

Fig. 9 外部精度管理試験調査により得られた検量線データの解析(ABI PRISM 7700)

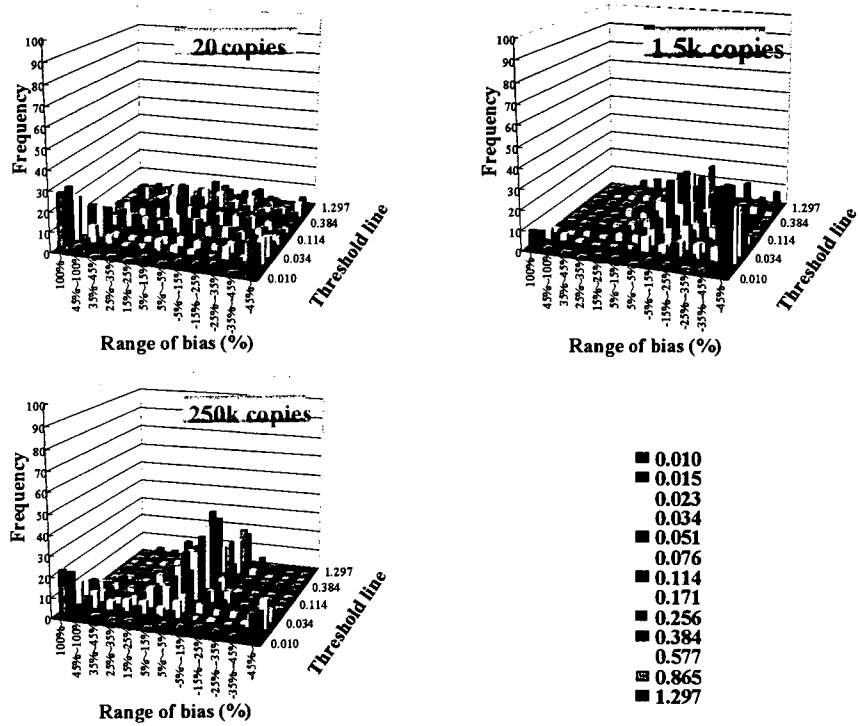


Fig. 10 外部精度管理試験調査により得られた検量線データの解析(その他)

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究

主任研究者 遠藤 明 (財)食品薬品安全センター 理事長  
分担研究者 渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部 主任研究官

研究要旨

平成19年10月17日に通知された食安輸発第1017004号により、魚類乾製品へのフグ混入検査が実施されている。本通知の別添2として示された分析法は、被検試料に含まれるDNAの特定領域を増幅後、増幅DNA断片の塩基配列を決定し、公的データベース等に登録された標本配列との相同性検索に供することにより、特定のフグ種を同定・鑑別するための方法である。生息海域等による変異といった特殊な場合を除き、被検試料より得られた塩基配列が標本配列と100%の相同性を有することをもって、特定のフグ種が同定される。しかし、生化学反応を基本原理とするDNA増幅および増幅DNA断片の塩基配列の決定過程には、得られる分析結果にエラーを生じる要因が含まれる。本研究では、上記分析法に含まれるエラーの主要因およびその大きさを明らかにし、その軽減のための改良および分析手順の規定、さらに分析結果に基づく判定のための基準策定を目的に検討を進めた。

その結果、水分含量の少ない試料からのDNA抽出を可能とする方法が開発され、その妥当性が確認された。また、特定DNA配列を増幅するためのPCRに含まれるエラーの大きさは、本分析法を構成する他の分析手順に比べて小さいと考えられた。増幅DNA断片の塩基配列を決定するための手順(ラベリング反応、シーケンスデータの採取およびそのトリミング)には大きなエラー要因が含まれていることが明らかになり、これを軽減するために分析法を改良し、手順を規定した。これら一試験室内での検討により得られた結果に基づき、本分析法によって得られる結果の判定基準を策定した。

本研究では、まず、一試験室により分析法を改良し分析手順を規定したうえで複数のフグ種を分析し、得られた分析結果に含まれるエラーの大きさを鑑みて判定基準を策定した。その後、一試験室内試験の結果に基づき作成した試験プロトコルに従い共同試験を実施することで、複数機関間での分析結果の一致の程度(機関透過性)について評価する。なお、本報告書は、上記研究内容の内、一試験室内試験までの結果を報告する中間報告である。

協力研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品部長  
協力研究者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部食品部第三室長  
協力研究者 石崎松一郎 東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科  
協力研究者 井部明広 東京都健康安全研究センター  
協力研究者 門間公夫 東京都健康安全研究センター  
協力研究者 田中之雄 大阪府立公衆衛生研究所  
協力研究者 吉光真人 大阪府立公衆衛生研究所

## A. 研究目的

昨今の食の安心・安全への関心の高まりと相反するかのように、基準に合致しない化学物質の残留や使用、期限あるいは原産地といった表示に関する不備、偽りの事例が後を絶たない。これら事例の事実確認は、提出資料の審査や記録の確認などの社会的検証法と共に、検疫所および地方自治体などによる輸入時また市場流通時におけるモニタリング検査といった科学的検証法によって行われる。検査が成立するための前提は、スコープの定められた分析法の使用であり、使用される分析法には、性能が評価され分析結果の判定基準が明示されているなど、その信頼性を確保することが求められる。つまり、食の安心・安全を確保する目的から検査が実施される場合、使用される分析法の信頼性が確保されていないなければならない。

フグに関しては、不適切な摂取や誤食が健康被害に直結するため、食品衛生法第4条に可食可能な魚種および部位が厳密に定められており、また混入が明らかになった場合には、有害な食品の採取、流通等を規制した食品衛生法の第6条に抵触することとなる。このため、フグを鑑別するための分析法を開発し、科学的検証法を整備することは、厚生労働行政上、非常に重要である。実際にも、平成19年10月17日には通知(食安輸発第1017004号)によりフグ鑑別試験法が公開され、魚類(カワハギ等)乾製品にフグを原材料とする製品が混入する問題に対応するべく、輸入時検査が実施されている。当該フグ鑑別試験法は、DNA配列の同定および比較を原理とする。本原理に基づく分析法は、フグ以外にも、肉種判別等に係る科学的検証法として開発され、運用され始めているが、信頼性確保の研究事例は国

内外を問わず少ない。特に、フグ鑑別試験法に関しては、分析結果の誤判定が健康被害につながる恐れが高いことから、十分な信頼性を確保することが必要である。

本研究においては、まず、食安輸発第1017004号により公開されたフグ鑑別試験法を一試験室内で評価し、エラー要因を特定した上で、それを軽減する目的から分析方法の改良を試みると共に、分析手順を規定した。さらに、分析結果の判定基準を策定した。次いで、一試験室内試験の結果に基づき作成した試験プロトコルに従い、共同試験を実施することで、複数機関間での分析結果の一致の程度(機関透過性)について評価した。なお、本報告書は、一試験室内試験の結果を報告する中間報告である。また、開発、評価された分析法は、特定の一魚種からなる単一の未加工原材料を対象とした方法である。原理的に、複数の魚種からなる混合原材料には適用できない。また、食品加工の影響については別途、評価が必要である。しかし、本文中でも考察するが、分析結果に含まれる主たるエラー要因は、増幅DNA断片の塩基配列決定のための分析手順に含まれており、基本的には、目的のDNA断片が増幅されるか否かが加工食品への適用可能性の指標となる。加工食品からのDNA抽出に適したDNA抽出法を分析手順として設定することにより、多くの加工食品への適用が可能になると考える。

## B. 研究方法

### B-1. DNA抽出法の改良

#### 1) 試料

DNA抽出法の改良を検討するため、多量に使用可能な試料として、インターネットを通じて購入したカワハギ、ナシフ

グ、シロサバフグ、トラフグの各種未加工食品を用いた。各魚試料は、食安輸発第 1017004 号により示された検査対象が魚類乾製品であることに加え、共同試験に供する試料としての均一性を担保する目的から、凍結乾燥した後に粉碎し、粉体試料として使用した。

## 2) DNA 抽出法の改良および評価

食安輸発第 1017004 号により示された DNA 抽出法の適用範囲を拡大することを目的とし、水分含量の低い被検試料からの DNA 抽出が可能となるよう抽出緩衝液等の液量を変更した。同時に、使用機器の制限を緩和することを目的に、試験条件を変更した。以下、改良法を示す。

均質化した調製試料 25 mg を 1.5 mL チューブに量り採り、あらかじめ 55°C に加温しておいた Buffer ATL 360  $\mu$ L と Proteinase K 溶液 (QIAGEN 社) 40  $\mu$ L を加える。その後、試料塊が残らないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、55°C で 3 時間加温する。その間、数回ボルテックスミキサーにより混合する。加温処理後、室温下、13,000G 以上の条件で 15 分間遠心分離し、上清を別の 1.5 mL チューブに移す。分取した上清に RNase A 溶液を 4  $\mu$ L 加えた後、ボルテックスミキサーで混合し、室温で 2 分間静置する。静置後、あらかじめ 55°C に加温しておいた Buffer AL 400  $\mu$ L を加えボルテックスミキサーで混合し、70°C で 10 分間加温する。ボルテックスミキサーで混合した後、エタノール (99.5% 以上) 400  $\mu$ L を加え、再度ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌し混合液を得る。次いで、混合液の半量を 2 mL collecting tube に設置した DNeasy Mini Spin column に負荷し、室温下 13,000G の条件で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。残りの半量について、同様の操作を行う。そ

の後、同 column に Buffer AW1 500  $\mu$ L を負荷し、室温下 13,000G の条件で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。同 column に Buffer AW2 500  $\mu$ L を負荷し、室温下 13,000G の条件で 10 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。新しい 1.5 mL チューブに column を移し、Buffer AE 200  $\mu$ L を負荷し室温で 5 分間静置した後、室温下 13,000G の条件で 1 分間遠心分離し、得られた溶液を DNA 試料原液とする。

得られた DNA 試料原液の吸光度を 200 nm から 320 nm の波長域で連続的に測定し、O.D.230 nm、260 nm、280 nm での吸光値から 260 nm/280 nm および 260 nm/230 nm の比を求めることで精製度の確認を行った。また、O.D.260 nm の吸光値 1 を 50 ng/mL DNA として DNA 濃度を算出した。

改良した DNA 抽出法の評価は、前述の 4 種の魚試料を用い、一試験室内、同一試験者により、1 日あたり各試料 2 点併行の抽出試験を 5 日繰り返すことにより行った。得られた結果の分散分析を行い、併行ならびに室内精度を算出した。

## B-2. 定性 PCR

各魚種を対象に、16S rRNA 遺伝子の特定領域を増幅するための定性 PCR は、プライマー対およびサーマルサイクラー条件を含め食安輸発第 1017004 号に従った。

## B-3. ラベリング反応およびシーケンシング

食安輸発第 1017004 号により示された 16S rRNA 遺伝子の特定領域を増幅するためのプライマー対 (16SarL; 5'-CGC CTG TTT ATC AAA AACAT-3' ならびに 16SbrH; 5'-CCG GTCTGA ACT CAG ATC ACG T-3') を用いた PCR により得られた増幅産物の

精製には、限外濾過膜タイプの精製カラム(Microcon YM-50)を用いた。精製後の PCR 増幅産物の吸光度を測定し、O.D.260 nm の吸光値 1 を 33 ng/mL DNA として PCR 増幅産物の濃度を算出した。

DNA の蛍光ラベル化(ラベリング反応)は、使用した DNA 配列解析装置(DNA シーケンサー; CEQ 8000 Beckman 社製)によって指定された試薬である DTCS クイックスタートキットを用いて行い、鋳型 DNA 濃度、サーマルサイクラー条件について検討した。反応液は、3.2 pmol のプライマーおよび検討量の鋳型 DNA を含み、DTCS クイックスタートキット付属の mater mix 8  $\mu$ L を加えた上で全量が 20  $\mu$ L となるよう滅菌蒸留水で調製した。

基本としたサーマルサイクラー条件は以下の通り。96°C 20 秒、50°C 20 秒、60°C 3 分を 1 サイクルとし、40 サイクル繰り返し。ラベリング反応後の産物は、機器付属のプロトコルに従い、エタノール沈殿法によって回収した。シーケンサーの分析条件は、機器付属のプロトコルに従った(CEQ8000 用セパレーションゲル、セパレーションバッファー、SLS サンプルローディングソリューション、およびキャピラリーアレイ 33-75B を用いた。泳動条件には、機器の基本設定である LFR-1 を使用した)。

#### B-4. シーケンスデータのトリミングおよび相同性検索

DNA シーケンサーにより自動決定された塩基配列データ(一次シーケンスデータ)の修正および、アライメントによる共通配列の決定には、遺伝情報処理ソフト GENETYX ver.9 を用いた。得られた共通配列(最終シーケンスデータ)は、インターネット上に公開されている DNA データベース(DNA Data Bank of

Japan; DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)を介し、BLAST 解析(blastn プログラム)による相同性検索に供した。また同時に、16SarL および 16SbrH のプライマー対によって増幅する DNA 領域の標本塩基配列を、26 種のフグを含む各魚種について採集し、GENETYX ver.9 上での相同性検索に供した。相同性検索の際には、まず連続した 6 bp の塩基の一致を指標とし、その上で GAP を考慮しない局所での一致率が最大となる解析条件を使用した。

#### B-5. 分析法および分析手順の適用可能性の評価

改良された分析法および、新たに規定した分析手順の他試料への適用可能性を評価する目的から、市場流通の規模および毒性、検索の対象となる DNA 配列の相同性の高さを勘案して選択した 6 種のフグ(トラフグ、カラスフグ、マフグ、シマフグ、シロサバフグ、クロサバフグ)および、陰性対象となるアンコウ、ウマヅラハギ、カワハギを対象とした試験を実施した。全ての試料は、東京海洋大学に保管されていた標本試料を用いた。

#### B-6. 判定基準の検討

相同性検索の結果明らかになった各フグ種および陰性試料間での塩基の一致率(相同性)および、分析結果に含まれるエラー(読み間違い塩基)の率を勘案し、誤判定を下す危険性の低い判定基準について検討した。なお、本分析法は、試験に供された検体が特定のフグ種であることを同定するための方法である。種内の一塩基置換多型や一部の種間を除き、原理的には 100%の塩基の相同性をもって特定のフグ種であると同定することができる。実際には、フグ種との塩基の相同性が一定以下の場合や、特定の魚種との相同性が 100%である場合

には、「フグ種ではない」あるいは、「100%の相同性を示した魚種である。あるいはその可能性が高い」と判断することが可能である。

#### C. D. 研究結果および考察

##### C. D. -1. DNA 抽出法の改良および評価

食安輸発第 1017004 号により示された DNA 抽出法に規定された量の凍結乾燥試料を試験に供した場合、試料が抽出用緩衝液によって十分に膨潤しなかった。試料が十分に膨潤せず、均一な細胞溶解液が得られないことにより、DNA 収量が安定しない事が考えられたため、抽出緩衝液 (Buffer ATL) 量を 360  $\mu$ L に変更し、この変更にあわせてその後添加される Buffer AL およびエタノール量を同じ比率で増加させた。

Proteinase K 溶液ならびに RNase A 溶液に関しては、これらの添加によって生じる酵素反応が十分に進行すると考え、また試験法のコスト増加を避ける目的からも、増量しなかった。さらに、加温処理後の遠心操作を、使用機器による制約を減らすことを目的に、13,000G に変更した。

変更後の条件に従い予備試験を実施した結果、質、量ともにその後の試験操作の実施に十分と判断される DNA が抽出されたことから、本法を改良 DNA 抽出法とした。

改良 DNA 抽出法の評価は、トラフグ、クサフグ、シロサバフグ、カワハギの 4 種の魚試料を用い、一試験室内で同一試験者が、1 日当たり 2 点の試料からの併行抽出を 5 日間繰り返すことによって行った。得られた DNA 収量について分散分析を行い、併行精度および室内精度を算出した。Table 1 に示したとおり、カワハギにおいて、室内精度が 40%を超え、

DNA 収量の日間変動が大きい結果ではあるが、これを除いた併行精度、室内精度は全試料を通じて 20%を下回っており、DNA 収量の安定性は良好であった。また、分析法および分析手順の適用可能性の評価において使用された 6 種のフグおよびカワハギ、ウマツラハギ、アンコウからも安定した量の DNA が抽出され、予測断片長に合致した PCR 増幅産物が大きな量的変動もなく得られた (Fig.1)。

本分析法においては、まず、ミトコンドリア DNA にコードされた 16S rRNA 遺伝子の特定領域を PCR により増幅する。次いで増幅された DNA 配列を決定し、標本塩基配列との一致の程度から特定フグ種を同定する。また、PCR によって増幅される DNA 領域は生物界に広く分布するため、検体が特定のフグ種でなくとも、増幅産物が得られる。このため、原理的に混合原材料を試験対象とすることはできない。また、試験結果は定性であり、単一原材料を対象とすることから、被検試料からの DNA 収量は大きな誤差要因とはならない。しかし、後述するラベリング反応に供する PCR 産物の量については、反応の正否に大きな影響を与えるため、注意が必要である。なお、本研究によって検討した DNA 抽出法は、未加工原材料を対象としている。強度の加熱や調味加工が施された加工食品からの DNA 抽出法については、食安発第 0622003 号 (平成 18 年 6 月 22 日)を参考にするなどし、別途検討が必要である。

##### C. D. -2. ラベリング反応およびシーケンシング

蛍光ラベル化された ddNTP を通常の dNTP と併せて基質とし、解析対象の塩基配列を含む DNA を鋳型に、単一プライマーを用いて DNA を繰り返し合成すると、プライマーが相補鎖を形成した単一鎖 DNA の塩基配列を反映して、末端が

蛍光ラベル化された種々の鎖長の DNA 断片が合成される。これを泳動により分離しつつ、蛍光を検出することにより、DNA 配列を決定することができる。これが DNA シーケンシング (DNA 配列決定) の概要であり、末端が蛍光ラベル化された種々の鎖長の DNA 断片の合成の過程を特にラベリングと呼ぶ。

フグ鑑別試験法においては、16SarL ならびに 16SbrH を用いた定性 PCR 中に起こる可能性のある取り込み塩基の誤りも、分析結果の誤差要因となり得るが、これに使用する DNA polymerase が、ミスマッチ修復型の酵素である Ex Taq であることから、その影響は小さいと考えられる。それに比べ、ラベリングは単一のプライマーのみを使用する反応であり、反応の正否を含めて分析結果への影響が大きい。特に、16SarL と 16SbrH の  $T_m$  値には  $10^{\circ}\text{C}$  ほどの差異があるため、各プライマーを使用したラベリング反応の条件を個別に検討することとした。ラベリング反応に影響を与える主要因として、鋳型 DNA 濃度およびアニーリング温度を想定し、最適化を試みた。なお、本試験法における鋳型 DNA は、PCR 増幅産物である。ラベリング反応の妨げとなるプライマー等の一本鎖 DNA の除去を目的に、食安輸発第 1017004 号には、ExoSAP-IT による酵素分解が指示されている。しかし、分解された dNTPs は反応溶液中に残存するため、吸光度に基づく PCR 増幅産物の濃度測定を行うことができない。本研究では、限外濾過膜タイプの精製カラム (Microcon YM-50) を用いて分子量により一本鎖 DNA 等を除去した後、PCR 増幅産物濃度を測定した。

トラフグより抽出した DNA を鋳型とし、PCR を実施することで一度に多量に調製した PCR 産物を精製後、ラベリング反

応の鋳型 DNA として使用し、一反応当たりの鋳型 DNA 量およびアニーリング温度について検討した。予備検討により、両プライマーの  $T_m$  値の差に起因すると考えられるが、同濃度の鋳型 DNA 量をラベリング反応に供した場合、Reverse プライマー (16SbrH) に比べ、Forward プライマー (16SarL) を用いた場合には十分なシーケンスデータが得られないことが明らかになった (結果は示していない)。そこで、使用した DNA シーケンサー (CEQ8000 Beckman 社製) に付属の反応プロトコルを参考に、鋳型 DNA 濃度について、16SarL を反応に用いる場合には、20、40、80 ng/reaction の 3 点、16SbrH を用いる場合には、5、10、20 ng/reaction の 3 点について検討した。

両プライマーの  $T_m$  値を考慮し、サーマルサイクラー条件のうち、アニーリング温度について、16SarL を用いる場合には、 $47^{\circ}\text{C}$  ならびに  $50^{\circ}\text{C}$ 、16SbrH を用いる場合には  $50^{\circ}\text{C}$  ならびに  $53^{\circ}\text{C}$  について検討した。

全ての条件下でのラベリング反応は 2 併行で実施した。Table 2 に示したとおり、シーケンスデータ取得の可否を判断条件にしても、16SbrH と 16SarL とでは、至適ラベリング条件が異なることが明らかとなった。つまり、16SarL を用いた場合には、 $T_m$  値からも予想されたとおり高アニーリング温度でのラベリング反応が進行しにくく、16SbrH を用いる場合に比べて、鋳型 DNA 量を増加させ、アニーリング温度を低めに設定すべきと考えられた。ただし、アニーリング温度を両プライマーのそれぞれに個別に設定してしまうと、反応を同時に行えなくなることから、共通して良好な結果が得られた  $50^{\circ}\text{C}$  を規定条件とした。それに対し、Table 2 に示した結果からは、16SarL を用いる場合には 80 ng/reaction、16SbrH を用いる場合

には20 ng/reactionを鋳型 DNAの規定量とすることが妥当であると考えられた。しかし、複数の魚種由来の PCR 増幅産物を用いたその後の検討により、16SarLを用いたラベリング反応に80 ngの鋳型 DNA を供した場合には、シーケンサーにより自動決定される塩基配列データ(後述する一次シーケンスデータ)として誤った塩基が決定される割合が高まることが観察され、これはラベリング反応によって生じる蛍光ラベル化 DNAの量が、シーケンサーの蛍光検出性能に比して過剰となることが原因であると推測された。ラベリング反応に供する PCR 増幅産物量を規定してなお、蛍光ラベル化 DNA 量に変動が生じる要因としては、本鑑別法の基礎を成す生物学上の差異でもあるが、PCR 増幅産物中の塩基配列が魚種に依存して変化することならびに、増幅産物の精製の程度や保存期間による安定性といった実験的要因の両方が考えられる。理想的には、後述するシーケンスデータのトリミングを通じて一次シーケンスデータの確からしさを判断し、最適なデータを取得することを目的に、個別の被検試料ごとにラベリング反応条件を検討することが望ましい。得られたシーケンスデータと標本塩基配列の相同性が100%であることを根拠に特定フグ種を同定するためには、シーケンスデータに実験によるエラーが含まれないことが絶対条件となる。しかし、常にこのエラーを減少させるべく、個別に最適な反応条件を検討することは実際的ではない。本研究においては、16SarL を用いて得られる蛍光ラベル化 DNA の量をシーケンサーの検出性能に適した量に減らすこと、試験法としての簡便性を増させること、および得られるシーケンスデータに含まれるエラーの大きさも考慮した判定基準を作成することについて総合的に判断し、ラベリング

反応に供する PCR 増幅産物の規定量を両プライマーに共通して20 ng/reaction とすることとし、他種魚種試料への適用可能性を評価した。

### C. D. -3. シーケンスデータのトリミングおよび相同性検索

シーケンサーによって自動決定される塩基配列データ(一次シーケンスデータ)には、DNA 合成および蛍光ラベル化された DNA 断片の分離および検出に起因するエラーが含まれている。このエラーを除き、データベース検索に供する最終データを得るための方法をシーケンスデータのトリミングと呼ぶ。トラフグから得られた一次シーケンスデータを一例に、トリミング方法を検討した。

一次シーケンスデータは、蛍光ラベル化した様々な長さの DNA 断片を電気泳動により分離しつつ検出し、その結果得られた波形データに基づき決定される。この際、DNA 断片の分離、同一長の DNA 断片に由来する蛍光の強度等の影響により、正確に決定されない場合がある。特に、短い DNA 断片の検出に伴う塩基配列の決定(シーケンスの読み始め)と、長い DNA 断片の検出に伴う塩基配列の決定(シーケンスの読み終わり)は不正確となる。

16SbrH と 16SarL により得られる PCR 増幅産物の大きさは、フグの種間で若干の差が認められるが、およそ610bp程である。試薬や手順に問題がなく試験が行われた場合には、この PCR 増幅産物を鋳型 DNA とし、16SbrH ならびに16SarL のそれぞれのプライマーを用いることで、500bp 以上の一次シーケンスデータが得られる。しかし、前述のとおり、一次シーケンスデータのうち、読み始めと読み終わりのデータは不正確であり、まずこれを除く事を目的に、500 bp 以降のデータを削除し、残った500 bp の塩基



配列のうち、1~50 bp までを次いで削除した。この操作により得られた 450 bp のシーケンスデータ(二次シーケンスデータ)をアライメントに用いた。アライメントとは、複数のシーケンスデータを比較し、その一致率に基づき共通配列を決定するための解析である。特定の DNA 配列を決定する場合には、対象とする二本差 DNA の両鎖からそれぞれシーケンスデータを得た上で、通常、遺伝子であれば翻訳される鎖についての共通配列を決定する(この場合、非翻訳鎖は相補鎖に変換した後アライメントに供する)。本分析法の場合には、16SbrH ならびに 16SarL のそれぞれを用いて得られるシーケンスデータがそれに該当する。アライメントに際しては、二次シーケンスデータに含まれるエラーにより、誤った共通配列を決定しないための方策として、プライマーごとに 2 つずつ、計 4 つの二次シーケンスデータを解析に供し、3 データ以上の一致をもって塩基を決定した。(他の 3 データに一致しない塩基の挿入が認められた場合は、削除した)。先の検討結果に基づき規定したラベリング反応条件下で、16SbrH および 16SarL のそれぞれを用いて得られた二次シーケンスデータのアライメント結果を Fig.2 に示した(図中では、削除した塩基を丸で囲み、3 データの一致によって選択した塩基をカラム上部に書き出した)。アライメントの結果、共通配列として 446 bp が決定され、これを最終シーケンスデータとして同一性検索に供した。

DDBJ を介して BLAST 検索した結果、*Takifugu rubripes* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GenBank アクセション番号 AY679677) として登録されている DNA 配列との間に 100% (446/446 bp) の同一性が確認された。その他にも *T. rubripes* 16S ribosomal RNA gene に

関する DNA 塩基配列が複数登録されているため、それらについても同じ同一性で検索された。同一の DNA 配列に関する複数の登録を除くと、*T. porphyreus* (マフグ) mitochondrial gene for 16S rRNA (GenBank アクセション番号 AB199323) との同一性が次いで高く、99% (444/446 bp) であった。また、26 種のフグから採集された 16SarL および 16SbrH のプライマー対によって増幅する DNA 領域の標本塩基配列を対象に、GENETYX ver.9 上で同一性検索を実施することでも同じ結果が得られた。これらの結果から、検討したシーケンスデータのトリミング方法を用いることにより、十分に精査された最終シーケンスデータを得ることが可能であり、それに 100% の同一性を示す標本配列が検索された場合には、十分な正当性をもって被検試料を同定できると考えられた。ただし、本結果はトラフグについて得られたものである。

#### C. D. -4. 分析法および分析手順の適用可能性の評価

先にも述べたとおり、被検試料となる各魚種の全てについて、得られる一次シーケンスデータに含まれるエラーが等しく最小となるようにラベリング反応の条件を最適化することは、試験法の実行性上不可能である。そこで、本研究において規定したラベリング反応条件および一次シーケンスデータの解析方法の適用可能性について、トラフグ以外のフグ種 6 種および陰性試料となる 3 種の魚種を用いて検討した。その結果、全ての被検試料から一次シーケンスデータが得られた。また、Fig.3 にその一例を示したが、アライメントを明らかに不正確にするような二次シーケンスデータは得られなかった。さらに、最終シーケンスデータの BLAST 検索および遺伝情報処理ソフト上で標本配列を用いて行った同一性検索の結果

をTable 3に示した。その結果、トラフグ、およびカワハギについては、最終シーケンスデータ(それぞれの塩基数は、トラフグが446 bp、カワハギが441 bp)に100%の同一性を有するDNA配列がGenBank上に登録されており、それらが検索されたことにより、被検試料をトラフグおよびカワハギと同一化できると考えられた。シマフグに関しては、GenBank上では一塩基置換のため99%の同一性を有する配列として検索されたが、シマフグ標本配列との同一性が100%(446/446 bp)であったことから、被検試料をシマフグとして同一化できると考えられた。また、カワハギについては標本配列との同一性検索の結果としても示されているとおり、各フグ種に含まれる該当DNA配列との同一性は、85%以下と低く、十分に低い同一性を判定基準とした場合にも、カワハギをフグ種として同一化する誤判定のリスクは低いと考えられた。しかし一方で、マフグやシロサバフグに観察されたように、最終シーケンスデータに実験的なエラーは含まれていないと考えられるものの、同一性検索に供したDNA配列中には他のフグ種との間に差が認められず、特定のフグ種として同一化することが不可能な場合があることも明らかになった。アンコウならびにウマヅラハギについては、GenBank上に登録されておらずまた標本配列も採取していなかったために、同一性に基づく同一化ができなかったが、少なくとも他の魚種と誤って同一化されることはなく、また各フグ種の該当DNA配列との同一性は85%以下であった。カラスフグに関しては、カラスフグ標本配列との同一性が99%(446/448 bp)であったため、最終シーケンスデータに実験的なエラーが含まれており、特定フグ種として同一化することはできないと考えられた。

以上の結果から、本分析法に規定さ

れた実験条件およびデータ解析条件に従うことにより、1)100%の同一性を有するDNA配列が一魚種についてのみ検索された場合には、被検試料を当該魚種として同一化することが可能であること、2)複数の魚種から100%の同一性を有するDNA配列が検索された場合には、そのいずれかの魚種であっても特定魚種の同一化には至らないこと、3)100%の同一性を有するDNA配列が検索されない場合には、最終シーケンスデータに実験的なエラーが含まれていると考えられ、なお同一化が必要な場合にはさらにシーケンスデータを精査することが必要なこと、4)100%の同一性を有するDNA配列が検索されずかつ、検索されたDNA配列の同一性が一定以下である結果に基づき、特定魚種ではないと判定可能な場合があることが示された。1~3)に関しては、被検試料由来の当該DNA配列がGenBankに登録されているあるいは採取されており、それらには誤りが含まれていないことを前提としている。また、4)については、本研究で検討したカワハギ、アンコウ、およびウマヅラハギと各フグ種との比較および、各フグ種間の比較結果に基づいて考えれば、90%以下の同一性を判断基準とすることによって、先に挙げた3魚種を少なくともフグ種と誤判定することはないと考える。

## E. 結論

食安輸発第 1017004 号により示されたフグ鑑別試験法の適用拡大を目的に、より頑健性の高い改良 DNA 抽出法を開発し、評価した。また、同一性検索に供される最終シーケンスデータを得るためのラベリング反応条件およびデータトリミング方法を確立し、3 種の陰性試料ならびに 6 種のフグ種への適用可能性について検討した。その結果、改良 DNA 抽

出法を用いることにより、多種の魚凍結乾燥試料から安定した収量で DNA を抽出可能であることが示された。また、確立されたラベリング反応条件を用いることにより、アライメントに支障を来すことのない一次シーケンスデータが得られることが示された。

さらに、最終シーケンスデータを相同性検索に供して得られた結果から、一次シーケンスデータのトリミング方法の妥当性が示された。本研究に用いた、3 種の陰性試料および 6 種のフグ種試料から得られた結果に基づき、フグ種鑑別に係る判定基準が以下のとおり提案された。

1) 100%の相同性を有する DNA 配列が一魚種についてのみ検索された場合には、被検試料を当該魚種として同定する。

2) 複数の魚種から 100%の相同性を有する DNA 配列が検索された場合には、そのいずれかの魚種であっても特定魚種であると同定することはできない。

3) 100%の相同性を有する DNA 配列が検索されない場合には、最終シーケンスデータに実験的なエラーが含まれていると考えられ、なお同定が必要な場合にはさらにシーケンスデータを精査する。

4) 100%の相同性を有する DNA 配列が検索されずかつ、検索された DNA 配列の相同性が一定以下である結果に基づき、特定魚種ではないとする。

なお、本判定基準は、被検試料由来の当該 DNA 配列が GenBank に登録されているあるいは採取されており、それらには誤りが含まれていないことを前提としているため、未登録の DNA 配列については分析者による採取、ひいては登録をすることにより、判定精度を高めるための努力が必要である。

現在、より多数のフグ種、および他機種シーケンサーへの適用可能性につい

て検討を進めている。さらに、それらの結果に基づき策定した共同試験プロトコルに従い、2 機関による分析法の妥当性評価試験を計画している。

#### 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

なし

#### 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

カワハギ

	Yield of DNA (ng/ uL)						
	1st day	2nd day	3rd day	4th day	5th day		
sample A	23.1	25.2	14.2	19.5	6.3	併行精度RSD%	8.9
sample B	25.2	27.3	15.3	15.9	7.9	室内精度RSD%	43.1

ナシフグ

	Yield of DNA (ng/ uL)						
	1st day	2nd day	3rd day	4th day	5th day		
sample A	32.6	29.5	20.0	27.3	16.9	併行精度RSD%	9.4
sample B	30.3	25.6	22.4	29.1	22.2	室内精度RSD%	20.7

シロサバフグ

	Yield of DNA (ng/ uL)						
	1st day	2nd day	3rd day	4th day	5th day		
sample A	47.0	42.0	38.1	40.2	40.3	併行精度RSD%	5.4
sample B	46.0	42.7	35.9	44.2	35.2	室内精度RSD%	10.2

トラフグ

	Yield of DNA (ng/ uL)						
	1st day	2nd day	3rd day	4th day	5th day		
sample A	42.9	40.5	42.2	38.9	34.5	併行精度RSD%	16.2
sample B	41.7	60.2	36.3	37.6	39.1	室内精度RSD%	17.3

Table 1. 改良DNA抽出法の評価結果

Forward		annealing temperature(°C)	
		47	50
template	20	○	×
DNA	40	◎	×
(ng/reaction)	80	◎	◎

Reverse		annealing temperature(°C)	
		50	53
template	5	×	◎
DNA	10	◎	○
(ng/reaction)	20	◎	◎

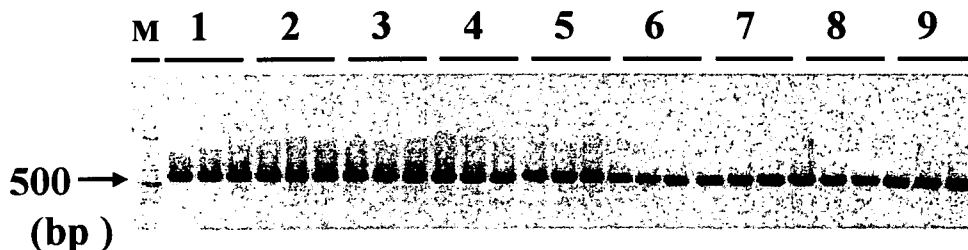
鋳型DNA溶液は全ての試験を通じて同じ  
全ての反応は2併行で実施

- ×
  - 
  - ◎
- 2併行した両サンプル共にシーケンスデータが得られず  
2併行したうちの1サンプルからシーケンスデータが得られず  
2併行した両サンプルともシーケンスデータが得られた

Table 2. ラベリング反応条件の最適化

試料	最終シーケンスデータ(塩基数: bp)	DDBJ			own sequences	
		相同性順位 魚種(和名)	GenBank アクセッション番号	塩基一致率(%)	相同性順位 魚種	塩基一致率(%)
アンコウ	445	1 <i>Lophus americanus</i> (アメリカアンコウ) 2 <i>Lophus bulegassai</i> (キアンコウ) 3 <i>Lophus piscatorius</i> (ニシアンコウ)	AP004414 AY368305 AY368305	430445 (96%) 372786 (94%) 370395 (96%)	1 ウチワフグ 2 モヨウフグ 3 ヨゴレフグ	385 / 449 (86%) 385 / 449 (86%) 382 / 449 (85%)
カラスフグ	448	1 <i>Takifugu rubripes</i> (トラフグ) 2 <i>Takifugu fasciatus</i> 3 <i>Takifugu porphyreus</i> (マフグ)	AY679677 EU346762 AB199223	446448 (99%) 444448 (99%) 444448 (99%)	1 トラフグ 2 カラスフグ 3 マフグ	446 / 448 (99%) 445 / 448 (99%) 444 / 448 (99%)
カワハギ	441	1 <i>Stephanolepis cirratifer</i> (カワハギ) 2 <i>Monacanthus hispidus</i> 3 <i>Monacanthus ciliatus</i> (ウチワハギ)	AP002932 AY679642 AY679648	441441 (100%) 440441 (99%) 440441 (99%)	1 カワハギ 2 ウチワフグ 3 ヒガンフグ	441 / 441 (100%) 370 / 440 (84%) 373 / 442 (84%)
クロサバフグ	438	1 <i>Lagoccephalus levigatus</i> (シロカナフグ) 2 <i>Tetraodon nigrovittatus</i> (ミドリフグ) 3 <i>Tetraodon fluviatilis</i> (グリーン・バファーン)	AY679679 DQ019313 AY679669	429439 (97%) 394440 (89%) 394440 (89%)	1 クロサバフグ 2 クマサカフグ 3 ドクサバフグ	437 / 438 (99%) 431 / 438 (98%) 429 / 438 (97%)
マフグ	417	1 <i>Takifugu fasciatus</i> 2 <i>Takifugu porphyreus</i> (マフグ) 3 <i>Takifugu obscurus</i> (メフグ)	EU346762 AB199223 AB199222	417417 (100%) 417417 (100%) 417417 (100%)	1 マフグ 2 シマフグ 3 トラフグ	417 / 417 (100%) 415 / 417 (99%) 415 / 417 (99%)
シマフグ	446	1 <i>Takifugu pardalis</i> (ヒガンフグ) 2 <i>Takifugu xanthopterus</i> (シマフグ) 3 <i>Takifugu fasciatus</i>	AB199220 AF138536 EU346762	445446 (99%) 446447 (99%) 444446 (99%)	1 シマフグ 2 ヒガンフグ 3 ショウサイフグ	446 / 446 (100%) 445 / 446 (99%) 445 / 446 (99%)
シロサバフグ	443	1 <i>Lagoccephalus levigatus</i> (シロカナフグ) 2 <i>Tetraodon nigrovittatus</i> (ミドリフグ) 3 <i>Tetraodon fluviatilis</i> (グリーン・バファーン)	AY679679 DQ019313 AY679669	433444 (97%) 401445 (90%) 401445 (90%)	1 ハコフグ 2 コモンフグ 3 シロサバフグ	443 / 443 (100%) 443 / 443 (100%) 443 / 443 (100%)
トラフグ	446	1 <i>Takifugu rubripes</i> (トラフグ) 2 <i>Takifugu fasciatus</i> 3 <i>Takifugu porphyreus</i> (マフグ)	AY679677 EU346762 AB199223	446446 (100%) 443446 (99%) 443446 (99%)	1 トラフグ 2 カラスフグ 3 マフグ	446 / 446 (100%) 444 / 446 (99%) 443 / 446 (99%)
ウマヅラハギ	450	1 <i>Nelusetta ayraudi</i> 2 <i>Muschenilla trachylepis</i> (イエローフインドレザーマケット) 3 <i>Cantharhinus pufus</i> (オレンジスポッテイドファイルフィッシュ)	AY679654 AY679652 AY679647	433450 (96%) 432451 (95%) 427452 (94%)	1 カワハギ 2 アカマフグ 3 ドクサバフグ	407 / 450 (90%) 379 / 451 (84%) 380 / 450 (84%)

Table 3. 相同性検索結果



Lane M; DNA size standard marker (100 bp ladder marker), sample 1; torafugu, sample 2; karasufugu, sample 3; mafugu, sample 4; shimafugu, sample 5; shirosabafugu, sample 6; kurosabafugu, sample 7; umadurahagi, sample 8; kawahagi, sample 9; ankou.

Figure 1. 定性PCR結果

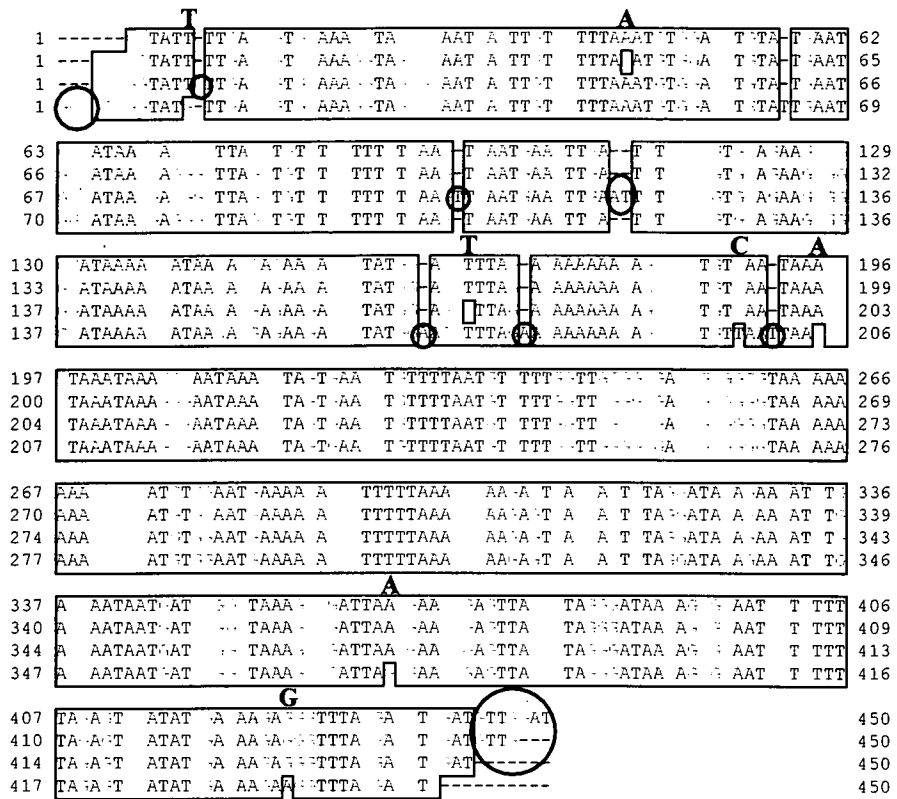
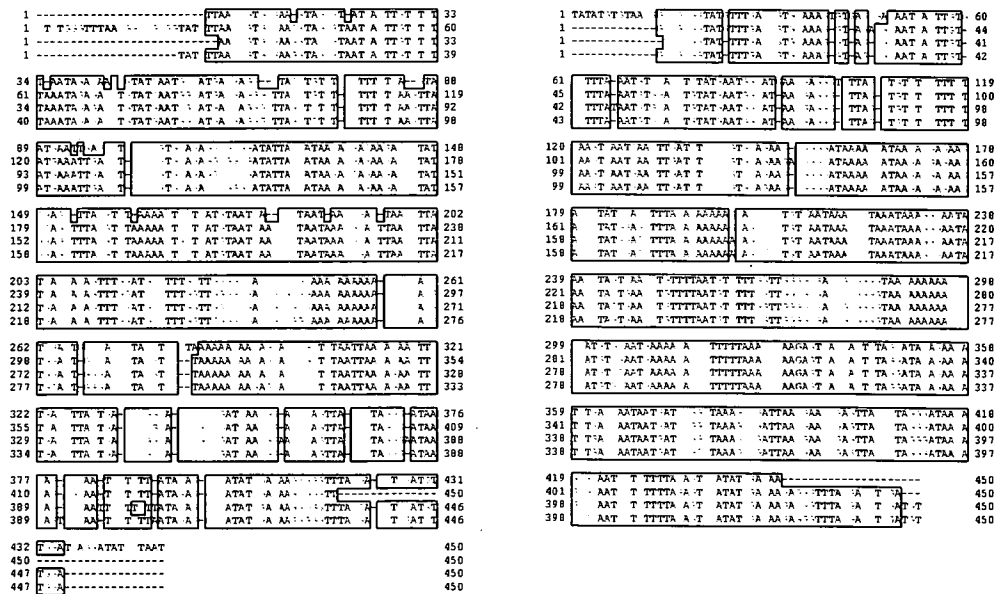


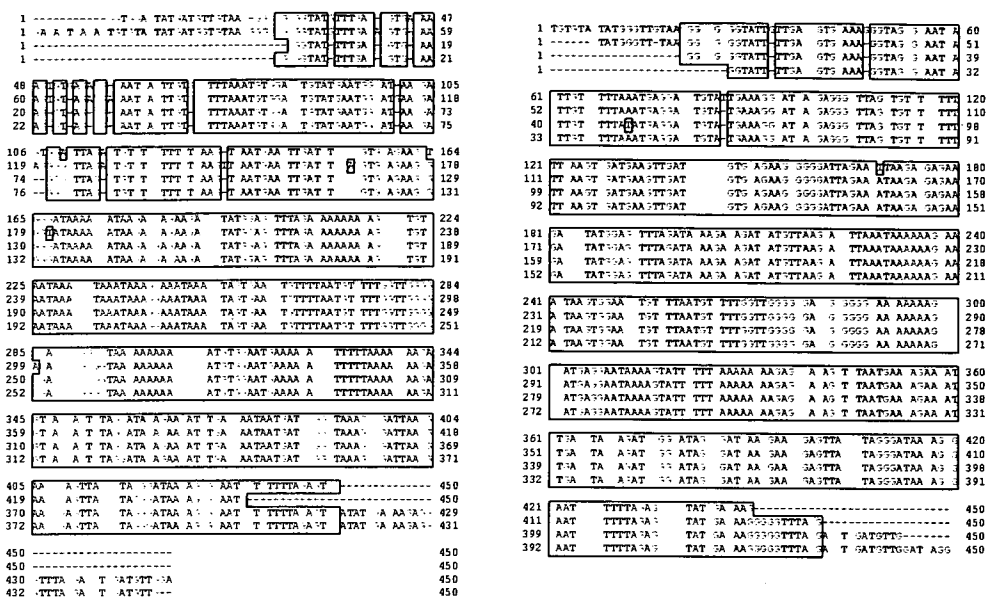
Figure 2. シーケンスデータトリミングの一例



A. カワハギ

B. カラスフグ

Figure 3. 二次シーケンスデータアライメントの一例



C.マフグ

D.クロサバフグ

Figure 3. 二次シーケンスデータアライメントの一例(続き)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 19 年度 分担研究報告書

貝毒検査の外部精度管理用適正調査試料の作製  
と信頼性確保に関する研究

分担研究者 町井 研士



厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書(平成 19 年度分)

貝毒検査の外部精度管理適正試料の作製と信頼性確保に関する研究

主任研究者 遠藤 明 (財)食品薬品安全センター 理事長  
分担研究者 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 室長  
協力研究者 大島 赴夫 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 食品衛生事業部長  
川崎 勝 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

下痢性貝毒調査用試料として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸をホタテホモジネートに添付する方法を検討しているが、吸着オカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中等に本来の力価が失われる可能性が危惧された。また、外部精度管理調査を多数の検査施設に対して行う上での問題点の確認、ノウハウの蓄積が望まれている。そこで、蛍光 HPLC 法によるオカダ酸の測定を用い、濾紙吸着オカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温条件で調査し、冷蔵及び冷凍条件下では 3 週間程度なら比較的安定であることが明らかになり、外部精度管理用サンプルとして使用の可能性が示唆されたがオカダ酸の安定性が危惧された。そこで今年度はオカダ酸の保存条件の検討と加熱に対する耐性を調査して、オカダ酸の安定保存の基礎データを得る事とした。

遮光バイアルにアセトン溶液で密栓又は吸着したオカダ酸は冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも 6 ヶ月間安定であることが昨年度までに明らかとなり、今年度は 60 週経過後は HPLC レベルでは 10~20%程度の回収率の減少傾向が観察されたが、マウスアッセイの結果力価は残存していることが明らかとなった。一方、オカダ酸は加熱処理により回収率の低下を招くが、通常の外部精度管理における輸送、分析操作で負荷されると予想される程度の熱に対しては安定である事が明らかとなった。更に熱以外にも実験中にかかる想定される負荷として、超音波、UV 照射、マイクロウエーブ波による暴露を予想して、検討したところほとんど影響を受けない事が判明した。以上の結果よりオカダ酸が遮光バイアル中で比較的安定保存できる事が判明したので、今後のリファレンスマテリアル作製に大きく寄与すると考えられる。しかし、昨年度までに濾紙に吸着したオカダ酸の回収率の経時的低下傾向が観察されたので、今後はオカダ酸の熱分解以外の要因(濾紙への吸着等)も考慮に入れて今後は精度管理用リファレンスマテリアルの作製を検討しなければならないことが明らかとなった。また、今回加熱時間と温度の相関に関する基礎的知見、超音波、UV、マイクロウエーブ波による暴露による基礎的データが得られたので、今後オカダ酸の回収率低下の予測の可能性が示唆された。

生鮮海産物ホモジネートを多数の検査機関に配布した時の問題点の基礎的検討をするために実際に小型電動式ミンチ機と圧搾空気を動力源とする半流動動物用充填機を用いて貝ホモジネートを作製し、信頼のおける 7 機関と当研究所の合計 8 機関で各 n=5 ずつ貝毒検査を行い問題点の確認を行った。今後は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。

## 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、微生物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。そこで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製から始める事とした。

下痢性貝毒の主要原因物質としてオカダ酸(OA)が挙げられる。外部精度管理用の下痢性貝毒検査試料(リファレンスマテリアル)作製に於いて、リファレンスマテリアルを安定して供給するためには、現状では生鮮サンプルと混和せず市販のOAを毒性が出ると予想される濃度で別に添付する方法が最適であると考えている。しかし、その際に生じる問題点として、OAが保存中、輸送中、精製操作中等に本来の力価が失われる可能性が危惧される。そこでOAの外部精度管理調査実施時に安定して供給するための基礎的データを得るために、そこでOAの安定性(回収率)を様々な保存条件下、経時的に追跡調査を継続して実施した。更にOAの熱に対する耐性を検討するために加熱試験を行った。加えて、熱負荷以外にも、超音波、UV照射、マイクロウェーブ照射による暴露が想定され、これらの暴露下に於けるOA

の挙動の基礎的データを得ることを目的として予備調査を実施した。

## B. 研究方法

### 1) 下痢性貝毒検査調査

下痢性貝毒については公定法の安元バイオアッセイ法<sup>1~2)</sup>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和光純薬製OA標準品をバイアル底に附着又は、濾紙ディスクに吸着後バイアルに密封した、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バイアルに附着したOAの有無ないし濾紙ディスクに吸着したOAの有無による。濾紙ディスク法では、バイアル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) 濾紙吸着OAの蛍光HPLCによるOA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：アセトンとは和光純薬製の試薬特級品を用いた。MeOH、MeCN、は和光純薬製 HPLCグレードを用いた。CHCl<sub>3</sub> 5000は和光純薬製を用いた。

OA標準品：Okadaic acidは和光純薬製生化学用を用いた。

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CHCl<sub>3</sub>に溶解した。

#### 2-b) OA吸着濾紙ディスクの作製

OA標準品をアセトンに溶解し、φ 13 mmの Whatman AA disc又は東洋濾紙製抗生物質検

定用ペーパーディスク厚手8 mmに各添加濃度になるよう添加量を調製して添着後風乾した。OA吸着濾紙ディスクは1.5 mL容遮光バイアルに密封保管した。

#### 2-c) 蛍光 (ADAM) 誘導体化

蛍光誘導体用のOA画分を濃縮乾涸後最小量のアセトンでバイアルへ移行後内部標準物質100  $\mu$ Lを加えて窒素気流中で乾涸する。残渣にADAM試薬100  $\mu$ Lを添加し、常温、遮光下で3時間反応してHPLC用のサンプルとした。

#### 2-d) 機器類

ポンプ: 東洋曹達工業製CCPMグラジェントポンプと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 $\times$ 4.6 mm ID)を用いた。

移動相: A (MeCN-MeOH-H<sub>2</sub>O, 8:1:1, v/v/v)とB (MeOH)。溶出条件は流速1.1 mL/minで室温下グラジェント溶出を行った。グラジェント条件は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  $\mu$ 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で補正後ピーク高法により行い、検量線は最小二乗法により行った。

#### 3) 冷凍、冷蔵及び室温条件下での遮光バイアル中のOAの回収率の経時変化

OAの保存: OAをバイアル中に溶液保存するサンプルは250  $\mu$ L容硝子インサートにOAア

セトン溶液40  $\mu$ L (OA量として10  $\mu$ g)を分注しバイアル中に密栓保存した。OAのバイアルまたは濾紙ディスクへの吸着は、同溶液40  $\mu$ Lを、1.5 mL容バイアルおよび濾紙ディスクに添着後風乾した。さらに濾紙ディスクは1.5 mL容バイアルに密栓保管した。バイアル中に保存したOAは直接ADAM化を行った。

ADAM試薬による蛍光HPLC法: Lee (1)らの方法を一部改良して行った。

OAの回収率の経時変化の測定頻度: 0日、1週、2週、3週、4週、6週、12週、24週および60週にn=5で行った。

測定データの解析: 各データをJUSE-QCUSにより統計解析を行い、箱髭図を比較した。

#### 4) OAの加熱処理

OAの加熱処理はヒーティングブロック内にバイアルを静置した。温度は50 $^{\circ}$ C~150 $^{\circ}$ C、加熱処理時間は48時間以内で、n=5で回収率を求めた。

#### 5) OAの超音波処理

OAの超音波処理は、OAをバイアル底部に付着後、水を適宜入れたプリンカップ中に置き、さらにプリンカップを超音波洗浄器中に静置して、60 min 超音波処理を行った。

#### 6) OAのUV照射

OAをバイアル底部に付着後、ペーパークロマトグラフィー用のUV検出器を用いて、UVを直接照射した。照射距離は約10 cmである。照射時間は、6時間と24時間検討した。

#### 7) OAのマイクロウェーブ処理

OAをバイアル底部に付着後、家庭用電子レンジで加熱処理した。処理時間は700 Wで15分である。

8) 測定データの解析: 各データをJUSE-QCUSにより統計処理を行い箱髭図を

比較した。

9) 下痢性貝毒検査外部精度管理用試料大量作製法の検討および検査件数が多い7機関への実試料配布と検査結果の検討

9-1) 貝の細切物(貝ホモジネート)作製及び配布用袋への充填

貝試料:青森県内のホタテ処理業者より、貝柱を除去した残りの部位を取り寄せ、良く洗浄した。手動式小型挽肉器:100 V電源、電動式のミンチ機[(株)なんつね:MS-12B]を使用した。

精度管理用試料ホモジネート:半解凍状態の貝材料を短時間にミンチにした。圧搾空気を動力源とする半流動動物用の充填機[充填機本体;(株)荒畑製作所、ESM-DX/エアコンプレッサー;リョービ販売(株)、ACP-50]の導入を試みた所、袋の口が汚れる問題は解消し、充填量の誤差も少なく、非常に効率良く充填作業を進めることが出来た。

9-2) 下痢性貝毒検査件数の多い機関の試験室による同一ロット試料の性能調査(Table A)

試験協力各機関へは、陰性試料、陽性試料各1検体を、昨年度と同様に、陽性試料は、小径ろ紙( $\phi$  13 mm)に一定量のOAを含浸、乾燥させたものを小型バイアルビンに入れ、マウスバイオアッセイ(MBA)により下痢性貝毒陰性と判断できた貝ホモジネートに同梱し、また、陰性試料として、OAを含浸しないろ紙を上記陽性試料と同形態で同時に試験協力施設へ発送する方式を踏襲した。各試料は、送付機関ごとに乱数表を用いて陰性、及び陽性試料に試料番号を割り当てた。また、添加毒素量は、確実にマウスが死亡する量、即ち、120 gの貝ホモジネート(マウス6匹分の注射液ができる)当たりOAを96  $\mu$ gとした。試験結果の判定は、食品衛生検査指針に則り、20 g未満のマウス3匹

に腹腔内注射の後24時間以内の死亡が2匹以上陽性とするものとした。

#### C. D. 結果及び考察

1) 下痢性貝毒検査調査の概略

下痢性貝毒の陽性サンプルの作製は公定法の安元バイオアッセイ法<sup>1~2)</sup>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OAの標準品を別添する。添加法としてはOAをバイアル底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つの添加法が考えられるが、昨年までの検討により、現在は濾紙ディスク法を採用している。濾紙ディスク法は、一定量のOAアセトン溶液を濾紙ディスクに添着後風乾してバイアル中に密栓する。陰性サンプルは濾紙ディスクをそのまま用いる。各検査施設は検査に先立ち濾紙ディスクをバイアル中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、MBAで毒性の有無を確認後各検査施設に冷凍輸送する。確認試験の結果によりOAの量を適宜加減することもある。

現在問題となることが予想される下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、濾紙ディスクに吸着させたOAはどの条件でも作製後3週間程度は安定である事は確認したが(図1-1~3)その後は徐々に回収率の低下が観察された。保存中、輸送中、精製操作中に本来の力価が失われる可能性が危惧される。そこでそれらの問題を解決するための基礎的データを得るために、OAの①保存条件の検討と②温度に対する安定性③OAが暴露する可能性として、超音波、電子レンジ、UV照射を考え、その暴露下に於けるOAの挙動の3点について基礎的検討した。