

平成 12 年度厚生科学研究費補助金  
生活安全総括研究事業報告

「タバコ煙及び加熱食品中のダイオキシン類の定量及びその評価」

(H-11-生活-004)

主任研究者 若林 敬二  
国立がんセンター研究所 がん予防研究部

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）

総括研究報告書

「タバコ煙及び加熱食品中のダイオキシン類の定量及びその評価」

(H-11-生活-004)

主任研究者 若林 敬二

国立がんセンター研究所 がん予防部

研究要旨

ダイオキシンに代表される内分泌攪乱作用物質が環境中に広く存在している。本研究においては、生活環境中に存在しているダイオキシン様物質の由来を正確に把握することを目的として、加熱食品中のダイオキシン類の定量を行うとともに、新たなダイオキシン様作用物質の検索を行った。まず、加熱食品中のダイオキシン類は、従来法を改良してアルカリ分解時間の延長、硝酸銀シリカゲルのシリカゲルへの重層、さらには塩基性アルミナカラムと活性炭シリカゲルカラムの段階分離を組み合わせることで、夾雑物質の除去が確実にできることがわかった。次に牛の生肉、焼き肉に含まれているダイオキシン量を測定したところ、全ての試料中よりダイオキシン類が検出され、加熱調理後の肉中のダイオキシン量は、調理前に比べて減少し、その分、流出油に分配されることが分かった。すなわち、牛肉の加熱調理条件下では、新たにダイオキシン類が生成される可能性は少ないことが示唆された。また、河川水中よりヒトアリル hidrocarbon (AhR) に結合する coplanar PCB 誘導体である 3,3'-dichloro-4,4'-dinitrobiphenyl、4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl を同定した。更に、卵巣摘出ラットを用いた実験系で新規ヘテロサイクリックア

ミンであるアミノフェニルノルハルマンは内分泌攪乱作用を示さないことがわかった。

#### 分担研究者

川森俊人 国立がんセンター研究所  
がん予防研究部 室長

多田敦子 国立がんセンター研究所  
がん予防研究部 研究員

遠藤 治 国立公衆衛生院地域環境  
衛生学部環境健康影響室  
主任研究官

#### A. 研究目的

乳がん、精巣がん等の発生に環境中の内分泌攪乱物質が関与していることが示唆されている。更に、内分泌攪乱作用を示すダイオキシン等の化合物は生物濃縮が起りやすく、大きな社会問題になっている。

ダイオキシン類は食物、大気、水及び土壤中より検出されており、そのヒト曝露量は大都市地域で 0.52-3.53 pgTEQ/kg/day と報告されている。ダイオキシン類の大きな発生原因の一つとして、ゴミの焼却炉における加熱反応が関与していることが指摘されている。

一方、我々のより身近な生活環境で、加熱反応が係っているものとしては、喫煙や加熱調理食品が挙げられる。タバコの煙は喫煙者に直接摂取される主流煙と空気中に拡散する副流煙があり、両者の煙ともニトロソアミン類、多環性芳香族炭化水素化合物等の発がん物質が含まれている。又、焼肉、焼魚等に代表される加熱調理食品にもヘテロサイクリックアミン(HCAs)等の発がん物質が存在していることが報告されている。しかしながら、タバコの煙及び加熱食品中のダイオキシン類の広範な分析研究は未だ行われておらず、正確な定量値の報告はほとんどない。

本研究においては、日常生活に密着した加熱食品中のダイオキシン類の定量を行い、生活環境中に存在しているダイオキシン類の由来を正確に把握し、それらのヒト健康に及ぼす影響を評価することを目的とする。また環境中にはダイオキシンや PCB 類と同様な毒性を有する未知化合物が多く

存在しているものと推定される。そこで、ダイオキシンと同様にヒトアリルヒドロカーボンレセプター (AhR) を介した系での内分泌攪乱作用を示す新規物質の同定についても本研究で検討する。以上の研究から得られる成果は、公衆衛生学的見地より重要な基礎的研究資料となるばかりでなく、ダイオキシン類等の内分泌攪乱物質のヒト曝露量のバックグラウンドを知る上で貴重なデータになるものと思われる。

## B. 研究方法

研究は以下の4つに分けて行った。すなわち

1) 加熱食品中のダイオキシン類の定量法の開発。

2) 加熱調理前および加熱調理後の食品中のダイオキシン類の定量。

3) 環境中の新たな内分泌攪乱作用物質の検索。

4) 内分泌攪乱作用物質の *in vivo* 毒性評価系の検討。

具体的には

1) については、特に従来の方法で加熱食品を前処理する際、PCB 及び他の夾雑物により、測定したいダイオキシ

ン類 (特に PCDD、PCDF 及びコプラナー PCB のモノオルト体) の検出が妨害される。又、コプラナー PCB のモノオルト体とノンオルト体の含有量を比較すると、食品ではモノオルト体がノンオルト体より過剰に存在するため、モノオルト体がノンオルト体の検出を妨害してしまう問題点がある。これらの2点を改良し、感度よくダイオキシン類を測定できる前処理法を検討した。

2) については国産の牛肉 100 g を生肉のまま、あるいはフライパンを用いて強火で加熱し、加熱肉と加熱時流出油に分けてそれら画分に含まれるダイオキシン類の定量を行った。

3) については報告例の少ない河川水に注目し、新たな内分泌攪乱作用物質の検索を行った。

4) では、加熱食品中ならびに、生体内で生成すると推定される発がん性ヘテロサイクリックアミンの子宮重量変化に及ぼす影響について検討した。

## C. 研究結果

上記研究方法により以下の成果を得た。

1) 加熱食品中のダイオキシン類の定量法の開発。

加熱食品中のダイオキシン類の定量のため、より効率よく捕集・精製を行える前処理法を開発した。

従来法と大きく異なるところは、アルカリ分解時間の延長、硝酸銀シリカゲルのシリカゲルへの重層、さらには塩基性アルミナカラムを用いた一般 PCB の除去操作を加えること、コプラナー PCB のモノオルト体とノンオルト体を塩基性アルミナカラムと活性炭シリカゲルカラムの段階で分画することである。

前処理法は以下の通りである。牛肉 100 g を焼き網を用いて強火で 10 分加熱調理し、内部標準 ( $^{13}\text{C}$  同位体: PCDD 及び PCDF の 4~7 塩素化物は 1 ng、8 塩素化物は 2 ng、コプラナー PCB は 1 ng) を添加した。この後、従来法では 1M KOH/EtOH 中で 3 時間のアルカリ分解を行っていたが、油分および有機物の分解を十分に行って夾雑物をより除去しやすくするため、2M KOH 水溶液中で攪拌しつづ一晩のアルカリ分解を行った。次に EtOH を添加して振盪した後、液-液

分配でヘキサン抽出を行った。従来法ではヘキサン層の洗浄に通常の前製水を使用していたが、抽出効率を高めるために 2% NaCl 水溶液を使用することとした。また 2% NaCl 水溶液には、水由来の汚染を減らすためにヘキサン洗浄水を使用した。得られた濃縮物の硫酸処理を行い、次いでシリカゲルの上に 1 g の硝酸銀シリカゲルを重層したカラムで処理した。従来はシリカゲルのみを用いていたが、硝酸銀シリカゲルを重層することにより硫化物除去を行うことができる。また、測定妨害となる一般 PCB を除去するために塩基性アルミナカラム処理を加えた。n-ヘキサンによる溶出で一般 PCB の除去を行った後、2 種類の分画方法を用いてコプラナー PCB のモノオルト体とノンオルト体を分離した。分画方法 1 では塩基性アルミナカラムの段階で、分画方法 2 ではその次の活性炭シリカゲルカラムの段階でモノオルト体とノンオルト体を分画した。

2) 加熱調理前および加熱調理後の食品中のダイオキシン類の定量

国産の牛肉 100 g を生肉のまま、あるいはフライパンを用いて強火で加熱し、加熱肉と加熱時流出油に分けて、分析対象試料とした。フライパンは、テフロン加工のものをメタノールで洗浄、乾燥した後使用した。得られた試料は先の、改良法により前処理を行い、GC/SIMS により定量を行った。牛肉の生肉、加熱肉と加熱時流出油中の PCDD 及び PCDF (TEF 値を有するもの) の含有量はそれぞれ、生肉 : N.D. ~ 540 pg (生肉 100g あたり)、加熱肉 : N.D. ~ 440 pg (調理前の生肉 100g あたり) 及び加熱時流出油 : 0.41 ~ 160 pg (調理前の生肉 100g あたり) であった。これらの総 TEQ 値はそれぞれ 0.47 pg-TEQ/g、0.35 pg-TEQ/g、0.11 pg-TEQ/g と算出された。注目すべき点は、生肉中の毒性評価値は加熱燃焼することにより加熱された肉 (本体) とその流出油に分配され、それらは、生肉の 74% 及び 23% であった。しかしながら、ダイオキシン類の各組成ごとに加熱肉と加熱時流出油中の濃度 (操作ブランク値を引いたもの) を足して生肉のそれと比較すると、加

熱により O8CDF が減少する事が分かり、また 2,3,7,8-T4CDF 及び O8CDD は微量ではあるものの増加していたことから、加熱調理により生成する可能性が示唆された。

### 3) 環境中の新規内分泌攪乱作用物質の検索

前回までの研究で、変異原活性の強いことが指摘されている和歌川の河川水中の変異原物質として 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl が同定された。また、同化合物はヒトアリルヒドロカーボンレセプター (AhR) を発現させた酵母を用いた系において AhR と結合し、その活性は  $\beta$ -naphthoflavone とほぼ同じであることがわかった。この化合物は親化合物である 3,3'-dichlorobenzidine から生成している可能性が高いため、構造が類似している他の 3,3'-dichlorobenzidine 誘導体も河川水中に存在している可能性がある。そこで、3,3'-dichlorobenzidine の構造類似体 3,3'-dichloro-4,4'-dinitrobiphenyl、4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl の河川水中の濃度の定量を行った。その結果、

前者は 3640 ng/L、後者は 2120 ng/L の濃度で和歌川河川水中に存在していることが明らかとなった。両者はいずれも AhR に高い結合能を持っており、3,3'-dichlorobenzidine から 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl へ生成する際の間体であると考えられた。

#### 4) 内分泌攪乱作用物質の in vivo 毒性評価系の検討

卵巣摘出したラットの子宮重量変化を指標とした試験系を用いて、17 $\beta$ -estradiol および新規ヘテロサイクリックアミン、アミノフェニルノルホルマン (APNH) の活性を調べた。17 $\beta$ -estradiol (50  $\mu$ g/kg) 投与群では、子宮重量、子宮内膜及び上皮細胞の高さは、コントロール群に比し増加した。細胞増殖率も有意に増加していた。APNH (50 mg/kg) 投与群では、APNH の全身に対する毒性のためか、体重増加抑制を認めた (P<0.001)。一方、子宮重量及びその体重に対する比率は有意に増加していた (P<0.05 及び P<0.01)。しかし、組織学的には、子宮間質部及び上皮部の高さは、コント

ロールに比べて変化なく、もっとも鋭敏である BrdUrd 陽性細胞数でも、コントロールとほぼ同程度で非常に少なく、APNH 投与により、子宮内での細胞増殖が亢進している様子は認めなかった。これらの結果より、APNH による子宮重量増加は子宮そのものが大きくなった訳ではなく、子宮液の増加によると考えられた。

#### D. 考察

これまでの報告で、ヒト (日本人) が 1 日のうちに摂取するダイオキシン量は 0.26~3.26 pg/kgbw/day とされている (ダイオキシンリスク評価検討報告書 平成 9 年 5 月)。このうち肉・卵から摂取する割合は全体の約 20% であることが知られている。今回得られた結果では、牛肉の毒性評価値は調理前で 0.47 pg-TEQ/g、調理後で 0.35 pg-TEQ/g であった。これらの値は過去の牛肉中のダイオキシン類の毒性評価値 (平成 9 年度厚生科学研究費報告書) に近いものであった。和歌川には先に単離された 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl 以外にも AhR と結合する能力を有す

る化合物が2種類存在していることが分かった。これら PCB 誘導体の濃度は合わせて約 6000 ng/L であり、この河川は PCB 誘導体に高濃度に汚染されていると考えられる。今後、これら化合物の種々の生物活性を調べる必要があると考えられる。

また、ヘテロサイクリックアミンの一種である APNH は卵巣摘出ラットの体重増加を抑制し、子宮液増加による子宮重量の増加をきたした。しかし BrdUrd 陽性細胞を指標にした細胞増殖能に変化を及ぼさなかった。この結果から APNH は、エストロゲン様作用を示さないと考えられた

## E. 結論

1) 加熱食品中のダイオキシン類、即ち、ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)ならびにコプラナーポリ塩化ビフェニル(コプラナー PCB)の適切な定量方法について、各種クロマトグラフィー、高分解能 GC/MS、内部標準試料などを用いて検討した。その結果、試料中からダイオキシン類をヘキサン抽出した後、塩基性アルミナカラ

ムで大量の一般 PCB を除去する方法と活性炭シリカゲルカラムでコプラナー PCB のモノオルト体とノンオルト体を分離する方法とを組み合わせた処理を行うことにより、各ダイオキシン類を効率よく捕集、分画できることが明らかとなった。

2) 牛肉の生肉、加熱肉と加熱時流出油中の PCDD 及び PCDF(TEF 値を有するもの)の含有量はそれぞれ、生肉：N.D.~540 pg (生肉 100g あたり)、加熱肉：N.D.~440 pg (調理前の生肉 100g あたり)及び加熱時流出油：0.41~160 pg (調理前の生肉 100g あたり)であった。これらの総 TEQ 値はそれぞれ 0.47 pg-TEQ/g、0.35 pg-TEQ/g、0.11 pg-TEQ/g と算出された。、生肉中の毒性評価値は加熱燃焼することにより加熱された肉(本体)とその流出油に分配され、それらは、生肉の 74%及び 23%であった。

3) 和歌川河川水中の変異原物質、4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl の構造類似体 3,3'-dichloro-4,4'-



dinitrobiphenyl、4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl の河川水中の濃度の定量を行った結果、前者は 3640 ng/L、後者は 2120 ng/L の濃度で和歌川河川水中に存在していることが明らかとなった。両者はいずれも AhR に高い結合能を持っており、さらに 3,3'-dichlorobenzidine から 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl へ生成する際の間体であると考えられた。

5) 卵巣摘出ラットを用いた実験系は in vivo エストロゲン作用物質の検出系として有用である。この系を用いて、新規ヘテロサイクリックアミンである APNH のエストロゲン様作用の有無を検討した。APNH は卵巣摘出ラットの体重増加を抑制し、子宮液増加による子宮重量の増加をきたした。しかし、BrdUrd 陽性細胞を指標にした細胞増殖能に変化を及ぼさなかった。この結果から APNH は、エストロゲン様作用を示さないと考えられた。

## F. 研究発表

学会発表

Identification of mutagens in the

Waka River in Wakayama, Japan. Takeji Enya-Takamura, Atsuko Tada, Takashi Sugimura, Keiji Wakabayashi, Tetsushi Watanabe, Teruhisa Hirayama, 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, December, 2000

論文発表

Kawamori T, Uchiya N, Watanabe K, Ohta T, Sugimura T, Wakabayashi K: Effects of heterocyclic amines with mammary gland carcinogenic potential on estrogenic response of uterus in ovariectomized rats. Cancer Letter 162: 31-37 (2001).

## G. 知的所有権の取得状況

なし

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

「加熱食品中のダイオキシン類の定量法の開発」

分担研究者 遠藤 治 国立公衆衛生院 地域環境衛生学部 主任研究官

研究要旨

環境中に存在するダイオキシン類の人体曝露を把握する研究の一環として、本研究では加熱食品中のダイオキシン類、即ち、ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF)ならびにコプラナーポリ塩化ビフェニル(コプラナー PCB)の適切な定量方法について、各種クロマトグラフィー、高分解能 GC/MS、内部標準試料などを用いて検討した。その結果、試料中からダイオキシン類をヘキサン抽出した後、塩基性アルミナカラムで大量の一般 PCB を除去する方法と活性炭シリカゲルカラムでコプラナー PCB のモノオルト体とノンオルト体を分離する方法とを組み合わせた処理を行うことにより、各ダイオキシン類を効率よく捕集、分画できることが明らかとなった。

A. 研究目的

生活環境中には様々な有害物質が存在している。人は呼吸により空気中の有害物質を取り込んでいるばかりでなく、日常の食品からも微量ずつではあるが有害物質を取り込んでいる。食品中の有害物質には様々なものが知られているが、例えば発がん物質を

例にとると、サイカシン、プタキロサイドなどの植物由来の化合物、カビから産生されるマイコトキシン、種々の多環性芳香族炭化水素、ニトロソアミン、残留農薬や食品添加物などが挙げられる。また肉や魚などの加熱調理により生成するヘテロサイクリックアミン類も食品中の発がん物質として

良く知られている。一方、食品に含まれるダイオキシン類については、主に流通・販売されている食品を対象に研究が進められており、その含有量や種類が明らかにされつつある。しかしながら、これら食品を加熱調理した場合のダイオキシン類の含有量の変化や種類の変化についての知見は極めて少なく、その人への曝露の実態については殆ど明らかにされていない。

そこで、本研究では、食品の加熱調理に伴う有害物質の曝露を把握する基礎的研究の一環として、加熱食品中のダイオキシン類を適切に捕集・分画し、定量する手法について検討し、その人体への曝露量や発生要因に関する基礎的資料を得ることを目的とした。

これまでに予備試験として、加熱した牛肉をアルカリ分解後、ヘキサン抽出し、シリカゲル及び活性炭シリカゲルカラムによる分画を行った後、高分解能GC/MSで各種ダイオキシン類の定量を試みた。その結果、以下の問題点が認められた。A) 一般のPCB及び他の夾雑物により、測定したいダイオキシン類（特にPCDD、PCDF及びコ

プラナー PCB のモノオルト体) の検出が妨害される。B) コプラナー PCB のモノオルト体とノンオルト体の含有量を比較すると、食品ではモノオルト体がノンオルト体より過剰に存在するため、モノオルト体がノンオルト体の検出を妨害してしまう。従って、これらを予め別々に分画し測定に供するのが望ましい。

そこで、本研究では、以上の問題点を解決すべく、適切な捕集・分画及び測定方法を検討することとした。

## B. 研究方法

### 1) 試料の調製及び採取

牛肉 100 g を焼き網を用いて強火で 10 分加熱調理し、内部標準 ( $^{13}\text{C}$  同位体: PCDD 及び PCDF の 4~7 塩素化物は 1 ng、8 塩素化物は 2 ng、コプラナー PCB は 1 ng) を添加した。この後、従来法では 1M KOH/EtOH 中で 3 時間のアルカリ分解を行っていたが、油分および有機物の分解を十分に行って夾雑物をより除去しやすくするため、2M KOH 水溶液中で攪拌しつつ一晩のアルカリ分解を行った。EtOH を添加して振盪した後、液-液分配でヘキサン抽出を行った。従

来法ではヘキサン層の洗浄に通常  
の精製水を使用していたが、抽出効率  
を高めるために 2% NaCl 水溶液を使用  
することとした。また 2% NaCl 水溶  
液には、水由来の汚染を減らすために  
ヘキサン洗浄水を使用した。得られた  
濃縮物の硫酸処理を行い、次いでシリ  
カゲルの上に 1 g の硝酸銀シリカゲ  
ルを重層したカラムで処理した。従来  
はシリカゲルのみを用いていたが、硝  
酸銀シリカゲルを重層することによ  
り硫化物除去を行うことができる。ま  
た、測定の妨害となる一般 PCB を除  
去するために塩基性アルミナカラム  
処理を加えた。n-ヘキサンによる溶出  
で一般 PCB の除去を行った後、2 種  
類の分画方法を用いてコプラナー  
PCB のモノオルト体とノンオルト体  
を分離した (図 1)。分画方法 1 では  
塩基性アルミナカラムの段階で、分画  
方法 2 ではその次の活性炭シリカゲ  
ルカラムの段階でモノオルト体とノ  
ンオルト体を分画した。

## 2) ダイオキシン類の測定

1) で得られた各画分を高分解能  
GC/MS で分析した。高分解能  
GC/MS 測定には、HP-6890 series

(HP 社製) を備えた JMS-700 (日本  
電子製) を用い、分解能 10000 で測  
定を行った。キャピラリーカラムは、  
4~6 塩素化物の分離には CP-SIL 88  
(長さ: 60 m、内径: 0.25 mm、膜  
厚: 0.1  $\mu$  m、CHROMPACK 社製)、  
7 及び 8 塩素化物の分離には RH-17  
カラム (長さ: 30 m、内径: 0.32 mm、  
膜厚: 0.25  $\mu$  m、INVENTX 社製)、  
ノンオルト及びモノオルトコプラナ  
ー PCB の分離には HT-8 カラム (長  
さ: 60 m、内径: 0.22 mm、膜厚:  
0.25  $\mu$  m、SGE 社製) をそれぞれ用  
いた。

## C. 研究結果

### 1) 1,3,6,8-T4CDD の検出

PCDD 及び PCDF は、今回行った  
カラムクロマトの条件下では、活性炭  
シリカゲルの最終分画面分、即ちトル  
エン溶出面分に溶出されることが予  
想された。1,3,6,8-T4CDD は、これ  
ら PCDD 及び PCDF の中でも最も早  
く溶出されることが分かっているた  
め、1,3,6,8-T4CDD が最終画面分に濃  
縮されていることが確認できれば、他  
の PCDD 及び PCDF についても同様  
に濃縮されているものと示唆される。

図2に1,3,6,8-T4CDDの各画分における溶出量の比を示した。分画方法1のFrc. 5、分画方法2のFrc. 4に1,3,6,8-T4CDDのほぼ100%が濃縮されたことが分かる。

## 2) ノンオルトコプラナー PCB

3,3',4,4'-T4CB、3,4,4',5-T4CB、3,3',4,4',5-P5CB 及び 3,3',4,4',5,5'-H6CB を指標に、各画分への溶出の割合を調べた(図3)。分画方法1では86~99%がFrc.5に、分画方法2では78~100%がFrc.4に効率よく濃縮された。

## 3) モノオルトコプラナー PCB

2,3,3',4,4'-P5CB、2,3,4,4',5-P5CB、2,3',4,4',5-P5CB、2',3,4,4',5-P5CB、2,3,3',4,4',5-H6CB、2,3,3',4,4',5'-H6CB、2,3',4,4',5,5'-H6CB 及び 2,3,3',4,4',5,5'-H7CB を指標に、各画分への溶出の割合を調べた(図4)。分画方法2では、指標にした化合物全てがFrc. 2に効率よく(93~99%)濃縮された。一方、分画方法1では、主にFrc. 2に溶出されたものの、2,3,4,4',5-P5CB や 2,3,3',4,4',5-H6CB の様にFrc.2で

は11及び35%しか溶出されず、その後の分画画分Frc. 5に89%及び60%が漏れ出てしまった。この結果から、各種ダイオキシン類の捕集、分画には、分画方法2の方がより優れていることが分かった。

また、図表には示さないが、従来法と比較し、今回用いた捕集、分画、定量方法では一般のPCBや他の夾雑物による各種ダイオキシン類の検出妨害が著しく軽減された。

## D. 考察

加熱牛肉中のダイオキシン類測定予備試験において、A)一般のPCB及び他の夾雑物による各種ダイオキシン類の検出妨害、B)コプラナーPCBのモノオルト体とノンオルト体を予め別々に分画する必要性、などの問題点が認められた。

A)については、アルカリ分解時間の延長や硝酸銀シリカゲルのシリカゲルへの重層、さらには塩基性アルミナカラムを用いた一般PCBの除去操作を加えることにより、著しい改善が認められた。またB)については、コプラナーPCBのモノオルト体とノンオルト体を塩基性アルミナカラムの段

階で分画する方法と次の活性炭シリカゲルカラムの段階で分画する方法の2種類の方法で検討したが、後者の方がモノオルト体とノンオルト体をより濃縮率よく分画でき、かつ簡便な方法であることが明らかとなった。

#### E. 結論

これまで、加熱食品中のダイオキシン類に関しては、国内外とも研究例が少なく、その曝露状況に関する詳細な情報は無かった。本研究における検討により、加熱食品中の各種ダイオキシン類の適切な試料捕集、分画、定量方法が見いだされた。この改良定量法を用いることにより、加熱調理前、調理後の食品中のダイオキシン類の正確な測定が可能となり、加熱調理由来のダイオキシン類の人への曝露量推定に大いに役立つものと考えられる。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

図1 加熱食品中のダイオキシン類の定量方法の検討

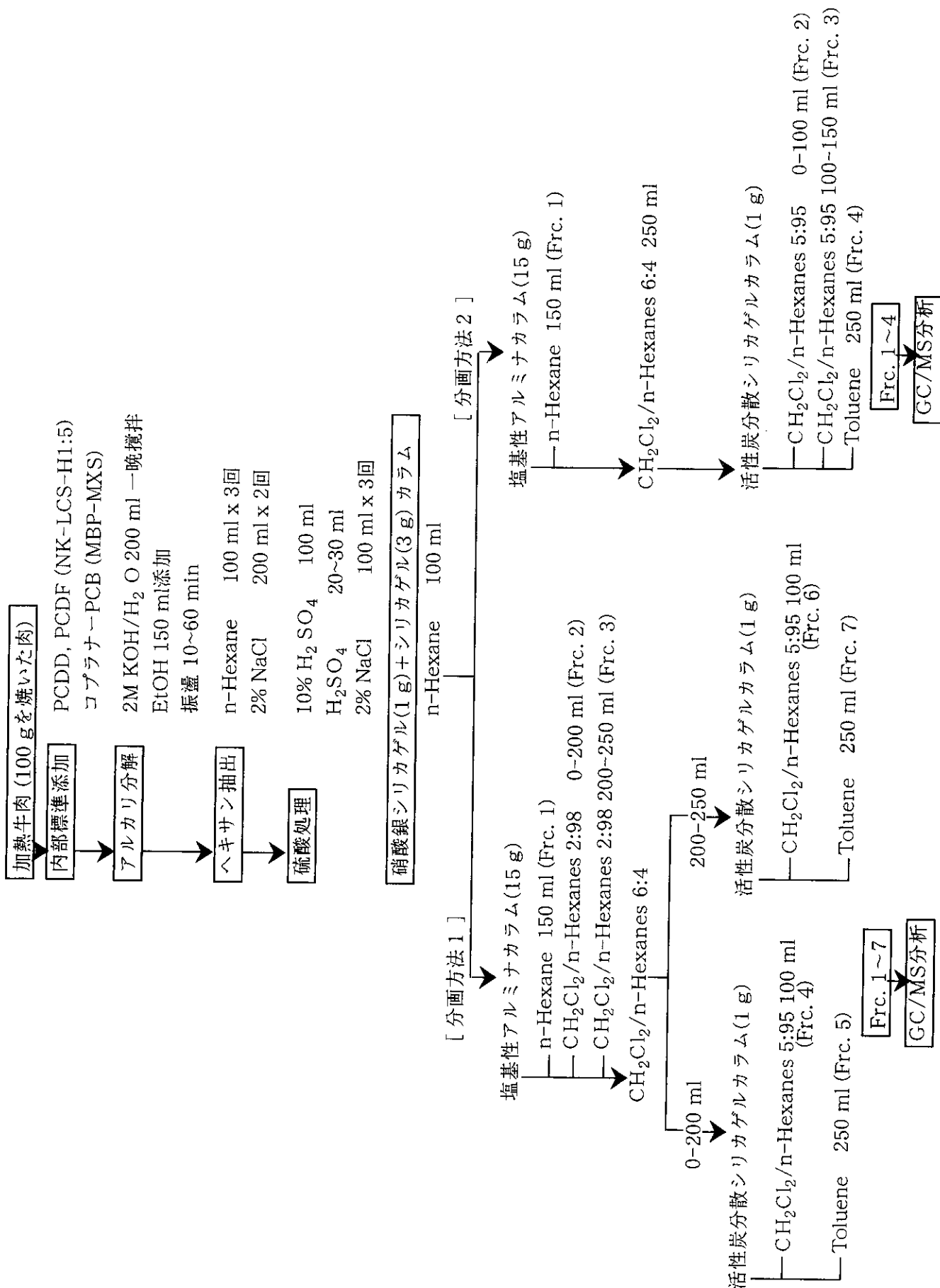
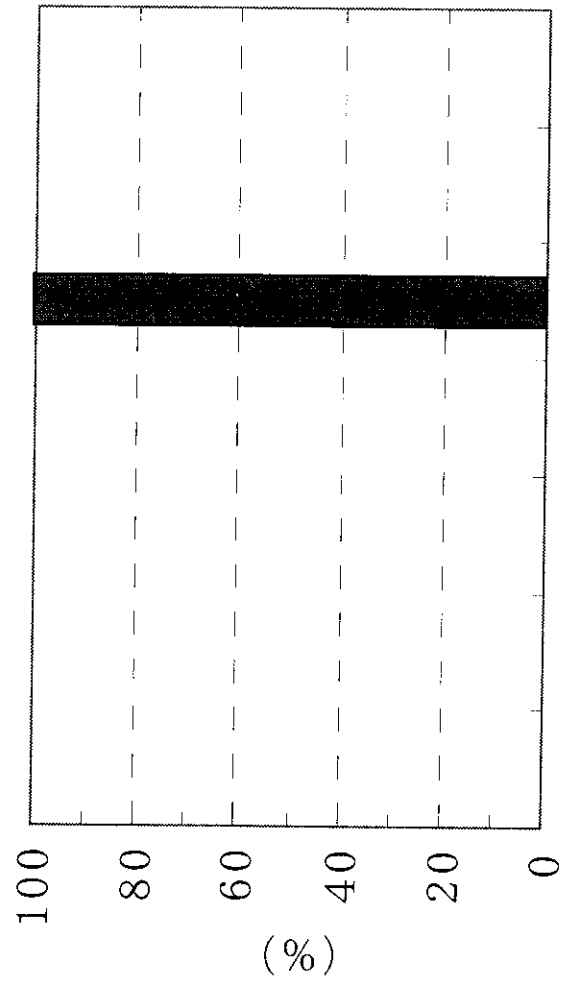
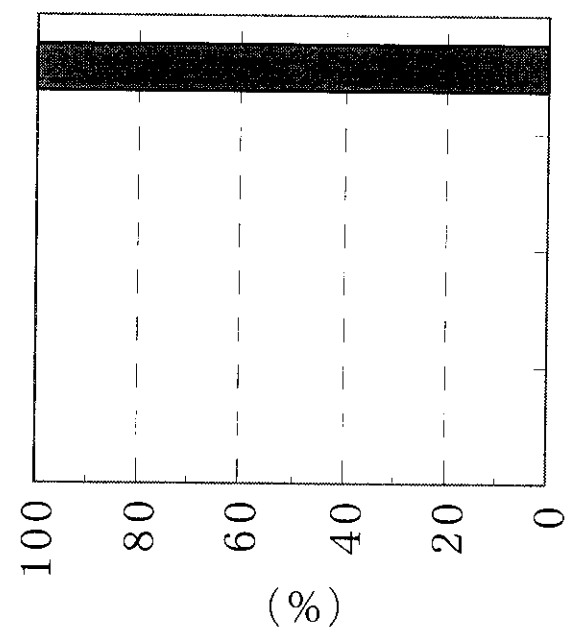


図2 各画分における1,3,6,8-T4CDDDDの溶出量の割合(%)

分画方法 1



分画方法 2

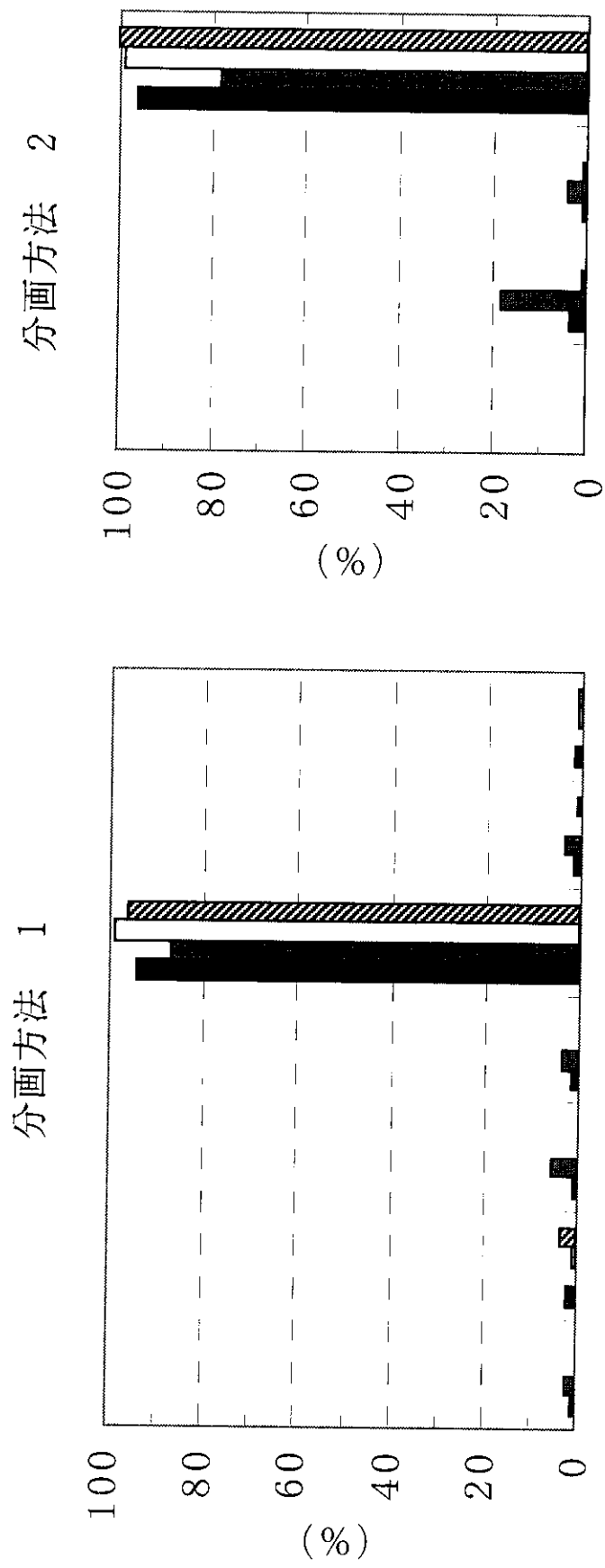


Frc.1 Frc.2 Frc.3 Frc.4 Frc.5 Frc.6 Frc.7

Frc.1 Frc.2 Frc.3 Frc.4



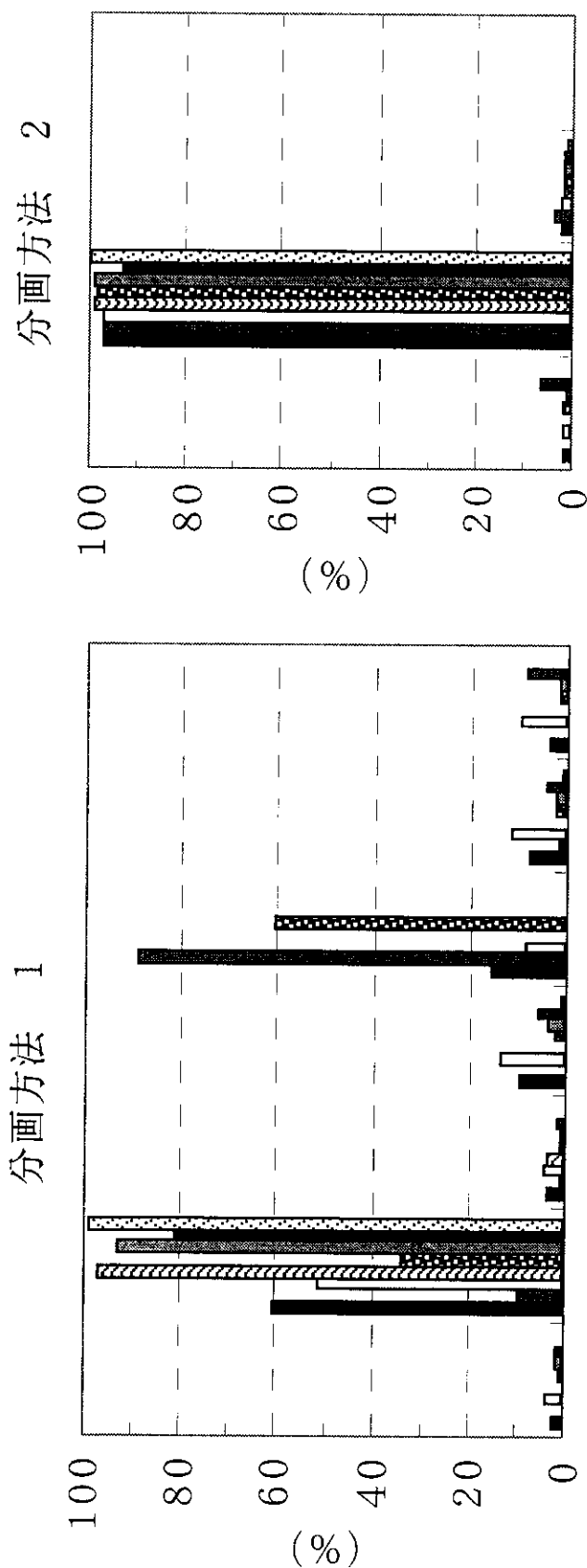
図3 各画分におけるノンオルトコプラナー-PCBの溶出量の割合 (%)



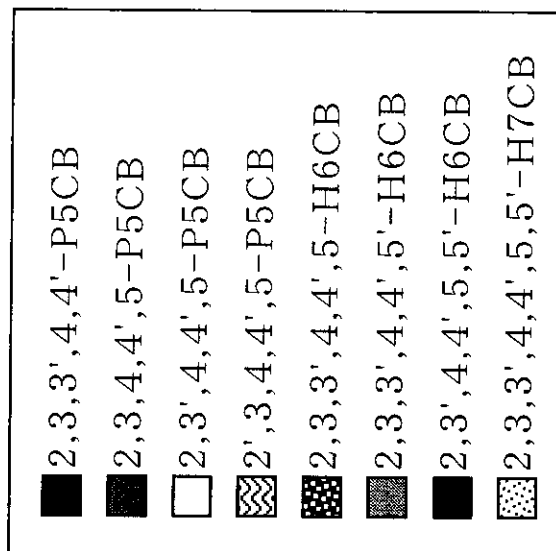
Frc.1 Frc.2 Frc.3 Frc.4 Frc.5 Frc.6 Frc.7 Frc.1 Frc.2 Frc.3 Frc.4

- 3,3',4,4'-T4CB
- 3,4,4',5-T4CB
- 3,3',4,4',5-P5CB
- ▨ 3,3',4,4',5,5'-H6CB

図4 各画分におけるモノオルトコプラナーPCBの溶出量の割合(%)



Frc.1 Frc.2 Frc.3 Frc.4 Frc.5 Frc.6 Frc.7



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

「加熱調理前および加熱調理後の食品中のダイオキシン類の定量」

分担研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所 がん予防研究部部長

研究要旨

環境中の有害物質に関する研究の一環として、肉の加熱調理によるポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(PCDD)及びポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)の濃度変化を調べた。牛肉をフライパンで加熱し、加熱肉及び加熱時流出油のダイオキシン類濃度を測定し、生肉の濃度と比較した。定量は改良法（塩基性アルミナカラムと活性炭シリカゲルカラムを組み合わせた方法）に従って行った。その結果、PCDD 及び PCDF(TEF 値を有するもの)の濃度は、使用した肉 100 g 当たり、加熱肉で 0～440 pg、加熱時流出油で 0.41～160 pg であった。これらの濃度を 1998 年 WHO/IPCS の毒性等価係数 (TEF) を用いて 2,3,7,8-T4CDD の毒性に換算して合計すると、それぞれ 35 pg-TEQ、11 pg-TEQ と算出された。これらの値は、生肉の TEQ 値の 74% 及び 23% であり、両者を合わせると生肉の 97% となった。牛加熱肉と加熱時流出油中の各種ダイオキシン類濃度を牛生肉のそれと比較すると、加熱により O8CDF が減少しており、一方 2,3,7,8-T4CDF 及び O8CDD は微量ではあるものの増加していたことから、加熱調理により生成する可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、環境中の発がん物質や内分泌攪乱物質の曝露とヒトの健康との係わりについての感心が高まりつつ

ある。これらに関する情報は次第に蓄積されつつあるが、環境中に微量に存在する発がん関連物質及び内分泌攪乱物質の汚染状況を把握するために

は、高感度かつ高精度な測定手法が必要であることより、その実態解明は十分な状況ではない。特に、ダイオキシン類などの微量物質の環境中での存在実態に関しては不明な点が多い。

肉や魚の加熱強度とヒトがん発生との関連性が、これまでにいくつかの疫学的研究により報告されている。また、加熱調理した肉から分離・同定された各種ヘテロサイクリックアミンが、ヒト発がんの原因物質であることが示唆されている。しかしながら、加熱食品を対象としたダイオキシン類の研究は、わずかに報告されているにすぎず、加熱調理食品に由来するダイオキシン類のヒト曝露量を把握できるような広範な分析データはほとんど見当たらない。そこで、加熱食品中の有害物質に関する研究の一環として、加熱調理前及び加熱調理後の肉、さらには加熱時に流出した油に含まれるダイオキシン類濃度を、共同研究者の遠藤らと共に検討した改良方法を用いて測定した。また、検出された各種ダイオキシン類の組成から、加熱調理による各種ダイオキシン類生成の可能性についても検討した。

## B. 研究方法

### 1) 試料

国産の牛肉 100 g を生肉のまま、あるいはフライパンを用いて強火で加熱し、加熱肉と加熱時流出油に分けて、分析対象試料とした。フライパンは、テフロン加工のものをメタノールで洗浄、乾燥した後使用した。

### 2) ダイオキシン類の抽出及び分画

塩基性アルミナカラムと活性炭シリカゲルカラムを組み合わせた改良定量法（遠藤らによる分担研究報告を参照）により、前述の試料（生肉、加熱肉及び加熱時流出油）に含まれる各種ダイオキシン類を捕集、分画、測定した。即ち、内部標準を添加し、2M KOH 水溶液中で一晩アルカリ分解した後、ヘキサン抽出画分を硫酸処理し、次いで硝酸銀シリカゲル、塩基性アルミナカラム、活性炭シリカゲルカラム等を用いて、モノオルトコプラナー PCB を含む画分と PCDD, PCDF 及びノンオルトコプラナー PCB を含む画分とに分画した。各画分のダイオキシン類濃度を、高分解能 GC/MS で測定し、同位体内部標準法を用いてダイオキシン類の濃度を算出した。