

表-1. 定量する化合物の名称等.

化合物の名称等		CAS Registry Number	IUPAC Number	
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	1746-01-6	-	
	1,2,3,7,8-PeCDD	40321-76-4	-	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	39227-28-6	-	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	57653-85-7	-	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	19408-74-3	-	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	35822-39-4	-	
	OCDD	3268-87-9	-	
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	51207-31-9	-	
	1,2,3,7,8-PeCDF	57117-41-6	-	
	2,3,4,7,8-PeCDF	57117-31-4	-	
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	70648-26-9	-	
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	57117-44-9	-	
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	72918-21-9	-	
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	60851-34-5	-	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	67562-39-4	-	
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	55673-89-7	-	
	OCDF	39001-02-0	-	
Co-PCBs	<i>non-ortho</i>	3,3',4,4'-TeCB	32598-13-3	#77
		3,4,4',5'-TeCB	70362-50-4	#81
		3,3',4,4',5'-PeCB	57465-28-8	#126
		3,3',4,4',5,5'-HxCB	32774-16-6	#169
	<i>mono-ortho</i>	2,3,3',4,4'-PeCB	32598-14-4	#105
		2,3,4,4',5'-PeCB	74472-37-0	#114
		2,3',4,4',5'-PeCB	31508-00-6	#118
		2',3,4,4',5'-PeCB	65510-44-3	#123
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	38380-08-4	#156
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	69782-90-7	#157
		2,3',4,4',5,5'-HxCB	52663-72-6	#167
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	39635-31-9	#189

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.

化合物の名称等	IUPAC Number	目標定量下限値			
		(pg/g-fat)	(pg/g または mL)		
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	-	1	0.003	
	1,2,3,7,8-PeCDD	-	1	0.003	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	2	0.006	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-	2	0.006	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	2	0.006	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-	2	0.006	
	OCDD	-	4	0.01	
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	-	1	0.003	
	1,2,3,7,8-PeCDF	-	1	0.003	
	2,3,4,7,8-PeCDF	-	1	0.003	
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	-	2	0.005	
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	-	2	0.005	
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	-	2	0.005	
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	-	2	0.005	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-	2	0.005	
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-	2	0.005	
	OCDF	-	4	0.01	
Co-PCBs	<i>non-ortho</i>	3,3',4,4'-TeCB	#77	10	0.03
		3,4,4',5-TeCB	#81	10	0.03
		3,3',4,4',5-PeCB	#126	10	0.03
		3,3',4,4',5,5'-HxCB	#169	10	0.03
	<i>mono-ortho</i>	2,3,3',4,4'-PeCB	#105	10	0.03
		2,3,4,4',5-PeCB	#114	10	0.03
		2,3',4,4',5-PeCB	#118	10	0.03
		2',3,4,4',5-PeCB	#123	10	0.03
		2,3,3',4,4',5-HxCB	#156	10	0.03
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	#157	10	0.03
		2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167	10	0.03
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189	10	0.03

pg/g-fat : 脂肪重量あたりの濃度

pg/gまたはmL : 試料全量あたりの濃度 (血液中の脂質濃度を0.3%として計算している。血液中の脂質濃度はかなり変動することに留意する必要がある。)

表-3. 測定に用いる標準物質.

		化合物の名称等	IUPAC Number
PCDDs		2,3,7,8-TeCDD	-
		1,2,3,7,8-PeCDD	-
		1,2,3,4,7,8-HxCDD	-
		1,2,3,6,7,8-HxCDD	-
		1,2,3,7,8,9-HxCDD	-
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-
		OCDD	-
	PCDFs		2,3,7,8-TeCDF
		1,2,3,7,8-PeCDF	-
		2,3,4,7,8-PeCDF	-
		1,2,3,4,7,8-HxCDF	-
		1,2,3,6,7,8-HxCDF	-
		1,2,3,7,8,9-HxCDF	-
		2,3,4,6,7,8-HxCDF	-
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-
		OCDF	-
Co-PCBs	<i>non-ortho</i>	3,3',4,4'-TeCB	#77
		3,4,4',5-TeCB	#81
		3,3',4,4',5-PeCB	#126
		3,3',4,4',5,5'-HxCB	#169
	<i>mono-ortho</i>	2,3,3',4,4'-PeCB	#105
		2,3,4,4',5-PeCB	#114
		2,3',4,4',5-PeCB	#118
		2',3,4,4',5-PeCB	#123
		2,3,3',4,4',5-HxCB	#156
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	#157
		2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189

表4. 測定に用いる同位体スパイク.

		化合物の名称等
PCDDs		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TeCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8-PeCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD
		$^{13}\text{C}_{12}$ -OCDD
PCDFs		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TeCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8-PeCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,7,8-PeCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,6,7,8-HxCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF
		$^{13}\text{C}_{12}$ -OCDF
Co-PCBs	<i>non-ortho</i>	$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4'-TeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -3,4,4',5-TeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5',5'-HxCB
	<i>mono-ortho</i>	$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4'-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,4',5-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4,4',5-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2',3,4,4',5-PeCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5-HxCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5'-HxCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4,4',5,5'-HxCB
		$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5,5'-HpCB

表-5. 測定質量数の例.

化合物の名称等		測定質量数			
		M	M+2	M+4	
PCDDs	¹² C ₁₂	¹² C ₁₂ -TeCDDs	319.8965**	321.8936*	323.8906
		¹² C ₁₂ -PeCDDs	353.8576	355.8546*	357.8516**(1)
		¹² C ₁₂ -HxCDDs	387.8186	389.8157*	391.8127**(2)
		¹² C ₁₂ -HpCDDs	421.7796	423.7766*	425.7737**
		¹² C ₁₂ -OCDD	455.7407	457.7377**	459.7348*
¹³ C ₁₂	¹³ C ₁₂	¹³ C ₁₂ -TeCDDs	331.9368**	333.9339*	335.9309
		¹³ C ₁₂ -PeCDDs	365.8978	367.8949*	369.8919**
		¹³ C ₁₂ -HxCDDs	399.8589	401.8559*	403.8530**
		¹³ C ₁₂ -HpCDDs	433.8199	435.8169*	437.8140**
		¹³ C ₁₂ -OCDD	467.7809	469.7779	471.7750*
PCDFs	¹² C ₁₂	¹² C ₁₂ -TeCDFs	303.9016**	305.8987*	307.8957
		¹² C ₁₂ -PeCDFs	337.8627	339.8597*	341.8567**
		¹² C ₁₂ -HxCDFs	371.8237	373.8208*	375.8178**
		¹² C ₁₂ -HpCDFs	405.7847	407.7818*	409.7789**
		¹² C ₁₂ -OCDF	439.7457	441.7428**	443.7399*
¹³ C ₁₂	¹³ C ₁₂	¹³ C ₁₂ -TeCDFs	315.9419**	317.9389*	319.9360
		¹³ C ₁₂ -PeCDFs	349.9029	351.9000*	353.8970**
		¹³ C ₁₂ -HxCDFs	383.8639	385.8610*	387.8580**
		¹³ C ₁₂ -HpCDFs	417.8250	419.8220*	421.8191**
		¹³ C ₁₂ -OCDF	451.7860	453.7830**	
Co-PCBs	¹² C ₁₂	¹² C ₁₂ -TeCBs	289.9224**	291.9194*	293.9165
		¹² C ₁₂ -PeCBs	323.8834	325.8804*	327.8775**
		¹² C ₁₂ -HxCBs	357.8444	359.8415*	361.8385**
		¹² C ₁₂ -HpCBs	391.8054	393.8025*	395.7995**
		¹³ C ₁₂	¹³ C ₁₂	¹³ C ₁₂ -TeCBs	301.9626**
¹³ C ₁₂ -PeCBs	335.9236			337.9207*	339.9177**
¹³ C ₁₂ -HxCBs	369.8847			371.8817*	373.8788**
		¹³ C ₁₂ -HpCBs	403.8457	405.8428*	407.8398**

*: 親イオン群の中で存在比が最も高い塩素同位体の質量数

** : 親イオン群の中で存在比が2番目に高い塩素同位体の質量数

(1)及び(2) : 試料中のPCB濃度が高い場合、この質量数は妨害を受ける可能性がある。

表-6. PCDDs, PCDFs及びCo-PCBsの塩素同位体の理論天然存在比.

化合物の名称等		理論天然存在比				
		M	M+2	M+4	M+6	M+8
PCDDs	TeCDDs	77.43	100.00	48.74	10.72	0.94
	PeCDDs	62.06	100.00	64.69	21.08	3.50
	HxCDDs	51.79	100.00	80.66	34.85	8.54
	HpCDDs	44.43	100.00	96.64	52.03	16.89
	OCDD	34.54	88.80	100.00	64.48	26.07
PCDFs	TeCDDs	77.55	100.00	48.61	10.64	0.92
	PeCDDs	62.14	100.00	64.57	20.98	3.46
	HxCDDs	51.84	100.00	80.54	34.72	8.48
	HpCDDs	44.47	100.00	96.52	51.88	16.80
	OCDD	34.61	88.89	100.00	64.39	25.98
Co-PCBs	TeCBs	76.67	100.00	49.11	10.83	0.93
	PeCBs	61.42	100.00	65.29	21.43	3.56
	HxCBs	51.22	100.00	81.48	35.51	8.75
	HpCBs	43.93	100.00	97.67	53.09	17.38

各塩素数毎に存在比が最も高い質量数の存在比を100として示してある.

表-7. TEQ算出のためのTEF.

化合物の名称等		IUPAC Number	WHO,1998-TEF	
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	-	1	
	1,2,3,7,8-PeCDD	-	1	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-	0.01	
	OCDD	-	0.0001	
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	-	0.1	
	1,2,3,7,8-PeCDF	-	0.05	
	2,3,4,7,8-PeCDF	-	0.5	
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	-	0.1	
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-	0.01	
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-	0.01	
	OCDF	-	0.0001	
Co-PCBs	<i>non-ortho</i>	3,3',4,4'-TeCB	#77	0.0001
		3,4,4',5'-TeCB	#81	0.0001
		3,3',4,4',5'-PeCB	#126	0.1
		3,3',4,4',5,5'-HxCB	#169	0.01
	<i>mono-ortho</i>	2,3,3',4,4'-PeCB	#105	0.0001
		2,3,4,4',5'-PeCB	#114	0.001
		2,3',4,4',5'-PeCB	#118	0.0001
		2',3,4,4',5'-PeCB	#123	0.0001
		2,3,3',4,4',5'-HxCB	#156	0.001
		2,3,3',4,4',5',5'-HxCB	#157	0.001
		2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167	0.00001
		2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189	0.0001

表-8. PCDDs, PCDFs及びCo-PCBs測定分析結果の表記例。

化合物の名称等	IUPAC Number	実測濃度 (pg/g-fat)	WHO,1998-TEF	
			毒性係数 TEF	毒性等量 TEQ (pg-TEQ/g-fat)
P C D D s	2,3,7,8-TeCDD	-	1	
	1,2,3,7,8-PeCDD	-	1	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-	0.01	
	OCDD	-	0.0001	
Total PCDDs	-	-		
P C D F s	2,3,7,8-TeCDF	-	0.1	
	1,2,3,7,8-PeCDF	-	0.05	
	2,3,4,7,8-PeCDF	-	0.5	
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	-	0.1	
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	-	0.1	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-	0.01	
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-	0.01	
	OCDF	-	0.0001	
Total PCDFs	-	-		
Total (PCDDs+PCDFs)	-	-	-	
C o - P C B s	3,3',4,4'-TeCB	#77	0.0001	
	3,4,4',5'-TeCB	#81	0.0001	
	3,3',4,4',5'-PeCB	#126	0.1	
	3,3',4,4',5,5'-HxCB	#169	0.01	
	Total non-ortho Co-PCBs	-	-	
	2,3,3',4,4'-PeCB	#105	0.0001	
	2,3,4,4',5'-PeCB	#114	0.001	
	2,3',4,4',5'-PeCB	#118	0.0001	
	2',3,4,4',5'-PeCB	#123	0.0001	
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	#156	0.001	
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	#157	0.001	
	2,3',4,4',5,5'-HxCB	#167	0.00001	
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	#189	0.0001	
	Total mono-ortho Co-PCBs	-	-	
	Total Co-PCBs	-	-	
Total (PCDDs+PCDFs+Co-PCBs)	-	-	-	

[注]

1.実測濃度 : ダイオキシン類及びコプラナーPCB濃度 (pg/g-fat)

2.毒性等量 : 2,3,7,8-TeCDD 毒性等量 (pg-TEQ/g-fat)

カッコ内の数値は実測濃度が目標定量下限値未満であった場合、目標定量下限値の1/2を用いて算出した最大見積もり濃度を表す。

3.表中『N.D.』は目標定量下限値未満を表す。

4.Total PCDDs 及び Total PCDFs はPCDDs 及びPCDFs それぞれにおける各2,3,7,8-位塩素置換異性体の合計を表す (その他の化合物は含んでいない)。

5.Total (PCDDs+PCDFs) は各2,3,7,8-位塩素置換異性体の合計を表す (その他の化合物は含んでいない)。

6.Total non-ortho Co-PCBs 及び Total mono-ortho Co-PCBs はそれぞれ各 non-ortho Co-PCB 及び mono-ortho Co-PCB の合計を表す。

7.Total Co-PCBs はCo-PCBs各化合物の合計を表す。

1 2 解説編

-
- 1 coplaner-PCBs
2 polychlorobiphenyl または polychlorinated biphenyl
3 *ortho*-position
4 isomer
5 congener または homologue
6 検出器の信号をスムージング等の処理によって取り込んでいる装置の場合、S/N の取り扱いに注意する。
7 polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins
8 polychlorinated dibenzofurans
9 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins
10 pentachlorodibenzo-*p*-dioxins
11 hexachlorodibenzo-*p*-dioxins
12 heptachlorodibenzo-*p*-dioxins
13 octachlorodibenzo-*p*-dioxin
14 tetrachlorodibenzofurans
15 pentachlorodibenzofurans
16 hexachlorodibenzofurans
17 heptachlorodibenzofurans
18 octachlorodibenzofuran
19 tetrachlorobiphenyls
20 pentachlorobiphenyls
21 hexachlorobiphenyls
22 heptachlorobiphenyls
23 2,3,7,8-TeCDD toxicity equivalency factor
24 2,3,7,8-TeCDD toxicity equivalency quantity
25 isotope dilution mass spectrometry. 定量する目的物質と同一の化学構造を持ち、特定の元素が天然の元素同位体組成と異なっている濃縮同位体スパイクを試料に添加し、最終的に試料中の同位体組成のずれから目的物質の濃度を定量する方法。PCDDs, PCDFs, Co-PCBs の場合、構成する炭素あるいは塩素の一部あるいは全部を ^{13}C または ^{37}Cl に置き換えた安定同位体スパイクを用いる。 ^{13}C の天然存在比は無視できるほど小さいので定量計算は簡単である。この方法は分析途中に同位体分離が起こらないことが条件となる。定量結果が回収率によらないという利点がある。
26 gas chromatography/mass spectrometry
27 gas chromatograph/mass spectrometer
28 high resolution gas chromatography
29 high resolution gas chromatograph
30 high resolution mass spectrometry
31 high resolution mass spectrometer
32 high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry
33 high resolution gas chromatograph/high resolution mass spectrometer
34 selected ion monitoring. 磁場を固定し、加速電圧を変化させることによって指定した質量数のイオンをモニターする方法。機器によっては SIR (selected ion recording), あるいは SID (selected ion detection) という呼称が用いられることがある。
35 relative response factor
36 not determined
37 electron ionization
38 International Union of Pure and Applied Chemistry
39 World Health Organization
40 Quality Assurance / Quality Control
41 Quality Control Check Sample
42 試料前処理室は前室を含む 2 重扉構造としたり、試料前処理室内への給気・排気はプレフィルター、活性炭フィルター、HEPA フィルターを通じた後行う構造とする等して試料前処理室雰囲気由来の汚染を防ぐよう留意することが望ましい。試料前処理室の給気側に活性炭フィルター及び HEPA フィルターを設置し、目安としては米国連邦規格 (Federal Standard) FS 209E クラス 1,000~10,000, あるいは JIS B 9920 クラス 6~7 程度するとブランク値低減に有効であると考えられる。試料前処理室は加圧型、陰圧型どちらも良いが、クリーン度の観点から考えれば加圧型の試料前処理室の方が有利である。加圧型、陰圧型共に試料前処理室外に空気が漏洩しないような構造が必要であり、また、試料前処理室内作業者の安全の観点から十分な空気供給量を確保することも必要である。この試料前処理室内では極力排ガス、灰、排水、土壌、堆積物等の試料を扱わないようにする。GCMS は可能であれば血液専用のものを用意する等し試料の二次汚染に十分留意する。GCMS を設置する部屋は試料前処理室とは別にする。GCMS 室内空気

の屋外への排気はプレフィルター、活性炭フィルター、HEPA フィルターを通じた後行う構造とする。試料前処理室の清浄度や温度をモニターする等して試料前処理室及び GC/MS 室の室内空気が正常に管理されていることを確認することが望ましい。

43 試薬類の管理を行うこと。例えば有機溶媒に関しては購入した量と廃棄した量の記録を取り収支を把握すること。試料前処理室内では有機溶媒を回収するような装置、例えばロータリーエバポレーターの減圧用ポンプの排気先にはガス冷却管等の回収装置を設けること。

44 ロータリーエバポレーター等で減圧乾燥させてはならない。

45 ロータリーエバポレーター等で減圧乾燥させてはならない。

46 活性炭シリカゲルは十分洗浄しないと測定に影響を与えるような妨害が出る場合が多い。

47 デカンやノナンのかわりにイソオクタン等でも良い。溶媒の種類によって GC 注入可能量が異なるので注意すること。

48 ガラス器具等について、合成洗剤を用いた洗浄、水洗浄、有機溶媒洗浄等により汚染がないようにする。

49 トラップ球を使用することによりロータリーエバポレーター内での還流による接続部からの汚染を防ぐことができる。

50 カラムクロマトグラフィーにおいて使用する充てん剤や溶媒の種類及び量は標準物質や実試料を用いた分画試験を行って決めること。

51 ロックマス、質量校正に使用する化合物は規定しない。

52 例えば同位体スパイク、ロックマスモニターの測定質量数のデータ取込時間を短くする等し、極力1ピークあたりのデータポイント数が多くなるようにする。

53 集中配管等でキャリアガスのボンベが GC と離れている場合、GC 入口にガス精製装置を装着すると良い。

54 他にアセトンヘキサン、メタノールクロロホルム、エタノールジエチルエーテルを用いる方法もある。

55 分析装置の高感度化により超微量の検出が可能のときは試料採取量を少なくすることが出来る。

56 内部標準をデカン溶液として添加した時は、デカンが留去されにくいので、バス温度を高め設定してデカンを十分に除くことが必要である。またバス温度を高くしすぎると回収率が低下するので注意する必要がある。

57 窒素吹きつけ操作に関しては窒素流量が多い、あるいは温度が高すぎると回収率が低下する場合があるので注意する。また、試料を完全に蒸発乾固させてしまうと回収率が低下する場合があるので注意する。

58 シリンジスパイクには、試料に添加した同位体スパイク以外のものを用いる。シリンジスパイクは GC/MS 測定における各測定ごとに (1 injection に付) 1種類以上使用する。

59 検量線用標準溶液の測定は毎回行う必要はない。検量線に使用する濃度範囲で1種類の標準溶液を試料とともに測定する。

60 Total(PCDDs+PCDFs) 実測濃度を有効数字2桁でまとめた Total PCDDs 実測濃度と Total PCDFs 実測濃度の和で表してはならない。

61 Total Co-PCBs 実測濃度を有効数字2桁でまとめた non-ortho PCBs 実測濃度と mono-ortho PCBs 実測濃度の和で表してはならない。

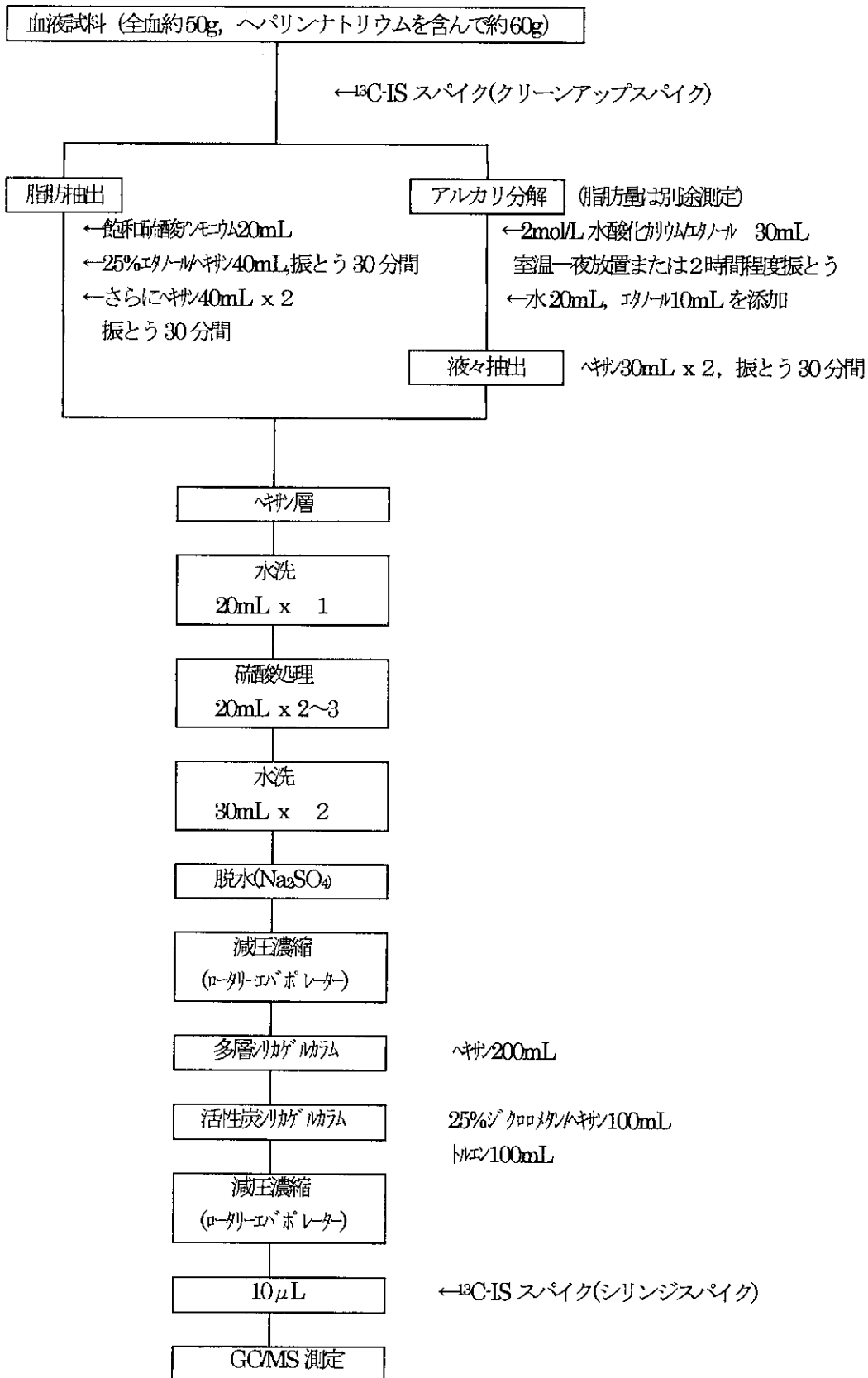
62 1/2 以外にも0あるいは1を用いて計算する場合もある。

63 精度管理には内部精度管理と外部精度管理がある。ここではこの内、内部精度管理について示したものである。内部精度管理は調査から分析値の結果作成までの QA/QC に直接あるいは間接的に関係する事項に関して、調査機関が機関内で自主的に行う管理事項であり、基本的には、『いつ』・『誰が』・『どこで』・『何のために』・『何を』・『どのように』行ったかが半明し、保管した記録から関係する全ての情報をトレースできることが条件となる。

64 調査計画によって頻度等については変更することが出来る。

65 血液 QCCS を準備し、用いる。

図-1. 血液中のダイオキシン類分析フロー



平成12年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究

I-3. ダイオキシン類のレポータージーンアッセイ系による簡易測定法の開発

主任研究者： 柳澤健一郎 財団法人 食品薬品安全センター 理事長
分担研究者： 中澤裕之 星薬科大学 教授
研究協力者： 松永 治之 住友化学工業株式会社・生物環境科学研究所
堀 伸二郎 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

ダイオキシン類の簡易測定法の開発を目的とし、アрилヒドロカーボンレセプター（AhR）を利用したレポータージーンアッセイ（AhRアッセイ）法の検討を行った。マウス肝由来Hepa1clc7細胞にダイオキシン類応答性のルシフェラーゼレポーター遺伝子を組み込んだ安定形質転換株を用いて以下の成果が得られた。(1)2,3,7,8-TCDD標品を用い、検量線の作成および定量可能範囲を定めた（0.5または1～6 pg/μL検液/ウェル）。(2)TEF値の定められたPCDDsおよびPCDFs類の活性を測定し、2,3,7,8-TCDDとのEC₅₀値の比からAhRアッセイ法のTEF値（Luc-TEF）をもとめた。Luc-TEFをWHO TEFと比較すると0.6～4倍の範囲に収まり、ほとんどの場合ほぼ一致していた。(3)母乳のモデルとしてのダイオキシン類標品添加牛乳、および(4)母乳（脂肪分）試料、それぞれを簡略前処理後AhRアッセイに供した結果、GC-MS測定による定量値と近い値が得られ、本アッセイ系の適用の可能性が高くなった。

A. 研究目的

昨年度に引き続き、アрилヒドロカーボンレセプター（Ahレセプター）を利用したルシフェラーゼアッセイ法と簡便な前処理法を組み合わせることで、ダイオキシン類の簡易測定法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

試料の前処理およびGC-MS測定は住化分析センターで、AhRアッセイは住友化学工業（株）生物環境科学研究所で実施した。

本年度は母乳中ダイオキシン類の測定を目標とし、(1)母乳のモデル系として牛乳へのダイオキシン類標品の添加、抽出、前処理、AhRアッセイ検討、および(2)母乳（脂肪分）試料の前処理、AhRアッセイの検討を行った。

ダイオキシン類標品はWellington Laboratories社製を購入した。

母乳中のダイオキシン類の分析は大阪府立公衆衛生研究所で高分解能GC-MSを用いて分析した。

B-1 牛乳の前処理

「食品中のダイオキシン類及びコプラナー PCB (Co-PCB)の測定方法暫定ガイドライン (案)」を参照して以下の操作を行った (図1~2参照)。

(1) アルカリ分解： 試料 (牛乳) を、秤量 (GC-MS測定用は100g、AhRアッセイ用は50g) し、1Lビーカーに移した。量り採った試料に濃度既知のPCDDs/DFs及びCo-PCBsのNative (混合) 標品を (GC-MS測定用にはクリーンアップスパイクも) 添加し、室温下マグネチックスターラーで15分以上攪拌した。標品添加試料に1.5M KOH/EtOH溶液を加えて (GC-MS測定用は300mL、LAhRアッセイ用は150mL) 2時間以上攪拌した。

(2) 液液抽出： アルカリ分解液を1L分液ロートに移し、これに、GC-MS測定用はヘキサン洗浄水250mLとヘキサン150mL、AhRアッセイ用はヘキサン洗浄水125mLとヘキサン75mLを加え、10分間振とう抽出した (計3回)。ヘキサン抽出液に2%塩化ナトリウム溶液200mLを加えて振とう (水洗) した後、水層を除きヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、クリーンアップ供試液とした。

(3) クリーンアップ： ヘキサン層を500 μ L程度まで濃縮後、多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。

(4) AhRアッセイ用溶液調製： 多層シリカゲルカラムの流出液を50 μ L程度まで濃縮した。別途、バイアルにDMSOを20 μ L取り、この上に濃縮した流出液を移し、窒素濃縮によってヘキサン層を揮発させ、DMSOに溶媒置換した。

(5) GC-MS測定用溶液調製： 多層シリカゲルカラムの流出液を1mL程度まで濃縮後、20mLメスフラスコにヘキサンを用いて洗いこみ、メスアップした。ホールピペットを用いメスフラスコ中の液を10mL分取し、以下の条件1で活性炭カラムクロマトグラフィーを行い、DXNの画分 (2画分) を得た。

[条件1]：カラム内径10mm、活性炭埋藏シリカゲル0.5g (和光)、湿式充填、1画分；25%ジクロロメタン/ヘキサン80mL、2画分；トルエン270mL 次にメスフラスコ中の残液10mLに対して以下の[条件2]で活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、CoPCBの画分 (2画分) を得た。

[条件2]：カラム内径10mm、活性炭埋藏シリカゲル0.5g (和光)、乾式充填、0画分；ヘキサン30mL、2画；トルエン100mL得られたDXN、CoPCB画分を50 μ L程度まで濃縮し、バイアルにシリンジスパイクを添加後、濃縮液を洗いこんだ。窒素濃縮で20 μ Lまで濃縮し、GC-MS測定用供試液とした。

B-2 母乳試料 (脂肪分) の前処理

母乳試料 (母乳-1~6;1996年採取) 中PCDDs/PCDFs/CoPCBのGC-MS分析は、図3に示す方法に従って行った。また、母乳-7 (1983年採取) は図4に従って行った。

母乳試料 (脂肪分) を、秤量 (GC-MS測定用は0.5~2g、AhRアッセイ用は1g程度) した。以後、AhRアッセイ用の前処理は牛乳試料と同様の方法を用い、スケールを変えて行った (図5~6参照)。

B-3細胞の培養

Hepa1clc7細胞由来ダイオキシン類応答性

安定形質転換細胞 (9G2株) を37℃、5% (v/v) CO₂、飽和湿度条件下、CO₂インキュベーター-BNA-110 (TABAI ESPEC) においてインキュベートした。通常の継代培養には培地A: αMEM培地 (GIBCO-BRL) /10% (v/v) 牛胎児血清 (FBS、GIBCO-BRL) /プラスチックサイジンS (16 μg/mL培地) /ジェネティシン (800 μg/mL培地) を用い、ダイオキシン類への曝露時には培地B: αMEM培地 (GIBCO-BRL) /10% (v/v) 牛胎児血清 (FBS、GIBCO-BRL) を用いた。以降、培養は前掲条件に従って行った。細胞は2~3日毎に(約80%コンフルエントに達した状態で) シャーレ (Φ10cm) から剥がし、培地Aに懸濁した後、細胞懸濁液の約1/10を新しいシャーレに植え替えた(継代)。

B-4 AhR (ルシフェラーゼ) アッセイ

1日目: 細胞播種

定法に従い細胞を剥がして約 2×10^5 細胞/mL培地Bの懸濁液を調製し、96ウェルプレート (COSTAR,フルオレッセンス/ルミネッセンスクリアボトム96ウェルプレート、コーニング社) に20,000細胞/100 μL培地/ウェルの割合で播種して一晩~一日培養した。

2日目: 被験物質添加

培地Aの1mLに対し、10 μLの割合で被験物質 (ダイオキシン類化合物) の溶液 (DMSO またはトルエン、一部ノナン) を添加・混合したものを100 μL/ウェルの割合で上記培養細胞に添加し、さらに16~24時間培養を続けた (200 μL/ウェル)。各被験物質の各濃度に対して4ウェルを用い、それらの平均値をデータとして用いた。培地中溶媒の終濃度は

0.5%(v/v)とした。

3日目: ルシフェラーゼ活性測定

細胞を被験物質に曝露してから24時間後に培地を除き、100 μL/ウェルのPBS(-)で2回ウェルを洗い、ウェル内の液をできる限り除いた後、細胞溶解液 (ピッカジーン、添付溶解剤の5倍希釈液) を1ウェル当り15 μL加えた。適宜プレートを傾けるなどしてウェル底面全体が細胞溶解液に浸るようにし、室温にて1時間以上細胞を溶解した。マイクロルーマットLB96Pルミノメーター (ベルトールド) にルシフェリン基質溶液 (20mM Tricine(pH7.8)、2.67mM MgSO₄、0.1mM EDTA、33.3mM DTT、270 μM Coenzyme A、530 μM ATP、470 μM Luciferin) をセットし、75 μL/ウェルの割合で自動分注後、発光量を測定した (Delay: 1.6秒、Meas. Interval: 5秒)。測定結果はExcel (マイクロソフト) にて処理した。

B-5計算方法

データは各試料の発光量 (RLU) から溶媒 (DMSO) コントロールの発光量を減じたNet値とし、さらに各プレート上の陽性コントロール (2378-TCDDの100または200 pg/μL) の測定値で合わせるよう補正した。EC₅₀値は、用量 (濃度) - 応答曲線を求めた後、De Leanらの近似式

$$(EC_{50}/x)^b = (R_{max}-y) / (y-R_{min})$$

x: 濃度

y: 応答 (発光量)

R_{max}: 最大応答 (飽和)

R_{min}: 溶媒コントロールの応答

b: 両辺の対数をとった時の傾き

をMulti近似計算プログラムに入力し、EC₅₀値を計算した (Simplex法)。

C. 研究結果

1) 定量法の検討

2,3,7,8-TCDDの濃度-応答曲線は、低濃度領域では直線性の上昇を示し、以後応答は飽和する。今回は定量の正確性に重きがあるので当該低濃度の直線領域で検量線を作成した (図7)。応答は大体6 pg/μL検液/ウェルまで直線性がみとめられ、0.5pg/μLではDMSOコントロールとの有意差がほとんどの場合にみとめられた。定量下限は0.5 (または1) pg/μLといえる。

2) WHO TEFとの比較検討

AhRアッセイからもとめられるTEF値 (Luc-TEFと呼ぶ) をWHO TEFと比較した。PCDDs 各標品7種 (2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PnCDD、1,2,3,4,7,8-HxCDD、1,2,3,6,7,8-HxCDD、1,2,3,7,8,9-HxCDD、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD、OCDD) およびPCDFs各標品9種 (2,3,7,8-TCDF、1,2,3,7,8-PnCDF、2,3,4,7,8-PnCDF、1,2,3,4,7,8-HxCDF、1,2,3,6,7,8-HxCDF、1,2,3,7,8,9-HxCDF、2,3,4,6,7,8-HxCDF、1,2,3,4,6,7,8-HpCDF、OCDF) について濃度を変化させてAhRアッセイを行い、用量-応答曲線をもとめた (図8~11)。次に各標品と2,3,7,8-TCDDのEC₅₀値の比をもとめ (付表1)、これらをAhRアッセイでもとめたTEF、即ちLuc-TEFとし、WHO TEF値と比較した (表1)。Luc-TEFはWHO TEFとほぼ近い値を示したが、1,2,3,7,8-PnCDDでは若干低く約6割程度の値であった。一方、2,3,4,6,7,8-HxCDFでは約2

倍、1,2,3,4,6,7,8-HpCDFでは約4倍だけLuc-TEFの方が高い値を示した。昨年度実施した一過性発現系のAhRアッセイにおいても1,2,3,4,6,7,8-HpCDFは約4倍高いTEF値を示しており、同様の結果が得られた。

OCDDおよびOCDFについては入手した標品原液の濃度がうすかったので十分な応答がみとめられず、EC₅₀値はもとめられなかった (図11に参考としてOCDDの応答曲線を載せた)。

3) 牛乳への混合標品添加、抽出・前処理

フローチャート (図1~2) に示したようにクリーンアップはAhRアッセイの場合は多層カラムのみ、一方GC-MSの場合はさらに活性炭埋蔵シリカゲルカラムを1ステップ付け加えるのみにし、従来のアルミナカラムおよび活性炭カラムの2工程から短縮化を行った。

表2に示したように、PCDDs/DFs(DXN)標品の場合は添加した量よりもとめた濃度に比べて若干低いものの、近い値がAhRアッセイによってもとめられた。CoPCB標品の場合はPCDDs/DFs標品の場合よりもさらに低い値となった。別途、標品溶液をAhRアッセイで測定した結果 (表4)、PCDDs/DFs標品は4.4pg-TEQ/μLとなり、調製濃度4.1pg-TEQ/μLとほぼ同じ値が得られた。一方、CoPCB標品の場合は、調製濃度4.4pg-TEQ/μLに対してAhRアッセイでは0.9pg-TEQ/μLとなり、牛乳添加実験と同様の低値を示した。PCDDs/DFsとCoPCBの標準液を等量混合した場合、調製濃度4.3pg-TEQ/μLに対してAhRアッセイでは2.9pg-TEQ/μLと低値を示した

が、DXNおよびCoPCB各々についてAhRアッセイでもとめた濃度から計算 $((4.4+0.9)/2)$ でもとめた濃度は2.7pg-TEQ/ μ Lとほぼ一致した。

4) 母乳試料（脂肪分）の前処理およびAhRアッセイ

母乳脂肪試料（母乳-1～7）について、ダイオキシン類のGC-MS測定と平行して前記の方法で前処理を行い、AhRアッセイを実施した（表5）。母乳-1～6の試料については、AhRアッセイによる定量値はGC-MS測定によりもとめたTEQ値と近い値が得られた（表6）。一方、母乳-7試料ではAhRアッセイでもとめた濃度は、GC-MS測定でもとめた濃度より低い値であった（表7）。全試料を通じて、AhRアッセイでは多層カラムから溶出されたブランク試料が幾分高値を示した。

D. 考察

母乳試料のAhRアッセイ結果は、GC-MS測定値に近い値が得られ、桁違いに大きく逸脱することはなかった。しかし、AhRアッセイで低値を示した試料も認められており、ブランク試料（多層カラム溶出物）が幾分高いことと合わせて検討が必要である。CoPCB標品のAhRアッセイ測定値がかなり低かった。このことからWHO TEFに比べてLuc-TEFが低い成分が含まれていることが示唆される。CoPCBとDXNの標品溶液を混合した系では加算性がみとめられたので、強いアンタゴニストは含まれていないと推測される。前処理法を、1)脂肪分を単離しない、2)クリーンアップを1ステップとすることにより簡略化を図った。本年度は脂肪分として試料を

供したが、生母乳の前処理検討が待たれる。

E. 結論

安定形質転換細胞を用いたAhRアッセイで、0.5（または1）～6pg-TEQ/ μ L検液の範囲で定量可能であることが示された。PCDDsおよびPCDFs各標品のAhRアッセイでもとめたTEFは、WHO TEFとほぼ同じ値を示した。母乳モデルとしての標品添加牛乳試料、および母乳脂肪分の簡略前処理後AhRアッセイでGC-MS測定値と近い値が得られ、本アッセイ系の母乳試料測定への適用可能性が高くなった。

F. 研究業績

Hori,S., Akutsu,K., Kitagawa,M., Oda,H., Nakazawa,H., Matsuki,Y., Makino,T., Development of Analysis for Polybrominated Diphenyl Ether in Seafood and Actual Contamination of Seafood, Organohalogen compounds, 47, 214-217(2000)

Konishi,Y., Kuwabara,K., Hori,S., Continuous Surveillance of Organochlorine Compounds in Mothers Milk from 1972 to 1998 in Osaka, Japan, Archives of Environmental Contamination and Toxicology (in press)

Takatori, S., Kitagawa, Y., Nishikawa, J., Nishihara, T., Oda, H., Nakazawa, H., Hori, S. "Detection of proestrogenic activities of chemicals using a Yeast Two-Hybrid Assay." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (in press)

Akutsu,K.,Obana,H.,Okiihashi, M., Kitagawa, H.,Nakazawa, H.,Matsuki, Makino,T., Oda,H., Hori,S. : GC/MS analysis of polybrominated

diphenyl ethers in fish collected from the Inland
Sea of Seto, Japan : Chemosphere (in press)

国際学会発表

Hori,S., Akutsu,K., Kitagawa,M., Oda,H.,
Nakazawa,H., Matsuki,Y., Makino,T.,
Development of Analysis for Polybrominated
Diphenyl Ether in Seafood and Actual
Contamination of Seafood. 20Th International
Symposium on Chlorinated Dioxins and Related
Compounds(DIOXIN2000)2000,8,13-17
(Monterey,CA,U.S.A.)

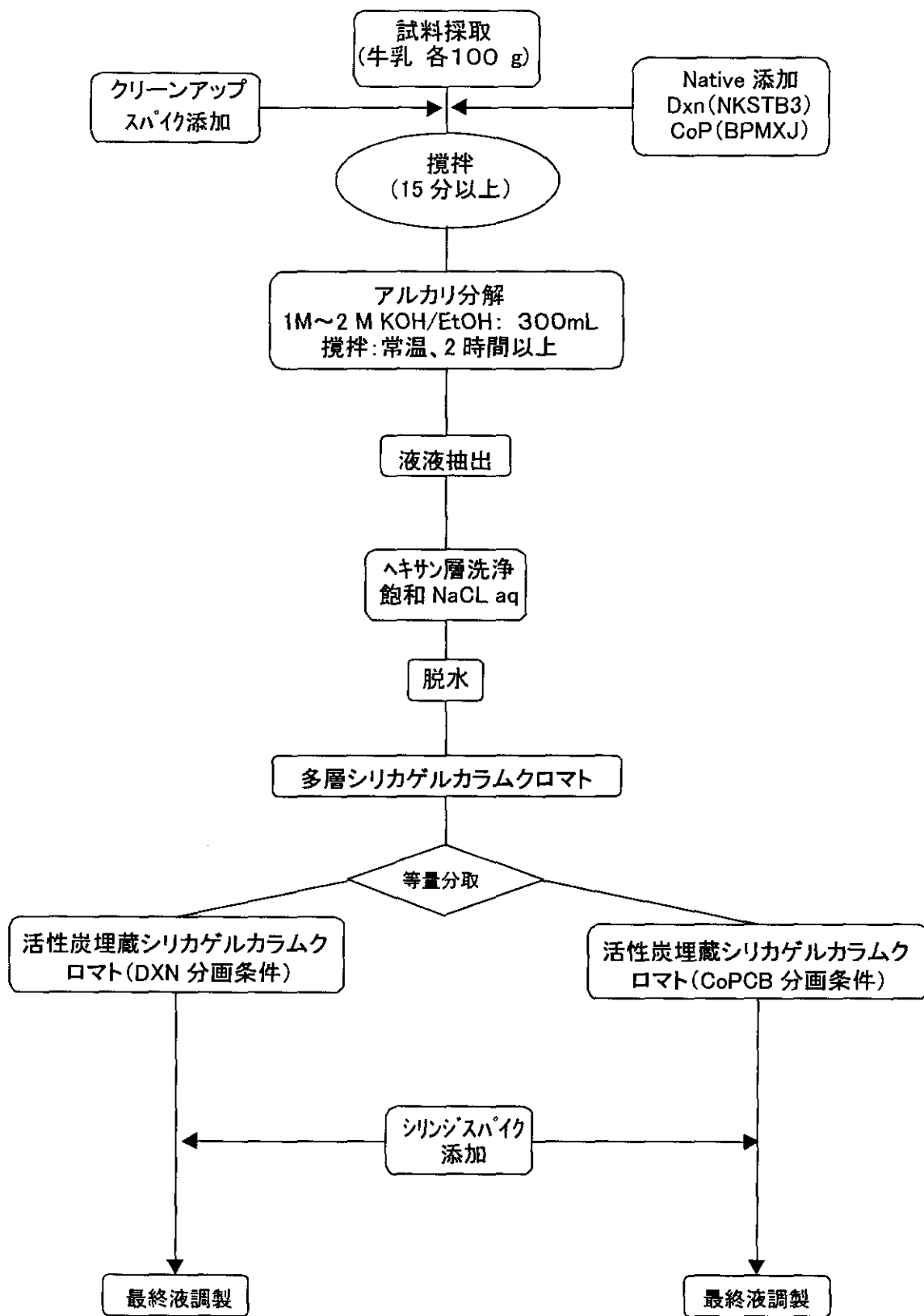


図1 GC-MS 測定用牛乳前処理フローチャート

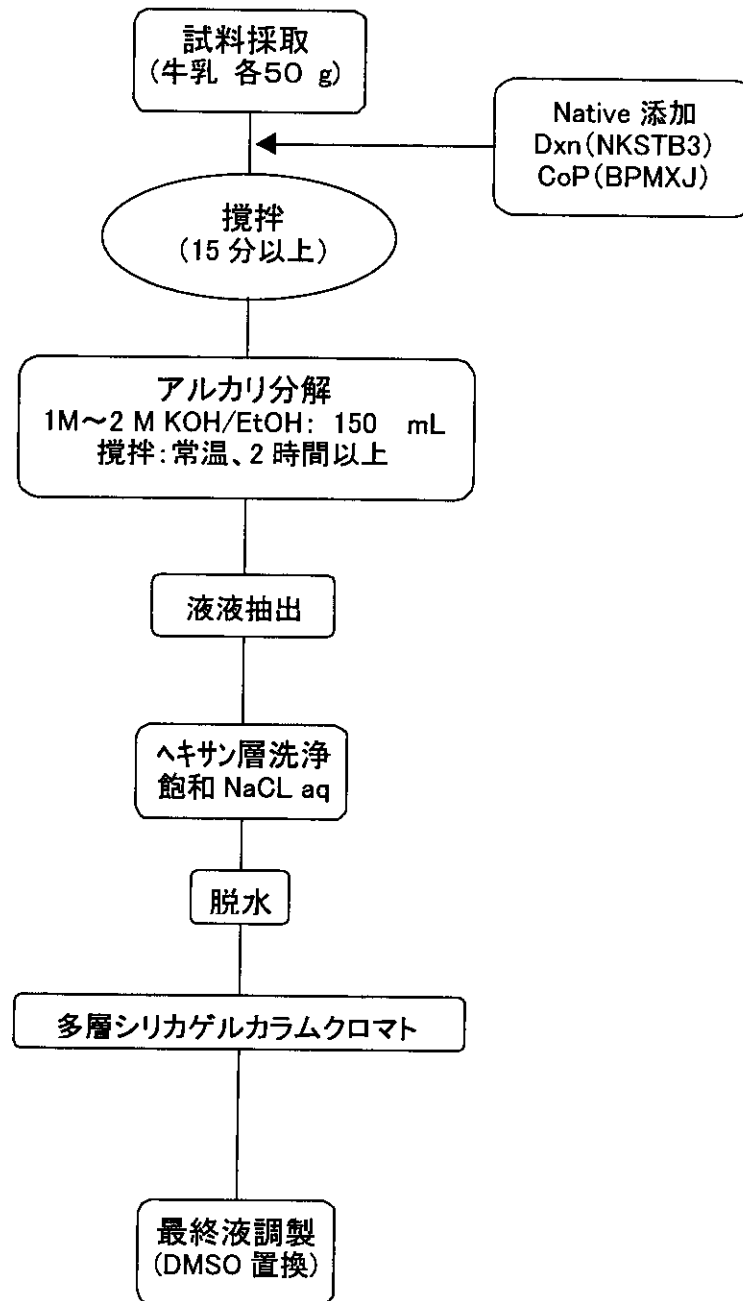


図2 AhR アッセイ用牛乳前処理フローチャート

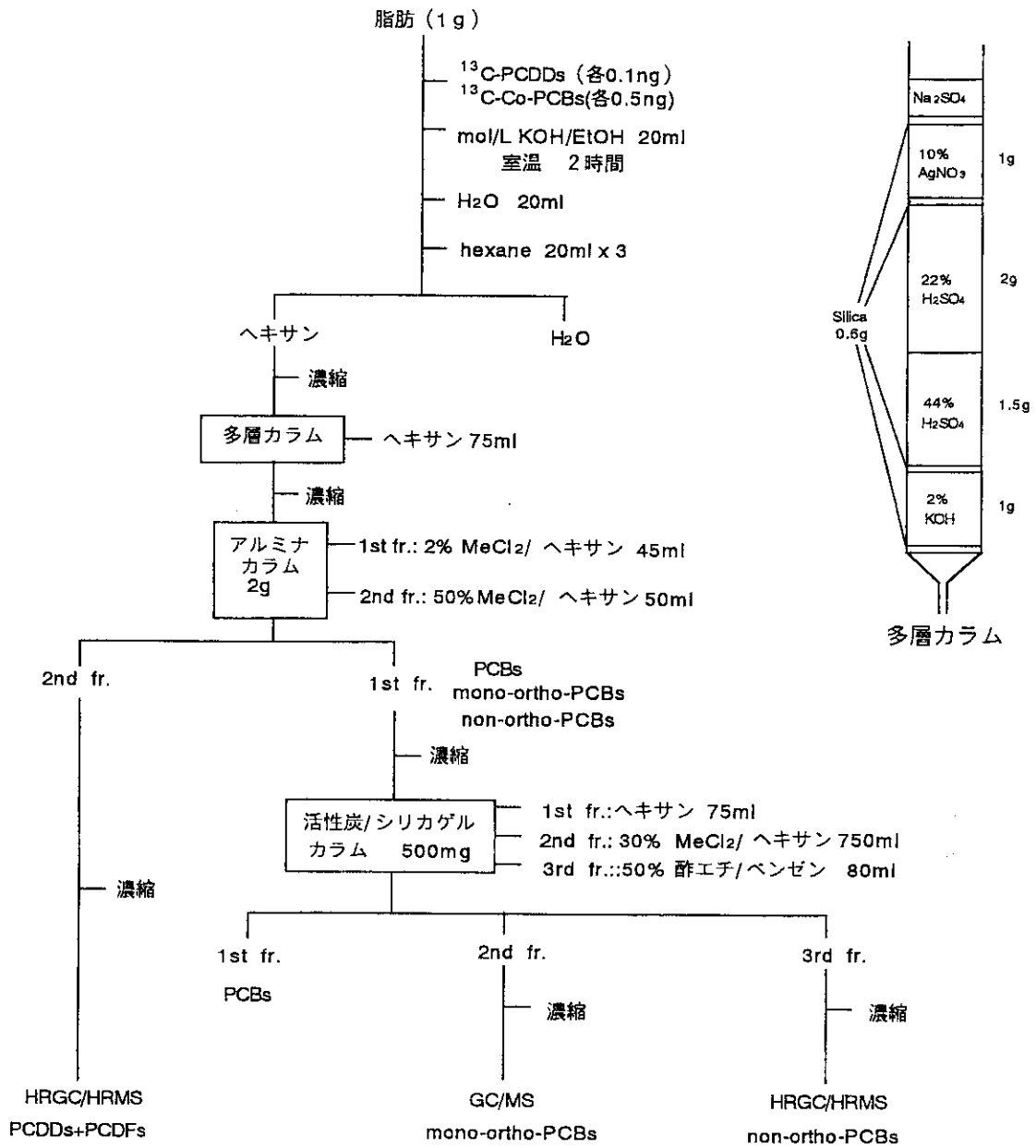


図3 脂肪からのダイオキシン分析方法