

ダイズ(RRS)プラスミドセット-ColE1/TE-(以上ニッポンジーン)および TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies Japan)を使用して実施した。リアルタイム PCR 装置には 7900HT Fast リアルタイム PCR システム 96 ウェル(Life Technologies Japan)を使用した。

#### 4. DNA 濃度の測定

260 nm における UV 吸収による DNA 濃度の測定(以下 UV 吸収法とする)には、GeneQuant pro(GE ヘルスケアジャパン)、UV 吸収スペクトルの測定には、UV-1700(島津製作所)を使用した。蛍光光度法による濃度の測定には測定試薬に Quant-iT™ dsDNA High Sensitivity Assay kit (Life Technologies Japan) および Varioskan Flash 多機能マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific)を使用した。

#### 5. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は ultraPURE™ Agarose-1000 (Invitrogen)、50×TAE(遺伝子工学研究用、ニッポンジーン)により作製したエチジウムブロミドを含むアガロースゲルを用い、電気泳動槽には、Mupid 2x(ADVANCE)を、画像解析にはプリントグラフ(ATTO)を使用して実施した。

### C. 結果および考察

#### 1. 外部精度管理調査試料の調製

外部精度管理調査試料の原料ダイズには遺伝子組換えダイズとしてブラジル産不分別ダイズ、非組換えダイズとして雪乃白姫ダイズを使用した。これら原料の RRS 混入率を定量 PCR 法により測定し、表 1 に示した。RRS 混入率は雪乃白姫ダイズが 0.0%、ブラジル産不分別ダイズが 79.3%であった。この結果に基づき、調製試料の RRS 含量がおおよそ 2%および 5%となるようにブラジル産不分別ダイズと雪乃白姫ダイズを混合し、試料 4 および試料 5 の外部精度管理調査試料

を作製した(表 2)。

本研究の平成 18 年度報告書、組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究においてダイズ品種間で DNA 収量に差があること、およびこの差が定量 PCR 法による RRS の定量値に影響を与える可能性が示された。このため表 1 に示したブラジル産不分別ダイズと雪乃白姫ダイズの DNA 収量および混合比から定量 PCR 法による測定濃度を予測し、予定濃度として試料 1~3 の表示濃度とともに表 3 に示した。

#### 2. 外部精度管理調査結果の検証

外部精度管理調査参加機関から報告された測定値を定量 PCR と ELISA の測定法別に平均値を算出してまとめた結果を表 3 に示した。試料 1 の定量 PCR 法による報告値の平均は 6.41%で表示濃度と同程度であったが、ELISA 法による報告値は 4.02%で定量 PCR 法に比べて 2%以上低かった。試料 2 の ELISA 法による報告値は表示濃度と近く、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値の差も小さかった。試料 3 の ELISA 法による報告値は表示濃度よりも高かったが、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値の差は小さかった。試料 4 と試料 5 は ELISA 法では予定濃度と報告値はほぼ等しく、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値間の差も小さかった。しかし、定量 PCR 法の報告値は DNA 収量から算出した定量 PCR 法の予定濃度と比べ試料 4 は 0.8%以上、試料 5 は 2%以上低かった。

試料 1 の ELISA 法による報告値が定量 PCR 法と比べ低かった理由としては、RRS の CP4EPSPS タンパク質の発現量が組換え DNA の量に比べて少なかった、または混合の過程で CP4EPSPS タンパク質が変性または消失した等の可能性が考えられた。しかし原料を含め調製方法の詳細が不明なため、原因を特定することはできなかった。

また、試料 4 および試料 5 の定量 PCR 法による報告値は原料の DNA 抽出量から算出した予定濃度と異なり、ELISA 法の平均値と同程度であった。この結果、品種の異なるダイズを混合した粉末からの DNA 抽出量は、単純に元のダイズの DNA 抽出量の比を反映していない可能性が示唆された。

### 3. DNA 収量および遺伝子コピー数に対する抽出法の影響

#### 3.1 外部精度管理調査における DNA 収量およびレクチンコピー数

外部精度管理調査において定量 PCR 法の参加機関が使用した DNA 抽出法は 1 機関を除き DNeasy Plant Mini Kit または GM quicker であった。参加機関の DNA 収量と、定量 PCR 測定における遺伝子のコピー数のうち内在性遺伝子であるレクチンのコピー数を DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker のそれぞれについてまとめ、表 4 および表 5 に示した。見かけの収量を抽出法間で単純に比較した場合、DNeasy Plant Mini Kit の DNA 収量は、GM quicker のそれに比べ 2 倍以上だった。レクチンコピー数の報告値は GM quicker が DNeasy Plant Mini Kit に比べ約 3 倍高く、DNA 抽出法が DNA 収量および定量 PCR 測定におけるレクチンのコピー数に影響していることが明らかになった。

#### 3.2 DNA 収量およびレクチンコピー数に対する DNA 抽出法の影響の検証

3.1 で明らかになった DNA 収量およびレクチンのコピー数に対する抽出法の影響を確認するため、GM quicker と DNeasy Plant Mini Kit を用いて外部精度管理調査試料 1 と試料 4 から DNA を抽出した。260 nm の吸光度から求めた DNA 収量は、DNeasy Plant Mini Kit の方が GM quicker に比べ試料 1 では 2.7 倍、試料 4 では 1.7 倍多かった(表 6)。なお、両抽出法とも最初のサンプリング量は 1 g であるが、このうちシリカ

ゲルカラムに負荷し DNA 溶出に供するサンプル量は、DNeasy Plant Mini Kit で 0.03 g、GM quicker で 0.05 g と、GM quicker の方が多いため、収量の差はさらに大きいと考えられた。次に抽出した DNA を 20 ng/μL に調整し、定量 PCR に供してレクチンのコピー数を測定した。その結果、試料 1、試料 4 とも GM quicker による DNA では DNeasy Plant Mini Kit に比べ 2 倍以上多いコピー数が測定され、外部精度管理調査と同様の結果が得られた(表 6)。

#### 3.3 抽出 DNA の質の検討

同量の鋳型 DNA を用いたにもかかわらず、定量 PCR におけるレクチンのコピー数に抽出法による差が認められたため、両法で抽出した DNA の質の違いを検討した。まず 3.2 で抽出した DNA の UV 吸収スペクトルを測定し比較した。その結果、試料 1、試料 4 ともに抽出法間でスペクトルに差は認められず(図 1)、データは示していないが、O.D.260/O.D.280 の比も全て 1.7~2.0 の範囲内であった。次に両法で抽出した DNA を 20 ng/μL に調整し、アガロースゲル電気泳動を行い、その結果を図 2 に示した。両者とも高分子のゲノミック DNA のバンドが観察されたが、等量の DNA を泳動したにもかかわらず、GM quicker のゲノミック DNA のバンドは DNeasy Plant Mini Kit に比べて濃いことが判明し、調整した溶液の DNA 濃度が異なっていた可能性が示された。また、両者ともゲノミック DNA のバンドから低分子方向にむけて薄い帯を引くスミアが観察されたが、ゲノミック DNA の量が違うことから単純に比較することはできなかった。

#### 3.4 DNA 定量法による DNA 濃度の差

アガロースゲル電気泳動の結果、20 ng/μL に調整した DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker の DNA 濃度が異なっていた可能性が示唆された。渡邊らは第 99 回日本食品衛生学会において通知に記載の各抽出法による DNA を吸光光

度法と蛍光光度法を用いて測定し、両者に差があることを報告している。そこで、3.2 の DNA 抽出液について蛍光光度法による濃度の測定を Quant-iT™ dsDNA High Sensitivity Assay kit を使用して行い、UV 吸収法による DNA 濃度と比較した結果を表 7 に示した。GM quicker では蛍光光度法による定量値の UV 吸収法に対する回収率が試料 1 では約 58%、試料 4 では約 62% となり、定量値が約 40% 減少した。一方、DNeasy Plant Mini Kit では蛍光光度法による定量値の UV 吸収法に対する回収率は試料 1 では約 13%、試料 4 では約 29% で、定量値が大きく減少し、UV 吸収法による DNA 濃度との差が GM quicker と比べて大きかった。

UV 吸収法による DNA の定量では、二本鎖 DNA に加え 260 nm に吸収をもつ一本鎖 DNA やオリゴヌクレオチド、その他不純物の濃度も加算される。一方、二本鎖 DNA に特異的に結合するインターカレーターを利用した蛍光光度法では二本鎖 DNA が特異的に測定される。

以上の結果、GM quicker の抽出 DNA では測定法間で定量値の差が小さいことから 260 nm の吸収は多くが二本鎖 DNA に由来すると考えられた。一方、DNeasy Plant Mini Kit では蛍光光度法による定量値が UV 吸収法を大きく下回ることから、抽出液に二本鎖 DNA 以外に 260 nm に吸収を持つ物質が多く含まれていることが示唆された。

GM quicker と DNeasy Plant Mini Kit による抽出 DNA を蛍光光度法での測定結果に基づき 7 ng/μL に調整後アガロースゲル電気泳動を行った。その結果、図 3 に示したように、両者の高分子のゲノミック DNA のバンドの濃さはほぼ等しくなった。またこの時、スメアについては抽出法間で差は認められず、DNA の断片化の程度には抽出法間で差はないものと考えられた。

### 3.5 蛍光光度法により濃度を調整した DNA の

#### レクチンコピー数

3.2 で 20 ng/μL に調整した DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker 抽出液を蛍光光度法で定量し、この結果から GM quicker 抽出液の濃度を DNeasy Plant Mini Kit の蛍光光度法による濃度に調整した。これらの DNA 溶液について定量 PCR によりレクチンのコピー数を測定した結果、抽出法によるレクチンコピー数の差は表 6 と比べて大きく減少した(表 8)。

以上の結果から、定量 PCR のコピー数は蛍光光度法による二本鎖 DNA の量を反映していると考えられ、UV 吸収法により DNA 濃度を調整した場合、DNeasy Plant Mini Kit による抽出 DNA では GM quicker による抽出 DNA に比べ、レクチンコピー数が低く測定されることが判明した。なお、RRS ダイブの定量 PCR 法は DNeasy Plant Mini Kit とほぼ同じ性能の DNeasy Plant Maxi Kit により抽出した DNA を用いて設定されたので、実際には GM quicker 抽出液を UV 吸収法で濃度を調整し定量 PCR を行った場合、PCR 反応液の鋳型 DNA の濃度が測定法の想定よりも高くなっていると考えられた。

以上、定量 PCR のコピー数は二本鎖 DNA の量に依存すると考えられること、抽出 DNA の 260 nm の吸収から求められた定量値と蛍光光度法による二本鎖 DNA の定量値は大きく異なる場合があり、これは抽出法に依存していることが判明した。RRS を含め通知の定量 PCR 法は混入率の計算に全て内標比を使用しているため、PCR 反応液に含まれる DNA の量の変動はある程度許容されるが、内標比を用いない定性 PCR 法では PCR 反応液に含まれる二本鎖 DNA の量により検出下限が変動することが予想される。このため複数の DNA 抽出法がある場合、定性 PCR の反応液を調製する際は、DNA 濃度を二本鎖 DNA 濃度として測定し PCR 反応液に含まれる二本鎖 DNA 濃度を一定にすることを考慮する

必要があると考えられた。

### 3. 6 トウモロコシにおける DNA 抽出法間および DNA 定量法間の差の検討

ダイズにおいては DNeasy Plant Mini Kit による抽出 DNA で UV 吸収法と蛍光光度法による DNA 定量値が大きく異なることが明らかになった。この現象がダイズ特有であるかどうかを検討するため、トウモロコシから DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker を使用して DNA を抽出し、DNA 濃度を UV 吸収法および蛍光光度法で測定した。その結果トウモロコシにおいても、GM quicker では蛍光光度法による DNA 濃度が UV 吸収法の 65%だったのに対し、DNeasy Plant Mini Kit では蛍光光度法による DNA 濃度が UV 吸収法の 37%と大幅に減少した(表 9)。トウモロコシでもダイズと同じ傾向が認められたことから、観察された定量値の差は、DNA 抽出法に由来すると考えられた。

## D. 結論

### 1. 外部精度管理調査試料の調製と調査結果

RRS を検査対象とした外部精度管理調査試料として、ブラジル産不分別ダイズと雪乃白姫ダイズを用いて RRS 混入率が約 2%および 5%の試料を作製した。定量 PCR 法による予定濃度は使用した 2 種のダイズの DNA 収量および混合比に基づき求めた。これら調製試料および RRS を含む市販のダイズ粉末 3 種を用いて、外部精度管理調査を実施した。

外部精度管理調査の報告値の平均値を測定法間および予定濃度と比較した結果、試料 1 は定量 PCR 法の表示濃度と報告値が同程度であったが、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値間では差が大きかった。試料 2 および試料 3 は ELISA 法の表示値と報告値が近く、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値間での差も小さかった。試料 4 と試料 5 は ELISA 法では予定濃度と報告

値はほぼ等しく、定量 PCR 法と ELISA 法の報告値間の差も小さかった。しかし、定量 PCR 法の報告値は DNA 収量から算出した定量 PCR 法の予定濃度とは一致せず、試料 5 では 2%以上低かった。

### 2. DNA 収量および遺伝子コピー数に対する抽出法の影響

外部精度管理調査の報告値を、使用した抽出法に基づき DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker の機関に分けて集計した結果 GM quicker では DNA 収量が少なく、定量 PCR における遺伝子コピー数が多い傾向が認められた。この傾向は、当所にて抽出した DNA でも認められた。品質確認のため測定した UV 吸収スペクトルの形状には抽出液間で差は認められなかったが、UV 吸収法により濃度を調整して実施したアガロースゲル電気泳動では GM quicker による DNA のバンドが DNeasy Plant Mini Kit による DNA より濃いことが判明した。

蛍光光度法で DNA を定量して UV 吸収法と比べた結果、GM quicker 抽出液では DNA 定量値はそれほど減少しなかったが、DNeasy Plant Mini Kit 抽出液では DNA 定量値が大幅に低下した。従って、GM quicker 抽出液では 260 nm の吸収のほとんどが二本鎖 DNA に由来するのに対し、DNeasy Plant Mini Kit 抽出液には二本鎖 DNA 以外にも 260 nm に吸収を持つ物質が多く含まれていることが示唆された。また、これらは PCR の鑄型とならないために GM quicker 抽出液のレクチンコピー数は DNeasy Plant Mini Kit 抽出液に比べ高くなると考えられた。このことは蛍光光度法により DNA の濃度を調整して測定したレクチンコピー数の結果からも裏付けられた。

トウモロコシから DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker により DNA を抽出し、ダイズと同様の検討を行った。抽出液の蛍光光度法による DNA

定量値を UV 吸収法による定量値と比べた結果、GM quicker では蛍光光度法の定量値は UV 吸収法に比べてそれほど低下しなかったが、DNeasy Plant Mini Kit 抽出液では大幅に低下した。よって、トウモロコシにおいてもダイズと同様 DNeasy Plant Mini Kit 抽出液には二本鎖 DNA 以外にも 260 nm に吸収を持つ物質が多く含まれていることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 穂山浩, 橘田和美, 遺伝子組換え食品の検知と表示制度の動向と今後の課題, 食品衛生学雑誌, 51, 383-392 (2010)
- 2 穂山浩, 未承認遺伝子組換え食品の検査法, 食品衛生研究, 60, 15-24, (2010)
- 3 Akiyama H., Sakata K., Spiegelhalter F., Furui S., Nakashima A., Kitta K., Teshima R., Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 maize, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 65-70 (2010)

##### 2. 学会発表

1. 穂山浩, 「国立医薬品食品衛生研究所における GMO 検知技術開発」, 穂山浩, The 2nd plenary meeting of ISO/TC 34/SC 16 horizontal methods for molecular biomarkers analysis 国際会議ポストワークショップ (2010. 2)
2. 穂山浩, 「遺伝子組換え食品の検査

について」, 知の市場, (2010. 11)

3. 穂山浩, 「遺伝子組換え食品について」, 第3回健康長寿長野研究会シンポジウム, (2010. 11)

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 1 原料ダイズの水分、DNA 収量、コピー数および RRS 混入率

	水分 (%)	DNA 収量 ( $\mu\text{g}$ )	レクチン <sup>1)</sup> (コピー)	RRS <sup>1)</sup> (コピー)	混入率 <sup>1)</sup> (%)
雪乃白姫ダイズ	9.67	6.81	31443 $\pm$ 2576	5 $\pm$ 2	0.0 $\pm$ 0.0
ブラジル産不分別 ダイズ	10.09	8.70	32133 $\pm$ 3337	26295 $\pm$ 1420	79.3 $\pm$ 6.8

1) Mean $\pm$ SD

表 2 外部精度管理試料の調製

	ブラジル産 不分別ダイズ 分取量	雪乃白姫 ダイズ分取量	調製量 合計	調製濃度 (%)
試料 4	29 g	1071 g	1100 g	2.09 <sup>1)</sup>
試料 5	73 g	1027 g	1100 g	5.26 <sup>2)</sup>

1) 試料 4 混入率(79.3)  $\times$  29  $\div$  1100

2) 試料 5 混入率(79.3)  $\times$  73  $\div$  1100

表 3 外部精度管理調査試料の予定濃度と外部精度管理調査結果

試料名	予定濃度 (%)		外部精度管理調査報告値 <sup>1)</sup> (%)	
	定量 PCR 法	ELISA 法	定量 PCR 法	ELISA 法
試料 1	6.10	—	6.41±0.76	4.02±1.03
試料 2	—	0.3	0.37±0.10	0.23±0.07
試料 3	—	1.25	1.72±0.37	1.55±0.15
試料 4	2.66 <sup>2)</sup>	2.09	1.80±0.33	1.84±0.18
試料 5	6.61 <sup>3)</sup>	5.26	4.56±0.84	4.94±0.72

1) Mean±SD

2)  $79.3 \times (8.7 \times 29) \div ((8.7 \times 29) + (6.8 \times 1071))$

3)  $79.3 \times (8.7 \times 73) \div ((8.7 \times 73) + (6.8 \times 1027))$

表 4 外部精度管理調査における DNA 収量

試料名	DNA 収量 <sup>1)</sup> (μg)	
	DNeasy Plant Mini Kit	GM quicker
試料 1	9.0±3.0 (n=35)	3.5±1.5 (n=6)
試料 2	10.7±3.4 (n=35)	4.2±2.1 (n=6)
試料 3	10.9±3.3 (n=35)	4.8±2.7 (n=6)
試料 4	9.8±3.7 (n=34)	4.6±1.4 (n=6)
試料 5	9.9±3.0 (n=34)	4.4±1.0 (n=6)

1) 参加機関の測定値の Mean±SD

表 5 外部精度管理調査におけるレクチンコピー数

試料名	レクチン <sup>1)</sup> (コピー)	
	DNeasy Plant Mini Kit (機関数=35)	GM quicker (機関数=6)
試料 1	21503 ± 10505	78069 ± 42729
試料 2	20557 ± 9942	77001 ± 33239
試料 3	19484 ± 8629	74926 ± 52807
試料 4	28861 ± 15565	80837 ± 27627
試料 5	30635 ± 21578	82854 ± 35411

1) 参加機関の測定値の Mean ± SD

表 6 DNA 収量とレクチンコピー数に対する抽出法の影響

試料名	DNA 収量 <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}$ )		レクチン <sup>1)</sup> (コピー)	
	DNeasy Plant Mini Kit	GM quicker	DNeasy Plant Mini Kit	GM quicker
試料 1	10.2 ± 1.1	3.8 ± 0.1	23083 ± 2895	77567 ± 3220
試料 4	8.6 ± 1.0	5.1 ± 0.5	30158 ± 4053	67891 ± 1721

1) Mean ± SD



表 7 DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker による抽出 DNA の UV 吸収法と蛍光光度法による濃度測定結果

試料名	試料 1		試料 4	
	DNeasy Plant Mini Kit	GM quicker	DNeasy Plant Mini Kit	GM quicker
UV 吸収法による DNA 濃度 (ng/μL)	77.0	56.5	51.5	92.5
蛍光光度法による DNA 濃度 (ng/μL)	10.3	32.7	14.8	57.8
UV 吸収法に対する回収率 (%)	13	58	29	62

表 8 DNeasy Plant Mini Kit と GM quicker による抽出 DNA 濃度を蛍光光度法により調整して測定したレクチンコピー数

試料名	DNeasy Plant Mini Kit			GM quicker		
	調製濃度 (ng/μL)		レクチン <sup>1)</sup>	調製濃度 (ng/μL)		レクチン <sup>1)</sup>
	UV 吸収法	蛍光光度法		UV 吸収法	蛍光光度法	
試料 1	20	2.7	12055 ± 1027	4.7	2.7	20922 ± 275
試料 4	20	5.7	26637 ± 3138	9.1	5.7	37555 ± 704

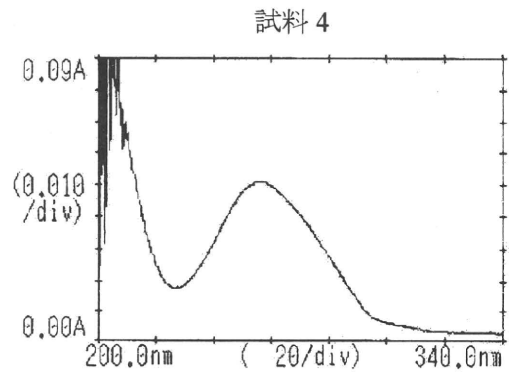
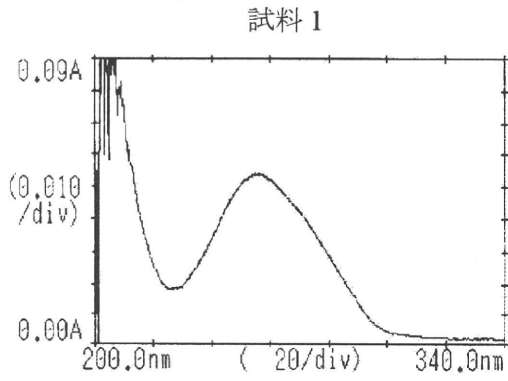
1) Mean ± SD

表9 トウモロコシにおける抽出 DNA の UV 吸収法と蛍光光度法による DNA 濃度測定結果

抽出法	DNeasy Plant Mini Kit	GM quicker
UV 吸収法による DNA 濃度 (ng/μL)	61.9	20.4
蛍光光度法による DNA 濃度 (ng/μL)	22.6	13.3
UV 吸収法に対する DNA 濃度の回収率 (%)	37	65

図1 DNeasy Plant Mini Kit および GM quicker 抽出による抽出 DNA の UV 吸収スペクトル

DNeasy Plant Mini Kit 抽出



GM quicker 抽出

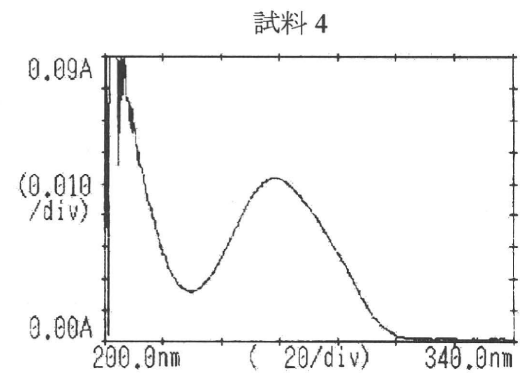
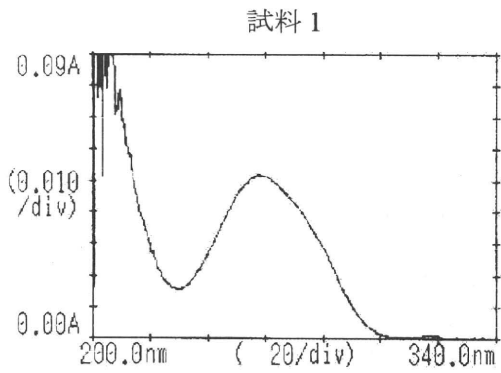
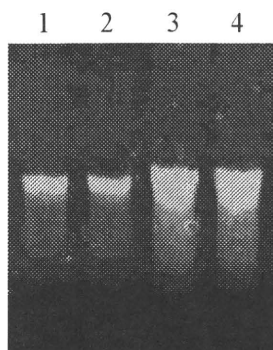


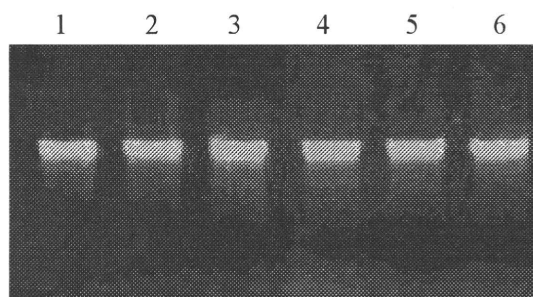
図2 UV 吸収法で 20 ng/μL に調整したダイズ抽出 DNA の電気泳動結果



レーン 1, 2 DNeasy Plant Mini Kit 抽出

レーン 3, 4 GM quicker 抽出

図3 蛍光光度法で 7 ng/μL に調整したダイズ抽出 DNA の電気泳動結果



レーン 1, 2, 3 DNeasy Plant Mini Kit 抽出

レーン 4, 5, 6 GM quicker 抽出

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）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 22 年度

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

誌上発表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
尾花裕孝: 起橋雅浩、小阪田正和、内田耕太郎、永吉晴奈、山口貴弘、柿本健作、中山裕紀子、尾花裕孝(大阪府立公衆衛生研究所)	加工食品を用いた農薬分析技能試験用試料調製の検討	食品衛生学雑誌	Vol.51 No.5	253-257	2010
Takatori S., Okihashi M., Kitagawa Y., Fukui N., Kakimoto - Okamoto Y. and Obana H. (大阪府立公衆衛生研究所)	Rapid and Easy Multiresidue Method for Determination of Pesticide Residues in Foods Using Gas or Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry.	Pesticides-Strategies for Pesticides Analysis		197-214	2011
村山三徳: Sakai, T., Hitomi, T., Sugaya, K., Kai, S., Murayama, M. and Maitani, T.	Determination Method for Ractopamine in Swine and Cattle Tissues Using LC/MS.	J. Food Hyg. Soc. Japan	Vol.48 No.5	144-147	2007
藤田和弘、仲西亜希子、石原三知代、伊藤裕信、中村宗知、渡井正俊、谷口誠、村山三徳	LC-MS/MS による畜水産食品中のピコザマイシンの定量	食品衛生学雑誌	Vol.50 No.2	52-57	2009
村山三徳	食品中の残留動物用医薬品の規制	食品衛生学雑誌	Vol.51 No.6	360-362	2010
大島赴夫: 穂山浩、橘田和美	遺伝子組換え食品の検知と表示制度の動向と今後の課題	食品衛生学雑誌	Vol.51 No.6	383-392	2010
穂山浩	未承認遺伝子組換え食品の検査法	食品衛生研究	Vol.60 No.11	15-24	2010

Akiyama H., Sakata K., Spiegelhalter F., Furui S., Nakashima A., Kitta K., Teshima R.,	Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 maize.	<i>Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)</i>	Vol. 51	65-70	2010
--	---	--	---------	-------	------

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
尾花裕孝: 北川陽子、起橋雅浩、高取聡、福井直樹、中辻直人、小阪田正和、柿本幸子、尾花裕孝(大阪府立公衆衛生研究所)	GC/MS/MS を用いた加工食品中の残留農薬一斉分析法の検討-農産物を主原料とした加工食品を中心に-	第 47 回全国衛生化学技術協議会年会(神戸)	2010
福井直樹、高取聡、北川陽子、起橋雅浩、中辻直人、小阪田正和、柿本幸子、尾花裕孝(大阪府立公衆衛生研究所)	LC/MS/MS を用いた飲料中の残留農薬一斉分析法の検討	第 47 回全国衛生化学技術協議会年会(神戸)	2010
村山三徳: 村山三徳	残留動物用医薬品の試験法 ポジティブリスト制への対応	日本食品衛生学会第 96 回学術講演会	2008
坂井隆敏、村山三徳、根本 了、松田りえ子	国産牛中のヒドロコルチゾン含有量実態調査	日本食品衛生学会第 97 回学術講演会	2009
村山三徳	有害物質とその検査方法および運用について	輸入食品検査検討会	2009
村山三徳	食品の安全性を求めて～食品検査の現場から見た輸入食品等の現状～	第7回食品衛生講演会	2010
大島赴夫: 笠間菊子、小熊恭代、鈴木達也、穂山浩、大島赴夫、小島幸一	特定原材料検査に関する外部精度管理の実施に向けた検討	第 100 回日本食品衛生学会 学術講演会(熊本)	2010
穂山浩	国立医薬品食品衛生研究所におけるGMO 検知技術開発	The 2nd plenary meeting of ISO/TC 34/SC 16 horizontal methods for molecular biomarkers analysis 国際会議ポストワークショップ	2010
穂山浩	遺伝子組換え食品について	第3回健康長寿長野研究会シンポジウム	2010

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）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 22 年度

研究成果の刊行物・別刷

論文発表



## ノート

## 加工食品を用いた農薬分析技能試験用試料調製の検討

(平成 22 年 5 月 28 日受理)

起 橋 雅 浩\* 小 阪 田 正 和 内 田 耕 太 郎 永 吉 晴 奈  
山 口 貴 弘 柿 本 健 作 中 山 裕 紀 子 尾 花 裕 孝

## Preparation of Samples for Proficiency Testing of Pesticide Residue Analysis in Processed Foods

Masahiro OKIHASHI\*, Masakazu OSAKADA, Kotaro UCHIDA, Haruna NAGAYOSHI,  
Takahiro YAMAGUCHI, Kensaku KAKIMOTO, Yukiko NAKAYAMA  
and Hiroataka OBANA

Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku,  
Osaka 537-0025, Japan; \* Corresponding author

To conduct proficiency testing for the analysis of pesticide residues in processed foods, fortified samples of retort curry and pancake were examined. In the case of retort curry, heating and mixing were necessary at the time of preparation to provide a homogenous analytical sample. A mixture of 4 carbamates and 11 organophosphorus pesticides was spiked and 14 of them showed consistent results in the samples. In the case of pancake, 10 kinds of pesticides were added to the pastry. The prepared pastry was then cooked. The relative concentrations of most of the pesticides in the pancake were not affected and all the pesticides showed consistent results in the samples. These results showed that the two tested samples were suitable for proficiency testing.

(Received May 28, 2010)

**Key words:** 残留農薬 pesticide residue; 加工食品 processed food; 技能試験 proficiency testing; 添加試料 fortified sample

## はじめに

平成 20 年初頭に冷凍餃子への農薬混入事件が発覚したため、冷凍餃子中の農薬分析が各地で行われ、当所においても分析を行った<sup>1)</sup>。この事件によって消費者の加工食品に対する不安が喚起され、加工食品中の農薬分析が重要視されるようになった。加工食品にはさまざまなものがあり、生鮮食品で用いていた分析試験法で対応できない事例が予測される。事件後に示された事務連絡の「食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法について」では測定対象が有機リン系農薬に限定されているため、当所では加工食品中の農薬を対象とした一斉分析法の開発を行ってきた<sup>2)</sup>。このように分析法の整備が十分でないなか、加工食品中の農薬分析は実施されている。これらの分析値が科学的に妥当かを検証する上で、各分析機関での判断材料となることを期待して、技能試験を企画した。技能試験に用いられる分析試料には、均一性が要求される。これまで技能試験に用いられた試料は、油脂や飲料<sup>4), 5)</sup>のような液体

か、野菜や果実を粉碎しペースト状にしたもの<sup>6)</sup>であった。これらは試料の物性が均質であり、流動性が高いため、分析試料の均一化が容易であると考えられる。しかし、加工食品が多種類の食材から構成される性質上、農薬を添加した試料の均一性を確保することが難しいと考えられた。そこでレトルトカレーとパンケーキの 2 種類の加工食品を用いて均一な試料調製方法の検討を行ったので報告する。

## 実験方法

## 1. 試料

大阪府内で購入したレトルトカレー、ホットケーキミックス、卵、牛乳を用いた。

## 2. 試薬

標準品：各農薬標準品は、和光純薬工業(株)、林純薬工業(株)、関東化学(株)、Dr. Ehrenstorfer 社および Riedel-Haën 社製(すべて残留農薬試験用)を用いた。溶液状態以外の農薬標準品は、アセトンで 1,000 µg/mL となるように溶解し、農薬標準原液を調製した。これらと溶液状態の農薬標準品を混合し、混合標準溶液 A (メタミド

\* 連絡先 okihasi@iph.pref.osaka.jp

大阪府立公衆衛生研究所：〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

ホス, アセフェート, ジメトエート, トルクロホスメチル, マラチオン, イソフェンホス, ジメチルピルホス-Z, エディフェンホス, ピラクロホス, フェノフカルブ, ベンダイオカルブ, ピリミカルブ, カルバリル; 以上 50 µg/mL, エトリムホス, エトプロホス; 以上 25 µg/mL アセトン溶液) および混合標準溶液 B (エスプロカルブ, クロルピリホス, ジェトフェンカルブ, ブプロフェジン, クレソキシムメチル, テブフェンピラド, フェナリモル, ビテルタノール, イミダクロプリド, テブフェノジド, クロルプロファミン, チオベンカルブ, トリアジメノール, フルトラニル, ミクロブタニル, オキサジキシル, レナシル, テニルクロール, アゾキシストロビン; 50 µg/mL アセトン溶液) を調製した. 混合標準溶液 C として林純薬工業(株)製オーダーメイド・農薬 10 成分混合標準溶液・添加用 (クロルピリホス, ジェトフェンカルブ, クレソキシムメチル, イミダクロプリド; 以上 120 µg/mL, エスプロカルブ, ビテルタノール; 以上 100 µg/mL, ブプロフェジン, テブフェンピラド, フェナリモル, テブフェノジド; 以上 80 µg/mL アセトン溶液) および同・測定用 (各 10 µg/mL アセトン溶液) を使用した.

グラファイトカーボンブラック (GCB)/PSA 積層カラム: SIGMA-ALDRICH 社製 ENVI™-CarbII/PSA (500/500 mg) を用いた.

### 3. 装 置

攪拌機: ケンミックス・アイコー KM-800

フードプロセッサー: 東芝精米機 QS-7

ハンドミキサー: bamix M200

ガスクロマトグラフ質量分析計: (株)島津製作所製 GCMS-QP2010, Waters 社製 QuattroMicro GC

液体クロマトグラフ質量分析計: (株)島津製作所製 LCMS-2020

### 4. 試料調製方法

#### 1) レトルトカレー試料の調製

水を入れた 20 L のステンレスバケツをガスコンロ上で 80℃ 以上に加熱し, レトルトカレーのパックを複数投入して 5 分間加熱した. 加熱されたレトルトカレーは, フードプロセッサーで約 500 g ずつ細切均一化した. これを上皿はかりに載せたステンレス容器 (容量 8 L: 攪拌機付属品) へ移し, 4.0 kg を量り採った. ここへ混合標準溶液 A を 100 ng/g (一部は 50 ng/g) となるように 8 mL 添加して攪拌機で 5 分間以上混合した. この操作を 2 回行って添加試料を合計 8.0 kg 調製し, 1 つのステンレス容器中で保温しつつ杓子で攪拌混合した. 約 200 g ずつアルミ製シール袋 30 個に分包して -20℃ で保存した.

#### 2) 予備検討のパンケーキ試料の調製

2 L ビーカー中で市販のホットケーキミックス 200 g に対し, 卵 1 個 (M 寸約 50 g), 牛乳 150 mL を加え, 均一になるまでハンドミキサーで混合し, 生地を合計 800 g 調製した. これに混合標準溶液 B を 100 ng/g となるように 1.6 mL 添加し, さらに 5 分間攪拌した. 生地

は 160℃ に設定したホットプレートで行い, 約 50 g ずつを杓子で採取し, 表裏を合計 3.5, 4.5, 5.5, 7, 10, 15, 30, 60 分間加熱調理した. 調製したパンケーキはワイヤラック上で放冷し, フードプロセッサーで粉碎して分析した.

#### 3) パンケーキ試料の調製

4-2) と同様の比率で生地を調製し, 合計 4.0 kg を攪拌機のステンレス容器へ移した. これに混合標準溶液 C を 80~120 ng/g となるように 8 mL 添加し, 攪拌機で 5 分間攪拌した. 生地

### 5. 農薬分析方法

分析方法は既報に準じた<sup>19-21)</sup>. 試料を均一化した後, 50 mL コニカルチューブに 5 g を採取した. これに無水硫酸マグネシウム 3 g (レトルトカレーの場合は 6 g) および酢酸エチル 20 mL を加え, ホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した. 遠心分離 (2,000×g, 5 分間) 後, 酢酸エチル層 8 mL をナス型フラスコに分取した. これをエバポレーターで濃縮し, 窒素気流下で乾固した. 残渣をヘキサン 10 mL に溶解させ, 別のコニカルチューブに移した. これにヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を加え分配抽出を行った. 遠心分離または静置後, アセトニトリル層を分取し, あらかじめアセトニトリル-トルエン (3:1) 30 mL を通液させた GCB/PSA 積層カラムに負荷した. 残ったヘキサン層に再度ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を加えて分配抽出を行い, 得られたアセトニトリル層を同じカラムに負荷した. このカラムにさらにアセトニトリル-トルエン (3:1) 30 mL を加えて溶出し, すべての溶出液を同一のナス型フラスコに回収した. これをエバポレーターで濃縮してアセトンで 2 mL に定容し, イミダクロプリド, テブフェノジド以外を GC/MS で測定した (試料換算: 1.0 g/mL). イミダクロプリド, テブフェノジドについては, このうち 0.5 mL を分取して窒素気流下で乾固し, 0.5 mL のメタノールに溶解した後に 3 倍量の蒸留水で定容して LC/MS で測定した (試料換算: 0.25 g/mL).

### 6. 均一性評価方法

分包した容器のうち 6 個を無作為に選択し, 各容器から 2 部位を採取して, 合計 12 個の試料を分析した. この結果から一元配置分散分析によって容器間/容器内の分散比を算出し, 容器数 6, 併行数 2, 有意水準 5% に対する棄却限界値 (4.387) より小さい場合に, 試料が均一であると判定した.

### 7. 保存試験方法

#### 1) レトルトカレー試料

試料調製後, 2 カ月間 -20℃ で保存した試料より, 1 個の容器を無作為に選択し, 併行数を 8 として試料を分析した. この結果を試料調製時の分析値と比較し, 残存率を求めた.

## 2) パンケーキ試料

調製した試料 5 g を 15 本のコニカルチューブに採取し、調製直後および 1, 2, 4, 8 週間  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した後、併行数を各 3 とし分析した。この結果を試料調製直後の分析値と比較し、残存率を求めた。

## 結 果

## 1. レトルトカレー試料の調製

レトルトカレーへの添加農薬としては、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用のある有機リン系、カーバメート系の農薬を選択した。レトルトカレー試料は、凍結する際に脂質が分離し、試料の不均一化を招くことが予備検討時に

観察された。そのため、試料の均一性評価の際には、分包装した各容器を湯煎で約  $60^{\circ}\text{C}$  に加温しつつハンドミキサーで攪拌してから採取した。調製したレトルトカレー試料の均一性評価を行った結果、カルバリルを除く 14 農薬の分析値からは試料が均一であると判定された。カルバリルに関しては分散比が棄却限界値を上回り、容器間での濃度の変動が併行条件で測定された濃度の変動に比べて大きかった。各農薬の平均濃度はエトリムホスで  $34\text{ ng/g}$ 、エトプロホスで  $37\text{ ng/g}$ 、それ以外は  $54\sim 83\text{ ng/g}$ 、変動係数は  $4\sim 6\%$  であった (Table 1)。また、保存試験の結果、アセフェート (127%) 以外の 14 農薬は残存率が  $96\sim 108\%$  であった。

Table 1. ANOVA results for the homogeneity test of curry samples

Pesticide	Spiked amount (ng/g)	Average (ng/g)	RSD (%)	F
Methamidophos	100	54	6	0.693
Acephate	100	61	6	1.326
Dimethoate	100	71	4	1.480
Tolclofos-methyl	100	78	4	1.093
Malathion	100	83	5	1.138
Isofenphos	100	83	4	1.023
Ethoprophos	50	37	5	0.884
Etrimfos	50	34	5	1.609
Dimethylvinphos	100	71	4	1.439
Edifenphos	100	73	5	4.385
Pyraclofos	100	79	5	3.349
Fenobucarb	100	78	5	1.925
Bendiocarb	100	67	6	2.615
Primicarb	100	75	4	1.021
Carbaryl	100	65	6	9.694

n=12

Table 2. Time course of pesticide concentration and weight of pancake

Baking time	3.5 min	4.5 min	5.5 min	7 min	10 min	15 min	30 min	60 min
Weight ratio*	87%	87%	88%	85%	85%	80%	70%	60%
Pesticide	Conc (ng/g)							
Esprocarb	95	92	93	90	92	99	91	100
Chlorpyrifos	96	91	90	91	94	101	99	104
Diethofencarb	101	101	103	95	104	111	95	90
Buprofezin	96	90	90	83	89	101	95	104
Kresoxim-methyl	99	93	93	92	96	104	101	103
Tebufenpyrad	120	104	107	98	94	113	100	103
Fenarimol	94	88	89	89	91	97	81	70
Bitertanol	91	88	87	85	87	94	71	79
Imidacloprid**	80	79	98	80	106	103	82	31
Tebufenozide**	101	92	126	105	119	116	116	126
Chlorpropham	99	94	94	91	97	104	99	80
Thiobencarb	94	92	91	89	90	97	92	94
Triadimenol	94	95	99	91	99	103	83	60
Flutolanil	101	95	96	93	98	106	94	85
Myclobutanil	99	91	94	89	93	101	80	61
Oxadixyl	95	97	90	94	91	98	67	25
Lenacil	90	87	87	86	87	95	67	29
Thenylchlor	90	85	83	80	86	83	68	65
Azoxystrobin	110	100	105	103	97	107	82	65

\* Relative weight against the pastry

\*\* Determined by LC/MS

## 2. パンケーキ試料の調製

### 1) 予備検討

パンケーキの調理後重量は、加熱調理工程で水分の蒸発などがあり、調理前の生地重量に対して10~15%の減少が見られた。パンケーキ試料への添加は調理前に行い、分析値は調理後重量で換算した濃度とすることにした。そこで、混合標準溶液Bを添加した生地で調理時間を変えたパンケーキを調製し、重量の変化と農薬濃度分析値の変化を調査した(Table 2)。なお、添加農薬は、参加機関が通常の検査業務で分析している農薬を中心に選択した。その結果、調理時間の延長に伴って減少する農薬と、ほとんど変化しない農薬があった。このことから、調理による重量の減少と、試料中の農薬量の減少は基本的に比例関係にあり、加熱に弱い農薬は長時間の調理でより大きく減少する、ということが考えられた。そこで、加熱に弱い農薬への影響を無視できる4分間を調理時間とした。また、この各農薬の熱安定性とパンケーキマトリックス中のクロマトグラム強度を基に、試料に添加する10農薬を選択し、混合標準溶液Cを準備した。

### 2) 試料調製

調製したパンケーキ試料の均一性評価を行ったところ、10農薬すべての分析値から試料が均一であると判定された。各農薬の平均濃度は、63~76 ng/g (80 ng/g 添加)、89.97 ng/g (100 ng/g 添加)、104~136 ng/g (120 ng/g 添加)、変動係数は全農薬を通じて6~16%であった(Table 3)。保存試験の結果、1~2週目では残存率が97~106%、4週目では89~96%、8週目では86~95%であった。

## 考 察

加工食品中の農薬分析は、中毒事件を契機に要望が増大し、それに応えるべく実施されている。これに対する技能試験を行うことは、その分析値の信頼性確保に大いに貢献すると思われる。この技能試験に用いる試料の検討には、原材料食品に準じた結果が予測されるため、加工度の低い食品や主成分が単一の食品は適していないと考えられた。そこで本研究では、動物性食品と植物性食品を含有するこ

と、また農薬添加後の均一性確保に有効と考えられる、流動性を有することを条件に、加工食品の選択を行った。なお、添加量は原材料由来の残留濃度を想定し、かつ測定が十分可能と思われる50~120 ng/gとした。

レトルトカレーは脂質、肉類、野菜類、そして多量の香辛料を含んでおり、夾雑物が多く測定への影響が大きかった。そのためか、均一性評価時の分析値が添加量よりも小さく、一般的な農薬分析法に求められている回収率の70~120%を満たさない農薬もあった。低回収率であった農薬については、分析法の性能が十分でなかったことが疑われる一方で、添加時に分解などによって試料中の真の濃度が添加量と乖離している可能性も考えられる。技能試験の結果は $\alpha$ スコアにより解析され、標的値には全機関の平均や過去の技能試験の結果、また均一性試験時の結果が用いられるのが一般的である。本研究で検討したレトルトカレーを試料とする場合には、どのような値を標的とするかを明確に定めるだけの科学的根拠がないため、技能試験結果の解析についても、より適切に各機関の技能を明らかにするための多角的な検討が必要と考えられた。また、試料の採取時に再均一化が必要なこともあり、当該試料を用いた技能試験は、参加機関にとって技術的にも難易度の高いものになると予想された。

次に、レトルトカレーで認められた、保存中に不均一化する問題点を克服すべく、調製時に流動性があり、その後固体化できる加工食品としてパンケーキを選択した。パンケーキは調理後に流動性を失い、試料を粉碎することで均一性の確保が容易であると考えられた。さらに、構成成分が小麦粉、牛乳、卵などで測定系への影響がレトルトカレーよりも小さく、添加量と分析値の乖離が少なくなると考えられた。一方でパンケーキは加熱調理するため、加熱が農薬へ及ぼす影響と、調理後の試料重量の減少による濃度変化が懸念された。しかし、数分の調理時間では農薬濃度に大きな変化は見られなかった。均一性評価時の分析値は添加量の79~113%であり、レトルトカレーよりも良好な回収率が得られた。しかし、保存試験においてはやや減少傾向が見られ、試験期間を短めに設定することが望ましいと考えられた。この原因は明らかではないが、粉碎し

Table 3. ANOVA results for the homogeneity test of pancake samples

Pesticide	Spiked amount (ng/g)	Average (ng/g)	RSD (%)	F
Esprocarb	100	97	6	0.296
Chlorpyrifos	120	136	9	1.083
Diethofencarb	120	130	16	0.100
Buprofezin	80	75	6	0.799
Kresoxim-methyl	120	111	13	0.032
Tebufenpyrad	80	76	6	0.515
Fenarimol	80	63	9	0.168
Bitertanol	100	89	6	0.393
Imidacloprid*	120	104	9	0.257
Tebufenozide*	80	64	14	0.240

\* Determined by LC/MS

n=12