

## データとの相関)

母乳(17検体)を試料とし、予めGC/MS分析用とELISA用に分けてそれぞれ分析を行った。GC/MS分析では常法(B-1参照)に従って前処理及び測定を行った。一方、ELISA分析用試料については、脂肪抽出、アルカリ分解処理を行った後、3層硫酸シリカゲルカートリッジ(B-4及びC-4を参照)を用いてクリーンアップした。カートリッジからの溶出液は窒素気流下で注意深く濃縮乾固させ、Triton X-100含有メタノール-DMSO溶液(1:1)に溶解し、ELISA用試験溶液とした。ELISAのアッセイはFig.2に従って行った。

## C. 研究結果及び考察

### C-1 ターゲットとする異性体の検討

GC/MS法を用いて母乳100検体を分析し、得られたダイオキシン異性体についてTEQとの相関性を調べたところ、1,2,3,7,8-PeCDDと2,3,4,7,8-PeCDFがTEQに対して高い相関( $r=0.962$ 、 $r=0.941$ )があることがわかった(Fig.3)。その理由として、両者とも毒性等価係数(TEF)が高くかつ母乳中の異性体存在量比も比較的多いことが強く影響しているためと考えられた。一方、ダイオキシン異性体として代表的な2,3,7,8-TCDDはTEQと相関性は認められたものの( $r=0.759$ )、上記2種類の異性体ほど高くなかった。これは2,3,7,8-TCDDの検出量が少ないためと推測された。また、OCDDは母乳中から検出される異性体としてもっとも高濃度であったが、TEFが0.0001と極めて低いためTEQへの寄与が低くなり、その結果TEQとの相関( $r=0.421$ )は低くなった。これらの結果から、1,2,3,7,8-PeCDDと

2,3,4,7,8-PeCDFがターゲットとして最も適していることがわかった。

### C-2 アッセイ系の検討

本年度の研究では、ELISAの手法として既に方法論として報告(文献1)されていて、その構築が簡便な間接競合法を採用することにした。抗体については、既に国外で作製されたものについて検討したところ、2,3,7,8-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDに対してそれぞれほぼ等価で反応することがわかった。しかし、2,3,4,7,8-PeCDFを含めて他の異性体に対しては反応性が小さいことが推測された。従って、このアッセイ系で検出されるのは2,3,7,8-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDとの合計量と見なされた。なお、最新のTEF(WHO1998)によると2,3,7,8-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDは、ともにその値は“1”であることから、この抗体が2,3,7,8-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDに対して等しく反応することは、TEQによる毒性評価において極めて有利に働くと思われた。

アッセイで使用する溶媒については、ダイオキシンの溶解性を考慮してDMSOとメタノールの混合液を選択した。その結果、吸光度測定におけるダイナミックレンジも上昇することが確認された。また、界面活性剤については、Triton-X100を添加することにより、実試料分析で脂肪成分が混入した場合においてもその影響を低減することができ、測定精度の向上をもたらした。更に、界面活性剤の種類についてもTween-20よりもTriton-X100の方が高濃度であっても、抗体に対して影響を及ぼしにくいことがわかった。これらの結果から、本研究で検討したELISAでは、1.5 pg/well

~135 pg/well のダイオキシン (2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD との合計量として) を測定することが可能となった。

Fig.4 に、ELISA によるダイオキシンの検量線を示した。

### C-3 GC/MS 法との両立

本研究で用いた抗体は、TEF の大きな異性体に強く反応する傾向があり、TEF の小さな異性体とは交差反応性が小さいことが予想された (文献 1)。そこで先に設定した①と②の条件をクリアするサロゲートとして、 $(^{13}\text{C})1,2,3,4\text{-TCDF}$  と  $(^{13}\text{C})\text{OCDD}$  を選定した。これらの TEF はそれぞれ 0 及び 0.0001 である。また、通常の試料クリーンアップ操作としてシリカゲル、アルミナ、活性炭シリカゲルなどが行われているが、それぞれのカラムクロマトグラフィーにおいて、4 塩素体と 8 塩素体は最初と最後 (またはその逆) の順で溶出されることから、4 塩素体と 8 塩素体のサロゲートの回収率が確認されれば、5~7 塩素体も十分に回収されていることが予想される。従って、③の条件もクリアされることが考えられた。

④の条件については、実際に母乳 (19 検体) に 10 種類 (各同族体に 1 種類) のサロゲートと、上記の選定したサロゲートを同時に添加して一連の分析を行い、データ解析に際して 10 種類及び 2 種類のそれぞれのサロゲートで異性体濃度を算出して比較検討した。その結果、各異性体間の値は良好に一致し、また、TEQ についても両者の間で良好な相関 ( $r=0.956$ ) が得られた (Fig.5)。これらの結果から、 $(^{13}\text{C})1,2,3,4\text{-TCDF}$  と  $(^{13}\text{C})\text{OCDD}$  をサロゲートとして用いることによって、GC/MS 法と ELISA で共通の前処

理操作が行うことができ、貴重な生体試料を有効に活用することが可能となった。

### C-4 前処理操作の簡便化

多層シリカゲルカラム処理を容易に行う手法について検討した。従来の多層シリカゲルカラムでは充填剤の種類・量ともに多く (Fig.6-A)、カラムへの充填操作が極めて煩雑であり、且つ熟練を必要とした。そこで充填剤の種類 of 省略化と充填剤量のスケールダウンについて検討した。母乳分析の場合、脂肪をアルカリ分解した後、多層シリカゲルカラムに掛けるため、夾雑物はかなり除かれていると考えられた。実際、平成 11 年に定められた「食品中のダイオキシン類測定方法ガイドライン」においても、多層カラムの充填剤量を従来の 2/5 程度に減じても支障ないことが述べられている。そこでスケールダウンしたカラムにおいて、更に積層する充填剤の種類を順に取り除いて、クロマトグラム等に対する影響を検討した。その結果、硝酸銀シリカゲル及び水酸化カリウムシリカゲルは無くても問題がないことがわかった。また、硫酸シリカゲルについても 22%、44% のどちらか片方で十分であった。他方、アルカリ処理液を直接硫酸シリカゲルに接触させた場合、交雑物中の有機物が硫酸で炭化されてカラム上部に炭化物の層が生じてしまう。そこで硫酸シリカゲルの上部に多めのシリカゲルを積層することで、試料由来の着色物質やその他比較的極性の大きい夾雑物はシリカゲルに吸着されて、下段の硫酸シリカゲルへの負荷をかなり押さえることができた。

なお、硫酸シリカゲルはダイオキシン以外の有機物の分解除去を目的としているた

め、このままでは硫酸シリカゲル処理によって新たに生成した極性の大きい共存物質がダイオキシン画分に混入することがあった。そこで、硫酸シリカゲルの下段に更にシリカゲルを積層して、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を行ったところ、上記の共存物質が除去されることがわかった。これらの結果から、本研究では Fig.6-B に示したように、従来は 5 種類の充填剤（無水硫酸ナトリウムを除く）を 7 層に積層していたが、2 種類の充填剤で 3 層に積層したカラムで十分であることがわかった。また、充填量（合計）についても、従来の 1/5 以下で十分なことがわかった。なお、硫酸ナトリウムは負荷するサンプル中の水分を取り除くために積層されているが、通常はカラム負荷前に既に脱水されているため必ずしも必要ではなかった。

更に、充填操作の省力化のために、ディスプレイタイプのカートリッジ（内径 15mm × 75 mm ; PP 製）に上記と同様の組成（3層硫酸シリカゲル）を充填した試作品について、その性能評価を行った。その結果、その溶出挙動、及び、実試料におけるクロマトグラム、サロゲートの回収率において、上記の 3 層硫酸シリカゲルカラムと比べていずれもほぼ同様であり、実用上、問題がないことが確認された。

#### C-5 ELISA による実試料分析（GC/MS 分析データとの相関）

ELISA 及び GC/MS 法で測定した母乳 17 検体の結果を Table 1 に示した。それぞれの実測値（2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD との合計量；fat basis）は、ほぼ一致していた。このことから実試料においても

2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,7,8-PeCDD 以外の異性体との交差反応はないことが示唆された。更に試料中の夾雑物による影響もほとんど認められなかったことから、ELISA 測定のためのクリーンアップとして 3 層硫酸シリカゲルカートリッジが十分に機能していたことが確認された。このことから本研究で開発した ELISA 測定法は、より煩雑なクリーンアップを必要とする GC/MS 法に比べて迅速性において優れていることが証明された。

また、ELISA の測定値と TEQ(PCDD+PCDF) についての関係を調べたところ、Fig.7 に示したように、両者の間には良好な相関性が認められた。これらの結果から、ELISA で得られた測定値から、直ちに TEQ を算出してその毒性評価を行うことができると考えられた。

なお、Fig.7 で得られた回帰直線の傾きは約 0.6 であった。これは母乳において TEQ の主成分が 1,2,3,7,8-PCDD と 2,3,4,7,8-PeCDF であったが、本研究で用いた抗体が 2,3,4,7,8-PeCDF とは反応しないためと推測された。従って、今後 2,3,4,7,8-PeCDF と反応する抗体を加味することにより、測定感度及び測定精度は更に向上することが期待された。

#### D. 結論

本研究においては、ELISA による高感度かつ簡便な生体試料中ダイオキシンの測定法を確立し、ヒト試料における毒性評価法としての有用性について検討した。本年度の研究では、まずその戦略として、ダイオキシン分析における ELISA のスタンスを明確にした。すなわち、ELISA を単に簡便な

スクリーニング法ではなく、直接的に毒性を評価できる方法として位置づけることにした。このような考え方は従来から存在した各種の ELISA には見られない新しいアプローチである。ELISA で検出するターゲットの選択に際しては、1,2,3,7,8-PeCDD と 2,3,4,7,8-PeCDF が適していることがわかったが、今回の研究では 2,3,7,8-TCDD と 1,2,3,4,7,8-PeCDD と反応する既存の抗体を用いて、アッセイ系の至適化を行った。また、ELISA に影響を及ぼさないサロゲートとして、(<sup>13</sup>C)1,2,3,4-TCDF と(<sup>13</sup>C)OCDD を選択することによって GC/MS 法と前処理操作を共通化することができ、これにより貴重な生体試料の有効活用に大きく寄与すると共に、同一サンプルにおける測定データ情報を豊富にすることができると予想された。更に、前処理操作において、簡便なカートリッジカラムを開発したことにより、迅速な分析が可能となった。

実際に本研究で開発した ELISA を母乳分析に適用したところ、GC/MS 法によるデータと比較して実測値及び TEQ とともに良好な一致が見られ、毒性評価法として十分に実用性があることが確認された。

#### E. 文献

E-1 Sugawara, Yukio; Gee, S. J.; Sanborn, J. R.; Gilman, S. D.; Hammock, B. D., Development of a Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Polyclonal Antibodies for the Detection of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, *Analytical Chemistry*, 1998, Vol. 70, No. 6, pp. 1092-1099.

E-2 Sanborn, J. R., Gee, S. J., Gilman, S. D., Sugawara, Y., Jones, A. D., Rogers, J., Szurdoki, F., Stanker, L. H., Stoutamire, D. W., Hammock, B. D., Hapten Synthesis and Antibody Development for Polychlorinated Dibenzo-p-dioxin Immunoassays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, Vol. 46, Issues 6, pp. 2407-2416.

#### F. 研究発表 (学会発表)

F-1 第5回免疫化学測定法研究会学術講演会シンポジウム (神戸), 2000年6月; (発表予定), タイトル: ELISA による母乳中のダイオキシン毒性評価法の開発 - GC/MS 法との両立は可能か? -

Table 1 ELISA及びGC/MS法による母乳中ダイオキシン濃度の比較

試料	GC/MS法*	ELISA
	pg/g fat	pg/g fat
母乳 1	7.96	7.91
母乳 2	15.01	15.58
母乳 3	4.22	4.24
母乳 4	7.74	10.28
母乳 5	5.25	7.26
母乳 6	10.99	14.66
母乳 7	4.93	6.45
母乳 8	9.13	8.53
母乳 9	5.24	5.20
母乳 10	9.12	10.79
母乳 11	7.42	7.66
母乳 12	7.25	11.66
母乳 13	8.18	5.44
母乳 14	9.56	9.98
母乳 15	5.09	4.29
母乳 16	4.59	4.00
母乳 17	5.21	4.57

\*: 2,3,7,8-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDの合計値

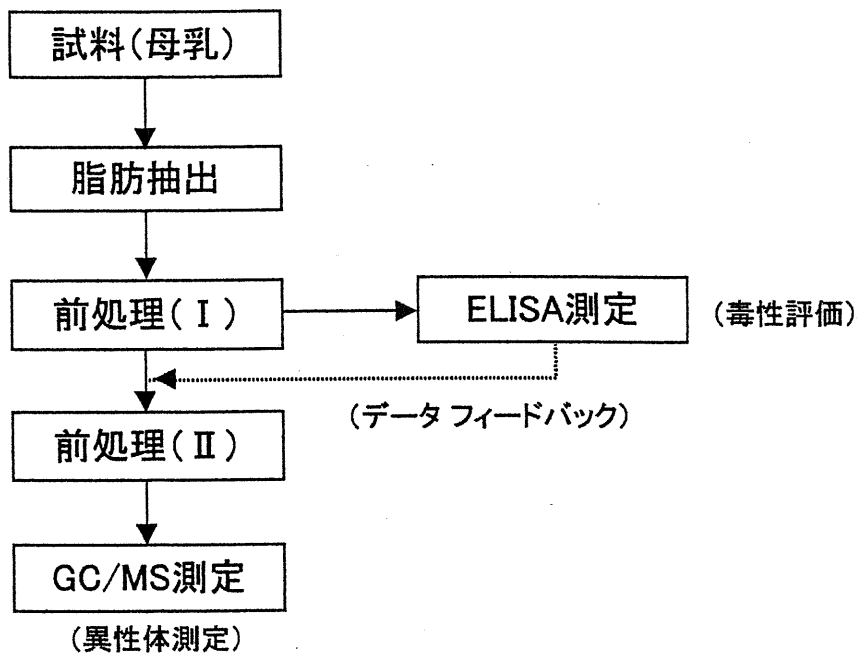


Figure 1. ELISA及びGCMS法によるダイオキシン分析フロー

3層硫酸シリカゲルカートリッジ

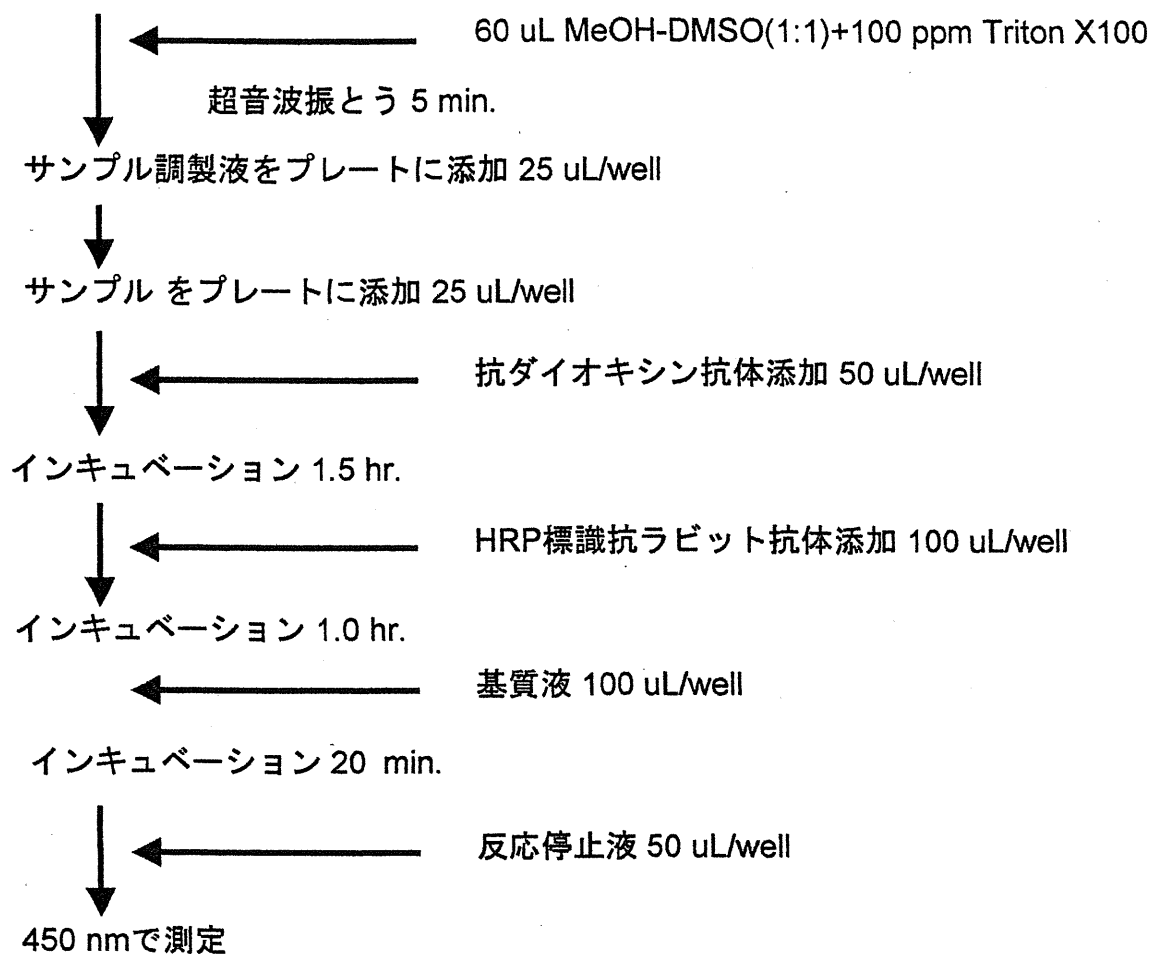
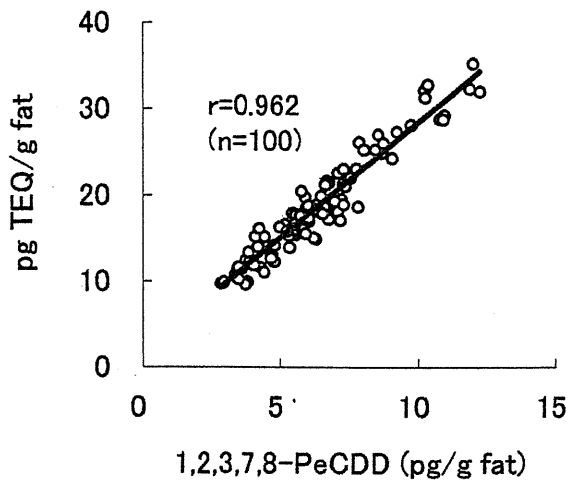


Figure 2. ELISAの操作手順

1,2,3,7,8-PeCDDとTEQとの相関



2,3,4,7,8-PeCDFとTEQとの相関

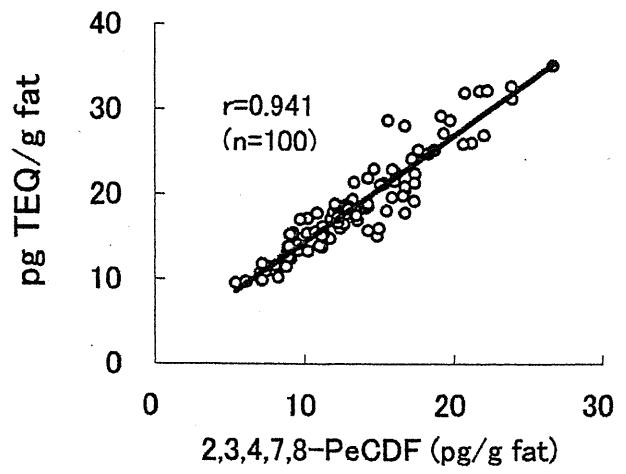


Figure 3. ダイオキシン異性体とTEQとの相関性



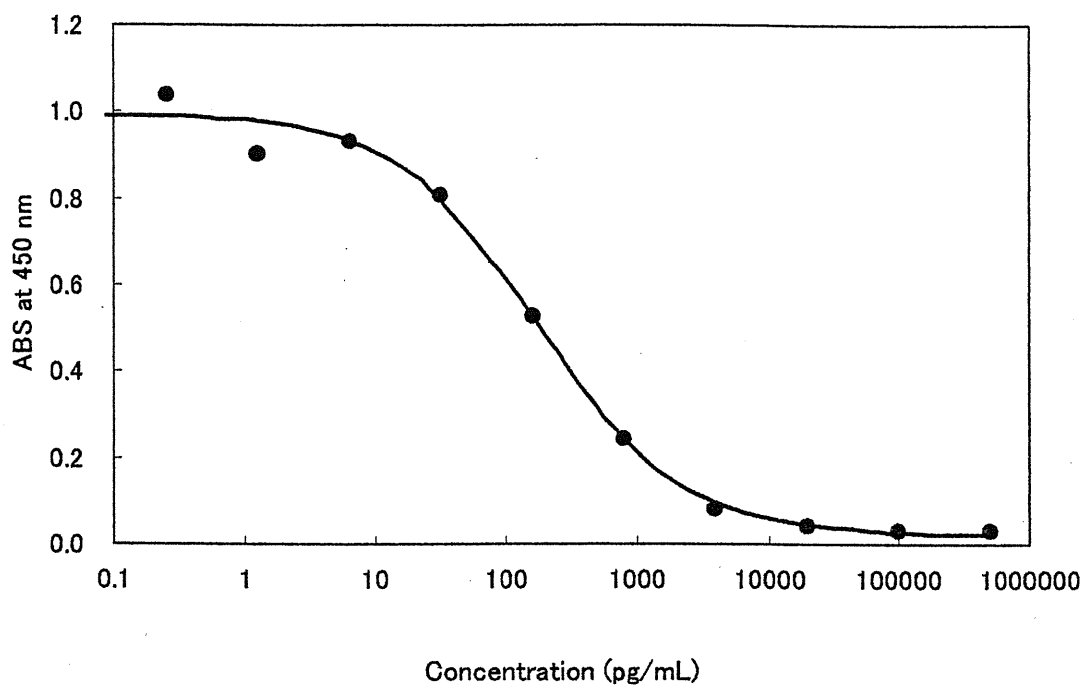


Figure 4. ELISAによるダイオキシンの検量線

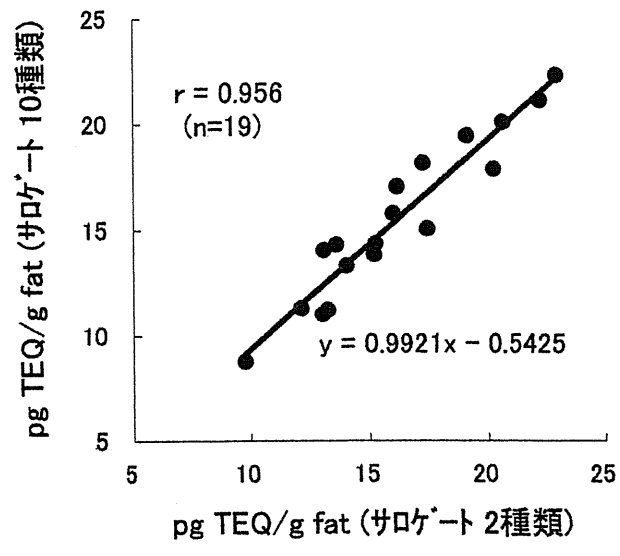
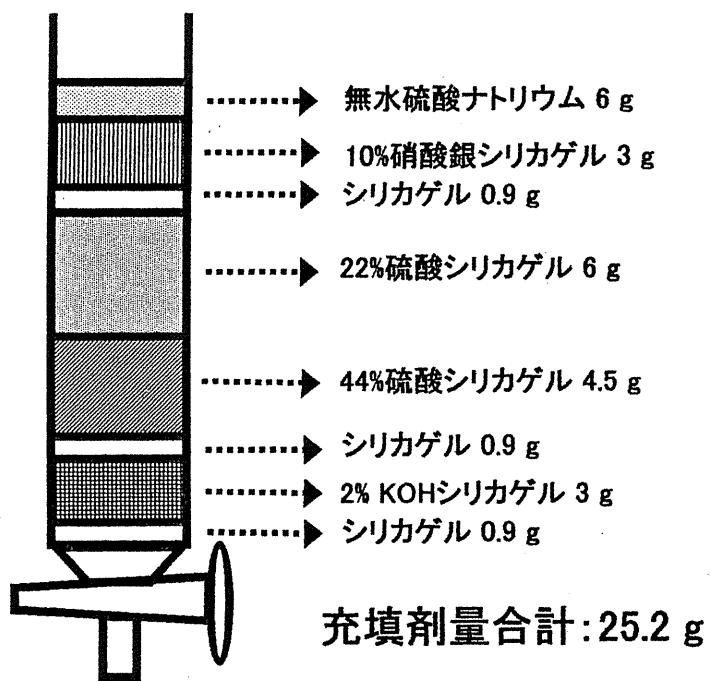


Figure 5. サロケート2種類および10種類で測定したデータの相関性

(A) 多層シリカゲルカラム  
(従来用いられているもの)



(B) 3層硫酸シリカゲルカラム  
(本研究で検討したもの)

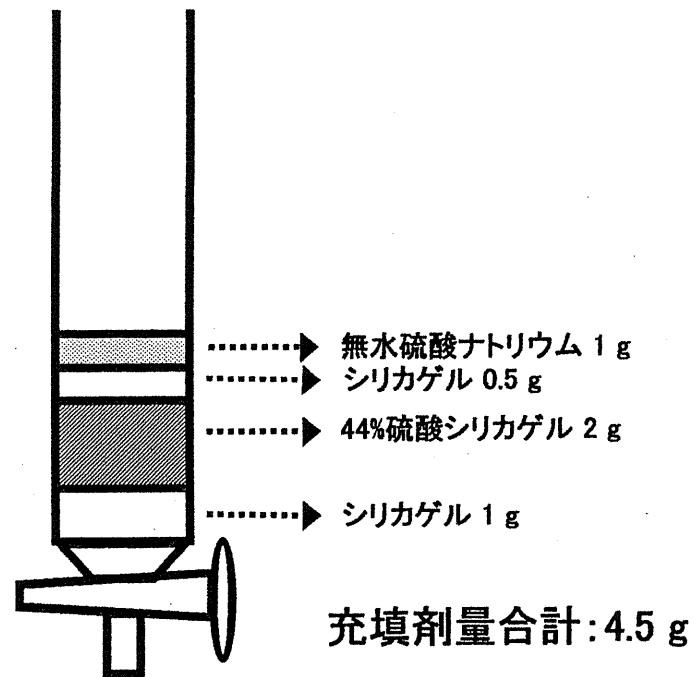


Figure 6. (A)多層シリカゲルカラム, 及び(B)3層硫酸シリカゲルカラム

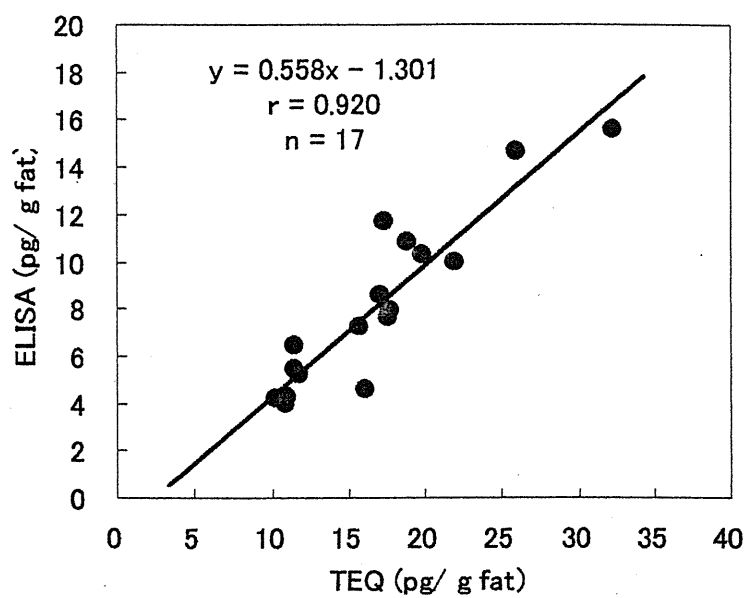


Figure 7. ELISAによる測定値とTEQ(PCDD/F)との相関性

平成 11 年度 厚生科学研究費（生活安全総合研究事業）  
研究報告

生体試料中のダイオキシンの酵素イムノアッセイ法の開発研究

—イムノアッセイ法によるダイオキシン類のスクリーニング法の開発—

主任研究者	松木 容彦	食品薬品安全センター秦野研究所	研究部長
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析学教室	教授
研究協力者	織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
	堀 伸二郎	大阪府立公衆衛生研究所	課長

研究要旨

胎脂及び母乳中のダイオキシン類汚染を明らかにするための簡便、迅速定量法として、ポリクロナル抗体を用いるイムノアッセイ法やレポータジーンを用いるアッセイ法が開発されている。これらのアッセイ法を検証するために胎児及び母乳中のダイオキシン類の機器分析法を開発する必要がある。そこで、イムノアッセイ法に用いる胎脂及び母乳脂肪中のダイオキシン類の異性体分析法の開発を行うとともにイムノアッセイ法の試料調整法を検討した。

胎脂及び母乳脂を室温アルカリ分解を行った後、多層カラムにより精製する。次に、アルミナカラムにより、PCDDs/PCDFs と PCBs を分離する。さらに、PCBs 画分をミニ活性炭カラムにより 1)PCBs, 2)mono-ortho-PCBs, 3)non-ortho-PCBs の 3 画分に分離することによりダイオキシン類はもとよりコプラナ PCBs も高精度で分析することが出来た。

A. 研究目的

現在、内分泌かく乱化学物質による環境及びヒトに対する汚染やその影響が社会問題になっている。中でも、ダイオキシン類のヒトへの汚染、特に胎児及び乳児に対する影響等については不明な点が多い。そこで、ダイオキシン類の胎児汚染の有無及び母乳を介しての乳児移行量を明らかにするには、胎児及び母乳中のダイオキシン類を測定する必要がある。

ダイオキシンの測定には高額な機器と高度な分析技術が必要である。さらに、分析に

は長期間を要する。そこで、最近ダイオキシン類の簡便、迅速定量法としてポリクロナル抗体を用いるイムノアッセイ法やレポータジーンを用いるアッセイ法が開発されている。これらのアッセイ法を検証するために胎脂及び母乳中のダイオキシン類の分析法を開発する必要がある。そこで、イムノアッセイ法に用いる胎脂及び母乳脂肪中のダイオキシン類の異性体分析法の開発を行うとともにイムノアッセイ法の試料調整法を検討した。

## B. 研究方法

### B-1 試料の前処理

B-1-1. 内標準物質の添加（クリーンアップスパイク）は抽出操作前の試料に、 $^{13}\text{C}_{12}$ で標識されたダイオキシン類 17 種類（各 100pg）及びコプラナーPCB(non-ortho;各 1ng、mono-ortho;2ng)12 種類（表 1）を内標準物質として添加する。

### B-1-2. 抽出・アルカリ分解

胎脂及び母乳脂肪（約 1g）を 50mL のピーカーに取り、1mol/L 水酸化カリウム-エタノール溶液 20mL を加え、室温でマグネチックスターラーにて緩やかに 2 時間攪拌し、アルカリ分解を行う。このアルカリ分解液を、100mL の分液漏斗に移し、ヘキサン洗浄水 20mL とヘキサン 20mL を加え、15 分間振とうする。ヘキサン層を分離し、水層にさらにヘキサン 20mL を加え同様の抽出操作を 2 回行う。ヘキサン層を合わせヘキサン洗浄水 20mL で 3 回洗浄する。次に、ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、約 5mL に濃縮する。

### B-1-3 クリーンアップ

#### 1) 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィ

内径 15mm、長さ 300mm のカラムにシリカゲル 0.6g、2%水酸化カリウムシリカゲル 1g、シリカゲル 0.6g、44%硫酸シリカゲル 1.5g、22%硫酸シリカゲル 2g、シリカゲル 0.6g、10%硝酸銀シリカゲル 1g 及び無水硫酸ナトリウム 4g を順次ヘキサンで湿式充てんし、多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管を作製する。

次に、ヘキサン 50mL を流して充てん物を十分洗浄した後、ヘキサン液面が充てん物上部にくるようにする。このカラムに前記アルカリ分解等により得られた試料抽出液をカラムに静かに移し入れ、液面を無水硫酸ナトリウム層の上端まで下げる。ヘキサン 2mL で試験管を洗浄し、洗液はカラムクロマトグラフ管内壁を洗いながら入れる。この洗浄操作をもう一度繰り返す。次に、ヘキサン 3mL をカラムクロマトグラフ管に流入した後、ヘキサン 75mL を滴下速度約 2.5mL/min（毎秒 1 滴程度）の速度で流し、ダイオキシン類及びコプラナーPCBs を溶出する。この溶出液を約 5mL に濃縮する。

#### 2) アルミナカラムクロマトグラフィ

内径 10mm、長さ 150mm のカラムにアルミナ 2g を、ヘキサンで湿式充てんし、その上に無水硫酸ナトリウムを約 10mm 積層する。ヘキサンで充てん物を十分洗浄した後、ヘキサン液面が充てん物上部にくるようにする。このカラムに前記多層カラムで精製した試料溶液を静かに移し入れ、液面を無水硫酸ナトリウム層の上端まで下げる。ヘキサン 2mL で試験管を洗浄し、洗液はカラムクロマトグラフ管内壁を洗いながら入れる。この洗浄操作をもう一度繰り返す。次に、ヘキサン 3mL をカラムクロマトグラフ管に流入した後、2% (v/v) ジクロロメタン-ヘキサン 45mL を滴下速度約 2.5mL/min で流し、PCBs を溶出する。さらに 50%ジクロロメタン-ヘキサン 50mL を、滴下速度約 2.5mL/min で流し、ダイオキシン類(PCDDs+PCDFs 画分)を溶出する。

PCBs画分は濃縮器で約5mLに濃縮した後、窒素気流により、溶媒を揮散除去した後、ヘキサン5mLに溶解する。

### 3) 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィー

パスツールピペットに無水硫酸ナトリウム5mm、活性炭シリカゲル125mg、無水硫酸ナトリウム10mmを積層する。ヘキサンの液面を十分洗浄した後、ヘキサン液面が充てん物上部にくるようにする。これに前記アルミナカラムで得られたPCBs画分をカラムに移し入れ、少量のヘキサンで洗い込み、ヘキサン75mLでPCBs(一般のPCBs)を溶出する。次に、30%ジクロロメタン-ヘキサン75mLでmono-ortho-PCBsを溶出させた後、50%酢酸エチル-ベンゼン80mLでnon-ortho-PCBsを溶出させる。

溶出液は約5mLに濃縮した後、窒素気流により、溶媒を揮散除去した後、シリンジスパイク溶液を一定量(20 $\mu$ L; 2ppb)加え、GC-MS試料溶液とする。

#### B-2. GC-MSによる同定・定量

ダイオキシン類及びコプラナーPCBsの同定・定量はキャピラリーカラムを用いるガスクロマトグラフ(HRGC)-高分解能二重収束質量分析計(HRMS)により測定した。

ダイオキシン類及びコプラナーPCBsの同定には各異性体につき2個のモニターイオンを測定しそのピーク面積比が、標準物質のものとほぼ同じであり、同位体の天然存在比に対して $\pm 15\%$ 以内であれば定量する。

試料中のダイオキシン類及びコプラナ

ーPCBsの濃度は、pg-TEQ/gで記述する。

上記のダイオキシン類の分析法を図1に示した。

#### C. 研究結果

上記の分析法によりAhレセプターを用いるダイオキシン類のスクリーニングアッセイ及びポリクロナル抗体を用いるイムノアッセイ用等の母乳試料を6検体分析を行った。

母乳中の実測濃度(pg/g fat)の平均値(最大値~最小値)はPCDDsで92.4 pg/g fat(最大値142.5~最小値45.4)、PCDFsで17.4 pg/g fat(最大値10.3~最小値45.4)、Co-PCBsで99.7 pg/g fat(最大値123.5~最小値71.2)、PCDDs+PCDFsで109.7 pg/g fat(最大値163.6~最小値59.2)、PCDDs+PCDFs+Co-PCBsで209.4 pg/g fat(最大値275.9~最小値130.3)であった。

TEQ濃度(pg-TEQ/g fat)の平均値(最大値~最小値)はPCDDsで9.8 pg/g fat(最大値12.1~最小値6.0)、PCDFsで5.3 pg/g fat(最大値7.3~最小値3.4)、Co-PCBsで5.8 pg/g fat(最大値8.3~最小値4.4)、PCDDs+PCDFsで15.1 pg/g fat(最大値18.8~最小値10.7)、PCDDs+PCDFs+Co-PCBsで20.9 pg/g fat(最大値26.7~最小値15.2)であった(表2)。

ダイオキシン類の各異性体実測濃度では1,2,3,6,7,8-HxCDD, OCDD, 2,3,4,7,8-PeCDFなどが比較的高い濃度を示した。一方、TEQ濃度においては1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDFの3

種類の異性体で全体の約 85%を占めていた。分析結果の詳細は表 2 に示した。

アッセイ用の試料として 6 種類の母乳中ダイオキシン類濃度の保証値を確定すると共にアッセイ用の試料調製を行った。

試料調製としては、1) 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー処理と 2) アルミナカラムクロマトグラフィー処理等を行った試料を作成した。

#### D. 考察

ヒト体内に蓄積されているダイオキシン類は相対毒性係数 (TEF) の設定されている異性体に限られており、その TEQ の約 85% は 3 つの異性体で占められている。従って、ダイオキシンの人体汚染の程度を Ah レセプターを用いるダイオキシン類のスクリーニングアッセイあるいはポリクロナル抗体を用いるイムノアッセイ等でスクリーニングする場合は TEF の無い (毒性の無い) ダイオキシン類の妨害等を考慮する必要がない。

Ah レセプターを用いるダイオキシン類のスクリーニングアッセイではベンズピレン等の多環芳香族炭化水素の影響に注意す

る必要がある。

#### E. 結論

1. Ah レセプターを用いるダイオキシン類のスクリーニングアッセイあるいはポリクロナル抗体を用いるイムノアッセイ法を検証するためのダイオキシン類分析法を確立した。

2. アッセイ用の試料として 6 種類の母乳中ダイオキシン類濃度の保証値を確定すると共にアッセイ用の試料調整を行った。

#### F. 研究業績

##### 論文

1. S.Hori, Y.Konishi, K.Kuwabara: Organohalogen Compounds, 44, 141

2. 堀 伸二郎: ダイオキシン類 (PCDDs, PCDFs, Co-PCBs) の分析の実際, ジャパンフードサイエンス, 38, 58 (1999)

##### 学会発表

1. S.Hori, Y.Konishi, K.Kuwabara: 19<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, September 12-17, 1999-Venice, Ital



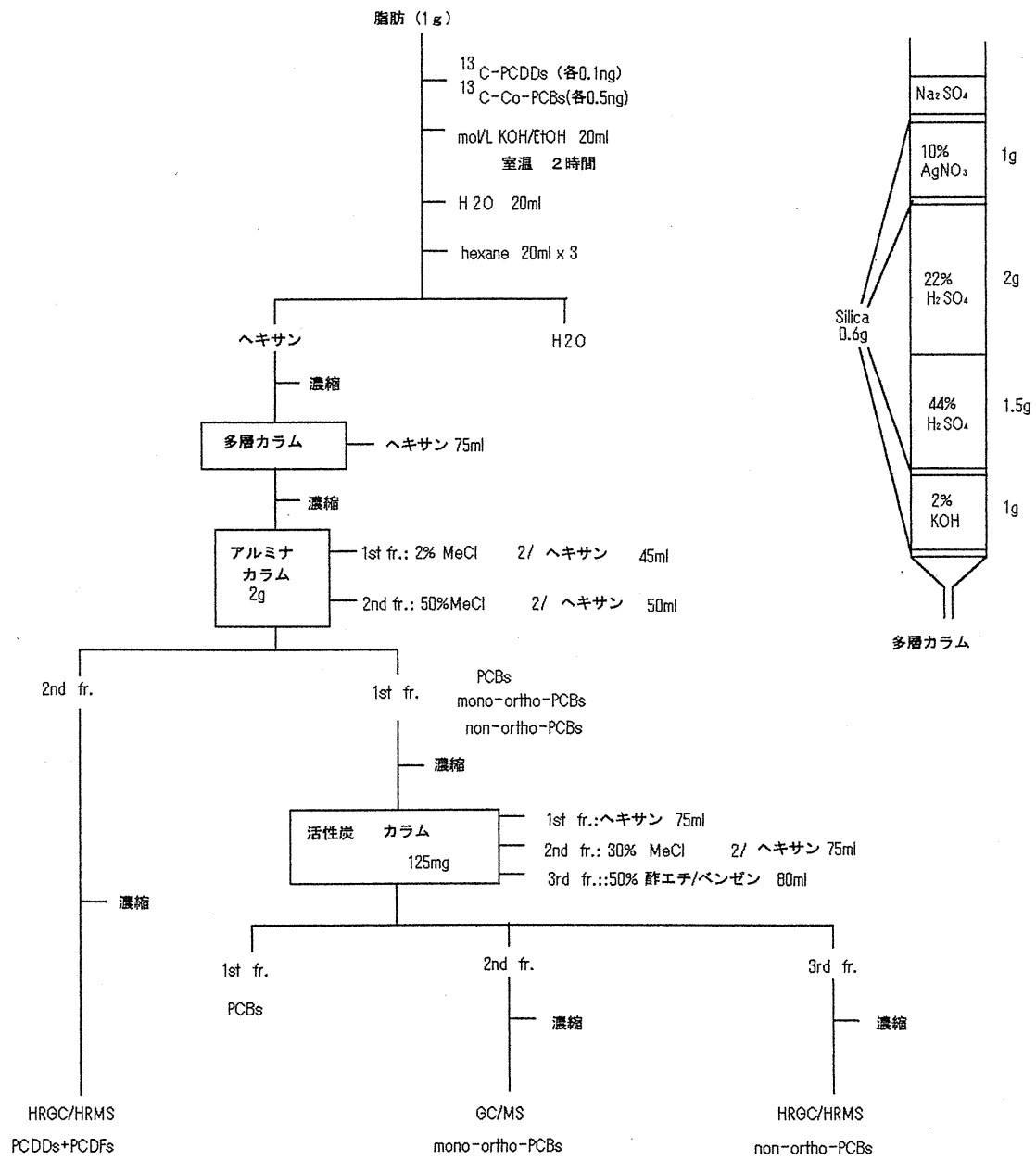


図1 脂肪からのダイオキシン分析手法

表1 添加ダイオキシン類およびコプラナーPCBs異性体と毒性等価係数(TEF)

PCDD/DF	TEF WHO(1997)	コプラナーPCBs	TEF WHO(1997)
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	non-ortho	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	3,3',4,4'-TCB	0.0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	3,,4,4',5-TCB	0.0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	3,3',4,4',5-PeCB	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.01
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	0.0001		
2,3,7,8-TCDF	0.1	mono-ortho	
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	2,3,3',4,4'-PeCB	0.0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	2,3,4,4',5-PeCB	0.0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	2,3',4,4',5-peCB	0.0001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	2',3,4,4',5-PeCB	0.0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	2,3,3',4,4',5-HxCB	0.0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	2,3,3',4,4',5'-HxCB	0.0005
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	2,3',4,4',5,5'-HxCB	0.00001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	0.0001
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	0.0001		

表2 母乳中のダイオキシン類及びコプラナPCBs濃度

ダイオキシン異性体	毒性等価係数 (TEF)	試料中濃度 毒性等量		試料中濃度 毒性等量		試料中濃度 毒性等量		試料中濃度 毒性等量		試料中濃度 毒性等量		試料中濃度 毒性等量		試料中濃度 毒性等量	
		pg/g (ppt)	TEQ (ppt)	pg/g (ppt)	TEQ (ppt)	pg/g (ppt)	TEQ (ppt)	pg/g (ppt)	TEQ (ppt)	pg/g (ppt)	TEQ (ppt)	pg/g (ppt)	TEQ (ppt)	pg/g (ppt)	TEQ (ppt)
		No.1		No.2		No.3		No.4		No.5		No.6		平均	
2,3,7,8-TCDD	1	0.462	0.462	1.141	1.141	0.272	0.272	0.894	0.894	1.748	1.748	1.221	1.221	0.956	0.956
1,2,3,7,8-PeCDD	1	6.205	6.205	4.068	4.068	3.827	3.827	5.561	5.561	6.144	6.144	6.68	6.680	5.414	5.414
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	3.347	0.335	3.316	0.332	0.691	0.069	2.656	0.266	2.148	0.215	0	0.000	2.026	0.203
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	24.886	2.469	19.582	1.958	15.63	1.563	32.92	3.292	34.266	3.427	36.864	3.686	27.325	2.732
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	3.432	0.343	2.738	0.274	2.617	0.262	5.76	0.576	7.443	0.744	3.963	0.396	4.326	0.433
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	7.195	0.072	3.308	0.033	4.173	0.042	9.831	0.098	7.468	0.075	7.502	0.075	6.580	0.066
OCDD	0.0001	27.756	0.003	17.452	0.002	18.173	0.002	73.659	0.007	51.149	0.005	86.291	0.009	45.747	0.005
PCDDs	計	73.083	9.888	51.605	7.807	45.383	6.038	131.281	10.694	110.366	12.357	142.521	12.067	92.373	9.809
ベンゾフラン異性体															
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.825	0.083	0	0.000	1.185	0.119	0	0.000	1.798	0.180	1.097	0.110	0.818	0.082
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.66	0.033	0	0.000	0.815	0.041	0	0.000	1.424	0.071	1.296	0.065	0.699	0.035
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	6.436	3.218	6.046	3.023	8.519	4.260	12.612	6.306	10.015	5.008	12.064	6.032	9.282	4.641
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	1.023	0.102	0.418	0.042	1.605	0.161	3.128	0.313	2.448	0.245	2.318	0.232	1.823	0.182
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	1.452	0.145	0.951	0.095	1.086	0.109	3.997	0.400	5.32	0.532	3.19	0.319	2.666	0.267
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.000	0.000
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.99	0.099	1.939	0.194	0	0.000	2.756	0.276	0	0.000	0	0.000	0.948	0.095
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	1.155	0.012	0.989	0.010	0.593	0.006	0.968	0.010	1.973	0.020	1.072	0.011	1.125	0.011
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.000	0.000
OCDF	0.0001	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.000	0.000
PCDFs	計	12.541	3.692	10.343	3.384	13.803	4.694	23.461	7.304	22.978	6.055	21.037	6.768	17.361	5.313
PCDDs+PCDFs	合計	85.624	13.580	61.948	11.171	59.186	10.730	154.742	17.998	133.344	18.413	163.558	18.835	109.734	15.121
コプラナPCB															
3,3',4,4'-TCB	0.0001	15.974	0.002	27.148	0.003	10.272	0.001	8.59	0.001	18.681	0.002	11.964	0.001	15.438	0.002
3,3',4,4',5'-PeCB	0.1	58.284	5.828	47.452	4.745	42.568	4.257	52.234	5.223	80.17	8.017	48.504	4.850	54.869	5.487
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.01	24.95	0.250	31.027	0.310	18.222	0.182	25.621	0.256	24.625	0.246	51.844	0.518	29.382	0.294
	計	99.208	6.079	105.627	5.058	71.062	4.440	86.445	5.480	123.476	8.265	112.312	5.370	99.688	5.782
ダイオキシン類	合計	184.832	19.659	167.575	16.229	130.248	15.170	241.187	23.479	256.82	26.678	275.87	24.205	209.422	20.903

平成11年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
研究報告書

生体試料中ダイオキシンの酵素免疫アッセイ法の研究開発  
—臍帯血・母体血・母乳採取に関する検討—

主任研究者 松木 容彦 食品薬品安全センター秦野研究所 研究部長  
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学 教授  
協力研究者 牧野恒久 東海大学医学部産婦人科 教授  
岩崎克彦 東海大学医学部産婦人科 助教授

研究要旨

ダイオキシンの免疫アッセイ法の確立とその正確さや精度 GC/MS 法による確認を行う時に必要となる母乳、臍帯血の供給に当たり本年度は、患者からの生体試料採取に関わるインフォームドコンセントの得かたや採乳、採血等の方法について吟味した。また、得られた一連の試料を必要とする各研究協力者へ提供した。

A. 研究目的

本研究の目的は、ELISA 法や GC/MS 法を確立する上で必要とされる汚染されていない母乳脂、母体血を各研究協力者に提供することにある。

B. 研究方法

東海大学医学部付属病院産科外来において、当院で分娩予定の患者に対し、採取方法、研究目的などを十分に説明した後で、同意の得られた患者より同意書をいただき、検体を採取した。

(1) 採取時期と採取量

母体血、臍帯血については分娩直後に行った。母体血の採取量は 20ml、また臍帯血については 50ml としたが、後者についてはこれに満たない場合も認められた。臍帯血の採取にあたっては、児が娩出し、臍帯結紮、切断後に、胎盤剥離前にシリ

ン法で採取した。得られた検体はすぐに分離、保存を行った。母乳採取にあたっては、産褥 5 日目に、搾乳器を使わずに、乳頭を直接哺乳びんに接して、用手搾乳採取した。採取量は 50ml を目指したが、全く採取できなかった症例も存在した。なお、母体血・臍帯血・母乳一連の採取は、すべて同一患者からであり、他の患者からの重複はない。

(2) 採取器具

内分泌攪乱化学物質のコンタミネーションを防止する目的でガラス製の器具を主体とし、以下を使用した。母体血・臍帯血採取用として、・注射器：TOP, 10ml, 20 ml, 50 ml ・注射針：ニプロ, フローマックス, 18G, 21G (×1 1/2") ・スピッツ：シバタ, TS13, 10ml 母乳採取用として、・哺乳びん：ピジョン, KR-100 以上を使用した。

(3) 採取器具の洗浄

洗浄液によるコンタミネーションに配慮