

linear and nonlinear calibration cases

3) 平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 [食品に残留する農薬、飼料

添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法]

表1 検討した農薬のMS/MS条件

グループB農薬

グループA農薬

		RT	分子量 MW	pos		neg	
				precursor	product	precursor	product
A1	アザメチホス	0.82	324	325	183		
A2	メトキシフェノジド	1.12	368	369	149		
A3	イフロバリカルブ	1.15	320	321	119		
A4	クロマフェノジド	1.15	394	395	175		
A5	ブタフェナシル	1.15	474	492	331		
A6	ナフロアニリド	1.19	291	292	171		
A7	ピラゾリネート	1.26	438	439	91	(290	143)
A8	フラチオカルブ	1.32	382	383	252		
A8-2	フラチオカルブ(2)*			383	195		

グループB農薬

		RT	分子量 MW	pos		neg	
				precursor	product	precursor	product
B1	チフェンスルフロン-メチル	0.5	388	388	167		
B2	プロモキシニル	0.57	275			276	81
B3	アイオキシニル	0.73	371			370	127
B4	ジクロルフロップ	0.86	234			233	161
B5	トリフルスルフロン-メチル	0.92	493	493	264		
B6-1	アシフルオルフェン	1.04	361			360	316
B6-2	アシフルオルフェン(2)*					360	195
B7	ホメサフェン	1.04	438			437	195

*フラチオカルブ及びアシフルオルフェンは、通知の条件では感度が低かったため、(2)の条件に変更した。

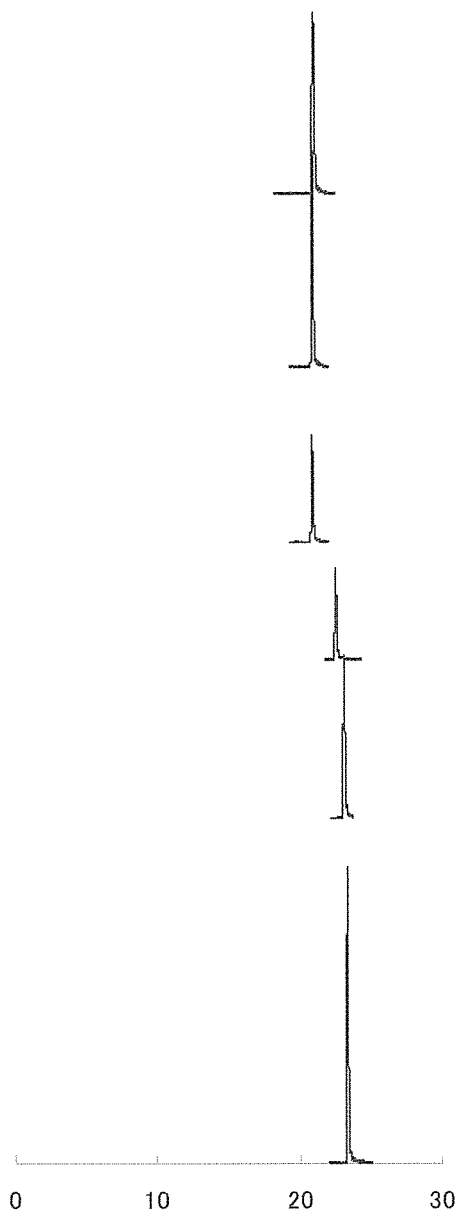


図1 グループAのクロマトグラム
 上から アザメチホス
 メトキシフェノジド
 イプロバリカルブ
 クロマフェノジド
 ブタフェナシル
 ナプロアニリド
 ピラゾリネート
 フラチオカルブ

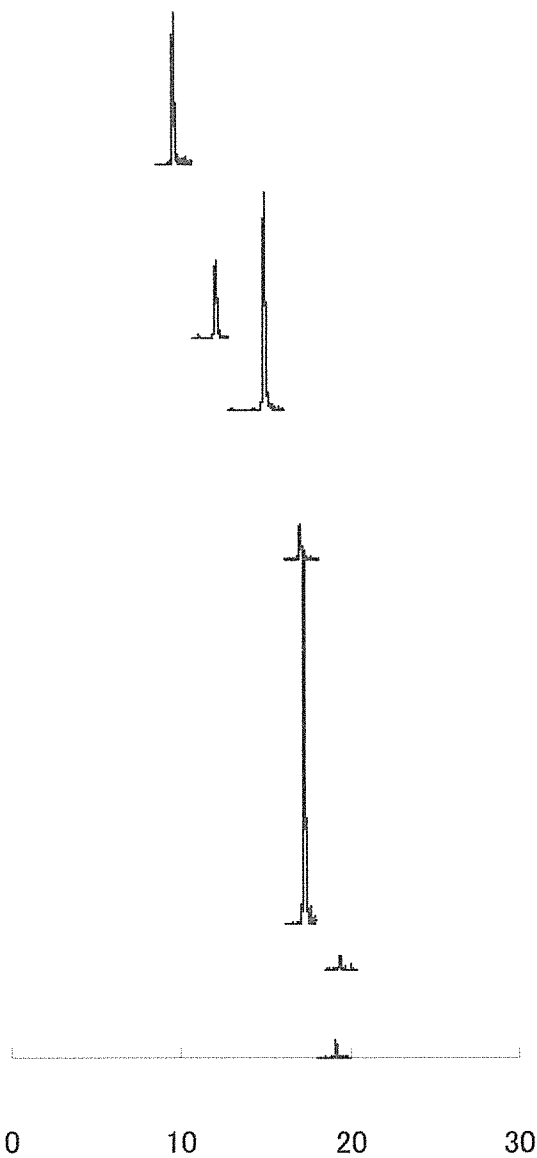


図2 グループBのクロマトグラム
 上から チフェンスルフロニーメチル
 ブロモキシニル
 アイオキシニル
 ジクロルプロップ
 トリフルスルフロニーメチル
 アシフルオルフェン
 ホサメフェン

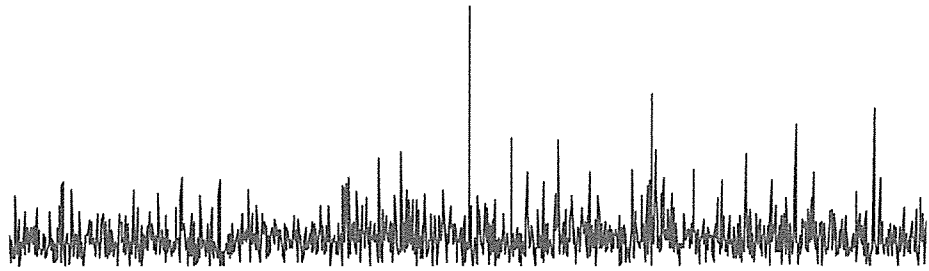


図3 アザメチhos検出条件のLC/MS/MS ベースライン

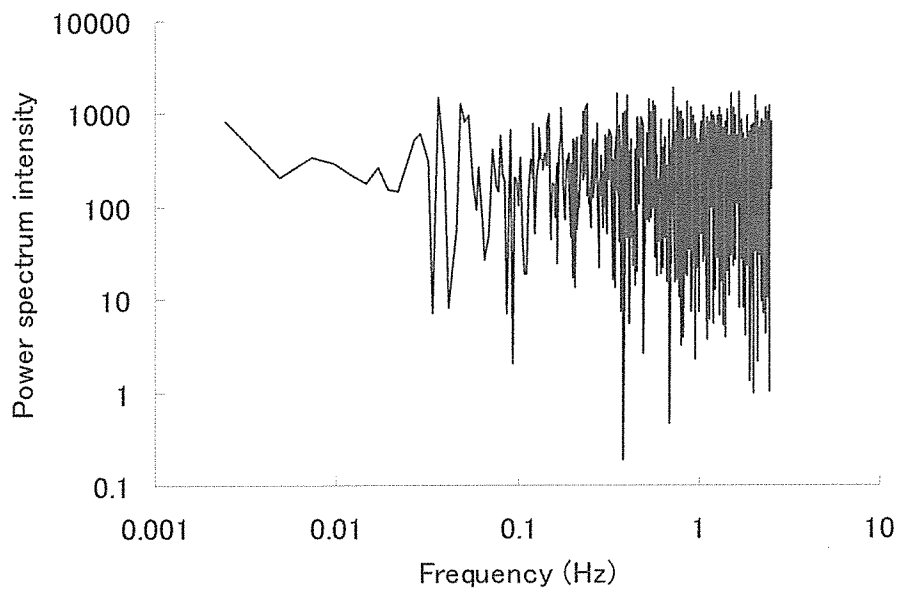


図4 アザメチhos検出条件のLC/MS/MS ベースラインのパワースペクトル

表2 農薬検出条件で得たベースラインのノイズパラメータ

農薬名	ノイズパラメータ		
	w	m	r
アザメチホス	17	0	0.5
メトキシフェノジド	23.5	0	0.5
イプロバリカルブ	13.3	0	0.5
クロマフェノジド	9.32	0	0.5
ブタフェナシル	6.5	0	0.5
ナプロアニリド	13.7	0	0.5
ピラゾリネート	25	0	0.5
フラチオカルブ	12	0	0.5
チフェンスルフロン-メチル	13.1	0	0.5
プロモキシニル	7.8	0	0.5
アイオキシニル	8.3	0	0.5
ジクロルプロップ	8.3	0	0.5
トリフルスルフロン-メチル	7.1	0	0.5
アシフルオルフェン	7.6	0	0.5
ホサメフェン	8.6	0	0.5

表3 検討した農薬の検出限界濃度

農薬名	検出限界(ppb)
アザメチホス	0.258
メトキシフェノジド	0.442
イプロバリカルブ	0.14
クロマフェノジド	0.1
ブタフェナシル	0.141
ナプロアニリド	0.376
ピラゾリネート	0.293
フラチオカルブ	0.1
チフェンスルフロン-メチル	1.2
プロモキシニル	1.4
アイオキシニル	0.5
ジクロルプロップ	3.3
トリフルスルフロン-メチル	0.24
アシフルオルフェン	9.3
ホサメフェン	5.5

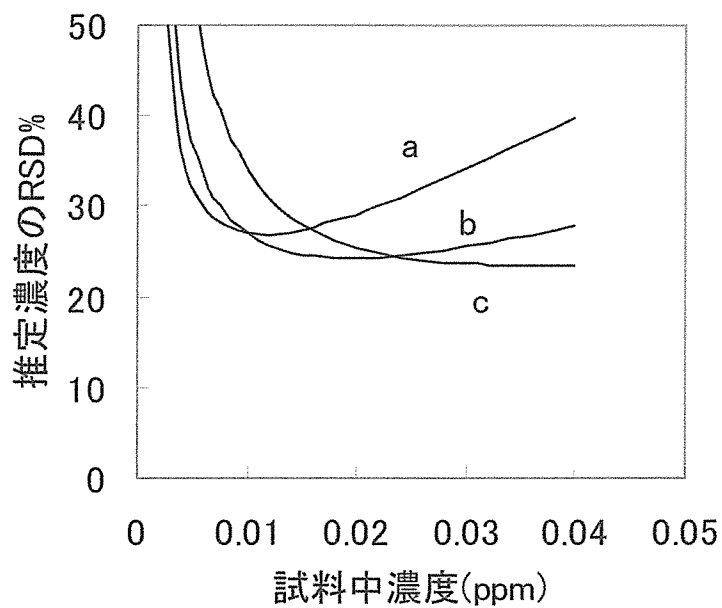


図5 添加濃度の精度プロファイルへの影響

添加量 a 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 ppm;

b 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm;

c 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ppm

検量線の傾き 100, ノイズSD 1, 前処理RSD 10% として計算した

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
分担研究年度終了報告書

食品マトリクスに応じた最適前処理技術の検討

主任研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院共生科学技術研究院 教授

研究要旨

食品分析における不確かさの問題は、化学試験法と微生物試験法で、前提条件が異なる。微生物試験では、化学試験法と異なり、標準試料が得がたい、という問題がある。そのため、標準となってきたのは、培養法の結果である。その問題がクローズアップされてきたきっかけは、迅速法に対する強い社会的要請である。すなわち、培養法は時間がかかるために、実用的には非培養法が不可欠であるが、そのバリデーションが難しい。非培養法では、得られたシグナルが微生物由来のものか、共存する不純物のものかの判断が難しく、したがって擬陽性、あるいは擬陰性の問題として議論されることが多い。培養法自体の不確かさの議論も必要であるが、実的要請に速やかに応えるには、非培養法の培養法に対する相関に関して不確かさを議論することが急務であろう。このような観点から、非培養法と培養法の相関は、少なくとも同じ原理の下で論じる必要がある。その具体的方法が生菌分離である。食品試料から生菌のみを分離し、これを非培養法で計数した後、その結果を、そのまま培養した後計数した結果と比較する、というものである。このような方法によって初めて培養法を基準にした不確かさの議論が出来るようになる。以上のような観点から、本年度は、最も汎用性の高い濾過法の適用食品を調査した後、濾過の困難なものに関して、密度勾配遠心分離法の適用条件を検討した。

A. 研究目的

食品試料中の化学成分の分析において、高い分析精度を得るためには、前処理によって、目的成分以外の成分をできるだけ分離除去しておくことが重要である。このことは、微生物試験法では一層重要である。すなわち、実用的に強く要請されている迅速な微生物試験法は通常、非培養法であり、一方、基準法とされている方法は培養法である。本来、原理が異なる方法を比較することは現象論に留まってしまう懸念がある。そこで、非培養法と培養法の相関は、少なくとも同じ原理の下で

論じる必要がある。その具体的方法が生菌分離である。食品試料から生菌のみを分離し、これを非培養法で計数した後、その結果を、そのまま培養した後計数した結果と比較する、というものである。

平成 17 年度は、生菌分離法として極めて有望と思われた超音波分離法に着目し、その開発グループであるスウェーデン、ルント大学より研究員を招聘して、共同実験を行った。その結果、脂肪成分や微生物生細胞が分離できる見通しを得た。しかし、本研究の本来の

首題である「分析法の不確かさ」に関する知見を得るには至らなかった。本年度は、最も汎用性の高い濾過法の適用食品を調査した後、濾過の困難なものに関して、密度勾配遠心分離法の適用条件を検討した。

B. 研究方法

市販の非培養法微生物計数装置（松下エコシステムズ社のバイオプローラ）を利用した。特性に濾過装置（図 1）で、数十種類の食品マトリクスを適用した結果、33 種類中 21 種類は、直接、生菌分離が可能であった。直接、濾過できない食品には、例えば、炭酸飲料、ジュース、茶、コーヒー、生乳、牡蠣、バター、などがある。そこで、これらから生菌分離するためには、個々に分離条件を検討し、最終的には分離プロトコルデータベースとしてまとめる必要があると考えられた。本年度の試験品として、生乳を選び、自然混入菌、および添加菌の分離条件を検討した。

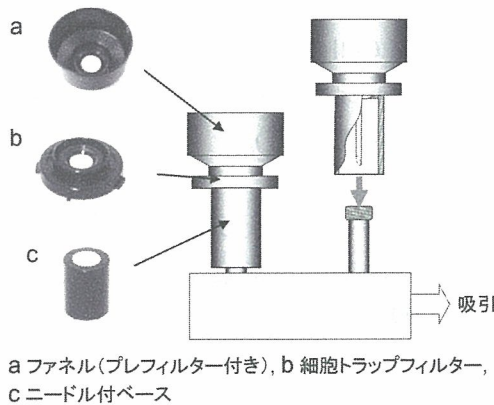


図1 バイオプローラ附属簡易型濾過装置

次に Ficoll を用いる密度勾配遠心分離法を適用した。しかし、直接の遠心分離では良好な分離が出来なかったため、界面活性剤として Triton X-100、また脱キレート剤として EDTA を併用することを考え、その濃度条件、

遠心条件等を検討した。

C. 研究結果

Ficoll を用いる生乳からの生菌分離を行った。その結果、

①1%Triton X-100、10 mM EDTA（終濃度）で、12,000 rpm×5 min

②Ficoll (10, 20, 30,40, 50%)で 25,000×20 min

の条件が適すること（図 2）、この結果、添加大腸菌はFicoll 30%および40%に回収されることがわかった（図 3）。

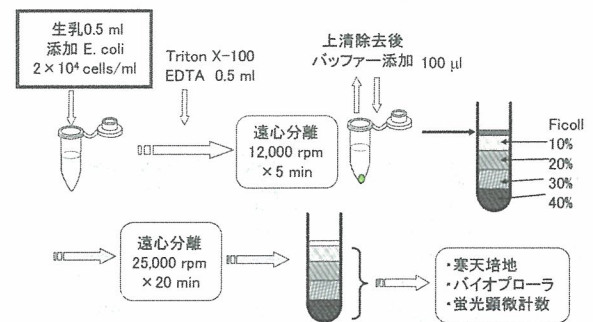


図2 生乳からの生菌分離法(1)

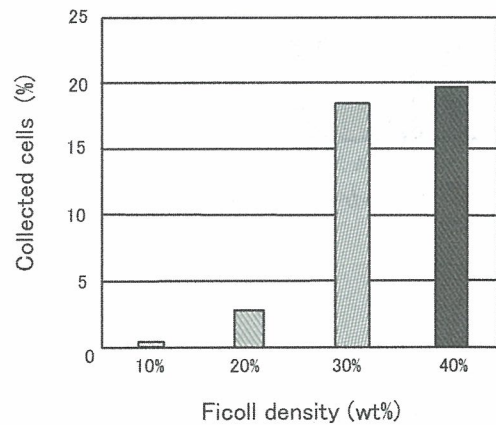


図3 Ficoll 密度勾配遠心分離法による生菌分離結果の一例

一方、自然混入菌の場合は、Ficoll 20%および30%に回収されることがわかった。そこで、下層に Ficoll、上層に生乳試料を希釈したリン酸バッファー（PB）とした、2層だけ

から成る試料を遠心分離した後、Ficoll 層の沈殿部と、PB/Ficoll 界面をそれぞれ分取し、寒天培地に播いて生菌を計数した。その結果、図 4 に示すように、PB/F20%界面、F20%沈殿、PB/F30%界面、および F30%沈殿に高濃度の生菌が回収された。また、各画分のコロニーの状態が異なることから、菌種の違いによって分離されたと考えられる。コロニーの状態は分離前とは異なることから、培養法では共存状態で直接コロニー計数する場合と、生菌分離した後に培養法でコロニー計数する場合では、必ずしも同等とは言えない、と推察された。

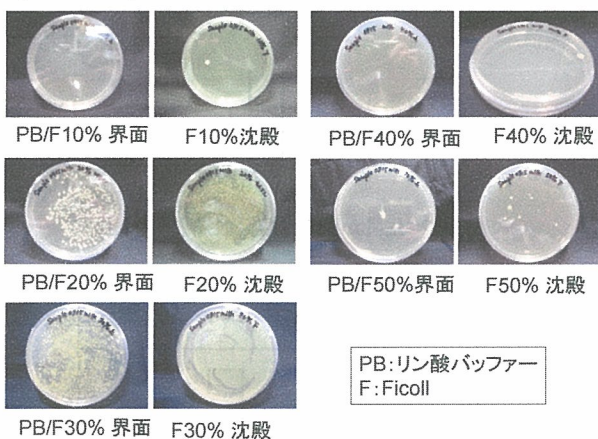


図4 生乳中から分離された自然混入菌

D. 結論

非培養法と培養法を同じ原理で議論するためには、生菌分離が不可欠と考えられる。さらに、複数の菌種が共存する食品では、菌種ごとの分離が必要と考えられる。すなわち、化学分析においては、化学成分毎に分離することが不可欠であるが、微生物試験法の場合も、それと全く同様である。

本年度は、培養法を基準とした非培養法の不確かさに関して、定量的な議論するには至らなかった。今後の課題である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表 (p.4 参照)

1. 論文発表

- T. Shimakita, et al.: Rapid Separation and Count of Viable Microbial Cells in Foods by Non-culture Method with a Bioplorer, a Focusing-free Microscopic Apparatus with a Novel Cell Separation Unit. *J. Food Protection* **69**, 145-151 (2006).
- K. Fujioka, et al.: Rapid Evaluation of the Efficacy of Microbial Cell Removal from Fabrics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 995-1002 (2006).
- T. Shimakita, et al.: Rapid Count of Microbial Cells in Dialysis Solution. *Ther. Apher. Dial.* (2007, in press)
- K. Fujioka, et al.: Automatic Mapping of Viable Microbial Cells Being Distributed in the Surface Layer of Cotton Fabrics. *Biocontrol Sci.* **12**, 31-34 (2007).

2. 著書・総説等

- 松岡英明：微生物の迅速検出と自動化、臨床病理レビュー特集第 136 号、(2006) pp92-99
- 松岡英明：微生物検査法の概略、“食品分析法の妥当性確認ハンドブック”サイエンスフォーラム (2007) pp189-198.

3. 学会発表

- 河西ちか子、他：生乳中の微生物迅速検出法の開発. 平成 18 年度日本防菌防黴学会大会、ICp-8、東京、2006 年 5 月.

F. 知的所有権の取得状況

なし