

採用することにした。添加濃度に関していえば、中腸腺は  $40\mu\text{g}$  に設定し、剥き身は  $40\mu\text{g}$  でも問題はないように思われたが、サンプル管ピ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  $80\mu\text{g}$  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  $125\text{g}$  を解凍後、オカダ酸を  $80\mu\text{g}$  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  $25\text{g}$  を解凍して、オカダ酸を  $40\mu\text{g}$  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

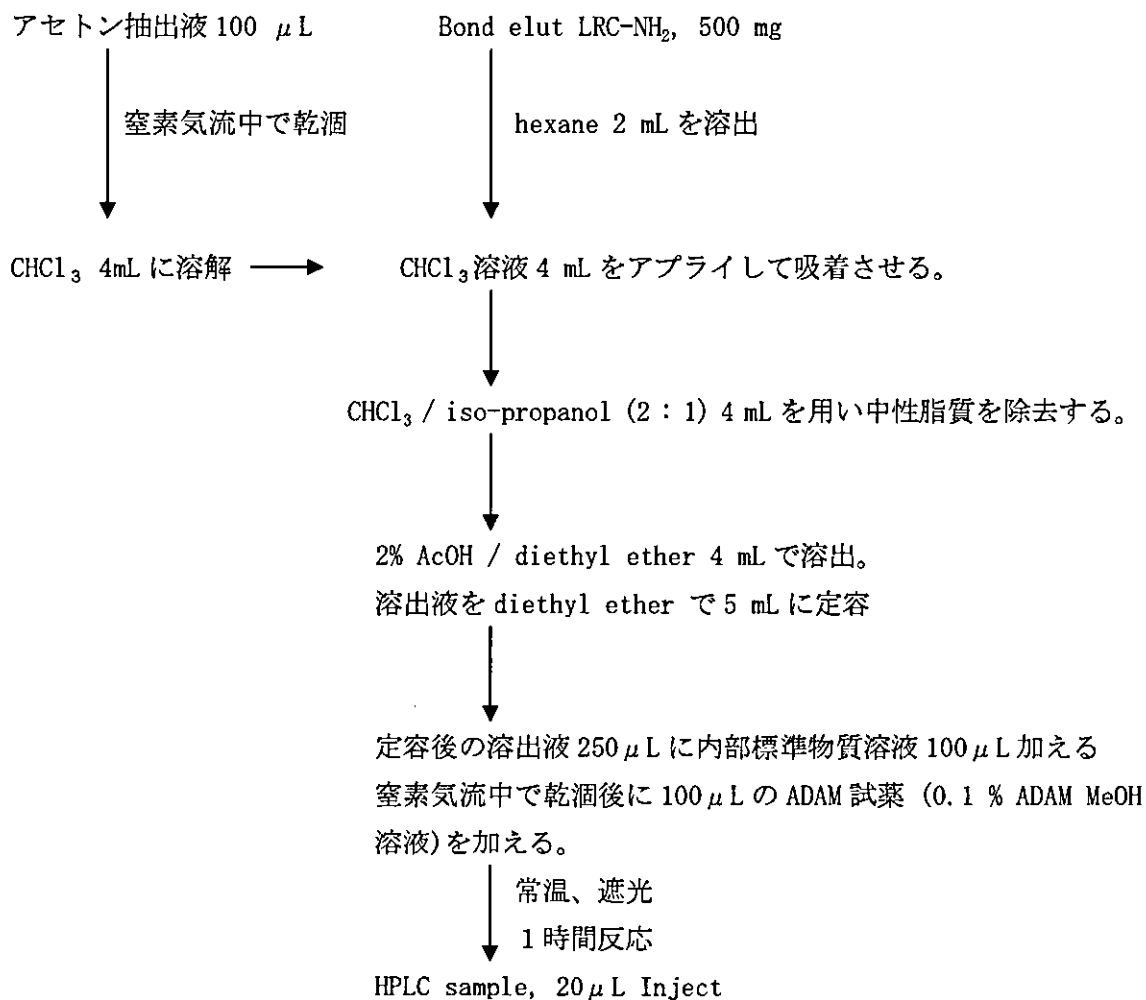
7) Kawasaki M. et.al. : Effect of  $\alpha$ -Linolenic Acid on the Metabolism of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 Polyunsaturated Fatty Acid and Histamine Release in RBL-2H3 Cell. Biol. Pharm. Bull. 17(10)

p1321-1325 (1994)

E. 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 各遊離脂肪酸の定量下限と相関係数及び保持時間

濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	cis6,9,12, 15		EPA		DHA	AA	palmitolei c acid, miristic acid		oleic acid, palmitic acid		stearic acid	aracidic acid
	C18:4	C20:5	C22:6	C20:4	C16:1 C14:0	C18:2	C18:1 C16:0	C18:0	C20:0			
10	318890	371855	218600	461371	880983	297314	797273	343927	291095			
5	146803.3	201646.9	119369.9	241041.7	421700	145475.2	378435.1	168344.8	155215			
1	5037.732	20382.55	23552.58	38761.58	79127.66	28558.73	73777.24	34021.8	13827.71			
0.5		7130.445	13432.22		30844.57		24615.84	16445.57				
定量下限	1	0.5	0.5	1	0.5	1	0.5	0.5	1			
相関係数	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	1	0.999	1	0.998			
保持時間	31.6	37.253	40.858	44.485	46.618	48.048	55.45	64.389	74.864			

表2 アセトン抽出液に於ける遊離脂肪酸の添加回収実験

FAA	回収率(%)			標準偏差	
	recovery 1	recovery 2	recovery 3 平均		
cis6,9,12,15 octadeca tetraenoic acid	(C18:4) 90.1172	87.5397	108.6286	95.4285	11.5041
EPA	(C20:5) 96.8802	103.203	120.475	106.8527	12.2135
DHA	(C22:6) 143.6624	76.9398	109.8119	110.1381	33.3625
AA	(C20:4) 93.7937	71.935	91.798	85.8422	12.0853
palmitoleic acid, miristic acid	(C16:1) 90.2715	95.0378	88.5121	91.2738	3.3764
linoleic acid	(C14:0) 86.8819	99.729	108.8059	98.4723	11.0159
oleic acid, palmitic acid	(C18:1) 118.4251	100.1435	117.4691	112.0126	10.29
stearic acid	(C18:0) 96.8618	91.902	135.8118	108.1919	24.0478
aracidic acid	(C20:0) 88.184	76.126	98.7696	87.6932	11.3298

表3-1 冷凍試料中の遊離脂肪酸の濃度 (μg/g)

中腸腺

FFA	鎖長	不飽和度	ω3, ω6	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9
cis6,9,12,15 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
aracidic 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3-2 冷凍試料中の遊離脂肪酸の濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )

剥き身	鎖長	不飽和度	$\omega 3$ , $\omega 6$	WH1	WH2	WH3	WH4	WH5	WH6	WH7	WH8	WH9
cis6,9,12,15 octadeca tetraenoic	18	4		42.0014	11.2082	39.3491	140.341	222.711	153.021	184.426	276.843	219.218
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, miristic 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4 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 5 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	サンプル管ビン
80 $\mu$ g	3	2
40 $\mu$ g	3	0

表6 ホタテ試料に濾紙ディスク法を用いてオカダ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)

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

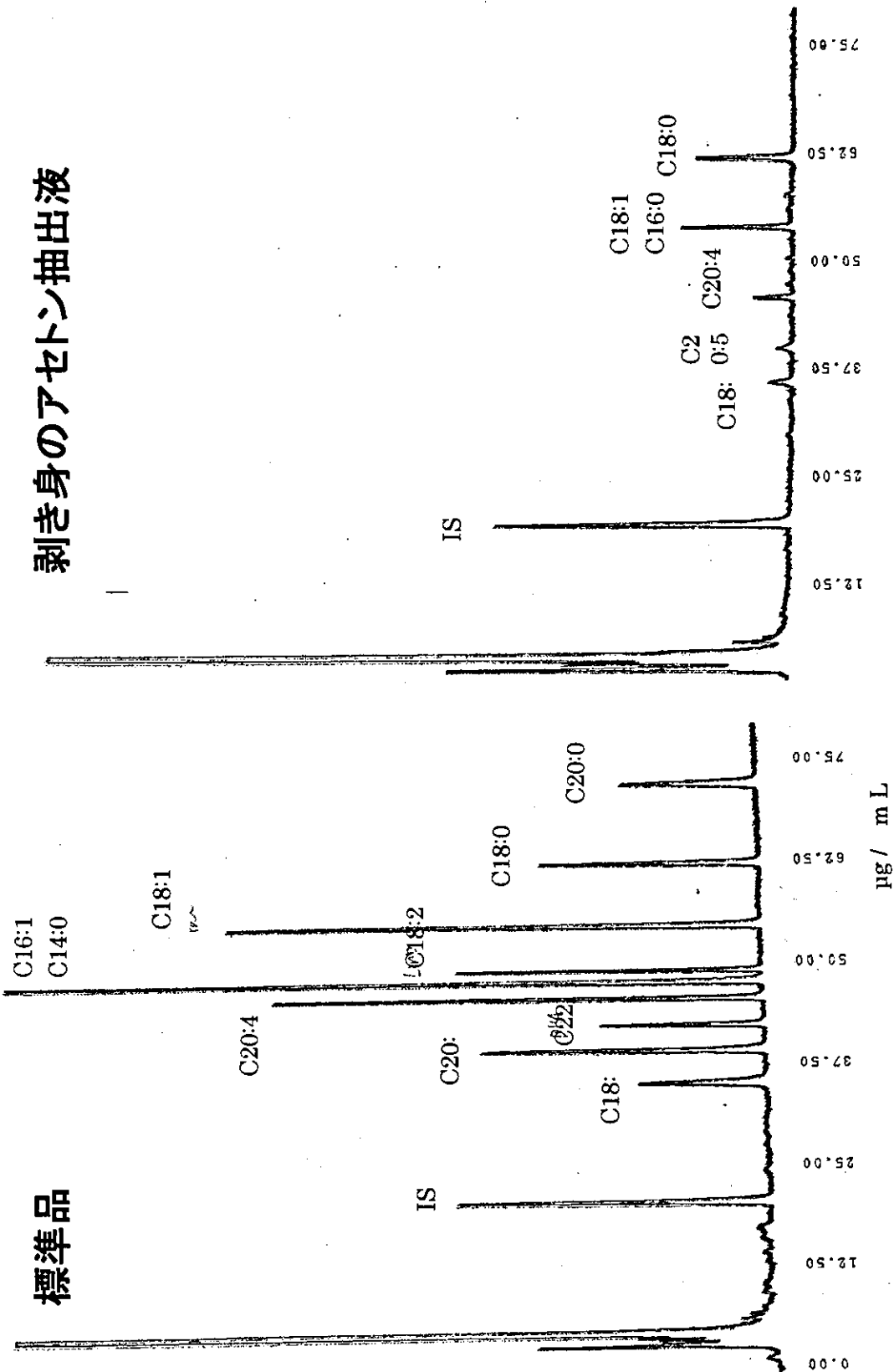
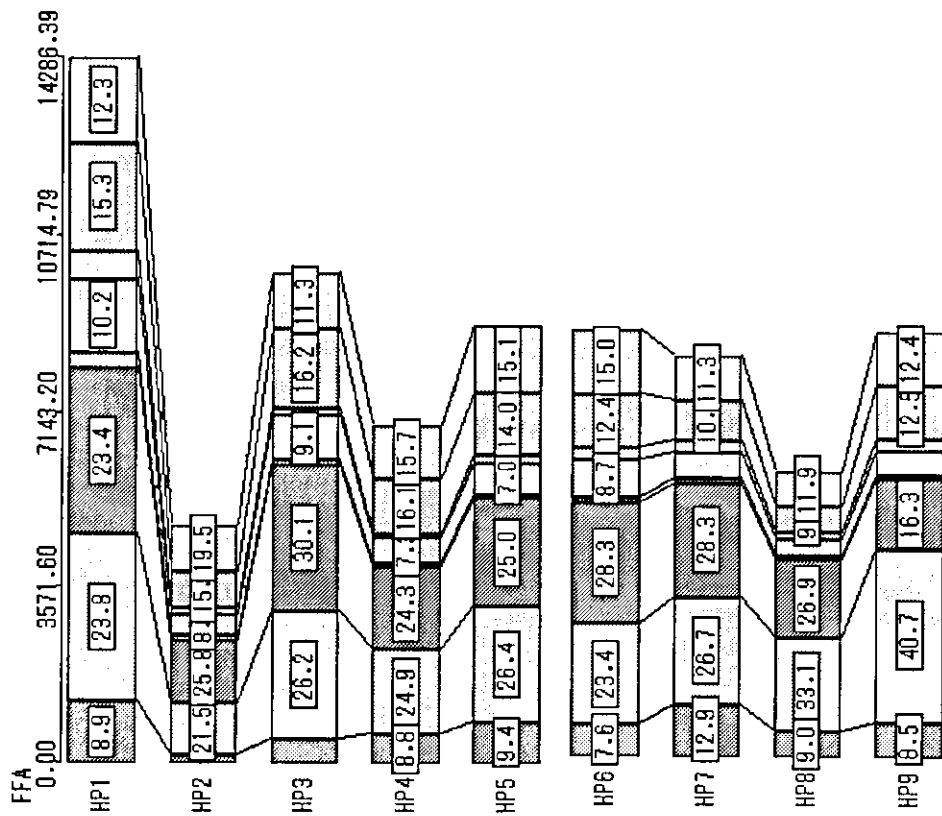
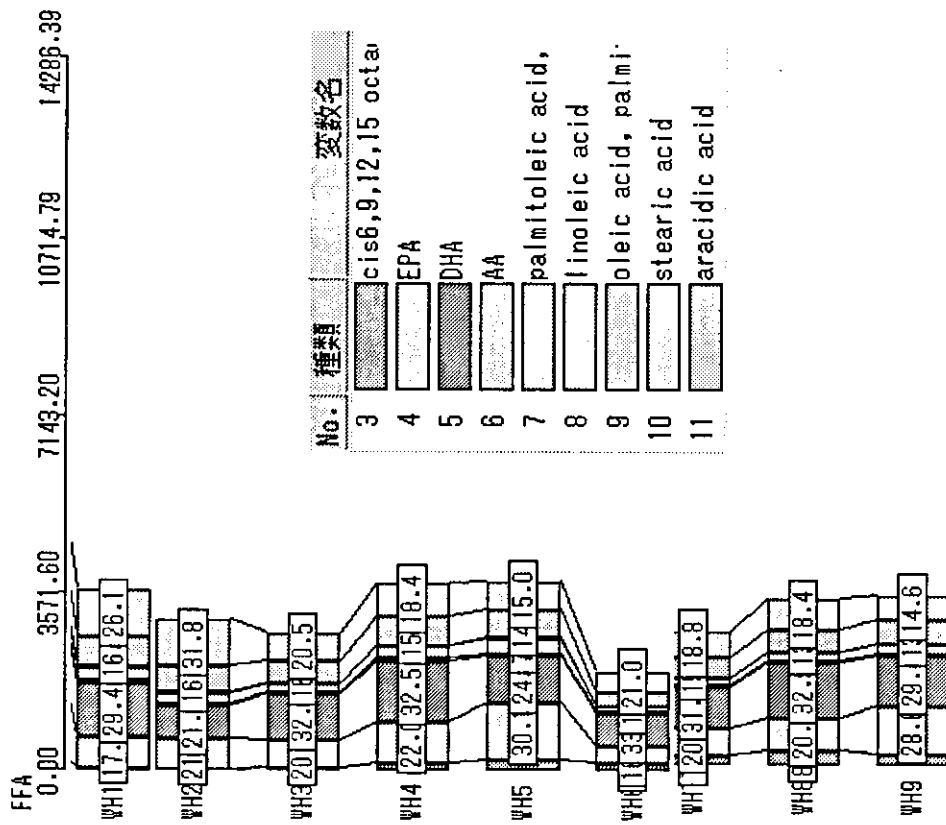


図 1 標準品と剥き身のアセトン抽出液のHPLCクロマトグラム

### 中腸腺



### 剥き身



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

図 2 精度管理用保存検体(ホタテ貝、4ヶ月)の遊離脂肪酸組成

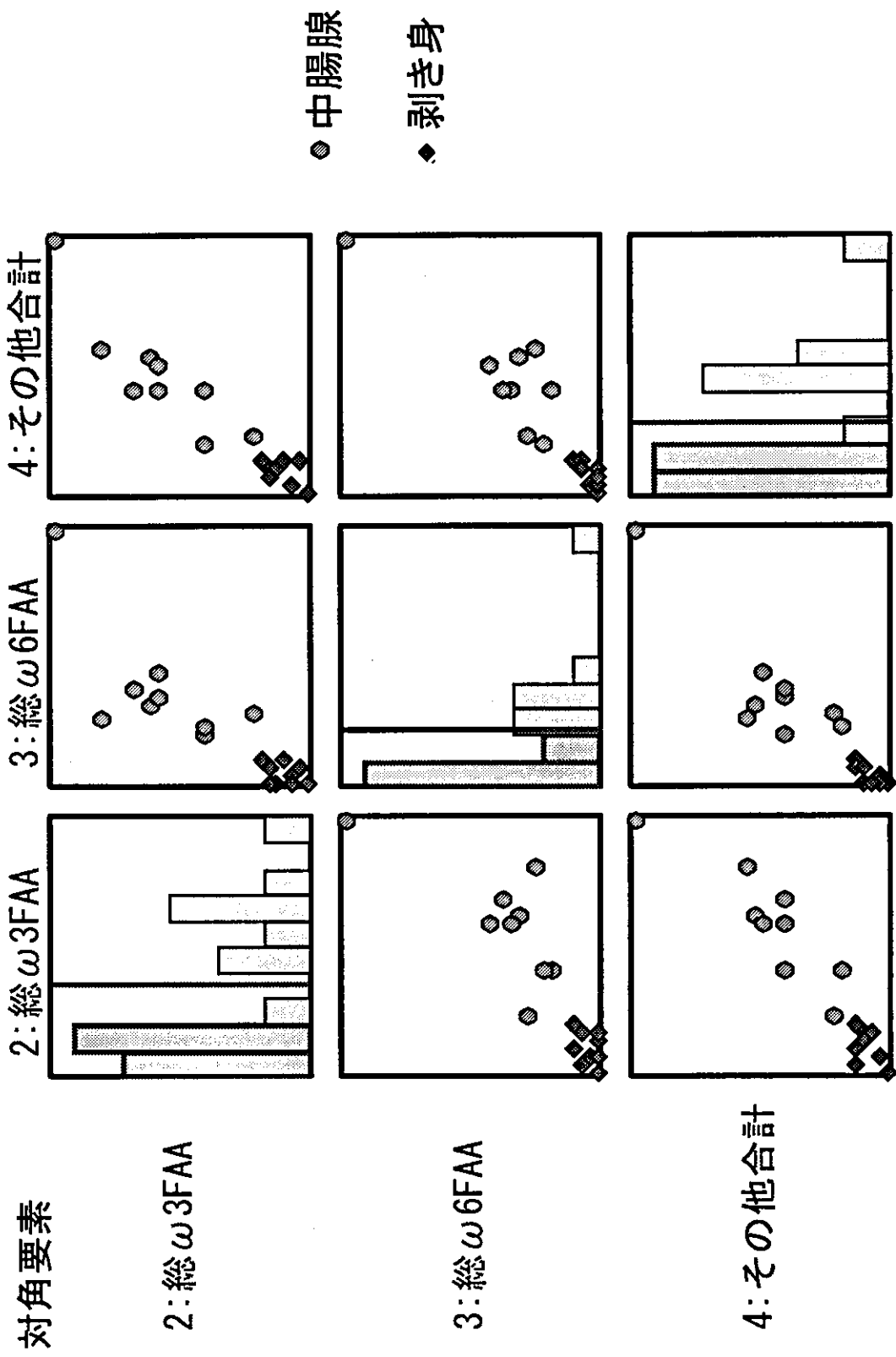


図 3 中腸腺及び剥き身の遊離脂肪酸の多変量連関図

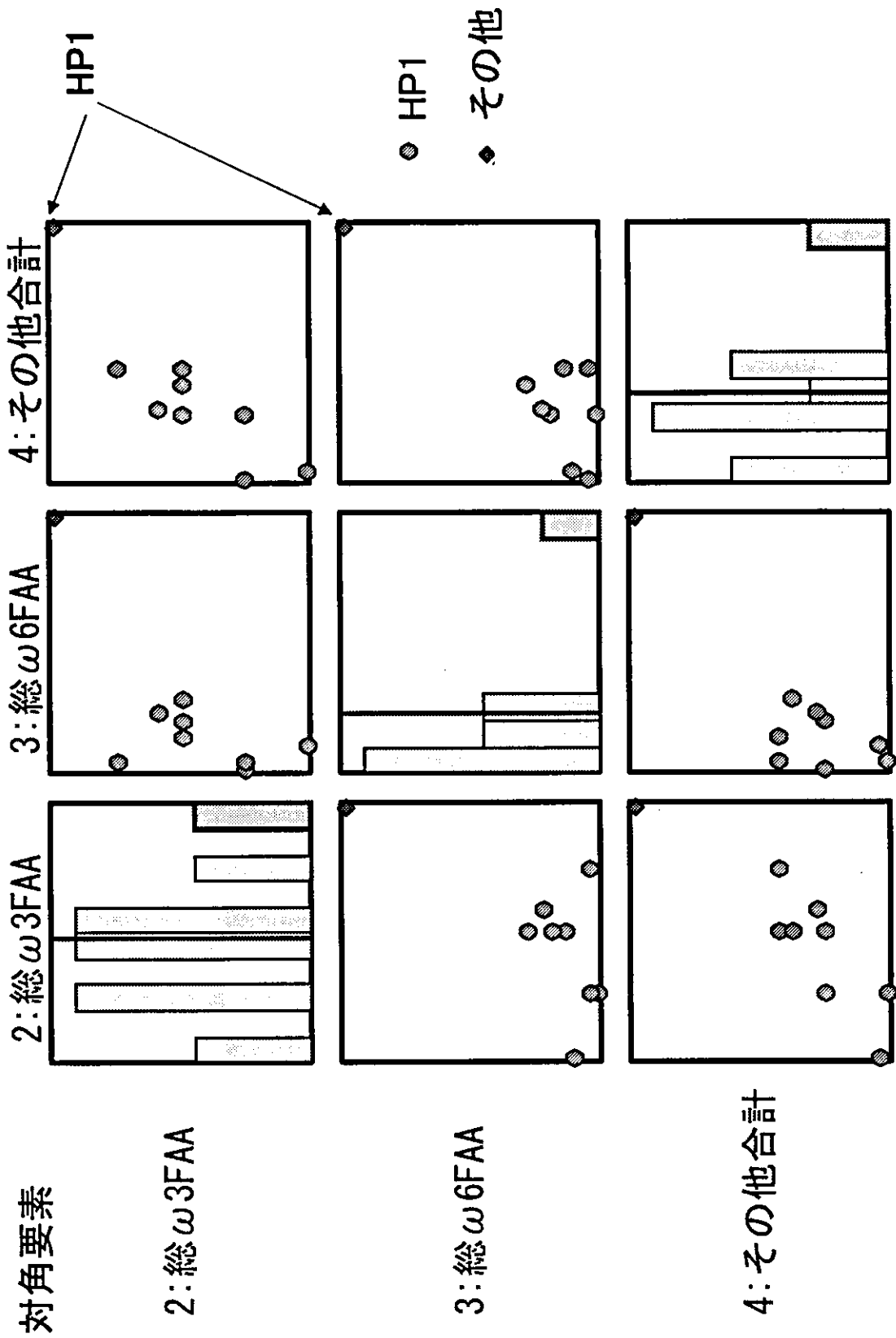


図 4 中腸腺の遊離脂肪酸の多変量連関図

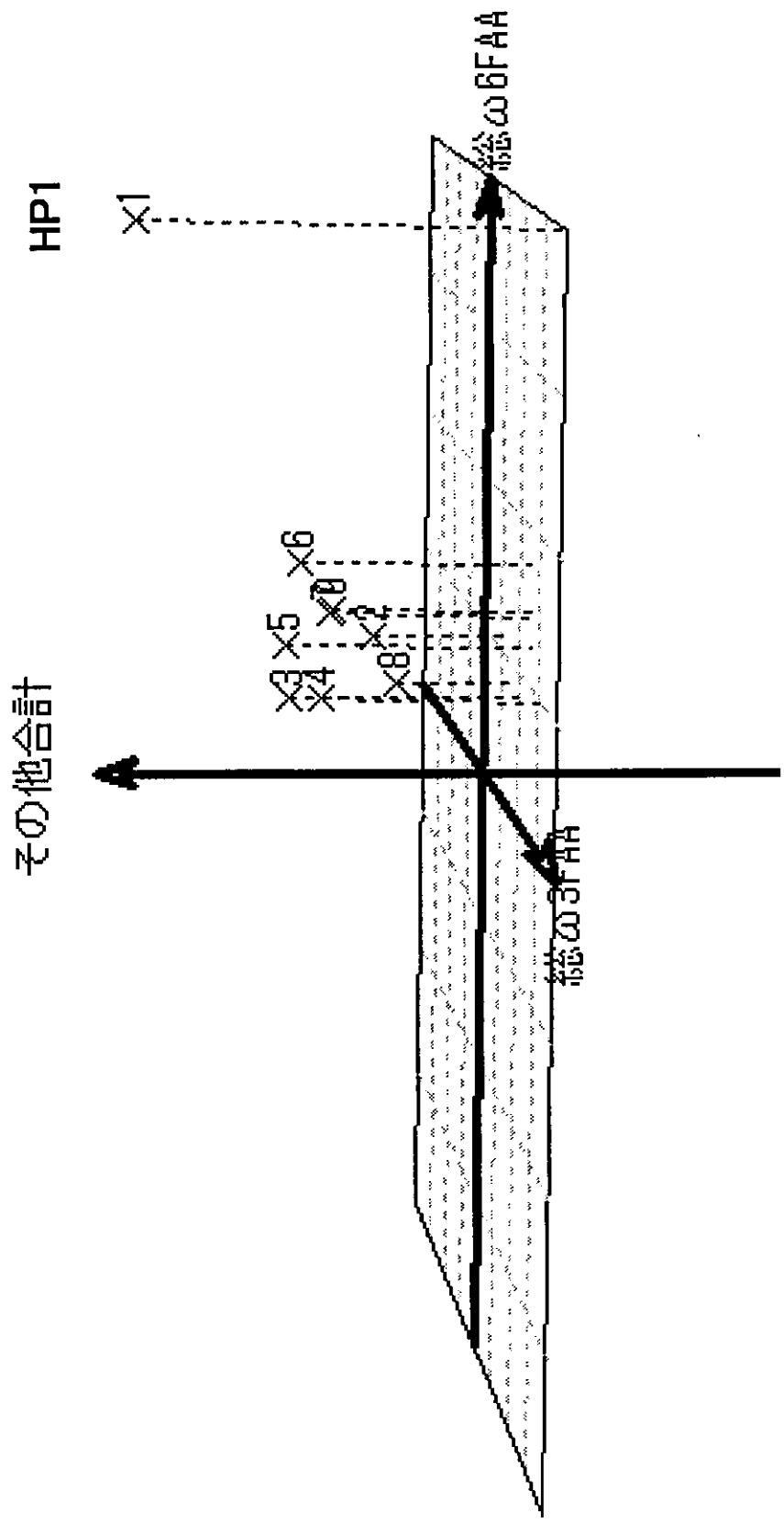
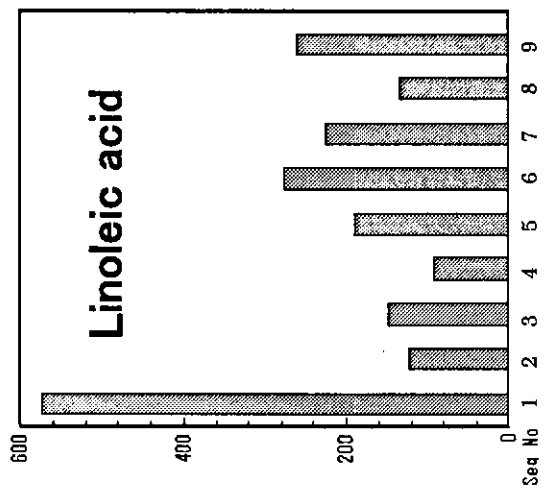
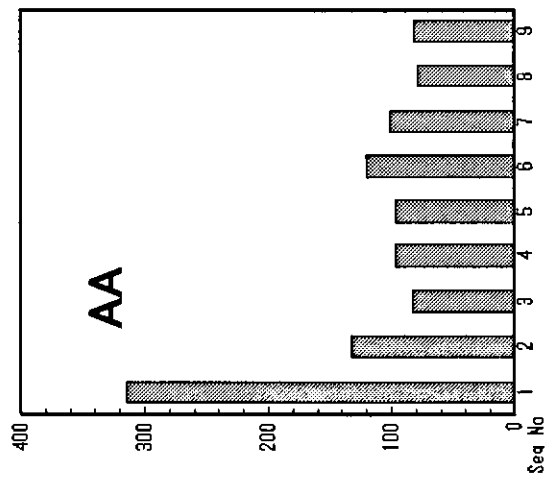


図 5 HP1の三次元図



### ω-3系列脂肪酸



### ω-6系列脂肪酸

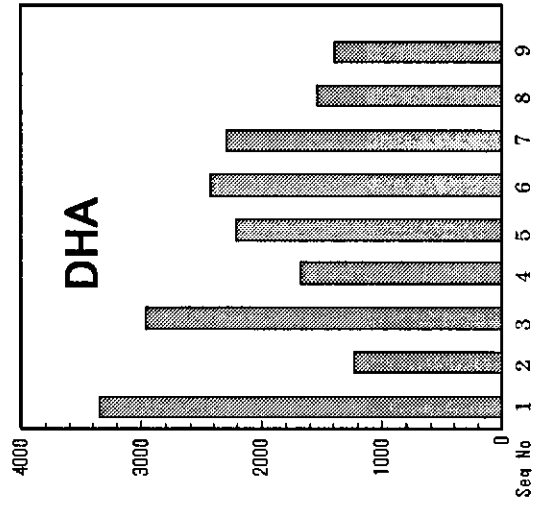
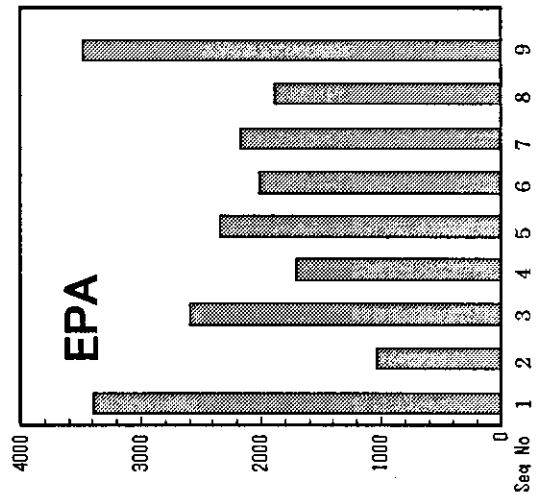


図 6 HP1のω-3及びω-6系脂肪酸の量的比較

## 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

## 研究成果に関する刊行物一覧表

(平成14～16年度)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
(1)中澤班 Saito, Mikiko Takekuma, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Msahiro Ishizuka, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki	Enzyme-linked immunosorbent assay toxicity evaluation method for dioxins in human milk.	Bull. Environ. Contam. Toxicol.,	70	636-643	2003
(2) Koichi Saito, Mikiko Takekuma, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Msahiro Ishizuka, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki	Extraction and cleanup methods of dioxins in house dust from two cities in Japan using ASE and a disposable multi-layer silica-gel cartridge	Chemosphere	53	137-142	2003
(3) Mikiko Takekuma, Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Ryuji Matumoto and Susumu Kobayashi	Levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in human milk in Saitama, Japan, and epidemiological research.	Chemosphere	54	127-135	2004
(4) Koichi Saito, Masakazu Ogawa, Mikiko Takekuma, Atsuko Ohmura, Migaku Kawaguchi, Rie Ito, Koichi Inoue, Yasuhiko Matsuki, and Hiroyuki Nakazawa	Systematic analysis and the overall toxicity evaluation of dioxins and hexachlorobenzene in human milk.	Organohalogen Compounds	66	38-41	2004
(5) Koichi Saito, Andreas Sjodin, Courtney D. Sandau, Mark D. Davis, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki,	Development of a Accelerated Solvent Extraction and Gel Permeation Chromatography Analytical Method for Measuring Persistent Organohalogen Compounds in Adipose and Organ Tissue Analysis.	Chemosphere	57	373-381	2004

and Donald G. Patterson, Jr.  (6) Koichi Saito, Masahiro Ishizuka, Yukio Sugawara, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki	Cleanup Method Using Disposable Tandem Cartridge System for the Determination of Dioxins in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.	Bull Environ Contam Toxicol.	73	17-23	2004
織田班 Shinjiro Hori, Kazuo Akutsu, Hajime Oda, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, Tsunehisa Makino	Development of an analysis method for polybrominated diphenyl ethers and its application to their detection as pollutions in human mother's milk.	Organohalogen Compounds	58	245-248	2002
(7) Shinji Kumagai, Shigeki Koda, Hajime Oda.	Exposure evaluation of dioxins in municipal waste incinerator workers.	Industrial Health	41	167-174	2003
(8) Kazuhiko Akutsu, Mikiya Kitagawa, Hiroyuki Nakazawa, Tsunehisa Makino, Katsuhiko Iwazaki, Hajime Oda, Shinjiro Hori.	Time-trend (1973-2000) of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk.	Chemosphere	53	645-654	2003
(9) 熊谷信二、織田肇、田淵武夫、赤阪進、小坂博、吉田仁、甲田茂樹、毛利一平	自治体焼却施設における堆積粉塵中ダイオキシン類濃度と労働者の血清中ダイオキシン類濃度との関係	産業衛生学雑誌	46	1-9	2004
米谷班 (10) R. Matsuda, T.Tsutsumi, M. Toyoda, T. Maitani	The Proficiency Testing of Determination of Dioxins in Food	Organohalogen Compounds	66	576-581	2004
松木班 (11) Mitsunobu Okuyama, Norihiro Kobayashi, Wakako Takeda, Takako Anjo, Yasuhiko	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Monitoring Toxic Dioxin Congeners in Milk Based on a Newly Generated Monoclonal Anti-Dioxin Antibody	Analytical Chemistry	76 (7)	1948-1956	2004