

0.007、変動係数 2.82%と、作製予定濃度に対して 96.3%の近似した濃度の試料を作製することができた。また、この時のF比が、0.869 と 5%水準 (F値 3.02) より小さく、精度管理調査に使用する調査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、市販のとうもろこし (収穫後、水蒸気処理して加工したペースト状の製品) に有機リン系農薬 (クロルピリホス、マラチオン) を添加して作製した。

無作為に採取した 10 個の容器について繰り返し 2 回の濃度測定を行った結果、クロルピリホスの濃度が、0.070 ppm、標準偏差 0.002、変動係数 2.67% およびマラチオンの濃度が、0.310 ppm、標準偏差 0.013、変動係数 4.13% であった (表2)。それぞれの作製予定濃度 (クロルピリホス およびマラチオンの作製予定濃度 0.080 ppm、0.320 ppm) に対して、87.5% および 96.9% と近似した濃度の試料を作製することができた。また、F比はそれぞれ 1.39 および 4.13 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)。安定性については、作製当日の濃度と比較して冷凍 1 ヶ月後でクロルピリホス  $95.8 \pm 1.66\%$ 、マラチオン  $93.9 \pm 3.11\%$ 、冷蔵 7 日後でクロルピリホス  $98.6 \pm 2.91\%$ 、マラチオン  $99.4 \pm 1.70\%$  の残存率であった。

## 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

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、残留動物用医薬品検査試料を作製した。小分け用容器に分注後、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。その結果、作製した試料の濃度は、0.253 ppm、標準偏差 0.020、変動係数 7.98% と、作製予定濃度 0.280 ppm に対して 90.4% と作製予定濃度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、1.78 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。

## D. 考察

### 1. 重金属 (カドミウム) 検査調査試料の作製

予め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作製予定濃度のカドミウム添加粉碎白米を作製する方法では、ほぼ作製予定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 0.869 (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

市販のとうもろこし (収穫後、水蒸気処理して加工したペースト状の製品) に有機リン系農薬 (クロルピリホスおよびマラチオン) を添加して、濃度の均一性および安定性 (冷蔵、冷凍保存) 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、作製予定濃度に対して、クロルピリホスでは 94.0% およびマラ

チオンでは 91.3%と作製予定濃度に近似した調査試料を作製することができた。調査試料として作製予定濃度の試料を適切に作製できることが分かった。また、安定性は、作製当日と比較して冷凍 1 ヶ月後でクロルピリホス 95.8%、マラチオン 93.9%、冷蔵 7 日後でクロルピリホス 98.6%、マラチオン 99.4%と、いずれも調査試料の保存条件として採用できる可能性を確認できた。

### 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

残留動物用医薬品の精度管理試料には食肉を採用する要望が多い。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。

### E. 結論

精度管理調査においては、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須であり、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。このような観点から以下の結論を得た。

1. 予めカドミウムを添加して作製した白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、目的とする作製予定濃度の試料が作製できること、および濃度の均一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とうもろこしのペースト（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マラチオン）を添加してハンドミキサーで攪拌して作製する方法により、均一な濃度の試料を作製できることが分かった。また、今回検討した水蒸気処理したとうもろこしでは、冷蔵、冷凍保存してもクロルピリホスおよびマラチオン濃度が、ほぼ安定であることが分かった。

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。

### 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 白米中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	0.248	0.247
2	0.259	0.251
3	0.263	0.259
4	0.255	0.261
5	0.258	0.259
6	0.253	0.272
7	0.259	0.259
8	0.251	0.250
9	0.250	0.274
10	0.259	0.251
	平均値	0.257
	標準偏差	0.007
	変動係数	2.82
	F比	0.869
	有意水準 5%	3.02

表2 とうもろこし中の農薬濃度の均一性の結果

クロルピリホス 単位 ppm			マラチオン 単位 ppm		
試料番号	測定①	測定②	試料番号	測定①	測定②
1	0.0707	0.0712	1	0.302	0.310
2	0.0707	0.0705	2	0.312	0.296
3	0.0720	0.0713	3	0.311	0.299
4	0.0724	0.0691	4	0.314	0.295
5	0.0683	0.0725	5	0.297	0.298
6	0.0715	0.0732	6	0.311	0.313
7	0.0703	0.0719	7	0.320	0.301
8	0.0706	0.0654	8	0.308	0.326
9	0.0706	0.0698	9	0.308	0.346
10	0.0706	0.0671	10	0.302	0.329
平均値	0.0700		平均値	0.310	
標準偏差	0.002		標準偏差	0.013	
変動係数	2.67		変動係数	4.13	
F比	0.860		F比	0.77	
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 ppm

試料番号	測定①	測定②		
1	0.236	0.237	平均値	0.253
2	0.264	0.270	標準偏差	0.020
3	0.251	0.228	変動係数	7.98
4	0.246	0.251	F比	1.78
5	0.237	0.301		
6	0.210	0.240	有意水準 5%	3.02
7	0.252	0.250		
8	0.261	0.249		
9	0.268	0.282		
10	0.264	0.269		

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 3）  
—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秦野研究所 特別参事  
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 特別参事  
分担研究者 大島 赴夫（財）食品薬品安全センター秦野研究所 部長  
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  
研究指導者 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

麻痺性貝毒と下痢性貝毒の外部精度管理調査を行う上での問題点としては、天然サンプルを用いるため麻痺性貝毒検査では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。また下痢性貝毒検査の問題点としては、精度管理用検体（陰性）の冷凍保存中の遊離脂肪酸増加による擬陽性化、オカダ酸の最適添加量の見極めと添加方法の決定、陰性サンプルの大量確保とその保存方法の確立、活性成分の LC-MS による多成分同時分析法の確立等がある。本研究では下痢性貝毒検査の問題点を中心に検討するために、遊離脂肪酸微量分析法の確立と精度管理用冷凍試料中の遊離脂肪酸含量の調査、そしてオカダ酸の試料への添加方法の検討を行った。

遊離脂肪酸の微量分析法の確立は、ポンドエルト NH<sub>2</sub> カラムによる固相抽出法を採用して液-液分配、濃縮操作を廃止した。蛍光誘導体化は検出感度に優れる 9-anthryldiazomethane (ADAM 試薬) による蛍光検出による HPLC 測定を行った。さらに内部標準法を採用し、誘導体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。

4 ヶ月冷凍保存した、精度管理用ホタテ貝ホモジネートサンプル 18 サンプル中の遊離脂肪酸濃度を測定し、中腸腺の方が剥き身より遊離脂肪酸濃度が高い傾向が観察された。また、今回測定した中腸腺中に、 $\omega$ -3 系列脂肪酸（アラキドン酸とリノール酸）が際立って多く、マウスアッセイで 1/3 が死亡したサンプルが観察された。現段階で、毒性と遊離脂肪酸含量の相関を論ずるのは時期尚早であるが、脂肪酸含量が高く毒性のあるサンプルが観察されたので、今後精度管理用検体作成時に遊離脂肪酸を測定し、毒性と比較することが必要と思われた。

オカダ酸の添加方法として、サンプル管ビンに附着させアセトンで回収する方法と、濾紙ディスクに吸着させる方法を検討したところ、濾紙ディスク法の方が再現性は良かった。添加量としては、剥き身 125 g に対して 80  $\mu$ g、中腸腺 25 g に対して 40  $\mu$ g で概ね良好な結果が得られた。

今後、オカダ酸の濾紙ディスク中の長期安定性を確認し、試験的にサンプルを試験機関に配布し問題点を確認する必要がある。また正確な評価を下すために LC-MS による毒性成分の測定も今後の課題である。

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、大量入手、保管等に特別な注意が必要で、さらに、指標とするアッセイが動物実験を用いているために煩雑な予備検討が予想された。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 輸出ホタテ検査機関に対して小規模に実施している。そこで、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に必要な作業及び手技の一連の行程を見学する事より開始し、特に作業が複雑で組織的に実施する上で問題点が多いと考えられた下痢性貝毒試料の作成から始めることとした。

下痢性貝毒の主要原因物質としてオカダ酸が挙げられる。外部精度管理用のリファレンスマテリアル作製は、市販のオカダ酸を毒性が出ると予想される濃度で、陰性サンプルに添加することを考えたが、陰性サンプルの保管とオカダ酸の添加法及び最適添加濃度の検討が必要であると考えられた。

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、陰性サンプルを冷凍保存しても遊離脂肪酸の増加により往々マウスが死亡(擬陽性化)し、精度管理用サンプルとして不適切になる事が知られている<sup>1)</sup>。そこで、試料保存中や輸送中の遊離脂肪酸の増加と擬陽性化の関連についての基礎的データを取り、今

後の安定した精度管理用試料作りに役立つ事が必要であると考えられた。昨年度は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の確立を行った。今年度は外部精度管理調査用に4ヶ月冷凍保存した18サンプルについて遊離脂肪酸を測定し、遊離脂肪酸含量の動向の基礎的調査を行った。

また、下痢性貝毒の原因物質の一つであるオカダ酸をサンプルに添加する方法は、下痢性貝毒検査試料として安定して供給できるように、サンプルと混和せずオカダ酸を別に添付して、調査時に各検査施設がそれを陰性サンプルに添加して、検査を行う方法が現状では最適であると考え、ダーラム管または濾紙ディスクに吸着させて添付する方法を検討した。

## 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の概略

下痢性貝毒については公定法の安元パイオアッセイ法<sup>4)</sup>を用いて予め陰性を確認した試料に、24時間以内での致死量のワコー純薬製オカダ酸標準品をサンプル管ビン底に附着又は、濾紙ディスクに吸着後サンプル管ビンに密封後、予め凍結してある陰性試料中に挿入し冷凍保存した。陽性サンプルと陰性サンプルの相違は管ビンに附着したオカダ酸の有無ないし濾紙ディスクに吸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ビン法では、ビン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り、一方濾紙ディスク法では、サンプル管ビンより濾紙ディスクを取り出して試料に加える操作が必要になる。作製した中の一定数の陽

性サンプルと陰性サンプルをマウスアッセイにより定性後各検査施設に冷凍輸送する。

## 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：フナコシ製 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ワコー純薬製の試薬特級品を用いた。MeOH、MeCN、イソプロパノールはワコー純薬製 HPLC グレードを用いた。CHCl<sub>3</sub> 5000 はワコー純薬製を用いた。

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 penta enoic 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 CHCl<sub>3</sub> 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 CHCl<sub>3</sub> に溶解した。

### 2-b) 抽出

抽出操作は下痢性貝毒試験に準じて行っ

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注した。

### 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 CHCl<sub>3</sub> に溶解する。Varian 製ボンドエリート、BOND ELUT LRC-NH<sub>2</sub>, 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 CHCl<sub>3</sub> 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、CHCl<sub>3</sub> / 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) 機器類

ポンプ：東洋曹達工業製 CCPM グラジェントポンプと 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-H<sub>2</sub>O, 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。

検出機：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  $\mu$ 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。

### 3) 4 カ月冷凍保存したホタテ剥き身及び中腸腺中の遊離脂肪酸の測定

外部精度管理調査用に国立医薬品食品衛生研究所にて 4 カ月間-70°C で保管した青森県産ホタテ剥き身ホモジネート及び中腸腺ホモジネートを用いた。遊離脂肪酸測定は前述の方法により行った。

### 4) 下痢性貝毒検査試料の作成について

#### 4-a) 試薬等

ワコー純薬製オカダ酸(生化学用)を用いた。ダーラム管は岩城硝子製の  $\Phi 0.5 \times 3.5$  mm を用いた。

#### 4-b) オカダ酸を附着させた管ビンの作成

オカダ酸標準品 200  $\mu$ g を 1mL のアセトンに溶解後、250  $\mu$ L ずつダーラム管に分注し窒素気流中でアセトンを留去した(40  $\mu$ g 用)。密栓後管ビンを-40°C の冷凍庫に保存した。

#### 4-c) オカダ酸を吸着させた濾紙ディスクの作成

オカダ酸標準品 1000  $\mu$ g を 1000  $\mu$ L のアセトンに溶解し、 $\Phi 13$ mm の whatman AA disc に 40  $\mu$ L (40  $\mu$ g 添加用)又は、80  $\mu$ L (80  $\mu$ g 添加用)添着後風乾した。オカダ酸を吸着した濾紙ディスクはダーラム管に保管した。密栓後管ビンを-36°C に冷凍保存した。

#### 4-d) オカダ酸の最適添加濃度及び添加方法に関する予備検討

予め下痢性貝毒試験法により陰性を確認して冷凍保存してあるホタテ剥き身ホモジネート 125g を解凍後、オカダ酸を 80  $\mu$ g 吸着させた濾紙ディスク、オカダ酸を 80  $\mu$ g 附着させたダーラム管、陰性対照として無処理の濾紙ディスクをそれぞれホモジネートに添加して下痢性貝毒試験を行なった。調製した試験溶液は、n=3 で行ない結果を比較した。同様の検討を 40  $\mu$ g でも行った。

#### 4-e) ホタテ剥き身に對するオカダ酸の添加の検討

下痢性貝毒試験法により陰性を確認済みで冷凍保存してあるホタテ剥き身ホモジネート 125g を解凍後、オカダ酸を 80  $\mu$ g 吸着させた濾紙ディスクを添加し、対照群として濾紙ディスクのみ添加したものを加えて、下痢性貝毒試験を n=5 で行って結果を比較した。

#### 4-f) ホタテ中腸腺のオカダ酸の添加の検討

下痢性貝毒試験法により陰性を確認済みの冷凍ホタテ中腸腺ホモジネート 25g を解凍後、オカダ酸を 40  $\mu$ g 吸着させた濾紙デ



ディスクを添加し、対象群として濾紙ディスクのみ添加したものを加えて、下痢性貝毒試験を n=5 で行って結果を比較した。

#### 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の概略。

下痢性貝毒の陽性サンプルの作成は公定法の安元バイオアッセイ法<sup>4)</sup>を用いて陰性を予め確認後、凍結保存してある陰性ホタテホモジネート試料に、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別添した。添加法としてはオカダ酸をサンプル管ビンに附着させる方法と濾紙ディスクに吸着させる方法の2つの添加法を検討した。サンプル管ビン法はオカダ酸をサンプル管ビンに附着させて、予め凍結してある陰性ホモジネート試料上に静置して凍結保存した。従って各検査施設は抽出に先立ちサンプル管ビン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通常の検査に先立って必要になる。陰性サンプルには管ビンを其の儘添付して凍結した。それに対して、濾紙ディスク法は、一定量のオカダ酸アセトン溶液を濾紙ディスクに添着後風乾してサンプル管ビン中に密栓した。陰性サンプルは濾紙ディスクをそのまま用いた。各検査施設は検査に先立ち濾紙ディスクをサンプル管ビンより取り出し試料に加える操作が必要になる。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凍結輸送する。確認試験の結果如何によりオカダ酸の量を適宜加減することもある。

今後の下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、オカダ酸が保存中、輸送中、精製

操作中に熱分解等により本来の力価が失われる可能性について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危惧されるため、保存法の検討の必要性も考えられる。更に、毒性の評価をより正確に行うために、LC-MS 等による活性成分の多成分同時分析法を導入することも不可欠である。

また貝毒検査全体について云える事であるが、海産生鮮食品マトリックス独特のリスクがあり、また天然物には不可解な要素の存在を払拭しきれず、今後更にリファレンスマテリアル作成の検討を充分に加える必要がある。

2) ホタテ剥き身及び中腸腺中の遊離脂肪酸の測定

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の1つとして、陰性サンプルを冷凍保存しても遊離脂肪酸の増加により往々マウスが死亡(擬陽性化)し、精度管理用サンプルとして不適切になる事が知られている。そこで、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偽陽性化との関連性について基礎的データを得る必要が生じた。

まず最初に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、昨年度遊離脂肪酸の微量分析法を確立した。

3) 4ヶ月冷凍保存したホタテ中の遊離脂肪酸の特徴

本法を用いて貝試料中の遊離脂肪酸含量

の基礎的データを収集して、精度管理用試料作成に役立てると共に、遊離脂肪酸の増加が貝毒の毒性発現に寄与するかどうかを検討するために、4ヶ月冷凍保存したホタテ貝の剥き身9種類、ホタテ中腸腺9種類について遊離脂肪酸含量を測定した(図1)。定量結果は表1、表2に示した。

4ヶ月冷凍保存後のホタテの剥き身と中腸腺の遊離脂肪酸組成は図1に示したが、その全体的な傾向として単位重量当たりの総遊離脂肪酸含量は中腸腺の方が剥き身より多く含有していた。個々の脂肪酸組成に関しては、EPA, DHA, ステアリン酸が主要な遊離脂肪酸であり、その組成比は概ね共通であった。脂肪酸は代謝系よりオレイン酸を前駆体とする $\omega$ -9系列、リノール酸を前駆体とする $\omega$ -6系列、 $\alpha$ -リノレン酸を前駆体とする $\omega$ -3系列に分類されるのでこの分類に従って遊離脂肪酸の定量値の合計を再計算して表4に示した。総 $\omega$ -3、総 $\omega$ -6脂肪酸として示し、 $\omega$ -9系列脂肪酸は他の遊離脂肪酸と不分離ピークを示したのでその他として遊離脂肪酸含量の合計を示した。遊離脂肪酸の多変量連関図は図2に示した。多変量連関図の四角の部分は剥き身で、丸印の点は中腸腺である。この図からも明らかなように遊離脂肪酸含量は $\omega$ 系列による分類によっても二つのグループに大分される事が今回明らかになった。図中に丸印で示した中腸腺の方が剥き身より総遊離脂肪酸含量が多い事が判明した。

## 2-b) 遊離脂肪酸含量と毒性との関連について

毒性と遊離脂肪酸含量に相関があるかどうかについて多変量連関図を用いて考察を加えた。毒性を発現するのは主に中腸腺(通

常は食用に供さない)であるので、図2の多変量連関図から中腸腺のみ抽出して再プロットした(図3)。図3中で四角の点で示したHP1はマウスアッセイ時に1/3のマウスの死亡が確認されているサンプルであるが、丸印で示したその他の集団から特に離れて遊離脂肪酸含量が多い事が解った。更に中腸腺の遊離脂肪酸を三次元図で表したのが図4である。この図からも明らかなように総 $\omega$ -6、総 $\omega$ -3脂肪酸、その他脂肪酸共にその他の中腸腺の集団より総遊離脂肪酸含量が多いことが確認された。さらに $\omega$ -3及び $\omega$ -6系列の遊離脂肪酸についてHP1と他の中腸腺の脂肪酸含量を比較すると、 $\omega$ -3系列の遊離脂肪酸のアラキドン酸(AA)とリノール酸(linoleic acid)が他の中腸腺の遊離脂肪酸含量に比べて特に多い事が解った(図5)。遊離脂肪酸と毒性の相関を論ずるには更に検討を要するが、中腸腺で遊離脂肪酸含量が高く、マウスアッセイで死亡例が観察されたサンプルが1例存在した(HP1)。この事実は、一般に言われている“遊離脂肪酸の増加がマウスアッセイの擬陽性化につながる”という仮説を支持する結果となった。以上より、今後レファレンスマテリアルを作製した時は、遊離脂肪酸を測定し然る後にマウスアッセイによる毒性試験と比較する事が重要であると示唆された。更に遊離脂肪酸とマウスアッセイの相関及び作用機序についても今後更に研究を継続発展させて解明する必要があると思われる。

## 3. 下痢性貝毒検査試料の作成について

—オカダ酸の添加について—

### 3-a) オカダ酸の最適添加濃度及び添加方法

に関する予備検討

オカダ酸の添加濃度は LD50 が 192  $\mu$ g/kg であることより、剥き身及び中腸腺に対する添加濃度は当初 40  $\mu$ g を予想した。この濃度で試みにマウスアッセイを行ったところ中腸腺では毒性を発現する結果となったが、剥き身のサンプルでは 40  $\mu$ g 添加時には毒性が発現する時としない時があった。そこで 80  $\mu$ g の添加量を試したところ概ね毒性を発現する事が明らかになった（データは示さず）。この理由については剥き身のサンプルではエーテル分配の行程が余分に入る事が考えられるが、他に原因が在るのかも知れない。

オカダ酸の添加方法として従来サンプル管ビンに一定量附着させて添加していたが、サンプル管ビンにアセトンを加えオカダ酸の回収作業を行う時に超音波処理をすると、オカダ酸が溶剤とともに揮散することが危惧された。また、サンプル管ビンより回収されたオカダ酸のアセトン溶液をホタテ剥き身ホモジネートまたは中腸腺ホモジネートに添加してマウスアッセイを行うのであるが、回収液はオカダ酸の標準原液そのものであるという問題点があった。そこで、その難点を解消するためにオカダ酸を濾紙ディスクに吸着させ、その濾紙ディスクをアッセイ時にホモジネートに添加する方法を考えた。濾紙ディスク法の利点は、各検査施設でのオカダ酸の添加は濾紙ディスクをサンプル管ビンより取り出し、ホモジネートサンプルに加える丈という簡便な操作で、サンプル管法の様な抽出操作が不要であり、実際に行われている貝毒検査に近い点である。

予め下痢性貝毒試験法により陰性を確認

して凍結保存してあるホタテ剥き身ホモジネートサンプル 125g を解凍後、オカダ酸を 80  $\mu$ g 吸着させた濾紙ディスク、オカダ酸を 80  $\mu$ g 附着させたサンプル管ビンから回収したアセトン溶液、陰性対象として無処理の濾紙ディスクを添加して下痢性貝毒試験を行なった。調製した試験溶液は、n=3 で行ない結果を比較した。同様の検討を 40  $\mu$ g でも行った。

結果は表 4 に示した。オカダ酸をサンプル管ビンに添加すると濾紙ディスク法に比較して死亡率が低い傾向（超音波処理中にオカダ酸を揮散漏出している可能性）が観察された。ディスク法に関しては、オカダ酸の添加濃度は 40  $\mu$ g でも 80  $\mu$ g でもマウスの死亡率に変わり無く、所期の目的を達成した。添加方法としては、結果が良くアッセイ時に手数が掛からず、より実際の貝毒検査法の操作に近い濾紙ディスク法を採用することにした。添加濃度に関していえば、中腸腺は 40  $\mu$ g に設定し、剥き身は 40  $\mu$ g でも問題はないように思われたが、サンプル管ビン法でデータにバラツキが観察されるので精度管理のリスクを軽減するため 80  $\mu$ g に設定した。以上の条件で陰性サンプルを含めて n=5 で検討した。

3-b) ホタテ剥き身にオカダ酸の添加の検討

下痢性貝毒試験法により陰性を確認済みの冷凍ホタテ剥き身 125g を解凍後、オカダ酸を 80  $\mu$ g 吸着させた濾紙ディスクを添加し、対象群として濾紙ディスクのみ添加したものを加えて、下痢性貝毒試験を夫々 n=5 で行って結果を比較した。その結果、ポジティブサンプルとネガティブサンプルが夫々対応する結果となった。

### 3-c) ホタテ中腸腺のオカダ酸の添加の検討

下痢性貝毒試験法により陰性を確認済後冷凍保存してあるホタテ中腸腺 25g を解凍して、オカダ酸を 40  $\mu$ g 吸着させた濾紙ディスクを添加し、対象群として濾紙ディスクのみ添加したものを加えて、下痢性貝毒試験を夫々 n=5 で行って結果を比較した。その結果良好な結果が得られ初期の目的を達成した。

### 3-d) 今後の展望

今後の試験で濾紙ディスク中でのオカダ酸の長期安定性が確認できれば、毒性のあるサンプルを海産試料と別に少ない容積で保管でき、今後のリファレンスマテリアル作成の効率化に大きく寄与するものと思われる。また、LC-MS を用いたオカダ酸及びその他の毒性成分の同時分析法を導入し、より精度の高いリファレンスマテリアルの評価を行い、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事が重要と思われる。最後に試験的に複数の貝毒検査機関に配布して貝毒検査を行い、先に設定したリファレンスマテリアル中のオカダ酸の濃度を再評価し、その他の実際に精度管理実施上生ずる問題を更に検討する予定である。

## 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検討した結果、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確立と、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。

4ヶ月冷凍保存した、精度管理用ホタテ貝サンプル 18 サンプル中の遊離脂肪酸濃度を測定し、単位重量当中腸腺の方が剥き身より遊離脂肪酸濃度が高い傾向が観察された。また、今回測定した中腸腺中の遊離脂肪酸を  $\omega$ -3 系列、 $\omega$ -6 系列、その他の脂肪酸に分類して、含量を比較したところ、 $\omega$ -3 系列脂肪酸（アラキドン酸とリノール酸）が際立って多いサンプルが観察され、このサンプルにはマウスアッセイで 1/3 の死亡が確認され、冷凍保存した試料中の遊離脂肪酸が増加し、マウスアッセイで擬陽性になるという仮説を支持する結果となった。この事実だけから毒性と遊離脂肪酸含量の相関を論ずるのは時期尚早であるが、今後リファレンスマテリアル作成時に例数を増やして遊離脂肪酸を測定し、毒性と比較することが重要と思われた。

オカダ酸の添加方法として、サンプル管ビンに附着させる方法と濾紙ディスクに吸着させて添加する方法を検討し、濾紙ディスク法が良いという結果が出た。添加量としては、剥き身 125g 中に 80  $\mu$ g、中腸腺 25g 中に 40  $\mu$ g で概ね良好な結果が得られた。今後、オカダ酸の濾紙ディスク中の安定性を確認し、試験的にサンプルを試験機関に配布し問題点を確認する必要がある。更に、より正確にリファレンスマテリアルの評価を行う上で、毒性成分の LC-MS を用いた多成分同時分析法の導入が必須となると考えられる。

## 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

○川崎 勝, 大島赴夫, 松木容彦, 鈴木敏之, 山本茂貴, 伊藤嘉典, 町井研士: 精度管理用貝毒検査試料中の遊離脂肪酸の測定。(社)日本食品衛生学会第88回学術講演会。広島 11月 (2004)

## 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

## 引用文献

- 1) Fukusi, A. et.al. : Increase of free fatty acids in the hepatopancreas of scallops kept in freezer. FISHERIES SCIENCE 2003; 69:p1080-1082
- 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 -61

4) 下痢性貝毒の検査について。厚生省通知環乳第37号。食品衛生研究会召集。食品衛生関係法規集2。昭和56年5月19日 p1732-1737

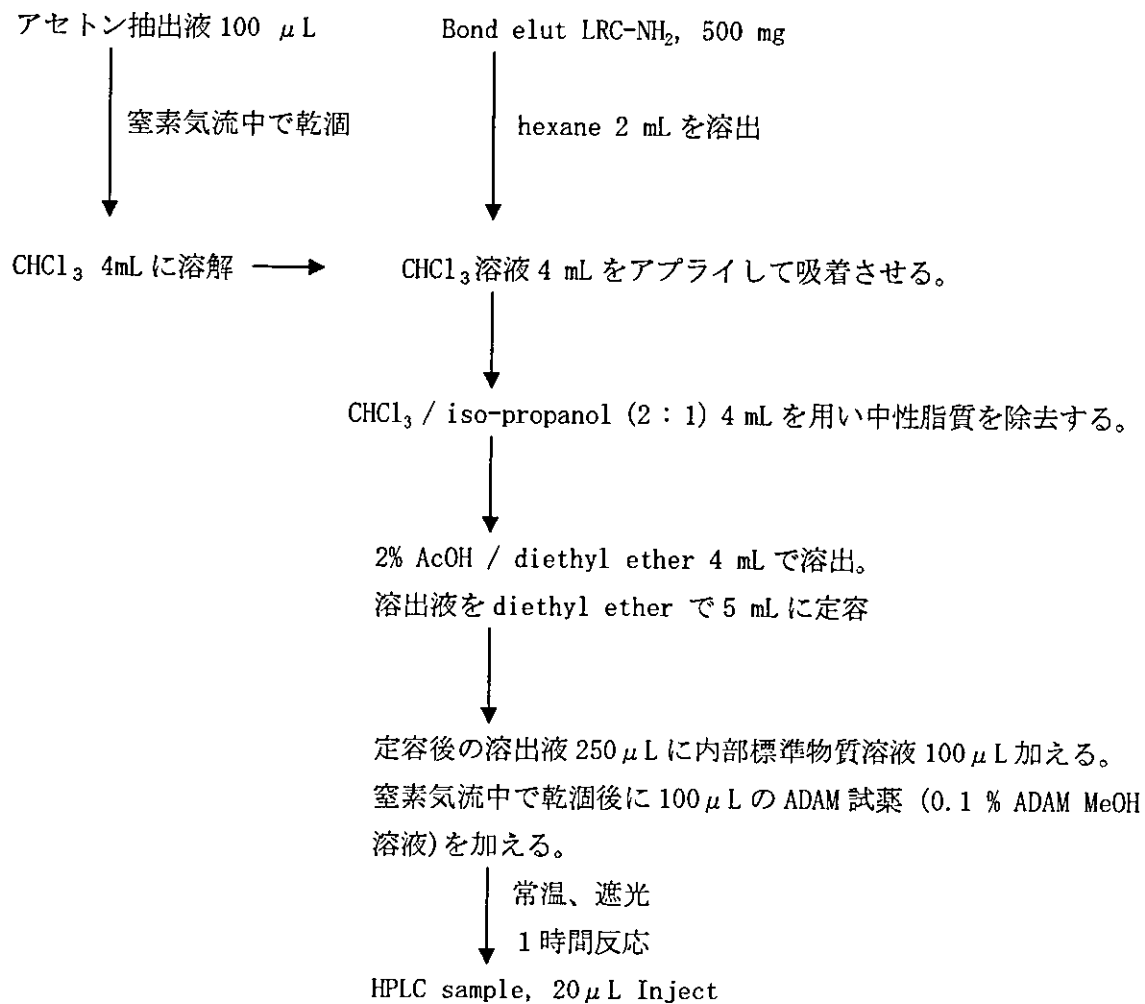
5) Suzuki, T. et.al. : Interference of Free Fatty Acid from the Hepatopancreas of Mussels with the Mouse Bioassay for Shellfish Toxins. Lipids, Vol. 31, No 6 (1996), p641-645

6) Suzuki, T. : High-performance lipid chromatographic resolution of dinophysistoxin-1 and free fatty acids as 9-anthrylmethyl esters. Journal of Chromatography A, 677 (1994) p301-306

7) Kawasaki M. et.al. : Effect of  $\alpha$ -Linolenic Acid on the Metabolism of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 Polyunsaturated Fatty Acid and Histamine Release in RBL-2H3 Cell. Biol. Pharm. Bull. 17(10) p1321-1325 (1994)

## 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。



Scheme 1 固相抽出法を用いたアセトン抽出液からの遊離脂肪酸の精製

表1 冷凍試料中の遊離脂肪酸の濃度 (μg/g)

FFA	鎖長	不飽和度	ω3, ω6	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9
				1266.91	165.079	469.494	606.705	830.007	655.817	1042.67	517.41	725.517
cis,6,9,12,15 octadeca tetraenoic	18	4		1266.91	165.079	469.494	606.705	830.007	655.817	1042.67	517.41	725.517
EPA	20	5	3	3397.91	1036.84	2595.06	1713.65	2339.32	2016.11	2168.86	1895.92	3491.22
DHA	22	6	3	3347.86	1243.44	2974.77	1673.87	2217.9	2433.68	2290.85	1540.44	1399.88
AA	20	4	6	315.01	132.545	83.5011	96.2909	96.9723	120.386	101.538	78.4994	81.9546
palmitoleic acid, miristic acid	16	1		1450.59	419.051	899.876	503.397	618.198	744.451	546.37	340.348	478.477
linoleic acid	18	2	6	573.901	122.755	148.365	93.5375	190.229	277.875	226.794	135.475	260.777
oleic acid, palmitic acid	18	1	9	2180.72	756.409	1607.79	1107.96	1239.74	1070.54	818.871	536.712	1075.29
stearic acid	18	0		1753.49	940.031	1116.68	1082.39	1342.67	1287.41	912.543	679.565	1066.75
aracitic acid	20	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
総遊離脂肪酸				14286.4	4816.15	9895.53	6877.79	8875.03	8606.28	8108.49	5724.37	8579.87

表2 冷凍試料中の遊離脂肪酸の濃度 (μg/g)

剥き身

FFA	鎖長	不飽和度	ω3, ω6	WH1	WH2	WH3	WH4	WH5	WH6	WH7	WH8	WH9
cis6,9,12,15	18	4		42.0014	11.2082	39.3491	140.341	222.711	153.021	184.426	276.843	219.218
octadeca tetraenoic												
EPA	20	5	3	638.779	637.377	578.148	824.638	1161.08	336.226	553.688	674.811	982.762
DHA	22	6	3	1066.01	648.271	918.7	1221.44	938.972	676.909	830.855	1098.08	1010.66
AA	20	4	6	81.0766	56.4719	55.0784	72.3762	73.1544	41.3145	15.6048	39.1627	38.8805
palmitoleic acid, myristic acid	16	1		232.6	202.99	154.178	223.787	299.908	100.08	152.229	177.029	210.382
linoleic acid	18	2	6	30.4936	17.9931	11.2657	0	21.8499	0	0	0	0
oleic acid, palmitic acid	18	1	9	584.597	495.801	473.204	584.145	563.76	283.924	411.228	459.89	472.98
stearic acid	18	0		946.914	966.294	573.551	689.226	578.073	424.288	498.037	614.62	500.397
aracidic acid	20	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
総遊離脂肪酸				3622.47	3036.41	2803.47	3755.95	3859.51	2015.76	2646.07	3340.44	3435.27



表3 試料中の遊離脂肪酸の濃度 (μg/g)

中腸腺									
FFA	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9
総ω3FAA	6745.77	2280.28	5569.83	3387.51	4557.22	4449.8	4459.71	3436.36	4891.1
総ω6FAA	888.911	255.301	231.866	189.828	287.201	398.261	328.332	213.975	342.732
その他合計	6651.71	2280.57	4093.83	3300.45	4030.61	3758.22	3320.45	2074.03	3346.04
総遊離脂肪酸	14286.4	4816.15	9895.53	6877.79	8875.03	8606.28	8108.49	5724.37	8579.87
剥き身									
FFA	WH1	WH2	WH3	WH4	WH5	WH6	WH7	WH8	WH9
総ω3FAA	1704.79	1285.65	1496.85	2046.07	2100.05	1013.13	1384.54	1772.89	1993.42
総ω6FAA	111.57	74.465	66.3442	72.3762	95.0043	41.3145	15.6048	39.1627	38.8805
その他合計	1806.11	1676.29	1240.28	1637.5	1664.45	961.313	1245.92	1528.38	1402.98
総遊離脂肪酸	3622.47	3036.41	2803.47	3755.95	3859.51	2015.76	2646.07	3340.44	3435.27

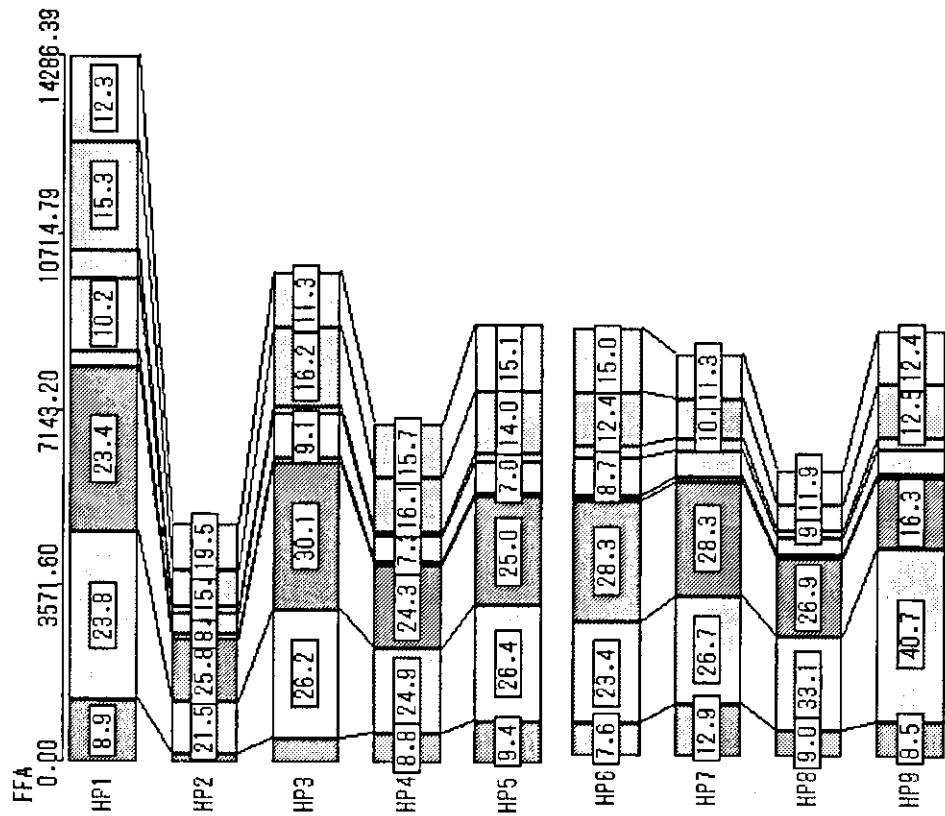
表 4 ホタテ剥き身に対するオカダ酸の添加量と  
添加方法によるマウスの死亡数の比較(予試験)

添加量	マウスの死亡数(3匹中)	
	濾紙ディスク	サンプル管ピン
80 $\mu$ g	3	2
40 $\mu$ g	3	0

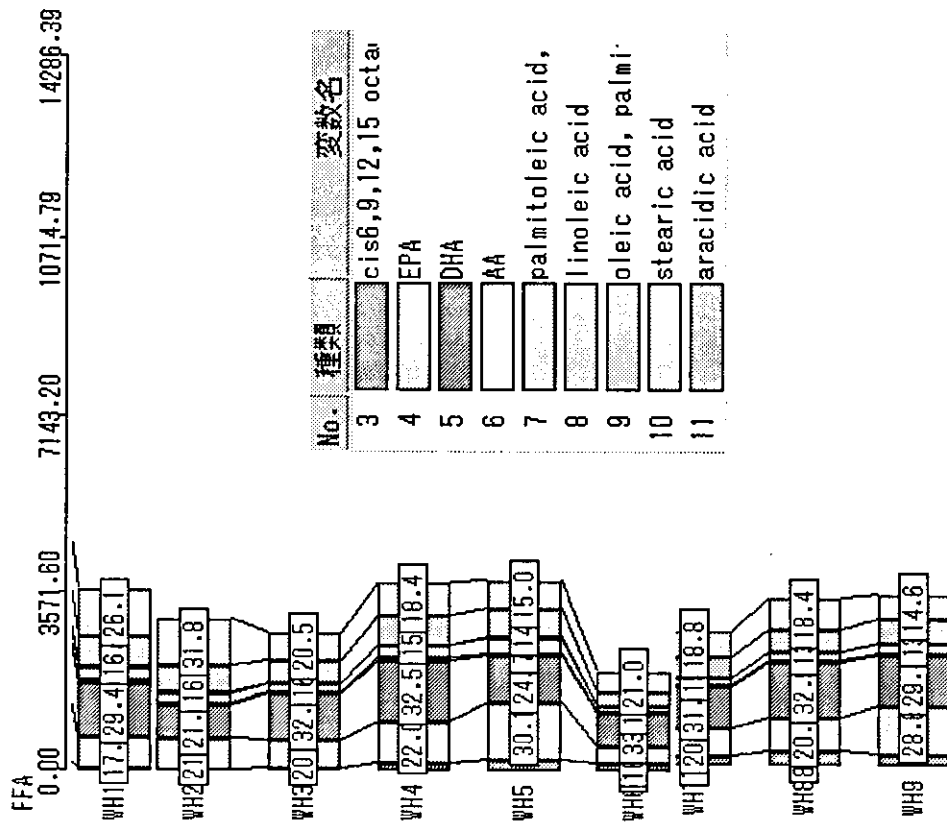
表5 ホタテ試料に濾紙ディスク法を用いてオカタ酸を添加したサンプルと未添加サンプルのマウスアッセイにおける毒性の比較 (n=5)

	オカタ酸の添 加量(μg)		陽性サンプル数		陰性サンプル数	
	80	0	5	0	5	0
ホタテ剥き身 (125g)	0	40	0	5	5	0
ホタテ中腸腺 (25g)	0	40	0	5	0	5

# 中腸腺



# 剥き身



No.	種類	変数名
3		cis6,9,12,15 octar
4		EPA
5		DHA
6		AA
7		palmitoleic acid,
8		linoleic acid
9		oleic acid, palmi-
10		stearic acid
11		aracidic acid

図 1 精度管理用保存検体(ホタテ貝、4ヶ月)の遊離脂肪酸組成