

201522021A

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27年度
総括・分担報告書

■研究代表者

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

■研究分担者

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

国立研究開発法人 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28年(2016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27年度
総括・分担報告書

■研究代表者

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

■研究分担者

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 斉 藤 貢 一

国立研究開発法人 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28年(2016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	3
渡辺 卓穂	
II. 研究分担報告	
1. 残留分析の測定に与える食品成分の影響に関する研究	41
尾花 裕孝	
2. 食品中に残留するマイコトキシン分析に係る精度管理体制の構築に関する研究	127
斉藤 貢一	
3. 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究	139
鎗田 孝	
4. 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、カビ毒検査)の作製検討と信頼性確保に関する研究	155
渡辺 卓穂	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	221
IV. 研究成果の刊行物・別刷	225

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 27 年度 総括研究報告書

研究代表者 渡辺 卓穂

平成 28 年(2016 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

研究代表者 渡辺 卓穂 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 部長

研究要旨

輸入食品及び国内の流通食品が急増する中、多種多様な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、重金属、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、カビ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正確で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全性の確保に対して大きく貢献するものと考えられる。そこで本年度は、1. 残留分析の測定値に与える食品成分の影響に関する研究（尾花分担研究）、2. 食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究（斉藤分担研究）、3. 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究（鎗田分担研究）、4. 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、カビ毒検査）の作製検討と信頼性確保に関する研究（渡辺分担研究）の4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副所長）、斉藤貢一（星薬科大学教授）、鎗田孝（(国研)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

輸入食品や国内食品の流通段階において、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および食品衛生登録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外部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。

他方、輸入食品の急増に伴い、検疫所をはじめとする輸出入関連の食品衛生検査機関において ISO/IEC17025 試験所認定取得のために技能試験（外部精度管理）への参加が必須となり、外部精度管理調査のより一層の充実が求められている。また、環太平洋パートナーシップ協定（TPP）の締結により輸出入に係る食品検査がなお一層拡大すると考えられる。近年、残留農薬検査には GC/MS や LC-MS/MS など質量分析が多用される一方で、食品マトリックスが測定系に影響を与えることが知られている。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、高信頼性分析により、外部精度管理で用いるマトリックスに依存しない絶対的な評価指標を得

ることも必要である。

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有害物質（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。

食品衛生検査に関わる精度管理体制の構築は、食品の広範囲な流通により国内外を問わず、その分析精度を確認するうえでますます重要な課題として認識されている。食品衛生検査に関わる精度管理用調査試料の作製に加えて、アレルギー物質検査ならびに組換え DNA 技術応用食品検査における精度管理体制の構築、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 残留分析の測定値に与える食品成分の影響に関する研究（尾花研究分担）

共同研究に先立ち、大阪府で事前検討を行った。まず、溶媒標準溶液における農薬由来のマトリックス効果を確認した。評価対象とする農薬の各単品溶液に他の 58～166 種類の農薬混合溶液を添加した溶液を調製し、GC-MS/MS で測定を行い、ピーク面積を比較した。

つぎに当該現象が残留農薬検査に及ぼす影響の検証を行った。具体的には、食品試料としてえだまめのマイクロペースト（市販品、農薬不検出）を使用し、大阪府の試験法に準じて抽出精製液を調製した。3 種類の評価対象農薬を試料換算濃度で 2 ppm になるように抽出精製液に添加して模擬試験液を調製した。模擬試験液の希釈率、補助マトリックス添加の有無、検量線用測定溶液の農薬数が異なる条件で、GC-MS/MS を用いて対応する検量線を作成して模擬試験液を定量し、理論値との一致度（定量率）および検量線の傾きを指標に評価を行った。

補助マトリックスには、試料と同じえだまめマイクロペーストから調製した抽出精製液（Green soybean matrix、以下 GSBm と略）の他、野菜果物ジュースの抽出精製液（Vegetable-fruit juice matrix、以下 VFJm と略）、ポリエチレングリコール 300（以下 PEG と略）を用いた。標準溶液のマトリックス組成により A～E の 5 種類に分類した検量線について比較検討を行った。A は試験液を最小限希釈して測定する場合に対応し、B～E は試験液を高倍率希釈して測定する場合に対応する検量線である。標準溶液に含まれる農薬数は 3 種類（3mix）と 169 種類（169mix）の 2 通りとした。

6 機関の地方衛生研究所の協力を得て、共同研究を行った。事前検討と同様に、溶

媒標準溶液および模擬試験液を用いた検討を行い、農薬由来のマトリックス効果の検証を行った。

模擬試験液および GSBm の調製用試料として、市販のえだまめマイクロペースト（天極堂製）を使用した。VFJm の調製には市販の野菜果物ジュース（伊藤園製、無添加充実野菜）を使用した。

大阪府の事前検討 1 における評価対象農薬は、代表的なリン系、ジカルボキシイミド系、ピレスロイド系の農薬から、PL2～6 のいずれにも含まれない 5 種類の農薬を選択した。模擬試験液を用いた検討では、初期条件の含有農薬数を最小限に抑えるために 3 種類の農薬のみ（マラチオン、プロシミドン、フルシトリネート）を評価対象とした。これら 3 種類の農薬は、えだまめにおける残留基準値が各々 2 ppm、1 ppm、2.0 ppm であり、実際の検体において ppm (μg/g) オーダーの高濃度の残留が想定しうるものである。なお、ピレスロイド系農薬について、大阪府の事前検討 1 ではペルメトリンを対象として共存農薬によるマトリックス効果を評価したが、協力機関による類似内容の実験 S では PEG 共注入時の分解挙動に着目してフルシトリネートを評価対象とした。IS として、事前検討では NPH-d8、PHN-d10、FLA-d10、TPP を用いたが、協力機関による共同研究では解析作業を簡便化するために PHN-d10 と TPP のみを用いた。また、同様の理由で、共同研究ではリン系農薬についてマラチオンのみを対象とした。

GC-MS (/MS) のイオン化法は EI とした。その他の条件は、残留農薬の検査で用いる標準作業書 (SOP) に準じた機器および条件を使用した。協力機関の使用機器の内訳は、

四重極型 GC-MS : 1 機関、四重極型 GC-MS/MS : 4 機関、イオントラップ型 GC-MS : 1 機関であった。注入量は、1~25 μ L、通常の検査における最終試験液中の試料濃度は、抽出精製前の試料に換算して 0.5~10 g/mL であった。ただし、今回の模擬試験液の測定では 1 g/mL を上限の条件（最小限希釈）とした。また、測定モードは、四重極型 GC-MS/MS を使用する 4 機関は MRM モード、イオントラップ型 GC-MS を使用する 1 機関が SCAN モード、四重極型 GC-MS を使用する 1 機関が SIM モードであった。

模擬試験液および検量線用測定溶液の基本マトリックス溶液として GSBm を用いた。また、測定時に添加する補助マトリックスの 1 つとして VFJm を用いた。大阪府の残留農薬検査の SOP に準じて処理を行い、農薬未添加の GSBm、VFJm を各々調製した。概要は以下の通りである。

えだまめミクロペーストまたは野菜果物ジュース 10 g をポリプロピレン製遠心管（50 mL 容）に精秤した。これにアセトニトリルを正確に 20 mL 加え、ホモジナイザーで 1 分間抽出した。次に塩化ナトリウム 1 g および無水硫酸マグネシウム 4 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g およびクエン酸二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を添加して 1 分間強く振とうした後、遠心分離（3000 rpm、10 分間）した。次にアセトニトリル層をあらかじめアセトニトリル/トルエン（3:1、v/v）30 mL でコンディショニングしたグラファイトカーボンブラック/第 1 級・2 級アミン（GCB/PSA）カートリッジカラム（Supelclean ENVI-Carb II/PSA、500 mg/500 mg、SPELCO 製）に 8 mL 負荷し、30 mL のアセトニトリル/トルエン（3:1、

v/v）で溶出した。抽出液を負荷した際の通過液と溶出液は、100 mL 容のナス型フラスコに回収し 40℃の水浴上で減圧濃縮した。乾固直前で減圧濃縮を終了し、残余の溶媒は窒素気流下で除去し、50%A/H を用いて 1 mL に溶解した（試料 4 g/mL 相当）。上記手順を繰り返して、必要量の抽出精製液を調製した。

実験 A~E で使用する食品試料の抽出精製液（GSBm、VFJm）は、各協力機関が残留農薬検査で用いる SOP に準じた方法を用いて必要量を調製した。

大阪府の事前検討 1 では 5 種類の農薬および 4 種類の IS を評価対象とした。各農薬と同濃度になるように IS を添加して、最終的に各 50 ng/mL、各 500 ng/mL の 2 点濃度の溶液を、共存農薬数が異なる 4 通りの組み合わせ（農薬単品、農薬単品+58 種類、+108 種類、+166 種類）で調製した。なお、溶媒組成は 50%A/H とした。

事前検討 2 では模擬試験液は、GSBm に試料換算で各 2 ppm 相当（試料 1 g に対し各 2000 ng）の濃度になるよう評価対象 3 農薬の標準溶液を添加して調製した。後述する A~E の 5 通りのマトリックス組成について、農薬数 3 または 169 の 2 通りの標準溶液（番号 1、2 で分類）で検量線を作成し、模擬試験液の最小限希釈液を検量線 A1、A2 で、高倍率希釈液を検量線 B1~E2 で各々定量した。マトリックスマッチング法を基本として、模擬試験液側にも各検量線に対応する試料マトリックス・補助マトリックスを添加した状態で測定して農薬を定量した。実験 A、実験 B~E に対応する検量線用測定溶液の調製は以下に示した。

A : 最小限希釈マトリックス（1 g/mL）

B：高倍率希釈マトリックス (0.025 g/mL)

C：高倍率希釈マトリックス (0.025 g/mL)
+GSBm (1 g/mL)

D：高倍率希釈マトリックス (0.025 g/mL)
+VFJm (1 g/mL)

E：高倍率希釈マトリックス (0.025 g/mL)
+PEG (0.5 mg/mL)

実験 A~E の各模擬試験液および検量線用測定溶液には、絶対検量線法または相対検量線法のどちらでも評価できるよう、IS を一定濃度（最終溶液中で各 50 ng/mL）になるように添加した。模擬試験液は、GSBm に試料換算で各 2 ppm 相当（試料 1 g に対し各 2 µg）の濃度になるよう評価対象 3 農薬の標準溶液を添加して調製した。

協力機関の実験 S (S50、S500) の測定溶液は、大阪府の事前検討 1 と異なり、各農薬の単品溶液ではなく 3mix 溶液を使用した。また、いずれの溶液も測定時の IS 濃度は 50 ng/mL とした。

実験 A~E では、大阪府の事前検討 2 と同様の実験を実施し、5 通りのマトリックス組成について、2 通りの農薬数の検量線を用いて、模擬試験液の最小限希釈液を検量線 A1、A2 で、高倍率希釈液を検量線 B1~E2 で各々定量した。マトリックスマッチング法を基本として、模擬試験液側にも各検量線に対応する試料マトリックス・補助マトリックスを添加した状態で測定して農薬を定量した。

試験方法としては、事前検討 1 では農薬の溶媒標準溶液を用いた事前検討を行い、農薬由来のマトリックス効果を確認した。異なる 4 通りの農薬数の組み合わせで調製した混合標準溶液（農薬単品、農薬単品 + 58 種類、+108 種類、+166 種類）を各 50

ng/mL および各 500 ng/mL の 2 点濃度で測定し、混合農薬数および濃度の違いによる評価対象農薬のピーク面積の変化を確認し（葉検出試料の再検査）を基本骨格として、えだまめ模擬試験液を測定する実験を構築した。

事前検討 2 では、残留農薬検査の SOP に準じた方法でえだまめペーストの抽出精製液を調製した。えだまめペーストの抽出精製液に試料中濃度として 2 µg/g 相当になるよう農薬混合標準溶液を添加した模擬試験液を調製した。5 通りのマトリックス組成について各 2 通りの農薬数で検量線用測定溶液（各 5 点濃度）を調製し、これらの検量線を用いて模擬試験液中の評価対象農薬を定量した。検量線用測定溶液は模擬試験液の測定前後に 2 回測定を行い、平均面積で検量線の傾き等を算出した。

絶対検量線法（IS 補正なし）および相対検量線法（IS 補正あり）を用い、添加農薬が理論値通りに定量された場合を定量率 100%として、それぞれの試験液における定量率を算出し、定量率 100±10%を良好な結果としてマトリックス補正効果の指標とした。

実験 S では、えだまめ模擬試験液の測定（実験 A~E）に先立ち、農薬の溶媒標準溶液を用いた比較実験を行い、農薬由来のマトリックス効果を各機関で確認した。異なる 4 通りの農薬数の組み合わせで調製した混合標準溶液（3mix、61mix、111mix、169mix）を 2 点濃度（各 50、500 ng/mL）で測定し、混合農薬数および濃度の違いによる評価対象農薬のピーク面積の変化を確認した。なお、溶媒組成は各機関の SOP の測定条件に準拠したものとした。各協力機関は、

GC-MS (VMS) のカラムおよびインサートを新品に交換し、一定の安定化を行った後にシークエンスに従い測定を行った。

また、実験 A~E では、各協力機関の抽出精製液の調製方法は、各機関の SOP に準じた方法で行い、計算シートに基づき算出した濃度のブランク試験液、PEG 溶液および IS 溶液の調製を行った。なお、実験 A における最終試験液中の試料濃度の上限は 1 g/mL とした。検量線は計 10 種類作成した。各協力機関はシークエンスに従い測定を行った。初めに、3mix の標準溶液を用いてマトリックスマッチング検量線 A1 を作成し、最小限希釈の模擬試験液（えだまめマトリックス濃度が機関 a~e は 1 g/mL、機関 f は 0.5 g/mL になるように調製）に含まれる評価対象農薬の定量率が 90~110% の範囲内であることを確認した。これによって GC-MS (VMS) の状況を含めて実験系が正常であることが確認される。目標値とした 90~110% の定量率から逸脱した場合は、装置の安定化および溶液の再調製等の措置を講じて再測定を行った。次に共存農薬数を増やした 169mix のマトリックスマッチング標準溶液を用いて検量線 A2 を作成して模擬試験液中の農薬を定量した（実験 A）。

その後、マトリックス濃度が 0.025 g/mL になるように希釈調製した模擬試験液（実験 A の試験液と比較して機関 a~e は 40 倍希釈、機関 f は 20 倍希釈に相当）に含まれる評価対象農薬について、えだまめの希釈マトリックスでマッチングした検量線 B1（3mix）および B2（169mix）を用いて定量した（実験 B）。次に、高倍率希釈した試験液および対応する検量線用の標準溶液に、補助マトリックスを添加した場合について

同様に 3mix と 169mix での定量率を求めた。補助マトリックスとして、GSBm（実験 C）、VFJm（実験 D）、PEG（実験 E）を用いた。

評価法として、各協力機関には、あらかじめ送付しておいた Excel ファイルに、実験毎に測定した評価対象農薬および IS の面積を入力し、ファイルを大阪府に提出することを求めた。

提出されたデータから、実験 S では単品溶液と混合溶液の農薬および IS のピーク面積を比較した。実験 A~E では絶対検量線法および相対検量線法の各々について、検量線の傾き等を計算し、各農薬の定量率を算出した。また、検量線の傾きや定量率に基づき、農薬由来のマトリックス効果の影響とその補正法について考察した。添加農薬が理論値通りに定量された場合を定量率 100% として、それぞれの試験液における定量率を算出し、マトリックス補正効果の指標とした。補助マトリックスや IS による補正効果の判定基準は、大阪府の事前検討 2 と同様に、定量率が $100 \pm 10\%$ の範囲を補正可能な目安として「良好」と判定した。

2 食品中に残留するマイコトキシン分析に係る精度管理体制の構築に関する研究（斉藤研究分担）

総 AFs 改良抽出操作は、粉碎均一化した試料（白コショウ）3.0 g を 50 mL 容のポリプロピレン製遠沈管に取り、これに塩化ナトリウム 0.3 g と精製水およびメタノール（1:4）混液 12 mL を加え、30 分間振とう機を用いて振とう抽出した。抽出溶液を桐山ロートで吸引ろ過し、水を加えて全量を 15 mL にメスアップした。5 mL を量り採り、7% TritonX-100 水溶液を加えて正確に

10 mL とし、十分混合した後、遠心分離 (5000 ×g、5 分間) し、上清 8 mL を試料抽出液とした。固相分散抽出 (SPDE) 法によるクリーンアップについては、固相抽出用ゲル (以下、固相と略) を調製するため、予め、イムノアフィニティーカートリッジ (AFLAKING) からイムノアフィニティーゲルを全量取り出し、PBS 1 mL に懸濁させた。この懸濁液を「(1) 改良 抽出操作」で調製した試料抽出液が入った 15 mL の遠沈管に添加した。試料中に固相を分散させるためにボルテックスミキサーにより 30 秒間攪拌させた後、遠心分離 (2500 ×g、20 秒間) を行い、固相と液相を分離させた。次にマイクロピペットにより液相を取り除き、洗浄液として PBS 6 mL を加えて固相を再度分散させ、同様の操作を行った。その後、精製水 6 mL を加え、同様の手順で固相を再度洗浄後、液相を 1 mL 程度残して除去した。また、固相蛍光誘導体化は、予め遠心ろ過フィルター「@ろ過™」の上部にキャップ付きチューブ「キャップチューブ™」を、下部に 2.0 mL 容のマイクロチューブを装着した。固相蛍光誘導体化法の操作方法は、SPDE 法によるクリーンアップで調製した固相の懸濁液をマイクロピペットを用いてキャップチューブ™に移動させた。固相内の水分を除去するために、遠心分離 (2500 ×g、20 秒間) を行い、TFA 100 μL を添加後、ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌し、10 分間暗所で放置した。その後、遠心分離 (2500 ×g、20 秒間) を行い、溶出液として精製水 900 μL で固相を分散させ、同様に遠心分離後、先の溶出液 (TFA 100 μL) と合わせ、その 50 μL を HPLC-FL で測定した。

HPLC には日立社製 L-6300 Intelligent

Pump を、検出器には日本分光 FP-2020 を用い、励起波長は 365 nm、蛍光波長は 450 nm とした。カラムには化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) を用い、移動相にはアセトニトリル/メタノール/水 = (1:3:6) を用いた。カラム温度は 40℃、移動相流速は 0.5 mL/min、試料注入量は 50 μL とした。

外部精度管理試験は、市販の白コショウに AFs を添加し、精度管理試験用の標準試料 (高濃度と低濃度) を調製した。本試験に参加協力してもらう検査機関に当該試料と実験に必要な試薬類を配布し、測定を依頼した。

AFM₁ 分析法における試料には、東京都内で市販されているプロセスチーズ (“雪印メグミルク 6P チーズ”、“雪印メグミルク ベビーチーズ”、“明治 十勝細切りチーズ”、“森永乳業 KRAFT 切れてるチーズ”) 4 種類を用いた。抽出操作としては、細切した試料 10 g を 50 mL 容のポリプロピレン製遠沈管に取り、これにアセトニトリル/メタノール/精製水混液 (60:10:30, v/v) 40 mL を加えてホモジナイズし、精製水で 50 mL にメスアップした。十分混合した後、遠心分離 (3000 ×g、5 分間) し、上清 5 mL を PBS 15 mL で希釈したものを試料抽出液とした。固相蛍光誘導体化法の操作方法は、調製した固相の懸濁液をキャップチューブ™に移動させ、固相内の水分を除去するために、遠心分離 (2500 ×g、20 秒間) した。流出液が入った 2.0 mL 容のマイクロチューブを取り外して新たなものに交換した後、キャップチューブ™に TFA 200 μL を添加し、SPDE 器具を天地逆の状態にして 30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、その状態のまま

40℃のアルミブロックヒーター上で 20 分間放置した。その後、SPDE 器具の天地を元に戻した後、遠心分離 (2500×g、20 秒間) し、ろ液を TFA 溶出液として分取した。更に、溶出液として精製水/アセトニトリル混液 (80:20, v/v) 0.8 mL を加えて固相を再び分散させ、上記と同様に遠心分離後、先の TFA 溶出液 200 μL と合わせて全量を 1 mL とし、その 100 μL を HPLC-FL で測定した。

AFM₁ 測定 (HPLC-FL) は、移動相には精製水/アセトニトリル混液 (80:20, v/v) を用い、蛍光検出器の励起波長は 365 nm、蛍光波長は 435 nm とした。

3 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究 (鎗田研究分担)

一斉試験法と個別試験法をベースとした IDMS 法 2 法によって、平成 27 年度に実施した残留農薬検査 I の調査試料 (ほうれんそうペースト) を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度や参照値と比較した。また、QuEChERS 法の評価として、対象農薬が残留した玄米粉末を QuEChERS 法によって分析し、一斉試験法による分析値と比較した。抽出前に分析対象農薬の標識体を添加する IDMS を適用することにより、両分析法の抽出能力を精密に比較した。

試料は、平成 27 年度外部精度管理調査 (残留農薬検査 I) の調査試料であるほうれんそう試料と、その基材であるほうれんそうペーストは、食品薬品安全センター秦野研究所より提供された。QuEChERS 法の評価には、産業技術総合研究所が平成 27 年度に実施した技能試験の比較試料であ

る玄米粉末を用いた。対象農薬を含まない玄米試料には市場流通品を用いた。

検量線、内標準及びシリンジスパイク溶液は、質量比混合法によって以下の溶液を調製した。外部精度管理調査試料の分析用としてマラチオン- d_6 とクロロピリホス- d_{10} を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 A とした。また、アラクロールを Ac に溶解したアラクロール溶液 A を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液 A を調製した。一方、マラチオンとクロロピリホスを Ac に溶解させ農薬混合溶液 A を調製した。さらに、農薬混合溶液 A、内標準溶液 A、アラクロール溶液 A、Ac を混合することにより、検量線溶液 A を調製した。検量線溶液 A 中の各成分濃度は、ほうれんそう試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調節した。次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認したほうれんそうペーストを前処理した。得られたブランク溶液を窒素气流で乾固し、前述の検量線溶液 A に溶解させることにより、マトリックスマッチ検量線溶液 A (分析法 1 用、分析法 2 用) を調製した。

QuEChERS 法の評価用として、エトフェンプロックス- d_5 とフェニトロチオン- d_6 を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 B とした。また、アラクロールを Ac に溶解したアラクロール溶液 B を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリンジスパイク溶液 B を調製した。一方、エトフェンプロックスとフェニトロチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液 B を調製した。さらに、農薬混合溶液 B、内標準溶液 B、アラクロール溶液 B、Ac を混合することにより、検量

線溶液 B を調製した。検量線溶液 B 中の各成分濃度は、玄米粉末（比較試料）を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調整した。

一方、チアメトキサム- d_3 を MeOH に溶解して内標準溶液 C を調製した。また、イミダクロプリド- d_4 を Ac に溶解した内標準溶液 C を調製し、さらにこの一部を MeOH に希釈してシリンジスパイク溶液 C を調製した。一方、チアメトキサムを MeOH に溶解しチアメトキサム溶液を調製し、これと内標準溶液 C、イミダクロプリド- d_4 溶液、MeOH を混合することにより、検量線溶液 C を調製した。検量線溶液 C 中の各成分濃度は、玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調整した。次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体含有しないことを確認した玄米試料を前処理して用いた。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の検量線溶液 B および検量線溶液 C に溶解させることにより、マトリックスマッチ検量線溶液 B（分析法 3 用、分析法 4 用）およびマトリックスマッチ検量線溶液 C（分析法 3 用、分析法 4 用）を調製した。

外部精度管理調査試料（ほうれんそう）の分析には分析法 1 と分析法 2 を適用した。QuEChERS 法の評価においては玄米粉末（比較試料）を分析法 3 によって分析し、比較のために一斉試験法に準拠した分析法 4 によっても分析した。詳細を以下に記す。分析法 1 は、ほうれんそう試料 5 g に内標準溶液 A を 0.5 mL を加えて静置した。これに水 20 mL を加えて 15 分静置した後、AN50 mL を加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN20 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、NaCl10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH7.0）20 mL を加え、10 分間振とうした。この抽出液に無水 Na_2SO_4 を加えて脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol（3:1）混液 2 mL に溶解した。Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 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、Ac10 mL を加えて再度 1 mL 以下に濃縮し、Ac5 mL を加えた後に溶媒を除去した。残留物を 0.8 mL のシリンジスパイク溶液 A に溶解し、試料溶液とした。得られた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 は、ほうれんそう試料 5 g に内標準溶液 A を 0.5 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 Ac50 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/Hex（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 を加えて振とうし、得られた EA および Hex 層を合わせた。無水 Na_2SO_4 によって脱水した後、EA と Hex を除去し、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 Na_2SO_4 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 AN/Tol (3:1) 混液 2 mL に溶解した。Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH₂ 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、Ac10 mL を加えて再度 1 mL 以下に濃縮し、Ac5 mL を加えた後に溶媒を除去した。残留物を 2 mL のシリンジスパイク溶液 A に溶解し、試料溶液とし、GC/MS によって測定した。分析法 3 は、玄米粉末 (比較試料) 5 g に内標準溶液 B0.4 mL および内標準溶液 C0.4 mL を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、AN10 mL を加えて 1 分間振とう (手振り) した。これに 4 g の MgSO₄、1 g の NaCl を加え、セラミックホモジナイザーを用いて 1 分間振とう (手振り) した。この抽出液を 4000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液 (6 mL) に 300 mg の PSA、45 mg のグラファイトカーボンブラック、300 mg の C18、900 mg の MgSO₄ を加え、1 分間振とう (手振り) した。再度 4000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を分画し、窒素を用いて乾固した。これに Ac2 mL を加えた後 1 mL ずつ分画し、窒素を用いて乾固した後、それぞれをシリンジスパイク溶液 B とシリンジスパイク溶液 C に転溶して試料溶液 (GC 用) および試料溶液 (LC 用) とした。試料溶液 (GC 用) 中のエトフェンプロックスとフェニトロチオンを GC/MS によって測定した。一方、試料溶液 (LC 用) 中のチアメトキサムを LC/MS によって測定した。分析法 4 は、玄米粉末 (比

較試料) 3 g に内標準溶液 B0.4 mL および内標準溶液 C0.4 mL を加えて静置した、これに水 10 mL を加えて 15 分静置した後、AN25 mL を加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN10 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。これに NaCl10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL を加え、10 分間振とうした。その後、あらかじめ AN10 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、振とうによって得られた AN 層と AN2 mL を通液する処理を行った。得られた処理液を無水 Na₂SO₄ によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol (3:1) 混液 2 mL に溶解した。Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH₂ 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。全溶出液を乾固して得られた残さを Ac5 mL に溶解させ、これを 2.5 mL ずつ分画し、窒素を用いて乾固した。得られた抽出物をそれぞれシリンジスパイク溶液 B とシリンジスパイク溶液 C に転溶して試料溶液 (GC 用) および試料溶液 (LC 用) とした。試料溶液 (GC 用) 中のエトフェンプロックスとフェニトロチオンを GC/MS によって、また試料溶液 (LC 用) 中のチアメトキサムを LC/MS によって測定した。

評価方法としては、外部精度管理調査試料の分析は次式から農薬濃度を求めた。

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

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 : 試料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 : 検量線用液 A の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 : 検量線用液 A の調製ばらつきに関わる係数 (= 1)、 M_c : 検量線用液 A 中の農薬混合液 A の質量、 C_c : 農薬混合液 A 中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 P : 分析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 A の質量、 M_s : 試料量、 $M_{sp(c)}$: 検量線用液 A 中の内標準溶液 A の質量、である。なお、マトリックスマッチ検量線溶液 A を用いて算出した測定結果を本分析の分析値 (報告値) としたが、比較のために検量線溶液 A を用いた測定結果も算出した。また、QuEChERS 法の評価は、(1) 式に準じて QuEChERS 法 (分析法 3) と一斉試験法 (分析法 4) による分析値を算出し、両者を比較することにより各抽出法の正確さを評価した。なお、マトリックスマッチ検量線溶液 B およびマトリックスマッチ検量線溶液 C を用いて得た測定値による比較を行ったが、マトリックス効果が測定値に与える影響を検討するために、検量線溶液 B および検量線溶液 C を用いた測定値も算出した。

4 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、カビ毒検査) の作製検討と信頼性確保に関する研究 (渡辺研究分担)

4.1 理化学検査のための適正調査試料の作製検討 :

試料基材として市販の玄米及び精米のそれぞれ新米 (収穫年 : 平成 26 年供試年

産の新米には該当しないが、研究開始時点
で新米として入手、呼称として新米とす
る) ならびに古米 (平成 22 年産)、以下、
米類、枝豆ペースト (新進) を用いた。

玄米及び精米の冷蔵保存における安定
性 (回収率) の評価について前年度 (平成
26 年度) から引き続き、基材成分の農薬に
対する影響の確認として、玄米及び精米そ
れぞれの古米ならびに新米を用い、冷蔵保
存における添加農薬の安定性 (回収率) を
検討した。なお、前年度は、加熱処理後の
米についてもその適用性を検討したが、非
加熱米と比較して加熱処理後に添加した
試料の方が経日的に添加農薬濃度の減少
傾向が著しかったことから、今年度は非加
熱米の検討のみを行った。基材である米類
をそれぞれ遠心粉碎機で粉碎、粉末化後、
直ちに 10 g をそれぞれ量り採り、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 1 $\mu\text{g/mL}$ 、フェニ
トロチオン 2 $\mu\text{g/mL}$ 、アセトン溶液) 1 mL
を正確に加え、試料に十分浸潤させた (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 $\mu\text{g/g}$)。また、同様に粉碎、粉末化し
た米類それぞれに、添加用農薬混合標準液
の代わりにアセトン 1 mL を添加し、ブラ
ンク試料とした。これらの試料について、
各農薬の回収率及び冷蔵保存 (0、5、10、
20、30、60、90、150、180、270 及び 360
日間) における安定性 (回収率) を検討し
た (各 $n=3$)。

冷凍保存における安定性 (回収率) の評
価については、玄米及び精米それぞれの古
米を用い、冷凍保存における添加農薬の安
定性 (回収率) を検討した。なお、先行し

て行っている冷蔵保存安定性検討とは別に、同時期に農薬を添加し冷蔵保存した試料についても、比較評価した。上述したように、農薬添加試料及びブランク試料を作製した。

これらの試料について、各農薬の回収率及び冷凍保存及び冷蔵保存（0、14、34、60、90及び120日間）における安定性を検討した（各 n=3）。

昨年度までの検討結果より、枝豆ペーストに水を5%または10%添加、及び大豆油を2%または5%添加することにより、良好な均一性及び冷凍保存安定性が得られることが明らかとなった。そこで、今年度はそれらの条件から最適な濃度を決定するため、作製した枝豆試料の繰り返し3回の凍結融解及び融解後の冷蔵保存（14日間）における添加農薬の安定性（回収率）を検討した。ブrikサーを用いて均質化した枝豆ペースト2kgに、水を5%及び10%、ならびに大豆油を2%及び5%となるように各々添加後、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 µg/mL、クロルピリホス 60 µg/mL、マラチオン及びフェニトロチオン 100 µg/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100 gを量りとり、容器に入れ冷凍保存した（理論値：ダイアジノン 0.01 µg/g、クロルピリホス 0.3 µg/g、マラチオン及びフェニトロチオン 0.5 µg/g）。また、同様に前処理をした枝豆ペーストに、水を5%及び10%、ならびに大豆油を2%及び5%となるように各々添加後、添加用農薬混合標準液の代わりにアセトンを添加し、同様に操作して得られた試料を、水5%及び10%、

及び油2%及び5%ブランク試料とした。これらの、凍結融解（3回）及び冷蔵保存（水添加は0、1、3、7、10及び14日間、油添加は0、1、5、7及び14日間）における安定性を検討した（各 n=3）。

測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編（2003）」に準じた。試料10.0 gを量り採り、アセトン100 mLで1回、更に50 mLで2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。濃縮物に飽和塩化ナトリウム溶液100 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回繰り返し、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回繰り返し、アセトニトリル層を合わせた後、アセトニトリルを留去した。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、各農薬の定量には絶対検量線を用いた。

4.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製検討：

試験菌株は、秦野研究所に保存してある以下の菌株を用いた。すなわち、腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討には *Vibrio parahaemolyticus* HIC 140279、*Vibrio fluvialis* HIC 140282 を、セレウス菌検査用調査試料の検討には *Bacillus cereus* HIC 140280、*Bacillus subtilis* HIC 140244 を、微生物担体の検討には *Salmonella enterica* HIC 140294、*Proteus mirabilis* HIC 140255 を使用した。なお、試験菌株は5継代以内のものを用いた。

腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討については、試験操作は国立医薬品食品衛生研究所 HP で公開されている NIHSJ-06-ST3(定性試験法)に従って実施した。基材は樹脂製容器に個別に収納したこうや豆腐(約16.5g/1個)を121℃で40分間高圧蒸気滅菌したものを使用した。なお、陽性菌として *Vibrio parahaemolyticus* (Vp)、陰性菌として *Vibrio fluvialis* (Vf) を使用した。Marine agar (Difco) に37℃で24時間培養した試験菌を添加剤含有 Marine broth (Difco) に接種し、同様に培養した培養液を適宜希釈したものを試験菌液とした。試験菌液50 mLを滅菌済こうや豆腐に添加したものを調査試料とした。調査試料は冷蔵または22.5℃で保存し、接種当日(0日後)、チルドゆうパック発送日(9日後)、チルドゆうパック到着日(12日後)に定性試験及び寒天平板混釈法による生菌数測定を実施した。定性試験では、TCBS 寒天培地(日水製薬、栄研化学、極東製薬、OXOID、MERCK)、X-VP 寒天培地「ニッスイ」(日水製薬)、CHROMagar Vibrio (関東化学)、ピ

ブリオ寒天培地「ニッスイ」(日水製薬)、ES ビブリオ寒天培地(栄研化学)の9種の選択寒天培地を使用した。発送時には温度データロガーを同梱し、輸送時の箱内温度をそれぞれ記録した。

セレウス菌検査用調査試料の検討については、米飯基材に接種する陽性菌(*Bacillus cereus*)及び陰性菌(*Bacillus subtilis*)について、芽胞液の安定性を確認した。陽性菌は芽胞形成培地で培養した菌を生理食塩液で懸濁した芽胞懸濁液、陰性菌は市販の芽胞液、陽性菌と同様に作製した芽胞懸濁液、芽胞懸濁液の一部をヒートショック処理により芽胞のみにした芽胞懸濁液の3種を用意した。これらを冷蔵保存し、約1年間の長期安定性を確認した。

微生物担体による安定化技術の検討については、2014年度の微生物担体の安定性確認試験において最も安定していたサルモネラについて、基材に混ぜた担体が潰れないまま定性試験を遂行しても影響がないかを確認した。確認には、食品衛生外部精度管理調査のサルモネラの項目で使用している陽性菌(*Salmonella enterica*)及び陰性菌(*Proteus mirabilis*)の2菌を使用した。生理食塩液に試験菌を懸濁して 1×10^5 CFU/mLの菌液を作製した。この菌液を0.5%アルギン酸ナトリウム加生理食塩液で20倍希釈したものを担体内包用溶液とした。担体内包用溶液を約0.05g(250 CFU/0.05g相当)ずつ5%塩化カルシウム溶液に滴下し、数秒反応させて生成した担体を生理食塩液に回収した。回収した担体を10 mLの緩衝ペプトン水に1粒ずつ添加した。緩衝ペプトン水は37℃で24時間培養した。培養後、培養液をテトラチオネート培地、

ラバポート培地にそれぞれ 1 mL、ラバポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地に 0.1 mL 添加した。培養液を添加した 3 種の選択液体培地を 42.5℃で 24 時間培養した。培養後の選択液体培地からそれぞれ ES サルモネラ II 寒天培地、DHL 寒天培地、MLCB 寒天培地、XLD 寒天培地、ブリリアントグリーン寒天培地、CHROMAgar サルモネラの 6 種の選択カンテン培地に 1 白菌耳画線後、37℃で 24 時間培養した。培養後の選択寒天培地を観察し、発育の有無及び陽性、陰性の判定を実施した。なお、担体の試験と並行して、 1×10^5 CFU/mL の菌液を生理食塩液で 20 倍希釈し、0.05 mL を緩衝ペプトン水に添加して同様に試験を実施したものを各試験菌の対照とした。

4.3 アレルギー関連物質検査のための適正調査試料の作製検討：

小麦は、神奈川県内の食品店で購入した小麦全粒粉を、そばは、中国北方産そば粉を使用した。小麦タンパク質添加用基材には、原材料の欄に小麦を使用した旨の表示が無い、ベビーフードおよびかぼちゃペーストを購入して使用した。そばタンパク質添加用基材には、原材料の欄にそばを使用した旨の表示が無いこしあんを購入して使用した。添加用タンパク質の抽出においては、小麦全粒粉からの添加用タンパク質の抽出は通知法標準品規格に記載の方法に従って抽出した。抽出液は、通知法改正前の抽出液から 2ME を除いた抽出液〔0.5%SDS を含有する 0.1M Tris-HCl (pH8.6)〕および通知法改正後の抽出液〔0.6%SDS 及び 0.1M 亜硫酸ナトリウムを含有する 0.1M Tris-HCl (pH8.6)〕の 2 種類を使用した。

また、そば粉からの添加用タンパク質の抽出は通知法標準品規格に記載の方法に従って行った。抽出液は、通知法改正前の抽出液から 2ME を除いた抽出液〔0.5%SDS、0.5M NaCl を含有する 20mM Tris-HCl (pH7.5)〕および通知法改正後の抽出液〔0.6%SDS 及び 0.1M 亜硫酸ナトリウムを含有する 20mM Tris-HCl (pH7.5)〕の 2 種類を使用した。小麦粉およびそば粉から抽出した添加用タンパク質溶液の濃度は 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス(株))を用いて定量した。

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、小麦タンパク質の定量には日本ハム社製の FASTKIT™ エライザ Ver. III小麦キット、森永生科学研究所製の FASPEK エライザ II小麦(グリアジン)キットおよびプリマハム社製のアレルゲンアイ®ELISA II小麦キットの 3 種類を使用した。また、そばタンパク質の定量には日本ハム社製の FASTKIT™ エライザ Ver. IIIそばキット、森永生科学研究所製の FASPEK エライザ IIそばキットおよびプリマハム社製のアレルゲンアイ®ELISA IIそばキットの 3 種類を使用した。なお、日本ハム社製 ELISA キットを N キット、森永生科学研究所製 ELISA キットを M キット、プリマハム社製 ELISA キットを P キットとした。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。

小麦タンパク質添加試料の作製において、小麦タンパク質添加試料は、基材にベビーフードおよびかぼちゃペーストを使用し、小麦タンパク質溶液を添加して作製した。

すなわち、ブrikサーで均質化した各基材約 2.5 kg に B. 2. 1 で抽出した小麦タンパク質溶液をそれぞれ添加し、ブrikサーで均一になるまで攪拌（20 秒、5 回）したものを試料とした。小麦タンパク質の添加量はベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料でそれぞれ 9. 98 µg/g および 9. 80 µg/g とした。

一方、そばタンパク質添加試料の作製において、そばタンパク質添加試料は、基材としてこしあん（水 10% 添加）を使用し、そばタンパク質溶液を添加して作製した。すなわち、あらかじめこしあんに水を 10% 添加して均質化した基材約 2. 5 kg に B. 2. 2 で抽出したそばタンパク質溶液を添加し、ブrikサーで均一になるまで攪拌（20 秒、5 回）したものを試料とした。そばタンパク質の添加量は 9. 97 µg/g とした。

4. 4 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正調査試料の作製検討：

外部精度管理調査試料の調製には、非遺伝子組換えコムギ（以下 nonGM コムギとする）穀粒、遺伝子組換えコムギ（MON71800）陽性コントロールプラスミド（以下、陽性プラスミドとする）および ColE1/TE（いずれも国立医薬品食品衛生研究所より供与）を使用した。なお、nonGM コムギ穀粒は厚生労働省通知に従って洗浄および乾燥した後、孔径 1. 5 mm のスクリーンを装着した超遠心粉碎機 ZM200（レッチェ）で粉碎したもの（以下 nonGM コムギ粉碎物とする）を使用した。

nonGM コムギ DNA 溶液の調製は、nonGM コムギ粉碎物から DNeasy Plant Maxi Kit（QIAGEN）を使用し、厚生労働省通知に従

って DNA 溶液を抽出し、水で 10 ng/µL に調整したものを nonGM コムギ DNA 溶液とした。

DNA 溶液試料は、陽性プラスミドを nonGM コムギ DNA 溶液で希釈し、試料 C（高濃度陽性試料；100 コピー/ウェル）、試料 B（中濃度陽性試料；50 コピー/ウェル）および試料 D（低濃度陽性試料；20 コピー/ウェル）を調製した。また、nonGM コムギ DNA 溶液を試料 A（陰性試料）とした。コムギ粉碎物試料は nonGM コムギ粉碎物を 50 mL 容の遠沈管に 1. 0 g ずつ分注し、このうち半分に ColE1/TE で希釈した陽性プラスミド溶液（75000 コピー/µL）を 10 µL ずつ添加し、試料 1（DNA 抽出確認用 陽性試料）とした。残り半分には陽性プラスミド溶液を添加せず、試料 2（DNA 抽出確認用 陰性試料）とした。また、MON71800 コムギ検査に使用できる陽性コントロールは市販されていないため、陽性プラスミドを ColE1/TE で希釈し、高濃度（500 コピー/ウェル）と低濃度（50 コピー/ウェル）の陽性コントロールを調製した。

外部精度管理調査の実施においては、外部精度管理調査参加機関には DNA 溶液試料 4 試料（試料 A、試料 B、試料 C および試料 D）各 1 本、コムギ粉碎物試料 2 試料（試料 1 および試料 2）各 2 本を、実施要領および報告書書式とともに送付した。参加機関での検査は通知法に従うこととした。ただし、コムギ粉碎物試料から DNA を抽出する際、試料の秤量を行わずに試料の入った遠沈管に直接抽出緩衝液を添加し、以降の操作を実施するよう依頼した。すなわち参加機関は、通知法に従ってコムギ粉碎物試料から抽出した DNA と、DNA 溶液試料のそれぞれについてコムギ陽性対照試験および

MON71800 検知試験のリアルタイム PCR 測定を実施した。次に各測定について Amplification plot を確認し、指数関数的な増幅が確認された場合は、Th. Line を 0.2 に設定して得られた Ct 値が 43 未満か否かにより、試料ごとに陰性または陽性の判定を行った。

外部精度管理調査結果の統計解析については、参加機関から回収した結果は試料ごとにまとめ、正答率を算出した。DNA 収量および Ct 値については試料ごとに平均値、標準偏差および変動係数 (%) を算出した。また、参加機関の Ct 値は、試料 B、試料 C および試料 D については MON71800 検知試験、試料 1 についてはコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験について、統計解析システム JUSE-QCAS (株)日本科学技術研修所を用いて統計解析を行い、正規確率プロットおよび 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。さらに、試料 1 についてはコムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の差についても同様に検討し、参加機関の Ct 値の相関についても検討した。

4.5 カビ毒検査のための適正試料の作製検討：

アフラトキシン (AF) とグループ特異的に反応するマウスモノクローナル抗体 (MoAb2-3) は、「知の拠点あいち」重点研究プロジェクトを通して、堀場製作所製のマウス腹水として提供された。抗体は、33% 飽和硫酸により不溶化させ、腹水中から回収した。ついで PBS (10mmol/L リン酸ナトリウム、150mmol/L 塩化ナトリウム；pH

7.0) に溶解し、PBS に対して透析を行い、抗体標品を得た。純度は、SDS-PAGE により 90%以上だった。

AFB₁ のオキシム化は、AFB₁ 20 μ mol をピリジン：メタノール：蒸留水 (1:4:1；v/v) 5.0 mL に溶解し、アミノオキシ酢酸ヘミ塩酸塩 72 μ mol を加えて混合した。この混合液を加熱しながら 2 時間環流させることにより、AFB₁ のカルボニル基にアミノオキシ酢酸ヘミ塩酸塩を結合させ、オキシム化した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー (1g) (展開溶媒；クロロホルム：メタノール (9:1；v/v)) を用いて、上記反応液からオキシム化 AFB₁ を含むフラクションを分画し、さらに、エバポレーターを用いて減圧濃縮を行い、オキシム化 AFB₁ を得た。つぎに、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識 AFB₁ の調製は、オキシム化 AFB₁ 20 μ mol と、これと等量 (モル当量) の *N*-ヒドロキシスクシンイミド及び、EDC を DMSO 2.0 mL 中で混合した。この混合溶液を、室温で 1.5 時間静置し、オキシム化 AFB₁ のカルボキシ基に *N*-ヒドロキシスクシンイミドを結合し、活性エステル化した。HRP 10 mg を PBS 1 mL に溶解し、上記の活性エステル 440 μ L を加えた。室温で 1.5 時間ゆっくり攪拌しオキシム化 AFB₁ のカルボキシ基と HRP に存在するリジン残基の ϵ アミノ基をアミド結合させた。さらに、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (担体：Sephadex G-25 Super-Fine (GE Healthcare) ϕ 15 \times 500 mm、展開溶媒：PBS) により HRP 標識 AFB₁ を精製した。

直接競合 ELISA の構築について 96 ウェルマイクロタイタープレートに 5 μ g/mL 抗マ