

博士学位論文

食品中の原材料および食品添加物の
迅速な検出法に関する研究

A study of assays for rapid detection of ingredients
and food additives in foods

2015年3月

鶴田 小百合

目 次

Abstract	1
緒論	3
第1章 リアルタイム PCR によるスケトウダラ卵加工品中のマダラ卵および カラフトシシヤモ卵の検出法の開発	
I 緒言	22
II 材料および実験方法	23
III 結果	26
IV 考察	33
V 要約	34
第2章 マルチプレックスリアルタイム PCR によるツキヨタケとシイタケの 同時検出法の開発	
I 緒言	36
II 材料および実験方法	37
III 結果	42
IV 考察	47
V 要約	48
第3章 固相抽出-LC-MS/MS による食品中の甘味料 12 種および保存料 9 種の 一斉分析法の開発	
I 緒言	49
II 材料および実験方法	50
III 結果	55
IV 考察	64
V 要約	65

総合考察	67
結論	76
略語表	77
謝辞	79
参考文献	80

Abstract

In this study, three assays for the rapid detection of ingredients and food additives, including fish roes, poisonous mushrooms, and sweeteners and preservatives in various foods, were developed to secure the safety and quality of food.

In chapter 1, a rapid and sensitive TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) assay was developed for the detection of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and capelin (*Mallotus villosus*) roes in Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) roe products. Primers and TaqMan minor groove binder (MGB) probes were designed according to the gene encoding cytochrome *b* and evaluated by the specificity for 3 Alaska pollack roes, 3 Pacific cod roes, 9 capelin roes, and samples from 48 other species. Mitochondrial DNA extracts of all the target species had positive signals with no cross-reaction, the limit of detection being 0.002 ng/ μ L of DNA. The linearity of the standard curves for the three species ranged from 0.002 ng/ μ L to 20 ng/ μ L of DNA with a square regression correlation (R^2) of 1.000. This assay was applied for the detection of Pacific cod and capelin roes in mixture samples: Pacific cod or capelin roes were added to Alaska pollack roes at 0.1%, 1%, and 10%. The threshold cycle (Ct) values were obtained from both the mixture samples at 0.1%. The practical applicability of this assay was examined in 64 samples of Alaska pollack roe products. In all cases, the species detected from the samples corresponded with the species described on the food label. This new assay proved to be specific to the target species, highly sensitive, and applicable to food samples, making it useful for the rapid detection of Pacific cod and capelin roes in Alaska pollack roe products.

In chapter 2, a rapid multiplex real-time PCR assay was developed to achieve highly specific, simultaneous detection of two types of mushrooms: the poisonous mushroom *Omphalotus guepiniformis* and the edible mushroom *Lentinula edodes*, both of which have fruiting bodies with a similar morphology. Primers and TaqMan MGB probes were designed according to the internal transcribed spacer 1–5.8S region of rDNA and evaluated by the specificity for fruiting bodies of 17 *O. guepiniformis*, 16 *L. edodes*, and samples from 57 other species. DNA extracts of all the target species had positive signals with no cross-reaction, the limit of detection being 0.25 pg of DNA. The linearity of both the detection systems ranged from 0.25 pg to 2.5 ng of DNA, with R^2 of >0.999. The Ct values for raw and processed (baking, stir-frying, deep-frying, boiling for 30, 60,

120, or 180 min or artificial digesting by α -amylase and pepsin) fruiting bodies and for fruiting bodies [1% (w/w)] mixed with foodstuffs or artificial gastric juice contents ranged from 17.16 to 26.60 for both examined species. This new assay proved to be specific to the target species, highly sensitive, and applicable to processed food samples and gastric juice contents, making it useful for the rapid identification of *O. guepiniformis* and *L. edodes* in case of mushroom poisoning.

In chapter 3, a rapid and simple assay was developed for the simultaneous determination of 12 sweeteners and 9 preservatives in various foods by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). The sweeteners and preservatives were extracted from solid samples with 80% and 50% methanol and from liquid samples with 80% methanol; and this was followed by Oasis WAX cartridge cleanup. The LC separation was performed on an XSelect CSH Phenyl-Hexyl column (5 μ m, 2.1 mm \times 150 mm) with a mobile phase of 10 mmol/L acetate buffer (pH 4.0)–acetonitrile, and MS detection was performed with negative-ion electrospray ionization. The quantification limits of acesulfame K, alitame, aspartame, cyclamic acid, neotame, saccharin Na, *p*-hydroxybenzoic acid methyl, *p*-hydroxybenzoic acid ethyl, *p*-hydroxybenzoic acid isopropyl, *p*-hydroxybenzoic acid propyl, *p*-hydroxybenzoic acid isobutyl, and *p*-hydroxybenzoic acid butyl were 0.001 g/kg; those of dulcin, glycyrrhizic acid, neohesperidin dihydrochalcone, rebaudioside A, stevioside, sucralose, and benzoic acid were 0.005 g/kg; and those of sorbic acid and dehydroacetic acid were 0.02 g/kg. The mean recoveries from 10 types of foods fortified at the levels of 0.02 and 0.2 g/kg were 70.9%–119.0%, and their relative standard deviations were 0.1%–11.7%. This new assay proved to be highly selective and quantitative for the detection of these 12 sweeteners and 9 preservatives and was applicable to food samples, making it useful for the rapid detection of these sweeteners and preservatives in various foods.

In conclusion, the three assays developed in the present study proved that the above mentioned ingredients and food additives are detectable in a rapid and simple manner and are considered to be useful in verifying species described on food labeling of fish roe products, investigating sources of mushroom poisonings, and simplifying the determination of food additives.

緒 論

近年、食品の生産・加工技術の進歩、食品流通の国際化の進展および消費者の趣味嗜好の多様化により、我々の食生活を取り巻く環境は大きく変化している。それに付随して、食品の品質と安全に関わる問題が多様化し、様々な事件や事故が発生していることから、食の品質と安全性について消費者の不安と不信が高まっている。行政、検査機関および食品メーカーは様々な食品の検査を実施して食の安全・安心確保に努めているが、多様化する食品の問題に対応するため、新たな食品検査法の開発および検査法の迅速、簡便化が求められている。そこで、以下に詳述する近年の食品の品質と安全に関わる3つの問題に対して、食品関連法に基づく地域に流通する食品への基準的的確な適用、食品企業のコンプライアンス向上による食品偽装の抑止、食品危害の調査と被害拡大の防止などに寄与し、地域の食の安全・安心確保の一助となると考えられる迅速かつ簡便な食品中の原材料および食品添加物の検出法について検討を行った。

1つ目の問題として、2007年発覚の牛ミンチ肉偽装事件などをはじめとした食品の原材料等を本来とは異なった表示を行った状態で流通・市販させる食品偽装問題があげられる。

福岡市においては、スケトウダラ卵加工品（英名Alaska pollack roe product）である福岡特産の辛子めんたいこ（英名Spicy cod roe, 参考1）について、辛子めんたいこ業界と福岡市の協働事業で、「辛子めんたいこ表示・衛生管理の手引き」の作成、講習会の実施および「辛子めんたいこ表示・衛生管理士」検定試験制度の創設などに取り組んでいる。これらの取組は、食品偽装問題などにより食に対する消費者の信頼が揺らぐ中、辛子めんたいこ業界が食品業界全体の見本となるよう表示等の法令遵守や衛生管理を周知徹底させ、消費者の信頼を守ることを目的としている。この辛子めんたいこ業界と福岡市の協働事業の中で、日本近海および世界の海域でのスケトウダラ（学名*Theragra chalcogramma*, 英名Alaska pollack）資源の減少に伴う卵巣の品質の悪化や価格の高騰が、辛子めんたいこ製造業者にとって深刻な問題となっており、辛子めんたいこの原料であるスケトウダラ卵巣に、魚卵加工品の原材料として使用されるマダラ（学名*Gadus macrocephalus*, 英名Pacific cod）やカラフトシシャモ（学名*Mallotus villosus*, 英名Capelin）の卵（参考1）、またはその他の魚卵（タイセイヨウタラ（学名*Gadus morhua*, 英名Atlantic cod）、ミナミダラ（学名*Micromesistius australis*, 英名Southern blue whiting）、ブルーホワイティング（学名*Micromesistius poutassou*,

英名Blue whiting) など) を混入させる原材料偽装が懸念されていた (1)。この原材料偽装の方法として、スケトウダラ卵巣中に他の魚卵を注射器等で微量に注入し、良質な形態の辛子めんたいこ製品にする手法も考えられた。

加工食品の原材料については、「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律 (JAS法)」の「加工食品品質表示基準」(平成12年農林水産省告示第513号) に基づき、食品表示に原材料名等を記載することが定められている。そのため、食品表示の原材料名に使用された魚卵の表示がない場合にはJAS法に違反する。また、公正競争規約において、「辛子めんたいこ」とは「スケトウダラの卵巣に唐辛子を主原料とする調味液等で味付けしたもの」と定義されているため、スケトウダラの卵以外の魚卵を使用した製品の品名を「辛子めんたいこ」と表示した場合には公正競争規約に違反する。さらに、食品衛生法第11条に基づく「食品、添加物等の規格基準」(昭和34年厚生省告示第370号) において、亜硝酸ナトリウムは発色剤としてスケトウダラ卵巣を塩蔵した「たらこ」には使用可能であるが、その他の魚卵には使用不可であることが定められていることから、亜硝酸ナトリウムを添加した場合は食品衛生法にも抵触する。

地域を代表する特産品である辛子めんたいこに原材料偽装があった場合には、食品関連法に基づく基準に抵触するだけでなく、辛子めんたいこ業界全体の信用問題に波及し、地元経済への影響も出かねないことから、業界団体から福岡市と福岡市保健環境研究所に辛子めんたいこの偽装混入検査の実施を要望されていた。そこで、スケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵などの魚卵の種を同定できる検査法が必要とされていた。

食品偽装の発見と抑止のために、食材の種の同定法を整備する必要性が高まっており、科学的手法に基づいた様々な同定法が開発されてきたが、特にPCR (Polymerase Chain Reaction) 法は、食品の形態に依存せず、微量のDNAを検出できることから有用な検査法である。従来のPCR法は、PCRにより標的遺伝子を増幅し、アガロースゲル等を用いてPCR増幅産物の電気泳動を行い、エチジウムブロマイド等で染色したものを紫外線照射下で検出するという方法である。

しかし、スケトウダラとマダラはミトコンドリアDNA配列の相同性が高いことから、従来のPCR法では、この2種を区別して検出することができるプライマーの設計やPCR条件の設定は困難である。そこで、スケトウダラやマダラ等のタラ類の同定法については、PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法が報告されている (2, 3, 4)。

PCR-RFLP法は対象となる生物種共通のPCR増幅産物を特定の塩基配列を認識し切断する酵素（制限酵素）により処理し、アガロースゲル等で切断片のパターンを検出することにより生物種間の塩基配列の差異を明らかにする手法である（参考2）。Aranishiらによりタラ類の同定法として報告されているPCR-RFLP法は、ミトコンドリアDNAのCytochrome *b*領域の一部をタラ類に共通のユニバーサルプライマーを使用してPCRにより増幅し、そのPCR増幅産物（558 bp）を制限酵素である*Eco32I*と*Eco105I*で切断する方法である（2）。制限酵素により切断した断片長はスケトウダラが106 bp、161 bpおよび291 bp、マダラは106 bpおよび452 bpであるため、断片長のパターンの違いにより種を判別できる（参考3）。しかし、PCR-RFLP法はスケトウダラとマダラのように同属の複数種混合された食品では、ユニバーサルプライマーを用いたPCRにおいて微量に混合している種のDNA増幅が抑制されること、制限酵素で切断されなかったPCR増幅産物と目的外の種のPCR増幅産物の判別が困難であること、切断片のパターンが複雑になることなどから分析が難しい。Aranishiらにより報告されているPCR-RFLP法により試験を行ったところ（2）、スケトウダラ卵中に約10%以上のマダラ卵を混合した試料の場合にはマダラ卵を検出可能であったが、微量に混合したマダラ卵は検出できなかった（参考4）。スケトウダラ卵巣中に他の魚卵を注入する偽装方法では、スケトウダラ卵にマダラ卵等が微量に混合されている可能性もあることから、より高感度な検出法を開発することが必要と考えられた。

また、カラフトシシャモについては、北太平洋や北大西洋の極北海域、オホーツク海およびベーリング海などに生息しているが、生息する海域によって遺伝的におおまかに4つの分岐群（北東－中央大西洋型（NECA）、北西大西洋型（NWA）、北極型（ARC）、北東太平洋型（PAC））に分けられることが報告されている（5）。このことはカラフトシシャモに特異的なプライマーの設計を困難にしており、種特異的プライマーを用いたPCRによるカラフトシシャモの同定法は報告されていない。

リアルタイムPCR法はPCR増幅産物量に比例した蛍光強度をリアルタイムで測定することにより、標的遺伝子を検出するものである（参考5）。リアルタイムPCR法は従来のPCR法やPCR-RFLP法比較して、電気泳動、制限酵素処理および染色等が不要であるため、迅速で簡便な方法であり、高感度でコンタミネーションの危険性も少ないなど多くの利点がある。さらに、TaqManプローブ等を使用するリアルタイムPCR法は、従来のPCR法より特異的な検出が可能である。これらの利点から、リアルタイムPCR法は、混合試料から

の種の同定に幅広く利用されており（6,7,8），牛ミンチ肉偽装事件が起こった際には，リアルタイムPCR法による肉種の同定法が開発された（9）。

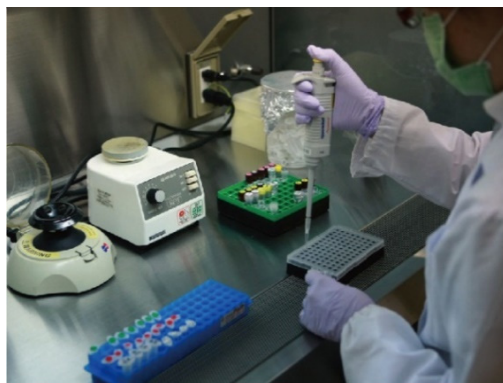
リアルタイムPCR法はスケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシヤモ卵を高感度かつ特異的に同定するために適しており，リアルタイムPCRによるこれらの魚卵の同定法を開発することは，スケトウダラ卵加工品の原材料偽装の発見に有効であると同時に，JAS法，公正競争規約および食品衛生法に基づく基準の的確な適用に寄与すると考えられる。また，福岡市と辛子めんたいこ業界団体が協力して，辛子めんたいこの偽装混入検査の実施など原材料偽装撲滅のための対策に取り組むことは，辛子めんたいこ業界のコンプライアンス向上による原材料偽装の抑止と福岡県の特産品である辛子めんたいこのブランド保持の効果が期待できると考えられる。

参考1 辛子めんたいこおよび各種魚卵の写真



参考2 PCR-RFLP法の流れ

① PCR反応液の調製



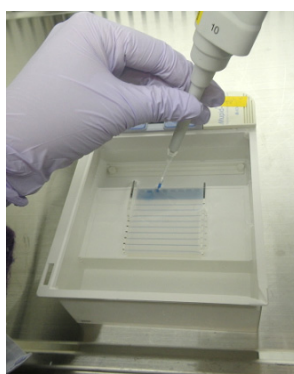
② PCR



③制限酵素処理



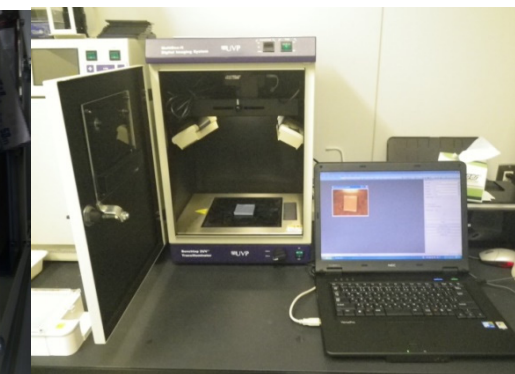
④電気泳動



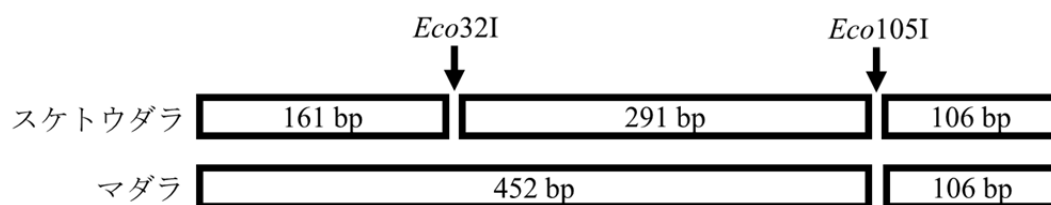
⑤染色



⑥紫外線照射撮影



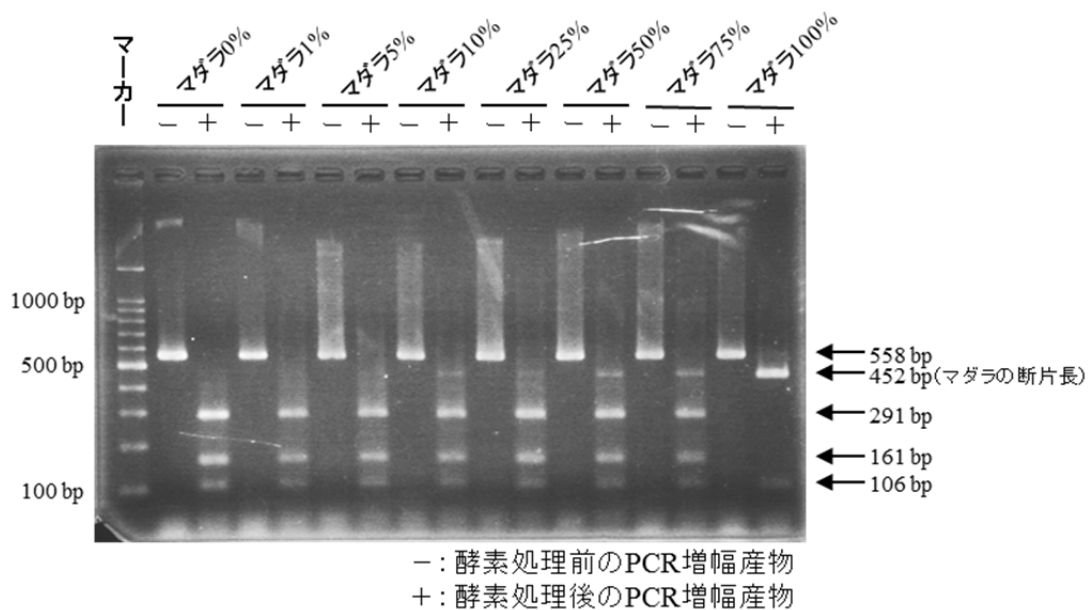
参考3 制限酵素によるPCR増幅断片の切断部位 (PCR-RFLP法)



参照：Aranishiらの論文 (2)

参考4 PCR-RFLP法によるスケトウダラ卵とマダラ卵の混合試料の検出試験

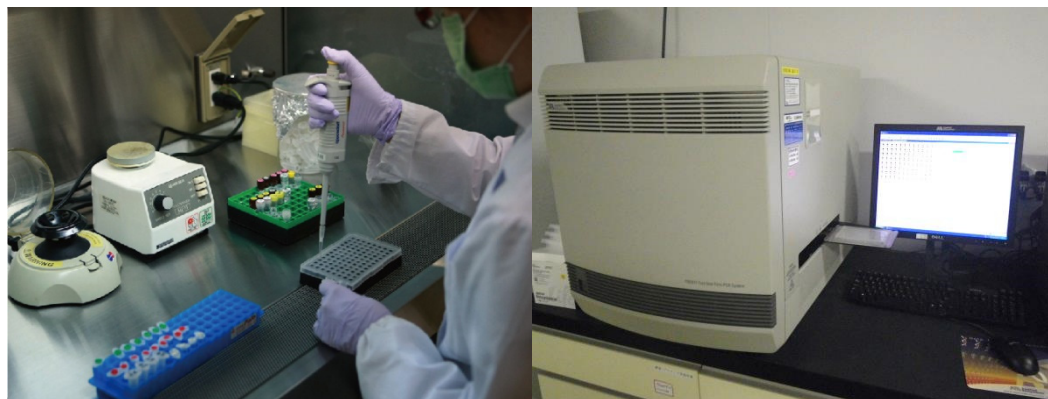
試料：スケトウダラ卵とマダラ卵を図中の割合で混合した試料



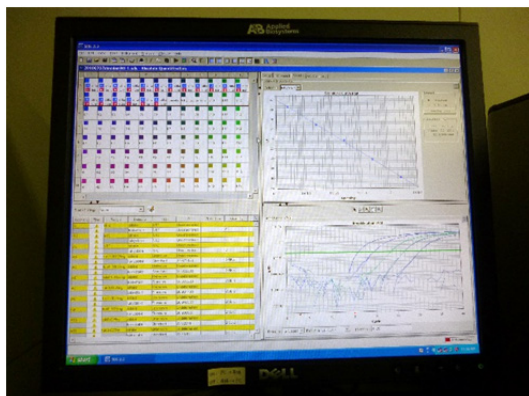
参考5 リアルタイムPCR法の流れ

① PCR反応液の調製

② リアルタイムPCR



③ データ解析



リアルタイム PCR :
Life Technologies 社製 ABI PRISM 7900HT

2つ目の問題として、毒キノコ等の植物性自然毒による食中毒の多発があげられる。毒キノコは植物性自然毒による食中毒の中で最も多い原因食品であり、近年のアウトドアブームによるキノコ狩りの人気の高まりを反映して、毒キノコを採取して喫食したことによる食中毒が毎年多数発生している。特に、毒成分イルージン S を含有するツキヨタケ（学名 *Omphalotus guepiniformis*, 参考 6）(10) による食中毒は、1996 年から 2005 年の間に日本で発生した毒キノコによる食中毒（計 584 件）の中で最大の割合（31.6%）を占めている（11）。ツキヨタケは日本の冷温帯林を代表するブナなどの枯れ木に自生するが、日本に自生する最も人気のある食用キノコの一つでツキヨタケと形態が似ているシイタケ（学名 *Lentinula edodes*）等と誤認して喫食され、食中毒となる事例が多く、喫食後 30 分から 3 時間で腹痛、下痢および嘔吐などの胃腸症状を呈す。食中毒の際には、適切な医療処置、保健所等の調査、被害拡大防止のための市民への情報提供などを迅速に行うために、食中毒の原因食品の迅速な同定が重要である。また、ツキヨタケはシイタケとよく誤認されることから、ツキヨタケによる食中毒が疑われる場合にはツキヨタケとシイタケを迅速に区別できる方法が望まれている。

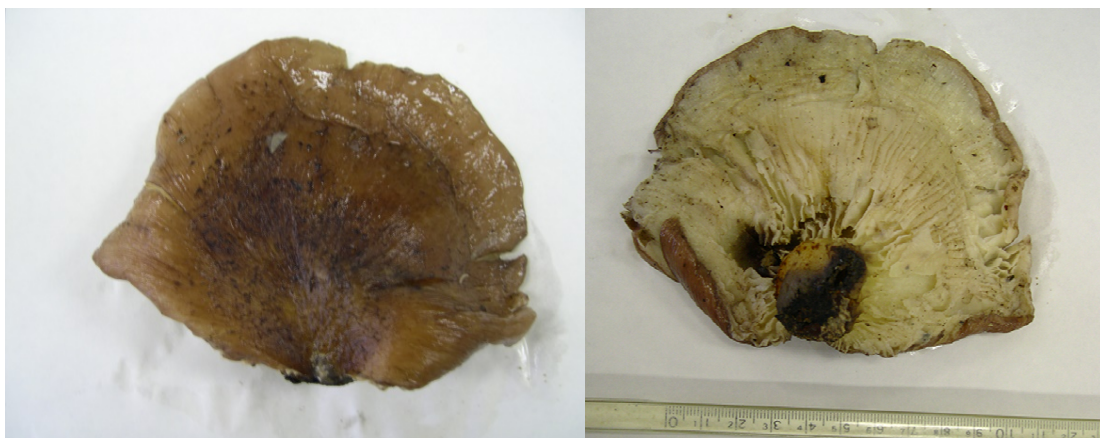
キノコは主に形態学的特徴によって同定されるが、食中毒の際には調理された食品や他の食材との混合試料、嘔吐物などが検査検体の場合も多く、その場合は形態による同定は困難である。また、ツキヨタケから食中毒の原因となる有毒成分イルージン S を溶媒抽出し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）、液体クロマトグラフータンデム型質量分析計（LC-MS/MS）およびガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）により測定する方法が報告されているが（12, 13, 14）、同定または定量のために必要となるイルージン S の標準品は市販されていない。

そこで、形態に依存せず、DNA を高感度かつ迅速に検出できるリアルタイム PCR 法は、食中毒の原因となる食材の種を同定する方法として有用と考えられる。リアルタイム PCR 法は、蛍光色素を用いて DNA の増幅を検出するが、代表的な検出方法として SYBR Green 法と TaqMan プローブ法がある。SYBR Green 法については、SYBR Green I が二本鎖 DNA に挿入して蛍光を発する色素であり、プライマーの二量体やミスプライミングによる増幅産物など非特異的な二本鎖 DNA も同時に検出することから、蛍光標識プローブを用いる TaqMan プローブ法と比較して原理的に特異性が劣っている（15, 16）（参考 7）。SYBR Green 法によつてツキヨタケの同定法が報告されているが（17）、食中毒の際の検査試料として考えられる混合試料や嘔吐物等に対しては検証されていない。

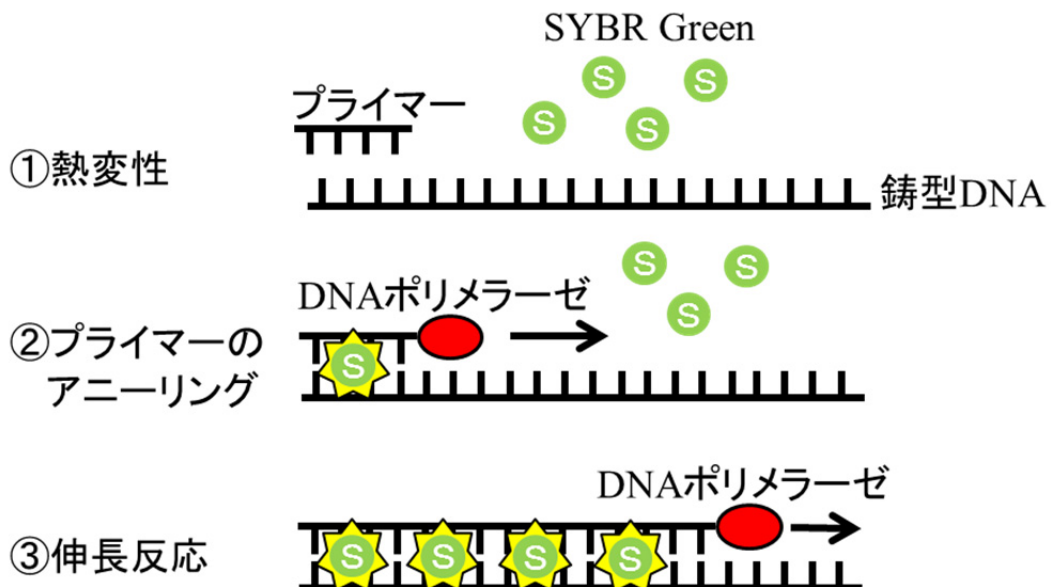
一方、TaqMan プローブ法は、5'末端を FAM など蛍光色素で、3'末端をクエンチャー物質（蛍光を消光させる物質）などで修飾したオリゴヌクレオチド（TaqMan プローブ）を PCR 反応系に加える方法である。TaqMan プローブは、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的に結合するが、TaqMan プローブ上にクエンチャー物質が存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制される。伸長反応ステップのときに、Taq DNA ポリメラーゼのもつ 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型 DNA に結合した TaqMan プローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャー物質による抑制が解除されて蛍光が発せられる（参考 8）。SYBR Green 法と比較して、TaqMan プローブを用意するための費用がかかるが、TaqMan プローブを標的 DNA に対して特異的に設計するため、特異性が高い方法である（15, 16）。さらに、複数のプローブに異なる蛍光色素を標識することで、単一反応にて複数の標的遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス解析を行うことができる。

そこで、ツキヨタケとシイタケを同時検出でき、調理された食品や他の食材との混合試料、嘔吐物からでも検出可能な TaqMan プローブによるマルチプレックスリアルタイム PCR 法を開発することは、食中毒の原因食品となるツキヨタケを迅速かつ特異的に同定するために有用と考えられる。また、食中毒の原因食品をツキヨタケと迅速に同定できることは、保健所等の適切な患者調査、原因食品の販売先や生息地の現地調査、被害拡大防止のための市民への情報提供などに貢献できると考えられる。

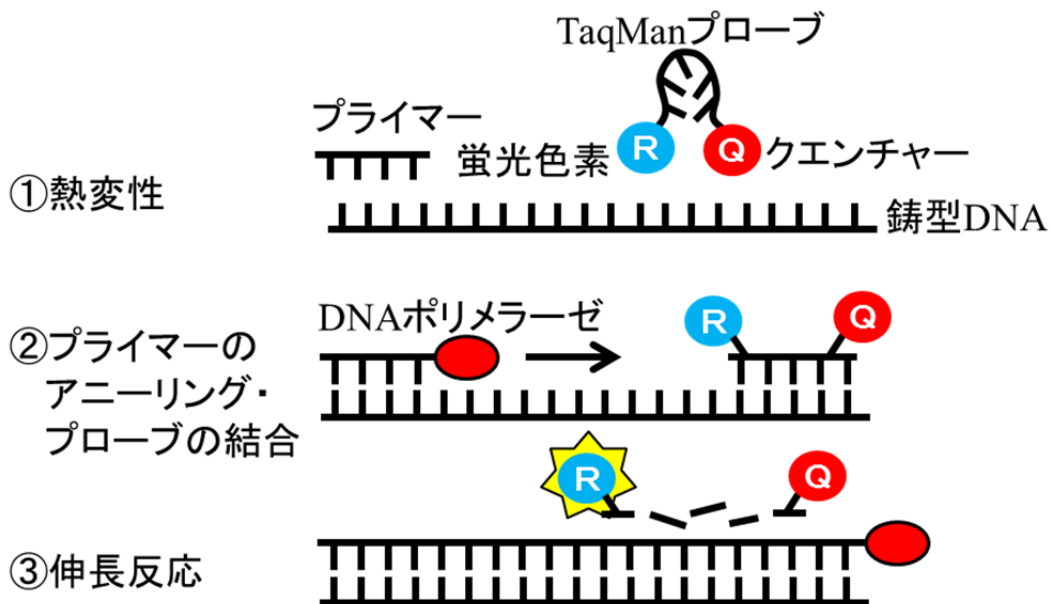
参考 6 ツキヨタケの写真



参考7 SYBR Green 法による検出方法の原理



参考8 TaqMan プローブ法による検出方法の原理



3つ目の問題として、食品、特に輸入食品における食品添加物の違反事例の多発があげられる。

食品添加物とは、食品衛生法第4条において、「食品の製造の過程において又は食品の加工若しくは保存の目的で、食品に添加、混和、浸潤その他の方法によって使用する物」と定義されている。また、同法第10条において、「人の健康を損なうおそれのない場合として厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて定める場合を除いては、添加物（天然香料及び一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用されるものを除く）並びにこれを含む製剤及び食品は、これを販売し、又は販売の用に供するために、製造し、輸入し、加工し、使用し、貯蔵し、若しくは陳列してはならない」とされている。

日本で使用が認められている食品添加物は、同法第10条に基づき厚生労働大臣が安全性と有効性を確認して指定した「指定添加物」の他、平成7年の食品衛生法改正の際に日本において既に使用され、長い食経験があるものについて例外的に指定を受けることなく使用、販売等が認められた「既存添加物」、動植物から得られる着香を目的として使用される「天然香料」、一般に飲食に供されているもので添加物として使用される「一般飲食物添加物」がある。また、同法第11条において、「厚生労働大臣は、公衆衛生の見地から、薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、販売の用に供する食品若しくは添加物の製造、加工、使用、調理若しくは保存の方法につき基準を定め、又は販売の用に供する食品若しくは添加物の成分につき規格を定めることができる」とされ、「食品、添加物等の規格基準」（昭和34年厚生省告示第370号）に基づいて、これらの規格基準に適合しない添加物およびこれを使用した食品の製造、販売、輸入等は禁止されている。さらに、同法第19条において、容器包装に入れられた加工食品は食品に使用した食品添加物を原則として、すべて表示することが義務づけられている。

日本において、食品添加物は国産食品、輸入食品を問わず上述のとおり規制されるが、日本と諸外国では食品添加物に対する法規制が必ずしも一致しないことから、輸入食品から指定外添加物が検出される、または指定添加物の定められた使用基準を超過するなどの食品衛生法に違反する事例が多発しており、国産食品においても依然として食品添加物の使用に伴う表示違反事例などが発生している（参考9,10）。

食品添加物の中でも、甘味料と保存料は日本および諸外国で製造される加工食品に幅広く使用される代表的な食品添加物である。甘味料と保存料の指定添加物の多くは対象食品および使用量について使用基準が定められており、使用基準違反や表示違反事例が発生し

ている（参考9）。また、甘味料と保存料の指定外添加物は輸入食品において検出事例が多い（参考10）。

指定添加物の甘味料として、アセスルファミウム、アスパルテーム、ネオテーム、サッカリンナトリウムおよびスクラロースなどがあり、指定添加物の保存料として、安息香酸、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸エステル類（パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸イソブチル、パラオキシ安息香酸ブチル）およびソルビン酸などがある。その他の甘味料としては、既存添加物のステビア抽出物（主成分はステビオシドおよびレバウディオシドA）やカンゾウ抽出物（主成分はグリチルリチン酸）などが使用されている。このように国内で使用できる甘味料と保存料の選択肢が多様化し、複数の組み合わせで使用される場合もある。また、諸外国で使用されている主な指定外添加物として、甘味料ではアリテーム（オーストラリア、ニュージーランド、メキシコおよび中国などで使用許可）、サイクラミン酸ナトリウム（EU、中国および台湾などで使用許可）、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン（EUなどで使用許可、日本では着香の目的以外に使用不可）、保存料ではパラオキシ安息香酸メチル（EU、カナダおよびインドなどで使用許可）などがあげられる（18, 19）。さらに、過去には日本で使用されていたが、現在では日本および諸外国において使用不可である甘味料のズルチンが中国から輸入された食品で検出される事例があった（20）。

このように、甘味料と保存料は、食品衛生法により対象食品および使用量について使用基準が定められている指定添加物に加え、諸外国で使用されている指定外添加物があり、食品中の甘味料や保存料を検査する際には、指定添加物と指定外添加物を含む多項目を分析することが求められている。

甘味料の分析法として、透析や溶媒により食品中から甘味料を抽出し、抽出液を固相カラム等により精製後、HPLC等の機器により定量測定する方法が一般的である（21, 22, 23, 24, 25, 26）。特に、複数の甘味料を食品から抽出する方法として広く用いられる透析法は、サンプル溶液と透析液を透析膜を介して接触させることにより、サンプル溶液内の低分子化合物と高分子化合物を分離する方法であり、食品中のアセスルファミウム、サッカリンナトリウム、アスパルテーム、スクラロース、サイクラミン酸、ステビオシド、レバウディオシドAおよびグリチルリチン酸等の分析法として報告されている（21, 22, 23, 24, 26）。しかし、透析法は、ビスケット等の穀類調製品やさきいか等の魚介乾製品において、回収率の低下が報告されている（26）。また、透析開始から終了まで時間を要し（約18～

48時間（21, 22, 23, 24, 26）），検査迅速化の障害となっている。

保存料の分析法としては、水蒸気蒸留や溶媒により食品中の保存料を抽出し、必要に応じて抽出液を固相カラム等により精製後、HPLC等の機器より定量測定する方法が一般的である（21, 22, 27, 28）。水蒸気蒸留法は水に溶けにくく、沸点の高い目的成分を水蒸気とともに、その沸点よりも低い温度で留出させ、目的成分を水と共に冷却捕集する方法であり、食品中の安息香酸、デヒドロ酢酸およびソルビン酸の分析法として報告されている（21, 22, 27）。しかし、パラオキシ安息香酸エステル類において、水蒸気蒸留法では高タンパク食品や高脂肪食品からの回収率が低いことから、高タンパク食品や高脂肪食品からの場合は溶媒抽出法により抽出し、抽出液を固相カラムにより精製後、HPLCにより定量測定する方法が報告されている（27, 28）。

このように、個別または複数同時に甘味料または保存料を測定する方法が報告されているが、甘味料と保存料両方の多項目を一斉分析する方法は報告されていない。多項目の甘味料および保存料を検査するためには、これら複数の分析法を実施するため、操作が煩雑で、検査にかかる人数と時間を要し、多種類の試薬、器具、固相カラムおよびHPLCカラム等の実験材料が必要となる。

現在、食品分析分野においては、輸入食品の増加等により求められる検査検体数と検査項目が増加していること、および食品中に残留する農薬等の規格基準が「ポジティブリスト制度」（799種類の農薬等に残留基準が設定され、基準値が設定されていない農薬等と作物の組み合わせについても、一律基準（0.01 ppm）が適用される）へ移行したことなどから、検査の迅速、簡便化のため、LC-MS/MS等を用いた多項目一斉分析法が多く報告されるようになった（29, 30）。

LC-MS/MSとは、HPLCと2台の質量分析計（MS）を結合させた装置であり、HPLCで試料中の成分を分離溶出後に、試料成分をイオン化し、1段目のMS部で特定の質量イオン（プレカーサーイオン）のみを通過させ、衝突室（コリジョンセル）内での衝突を経て解離生成した特定のイオン（プロダクトイオン）を2段目のMSで検出する（参考11, 12）。食品添加物の分析に広く利用されているHPLCは、一般的にHPLCカラムにより成分を分離後、UV、蛍光または電気伝導度などで検出し、物質の定性は主に保持時間で、定量はピーク強度・面積で行うことから、多項目一斉分析において複数の成分がほぼ同時にカラムから溶出する場合には確実な定性や定量が困難になる。一方、LC-MS/MSは目的とする質量イオンを通過させるための条件を高速で切り替え可能のため、どちらかのMSで通過させる質量イオ

ンさえ異なれば、溶出時間が同じであっても、別の質量軸のクロマトグラムとして区別することができ、多項目の目的成分を選択的かつ高感度に一斉分析できる。

食品中の甘味料や保存料は、多くの検査機関等で頻繁に検査され、指定添加物と指定外添加物を含む多項目を分析することが求められ、輸入食品の増加に伴う検査検体数の増加も予測されることから、多項目の甘味料と保存料の検査の迅速、簡便化が望まれている。

そこで、多項目の甘味料と保存料を LC-MS/MS により一斉分析できる検査法を開発することは、食品中の甘味料と保存料の検査を迅速かつ簡便化することができ、検査に必要な人数、時間および実験材料の削減のために有効であると考えられる。また、食品添加物の検査を迅速かつ簡便化することは、地域に流通する食品について食品添加物の使用基準や表示基準が遵守されているか確認するために有用であると考えられる。なお、本研究の対象物質は同時分析が可能であった甘味料 12 種および保存料 9 種とした（参考 13, 14）。

参考 9 福岡市における甘味料と保存料の食品衛生法違反事例（平成 20～25 年）

使用基準違反事例

年度	食品名	分類	検査項目	検出値	基準値等
20	チョコレート	菓子	サイクラミン酸（甘味料）	0.05 g/kg	使用不可
21	高菜漬け	漬物	サッカリンナトリウム（甘味料）	0.21 g/kg	0.20 g/kg
22	大根漬け	漬物	サッカリンナトリウム（甘味料）	0.23 g/kg	0.20 g/kg

表示違反事例

年度	食品名	分類	表示違反内容
20	たくあん漬け	漬物	サッカリンナトリウム（甘味料）
21	漬物	漬物	アセスルファムカリウム（甘味料） ソルビン酸（保存料）
	イワシ半月	魚肉ねり製品	サッカリンナトリウム（甘味料）
22	筑前煮	そうざい	サッカリンナトリウム（甘味料）
	たちうおみりん干し	魚介類加工品	サッカリンナトリウム（甘味料）
23	しょうゆ	調味料	サッカリンナトリウム（甘味料） パラオキシ安息香酸エステル類（保存料）
25	かまぼこ	魚肉練り製品	サッカリンナトリウム（甘味料）
	かまぼこ	魚肉練り製品	サッカリンナトリウム（甘味料）
	サバの南蛮漬け	そうざい	サッカリンナトリウム（甘味料）

参照：平成 20～25 年度福岡市保健環境研究所報

参考 10 輸入時検査等における甘味料と保存料の食品衛生法違反事例（平成 25 年）

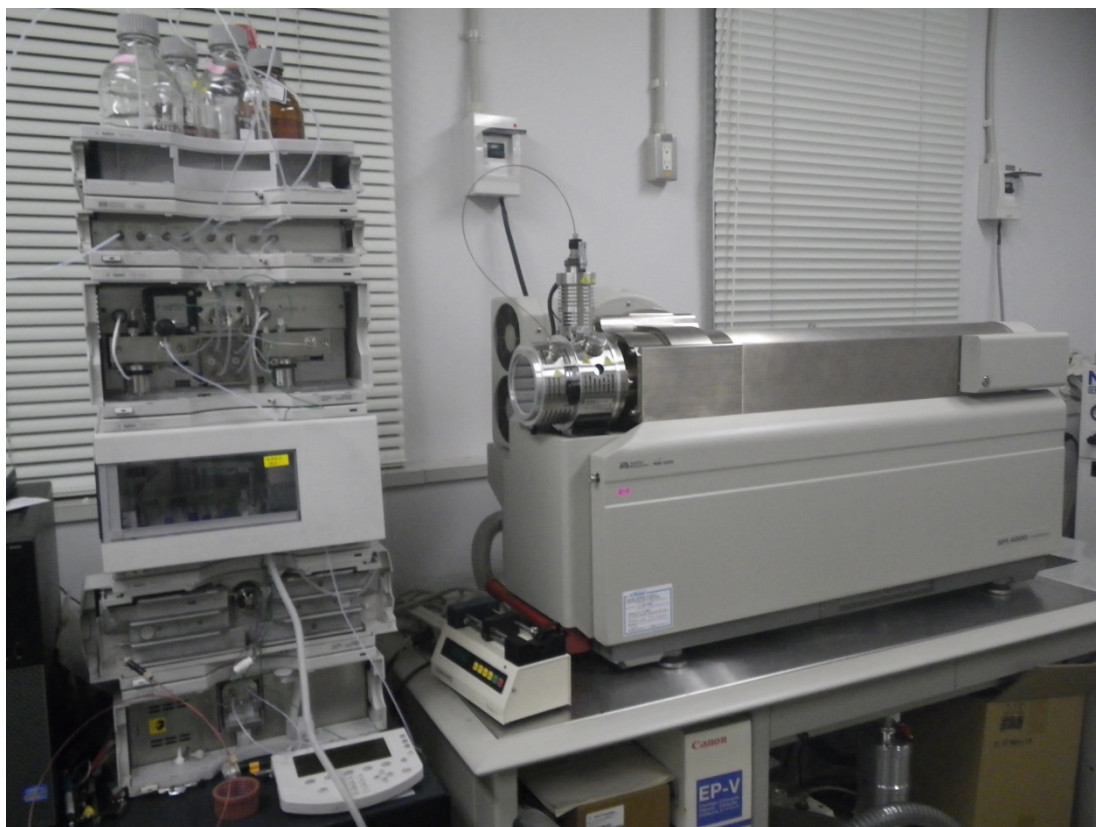
No.	品名	分類	生産国	違反項目 ①	違反項目 ②	違反内容	備考
1	シロップ	その他の食品	イスラエル	使用基準	アセスルファムカリウム	0.38 g/kg 検出	自主検査
2	シロップ	その他の食品	イスラエル	使用基準	アセスルファムカリウム スクラロース	アセスルファムカリウム 0.39 g/kg, スクラロース 0.61 g/kg 検出	自主検査
3	シロップ	その他の食品	イスラエル	使用基準	アセスルファムカリウム スクラロース	アセスルファムカリウム 0.44 g/kg, スクラロース 0.59 g/kg 検出	自主検査
4	魚醤	その他の食品	ベトナム	使用基準	アセスルファムカリウム	0.5 g/kg 使用	行政検査
5	シロップ	その他の食品	台湾	使用基準	アセスルファムカリウム	0.45 g/kg 検出	自主検査
6	シロップ	その他の食品	台湾	使用基準	アセスルファムカリウム	0.38 g/kg 検出	自主検査
7	無加熱摂取冷凍食品： 冷凍コハダ	水産 (加工品含む)	中華人民 共和国	指定外 添加物	サイクラミン酸	11 µg/g 検出	自主検査
8	容器包装詰加圧加熱殺菌 食品：加工卵が主原料のもの (うずらの卵)	畜産 (加工品含む)	台湾	指定外 添加物	サイクラミン酸	60 µg/g 検出	自主検査
9	キャンディー類	その他の食品	台湾	指定外 添加物	サイクラミン酸	43 µg/g 検出	自主検査
10	漬け物	農産 (加工品含む)	タイ	指定外 添加物	サイクラミン酸	77 µg/g 検出	モニタリング 検査
11	いったスイカの種子	種実類	中華人民 共和国	指定外 添加物	サイクラミン酸	75 µg/g 検出	自主検査
12	その他の農産加工品： 烏龍茶エキスパウダー	農産 (加工品含む)	中華人民 共和国	指定外 添加物	サイクラミン酸	8 µg/g 検出	自主検査
13	いったコーヒー	種実類	ベトナム	指定外 添加物	サイクラミン酸	1,000 µg/g 検出	自主検査
14	チョコレート類	その他の食品	アメリカ 合衆国	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 0.20 g/kg 検出 (対象外使用)	自主検査
15	果汁入り飲料	飲料	サウジ アラビア	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 0.05 g/kg 検出 (対象外使用)	自主検査
16	野菜の調整品	農産 (加工品含む)	イタリア	使用基準	ソルビン酸 安息香酸	ソルビン酸 0.02 g/kg, 安息香酸 0.03 g/kg 検出 (対象外使用)	モニタリング 検査
17	無加熱摂取冷凍食品： チャンジャ	水産 (加工品含む)	大韓民国	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 0.069 g/kg 検出 (対象外使用)	自主検査
18	加熱後摂取冷凍食品(凍結 直前未加熱)： 50g 玉子サラダフライ	その他の食品	中華人民 共和国	使用基準	ソルビン酸カリウム	対象外使用	行政検査

19	漬け物	農産 (加工品含む)	中華人民 共和国	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 0.56 g/kg 検出	自主検査
20	原料用果汁グレープ	飲料	イタリア	使用基準	ソルビン酸	0.24 g/kg 検出 (対象外使用)	自主検査
21	その他の洋菓子	その他の食品	トルコ	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 3.16 g/kg 検出 (原材料のシロップに ソルビン酸カリウムを 1.0 g/kg を超えて使用)	自主検査
22	アイスクリーム	乳・乳製品	ベルギー	使用基準	ソルビン酸	0.10 g/kg 検出 (対象外使用)	自主検査
23	ストロベリージャム	農産 (加工品含む)	イタリア	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 1.2 g/kg 検出	自主検査
24	調味料	その他の食品	ベトナム	使用基準	ソルビン酸 安息香酸	ソルビン酸 0.07 g/kg, 安息香酸 0.04 g/kg 検出 (共に対象外使用)	自主検査
25	調味料	その他の食品	イギリス	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 1.0 g/kg を超えて使用	自主検査
26	とうがらし調整品	その他の食品	ブラジル	使用基準	ソルビン酸カリウム	対象外使用	自主検査
27	乾燥すもも	農産 (加工品含む)	中華人民 共和国	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 0.57 g/kg 検出	自主検査
28	とうがらし味噌 柿ニンニクコチュジャン	その他の食品	大韓民国	使用基準	ソルビン酸カリウム	対象外使用	行政検査
29	唐辛子の葉和え	農産 (加工品含む)	大韓民国	使用基準	ソルビン酸	0.06 g/kg 検出 (対象外使用)	モニタリング 検査
30	エゴマの葉和え	農産 (加工品含む)	大韓民国	使用基準	ソルビン酸	0.30 g/kg 検出 (対象外使用)	モニタリング 検査
31	果実ピューレ及び ペースト	農産 (加工品含む)	フランス	使用基準	ソルビン酸カリウム	(ソルビン酸として) 0.068 g/kg 検出 (対象外使用)	自主検査
32	果実の調整品	農産 (加工品含む)	インド	指定外 添加物 使用基準	ヨウ素 安息香酸ナトリウム	ヨウ素使用, 安息香酸ナトリウム (安息香酸として) 0.21 g/kg 検出 (対象外使用)	行政検査 自主検査
33	RICE CAKE	穀類 (加工品含む)	大韓民国	使用基準	安息香酸ナトリウム	(安息香酸として) 0.79 g/kg 検出 (対象外使用)	モニタリング 検査
34	漬け物	農産 (加工品含む)	トルコ	使用基準	安息香酸ナトリウム	(安息香酸として) 0.27 g/kg 検出 (対象外使用)	自主検査
35	健康食品	その他の食品	アメリカ 合衆国	指定外 添加物	パラオキシ 安息香酸メチル	0.017 g/kg 検出	自主検査
36	健康食品	その他の食品	ペルー	指定外 添加物	パラオキシ 安息香酸メチル	7.3 g/kg 検出	自主検査
37	無加熱摂取冷凍食品： ケーキ	その他の食品	カナダ	使用基準	プロピオン酸カルシウム	(プロピオン酸として) 2.6 g/kg 検出	自主検査

参照：厚生労働省ホームページ

(http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html)

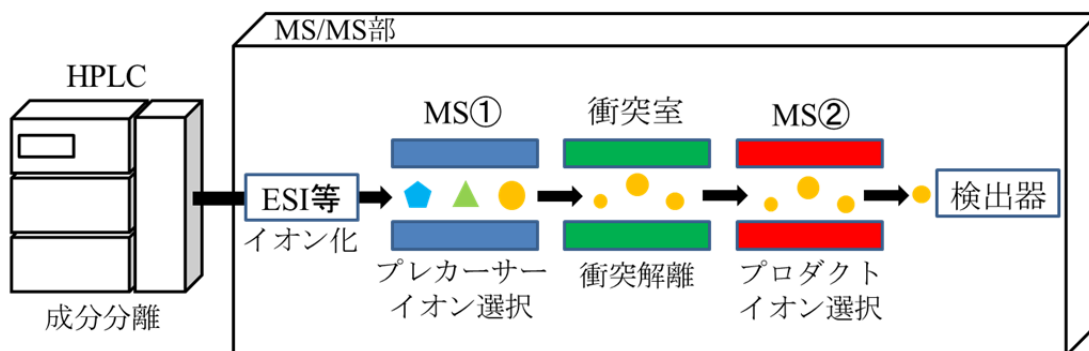
参考 11 LC-MS/MS 装置の写真



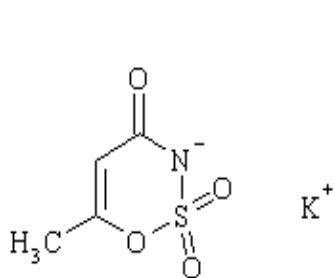
液体クロマトグラフ：Agilent Technologies 社製 1100 シリーズ

質量分析計：AB Sciex 社製 API4000

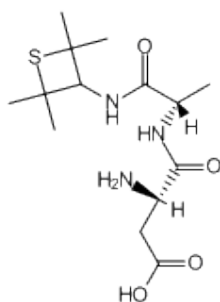
参考 12 LC-MS/MS による分析の原理 (MRM モード)



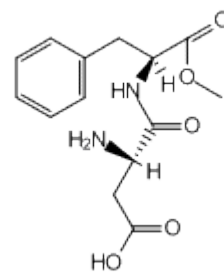
参考 13 対象物質の甘味料 12 種とその構造式 (下線を引いた物質は指定外添加物)



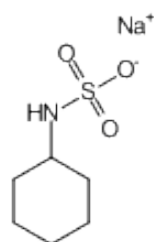
アセスルファム
カリウム (AK)



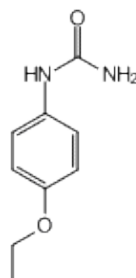
アリテーム
(AL)



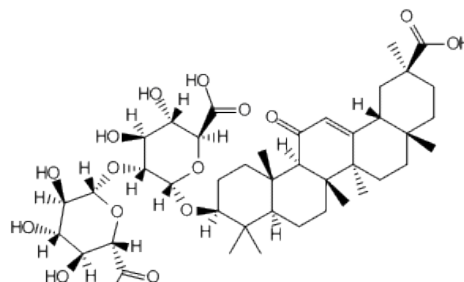
アスパルテーム
(ASP)



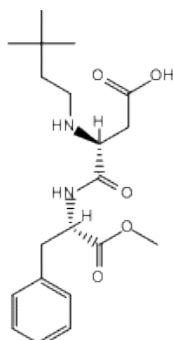
サイクラミン酸
ナトリウム (CYC)



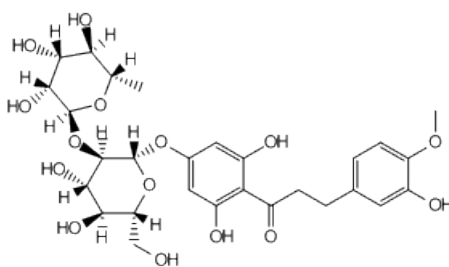
ズルチン
(DU)



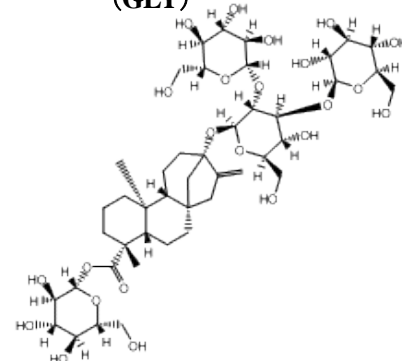
グリチルリチン酸
(GLY)



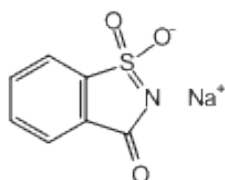
ネオテーム
(NEO)



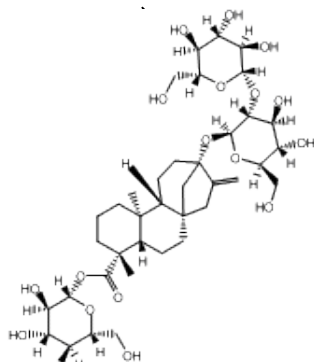
ネオヘスペリジンジヒドロ
カルコン (NHDC)



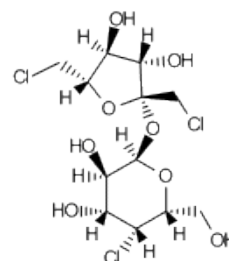
レバウディオシド A
(REB)



サッカリンナトリウム
(SAC)



ステビオシド
(STV)

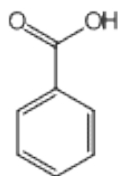


スクラロース
(SUC)

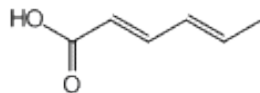
提供 : AK 以外は科学技術振興機構 (JST), AK は SDBSWeb : <http://sdfs.db.aist.go.jp>

(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 2015 年 2 月)

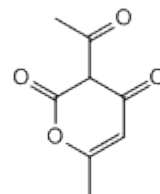
参考 14 対象物質の保存料 9 種とその構造式 (下線を引いた物質は指定外添加物)



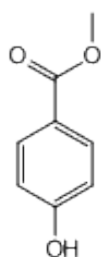
安息香酸
(BA)



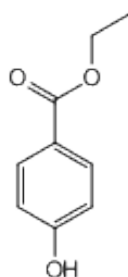
ソルビン酸
(SOA)



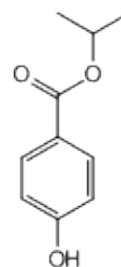
デヒドロ酢酸
(DHA)



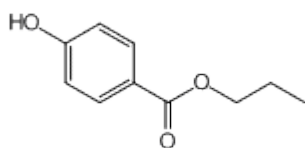
パラオキシ安息香酸
メチル (PHBA-Me)



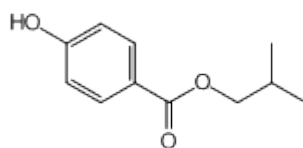
パラオキシ安息香酸
エチル (PHBA-Et)



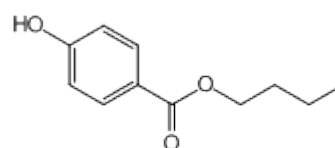
パラオキシ安息香酸
イソプロピル (PHBA-iPr)



パラオキシ安息香酸
プロピル (PHBA-Pr)



パラオキシ安息香酸
イソブチル (PHBA-iBu)



パラオキシ安息香酸
ブチル (PHBA-Bu)

提供：科学技術振興機構 (JST)

本研究では、上述の食品問題に対して、食品関連法に基づく地域に流通する食品への基準的的確な適用、食品危害の調査と被害拡大の防止、食品企業のコンプライアンス向上による食品偽装の抑止などに寄与し、地域の食の安全・安心確保の一助となることを主な目的とし、食品中の原材料と食品添加物の迅速な検出法の開発を検討した。

各章ごとの目的と概要として、第1章では、スケトウダラ卵加工品中にマダラ卵およびカラフトシシヤモ卵を混入させる原材料偽装の発見と抑止のために、リアルタイム PCR 法によるスケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシヤモ卵の検出法を開発し、高感度、特異的かつ迅速にこれらの魚卵を検出可能であることを確認した。第2章では、毒キノコによる食中毒の原因食品を同定するために、マルチプレックスリアルタイム PCR 法によるツキヨタケとシイタケの同時検出法を開発し、特異的、迅速かつ高感度にツキヨタケとシイタケを判別可能であること、調理された食品、他の食材との混合試料および嘔吐物に対しても適用可能であることを確認した。第3章では、多項目の甘味料および保存料の検査の迅速、簡便化のために、食品中の甘味料12種および保存料9種の固相カラムによる同時抽出・精製法および LC-MS/MS による一斉分析法を開発し、すべての対象物質において高い定量性と選択性をもつことを確認した。

また、本論文の成果は以下の報告にて公表した。

第1章 食品衛生学雑誌第51巻3号

第2章 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry Vol.76, No.7

第3章 食品衛生学雑誌第54巻3号

第1章 リアルタイムPCRによるスケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵の検出法の開発

I. 緒言

スケトウダラ卵巣を原材料として製造される福岡県特産品の辛子めんたいこについて、表示等の法令遵守を周知徹底させ、辛子めんたいこ業界全体の信用を保持するため、福岡市と辛子めんたいこ業界は協働で「辛子めんたいこ表示・衛生管理の手引き」の作成、講習会の実施および「辛子めんたいこ表示・衛生管理士」検定試験制度の創設などに取組んでいる。このような取り組みの中で、スケトウダラ卵巣の品質悪化や価格高騰により、魚卵加工品の原材料として使用されるマダラ卵やカラフトシシャモ卵を辛子めんたいこなどのスケトウダラ卵加工品に混入させる原材料偽装が懸念されていた(1)。地域を代表する特産品に原材料偽装があった場合には、辛子めんたいこ業界全体の信用問題に波及する可能性があることから、スケトウダラ卵加工品中のマダラ卵やカラフトシシャモ卵を検出する方法を開発し、原材料偽装の有無を確認することが求められていた。

カラフトシシャモについては、北太平洋や北大西洋の極北海域、オホーツク海およびベーリング海などに生息しているが、生息する海域によって遺伝的におおまかに4つの分岐群(NECA, NWA, ARCおよびPAC)に分けられることが報告されている(5)。このことはカラフトシシャモに特異的なプライマーの設計を困難にしており、種特異的プライマーを用いたPCRによるカラフトシシャモの同定法は報告されていない。

スケトウダラやマダラ等のタラ類については、PCR-RFLP法による同定法が報告されている(2,3,4)。PCR-RFLP法は対象となる生物種共通のPCR増幅産物を特定の塩基配列を認識し切断する酵素(制限酵素)により処理し、アガロースゲル等で切断片のパターンを検出することにより生物種間の塩基配列の差異を明らかにする手法である。しかし、PCR-RFLP法はスケトウダラやマダラのように同属の複数種混合された食品では、ユニバーサルプライマーを用いたPCRにおいて微量に混合している種のDNA増幅が抑制されること、制限酵素で切断されなかったPCR増幅産物と目的外の種のPCR増幅産物の判別が困難であること、切断片のパターンが複雑になることなどから分析が難しい。Aranishiらにより報告されているPCR-RFLP法では、スケトウダラ卵中に約10%以上のマダラ卵を混合した試料の場合にはマダラ卵を検出可能であったが、微量に混入したマダラ卵は検出できな

った (2)。スケトウダラ卵巢中に他の魚卵を微量に注入する可能性もあることから、PCR-RFLP法より高感度に検出できる方法が必要と考えられた。

リアルタイムPCR法は、混合試料からの種の同定に幅広く利用されており (6, 7, 8)、高感度かつ特異的に種を同定するために有用である。また、電気泳動、制限酵素処理および染色等が不要であるため、PCR-RFLP法比較して迅速で簡便な方法である。

リアルタイムPCRの検出方法の主なものとして、SYBR Green法とTaqManプローブ法の2種類が広く利用されている。SYBR Green法は、SYBR Green I 等の二本鎖DNAの間に挿入して蛍光を発するインターカレーターを用いてDNA増幅の検出を行うことから、プライマーの二量体や目的以外の増幅産物などの非特異的な二本鎖DNAも検出し、TaqManプローブ法と比較して原理的には特異性が劣る (15, 16)。

TaqMan プローブ法は 5'末端を FAM など蛍光色素で、3'末端をクエンチャー物質 (蛍光を消光させる物質) などで修飾したオリゴヌクレオチド (TaqMan プローブ) を PCR 反応系に加える方法である。TaqMan プローブが鋳型 DNA に結合後、DNA 合成の過程でプローブが分解されることにより蛍光を発する。配列特異的な TaqMan プローブを用いることから、特異性が高い検出方法であり、スケトウダラとマダラのミトコンドリア DNA のような相同性の高い配列同士も区別して検出できる (15, 16)。特に、TaqMan minor groove binder (MGB) プローブは、プローブの 3' 末端に結合させた MGB 構造の影響により、従来のプローブと比較して短い配列で特異性の高いアニーリングが可能である (31)。

そこで本章では、スケトウダラ卵加工品に混入した異種魚卵を特異的、高感度かつ迅速に検出するため、TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR によるスケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシヤモ卵の検出法の開発を検討した。

II. 材料および実験方法

1. 材料

スケトウダラ卵 3 検体、マダラ卵 3 検体、カラフトシシヤモ卵 9 検体 (ノルウェー産 3 検体、アイスランド産 3 検体、カナダ産 3 検体)、辛子めんたいこ 47 検体、辛子めんたいこ加工品 17 検体、および Table 1 に示した他種 48 検体の鮮魚介類・食肉類・加工食品を実験に用いた。また、スケトウダラ卵にマダラ卵またはカラフトシシヤモ卵を 0.1, 1, および 10%の割合で添加した混合試料を調製し、混合試料からのマダラ卵およびカラフトシシヤモ卵の検出試験に用いた。

Table 1 The 48 species tested for specificity by real-time PCR.

Scientific name (English name)
<i>Anguilla japonica</i> (Japanese eel)
<i>Anoplopoma fimbria</i> (Sablefish)
<i>Anthocardis crassispina</i> (Hard-spined sea urchin)
<i>Arctoscopus japonicus</i> (Sailfin sandfish)
<i>Atrina pectinata</i> (Pen shell)
<i>Balaenoptera acutorostrata</i> (Common minke whale)
<i>Chionoecetes opilio</i> (Snow crab)
<i>Clupea pallasii</i> (Pacific herring)
<i>Cololabis saira</i> (Pacific saury)
<i>Corbicula japonica</i> (Japanese corbicula)
<i>Crassostrea gigas</i> (Japanese oyster)
<i>Cypselurus agoo agoo</i> (Flying fish)
<i>Eleginus gracilis</i> (Saffron cod)
<i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod)
<i>Haliotis discus discus</i> (Japanese abalone)
<i>Hyporhamphus sajori</i> (Japanese halfbeak)
<i>Ibacus ciliatus</i> (Fan lobster)
<i>Katsuwonus pelamis</i> (Skipjack tuna)
<i>Lagocephalus wheeleri</i> (Green rough-backed puffer)
<i>Loligo bleekeri</i> (Spear squid)
<i>Lophiomus setigerus</i> (Monkfish)
<i>Macruronus novaezelandiae</i> (Blue grenadier)
<i>Mercenaria mercenaria</i> (Northern quahog)
<i>Micromesistius australis</i> (Southern blue whiting)
<i>Octopus vulgaris</i> (Common octopus)
<i>Oncorhynchus keta</i> (Chum salmon)
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (Coho salmon)
<i>Oncorhynchus nerka</i> (Sockeye salmon)
<i>Pagurus major</i> (Red seabream)
<i>Pandalus eous</i> (Northern shrimp)
<i>Paralithodes camtschaticus</i> (Alaskan king crab)
<i>Patinopecten yessoensis</i> (Japanese scallop)
<i>Penaeus monodon</i> (Black tiger prawn)
<i>Ruditapes philippinarum</i> (Japanese littleneck)
<i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon)
<i>Sardinops melanostictus</i> (Japanese sardine)
<i>Scomber japonicus</i> (Chub mackerel)
<i>Sepia lycidas</i> (Kisslip cuttlefish)
<i>Seriola quinqueradiata</i> (Japanese amberjack)
<i>Spirinchus lanceolatus</i> (Shishamo smelt)
<i>Takifugu rubripes</i> (Tiger puffer)
<i>Trachurus japonicus</i> (Japanese jack mackerel)
<i>Bos taurus</i> (Cattle)
<i>Equus caballus</i> (Horseflesh)
<i>Gallus gallus domesticus</i> (Chicken)
<i>Ovis aries</i> (Sheep)
<i>Sus scrofa domesticus</i> (Pig)
<i>Laminaria japonica</i> (Japanese tangle)

2. プライマーおよびプローブ

ミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 領域の塩基配列データ (GenBank accession number AB078151 (スケトウダラ), AB078152 (マダラ), AB049022 (カラフトシシャモ)) を NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank から得て、配列情報解析ソフトウェア DNASIS Pro (日立ソフトウェアエンジニアリング (株)) を用いて比較解析後、スケトウダラ、マダラおよびカラフトシシャモに特異的なプライマーと TaqMan MGB プローブを Primer Express ソフトウェア v2.0 (Life Technologies 社) により設計した。プローブは 5'末端に蛍光色素 FAM を標識し、3'末端に非蛍光クエンチャー物質 (NFQ) と MGB を結合させた。プライマーは (株) シグマアルドリッチジャパンに、プローブは Life Technologies 社に合成を依頼した。

3. DNA 抽出法

材料を均質に混合したものを試料とした。なお、辛子めんたいこ加工品については、魚卵とその他の部位を分離することが容易な 14 検体は魚卵の部位のみを均質に混合したものを試料とし、それ以外の辛子めんたいこソース (Spicy cod roe sauce), めんたい鮭フレーク (Salmon flakes with spicy cod roe) およびめんたいの佃煮 (Spicy cod roe boiled in soy sauce) の 3 検体は全体を均質に混合したものを試料とした。これらの試料 5 g をポリプロピレン製 50 mL 遠沈管に採取し、0.25 mol/L スクロースと 1 mmol/L EDTA を含む 10 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) を 30 mL 加えた。ホモジナイザー (TissueRuptor : (株) キアゲン) を用いて水中で破碎後、高速冷却遠心分離機 (6200 : 久保田商事 (株)) を用いて 4°C, 1,000 ×g で 3 分間遠心分離し、得られた上清を粗抽出液とした。粗抽出液 1 mL を分取し、DNA 抽出キット (mtDNA Extractor CT kit: 和光純薬工業 (株)) を用いて、添付説明書の手順 (4°C, 10,000 ×g で 10 分間の遠心分離操作から) に従い DNA の抽出を行った。得られた DNA 溶液は分光光度計 (ND-1000 : NanoDrop Technologies 社) を用いて 260 nm の吸光度を測定し、DNA 濃度を算出後、TE 緩衝液で 20 ng/μL に調製した。なお、検量線作成用のスタンダード DNA 溶液を作製する際は、50 μg/mL のキャリアー DNA (Ribonucleic acid, transfer : Sigma-Aldrich 社) を含む TE 緩衝液を希釈に使用した。

4. リアルタイム PCR 条件

PCR 用反応液は 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ に調製し、その組成を TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies 社) 12.5 μL , Forward プライマー溶液 (25 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL , Reverse プライマー溶液 (25 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL , プローブ溶液 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL , 滅菌超純水 8.5 μL , DNA 溶液 (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2.5 μL とした。一つの DNA 溶液当たり 3 つの well を用いて測定を行った。リアルタイム PCR 装置として ABI PRISM 7900HT (Life Technologies 社) を用い、PCR として 50°C で 2 分間の UNG (Uracil DNA glycosylase) 処理後、95°C で 10 分間加温し、40 サイクル (95°C, 15 秒→60°C, 1 分) の増幅反応を行った。

5. リアルタイム PCR 後のデータ解析

リアルタイム PCR 後のデータとして、SDS v.2.1 ソフトウェア (Life Technologies 社) を使用して解析した。Amplification plot 上で Threshold line と増幅曲線との交点におけるサイクル数を Threshold cycle 値 (Ct 値) とした。Threshold line として、ベースライン (3 サイクルから 15 サイクル) を設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側であり、各陽性試料 (スケトウダラ, マダラおよびカラフトシシャモから抽出したミトコンドリア DNA) の指数関数的増幅領域である 0.20 とした。各試料の Ct 値は 3 つの well の平均の値とした。

III. 結果

1. プライマーおよびプローブの設計

ミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 領域はタラ類の魚種鑑別やカラフトシシャモの遺伝的分岐の研究に用いられている (2, 3, 5)。そのため、スケトウダラ, マダラおよびカラフトシシャモに特異的なプライマーと TaqMan MGB プローブはミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 領域において設計した (Fig. 1)。プローブについては、スケトウダラとマダラは Cytochrome *b* 領域の配列相同性が高いことから、従来の TaqMan プローブより特異性が高い TaqMan MGB プローブを用いた。カラフトシシャモは生息する海域によって遺伝的におおまかに 4 つの分岐群 (NECA, NWA, ARC および PAC) に分けられることが報告されている (5)。そこで、カラフトシシャモ検出用プライマーとプローブについては、Dodson らにより報告された Cytochrome *b* 領域に基づくハプロタイプ 154 種の塩基配列データ

(GenBank accession number DQ457421-DQ457574) を比較解析し (5), 相同性の高い領域において設計した (Fig. 2)。マダラ検出用プライマーについては、スケトウダラ DNA 溶

液中の微量のマダラ DNA を高感度に検出するために、マダラ検出用プライマーのミスアニーリングによるスケトウダラ DNA の増幅によって、マダラ DNA の増幅が抑制されることを防ぐ必要があるため、アレル特異的 PCR 法 (32, 33) を参考に Reverse プライマーの 3'末端をスケトウダラとマダラの変異塩基に対応させ、3'末端から 2 番目に mismatches を導入した。設計したプライマーと TaqMan MGB プローブの配列は Table 2 に示した。

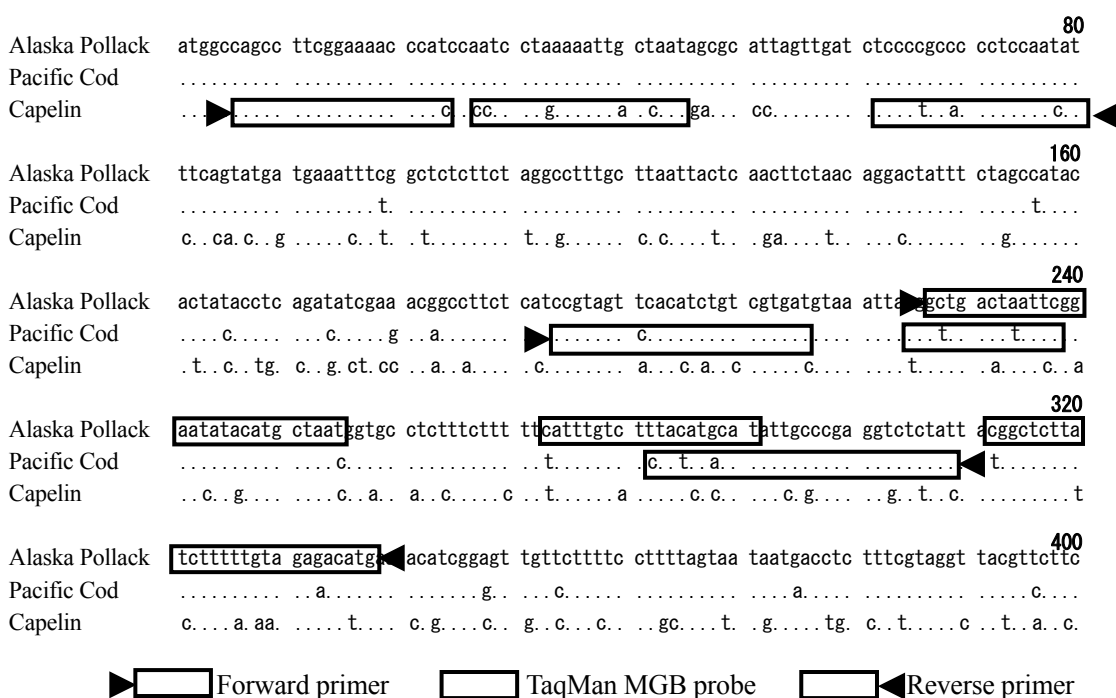


Fig. 1. Alignment of the mitochondrial cytochrome *b* region sequences from each species.

Alaska Pollack: GenBank accession number AB078151, Pacific cod: GenBank accession number AB078152, Capelin: GenBank accession number AB049022

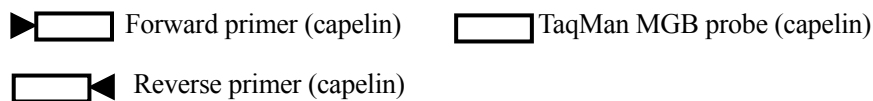
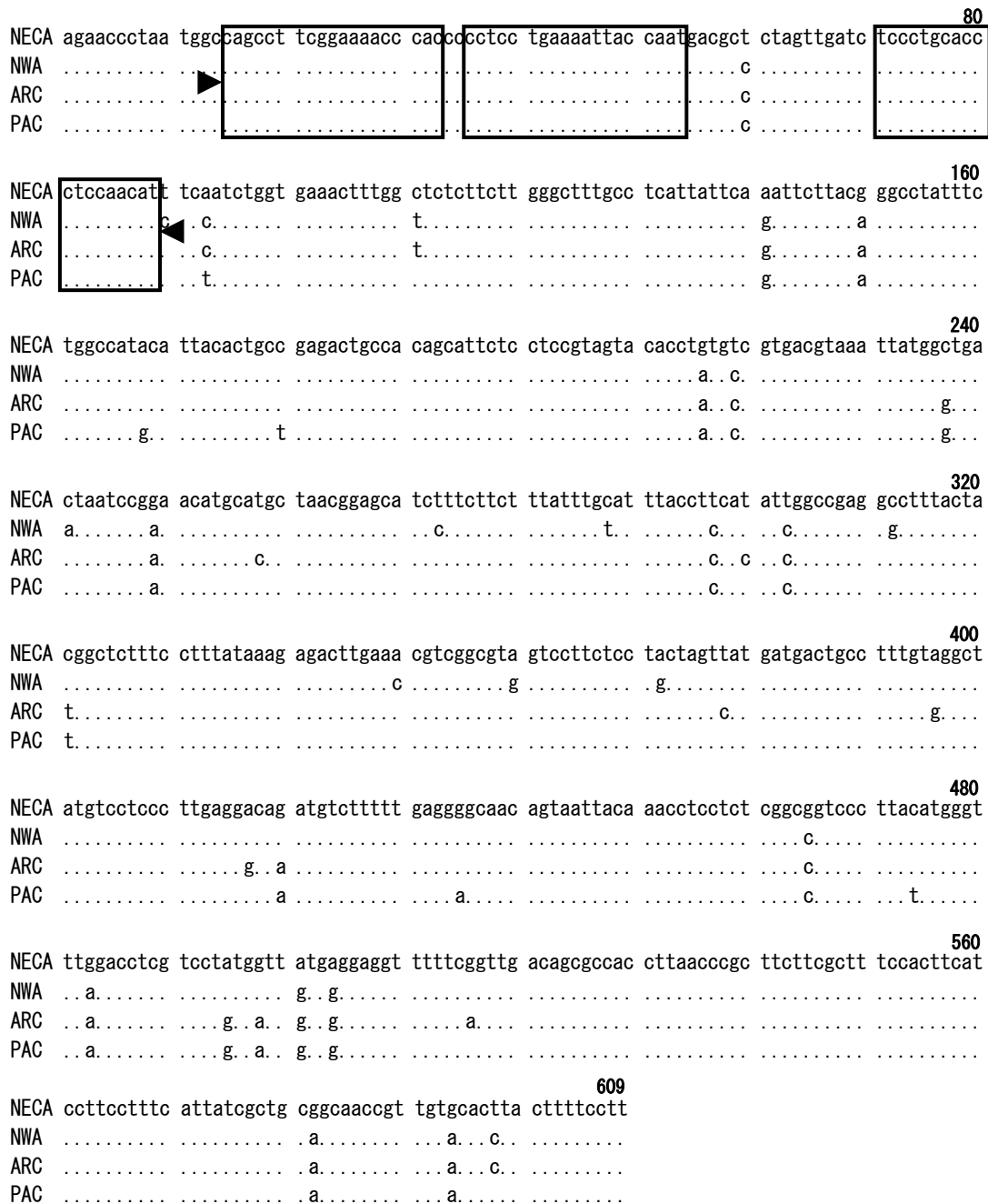


Fig. 2 Alignment of the mitochondrial cytochrome *b* region sequences from the four mitochondrial DNA clades (NECA: northeast-central Atlantic, NWA: northeastern Atlantic, ARC: Arctic, PAC: northeast Pacific) of capelin.

NECA: GenBank accession number DQ457459, NWA: GenBank accession number DQ457502,

ARC: GenBank accession number DQ457422, PAC: GenBank accession number DQ457549

Table 2 List of primers and probes.

Species	Primer/ probe* ¹	Sequence of oligonucleotide (5'-3') * ²	Amplicon length
<i>Theragra</i>	F-primer	5' - GCTGACTAATTTCGGAATATAACATGCTAAT - 3'	
<i>chalcogramma</i> (Alaska pollack)	R-primer	5' - CATGTCTCTACAAAAAGATAAGAGCCG - 3'	112 bp
	Taq-probe	5' - (FAM) - CATTGTCTTTACATGCAT - (NFQ) (MGB) - 3'	
<i>Gadus</i>	F-primer	5' - CCGTAGTCCACATCTGTCGTGAT - 3'	
<i>macrocephalus</i> (Pacific cod)	R-primer	5' - ATAGAGACCTCGGGCAATATGTATAGAG - 3'	116 bp
	Taq-probe	5' - (FAM) - CGGTTGACTTATTC - (NFQ) (MGB) - 3'	
<i>Mallotus</i>	F-primer	5' - CAGCCTTCGGAAAACCCAC - 3'	
<i>villosus</i> (Capelin)	R-primer	5' - ATGTTGGAGGGTGCAGGGA - 3'	75 bp
	Taq-probe	5' - (FAM) - CCTCCTGAAAATTACCAAT - (NFQ) (MGB) - 3'	

*¹ F: Forward, R: Reverse, Taq: TaqMan MGB

*² FAM: 6-carboxyfluorescein, NFQ: non-fluorescent quencher, MGB: minor groove binder

2. 設計したプライマーおよびプローブの特異性

設計した3組のプライマーとプローブを用いて、スケトウダラ卵3検体、マダラ卵3検体、カラフトシシヤモ卵9検体およびTable 1に示した48種の検体から抽出したDNA溶液をリアルタイムPCRに供した。その結果、スケトウダラの検出試験ではスケトウダラ卵3検体のみから、マダラの検出試験ではマダラ卵3検体のみから、カラフトシシヤモの検出試験ではカラフトシシヤモ卵9検体のみからCt値が得られ、いずれの検出試験においても他の種との交差反応は認められなかった。

3. 感度および検量線

0.002~20 ng/μLの範囲で10倍段階希釈したスケトウダラ卵、マダラ卵およびカラフトシシヤモ卵の抽出DNA溶液をリアルタイムPCRに供し、それぞれの検出試験における10倍段階希釈系列から得られたCt値をDNA濃度 (ng/μL) の対数に対してプロットした検量線を作成した (Fig. 3)。スケトウダラ、マダラおよびカラフトシシヤモの検出試験にお

いて、検出限界は 0.002 ng/μL であり、検量線の相関係数 (R^2) は 0.002 から 20 ng/μL の範囲で 1.000 であり、検量線の傾きから算出される PCR 増幅効率 (PCR 増幅効率 = $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$) は 88.1~94.5%であった。

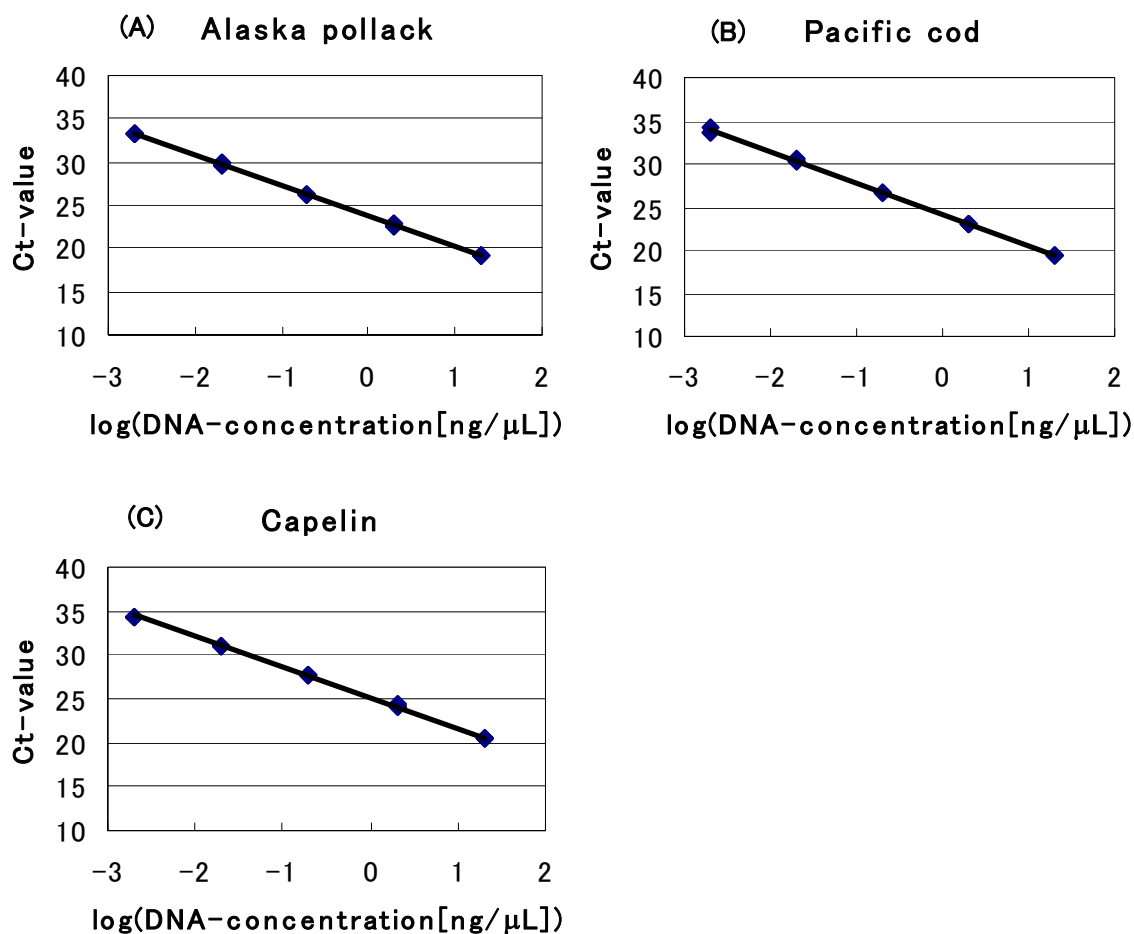


Fig. 3 Standard curves for the real-time PCR.

Standard curves generated from amplification data given by 10-fold serial DNA dilutions of Alaska pollack (A), Pacific cod (B) and Capelin (C) in the range between 0.002 ng/μL and 20 ng/μL. The relationships between threshold cycle Ct and log DNA concentration (ng/μL) are $y = -3.56x + 26.22$ ($R^2 = 1.000$, PCR efficiency=91.0%) (A), $y = -3.65x + 24.12$ ($R^2 = 1.000$, PCR efficiency=88.1%) (B), and $y = -3.46x + 25.14$ ($R^2 = 1.000$, PCR efficiency=94.5%) (C).

4. 混合試料からのマダラ卵およびカラフトシシャモ卵の検出

スケトウダラ卵にマダラ卵またはカラフトシシャモ卵を添加した混合試料から3回並行して抽出したDNA溶液を、リアルタイムPCRに供した。その結果、マダラの検出試験において、マダラ卵を0.1%の割合で添加した混合試料から 29.7 ± 0.7 のCt値が得られた (Table 3)。また、カラフトシシャモの検出試験においても、カラフトシシャモ卵を0.1%の割合で添加した混合試料から 33.4 ± 1.2 のCt値が得られた (Table 4)。なお、スケトウダラの検出試験では各混合試料からは $16.2 \pm 0.1 \sim 19.0 \pm 1.0$ のCt値が得られた (Table 3, 4)。

Table 3 Ct value obtained by the real-time PCR of sample added Pacific cod roes to Alaska pollack roes.

Pacific cod Mixing ratio (%)	Pacific cod (Mean Ct-value \pm SD)	Alaska pollack (Mean Ct-value \pm SD)
0.1	29.7 ± 0.7	17.0 ± 0.2
1	26.7 ± 0.2	16.2 ± 0.1
10	23.2 ± 0.1	16.5 ± 0.1

Table 4 Ct value obtained by the real-time PCR of sample added Capelin roes to Alaska pollack roes.

Capelin Mixing ratio (%)	Capelin (Mean Ct-value \pm SD)	Alaska pollack (Mean Ct-value \pm SD)
0.1	33.4 ± 1.2	19.0 ± 1.0
1	27.7 ± 1.6	18.0 ± 0.3
10	23.4 ± 0.4	18.6 ± 0.3

5. 辛子めんたいこおよびその加工品の試験

辛子めんたいこ 47 件およびその加工品 17 件から抽出した DNA 溶液をリアルタイム PCR に供した。なお、辛子めんたいこおよびその加工品において、0.1%以下の割合でマダラ卵およびカラフトシシヤモ卵を混入させることは経済的利益に乏しく、故意の混入である可能性は非常に低い。そこで本試験では、0.1%の混合試料の Ct 値 (Table 3, 4) から小数点以下を切り捨てた値を陽性の下限とし、マダラの検出試験では Ct 値が 29.0 以下、カラフトシシヤモの検出試験では Ct 値が 33.0 以下を陽性と判定した。結果の詳細を Table 5 に示した。スケトウダラの検出試験では、スケトウダラ卵 (たらこ) の使用表示がある 64 検体から 16.5~26.7 の Ct 値が得られた。マダラの検出試験では、マダラ卵 (まだらこ) の使用表示がある 3 検体は陽性となり、使用表示がない検体はすべて陰性となった。カラフトシシヤモの検出試験では、カラフトシシヤモ卵の使用表示がある 3 検体は陽性となり、使用表示がない検体はすべて陰性となった。

Table 5 Ct value obtained by the real-time PCR of Allaska pollack roe products.

Sample name	Number	Labeled species	Allaska pollack	Pacific cod	Capelin
Spicy cod roe	47	A* ¹	16.5~24.7	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Spicy cod roe without skin (barako)	2	A	18.2~18.7	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Spicy cod roe without skin (barako)	1	A, P* ²	20.0	24.2	(-)* ⁵
Spicy cod roe without skin (barako)	1	A, P, C* ³	19.9	26.5	20.9
Squid with spicy cod roe	3	A	17.3~19.6	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Herring roe with spicy cod roe	2	A	18.3~18.9	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Spicy cod roe sauce	2	A	23.6~24.7	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Grilled spicy cod roe	1	A	23.0	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Pen shell with spicy cod roe	1	A	18.8	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Salmon flakes with spicy cod roe	1	A	24.5	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Sardine with spicy cod roe	1	A, C	24.6	(-)* ⁴	17.0
Spicy cod roe boiled in soy sauce	1	A	26.7	(-)* ⁴	(-)* ⁵
Spicy cod roe in tube	1	A, P, C	20.9	22.5	16.9
Total	64				

*¹ A : Alaska pollack, *² P : Pacific cod, *³ C : Capelin

*⁴ (-) : Ct value was over 29.0 or not detected. *⁵ (-) : Ct value was over 33.0 or not detected.

IV. 考察

リアルタイム PCR 法によるスケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵の検出法の開発について検討した。

ミトコンドリア DNA の抽出については、魚卵の混合試料の場合、ミトコンドリア DNA 抽出キットの手順書に従った少量の試料 (50 mg) を採取するとリアルタイム PCR の結果がばらつく可能性がある。そこで、魚卵 5 g からミトコンドリアをショ糖 (スクロース) 密度勾配遠心法により分離し、混合した上清 1 mL を分取してミトコンドリア DNA 抽出キットによる抽出を行うことで、同一試料においてリアルタイム PCR の結果のばらつきを少なくすることができた。

スケトウダラ、マダラおよびカラフトシシャモに特異的なプライマーとプローブを、タラ類の魚種鑑別やカラフトシシャモの遺伝的分岐の研究に用いられているミトコンドリア DNA の *Cytochrome b* 領域において設計した (2, 3, 5) (Fig. 1, Table 2)。また、プローブについては、スケトウダラとマダラが *Cytochrome b* 領域において配列相同性が高いことから、特異性の高い TaqMan MGB プローブを用いることとした。

マダラ検出用プライマーについては、アレル特異的 PCR 法 (32, 33) を参考に Reverse プライマーの 3'末端をスケトウダラとマダラの変異塩基に対応させ、3'末端から 2 番目に mismatches 塩基を導入したことで、マダラ検出用プライマーのミスアニーリングによるスケトウダラ DNA の増幅によって、マダラ DNA の増幅が抑制されることを防ぎ、スケトウダラ DNA 溶液中に微量に混入したマダラ DNA を高感度に検出することを可能とした。

カラフトシシャモ検出用プライマーとプローブについては、Dodson らにより報告された *Cytochrome b* 領域に基づくハプロタイプ 154 種の塩基配列データ (GenBank accession number DQ457421-DQ457574) を比較解析し (5)、相同性の高い領域においてカラフトシシャモに特異的なプライマーとプローブを設計したことで、生息海域の異なるカラフトシシャモであっても検出することができた。

設計した 3 組のプライマーとプローブを用いたリアルタイム PCR では、スケトウダラの検出試験ではスケトウダラ卵の検体のみから、マダラの検出試験ではマダラ卵の検体のみから、カラフトシシャモの検出試験ではカラフトシシャモ卵の検体のみから Ct 値が得られ、他の種との交差反応は認められなかったことから、本法は標的とする種に特異的であることが確認された。なお、スケトウダラ卵加工品への混入の可能性が指摘されているブルーホワイトニングについては (1)、市販では試料の入手が困難であることから交差反応の試

験を行うことができなかつたが、NCBI の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 検索においてプライマーおよびプローブの塩基配列と相同性がないことを確認した。

本法の検出限界は DNA 濃度として 0.002 ng/μL, 検量線の相関係数は 0.002 から 20 ng/μL の範囲で 1.000, PCR 増幅効率は 88.1~94.5%であり, 高い感度, 良好な検量線の直線性および高い PCR 増幅効率を示すことが明らかとなった。

また, 混合試料を用いて行った試験では, スケトウダラ卵に 0.1%の割合で添加したマダラ卵およびカラフトシシャモ卵を検出することが可能であり, 本法は混合試料から標的とする種を高感度に検出できることが示された。

さらに, 辛子めんたいこおよびその加工品の試験を行った結果, すべての検体において使用表示どおりにスケトウダラ, マダラおよびカラフトシシャモが検出されたことから, 本法は夾雑物の多い辛子めんたいこおよびその加工品においても原材料の同定に利用できることが確認された。

これらのことから, 本法はスケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵を特異的, 高感度かつ迅速に検出することが可能であり, 魚卵の原材料偽装の発見のために有用な試験法と考えられた。

なお, 平成 20 年度から平成 26 年度現在まで, 市場に流通する辛子めんたいこ製品 114 検体について, 本法によるマダラ卵とカラフトシシャモ卵の検出試験を定期的実施した結果, すべての検体でマダラ卵およびカラフトシシャモ卵は陰性であった。

マダラ卵等の偽装混入防止のための福岡市の取り組みが, 福岡市と辛子めんたいこ業界で作成および配布している「辛子めんたいこ表示・衛生管理の手引き」や平成 20 年 5 月の全国紙の記事において掲載され, これらの取り組みを辛子めんたいこ製造業者や消費者に紹介することができた。

このように, 福岡市と辛子めんたいこ業界が協力して偽装の撲滅に取り組み, 業者や消費者に周知していくことにより, 辛子めんたいこ業界のコンプライアンス向上による原材料偽装の抑止, および特産品のブランド保持の効果が期待できると考えられる。

V. 要約

スケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵を迅速かつ高感度に検出できるリアルタイム PCR 法を開発した。スケトウダラ, マダラおよびカラフトシシャモに特異的なプライマーと TaqMan MGB プローブを Cytochrome *b* 領域において設計した。本

法は、他種との交差反応が認められず、検出下限が DNA 濃度 0.002 ng/μL であり、検量線の相関係数は 1.000 であった。また、本法を用いた試験では、スケトウダラ卵に 0.1%の割合で添加したマダラ卵またはカラフトシシヤモ卵を検出することが可能であり、市販のスケトウダラ卵加工品 64 検体からは使用表示どおりにそれぞれの種が検出された。これらのことから、本法はスケトウダラ卵加工品中にマダラ卵およびカラフトシシヤモ卵を混入させる原材料偽装の発見と抑止のために有用な試験法と考えられた。

第2章 マルチプレックスリアルタイム PCR によるツキヨタケとシイタケの 同時検出法の開発

I. 緒言

有毒成分イルージン S を含有するツキヨタケによる食中毒事例は、近年発生したキノコによる食中毒事例の中で最も多く、シイタケ等の食用キノコと形態が似ていることから誤食されることが多い (10, 11)。

ツキヨタケによる食中毒疑い事例が発生した場合は、適切な医療処置、保健所等の調査、被害拡大防止のための市民への情報提供などを迅速に行うために、食中毒の原因食品の迅速な同定が重要である。キノコは主に形態学的特徴によって同定されるが、調理された食品や他の食材との混合試料、嘔吐物などが検査検体の場合は同定が困難である。また、LC-MS/MS 等によるツキヨタケの有毒成分イルージン S の測定法が報告されているが (12, 13, 14)、同定または定量のために必要となるイルージン S の標準品は市販されていない。さらに、SYBR Green 法を用いたリアルタイム PCR によるツキヨタケの同定法が報告されているが (17)、食中毒の際の検査試料として考えられる混合試料や嘔吐物等に対しては検証されていない。それに加えて、SYBR Green 法は、SYBR Green I が二本鎖 DNA に挿入して蛍光を発する色素であることから、プライマーの二量体やミスプライミングによる増幅産物など非特異的な二本鎖 DNA も同時に検出し、蛍光標識プローブを用いる TaqMan プローブ法と比較して原理的に特異性が劣っている (15, 16)。

一方、TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR は、標的 DNA に対して特異的なオリゴヌクレオチドの 5'末端を FAM などの蛍光色素で、3'末端をクエンチャー物質などで修飾した TaqMan プローブを使用することから、特異性の高い検出が可能であり (15, 16)、形態に依存せず、キノコや食材の種の同定に利用されている (6, 7, 8, 34)。

さらに、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR では、マルチプレックス解析を行うことが可能であり、通常の実時間 PCR 法と比較して、迅速な検出ができ、コストと必要サンプル量の削減ができる。

そこで本章では、食中毒の原因食品を同定する際に、ツキヨタケとシイタケを迅速に判別するために、TaqMan プローブを用いたマルチプレックスリアルタイム PCR 法によるツキヨタケとシイタケの同時検出法を検討した。

II. 材料および実験方法

1. 材料

ツキヨタケの子実体 17 検体 (OG1-17) とシイタケの子実体 16 検体 (LE1-16) を使用した (Table 6)。山形県の羽黒山, 湯殿山および月山で採取したツキヨタケの子実体 14 検体 (OG1-14) は山形県衛生研究所の笠原義正氏より提供して頂いた。長野県と茨城県から採取したツキヨタケ 3 検体 (OG15-17) は千葉県立中央博物館の吹春俊光氏より提供して頂いた。シイタケの子実体は日本と中国で生産される市販品種であり, 福岡県のスーパーマーケットで購入した。Table 7 に示した他種 57 検体については, 一般的に食材に利用される 52 検体は福岡県のスーパーマーケットで購入し, テングタケ (学名 *Amanita pantherina*), ドクササコ (学名 *Paralepistopsis acromelalga*), クサウラベニタケ (学名 *Entoloma rhodopolium*) およびカキシメジ (学名 *Tricholoma ustale*) は吹春俊光氏と千葉県衛生研究所の石井俊靖氏に提供して頂き, *Omphalotus olearius* (NBRC8533) は独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター生物資源課 (NBRC) から購入した。

Table 6 *O. guepiniformis* and *L. edodes* used in this study.

Species	Name	Locality	Number	Date of collection* ¹	Collection number* ²	Remarks
	OG1-5	Mt. Haguro, Yamagata, Japan	5	2009/Oct.	—	Fruiting body isolated from the field
	OG6-13	Mt. Yudono, Yamagata, Japan	8	2009/Sept.	—	Fruiting body isolated from the field
	OG14	Mt. Gassan, Yamagata, Japan	1	2009/Oct.	—	Fruiting body isolated from the field
	OG15	Nagano, Japan	1	2005/Oct.	CBM-FB-36045	Freeze-dried fruiting body isolated from the field
	OG16	Nagano, Japan	1	2009/Oct.	CBM-FB-37900	Freeze-dried fruiting body isolated from the field
	OG17	Ibaraki, Japan	1	2002/Oct.	CBM-FB-31805	Freeze-dried fruiting body isolated from the field
<i>L. edodes</i>	LE1-2	Nagasaki, Japan	2	—	—	Commercial cultivar
	LE3-4	Oita, Japan	2	—	—	Commercial cultivar
	LE5-6	Miyazaki, Japan	2	—	—	Commercial cultivar
	LE7	Fukuoka, Japan	1	—	—	Commercial cultivar
	LE8	Gunma, Japan	1	—	—	Commercial cultivar
	LE9-16	China	8	—	—	Commercial cultivar (dried fruiting body)

*¹—: Date of collection unknown

*²—: No number, CBM: Natural History Museum and Institute, Chiba

Table 7 The 57 species tested for specificity by multiplex real-time PCR.

Scientific name
<i>Agaricus bisporus</i> * ¹
<i>Auricularia auricular</i> * ¹
<i>Flammulina velutipes</i> * ¹
<i>Grifola frondosa</i> * ¹
<i>Hypsizigus marmoreus</i> * ¹
<i>Lyophyllum decastes</i> * ¹
<i>Panellus serotinus</i> * ¹
<i>Pholiota nameko</i> * ¹
<i>Pleurotus eryngii</i> * ¹
<i>Pleurotus ostreatus</i> * ¹
<i>Amanita pantherina</i> * ²
<i>Paralepistopsis acromelalga</i> * ² (CBM-FB-37920)* ³
<i>Entoloma rhodopolium</i> * ² (CBM-FB-35976)* ³
<i>Omphalotus olearius</i> * ² (NBRC 8533)* ⁴
<i>Tricholoma ustale</i> * ² (CBM-FB-37159)* ³
<i>Allium cepa</i>
<i>Allium fistulosum</i>
<i>Allium sativum</i>
<i>Allium tuberosum</i>
<i>Amorphophallus konjac</i>
<i>Apium graveolens</i>
<i>Arctium lappa</i>
<i>Asparagus officinalis</i>
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>
<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i>
<i>Brassica rapa</i> var. <i>peruviridis</i>
<i>Capsicum annuum</i>
<i>Chrysanthemum coronarium</i>
<i>Colocasia esculenta</i>
<i>Cucumis sativus</i>
<i>Cucurbita maxima</i>
<i>Daucus carota</i>
<i>Ipomoea batatas</i>
<i>Lactuca sativa</i>
<i>Momordica charantia</i>
<i>Nelumbo nucifera</i>
<i>Persea americana</i>
<i>Petroselinum crispum</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Phyllostachys pubescens</i>
<i>Pisum sativum</i>
<i>Raphanus sativus</i>
<i>Sargassum fusiforme</i>
<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>Solanum melongena</i>
<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Spinacia oleracea</i>
<i>Undaria pinnatifida</i>
<i>Zingiber mioga</i>
<i>Zingiber officinale</i>
<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>
<i>Triticum aestivum</i>
<i>Glycine max</i>
<i>Bos taurus</i>
<i>Gallus gallus domesticus</i>
<i>Sus scrofa domesticus</i>

*¹ Edible mushrooms, *² Poisonous mushrooms, *³ Collection number, CBM: Natural History Museum and Institute, Chiba, *⁴ Collection number, NBRC: National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center, Japan

2. 材料の加工

ツキヨタケ (OG6) とシイタケ (LE8) の子実体を 5 mm 厚かつ約 30 mm 角に切断した。これらの断片を焼く (断片の両側をホットプレート上で 240°C, 2 分間), 炒める (キャノーラ油をひいたホットプレート上で 240°C, 2 分間), 油で揚げる (キャノーラ油で満たしたビーカーの中で 180°C, 2 分間), 煮沸する (水で満たしたビーカー中で 30, 60, 120 または 180 分間), および消化させることにより加工した。

人工的な消化を Chanvrier 氏らにより報告された手順により行った (35, 36, 37)。乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で粉碎した試料 500 mg に, ヒト唾液由来 α -アミラーゼ (Sigma-Aldrich 社) を水で溶解して 250 unit/mL に調製した人口唾液 1 mL を添加し, 15 ~20 秒間攪拌混合した。ブタ胃粘膜由来ペプシン (Sigma-Aldrich 社) を 0.02 mol/L HCl で溶解し 1 mg/mL に調製した人口胃液 5 mL を添加し, アルミブロック恒温槽 (ALB-221 : イワキ (株)) で 37°C, 30 分間保温した。その後, 95%エタノールを添加して酵素を不活性化し, 高速冷却遠心分離機 (6200 : 久保田商事 (株)) を用いて 10 分間, 2000×g で遠心分離を行った。上清を廃棄し, 残渣を最初に 0.2 mol/L の酢酸緩衝液 (pH6.0) で, 次に水で 2 回洗浄した。

ツキヨタケまたはシイタケを含む味噌汁を, 市販製品の即席野菜入り味噌汁 ((株) 永谷園) を使用して作製した。製品の生みそと乾燥野菜に重量の約 1%となるようにツキヨタケまたはシイタケの子実体を加えて, 180 mL の沸騰水を加えて混合した。作製した味噌汁を 10 分間, 2000×g で遠心分離を行った後, 得られた残渣を蒸留水で 2 回洗浄し, ミキサーを用いて粉碎した。

3. プライマーおよびプローブ

Internal transcribed spacer 1 (ITS1)-5.8S リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) 領域において, Primer Express ソフトウェア v. 3.0 (Life Technologies 社) を用いて, ツキヨタケとシイタケに特異的なプライマーと TaqMan MGB プローブを設計した。ITS1-5.8S rDNA 領域の塩基配列データ (GenBank accession number AY313286 (ツキヨタケ), AF079572 (シイタケ)) は NCBI GenBank から得た。ツキヨタケ検出用プローブの 5'末端に蛍光色素 FAM を, シイタケ検出用プローブの 5'末端に蛍光色素 VIC を標識し, 両方の TaqMan MGB プローブの 3'末端に NFQ と MGB を結合させた。プライマーと TaqMan MGB プローブは Life Technologies 社に合成を依頼した。

4. DNA 抽出

材料を液体窒素で凍結させ、乳棒と乳鉢で細かく粉砕したものを試料とした。試料 300 mg (湿重量) または 50 mg (乾燥重量) から DNeasy Plant mini kit (QIAGEN 社) を用いて、液量の変更 (AP1 緩衝液 600 μ L, RNase A (100 mg/mL) 6 μ L, AP2 緩衝液 195 μ L) 以外は添付説明書の手順に従い、DNA の抽出を行った。得られた DNA 溶液は分光光度計 (ND-1000 : NanoDrop Technologies 社) を用いて 260 nm の吸光度を測定し、DNA 濃度を算出後、TE 緩衝液で 1 ng/ μ L に調製した。

5. マルチプレックスリアルタイム PCR 条件

PCR 用反応液は 25 μ L/well に調製し、その組成を TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies 社) 12.5 μ L, ツキヨタケ検出用プライマー対溶液 (25 μ mol/L) 0.3 μ L, ツキヨタケ検出用プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.25 μ L, シイタケ検出用プライマー対溶液 (25 μ mol/L) 0.3 μ L, シイタケ検出用プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.25 μ L, DNA 溶液 (1 ng/ μ L) 2.5 μ L, 滅菌超純水 8.9 μ L とした。一つの DNA 溶液当たり 3 つの well を用いて測定を行った。リアルタイム PCR 装置として ABI PRISM 7900HT (Life Technologies 社) を用い、PCR として 50°C で 2 分間の UNG 処理後、95°C で 10 分間加温し、40 サイクル (95°C, 15 秒→60°C, 1 分) の増幅反応を行った。

6. マルチプレックスリアルタイム PCR 後のデータ解析

リアルタイム PCR 後のデータとして、SDS v.2.3 ソフトウェア (Life Technologies 社) を使用して解析した。Amplification plot 上で Threshold line と増幅曲線との交点におけるサイクル数を Ct 値とした。Threshold line として、ベースライン (3 サイクルから 15 サイクル) を設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側であり、各陽性試料 (ツキヨタケとシイタケから抽出した DNA) の指数関数的増幅領域である 0.20 とした。各試料の Ct 値は 3 つの well の平均の値とした。増幅曲線が指数関数的に増幅しているか判断するために、Ct 値の前後の 3 サイクルが必要であることから、40 サイクルランにおいて、38 以下の Ct 値かつ指数関数的増幅が観察される場合にツキヨタケまたはシイタケ陽性と判定した (38)。

III. 結果

1. プライマーおよびプローブの設計

ITS1 領域は 5.8S rDNA と 18S rDNA の間の非転写領域で、種間変異が大きく、菌種の PCR 法による同定 (17, 39, 40, 41) や系統発生の調査 (42, 43) に用いられている。そのため、ツキヨタケおよびシイタケに特異的なプライマーとプローブは ITS1-5.8S rDNA 領域において設計した。また、ツキヨタケ属 (*O. guepiniformis*, *O. olearius*, *O. illudens*, *O. nidiformis*, *O. olivascens*, *O. subilludens* および *O. mexicanus*) は ITS1 領域で高い相同性があるため (42, 44), 配列特異性が高い TaqMan MGB プローブを用いた。設計した TaqMan MGB プローブの配列は BLAST 検索により他種の DNA 配列と有意な相同性がないことを確認した。設計したプライマーと TaqMan MGB プローブの配列は Table 8 に示した。

Table 8 List of primers and probes.

species	Primer/ probe* ¹	Sequence of oligonucleotide (5'-3')* ²	Amplicon length
<i>O. guepiniformis</i>	F-primer	5'-TCTGGGCTTCTATGTCTTACAAACTC-3'	101 bp
	R-primer	5'-CCGTTGCTGAAAGTTGTATAAGTTTT-3'	
	Taq-probe	5'-(FAM)-CTCTTTATTGGTACTTAATTG-(NFQ)-(MGB)-3'	
<i>L. edodes</i>	F-primer	5'-CATCCACCTGTGCACTTTTTGTAG-3'	93 bp
	R-primer	5'-GAAGCCTTGTCAACTAGTCTTTTCAA-3'	
	Taq-probe	5'-(VIC)-AGGTGCTCATTATGAGTTA-(NFQ)-(MGB)-3'	

*¹ F: Forward, R: Reverse, Taq: TaqMan MGB

*² FAM: 6-carboxyfluorescein, VIC: 6-carboxyrhodamine, NFQ: non-fluorescent quencher,
MGB: minor groove binder

2. マルチプレックスリアルタイム PCR 条件

ツキヨタケまたはシイタケ DNA 2.5 ng をマルチプレックスリアルタイム PCR に供し、設計したプライマー対とプローブの最適濃度を検討した。まず、両プライマー対の濃度を

100, 200, 300 または 400 nmol/L とし、両プローブの濃度 (200 nmol/L) を含む他の条件は変更せず試験した。ツキヨタケ検出系およびシイタケ検出系において、両プライマー対の濃度が 300 nmol/L と 400 nmol/L では Ct 値に大きな差はなかったが、それらの Ct 値は 100 nmol/L と 200 nmol/L の場合の Ct 値より低い値だった。そこで、両プライマー対の最適濃度は 300 nmol/L とした。

次に、両プライマー対の濃度を 300 nmol/L に設定し、両プローブの濃度を 50, 100 または 200 nmol/L として試験した。両検出系において、両プローブの濃度が 100 nmol/L と 200 nmol/L では Ct 値に大きな差はなかったが、それらの Ct 値は 50 nmol/L の場合の Ct 値より低い値だった。そこで、最適濃度は両プライマー対の濃度が 300 nmol/L、両プローブの濃度が 100 nmol/L とした。

3. 設計したプライマーおよびプローブの特異性

設計したツキヨタケおよびシイタケ検出用プライマーとプローブを用いて、ツキヨタケ 17 検体、シイタケ 16 検体 (Table 6)、一般的に使用される食材 52 検体および毒キノコ 5 検体(テングタケ, ドクササコ, クサウラベニタケ, カキシメジ, *Omphalotus olearius*) (Table 7) から抽出した DNA 溶液をマルチプレックスリアルタイム PCR に供した。その結果、ツキヨタケ検出系においてはすべてのツキヨタケ検体から 17.50~20.28 の Ct 値が得られ、シイタケ検出系においてはすべてのシイタケ検体から 16.51~19.21 の Ct 値が得られた。また、両検出系において、標的とする種以外で交差反応は認められなかった。

4. 感度および検量線

0.25 pg ~2.5 ng の範囲で 10 倍段階希釈したツキヨタケおよびシイタケ DNA 溶液をリアルタイム PCR に供し、ツキヨタケとシイタケの検出系において 10 倍段階希釈系列から得られた Ct 値を DNA 量 (ng) の対数に対してプロットした検量線を作成した (Fig. 4)。検出限界は両検出系とも 0.25 pg であり、検量線の相関係数 (R^2) は 0.25 pg から 2.5 ng の範囲で 0.999 以上であった。PCR 増幅効率の計算式を用いて ($\text{PCR 増幅効率} = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$)、検量線の傾き (ツキヨタケ: -3.58, シイタケ: -3.58) から計算すると、PCR 増幅効率は両検出系とも 90%であった。

また、他の食品との混合試料からツキヨタケとシイタケ DNA を抽出した場合の感度と検量線について検討するため、ツキヨタケおよびシイタケ DNA が 0.01, 0.1, 1, 10 および

100%となるようにムキタケ (学名 *Panellus serotinus*) DNA に混合し, 全 DNA 量を 2.5 ng としてリアルタイム PCR に供し, 検量線を作成した。両検出系とも, 検出限界は 0.01% (ツキヨタケまたはシイタケ DNA 0.25 pg), 両検出系の検量線の相関係数は 0.01 から 100% の範囲で 0.999 以上, 検量線の傾き (ツキヨタケ : -3.85, シイタケ : -3.82) から計算される PCR 増幅効率 は 80% 以上であった。

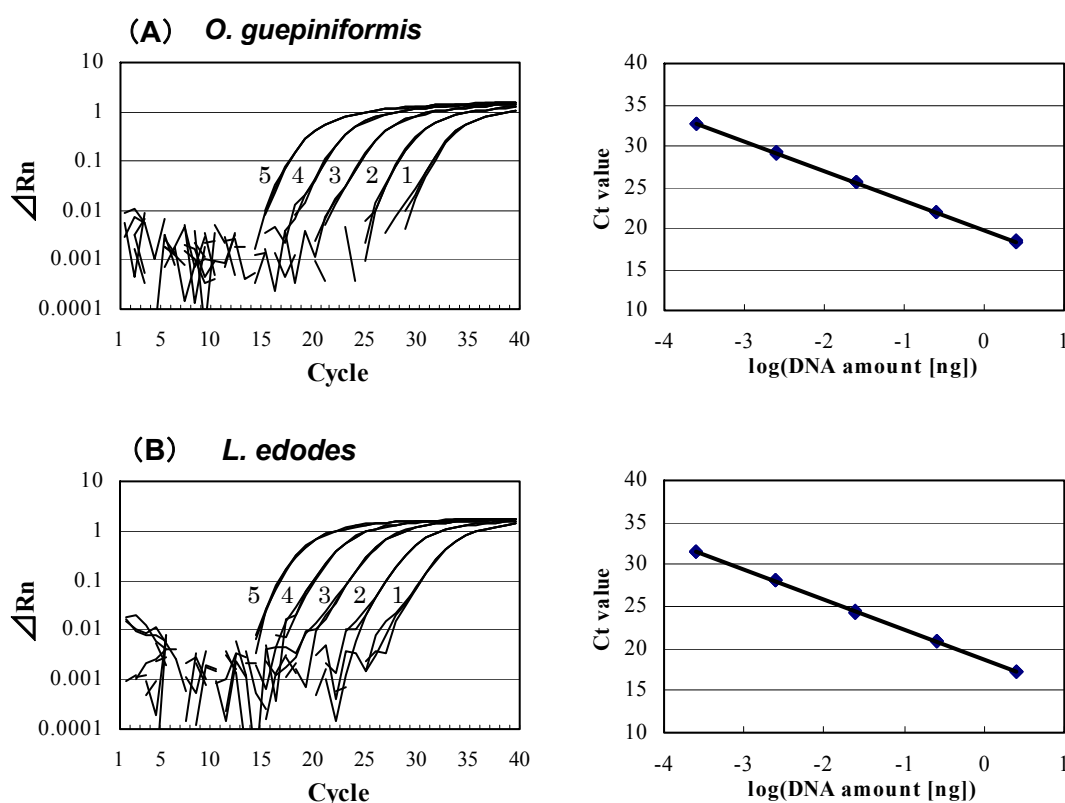


Fig. 4 Amplification plots and standard curves for multiplex real-time PCR.

The amplification plots were generated by 10-fold serial DNA dilutions of *O. guepiniformis* (A) and *L. edodes* (B) DNA (1, 0.25 pg; 2, 2.5 pg; 3, 0.025 ng; 4, 0.25 ng; 5, 2.5 ng). The standard curves were generated from the amplification data. The relationships between threshold cycle Ct and log DNA amount are $y = -3.58x + 19.83$ ($R^2 = 1.000$) (A) and $y = -3.58x + 18.68$ ($R^2 = 1.000$) (B).

5. 加工した試料, 混合試料および嘔吐物に対する適用性

加工した試料に対する本法の適用性を検討するために, 焼く, 油で炒める, 油で揚げる, 煮沸する, および消化させる加工をしたツキヨタケとシイタケから抽出した DNA 溶液をマルチプレックスリアルタイム PCR に供した。これらの加工した検体から得られた Ct 値は, ツキヨタケ検出系においては 20.48~26.55 (ツキヨタケの生試料では 18.55) であり, シイタケ検出系においては 17.79~22.73 (シイタケの生試料では 17.16) であった (Table 9)。ツキヨタケとシイタケのすべての加工した検体は, 生試料と比較して Ct 値が高かったが, 検査のための十分な感度が得られた。

混合試料および嘔吐物に対する本法の適用性の検討のために, 約 1% (w/w) のツキヨタケまたはシイタケを含む野菜入り味噌汁とそれを人工的に消化させた検体から抽出した DNA 溶液をマルチプレックスリアルタイム PCR に供した。これらの検体から得られた Ct 値は両検出系において 25.18~26.60 であった (Table 9)。

Table 9 Ct values of processed mushrooms by multiplex real-time PCR.

Processing method	<i>O. guelpiniformis</i>	<i>L. edodes</i>
	Mean Ct value \pm SD* ¹	Mean Ct value \pm SD* ¹
None	18.55 \pm 0.03	17.16 \pm 0.01
Baking at 240°C for 2 min on hot plate	20.48 \pm 0.02	18.34 \pm 0.04
Stir-frying at 240°C for 2 min on hot plate	26.55 \pm 0.02	22.73 \pm 0.06
Deep-frying at 180°C for 2 min in oil	21.14 \pm 0.02	21.53 \pm 0.04
Boiling for 30 min in water	21.71 \pm 0.05	18.94 \pm 0.04
Boiling for 60 min in water	21.16 \pm 0.02	17.79 \pm 0.02
Boiling for 120 min in water	24.92 \pm 0.03	17.79 \pm 0.02
Boiling for 180 min in water	23.08 \pm 0.05	17.90 \pm 0.04
Digesting raw mushroom	19.00 \pm 0.02	17.99 \pm 0.01
Miso soup spiked with 1% mushroom* ²	25.71 \pm 0.09	25.18 \pm 0.02
Digested miso soup spiked with 1% mushroom* ²	26.60 \pm 0.07	25.93 \pm 0.07

*¹ Mean Ct value and SD of triplicate wells for each sample

*² *O. guelpiniformis* or *L. edodes*

6. マルチプレックスリアルタイム PCR の併行精度と室内再現精度

併行精度と室内再現精度の評価のために、ツキヨタケおよびシイタケ DNA の 10 倍段階希釈系列 (0.25 pg から 2.5 ng) をマルチプレックスリアルタイム PCR に供した。併行精度の算出のための Ct 値の標準偏差 (SD) および変動係数 (CV) は、同日に実施した 3 回併行試験から得られた Ct 値から算出した。室内再現精度の算出のための Ct 値の同様の変数は 1 日 1 回の併行試験を 3 回実施し、得られた Ct 値から算出した。併行精度については、ツキヨタケ DNA から得られた Ct 値の CV が 0.04~0.38% であり、シイタケ DNA から得られた Ct 値の CV が 0.05~0.30% であった。室内再現精度については、ツキヨタケ DNA から得られる Ct 値の CV が 0.20~1.23% であり、シイタケ DNA から得られる Ct 値の CV が 0.21~0.85% であった (Table 10)。

Table 10 Repeatability and reproducibility of multiplex real-time PCR.

DNA dilution		<i>O. gupepiniformis</i>				<i>L. edodes</i>			
		Same day (<i>n</i> =3)			3 days (<i>n</i> =9)	Same day (<i>n</i> =3)			3 days (<i>n</i> =9)
		1	2	3		1	2	3	
2.5 ng	mean Ct	18.40	18.45	18.38	18.41	17.24	17.24	17.19	17.22
	SD	0.02	0.01	0.04	0.04	0.02	0.02	0.05	0.04
	CV	0.08	0.05	0.24	0.20	0.13	0.13	0.28	0.21
0.25 ng	mean Ct	21.97	22.24	22.13	22.11	20.84	21.21	21.18	21.08
	SD	0.01	0.01	0.05	0.12	0.06	0.02	0.03	0.18
	CV	0.05	0.05	0.21	0.54	0.30	0.11	0.13	0.85
0.025 ng	mean Ct	25.55	26.03	26.27	25.95	24.39	24.58	24.57	24.51
	SD	0.02	0.03	0.03	0.32	0.02	0.07	0.05	0.10
	CV	0.08	0.10	0.10	1.23	0.09	0.29	0.21	0.43
2.5 pg	mean Ct	29.21	29.54	29.97	29.57	28.08	28.27	28.32	28.23
	SD	0.06	0.10	0.01	0.34	0.02	0.02	0.01	0.11
	CV	0.21	0.35	0.04	1.13	0.06	0.08	0.05	0.40
0.25 pg	mean Ct	32.67	33.09	33.42	33.06	31.54	31.85	31.93	31.77
	SD	0.12	0.05	0.13	0.34	0.03	0.09	0.03	0.19
	CV	0.35	0.16	0.38	1.02	0.09	0.27	0.09	0.58

IV. 考察

マルチプレックスリアルタイム PCR 法によるツキヨタケとシイタケの同時検出法の開発を検討した。

ツキヨタケおよびシイタケに特異的なプライマーと TaqMan MGB プローブを ITS1-5.8S rDNA 領域において設計し (Table 8), 設計した TaqMan MGB プローブの配列は BLAST 検索により他種の DNA 配列と有意な相同性がないことを確認した。設計したプライマーとプローブを用いたマルチプレックスリアルタイム PCR により, ツキヨタケ検出系ではツキヨタケのみ, シイタケ検出系ではシイタケのみ検出され, 他種との交差反応は認められなかったことから, 本法は標的とする種に特異的であることが確認された。

本法は, 両検出系において, 検出限界が 0.25 pg, 検量線の相関係数は 0.25 pg~2.5 ng の範囲で 0.999 以上, PCR 増幅効率 は 90% であり, 高い感度, 良好な検量線の直線性および高い PCR 増幅効率を示すことが明らかとなった (Fig. 4)。また, 良好な併行精度と室内再現精度を示したことから, ツキヨタケおよびシイタケ検出のための十分な測定精度と再現性を有することが示された。(Table 10)。

また本法では, ツキヨタケとシイタケを調理および人工的に消化させた検体, 1%のツキヨタケまたはシイタケを含む味噌汁, およびその味噌汁を人工的に消化させた検体から Ct 値が得られたことから (Table 9), 調理や消化した試料, 他の食品との混合試料および嘔吐物においても適用可能であることが示された。調理および消化された試料から得られたすべての Ct 値は, 生試料のツキヨタケまたはシイタケから得られた Ct 値よりも高く, 高温や人工胃液中の酸の存在によって DNA が一部分解されたと推測されたが (45, 46, 47, 48, 49), ツキヨタケまたはシイタケを検出するための十分な感度であった。

これらのことから, 本法はツキヨタケとシイタケを特異的, 高感度かつ迅速に同時検出することが可能であり, 調理された試料, 他の食品との混合試料および嘔吐物にも適用可能であることから, 食中毒の原因食品をツキヨタケと迅速に同定するために有用と考えられた。なお, 平成 24 年に福岡市でツキヨタケによる食中毒疑い事例が発生した際は, 本法によりツキヨタケと同定することができ, 保健所等の調査や市民への情報提供に貢献することができた。

V. 要約

毒キノコであるツキヨタケと食用キノコであるシイタケを迅速かつ高感度に同時検出できるマルチプレックスリアルタイム PCR 法を開発した。ツキヨタケとシイタケに特異的なプライマーと TaqMan MGB プローブは ITS1-5.8S rDNA 領域において設計した。本法は、他種との交差反応が認められず、検出下限が DNA 量 0.25 pg であり、検量線の相関係数は 0.999 以上であった。また、ツキヨタケとシイタケを調理および人工的に消化させた検体、1%のツキヨタケまたはシイタケを含む味噌汁、およびその味噌汁を人工的に消化させた検体から Ct 値が得られた。これらのことから、本法はツキヨタケとシイタケを特異的、高感度かつ迅速に同時検出することが可能であり、調理された試料、他の食品との混合試料および嘔吐物にも適用可能であることから、食中毒の原因食品をツキヨタケと迅速に同定するために有用と考えられた。

第3章 固相抽出-LC-MS/MS法による食品中の甘味料12種および保存料9種の 一斉分析の開発

I. 緒言

食品添加物の甘味料および保存料は、国内および諸外国で製造される多種類の加工食品に使用されている。国内においては、使用できる甘味料と保存料の選択肢が多様化し、複数の組み合わせで使用される場合もある。また、国内では指定外であるが諸外国では使用されている食品添加物もあり、輸入食品においてサイクラミン酸ナトリウムやパラオキシ安息香酸メチル等の指定外添加物の違反事例が多発している。

そのため、食品中の甘味料や保存料を検査する際には、食品衛生法により対象食品および使用量について使用基準が定められている指定添加物に加え、諸外国で使用されている指定外添加物を含む多項目を分析することが求められている。また、食品中の甘味料や保存料の検査は多くの検査機関等で頻繁に行われており、輸入食品の増加に伴う検査検体数の増加も予測されることから、これらの検査の迅速、簡便化が望まれている。

甘味料の分析法として、透析や溶媒により食品中から甘味料を抽出し、抽出液を固相カラム等により精製後、HPLC等の機器により定量測定する方法が一般的である(21, 22, 23, 24, 25, 26)。特に、複数の甘味料の食品からの抽出法として広く用いられる透析法は、サンプル溶液と透析液を透析膜を介して接触させることにより、サンプル溶液内の低分子化合物と高分子化合物を分離する方法であり、特別な装置を必要としない簡便な方法である。しかし、透析法はビスケット等の穀類調製品やさきいか等の魚介乾製品において回収率の低下が報告されており(26)、透析開始から終了まで時間を要すことから、(約18~48時間(21, 22, 23, 24, 26))、検査迅速化の障害となっている。

保存料の分析法としては、水蒸気蒸留や溶媒により食品中の保存料を抽出し、必要に応じて抽出液を固相カラム等により精製後、HPLC等の機器より定量測定する方法が一般的である(21, 22, 27, 28)。水蒸気蒸留法は水に溶けにくく、沸点の高い目的成分を水蒸気とともにその沸点よりも低い温度で留出させ、目的成分を水と共に冷却捕集する方法であり、食品中の安息香酸、デヒドロ酢酸およびソルビン酸の分析法として報告されている(21, 22, 27)。しかし、パラオキシ安息香酸エステル類においては、水蒸気蒸留法では高タンパク食品や高脂肪食品からの回収率が低いことから、高タンパク食品や高脂肪食品からは溶媒抽出法により抽出し、抽出液を固相カラム等により精製後、HPLCにより定量測定する方法

が報告されている (27,28)。

このように、個別または複数同時に保存料または甘味料を測定する方法が報告されているが、甘味料と保存料両方の多項目を一斉分析する方法は報告されていない。多項目の甘味料および保存料を検査するためには、これら複数の分析法を実施するため、操作が煩雑で、検査にかかる人数と時間を要し、多種類の試薬や器具等の実験材料が必要となる。

一方、LC-MS/MSはHPLCと2台のMSを結合させたシステムであり、試料由来の共存物質(マトリックス)存在中でも複数の目的成分を高感度で選択的に一斉分析できる装置である。食品分析分野においても同装置を用いた分析法が多く報告されるようになり、農薬や動物用医薬品の公定試験法にも採用されるようになった(29,30)。

そこで本章では、多項目の甘味料および保存料の検査を迅速かつ簡便化するために、甘味料であるアセスルファムカリウム (AK), アリテーム (AL), アスパルテーム (ASP), サイクラミン酸ナトリウム (CYC), ズルチン (DU), グリチルリチン酸 (GLY), ネオヘスペリジンジヒドロカルコン (NHDC), ネオテーム (NEO), レバウディオシド A (REB), サッカリンナトリウム (SAC), ステビオシド (STV) およびスクラロース (SUC) の12種(参考13), 保存料である安息香酸 (BA), デヒドロ酢酸 (DHA), パラオキシ安息香酸エステル類 (PHBA-Es: パラオキシ安息香酸メチル (PHBA-Me), パラオキシ安息香酸エチル (PHBA-Et), パラオキシ安息香酸イソプロピル (PHBA-iPr), パラオキシ安息香酸プロピル (PHBA-Pr), パラオキシ安息香酸イソブチル (PHBA-iBu), パラオキシ安息香酸ブチル (PHBA-Bu)) およびソルビン酸 (SOA) の9種(参考14) について、食品からの同時抽出・精製法およびLC-MS/MSによる一斉分析法を検討した。

II. 材料および実験方法

1. 試薬等

関東化学(株)製特級メタノール(純度99.8%以上), 関東化学(株)製HPLC用アセトニトリル(純度99.8%以上), 和光純薬工業(株)製特級酢酸(純度99.7%以上), 和光純薬工業(株)製特級ギ酸(純度98.0%以上), 和光純薬工業(株)製特級酢酸アンモニウム(純度97.0%以上), 蒸留水, アドバンテック東洋(株)製ろ紙(No.5A, 5C), アドバンテック東洋(株)製0.20 μm フィルター(DISMIC-13HP), 逆相-弱アニオン交換ミックスモードカラムとしてWaters社製Oasis-WAX(150 mg/6 mL, 粒径30 μm)を使用した。

2. 標準液

1) 標準品

AK (純度 99.0%以上, HPLC 用), GLY (純度 99.0%以上, 生薬試験用), REB (純度 99.0%以上, 食品分析用), SAC (二水和物, 純度 99.0%以上, 食品分析用), STV (純度 99.4%, ステビオシド定量用), SUC (純度 98.0%以上, HPLC 用), PHBA-Me (純度 99.0%以上, 特級), PHBA-Et (純度 99.0%以上, 特級), PHBA-Pr (純度 95.0%以上, 一級) および PHBA-Bu (純度 98.0%以上, 特級) は和光純薬工業 (株) 製を使用した。ASP (純度 99.5%, 食品分析用), DU (純度 99.8%, 食品分析用), BA (純度 99.5%以上, 特級) および SOA (純度 98.0%以上, 鹿特級) は関東化学 (株) 製を使用した。DHA (純度 98.0%以上, 特級), PHBA-iPr (純度 99.0%以上, 特級) および PHBA-iBu (純度 99.0%以上, 特級) は東京化成工業 (株) 製を使用した。AL (純度 99.2%) は APAC Pharmatech 社製, CYC (純度 98.0%), および NHDC (純度 95.0%以上) は Sigma Aldrich 社製, NEO (純度 95.4%) は United States Pharmacopeial Convention 社製を使用した。

2) 調製方法

標準原液は各標準品 20 mg (SAC 標準品 (二水和物) は 23.5 mg) を精秤し, 甘味料は 80%メタノール (STV および DU) または 50%メタノール, 保存料はメタノールで溶解し, 20 mL に定容した (1,000 µg/mL)。各標準原液は遮光, 密閉して冷蔵保存し, 作製後 1 ヶ月内に使用することとした。

標準溶液は, 各標準原液を 1 mL ずつ混合し, 50%メタノールで 100 mL に定容した (10 µg/mL)。

3. 試料

しょうゆ (3 検体), みそ, ストロベリージャム, アイスクリーム (2 検体), バター, クリーム入りビスケット, 白菜漬, あんこ入り饅頭, ウインナーソーセージ (2 検体), かまぼこ (2 検体), ウスターソース, 魚介乾製品, さきいか, 砂糖代替品, 清涼飲料水, しょうゆ漬, ミックスベリージャム, ゼリー, たくあん漬, ちくわおよび福神漬は, 平成 23 年 4 月から平成 24 年 3 月に購入した国内で流通する食品を用いた。

4. 測定条件

1) LC 条件

液体クロマトグラフ:Agilent Technologies 社製 1100 シリーズ

カラム : XSelect CSH Phenyl-Hexyl Column (5 μ m, 2.1 mm \times 150 mm, Waters 社製)

移動相 : A ; 10 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0), B ; アセトニトリル

グラジエント条件 : A:B (分) \rightarrow 95:5 (0-1) \rightarrow 45:55 (40) \rightarrow 5:95 (40.1-50) \rightarrow 95:5 (50.1-65)

流速 : 0.2 mL/min

注入量 : 5 μ L

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

2) MS/MS 条件

質量分析計 : AB Sciex 社製 API4000

イオン化モード : ESI, negative (MRM)

データ取り込み時間 : 30 msec

イオンスプレー電圧 (IS) : - 4500 V

イオン源温度 (TEM) : 500 $^{\circ}$ C

カーテンガス (CUR) : 30 psi

コリジョンガス (CAD) : 5 psi

イオンソースガス 1 (Gas1) : 40 psi

イオンソースガス 2 (Gas2) : 70 psi

対象物質ごとの測定条件は Table 11 に示した。

Table 11 MS/MS condition and monitoring ions for the 21 target compounds.

Analytes	Additive use	Formula	Precursor ion (m/z)	Declustering		Quantitative ion		Qualitative ion	
				potential (V)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	
AK	Sweetener	C ₄ H ₄ O ₄ NSK	161.9	[M-K] ⁻	-40	82.0	-20	78.0	-42
AL	Sweetener	C ₁₄ H ₂₅ O ₄ N ₃ S	330.2	[M-H] ⁻	-95	295.2	-30	167.1	-30
ASP	Sweetener	C ₁₄ H ₁₈ O ₅ N ₂	293.1	[M-H] ⁻	-65	260.9	-14	199.9	-20
CYC	Sweetener	C ₆ H ₁₂ O ₃ NSNa	177.9	[M-Na] ⁻	-65	79.9	-32	95.9	-28
DU	Sweetener	C ₉ H ₁₂ O ₂ N ₂	179.0	[M-H] ⁻	-50	107.1	-26	149.8	-16
GLY	Sweetener	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.3	[M-H] ⁻	-145	351.0	-54	113.0	-74
NHDC	Sweetener	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅	611.2	[M-H] ⁻	-120	303.0	-44	125.1	-70
NEO	Sweetener	C ₂₀ H ₃₀ O ₅ N ₂	377.1	[M-H] ⁻	-100	200.0	-26	345.0	-18
REB	Sweetener	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	965.4	[M-H] ⁻	-125	803.3	-34	317.3	-92
SAC	Sweetener	C ₇ H ₄ O ₃ NSNa	181.9	[M-Na] ⁻	-65	106.0	-26	41.9	-50
STV	Sweetener	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	803.3	[M-H] ⁻	-80	641.3	-24	317.3	-84
SUC	Sweetener	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₃ O ₈	395.0	[M-H] ⁻	-70	358.7	-16	-	-
			397.0	[M-H] ⁻	-	-	-	360.7	-16
BA	Preservative	C ₇ H ₆ O ₂	120.9	[M-H] ⁻	-35	77.0	-20	-	-
DHA	Preservative	C ₈ H ₈ O ₄	166.9	[M-H] ⁻	-35	83.1	-14	122.9	-12
PHBA-Me	Preservative	C ₈ H ₈ O ₃	151.0	[M-H] ⁻	-60	91.9	-32	136.0	-20
PHBA-Et	Preservative	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.0	[M-H] ⁻	-60	91.9	-20	136.0	-30
PHBA-iPr	Preservative	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	178.9	[M-H] ⁻	-60	91.9	-24	136.9	-30
PHBA-Pr	Preservative	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	178.9	[M-H] ⁻	-65	91.9	-36	136.1	-24
PHBA-iBu	Preservative	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	192.9	[M-H] ⁻	-60	91.9	-22	136.1	-32
PHBA-Bu	Preservative	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	192.9	[M-H] ⁻	-95	91.9	-30	136.1	-30
SOA	Preservative	C ₆ H ₈ O ₂	110.9	[M-H] ⁻	-60	67.0	-18	-	-

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

固体試料：フードプロセッサーで細切均一化した試料 5 g を量り採り，80%メタノール（高脂肪食品は 95%メタノール）20 mL を加え，ホモジナイザー（TissueRuptor：（株）キアゲン）を用いてホモジナイズした（バターやアイスクリームは湯浴で溶解）。振とう機で 10 分間振とう後，高速冷却遠心分離機（6200：久保田商事（株））を用いて 5,000×g で 5 分間遠心分離し，上清を No.5C（ろ紙が詰まりやすいジャムやアイスクリームなどの食品では No.5A）のろ紙で吸引ろ過した。さらに，80%メタノール（高脂肪食品は 95%メタノール）でろ紙を洗浄するとともに液量を 25 mL とした。残渣に 50%メタノール 20 mL を加え，同様の操作（ホモジナイズを除く）を行ったのち，上清をあわせ 50%メタノールで 50 mL に定容したものを抽出液とした。

液体試料：試料 5 g に 80%メタノール 30 mL を加え混合後，5,000×g で 5 分間遠心分離した。上清をろ紙ろ過（No.5C）し，80%メタノールでろ紙を洗浄するとともに液量を 50 mL に定容したものを抽出液とした。

2) 精製

抽出液を水で 5 倍（高脂肪食品および液体試料は 6 倍）に希釈し，その 5 mL（高脂肪食品および液体試料は 6 mL）をメタノール 5 mL および水 5 mL でコンディショニングした Oasis-WAX に負荷したのち，固相カラムを 10%メタノール 10 mL で洗浄した。5%ギ酸-0.1 mol/L 酢酸アンモニウム含有 85%メタノール 10 mL を固相カラムに負荷し，自然落下により通液させた。溶出液を 5%ギ酸-0.1 mol/L 酢酸アンモニウム含有 85%メタノールで 10 mL に定容後，0.20 μm フィルターでろ過したものを試験溶液とした。

6. 定量

標準溶液を 5%ギ酸-0.1 mol/L 酢酸アンモニウム含有 85%メタノールで希釈し，0.002～4 μg/mL の範囲で検量線用標準溶液を調製した。検量線は各対象物質の濃度範囲において，クロマトグラムのピーク面積から，絶対検量線法により作成した。

III. 結果

1. MS/MS 条件の検討

各標準原液を 50%アセトニトリルで適宜希釈し、インフュージョンによりポジティブおよびネガティブモードで分析を試みた。ポジティブモードでは、AK, CYC, SAC の強酸性物質は感度が低く、測定が困難であった。SOA については、0.05%ぎ酸含有 50%アセトニトリルを希釈液とした場合ではネガティブモードよりポジティブモードは約 100 倍感度が高かったが、50%アセトニトリルを希釈液とした場合では感度に大きな差はなかった。ネガティブモードではすべての対象物質を一斉に測定できることから、測定はネガティブモードで行うこととした。甘味料と保存料はプロトン、ナトリウムイオンまたはカリウムイオンが脱離したイオンをプレカーサーイオンとし、その感度が最大になるように、オリフィスプレート電圧等の条件を最適化した。そのうち、プロダクトイオンスキャンを行い、コリジョンエネルギー等を最適化して最も高い強度が得られたイオンを定量イオンに、次に高い強度が得られたイオンを確認イオンに用いることとした (Table 11)。移動相組成の決定後に、移動相で各標準原液を希釈して同様の操作を行い、生成するイオンが同一であり、強度に大きな差異がないことを確認した。BA と SOA はプロダクトイオンが 1 つしか得られなかったため、定量イオンのみとした。

2. LC 条件の検討

今回検討した甘味料および保存料の分析には、AK および SAC を除いて ODS カラムが用いられており (22)、これら全てを一斉に分析するには、ODS カラムをはじめとする逆相カラムを用いることが適当と考えられた。強酸性物質である AK や SAC については ODS カラムでは良好な保持が得られず、分析には移動相にイオンペア試薬を添加する (25)、もしくは分離カラムにアミノプロピルカラム (21, 26) を用いる方法が報告されている。しかし、イオンペア試薬の使用は試薬の機器への残存が懸念され、アミノプロピルカラムでは固定相の耐久性に問題があるとされている (50)。

一方、フェニルカラムは AK と SAC が分子内に π 電子共役系を有していることから、 π 電子の相互作用によって保持することができると考えられ、さらに疎水性相互作用による保持も起こることが期待できる。

酸性化合物をフェニルカラムに保持させるため、移動相には、ぎ酸または酢酸緩衝液-アセトニトリル系を検討し、すべての対象物質を保持して、SOA の感度がより高かった酢

酸緩衝液 (pH 4.0) -アセトニトリルを使用した。カラムには、フェニルカラムである GLサイエンス社製 Inertsil Ph-3, InertSustain phenyl および Waters 社製 XSELECT CSH Phenyl-Hexyl を比較検討し、Inertsil Ph-3 および InertSustain phenyl より DHA のテーリングが大きいものの、AK および SAC の保持がより良好であった XSELECT CSH Phenyl-Hexyl を選択した。PHBA-iBu と PHBA-Bu は、検討したカラムでは同程度の分離であり、完全な分離は困難であったが、後述の添加回収試験では回収率および相対標準偏差 (RSD) は良好であった (Table 12)。ODS カラムを用いた他の PHBA 類の分析法では、異性体の完全な分離は難しいことから、定量イオンと確認イオンのアバンダンス比により同定する方法が報告されている (51)。本法による比率 (確認イオン/定量イオン) は PHBA-iBu は 0.4, PHBA-Bu は 0.3 であった。

3. 精製条件の検討

対象物質は極性の低い物質と酸性物質であるので、逆相-弱アニオン交換ミックスマードカラムである Oasis-WAX を用いた精製条件を検討した。Oasis-WAX に対象物質 21 種を負荷させ、0~100%メタノール溶液を低い濃度から順次通液させたところ、SUC が 15%メタノールで溶出され始め、極性の比較的低い物質 13 種は 85%メタノールですべて溶出された。これらの結果から、固相カラムに負荷する抽出液は、メタノール濃度が 15%以下となるように蒸留水で希釈し、洗浄液は 10%メタノールとし、溶出液は 85%メタノールとした。

酸性物質の溶出は、ASP がアルカリ性条件下で速やかに加水分解することから、酸性の溶出液で溶出させることを検討した。ぎ酸または塩酸含有 85%メタノールにより検討を行ったところ、ぎ酸は 5%の濃度で AK と SAC 以外のすべての物質が溶出され、塩酸は 0.1 mol/L の濃度ですべての物質が溶出された。しかし、GLY は強酸性下で溶解性が低下し、0.1 mol/L 塩酸含有 85%メタノール中では経時的な濃度減少が観察されたことから、溶出液にはぎ酸を選択した。

AK と SAC は揮発性塩である酢酸アンモニウムにより溶出することを検討し、0.1 mol/L の濃度により溶出された。

これらの結果から、溶出液は 5%ぎ酸-0.1 mol/L 酢酸アンモニウム含有 85%メタノールとした。

4. 抽出条件の検討

1) 固体試料

甘味料と保存料の抽出には水とメタノールの混合溶液（50%メタノール等）による抽出法が報告されており（27, 52），本法においてもこの抽出法を検討した。Table 12 に示した固体試料（しょうゆを除く 9 種類の試料）に対象物質 21 種を 0.02 g/kg 添加し，50%メタノール 20 mL で 1 回抽出後 50 mL に定容し，添加回収率を求めたところ，高脂肪食品および高タンパク食品で PHBA-Es 類, SOA 等の保存料の回収率が低い傾向があった。

一方，80%メタノールにより上述と同様の操作で抽出したところ，バターを除いてすべての対象物質で 70～120%の良好な回収率を示したが，高濃度（0.2 g/kg）添加した場合ではスクラロースの回収率が低い場合があった。

これらの結果から，バター等の高脂肪食品を除く固体試料については，すべての対象物質において良好な添加回収率を得るために，1 回目は 80%メタノール，2 回目は 50%メタノールで抽出を行うこととした。

バターは上述の方法においても BA, DHA および SOA の回収率が低く，この理由としてこれらの保存料は 80%メタノールより油脂との親和性が高いためと考えられた。そこで，バター等の高脂肪食品は 1 回目の抽出を 95%メタノールにより行い，バターおよびドレッシングによる添加回収試験（0.02 および 0.2 g/kg 添加）を行ったところ，すべての対象物質で 70～120%の回収率を得た。

2) 液体試料

0.02 g/kg および 0.2 g/kg 添加した液体試料（しょう油，ウスターソース，清涼飲料水）を蒸留水で 10 倍希釈し，直接固相カラムに負荷して精製したところ，AK の回収率が 120%以上と高くなる傾向があり，未添加の液体試料の抽出液に標準溶液を添加した場合においても，AK の回収率は 120%以上となった。AK は HPLC カラムからの溶出が最も速い物質であるため，除去されなかった夾雑物質と分離できず，マトリックス効果により回収率が高くなったと考えられた。そこで，液体試料は 80%メタノールを加えて除タンパク操作を行い，本法に従いカラム精製を行ったところ，すべての対象物質で 70～120%の良好な回収率を得た。

5. 抽出液および溶出液中での対象物質の安定性

対象物質の抽出液または溶出液中の安定性を検討するため、標準溶液 10 $\mu\text{g/mL}$ を抽出液 (65%, 72.5%および 80%メタノール溶液) と溶出液 (5%ぎ酸-0.1 mol/L 酢酸アンモニウム含有 85%メタノール) で希釈して 0.1 $\mu\text{g/mL}$ とし、経時的に LC-MS/MS で測定した ($n=3$)。

その結果、ASP のみ 65%メタノール中で濃度が経時的に減少し、24 時間後に濃度が約 10%減少した (Fig. 5)。その他の対象物質では、すべての溶液中で 40 時間後も安定的に存在した。

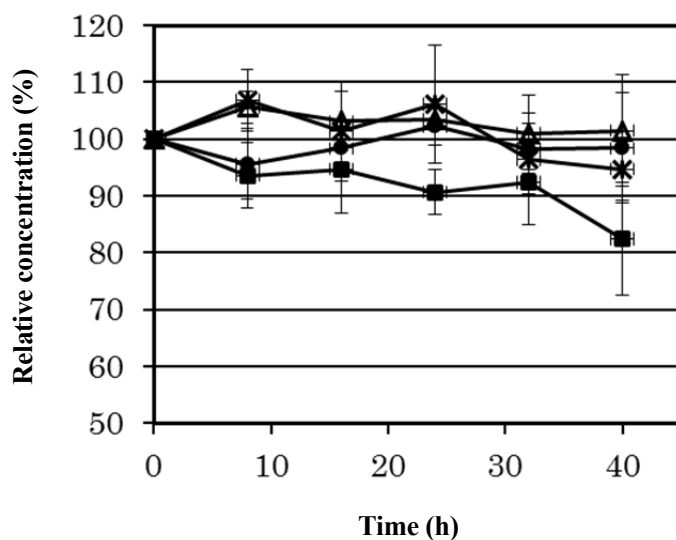


Fig. 5 Stability of aspartame in extraction solutions and elution buffer.

Data show means of triplicate determinations. Error bars show standard deviation from the mean.

■:-65%methanol, ●-72.5%methanol, Δ-80%methanol, *-elution buffer

6. 検量線

Table 11 に示した定量イオンを用いて検量線を作成したところ、AK, CYC および PHBA-Es 類は標準液 0.002~0.2 µg/mL, AL および SAC は 0.005~0.5 µg/mL, ASP および NEO は 0.005~2 µg/mL, DU および BA は 0.01~2 µg/mL, GLY, NHDC, REB, STV, SUC は 0.02~2 µg/mL, DHA および SOA は 0.1~4 µg/mL の範囲で相関係数 0.999 以上であり、21 種すべてで良好な直線性を示した。

7. 添加回収試験

10 種の食品に対象物質 21 種を 0.02 g/kg および 0.2 g/kg となるように添加し、30 分間放置後に本法に従い添加回収試験 ($n=3$) を行った。その結果、0.02 g/kg および 0.2 g/kg 添加した 10 試料すべてにおいて、対象物質 21 種の添加回収率が 70.9~119.0% と良好な結果を示し、相対標準偏差は 0.1~11.7% であった (Table 12)。検討したすべての試料において分析の支障となるピークは認められなかった (Fig. 6)。また、添加回収試験における添加濃度 0.02 g/kg 相当となるようにブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) および溶出液で調製した標準溶液 (溶出液標準溶液) を調製し、試料マトリックスの測定値への影響を検討した。その結果、マトリックス添加標準溶液の溶出液標準溶液に対するピーク面積比は 0.84~1.15 の範囲であった。定量下限は、AK, AL, ASP, CYC, NEO, SAC および PHBA-Es 類は 0.001 g/kg, DHA および SOA は 0.02 g/kg, それ以外の対象物質は 0.005 g/kg であった。

Table 12 Recoveries of the 21 target compounds in 10 samples.

Compounds	Spiked level (g/kg)	Recovery (%) (n=3)																													
		Biscuit			Butter			Ice cream			Kamaboko			Maniū			Miso			Pickles			Wiener sausage			Soy sauce			Strawberry jam		
		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD		Mean	RSD	
AK	0.02	102.3	1.6	108.5	1.4	110.0	1.6	103.3	3.3	107.5	5.7	115.7	2.8	102.5	0.8	113.5	3.5	106.8	3.6	105.0	2.9										
AK	0.2	97.3	3.7	108.3	1.5	103.5	2.8	103.0	0.2	104.5	0.6	99.5	3.9	94.9	2.2	97.3	0.6	102.2	7.3	99.8	4.6										
AL	0.02	91.3	7.1	92.0	5.0	106.8	4.3	90.0	2.9	98.7	9.2	115.2	1.8	96.2	2.4	95.5	5.8	119.0	2.9	108.3	3.1										
AL	0.2	93.5	1.6	95.0	5.0	97.4	6.1	93.3	2.4	95.4	5.0	94.3	0.6	95.2	1.7	99.8	3.4	102.3	2.0	99.0	2.9										
ASP	0.02	85.8	2.2	103.0	4.3	98.2	5.9	90.2	3.1	96.5	6.0	110.5	3.0	89.5	3.4	98.0	6.3	95.7	1.6	106.8	4.6										
ASP	0.2	85.0	0.8	87.0	6.1	95.1	0.4	88.7	2.4	88.8	0.6	85.8	1.3	91.5	4.0	89.8	1.1	84.8	6.9	92.0	2.4										
CYC	0.02	98.3	1.6	93.7	3.6	96.7	3.4	89.5	1.5	96.8	4.7	100.0	0.9	97.5	0.0	92.2	2.7	101.7	5.2	96.2	1.3										
CYC	0.2	87.8	1.4	78.8	3.1	85.9	2.5	85.0	1.1	90.6	0.7	89.6	1.9	83.0	9.1	98.4	5.3	95.8	4.4	104.8	2.9										
DU	0.02	90.5	2.9	96.0	5.1	99.2	1.5	96.5	6.9	95.0	3.5	95.5	3.6	93.0	4.9	96.3	2.9	89.5	3.9	101.0	6.0										
DU	0.2	95.6	3.6	98.8	2.0	100.8	5.5	95.1	5.0	96.0	3.2	92.4	1.0	96.7	3.0	95.3	0.7	91.7	4.4	95.1	4.6										
GLY	0.02	76.5	4.0	101.3	4.7	89.0	1.1	88.8	4.5	84.8	3.8	72.3	3.1	81.8	4.9	71.5	1.4	83.3	3.7	72.2	2.1										
GLY	0.2	91.4	3.4	103.7	6.7	97.8	2.2	80.9	3.7	77.3	0.9	90.1	1.9	80.8	4.0	70.9	2.3	81.0	3.4	87.8	3.1										
NHDC	0.02	85.0	6.1	98.8	4.1	84.0	2.7	81.0	5.1	89.2	4.6	103.8	8.9	86.3	1.5	88.5	4.3	88.7	7.3	94.3	1.6										
NHDC	0.2	82.3	5.9	98.2	7.9	87.3	4.0	79.7	5.6	86.6	2.4	77.2	3.7	82.4	4.4	86.0	7.6	90.2	10.1	94.3	3.9										
NEO	0.02	102.8	6.9	92.7	1.7	99.7	1.9	91.3	5.1	97.3	6.9	94.8	1.3	91.8	8.5	92.7	3.0	90.3	2.5	89.7	2.0										
NEO	0.2	82.8	3.6	90.3	4.7	97.8	1.5	97.4	1.5	97.0	1.9	83.6	2.8	95.0	2.3	89.3	2.8	92.0	9.7	94.6	5.7										
REB	0.02	83.3	1.9	98.5	3.6	97.3	3.6	109.3	6.7	100.5	7.0	91.0	4.8	86.3	7.9	88.3	5.7	93.8	4.8	81.0	1.6										
REB	0.2	97.3	1.7	89.5	9.2	96.6	6.2	96.6	4.0	93.0	6.1	97.2	3.0	90.7	5.6	89.3	1.3	83.2	1.9	84.0	11.7										
SAC	0.02	98.3	4.9	107.2	7.5	101.7	1.5	102.8	1.6	96.7	4.4	109.0	2.4	95.0	2.4	100.2	2.0	105.5	8.2	103.8	2.2										
SAC	0.2	97.3	3.8	110.8	2.5	102.3	1.5	92.8	3.3	96.3	0.8	97.4	2.9	93.8	2.4	98.4	3.0	103.5	4.4	96.4	0.1										
STV	0.02	89.2	4.1	90.7	8.9	94.7	6.7	109.3	6.7	102.7	7.3	90.0	10.9	99.8	6.8	92.8	7.3	84.2	11.2	80.3	5.3										
STV	0.2	104.8	5.6	89.0	1.0	96.8	5.9	92.4	9.1	86.3	4.7	102.8	4.4	88.8	2.7	77.8	11.0	89.7	6.3	76.2	10.8										
SUC	0.02	92.0	3.8	86.8	5.8	99.0	4.6	95.3	2.1	96.7	4.8	108.3	2.3	89.7	5.6	96.8	11.4	96.5	4.5	107.0	4.6										
SUC	0.2	78.5	8.2	89.5	6.0	99.8	1.0	91.5	6.4	90.8	1.4	82.9	2.2	82.4	4.4	91.5	4.9	81.3	0.7	98.2	3.0										
BA	0.02	95.5	5.5	97.8	1.6	95.7	3.8	78.7	3.0	108.3	7.2	108.7	3.9	97.7	0.8	82.8	3.3	97.7	2.8	107.2	2.7										
BA	0.2	84.9	1.9	82.2	1.4	82.5	3.9	87.1	4.2	93.6	3.2	95.6	0.8	85.8	6.5	87.3	1.7	96.5	2.7	97.9	1.7										
DHA	0.02	98.0	4.7	90.3	3.7	86.8	1.9	82.5	5.8	91.0	2.4	98.0	0.5	98.3	3.1	94.7	1.9	86.3	4.3	103.2	0.7										
DHA	0.2	88.8	2.9	74.6	5.0	80.8	2.2	87.6	2.1	86.4	2.2	81.3	0.4	83.3	3.6	92.4	3.2	84.8	2.8	103.3	1.3										
PHBA-Me	0.02	96.8	1.1	97.5	5.4	103.5	0.8	101.2	1.2	99.5	6.6	96.2	3.0	98.8	2.0	100.3	2.9	93.7	3.4	91.2	0.8										
PHBA-Me	0.2	98.2	1.0	99.8	4.5	104.7	1.2	100.8	0.7	103.3	1.0	94.1	2.9	96.3	2.6	97.8	1.5	101.5	7.0	100.8	1.8										
PHBA-Et	0.02	93.2	2.2	92.0	1.1	97.2	4.2	97.3	1.8	93.7	5.8	94.3	2.7	95.3	2.5	94.0	4.7	90.5	3.4	95.5	2.4										
PHBA-Et	0.2	88.3	1.4	93.8	6.1	100.8	2.0	98.4	1.8	101.9	1.6	86.9	0.6	98.7	2.2	93.6	0.9	98.3	6.3	99.7	1.3										
PHBA-iPr	0.02	92.5	1.9	92.3	1.3	95.8	2.6	99.5	2.7	96.3	8.9	97.7	2.1	94.5	3.2	92.3	3.3	91.8	3.1	96.0	1.0										
PHBA-iPr	0.2	89.8	1.1	95.5	3.7	101.3	1.0	96.1	0.8	99.9	1.5	92.0	2.7	96.8	2.1	94.3	1.6	96.2	2.1	101.8	1.5										
PHBA-Pr	0.02	91.3	0.6	97.2	2.5	102.2	2.5	98.5	2.2	95.0	7.6	88.5	3.0	93.2	3.8	93.2	2.7	91.8	3.5	97.0	0.9										
PHBA-Pr	0.2	91.8	2.2	95.2	3.7	103.1	0.6	99.0	1.5	101.0	1.6	91.9	2.3	96.8	2.1	92.8	2.4	96.7	3.8	101.4	2.1										
PHBA-iBu	0.02	93.7	1.9	91.0	1.0	94.7	2.7	95.2	2.7	91.5	3.8	98.2	1.8	98.5	2.2	87.0	3.5	92.0	3.8	97.0	2.1										
PHBA-iBu	0.2	88.0	1.8	91.0	3.1	100.3	0.9	90.9	1.8	94.1	0.9	86.4	1.8	92.3	1.7	89.0	5.6	95.0	1.9	101.6	3.1										
PHBA-Bu	0.02	89.8	1.8	87.8	2.3	94.7	2.7	98.8	1.1	101.0	4.3	94.7	2.4	96.7	2.8	87.0	3.5	90.5	4.4	94.7	2.1										
PHBA-Bu	0.2	88.0	1.8	89.5	3.4	96.6	2.8	97.5	3.4	100.3	0.8	86.4	1.8	92.3	1.7	86.8	1.5	95.5	5.7	99.1	4.0										
SOA	0.02	79.3	5.1	88.2	6.9	101.8	1.0	89.0	2.9	98.8	4.4	103.0	6.8	103.2	1.1	102.8	1.8	93.2	5.3	106.2	5.0										
SOA	0.2	86.5	7.0	71.0	1.3	78.7	1.8	86.0	7.3	87.0	1.8	89.1	3.9	79.6	7.6	97.8	2.2	97.2	1.8	106.9	6.6										

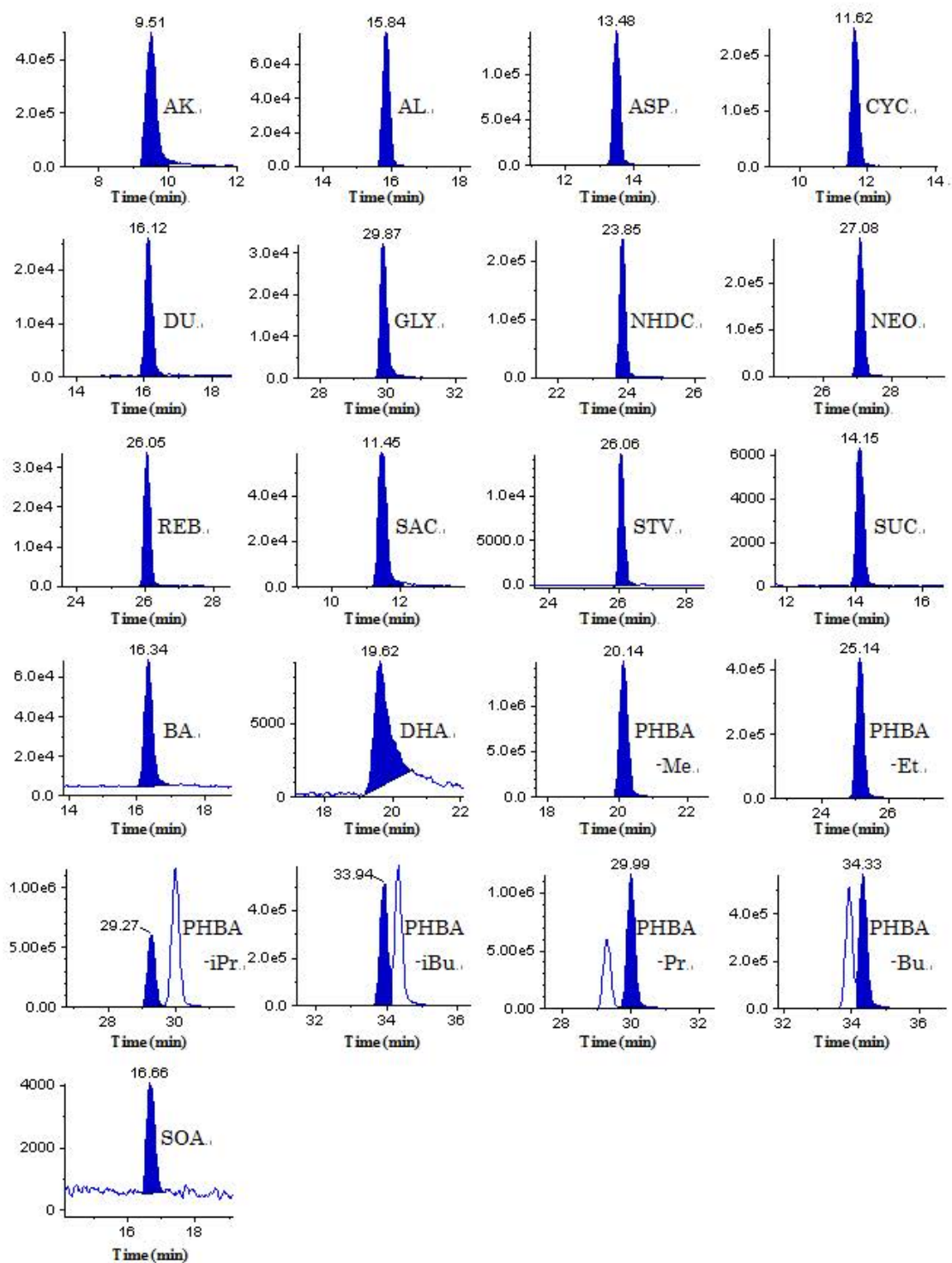


Fig. 6 MRM chromatograms of butter fortified with 21 compounds at 0.02 g/kg.

8. 従来法との比較検討

AK, ASP, SAC, SUC, PHBA-Es 類および SOA は、各食品添加物の表示がある食品を用いて従来法と本法との比較検討を行った。従来法として、AK および SAC は厚生労働省通知食基発第 58 号 (23), ASP は衛生試験法注解 2010 (22), SOA および PHBA-Es 類は厚生労働省通知食安基発 0528 第 3 号 (27) に従った。SUC は、試験溶液の調製は衛生試験法注解 2010 (22), 定量は Stroka らの方法 (53) に従った。AK は 4 検体 (ちくわ, 清涼飲料水, ゼリーおよび福神漬), ASP は 4 検体 (清涼飲料水, 砂糖代替品, ゼリーおよび福神漬), SAC は 4 検体 (しょうゆ, ウスターソース, しょうゆ漬, 魚介乾製品), SUC は 3 検体 (アイスクリーム, ゼリーおよび福神漬), PHBA-Es 類は 2 検体 (しょうゆ 2 検体) および SOA は 5 検体 (たくあん漬, かまぼこ, ミックスベリージャム, ウィンナーソーセージおよびさきいか) を用いて試験し, 結果を Table 13 に示した。すべての食品において, 本法と従来法の両方で, 表示どおりに各食品添加物が検出された。従来法の測定値に対して本法は魚介乾製品の SAC の測定値 (147%) を除いて 80~108% の測定値となり, 従来法とほぼ同等の結果が得られることが示された。

Table 13 Comparison of conventional methods and the newly developed methods for estimating contents of target components in samples.

Compounds	Samples	Conventional methods① (g/kg)	New method② (g/kg)	Ratios of Contents (②/①%)	
AK	Fish sausage(tikuwa)	0.031	0.031	100	
	Jelly	0.078	0.070	90	
	Pickles(hukujinzuke)	0.11	0.11	99	
	Soft drink(calpis)	0.041	0.039	95	
ASP	Jelly	0.17	0.18	106	
	Pickles(hukujinzuke)	0.073	0.070	96	
	Soft drink(calpis)	0.074	0.072	97	
	Sugar substitute	6.7	6.9	103	
SAC	Dried fish	0.15	0.22	147	
	Pickles(shoyuzuke)	0.60	0.58	97	
	Soy sauce	0.26	0.28	108	
	Worcestershire sauce	0.15	0.16	107	
SUC	Ice cream	0.033	0.033	100	
	Jelly	0.025	0.023	92	
	Pickles(hukujinzuke)	0.078	0.076	97	
PHBA -Es	-iPr	0.065	0.071	92	
	-iBu	Soy sauce	0.046	0.056	82
	-Bu		0.043	0.054	80
	-iPr		0.045	0.050	90
	-iBu	Soy sauce	0.034	0.039	87
	-Bu		0.032	0.039	82
SOA	Dried fish (sakiika)	0.50	0.42	84	
	Kamaboko	0.33	0.32	97	
	Mixed berry jam	0.29	0.28	97	
	Pickle (takuan)	0.69	0.63	91	
	Wiener sausage	1.24	1.27	102	

IV. 考察

食品中の甘味料 12 種および保存料 9 種を固相抽出-LC-MS/MS 法により一斉分析する方法を検討した。

LC-MS/MS 測定については、疎水性物質および強酸性物質である AK と SAC の保持が期待できるフェニルカラム (Waters 社製 XSELECT CSH Phenyl-Hexyl) と移動相に酢酸緩衝液 (pH4.0) -アセトニトリルを使用した LC により対象物質の分離を行い、ネガティブモードで MS/MS 測定したことにより、すべての対象物質を一斉に分析することができた。

抽出液の精製については、逆相-弱アニオン交換ミックスモードカラムである Oasis-WAX に、メタノール濃度が 15%以下となるように蒸留水で希釈した抽出液を負荷し、10%メタノールで洗浄し、5%ギ酸-0.1 mol/L 酢酸アンモニウム含有 85%メタノールで溶出させたことにより、対象物質すべてを固相カラムに保持および溶出させ、抽出液を精製することができた。

試料からの抽出法については、13 種類の試料 (Table 12 に示した試料, ドレッシング, ウスターソースおよび清涼飲料水) に 21 種の対象物質を 0.02 g/kg と 0.2 g/kg 添加した添加回収試験を行った結果, 固体試料は 80%メタノール (高脂肪食品は 95%メタノール) と 50%メタノールによる 2 回抽出, 液体試料は 80%メタノールによる抽出により, 様々な食品から対象物質 21 種を良好な添加回収率で抽出することができた。抽出液 (65%メタノール) 中では, ASP は 24 時間後に濃度が約 10%減少したため (Fig. 5), 24 時間程度で抽出から溶出まで行うことが望ましいと考えられた。ASP は pH 3~5 で安定に存在するが (22), GLY は酸性条件下では抽出されにくいいため, 抽出液の pH は調整しないこととした。

10 種の食品に対象物質 21 種を 0.02 g/kg および 0.2 g/kg となるように添加し, 本法により添加回収試験を行った結果, 対象物質 21 種の添加回収率が 70.9~119.0%と良好な結果を示し, 相対標準偏差は 0.1~11.7%であり (Table 12), マトリックスによる測定値への影響は少ない (マトリックス添加標準溶液のピーク面積/溶出液標準溶液のピーク面積 = 0.84~1.15) と考えられることから, 定量性および選択性が高いことが示された。

定量下限は, AK, AL, ASP, CYC, NEO, SAC および PHBA 類は 0.001 g/kg, DHA および SOA は 0.02 g/kg, それ以外の対象物質は 0.005 g/kg であったことから, SOA と DHA を除いて食品の検査のために十分な感度を有していると考えられ, 定量イオンを用いた検量線は 21 種すべてで相関係数 0.999 以上と良好な直線性を示した。

SOA と DHA の定量下限が他の物質より高いことについては、SOA は本法がネガティブモードを用いることから、報告されている試験法のポジティブモードより感度が劣ること(26)、DHA はピークがテーリングすることなどが理由として考えられる。規格基準で定められた対象食品への使用基準は SOA が 0.050~3.0 g/kg、DHA が 0.50 g/kg であり、0.02 g/kg の定量下限は食品の検査に必要な感度を有していると考えられたが、定量下限に近い濃度の場合は従来法で再測定することが望ましいと思われた。

また、本法と従来法との比較検討を行ったところ、検討したすべての食品において、本法と従来法の両方で食品表示どおりに甘味料および保存料が検出され、魚介乾製品の SAC の測定値を除いてほぼ同等の添加回収率の結果が得られたことから (Table 13)、本法は食品中の甘味料および保存料の検査法として有用であることが示された。魚介乾製品の SAC は従来法に対して 147% の測定値であったが、透析法は魚介乾製品において低回収率傾向であることが報告されており (26)、この試験溶液で調製したマトリックス添加標準溶液において正のマトリックス効果は認められなかったため、本法での回収率の改善を反映した結果と推測された。

これらのことから、本法は甘味料 12 種および保存料 9 種を食品から同時抽出・精製および LC-MS/MS による一斉分析をすることが可能であり、定量性および選択性も高いことから、食品中の複数の甘味料および保存料を迅速かつ簡便に分析する方法として有用であると考えられた。なお本法は、福岡市保健環境研究所において、スクリーニング試験や同定のための確認試験法として使用されている。

V. 要約

食品中の甘味料 12 種および保存料 9 種の固相抽出-LC-MS/MS 法による分析法を開発した。固体試料は 80%メタノール（高脂肪食品は 95%メタノール）と 50%メタノールによる 2 回抽出、液体試料は 80%メタノールによる抽出を行い、逆相-弱アニオン交換ミックスモードカラムで精製を行った。精製した溶液中の対象物質を、フェニルカラムと酢酸緩衝液 (pH 4.0) -アセトニトリルの移動相を使用した LC により分離し、ネガティブモードで MS/MS 測定した。定量下限は 0.001~0.02 g/kg であり、定量イオンを用いた検量線はすべての対象物質で相関係数 0.999 以上であった。対象物質 21 種を 10 試料に添加し試験した結果、70.9~119.0% の良好な添加回収率が得られた。今回開発した分析法は、甘味料 12 種

と保存料9種を迅速かつ簡便に一斉分析でき、定量性および選択性も高いことから、甘味料と保存料の一斉試験法として有用と考えられた。

総 合 考 察

近年、食品偽装、食中毒および輸入食品の食品衛生法違反など食品に関わる様々な事件や事故が発生しており、食の品質と安全性について消費者の不安と不信が高まっている。多様化する食品の問題に対応するため、行政、検査機関および食品メーカー等は様々な食品の検査を実施する必要がある、食品検査法の迅速化や簡便化が求められている。

そこで本研究では、食品関連法に基づく地域に流通する食品への基準の的確な適用、食品危害の調査と被害拡大の防止、食品企業のコンプライアンス向上による食品偽装の抑止などに寄与し、地域の食の安全・安心確保の一助となることを主な目的とし、食品中の原材料と食品添加物の迅速な検出法を検討した。

第1章では、辛子めんたいこ等のスケトウダラ卵加工品に、魚卵加工品の原材料として使用されるマダラやカラフトシシャモ等の卵を混入させる原材料偽装の発見と抑止のために、スケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵の高感度な検出法の開発を検討した。辛子めんたいこは、その原材料であるスケトウダラ卵巣にマダラ等の魚卵を混入させる原材料偽装が懸念されており (1)、地域を代表する特産品に原材料偽装があった場合には、辛子めんたいこ業界全体の信用問題に波及する可能性があることから、スケトウダラ卵加工品中の魚卵を鑑別できる方法を開発し、原材料偽装の有無を確認することが求められていた。

現在、タラ類の同定法として報告されている PCR-RFLP 法は、スケトウダラ卵中に約 10% 以上のマダラ卵が混入していた場合には検出可能であったが、微量に混入したマダラ卵は検出できなかった。スケトウダラ卵巣の形態を良くするため、スケトウダラ卵巣中に他の魚卵を微量に注入する可能性もあることから、PCR-RFLP 法よりも高感度に検出できる方法が必要であった。また、カラフトシシャモは生息する海域によって 4 つのミトコンドリア DNA 遺伝子型に分岐していることが報告されているが (5)、このことはカラフトシシャモに特異的なプライマーの設計を困難にしており、種特異的プライマーを用いた PCR によるカラフトシシャモの同定法は報告されていない。

リアルタイム PCR 法は、混合試料からの種の同定に幅広く利用されており (6, 7, 8)、迅速かつ高感度に標的遺伝子を検出できる。さらに、TaqMan プローブ等を使用するリアルタイム PCR 法は、従来の PCR 法より特異的な検出が可能である。

そこで、スケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵を検出できるリアルタイム PCR 法の開発を検討し、スケトウダラ、マダラおよびカラフトシシャモに特異的なプライマーとプローブをミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 領域において設計した (Fig. 1, Table 2)。

プローブについては、スケトウダラとマダラが Cytochrome *b* 領域において配列相同性が高いことから、特異性の高い TaqMan MGB プローブを用いることとした。

マダラ検出用プライマーについては、アレル特異的 PCR 法 (32, 33) を参考に Reverse プライマーを設計したことで、ミスアニーリングによるスケトウダラ DNA の増幅によって、マダラ DNA の増幅が抑制されることを防ぎ、スケトウダラ DNA 溶液中の微量のマダラ DNA を高感度に検出することを可能とした。

カラフトシシャモ検出用プライマーについては、同種内で相同性の高い領域においてカラフトシシャモに特異的なプライマーとプローブを設計したことで (Fig. 2)、生息海域の異なるカラフトシシャモであっても検出することを可能とした。

設計した 3 組のプライマーおよび TaqMan MGB プローブを用いたリアルタイム PCR により、標的とする種のみから Ct 値が得られ、他種との交差反応は認められなかったことから、設計したプライマーおよびプローブは標的とする種に特異的であることが確認された。

また、本法は、高い感度、良好な検量線の直線性および高い PCR 増幅効率をもつことが示され (Fig. 3)、スケトウダラ卵に 0.1% の割合で添加したマダラ卵またはカラフトシシャモ卵を検出可能であったことから、混合試料から標的とする種を高感度に検出できることが示された。

さらに、辛子めんたいこおよびスケトウダラ卵加工品において、本法により使用表示どおりにスケトウダラ、マダラおよびカラフトシシャモが検出されたことから (Table 5)、本法は夾雑物の多い辛子めんたいこ等のスケトウダラ卵加工品においても原材料鑑定に利用できることが確認された。

これらのことから、本法はスケトウダラ卵加工品に混入したマダラ卵およびカラフトシシャモ卵を高感度かつ特異的に検出することが可能であり、原材料偽装の発見のために有用な検査法であると同時に、JAS 法、公正競争規約および食品衛生法に基づく基準の的確な適用に寄与できると考えられた。また本法は、タラ類の同定法として報告されている PCR-RFLP 法と比較して、マダラ卵等が微量に混入した場合でも検出可能であり、電気泳動、制限酵素処理および染色等が不要であることから、検査時間が短縮できるため (本法

の検査時間は約4時間)、より高感度、迅速かつ簡便な方法である。さらに、検査のための試薬代も1検体あたり約1,500円(スケトウダラ、マダラおよびカラフトシシャモの3つの検出試験を行った場合)であることから、実用的な検査法と考えられた。

なお、福岡市においては、市場に流通する辛子めんたいこ製品について、開発した検査法によりマダラ卵およびカラフトシシャモ卵の偽装混入検査を定期的実施している。平成20年度から平成26年度現在まで、流通する辛子めんたいこ製品114検体の検査を実施した結果、すべての検体でマダラ卵およびカラフトシシャモ卵は陰性であった。

これらの魚卵の検出法の開発や辛子めんたいこ製品の偽装混入検査の実施などの福岡市の取り組みについては、辛子めんたいこ業界と福岡市の協働事業で作成および配布している「辛子めんたいこ表示・衛生管理の手引き」において紹介されている(参考15)。また、平成20年5月の全国紙の記事においても、福岡市と全国辛子めんたいこ食品公正取引協議会が、辛子めんたいこ業界全体の品質を保持するため、辛子めんたいこ製品においてマダラ卵等の偽装混入検査を実施していることが紹介された。

このように、福岡市と辛子めんたいこ業界が協力して原材料偽装の撲滅に取り組み、業者や消費者に周知していくことで、地域の代表的な業界団体である辛子めんたいこ業界のコンプライアンス向上による原材料偽装の抑止と福岡県の特産品である辛子めんたいこのブランド保持の効果が期待できると考えられる。

参考15 辛子めんたいこ表示・衛生管理の手引き(表紙)



辛子めんたいことは

辛子めんたいこの定義は「辛子めんたいこ食品の表示に関する公正競争規約」第2条で「すけとうだらの卵巣に唐辛子を主原料とする調味液等で味付けしたものをいう」と定められています。

したがって、すけとうだらの卵にマダラやシシャモの卵を混ぜたものは、「辛子めんたいこ」と表示することはできません。たとえ切り、バラコであっても同じです。

■辛子めんたいこのDNA検査 (マダラ等の卵の偽装混入検査の実施)

平成19年の食品偽装事件を機に、福岡市は全国辛子めんたいこ食品公正取引協議会の協力を得て、辛子めんたいこにマダラやカラフトシシャモの卵が混入していないか調べるためのDNA検査法を開発しました。この検査法により、マダラやカラフトシシャモの卵が1%程度混入した場合でも、その混入を確認できるようになりました。(食品衛生学雑誌2010 Vol.51 No.3 に掲載)

右ページの表は今までに実施した辛子めんたいこのDNA検査結果です。

今後も、福岡市と全国辛子めんたいこ食品公正取引協議会は協働で辛子めんたいこへのマダラ等の卵の偽装混入防止のため、市場に流通している辛子めんたいこの検査を行ってまいります。



DNA検査の様子

●2008年～2010年にかけて実施した辛子めんたいこのDNA検査結果

実施回数	実施日	対象施設(社)	検体数(件)	検査結果
1回目	2008/4/11	16	16	すべて適
2回目	2008/8/22	14	14	すべて適
3回目	2009/5/26	20	20	すべて適
4回目	2009/11/10	16	16	すべて適
5回目	2010/6/14	9	11	すべて適
計		75	77	

トピックス

「辛子めんたいこの由来」

すけとうだらの卵巣を加工して食べる食文化は、17世紀ごろには朝鮮半島で広まっていたといわれています。赤唐辛子やニンニクでまぶした「キムチ」や「コチュジャン」等と同じように辛子めんたいこは古くから朝鮮半島の伝統的食品の一つとなっており、昭和の初期から日本でも食べられるようになりました。

「めんたいこ」の語源については、すけとうだらを朝鮮語で「ミョンテ」と言い「明太魚」、「明太」と書くことから、すけとうだらの子(卵)を「めんたいこ(明太子)」と呼ぶようになったものです。

「すけとうだらの卵巣」

すけとうだらは、北太平洋を中心に広く分布するクラ科の魚で、成魚の体長は60～70cmほどになります。卵巣は2本が一對の状態です。一尾の卵巣には約20万～150万粒の魚卵が詰まっています。

一般に魚卵は栄養豊富とされていますが、すけとうだらの卵巣も例外ではなく、ビタミンB₁・B₂・Eが豊富に含まれています。また、エネルギーは100g当たり126キロカロリー(五訂増補日本食品標準成分表より)です。

第2章では、毒キノコによる食中毒の中で最も事例数が多く、食用キノコであるシイタケ等と誤認して喫食されるツキヨタケについて、食中毒の原因食品の同定に利用できるツキヨタケとシイタケの同時検出法の開発を検討した。

食中毒の際には、適切な医療処置、保健所等の調査、被害拡大防止のための市民への情報提供などを迅速に行うために、食中毒の原因食品の迅速な同定が重要である。キノコは主に形態学的特徴によって同定されるが、調理された食品や他の食材との混合試料、嘔吐物などが検査検体の場合は同定が困難である。また、LC-MS/MS等によるツキヨタケの有毒成分イルージンSの測定法が報告されているが(12, 13, 14)、同定または定量のために必要となるイルージンSの標準品は市販されていない。さらに、SYBR Green Iを用いたリアルタイムPCR法によるツキヨタケの同定法が報告されているが(17)、食中毒の際の検査検体として考えられる混合試料や嘔吐物等に対しては検証されておらず、SYBR Green Iを用いたリアルタイムPCR法は非特異的な二本鎖DNAも検出するため、TaqManプローブ法と比較して原理的に特異性が劣っている。

一方、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法は、特異性の高い検出方法であり、形態に依存せず、食品からの種の同定に幅広く利用されていることから(6, 7, 8)、食中毒の原因となる食材の種を同定する方法として有用である。さらに、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCRでは、複数のプローブに異なる蛍光色素を標識することで、単一反応にて複数の標的遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス解析を行うことができる。

そこで、調理された食品、他の食品との混合試料および嘔吐物からでもツキヨタケとシイタケを同時検出できるマルチプレックスリアルタイムPCR法の開発を検討し、ツキヨタケおよびシイタケに特異的なプライマーおよびTaqMan MGBプローブをITS1-5.8S rDNA領域において設計した(Table 8)。

設計したプライマーとプローブを用いたマルチプレックスリアルタイムPCRにより、ツキヨタケ検出系ではツキヨタケ検体のみ、シイタケ検出系ではシイタケ検体のみ検出され、他の種との交差反応は認められなかったことから、本法は標的とする種に特異的であることが確認された。

本法は、両検出系において、高い感度と良好な検量線の直線性および高いPCR増幅効率をもち(Fig. 4)、十分な測定精度と再現性を有することが示され(Table 10)、調理や消化した試料、他の食材との混合試料および嘔吐物においても適用可能であることが確認された(Table 9)。

これらのことから、本法はツキヨタケとシイタケを特異的、高感度かつ迅速に同時検出でき、調理や消化された試料、他の食品との混合試料および嘔吐物にも適用可能であることにくわえて、検査のための試薬代は1検体あたり約800円、検査にかかる時間は約4時間であることから、食中毒の原因食品をツキヨタケと迅速に同定するために有用で実用的な検査法と考えられた。

第3章では、世界的に使用される代表的な食品添加物の甘味料と保存料について、多項目の甘味料と保存料を迅速かつ簡便に一斉分析する検査法の開発を検討した。

甘味料および保存料の分析法は、透析法、水蒸気蒸留法、溶媒抽出法などにより、食品から抽出し、必要に応じて抽出後に固相カラム等で精製後、HPLC等で定量測定する方法が一般的である。複数の甘味料の抽出方法に広く用いられる透析法は、ビスケット等の穀類調製品やさきいか等の魚介乾製品において、回収率の低下が報告されており(26)、透析開始から終了まで時間を要する(約18~48時間(21, 22, 23, 24, 26))。

複数の保存料の抽出方法に広く用いられる水蒸気蒸留法は、パラオキシ安息香酸エステル類において高タンパク食品や高脂肪食品からの回収率が低いことから、高タンパク食品や高脂肪食品からは溶媒抽出法により抽出し、抽出液を固相カラム等により精製後、HPLC等により定量測定する方法が報告されている(27, 28)。

甘味料と保存料両方の多項目を検査するためには複数種類の分析法を実施するため、操作が煩雑で人と時間を要し、試薬や器具等の実験材料も多数用意する必要がある。

一方、LC-MS/MSは試料由来の共存物質存在中でも複数の目的成分を高感度かつ選択的に一斉分析できる装置である(29, 30)。

そこで、指定または指定外添加物である甘味料12種(AK, AL, ASP, CYC, DU, GLY, NHDC, NEO, REB, SAC, STVおよびSUC)および保存料9種(BA, DHA, PHBA-Me, PHBA-Et, PHBA-iPr, PHBA-Pr, PHBA-iBu, PHBA-BuおよびSOA)について、食品からの同時抽出・精製法およびLC-MS/MSによる一斉分析法を開発することとした。

固体試料では80%メタノール(高脂肪食品は95%メタノール)と50%メタノールによる2回抽出、液体試料は80%メタノールによる抽出を行い、逆相-弱アニオン交換ミックスモードカラムで精製後に、ネガティブモードでのLC-MS/MSによる測定を行うことで、対象物質21種を一斉に分析できることを確認した。

本法は、すべての対象物質において、定量イオンを用いた検量線が良好な直線性を示し、良好な添加回収率が得られ (Table 12)、マトリックスによる測定値への影響は少ないと考えられたことから、定量性および選択性が高いことが示された。

また、定量下限は、AK, AL, ASP, CYC, NEO, SAC および PHBA 類は 0.001 g/kg, DHA および SOA は 0.02 g/kg, それ以外の対象物質は 0.005 g/kg であり、食品の検査に必要な感度は有していることが確認された。

さらに、本法と従来法との比較検討を行ったところ、両法において、検討したすべての食品から食品表示どおりに甘味料および保存料が検出され、魚介乾製品の SAC の測定値を除いてほぼ同等の測定値の結果が得られたことから (Table 13)、本法は食品中の甘味料および保存料の検査法として有用であることが示された。

これらのことから、本法は甘味料 12 種および保存料 9 種を食品から同時抽出・精製および LC-MS/MS による一斉分析をすることが可能であり、定量性および選択性も高いことから、食品中の複数の甘味料および保存料を迅速かつ簡便に分析する方法として有用と考えられた。また、本法における抽出・精製法は、一般的に検査機関で使用される試薬や器具、および 1 種類の固相カラム (約 1,000 円/個) 等を使用し、検査にかかる時間も約 4 時間であるため、多項目の甘味料や保存料を複数の試験法で分析する場合と比較して、必要な試薬、器具および固相カラム等の実験材料の削減ができ、検査にかかる人や時間も削減できると考えられた。

これらのことから、本研究で構築した上述の 3 つの検査法は、迅速かつ簡便に食品中の原材料や食品添加物を検出できる方法として検査機関等に利用されることが期待できる。

本研究の地域に対する効果として、食品偽装が社会問題となっている昨今、地域を代表する特産品の辛子めんたいこに原材料偽装があった場合には、辛子めんたいこ業界全体の信用問題に波及する恐れがあるが、スケトウダラ卵加工品中の微量のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵を検出できる検査法を開発し、辛子めんたいこの偽装混入検査を実施していること、福岡市と辛子めんたいこ業界団体が協力して偽装混入の撲滅に取り組んでいることを業者や消費者に紹介したことにより、辛子めんたいこ業界のコンプライアンス向上による原材料偽装の抑止や福岡県の特産品である辛子めんたいこのブランド保持の効果が期待できると考えられる。

偽装撲滅の取組以外にも、辛子めんたいこ業界と福岡市は「辛子めんたいこ表示・衛生管理の手引き」の作成配布による表示・衛生管理の周知徹底、講習会の実施および「辛子めんたいこ表示・衛生管理士」検定試験制度の創設などに取組んでいる。このように、福岡市と辛子めんたいこ業界が協力して偽装や表示違反の撲滅などに取り組むことで、地域の代表的な業界団体である辛子めんたいこ業界の法令遵守の意識向上が期待され、辛子めんたいこの安全・安心の確保に繋がると考えられる。

また、ツキヨタケによる食中毒は全国的に発生しており、ツキヨタケを迅速に同定できる検査法を開発したことは、食中毒の発生の際に、保健所等の患者調査、原因食品の販売先や生息地の現地調査、販売品の場合は販売差し止め等の措置、市民への情報提供など、管轄の自治体が迅速に対応するために有用であると考えられる。平成24年に福岡市でツキヨタケによる食中毒疑い事例が発生した際は、本法により原因食品をツキヨタケと同定し、保健所等の調査や市民への情報提供に貢献することができた。

さらに、検査機関等において頻繁に検査されている甘味料と保存料の一斉分析法を開発し、検査を迅速かつ簡便化したことは、輸入食品や国産食品で食品衛生法違反事例が多発し、指定添加物と指定外添加物を含む多項目を分析することが求められている昨今、地域に流通する食品について食品添加物の使用基準や表示基準が遵守されているかを検査機関等が確認するために有用であると考えられる。なお本法は、福岡市保健環境研究所において、スクリーニング試験や同定のための確認試験法として使用されている。

これらのことから、本研究は、食品関連法に基づく地域に流通する食品への基準の的確な適用、食品危害の調査と被害拡大の防止、食品企業のコンプライアンス向上による食品偽装の抑止などに寄与し、地域の食の安全・安心確保の一助となることが期待できる。

今後の課題として、第1章については、多品目を製造する食品工場の場合、食品加工時のコンタミネーションやキャリーオーバーが発生する可能性があり、どの値の Ct 値を境にマダラおよびカラフトシシャモを陽性または陰性と判定するのかについては今後さらなる検討が必要であると考えられる。

第2章については、キノコによる食中毒事例はツキヨタケ以外にクサウラベニタケ、カキシメジ、ドクササコ、テングダケなども多く発生していることから、毒キノコによる食中毒が発生した際の原因食品の同定のためには、これらの種の同定法も検討することが望まれる。

他の毒キノコの同定法または有毒成分の分析法として、クサウラベニタケについては、SYBR Green 法を用いたリアルタイム PCR による同定法 (17)、有毒成分ムスカリンを HPLC や LC-MS/MS 等により分析する方法 (54, 55, 56, 57)、およびクサウラベニタケの呈色反応 (硫酸バニリン反応により誤食されやすいウラベニホテイシメジは赤紫色になるが、有毒のクサウラベニタケは変色しない) による判別法 (58) などが報告されている。カキシメジについては、SYBR Green 法を用いたリアルタイム PCR による同定法 (17) など、ドクササコについては、有毒成分アクロメリン酸を LC-MS により分析する方法など (59)、テングダケについては、有毒成分ムシモールを HPLC や LC-MS/MS 等により分析する方法 (54, 55, 56, 57) などが報告されている。本法によりツキヨタケが検出されなかった場合には、報告されている他の毒キノコの同定法を用いて検査する必要があると考えられる。

第3章については、本法で使用したカラムである Waters 社製 XSELECT CSH Phenyl-Hexyl では、PHBA-iBu と PHBA-Bu の完全な分離は困難であり、DHA のピークのテーリングが観察されたため、これらのことが改善され、かつ他の対象物質も問題なく分離できるカラムが開発されれば、使用するカラムの変更を検討する必要があると思われる。また、本法の対象物質 21 種以外の甘味料および保存料について、指定添加物の甘味料であるキシリトール、D-ソルビトールの糖アルコールは、親水性化合物であることから、本法のフェニルカラムを用いた逆相クロマトグラフィーでは保持がなく、指定添加物の保存料であるナイシンは、厚生労働省通知での分析法では弱酸性陽イオン交換樹脂カラムで精製することから (60)、本法で用いた逆相-弱アニオン交換ミックスモードカラムでの精製は困難であり、指定添加物の保存料である二酸化硫黄 (M.W.64) とプロピオン酸 (M.W.74) は、分子量が小さいことから MS/MS 条件が得られず、さらに本法の条件でフェニルカラムへの保持がなかった。これらのことから、その他の甘味料や保存料は従来法で検査を行う必要があるが、法違反の際には異なる検査法で再検査することが望ましいと思われるため、対象物質 21 種以外の甘味料および保存料についても新たな検査法を検討していくことが望まれる。

結 論

1. リアルタイムPCR法によるスケトウダラ卵加工品中のマダラ卵およびカラフトシシャモ卵の検出法を開発した。このことは、福岡県の特産品である辛子めんたいこ等の原材料偽装を発見するために有用であり、辛子めんたいこ業界のコンプライアンス向上による原材料偽装の抑止と特産品のブランド保持の効果が期待できると考えられる。
2. マルチプレックスリアルタイムPCR法によるツキヨタケとシイタケの同時検出法を開発した。このことは、食中毒が発生した際に、原因食品をツキヨタケと迅速に同定するために有用であり、保健所等の調査や市民への情報提供などに貢献できると考えられる。
3. 食品中の甘味料12種および保存料9種の固相カラムによる同時抽出・精製法およびLC-MS/MSによる一斉分析法を開発した。このことは、食品中の複数の甘味料と保存料の検査を迅速かつ簡便化するために有用であり、地域に流通する食品検査の省力化のために貢献できると考えられる。

略 語 表

略 語	名 称	種 類
PCR	Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)	
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (制限酵素断片長多型)	
ARC	The arctic clade (北極型)	カラフト シシヤモ
NECA	The northeast-central Atlantic clade (北東-中央大西洋型)	
NWA	The northwest Atlantic clade (北西大西洋型)	
PAC	The northeast Pacific clade (北東太平洋型)	
HPLC	高速液体クロマトグラフ	
LC-MS/MS	液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計	
GC-MS	ガスクロマトグラフ質量分析計	
MGB	Minor groove binder	プローブ 関連
NFQ	Non-fluorescent quencher (非蛍光クエンチャー物質)	
FAM	6-carboxyfluorescein	
VIC	6-carboxyrhodamine	
NCBI	National Center for Biotechnology Information	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	
EDTA	エチレンジアミン四酢酸	試薬名
TE 緩衝液	Tris-EDTA 緩衝液	試薬名
UNG	Uracil DNA glycosylase (ウラシル DNA グリコシラーゼ)	酵素名
Ct 値	Threshold cycle 値	
ITS	Internal transcribed spacer (内部転写領域)	DNA 領域
rDNA	Ribosomal DNA (リボソーム RNA 遺伝子)	
R^2	Correlation coefficient (相関係数)	
SD	Standard Deviation (標準偏差)	
CV	Coefficient of variation (変動係数)	

略 語	名 称	種 類
AK	アセスルファムカリウム	甘味料
AL	アリテーム	
ASP	アスパルテーム	
CYC	サイクラミン酸ナトリウム	
DU	ズルチン	
GLY	グリチルリチン酸	
NHDC	ネオヘスペリジンジヒドロカルコン	
NEO	ネオテーム	
REB	レバウディオシド A	
SAC	サッカリンナトリウム	
STV	ステビオシド	
SUC	スクラロース	
BA	安息香酸	
DHA	デヒドロ酢酸	
PHBA-Me	パラオキシ安息香酸メチル	
PHBA-Et	パラオキシ安息香酸エチル	
PHBA-iPr	パラオキシ安息香酸イソプロピル	
PHBA-Pr	パラオキシ安息香酸プロピル	
PHBA-iBu	パラオキシ安息香酸イソブチル	
PHBA-Bu	パラオキシ安息香酸ブチル	
SOA	ソルビン酸	

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご指導とご教示を賜りました福岡市保健環境研究所 保健科学課 赤木 浩一主任研究員，国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 穂山 浩部長に心より感謝申し上げます。

学位論文をまとめるにあたり、ご丁寧なご指導ならびにご校閲を賜りました三重大学大学院 地域イノベーション学研究科 矢野 竹男教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、貴重なご助言を賜りました千葉大学 教育学部 鈴木 彰 名誉教授，福岡市保健環境研究所 樋脇 弘課長，福岡市保健環境研究所 坂本 智徳 氏に深謝いたします。

本研究の遂行に際し、貴重な試料をご提供いただきました山形県衛生研究所 理化学部 笠原義正氏，千葉県立中央博物館 吹春 俊光氏，千葉県衛生研究所 生活環境研究室 石井 俊靖氏に深謝いたします。

参 考 文 献

1. Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard, T. D. Jr., and Kaiser, M. J. Fisheries for Global Welfare and Environment. Tokyo, Terra Scientific Publishing Company, 2008, p. 297-306.
2. Aranishi, F., Okimoto, T., and Izumi, S. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. *J. Appl. Genet.*, **46**, 69-73 (2005).
3. Akasaki, T., Yanagimoto, T., Yamakami, K., Tomonaga, H., and Sato, S. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome *b* gene in cod fish (order *Gadiformes*) products. *J. Food Sci.*, **71**, C190-C195 (2006).
4. Finizio, A. D., Guerriero, G., Russo, G.L., and Ciarcia, G. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments. *Eur. Food Res. Technol.*, **225**, 337-344 (2007).
5. Dodson, J. J., Tremblay, S., Colombani, F., Carscadden, J. E., and Lecomte, F. Trans-Arctic dispersals and the evolution of a circumpolar marine fish species complex, the capelin (*Mallotus villosus*). *Mol. Ecol.*, **16**, 5030-5043 (2007).
6. Brodmann, P. D., and Moor, D. Sensitive and semi-quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci.*, **65**, 599-607 (2003).
7. Lopez, I., and Pardo, M. A. Application of relative quantification TaqMan real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4554-4560 (2005).
8. Demmel, A., Hupfer, C., Hampe, E. I., Busch, U., and Engel, K. Development of a real-time PCR for the detection of lupine DNA (*Lupinus* species) in foods. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4328-4332 (2008).
9. Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., and Akiyama, H. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 3131-3135 (2007).
10. Nakanishi, K., Ohashi, M., Tada, M., and Yamada, Y. Illudin S (Lampterol) Tetrahedron, **21**, 1231-1246 (1965).

11. Yamaura, Y. Mushroom poisoning. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **50**, J301–306 (2009).
12. Kasahara, Y. Quantitative analysis of toxic substance, illudin S in the fruit body of *lampteromyces japonicas*. *Rep. Yamagata Pref. Inst. Public Health*, **31**, 5–9 (1998).
13. Kasahara, Y., and Itou, T. Determination of illudin S in *Omphalotus guepiniformis* and foods that caused food poisoning by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **50**, 167–172 (2009).
14. Kanamori-Kataoka, M., Seto, Y., and Kuramoto, M. Development of a method for determining illudin S in food by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Health Sci.*, **52**, 237–242 (2006).
15. Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill III, F. R., and Smith, T. F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**, 165–256 (2006).
16. Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H. R. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **5**, 209–219 (2005).
17. Maeta, K., Ochi, T., Tokimoto, K., Shimomura, N., Maekawa, N., Kawaguchi, N., Nakaya, M., Kitamoto, Y., and Aimi, T. Rapid species identification of cooked poisonous mushrooms by using real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3306–3309 (2008).
18. 日本食品添加物協会，食品添加物マニュアル編集委員会 編集．新食品添加物マニュアル 第2版．東京都，日本食品添加物協会，2007．
19. 日本食品添加物協会，国際専門委員会 編集．世界の食品添加物概説．東京都，日本食品添加物協会，2004．
20. 医薬食品局食品安全部監視完全課輸入食品安全対策室長通知「中国産加工食品の取り扱いについて」，平成19年5月30日，食安輸発第0530003号（2007）．
21. 厚生労働省 監修．食品衛生検査指針 食品添加物編2003．東京都，社団法人 日本食品衛生協会，2003，p.12-30，p.216-220，p.228-239．
22. 日本薬学会 編集．衛生試験法・注解2010（Methods of Analysis in Health Science）．東京都，金原出版株式会社，2010，p.317-326，p.350-367．

23. 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長通知「食品中のアセスルファミカリウム分析法について」，平成13年12月28日，食基発第58号（2001）。
24. Sakamaki, N., Matsumoto, H., Hagino, K., Nakazato, M., and Yasuda, K. Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A and glycyrrhizic acid in foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **45**, 81-86 (2004).
25. Koyama, M., Yoshida, K., Uchibori, N., Wada, I., Akiyama, K., and Sasaki, T. Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **46**, 72-78 (2005).
26. Moriyasu, T., Nakazato, M., Kobayashi, C., Kikuchi, Y., Hayano, K., and Tamura, Y. Determination of acesulfame K, saccharin and aspartame in various foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **37**, 91-96 (1996).
27. 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知「食品中の食品添加物分析法」の改正について」，平成22年5月28日，食安基発0528第4号（2010）。
28. Miyakoda, M., Yamada, Y., Amakawa, E., and Yasuda, K. Determination of preservatives in foods by direct extraction. *Tokyo Kenkou Anzen Kenkyu Senta Nenpo (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.)*, **55**, 101-106 (2004).
29. 畑野 和広，LC/MS/MSによる食品分析，財団法人九州環境管理協会 会報「環境管理」，37, 22-30 (2008).
30. 厚生労働省医薬食品局食品安全部部長通知「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について」，平成17年1月24日，食安発第01001号（2005）。
31. Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R. B., and Hedgpeth, J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 655-661 (2000).
32. Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J. C., and Markham, A. F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, **17**, 2503-2516 (1989).

33. Hayashi, K., Hashimoto, N., Daigen, M., and Ashikawa, I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet.*, **108**, 1212-1220 (2004).
34. Maruyama, T., Yokoyama, K., Makino, Y., and Goda, Y. Phylogenetic relationship of psychoactive fungi based on rRNA gene for a large subunit and their identification using the TaqMan assay. *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 710–714 (2003).
35. Chanvrier, H., Uthayakumaran, S., Appelqvist, I. A. M., Gidley, M. J., Gilbert, E.P., and López-Rubio, A. Influence of storage conditions on the structure, thermal behavior, and formation of enzyme-resistant starch in extruded starches. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9883–9890 (2007).
36. Muir, J. G., Birkett, A., Brown, I., Jones, G., and O’Dea, K. Food processing and maize variety affects amounts of starch escaping digestion in the small intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, 82–89 (1995).
37. Htoon, A., Shrestha, A. K., Flanagan, B. M., Lopez-Rubio, A., Bird, A. R., Gilbert, E. P., and Gidley, M. J. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility. *Carbohydr. Polym.*, **75**, 236–245 (2009).
38. Akiyama, H., Sakata, K., Spiegelhalter, F., Furui, S., Nakashima, A., Kitta, K., and Teshima, R. Interlaboratory validation of an event-specific real time polymerase chain reaction detection method for genetically modified DAS59132 maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **51**, 65–70 (2010).
39. Atkins, S. D., and Clark, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.*, **45**, 3–15 (2004).
40. Palapala, V. A., Aimi, T., Inatomi, S., and Morinaga, T. ITS-PCR-RFLP method for distinguishing commercial cultivars of edible mushroom, *Flammulina velutipes*. *J. Food Sci.*, **67**, 2486–2490 (2002).
41. Epis, S., Matinato, C., Gentili, G., Varotto, F., Bandi, C., and Sassera, D. Molecular detection of poisonous mushrooms in different matrices. *Mycologia*, **102**, 747–754 (2010).
42. Kirchmair, M., Morandell, S., Stolz, D., and Poder, R. Phylogeny of the genus

- Omphalotus* based on nuclear ribosomal DNA-sequences. *Mycologia*, **96**, 1253–1260 (2004).
43. Hibbett, D. S., Hansen, K., and Donoghue, M. J. Phylogeny and biogeography of *Lentinula* inferred from an expanded rDNA dataset. *Mycol. Res.*, **102**, 1041–1049 (1998).
 44. Ronald, H., Petersen, R. H., and Hughes, K. W. Mating systems in *Omphalotus* (*Paxillaceae*, *Agaricales*) *Plant Syst. Evol.*, **211**, 217–229 (1998).
 45. Van den Eede, G., Aarts, H., Buhk, H. J., Corthier, G., Flint, H. J., Hammes, W., Jacobsen, B., Midtvedt, T., van der Vossen, J., von Wright, A., Wackernagel, W., and Wilcks, A. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 1127–1156 (2004).
 46. Chen, Y., Wang, Y., Ge, Y., and Xu, B. Degradation of endogenous and exogenous genes of Roundup-Ready soybean during food processing. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 10239–10243 (2005).
 47. Chiter, A., Forbes, J. M., and Blair, G. E. DNA stability in plant tissues: implications for the possible transfer of genes from genetically modified food. *FEBS Lett.*, **481**, 164–168 (2000).
 48. Tilley, M. PCR amplification of wheat sequences from DNA extracted during milling and baking. *Cereal Chem.*, **81**, 44–47 (2004).
 49. Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P., and Hertel, C. The effect of processing parameters on DNA degradation in foods. *Eur. Food Res. Technol.*, **217**, 338–343 (2003).
 50. Olsen, B. A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *J. Chromatogr. A*, **913**, 113-122 (2001).
 51. Ujiie, A., Hasebe, H., Chiba, Y., and Yanagita, N. Simultaneous determination of 7 kinds of preservatives and saccharin in foods with HPLC, and identification with LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **48**, 163-169 (2007).
 52. Yang, D., and Chen, B. Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 3022-3027 (2009).
 53. Stroka, J., Dossi, N., and Anklam, E. Determination of the artificial sweetener sucralose by capillary electrophoresis. *Food Addit. Contam.*, **20**, 524-527 (2003).

54. Chung, W., Tso, S., and Sze, S. Separation of polar mushroom toxins by mixed-mode hydrophilic and ionic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.*, **45**, 104-111 (2007).
55. Tsunoda, K., Inoue, N., Aoyagi, Y., and Sugahara, T. Simultaneous analysis of ibotenic acid and muscimol in toxic mushroom, *Amanita muscaria*, and analytical survey on edible mushrooms. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **34**, 12-17 (1993).
56. Tsujikawa, K., Mohri, H., Kuwayama, K., Miyaguchi, H., Iwata, Y., Gohda, A., Fukushima, S., Inoue, H., and Kishi, T. Analysis of hallucinogenic constituents in *Amanita* mushrooms circulated in Japan. *Forensic Sci. Int.*, **164**, 172-178 (2006).
57. Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Iwata, Y., Inoue, H., Yoshida, T., and Kishi, T. Determination of muscimol and ibotenic acid in *Amanita* mushrooms by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **852**, 430-435 (2007).
58. 大木正行, 吉川進, 三浦則夫, 山浦由郎, キノコの呈色反応による毒キノコの理化学的鑑別法について, *食品衛生研究*, **36**, 95-98 (1986).
59. Bessard, J., Saviuc, P., Chane-Yene, Y., Monnet, S., and Bessard, G. Mass spectrometric determination of acromelic acid A from a new poisonous mushroom: *Clitocybe amoenolens*. *J. Chromatogr. A*, **1055**, 99-107 (2004).
60. 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長・監視安全課長通知「「食品中の食品添加物分析法」の改正について」, 平成21年3月2日, 食安基発第0302003号・食安監発第0302003号 (2009).