

平成 1 1 年度厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業 実績報告書

「ダイオキシン類等の試験・分析の
信頼性確保に関する調査研究」

(1 1 1 4 0 1 0 1)

主任研究者

財団法人食品薬品安全センター 柳澤健一郎

分担研究者

星薬科大学 薬品分析化学教室 中澤 裕之

財団法人食品薬品安全センター 小野 宏

平成11年度厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業 実績報告書

「ダイオキシン類等の試験・分析の 信頼性確保に関する調査研究」

(11140101)

主任研究者

財団法人食品薬品安全センター 柳澤健一郎

分担研究者

星薬科大学 薬品分析化学教室 中澤 裕之

財団法人食品薬品安全センター 小野 宏

生活安全総合研究
「ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究」

報 告 書

目 次

平成11年度 厚生科学研究費補助金研究報告書（様式A(4)）

平成11年度 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

平成11年度 厚生科学研究費補助金総括研究報告書

平成11年度 厚生科学研究費補助金分担研究報告書

I. ダイオキシン類の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究

- (1) 食品中のダイオキシン類検査に係る外部精度管理調査
- (2) 生体試料のダイオキシン類およびコプラナーPCB測定および精度管理
- (3) ダイオキシン類のレポータージーンアッセイ系による簡易測定法の開発
別添 「母乳中のダイオキシン類およびコプラナーPCBの分析法（案）」

II. 食品の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究

- (1) 精度管理に必要な統計学的処理の手法に関する検討
- (2) 試薬・標準品等のリファレンス・センターに関する検討
- (3) 精度管理用試料における添加物質に対する食品成分による影響に関する検討
- (4) 精度管理調査方法の効率化に関する検討

様式A (4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成12年 4月10日

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

所在地 ㊤105-0001 東京都港区虎ノ門 1-15-12

フリガナ ざいだんほうじん しょくひんやくひんあんぜんせんたー

法人名 財団法人 食品薬品安全センター 印

フリガナ やなぎさわけんいちろう

代表者名(職名) 柳澤健一郎 (理事長) 職印

平成 11 年度厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究 研究事業) に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究(11140101)

国庫補助金精算所要額 : 金 96,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク
(別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは 雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執 筆 者 氏 名
なし			

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

なし

別添 1.

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称= 厚生科学研究費

研究事業名= 生活安全総合研究事業

研究課題名= ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究

国庫補助金精算所要額（円）= 96,000,000

研究期間（西暦）=1999-2001

研究年度（西暦）=1999

主任研究者名= 柳澤健一郎（（財）食品薬品安全センター）

分担研究者名= 中澤裕之（星薬科大学薬品分析化学教室），小野 宏（食品薬品安全センター秦野研究所）

研究目的= 食品や血液、母乳等人体試料中のダイオキシン等の微量化学物質は、装置のわずかな汚染や試薬に含まれる不純物、分析機器の調整等により、測定結果に変動を生じる。微量化学物質の測定結果について信頼性を確保するために、各試料の持つ特殊性を考慮に入れ、測定方法について、適切なリスク評価の実施を念頭に置いた測定手法の検討および測定の各段階における技術的検討を行った上で、施設整備、機器および試薬等の整備管理を確立する。さらに、分析者の熟練の達成、外部機関による技術評価体系の確立によって測定結果の信頼性確保を目的としている。

また、ダイオキシン以外の食品衛生検査についても、検査結果の信頼性確保のための検査機関における GLP 体制の充実と精度管理の徹底が求められている。本研究では、わが国の食品の検査分析の信頼性確保に関して行われる外部精度管理調査の実施に必要である諸問題について検討することを目的とした。

研究方法= (1) ダイオキシン濃度の測定について、食品、血液、母乳の試料の測定を行い、その精度の検討を行った。(2) 食品衛生検査の精度管理結果の実際のデータについて統計学的な検討を行い、適切な評価法を検討した。(3) 適正な試薬・標準品の実態を調査し、それらを確保、供給するための方策を検討した。(4) 精度管理調査用試料の作製方法について、理化学的検査及び微生物検査のための試料を種々の方法で作製して検査データを求め、均質性及び目的物質の安定性の確保と実際の食品形態に近い検体の作製方法を検討した。(5) 外部精度管理調査機関と検査機関の間の連絡（試料の送付、データ授受を含む）の正確性と評価の効率化のため、電子媒体による連絡の検討を行った。

結果と考察= (1) 食品中のダイオキシン類測定のための指針を策定した。これにより測定の信頼性の向上が期待される。(2) 調査試料の内容に応じた適切な検査結果の評価に関する統計学的方法の検討を行った。

(3) 精度管理業務に必要な適正な試薬・標準品の供給体制の必要性が認められた。標準品について純度の調査を行ったところ、多少問題があることが認められた。(4) 食品衛生外部精度管理調査において用いる共通試料の作製に関する検討を行い、実際の食材に近い試料として使用できるものを作製した。(5) 調査機関と検査機関の連絡およびデータ転送に電子媒体を用いる方法を試み、モデル連絡調査を行って実用化できる可能性の高いことを認めた。

結論= 食品衛生検査のデータは正確で信頼性の高いものでなければならないが、検査の精度管理を行うにあたっては、調査試料の適格性の問題のほか、調査法、統計解析法、結果の評価法とくに評価の基準にも問題が残っており、検査法自体も検討の必要がある。さらに、標準物質の供給体制も整備しなければならない。

平成 1 1 年度 厚生科学研究費補助金研究（生活安全総合研究事業）

「ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究」

総括研究報告書

主任研究者 柳澤健一郎（財団法人食品薬品安全センター 理事長）

ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究

主任研究者 柳 澤 健 一 郎 （財団法人食品薬品安全センター理事長）

研究要旨 今日、公衆衛生上、とくに食品衛生上の重要課題であるダイオキシンの分析は、ごく微量の物質の測定にかかる高度の技術が要求されるものであり、また、測定の各段階における正確な操作と機器および試薬等の整備管理に欠陥があれば、測定結果が容易に変動するものである。この分析結果の信頼性を確保するための手法と手順を確立すべく研究を行った。「食品中ダイオキシン類・コプラナーPCBs検査のためのガイドライン案」を作製した。また、母乳中のダイオキシン類測定法、血液中ダイオキシンの測定法についても指針の作製を試みた。

また、ダイオキシン以外の食品衛生検査においても、検査の信頼性を確保することが重要であり、さきに食品衛生検査施設の GLP 規制が実施され、検査体制の充実と精度管理の徹底が求められることになったところであるが、精度管理制度の実質的な内容と効率的な運用にはなおいくつかの検討課題を残している。この研究では、外部精度管理調査のあり方を検討し、適正で実質的な調査を効率的に行うために考慮すべき諸問題を検討した。まず、調査結果の評価のために用いられる各種の統計学的手法の検討、つぎに検査のための適正な試薬や標準品の確保をいかにすべきかの検討、精度管理調査試料の作製方法の検討を行い、さらに精度管理調査作業の効率化についての検討を行った。

分担研究者

中澤裕之 星薬科大学薬品分析化学教室
教授小野 宏 財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所・所長

備等により、測定値の変動を来す。こうした微量化学物質の測定値の信頼性を確保するための手段を確立することが目的である。またその他の食品衛生検査の信頼性確保のために行われている精度管理事業を進める上で、解決すべき問題がまだ残されている。本研究では、それらの課題に応えることを目的として各種の問題点を取り上げて研究した。

B. 研究方法

A. 研究目的

食品や人体試料中のダイオキシン等の微量化学物質は、採取装置のわずかな汚れや試薬に含まれる不純物、分析機器の整備調整の不

(1) 公的検査機関から、ダイオキシン類について分析経験の豊富な専門家、精度管理に関する専門家を委嘱して、検査のためのガイドライン案を検討した。

母乳の試料について GC/MSを用いる分析法のマニュアルを作成し、これに基づき共通試料のダイオキシン濃度を国内数機関において測定し、比較検討する準備を進めた。

マウス肝由来の Hepalc1c7細胞を ATCC から入手し、レポータールシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドを導入し、ダイオキシンに反応するルシフェラーゼアッセイ細胞系を作製した。この系において10種のダイオキシンの測定を試みた。

(2) ダイオキシン以外の食品衛生検査の信頼性確保について、外部精度管理調査における統計学的解析方法の検討、精度管理において必要となる食品関連化学物質の適正な試薬・標準品を確保し、供給できるような支援体制のためのリファレンスセンターの実現性の調査・検討、外部精度管理調査のための適切な調査試料の作製法、調査機関と参加機関との間のデータ送受の正確性と評価の効率化の検討を行い、電子通信手段の利用を試みた。

C. 研究結果

(1) 「食品中のダイオキシン類・コプラナーPCBs検査のための暫定ガイドライン」を策定した。また、血液・母乳の検査については、測定マニュアルの骨子を作製した。

レポータージーンアッセイ系のダイオキシン類に対する反応は概ね予測値と近似し、試験系の有用性が示された。

(2) 食品衛生外部精度管理調査の結果の評価方法について、統計学的検討を行い、調査試料の内容に応じた評価法が必要であることが観察された。精度管理に使用する試薬や標準品の国内における標準物質の供給の実態を調査した結果、早急に供給体制を整備すべき必要性が認められた。

また、市場に提供されている残留農薬検査

標準品について純度の調査を行ったところ、やや純度の低いものが認められた。

食品衛生外部精度管理調査のための共通試料の作製に関する検討を行い、実際の食材に近い試料の作製を試み、均質性と安定性の高い調査試料を求めて種々検討を行い、若干の成果を得た。外部精度管理調査の効率的な進め方について具体的資料を蓄積した。

D. 考察

(1) ダイオキシンの濃度の測定については、分析の各段階で結果に影響する変動要因があるので、測定法の基準を普及させ、精度管理を十分に行う必要がある。この研究で策定した「食品中のダイオキシン類・コプラナーPCBs検査のための暫定ガイドライン案」はこれから検査の信頼性を確保するために活用されるであろう。

「母乳中のダイオキシン類およびコプラナーPCBsの分析法」はまとまりつつある。さらに、濃度の低い点で困難はあるが、血液についても同様のマニュアルが必要である。

(2) 現行の外部精度管理調査における統計解析・評価方法の再検討を行い、理論的にまた具体的なデータの検証によって、種々の問題点が指摘された。今後より適切な評価方法を開発、採用していくべきである。

(3) 検査機関の検査方法の管理について、アンケート調査を行った結果、分析法バリデーション、内部精度管理の現状を調査した。それらの管理の目標値の設定や指導が必要と認められた。

(4) 精度管理業務を円滑に進めるためには、適正な試薬・標準品の確保と安定供給が必須であると考えられるが、国内における標準物質の供給の実態を調査し、早急に供給体制を整備すべき必要性が認められた。また、市場に提供されている標準品について純度の調査

を行ったところ、やや純度の低いものが認められ、この点の管理体制の整備も必要と考えられた。

(5) 食品衛生外部精度管理調査において熟練度を調査するための共通試料は聞き取り調査によれば、実際の食材に近い試料の開発が必要であり、均質性と安定性の高い調査試料が求められていることが判った。さらに、理化学的検査および微生物検査の試料について、それぞれ問題解決のための具体的着想も得たが、なお検討が必要である。

(6) 外部精度管理調査の調査機関と検査機関の連絡およびデータ転送に電子媒体を用いる方法は有用である可能性を認めた。これによって、今後より正確性の高い効率的な調査が可能となると見込まれる。

E. 結論

ダイオキシン類および非ダイオキシンの食品中の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究」を2つの分担課題に分けて行い、測定データの信頼性確保のために採るべき措置について有益な知見を得た。

(1) ダイオキシンの濃度の測定については、分析の各段階で結果に影響する変動要因があるので、測定法の基準を策定して普及させ、精度管理を十分に行う必要がある。

(2) 精度管理の統計学的解析方法については $\bar{X}-R$ 管理図と、 z -スコア方式とによって評価してきたが、この方法を検証し新たな統計解析方法を探った。

(3) 食品衛生検査の実態を調査し、適正な試薬・標準品の確保と供給のためのリファレンスセンターの必要性を確認した。

(4) 適当な調査試料の作製方法を検討し、実際の食品形態に近い試料を数種類試作した。

(5) 調査試料の送付・検査結果の回収・評価の調査機関と参加機関との間の連絡の正確性と効率化を検討した。

F. 研究発表
なし

G. 知的所有権の取得状況
なし

平成 1 1 年度 厚生科学研究費補助金研究（生活安全総合研究事業）

「ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究」

分 担 研 究 報 告 書

I. ダイオキシン類の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究

- (1) 食品中のダイオキシン類検査に係る外部精度管理調査
- (2) 生体試料のダイオキシン類およびコプラナー P C B の測定および精度管理
- (3) ダイオキシン類のレポータージーンアッセイ系による簡易測定法の開発

別添「母乳中のダイオキシン類およびコプラナ P C B の分析法（案）」

平成11年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究
(1)食品中のダイオキシン類検査に係る外部精度管理調査

主任研究者：柳沢健一郎（財団法人 食品薬品安全センター 理事長）

分担研究者：中澤 裕之（星薬科大学 教授）

研究協力者：豊田 正武（国立医薬品食品衛生研究所 食品部長）

協力研究者：飯田 隆雄（福岡県保健環境研究所 保健科学部長）

内山 貞夫（（財）食品薬品安全センター 食品衛生外部精度管理調査事業部長）

大隅 昇（文部省統計数理研究所 教授）

佐々木 久美子（国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長）

堀 伸二郎（大阪府立公衆衛生研究所 食品衛生部食品化学課長）

松木 容彦（（財）食品薬品安全センター 研究部長）

松田 りえ子（国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官）

研究要旨

近年、廃棄物焼却場から排出されるダイオキシンによる環境汚染及びこれによる人体汚染や健康影響に関する住民の不安が広がり、社会的関心も高まっている。ダイオキシン対策に関しては、平成11年3月の関係閣僚会議において、「ダイオキシン対策推進基本指針」が示され、検査体制の整備を図ることが緊急に構すべき対策として提言されている。

しかしながら、我が国におけるダイオキシンの人体汚染に関する調査研究の報告は不足している状況であり、これらの知見の蓄積が求められている。このためには、食品、母乳、血液中の極く微量のダイオキシンレベルを把握する必要がある、適切な測定方法の確立と精度管理体制の整備が不可欠である。本研究では、(1)で「食品中のダイオキシン類検査に係る外部精度管理調査」、(2)では「生体試料のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定及び精度管理」として母乳、血液等の生体試料中のダイオキシン濃度測定について、前処理、抽出、分析等における技術的検討を行うとともに、施設整備、機器及び試薬等の整備・管理に加え、分析者の熟練度の向上、定期的な外部機関による技術評価等、測定の信頼性確保に関する手法を確立することを目的としている。また、(3)では「ダイオキシン類のレポータージーンアッセイ系による簡易測定法の開発」としてバイオアッセイについて検討した。

以下、(1)、(2)、(3)について順に報告する。

(1)「食品中のダイオキシン類検査に係る外部精度管理調査」

ヒトへのダイオキシン曝露の経路として食品の摂取は重要であり、ダイオキシン汚染実態調査の結果から合理的な結論を導くためには、まず結果の信頼性を確保しなくてはならない。本研究は、平成11年度厚生科学研究の指定を受け、食品に係る標準的な測定・分析方法及び精度管理を実施するための指針を作成することについて検討し、「食品中のダイオキシン類・コプラナーPCBs検査のための暫定ガイドライン案」を作成した。

測定結果の信頼性の確保を目的として、「外部精度管理調査研究実施要領」を作成し、これに基づいて、共通サンプルを国内十数カ所の測定機関に配布し、外部精度管理調査を行うこととした。分析結果を解析して、参加機関の真度、室内再現性及び室間再現性等について評価を行う予定で現在、作業中である。

A. 研究目的

近年、ダイオキシン類による環境汚染及びこれによる健康影響に関する不安が広がり、社会的関心も高まっている。市場に流通している食品に含まれるダイオキシン類の汚染状況を評価するためには、試料中のダイオキシン類濃度を一定の正確性及び精密性をもって把握する必要がある。しかしながら、食品中のダイオキシン類は非常に微量であるため、分析に使用する器具等のわずかな汚れや試薬に含まれる不純物、食品成分の影響、分析機器の調整等により、測定結果にバラツキが生じ得る。

このような中で、微量のダイオキシン類の測定結果について信頼性を確保するためには、各試料の持つ特殊性を考慮に入れ、測定方法に関して十分な検討を行った上で、施設整備、機器及び試薬等の整備・管理に加え、分析者の熟練度の向上、定期的な外部機関による技術評価等、測定の信頼性確保に関する手法を早急に確立する必要がある。

こうした状況に鑑み、ダイオキシン対策に関しては、平成 11 年 3 月の政府関係閣僚会議で示された「ダイオキシン対策推進基本指針」においても、検査体制の整備を図ることが緊急に構すべき対策として取り上げられている。

本研究は、食品に係る標準的な測定・分析方法及び精度管理を実施するための指針を作成することを緊急の課題と認識し、「食品中のダイオキシン類・コブラナー PCBs 検査のための暫定ガイドライン」の作成について検討を行ったものである。

B. 研究方法

公的検査機関及び指定検査機関から、食品中のダイオキシン類について分析経験のある専門家、精度管理に係る専門家等に参加を求め、検討班を編成した。関係者は次のとおりである。

飯田隆雄（福岡県保健環境研究所保健科学部長）、上野順士（（財）日本食品分析センター品質保証部門統括）、内山貞夫（（財）食品薬品安全センター食品衛生外部精度管理調査事業部長）、木村博承（厚生省生活衛生局食品保健課課長補佐）、斎藤貢一（埼玉県衛生研究所食品衛生部食品化学科）、

斎藤行生（（社）日本食品衛生協会食品衛生研究所試験検査センター長）、佐々木久美子（国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長）、柴辻正喜（厚生省生活衛生局食品保健課課長補佐）、手塚義博（（財）日本冷凍食品検査協会官公庁受託業務部長）、豊田正武（国立医薬品食品衛生研究所食品部長）、中澤裕之（星薬科大学薬学部教授）、中村又善（福岡県保健環境研究所生活化学課）、堀伸二郎（大阪府立公衆衛生研究所食品衛生部食品化学課長）、堀就英（福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課）、松井好之（（財）日本冷凍食品検査協会横浜事業所副所長）、松田りえ子（国立医薬品食品衛生研究所食品部主任研究官）、丸山義弘（（財）食品環境検査協会福岡事業所主席）、柳俊彦（（財）日本食品分析センター多摩研究所環境科学部副主任研究員）、吉川礼次（（財）食品環境検査協会業務部長）。

他の分野で示されている分析法マニュアル、食品分析に係る公表文献、分析機関で行われている分析法、精度管理に係る研究報告等を参考として、ガイドライン案の作成を検討した。

C. 研究結果

1. ガイドラインの位置付け

食品中のダイオキシン濃度については、種々の機関で、それぞれの測定法により、分析が行われており、検出下限値、測定対象化合物、毒性等価係数等が異なる場合には、それぞれの分析結果の持つ意味合いが異なってくる。そこで、行政的な対応の面を含め、これらの結果をもとに判断を行おうとした場合、多くの困難が伴う。このため、食品のダイオキシン分析に関するガイドラインを作成し、標準的な取扱いを示すことは、こうした判断を助け、検査結果について、評価の対象にし得るものと判断された。

2. 分析方法

分析機関においては、他の分野で示されている分析法マニュアル、食品分析に係る公表文献等を参考として、それぞれの機関で分析手順を定め、依頼に応じているのが実状である。本研究では、食品のダイオキシン分析を行っている機関の分析方法を調

査し、それぞれの工程毎に標準的な分析の流れに整理した。

また、分析方法採用の要件を定めることにより、分析方法の選択を可能にするともに、精度の向上等についても、有効に活用できるものとした。

3. 検出下限値

検出下限値は分析結果の許容性を確認する上で有効な指標であり、標準的な値を定めておく必要がある。本ガイドラインが対象とする主な食品は、食品衛生法上の食品であり、現実的に採取可能な試料量等も考慮した上で、検査結果の判断が可能と考えられる検知レベルを「標準的検出下限値」として設定した。

食品のダイオキシン分析においては、食品中に含まれる多数の成分によって影響を受ける一方、食品中に含まれるダイオキシンの濃度は非常に低い。本ガイドラインでは、分析値の信頼性を保証する上で、このような食品分析の特殊性を考慮し、検出下限値の設定方法について、日常的に確認可能な方法として明確化した。

4. 表示方法

検出されたダイオキシン類の濃度は、2、3、7,8-TCDD 毒性当量に換算した後、合計値をもって表示される。本ガイドラインでは、毒性等価係数が定まっている異性体について、検出された異性体の種類が明らかになる表示方法を採用した。また、リスク（摂取量）の評価を行う際にも、本表示方法の票が利用できるよう、その場合には、未検出異性体の検出下限値にどの係数を乗じて毒性当量を見積ったのかを明記させることとした。

5. 精度管理

本ガイドラインは、標準的な測定・分析方法を示すとともに、分析データの品質管理に係る内容についても、実施頻度と合わせて記載した。また、内部精度管理及び外部精度管理を項を設けて記述した。さらに、検量線の作成と確認の手順を明確化し、検出結果に対する信頼性の確保を図ることにした。

6. その他

食品試料においては、試料採取時の誤差や損失は生じにくいことから、サンプリングスパイク及び二重測定は、規定から除

外した。全体として、ダイオキシン分析の初心者にも、分かりやすい構成とするよう心がけた。

D. 考察

関係閣僚会議の「ダイオキシン対策推進基本指針」の提言を受け、食品に係る標準的な測定・分析方法及び精度管理を実施するための指針について検討し、「食品中のダイオキシン類・コプラナーPCBs 検査のための暫定ガイドライン案」を作成した。作成されたガイドライン案は、別添のとおりである。

E. 謝辞

本研究にご協力いただいた環境庁水質保全局水質規制課、(社)日本分析機器工業会技術委員会、日本試薬連合会に感謝いたします。

F. 研究業績

研究報告書及び参考資料

- 1) 「ダイオキシン類に係る水質調査マニュアル」、環境庁水質保全局水質規制課、平成 10 年 7 月。
- 2) 「排ガス中のダイオキシン類及びコプラナーPCB の測定方法」、日本工業規格(案)、1999。
- 3) 「廃棄物処理におけるダイオキシン類標準測定分析マニュアル」、厚生省生活衛生局水道環境部環境整備課、平成 9 年 2 月。
- 4) 「ダイオキシン類に係る水生生物調査暫定マニュアル」、環境庁水質保全局水質管理課、平成 10 年 9 月。
- 5) 「ダイオキシン類に係る土壌調査暫定マニュアル」、環境庁水質保全局土壌農業課、平成 10 年 1 月。
- 6) 「有害大気汚染物質測定方法マニュアル(ダイオキシン類及びコプラナーPCBs)」、環境庁大気保全局大気規制課、平成 11 年 3 月。
- 7) 日本薬学会「I 衛生試験法 2,4 食品汚染物試験法 2,4,2,2 理化学的試験 16) ダイオキシン類」、公衆衛生協議会資料(日本薬学会第 119 年会)、P.7-15、平成 11 年 3 月。
- 8) 堀伸二郎ほか「食品のダイオキシン類汚

- 染調査－魚介類について－」、大阪府立公衆衛生研究所報、第36号、P93-103、平成10年
- 9) 堀伸二郎ほか「食品中の化学物質の新しい分析 13 ダイオキシン類とPCBsの分析法」、月刊フードケミカル、P.83-95、1994.
 - 10) 豊田正武、内部博泰、柳俊彦、河野洋一、堀就英、飯田隆雄「日本における食事経路のPCDDs, PCDFs及びCoplanar PCBsの摂取量」、食衛誌、Vol.40、No.1、P.98-110、1999.
 - 11) 豊田正武、飯田隆雄、堀就英、柳俊彦、河野洋一、内部博泰「日本における市販食品中のPCDDs、PCDFs及びCoplanar PCBsの含有量」、食衛誌、Vol.40、No.1、P.111-121、1999.
 - 12) 「ダイオキシンのリスク評価 参考資料 1 (3)試料の抽出、分析の方法」環境庁ダイオキシンリスク評価研究会、P.124-127.
 - 13) 高山幸司ほか「日本沿岸魚及び市販魚中のPCDDs、PCDFs及びCoplanar PCBs」、衛生化学、37(2)、P.125-131、(1991).
 - 14) Kerstin Welsch-Pausch et al, "Determination of the Principal Pathways of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans to Lolium multiflorum (Welsh Ray Grass)", Environ. Sci. Technol., 29, 4, 1090-1098, (1995).
 - 15) Stephan Safe et al "Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans Associated with Wood-Preserving Chemical Sites: Biomonitoring with Pine Needles", Environ. Sci. Technol., 26, 2, 394-396, (1992).
 - 16) EPA Method 1613: Tetra-Through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS, October 1994.
 - 17) 森田昌敏「血液中のダイオキシン類分析法」
 - 18) 豊田正武、松田りえ子「ダイオキシン分析に係わる外部精度管理手法及びその評価方法に関する研究」、平成9年度厚生科学研究報告書.
 - 19) 堀江有治「ダイオキシン測定に関する精度管理問題の最近の状況」、資源環境対策、P.951-956、Vol.34、No.10、(1998).
 - 20) 「ダイオキシンの耐容一日摂取量(TDI)について」、中央環境審議会環境保健部会、生活環境審議会、食品衛生調査会、平成11年6月.
 - 21) WHO Consultation, "Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI)" Executive summary, 1998.
 - 22) Alborg U.G, "Toxic Equivalency Factors for Polychlorinated Dioxins, Dibenzofurans and Biphenyls Pro's and Con's and Consequences", Organohalogen Compounds, 21, (1994).
 - 23) Alborg U.G et al, Report on WHO-ECEH and IPCS consultation "Toxic Equivalency Factors for Dioxin-like PCBs", Chemosphere, 1049-1067, 28, 6, (1994).
 - 24) 榎孝雄、池上幸江、内山貞夫、佐々木久美子、永山敏廣、堀伸二郎、前川吉明、吉池信男「食品中残留農薬暴露評価の精密化に美関する研究」、平成9年度厚生科学研究報告書.
 - 25) Hamilton D.J. et al, IUPAC Reports on Pesticides "Optimum use of available residue data in the estimation of dietary intake of pesticides", Pure & Appl. Chem., 1373-1410, 69, 6, (1997).
 - 26) 「水道原水及び浄水中のダイオキシン類及びコプラナーPCB 調査マニュアル(案)」、厚生省水道環境部水道整備課、平成11年.
 - 27) 豊田正武、松田りえ子「ダイオキシン分析に係わる外部精度管理手法及びその評価方法に関する研究」、平成10年度厚生科学研究報告書.
 - 28) 「平成10年度環境測定分析統一精度管理調査結果－ダイオキシン類－」、環境庁企画調整局環境研究技術課、平成11年.
 - 29) 「平成10年度食品衛生外部精度管理調査結果報告書－総括報告書－」、(財)食

品薬品安全センター秦野研究所，平成
11 年．

- 30)食品衛生外部精度管理調査事業標準作
業書，(財)食品薬品安全センター秦野研
究所，平成 8 年．
- 31)「食品中のダイオキシン類及びコブラ
ナーPCB 測定方法暫定ガイドライン」，
厚生省生活衛生局食品保健課，平成 11
年．
- 32)「JIS Q0043-1 試験所間比較による技
能試験 第 1 部:技能試験スキームの開
発及び運営」，日本工業標準調査会審議．
- 33)(社)日本分析化学会編「分析所認定ガイ
ドブック」，丸善(株)，平成 11 年．

平成11年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究
(2) 生体試料のダイオキシン類及びコブラナーPCBの測定及び精度管理

主任研究者：柳沢健一郎（財団法人 食品薬品安全センター 理事長）

分担研究者：中澤 裕之（星薬科大学 教授）

研究協力者：森田 昌敏（国立環境研究所 統括研究官）

協力研究者：飯田 隆雄（福岡県保健環境研究所 保健科学部生活化学課長）

齊藤 貢一（埼玉県衛生研究所 専門研究員）

土屋 悦輝（東京都立衛生研究所 環境保健部長）

堀 伸二郎（大阪府立公衆衛生研究所 食品衛生部食品化学課長）

宮田 秀明（摂南大学薬学部 教授）

板野 一臣（大阪市立環境科学研究所 研究副主幹）

渡邊 昌（東京農業大学応用生物科学部 教授）

研究要旨

近年、廃棄物焼却場から排出されるダイオキシンによる環境汚染及びこれによる人体汚染や健康影響に関する住民の不安が広がり、社会的関心も高まっている。しかしながら、我が国におけるダイオキシンの人体汚染に関する調査研究の報告は不足している状況であり、これらの知見の蓄積が求められている。このためには、食品や環境試料に加えて、母乳、血液等の生体試料を対象とした、極微量のダイオキシンレベルを把握する必要がある。加えて、ダイオキシンに関しては数値だけが一人歩きする状況で、社会を混乱させる事態を招いており、適切な測定方法の確立と精度管理体制の整備が不可欠である。

本研究では、母乳、血液等の生体試料中のダイオキシン類の濃度測定について、前処理、抽出、分析等における技術的検討を行うとともに、施設整備、機器及び試薬等の整備・管理に加え、分析者の熟練度の向上、定期的な外部機関による技術評価等、測定の信頼性確保に関する手法を確立する。

本年度は母乳のダイオキシン分析に関して「母乳中のダイオキシン類及びコブラナーPCBの分析法（案）」を作成した。現在、国立環境研究所において分析用共通試料を作成し、本年度、この試料の分析に参画を表明している6機関に配布し、分析を実施する予定で作業を進めている。血液に関しては現在、分析法の作成作業を行っている。

A. 研究目的

ダイオキシンの人体汚染状況とその健康影響を評価するためには、血液、母乳等の生体試料中のダイオキシン濃度を一定の正確性及び精密性をもって把握する必要がある。しかしながら、人体試料中のダイオキシンは非常に微量であるため、採取装置のわずかな汚れや試薬に含まれる不純物、分析機器の調整等により、測定結果にばらつきをもたらし、得られた分析数値のみが一人歩きして社会を混乱させる事態が生じており、微量のダイオキシン測定結果について信頼性を確保するためには、各生体試料のもつ特殊性を考慮に入れ、測定方法について十分な検討を行うことが要求される。さらに、測定施設の整備、機器及び試薬等の整備・管理に加え、分析者の熟練度の向上、定期的な外部機関による技術評価等の

きをもたらし、得られた分析数値のみが一人歩きして社会を混乱させる事態が生じており、微量のダイオキシン測定結果について信頼性を確保するためには、各生体試料のもつ特殊性を考慮に入れ、測定方法について十分な検討を行うことが要求される。さらに、測定施設の整備、機器及び試薬等の整備・管理に加え、分析者の熟練度の向上、定期的な外部機関による技術評価等の

外部精度管理を実施する必要がある。これらの試料の測定に関しては、測定の困難さ等から、現在のところ実施可能な機関も限られているが、今後、測定の需要が増大し、対応する機関も増加することが予想される。

本研究により、測定の信頼性を確保する手法及び体制を確立することが達成されれば、現在実施中の機関のみならず、将来測定を実施する機関においても信頼性の確保を図る上で大いに寄与することが期待される。

B. 研究方法

ダイオキシンについて、米国環境保護庁が環境試料に係るガイドラインを示しているが、母乳、血液等の生体試料に関しては満足すべきガイドラインは作成されていない。また、血液や母乳などの人体試料については技術評価手法に関する十分な検討が行われていない。このように、血液、母乳中のダイオキシンの濃度測定に関する信頼性確保に関する調査研究は、その重要性にもかかわらず、他に実施された例はない。

本年度は母乳について、GC/MSを用いたダイオキシン測定分析方法のマニュアル（案）を作成し、これに基づき、共通試料について国内の測定機関（福岡県保健環境研究所、埼玉県衛生研究所、東京都立衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、摂南大学薬学部、大阪市立環境科学研究所）において分析を実施する。なお、「血液中のダイオキシン類及びコブラナーPCBの分析法」に関しては分析法を構築中である。

人体試料の採取等にあたっては、研究協力者に対する人権擁護上の配慮、研究による研究協力者に対する不利益、危険性の排除等の説明を行い、理解（インフォームド・コンセント）を得、同意の署名をもらう。

C. 研究結果

血液、母乳の試料については、GC/MSを用いたダイオキシン測定分析方法のマニュアル（案）を作成した。現在、これに基づき、国立環境研究所で共通試料を調製中で、この試料に母乳について国内の測定機関において分析を実施中である。さらに、測定結果のばらつきの程度、その原因などについて検討を行い、分析

の正確性及び精密性を確保するための留意点の洗い出しを行って、「母乳中のダイオキシン類及びコブラナーPCBの分析法（案）」を構築する予定である。

D. 考察

母乳に関しては参画機関に国立環境研究所で作製した共通試料を配布して「母乳中のダイオキシン類及びコブラナーPCBの分析法（案）」に基づき分析作業を実施中であるが、分析結果のばらつきの程度、その原因などについて検討を加え、分析の正確性及び精密性を確保するための留意点の洗い出しを行う予定である。

血液に関しては濃度レベルも低く、現在、測定法のマニュアルを作成中であるが、共通試料を国立環境研究所で作製し、国内の機関で測定を行い、データを取得する計画である。参画を予定している機関は次の6機関、福岡県保健環境研究所、埼玉県衛生研究所、東京都立衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、摂南大学薬学部、東京農業大学である。

E. 結論

母乳及び血液のダイオキシン測定については、本年度、測定分析マニュアルとして「母乳中のダイオキシン類及びコブラナーPCBの分析法（案）」を策定した。今後は、実試料の測定結果に基づき、測定分析マニュアル（案）についてさらに詳細な検討を加え、ガイドラインを作成する。

また、本測定に関連する施設内の内部精度管理及び施設間の外部精度管理のあり方・手法について、検討を行う。

次年度以降は、引き続いて「血液中のダイオキシン類及びコブラナーPCBの分析法」を作成し、分析値の信頼性確保に関して、母乳同様の作業を実施する予定である。

F. 研究業績 学会発表 なし

ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究
(3)ダイオキシン類のレポータージーンアッセイ系による簡易測定法の開発

主任研究者： 柳澤健一郎（財団法人 食品薬品安全センター 理事長）

分担研究者： 中澤裕之（星薬科大学 教授）

研究協力者： 松永 治之（住友化学工業株式会社・生物環境科学研究所）

研究要旨

ダイオキシン類の簡易測定法の開発を目的とし、アリルハイドロカーボンレセプターを利用したレポータージーンアッセイ（ルシフェラーゼアッセイ）法の検討を実施した。マウス肝由来 Hepa1c1c7細胞にダイオキシン類応答性のルシフェラーゼ遺伝子含有プラスミドを導入し（一過的）、同細胞をダイオキシン類に曝露すると、その濃度依存的にルシフェラーゼの転写が活性化された。TEF値が異なるダイオキシン類同族体の10種について同ルシフェラーゼアッセイを実施した結果、片対数グラフよりもとめた EC_{50} 値から算出したTEF値は再評価されたTEF値（WHO, 1997）と比べると4倍高い化合物もみとめられたが、概ね近い値が得られた。

A. 研究目的

近年ダイオキシン類はその毒性および生体内への残留・蓄積性が問題となっており、ヒトの血液・母乳等生体試料、農作物等食品試料、および環境試料におけるダイオキシン類測定の需要が高まっている。現在行われているダイオキシン類の検出・測定はHRGC/HRMSといった高価な装置と煩雑な前処理が必要な機器分析が主流であるが、多数検体についてより迅速かつ低コストで測定できる技術の開発が求められている。そこで、ダイオキシン類に結合する受容体（レセプター）を利用した測定法であるレポータージーンアッセイ系について、アッセイ条件の検討、および各種

ダイオキシン類異性体の測定を含めた基礎データの取得を行い、当該アッセイ系の評価を行った。ダイオキシン類の毒性は生体内のアリルハイドロカーボンレセプター（Ahレセプター）に結合することにより惹起されるというのが主要な見方となっており、Ahレセプターの機能を破壊したAhレセプター遺伝子欠損マウスを用いた実験からもそれが裏付けられている（表1）。Ahレセプターの機能については以下のように説明されている。Ahレセプターはリガンド作動性の転写調節因子で、通常細胞質において熱ショックタンパクHsp90と複合体を形成している。細胞内にダイオキシン類あるいは多環芳香族炭化水素な

どのAhレセプターの活性化物質（アゴニスト）が入ってAhレセプターと結合すると、AhレセプターはHsp90と解離して核内に移行する。Ahレセプターは核内でArnt（Ah receptor nuclear translocator）と呼ばれる核タンパク質とヘテロ二量体を形成し、染色体DNA上のダイオキシン応答配列（Dioxin Responsive Element（DRE）、Xenobiotic Responsive Element（XRE）とも呼ばれる）に結合することにより、配列の下流にある遺伝子の転写を活性化する（図1）。今回検討したレポーター遺伝子アッセイ法は、上記Ahレセプターによる転写調節能を利用した測定法で、レポーター（ルシフェラーゼ）遺伝子を導入した培養細胞をダイオキシン類などの化合物に曝露するとそれら化合物の量および活性の強さに応じてルシフェラーゼ遺伝子の転写が活性化され、生成したルシフェラーゼの酵素反応で生じる発光の量を測定することにより、ダイオキシン類も含めたAhレセプターの活性化物質を半定量的に検出することが可能である。

機器分析によるダイオキシン類の定量では毒性等価係数（TEF）値の定められた同族体の種類とその濃度を知ることができるがサンプル中の未知物質も含めた物質全体の生物学的な影響や毒性に関する情報は得ることができないことから、本法は機器分析の測定値に比べ毒性学的により意味のあるデータの提供が可能であると考えられる。また、ダイオキシン類以外にも、Ahレセプターに作用する化学物質を検出できる系として期待される。

B. 研究方法

B-1細胞の培養

ATCCから入手したHepa1c1c7細胞（ATCC CRL2026）を α MEM培地（GIBCO-BRL）/10%（v/v）牛胎児血清（FBS、GIBCO-BRL）—（以後培地Aと略す）中、37°C、5%（v/v）CO₂、飽和湿度条件下、CO₂インキュベーター-BNA-110（TBAI ESPEC）においてインキュベートした。以降、培養は前掲条件に従って行った。細胞は2～3日毎に（約80%コンフルエントに達した状態で）シャーレ（Φ10cm）から剥がし、培地Aに懸濁した後、細胞懸濁液の約1/10を新しいシャーレに植え替えた（継代）。細胞の剥離は、まず培地を除き、PBS（-）をシャーレ1枚あたり5～10ml側壁に沿って静かに加え、シャーレを緩やかに傾けて底面の細胞を洗った。次に、PBS（-）を除き、トリプシン液（0.25%トリプシン/0.02%EDTA）5mlを側壁に沿って加え、底面全体が浸るようにした後、トリプシン液を除き、シャーレをCO₂インキュベーターに移して37°Cで約80秒静置した。シャーレをインキュベーターから取り出し、細胞の状態を顕微鏡で観察して菱～星状から丸状に変わっていたらシャーレを水平方向にゆすって細胞を剥離した。直ちに培地Aを約10 ml/シャーレの割合で添加して、プロウピペットによる吸引・吐出を繰り返して（5～10回）細胞をばらばらに解離させた細胞懸濁液を調製した。

B-2遺伝子導入～ルシフェラーゼアッセイ

1日目：細胞播種～遺伝子導入

アッセイに必要な細胞数が得られるように

シャーレの枚数を予め計算した。2.1.記載方法で調製した細胞懸濁液の一部をヘモサイトメーターにのせ、顕微鏡下、細胞数を測定した。シャーレ1枚(10ml培地)あたり細胞数が100万個になるように細胞懸濁液を培地Aで希釈し、10mlずつ新しいシャーレに加えた。細胞が均一に拡散するようにシャーレを軽く揺すった後CO₂インキュベーター内で静置培養した。

細胞播種後6時間以上経過した後(細胞がシャーレ底面に接着していることを確認)、以下で調製したトランスフェクション培地に交換した。まず、無血清 α MEM培地を700 μ lずつ2本のポリカーボネート製チューブに入れ、一方にレポータープラスミド(pGV-Ya-XREx5, 作成法については平成12年7月公開予定の特許明細書参照)3.25 μ gを加え、もう一方にリポフェクトアミン30 μ lをそれぞれ加えた。プラスミド添加量の検討時にはレポータープラスミド7 μ g添加群も設定した。緩やかにチューブを揺すって混合した後、室温で5分間静置し、続いてリポフェクトアミンを混合した培地をプラスミドを混合した培地に加え、緩やかに混合した。30分間室温にて放置後、さらに無血清 α MEM培地を5.6ml加え、容量を7mlとした(トランスフェクション培地)。先に100万個細胞/枚播種、培養したシャーレから培地を除き、トランスフェクション培地を加えてCO₂インキュベーター内で16時間静置培養した。

2日目：被験物質添加

まず、トランスフェクション培地に交換してから16時間培養したシャーレから培地を除

き、培地A 10mlを入れ、培養を続けた。

別途、被験物質のDMSO溶液およびDMSO希釈液を調製し、培地Aを4mlずつ分注したチューブのそれぞれに被験物質のDMSO溶液8 μ lを添加・混合した。本被験物質含有培地を8チャンネルピペットで96ウェルプレートに1ウェルあたり100 μ lずつ分注し、CO₂インキュベーター内に静置した。

先の、培地Aに交換後培養を続けたシャーレからB-1記載の方法で細胞を剥がし、細胞数が10万個/mlになるように細胞懸濁液を調製した。被験物質含有培地の入っているプレートをインキュベーターから出し、細胞懸濁液を8チャンネル連続分注ピペットで1ウェルあたり100 μ l(細胞1万個)ずつ追加分注した。プレートをCO₂インキュベーター内に戻し、静置培養した(24時間、または曝露時間検討時には48時間も実施)。

3日目：ルシフェラーゼ活性測定

細胞を被験物質に曝露してから24時間後に培地を除き、100 μ l/ウェルのPBS(-)で2回ウェルを洗い、ウェル内の液をできる限り除いた後、細胞溶解液(ピッカジーン、添付溶解剤の5倍希釈液)を1ウェル当り15 μ l加えた。適宜プレートを傾けるなどしてウェル底面全体が細胞溶解液に浸るようにし、室温で1時間以上において細胞を溶解した。マイクロローマツトLB96Pルミノメーター(ベルトールド)にルシフェリン基質溶液(ピッカジーン、東洋インキ)を用意し、細胞を溶解したプレートを装置にセットして、基質溶液の自動分注一発光量の測定を行った。測定結果はExcel(マイクロソフト)にて処理した。