

が大きい傾向がみられた。同じ試料を用いて実施した平成 14 年度の外部精度管理では、TEQ の試験室間の RSD は 7.1%であった。今回の内部精度管理から求めた日間の RSD は、試験者 A では 5.8%、試験者 B では 7.4%であった。平成 16 年度一 試料として茶粉末を用いており、TEQ は 1pg/g 以下で、平成 14 年及び 15 年に使用した魚試料と比べて 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。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。

4. 松木分担研究：1) ダイオキシシン ELISA 法の構築と生体試料及び食品中ダイオキシシン検査への利用— ① 塩素化ダイオキシシン ELISA キットのバリデーション—平成 14～15 年度にわたり実施した、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 キットによる模擬生体試料の測定結果は、両キットとも機関間変動はやや大きかったものの、測定内変動は小さかった。測定値は理論値と大きく乖離することもなく、濃度順位が逆転することもなかった。また、平成 16 年度に実施した魚肉試料の測定内変動、測定間変動および機関間変動はそれぞれ 5～29%、15～51%および 72%であり、測定値は理論値の 10～60%と、本 ELISA キットは食品試料の検査においても良好な結果が得られた。② 臭素化ダイオキシシン ELISA 法の確立：平成 14 年度及び 15 年にかけて、4 または 5 塩素化、臭素化、塩素・臭素混合型 PBDD/Fs との反応性が高いモノクローナル抗体を選択して ELISA を最適化し、定量限界 2, 3, 7, 8-TeBDD 1pg/assay の ELISA を確立した。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：① 大腸菌の試験菌株間における培地中での増殖能とガス産生能の比較：秦野研究所保存の大腸菌 10 株について異なる培養条件 (2 条件：EC 培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 培養、BGLB 培地で $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 培養) におけるガス産生能を比較した結果、試験菌株によってガス産生能が大きく異なる結果を得た。BGLB 培地を用いて観察した結果では、 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養後に 10 株中 8 株でガス産生が認められ、 48 ± 3 時間後では 10 株中 9 株がガス産生を示した。一方、EC 培地 (公定法) では、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養後に 10 株中 5 株でガス産生を認め、他の 5 株ではガス産生が認められず、 48 ± 3 時間培養後でも 10 株中 6 株でガス産生を認める結果であった。また、培地中での発育は、BGLB 培地による $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養で全ての試験菌株が約 $10^{7\sim 8}$ cfu/mL のレベルまで増殖していたのに反し、EC 培地を用い、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養では、約 $10^{5\sim 7}$ cfu/mL のレベルまでの増殖が認められたが、2 菌株についてはほとんど発育を認めなかった。② 大腸菌の発育およびガス産生に及ぼすマッシュポテトの影響：調査試料の作製に当たって、マッシュポテトを基材としているため、大腸菌の発育やガス産生にマッシュポテトが影響を及ぼすか否かを検討した。その結果、BGLB 培地、ならびに EC 培地いずれの培地中でもマッシュポテトの添加による発育増殖への影響はほとんど認められず、ガス産生への影響も有意な差としては観察されなかった。また、異なる接種菌数でのガス産生については、接種菌数、ならびに培養時間の増加に従ってガス産生の判定が容易である傾向を示したが、マッシュポテトの有無については有意な差を認めなかった。EC 培地 (公定法、推定試験) での接種

菌数とガス産生能の関係については、低濃度接種量では 24 時間培養後の判定でガス産生を認めず、高濃度の接種菌数では判定可能であった。また、48 時間培養ではいずれの添加濃度においても明らかなガス産生を認めるが、菌株間の違いが大きく、菌株によっては低濃度接種菌量ではガス産生を認める事が出来なかった。③ 異なるガス産生能を示す大腸菌の発育およびガス産生に対する培養温度の影響：ガス産生能の異なる菌株を用いた培養温度の影響では、ガス高度産生株では EC 培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養で発育並びにガス産生を示すものの、中度並びにガス弱産生株では発育並びにガス産生を認めなかった。この 2 株に付いて、 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ でさらに 24 時間培養してガス産生を観察すると、中度ガス産生能株では発育並びにガス産生を示したが、弱ガス産生能株は増殖を示さず、後培養で死滅を確認した。即ち、EC 培地（公定法、推定試験） $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養で明らかにガス産生を示すグループ（Type I）、EC 培地でガス産生を示さないが BGLB 培地 $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養ではガス産生を示すグループ（Type II）、いずれの培地でもガス産生を認めないグループ（Type III）と大きく 3 つのカテゴリーに分類された。Type III は、全く増殖を示さない菌株も含まれる。④ ハンバーグを基材とした大腸菌群・大腸菌検査のための調査試料作製：ハンバーグを基材として用いる場合、肉に含まれている脂肪の量によって前処理が異なり、残存する脂肪の量が少ないほうが試験菌の接種に適していた。試験菌の接種方法では浸漬法が安定した結果を示しており、ハンバーグ表面に均一な付着菌数を持つ試料の作製が可能であった。作製した試料は、 4°C 保存でも -20°C 保存でも接種後 28 日間

まで安定した菌数で推移し、接種菌数の大きな増減は認められなかった。調製試料を 4°C 下で 28 日間保存し、EC 培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $24 \sim 48$ 時間培養、または BGLB 培地で $35.0 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $24 \sim 48$ 時間培養した後、判定基準にしたがってガス産生の有無を観察した結果、いずれの培地でもガス産生を認めた。しかしながら、EC 培地で $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養では、EC 培地中の接種菌数によって BGLB 培地に比べ微弱なガス産生を認める結果であった。 4°C 、 -20°C いずれの保存条件でも、EC 培地中でのガス産生には影響が認められなかった。大腸菌群および大腸菌検査のための調査試料として調製したハンバーグ基材による試料は、低温保存で少なくとも約 5 週間安定であり、付着菌数のコントロールも調製菌液の菌数を調整することで可能であった。⑤ 殺菌液卵（鶏卵）を基材としたサルモネラ属菌検査のための調査試料作製：殺菌液卵（鶏卵）を用いたサルモネラ属菌検査のための調査試料作製には、安定化剤の共存が必要であった。試験菌を接種後、常温に保存すると接種菌の活発な増殖を認め、24 時間後には異臭を認め基材の変質が観察された。 4°C 、28 日間の保存条件では、低温保存であるにもかかわらず接種菌の増殖を認めたが、常温保存時に観察された基材の変質ならびに極端な異臭を認めることはなく（微弱は異臭を認める場合がある）、初発菌数をコントロールすることによって長期間保存後の試料中の菌数を調節することは可能であった。また、*S. Enteritidis* の各種培地中での増殖を確認した結果、検査法（公定法）の判定基準にしたがって接種菌の有無を判定することが可能であった。調製試料が液状であるため輸送時の液漏れによる汚染を防ぐため、振盪機を用いて液漏れ確認を行った

結果、液漏れは認められなかった。ハンバーグを基材に用いた場合、残存する脂肪含有量が少ないほうが試験菌の接種に適しており、試験菌の接種法としては浸透法により安定菌数が得られかつ表面菌の付着を可能とした。また、5週間安定であった。殺菌液卵を用い調査試料の作製を試みた結果、安定化剤を添加し、初発菌数の調節により菌数の調節が可能であり、また、公定法での接種菌の有無の確認が可能であった。

(2) 理化学検査試料— ① 重金属(カドミウム) 検査調査試料: a) カドミウム添加玄米(添加玄米)、無洗米(添加無洗米)および白米入り各容器について $n=3$ (合計9測定値) でカドミウム含量の測定をした結果、添加玄米の濃度は $1.54\sim 1.65$ ppm、標準偏差は $0.023\sim 0.096$ 、無洗米の濃度は $1.72\sim 1.90$ ppm、標準偏差は $0.010\sim 0.036$ および白米の濃度は $2.10\sim 2.18$ ppm、標準偏差は $0.045\sim 0.068$ と、カドミウム濃度の標準偏差は容器間および容器内のいずれにおいても小さかった。b) カドミウムを添加した玄米(添加玄米)と自然汚染の玄米(汚染玄米)を精米して、カドミウムのぬか部位と白米部位への分布を、それぞれ $n=3$ で調べた結果、添加玄米 1.57 ± 0.02 ppm、添加精米 0.68 ± 0.01 ppm、汚染玄米 1.07 ± 0.02 ppm および汚染精米 1.00 ± 0.03 ppm であった。精米することにより、添加玄米では 1.57 ppm \rightarrow 0.68 ppm (残存率 43.3%) および汚染玄米では 1.07 ppm \rightarrow 1.00 ppm (残存率 91.7%) と減少した。c) カドミウム添加粉碎白米(添加粉碎白米)について小分けにした容器から無作為に採取し、濃度の均一性を調べた結果、測定値 \pm 標準偏差 ppm (予定作製濃度 ppm) は、 0.473 ± 0.008 ppm (予定作製濃度 0.470 ppm)、 0.375 ± 0.010 ppm (予定作製濃度

0.370 ppm) および 0.267 ± 0.0087 ppm (予定作製濃度 0.257 ppm) と予定作製濃度に対して、近似した濃度の調査試料を作製することができた。② 残留農薬(有機リン系農薬) 検査調査試料: a) にんじん基材に有機リン系農薬を添加して回収率を調べた結果、予定作製濃度に対して $90\sim 100\%$ の範囲であった。別に、にんじんを基材にクロルピリホスおよびフェニトロチオンを添加試料について添加回収および均一性について調べた結果、回収率及び均一性はともに良好な結果を示した。b) とうもろこしについても a) 同様添加回収率と均一性について調べた結果、作製予定濃度に対して、 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、また、容器間濃度は均一であると判断された。さらに、ほぼ1ヶ月間安定であることが確認された。③ 残留動物用医薬品(フルベンダゾール) 検査調査試料: 動物用医薬品添加液卵について回収率、均一性を調べた結果良好な結果が得られた。また、冷凍保存($-20\pm 5^{\circ}\text{C}$)した試料について濃度の安定性を調べた結果、作製後40日間冷凍保存において作製当日濃度に対して、ほぼ 100% の濃度の安定性が確保できた。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)濃度がほぼ均一な濃度の試料を作製することができた。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)した結果、ほぼ目的濃度の試料を作製することができた。また、均一性も良好であった。(3) 貝毒検査試料 作製—平成15年度までにHPLCによる遊離脂肪酸の分析法を確立した。本法を用いて、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を測定し、両者の組

成特徴を調べた結果、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、また、個々の脂肪酸組成に関しては、ともに 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。さらに、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 1 例観察された。(4) 組換え DNA 食品検査— ① 平成 14 年度外部精度管理調査結果：遺伝子組換えおよび非組換えパパイヤ外部精度管理試料の定性 PCR 法（果肉）および GUS 法（種子）の測定データについてそれぞれ集計を行ったところ、いずれの測定法においても全ての参加機関で遺伝子組換えパパイヤと非組換えパパイヤが正しく判定された。② 確認試験：配布に使用するパパイヤ全個体の一部をサンプリングし、種子（GUS 法）と果肉（定性 PCR 法）のそれぞれを測定した結果、GUS 法、定性 PCR 法のいずれにおいても遺伝子組換えパパイヤは全て遺伝子組換えパパイヤと判定され、非組換えパパイヤと表示された試料においてはいずれも全て非遺伝子組換えパパイヤと判定された。③ 安定性試験：外部精度管理実施期間における配布試料の安定性を検討した結果、GUS 法、定性 PCR 法のいずれでも検討した全ての保存条件、保存期間を通して遺伝子組換えパパイヤは陽性、非組換えパパイヤは陰性と判定された。④ ゲル撮影装置の検討：検討した 4 種類の CCD カメラでは、いずれも 1 ウェルあたりの 100bp の DNA のアプライ量が 1.875 ng 以上のとき 100bp のバンドを確認でき、機種間差も認められなかった。一方、ポラロイドカメラでは 3.125 ng 以上アプライしないと 100bp のバンドを確認できなかった。以上の結果から、CCD カメラはポラロイドカメラに比べて感度が約 2 倍優れているこ

とが明らかになった。⑤ 平成 15 年度外部精度管理：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%）をについて、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。ELISA 法に参加した 17 機関の測定値の平均は、5%濃度試料でやや高値を示したものの、混合重量比に近い測定結果であった。一方、定量 PCR 法に参加した 22 機関の測定値の平均は 5%濃度で 3.759 ± 0.671 、1%濃度で 0.695 ± 0.176 といずれも混合重量比よりも 20%以上低い測定結果であった。定量 PCR 法の測定結果を詳細に検討した結果、DNA 抽出法にシリカゲル膜タイプキット法（以下キット法とする）を用いた 18 機関の測定値が重量混合比よりも低い結果であったのに対して、これ以外の抽出法を用いた 4 機関の測定値はより混合重量比に近く、DNA 抽出法により測定値に差が生ずることが判明した。このため、統計解析は ELISA 法による測定値と定量 PCR 法で DNA 抽出にキット法を使用した機関の測定値の 2 種類について別々に実施した。ELISA 法に参加した 17 機関の測定値のうち、z スコアが 2 を超えたのは 1 機関の 1%濃度の 1 測定のみで、施設内の測定値のばらつきを示す R 管理図で管理限界を超えた機関も 1 測定、1 機関のみであった。一方、定量 PCR 法でキット法により DNA 抽出を行った 18 機関の測定値のうち、z スコアが 2 を超えたのは 1 機関の 1%濃度の 1 測定のみであったが、R 管理図で管理限界を超えた機関が 3 測定、3 機関あった。⑥ 抽出 DNA の品質が定量 PCR 測定に与える影響についての検討：異なる 2 日に抽出した DNA の収量および 260nm/280nm の吸光度比を比較した結果、日間差が認められた。次にこの DNA のうち 1 抽出について内在性遺伝子

Le1 を定量 PCR 法により n=5 で 3 ラン繰り返し測定した。その結果、同一ラン内の RSD は 4.8~8.5%、であった。さらに異なる 2 日に抽出した計 8 抽出の DNA についてそれぞれ n=1 で 3 ランの測定を行った結果、それぞれの抽出のラン間の RSD は 0.6~6.7% であったのに対し、それぞれのランにおける 8 抽出の DNA 間の RSD はいずれも 25%前後であった。⑦平成 16 年度の外部精度管理：調査に用いる GM トウモロコシ (Mon810 系統) 試料は目的の濃度に近似した濃度で作製でき、また、均一性と安定性に優れていた。27 の参加機関データを解析した結果、おおむね良好な測定精度で試験が実施されていることが確認されたが、使用機器特異的あるいは機関特異的なデータの偏り等がみられまだ改良点も見られた。

D. 考察

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：本研究で 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が行えた。また、GPC クリーンアップでは、オートサンプラーとフラクションコレクターをセットし、パーソナルコンピューターによって制御するシステムを適用することで、GPC による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) を用いた。各工程ともほぼ完全な自動化が達成できたことから、本分析方法では夜間での自動処理によって前処理時間を実質的に短縮することができるだけでなく、精度管理への貢献も期待される。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：HCB の Ah レセプターへの結

合力から、HCB の毒性をダイオキシンの毒性評価で使われる毒性等価係数 (TEF) で表した場合、0.0001 に相当するといわれている。この数値を今回の実験結果に照らし合わせると、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) となった。これらの結果を既に測定したダイオキシン類の TEQ (I-TEF を用いて計算) と合わせると、およそ 16% (平均値) の増加となることがわかった。なお毒性等量の計算に際して、モノオルト PCBs の TEQ (Total TEQ (WHO-TEF) の約 20%) を推測して、WHO-TEF (1998) を用いた場合、HCB による TEQ の増加は 10% 程度となった。これらの結果から、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。したがって、測定対象のダイオキシン異性体が異なり旧来の TEF を使用したデータについても、最新の TEQ に補正し、過去の文献上のデータ比較検討することが可能となった。また、過去の文献データにおいては、モノオルト PCB やジオルト PCB が測定されていない場合にも、今回得られた補正ファクターを用いることにより、たとえ実際に測定していなかった場合においても推定値として算出することが可能と思われる。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

ーフードの適用月齢が5~10ヶ月(平均7.5ヶ月)であったこと、また、「平成12年乳幼児身体発育調査報告書」(平成13年10月、厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課)によるデータから、7.5ヶ月の乳幼児の体重がおよそ8kgであったことから、これを基準にして、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)として菓子を食べるものと設定して1日摂取量を調べた結果、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。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行ってきた一般成人を対象としたトータルダイエツト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る。

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: PCDD/Fs およびノンオルト Co-PCBsの何れにおいても、LaviStoma 大量注入法と従来法との間に良好な相関が得られ、十分に実用性があることが分かり、また、この装置を使用することにより、従来から分析操作上の問題点として指摘されていた、GC/MSに注入する最終液量を極微量に濃縮する操作を省くことができることから、前処理操作が大幅に軽減され、分析操作の迅速化されると共に、窒素パージに際しての実験者への曝露が低減され、更に測定データの精度向上が期待される。

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 粉乳の精度管理: 各研究機関間の変動係数が一部の物質で30%を超えた。この原因は標準品の差異と共にGC/MSでのピーク面積の求め方(ピークに対するベースラインの取り方)にあると考えられる。ただし、毒性等量の寄与率が大きい2,3,7,8-TeCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,4,7,8-PeCD, 3,3', 4,4', 5-PeCBの変動係数が16~22%であることから毒性等量の変動はPCDDs/PCDFs およびCo-PCBsでそれぞれ17%および19%と良好な結果であった。したがって、修正マニュアルにより再現性のある測定ができることがわかった。

② 血清の精度管理: 研究機関間の変動係数が一部の物質で30%を超えた。原因としては、ブランク値による底上げが考えられたが、物質によってはそれだけでは説明できなかった。ただし、毒性等量については、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ことがわかった。操作ブランク値については、マニュアルで定める定量下限目標値を上回り、かつ試料中濃度の1/10を超えるケースが、一部機関で見られ、何らかの汚染の影響と考えられた。血清中のダイオキシン類濃度は非常に低いため、高濃度試料の分析に用いた器具とは別の器具を使用するなど、汚染防止が不可欠である。この点についてマニュアルでより詳細に解説する必要がある。脂質については、1回目の精度管理では7機関中5機関では適切に抽出されていると考えられたが、2機関では大きな差が見られた。抽出条件を統一しエマルジョンの処理を改良した結果、2回目の精度管理では研究機関間の変動係数は13%と低くなり、修正マニュアルで適切に測定できることが分かった。

2) 母乳中臭素化ダイオキシン類について

は、測定マニュアル(案)の検証：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精度管理試料とし、各協力研究機関で測定した。また、操作ブランクについても合わせて測定した。測定の結果、添加脂肪試料の各研究機関の平均値は、各化合物とも添加値とよく一致しており、各化合物の機関間変動係数も、2化合物は20%を若干超えたものの、他の10化合物については変動係数20%以内と良好な結果を示した。また、回収率も良好で大半の報告値が50~120%の範囲内であった。次に、目標とする定量下限値についても、添加および無添加脂肪試料分析により、達成可能な値を得ることができた。したがって、平成15年度作成した「母乳中の臭素化ダイオキシン類測定マニュアル(案)」の基本的な適切性を確認することができた。また、平成16年度の検討によって得られた情報を基に、それまでの測定マニュアル(案)を再度見直し、必要な追加・修正を加え、測定マニュアル(案)をより完成度の高いものとすることができた。3) 母乳中臭素化ダイオキシン濃度の実態調査：塩素化ダイオキシン類と比べると非常に低いことがわかった。しかし、塩素化ダイオキシン類については、発生源、環境挙動、人体への移行のメカニズム等が解明され発生源対策が取られているのに対し、臭素化ダイオキシン類は発生源を含め未解明な点が非常に多い。したがって、母乳中の臭素化ダイオキシン類の正確な実態把握や将来予測を行うために、発生源調査と合わせ、国レベルでの母乳中の臭素化ダイオキシン類調査が望まれる。

3. 米谷分担研究：1) 初期には認証標準物質等を調査試料に用いたが、2001年以降はダイオキシンが含まれる可能性のある食

品類を調査試料に用いて来た。これらの試料は、菌津製の観点からも妥当であり、また、自然汚染品であるので分析評価試料としてはふさわしいものと判断される。2) 低濃度の試料についてもかなり精度よく各機関は測定できている結果が得られており、TEQ1pg/g程度の試料については、各検査機関の技能水準は高く信頼できると評価される。

4. 松木分担研究：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—平成14年度、15年度で実施した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、2種による模擬生体試料の測定結果は、両キットとも機関間変動はやや大きかったものの、測定内変動は小さく、また、測定値は理論値とずれは小さく、濃度順位が逆転することもなかった。したがって、本ELISAキットは母乳やその他の生体試料中のダイオキシン濃度のスクリーニング検査には十分有効な手段となると思われる。本誌にはデータを記載しなかったが、別のダイオキシン研究班グループで、ダイオキシンをマウスに投与した時の各臓器中のダイオキシン濃度レベルの測定においては、ほぼHRGC/MSで測定した値と近似した値が得られている。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。したがって、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と思われ

る。平成 16 年度に、魚肉試料での精度管理を行った結果、測定内変動、測定間変動および機関間変動はそれぞれ比較的良好な結果が得られた。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魚肉を含め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と思われる。② 臭素化ダイオキシン ELISA 法の確立：平成 14 年～15 年度にかけて、4 または 5 塩素化、臭素化、塩素・臭素混合型 PBDD/Fs との反応性が高いモノクローナル抗体を選択して ELISA を最適化し、定量限界 2, 3, 7, 8-TeBDD 1pg/assay ELISA を確立した。同研究班の織田らは、HRGC/MS による臭素化ダイオキシンの測定法を確立し母乳中レベルを調べた結果、塩素系ダイオキシンレベルに比し 1/10—1/100 以下レベルにあることを示しており、臭素化ダイオキシンに注目した分析は、安全性の観点からも必ずしも重要とは思われないが、本 ELISA 法を用いることにより、塩素化体及び臭素化体を組みにした食品や生体試料中の総ダイオキシン TEQ レベルを把握できるものと考えられる。また、臭素化ダイオキシン投与動物実験などでの生体中の濃度分布や推移などの調査にも感度、精度の観点から有効な測定手段と思われる。2) 食品衛生検査外部精度管理調査における微生物検査及び理化学検査試料作製と基礎的検討：(1) 微生物検査—① 加熱後摂取冷凍食品（凍結直前加熱以外）や非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品などの大腸菌検査の公定法（推定試験）では EC 培地を用い、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養してガス産生を指標に判定する検査手順が示されている。その他自主検査等では、BGLB 培地を用い $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ で 48 ± 3

時間培養してガス産生を確認する方法などがあるが、食材のカテゴリーを提示して調査試料を提供している外部精度管理調査においては、食材のカテゴリーに従って公定法が選択される場合が多い。日常行われている種々の検査方法を想定して、保存菌株に対する EC 培地並びに BGLB 培地中での発育並びにガス産生能について基礎的検討を行った結果では、EC 培地は大腸菌に対する選択性は高いものの、菌株によっては判定基準となるガス産生能を指標に大腸菌の有無を推定するのは困難な場合があることが示された。すなわち、汚染している大腸菌の食品中での存在様式、食品の保存条件、大腸菌自身の性状など様々な要因で、汚染大腸菌は EC 培地、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養によるガス産生が陰性となりうる可能性が示唆され、実際培養条件の違いによって、試験対象となる大腸菌は 3 グループに大別され、採用される検査手順によっては大腸菌が存在していても陰性と報告する結果がありうることになる。日常の食品検査では様々な性状を持つ大腸菌が、検査対象となっているのも事実であり、試験菌株の選択については外部精度管理調査の目的によって使い分けることが必要であると考えられるが、今回得られた結果を踏まえ試験菌株としての採用は確実に検出される type の菌種をまず優先して選択することが必要であるものとする。また、今回の EC 培地を用いた推定試験結果が、普遍的に見られる現象であるかは更なる検討が必要ではあり、大腸菌検査における検査方法についても再度検証が必要ではないかと考える。

実食材を基材とした調査試料作製については、まず大腸菌群検査・大腸菌検査ならびにサルモネラ属菌検査を対象とし、ハンバーグおよび殺菌液卵を基材として作製の

検討を実施した。食品の場合、食品表面に菌が汚染している場合と食品内外に菌が汚染している場合があげられる。ハンバーグは挽肉を材料として作られている場合が多く、この場合は食品内外について微生物汚染が想定される。今回の調製法では、試験菌が基材内部にも浸潤するが、基材表面への微生物付着を主とする調製法となっている。ハンバーグ中には脂肪が多く含まれているため、今回の調製法では試験菌の食品中への浸潤や表面付着に対して素材の持つ脂肪（油脂成分）が菌の定着に影響を及ぼす可能性があるため適度な脱脂が必要であり、調製工程で基材を汚染した微生物に対する滅菌処理が必要となる。このような前処理を行った後、ハンバーグ基材に接種した試験菌は、4℃保存でも-20℃保存でも保存期間中は生菌数の大きな変化を認めず比較的安定に推移していた。調査試料として参加機関に配布するときの輸送条件などを考え、まず4℃保存試料を優先してその安定性・均一性ならびに検査法（公定法など）による試験菌の検出の有無を検討し良好な結果が得られた。た。但し、食品の規格基準に示されている冷凍食品として冷凍試料を配布する場合でも、冷凍保存条件ならびに配布時の輸送条件を適切な条件下に設定できれば、凍結融解を避けて冷凍試料を配布することは可能な状況にまで達している。サルモネラ属菌検査用調査試料として検討した殺菌液卵（鶏卵）は、液状基材のため取り扱いが容易であったが、添加菌が低温保存中に発育増殖を示すため、安定化剤の添加による試験菌の増殖抑制を考慮した基材の設計にする必要があり、低温保存中の菌の増殖を考慮して接種菌量を設定することにより、増加菌数を加味した最終の生菌数を期待する設定範囲に留めることは可能

と考える。しかしながら今回のような液状基材の場合、菌の増殖抑制と基材の変質（腐敗臭の発生）防止のために安定化剤の添加は必須と考えられ、特殊な安定化剤を選択して菌の増殖をコントロールする場合は、検査手法（特に前増菌培地中での発育抑制）への影響を十分考慮しなければならない。したがって、調査試料として一定の有効期間を保証するために接種菌が安定で死滅せず、増減を示さない調査試料の提供が望まれ、さらに他の調査試料作製と同様に、最終的に同定検査の対象となる試験菌株の生化学的性状についても十分考慮しなければならない。食品・食品添加物等規格基準のカテゴリーに記載されている実食材（殺菌液卵など）を用いたサルモネラ属菌検査用調査試料の作製にあたり、解決しなければならない問題点については今後の検討課題と考える。（2）理化学検査—①重金属（カドミウム）検査調査試料については、硝酸酸性下、カドミウムを白米に添加後、カドミウム添加粉碎白米を作製する方法では、ほぼ作製予定濃度でかつ均質な調査試料を作製することができ、本作製方法が、調査試料の作製方法として、適切であると判断された。農作物の残留農薬調査試料として作製したマラチオンおよびクロロピリホスの有機リン系農薬検査調査試料の濃度は、作製予定濃度と近似した濃度が得られることが、また、安定性は、作製当日と比較して冷凍1ヶ月間、安定であることが確認できた。残留動物用医薬品の規格基準がある液卵を基材として使用して、残留動物用医薬品（フルベンダゾール）の添加試料を作製した結果、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。以上、今後の理化学検査試料作製のグレードアッ

ブが図れる基礎的情報が得られた。② マイコトキシンの精度管理試料作製については、カビ毒汚染小麦を用い、遠心粉碎機で粉碎・混合する方法により、適切な濃度でかつ均質なカビ毒検査調査試料の作製が出来、今後も外部精度管理調査の実施が可能と思われる。(3) 貝毒検査— ① 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、今回の検討において、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1例が観察され、試料保存中の遊離脂肪酸の増加によりマウスアッセイ結果が擬陽性化するという、既報と同様の結果が得られた。この結果は、保存レファレンスマテリアルの調査への利用においては、事前に遊離脂肪酸を測定し、遊離脂肪酸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ことを示唆していると思われた。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。② 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)が観察されるが、一方、ディスク法試料では、オカダ酸添加濃度が40 μ gでも80 μ 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ていることから、後者が実際の調査試料として有効と思われる。今後はさらに、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構築し、リファレンスマテリアルの性状をより正確に評価して精度管理試料として用いる必要性を強く示唆している。

(4) 組換えDNA食品検査:平成14年度—
① 株式会社ダイヤモンドスターより入手したハワイ産パパイヤについて確認試験を行い、組換え体、非組換え体の別を試験し、

表示通りであることを確認した。現在、遺伝子組換えパパイヤ(55-1)は安全性未審査であるため、日本国内での流通が禁止されているが、本試験の結果より、ハワイ産パパイヤは両者が混合しないよう適切に分別されていることが推察された。② 安定性試験の結果、種子を用いるGUS法では、冷蔵保存で16日後まで試験結果に影響を与えないことが明らかになり、外部精度管理で指定した測定期間(冷蔵で試料送付し、試料到着後冷蔵保存し2週間以内に試験)での種子の安定性が確認された。また、果肉を用いるPCR法でも、冷蔵および冷凍保存で14日後まで、試験結果に影響を与えないことが明らかになり、同じく外部精度管理で指定した測定期間(冷蔵で試料送付し、試料到着後直ちに凍結乾燥し、2週間以内に試験)での果肉の安定性が確認された。さらに、試料送付および参加機関での保存中の事故を想定し、種子(GUS法)では室温保存で16日後まで、果肉(定性PCR法)では室温保存で7日後まで安定性を検討したが、いずれの試料でも安定性が確認された。しかし室温で保存した果肉は、冷蔵で保存した場合と比べ、果肉が軟化すると共にDNA抽出液の230nmの吸光度(糖に由来)が高くなる傾向が認められ、果実の成熟がより進みやすいことがうかがわれた。③ 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結果、CCDカメラの感度がポラロイドカメラに比べて優れていることが明らかになった。平成15年度:①ダイズ外部精度管理においてELISA法に参加した機関の測定値の平均は混合重量比に近い測定結果であったのに対し、定量PCR法に参加した機関の測定値の平均は混合重量比よりも20%以上低い測定結果であった。②定量PCR法の測定結果を詳細に

検討した結果、DNA 抽出法にキット法を用いた場合、定量 PCR の測定値が重量混合比よりも低くなるものと考えられた。このようにダイズ外部精度管理の測定結果には参加機関の技量の違いだけでなく、測定法（ELISA 法または定量 PCR 法）、DNA 抽出法の違いが影響を与えていたことが判明したため、結果を解析する際には測定された数値だけでなく測定条件等についても吟味する必要のあることが明らかになった。③ ELISA 法では参加した 17 機関のうち z スコアが 2 を超えたのは 1 機関の 1 測定、また R 管理図で管理限界を超えた機関も 1 測定、1 機関のみであり、全体的には、各機関ともおおむね良好な測定精度を保っているものと考えられた。一方、定量 PCR 法（DNA 抽出：キット法）では 18 機関のうち、z スコアが 2 を超えたのは 1 機関の 1 測定のみであったが、R 管理図で管理限界を超えた機関が 3 測定、3 機関あり、測定の再現性が十分でない機関があることが明らかになった。平成 16 年度：低濃度試料同様、高濃度試料を対象とした試験においても、機種 F を使用した機関については、それ以外の定量 PCR 装置を用いた機関に比べて、同一の DNA を異なったランで繰り返し測定した場合に、測定値が大きく変動し、得られる測定値についてのラン間再現性が低い傾向が明らかとなった。なお、機種 F を除いた定量 PCR 結果では、高いラン間再現性が示されていることから、コピー数の測定に対する定量系の影響は少ないと考えられた。

E. 結論

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：今回確立した分析方法では、前処理操作に自動化システムを組み込むことが可能となった。これによって省力化と前処理時間の迅速化が図られるだけでなく、分析担当者の技量に起因する測定値のバラツキ問題を改善することができるなど、精度管理への貢献も期待される。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：実際に、母乳 100 検体について HCB の測定を行ったところ全ての検体から HCB が検出され、また、既報の研究データについて HCB の相当 TEF を当てはめてダイオキシンと合わせた総毒性を再評価してみたところ、HCB は総合毒性を 16%（I-TEF で算出）、または 10%（WHO-TEF 1998 で算出）増加させることがわかった。これらの結果から、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、今後ダイオキシン以外でダイオキシンと同様な作用機序が想定される他の有機汚染化合物の曝露評価についても注目する必要があることが確認された。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：ダイオキシン異性体の種類と毒性係数が異なる三種類の TEF（I-TEF、WHO-TEF1993 及び WHO-TEF1998）によって得られた母乳中の各 TEQ の間には良好な相関性があり、得られた相互補正ファクターにより、過去の文献値を現在の値と比較する際には、今回の研究成果は有用に活用されるものと思われる。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：市販ベビーフード中のダイオキシン類の分析と乳幼児におけるその摂取量について検討した結果、成人のトータルダイエ

ット方式に準じて、ベビーフードを6つの食品群に分類し、更に、1日の摂取量算出に際して独自の算出方法を考案した。すなわち、1日に食事を3回と副食でおやつを食べると仮定し、更に、野菜、フルーツ、魚、肉、及び乳製品の5つの食品群を平均的に食べるものとして、これらの総摂取量に3/5を乗じたものに、副食(菓子)からの摂取量を加えるものとした。ダイオキシン分析結果をこの評価方法に適用したところ、乳幼児(月齢7.5ヶ月、体重8kg)の体重当たりの1日摂取量は、我が国で定めたTDI(4 pg TEQ/kgbw /day)を大きく下回り、また、成人を対象としてこれまでに厚生労働省が行ってきたトータルダイエット方式による食品からのダイオキシン類摂取量をも下回った。これらの結果から、本研究で提案した食品群分類法及び総摂取量の算出法が妥当であることが確認された。

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：母乳と血液中ダイオキシンのGC/MS測定に際して、大量注入法の導入を検討したところ、十分に実用性が確認された。この装置を使用することにより、GC/MSに注入する最終液量を窒素パージにより極微量に濃縮する操作を省くことができることから、前処理操作が迅速化されると共に、更に測定データの精度向上も期待される。

2. 織田分担研究：血清中の脂質濃度およびダイオキシン類濃度は「血液中のダイオキシン類測定マニュアル」により再現性のある測定ができることが分りその妥当性が検証された。また、現在の入手しうる標準試薬および技術情報のもとでは、完成度の高い「母乳中の臭素化ダイオキシン類測定マニュアル(案)」を策定することができた。さらに、臭素化ダイオキシン類を添加した

脂肪および無添加脂肪を分析した結果から、測定マニュアル(案)の基本的な適切性が検証された。現在、臭素化ダイオキシン類分析において、残されている大きな問題は、適切な臭素化ダイオキシン類標準物質および内標準物質の不足である。今後、臭素化ダイオキシン類の標準物質および内標準物質が充実できれば、より充実した測定マニュアル(案)の完成が期待される。

3. 米谷分担研究：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程度にあることが示され、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ていることが検証された。

4. 松木分担研究：平成14年度、15年度に実施した、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、2種による模擬生体試料の測定結果は、両キットとも機関間変動はやや大きかったものの(各機関の技術熟達度に差がある)、測定内変動は小さく、また、測定値は理論値とのずれは小さく、濃度順位が逆転することもなかった。したがって、本ELISAキットは母乳やその他の生体試料中のダイオキシン濃度のスクリーニング検査には十分有効な手段となることが検証された。本誌には記載しなかったが、我々が参加した別のダイオキシン研究班グループでの成果として、マウスに投与した時の各臓器中のダイオキシン濃度レベルの測定における結果では、ほぼHRGC/MSによる測定結果と近似した値が得られておりダイオキシンのトキシコキネティクス試験での有効な測定手技であることが検証された。また一方、本キットは生体試料だけでなく、前処理法の検討により土壌や底質など環境試料測定においても有効なスクリーニング法であり、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において、土壌および底質200試料を1週間で精度よく測定できた。また、平成16年度には、魚肉試料での技能試験を試みた結果、測定内変動、測定間変動および機関間変動はそれぞれ比較的良好な結果が得られた。以上の観点から、本キットを用いるELISAアッセイ法は、比較的測定感度が高く、また、操作が簡便で多検体が同時に測定できるうえ、同時再現性も良好であることから、安価な簡易測定法として魚肉を含め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確認された。本ELISAキットは、それぞれのマトリックスに適した前処理法を検討することにより、様々な検体の測定に利用が可能と思われる今後の発展が期待される。一方、臭素化ダイオキシンのELISA法については、平成14年～15年度にかけて、4または5塩素化、臭素化、塩素・臭素混合型PBDD/Fsとの反応性が高いモノクローナル抗体を選択してELISAを最適化し、定量限界2,3,7,8-TeBDD 1pg/assayのELISAを確立できた。しかし、同研究班の織田らが、HRGC/MSにより母乳中臭素化ダイオキシンのレベルを調べた結果、塩素系ダイオキシンレベルに比し1/10—1/100以下レベルにあることを示していることから、本ELISA法は、生体の汚染モニタリング当には不向きであるが、臭素化ダイオキシン単独投与動物実験などでの生体中の濃度分布や推移などの調査あるいは高濃度の環境試料などの検査には有効な手段と思われる。

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

— 微生物検査試料：食品衛生外部精度管理

調査の実施に当たり均一で安定な調査試料の作製を主眼としてこれまで検討してきた。その結果、マッシュポテトを基材とする場合は比較的安定な調査試料の提供が可能となった。一方、食品・食品添加物等規格基準に記載されている食品のカテゴリーを参考に調査試料に対し見立て食材を提示した場合、公定法にしたがった検査手順が採用されることが多いが、それらの機関では、実際、大腸菌の汚染濃度、大腸菌の履歴、大腸菌の性状によっては、本試験方法（推定試験）で大腸菌が存在していても判定結果が大腸菌陰性となりうる事が示唆された。この結果は、調査試料の不備、検査施設の技術的問題、採用した検査方法の問題、試験菌株自身の生化学的性状など様々な要因が考えられるため、種々その要因について解析した結果、それらの機関で採用している培養条件では必ずしも用いた大腸菌株が検出できない（増殖できない）場合が推測され、精度管理調査試料に用いる試験菌株の生化学的性状については十分その目的性を吟味した上で菌株を選択すること必要となること、また、各機関が用いている検査方法それぞれ自身の良否の問題を別にすれば、外部精度管理調査に参加している多くの施設が採用している公定法操作上の判定基準が満たされるような菌株を第一に選択することが適切と考えられた。食品衛生外部精度管理調査の特定微生物検査用調査試料としては、実食材を基材とした調査試料配布の要望に答えるため大腸菌群・大腸菌検査用試料としてハンバーグ、サルモネラ属菌検査用試料として殺菌液卵（鶏卵）を選択し調査試料作製を試み、ハンバーグ基材と殺菌液卵（鶏卵）基材はともに、試験菌の分散性・均一性ならびに安定性が一定期間確保され、調査試料として提供が可能とな

った。今後、さらに適切な調査試料として配布するためには、基材中での菌の安定性や基材の変質防止など改良しなければならない点も認められ今後引き続き検討したい。

2) 理化学検査— 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り、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 カドミウム汚染米については、硝酸酸性下のカドミウム溶液に玄米、無洗米あるいは白米を浸漬する方法により、また、収穫後に水蒸気処理を行った、にんじんあるいは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、フェニトロチオン、クロルピリホス、マラチオン等）を添加する方法により目的とする濃度の調査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 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、ほぼ安定であるも分かった。③ 液卵に残留動物用医薬品（フルベンダゾール）を添加する方法により、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。3) 貝毒検査試料— ① 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定量方法の確立の必要性と、精度管理用検体としてのオカダ酸の最適添加量の見極めが挙げられる。

② 冷凍保存したホタテ試料中の遊離脂肪酸含有レベルと毒性発現との関係を調べた結果は、保存試料中の一部がマウスアッセイで擬陽性になり、既存の文献結果を支持する結果を示しており、今後リファレンスマテリアル作成時にさらに例数を増やすなどして遊離脂肪酸レベルの増加と毒性発現との関係について詳細な検討が必要と思われた。4) 組換え DNA 検査：① パパイヤ試料の場合は、混入率が 100%または 0%のいずれかであるため問題は少ないが、CBH351 トウモロコシなど混入率がごくわずかな試料を分析する場合などは、ゲル撮影装置によって、判定が異なってくる可能性が示唆され、今後の検討課題の一つと思われた。② 同一試料について、ダイズ抽出 DNA 中の内在性遺伝子 Le1 のコピー数を定量 PCR 法により繰り返し測定したときの同一ラン内の RSD は 4.8~8.5%であり、また、別々に抽出した 8 抽出の DNA の 3 ラン間の抽出ごとの RSD は 0.6~6.7%の範囲であり、同一 DNA 試料のラン内、ラン間の RSD はいずれも 10%程度と比較的精度がよいと思われた。一方、異なる試料について、別々に抽出した 8 抽出の DNA を同一ランで測定したときの抽出間の RSD はいずれのランでも 25%前後と大きく、また、抽出 DNA を抽出日ごとに比較したところ、収量、吸光度比のみでなく、Le1 のコピー数にも日間差が認められた。従って定量 PCR 法では DNA の品質が測定値に大きく影響を及ぼすもの考えられ、DNA 抽出操作の細部にわたる検討が引き続き必要と考えられた。③ 調査試料に、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結果、F を除く

機関を対象とした統計処理において Xbar、Z-スコア、R 管理図で管理限界を上回る定量値を報告した機関においては、抽出 DNA の収量あるいは質に共通の問題が認められた。また、DNA 抽出法別にみると、CTAB 法を使用した 4 機関のうち 2 機関が定量値に異常を示した機関に含まれており、いずれの機関についても抽出 DNA の質が定量 PCR に影響した可能性が考えられた。しかし、DNA 抽出法に CTAB 法を採用した残り 2 機関の結果からはコピー数も含めて問題は認められていないので、今回管理限界を上回った参加機関は、CTAB 法を用いた時の DNA 抽出操作手技の経験不足による可能性が考えられた。以上のような観点から、組み換え DNA 食品検査においては、今後も検査に用いる機器種の違いや DNA 抽出法の違いさらには検査手法の熟達度違いなどの問題

についてさらに継続的精度管理調査の必要性があると考えられた。

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

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）

資料1

「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」

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
(平成14～16年度)

分担研究者 中澤裕之

資料1

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14～16年度）

－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

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
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
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
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
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

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	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	大村 厚子	埼玉県衛生研究所 生体影響担当
協力研究者	竹熊 美貴子	埼玉県衛生研究所 生体影響担当
協力研究者	Andreas Sjodin	Centers for Disease Control and Prevention

研究要旨

ダイオキシン類や POPs 等、環境汚染化学物質による食品及び生体曝露状況をモニタリングする方法を確立し、更に食品及び生体試料検査における信頼性を確保するための研究を行った。その第一段階として、生体試料中の POPs 関連物質を簡便・迅速且つ高精度な分析方法を確立すると共に、貴重な生体試料分析に際して出来る限り前処理を共通化した系統分析法を検討した。特に、POPs の中でもダイオキシン類と同様な毒性活性を有し、且つ意図的及び非意図的に生産されるヘキサクロロベンゼン(HCB)を取り上げて、ダイオキシン類との総合的な毒性評価について母乳を対象として再評価したところ、HCBは総合毒性を16% (I-TEFで算出)、または10%(WHO-TEF 1998で算出)増加させることがわかった。

なお、ダイオキシン類の毒性評価に際して広く使用されている毒性等価係数(TEF)には、制定された年代によってダイオキシン類異性体の種類および毒性係数が異なるものがあるため、文献から得られる毒性等量 (TEQ) をそのまま比較検討することは困難であった。そこで、母乳 150 検体について、これまで最も汎用されてきた I-TEF、WHO-TEF(1993)および WHO-TEF(1998)で対象となったダイオキシン類異性体を全て測定し、各 TEF に基づく TEQ を算出して、それぞれを比較検討することで、TEQ を相互補正するためのファクターの算出を試みた。

また、従来の母乳・血液中のダイオキシン分析では前処理操作において窒素パージによる濃縮操作が必須とされてきたが、この操作過程はダイオキシン類の揮散や実験者への曝露などの問題点が指摘されてきた。そこで、高分解能 GC/MS 測定において大量注入法を導入することで、窒素パージ操作を省くことを目的としてその基礎的検討を行った。実際に母乳及び血液を用いて従来のスプリットレス注入法と大量注入法との比較を行ったところ、両者の TEQ 間には良好な相関性が得られ、大量注入法の実用性が確認された。

他方、食品分析として従来ほとんど報告例のないベビーフード中のダイオキシン類の濃度調査を行うと共に、トータルダイエツトスタディと同様なコンセプトに基づいた、乳幼児におけるダイオキシン類摂取量を評価する方法を提案した。本法に従ってベビーフードを6つの食品群に分類して調査したところ、乳幼児（月齢7.5ヶ月、体重8kg）の体重当たりの1日摂取量は、我が国で定めたTDI(4 pg TEQ/kgbw /day)を大きく下回っていた。

A. 研究目的

ダイオキシンや PCB、臭素系難燃剤などの、いわゆる POPs と呼ばれる有機ハロゲン化合物による環境汚染問題は、わが国のみならず世界的にも重大な社会的関心事であり、その対策と予防に関する研究が急務となっている。本研究班においては、これまでに母乳や血液、食品中のダイオキシン分析法マニュアルの作成や共同試験による精度管理の実施などにおいて成果を上げてきた。しかし、現状ではこれら環境汚染物質の、環境・食品・生体系における汚染実態調査及び曝露評価は未だに十分とはいえない。具体的な問題点として、特に、生体試料における POPs 分析法が確立されていないこと；ダイオキシン類と類似した毒性を持つ化合物の毒性評価が行われていないこと；ダイオキシン類の毒性評価に際して使われる TEF については、制定された年代によってダイオキシン類異性体の種類および毒性係数が異なるものがあるため、異なる TEF から得られた毒性等量 (TEQ) をそのまま比較検討することは困難であること；乳幼児の食品としてベビーフード中のダイオキシン類については、これまでその測定例がほとんど報告されていないことなどが挙げられる。

また、本研究班では、これまでに母乳や血液、食品中のダイオキシン類分析法マニュアルを作成してきたが、高感度測定が求められていたことから、分析の前処理最終工程の濃縮に際して、窒素パーズにより極微量まで濃縮しなければならず、この操作上においてダイオキシン類の揮散が危惧され、それに伴う

実験者への曝露や測定値の信頼性が損なわれることなどが問題点として指摘されている。そこで、本研究班では平成14～16年度にかけて上記の問題点を解決するために、次の5点を重点課題として検討した。

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
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
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
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
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

B. 研究方法

B-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) 試料及び試薬類

方法論開発のための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。

2) 抽出方法

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。抽出溶媒として、ジクロロメタン/アセトン (1:1)を用いた。得られた抽出液は、大部分の有機溶媒を留去した後、ヘキサン: *n*-ブチルメチルエーテル (MTBE) (9:1) 10ml 及び 0.1M H₃PO₄/1% KCl 10ml を加えて分

配抽出し、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。

3) クリーンアップ

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)によるクリーンアップを行った。次に固相抽出カートリッジ(シリカゲル SPE)を用いてクリーンアップを行った。5%ジクロロメタン/ヘキサン 6ml を用いて低極性化合物群を溶出(Fraction-A)した後、10%メタノール/ジクロロメタン 8ml でフェノール性化合物などの高極性化合物群を溶出(Fraction-B)した。

GC/MSはHP6890 GC-HP5973MSDを使用し、GC カラムには DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25um) を、NCI 反応ガスにはメタンを用いた。GC オープン昇温条件は、80°C(1min)→[15°C/min]→275°C→[10°C/min]→320°C(5min)、注入口温度は 280°C、注入方法はスプリットレスで 2μl 注入した。

B-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。

B-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。活性炭/シリカゲルカラムによる PCBs の分画に際しては、始めにヘキサン 10mL でマトリックス由来の夾雑物質および大部分の非プラナー PCBs を溶出させ、続いて 25%ジクロロメタン/ヘキサン 40mL でモノオルト PCBs (WHO-TEF1998 で定められた 8 種類) およびジオルト PCBs (WHO-TEF1993 で定められた 2 種類) を溶出させた後、トルエン 100mL で PCDD/Fs およびノンオルト PCBs を溶出させた。

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以下の 3 通りの計算を行った。

- ① I-TEF および WHO/PCBS-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
- ② WHO-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

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。

B-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

一般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。概略は次の通りである。試料をアルカリ分解処理し、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムクロマトグラフィーによりクリーンアップした。測定には高分解能 GC/MS を用いて同位体希釈質量分析法にて定量した。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。

B-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

母乳・血液中ダイオキシン類の分析における抽出・クリーンアップ方法については前記 (B-3) と同様に行った。高分解能 GC/MS における大量注入法の検討に際しては、従来法（スプリットレス法）との比較を行うため、トルエン溶出画分（PCDD/Fs およびノンオルト PCBs）については窒素パージにより濃縮（母乳試料は 50 μ L、血液試料は 10 μ L）後、その 1 μ L をスプリットレス注入をした。その後、大量注入に供するために、残余試料を改めてトルエンで 1mL 程度に希釈して、その 20 μ L を大量注入した。

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。

その後、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。

C. D. 研究結果及び考察

C.D-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

生体試料中に残留する多くの有機ハロゲン化合物の ASE における至適抽出溶媒について詳細に検討した。これらの化学物質は生体試料中においては主に脂質中に溶け込んでいることから、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り、無極性の脂質のみならず、リン脂質などの極性の大きい脂質も十分に抽出されることがわかった。

(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。GPC カラムに Bio-Beads S-X3 を、移動相にジクロロメタン/ヘキサン(1:1)を用いて脂質等夾雑物の除去及び分析対象とした有機ハロゲン化合物 59 種類の各溶出フラクションを調べた。その結果、夾雑物となる脂質成分の大部分は保持容量として 0~90mL 中に溶出されたが、分析対象化学物質は 90~160mL 中に溶出された。

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、MeSO₂ 体) や TBBP-A、および PCP など極性の大きい化合物との分画を検討した。シリカゲル SPE における上記の分析対象化合物の溶出挙動を検討したところ、PBDEs、PCBs、PCNs および大部分の有機塩素系農薬は 5%ジクロロメタン/ヘキサン 6ml 中に溶出された (Fraction-A)。他方、PCB 代謝体 (OH 体、MeSO₂ 体)、TBBP-A、PCP、 δ -HCH、endosulfan II、endosulfan sulfate、endrin