

Fig 農薬毎の室内精度 上 : 0.1 µg/g, 下 : 0.02 µg/g

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）
分担研究報告書

標準添加法における不確かさおよび検出限界の推定に関する研究

分担研究者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長
研究協力者 岩木和夫 奥羽大学薬学部

研究要旨

農薬等の LC/MS あるいは LC/MS/MS 分析において、マトリクスの影響を除くために標準添加法が使用される。標準添加法は1回の分析のために測定を4-6回実施する必要があり、試料中の分析対象濃度と添加する標準品濃度により真度及び精度が変化するため、通常の方法でバリデートして不確かさを求めることは困難である。本研究では、回帰直線の信頼区間を計算する方法を標準添加法に適用し、その精度及び不確かさを求める方法を検討した。さらに、実際の農作物の抽出液に農薬を添加して、標準添加のシミュレーションを実施し、真度の評価を行った。

この結果、検出限界近くの低濃度では、値が変動するとともに、濃度とピーク面積の関係、あるいはマトリクスからの影響により大きなバイアスが現れることが明らかとなった。

A. 研究目的

食品中の農薬等の分析においては、GC/MS 及び LC/MS のような質量分析計を検出系とした方法が繁用されている。これらの検出系は選択性に優れており、例えば UV 検出に比較して試料の前処理によるクリーンアップを容易にできる。一方、質量分析による検出においては、試料溶液中に残存する食品マトリクス成分が、分析対象物のイオン化率に大きく影響し、純粋な溶媒中の標準品とは異なるピーク強度となることが知られている。このような系での定量では、標準品溶液で作成した検量線では、試料中の真の濃度は求められない。イオン化率変動の影響を補正し、正しい分析結果を得るために、同位体内部標準を添加する方法がある。同位体内標準は分析対象とほぼ同じ挙動をとることが期待されるので、イオン化率が変化しても正しい定量値が得られる。しかしながら、800 種類ともいわれる分

析対象農薬全てに、同位体の内標準を揃えることは困難である。

同位体内標を使わずに、マトリクス等によるイオン化率の変動の影響を避ける方法として、標準添加法がある。標準添加法では、試料に既知量の分析対象物を段階的に添加して分析する。得られた測定値を添加量に対してプロットし、最小二乗法により直線を当てはめる。この回帰直線の X 切片が、元の試料中に存在する分析対象物の量となる。

標準添加法による定量では、1 試料の定量に 3-5 測定が必要であること、試料中の分析対象の濃度と添加する量の関係により、精度が変化すること等により、通常のパリデーションで行われるくり返しにより、精度あるいは不確かさを求めることが困難である。

平成 17 年度には、個々の測定濃度における測定値の標準偏差から回帰直線の標準偏差を求める方法¹⁾を、標準添加法

の回帰直線に応用し、不確かさを求める方法を検討した。本年度は、実際の農作物試料溶液に、種類の濃度の農薬を添加した試料を分析することにより、標準添加法のシミュレーションを行い、添加濃度と真度の関係について検討した。

B. 研究方法

LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I²⁾の対象となっている農薬から、マトリクスによりイオン化率が変動すると報告されている農薬を8種類(グループA)、LC/MSによる農薬等の一斉試験法 II²⁾から7種類(グループB)、選択した。選択した農薬を以下に示す。

LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I 対象農薬

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

LC/MSによる農薬等の一斉試験法 II 対象農薬

チフェンスルフロナーメチル
プロモキシニル
アイオキシニル
ジクロルプロップ
トリフルスルフロナーメチル
アシフルオルフェン
ホサメフェン

これらの農薬について分析条件を検討し、下記の条件を決定した。

分離条件

カラム :C18 内径 2 mm, 長さ 150 mm,
粒径 3 μm
カラム温度 : 40℃

移動相 : A液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液, B液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液

注入量 : 5 μL

それぞれの農薬の LC/MS/MS 条件を表 1 に示す。

データ取り込み

ノイズパラメータの解析及びピーク面積測定のためのデータの取り込み間隔は 200 ms とした。

検出限界の推定

各農薬の分析条件に従ってベースラインデータを取り込み、FUMI 理論に従ってノイズパラメータを計算した。計算には専用ソフトウェア TOCO を用いた。このパラメータと標準品ピークの面積から、検出限界を推定した。各農薬の検出限界を表 2 に示す。

標準添加法のシミュレーション

試料作物としてオレンジと大豆を選択し、それぞれ一斉試験法の試料調製方法に従い抽出溶液を作製した。これに上記農薬を添加した溶液を LC/MS により分析しそれぞれのピーク面積を得た。

添加濃度は表 2 に示した検出限界濃度の、3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21 倍とした。

添加回収模擬実験のデザイン

表 3 に添加濃度を示す。A~C は試料中の濃度を 3 とし、添加レベルの最大値が 3 倍, 5 倍, 7 倍とする場合に相当する。D と E は試料中濃度が 9 とし、添加濃度範囲が小さい場合と大きい場合とした。

C 研究結果

図 1 にチフェンスルフロナーメチルのクロマトグラムを示す。最低の添加量は検出限界の 3 倍で、かなり低濃度である

ため、ピーク部分に大きなノイズが現れている。

図2にはチフェンスルフロンメチルの添加濃度とピーク面積を示す。大豆、オレンジのどちらに添加しても、回帰直線の傾きはほぼ同じであった。また、添加濃度に対するピーク面積の関係は概ね線形であるが、高濃度側でやや面積が小さくなる傾向が見られ、全体として上に凸になっている。相関係数は大豆が0.93、オレンジが0.996であった。また、切片もゼロではなく、正の値となった。図1のクロマトグラムに示すように、今回の添加濃度は検出限界に近く、ノイズの影響を受けてピーク面積が変動しやすくなるため、このような結果となったと考えられる。

図3は、図2のプロットの上に、表3に示した添加濃度パターンで得られた会期曲線5種類を重ねた。5濃度から計算した回帰直線の傾きには変動が見られ、高濃度での回帰直線の傾きは小さくなり切片が大きくなる、逆に低濃度での回帰直線の傾きは大きく、切片が小さくなるといった、逆相関の関係が見られる。

図4はオレンジについて、各添加パターンでの測定値をプロットした。横軸は、最低濃度との差とした。このようにして作成した回帰直線が、実際の標準添加法で求められる直線となる。A~Cは最低濃度が3で、添加濃度範囲が異なっている。範囲の小さいAあるいはDでは、各点の僅かな面積の変動により、回帰曲線の傾きが変動する。標準添加法では、切片を傾きで割った値が分析値となるため、傾きの変動が分析値の変動に大きく影響することは、容易に想像できる。また、ピーク面積が濃度に対して直線ではなく、全体として高濃度側で傾きが小さくなることから、C、Eの添加パターンでは回帰直線の傾きが小さくなり、X切片が大きくなることから、推定された濃度は、大きな正のバイアスを示す。

表4及び5はA~Eの添加濃度パターンのシミュレーションから推定された試料中の農薬濃度と、真値(A~Cでは3、D~Eは9)に対するバイアスを示す。また、図5及び6にはバイアスをグラフとして示した。グループA、Bともに、Aの添加パターンでのバイアスが比較的小さく、高濃度の添加を含んだパターンでは大きなバイアスとなる農薬がみられた。これは、チフェンスルフロンメチル以外の農薬でも、高濃度でピーク面積と添加濃度の直線関係が失われるパターンが多くみられたためである。とくに、オレンジではこの傾向が顕著であり、大豆に比べて大きなバイアスを示している。これは、オレンジ抽出液を連続して注入した場合、感度の低下が著しい農薬があったことが原因の一つとなっている。

D. 結論

昨年度は標準添加法により得られた分析結果を検証するための実験系として、LC/MS/MSによる農薬一斉分析法を選択した。

選択した分析系において、それぞれの農薬の検出限界を求め、検出限界に基づいて標準添加法模擬実験の添加量を決定した。実際の農作物として大豆及びオレンジの抽出液を作成し、農薬を添加して標準添加法のシミュレーションを行った。この結果、検出限界近くの低濃度では、値が変動するとともに、濃度とピーク面積の関係、あるいはマトリクスからの影響により大きなバイアスが現れることが明らかとなった。

回収率あるいはイオン化率がマトリクスにより変動しやすい農薬の分析において、標準添加法は強力な方法であるが、標準添加法自体の不確かさの要因もあり、正確な分析のためには、適切な添加量、濃度とピーク面積の相関等を考慮することが必要である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

松田りえ子，岩木和夫，大羽宏，中村由美子，林 譲，米谷民雄；標準添加法の不確かさについて

日本薬学会第 127 年回（2007 年 3 月）

G. 知的所有権の取得状況

なし

参考文献

1) Y.Hayashi, R.Matsuda, R.B.Poe, *Analyst*, 121, 591-599 (1996)

2)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	イプロバリカルブ	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	ナプロアニリド	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	ジクロルブロッブ	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。

表2 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
イプロパリカルブ	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

表3 添加濃度のパターン

A	3	4	5	6	9
B	3	6	9	12	15
C	3	9	12	15	21
D	9	10	11	12	15
E	9	12	15	18	21

添加濃度は検出限界濃度に対する比で表示

表4 グループA農薬のシミュレーション結果

		大豆		オレンジ	
		推定値	バイアス%	推定値	バイアス%
アザメチホス	A	0.79	-73.6	4.15	38.5
	B	0.65	-78.3	2.69	-10.4
	C	0.63	-78.9	3.06	1.9
	D	6.18	-31.4	5.08	-43.5
	E	5.92	-34.2	7.60	-15.6
メキシフェノジド	A	2.24	-25.3	5.89	96.2
	B	4.05	34.9	9.80	226.8
	C	5.53	84.3	16.67	455.8
	D	16.59	84.4	22.49	149.8
	E	17.61	95.7	63.22	602.5
イプロバリカルブ	A	2.45	-18.2	3.60	20.1
	B	4.20	40.1	6.94	131.2
	C	4.00	33.2	5.44	81.3
	D	17.50	94.5	23.93	165.9
	E	12.11	34.6	14.92	65.8
クロマフェノジド	A	1.95	-34.9	3.92	30.5
	B	5.83	94.3	6.55	118.4
	C	8.42	180.6	7.01	133.5
	D	34.51	283.4	22.54	150.5
	E	34.90	287.8	18.55	106.1
ブタフェナシル	A	2.83	-5.7	3.67	22.3
	B	4.76	58.7	4.51	50.5
	C	5.63	87.8	4.41	47.0
	D	20.23	124.8	12.42	38.0
	E	18.30	103.4	12.25	36.1
ナプロアニリド	A	2.80	-6.7	3.76	25.3
	B	4.97	65.8	6.41	113.7
	C	5.87	95.6	12.33	310.9
	D	22.93	154.8	21.44	138.3
	E	17.34	92.7	56.25	525.0
ピラゾリネート	A	1.52	-49.3	5.17	72.2
	B	1.69	-43.8	6.04	101.3
	C	2.37	-21.0	8.18	172.7
	D	9.79	8.8	10.96	21.8
	E	8.93	-0.8	18.15	101.7
フラチオカルブ	A	0.85	-71.7	3.23	7.6
	B	1.73	-42.5	5.88	96.0
	C	2.55	-15.0	8.49	182.8
	D	18.27	103.0	27.76	208.5
	E	9.37	4.1	27.44	204.9

表5 グループB農薬のシミュレーション結果

		大豆		オレンジ	
		推定値	バイアス%	推定値	バイアス%
チフェンスルフロンメチル	A	4.06	35.2	4.82	60.7
	B	5.35	78.5	4.93	64.3
	C	4.78	59.4	4.98	66.1
	D	15.58	73.2	13.34	48.2
	E	12.50	38.8	12.40	37.8
プロモキシニル	A	3.58	19.4	4.41	47.0
	B	5.09	69.5	6.85	128.3
	C	8.07	169.0	18.27	509.0
	D	18.00	100.0	25.36	181.8
	E	23.32	159.1	178.54	1883.8
アイオキシニル	A	3.60	20.1	4.64	54.5
	B	5.74	91.2	7.33	144.3
	C	9.79	226.4	12.58	319.3
	D	28.41	215.7	25.10	178.9
	E	31.27	247.4	51.26	469.6
ジクロロプロップ	A	4.06	35.4	4.55	51.6
	B	4.57	52.5	3.92	30.7
	C	6.23	107.7	8.15	171.7
	D	15.67	74.1	11.78	30.9
	E	17.00	88.8	24.65	173.9
トリフルスルフロンメチル	A	3.67	22.5	4.93	64.3
	B	5.41	80.4	6.28	109.4
	C	5.37	79.1	5.54	84.7
	D	16.23	80.3	13.59	51.0
	E	13.38	48.7	12.44	38.2
アシフルオルフェン	A	3.87	29.1	5.31	77.0
	B	2.66	-11.4	7.08	136.0
	C	7.02	134.0	5.41	80.2
	D	7.98	-11.3	19.72	119.1
	E	24.33	170.3	13.43	49.2
ホサメフェン	A	2.25	-25.1	2.95	-1.8
	B	2.98	-0.7	7.39	146.4
	C	6.84	127.9	16.71	457.0
	D	11.54	28.2	453.84	4942.7
	E	33.86	276.2	-236.66	-2729.6

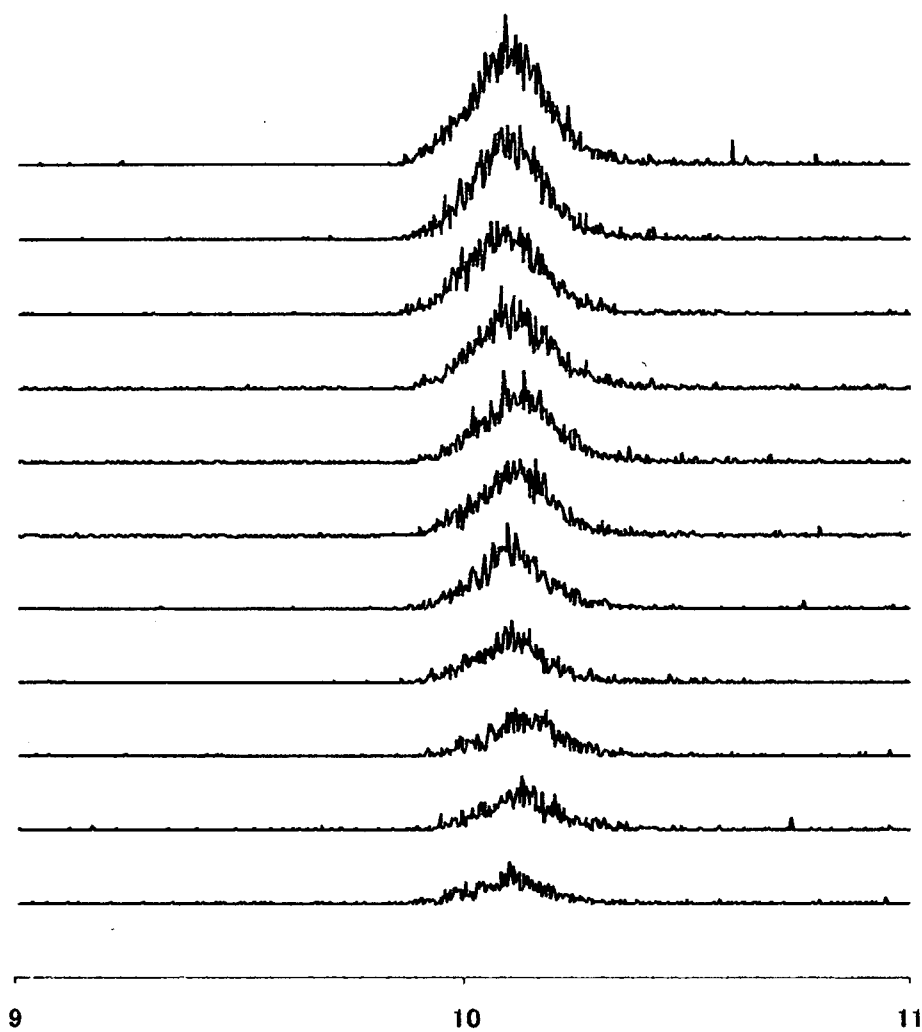


図1 オレンジに添加したチフェンスルフロナーメチルのクロマトグラム
添加量：下から検出下限濃度の3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21倍

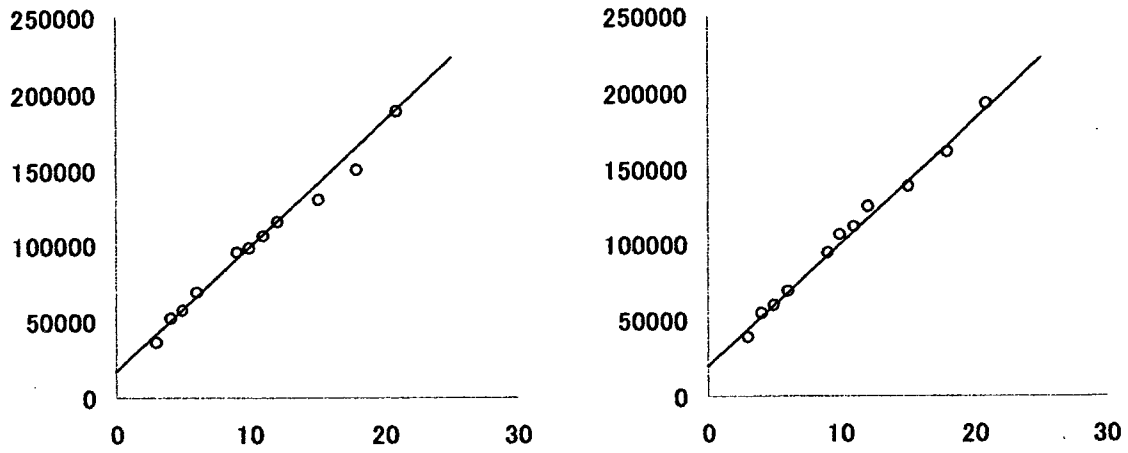


図2 チフェンスルフロン-メチルの添加濃度とピーク面積
左 大豆, 右 オレンジ

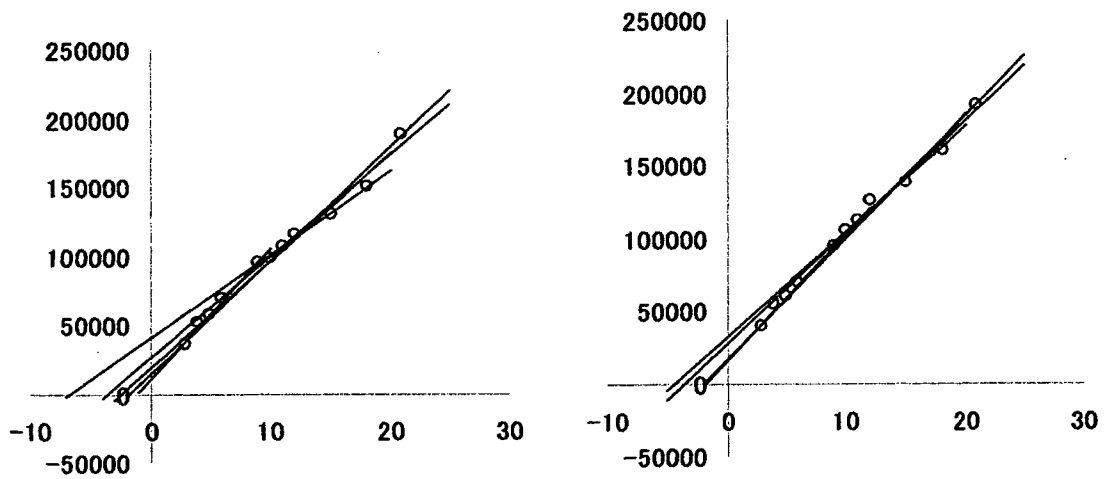


図3 標準添加の回帰直線
左 大豆, 右 オレンジ

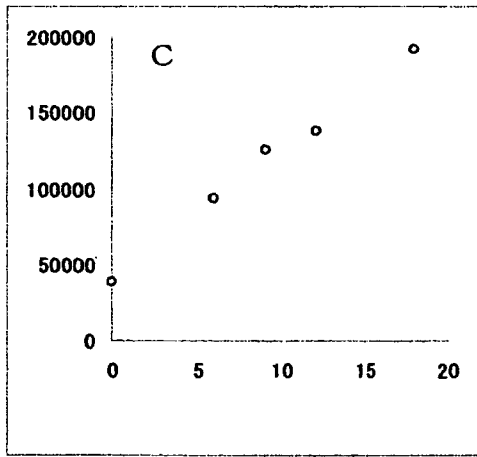
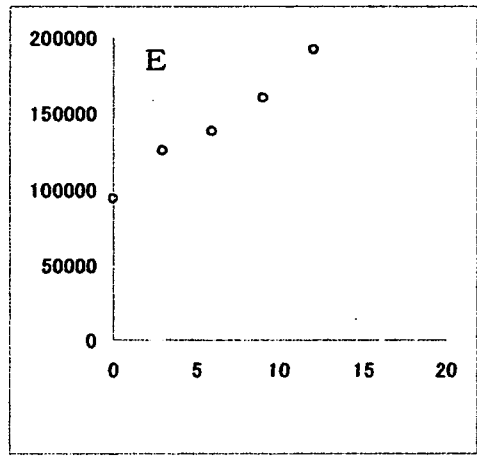
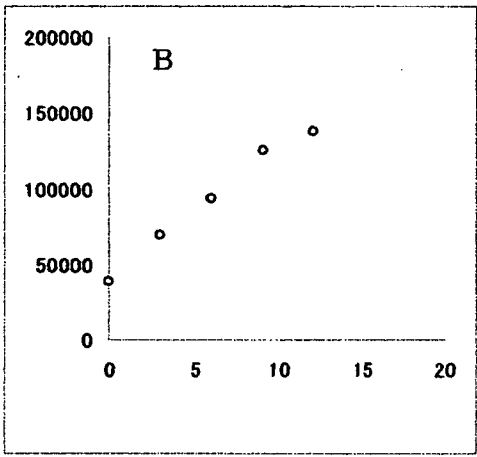
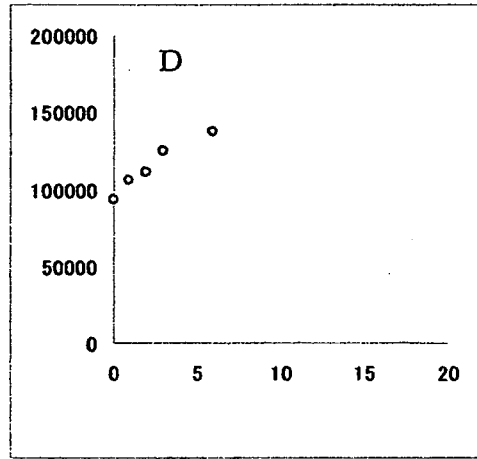
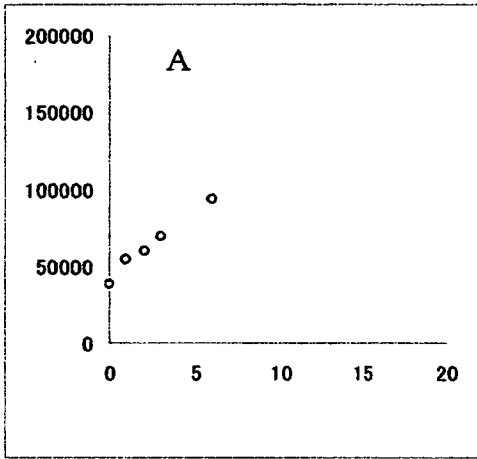


図4 各添加濃度パターン

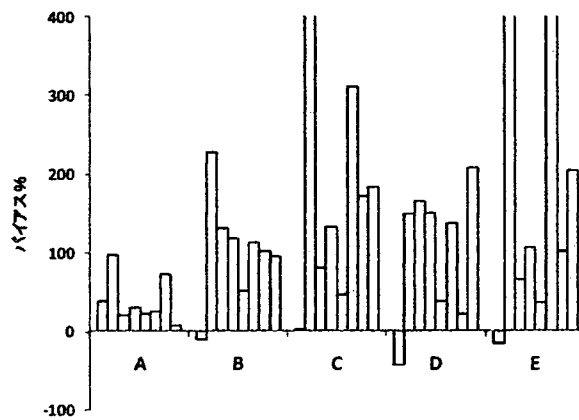
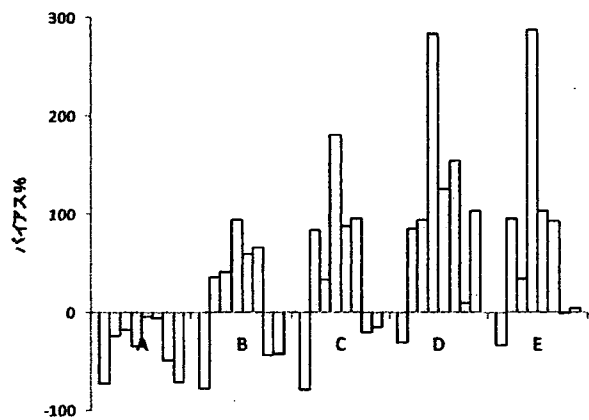


図5 Aグループ農薬シミュレーション結果
左 大豆 右 オレンジ

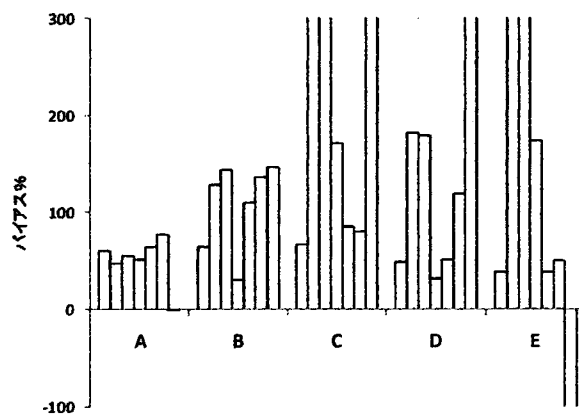
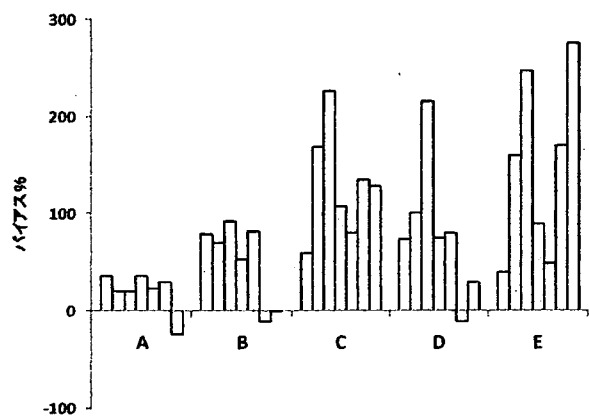


図6 Bグループ農薬シミュレーション結果
左 大豆 右 オレンジ

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 大学院工学府 教授

研究要旨

食品中の農薬分析で議論されてきたように、不確かさの推定は、バリデーションされた試験法で結果を得ることが基本である。微生物試験の場合も、その意味では同じであるが、微生物試験では、そのバリデーションの基準となる標準法（培養法）の設定自体が極めて難しい。さらに、培養法では時間がかかるために、より迅速な非培養法に対する社会的要請が高まっている。こうした要請に応えるためには、食品からの生菌分離技術の開発が必須と考えられる。即ち、食品試料から無傷害的に生菌を分離し、これを非培養法で計数した後、その分離された生菌をそのまま培養した後、コロニー計数した結果と比較することができる。そこで、本研究では平成17-18年度に、生菌分離技術の調査、および音波分離、濾過、密度勾配遠心分離、などによる実験研究を行い、その基礎データを蓄積してきた。本年度は、密度勾配遠心分離法の焦点を絞り、遠心分離後の各層を簡便迅速かつ高精度に採取する装置の開発を目指し、その基本設計仕様を決定した。すなわち、採取管アセンブリー、及びマイクロフロー制御プレートを新規設計・製作した。その結果、密度勾配層間の乱れが無く、各画分を採取できる条件を設定できた。また、分画後の生細胞計数に、細胞内エステラーゼ活性を指標とする蛍光染色法を導入し、専用の光学系を備えた計数装置を製作した。

A. 研究目的

培養法と非培養法を同じ基準で議論するための、最も有力な方法は、食品中の微生物細胞を非傷害的に分離することである、と考えられる。通常、顕微蛍光計測による非培養法では、共存する食品成分等のために、擬陽性や擬陰性のシグナルが避けられないことが問題点であった。そのため、微生物細胞のみを非傷害的に分離して、非傷害的に蛍光染色して計数し、その後、培養法で計数すれば、非培養法と培養法の結果が極めて高い確率で一致すると期待される。しかし、物理的あるいは化学的に異なる様々の成分が含まれる食品マトリクスから、微生物細胞のみを、非傷害的に分離することはそれ程簡単ではない。原理的可能な方法にも

限りがある。

本年度は前年度までの結果に基づき、Percoll密度勾配遠心分離法が、難濾過性食品の多くに適用できる有望な方法と判断し、この原理による分離システム構築のために基礎データを得ることとした。また、非培養計数法として、これまでは細胞膜透過性の違いから細胞生死を判別する原理の蛍光染色法を採用してきたが、分離過程で細胞膜がある程度傷害を受けると、それだけで死菌と判定され舞う可能性があるため、別の原理の蛍光染色法を採用することとした。具体的には細胞内エステラーゼ活性を指標と蛍光色素に採用であり、それに適用できる光学系を備えた計数装置を新たに製作することとした。

B. 研究方法

新規微生物計数装置の製作

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）は元々、蛍光色素 DAPI および PI（何れも DNA と結合して蛍光を発する）、新たにカルボキシフルオレセインジアセテート (CFDA) に適用できる光学系を備えたバイオプローラを製作した。

Percoll 密度勾配の調製

Percoll (#170891-01、GE Helthcare) を滅菌した 50mM、pH7.0 リン酸緩衝液 (PB) で希釈し、25%、50%、75%、100% の密度溶液をそれぞれ調製した。各濃度の Percoll 溶液を密度の高い方から順にマイクロピペットを用いて、200 μ l ずつ超遠心管 (11 \times 34mm) に重層し、密度勾配を作製した。

適用菌種検討に供した試験菌液の調製

スラントで保管されている次の *Escherichia coli* を LB 液体培地に播種し、37 $^{\circ}$ C、18h、130rpm で前培養した。前培養液から 100 μ l 採取し、10ml LB 液体培地に播種し、同条件で本培養し試験菌液とした。これを終濃度約 1×10^5 cells/ml あるいは 1×10^5 cells/ml となるようにリン酸緩衝液で希釈した。

細胞バイアブル分離及び菌数計測

Percoll 密度勾配を調製した上に、試験菌希釈液 200 μ l (2×10^4 cells) を重層し、4 $^{\circ}$ C、5,000rpm、30min で遠心後、マイクロピペットで、遠心管上方から 200 μ l ずつ回収した。回収した各密度層 100 μ l を CFDA で染色した後、バイオプローラ（松下エコシステム）で菌数測定した。また残りの 100 μ l を標準寒天培地に播いて 37 $^{\circ}$ C、130rpm、18h 培養した後、コロニー計数して生菌数とした。

C. 研究結果

Percoll 密度各画分の採取性能評価基準

Percoll 密度勾配遠心分離後に、各密度層を乱すことなく、各画分を採取するためのデバイス設計が行った。その性能評価に際して、予め、基準とすべき性能を明らかにしておく必要があった。図 1 に示すように、上層から慎重にマニュアル操作で採取して、全体の回収率、及び各画分への分配率を調査した。3 人の実験者が実施した結果を表 1 に示す。

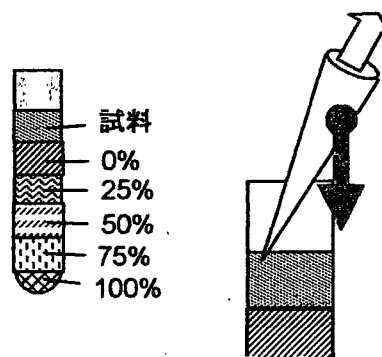


図1. 上層からの採取

E. coli の PB 懸濁液 300-400 cfu/100 μ l を試料として、分離後、各層 200 μ l ずつ採取し、培養法でコロニー計数した。一方、遠心分離前の試料についても培養法でコロニー計数し、添加菌数とした。表に示すように、添加回収率は 3 人とも $100 \pm 5\%$ 以内であった。即ち、100% の回収率を基準にすることが妥当であると判断された。また、この場合、3 人の実験者のデータを区別せずに考えても差し支えないと判断されたので、各層への分配率は、3 人分計 10 試料についての平均、および標準偏差を求めた。その結果、82% の菌が Percoll75% 層に回収されることがわかった。そこで、デバイスの性能としては、80% 以上の菌が 75% 層に回収されたら合格と判断することとした。

採取デバイスの性能評価

遠心管の上層から採取する方法の場合、採取管先端位置の制御が難しい。そこで、上記のマニュアル操作の場合と異なり、

表1. 基準となる添加回収性能

試料 No	採取者	検出菌数 (cfu/100 μ l)					回収菌数 合計 (cfu /100 μ l)	添加菌数 (cfu /100 μ l)	添加回収 率 (%)	添加回収 率の平均 (%)
		Percoll 密度								
		0%層	25%層	50%層	75%層	100%層				
1	A	0	0	62	252	10	324	351	92.3	95.2
2		0	1	55	238	11	305	322	94.7	
3		1	5	6	304	23	339	344	98.5	
4	B	0	2	19	320	7	348	351	99.1	100.6
5		0	2	64	252	13	331	322	102.8	
6		0	4	14	297	29	344	344	100.0	
7	C	0	0	75	276	18	369	351	105.1	103.0
8		0	3	65	246	12	326	322	101.2	
9		0	1	18	312	26	357	344	103.8	
10		0	5	17	292	36	350	344	101.7	
平均		0.1	2.3	39.5	278.9	18.5	339.3			
分布率 (%)		0	0.7	11.6	82.2	5.5	100			

採取管を遠心管に底まで挿入し、下層から順に採取する設計とした。しかし、1本の採取管で200 μ l \times 6層を連続して採取しても、その後、それを分けることが難しかった。次に、6本の採取管を用意し、1本挿入して200 μ l採取する操作を、採取管を交換しながら6回繰り返した。しかし、操作の過程で層が乱れ、良好な回収性能は得られなかった。

そこで、採取管としてシリンジの針を利用し、これを6本束ねて最初から挿入しておき、順次、200 μ lずつ吸引して採取するようにした(図2)。その結果、表2に示すように、97%の添加回収率、86%の菌がPercoll75%層に回収、という性能が得られた。

以上により、採取デバイスの仕様で最も重要な項目である採取管の設計を決定した。

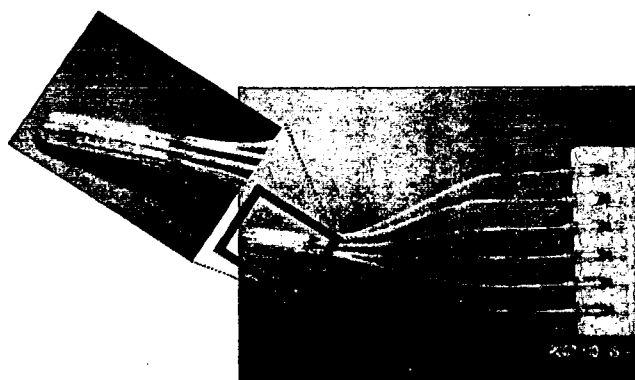
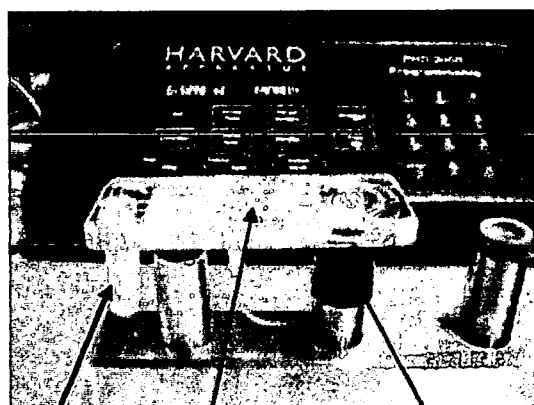


図2. 採取管アセンブリー

マイクロフロー制御プレートの基本設計

図2に示された5本のシリンジを順次操作することによって、所期の性能を得ることができたので、この操作を自動化するためのマイクロフロー制御プレートを設計した。この場合、採取した6 \times 200 μ lを1枚のバイオフロー専用メンブレンフィルター上に、スポット状に滴下するようにした。

図3に試作したプレートを示す。本プレートのマイクロ流路を介して、各層ごとに独立してメンブレンフィルター側に移送できることを確認し、フロー制御のためのバルブおよびアクチュエータの設計条件が明らかになった。



遠心管
マイクロフロー制御プレート
バイオフロー用
フィルターアセンブリー

図3. マイクロフロー制御プレートの機能試験

表2. 採取デバイスによる添加回収成績

試料No	検出菌数 (cfu/100μl)					回収菌数 合計 (cfu /100μl)	添加菌数 (cfu /100μl)	添加回収 率 (%)	添加回収 率の平均 (%)
	Percoll 密度								
	0%層	25%層	50%層	75%層	100%層				
1	0	7	47	357	6	417	445	93.7	96.6
2	0	8	42	393	8				
3	0	9	38	387	5				
4	0	3	48	345	17				
平均	0	6.75	43.75	370.5	9	430			
分布率 (%)	0	1.6	10.1	86.2	2.1	100			

イオプロラで計数できるようになった。

CFDA を用いた非培養生菌計数の結果

新規製作した装置により、Percoll 密度勾配遠心分離法で分画したのち、培養法 (x) と CFDA 染色法 (y) の生菌計数結果を比較した。その結果、図 4 に示すような相関が得られた。

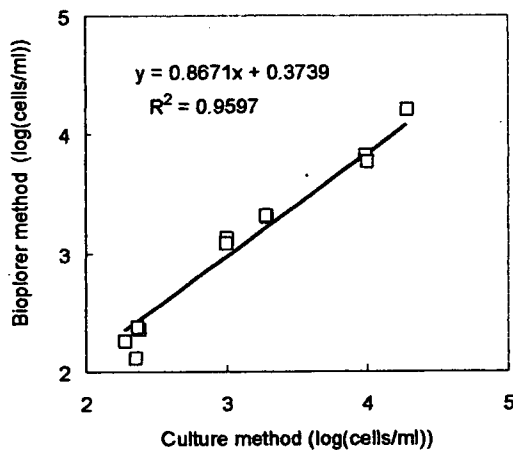


図4. バイオプロラ法と培養法の相関

D. 結論

食品からの微生物細胞の非傷害的分離法として、汎用性が高く、且つ高性能分離が期待される Percoll 密度勾配遠心分離法に焦点を絞り、遠心分離後の各画分を、簡便迅速かつ高精度に採取する装置の基本設計を進め、有用なデータを得た。即ち、最も基本となる、複数本の微細採取管アセンブリー、マイクロフロー制御プレートの仕様を決定した。これによって、次の装置設計段階に進めことができるようになった。また、非培養生菌計数法として導入した CFDA 法についてもバ

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

○学会発表

- ・松岡英明, “微生物試験における精度目標”, AOAC インターナショナル総会・シンポジウム『食品分析討論会 2007~ゴールはどこに?~』東京, 2007 年 6 月 9 日
- ・松岡英明, “食品微生物試験の標準化の動向について”, AOACI 日本セクション・食品分析研究会 合同シンポジウム in 信州, 長野県上伊那郡, 2007 年 11 月 2 日
- ・松岡英明, “微生物検査法における生菌分離技術の開発”, 日本防菌防黴学会 第 35 回通常総会付設講演会, 大阪, 2007 年 5 月 24 日
- ・松岡英明, 高山幸大, 小泉貴寛, 荒木恵美子, 斉藤美佳子, “食品中の生菌の迅速分画計数システムの開発”, 日本化学会第 87 春季年会, 大阪, 2007 年 3 月 28 日
- ・瀬口裕介, 小泉貴寛, 斉藤美佳子, 松岡英明, “密度勾配遠心分離後の生菌画分回収システムの開発”, 日本防菌防黴学会第 34 回年次大会, 大阪, 2007 年 8 月 31 日

G. 知的所有権の取得状況

なし