

表4. 生体組織からの回収率

	Spiked Fraction	脂肪 (牛)		心臓 (豚)		腎臓 (豚)		肝臓 (豚)	
		5 ng/g		1ng/g		1ng/g		1ng/g	
		Mean (%)	(Std) (n=3)	Mean (%)	(Std) (n=3)	Mean (%)	(Std) (n=3)	Mean (%)	(Std) (n=3)
脂質含量 (%)		86.5	(1.4)	3.88	(0.16)	6.05	(0.14)	5.23	(0.06)
tri- to heptaBDE	A	86.3 - 115		80.1 - 113		68.2 - 95.3		70.1 - 92.4	
		(2.0 - 9.3)		(7.6 - 14)		(1.0 - 8.3)		(4.5 - 10)	
TBBP-A	B	41.2	(14)	21.6	(7.0)	78.6	(15)	34.8	(14)
penta- to decaCB	A	80.9 - 98.5		74.1 - 86.7		62.0 - 70.7		65.5 - 79.8	
		(1.0 - 14)		(9.1 - 21)		(4.3 - 6.1)		(7.8 - 17)	
OH-PCBs	B	58.3 - 65.6		47.4 - 57.3		57.5 - 68.8		36.2 - 43.7	
		(4.9 - 5.7)		(8.2 - 9.1)		(3.7 - 7.9)		(5.1 - 8.7)	
MeSO ₂ -PCBs	B	64.2 - 75.8		87.0 - 119		73.5 - 98.8		73.7 - 82.9	
		(6.7 - 7.5)		(11 - 16)		(14 - 16)		(16 - 20)	
PCN	A	96.1 - 118		87.3 - 102		75.3 - 87.7		76.9 - 94.9	
		(0.1 - 5.5)		(11 - 13)		(6.2 - 8.8)		(9.5 - 12)	
有機塩素系農薬									
Pentachlorobenzene	A	40.9	(0.8)	50.8	(12)	48.8	(9.5)	24.3	(5.2)
Hexachlorobenzene	A	79.2	(3.0)	64.5	(16)	56.3	(14)	46.4	(8.3)
α-HCH	A	68.0	(2.2)	66.5	(13)	54.7	(9.4)	50.7	(9.9)
β-HCH	A	80.1	(4.9)	75.9	(14)	68.5	(3.3)	66.8	(17)
γ-HCH	A	88.7	(16)	88.4	(16)	72.6	(11)	63.4	(14)
δ-HCH	B	73.8	(8.0)	71.4	(18)	59.4	(5.6)	60.9	(8.4)
Heprachlor	A	79.4	(16.1)	74.2	(15)	60.2	(9.6)	46.4	(11)
Heprachlor epoxide	A	80.7	(6.2)	66.4	(9.6)	53.6	(4.8)	53.8	(8.9)
α-Chlordane	A	82.8	(2.6)	77.5	(10)	64.9	(6.3)	65.7	(10)
γ-Chlordane	A	81.7	(2.8)	81.3	(11)	68.6	(6.4)	65.4	(9.6)
4,4'-DDE	A	85.5	(2.1)	68.1	(9.5)	58.5	(4.9)	63.0	(10)
Aldrin	A	111	(20)	110	(20)	90.0	(11)	84.3	(13)
Dieldrin	A	64.6	(5.9)	43.7	(4.8)	37.9	(2.6)	36.3	(5.1)
Endrin	A	52.5	(2.6)	45.4	(5.9)	37.6	(3.5)	37.6	(6.3)
Endrin aldehyde	A	47.9	(2.3)	45.2	(6.1)	39.1	(3.3)	37.1	(5.5)
Endrin ketone	B	72.7	(6.4)	122	(38)	77.3	(n=1)	88.5	(14)
Endosulfan I	A	82.7	(3.6)	78.0	(10)	65.0	(7.1)	65.0	(10)
Endosulfan II	B	79.5	(2.9)	88.5	(14)	73.3	(6.6)	79.2	(8.4)
Endosulfan sulfate	B	70.1	(6.6)	83.3	(13)	67.8	(5.5)	65.8	(11)
Octachlorostyrene	A	94.5	(7.0)	90.4	(14)	75.3	(9.2)	76.5	(11)
Pentachlorophenol	B	94.0	(11)	92.6	(23)	82.2	(12)	106.2	(11)

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

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適用性
ならびに生体曝露に関する研究／および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

分担研究者 織田 肇

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

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

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	織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所 副所長
研究協力者	森田昌敏	独立行政法人 国立環境研究所
	飯田隆雄	福岡県保健環境研究所
	太田壮一	摂南大学薬学部
	高菅卓三	（株）島津テクノロジー
	中村宗知	（財）日本食品分析センター
	藤峰慶徳	大塚製薬株式会社
	宮崎 徹	（株）ニッテクリサーチ
	堀伸二郎, 渡辺 功, 熊谷信二	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアルについて検討を行い、マニュアルの修正を行った。主な点は以下のようである。①目標定量下限値は、ダイオキシンおよびジベンゾフランは現行のままで良いが、ノンオルソ PCB は 10 pg/g fat に、モノオルソ PCB は 50 pg/g fat に変更する。②カラムクロマトグラフィーは一般的な組み合わせを示すが、その他でも精度が保証できれば良い。③質量分析計の感度は、20～50fg の 2,3,7,8-TCDD で SN 比が 5 以上であることが望ましい。

血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアルについて検討を行い、マニュアルの修正を行った。主な点は以下のようである。①脂質抽出法については、全血の場合は、暫定マニュアルのままとするが、血清および血漿の場合は、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質量分析計の感度は、母乳の場合と同様とする。④試料の少量化については、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が、試料量を減らしすぎると、脂質量の測定で変動係数が大きくなるため、今後の検討が必要である。

臭素化ダイオキシン類の測定法については、母乳中の臭素化ダイオキシンの分析法（案）を基本に、最新の技術的知見を取り入れ、より信頼性の高い高感度の分析法マニュアル（案）の策定を行った。すなわち、①臭素化ダイオキシン類の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の検討、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、③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、④GC-MS 分析における高感度検出方法等を分析法マニュアル（案）に取り入れた。同時に、標準物質の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純物質の選択、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も明らかにした。

A. 研究目的

来年度は母乳および血液中塩素化ダイオキシン類濃度に関する精度管理を実施する予定であるが、そのために「母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」および「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」の適切性を検討した。また、母乳中臭素化ダイオキシン測定マニュアル（案）の作成をめざし検討を行った。

B. 研究方法

上記マニュアルを実試料に適用して問題点を抽出するとともに、ダイオキシン類測定を行っている他機関の研究者の意見を聴取して、マニュアルの修正点を明らかにした。

C. 研究結果

C-1. 母乳中ダイオキシン類測定マニュアルについて

1) 目標定量下限値

ダイオキシンとジベンゾフランについては、現行マニュアルの通りでよい。Co-PCBについては、現行マニュアルでは 10 pg/g fat となっているが、ブランクの問題（特にモノオルソ（#118）から少し高い目に設定する方がよい。したがって、TCDD, PeCDD, TCDF, および PeCDF は 1 pg/g fat, HxCDD, HpCDD, HxCDF および HpCDF は 2 pg/g fat, OCDD および OCDF は 5 pg/g fat とする。また、ノンオルソ PCB は 10 pg/g fat, モノオルソ PCB は 50 pg/g fat とする。

2) クリーンアップ

クリーンアップには、硫酸処理、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、硝酸銀カラムクロマトグラフィー、多層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、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどがあり、これらの中から選択して、組み合わせて行う。マニュアルでは、一般的な組み合わせを記載するが、他の組み合わせでも測定できるのであれば問題ない。マニュアルに定められた精度が保証できれば、どのようなクリーンアップ法でも良い。

3) PCB の分取について

PCBはカラムクロマトグラフィーにより、ノンオルソ PCB（+ダイオキシンおよびジベンゾフラン）フラクションとモノオルソ PCB フラクションに分かれるが、最終的にGC-MSで測定する場合、2つのフラクションを合わせて測定しても、あるいは別々に測定しても感度はほぼ同等である。ただし、ノンオルソ PCB とモノオルソ PCB の濃度は大きな差があるため、濃度が低いノンオルソ PCB のピークが埋もれてしまい、間違ったピークをとる可能性がある。したがって、マニュアルでは、別々の測定を基本とする。

4) 質量分析計

現行マニュアルでは、質量分析計の感度は、10fg の 2,3,7,8-TCDD で SN 比が 5 以上であることが望ましいと規定されている。

可能なケースもあるが、困難なケースもあり、20~50fg の 2,3,7,8-TCDD で SN 比が 5 以上であることが望ましいとすることが適切である。

C-2. 血中ダイオキシン類測定マニュアルについて

1) 目標定量下限値

目標定量下限値については、母乳の場合と同じである。すなわち、ダイオキシンとジベンゾフランについては、現行マニュアルの通りでよい。Co-PCB については、現行マニュアルでは 10 pg/g fat となっているが、ブランクの問題（特にモノオルソ（#118））から少し高い目に設定する方がよい。したがって、TCDD, PeCDD, TCDF, および PeCDF は 1 pg/g fat, HxCDD, HpCDD, HxCDF および HpCDF は 2 pg/g fat, OCDD および OCDF は 5 pg/g fat とする。また、ノンオルソ PCB は 10 pg/g fat, モノオルソ PCB は 50 pg/g fat とする。

2) 濃度表示について

血中ダイオキシン類濃度は、血液 1 g 中のダイオキシン類量で表す場合と、脂質 1 g 中のダイオキシン類量で表す場合がある。同一の血液でも脂質量は抽出法によって異なるため、脂質 1 g 当たりのダイオキシン類量で表すと、抽出法の違いによる影響を受ける。この点からは、脂質抽出法の影響を受けないように、血液 1 g 当たりのダイオキシン類量で示した方がよい。一方、血液 1 g 当たりで表すと、高脂血症の場合、脂質が多いので見かけ上ダイオキシン類濃度が高くなる。この点からは、脂質量で標準化できるように、脂質 1 g 当たりのダイオキシン類量で表した方がよい。また、体

内負荷量を考える場合には、脂質 1 g 当たりで表した方がよい。このように、それぞれ長所と短所があるが、マニュアルでは現行通り、脂質 1 g 当たりのダイオキシン類量で表すこととする。

3) 全血、血清および血漿について

現行マニュアルでは、全血の測定が基本となっているが、その他に血清および血漿の測定もある。前処理は、全血よりも血清あるいは血漿の方が容易であり、この点では血清あるいは血漿の測定を基本とした方がよいとする考え方もある。しかし、採血時に溶血した場合、血清で測るためには、再度採血する必要が生じる。また、血球にもダイオキシン類が含まれているので、全血を使用して測定する方が効率がよい。さらには、暫定マニュアル制定後、全血で測定したデータが多数あることを考慮すれば、全血を基本にし、血清および血漿もマニュアルに含めることが適切である。

4) 脂質抽出について（別添1参照）

現行マニュアルでは、脂質抽出法として Patterson 法を記載している。しかし、Patterson 法でも、硫安、エタノール、ヘキサンなどの抽出試薬の量により抽出される脂質量が異なる。したがって、もっとも抽出率の高い試薬量を選択するべきと考えられる。ところが、抽出率が高いとしても、実際に抽出されたものが本当に脂質かどうかという点は検討されていない。しかも、抽出した時に、脂質が変成しているため、抽出したものが本当に脂質かどうかを確かめることが現時点ではできない。以上の点を考慮し、脂質抽出法に関しては統一した方法を決めることとする。

結論的には、全血については、現行マニ

マニュアルを変更しない。その理由としては、①現行マニュアルに示された抽出試薬量の割合（別添1の表1の方法2）であれば、その前後で多少試薬の割合が変動しても、抽出率の違いはそれほど大きくないこと（別添1の図1）、②既に、この方法によるデータが多数あり、今後のデータとの比較を考えると変更は望ましくないことがあげられる。

血清および血漿については、現行マニュアルでは「血清、血漿も同様に行うことができる」と記載されているだけであり、表現があいまいで、試料量が明確でない。この点を明確にするため、試料量を全血の半分とするよう明記する。その理由としては、①全血と同量の血清を用いて現行マニュアルに従って抽出を行った場合、抽出試薬量の多少の変動により抽出率が大きく変動すること（別添1の図2）、②全血の半分の血清を用いて抽出を行った場合、抽出試薬量の多少の変動による抽出率の変動は小さいこと（別添1の図2）、③全血の中の液体部分は約50%であり、液液抽出という観点で考えれば、抽出試薬の量を同じとすれば、血清の量を全血の量の半分にすれば、両者は同等になることがあげられる。

抽出の回数については、現行マニュアルでは3回目と定めている。しかし、3回目に抽出される量は全体の5%以下である（別添1の表4）。したがって、脂質抽出の3回目は省略可能であり、この点をマニュアルに記載する。

5) クリーンアップについて

クリーンアップについては、母乳の場合と同様である。すなわち、硫酸処理、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、硝酸銀

カラムクロマトグラフィー、多層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、活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどがあり、これらの中から選択して、組み合わせて行う。マニュアルでは、一般的な組み合わせを記載するが、他の組み合わせでも測定できるのであれば問題ない。マニュアルに定められた精度が保証できれば、どのようなクリーンアップ法でも良い。

6) PCB 分取について

PCB 分取については、母乳の場合と同様である。すなわち、PCB はカラムクロマトグラフィーにより、ノンオルソ PCB（+ダイオキシンおよびジベンゾフラン）フラクションとモノオルソ PCB フラクションに分かれるが、最終的に GC-MS で測定する場合、2つのフラクションを合わせて測定しても、あるいは別々に測定しても感度はほぼ同等である。ただし、ノンオルソ PCB とモノオルソ PCB の濃度は大きな差があるため、濃度が低いノンオルソ PCB のピークが埋もれてしまい、間違ったピークをとる可能性がある。したがって、マニュアルでは、別々の測定を基本とする。

7) 質量分析計について

現行マニュアルでは、質量分析計の感度は、10fg の 2,3,7,8-TCDD で SN 比が5以上であることが望ましいと規定されている。可能なケースもあるが、困難なケースもあり、20~50fg の 2,3,7,8-TCDD で SN 比が5以上であることが望ましいとすることが適切である。

8) 試料の少量化について(別添2参照)

現在、使用している試料量は5~100mlであり、既に5mlのように少量で測定可能

な機関もある（別添2参照）。例えば、内径 0.15mm, 膜圧 0.15 μ m 程度のカラムや大量注入装置を使用すると S/N 比が向上すると
の報告もある。ただし、試料量を減らしすぎると、脂質量の測定で変動係数が大きくなるため、限界もある。したがって、現時点では、少量化についてはマニュアルには含めず、参考として示す。

C-3. 母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアルについて

1) 調査対象物

本マニュアルでは臭素化ダイオキシン類の生体暴露評価に必要とされる 2,3,7,8-位臭素置換異性体を調査対象とする事とした。ただし、現在標準品が入手不可能な物質については、暫定的に調査対象物質より除外し、標準品が入手可能になり次第調査対象物とする。現在標準品が入手可能な物質は、PBDDs 6 種 : 2,3,7,8-TeBDD , 1,2,3,7,8-PeBDD , 1,2,3,4,7,8-HxBDD , 1,2,3,6,7,8-HxBDD , 1,2,3,7,8,9-HxBDD , OBDD および PBDFs 5 種 : 2,3,7,8-TeBDF , 1,2,3,7,8-PeBDF , 2,3,4,7,8-PeBDF , 1,2,3,4,7,8-HxBDF , 1,2,3,4,6,7,8-HpBDF である。

なお、臭素および塩素が同時に置換している臭素・塩素化ダイオキシン類およびポリ臭化ビフェニル (PBBs) のコプラナー PBBs は、標準品および情報量も少なく、また測定項目が増えることにより試料量も増やさざるを得ないなどの理由から本マニュアルでの調査対象物とはしないこととした。

2) 内標準物質

臭素化ダイオキシンの内標準物質につい

ては、原則として、塩素化ダイオキシン類と同様、測定対象物と同じ構造を有する標準物質をクリーンアップスパイクとして使用する事とした。しかし、臭素化ダイオキシン類の内標準物質は、入手不可能な物質が多く、入手可能になるまで暫定的に他の内標準物質を使用する。現在入手可能な内標準物質は、¹³C₁₂-2,3,7,8-TeBDD ,
¹³C₁₂-1,2,3,7,8-PeBDD ,
¹³C₁₂-1,2,3,4,7,8-HxBDD ,
¹³C₁₂-1,2,3,6,7,8-HxBDD ,
¹³C₁₂-1,2,3,7,8,9-HxBDD ,
¹³C₁₂-2,3,7,8-TeBDF ,
¹³C₁₂-1,2,3,7,8-PeBDF ,
¹³C₁₂-2,3,4,7,8-PeBDF ,
¹³C₁₂-1,2,3,4,7,8-HxBDF である。

また、シリンジスパイクに使用する内標準物質も 2,3,7,8-位置換体以外の臭素化ダイオキシンが望ましいが現在は入手不可能である。したがって、入手可能となるまで他の内標準物質（例：¹³C₁₂-PBDE）を使用する。使用する適切な内標準物質については、溶出時間や測定質量数の関係もあり今後検討する。

3) 目標定量下限値

先に示された案では tetra-:1pg/g-fat, penta-:2pg/g-fat, hexa-:20pg/g-fat, hepta-200pg/g-fat, octa-:500pg/g-fat となっている。tetra-:1pg/g-fat は塩素化ダイオキシンと同じ定量下限値であり、臭素化ダイオキシンが塩素化ダイオキシンより GC-MS に対する感度が低いことを考慮すると困難である。しかし、定量下限値を高くした場合、分析しても測定値がすべて nd となる可能性や、塩素化ダイオキシン類の毒性等量との比較を考慮すると臭素化ダイ

オキシンの目標定量下限値は tetra:1pg/g-fat は必要である。

4) 分析試料量

母乳分析試料量は塩素化ダイオキシン類測定では 50g となっているが、試料量を増加しても定量下限値上昇が必ずしも比例するわけではなく、また、前処理が非常に煩雑になり対応が困難である。このため、臭素化ダイオキシン類測定でも、母乳試料量は 50~100g とする事とした。

5) 前処理

前処理は塩素化ダイオキシン類測定マニュアルに準じるが、臭素化ダイオキシン類、特に 7~8 臭素化体が前処理中に分解しないことの確認が必要である。また、臭素化ダイオキシン測定に妨害となる臭素化ジフェニルエーテルの分離除去、操作途中での光分解防止や熱分解についてはさらに検討を行い注意点をマニュアルに取り入れるようにすることとした。

6) GC-MS 測定

GC-MS 測定において、臭素化ダイオキシンは塩素化ダイオキシンより検出感度がよくないが、本マニュアルでは、塩素化ダイオキシン類測定に準じた試料量や目標定量下限値を暫定的に設定した。従って、臭素化ダイオキシン類の目標定量下限値を達成するためには GC-MS 分析における高感度検出法の開発が不可欠となる。また、GC-MS 分析において GC 導入部や分離カラム内での熱分解の可能性もありこの点も今後の検討課題である。なお、分解能は塩素化ダイオキシン測定と同じ 10,000 とした。

D. 考察

今年度の研究により、「母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」および「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」の修正がほぼ完了したので、来年度は精度管理（コラボレーション）を実施し、マニュアルの評価を行うことができるようになった。また、「母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアル」についても、現時点で加筆修正が可能な部分については実施した。ただし、まだ検討の必要な部分があるため、来年度、引き続き課題点の解決を計りながら、より信頼性の高い分析法マニュアル（案）を完成させる。

E. 結論

「母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」（別添 3 参照）および「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」（別添 4 参照）の修正がほぼ完了した。また、「母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアル」についても加筆修正を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shinjiro Hori, Kazuo Akutsu, Hajime Oda, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, Tsunehisa Makino, Development of an analysis method for polybrominated diphenyl ethers and its application to their detection as pollutions in human mother's milk, Organohalogen Compounds 58, 245-248(2002)

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

別添1. 血中ダイオキシン類濃度測定暫定マニュアルの脂質抽出法に関する検討

A. 目的

2001年に血液中のダイオキシン類の濃度を定量測定するために、血中ダイオキシン類濃度測定暫定マニュアルが制定され公表された。その後、いくつかの測定機関において血液試料の分析が行われてきたが、この暫定マニュアルの実試料への適用においていくつかの問題点が指摘されている。そのひとつが脂質抽出法である。血中ダイオキシン類濃度は脂質 1g 当たりのダイオキシン類量として表示されるため、脂質量の測定が重要である。暫定マニュアルでは、いわゆる Patterson 法が採用されているが、抽出溶媒の量に 2 つの方法が記載されており、同じ血液試料を分析しても異なった測定値が得られる可能性がある。そこで脂質抽出法の検討を行った。

B. 方法

B-1. 抽出溶媒の量が脂質抽出量に与える影響の検討

暫定マニュアルに記載されている脂質抽出法は次の 2 通りである。

- ① 血液試料 (約 50g) に飽和硫酸アンモニウム 20ml、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、水槽に 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。
- ② 血液試料 (約 20g) に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、水槽に 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。

方法①は、この方法で抽出した脂質を使って、さらにダイオキシン類を測定するものである。方法②は、この方法で抽出した脂質は脂質量の測定のみで使用し、ダイオキシン類の測定は別の試料を使って行うものである。これら 2 つの方法では、血液量を同一とした場合、抽出溶媒の量が異なる。そこで、抽出溶媒量の違いが脂質抽出量に与える影響を検討した。

血液試料は男性 3 名 (27 歳、49 歳、59 歳) から同意を得た後、採取した。各人ごとに、ヘパリン入り真空採血管(テルモ製)により 50ml、プレニイ真空採血管(テルモ製)により 100ml を採取した。プレニイ真空採血管(テルモ製)により採取した血液は遠心分離後、血清を採取した。

得られた全血および血清を用い、表 1 および表 2 に示す 5 つの方法により脂質抽出を行った。抽出後、ロータリーエバポレータにより濃縮し、重量を測定した試験管に移してさらにヘキサンを蒸発させ乾固後、重量測定して脂質量を算出した。なお、ヘキサンによる抽出は 3 回であるが、3 回目の抽出の効果を検討するため、2 名の試料については 3 回目の抽出液は別に濃縮乾固し重量測定を行った。

B-2. 抽出溶媒の量がダイオキシン類の抽出量に与える影響の検討

血液中ではダイオキシン類は脂質とともに

に動いていると考えられており、抽出溶媒量の違いは脂質のみならずダイオキシン類の抽出量にも影響する可能性がある。そこで、プール血清 30ml を用い、表 3 に示す 2 つの方法により脂質抽出を行い、引き続きダイオキシン類の分析を行った。これらの脂質抽出法は表 2 の方法 2 および 4 にほぼ相当する。

表1. 全血からの脂質抽出率の検討 (ml)

	血清	硫安	エタノール	ヘキサン
1	10	2	2	6*2
2	10	3	3	10*2
3	10	5	5	15*2
4	10	7	7	20*2
5	10	10	10	30*2

表2. 血清からの脂質抽出率の検討 (ml)

	全血	硫安	エタノール	ヘキサン
1	10	2	2	6*2
2	10	3	3	10*2
3	10	5	5	15*2
4	10	7	7	20*2
5	10	10	10	30*2

表3. 血清からのダイオキシン類抽出率の検討 (ml)

方法	全血	硫安	エタノール	ヘキサン
A. 表2の方法4	30	20	20	60, 60
B. マニュアルの方法	30	12	6	18, 24

C. 結果

C-1. 脂質抽出量

図 1 に 5 つの方法による全血からの脂質抽出量を示す。方法 3 がもっとも多く、次いで方法 2, 4, 5, 1 の順であるが、方法 2, 4 および 5 については、方法 3 の抽出量との差は 20% 未満であり、大きな差は見られなかった。したがって、これらの方法であれば、脂質ベースで表示したダイオキシン類濃度に大きな影響はでない。しかし、方法 1 については、方法 3 の抽出量との差が 20% を超えるケースがあり、ダイオキシン類濃度の表示に大きな影響を与える。

図 2 に 5 つの方法による血清からの脂質抽出量を示す。方法 4 がもっとも多く、次いで方法 3, 5, 2, 1 の順であるが、方法 3 および 5 については、方法 4 の抽出量との差は 20% 未満であり、大きな差は見られなかった。したがって、これらの方法であれば、脂質ベースで表示したダイオキシン類濃度に大きな影響はでない。しかし、方法 1 および 2 については、方法 4 の抽出量との差が 20% を超えるケースがあり、ダイオキシン類濃度に大きな影響を与える。

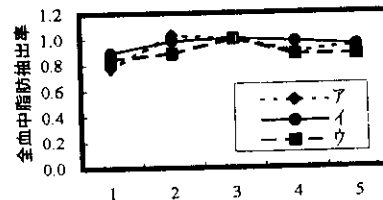


図1. 全血中からの脂肪抽出率

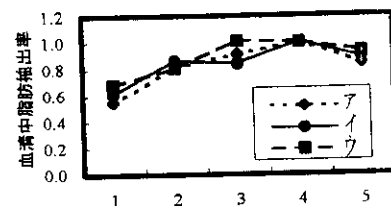


図2. 血清からの脂肪抽出率

表4に全血からの3回目抽出量の全抽出量に占める割合を示す。方法1は3回目の抽出量が10%以上のケースがあるが、方法2~5では5%以下であり、これらの方法であれば2回抽出で十分と考えられた。

表4に、血清からの3回目抽出量の全抽出量に占める割合を示す。方法1は3回目の抽出量が10%以上のケースがあるが、方法2~5では5%以下であり、これらの方法であれば2回抽出で十分と考えられた。

表4. 3回目の抽出率
(3回の計に対する割合)

方法	全血		血清	
	イ	ウ	イ	ウ
1	0.07	0.13	0.08	0.12
2	0.01	0.03	0.05	0.05
3	0.03	0.03	0.05	0.04
4	0.04	0.01	0.01	0.00
5	0.01	0.04	0.02	0.02

C-2. ダイオキシン類の抽出量

表5に2つの抽出法を用いて測定した血清30ml中の脂質量およびダイオキシン類量を示す。方法Bによる脂質抽出量は方法Aの場合の60%であるが、ダイオキシン類量はいずれの方法でもほぼ同じであった。表6に脂質ベースの血清中ダイオキシン類の毒性等量を示す。方法Bによる測定値は方法Aに比較し約1.6倍になっている。したがって、血清中ダイオキシン類濃度を脂質ベースで行う場合、脂質抽出法の統一が重要である。

表5. 測定結果

	A	B
脂質量(mg)	200	126
ダイオキシン総量(pg)	pg	pg
2,3,7,8-TCDD	0.42	0.38
1,2,3,7,8-PeCDD	1.16	1.21
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.82	0.84
1,2,3,6,7,8-HxCDD	5.25	5.55
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1.07	1.15
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	4.71	4.75
OCDD	66.3	64.3
2,3,7,8-TCDF	0.36	0.28
1,2,3,7,8-PeCDF	0.39	0.32
2,3,4,7,8-PeCDF	3.54	3.59
1,2,3,4,7,8-HxCDF	1.29	1.22
1,2,3,6,7,8-HxCDF	1.39	1.57
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.75	0.91
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.21	1.79
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND
OCDF	ND	ND
3,4,4,5-TeCB	1.01	1.03
3,3,4,4-TeCB	3.92	4.06
2',3,4,4',5-PeCB 123	274	244
2,3',4,4',5-PeCB 118	4357	4231
2,3,4,4',5-PeCB 114	221	221
2,3,3',4,4'-PeCB 105	985	959
3,3',4,4',5-PeCB 126	23.6	23.3
2,3',4,4',5,5'-HxCB 167	646	582
2,3,3',4,4',5-HxCB 156	1391	1363
2,3,3',4,4',5'-HxCB 157	369	361
3,3',4,4',5,5'-HxCB 169	12.6	12.3
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB 189	153	155

表6. 脂質1g当たりの毒性等量(pg/g脂質)

	A	B
TEQ-PCDD	11.8	19.1
TEQ-PCDF	11.0	17.7
TEQ-PCB	20.3	31.7

D. 考察

血液からの脂質抽出を考える場合、血中ダイオキシン類濃度の表示においてベースとして使用する脂質の定義が重要となる。この定義は血液中のダイオキシン類の挙動と密接に関連しているが、現時点では、十分には解明されていないため、正確には定めることはできない。また、脂質の定義ができたとしても、抽出された物質が本当にその定義に当てはまる脂質なのかを測定することは困難である。例えば、脂質が抽出されても抽出溶媒のために変性しているという指摘もあるためである。したがって、現時点で可能なことは、脂質が抽出できるとされている方法の中で、抽出溶媒の量などの違いが抽出量に影響する程度が少ないものを採用するしかないと考えられる。そこで、暫定マニュアルに採用された Patterson 法において、抽出溶媒の量の違いが脂質抽出量に及ぼす影響を検討した。

全血からの脂質抽出では、方法 2~5 で抽出量に大きな差は見られなかった。したがって、これらの方法であれば、いずれの方法を使用しても脂質ベースのダイオキシン類濃度に大きな影響はないと考えられた。暫定マニュアルで示されている 2 つの脂質抽出法は方法 2 および 3 とほぼ同一のものであり、いずれの方法も採用できる。暫定マニュアルの公表後、この方法に従って、多数のサンプルの全血中ダイオキシン類の測定が行われており、これらのデータを今後に生かすためには、マニュアルを変更すべきではないと考えられる。ただし、暫定マニュアルには 2 つの方法が記載されているので、どちらか一方に定めた方が混乱がなくてよいであろう。

血清からの脂質抽出では、方法 3~5 で大きな差は見られなかった。したがって、これらの方法であれば、いずれの方法を使用しても脂質ベースのダイオキシン類濃度に大きな影響はないと考えられた。暫定マニュアルで示されている脂質抽出法は方法 2 とほぼ同一のものであるが、この方法では方法 4 の 70%しか抽出できない。また、抽出溶媒量の変化の影響も受けやすい。したがって暫定マニュアルを変更すべきである。方法 3、4、5 のいずれでも良いが、中央に位置する方法 4 が抽出溶媒量の変化の影響をもっとも受けにくく、この方法の採用が適切である。この方法であれば、全血の場合と比較し、試料の量を半分にすれば抽出溶媒量は同一でよいこととなる。全血中の約 50%が血清であることから考えれば、血清の試料量を半分にすることにより、全血の液体部分の量とほぼ同一となり、液液抽出としては抽出溶媒の量との比が全血と血清でほぼ同一となる。したがって、方法 4 を採用することは適切と考えられる。暫定マニュアル公表後は、ほとんどの測定機関で全血の測定が行われており、血清からの抽出法の変更は大きな影響を与えないと考えられる。大阪府立公衆衛生研究所では、これまで約 200 件の血清の測定を行っているが、脂質抽出法として方法 4 を使用しており、マニュアルで方法 4 を採用すれば、今後もこれらのデータが生きることになる。

抽出回数に関する検討では、方法 2~5 の場合、3 回目の脂質抽出量が 5%以下であることが明らかとなった。暫定マニュアルでは 3 回抽出と定めているが、前処理法をなるべく簡単にするためにも、マニュアルの

変更が望ましい。

脂質抽出における抽出溶媒量の違いがダイオキシン類の抽出に影響するかを検討したが、2つの方法による大きな差は見られなかった。このことは、脂質ベースで表す場合、血清中ダイオキシン類濃度は脂質抽出量により大きな影響を受けることを示しており、したがって、脂質抽出法の選定が重要となる。

E. 結論

暫定マニュアルの改定に関して、以下の点が明らかとなった。

- ① 全血からの脂質抽出法としては暫定マニュアルを改定する必要はない。
- ② 血清からの脂質抽出法としては暫定マニュアルを改定する必要があり、試料量を全血の場合の半分とし、抽出溶剤の量はそのままとする。
- ③ 脂質の抽出回数は2回で十分であり、暫定マニュアルを改定することが望ましく、「3回の抽出」を「2回以上の抽出」に変更する。

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. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添2. ヒト血清中のダイオキシン類測定に関する少量化に関する検討

独立行政法人 国立環境研究所
森田昌敏, 北村公義

A. 目的

ヒト血清中のダイオキシン類測定には微極性液相の GC キャピラリーカラムを用い、分解能を 10000 に設定した高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能二重収束型質量分析計(HRGC-HRMS)を用いた超微量測定法が用いられている。この方法で得られる感度は一般的に 10fg で S/N=5~10 程度である。この絶対感度は機器の性能に依存し、大幅に向上させることは困難である。血液中の脂質量は 0.2~0.8%程度であるので、定量下限値として 2,3,7,8-TeCDD で 1pg/g lipid を得るためには最終濃縮液を 20 μ L、スプリットレス (SL) による注入量を 2 μ L とすれば、試料量として全血約 50g (血清 25g) が必要となる。実際の試料採取 (採血) において、二重測定を含め約 100g の採血が行われているのが現状である。血液を試料とする調査において、採血量を減らすことができれば被験者の負担が軽減され、また事前採血が不必要になるなど利点は大きい。

そこで、1 回に使用する分析試料量を全血 10g (血清 5g) として測定可能にするために、5g の血清試料をアットカラム濃縮大量導入 (ALV) を用いて、最終濃縮液を 110 μ L、注入量を 100 μ L とする測定方法の確立を試みた。なお、対照としては 25g の血清試料を従来法で測定した。

B. 方法

B-1. 試料

国立環境研究所の標準血清を用いた。

B-2. 抽出

1) 血清 5g

試料を解凍後、約 5g を量り取り、0.1pg/ μ L の ^{13}C 同位体スパイクを 22 μ L 添加し、攪拌した。これに飽和硫酸アンモニウム 3ml 及び 25%エタノール/n-ヘキサンを 12ml 添加し、30 分間振とう抽出を行った。ヘキサン層を分取後、下層に n-ヘキサン 10ml を添加して 30 分間振とう抽出を 2 回行った。その後、これらの n-ヘキサン分画を混合し、精製水 10ml で 1 回洗浄した。次いで無水硫酸ナトリウムを積層したカラムで脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を 2mL 程度まで留去した。次に秤量瓶に移し、デシケーターで乾燥後、重量を測定し、前後の重量差から試料中の脂質量を算出した。

2) 血清 25g

試料を解凍後、約 25g を量り取り、0.1pg/ μ L の ^{13}C 同位体スパイクを 200 μ L 添加し、攪拌した。次いで飽和硫酸アンモニウム 15ml 及び 25%エタノール/n-ヘキサンを 60ml 添加し、30 分間振とう抽出を行った。ヘキサン層を分取後、下層に n-ヘキサン 50ml を添加して 30 分間振とう抽出を 2 回行った。その後、これらの n-ヘキサン分画を混合し、精製水 50ml で 1 回洗浄した。

これは無水硫酸ナトリウムを積層したカラムで脱水後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を2mL程度まで留去した。次に秤量瓶に移し、デシケーターで乾燥後、重量を測定し、前後の重量差から試料中の脂質量を算出した。

B-3. カラムクロマトグラフィー

1) 血清 5g

① 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径約10mm、長さ約300mmのガラス製カラムクロマト管にシリカゲル0.5g、2%水酸化カリウムシリカゲル1.0g、シリカゲル0.5g、44%硫酸シリカゲル2.0g、22%硫酸シリカゲル2.0g、シリカゲル0.5g、10%硝酸銀-シリカゲル1.0g、シリカゲル0.5g、無水硫酸ナトリウム6.0gを順次ヘキサンで充填した。ヘキサン60mLを流速2.5mL/minで流し、充填物を洗浄後、秤量後の脂質をヘキサン数mlで溶解し、秤量瓶内を洗いこみながら移した。次に、ヘキサン60mlを流速2.5mL/minで溶出させ、得られた溶出液をロータリーエバポレーターにて約2mL程度まで濃縮し、活性炭カラムクロマトグラフィーに供した。

② 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径約6mm、長さ約100mmのガラス製カラムクロマト管に、無水硫酸ナトリウム0.6g、活性炭シリカゲル0.2g、無水硫酸ナトリウム0.6gを乾式充填した。試料溶液を移し入れ、ジクロロメタン/ヘキサン(1:3)溶液10mLを流速2.5mL/minで溶出後、トルエン50mLを同じ流速で先細の梨型フラスコへ溶出させた。トルエン画分をロータリーエバポレーターにて約1mL程度まで濃縮後、梨型フラスコ内へ緩やかに窒素を吹

き付けて濃縮し、2.2pgのトルエン溶液のシリンジスパイクを添加後110 μ Lのトルエン溶液になるように定容してALVによるGC-MS分析用試料とした。

2) 血清 25g

① 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径約15mm、長さ約300mmのガラス製カラムクロマト管にシリカゲル0.9g、2%水酸化カリウムシリカゲル3.0g、シリカゲル0.9g、44%硫酸シリカゲル4.5g、22%硫酸シリカゲル6.0g、シリカゲル0.9g、10%硝酸銀-シリカゲル3.0gを順次ヘキサンで充填した。その上部に無水硫酸ナトリウムを6.0g積層し、ヘキサン200mLを流速2.5mL/minで流し、充填物を洗浄後、秤量後の脂質をヘキサン数mlで溶解し、秤量瓶内を洗いこみながら移した。次に、ヘキサン200mlを流速2.5mL/minで溶出させ、得られた溶出液をロータリーエバポレーターにて約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した。

② 活性炭シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径約10mm、長さ約150mmのガラス製カラムクロマト管に、無水硫酸ナトリウム3.0g、活性炭シリカゲル0.5g、最後に無水硫酸ナトリウム3.0gを乾式充填する。試料溶液を移し入れ、ジクロロメタン/ヘキサン(1:3)溶液100mLを流速2.5mL/minで溶出後、トルエン100mLを同じ流速で丸底フラスコへ溶出させた。トルエン画分をロータリーエバポレーターにて約1mL程度まで濃縮後、フラスコ内の試料液は先細のスピッツ管へトルエンで洗いこみながら約5mL程度で移した。次に、スピッツ管の試料液に緩やかに窒素を吹き付けて濃縮し、溶媒がほとんど留去させた。そして20pgのノナン

溶液のシリンジスパイクを添加後、20 μ Lのノナン溶液になるように定容してSLによるGC-MS分析用試料とした。

B-4. ALVのためのトルエン溶媒排出条件

表1に示した条件で行った。

表1. アットカラム濃縮大量導入のためのインジェクター条件

Injector (OPTICS, GL Sciences) for Large Volume Injection
Equilibration time : 30sec
Initial Temperature : 105°C
Ramp Rate : 16°C/sec
Final Temperature : 280°C
Vent time : Auto (level 10)
Purge Pressure : 25kPa
Transfer Pressure : 100kPa
Split Open Time : 2.5min
Transfer Time : 3min
Initial Pressure : 100kPa
Final Pressure : 310kPa
End Time : 49min
Split Flow : 20ml/min
Vent Flow : 100ml/min
Purge Flow : 3ml/min

B-5. GC-MS分析条件

表2に示した条件で行った。MSはSelected Ion Monitor(SIM)法によってPCDDs、PCDFsおよびNon-*ortho*-PCBsの測定をモニターイオンの強度比が、標準試料の測定であられたものと $\pm 15\%$ の範囲で一致するものを目的物質とみなして行った。高感度を得るため $^{13}\text{C}_{12}$ -同族体およびPFKのデータサンプリング時間を短くし、 $^{12}\text{C}_{12}$ -同族体は長くした。なお、検出限界および定量限界はそれぞれS/N=3および10とした。

C. D. 結果と考察

C-1. ALVの再現性

ALVは図1に示すように溶媒沸点付近の温度勾配をかけたプレカラムの中に溶媒を注入し、キャリアーガス圧力と溶媒の蒸気圧が平衡に達する温度のところで起こる溶媒の静止状態を利用した導入法である。

すなわち、注入口温度を試料溶媒沸点以下に、オープン温度を試料溶媒沸点以上に設定し、図2のようにプレフィット式になっているライナーに試料溶媒を注入する。試料溶媒はライナー及びプレカラム中に液体のまま留めておくと試料溶媒は一定の蒸気圧で揮発していく。ここでライナーに設けた溶媒排出口から揮発してくる溶媒は排出されライナー中の溶媒は濃縮され、その後、注入口の温度と圧力を上げることによって目的成分の分析が達成される。

まずPCDDsおよびPCDFsの同族体をそれぞれ25fg(OCDDおよびOCDFは50fg)およびNon-*ortho*-PCBsの同族体それぞれ250fgをALVで100 μ L、SLで2 μ Lそれぞれ導入しGC-MS測定をそれぞれ5回ずつ行った。その結果、両者で全ての同族体でS/N比が10以上であり、全同族体で両者の間で面積値に有意な差は見られなかった。これよりALVでの100 μ Lの注入は従来の2 μ LのSLと差がないものであることを確認された(表3)。

C-2. ブランク試料でのPCDDs、PCDFs

およびNon-*ortho*-PCBs測定

試料量と同量のヘキサン交換水を試料と見立て全操作を行った。すなわち5mLおよび25mLの試料をそれぞれALVおよびSLのためにブランク試験を行った。それぞれ6試料ずつ行い、後述の血清試料からの抽

出脂質量の平均値から 1g 脂質当たりの PCDDs、PCDFs および Non-ortho-PCBs のブランク濃度を求めた (表 4)。

OCDD のみピークが検出限界以上定量限界未満で検出され、ALV および SL でそれぞれ 1.5pg/g lipid (検出限界は 0.61pg/g lipid) および 1.4pg/g lipid (検出限界は 1.2pg/g) であった。表 4 より ALV を用いた 5mL の方が SL の 25mL よりも検出限界値が低かった。ALV の場合、最終液量 110 μ L のうち 100 μ L 導入しているため試料量 4.5mL 分が導入されており、一方、SL では最終液量 20 μ L のうち 2 μ L 導入しているため試料量 2.5mL 分しか導入されていない計算となる。すなわち導入された試料量が多い分 ALV の方が試料単位当たりでは検出限界が高くなる結果となった。加えて、ALV での導入は実際に機器へ入っていく溶媒量を SL と同等以上に低減されたため大量導入でありながら S/N の低減につながったとも考えられた。

C-3. 実試料での PCDDs、PCDFs および

Non-ortho-PCBs 測定

実試料での抽出脂質含有量は n=3 で 5mL および 25mL でそれぞれ 0.45% および 0.46% でありいずれも RSD は 1% 未満であり、両分析に際して問題ない条件であった。実試料の分析値では 5mL と 25mL 両者共通に測定できたものについては有意差は認められず RSD も 10% 未満であり、2,3,7,8-TCDF および ND であった同族体以外、安定していた (表 5)。

回収率では 2,3,7,8-TCDD および 2,3,7,8-TCDF でそれぞれ 61% および 63% と低めではあったがその他の同族体では大

差なく両方法で 67~107% であった。2,3,7,8-TCDF は機器に導入された絶対量が多い結果、ALV でのみ定量可能であったが RSD は 15% であった。

ALV を用いた 5mL および SL での 25mL での血清試料のクロマトグラムを図 3-1~3-3 に示す。100 μ L の GC-MS への大量導入の結果、1,2,3,4,7,8-HxCDD において分離が劣っているが、ALV を用いた 5mL の方が SL での 25mL よりも良好な S/N でのクロマトグラムを得ることができた。以上より、ALV を用いた 5mL での血清分析は従来の 25mL での SL と数値において問題なく、クロマトグラムにおいては 1,2,3,4,7,8-HxCDD を除き良好であることが明らかとなった。

また、ALV では 1,2,3,7,8-PeCDF および 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF は検出限界以上、定量限界未満ではあったがピークが確認できた。このことは ALV を用いて 5mL 以上の試料量を用いればこれまで数値として ND になる傾向のある同族体のデータをとることができ得ることを示している。

なお、Mono-ortho-PCBs は PCDDs、PCDFs および Non-ortho-PCBs に比べ血清中の濃度は一般的に 10~1000 倍以上存在する。このため、試料の少量化は問題にならないため、議論を PCDDs、PCDFs および Non-ortho-PCBs のみに絞った。

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. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

3. 用新案登録

なし

3. その他

なし

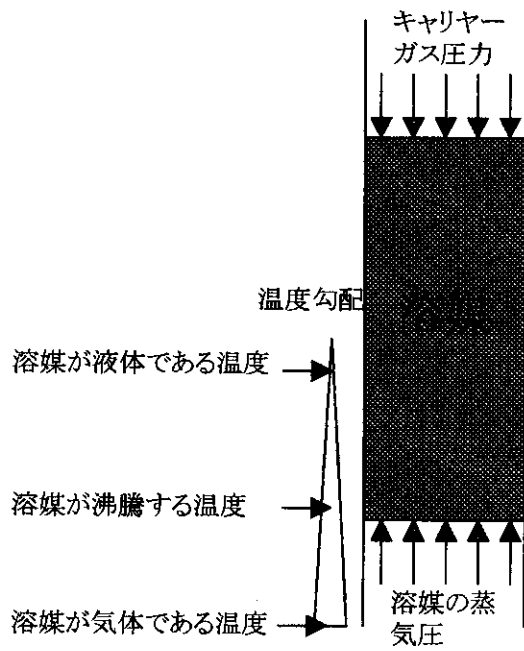


図1 キャリアーガス圧力と溶媒蒸気圧の平衡状態による溶媒の静止

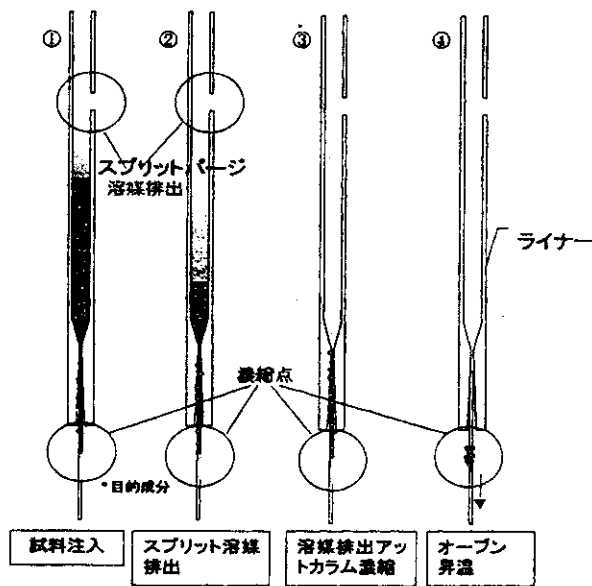


図2. ALVにおけるトルエン溶媒の排出