

独立行政法人農林水産消費安全技術センター

令和6年度

公開調査研究発表会

要旨集



日時 : 令和6年11月26日(火) 13:30 ~ 16:00

場所 : 農林水産消費安全技術センター 大会議室
さいたま市中央区新都心2-1 さいたま新都心合同庁舎検査棟7階

独立行政法人農林水産消費安全技術センター
令和6年度公開調査研究発表会
プログラム

日時：令和6年11月26日（火） 13:30～16:00
会場：独立行政法人農林水産消費安全技術センター 本部 大会議室
（さいたま市中央区新都心2-1さいたま新都心合同庁舎検査棟）

開会挨拶

理事長 木内 岳志

<発表（前半）>

- 1 硫黄を含む肥料のひ素分析における前処理方法の改良
肥飼料安全検査部 肥料鑑定課 専門調査官 佐久間 健太
13:35～13:55
- 2 除草剤の効果と処理後の散水による影響調査
農薬検査部 農薬有効性審査課 検査管理官 泉澤 努
13:55～14:15
- 3 飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査
肥飼料安全検査部 飼料鑑定第一課 調査官 山上 陽平
14:15～14:35

<休憩> 14:35～14:55

<発表（後半）>

- 4 元素分析による乾わかめの原料原産地判別法の開発
表示監視部 技術研究課 調査官 青木 彩果
14:55～15:15
- 5 DNA分析によるイカ類の種判別対象の拡大
神戸センター 技術研究課 主任調査官 足立 静香
15:15～15:35
- 6 ICP-MSによる葉菜類中のタリウム分析法の妥当性評価
神戸センター 有害物質等分析調査課 主任調査官 井伊 悠介
15:35～15:55

※ 1課題当たり発表時間15分、質疑応答5分

1. 硫黄を含む肥料のひ素分析における前処理方法の改良の検討

佐久間 健太

(独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

【はじめに】

FAMIC では肥料の分析法の改良、分析法の性能評価などの調査研究に取り組んでおり、今回は硫黄を含む肥料のひ素分析における前処理方法の改良について検討を行った。

肥料中のひ素の分析は、肥料等試験法¹⁾に記載されているとおり、分析試料を硝酸-硫酸-過塩素酸で分解する前処理方法がとられているが、硫黄を含む肥料に対して同法を適用すると、硫黄が加熱によって液状化し、分解容器内に固形分が無くなるため突沸しやすくなる。硫黄自体は酸では分解されないため、分解操作終了後も硫黄が単体のまま分解容器内に残留することから、「抽出が適切に行われているかどうか判断に迷う」「分析操作が困難である」といった意見があがっていた。そこで、肥料のひ素分析における前処理方法と同等の抽出性能を有していると考えられる「強熱による乾式灰化-塩酸煮沸²⁾」による前処理を行う分析法²⁾を参考にし、分解・抽出した溶液について水素化物発生原子吸光法への適用を検討した。

【方法】

今回検討を行う分析方法(図1)と肥料等試験法のひ素分析法(図2)を用いて分析を実施し、回収率を比較した結果、同等の抽出能力があると考えられる結果が得られたため、肥料等試験法に従い分析法の妥当性確認を行った。

試料：硫黄を含む肥料5点(0.5mmの網篩を全通したもの)、ゼオライト及びベントナイト(0.5mmの網篩を全通したもの)を各1点使用した。

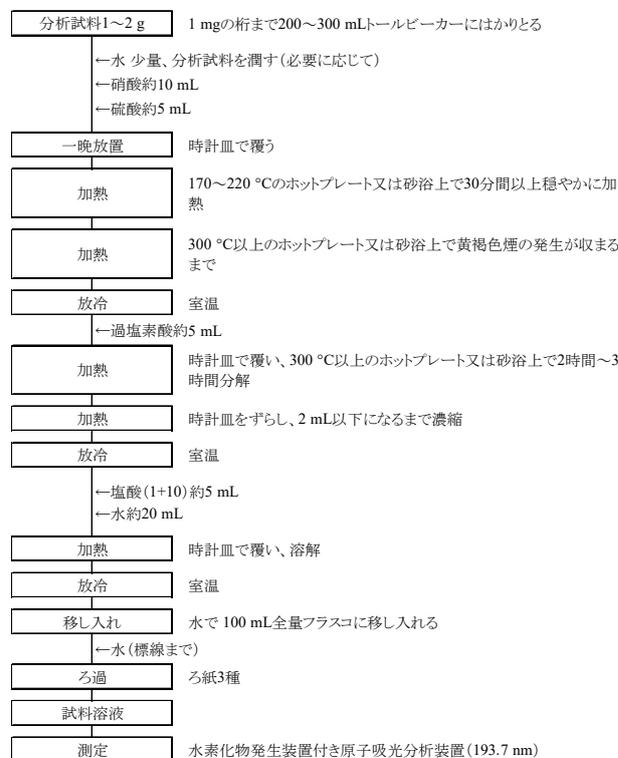


図1 肥料等試験法のひ素分析法のフローシート

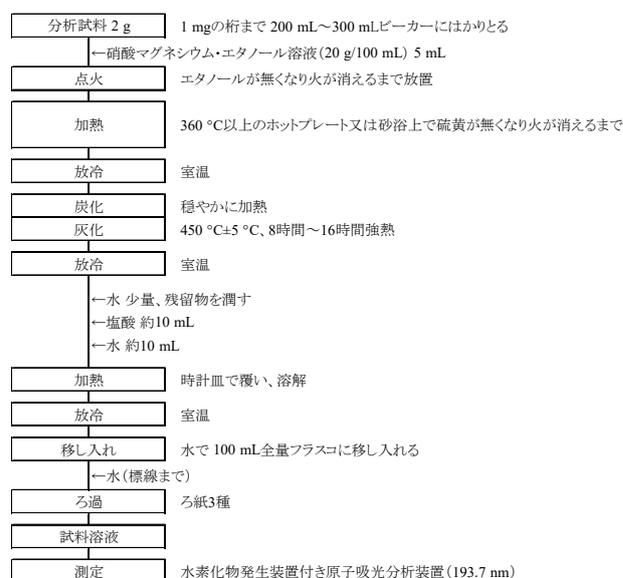


図2 今回検討したひ素分析法のフローシート

【結果及び考察】

真度：肥料として流通している硫黄を用いて添加回収試験を実施した。添加濃度 5~25 mg/kg に

対して回収率は 98.9～101.6 %であり、肥料等試験法附属書 A に示されている真度の目標範囲内であった。

中間精度及び併行精度：肥料として流通している硫黄に対して 5 mg/kg 及び 25 mg/kg になるように標準液を添加した試料を用い、2 点併行で日を変えて 5 日間試験を実施した。測定結果の平均値は 4.9 mg/kg 及び 24.8 mg/kg、併行相対標準偏差は 1.5 % 及び 1.4 %、中間相対標準偏差は 1.4 % 及び 1.9 % であった。この濃度におけるいずれの相対標準偏差も肥料等試験法附属書 A に示されている併行精度（併行相対標準偏差）及び中間精度（中間

相対標準偏差）の目安範囲内であった。

本法の定量下限及び検出下限は 0.1 mg/kg 及び 0.03 mg/kg と推定され十分な性能を有していた。

以上の結果から、本法は硫黄資材中のひ素を測定するために、十分な性能を有していることが確認された。

【参考文献】

- 1) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター．肥料等試験法．(2023)．
- 2) 厚生労働省．第 9 版食品添加物公定書．

2. 除草剤の効果と処理後の散水による影響調査

泉澤努、村山和晃、藤田智紀、工藤幹子、笹沼伸一郎

(独) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

【はじめに】

近年、地球温暖化の影響等により特に夏季において突然の降雨が発生することが多くなっている。除草剤を処理した後に降雨があれば、薬液の流失によって除草効果に影響することが考えられるが、処理後の降雨までの時間や降雨量の違いが、効果にどの程度の影響を及ぼすかに関する知見は得られていない。このため、除草剤の効果と降雨の関係に関する情報を得ることを目的として、散布後の降雨が、除草効果にどのように影響するのか調査を行った。

【方法】

供試植物：除草剤を処理する植物として葉の形状等が異なる以下の2種を選定した。

試験Ⅰ：*Crotalaria juncea* (クロタラリア)

試験Ⅱ：*Avena sativa* (エンバク)

供試薬剤：雑草の区別無く枯死させる、いわゆる非選択性除草剤の中から、有効成分の異なる4種類を選定した。※ () 内は略号。

グルホシネート液剤 (B)

グリホサートカリウム塩液剤 (T)

グリホサートイソプロピルアミン塩液剤 (S)

アシュラム液剤 (A)

薬剤処理：供試薬剤の適用作物名「樹木等」、適用雑草名「一年生雑草」、使用方法「雑草茎葉散布」の中で最も高濃度となる希釈倍数で処理した。

試験区の構成：3棟のビニールハウスを使用し、1ハウスを1反復とした。処理区の面積は1区0.25 m² (0.5 m×0.5 m) とした。試験区は、処理区(除草剤処理から5分経過後に1時間散水)、対照区(除草剤処理のみ)、無処理区(除草剤処理及び散水を行わない)の3区とした。

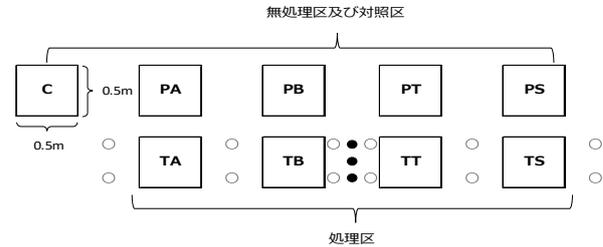


図1 試験区の構成

散水処理：レインカーテン用ノズル (TRCN-ST、(株) テクノコア製) 3個を10 cm 間隔で高さ2 m に設置し除草剤処理5分後1時間散水処理した。

散水量の計測：試験区内に雨量計測升 (内寸1辺68 mm) を12箇所置き、散水後30分に各所に貯まった水量を用いて以下の計算式により1時間当たりの散水量に換算し、さらに12箇所の散水量の平均を散水量とした。

$$\text{散水量 (mm/h)} = \frac{\text{容器の水量 (mL)} \times 1000 \times 60}{\text{散水時間 (分)} / \text{容器の底面積 (mm}^2\text{)}}$$

残草量による除草効果の確認：散水処理約2週間後に各処理区より供試植物を地際で刈り取り、本数及び生質量を測定し、さらに80℃で3~5日間乾燥させた後、乾燥質量を測定した。効果は供試薬剤毎に処理区と対照区の残草量を比較して確認した。残草量は無処理に対する処理区、又は対照区の生質量又は乾燥質量の比により以下の計算式で求めた。

$$\text{残草量 (質量)} = \frac{\text{処理区又は対照区の質量}}{\text{無処理区の質量}} \times 100$$

遠視調査による除草効果の確認：試験区毎に肉眼観察による外観を調査し以下の4段階で評価した。

- 健全：全て健全に生育している
- 一部褐変：一部の株が褐変している
- 一部枯死：一部の株が枯死している
- 枯死：全て枯死している

統計解析：試験Ⅰは生質量及び乾燥質量ともに、Shapiro-Wilk 検定を有意水準 5%で行い、全て正規分布しないとはいえなかった。そのため、Levene 検定を有意水準 5%で行い、等分散していないことから、Welch の一元配置分散分析を行った結果、有意水準 5%で有意差があった。群間の差は Games-Howell 検定を有意水準 5%で行った。試験Ⅱは生質量及び乾燥質量ともに、Shapiro-Wilk 検定を行い、有意水準 5%で全て正規分布しないとはいえなかった。そのため、Levene 検定を有意水準 5%で行い、等分散していないとはいえないことから Welch の一元配置分散分析を有意水準 5%で行った結果、有意差があった。群間の差は Tukey 検定を有意水準 5%で行った。

【結果及び考察】

散水量：反復毎の散水量の最小値は 20.4、最大値は 32.5 mm/h であった。

散水処理の影響：供試植物の肉眼観察結果より、枯死植物の残渣が残存していたため、生質量の方が乾燥質量よりも供試植物の枯死状況を反映していると判断し、生質量の結果から散水処理の影響を評価した。試験Ⅰ及びⅡについて、供試薬剤毎に処理区と対照区の生質量を比較したところ、処理区と対照区に有意な差は認められなかった。試験Ⅰの対照区の A 剤の残草量(生質量、以下同じ)は 38.4%と高い値であった。これは A 剤の効果が遅効的であり、処理後約 2 週間の試験期間では十分な効果を確認できなかった可能性が考えられる。一方、対照区の B 剤、S 剤及び T 剤の残草量は 3.2%、3.4%、8.3%と十分な効果が認められた。試験Ⅱについても同様の傾向であった。

また、達観調査で処理区と対照区を比較したところ、A 剤と T 剤では判然としなかったが、B 剤

と S 剤では処理区は「枯死」、対照区は「一部枯死」となり、処理区と対照区に差が認められ、試験Ⅱについても傾向は同じであった。これは、A 剤と T 剤は効果の発現がより遅効的なため、除草剤処理後から調査日までの期間が短く、処理区と対照区に十分な差が現れる前だった可能性が考えられた。

以上より、除草剤処理後の降雨までの時間や降雨が効果に与える影響について、統計解析から有意差は確認できなかったが、達観調査の結果より除草剤処理 5 分後の散水は除草効果にフレを生じさせた。

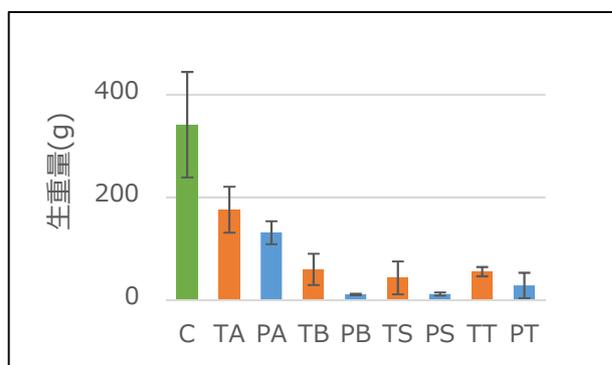


図 2 試験Ⅰの処理区別生重量

【参考文献】

- 1) 農薬の登録申請において提出すべき資料,平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知
- 2) 「農薬(製剤)の薬効及び薬害の試験方法等に関する審査ガイダンス」について,令和 4 年 3 月 22 日付け 3 消安第 6700 号農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知

3. 飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査

山上 陽平^{1,4}、浅尾 美由起²、高橋 亜紀子¹、橋本 仁康¹、新井 詠子¹、
奥山 紀子¹、有原 若奈¹、増井 亮太³、嶋崎 洋子¹

¹ (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部、² 同 企画調整部、³ 同 神戸センター
⁴ (国研) 農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門

【はじめに】

薬剤耐性菌の出現と拡散は世界的な問題となっている。薬剤耐性菌や薬剤耐性遺伝子は人や動物、食品、環境の間で伝播する可能性がある。薬剤耐性対策には、各分野が一体となって取り組むワンヘルス・アプローチの考えのもと進めることが重要である¹⁾。動物分野のうち OIE²⁾や Codex Alimentarius³⁾のガイドラインでは、家畜や飼料における薬剤耐性菌の調査が求められている。日本では動物分野での薬剤耐性菌の全国的なモニタリングである JVARM を 1999 年から実施しており、家畜における薬剤耐性菌を調査している¹⁾。

飼料には、動物や植物由来の原料や、対象家畜の養分要求量を満たすように複数の原料や飼料添加物を混合した配合飼料等がある。多くの飼料は水分活性が低いが、腸球菌や大腸菌は飼料中に生残する。先行研究では、米国で採取した飼料から腸球菌や大腸菌が分離され、それらの菌が薬剤耐性を示した報告がある⁴⁾。一方で、日本では全国規模で飼料中の薬剤耐性菌を調査した事例はない。

予備調査として国内飼料における腸球菌と大腸菌の分離率を調べた結果、腸球菌が比較的多く分離された。そこで、本調査⁵⁾では国内の飼料製造事業場から飼料を採取し、腸球菌を分離し、その薬剤耐性を調べた。加えて、飼料が家畜の薬剤耐性腸球菌の分布に影響している可能性を調べるため、本調査で得られた飼料と JVARM の調査¹⁾で得られた家畜(牛、豚、鶏)からそれぞれ分離された腸球菌の耐性率を比較した。

【方法】

試料：2018 年から 2020 年の間に全国の飼料製造事業場から配合飼料(鶏用、豚用、牛用) 57 試料、

飼料原料(大豆油かす、魚粉、チキンミール、原料混合肉骨粉) 275 試料を採取した。

分離：試料 25 g を AC 液体培地に入れて培養し、1 白金耳を ECS 寒天培地に塗布して培養した。腸球菌の典型性状である周囲が黒褐色又は黒色帯で中心が半透明の集落を釣菌し、BHI 寒天培地に塗布して培養した。

同定：分離後、グラム染色と高塩化ナトリウム耐性、高温耐性、運動性、色素産生性、API rapid ID 32 STREP kit (bioMérieux, Lyon, France)を用いた性状試験を行った。加えて、*Enterococcus faecalis*、*E. faecium*、*E. casseliflavus*、*E. durans*、*E. gallinarum*、*E. hirae* の種特異的なプライマーを用いて定性 PCR を行った。得られた結果から総合的に菌種を同定した。

薬剤感受性試験：1 試料につき 1 菌種の菌株を選択し、134 株を薬剤感受性試験に供した。2 倍系列で 10~12 段階に希釈した 10 種類の各薬剤が添加されたフローズンプレート‘栄研’を用いた。試験は微量液体希釈法で行った。試験⁶⁾と判定⁷⁾は CLSI の方法に従った。

統計処理：腸球菌の分離率と耐性率の比較は、フィッシャーの正確確率検定(両側検定)を用いて解析し、有意水準は 5%未満とした。

【結果及び考察】

分布：北海道、東北、関東、中部、近畿、中国、四国、九州の各地方で採取した試料の腸球菌の分離率は、69.0%、62.5%、55.0%、69.4%、45.0%、51.4%、70.6%、51.2%、全国平均で約 58%であり、地域別の分離率に有意差はなかった($p > 0.05$)。配合飼料と飼料原料の腸球菌の分離率は、82.5%、53.5%であり、配合飼料の方が高かった

($p < 0.05$)。これは配合飼料には様々な原料が混合されていることが要因と考えられた。また、飼料原料のうち、腸球菌の分離率は植物性飼料原料（大豆油かす）の方が動物性飼料原料（魚粉、チキンミール、原料混合肉骨粉）より高かった ($p < 0.05$)。

薬剤感受性：薬剤感受性試験に供した菌株の各薬剤に対する全体の耐性率を表1に示した。飼料と家畜¹⁾から分離された腸球菌の各薬剤に対する耐性率の比較では、10薬剤中6薬剤で飼料の方が有意に低く、薬剤耐性パターンは家畜とは異なっていた。この結果から、飼料は家畜の薬剤耐性腸球菌の分布に対して潜在的な影響を与える可能性が低いと示唆された。特に人と動物の医療にとって極めて重要なバンコマイシンとシプロフロキサシンについて、飼料中のバンコマイシン耐性率は0% (0株)、シプロフロキサシン耐性率は0.8% (1株)であり、極めて低かった。また、腸球菌はカナマイシンに対して自然耐性がある。今回のカナマイシンのブレイクポイントは128 µg/mLと低かったため、カナマイシンに対する耐性率が比較的高くなったと考えられた。

以上より、国内の家畜が食する飼料における薬剤耐性菌の分布に関する情報が得られた。飼料を対象とした調査は世界的に少なく、今後の薬剤耐性対策への貢献が期待される。今後、飼料と家畜由来の耐性菌の関係性等を明らかにするには遺伝

子レベルの解析が必要である。

【参考文献】

- 1) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議. 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン2016-2020. (2016).
- 2) OIE. OIE standards, guidelines, and resolutions on antimicrobial resistance and the use of antimicrobial agents. (2020).
- 3) CODEX Alimentarius. Guidelines on integrated monitoring and surveillance of foodborne antimicrobial resistance. (2021).
- 4) Ge B, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of indicator organisms *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. animal food, 2005–2011. *Microorganisms.*, 8, 1048 (2020).
- 5) Yamagami Y, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from animal feed in Japan. *Front. Vet. Sci.*, 10 (2024).
- 6) CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically; approved standard M07. 11th ed. (2018).
- 7) CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100. 31st ed. (2021).

表1. 飼料と家畜から分離された腸球菌 (*Enterococcus* spp.) の薬剤耐性率

薬剤	ブレイクポイント (µg/mL)	飼料の 分離株数	飼料の 耐性株数	耐性率 (%)	
				飼料	家畜 ^c
アンピシリン	16 ^a	134	0	0.0	0.1
バンコマイシン	32 ^a	134	0	0.0	0.0
テトラサイクリン	16 ^a	134	8	6.0	46.9 *
エリスロマイシン	8 ^a	134	33	24.6	21.2
タイロシン	64 ^b	134	2	1.5	20.5 *
リンコマイシン	128 ^b	134	3	2.2	26.8 *
ゲンタマイシン	32 ^b	134	1	0.8	11.3 *
カナマイシン	128 ^b	134	35	26.1	31.6
クロラムフェニコール	32 ^a	134	0	0.0	8.3 *
シプロフロキサシン	4 ^a	134	1	0.8	7.8 *

^a CLSIが設定したブレイクポイント⁷⁾

^b JVARMで得られた微生物学的ブレイクポイント (二峰性を示すMIC分布の中間点)¹⁾

^c $n = 861$ ¹⁾. * $p < 0.05$

4. 元素分析による乾わかめの原料原産地判別法の開発

青木 彩果、渡邊 彩乃、上村 道尚、田中 真澄

(独) 農林水産消費安全技術センター表示監視部

【はじめに】

乾わかめの輸入量は 8,140 トン¹⁾であり、輸入先は中国及び韓国である。一方、国産原料を使用した乾わかめについての統計はないが、養殖わかめ類の国内収穫量は 46,929 トン²⁾であり、その全てを乾わかめに換算したとしても 1,877 トン (歩留まり 4 %として換算³⁾) にしかならず、乾わかめの流通量の大半を輸入品が占めていると考えられる。外国産原料を使用した乾わかめは、国産原料を使用した乾わかめよりも安価であり、過去に外国産原料を使用した乾わかめの原料原産地を国産とした不適正表示の事例が発生していることから、乾わかめの原料原産地を判別する科学的手法が求められている。

近年では、生育環境により産地間で差異が見られる元素を指標とした産地判別の検討が行われ、わかめ加工品でも報告されている^{4,5)}。FAMIC⁶⁾でも、同様に元素分析による湯通し塩蔵わかめの国産 (三陸産及び鳴門産) と外国産 (中国産及び韓国産) の判別法について報告している⁶⁾。乾わかめの中間原料として湯通し塩蔵わかめが使用されていることから、乾わかめについても同様に判別可能であると推測された。そこで、本研究では、元素分析による乾わかめの原料原産地判別法を検討した。

【方法】

供試試料 : 試料は全て日本わかめ協会の協力を得て入手した。国産原料を使用した試料 (以下「国産試料」という。) として、三陸産 58 点、鳴門・瀬戸内産 22 点、九州産 13 点、東海産 6 点、北海道産 19 点の合計 118 点を、外国産原料を使用した試料 (以下「外国産試料」という。) として、中国産 57 点、韓国産 30 点の合計 87 点を用いた。
脱塩・均質化 : 試料約 2 g を樹脂製ビーカーに採

取し、水戻し後に超純水にて 2 回洗浄を行った。その後、105 °C で 16 時間以上乾燥した。乾燥した試料を樹脂製袋に入れて樹脂製ハンマーで 2 mm 以下になるまで粉碎し、均質化試料とした。

酸分解 : 均質化試料を樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、61 %硝酸及び 60 %過塩素酸を用いて分解した。残った乾固物を 1 %硝酸で溶解して 50 mL に定容したものを元素分析用試料溶液とした。

元素濃度測定 : ICP-MS 及び ICP-OES を用いて、元素分析用試料溶液中の 13 元素の濃度を測定した。

判別モデルの構築 : 測定した元素分析用試料溶液中の元素濃度及びその常用対数の値を用いて統計解析を実施し、線形判別分析 (LDA)、二次判別分析 (QDA) 及びサポートベクターマシン (SVM) 等の解析方法を組み合わせて構築した判別モデルの中から、的中率が高く、最適な判別モデルを選択した。

今回の解析では、元素濃度の常用対数の値を用い、SVM によって解析された判別モデルを選択した。また、構築した判別モデルの未知試料に対する的中率は、判別モデル構築用試料を用いた Leave-one-out cross validation (LOOCV) により確認した。

【結果】

判別モデルの構築 : SVM による統計解析の結果、5 元素の元素濃度から換算した指標による国産/外国産判別モデルが得られた。この判別モデルを元に LOOCV により得られた判別得点の度数分布を下図に示す。判別得点の値が正の場合を国産と判別する時、判別モデル構築用試料 205 点のうち国産試料の 100 % (118/118)、外国産試料の 100 % (87/87) を正しく判別した。

以上の結果から、元素分析による乾わかめの原料原産地判別法を確立できた。

【参考文献】

- 1) 財務省. 貿易統計. (令和 4 年).
- 2) 農林水産省. 漁業・養殖業生産統計. (令和 4 年).
- 3) 大房剛. 日本での最近の食用海藻業界の動向と問題点. *Algal Resources*, **4**, 15-21 (2011).
- 4) 絵面ら. わかめの加工による微量元素組成変

動と産地判別の可能性. *食科工誌*, **62**(10), 484-491 (2015).

- 5) 絵面ら. 加工による影響を受けにくい微量元素組成による原藻わかめ, 湯通し塩蔵わかめおよび乾わかめの産地判別. *食科工誌*, **63**(9), 427-432 (2016).
- 6) 川井ら. 元素分析による湯通し塩蔵わかめの原料原産地判別法の開発. *食品関係等調査研究報告*, **47**, 1-7 (2024).

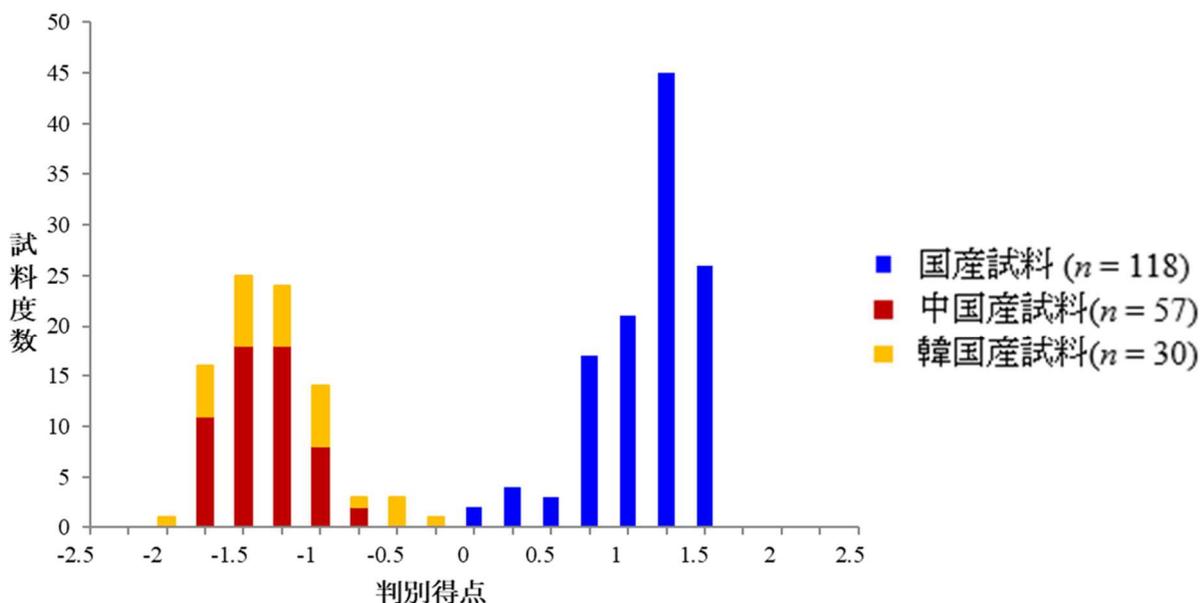


図 元素分析による乾わかめの原料原産地判別の判別得点の度数分布

5. DNA 分析によるイカ類の種判別対象の拡大

足立 静香¹、岡田 めぐみ¹、豊田 正俊²、高嶋 康晴³

¹ (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター、² 同 本部横浜事務所、³ 同 表示監視部

【はじめに】

イカ類は、世界に 500 種類程存在し、日本近海に 140 種類程が生息していると言われている¹。国産のイカ類の代表的な種であるスルメイカは、近年漁獲量が激減し、代替りのイカ類（南太平洋及び大西洋海域から輸入されるアメリカオオアカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ等）の利用が拡大してきた²。ミトコンドリア DNA の cytochrome c oxidase subunit I（以下「COI 遺伝子」という。）領域の塩基配列情報は、多くの生物の種判別に利用されており、本領域を用いたイカ類の PCR-RFLP（制限酵素断片長多型法；Restriction Fragment Length Polymorphism）法による種判別^{3,4}を基に、令和元年にスルメイカと他のイカ類との判別法を開発した⁵。

イカ類は、生鮮食品、加工食品ともに流通量が多く、スルメイカ以外にも多様なイカ類が利用されている。国産のイカ類では、スルメイカ以外にコウイカ、ヤリイカ、ケンサキイカ、アオリイカ、アカイカ及びソデイカ（以下「国産イカ類 7 種」）等が漁獲されている。一方、輸入されるイカ類は、上述したアメリカオオアカイカ等のスルメイカ類の他にも、北米沿岸、南アメリカ沖、ヨーロッパ海域、東南アジア海域等に生息するコウイカ類、ヤリイカ類等があり、日本近海で漁獲されるイカ類と異なる種類のイカ類が輸入されている²。

食品に関する表示は、食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）において、一般用生鮮食品にあつては「名称」及び「原産地」を、一般用加工食品にあつては「名称」、「原材料名」等の表示の他、一番多く使用される原材料には「原産地」の表示が義務化されている。スルメイカの判別法では対象種が「スルメイカ」に限られることから、国産イカ類 7 種に判別対象を拡大し、輸入されるイカ

類を含めた PCR-RFLP 法によるスクリーニング的な種判別と、DNA シークエンス法を組合せて種判別する判別法の確立を検討した。なお、東南アジアを中心に生息しているイカ類は、由来の明確な試料の入手が困難であったため、検討の対象としていない。

【方法】

供試試料：種判別の検討対象として国産イカ類 7 種に加えて 9 種（アメリカオオアカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカほか 6 種）のイカ類を収集した（合計 16 種）。

国内市場の流通実態調査には、生鮮食品及び加工食品 204 点を供した。加工食品の適用範囲の確認には市販品 110 商品（惣菜、干物、珍味等）を供した。

試料は、DNA シークエンス法で COI 遺伝子領域内の塩基配列を確認し、国際塩基配列データベース（International Nucleotide Sequence Database；以下「INSDB」という。）と照合し、種を推定した。**プライマーの設計：**解析した COI 遺伝子領域内の塩基配列情報及び INSDB の登録データから、イカ類 16 種に加え、市場流通実態調査で確認されたイカ類を識別可能な制限酵素を選定し、加工食品の判別に適した 400 bp 程度の増幅長で PCR-RFLP による判別が可能となる位置にプライマーを設計した。

DNA 抽出及び PCR-RFLP：DNA 抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) により行い、PCR には KOD FX Neo (東洋紡) 又は TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (タカラバイオ) を用いた。PCR 後の制限酵素処理は、選定した 4 種の制限酵素 AclI、HpyCH₄V、MspI 及び TaqI をそれぞれ単独で処理し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した。

【結果及び考察】

市場流通しているイカ類の実態調査として行った生鮮食品及び加工食品の DNA シークエンス解析の結果、204 点のうちイカ類 16 種が 116 点、16 種以外のイカ類が 88 点であった。設計したプライマーによる PCR では、加工食品の 2 商品を除き目的長 414 bp の PCR 産物を検出した。

PCR 産物が得られた試料について、4 種の制限酵素による PCR-RFLP の遺伝子型を確認した。判別対象である国産の主要なイカ類 7 種を効率的に判別できるよう遺伝子型のパターンを整理した。その結果、イカ類 16 種は 20 パターンの遺伝子型となった（図、表）。PCR-RFLP の結果が「判別対象外の型」であった場合はその時点では種を確定できないため、DNA シークエンス法により種を推定する。

イカ類 16 種以外のイカ類となった市販品 88 点は、17 パターンの遺伝子型であった。このうち 2 パターンの遺伝子型は、イカ類 16 種で確認された遺伝子型と同一であったが、いずれも「判別対象以外の型」であり、DNA シークエンス法により種を推定する手順となるため、判別への影響はない。一方、1 点がアカイカの遺伝子型と一致し、誤判別となった。

加工食品の適用確認では、110 商品を分析したところ、2 商品が PCR 増幅不良であったが、108 商品は PCR-RFLP による遺伝子型を確認し、幅広

い加工食品に適用が可能であることを確認した。

以上のことから、生鮮いカの種名表示やいか加工食品の原材料名に表示されたイカの種名の真正性の確認について、PCR-RFLP 法による判別対象をスルメイカを含む国産イカ類 7 種に拡大することが可能となった。イカ類は種によって分布域や漁獲国が異なる¹⁾ことから、本法により原料原産地表示の真正性の確認にも活用が可能となった。

【参考文献】

- 1) 全国いか加工業協同組合. 新編 世界イカ類図鑑 ウェブ版.
<http://www.zen-ika.com/zukan/index.html>
(2024.11.5)
- 2) 若林ら. 塩基配列分析に基づくスルメイカ不漁期のイカ加工製品原料種判別. 日本 DNA 多型学会第 26 回学術集会講演要旨, p.74 (2017).
- 3) 若林ら. mtDNA COI 領域を用いたイカ加工製品の原料種判別. DNA 多型, **17**, 144-146 (2009).
- 4) 竹元. ミトコンドリア DNA 解析によるイカ類の種判別法の開発に関する研究. 東京大学学位論文. 128769 (2012).
- 5) 足立ら. DNA 分析によるスルメイカ判別法の開発及びその加工品における原料種判別の適用検討. 食品関係等調査研究報告, **44**, 26-34 (2020).

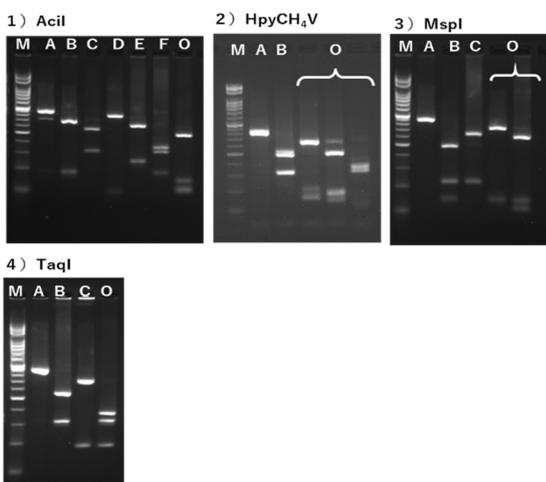


図 PCR-RFLP の電気泳動写真
A～F、O：各制限酵素における遺伝子型

表 イカ類 16 種の遺伝子型

種名	PCR-RFLPの結果				PCR-RFLPによる 遺伝子型
	AciI	HpyCH ₄ V	MspI	TaqI	
国産イカ類7種					
コウイカ	F	B	C	C	コウイカ型
ヤリイカ	E	A	C	B	ヤリイカ型
ケンサキイカ	B	A	A	C	ケンサキイカ型
アオリイカ	C	B	A	C	アオリイカ型①
	D	B	B	C	アオリイカ型②
	A	B	B	C	アオリイカ型②'
スルメイカ	A	A	B	A	スルメイカ型
アカイカ	B	A	A	A	アカイカ型
ソデイカ	A	A	A	A	判別対象以外の型
ヨーロッパコウイカ	C	O	O	C	
種判別可能な9種					
ヨーロッパコウイカ	B	A	O	O	
パタゴニアヤリイカ	O	O	A	A	
カリフォルニアヤリイカ	O	A	A	A	
カリフォルニアヤリイカ	B	B	O	B	
アフリカヤリイカ	B	B	O	B	
アメリカオアカイカ	A	B	A	C	判別対象以外の型
アメリカオアカイカ	B	B	C	A	
アルゼンチンマツイカ	A	A	O	A	
カナダマツイカ	B	B	C	A	
カナダマツイカ	C	A	O	A	
オーストラリアスルメイカ	A	A	C	A	
オーストラリアスルメイカ	D	A	C	A	
ニュージーランドスルメイカ	A	A	C	A	

6. ICP-MSによる葉菜類中のタリウム分析法の妥当性評価

井伊 悠介、立石 洋暢

(独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター

【はじめに】

タリウムは穀物、葉菜類、菜種等に含まれ、長期的な大量摂取により脱毛等が生じることが報告されている。農林水産省では、国産の農産物における低減対策の必要性を検討するため、コメ及び葉菜類中のタリウムの含有実態を把握するための調査を実施することとしている。

そこでこの調査に資するため、葉菜類中のタリウム分析法について単一試験室による妥当性の評価を行った。

【方法】

1 分析操作

図1のとおり。

1-1 試料の調製

コマツナを用いた。土が付着している場合があるため、水道水と超純水で洗浄し、水を拭き取った。ミキサーでペースト状にし、乾燥（100℃、18時間）した。その後ミルで粉末状にし、分析に供した。乾燥処理により試料中の固形分を測定した。

1-2 試料溶液の調製

ビーカーに採取した粉末状の試料 0.5 g に、61%硝酸 10mL を加え 120℃まで加熱した。褐色のガスの発生が収まった後に 60%過塩素酸 2.5 mL を加え 230℃まで加熱し、試料の分解を続け、TI を抽出した。加熱を続け酸を除去し、ビーカーに 1%硝酸を加え洗いこみ、内標準（白金、Pt）を含んだ 50 mL の試料溶液を調製した。試料をビーカーに採取せずに以降の操作を行う空試験も実施した。

1-3 検量線用標準液の調製

内標準を含む 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 および 100 µg/L の標準液を調製した。

1-4 機器測定及び定量

ICP-MS で測定し、試料溶液中の TI の濃度を算出し、この結果と試料の固形分より試料中濃度（乾燥前の濃度。添加濃度も含めて以下同じ）を求めた。

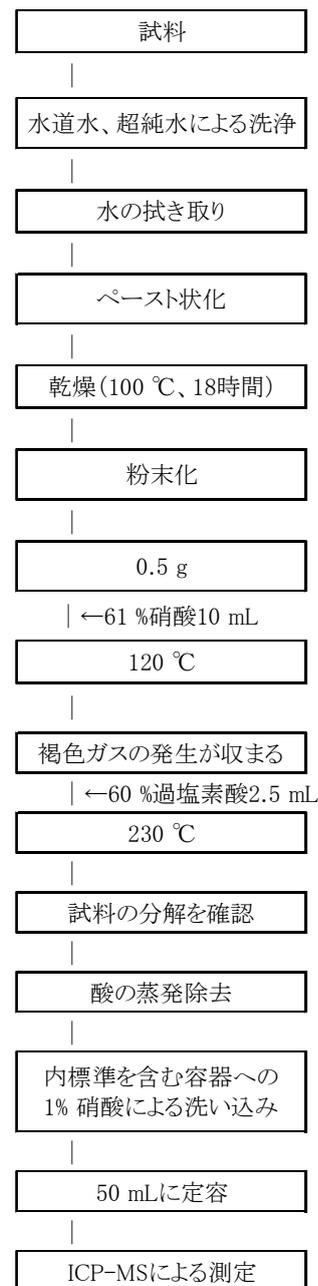


図1 分析操作

2 妥当性評価

検出下限及び定量下限、検量線の直線性、ならびに添加回収試験による真度及び精度について確認した。

2-1 検出下限及び定量下限の算出

10点併行の空試験の試料溶液を測定し、その結果の標準偏差の3倍を検出下限²⁾、14.1倍を定量下限³⁾とした。

2-2 検量線の直線性

検量線の範囲を0.02～5 µg/L (試料中濃度0.1～25 µg/kg) と2～100 µg/L (試料中濃度10～500 µg/kg) に分けて3回繰り返して測定し、直線性を確認した。

2-3 真度及び精度の確認

試料溶液の調製でビーカーに採取した試料に添加濃度が0 µg/kg (無添加)、10 µg/kg および200 µg/kg となるように標準液を加えた添加回収試験により真度及び精度の確認を行った。2点併行の試験を、試験者または試験日を変えて5回繰り返した。真度として平均の添加回収率を求め、精度として併行精度 (RSD_r)、室内精度 (RSD_i)、HorRat(r)等を算出した。

【結果及び考察】

1 検出下限及び定量下限

検出下限は0.006 µg/kg、定量下限は0.027 µg/kgであった。

2 直線性

0.02～5 µg/L と2～100 µg/L の両範囲で相関係数はともに1.000であり、直線性が確認された。

3 真度

平均の回収率は、添加濃度が10 µg/kg と200 µg/kg の順に、89.8%および103.0%であった(表1)。「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」⁴⁾(以下、ガイドライン)では濃度が0.01～0.1 mg/kg (10～100 µg/kg) の場合、回収率を60～115%、0.1～1 mg/kg (100～1000 µg/kg) の場合、回収率を80～110%としており、両添加濃度の回収率はともに範囲内であった。

表1 添加回収試験により算出した真度

添加濃度 µg/kg	回収率 %					平均値
	試験1	試験2	試験3	試験4	試験5	
10	87.1	86.6	91.8	93.3	89.2	89.8
	90.4	84.7	90.6	93.0	90.7	
200	104.6	103.1	102.8	102.6	101.7	103.0
	102.7	104.5	103.0	103.5	101.7	

4 精度

添加濃度が10 µg/kg と200 µg/kg の順に、RSD_rは1.5%および0.8%、RSD_iは3.3%および1.0%であった。ガイドラインでは濃度が0.001～1 mg/kg (1～1000 µg/kg) の場合、RSD_rを15%以下、としており、両添加濃度のRSD_rおよびRSD_iはともに範囲内であった。

添加濃度が10 µg/kg と200 µg/kg の順に、HorRat(r)は0.07および0.04であった。ガイドラインではHorRat(r)は0.3～1.3としているが、0.3未満だった要因は熟練した試験者グループで短期間に実施したためと考えられた。

表2 添加回収試験により算出した精度

添加濃度 µg/kg	S _r µg/kg	S _i µg/kg	RSD _r %	RSD _i %	HorRat(r)	HorRat(i)
10	0.14	0.30	1.5	3.3	0.07	0.15
200	1.6	2.0	0.79	1.0	0.04	0.05

S_r 併行標準偏差、S_i 室内標準偏差、RSD_r 併行精度、RSD_i 室内精度

【参考文献】

- 1) 農林水産省. 令和6年度食品の安全性に関する有害化学物質及び有害微生物のサーベイランス・モニタリング年次計画.(令和6年4月26日).
- 2) JIS K 0133:2007 高周波プラズマ質量分析通則 3.11 方法検出下限
- 3) JIS K 0133:2007 高周波プラズマ質量分析通則 3.12 定量下限
- 4) 農林水産省. 分析法の妥当性確認に関するガイドライン.(令和元年10月)