

**References**

- 1 ISO 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method
- 2 Tsutsumi T., Yanagi T., Nakamura M., Kono Y., Uchibe H., Ida T., Hori T., Nakagawa R., Tobiishi K., Matsuda R., Sasaki K. and Toyoda M. (2001) *Chemosphere* 41, 1129.
- 3 van Bavel B. (2003) *Organohalogen Compounds* 2003, 122
- 4 Tsutsumi T., Ida T., Hori T., Nakagawa R., Tobiishi K., Yanagi T., Kono Y., Uchibe H., Matsuda R., Sasaki K. and Toyoda M. (2002) *Chemosphere* 46, 1443.

**Table 1 Samples used in the proficiency testing and their reproducibility**

Year	No of Participants	Samples	TEQ (pg/g)	Reproducibility RSD%
1998	6	BCR CRM607 spray-dried milk	3.3	6.6
1999	15	BCR CRM607 spray-dried milk	3.6	11
		CARP-1 homogenized fish	79	8.0
		Nonane solution of standards	23	8.7
2000	10	BCR RM534 spray-dried milk	4.6	18
		Nonane solution of standards	16	9.0
2001	9	Sea bass freeze-dried	6.1	11
		Spinach freeze-dried	0.32	31
2002	8	Grey mullet freeze-dried	7.3	7.1

Table 2 Results of proficiency testing in 2001 Sample: Sea bass

Analyte			Normal statistics			Robust statistics		
	max (pg/g)	min (pg/g)	mean (pg/g)	SD (pg/g)	RSD (%)	mean (pg/g)	SD (pg/g)	RSD (%)
2,3,7,8□TCDD	0.31	0.18	0.24	0.05	19	0.24	0.05	22
1,2,3,7,8□PeCDD	1.08	0.70	0.84	0.13	15	0.84	0.13	16
1,2,3,4,7,8□HxCDD	0.28	0.12	0.18	0.05	28	0.17	0.04	25
1,2,3,6,7,8□HxCDD	0.63	0.46	0.55	0.06	12	0.55	0.07	13
1,2,3,7,8,9□HxCDD	0.13	0.07	0.09	0.02	24	0.09	0.03	28
1,2,3,4,6,7,8□HpCDD	0.70	0.20	0.33	0.16	48	0.29	0.08	26
∑ p b c c	18.50	0.37	2.85	6.33	222	0.67	0.25	38
2,3,7,8□TCDF	1.93	1.27	1.50	0.22	15	1.49	0.22	15
1,2,3,7,8□PeCDF	0.69	0.34	0.46	0.12	26	0.45	0.12	26
2,3,4,7,8□PeCDF	2.49	1.51	1.87	0.28	15	1.84	0.22	12
1,2,3,4,7,8□HxCDF	0.35	0.14	0.20	0.07	35	0.18	0.04	20
1,2,3,6,7,8□HxCDF	0.19	0.14	0.17	0.02	14	0.17	0.03	16
1,2,3,7,8,9□HxCDF	1.04	-	-	-	-	-	-	-
2,3,4,6,7,8□HxCDF	0.33	0.26	0.30	0.03	9	0.30	0.03	10
1,2,3,4,6,7,8□HpCDF	0.57	0.06	0.19	0.17	92	0.14	0.06	45
1,2,3,4,7,8,9□HpCDF	0.14	0.01	0.07	0.05	77	0.07	0.06	87
∑ p b c e	0.29	0.01	0.18	0.11	61	0.18	0.13	69
3,3',4,4'□TCB	75.5	43.7	53.7	9.8	18	52.48	8.02	15
3,4,4',5'□TCB	3.32	1.69	2.43	0.53	22	2.43	0.60	25
3,3',4,4',5'□PeCB	38.7	20.7	30.0	5.4	18	30.0	6.0	20
3,3',4,4',5',5'□HxCB	14.6	9.4	11.2	1.8	16	11.10	1.71	15
2,3,3',4,4'□PeCB	1180	827	983	106	11	979	112	11
2,3,4,4',5'□PeCB	134.7	51.0	77.9	23.2	30	73.7	12.1	16
2,3',4,4',5'□PeCB	3589	2741	3214	310	10	3214	351	11
2',3,4,4',5'□PeCB	73.9	33.2	47.4	12.5	26	46.1	11.0	24
2,3,3',4,4',5'□HxCB	491	391	435	35	8	435	39	9
2,3,3',4,4',5'□HxCB	140	97	114	14	12	113.2	14.4	13
2,3',4,4',5,5'□HxCB	246	205	221	16	7	221	18	8
2,3,3',4,4',5,5'□HpCB	61.7	45.5	54.9	4.7	9	55.2	4.6	8
TEQ	6.90	5.19	6.19	0.60	10	6.19	0.68	11

## 遺伝子組換え大豆定量検査法の外部精度管理について

○渡邊敬浩<sup>1</sup>， 穂山浩<sup>1</sup>， 米谷民雄<sup>1</sup>， 笠間菊子<sup>2</sup>， 松木容彦<sup>2</sup>， 児玉貴志<sup>3</sup>， 栗原秀夫<sup>3</sup>， 日野明寛<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所， <sup>2</sup>(財)食品薬品安全センター秦野研究所， <sup>3</sup>(独)農林水産消費技術センター， <sup>4</sup>(独)食品総合研究所)

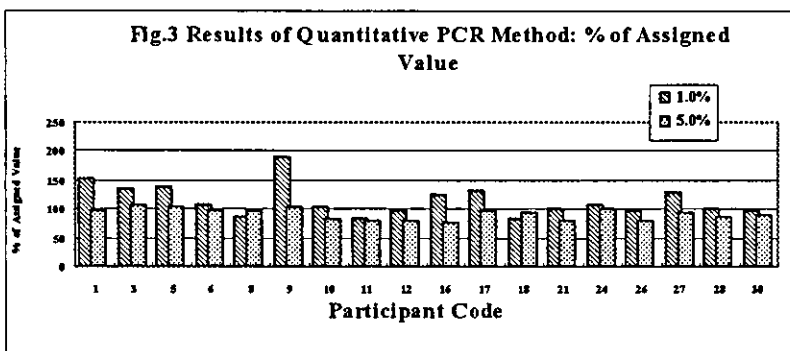
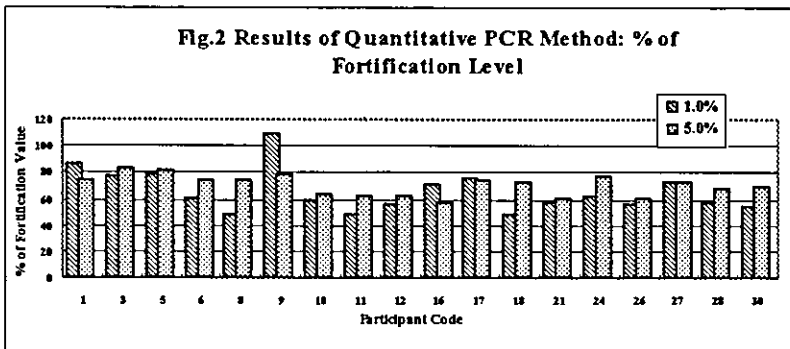
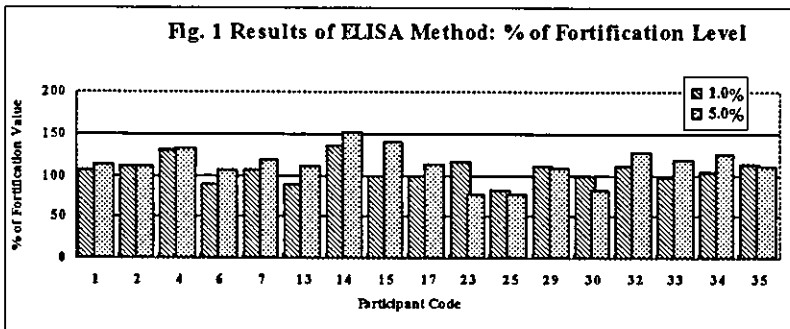
【緒言】厚生労働省では平成 13 年 4 月以降、公衆衛生の観点から遺伝子組換え(GM)食品の安全性審査を義務付けるものとし、併せて表示制度を施行している。またこれに伴い、流通ならびに表示の科学的検証を目的とした検査方法を記した「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」を医薬局食品保健部長通知し、GM 食品の検査方法を定めた。当該検査方法は平成 13 年 3 月 27 日に通知されて以降、科学的検証法の改良や対象 GM 食品の変遷等に合わせて順次改訂を重ね、平成 15 年 6 月 18 日に通知された食発第 0618001 号においては、分析適応可能機種種の拡充に伴い、定量 PCR 法の項を中心とした大幅な改訂を行ったところである。

GM 食品のうち、安全性審査を終了した GM 食品に関しては食品衛生法に規格基準が設けられており、意図せざる場合、5%の混入率を目安に分別流通管理が正しく行われているか否かが判断される。行政上、この数値をもって判断がなされるため、当該検査方法を用いて得られる測定結果の信頼性を確保することが大変重要である。この測定結果の正当性を保証するためには、精度管理が不可欠である。すなわち、諸検査機関が厚生労働省通知法に従い配布検査試料を同一時期に分析し、その分析結果をもとに、当該分析法における検査機関間のデータのばらつきの程度ならびに検査水準を把握すること、さらには、検査担当者が自己の技術を客観的に認識し、検査技術の維持向上を図ることは極めて重要と思われる。しかしながら GM 食品定量検査方法に採用されている ELISA 法、ならびに定量 PCR 法を対象とした外部精度管理方法については国際的にもほとんど検討されておらず、既存の外部精度管理方法が適用できるのかについての情報は少ない。本研究では、昨年度本会において報告した GM トウモロコシおよび GM ジャガイモの定性検査法に引き続き、安全性審査の終了した GM 大豆の定量検査方法を対象とした外部精度管理方法を検討することを目的とし、35 機関(定量 PCR 法のみ：18 機関，ELISA 法のみ：13 機関，両法：4 機関)による試験を実施し、集計された共通未知試料の分析結果の相互比較を通じて検査機関によるばらつきの程度ならびにその要因について詳細な検討を行った。

【方法】GM 大豆試料は厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課を通じ、また 0%試料ならびに疑似混入試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換え(non-GM)大豆試料(アメリカ産大豆)は(独)食品総合研究所を通じ入手した。入手した全ての大豆試料を粒径が均一に 200  $\mu\text{m}$  となるよう粉碎し、その後、被験物質の混入率が重量換算で 1.0%、5.0%となるよう混合した。混合は以下の通り行った。まず、均一に粉碎した試料を再度凍結乾燥処理した。その後、上記重量比となるよう 0%試料と被験物質を正確に秤量し、全量を 500 g としてプラスチック製の袋に量り採った。袋中で十分な混合を行った後、篩にかけ、再び袋中で混合を繰り返した。この混合操作は合計で 3 回行った。混合操作後の試料を粉砕器で再度粉碎した後、疑似混入試料とした。疑似混入試料調製後、0%試料ならびに疑似混入試料を 6.5 g (定量 PCR 法) または 2.0 g (ELISA 法)となるよう、それぞれ 50 mL、あるいは 15 mL 容遠沈管 50 本に秤量分注し小分け試料とした。小分け試料のうち 6 点を無作為選出し、定量 PCR 法を用いた均一性試験を食品総合研究所で、ELISA 法を用いた均一性試験を国立衛研で実施した。試験の結果は統計的に処理し、十分な均一性を確認した。安定性試験は小分け試料 4 点を無作為選出し、試料配布日を 0 日目とし、-20°Cの条件で 30 日間保存した後に、試験終了時としての測定を実

施した。測定試験はPCR法, ELISA法の両法を用いて行い, 外部精度管理実施期間中における保存安定性について検討した。均一性確認後, 各小分け試料は0%試料を「低濃度」, 1.0%試料を「中濃度」, 5.0%試料を「高濃度」検体と表記し参加機関に送付した。またこれに合わせELISA法, 定量PCR法ともに, 厚生労働省通知法食発第0618001号に従い試験するものとし, 当該通知法に従ったマニュアルを作成し, 同送した。報告された測定データの統計処理は, ISO/IEC GUIDE 43-1等の国際基準を参考に実施した。

【結果及び考察】ELISA法を実施した各機関において得られた定量値を, 送付検体のGM大豆混入率に対する相対値に換算した結果をFig.1に示す。5%検体を測定した場合, 機関14ならびに15においてそれぞれ152.4%(定量値:7.62), 140.8%(定量値:7.04)と高めの値が報告された。また一方で, 機関23ならびに25からはそれぞれ76%(定量値:3.82)と若干低めの値が報告されている。これら機関間にみられる測定値のばらつきの原因については現在解析しているところであるが, 全体としては1.0%検体を測定した平均値が1.06%(相対値:105.8%), 5%検体を測定した場合の平均値が5.66%(相対値:113.2%)と報告されており, 良好な試験が行われたものと判断している。次に定量PCR法の結果を示す。定量PCR法を実施した22機関中18の機関



がシリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant mini kit)を用いてDNA抽出を行っていた。Fig.2には, それら機関より報告された定量値を送付検体のGM大豆混入率に対する相対値に換算した結果を示す。シリカゲル膜タイプキット法を用いた機関から報告された定量値は, 1.0%検体の平均値が0.66%(相対値:65.7%), 5%検体の平均値が3.53%(相対値:70.7%)と混入率と比較して低めであった。しかし, Fig.3に示すように, 国立衛研において同法を用いて得られた定量値に対し相対値を算出した場合には, 機関番号1ならびに6の機関から報告された1.0%検体に対する結果を除き, 良好な試験が行われたことが示唆されている(1.0%検体相対値:115.3%, 5%検体相対値:91.3%)。また, 他のDNA抽出法を採用した機関からは混入率と比較し良好と判断される結果が報告されている(1.0%検体平均値:0.87%, 5%検体平均値:4.78%)。これらの結果から, 大豆検体からシリカゲル膜タイプキット

法(QIAGEN DNeasy Plant mini kit)を用いて抽出されたDNAを対象にPCR法を実施した場合, 何らかの要因により測定値が低くなる可能性が示唆され, 通知の改正が必要と考えられた。

【謝辞】本研究は厚生労働省医薬局食品保健部の食品等検査費により実施した。本試験にご参加いただきました各検査機関の諸氏に深謝いたします。

## 精度管理用貝毒検査試料中の遊離脂肪酸の測定

(財) 食品薬品安全センター・〇川崎勝、大島赴夫、(社) 日本食品衛生協会・

松木容彦、(独) 水産総合研究センター・鈴木敏之、

国立医薬品食品衛生研究所・山本茂貴、伊藤嘉典、町井研士

### A. 研究目的

下痢性貝毒検査におけるマウスアッセイ<sup>1)</sup>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(偽陽性化)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。安定した外部精度管理調査用試料を調製するために、遊離脂肪酸の簡便な微量分析法を確立することとした。

### B. 遊離脂肪酸測定

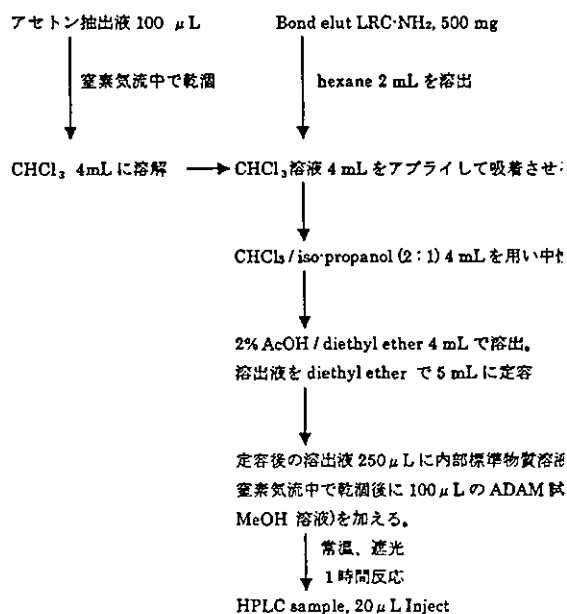
標準品は myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), arachidic acid (C20:0), palmitoleic acid (C18:4), cis 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5), Cis 4, 7, 10, 13, 16, 19- eicosapentaenoic acid sodium salt, arachidonic acid (C20:4), cis 4, 7, 10, 13, 16, 19- docosahexaenoic acid (C22:6) を測定対象にした。測定は鈴木ら<sup>2,3)</sup>による方法を一部改変して行った (scheme 1)。主な変更点は以下の通りである。測定に用いる溶液量を 100  $\mu$ L にスケールダウンし、マウスアッセイに用いるアセトン抽出液の一部をアッセイに支障を来さないよう少量分取して試料とした。Hexane-MeOH による液-液分配をより操作の簡便な Bond elut NH<sub>2</sub> 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を採用して HPLC による蛍光検出による測定を行った。ADAM 試薬は条件により反応中間体を検出する可能性もあったの

で、内部標準物質 (IS) は、貝試料由来のピトと重ならない保持時間を持つ decanoic acid (C10:0) が最適と考え使用したところ良好結果が得られた。

添加回収実験は各脂肪酸 8  $\mu$ g をアセトン抽出液 50  $\mu$ L に加えて回収率を求めた。その結果 85 %~112 % の良好な回収率が得られた。よって、貝毒検査用のアセトン抽出液の微量簡便な遊離脂肪酸測定法が確立された。本法を用いた貝試料中の遊離脂肪酸含量の基本的データを収集して、精度管理用試料作製立てると共に、遊離脂肪酸の増加が貝毒の発現にどのように寄与するかについて検討である。

### C. 文献

- 1) AOAC official methods of analysis (2000) Natural toxins chapter 49,
- 2) Suzuki, T. et al. Lipids, Vol. 31 6 (1996), p641-645
- 3) Suzuki, T. Journal of Chromatography A, 677 (1994) 301-306



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