

表1 確認試験結果(GUS法)

試料番号	非組換えパパイヤ										
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11
調査した胚の数	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
青色を示した胚の数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GUS陽性率(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
判定	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

試料番号	組換えパパイヤ										
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
調査した胚の数	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
青色を示した胚の数	11	10	9	9	10	6	9	9	9	5	9
GUS陽性率(%)	91.7	83.3	75.0	75.0	83.3	50.0	75.0	75.0	75.0	41.7	75.0
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性

表2 確認試験結果(定性PCR)

非組換えパパイヤ												
試料番号	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	
抽出番号	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
対照プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
検出プライマー	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
確認プライマー	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
判定	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

組換えパパイヤ												
試料番号	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	
抽出番号	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
対照プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
検出プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
確認プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性

+ : 予定長のバンドを検出
 - : 予定長のバンドを検出せず

表3 安定性試験結果(GUS法)

保存条件	非組換えパパイヤ						
	冷蔵			室温			
保存日数	0	3	9	16	3	9	16
調査した胚の数	12	12	12	12	12	12	12
青色を示した胚の数	0	0	0	0	0	0	0
GUS陽性率 (%)	0	0	0	0	0	0	0
判定	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

保存条件	組換えパパイヤ						
	冷蔵			室温			
保存日数	0	3	9	16	3	9	16
調査した胚の数	12	12	12	12	12	12	12
青色を示した胚の数	11	10	8	9	7	9	7
GUS陽性率 (%)	91.7	83.3	66.7	75.0	58.3	75.0	58.3
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性

表4 安定性試験結果(定性PCR)

非組換えノシパイヤ												
保存条件	冷蔵						室温			冷凍		
	0	3	7	10	14	14	3	7	14	1	2	14
保存日数	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
抽出番号	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
対照プライマー	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
検出プライマー	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
確認プライマー	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
判定	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

組換えノシパイヤ												
保存条件	冷蔵						室温			冷凍		
	0	3	7	10	14	14	3	7	14	1 <td>2</td> <td>14</td>	2	14
保存日数	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
抽出番号	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
対照プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
検出プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
確認プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性

+ : 予定長のバンドを検出
 - : 予定長のバンドを検出せず

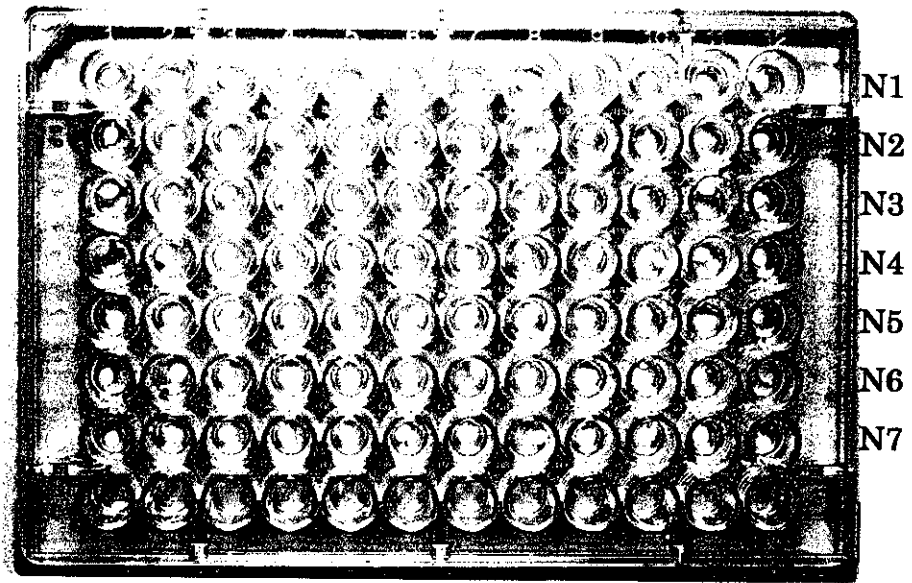


図1 非遺伝子組換えパパイヤの GUS 法による試験結果 1

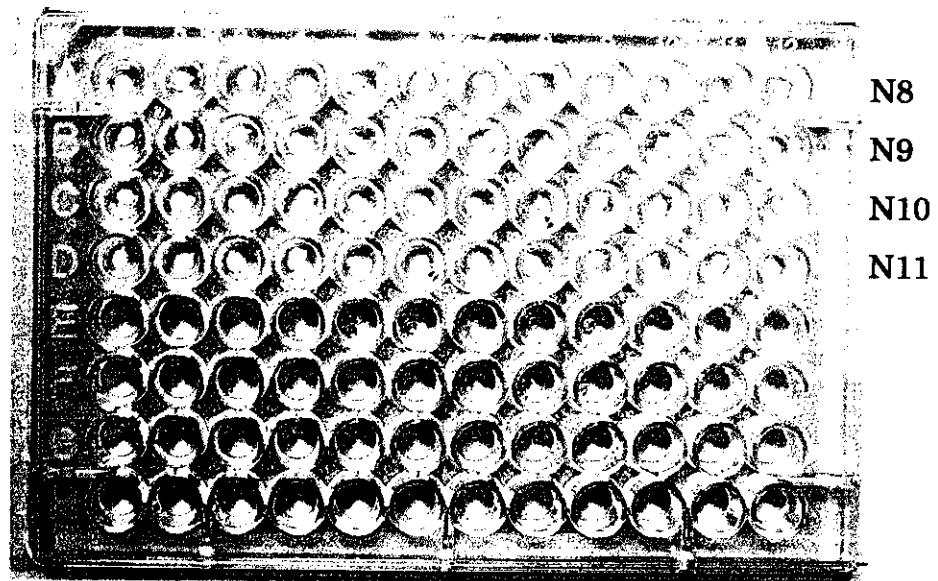


図2 非遺伝子組換えパパイヤの GUS 法による試験結果 2

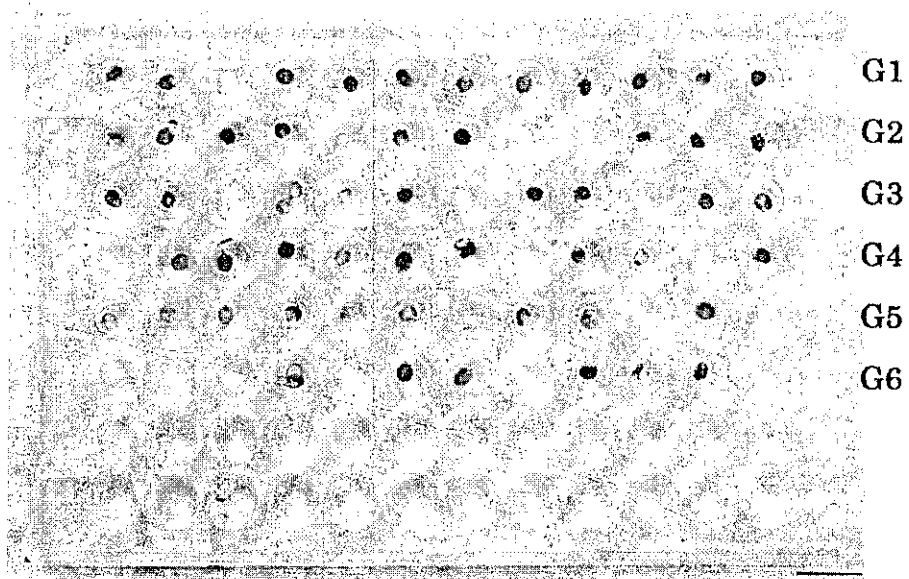


図3 遺伝子組換えパパイヤの GUS 法による試験結果 1

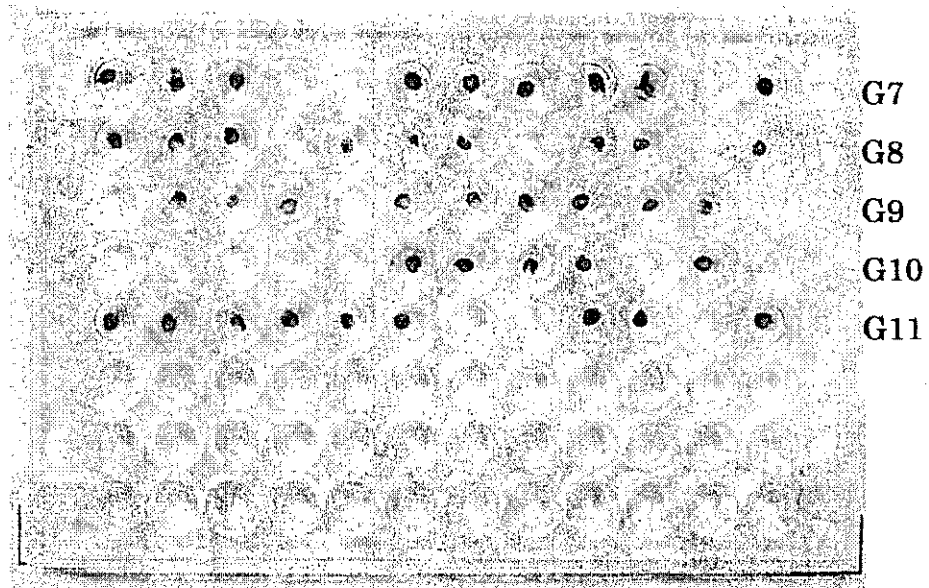


図4 遺伝子組換えパパイヤの GUS 法による試験結果 2

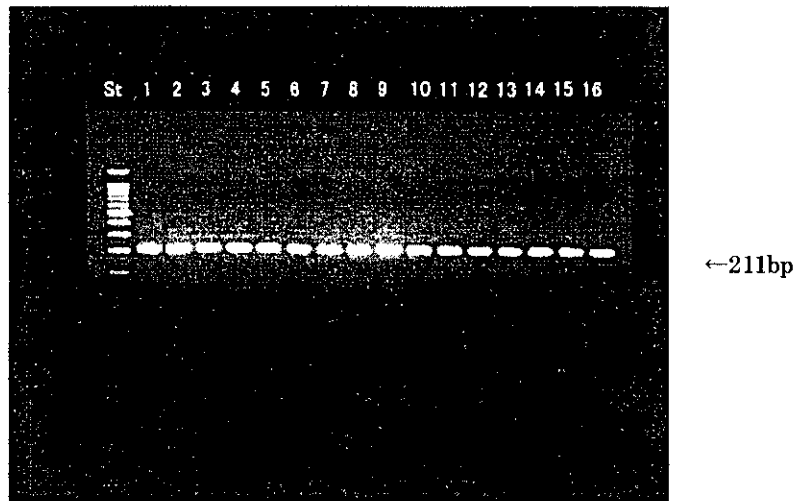


図5 対照プライマーによる非組換えパパイヤの PCR 結果



図6 検出プライマーによる非組換えパパイヤの PCR 結果 1

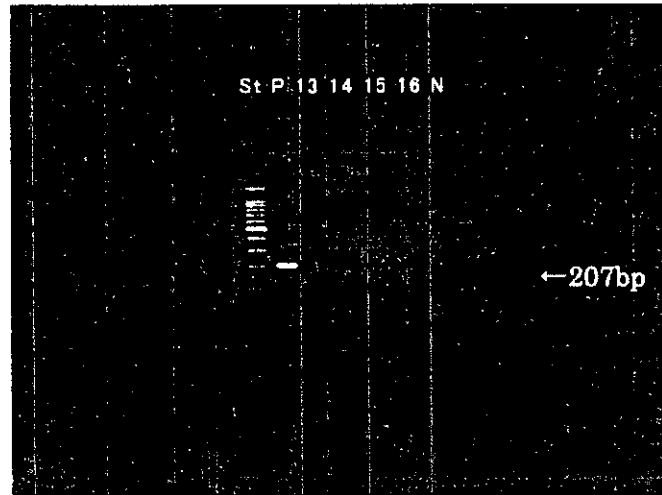


図7 検出プライマーによる非組換えパパイヤのPCR結果2

図5～7

St	DNA 分子量標準
1,2	保存0日
3,4	冷蔵保存3日
5,6	冷蔵保存7日
7,8	冷蔵保存10日
9,10	冷蔵保存14日
11,12	室温保存3日
13,14	室温保存7日
15,16	冷凍保存14日
P	ポジティブコントロール
N	NTC

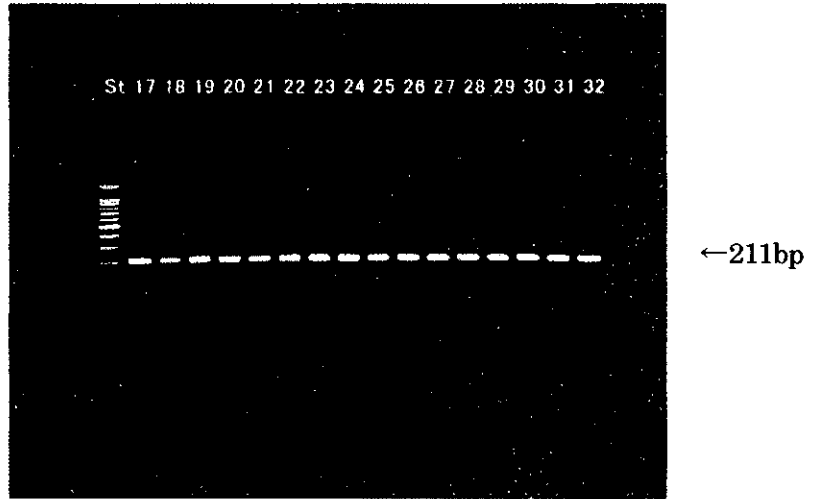


図8 対照プライマーによる組換えパパイヤの PCR 結果

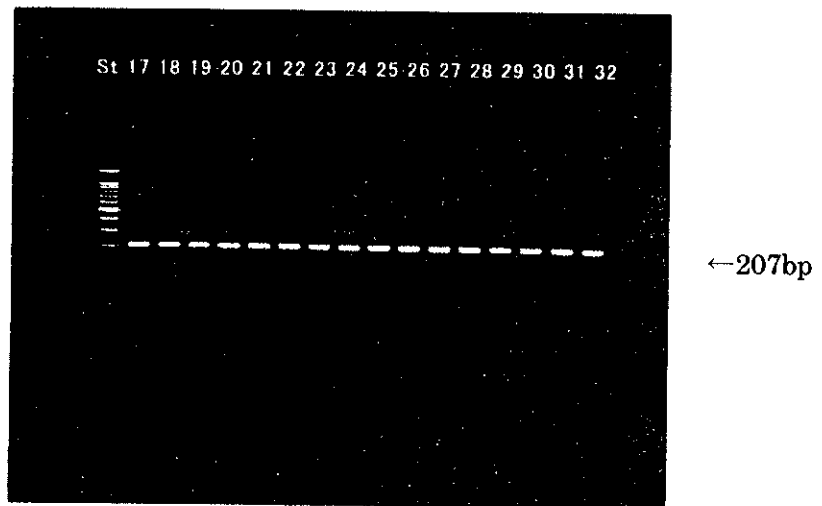


図9 検出プライマーによる組換えパパイヤの PCR 結果

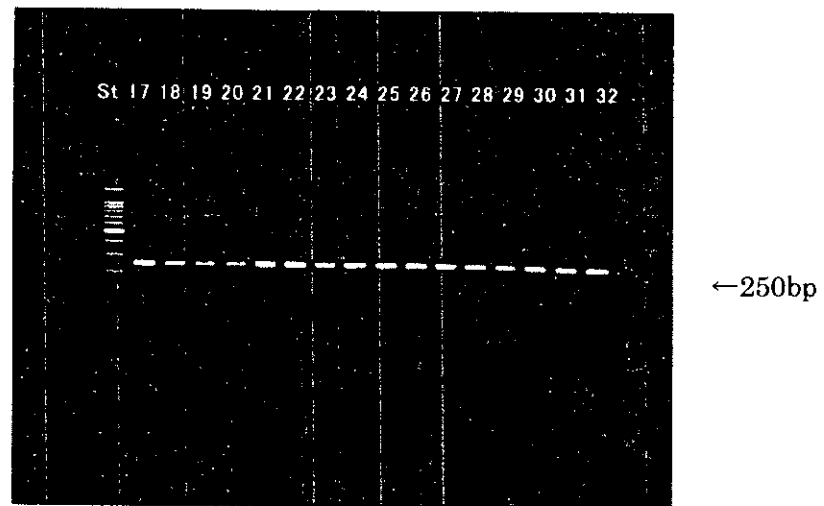


図 10 確認プライマーによる組換えパパイヤの PCR 結果

図 8 ~ 10

St	DNA 分子量標準
17,18	保存 0 日
19,20	冷蔵保存 3 日
21,22	冷蔵保存 7 日
23,24	冷蔵保存 10 日
25,26	冷蔵保存 14 日
27,28	室温保存 3 日
29,30	室温保存 7 日
31,32	冷凍保存 14 日

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」

研究成果に関する刊行物

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
織田 肇	Development of an analysis method for polybrominated diphenyl ethers and its application to their detection as pollutions in human mother's milk, Shinjiro Hori, Kazuo Akutsu, Hajime Oda, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, Tsunehisa Makino,	Organohalogen Compounds	58	245-248	2002年
奥山光伸	Development of Simple and Rapid Purification Methods for Bioanalytical Detection of Dioxins Mitsunobu Okuyama, Wakako Endo, Takako Anjo, Yasuhiko Matsuki, Shinjiro Hori, Norihiro Kobayashi, Junichi Goto, Atsunori Sano, Tomonori Matsuda	Organohalogen Compounds	58	365-368	2002年

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
斉藤貢一	生体試料中の臭素系難燃剤及びPCB代謝物など有機ハロゲン化合物の前処理方法の検討: 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
斉藤貢一	生体試料中の有機ハロゲン化合物の分析: 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
奥山光伸	生体試料中ダイオキシンELISAの構築及び試料精製法の開発: 奥山光伸、武田和香子、安生孝子、松木容彦、神戸川 明、小林典裕、後藤順一、堀 伸二郎	第7回免疫化学測定法研究会	2002年7月

20020881

以降 P.189-P.194までは雑誌/図書に掲載された論文となりますので、P.187の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

生体試料中の臭素系難燃剤及びPCB代謝物など有機ハロゲン化合物の前処理方法の検討

○齊藤貢一、Andreas Sjodin¹⁾、Courtney Sandau¹⁾、Mark Davis¹⁾、Donald Patterson, Jr.¹⁾、中澤裕之²⁾、松木容彦³⁾ (埼玉衛研、¹⁾ Centers for Disease Control and Prevention、²⁾ 星薬科大、³⁾ 食品薬品安全センター)

【はじめに】

近年、環境汚染化学物質による生体への汚染と、その残留によって引き起こされる影響が懸念されている。環境汚染化学物質の中でも有機ハロゲン化合物は古くから農薬や難燃剤などに使われてきた経緯があり、それらによって引き起こされる環境汚染問題は従来から指摘されてきた。また最近では、これらの化学物質の中には内分泌攪乱作用が指摘されている物も含まれていることから、これらの化学物質の生体への残留調査と共に、生体への影響を評価する調査が望まれている。

そこで生体試料を対象としたこれら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。分析対象の環境汚染化学物質としては、古くから使われてきた DDT 類、HCH 類、ドリン剤及びククロルデンなどの有機塩素系農薬 (21 種類)、PCN や PCB 及びその代謝物など (26 種類)、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 (12 種類)、合計 59 種類の化学物質を選択した。これらの環境汚染化学物質による生体影響を評価するためには、できるだけ多くの化学物質を系統的に抽出・クリーンアップするなど、簡便且つ迅速に測定する必要がある。そこで今回の研究では、高速溶媒抽出(ASE)を用いた抽出方法及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、主に前処理方法についての検討を行った。

【実験方法】

試料： ヒトの臓器などは入手が難しく、貴重であることから、方法論開発のための生体試料としては、牛の脂肪及び豚の臓器 (心臓、腎臓、肝臓) を用いた。

抽出方法 (脂質抽出)： 各臓器 (1 - 5 g) を細切・ホモジナイズした後、Hydromatrix を加えて試料の脱水と分散を行った。サロゲートとして測定に必要な安定同位体 (¹³C) をスパイクした後、ASE セル (33ml) に充填し、ジクロロメタン/アセトン (1:1) を抽出溶媒として、100°C、1500psi、2cycle で抽出した。大部分の有機溶媒を留去した後、*tert*-Butyl methyl ether (10ml) 及び 0.1M H₃PO₄/1% KCl (10ml) を加えて Rocking-分配抽出 (2 回) し、有機溶媒相を分取した後、溶媒を完全に留去して脂質を得た。

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行った。続いて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、無極性物質 (5%ジクロロメタン/ヘキサン溶出フラクション: Fraction A) とフェノール性化合物

Study of Pretreatment for the Analysis of Brominated Flame Retardants, PCB Metabolites and Other Halogenated Environmental Organic Pollutants in Biological Samples

Koichi SAITO, Andreas SJODIN¹⁾, Courtney SANDAU¹⁾, Mark DAVIS¹⁾, Donald PATTERSON, Jr.¹⁾, Hiroyuki NAKAZAWA²⁾, Yasuhiko MATSUKI³⁾ : Saitama Institute of Public Health, 639-1 Kamiokubo, Saitama 338-0824, Tel 048-853-6123, Fax 048-840-1041; ¹⁾ Centers for Disease Control and Prevention, 4770 Buford Hwy, NE Atlanta, GA 30341-3724, USA, Tel 1-770-488-4207, Fax 1-770-488-4546; Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa, Tokyo 142-8501, Tel 03-5498-5763, Fax 03-5498-5062; Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute, 729-5, Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Tel 0463-82-4751, Fax 0463-82-9621

[結果及び考察]

脂質抽出

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ところ、ジクロロメタン/アセトン(1:1)を用いることで、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。

クリーンアップ

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が、これらの方法ではディ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ため、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)を用いて脂質の除去及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90mL~160mL(保持時間18分~32分)中に溶出され、他方、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)。

代謝体と親化合物とのSPEによる分画

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共存物質の除去を行うと共に、生体組織中での残留性が高いPCBや塩素系農薬類(低極性化合物画分)と残留量が少ないと推測されるPCB代謝体(OH体, MeSO₂体)やTBBP-A、及びエンドリンやエンドスルファンの代謝体など極性の大きい化合物との分画を検討した。その結果、低極性化合物画分(Fraction A)は5%ジクロロメタン/ヘキサン6mlで、他方、高極性化合物画分(Fraction B)は10%メタノール/ジクロロメタン溶出8mlで良好に分画され、且つ、SIM測定で妨害となる共存物質も十分に除去された。また、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。

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クリーンアップ及びSPE分画, 更にメチル化操作まで含めたすべての工程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。

前処理の自動化

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、GPE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。

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)

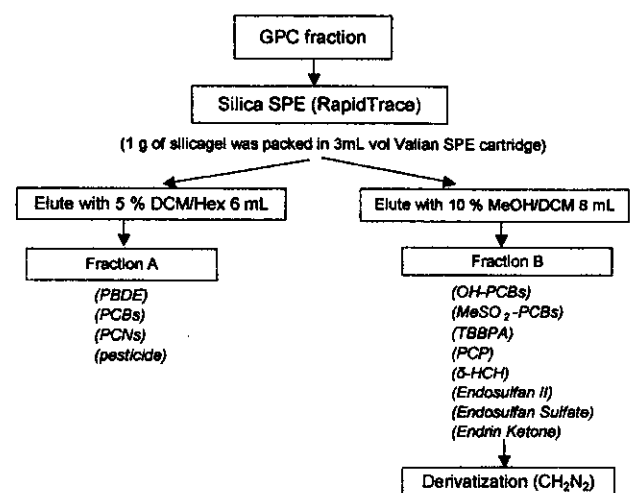


図1. シリカゲルSPEによる分画

生体試料中の有機ハロゲン化合物の分析

○ 齊藤貢一 (埼玉県衛生研究所), Andreas Sjodin, Coutney Sandau, Mark Davis, Donald Patterson, Jr. (Centers for Disease Control and Prevention), 中澤裕之 (星薬科大学), 松木容彦 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

Analysis of Halogenated Organic Pollutants in Biological Samples

Koichi SAITO (Saitama Institute of Public Health), Andreas SJODIN, Coutney SANDAU, Mark DAVIS, Donald PATTERSON, Jr. (CDC), Hiroyuki NAKAZAWA (Hoshi University), Yasuhiko MATSUKI (Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute)

[目的]

PCB や塩素系農薬さらに臭素系難燃剤などの、いわゆる有機ハロゲン化合物によって引き起こされる環境汚染は、従来から指摘されてきた問題である。また最近では、これらの化学物質に加えて、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もある。従って、これらの化学物質の生体への残留調査と共に、生体への影響を評価する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一斉分析方法の開発に関する研究を行った。分析対象の有機ハロゲン化合物としては、有機塩素系農薬 21 種類 (代謝体を含む)、PCB とその代謝物 (OH 体, MeSO₂ 体) 及び PCN など (26 種類), 更にポリ臭素化ジフェニールエーテル (PBDE) 類や TBBP-A などの臭素系難燃剤 (12 種類), 合計 59 種類の化学物質を選択した。今回、これらの化学物質を系統的に抽出・クリーンアップするために、①高速溶媒抽出 (ASE) を用いた抽出方法、②ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) を用いたクリーンアップ方法を検討すると共に、③PCB 代謝物や TBBP-A など、他の有機ハロゲン化合物と比較して極性の異なる化合物について固相抽出法 (SPE) を用いた分画条件についても検討を行い、更に、④これらの全体的な操作に関して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った。

[実験方法]

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

抽出方法 (脂質抽出): 細切・ホモジナイズした各臓器 (1~5 g) に Hydromatrix を加えて試料の脱水と分散を行った後、ASE セル (33ml) に充填し、ジクロロメタン/アセトン (1:1) を抽出溶媒として、表 1 の条件で抽出した。RapidVap を用いて大部分の有機溶媒を留去した後、*tert*-butyl methyl ether (MTBE: 10ml) 及び 0.1M H₃PO₄/1% KCl (10ml) を加えて Rocking-

分配抽出 (2回) し、有機溶媒相を分取した後、溶媒を完全に留去して脂質を得た。

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行った (表 2)。続いて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、低極性化合物群 (Fraction-A : 5% ジクロロメタン/ヘキサン溶出) と、高極性化合物群 (Fraction-B : 10% メタノール/ジクロロメタン溶出) に分画した。Fraction-A については濃縮してシリンジスパイクを添加した後、NCI-GC/MS で SIM 測定した。他方、Fraction-B はジアゾメタンでメチル化操作を行った後、NCI-GC/MS に供した。

GC/MS は HP6890 GC-HP5973MSD を、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) で行った。

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バial 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)

mmol/L 酢酸ナトリウム・クエン酸緩衝液 (pH5.0) 100 μ L を加えて室温で 30 分間反応後、3 mol/L 硫酸 50 μ L を添加して酵素反応を停止し、波長 490nm における各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Tek Instrument Inc. BL312e) により測定した。

HRGC/HRMS：上記の前処理法により精製した試料に ^{13}C 標識内部標準物質を添加し、以下の条件でガスクロマトグラフ (Hewlett Packard 5890-II) / マススペクトロメーター (JEOL JMS-700, Mstation) を用い、SIM 法により測定した。

GC 条件

カラム：Supelco 2331 60m x 0.25mm i.d. 膜厚 0.25 μ m

昇温プログラム：130 $^{\circ}\text{C}$ (2 min)、130-200 $^{\circ}\text{C}$ (15 $^{\circ}\text{C}$ /min)、200-260 $^{\circ}\text{C}$ (3 $^{\circ}\text{C}$ /min)、260 $^{\circ}\text{C}$ (30 min)

キャリアーガス：He

カラムヘッドプレッシャー：168 Kpa

注入口温度：270 $^{\circ}\text{C}$

注入量：2 μ L

MS 条件

検出モード：EI

イオン源温度：270 $^{\circ}\text{C}$

イオン化電流：600 μ A

イオン化エネルギー：38 eV

加速電圧：10 KV

【結果および考察】 本 ELISA の測定範囲は 1~100 pg/assay であり、母乳など生体試料中のダイオキシン類を測定できる感度を有していた。

脂肪を水酸化カリウムおよび濃硫酸で完全に分解した後に、ダイオキシン吸着カラムで精製することにより、ELISA に適用可能な試料を調製しうることが判明した。本法で精製したダイオキシン添加バターまたは牛乳を ELISA により測定した結果、その測定値はほぼ満足できるものであり、HRGC/HRMS による測定値とも良好な相関性がみられた。また、母乳中の毒性等価量 (TEQ) の大部分を占める 3 種のダイオキシン類、2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PeCDD および 2,3,4,7,8-PeCDF の回収率 (HRGC/HRMS による) はそれぞれ 64%、75% および 85% であった。

ダイオキシン類のように、水に難溶性で試験器具に吸着しやすく、かつ超微量 (ppt レベル) を測定するには、界面活性剤や吸着防止剤の使用が必須で、その種類や濃度を適切に設定することが重要となる。本研究では、Triton X-100 の添加が有効で、上記のように満足のいく回収率を得ることに成功した。

今回開発した精製法を組み合わせた ELISA は、安価で簡便・迅速なダイオキシン類のモニタリングおよびスクリーニング法となることが期待される。

【謝辞】 本研究は、厚生労働科学研究補助費により実施された。