

表 1 BGLB 培地、EC 培地中での培養に伴うガス産生能

試験菌株	培 養 時 間			
	24 時間培養後のガス産生		48 時間培養後のガス産生	
	BGLB 培地	EC 培地	BGLB 培地	EC 培地
HIC12014	30%	20%	70%	50%
NIHJ	—	—	<5%	—
DH-1	10%	—	25%	—
IFO 3139	20%	—	40%	—
NHL u5/41	10%	5%	10%	10%
NCTC9001	30%	20%	70%	25%
HIC1207	—	—	—	—
HIC 1203	30%	15%	50%	50%
HIC 2211	20%	5%	50%	50%
ATCC 8739	10%	—	40%	40%

表 2 BGLB 培地、EC 培地中での培養 24 時間後、48 時間後の生菌数増加

試験菌株	初発菌数	培 養 時 間			
		24 時間後		48 時間後	
		BGLB 培地	EC 培地	BGLB 培地	EC 培地
HIC12014	2.0×10^1	5.8×10^7	6.8×10^7	7.9×10^6	1.3×10^7
NIHJ	7.0×10^1	1.9×10^7	3.4×10^5	2.0×10^5	3.7×10^6
DH-1	1.0×10^1	5.9×10^7	2.4×10^7	2.5×10^7	7.9×10^6
IFO 3139	7.0×10^1	1.6×10^8	<10	7.1×10^7	<10
NHL u5/41	3.0×10^1	8.2×10^5	3.0×10^7	2.0×10^7	9.6×10^1
NCTC9001	5.0×10^1	1.6×10^8	1.4×10^7	3.9×10^7	6.3×10^6
HIC1207	5.0×10^1	7.2×10^7	<10	7.7×10^3	<10
HIC 1203	9.0×10^1	6.0×10^7	2.9×10^7	4.6×10^6	7.4×10^6
HIC 2211	4.0×10^1	1.2×10^8	2.1×10^7	3.4×10^7	6.2×10^6
ATCC 8739	7.0×10^1	8.9×10^7	2.7×10^7	1.4×10^7	4.5×10^7

表3 BGLB 培地および EC 培地中での *E coli* HIC2211 の経時的菌数変化とガス産生

培地	側定	培養時間					
		接種直後	3時間後	6時間後	24時間後	30時間後	48時間後
BGLB 培地	生菌数測定	2.0×10^1	3.4×10^2	9.5×10^3	1.2×10^8	7.1×10^7	3.2×10^7
	ガス産生	—	—	—	10%	15%	50%
	生菌数測定	1.0×10^1	2.9×10^2	6.9×10^4	7.4×10^8	9.0×10^7	4.0×10^7
	ガス産生	—	—	—	10%	15%	50%
EC 培地	生菌数測定	1.0×10^1	1.1×10^2	5.0×10^4	8.0×10^7	5.4×10^7	4.3×10^7
	ガス産生	—	—	—	20%	30%	60%
	生菌数測定	4.0×10^1	9.0×10^2	5.8×10^3	3.8×10^7	7.5×10^7	7.2×10^7
	ガス産生	—	—	—	15%	15%	60%

表驛の数值は、培地 1mL あたりの生菌数を示す。

ガス産生の確認は、ターラム管中蓄積するガスの%を表示す故

初発菌数は、 1.8×10^2 cfu/mL とした。

表4 大腸菌の発育及びガス産生に対する培養温度の影響

試験菌株	発育及びガス産生			
	44.5°C、24時間培養		32.5°C、24時間培養 ¹⁾	
	発育・増殖	ガス産生	発育・増殖	ガス産生
<i>E coli</i> HIC12014 ²⁾	陽性	陽性	— ⁵⁾	—
<i>E coli</i> HIC2211 ³⁾	陰性	陰性	陽性	陽性
<i>E coli</i> ATCCC8739 ⁴⁾	陰性	陰性	陰性 ⁶⁾	陰性

1) 44.5°Cで24時間培養後、32.5°Cで24時間培養した結果

2) ガス高度産生能を有する菌株

3) ガス中度産生能を有する菌株

4) ガス弱産生能を有する菌株

5) — 実施せず

6) 32.5°C、24時間培養後に生菌確認をした結果、生菌を認めない。

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 4）
—理化学的検査調査試料の作製に関する研究—

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	福原 克治	(財) 食品薬品安全センター	秦野研究所 室長
	鈴木 達也	(財) 食品薬品安全センター	秦野研究所 副主幹
	大隅 昇		文部科学省統計数理研究所 教授

研究要旨

安全で安心な食品を確保するためには、食品中の残留物、汚染物および食品添加物等の各種の化学物質を検査することが必須である。そのためには、検査法の確からしさを確認する手段として、精度管理調査を実施する必要がある。その精度管理調査に使用する検査試料は、検査対象物質の濃度が均一で、検査期間において濃度が安定であることが求められる。このような目的で、検査試料において検査項目の濃度が均一で安定な試料の開発を検討、研究した報告は極めて少なく、適切な検査試料の開発が遅れている。

今年度は、重金属（カドミウム）、残留農薬（有機リン系農薬）、残留動物用医薬品（フルベンダゾール）およびカビ毒（デオキシニバレノールおよびニバレノール）の検査試料について検討した。重金属検査試料の粉碎した白米、残留農薬検査試料のにんじんペースト試料ならびに残留動物用医薬品検査試料の液卵を使用し、それぞれの濃度の均一性および安定性について検討した。一方、カビ毒の検査試料の汚染小麦についても同様の検討を行った。

その結果、いずれの検討試料についても適切な結果が得られ、重金属、残留農薬、残留動物用医薬品およびカビ毒の検査に使用できる調査試料を開発することができた。

A. 研究目的

食品衛生検査に係わる検査機関の外部精度管理調査に使用する「調査試料」の作製方法を確立することを目的として、以下の検討を実施した。

B 研究方法

1 重金属（カドミウム）検査試料

重金属（カドミウム）検査に使用する調査試料として、昨年が続いて白米についてカドミウム濃度の均一性および安定性を調

べ、作製法の再現性について検討した。

1) 試料基材および試薬

白米 ひとめぼれ、宮城県産、生産年 2001 年、硝酸 有害金属測定用、関東化学株式会社、カドミウム標準液（1000 ppm） 原子吸光分析用、関東化学株式会社、水 注射用水、光製薬株式会社

2) 試料作製

①カドミウム添加白米（添加白米）

硝酸酸性溶液にカドミウム標準液（1000 ppm）を加えた後、水で 20 L に定容し、濃

度 2 ppm のカドミウム溶液を調製した。この溶液に白米 15 kg を添加した後、24 時間静置した。この間 5 回、良く攪拌した。ザルで白米を採り、ろ紙上に 3 日間放置して、水分を蒸散後、白米のカドミウム濃度を測定した。

②粉砕白米

①で作製したカドミウム添加白米に適量のカドミウム無添加白米を加え、遠心粉砕機で粉に粉砕して目標濃度（約 0.370 ppm）の粉砕白米を作製した。

3) 測定法

試料中のカドミウムの測定は、食品衛生法に準拠して測定した。すなわち、試料 10g をケルダール分解フラスコに量り、硝酸 40 mL を添加して、加熱、分解した。硝酸による激しい反応が終了後、硫酸 20 mL を加え、溶液が暗色になったら硝酸を 2~3 mL 追加して溶液が透明になるまで加熱を繰り返した。分解液を水で希釈しながらメスフラスコに移し、100 mL に定容した。この試料液 50 mL を採り、DDTC-MIBK 法により抽出を行い、原子吸光光度法により以下の条件でカドミウムを測定した。

原子吸光光度計の条件

原子吸光光度計 AA-660 株式会社 島津製作所

使用ガス	可燃性ガス，アセチレン 支燃性ガス，空気
ランプ	中空陰極ランプ
波長	カドミウム，228.8 nm

2 残留農薬（有機リン系農薬）検査試料

昨年に続いて、にんじんを使用して、残留農薬（有機リン系農薬）検査に使用する調査試料の作製法の再現性について検討した。

1) 試料基材および試薬

にんじん（マイクロヘースト状食材） 株式会社 新進、クロルピリホスおよびフェニトロチオン（残留農薬分析用） 関東化学株式会社、ヘキササンおよびアセトニトリル（残留農薬分析用） 和光純薬工業株式会社

2) 試料作製

にんじんの冷凍品を一昼夜、冷蔵庫中で解凍して、その 5 kg を速やかにテフロンコーティングステンレス容器（20 L 容）に採り、これに有機リン系農薬（クロルピリホスおよびフェニトロチオン、マラチオン）のアセトン溶液を添加した。ステンレス製大型スパーテル 3 本で 5 分間ずつ 3 回、攪拌した後、低温実験室（0~5℃）に保管した。24 時間後に、再度、ステンレス製大型スパーテルで 5 分間、攪拌した。これを 5 個の容器について行い、合わせて混合した後、約 200 g ずつポリプロピレン製容器に小分けにした。小分けにした容器を無作為に 10 個ずつ採取して、それぞれ繰り返し 2 回、有機リン系農薬を測定した。

3) 測定法

試料 20 g を秤量して分液ロートに採り、アセトン 100 mL を加えて 5 分間振とう・抽出した。ろ過を行い、残渣に新たなアセトン 100 mL を加えて 5 分間振とう・抽出を行い先のろ液と合わせて、約 25 mL まで減圧濃縮した。濃縮液に 10 % 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えた後、20% 酢酸エチル含有ヘキササン 100 mL ずつ、2 回、振とう・抽出（10 分間）した。有機溶媒層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下（40℃以下）で濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をアセト 5 mL で溶解してガスクロマトグラフに供した。

ガスクロマトグラフ条件

ガスクロマトグラフ 島津製作所 GC-17A（炎光光度型検出器付）

カラム DB-210 (内径 0.25 mm、長さ 30 mm、膜厚 0.25 μm)

注入口温度 260°C、検出器温度 260°C

カラムオープン温度 60°C (2 min)、昇

温 20°C/min、240°C (15 min) キャリヤ

ーガス ヘリウム、流量 0.8 mL/min

線速度 19 cm/sec、水素 60 kpa

空気 70 kpa、試料導入 スプリット

レス

3. 残留動物用医薬品 (フルベンダゾール) 検査試料

昨年に続いて液卵について残留動物用医薬品 (フルベンダゾール) 検査に使用する調査試料の作製の再現性について検討した。

1) 基材および試薬

液卵 市販の鶏液卵、フルベンダゾール (残留動物用医薬品検査用) (関東化学株式会社)、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノール、無水硫酸ナトリウム (試薬特級) (和光純薬工業株式会社)、アセトニトリル、メタノール 高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業株式会社)

2) 試料作製

水約 1 kg にフルベンダゾールを含むメタノール溶液約 200 mL および液卵 4 kg を加え良く攪拌した。全量を水で 8 kg に調整し、良く攪拌した後、ポリエチレン製容器に約 25 g ずつ分注した。フルベンダゾール作製目的濃度は、0.380 μg/g とした。

3) 測定法

測定操作は食品衛生法に準拠した。液卵 2.5 g を採取して酢酸エチル 50 mL ずつ 2 回抽出し、抽出液を硫酸ナトリウムで脱水した後、濃縮乾固した。残渣をアセトニトリル 50 mL で溶解して、アセトニトリル飽和ヘキサン 50 mL ずつ 2 回抽出して、油

脂分を除去した。アセトニトリル層を濃縮乾固し、液体クロマトグラフの移動相 1 mL に溶解して、高速液体クロマトグラフで測定した。

高速液体クロマトグラフ条件

高速液体クロマトグラフ 島津製作所

LC-10A、検出器 島津製作所 SPD-10A、

検出波長 290 nm、カラム mightysil

RP-18(H) (150×6.0 mm)、移動相 アセ

トニトリル/メタノール 7/13、流量 1.0

mL/min、カラムオープン 40°C

4 カビ毒検査試料の作製

カビ毒 (デオキシニバレノールおよびニバレノール) で汚染された小麦を使用してカビ毒検査の外部精度管理調査試料の作製について検討した。

1) 基材および試薬

カビ毒汚染小麦 農業試験所において、カビ毒 (デオキシニバレノールおよびニバレノール) 産生菌を接種した小麦試料を入手した (作製時の異なる 2 種類 カビ毒汚染小麦 A、カビ毒汚染小麦 B)。デオキシニバレノールおよびニバレノール標準品 Sigma。アセトニトリル、メタノール、酢酸アンモニウム 和光純薬工業(株)、カラム ウォーターズ ODS (内径 2.1 mm×長さ 250 mm)、遠心粉碎機 Retsch (ドイツ型)

高速液体クロマトグラム/質量術計 Waters ZQ

2) 試料作製

①遠心粉碎機 (1.5 mm フィルター) を使用してカビ毒汚染小麦 A、約 7 kg を約 300 g ずつ粉碎・混合した後、米袋 (30 kg 用) に採り、ふり混ぜた。この袋より無作為に 150 g ずつを 5 回、採取して、それぞれのカビ毒 (デオキシニハレノールおよびニハレノール) を測定した。

②上記で作製したカビ毒汚染小麦 160 g に対して無汚染小麦A 340 g の割合でビニール袋中で混合した後、再度、遠心粉碎機（1.5 mm フィルター）を使用して粉碎混合した。この操作を 28 回行って合計約 14 kg の試料を作製した。これを米袋（30 kg 用）に採り、ふり混ぜた後、無作為に約 150 g ずつ、ポリエチレン容器に分取した。無作為に 10 個の容器を選出して、それぞれの容器について2回の繰り返し測定を行い、カビ毒濃度の均一性を確認した。

③遠心粉碎機（1.5 mm フィルター）を使用してカビ毒汚染小麦B、約12 kg を約500 g ずつ粉碎・混合した後、米袋（30 kg 用）に採り、ふり混ぜた。この袋より無作為に150 g ずつを5回、採取して、それぞれのカビ毒（デオキシニバレノールおよびニバレノール）を測定した。ついで粉碎・混合した残りの試料から無作為に約 150 g ずつ、ポリエチレン容器に分取した。その中から無作為に 10 個の容器を採取して、それぞれの容器について2回の測定を行い、カビ毒濃度の均一性を確認した。

④上記で作製した小麦のカビ毒調査試料を、室温に放置（3ヶ月）した後、カビ毒成分の濃度を測定してカビ毒成分の安定性を確認した。

3) 測定法

厚生労働省から提示されている方法（食安発第0717002号）に従って測定した（別紙）。

C. 研究結果

1. 重金属（カドミウム）検査調査試料の作製

1) 粉碎白米（カドミウム添加粉碎白米）

粉碎白米（予定作製濃度約 0.370 ppm）については、小分けにした容器から無作為に容器 10 個採取し、それぞれの容器につ

いて $n=2$ で、カドミウム濃度を測定し、濃度の均一性を調べた。その結果、作製目標濃度約 0.370 ppm に対して、作製した試料の濃度は、 0.375 ± 0.010 ppm と、非常に近似の試料を作製することができた。また、この時のF比が、2.06 と5%水準（F値 3.02）より小さく、精度管理調査に使用する試料として均一な濃度を確保することができた（表1）。

2 残留農薬（有機リン系農薬）検査試料の作製

調査試料は、市販のにんじんスープ基材（収穫後、水蒸気処理してヘーストに加工した製品）に有機リン系農薬（クロルピリホス、フェニトロチオン）を添加して作製した。

無作為に抽出した 10 個の容器について繰り返し 2 回測定した結果、クロルピリホスは、作製濃度が 0.235 ppm、標準偏差 0.005、変動係数 2.0%およびフェニトロチオンは、作製濃度が 0.137 ppm、標準偏差 0.008、変動係数 5.9%であった（表2）。

また、F比はそれぞれ 1.39 および 0.93 と5%水準（F値 3.02）と比較して、小さく容器間の濃度は均一であると判断された（表2）。

3. 残留動物用医薬品（フルベンダゾール）検査調査試料の作製

鶏の液卵に、水を加えた後、フルベンダゾールのメタノール溶液を加えて、攪拌・混合し、残留動物用医薬品添加液卵材料を作製した。容器に分注後、容器 10 個を無作為に採取し、それぞれの容器について $n=2$ でフルベンダゾール濃度を調べた。また、凍結保存し、濃度の安定性についても調べた。その結果、予定作製濃度 0.380

ppm に対して、作製した試料の濃度は、 0.356 ± 0.012 ppm と、予定作製濃度に非常に近い濃度の試料を作製することができた（表3）。また、F比が、1.00 と5%水準（F値 3.02）より小さく、容器間の試料の濃度は、調査試料として適切であった。試料濃度の安定性は、作製後 40 日間、冷凍保存（ $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ ）した試料において、作製当日濃度の $1.00 \pm 5.18\%$ の濃度が確保できた。

4 カビ毒検査調査試料の作製

カビ毒汚染小麦を遠心粉碎機で粉碎・混合してカビ毒（デオキシニバレノールおよびニバレノール）濃度が均一な試料を作製した。その結果（ $n=3$ ）、デオキシニバレノールが 4.73 ppm、標準偏差 0.061 および変動係数 1.3%、ニバレノールが 0.07 ppm、標準偏差 0.0058 および変動係数 8.3% であった。1 回の粉碎・混合において、変動係数がそれぞれ 1.3% および 8.3% と小さく、ほぼ均一な濃度の試料を作製することができた（表4）。さらに、この試料を無汚染小麦と 8/17（8/25 希釈）に混合希釈（希釈混合試料）した。無作為に抽出した試料 10 個について繰り返し 2 回の測定を行い濃度の均一性を確認した結果、デオキシニバレノールが 1.55 ppm、標準偏差 0.091 および変動係数 5.92%、ニバレノールは検出限界以下であった（表5）。作製予定濃度 1.47 ppm に対して作製した試料の濃度は、1.55 ppm と、ほぼ予定濃度の試料を作製することができた。また、F比は 1.53 と、F値 3.02 と比較して小さく、作製した試料間に濃度の差がないことが確認できた。

試料作製法の再現性を調べるために、繰り返し作製して検討した。カビ毒汚染小麦 B を 500 g ずつ遠心粉碎機で粉碎・混合した（2 回目混合試料）。その結果（ $n=3$ ）、デオキシニ

バレノールが 1.41 ppm、標準偏差 0.040 および変動係数 2.8%、ニバレノールが 0.72 ppm、標準偏差 0.025 および変動係数 3.5% であった（表6）。また、無作為に抽出した 10 個の試料について 2 回の繰り返し測定の結果、F比はデオキシニバレノール 1.20 およびニバレノール 1.72 と、F値 3.02 と比較して小さく、作製した試料間に濃度の差がないことが確認できた（表7, 8）。いずれも、1 回目の作製結果と、ほぼ同様の標準偏差および変動係数であった。

試料濃度の安定性について調べた結果、1 回目に作製した希釈混合試料（ $n=3$ ）のデオキシニバレノールは室温 150 日保存後の濃度が 1.74 ppm、標準偏差 0.06 であった。2 回目希釈試料（ $n=3$ ）では室温 90 日保存後の濃度がデオキシニバレノールで 1.34 ppm、標準偏差 0.017、ニバレノールで 0.71 ppm、標準偏差 0.038 であった。作製時と比較して安定性は、それぞれ 112.3%、95.0% および 98.6% と、いずれも安定であると判断された（表9）。

D. 考察

1. 重金属（カドミウム）検査調査試料の作製

1) カドミウム添加白米を粉碎した粉碎白米（カドミウム添加粉碎白米）

先に作製したカドミウム添加白米の濃度を測定した後、カドミウム無添加白米を加えて予定作製濃度のカドミウム添加粉碎白米を作製する方法では、ほぼ 100% の予定作製濃度の調査試料を作製することができること、および小分けした試料容器間のカドミウム濃度の F比（10 個の試料容器から $n=2$ で採取して濃度を測定）が 2.06（5% 水準 F値 3.02）と、濃度の均一性も確保でき、当作製方法が、調査試料の作製方法

として、適切であると判断した。

2 農作物の残留農薬（有機リン系農薬） 検査調査試料の作製

農作物に農薬を添加して調査試料を作製する事前の検討として、収穫後に水蒸気処理により酵素分解したんじんのペースト（スープ用食材の市販品）に有機リン系農薬（クロルピリホスおよびフェニトロチオン）を添加して、濃度の均一性を調べた。

その結果、作製した有機リン系農薬検査調査試料の濃度は、予定作製濃度に対し、クロルピリホスでは 94.0%およびフェニトロチオンでは 91.3%で作製することができた。調査試料として予定作製濃度の試料を適切に作製できることが分かった。

3. 残留動物用医薬品（フルベンダゾール） 検査調査試料の作製

従来、残留動物用医薬品の精度管理試料には食肉を使用してきた。しかし、食肉に直接残留動物用医薬品を添加することが、濃度の均一性の観点から難しく、精度管理調査結果の評価を困難にしていた。そこで、液状の食材として残留動物用医薬品の規格基準がある液卵を使用して、これに残留動物用医薬品（フルベンダゾール）を添加する作製方法を検討した。市販の液卵は、クロマトグラムにフルベンダゾールの測定を妨害する成分の出現はなく、また、濃度の均一性も確保できた。

4 カビ毒検査調査試料の作製

カビ毒による小麦および大麦の汚染は、安全な食品を確保する観点から重要な問題である。そのためには、まず、カビ毒による小麦および大麦の汚染の実態を調べることになり、その検査方法の信頼性が求められる。当研究

においては、その検査の信頼性を担保するために実施される精度管理調査に使用されるカビ毒検査の調査試料の作製法について検討した。その結果、汚染小麦を使用して遠心粉碎機で粉碎・混合する方法により、外部精度管理調査に使用できる調査試料を作製できることを確認した。また、同様な方法により高濃度の試料を希釈して調査試料を作製することも確認した。今後は、他のカビ毒についても、汚染小麦あるいは大麦の入手ができれば、同様な方法で検討する予定である、

E. 結論

精度管理調査においては、外部調査および内部調査を問わず、いかに適正な調査試料が提供できるかが重要な課題である。適正な調査試料を使用した調査であれば、最適な調査結果を得ることができる。この様な観点から以下の結論を得た。

1 カドミウムを添加して作製した白米(高濃度米)にカドミウム無添加白米を加えて、遠心粉碎機で粉碎 混合する方法が、再現性の観点からも作製濃度の調整、均一性および安定性が確保できる適切な方法であることが分かった。

2. 収穫後に水蒸気処理を行ったんじんのペースト（スープ用食材の市販品）に有機リン系農薬添加して作製する方法により、農薬濃度の均一性および安定性において再現性の良い調査試料を作製できることが分かった。

3 液卵に残留動物用医薬品（フルベンダゾール）を添加する方法で、濃度の均一性および安定性において適切な調査試料を作製できることが分かった。

4 カビ毒（デオキシニバレノールおよびニバレノール）で汚染された小麦を用い、遠心粉砕機で粉砕・混合する方法により、カビ毒検査調査試料の作製が可能となった。また、高濃度の試料の希釈による調査試料作製においても、遠心粉砕機で粉砕・混合する方法が採用できることが分かった。

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

表1 白米のカドミウム濃度の均一性の結果

単位 ppm

試料番号	測定①	測定②		
1	0.377	0.369	平均値	0.375
2	0.385	0.376	標準偏差	0.010
3	0.377	0.387	変動係数	2.7
4	0.387	0.384	F比	2.06
5	0.386	0.381		
6	0.381	0.365	有意水準5%	3.02
7	0.384	0.369		
8	0.363	0.355		
9	0.356	0.373		
10	0.363	0.380		

表2 にんじんペーストの農薬濃度の均一性の結果

クロルピリホス 単位 ppm フェニトロチオン 単位 ppm

試料番号	測定①	測定②	試料番号	測定①	測定②
1	0.240	0.240	1	0.127	0.131
2	0.232	0.235	2	0.128	0.142
3	0.231	0.237	3	0.126	0.149
4	0.230	0.231	4	0.128	0.141
5	0.240	0.236	5	0.135	0.128
6	0.229	0.234	6	0.143	0.139
7	0.236	0.230	7	0.147	0.132
8	0.237	0.229	8	0.148	0.143
9	0.239	0.236	9	0.142	0.145
10	0.234	0.247	10	0.125	0.136
平均値	0.235		平均値	0.137	
標準偏差	0.005		標準偏差	0.008	
変動係数	2.0		変動係数	5.9	
F比	1.39		F比	0.93	
有意水準5%	3.02		有意水準5%	3.02	

表3 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	0.343	0.358	平均値	0.356
2	0.365	0.367	標準偏差	0.012
3	0.384	0.361	変動係数	3.4
4	0.377	0.345	F比	1.00
5	0.361	0.336		
6	0.345	0.360	有意水準 5%	3.02
7	0.360	0.345		
8	0.344	0.342		
9	0.361	0.351		
10	0.360	0.352		

表4 1回目混合試料のデオキシニバレゾールおよびニバレゾール濃度

試料番号	デオキシニバレゾール (ppm)	ニバレゾール (ppm)
1	4.66	0.07
2	4.76	0.06
3	4.77	0.07
平均値	4.73	0.07
標準偏差	0.061	0.006
変動係数	1.3%	8.3%

表5 希釈混合試料のデオキシニバレノール濃度の均一性試験の結果
単位 ppm

試料番号	測定①	測定②		
1	1.44	1.51	平均値	1.55
2	1.66	1.54	標準偏差	0.091
3	1.55	1.47	変動係数	5.92%
4	1.75	1.55	F比	1.53
5	1.50	1.35		
6	1.55	1.42	有意水準 5%	3.02
7	1.48	1.63		
8	1.65	1.61		
9	1.54	1.60		
10	1.56	1.54		

表6 2回目混合試料のデオキシニバレゾールおよびニバレノール濃度

試料番号	デオキシニバレゾール (ppm)	ニバレゾール (ppm)
1	1.37	0.69
2	1.45	0.74
3	1.40	0.72
平均値	1.41	0.72
標準偏差	0.040	0.025
変動係数	2.8%	3.5%

表7 2回目希釈試料デオキシニバレノール濃度の均一性試験の結果
単位 ppm

試料番号	測定①	測定②		
1	1.31	1.38	平均値	1.34
2	1.29	1.34	標準偏差	0.036
3	1.30	1.27	変動係数	2.71%
4	1.37	1.35	F比	1.20
5	1.37	1.33		
6	1.35	1.35	有意水準5%	3.02
7	1.31	1.36		
8	1.39	1.36		
9	1.34	1.40		
10	1.38	1.32		

表8 希釈混合試料のニバレノール濃度の均一性試験の結果
単位 ppm

試料番号	測定①	測定②		
1	0.73	0.74	平均値	0.73
2	0.71	0.68	標準偏差	0.049
3	0.73	0.63	変動係数	6.67%
4	0.68	0.69	F比	1.72
5	0.77	0.70		
6	0.77	0.71	有意水準5%	3.02
7	0.67	0.71		
8	0.75	0.80		
9	0.72	0.84		
10	0.77	0.75		

表9 デオキシニバレゾールおよびニバレノール検査試料の安定性

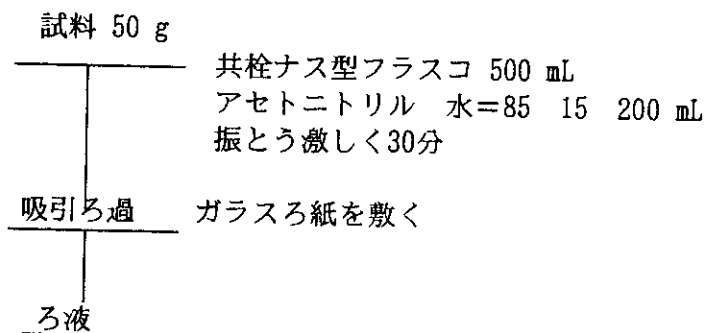
	デオキシニバレゾール (ppm)	ニバレゾール (ppm)
1回目希釈混合試料		
1	1.68	N.D.*
2	1.74	N.D.*
3	1.80	N.D.*
平均値	1.74	—
標準偏差	0.06	—
変動係数	3.4%	—
2回目希釈混合試料		
1	1.33	0.74
2	1.33	0.73
3	1.36	0.67
平均値	1.34	0.71
標準偏差	0.017	0.038
変動係数	1.3%	5.4%

* 検出限界 0.05 ppm

別紙

デオキシニバレノールおよびニハレノール試験法

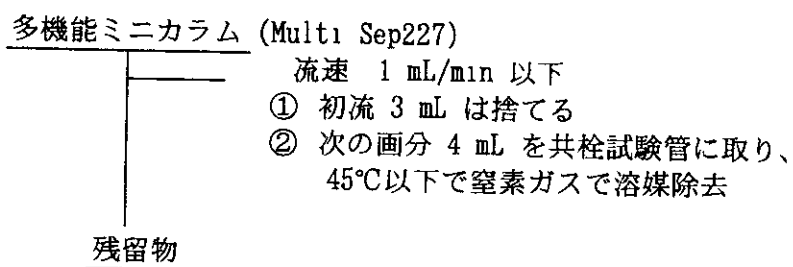
< 抽出 >



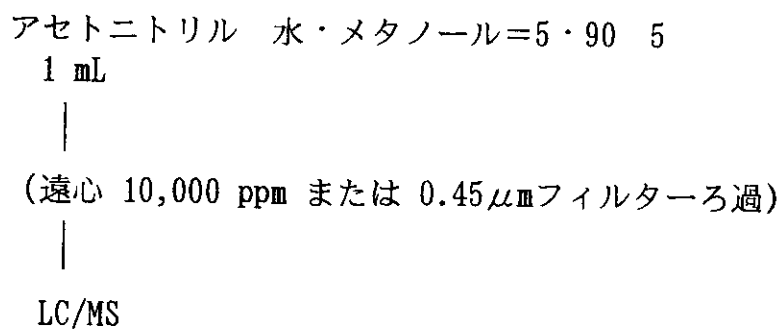
ろ液 10 mL を取る

< 精製 >

抽出で得られた 10 mL をミニカラムへ注入



< 測定 >



平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

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
研究協力者 町井 研士 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部第 2 室 室長

研究要旨

国立医薬品食品衛生研究所で対 Eu ホタテの検査機関向けに小規模に実施されている麻痺性貝毒と下痢性貝毒の外部精度管理調査の現状を調査した結果、麻痺性貝毒検査では天然サンプルを用いるため、陽性サンプルの大量確保と活性を保持したままの長期保存法の確立、均一化に今後の検討課題があると思われ、また、下痢性貝毒検査の検討課題としては、HPLC を用いたオカダ酸の簡便かつ迅速な定量方法の開発と、精度管理用検体へのオカダ酸の最適添加量の見極めが重要と考えられた。

現在危惧される問題点は、マウスアッセイで陰性の貝毒検査用試料を冷凍保存しても、往々遊離脂肪酸量の増加によるサンプルの偽陽性化を示すこと、この事は活性が安定で均一な精度管理用試料作製上の大きな障害となる。したがって遊離脂肪酸の迅速かつ簡便で検出感度の良い微量分析法の確立が必要となり、分析法の検討を開始した。最初に微量分析を可能にするために遊離脂肪酸測定に用いるアセトン抽出液量のスケールダウンを図った。簡便な精製を行うためにボンドエルト NH₂ カラムによる固相抽出法を採用し、液-液分配、濃縮操作を省略した。遊離脂肪酸の測定においては簡便な操作で検出感度に優れる 9-anthryldiazomethane (ADAM 試薬)による蛍光誘導体化と HPLC/蛍光検出により測定を行った。さらに内部標準法を採用し、誘導化による測定誤差を補正した。その結果、微量で簡便かつ精度の良い脂肪酸測定が可能となった。今後は本法を用いて収集した貝試料中の遊離脂肪酸含量の基礎的データに基づき、活性の変動が少なく、評価に影響を与えないような精度管理用試料作りの指標を樹立し、遊離脂肪酸の増加と貝毒の毒性発現との関係に関する研究の展開を図りたい。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査は現在、理化学的検査調査として、食品添加物、重金属、残留農薬、残留動物用医薬品が行われ、細菌学的検査調査として一般細菌数、細菌同定について行われている。

一方、貝毒検査については外部精度管理調査が実施されていない。貝毒検査については、食品マトリックスが生鮮海産物のため、保管条件等には特に注意が必要で、また、貝毒の判定においては、動物実験によるアッセイ法であるため、詳細な検出精度の再確認等が必要と考えられた。国内では麻痺性貝毒と下痢性貝毒の外部精度管理調査については国立医薬品食品衛生研究所の町井研士博士が対 Eu 輸出ホタテの検査機関に対して小規模に実施している。そこで初年度は、町井博士のご厚意により国立医薬品食品衛生試験所で実施している麻痺性貝毒と下痢性貝毒の外部精度管理調査を補助する事より開始した。

また、下痢性貝毒調査用のマウスアッセイのための外部精度管理用リファレンスマテリアルを安定して供給する上での問題点としては、陰性サンプルを冷凍保存すると遊離脂肪酸の増加によりアッセイ時に往々マウスが死亡(偽陽性化)し、精度管理用サンプルとして不適切な試料に変化する事が知られている¹⁾。そこで試料保存期間中や輸送中に遊離脂肪酸の増加と毒化が平行に起こるかどうかの基礎的データを取り、これらの事象について確認する必要が生じた。

そこで今年度は目的の遊離脂肪酸を簡便で微量かつ効率的に測定できる分析法を確立することとした。

B. 研究方法

1)国立医薬品食品衛生研究所で行っている貝毒の外部精度管理調査実施手順の概略を以下に示した。

1 a)麻痺性貝毒検査調査

麻痺性貝毒の活性本態のサキシトキシンは入手が困難でありかつ化学兵器禁止特定物質の規制等に関する法律²⁾により特定化学物質に指定されているので、陽性試料には毒化した天然試料を用いている。陽性サンプルと陰性サンプルを、AOAC 試験法³⁾によるマウスアッセイ法による確認後に各検査施設に冷凍送付した。

1 b)下痢性貝毒検査調査

下痢性貝毒については公定法の安元バイオアッセイ法⁴⁾を用いて予め確認した陰性試料に、毒性が出ると予想される濃度の市販のオカダ酸の標準品をサンプル管に附着させ、陰性試料を添加後冷凍保存した。陽性サンプルと陰性サンプルの相違はサンプル管に附着したオカダ酸の有無による。従って各検査施設は抽出に先立ちサンプル管に附着したオカダ酸を溶剤で抽出し試料に添加する工程が必要になる。陽性サンプルと陰性サンプルの一部についてマウスアッセイによる定性確認後各検査施設に冷凍輸送した。

2)固相抽出と ADAM 試薬による蛍光 HPLC による遊離脂肪酸の測定

2 a)試薬

蛍光化試薬 フナコン製 9 anthryl diazometane (ADAM)試薬を用いた。反応用に 0.1% ADAM MeOH 溶液を調製した。

溶剤 アセトンと酢酸及びジエチルエーテルは和光純薬製の試薬特級品を用いた。MeOH、MeCN、イソプロパノールは和光純薬製 HPLC グレードを用いた。CHCl₃ 5000 は和光純薬製を用いた。

脂肪酸標準品 myristic acid (C14 0), palmitic acid (C16 0), stearic acid (C18 0), oleic acid (C18 1), linoleic acid (C18 2), arachidic acid (C20 0), palmitoleic acid (C18 4), cis 5, 8, 11, 14, 17-eicosa pentaenoic acid (EPA) (C20 5) は GLサイエンス社製を用いた。Cis 4, 7, 10, 13, 16, 19-eicosapentaenoic acid sodium salt はシグマ社製を、arachidonic acid (C20 4) は ICN biomedical 社製、cis 4, 7, 10, 13, 16, 19- docosahexaenoic acid (C22 6) は、CAYMAN Chem 社製を用いた。

内部標準物質 docosanoic acid (C10 0) は GLサイエンス社製を用い 10 μg/mL の濃度になるように CHCl₃ に溶解した。

脂肪酸混合液 上記 10 種の脂肪酸を夫々 10 μg/mL の濃度になるように CHCl₃ に溶解した。

2 b)抽出

抽出操作は下痢性貝毒試験法に準じて行った。予め細切した帆立貝の剥き身 125 g をアセトン 275 mL を用い 1000 rpm, 3 min ホモジナイズする。減圧濾過後、残渣に 250 mL のアセトンを加え、同様の条件でホモジナイズした。この操作は 2 回繰り返した。濾液を合し、良く攪拌した後、数 mL を脂肪酸測定用のアセトン抽出液として分取した。

2 c)精製

アセトン抽出液 100 μL を窒素気流中で乾涸した後 4 mL の CHCl₃ に溶解する。Varian 製ボンドエリート、BOND ELUT LRC-NH₂, 500MG を Hexane 2 mL でコンディショニングを行う。コンディショニング後先に調製した CHCl₃ 溶液 4 mL をボンドエリートにアプライする。遊離脂肪酸をボンドエリートに吸着後、CHCl₃ / iso propanol (2 1), 4 mL と 2%AcOH / diethyl ether 4 mL を順次溶出し、2%AcOH / diethyl ether 4 mL 溶出画分を diethyl ether で 5 mL に定容して蛍光誘導体用のサンプルとした。

2-d)蛍光誘導体化

蛍光誘導体用の遊離脂肪酸画分 250 μL に内部標準物質 100 μL を加えて窒素気流中で乾涸する。残渣に ADAM 試薬 100 μL を添加し、常温、遮光下で 1 時間反応して HPLC 用のサンプルとした。

2 e)機器

ポンプ 東洋曹達工業製 CCPM グラジエントポンプと CCP 用コントローラを使用した。

カラム 野村化学社製 Deverosil ODS 5 (250 mm X 4.6 mm ID) を用いた。

移動相 A (MeCN-MeOH-H₂O, 8 1 1, v/v/v)と B (MeOH)。溶出条件は流速 1.1 mL/min で室温下グラジエント溶出を行った。グラジエント条件は 100% A を 15 分保持した、その後 55 分に B が 100 % になるよう溶出し、90 分まで 100 % B を保持した。

検出器 東洋曹達工業製 FS-8000 蛍光検出機を用い、Em 412, Ex 365 で検出した。

レコーダー 東洋曹達工業製 Chromatocorder 21 を用い、ATT 4, chart speed 0.2 cm/min で記録した。

定量 サンプル注入量, 20 μ L, ピークの帰属は IS による保持時間の補正後、標準品との直接比較により行った。定量計算は IS で補正後ピーク面積法により行い、検量線は最小二乗法により行った。

C. D. 結果及び考察

1) 国立医薬品食品衛生研究所で行っている貝毒の外部精度管理調査手順の概略

1 a) 麻痺性貝毒検査調査の概略

麻痺性貝毒の活性本態のサキシトキシンは入手が困難かつ化学兵器禁止特定物質の規制等に関する法律²⁾により特定化学物質に指定されているので、陽性サンプルには毒化した天然サンプルをマウスバイオアッセイ法により陽性を確認後用いている。陽性サンプルと陰性サンプルを、AOAC 試験法³⁾によるマウスアッセイ法で毒性の有無を確認後に各検査施設に冷凍送付した。

天然サンプルを用いるため陽性サンプルの大量確保と活性を保持したまま長期保存法の確立、均一化に今後の検討課題があると考えられる。

1 b) 下痢性貝毒検査調査の概略

下痢性貝毒の陽性サンプルは公定法の安元バイオアッセイ法⁴⁾を用いて予め確認した陰性試料に、毒性が出ると予想される濃度の市販のオカダ酸の標準品をサンプル管に附着させて陰性試料と共に冷凍した。従って各検査施設は抽出に先立ちサンプル管に附着したオカダ酸を溶剤で抽出し試料に添加する工程が必要になる。陽性サンプル

と陰性サンプルは、マウスアッセイで毒性の有無を確認後各検査施設に冷凍輸送する。確認試験の結果によりオカダ酸の量を適宜加減することもある。

今後の下痢性貝毒の検討課題として HPLC を用いたオカダ酸の定量方法の開発と、精度管理用検体として安定した活性の得られるオカダ酸の最適添加量の見極めが重要と思われる。その他オカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中熱分解等により本来の力価が失われる可能性も検討する必要がある。また、冷凍保存中に遊離脂肪酸の増加がマウスアッセイ変動の要因となることがいわれているが、それについては次項に述べた。

また貝毒検査全体について言える事であるが、比較的活性の出やすい天然由来の生鮮食品マトリックス独特のリスクがあり、また天然物には確認の困難な毒素産生のシステムの存在を払拭しきれず、今後検討すべき点が多い。

2) 遊離脂肪酸

下痢性貝毒調査用のマウスアッセイのための外部精度管理用リファレンスマテリアルを安定して供給する上での問題点として、陰性サンプルを冷凍保存すると遊離脂肪酸の増加により往々マウスが死亡(偽陽性化)し、精度管理用サンプルとして不適切試料に変化する事が知られている。安定した外部精度管理調査用試料を得るために、試料保存中や輸送中に遊離脂肪酸の増加と毒化が平行に起こるかどうかの基礎的データを得る必要が生じた。

そこで今年度は遊離脂肪酸を微量かつ効率的に測定してその事実を確認するために、

遊離脂肪酸の微量分析法を確立することとした。遊離脂肪酸測定は鈴木ら^{5,6}による方法を変更して行った。主な変更点は以下の通りである。マウスアッセイに支障を来さないようマウスアッセイ時に得られるアセトン抽出液を一部分注するか、マウスアッセイ後の残りの抽出液（界面活性剤入りの生理食塩水に懸濁したサンプル）で行い、出来るだけ微量で行うよう計画した。遊離脂肪酸測定に用いる溶液量を 100 μ L 程度にスケールダウンした。これは注入する遊離脂肪酸の量と文献値から概算して決定した。Hexane MeOH による液液分配をより操作の簡便な固相抽出法に変更した。固相抽出法は川崎ら⁷)によるボンドエルト NH₂ による遊離脂肪酸分離法を用いた。その結果、液液分配と減圧濃縮操作のない、簡便な精製法となった。遊離脂肪酸の検出には微量で感度良くさらに誘導体化に特別な装置や技術を要しない 9-anthryl diazomethane (ADAM 試薬)による蛍光誘導体化と HPLC による蛍光検出による測定を行った。

ADAM 試薬はほぼ定量的に反応が進行するが、条件により反応中間体を検出する可能性もあるので、内部標準物質(IS)の使用を検討した。内部標準物質として、貝類についての報告がなく、貝試料由来のピークと重ならないような保持時間を持つ IS を検討した。飽和脂肪酸の鎖長と保持時間に相関が見られる事(図 1)に着目し、decanoic acid (C10:0) が最適と考え使用したところ良好な結果が得られた(図 1)。

各遊離脂肪酸の定量下限と相関係数を表 1 に示したが、総ての脂肪酸が 1 ~ 10 μ g/mL の濃度で良好な直線性を示した。

添加回収実験は各脂肪酸 8 μ g をアセトン抽出液 50 μ L に加えて scheme 1 に従って抽出操作を行い、回収率を求めた(表 2)。その結果 85 % ~ 112 % の良好な回収率が得られた。

4 ヶ月冷凍保存したホタテ貝の剥き身のサンプルについて遊離脂肪酸量を測定した(図 2)。脂肪酸組成、アセトン抽出液中及び剥き身中の脂肪酸量の定量結果について表 3 ~ 表 5 に示した。試料 1g 中の脂肪酸総量はおおよそ 1464 μ g で鈴木ら⁵)とほぼ同様の値を示した。因みに本実験で用いたアセトン抽出液についてはマウスアッセイで陰性であった。さらに、マウスアッセイ時に用いた界面活性剤入りのサンプルをアセトンに希釈後遊離脂肪酸を定量したところほぼ同様の定量結果が得られた(データは示していない)。この事によりマウスアッセイでの残りのアセトン抽出液からも本法で遊離脂肪酸が測定できることが明らかになった。

以上より、貝毒検査用のアセトン抽出液の微量かつ簡便な遊離脂肪酸測定法が確立できた。今後は本法を用いた貝試料中の遊離脂肪酸含量の基礎的データを収集して、精度管理用試料作製に役立てると共に、遊離脂肪酸の増加と貝毒の毒性発現との詳細な検討を行う予定である。

E. 結論

国立医薬品食品衛生研究所で対 Eu 輸出ホタテ検査機関に対して小規模に実施している麻痺性貝毒と下痢性貝毒の外部精度管理調査について再検討結果、麻痺性貝毒検査では天然サンプルを用いるため陽性サンプルの大量確保のやり方と活性を保持したままの長期保存操作法の確立、試料の均一

化法に今後の検討の課題があると考えられた。下痢性貝毒検査の検討課題として、HPLCを用いたオカダ酸の定量方法の開発と、精度管理用検体としてオカダ酸の最適添加量の見極めが挙げられる。

遊離脂肪酸測定においては、用いるアセトン抽出液の量のスケールダウンを図り、微量分析を可能にした。精製にはボンドエルトNH₂による固相抽出法を採用して液-液分配、濃縮操作に代え簡便化した。遊離脂肪酸の測定には簡便な操作で検出感度に優れる 9-anthryldiazomethane (ADAM 試薬)による蛍光誘導体化と HPLC による蛍光検出による測定を行った。さらに内部標準法を採用し、誘導化による測定誤差を減少を図った結果、微量で簡便かつ精度の良い脂肪酸測定が可能となった。今後は本法を用いた貝試料中の遊離脂肪酸含量の基礎的データを収集して安定で再現性の良い外部精度管理調査試料の作製に役立てると共に、遊離脂肪酸の増加と貝毒の毒性発現との関連についての解明に大きく寄与すると考えている。

謝辞

本研究に対しご協力を頂き、研究の場をご提供頂いた国立医薬品食品衛生研究所、食品衛生管理部第2室室長の町井研士博士に衷心より感謝し、同食品衛生管理部長の山本茂貴博士に深甚の謝意を表します。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) Fukusl, A et al FISHERIES SCIENCE 2003, 69 1080-1082
- 2) 官報号外第 64 号、平成 7 年 4 月 5 日、法律第 65 号、化学兵器禁止及び特定物質の規制等に関する法律
- 3) AOAC official methods of analysis (2000) Natural toxins chapter 49, p59
- 4) 昭和 56 年 5 月 19 日 厚生省通知環乳第 37 号
- 5) Suzuki, T et al Lipids, Vol 31, No 6 (1996), p641-645
- 6) Suzuki, T Journal of Chromatography A, 677 (1994) 301 306
- 7) Kawasaki, et al Biol Pharum Bull 17(10) 1321 1325 (1994)

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