

るが、その至適条件を見出すことは困難が予想される。この予測を踏まえると、これまでに実績のある無芽胞形成菌での安定性の確保方法がセレウス菌にも適用できる可能性は高いものと思われる。

これに対して、一部の陰性対照菌は選択培地上において48時間培養により擬陽性を示すことが明らかになった。この事実は、最終的な菌種の同定を行わない限り、検査結果を陽性と判断する可能性を示しており、新規項目の導入時には避けるべき条件であると考えられる。そのため、陰性対照菌の選択培地上での反応性について、「発育しない」ということも含めて再考する必要がある。ただし、選択培地上に発育集落を認めないことは、場合によっては添加菌が存在しないことを意味することもありうることから、普通寒天培地等の一般的な栄養培地上で発育することが絶対条件となる。

基材の検討においては、今回白米を候補として挙げたが、オートクレーブ処理後の物性変化のため採用することは難しいものと判断した。これまでの外部精度管理調査試料用基材の条件として、オートクレーブ処理ができるもの、その後の形状が少なくとも1ヶ月間保持できるもの、対象菌の接種が容易であるものが挙げられる。そのため、別の候補となりうる基材を選定する必要があると考えられた。しかし、マッシュポテトはこれまでも採用実績があることに加え、基材としての大きな問題点はないことから、これについて検討することは調査試料の新規開発という意味において今後の進捗に大きく関わるものであると考えている。

平成21年度は、外部精度管理調査試料として新規項目を導入することを目的として、

セレウス菌検査を対象とした調査試料の作製を検討した。

セレウス菌と対象菌株について市販の白米基材に菌を添加後、均一性と安定性を検討した結果、冷蔵保存では28日目まで安定性を確保し、菌数のばらつきに大きな変化はなかった。定性検査の結果では、陽性対照として用いたセレウス菌は使用した全ての選択培地上で典型集落の形成を認めるが、陰性対照である *B. subtilis* は NGKG 寒天培地において集落形成を認めなかった。28日間冷蔵保存した後、白飯基材(15% NaCl 溶液で調製)を 22.5°C で 24 時間保存してセレウス菌の菌数を確認したが、変化はほとんど見られなかった。外部精度管理調査を実施するにあたり、市販の白飯を基材としたセレウス菌の調査試料は、今後有用であることが示唆された。

一般にビブリオ属菌は保存環境の管理が難しく、長期保存には不安定な菌として認識されている。今回は Marine agar および Marine broth を用い、冷蔵および 22.5°C 保存下でビブリオ属菌の生存の可否を検討し、長期生存が確認された。菌液接種の方法を考慮し、Marine broth 中でのビブリオ属菌の菌数変動をみると、ビブリオ属菌を  $10^3$  cfu/mL レベルで接種した場合、冷蔵保存で 28 日目までにほぼ死滅することが明らかとなったが、22.5°C で保存すると、保存開始 3 日目に  $10^8$  cfu/mL 程度まで一旦上昇し、その後安定化する傾向が認められた。定性検査および定量検査を TCBS 寒天培地で観察したところ、Marine agar での測定結果に比べて、菌数が少なくとも 1 オーダー以上の相違を認めた。すなわち、現時点ではビブリオ属菌検査について定量検査の実施が困難なこ

とを示唆した。

平成 22 年度は、外部精度管理調査において新規項目を導入することを目的として、セレウス菌検査およびビブリオ属菌検査に関する調査試料の作製を試みた。

セレウス菌用調査試料では米飯基材に 10～15%の滅菌食塩液を添加することにより、*B. cereus*ではいずれの濃度においても安定的に添加菌が回収されたが、*B. subtilis*および *B. megaterium* では食塩濃度に依存した増菌抑制効果が認められた。さらに、*B. megaterium* では採用した全ての選択培地上で集落を形成しなかったが、*B. subtilis* では選択培地の種類によっては非典型集落形成を認めた。

一方、ビブリオ属菌検査では、こうや豆腐において *V. parahaemolyticus* および *V. fluvialis* のいずれにおいても 100 日まで安定して添加菌を回収することができた。しかし、添加濃度を維持して 100 日目まで推移するのではなく、一般的な栄養型細菌と同様に一度増菌してから安定化する傾向が認められた。また、メーカーの異なる TCBS 寒天培地および酵素基質培地(3 種)を用いて 100 日間保存したこうや豆腐基材について菌数測定を行ったところ、酵素基質培地では Marine agar で測定した菌数と比較してわずかに低い菌数が検出されたが、TCBS 寒天培地ではメーカーにより検出される菌数に大きな相違が得られた。

以上のことから、セレウス菌検査用調査試料では 15%滅菌食塩液を添加することにより添加菌である陽性対照菌および陰性対照菌のいずれも安定した濃度で長期間に亘り 22.5℃で保存できることが明らかとなり、温度変化に非常に強い基材が作製されたものと

考えられる。ビブリオ属菌検査用調査試料ではこうや豆腐を用いることにより食材として調査試料を提供できる可能性が示唆された。

### (3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製:

平成 20 年度では、そば試料作製の検討を行った。自家製一次標準粉末をマイクロディスクメンブレーターでさらに粉砕して標準品規格による抽出を行った結果、タンパク質の抽出量がケルダール法によるタンパク質量に近づいた。この粉末をあずきあんおよびカボチャペーストに添加し、ELISA キットでそばタンパク質を測定し、回収率および安定性を検討した。FASTKIT エライザ Ver. II そばでは昨年と同様回収率が添加量を上回ったが、昨年と比べ安定性が改善した。これらの試料について PCR 法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/G による DNA 抽出液では、全例でそばプライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応できる試料が調製できた。

落花生試料作製の検討では、自家製一次標準粉末をマイクロディスクメンブレーターでさらに粉砕して標準品規格による抽出を行った。そばとは異なり、さらに粉砕した粉末を使用しても、抽出液のタンパク質含量はケルダール法に比べて低かった。この粉末をあずきあんおよびカボチャペーストに添加し、ELISA キットで落花生タンパク質を測定し、回収率および安定性を検討した。作製時の回収率は昨年度と変わらなかったが、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生 で安定性がやや改善した。これらの試料について PCR 法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/G による DNA 抽出液では、

全例で落花生プライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応できる試料が調製できた。

小麦試料作製の検討では、小麦一次標準粉末の代替品を見つけるべく、新たに全粒粉2種について検討を行った。これらの全粒粉の標準品規格による抽出液の2-D Quant Kitによるタンパク質量はELISA法によるタンパク質量とは差があったが、ELISAキット間の測定値の乖離はハルユタカに比べて小さかった。このうち1つを食材に添加したものでELISAキット間の測定値は類似していた。この小麦添加試料についてPCR法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/GによるDNA抽出液では、全例で小麦プライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応できる試料が調製できた。

卵試料作製の検討では、混合用のミキサーとしてBLIXER-5Plusを導入し、これを使用して約3kgのスケールで卵添加試料を調製した。調製した試料の均一性を一元配置の分散分析により検討した結果、調製した試料はいずれも測定キットにかかわらず、均一と判定された。これらの試料は-20℃で18週間保存後のELISA法の測定およびウエスタンブロットによる確認試験においても良好な結果を示した。

平成21年度には、協力参加機関の測定値を解析した結果について、測定操作に習熟した機関でも操作を誤った可能性があることや、使用する計算ソフトウェアにより定量値が違ってくることが明らかになり、外部精度管理が特定原材料検査の精度の向上に寄与できる可能性が示された。

牛乳試料作製の検討では、ELISA法によ

る測定値を一元配置の分散分析によりいずれの試料も均一と判定され、これらの試料は-20℃で16週間保存後においてもELISA法の測定で安定性が確認されたが、ウエスタンブロットによる確認試験の試料としては問題が残る試料もあった。

平成22年度では、乳添加試料を用いて外部精度管理調査の模擬試験を実施し、試料の調製から報告値の解析に至る手順について確認した。調製した試料の均一性および試験期間内の安定性の確認、プロトコルの作成、試料の配布、報告書の回収に関しては昨年度と同様支障なく実施できた。

共同試験結果について統計解析した結果では、ウェル間の吸光度の再現性が悪い測定などが認められ、マイクロプレートの洗浄操作に問題があった可能性が考えられた。

えび・かに試料作製については、市販の食品素材を用いて精度管理試料に添加するえび・かにタンパク質の抽出を検討した結果、外部精度管理調査試料の調製に使用可能な抽出液が得られた。これらの試料は-20℃で9週間保存後も安定であった。

#### (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:

平成20年度は、中国産安全性未審査遺伝子組換え米を検査対象とした外部精度管理調査において、調査試料をDNA抽出操作の信頼性の確認を目的としたコメ加工品粉砕物試料と、定性PCR法およびリアルタイムPCR法による遺伝子組換えコメ検出操作の信頼性の確認を目的としたDNA溶液試料を調査試料として、作製方法を検討した。DNA溶液試料を作製するためのDNA抽出

に用いる遺伝子組換え米を含まないコメ加工品の選定、DNA 抽出方法の検討および各検出系における検出下限のコピー数の検討を行い、その結果から外部精度管理調査試料を作製した。外部精度管理調査に参加した 33 機関からの報告は、想定したとおりの結果であった。

コメ加工品からの DNA 抽出方法の検討では、より多くのコメ加工品から PCR 反応に必要な濃度の DNA を抽出し、SPS 遺伝子の検出率を向上させることを目的として、DNA 抽出方法の検討を行った。15 種類のコメ加工品を対象とし、GM quicker 2 (通知法) と Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて DNA を抽出し、収量および SPS 遺伝子検出の可否を検討した。

GM quicker 2 (通知法) では PCR に用いる DNA 濃度である 10 ng/ $\mu$ L に満たない DNA 収量の加工品が 4 種類あったが、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) では全て 10 ng/ $\mu$ L 以上の DNA 収量であった。また 15 種類のうち 10 種類は Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いた方がより高い収量が得られ、GM quicker 2 (通知法) で十分な抽出 DNA が得られなかったコメ加工品からも、PCR に必要な濃度の DNA を抽出することができた。

SPS 遺伝子の検出においては、今回検討した 15 種類のコメ加工品では、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) と GM quicker 2 (通知法) による抽出 DNA は同等であることがわかった。したがって、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) は、

コメ加工品からの DNA 抽出方法として有効な方法のひとつであると考えられた。

平成 21 年度の外部精度管理用調査試料の作製方法の検討では、Bt10 および DAS59132 トウモロコシを検査対象とした。Bt10 および DAS59132 トウモロコシの組換え DNA を含む DNA 溶液試料を作製するため、Bt10 については Bt10 陽性コントロールプラスミドを、DAS59132 については DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液を段階希釈し、対応する検出系における検出下限を検討した。Bt10 陽性コントロールプラスミドでは 4000 倍希釈、DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液では 0.05% (2000 倍希釈) が検出下限と考えられ、これらの濃度の組換え DNA を含む調査試料を作製し、外部精度管理調査を実施した。その結果、全機関で陽性結果が得られ、検出下限の妥当性が確認できた。しかしながら、Bt10 陽性試料中の試料 1 の測定で、Bt10 を検出しなかった機関があったため、その原因を検討した。当該機関は PCR 酵素にホットスタート酵素を使用しておらず、そのため誤った結果を報告したことが明らかになった。また、プライマー・プローブの濃度の影響が大きいことも明らかとなった。

平成 22 年度は、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。

DNA 収量および遺伝子コピー数に対する抽出法の影響では、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 2 の機関に分けて集計した結果 GM quicker 2 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 2 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 UV 吸収法と比べた結果、GM quicker 2 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 2 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。これらは

PCR の鑄型とならないために GM quicker 2 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。これ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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

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 20 年度～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: 北川陽子、岡本葉、高取聡、起橋雅浩、村田弘、住本建夫、尾花裕孝、田中之雄	健康危機事例への対応について—冷凍餃子が原因とされる有機リン系農薬中毒—	大阪府立公衆衛生研究所研究報告	Vol.46	35-43	2008
椛島由佳、上野英二、大島晴美、大野勉(愛知県衛生研究所)、斎藤勲(東海コープ事業連合商品安全検査センター)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	愛知県における野菜・果実中の農薬残留データに基づいたポジティブリスト制度下での農薬検査対象設定方法の検討	食品衛生学雑誌	Vol.49, No.4	283-293	2008
上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野勉(愛知県衛生研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	データベースソフトウェアを用いた GC/MS による農産食品中残留農薬の多成分一斉分析法の検討	食品衛生学雑誌	Vol.49, No.4	316-319	2008
上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野勉(愛知県衛生研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	NCI モード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロ ECD による畜水産物中残留農薬の多成分分析	食品衛生学雑誌	Vol.49, No.6	390-398	2008
岡本葉、高取聡、北川陽子、起橋雅浩、福井直樹、村田弘、住本建夫、田中之雄(大阪食品衛生協会)、尾花裕孝(大阪府立公衆衛生研究所)	LC-MS/MS による餃子中の農薬一斉分析法の検討	食品衛生学雑誌	Vol.50, No.1	10-15	2009

北川陽子、起橋雅浩、高取聡、岡本葉、福井直樹、村田弘、住本建夫、尾花裕孝	GC/MS を用いた加工食品中の残留農薬一斉分析法の検討	食品衛生学雑誌	Vol.50, No.5	198-207	2009
北川陽子、起橋雅浩、高取聡、岡本葉、福井直樹、村田弘、住本建夫、尾花裕孝	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	食品衛生学雑誌	Vol.50, No.5	243-252	2009
皇山えり子、阿久津千寿子、梶田弘子、菅原隆志(岩手県環境保健研究センター)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	Dispersive SPE を用いた加工食品中の残留農薬迅速一斉分析法の検討	岩手県環境保健研究センター一年報	Vol.8	81-86	2009
小林ゆかり、土田由里子、岩崎奈津美、丹治敏英(新潟県環境保健科学研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	加工食品中の残留農薬分析法の検討	新潟県環境保健科学研究所年報	24	73-77	2009
上野英二、梶島由佳、大島晴美、大野勉、根本了、米谷民雄(愛知県衛生研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	LC-MS による農産物中デメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンの分析	食品衛生学雑誌	Vol.50, No.2	64-69	2009
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	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.	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.,	Determination Method for Ractopamine in Swine and Cattle Tissues Using LC/MS	J. Food Hyg. Soc. Japan	Vol.48, No.5	144-147	2007



Murayama M. and Maitani T.					
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, <u>村山三徳</u>	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
<u>村山三徳</u>	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: <u>穂山浩</u> , 橋田和美 (国立医薬品食品衛生研究所)財団法人食品薬品安全センター研究協力者	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
<u>穂山浩</u> (国立医薬品食品衛生研究所)財団法人食品薬品安全センター研究協力者	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., (国立医薬品食品衛生研究所)財団法人食品薬品安全センター研究協力者	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)	Vol. 51, No.2	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: 起橋雅浩, 高取聡, 北川陽子, 岡本葉, 田口修三, <u>尾花裕孝</u>	Pesticide Analysis in Processed Foods	7th EUROPEAN PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP, Berlin, Germany	2008

岡本葉、高取聡、福井直樹、北川陽子、起橋雅浩、村田弘、住本建夫、尾花裕孝	加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発(1) -LC-MS/MSを用いた検討-	第96回食品衛生学会 学術講演会(神戸)	2008
北川陽子、起橋雅浩、高取聡、岡本葉、福井直樹、村田弘、住本建夫、尾花裕孝	加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発(2) -GC-MS および GC-MS/MS を用いた検討-	第96回食品衛生学会 学術講演会(神戸)	2008
村田弘、織田肇、岩上正藏、田中之雄、尾花裕孝、住本建夫、高取聡、北川陽子、柿本幸子、岡本葉(大阪府立公衆衛生研究所)、土田由里子(新潟県保健環境科学研究所)、上野英二(愛知県衛生研究所)、田中敏嗣(神戸市環境保健研究所)、宇野正清(奈良県保健環境研究センター)、木野善夫(和歌山市衛生研究所)、佐々木珠生(広島市衛生研究所)、堤泰造(徳島県保健環境センター)、花田喜文(北九州市環境科学研究所)	農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の精度管理に関する研究(第3報)	第45回全国衛生化学 技術協議会年会(佐賀)	2008
起橋雅浩、北川陽子、高取聡、岡本葉、福井直樹、村田弘、住本建夫、尾花裕孝	加工食品中の残留農薬分析	第31回農薬残留分析 研究会(宮崎)	2008
上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野勉(愛知県衛生研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	Analytical method for water-soluble pesticides in animal and fishery products by LC-MS (/MS)	7th EUROPEAN PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP, Berlin, Germany	2008
上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野勉(愛知県衛生研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	畜水産食品中デメトン-S-メチルおよびオキソデメトンメチルの分析	第96回食品衛生学会 学術講演会(神戸)	2008
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、尾花裕孝	加工食品試料を用いた外部精度管理試料調製の検討	第46回全国衛生化学 技術協議会年会(岩手)	2009
福井直樹、高取聡、北川陽子、柿本幸子、柿本葉、村田弘、起橋雅浩、尾花裕孝	農産物を主原料とした加工食品の残留農薬実態調査	第46回全国衛生化学 技術協議会年会(岩手)	2009
畠山えり子、阿久津千寿子(岩手県環境保健研究センター)、梶田弘子(岩手県食肉衛生検査所)大	LC/MS/MS を用いた加工食品中のグルホシネート及び代謝物の同時分析	第32回農薬残留分析 研究会(島根)	2009

阪府立公衆衛生研究所研究協力者			
皇山えり子、阿久津千寿子、青木晴美(岩手県環境保健研究センター)、梶田弘子(岩手県食肉衛生検査所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	LC/MS/MS を用いた加工食品中のグルホシネートおよびグリホサートの同時分析	第 46 回全国衛生化学技術協議会年会(岩手)	2009
上野英二、大野春香、棚橋高志、大島晴美、三上栄一(愛知県衛生研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	畜水産物中の農薬分析における多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーの応用	日本農薬学会第 32 回農薬残留分析研究会(島根)	2009
上野英二、大野春香、棚橋高志、大島晴美、三上栄一(愛知県衛生研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	畜水産食品中アセフェート、オメトエートおよびメタミドホスの分析	日本食品衛生学会第 98 回学術講演会(北海道)	2009
大野春香、棚橋高志、上野英二、大島晴美、三上栄一(愛知県衛生研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	GC- $\mu$ ECDによる魚介類中のPCB、有機塩素系農薬及びクロルデン類の一斉分析法の検討	第 46 回全国衛生化学技術協議会年会(岩手)	2009
苗床江理、山口理香、布川徹、徳崎健史、森下正人(北九州市環境科学研究所)大阪府立公衆衛生研究所研究協力者	LC/MS を用いた食品中残留農薬等測定における基礎的研究 ー試験液中の水の及ぼす影響ー	第 46 回全国衛生化学技術協議会年会(岩手)	2009
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	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ー農産物を主原料とした加工食品を中心にー	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	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
中澤裕之: 斉藤貢一、馬場奈美季、岩崎雄介、伊藤里恵、細江智夫、河合賢一、中澤裕之	LC/TOF-MSによるシクロピアン酸の分析	日本薬学会第 129 年会(京都)	2009
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: 井上雪乃、笠間菊子、鈴木達也、 大島赴夫、穂山浩、中島治、手島 玲子	中国産安全性未審査遺伝子組換え米を対象とした外部精度管理調査における試料作製の検討	日本食品衛生学会 第96回学術講演会 (神戸)	2008
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	日本食品衛生学会 第100回学術講演会 (熊本)	2010
穂山浩(国立医薬品食品衛生研究所)財団法人食品薬品安全センター研究協力者	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(国立医薬品食品衛生研究所)財団法人食品薬品安全センター研究協力者	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 20 年度～平成 22 年度

研究成果の刊行物・別刷

論文発表

## 健康危機事例への対応について —冷凍餃子が原因とされる有機リン系農薬中毒—

北川陽子\*1 岡本葉\*1 高取聡\*1 起橋雅浩\*1 村田弘\*1 住本建夫\*1 田中之雄\*2 尾花裕孝\*1

千葉県、兵庫県において輸入冷凍餃子を喫食した3家族、のべ10名が有機リン系農薬中毒症状を呈する健康危機事例が、平成19年12月末から平成20年1月にかけて発生した。3家族が喫食した輸入冷凍餃子の包装材や食品の一部から高濃度のメタミドホス及びジクロロボスの検出が報道された。当所においてもメーカーが自主回収している該当製品を喫食して、健康被害を訴える府民に対応するため、大阪府下の各保健所を通じて持ち込まれた検体についてメタミドホス及びジクロロボスの検査を行った。その結果、検査を行った40検体（包装材17検体、食品23検体）についてメタミドホス及びジクロロボスは検出されなかった。

**キーワード：**危機管理、冷凍餃子、加工食品、メタミドホス、ジクロロボス

**keywords：** risk management, frozen chinese dumpling, processed food, methamidophos, dichlorvos

平成19年12月末から平成20年1月にかけて、千葉県及び兵庫県の3家族（のべ10名）が、輸入冷凍餃子を喫食したところ、有機リン系農薬中毒の症状を呈し、数名が一時重症に陥るといって極めて重大な健康危機事例が発生した。3家族が喫食した輸入冷凍餃子は、中国の同一工場内で生産されており、輸入業者は、その工場で生産された製品について自主回収を行った。該当製品の一部から高濃度の有機リン系農薬（メタミドホス及びジクロロボス）の検出が確認されたため、該

当製品を喫食した消費者から、健康被害の相談が相次いで保健所等に寄せられた。当所においても、事件の一報から、府民の健康不安に対応するため、大阪府下の各保健所に持ち込まれた製品（包装材及び食品）について、メタミドホス及びジクロロボスの緊急検査を行った。

本報告では、保健所から持ち込まれた40検体（包装材17検体、食品23検体）について、メタミドホス及びジクロロボスの分析結果を報告するとともに、健康危機事例への対応を通じて、工夫した点や今後の課題等について報告する。

\*1 大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部 食品化学課

\*2 社団法人 大阪食品衛生協会

The Correspondence to the Healthy Crisis Case

-The Organophosphorus Pesticide Poisoning in Which Frozen Chinese-made Dumpling-

by Yoko KITAGAWA, You OKAMOTO, Satoshi TAKATORI, Masahiro OKIHASHI, Hiroshi MURATA, Tatsuo SUMIMOTO, Yukio TANAKA and Hirotaka OBANA

### 実験方法

#### 1. 試料

有機リン系農薬中毒事件に関連して、保健所に持ち込まれた40検体（包装材17検体、食品23検体）。食品の内訳は、メーカー自主回収対象食品19件（冷凍餃

子 14 検体、ロールキャベツ 3 件、豚肉ごぼう巻き 2 件) 及び対象外の食品 4 件 (冷凍餃子 2 件、レトルトカレー 2 件) であった。また、市販の国産冷凍餃子 1 検体を当所近くのスーパーで購入し、添加回収実験用に使用した。

## 2. 試薬

標準品及び試薬類は和光純薬工業社製を用いた。メタミドホス標準品及びジクロロボス標準品は、残留農薬分析用標準品を用いた。無水硫酸マグネシウムは特級、ギ酸は HPLC 用をそれぞれ使い、その他の試薬は残留農薬分析用を用いた。C18 カラムは ENVI<sup>TM</sup>-18 (3 mL) (SUPELCO 社製)、グラファイトカーボン/PSA 積層カラムは、ENVI<sup>TM</sup>-CarbII/PSA (500/500 mg) (SUPELCO 社製) をそれぞれ用いた。

## 3. 機器

フードプロセッサは、SQ-7 (東芝社製) を用いた。高速ホモジナイザーは、ポリトロン PT10 (KINEMATICA, Littau-Lucerne, Switzerland) を用いた。遠心分離器及びローターは、himac SCR20B 及び R12A5 (日立社製) を用いた。使用機器であるタンデム型質量分析器付きガスクロマトグラフ (GC/MS/MS)、タンデム型質量分析器付き液体クロマトグラフ (LC/MS/MS)、蛍光光度検出器付きガスクロマトグラフ (GC-FPD) 及びパルス式蛍光光度検出器付きガスクロマトグラフ (GC-PFPD) の分析条件は、分析条件の項目に記載した。

## 4. 試験液の調製

### 4-1) 包装材中のメタミドホス及びジクロロボスの分析方法

当初はメタミドホスのみが検出されたとの報道がなされたため、メタミドホスが溶解しやすいメタノールで溶出試験を行った。操作方法を図 1 に示す。包装

材の面積を測定し、表面積あたり約 2 mL に相当する 400 mL のメタノールを用いて室温で 30 分両面浸漬溶出を行った。その後、浸出液 100 mL を分取し、減圧濃縮を行った。これを 10% アセトン/ヘキサンで 5 mL に定容し、GC-PFPD 及び GC/MS/MS にて分析を行った。

### 4-2-1) 食品中のメタミドホス及びジクロロボスの分析方法

当所において行われている農薬検査の方法<sup>1)</sup>を一部改変して前処理を行った。操作方法を図 2 に示す。フードプロセッサで試料を均一化し、2 g を 50 mL ポリプロピレン製チューブに採取し、アセトニトリル 20 mL を加えて、ホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出を行った。これに塩化ナトリウム 1 g 及び無水硫酸マグネシウム 4 g を加え、直ちに 1 分間振とう攪拌した。その後、遠心分離 (1200×g、10 分間) を行った。アセトニトリル層 5 mL (0.5 g 相当) をアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした ENVI<sup>TM</sup>-18 (上部) 及びアセトニトリル/トルエン (3/1) 30 mL でコンディショニングした ENVI<sup>TM</sup>-CarbII/PSA (下部) を連結したカラムに負荷した。負荷後、アセトニトリル 10 mL で溶出し、ENVI<sup>TM</sup>-18 を取り除いた後、ENVI<sup>TM</sup>-Carb/PSA をアセトニトリル/トルエン (3/1) 30 mL で溶出した。負荷した際の通過液及び溶出液を 100 mL ナス型フラスコに捕集し、減圧濃縮した。これを窒素気流下で乾固後、メタノールで 2 mL に定容し (2.0 g/mL)、水で 4 倍に希釈したものを LC/MS/MS にて測定を行った (0.5 g/mL)。

### 4-2-2) 食品中のメタミドホス及びジクロロボスの分析方法 (追加実験)

厚生労働省から、今回の冷凍餃子事件に対応するための分析法として「食品中に残留する農薬メタミドホスに係る試験法」が提示された<sup>2)</sup>。このため、この方

法を一部簡略化し、追加実験としてメタミドホス及びジクロロボスの分析に用いた。操作方法を図3に示す。試料2gに酢酸エチル15mL及び無水硫酸ナトリウム15gを添加し、ホモジナイザーで1分間攪拌抽出を行った。その後、遠心(1200×g、10分間)し、上清0.75mL(0.1g相当)を採取した。これにアセトン0.25mLを添加し、GC-FPDにて分析を行った(0.1g/mL)。

#### 5. 分析条件

包装材料については、GC-PFPDで定性を行い、GCMS/MSで定量(添加回収実験)を行った。食品については、LCMS/MS及びGC/FPDを用いて、それぞれ定性及び定量(添加回収実験)を行った。以下に個々の分析機器の測定条件を示す。

##### 5-1) GC-PFPD 条件

GC : 6890 (Agilent)  
カラム : HP-5MS (30m×0.25mm, 0.25 $\mu$ m ; J&W)  
キャリアーガス : ヘリウム  
注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C  
検出器温度 : 300 $^{\circ}$ C  
カラム昇温 : 50 $^{\circ}$ C (1 min)  $\rightarrow$  25 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  125 $^{\circ}$ C (0 min)  
 $\rightarrow$  10 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  300 $^{\circ}$ C (6.5 min)  
注入量・方式 : 2  $\mu$ L・パルスドスプリットレス (1 min)

##### 5-2) GC/MS/MS 条件

GC : CP-3800 (Varian)  
MS/MS : 1200L (Varian)  
イオン化モード ; Electro-ionization, positive mode (EI)  
カラム : Factor Four VF-5ms (30m×0.25mm, 0.25 $\mu$ m ; Varian)  
キャリアーガス : ヘリウム  
注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C  
トランスファーライン温度 : 250 $^{\circ}$ C  
イオン源温度 : 200 $^{\circ}$ C

MRM条件 : (A) メタミドホス, Q1/Q3 [CE (V)] = 141/94 [5], (B) ジクロロボス, Q1/Q3 [CE (V)] = 185/93 [20]  
カラム昇温 : 50 $^{\circ}$ C (1 min)  $\rightarrow$  25 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  125 $^{\circ}$ C (0 min)  
 $\rightarrow$  10 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  300 $^{\circ}$ C (6.5 min)  
注入量・方式 : 2  $\mu$ L・パルスドスプリットレス (1 min)

##### 5-3) LC/MS/MS 条件

LC : 1100 Series (Agilent)  
MS/MS : API 3000 (Applied Biosystems)  
イオン化モード ; Electrospray ionization positive mode (ESI)  
カラム : ASCENTIS C18, 2.1×100 mm, 3 $\mu$ m (SUPELCO)  
移動相 : (A) 0.1% ギ酸水溶液、(B) 0.1% ギ酸含有メタノール溶液  
グラジエント : (B) 25 $\rightarrow$ 95% (12 min : liner)  $\rightarrow$  95% (8 min)  
流速 : 200  $\mu$ L/min  
カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C、注入量 : 5  $\mu$ L  
電圧/温度 : 4000V/450 $^{\circ}$ C  
MRM条件 : (A) メタミドホス, Q1/Q3 [CE (V)] = 142/94 [19], (B) ジクロロボス, Q1/Q3 [CE (V)] = 221/109 [31]

##### 5-4) GC-FPD 条件

GC : GC-17A (Shimadzu)  
カラム : DB-1701 (30m×0.25mm, 0.25 $\mu$ m ; J&W)  
キャリアーガス : ヘリウム  
注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C  
検出器温度 : 250 $^{\circ}$ C  
カラム昇温 : 80 $^{\circ}$ C (2 min)  $\rightarrow$  20 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  180 $^{\circ}$ C (0 min)  
 $\rightarrow$  4 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  260 $^{\circ}$ C (0 min)  $\rightarrow$  10 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  280 $^{\circ}$ C (5 min)  
注入量・方式 : 2  $\mu$ L・スプリットレス (2 min)

## 結果及び考察

### 1. 添加回収実験



### 1-1. 包装材の添加回収実験

市販冷凍餃子の包装材にメタミドホス及びジクロロボスを10 µg 添加し、回収実験を実施した。結果を表1に示す。メタミドホスでは良好な回収率を得たが、ジクロロボスについては回収率が40%と低い値となった。この原因として、ジクロロボスは蒸気圧が高いため、添加した際に溶媒と一緒に揮散した可能性が考えられた。ジクロロボスは製剤中では水で希釈したときに乳化しやすいように界面活性剤やキシレンが添加されている。添加回収実験を行う際にジクロロボスの製剤を添加していれば、ジクロロボスが良好に回収されたかも知れない。今回は低い回収率となったが、検出器であるPFPDは、通常のFPDよりも高感度であり、定量下限である0.01 ngの1/10の濃度まで測定可能であったため、低濃度のジクロロボスについても検出可能であると判断した。

### 1-2. 食品の添加回収実験

試験品のほとんどが冷凍餃子であったため、冷凍餃子を対照品として添加回収実験を行った。健康危機事例という観点から、中毒量を考慮し、添加量は通常の農薬検査で行っている0.1 ppmの10倍濃度である1 ppmを添加して行った。結果を表2に示す。LC/MS/MS(前処理方法4-2-1)及びGC-FPD(前処理方法4-2-2)のいずれについても良好な結果を得た。以上のことから、上記の分析方法は、食品中のメタミドホス及びジクロロボスを分析する上で、十分な精度を有すると結論づけられた。

## 2. 実試料の測定結果

大阪府下の各保健所から持ち込まれた40検体(包装材17検体、食品23検体)について前述の前処理方法を適用し、測定した結果、全ての検体についてメタミドホス及びジクロロボスは検出されなかった(表3)

これまで我々は、農産物を中心に残留農薬分析を行

ってきた<sup>3,8)</sup>。しかしながら今回の事例は、1) 検体が加工食品である、2) 検体数が未知数、3) 搬入される個々の検体量が少量、4) 中毒症状が出ている、5) 迅速で正確な測定が要求された。そこで、健康危機事例への対応として、A) 担当者が習熟した確実な方法、B) スケールを小さく、C) 前処理を最小で、D) 検出下限値を高く設定する等の方針をたて、この方針に基づき測定を行った。実際には、報道があった翌日に添加回収実験を行い、実験系を構築した。その結果、報道の2日後から実試料の測定に取りかかることができた。さらに、全ての検体について、搬入された翌日には結果を順次公表し、迅速な対応ができた。

保健所から搬入された検体(食品)は、冷凍餃子が最も多く16件であったが、その他ロールキャベツ(3件)、豚肉のごぼう巻き(2件)、レトルトカレー(2件)と多岐にわたっていた。レトルトカレーの分析については、添加回収実験を行った冷凍餃子よりもさらに脂質が多い事が予測されたため、4-2-2の方法に準じて別途添加回収実験(添加濃度1 ppm)を行った(表5)。その結果、メタミドホス及びジクロロボスいずれについても良好な回収率を得た。

健康危機事例の場合、搬入される検体重量が一定量ではない。今回の事件に関連して搬入された検体重量は3.6 g~300 gであり、数十gの検体も少なくなかった。これらのことから、前処理を小スケールで行うことの重要性が示唆された。また、本事例では、検体の搬入時刻がまちまちであったため、各担当者が、検体のそれぞれの情報(検体番号等)、前処理工程、結果の判定等の情報を共有することが難しかった。これに対応するため、検査工程確認表を作成し活用した。具体的には、搬入された検体毎に、商品名、保健所名、検体番号、検査部位の部別、検査工程及び結果判定等を表にし、掲示した。検査工程確認表の例を図4に示す。この表に検査担当者が、それぞれの担当した工程を書き込み、情報の共有化を行った。特に本件では、同じ

商品名の検体が重複して搬入されたため、検体の取り違え等の防止に有用であった。さらに、刻々と変化する検体搬入数、各検体の検査工程段階、結果の判定等の情報が一目瞭然となった。このように検査工程確認表の活用は、健康危機事例に有用な手段であると考えられた。

### 3. 今後の課題

今回の事例の場合、測定項目はメタミドホスとジクロルボスに限定されていたが、その他にも中毒原因物質が混入している可能性も否定できない。そのため、GC/MS 及び LC/MS 測定において、スキャンモードでの測定を行うことは重要である。GC/MS においては、データベースがかなり普及しており、多くの化学物質についてマススペクトルが検索可能である。一方、LC/MS においては、データベースが GC/MS ほど普及していないため、当所において現在スキャンデータを独自に蓄積しつつある。今後、このような事例が起こった場合、原因物質をはじめから限定せず、スキャンモードで測定することにより幅広く原因物質を検索することが必要であると考えられた。

残留農薬等に関する新しい制度（ポジティブリスト制度）の導入以前、加工食品の残留農薬の基準値は設定されていなかった。しかしながら、ポジティブリスト制度導入後、個別の基準値が設定された場合を除き、すべての食品が原則一律基準の対象となった。綿実油等の一部の加工食品については、個別に基準値が設定されているが、ほとんどの加工食品は、基準値が設定されておらず、原材料にさかのぼって判断しなければならない。さらに加工食品は油脂が多く含まれており、また、加熱処理により発生する食品成分の分解物、調味料、及び香辛料等も存在する。これらは農薬の分析に妨害成分となり、農産物を対象とした試験法を加工食品に適用することは困難である。このため、加工食品中の残留農薬は、検査所及び各都道府県の衛生研究

所等でもほとんど検査されていない。事件以降、様々な加工食品から農薬の検出事例が後を絶たないため、現在、当所では加工食品中の残留農薬の分析方法の確立をめざし、前処理方法等の検討を行っている。今回の健康危機事例への対応で得た経験や問題点を活かし、このような健康危機事例への迅速な対応、かつ分析精度の向上を目指したい。

### 謝辞

今回、検体の搬入にご尽力いただきました食の安全推進課及び各保健所の食品衛生監視員の皆様には感謝致します。

### 文献

- 1) 高取聡, 岡本葉, 北川陽子, 柿本幸子, 村田弘, 住本建夫, 起橋雅浩, 田中之雄: 農産物中の残留農薬検査に用いる新規一斉分析法, 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告, 45, 67~75 (2007)
- 2) 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, 厚生労働省平成 20 年 3 月 20 日通知 <<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/index.html>> (accessed 2008-4-2)
- 3) 小西良昌, 吉田精作, 今井田雅示: 野菜および果実中の残留農薬の汚染実態-昭和 51 年度-昭和 60 年度-, 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告, 食品衛生編, 18, 63~68 (1987)
- 4) 吉田精作, 村田弘, 今井田雅示: 野菜および果実中の残留農薬の汚染実態-昭和 61 年-平成 2 年度-, 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告, 食品衛生編, 22, 59~68 (1991)
- 5) 北川幹也, 村田弘, 今井田雅示: 野菜および果実中の残留農薬の汚染実態-平成 3 年度-平成 7 年度-, 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告, 食品衛生編, 27, 49

～52 (1996)

6) 福島成彦, 北川幹也, 高取聡, 吉光真人, 桑原克義, 堀伸二郎: 野菜および果実中の残留農薬の汚染実態-平成8年度～平成12年度-, 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告, 40, 117～125 (2002)

7) 北川陽子, 起橋雅浩, 尾花裕孝, 阿久津和彦, 柿本幸子, 岡本葉, 高取聡, 小西良昌, 村田弘, 住本建夫, 堀伸二郎, 田中之雄: 輸入農産物中の残留農薬の

実態調査-平成11年度～平成18年度-, 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告, 45, 29～36 (2007)

8) 柿本幸子, 高取聡, 北川幹也, 吉光真人, 北川陽子, 岡本葉, 起橋雅浩, 小西良昌, 尾花裕孝, 福島成彦, 村田弘, 住本建夫, 堀伸二郎, 田中之雄: 国産野菜および果実中の残留農薬の汚染実態-平成13年度～平成18年度-, 大阪府立公衆衛生研究所 研究報告, 45, 37～42 (2007)

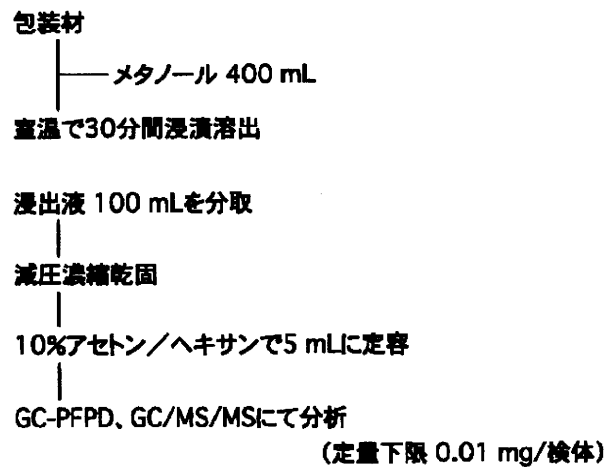


図1 包装材中のメタミドホス及びジクロロホスの分析方法

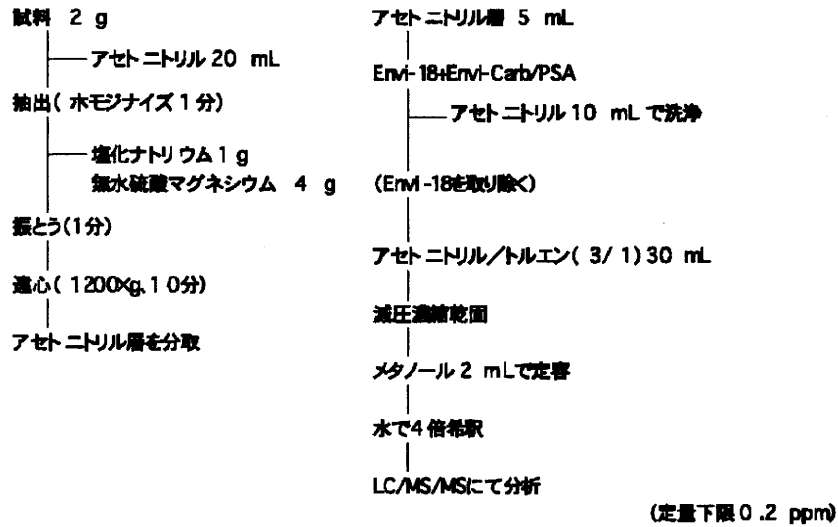


図2 加工食品中のメタミドホス及びビシクロルポスの分析方法

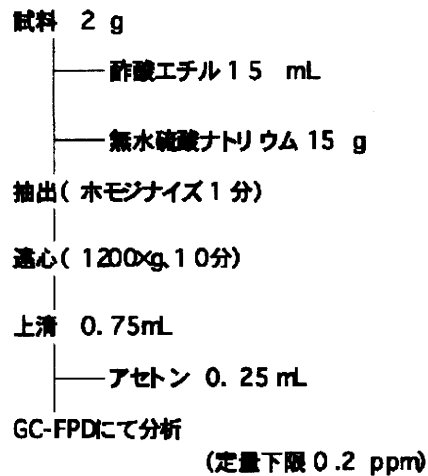


図3 加工食品中のメタミドホス及びビシクロルポスの分析方法  
(追加実験)