

厚生労働科学研究費補助金研究  
(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14～16年度  
総合研究報告書

■主任研究者

財団法人 食品薬品安全センター 柳 澤 健一郎

■分担研究者

星薬科大学 薬品分析化学教室 中 澤 裕 之

大阪府立公衆衛生研究所 織 田 肇

国立医薬品食品衛生研究所 米 谷 民 雄

財団法人 食品薬品安全センター 松 木 容 彦

平成17年(2005)4月

# 目 次

I. 総合研究報告	
(主任研究者)	
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 柳澤 健一郎	1
(分担研究者)	
資料1 PCB代謝物および難燃剤成分のHRGC/MSモニタリング法の 確立と精度評価ならびに生体曝露に関する研究 中澤 裕之	33
資料2 血液および母乳試料中のダイオキシン測定マニュアルの実試料 への適用性ならびに生体曝露に関する研究、および臭素化 ダイオキシン測定法の確立、測定操作マニュアル作成に関する研究 織田 肇	51
資料3 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	155
米谷 民雄	
資料4-1～4-5 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 松木 容彦	161
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	255
III. 研究成果の刊行物	261

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14～16年度

総合研究報告書

主任研究者 柳澤健一郎

平成17年（2005）4月

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

総合研究報告書（平成 14～16 年度）

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）

研究要旨

ダイオキシン類の環境汚染化学物質の生活環境からの一日も早い低減化と環境改善ならびに食品や飲料水中のダイオキシンレベルさらにはヒトでの曝露レベルの経年的かつ長期的なモニタリング調査が必須とされ、一方では、環境汚染化学物質や食品検査の実施機関の検査結果の信頼性保証担保システム構築の重要性が指摘されている。このような社会的背景下、環境汚染化学物質検査のみならず食品衛生検査や遺伝子組換え食品検査等の検査データの信頼性保証を担保するため、公定法としての検査法ガイドラインや検査操作マニュアルの策定、整備、さらには各検査機関に対する内部および外部精度管理実施体制や信頼性保証担保システムの導入、整備は行政上の取り組むべき重要かつ緊急な課題である。当研究班では、ダイオキシンならびに食品衛生検査における検査法の開発、ガイドライン案や操作マニュアル案の策定さらには精度管理実施とその問題点の洗い出し等の基礎的データや資料の作成あるいはその関連情報の提供を行うことを研究目的として、平成 14 年度から 16 年度の 3 年間にわたり、1. PCB 代謝物および難燃剤成分の HRGC/MS モニタリング法の確立と精度評価に関する研究（中澤分担研究）、2. 血液および母乳試料中ダイオキシン測定マニュアル実試料への適用性ならびに生体曝露に関する研究/臭素化ダイオキシン測定法の確立と測定操作マニュアル作成に関する研究（織田分担研究）、3. 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（米谷分担研究）、4. 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/食品英詩絵検査精度管理調査における適正調査試料作製と質的向上に関する研究（松木分担研究）の 4 研究課題で実施した。なお、松木分担研究課題の中から食品衛生検査と組換え DNA 食品検査の外部精度管理調査試料作製部分の課題について平成 16 年度は、大島、渡邊が分担研究者として担当したが、本総合報告書ではそれらをまとめて松木分担研究報告の中の一括記載した。また、各分担研究者の平成 14～16 年度の研究詳細については、別添資料 1～資料 4 として添付したので参照されたい。

分担研究者名＝中澤裕之（星薬科大学教授）、  
織田 肇（大阪府立公衆衛生研究所所長）、  
米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所食品部  
長）、松木容彦（（財）食品薬品安全センター  
特別参事）、大島赴夫\*（（財）食品薬品安  
全センター秦野研究所部長）、渡邊敬浩\*  
（国立医薬品食品衛生研究所研究員）（\*大

島赴夫、渡邊敬浩は平成 16 年度のみの研究  
を分担研究者として実施した）

A. 研究目的

ダイオキシン類は動物を用いた実験により、急性毒性、免疫毒性、発ガン性、生殖毒性等が強く疑われており、また、発現

機序等についてもいまだ不明な点が多いことから、これら環境汚染化学物質による食物汚染やヒト体内暴露による国民健康への影響が懸念されている。したがって、これらの化学物質の生活環境からの一日も早い低減化ならびに環境改善の実施と、加えて経年的かつ長期的なモニタリング調査が必須とされる。一方、規制緩和策を受け環境汚染化学物質の検査を目的とした民間検査機関の増設に伴い、これら関連の検査機関から出される検査結果の信頼性保証確保に対する厳しい対応が望まれる。このような社会的背景下、環境汚染化学物質検査のみならず食品衛生検査や遺伝子組換え食品検査等も含め、出力される検査データの信頼性保証を担保するためには、検査法ガイドラインや検査操作マニュアルの策定、整備、精度管理実施体制と信頼性保証担保システムの構築、整備などについての具体的対応策を打ち出し、実施していくことは行政上の取り組むべき重要かつ緊急な課題であり、その方法の開発や基礎的データの作成あるいは関連資料の提供を行う等、円滑な行政活動に資することが当研究班の研究目的である。本報告書は平成14年度から16年度の3年間に亘り実施した研究報告を取りまとめたものである。

## B. 研究方法

1. 中澤分担研究：1) 生体試料中 POPs 関連物質のモニタリング法の確立と精度評価に関する研究— ① 測定法開発：生体試料として牛の脂肪及び豚の臓器(心臓, 腎臓, 肝臓)を用い、また、測定対象 POPs として臭素系難燃剤、有機塩素系農薬及び PCB 代謝物など 59 種類を選定した。抽出方法としては、高速溶媒抽出法 (ASE) 法を用い

て生体試料中の脂質と共に対象化学物質を抽出した。有機溶媒相(上層)を分取し、溶媒を完全に留去して脂質を得た。脂質をジクロロメタン/ヘキサン(1:1) 5mL に再溶解し、GPC カラム(Bio-Beads S-X3)、ついで固相抽出カートリッジ(シリカゲル SPE)を用いるクリーンアップにより、低極性化合物群とフェノール性化合物などの高極性化合物群に分別し、GC/MS (スプリットレス)により測定した。② 母乳中に残留するヘキサクロロベンゼンとダイオキシン類との総合的毒性評価：ダイオキシン分析は、公定法(母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル)に準じて行った。概略は次の通りである。母乳約 50g から脂肪抽出し、硫酸分解処理後、シリカゲルカラム、アルミナカラム、活性炭シリカゲルカラムの順に各クロマトグラフィーによりクリーンアップを行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーに際しては、ヘキサン 120mL でダイオキシン類を溶出後、更に 10%ジクロロメタン 60mL を流してこの分画に溶出される有機塩素系農薬を調べた。なお、ダイオキシン類の測定では PCDD/Fs 及びノンオルト Co-PCBs を対象とし、高分解能 GC/MS を用いて同位体希釈質量分析法にて定量した。毒性等量 (TEQ) の算出に際しては I-TEF を用いた。他方、有機塩素系農薬の測定には ECD-GC を用いて絶対検量線法にて定量した。2) 異なった毒性等価係数による母乳中ダイオキシン類の毒性等量評価の検討— 母乳試料 (150 検体) のダイオキシン分析は、公定法(母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル)に準じて行った。測定対象は PCDD/Fs (17 種類)、ノンオルト Co-PCBs (4 種類)、モノオルト PCBs (8 種類) およびジオルト PCBs (2 種類) とし、毒性等量 (TEQ) の算出に際しては同一試料

について、①I-TEF および WHO/IPCS-TEF (1993)を用いて PCDD/Fs (17 種類) および ノンオルト PCBs (3 種類) の TEQ を算出、②WHO-TEF(1993)を用いて PCDD/Fs(17 種類)、ノンオルト PCBs (3 種類)、モノオルト PCBs (8 種類) およびジオルト PCBs(2 種類)の TEQ を算出、③ WHO-TEF(1998)を用いて PCDD/Fs (17 種類)、ノンオルト PCBs (4 種類) およびモノオルト PCBs (8 種類) の TEQ を算出、の3種の方法で算出し、それぞれの TEQ の相関性を比較検討すると共に、相互補正に必要なファクターを算出した。3) ベビフード中に残留するダイオキシン類の調査と乳幼児への曝露評価の検討—成人の食品からの摂取量調査に汎用されるトータルダイエット方式の食品群を考慮して、ベビーフードを6種類の食品群(菓子、野菜、フルーツ、魚、肉、乳製品)に分けてそれぞれのダイオキシン分析を行い、総摂取量の見積りを検討した。ダイオキシン分析は、公定法(食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定法法暫定ガイドライン)に準じて行った。測定対象はPCDD/Fs、ノンオルト Co-PCBs、及びモノオルト PCBs とし、毒性等量(TEQ)の算出に際してはWHO-TEFを用いた。4) ダイオキシン類のGC/MS測定における大量注入法の導入—高分解能GC/MSにはJEOL MS-700を用い、GC注入部には従来のスプリットレス注入部とは別の注入部に大量注入装置を設置した。大量注入装置にはLaviStoma(エミネット(株)製)を用いた。また、大量注入法の実用性を確認するために、母乳と血液のそれぞれ同一試料について、従来法(スプリットレス)で測定して得られた値と大量注入法で得られた値(TEQ)との相関性を比較検討した。

2. 織田分担研究: 1) 母乳中塩素化ダイオ

キシン類測定マニュアルの検討—日常的にダイオキシン類分析を行っている研究機関の経験を基に、「母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」の修正を行う。さらに、ダイオキシン類濃度の保証値を有する粉乳(牛乳を乾燥し粉末状にしたもの、European Commission製BCRRM534)中のダイオキシン類濃度を修正マニュアルに従って測定し、マニュアルの適切性を検討した。2) 血液中塩素化ダイオキシン類測定マニュアルの検討—日常的にダイオキシン類分析を行っている研究機関の経験を基に、「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」の修正を行う。さらに、同一ロットの血清試料(日水製薬製L-コンセーラII)中のダイオキシン類濃度を修正マニュアルに従い測定し、マニュアルの適切性を検討した。3) 血液試料の少量化に関する検討—上記の粉乳および血清を、福岡県保健環境研究所(飯田ら)が開発した少量法により測定し、結果の比較検討を行った。また、上記の血清を国立環境研究所が開発した少量法により測定し、結果の比較検討を行った。4) 血液試料の前処理の簡易化に関する検討—血清試料の前処理の簡便さと大幅な時間短縮を目指して、ディスク型固相(C18)抽出法により血清中ダイオキシン類分析を行い、液々抽出法およびカートリッジ型固相抽出法との比較検討を行った。5) 母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアルの検討—①精度管理:「母乳中の臭素化ダイオキシンの分析法(案)」を基本に、最新の技術的知見を取り入れ、より信頼性の高い高感度の測定マニュアル(案)の策定を行った。このマニュアル(案)の適切性を検討するため、牛乳脂肪に一定量の臭素化ダイオキシン類を添加した試料および無添加試料を用い、協力研究機関で測定した。

また、操作ブランクについても同時に検討した。精度管理結果について、無添加脂肪試料の報告値、添加脂肪試料の報告値および添加値との比較、報告値の機関間変動、回収率、検量線濃度および直線性、検出下限等の解析を行い、測定マニュアル（案）の適切性を検証した。また、各協力研究機関で使用した標準物質、内標準物質、前処理法条件、測定装置条件等についても情報の提供を得た。② 臭素化ダイオキシン類測定マニュアル（案）の見直し：精度管理解析結果および協力研究機関より提供された標準物質、内標準物質、前処理法条件、測定装置条件等の情報を基に、測定マニュアル（案）を再度見直し、必要な追加・修正を加えた。6）母乳中臭素化ダイオキシン類濃度の実態調査－ 母乳の臭素化ダイオキシン類による汚染実態の概要を把握するため、若干例の母乳について、臭素化ダイオキシン類濃度を測定した。またヒトへの暴露評価のため、母乳中の塩素化ダイオキシン類も合わせて測定した。さらに、粉ミルクや市販乳についてもこれらのダイオキシン類を測定した。

3. 米谷分担研究：1）外部精度管理：平成14年度と16年度は、食品中のダイオキシン検査の外部精度管理における調査試料作製と調査を実施した。試料として、凍結乾燥した魚（ボラ）粉末及び茶粉末を用いた。参加を希望した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。それぞれの試料について、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試料ずつを抜き取って測定し、均一性を確認した。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。2）内部精度管理：平成15年度は内部精度管理方法について検討した。試料は14年度に外部精度管理に用いた、凍結乾燥した魚（ボラ）粉末を使用した。試験者2名にて、均一化した試料1検体ずつを4週間毎に10回分析した。4. 松木分担研究（平成16年度の大島、渡邊分担の精度管理に関する研究を含む）：1）ダイオキシン ELISA 法の構築と生体試料及び食品中ダイオキシン検査への利用－① 塩素化ダイオキシン ELISA キットのバリデーション：a) 試料－ダイオキシン類混合標準液、標準品添加精製バター、標準品添加牛乳および国立医薬品食品衛生研究所で作製した凍結乾燥魚肉を用いた。b) ELISA 試料の調製－試料を水酸化カリウムで加水分解後、*n*-ヘキサンで抽出した。ヘキサン層を濃硫酸で洗浄し、魚肉の場合はさらに化学修飾シリカゲルカラムで精製後、フタロシアニン固定化シリカゲルカラムで精製した。c) 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濃度を算出した。② 臭素化ダイオキシン ELISA の確立：a) 抗 PBDD/Fs モノクローナル抗体の作製－ハプテンの BSA 結合体を免疫して得たマウス脾臓細胞とミエローマ細胞を常法により融合させた。抗 PBDD/Fs 抗体を産生しているハイブリドーマを選択し、限界希釈法により

クローニングを行った。b)ELISA の構築—PBDD/Fs との親和性および臭素化・塩素化・臭素塩素混合ダイオキシンとの交差反応性を調べて適切なモノクローナル抗体を選別し、抗体量、標識抗原量および試料溶解液濃度を最適化して臭素化ダイオキシンのELISA を構築した。2) 食品衛生外部精度管理調査における微生物および理化学検査試料作製と基礎的検討—(1) 微生物検査試料：試験菌株— 秦野研究所保存の以下の14 菌種を用いた。

*Escherichia coli* IF03240、*Escherichia coli* NIHJ、*Escherichia coli* DH-1、*Escherichia coli* IF03139、*Escherichia coli* NHL u5/41、*Escherichia coli* NCTC9001、*Escherichia coli* HIC1203、*Escherichia coli* HIC1207、*Escherichia coli* HIC2211、*Escherichia coli* ATCC8739、*Klebsiella oxytoca* ATCC33496、*Acinetobacter calcoaceticus* IF012552、*Salmonella* Enteritidis HIC12042、*Proteus mirabilis* ATCC25933

①培養条件の違いによる大腸菌のガス産生能の比較—大腸菌の培養は、大腸菌検査の公定法の推定試験で示されている EC 培地、ならびに大腸菌の自主検査等で汎用される BGLB 培地の 2 種を用いた。各培地 9mL に試験菌液 1mL を加え、EC 培地は  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、BGLB 培地は  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で 48 時間まで培養し、推定試験の判定基準であるガス産生能について比較検討した。なお、各試験菌は、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト (SCD) 培地を用いて  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約  $10 \sim 100$  cfu/mL となるように調製したものを接種菌液とした。②大腸菌の接種濃度とガス産生におけるマッシュポテトの影響—*E. coli* HIC2211 及び *E. coli* ATCC8739 株を用い、大腸菌の

接種菌数と発育増殖ならびにガス産生能について検討した。試験菌液は、SCD 培地を用いて  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約  $10^1 \sim 10^3$  cfu/mL となるように調製した。また、EC 培地および BGLB 培地の 2 種を用い、マッシュポテト存在下並びに非存在下について実施した。培養条件は、各培地 9mL に菌液 0.5mL 並びに 5 倍希釈マッシュポテトまたはリン酸緩衝液 0.5mL を加え、EC 培地は  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、BGLB 培地は  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で 48 時間まで培養し、菌液接種 3 時間、6 時間、24 時間、30 時間、48 時間後に生菌数測定を行い、各菌株の増殖曲線を作成し、併せてガス産生能を観察した。③大腸菌の発育およびガス産生能に対する培養温度の影響—ガス産生の異なる 3 種の大腸菌 [ガス高度産生株 *E. coli* IF03240、ガス中程度産生株 *E. coli* HIC 2211、ガス弱産生株 *E. coli* ATCC8739] を用い、これらの菌の発育増殖及びガス産生能に対する培養温度の影響を検討した。試験菌液は、SCD 培地を用いて  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約  $10 \sim 100$  cfu/mL となるように調製した。EC 培地 9mL に菌液 1mL を加え、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で 24 時間培養して試験菌の発育とガス産生能を判定した後、ガス産生を認めない菌株については  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  でさらに 24 時間培養して試験菌の発育並びにガス産生能を観察した。④異なった培養条件下での培養による大腸菌数の比較—EC 培地 ( $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  培養)、及び BGLB 培地 ( $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  培養) で 24 時間、並びに 48 時間培養後の各試験菌株の増殖能を生菌数測定により比較した。なお、試験菌の接種量は培地 (9mL) あたり  $10 \sim 100$  個とした。⑤異なった培養条件下での大腸菌数の経時変化とガス産生能の比較—*E. coli* HIC2211 を用いて、大



腸菌の接種濃度と大腸菌の発育増殖並びにガス産生について検討した。試験菌液は、SCD 培地を用いて  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で前培養した後、リン酸緩衝液で希釈して約  $10^1 \sim 10^3$  cfu/mL となるように調製した。また、EC 培地および BGLB 培地の 2 種を用いて実施した。培養条件は、各培地 9mL に菌液 1mL 加え、EC 培地は  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、BGLB 培地は  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  で 48 時間まで培養し、菌液接種直後、3 時間、6 時間、24 時間、30 時間、48 時間後の生菌数測定を行い、生菌数測定とガス産生能を観察した。⑥ 大腸菌・大腸菌群検査用調査試料作製のための実食材基材の選択（食品・食品添加物等規格基準のカテゴリーを参考とした選択）— 実食材を用いた大腸菌・大腸菌群検査用調査試料作製のための基材は、市販の冷凍ハンバーグ（T 社、I 社、M 社）を用いて実施した。

試験菌（*Escherichia coli* IF03240、*Klebsiella oxytoca* ATCC33496、*Acinetobacter calacooaceticus* IF012552）をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト（SCD）寒天培地で  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18~24 時間培養した後、安定化剤を含む滅菌生理食塩液に懸濁して約  $10^8$  colony forming units (cfu)/mL の試験菌液を調製し、これにあらかじめ前処理して加熱殺菌した冷凍ハンバーグ（T 社、I 社、M 社）を調製菌液に浸漬してハンバーグ表面に試験菌を均一に付着させた。これらを  $4^\circ\text{C}$  下に 35 日間保存し、接種当日、7、14、21、28、35 日目に生菌数測定を行い付着菌数とその経日的変化を確認した。1 回の測定に 3 個のハンバーグを用い、菌数測定は  $n=2$  で行いその平均値を求めて生菌数 (cfu/g) とした。⑦ ハンバーグ基材中の接種菌の均一性と安定性の確認— 先に示したと同様の方法で菌液調製を行いハンバーグ（M 社）に試験菌を均

一に付着させた後、これらを  $4^\circ\text{C}$  下に保存して接種当日、7、14、28 日目にハンバーグ表面の生菌数の分布を確認した。ハンバーグを 8 分割し、各分画ごとに生菌数測定を行い、付着菌数を測定して、付着菌数の均一性と安定性を確認した。また、14 日間、28 日間保存試料については、EC 培地を用い  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  で  $24 \pm 2$  時間培養して試験菌の発育ならびにガス産生の有無について確認を行った後、培養液の 1 白金耳を EMB 寒天培地に移植し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $24 \pm 2$  時間培養して発育集落の有無ならびにその性状を観察した。⑧ 保存条件の異なるハンバーグ基材を用いた大腸菌の培養における生菌数の経時変化とガス産生能の比較— 先に示した手順に従ってハンバーグ（M 社）基材表面に大腸菌を付着させた後、 $4^\circ\text{C}$  ならびに  $-20^\circ\text{C}$  に 35 日間保存し、生菌数を経日的に測定して接種菌数の推移を確認した。また、保存 28 日目の試料を用いて、EC 培地で  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間~ $48 \pm 3$  時間培養または BGLB 培地で  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間~ $48 \pm 3$  時間培養を行い、試験菌の発育ならびにガス産生量についてその有無を観察した。⑨  $0.4^\circ\text{C}$  保存ハンバーグ基材を用いた大腸菌・大腸菌群の培養における生菌数の経時変化とガス産生能の比較— ハンバーグ（M 社）に *E. coli*、*K. oxytoca* および *A. calacooaceticus* を単独で付着させ経日的に生菌数測定を行い生菌数の推移を確認した。なお、*E. coli* については、異なった濃度の調製菌液を用いてハンバーグに付着させた後、付着菌数と生菌数の推移についても併せて測定した。また、*E. coli* および *K. oxytoca* については、35 日間まで保存した試料について経日的に試験培地（EC 培地で  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \pm 2$  時間培養、BGLB 液体培地で  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $48 \pm 3$  時間培養）中での発育

とガス産生についてその有無を観察した。  
⑩ 安定化剤の選択とサルモネラ属菌の4℃保存液卵中での生菌数の推移—実食材を用いたサルモネラ属菌検査用試料作製のための基材は、市販の殺菌液卵（鶏卵）を用いた。殺菌液卵と滅菌済み安定化剤（SPG10、SPG20）とを1:1の容量比で混合して試験液卵を作製した。なお、安定化剤の代わりに滅菌生理食塩液を用いて作製したものを対照試験液卵とした。

試験菌 (*Salmonella* Enteritidis HIC1204、*Proteus mirabilis* ATCC25933) を SCD 培地で 35±1℃、18~24 時間培養した後、試験菌液約 10<sup>9</sup>cfu/mL を作製し、試験菌液 1mL を試験液卵 100mL（最終菌液濃度約 10<sup>7</sup>cfu/mL）に加えて 4℃下に 28 日間保存して接種後 7 日目、14 日目、28 日目に生菌数測定を行い、試験菌数の経日的推移を計測した。なお、同様に調製したものを 22.5℃に 3 日間静置し、基材変質の有無について観察した。また、異なる試験菌液を調製して殺菌液卵に接種後、先に示したと同様に 4℃下に 28 日間静置して経日的に生菌数測定を行い、保存期間中の菌数の推移を観察した。  
⑪ 選択培地中での試験菌の発育確認—試験菌 (*S. Enteritidis*、*P. mirabilis*) を用いて調製した試料について、検査法に従い前増菌培地（緩衝ペプトン水、EEM 液体培地）、増菌培地（セレナイトシスチン培地、テトラチオネート培地、ラパポートバシリアディス培地）、確認培地（DHL 寒天培地、MLCB 寒天培地、ブルアアントグリーン寒天培地、ES サルモネラ寒天培地）を用いて培養したときの試験菌の発育の有無を観察し、サルモネラ属菌の判定基準に従った検出確認を実施した。（2）理化学検査試料作製—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、玄米、無洗米および白米について、それぞれカドミウムを添加して、カドミウム濃度の均一性について検討した。また、カドミウム添加玄米については、ぬか部位と白米部位へのカドミウムの濃度分布について原子吸光光度法により調べた。

② 残留農薬（有機リン系農薬）検査試料—にんじんおよびとうもろこしを材料に使用して、残留農薬（有機リン系農薬：とうもろこし；クロルピリホス、マラチオン、にんじん；EPN、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン）検査の調査に使用する調査試料の作製法についての適正を調べるため、ガスクロマトグラフィーにより測定し検討した。③ 残留動物用医薬品（フルベンダゾール）検査試料—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法の再現性について HPLC 法により検討した。④ カビ毒検査試料—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に使用する調査試料の作製法の適切性について、厚生労働省から提示されている方法（食安発第 0717002 号）に従って測定し検討した。

（3）貝毒検査試料：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としては毒性が出ると予想される濃度で、オカダ酸を陰性サンプルに添加することとし、まず、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について検討した。外部精度管理調査試料としての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度々マウスが死亡（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ことから、まず、平成 15 年度から、遊離脂肪酸を簡便でかつ効率的に測定でき

る分析法の確立した。ついでリファレンスマテリアルの安定性について確認するため、保存期間中に増加する遊離脂肪酸を測定し、遊離脂肪酸産生の変化について調べた。

(4) 組換え DNA 食品検査試料— ① 平成 14 年度外部精度管理：パパイヤの果肉または種子を各機関に送付し、定性 PCR 法（果肉）および GUS 法（種子）の測定データについて集計を行った。② 確認試験：外部精度管理試料配布時に配布に使用したパパイヤ全個体につき、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。a) GUS 法：分取した種子から無作為に 1 粒をとり、胚を取り出した。これに基質溶液を加え、37℃、10～15 時間加温後、それぞれの検体について、青色を呈した胚の数を数えた。1 個体につきそれぞれ 12 個の種子を試験し、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。b) 定性 PCR 法：果肉を凍結乾燥後、ミキサーミルにて粉碎し、通知法のシリカゲル膜タイプキット法により DNA を抽出した。次にこの DNA 溶液について、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 PCR 増幅を行った後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅バンドの有無を観察した。対照用プライマー対で予定長の 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。③ 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℃）、冷蔵（約 4℃）、

冷凍（約-20℃）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 日目に GUS 法で、果肉については保存第 0 日、3 日、7 日および 14 日目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。④ 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 μg/mL を含む 3% のアガロースゲルで電気泳動した。これを各種ゲル撮影装置を用いて撮影し、100bp のバンドについてどの濃度までバンドが確認できるか比較した。⑤ 平成 15 年度外部精度管理：国立医薬品食品衛生研究所にて作製された遺伝子組換えダイズ（ラウンドアップレディ）擬似混入試料（混合重量比 0%、1%、5%）を参加機関に送付し、ELISA 法または定量 PCR 法により測定された結果について結果の集計を行った。⑥ DNA 抽出が定量 PCR 測定に与える影響についての検討：国産ダイズ試料から「JAS 分析ハンドブック 遺伝子組換え食品検査」に従って DNA を抽出した。この抽出 DNA について、内在性遺伝子レクチンのコピー数を定量 PCR 法で測定し、DNA 抽出の再現性および定量 PCR の再現性について検討した。⑦ 平成 16 年度外部精度管理（渡邊分担者実施）：調査試料には、GM トウモロコシ Mon810 系統を用い 27 機関を対象に調査を実施した。試験試料を作製し、試料濃度、均一性、安定性を調べた。

#### 倫理面への配慮

ダイオキシン測定のため、母乳や血液など、ヒトの試料を採取する際には、研究協力者に対する人権擁護上の配慮、研究による研究協力者に対する不利益、危険性の排

除等の説明を行い、理解（インフォームドコンセント）を得、同意の署名をもらう。さらに、ダイオキシン標準品は特定の管理区域内で取り扱うこととし、実験担当者は予め、実験手順や廃棄処理法等を含めてプロトコールを作製し、それに従って遂行する。さらに、実務担当者は自らの健康管理に十分配慮し、健康診断等の記録の保管を行う。実験廃棄物は定められた専門業者に搬出する。研究に使用する微生物などの取り扱いには特定の区域内で行う。また、実験に使用した微生物や微生物汚染試料については、実験終了後すみやかに廃棄処理方法に従って滅菌処理する。実務担当者は自らの健康管理に十分配慮し、健康診断などの記録の保管を行う。組換え DNA 食品検査に使用する改良遺伝子片のコピーや標準品等の保管管理は、管理責任者を定め、厳重な管理体制下で行い、試験に使用するサンプル等の一般試験室等への拡散を防止する。遺伝子組換え作物の取扱いは特定の区域内で行った。また、遺伝子組換え作物が周囲の自然環境に放出されないよう安全性未確認の遺伝子組換え作物は全て、また安全性確認済みの遺伝子組換え作物においても種子等の栽培可能な実験廃棄物は焼却処分に付した。さらに、これらの試験実施に当たっては、研究所等への届出等による試験実施許可をもらい実施する。

### C. 結果

1. 中澤分担研究：1) 生体試料中 POPs 関連物質のモニタリング法の確立と精度評価に関する研究— ① ASE 抽出条件の検討：脂質抽出に対して至適な抽出溶媒を調べたところ、ジクロロメタン/アセトン(1:1)が最も良好な組み合わせであった。② クリーンアップ：迅速で自動化が容易なクリー

ンアップ法として GPC を採用した。次にシリカゲルを充填した SPE を用いて、GPC 溶出フラクションに残存する微量の共存物質の除去を行うと共に、PCB や塩素系農薬類および PBDEs などの低極性化合物画分と、PCB 代謝体 (OH 体、MeSO<sub>2</sub> 体) や TBBP-A、および PCP など極性の大きい化合物との分画を行った結果、SIM 測定で妨害となる共存物質も十分に除去された。③ 添加回収実験：生体試料として牛や豚の臓器（脂肪、心臓、腎臓、肝臓）を用いて、ASE 抽出、GPC クリーンアップ及び SPE 分画、更にメチル化操作まで含めたすべての工程を介した添加回収実験を行ったところ、分析対象とした 59 種類の環境汚染化学物質はほぼ良好に回収された。④ 前処理の自動化：ASE による脂質抽出に関しては、MTBE を用いた液液分配操作以外は自動化できた。また、GPC クリーンアップについても自動クリーンアップが可能となった。更に SPE 分画操作では、操作の自動化を考慮して SPE の自動処理システム (Rapid Trace) を導入した。2) 母乳中に残留するヘキサクロロベンゼンとダイオキシン類との総合的毒性評価：最初に、母乳中ダイオキシン分析の前処理過程における HCB 及び主な有機塩素系農薬の分画挙動を調べ、分析法を確立した。次に、確立した本分析法を用いて、母乳中ダイオキシン分析の一連の操作において、ダイオキシン類に加えて、非プラナー PCB 画分に溶出された HCB の測定を行ったところ、全ての検体 (n=100) から HCB が検出され (4.1~91.8 ng/g fat)、平均値は 33.9 ng/g fat であった。そこで文献上の HCB の毒性等価係数 (TEF)、0.0001 を用いて TEQ を算出し (母乳中 HCB の毒性等量 (TEQ) は 0.41~9.2pg TEQ/g fat (平均値：3.4 pg TEQ/g fat, n=100))、ダイオキシンのみを考慮し

た従来法で算出した TEQ と比較すると、およそ 16%(平均値)の増加となり母乳中に残留するダイオキシン類の毒性を評価する場合には、ダイオキシンと同様に母乳を普遍的に汚染している HCB の毒性を無視できないことが確認された。3) 異なった毒性等価係数による母乳中ダイオキシン類の毒性等量評価の検討：母乳中ダイオキシン分析に際して、PCB の分画を行い、公定法では求められていないジオルト PCBs の測定も行って、各 TEF による TEQ の違いを検討した結果、各 TEQ の間には、それぞれ極めて良好な相関性があることが確認された。HCB, PCB の 何れの組み合わせの場合においても回帰直線の傾きの値が、各 TEQ 間の補正ファクターなることから、これらの値を用いることにより、過去の文献上のデータと比較する場合、測定対象のダイオキシン異性体が異なる場合においても、最新の TEQ に補正して比較検討することが、また、モノオルト PCB やジオルト PCB が測定されていないデータの場合にも TEQ の推定値を算出でき、比較、評価が可能と思われる。4) ベビーフード中に残留するダイオキシン類の調査と乳幼児への曝露評価の検討：ベビーフードを、菓子、野菜、フルーツ、魚、肉、及び乳製品の 6 種類に大まかに分類し、それぞれに該当する食品を購入して分析した。なお、摂取量の計算に際して簡便化を図るために、一回の食事に一ビンを食べるものとし、1日3回主食のビン詰めを食べ、更に副食(おやつ)として菓子(20g/day)を食べるものと設定した。また、菓子を除いた5つの食品群を均等に摂取するものと仮定して、ダイオキシン類の1日摂取量は、{これら5つの食品群からの総摂取量×3/5+1群(菓子)からの摂取量}として算出した。その結果、体重当たりの1日摂取

量は、0.061 pg TEQ/kgbw /day (ND=0で算出)、及び1.2 pg TEQ/kgbw /day (ND=定量下限値×1/2で算出)であった。今回の調査では、体重当たりの1日摂取量が1.2 pg TEQ/kgbw /day (ND=定量下限値×1/2で算出)であったが、この値は我が国がダイオキシン摂取量に対して定めた耐容1日摂取量(TDI:Tolerable Daily Intake)の4pgと照らし合わせた場合、十分に下回っており、また、厚生労働省がこれまでにやってきた一般成人を対象としたトータルダイエツスタディによる食品からのダイオキシン類1日摂取量調査(平成9年度から13年度)の値(1.45~2.41pg TEQ/kgbw /day)よりも下回っていることから、市販ベビーフードからのダイオキシン摂取量は直ちに問題になる量ではないと考えられた。5) ダイオキシン類のGC/MS測定における大量注入法の導入：GC/MS測定における最適な大量注入法を選択するために、従来までに報告されている主な方式としProgrammed Temperature Vaporizing (PTV)注入法、プレカラム注入法(Solvent Cut Large Volume Injection System:SCLV注入法)と最近開発された大量注入法としてLaviStoma大量注入法が現在多用されていることからこれらの実用性について比較検討した結果、操作性が簡便であり、また、注入量も数十~100μL程度まで注入可能であった。ついで、実際に装置を導入して、ダイオキシン分析における最適条件の検討を行ったところ十分に実用性があることがわかった。

2. 織田分担研究：1) 母乳中塩素化ダイオキシン類測定マニュアルの検討：① 測定マニュアルの検討— a) 目標定量下限値の設定：定量下限値はダイオキシンとジベンゾフランについては、暫定マニュアルの通りでよい。Co-PCBについては、暫定マニ

アルでは 10 pg/g fat となっているが、ブランク値（特にモノオルト（#118））を考慮すると、少し高い目に設定する方がよい。したがって、TeCDD, PeCDD, TeCDF および PeCDF は 1 pg/g fat、HxCDD, HpCDD, HxCDF および HpCDF は 2 pg/g fat、OCDD および OCDF は 5 pg/g fat とする。また、ノンオルト PCB は 10 pg/g fat、モノオルト PCB は 50 pg/g fat とする。

b) クリーンアップ：クリーンアップには、硫酸処理、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、硝酸銀カラムクロマトグラフィー、多層カラムクロマトグラフィー、アルミナカラムクロマトグラフィー、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどがあり、これらの中から選択して、組み合わせで行う。マニュアルでは、一般的な組み合わせを記載するが、他の組み合わせでも測定できるのであれば問題ない。マニュアルに定められた精度が保証できれば、どのようなクリーンアップ法でも良い。

c) PCB の分取について— PCB はカラムクロマトグラフィーにより、ノンオルト PCB（+ダイオキシンおよびジベンゾフラン）フラクションとモノオルト PCB フラクションに分かれるが、最終的に GC-MS で測定する場合、2つのフラクションを合わせて測定しても、あるいは別々に測定しても感度はほぼ同等である。ただし、ノンオルト PCB とモノオルト PCB の濃度は大きな差があるため、濃度が低いノンオルト PCB のピークの判定が困難になり、間違ったピークをとる可能性がある。したがって、マニュアルでは、別々の測定を基本とする。

d) 質量分析計— 暫定マニュアルでは、質量分析計の感度は、10fg の 2, 3, 7, 8-TeCDD で S/N 比が 5 以上であることが望ましいと規定されている。可能なケースもあるが、困難なケースもあり、20～

50fg の 2, 3, 7, 8-TeCDD で S/N 比が 5 以上であることが望ましいとすることが適切である。

② 精度管理結果 a) 脂肪濃度について— 7 機関の平均値は 240mg/牛乳粉末 1g であり、変動係数は 20%であった。F 機関においては 154mg/牛乳粉末 1g と低い値を示したが、その原因は採取試料量が他に比べて少ないことによると思われる。

b) ダイオキシン類濃度について—

ア. 測定値と保証値の比較：ダイオキシン (PCDDs) およびジベンゾフラン (PCDFs) の保証値と 7 機関の平均値を比較すると、全ての物質で保証値よりも低い値が得られ、PCDDs で保証値の 82～94%, PCDFs で 53～94%であった。保証値の 53%であった物質は 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD であり、この物質を除くと保証値の 75～94%であった。

イ. 試料中濃度の研究機関間の変動— 保証値が無い物質も含め全ての物質 (PCDDs, PCDFs, Co-PCBs) について、7 機関での機関間の変動を検討した。変動係数が 30%を越えた物質は、OCDD, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF, OCDF, 3, 4, 4', 5-TeCB(#81), 3, 3', 4, 4' -TeCB(#77), 3, 3', 4, 4', 5, 5' -HxCB(#169), 2', 3, 4, 4', 5-PeCB(#123), 2, 3, 3', 4, 4' -PeCB(#105), 2, 3', 4, 4', 5, 5' -HxCB(#167), 2, 3, 3', 4, 4', 5' -HxCB(#157), 2, 3, 3', 4, 4', 5, 5' -HpCB(#189)であった。特に、30%以上の変動係数が多く見られた Co-PCBs については、G 機関のブランク値が高く、ブランク値を引いた値で再計算すると、殆どの物質で 30%以下になった。また、毒性等量 (TEQ) の変動係数は PCDDs/PCDFs および Co-PCBs とともに 20%以下であった。

c) 試料中濃度の研究機関内の変動— 各研究機関内での同一試料の 3 回測定における

変動係数は、全機関において、全物質で変動係数が 20%以下であった。d) 回収率について—内部標準物質の回収率を表 4 に示す。回収率は 35～134%であり、一部で測定マニュアルで望ましいとする範囲 (50～120%) を超えていた。ただし、再測定の必要のない範囲 (25～150%) には入っていた。

2) 血液中塩素化ダイオキシン類測定マニュアルの検討 ① 測定マニュアルの修正について— a) 目標定量下限値：目標定量下限値については、母乳の場合と同じである。すなわち、ダイオキシンとジベンゾフランについては、暫定マニュアルの通りでよい。Co-PCB については、暫定マニュアルでは 10 pg/g fat となっているが、ブランク値 (特にモノオルト (#118)) を考慮すると、高い目に設定する方がよい。したがって、TeCDD, PeCDD, TeCDF, および PeCDF は 1 pg/g fat, HxCDD, HpCDD, HxCDF および HpCDF は 2 pg/g fat, OCDD および OCDF は 5 pg/g fat とする。また、ノンオルト PCB は 10 pg/g fat, モノオルト PCB は 50 pg/g fat とする。b) 濃度表示について—血中ダイオキシン類濃度は、血液 1 g 中のダイオキシン類量で表す場合と、脂質 1 g 中のダイオキシン類量で表す場合がある。同一の血液でも脂質量は抽出法によって異なるため、脂質 1 g 当たりのダイオキシン類量で表すと、抽出法の違いによる影響を受ける。この点からは、脂質抽出法の影響を受けないように、血液 1 g 当たりのダイオキシン類量で示した方がよい。一方、血液 1 g 当たりで表すと、高脂血症の場合、脂質が多いので見かけ上ダイオキシン類濃度が高くなる。この点からは、脂質量で標準化できるように、脂質 1 g 当たりのダイオキシン類量で示した方がよい。また、体内負荷量を考える場合には、脂質 1 g 当

りで示した方がよい。このように、それぞれ長所と短所があるが、マニュアルでは暫定通り、脂質 1 g 当たりのダイオキシン類量で表すこととする。c) 全血、血清および血漿について—暫定マニュアルでは、全血の測定が基本となっているが、その他に血清および血漿の測定もある。前処理は、全血よりも血清あるいは血漿の方が容易であり、この点では血清あるいは血漿の測定を基本とした方がよいとする考え方もある。しかし、採血時に溶血した場合、血清で測るためには、再度採血する必要が生じる。また、血球にもダイオキシン類が含まれているので、全血を使用して測定する方が効率が良い。さらには、暫定マニュアル制定後、全血で測定したデータが多数あることを考慮すれば、全血を基本にし、血清および血漿もマニュアルに含めることが適切である。d) 脂質抽出について—暫定マニュアルでは、脂質抽出法として Patterson 法を記載している。しかし、Patterson 法でも、硫酸、エタノール、ヘキサンなどの抽出試薬の量により抽出される脂質量が異なる。したがって、もっとも抽出率の高い試薬量を選択するべきと考えられる。ところが、抽出率が高いとしても、実際に抽出されたものが本当に脂質かどうかという点は検討されていない。しかも、抽出した時に、脂質が変成しているため、抽出したものが本当に脂質かどうかを確かめることが現時点ではできない。以上の点を考慮し、脂質抽出法に関しては統一した方法を決めることとする。結論的には、全血については、暫定マニュアルを変更しない。その理由としては、① 暫定マニュアルに示された抽出試薬量の割合は多少変動しても、抽出率の違いはそれほど大きくないこと、② 既に、この方法によるデータが多数あり、今後のデ

ータとの比較を考えると変更は望ましくないことがあげられる。血清および血漿については、暫定マニュアルでは「血清、血漿も同様に行うことができる」と記載されているだけであり、表現があいまいで、試料量が明確でない。この点を明確にするため、試料量を全血の半分とするよう明記する。その理由としては、① 全血と同量の血清を用いて暫定マニュアルに従って抽出を行った場合、抽出試薬量の多少の変動により抽出率が大きく変動すること、② 全血の半分の血清を用いて抽出を行った場合、抽出試薬量の多少の変動による抽出率の変動は小さいこと、③ 全血の中の液体部分は約50%であり、液液抽出という観点で考える時、抽出試薬の量を同じとすれば、血清の量を全血の量の半分にすれば、両者は同等になることがあげられる。抽出の回数については、暫定マニュアルでは3回目と定めている。しかし、3回目に抽出される量は全体の5%以下である。したがって、脂質抽出の3回目は省略可能であり、この点をマニュアルに記載する。e) クリーンアップについて— クリーンアップについては、母乳の場合と同様である。すなわち、硫酸処理、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、硝酸銀カラムクロマトグラフィー、多層カラムクロマトグラフィー、アルミナカラムクロマトグラフィー、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどがあり、これらの中から選択して、組み合わせて行う。マニュアルでは、一般的な組み合わせを記載するが、他の組み合わせでも測定できるのであれば問題ない。マニュアルに定められた精度が保証できれば、どのようなクリーンアップ法でも良い。f) PCB分取について— PCB分取については、母乳の場合と同様である。すなわち、PCBはカラムクロマト

グラフィーにより、ノンオルト PCB (+ダイオキシンおよびジベンゾフラン) フラクシオンとモノオルト PCB フラクシオンに分かれるが、最終的にGC-MSで測定する場合、2つのフラクシオンを合わせて測定しても、あるいは別々に測定しても感度はほぼ同等である。ただし、ノンオルト PCB とモノオルト PCB の濃度は大きな差があるため、濃度が低いノンオルト PCB のピーク判定が困難になり、間違ったピークをとる可能性がある。したがって、マニュアルでは、別々の測定を基本とする。g) 質量分析計について— 暫定マニュアルでは、質量分析計の感度は、10fg の 2, 3, 7, 8-TeCDD で S/N 比が 5 以上であることが望ましいと規定されている。可能なケースもあるが、困難なケースもあり、20~50fg の 2, 3, 7, 8-TeCDD で S/N 比が 5 以上であることが望ましいとすることが適切である。② 精度管理について— a) 脂質濃度について：1 回目— 7 機関中 5 機関では 5.12~5.78mg/g であった。酵素法で測定した総コレステロール、中性脂肪、リン脂質は合計で 4.61mg/g であり、マニュアルの抽出法によりほぼ正確に脂質が抽出されていると考えられる。一方、c 機関は 29.3 mg/g と先の 5 機関の値の 5~6 倍であり、脂質以外の物質を抽出した可能性、あるいは抽出溶媒が十分に蒸発していなかった可能性がある。なお、c 機関では、再測定を実施した結果、5.3mg/g と他の機関とほぼ同一になった。g 機関は 2.92 mg/g と先の 5 機関の値の約半分であり、水洗時にリン脂質が失われた可能性が考えられる。2 回目：7 機関の平均で 5.54mg/g であった。酵素法で測定した総コレステロール、中性脂肪、リン脂質は合計で 5.22mg/g であり、マニュアルの抽出法によりほぼ正確に脂質が抽出されていると考えられる。各機関の



平均値は4.21~6.31mg/gであった。研究機関間の変動係数は13%と少し大きい、1回目110%と比較するとかなり改善された。誤差要因の検討では、エマルジョン除去のためにエタノールを使用すると、リン脂質などがエタノールを含む水槽に移行することが考えられた。b) ダイオキシン類濃度について—ア. 試料中濃度の研究機関間の変動：研究機関間の変動係数が30%を超えた物質は、ダイオキシンでは1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,4,7,8-HxCDDおよびOCDD、コプラナPCBでは3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)および2',3,4,4',5-PeCB(#123)であった。物質ごとに見ると、1,2,3,7,8-PeCDDではf機関が平均値の1.7倍に、1,2,3,4,7,8-HxCDDではe機関が平均値の2.0倍に、OCDDではb機関が平均値の2.1倍になっている。また、3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)ではf機関が平均の1.7倍に、2',3,4,4',5-PeCB(#123)ではb機関およびd機関が平均の1.6倍および1.5倍になっている。これらの中1,2,3,4,7,8-HxCDDについては、該当機関の操作ブランク値を差し引くと他の機関の測定値とほぼ同程度になるため、ブランク値が底上げしているものと考えられる。他の物質については、原因は明確ではない。毒性等量 (TEQ) については、研究機関間の変動係数は20%以下であり、修正マニュアルにより再現性のある測定ができる。イ. 試料中濃度の研究機関内の変動：各研究機関内での同一試料の3回測定における変動係数は、c機関で3,4,4',5-TeCB(#81)が、e機関で2,3,7,8-TeCDD、2,3,7,8-TeCDFおよび2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167)が30%を超えていた。この中で3,4,4',5-TeCB(#81)および2,3,7,8-TeCDDについては、試料中濃度が低く、測定限界近くでの測定のため変

動係数が大きくなったものと考えられる。2,3,7,8-TeCDFも試料中濃度は低い、e機関の値は他の機関に比較してかなり大きく、汚染等の影響があったものと考えられる。2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167)については、変動の大きい原因は明確ではない。ウ. 操作ブランクについて：各研究機関の操作ブランク値がマニュアルで定める定量下限目標値を上回ると、試料中濃度の測定に支障をきたす。ただし、その場合でも、試料中濃度が操作ブランク値よりも十分多くければ問題はない。そこで、操作ブランク値が定量下限目標値を上回り、かつ試料中濃度の1/10を超えるケースを検討した。d機関3,3',4,4'-TeCB(#77)が、e機関1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,4,7,8-HxCDD、2,3,4,7,8-PeCDF、1,2,3,6,7,8HxCDF、1,2,3,4,6,7,8-HpCDF、3,3',4,4'-TeCB(#77)及び2,3,4,4',5-PeCB(#114)が該当した。何らかの汚染の影響と考えられる。エ. 回収率について：回収率は43~132%であり、一部のものでは、測定マニュアルで望ましいとする範囲(50~120%)を超えていた。ただし、再測定の必要のない範囲(25~150%)には入っていた。3) 血液試料の少量化に関する検討：① 福岡県保健環境研究所の少量法—福岡県保健環境研究所(飯田ら)の少量法を血清試料および粉乳試料に応用し、測定マニュアルに従った分析(以下、従来法)との比較を行った。その結果、血清試料ではダイオキシン類濃度は1,2,3,6,7,8-HpCDDおよびOCDDを除いてほぼ従来法と同じ値であった。1,2,3,6,7,8-HpCDDおよびOCDDは従来法に比べて、それぞれ、約1.5倍および2倍高い値を示した。しかし、1,2,3,6,7,8-HpCDDおよびOCDDは毒性等価係数が0.01および0.0001と低いので毒性等量には大きな影響

はなかった。また、血清中脂質濃度については、従来法の約 1/2 となった。この原因は明確でなく、今後、検討が必要である。

粉乳試料については、ダイオキシン類の各物質濃度は少量法と従来法の測定結果は良く一致していた。また、脂質濃度もほぼ同じ値であった。以上、血清試料と粉乳試料を少量法と従来法で分析した結果、血清試料では 1, 2, 3, 6, 7, 8-HpCDD および OCDD 濃度と脂質濃度についてなお検討を要すが、粉乳試料については極めて良い一致を示すことが分かった。② 国立環境研究所の少量法— 国立環境研究所の少量法を血清試料に応用し、従来法との比較を行った。その結果、ダイオキシン類濃度はいずれの物質でも従来法とほぼ同じ値であり、脂質濃度もほぼ同じであった。したがって、この方法でも血清中ダイオキシン類濃度を適切に測定できることが分かった。4) 血液試料の前処理の簡易化に関する検討：回収率については、ディスク型固相抽出法は TeCB, PeCB, TeCDD, TeCDF, PeCDF で最も低くなる傾向があったが、その差は 10%程度であったため十分に適用可能であると判断できた。実測値において、ディスク型固相抽出法は液々抽出法およびカートリッジ型固相抽出法とほぼ同一の結果が得られ、3 回の繰り返し検討におけるそれぞれの化合物濃度の変動係数は 20%未満であり、再現性は良好であった。5) 母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアルの検討：① 精度管理結果について— a) 測定対象化合物：測定対象化合物は、現在標準品が入手できる 2, 3, 7, 8-TeBDD, 1, 2, 3, 7, 8-PeBDD, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxBDD, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxBDD, 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxBDD, OBDD, 2, 3, 7, 8-TeBDF, 1, 2, 3, 7, 8-PeBDF, 2, 3, 4, 7, 8-PeBDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxBDF, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpBDF

および OBDF の 12 化合物とした。また、HpBDD は、適切な標準が入手できないが、OBDD の不純物として検出されるため参考として対象化合物に追加した。b) 検量線および内標準物質：測定対象化合物の検量線濃度および内標準物質は、各研究機関で準備したものを使用した。検量線は、各機関によって異なるが、一般的に、2, 3, 7, 8-TeBDD では 0.1~100pg/ $\mu$ L, OBDD で 2~500pg/ $\mu$ L の濃度範囲で 5 段階の標準溶液が使用された。また、検量線用標準溶液中のクリーンアップ内標準物質濃度は、一般的に、<sup>13</sup>C-2, 3, 7, 8-TeBDD では 10~100pg/ $\mu$ L, <sup>13</sup>C-OBDD で 20~500pg/ $\mu$ L であった。検量線の直線性に関しては、OBDF を除き、良好であった。OBDF については、機関により、相対感度係数 (RRF) が濃度により大きく異なることが認められた。これは OBDF の適切な内標準物質 (<sup>13</sup>C-OBDF) が得られないことに原因するものであった。c) 操作ブランク：操作ブランクについては 1 機関より、微量の 2, 3, 7, 8-TeBDF および OBDD が検出された。2, 3, 7, 8-TeBDF については、前処理で使用するカラムクロマトグラフの基材から、また OBDD はガスクロマトグラフのインジェクション部分からの汚染によるものと推定した。他の機関からはいずれの測定対象化合物も検出下限値以下であった。d) 検出下限値：今回の無添加および添加脂肪を分析した場合の検出下限値は、各機関の機器の感度や測定条件によって異なるが、2, 3, 7, 8-TeBDD では、5 機関において 1pg/g-脂肪 を達成できた。また、OBDD については、6 機関において 50pg/g-脂肪 を達成できた。なお、今回の脂肪試料分析量は 3~5g、最終溶液量は 50  $\mu$ L である。e) 無添加脂肪試料中の臭素化ダイオキシン類濃度：いずれの分析機関においても、すべての測

定対象化合物は検出されず、検出下限値以下であった。ただし、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxBDD および 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxBDD についてはガスクロマトグラフでの分離が困難なため、両者を合わせた報告値となっている。f) 添加脂肪試料中の臭素化ダイオキシン類脂肪中濃度：添加脂肪試料中の臭素化ダイオキシン類濃度の協力研究機関の平均値は、いずれの測定対象化合物についても添加値と±10%以内でよく一致していた。またそれらの変動係数も、1, 2, 3, 4, 7, 8-/1, 2, 3, 6, 7, 8-HxBDD および OBDF がそれぞれ 25% および 32% と 20% を越えたが、他の化合物は 20% 以内と良好な結果を得ている。なお、HpBDD は適切な標準品が入手できないため、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpBDF の RRF 値を用いて参考値として報告されているが、報告のあった 4 機関での報告値はよく一致していた。g) 回収率：クリーンアップスパイクに用いた内標準物質の回収率については、機関によって用いた内標準物質の種類が異なるので、回収率が報告されている化合物の種類は機関によって異なっている。各化合物の回収率は 49~101% で、1 機関の 1 化合物 (49%) を除き、測定マニュアル (案) で定めた望ましい回収率である 50~120% の範囲に入っており、良好な結果を得た。なお、一般的に、高臭素化 PBDDs/DFs の回収率は低臭素化の回収率より低い傾向を示した。h) クロマトグラム：高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS)：得られた添加脂肪中臭素化ダイオキシン類のクロマトグラムは、一般的にいずれの化合物においても、S/N が 10~200 の範囲であり、良好なクロマトグラムを示した。② 臭素化ダイオキシン類測定マニュアル (案) の見直し：上記の精度管理解析結果および各協

力研究機関より提供された標準物質、内標準物質、前処理法条件、測定装置条件等の情報を基に、測定マニュアル (案) を再度見直した。a) 測定対象化合物：本マニュアルでは臭素化ダイオキシン類の生体影響評価に必要とされる 2, 3, 7, 8-位臭素置換異性体を調査対象とする事とし、現在標準品が入手不可能な物質については暫定的に調査対象物質より除外するが入手可能になり次第、調査対象物とすることとした。現在、入手可能な標準物質は PBDDs 6 種 (2, 3, 7, 8-TeBDD, 1, 2, 3, 7, 8-PeBDD, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxBDD, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxBDD, 1, 2, 3, 7, 8, 9-HxBDD, OBDD) および PBDFs 6 種 (2, 3, 7, 8-TeBDF, 1, 2, 3, 7, 8-PeBDF, 2, 3, 4, 7, 8-PeBDF, 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxBDF, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpBDF, OBDF) である。b) 内標準物質：原則として、塩素化ダイオキシン類と同様、測定対象物と同じ構造を有する内標準物質をクリーンアップスパイクとして使用することとするが、臭素化ダイオキシン類の内標準物質は入手不可能な物質も多い。また、シリンジスパイクに使用する内標準物質も 2, 3, 7, 8-位置置換体以外の臭素化ダイオキシン類が望ましいが、現在 2 種を除き入手不可能である。したがって、今回の測定マニュアル (案) では、現在入手しうる内標準物質を用いて、標準物質と内標準物質の対応例を示すこととした。今後、新たな内標準物質が入手可能になり次第変更していく必要がある。c) 目標定量下限値：昨年度案では、目標定量下限値を、tetra-: 1pg/g-脂肪, penta-: 2pg/g-脂肪, hexa-: 20pg/g-脂肪, hepta-: 200pg/g-脂肪, octa-: 500pg/g-脂肪と仮に設定していた。今年度の臭素化ダイオキシン類添加脂肪および無添加脂肪試料の分析結果、大半の機関で 2, 3, 7, 8-TeBDD は 1pg/g-脂肪、ま

た、OBDD は 50pg/g-脂肪 を達成できた。一方、現在の母乳中の PCDDs/DFs の毒性等量はおおよそ 10~20pgTEQ/g-脂肪と言われている。臭素化ダイオキシン類の TEQ への寄与を塩素化ダイオキシン類と比較する場合（臭素化ダイオキシン類の TEF は公に認められたものはないが、対応する塩素化ダイオキシン類の異性体の TEF を使用する）、臭素化ダイオキシン類が検出されなかった時の最大見積 EEQ 相当量は塩素化ダイオキシン類の寄与（10~20pgTEQ/g-脂肪）を十分に下回る必要性がある。今回、これらの点と実際の脂肪分析を通して得られた検出下限値と考慮し、臭素化ダイオキシン類の定量下限値を設定した。すなわち、測定マニュアル（案）の目標定量下限値は、tetra- : 1pg/g-脂肪, penta- : 1pg/g-脂肪, hexa- : 5pg/g-脂肪, hepta- : 20pg/g-脂肪, octa- : 50pg/g-脂肪とした。d) 分析試料量 : 母乳分析試料量は、昨年度案の通り、母乳試料量は 50~100g とする事とした。e) 前処理 : 前処理は、昨年度案の通り、母乳試料より脂肪を溶媒抽出後、脂肪試料（約 1g 程度）をアルカリ分解あるいは硫酸処理を行い、その後、カラムクロマトグラフ操作でクリーンアップおよび分画操作を行うこととした。カラムクロマトグラフ操作では、シリカゲルカラムクロマトグラフおよび多層シリカゲルカラムクロマトグラフでクリーンアップした後、フロリジルカラムクロマトグラフ、アルミナカラムクロマトグラフ、活性炭シリカゲルカラムグラフのいずれかあるいはこれらを組み合わせにより、さらなるクリーンアップおよび臭素化ダイオキシン類の分画を行うこととした。今年度、測定マニュアル（案）に示した分析フロー例を一部修正した。f) GC-MS 測定 : 昨年度、協力研究機関に臭素化ダイオ

キシン類混合標準液を配布し、質量分析計の検出下限を測定したところ、2, 3, 7, 8-TeBDD で 10fg~500fg、OBDD で 100fg~20000fg であり、機器および測定条件により 1~2 桁の大きな差があることを認めた。今回、精度管理試料分析結果もふまえ、望ましい質量分析計の条件として、2, 3, 7, 8-TeBDD で 100fg, OBDD で 5000fg において S/N>5 の検出感度を得られるものであることを測定マニュアル（案）に記述することとした。また、GC 導入部、分離カラム、MS 条件等は、昨年度どおり、GC 導入部では、熱分解を軽減するため、オンカラム注入法もしくはスプリットレス法では注入口温度を可能な限り低温（240℃）とし、分析カラムでは膜厚が薄く（0.1μm）長さの短い（15m）カラムを使用することとし測定マニュアル（案）に測定条件例を示した。なお、分解能は塩素化ダイオキシン測定と同じ 10,000 以上とした。6) 母乳中の臭素化ダイオキシン類濃度の調査 : 母乳中の臭素化ダイオキシン類は 2, 3, 7, 8-TeBDF を主成分として検出されたが、その濃度は非常に低く、毒性等量相当値で、塩素化ダイオキシン類のおおよそ 1/10~1/100 であった。また、粉ミルクや市販乳中の臭素化ダイオキシン類濃度はさらに低く、母乳より 1 桁低いレベルであった。

3. 米谷分担研究 : 平成 14 年度 - 7 置換 PCDF 及び 3, 3', 4, 4', 5, 5' -HxCB を除いて、全ての異性体の機関間の RSD は 40% 以下であった。この試料の TEQ は 7.32pg/g であり、試験室間 RSD は 7.5% であった。ボラ試料は脂肪含量が高く、前処理が複雑であるにも関わらず、良好な結果が得られた。平成 15 年度（内部精度管理） - 2 名の試験者について比較したところ、Co-PCB 分析において、一方の試験者の方が、全般的に RSD