

C. 研究結果

1) プラスミド導入量の検討

まず、プラスミドの導入量を3.25mg/シャーレおよび7mg/シャーレの2用量設定し、陽性化合物3-メチルコランズレン (3-MC) を用いて検討した。期待に反し、むしろ導入量の少ない3.25mg/シャーレの方が応答が強かった (図2)。今回はリポフェクトアミン量を34.86 μ l/dishとしたが、遺伝子導入の際に死細胞の割合が多く、細胞へのダメージが強かったため以降は量を減らして30 μ l/100万細胞/シャーレに条件を変更した。

2) 化合物曝露時間の影響

エストロゲンレセプターなどでは化合物の曝露時間を約40時間で実施しているの、24時間および40時間の2種類の曝露時間でそれぞれのルシフェラーゼ活性を比較した (図3)。その結果、曝露時間は24時間の方が活性が高いということが明らかとなった。

3) 細胞継代数の影響

これまで細胞継代数が8回を越えた細胞を用いると顕著に活性が落ちていく現象がみとめられた。そこで、同時に継代数1 (起眠させたばかりの新しい細胞) と継代数11 (8回目で活性が落ちた細胞をそのまま継代して使用) の両者を同じ条件下で遺伝子導入を行い、3-MC (5 μ M \sim 1nM) を用いてそれぞれのルシフェラーゼ活性を比較した (図4)。その結果、継代数の多い (古い) 細胞は新しい細胞より活性が低くなったため、継代数が8回を越えた細胞はアッセイに適さないことが明らかになった。

4) ダイオキシン類の応答曲線

これまでに検討した条件下で、ダイオキシン/フラン類 (1,3,6,8-TCDD, 2,3,7,8-TCDD, 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PCDD, 1,2,3,7,8-PCDF, 2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,6,7,8-HCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HCDF) の標準液を用いてAhレセプターアッセイを行い、各化合物のAhレセプターに対する作用を調べた (図5)。これらの標準液はTEFが定まっているものの中からTEF値が高いものと、環境サンプル中に多く含まれるものから入手可能なものを選定し、溶媒をDMSOに置換してアッセイに供した。各ダイオキシン/フラン類のうち、TEFの定まっているものについては500nM \sim 1pMの濃度範囲 (2,3,7,8-TCDDの場合は1.6nM \sim 16fM) で応答がピークに達した。

応答曲線の片対数グラフよりEC₅₀値をもとめ、それらのEC₅₀値で同様に得られた2,3,7,8-TCDDのEC₅₀値を除することによってAhレセプターアッセイの結果より得られる毒性等価係数 (EC₅₀ (2,3,7,8-TCDD)/EC₅₀ (sample)) が求められる (表2)。その結果、最新の再評価されたTEF値 (WHO, 1997) より2 \sim 4倍高い化合物も存在したが、ほぼ近い値が得られた。

D. 考察

2,3,7,8-TCDDの用量応答曲線より、培地中濃度1.6pMから16pMの間で溶媒 (DMSO) 対照 (バックグラウンド) の2倍以上の応答がみとめられることから、およその検出限界 (S/N=2とした場合) は2pM付近と推測される。該低濃度領域の測定点を増やしてより正確な

検出限界をもとめることが必要である。また、今回TEF値の算出等、定量的取り扱いには EC_{50} 値に基づいたが、低濃度域での一次回帰、比較的広い濃度範囲における逆数プロット解析、片対数での一次回帰など適切な線形解析を取り入れて定量的解析法を検討する必要がある。

今回、10種の同族体単品についてルシフェラーゼアッセイ法による測定を行ったが、同族体の混合物の場合について、相加的・相乗的・阻害のいずれなのかを今後検討する必要がある。また、本ルシフェラーゼアッセイを実際の試料（例えば母乳等）測定に応用するためには適切な抽出・前処理法の開発が今後の検討課題である。

E. 結論

一過性発現系におけるルシフェラーゼアッセイ法により各種ダイオキシン類同族体単品の検出が可能であることが示された。それらの用量応答曲線から EC_{50} 値をもとめ、2,3,7,8-TCDDに対する相対活性、すなわちTEF値を計算した結果、再評価されたTEF値（WHO, 1997）とほぼ近い値が得られ、本測定法の有用性が示唆された。

F. 研究業績

なし。

表1 Ahレセプターノックアウトマウスを用いたダイオキシン類の毒性研究

	野生型 (+/+) またはヘテロ (+/-) マウス	ノックアウト (KO、-/-) マウス
1. 急性毒性 (TCDD 単回腹腔内投与) ¹⁾	200 μg/kg : 胸腺 : 重量減少 (皮質の退 化)、リンパ球減少 肝 : 肝細胞への脂質の蓄積 炎症性細胞の浸潤	2000 μg/kg : 異常なし
2. 催奇形性 (TCDD 40 μg/kg、経口) ²⁾	口蓋裂 : +/+ (100%) +/- (24%) 水腎症 : +/+、+/- (100%)	正常
3. 発癌 ³⁾ Benzo[a]pyrene 雄 : 2mg/70g 皮下 投与 (1,8日目に2 回), 18週目に屠殺 雌 : 200 μg/70g 背 中皮膚に塗布 (1回/ 週、25週)、28週 目に屠殺	皮下投与 (雄) : +/+ : 17/17 (100%) +/- : 17/17 (100%) 塗布 (雌) : +/+ : 15/16 (93.8%) +/- : 13/14 (92.4%)	皮下投与 (雄) : -/- : 0/16 (0%) 塗布 (雌) : -/- : 0/10 (0%)

1. Fernandez-Salguero et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 140, 173-179 (1996)
2. Mimura J et al., Genes Cells 2, 645-654 (1997)
3. Shimizu Y et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 779-782 (2000)

表2 ダイオキシン/フラン類におけるTEFと実験より算出したLuc-TEF [$EC_{50}(2,3,7,8\text{-TCDD})/EC_{50}(\text{sample})$] との関係

ダイオキシン/フラン類	I-TEF (1994)	WHO-TEF (1997)	Luc-TEF $EC_{50}(2,3,7,8\text{-TCDD})/EC_{50}(\text{sample})$	Luc-TEF/ WHO-TEF
2,3,7,8-TCDD	1	1	1	1
3-MC	—	—	0.0023	—
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1	0.25	2.5
2,4,6,8-TCDF	—	—	—	—
1,3,6,8-TCDD	—	—	—	—
1,2,3,7,8-PeCDD	0.5	1	0.72	0.72
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.05	0.046	0.92
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.5	0.9	1.8
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1	0.098	0.98
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01	0.041	4.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01	0.0078	0.78

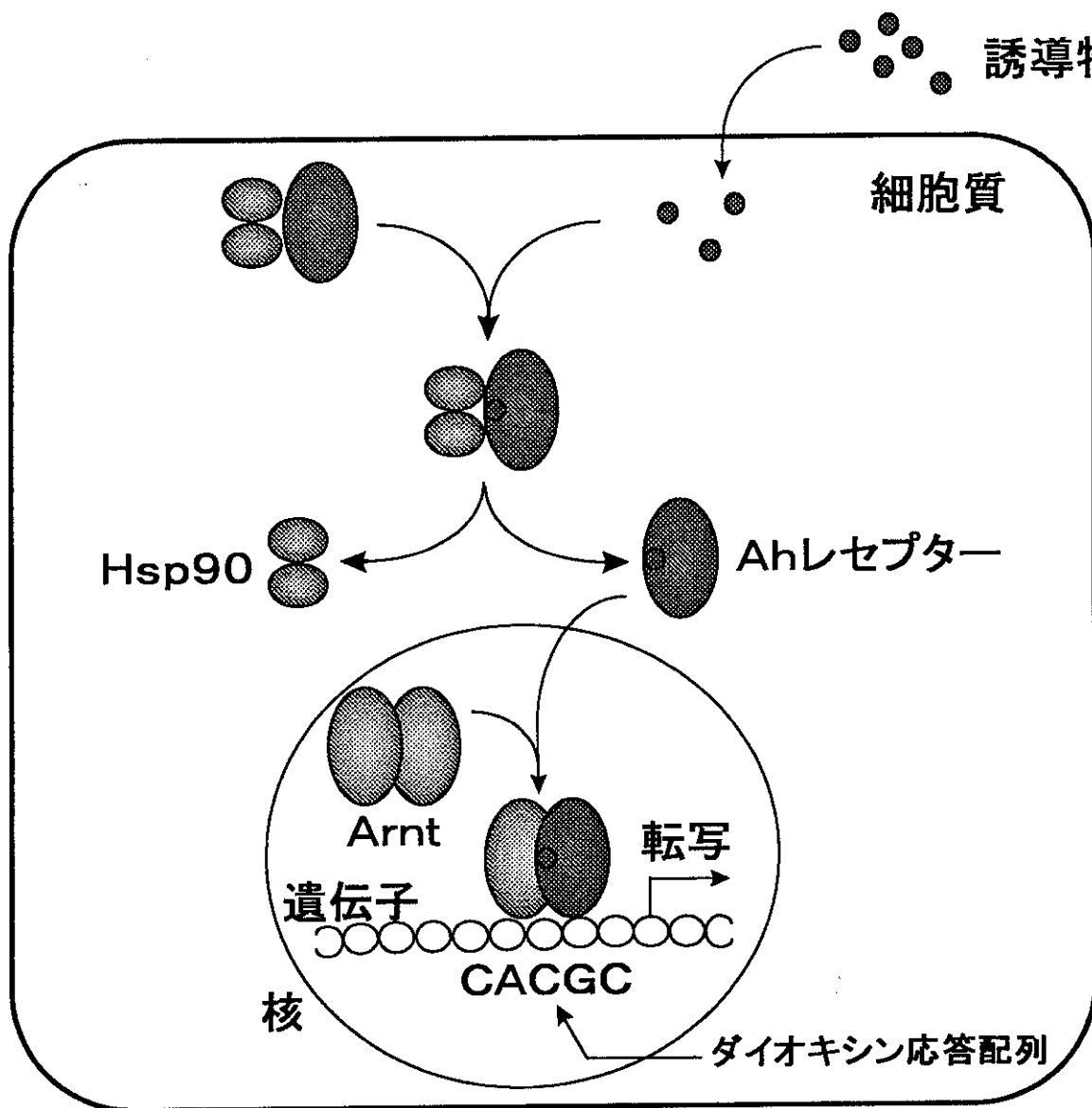


図1 Ahレセプターの作用モデル

導入プラスミド量による活性化への影響

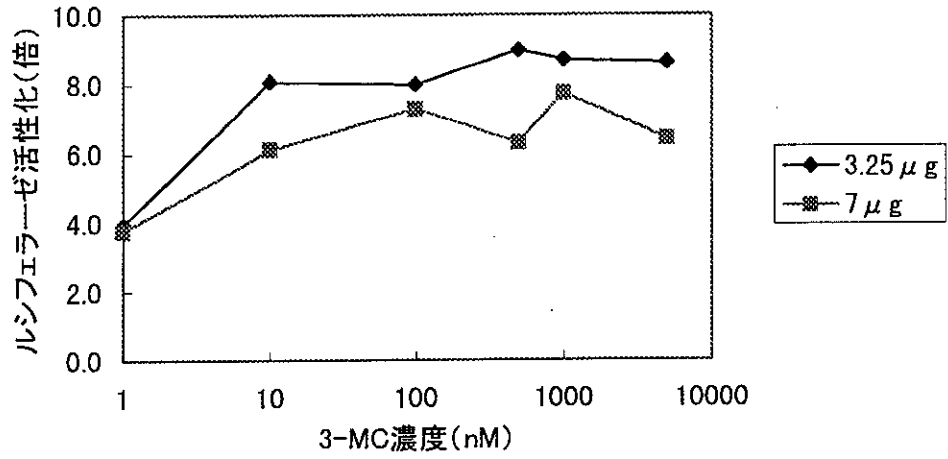


図2 プラスミドの導入量による活性の差異

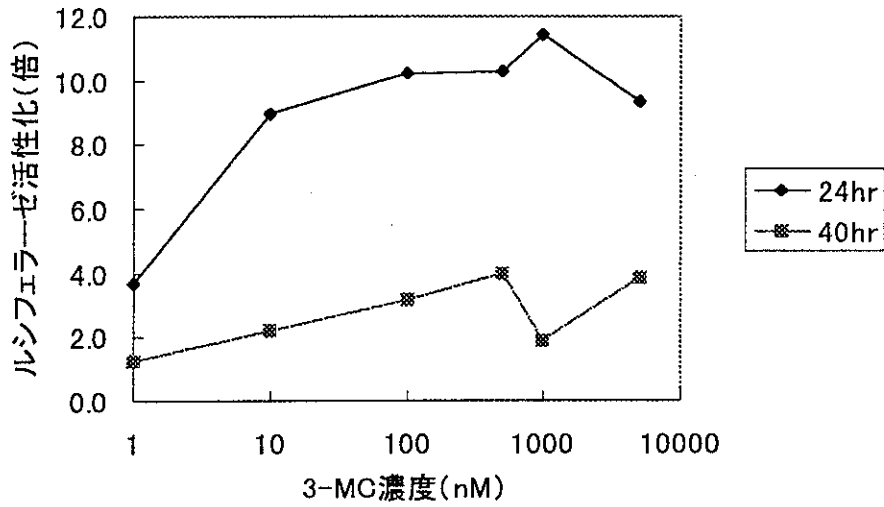


図3 サンプル曝露時間と活性

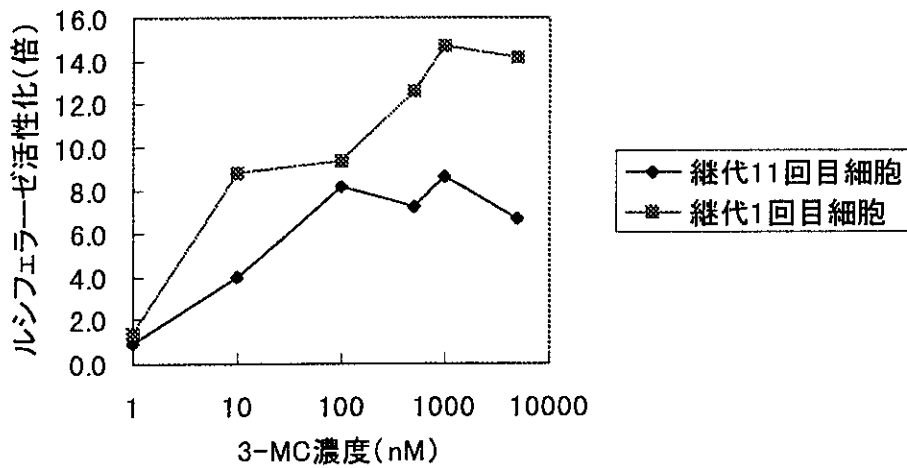


図4 細胞継代数による活性の差異

母乳中のダイオキシン類及びコプラナPCBの分析法(案)

1. はじめに

母乳中のダイオキシン類及びコプラナPCBの濃度は低濃度であり、現在の科学技術レベルで考えられる範囲において確からしい値を得る為には、一定の分析実験設備や測定分析に関わる一定水準以上の技術が要求される。そこで、母乳中のダイオキシン類及びコプラナPCBの濃度を決定する為の参考となるように技術的内容をまとめた。なお、ここで示した以外の方法であっても本方法と同等以上の性能を持つことが確認されればその方法を採用しても良い。

2. 用語の定義

本マニュアル中で記載する用語の定義を次のように定める。

2.1 ダイオキシン類

ポリクロロジベンゾーパラジオキシンとポリクロロジベンゾフランで表される化合物の総称。ただし、本マニュアルではテトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ及びオクタクロロジベンゾーパラジオキシン及びテトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ及びオクタクロロジベンゾフランを示す。

2.2 ダイオキシン類2,3,7,8-位塩素置換異性体

ダイオキシン類の内、化学構造上2, 3, 7及び8で表記される位置に塩素が配位している化合物の総称。PCDDs 7化合物, PCDFs 10化合物, 合計17化合物が存在する。

2.3 コプラナPCBs¹

ポリクロロビフェニル¹で表される化合物であって、化学構造上2, 2', 6及び6'で表記されるオルト位³に配位する塩素数が2以下である化合物の総称。ただし、本マニュアルではこの化合物の内、『表-1. 定量する化合物の名称等。(p.15)』のCo-PCBsの欄に示す12種類の化合物を示す。

2.4 ノンオルトコプラナPCBs

ポリクロロビフェニルで表される化合物であって、化学構造上2, 2', 6及び6'で表記されるオルト位に塩素が配位しない化合物の総称。ただし、本マニュアルではこの化合物の内、『表-1. 定量する化合物の名称等。(p.15)』の中でCo-PCBsのnon-orthoの欄に示す4種類の化合物を示す。

2.5 モノオルトコプラナPCBs

ポリクロロビフェニルで表される化合物であって、化学構造上2, 2', 6及び6'で表記されるオルト位に塩素が1つ配位する化合物の総称。ただし、本マニュアルではこの化合物の内、『表-1. 定量する化合物の名称等。(p.15)』の中でCo-PCBsのmono-orthoの欄に示す8種類の化合物を示す。

2.6 異性体¹

同一の化学式を持ち、塩素の置換位置が異なる化合物を指す。

2.7 同族体¹

塩素の配位数が同じであって置換位置を異にする一群の化合物。

2.8 目標定量下限値

本マニュアルで規定する『定量する下限値』。

2.9 検出下限値

2.9.1 装置の検出下限値

分析化学的な見地における検出下限値。標準物質を測定したときのクロマトグラムピーク高さがS/N=3に相当する標準物質の絶対量を装置(GC-MS)の検出下限値とす

る¹。あるいはGC-MSで検出できる低濃度標準溶液（各化合物の絶対量で10～50fg程度）を5回以上繰り返し測定し、その標準偏差の3倍を検出下限値としても良い。

2.9.2 試料の検出下限値

実際の試料を測定し、そのときの測定試料中の目的化合物クロマトグラムピーク高さを標準物質のピーク高さと比較し、測定試料中のピーク高さがS/N=3に相当する標準物質濃度と、採取試料量等から計算した値を測定分析方法の検出下限値とする。実試料でピークが出現しない化合物に関しては、S/N=3に相当するピーク高さを標準物質を測定したときのピーク高さから予測し、それに等しいピーク高さに相当する標準物質濃度と採取試料量等から計算した値を測定分析方法の検出下限値とする。

なお、試料の検出下限値は目標定量下限値を満足していなければならない。

3. 略語の定義

本マニュアル中で記載する用語の定義を次のように定める。

- 3.1 PCDDs：ポリクロロジベンゾーパラジオキシン⁷
- 3.2 PCDFs：ポリクロロジベンゾフラン⁸
- 3.3 Co-PCBs：コプラナPCBs
- 3.4 non-ortho PCBs：ノンオルトPCBs
- 3.5 mono-ortho PCBs：モノオルトPCBs
- 3.6 TeCDDs：テトラクロロジベンゾーパラジオキシン⁹
- 3.7 PeCDDs：ペンタクロロジベンゾーパラジオキシン¹⁰
- 3.8 HxCDDs：ヘキサクロロジベンゾーパラジオキシン¹¹
- 3.9 HpCDDs：ヘプタクロロジベンゾーパラジオキシン¹²
- 3.10 OCDD：オクタクロロジベンゾーパラジオキシン¹³
- 3.11 TeCDFs：テトラクロロジベンゾフラン¹⁴
- 3.12 PeCDFs：ペンタクロロジベンゾフラン¹⁵
- 3.13 HxCDFs：ヘキサクロロジベンゾフラン¹⁶
- 3.14 HpCDFs：ヘプタクロロジベンゾフラン¹⁷
- 3.15 OCDF：オクタクロロジベンゾフラン¹⁸
- 3.16 TeCBs：テトラクロロビフェニル¹⁹
- 3.17 PeCBs：ペンタクロロビフェニル²⁰
- 3.18 HxCBs：ヘキサクロロビフェニル²¹
- 3.19 HpCBs：ヘプタクロロビフェニル²²
- 3.20 2,3,7,8-TeCDD：2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 1.21 1,2,3,7,8-PeCDD：1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.22 1,2,3,4,7,8-HxCDD：1,2,3,4,7,8-ヘキサクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.23 1,2,3,6,7,8-HxCDD：1,2,3,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.24 1,2,3,7,8,9-HxCDD：1,2,3,7,8,9-ヘキサクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.25 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD：1,2,3,4,6,7,8-ヘプタクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 3.26 2,3,7,8-TeCDF：2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフラン
- 3.27 1,2,3,7,8-PeCDF：1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン
- 3.28 2,3,4,7,8-PeCDF：2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン
- 3.29 1,2,3,4,7,8-HxCDF：1,2,3,4,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン
- 3.30 1,2,3,6,7,8-HxCDF：1,2,3,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン
- 3.31 1,2,3,7,8,9-HxCDF：1,2,3,7,8,9-ヘキサクロロジベンゾフラン

- 3.32 2,3,4,6,7,8-HxCDF : 2,3,4,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン
- 3.33 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF : 1,2,3,4,6,7,8-ヘプタクロロジベンゾフラン
- 3.34 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF : 1,2,3,4,7,8,9-ヘプタクロロジベンゾフラン
- 3.35 3,3',4,4'-TeCB : 3,3',4,4'-テトラクロロビフェニル ; IUPAC77
- 3.36 3,4,4',5'-TeCB : 3,4,4',5'-テトラクロロビフェニル ; IUPAC81
- 3.37 3,3',4,4',5'-PeCB : 3,3',4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC126
- 3.38 3,3',4,4',5,5'-HxCB : 3,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル ; IUPAC169
- 3.39 2,3,3',4,4'-PeCB : 2,3,3',4,4'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC105
- 3.40 2,3,4,4',5'-PeCB : 2,3,4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC114
- 3.41 2,3',4,4',5'-PeCB : 2,3',4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC118
- 3.42 2',3,4,4',5'-PeCB : 2',3,4,4',5'-ペンタクロロビフェニル ; IUPAC123
- 3.43 2,3,3',4,4',5'-HxCB : 2,3,3',4,4',5'-ヘキサクロロビフェニル ; IUPAC156
- 3.44 2,3,3',4,4',5'-HxCB : 2,3,3',4,4',5'-ヘキサクロロビフェニル ; IUPAC157
- 3.45 2,3',4,4',5,5'-HxCB : 2,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル ; IUPAC167
- 3.46 2,3,3',4,4',5,5'-HpCB : 2,3,3',4,4',5,5'-ヘプタクロロビフェニル ; IUPAC189
- 3.47 TEF : 毒性等価係数²³
- 3.48 TEQ : 毒性等量²⁴
- 3.49 IDMS : 同位体希釈質量分析法²⁵
- 3.50 GC-MS : ガスクロマトグラフ質量分析法²⁶またはガスクロマトグラフ質量分析計²⁷
- 3.51 HRGC : 高分解能ガスクロマトグラフィー²⁸または高分解能ガスクロマトグラフ²⁹
- 3.52 HRMS : 高分解能質量分析法³⁰または高分解能質量分析計³¹
- 3.53 HRGC-HRMS : 高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析法³²または高分解能ガスクロマトグラフ/高分解質量分析計³³
- 3.54 SIM : 選択イオン検出法³⁴。
- 3.55 RRF : 相対感度係数³⁵
- 3.56 N.D. : 目標定量下限値未達³⁶
- 3.57 EI法 : 電子衝撃イオン化³⁷法
- 3.58 IUPAC : 国際純正及び応用化学連合³⁸
- 3.59 WHO : 国連世界保健機関³⁹
- 3.60 QA/QC : 品質保証・品質管理⁴⁰
- 3.61 QCCS : 品質管理チェック試料⁴¹

4. 調査対象物質

本マニュアルではPCDDs, PCDFs及びCo-PCBの内、『表-1。定量する化合物の名称等。(p.15)』に示す化合物を調査対象とする。また、必要に応じて脂肪量を測定する。

5. 目標定量下限値

本マニュアルでは『表-2。本マニュアルで規定するPCDDs, PCDFs及びCo-PCBs各化合物の目標定量下限値。(p.16)』に示す目標定量下限値を設定する。通常、目標定量下限値は分析化学的な検出下限値を満足していなければならない。

6. 分析に必要な施設・試薬・器具等

ここでは、分析を行うに当たって必要な施設・器具・試薬等に関して必要とされるまたは望ましい要求事項を示す。

6.1 試料前処理室

器具や試薬の準備，抽出・濃縮・精製等の最終試料調整までの各作業を行う試料前処理室は試料の汚染を極力防ぐような構造とする¹²。

6.2 試薬類¹³

試薬類は，必要に応じて可能なものは蒸留，加熱処理，洗浄等の精製操作を行う等して，本方法によって使用する量が，PCDDs，PCDFs及びCo-PCBsの定量に影響を及ぼさないことを確認した後使用する。以下に使用する試薬とその調整法の一例を示す。

6.2.1 アセトン

6.2.2 エタノール

6.2.3 ジエチルエーテル

6.2.4 ヘキサン

6.2.5 トルエン

6.2.6 ジクロロメタン

6.2.7 デカン

6.2.8 精製水

精製水製造器等で得られるもの。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

6.2.9 飽和シュウ酸ナトリウム水溶液

市販試薬を精製水に溶かす。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

6.2.10 硫酸

市販の試薬をヘキサンで洗浄する。

6.2.11 無水硫酸ナトリウム

市販の試薬を450°Cで4hrs以上加熱処理する。

6.2.12 水酸化カリウム水溶液

市販の試薬の適当量を精製水適当量に溶かす。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

6.2.13 40%(w/w)硝酸銀水溶液

硝酸銀適当量を精製水適当量に溶かす。必要に応じてヘキサンで洗浄する等して精製する。

6.2.14 シリカゲル

カラムクロマトグラフィー用シリカゲルをメタノールにて超音波洗浄を行った後，減圧乾燥し，ガラス製ビーカーに入れ，層の厚さを10mm以下にして130°Cで約18hrs乾燥した後，密閉可能な容器に入れ，デシケーター内で保管する。

6.2.15 22%硫酸含有シリカゲル

硫酸をシリカゲルに，硫酸がシリカゲルに対して22%(w/w)となるように加え，攪拌混合し，密閉可能な容器に入れ，デシケーター内で保管する¹⁴。

6.2.16 44%硫酸含有シリカゲル

硫酸をシリカゲルに，硫酸がシリカゲルに対して44%(w/w)となるように加え，攪拌混合し，密閉可能な容器に入れ，デシケーター内で保管する¹⁴。

6.2.17 10%硝酸銀含有シリカゲル

硝酸銀溶液を，シリカゲルに硝酸銀がシリカゲルに対して10%(w/w)となるように加え，攪拌混合した後ロータリーエバポレーター等で減圧乾燥させ，密閉可能な容器に入れ，デシケーター内で保存する。調製及び保管は遮光した状態で行う。

6.2.18 活性炭シリカゲル

活性炭シリカゲルをアセトンで超音波洗浄し濾過した後，トルエンでソックスレー

洗浄し⁴⁶、ロータリーエバポレーターで減圧乾燥させ、密閉可能な容器に入れ、デシケーター内で保存する。

6.2.19 標準物質

『表-3。測定に用いる標準物質。(p.17)』を用いる。

6.2.20 標準溶液

市販の標準溶液をデカン⁴⁷で希釈、混合して調製する。

6.2.21 同位体スパイク

『表-4。測定に用いる同位体スパイク。(p.18)』を用いる。

6.2.22 同位体スパイク溶液

市販の溶液をデカン⁴⁸で希釈、混合して調製する。

6.3 器具・機材

6.3.1 分析前処理器具・機材

使用する全ての器具及び装置にはPCDDs, PCDFs及びCo-PCBsの測定分析に影響を及ぼさないことが要求される。分析途中の試料の汚染を防ぐ観点から使用する全ての器具等は母乳分析専用とすることが望ましい。GC-MSも超微量ダイオキシン類専用のものを用いる。

6.3.1.1 乾燥機

ガラス製品及び試薬類を加熱処理するもの(450°C程度で連続使用可能なもの)。

6.3.1.2 マッフル炉

セラミック製品を加熱処理するもの(1000°C程度で連続使用可能なもの)。

6.3.1.3 ロータリーエバポレーター

大気開放コックの先に活性炭カラム, エアフィルターを装着したり, また, トラップ球を使用する等して汚染を防ぐようにすることが望ましい⁴⁹。

6.3.1.4 ロータリーエバポレーター用真空ポンプ

有機溶媒の排気に内部が耐えられるもの。排気側にガス冷却管等を接続し, 有機溶媒の回収を行う。

6.3.1.5 冷却水循環装置

ソックスレー抽出器, ロータリーエバポレーターの冷却管(コンデンサー)に使用する。

6.3.1.6 ガス吹き付け装置

抽出精製試料を濃縮する為に使用する。

6.3.1.7 シリカゲルカラムクロマト管

内径約10mm, 長さ約300mmのガラス製カラムクロマト管にシリカゲル3.0g, 無水硫酸ナトリウム6.0gをヘキサンで湿式充填する。ヘキサン200mLを流速2.5mL/minで流し, 充填物を洗浄する⁵⁰。

6.3.1.8 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管

内径約10mm, 長さ約300mmのガラス製カラムクロマトグラフ管にシリカゲル0.9g, 44%硫酸シリカゲル4.5g, 22%硫酸シリカゲル6.0g, シリカゲル0.9g, 10%硝酸銀-シリカゲル3.0g, 無水硫酸ナトリウム6.0gを順次ヘキサンで湿式充填する。ヘキサン200mLを流速2.5mL/minで流し, 充填物を洗浄する。

1.1.1.9 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフ管

内径約10mm, 長さ約150mmのガラス製カラムクロマト管に, 無水硫酸ナトリ

ウム3.0g, 活性炭シリカゲル0.5g, 最後に無水硫酸ナトリウム3.0gを乾式充填する。

6.3.1.10 活性炭/硫酸ナトリウムカラムクロマトグラフ管

6.3.2 ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC-MS)

高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計 (HRGC-HRMS) を用いる。質量分析計の質量分離方式は二重収束型とする。

6.3.2.1 ガスクロマトグラフカラムオープン

カラムオープンの温度制御範囲が50~350°Cであり, 測定対象物質の最適分離条件を設定・制御できるような昇温プログラムが可能なもの。

6.3.2.2 ガスクロマトグラフキャピラリーカラム

内径0.22~0.32mm, 長さ30~60mの溶融シリカ製のものであって, 内面に液相を塗布したもの。通常, 微極性 (5%フェニルメチルシリコン系) のものを用いるが必要に応じて中極性 (25%フェニルメチルシリコン系), 強極性 (シアノプロピル系) のものを用いる。

例) BPX5 (長さ: 30m, 内径: 0.25mm, 膜厚: 0.25 μ m, SGE社製)

CP-SIL 8 CB-MS (長さ: 30m, 内径: 0.25mm, 膜厚: 0.25 μ m, Chrompak社製)

なお, ここで示した製品は参考のために表記したものであってこれらを使用しなければならない訳ではない。

6.3.2.3 質量分析計 (MS)

二重収束型のもので, ロックマス方式⁵⁾により分解能10,000以上で測定可能なもの。イオン源は, 温度を160~350°Cに保つことができ, EI法が可能で, イオン化電圧を25~70eV程度に制御可能なもの。検出法としてSIM法が可能であり, 磁場スイッチング使用時の必要な測定質量数のチャンネル数, 感度, 安定性の関係からSIM法における周期を最大でも1 sec未満にできるもの⁵⁾。実際に試料を測定するときと同一の条件において, 標準物質の2,3,7,8-TeCDD 10fgでSN>5, OCDD 50fgでSN>5 の検出感度を得られるもの。

6.3.2.4 試料導入部

本マニュアルで要求する定量を満足する方式のもの。感度を稼ぐ目的で大量注入方式やマルチディメンジョン方式を採用してもよい。

6.3.2.5 キャリアーガス

高純度ヘリウムガス⁶⁾。

7. 調査計画

目的を明らかにし, 調査計画を作成する。調査計画によっては, 採乳対象者に関して実際に採乳が可能であるかどうか事前に健康診断等を行う, また採乳時期と量といった事項に関しても注意を払う必要がある。

8. 試料採取

採乳は, 母乳提供者本人あるいは医師, 看護婦 (保健婦 (士), 助産婦を含む) が行う。通常の試料採取には50~100ccの採乳バッグあるいはガラス製容器, フッ素樹脂製容器などを使用する。試料は50~100cc程度を採取する (採取量は重量によって求める)。試料採取に当たっては試料採取に関わる情報を記録する。容器の選択に当たってはブランク試験を行い, 汚染のないことを確認する。採取した試料は, 変質や脂肪の分離を避けるため, 採取後すぐによく攪拌し, 分析するまで冷凍し暗所に保存する。

9. 測定分析

9.1 測定方法の概要

同位体希釈質量分析法 (IDMS) による。すなわち、試料に内部標準物質として定量する目的化合物の¹³C同位体をスパイクし、有機溶媒によってPCDDs, PCDFs及びCo-PCBsを抽出し、精製し、GC-MSを用いて同位体比を測定する。分析方法のフローを図-1に示す。

なお、PCDDs, PCDFs及びCo-PCB濃度を脂肪あたりで表記する場合は、後述の方法によって脂肪量を測定する。

9.2 前処理

9.2.1 試料

採取した試料は容器内で十分混合した後、ダイオキシン類測定分析用 (I), ダイオキシン類測定分析用 (二重測定用必要に応じて), の2つに分けてフッ素樹脂製容器またはガラス製容器に分注する。分注した試料は分析を行うまで冷凍保存する。

9.2.2 同位体スパイクの添加

試料を解凍後、約50gの試料を量り取り、同位体スパイクを添加し、攪拌する。なお、同位体スパイクの添加量は各化合物10~100pg程度とする⁴⁾。

9.2.3 抽出

シュウ酸ナトリウム飽和水溶液 10mL, ジエチルエーテル 50mL, エタノール20mLを順に加え、その都度よく攪拌する。最後にヘキサン30mLを加え、10分間振とう抽出を行う。ヘキサン層を分画後、残層にヘキサン30mLを添加し、更に10分間振とう抽出を行う。この操作をもう1回繰り返す、計3回の抽出によるヘキサン分画を混合する。得られたヘキサン分画を精製水50mLで2回洗浄した後、水層を捨てる。得られたヘキサン分画を精製水50mLで2回洗浄した後、水層を捨て、ガラス製ロート下部にガラスウールを詰め、無水硫酸ナトリウムを積層したもので脱水する。

9.2.4 脂肪 (抽出物) 重量の測定

あらかじめ105 °Cで3時間加熱、放冷し、重量を測定したナス型フラスコに、抽出液を移し、これをロータリーエバポレーターでヘキサンがなくなるまで濃縮する。これを、110 °Cで1時間程度加熱、放冷し、重量を測定する。得られた重量の差を抽出物重量とし、これを脂肪の重量とみなす。

9.2.5 硫酸処理

秤量した脂肪全量をヘキサン100mLに溶解し、分液ロートに移す。濃硫酸 約20mLを加え、静置後硫酸層を除去する。新たに濃硫酸 約20mLを加え、2回目以降は穏やかに振とうし、静置後硫酸層を除去する。この操作を硫酸層の着色が薄くなるまで繰り返す。

9.2.6 水洗・濃縮

硫酸処理が終了したヘキサン分画を精製水30mLで2回洗浄する。無水硫酸ナトリウムを用いて脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて約2mlまで濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供する。

9.3 カラムクロマトグラフィー

硫酸処理の終了した試料をカラムクロマトグラフィーによって更に精製する。尚ここではシリカゲ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, 活性炭カラムグラフが示されている。必要に応じてこれらを組み合わせるがシリカゲルカラム、活性炭カラムの2段のクロマトグラフが一般的である。ここで示すカラムクロマトグラフィーの展開

溶媒の量は参考の為示したものであり、分画試験を行って決定する。

9.3.1 シリカゲルカラムクロマトグラフィー（及びアルミナカラムクロマトグラフィー（オプショナル））

次に示すシリカゲルカラムクロマトグラフィーあるいは多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーのどちらかを行う。シリカゲルクロマトグラフィーのあと、アルミナクロマトグラフィーを経て活性炭カラムクロマトグラフィーへいくが、アルミナカラムクロマトグラフィーを省くことも可能である。

9.3.1.1 シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルクロマト管（シリカゲル1.5 g, 130°C, 3時間活性化したもの）の液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げ、調製した試料を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げる。ヘキサン80mlを流速1mL/minで流し展開溶出させる。得られた溶出液をロータリーエバポレーターにて約2mlまで濃縮し、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーまたはアルミナカラムクロマトグラフィーに供する。

9.3.1.2 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー

多層シリカゲルクロマト管の液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げ、調製した試験溶液を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げる。ヘキサン200mlを流速2.5mL/minで流し展開溶出させる。得られた溶出液をロータリーエバポレーターにて約2mlまで濃縮し、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供する⁵⁵。

9.3.1.3 アルミナクロマトグラフィー

アルミナ（塩基性）7.5 gをヘキサンを用いて湿式充填し、上部に硫酸ナトリウムを1cm高に積層する。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで溶出した画分を、クロマトグラフ管に流し込み、ジクロロメタンヘキサン溶液で分画する。最初に2%ジクロロメタンヘキサン65mlで溶出させ（PCB画分）次いで60%ジクロロメタンヘキサン100mlで溶出する。第2画分を濃縮した後、活性炭カラムにかける。（PCDDs, PCDFs及びノンオルソPCB）

9.3.2 活性炭カラムクロマトグラフィー

9.3.2.1 活性炭シリカゲルクロマトグラフィー

活性炭シリカゲルクロマト管に調製した試験溶液を静かに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げる。これに25%ジクロロメタン含有ヘキサン溶液100mlを流速2.5mL/minで流し展開溶出させる。この画分にはmono-ortho-CBsが含まれる。次いで、トルエン100mlで溶出する。この画分にはPCDDs, PCDFs及びnon-ortho-CBsが含まれる。25%ジクロロメタン含有ヘキサン画分及びトルエン画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、更にゆるやかに窒素を吹き付け⁵⁶、濃縮した後、各画分に測定に必要なシリンジスパイク⁵⁷を添加して10μLに定容し、GC-MS分析用溶液とする。

9.3.2.2 活性炭/硫酸ナトリウムカラムクロマトグラフィー

活性炭/硫酸ナトリウムを充填して用いることも出来る。トルエン画分から1~2μL分取し25%ジクロロメタン含有ヘキサン画分に加え、トルエン画分と同様の方法で濃縮し、測定に必要なシリンジスパイクを添加し10μLに定容し、GC-MS分析用溶液としても良い。

9.4 測定準備

9.4.1 検量線の作成

標準溶液中のPCDDs, PCDFs及びCo-PCBs各化合物に対して0.01~50pg/ μ L程度の濃度範囲で0を含めて5段階程度の標準濃度系列を調製する。この標準濃度系列には同位体スパイクを添加しておく⁵⁸。

9.4.2 GC-MS状態の確認

GC-MSが本法に対して適切な状態であることを確認する（QA・QC参照）。

9.5 測定

標準溶液及び試料の適当量をGC-MSに注入⁵⁹し、各同族体につき『表-5。測定質量数の例。(p.19)』から任意の2つ以上の質量数のクロマトグラムを記録する。

9.6 計算

次式によって濃度を算出する。

$$C_{\text{Sample}} = ((A_{\text{Sample}} \times C_{\text{Sample-IS}}) / (A_{\text{Sample-IS}} \times \text{RRF})) \times (1 / V)$$

C_{Sample} : 分析対象物質の濃度 (pg/mLまたは pg/g)

A_{Sample} : 分析試料中の各化合物のクロマトグラムピーク面積値

$A_{\text{Sample-IS}}$: 分析試料中の各同位体スパイクのクロマトグラムピーク面積値

$C_{\text{Sample-IS}}$: 分析試料への同位体スパイクの量 (pg)

V : 試料採取量 (mLまたはg)

$$\text{RRF} = (A_{\text{STD}} \times C_{\text{STD-IS}}) / (A_{\text{STD-IS}} \times C_{\text{STD}})$$

A_{STD} : 標準溶液中の分析対象物質のクロマトグラムピーク面積値

$A_{\text{STD-IS}}$: 標準溶液中の同位体スパイクのクロマトグラムピーク面積値

C_{STD} : 標準溶液中の各化合物の量 (pg)

$C_{\text{STD-IS}}$: 標準溶液中の各同位体スパイクの量 (pg)

PCDDs及びPCDFs 2,3,7,8-位塩素置換異性体はそれぞれ対応する17種類の2,3,7,8-位塩素置換異性体の標準物質及び同位体スパイクの濃度、添加量及びレスポンスを用いて濃度を算出する。Co-PCBに関してはそれぞれ対応する12種類のCo-PCBの標準物質及び同位体スパイクの濃度、添加量及びレスポンスを用いて濃度を算出する。

9.7 測定結果の表記方法

母乳中のPCDDs, PCDFs及びCo-PCBsは通常低濃度であると考えられ、本マニュアルの方法をもってしても目標定量下限値付近あるいは目標定量下限値未満の数値が出現する場合もある。数値の取り扱い方法が異なることにより、得られる最終結果に差異が生じることがないように数値の取り扱い方法を定める。なお、有効数字の取扱方法はJIS Z 8401にしたがう。

9.7.1 PCDDs, PCDFs及びCo-PCBsの同定

PCDDs及びPCDFs各異性体は、モニターした2つ以上のイオンにおけるクロマトグラム上のピーク面積の比が標準物質のものとほぼ同じであり、『表-6。PCDDs, PCDFs及びCo-PCBsの塩素同位体の理論天然存在比。』に示す塩素原子の同位体存在比から推定されるイオン強度比に対して $\pm 30\%$ 以内であり、更にピークの保持時間が標準物質とほぼ同じであり、対応する内標準物質との相対保持時間が標準物質と一致することで同定する。

9.7.2 実測濃度の表記

- ・N.D.表記となっている異性体に関しては、数値は0（ゼロ）として計算する。
- ・2,3,7,8-位塩素置換異性体（17化合物）及びコプラナPCB（12化合物）の各実測濃度は有効数字2桁に丸めて表記する。
- ・2,3,7,8-位塩素置換異性体（17化合物）及びコプラナPCB（12化合物）の各実測濃度が目標定量下限値未満であった場合、2,3,7,8-置換位置異性体（17化合物）及びコプラナPCB（12化合物）の各実測濃度はN.D.と表記する。
- ・2,3,7,8-位塩素置換異性体（17化合物）の濃度の総和をTotal(PCDDs+PCDFs)として有効数字2桁で表記する⁶⁰。
- ・PCDDsに含まれる全ての化合物が目標定量下限値未満であった場合、PCDDsの実測濃度はN.D.と表記する。
- ・PCDFsに含まれる全ての化合物が目標定量下限値未満であった場合、PCDFsの実測濃度はN.D.と表記する。
- ・PCDDsとPCDFsが共にN.D.であった場合、Total(PCDDs+PCDFs)の実測濃度はN.D.と表記する。
- ・IUPAC #77, # 81, #126, #169の実測濃度を積算し、non-ortho PCBs実測濃度として有効数字2桁で表す。
- ・IUPAC#105, #114, #118, #123, #156, #157, #167, #189の実測濃度を積算し、mono-ortho PCBs実測濃度として有効数字2桁で表す。
- ・IUPAC #77, # 81, #126, #169, #105, #114, #118, #123, #156, #157, #167, #189の濃度を積算し、Total Co-PCBs実測濃度として有効数字2桁で表す⁶¹。

9.7.3 TEQの算出

- ・有効数字2桁で丸めた2,3,7,8-位塩素置換異性体（17化合物）及びコプラナPCB（12化合物）の各実測濃度にTEFを乗じ、TEQを算出する。一例としてWHO-1997によるTEFを『表-7. TEQ算出の為のTEF。 (p.21)』に示す。各2,3,7,8-位塩素置換異性体及びCo-PCBsのTEQは2桁表記とする。
- ・2,3,7,8-位塩素置換異性体及びCo-PCBs濃度が目標定量下限値未満であった場合、毒性等量は0（ゼロ）として表記し、その右横にカッコ書きで最大見積TEQを記載する。最大見積TEQは各化合物の目標定量下限値の1/2にTEFを乗じたものとする⁶²。
- ・実測濃度にN.D.が表記された場合（最大見積TEQが表記された場合）、Total PCDDs, Total PCDFs, Total(PCDDs+PCDFs), non-ortho PCBs, mono-ortho PCBs, Total Co-PCBs, Total(PCDDs+PCDFs+Co-PCBs)にもカッコ書きで最大見積TEQを記載する。この最大見積TEQは各化合物のTEQと最大見積TEQとの積算で表す。
- ・Total PCDDs(TEQ)及びTotal PCDFs(TEQ)は2桁表記とする。
- ・Total PCDDs(TEQ)+Total PCDFs(TEQ)は2桁表記とする。
- ・non-ortho PCBsのTEQは2桁表記とする。
- ・mono-ortho PCBsのTEQは2桁表記とする。
- ・Co-PCBのTotal TEQは2桁表記とする。
- ・PCDDs, PCDFs, Co-PCBsのTotal TEQは2桁表記とする。
- ・各実測濃度からPCDDs, PCDFs, Co-PCBsのTotal TEQを算出するまでの過程で数値の丸めは行わない。

9.7.4 測定結果の表記方法

測定結果の表記方法の例を『表-8. PCDDs, PCDFs及びCo-PCBs測定分析結果の表記例。 (p.22)』に示す。

10. 安全管理

ここでは、測定分析に関係する者の安全や、区域外への化学物質の漏洩防御の観点から留意すべき事柄をまとめた。

10.1 試料前処理室及びGC-MS室の構造

試料前処理室及びGC-MS室内の空気は活性炭フィルターとHEPAフィルター等を通じた後屋外へ排気する構造とすることが望ましい。

10.2 試料前処理室への出入り

PCDDs, PCDFs及びCo-PCBsの測定分析に関わる区域には許可なしに関係者以外の者が立ち入ることを禁止すること、また、区域入り口にはその旨表記すること。一時的に許可を与えられ、区域内に入ることが許された者がいる場合はその記録を取ること。区域内への入り口は施錠可能な構造でなければならない。

10.3 試薬の管理

測定分析に使用する有機溶媒の管理を行うこと。各有機溶媒毎に購入量と廃棄量の記録を取ること。有機溶媒が揮散することを可能な限り防御するように工夫し、さらに試料前処理室内の換気を十分とれるようにすること。

10.4 標準物質の管理

標準物質は施錠可能な冷蔵庫に保管し、購入及び使用の記録を取ること。

10.5 分析者

区域内では専用の実験衣及び靴を着用すること。試料前処理室内では常に耐溶剤製の不透透手袋等及び安全眼鏡を装着すること。

10.6 測定分析機関の義務

試料前処理室に立ち入る許可を持っている者に関しては労働安全衛生法に定められた特定化学物質に関わる定期的健康診断を年2回実施すること。

10.7 GC-MS

GC-MSロータリーポンプの排気、GCのパージガスは、活性炭フィルターを通じた後排気されるようにすること。

10.8 母乳の付着したガラス器具の洗浄

必要に応じ、滅菌した後洗浄する。

10.9 母乳の付着した廃棄物の管理

母乳採取及び搬入時に用いられた採乳バッグや作業中に母乳の付着した布等は、必要に応じ、オートクレーブバッグに入れた後高圧蒸気滅菌し、医療廃棄物として廃棄する。

10.10 その他の廃棄物の管理

上記以外に試料前処理室験室及びGC-MS測定室内で生じた各種廃棄物は種別により分類し、廃棄物処理業者までトレース可能なように管理すること。

11. 品質保証／品質管理・内部精度管理

有形の工業製品と異なり、PCDDs, PCDFs及びCo-PCBsの測定データに関しては、最終測定値のみでは結果の確からしさを確認することは困難である場合も多い。そこで、品質保証(QA)/品質管理(QC)・精度管理¹³⁾について記述した。本記述はPCDDs, PCDFs及びCo-PCBsに係る調査を行う機関が、一定水準以上の測定分析結果を報告することが可能となるように、調査に直接的に関わる事項に対して、記録として要求される項目について記述したものである。PCDDs, PCDFs及びCo-PCBsに係る調査を行う全機関は、少なくともここで述べる項目に関する情報を記録・保管しなければならない。なお、本マニュアルではPCDDs, PCDFs及びCo-PCBsの測定分析結果の報告までを対象としており、得られたデータを用いた考察や解析等の部分に関しては含まない。

なお、ここで示した各項目が満足されていない場合、その原因を明らかにし、取り除いた後、再分析、再測定等適切な処置をおこなう。

11.1 調査

11.1.1 試料採取の記録

試料の採取方法（例えばどのような採血方法であったか）を記録する。

11.1.2 試料確認の記録

試料採取後、試験機関に試料が入る段階（試料の受付）における試料の確認を記録する。試料確認の日時、確認した人の所属・氏名、試料の試料前処理室まで搬送された手段・状態、試料の媒体、試料の入っていた容器の種類・サイズ、保管する場合その保管場所、保管方法、試料の管理番号を記録する。運送業者を利用した場合、その配送伝票の複製を保管する。

11.2 測定分析

11.2.1 使用器具・機材・装置

使用した器具に関して、メーカー、準備方法（必要であれば洗浄方法）を記録する。

11.2.2 使用試薬

分析に用いた試薬のメーカー名、製品名、等級、精製方法等を記録する。

11.2.3 標準物質・標準溶液

分析に用いた試薬のメーカー名、製品名等を記録する。

11.2.4 標準溶液調整記録

標準溶液を調整した状況を記録する。

11.2.5 試料前処理室等の清浄度の記録

測定分析が行われた雰囲気客観的に判断可能なような記録（例えば試料前処理室及びGC-MS室の温度・清浄度の記録等）を取る。

11.2.6 分析前処理記録

分析者の所属、氏名、試料の状態、分析の各段階における操作日時、試料量（分析に供した量）、各試薬使用量、試料前処理室雰囲気等一連の前処理において、必要な情報を記録する。

11.2.7 GC-MSの記録

11.2.7.1 GC-MS日常点検記録

GC-MSの日常点検結果（冷却水、真空ポンプ、真空度等の基本的な事項）を記録する。

11.2.7.2 GC-MSメンテナンス記録

GC-MSに関して日常点検の範疇を超える点検・調整事項（修理。磁場調整等日常的には発生しない事柄）があれば記録する。

11.2.7.3 GC-MS使用状況記録

GC-MSの使用状態（各種消耗品の交換、イオン源の交換、GCカラムの交換、GCカラムエージング、フライトチューブベーキング、イオン源ベーキング、測定検体数等、どのような状況で使用されたか）を記録する。

11.2.7.4 MS調整の記録

GC-MS測定分析条件を記録する。

11.2.7.5 透過率の記録

設定分解能時のイオン透過率の記録。

11.2.7.6 GC分離能の記録

測定時に必要なGCカラム分離能が得られていることを確認できるクロマトグ

- ラムの記録。
- 11.2.7.7 感度の記録
測定時に必要な感度が得られていることを確認できる記録（クロマトグラム等）。
- 11.2.7.8 標準物質の同位体比の確認
測定した標準物質中の各化合物に関して、2つのモニターイオンのレスポンス比が理論値とずれていないことを確認できる記録。理論塩素同位体存在比と実測同位体比の採用範囲は30%以内とする。『参照：表-6。PCDDs, PCDFs及びCo-PCBsの塩素同位体の理論天然存在比。（p.20）』
- 11.2.7.9 RRF
RRFの変動は前回の測定時と比較して±20%以内であることとする。
- 11.2.7.10 測定順の記録
GC-MSによる測定の順番の記録。標準溶液，最終溶媒ブランク，全操作ブランク，試料，2重測定（同一測定バイアルからのGC-MS測定），2重測定（試料採取からの2重測定）等試料の測定順番の記録。
- 11.2.7.11 クロマトグラムの記録
標準溶液，最終溶媒ブランク，全操作ブランク，試料に関する各測定質量数のクロマトグラムの記録。
- 11.3 計算
- 11.3.1 計算工程の記録
標準溶液の濃度，内部標準の添加量，GC-MS測定面積値，試料採取量から最終濃度までの計算過程がトレース可能である記録。
- 11.3.2 同位体比の確認記録
測定に用いた同位体の理論比との差が判明する記録。上記計算の工程に含まれていれば良い。
- 11.3.3 回収率の確認記録
シリンジスパイクを用いて計算した回収率の記録。上記計算の工程に含まれていれば良い。回収率は，17種類のPCDDs及びPCDFs各2,3,7,8-位塩素置換異性体及び12種類のCo-PCBsにおいて大量注入方式を採用した場合，各々50-120%の範囲であること。
- 11.4 ブランク試験
- 11.4.1 保存容器ブランク
保存容器のブランク試験を行い，その結果を記録する。保存容器の製造ロットが変わる毎に行う。
- 11.4.2 全操作ブランク
試料に対して行う分析方法と同一の方法で操作を行う，全操作ブランクの試験の記録。全操作ブランクは分析検体数10に対して1以上の頻度で行う。
- 11.4.3 同位体スパイクの検査
同位体スパイク中に存在する¹²C化合物が，用いる添加量で定量に影響を与えないことを確認した記録。
- 11.5 2重測定（試料の前処理から）
可能であれば試料採取の段階で2つの試料を採取し個々に測定分析を行うことが望ましい。この操作は分析検体数10に対して1以上の頻度で行う。この2重測定の結果は各2,3,7,8-位塩素置換異性体の実測濃度と実測濃度の平均値との差で50%以内であることが要求され