

反応液の調製の不確かさが複合要因となって定量値に影響を与えたものと推察された。

以上のように、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関しては、抽出 DNA の収量あるいは質に問題が認められた。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。先にも言及したが、CTAB 法はシリカゲル膜タイプキット法に比べ操作が煩雑なため、定量 PCR 法に適した DNA(量および質の両方において)を得るには熟練を要する。このため、今回管理限界を上回った参加機関は、CTAB 法を用いた DNA 抽出の経験が不十分あるいは、正確な操作を習得出来ていない可能性が考えられた。

E. 結論

遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810系統)を対象とし、精度管理試験用試料の調製法につき検討を行った。試料の均一性、および安定性について検討を行った結果、十分な妥当性が確認された。

試験的に実施した外部精度管理試験の結果、高濃度試料を対象とした CaM 定量系、および Mon810 特異的定量系を用いた測定において、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関が使用していた定量 PCR 装置はいずれも機種 F であり、得られる定量値が定量 PCR 装置依存的に異なる可能性が示唆された。その原因について機種 F の使

用に限定すれば、キャピラリー間誤差に比較してラン間誤差が大きかったことから、ラン毎に規定される検量線に誤差が生じていた可能性、および精度管理試験後の調査検討の結果からは、試薬あるいは機器に問題があった可能性が強く示唆された。機種 F を使用した機関以外の機関について統計解析の結果をみると、Xbar、Z-スコア、R 管理図のいずれかで管理限界を上回った機関においては、全ての機関において抽出 DNA の収量および質に問題が認められており、これらが主原因となって定量値に影響を受けたものと推察された。

その他としては、DNA 濃度測定に系統的な誤差が疑われる機関、また、機種 D を使用している機関中、定量 PCR 装置の検出器付属部品の劣化によるものと思われるデータの不安定性が示唆される機関が認められており、これらのことも得られる定量値の不確かさを増大させる要因になりうると考えられる。また、本文中では結果に大きな問題がみられた機関 26 についてのみ言及したが、その他複数の機関においても定量値の解析方法に誤りが認められており、これら解析方法についても十分注意する必要があると考える。

通知法を改変させた機関独自の方法を用いて試験を実施している機関も見受けられたが、報告された結果には問題がなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

穂山浩, 渡邊敬浩, 笠間菊子, 松木容彦, 米谷民雄 (2003) 「食品衛生外部精度管理調査研究の概要(第1報)遺伝子組換えトウモロコシ

(CBH351) および遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Plus and NewLeaf Y)の検知用試料の作製と調査成績について」食品衛生研究 54(4) 25-35

Takahiro Watanabe, Hideo Kuribara, Takashi Mishima, Hiroyuki Kikuchi, Misao Kubo, Takashi Kodama, Satoshi Futo, Kikuko Kasama, Akie Toyota, Masanori Nouno, Ayako Saita, Kunihiko Takahashi, Akihiro Hino, Hiroshi Akiyama, Tamio Maitani (2004) 「New Qualitative Detection Methods of Genetically Modified Potatoes」 Biol Pharm Bull. 27(9):1333-1339

2.学会発表

渡邊敬浩, 穂山浩, 米谷民雄, 笠間菊子, 松木容彦, 児玉貴志, 栗原秀夫, 日野明寛 (2003) 「遺伝子組換え大豆定量検査法の外部精度管理について」全国衛生化学協議会第40回年会(和歌山)

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 1-1a. 低濃度試料における均一性の確認 (CaM 定量系)

測定1				測定2			
検体	SSIIb	MON810	GM (%)	検体	SSIIb	MON810	GM (%)
1	44000.64	74.33	0.43	1	47498.35	63.00	0.35
2	48476.21	62.82	0.33	2	51941.92	67.70	0.34
3	40458.56	60.25	0.38	3	40207.17	47.27	0.31
4	39588.81	70.18	0.45	4	42983.69	66.33	0.41
5	43292.36	59.18	0.35	5	48042.23	61.86	0.34
6	48299.29	62.76	0.33	6	47913.11	47.90	0.26
平均			0.38	平均			0.33

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	P-値	分散比	F境界値	有意水準
グループ間	0.03352	5	0.0067	0.13611	2.6219	4.38737	0.05
グループ内	0.01534	6	0.00256				
全変動	0.04886						

表 1-1b. 低濃度試料における均一性の確認 (Mon810 定量系)

測定1				測定2			
検体	SSIIb	MON810	GM (%)	検体	SSIIb	MON810	GM (%)
1	44421.15	69.74	0.41	1	48927.21	57.60	0.31
2	46831.15	58.31	0.33	2	48247.70	48.56	0.26
3	41179.26	66.43	0.42	3	40852.09	58.29	0.38
4	41772.69	55.51	0.35	4	43050.16	67.05	0.41
5	46094.72	59.13	0.34	5	48510.56	43.29	0.23
6	48792.2	73.84	0.40	6	46456.37	58.71	0.33
平均			0.38	平均			0.32

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	P-値	分散比	F境界値	有意水準
グループ間	0.03805	5	0.00761	0.33021	1.4462	4.38737	0.05
グループ内	0.03157	6	0.00526				
全変動	0.06962						

表 1-2a. 高濃度試料における均一性の確認 (CaM 定量系)

測定1				測定2			
検体	SSIIb	MON810	GM (%)	検体	SSIIb	MON810	GM (%)
1	41689.63	970.35	5.97	1	53249.69	1125.77	5.42
2	45076.5	959.17	5.46	2	44132.68	808.85	4.70
3	41100.66	1057.02	6.59	3	40329.27	851.07	5.41
4	39560.67	1036.56	6.72	4	39622.14	875.99	5.67
5	45949.72	1104.22	6.16	5	45004.22	935.99	5.33
6	46356.42	1037.06	5.74	6	44898.08	879.56	5.02
平均			6.11	平均			5.26

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	P-値	分散比	F境界値	有意水準
グループ間	0.044193	5	0.008839	0.074373	3.619939	4.387374	0.05
グループ内	0.01465	6	0.002442				
全変動	0.058842						

表 1-2b. 高濃度試料における均一性の確認 (Mon810 定量系)

測定1				測定2			
検体	SSIIb	MON810	GM (%)	検体	SSIIb	MON810	GM (%)
1	40996.40	829.00	5.32	1	41954.28	786.19	4.93
2	43625.25	763.85	4.61	2	46558.70	771.07	4.36
3	37980.80	759.28	5.26	3	38094.28	852.06	5.89
4	36472.68	785.61	5.67	4	39104.06	818.95	5.51
5	45423.61	831.95	4.82	5	46158.12	857.29	4.89
6	45920.81	776.64	4.45	6	43469.02	833.07	5.04
平均			5.02	平均			5.10

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	P-値	分散比	F境界値	有意水準
グループ間	0.017	5	0.003	0.037	5.014	4.387	0.05
グループ内	0.004	6	0.001				
全変動	0.021						

表 2-1. 試料の安定性確認(低濃度)

		低濃度試料		
		CaM	Mon810	GA21
開始前	1	0.44	0.34	trace
	2	0.42	0.24	trace
	3	0.38	0.45	trace
	4	0.42	0.37	trace
	Mean	0.42	0.35	
	S.D.	0.03	0.09	

		低濃度試料		
		CaM	Mon810	GA21
-20°C 1ヶ月 保存後	5	0.50	0.24	trace
	6	0.44	0.22	trace
	7	0.38	0.33	trace
	8	0.38	0.25	trace
	Mean	0.43	0.26	
	S.D.	0.06	0.05	
	t	0.319	1.812	
t境界値*	2.447	2.447		

*: 信頼度95%

表 2-2. 試料の安定性確認(高濃度)

		高濃度試料		
		CaM	Mon810	GA21
開始前	1	5.67	4.19	trace
	2	5.40	4.99	trace
	3	5.79	4.92	trace
	4	5.79	4.57	trace
	Mean	5.66	4.67	
	S.D.	0.18	0.37	

		高濃度試料		
		CaM	Mon810	GA21
-20°C 1ヶ月 保存後	5	5.57	4.97	trace
	6	5.30	4.49	trace
	7	5.55	4.73	trace
	8	5.12	4.51	trace
	Mean	5.39	4.68	
	S.D.	0.22	0.22	
	t	1.960	0.035	
t境界値*	2.447	2.447		

*: 信頼度95%

表 3-1. DNA の平均収量とばらつき(高濃度試料 9 抽出)

機関番号	DNA抽出法	平均収量 (μg)	SD	RSD (%)
1	シリカゲル膜タイプキット法	29.3	7.1	24.2
2	シリカゲル膜タイプキット法	25.6	1.2	4.7
3	シリカゲル膜タイプキット法	22.4	1.0	4.4
4	シリカゲル膜タイプキット法	15.6	3.9	25.2
5	シリカゲル膜タイプキット法	22.2	2.2	9.7
6	シリカゲル膜タイプキット法	20.4	1.3	6.5
7	シリカゲル膜タイプキット法	13.3	3.0	22.4
8	シリカゲル膜タイプキット法	24.5	3.7	14.9
9	シリカゲル膜タイプキット法	13.6	0.7	5.4
10	シリカゲル膜タイプキット法	15.2	3.2	20.8
11	シリカゲル膜タイプキット法	25.3	1.7	6.6
12	シリカゲル膜タイプキット法	12.7	3.8	30.0
13	シリカゲル膜タイプキット法	15.0	4.2	28.1
14	シリカゲル膜タイプキット法	22.6	1.6	7.1

機関番号	DNA抽出法	平均収量 (μg)	SD	RSD (%)
15	シリカゲル膜タイプキット法	20.1	2.5	12.4
16	CTAB法	3.3	0.4	12.9
17	シリカベースレジソタイプキット法	55.6	5.8	10.5
18	シリカゲル膜タイプキット法	23.4	1.0	4.4
19	シリカゲル膜タイプキット法	9.4	1.8	18.8
20	シリカゲル膜タイプキット法	16.0	1.6	9.7
21	CTAB法	3.2	0.1	3.1
22	シリカゲル膜タイプキット法	15.8	1.6	10.0
23	シリカゲル膜タイプキット法	24.0	2.5	10.4
24	シリカゲル膜タイプキット法	25.3	1.3	5.0
25	シリカゲル膜タイプキット法	24.6	1.5	6.3
26	CTAB法	3.0	0.4	13.6
27	CTAB法	15.4	1.2	7.8

表 3-2. DNA の平均収量とばらつき(高濃度試料 9 抽出)

抽出法	採用機関数	平均収量	平均SD	平均RSD(%)
シリカゲル膜タイプキット法	22	19.7	2.4	13.0
CTAB法	4	6.2	0.5	9.4
シリカベースレジソタイプキット法	1	55.6	5.8	10.5

表 4. トウモロコシ定量 PCR 結果 (スクリーニング低濃度)

機関番号	定量PCR装置	CaM定量系			
		1	2	3	平均
1	機種A	0.47	0.42	0.40	0.43
2	機種B	0.32	0.27	0.37	0.32
3	機種A	0.38	0.43	0.34	0.38
4	機種D	0.25	0.24	0.40	0.30
5	機種A	0.49	0.43	0.37	0.43
6	機種F				
7	機種A	0.26	0.31	0.36	0.31
8	機種A	0.26	0.26	0.27	0.26
9	機種A	0.40	0.45	0.45	0.43
10	機種A	0.25	0.28	0.36	0.30
11	機種B	0.34	0.26	0.30	0.30
12	機種E	0.25	0.26	0.33	0.28
13	機種C	0.27	0.31	0.26	0.28
14	機種B	0.25	0.31	0.27	0.28
15	機種B	0.32	0.34	0.33	0.33
16	機種C	0.31	0.29	0.23	0.28
17	機種A	0.27			
18	機種B	0.28	0.38	0.39	0.35
19	機種F	0.36	0.43	0.28	0.36
20	機種D	0.25	0.22	0.27	0.25
21	機種B				
22	機種D	0.43	0.31	0.45	0.40
23	機種A	0.28	0.30	0.29	0.29
24	機種B	0.31	0.27	0.32	0.30
25	機種A	0.42	0.31	0.32	0.35
26	機種D			0.86	
27	機種D	0.41	0.38	0.46	0.42
平均					0.331
SD					0.058

定量下限値以下の定量値については空欄

1	0.43
3	0.38
5	0.43
7	0.31
8	0.26
9	0.43
10	0.30
17	
23	0.29
25	0.35
平均	0.35

4	0.30
20	0.25
22	0.40
26	
27	0.42
平均	0.34

6	
19	0.36
平均	0.36

2	0.32
11	0.30
14	0.28
15	0.33
18	0.35
21	
24	0.30
平均	0.31

13	0.28
16	0.28
平均	0.28

表 5. トウモロコシ定量 PCR 結果 (スクリーニング高濃度)

機関番号	定量PCR装置	CaM定量系			
		1	2	3	平均
1	機種A	6.28	5.77	6.21	6.09
2	機種B	5.94	5.53	5.92	5.80
3	機種A	5.68	5.20	5.59	5.49
4	機種D	5.06	5.08	5.49	5.21
5	機種A	5.79	5.20	6.39	5.79
6	機種F	11.36	10.18	10.76	10.77
7	機種A	5.32	4.74	4.51	4.86
8	機種A	4.70	5.25	5.64	5.20
9	機種A	5.60	5.61	5.42	5.54
10	機種A	5.95	6.17	5.73	5.95
11	機種B	5.91	4.53	5.05	5.16
12	機種E	5.76	4.76	4.50	5.01
13	機種C	4.51	5.05	4.84	4.80
14	機種B	5.28	4.29	5.12	4.90
15	機種B	5.19	5.36	5.10	5.22
16	機種C	5.01	4.89	4.55	4.82
17	機種A	5.04	5.09	5.16	5.10
18	機種B	5.61	5.13	5.05	5.26
19	機種F	10.82	10.50	9.62	10.31
20	機種D	5.19	4.46	5.14	4.93
21	機種B	5.16	5.59	4.98	5.24
22	機種D	5.27	5.95	6.29	5.84
23	機種A	5.03	5.30	4.96	5.10
24	機種B	5.19	5.02	5.39	5.20
25	機種A	5.51	4.94	5.52	5.32
26	機種D	8.36	7.90	6.16	7.47
27	機種D	6.30	5.28	5.87	5.82
平均					5.785
SD					1.478

機種A

1	6.09
3	5.49
5	5.79
7	4.86
8	5.20
9	5.54
10	5.95
17	5.10
23	5.10
25	5.32
平均	5.44

機種D

4	5.21
20	4.93
22	5.84
26	7.47
27	5.82
平均	5.85

機種F

6	10.77
19	10.31
平均	10.54

機種B

2	5.80
11	5.16
14	4.90
15	5.22
18	5.26
21	5.24
24	5.20
平均	5.25

機種C

13	4.80
16	4.82
平均	4.81

表6. Mon810 系統特異的試験結果

機関番号	定量PCR装置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均
1	機種A	5.86	6.18	5.85	5.53	6.37	6.27	5.69	6.34	6.26	6.04
2	機種B	5.11	4.95	5.11	6.10	4.54	5.08	4.61	5.00	4.91	5.03
3	機種A	5.99	5.73	5.38	6.31	5.91	5.95	6.26	6.03	6.44	6.00
4	機種D	5.40	4.82	4.65	4.56	4.37	4.49	4.90	4.79	4.50	4.68
5	機種A	6.96	6.45	6.15	6.60	6.44	6.21	5.63	5.82	5.92	6.24
6	機種F	7.55	8.14	8.31	7.51	6.25	7.55	7.53	6.77	8.16	7.53
7	機種A	4.31	4.12	5.08	4.74	5.07	4.61	5.25	5.18	4.68	4.78
8	機種A	6.36	5.56	6.01	6.06	6.25	5.66	5.97	5.95	5.75	5.95
9	機種A	5.26	5.09	5.29	5.38	5.47	5.46	5.73	5.54	5.33	5.51
10	機種A	5.69	5.07	5.06	5.69	6.00	5.37	5.12	5.45	5.38	5.43
11	機種B	5.53	5.67	5.17	5.08	5.69	5.19	5.89	5.14	4.77	5.35
12	機種E	5.76	6.47	5.83	9.10	6.87	5.76	5.67	9.83	7.91	7.02
13	機種C	4.39	4.58	4.89	4.72	5.21	4.89	5.63	5.31	4.78	4.93
14	機種B	5.58	5.96	5.91	5.60	5.43	5.97	6.52	6.05	5.60	5.85
15	機種B	5.34	5.62	5.77	5.13	5.47	5.60	5.09	5.36	4.92	5.37
16	機種C	5.38	5.24	5.08	5.45	5.47	5.02	4.94	5.12	5.76	5.27
17	機種A	5.65	5.41	4.66	4.90	5.40	5.42	4.08	5.34	5.13	5.11
18	機種B	5.89	5.64	6.75	5.66	5.63	5.72	6.33	5.26	5.05	5.77
19	機種F	9.37	9.43	9.53	8.89	8.99	13.28	14.31	14.05	13.99	11.32
20	機種D	4.91	4.76	4.17	4.07	4.03	4.23	4.89	4.21	3.92	4.35
21	機種B	4.98	6.00	5.68	5.96	9.45	5.79	5.69	5.77	4.35	5.96
22	機種D	5.49	5.28	4.74	6.32	4.70	4.83	5.13	4.92	4.22	5.07
23	機種A	5.79	5.27	6.08	5.57	6.00	5.85	5.54	6.48	6.23	5.87
24	機種B	5.88	6.20	4.43	5.11	5.60	4.66	5.18	6.34	5.34	5.42
25	機種A	5.75	5.11	5.61	5.19	5.52	5.13	5.70	5.63	5.71	5.48
26	機種D	5.35	3.90	4.82	6.31	5.38	5.28	5.17	4.91	5.64	5.30
27	機種D	5.59	4.45	4.29	4.96	4.13	3.93	5.21	4.82	4.89	4.70
平均											5.753
SD											1.309

機種A	
1	6.04
3	6.00
5	6.24
7	4.78
8	5.95
9	5.51
10	5.43
17	5.11
23	5.97
25	5.48
平均	5.64

機種D	
4	4.68
20	4.35
22	5.07
26	5.30
27	4.70
平均	4.82

機種F	
6	7.53
19	11.32
平均	9.43

機種B	
2	5.03
11	5.35
14	5.85
15	5.37
18	5.77
21	5.96
24	5.42
平均	5.54

機種C	
13	4.93
16	5.27
平均	5.10

機関番号	ラン間再現性 (3ラン間の相対標準偏差%) ¹⁾				DNA抽出の再現性 (9抽出間の相対標準偏差%) ²⁾	
	抽出1	抽出2	抽出3	平均		
1	5.6	4.7	6.2	5.50	21.5	
2	3.7	7.1	3.2	4.67	10.0	
3	1回のみ測定				2.8	
4	4.5	9.4	9.5	7.80	22.8	
5	3.0	7.0	7.6	5.87	9.9	
6	56.8	53.8	48.5		7.0*	
7	23.6	24.4	10.7	19.57	7.3	
8	5.9	10.3	7.2	7.80	9.5**	
9	4.5	5.3	6.2	5.33	4.2	
10	4.6	10.4	2.6	5.87	24.3	
11	6.7	6.3	5.3	6.10	10.3	
12	8.3	14.3	12.0	11.53	28.6	
13	2回のみ測定				37.1	
14	5.3	3.8	2.1	3.73	5.5	
15	0.9	4.4	7.2	4.17	26.9	
16	5.7	14.5	6.3	8.83	7.9	
17	8.8	6.3	9.8	8.30	12.6	
18	4.7	6.7	9.4	6.93	6.6	
19	40.3	38.5	28.9		18.1*	
20	5.7	7.0	2.8	5.17	6.4	
21	2回のみ測定				68.5	
22	8.8	15.4	11.0	11.73	18.1	
23	1.8	2.7	2.3	2.27	10.5	
24	2回のみ測定				11.4	
25	5.2	6.7	6.9	6.27	4.3	
26	99.2	87.1	92.5		66.2	
27	6.1	18.1	5.0	9.73	12.0	
機種Fおよび機関26 ³⁾ を除いた機関についての				平均	7.36	*:n=5
				標準偏差	3.78	** :n=8

- スクリーニング定量(CaM, GA21)、Mon810系統特異的定量で得られたSSIIbのコピー数から計算 (3ラン実施した機関についてのみ算出)
- Mon810系統特異的定量で得られたSSIIbのコピー数から計算
- 他の機関の値と大きく異なるため除外した

表7. トウモロコシ定量PCR SSIIb の測定値を指標とした再現性の検討

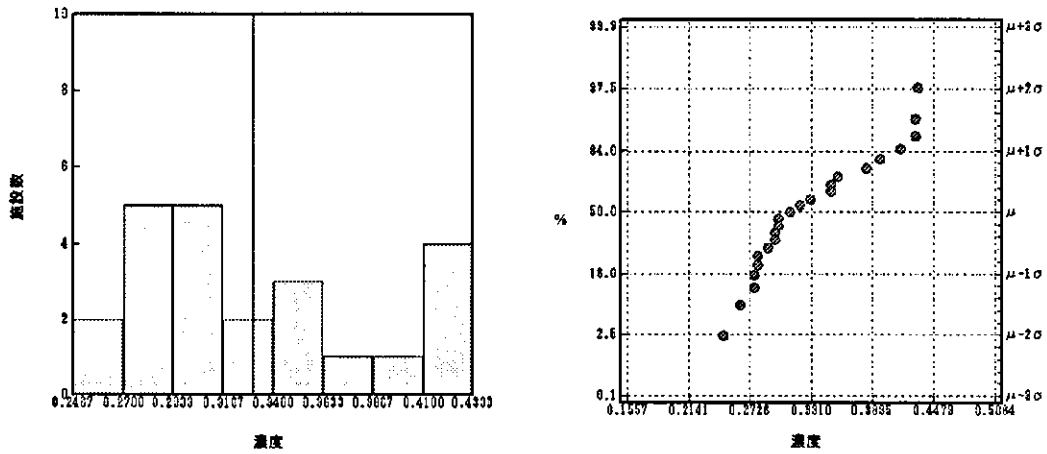


図1 低濃度のスクリーニングの CaM の測定におけるヒストグラムと正規確率プロット

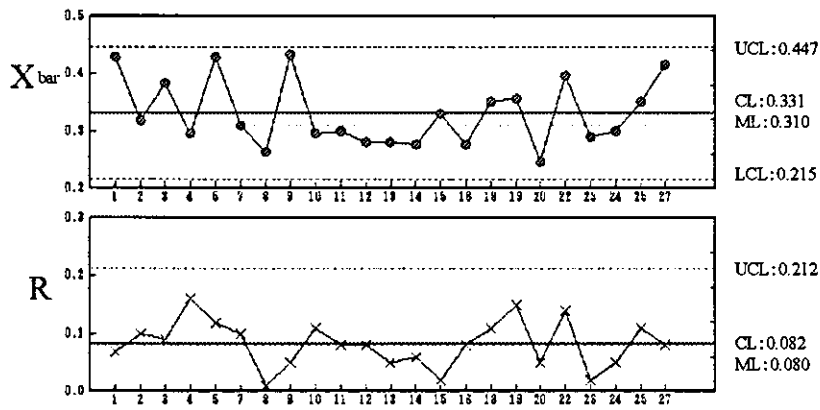


図2 低濃度のスクリーニングの CaM の測定における X-R 管理図

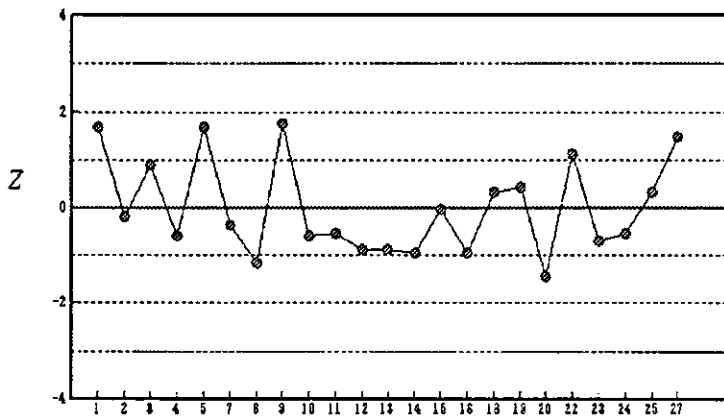


図3 低濃度のスクリーニングの CaM の測定における z-スコア

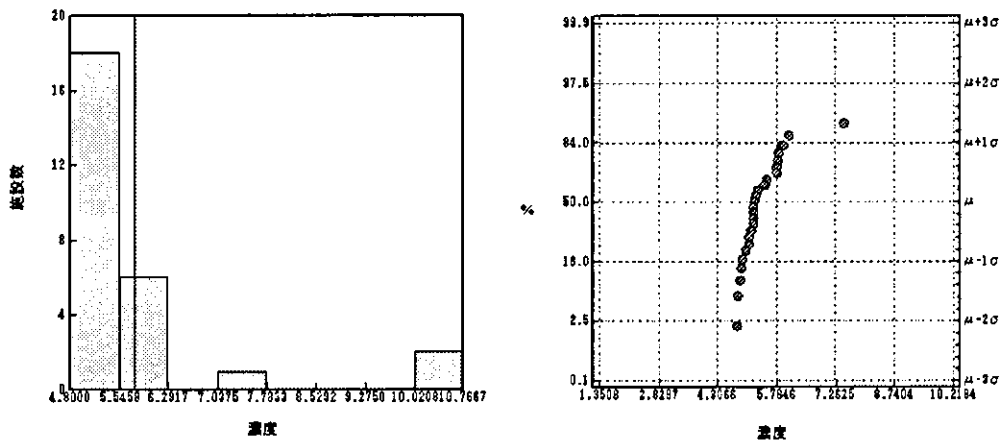


図 4 高濃度のスクリーニングの CaM の測定におけるヒストグラムと正規確率プロット

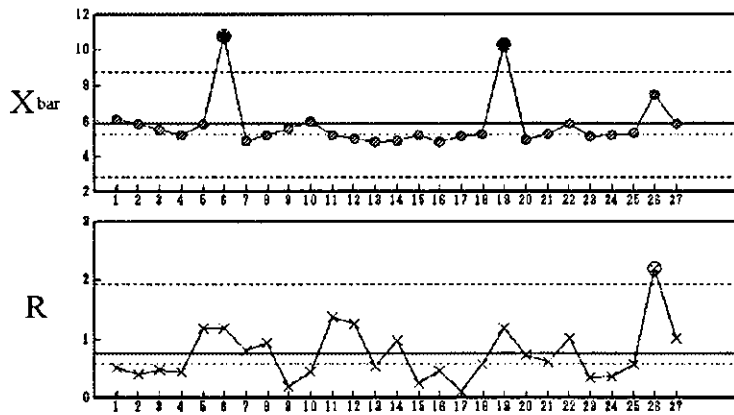


図 5 高濃度のスクリーニングの CaM の測定における X-R 管理図

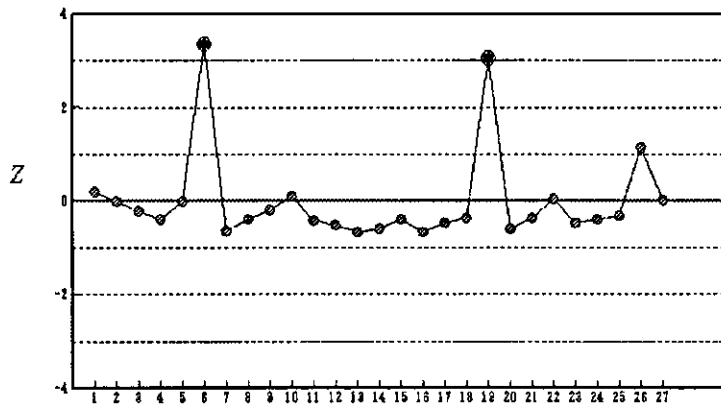


図 6 高濃度のスクリーニングの CaM の測定における z-スコア

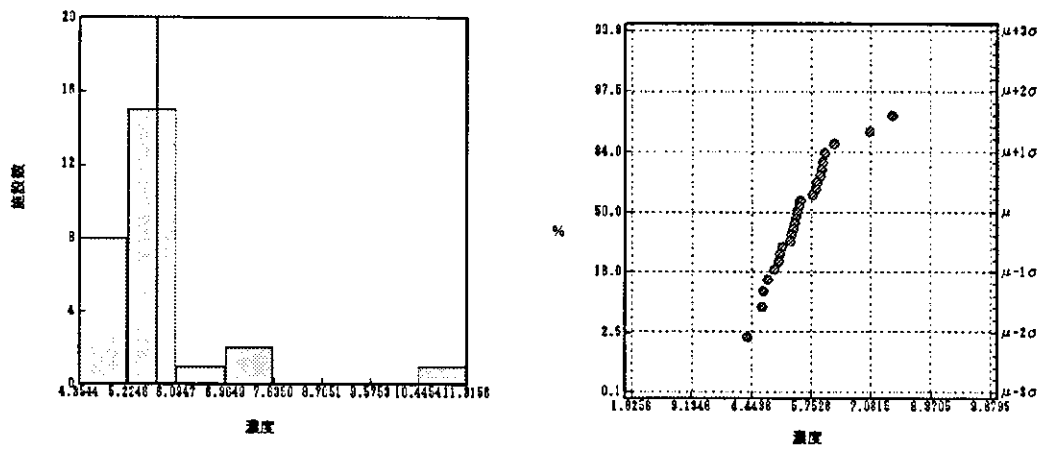


図7 系統特異的定量の Mon810 の測定におけるヒストグラムと正規確率プロット

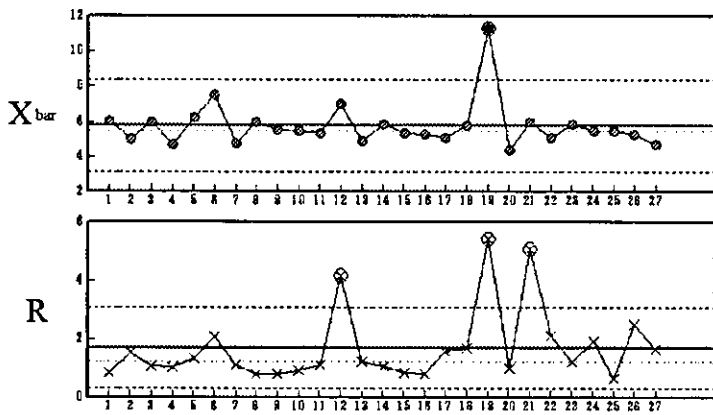


図8 系統特異的定量の Mon810 の測定における X-R 管理図

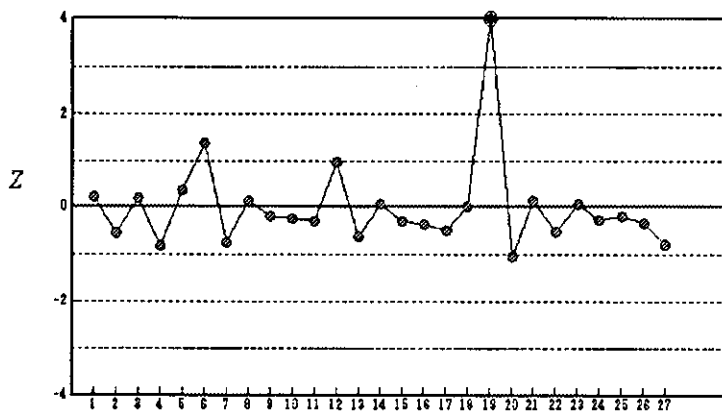


図9 系統特異的定量の Mon810 の測定における z-スコア

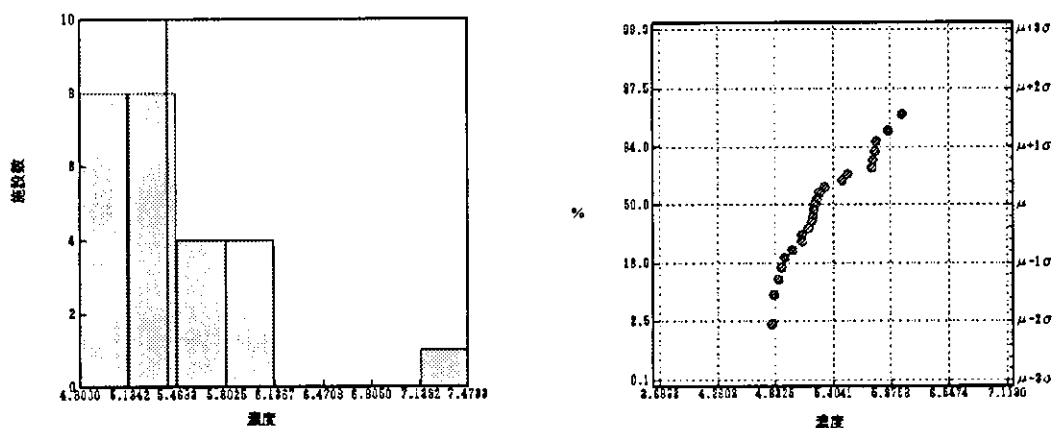


図 10 高濃度のスクリーニングの CaM の測定におけるヒストグラムと正規確率プロット
(定量 PCR 装置に機種 F を用いた機関の測定値を除外した場合)

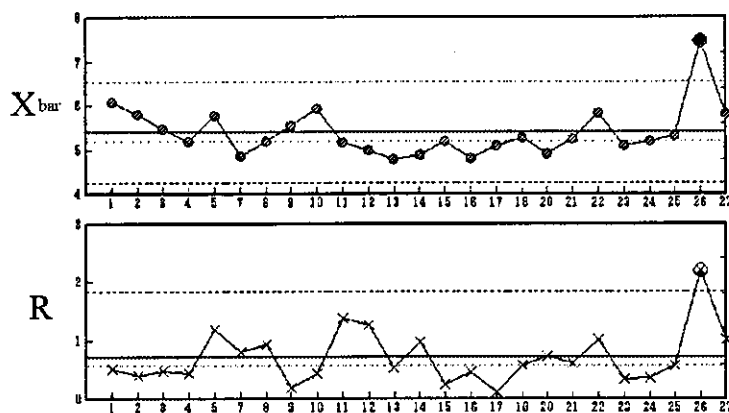


図 11 高濃度のスクリーニングの CaM の測定における X-R 管理図
(定量 PCR 装置に機種 F を用いた機関の測定値を除外した場合)

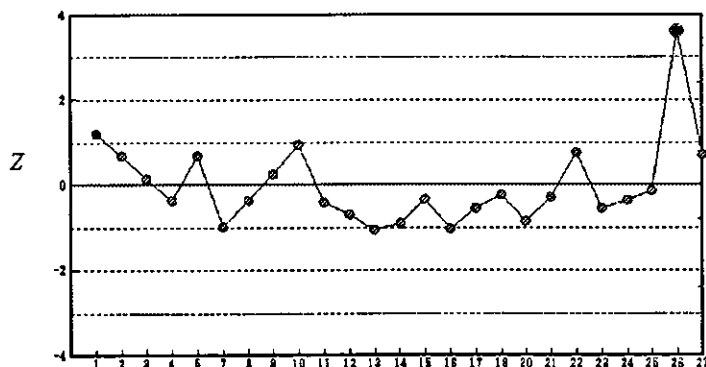


図 12 高濃度のスクリーニングの CaM の測定における z-スコア
(定量 PCR 装置に機種 F を用いた機関の測定値を除外した場合)

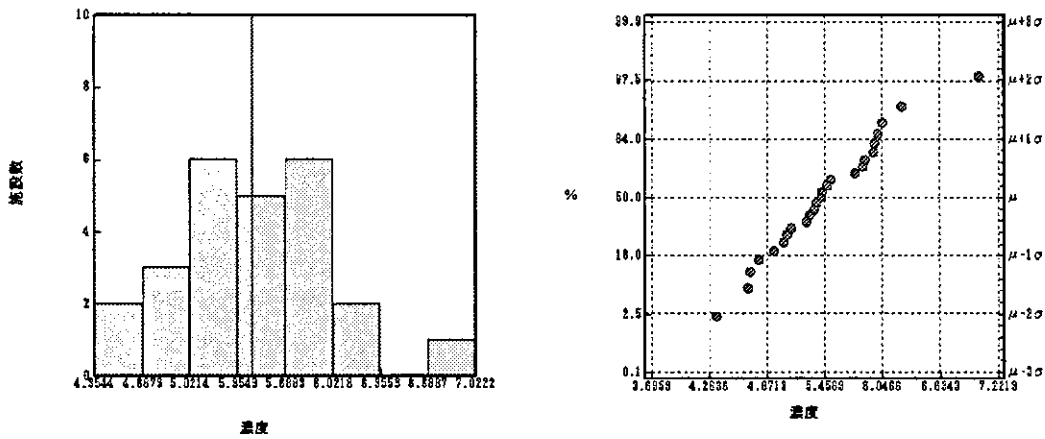


図 13 系統特異的定量の Mon810 の測定におけるヒストグラムと正規確率プロット
(定量 PCR 装置に機種 F を用いた機関の測定値を除外した場合)

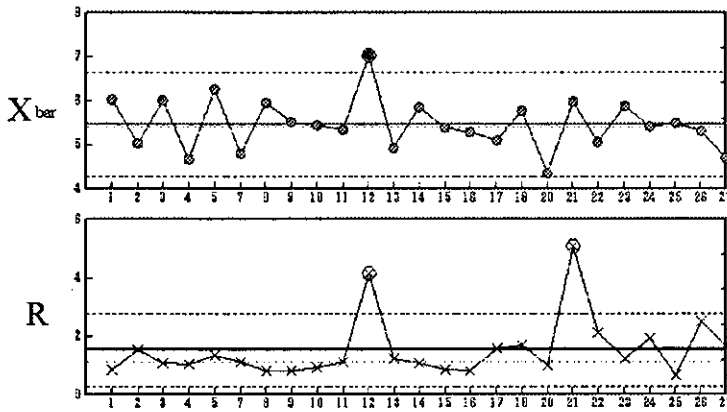


図 14 系統特異的定量の Mon810 の測定における X-R 管理図
(定量 PCR 装置に機種 F を用いた機関の測定値を除外した場合)

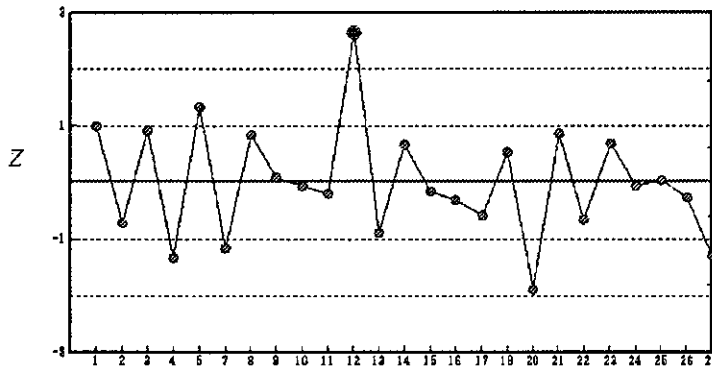


図 15 系統特異的定量の Mon810 の測定における z-スコア
(定量 PCR 装置に機種 F を用いた機関の測定値を除外した場合)

資料4-5

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

分担総合研究報告書（平成14～16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（その5）
—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

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、ボンドエルト NH₂ 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、 ω -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 μ g、中腸腺 25 g に対して 40 μ 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¹⁾。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。旧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、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附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⁴⁾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した、それを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。CHCl₃ 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 CHCl₃ 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 CHCl₃ 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 CHCl₃ に溶解する。Varian 製ボンドエリート、BOND ELUT LRC-NH₂, 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 CHCl₃ 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、CHCl₃ / 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 μ L に内部標準物質 100 μ L を加えて窒素気流中で乾涸する。残渣に ADAM 試薬 100 μ L 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 グラジエントポンプと 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-H₂O, 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 μ 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℃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 Φ 0.5 x 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 μ g を 1mL のアセトンに溶解後、250 μ 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 μ g 用)。密栓後管ビンを-40℃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 μ g を 1000 μ L のアセトンに溶解し、 Φ 13mm の whatman AA disc に 40 μ L (40 μ g 添加用)又は、80 μ L (80 μ 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℃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 μ g 吸着させた濾紙ディスク、オカダ酸を 80 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 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⁴⁾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冷凍保存した。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冷凍した。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冷凍輸送する。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。

昨年度は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、遊離脂肪酸の微量分析法を確立した。

3-a) 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2)。定量結果は表3-1, 3-2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2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 ω -9系列、リノール酸を前駆体とする ω -6系列、 α -リノレン酸を前駆体とする ω -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 ω -3、総 ω -6脂肪酸として示し、 ω -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3に示した。多変量連関図の丸印の部分は剥き身で、四角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 ω 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3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4)。図4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5である。この図からも明らかなように総 ω -6、総 ω -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 ω -3及び ω -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、 ω -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6)。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 $192 \mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $40 \mu\text{g}$ 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 $40 \mu\text{g}$ 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 $80 \mu\text{g}$ 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 $80 \mu\text{g}$ 吸着させた濾紙ディスク、オカダ酸を $80 \mu\text{g}$ 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 $40 \mu\text{g}$ でも行った。

結果は表5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 $40 \mu\text{g}$ でも $80 \mu\text{g}$ 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