

厚生科学研究費補助金

生活安全総合事業

ダイキシン類のヒトの曝露状況の把握と健康影響に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 渡邊 昌

平成13年（2001年）4月

目次

I.	総括研究報告	
	ダ イキ シ 類 の ヒ の 曝 露 状 況 の 把 握 と 健 康 影 響 に 関 す る 研 究	3
	渡 邊 昌	
	(資 料 : 調 査 デ ザ イ ン と 調 査 票)	
II.	分担研究報告	
1.	ダ イキ シ 類 の 測 定 法 の 開 発 に 関 す る 研 究	9
	宮 田 秀 明	
	(資 料 : 血 液 中 ダ イ キ シ 類 の 簡 易 ・ 高 精 度 分 析 法 の 開 発)	
2.	ダ イキ シ 類 の 測 定 に 関 す る 研 究	14
	飯 田 隆 雄	
	(資 料 : ダ イ キ シ 類 測 定 法 の 標 準 化)	
3.	ダ イキ シ 類 暴 露 の 病 理 に 関 す る 研 究	23
	秦 順 一	
	(資 料 : ダ イ キ シ 類 曝 露 の 病 理 研 究)	
4.	ダ イキ シ 類 暴 露 モ デ ル の 作 成 に 関 す る 研 究	28
	大 瀧 慈	
	(資 料 : ヒ 血 中 ダ イ キ シ 類 濃 度 と そ の 暴 露 要 因 の 関 係 を 明 ら か に す る た め の 統 計 モ デ ル の 開 発)	
5.	ダ イキ シ 調 査 票 の 開 発 に 関 す る 研 究	35
	中 村 好 一	
	(資 料 : ダ イ キ シ 類 曝 露 推 定 調 査 票 の 開 発)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV.	研究成果の刊行物・別冊	49

ダイオキシン類のヒトの曝露状況の把握と健康影響に関する研究

主任研究者 渡邊 昌 東京農業大学教授

研究要旨：本研究において、血中低濃度ダイオキシン類の測定法を確立し、代表的地域で日本人のダイオキシン類曝露程度を明らかにすることを目的とした。平成10年度は焼却場周囲および対照地域の住民調査を行い、全体として差がなかったことから平成11,12年度は厚生省多目的コホート地域住民の調査を行った。測定を終了した全国13ヶ所の住民の血中濃度は $25.5 \pm 14.5 \text{ pgTEQ/g}$ 脂肪であった。身体検査、血液生化学検査、肺機能検査、免疫能、アンケート票による生活習慣や既往歴等を総合的に分析して、ダイオキシン類低濃度曝露による高血圧や糖尿病への健康影響を示唆した。

分担研究者氏名・所属施設・職名

宮田秀明（摂南大学教授）

飯田隆雄（福岡県保健環境研部長）

秦 順一（慶応義塾大学医学教授）

大滝 慈（広島大学教授）

中村好一（自治医科大学教授）

A. 研究目的

ダイオキシン類は、その発生が有機塩素化合物の生産過程や廃棄物の処理過程等で発生すると考えられているが、その影響が人体に対し、どの程度起こり得ているのかを評価することが必要不可欠である。日本では耐用一日摂取量（TDI）を最近 4 pg/kg 体重としたが、算定根拠とした海外のヒト曝露影響の研究は大量曝露後の追跡調査が主であり、我が国のように低濃度慢性的曝露が続いた場合にどうなるかは不明である。本研究においては、代表的地域で日本人の生活習慣による曝露程度を明らかにし、ダイオキシン類が人体にどの程度の影響を及ぼしているかについて平成10年度に続き基礎的研究を行った。またこれにより我が国におけ

るバックグラウンド値を作成し、もって人体影響データと比較するためのデータベースづくりを目的とした。

B. 研究方法

我が国におけるダイオキシン類のバックグラウンド値を測定することを目的に、以下の方法で研究を実施した。1998年度は宮城県、横浜市、大阪府、島根県の4カ所を選定し、焼却場3カ所、最終処分場1ヶ所の2 km以内に5年以上居住する30歳代、40歳代の周辺住民約20名、焼却場から3-5 km以上離れた所に5年以上居住するほぼ同数の住民を対照者として、インフォームドコンセントをとって健診、採血をおこなった。焼却場周囲住民と対照地区住民のダイオキシン類血中濃度に差がなかったことから、1999年度は厚生省多目的コホートの対象地区である沖縄県の宮古の平良市、長崎県の小値賀町、長野県の佐久を選び、2000年度は鳥取県の八東町、沖縄県の具志川市、新潟県の小国町を調査した。

調査の内容としては血液中ダイオキシン類濃

度（PCDD 7種、PCDF 10種、コプラ-PCB 12種）、血液一般検査、血液生化学検査、リンパ球免疫指標検査、一般健診、および生活歴調査票による既往歴や食・生活習慣調査を行った。さらに今年から甲状腺ホルモン等の内分泌環境の測定項目も取り入れた。

血中ダイオキシン濃度は対象者の血液から硫酸アンモニウム飽和溶液：エタノール：ヘキサン＝1：1：3混合液により脂質抽出を行い、脂質量後、ダイオキシン類を多層シリカカラムおよび活性

炭埋蔵シリカカラムでクリーンアップして、ガスロマトグラフィー-マススペクトロメトリ（MAT95S）にて測定した。

C. 研究結果

調査対象者の特性：3地域の対象者数は鳥取県の八東町が72名、沖縄県の具志川市が72名、新潟県の小国町が50名の合計194名である。男性91名、女性101名の合計192名ですべての調査項目を完了できた。

	男性 n=91		女性 n=101	
	平均値	sd	平均値	sd
年齢	51.2 ±	8.0	49.1 ±	8.3
身長	166.3 ±	6.4	153.9 ±	5.6
体重	64.6 ±	8.7	54.2 ±	8.1
脈拍	72.1 ±	10.9	76.3 ±	11.5
最高血圧	129.1 ±	15.7	128.7 ±	35.5
最低血圧	78.4 ±	10.6	74.2 ±	10.1

血中ダイオキシン類濃度：昨年度採血し、ダイオキシン類測定を終了した対象者の血中ダイオキシン類量（PCDDs + PCDFs）は沖縄の宮古が平均 11.2 ± 3.5 pgTEQ/g 脂肪であり、長崎県小値賀は 7.3 ± 2.6 pgTEQ/g 脂肪、長野県の佐久が 21.3 ± 16.2 pgTEQ/g 脂肪であった。それぞれの中央値は 10.4、7.1、16.8 である。Coplanar PCB をあわせた TEQ は沖縄が 15.1 ± 5.4 pgTEQ/g 脂肪、長崎が 14.0 ± 7.0 pgTEQ/g 脂肪、長野が 27.9 ± 16.5 pgTEQ/g 脂肪であった。100 pgTEQ/g 脂肪以上の者は一人もいなかったが、50 pgTEQ/g 脂肪以上のものは 6 名おり、最高は 93.6 pgTEQ/g 脂肪であった。異性体別にみると、

オカクロジベンゾダイオキシンがもっとも多く、ついでヘキサ、ヘプタジベンゾダイオキシンが多かった。PCB では PCB114 がもっとも多く、ついで PCB123、PCB167、PCB157 等であった。ダイオキシン、ジベンゾフラン、コプラ-PCB 濃度の関係では、ダイオキシンとジベンゾフランは密接に相関しているが、PCB は相関の程度が低くなる。年齢が高くなるほど、ダイオキシン類も PCB も増加した。職業では農業従事者が高い傾向を示した。今年度採血分は鳥取県の八東町の結果が出せたが、隣県の島根とほぼ同一でやや高めであった。他の 2 地域は採血が年度末になったため、現在測定中である。

血清生化学検査値

血液検査結果、リンパ球マーカーからみた免疫能、ホルモン測定値を以下に示す。

	男性(n=90)		女性(n=100)			男性(n=90)		女性(n=100)	
	平均値	sd	平均値	sd		平均値	sd	平均値	sd
HB	14.6 ±	1.2	12.4 ±	1.0	T_CHOL	193.3 ±	32.8	193.0 ±	32.0
HT	42.2 ±	2.7	37.2 ±	2.4	CHO	56.1 ±	13.5	61.6 ±	14.3
RBC	463.6 ±	35.7	419.5 ±	30.5	TG	107.0 ±	71.8	74.4 ±	39.3
WBC	5329.4 ±	1357.5	4820.0 ±	1081.3	TP	7.1 ±	0.5	7.2 ±	0.4
					ALB	4.2 ±	0.3	4.1 ±	0.2
PLT	19.8 ±	4.7	21.3 ±	4.8	bilirubin	0.6 ±	0.3	0.6 ±	0.2
GOT	24.4 ±	8.7	19.6 ±	5.5					
GPT	25.3 ±	16.1	16.8 ±	9.2	GLU	103.4 ±	34.6	90.4 ±	16.4
G_GTP	53.3 ±	56.9	22.8 ±	15.3	HBA1C	5.4 ±	1.1	5.1 ±	0.6
BUN	15.0 ±	3.2	12.9 ±	2.7	UA	6.0 ±	1.4	4.5 ±	1.2
ALP	256.4 ±	60.1	257.0 ±	68.4	CRE	1.0 ±	0.2	0.8 ±	0.1
AMY	114.7 ±	31.2	110.6 ±	32.1	CHE	372.8 ±	81.2	356.6 ±	83.3

	男性 n=56		女性 n=64			男性 n=56		女性 n=64	
	平均値	sd	平均値	sd		平均	sd	平均値	sd
PHA	38209.5 ±	9468.2	37234.8 ±	13116.3	TSH	1.4 ±	0.9	1.5 ±	0.7
CONA	30323.2 ±	8422.8	28570.0 ±	9247.2	FT3	2.9 ±	0.3	2.8 ±	0.2
PHA_cont	579.1 ±	559.5	610.1 ±	1110.5	FT4	1.2 ±	0.2	1.2 ±	0.2
NK	38.9 ±	18.6	37.2 ±	17.4	testosteron	450.1 ±	121.9	28.6 ±	13.1
CD3	64.8 ±	10.9	68.7 ±	7.7	androstendion	1.2 ±	0.4	1.0 ±	0.5
CD4	42.4 ±	9.1	44.4 ±	7.2	E2	17.0 ±	4.7	80.4 ±	52.1
CD8	27.2 ±	7.4	27.1 ±	7.0	progesteron	0.7 ±	0.1	3.4 ±	5.0
CD4_8	1.8 ±	0.9	1.8 ±	0.8					
CD56	21.5 ±	8.6	19.6 ±	6.8					
CD19	11.8 ±	4.8	11.3 ±	4.7					

これら結果をグイ村の類血中濃度と相関させて解析できたのは鳥取の八東町のみであり、他の2地区の結果が出しだい解析する。

D. 考察

生体組織中のダイオキシン類測定法は一定化したものがなかったが、種々の検討の結果、ほぼ標準化する方法をまとめ、ガイドラインを公表した。

ダイオキシン類は、その発生が有機塩素化合物の生産過程や廃棄物の処理過程等で発生すると考えられているが、日本では特殊な地域をのぞき健康影響を生じるような暴露になっていない。農業従事者が高い傾向があり、むしろ昔の農薬に混在していたダイオキシン類の影響がいまだに残存していると思われる。魚介類の異性体分布と異なる点もこれを支持する。数10 pgTEQの低濃度暴露であってもダイオキシン類の半減期は長いため、その影響が人体に対し、どの程度起こり得ているのかを評価することが必要不可欠である。海外の暴露影響の研究は大量暴露後の追跡調査からベトナム従軍兵士のように低濃度暴露の影響研究に移っている。従来健康影響の見られなかった50 pgTEQ/g 脂肪程度の暴露が糖尿病や高血圧、高脂血症のリスクとなっている可能性があり、さらに例数をふやして検討する必要がある。平成12年度の調査結果が出揃えば全国各地でほぼ600名の調査が完了することになるので全てをデータベース化して結論を得たい。平成10年度、11年度の結果は国際ダイオキシン学会に発表し、海外の研究者と意見を交換したが、今年の国際ダイオキシン学会ではシンポジストとして低濃度暴露結果を総括する予定である。

E. 結論

10年度に測定した4府県住民、11年度の3地域住民ともに100pgTEQ/g 脂肪以上のダ

イキシン類曝露をしめしたものは居なかった。今回の全平均19.8pgTEQ/g 脂肪は欧米の住民濃度とほぼ同じ水準である。健康に影響がでる可能性のあるダイオキシン類濃度は83pgTEQ/g 体重以上とされ、これは脂肪量あたりに換算すると250-400pgTEQ/g 脂肪程度になる。今回の対象者の濃度は健康影響を起こす下限の10分の1以下といえる。測定したかぎりの検査結果から体内蓄積ダイオキシン類によって異常値を示したというものはなかったが、高血圧、高脂血症等生活習慣病の頻度はダイオキシン類濃度の高い群に多く、今後の検討が必要である。10年度の島根、11年度の長野、12年度の鳥取は比較的高値を示した。職業では農業が高値をしめし、昔の農薬中に混在したダイオキシン類曝露の影響がいまだに残っていると思われる。

F. 健康危険情報

健康に影響がでる可能性のあるダイオキシン類濃度は83pgTEQ/g 体重以上とされ、これは脂肪量あたりに換算すると250-400pgTEQ/g 脂肪程度になる。しかし、今回のような低濃度の曝露でも糖尿病、高血圧、高脂血症等生活習慣病の頻度はダイオキシン類濃度の高い群に多く、今後の検討が必要である。糖尿病は従来ダイオキシン類曝露がリスクとはいわれてなかったが、米国のベトナム退役軍人の追跡調査でもリスクとして報告された。ダイオキシン類がインスリン・レプターに結合することも発見され、今後の動向を見守る必要がある。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Watanabe S, Kitamura K, Kikuchi Y, Sunaga M, Iida T, Waechter G, Yamamoto F. Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar PCB around municipal waste incinerators. *Organohalogen Compounds* 48: 199-202, 2000
- 2) Kitamura K, Kikuchi Y, Watanabe S, Waechter G, Sakurai H, Takada T. Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD), dibenzofurans (PCDF), and coplanar PCB (Co-PCB) of municipal waste incinerator workers. *J Epidemiol* 10: 262-270, 2000
- 3) Kitamura K, Nagahashi M, Sunaga M, Watanabe S, Nagao M. Balance of intake and excretion of 20 congeners of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, polychlorinated dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyl in healthy Japanese men. *J Health Science* 47:145-154, 2000
- 4) Nagahashi M, Kikuchi N, Migaki E, Watanabe S, Miki T. Separation and estimation of bisphenol A by liquid chromatography with UV detection. *Acta Chromatographica* 10: 110-121, 2000
- 5) Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J, Watanabe S. Occurrence of tris(4-chlorophenyl) methanol and some other persistent organochlorines in Japanese human adipose tissue. *Env Health Perspect* 108: 599-603, 2000
- 6) Fujimine Y, Hirai T, Usuki Y, Kodaira T, Watanabe S. Distribution of dioxin congeners in various components of human blood. *Organohalogen Compounds* 48: 64-67, 2000
- 7) Nakao T, Aozasa O, Ohta S, Miyata H. Formation of dioxin analogues on combustion process with unregulated small incinerator. *Organohalogen Compounds* 46: 205-208, 2000
- 8) Miyata H, Takamitsu S, Iwata N, Nakao T, Aozasa O, Ohta S. Investigation on assessment of air pollution by dioxin analogues using Japanese block pine needle as an indicator. *Organohalogen Compounds* 46: 373-376, 2000
- 9) Aozasa O, Tesumi T, Ohta S, Nakao T, Miyata H. Promoting fecal excretion of accumulated dioxins by porphyrin-dietary fiber. *Organohalogen Compounds* 48: 327-330, 2000
- 10) Nagayama J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H. Condition of thyroid hormone system in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. *Organohalogen Compounds* 48: 236-239, 2000

- 11) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astutu E, Yanagawa T, Watanabe T. Effects of exposure to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins through human milk on total development in 10-month-old Japanese infants. Organohalogen Compounds 48: 240-243, 2000
- 12) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti E, Yanagawa T, Watanabe T. Developmental condition in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. Organohalogen Compounds 48: 244-247, 2000
- 13) Nagayama J, Fukushige J, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Astuti E, Yanagawa T, Watanabe T. Condition of helper and suppressor T lymphocyte subpopulations in 10-month-old Japanese infants perinatally exposed to organochlorine pesticides, PCBs and dioxins. Organohalogen Compounds 49: 87-91, 2000

分 担 研 究 報 告 書

- 2 分担研究課題 ダイオキシン類のヒト暴露状況の把握と健康に関する研究

分担研究者 氏 名 宮 田 秀 明 (印)

【本年度の成果の要旨】

精製時間が大幅に短縮できる簡易・高精度の血液中ダイオキシン類の分析法を開発し、これまで不明であった血液中ダイオキシン類濃度の経時変化を5名について調査した。その結果、3ヶ月間における血中濃度の変化は極めて少なく、血中濃度の恒常性を初めて明らかにすることができた。

一方、7名について産褥後5日から6ヶ月の母乳中ダイオキシン類濃度を測定した。また、静岡県立大学の協力を得て、乳児の哺乳量および体重の経時変化を調べた。その結果、母乳中のダイオキシン類は、主として食事経由のものであることが判明した。従って、母乳は、人体汚染評価試料として適切でないことを明らかにした。

以上の研究成果から、血液は広範囲の対象者から容易に採取ができ、かつ人体汚染評価に使用できる唯一の指標試料であることが判明した。

【分担研究課題】

1) 血液中ダイオキシン類の簡易・高精度分析法の開発

血液はダイオキシン類の人体汚染評価試料として国際的に多くの国で使用されている。しかし、血液中ダイオキシン類の恒常性については不明の状態である。これを検討するため、本研究では22~23歳の一般青年人を対象として、空腹時の血液を経月的に5回採取し、ダイオキシン類濃度の経月変動を検討した。

しかし、経月濃度の変動を解明するためには、健常人の血液中ダイオキシン類濃度が一般的な環境試料のレベルに比べ極めて微量であるとともに、一度に入手可能なサンプル量に限りがあることから、その濃度を正確に定量し、簡易で高感度かつ高精度の分析技術が不可欠である。よって本研究では、まず、血液中ダイオキシン類の高精度簡易分析法を確立することに着手した。

従来の血液中ダイオキシン類の分析法は抽出、精製、機器分析の3段階からなるが、使用試薬量が多く、多大な費用、労力および時間を要する。また、分析操作におけるブランク値が高く、血液試料の定量値に影響を及ぼすことが大きな問題点となっている。そこで、使用試薬量を低減化した精製法について検討を行った。その結果、今回開発した分析法は、アルカリ分解、マイクロ硝酸銀・シリカゲルカラム精製、活性炭カラム精製、超高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析計による定量から構成されており、従来法に比べて精製に要する溶媒使用量が90%節約、所要時間が90%短縮でき、また、試薬ブランク値も大幅に低下し、より高精度にダイオキシン類の測定が可能となった。

2) 血液中ダイオキシン類の経時的濃度変動

健康な男女5名の血液中ダイオキシン類濃度を定量し変動を検討したところ、5ヶ月間における血中ダイオキシン類 TEQ 濃度の経月変動は極めて少なく、5人における変動係数は9.4%~29%にすぎなかった(表1)。また、血液中のPCDDs、PCDF及びCo-PCBの総TEQ濃度に対する組成比はPCDDsが占める割合が最も高く、この傾向は5名の3ヶ月、5回の測定において変わることはなかった。さらに、5名のうち、4名はPCDDsについてPCDFsが高値を示し、Co-PCBが最も低い傾向にあった。しかし、1名のみが逆にPCDFsに比べCo-PCBの占める割合が高く、他の4名とは異なった組成比であった。しかしながら、どちらにしてもこれら化合物の組成比は、3ヶ月間において経月で変化せず、一定の傾向にあることが明らかとなった。

本結果は、血液中ダイオキシン類濃度は、食事以外の日常的因子によって短期間で著しく変動しないことを示し、血中ダイオキシン類の恒常性を初めて明らかにしたものであり、空腹時の血液は人体汚染評価試料として極めて有用であることが指摘できた。

3) 人体汚染評価試料としての血液の有用性

現在、ダイオキシン類による人体汚染を評価するための試料として、脂肪組織、母乳および血液が用いられている。現存する人から脂肪組織を採取するためには手術が伴うため、現実的には広範囲な人から採取することは極めて困難である。このため、国際的な評価試料として、母乳や血液が使われている。しかし、ドイツのFurstら(1989)が報告した母乳中ダイオキシン類濃度を詳細に検討すると、出産5周目の濃度は10~15週目とほぼ同様であり、必ずしも経時的減衰は認められない。換言すれば、母乳中濃度は、人体汚染濃度を反映したものとは言えない可能性が強いものと推測される。これを明らかにする目的で、

静岡県立大学看護学部落合助教授らの協力のもとに7人の出産者から産褥後経時的得た母乳試料を分析するとともに、体重、母乳摂取量等の乳児に関する詳細な情報を得た。

母乳試料は、産褥5日、1ヶ月、3ヶ月および6ヶ月に約100 mlを採取した。また、この試験期間において乳児の哺乳量ならびに母乳搾乳量を連続的に測定した。

表2は本研究成果を纏めたものである。対象者7名の母乳中(PCDDs + PCDFs)濃度の平均値は、産褥5日～6ヶ月にかけて減少傾向が認められるものの、1ヶ月～6ヶ月の減少傾向は極めて小さいことが判明した。一方、平均脂肪濃度は、産褥5日では2.43%であるが、1ヶ月～6ヶ月で3.15%～3.99%とかなり増加しており、特に3ヶ月では3.99%と最も高く、経時的にかなりの変動が認められた。

この間、乳児の体重は、3.17 kgから7.75 kgと約2.4倍増加している。しかし、この体重増加率は一定でなく、5日～1ヶ月で51.6 g/日、1ヶ月～3ヶ月で31.3 g/日、3ヶ月～6ヶ月で15.7 g/日と産褥以降経時的に減少する傾向にある。母乳脂肪摂取量は、5日で3.77 g/kg/日、1ヶ月で5.70 g/kg/日、3ヶ月で4.69 g/kg/日および6ヶ月で3.14 g/kg/日となり、体重増加率を反映して1ヶ月～6ヶ月にかけて減少している。

表2に示すように、ダイオキシン類一日摂取量は5日～1ヶ月で81.1～85.5 pgTEQ/kg/日と最も多く、3ヶ月で60.5 pgTEQ/kg/日に減少し、6ヶ月では37.4 pgTEQ/kg/日とさらに少なくなっていた。この結果から、母乳経由のダイオキシン類摂取量は、産褥1ヶ月～2ヶ月が最大になり、それ以降漸減し、6ヶ月では最大時の約40%程度に減少することが明らかとなった。従って、授乳によるダイオキシン類の影響評価は、産褥後3ヶ月程度を目途に検討することが適切と思われる。

一方、乳児一人当たりにおけるダイオキシン類の平均一日摂取量は、257～384 pgTEQと大きな変動は認められない。この結果を基にすると、母乳中のダイオキシン類濃度が主として体内蓄積量を反映するとすれば、経時的に一定の減少率を示すものと推定される。しかし、表2にも示すように、母乳中濃度の一日減少率は、5日～1ヶ月で0.26 pgTEQ、1ヶ月～3ヶ月で0.035 pgTEQ/日、3ヶ月～6ヶ月で0.011 pgTEQ/日であり、経時的に有意に激減していた。従って、母乳中ダイオキシン類は食事経由のものが主体であり、体内蓄積由来のものは副次的であることが判明した。従来、母乳は国際的に人体汚染の評価試料と見なされ、母乳中濃度を用いて国際間の人体汚染が評価されてきた。しかし、今回の成果はこれを覆すものであり、新たな知見を提供することができた。

2)の結果および本結果から、現段階では、血液試料のみが現存する広範囲の人から容易に採取でき、しかもダイオキシン類の人体汚染評価試料として有用なものであると言及できる。

表1 健康人の血液中ダイオキシン類TEQ濃度の経時変動

被験者	Compound	血液中濃度(pg-TEQ/g fat)					平均値	C.V.(%)
		1日目	4週間後	5週間後	7週間後	11週間後		
21歳男性	PCDDs	9.1	6.3	11	6.2	12	8.9	30
	PCDFs	7.1	5.3	4.8	5.0	9.0	6.2	29
	Co-PCBs	5.5	3.5	5.0	3.6	7.2	5.0	31
	Total	22	15	20	15	29	20	29
23歳男性	PCDDs	6.1	2.6	7.7	11	9.0	7.3	44
	PCDFs	4.6	4.6	6.0	6.4	5.4	5.4	15
	Co-PCBs	2.5	3.0	2.7	4.2	3.2	3.1	21
	Total	13	10	16	21	18	16	27
22歳女性	PCDDs	10	11	10	12	13	11	12
	PCDFs	7.0	6.8	8.4	7.2	7.2	7.3	8.6
	Co-PCBs	5.3	4.8	4.9	6.6	6.4	5.6	15
	Total	22	22	24	26	27	24	9.4
23歳女性	PCDDs	12	14	13	13	19	14	20
	PCDFs	5.1	5.5	7.4	6.8	7.4	6.4	17
	Co-PCBs	6.4	7.1	8.4	8.0	8.1	7.6	11
	Total	23	26	28	28	34	28	14
23歳女性	PCDDs	13	8.9	15	22	19	16	33
	PCDFs	7.4	7.7	9.0	12	12	9.6	23
	Co-PCBs	7.9	7.3	9.1	6.9	6.7	7.6	13
	Total	28	24	33	41	37	33	21

表2 産褥後における母乳中ダイオキシン類濃度と乳児における摂取量の経時変化

出産後の期間	5日	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
ダイオキシン類濃度 (pgTEQ/g 脂肪)	21.5	15.0	12.9	11.9
ダイオキシン類濃度減少率 (pgTEQ/日)		0.26*	0.035**	0.011***
母乳脂肪濃度 (%)	2.43	3.26	3.99	3.15
乳児の体重 (kg)	3.17	4.46	6.34	7.75
体重増加率 (g/日)		51.6*	31.3**	15.7***
母乳摂取量 (g/kg/日)	155	175	118	99.7
母乳脂肪摂取量 (g/kg/日)	3.77	5.70	4.69	3.14
ダイオキシン類摂取量 (pgTEQ/kg/日)	81.1	85.5	60.5	37.4
ダイオキシン類摂取量 (pgTEQ/日)	257	381	384	290

* : 5日～1ヶ月の変化率 ** : 1ヶ月～3ヶ月の変化率 *** : 3ヶ月～6ヶ月の変化率

血液中のダイオキシン類の分析法に関するガイドライン作成に関する研究

飯田隆雄、福岡県保健環境研究所

はじめに

血液中のダイオキシン類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ためには、分析実験設備や測定・分析操作等に関わる一定水準以上の技術が要求される。そこで、血液中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの濃度を測定するための方法として技術的内容をまとめた。

1. 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。

ダイオキシン類：平成11年7月16日に公布されたダイオキシン類対策特別措置法において、ダイオキシン類とは、ポリクロロジベンゾーパラジオキシン(PCDDs)とポリクロロジベンゾフラン(PCDFs)及び同様な毒性を示すコプラナーPCBsで表される化合物の総称である。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（7種）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（10種）及びコプラナーPCBs（12種）の化合物を示す。

2,3,7,8-位塩素置換異性体：PCDDs及びPCDFs類の内、化学構造上2,3,7及び8で表記される位置が塩素で置換され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。

コプラナーPCBs：ポリクロロビフェニル²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の塩素置換数が1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。』のCo-PCBsの欄に示す12種類の化合物を示す。

ノンオルトコプラナー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が塩素で置換されていない化合物の総称。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。』の中でCo-PCBsのnon-orthoの欄に示す4種類の化合物を示す。

モノオルトコプラナー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が塩素で1ヶ所置換されている化合物の総称。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。』の中でCo-PCBsのmono-orthoの欄に示す8種類の化合物を示す。

異性体⁴：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。

同族体⁵：塩素で置換された数が同じであって位置を異にする一群の化合物。

検出下限値：

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SN=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。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。

実測定の検出下限値：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SN=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実測定における検出下限値とする。実試料でピークが出現しない化合物に関しては、SN=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推定し、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実測定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。

2 調査計画

採血の実施にあたっては、被験者や協力者に対して十分なインフォームド・コンセントを行う。調査の目的及び背景、実際に協力してもらう内容、実施後のデータの取り扱いなどについて事前に文書で説明し、

調査に対する理解を得、文書で同意を得る必要がある。このため調査計画は事前に綿密に作成されなくてはならない。また、採血時の事故を防ぐため、採血現場には医師が立ち会い、必要に応じてアドバイス、問診、健康診断等を行えるような体制を整備すること。

研究目的によっては倫理指針等が作成されている場合があるので、その際にはそれらに従うこと。

3 試料採取 及び試料の取り扱い

採取は、医師、看護婦（保健婦（夫、士））や助産婦を含む）等採血について専門の技術を有するものが行う。通常の試料採取には50～200mlの採血パック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100ml程度を採取し、2回分として小分けし（1回分50ml）、また1部脂肪酸分析や生化学試験に回せるようにしておくことと便利である。（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、変質を避けるため、採取後すぐによく混和し、分析するまで冷凍し暗所に保存する。

血液検体は、病原菌等の感染の危険性があるので、感染防止に留意すること。

4 測定

4.1 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（全血）に内部標準物質として定量する目的化合物の¹³C同位体を添加（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。血液からダイオキシン類を抽出するにあたり、脂抽出から入る場合と、アルカリ分解から入る場合があり、どちらを採用してもよい。

なお、PCDDs、PCDFs及びCo-PCBs濃度を脂あたりで表記する場合は、後述の方法によって脂量を測定する。血清、または血しょうも同様に行うことができる。

脂抽出には現在いくつかの方法が提案されているが、それぞれの方法によって得られる結果は異なるので単位脂重量あたりでダイオキシン類濃度を比較する際は注意が必要である。ここではエタノール：ヘキサン：飽和硫酸アンモニウムを用いる方法を採用する。

4.2 前処理

(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)、二重測定用ダイオキシン類測定分析用（必要に応じて）、脂量測定用（別個に測定する場合）等2つ又は3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。

(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⁵⁵。なお、同位体スパイクの添加量は各化合物5～100pg程度とする。

(3) 脂質の抽出及び脂質濃度の測定（脂濃度を別個に求める場合）

9.2.1で分注した脂量測定用の試料（約20g）を解凍し、重量を測定後、飽和硫酸アンモニウム6mL、25%エタノール/n-ヘキサンを24mL添加し、30分間振とう抽出を行う。ヘキサン層を分画後、水層にn-ヘキサン20mLを添加し更に30分間振とう抽出を行う。この操作をもう一度繰り返す。3回の抽出によるn-ヘキサン分画を混合する。脂含量測定にあつては、得られたn-ヘキサン分画を精製水40mLで3回洗浄する。

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後、

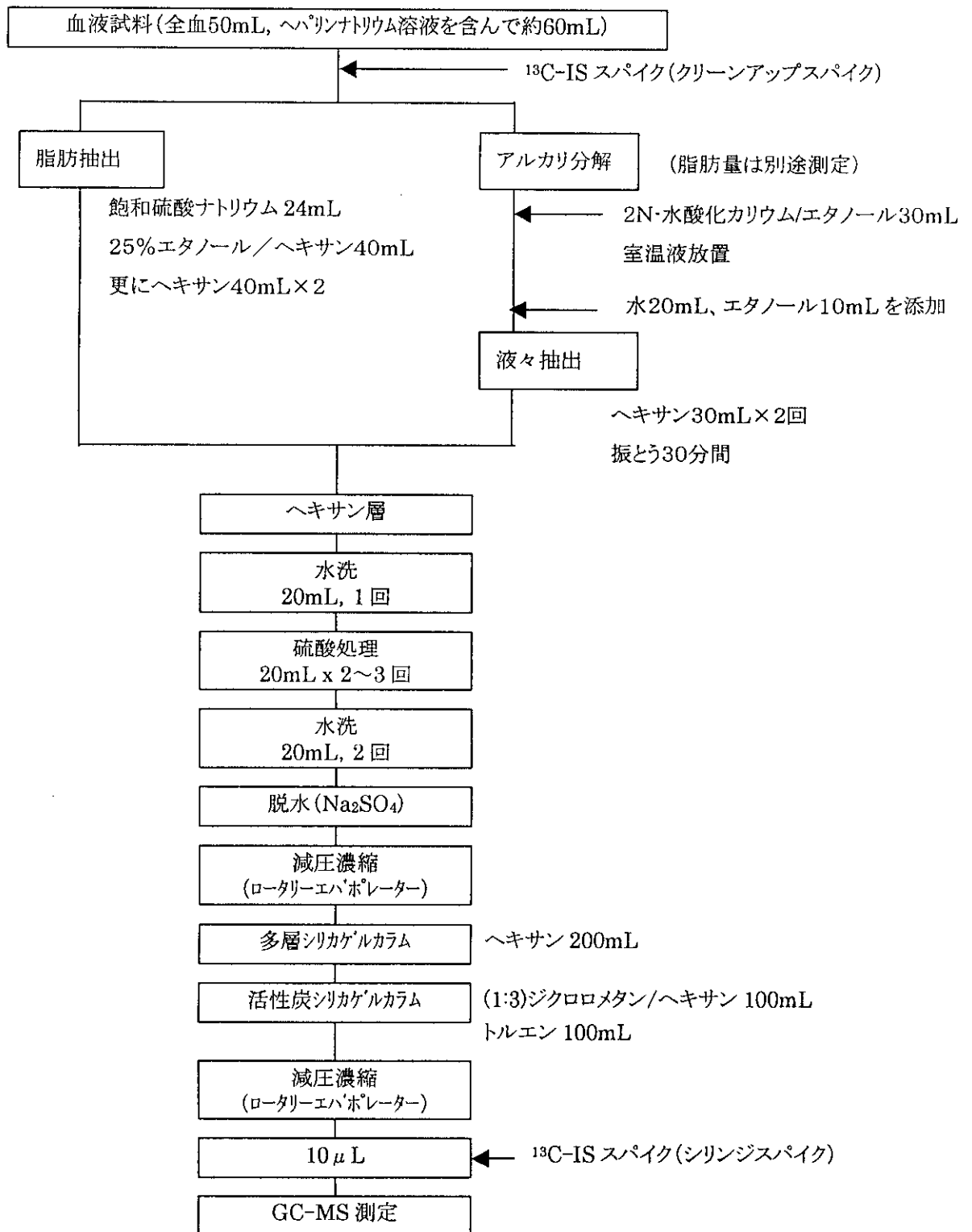


図-1. 血液中のダイオキシン類分析フロー.

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	non-ortho	$^{13}\text{C}_{12}$ -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
	mono-ortho	$^{13}\text{C}_{12}$ -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

ロータリーエボレーターを用いて溶媒を留去する。得られたn-ヘキサン分画を精製水20mLで1回洗浄する。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後、ロータリーエボレーターを用いて約2mlまで濃縮し、あらかじめ重量を測定し、恒量となったことを確認した秤量瓶に移す。デシケーターもしくは30℃以下に設定した浴温下での窒素ガスパージで乾燥し、重量を測定する。抽出前後の重量比から血液中の脂份量を算出する。ただし、試料には抗凝固剤としてヘパリンナトリウム溶液が含まれているのでその重量を考慮しなければならない。

(4) 脂質の抽出及び脂質濃度の測定 (脂質を抽出し、抽出した脂質を用いてダイオキシン類の分析を行う場合)

(3) で同位体スパイクを添加した血液試料に飽和硫酸アンモニウム20mL及び25%エタノール/n-ヘキサンを40mL添加し、30分間振とう抽出を行う。ヘキサン層を分画後、水層にn-ヘキサン40mLを添加し更に30分間振とう抽出を行う。この操作をもう一度繰り返す。3回の抽出によるn-ヘキサン分画を混合する。得られたn-ヘキサン分画を精製水20mLで1回洗浄する。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後、あらかじめ105℃で3時間加熱、放冷し、重量を測定して恒量となったことを確認しておいたナス型フラスコに移し、ロータリーエボレーターを用いて溶媒を留去する水及び溶媒が完全にないことを確認し、ナス型フラスコの外側をよくふいた後、重量を測定する。

前後の重量比から血液中の脂份量を算出する。血中含量に換算するにあたって試料には抗凝固剤としてヘパリンナトリウム溶液が含まれているのでその重量を考慮しなければならない。

4.3 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ィー、アルミナカラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィーが示されている。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ィーが一般的である。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。

(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 (オプション))

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。シリカゲルカラムクロマトグラフィーの後、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。

(2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルカラムクロマトグラフ管 (シリカゲル1.5g, 130℃, 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ボレーターにて約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。

(3) 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー

多層シリカゲルカラムクロマトグラフ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ボレーターにて約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。

(4) アルミナカラムクロマトグラフィー

アルミナカラムクロマトグラフ管の液面を無水硫酸ナトリウム層まで下げ、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、ジクロロメタン含有ヘキサン溶液で画分する。最初に2%ジクロロメタン含有ヘキサン65mLで溶出させ（第1画分：PCB画分）次いで60%ジクロロメタン含有ヘキサン100mLで溶出する（第2画分）。第2画分を濃縮した後、活性炭カラムにかける。（PCDDs, PCDFs及びノンオルト Co-PCBs）

(5) 活性炭カラムクロマトグラフィー

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グラフ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 Co-PCBs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 Co-PCBs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濃縮した後、各画分に測定に必要なシリンジスパイクを添加して10 μ Lに定容し、GC/MS分析用溶液とする。カラムクロマトグラフィーとして、活性炭/無水硫酸ナトリウムを充填して用いることもできる。市販の活性炭シリカゲルによっては、mono-ortho Co-PCBsもトルエン画分にくるので、この場合は、トルエン画分のみをGC/MS分析すればよい。

5 測定準備

5.1 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

5.2 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

6 測定

標準溶液及び試料の適当量をGC/MSに注入し、各同位体につき『表1 測定質量数の例』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。

7 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-PCBsに関してはそれぞれ対応する12種類のCo-PCBs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

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 -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 -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 -TeCBs	301.9626**	303.9597*	305.9567
		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。