得られたブランク試料のクロマトグラムにおいて、サルファ剤の保持時間付近に基材由来の夾雑ピークが認められた場合は、バックグラウンドとして試料のピークエリアから差し引いて

計算した。また、作製後における回収率は添加量の 0.2 µg/g に対し、81~87%といずれも良好であり、これを 100%として、14 日間の冷蔵保存安定性を検討した。

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 及び SQ) においては 7 日後で 76~94%、14 日後で 58~74%の安定性であり、やや減少傾向が認められた。

凍結融解安定性は、作製後より冷凍保存した試料 10 容器について、凍結融解を 3 回まで行い、凍結融解ごとにそれぞれの容器につき n=2 で各サルファ剤濃度を測定した。なお、繰り返し凍結融解 3 回目で腐敗を認めたため、それ以上の凍結融解は行わなかった。得られた結果について、均一性試験時に対する割合 (安定性 (%)) を算出した。ヒレ肉においては、SMX 及び 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 回目でも 85%以上と、良好な安定性であった。なお、SMX 及び SQ 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、カタ肉においては、SDZ が 2 回目で 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 及び SQ) に見られた。他 6 種のサルファ剤 (SMR、SDD、SMPD、SMMX、SCPD 及び SIX) では 3 回までで 80%以上の安定性があった。

食品添加物検査の着色料について、新基

材としてゼラチンを用いたゼリー菓子の作製を試み、複数色素 (茶系の色調①、赤系の色調②及び③ならびに紫系の色調④) について、それぞれゼラチン濃度を変えて均一性を確認した (n=5)。

その結果、いずれの試料からも、抽出、精製においてゼラチンの妨害を受けることなく、添加色素が正しく検出された。作製工程がやや煩雑であるが、固体試料の 1 つとして、ゼリー菓子が適用できると考えられた。

果実ペースト (いちご及びバナナ) を用いた試料では、許可されている酸性タール色素 12 物質を、それぞれの基材に加えて混合し、均一性を確認した (n=5) 結果、いずれの試料からも、抽出、精製において基材の妨害を受けることなく、添加色素が正しく検出された。果実ペーストは、やや粘性が高く、混合が不完全となることが懸念されたが、n=5 の試料いずれからも、同様の色調及び色度のスポットが得られた。

魚肉製品としての鮭フレークは、脂質が 25~30%あり、アルミニウムレーキを用いた油性溶液による標準溶液添加の必要性が予測されたが、今回の水溶液での色素標準品の添加でも、色素が全体に浸透し、定性試験用試料として適用できると考えられた。

魚肉練り製品であるしんじょう及びかまぼこなどの高タンパク質食品からは、キサnten系色素がタンパクとの吸着により検出されにくい事例が挙げられているが、本研究では市販品への添加においては、抽出に特に問題はみられなかった。

食品添加物検査では、ソルビン酸カリウム水溶液 (ソルビン酸濃度として 0.52

g/kg)に1週間浸漬して得られた試料の外皮、外皮を除く外表面及び中心部の3部位について、試料作製0日及び冷蔵保存60日後のソルビン酸濃度を測定した結果、作製0日後(作製直後)において、大根漬けの3部位について、外皮、外皮を除く外表面及び中心部のいずれでも、浸漬液のソルビン酸濃度0.52 g/kg(理論値)とほぼ同濃度であり、いずれの部位にも均等にソルビン酸溶液が浸透したと考えられた。試料を取り出した後の浸漬液についてもソルビン酸濃度を測定したところ、試料と比較すると、やや高い値を示したが、これは、浸漬液のみ水蒸気蒸留による抽出は行わず、水で希釈後測定したことによると考えられる。

また、冷蔵保存60日後に、同様にソルビン酸濃度を測定して安定性を検討した結果、いずれの部位においても作製当日に対し97~100%の安定性を示した。さらに、大根漬試料と同期間、同様に保存した浸漬液及び保存中に大根漬試料から滲出した液(以下、滲出液)についても、ソルビン酸濃度を測定した結果、両液とも約0.52 g/kgであり同程度であった。このことから、作製60日後においても、試料基材中のソルビン酸濃度は、いずれの部位においても安定しており、また、滲出液ともほとんど差が認められなかった。実際の試験検査時には、全部位を細切・均質化して用いるため、滲出液があった場合でも、濃度が変わることなく十分に定量試験として適用でき、固体部分のみを試験対象とする検査機関あるいは液体部分も合わせて両方を試験対象とする検査機関のいずれの測定法でも結果に影響を及ぼさないこ

とが示唆された。

大根漬け中保存料(ソルビン酸)の長期冷蔵保存安定性(冷蔵保存135日)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。

大根漬け及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。基材対浸漬溶液比とソルビン酸濃度の関係は、浸漬溶液比率が高いほど大根漬け中ソルビン酸濃度は高くなった。実濃度の理論値との乖離の点では、添加したソルビン酸濃度の理論値と大根漬け中の実濃度との差異は、基材比率が高いほど、高い傾向がわずかに認められた。このことから、基材対浸漬溶液比は1:1(質量比)とする条件が最も理論値に近い濃度となり、添加濃度をコントロールする上で適していると考えられた。

市販のシロップを基材とし、シロップ含有量を50%とし、保存料であるソルビン酸及びソルビン酸カリウムを添加して試料を作製し、安定性の検討を行った。その結果、ソルビン酸添加試料の安定性は作製後、冷蔵保存30日後で90%、60日後で77%と低下する傾向があった。一方、ソルビン酸カリウム添加試料では、30日後で99%、60日後で98%と、良好な安定性を確保することができた。ソルビン酸を添加した試料の安定性が、ソルビン酸カリウムを添加した試料と比較して著しく低下したことから、水溶液試料の場合、ソルビン酸よりソルビン酸カリウムを用いる方が、より安定した試料が作製できることが示

唆された。また、添加試薬にソルビン酸カリウムを用いて、シロップ含有量及びソルビン酸としての濃度を変えて試料を作製し、それらのソルビン酸濃度の安定性を検討したところ、作製後、冷蔵保存 47 日後において、いずれのシロップ含有量（10、30 及び 50%）及びシロップ含有量 50%におけるソルビン酸濃度（0.40、0.60、0.75 及び 0.95 g/kg）でも、102~103%の良好な安定性が得られた。このことから、使用基準の 1.0 g/kg に近い、高い濃度で作製しても、シロップ含有量 10~50%の範囲においては、ソルビン酸の定量試験に適用できることが示唆された。

保存料（ソルビン酸及び PHBA エステル類）検査試料に新たな基材として、果実ペースト及び魚肉練り製品の適用性を検討した。

果実ペースト（ソルビン酸及び PHBA エステル類）の均一性試験は、作製後、冷蔵及び冷凍保存した各 10 容器につき n=2 でソルビン酸及び PHBA エステル類の濃度を測定した。その結果、いちごペースト及びバナナペーストとも、冷蔵保存条件時の PHBA エチルでは均一性が得られなかったが、その他の添加した保存料については、均一性が認められた。しかし回収率において、PHBA エチルで全試料とも 50%付近、また、冷蔵保存品における PHBA プロピルが約 60%、PHBA イソブチルが 80%弱と、やや低かったため、冷凍保存品の前処理では、試料量を 15 g から 5 g へと変更して抽出した。その結果、PHBA プロピルは約 70%、PHBA イソブチルは約 90%と、ともに回収率が改善したが、PHBA エチルではほとんど変化がなかった。PHBA エチル及

び PHBA プロピルの市場での使用実態がほとんど無い事、また、今回測定した回収率の観点から、これら 2 物質を除き、実試料化に向けては、ソルビン酸、PHBA イソブチル、PHBA ブチル、PHBA イソブチルの 4 種の保存料を対象に、ペースト中の安定性を検討必要がある。また、冷凍試料の外観において、凍結部分と非凍結部分で斑になった。これは、試料の糖度が高いこと、また増粘剤の使用などが原因と考えられた。また、特に PHBA エステル類において、冷凍試料で F 値が 1 未満となる傾向が見られたことも、この凍結のばらつきにより、1 容器間で濃度差が大きくなったことが原因である可能性が考えられた。これらの事から、果実ペーストの保存条件は冷蔵とし、今後、長期保存安定性の確認が必要である。

魚肉練り製品として、市販品のしんじょうにソルビン酸カリウムを添加し、均一性を確認した。その結果、冷蔵、冷凍いずれの保存においても均一性が得られたことから、実試料化の可能性があると考えられた。

固体試料として魚のすり身（生）を加熱してかまぼこ試料を作製し、検討を行った。まず、餅つき機の混練機能を利用して、魚のすり身（生）にソルビン酸カリウムを添加した。1 回の混練を、すり身 1 及び 3 kg としたところ、均一性が得られ、いずれにおいても餅つき機の混練機能により、すり身中のソルビン酸が均一となることが確認できた。

次に、この均一となったすり身を 3 つ（A、B、C）に分け加熱工程の検討を行った。餅つき機の「蒸し」機能を利用して餅

つき機の臼部に立てて配置し、約 30 分蒸したかまぼこ A、B、C をそれぞれ個体ごとに 6 分割し一個体内での均一性を確認した。その結果、A、B、C それぞれの個体内でのソルビン酸の分布にばらつきはなかったが、A、B、C の 3 個体間（それぞれの分割部位 1~6 について、各 n=2 の平均値を 1 データとした）では、不均一であった。この時、A、B、C それぞれの上部だけの解析では、ばらつきは少なく、一方、蒸気接触が高いと考えられる下部についてはばらつきが大きく、均一性が得られなかった。このことから、蒸し位置によるすり身と蒸気接触の差異が不均一の原因と考えられたため、餅つき機の「蒸し」機能の利用は難しいと判断した。

そこで、ウィンディーオープンを用いて加熱し、かまぼこの作製を試みた。オープンに 110°C に設定し、オープン付属の棚板に、チャック付袋 20 個に小分けしたすり身を直接設置したが、加熱中に、一部の袋で内圧が上がり破裂する現象が見られ、また、すり身の一部に棚板との接触部分に焦げ付きが発生した。そのため、全試料をオープンから出し、チャック付袋からすり身を取り出し、改めてサランラップに包み直した。また、焦げ付き防止のため、金属製金網カゴに載せ、再び 30 分程度加熱してかまぼこを作製した。なお、下段の試料の 1 つについては、n=2 測定のうち、1 測定値が明らかに他より数値が低く、棄却検定を行った結果、有意差を認めたため、この測定結果を除外して分散分析を行った。その結果、下段についてのみ、均一性が得られたが、配置の前後の別や全試料での解析では均一性が得られず、全体的にばらつ

た結果となった。今後は加熱容器の選別を含め、加熱条件及び試料数を増やし、再度、オープン内での温度分布等を検討することが必要である。

残留農薬検査用試料に、マッシュポテトの適用を検討した。乾燥材料に水を添加して作製し冷凍するため、解凍時、離水する現象があり、均質な試料が得られなかったことから、離水防止の目的で、試料の安定剤となる添加物を検討した。

安定剤には、ペクチン及びパールアガーを用い、それぞれの添加剤につき、2 濃度の添加量で試料を作製したところ、解凍後の状態は、いずれの添加剤及び濃度でも、水分と基材が分離することなく、目視では、ほぼ均質な解凍試料が得られた。そこで、それぞれの添加剤につき、添加剤濃度の高い試料について、添加農薬の回収率及び均一性 (n=5) を検討した。

その結果、クロルピリホス、フェニトロチオン、マラチオン、ダイアジノン及びエトプロホスの 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、ならびにブタミホス、ジメトエート及びフェンスルホチオン 0.2 $\mu\text{g/g}$ の添加濃度に対しペクチン及びパールアガーのいずれでも、フェンスルホチオンの 140% を超える回収率を除いては、83~105% の良好な結果であった。しかしながら、RSD (%) は、4~12% と、農薬により差がみられ、添加した安定剤の違いは、ほとんどみられなかった。クロマトグラムについては、ブランク試料に、添加農薬の測定を妨害するピークは認められなかった。

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%含水アセトン及び酢酸エチル) 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、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、フェントロチオン 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。含水アセトンが最も良好な回収率が得られたが、含水であることから他の 3 溶媒に比べて試料作製時、溶媒留去の操作において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、回収率及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%)。

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。

バッチ間の均一性が得られなかった農薬添加玄米粉末試料を用い、それらの均質化の検討を行った。10 バッチの試料を合わせてロッキングミキサーを用いて 3 回混合し、混合毎に均一性試験を行った。1 回の混合でマラチオンを除く 3 種の農薬

は均一となったが 2 回の混合においてもマラチオンは均一にならなかった。3 回目の混合では、均一性を示す F 値は有意水準 5% 点より小さくなったが、マラチオンを除く 3 農薬の F 値は 1 を著しく下回り、容器内の濃度差が大きいことが示唆された。その後、更に遠心粉砕機を用いて再粉砕したところ、いずれの農薬においても良好な均一性が得られた。小型粉砕器は、単に粉砕するのみで、フィルターを通さないため、粒子径にばらつきを生じる可能性がある。一方、再粉砕に用いた遠心粉砕機は、1.0 mm のフィルターを用いた遠心型の粉砕機であり、粒子径がある程度均一となる。本作製法では、農薬成分は主に米粒表面に吸着していると考えられ、胚乳部までは浸透していない可能性が高い。そのため、より粒子径を小さくかつ均一にする必要があることが示唆された。

同様にして、精米についても農薬添加溶媒に浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた精米を乾燥・粉砕する方法で、粉末試料を作製し、均一性試験を行ったところ、小型遠心器による粉砕では、均一性が得られなかった。そこで、ロッキングミキサーによる混合を行わず、遠心粉砕機による再粉砕を行ったところ、概ね良好な均一性が得られた。精米の作製は、浸漬溶液を減圧乾固する際、微細な粒子が内容物の突沸を招き、細心の注意が必要であったことから、実試料作製の上では、玄米試料の方が、減圧乾固の工程が扱いやすいと考えられた。

また、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について、各農薬濃度を測定した結果、10 個の粉体フラスコ間でばらつきはあっ

たが、いずれの農薬も添加量の約 5~7% が微細の粒子とともに粉体プラスチック内壁面に残留していた。今後、添加量を示す際、これらの数値の取扱いを検討する必要がある。

以上のことから、農薬検査用調査試料として、固体試料である穀類の粉末試料は、遠心粉碎機を用いることで均一化が可能であり、これらの適用は大いに可能性があるが、上記の検討をする際、混合及び均一性試験を順次行ったため、約 2 か月の期間を要した。その間で、均一性を確保することはできたが、一方で、回収率が玄米及び精米とも経時に伴い、いずれの農薬も減少する傾向が見られた。これは、玄米及び精米成分が影響している可能性があり、試料中酵素の不活化など、今後は粉末試料中における安定性確保の検討が必要である。

また、固体試料とは別に、これまでの野菜ペーストに加えて新たに枝豆を基材とした調査試料の作製を検討した。

従来の野菜ペーストと同様に、基材に農薬混合標準液を添加し混合（試料中添加濃度：ダイアジノン 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス 0.3 $\mu\text{g/g}$ 、及びマラチオン及びフェントロチオン 0.5 $\mu\text{g/g}$ ）したところ、いずれの農薬も均一性が得られなかった。そこで、基材に水分あるいは油分を添加し均質なペースト基材を作製後、農薬混合標準液を添加する方法を検討した。

その結果、水分添加においては、0%、5%、10%及び 20%の含量で作製したところ、0%では F 値がクロルピホスの 1.889 を除き、いずれの農薬も約 3.4 から 5.1 と大きい値を示したが、5~20%の水を添加することで、F 値は、いずれの農薬も有

意水準 5%点より小さくなり、均一性が得られた。回収率や相対標準偏差などを考慮すると、水分添加濃度は 10%が適切であると考えられた。

油分添加においては、0%、2%、5%及び 10%の含量で作製したところ、0%では上述のとおり F 値がクロルピホスを除き、いずれの農薬も有意水準 5%点より大きい値を示したが、2%~10%の油分（大豆油）を添加することで、F 値は、いずれの農薬も有意水準 5%点より小さくなり、均一性が得られた。回収率や相対標準偏差などを考慮すると、油分添加濃度は 2%~10%が適切であると考えられた。なお、水分あるいは油分をそれぞれの濃度に応じて添加したブランク試料について、得られたクロマトグラムでは、いずれの添加農薬の測定に影響を及ぼすものはなかった。

水分あるいは油分の添加が枝豆ペーストに農薬を均一に混合する際有効であることが示唆され、今後、これらの冷凍保存安定性及び凍結融解安定性を検討する必要がある。

重金属検査用試料作製においては、混合に、ロックミキサー（RM-10G）を用いる方法を検討した。この混合機は、回転による拡散混合と揺動による移動混合を同時に行い、短時間で均一混合が可能であった。条件 1 の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%の回収率であり、一元配置の分散分析により均一性のある混合試料が得られた。また条件 2 においても同様であった。更に高濃度玄米の希釈率が最も高い 16 倍の条件 3 においても、倍散する方法で行ったが、理論値の 0.157 $\mu\text{g/g}$ に対

し、変動係数 1.0%の範囲で 100%の回収率であり、同様に良好な均一性が得られた。ロッキングミキサー (RM-10G) は、粉体の混合には非常に有効な混合機であることが確認された。

6.2 微生物学検査のための適性試料の作製検討：

外部精度管理調査試料を作製するにあたり、とりわけ菌数測定も行う場合には、基材に接種した添加菌の長期間の安定性と温度変化に強いことが求められる。これまでの検討結果から、米飯基材を用いることにより、陽性対照菌において、各種選択定性培地上にて明らかな典型集落形成を認め、かつ冷蔵保存において安定した菌数を得たことから、外部精度管理調査試料として使用できる可能性が示唆された。一方、陰性対照菌では一部の選択定性培地では集落形成を認めないものの、陽性対照菌と明らかな判別ができることから、上記結果を踏まえて少なくとも定性検査用の調査試料としては採用できるものと考えられた。そこで、定量検査を踏まえた輸送時の温度変化の影響を考慮し、冷蔵保存後に各種温度で継続的に保存した際の米飯基材中の試験菌数変動を観察することとした。すなわち、セレウス菌検査に使用することを前提とした陽性対照菌または陰性対照菌を米飯基材に添加した後、冷蔵保存にて 7 日間、その後冷蔵、22.5℃または 32.5℃で 35 日間保存した際の菌数変動を確認した。その結果、陽性対照菌では *B. cereus* HIC 080115 及び HIC 100172 ではいずれの保存条件下においても 35 日目まで安定した菌数が得られた。これに対して、*B. cereus* HIC 080117 ではわずかに減少傾向が認められたが、*B. cereus* HIC 080117 ではいずれの保存

温度においても大きな差異は認められなかった。一方、陰性対照菌では使用した *B. subtilis* HIC 100165、枯草菌 6633 (E-MN11)、*B. megaterium* HIC 080136 のいずれにおいても 32.5℃保存で著しい菌数の増加が認められた。さらに *B. subtilis* HIC 100165 では 22.5℃での保存によっても著しい菌数の増加が認められた。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、本研究では対照菌を接種した基材に温度負荷をかけることによっても安定的な菌数が得られるかについて確認することとした。その結果、少なくとも陽性対照菌では冷蔵から 32.5℃までの広い温度範囲においても保存 35 日目まで安定的に菌数が回収できることが明らかとなった。外部精度管理調査試料では指定された輸送環境の維持や正しい温度での保存が求められるが、微生物検査を行う場合、特にこれらの点が厳密に管理される必要がある。しかし、配送業者においても配送時の温度管理を行っているとのことであるが、実際には冷蔵で送付したにも関わらず到着時の温度が 10℃を超えていた等の報告もある。このことを踏まえると、輸送や保存条件の逸脱にも耐えうるような基材を開発することが望まれる。今回のように 32.5℃においても長期間に亘って安定した菌数が確保できたことは定量検査における菌数測定結果のばらつきを小さくするうえでも有効であると考えられる。これに対して陰性対照菌では

32.5℃では添加菌数の増加が認められた。セレウス菌では陽性菌の菌数測定を行うことから、定性検査において陰性と判定される場合には菌数測定が実施されることはない。そのため、菌数の増加が認められたとしても検査結果に対して影響を及ぼすことはないものと考えられるが、場合によっては偽陽性を疑うこともありうることから、なるべく陽性対照菌と同等の菌数確保が望ましい。少なくとも今回の検討では長期間に亘って温度負荷をかけた場合の菌数変動を観察したが、短時間であれば今回観察されたほどの菌数の増加は認められないと考えられることから、外部精度管理調査試料として採用することは可能であると思われる。ビブリオ属菌検査用調査試料の冷凍保存時の安定性では、これまでの検討からビブリオ属菌検査用調査試料として Marine broth に接種した菌液を使用し、かつ、こうや豆腐を用いることにより 22.5℃での保存により長期間に亘り安定した菌数を確保することができた。しかしながら、22.5℃での保存後に冷蔵あるいは冷凍保存することにより、その接種菌数は著しく減少した。少なくとも定性検査を実施するうえでは十分に検出できる範囲ではあるが、より安定化をはかるため、凍結保存時の菌数変動について観察した。その結果、凍結後 14 日目では接種菌数とほぼ同等の菌数が残存していたが、さらに保存期間を延長することにより、36 日目では 1~2 オーダーの減少が認められ、保存 71 日目にはほとんど検出されなかった。また、凍結後の基材について、解凍せずに液体培地中に添加した場合と、1 時間の室温放置により解凍した場合とでの生残菌数の差異について観察したが、大きな差異は認められなかった。ビブリオ属菌検査では、これまでの検討から Marine broth に懸濁したビブリオ属陽性対照

菌が室温において長期間に亘り安定的に回収できること、ならびにこうや豆腐を基材として採用したところ、菌液のみと同様に長期間の安定性が担保できることが明らかとなったが、冷蔵保存により著しい菌数減少が認められた。検査機関における検体の保存は一般的に冷蔵保存あるいは冷凍保存であることを考慮すると、この結果は調査試料を受領した検査機関において SOP には通常掲載されていない方法で保存する可能性を示唆している。外部精度管理調査は通常検査機関で実施している検体の保存方法に従って処理されることが望ましいことから、今回は冷凍保存における安定性について確認した。その結果、冷凍後 14 日目までは接種菌数と同等の菌数が得られたが、保存期間の延長に伴い菌数の減少が認められた。少なくとも今回の検討では凍結後 36 日目には 1~2 オーダー程度の菌数減少が認められたことから、本基材を定性検査として使用する場合には、実施が可能であるものと考えられた。しかしながら、送付前の調査試料作製期間を考慮すると、さらに長い時間の安定性が担保されることが望ましいことから、さらなる検討が必要であるものと考えられた。また、これまでの検討から室温では非常に安定であったが、この情報を調査試料の保存条件として記載することも可能ではあるが、誤って到着後に冷蔵あるいは冷凍保存される可能性も否定できないことから、これらの温度域での安定性が必要であると考えられる。

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を、こうや豆腐基材を用いて行った。乾物であるがゆえに、*Bacillus* 属といったグラム陽性菌の混入の可能性が考えられる。そこで、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* 及び *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も影響は認められなかった。また、ビブリオ属菌検査用調査試料に用いる基材の検討では、すでに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。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。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。しかし、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。

また、一般細菌数測定検査におけるストマッカー袋のメーカーごとの相違に関する検討を行った。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。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。

次いで、試験菌のフィルターへの吸着に関して検討した。その結果、一般細菌数検査の測定において、これまで当方において使用していたストマフィルターNEO (GSIクレオス) ではフィルターなしのストマッカー袋を使用して同様に試験したものと比較して低い回収率を認めたことがなかったが、一部のメーカーでは約40%と低い回収率となった。メーカーによりストマッカー袋に付属のフィルターの孔径や材質も異なっている。このことから、通常当財団において使用しているストマッカー袋と、平成24年度の検討において最も回収率の低かったストマッカー袋の2種を用いて、試験菌がフィルターを通過すること、ならびにフィルターへの吸着性の有無を確認するため、寒天状基材の非存在下、試験菌を添加したときのフィルターの内側と外側、すなわち試料溶液の採取側と調査試料をストマッカー袋に入れた側での試験菌濃度の差について確認した。その結果、試験菌の濃度はフィルターの内側と外側でほぼ同等であり、か

つ添加濃度に対する回収率も 90~120%を示した。また、回収率は試験菌と寒天状基材を別途加えたときにも同様であった。このことから、試験菌はいずれのストマッカー袋においても通過することが可能であり、フィルターに吸着する可能性も低いものと考えられた。また、この結果を踏まえると、寒天状基材中に封入された試験菌がストマッカー処理により粒子状となった寒天中に取り込まれたままとなり、この寒天粒子がフィルターを通過できなかったことにより、回収率が低くなる可能性が示唆された。

これまでの経験から、基材として使用する寒天はメーカーによって硬度等が異なることから、ストマッカー処理後の寒天粒子の残存に大きな影響を及ぼすものと考えられる。そこで、3社の4製品を用いて、0.6~0.75%の濃度範囲で作製した寒天状基材における回収率について検討した。その結果、低濃度の寒天で作製した基材において、ストマッカー袋間での相違が大きくなった。また、高濃度の寒天で作製した場合には、いずれのストマッカー袋においても回収率が低く、ストマッカー袋間での大きな相違は認められなかった。なお、この傾向は試料の作製42日後においても同様であった。

また、一般細菌数測定用調査試料は陸送することで各検査機関に配送される。そのため、寒天濃度が低い場合には、輸送時の振動や荷物の取扱いといった衝撃が加わる可能性がある。これにより、基材の破壊ということも考えられることから、作製した寒天状基材を振盪器で容器の縦方向または横方向に振盪したときの、基材の物理的形状変化について観察した。振盪器に容器を立て、これを振盪したところ、いずれの基

材も変形は認められなかった。これに対して、容器を横に設置して振盪を行ったところ、和光純薬の2製品で作製した0.6%の寒天濃度において、容器から基材がはがれた。これ以外の基材では、振盪に伴う基材からの浸出液が増加する傾向はあるものの、基材の崩壊は認められなかった。

寒天粒子をさらに小さくするための手段のひとつとしてストマッカー処理時間の延長が挙げられる。そこで、最も寒天濃度の高い0.75%においてストマッカー処理時間を1分間と3分間で回収率を比較したところ、和光純薬の2製品で作製した基材では3分間のストマッカー処理により試験菌の回収率の上昇が認められたが、これ以外では明らかな回収率の上昇は認められなかった。

さらに、より詳細に検討するため、外部精度管理調査において使用頻度が比較的高く、かつ低めの値を報告した検査機関で採用されていたストマッカー袋を用いて各寒天濃度における回収率を検討したところ、和光純薬の2製品で作製した基材では濃度によらず、ピクソン20(エルメックス)を除く3種のストマッカー袋において高い回収率を示した。これに対して、OXOID及びMERCKの寒天で作製した基材では、寒天の濃度に依存した回収率の低下が認められた。また、いずれの基材においてもピクソン20で回収率が低くなる傾向が認められた。また、寒天及びストマッカー袋の組み合わせにおける試験対象菌の吸着の可能性を検討したところ、通常使用している和光純薬の寒天とサニスペックテストバッグ(サニーフーズ)の組み合わせで回収率が約60%であったものの、これ以外の組み合わせでは

いずれも回収率が80%以上であったことから、試験対象菌のストッカー袋への吸着はほとんどないと考えられた。

6.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製：

甲殻類タンパク質を測定対象とした共同試験試料について配付前に、添加量の回収率の確認を兼ねて均一性試験を実施した。その結果、添加試料(試料1、試料2、試料5、試料6、試料8)についてはいずれも一元配置による分散分析で均一と判定された。回収率はカニ添加液を加えた試料1と試料5の甲殻類キット「マルハ」による測定で50%を下回ったが、このほかの測定では通知(消食表第286号)の定量検査法の評価基準に示された回収率50%~150%の範囲内であった。なお、今回使用したカニを含む食品素材は平成22年度報告書、表13の①と同一物で、平成22年度の報告でも、抽出液の総タンパク質に対する甲殻類キット「マルハ」の測定値の回収率は41.2%と低かったが、カニを含む適切な食品素材が見つからなかったため試料調製に使用した。一方、共同試験の測定期間終了後に実施した安定性試験の測定値はカニ添加液を加えた試料の甲殻類キット「マルハ」による測定値も含め、均一性試験の88.0~112.5%の範囲と良好であった。

ブランク試料については、試料3(ホワイトソース)、試料7(ブロッコリー)の測定値は、いずれもキットの検出下限(0.31 μ g/g)以下であったが、試料4(ハンペン)の測定値はいずれの測定においても0.31 μ g/g前後で、使用したハンペンは甲殻類タンパク質をわずかに含むことが示された。参加機関への試料及びキットの送付に関しては、取り違いや配送に関す

るトラブルの報告はなかった。また、全参加機関について発送の翌日に到着したことをインターネット上で確認した。共同試験結果の統計解析に先立って参加機関が使用したELISA計算ソフトウェアを確認した。その結果、平成21年度に問題を指摘したソフトウェア(マイクロプレートマネージャーVer.5)を使用している機関が3機関あることが判明した。これら3機関のELISAの吸光度についてマイクロプレートマネージャーVer.5のLogistic 4PL解析とLogistic 5PL解析(Rodbard)を実施し、解析結果を比較した。その結果、甲殻類の測定においても卵、乳と同様、Logistic 4PL解析では回帰曲線が吸光度のプロットからはずれていたほか、計算結果も最大10%程度差があることが明らかになった。このためこれら3機関についてはLogistic 5PLによる解析の結果を以下の解析に使用することとした。これ以外の機関については提出データをそのまま使用した。なお、平成23年10月23日、消費者庁食品表示課から、マイクロプレートマネージャーVer.5を特定原材料検査に使用する場合はLogistic 5PL解析を使用する旨の業務連絡が発出されている。添加試料のFAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」による測定では試料8を除きXbar管理図においてXbarが管理限界線(UCLまたはLCL)の範囲外及びzスコアの絶対値が2以上となった機関はなかった。なおXbarが管理限界線の範囲外となった機関番号1について報告書を確認したが問題となる点は見つからなかった。これに対してR管理図では、上部管理限界線(UCL)を超えた機関が試料1、試料2、試料5、試料8でそれぞれ1機関ずつ認められた。試料1でR管理図のUCLを超えた機関番号2は同じ抽出液を用いたと思われる甲殻類キット「マルハ」による測定では再現性に問題がない

ため、抽出液の希釈に問題があったと考えられた。試料 2 と試料 8 で R 管理図の UCL を超えた機関番号 4 は試料 8 では並行測定 of 3 ウェル間の再現性不良が原因と考えられたが、試料 2 では同一抽出の 3 ウェル間の再現性に問題はなく、原因は不明であった。また、試料 5 で R 管理図の UCL を超えた機関番号 10 も並行測定 of 3 ウェル間の再現性不良が原因と考えられた。

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

共同試験試料の DNA 抽出結果については、試料 1~8 の共同試験試料のそれぞれから、通知に記載の抽出法のうちイオン交換樹脂タイプのキット (Genomic-Tip 20/G) を使用してそれぞれ 3 並行で DNA を抽出した。DNA 収量は用いた基材によって大きく異なり、ハンペン基材はホワイトソース基材に比べて約 8 倍、ブロッコリー基材はホワイトソース基材に比べて約 30 倍多かったが、260 nm/280 nm の吸光度比は 1.61~1.95 で、いずれの DNA 原料液も通知の基準 (1.2~2.5) を満たしていた。基材により DNA 収量の差が大きかったため、以

前 PCR による確認試験を実施した平成 20 年度と DNA 収量を比較した。平成 20 年度に使用した基材ではハンバーグの DNA 収量が約 100 µg とブロッコリーと同程度であったほか、あずきあんの DNA 収量はホワイトソースと同程度に少なく、今回認められた DNA 収量の差は特別ではないことが明らかになった。

ホワイトソースを基材とした試料における確認試験では、DNA 抽出確認用の植物検出用試験で全 DNA 試料で予定長の増幅物が確認された。エビ検出用試験ではエビ添加液を加えた試料 2 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認されたが、これ以外では予定長の増幅物は認められなかった。カニ検出用試験ではカニ添加液を加えた試料 1 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認されたが、これ以外では予定長の増幅物は認められなかった。以上、試料 1~3 は、添加液の種類に応じて予測通りエビ、カニ DNA を区別して検出できたことから、確認試験にも使用できる試料であることが示された。なお、動物検出用試験は基材のみの試料 3 では予定長の増幅物の有無は明確ではなかった。一方、添加液を加えた試料 1 と試料 2 ではいずれも予定長の増幅物が確認でき、動物 DNA は添加液に由来したものと考えられた。

また、ハンペンを基材とした試料では、DNA 抽出確認用の植物検出用試験及び動物検出用試験は共に全 DNA 試料で予定長の増幅物が確認された。カニ検出用試験ではカニ添加液を加えた試料 4 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認された一方、試料 5 では予定長の増幅物は認められずカニについては想定通りの結果であった。しかし、エビ検出用試験では試料 4、試料 5 共にエビ添加液を加えていないにもかかわらず、試料 4 の抽出 2 を除く全抽出でエビ DNA の増幅物が確認された。ハンペン基

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

ブロッコリーを基材とした試料では、DNA 抽出確認用の植物検出用試験では全試料の全抽出で予定長の増幅物が確認され、カニ検出用試験では増幅物が認められず想定通りの結果だった。しかし、エビ検出用試験では、ブランク試料の試料 7 も含め非特異的増幅が認められた一方、エビ添加液を加えた試料 6、試料 8 で予定長の増幅物は検出できなかった。また、動物検出用試験でも予定長の増幅物の有無は明確ではなかった。以上、エビ添加液を加えた試料 6、試料 8 において想定とは異なりエビ DNA が検出できなかったことから、これらの試料は確認試験試料としては使用できないことが明らかになった。なお、データは示していないが、試料 6 及び試料 8 の DNA 抽出液(原液)及び $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ に調製した DNA 試料液についてもエビ検出用試験を実施した。しかし、これらの試料液による PCR では非特異的増幅の割合は増加したが、予定長の増幅物は確認できなかった。

さらに、エビ確認試験の検討としてエビタンパク質を表示義務の下限である約 $10 \mu\text{g/g}$ 加えて調製した試料 2 と試料 6 のうちホワイトソースを基材とした試料 2 ではエビ DNA が検出されたが、ブロッコリーを基材とした試料 6 では検出できなかった。ブロッコリー基材はホワイトソース基材に比べて DNA 含量が約 30 倍多いため、PCR 反応液に加える DNA のうち添加液

に由来する DNA が相対的に少なくなるのが、エビ DNA 不検出の一因であると考えられた。しかし、先に述べた通りブロッコリー基材の DNA 含量は特別ではないため、確認試験試料はブロッコリーのように DNA 含量が高い基材においてもエビタンパク質が $10 \mu\text{g/g}$ を超える場合はエビ DNA を検出できることが求められる。また今回の不検出には基材以外に使用したエビ添加液の DNA 含量及び質も関係していると考えられるため、共同試験試料とは別の原料から新たにエビ添加液を作製し、試料 6 と同じ濃度のエビタンパク質をブロッコリーに加えた試料を作製してエビ検出用試験の感度を検討することとした。当該試料では予定長の増幅物が検出でき、新たに調製したエビ抽出液は共同試験試料調製に使用したエビ添加液に比べエビ DNA を多く含んでいることが分かった。従って、共同試験試料調製に使用したエビ添加液は DNA 含量が少ないかまたは変性しているものと考えられ、確認試験試料の作製には適当ではないことが明らかになった。以上の結果、エビ添加液の調製法を改めて検討する必要が生じた。

卵タンパク質を含まない基材に卵タンパク質を添加して共同試験を行った。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)、アレルゲンアイ ELISA 卵 (プリマハムキット) の各キットを用いて測定し、均一性を検討した。その結果、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。安定性は同じ試料においても測定したキットにより変化の方向が異なっており、変動幅は測定誤差の範囲内と考えられた。

精度管理調査結果については、参加機関の測定値を試料別かつ測定キット別に集計し、測定値の分布をまとめた。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。これは日本ハムキットの測定操作ステップが他のキットに比べ多いことに起因するのではないかと考えられた。また参加機関の総平均値は均一性試験の結果と同様、添加量の低い試料2の測定値が試料1の測定値を上回った。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。

各参加機関が使用した検査手法をまとめると以下ようになった。プレートの洗浄はウオ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はいずれもウオッシャーを使用していたことから、こ

れらの機関ではウオ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。

そばタンパク質溶液添加試料の作製について、標準品規格では、茨城県産そば及び中国北方産そばを等量混合した後に粉碎して調製した粉末を使用し、メルカプトエタノールを含む抽出液を用いてタンパク質を抽出するが、操作が複雑であることに加え、試料を各検査機関に送付し、検査者が取り扱う際には毒物であるメルカプトエタノールは含有していないことが望ましい。そこで、あらかじめ粉碎されている市販のそば粉3種類(茨城県産そば粉、中国北方産そば粉及びダッタンそば粉)からそれぞれ2種類の抽出液(メルカプトエタノールを含む(+ME)抽出液またはメルカプトエタノールを含まない(-ME)抽出液)を用いてタンパク質を抽出し、各抽出液のタンパク質濃