

総合研究報告書

検査機関の信頼性確保に関する研究

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、平成26年度から平成28年度までの3年間に実施した以下の4研究課題、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（尾花、梶村研究分担）、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）、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）、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）について報告した。

研究分担者名 = 尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部長）、梶村計志（大阪府立公衆衛生研究所食品化学課長）、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グループリーダー）、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。

アレルギー関連物質検査については 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。

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 残留分析の測定に与える食品成分の影響に関する研究（尾花、梶村研究分担）

大阪府立公衆衛生研究所は、試料等の送付、分析結果の解析、協力機関との連絡調整、報告書の作成および研究遂行に係る事務を行った。また共同研究に先立ち、協力機関とほぼ同条件で事前検討を実施した。研究に参加した協力機関は、近畿地区に立地する 6 ヶ所の地方衛生研究所（京都市衛生環境研究所、神戸市環境保健研究所、大阪市立環境科学研究所、奈良県保健研究セ

ンター、堺市衛生研究所および和歌山県環境衛生研究センター)である。

平成 26 年度は、GC-MS(/MS)による残留農薬分析におけるマトリックス効果の制御方法について検討を行った。同種の食品由来の抽出物が添加されたマトリックスマッチング検量線に代わる汎用性の高いマトリックスの探索を行うことを目的とした。大阪府立公衆衛生研究所および各協力機関が使用する分析機器の内訳は、

タンデム四重極型 GC-MS/MS : 5 機関、

イオントラップ型 GC-MS : 1 機関、

四重極型 GC-MS : 1 機関であった。

試験液の注入量は、1~25 µL の範囲であり、最終試験液中のマトリックス濃度は、試料換算で 0.5~10 g/mL 相当であった。測定は、タンデム四重極型 GC-MS/MS を使用する 5 機関が 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 モードで行った。実験は、食品試料(ほうれん草およびえだまめマイクロペースト)から抽出した溶液に既知濃度の農薬を添加した試験液を分析し、種々の検量線を用いて定量的な解析を行った。また、GC-MS(/MS)のイオン化は、電子イオン化法(EI)を用いた。評価の対象とする農薬は、和光純薬工業製の農薬混合標準溶液、3 種類(PL-1-2、PL-2-1 および PL-3-3)に含まれる 89 農薬とした。試験液の調製は、各協力機関の標準作業書に準じた方法を用いた。汎用マトリックスの候補として野菜果実ジュース抽出物

((Vegetable-fruit juice matrix、以下 VFJm と略) およびポリエチレングリコール 300 (PEG) を選択し、下記に示す 5 種類の検量線(A~E)により定量的な解析を行い、

補正効果を比較した。

検量線 A : 試料マトリックスマッチング

検量線 B : 溶媒標準

検量線 C : VFJm 添加

検量線 D : PEG 添加

検量線 E : VFJm+PEG 添加

各標準溶液および試験液には、内部標準(トリフェニルリン酸:TPP)を一定濃度(試料 1 g に対して 50 ng)添加した。また、検量線 D および E については、定量に用いる試験液にも PEG を添加する共注入法を採用した。試験の実施方法は、以下の通りである。大阪府立公衆衛生研究所および各協力機関は、GC-MS(/MS)のカラムおよびインサートを新品に交換し一定時間、安定化を図った後、分析を開始した。初めに、最も補正効果が高いと考えられる検量線 A (マトリックスマッチング)を用いて定量を行い、絶対検量線法による解析結果について、各協力機関の測定可能な農薬数の 9 割以上が回収率 90~110%の範囲であることを確認した。これらの検討により、GC-MS(/MS)の稼働状況を含め、測定系が正常に機能していることを確認した。90~110%の回収率に入る農薬数が 9 割に満たない場合、再度、装置の安定化、農薬混合標準溶液の調製を行い、9 割以上が良好な結果を示すことを確認した。その後、検量線 B、C、D および E による定量を順次行った。マトリックス補正効果の判定基準は、回収率が $100 \pm 10\%$ の範囲を補正可能な目安として「良好な結果」と判定した。各協力機関は、あらかじめ送付されたエクセルファイルに、試料毎に検量線に用いた標準溶液、試験液(ブランクおよび添加)の面積値を入力し、大阪府立公衆衛生研究所に提出した。提出され

たデータから絶対検量線法および内部検量線法のそれぞれについて、検量線の傾き、切片、 r^2 を導き、各農薬の回収率を算出した。その後、算出した回収率から度数分布表を作成し、各検量線のマトリックス補正効果を比較した。

平成 27 年度は、GC-MS(/MS)分析における農薬由来のマトリックス様効果とその制御方法について検討を行い、残留農薬検査における効率的な精度管理体制を構築することを目的とした。大阪府立公衆衛生研究所および各協力機関が使用する機器（機種）、測定条件等は、前年度と同様であった。模擬試験液および抽出精製液（Green soybean matrix、以下 GSBm と略）を調製するための試料として市販のえだまめマイクロペーストを使用した。VFJm の作製には市販品を用いた。

大阪府立公衆衛生研究所の事前検討で評価対象とした 6 種類の農薬（オメトエート、テルブホス、マラチオン、プロシミドン、ペルメトリン、フルシトリネート）は和光純薬工業製の農薬標準品を使用した。評価対象となる農薬は、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、和光純薬製の混合標準溶液（PL2~6）の何れにも含まれていない 6 種類を選択した。模擬試験液を用いた検討では、初期条件の配合農薬数を最小に抑えるため、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。6 機関の共同研究で評価対象農薬としたマラチオン、プロシミドン、フルシトリネートは、和光純薬工業製の混合溶液（オーダー品、各 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を使用した。大阪府立公衆衛生研究所の事前検討では、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様効果を評価したが、協力機関による類似の実験では、PEG 共注入時の分解挙動に着目し、フルシトリネートを評価対象とした。また、事前検討では内標準物質として、ナフタレン-d8（NPH-d8）、フェナントレン-d10（PHN-d10）、フルオランテン-d10（FLA-d10）および TPP を用いたが、共同研究では解析作業を簡便化するために PHN-d10 と TPP を用いた。同様の理由から、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。

共同研究に先立ち、大阪府で事前検討を行った。初めに、溶媒標準溶液における農薬由来のマトリックス様効果を確認した。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それぞれ調製し、GC-MS/MS で測定を行い、ピーク面積値を比較した。次に当該現象が残留農薬検査に及ぼす影響の検証を以下の通り行った。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、大阪府の標準作業書に準じて抽出精製液を調製した。その後、3 種類の評価対象農薬を抽出精製液に添加し、模擬試験液を作製した。模擬試験液の希釈率、補助マトリックス添加の有無、測定溶液の農薬数が異なる条件で、それぞれ対応する検量線を作成し、模擬試験液を定量した。そして、理論値との一致度（定量率）および検量線の傾きを指標として補正効果を評価した。補助マトリックスは、試料と同じえだまめマイクロペーストから調製した GSBm の他、VFJm および PEG を用いた。調製方法等は以下の通りである。模擬試験液には、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 農薬を添加した。後述する A~E、5 通りのマトリックス組成について、農薬数 3 または 169 種類の農薬を添加した標準溶液で検量線を作成し定量した。マトリックスマッチング法をベースとして、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。下記に示すマトリックス組成 A は試験液を最小限希釈して測定する実験系に対応し、B~E は試験液を高倍率希釈して測定する場合にそれぞれ対応している。

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)

共同研究は、6 機関の協力を得て行われた。大阪府立公衆衛生研究所の事前検討と同様、溶媒標準溶液および模擬試験液を用いた調査を行い、農薬由来のマトリックス効果の顕在化について検証を試みた。試料は事前検討と同じえだまめのマイクロペーストを用いた。抽出精製液の調製方法は各協力機関の標準作業書に基づく試験法に準じた。共同研究の試験結果は、以下の手順で評価した。各協力機関は、あらかじめ送付した Excel ファイルに、実験毎に測定した評価対象農薬および内部標準物質のピーク面積値を入力し、ファイルを大阪府に提出した。提出されたデータから、農薬の溶媒標準溶液を用いた実験では、単品溶液と混合溶液における農薬および内部標準物質の

ピーク面積を比較した。マトリックス組成の分類 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、検量線の傾き等を求め、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顕在化とその補正方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 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内部標準による補正効果の判定基準は、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。

平成 28 年度は、動物用医薬品 (合成抗菌剤) を対象として、LC-MS/MS によるマトリックス効果を検証した。大阪府立公衆衛生研究所により行われた事前検討では、種々の食品を用い、マトリックス検量線の汎用性等について調査した。事前検討の内容は以下の通りである。1 つ目の検討では、成分組成が異なる検体を同一バッチ内で処理する場合を想定し、異なる食品で作成したマトリックス検量線の汎用性について調査した。異なる魚種、ブリ、サケ、カレイ、エビについて、30 種類の合成抗菌剤を対象としてそれぞれマトリックス検量線を作成し、傾きを比較した。2 つ目の事前検討では、成分組成が異なる同一食品群の検体を用い、同じくマトリックス検量線の汎用性について調査した。調査方法は、無脂肪乳 (乳脂肪分 : 0.1%) と特濃加工乳 (乳脂肪分 : 4.2%) を試料とし、マトリックス検量線を作成し、傾きを溶媒検量線と比較した。3 つ目の検討では、保存状態が異なる同一の食品を用い、マトリックス検量線の汎用性について調査した。牛乳および鶏卵を材

料とし、タンパク質の変性が考慮される凍結および新鮮な状態の検体について、マトリックス検量線を作成し、傾きを溶媒検量線と比較した。さらに、協力機関との共同研究では、主に2つの検討が行われた。1つ目の検討では、大阪府立公衆衛生研究所により調製された同一の試験液を、各機関が保有している分析機器で測定し、発現するマトリックス効果の違いを比較した。2つ目の検討では、同一の検体を各協力機関の標準作業書に基づく方法により精製・測定し、発現するマトリックス効果の違いを比較した。対象とする合成抗菌剤は、各機関がルーチン検査を行っている共通のサルファ剤9種類とした。また、対象とする食品は、均一な試料が入手しやすい牛乳および鶏卵とした。試験実施後、各機関により得られた結果を解析し、LC-MS/MSによるマトリックス効果について、影響を及ぼす因子を推測すると共に、その制御に有効な基礎的な情報の共有化を図った。

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（斉藤研究分担）

総アフラトキシン（AF）分析における抽出操作について、試料には、東京都内で市販されているとうもろこし（アメリカ産およびフランス産）、落花生（中国産および日本産）、白コショウ（インドネシア産、スリランカ産およびマレーシア産）および黒コショウ（インド産、スリランカ産およびマレーシア産）を用いた。ハンドミキサーにより粉碎均一化した試料3gを50mL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0.3gと精製水/メタノール

（1：4）混液10mLを加え、30分間振とう抽出した。抽出液を桐山ロートで吸引ろ過し、ろ液5mLを量り採り、7%TritonX水溶液を加えて正確に10mLとした。十分混合した後、遠心分離（5000×g、5分間）し、上清8mLを試料抽出液とした。

AF-M₁分析における抽出操作について、細切した試料（チーズ）10gを50mL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）40mLを加えてホモジナイズし、精製水で50mL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5mLをPBS15mLで希釈したもの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は、固相抽出用ゲル（以下、固相と略）を調製するため、予め、カートリッジからイムノアフィニティゲルを全量取り出し、PBS1mLに懸濁させた。この懸濁液を「(1)および(2)の抽出操作」で作製した試料抽出液（8mL）が入った15mL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（チーズの場合には10mL×2回、同じ操作を繰り返した）。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PBS10mL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10mLを加え、同様の手順で固相を再度洗浄後、液相を1mL程度残して除去した。

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(AF-M₁分析では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(AF-M₁分析では40で20分間)で放置した。その後、遠心分離(2500×g、20秒間)し、溶出液として精製水900 μL(AF-M₁分析では400 μL×2)で固相を分散させ同様に遠心分離後、先の溶出液と合わせ、全量を1mLとした。

AFs および AF-M₁ 測定(HPLC-FL)は、Afs 分析に際し、HPLC には日立社製 L-6300 Intelligent Pump を、検出器には島津製作所製 RF-10A_{XL} を用い、励起波長は 365nm、蛍光波長は 450nm 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。

AFM₁測定(HPLC-FL)は、上記AFsとほぼ同様であるが、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、試料注入量は 100 μL とした。

外部精度管理試験は、香辛料としては、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を添加して、高濃度試料A(20 ng/g)と低濃度試料B(2 ng/g)の2種類を調製した。

チーズについては、市販の固形チーズに予め試料と同重量の抽出液を添加して、軽くホモジナイズして“泥状(スラリー状)”としたものに精度管理試験用の標準試料を添加して、高濃度試料(1 ng/g)と低濃度

試料(0.1 ng/g)の2種類を調製した。

本試験に参加協力してもらう検査機関(8機関)に当該試料と実験に必要な試薬類を配布し、また操作プロトコールを指定して分析を依頼した。室間精度管理のデータ解析には一元配置分散分析を行って相対標準偏差を算出し、更にHorRat(Horwitz ratio)値も合わせて算出した。

3 外部精度管理調査試料の高信頼性分析に関する研究(鎗田分担研究)

同位体希釈質量分析法(IDMS)におけるマトリックス効果の検証について、分析試料由来マトリックスを含む検量線溶液と含まない検量線溶液を用い、標識体に対する分析対象農薬の含有量比と面積比との関係を表した検量線を作成し、その傾き等からマトリックス効果の影響を評価した。その際、平成25年度外部精度管理調査試料(残留農薬検査)の基材であったともろこしペーストを、平成17年1月24日付け食安発第0124001号の通知試験法(一斉試験法)に準拠して処理した前処理液をマトリックスとして用いた。9種類の分析対象農薬およびその標識体を、各々の濃度が62.5 mg/kgとなるようにアセトンに希釈した。また、各標識体を6.25 mg/kgとなるようにアセトンに希釈した。両溶液をアセトンに混合し、6種類の検量線溶液(マトリックス無、以下MF検量線溶液)を調製した。検量線溶液中の分析対象農薬の濃度は0.25~6.25 mg/kg、各標識体の濃度は1.25 mg/kgとした。また、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もろこしペーストを、一斉試験法に準拠して処理した。得られた

ブランク溶液を窒素気流で乾固し、MF 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ングした検量線溶液(以下 MM 検量線溶液)を調製した。

外部精度管理調査試料の分析については、前述の一斉試験法と、同通知における個別試験法をベースとした IDMS によって、平成 26 年度に実施した残留農薬検査の調査試料であるかぼちゃ試料と、平成 27 年度に実施した残留農薬検査の調査試料であるほうれんそう試料を分析し、その結果を参照値等と比較した。

標準液の調製手順を以下に示す。かぼちゃ試料の分析においては、EPN- d_6 とクロルピリホス- d_{10} を含む内標準溶液を調製した。また、EPN とクロルピリホスを含むアセトン溶液(農薬混合溶液)を調製し、これと内標準溶液、アセトンを混合し検量線溶液とした。なお、検量線溶液中の各成分濃度は、試料を前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。一方、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かぼちゃペーストを分析試料と同様に前処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の混合溶液に溶解させることにより、マトリックスマッチングした検量線溶液を調製した。

ほうれんそう試料の分析においては、マラチオン- d_6 とクロルピリホス- d_{10} を含む内標準溶液を調製した。また、マラチオンとクロルピリホスを含むアセトン溶液(農薬混合溶液)を調製し、これと内標準溶液、アセトンを混合し検量線溶液とした。なお、検量線溶液中の各成分濃度は、試料を前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。一方、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分析試料と同様に前処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の混合溶液に溶解させることにより、マトリックスマッチングした検量線溶液を調製した。

IDMS による定量値は次式から求めた。

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

ここで、 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 : 検量線溶液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 : 検量線溶液の調製ばらつきに関わる係数(= 1)、 M_c : 検量線溶液中の農薬混合液の質量、 C : 農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 P : 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の質量、 M_s : 試料量、 $M_{sp(c)}$: 検量線溶液中の内標準溶液の質量、である。また定量値の不確かさは、式の各項の不確かさを評価し、これらを合成して求めた。

簡易分析法の正確さの検討については、国内の試験機関が簡易分析法として導入している QuEChERS 法と STQ 法について、IDMS を適用することにより特に抽出過程の正確さを評価した。

抽出過程の正確さを精密に評価するためには、実際に農薬が残留した試料が必要である。そこで、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試料と、産業技術総合研究所が開発した大豆認証標準物質(NMIJ CRM 7509-a)とリンゴ認証標準物質(NMIJ CRM 7510-a)を用いた。また STQ 法の評価には前記玄米試料を用いた。

QuEChERS 法の操作手順としては、玄米試料 5 g、大豆試料 2 g またはリンゴ試料 1 g を採取し、それぞれ内標準溶液(対象農薬の安定同位体置換物質)を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、アセトニトリル 10 mL を加えて 1 分間振とう(手振り)した。これに 4 g の $MgSO_4$ 、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 3500 rpm 又は 4000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液に固相剤(適量のグラファイトカーボンブラック、C18、 $MgSO_4$)を添加して 1 分間振とう(手振り)した。再び 5 分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固し、再度アセトン又はメタノールに希釈したものを GC/MS または LC/MS によって分析した。

STQ 法の操作手順は、玄米試料 5 g を採取し、内標準溶液(対象農薬の安定同位体置換物質)を加えて静置した。水 10 mL を加えてさらに 15 分間静置し、アセトニトリル 10 mL を加えてホモジナイザーを用いて 2 分間細砕した。これに 4 g の $MgSO_4$ 、1 g の NaCl、1 g のクエン酸 $3Na_2$ 水和物、0.5 g のクエン酸水素 $2Na_{1.5}$ 水和物を加え 1 分間振とう(手振り)した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、次の手順によって上澄み液を精製した。すなわち、アイスティアエンス製 C18-50 mg

固相ミニカートリッジ(Smart-SPE)をアセトン 2 mL およびアセトニトリル 2 mL でそれぞれコンディショニングした後上澄み液を負荷し、さらにアセトニトリル 0.2 mL を注入した。溶出液にトルエン 0.4 mL を添加した。アイスティアエンス製 GCS-20 mg と PSA-30 mg の固相ミニカートリッジ(Smart-SPE)を連結させ、ここに 0.3 g の $MgSO_4$ を積層させたものにより、試料液をさらに精製した。得られた溶出液を窒素により乾固し、アセトンまたはメタノールに再溶解したものを GC/MS または LC/MS によって分析した。

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(渡辺分担研究)

4.1 理化学検査のための適正調査試料の作製:

平成 26 年度は、残留農薬検査に使用する調査試料として、玄米および精米を選択して 4 種の農薬を添加し、固体試料の基材として穀類粉末の利用の可能性を検討した。この他、これまでのほうれんそうやにんじんなど水分含量が高い従来の野菜ペーストに加えて枝豆ペーストについても検討を加えた。

試料基材として、市販の玄米および精米のそれぞれ新米(平成 26 年産)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。

玄米および精米の試料作製については、基材成分の農薬に対する影響の確認として、玄米および精米それぞれの古米ならび

に新米を用い、加熱処理の有無の違いについて、添加農薬の回収率および安定性を検討した。

加熱処理を行う場合は、条件を 60°C で 6 時間とし、加熱後、室温まで放冷し、以下の操作を行った。

基材である米類をそれぞれ遠心粉砕機で粉砕、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、クロルピリホスおよびマラチオン 1 µg/mL、フェニトロチオン 2 µg/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、クロルピリホスおよびマラチオン 0.1 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g)。また、同様に粉砕、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、各農薬の回収率および冷蔵保存(加熱した米類については 0、5、10、20、30 および 60 日間、非加熱の米類は 0、5、10、20 および 30 日間)における安定性を検討した(各 n=3)。

また、枝豆の試料作製については、これまで、枝豆ペーストを基材として用いることの適用性を検討した結果、農薬を均一に添加混合できる条件が、明らかとなった。枝豆ペーストに農薬を直接添加した場合は、均一性が確保できず、水あるいは油分を適量添加することで均一性が得られることから、水分および油分として大豆油を添加し、均質化した基材に農薬標準液を添加したものについて、冷凍保存による安定性(0、1、2、3、6 および 9 か月間)を評価した。

ブ里克サーを用いて均質化した枝豆ペ

ースト 2kg に、水を 5%、10% および 20%、ならびに大豆油を 2%、5% および 10% となるように各々添加後、ブ里克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、マラチオンおよ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、ブ里克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、マラチオンおよ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 5%、10% および 20%、ならびに大豆油を 2%、5% および 10% 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%、10% および 20%、および油 2%、5% および 10% ブランク試料とした。これらの、冷凍保存における安定性を検討した。

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 回繰り返す。酢酸エチル/n-ヘキサン (1:4) 層を n-ヘキサン層に合わせた。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置後、40°C 以下で酢酸エチル/n-

ヘキサンを留去した。残留物に n-ヘキサンを加えて溶解させ、正確に 10 mL とした後、GC(FPD)で測定した。

なお、玄米および精米試料の測定においては、試料採取後、水 20 mL を加え 2 時間膨潤させた後、アセトンによる抽出操作を行った。また、酢酸エチル/n-ヘキサンを留去後、以下の操作を行った。残留物をアセトニトリル飽和 n-ヘキサン 30 mL に溶解し、n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて振とうした。アセトニトリル層をとり、残った n-ヘキサン層に n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、上記の操作を 2 回繰り返し、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、各農薬の定量には絶対検量線を用いた。

平成 27 年度は、玄米及び精米の冷蔵保存における安定性(回収率)の評価を行った。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添加農薬濃度は経日的に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 µg/mL、フェニトロチオン 2 µg/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 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/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、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。

冷蔵と同様に、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)。

枝豆については、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)。

平成 28 年度は、米類の試料作製プロセスでは、粒状への添加法から粉末試料への添加法へ変更し、昨年までの作製法を改良した上で、スモールスケールから実配付量作製の方法を検証・確立することを目的とした。

また、枝豆については、昨年までに油分を添加することで均質性のある試料を作製できることが明らかとなっており、今年度は、米類と同様にスモールスケールから実配付量の作製法を検証・確立することを目的とした。

冷凍及び冷蔵保存における長期安定性

(回収率)の評価については、平成 27 年度から引き続き、基材に玄米及び精米それぞれの古米を用い、冷凍及び冷蔵保存における添加農薬の安定性(回収率)を検討し、比較評価した。

基材である米類をそれぞれ遠心粉碎機で粉碎し、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 µg/mL、フェニトロチオン 2 µg/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 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/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。併せて、アセトンを添加しない米類粉末試料をアセトン無添加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、冷凍及び冷蔵保存(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)。

浸漬用溶媒の検討については、粉体攪拌用フラスコ(2L 容)に各溶媒(ヘキサン、アセトン及び酢酸エチル)をそれぞれ 590 mL とり、これに添加用農薬混合標準液(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 5 µg/mL、フェニトロチオン 10 µg/mL、アセトン溶液)10 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で 5 分間回転混合し、予め均質な浸漬用農薬混合標準液を調製した。これに、遠心粉碎機により粉碎・粉末化した玄米(古米)500 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

静置による浸漬を行った。浸漬後、浸漬溶媒を留去し、内容物をテフロンシート上に広げ、室温下で3日間乾燥し、浸漬溶媒検討用作製試料とした(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 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g)。この時の、溶媒留去の様子及び浸漬溶媒検討用作製試料の乾燥状態等を目視で観察し、浸漬用溶媒として適用可能な溶媒について検討した。なお、溶媒留去において、減圧濃縮装置のロータリーエバポレーターに球形ガラスフィルターあるいはロータリージョイントを接続し、粉体の冷却部への吸い込みを防止した。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合無し)については、粉体攪拌用フラスコ(2L容)1個にアセトンを710 mLとり、これに添加用農薬混合標準液(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 6 µg/mL、フェニトロチオン 12 µg/mL、アセトン溶液) 10 mLを正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で5分間回転混合し、予め均質な浸漬用農薬混合標準液を調製した。これに、遠心粉碎機により粉碎・粉末化した玄米(古米)600 gを量り入れ、以下、浸漬用溶媒の検討と同様に操作し、1個のバッチ内均質性の検討用作製試料(回転・揺動混合無し)とした(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 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g)。作製した試料は、約25 gずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、無作為に選んだ10袋について行った。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合有り)については、バッチ内の均質性

の検討(回転・揺動混合無し)と同様にし得られた乾燥試料すべてをロッキングミキサーにより回転・揺動混合し、1個のバッチ内均質性の検討用作製試料(回転・揺動混合有り)とした(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 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g)。作製した試料は、約25 gずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、無作為に選んだ10袋について行った。なお、浸漬溶媒を留去後、内容物を取り出した後の粉体攪拌用フラスコ内壁面の残渣をヘキサソール 50 mLで3回洗い込み、これらを合わせて減圧濃縮し、5 mLとした溶液について各農薬濃度を測定し、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率を算出した。

バッチ間の均質性の検討は、粉体攪拌用フラスコ(2L容)10個に各々アセトンを710 mLとり、これに添加用農薬混合標準液(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン 6 µg/mL、フェニトロチオン 12 µg/mL、アセトン溶液) 10 mLを各々正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で5分間回転混合した。これに、遠心粉碎機により粉碎・粉末化した玄米(古米)600 gを各々量り入れ、同様に5分間、回転混合した後、以下、バッチ内均質性の検討用作製試料(混合)と同様に行い、10個のバッチ間均質性の検討用作製試料とした(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 µg/g、フェニトロチオン 0.2 µg/g)。なお、ロッキングミキサーによる混合は、各バッチ毎に行った。作製した試料は、約25 gずつ分取しジッパー付袋に入れ、均質性試験は、1バッチにつき無作為に選ん

だ1袋についてn=2で測定を行った。また、バッチ内均質性の検討用製試料（回転・揺動混合有り）と同様に、各粉体攪拌用フラスコ内壁面残存農薬の残存率について測定した。

つぎに、枝豆については、平成27年度までの検討結果より、冷凍保存における凍結融解3回及び融解後冷蔵保存（14日間）の安定性を確認した結果、枝豆ペーストに水10%の添加が最も有効であることが明らかとなった。そこで今年度は、水10%添加の条件により、外部精度管理調査の実配付量である作製プロセスの確立の一環として、ブリクサー5プラスを用いて複数バッチを作製し、バッチ間の均質（同等）性を検討した。

ブリクサーを用いて均質化した枝豆ペースト1.8kgに、水分添加量が10%となるように水を加え、さらにブリクサーを用いて均質化した。これに添加用農薬混合標準液（ダイアジノン2µg/mL、クロルピリホス60µg/mL、マラチオン及びフェニトロチオン100µg/mL、アセトン溶液）10mLを正確に加え、ブリクサーを用いて混合した（理論値：ダイアジノン0.01µg/g、クロルピリホス0.3µg/g、マラチオン及びフェニトロチオン0.5µg/g）。更に、同様の操作をそれぞれ別のブリクサー容器を用いて4回繰り返し行い、合計5バッチを作製した。次に、各容器内作製ペースト試料の上層部と下層部の各々を4分割し、計8分割とし冷凍した。これらのペースト試料から、1バッチにつき4分画（各々丸数字）をそれぞれ5バッチについて採取し、5バッチ間の均質（同等）性を確認した。別に、枝豆ペーストに、水分添加量が10%

となるように水を加え、添加用農薬混合標準液の代わりに同量のアセトンを添加し、同様に操作して得られた試料を、水10%ブランク試料とした。

4.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製：

試験菌株は、秦野研究所に保存してある以下の菌株を用いた。腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討では、

Vibrio parahaemolyticus HIC 140279

Vibrio fluvialis HIC 140282

セレウス菌検査用調査試料の検討では、

Bacillus cereus HIC 140280

Bacillus subtilis HIC 140244

微生物担体の検討では

Staphylococcus aureus HIC 140243

Escherichia coli HIC140246

Salmonella enterica HIC 140294

なお、試験菌株は5継代以内のものを使用した。

平成26年度は、腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討を行った。外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する40個単位で調製を行い、調査試料の基材であるこうや豆腐の有用性を検討した。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）およびNIHSJ-07-ST2（定量試験法）に従って実施した。樹脂製容器40個に個別に収納したこうや豆腐（約16.5g/1個）を121で40分間高圧蒸気滅菌後、その全てについて無菌性を確認した。

無菌性が確認された方法で滅菌したこうや豆腐を用い、調査試料の安定性確認試験を実施した。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。調査試料は冷蔵保存し、保存 0、7、14、21、28 日後に定性試験、寒天平板表面塗抹法および最確数法による生菌数測定を実施した。併せて損傷菌の回復に効果があるとの報告があるピルビン酸を添加した試験菌液で調査試料を作製し、保存 14、21、28 日後に同様の試験を実施してピルビン酸による生菌数低下の抑制効果を検討した。定性試験および最確数法では、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)、ビブリオ寒天培地「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。最確数法の結果は、3%NaCl 添加標準寒天培地を用いて寒天平板混釈法で得られた生菌数と比較した。

セレウス菌検査用調査試料の検討については、外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する 30 個単位で調製を行い、調査試料の基材である米飯の有用性を検討した。試験操作は食品衛生検査指針 (微生物編) に収載の試験法に準拠して定性試験および定量試験を実施した。調査試料は 121 で 40 分間高圧蒸気滅菌した米飯を使用した。高濃度 NaCl 溶液で 10^5 CFU/mL に調整した試験菌液 (芽胞液) を滅菌済の米飯に接種し、十分に吸収させたものを調査試料とした。調査試料は、冷蔵および 32.5 で保存し、接種 0、4、8 週間後に定性試験および定量試験を実施した。定性試験では NGKG 寒

天培地(日水製薬)、MYP 寒天培地(OXOID)、セレウス選択培地 (MERCK) の 3 種の選択寒天培地を使用した。定量試験では、標準寒天培地を用いた寒天平板表面塗抹法または寒天平板混釈法による生菌数測定、ならびに定性試験の 3 種の選択寒天培地を用いた寒天平板表面塗抹法による生菌数測定を実施した。

一方、微生物担体による安定化技術の検討については、現在運用している調査試料の菌数の安定化を妨げる要因として、食品と微生物が直接接触していることが挙げられる。この問題を解消する手段として、バイオリアクター等に利用されている人造いくらの作製方法を用いて微生物担体を作製し、その安定性を検討した。

標準寒天培地で培養した試験菌を生理食塩液に懸濁し、 10^4 CFU/mL 相当の試験菌液を調製した。試験菌液を 0.5%アルギン酸ナトリウム含有生理食塩液に加え、約 0.05 mL ずつ 5%塩化ナトリウム溶液に滴下した。なお、微生物担体 1 個 (約 0.05mL) あたりの生菌数が 50 ~ 100 CFU となるように調製した。滴下 30 秒後に形状を崩さないように塩化ナトリウム溶液から回収し、生理食塩液に浮遊させた。これを冷蔵保存し、保存 0、1、2、5、6、7 日後に微生物担体 10 個の生菌数を測定した。併せて試験菌液の残液を試験対照とし、同様に保存および生菌数測定を実施して 0.05 mL あたりの生菌数を算出した。

平成 27 年度は、引き続き腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討を行った。基材は樹脂製容器に個別に収納したこうや豆腐 (約 16.5 g/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) ビブリオ寒天培地「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。

また、微生物担体による安定化技術の検討については、平成 26 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/0.05 g 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、ラパポート培地にそれぞれ 1 mL、ラパポート・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 寒天培地、DHL 寒天培地、MLCB 寒天培地、XLD 寒天培地、プ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。

平成 28 年度は、新たに定量試験 (一般細

菌数)の新規調査用試料としてゼラチン試料の検討について実施した。

試験菌株は、市販の枯草菌芽胞液(栄研化学)を使用した。ゼラチン試料の濃度は、冷蔵、固形の状態から24前後(室温を想定)で1時間程度完全に溶解し、液体になる濃度を検討した。ゼラチン濃度を1%から5%まで5段階に振り、寒天試料の寒天をゼラチンに代えて調製した。これを121/40分間で高压蒸気滅菌処理した後、5以下で1晩以上冷蔵した。冷蔵後、完全に固化したゼラチンを24前後の室温に放置し、1時間ごとに基材形状の経過観察を実施した。

ゼラチン試料の安定性については、前項で決定したゼラチン濃度で試料を10本作製し、寒天試料と同様に、最終濃度が $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ CFU/mL相当となるように試験菌を接種した。接種後、ゼラチン試料の生菌数の経時変化を観察し、接種直後からの増減を確認した。なお、経時変化は接種から28週間後(約4ヶ月)とした。

なお、ゼラチン試料は室温で溶解したことを確認してから10mLをフィルターなしの検体袋に秤量し、ペプトン食塩緩衝液で10倍段階希釈して生菌数測定に供した。

ゼラチン試料でフィルター付き検体袋を用いた場合の影響について検討した。前項と同様に試料を10本作製し、試験菌を接種したゼラチン試料を用いて、フィルターなしの検体袋およびフィルター付き検体袋で生菌数測定を実施した。フィルター付き検体袋は、これまでの外部精度管理調査結果からばらつきが比較的少ないもの(A社製)と多いもの(B社製)の2種を使用した。

また、フィルター付き検体袋については、ストマッカー1分処理の後、検体とペプト

ン食塩緩衝液を投入した側(フィルター外部)とピペットを挿入する側(フィルター内部)の2点について生菌数測定を実施した。また、平成28年度の外部精度管理で実際にゼラチン試料を運用し、前年度の寒天試料との比較および参加機関からのアンケート集計を実施した。これらの結果から、改善点を考察した。

4.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製:

平成26年度は落花生の外部精度管理用調査試料の作製を目的として、落花生タンパク質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行い、試料の保存安定性を確認した。

また、落花生の外部精度管理用調査試料に用いる適正な基材を探索することを目的として、落花生ELISAキットの様々な食品に対する反応性について確認し、測定を阻害する食品成分についても検討した。

落花生は国産落花生(千葉半立種)、中国産落花生およびアメリカ産落花生、その他にレトルトパウチ食品であるゆで落花生(千葉半立種)をそれぞれ購入して使用した。食品は原材料の欄に落花生を使用した旨の表示が無い、こしあん、チョコレートクリーム、白がゆ、かぼちゃペースト、とうもろこしペースト、ブロッコリーペースト、豆腐、高野豆腐、カスタードクリーム、いちごジャム、ビスケット、鶏がらスープの素、いりごま、米粉、小麦粉、ハンバーグ、あさり缶詰、魚肉ソーセージ、鯖缶詰、オリーブオイル、ココアパウダー、ミルクココア、チョコレート、チョコクッキー、シナモン、ミックスベリーを購入し

て使用した。

落花生からのタンパク質抽出は通知法標準品規格に記載の方法に従って実施した。落花生はミルサー IFM-700G (岩谷産業株) で粉碎したものを使用した。抽出には振とう機: RECIPRO SHAKER NR- および Double Shaker R-30 mini (以上 TAITEC) 遠心機: himac CF 16RX (日立工機株) を使用した。

落花生から抽出したタンパク質の濃度は 2-D Quant Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス株) を用いて定量した。

特定原材料 (落花生) タンパク質の定量は ELISA 法により実施した。すなわち日本ハム社製の FASTKIT™ エライザ Ver. 落花生キット (N キット) 森永生科学研究所製の FASPEK エライザ 落花生キット (M キット) およびプリマハム社製のアレルゲンアイ® ELISA 落花生キット (P キット) を使用した。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。

SDS-PAGE はゲルに SDS-PAGE mini (テフコ) を使用し、電気泳動槽 STC-808 (テフコ) により行った。泳動後のゲルはコロイド CBB 染色キット (テフコ) で染色した。分子量マーカーには SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (invitrogen) を使用した。

試料の作製には、中国産落花生よりタンパク質抽出を行い、落花生タンパク質溶液を調製した。次に、こしあんおよびチョコレートクリームに落花生タンパク質溶液をそれぞれ 10.7 µg/g、10.8 µg/g となるよう添加し、フードプロセッサー: MK-K58 (松下電器産業株) で均質になるまで混合し

た後、遠沈管に分注して試料を作製した。作製した試料はいずれも -20 °C で凍結保存した。

平成 27 年度は通知法改正後の 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、通知法改正前に開発した小麦およびそばの基材添加用タンパク質溶液について、通知法改正後の ELISA キットを用いて測定を行い、反応性を確認した。さらに、小麦およびそばについて、実際の配布量を想定したラージスケールでの試料調製を試み、均一性および保存安定性を確認した。なお、通知法改正前の ELISA キットを旧 ELISA キット、通知法改正後の ELISA キットを新 ELISA キットとした。

小麦は、神奈川県内の食品店で購入した小麦全粒粉を使用した。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。

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。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。

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. 小麦キット、森永生科学研究所製の FASPEK エライザ 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 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. そばキット、森永生科学研究所製の FASPEK エライザ そばキットおよびプリマハム社製のアレルゲンアイ®ELISA 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。

基材の均質化および混合には、ロボ・キューブ BRIXER-5-Plus(株)エフ・エム・アイ、以下ブrikサーとする)を使用した。また、作製した試料はいずれも 25 mL チューブに 10 g ずつ分取し、使用時まで -20 で冷凍保存した。

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 $\mu\text{g/g}$ および 9.80 $\mu\text{g/g}$ とした。

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 $\mu\text{g/g}$ とした。

平成 28 年度は卵添加試料の定量検査における外部精度管理調査に向けて、通知法改正後の ELISA キットを使用して測定したデータを通知法改正前の過去のデータと比較することで、その適用性を評価した。さらに、ラージスケールで試料作製を行い、卵タンパク質添加試料を用いた外部精度管理調査を計画、実施した。

基材として、かぼちゃペースト(市販品)および特定原材料を含まないとして市販されているベビーフードの 2 種類を卵タンパク質添加用基材として使用した。これらについては、ELISA 法により、あらかじめ卵を含まないことを確認した。

外部精度管理調査試料の調製として、全卵添加試料および乾燥全卵添加試料の 2 種類を各基材について作製した。各基材を 50 mL 遠沈管に 1 g ずつ秤量し、添加用卵タンパク質溶液をそれぞれ 10 $\mu\text{g/g}$ となるように加えた。パラフィルムを巻いた後、使用するまで -20 で凍結保存した。

外部精度管理調査試料の調製として乾燥全卵添加試料を各基材について作製した。各

基材に添加用卵タンパク質溶液をそれぞれ 10 µg/g となるように加え、ロボ・クープブrikサー5プラス(エフ・エム・アイ)で均質化して試料を作製した(2 kg)。それぞれの試料はいずれも遠沈管 80 本に約 10 g ずつ分注し、パラフィルムを巻いた後、-20 で凍結保存した。ベビーフード試料を試料 1、かぼちゃペースト試料を試料 2 とし、均質性および安定性はこれらの試料を用いて確認を行った。

通知法改正前および通知法改正後 ELISA キットにおける卵タンパク質添加試料の適用性を評価した。通知法改正前の ELISA キットによる回収率のデータは平成 24 年度に行った外部精度管理調査における均質性の結果を示した。各測定データは以下の ELISA キットを使用して測定したものであり、通知法改正前と通知法改正後の ELISA キットにおける各試料の回収率を比較し、両者にどの程度の乖離が見られるかを検証することで評価した。

外部精度管理調査試料の均質性および安定性を検討した。均質性の確認は、試料の作製直後と発送前の 2 時点について行った。調査試料のそれぞれについて 10 容器から n=1 でサンプリングして、ELISA 法による卵タンパク質濃度の測定を行い、平均値、標準偏差、変動係数を算出した後、濃度平均値から添加量に対する回収率を求め、2 時点におけるこれらの値をそれぞれ比較することで均質かどうかを判断した。また、試料作製から調査期間終了までに定期的に試料を測定し(0 日目、34 日目、69 日目、92 日目、126 日目および 194 日目、0 日目および 92 日目は n=10、その他は n=4)、安定性を 0 日目における濃度に対する割合として算出し確認した。なお、均質性および安定性はモリナガキット、日本ハムキットおよびブリマハムキットの 3 種類の ELISA

キットについて測定した結果を示した。

使用キットの使用期限の関係でロットが切り替わる際には、古いロットと新しいロットのキットを用いて同一試料の回収率を比較し、問題が無いことを確認した後使用した。また、吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダー EL 808IU、および計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver.1.80 (Bio-Tek Instruments, Inc.) を使用した。

外部精度管理調査の実施については、平成 24 年度に実施した外部精度管理調査の参加機関を対象に、地方衛生研究所を中心とした 29 機関に外部精度管理調査への参加を募った結果、18 機関が参加の意向を示した。そのため、平成 28 年 11 月 8 日にこれら 18 機関に対して 2 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 (FASPEK エライザ II 卵、FASTKIT エライザ Ver. III シリーズ卵、アレルギーアイ ELISA II シリーズ卵) のうち、任意の 2 種類を使用し、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 ウェル併行とした。また、報告書の回収期限は平成 28 年 12 月 9 日とした。

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 JMP (SAS Institute Japan 株式会社) を用い、Xbar-R 管理図を代用した解析を実施した。なお、Xbar 管理図の管理限界線の値は (ロバスト平均値 \pm ロバスト平均値 $\times 50\%$) 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」と記載されていることから、キットの測定誤差の範囲についてもこれ以下と考えられることによるものである。なお、添加回収率についてはこれまでの経験上、用いるキットにより異なる可能性があることから、各試料およびキットごとに算出したロバスト平均値を付与値とした解析を行うこととした。

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: システムサポート、大隅昇) により行い、得られたロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いて z-スコアを算出した。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キットを使用した機関は 18 機関、日本ハムキットを使用した機関は 18 機関、プリマハムキットを使用した機関は 0 機関であった。

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:

26 年度は、平成 25 年度に収集した遺伝子組み換え食品検査外部精度管理調査において収集した Ct 値に対して、定量試験の外部精度管理で用いる総計手法を適用し、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。あわせてコメ粉砕物試料についても検討した。外部精度管理調査試料の調製には、国立医薬品食品

衛生研究所より供与された遺伝子組換えコメ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、また、神奈川県内で購入した国産米粉 2 種 (米粉 および米粉) およびタイ産ライスヌードル 1 種を使用した。なお、タイ産ライスヌードルは孔径 1.0 mm のスクリーンを装着した超遠心粉砕機 ZM200 (レッチェ) で粉砕したもの (ライスヌードル粉砕物) を使用した。米粉 から Genomic-tip100/G (QIAGEN) を使用し通知法のプロトコールに従って DNA 溶液を抽出し、水で 10 ng/ μ L に調整したものを 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。

外部精度管理調査試料の調製として、DNA 溶液試料は、陽性プラスミドを nonGM コメ 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 A (中濃度陽性試料; 40 コピー/ウェル) および試料 B (低濃度陽性試料; 20 コピー/ウェル) を調製した。また、nonGM コメ DNA 溶液を試料 D (陰性試料) とした。

コメ粉砕物試料は米粉 を 15 mL 容の遠沈管に 500 mg ずつ分注し、このうち半分は ColE1/TE で希釈した陽性プラスミド溶液 (3000 copies/ μ L) を 10 μ L ずつ添加し、試料 1 (GM quicker2 抽出用 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 (GM quicker2 抽出用 陰性試料) とした。また、ライスヌードル粉砕物を 50 mL 容の遠沈管に 2.0 g ずつ分注し、同様に陽性プラスミド溶液 (6000

copies/ μL)を10 μL ずつ添加し、試料4 (Genomic-tip100/G 抽出用 陽性試料)とした。残り半分にはプラスミド溶液を添加せず、試料3(Genomic-tip 100/G 抽出用 陰性試料)とした。

外部精度管理調査の実施については、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、コムギ粉砕物試料4試料(試料1、試料2、試料3および試料4)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、コムギ粉砕物試料からDNAを抽出する際、試料1および試料2はGM quicker2を、試料3および試料4はGenomic-tip 100/Gを用いてそれぞれ2併行で実施することとし、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砕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用試験およびCpTI検出用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48未満か否かにより、陰性試料または陽性試料の判定を行った。

外部精度管理調査結果の統計解析については、参加機関の測定結果は試料ごとにまとめ、正答率を算出した。また、参加機関のCt値は、試料A、試料Bおよび試料CについてはCpTI検出用試験、試料1および試料4についてはコムギ陽性対照用試験および

CpTI検出用試験について、それぞれ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および試料4についてはコムギ陽性対照用試験とCpTI検出用試験のCt値の差についても同様に検討した。

平成27年度は、平成26年度と同様にコムギの検討を行った。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1.5mmのスクリーンを装着した超遠心粉砕機ZM200(レッチェ)で粉砕したもの(以下 nonGM コムギ粉砕物とする)を使用した。

nonGM コムギDNA溶液の調製は、nonGM コムギ粉砕物から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。コムギ粉砕物試料はnonGM コムギ粉砕物を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、コムギ粉砕物試料 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、コムギ粉砕物試料から DNA を抽出する際、試料の秤量は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砕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:

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、昨年度と同様に、AFB₁ 20 μmol 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 μmol を加えて混合した。この混合液を加熱しながら 2 時間還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 (1 g) (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。

HRP 標識 AFB₁ および AFB₂ の調製は、オキシム化 AFB₁ 20 μmol 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、水溶性カルボジイミドを 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 μL 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 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) 15 × 500 mm、展開溶媒: PBS) により HRP 標識 AFB₁ を精製した。同様に、HRP 標識 AFB₂ を調製した。

直接競合 ELISA の構築は、96 ウェルマイクロタイタープレートに、PBS で 5 μg/mL の濃度に調製した抗マウス IgG を 100 μL/ウェルで添加後、4 で一晩静置し固相した。その後、0.4% BSA/PBS を 300 μL/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/PBS で 40-150 ng/mL に希釈した MoAb2-3 を 100 μL/ウェルで添加後、室温で 1 時間静置した。反応後、0.02% Tween20/ PBS でウェルを洗浄し、0.2% BSA/ PBS で 2.5-5.0 ng/mL に希釈した HRP 標識 AFB₁ または、30-100 ng/mL に希釈した HRP 標識 AFB₂ と測定対象 AF (10%メタノールに溶解) との等量混合液を 100 μL/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 (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン試薬) 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 250 ng/mL に希釈した各 AF4 種をそれぞれ、ピーナッツバター調製液に 100 μL あるいは 20 μL 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。

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 25 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。窒素パーシにより乾燥し、2.0 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 (2.1×50 mm, 粒径 1.7 μm), 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、流速 0.5 mL/min, サンプル注入量は 5 μL とした。

C. D. 研究結果及び考察

1 尾花、梶村研究分担

平成 26 年度における大阪府立公衆衛生研究所の試験結果 (事前検討) は、以下の通りである。評価対象とした 89 農薬のうち、ピレトリンは感度が低く、検出することができなかった。また、ほうれん草から微量のシベルメトリンが検出されたため、ほうれん草については、シベルメトリンを対象項目から除外した。これらの結果、事前検討はピレトリンを除いた 88 農薬 (ほうれん草はシベルメトリンをさらに除いた 87 農薬) について行われた。検量線 A (マトリックスマッチング) による定量では、追加精製の有無および食品試料に関わらず、測定可能な農薬数の 9 割以上が回収率 90~110% の範囲に入った。当該検量線では、試験溶液と標準溶液のマトリックス組成が一致しているため、良好な結果が得られた。検量線 B (溶媒標準) を用いた場合、絶対検量線法では、追加精製の有無および試料に関わらず、回収率が 200% を超える農薬

が多数確認された。これは、発現したマトリックス効果により、測定値が過剰に算出されていると考えられる。溶媒標準では、GC 内の活性点に農薬が吸着するため、質量分析計に到達できる絶対量が、マトリックスを含む試験液と比べ減少することが要因と考えられた。内部標準法を用いて定量した場合、ほうれん草、えだまめ共に回収率が 100% 以下となる農薬の数が増加した。また、追加精製を行った場合、若干の回収率の改善が認められたが、当該検量線では、内部標準により補正を行った場合でも、良好な回収率を示す農薬の数は少なかった。検量線 C (VFJ 添加) で定量を行った場合、ほうれん草では、農薬の回収率が広範囲に分布する傾向が認められた。この傾向は追加精製の有無に関わらず同様であった。絶対検量線法では、過剰定量される農薬の数が多い傾向が確認されたが、追加精製を行うことで良好な結果を示す農薬数が増加した。内部標準法では、検量線 B と同じく、回収率は低めの傾向を示したが、検量線 B よりも良好であった。えだまめでは、多くの農薬が良好な回収率を示した。特に C18 による追加精製を行った場合、絶対検量線法、相対検量線法とも、88 農薬中 60 農薬以上が良好な結果を示した。PEG を添加した試験液では、一部の農薬 (シハロトリン、シフルトリン、フェンバレレートおよびホスメット等) のピーク面積値が低下した。これらの農薬では、濃度とピーク面積値の比例関係が脆弱であり、検量線 D (PEG 添加) では、直線性の指標となる r^2 も 0.990 を下回った。定量値は、検量線の直線性に関わらず、得られた検量線で定量し、度数分布に反映した。その結果、検量線 D (PEG 添加)

による定量では、試料および追加精製の有無に関わらず、絶対検量線法では過剰定量される農薬の数が多かった。また、内部標準法では過剰定量の傾向は確認されるが、絶対検量線法に比べて若干の改善が認められた。検量線 E (VFJ+PEG 添加) を用いた場合、絶対検量線法において、ほうれん草、えだまめ共に良好な結果を示す農薬の割合が高かった。また、追加精製により良好な結果を示す農薬の数は増加し、ほうれん草で 87 農薬中 56 農薬、えだまめで 88 農薬中 67 農薬が良好な結果を示した。内部標準法では、絶対検量線法に比べて若干、過剰定量の傾向が認められた。特にほうれん草にその傾向が強く、追加精製を行った場合、110~130%の回収率を示す農薬の度数が最も高くなり(87 農薬中 56 農薬)、良好な結果を示す農薬数は 7 農薬にとどまった。一方、えだまめでは、精製度に関わらず 6 割以上の農薬が良好な結果を示した。

平成 26 年度における各協力機関による測定結果は、以下の通りである。検量線 A では、内部標準による補正の有無に関わらず、各機関ともほぼ 90%以上の農薬が良好な結果を示した。検量線 B では、絶対検量線法で過剰定量、内部検量線法で過小定量の傾向が確認された。検量線 C および D では、機関により差が認められたが、内部検量線法で定量することにより、良好な結果を示す農薬数が増加した。検量線 E は、絶対検量線法又は内部検量線法の何れかで良好な結果を示す農薬数が最大になった。検量線 D については、補正可能な農薬の割合が高い機関と低い機関が混在していたが、検量線 E では割合が低い機関の結果が改善され、機関による差が縮小した。検量線 C

と検量線 E の傾向は類似していたが、ひとつの機関を除いて、補正可能な農薬の割合が検量線 E で 10%程度増加した。えだまめでは、内部標準の補正により、良好な結果を示す農薬の割合は各検量線とも増加した。検量線 D では、内部標準による補正により各機関の割合の差は縮小したが、検量線 C および E と比較し、なお機関の差は大きかった。ほうれん草では回収率 $100 \pm 10\%$ となった農薬数を基準にした場合、検量線 C、D、E の間にえだまめの様な明確な傾向が認められなかったため、回収率 $100 \pm 20\%$ の農薬を補正可能農薬とした。その結果、ほうれん草の結果はえだまめの傾向に類似し、全ての機関で検量線 E が汎用性の高い検量線となった。検量線 D は機関による差が大きく、汎用性は認められなかった。内部標準による補正は、いずれの検量線についても、えだまめの結果と同様に効果的であった。大阪府立公衆衛生研究所の事前検討において、一部の農薬(シハロトリン、シフルトリン、フェンバレレート、ホスメット等)に PEG 添加による感度低下が認められた。同様の傾向を示したのは、機関 a のみであり、機関 e では、フルバリネートのみ感度低下を示した。大阪府と機関 b および機関 e は同じメーカーの GC-MS/MS を使用し、GC の分析条件にも大きな違い(注入口温度、インサートライナーの種類、スプリットレス時の圧力等)はない。しかし、PEG の添加に対する挙動は異なっており、感度低下の要因となる因子は特定できなかった。大阪府立公衆衛生研究所および各協力機関の試験液調製方法は、以下の 2 種類に大別される。

イ.QuEChERS 法をベースとした方法(大阪

府および4機関)

口.厚生労働省の一斉分析法をベースとした方法(2機関)

この内、QuEChERS法をベースとする方法を適用している機関fは、検量線C、DおよびEの全てについて、良好なマトリックス補正効果が認められた。QuEChERS法をベースとした方法を採用している機関は5機関あり、補正効果が試験液の調製方法によることを特定できなかった。大阪府立公衆衛生研究所および協力機関の機器の内訳は、Agilent社製のGC-MSが1機関、GC-MS/MSが5機関、Thermo社製のGC-MSが1機関であった。機関fはAgilent社製のGC-MS/MSを使用し、かつ注入口の仕様がアイスティサイエンス社製の胃袋型インサートによる。機関fは検量線C、DおよびEにおいて良好なマトリックス補正効果が認められたが、1機関のみの結果であるため、補正効果が胃袋型インサートによる大量注入方式に基づくものであることを断定できなかった。

平成27年度、大阪府立公衆衛生研究所により行われた試験の結果(事前検討)は、以下の通りである。評価対象とした5種類の農薬および4種類の内部標準物質の何れも、溶液中の共存農薬数の増加に伴いピーク面積値が大きくなる傾向が確認された。なお、この現象(各溶液間の相対的な差異)は、50 ng/mL溶液よりも濃度が高い500 ng/mL溶液で顕著であった。またオメトエートでは、ピーク面積の増大のみならず、保持時間の短縮も観察された。以上の結果から、GC-MS(/MS)測定において農薬成分自体がマトリックスとして機能することが示された。ピーク面積が増大する程度は農薬・内部標準物質の種類により異なった。

例えば、各500 ng/mLの検討において、単品と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約4.0倍の増大が確認されたのに対し、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倍程度であった。また、内部標準物質について166農薬の添加により、TPPは平均約7.1倍の増大が観察されたのに対し、NPH-d8、PHN-d10、FLA-d10では各々1.2、1.5、1.7倍程度であった。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の中では、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」の影響が弱いことが示唆される。機器測定時の農薬のピーク面積の変動を補正するには、対象農薬と同様の挙動を示す内部標準物質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パターンの多種類混合溶液(+58農薬、+108農薬、+166農薬)では、順に0.4~0.6、0.4~0.6、0.3~0.7となった。すなわち、単品溶液と多種類混合溶液の比較では、両者の値に違いが存在するが、3パターンの多種類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は汎用的な内部標準物質として比較的有効に機能することが示唆される。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の方が全般的に溶液間の面積比の差が小さく、内部標準物質としてより有効に機能することが考えられた。絶対検量線による模擬試験液の定量結果に

ついて、最小限希釈マトリックスを適用した場合でもフルシトリンネートは、3種類混合標準と169種類混合標準溶液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。大阪府立公衆衛生研究所の標準作業書に基づく通常濃度(1 g/mL)の試料マトリックスが存在する状況でも、農薬が $\mu\text{g/mL}$ オーダー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倍希釈に相当する高倍率希釈マトリックスでは、評価対象3農薬の何れも、169種類混合標準溶液の検量線の傾きが3種類混合標準より大きくなり、農薬の定量率が全体的に低い傾向が確認された。マラチオン、プロシミドン、フルシトリンネートの定量率は、169種類混合標準溶液の場合、順に82%、85%、87%であるのに対し、3種類混合標準溶液では64%、65%、77%であった。これらの結果から、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量が低減した状況(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相違は、補助マトリックスとしてGSBm又はVFJmを添加した模擬試験液では小さくなり、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が緩和できることが示唆された。一方、PEGを添加した模擬試験液において、マラチオン、フルシトリンネートでは、定量率の差および相対標準偏差が大きい傾向が確認された。さらにフルシトリンネートでは、ピーク面積の減少傾向が観察され、原因として、PEGによる分解が考えられた。TPP、PHN-d10、FLA-d10、NPH-d8を内部標準物質とした場合の模擬試

験液の定量結果について、PEGを添加した溶液では、マラチオン、フルシトリンネートについて良好な結果は得られなかった。一方、絶対検量線法で顕著な差が認められた高希釈マトリックスの模擬試験液について、TPPまたはFLA-d10を内部標準とした場合、両者の傾きや定量率の差は縮小した。

平成27年度における各協力機関の実験結果は、以下の通りである。共存農薬数が異なる50 ng/mLの各溶媒標準溶液の測定結果では、4機関で共存農薬数の増加に伴う面積値の増大が観察されたが、2機関では明確な傾向は確認できなかった。農薬や内部標準物質の種類により増大率には差が認められた。50 ng/mLの各溶媒標準溶液を使用した実験では、機関fのTPP、フルシトリン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倍であった。一方、同条件で機関fのプロシミドン、PHN-d10の増大率は各々1.4倍、1.3倍であり、これらの化合物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。500 ng/mLの各溶媒標準溶液を使用した実験では、ほとんどの機関で50 ng/mLの溶媒標準溶液を使用した場合よりもピーク面積の増大傾向が強く発現した。しかし、機関fでは、3農薬について50 ng/mLの溶媒標準溶液を使用した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 μL 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 μL または2 μL 注入)より12.5~25倍高い状況となる。従って、MS側で過負荷によるイオン化抑制(ピーク面積の頭打ち)が起こりやすい状態であることが推測され、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。絶対検量線法による模擬試験液の定量試験では、機関 f の一部の試験を除き、全般に 169 種類混合溶液で定量した場合に定量値が低い傾向が観察された。特に、単純な希釈測定に対応する高倍率希釈マトリックスで過小定量の傾向が顕著であった。この傾向は、GSBm 又は VFJm などの補助マトリックスを添加することで補正された。なお、PEG を添加した実験系では、一部の機関でフルシトリネートの定量性が悪くな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、これが要因と考えられる。機関 f は、最小限希釈マトリックスによる実験について、他機関の傾向と異なっていた。機関 f の検量線を見ると、169 種類混合溶液の検量線の傾きが 3 種類混合溶液よりも小さくなる逆転現象が生じていた。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になった。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環境と言える。169 種類混合溶液による測定時に、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引き起こした可能性が高い。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なく、過大定量の要因になることも示唆された。TPP を内部標準とした測定では、食品マトリックス量が比較的多い模擬試験液において全機関で比較的良好な定量結果が得られた。しかし、一部の機関の一部の模擬試験液で、全

ての評価対象農薬が過大定量の傾向（定量率 133 ~ 260%）を示す現象も確認された。TPP は汎用的な内部標準として使用されるが、食品試料マトリックス量が低減した条件下では、農薬と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。一方 PHN-d10 を内部標準とした場合、TPP で観測された一部の機関の過大定量は解消され、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に合わせて適切な内部標準物質を選択することが重要である。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 $[\text{Slope } 169\text{mix}] / [\text{Slope } 3\text{mix}]$ を指標として、マトリックス効果の強さを検証した。全般にマトリックス効果が弱いのはプロシミドンであり、強いのはフルシトリネートであった。また、単純な希釈測定に相当する高倍率希釈マトリックスでは、補正効果が全体的に弱い結果となった。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推測される。しかし、食品マトリックス濃度が低い状況下では、農薬由来のマトリックス効果の顕在化に注視する必要がある。一方、フルシトリネートは、マトリックス量が比較的多い状況でも共存農薬の影響を受けやすく、正確な定量を行うことが難しい農薬と言える。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 つの異性体の等量混合物である。従って、異性体あたりの濃度はマラチオン、プロシミドンの約半分になることになる。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

大きくなった要因であることが推察される。

平成 28 年度、大阪府立公衆衛生研究所で行われた試験の結果（事前検討）は、以下の通りである。ブリ、サケ、カレイ、エビの各魚種について、合成抗菌剤 30 種類を対象としてマトリックス検量線を作成し、傾きを比較した。ナリジクス酸およびスルファチミジンでは、カレイ以外の魚種から作成した検量線の傾きがほぼ同一であった。このような化合物では、他の魚種から作成したマトリックス検量線により、定量的な解析を行うことが可能であることが推測された。一方、ダノフロキサシン、マルボフロキサシンなどキノロン系の化合物では、マトリックス検量線の傾きの差が大きく、異なる魚種を対象に定量することは困難であると思われた。次に、無脂肪乳（乳脂肪分：0.1%）と特濃加工乳（乳脂肪分：4.2%）を試料として用い、乳脂肪分の量が測定結果に及ぼす影響について調査した。乳脂肪分の量が多い特濃加工乳から調製した試料溶液の方が若干、マトリックス効果を受けやすいことが確認されたが、顕著な差は認められなかった。また、LC-MS/MS 分析における合成抗菌剤の保持時間とマトリックス効果の関係について、効果を強く受ける保持時間帯が存在することを確認した。当該保持時間には、食品マトリックスであるタンパク質、脂質などが多く共溶出し、結果として効果を強く発現している可能性がある。さらに、3 つ目の事前検討では、牛乳、鶏卵の凍結および新鮮検体を使用し、マトリックス効果の発現について検討を行った。凍結により食品中に含まれるタンパク質が変性することが予測されるため、この実験ではタンパク変性によるマトリックス効果

への影響について調査することが目的となる。しかし、牛乳、鶏卵共、凍結による影響は特に観察されなかった。近畿地区の地方衛生研究所との共同研究では、主に 2 つの検討が行われた。大阪府立公衆衛生研究所により調製された、同一の試験液を、各機関が保有している分析機器により測定した結果、発現するマトリックス効果に大きな差異が確認された。概ねイオン化が抑制された機関が 4 機関、逆にイオン化が促進された機関が 1 機関、マトリックス効果がほとんど発現しない機関が 2 機関存在した。これは過去 2 年、共同試験を行った GC-MS(/MS) とは大きく異なる知見であり、LC-MS/MS におけるマトリックス効果の発現は、非常に複雑であることが検証された。さらに、これらの結果を、各協力機関の標準作業書に基づく方法により精製・測定した場合と比較した。機関 f は、精製法の違いによる影響は特に無く、この要因として「使用する分析機器が食品マトリックスの影響を受けにくい」、「分析条件が良好である」等の理由が考えられた。また、機関 e は、独自の方法により精製を行うことにより、同一の試験液を分析した時に生じていた強いマトリックス効果を制御できることも示された。

2 斉藤分担研究

香辛料中総 AFs 分析の室間再現精度について、真度の評価として、全体的な回収率は、試料 A および試料 B 共に概ね 70% 程度であった。また、アフラトキシンの種類では、AF-G₂ と B₂ ではやや低め (61 ~ 71%) となったが、AF-G₁ と B₁ では約 69 ~ 77% と良好であった。

精度の評価として、8 検査機関の室間精度を相対標準偏差 (RSD_R) で算出したところ、試料 A(高濃度添加)では 26%未満、他方、試料 B(低濃度添加)では 29%未満であった。更に、室間再現精度については HorRat 値で評価した結果、試料 A では 1.13 ~ 1.18、他方、試料 B では 1.22 ~ 1.31 であり、国際食品規格委員会 (Codex Alimentarius Commission : CAC)での許容範囲以内であった。この結果から、本試験法の室間再現精度は良好であることが確認された。

また、各検査機関の実測データを評価すると、いずれの機関も平均値 ± 2SD 以内にほぼ入っていた。このことから、今回の外部精度管理試験に参加した各検査機関は、いずれも技能的に問題が無いことも確認された。

チーズ中 AF-M₁ 分析の室間精度管理については、真度の評価として、試料 A および試料 B の回収率は、概ね 93%および 104%程度であった。

精度の評価として、8 検査機関の室間精度を相対標準偏差で算出したところ、試料 A(高濃度添加)では 20%未満、他方、試料 B(低濃度添加)では 31%未満であった。これらを HorRat 値で算出すると試料 A では 0.90、他方、試料 B では 1.41 であり、いずれも CAC で規定した HorRat 値の許容範囲 (2) 内であった。

また、各検査機関の実測データを評価すると、いずれの検査機関も試料 A および B において “ 平均値 ± 2SD ” に入っていた。以上の結果から、チーズ中 AF-M₁ 分析における本試験法の精度も良好であることが推察された。

3 鎗田研究分担

IDMS におけるマトリックス効果の検証については、MF 検量線溶液と MM 検量線溶液のそれぞれについて検量線を作成したところ、両者の面積比は良好な直線関係 ($R^2 > 0.999$) を示した。一方で、ほとんどの対象農薬について、MF 検量線溶液を用いて作成した検量線の方が、MM 検量線溶液を用いて作成した検量線よりも傾きは大きくなり、特にフェニトロチオンとイソキサチオンでは 15%以上も大きくなった。IDMS の検量線の傾きが試料マトリックスに包括的に影響されるという事象は、報告者が知る限りこれまでに報告はなかった。MF 検量線溶液と MM 検量線溶液の SIM クロマトグラムを比較したところ、MF 検量線溶液の測定における標識体ピークの強度が、測定対象農薬のピーク強度に対して相対的に小さくなることが確認され、両化合物の同位体平衡が完全には成立していないことが示唆された。GC におけるマトリックス効果は、GC 装置内での分析対象物質の不可逆的な吸着に起因し、特に試料注入口の寄与が大きいと考えられている。そこで、スプリットレス注入法よりも吸着が少ないと考えられるオンカラム注入法を適用し検量線を作成した。スプリットレス注入法とオンカラム注入法による検量線の傾きの比は異なったことから、注入口において分析対象農薬とその標識体の吸着様子が異なっていることが示された。ただし、オンカラム注入法を用いた場合でも、検量線の傾きが 1 より明らかに大きい農薬もあり、注入口以外への吸着も無視できないと考えられた。

以上のように、標識体を内標準に用いた IDMS においても、マトリックス効果の影響を完全に排除することは困難であった。そのため IDMS においても、マトリックスマッチングした検量線溶液を用いることが、高信頼性分析のために有効であることが示された。

外部精度管理調査試料の分析について、平成 26 年度残留農薬検査 調査試料(かぼちゃ試料)を分析した結果、クロルピリホスの定量値は一斉試験法をベースとした分析法 1 では 40.30~41.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、個別試験法をベースとした分析法 2 では 41.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 41.78 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN の定量値は分析法 1 では 231.5~240.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、分析法 2 では 240.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 及び 246.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ であり(分析法 1 : $n=5$ 、分析法 2 : $n=2$)、両法の結果は一致していた。そこで、分析法毎に前記式の F_e 、 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ところ、クロルピリホス : $(41.2 \pm 1.7) \mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN : $(241 \pm 15) \mu\text{g}/\text{kg}$ (重み付け平均値 \pm 拡張不確かさ(包含係数 : 2))であった。この結果を外部精度管理調査の結果と比較したところ、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 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN が 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、IDMS による定量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参照値(2 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 $(37.027 \pm 7.978) \mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN が $(214.064 \pm 61.672) \mu\text{g}/\text{kg}$ であった。IDMS による定量値はこれよりクロルピリホスについて

11%、EPN について 12% 高く、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、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について 21%、EPN について 25% であり、IDMS の不確かさは充分小さいことが示された。

平成 27 年度残留農薬検査 調査試料(ほうれんそう試料)を分析した結果、クロルピリホスの定量値は一斉試験法をベースとした分析法 1 では 20.4~21.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、個別試験法をベースとした分析法 2 では 19.4~21.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンの定量値は分析法 1 では 795~849 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 では 790~823 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり($n=5$)、両法の結果は一致していた。

各分析法について、前記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、さらに分析法 1 と分析法 2 の結果の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 では 20.4~21.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 では 19.1~21.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンが分析法 1 では 754~805 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 では 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、本研究における「4.1. IDMS に

におけるマトリックス効果の検証」の検討結果を支持するものであった。

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 µg/kg、マラチオンが 800 µg/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参照値（2 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±6.422) µg/kg、マラチオンが(739.322±21.4784) µg/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 26 年度における結果の同様であった、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。

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。

簡易分析法の正確さの検討について、QuEChERS 法を評価した。平成 26 年度に農薬が残留した玄米試料を分析し、その結果を一斉試験法による結果と比較した。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。さらに、平成 27 年度に大豆標準物質とリンゴ標準物質を分析した。得

られた結果は認証値と一致しており、QuEChERS 法によって十分に対象農薬が抽出されることが確認できた。なお、マトリックスマッチングしていない検量線を用いた場合、マトリックスマッチングした検量線を用いた場合と比較して得られる定量値が 7.7～22 %低くなった。QuEChERS 法の精製効果は一斉試験法よりも低いと考えられたため、IDMS においてより強いマトリックス効果の影響を受けうることが示唆された。

STQ 法の評価について、STQ 法は、QuEChERS 法と固相抽出法を組み合わせた残留農薬一斉分析法である。操作が迅速・簡便であるため、近年日本国内の分析試験所で導入されている。同法のうち今回は GC-A 法に IDMS 法を適用し、農薬が残留した玄米試料を分析した。その結果、全ての対象農薬について STQ 法の分析値は一斉試験法および前述の QuEChERS 法の結果とよく一致していた。すなわち、STQ 法により玄米中の対象農薬が十分に抽出及び精製されていたことを示しており、STQ 法によって正確な分析が可能であることが示された。

4 渡辺研究分担

4.1 理化学検査のための適正試料の作製検討：

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・粉碎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、平成 26 年度は、それ

らが米成分に由来する可能性の確認として、粉碎・粉末化した米類に農薬を添加し冷蔵保存におけるそれらの経日的安定性（農薬添加後加熱した米類については0、5、10、20、30 および 60 日間、非加熱の米類は0、5、10、20 および 30 日間）を検討した。併せて、米自体が持つ酵素等が影響を与える可能性を考慮して、それらを失活させる目的で、同種の米類を加熱後、農薬を添加し、その後の冷蔵保存による安定性（農薬添加後0、5、10、20 および 30 日間）を検討した。なお、それぞれの測定時点およ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、一部の時点およ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。

その結果、非加熱の米類に添加した農薬は、いずれも、農薬添加後経日的に緩い減少傾向を示したものの、30 日間で添加濃度に対し、80%以上の回収率であった。

精米および玄米を比較すると、いずれの農薬でも添加後30日において玄米の方が精米より添加濃度に対する回収率がわずかに高い傾向があり、マラチオンを除き、他の3種の農薬は、添加後30日においても添加濃度に対し約90%の回収率が得られた。

新米および古米の比較では、精米および玄米ともに顕著な差は認められなかった。

また、農薬の中では、クロルピリホスがいずれの米の種類でも比較的安定した回収を示し、特に玄米の古米および新米とも添加後30日間で90%以上の良好な回収が得られた。また、フェニトロチオンは、玄米の古米および新米において添加後30日

間で90%以上の良好な回収を示した。

一方、加熱した米類に添加した農薬はいずれの米類も農薬添加後、経日的に顕著な減少傾向を示し。

精米および玄米を比較すると、いずれの農薬でも添加後30日間において、非加熱の米類と同様に玄米の方が精米より添加濃度に対する回収率が高い傾向があった。しかしながら、添加後30日においては、クロルピリホスおよびフェニトロチオンを除く他の2種については、添加濃度に対し約80%以下の回収率であった。

また、農薬の中では、非加熱の米類と同様にクロルピリホスがいずれの米の種類でも比較的安定した回収を示し、玄米の古米および新米とも添加後30日間で80%以上の回収が得られた。非加熱の米類では、フェニトロチオンが、良好な回収を示したことに反し、加熱した米類では、添加後60日で約80%以下にまで減少した。

加熱処理をした米類の方が、非加熱の米類と比較し、概して減少傾向が著しく、添加農薬の安定を図るには適さないと考えられた。米中酵素は、50~60 においても活性化する場合もあり、今回の加熱条件では完全に失活できない可能性も考えられるが、60 以上の加熱をした場合、糖質、脂質およびタンパク質等の更なる変性・変質が予測されることから、より苛酷な加熱条件を検討することは難しいと考えられる。

今回の実験では、非加熱の米類において、添加後30日間では、農薬の著しい減少傾向は認められずこれまでの結果に反しているが、約半年から1年で半減した試料は、酢酸エチルの農薬標準液に浸漬し、

乾燥後、粉碎機を用いることで、若干の熱負荷がある点などが異なり、作製条件を考慮した安定性の確認も必要である。一般的には、今回使用した有機りん系農薬は、アルカリには不安定だが、酸には比較的安定とされている。今回の安定性の確認を目的とした試験設定と酢酸エチル溶液にて添加した場合の試料とで農薬の安定性に大きく影響を及ぼす要因があるかについても精査する必要があると考えられた。

今後は、60日以降も継続して安定性を検討することと併せて、農薬を添加する際に用いる溶媒の種類についても、均一性のみでなく、安定性の観点からも確認を行う。

一方、枝豆については、先の米類などの固体試料とは別に、これまでの野菜ペーストに加えて新たに枝豆ペースト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 µg/g、クロルピリホス 0.3 µg/g、およびマラチオンおよびフェニトロチオン 0.5 µg/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を試み、水分添加(5%、10%および20%)および油分添加(2%、5%および10%)のいずれも良好な均一性が得られている。そこで、平成26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。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も同時に

測定を行ったところ、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が、冷凍保存9か月間で油分2%および5%については、ダイアジノンの保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定が困難となった。また、油分10%については、冷凍保存9か月間で4種農薬すべての保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定が困難となった。

水分添加基材については、作製後9か月までの間、いずれの農薬のいずれの測定時点でも、F値が有意水準5%点の3.020未満であり、安定して良好な均一性を示す結果が得られたが、水分添加量の異なる3条件とも、4種農薬で添加量に対する回収率は、減少傾向であった。特に、水分を20%添加した場合はダイアジノンの回収率が作製後6か月以降で急激に低下し、回収率が比較的安定であったクロルピリホスも9か月で回収率が80%以下となった。

油分添加基材については、作製後9か月までの間、いずれの農薬のいずれの測定時点でも、F値が有意水準5%点の3.020未満であり、安定して良好な均一性を示す結果が得られたが、水分添加基材と同様に、添加量の異なる3条件とも、4種農薬で添加量に対する回収率は、減少傾向であった。油分の添加量の違いによる回収率および安定性の明らかな差は見られなかったが、油分10%については、均一性はあるものの概して測定値のバラツキがやや大きく、さらには冷凍保存9か月間で4種農薬すべての保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定が困難となった。また本来の枝豆の成分とは脂質の点

において異なることから、油分 10%添加基材は適切ではないと考えられた。

平成 27 年度は、平成 26 年度に引き続き長期の冷蔵条件下の安定性及び冷凍条件下での安定性を検討した。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(図 5、6)。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。

また、枝豆については、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 µg/g、クロルピリホス 0.3 µg/g、及びマラチオン及びフェニトロチオン 0.5 µg/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。

平成27年度から引き続き、基材自体の農薬添加試料としての適用性の確認として、粉碎・粉末化した米類（精米及び玄米のそれぞれ古米）に農薬を添加し冷凍及び冷蔵保存条件下での経日的安定性（平成27年度の農薬添加後0、14、34、60、90及び120日間に加え、本年度は180、270及び360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。玄米の冷凍保存に

おいては、4種農薬とも270日間経過時点で80%以上の回収率を示しており、また、マラチオン及びフェニトロチオンは冷凍保存360日間でも、90%以上の安定した回収率を示していた。このことから、玄米の冷凍保存においては、外部精度管理調査実施後の余剰試料を内部精度管理試料として活用できる可能性があると考えられた。

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。またアセトンを添加しない米類ブランク試料と比較したところ、差は認められず、アセトンを添加後、長期冷凍保存することの影響はないと考えられた。

実作製における作製プロセスの確立及びその検証について浸漬用溶媒の検討を行った。平成27年度までは、米を粒状で浸漬用農薬混合標準液に浸漬し、溶媒留去後乾燥・粉碎し、粉碎物を混合する方法で調製したが、今年度は、米を予め粉碎し粉末化した試料を用いて調製する方法を試みた。調製に先立ち、浸漬用農薬混合標準液に用いる溶媒の検討を行った。玄米（古米）を3種の浸漬用溶媒（ヘキサン、アセトン及び酢酸エチル）に浸漬した後、ロータリーエバポレーターにより浸漬溶媒を留去し、自然乾燥させた時の、得られた作製試料の乾燥状態等について、目視により観察を行った。その結果、アセトンに浸漬した試料が最も溶媒の除去状態が良好であり、ヘキサン及び酢酸エチルによる試料は、溶媒の除去が不完全となる傾向があった。溶媒の一部が残留することは、溶液部

分が濃縮されているため高濃度の農薬が一部の試料と接触し農薬が偏在する可能性が高く、また、アセトン浸漬試料と比べ、ヘキサン及び酢酸エチル浸漬試料は、溶媒留去時に突沸しやすいなど細心の注意と時間を要したため、実試料作製には不適と判断した。以上の結果より、玄米粉体試料作製に用いる溶媒は、アセトンを採用することとした。なお、溶媒留去において、減圧濃縮装置のロータリーエバポレーターに球形ガラスフィルターあるいはロータリージョイントを接続し、粉体の冷却部への吸い込みを防止した。その結果、溶媒の留去速度が低下するものの、粉末の飛散防止に高い効果があることがわかり、採用することで農薬の粉体試料への添加が可能となった。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合無し)については、粉碎・粉末化した玄米(古米)に農薬(アセトン溶液)を添加し、乾燥した試料につき、1バッチ内の均質性について評価した。

一元配置の分散分析の結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%点よりも大きく、1バッチ内の均質性は得られなかった。しかし、各農薬の添加濃度(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 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g)に対する回収率は89~97%であり、添加した農薬は、バッチ内においては良好に玄米試料に移行したと考えられた。

バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合有り)については、バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合無し)の結果よりバッチ内において、玄米試料に対する添加

農薬の濃度にばらつきが生じていることが明らかとなったため、これを均質にするために、農薬添加後の乾燥試料をロックミキサーにより回転・揺動を混合し、1バッチ内を均質とし、評価を行った。

その結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%点よりも小さく、ロックミキサーによる混合により、1バッチ内の試料は良好な均質性を得られることが明らかとなった。また、農薬の添加濃度(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 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g)に対する回収率は88~101%であり、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率は1%であることから、いずれの農薬も玄米試料に良好に移行し添加されたと考えられた。

バッチ間の均質性の検討については、バッチ内の均質性の検討(回転・揺動混合有り)の方法で1バッチ内の均質性が確認できたため、さらに複数バッチを同様の方法で作製した場合のバッチ間の均質(同等)性を検討した。10個の粉体攪拌用フラスコを用いて繰り返し10回の操作により農薬添加粉末玄米試料を作製した。その結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%点よりも小さく、10バッチの試料について良好な均質性が得られ、バッチ間の同等性が明らかとなった。また、農薬の添加濃度(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 µg/g、フェニトロチオン0.2 µg/g)に対する回収率は89~98%であり、粉体攪拌用フラスコ内壁面への農薬残存率はいずれの粉体攪拌用フラスコ及び農薬で約1%以下であることから、添加農薬は10バッチ

において玄米試料に良好に移行し高い再現性で添加されたと考えられた。作製試料の各農薬測定結果は、いずれのバッチにおいても回収率に同様の傾向がみられ、バッチ間で玄米試料への農薬添加の状態に差異は認められなかった。

一方、枝豆では、水 10%を添加した枝豆ペーストに農薬混合標準液を添加し、ブリクサー5 プラスを用いて混合した時の、1 バッチ内の均質性及び5 バッチ間の均質性(同等)性を評価した。各バッチ内の均質性について評価した結果、作製試料の各農薬測定結果は、バッチ(容器)内のいずれのサンプリング部位においても、回収率に同様の傾向がみられ、バッチ内の作製試料は均質であることが明らかとなった。5 バッチ間の均質性について評価した結果、いずれの農薬においても得られたF値は有意水準5%点よりも小さく、5 バッチの試料について良好な均質性が得られ同等であることが明らかとなった。また、ダイアジノンについては基材由来の夾雑物の影響があり、ブランク試料を差し引いて算出したことから、他の農薬と比較して部位の違いによる回収率にばらつきがみられたが、農薬の添加濃度(理論値)(ダイアジノン 0.01 µg/g、クロルピリホス及びマラチオン 0.3 µg/g、フェントロチオン 0.5 µg/g)に対する回収率は82~104%であり、満足できる結果であった。今回の5 バッチによる合計作製量は10 kgであるが、本作製操作を繰り返し行うことで、外部精度管理調査の実配付量を作製することが可能であると考えられた。

4.2 微生物学検査のための適性試料の作

製検討：

平成26年度において、腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討を行った。外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する40個を同時に滅菌した結果、樹脂製容器の変形もなく、基材であるこうや豆腐についても滅菌後の無菌性が確認された。

定性試験では、用いた9種の寒天培地上で保存28日後まで腸炎ビブリオを判定することが可能であった。陰性菌である*V. fluvialis*では、一部の酵素基質培地上で陽性を疑う集落が確認されたが、NIHSJ-06-ST3では腸炎ビブリオと推定される集落について同定試験を実施することとなっているため問題とはならないと考えられた(定性試験に関するデータは示していない)。

最確数法では、保存28日後まで陰性、陽性ともに集落の発育を認めたが、選択培地上の陽性集落のみを計測したため、陰性菌は陽性反応を検出したCHROMagarを除いて<3.0との結果が得られた。陽性菌では、保存14日後以降減少傾向が認められたものの、いずれの寒天培地を用いた場合でも保存28日後まで腸炎ビブリオが検出可能であった。このことから、NIHSJ-07-ST2(定量試験法)に従った試験のための調査試料として有用であることが示唆された。しかしながら最確数法による生菌数測定を行うための調査試料では1400 CFU/gを超えないよう試験菌を接種する必要があり、保存14日後以降の菌数の減少傾向を抑制することが必要と考えられた。

VBNC状態のビブリオ属菌に対する回復効果の報告のあるピルビン酸を加えた調査試料について同様に冷蔵保存試験を実施したところ、ピルビン酸を含まない調査試料よ

りも生菌数の減少幅が大きくなる結果となった。これより、最確数法による定量試験のための調査試料としては、ピルビン酸の添加は不適と判断し、定量試験用の調査試料については添加剤等のさらなる検討が必要だと考えられた。以上のことから、こうや豆腐を用いた調査試料は定性試験において有用性が認められた。併せて定性試験用の調査試料の検討が今後の課題であると示唆された。

セレウス菌検査用調査試料の検討については、調査試料の基材として米飯を使用し、食品衛生検査指針（微生物編）に収載の試験法に従って定性試験、定量試験を実施した。

定性試験では、セレウス菌を接種した調査試料において、冷蔵ならびに 32.5 保存の両者で、接種 8 週間後まで用いたすべての選択寒天培地上で陽性集落が確認された。一方、陰性菌として接種した枯草菌において、NGKG 寒天培地上では集落の発育が認められなかったが、MYP 寒天培地およびセレウス選択寒天培地では陰性集落の形成（発育）が認められた。国内では入手の容易さや過去の実績などから多くの機関が定性試験に NGKG 寒天培地を選択している可能性が高いことから、陰性菌が NGKG 寒天培地上で発育しない点については十分な検討が必要と思われた。

定量試験では、標準寒天培地による生菌数測定の結果、いずれの試験菌も保存開始から 8 週間にわたってほぼ同等の菌数が維持されたことから、非常に安定性の高い調査試料であることが示唆され。また、32.5 で保存した調査試料でも菌数の変動が認められなかったことから、実際に外部精度管

理調査試料として送付した場合に予想される温度変化による試験結果への影響が低いことが示唆された。定性試験用の寒天培地による生菌数測定では、NGKG 寒天培地において枯草菌が発育しないことから <1000 CFU/g となったが、MYP 寒天培地およびセレウス選択寒天培地では、陽性菌は標準寒天培地の生菌数測定結果と同等、陰性菌はそれより低い数値であったものの保存条件に関わらず試験期間にわたって菌数が維持された。なお、陽性集落と陰性集落は集落外縁の培地色や不透明帯などの違いで判別されるが、見慣れていない場合は誤判定も考えられるため、陰性菌の集落数についても計測を実施した。以上のことから、国内で利用が多いと思われる NGKG 培地で発育する陰性菌の探索などの課題を残すものの、定量試験用の調査試料としての有用性が認められた。

また、微生物担体による安定化技術の検討については、調製直後の微生物担体の生菌数は、目標とした生菌数の範囲内であった。このことから、任意の生菌数の微生物担体の作製が可能であることが示唆された。微生物担体中の生菌数の挙動を確認したところ、黄色ブドウ球菌では個々の微生物担体から得られた生菌数測定値のばらつきが大きく、担体間で 10 倍以上の差が認められた。黄色ブドウ球菌では、他の試験菌に比べて試験対照での生菌数の変化も大きいことから、試験菌の特徴に起因することが考えられた。大腸菌およびサルモネラ属菌では個々の微生物担体から得られた生菌数測定値のばらつきが小さく、生菌数の平均値と試験対照での生菌数の変化についても安定的な挙動を示した。以上のことから、試験

菌による差は認められるものの、人造いくらの製法で作製した微生物担体に一定量の微生物を封入することが可能であり、少なくとも 7 日間は安定であることが確認された。事前に実施した予備検討の結果から、培地やリン酸緩衝液にアルギン酸ナトリウムを溶解して調製した微生物担体を冷蔵保存した場合、または生理食塩液にアルギン酸ナトリウムを溶解して調製した微生物担体を 15 前後で保存した場合も生菌数が安定しないことが明らかとなっている。これらのことから、微生物担体を調製する際に使用する溶液として培地やリン酸緩衝液は適当ではないこと、保存温度によっては微生物担体中に封入した微生物が増殖すると考えられ、微生物を封入した担体は保存条件を十分に検討する必要があることが示唆された。また、7 日間の生菌数が最も安定して推移したサルモネラ属菌についても、7 日後には接種時の半分以下の菌数まで低下していることから、更に長期間安定な担体とするためには保存剤の添加を含めた保存条件の検討が必要であると考えられた。

平成 27 年度は、引き続き腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討を行った。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 回について実施した。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、梱包して発送した各温度条件 5 セットの箱内温度平均値の経時的変化について、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。

また、微生物担体による安定化技術の検討については、各試験菌の担体は 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した結果、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。

平成 28 年度は新規調査用試料としてゼラチン試料の濃度を検討した。5 種のゼラチンの濃度で調製したゼラチン試料を冷蔵後、室温（24 前後）にて放置し経過観察した結果、ゼラチン 1%および 2%では冷蔵しても固形にならなかった。また、4%では 1 時間後に溶解しているものの、若干粘土が高い状態であり、5%では 1 時間後では半固形の状態であったことから、1 時間後に液状化している条件に当てはまらないと判断した。以上のことから、ゼラチン濃度は 3%として以降の検討を実施することとした。

ゼラチン試料の安定性を検討した結果、ゼラチン試料 10 本の生菌数平均値の経時

的变化、併せて各測定時の標準偏差、変動係数および冷蔵から取り出した直後の外観については、生菌数は接種直後（0 週）から 28 週目まで殆ど変動することがなかったため、安定であると判定した。また、変動係数も 0.05 から 0.07 の間にあり、検体間のばらつきも非常に少ないと考えられた。併せて、冷蔵保管中にゼラチンが変性して液状に変化することもなかったことから、安定性に特に問題はないと考えられた。

ゼラチン試料でフィルター付き検体袋を用いた場合の影響について、ゼラチン試料 10 本についてフィルターなし検体袋、2 社のフィルター付き検体袋を用いて生菌数測定を実施した。その結果、フィルターなし検体袋の生菌数平均値を 100%とした場合のフィルター付き検体袋の各生菌数測定値の比率は 80%以上であり、フィルターなし検体袋の生菌数とほぼ同等であると評価できた。また、各項目の変動係数も 0.1 以下と低い数値であることから、フィルター付き検体袋を用いることによる生菌数への影響は低減化できると示唆された。

外部精度管理調査試料としての運用するために、平成 27 年度および平成 28 年度の外部精度管理調査の統計結果を示した。フィルター付き検体袋を使用する参加機関が大半である状況は平成 27、28 年度とも変わらないにもかかわらず、平成 28 年度の方が変動係数が低くなったことから、実際の運用からもゼラチン試料の方がフィルター付き検体袋の影響が生菌数結果に反映されにくいことが明らかとなった。

しかしながら、アンケート結果を集計したところ、ゼラチン試料を氷菓と同様に溶解操作できると明言されていなかったため、

半固体の状態が無理やりピペットで 10mL 秤量した、試験中にだんだん液体になって操作しにくかった、氷菓は液状での操作となっているが固体なので仕方なく重量で秤量した、などの意見が見られた。氷菓と同じ操作で試験ができるので良い、といった意見もあったことから、溶解操作について明文化することで混乱を避ける必要があると考えられた。

4.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製：

平成 26 年度は、特定原材料（落花生）調査試料の作製を検討した。基材に添加する落花生タンパク質の調製を行うにあたり、通知法の落花生標準品規格では千葉県産バージニア種落花生を使用することとしているが、品種名や加熱の有無等は不明である。そこで、基材の添加に適した落花生を選定するために、生落花生 3 種類〔国産生落花生（千葉半立種）、中国産生落花生およびアメリカ産生落花生〕およびゆで落花生 1 種類〔国産ゆで落花生（千葉半立種）〕からそれぞれタンパク質を抽出し、各落花生タンパク質抽出液中の総タンパク質濃度を比較した。その結果、生落花生 3 種のタンパク質濃度は落花生標準品規格に記載のタンパク質濃度をいずれも満たしていた。一方、国産ゆで落花生のタンパク質濃度は落花生標準品規格を上回っており、国産生落花生の約 2 倍のタンパク質が抽出された。次に、各落花生タンパク質抽出液をそれぞれ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう希釈後、3 種類の ELISA キットで測定し、落花生タンパク質の回収率を比較した。その結果、生落花生 3 種の回収率は各キット内でそれぞれ同程度であ

ったが、キット間で比較すると、P キット、N キット、M キットの順に高かった。また、国産ゆで落花生の回収率は N キットでは 75.4% であり、同キットの国産生落花生の回収率と同程度であったが、M キットおよび P キットではそれぞれ 22.5% および 51.1% と低く、同キットの国産生落花生の回収率の約 2 分の 1 であった。生落花生よりもゆで落花生で回収率が低かった原因として、加熱処理による落花生タンパク質の変性が考えられた。そこで、ゆで落花生中のタンパク質が変性しているかを確認するために、各落花生タンパク質抽出液について SDS-PAGE を行い、泳動像を比較した。その結果、国産ゆで落花生は生落花生 3 種に比べて全体的にバンドが不明瞭であり、高分子側のバンドに消失または減少がみられた。このことから、国産ゆで落花生のタンパク質は加熱処理により変性していることが確認された。また、加熱処理した食品中の落花生タンパク質を M キットまたは P キットで測定した場合、測定値が実際の値よりも低くなる可能性が考えられた。以上のことから、添加用落花生タンパク質溶液には国産ゆで落花生を除く生落花生 3 種のうち、ELISA 測定値の比較的高かった中国産生落花生を使用することとした。

落花生添加試料の作製検討については、選定した中国産生落花生から抽出した落花生タンパク質溶液をこしあんおよびチョコレートクリームにそれぞれ添加し、落花生タンパク質添加試料を作製した。この落花生タンパク質添加試料について、調製直後、冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の回収率を調べ、安定性を評価した。なお、回収率は 3 種類の ELISA キットの測定値が

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 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の測定値から算出したタンパク質量を保存前（調製直後）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、調製直後の回収率は、こしあん試料およびチョコレートクリーム試料でそれぞれ P キットが 170.3%、133.6%、N キットが 104.4%、64.0%、M キットが 73.5%、73.7% と、P キット、N キット、M キットの順に高く、落花生タンパク質溶液の結果と同様にキット間差が大きかった。さらに、N キットおよび P キットでは試料間差も大きく、こしあん試料はチョコレートクリーム試料に比べて回収率が高かった。冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の安定性は、P キットでは保存期間が長くなるにつれて回収率が低くなる傾向がみられたが、N キットおよび M キットでは両試料の安定性がいずれも 100% 程度と良好であった。以上のことから、3 種類のうち 2 種類の ELISA キットでは 2 ヶ月間安定であることが確認されたことから、これらの試料が外部精度管理用調査試料として適用できる可能性はあるが、長期安定性を確保するための更なる検討が必要であることが示唆された。

落花生 ELISA キットの測定に影響を及ぼす食品について検討した。落花生 ELISA キットの食品夾雑物の影響については、こしあん試料とチョコレートクリーム試料の落花生 ELISA キットの測定値はキット間差に加え、基材間差も大きかった。このことから、落花生 ELISA キットの測定は食品夾雑物の影響を受けやすいと考えられた。また、現在使用している変性剤に亜硫酸ナトリウ

ムを用いた改良型 ELISA キットは、発売されてからの期間が浅く、様々な食品に対する反応性についての知見が少ない。そこで、落花生の外部精度管理用調査試料に用いる適正な基材を探索することを目的として、落花生 ELISA キットにおける食品夾雑物の影響について検討した。

検討には 20 種類の食品（こしあん、白がゆ、かぼちゃペースト、とうもろこしペースト、ブロッコリーペースト、豆腐、高野豆腐、カスタードクリーム、いちごジャム、ビスケット、鶏がらスープの素、いりごま、米粉、小麦粉、ハンバーグ、あさり缶詰、魚肉ソーセージ、鯖缶詰、オリーブオイル、ココアパウダー）を使用し、以下に示す 2 種類の方法で試験を行った。

- (1) 食品抽出液からの落花生タンパク質の添加回収試験：ELISA キットの測定段階における食品夾雑物の影響を評価するために、20 種類の食品から N キット付属の抽出液を用いてそれぞれ抽出を行い、得られた食品抽出液に各キット付属の落花生標準品を 12.5 ng/mL となるよう添加して ELISA 測定を行い、添加量に対する回収率を求めた。
- (2) 食品からの落花生タンパク質の添加回収試験：ELISA キットの抽出段階における食品夾雑物の影響を評価するために、抽出を行う前の 20 種類の食品に落花生タンパク質溶液を 5.0 $\mu\text{g/g}$ となるよう添加後、N キット付属の抽出液を用いて抽出および測定を行い、併行して行った落花生タンパク質溶液の測定値に対する回収率を求めた。まず、(1) の回収率（横軸）についてキット毎に比較した結果、M キットではすべての食品で回収率が 80~120% の範囲内、N キットではほとんどの食品で回収率が 90~

130%の範囲内にあり、いずれも良好であった。一方、Pキットではほとんどの食品で回収率が110~190%程度と範囲が広く、200%を超える食品もあった。また、Nキットにおいて、回収率が150%を超えた食品3種(ココアパウダー、いりごま、小麦粉)については、食品抽出液落花生標準品を添加しないブランク試料でもELISA測定値が1 µg/g以上であったことから、疑陽性反応あるいは原材料に落花生が含まれていた可能性が考えられた(データは示さず)。次に、(2)の回収率(縦軸)についてキット毎に比較した結果、Mキットでは回収率が全体的に低かったが、ほとんどの食品で60~110%程度と比較的良好であった。一方、NキットおよびPキットではほとんどの食品で回収率がそれぞれ90~150%、100~160%程度と広範囲であった。また、NキットおよびMキットではハンバーグ、Pキットではココアパウダーで回収率が50%以下であった。これらの食品については、原材料中に測定阻害物質が含まれている可能性が考えられた。かぼちゃペースト、とうもろこしペースト、鶏がらスープの素、オリーブオイルの4食品はすべてのELISAキットで回収率が80~120%であったことから、外部精度管理用調査試料に用いる基材として利用できる可能性が考えられた。

さらに、(1)と(2)の回収率のプロット範囲の形状から各キットにおける食品夾雑物の影響について比較した結果、Mキットでは、プロット範囲が小さく、ELISA法の測定段階および抽出段階のいずれでも食品夾雑物の影響を受けにくいと考えられた。Nキットでは、プロット範囲が縦に長く、ELISA法の測定段階よりも抽出段階で食品

夾雑物の影響を受けやすいと考えられた。Pキットではプロット範囲が右上がりであり、(1)で回収率の低い(または高い)食品は(2)でも同様の傾向があることから、PキットはELISA法の抽出段階よりも測定段階で食品夾雑物の影響を受けやすいと考えられた。

プロアントシアニジンを含む食品による測定阻害については、落花生の主要なアレルゲンであるAra h1はプロアントシアニジンと結合して複合体を形成することが知られており、PキットはAra h1に対するモノクローナル抗体を用いて測定するため、ポリクローナル抗体を用いて測定する他キットに比べプロアントシアニジンの影響を受けやすいと推測された。また、(2)においてPキットの回収率がプロアントシアニジンを含むココアパウダーでのみ極端に低かったことから、プロアントシアニジンが測定を阻害している可能性が考えられた。そこで、プロアントシアニジンを含む食品6種(ココアパウダー、ミルクココア、チョコレート、シナモン、ミックスベリー)について落花生タンパク質の添加回収試験を(2)と同様の方法で行い、回収率を比較した。なお、プロアントシアニジンを含む食品は「米国農務省(USDA)データベース(Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods)」(<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/PA/PA.pdf>)を参考に選択した。その結果、Nキットでは回収率が低い食品はなかったが、MキットおよびPキットではプロアントシアニジンを特に多く含むシナモンで回収率がそれぞれ15.9%、3.6%と極めて低かった。このことから、P

キットに加え、プロアントシアニジンの特
に多く含む食品では M キットでも、プロア
ントシアニジンにより測定が阻害される可
能性が考えられた。

ゼラチン添加抽出液による回収率の向上
については、プロアントシアニジンによる
測定阻害は小麦グリアジン測定用の ELISA
キットにおいても確認されており、プロア
ントシアニジンと結合性のあるゼラチンを
抽出液に添加することで回収率が向上する
との報告がある。落花生 ELISA キットにお
いても測定阻害にプロアントシアニジンが
関与している場合、ゼラチンを抽出液に添
加することで、プロアントシアニジンがゼ
ラチンに吸着され、回収率が向上すると考
えられた。そこで、回収率が極端に低かつ
たココアパウダーおよびシナモンについて、
プロアントシアニジンと結合性のある魚ゼ
ラチン (FG) およびウシゼラチン (BG) を
添加した抽出液を用いて落花生タンパク質
の添加回収試験を (2) と同様の方法で行い、
回収率が向上するか確認した。その結果、
測定阻害がみられた M キットのシナモン、P
キットのココアパウダーおよびシナモンで
は無添加区よりもゼラチン添加区で回収率
が高かった。このことから、ゼラチン添加
による回収率の向上が落花生 ELISA キット
においても確認された。なお、M キットの
ココアパウダーと両キットの落花生タンパ
ク質溶液においてゼラチンの添加による回
収率の減少がみられたが、これはゼラチン
の成分が ELISA の抗原抗体反応を阻害した、
あるいはゼラチン添加抽出液に粘性がある
ため、落花生タンパク質の抽出効率が低下
したことが原因であると考えられた。以上
のことから、シナモンやココアパウダーを

含む食品を基材として採用する場合、落花生
タンパク質の回収量が実際の含有量より
も低くなることが予想されるが、基材への
ゼラチン添加により改善できる可能性が考
えられた。また、より難易度の高い外部精
度管理用調査試料を作製する場合にはこれ
らプロアントシアニジンを多く含む食品が
利用できると思われる。

平成 27 年度は、特定原材料(小麦)調査試
料の作製を検討した。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
濃度を測定した結果、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。

ラージスケールでの試料作製を行った。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。次に、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 ヶ月後に同様にして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% の範囲内であったことから、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。

次に、特定原材料(そば)調査試料の作製を検討した。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。そばタンパク質溶液は、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中国北方産そば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。各そばタンパク質溶液は、総タンパク質濃度を測定後、10 µg/mL となるよう希釈し、3 種類の新 ELISA キットにより測定した。各そばタンパク質溶液の総タンパク質濃度を測定した結果、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について、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。

ラージスケールでの試料作製を検討した。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。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。

日本ハムキットの検量線吸光度の比較を検討した。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。

平成 28 年度は、通知法改正前および通知法改正後の ELISA キットによる卵タンパク質添加試料の適用性評価について検討した。通知法改正前および通知法改正後の ELISA キットによる卵タンパク質添加試料の回収率を検討した結果、全卵添加試料について、ベビーフ

ード試料およびカボチャペースト試料共に、通知法改正前のデータは各社キット間でばらつきがあるものの、約 90～105%と良好な回収率が得られた。これに対し、通知法改正後のデータは改正前よりも測定値が低いものの 80%前後の良好な回収率が得られた。但し、各社キット間でばらつきがほとんどなかった点では改正前におけるデータと異なった。

また、通知法改正後のキットについては、全卵添加試料だけでなく、卵タンパク質を乾燥全卵粉末に変更した試料の回収率についても検討した。これは、乾燥全卵粉末は全卵よりも扱いやすく、長期保存が可能なため、安定した品質の外部精度管理調査試料を作製できると考えたためである。その結果、乾燥全卵添加試料は全卵添加試料よりも高い回収率が得られ、約 85～105%と良好であった。ただし、全卵添加試料は 3 種類のキット間で回収率がほとんど変わらなかったのに対し、乾燥全卵添加試料ではプリマハムキットの回収率が他の 2 種類のキットよりも高めに得られた。この傾向は、ベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料のいずれでも同じであった。以上より、通知法改正後の ELISA キットで測定した卵タンパク質添加試料の回収率は、全卵添加試料および乾燥全卵粉末添加試料共に 80～110%の範囲内と良好であり、検討に用いた試料が同一でないため単純比較することはできないものの、通知法改正前の回収率と大きく乖離しなかったことから、通知法改正後の ELISA キットでもこれまで作製してきた卵タンパク質添加試料が適用可能であることが示された。なお、これ以降の検討はより高い回収率が得られた乾燥全卵粉末添加試料について行った。

外部精度管理調査試料の均質性については、試料作製直後（0 日目）と発送前（92 日目）

の添加量に対する回収率および変動係数をキットの種類ごとに比較すると、回収率、変動係数共に大きな相違は認められず、回収率では最大で6.7%、変動係数では最大で0.023の変動幅であった。これらの変動幅は測定誤差の範囲内と考えられたために、作製した試料は均質であると判断した。ただし、測定値は測定キットごとに特徴的な回収率を示した。プリマハムキットでは約110%台と高めの値を示したのに対し、モリナガキットでは約80~90%、日本ハムキットでは約75~85%と低めの回収率を示し、この傾向は試料が異なっても同様であった。

外部精度管理調査試料の安定性については、試料作製から調査期間終了までに定期的に試料を測定し(0日目、34日目、69日目、92日目、126日目および194日目、0日目および92日目は $n=10$ 、その他は $n=4$ で測定)、特に、外部精度管理調査試料発送前の安定性は92日目、調査期間終了後の安定性は194日目に確認した。その結果、試料1および試料2の安定性は共に変動はあるものの90%~110%の範囲内であった。特に試料配付前と調査期間終了後では若干の低下がみられたものの、試料1および試料2のいずれにおいても全てのキットで安定性の変化率が10%以内であったことから測定誤差の範囲内と考えられた。従って、卵タンパク質添加試料1および試料2については194日目までの長期安定性が確認できた。なお、これらの結果から今回作製した試料は安定であり、外部精度管理試料として採用できるものと判断した。

外部精度管理調査の結果(回収データの分布)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た。モリナガキットと日本ハムキットの測定値の分布について比較

すると、わずかに日本ハムキットのほうが分布範囲が狭い傾向にあり、変動係数で比較するとモリナガキットが0.08~0.1、日本ハムキットが0.06~0.07と日本ハムキットのほうがわずかに小さかった。また、同一試料のキット間差は試料2のほうが大きかった。

また、種々の方法で集計した結果を示す。まず、キット別集計結果から、モリナガキットについては、試料1では、 \bar{X} 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、 R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が1機関あった。全18機関のロバスト平均値 \pm ロバスト標準偏差は 9.694 ± 0.963 $\mu\text{g/g}$ であった。これに基づき z -スコアを算出したところ、 z -スコアの絶対値が2以上の機関は1機関であり、絶対値が3以上の機関はなかったことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

試料2では、 \bar{X} 管理図で管理限界線の範囲を超えたデータはなかったが、 R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が1機関あった。全18機関のロバスト平均値 \pm ロバスト標準偏差は 9.136 ± 0.750 $\mu\text{g/g}$ であった。これに基づき z -スコアを算出したところ、 z -スコアの絶対値が2以上の機関は2機関であり、絶対値が3以上の機関はなかったことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

日本ハムキットについては、試料1では \bar{X} 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、 R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が1機関あった。全18機関のロバスト平均値 \pm ロバスト標準偏差は 8.893 ± 0.553 $\mu\text{g/g}$ であった。これに基づき z -スコアを算出したところ、 z -スコアの絶対値が2以上の機関は2機関であり、絶対値が3以上の機関はなかったことから、明らかな異常値ではないものと考えられた。

試料 2 では、Xbar 管理図、R 管理図の両者において管理限界線の範囲を超えた機関はなかった。全 18 機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は $8.003 \pm 0.522 \mu\text{g/g}$ であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 1 機関であり、絶対値が 3 以上の機関はなかったことから、明らかな異常値ではないと考えられた。

プリマムキットについては、測定した機関はいなかったため、統計解析は実施しなかった。

キットのロット間の測定値の比較を行った。今回の外部精度管理調査において、日本ハムキットについては 1 ロットのみであったが、モリナガのキットにおいて合計 6 ロットが外部精度管理調査に用いられていた。そこで、モリナガキットにおけるロット間差について観察した。その結果、若干の測定値の変動はあるものの、試料 1、試料 2 のいずれにおいても明確なロット間差は認められなかった。

測定値の相関性については、試料 1 と試料 2 の各機関における測定値のモリナガキット内および日本ハムキット内における相関性を検討した。モリナガでは相関係数が 0.914、日本ハムでは 0.823 といずれも非常に高い相関を認めた。

同様に試料ごとにキット間の相関性を検討し、結果を図 20 に示した。その結果、試料 1 では相関係数が 0.598、試料 2 では 0.619 といずれも高い相関を認めた。

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：

外部精度管理調査結果における DNA 溶液試料の解析について、CpTI コメの検査法は定性試験ではあるが、測定にリアルタイム

PCR を使用しており、増幅が認められた測定については、Ct 値が得られる。そこで、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。DNA 溶液試料は DNA 抽出および濃度調整の操作が含まれないため PCR 反応液に含まれる銕型の量には機関間差が少なく、Ct 値はほぼ一定になると予想される。このため、試料 A、試料 B および試料 C 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、機関番号 13 の報告値がすべての試料で平均値から大きく離れていた。このため、2 シグマ処理 (z-スコアの絶対値が 2 以上のデータを除く操作) を実施したところ、1 機関 (機関番号 13) が除外され、正規確率プロットはいずれの試料においてもひずみ、とがりが小さくなり、正規分布に近い形状となった。2 シグマ処理で除外された機関番号 13 はすべての CpTI 検出用試験で Ct 値が他機関より 4 サイクル程度大きいため、プライマー・プローブの濃度調整に問題があった可能性が示唆された。2 シグマ処理後の z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関は試料 A では機関番号 11、機関番号 29、試料 B では機関番号 11、機関番号 15、機関番号 29、試料 C では機関番号 11、機関番号 29 であった。試料 A、試料 B および試料 C のいずれでも z-スコアが 2 以上であった機関番号 11 および機関番号 29 について、リアルタイム PCR 測定時の増幅曲線を確認したところ、ベースラインの継続的増加が認められた。ベースラインの増加分は増幅による蛍光増加分から差し引かれるため、増幅

曲線は緩やかになり、Ct 値が大きくなったと考えられた。また、試料 B において z-スコアが -2 以下であった機関番号 15 については、反応がプラトーに達した時の蛍光強度が他の機関に比べて大きいことから、PCR 反応液の調製あるいは装置の設定が Ct 値に影響した可能性が考えられた。以上のことから、DNA 溶液試料において 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。

コメ粉砕物試料について平成 24 年度と同様に Ct 値の差を用いた解析を行い、DNA 濃度の誤差を補正できるか検討した。コメ陽性対照用試験および CpTI 検出用試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施した場合、試料 1 では DNA の濃度差による Ct 値のばらつきが解析結果に影響している可能性が考えられた。一方、試料 4 では DNA の濃度差による Ct 値のばらつきが小さく、解析結果への影響は比較的少ないと考えられた。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、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。また、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。

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、各機関でばらついていたが、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、上述した測定機関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試料の作製検討：

直接競合 ELISA は、カビ毒の分析に広く利用される。必要工程が少ないため、迅速な測定に適している。まず、固相抗体と酵素標識物の濃度を最適化するためにチェックボードタイトレーションをし、吸光度 1.0 - 1.5 となるような濃度の条件を 4 つ選んだ。この 4 つの条件を用いて AFB₁ の標準曲線を作成し、阻害率を求めた。

最も高感度の直接競合 ELISA を構築できる条件は、MoAb2-3: 40 ng/mL, AFB₁-HRP: 5.0 ng/mL または、MoAb2-3: 40 ng/mL, AFB₂-HRP: 100 ng/mL であった。HRP 標識物を作製する際、AFB₁ のほうが AFB₂ と比べて安価で入手しやすい。また、使用量も 1/20 で済むため、最終的に前者の条件を使って直接競合 ELISA を構築した。

阻害感度の比較に用いられることが多い 50%阻害濃度 (IC₅₀ 値) においては、AFB₁: 90 pg/mL、AFB₂: 100 pg/mL、AFG₁: 130 pg/mL、AFG₂: 190 pg/mL となった。同じ抗体を用い

て以前に公表した間接競合 ELISA の結果と比較して、20 倍高感度化することができた。

測定範囲 (IC₂₀ 値から IC₈₀ 値の範囲と定義) は、AFB₁: 50-230 pg/mL、AFB₂: 50-270 pg/mL、AFG₁: 60-390 pg/mL、AFG₂: 65-700 pg/mL となった。測定下限濃度は、最も低濃度に設定された EU の規格値 4µg/kg と比較して AFG₂ でも 61 倍低く、これらの規格値を測定するために十分高感度な直接競合 ELISA が構築できたと考えられる。

しかしながら、各 AF に対する感度に差が見られ、また、標準曲線の勾配は各 AF で異なっており、B 群より G 群の方がなだらかなになった。そのため、同じ測定結果 (吸光度) であってもサンプル中の各 AF の存在比によって、考えられる真の総 AF 濃度は異なる。その差は、IC₂₀ 値近傍を測定に用いた場合には最大 1.4 倍と見積もられ、一方、IC₈₀ 値近傍を用いた場合には最大 3 倍と見積もられる。このことから、実試料を測定する際には、IC₂₀ 値近傍を用いることで、比較的正確な総 AF 濃度を測定できると考えられる。いずれにしても、本 ELISA による測定結果では、その阻害率を考慮してぶれ幅を見積もる必要がある。

これらの結果から、開発した直接競合 ELISA は、食品中の総 AF の基準値を測定するのに適しており、最大 3 倍程度反応性が異なるももの 4 種類の AF の総量を測定できることが判った。測定結果の評価には、各々の結果における阻害率に応じた振れ幅を見込むことが重要である。

構築した直接競合 ELISA が、食品中の AF を定量可能なことを確認するために、添加回収試験を行った。抽出と希釈操作により、ピーナッツバター中の AF は、直接競合

ELISA に供試されるまでに最低でも 32 倍希釈される。そのため、食品中の定量下限濃度 (IC₂₀ 値) は、AFB₁: 1.6 ng/g、AFB₂: 1.6 ng/g、AFG₁: 1.9 ng/g、AFG₂: 2.0 ng/g となった。AF に汚染していないピーナッツバターに AFB₁, B₂, G₁, G₂ を各 2 ng/g と 10 ng/g 添加し、メタノールで抽出し、回収試験を試みた。検量線には、添加した各 AF の標準曲線を用いた。その結果、添加した AF を検量線にすることで 87%-119% と良好な回収率を得ることができた。構築した直接競合 ELISA は、基準値以下の濃度のピーナッツバター中の各 AF を精確に測定できた。ピーナッツバター中のマトリックス影響のない堅牢な直接競合 ELISA を構築できたことが明らかになった。

食品を汚染する各 AF の分布は、当然ながらサンプルごとに異なる。構築した直接競合 ELISA は、混合して汚染している AF を区別して定量することはできないため、市販のピーナッツバターを 23 検体集めて、その中に含まれる各 AF の濃度を LC-MS/MS で調べた。その結果、23 検体中 17 検体で AF が検出された。AF が汚染した全ての検体で、メジャーな AF は B₁ であり、その汚染濃度は 0.4-5.1 ng/g の範囲で分布していた。さらに、G₁ と G₂ の検出例はなく、B₂ のみ 4 検体で 0.5-1.0 ng/g と微量検出した。このように、供試したピーナッツバターでは、B₁ が主な汚染 AF だった。

そこで、直接競合 ELISA においても、最も感度の高い B₁ と最も感度の低い G₂ を検量線にして総 AF 濃度を測定し、LC-MS/MS と比較した。LC-MS/MS で陰性のものは ELISA でもすべて陰性だった。また、LC-MS/MS で 0.4-0.5 ng/g だったものは、ELISA では感

度が足りずに陰性だった。一方、LC-MS/MS で 0.6 ng/g 以上の結果を得た場合は、ELISA でも濃度依存的な測定値を得た。

このように構築した ELISA は、LC-MS/MS における感度で考えると AFB₁ が 0.6 ng/g 以上の濃度であれば検出が可能と考えられた。また、規格値付近の濃度での偽陰性は認められないことから、スクリーニング検査としては十分な性能を有すると考えられた。LC-MS/MS と ELISA の両方で測定値を得たサンプルを用いて、その相関性を調べた結果、B₁ を検量線にした場合は、 $y = 1.08x + 0.86$ 、 $R^2 = 0.99$ と ELISA に 0.86 ng/g の切片を認めたが、勾配は 1.08、決定係数は $R^2 = 0.99$ と非常に良好な相関性を得た。切片が生じた理由については不明だが、LC/MS/MS は有機溶媒に AF を溶解しており、ELISA はメタノールを含む水溶液に溶解していることから、溶媒の異なる希薄溶液中での溶解性などの挙動に依ることかもしれない。

一方、G₂ を検量線にした場合は、 $y = 1.91x + 0.66$ と ELISA 側が約 2 倍、勾配が高くなることが判った。また、決定係数も $R^2 = 0.88$ と B₁ による検量線と比較して低下した。決定係数が低い明確な理由は不明だが、G₂ の標準曲線の勾配が緩やかなため測定結果がばらつきやすいことが考えられる。従って、ピーナッツバター中の AF を ELISA で測定する場合は、AFB₁ 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。

B₁ を検量線にした場合、仮に G₂ のみが含まれているサンプルがあった場合における ELISA での測定結果は、標準曲線を利用して予測できる。例えば、G₂ のみが 4 ng/g 含

まれているサンプルの場合、測定結果は2.3 ng/g になると見積もられる。また、例えば、G₂のみが10 ng/g 含まれているサンプルの場合、測定結果は3.9 ng/g になると見積もられる。AFB₁ を検量線にして構築したELISA は、カットオフ値をこのように予測できる数値以下に設定することで総AFの規格値に対応できるスクリーニング検査に用いることができると考えられた。

E. 結論

1 尾花、梶村研究分担

平成26年度における研究結果から、汎用マトリックス添加検量線として、検量線D(PEG添加)およびE(VFJ+PEG添加)が使用可能であり、内部標準による補正も有効であることが示された。しかし、検量線Dは機関により補正効果および感度の安定性の差が大きく、効果が期待できない場合も考えられた。今回、共同研究を行った各機関の試験液調製方法、試験液濃度、注入量および分析機種は多種多様であったが、少なくとも検量線Eを用いた場合、全ての機関で補正可能な農薬の割合が最も高かった。

平成27年度における研究結果より、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。溶媒標準溶液を用いた検討において、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)および内部標準(TPP、PHN-d10)のピーク面積値の増大が確認され、この現象が普遍的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検討より、当該現象は食品マトリックス存在下において

も顕在化することが示された。また、試験液中の農薬数と乖離する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こ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、その対策方法として内部標準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ることが示された。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)の増大が観察され、内部標準による補正で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、原因のひとつであることが推測された。

平成28年度における研究結果より、魚種が異なる検体を同一バッチ内で処理する場合、合成抗菌剤の種類によっては、定量にマトリックスマッチングの検量線を使用することが不可欠であることが示された。牛乳中の乳脂肪分の量が測定結果に及ぼす影響について検討したところ、無脂肪乳より乳脂肪分の量が多い特濃加工乳の方がマトリックス効果を受けやすいことが確認された。また、牛乳および鶏卵を凍結することによるマトリックス効果発現への関与について調査したが、大きな影響は観察されなかった。さらに、同一試験液を用いた6機関との共同研究から、LC-MS/MSのマトリックス効果は複雑かつ多様であり、過去2年間研究を行ったGC-MS(/MS)とはメカニズム等が大きく異なることが示された。

2 斉藤研究分担

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。その結果、白コショウ中の総 AFs 分析およびチーズ中 AF-M₁ 分析においていずれも良好な真度と精度が得られ、残留試験法として十分に実用性があることが示された。

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 AFs および AF-M₁ の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、食品マトリックス中農薬を精確に分析することが可能になった。また、この方法によって平成 26 年度及び 27 年度外部精度管理調査（残留農薬検査）の調査試料を分析した結果、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。以上の結果から、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 法に関する成果を活用して、日本の検査機関においても広く適用されている QuEChERS 法と STQ 法の抽出能力

を精密に評価した。その結果、検討した試料及び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。今後より多種類の試料及び農薬についての検証が望まれる。

4 渡辺研究分担

4.1 理化学検査のための適正試料の作製：

精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の同等性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料の作製を目的とし、実分析をふまえた調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

玄米および精米については、新たに、固体試料である穀類の粉末試料を基材として、玄米および精米の適用の可能性を検討したところ、非加熱の玄米において比較的安定した添加農薬の回収が得られた。また、古米あるいは新米で、回収率および安定性に顕著な差が見られなかったことから、随時市販品を購入し作製できることが明らかとなった。また、基材に玄米を用い、冷凍条件下で保存することで、作製後 360 日間の安定性も確保された。これにより、余剰試料を内部精度管理試料として使用が可能であると考えられた。

枝豆については、基材成分である水分を 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、良好な均質性が得られ、1 バッチで 2 kg の作製を同様の方法で複数バッチ繰り返し実施することで実配付量の枝豆ペースト試料の作製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試料の作製：

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。

ゼラチン試料は安定性に問題なく、参加機関の使用する器材による試験結果への影響も少ない点で寒天試料より一般細菌数用の試料として優れていると考えられた。また、実際の運用時に取扱いについて若干の補足を加えることで、外部精度管理調査用の試料としての品質をさらに向上できると考えられた。

4.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製：

落花生 ELISA キットの測定に影響を及ぼす食品についての検討では、M キットは、ELISA 法の測定段階および抽出段階のいずれでも食品夾雑物の影響を受けにくかったが、N キットは抽出段階で、P キットは測定段階で食品夾雑物の影響を受けやすいことが明らかとなった。また、かぼちゃペースト、トウモロコシペースト、鶏がらスープの素、オリーブオイルの 4 食品はすべての

ELISA キットで落花生タンパク質の回収率が 80~120%であったことから、外部精度管理用調査試料に用いる基材として利用できる可能性が考えられた。

また、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。

卵添加試料を作製し、添加回収試験および安定性確認試験を行ったところ、通知法の改正後のキットにおいても過去に実施した際と類似の結果が得られた。また、かぼちゃペーストおよびベビーフードを用いた外部精度管理調査を試験的に 18 機関を対象に実施した。その結果、回収率を指標とした Xbar 管理図では管理限界線の範囲を超える機関は認められなかった。

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 CpTI 検出用試験の Ct 値の正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示していた。この時、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。

コメ粉碎物試料において、試料 1 では Ct 値をそのまま用いて解析した場合よりも、コメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差を用いて解析した場合のほうが正

規確率プロットの形状がより正規分布に近くなったことから、Ct 値の差を用いることにより DNA 濃度の誤差を補正できる可能性が示唆された。一方、試料 4 では、Ct 値をそのまま用いた場合のほうが Ct 値の差を用いた場合よりも正規確率プロットの形状はより正規分布に近かったが、Ct 値の差を用いた場合の z-スコアが 2 以上となった機関が、DNA 溶液試料の場合と一致したことから、試料 4 においても DNA 濃度の誤差が補正された可能性が考えられた。このことから、コメ粉砕物試料についても Ct 値を用いた解析により、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・高感度な総 AF 測定法の開発を目指した。その結果、基準値以下の AF が汚染したピーナ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 のスクリーニング検査に適用可能と考えられた。また、供試したピーナツバターには、いずれも B₁ がメジャーに含まれていた。即ち、B₁ 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。G₂ がメジャーに存在したとしても、測定結果は予想することができる。カットオフ値を決めて、それ以上の AF が存在していた場合は、LC-MS/MS で確認することで、総 AF の含量を確認することができる。構築した直接競合 ELISA は、信頼性の高いスクリーニング方法であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 渡辺卓穂：食品分析の信頼性を確保するための外部精度管理について（計測標準フォーラム講演会），計測標準と計量管理，64，6-11（2014）
- 2) K. Akutsu, M. Yoshimitsu, Y. Kitagawa, S. Takatori, N. Fukui, M. Osakada, S.

Yamaguchi, K. Kajimura, H. Obana, T. Watanabe, Evaluation of matrix-like effects in multiresidue pesticide analysis by GC/MS/MS, Journal of Separation Science, 40(6), 1293-1300 (2017)

2. 学会発表

- 1) 鎗田孝, 大竹貴光, 青柳嘉枝, 高坂典子, 鈴木達也, 渡辺卓穂: 同位体希釈質量分析法による食品衛生外部精度管理調査試料(残留農薬分析用)の分析: 第37回農薬残留分析研究会, 仙台, 2014
- 2) 梅津麻実, 米澤夏岐, 鈴木達也, 渡辺卓穂: 特定原材料の外部精度管理用調査試料の作製検討 落花生 ELISA キットの測定に影響を及ぼす原材料についての検討 : 第108回日本食品衛生学会学術講演会, 金沢, 2014
- 3) 山崎朋美, 佐藤夏岐, 平川由紀, 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 の構築とその反応特性: 第110回日本食品衛生学会学術講演会, 京都, 2015
- 4) 阿久津和彦, 吉光真人, 北川陽子, 高取聡, 福井直樹, 小阪田正和, 山口聡子, 並河幹夫, 伴創一郎, 大久保祥嗣, 中島涼, 丸山量子, 角谷直哉, 宮本伊織, 山下浩一, 西山隆之, 神藤正則, 山本直美, 高井靖智, 樋下勝彦, 梶村計志, 尾花裕孝, 渡辺卓穂: GC-MS(/MS)測定における農薬由来マトリックス効果の検討1 近畿地衛研6機関における共同研究結果 : 第111回日本食品衛生学会学術講演会, 東京, 2016
- 5) 吉光真人, 阿久津和彦, 北川陽子, 高取聡, 福井直樹, 小阪田正和, 山口聡子, 並河幹夫, 伴創一郎, 大久保祥嗣, 中島涼,

丸山量子, 角谷直哉, 宮本伊織, 山下浩一, 西山隆之, 神藤正則, 山本直美, 高井靖智, 樋下勝彦, 梶村計志, 尾花裕孝, 渡辺卓穂: GC-MS(/MS)測定における農薬由来マトリックス効果の検討2 近畿地衛研6機関における共同研究結果 : 第111回日本食品衛生学会学術講演会, 東京, 2016

H. 知的所有権の取得状況

なし