

表5 にんじんの農薬濃度の測定結果

| ロット番号 | 測定 | EPN | クロピリホス | メキアザリン | フェントロチオン | マラチオン ($\mu\text{g/g}$) |
|-------|--------|------|--------|--------|----------|---------------------------|
| A | 1 | 0.92 | 0.09 | 0.05 | 0.09 | 0.09 |
| | 2 | 0.92 | 0.09 | 0.05 | 0.09 | 0.10 |
| | 3 | 0.88 | 0.09 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| | 平均値 | 0.91 | 0.09 | 0.05 | 0.09 | 0.10 |
| | ±標準偏差 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 |
| B | 1 | 0.96 | 0.09 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| | 2 | 0.94 | 0.09 | 0.04 | 0.10 | 0.10 |
| | 3 | 0.89 | 0.09 | 0.05 | 0.09 | 0.10 |
| | 平均値 | 0.93 | 0.90 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| | ±標準偏差 | 0.91 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 |
| C | 1 | 0.93 | 0.09 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| | 2 | 0.93 | 0.09 | 0.05 | 0.09 | 0.10 |
| | 3 | 1.02 | 0.10 | 0.05 | 0.10 | 0.11 |
| | 平均値 | 0.96 | 0.09 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| | ±標準偏差 | 0.05 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.01 |
| | 平均値 | 0.93 | 0.09 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| | ±標準偏差 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 |
| | 作製予定濃度 | 1.0 | 0.1 | 0.05 | 0.1 | 0.1 |

表6 液卵のフルベンダゾール濃度の均一性の結果

| 単位 $\mu\text{g/g}$ | | | | |
|--------------------|-------|-------|---------|-------|
| 試料番号 | 測定① | 測定② | | |
| 1 | 0.493 | 0.494 | 平均値 | 0.496 |
| 2 | 0.484 | 0.489 | 標準偏差 | 0.015 |
| 3 | 0.478 | 0.476 | 変動係数 | 3.02 |
| 4 | 0.485 | 0.514 | F比 | 1.38 |
| 5 | 0.507 | 0.497 | | |
| 6 | 0.516 | 0.503 | 有意水準 5% | 3.02 |
| 7 | 0.500 | 0.500 | | |
| 8 | 0.478 | 0.516 | | |
| 9 | 0.461 | 0.496 | | |
| 10 | 0.504 | 0.519 | | |

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査精度管理調査における
適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その 5）
—精度管理調査方法の効率化に関する検討—

主任研究者 柳澤 健一郎 （財）食品薬品安全センター 理事長
分担研究者 松木 容彦 （財）食品薬品安全センター-秦野研究所 副所長
協力研究者 川崎 勝 （財）食品薬品安全センター-秦野研究所 研究員

研究要旨

外部精度管理調査における調査試料の宅配業者の輸送条件別の温度管理状況を詳細に調査するために、全国 10 箇所の参加施設を対象に 3 種類の条件下（常温便、クール便、ならびに冷凍便）で温度履歴センサーを送付し、各地方への輸送形態別の温度変化をアナログ的に調査した。

今回の結果として、概ねクール便と冷凍便による輸送中の温度管理は良好に維持され、調査試料の損傷に関わる恐れは考えられなかった。しかし常温便をクール便で輸送したと推定される例やクール便の長時間常温放置の例が観察された。さらに冷凍便で移し変え時に 0℃ 以上になった例が観察された。これらの例による常温暴露は今回の実験系では温度計の梱包位置が試料位置の外側にあり、外気温にすぐに反応する系に設定したので実際の試料輸送下では調査試料に直に影響するとは考えられないが、配付試料の輸送においては配送条件が必ずしも守られていない例があることが認められ、今後、輸送中に調査試料温度適化を極力抑えるべく、試料梱包の仕方の工夫の必要性が明らかとなった。

A. 研究目的

わが国の食品衛生外部精度管理調査において、正確で効率の良い精度管理調査方法の採用が参加施設から強く求められていると同時に当外部精度管理調査事業実施機関としてもその必要性が急務となっている。

また、外部精度管理調査における調査試料の宅配業者の輸送中の温度管理を詳細に調査するために、試料送付の温度条件を想

定し、全国 10 箇所の参加施設に 3 種類の条件下（常温便、クール便、ならびに冷凍便）で温度履歴センサーを送付し、各地方への輸送形態別の温度変化をアナログ的に調査した。

B. 研究方法

2) 輸送上の温度管理についての調査

精度管理調査試料の輸送中の温度変化に

についての調査は、温度履歴の明確な温度履歴センサーを各ブロック 10 の施設に普通便、クール便及び冷凍宅配便で送付した。今回の調査は今年度から食品衛生外部精度管理調査に用いているのと同じ発泡スチロール製箱を用いた。

2-a) 協力機関

温度センサーの協力施設は以下のよう
ブロック毎の機関である。

北海道立衛生研究所
山形県衛生研究所
東京都立衛生研究所
長野県衛生公害研究所
愛知県衛生研究所
石川県保健環境センター
大阪府立公衆衛生研究所
高知県衛生研究所
福岡県保健環境研究所
沖縄県衛生環境研究所

2-b) 温度センサーの発送と返送

温度センサーは低温実験室で 3 日間順化後、リセットして温度記録後に平成 13 年 9 月 28 日に発送した。発送に付随するクッションビニール、送付用箱、実施要領書も低温実験室で 3 日間順化し、梱包作業も低温実験室でおこなった。梱包後、クール便 (0 ~ 5°C)、冷凍便は大和運輸で送付した。

温度センサーは、当該協力施設に到着したのち、到着日時時刻を記録して頂き、直ちに常温で返送してもらった。

2-c) 温度データの回収

温度センサーについては、返送後、コミュニケーションポート TR50C (ソフトウ

エア: Thermo Recorder for Windows 付き) を用い時間毎の温度履歴図を作製した。

2-d) 温度センサー

温度履歴センサー: (株)T & D 社製おんどり Jr.TR-51A 及びソフトウェアとして Thermo Recorder Windows。コンピュータ一部分として富士通(株)製 FMV-BIBL を使用した。

C. 結果

1) 輸送上の温度管理についての調査

当初発送は 9 月 28 日におこなった。

全国 10 箇所に送付した温度履歴センサー (夏季調査) の結果は図 1 ~ 10 に示した。チルド便に於いて輸送中の調査試料の一時的な移し替え作業と考えられる温度変化は最高で約 15°C までの上昇で 6 例あった。今回の結果として、概ねクール便と冷凍便による輸送中の温度管理は良好に維持され、調査試料の損傷に関わる恐れは考えられなかった。しかし常温便をクール便で輸送したと推定される例(図 8)やクール便の長時間常温放置の例(図 6)が観察された。また冷凍便で移し替え時に 0°C 以上になった例(図 3, 7, 9)が観察された。

D. E. 考察、結論

1) 輸送上の温度管理についての調査

全国 10 箇所の協力施設へ温度センサーを送付し、夏期における輸送、常温あるいは冷凍条件での温度変化を調べた。全国 10 箇所に送付した温度履歴センサーにおいては、チルド便や冷凍便では、輸送中の調査試料の一時的な移し替え作業による温度変化の結果からは高温にされされてい

いことが明らかとなった。しかし常温便をクール便で輸送したと推定される例(図8)やクール便の長時間常温放置(図6)の例が観察された。また冷凍便で移し変え時に0℃以上になった例(図3, 7, 9:何れも大都市で貨物量が多いことが推定される)が観察された。これらの例による常温への温度上昇については、今回の実験系では同梱した温度センサーが外気温にすぐに反応する形態にあったので実際に配付サンプルに同程度の温度変化の影響が生じるとは考え難いが、今後サンプルの輸送を考える上で輸送会社の選択について十分考慮しなければならないことが示唆された。また、精度管理調査結果を評価する上で輸送中の温度履歴調査とのつき合わせも必要と考えられた。一方、これらの結果は、チルド便や冷凍便を利用する調査試料の輸送上の温度

管理に大きな情報を提供することになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

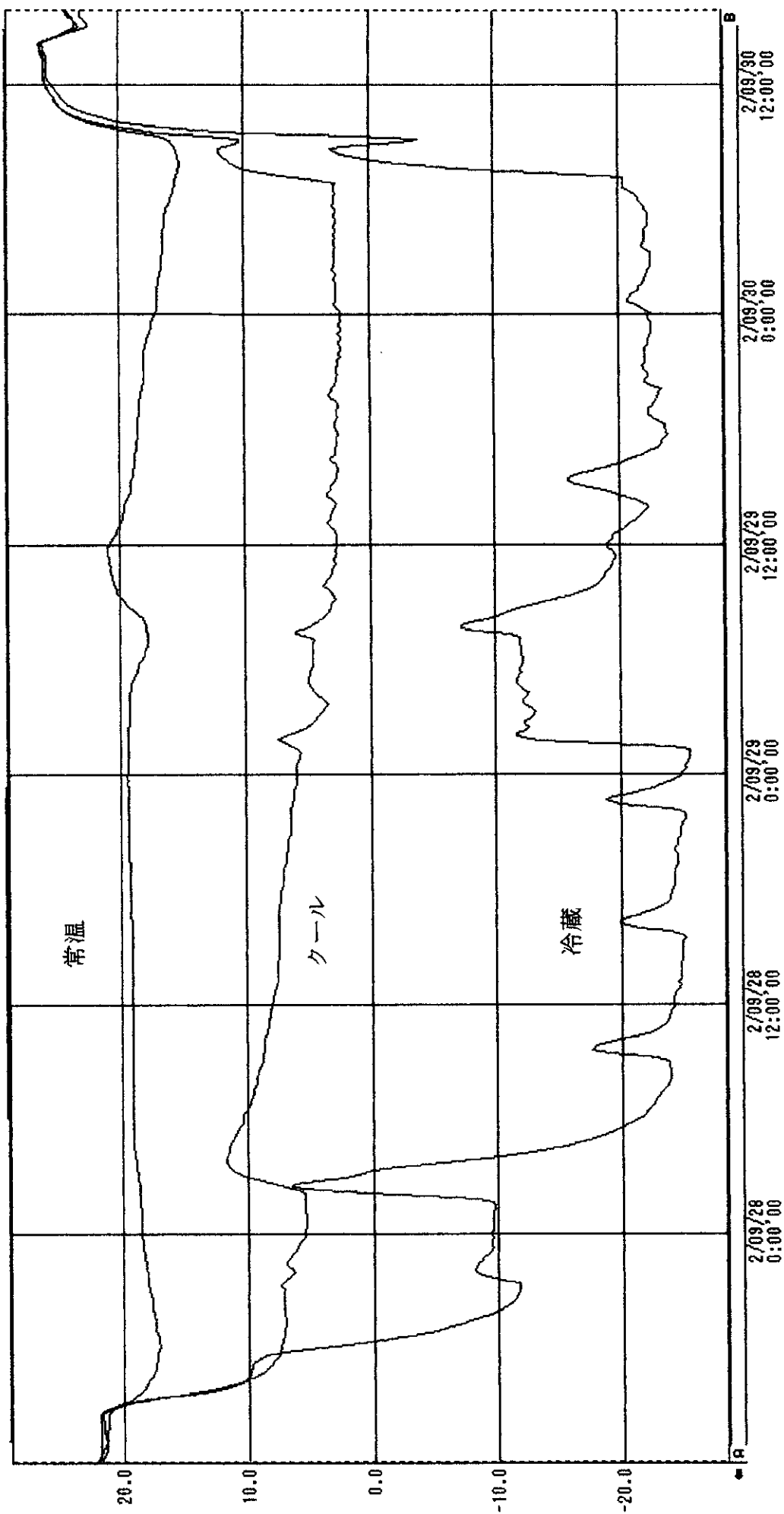


図1 北海道に送った常温便、クール便及び冷蔵便の輸送中の温度変化

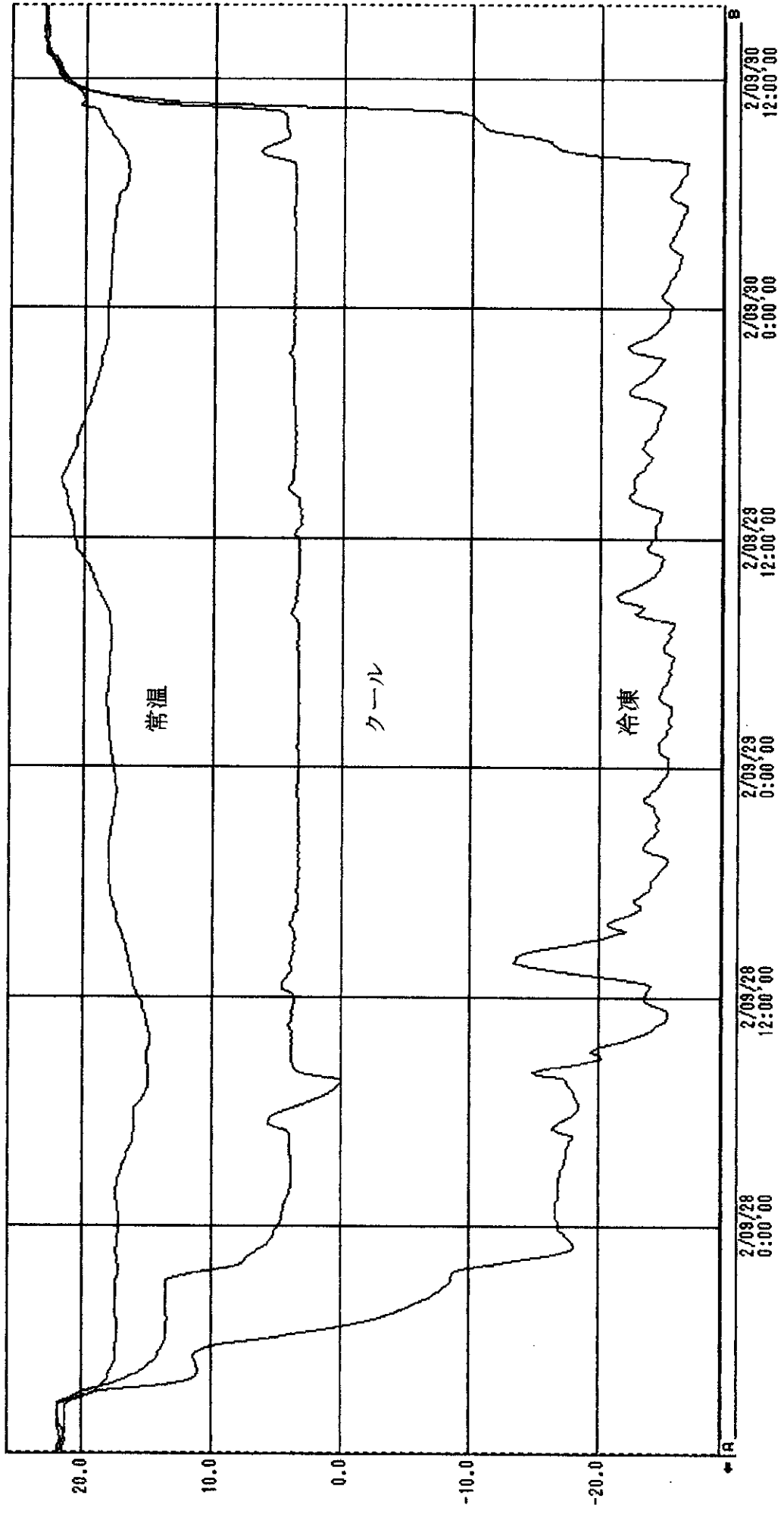


図2 山形県に送った常温便、クール便及び冷凍便の輸送中の温度変化

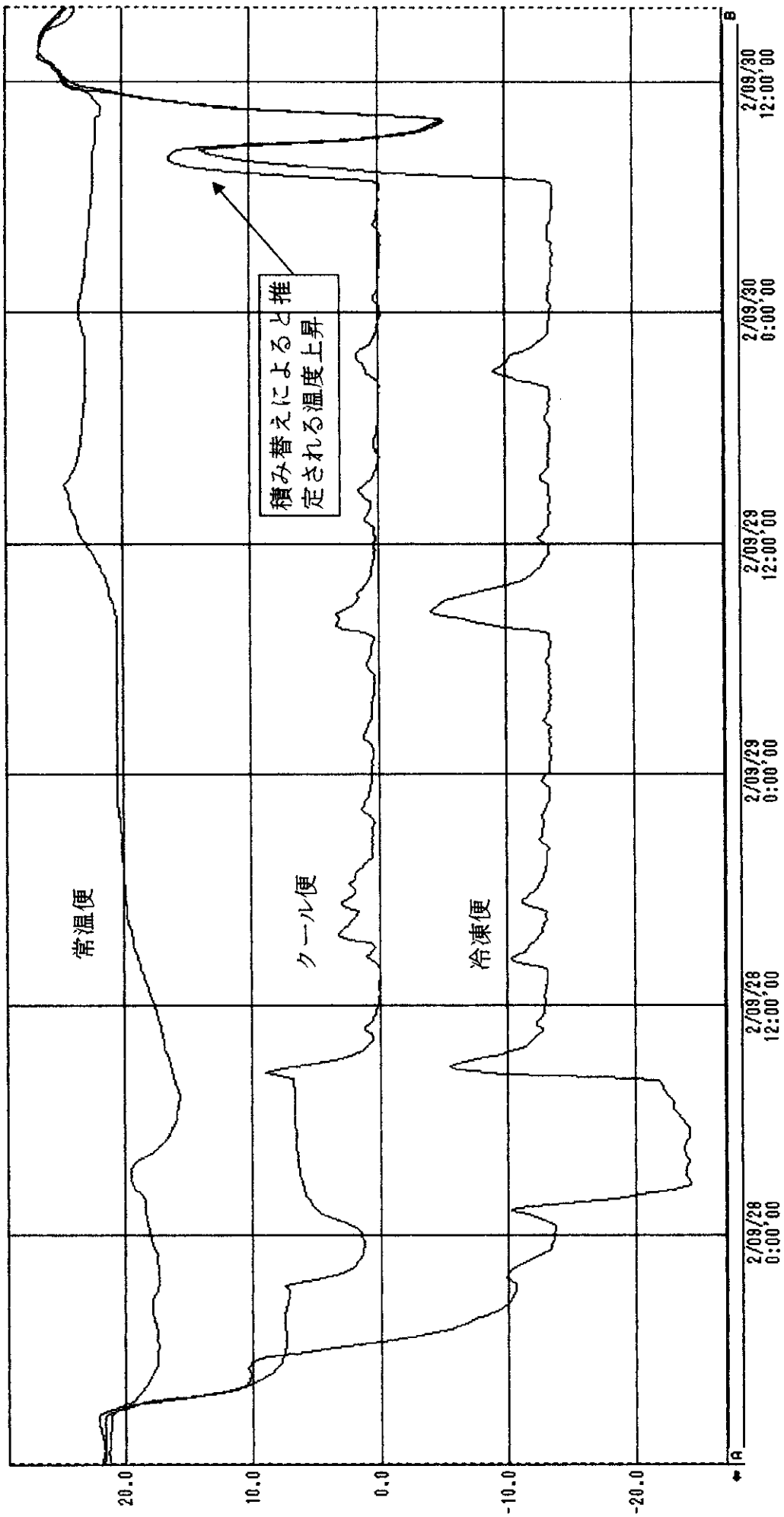


図3 東京都に送った常温便、クール便及び冷凍便の輸送中の温度変化

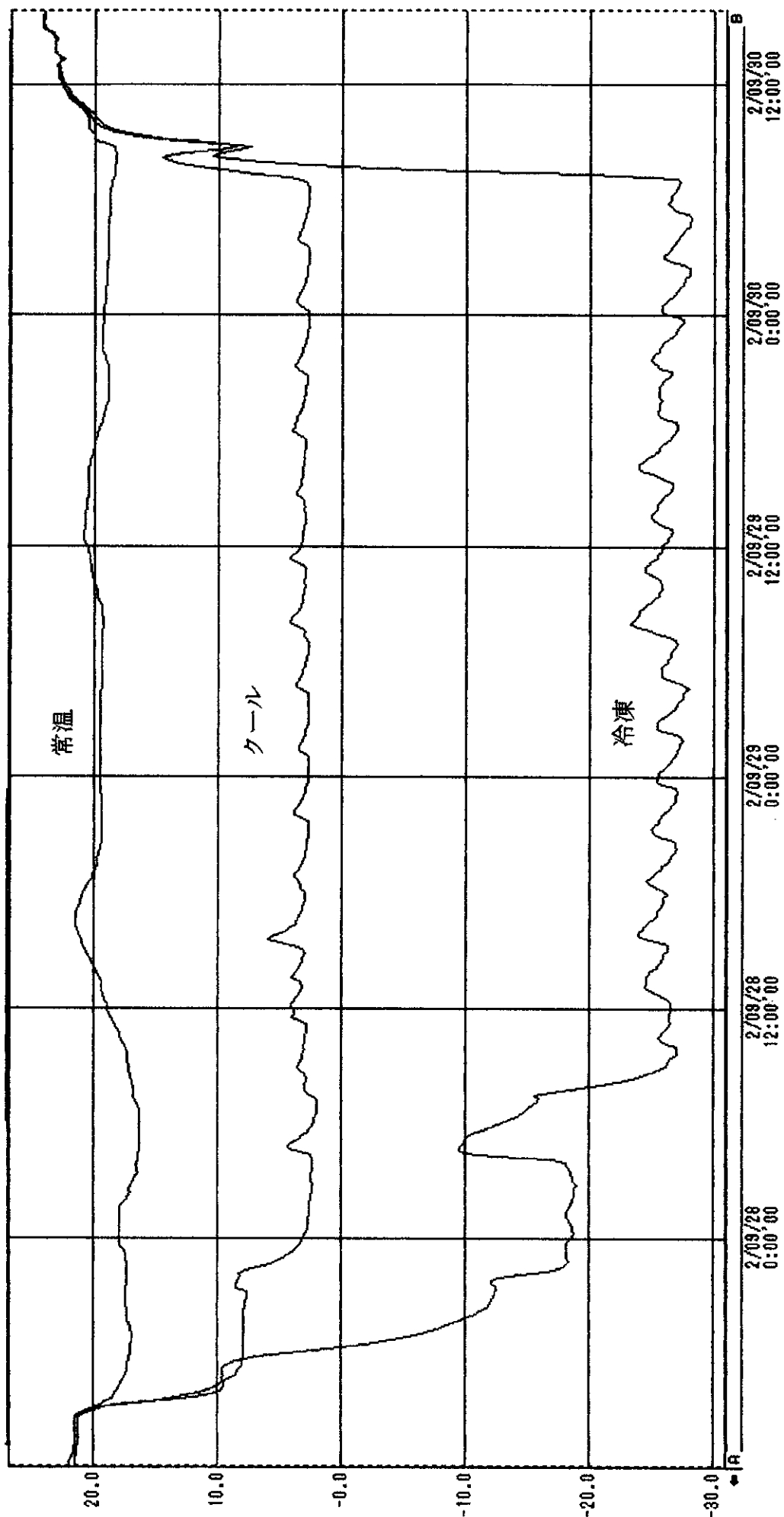


図4 長野県に送った常温便、クール便及び冷凍便の輸送中の温度変化

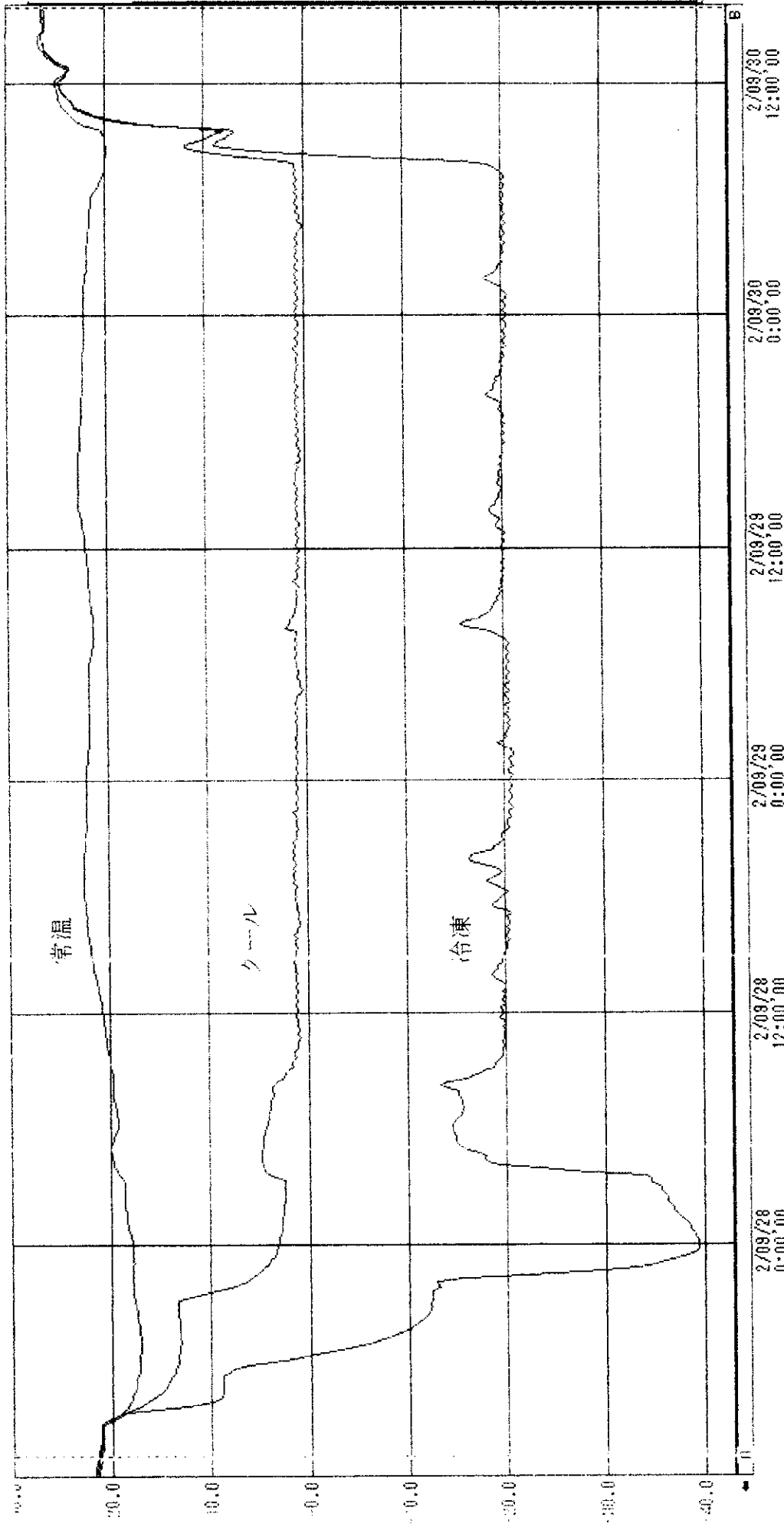


図5 愛知県に送った常温便、クール便及び冷凍便の輸送中の温度変化

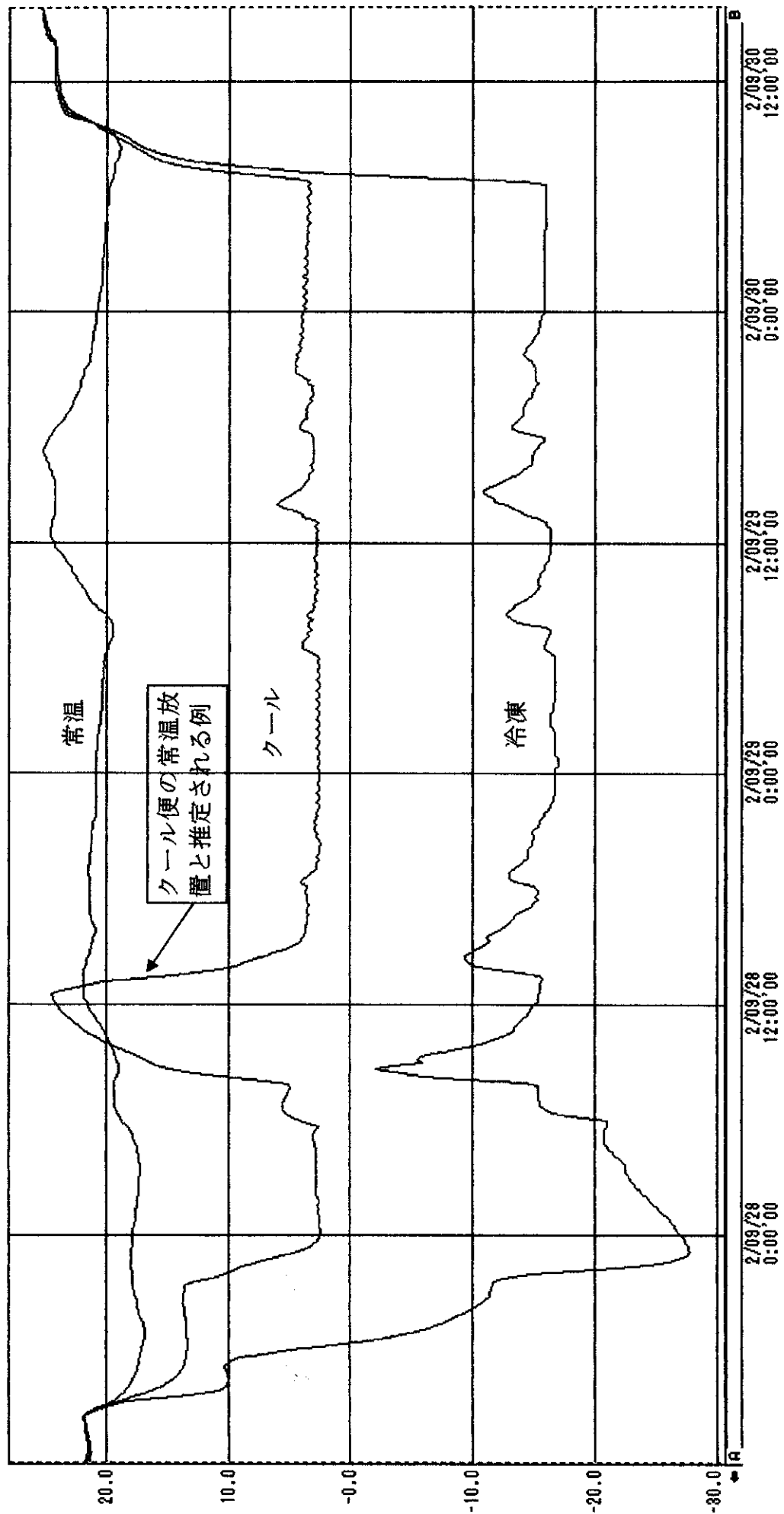


図6 石川県に送った常温便、クール便及び冷凍便の輸送中の温度変化

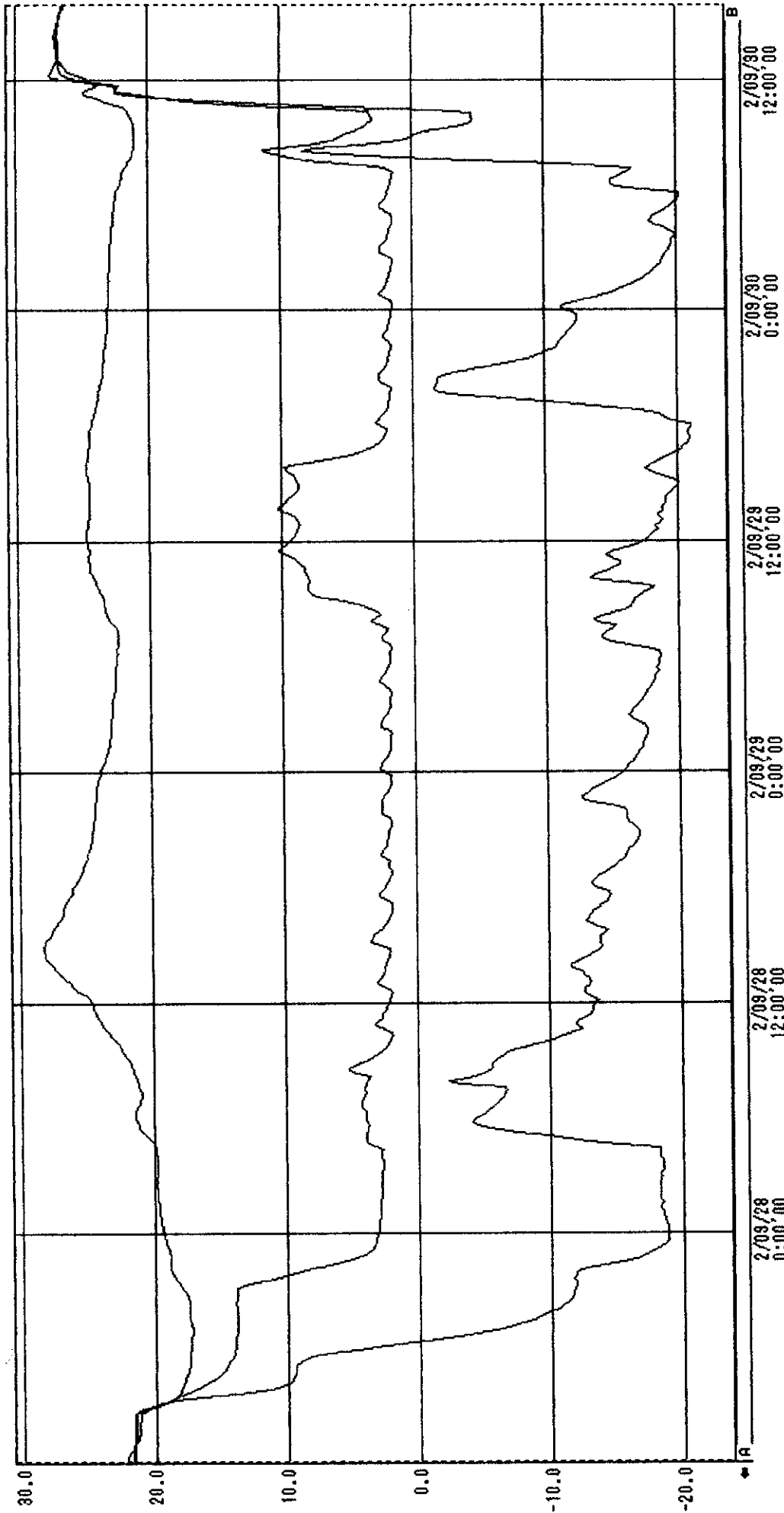


図7 大阪府に送った常温便、クール便及び冷凍便の輸送中の温度変化

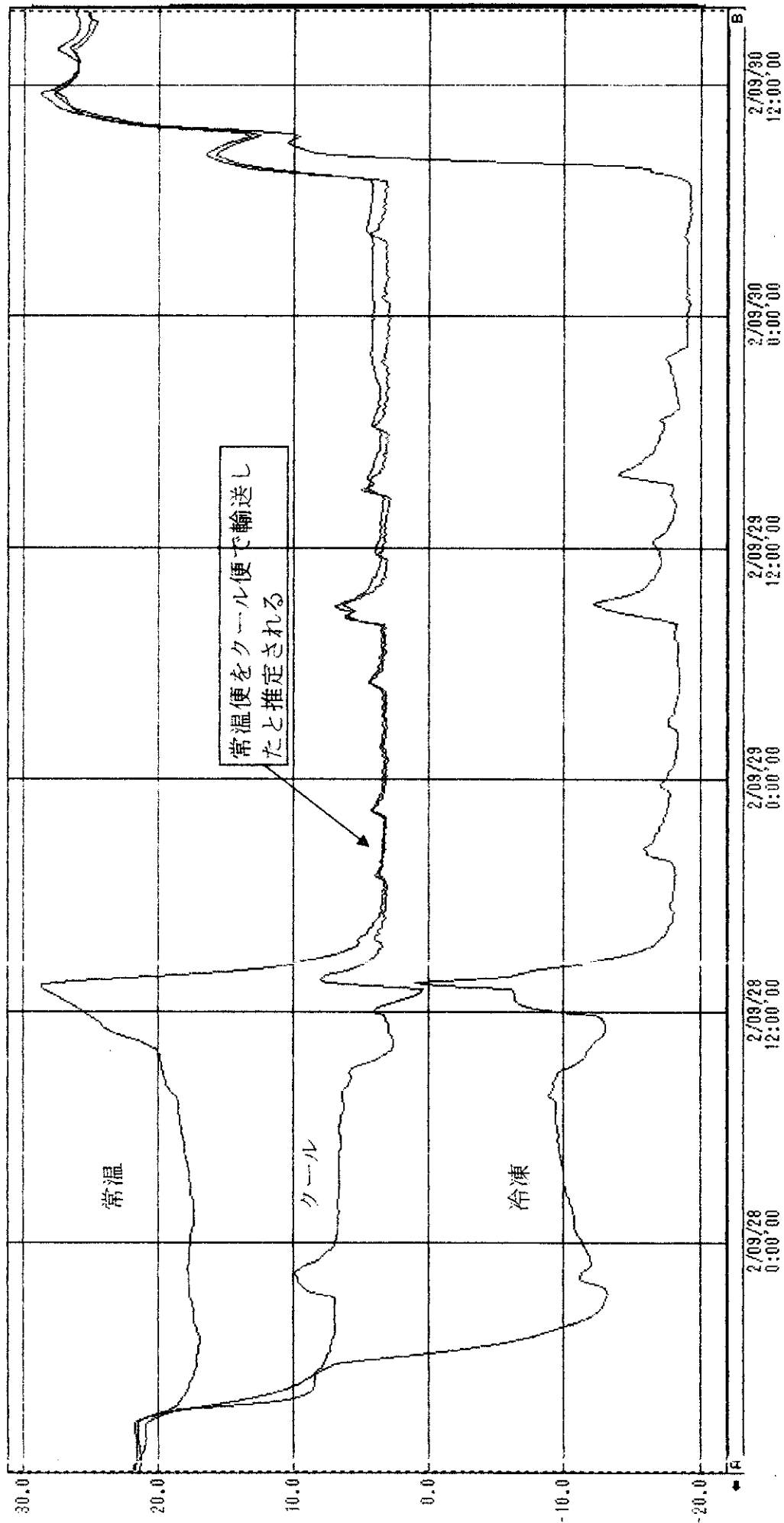


図3 高知県に送った常温便、クール便及び冷凍便の輸送中の温度変化

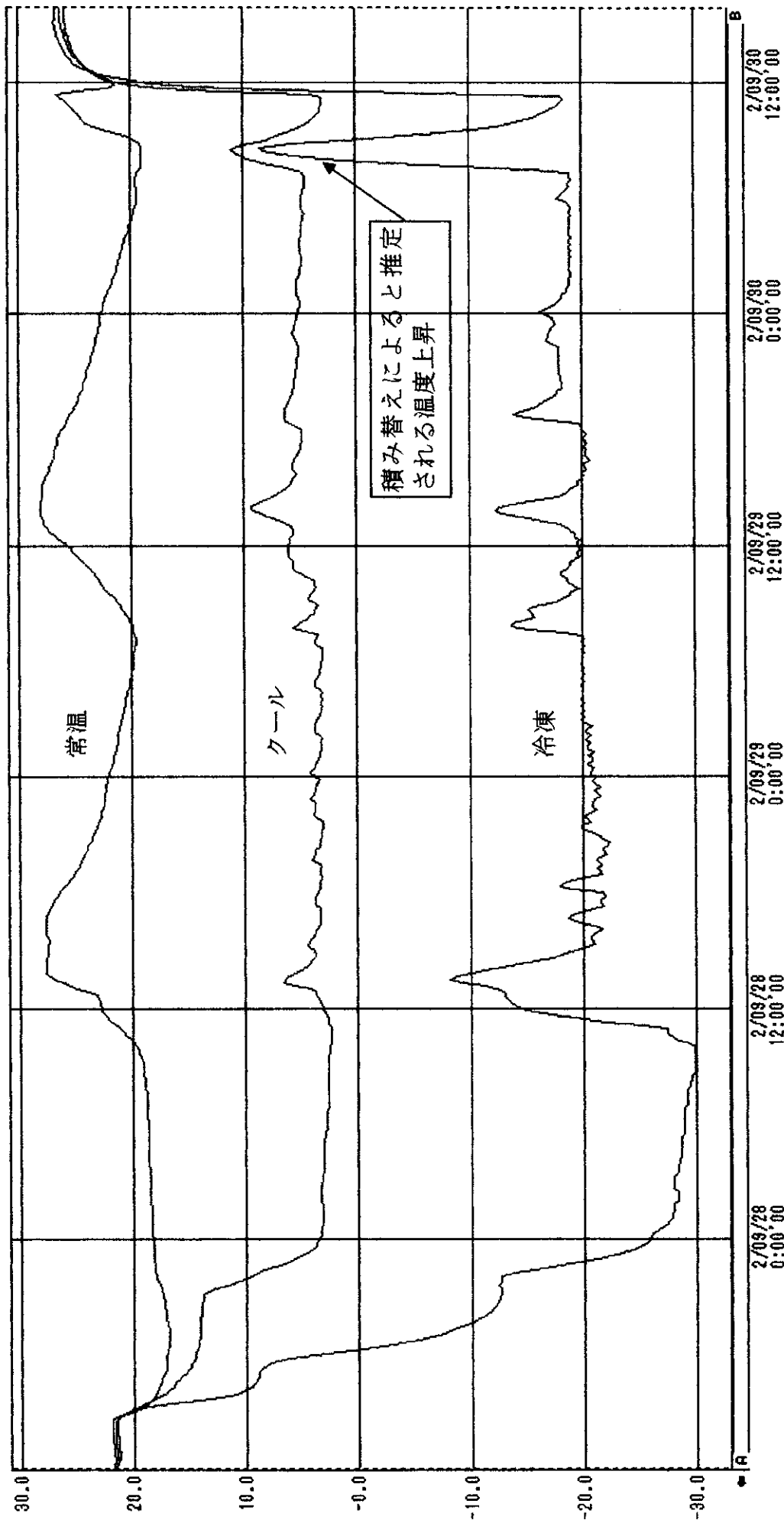


図9 福岡県に送った常温便、クール便及び冷凍便の輸送中の温度変化

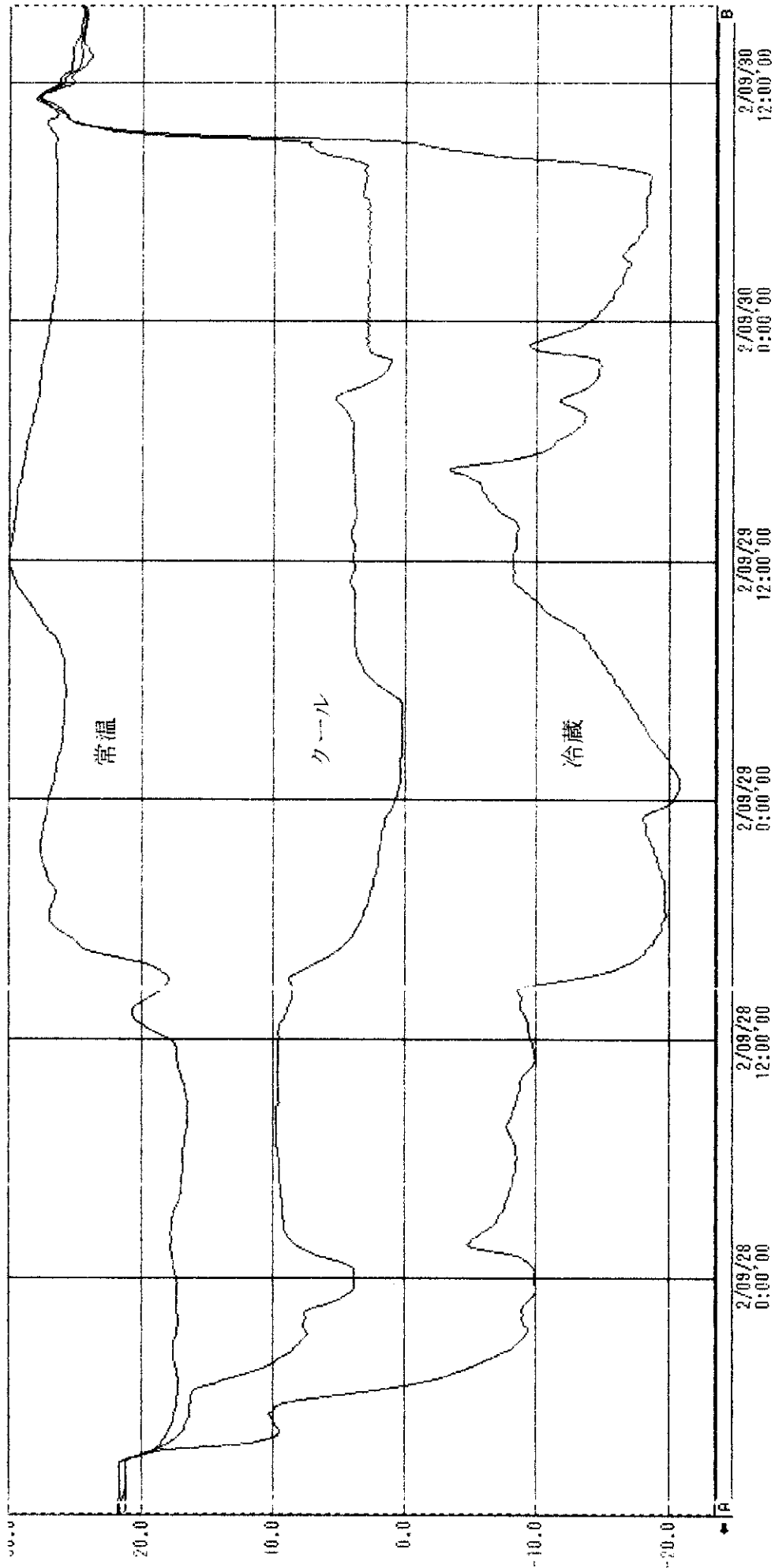


図10 沖縄県に送った常温便、クール便及び冷蔵便の輸送中の温度変化

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査精度管理調査における
適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その 6）
—食品衛生外部精度管理調査（遺伝子組換え食品）における調査試料の適性
および検査法の検討—

主任研究者 柳澤 健一郎 (財)食品薬品安全センター 理事長
分担研究者 松木 容彦 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 副所長
協力研究者 笠間 菊子 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
稲山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤを対象とした外部精度管理調査において、配布試料の全個体について種子および果肉の一部をとり、定性 PCR 法と GUS 法のそれぞれを用いて分析し、配布試料の組換え体、非組換え体の別が表示通りであることを確認した。さらに、分割したパパイヤ果肉および種子を各種条件下で保存後分析し、試験実施期間中における配布試料の安定性を確認した。また、定性 PCR 法の解析に使用する各種のゲル撮影装置について性能を比較した結果、CCD カメラに明確な機種間差がないことおよび CCD カメラはポラロイドカメラに比べて感度が優れていることが明らかになった。

A. 研究の目的

平成 13 年度より食品衛生外部精度管理調査の新たな調査項目として、遺伝子組換え食品検査を実施している。本年度は、安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ (55-1) を検査対象とし、定性 PCR 法および GUS (β -glucuronidase) 法それぞれについて外部精度管理調査を行った。配布試料には生のパパイヤを用い、使用する個々の果実について配布試料の一部をとり、組換え体、

非組換え体の別が表示通りであるか否かの確認試験を実施した。また、確認試験実施に伴い果実を切断し分割する操作が必須となったため、分割後の果実の試験実施期間中の保存安定性について検討した。さらに定性 PCR 法に使用するゲル撮影装置の機種間の感度の差についても検討した。

B. 研究方法

株式会社ダイヤモンドスターよりハワイ

産遺伝子組換えパパイヤおよび非遺伝子組換えパパイヤ各 16 個を購入し、以下の試験に使用した。

1. 確認試験

外部精度管理試料配布時に配布に使用した全個体につき、果肉および種子の一部をサンプリングし、厚生労働省の通知法（GUS法および定性PCR法）に従って、組換え体、非組換え体の別が表示通りであるか否かについて検討した。

(1) GUS法

予め、200 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を1ウェルあたり50 μ L、96ウェルプレートの必要数のウェルに分注した。次に、分取した種子から、無作為に1粒をとり、ガラス板上に置いた。粘性のある外皮をピンセットで取り除き、メスで種子の縦中央に切れ目を入れ、種皮を取り除き、淡白色の胚珠を採取した。胚珠の縦中央に見える白線に沿ってメスを入れ、胚珠を縦半分に切断し、切断面に露出した胚をピンセットで注意深く取り出し、先に分注しておいた200 mMリン酸緩衝液中に浸した。この操作を繰り返し、1検体あたり12個の胚を取り出した。胚を採取し終えた後、各ウェルよりリン酸緩衝液を除去し、基質（5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide）溶液を1ウェルあたり50 μ Lずつ加え、基質溶液の浸透を促すためアスピレーターで15分間脱気した。脱気後、プレートをパラフィルムでおおい、37 $^{\circ}$ C、10~15時間加温後、各ウェルに70%エタノールを50 μ Lずつ加え反応を停止後、それぞれの検体について、青色を呈した胚の数を数え、GUS発現率を算出した。GUS発現率が30%以上の場合、遺伝子組換

えパパイヤと判定した。

(2) 定性PCR法

1) 凍結乾燥

果肉を10 mm程度の角状に切り分け、-80 $^{\circ}$ Cで予備凍結後、完全に水分がなくなるまで凍結乾燥した。検体が十分に乾燥したことを確認後、ミキサーミルを使用し、粉碎し、均一化した。

2) DNA抽出

DNA抽出はシリカゲル膜タイプキット法により行った。粉碎試料80 mgをマイクロ遠沈管に秤取し、予め65 $^{\circ}$ Cに温めておいたAP1緩衝液600 μ LとRNaseA 4 μ Lを加え、試料塊がないようボルテックスミキサーで激しく混合し、その後65 $^{\circ}$ Cで15分間加温した。その間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌した。加温処理後、AP2緩衝液195 μ Lを加え、氷上に5分間静置後、室温下10,000 x gで5分間遠心し、遠心後の上清を分取した。この上清500 μ LをQIAshredder spin columnに負荷し、室温下10,000 x gで、4分間遠心し、溶出液を新しい遠沈管分取した。残りの上清についても同様に操作し、全量をQIAshredder spin columnに負荷し、溶出液を分取した。次いで、溶出液の1.5倍量のAP3緩衝液・エタノール混液を加え、10秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、溶解液を得た。得られた溶解液のうち500 μ Lを、mini spin columnに負荷し、室温下10,000 x gで5分間遠心し、溶出液を捨てた。残りの溶解液についても同様に操作し、全量をmini spin columnに負荷した。次いで、mini spin columnにAW緩衝液500 μ Lを負荷し、室温下10,000 x gで5分間遠心

した。得られた溶出液を捨て、同じ操作をもう一度繰り返した後、mini spin column を乾燥させるため、10,000 x g で 15 分間遠心した。mini spin column を別の遠沈管に移し、予め 65°C に温めておいた水 50 μ L を加え、5 分間静置した後、室温下 10,000 x g で 1 分間遠心し DNA を溶出した。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とした。

3) DNA 試料液中の DNA の純度の確認と定量

DNA 試料原液を取り、TE 緩衝液を加えて 5 倍希釈し、260 nm の吸光度を測定し、DNA 濃度を算出した。

4) PCR 増幅

PCR 増幅は対照用、検出用および確認用のそれぞれのプライマー対を用いておこなった。最終濃度が PCR 緩衝液 \times 1、0.20 mmol/L dNTP、3 mmol/L 塩化マグネシウム、0.2 μ mol/L 5' および 3' プライマーとなるように調製した液に、Taq DNA ポリメラーゼ 0.625 unit および DNA 試料 25ng を加え全量 25 μ L とし、反応液とした。これを PCR 増幅装置にセットし、95°C で 10 分間保った後、95°C 0.5 分間、60°C 0.5 分間、72°C 0.5 分間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行い、さらに 72°C で 7 分間終了反応を行った後、4°C とした。

5) アガロースゲル電気泳動

アガロースに TAE 緩衝液を加え、加熱してアガロースを溶解した。次いで 100 mL 当たり 5 μ L のエチジウムブロミド溶液を加え、ゲルメーカーにゲルを流し込み、室温で冷やし固めてゲルを作製した。

次に TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットし、増幅後の PCR 反応液 7.5 μ L と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入し、100 V で BPB がゲルの 1/2 から 2/3 に移動するまで電気泳動を行った。

6) ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに電気泳動終了済みゲルをのせて紫外線 (312 nm) を照射し、予定長の PCR 増幅バンドの有無を観察した。

7) 結果の判定

対照用プライマー対を用いたレーンで予定長の PCR 増幅バンドが検知され、かつ検出用プライマー対を用いたレーンで予定長の PCR 増幅バンドが検出され、さらに確認用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検出された場合、遺伝子組換えパパイヤと判定した。

2. 安定性試験

配布試料として使用しなかった残りの組換え体および非組換え体のパパイヤ各 1 個についてそれぞれ果肉および種子を分割し、室温 (19~22°C)、冷蔵 (約 4°C)、冷凍 (約 -20°C) の各条件下で保存した。種子については保存第 0 日、3 日、9 日および 16 日めに GUS 法で、果肉については保存第 0 日、3 日、7 日および 14 日めに凍結乾燥に付した後定性 PCR 法で試験し、保存条件および保存期間が試験結果に与える影響について検討した。

3. ゲル撮影装置の機種間差の検討

定性 PCR 法の解析に使用する各種のゲル撮影装置について性能を比較した。DNA

分子量マーカーを段階希釈し、エチジウムブロミド 0.5 μ g/mL を含む 3% のアガロースゲルで電気泳動後各種ゲル撮影装置を用いて撮影し、100bp のバンドについての濃度までバンドが確認できるか比較した。

C. 結果

1. 確認試験

配布に使用するパパイヤ全個体の一部をサンプリングし、配布試料の組換え体、非組換え体の別が表示通りであるか否かについて、厚生労働省の通知法に従って検討した。

GUS 法においては種子から胚を計 12 個取り出し、基質 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) 溶液を加え、37 $^{\circ}$ C で 10~15 時間インキュベート後、青色に染色された胚の数を数えた。GUS 法の結果は表 1 および図 1~4 に示したが、遺伝子組換えパパイヤと表示された試料においてはいずれも GUS 発現率が 30% 以上となり、全て遺伝子組換えパパイヤと判定された。一方、非組換えパパイヤと表示された試料においてはいずれも GUS 発現率が 0% であり、全て非遺伝子組換えパパイヤと判定された。

定性 PCR 法においては果肉を凍結乾燥後粉碎し、シリカゲル膜タイプキット法を用いて DNA を抽出した。この DNA について陽性対照用、検出用、確認用の各プライマーを用いて PCR を行い、それぞれ 211bp、207bp、250bp の増幅バンドが検出されるか否かを検討した。定性 PCR 法の結果は表 2 に示したが、組換え体と表示された試料においてはいずれも対照用、検

出用、確認用の各プライマーで予定長の PCR 増幅バンドが検出され、全て遺伝子組換えパパイヤと判定された。非組換え体と表示された試料においてはいずれも対照用プライマーでは予定長の PCR 増幅バンドが検出されたが、検出用、確認用のプライマーでは PCR 増幅バンドは検出されず、全て非組換えパパイヤと判定された。

2. 安定性試験

配布試料として使用しなかった組換え体および非組換え体のパパイヤ各 1 個の果肉および種子を分割し、室温 (19~22 $^{\circ}$ C)、冷蔵 (約 4 $^{\circ}$ C)、冷凍 (約 -20 $^{\circ}$ C) の各条件下で保存後確認試験と同様の条件下で分析し、外部精度管理実施期間における配布試料の安定性を検討した。GUS 法による種子の試験結果は表 3 に示したが、冷蔵および室温保存 16 日後においても遺伝子組換えパパイヤは全て陽性、非組換えパパイヤは全て陰性と判定された。定性 PCR 法による果肉の試験結果は表 4 および図 5~10 に示した。その結果、冷蔵および冷凍保存で 14 日、室温保存で 7 日後に凍結乾燥を行った場合でも、いずれも遺伝子組換えパパイヤは陽性、非組換えパパイヤは陰性と判定された。

3. ゲル撮影装置の検討

組換え DNA 検査の基礎的検討として、定性 PCR 法の解析に使用する各種のゲル撮影装置について性能を比較した。DNA 分子量マーカーを段階希釈してアガロースゲルで電気泳動した後、各種ゲル撮影装置を用いて撮影し、100bp のバンドについての程度の濃度までバンドが確認できるか比較した。その結果、検討した CCD

カメラではいずれも1ウェルあたりの100bpのDNAのアプライ量が1.875 ng以上のとき100bpのバンドを確認できたが、ポラロイドカメラでは3.125 ng以上アプライしないと100bpのバンドを確認できなかった。以上の結果から、CCDカメラはポラロイドカメラに比べて感度が約2倍優れていることが明らかになった。一方、検討した4種類のCCDカメラ間には、明確な差は認められなかった。

D. E. 考察、結論

株式会社ダイヤモンドスターより入手したハワイ産パパイヤについて確認試験を行い、組換え体、非組換え体の別を試験し、表示通りであることを確認した。現在、遺伝子組換えパパイヤ(55-1)は安全性未審査であるため、日本国内での流通が禁止されているが、本試験の結果より、ハワイ産パパイヤは両者が混合しないよう適切に分別されていることが推察された。

安定性試験の結果、種子を用いるGUS法では、冷蔵保存で16日後まで試験結果に影響を与えないことが明らかになり、外部精度管理で指定した測定期間(冷蔵で試料送付し、試料到着後冷蔵保存し2週間以内に試験)での種子の安定性が確認された。また、果肉を用いるPCR法でも、冷蔵および冷凍保存で14日後まで、試験結果に影響を与えないことが明らかになり、同じく外部精度管理で指定した測定期間(冷蔵で試料送付し、試料到着後直ちに凍結乾燥し、2週間以内に試験)での果肉の安定性が確認された。また、試料送付および参加機関での保存中の事故を想定し、種子(GUS法)では室温保存で16日後まで、

果肉(定性PCR法)では室温保存で7日後まで安定性を検討したが、いずれも安定性が確認された。しかし室温で保存した果肉は、冷蔵で保存した場合と比べ、果肉が軟化すると共にDNA抽出液の230nmの吸光度(糖に由来)が高くなる傾向が認められ、果実の成熟がより進みやすいことがわかった。

定性PCR法の解析に使用する各種のゲル撮影装置について性能を比較した結果、CCDカメラの感度がポラロイドカメラに比べて優れていることが明らかになった。パパイヤ試料の場合は、混入率が100%または0%のいずれかであるため問題は少ないが、CBH351トウモロコシなど混入率のごくわずかな試料を分析する場合などは、ゲル撮影装置によって、判定が異なってくる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし