

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業

【ダイオキシン類等の化学物質の食品及び
生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究】

平成14年度
総括・分担研究報告書

■主任研究者

財団法人 食品薬品安全センター 柳 澤 健一郎

■分担研究者

星薬科大学 薬品分析化学教室 中 澤 裕 之

大阪府立公衆衛生研究所 織 田 肇

国立医薬品食品衛生研究所 米 谷 民 雄

財団法人 食品薬品安全センター 松 木 容 彦

平成15年4月

目 次

総括研究報告

- ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における 1
信頼性確保と生体曝露モニタリング法の確立に関する研究
柳澤 健一郎

分担研究報告

1. PCB代謝物および難燃剤成分のHRGC/MSモニタリング法の確立と 7
精度評価ならびに生体曝露に関する研究
中澤 裕之
2. 血液および母乳試料中のダイオキシン測定マニュアルの実試料への 19
適用性ならびに生体曝露に関する研究/臭素化ダイオキシン測定法
の確立、測定操作マニュアル作成に関する研究
織田 肇
3. 食品中ダイオキシン類分析の信頼性確保に関わる調査研究 97
米谷 民雄
4. 生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価 109
および臭素化ダイオキシンELISA確立に関する研究/食品衛生検査
精度管理調査における適正調査試料作製と質向上に関する調査研究
松木 容彦

研究成果の刊行に関する一覧表 187

研究成果の刊行物・別刷 189

厚生労働科学研究費補助金研究（食品・化学物質安全総合研究事業）

「ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における
信頼性確保と生体曝露モニタリング法の確立に関する研究」

総括研究報告書

主任研究者 柳澤健一郎

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 柳澤 健一郎（食品薬品安全センター 理事長）

研究要旨

ダイオキシン類の環境汚染化学物質の生活環境からの一日も早い低減化と環境改ならびに食品や飲料水中のダイオキシンレベルさらにはヒトでの曝露レベルの経年的かつ長期的なモニタリング調査が必須とされ、一方では、環境汚染化学物質や食品検査の実施機関から出される検査結果の信頼性保証担保システム構築の必要性が指摘されている。このような社会的背景下、環境汚染化学物質検査のみならず食品衛生検査や新しい食品としての組換え DNA 食品検査等も含め、各検査機関から出力される検査データの信頼性保証を担保するために、公定法としての検査法ガイドラインや検査操作マニュアルの策定、整備、さらには各検査機関に対する内部および外部精度管理実施体制や信頼性保証担保システムの導入、整備は行政上の取り組むべき重要かつ緊急な課題である。当研究班では、検査法の開発、ガイドライン案や操作マニュアル案の策定さらには精度管理実施とその問題点の洗い出し等の基礎的資料やデータの作成あるいはその関連情報の提供を行うことを研究目的として、1. PCB代謝物および難燃剤成分のHRGC/MSモニタリング法の確立と精度評価に関する研究（中澤分担研究）、2. 血液および母乳試料中ダイオキシン測定マニュアル実試料への適用性ならびに生体曝露に関する研究/臭素化ダイオキシン測定法の確立と測定操作マニュアル作成に関する研究（織田分担研究）、3. 食品中ダイオキシン類分析の信頼性確保に関わる調査研究（米谷分担研究）、4. 生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する/食品衛生検査精度管理調査における適正調査試料作製と質的向上に関する調査研究（松木分担研究）の4研究課題を実施した。

分担研究者名＝中澤裕之（星薬科大学教授）、
織田 肇（大阪府衛生研究所副所長）、米谷
民雄（国立医薬品食品衛生研究所食品部長）、
松木容彦（財）食品薬品安全センター秦野研
究所副所長）

A. 研究目的

ダイオキシン類は動物を用いた実験により、
急性毒性、免疫毒性、発ガン性、生殖毒性

等が強く疑われており、また、発現機序等
についてもいまだ不明な点が多いことから、
これら環境汚染化学物質による食物汚染や
ヒト体内暴露による国民健康への影響が懸
念されている。しがって、これらの化学物
質の生活環境からの一日も早い低減化と環
境改善ならびに経年的かつ長期的なモニタ
リング調査が必須とされる。近年、環境汚
染化学物質の検査を目的とした民間検査機

関が行政の規制緩和策を受けて急増し、その結果、検査機関から出される検査結果の信頼性が問われる問題も生じている。このような社会的背景下、環境汚染化学物質検査のみならず食品衛生検査や組換え DNA 食品検査等も含め、出力される検査データの信頼性保証を確保するため、検査法ガイドラインや検査操作マニュアルの策定、整備、精度管理実施体制と信頼性保証担保システムの構築、整備などについての具体的な対応策を打ち出すことは行政上の取り組むべき重要かつ緊急な課題であり、その方法の開発や基礎的データの作成あるいは関連資料の提供を行う等、円滑な行政活動に資することが当研究班の研究目的である。

B. 研究方法

1. 中澤分担研究：有機塩素系農薬、PCNやPCB及びその代謝物、ポリ臭素化ジフェニルエーテルなどの臭素系難燃剤（以上合計59種類）の生体試料分析において最も重要な分析操作上の課題とされている脂質抽出操作のステップに自動化抽出システムと脂質分画法を組み入れた一斉分析法構築の検討を行った。2. 織田分担研究：1) 先に当研究班で作成した既存の母乳中ならびに血液中ダイオキシン測定暫定マニュアルに、実試料測定時の問題点を加筆、修正して、より実質的なマニュアルに改定した。また、試料の少量化についても検討した。2) 先に当研究班で作成し提示した臭素化ダイオキシン類の分析法素案について、分析化学的検討課題を洗い出すとともに最新の測定技術的知見を導入して、より信頼性の高い高感度な分析マニュアル(案)を策定した。3. 米谷分担研究：食品中の

ダイオキシン分析の外部精度管理調査試料として魚(ボラ)筋肉部凍結乾燥品を基材とする調査試料を作製し、調査に供した。作製した試料については、均一性を確認した。また、植物性基材の適用性について検討した。4. 松木分担研究：1) 臭素化ダイオキシンのELISA法を確立するため、臭素化ダイオキシンハプテン、免疫原および酵素標識ハプテン抗原を合成した。ついで、PBDD/Fsに対するモノクローナル抗体を作製した。2) 先の研究班(平成11-13年度)において作製した塩素化ダイオキシン類アッセイ用のELISAキットの精度を確認するため、ダイオキシン分析機関8社においてコラボレーション試験を実施した。3) 食品衛生検査外部精度管理調査の微生物検査における大腸菌同定検査における培地条件や温度条件の適正性について検証した。また、理化学検査においては、金属検査試料として実材試料に近いカドミウム米と動物用医薬品検査試料として液卵試料の作製を行った。さらに、調査試料配布時における高温季の輸送中の温度履歴について調査した。4) 組替えDNA検査で定性PCR法解析に用いられるゲル撮影装置の性能比較および配布試料の組替え体と非組替え体の性状確認を行うとともに安定性について調べた。

C. 結果

1. 中澤分担研究：生体試料からの脂質の抽出法として、高速溶媒抽出法(ASE)を採用した。得られた脂質をGPCによりクリーンアップ後、シリカゲルを充填した固相抽出カラム(SPE)を用いて分析対象化合物を、低極性物質群(5%ジクロロメタン/ヘキサ

ン溶出フラクション：Fraction-A）と高極性物質群（10%メタノール/ジクロロメタン溶出フラクション：Fraction-B）に分画し系統的測定法を構築した。59種類の環境汚染化学物質はほぼ良好に回収された。2. 織田分担研究：2-1) 母乳および血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアルにおいてはそれぞれ以下の点を追加，記載した。母乳については，①装置の検出下限値は20～50fg，試料量は母乳50mLとする。②各種のダイオキシン類とコプラナーPCBの目標定量下限値については新たに定めた。③カラムクロマトグラフィーによるPCBの分取およびGC/MS測定においては，「ノンオルソPCB+ダイオキシン類」および「モノオルソPCB」の2回測定を基本とすることとした。血液については，①脂肪抽出においては，全血では，暫定マニュアルのままとするが，血清および血漿では，試料量を全血の半分とする。②目標定量下限値は，母乳の場合と同様とする。③試料の少量化に当っては，内径の小さなカラムの使用や大量注入法を導入することにより実現可能であることをマニュアルには含めず，参考資料として示すこととした。2-2) 臭素化ダイオキシン類のマニュアル（案）に当っては原案に以下の点を追記した。①生体曝露評価に必要とされる分析対象化合物の選択およびそれらの目標定量下限値，②前処理方法において臭素化ジフェニルエーテルなど臭素化ダイオキシン分析妨害物質の分離除去方法，前処理および機器分析操作途中での臭素化ダイオキシンの分解防止対策，③GC/MS分析における高感度検出方法等を取り入れた。また，④標準物質が市販されていない化合物の測定法，臭素化ダイオ

キシンの前処理およびGC/MS検出時における安定性の確認，標準物質に対する内標準物質の選択，高感度検出法の改良など臭素化ダイオキシン分析における検討課題点を明らかにした。3. 米谷分担研究：本年度作製した精度管理調査試料（ボラ魚体）の複数について分析し，使用する試料の均一性を評価したところ，調査試料として均一であり，外部精度管理に充分使用可能であった。また，各機関からの調査結果を統計的に評価して，各機関の技能の評価法を検討した結果，大方のダイオキシン異性体のRSDは40%以下であったが7置換体のPCDFについては50%以上でありまたコプラナーPCB類は43%といくぶん高い結果であった。さらに，精度管理調査用試料として植物性基材の適用の可能性が示された。4. 松木分担研究：4-1) 臭素化ダイオキシンの酵素免疫測定法の開発については，ポリ臭素化ダイオキシン(PBDD)ハプテン，免疫原および酵素標識ハプテン抗原を合成し，さらに，PBDD/Fsに対するモノクローナル抗体を作製した。4-2) 平成11～13年度の厚生科学研究費補助金研究（松木班）においてキット化したダイオキシンELISAキットの精度評価のため，分析機関8社においてコラボレーションを実施した結果，検量線作成においては，各機関ともほぼ近似した検量線が得られた。検量線吸光度の相対変動係数は，各濃度とも14%以下であった。さらに，測定機関間での変動と分析操作上の問題点の有無等を調べた結果，標準品添加精製バター試料での変動は10%程度であり，簡易測定法としては満足すべき結果であった。その他の操作上，特に問題となるような技術的問題は見られなかつ

た。4-3) 食品衛生外部精度管理調査の大腸菌同定検査試料については、公定法として採用されている培地 (EC 培地) と指定温度条件下で再検討したところ、大腸菌の汚染濃度あるいは大腸菌の性状によっては、大腸菌が存在していても陰性となりうる事が、また、公定法の操作の一部を変えて培養する場合にはより正確に大腸菌を検出する事ができることが明らかとなった。4-4) 理化学検査においては、玄米、無洗米および精白米について、目的濃度に適合し、かつ均一な濃度のカドミウム米試料 (F 値: $3.22\% < 5\%$) 作製に成功した。一方、液体試料として動物用医薬品 (フルベンダゾール) 添加液卵試料を作製し、目的濃度に適合し、かつ均一な濃度の鶏卵試料 (F 値: $1.37\% < 5\%$) が得られ、従来より実食材に近い材料の作製が可能となった。4-5) 輸送中の精度管理調査用配布試料の温度管理状況調査においては、普通便、冷蔵便及び冷凍便による温度履歴調査 (高温期調査) を試みた結果、一部の事例を除いて概ね良好な温度管理がなされていることが確認された。4-6) 組換え DNA 検査の基礎的検討においては、定性 PCR 法の解析に使用する、各種のゲル撮影装置について性能を比較した結果、CCD カメラはポラロイドカメラに比べて感度がおおよそ 2 倍以上優れていること、用いた 4 種の CCD カメラ間には、明確な差は認められないことが分かった。外部精度管理調査調査試料 (パパイヤ) の定量試験に先立ち、厚生省の通知法により、配布試料の組替え体と非組替え体表示の確認試験を行った結果、GUS 法、PCR 法のいずれについても両配布試料の表示が正しいことを確認した。残りの試料

を用いて両法で安定性を調べた結果、冷凍、室温のいずれの条件下でも少なくとも精度管理調査期間 (2-3 週間) は安定であることを確認した。

D, 考察

1. 中澤分担研究: 生体試料中の残留微量化学物質の一斉分析法の前処理に自動化脂質抽出システムが導入でき、簡易でかつ迅速なクリーンアップ操作法が確立できた。また、本法の導入により分析担当者の測定技術に起因していた測定値のバラツキの改善が可能と期待される。2. 織田分担研究: 母乳および血液中ダイオキシン類測定マニュアルの加筆修正等を行い、ほぼ完成したマニュアルが提供でき、本マニュアルに従い平成 15 年度には各検査機関でのクロスチェックが可能と考えられる。また、本マニュアルの使用により検査データの信頼性が向上することが期待される。臭素化ダイオキシン測定マニュアルについては測定上の実質的な検討課題を明らかに出来、今後のマニュアル作成の基盤的情報の提供が可能と考えられる。3. 米谷分担研究: 食品中ダイオキシン測定の精度管理試料としては、わが国で初めて実食材の魚体試料作製に成功し、今後広く提供が可能と考えられる。本作成技術を応用して、さらに植物性基材を含めて試料種の作製範囲の拡大の可能性が示された。4. 松木分担研究: 臭素化ダイオキシンのモノクロモノクロール抗体の作製に成功したことから、平成 15 年度に ELISA アッセイ系の確立を予定している。平成 14 年度の結果から塩素化ダイオキシンの ELISA キットが実用性の高い簡易型モニタリング法であることが確認で

きたので、ポリクローナルを用いた ELISA キットについてもその実用性は期待でき、平成 15 年度にコラボレーション試験の実施を予定している。精度管理調査における微生物検査においては、公定法の改良点が明らかになり、今後の検討の必要性を示した。理化学検査においては、実食材を使用した精度管理試料が作製できた。平成 15 年度は、この技法をもとにさらに適正な試料を提供するとともに、各検査機関のデータについて用いられている検査法別の評価を試みる。試料送付期間における温度管理状態はかならずしも万全ではない結果が得られ、引き続き精度管理調査の必要性が示された。組替え DNA 食品検査の精度管理試料（パパイア）の表示確認および安定性を確認し、調査法の妥当性を裏付けた。また、使用するカメラ間の精度を確認した。

E. 結論

1. 中澤分担研究：ストックホルム国際会議で規制対象となった POPs に加えて臭素系難燃剤と PCB 代謝物を含めた系統分析法ができ、今後各検査機関での利用が期待される。2. 織田分担研究：母乳および血液中のダイオキシン測定操作マニュアルの不備な点について加筆、修正し、より信頼性の高いマニュアルの提供が出来た。測定試料の少量化の可能性を確認しその方法を提示した。臭素化ダイオキシンについては測定操作マニュアル作成の基本的な項目について洗い出しを行い分析操作マニュアル作成の基盤が策定できた。3. 米谷分担研究：精度管理調査試料として実食材のボラ魚体を基材とした試料の作製に成功し、今後の精度管理調査試料作製の展望が開け

た。4. 松木分担研究：生体試料中ダイオキシンモニタリング用として開発したモノクローナル抗体を用いた ELISA キットの検査機関間バリデーションを行いその実用性のあることを明らかにした。臭素化ダイオキシンに対するモノクローナル抗体が作製でき、ELISA 確立への道が開けた。微生物検査の精度管理を通して、公定法の改良点を明らかにした。理化学検査においては実食材類似の新しい精度管理調査用基材が開発でき、今後の試料作製の見通しが得られた。精度管理試料配布に当たり輸送中の温度管理の状態を調査し、今後も輸送中のモニタリング継続の必要性が求められた。組替え DNA 食品検査の精度管理調査実施における基礎的データの収集と外部精度管理調査を行い、調査法の妥当性が確認できた。また、各検査機関の現段階の技術情報を確認でき。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金研究（食品・化学物質安全総合研究事業）

「ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における
信頼性確保と生体曝露モニタリング法の確立に関する研究」

分担研究報告書

PCB代謝物および難燃剤成分の HRGC/MS モニタリング法の確立と
精度評価に関する研究

分担研究者 中澤裕之

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担研究報告書

PCB 代謝物および難燃剤成分の HRGC/MS モニタリング法の確立と精度評価に関する研究

主任研究者 柳澤 健一郎 （財）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 斉藤 貢一 埼玉県衛生研究所 専門研究員
研究協力者 Andreas Sjodin Centers for Disease Control and Prevention

研究要旨

環境汚染問題に加えて、内分泌攪乱作用など生体への影響が懸念されている PCB や臭素系難燃剤および有機塩素系農薬など、いわゆる POPs による生体への残留・影響評価調査を行うために、生体試料を対象とした 59 種類の環境汚染化学物質の分析方法の開発に関する研究を行った。

生体試料からの抽出方法として、自動化システムを組み込むことが可能な高速溶媒抽出法(ASE)を採用し、抽出溶媒の種類および比率などを詳細に検討したところ、ジクロロメタン/アセトン(1:1)が最も脂質抽出に適した溶媒系であることがわかった。得られた脂質のクリーンアップ法として、ゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)を用いる方法を検討し、GPC カラムに Bio-Beads S-X3 を、移動相にジクロロメタン/ヘキサン(1:1)を用いたところ、分析対象化学物質を損なうことなく、大部分の脂質を除去することができた。続いて、固相抽出カラム(SPE)を用いることで、低極性物質群と高極性物質群とに分画することができた。添加回収実験を行ったところ、59 種類の環境汚染化学物質はほぼ良好に回収された。

本分析方法では、前処理操作に自動化システムを組み込むことが可能となった。これによって省力化と前処理時間の迅速化が図られるだけでなく、分析担当者の技量に起因する測定値のバラツキ問題を改善することができるなど、精度管理への貢献も期待される。

A. 研究目的

近年、PCB や塩素系農薬、臭素系難燃剤などの、いわゆる有機ハロゲン化合物によ

る環境汚染とヒトへの曝露、およびその残留によって引き起こされる生体影響が懸念されている。2001 年にストックホルムで開

催された国際会議においては、12種類の残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants : POPs) を規制する条約が採択された。POPs とは、PCB, DDT, ダイオキシン類などのように、環境中での残留性、生体濃縮性、毒性が高く、更に長距離移動性が懸念されて、生物全般に悪影響を与えおそれのある残留性有機汚染物質と定義されている。

POPs に加えて、PCB 水酸化体やある種の塩素系農薬代謝体の中には内分泌攪乱作用が指摘されている物質もある。従って、これらの化学物質による地球規模での環境汚染調査と共に生体への残留・影響調査が望まれている。

そこで生体試料を対象とした各種の有機ハロゲン化合物とその生体内代謝物の簡便・迅速な一斉分析方法の開発に関する研究を行うことにした。分析対象の化学物質としては、POPs 条約で規制されている DDT 類, HCH 類, ドリン剤およびクロルデンなどの有機塩素系農薬に加えて、PCN や PCB およびその代謝物など、更に近年になって環境汚染と共に生体への残留が懸念されているポリ臭素化ジフェニールエーテル(PBDE)類などの臭素系難燃剤を選択した。本研究では、これらの化学物質を簡便且つ迅速に抽出・クリーンアップするために、高速溶媒抽出(ASE)を用いた抽出方法およびゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)や固相抽出法(SPE)を用いたクリーンアップ方法など、主に自動化処理を念頭に置いた前処理方法についての検討を行うことにした。

B. 研究方法

1. 実験機材

1) 試料

方法論開発のための生体試料として牛の脂肪および豚の臓器 (心臓, 腎臓, 肝臓) を用いた。

2) 試薬類

標準品 : 臭素系難燃剤には、triBDE-17, triBDE-28, tetra- BDE-47, tetraBDE-66, pentaBDE-100, penta BDE-99, penta-BDE-85, hexa- BDE-154, hexaBDE-153, hexaBDE-138, heptaBDE-183, TBBP-A ; PCN には、pentaCN-52, hexaCN-66, heptaCN-73, octaCN-75 ; PCB としては、pentaCB-92, 101, 119, 118, 105, hexaCB-151, 144, 134, 158, 128, 157, heptaCB-191, 190, nonaCB-208, 207 ; PCB 代謝物 (OH 体) としては、4-OH-pentaCB-107, 4-OH- hexaCB-130, 4-OH-heptaCB-187 ; PCB 代謝物 (MeSO₂体) としては、4-MeSO₂- pentaCB-87, 4-MeSO₂-hexaCB-132, 4-MeSO₂-hepta- CB-174 ; 有機塩素系農薬としては、pentachlorobenzene, hexachlorobenzene, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, heptachlor, heptachlor epoxide, α -chlordane, γ -chlordane, 4,4'-DDE, aldrin, dieldrin, endrin, endrin aldehyde, endrin ketone, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulfate, octachlorostyrene, pentachlorophenol, 以上 59 種類とした。

Hydromatorix : Varian 社製(CA, USA)を、予めジクロロメタンを溶媒として ASE で洗浄した後、150°C のオープンで乾燥させた。
シリカゲル : Aldrich 社製, (high-purity

grade, 70-230 mesh, 60 Å) for column chromatography

固相抽出カートリッジ (SPE) : 150°C のオーブンで加熱・活性化させたシリカゲル 0.95 g をポリプロピレン製ディスポーザブルの空カートリッジ (3 ml 容, Varian 社製, USA) に充填した。フリットには予めヘキサンで超音波洗浄したテフロン製品を用いた。SPE における pre-wash, sample apply, elution などの操作は自動前処理装置の RapidTrace を用いて行った。

ジアソメタン発生用紙用試薬 : N-methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamide (Sigma-Aldrich, USA) を用いた。

3) 装置

ASE: ASE-200 (Dionex, USA)

GPC: AutoPrep 2000 (OI-Analytical)

GPC column: Biobeads S-X3 (, OI-Analytical, USA)

SPE: RapidTrace (Zymark, USA)

Evaporator: RapidVap (Labconco, USA)

GC/MS は HP6890 GC-HP5973MSD を使用し, GC カラムには DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25um) を, NCI 反応ガスにはメタンを用いた。GC オープン昇温条件は, 80°C(1min)→[15°C/min]→275°C→[10°C/min]→320°C(5min), 注入口温度は 280°C, 注入方法はスプリットレスで 2µ注入とした。

2. 抽出方法

2-1 脂質抽出—ASE 法

細切・ホモジナイズした各臓器 5g (脂肪組織の場合は 1g) に Hydromatrix 6·7g (試料重量の約 1.2 · 1.4 倍量) を加えて試料の脱水と分散を行った。予め ASE セル(3ml)

の出口側フリットとしてセルロースフィルターを 2 枚敷き, 更に ASE セル内に Hydromatrix 約 1 g を充填しておき, その上部に前記の試料を積層充填した(図 1)。セル上部に空隙が生じた場合には Hydromatrix だけを追加充填した。ジクロロメタン/アセトン(1:1)を抽出溶媒として, ASE を用いて表 1 の条件で脂質抽出を行った。得られた抽出液は, RapidVap を用いて大部分の有機溶媒を留去した後, ヘキサン:tert-butyl methyl ether (MTBE) (9:1) 10ml および 0.1M H₃PO₄/1% KCl 10ml を加えて rocking(30 回)で分配抽出し, 有機溶媒相(上層)を分取した。下層に再度ヘキサン:MTBE (9:1) 10ml を加えて同じ操作を繰り返し, 有機溶媒相(上層)を合わせた後, RapidVap を用いて溶媒を完全に留去して脂質を得た。

2-2 脂質抽出—WBG 法

細切した各臓器 (1~5 g) を 50ml 容のガラス瓶に採り, アセトン:ヘキサン (7:2) 混液 15ml を加えて高速ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。内容物を 50ml 容の遠沈管に移し, 3000rpm で 10 分間遠心分離した。上清をデカンテーションして別の遠沈管に移した後, 残渣にヘキサン:MTBE (9:1) 10ml を加え, vortex mixer を用いて 1 分間内容物を攪拌・混和した。この混合物を遠心分離 (3000rpm, 10min) した後, 上清を先に分離した上清に合わせた。残渣にヘキサン:MTBE (9:1) 10ml を加え, 再度同じ操作を行って上清を合わせた後, 0.1M リン酸/1% KCl 水溶液 10ml を加えて緩やかに 30 回 rocking した。遠心

分離 (2000rpm, 5min) 後, 上層の有機溶媒相を 60ml 容試験管(ASE 用抽出試験管)に移し, 下層にヘキサン: MTBE (9:1) 10ml を加えて再度 rocking と遠心分離を行い, 上層を先に分け採った上層と合わせた後, RapidVap を用いて溶媒を完全に留去して脂質を得た。

3. クリーンアップ

脂質をジクロロメタン/ヘキサン(1:1) 5ml に再溶解し, GPC カラム(Bio-Beads S-X3)によるクリーンアップを表 2 で示した操作条件で行った。得られた GPC フラクション (約 70ml) を RapidVap を用いて溶媒留去後, ヘキサン 0.5ml で再溶解した。次にシリカゲルを充填した固相抽出カラム (SPE)にこのヘキサン溶液を負荷し, 5%ジクロロメタン/ヘキサン 6ml を用いて低極性化合物群を溶出 (Fraction-A) した後, 引き続き 10%メタノール/ジクロロメタン 8ml でフェノール性化合物などの高極性化合物群を溶出 (Fraction-B) した。Fraction-A については濃縮して, シリンジスパイク(¹³C-PCB153, 516pg/μl)を 20μl 添加し, 更にヘキサンを加えて全量を 200μl とした後, NCI-GC/MS で SIM 測定した。他方, Fraction-B は 0.5ml 程度に濃縮した後, ジアゾメタン (ヘキサン溶液) を約 2~3ml 加え, 室温下で 3h 放置してメチル化を行った。RapidVap を用いて過剰のジアゾメタン試薬とヘキサンを留去した後, Fraction-A と同様にシリンジスパイクを加えた後, NCI-GC/MS に供した。

C. D. 結果および考察

1. 脂質抽出

1) 試料脱水剤 (至適 Hydromatorix 量) の検討

ASE で試料から脂質を抽出するためには, 予め試料中の水分を脱水または乾燥させる必要がある。土壌などの環境試料を対象とした ASE 抽出用の脱水剤としては, 通常, 無水硫酸ナトリウムや Hydromatorix が用いられている。生体試料の場合には水分含量が多いため, 無水硫酸ナトリウムでは十分に脱水することが困難であった。他方, Hydromatorix を用いた場合では, 臓器の中でも比較的水分含量の多い肝臓であってもその試料重量の 1.2-1.4 倍量の Hydromatorix を混和させることによって試料はさらさら状態になり, ASE 用セルへの充填作業も容易であった。なお, Hydromatorix は天然資源であり, POPs や臭素系難燃剤等のバックグランドレベルでの汚染が危惧されたため, 使用前に ASE を用いてジクロロメタンで洗浄し, 150°C で乾燥させたものを使用した。

2) ASE 抽出条件の検討

生体試料中に残留する多くの有機ハロゲン化合物は, 生体内の脂質中に蓄積されていることから, 生体への影響を評価する際に, 通常これらの化学物質濃度は脂質当たりの重量濃度で表されている。しかし, リン脂質などの極性の大きい脂質は, 有機溶媒には抽出されにくい場合があるため, 生体からの抽出に際しては脂質抽出の効率についても考慮する必要がある。そこで臓器の中でもリン脂質含量の多い肝臓を試料と

して、ASEにおける至適抽出溶媒について詳細に検討した。図2に示したように、ヘキサン/DCM系の溶媒では、無極性のヘキサン単独で用いるよりもDCM含量が増えるにしたがって脂質の抽出効率は上昇した。また、DCM/アセトン、ヘキサン/アセトン、DCM/メタノール系およびイソプロパノール単独についても検討したところ、DCM/アセトン系による脂質抽出効率がよいことがわかった。そこで、DCM/アセトンおよびヘキサン/アセトン系において、それぞれDCMとヘキサン含量を段階的に変えて、脂質抽出に対して至適な組み合わせ比率を調べたところ、ジクロロメタン/アセトン(1:1)が最も良好な組み合わせであり、無極性の脂質のみならず、リン脂質などの極性の大きい脂質も十分に抽出されることがわかった(図3)。

ASEの抽出温度および圧力については、装置のMaxとして、150°C、2000psi程度までは使用可能であったが、今回の実験では高価なASE装置に負担をかけない範囲での効率的な抽出条件を求めたため、100°C、1500psiとした。

抽出 cycle 数としては、肝臓を試料として、1から4サイクルまでの各抽出液中の脂質含量を検討したところ、2サイクルで脂質が十分に抽出されることがわかった。

3) ASE 抽出液の処理

ASE抽出液には微量の水分などの高極性成分、および試料やHydromatorix由来の微粉末なども流出されていた。そこでこれらを取り除くため、無水硫酸ナトリウムをクロマトグラフ管に充填したカラムを通過

させる方法、またはリン酸で液性を酸性にしてヘキサン/MTBE(9:1)で液系分配抽出する方法について比較検討した。前者の無水硫酸ナトリウムで水分を脱水させる手法は一般によく用いられる方法であったが、標準品のヘキサン溶液を用いた予備実験では、PCB水酸化体やPCPなど一部のフェノール性化合物は無水硫酸ナトリウムに吸着して回収が不完全になることがあった。他方、後者では、手作業の操作が若干煩雑ではあったが、目的物質の回収が良好であったことから、後者の方法を採用することにした。

4) WBG method との比較

ASEによる脂質抽出効率を評価するため、豚の心臓、腎臓、肝臓および牛の脂肪組織を用いて、WBG method との比較を行った。なお、WBG method とは、従来から主に生体試料や食品試料の脂質抽出に広く使われている、アセトン/ヘキサンによるホモジナイズ抽出法の一つである。その結果、図4に示したように、何れの試料においても、ASE法とWBG method はきわめて良く一致した値を示した。これにより、本研究で検討したASEによる生体組織からの脂質抽出法の妥当性が確認された。

2. クリーンアップ

2-1 GPC

従来、生体試料や環境試料におけるPCBや臭素系難燃剤のクリーンアップ法としては、濃硫酸を用いて共存物質を分解除去する方法や、アルカリ分解法などが主に用いられてきた。しかし、これらの方法ではデ

イルドリンやエンドリンなど一部の有機ハロゲン化合物は共存物質と共に分解されてしまう。そこで、非破壊的なクリーンアップ方法として GPC を採用した。GPC カラムに Bio-Beads S-X3 を、移動相にジクロロメタン/ヘキサン(1:1)を用いて脂質等夾雑物の除去および分析対象とした有機ハロゲン化合物 59 種類の各溶出フラクションを調べた。その結果、分析対象化学物質は保持容量として 90~160mL (保持時間 18~32 分) 中に溶出された。他方、脂質除去を検討するために豚肝臓抽出液を試料溶液としてその溶出挙動を調べたところ、大部分の脂質は 90mL (保持時間 18 分) 以前に溶出され、その除去率は十分に満足できる値であった(表 3)。

2-2 SPE による分画および誘導体化

シリカゲルを充填した SPE を用いて、GPC 溶出フラクションに残存する微量の共存物質の除去を行うと共に、PCB や塩素系農薬類および PBDEs などの低極性化合物画分と、PCB 代謝体 (OH 体, MeSO₂ 体) や TBBP-A, および PCP など極性の大きい化合物との分画を検討した。分画を行う理由は、PCB の OH 体や PCP などのフェノール性化合物は、GC/MS 測定に際してメチル化などの誘導体化操作が必要であることに加えて、これらの代謝体は親化合物である PCB に比べてその残留レベルが低いことが予想されたためである。シリカゲル SPE における上記の分析対象化合物の溶出挙動を検討したところ、PBDEs, PCBs, PCNs および大部分の有機塩素系農薬は 5%ジクロロメタン/ヘキサン 6ml 中に溶出された

(Fraction-A)。他方、PCB 代謝体 (OH 体, MeSO₂ 体), TBBP-A, PCP, δ -HCH, endosulfan II, endosulfan sulfate, endrin ketone は、10%メタノール/ジクロロメタン溶出 8ml 中に溶出され (Fraction-B), 且つ、SIM 測定で妨害となる共存物質も十分に除去された。

Fraction-B に分画された PCB 水酸化体や TBBP-A などのフェノール性化合物の測定には誘導体化が必要であったため、簡便なメチル化を採用し、反応試薬には従来から広く用いられているジアゾメタンを用いた。反応条件は、室温下 3 時間で十分であった。

3. 添加回収実験

生体試料として牛や豚の臓器 (脂肪, 心臓, 腎臓, 肝臓) を用いて、ASE 抽出, GPC クリーンアップおよび SPE 分画, 更にメチル化操作まで含めたすべての工程(図 5)を介した添加回収実験を行ったところ、分析対象とした 59 種類の環境汚染化学物質はほぼ良好に回収された(表 4)。

4. 前処理の自動化

本研究で ASE による脂質抽出に関しては、MTBE を用いた液液分配操作以外は自動化が行えた。また、GPC クリーンアップでは、オートサンプラーとフラクションコレクターをセットし、パーソナルコンピュータによって制御するシステムを適用することで、GPC による自動クリーンアップが可能となった。更に SPE 分画操作では、操作の自動化を考慮して SPE の自動処理システム (Rapid Trace) を用いた。各工程ともほぼ完

全な自動化が達成できたことから、本分析方法では夜間での自動処理によって前処理時間を実質的に短縮することができるだけでなく、精度管理への貢献も期待される。

E. 結論

生体への残留が危惧されているPCBや臭素系難燃剤および有機塩素系農薬などの59種類の環境汚染化学物質を分析するために、主に前処理方法に関する検討を行った。その結果、自動化システムを組み込むことが可能な高速溶媒抽出法(ASE)による生体試料からの至適脂質抽出条件として、ジクロロメタン/アセトン(1:1)が最も脂質抽出に適した溶媒系であることがわかった。得られた脂質のクリーンアップ法としては、ゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)として、GPCカラムにBio-Beads S-X3を、移動相にジクロロメタン/ヘキサン(1:1)を用いることで分析対象化学物質を損なうことなく、共存物質を除くことができた。更に、自動化された固相抽出カラム(SPE)処理装置を用いることで、低極性物質群と高極性物質群とに分画することができ、添加回収実験では59種類の環境汚染化学物質はほぼ良好に回収された。

本分析方法では、前処理操作に自動化システムを組み込むことが可能となった。これによって省力化と前処理時間の迅速化が図られるだけでなく、分析担当者の技量に起因する測定値のバラツキ問題を改善することができるなど、精度管理への貢献も期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(学会発表)

1. 齊藤貢一, Andreas Sjodin, Coutney Sandau, Mark Davis, Donald Patterson, Jr., 中澤裕之, 松木容彦: 第11回環境化学討論会, 2002年6月.
2. 齊藤貢一, Andreas Sjodin, Coutney Sandau, Mark Davis, Donald Patterson, Jr., 中澤裕之, 松木容彦: 第5回日本水環境学会シンポジウム, 2002年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

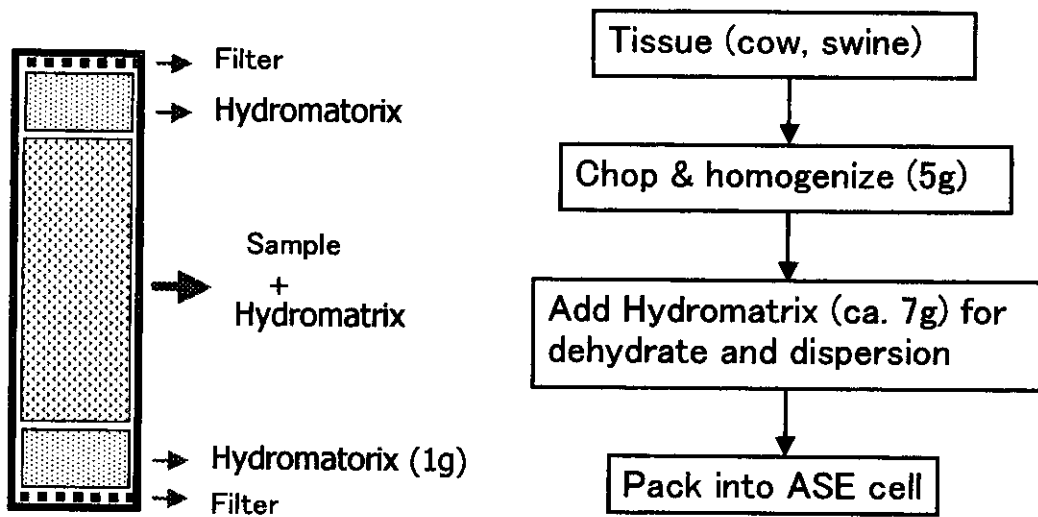


図1. ASEセルへの試料充填方法

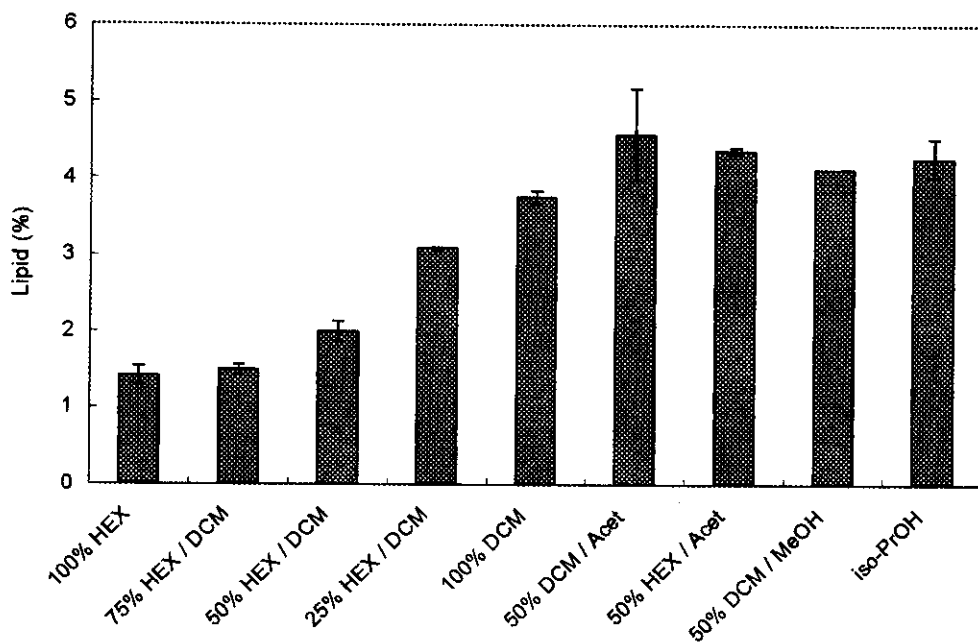


図2. ASEによる脂質抽出のための至適溶媒系の検討

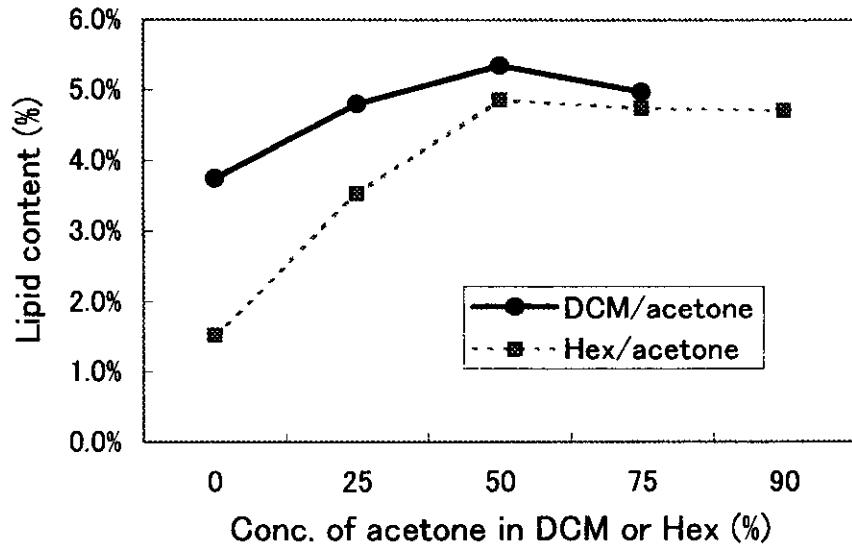


図3. DCM/アセトンおよびヘキサン/アセトンによる脂質抽出率の比較

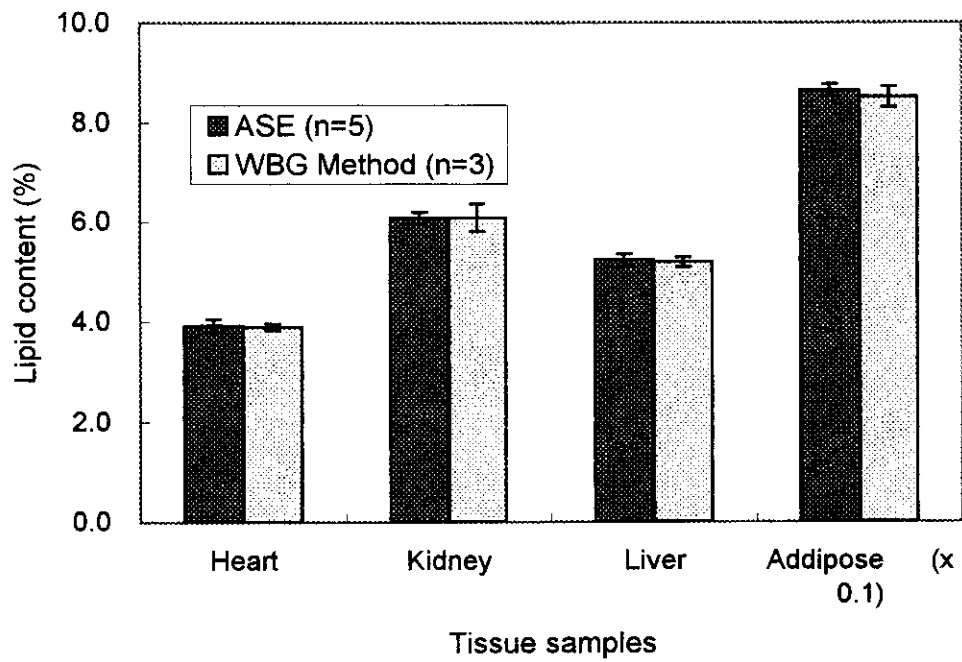


図4. 生体組織中の脂肪抽出におけるASE法とWBG法との比較

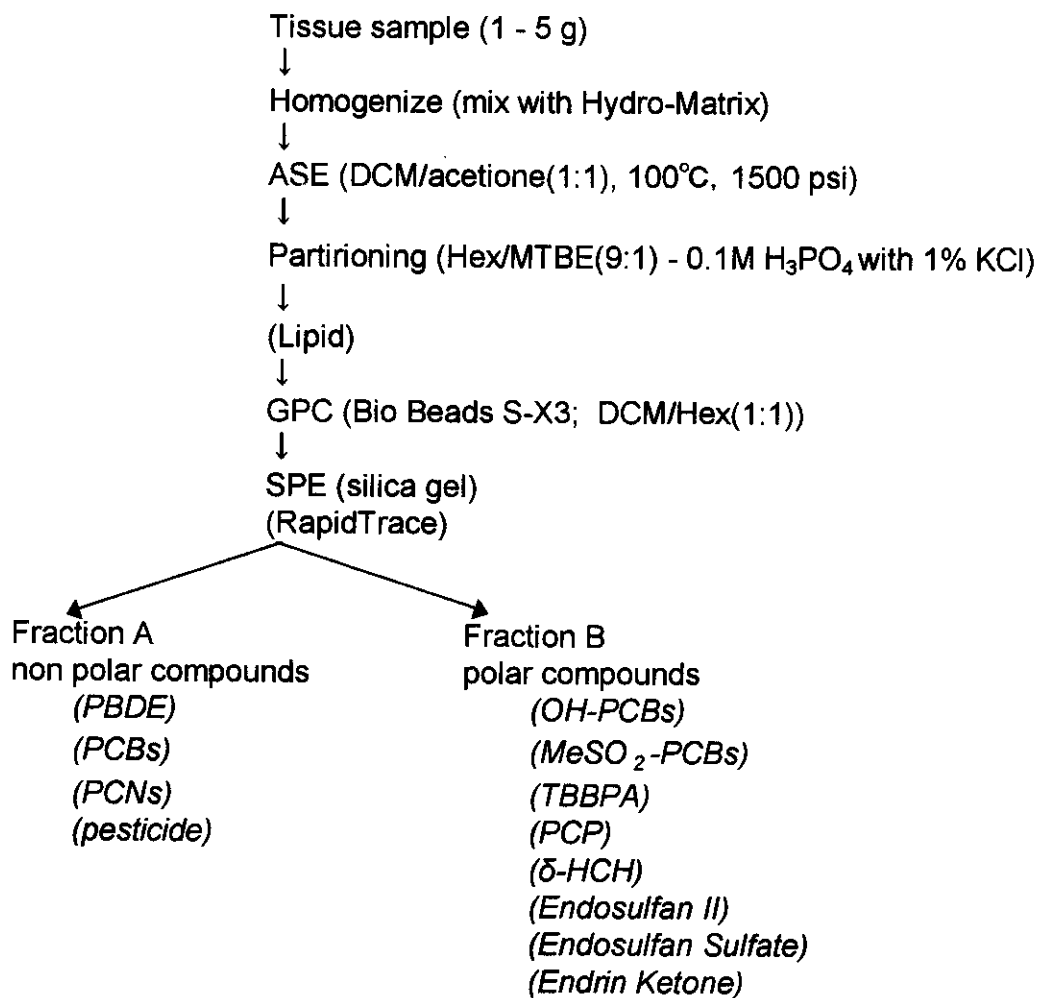


図5. 前処理操作フローチャート

表 1. ASE操作条件

セル容量	:	33 mL
抽出溶媒	:	ジクロロメタン / アセトン (1:1)
温度	:	100 °C
圧力	:	1500 psi
加熱時間	:	5 min
Static time	:	5 min
パージ時間	:	60 sec
フラッシュ容量	:	50%
抽出回数	:	2回 {2ハイアル x (static 2 cycle)}

表 2. GPC操作条件

GPC装置	:	AutoPrep 2000 (OI Analytical)
カラム	:	Bio-Beads S-X3 (35 g)
移動相	:	ジクロロメタン / ヘキサン (1:1)
流速	:	5 mL/min
カラム温度	:	室温
注入量	:	5 mL
分取時間	:	18 - 32 min (70 mL)

表3. GPCによる脂質除去

臓器 (n=5)	脂質重量(g) (GPC処理前)	脂質重量(g) (GPC処理後)	脂質除去率 (%)
脂肪組織	0.9022	0.0007	99.9%
心臓	0.1975	0.0011	99.4%
腎臓	0.3047	0.0017	99.4%
肝臓	0.2677	0.0014	99.5%

(各測定値は平均値)