

detection⁵ have also been reported. These methods are sensitive, but generally require complicated pre-treatments and are also time-consuming for detection of ppb levels of ractopamine (Table 1). The methods using HPLC with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) are highly sensitive^{8, 13, 14}, but these instruments are expensive.

On the other hand, LC/MS systems are widely available, and are sensitive enough to detect ppb levels of ractopamine as listed in Table 1. So, if a simple and reliable method using LC/MS is developed, more inspection agencies will be able to perform residue analysis of ractopamine.

The aim of this study was to develop a simple and reliable method for the quantification and confirmation of trace amounts of ractopamine in swine and cattle tissues using LC/MS. The procedure was developed for use in routine monitoring of ractopamine residues, as mandated by the inspection agencies.

Materials and Methods

Samples, chemicals and materials

Swine and cattle tissues (muscle, fat and liver) were purchased from a market in Tokyo, Japan. These samples were stored at -40°C until analysis. Standard ractopamine hydrochloride was obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Ractopamine standard solutions were prepared as described below. A standard stock solution containing $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of ractopamine was prepared in methanol, and the solution was diluted successively with methanol. These standard solutions were stored at -20°C until analysis. All the solvents used were of LC grade and other chemicals used were of analytical grade unless otherwise stated.

Liquid chromatograph and mass spectrometer

Alliance 2695 separation module liquid chromatograph (Waters, Co., Milford, MA, USA) coupled with a micromass ZQ 2000 mass spectrometer (Waters).

LC/MS conditions

Column: Wakosil-II 3C18HG (150×3 mm i.d., 3 μm , Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Column oven temperature: 40°C

Mobile phase composition: 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80 : 20)

Flow rate: 0.4 mL/min

Source temperature: 100°C

Desolvation temperature: 350°C

Gas: nitrogen, flow rate: ca. 360 L/hr

Capillary voltage: 3.5 kV

Ionization mode: ESI, positive ion mode

Measuring mode: SIR

Monitoring ion: m/z 302

Cone voltage: 20 V

Sample preparation

For meat and liver, a finely chopped sample (5.0 g)

was weighed into a 50 mL centrifuge tube. Then 20 mL of ethyl acetate and 1 mL of 4 mol/L potassium carbonate solution were added to the tube, and the sample was homogenized for 2 min and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The ethyl acetate layer was transferred to a recovery flask, and 20 mL of ethyl acetate was added to the pellet in the tube. The mixture was homogenized and centrifuged. The resulting ethyl acetate solutions were combined and evaporated to dryness below 40°C . The residue was dissolved in 30 mL of acetonitrile, and the acetonitrile solution was vigorously shaken twice with 30 mL of *n*-hexane saturated with acetonitrile. The resulting acetonitrile solution was evaporated to dryness, and the residue was redissolved in 1.0 mL of methanol.

For fat samples, preparation of the test solution was performed as described below. A sample (5.0 g) was weighed into a 250 mL glass tube. Then 30 mL of acetonitrile and an equivalent volume of *n*-hexane saturated with acetonitrile were added, and the sample was homogenized for 2 min and centrifuged for 10 min at 3,000 rpm. The acetonitrile layer was transferred to a recovery flask, and 30 mL of acetonitrile was added to the glass tube. The mixture was homogenized and centrifuged. The two acetonitrile layers were combined and defatted with 30 mL of *n*-hexane saturated with acetonitrile. The acetonitrile layer was evaporated to dryness, and the residue was redissolved in 1.0 mL of methanol.

Determination of ractopamine

Determination of ractopamine was performed by LC/MS. Aliquots of $2\ \mu\text{L}$ of the ractopamine standard solutions and the test solutions were injected into the LC/MS system. The quantification was performed by calculating the peak areas. Detection was performed by SIR at m/z 302.

Results and Discussion

MS conditions

Ractopamine is a basic compound possessing an amino group (Fig. 1). Therefore, the positive ESI mode was applied for the analysis of this drug. In the MS spectrum of ractopamine, the proton adduct of the ractopamine molecule ($M+H$)⁺ (m/z 302) was observed as a base peak. Therefore, the m/z 302 ion was selected as the monitor ion for SIR. The cone voltage was set to 20 V, since the monitoring ion (m/z 302) was observed most strongly.

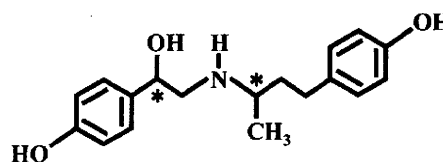


Fig. 1. Structure of the β -agonist ractopamine

The asterisks indicate asymmetric carbon atoms.

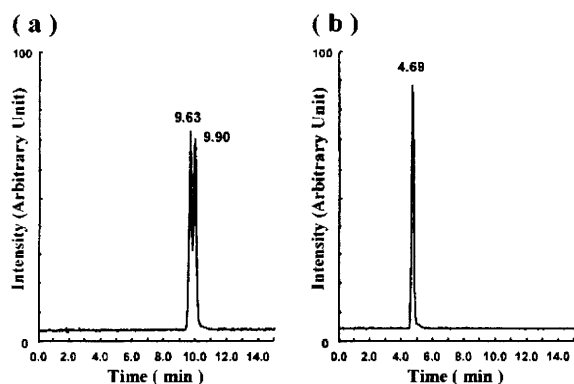


Fig. 2. Chromatograms of ractopamine standard solutions with two different mobile phases

0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ractopamine standard solution was injected into the LC/MS with the mobile phase of 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (85:15) (a) or (80:20) (b).

HPLC conditions

A standard C18 column, which is generally used for the analysis of veterinary drugs, was selected as the analytical HPLC column.

Acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid were selected as the mobile phase and the flow rate was set to 0.4 mL/min, based on the Multi-residue Method I for Veterinary Drugs, etc. by HPLC (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan).

The standard solution of ractopamine was subjected to LC/MS using 2 different mobile phases (0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80:20 and 85:15)). The chromatograms obtained are shown in Fig. 2. The peak obtained was very sharp with 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80:20), whereas it was slightly broadened with 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (85:15). It was considered that the isomers of ractopamine were partially separated in the latter mobile phase.

The MRLs for ractopamine are set as the total concentration of these isomers. Therefore the mobile phase of 0.05% trifluoroacetic acid-acetonitrile (80:20) was selected in this study and the ractopamine was determined based on the one peak.

Extraction and clean-up

First, solvents for the extraction of ractopamine were investigated. Almost all added ractopamine was extracted by using methanol/acetic acid¹⁾, methanol²⁾ or acetonitrile, but materials which interfered with the determination of ractopamine were also extracted. Therefore, we used ethyl acetate as a solvent for extraction, and transferred un-ionized ractopamine to the ethyl acetate layer by adding 4 mol/L potassium carbonate. This method could extract ractopamine almost entirely, without extracting any interfering material. In the case of fat, ractopamine was extracted and purified by partition with acetonitrile/*n*-hexane, because no interfering material was extracted.

Table 2. Results of recovery tests for ractopamine

	Fortified (ppm)	Swine		Cattle	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Muscle	0.01	99.7	6.6	108.3	0.1
Fat	0.01	99.5	9.5	97.0	0.1
Liver	0.04	100.8	5.7	109.4	1.9

n=3

Next, clean-up procedures were investigated using several cartridge columns (polymer, C18 reverse phase and cation-exchange type). The retention and elution of ractopamine were good in the case of the standard solution, but less good in the case of food matrices, and the recoveries varied widely. So, the chosen clean-up procedure consisted of only partition with acetonitrile/*n*-hexane, without using the cartridge columns.

With such a simple method, the extraction of ractopamine was achieved with high recovery and high reproducibility, without interfering peaks on the chromatograms.

Recovery test and precision of analysis

The results of recovery tests are shown in Table 2. Ractopamine was added to muscle and fat at the level of 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$, and added to liver at the level of 0.04 $\mu\text{g}/\text{g}$. These samples were analyzed by the proposed methods. Mean recoveries of ractopamine from swine tissues were 99.5–100.8%, and those from cattle tissues were 97.0–109.4%. The RSDs (*n*=3) ranged from 5.7% to 9.5% for swine samples, and from 0.1% to 1.9% for cattle samples. The LOQ was 1 ng/g (*S/N*=10). These results satisfied the standards for residual analysis of veterinary drugs in foods established by the Codex Alimentarius Commission (CAC). Therefore the method proposed in this study offers good performance for the analysis of ractopamine residues in foods.

Conclusion

A simple and reliable method using LC/MS has been developed for the determination of ractopamine in swine and cattle tissues. The method consists of extraction with ethyl acetate for muscle and liver and with acetonitrile/*n*-hexane for fat, clean-up by extraction with acetonitrile/*n*-hexane saturated with acetonitrile, and determination using LC/MS (SIR mode).

The mean recoveries of ractopamine from swine samples were 99.5–100.8%, and those from cattle samples were 97.0–109.4%. The RSDs ranged from 0.1% to 9.5% (*n*=3). The LOQ was 1 ng/g (*S/N*=10). These results meet the standards for residual analysis of veterinary drugs in foods established by CAC. Therefore, the simple method developed in the present study is suitable for routine monitoring of ractopamine.

References

- 1) Antignac, J. P., Marchand, P., Bizec, B. L., Andre, F., Identification of ractopamine residues in tissue and urine

- samples at ultra-trace level using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **774**, 59-66 (2002).
- 2) Gu, Y., Schinckel, A. P., Forrest, J. C., Kuei, C. H., Watkins, L. E., Effects of ractopamine, genotype, and growth phase on finishing performance and carcass value in swine: I. Growth performance and carcass merit. *J. Anim. Sci.*, **69**, 2685-2693 (1991).
 - 3) Engeseth, N. J., Lee, K. O., Bergen, W. G., Helferich, W. G., Knudson, B. K., Merkel, R. A., Fatty acid profiles of lipid depots and cholesterol concentration in muscle tissue of finishing pigs fed ractopamine. *J. Food Sci.*, **57**, 1060-1062 (1992).
 - 4) Stites, C. R., McKeith, F. K., Singh, S. D., Bechtel, P. J., Mowrey, D. H., Jones, D. J., The effect of ractopamine hydrochloride on the carcass cutting yields of finishing swine. *J. Anim. Sci.*, **69**, 3094-3101 (1991).
 - 5) Shishani, E. I., Chai, S. C., Jamokha, S., Aznar, G., Hoffman, M. K., Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **483**, 137-145 (2003).
 - 6) Watkins, L. E., Jones, D. J., Mowrey, D. J., Anderson, D. B., Veenhuizen, E. L., The effect of various levels of ractopamine hydrochloride on the performance and carcass characteristics of finishing swine. *J. Anim. Sci.*, **68**, 3588-3595 (1990).
 - 7) Haasnoot, W., Stouten, P., Lommen, A., Gazemier, G., Hooijerink, D., Schilt, R., Determination of fenoterol and ractopamine in urine by enzyme immunoassay. *Analyst*, **119**, 2675-2680 (1994).
 - 8) Elliott, C. T., Thompson, C. S., Arts, C. J., Crooks, S. R., Baak, M. J., Verheij, E. R., Baxter, G. A., Screening and confirmatory determination of ractopamine residues in calves treated with growth promoting doses of the β -agonist. *Analyst*, **123**, 1103-1107 (1998).
 - 9) Shelver, W. L., Smith, D. J., Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine. *J. Immunoassay*, **21**, 1-23 (2000).
 - 10) Turberg, M. P., Macy, T. D., Lewis, J. J., Coleman, M. R., Determination of ractopamine hydrochloride in swine and turkey tissues by liquid chromatography with coulometric detection. *J. AOAC Int.*, **78**, 1394-1402 (1995).
 - 11) Turberg, M. P., Macy, T. D., Lewis, J. J., Coleman, M. R., Determination of ractopamine in monkey plasma and swine serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*, **26**, 279-285 (1996).
 - 12) Turberg, M. P., Macy, T. D., Lewis, J. J., Coleman, M. R., Determination of ractopamine hydrochloride in swine, cattle, and turkey feeds by liquid chromatography with coulometric detection. *J. AOAC Int.*, **77**, 840-847 (1994).
 - 13) Churchwell, M. I., Holder, C. L., Little, D., Preece, S., Smith, D. J., Doerge, D. R., Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric analysis of incurred ractopamine residues in livestock tissues. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1261-1265 (2002).
 - 14) Fesser, A. C., Dickson, L. C., MacNeil, J. D., Patterson, J. R., Lee, S., Gedir, R., Determination of beta-agonists in liver and retina by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **88**, 61-69 (2005).

報 文

LC-MS/MS による畜水産食品中のピコザマイシンの定量

(平成 20 年 10 月 7 日受理)

藤田和弘^{1,*} 仲西亜希子¹ 石原三知代¹ 伊藤裕信¹
 中村宗知¹ 渡井正俊¹ 谷口 誠² 村山三徳³

Determination of Bicozamycin in Livestock Products and Seafoods by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Kazuhiro FUJITA^{1,*}, Akiko NAKANISHI¹, Michiyo ISHIHARA¹, Hironobu ITO¹, Munetomo NAKAMURA¹,
 Masatoshi WATAI¹, Makoto TANIGUCHI² and Mitsunori MURAYAMA³

¹ Japan Food Research Laboratories: 7-4-41 Saitoasagi, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan;

² Mimasaka University: 50 Kitazono-cho, Tsuyama, Okayama, 708-8511, Japan;

³ National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; *Corresponding author

A novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for trace residue determination of bicozamycin (BZM) in livestock products and seafoods. BZM was extracted from a sample with acetonitrile-water (4:1), followed by a two-stage SPE enrichment and cleanup. The first stage involved a styrene-divinylbenzene copolymer cartridge (GL-Pak PLS-2), and the second stage involved a divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer cartridge (Oasis HLB). The LC separation was performed on a C18 column using 0.01% formic acid-methanol (8:2) as the mobile phase and MS detection with negative ion electrospray ionization. The mean recoveries from swine muscle, liver, yellowtail, and milk fortified at the minimum residue limit (MRL) levels and 0.01 µg/g were >70%, and the relative standard deviations (RSDs) were <20%. Limits of quantitation (LOQs) ranged from 0.002 to 0.005 µg/g.

(Received October 7, 2008)

Key words: ビコザマイシン bicozamycin; 畜産食品 livestock product; 水産食品 seafood; 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC-MS/MS

緒 言

ピコザマイシン (BZM) は, *Streptomyces sapporonensis* から産生される抗生物質で, Fig. 1 に示す構造を有し, *Escherichia coli*, *Salmonella* などのグラム陰性菌に対して抗菌作用を有している。わが国においては, 飼料添加物として鶏用および豚用飼料への使用が認められており, また, 安息香酸塩は水産用医薬品としてスズキ目魚類への使用が認められている。これらのことから, 薬剤が不適切な使用をされた場合, 家畜などへの残留が懸念される。

BZM の化学的な残留分析法としては, 高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) により分離し, デンシトメトリーで蛍光検出する方法¹⁾ と UV 検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC)²⁾ による方法が報告されてい

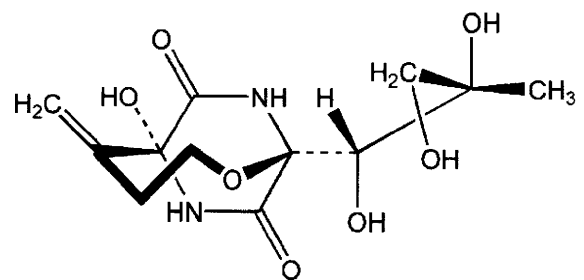


Fig. 1. Chemical structure of BZM.

るが, ポジティブリスト制度において設定された暫定基準値をクリアできる検出感度を有していない。

そこで著者らは, 種々のポリマー系カートリッジに対する BZM の挙動を確認した後, 2 種類のカートリッジを用いて濃縮・精製した後, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による方法を検討したところ, 良好な結果が得られたので報告する。

* 連絡先

¹ 財団法人 日本食品分析センター: 〒567-0085 茨木市彩都あさぎ 7-4-41

² 美作大学: 〒708-8511 岡山県津山市北園町 50

³ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

実験方法

1. 試料

試料は大阪府内で市販されていた豚筋肉、豚肝臓、ブリーおよび牛乳を使用した。

2. 試薬等

標準品: BZM は独立行政法人農林水産消費安全技術センター検定品 (力価 916.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$) を用いた。

標準溶液: BZM 標準品 20 mg (力価として) を精密に量り、メタノール 20 mL に溶解して標準原液 (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とし、標準溶液は用時適宜 0.01% ギ酸で希釈して調製した。なお、標準原液は -25°C で保存した。

GL-Pak PLS-2 カートリッジ (500 mg): ジーエルサイエンス社製、カートリッジはあらかじめメタノール 10 mL および水 10 mL でコンディショニングした後、使用した。

Oasis HLB カートリッジ (60 mg): Waters 社製、カートリッジはあらかじめメタノール 5 mL および水 5 mL でコンディショニングした後、使用した。

試薬: メタノールおよびギ酸は LC/MS 用を、その他の試薬は市販特級品を、水は Millipore 社製 Milli-Q 超純水製造装置で精製した水を使用した。

メンブランフィルター: Millipore 社製 Millex-LG 0.20 μm

3. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフは、島津製作所社製 LC-20 シリーズ、タンデム質量分析装置は Applied Biosystems 社製 4000Qtrap を用い、Table 1 および 2 に示した条件で測定した。

4. 検量線

BZM 標準原液を 0.01% ギ酸で希釈し、0.5~25 ng/mL の標準溶液を調製し、その 5 μL を LC-MS/MS に注入した。検出には MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を採用し、得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

Table 1. Operating conditions of MS/MS

Ionization	ESI, negative	
Ion spray voltage	-4,500 V	
Ion spray temp.	450 $^{\circ}\text{C}$	
Declustering potential	-40 V	
Dwell time	150 ms	
Curtain gas	20 psi	
Collision gas	6 psi	
Nebulizer gas	60 psi	
MRM Transition (m/z)	CE* ¹ (eV)	CXP* ² (V)
301 \rightarrow 209* ³	-22	-3
301 \rightarrow 184	-18	-5
301 \rightarrow 124	-34	-7

*¹ Collision energy.

*² Collision exit potential.

*³ Daughter ion for quantitation.

Table 2. Operating conditions of LC

Column	Hydrosphere C18 HS-301-3, (3 μm , 100 \times 4.6 mm i.d.)		
Flow rate	0.2 mL/min		
Oven temp.	40 $^{\circ}\text{C}$		
Injection volume	5 μL		
Eluent	A=0.01% Formic acid, B=Methanoli		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00 \rightarrow 10.00	100	0
	10.01 \rightarrow 24.00	80	20
	24.01 \rightarrow 34.00	100	0

5. 試験溶液の調製

試料 5.0 g を採取し、アセトニトリル-水 (4:1) 40 mL を加えてホモジナイズ (30 秒間) した後、遠心分離 (3,500 rpm, 20 $^{\circ}\text{C}$, 5 分間) し、上澄み液を分取した。残留物にさらにアセトニトリル-水 (4:1) 40 mL を加えて 5 分間振とう抽出した後、同様に遠心分離した。上澄み液を先のものと同様に合わせ、アセトニトリル-水 (4:1) で 100 mL に定容し、その 20 mL を分取した後、1-プロパノール 5 mL を加えて減圧下濃縮乾固した。残留物に 2% 塩化ナトリウム溶液 30 mL およびジエチルエーテル 30 mL を加えて 5 分間振とうした後、遠心分離 (3,500 rpm, 20 $^{\circ}\text{C}$, 5 分間) して水層を分取し、1-プロパノール 10 mL を加えて再度濃縮乾固した。残留物を水 10 mL (5 mL \times 2 回) に溶解して、GL-Pak PLS-2 カートリッジに負荷し、カートリッジを水 5 mL で洗浄後、メタノール-水 (3:2) 10 mL で溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固した後、残留物を 0.01% ギ酸 10 mL に溶解した後、Oasis HLB カートリッジに負荷した。通過液の最初の 4 mL を廃棄し、残りの 6 mL を分取してメンブランフィルターでろ過して試験溶液とし、この 5 μL を LC-MS/MS に注入した。

結果および考察

1. LC-MS/MS 測定条件の検討

1.1 MS/MS 条件の検討

BZM は、極性が高い化合物であることから、イオン化のインターフェイスとして ESI を選択した。標準溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をインフュージョン法により直接 MS 部に導入してイオン化条件を検討した。その結果、Fig. 2 に示すように、脱プロトン化分子 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ (m/z 301) を高感度に検出することができたため、このイオンをプレカーサーイオンとして選択し、イオン化電圧ならびにコリジョンエネルギーなどの最適化を行った。Fig. 3 にプロダクトイオンのマススペクトルを示した。この結果から、プロダクトイオンには、 m/z 301 $>$ 209, m/z 301 $>$ 184, m/z 301 $>$ 124 の 3 イオンを採用し、最も高感度な m/z 301 $>$ 209 を定量用イオンとし、MRM モードで測定することとした (Table 1)。

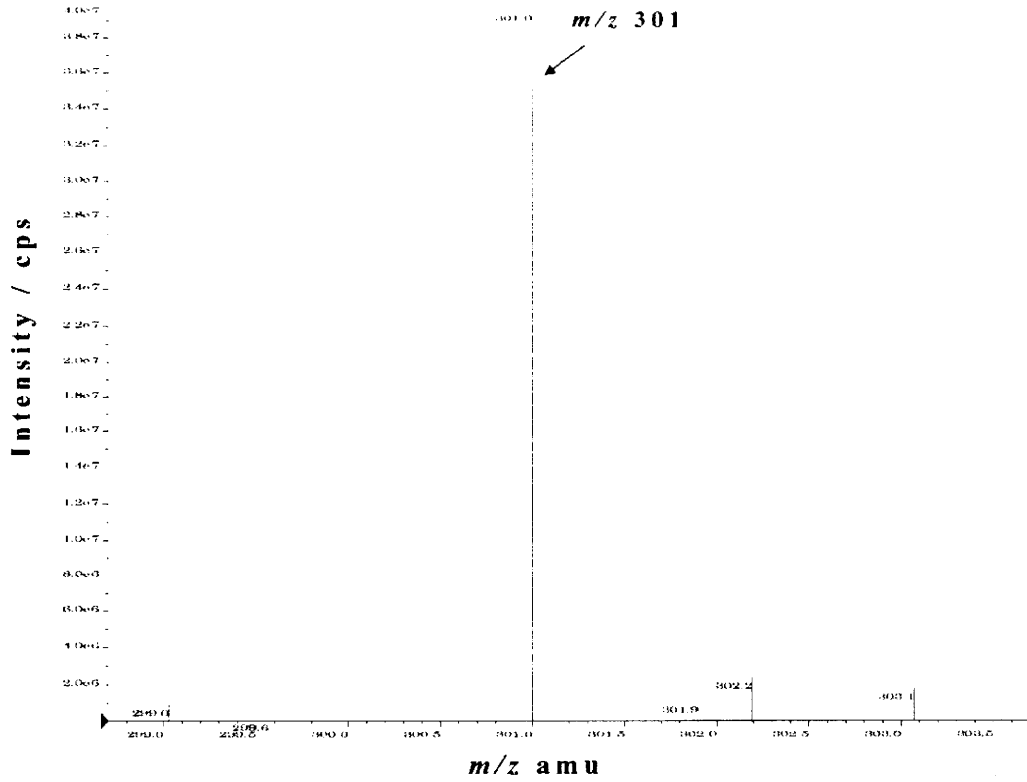


Fig. 2. MS spectrum of BZM obtained by direct infusion of the standard solution (1 $\mu\text{g/mL}$).

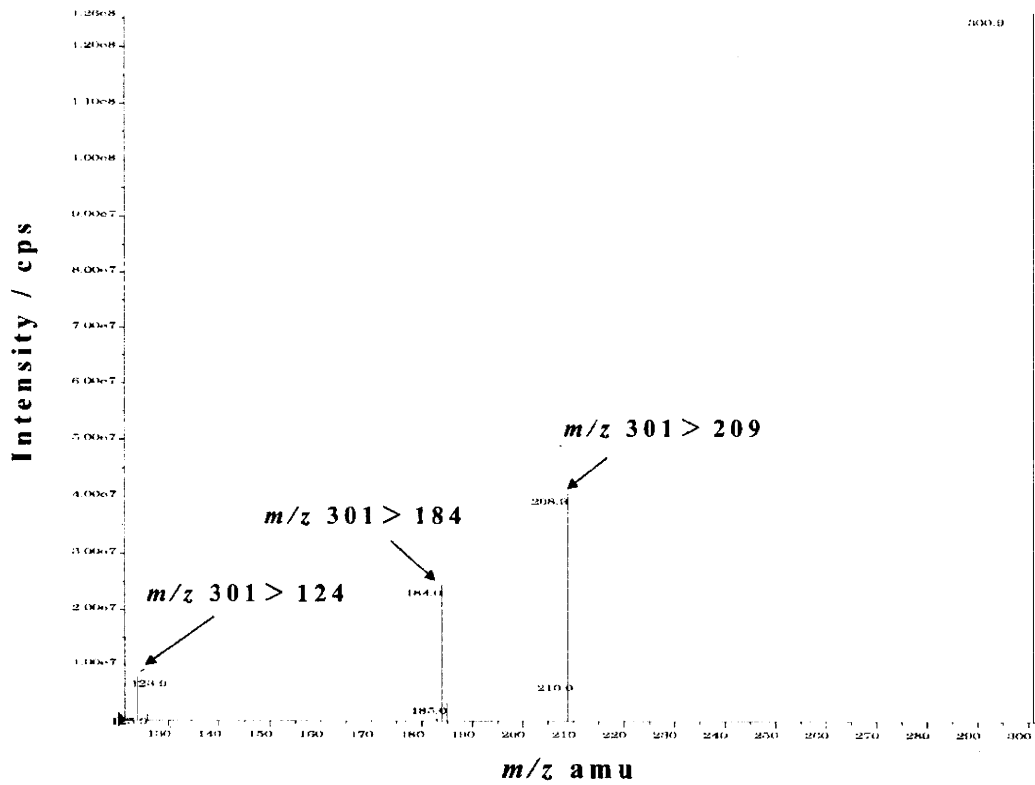


Fig. 3. Product ion scan of BZM, m/z 209, showing the most intense fragment ions at m/z 184 and 124.

1.2 LC条件の検討

BZMは非常に極性が高く、ODS系カラムへの保持が弱い。そのため、Iseらは、過塩素酸溶液やリン酸二水素カリウム溶液にほとんどメタノールなどの有機溶媒を加えない移動相を使用している²⁾。ODS系以外のカラムとして、極性物質に対して保持能力が良いとされるHILIC系カラムの一種であるInertsil Diolについて検討したが、良好な結果が得られなかった。そこでODS系カラムでの測定条件を検討した。

分析カラムとして、水の割合が多い移動相において耐久性が高い、Hydrosphere C18 H-301-3を使用し、BZMの保持を向上させるため、内径4.6 mm、長さ100 mmの通常のHPLCで汎用されるカラムサイズとした。また、移動相に用いる有機溶媒として、保持が比較的良好であったメタノールを選択した。

次に、移動相に加える揮発性の酸として酢酸、ギ酸を、添加剤として酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムを用いて、ピーク形状、検出感度に及ぼす影響を調べた。その結果、0.01%のギ酸を加えることにより、最も良好な感度を得られ、ピーク形状も良好であった。したがって、移動相には0.01%ギ酸-メタノール系を用いることとした。BZMは、0.01%ギ酸-メタノール(80:20)でピーク形状、感度とも良好に測定可能であったが、試料が豚肝臓の場合、マトリックスの影響によるイオン化抑制が残留基準値濃度(0.2 µg/g)の添加回収実験の回収率として、30%程度認められた。通常、イオン化抑制を回避する方法として、グラジエント溶出が用いられるが、BZMはODS系カラムへの保持が弱いため、グラジエント溶出の条件設定が困難であった。そこで、最初の数分間0.01%ギ酸のみを通液し、その後0.01%ギ酸-メタノール(80:20)に切り替えて通液してBZMを溶出させる手法を検討した。その結果、10分間0.01%ギ酸を通液させてからBZMを溶出させた場合、前述の添加回収実験の回収率として、約20%のイオン化率の改善が見られた。よって、本条件で測定を行うこととした(Table 2)。また、定量用イオンを用いて、本条件で検量線を作成したところ、0.5~25 ng/mLの範囲で良好な直線性($R^2=0.999$)が得られた。なお、確認イオンとして用いた m/z 301 > 184および m/z 301 > 124においても同様の濃度範囲で良好な直線性($R^2=0.999$)が得られた。

2. 前処理法の検討

BZMの残留分析の前処理法としては、齊藤らは、各種の固相抽出カートリッジ、吸着樹脂を検討した結果、XAD-2樹脂およびXAD-4樹脂にのみBZMが吸着し、より吸着能が高かったXAD-4樹脂を採用している¹⁾。しかしながら、当時はXAD-4に該当するスチレンジビニルベンゼン共重合体などのポリマー系カートリッジが存在しなかったことから、本研究においては、操作性を考慮して、現在汎用されている、ポリマー系カートリッジについてBZMの挙動を確認することとした。

Table 3. Comparison of recovery of BZM from various SPE cartridges

Cartridge	Recovery* (%)
Oasis HLB (60 mg)	<5.0
Oasis HLB (200 mg)	9.2
GL-Pak PLS-2 (270 mg)	39.0
GL-Pak PLS-2 (500 mg)	84.0
Aquisis PLS-3 (200 mg)	11.6
InertSep Pharma-1 (200 mg)	4.8
InertSep Pharma-2 (500 mg)	46.7

* 10 mL of standard solution of BZM (0.025 µg/mL in water) was applied to the cartridge in duplicate.

Table 4. Effect of volume of water used for washing the GL-Pak PLS-2 (500 mg) cartridge on the recovery of BZM

Volume of water (mL)	Recovery* (%)
5	89.3
10	81.9
20	63.5
50	4.0

* 10 mL of standard solution of BZM (25 ng/mL in water) was applied to the cartridge in duplicate.

Table 5. Elution fraction of BZM from the Oasis HLB cartridge

Elution fraction (mL)	Recovery* (%)
0~2	<5.0
2~4	32.3
4~6	93.5
6~8	103.8
8~10	104.8

* 10 mL of Standard solution of BZM (50 ng/mL in 0.01% formic acid) was applied to the cartridge in duplicate.

25 ng/mLの標準溶液10 mL (250 ng)を負荷して検討した結果、含窒素ポリマー系カートリッジであるOasis HLB, Aquisis PLS-3, Inertsil Pharmaは、BZMの吸着は弱く、XAD-4と同様のスチレンジビニルベンゼン共重合体カートリッジであるGL-Pak PLS-2の方がBZMは強く吸着されていた(Table 3)。しかしながら、充填量の差が大きく回収率に影響していることから、GL-Pak PLS-2も水溶液中で不可逆的な吸着をしているものとは考えられなかった。そこで次に、上記と同様にGL-Pak PLS-2 (500 mg)を用いて、水洗の容量の違いによるBZMの回収率を調べた。その結果、水洗の容量が増すにつれて回収率が低下していることから、BZMの十分な回収を得るには、5 mLの水洗で行う必要があるものと示唆された(Table 4)。

これらの結果に基づいて、豚肝臓を用いて精製効果を確認した。なお、抽出は、カートリッジに負荷する際に濃縮する必要があることから、Iseらの方法²⁾に準拠して含水アセトニトリルを用いることとした。その結果、1.2 LC条件の検討において記述したように、移動相条件を検

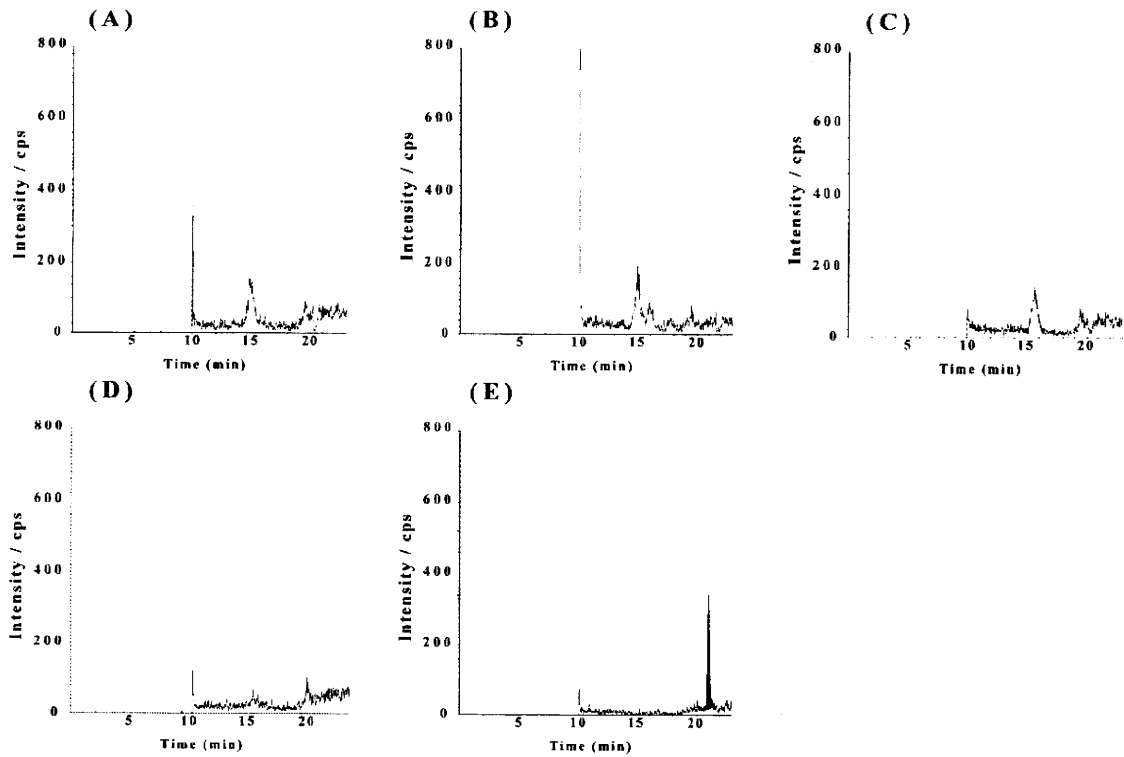


Fig. 4. MRM chromatograms of (A) swine muscle extract, (B) swine liver extract, (C) yellowtail extract, (D) milk extract, (E) standard solution (0.5 ng/mL).

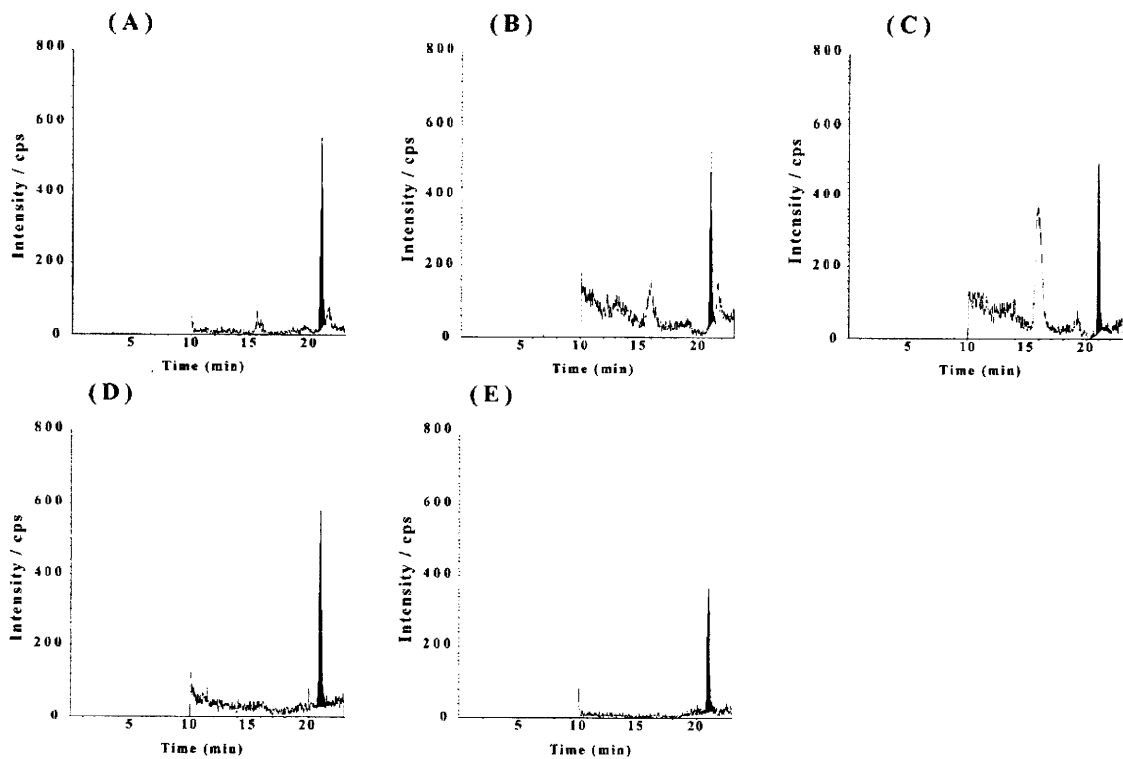


Fig. 5. MRM chromatograms of (A) extract of swine muscle fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$, (B) extract of swine liver fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$, (C) extract of yellowtail fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$, (D) extract of milk fortified at 0.01 $\mu\text{g/g}$, (E) standard solution (0.5 ng/mL).

Table 6. Results of recovery tests of BZM

Sample	Fortified ($\mu\text{g/g}$)	Day 1		Day 2		Interassay	
		Recovery ^a (%)	RSD (%)	Recovery ^a (%)	RSD (%)	Recovery ^b (%)	RSD (%)
Swine muscle	0.2	86.5	7.3	80.2	5.0	83.3	7.8
	0.01	84.0	2.4	98.8	5.4	91.4	12.1
Swine liver	0.2	79.3	2.9	95.7	1.3	87.5	13.4
	0.01	86.2	7.5	71.4	7.4	78.8	14.9
Yellowtail	0.05	80.3	3.7	83.6	4.3	82.0	4.6
	0.01	82.7	2.7	76.4	9.7	79.6	8.3
Milk	0.1	76.1	8.8	84.8	3.8	80.4	9.6
	0.01	88.5	2.5	90.5	5.5	89.5	4.3

^a Mean of 5 replicates.

^b Mean of 2 replicates (average value for each intraday).

討することにより、約 20% のイオン化率の改善はなされたものの、まだ約 10% のイオン化抑制が認められた。そこで、アフラトキシンなどのカビ毒の分析で報告されている多機能カラムの手法³⁾を参考に、先のカートリッジの検討で最も BZM の保持の弱かった Oasis HLB (60 mg) に GL-Pak PLS-2 (500 mg) 処理後の溶解液を通液させることにより、夾雑成分の除去が可能か否か試みた。まず、0.01% ギ酸で希釈した 50 ng/mL の標準溶液 10 mL (500 ng) を Oasis HLB (60 mg) カートリッジに通液して、その通過液を 2 mL ずつ分取して通過液中の BZM 濃度を調べた。その結果、最初の 4 mL では BZM 濃度は、十分ではなかったが、それ以降の溶出フラクションでは 90% 以上の濃度を得ることができた (Table 5)。よって、Oasis HLB (60 mg) カートリッジ通過液の 4 mL 以降の溶液を分取することとした。次に、本精製工程を加えて、豚肝臓を用いてイオン化抑制を確認したところ、ほぼイオン化抑制を解消することができた。

3. 添加回収実験

豚筋肉・肝臓、ブリおよび牛乳について、残留基準値濃度 (豚筋肉・肝臓 0.2 $\mu\text{g/g}$ 、ブリ 0.05 $\mu\text{g/g}$ 、牛乳 0.1 $\mu\text{g/g}$) および 0.01 $\mu\text{g/g}$ 相当濃度になるように標準溶液を 0.5~1 mL 添加して、同日 5 回、異日 2 回の繰り返しで回収実験を実施した。

1.2 LC 条件の検討および 2. 前処理法の検討において、イオン化抑制に対する改善が可能であったため、回収率の算出は絶対検量線法で実施した。

MRM クロマトグラムを Fig. 4 および Fig. 5 に、回収率と相対標準偏差の結果を Table 6 に示した。いずれの試料においても良好なクロマトグラムが得られ、また、いずれの添加濃度においても平均回収率は 70% 以上、併行再現性は 10% 未満、室内再現性は 20% 未満と良好であった。本法による定量下限 ($S/N=10$) は、豚筋肉および牛乳で 0.005 $\mu\text{g/g}$ 、豚肝臓で 0.002 $\mu\text{g/g}$ 、ブリで 0.004 $\mu\text{g/g}$ であった。

また、大阪府で市販されている豚筋肉・肝臓、ブリ (またはハマチ) および牛乳各 3 検体、合計 12 検体について本法を用いて調査した結果、BZM は検出されなかった。

まとめ

LC-MS/MS による畜水産食品中の BZM の分析法を検討した。

1. BZM の LC-MS/MS 条件を最適化した結果、ESI ネガティブイオンモードにおいて、定量用イオンとして、 m/z 301 > 209 が、確認用イオンとして m/z 301 > 184 および 301 > 124 が有効であり、いずれのイオンとも 0.5~25 ng/mL の濃度範囲において良好な直線性を示した。

2. BZM の固相抽出カートリッジとして、濃縮の際は GL-Pak PLS-2 (500 mg) が、イオン化抑制を低減させる際は Oasis HLB (60 mg) が有効であった。

3. 豚筋肉、肝臓、ブリ、乳を用いた添加回収実験の結果、いずれの試料においても平均回収率 70% 以上、併行再現精度 10% 未満、室内再現精度 20% 未満の良好な結果が得られた。

4. 本法における定量限界は、0.002~0.005 $\mu\text{g/g}$ ($S/N=10$) であった。

5. 本法を用いて市販試料 12 検体について調査を行ったところ、いずれの検体からも BZM は検出されなかった。

なお、本研究の一部は日本食品衛生学会第 95 回学術講演会 (2008 年 5 月、東京) において発表した。

文 献

- 1) Saito, K., Horie, M., Hoshino, Y., Nose, N., Nakazawa, H. Determination of bicozamycin in chicken egg and meat by fluorescence densitometry with high performance thin layer chromatography. EISEI KAGAKU, 32, 442-446 (1986).
- 2) Ise, N., Shibusaki, H., Oshita, M., Osaki, N., Ueki, M., Fujisaki, M. Determination of bicozamycin and its benzoyl-ester derivative in yellowtail tissues by high performance liquid chromatography. J. Liq. Chromatogr., 16, 2399-2414 (1993).
- 3) Akiyama, H., Chen, D., Miyahara, M., Toyoda, M., Saito, Y. Simple HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nuts and corn. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.), 37, 195-201 (1996).

総説

食品中の残留動物用医薬品の規制

村山三徳*

The Japanese Regulation on Residual Veterinary Drugs and Feed Additives in Foodstuffs

Mitsunori MURAYAMA

Japan Food Hygiene Association, Japan Food Hygiene Laboratory:
2-5-47 Tadao, Machida, Tokyo 194-0035, Japan

Key words: 食品衛生法 food sanitation law; 規格基準 specification and standard; リスクマネジメント risk management system; 動物用医薬品 veterinary drug; 飼料添加物 feed additive

食品に残留する動物用医薬品および飼料添加物に対する規制は、食の安全への要求の高まりと、分析技術の進歩を受けて、1990年以降急速に拡充されてきた。1960年代に原則無残留規制がしかれて以降、毒性評価結果から残留基準を設定する体制に移行し、さらにはいわゆるポジティブリスト制へ移行してきたが、まさに日本食品衛生学会の歴史と密接に連携してきたと言える。

本稿では、食品に残留する動物用医薬品および飼料添加物に対する規制の歴史をたどり、規制のあるべき姿を探る一助としたい。

規格基準の歴史

太平洋戦争終結後の食糧事情の悪化を受け、粗悪食品による食中毒多発に対処するべく、日本国憲法施行から7か月を経た昭和22年12月24日に食品衛生法（昭和22年法律第233号）が制定された。昭和34年12月28日には、随時発出されてきた規格をまとめて、食品、添加物等の規格基準（厚生省告示第370号）が制定された。その後も規格基準は随時改定、追加され、平成15年にいわゆる農薬等のポジティブリスト制の導入を経て現在に至る。

動物用医薬品および飼料添加物については、抗生物質および合成抗菌剤の乱用によるヒトの健康への危害防止、耐性菌の出現抑制のために、食品、添加物等の規格基準（厚生省告示第370号）において、食品は抗生物質を含有してはならないこと、加えて畜水産食品は合成抗菌剤を含有してはならないことが規定された。個別の動物用医薬品等については、随時試験法が通知され、試験法の検出限界を超えて検出されてはならない、すなわち原則として無残留規制がしかれたが、食品、添加物等の規格基準（厚生省告示第370号）には収載されなかった。試験法としては当

初はマイクロバイオアッセイが示されていたが、寄生虫用剤等の微生物の感受性が低い化合物を対象とする必要性から、理化学的試験も取り入れられるようになっていった。1990年までに31種類の抗生物質に対してマイクロバイオアッセイ、35種類の抗生物質以外の動物用医薬品等に対してガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等による理化学的試験法が示された。1990年には厚生省による輸入畜水産食品中の残留有害物質モニタリングが開始され、1991年に横浜および神戸検疫所に輸入食品・検査検査センターが設置されて、輸入食品の残留有害物質モニタリング体制が確立した一方で、規制の国際協調が強く要求されるようになり、国際食品規格(CODEX)に従い、1995年にオキシテトラサイクリン、イベルメクチン、クロサンテル、フルベンダゾール、ゼラノール、トレンボロンについて食品、添加物等の規格基準（厚生省告示第370号）に、オキシテトラサイクリンが乳および乳製品の成分規格等に関する省令（昭和26年12月27日厚生省令第52号）に残留基準値および試験法が規定された。同時に薬事・食品衛生審議会において科学的毒性試験結果を基に一日摂取許容量(ADI: Acceptable Daily Intake (mg/kg 体重/日)、一生涯にわたって毎日摂取し続けたとしても、危害を及ぼさないと見なせる体重1kg当たり一日許容摂取量)を設定し、ADIを超えないように残留基準値を設定する体制が確立された。しかし、個別動物用医薬品等の試験法通知は廃止されず、残留基準値が設定されていない動物用医薬品等についての無残留規制は維持された。その後、平成15年のポジティブリスト制導入までに34化合物に対して残留基準値および試験法が規定された。

現在の規制

現行規制はリスクマネジメントの手法を取り入れている。科学的根拠に基づきリスクを評価し、関係行政機関が連携してリスクを管理し、関係行政機関、民間機関、事業

* 社団法人日本食品衛生協会食品衛生研究所: 〒194-0035
東京都町田市忠生 2-5-47
E-mail: murayama@jfha.or.jp

者および消費者相互のリスクコミュニケーションによってよりよい体制を構築し、リスクを減らそうとしている。関係行政機関は、より多くの情報を公開し、施策決定をする際には、パブリックコメントにより広く意見聴取を行っているほか、随時フォーラム、ワークショップ、説明会等を開催して情報の周知、民間からの意見聴取に努めている。

1. 登録制度

動物用医薬品の製造、輸入販売は、薬事法（昭和35年8月10日法律第145号）により、農林水産大臣の許可を受けた者のみに認められている。登録制度の代表的な流れの例を示す。

農林水産大臣の許可を得るには、農林水産大臣に登録申請を行う。申請を受けた農林水産大臣は厚生労働大臣に残留基準値設定を依頼する。厚生労働大臣は食品安全委員会に毒性評価を依頼する。食品安全委員会は動物用医薬品専門調査会または肥料・飼料等専門調査会において、科学的毒性試験結果を基にADIを設定し厚生労働大臣に通知する。厚生労働大臣は薬事・食品衛生審議会に残留基準等食品規格の設定について諮問し、薬事・食品衛生審議会はADIを超えないように残留基準値を設定する。農林水産大臣は薬事・食品衛生審議会動物用医薬品等部会に承認の妥当性について諮問し、動物用医薬品等部会は有効性、副作用、環境影響、残留性、抗生物質および合成抗菌剤にあっては耐性菌出現等を総合的に評価して承認の妥当性を判断する。承認がなされる際には、残留基準値を超えないように用法・用量、使用禁止期間（休薬期間）等が設定され、動物用医薬品にあっては動物用医薬品の使用の規制に関する省令（昭和55年9月30日農林水産省令第42号）、飼料添加物にあっては飼料および飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年7月24日農林省令第35号）に登録される。

2. 残留規制

平成15年に導入されたポジティブリスト制度は、使用される可能性のある農薬、動物用医薬品、飼料添加物すべてに残留基準を設定する制度である。食品は、残留基準が定められている場合を除き、抗生物質および合成抗菌剤を含有してはならないとするほか、ポジティブリストには280種類の動物用医薬品等がリストアップされている。そ

の内訳は、不検出基準が適用される動物用医薬品等が13種類、リスク評価が終了して残留基準値が設定されているもの40種類、残りは過去の基準または日本と同等の手法でリスク評価された結果から定められた諸外国の基準を適用した暫定基準である。

3. 残留監視体制

日本国内の食品の残留有害物質監視は、厚生労働省、農林水産省の指導の下、地方自治体が実務を担当している。地方衛生研究所、食肉衛生検査所、保健所等が収去、検査にあたり、違反事例には行政措置を行う。監視状況の公表は自治体ごとに異なり、全国規模での状況を把握することは難しい状況である。ちなみに東京都から公表されている2008年度の監視状況では、総検査品目数70,871（国産48,107、輸入22,764）、違反品目数66（国産36、輸入30）であり、後述する厚生労働省検査所調べによる輸入食品の違反率と比較して1/5～8程度になっている。

輸入食品にあっては、厚生労働省検査所が監視指導している。検査所では輸入食品の5%以上を検査対象とするように監視指導計画を策定し、モニタリング検査を実施している。違反事例が認められると、検査件数割合を引き上げて対応し、違反頻度が高い場合には全品検査、違反の及ぼす影響が重篤であると判断される場合には、関係行政機関長の協議および薬事・食品衛生審議会の意見を受けて、包括的な輸入・販売禁止措置を執ることができるとしている。

厚生労働省が公表している監視指導結果の概要を表1にまとめた。2004年度から2009年度まで、輸入食品届出件数は180万件前後でほぼ一定であるが、違反件数は1,000～1,500件、動物用医薬品等の違反件数は54～246件と増減が大きい。これは、平成15年に発出されたポジティブリスト制度が平成18年5月に施行されたため、従来から違反が多いサルファ剤、テトラサイクリン系抗生物質等に加えて、不検出基準が適用されたクロラムフェニコール、ニトロフラン類、マラカイトグリーン等の違反事例が追加されたためである。

今後の課題

第一に挙げられる問題点は、リスク評価に時間を要することである。300種類近い動物用医薬品等に対して、毒性が評価されてADIおよび残留基準値が設定されているの

表1. 輸入食品届出・検査・違反状況

年度	届出件数 (件)	輸入重量 (千トン)	検査件数 (件)	検査件数割合 (%)	違反件数 (件)	違反件数割合 (%)	動物用医薬品等 違反件数 (件)
2004	1,808,830	32,018	187,553	10.4	1,017	0.056	72
2005	1,871,173	31,825	190,959	10.2	1,014	0.054	54
2006	1,845,995	31,555	203,001	11.0	1,515	0.082	246
2007	1,797,086	32,261	198,542	11.0	1,150	0.064	158
2008	1,759,123	31,551	193,917	11.0	1,150	0.065	115
2009	1,821,269	30,605	231,638	12.7	1,559	0.086	105

は53種類である。さらに毒性未評価の動物用医薬品等は、評価するためのデータが整えられていない場合があり、暫定基準のまま取り残される可能性が高い。科学的根拠に基づいた規制を支えるために、リスク評価は欠かせない。

第二にリスク管理のあり方について、関係行政機関の連携不足が指摘される。特に、国内監視体制が地方自治体によるところが大きいため、情報の共有が困難となっている。また、輸入食品検査においては厚生労働省指導により、国際的な評価に耐えうる水準の検査体制を保持しているが、国内監視体制における検査水準は明確ではない。

第三にリスクコミュニケーションの不足による、不安の拡大、フードファディズムの発生がある。正確な情報が伝わらないために、風評被害を生んだり、特定の食材の摂食を避けるあまりにバランスを欠いた食生活を招くおそれが

ある。関係行政機関は情報を発信する際には、一部の専門家でなければ理解できないような内容ではなく、一般の消費者が納得できるような内容にするべく細心の注意を払うべきである。また、民間からの意見聴取においても、現状では食の安全に興味を持つ人の意見だけが採り上げられる傾向があるが、より広くコミュニケーションを図ってこそ、リスクマネジメントの有効性が上がる。

ま と め

規制は変化する社会情勢に合わせて柔軟性が高くなければならない。リスクマネジメントシステムは、PDCA サイクル（計画・実施・評価・改善を繰り返すシステム）を経て完成度を高めていく必要があり、活発なリスクコミュニケーションと、規制のあり方についての再評価を繰り返して、より実効性の高い規制の構築を目指すべきである。

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

穂山 浩^{1,*} 橋田和美²

Recent Trends and Future Prospects for Labeling Regulation and Detection Methods of Genetically Modified Foods in Japan

Hiroshi AKIYAMA^{1,*} and Kazumi KITTA²¹National Institute of Health Sciences, Division of Novel Foods and Immunochemistry; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan²National Food Research Institute, Analytical Science Division; 2-1-12 Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan;

* Corresponding author

Key words: 遺伝子組換え食品 genetically modified foods; 検知法 detection method; 表示 labeling; ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction

遺伝子組換え作物とは、バイオテクノロジー技術を応用した農産物の一種であり、ある生物の遺伝子を人為的な方法によって別の生物に入れる遺伝子組換え技術によって作られた農産物をいう。現在、種子植物に限って商品化されている。英語では「Genetically Modified Organisms; GMO」と呼ばれており、遺伝子組換え作物(GM作物)およびそれを用いた加工食品を、総称して遺伝子組換え食品(GM食品)という。

GM食品開発の主要な目的のひとつは、人口増加に伴う食糧不足対策である。現在のペースで世界の人口が増加すれば、数十年後には世界中が食糧不足になると予想されている。そのため食糧増産対策として寒冷地や砂漠のような厳しい環境でも生育する作物の開発が必要になってくる。従来の品種改良では不可能であった2生物間の交配品種であっても、GM技術を用いれば短期間に効率よく開発することが可能であり、さまざまなGM作物の開発が進められている。

GM食品の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保が強く求められ、国際的な基準作りが進められた。近年ではGM食品の開発や実用化は、アメリカ、カナダ、中国を中心に世界各国で急速に広がっている。GM植物のみならず、GM魚を代表とするGM動物の開発も行われ、実用化されつつある。またトウモロコシ等の作物に組換え技術を応用し、医療用の医薬品原料等を生産させることも実用化されつつある。さらには食品添加物を生産するためのGM微生物はすでに応用されており、工業原

料生産および環境浄化目的のGM植物・生物の開発も急速に行われている。2001年からわが国では食品衛生法により、GM食品の安全性審査が義務づけられている。しかしながら、前述のような多種多様なGM植物・生物が各国で開発されている現状では、意図せずに未承認のGM植物・生物が食品として国内に流入、流通するおそれがある。したがって食用および非食用を問わず、未承認の遺伝子組換え体の食品への混入は未然に防ぐことが求められている。一方、安全性審査が終了したGM食品に関しては、「遺伝子組換え食品」あるいは「不分別遺伝子組換え食品」の表示が義務づけられている。わが国では輸入に際して分別生産流通管理により、非GM食品を確保しているが、非意図的な混入があることを考慮し、食品衛生法の届出義務における分別GM食品混入の目安は重量割合(粒割合)で5%以下と考えている。そのため書類等により証明されている場合でも、表示の妥当性を科学的に検証するためには5%を定量する必要がある。わが国では、定量PCR法により5%の検証を行ってきた。しかし、掛け合わせGMトウモロコシが混入した場合、多重測定が起こり、真値が得られないことが問題になってきた。これらのGM食品の行政規制上の諸問題に対応すべく検知法が開発され行政対応されている。本論ではわが国のGM食品の表示制度と最新の動向も踏まえGM食品の検知法について紹介する。

1. GM食品の表示行政と制度

厚生労働省では、安全性未審査のものが国内で流通しないよう、食品衛生法に基づく食品の規格基準(厚生労働大臣告示)に規定を設けることにより、2001年4月から安全性審査を法的に義務化することとなった。併せて安全性審査の義務化と一体のものとして、食品の内容を消費者に

* 連絡先

¹ 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1² (独)農研機構 食品総合研究所 食品分析研究領域: 〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12

表 1. 遺伝子組換え食品の表示制度

I 従来のもとの組成、栄養価等が同等のもの (除草剤の影響を受けないようにした大豆、害虫に強いトウモロコシなど)	
①農産物及びこれを原材料とする加工食品であって、加工後も組換えられた DNA 又はこれによって生じたタンパク質が残存するものは以下の3つのタイプの表示内容に分類される。	
(1) 分別生産流通管理が行われた GM 食品の場合	「遺伝子組換え食品」である旨(義務表示) 例 大豆(遺伝子組換え食品)
(2) GM 食品と非 GM 食品の分別生産流通管理(Identity Preserved (IP)ハンドリング)*が行われていない場合	「遺伝子組換え不分別」である旨(義務表示) 例 大豆(遺伝子組換え不分別)
(3) 分別生産流通管理が行われている非 GM 食品の場合	「遺伝子組換えではない」(任意表示) 例 トウモロコシ(遺伝子組換えでない)
②組換えられた DNA 及びこれらによって生じたタンパク質が、加工後に残存しない加工食品(大豆油、醤油、コーン油、異性化液糖等)	
「遺伝子組換えではない」、「遺伝子組換え不分別」等(任意表示)	
II 従来のもとの組成、栄養価等が著しく異なるもの(高オレイン酸大豆など)(JAS 法のみ義務表示)	
「大豆(高オレイン酸遺伝子組換え)等」(義務表示)	

* 分別生産流通管理(Identity Preserved (IP)ハンドリング)とは GM 作物または non-GM を農場から食品製造業者まで生産、流通および加工の各段階で相互に混入が起らないよう管理し、そのことが書類等により証明されているこという。

表 2. GM 表示の対象となりうる加工食品

1 豆腐および油揚げ類	17 コーンスターチ
2 凍豆腐、おからおよび湯葉	18 ポップコーン
3 納豆	19 冷凍トウモロコシ
4 豆乳類	20 トウモロコシ缶詰およびトウモロコシ瓶詰
5 みそ	21 コーンフラワーを主な原料とする加工品
6 大豆煮豆	22 コーングリッツを主な原料とする加工品
7 大豆缶詰および大豆瓶詰	23 トウモロコシ(調理用)を主な原料とする加工品
8 きな粉	24 16~20 を主な原料とする加工品
9 大豆いり豆	25 ポテトスナック菓子
10 1~9 を主な原料とする加工品	26 乾燥ばれいしょ
11 調理用の大豆を主な原料とする加工品	27 冷凍ばれいしょ
12 大豆粉末を主な原料とする加工品	28 ばれいしょデンプン
13 大豆タンパク質を主な原料とする加工品	29 調理用のばれいしょを主な原料とする加工品
14 枝豆を主な原料とする加工品	30 25~28 を主な原料とする加工品
15 大豆もやしを主な原料とする加工品	31 アルファルファを主な原料とする加工品
16 コーンスナック菓子	32 調理用のてん菜を主な原材料とする加工品

明らかにするために表示制度を開始した。また農林水産省では、JAS 法(農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律)に基づき、GM 作物とその加工食品について表示基準を定め、同様に 2001 年 4 月より適用を開始した。厚生労働省の表示については、食品衛生法の公衆衛生の観点から表示を義務づけ、農林水産省の表示については、JAS 法の消費者の選択の観点から表示を義務づけた。2009 年 9 月より消費者庁発足に伴い、厚生労働省が所管していた食品衛生法および農林水産省が所管する JAS 法のそれぞれ食品表示に関する業務は消費者庁に移管された。具体的表示制度の内容を表 1 に示す。また表示の対象となる加工食品を表 2 に示す。表示が義務づけられている加工食品における主な原材料とは、すべての原材料中、重量で上位 3 品目の中に入り、かつ食品中に占める重量が 5 パーセント以上のものとしている。^{1), *1, *2}

2. イベントと系統と品種

GM 食品の開発企業は染色体挿入部位とそのコピー数の違いから、多くの組換えイベント(event)を分離取得する。その後、イベント毎に増殖・分化されるが、このひとつのイベント由来の後代植物を系統(line)と言う²⁾。開発者は、導入形質を安定化させ、さまざまな気候で栽培できる品種(variety あるいは cultivar)を育成するために、ひとつの GM 系統から多数の優良品種を育成している。GM トウモロコシの種子は、1 代限りの優良形質を持つ

*1 食品衛生法施行規則第 21 条

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syokusanzen/kisei/dl/syokuei4.pdf>

*2 遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第 7 条第 1 項及び生鮮食品品質表示基準第 7 条第 1 項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準(平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 517 号)

http://www.maff.go.jp/j/jas/hyoji/pdf/kijun_03.pdf

F1 ハイブリッド (雑種強勢品種) として育成されている。しかし最近では、異なる組換え系統間での交配を行って、2 種類の導入遺伝子を持つスタック (stack) の F1 ハイブリッド品種も育成されている。わが国では系統ごと (スタック品種に関してはスタック品種ごと) に特性評価および安全性評価が実施される。

したがって系統ごとに検知法を確立することが必要になっている。食品中に存在する GM 食品を検知する基本的な手法としては、大きく分けて導入遺伝子から作られるタンパク質を検出対象とした方法 (protein-based method) と、GM 食品に使用された DNA の領域配列を検知するポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; PCR) を利用した方法 (DNA-based method) がある。

3. 安全性未審査の GM 食品の検査法

2010 年 7 月現在、安全性未審査の GM 食品としては、トウモロコシとして CBH351 系統 (害虫抵抗性)³⁾、DAS 59132 系統 (除草剤耐性)⁴⁾、Bt10 系統 (害虫抵抗性)⁵⁾ が検査対象となっている。また 2009 年までは安全性審査が継続中であったハワイ産抗ウイルスパパイヤ (55-1 系統) は定性 PCR 法^{6), 7)} と組織染色法⁸⁾ を検査法として採用していた。また監視安全課長通知法として、米国産長粒種 LL コメ (LL601 系統)⁹⁾、中国産害虫抵抗性 Bt コメ (Bt 63 系統および未知系統)¹⁰⁾、カナダ産 GM 亜麻 (FP967 系統)¹¹⁾、カナダ産 GM ナタネ (*Brassica rapa* RT73 系統) が検査対象になっている。表 3 に各検査法を示す。

3.1 定性 PCR 法およびリアルタイム定性 PCR 法

定性 PCR 法の場合、鋳型となるゲノム DNA の抽出は PCR 検出を可能にするのに重要である。ゲノム DNA と複合体を形成しやすいセチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) などを利用した方法や市販の DNA 抽出用のキット (シリカゲル膜タイプ法、イオン交換カラム法) を用いる方法が規定されている。

PCR 反応を行う際には、コントロールとして対象作物

に必ず含まれる内在性遺伝子の DNA 配列の PCR (ダイズであれば *le1* 遺伝子等、トウモロコシであれば *Zein*, *SSI7b* 遺伝子等) を行う必要がある。PCR 法の原理を図 1 に示す。PCR 反応後、反応液はアガロース電気泳動したものをエチジウムブロマイドで蛍光染色し、紫外線照射下において画像解析機器等で写真撮影する。設計したプライマー対に挟まれた DNA の長さ一致するバンドが検出される。違反の際の社会的な影響を考慮して、異なった標的

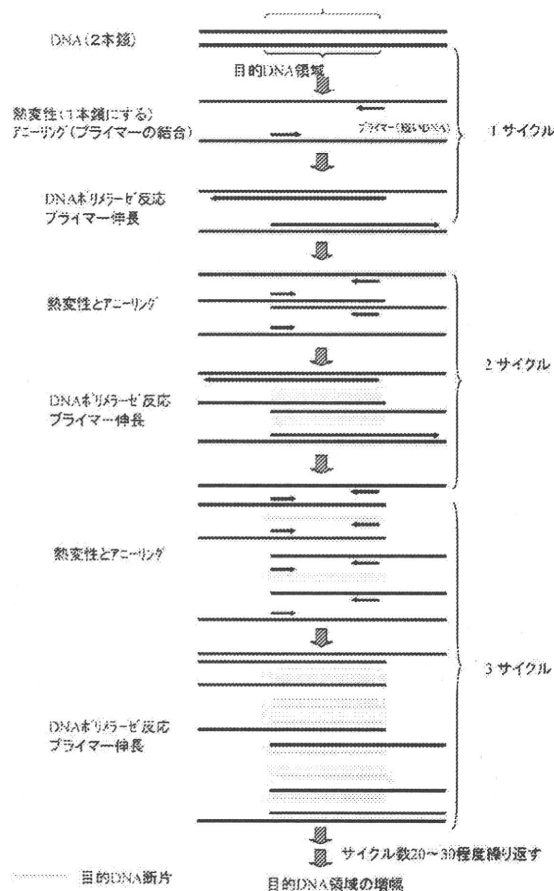


図 1. PCR 法の原理

表 3. 未承認遺伝子組換え食品の検知法

作物	系統名	検知方法	タンパク質あるいは DNA 抽出法
トウモロコシ	CBH351; Starlink	ラテラルフロー法	水でタンパク質を抽出
トウモロコシ加工品	CBH351; Starlink	定性 PCR 法	イオン交換樹脂タイプキット法
トウモロコシ	Bt10	定性 PCR 法	シリカゲル膜タイプキット法
	DAS59132	リアルタイム定性 PCR 法	シリカゲル膜タイプキット法
コメ	米国産 LL コメ	リアルタイム定性 PCR 法	シリカゲル膜タイプキット法
	中国産 Bt コメ	ラテラルフロー法	水でタンパク質を抽出
コメ加工品	中国産 Bt コメ	定性 PCR 法	シリカゲル膜タイプキット法
		リアルタイム定性 PCR 法	
ナタネ	RT73 <i>B. rapa</i>	リアルタイム定性 PCR 法 (end-point 解析)	シリカゲル膜タイプキット法
亜麻	FP967; CDCTrifid	リアルタイム定性 PCR 法	イオン交換樹脂タイプキット法

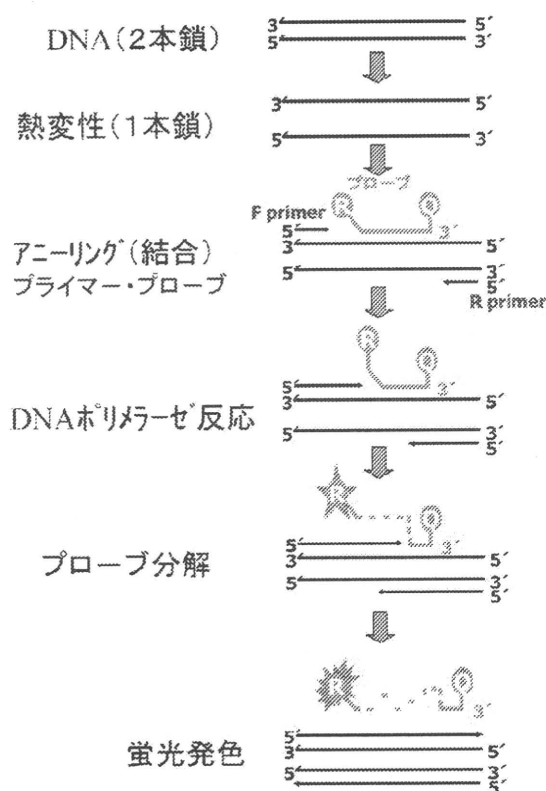


図2. 定量PCRの原理

領域を認識するプライマー対を2種類(検出と確認)用いて試験し, 両方検出されれば陽性と判断する. リアルタイム定性PCR法は, 近年リアルタイムPCR機器の普及により, 広く応用されるようになってい. 指数関数的な増幅曲線の有無で陽性あるいは陰性と判断できるため, アガロースゲル電気泳動を行う必要がなく, 多検体を迅速かつ簡易に判定することが可能である.

3.2 組換えタンパク質を検知する方法

組換えタンパク質を検知する定性検知法としては, ラテラルフロー法¹²⁾, 組織化学染色法⁶⁾, などが採用されている. ラテラルフロー法についてはすでにいくつかのキットが販売されている. 定性PCR法と比較して, ラテラルフロー法および組織化学染色法は簡便である.

4. 安全性審査済みのGM食品の検査法

わが国では, 分別生産流通管理により, 書類等により証明されている場合でも, 非意図的な混入があることを考慮し, 科学的な検知による行政上の判断の目安は重量割合(粒割合)で5%以下と考えている. そのため表示の妥当性を検証するためには5%を定量する必要がある.

4.1 ELISA法

GM食品に発現しているタンパク質を免疫抗体による特異的な結合を利用し, 抗体に結合された酵素と基質により発色させて測定する酵素免疫測定法である. GMダイズ(ラウンドアップダイズ, GTS 40-3-2)の定量検査にELISA法が採用されている¹³⁾. しかしELISA法は, GM

トウモロコシのように種々の系統に共通して発現しているタンパク質を検知する場合は, 系統ごとの正確な定量は困難である.

4.2 定量PCR法

GM食品を定量PCR法により定量するためには, 一般に分析用の標準物質として, 各GM系統を一定量だけ含むnon-GM作物の種子粉碎物またはそのゲノムDNAが必要になる. GM食品の混入率は, 複数の混入率の標準物質から測定した検量線から計算することになる. しかし, わが国の標準分析法ではGMダイズ, 各GMトウモロコシに導入されている組換えDNA断片のPCR増幅産物をプラスミド上に連結した標準物質を採用している^{14), 15), 19), 20)}. この標準物質を用いることにより, 作物の種子を入手せずとも, GM系統ごとに混入率を検査できる利点がある.

リアルタイムPCRを用いた定量PCR法は, 該当する作物が必ず持っている内在性遺伝子に対する組換え遺伝子の存在比率からGM作物が何%存在するかを相対的に測定する方法である^{16), 17)}. わが国の公定検査法に採用されている定量PCR法の原理(TaqMan Chemistry)を図2に示す.

定量PCR法では, 一定のサイクルでの目的領域の生産量(プロダクト量)を比較するのではなく, 一定のプロダクト量に達するサイクル数(Ct; スレッシュホールドサイクル)で比較する¹⁸⁾. あらかじめ既知濃度の標準DNA(公定検査法ではプラスミド)を用いて定量PCRを行い, 得られたCt値をもとに検量線を作成する(図3). 現状のGM食品定量検査法はGMダイズ(GTS 40-3-2)とGMトウモロコシ5系統(MON810, GA21, Bt11, E176, T25)について示されている. GMトウモロコシの定量検査法は, GMトウモロコシ5系統のコンストラクト特異的な領域のDNA配列を定量する分析法を使用し, 種子(F1世代)中の挿入DNA配列のコピー数を反映した内標比を測定し, これを使用して試料(穀物; F2世代)中のGM特異的配列のコピー数から種子の重量ベースとしてGM混入率を表している(図3). しかし, トウモロコシ5系統を最初からすべて測定するのは煩雑なので, 広く共通して使われているカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(P35S)内の配列とGA21系統のコンストラクト特異的配列の定量法を組み合わせたスクリーニング法をまず行い, 求められたMON810系統換算値が4.5%を超える場合においては5系統ごとに個別に定量することになっている.

4.3 トウモロコシ粒検査法

安全性審査が終了したGM食品が年々多くなり, さらに生産性の効率性や開発費用の低コストなどの理由により, 異なる系統由来のGMトウモロコシを掛け合わせたスタック品種トウモロコシ(例えば害虫抵抗性と除草剤耐性の掛け合わせ)の開発が急激に進んでおり, わが国でも50種のスタック品種トウモロコシについて安全性審査が

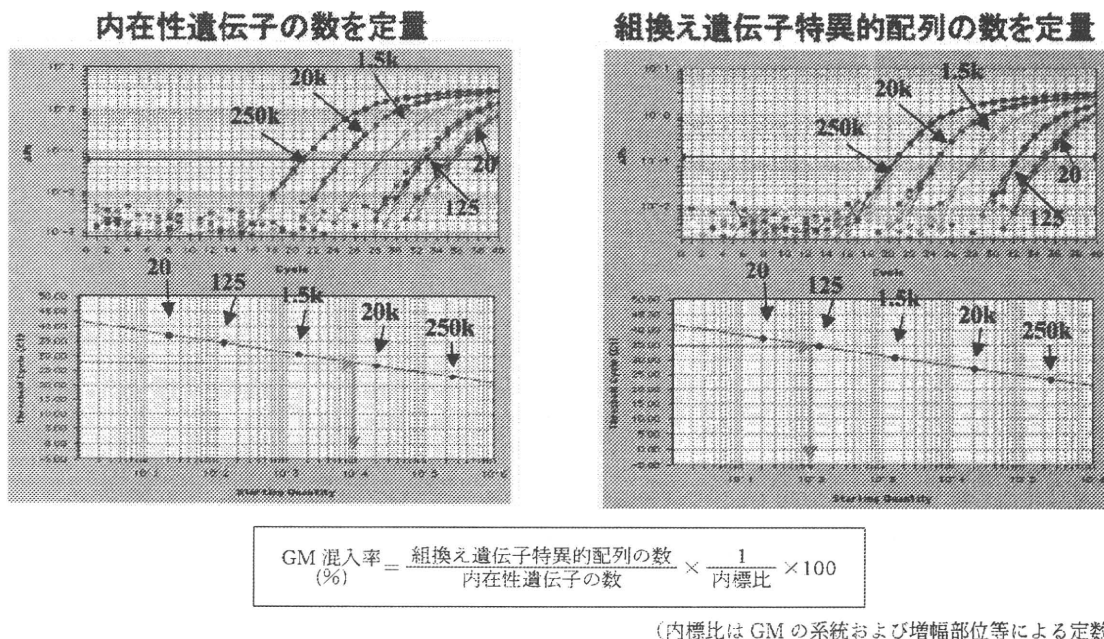


図 3. 定量 PCR 法による遺伝子組換え体の定量

すでに終了している (2010 年 7 月現在) (表 4)。国際的に使用されている一般的な定量 PCR 法は、該当する作物が必ず持っている内在性遺伝子に対する組換え遺伝子の存在比率から GM 作物が何%存在するかを相対的に測定する方法である^{16), 17)}。

従来の単一系統のみのトウモロコシ系統の重量換算で混合した粉碎試料を、通知で定められている検査法による定量 PCR 法で分析しても、科学的にはほぼ同じ値の測定値になる。しかしスタック品種トウモロコシが試料に混入している場合、その粉碎物を定量 PCR で定量する方法では、1 穀粒中に複数の異なった GM 遺伝子が挿入されているため、コピー数の多重計測が起り、測定混入率が重量割合で測定した値より常によく見積もられる²¹⁾。この問題を解決するには粒ごとの検査法の必要が生じ、粒単位検査法が確立された^{22), 23)} (図 4)。この方法は現在までの表示閾値に則した考え方を大幅に修正せず運用できる。また従来の定量 PCR 法の諸問題として、スタック品種混入による定量値のばらつき、トウモロコシにおける胚乳の核相 (3n) と胚芽の核相 (2n) が異なることから生じる定量値のばらつき、GM が父親由来か母親由来で種子 (F1) の GM 遺伝子量が異なることから生じる定量値のばらつき、機種間による定量値のばらつき、DNA 抽出法による定量値のばらつき、ある一定企業のリアルタイム PCR 機種のマーケットに依存する状況などがある。粒迅速検査法では、このような諸問題が大幅に解消される可能性がある。適切なサンプル数の検査を行えば、粒単位での GM 混入率を求めることができ、また Multiplex PCR^{24), 25)} と併用することにより、単一系統かスタック品種の区別およびその系統判別が可能となった。本法は平成 21 年 8 月に厚生労働省食品安全部医薬食品局長通知として示された。本法を用

いて 2005 年度米国産の不分別トウモロコシの分析を 5 検体 (各検体 180 粒) 行ったところ、GM トウモロコシの混入率は 40.0~79.4% の範囲で平均 52.2% であった。各検体とも系統別分析で同様の傾向であったことから、すべての検体を合わせて合計 900 粒としてその系統割合を計算した。単一系統では Mon810 系統が主流であり、スタック品種では MON810 系統と NK603 系統の掛け合わせ品種が主流であった (図 5)。

今後は著しく増加を続けるスタック品種の混入試料に関してどのように表示を検証するかが課題である。また以前から望まれていた加工食品から直接に定量可能な検査法の開発も必要になってくると考えられる。

5. 最近の動向

5.1 未承認 GM 食品のスクリーニング検知法

著者らは、未承認 GM 食品の混入防止を目的としたスクリーニング的な監視のために、リアルタイム PCR 機器とマルチプレックス PCR および増幅産物の融解曲線解析を用いて GM 食品に汎用される P35S と NOST を同時に検出する検知法を確立した²⁶⁾。

GM 食品に汎用されるターゲット配列として P35S、NOST を選択した。PCR の妥当性を評価するための内部標準プラスミドに ColE1 を用いた。ターゲット DNA 配列および ColE1 プラスミド配列を検知するプライマー対を設計し、GM トウモロコシ (NK603) にてピークの分離度を確認後、鋳型濃度や PCR 条件などの最適化を行った。試料として GM ダイズ (Roundup Ready Soybean)、GM ジャガイモ (NewLeaf)、Bt コメ混入もち米、GM ダイズ (Roundup Ready Soybean) が混入したビスケットを用いて 3-plex PCR を行った結果、再現性の高い良好な

表 4. 安全性審査の手続を経た遺伝子組換え (GM) スタック品種トウモロコシ

除草剤耐性		害虫抵抗性		その他の形質	トウモロコシ品種名称 (平成 22 年 7 月 25 日現在)
グリホサート	グルホシネート	チョウ目 (鱗翅目)	コウチュウ目 (鞘翅目)		
○		○			MON810×GA21, MON810×NK603, MON89034×NK603, MON89034×1507, MIR162×GA21, MIR162×1507, 1507×GA21, MIR162×1507×GA21, MON89034×1507×NK603.
○			○		MON863×NK603, MIR604×GA21
○		○	○		MON863×MON810, MON810×MON88017, MON89034×MON88017, MON810×MON863×NK603, MON89034×1507×MON88017, MIR162×MIR604×GA21
	○	○			MON810×T25, Bt11×MIR162, Bt11×1507
○	○				NK603×T25
		○	○		MIR604×MIR162
	○	○	○		1507×B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7, Bt11×MIR604, MON89034×B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7, Bt11×MIR162×MIR604
○	○	○			NK603×1507, Bt11×GA21, Bt11×MIR162×GA21, Bt11×MIR162×1507, Bt11×1507×GA21, Bt11×MIR162×1507×GA21
○	○		○		NK603×B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7, B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7×MON88017
○	○	○	○		NK603×B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7×1507, Bt11×MIR604×GA21, 1507×MON88017, MON89034×1507×B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7, 1507×B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7×MON88017, MON89034×B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7×MON88017, MON89034×1507×B.t. Cry34/35Ab1 EventDAS-59122-7×MON88017, Bt11×MIR162×MIR604×GA21
		○		高リシン	LY038×MON810
○				耐熱性 α-アミラーゼ産生	3272×GA21
			○	耐熱性 α-アミラーゼ産生	3272×MIR162
	○	○		耐熱性 α-アミラーゼ産生	3272×Bt11, 3272×Bt11×MIR162
○		○		耐熱性 α-アミラーゼ産生	3272×MIR162×GA21
○	○	○		耐熱性 α-アミラーゼ産生	3272×Bt11×GA21
○	○	○	○	耐熱性 α-アミラーゼ産生	3272×Bt11×MIR162×GA21

結果が得られた (図 6). 蛍光色素として用いた Eva green® は細胞不浸透性なので SYBR green® と比べて毒性が低く、かつ PCR 阻害性の低いことなどが特徴とされている。確立された方法は、未承認 GM 食品のスクリーニング法として迅速性、安全性、信頼性に優れた手段であると考えられる。

5.2 リアルタイム PCR アレイ分析法を利用した網羅的未承認 GM 食品推定法

現行の技術では、組換え DNA 情報が確認できる場合を除いて、未承認 GM 食品の検出はできない状況にある。そこで著者らは GM 食品網羅的検知技術リアルタイム PCR アレイ分析法を利用し、組換え DNA 情報が未確認のものを含めた未承認 GM 食品の系統の混入を推定する

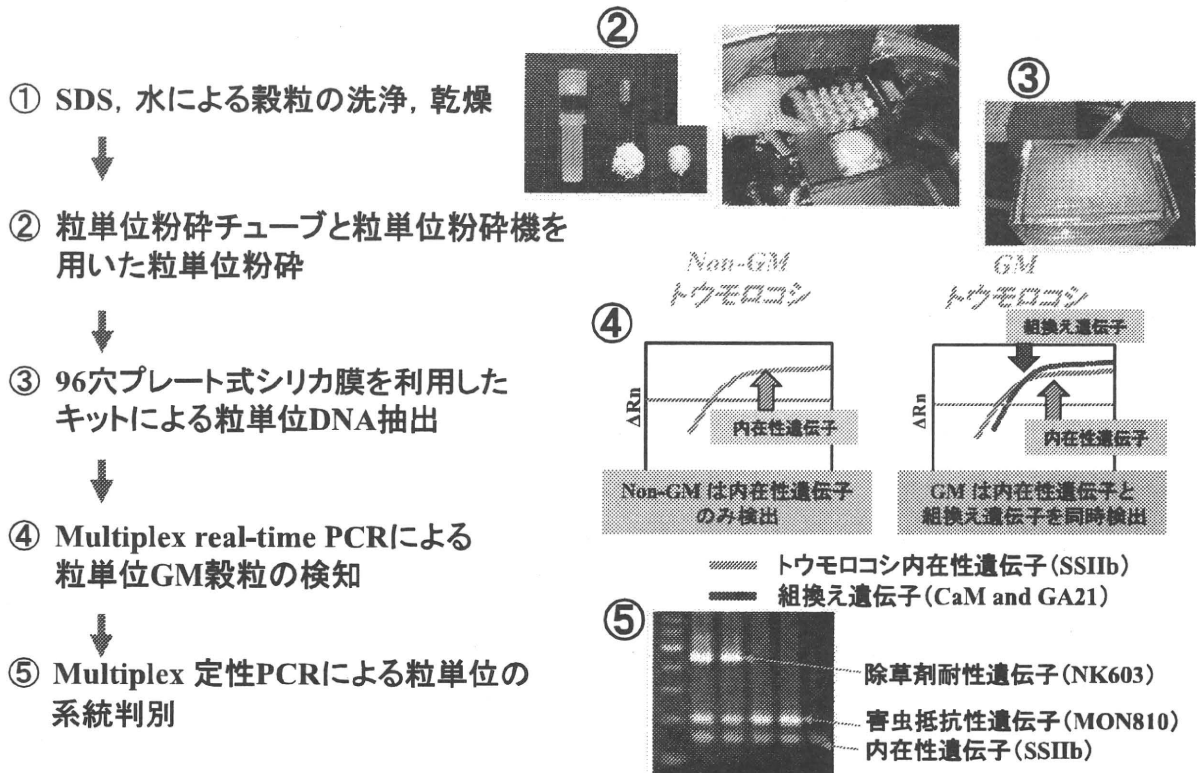


図4. スタック品種トウモロコシ混入試料に対応した粒単位の遺伝子組換えトウモロコシ検知法（粒単位検査法）

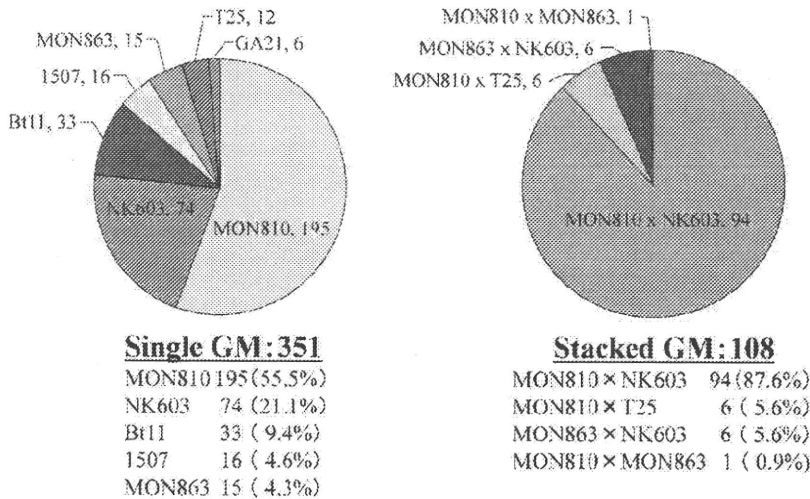


図5. GM 不分別トウモロコシ試料中の混入GM トウモロコシの系統別割合

手法を確立した²⁷⁾。その概要を図7に示す。GM トウモロコシおよびGM ダイズの承認系統、プロモーターやターミネーター領域などの組換え DNA セグメント、作物内在性遺伝子等を標的とするリアルタイム PCR アレイ分析法により、幅広いGM 農作物の検出が可能であることが明らかになった。

この分析法の結果を利用し、サンプル中への未承認GM 食品系統の混入を推定する手法の開発を検討した。未承認GM 食品系統はすべてのGM 食品系統から承認GM 食品系統を削除したものと定義される。リアルタイム PCR ア

レイ分析の結果として得られるGM 食品に共通性が高い組換え DNA セグメントおよび承認GM 食品系統特異的検出の結果に加え、承認GM 食品系統が有する組換えDNA セグメントの情報を総合的に判断することで、未承認GM 食品の混入が推定可能であることを見いだした。また、リアルタイム PCR アレイの分析結果を入力するだけでこの推定プロセスを簡便に実施可能なソフトウェアを開発した。

これまでに混入が問題となったCBH351 トウモロコシ、米国産LL コメ (LL 601 系統)、中国産Bt コメ、DAS

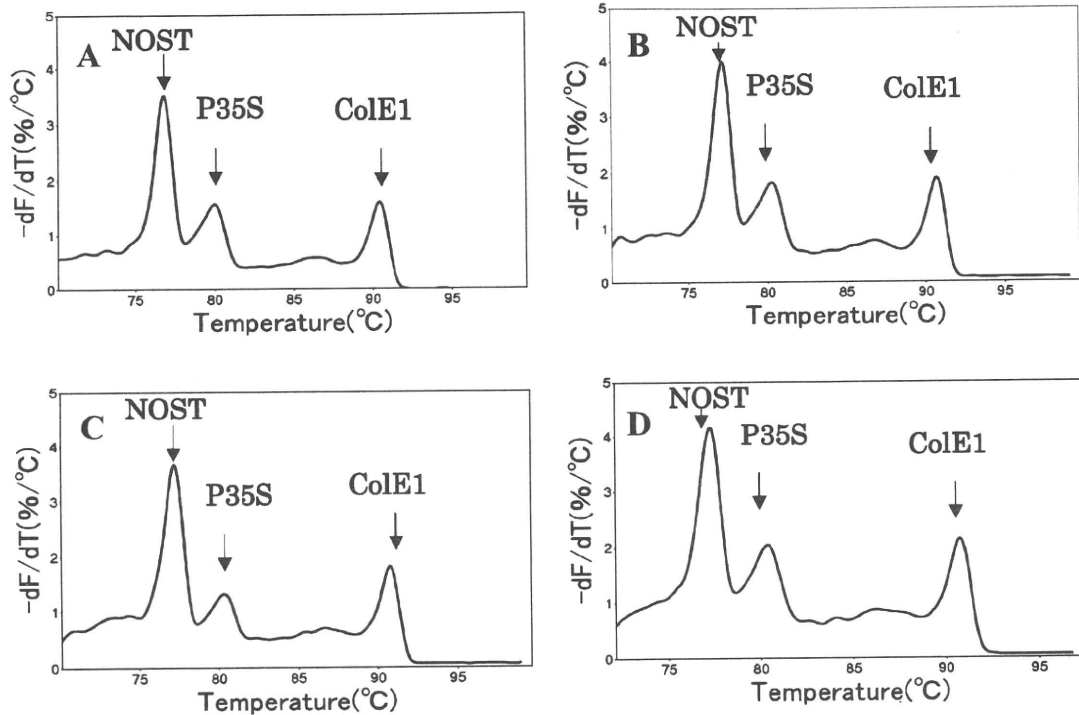


図 6. 未承認遺伝子組換え作物のスクリーニング検知法の適用

- A: GM soybean (Roundup Ready soybean)
- B: GM potato (New Leaf)
- C: Rice contaminated with unauthorized GM rice.
- D: Biscuit contaminated with GM soybean of unknown amount.

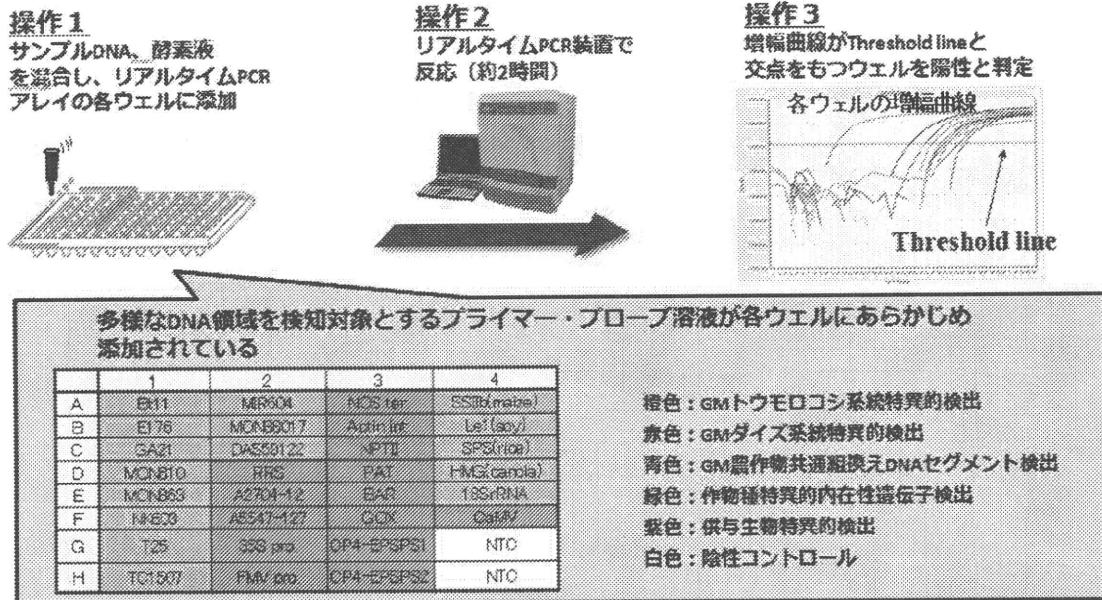


図 7. リアルタイム PCR アレイ分析法の概略

59132 トウモロコシなどの未承認 GM 食品系統はいずれもリアルタイム PCR アレイで検知可能な組換え DNA セグメントを有しているため、本研究で確立した推定プロセスの対象となりうる事が予想された。現段階では、承認 GM 食品系統特異的検出はすべての承認 GM 食品系統を

対象としておらず、未承認 GM 食品系統として誤判定される可能性がある。こうした承認 GM 食品系統および最近承認された GM 食品系統のさらなる標的の追加とそれに伴った推定プロセスの改良が今後の課題である。