

ウス IgG/10 mM PBS を 100 μ L/ウェルで添加後、4°Cで一晩静置し固相した。その後、0.4% BSA/10 mM PBS を 300 μ L/ウェルで添加後、室温で 30 分静置し、ブロッキングした。そこに、0.2% BSA/10 mM PBS で 40 ng/mL に希釈した MoAb2-3 を 100 μ L/ウェルで添加後、室温で 1 時間静置した。反応後、0.02% Tween20/10 mM PBS でウェルを洗浄し、0.2% BSA/10 mM PBS で 10 ng/mL に希釈した HRP 標識 AFB₁ と測定対象 AF (10%メタノールに溶解) との等量混合液を 100 μ L/ウェルで添加し、室温で 1 時間静置して、競合反応させた。反応後、ウェルを洗浄し、HRP に対する基質 (テトラメチルベンジジン) を加えて室温で 10 分間発色させ、0.5 mol/L 硫酸で発色を停止した。分光光度計 (BIO-RAD 製 X-Mark) を用いて 450 nm における各ウェルの吸光度を測定した。

直接競合 ELISA によるピーナッツバター中の AF の測定では、AF に汚染されていない市販の国産ピーナッツを粘稠性が生じるまで磨砕均一化してピーナッツバターを調製し、AF の添加回収試験を実施した。また、市販の輸入ピーナッツバターを用いて、AF 汚染を調べた。ピーナッツバター 2.5 g に対して、NaCl 0.25 g、80%メタノール 10 mL を加え、ピーナッツバター調製液とした。添加回収試験においては、メタノールで 500 ng/mL に希釈した各 AF4 種、及びそれらの等量混合物 (各 0.25 μ g/mL) をそれぞれ、ピーナッツバター調製液に 100 μ L あるいは 20 μ L ずつ添加した (試料中最終 AF 量:10 ng/g あるいは 2 ng/g)。これらを 30 分間室温で振とうし、遠心分離により得られた上清を 10%メタノール相当となるよう

に蒸留水で希釈した。さらに、構築した直接競合 ELISA の測定範囲に収めるために、10%メタノールで適宜希釈した。これらの希釈液を上記の測定対象 AF として直接競合 ELISA に供試した。また、LC-MS/MS によるピーナッツバター中の AF の測定は、サンプル 20 g を取り、2.5 g の NaCl を添加後、100 mL のメタノール溶液 (水:メタノール=1:4) を加えて 5 分間ホモジェナイズした。3000 rpm で 15 分間遠心し、その上清を 25 mL 分取して水で 50 mL にフィルアップした。その 10 mL を取り、イムノアフィニティーカラム (AFLAKING 堀場製作所製) にアプライしてアセトニトリル溶出液 3 mL を得た。窒素パージにより乾燥し、1.0 mL の溶解液 (10 mM 酢酸アンモニウム溶液:メタノール=6:4) で再溶解し、LC-MS/MS にかけた。LC は AQUITY UPLC (Waters 製)、検出器は Quattro Premier XE (Waters 製) を用いた。カラムは AQUITY UPLC BEH C18 (2.1 \times 50 mm, 粒径 1.7 μ m), 移動相は A 液:10 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.0), B 液:MeOH, グラジエント条件は A:B=0 min (95:5) -5 min (20:80) -5.1 min (95:5)、カラム温度 40°C、流速 0.5 mL/min, サンプル注入量 5 μ L だった。

C. D. 研究結果および考察

1 尾花研究分担

事前検討 1 において、今回評価対象とした 5 種類の農薬および 4 種類の IS のいずれについても、溶液中の共存農薬数の増加に伴いピーク面積が増大する傾向が認められた。なお、この傾向 (各溶液間の相対的な差異) は 50 ng/mL 溶液よりも 500 ng/mL 溶液でより顕著であった。オメトエートでは、

ピーク面積の増大のみならず、保持時間の短縮が観測された。以上の結果から、GC-MS (MS) 測定において農薬そのものがマトリックスとして機能することが裏付けられた。

ピーク面積が増大する程度は農薬・ISの種類によって異なった。例えば、各 500 ng/mL の検討において、単品農薬の場合と 166 農薬を添加した場合を比較すると、マラチオンでは平均で 4.0 倍の増大が観測されたのに対し、オメトエート、テルブホス、プロシミドン、ペルメトリンでは各々 2.0、2.3、2.0、3.4 倍の増大であった。また、IS について 166 農薬の添加により、TPP では平均で 7.1 倍の増大が観測されたのに対し、NPH-d8、PHN-d10、FLA-d10 については各々 1.2、1.5、1.7 倍の増大であった。今回評価対象とした 3 種類の多環芳香族炭化水素の重水素化体 (d-PAHs) のうち、ピーク面積の変化が最も小さかったのは NPH-d8 であり、d-PAHs では、芳香環の数が少ないもの (分子量が小さく揮発性が高いもの) ほど「マトリックス効果」の影響が小さいことが示唆された。

機器測定時の農薬のピーク面積の変動を補正して定量するためには、対象農薬と同様の挙動を示す IS を用いることが望ましい。各農薬の対 TPP 比の相対値 (単品=1) は、各 500 ng/mL の 3 パターンの多種混合溶液 (+58 農薬、+108 農薬、+166 農薬) について、順に 0.4~0.6、0.4~0.6、0.3~0.7 の値となった。すなわち、単品溶液と多種混合溶液の比較では、両者の値に乖離があるが、3 パターンの多種混合溶液間の比較では、面積比の差は比較的小さく、一定量のマトリックス存在下において TPP

は汎用的な IS として比較的有効に機能することが示唆された。また、3 種類の d-PAHs に対する各農薬の面積比の比較では、NPH-d8 よりも PHN-d10 や FLA-d10 の方が全体的に溶液間の面積比の差が小さく、IS としてより有効に機能すると考えられた。

事前検討 2 において、絶対検量線による模擬試験液の定量結果でフルシトリネートについては A1 と A2 の検量線の傾きに差が認められ、定量率は各々 98%、78% であった。大阪府の SOP の通常濃度 (1 g/mL) の試料マトリックスが存在する場合でも、農薬が $\mu\text{g/mL}$ オーダーで含まれている混合標準溶液では農薬由来のマトリックス効果が無視できないことが示唆された。

40 倍希釈に相当する B1、B2 では評価対象 3 農薬のいずれについても B2 の検量線の傾きが B1 より大きくなり、農薬の定量率が全体的に低い傾向が観測された。マラチオン、プロシミドン、フルシトリネートの定量率は、B1 の場合で順に 82%、85%、87% であったのに対し、B2 では 64%、65%、77% であった。この結果から、農薬由来のマトリックス効果は、食品試料由来のマトリックスが低減した状況 (溶媒標準溶液に近い状況) で、より顕在化しやすいことが示唆された。絶対検量線の傾きの差や定量率の差は、補助マトリックスとして GSBm を添加した C1 と C2、VFJm を添加した D1 と D2 では小さなものになっており、これらの補助マトリックスの添加により、農薬由来のマトリックス効果の影響を緩和できることが示唆された。一方、PEG を添加した E1、E2 においてプロシミドンの結果は良好であったが、マラチオン、フルシトリネートについては定量率の差および RSD が大きい傾向

が認められた。さらにフルシトリネートについては全体的なピーク面積の減少傾向が観測され、原因として、PEG による分解が考えられた。

相対検量線は、いずれの IS による補正でも E1、E2 のマラチオン、フルシトリネートについて良好な結果は得られなかった。一方、絶対検量線では顕著な差が認められた B1 と B2 について、TPP または FLA-d10 を IS とした相対検量線では両者の傾きや定量率の差は小さなものとなった。3 種類の d-PAHs を IS とした相対検量線での B2 の各農薬の定量率を比較すると、NPH-d8 では理論値との差が大きく補正効果が小さいことが分かった。NPH-d8 はマトリックス効果の影響を受けにくく、ほぼ一定した感度が得られることから、試験液の注入異常やバイアル中の溶媒揮発の有無を判定するためのシリンジスパイクとしての用途には適した化合物と考えられた。

各協力機関の実験結果として、実験 S50 では機関 c、d、e、f で共存農薬数の増加に伴う面積の増大が観測されたが、機関 a、b ではその傾向は明確には観測されなかった。農薬や IS の種類によって増大率には差が認められた。実験 S50 では機関 f の TPP、フルシトリネートでピーク面積の増大率が大きく、166 農薬の添加で各々 1.8 倍、2.1 倍の増大が観測された。一方、同条件で機関 f のプロシミドン、PHN-d10 の増大は各々 1.4 倍、1.3 倍であり、これらはマトリックス効果を比較的受けにくいことが示唆された。実験 S500 では、機関 a~e で実験 S50 よりもピーク面積の増大傾向が強くと発現したが、機関 f では 3 農薬について全体的に実験 S50 のときよりも変化が小さくなった。

他の 5 機関と異なり機関 f は大量注入法 (25 μ L 注入) を採用しているため、同じ濃度の溶液を測定した場合、各化合物の絶対注入量が他機関 (1 μ L または 2 μ L 注入) より 12.5~25 倍高い状況となる。したがって、MS 側で過負荷によるイオン化抑制 (ピーク面積の頭打ち) が起こりやすい状況にあったと推測され、このことが、機関 f で農薬由来のマトリックス効果の濃度依存性が、見かけ上、他機関と異なった一因と考えられた。

IS のピーク面積の変動について、実験 S では 3、61、111、169 種類の農薬を含む溶液各 1 回ずつの注入を 1 セットとして、捨て分析を挟んで各濃度 4 セット ($n=4$) の測定を実施している。全機関に共通する反復的な波状パターンは、上記シーケンスにおける測定溶液中の農薬数の増減に対応していることが分かる。これらの結果は、先に述べた農薬や IS のピーク面積の増大現象が、単なる経時的・偶発的な装置内部の状態変化 (注入口・カラムの劣化、検出器の感度ドリフト等) によるものではなく、溶液中の農薬数と明らかに相関することを示している。なお、波状パターンは PHN-d10 より TPP において明確であり、これは両者のマトリックス効果の受けやすさを反映したものであろう。大阪府の事前検討においてマトリックス効果を受けにくいことが示唆された NPH-d8 を IS としてモニターした場合は、より変動が少ないグラフになると予想される。以上の結果から、少なくとも溶媒標準溶液の条件では、異なる複数機種において農薬由来のマトリックス効果は無視できない現象であることが明らかとなった。

実験 A~E における絶対検量線については機関 f の実験 A2 を除き、全体的に 169mix で定量した場合に定量値が低い傾向が観測された。特に、単純な希釈測定に対応する実験 B2 で過小定量の傾向が顕著であった。この傾向は食品マトリックスを補助的に添加した実験 C2、D2 では小さくなった。なお、PEG を添加した実験 E では一部の機関でフルシトリネートの定量性が悪化する現象が認められた。PEG との共注入により一部のピレスロイド系農薬（フルシトリネート等）が分解することが知られており、このことが一因と推測された。

機関 f の実験 A2 については、他機関の傾向と異なり、逆に定量値が過大となる結果となった。機関 f の検量線を見ると、他機関と異なり A2 の検量線の傾きが A1 の検量線よりも小さくなる逆転現象が起こっており、さらにマラチオンやプロシミドンでは明らかな頭打ちの曲線となっていた。機関 f は大量注入法（25 μ L 注入）を採用しており、高濃度溶液の測定時に過負荷によるイオン化抑制が他機関より起こりやすい条件と言える。検量線 A1 と A2 の各測定溶液を比較すると、GSBm の濃度は一定であり共存農薬数のみが異なる。以上から、検量線 A2 の溶液測定時に、評価対象農薬と共溶出した共存農薬が過負荷による評価対象農薬のイオン化抑制を起こした可能性が高いと推測された。この現象も一種のマトリックス効果であり、農薬由来のマトリックス効果は過小定量だけではなく、過大定量の要因にもなることが示唆された。

一方、TPP に対する相対検量線では、食品マトリックス量が比較的多い実験 C・D において全機関で比較的良好な定量結果が得

られたが、機関 d・e の実験 B2 で、全ての評価対象農薬で過大定量の傾向（定量率 133~260%）が観測された。TPP は汎用的な IS として使用されるが、食品試料マトリックスが低減した条件では農薬との挙動が大きく異なり定量誤差を拡大する可能性があることが示唆された。

PHN-d10 に対する相対検量線では、TPP の相対検量線で観測された機関 d および e の過大定量傾向は解消され、実験 B2 の結果は全体的に過小定量の傾向を示した。農薬の正確な定量には、各機関の装置の特性等に合わせて適切な IS を選択することが重要であることが分かった。

各評価対象農薬について共存農薬数が異なる検量線の傾き比 [Slope 169mix] / [Slope 3mix] を 4 つのカテゴリー（カテゴリー I、II、III、IV）で分類した。カテゴリー I・II のいずれかに入った農薬は、傾き比が 0.9~1.1 の範囲内に収まっていることを意味している。つまり、3mix の検量線に対する 169mix の検量線の傾きの変化が $\pm 10\%$ 以内に収まっていることになる。一方、カテゴリー III・IV のいずれかに入った農薬は傾き比が 0.9~1.1 の範囲から外れていることになる。全体的にカテゴリー I・II の総数が多いのはプロシミドンであり、カテゴリー III・IV の総数が最も多いのはフルシトリネートであった。また、絶対・相対検量線のいずれについても、単純な希釈測定に対応する実験 B ではカテゴリー I・II の総数が全体的に少ない結果となった。これらの結果から、プロシミドンは今回検討した評価対象農薬の中では共存農薬の影響を比較的受けにくく、定量しやすい農薬であることが分かる。しかし、そ

れでも食品マトリックス濃度が低い状況では農薬由来のマトリックス効果の顕在化に注意する必要がある。一方、フルシトリネートはマトリックス量が比較的が多い状況であっても共存農薬の影響が顕在化しやすく、正確に定量しにくい農薬と言える。今回各機関に配布した標準溶液に含まれるフルシトリネートは2つの異性体のほぼ等量の混合物であり、1つの異性体あたりではマラチオン、プロシミドンの濃度に比べて約半分の濃度に相当することになる。この濃度の違いが、フルシトリネートにおいて農薬由来のマトリックス効果が大きくなった一因とも考えられる。

ISのピーク面積の変動について、いずれの機関においても、全体のマトリックス量が比較的少ない実験Bのシーケンスでピーク面積の相対的な低下が観測されており、これらのISのピーク面積が食品成分等のマトリックスの影響を大きく受けることが分かる。実験Bにおけるピーク面積の低下傾向はPHN-d10よりもTPPで顕著であった。なお、実験A～Eの一連のシーケンスを通じて、機関fではISのピーク面積の変動が比較的小さい結果となった。この違いが何に起因するかは不明であるが、機関fのみが大量注入法を使用しており、ISや農薬等の絶対注入量が他機関より12.5～25倍高いことが関係している可能性がある。四重極型GC-MSを使用した機関cでは、実験A以降のISのピーク面積の低下が著しく、実験Aの高濃度農薬混合溶液の連続測定がMSのイオン源等に大きな負荷を与えた可能性がある。

共存農薬として高濃度の単品農薬を添加した場合に農薬由来のマトリックス効果が

発現する可能性がある。この点を確認するために大阪府のみで事後検討（追加実験）を行った。4種類のISを含むマラチオンの溶媒標準溶液に高濃度（ $\mu\text{g/mL}$ オーダー）のオメトエートを添加してマラチオンおよびISのピーク応答を調べた。その結果、オメトエートの添加濃度の上昇に伴い、マラチオンやPHN-d10のピーク形状がシャープになり、保持時間が短縮する傾向が明確に観測された。オメトエートの添加濃度の上昇に伴い、ピーク面積が明らかに増大している。これらの結果は、高濃度の単品農薬がマトリックスとして機能することを示している。さらに10～100 ng/mL のマラチオンに20 $\mu\text{g/mL}$ のオメトエートを添加して測定する実験を行ったところ、当該現象が検量線の傾きに影響を及ぼすことが確認された。

2 齊藤研究分担

厚生労働省の公定検査法では、抽出操作の際に、試料中のAFsを振とう抽出後、精製水またはPBSを用いて抽出液を希釈する。しかし、香辛料では油脂性成分が多いため、精製水などで希釈をしたときに、水に不溶性油脂性成分が沈殿し、この沈殿物にAFsが吸着することで回収率の低下を招いてしまうことがある。そのため、香辛料を試料とする際には、脂溶性成分への吸着を防ぐために、界面活性剤として8% Tween20水溶液を用いて希釈することが推奨されている。

本研究においても、界面活性剤の有効性を検討した結果、非イオン性界面活性剤であるTritonX-100を用いた時に、8% Tween20に比べて若干ではあったが良好な回収率が得られたことから、TritonX-100を希釈溶

媒として採用した。また、希釈溶媒を添加した際に生じる不溶物量について検討したところ、希釈後に残存するメタノールの含有率が高くなるほど不溶物が少なくなることが判明した。しかし、メタノール濃度が上昇すると今度はイムノアフィニティーゲルに対して変性などの影響が出ることから、AFLAKINGにおけるメタノール使用上限濃度である40%となるように希釈溶媒(TritonX-100)を加えることとした。そのことを踏まえた上で、測定感度の向上を目指して、試料採取量、抽出溶媒量および希釈溶媒量について検討し、研究方法で示した方法を採用した。構築した方法について、妥当性を確認するために精度管理用試料を調製して外部機関による外部精度管理試験を行った。現在、総参加機関数8機関にて精度管理試験を実施中である。結果については平成28年度内には判明すると思われ、28年度の報告書にて結果の詳細を明らかにする予定である。

また、AFM₁分析法を検討した結果、固相の検討では、SPDE法で使用する固相の種類について、Oasis[®]HLBとイムノアフィニティーゲルを用いて比較検討した。その結果、Oasis[®]HLBを用いてプロセスチーズの試料抽出液をクリーンアップした際、夾雑物の妨害ピークがAFM₁のピークと重なってしまい、測定が困難となった。他方、イムノアフィニティーゲルを用いた場合、AFM₁のピークが妨害ピークと重なることもなく、良好なクロマトグラムと高い回収率を得られたため、SPDE法で用いる固相としてイムノアフィニティーゲルを採用した。つぎに、固相蛍光誘導体化法の至適条件を検討した。TFAの添加量について50~300 µLの範囲で

検討した。その結果、200 µLを添加した際に最も高い反応性が得られたことから、TFAの添加量は200 µLを採用した。次に、反応時間について、5~40分の範囲で検討したところ、20分で最も高い反応性が得られたことから、反応時間は20分を採用した。また、反応温度について、常温(25℃)~70℃の範囲で検討したところ、40℃において最も高い反応性が得られたことから、反応温度は40℃を採用した。移動相については、HPLC-FLの移動相として精製水/アセトニトリル混液(75:25, v/v)を用いたところ、AFM₁のピークが妨害ピークと重なってしまった。一般に、移動相の有機溶媒濃度の低下に伴って保持時間が延長することから、アセトニトリルの濃度を下げ、精製水/アセトニトリル混液(80:20, 82:18, v/v)という2つの組成を検討した。その結果、どちらの組成においてもAFM₁のピークと妨害ピークを分離することができ、良好なクロマトグラムが得られた。なお、保持時間は前者が11.05分、後者が12.55分であり、測定にかかる時間を考慮して、移動相は精製水/アセトニトリル混液(80:20, v/v)を採用した。

本条件により、検出限界(LOD; S/N=3)は0.01 ng/mL、定量限界(LOQ; S/N>10)は0.03 ng/mLであった。検量線を作成したところ0.03~5.0 ng/mLの濃度範囲で良好な直線性が得られた。

一方、添加回収試験では、本法のチーズへの適用性を評価するため、1日3検体計5日間で添加回収試験を行った。添加濃度については、コーデックス委員会の規制値0.5 µg/kgを網羅できる高濃度(1 ng/mL)と低濃度(0.1 ng/mL)に設定した。回収率、併行精度および室内精度については、一元配

置分散分析法で統計解析した。その結果、高濃度では約 93%、低濃度では約 91%の良好な回収率が得られた。更に、併行精度および室内精度はどちらの濃度でも 5~7%と高い再現性が得られた。実試料として、本法を用いて、国産のチーズ(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 検体を対象として実態調査を行った。その結果、いずれの試料においても AFM₁ は検出限界未満であった。

3 鎗田研究分担

外部精度管理調査試料の分析については、分析法 1 と分析法 2 によって、平成 27 年度外部精度管理調査(残留農薬検査 I)の調査試料を分析した。クロルピリホスの定量値は分析法 1 が 20.4~21.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 が 19.4~21.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンの定量値は分析法 1 が 795~849 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 が 790~823 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり ($n=5$)、両法の結果はほぼ一致していた。各分析法について、(1) 式の各要因の不確かさを基に得られた分析値の合成標準不確かさを算出した。ここで、 F_c 、 R_s 、 R_c 、 $M_{sp(s)}$ 、 M_s 以外の要因は分析法 1 と分析法 2 で共通である。そこで、前記 5 要因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ところ、クロルピリホス：(20.8 \pm 0.9) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオン：(814 \pm 30) $\mu\text{g}/\text{kg}$ (重み付け平均値 \pm 拡張不確かさ(包含係数:2))であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液 A を用いて算出した測定値は、クロルピリホスが分析法 1 で 20.4~21.7

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 で 19.1~21.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンが分析法 1 で 754~805 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 が 747~792 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、マトリックスマッチ検量線溶液 A との結果と比べて特にマラチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。この傾向は、昨年度の本研究の結果を支持するものであった。

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、クロルピリホスが 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンが 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、IDMS による定量結果はこれと一致した。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) とその標準偏差の 2 倍は、クロルピリホスが (20.115 \pm 6.422) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンが (739.322 \pm 21.4784) $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。マラチオンについては、IDMS による定量値はこれより 10 %高く、平成 25 年度および平成 26 年度における結果と同様であった、その原因として、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。一方、クロルピリホスについては、参加機関の結果から決定した付与値と、IDMS の結果や調製値とはほぼ一致していた。研究の目的から外れるために、本研究ではその原因の解明は行わなかった。しかし、外部精度管理における参加者の分析値の傾向を把握するためにも、その原因を解明することは意義深いと考えられた。なお、参加機関間の報告値のばらつき(標準偏差)に対して、IDMS による定量値の不確かさはクロルピリホスとマラチオンとも 14 %であり、IDMS の不

確かさは充分小さいことが示された。

QuEChERS 法の評価については、QuEChERS 法と一斉試験法によって得られた定量値からクリーンアップや GC/MS および LC/MS 過程では分析対象農薬とその標識体の間で同位体平衡が成り立っていると考えられることから、両分析結果の差は、抽出過程での抽出能力の差に起因していると考えられる。実験の結果から、両分析値に有意な差はなく、簡易分析法にもかかわらず QuEChERS 法によって正確な分析値が得られることが示された。なお、マトリックスマッチングしていない検量線 B を用いた場合、GC/MS で定量するエトフェンプロックスとフェニトロチオンについて、各々 13 % と 22 % 定量値が低くなった。QuEChERS 法は一斉試験法よりも精製効果が低いと考えられたため、IDMS においてもマトリックス効果の影響をより強く受ける可能性がある。QuEChERS 法によってより正確な IDMS 分析を行うためには、今後マトリックス効果に関するより詳細な検討が必要であることが示唆された。

4 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：

米類を農薬添加溶媒に浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた米類を乾燥・粉砕する作製方法により、添加農薬の均質性が得られることが、これまでに明らかになった。しかしながら、作製後、約 6 ヶ月～1 年の時点で、添加農薬の濃度が半減する現象が見られたことから、それらが米成分に由来する可能性の確認として、粉砕・粉末化した米類(精米及び玄米のそれぞれ新米なら

びに古米)に農薬を添加し冷蔵保存条件下での経日的安定性(農薬添加後 0、5、10、20、30、60、90、150、180、270 及び 360 日間)を検討した。その結果、精米については新米及び古米のいずれにおいても 4 種農薬すべてが約 80% の回収率を確保できる期間は、添加後 90 日までであり、90 日を経過後、クロルピリホスを除く 3 種の農薬とも減少傾向が見られ、270 日においてはいずれの農薬も概ね 50% 以下の回収率となった。精米においては、わずかに古米より新米の方が 4 種農薬とも高い回収率を示した。これは、何らかの米成分の変化が影響していると考えられるが、影響因子の特定はできていない。玄米においては、新米及び古米での安定性の差はほとんど見られなかった。概した傾向は、精米より玄米の方が、より高い安定性を示した。一方、冷凍保存における安定性(0、14、34、60、90 及び 120 日間)を検討したところ、精米及び玄米ともに明らかに冷蔵よりも冷凍保存の方が高い安定性を示し、さらに精米より玄米の方が良好な安定性が得られた。精米においては特にマラチオン及びフェニトロチオンの 2 農薬が冷凍と冷蔵保存で顕著な差が認められた。玄米は、4 種農薬とも 120 日間保存時点で 80% 以上の回収率を示しており、外部精度管理調査において配布する上での必要な期間は安定性を確保できると考えられた。なお、それぞれの測定時点及び米の種類に応じてブランク試料についても同時に測定を行ったところ、一部の時点及び農薬において基材由来のピークが出現したため、それらを差し引いて回収率の算出を行った。

今後は、冷凍保存について 120 日以降も

継続して安定性を検討することと併せて、外部精度管理調査で配布する際の必要量の作製ができるシステムの確立と、その方法でも均一性の確認が必要である。

従来の野菜ペーストと同様に、枝豆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 $\mu\text{g/g}$ 、クロロピリホス 0.3 $\mu\text{g/g}$ 、及びマラチオン及びフェニトロチオン 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ことから、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で良好な均一性を得ることができた。回収率の点で、20%水分添加及び10%油分添加を除き、水分5%及び10%ならびに油分2%及び5%について、添加剤の選択及び濃度を決定するために繰り返し3回の凍結融解の安定性及び融解後冷蔵保存における安定性を確認した。そこで、今年度は、それらの冷凍保存における安定性を検討し、適切な水分あるいは油分の添加量を選択することとした。その結果、油分添加の2試料についてダイアジノンが2回の凍結融解で回収率の減少傾向が認められたが他の試料及び農薬についてはいずれも繰り返し3回の凍結融解の影響は認められなかった。一方、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ところ、概して水分添加の方が油分添加より良好な安定性を示した。水分の添加量については10%添加の方が4種農薬とも良好な回収率を示した。

以上の結果から、枝豆ペーストについては、添加剤には水を用い、その添加量は10%が適切であると判断できた。公定法に

おいては、枝豆は豆類ではなく野菜の分類となり、脱脂工程が求められていない。しかしながら、枝豆は4%程度の脂質を含有しており、その上でも、本来の枝豆の成分とは脂質の点において異なる油分を添加することは好ましくない。今年度、水分添加において良好な結果が得られたので、今後は米の作製と同様に外部精度管理調査で配布する際の必要量の作製ができるシステムの確立と、その方法により得られた試料の均一性の確認が必要である。

4.2 微生物学検査のための適性調査試料の作製検討：

腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討については、生菌数測定は接種当日、発送当日、チルドゆうパック到着後の3回実施した。接種当日は各菌2個ずつ、発送当日は保管温度2条件について各菌2個ずつ、チルドゆうパック到着後は発送した保管温度2条件について5セットずつの検査用調査試料を使用した。定性試験は生菌数試験の残余を使用し、接種直後及びチルドゆうパック到着後の2回について実施し、輸送中の箱内温度を記録したデータロガーは、チルドゆうパック到着後に速やかに回収した。生菌数測定結果より、チルドゆうパックで輸送会社の冷蔵倉庫に保管されている間の生菌数の変化は小さいこと、及びチルドゆうパック発送前の保管温度条件がチルドゆうパック発送後の生菌数に大きく影響することが示唆された。生菌数の経時的変化について、発送前の保管条件が冷蔵の場合、Vpで約 10^{-1} 倍、Vfで約 10^{-3} 倍に接種菌数から減少した。一方22.5℃保管では、Vpで約 10^2 倍、Vfで約10倍に増殖した。なお並行

して実施した定性試験では、いずれの保管条件においても選択培地上の集落は陽性菌、陰性菌共に正常な反応を示した。また、輸送時の温度変化を記録した結果、梱包直後は梱包時の室温だが、梱包後 2 時間以内に 10℃以下に低下し、配送会社の倉庫に保管されて 1℃前後に安定した後、配送のため倉庫から出されて 3℃前後まで上昇した(今回の輸送試験は同一管内での輸送であったことから、県内の配送センターに集積されないため、輸送時間が非常に短くなった)。75 時間後の開封時に温度の急激な上昇が認められたが、梱包開始から開封までの間に大きな温度上昇は認められず、安定した低温保管であったことが示された。定性試験の外部精度管理において、輸送中の生菌数の減少は判定結果に大きく影響する。今回の結果より、発送前の保管温度を 22.5℃にすることで、輸送中の低温保管による生菌数の減少を回避できると考えられた。

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。全体的に大きな生菌数の変動は認められなかったが、長期保存で生菌数がより安定する傾向が認められた。特にヒートショック処理を実施していない芽胞液は、芽胞以外の菌の除去効果があると考えられた。今回の結果から、基材に接種する試験菌は、陽性菌、陰性菌共に 24 週(約半年)以上の冷蔵保管後の芽胞懸濁液を使用することで、調査用試料の生菌数の精度を高められる可能性が示唆された。

微生物担体による安定化技術の検討については、各試験菌の担体を 10 個ずつ試験に

供した。担体の選択寒天培地の発育の有無及び定性試験の判定結果で陽性菌は対照試験及び全ての担体で陽性の判定を得られた。一方、陰性菌は一部の寒天培地上で弱い発育が確認されたが、対照及び全ての担体で陰性の判定を得られた。以上のことより、液体培地による増菌の工程が入る試験法では担体が潰れない場合も結果に影響はないことが示唆された。

4.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製検討検討：

小麦タンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性においては、通知法改正前に開発した基材添加用の小麦タンパク質溶液について、新 ELISA キットを用いて測定し、反応性を確認した。小麦タンパク質溶液は、通知法改正前の旧 ELISA キットを用いた検討で良好な結果が得られている小麦全粒粉および通知法改正前の抽出液から 2ME を除いた抽出液(old-2ME 抽出液)を用いて調製した。また、通知法改正後の抽出液(new 抽出液)を用いたものについても同様に調製した。各小麦タンパク質溶液は、総タンパク質濃度を測定後、10 µg/mL 程度に希釈し、3 種類の新 ELISA キットにより測定した。各小麦タンパク質溶液の総タンパク質濃度測定結果より old-2ME 抽出液および new 抽出液により抽出した小麦タンパク質溶液中の総タンパク質濃度はそれぞれ 4.3 mg/mL および 4.4 mg/mL と同程度であり、いずれも標準品規格に記載のタンパク質濃度範囲(4.0~6.0 mg/mL)内であった。

各小麦タンパク質溶液の新 ELISA キットにおける測定値および回収率から、各小麦タンパク質溶液の回収率は、old-2ME 抽出

液で 100.2~130.7%、new 抽出液で 99.0~122.2%と良好であった。また、両小麦タンパク質溶液ともに M キット、N キット、P キットの順に回収率が高かったが、M キットと P キットの回収率の差はいずれも約 30%であり、キット間差は小さかった。old-2ME 抽出液と new 抽出液を比較すると、すべての ELISA キットでほぼ同等の反応性を示し、抽出液の違いによる影響はみられなかった。以上のことから、小麦タンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性は old-2ME 抽出液および new 抽出液の両方で良好であった。また、通知法改正前に開発した材料および抽出液が新 ELISA キットにおいても適用可能であることが確認できた。

つぎに、新 ELISA キットに適用可能であることが確認された小麦タンパク質溶液を用いて、外部精度管理調査の実施を想定したスケール（約 2 kg スケール）での試料作製を試みた。なお、小麦タンパク質溶液の抽出には old-2ME 抽出液を用いた。添加用基材にはベビーフードおよびかぼちゃペーストを用い、それぞれに小麦タンパク質溶液を加えて混合し、試料を作製した。均一性試験として、分注後に冷凍保存した試料から 10 容器を無作為に選び、1 容器につき $n=2$ でサンプリングを行い、3 種類の新 ELISA キットで測定を行った。各キットの測定結果について一元配置による分散分析を行い、試料の均一性を確認した。その結果、ベビーフード試料、かぼちゃペースト試料は F 値がいずれも有意水準 5% 点 (3.020) 未満であり、均一性が認められた。安定性試験として、これら試料について冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後に同様にサンプリングおよび ELISA 測定

を行い、冷凍保存 0 ヶ月（均一性試験）結果と合わせて添加回収率および安定性を評価した。なお、回収率は 3 種類の新 ELISA キットの測定値から算出したタンパク質量を添加タンパク質量で除することで求めた。また、安定性は冷凍保存 1 ヶ月および冷凍保存 2 ヶ月の測定値から算出したタンパク質量を冷凍保存 0 ヶ月の測定値から算出したタンパク質量で除することで求めた。その結果、冷凍保存 0 ヶ月の回収率は、両試料において M キットでは 160% 程度と高めであったが、N キット、P キットではいずれも 100% 程度と良好であった。また、M キットと N キット、P キットの回収率の差は約 60% であり、キット間差は小麦タンパク質溶液のキット間差に比べて大きかった。これは、食品マトリックスによる影響若しくは M キットのロット間差による可能性が考えられた。ベビーフード試料とかぼちゃペースト試料の回収率はすべての ELISA キットでほぼ同等であり、試料間差は小さかった。さらに、冷凍保存 1 ヶ月および冷凍保存 2 ヶ月の安定性は、すべての試料および ELISA キットで 85~110% の範囲内にあったことから、これら試料は少なくとも 2 ヶ月間は安定であることが確認できた。以上のことから、小麦タンパク質添加試料（ベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料）については外部精度管理調査実施に向けて、均一かつ安定した試料を大量に作製することができたものと考えられた。

そばタンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性については、通知法改正前に開発した基材添加用のそばタンパク質溶液について、新 ELISA キットを用いて測定し、反応性を確認した。各そばタンパク質溶液

の総タンパク質濃度測定結果より old-2ME 抽出液および new 抽出液により抽出したそばタンパク質溶液中の総タンパク質濃度はそれぞれ 3.0 mg/mL および 5.7 mg/mL であり、new 抽出液は old-2ME 抽出液と比較して約 2 倍高かった。また、new 抽出液により抽出したそばタンパク質溶液は標準品規格に記載のタンパク質濃度範囲 (2.7~4.0 mg/mL) を上回った。各そばタンパク質溶液の新 ELISA キットにおける測定値および回収率から old-2ME 抽出液における回収率は、N キットで 133.7%、M キットで 132.0%、P キットで 198.5% であり、P キットで測定した場合の回収率が他の 2 キットに比べて高く、キット間差が大きかった。一方、new 抽出液における回収率はそれぞれ 111.2%、137.9%、106.1% とキット間差が old-2ME 抽出液よりも小さく、約 30% であった。old-2ME 抽出液を用いた場合にキット間差が大きくなった原因として、old-2ME 抽出液は還元剤を含まないことから、抽出できるそばタンパク質の種類に偏りが生じ、P キットの抗体が認識するタンパクが多く抽出された可能性が考えられた。一方、new 抽出液は還元剤として亜硫酸ナトリウムを含むため、3 種類の ELISA キットがそれぞれ認識するそばタンパク質をバランスよく抽出できたと考えられた。以上のことから、そばタンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性は old-2ME 抽出液 よりも new 抽出液で良好であり、旧 ELISA キットにおいて開発した材料である中国北方産そば粉は新 ELISA キットにおいても適用可能であることが確認できた。

新 ELISA キットに適用可能であることを確認した中国北方産そば粉および new 抽出

液を用いて調製したそばタンパク質溶液を用いて、外部精度管理調査の実施を想定したスケール (約 2 kg スケール) での試料作製を試みた。添加用基材にはこしあんを用い、そばタンパク質溶液を加えて混合し、試料を作製した。均一性試験および安定性試験は小麦と同様に行った。均一性試験の結果、こしあん試料の F 値は有意水準 5% 点 (3.020) 未満であり、均一性が認められた (表 8)。安定性試験の結果、冷凍保存 0 ヶ月の回収率は、N キットでは 152.6% と高かったが、M キットでは 136.0%、P キットでは 96.7% と良好であった。また、N キットと P キットの回収率の差は約 60% であり、キット間差はそばタンパク質溶液のキット間差に比べて大きかった。これは、食品マトリックスによる影響若しくは N キットのロット間差による可能性が考えられた。さらに、冷凍保存 1 ヶ月および冷凍保存 2 ヶ月の安定性は、すべてのキットで 90~110% の範囲内にあったことから、こしあん試料は少なくとも 2 ヶ月間は安定であることが確認できた。以上のことから、そばタンパク質添加試料 (こしあん試料) についても外部精度管理調査実施に向けて、均一かつ安定した試料を大量に作製することができたものと考えられた。

つぎに、平成 25 年度の検討において、そば試料 (ビスケット試料、こしあん試料、カスタードクリーム試料およびチョコレートクリーム試料) を日本ハム社製の旧 ELISA キットで測定すると、保存期間が長くなるにつれて検量線作成用のそば標準品の吸光度が低下し、そば試料の定量値が見かけ上増加するという問題があった。そこで、新 ELISA キットにおいても同様の傾向がみら

れるかを確認するために、新旧 ELISA キットの検量線作成用のそば標準品 2 濃度（25 および 50ng/mL）の吸光度およびこしあん試料の吸光度の経時変化を比較した。なお、旧 ELISA キットのデータは、平成 25 年度に報告済みのこしあん試料の冷凍保存 0、1、2 ヶ月の測定データ、新 ELISA キットのデータは C. D. 2. 2. の冷凍保存 0、1、2 ヶ月の測定データを使用した。

その結果、旧 ELISA キットではそば標準品の吸光度は保存 1 ヶ月で著しく減少していたが、こしあん試料の吸光度は保存期間の経過に伴って緩やかに減少しており、そば標準品の吸光度とこしあん試料の吸光度に乖離がみられた。一方で、新 ELISA キットでは、そば標準品の吸光度とこしあん試料の吸光度に乖離はみられず、いずれも保存期間の経過に伴って緩やかに減少していた。このことから、日本ハム社製新 ELISA キットでは、旧 ELISA キットでみられたようなそば標準品の吸光度の低下はみられず、そば試料を安定して測定できることが確認できた。

4.4 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：

平成 26 年度の外部精度管理調査参加機関は 24 機関であり、MON71800 コムギの検出に関しては全機関が陽性試料および陰性試料を正しく判定し、正答率はすべて 100%であった。定性試験では検出下限付近のコピー数を含む試料の測定結果において、検出の有無は確率の問題となるため、外部精度管理調査試料の濃度を検出下限付近に設定すると陰性だった場合、結果の解釈が難しくなると考えられた。このため、平成 26

年度の外部精度管理調査試料は検出下限付近の濃度設定を避け、低濃度試料でも検出下限の 4 倍の濃度とした。このため、陽性試料に関しては難易度が低くなり、結果として正答率は全試料とも 100%となった。従って、判定結果のみから参加機関の検出感度を確認することは困難であった。DNA 溶液試料および陽性コントロールの Ct 値の変動係数は両試験でいずれも約 2%であり、非常に精度よく検査が実施されているものと考えられた。また、コムギ粉砕物試料では DNA 収量の変動係数は両試料で約 60%と高く、各機関ではばらついていて、Ct 値の変動係数は両試料で約 4%と小さくなった。このことから、DNA 抽出液の濃度測定およびリアルタイム PCR に供する DNA 溶液の濃度調整は各機関で適切に実施されたと考えられた。しかし、コムギ粉砕物試料の Ct 値の変動係数は DNA 溶液試料の約 2 倍であることから、コムギ粉砕物試料の Ct 値には DNA 抽出液の濃度測定およびリアルタイム PCR に供する DNA 溶液の濃度調整の操作による機関間差が含まれていると考えられた。

参加機関から収集した Ct 値を用いて、定量試験の外部精度管理で用いる統計手法を適用し、定性試験による外部精度管理結果をより詳細に解析できないか検討した。

なお、DNA 溶液試料は DNA 抽出および濃度調整等の操作が含まれないため PCR 反応液中の鋳型量の機関間差は少なく、Ct 値はほぼ一定になると予想される。このため、試料 B、試料 C および試料 D については Ct 値をそのまま解析した。正規確率プロットを確認したところ、すべての試料でひずみ、とがりが共に小さく、正規分布に近い形状

であった。また、 z -スコア管理図を確認したところ、 z -スコアの絶対値が 2 以上となった機関は試料 B では機関番号 17、試料 C および試料 D では機関番号 18 であった。これら機関について測定手法等の確認を行ったところ、機関番号 17 ではすべての試料で MON71800 検知試験の Ct 値が高い傾向にあり、PCR 反応がプラトーに達した時の蛍光強度が他機関に比べて低いことから、MON71800 検知試験用の PCR 反応液の調製が Ct 値に影響した可能性が考えられた。また、機関番号 18 はリアルタイム PCR の解析時にベースラインおよび Th. line を設定せずに求めた Ct 値を報告していた。そこで、通知法に従いベースラインを 3 サイクルから 15 サイクル、Th. line を 0.2 に設定して Ct 値を求めたところ、設定後の Ct 値は設定前の Ct 値に比べてコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の両試験で 1 以上小さくなった（データは示さず）。このことから、機関番号 18 ではリアルタイム PCR の解析時の設定ミスが Ct 値に影響したと考えられた。以上のことから、DNA 溶液試料では Ct 値を用いた解析を行うことで参加機関の測定精度より詳しく推定できる可能性が示唆された。

コムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値を用いた解析については、まず、試料 1 についてコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施した。その結果、コムギ陽性対照試験では平均値から大きく離れたデータが認められたことから、2 シグマ処理を実施したところ、1 機関（機関番号 22）が除外された。MON71800 検知試験では、平均値から大きく離れたデータは認め

られなかったため、2 シグマ処理は実施しなかった。

2 シグマ処理後のコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の正規確率プロットを確認したところ、両試験でひずみ、とがりが共に小さく、正規分布に近い形状を示した。また、 z -スコア管理図を確認したところ、2 シグマ処理後のコムギ陽性対照試験では機関番号 18 で z -スコアが -2 以下、MON71800 検知試験では機関番号 22 で z -スコアが 2 以上であった。機関番号 18 の DNA 抽出液の測定値について確認したところ、260 nm および 230 nm の吸光度比を負の値で報告しており、DNA 収量も他機関に比べて低かったことから、DNA 濃度を正確に測定できていなかった可能性が考えられた。よって、試験番号 18 はリアルタイム PCR に用いた DNA 溶液の濃度が濃かったために、Ct 値が小さくなった可能性が考えられた。一方、MON71800 検知試験の z -スコアが 2 以上であった機関番号 22 はコムギ陽性対照試験でも z -スコアが 2 以上であり、2 シグマ処理で除外された。この機関の DNA 抽出液の測定値について確認したところ、260 nm の吸光度値が 0.1 以下と低く、DNA 濃度を正確に測定できていなかった可能性が考えられた。よって機関番号 22 はリアルタイム PCR に用いた DNA 溶液の濃度が薄かったために、両試験の Ct 値が大きくなった可能性が考えられた。以上のことから、コムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施した場合、DNA の濃度差が解析結果に影響すると考えられた。

コムギ陽性対照試験および MON 71800 検知試験の Ct 値の差を用いた解析におい

ては、試料 1 についてコムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の差を求め、この差について統計解析を実施した。なお、リアルタイム PCR の解析時の設定ミスが Ct 値に影響していると考察した機関番号 18 については、報告されたそのままの Ct 値の差と通知法に従って設定後に求めた Ct 値の差を比較したところ、大きな差は認められなかったことから、報告されたそのままの Ct 値を用いて解析した（データは示さず）。その結果、正規確率プロットおよび基本統計量は、コムギ陽性対照試験の Ct 値をそのまま用いて解析した場合と比較すると、ひずみ、とがりが共に小さく、より正規分布に近い形状となった。しかし、2 シグマ処理後のコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値をそのまま用いて解析した場合と比較すると、ひずみ、とがりは若干大きかった。また、z-スコア管理図を確認したところ、機関番号 18 および機関番号 22 は Ct 値をそのまま解析した場合では z-スコアの絶対値が 2 以上であったが、Ct 値の差を用いた場合では z-スコアの絶対値がいずれも 2 未満であった。機関番号 22 は、DNA 濃度が薄いため両試験の Ct 値が他機関よりも大きかったが、Ct 値の差は他機関とほぼ同等であり、リアルタイム PCR 測定には問題がないことが示された。機関番号 18 は、DNA 濃度が他機関よりも濃いため、両試験の Ct 値が他機関よりも小さかったが、Ct 値の差は他機関とほぼ同等であり、リアルタイム PCR 測定には問題がないことが示された。このことから、コムギ粉砕物試料における Ct 値の差を用いた解析により DNA 濃度の誤差を補正できたと考えられた。さらに、z-スコア管理図におい

て z-スコアが 2 以上であった機関は機関番号 3、機関番号 21 であった。これら機関は試料 1 の MON71800 検知試験でのみ Ct 値がやや高かったが、Ct 値をそのまま解析した場合には両試験で z-スコアが 2 未満であり、報告された検査法や生データにも特に問題は認められなかった。陽性プラスミドを添加した試料では、DNA 抽出操作が異なると DNA 溶液に含まれる陽性プラスミドの割合も異なる可能性があることから、機関番号 3 および機関番号 21 は DNA 抽出の際、他機関とは異なる操作により陽性プラスミドの回収量が低くなることで、MON71800 の Ct 値が高くなり、Ct 値の差が他の機関に比べて大きくなった可能性が考えられた。以上のことから、コムギ粉砕物試料はコメ粉砕物試料と同様に、Ct 値の差を用いた解析により DNA 濃度の誤差を補正することができたと考えられた。一方で、DNA 抽出操作が異なると DNA 溶液に含まれる陽性プラスミドの割合も異なる可能性があることから、Ct 値をそのまま用いた解析と Ct 値の差を用いた解析の両者から検査精度を評価する必要があると思われる。なお、抽出キットあるいは抽出操作の違いが陽性プラスミドの抽出量にどの程度影響するかについては不明であり、今後の課題としたい。

陽性プラスミドの調製濃度が同じである低濃度陽性コントロールと試料 B について、参加機関の MON71800 検知試験における Ct 値の相関を検討した。その結果、両者の相関係数は 0.852 と、強い正の相関があった。このことから、リアルタイム PCR の Ct 値は測定機関固有の誤差（PCR 装置、試薬の種類、試薬のロット、ピペットなど）による影響が大きいと考えられた。さらに、低濃

度陽性コントロールにおける、コムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の相関についても検討した。その結果、両者の相関係数は 0.564 であり、MON71800 検知試験における試料 B との相関係数よりも低かった。同じ試料同士よりも同じ PCR 反応液同士で相関係数が高いことから、上述した測定機固有の誤差の中でも特に PCR 反応液の誤差が Ct 値に影響していると考えられた。

4.5 カビ毒検査のための適正調査試料の作製検討：

直接競合 ELISA における各 AF の反応性については、AF による 20% 阻害濃度 (IC_{20} 値) を測定下限、80% 阻害濃度 (IC_{80} 値) を測定上限とした場合、 AFB_1 は測定範囲：50-200 pg/mL、 AFB_2 は測定範囲：50-230 pg/mL、 AFG_1 は測定範囲：60-370 pg/mL、 AFG_2 は測定範囲：60-600 pg/mL となった。この結果から、MoAb2-3 を用いて構築した直接競合 ELISA は、基準値を測定するうえで十分に高感度であり、最大 2 倍程度反応性が異なるものの、4 種類の AF を測定できることが判った。また、直接競合 ELISA の安定性を確認するために、ELISA の製造日間の違いを調べた。その結果、3 回の製造ロット間差が小さく、安定して製造できたことが判った。

国産ピーナッツ由来のピーナッツバターに AFB_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 を各 2 ng/g と 10 ng/g 添加し、回収試験を試みた。検量線には、添加した AF を置いた場合と、すべてに G_2 を置いた場合を検討した。添加した AF を検量線にすることで 95%-119% と良好な回収率を得ることができた。一方、 G_2 を検量線に置いた場合は、114%-258% と、最大で 2.6 倍

高い回収率となった。構築した直接競合 ELISA は、ピーナッツバター中に汚染している AF を測定することができた。また、検量線に添加した AF と同じものを使用することで、高い定量性を得ることができた。しかし、各 AF の含量が実試料では不明なので、このような検量線を置くことはできない。そこで、最も感度の低かった G_2 を用いて添加回収試験を試みた。回収率は、最大 2.6 倍高くなるものの、偽陽性を生じにくい測定条件を確立できたと考えられた。

輸入ピーナッツバター中の AF 汚染頻度、濃度、各 AF の存在比率を知るために LC-MS/MS で測定を試みた。その結果、AF 濃度が定量下限 (0.2 ng/g) 以下だったものは 23 検体中わずかに 5 検体だった。AF が汚染した全ての検体で、メジャーな AF は B_1 であり、その汚染濃度は 0.3-4.3 ng/g の範囲で分布していた。さらに、 G_1 と G_2 の検出例はなく、 B_2 のみ 4 検体で 0.4-0.7 ng/g と微量検出した。このように、ピーナッツバターの場合は、 B_1 が汚染源といえる。そこで、直接競合 ELISA においても、 B_1 と G_2 を検量線に AF 濃度を測定し、LC-MS/MS と比較した。その結果、 B_1 を検量線にした場合は、 $y=1.26x+0.59$ 、 $R^2=0.98$ 、 $n=11$ とやや ELISA にバイアスがかかるが良好な相関性を得た。一方、 G_2 を検量線にした場合は、 $y=1.87x+0.66$ 、 $R^2=0.95$ 、 $n=11$ と ELISA 側が約 2 倍、値が高くなることが判った。輸入ピーナッツ汚染を ELISA で測定する場合は、 AFB_1 を検量線にすれば多くのサンプルで定量性の高い結果を得られると考えられた。

E. 結論

1 尾花研究分担

本研究結果より、GC-MS (MS) 測定における農薬由来のマトリックス効果に関する基礎的なデータを得た。単純な溶媒標準溶液を用いた実験において、メーカーや注入方式が異なる複数の機種で、共存農薬数の増加に伴う評価対象農薬（マラチオン、プロシミドン、フルシトリネート）および IS (TPP, PHN-d10) のピーク面積の増大が確認され、この現象が一般性のあるものであることが明らかとなった。さらに、えだまめ模擬試験液を用いた実験により、当該現象は食品マトリックス存在下においても顕在化し得ること、試験液中の農薬数と乖離した多数の農薬を含む混合標準溶液を使用する場合、特に絶対検量線法において定量値の過小評価が起り得ることが明らかとなった。なお、過小評価の傾向は、食品マトリックス量が低減する希釈測定時により顕著になり、その対策として IS による補正や補助的な食品マトリックスの添加が有効であった。一方、PEG を添加した場合、複数の機関でフルシトリネートの定量性の悪化（検量線の直線性の異常や定量値のばらつきの増大）が観測され、IS による補正によっても改善されなかった。前年度の検討において PEG との共注入により一部のピレスロイド系農薬（フルシトリネート等）が分解することが示唆されており、このことが一因と推測された。

試験液の希釈測定時に農薬濃度を正確に定量するためには、試験液の希釈は最小限に留め、可能な限り農薬数が少ない標準溶液（試験液中の農薬数・濃度に近い標準溶液）をマトリックスマッチングして使用することが望ましいと考えられた。多数の農薬を含む混合溶液を使用する場合、IS によ

る補正や有効な補助マトリックスの添加等、農薬由来のマトリックス効果の影響を減ずる措置が必要であろう。

2 齊藤研究分担

食品中 AFs の分析に関して、従来の公定検査法では操作が煩雑であること、実験者への AFs の曝露が危惧されること、食品の種類によって夾雑物の種類や量が異なることから、前処理法を使い分けなければならないといった問題点があった。そこでこれらの問題点を克服するために、食品中 AFs の前処理法としてイムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法および固相蛍光誘導体化法を構築し、精度管理試験を実施した。現在検査を実施中であり、本報告書において結果を述べることはできなかったが、来年度の報告書においてその結果を明らかにする予定である。

また、乳中の AFM₁ 分析については、規制値が平成 28 年 1 月 23 日から適用されることから、先を見通した対策として、特に乳製品であるチーズを対象とした新たに実用的な試験法を検討した。

その結果、これまでに構築した香辛料中の AFs 分析法を基にして、SPDE 法と固相蛍光誘導体化法を併用した分析法を構築した。これにより、クリーンアップ中に蛍光誘導体化を行うことができ、誘導体化の前に必要だった窒素乾固が不要となり、操作の簡便化と操作時間の短縮に繋がった。また、従来法に比べて実験環境の閉鎖性が高くなり、実験者への AFM₁ 曝露が低減され、実用性の高い AFM₁ の分析法を構築することができた。本法のチーズへの適用性を評価するため、高濃度 (1 ng/mL) と低濃度 (0.1 ng/mL)

において添加回収試験を行った。その結果、高濃度では約 93%、低濃度では約 91%の良好な回収率が得られた。更に、併行精度および室内精度はどちらの濃度でも 5~7%と高い再現性が得られた。以上の結果から、本法は従来法の様々な問題点を克服し、チーズ中の AFM₁ の残留分析に有用であることが示唆された。

本研究を実施することにより、現行の公定法に代わる微量分析が可能な信頼性の高い分析方法を示すことが可能となり、食品衛生に大いに寄与することが期待される。

3 鎗田研究分担

マトリックスマッチング法を適用した IDMS によって、平成 27 年度外部精度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料を分析した結果、同法によって真度が高くかつ不確かさが小さい分析値を得られることを確認した。これより、本法は外部精度管理調査試料中の分析対象農薬の高信頼性分析に有効な定量法であると考えられた。一方、IDMS 法を適用することにより、日本の検査機関においても広く適用されている QuEChERS 法の抽出能力を精密に評価した。その結果、検討した農薬について一斉試験法の同等の抽出能力が認められたことから、同法の正確さが確認できた。

4 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：

新たに、固体試料である穀類の粉末試料を基材として、残留農薬検査のための試料作製を玄米及び精米のそれぞれ新米ならびに古米を用いて検討したところ、基材に

は玄米を使用し、保存は冷凍条件下で行うことで、適用できることが示唆された。また、枝豆ペーストを基材として試料作製を試みた結果、枝豆自体が本来含有する水分を 10%添加し均質な基材とした後、農薬を添加混合することで、良好な均一性が得られ冷凍保存により必要な安定性期間を確保することが可能であることが示唆された。

4.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製検討：

腸炎ビブリオ用調査試料の検討では、チルドゆうパックでの輸送が可能であることを示すことができた。また、セレウス菌用調査試料の検討では、接種菌の安定性を確認できたことより、接種菌の生菌数の精度を向上できる可能性を示した。微生物担体による安定化技術の検討では、定性試験において、担体が潰れない状態で操作を進めた場合にも、結果に影響がないことが示された。以上のことより、腸炎ビブリオ、セレウス菌の調査用試料は実際の運用可能なレベルに達したと考えられた。また、微生物担体による安定化技術の検討においては、基礎的なデータを収集できた。

4.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製検討：

通知法改正後の新 ELISA キットに適用可能な外部精度管理調査試料の作製を目的として、小麦およびそばタンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性を確認した結果、小麦タンパク質溶液の反応性は良好であり、そばタンパク質溶液の反応性は通知法改正後の抽出液において良好であった。

新 ELISA キットにおいて良好な反応性が確認された小麦およびそばタンパク質溶液を用いて、外部精度管理調査の実施を想定したスケール（約 2 kgスケール）で試料を作製し、均一性および安定性について確認した結果、小麦添加試料（ベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料）およびそば添加試料（こしあん試料）のいずれにおいても、均一性および冷凍保存 2 ヶ月までの安定性が確認できた。また、そば試料について日本ハム社製の新旧 ELISA キットの検量線作成用のそば標準品の吸光度およびこしあん試料の吸光度の経時変化を比較したところ、新 ELISA キットでは、旧 ELISA キットでみられたようなそば標準品の吸光度の低下はみられず、そば試料を安定して測定できることが確認できた。

以上のことから、特定原材料である小麦およびそばの外部精度管理調査実施に向けた、新 ELISA キットに適用可能な均一かつ安定した試料を大量に作製することができた。

4.4 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正試料の作製検討：

外部精度管理調査の際、リアルタイム PCR 測定で得られる参加機関の Ct 値について正規確率プロットおよび z-スコア管理図を作成し、グラフの形状を検討した。その結果、DNA 溶液試料については MON71800 検知試験の Ct 値の正規確率プロットはひずみ、とがりが共に小さく、正規分布に近い分布を示していた。このとき、z-スコアが 2 以上となった機関について Ct 値がはずれた原因が推定でき、Ct 値の解析により、外部精度管理参加機関における測定精度をより

詳しく推定できる可能性が示された。

コムギ粉砕物試料については、コムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関はいずれも DNA の濃度測定に問題が認められたことから、DNA の濃度の誤差が解析結果に影響すると考えられた。また、コムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の差を用いて解析したところ、Ct 値をそのまま用いた場合に z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関はいずれも z-スコアの絶対値が 2 未満となったことから、Ct 値の差を用いた解析により DNA 濃度の誤差を補正できたと考えられた。一方で、DNA 抽出操作が異なると DNA 溶液に含まれる陽性プラスミドの割合も異なる可能性があることから、Ct 値をそのまま用いた解析と Ct 値の差を用いた解析の両者から検査精度を評価する必要があると思われる。さらに、参加機関の Ct 値の相関について検討した結果、同じ試料同士よりも同じ PCR 反応液同士で相関係数が高いことから、リアルタイム PCR の Ct 値は測定機関固有の誤差の中でも特に PCR 反応液の誤差が影響していると考えられた。

4.5 カビ毒検査のための適正試料の作製検討：

直接競合 ELISA による迅速・簡便・高感度な AF 測定法の開発を目指した。その結果、基準値（10 ng/g）とその 1/5 濃度である 2 ng/g の AF が汚染したピーナッツバターを測定可能な、実用的な直接競合 ELISA を構築できた。最も高感度な B₁ と低感度な G₂ では、その感度に 2 倍程度の違いがあるが、

定量精度を倍半分と見積もれば、十分に総AFを測定可能であることがわかった。また、供試したピーナッツバターには、何れも B_1 がメジャーに含まれていた。即ち、 B_1 を検量線に用いることで定量精度の高い測定方法となることが判った。直接競合 ELISA をスクリーニング方法と位置づけることにより、 B_1 検量線を用いて万が一 G_2 がメジャーであったとしても、1/2 濃度の値が得られることになる。 B_1 検量線を基にして 5 ng/g 以上の AF が存在していた場合は、LC-MS/MS で確認することで、 G_2 の含量を確認することができる。構築した直接競合 ELISA は、定量性の高いスクリーニング方法として有効と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

1) 山崎朋美、佐藤夏岐、平山由紀、岩佐精二、渡辺卓穂、三宅司郎：カビ毒アフラトキシンに対する ELISA の構築とその反応性：第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会，京都，2015.

H. 知的所有権の取得状況

なし