

表5 市販牛乳及び粉ミルク中のPBDDs/DFsのTEQ濃度

pg-TEQ / g fat base	牛乳				粉ミルク			
	1	2	3	4	①	②	③	④
2378-TeBDF	N.D.	0.050	N.D.	0.041	0.054	0.015	0.021	0.064
2378-TeBDD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12378-PeBDF	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
23478-PeBDF	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12378-PeBDD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
123478-HxBDF	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
123478-HxBDD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
123678-HxBDD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
123789-HxBDD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	N.D.	0.050	N.D.	0.041	0.054	0.015	0.021	0.064

N.D.: not detected

(3) 母乳、市販牛乳及び粉ミルク中に含まれていた3種のダイオキシン類の総毒性濃度の比較

図2は、母乳、市販牛乳及び粉ミルク中の3種のダイオキシン類の総毒性濃度を比較したものである。その結果、母乳、牛乳及び粉ミルクのダイオキシン類総濃度は、それぞれ6.2~23.7 pg-TEQ、1.3~2.74 pg-TEQ及び0.38~2.45pg-TEQ/g-脂質重量であった。また、ダイオキシン類の総毒性濃度に対する各ダイオキシン類の相対比率は、母乳においては、PCDDs/DFs; 62~93%、PXDDs/DFs; 3.9~31%及びPBDDs/DFs; 0.5~1.4%であったのに対して、牛乳と粉ミルク

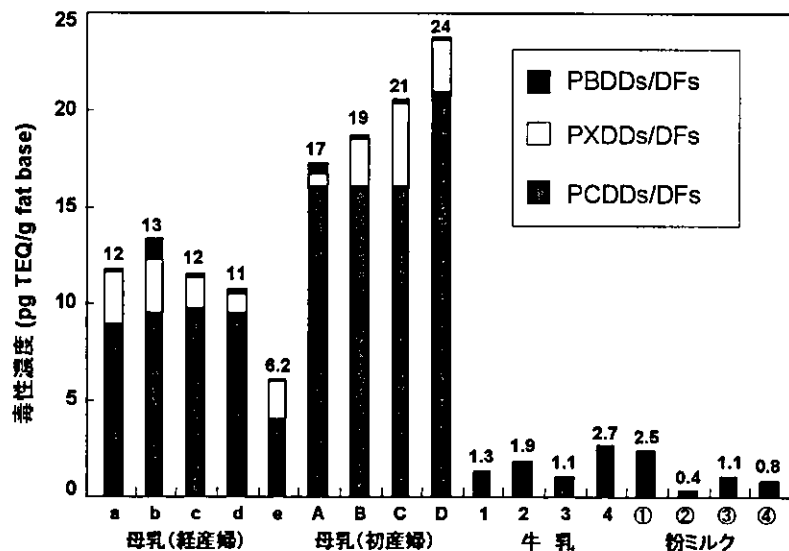


図2 母乳、牛乳及び粉ミルク中に観察されたダイオキシン類の毒性濃度の比較

のそれらは、PCDDs/DFs; 92~100%、PXDDs/DFs; 0% 及びPBDDs/DFs; 0.1~8.0% であることが判明した。それ故に、母乳においては、PCDDs/DFs の汚染レベルの更なる低減化が必要なこと、並びにPXDDs/DF が著者の予想を遙かに越えて極めて高いことが明らかとなった。とりわけ、今回調査したのは9異性体のみであったが、理論的には2,378体だけでも1000種類以上存在すると推定される、PXDDs/DFs の発生源や汚染経路の解明が、今後のダイオキシン類による母乳汚染における重要な課題であることが考察された。この考察は、上記の母乳における3種のダイオキシン汚染レベルを基礎データとして、乳児や新生児に対する耐容1日摂取量を求めた場合(母乳摂取量; 150 ml/kg-体重/日として換算)に、その平均摂取量(平均毒性寄与率)がPCDDs/DFs; 55 pg-TEQ/kg-体重/日(平均80%)、PXDDs/DFs; 11 pg-TEQ/kg-体重/日(平均17%) 及びPBDDs/DFs; 1.5 pg-TEQ/kg-体重/日(平均3%) であることが試算され、著者の予想以上に乳児等のPXDDs/DFs の摂取量が高いことから支持された。また併せて、多くの生体試料中で高頻度に検出されるコプラナーPCBの類縁化合物である、塩素・

臭素化 Co-PXB に関しても早急な検討が必要であることが推察された。従って、現在、上記の標準品が極めて不足していることより、今回調査した標準品以外の PXDDs/DFs や Co-PXB の標準品を入手でき次第、より詳細な検討が必要であるものと確信された。一方、牛乳や粉ミルクにおいては、ダイオキシン類の汚染レベルは極めて軽度であること、しかも PXDDs/DFs や PBDDs/DFs は、ほとんど無視できる汚染レベルであることが判明した。

#### 【引用文献】

- 1) 平成9・10年度 厚生科学研究「母乳中のダイオキシン類に関する調査」平成11年8月
- 2) 平成9～11年度 厚生科学研究「母乳中のダイオキシン類濃度等に関する調査研究」平成12年12月
- 3) Noren, K., Meironyte, D.: Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years, *Chemosphere*, **40**, pp. 1111-1123 (2000)
- 4) Akutsu, K., Kitagawa, M., Nakazawa, H., Makino, T., Iwazaki, K., Oda, H., Hori, S.: Time-trend(1973-2000) of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk, *Chemosphere*, **53**, pp. 645-654 (2003)
- 5) Watanabe, I., Tatsukawa, R.: Formation of brominated dibenzofurans from the photolysis of flame retardant Decabromobiphenyl ether in hexane solution by UV and sun light, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**, pp. 953-959 (1987)
- 6) Eriksson, J., Jakobsson, E., Marsh, G., Bergman, A.: Photo decomposition of brominate diphenylethers in methanol/water, Abstracts of BFR 2001 (Stockholm) pp. 203-206 (2001)
- 7) Hayakawa, K., Takatsuki, H., Watanabe, H., Sakai, S.: Polybrominated diphenyl ethers, polybrominated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans and monobromo-polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans in the atmosphere and bulk deposition in Kyoto, Japan. *Chemosphere* **57**, pp. 343-356 (2004)
- 8) Ohta, S., Nishimura, H., Nakao, T., Aozasa, O., Okumura, T. and Miyata, H.: Contamination levels of PBDEs, TBBPA, PCDDs/DFs, PBDDs/DFs and PXDDs/DFs in the environment of Japan, *Organohalogen Compounds* **57**, 57-60 (2002)
- 9) 厚生省：平成12年 母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル（平成12年12月22日）
- 10) Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunstrom, B., Cook, P., Freeley, M., Giesy, J.P., Liem et.al.: *Environment Health Perspectives* **106**, pp775-792 (1998)
- 11) Aozasa, O., Ohta, S., Nakao, T., Nishimura, H., Okumura, T., Miyata, H.: Monthly variation in blood dioxin level, characteristics of isomer composition, and isomer changes in residents near an incineration facility, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **70**, 660-667, 2003

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

「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」

平成 16 年度  
分担研究報告書

食品中ダイオキシン類分析の信頼性確保に関わる調査研究

分担研究者 米谷民雄

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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（平成16年度）

食品中ダイオキシン類分析の信頼性確保に関わる調査研究

主任研究者 柳澤 健一郎（財）食品薬品安全センター 特別参事  
分担研究者 米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所 部長  
協力研究者 松田 りえ子 国立医薬品食品衛生研究所 室長

研究要旨

8カ所のダイオキシン類分析機関に試料を配布し、報告された分析結果を比較した。試料として、市販の茶を均一に混合し粉末としたものを用いた。今回の試料に選んだ茶のTEQは1pg/g以下であり、魚試料と比べて1/5以下の濃度であった。このような試料を用いても、TEQで22%程度の機関間RSDが得られた。従って、食品中のダイオキシン類分析の品質はかなり高いと考えられる。

A. 研究目的

近年、ダイオキシン類による健康への危害が、社会的に大きな問題となっている。ヒトへのダイオキシン類曝露の主要な経路は食品であると考えられており、ダイオキシン類曝露の影響を精密に評価するためには、多数の食品の分析値や、トータルダイエット試料を分析した結果から、食品に含まれるダイオキシン類の量の分布を知り、食品からのダイオキシン類摂取による健康リスクを評価しなければならない。

正しいリスク評価のためには、食品中のダイオキシン類の分析を注意深く行って、正確な分析値を得ることが重要である。しかし、前述のように食品からのダイオキシン類摂取量の総摂取量に対する割合は高いとはいえ、個々の食品におけるダイオキシン類の濃度は、たとえば飛灰などに比較すると非常に低い。また、多くの成分を含んだ複雑なマトリクスからの抽出のためには、長時間にわたる煩雑な前処理が必要となる。このため、ダイオキシン類の分析値は、食品のマトリクスによる妨害に加えて、試

験室の空気や試薬の汚染といった、分析環境からのコンタミネーションの影響を受ける可能性が高い。このように、食品中のダイオキシン類の分析結果には大きな誤差が伴う可能性があり、このような分析値に基づいたリスク評価は、誤った結論に陥る危険もある。

食品からのダイオキシン類摂取量を求め、さらにその生体への影響を評価するためには、単に多数の食品中のダイオキシン類分析値を収集するだけでは、その結果の信頼性は低いものとなる。正しい評価のためには品質の保証された分析値に基づいた推定が不可欠である。

分析値の品質あるいは正当性を保証するために、分析の精度管理あるいは品質管理を取り入れなければならない。品質の保証された分析値を得るために、厚生省、環境庁等が作成したダイオキシン類分析に関連したガイドライン・マニュアル中には、分析法だけではなく、測定データの品質管理に関する項目が設定されている。品質管理項目としては、分析法のバリデーション、分析時の信頼性の確認、データ

の管理・評価、内部精度管理の実施に加えて、外部精度管理に参加することが規定されている。外部精度管理は技能試験ともいわれ、多数の試験機関が共通試料を分析した結果を相互比較する事によって、個々の分析機関の能力を客観的に評価する手法である。

本研究では、ダイオキシン類分析の技能試験方法を検討する目的で、8機関を対象として外部精度管理を実施した。試料として、ダイオキシン類濃度の低い植物性試料である茶粉末を使用した。

## B. 研究方法

8カ所のダイオキシン類分析機関に試料を配布し、報告された分析結果の比較及び統計解析を実施した。

試料 市販の茶を均一に混合し粉末としたものを試料とした。

試料を調製した日本食品分析センターと、試料を配布した国立医薬品食品衛生研究所食品部で3試料づつを抜き取って測定し、均一性を確認した。

### 技能試験結果の評価

8参加機関からの報告値および日本食品分析センターと国立医薬品食品衛生研究所食品部の分析値について、全ての異性体ごとに、平均値、標準偏差(SD)、相対標準偏差(RSD)を求めた。はずれ値を含む可能性もあるため、頑健な平均、標準偏差、相対標準偏差も求めた。頑健な統計量の算出には、algorithm Aを用いた。検出下限以下の分析値は除き、分析値が報告されたもののみについて、統計量を計算した。

zスコアの計算は、頑健な統計量に基づいて行った。

## C. 研究結果

8参加機関全てから分析結果が報告された。これに、試料の均一性評価を実施した、食品分析センターおよび国立医薬品食品衛生研究所

のデータを加えて解析を行った。

Table 1に各試料の分析値、Table 2に全ての分析結果の最大値、最小値、平均値、SD、RSD(%で表示)、頑健な平均値、頑健なSD、頑健な統計量から計算したRSD%を示す。報告値から計算したTEQの統計量も示した。

Table 3には、頑健な統計量に基づいて計算したzスコアを示した。Figure 1は参加機関毎にzスコアをまとめてグラフとして示した。参加機関中には、全ての異性体について正あるいは負のスコアが偏って現れる機関が多く見られた。

## D. 考察

### 試料の均一性

測定による誤差の影響が少ないと考えられる、比較的高濃度の異性体の測定値から試料の均一性を評価したところ、RSDは5%以下であり、今回調製した試料は技能試験の目的にかなうと考えられた。

### 試料の分析値のばらつき

濃度の低い異性体では、参加機関間の報告値の変動は30%程度であった。比較的濃度の高い3,3',4,4'-TCB(11pg/g)のRSDが20%程度、2,3,3',4,4'-PeCB(21pg/g)のRSDが11%、2,3',4,4',5-PeCB(48pg/g)のRSDが13%であった。報告値から計算したTEQの変動は22%程度のRSDとなった。今回の試料に選んだ茶のTEQは1pg/g以下であり、魚試料と比べて1/5以下の濃度である。このような試料を用いても、TEQで22%程度の機関間RSDが得られたことは、食品中のダイオキシン類分析の品質はかなり高いことを示している。

Table 3には、個々の異性体毎のzスコア及びTEQのzスコアを示した。TEQで大きなzスコアを与えた機関はなかった。Fig. 1には個々の異性体ごとに計算したzスコアを示した。TEQでは大きくはずれた値はないが、個々の異性体では、3以上のzスコアとなった機

関があった。大部分の z-スコアが正あるいは負に偏っている機関がみられた。これは例年認められる傾向であり、個々の機関で用いている標準品あるいは内標準の濃度等にバイアスの要因があることが示唆された。これらの原因を確定し、分析値のバイアスを小さくすることが、今後の信頼性保証の上で重要である。

Table 4 には、1998 年から 2003 年に実施した、食品中のダイオキシン類外部精度管理の結果を示す。初期に認証標準物質等を試料として用いたが、2001 年以降はダイオキシン類が含まれる可能性のある食品を用いて試料を作成している。これらの試料の均一性も外部精度管理の目的には十分であり、さらに自然汚染試料であるところから、分析の能力評価にはふさわしいと考えられる。また、徐々に低濃度の試料を取り入れており、いわゆる困難な分析での技能が評価されている。

Figure 2 は、各試料の TEQ と室間再現性の関係を表示している。見やすくするために、横軸は対数表示とした。全体として、TEQ の増加と共に RSD は低下している。植物性試料であるハウレンソウ及び茶はいずれも TEQ が 1 以下であり、室間再現性は 20%以上となった。TEQ が 1 以上の試料では、RSD は 20%以下となった。

この結果、我が国の分析機関は、TEQ 1pg/g 程度の試料については、信頼できる分析能力を有していると考えられる。

#### E. 結論

技能試験の結果から、TEQ が 1pg/g 以下の試料においても、試験室間の変動は 20%RSD 程度であることが示され、我が国における食品中のダイオキシン類分析値の信頼性が保証された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

The Proficiency Testing of  
Determination of Dioxins in Food  
R. Matsuda, T. Tsutsumi, M. Toyoda, T.  
Maitani; Organohalogen Compounds  
Volume 66 (2004), 576-581.

##### 2. 学会発表

The Proficiency Testing of  
Determination of Dioxins in Food  
R. Matsuda, T. Tsutsumi, M. Toyoda, T.  
Maitani, Dioxin 2004, Berlin (2004)

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1 茶試料を用いたダイオキシン類精度管理結果

分析値	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	mean	SD	RSD	
P	0.056	0.037	0.047	0.033	0.059	0.013	0.046	0.000	0.040	0.030	0.040	0.040	0.014	34.9
C	0.179	0.128	0.177	0.108	0.217	0.028	0.160	0.192	0.135	0.127	0.145	0.145	0.053	36.7
D	0.155	0.096	0.116	0.091	0.169	0.028	0.077	0.067	0.091	0.057	0.095	0.095	0.043	45.2
D	0.184	0.204	0.274	0.168	0.317	0.052	0.192	0.118	0.187	0.121	0.182	0.182	0.076	41.9
s	0.178	0.135	0.190	0.127	0.249	0.047	0.183	0.192	0.160	0.141	0.160	0.160	0.053	33.2
	1.80	1.39	1.95	1.13	2.58	0.36	2.12	2.21	1.69	1.56	1.68	1.68	0.63	37.3
OCDD	8.0	7.1	10.1	5.8	13.4	1.4	11.9	11.3	8.9	8.2	8.6	8.6	3.4	39.9
2,3,7,8-TCDF	0.58	0.39	0.37	0.34	0.46	0.11	0.40	0.48	0.33	0.33	0.38	0.38	0.12	32.7
1,2,3,7,8-PeCDF	0.67	0.55	0.65	0.41	0.75	0.08	0.37	0.70	0.40	0.39	0.50	0.50	0.21	41.3
2,3,4,7,8-PeCDF	0.53	0.43	0.56	0.40	0.67	0.14	0.54	0.59	0.45	0.42	0.47	0.47	0.15	30.7
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.43	0.38	0.52	0.31	0.63	0.10	0.41	0.51	0.38	0.34	0.40	0.40	0.14	35.7
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.65	0.42	0.56	0.33	0.77	0.10	0.48	0.58	0.45	0.38	0.47	0.47	0.19	39.4
1,2,3,7,8,9-HxCDF		0.027	0.051	0.024			0.035		0.035					
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.77	0.60	0.75	0.49	0.91	0.22	0.88	0.86	0.67	0.65	0.68	0.68	0.21	30.6
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.58	1.26	1.81	1.00	2.57	0.27	2.05	2.01	1.63	1.45	1.56	1.56	0.63	40.5
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.30	0.21	0.29	0.18	0.46	0.04	0.31	0.38	0.27	0.24	0.27	0.27	0.11	42.9
OCDF	1.66	1.26	2.00	0.96	2.46	0.11	2.13	2.16	1.57	1.47	1.58	1.58	0.69	43.6
3,3',4,4'-TCB	13.4	10.3	11.3	10.1	14.4	6.2	11.5	12.4	10.7	10.1	11.0	11.0	2.2	20.2
3,4',4',5'-TCB	1.50	1.50	1.42	1.33	1.85	0.86	1.33	1.56	1.34	1.25	1.39	1.39	0.25	18.1
3,3',4,4',5'-PeCB	2.11	1.94	1.92	1.74	2.51	1.65	1.76	1.93	1.97	1.78	1.93	1.93	0.24	12.6
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.326	0.337	0.382	0.373	0.500	0.385	0.331	0.398	0.406	0.372	0.381	0.381	0.050	13.2
2,3,3',4,4'-PeCB	20.8	23.5	21.4	18.3	25.9	18.0	21.1	20.6	21.7	19.9	21.1	21.1	2.3	11.0
2,3,4,4',5'-PeCB	1.97	2.28	2.00	1.98	2.45	1.97	1.92	1.92	2.11	1.93	2.05	2.05	0.18	8.6
2,3',4,4',5'-PeCB	54.0	54.2	50.1	40.6	55.0	36.4	50.5	48.0	47.3	45.0	48.1	48.1	6.1	12.6
2',3,4,4',5'-PeCB	1.24	1.64	1.60	1.17	1.92	2.72	1.59	1.33	2.08	1.88	1.72	1.72	0.46	27.0
2,3,3',4,4',5'-HxCB	4.19	4.21	3.81	3.20	4.37	3.23	3.09	3.39	3.56	3.24	3.63	3.63	0.48	13.3
2,3,3',4,4',5'-HxCB	1.46	1.59	1.61	1.08	1.65	1.18	1.16	1.28	1.33	1.21	1.35	1.35	0.21	15.4
2,3',4,4',5,5'-HxCB	1.99	2.02	1.93	1.51	2.21	0.96	1.43	1.71	1.53	1.37	1.67	1.67	0.38	22.6
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	0.92	1.08	1.01	0.86	0.96	0.91	0.74	0.79	0.87	0.81	0.90	0.90	0.11	11.8
TEQ	1.096	0.875	1.067	0.762	1.329	0.366	0.996	1.057	0.899	0.815	0.93	0.93	0.26	27.6

Table 2 茶試料を用いたダイオキシン類精度管理統計量

分析値	mean	SD	RSD	Robust mean	Robust SD	Robust RSD	
P C D D s	2,3,7,8-TCDD	0.040	0.014	34.9	0.041	0.014	35.4
	1,2,3,7,8-PeCDD	0.145	0.053	36.7	0.150	0.048	31.9
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.095	0.043	45.2	0.095	0.048	50.9
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.182	0.076	41.9	0.181	0.083	45.7
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.160	0.053	33.2	0.163	0.043	26.7
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1.678	0.625	37.3	1.726	0.593	34.4
P C D F s	OCDD	8.595	3.429	39.9	8.854	3.260	36.8
	2,3,7,8-TCDF	0.380	0.124	32.7	0.388	0.099	25.6
	1,2,3,7,8-PeCDF	0.499	0.206	41.3	0.510	0.206	40.3
	2,3,4,7,8-PeCDF	0.473	0.145	30.7	0.490	0.119	24.2
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.400	0.143	35.7	0.410	0.123	30.0
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.470	0.185	39.4	0.479	0.180	37.6
	1,2,3,7,8,9-HxCDF						
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.682	0.209	30.6	0.703	0.186	26.5
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.563	0.633	40.5	1.598	0.605	37.9
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.267	0.115	42.9	0.271	0.104	38.3
	OCDF	1.578	0.688	43.6	1.633	0.646	39.6
	ノ ン オ ルト	3,3',4,4'-TCB	11.037	2.227	20.2	11.222	2.007
3,4,4',5'-TCB		1.393	0.252	18.1	1.404	0.180	12.8
3,3',4,4',5'-PeCB		1.931	0.244	12.6	1.899	0.192	10.1
3,3',4,4',5,5'-HxCB		0.381	0.050	13.2	0.374	0.039	10.4
モ ノ オ ルト	2,3,3',4,4'-PeCB	21.111	2.329	11.0	20.957	2.274	10.8
	2,3,4,4',5'-PeCB	2.052	0.177	8.6	2.026	0.139	6.9
	2,3',4,4',5'-PeCB	48.103	6.075	12.6	48.346	6.333	13.1
	2,3,4,4',5'-PeCB	1.717	0.463	27.0	1.675	0.422	25.2
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	3.628	0.481	13.3	3.628	0.545	15.0
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	1.355	0.209	15.4	1.355	0.236	17.5
	2,3',4,4',5,5'-HxCB	1.666	0.377	22.6	1.678	0.402	23.9
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	0.904	0.106	11.8	0.904	0.121	13.3
	TEQ	0.926	0.256	27.6	0.946	0.210	22.2



Table3 茶試料を用いたダイオキシン類精度管理z-スコア

分析値	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P	1.064	-0.261	0.415	-0.531	1.262	-1.896	0.386		-0.082	-0.755
C	0.610	-0.461	0.551	-0.878	1.397	-2.543	0.207	0.874	-0.313	-0.487
D	1.259	0.030	0.435	-0.070	1.544	-1.385	-0.358	-0.573	-0.066	-0.772
D	0.036	0.279	1.126	-0.157	1.643	-1.558	0.134	-0.762	0.073	-0.729
s	0.339	-0.644	0.609	-0.828	1.971	-2.661	0.452	0.666	-0.080	-0.514
	0.128	-0.575	0.370	-1.005	1.437	-2.309	0.669	0.817	-0.068	-0.274
OCDD	-0.253	-0.547	0.367	-0.931	1.381	-2.297	0.933	0.750	0.006	-0.205
P	1.958	0.008	-0.148	-0.505	0.764	-2.785	0.128	0.953	-0.631	-0.568
C	0.789	0.193	0.687	-0.478	1.184	-2.071	-0.682	0.937	-0.523	-0.605
D	0.367	-0.478	0.562	-0.739	1.541	-2.959	0.393	0.819	-0.342	-0.582
F	0.161	-0.225	0.879	-0.795	1.798	-2.546	0.012	0.793	-0.245	-0.580
s	0.927	-0.328	0.453	-0.856	1.601	-2.117	-0.017	0.533	-0.178	-0.534
	0.372	-0.529	0.276	-1.120	1.140	-2.585	0.962	0.824	-0.161	-0.266
	-0.025	-0.559	0.342	-0.992	1.611	-2.188	0.749	0.681	0.058	-0.253
	0.306	-0.629	0.130	-0.859	1.847	-2.239	0.332	1.033	-0.020	-0.292
OCDF	0.040	-0.577	0.561	-1.049	1.287	-2.352	0.774	0.816	-0.097	-0.254
ノ	1.100	-0.459	0.014	-0.559	1.568	-2.489	0.155	0.587	-0.255	-0.582
ン	0.519	0.536	0.091	-0.410	2.456	-3.028	-0.417	0.869	-0.329	-0.859
オ	1.119	0.212	0.082	-0.828	3.154	-1.309	-0.701	0.160	0.381	-0.617
ルト	-1.225	-0.953	0.185	-0.032	3.230	0.283	-1.098	0.607	0.805	-0.070
モ	-0.085	1.119	0.195	-1.168	2.177	-1.321	0.075	-0.157	0.311	-0.467
ノ	-0.413	1.826	-0.226	-0.334	3.030	-0.430	-0.778	-0.766	0.607	-0.658
オ	0.899	0.924	0.269	-1.223	1.046	-1.882	0.337	-0.055	-0.166	-0.533
ル	-1.039	-0.083	-0.190	-1.198	0.575	2.488	-0.194	-0.818	0.957	0.492
ト	1.025	1.067	0.324	-0.785	1.362	-0.729	-0.990	-0.437	-0.119	-0.719
	0.449	0.995	1.058	-1.162	1.268	-0.749	-0.815	-0.316	-0.099	-0.627
	0.773	0.852	0.628	-0.418	1.323	-1.786	-0.609	0.080	-0.357	-0.772
	0.154	1.454	0.891	-0.393	0.458	0.067	-1.381	-0.965	-0.285	
TEG	0.716	-0.340	0.577	-0.875	1.827	-2.769	0.241	0.528	-0.223	-0.625

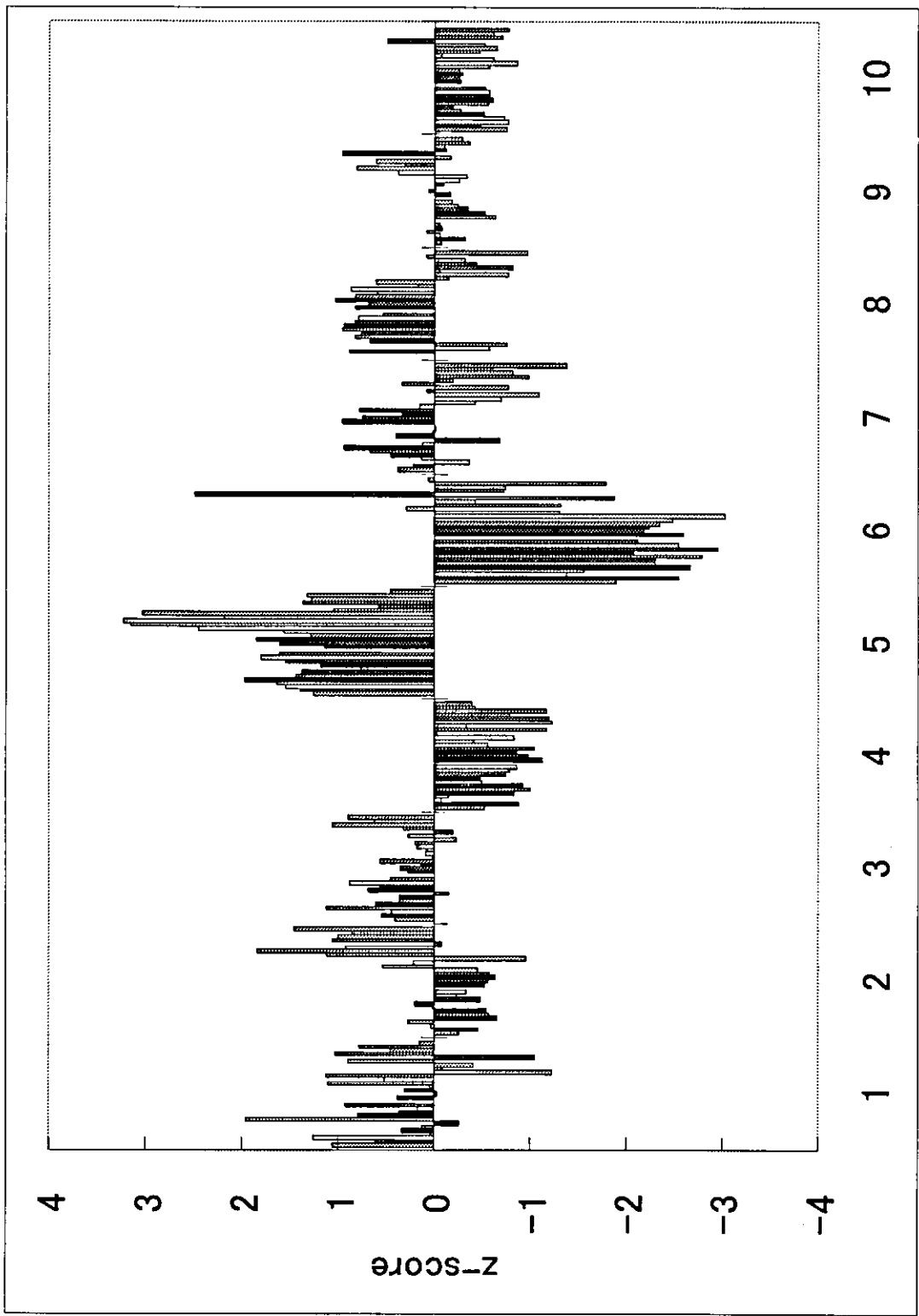


Figure 1 各参加機関の z-スコア

Table 4 1998-2003 年に実施された食品中ダイオキシン類外部精度管理結果

年	参加者	試料	TEQ (pg/g)	RSD%
1998	6	BCR CRM607 粉乳	3.3	6.6
1999	15	BCR CRM607 粉乳	3.6	11
		CARP-1 魚ホモジネート	79	8.0
		標準品溶液	23	8.7
2000	10	BCR RM534 粉乳	4.6	18
		標準品溶液	16	9.0
2001	8	スズキ 凍結乾燥粉末	6.1	11
		ハウレンソウ 凍結乾燥粉末	0.32	31
2002	10	ボラ 凍結乾燥粉末	7.3	7.1
2003	10	茶粉末	0.95	22

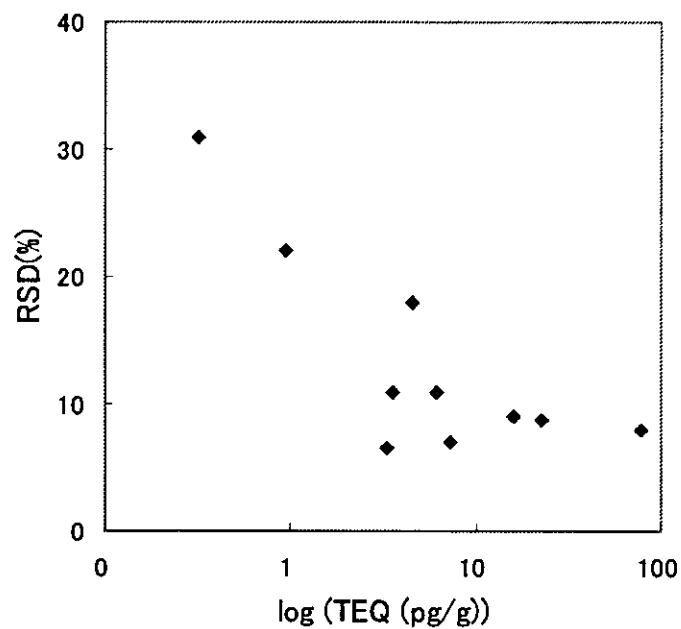


Figure 2 外部精度管理試料の TEQ と室間精度の関係

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

「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」

平成 16 年度

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に関する研究  
- ELISA キットによる魚肉中ダイオキシンの測定 -

分担研究者 松木容彦

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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（平成 16 年度）

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に関する研究  
—ELISA キットによる魚肉中ダイオキシンの測定—

主任研究者 柳澤 健一郎 (財)食品薬品安全センター 特別参事  
分担研究者 松木 容彦 (財)食品薬品安全センター 特別参事  
協力研究者 奥山 光伸 (株)帝国臓器製薬メディカル 開発研究部 研究員  
神戸川 明 神戸川研究所 所長  
伊藤 順子 相模女子短期大学 教授  
協力検査機関 株式会社エスアールエル、国土環境株式会社、株式会社島津テクノリサーチ、  
株式会社ビー・エム・エル、和光純薬工業株式会社

研究要旨

ダイオキシン類の汚染実態やヒトへの曝露状況を把握するために、安価で簡便、迅速かつ高感度なスクリーニング法およびモニタリング法の開発が強く求められている。我々は平成 11～13 年度の厚生科学研究費補助金研究においてマウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体を用いた生体試料中ダイオキシンの酵素免疫測定法（ELISA）を開発し、それぞれキット化した。昨年度までに、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた ELISA キットについて生体試料中ダイオキシン簡易測定法としての有用性を評価するために、ダイオキシン標準品、標準品添加精製バターおよびダイオキシン標準品添加牛乳を共通試料としてバリデーション試験を実施し、母乳検体の簡易測定法としてほぼ満足できる結果を得た。

本年度は食品中ダイオキシンレベルの簡易モニタリング法としての有用性を評価するため、凍結乾燥魚肉を共通試料とし、前処理から ELISA まで一連の操作についてダイオキシン分析機関 4 社においてモノクローナル抗体を用いた ELISA キットのバリデーション試験を実施した。

その結果、各測定機関の測定内、測定間および機関間の相対変動係数はそれぞれ 5.1～28.5%、15.3～50.8%および 72.4%であった。測定間および測定機関間の変動はやや大きかったものの、測定内変動は 30%以下であった。これらの測定変動は簡易測定法としてほぼ満足できるものであり、本法が魚類中のダイオキシンのモニタリング法およびスクリーニング法として有用であることが示された。

A. 研究目的

ダイオキシンによる環境や食物の汚染とそのヒトへの健康影響に対する懸念は大きく、環境、食品およびヒトの汚染実態を迅速に把握することが求められている。従来、ダイオ

キシンの測定には高分解能ガスクロマトグラフィ―/マススペクトロメトリー（GC/MS）が用いられている。しかし、その試料前処理には他段階で煩雑なクリーンアップ操作を必要とし、測定に要する時間が長く、経費

は著しく高価なものとなっていることから、安価で簡便、迅速かつ高感度なダイオキシンのスクリーニング法およびモニタリング法の開発が期待されている。

我々は平成 11～13 年度の厚生科学研究費補助金研究においてマウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体を用いた生体試料中ダイオキシンの酵素免疫測定法 (ELISA) を開発してそれぞれキット化した。また、昨年度までに、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いたダイオキシン ELISA キットの簡易測定法としての有用性を評価するために、ダイオキシン標準品、標準品添加精製バターおよびダイオキシン標準品添加牛乳を共通試料としてダイオキシン分析機関 8 社と食品薬品安全センターの 9 機関でバリデーション試験を実施した。その結果は、母乳中のダイオキシンの簡易測定法としてほぼ満足できるものであった。

本年度は、食品中ダイオキシンレベルの簡易モニタリング法としての有用性を評価するため、凍結乾燥魚肉を共通試料として、前処理から ELISA まで一連の操作についてモノクローナル抗体を用いた ELISA キットのバリデーション (同時再現性・日差再現性) 試験を 4 協力検査機関で実施した。

## B. 研究方法

### 1. 協力検査機関

株式会社エスアールエル

国土環境株式会社

株式会社島津テクノリサーチ

株式会社ビー・エム・エル

## 2. 実験材料

### 1) 試薬

アセトン、エタノール、メタノール、*n*-ヘキサン：和光純薬工業 ダイオキシン類分析用フルオロベンゼン：和光純薬工業 再蒸留品  
その他の試薬：特級

### 2) 器材

ダイオキシン ELISA キットワークー、化学修飾シリカゲルカラム TypeIII、プレセップ<sup>®</sup>フタロシアニン固定化シリカゲル (Wakogel P-29) カラム：和光純薬工業

## 3. バリデーション用試料

平成 14 年度の厚生科学研究「食品中ダイオキシン類分析の信頼性確保に関わる調査研究」において、国立医薬品食品衛生研究所で作製した凍結乾燥魚肉 (ボラ) の提供を受け用いた。この試料の GC/MS で測定したダイオキシン含量を表 1 に示した。

## 4. ELISA 試料の調製

凍結乾燥魚肉 40 g を水 160 mL に懸濁し、エタノール 200 mL および 10 mol/L KOH 40 mL を加えた。30～40℃で 2 時間攪拌し、室温で一晩放置した。これを分液ロートに移し、*n*-ヘキサン 100 mL で 3 回抽出した。ロータリーエバポレーターでヘキサン層を約 5 mL に濃縮後、濃硫酸 1 mL を添加した。これに *n*-ヘキサン 2 mL を加えて 2 回抽出し、合わせたヘキサンを濃硫酸 1 mL で再洗浄した。硫酸ナトリウム約 5 g で脱水して約 1 mL に濃縮したヘキサン層を、*n*-ヘキサン 20 mL で予め洗浄した化学修飾シリカゲルカラムに負荷し、*n*-ヘキサン 20 mL で

溶出した。次いで、このヘキサン層を約 1 mL に濃縮し、フルオロベンゼン 1 mL、エタノール 1 mL、アセトン 3 mL および *n*-ヘキサン 3 mL で順次洗浄した wakogel P-29 カートリッジカラムに負荷し、*n*-ヘキサン 3 mL およびフルオロベンゼン/*n*-ヘキサン (1:9) 1 mL でカラムを洗浄後、フルオロベンゼン 1 mL でダイオキシンを溶出した。溶媒を乾固後、残渣に DMSO 40  $\mu$ L を添加して溶解した (図 1)。

## 5. ELISA

ダイオキシン ELISA キットの現品説明書に従って操作し、4-パラメーター回帰式にフィットさせた検量線から試料中のダイオキシンを 2,3,7,8-TeCDD 相当量として算出した。

検量線希釈系列および試料に抗ダイオキシン抗体溶液を加えて室温で 30 分間放置した。次いでペルオキシダーゼ標識ハプテン溶液を添加後、その混合液 100  $\mu$ L を 2 次抗体固定化プレートの各ウエルに分注して冷蔵下で一晩放置した。ウエルを緩衝液 B で洗浄し、基質溶液を加えて室温で 30 分間酵素反応後の吸光度をプレートリーダーで測定した (図 2)。

## 6. バリデーション試験

同時再現性 (測定内変動) 試験では、40 g の凍結乾燥魚肉を処理し、その 10 g 分を  $n=3$  で測定した。

日差再現性 (測定間変動) 試験では、40 g の凍結乾燥魚肉を日を変えて 3 回処理し、その 10 g 分を  $n=3$  で測定した。

### C. D. 研究結果および考察

#### 1. 検量線

バリデーション試験に参加した 4 機関・各 3 回の検量線の相対吸光度を図 3 に、吸光度および相対吸光度の変動を表 2 に示した。

検量線吸光度の実施機関内における相対変動係数 (cv) は 3.5~37.9% と大きかったが、相対吸光度の変動は 5% 以下と小さく、また、検量線を 4-パラメーター回帰式にフィットさせたときの相関係数 ( $r$ ) は 0.994 以上であり、本 ELISA キットは再現性が高いことが示された。

#### 2. 試料の測定

凍結乾燥魚肉の測定値は 0.08~0.65 (平均 0.22) 2,3,7,8-TeCDD pg eq./mL であり、多くは 0.1~0.3 pg eq./mL であった。測定内変動、測定間変動および機関間変動はそれぞれ 5.1~28.5% (平均 14.1%)、15.3~50.8% (平均 32.0%) および 72.4% であった。(表 3)。

また、キットに使用している抗体のダイオキシン異性体との交差反応性から算出した試料の理論値は 1.1 pg eq./g であり、各機関の測定値はこの値の 10~60% であった。脂肪など有機物の多い魚肉試料であるため前処理行程が比較的長いことやダイオキシン含量が少ないことを考慮すれば、この結果は満足すべきものと考えられる。

## E. 結論

マウスモノクローナル抗体を用いたダイオキシン ELISA キットを使用し、凍結乾燥魚肉を共通試料として 4 機関でバリデーション試験を行い、食品中ダイオキシン類のモニタ

リング法およびスクリーニング法としての有用性を評価した。

その結果、測定機関間での変動はやや大きかったものの、測定機関内変動は簡易測定法として満足できるものであった。本キットは操作が比較的簡便で多検体が同時に測定できるうえ、同時再現性が良好であったことから、安価な簡易測定法として食品中ダイオキシン類のスクリーニング法およびモニタリング法として有用であることが示された。

現在、本キットは生体試料や食品だけでなく、土壌や底質など環境試料も測定できる前処理法を検討しており、2004年5月に米国ミシガン州において実施されたダイオキシン簡易測定法の EPA SITE デモンストレーションに参加し、土壌および底質 200 試料を 1 週間で測定した。

本 ELISA キットは、マトリックスに適した前処理法を検討することにより、適用試料を広げることが可能である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mitsunobu Okuyama, Norihiro Kobayashi, Wakako Takeda, Takako Anjo, Yasuhiko Matsuki, Junichi Goto, Akira Kambegawa, Sinjiro Hori

“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Monitoring Toxic Dioxin Congeners in Milk Based on a Newly Generated Monoclonal Anti-Dioxin Antibody” Analytical Chemistry 76(7), 1948-1956, 2004

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



表1 GC/MS による凍結乾燥魚肉中ダイオキシン類含量

	Compound	Concentration (pg/g)
PCDD	2,3,7,8-TeCDD	0.25
	1,2,3,7,8-PeCDD	0.43
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.07
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.14
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.05
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.13
	1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	0.28
PCDF	2,3,7,8-TeCDF	1.93
	1,2,3,7,8-PeCDF	0.23
	2,3,4,7,8-PeCDF	0.93
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.07
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.10
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	—
	2,3,4,7,8,9-HxCDF	0.13
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.16
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.06
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	0.17	
co-PCB	3,3',4,4'-TeCB	179
	3,4,4',5'-TeCB	23
	3,3',4,4',5'-PeCB	33
	2,3,3',4,4'-PeCB	4353
	2,3,4,4',5'-PeCB	320
	2,3',4,4',5'-PeCB	12064
	2',3,4,4',5'-PeCB	242
	3,3',4,4',5,5'-HxCB	2
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	1268
	2,3,3',4,4',5',5'-HxCB	312
	2,3',4,4',5,5'-HxCB	573
	1,2,3,4,7,8,9-HpCB	75

表2 検量線(吸光度・相対吸光度)の機関内変動

TriCDA conc (pg/mL)	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D
	CV for Absorbance (%)			
0	10.3	13.8	30.5	17.1
40	14.4	13.3	36.7	16.2
100	13.6	12.9	37.9	13.6
250	10.1	15.3	21.8	7.0
500	9.9	19.2	30.0	6.2
1000	6.5	15.5	20.1	3.5
2500	5.9	15.1	16.7	4.1
	CV for Relative Absorbance (%)			
40	4.3	0.0	0.3	0.0
100	3.8	0.0	0.4	0.2
250	1.8	0.1	0.5	0.4
500	2.0	0.2	0.6	0.4
1000	4.5	0.1	0.4	0.7
2500	4.9	0.0	0.6	0.5

表3 ELISA による凍結乾燥魚肉中ダイオキシンの測定

	2,3,7,8-TeCDD (pg eq./g)							
	Lab A		Lab B		Lab C		Lab D	
1	0.11	0.14	0.12	0.11	0.19	0.19	0.13	0.12
	0.18	±	0.11	±	0.17	±	0.10	±
	0.14	0.04	0.11	0.01	0.21	0.02	0.14	0.02
Intra-assay (cv %)	24.5		5.1		10.5		16.9	
2	0.06	0.08	0.12	0.12	0.58	0.62	0.22	0.24
	0.10	±	0.13	±	0.63	±	0.23	±
	0.08	0.02	0.11	0.01	0.65	0.04	0.28	0.03
Intra-assay (cv %)	25.0		8.3		5.8		13.2	
3	0.09	0.11	0.14	0.15	0.57	0.54	0.17	0.18
	0.13	±	0.15	±	0.54	±	0.23	±
	0.11	0.02	0.16	0.01	0.50	0.04	0.13	0.05
Intra-assay (cv %)	18.2		6.7		6.5		28.5	
Mean	0.11		0.13		0.45		0.18	
SD	0.03		0.02		0.23		0.06	
Inter-assay (cv %)	28.5		15.3		50.8		33.2	
Inter-lab. assay	0.22 ± 0.16		(cv %)		72.4			

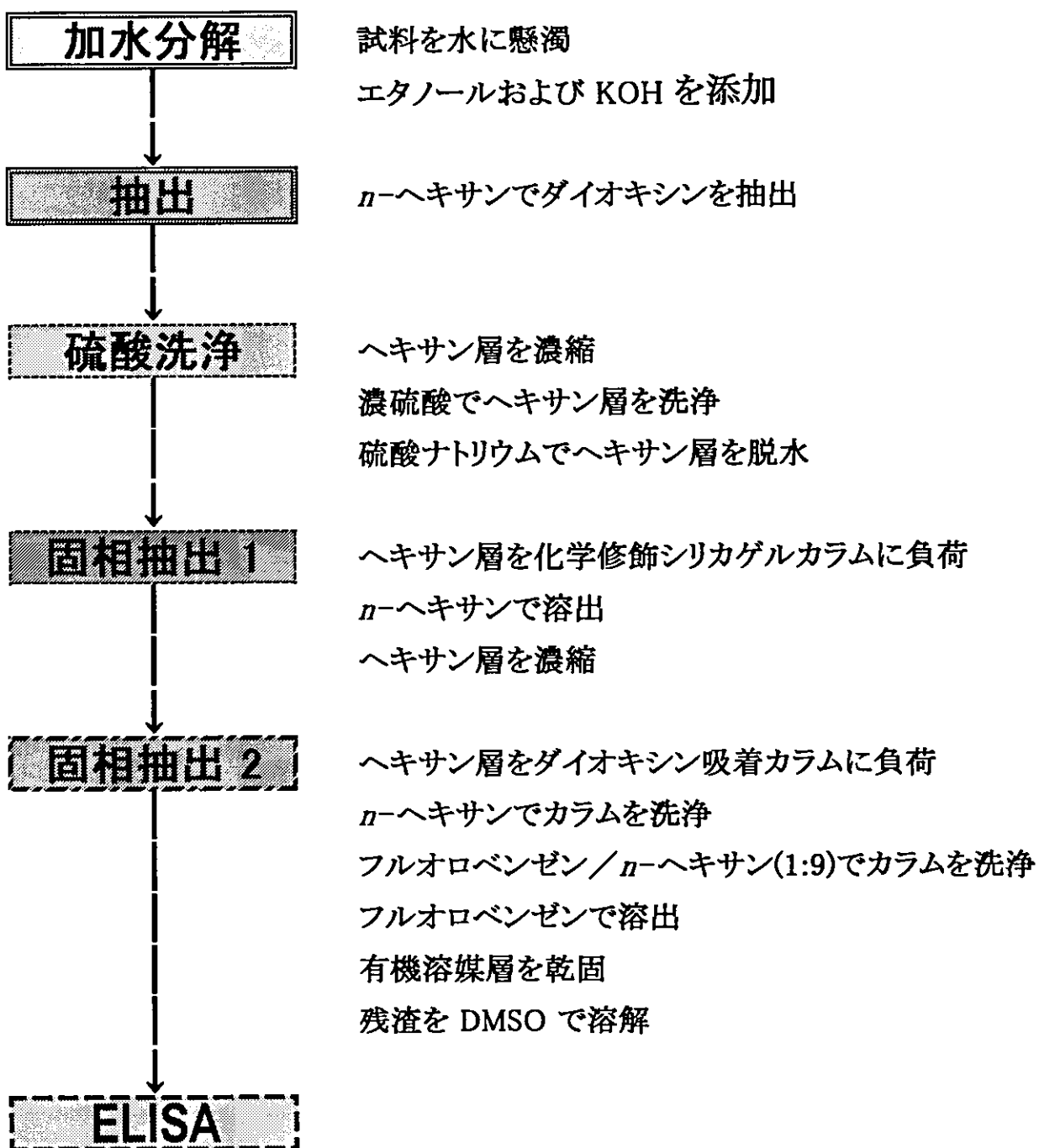


図1 ダイオキシン ELISA の試料調製法