

TDI の 7~15 倍にもなるといわれている。厚生労働省の調査結果によると、母乳中の平均濃度は 24.0pg-TEQ、母乳 100g 当たりでは 59.0pg-TEQ/100g 母乳であったのに対し、牛乳及び粉ミルクのダイオキシン類濃度は、それぞれ 0.031pg-TEQ/g、0.022pg-TEQ/g であった。単純に 100g あたりの濃度で比較すると、母乳はそれらの 19~27 倍の濃度ということである。厚生労働省の調査結果によると、母乳中のダイオキシン類濃度は 1970 年代半ばが最も高く、その後は減少傾向にあり、発育状況・甲状腺機能等を人工栄養群と比較した結果でも、異常はみられなかったという。母乳の汚染は乳児に直接影響を与えるものであり、母乳保育の有益な点（免疫抗体や栄養素の補給、母と子

E. 結論

平成 9 年度から測定を終了した全国 17ヶ所 740 人の血中濃度は 21.5 ± 13.8 pgTEQ/g 脂肪であった。身体検査、血液生化学検査、ホルモン検査、免疫能、アンケート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。血中ダイオキシン類濃度派地域差があり、職業の影響もあった。低濃度曝露であっても長期間体内に存在するためにさまざまな代謝異常をおこし、糖尿病、高脂血症、高血圧、痛風、甲状腺疾患、アレルギーなどのリスク要因となることが示された。また喫煙、飲酒、肉食、風呂、洗髪をしないことはダイオキシン類の蓄積をまねきやすいことが示唆された。PCB などは魚介類からくることが示唆されたが、納豆、豆腐など和食はダイオキシンの排出をすすめ

ている可能性が示された。女性の生殖機能に対する影響は明らかでなかったがホルモンへの影響がみられたことから長期影響を無視するわけにはいかない。

F. 健康危険情報

ダイオキシン類曝露源として農業のリスクが示された。ダイオキシン類、とくに PCB 曝露に関して、糖尿病、高血圧、高脂血症、痛風等の生活習慣病のリスクとなっている可能性が示された。また、甲状腺ホルモン、性ホルモン、免疫能等への影響は低濃度曝露であっても無視できない。今後の追跡が必要である。

G. 参考文献

- 1) 渡邊昌, I. 化学物質による内分泌攪乱, 医学書院, 1999
- 2) 宮田秀明, ダイオキシン, 岩波新書, 東京, 1999
- 3) 環境省, 平成 10 年度「ダイオキシン類の人体、血液、野生生物及び食事中的蓄積状況等について」
- 4) Nukaya M, Takahashi Y, Gonzalez FJ, Kamataki T. Aryl hydroCarbon receptor-mediated suppression of expression of the low-molecular-weight prekininogen gene in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 14;287:301-4
- 5) Henriksen GL, Ketchum NS, Michalek JE, Sway JA. Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 1997; 8:252-8

- 6) Longnecker MP, Michalek JE. Serum dioxin level in relation to diabetes mellitus among Air Force veterans with background levels of exposure. *Epidemiology* 2000 ;11(1):44-8
- 7) Oda H, Matsushita N, Hirabayashi A, Yoshida A. Hyperlipoproteinemia in rats fed polychlorinated biphenyls. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1990;36:117-22
- 8) 厚生労働省 HP, たばこ煙中のダイオキシン
http://www.health-net.or.jp/kenkoneit/tobacco/21c_tobacco/1st/23.html
- 9) Calvert GM, Sweeney MH, Deddens J, Wall DK. Evaluation of diabetes mellitus, Serum glucose, and thyroid function among United States workers exposed to ,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Occup Environ Med* 1999; 56:270-6
- 10) 平成 12 年 乳幼児身体発育調査報告書 (厚生労働省雇用均等・児童家庭局)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/0110/h1024-4c.html#hyo5-8>
- 11) 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書 平成10年11月厚生省
http://www1.mhlw.go.jp/shingi/s9811/s1119-2_13.html
- 12) ダイオキシン類の人体、血液、野生生物及び食事中の蓄積状況等について平成 10 年度調査結果 環境省
<http://www.env.go.jp/press/press.php3?serial=1837>
- 13) MoCarelli P., Brambilla P., Gerthoux PM, et al., Change in sex ratio with exposure to dioxin, *Lancet*; 348: 409. (1996)
- 14) MoCarelli P., Gerthoux PM, Ferarri E, et al., "Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring", *Lancet*, May, 27; 355(9218):1858-63 (2000)
- 15) Davis DL, Gottlieb MB, Stampnitzky JR, "Reduced ratio of male to female birth in several industrial countries: a sentinel health indicator?", *JAMA*, 279: 1018-23 (1998)
- 16) Yoshimura T, Kaneko S, Hayabuti H, "Sex ratio in offspring of those affected by dioxin and dioxin-like compounds: the Yusho, Seveso, and Yucheng incidents", *Occup Environ Med* Aug; 58(8):540-1 (2001)
- H. 論文発表
- 1) Watanabe S, Iida T, Ohkaki M, Hosseinpour J, Health effects of dose exposure of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar PCB among Japanese residents, *Organohalogen Compounds* 59, 2002
- 2) Watanabe S, Kitamura K, Kikuchi Y, Sunaga M, Iida T, Waechter G, Yamamoto F, Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofurans and coplanar PCB around municipal waste

incinerators, OrganohaLogen
Compounds 48 ,2000

- 3) 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
coplanarPCB (Co-PCB) of municipal
waste incinerator workers , J Epidemiol
10 ,2000

- 13) Mizuno R, “The male/female ratio
of fetal death and births in Japan” ,

Lancet. Aug, 26; 356: 738-9 (2000)

***謝辞**

本研究は、厚生労働省の厚生科学研究費により行われた。

本研究に御協力していただいた、対象者の方々、保健所ならびに市町村の方々、採血や健康診断にご協力いただいた軽米病院、横手病院、佐久総合病院、宮古病院、小国病院、二戸保健所、宮古保健所、上五島保健所、おじか町、白石市に深謝する。

分担研究報告書
微量環境汚染物質の分析法に関する研究

分担研究者：宮田秀明 摂南大学教授

要約 前年度で開発した簡易迅速化血液中ダイオキシン類分析法を基礎とし、最も低極性の塩素化ダイオキシン類と最も高極性の臭素化ダイオキシン類を含む標準品を利用することにより、血液試料を対象とした全臭素系ダイオキシン類の分析法を開発した。その方法は、脂肪抽出→硫酸シリカゲル処理による脂肪除去→硝酸銀シリカゲルカラム精製→活性炭分散シリカゲルカラム精製→高分解能 GC/高分解能 MS 分析から構成されている。

犬体内における POPs の蓄積パターンを比較することにより、ダイオキシン類の蓄積特性を明らかにした。ダイオキシン類は塩素系農薬中最強毒性物質のディルドリンと類似した蓄積パターンを示し、脂肪ベースにおける蓄積濃度は肝臓>肺臓>>脂肪組織の順であった。この結果は大部分のダイオキシン類は肝臓や肺臓の実質細胞と共有結合している可能性を強く示唆するものである。一方、PAHs に関しては環境内分布を反映して、肺臓に最も多く蓄積していた。

1) 血液中臭素系ダイオキシン類分析法の開発

A. 研究目的

近年、臭素系難燃剤を含む廃棄物の焼却に伴って、ダイオキシン類と同様な生体作用と毒性をもつ臭素系ダイオキシン類が発生していることが明らかにされ、その人体汚染が注目されている。臭素系ダイオキシン類は、塩素と臭素の組み合わせの相違により約 5,000 もの膨大な種類の化合物が存在する。しかし、市販標準物質の種類が限定されていること、光分解されやすく、また、分析感度が低いことなどのため、一般者における血液中臭素系ダイオキシン類の調査報告は皆無の状態にあ

る。従って、本研究では血液を対象とした臭素系ダイオキシン類分析法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

上記したように市販品の種類は極めて少ないが、最も低極性の塩素化ダイオキシン類と最も高極性の臭素化ダイオキシン類を含む標準品を利用することにより、全臭素系ダイオキシン類を対象とした分析法の開発が可能であることに着目し、前年度で開発した簡易迅速化血液中ダイオキシン類分析法を基礎とした臭素系ダイオキシン類分析法の開発を検討した。

C. 研究結果および考察

従来使用されてきた脂肪除去を目的とするアルカリ分解法においては、塩素化ダイオキシン類の回収率 75.2~92.2%に較べて、臭素化ダイオキシン類は 71.6~80.6%と明らかに低く（表 1）、臭素化ダイオキシン類はアルカリ条件下で脱臭素化しやすいことが判明した。そのため、新たに考案した硫酸シリカゲル処理法はアルカリ分解処理法に比較して分解率も低く（図 1）、脂肪除去の効率も良好であった。脂肪除去に続く精製法としての硝酸銀シリカゲルカラム（10 g）では、0~20%の 5 種類のジクロロメタン/ヘキサン混合溶媒を用いて検討した結果、極性妨害物の除去効率および溶出溶媒使用量において 5%混液が最適溶出溶媒であることが判明した。また、次の精製工程である活性炭分散シリカゲルカラム（1 g）における検討結果では、25%ジクロロメタン/ヘキサン混液 150 ml で低極性妨害物を除去した後、逆流によりトルエン 100 ml で臭素系ダイオキシン類を溶出する方法が最適であることが明らかとなった。

上記の結果を開発した分析法のフローシートを図 2 に示す。なお、HRGC/HRMS の分析条件は以下に示す。

機種：Hewlett Packard 6890 ガスクロマトグラフ-JEOL JMS-700MS 質量分析計
MS 条件

分解能：10000、イオン化電流：600 μ A、
イオン化電圧：38 eV、イオン源温度：
240 $^{\circ}$ C

GC 条件

1) 4~6 臭素系化合物分析用

J&W 製 DB-17 (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m)、カラム温度：90 $^{\circ}$ C (2 min) - 190 $^{\circ}$ C

(10 $^{\circ}$ C/min) - 280 $^{\circ}$ C (5 $^{\circ}$ C/min, 27 min) -
310 $^{\circ}$ C (10 $^{\circ}$ C/min, 10 min)

2) 7~8 臭素系化合物分析用

SGE 製 BPX-5 (7 m x 0.25 mm, 0.25 μ m)、カラム温度：140 $^{\circ}$ C (1.5 min) - 260 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C/min) - 280 $^{\circ}$ C (3 $^{\circ}$ C/min, 8 min)

2) ダイオキシン類の生体内分布における特異性

A. 研究目的

食事、大気、土壌、水などの媒体には実に多種類の汚染物質が存在している。特に、ダイオキシン類を含む多くの POPs は地球規模的な汚染を引き起こしているため、国際的にも極めて注目されている。しかし、これら各汚染物質の環境媒体中の分布はかなり相違し、これにより人体内分布パターンも相違することが予想される。本研究では各種 POPs の臓器内蓄積パターンを比較検討することによって、その結果からダイオキシン類の汚染特異性を明らかにし、人体汚染への基礎的知見を提供することを目的とした。

B. 研究方法

ヒトと同じ環境に生息し、しかもアルコール、たばこなどによる汚染影響を受けない犬に着目し、台湾台中県で捕獲した 6 匹の野犬について、大気経由汚染のターゲット器官として肺蔵を、単なる貯蔵器官として脂肪組織を、また、代謝・活性化等のターゲット器官として肝臓を選択し、各種環境汚染物質の汚染パターンを比較検討した。

C. 研究結果および考察

(a) ダイオキシン類の体内分布

表1 アルカリ分解による各¹³C-標準品の回収率 (n=3)

臭素化ダイオキシン類	平均値±標準偏差(%)	塩素化ダイオキシン類	平均値±標準偏差(%)
2,3,7,8-TBDD	78.5±4.2	2,3,7,8-TCDD	79.5±2.0
1,2,3,7,8-PeBDD	66.4±11.6	1,2,3,7,8-PeCDD	88.2±6.8
1,2,3,4,7,8/1,2,3,6,7,8-HxBDD	66.7±13.0	1,2,3,4,7,8+1,2,3,6,7,8-HxCDD	83.1±0.8
1,2,3,7,8,9-HxBDD	63.0±8.2	1,2,3,7,8,9-HxCDD	86.8±5.2
2,3,7,8-TBDF	82.2±4.0	2,3,7,8-TCDF	85.6±3.1
1,2,3,7,8-PeBDF	68.0±4.2	1,2,3,7,8-PeCDF	80.6±1.9
2,3,4,7,8-PeBDF	64.3±5.1	2,3,4,7,8-PeCDF	79.7±2.2
1,2,3,4,7,8-HxBDF	67.9±13.5	1,2,3,4,7,8-HxCDF	87.6±7.0
OBDD	-	OCDD	77.4±4.4

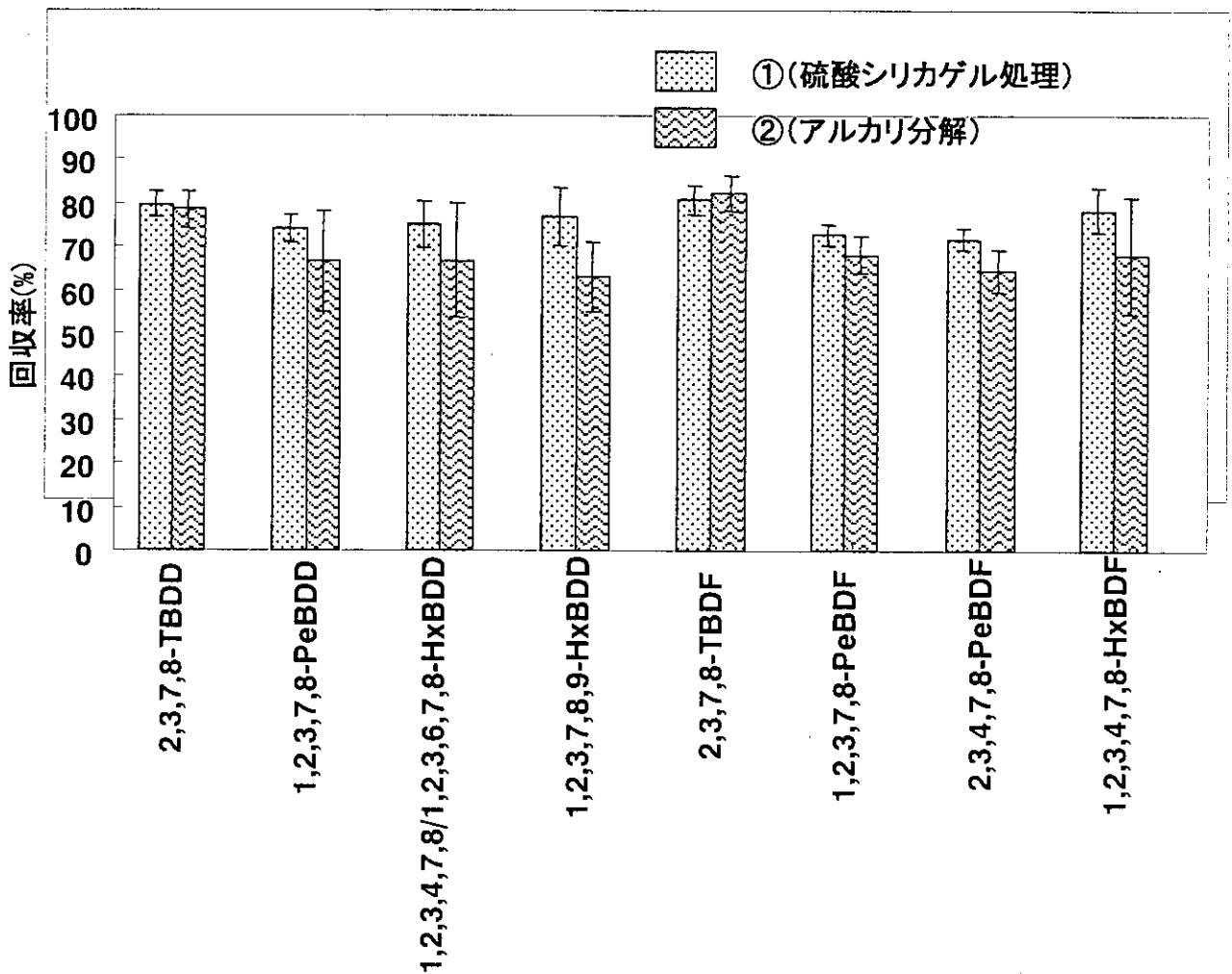
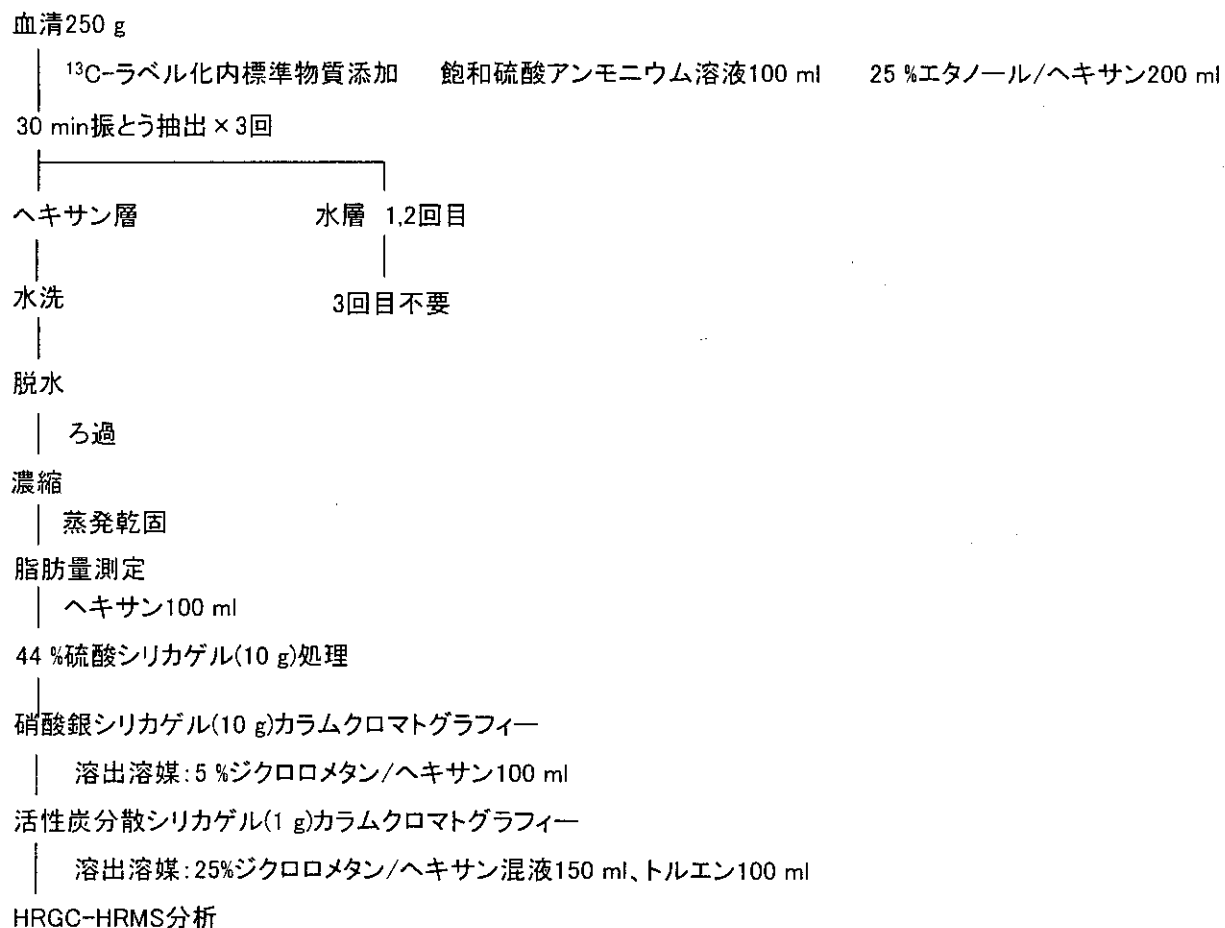


図1. 脂肪除去法による¹³C-臭素化ダイオキシン類回収率の比較



今回開発した血液中臭素系ダイオキシン類分析法のフローシート

図3に示すように、脂肪ベースで表した高毒性のダイオキシン類の毒性等量は、No. 4を除けば、いずれも肝臓が最も高い。単なる貯蔵場所としての脂肪組織と比較すると、肝臓の蓄積濃度は1.33倍(No. 4)～8.65倍(No. 6)、平均5.78倍も高い。このような結果は、ダイオキシン類が肝臓の実質細胞に作用し、細胞内のリポ蛋白質等と共有結合していることを示唆するものであり、極めて興味深い結果である。また、肝臓に続いて肺臓も高蓄積性を示す。肺臓/脂肪組織の濃度比は、1.19倍(No. 5)～10.45倍(No. 4)、平均3.57倍にもなる。肝臓と同様に、肺臓もP450などの電子伝達系組織が高度に発達している器官であることから、単なる貯蔵以外に実質細胞に作用しているダイオキシン類が多いことが強く示唆される。

脂肪組織中PCDDsのTEQ構成比は、2,3,7,8-TeCDD(42.3%)が最も多く、次いで1,2,3,7,8-PeCDD(25.7%)、1,2,3,4,7,8-HxCDD(12.4%)、1,2,3,6,7,8-HxCDD(11.2%)、1,2,3,4,7,8,9-HpCDD(4.9%)、1,2,3,7,8,9-HxCDD(3.2%)、OCDD(0.41%)の順である。しかし、肝臓や肺では1,2,3,7,8-PeCDD(32.4%、28.1%)、1,2,3,4,7,8-HxCDD(16.0%、12.5%)および1,2,3,4,7,8,9-HpCDD(18.5%、10.0%)の構成比が相対的に増加し、脂肪組織とは異なる。一方、PCDFsについては、各組織に共通して2,3,4,7,8-PeCDFの構成比が最も大きい。次の主要構成成分は肺臓と脂肪組織では2,3,4,6,7,8-HpCDFと1,2,3,4,7,8,9-HpCDFであるが、肝臓では1,2,3,4,7,8-HxCDFとなっている。Co-PCBsについても臓器間の構成

比が相違する(図4)。脂肪組織における主要構成成分は、3,3',4,4',5,5'-HxCB(25.4%)、3,3',4,4',5-PeCB(20.6%)、2,3,3',4,4',5'-HxCB(17.4%)、2,3,3',4,4'-PeCB(16.4%)および2,3,3',4,4',5-HxCB(11.0%)である。しかし、肝臓では2,3,3',4,4',5-HxCB(2.9%)と2,3,3',4,4',5'-HxCB(3.4%)が、また、肺臓では2,3,3',4,4'-PeCB(1.7%)が微量成分となっている。

(b) PAHs、塩素系農薬およびクロルデン類の体内分布

有機塩素系農薬とクロルデン類の蓄積濃度や蓄積パターンは個体間で大きく相違する(図5)。この結果は、これらの汚染物質の環境内における存在量や分布がダイオキシン類よりも不均一であることを示唆する。No. 6を除くと、ダイオキシン類と同様に、脂肪組織に比べて肝臓の蓄積濃度が高い。特に、肺臓における蓄積濃度はNo. 3およびNo. 6では脂肪組織よりも低く、ダイオキシン類とは異なるパターンを示す。脂肪組織に比べて肺臓や肝臓の蓄積濃度が顕著に高い個体はNo. 1とNo. 4であり、これらの主汚染物質はデイルドリンであった。一方、主要成分がオキシクロルデンと β -HCHであるNo. 3やNo. 6では、上述したように肺臓よりも脂肪組織の蓄積濃度は高い。このように、塩素系農薬中、最強毒性のデイルドリンがダイオキシン類と類似した蓄積傾向を示すことから、体内蓄積パターンは汚染物質の生体作用力と相関することが示唆された。

PAHsの蓄積パターンはダイオキシン類、有機塩素系農薬、クロルデン類の有機塩素系汚染物質と異なり、大半の個体において蓄積濃度は肺臓>肝臓>脂肪組織の順になってい

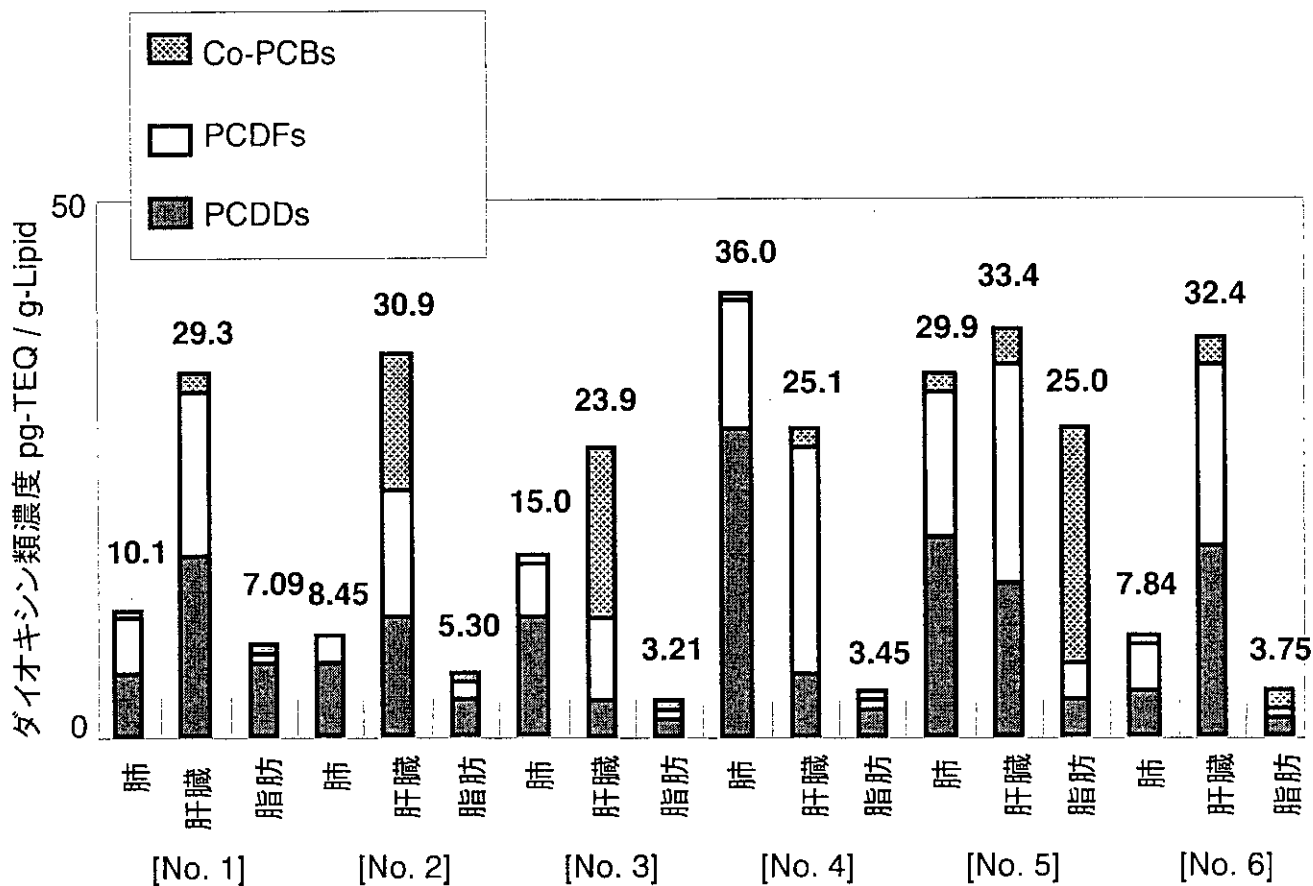


図3. 各組織中ダイオキシン類濃度 (pg-TEQ / g-Lipid)

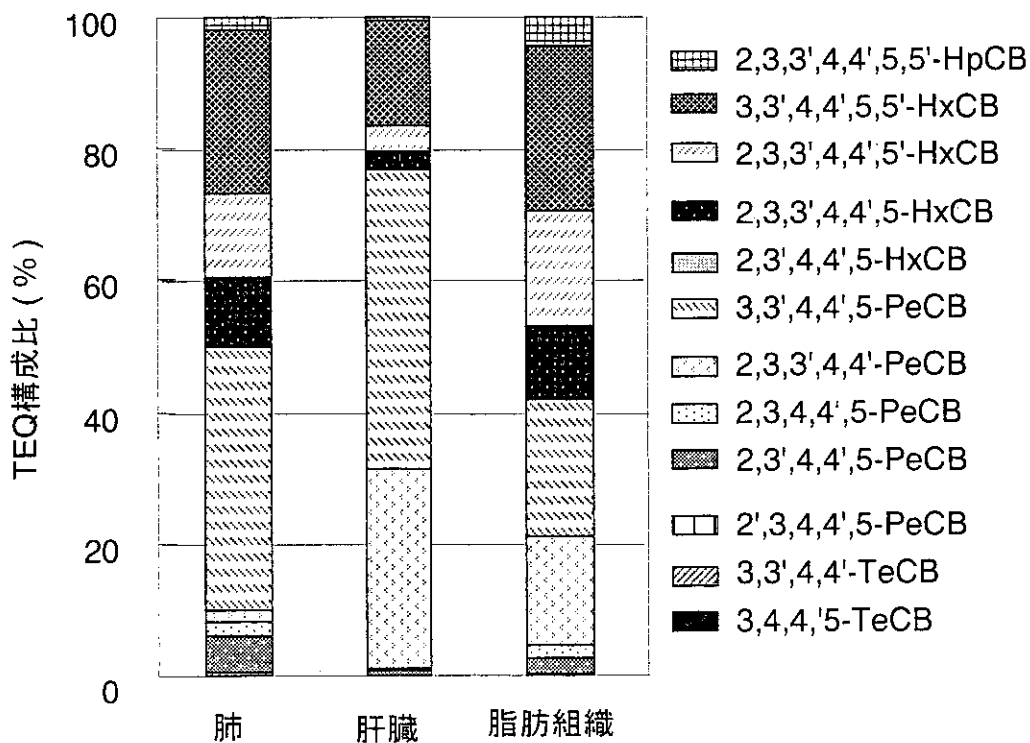


図4. 各組織におけるCo-PCB化合物の平均TEQ構成比

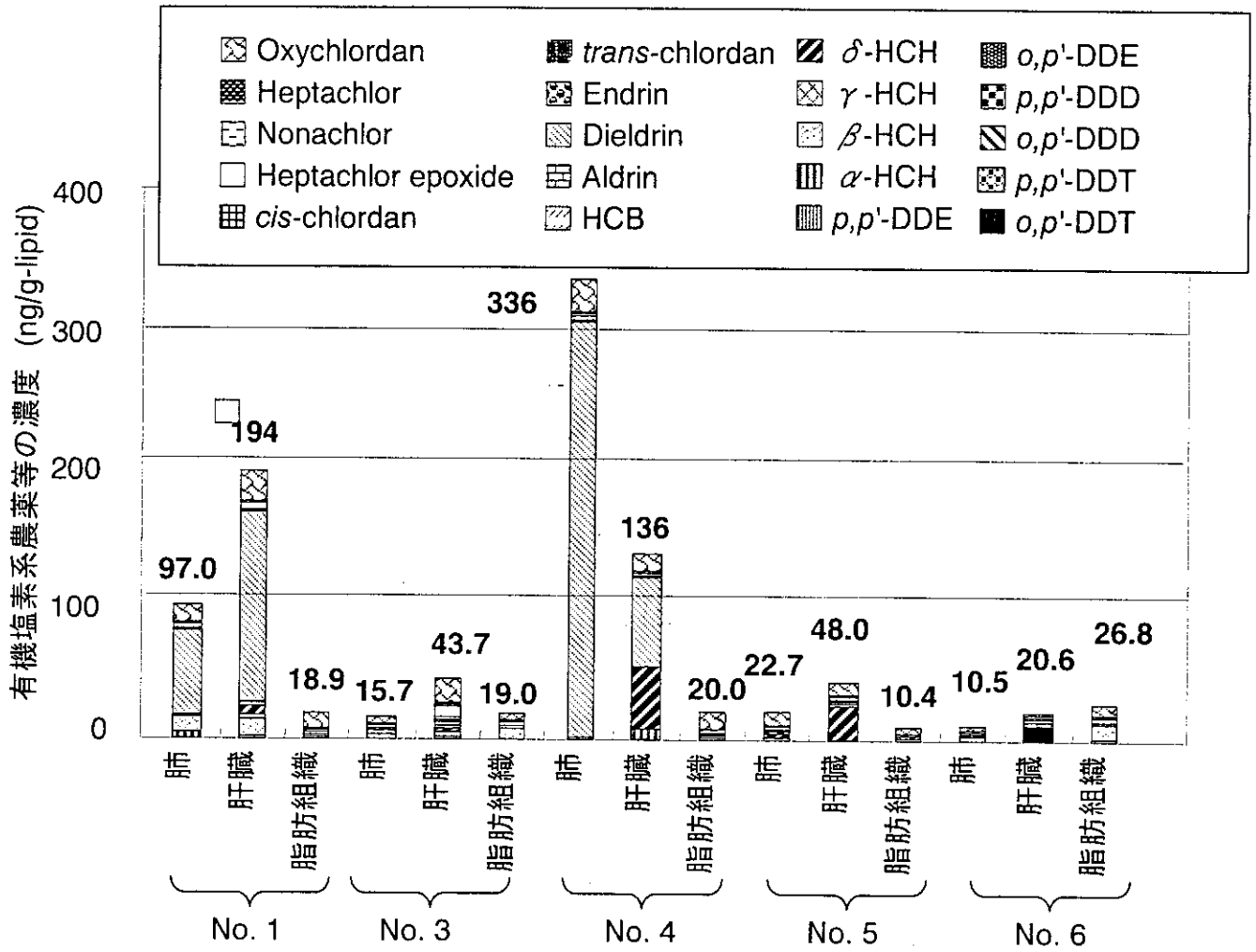


図5. 各組織における有機塩素系農薬等の濃度

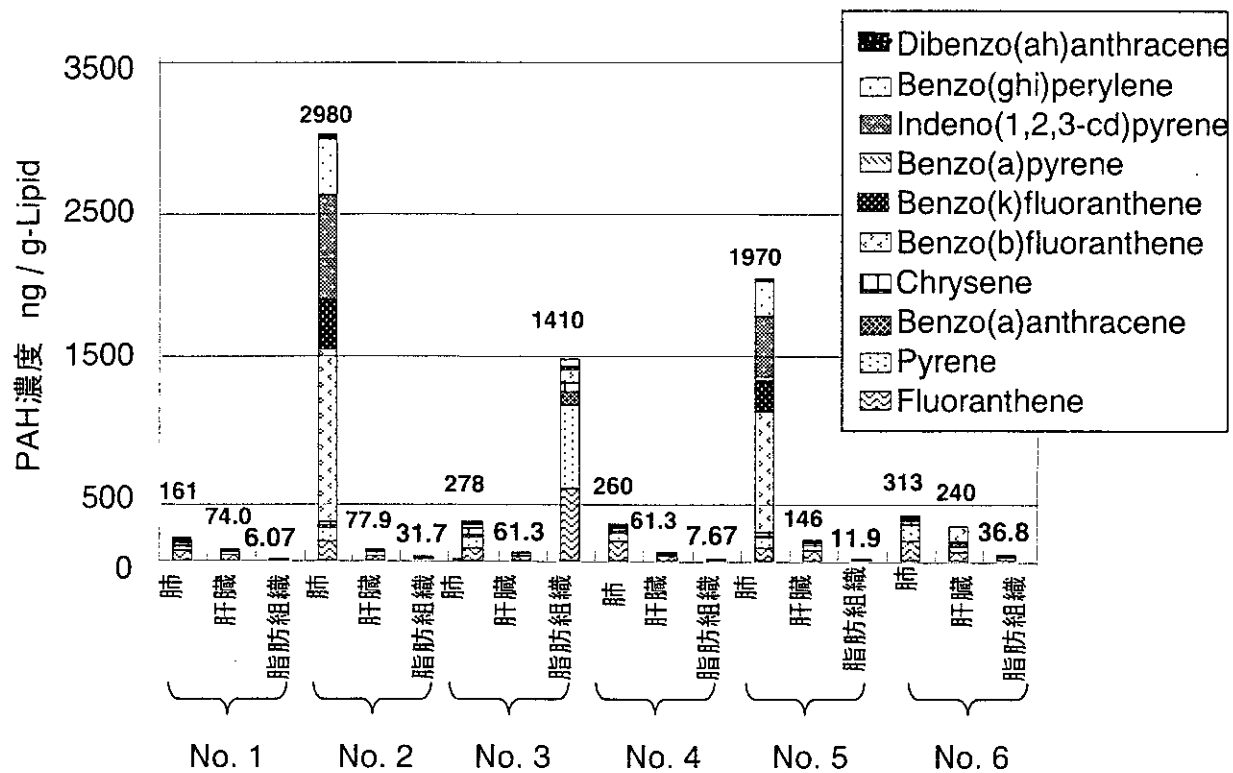


図6. 各組織におけるPAHの濃度 (ng/g-Lipid)

る(図6)。肺臓における蓄積濃度は脂肪ベースで77.3~2,980 ng/gである。No. 3を除くと、肺臓/脂肪組織の蓄積濃度比はNo. 1で26.5倍、No. 2で93.9倍、No. 4で33.9倍、No. 5で165.7倍、No. 6で8.5倍にもなる。同様に肝臓の蓄積濃度も脂肪組織よりも高く、No. 3を除けばその蓄積倍率は2.5倍~12.3倍になる。ダイオキシン類の場合と異なり、PAHsはその主要な人体汚染媒体が大気であるため、肺臓への特異的蓄積傾向を示したものと考えられる。肝臓と脂肪組織の主要成分はFluorantheneおよびPyreneである。肺臓においても同様であるが、No. 2およびNo. 5の2個体の主成分はBebzo(b)fluorantheneとIndeno(1,2,3-cd) pyreneであった。この結果は、これら2固体が生息する大気環境が他の4固体とは異なったPAHs組成により汚染されていることを示唆する。

E. 結論

(a) 前年度で開発した簡易迅速化血液中ダイオキシン類分析法を基礎とした脂肪抽出→硫酸シリカゲル処理による脂肪除去→硝酸銀シリカゲルカラム精製→活性炭分散シリカゲルカラム精製→高分解能GC/MS分析から構成される血液試料を対象とした臭素系ダイオキシン類分析法を開発した。

(b) 犬体内におけるPOPの蓄積パターンを比較することにより、ダイオキシン類の蓄積特性を明らかにした。その結果、大部分のダイオキシン類は肝臓や肺臓の実質細胞と共有結合している可能性が強く示唆された。一方、PAHsに関しては環境内分布を反映して、肺臓に最も多く蓄積していた。

G. 研究発表

- 1) T. Nakao, O. Aozasa, S. Ohta, H. Miyata: Assessment of human exposure to PCDDs, PCDFs and Co-PCBs using hair as human pollution indicator sample I: development of analytical method for human hair and evaluation for exposure assessment, Chemosphere, 48, 885-896, 2002
- 2) T. Nakao, D. Ishizuka, H. Nishimura, O. Aozasa, S. Ohta, H. Miyata, et. al: Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meats and levels in human milk of nursing women in Japan, Chemosphere, 46, 689-696, 2002
- 3) T. Nakao, O. Aozasa, S. Ohta, H. Miyata: Formation of dioxin analogs by open-air incineration of waste wood and by fire of buildings and houses concerning Hanshin Great Earthquake in Japan, Chemosphere, 46, 429-437, 2002
- 4) T. Nakao, O. Aozasa, S. Ohta, H. Miyata: Investigation of PCDD/DF, PXDD/DF, PBDD/DF and nitro-PAH detected on flue gas from waste incinerator, Organohalogen Compounds, 56: 349-352, 2002
- 5) H. Miyata, T. Nakao, H. Ito, K. Nakatsuji, K. Adachi, K. Suguro, M. Hosoya, H. Tsuji, H. Nishimura, N. Higashi, T. Kameko: A new destruction technique for dioxin analogues in landfills and fly ash concerning waste combustion by DCR-Dehalogenation method, Organohalogen Compounds 56: 425-428, 2002

- 6) H. Miyata, T. Nakao, N. Iwata, O. Aozasa, A. Shimamura, S. Ohta: Development of simple and accurate evaluation method on air pollution by dioxin analogues using Japanese black pine needle as an indicator, *Organohalogen Compounds*, 59: 103-106, 2002
- 7) T. Nakanishi, Y. Kobayashi, T. Nakao, H. Miyata: Study of the influence of Co-PCBs in dioxin screening by AH-Immunoassay, *Organohalogen Compounds*, 58: 393-396, 2002
- 8) S. Ohta, T. Nakao, H. Nishimura, T. Okumura, O. Aozasa, H. Miyata: Contamination levels of PBDEs, TBBPA, PCDDs/DFs, PBDDs/DFs and PXDDs/DFs in the environment of Japan, *Organohalogen Compounds*, 57: 57-60, 2002
- 9) O. Aozasa, S. Ohta, T. Nakao, H. Miyata, A. Mochizuki, Y. Fujimine: Variation in blood dioxin level, characteristics of isomer composition, and isomer changes in residents near an incineration facility, *Organohalogen Compounds*, 55: 335-338, 2002
- 10) Y. Fujimine, T. Hirai, A. Mochizuki, Y. Usuki, T. Kodaira, S. Watanabe, H. Miyata: The kinetics of dioxin congeners in human body, *Organohalogen Compounds*, 55: 413-416, 2002

厚生科学研究分担研究報告書

ヒト剖検試料中のダイオキシン類 (PCDD/DFs、Non-ortho-PCBs) 調査

分担研究者 飯田隆雄 (福岡県保健環境研究所 保健科学部長)

研究要旨 日本人体内におけるダイオキシン類の暴露状況を把握し、特定の疾患や病態と蓄積の相関関係を得るための基礎データとすることを目的とし、インフォームドコンセントのもとに、平成 11 年度より 3 年間で 210 例の剖検例について各種臓器、組織が採取された。このうち現在までに血液 (18 件)、胆汁 (15 件)、脂肪組織 (20 件)、肝臓中のダイオキシン類 (PCDD/DFs、Non-ortho-PCBs) の調査が終わった。しかし、未調査の試料は膨大であり効率的かつ正確な迅速分析法が必要である。この目的を達成するためダイオキシン類の試料からの抽出に高速溶媒抽出器 (ASE) による抽と大量溶媒注入装置を装着した GC/MS 測定を組み合わせた高感度迅速分析法を確立した

研究協力者

竹中重幸 (福岡県保健環境研究所 専門研究員)、
戸高 尊 (社団法人 日本食品衛生協会リサーチ
レジデント)、平川博仙 (福岡県保健環境研究所
専門研究員)、中川礼子 (福岡県保健環境研究所
生活化学課長)、飛石和大 (福岡県保健環境研究
所 主任技師)

A. 研究目的

日本人体内におけるダイオキシン類の暴露状況を把握し、特定の疾患や病態と蓄積の相関関係を得るための基礎データとすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 試料

血液試料、血清試料及び手術時採取臓器

2. 試薬

PCDDs (7 種類) および PCDFs (10 種類)、PCB 標準品は前年度と同じ試薬を用いた。その他の試薬はダイオキシン分析用または残留農薬分析用を使用した。蒸留水はヘキサンで 1 回洗浄したものを使用した。

3. 分析方法

3.1. 脂肪の抽出

血液試料：アイソリユートをつめた円筒濾紙を 33ml 抽出管に入れアセトン・ヘキサン (2:1) 40ml を用い 150℃、2000psi で 3 回洗浄した。これに血液 5ml を秤取し、凍結乾燥した。サンプリングスバイク内標準添加後アセトン・ヘキサン (1:3) で抽出した。抽出溶液をナスフラスコに移し、2ml まで濃縮した。秤量瓶に移し、室温で放置し、恒量後、脂肪重量を測定し、脂肪重量とした。ASE 抽出条件を検討するためアセトンとヘキサンの

比率を (1:2)、(1:1) 及び (2:1) に変えて 100℃、1500psi で抽出した。さらに抽出残さにサンプリングスパイク内標準を添加し 150℃、2000psi、アセトン・ヘキサン (1:3) で抽出した。

3.2. クリーンアップ

3.1. で抽出した脂肪に少量のヘキサンを加えて溶解し、濃硫酸 3ml を加え一夜放置した。上清硝酸銀/シリカゲル (1/10、0.5 g) を乾式充填したクロマトカラムに負荷した。その後、ヘキサン 15mL で溶出させ、その溶出液を活性炭 (活性炭/無水硫酸ナトリウム (1/1000)、0.5 g) を乾式充填したクロマトカラムに負荷し、その後、10%ジクロロメタン・ヘキサン 10mL で溶出を行い、第一画分とした。次に、トルエン 25mL で溶出を行い、第二画分とした。PCDD/DFs、Non-ortho-PCBs が含まれる第二画分は濃縮後、ジクロロメタンでガスクロバイアルに移し室温で溶媒を留去し、*n*-ノナンを 10 μ L 加えて残留物を溶解した後、シリジンスパイクを添加し、質量分析用試料液とした。

3.3. GC/MS の分析条件

ガスクロマトグラフ・質量分析計は HP6890 (Hewlett Packard)・Autospec-Ultima E (Micomass) に大量注入装置 (Solvent Cut Large Injection System, SGE 社製) を装着したものを使用した。キャピラリーカラムは SGE 社製 BPX5 (プレカラム: 6m \times 0.25mm i. d.、膜厚 0.25 μ m、分析カラム: 30m \times 0.15mm i. d.、膜厚 0.15 μ m) を用いた。分析条件は注入高温度 300℃、インターフェース温度 280℃、プレカラム温度を 80℃から 320℃まで 1 分間に 20℃の割合で昇温させ、5 分間保持させた。この間に注入された試料の溶媒等不要成分は分析系外に排出され、分析対象成分だけが分析カラムの入り口にトラップされる。GC

オープンを 180℃まで 1 分間に 70℃の割合で降温させ、180℃で 1 分保持後、320℃まで 1 分間に 5℃の割合で昇温、320℃で 2 分間保持した。キャリアーガスはヘリウムを用いた。質量分析計のイオン源温度は 270℃、加速電圧を 8kV とした。

C. 研究結果

表 1 に血清試料 3 件 (5g) 中の PCDD/DFs 及び Non-ortho-PCBs を①ASE 抽出・SCLV 注入法、②従来抽出法・SCLV 注入法の 2 つの方法で分析した結果を示す。この表から明らかなように 2 つの方法での結果はほぼ一致していた。しかし、HpCDD と OCDD は ASE で抽出した方が高い値を示した。表 2 に一般人 5 名の全血試料について①ASE 抽出・SCLV 注入法 (5g 使用)、②従来抽出法・従来注入法 (30g 使用) の 2 つの方法で分析した結果を示す。この表からもわかるように 2 つの方法でほぼ一致した値が得られたが、HpCDD と OCDD は ASE で抽出した方が血清の場合よりさらに高い値を示した。表 3 に ASE 抽出の温度と圧力条件を 100℃、1500psi に緩和し、抽出溶媒の極性をアセトン・ヘキサン (1:2)、(1:1) 及び (2:1) と高くした場合の結果と未抽出量を検討した結果を示す。この結果から 100℃、1500psi という温度と圧力条件では一般に極性をあげてもダイオキシン類は完全には抽出されないようで、抽出残さを温度 150℃、圧力 2000psi の条件を用いて ASE で再抽出すると 10-50%が抽出された。特に、HpCDD と OCDD はアセトン・ヘキサン (2:1) でも 100℃、1500psi では 25-30%程度抽出されない。表 4 にヒト組織の ASE 抽出・SCLV 注入法で行ったダイオキシン類の分析例を示す。

表1. ASE/SCLV法と従来法の比較(血清中ダイオキシン類濃度: Whole Basis)

Congener	血清試料1				血清試料2				血清試料3				ND	TEF	
	ASE/SCLV法(福岡保健研)		従来法(大塚アッセイ研)		ASE/SCLV法(福岡保健研)		従来法(大塚アッセイ研)		ASE/SCLV法(福岡保健研)		従来法(大塚アッセイ研)				
	実測濃度	TEO濃度	実測濃度	TEO濃度	実測濃度	TEO濃度	実測濃度	TEO濃度	実測濃度	TEO濃度	実測濃度	TEO濃度			
1 2,3,7,8-TCDD	0.084	0.084	0.063	0.063	0.052	0.052	0.035	0.035	0.070	0.070	0.07	0.088	0.088	0.031	
2 1,2,3,7,8-PeCDD	0.129	0.129	0.087	0.087	0.012	0.012	0.086	0.086	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.031	
3 1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.071	0.0071	0.084	0.0084	0.061	0.0061	0.061	0.0061	0.051	0.0051	0.0051	0.043	0.0043	0.06	0.1
4 1,2,3,5,7,8-HxCDD	0.29	0.029	0.20	0.02	0.25	0.025	0.16	0.016	0.26	0.026	0.026	0.13	0.013	0.06	0.1
5 1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.13	0.013	0.058	0.0058	0.100	0.01	0.08	0.008	0.094	0.0094	0.0094	0.091	0.0091	0.06	0.1
6 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.79	0.0079	0.47	0.0047	0.870	0.0087	0.34	0.0034	0.66	0.0066	0.0066	0.32	0.0032	0.06	0.01
7 OCDD	9.6	0.00096	3.0	0.0003	9.7	0.00097	2.1	0.00021	7.7	0.00077	3.0	0.0003	0.0003	0.15	0.0001
Total PCDDs	11.1	0.27	4.0	0.19	11.0	0.11	2.9	0.15	8.9	0.23	3.8	0.23	0.23		
8 2,3,7,8-TCDF	0.008	0.001	ND	ND	0.0078	0.001	0.012	0.001	0.008	0.001	0.001	ND	ND	0.03	0.1
9 1,2,3,7,8-PeCDF	0.028	0.0014	0.024	0.0012	0.024	0.0012	0.028	0.0014	0.016	0.0008	0.0008	ND	ND	0.03	0.05
10 2,3,4,7,8-PeCDF	0.140	0.070	0.14	0.070	0.120	0.060	0.11	0.055	0.12	0.060	0.10	0.05	0.05	0.03	0.5
11 1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.570	0.057	0.50	0.05	0.52	0.052	0.30	0.03	0.47	0.047	0.047	0.43	0.043	0.06	0.1
12 1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.440	0.044	0.35	0.035	0.370	0.037	0.25	0.025	0.340	0.034	0.034	0.32	0.032	0.06	0.1
13 2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.023	0.0023	ND	ND	0.021	0.0021	0.024	0.0024	0.018	0.0018	0.0018	ND	ND	0.06	0.1
14 1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.015	0.0015	ND	ND	0.012	0.0012	ND	ND	0.012	0.0012	0.0012	ND	ND	0.06	0.1
15 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.70	0.0070	0.70	0.007	0.710	0.0071	0.51	0.0051	0.59	0.0059	0.0059	0.67	0.0067	0.06	0.01
16 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.042	0.00042	ND	ND	0.043	0.00043	ND	ND	0.0350	0.00035	0.00035	ND	ND	0.06	0.01
17 OCDF	0.011	0.0000011	ND	ND	0.0090	0.0000090	ND	ND	0.012	0.0000012	0.0000012	ND	ND	0.15	0.0001
Total PCDFs	2.0	0.18	1.7	0.16	1.8	0.16	1.2	0.12	1.6	0.15	1.5	0.13	0.13		
18 3,4,4',5-TCB(#81)	0.028	0.00	ND	ND	0.024	0.00	ND	ND	0.029	0.00	0.00	ND	ND	0.3	0.0001
19 3,3',4',4'-TCB(#77)	0.110	0.0000011	0.07	0.000007	0.13	0.0000013	0.020	0.0000020	0.23	0.000023	0.000023	0.18	0.000018	0.3	0.0001
20 3,3',4',4',5-PeCB(#126)	0.320	0.032	0.38	0.038	0.24	0.024	0.19	0.019	0.26	0.026	0.026	0.300	0.030	0.3	0.1
21 3,3',4',4',5,5'-HxCB(#169)	0.331	0.000331	0.26	0.0026	0.34	0.0034	0.14	0.0014	0.330	0.0033	0.0033	0.22	0.0022	0.3	0.01
Total Non-ortho PCBs	0.79	0.035	0.71	0.041	0.62	0.027	0.35	0.020	0.85	0.029	0.029	0.70	0.03		
Total PCDD/DFs	13	0.46	5.7	0.35	13	0.28	4.1	0.27	11	0.38	5.3	0.36	0.36		
Total PCDD/DFs+Non-Ortho PCBs	14	0.49	6.4	0.39	13	0.30	4.4	0.30	11	0.41	6.0	0.39	0.39		

表2. ASE抽出・SCLV注入法と従来法の比較(全血中ダイオキシン分析: Lipid basis)

Congener	全血試料1		全血試料2		全血試料3		全血試料4		全血試料5	
	ASE	従来法	ASE	従来法	ASE	従来法	ASE	従来法	ASE	従来法
2.3.7.8-Tetra-CDD	2.4	3.0	2.0	1.6	ND	1.0	1.5	1.5	ND	ND
1.2.3.7.8-Penta-CDD	9.7	12	5.8	7.1	3.4	4.1	5.8	6.2	3.3	4.8
1.2.3.4.7.8-Hexa-CDD	4.7	5.1	3.1	2.8	2.4	1.7	2.4	2.7	2.3	2.6
1.2.3.6.7.8-Hexa-CDD	39.	56.	18.	22.	11.	13.	15.	17.	13.	14.
1.2.3.7.8.9-Hexa-CDD	6.9	9.0	4.7	4.3	2.6	2.4	2.8	3.0	3.1	2.2
1.2.3.4.6.7.8-Hepta-CDD	84.	40.	66.	20.	68.	16.	51.	14.	62.	13.
OCDD	910.	414.	630.	141.	650.	122.	480.	124.	560.	117.
2.3.7.8-Tetra-CDF	1.1	1.8	ND	1.2	ND	ND	ND	ND	ND	1.3
1.2.3.7.8-Penta-CDF	0.84	1.2	ND	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2.3.4.7.8-Penta-CDF	14.	21.	11.	15.	6.2	6.8	8.3	11.	7.1	6.6
1.2.3.4.7.8-Hexa-CDF	5.4	7.6	4.1	6.7	2.6	3.4	3.1	4.7	2.6	3.1
1.2.3.6.7.8-Hexa-CDF	5.1	7.4	6.1	7.9	3.2	4.1	4.4	5.6	3.0	4.0
1.2.3.7.8.9-Hexa-CDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.4	ND	ND
2.3.4.6.7.8-Hexa-CDF	2.0	3.0	2.5	3.9	ND	ND	2.1	ND	ND	ND
1.2.3.4.6.7.8-Hepta-CDF	2.2	4.4	3.8	6.7	2.8	4.4	2.6	4.1	2.9	5.3
1.2.3.4.7.8.9-Hepta-CDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3.3'.4.4'-Tetra-CB (#77)	12.	15.	11.	16.	ND	ND	ND	ND	ND	12.
3.4.4'.5-Tetra-CB (#81)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3.3'.4.4'.5-Penta-CB (#126)	140.	187.	36.	55.	18.	22.	31.	41.	ND	18.
3.3'.4.4'.5.5'-Hexa-CB (#169)	57.	79.	41.	55.	27.	29.	41.	57.	29.	36.

ASE抽出・SCLV注入法は全血5g使用
従来法全血30g使用

表3. ASEによる全血中ダイオキシン類抽出条件検討 (Whole Basis)

Congener	試料1 (pg/g)			試料2 (pg/g)			試料3 (pg/g)			ND	TEF
	1回目(1:2)	2回目(2:1)	合計	1回目(1:1)	2回目(2:1)	合計	1回目(2:1)	2回目(2:1)	合計		
	1 2,3,7,8-TCDD	0.0094	0.0024	0.012	0.0090	0.0025	0.012	0.0087	0.0008		
2 1,2,3,7,8-PeCDD	0.030	0.0066	0.036	0.032	0.0057	0.038	0.028	0.0066	0.035	0.003	1
3 1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.016	0.0052	0.021	0.017	0.0027	0.019	0.017	0.0028	0.020	0.005	0.1
4 1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.113	0.032	0.145	0.122	0.020	0.142	0.118	0.018	0.136	0.005	0.1
5 1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.022	0.0065	0.029	0.023	0.0036	0.027	0.022	0.0034	0.025	0.005	0.1
6 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.16	0.13	0.28	0.20	0.08	0.29	0.21	0.07	0.29	0.005	0.01
7 OCDD	1.3	1.3	2.6	1.4	1.1	2.5	2.0	0.86	2.8	0.01	0.0001
Total PCDDs	1.7	1.9	3.6	2.0	1.6	3.6	2.7	1.3	4.0		
8 2,3,7,8-TCDF	0.0071	0.0035	0.011	0.0066	0.0039	0.011	0.0074	0.0055	0.013	0.003	0.1
9 1,2,3,7,8-PeCDF	0.0053	0.0035	0.0088	0.0050	0.0028	0.0077	0.0053	0.0032	0.008	0.003	0.05
10 2,3,4,7,8-PeCDF	0.063	0.0151	0.078	0.064	0.013	0.077	0.065	0.010	0.076	0.003	0.5
11 1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.027	0.0010	0.029	0.031	0.007	0.037	0.029	0.006	0.036	0.005	0.1
12 1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.022	0.0084	0.031	0.025	0.005	0.030	0.027	0.005	0.032	0.005	0.1
13 2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.009	0.0029	0.012	0.010	0.003	0.013	0.010	0.003	0.013	0.005	0.1
14 1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.002	0.0007	0.003	0.001	0.001	0.003	0.001	0.002	0.003	0.005	0.1
15 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.012	0.0059	0.018	0.014	0.004	0.018	0.017	0.003	0.020	0.005	0.01
16 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.0016	0.0014	0.0030	0.0020	0.000	0.0022	0.002	0.000	0.003	0.005	0.01
17 OCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.0001
Total PCDFs	0.15	0.042	0.19	0.16	0.040	0.20	0.16	0.038	0.20		
18 3,4,4',5'-TCB(#81)	0.018	0.008	0.026	0.015	0.006	0.021	0.015	0.006	0.021	0.03	0.0001
19 3,3',4',4'-TCB(#77)	0.224	0.116	0.340	0.082	0.037	0.119	0.092	0.043	0.135	0.03	0.0001
20 3,3',4',4',5'-PentCB(#126)	0.345	0.066	0.411	0.344	0.046	0.390	0.329	0.049	0.378	0.03	0.1
21 3,3',4',4',5,5'-HexCB(#169)	0.166	0.039	0.204	0.169	0.025	0.194	0.167	0.023	0.191	0.03	0.01
Total Non-Ortho PCBs	0.75	0.23	0.98	0.61	0.11	0.72	0.60	0.12	0.73		
Total PCDD/DFs+Non-Ortho PCBs	2.6	0.23	2.8	1.2	0.22	1.4	1.2	0.17	1.4	0.03	0.0001
Total PCDD/DFs+Non-Ortho PCBs TEQ	0.13	0.031	0.16	0.14	0.025	0.16	0.13	0.023	0.15	0.03	0.0005

1回目の抽出はASEの温度100°C、圧力1500psiの条件で行い、抽出溶媒として試料1はアセトン/ヘキサン(1:2)を、試料2はアセトン/ヘキサン(1:1)を、試料3はアセトン/ヘキサン(2:1)を用いた。
 2回目の抽出は試料1から3の抽出残さに内標準を加えASEの温度150°C、圧力2000psiの条件で抽出溶媒としてアセトン/ヘキサン(1:3)を用いて再抽出した。

表4. ヒト臓器・組織中ダイオキシン類の分析例 (pg/g lipid)

Congener	胃癌部		胃正常部		腎癌部		腎正常部		右腎臓周囲脂肪		血液	
	濃度	検出率	濃度	検出率	濃度	検出率	濃度	検出率	濃度	検出率	濃度	検出率
2,3,7,8-TCDD	23.		2.2		13.		17.		2.5		2.6	
1,2,3,7,8-PeCDD	51.		11.		24.		38.		12.		19.	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	18.		3.4		6.2		17.		3.1		4.2	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	122.		48.		76.		77.		42.		53.	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	24.		3.9		12.		27.		3.2		6.7	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	47.		25.		94.		124.		14.		60.	
OCDD	776.		230.		412.		707.		186.		1174.	
Total PCDDs	1061.		324.		637.		1005.		264.		1319.	
2,3,7,8-TCDF	17.		1.6		6.6		24.		1.5		3.5	
1,2,3,7,8-PeCDF	26.		1.1		9.		13.		0.9		2.6	
2,3,4,7,8-PeCDF	515.		21.		305.		433.		175.		211.	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	123.		32.		55.		108.		27.		42.	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	41.		13.		20.		34.		12.		24.	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	9.4		2.6		7.		3.5		2.1		3.5	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	23.		9.2		13.		8.2		2.3		6.3	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	16.		1.7		5.		13.		1.8		2.6	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	11.		0.2		5.8		15.		0.2		0.9	
OCDF	67.		0.4		2.9		15.		0.3		1.9	
Total PCDFs	848.		83.		429.		667.		223.		298.	
3,4,4',5'-TCB (#81)	39.		5.3		7.		34.		5.		7.7	
3,3',4',4'-TCB (#77)	152.		7.8		32.		108.		4.4		22.	
3,3',4,4',5-PenCB (#126)	232.		127.		162.		202.		115.		111.	
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	293.		241.		223.		256.		222.		211.	
Total Non-ortho PCBs	716.		381.		424.		600.		346.		352.	
Total PCDD TEQ	91.		19.		48.		68.		19.		28.	
Total PCDFs TEQ	281.		16.		163.		235.		92.		114.	
Total PCDD/DFs TEQ	372.		36.		211.		303.		111.		142.	
Total Non-ortho PCBs TEQ	26.		15.		18.		23.		14.		13.	
Total PCDD/DFs+Non-ortho PCBs TEQ	372.		51.		230.		326.		125.		155.	
Lipid (%)	0.75		28.		1.7		0.34		64.		0.43	

D. 考察

ASE抽出(温度150℃、圧力2000psi)で血液、血清から効率よくPCDD/DFs及びNon-ortho-PCBsが抽出できた。さらに、SCLVを使用することにより高感度で迅速な分析が可能になった。ASE抽出では従来法と比べてHpCDD及びOCDDが高濃度になる傾向が明らかになったが、両者は毒性等価係数(TEF)が、それぞれ、0.01及び0.00001と小さいので全体のTEQ濃度はほとんど変わらない。HpCDDとOCDDが高濃度なる原因として、ASE抽出時にHpCDDについてはOCDDが分解すること、さらに、OCDDについて共存物質からOCDDが生成することが考えられる。しかし、ASE抽出は環境試料のダイオキシン分析ではすでに多くの報告がありOCDDの分解によるHpCDDの生成、共存物質からのOCDDの生成は報告されていない。また、¹³CラベルしたOCDD内標準物質が分解によって大きくは変化していないこと、さらに、緩和なASE抽出条件(温度100℃、圧力1500psi)で抽出溶媒の極性をあげる(アセトンの比率を増す)ことによりHpCDD及びOCDDが高くなること等を考えると、試料中に残っていたHpCDD及びOCDDがASE抽出(温度150℃、圧力2000psi)で完全に抽出されるという可能性もあり今後の検討課題である。

E. 結論

アセトン・ヘキサン(1:3)でASE抽出(温度150℃、圧力2000psi)することにより血液、血清から効率よくPCDD/DFs及びNon-ortho-PCBsが抽出でき、血中脂質含量も従来法と一致した値が得られた。さらに、SCLVを使用することにより高感度で迅速な分析が可能になった。ヒト臓

器・組織に対しても応用できることが示唆された。

G. 今後の予定

ASE抽出・SCLV注入法はヒト臓器中ダイオキシン分析にも応用できることが示唆された。今後、血液のみならず臓器・組織についても従来法との同等性を検証する。

15年度は腎臓(20)、脾臓(18)、膵臓(18)、肺(18)、腹壁脂肪(10)、項部脂肪(14)、腋窩脂肪(7)、骨髄(20)、乳腺(2)、上行結腸粘膜(11)、胃体部粘膜(9)、下垂体(3)、脳(3)の153試料についてダイオキシン類を測定する。