

厚生労働科学研究費補助金研究  
(食品安全確保研究事業)

【 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15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16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 9  
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  
の確立と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 101  
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 115  
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 185
- 研究成果の刊行物・別刷 187

厚生労働科学研究費補助金研究（食品安全確保研究事業）

「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15年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

タ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善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の検査結果の信頼性保証担保システム構築の重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遺伝子組換え食品検査等の検査データの信頼性保証を担保するため、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、ダイオキシンならびに食品衛生検査における検査法の開発、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データや資料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 生体試料中タ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（大阪府立公衆衛生研究所所長）、  
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

タ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  
ヒト体内曝露による国民健康への影響が懸  
念されている。したがって、これらの化学物  
質の生活環境からの一日も早い低減化なら  
びに環境改善の実施と加えて、経年的かつ  
長期的なモニタリング調査が必須とされる。  
一方、規制緩和策を受け環境汚染化学物質  
の検査を目的とした民間検査機関の増設に  
伴い急増し、これら関連の検査機関から出

される検査結果の信頼性保証確保に対する厳しい対応が望まれる。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遺伝子組換え食品検査等も含め、出力される検査データの信頼性保証を担保するためには、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 1) ダイオキシン類と類似毒性を示すヘキサクロロベンゼン(HCB)とダイオキシン類化合物の系統分析およびその総合的毒性評価を行った。2) ベビーフード中ダイオキシン類の分析とその摂取量評価について検討した。2. 織田分担研究 1) 実試料(粉乳および血清試料)測定時の分析化学的問題への対処事項を検討し、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ついて補足、改定した。2) 粉乳と血清試料を用い、試料少量化の分析法を検討し、マニュアルを作成した。3) 臭素化ダイオキシン類混合物標準液を用いてGC測定条件の適否と検出感度の確認と前処理条件についてマニュアルの追加・修正を行った。3. 米谷分担研究 1) 市販の茶を粉碎し、混合した調査試料を作製し、分析機関(8機関)での技能試験を実施した。2) ボラ可食部分の凍結乾燥試料を用い、試験者

2名について9カ月間にわたり内部精度管理調査を実施した。4 松木分担研究 1) ダイオキシンELISAキットワコー(キットM 和光純薬工業)とイムノエコDXN(キットP コスモ石油)を用い、それぞれ8検査機関でのバリデーションを試みた。2) 臭素化ダイオキシンモノクローナル抗体を用い、PBDD/FsについてのELISA法を構築した。3) 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法の培地条件や温度条件の適切性についての検証ならびに理化学検査における実食材調査試料作製を行った。4) 安全性審査承認済みサイズの外部精度管理調査の実施と調査試料の長期安全性の確認のための基礎検討を行った。5) 貝毒検査の外部精度管理調査のための調査試料作製における基礎的検討を行った。

## C. 結果

1 中澤分担研究 1) 母乳試料を用い、HCBと主な有機塩素系農薬を分画法を確立し、測定した結果、HCB添加牛乳での回収率は68.1% (n=4)であった。母乳試料のHCBをHRGC/MSにより測定した結果、33.9 ng/g fatであった。2) ベビーフードを6種の食品カテゴリーに分類し、ダイオキシン含量を測定した。食品の摂取量を設定し、ダイオキシンの1日摂取量を算出した結果、0.06 pg~1.2 pg TEQ/kgbw/dayであった。2. 織田分担研究 1) 7機関での母乳試料中塩素化ダイオキシン測定操作マニュアルの妥当性の確認を行った。脂肪濃度は240 mg/牛乳粉末 (n=7)であった。7機関での試料中ダイオキシン測定濃度はすべての類縁化合物について、配布した試料中

ダイオキシン濃度（保証値）より若干低い値を示した（PcDDs 82～94%、PcDFs 53～94%、1,2,3,7,8-PeCDF 53%）。同一試料3回測定における機関間変動係数は、大部分の類縁化合物質では30%以内であった。また、機関内変動は20%以内であった。内部標準物質の回収率は35～134%であった。2）血漿中塩素化ダイオキシン類測定マニュアル従って脂肪濃度を酵素法により測定した結果、一部の機関を除いて、ほぼ正確に抽出されていた。各ダイオキシン類濃度の機関間測定値の変動係数は、30%を超えるものもあったが、TEQ換算値でみるといずれも変動係数は20%以内で、再現性は良好と判断された。機関内変動は良好であった。一部の類縁物質については操作ブランク値が定量下限目標値を上廻り、かつ試料中濃度の1/10を超える結果が得られ、何らか操作上の汚染が懸念された。内部標準物質の回収率は良好であった。3）血清試料と粉乳試料ではおおむね少量注入法でも従来法とほぼ同等のダイオキシン値が得られた。血清脂質濃度は従来法のおおよそ1/2と低かったが、粉乳試料ではほぼ同等の値が得られた。4）母乳臭素化ダイオキシン類測定のマニュアル作成において数種の測定標準物質の目標定量下値を設定した。検査に用いる分析試料量は50～100gとした。分析前処理操作は基本的には塩素化ダイオキシンに準じることとした。検出下限について各機関の値を比較したところ、機関により1～2桁オーダの違いが認められ、再度、検討が必要となった。分析条件も新たに設定した。母乳試料について4～6臭素化ダイオキシン類を測定した結果、2,3,7,8 TeBDFが主成分であり、そ

の他、PBDDs成分が検出された。3．米谷分担研究 1）茶試料を用い、8ヶ所のダイオキシン検査機関を対象に技能試験を実施し、結果を回収、解析中である。2）試験者2名（A、B）について、昨年度作製したボラ可食部凍結乾燥試料を用い、内部精度管理を実施した結果、昨年度の技能試験結果より両者とも若干高いTEQ値を示した。また、両者の分析精度にはいくぶん差が認められ、測定濃度のRSDは試験者Aでは58%、試験者Bでは74%であった。また、TEQについての検査機関間におけるRSDは71%であった。個々の異性体ごと測定結果に両者で有意差は認められなかったが、Co PCBでは差が認められた。一方、4週間隔、10回測定時の両試験者のデータについて各異性体濃度及びTEQをzスコア化した結果、特に系統的な変化は見られず、今回用いた魚試料は内部精度管理試料として適用可能であることが示された。4．松木分担研究 1）昨年度使用したモノクローナルの抗体を用いたELISAキットMを用い、標準品添加牛乳試料での再現性を調べた結果、参加機関間再現性が良好であることが確認された。併行して実施したELISAキットP（ポリクローナル抗体）では、各検量線濃度における機関内の吸光度のRSDは1～10%（その多くは5%以内）であり、機関間のRSDは若干大きいものの各機関の検量線の相関係数はいずれも0.99以上を示し、精度が良好であることが確認された。3濃度の標準品測定時のキットPでの機関間のRSDはそれぞれ43%、32%および31%、また、機関内変動はそれぞれ14%、12%、および20%以内であった。また、各機関の測定結果は理論値に近

似していた。精製バター試料 3 濃度についてキット P を用いて測定した結果、各濃度試料の機関内 RSD はそれぞれ 27%、13% および 9% であり、各測定値は理論値と近似していた。ブランク試料と標準添加牛乳試料では、キット M における機関内 RSD はブランクで 83%、添加試料で 73% と大きかったが、機関内 RSD はそれぞれ 3% および 23% と良好であった。キット P では、機関内 RSD は、59% および 53% であり、機関間 RSD はそれぞれ 24% および 17% であった。

2) 昨年度作製したポリ臭素化ダイオキシンモノクローナル抗体を用い、ELISA 法を確立した。

3) 食品衛生微生物検査では、大腸菌 10 種について異なる培養条件でガス産生能について比較した結果、24 時間培養でガス産生を示す菌種では 10<sup>7</sup> cfu/mL 以上の生菌の存在の必要性があること、また、ガス産生が認められない菌種では接種菌の発育を認めないか、増殖してもガス産生に十分な菌量に達していないことが確認された。増殖の経時変化とガス産生について比較した結果を併せるとガス産生能を検出指標とする場合、大腸菌種は 3 グループに分けられることが判明した。理化学検査では、均質性および安定性に優れた数種の添加試料を作製し、平成 15 年度の外部精度管理調査に供した。濃度の異なるカビ毒（デオキシニバレソールおよびニバレノール）汚染小麦 2 種を用いてカビ毒検査の外部精度管理調査用試料を作製した結果、均質でかつ目的濃度に調製された汚染小麦試料の作製が可能となった。

4) 安全性審査済みの遺伝子組み換えダイズ試料を用い、外部精度管理調査を行った結果、ELISA 法に参加した 17 機関の測定結果は

混合重量比 1% および 5% 試料のいずれも重量混合比に近似した値が得られた。定量 PCR 法に参加した 22 機関の測定結果は、低濃度、高濃度試料とも重量混合比よりも低い値が得られた。ダイズ調査試料から 2 日間にわたって DNA 抽出を行い、指標波長を 260 nm と 280 nm の吸光度測定により、吸光度比および収量を求めた結果、機関内の RSD は比較的良好であったが、測定結果に日差が認められ、抽出 DNA の品質の違いによる差と判断された。

#### D. 考察

1. 中澤分担研究 1) 最近の研究では、HCB の Ah レセプターへの結合力から、HCB 毒性等価係数 (TEF) は、0.0001 に相当するといわれており、この数値を既に測定したダイオキシン類の TEQ (I-TEF を用いて計算) に加味すると、およそ 16% (平均値) の TEQ の増加となることがわかった。したがって、ダイオキシン類の毒性評価においては、母乳を普遍的に汚染している HCB の毒性を無視できないことが確認された。さらに、母乳はヘプタクロルエポキサイド、β-HCH、DDEs などの有機塩素系農薬によっても高濃度に汚染されていることが分かり、今後貴重な生体試料を用いて HCB に加え、ダイオキシン類似毒性を有する環境汚染化学物質を同時に測定する試みは重要であると考えられる。

2) ベビーフード摂取調査では、体重当たりの 1 日摂取量が 12 pg TEQ/kgbw /day (ND=定量下限値×1/2 で算出) であったが、この値は我が国がダイオキシン摂取量に対して定めた耐容 1 日摂取量 (TDI Tolerable Daily Intake) の 4pg と照らし合わせた場合、十分に下回ってお

り、また、厚生労働省がこれまでに行ってきた一般成人を対象としたトータルダイエツトスタディによる食品からのダイオキシソ類1日摂取量調査(平成9年度から13年度)の値(1.45~2.41pg TEQ/kgbw /day)よりも下回っていることから、市販ベビーフードからのダイオキシソ摂取量は直ちに問題になる量ではないと考える。

## 2. 織田分担研究

1) 粉乳のクロスチェックでは、各研究機関間の変動係数が一部の物質で0.3を超えた。この原因は標準品の差異と共にGC/MSでのピーク面積の求め方(ピークに対するベースラインの取り方)にあると考えられる。他の主物質の毒性等量の変動はPCDDs/PCDFsおよびCo PCBsではそれぞれ0.17および0.19と良好な結果であり、現行マニュアルにより再現性のある測定ができることがわかった。

2) 血清のクロスチェックでは、研究機関間の変動係数が一部の物質で0.3を超えた。原因としては、ブランク値による底上げが考えられたが、物質によってはそれだけでは説明できなかった。ただし、毒性等量については、研究機関間の変動係数は0.2以下であり、現行の測定マニュアルにより再現性のある測定ができることがわかった。また、操作ブランク値については、マニュアルで定める定量下限目標値を上回り、かつ試料中濃度の1/10を超えるケースが、一部機関で見られ、何らかの汚染の影響と考えられた。血清中のダイオキシソ類濃度は非常に低いので、高濃度試料の分析に用いた器具とは別の器具を使用するなど、汚染防止が不可欠である。脂質測定については、脂質1g中のダイオキシソ類量として試料中濃度を表示する場合は、大きな誤差の要因となるこ

とがわかった。

3) 血清および粉乳試料について少量注入法の可能性が示され、マニュアル化した。

4) 母乳中の臭素化ダイオキシソ類の測定については、前処理条件および測定条件の追加・修正を行うとともに具体的な例を測定マニュアル案に取り入れた。現段階ではより完成度の高い「母乳中の臭素化ダイオキシソ類分析マニュアル案」が策定されたと考える。また、若干例の母乳試料を分析し、実際の母乳中の臭素化ダイオキシソ類の組成およびレベルの概要を把握した。これにより、次年度の各協力研究機関間クロスチェックおよび測定マニュアル案の検証および評価が実施できるものとする。

## 3. 米谷分担研究

1) 茶試料での技能試料については現在解析中である。

2) 昨年度作製したボラ試料を用い、試験者2名について内部精度調査を実施した。昨年度の技能試験で得られた結果では、TEQは7.32pg/gであり、今回実施した試験者AのTEQの平均は8.04pg/g、Bは7.81pg/gと両者ともやや高かった。2名の試験者の結果の有意差の有無についても吟味した。各異性体の濃度の分散についてF検定を行った結果、1,2,3,7,8-PeCDFと2,3,4,6,7,8-HxCDFにおいて、試験者Bの分散が有意に大きい結果となった。他の異性体については有意差はなかった。さらに、各異性体濃度の平均値についても検定を行った結果、1,2,3,4,7,8-HxCDFと2,3,4,6,7,8-HxCDFについては、試験者Bが有意に高い値となり、他の異性体については有意差は見られなかった。一方、Co-PCBでは12異性体中、試験者Aの方が小さい測定値を出したのは1回のみであった。この確率は0.003であり、0.01よりも



小さいので、99%の確率で平均値は試験者Aの方が大きいことが示された。RSD については、試験者Aが小さい値を出したのは2回であり、この確率は0.019ということから、試験者BのRSDが有意に大きい結果となった。10回の各異性体濃度及びTEQをz-スコア化して比較した結果、スコアが徐々に上昇あるいは下降するような、系統的な変化は見られず、今回用いた凍結乾燥魚試料が、内部精度管理試料として適用可能であることが示された。しかし、mono-ortho Co-PCBのz-スコアはいずれの試験者においても全ての異性体がほぼ同じ値となり、系統的な変動が現れた。また、試験者2人の間でも、ほぼ類似したハターンが現れている。このように同じ変動パターンが現れる原因としては、検量線作成時と測定時でGC/MS測定RRFが変動しているか、添加する内部標準の濃度が変動しているということが考えられる。さらに、mono-ortho Co-PCB類はnon-ortho Co-PCBよりも濃度が高いにも関わらず、高いRSDを示しており、mono-ortho Co-PCBには、他の物質とは異なる変動要因が存在することが示唆され、このような変動の原因を特定し除去することにより、mono-ortho Co-PCB類のRSDがnon-ortho Co-PCB類と同程度またはそれ以下になると期待できる。

#### 4. 松木分担研究

1) マウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体を用いたダイオキシンELISAキットを開発し、ダイオキシン標準品、標準品添加精製バターおよび標準品添加牛乳を共通試料として9機関でバリデーション試験を行い、ダイオキシン類のモニタリング法およびスクリーニング法としての有用性を評価した。その結果、い

ずれの試料についても測定機関間変動はやや大きかったものの、測定機関内変動はおおむね20%以下と小さく、簡易測定法として満足できるものであった。両キットとも操作が簡便で多検体が同時に測定できるうえ、測定内変動が比較的小さく、また試料中濃度順位が逆転することなく再現されたことから、安価な簡易測定法としてダイオキシン類のスクリーニング法およびモニタリング法となることが示された。現在、両キットとも生体試料だけでなく、土壌や底質など環境試料や食品も測定できる前処理法を検討し、適用範囲を広げ、検討を行っている。

2) 昨年度作製したモノクローナルの抗体の中から感度、交差性の観点で選択したB6 11は、毒性が強いと考えられている四または五塩素化、臭素化、塩素・臭素混合型PBDD/Fsと反応性が高いことから、本抗体を用いるELISA法は、総ダイオキシン類の毒性等価を評価する時の簡便なスクリーニング法またはモニタリング法として使用できることが示された。

3) 食材カテゴリーを指定し、公定法を採用し、精度管理を行う場合には調査試料に添加される試験菌種がどのような標準菌株であるかは大きな問題となる。今回の結果で示したように、培養条件の適性により、試験対象となる大腸菌の生育は3グループに大別される。したがって調査時に採用される検査手順の違いにより大腸菌が存在していても陰性と報告する結果がありうるということが確認された。また、発生するガスは対数増殖期から静止期 衰退期へと移行する段階で十分な量蓄積されるものと考えられ、培地中での菌数が一定数以上に達しないとガス産生による判定が困難となることか示され

た。今回得られた結果を踏まえ、精度管理調査においては、標準菌株として確実に検出されるものをまず優先すること、また、日常の食品検査では様々な性状を持つ大腸菌が、検査対象となっているのも事実であり、試験菌株の選択に付いては外部精度管理調査の目的によって使い分けることが必要であると考え。 4) 汚染米試料作製については、高濃度米にカドミウム無添加白米を加え、遠心粉砕機で粉砕・混合する方法により、にんじんペースト試料作製については、水蒸気処理後のにんじんペーストに有機リン系農薬を添加することにより、また、液卵試料作製については、フルベンダゾールを添加することにより、それぞれ目的濃度の均一な調査試料が作製できた。さらに、カビ毒汚染小麦を用い、遠心粉砕機で粉砕・混合する方法により、カビ毒検査調査試料の作製が可能となった。 5) 麻痺性貝毒検査調査においては、天然サンプルを用いるため陽性サンプルの大量確保と活性を保持したまま長期保存法の確立や試料の均質化が今後の検討課題と考えられ、また、下痢性貝毒検査調査においては、HPLC を用いたオカダ酸の定量方法の開発と、精度管理用検体として安定した活性が得られるオカダ酸の最適添加量の見極めが重要と思われる。その他オカダ酸が保存中や輸送中の安定性や精製操作中熱分解等についての検討も必要と思われる。一方、遊離脂肪酸の毒性については、試料保存中や輸送中の遊離脂肪酸の増加と毒化との関連について調べるのが重要と思われ、今後、遊離脂肪酸の微量分析法の確立が急務と思われる。 6) 遺伝子組換えダイズの外部精度管理調査においては、ELISA 法の測定

値は高濃度でやや高値を示したものの、混合重量比に近い測定結果であり、一方、定量 PCR 法では DNA 抽出法ごとに集計を行ったところ、抽出の仕方により結果が異なることから、定量 PCR 法では、DNA 抽出法の違いが測定値に影響を与え、混合重量比よりも低い測定結果が示されたものと考えられた。また、調査試料の安定性確認のための基礎実験を行った結果、同一 DNA 試料を繰り返し測定したときの定量 PCR のラン内およびラン間の RSD は最大 10%程度であり、一方 8 抽出試料の DNA を  $n=1$  で同時に測定した時のラン内の RSD は 25%以上と、同一 DNA 試料を繰り返し測定したときの RSD よりも大きく、さらに、抽出日別に DNA 量を比較すると、その収量ならびに定量 PCR により得られた *Lel* のコピー数にも差が認められた。したがって、DNA の品質が定量値 (コピー数) に大きく影響した可能性が考えられ、今後の試料の安定性確認時に考慮すべき事項と思われる。

## 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マニュアル化した。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 法を確立した。微生物検査の精度管理を通して、公定法の改良点を提起した。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。貝毒検査においては、精度管理実施上の問題点を確認し、その基礎的検討を行った。遺伝子組替え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、調査法の妥当性と問題

点を確認できた。

#### 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（食品安全確保研究事業）

「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 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

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

母乳中に残留するヘキサクロロベンゼンとダイオキシン類との総合的毒性評価及び  
ベビーフード中に残留するダイオキシン類の調査と乳幼児への曝露評価の検討

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  
協力研究者 斉藤 貢一 埼玉県衛生研究所 専門研究員

#### 研究要旨

ダイオキシン類似毒性が疑われている有機塩素系農薬のヘキサクロロベンゼン(HCB)の母乳中残留調査を行うために、母乳中ダイオキシン分析の前処理過程におけるヘキサクロロベンゼンの分画挙動を調べて、ダイオキシンと HCB を系統的に分析する方法を検討した。更に、実際の母乳中ダイオキシン類と HCB の測定を行い、ダイオキシン類としての総合的毒性評価を行った。また、市販ベビーフード中ダイオキシン類の調査を行い、更に摂取量について独自の方法を考案して、乳幼児への曝露評価を試みた。

#### A. 研究目的

ダイオキシンやPCB、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問題は、わが国のみならず世界的にも重大な社会的関心事であり、その対策と予防に関する研究が急務となっている。本研究班においては、これまでに母乳や血液、及び食品中のダイオキシン分析法マニュアルの作成や共同試験による精度管理の実施、また、臭素系難燃剤の新規分析方法の開発などにおいて成果を上げてきた。しかし、現状ではこれら環境汚染物質の、環境・食品・生体系における汚染実態調査は未だに十分とはいえず、ヒトへの影響、特に曝露実態調査が不十分な乳幼児におけるリスク評価を行うことが急務と思われる。

そこで、平成 15 年度の研究では、次の 2 点を重点課題として検討を行った。

検討課題① ダイオキシン類似毒性を示

すヘキサクロロベンゼンとダイオキシン類との系統分析及びその総合的毒性評価、ヘキサクロロベンゼン(HCB)は、有機塩素系農薬であり、2001 年に採択された、いわゆる「ストックホルム条約」において残留性有機汚染物質(POPs)に指定されており、動物実験で発がん性、催腫瘍性、催奇形性を示し、ヒトに対しても発がん性の疑いが持たれている。更に最近の研究では、Ah レセプターに結合してダイオキシン類似の作用を示す可能性も指摘されている。HCB はヒト母乳中からも普遍的に検出されていることから、本研究では HCB に焦点を当て、ダイオキシンと併せてその毒性評価を試みる。その際、ヒト母乳は貴重な生体試料であり、繰り返して採取すること、また、多量に採取することは極めて困難であることから、ダイオキシン分析の前処理過程で行われる分画操作を再検討し、その過程で派生するフラクションについ

て、HCB 等有機塩素系農薬分析への有効活用を検討する。

**検討課題② ヘビーフード中ダイオキシン類の分析とその摂取量評価**、一般成人が食品から摂取するダイオキシン類については、トータルダイエツト方式などにより多くの報告がなされているが、乳幼児が摂取する食品（いわゆるベビーフード）においては、これまで、そのダイオキシン残留量と摂取量に関する報告例はほとんど見あたらない。その理由のひとつに、トータルダイエツト方式のような一般成人が摂取するモデル食品群が定義されていないことが挙げられる。そこで本研究では、ベビーフードのモデル食品群を提案し、実際にダイオキシン類残留調査を開始すると共に、摂取量について独自の方法を考案して、ベビーフード摂取に伴う乳幼児へのダイオキシン類曝露評価を試みる。

## B. 研究方法

### **検討課題① HCB とダイオキシン類の系統分析及びその総合的毒性評価**

ダイオキシン分析は、公定法（母乳中のダイオキシン類測定暫定マニュアル）に準じて行った。概略は次の通りである。母乳約 50g を試料とし、脂肪抽出後、硫酸分解処理を行い、続いてシリカゲルカラム（内径 1.0cm のカラムに 1.5g 充填）、アルミナカラム（内径 1.5cm のカラムに 7.5g 充填）、活性炭カラム（内径 0.8cm のカラムに 0.5g 充填）の順に各クロマトグラフィーによりクリーンアップを行った。これら 3 種類のクロマトグラフィーにおける HCB 等、有機塩素系農薬の分画を調べるために、HCB の他に主な有機塩素系農薬（ $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -HCHs、o,p-DDE、p,p'-DDE、o,p-DDD、p,p'-DDD、o,p-DDT、o,p'-DDT、ヘブタクロール、ヘブタクロールエポキサイド）の標準品をそれぞれ別個のカラムに添加し、それぞれの溶出パターンを調べた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーに際しては、ヘキサン 120ml でダイオキシン類を溶出後、更に 10%ジクロロメタン(DCM)60mL

を流してこの分画に溶出される有機塩素系農薬を調べた。なお、ダイオキシン類の測定では PCDD/Fs 及びノンオルト Co-PCBs を対象とし、高分解能 GC/MS を用いて同位体希釈質量分析法にて定量した。毒性等量 (TEQ) の算出に際しては I-TEF を用いた。他方、有機塩素系農薬の測定には ECD-GC を用いて絶対検量線法にて定量した。

### **検討課題② ヘビーフード中ダイオキシン類の分析とその摂取量評価**

一般成人の食品からの摂取量調査に汎用されるトータルダイエツト方式の食品群を考慮して、ベビーフードを 6 種類の食品群（菓子、野菜、フルーツ、魚、肉、乳製品）に分けてそれぞれのダイオキシン分析を行い、総摂取量の見積りを検討した。ダイオキシン分析は、公定法（食品中のダイオキシン類及びコプラナー PCB の測定法暫定ガイドライン）に準じて行った。概略は次の通りである。試料をアルカリ分解処理し、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムクロマトグラフィーによりクリーンアップした。測定には高分解能 GC/MS を用いて同位体希釈質量分析法にて定量した。測定対象は PCDD/Fs、ノンオルト Co-PCBs、及びモノオルト PCBs とし、毒性等量 (TEQ) の算出に際しては WHO-TEF を用いた。

## C. 研究結果

### **検討課題① HCB とダイオキシン類の系統分析及びその総合的毒性評価**

母乳は貴重な生体試料であり、同一のヒトからダイオキシン分析用及び HCB 分析用の試料をサンプリングするのは極めて難しいことから、母乳中ダイオキシン分析の前処理過程における HCB 及び主な有機塩素系農薬の分画挙動を調べた。その結果、HCB はダイオキシン前処理過程において、硫酸処理によって分解・除去されず、シリカゲルカラムクロマトグラフィーではダイオキシン類のフラクションに溶出され、アルミナと活性炭カラムクロマトグラフィーではいずれも非ブ

ラナーPCB画分に溶出されることがわかった。その他の有機塩素系農薬の分画挙動については、図1のフローチャート上に示した。なお、分画挙動の検討に際し、 $\beta$ -HCHはシリカゲルカラムからの溶出（ヘキサン120mL）が不十分であったため、更に10%DCM/ヘキサン60mLを流して溶出させた。その結果、このフラクションには $\beta$ -HCHの他にヘプタクロルエポキシサイドが溶出されることがわかった。その他の有機塩素系農薬もシリカゲルカラム及び活性炭カラムクロマトグラフィーにおいて回収されるが、アルミナカラムクロマトグラフィーにおいて回収されるのは、HCB、*o,p*-DDE、*p,p'*-DDE及び $\beta$ -HCHだけであった。

カラムクロマトグラフィーにおける一連の分画操作に加えて、母乳からの脂肪抽出や硫酸分解処理操作を通じたHCBの添加回収試験を行った。添加回収試験においては、ヒト母乳に代わる疑似試料として牛乳を用いてHCBを添加(10ppb)し、図1のフローに従って分析を行ったところ、その回収率は平均で68.1%(*n*=4)であり、十分な実用性が示された。参考データとして本分析操作において測定可能なヘプタクロルエポキシサイド、 $\beta$ -HCH、及び総DDEs(*o,p*-DDE、*p,p'*-DDE)の添加回収率も表1に示した。これらにおいても60~104%程度の良好な回収率が得られた。なお、 $\beta$ -HCHの回収率はシリカ及び活性炭シリカゲルカラムからの合計値である。

次に、確立した本分析法を用いて、母乳中ダイオキシン分析の前処理過程において上記の分画を行い、ダイオキシン類の測定に加えて、非プラナーPCB画分に溶出されたHCBの測定を行ったところ、全ての検体(*n*=100)からHCBが検出され(4.1~91.8 ng/g fat)、平均値は33.9 ng/g fatであった(表2)。また、本分析法で同時に測定できるヘプタクロルエポキシサイド、 $\beta$ -HCH、及び総DDEsについても参考データとして併せて測定した。その結果、いずれの農薬も全ての検体から検出され、母乳が未だにこれらの有機塩素系農薬に汚染されていることが確認された(表2)。

## 検討課題② ベビーフード中ダイオキシン類の分析とその評価

ベビーフードを、菓子、野菜、フルーツ、魚、肉、及び乳製品の6種類に大まかに分類し、それぞれに該当する食品を購入して分析した。一般成人のトータルダイエツスタディでは、13群の食品に分類されているが、通常市販されているベビーフードでは、調理済みで一食分としてビン詰めされている形態が多く、しかも各食品の種類ごとに明確に分かれてはいないので、大まかな分類として上記の6種類とした(表3及び表4)。なお、摂取量の計算に際して簡便化を図るために、一回の食事に一ビンを食べるものとし、1日3回主食のビン詰めを食へ、更に副食(おやつ)として菓子を食するものと設定した。なお、今回選んだ副食はビスケットであり、製造会社や育児経験者からの聞き込み調査により、1日の副食の食事量を20gとした。

また、菓子を除いた5つの食品群を均等に摂取するものと仮定して、ダイオキシン類の1日摂取量は、{これら5つの食品群からの総摂取量  $\times$  3/5 + 1群(菓子)からの摂取量}として算出した。体重当たりの摂取量算出に際しては、まず、調査対象としたベビーフードの適用月齢が5~10ヶ月(平均7.5ヶ月)であったこと、また、「平成12年乳幼児身体発育調査報告書」(平成13年10月、厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課)によるデータから、7.5ヶ月の乳幼児の体重がおよそ8kgであったことから、これを基準として適用した。

その結果、体重当たりの1日摂取量は、0.061 pg TEQ/kgbw /day (ND=0で算出)、及び1.2 pg TEQ/kgbw /day (ND=定量下限値  $\times$  1/2で算出)となった。

## D. 考察

### 検討課題① HCBとダイオキシン類の系統分析及びその総合的毒性評価

最近の研究では、HCBのAhレセプターへの結合力から、HCBの毒性をダイオキシンの毒性評価で使われる毒性等価係数(TEF)で

表した場合、0.0001 に相当するといわれている。この数値を今回の実験結果に照らし合わせると、母乳中 HCB の毒性等量 (TEQ) は 0.41~9.2pg TEQ/g fat (平均値 3.4 pg TEQ/g fat, n=100) となった。これらの結果を既に測定したダイオキシン類の TEQ (I-TEF を用いて計算) と合わせると、およそ 16% (平均値) の増加となることがわかった (表 5)。なお毒性等量の計算に際して、モノオルト PCBs の TEQ (Total TEQ (WHO-TEF) の約 20%) を推測して、WHO-TEF (1998) を用いた場合、HCB による TEQ の増加は 10% 程度となった。これらの結果から、母乳中に残留するダイオキシン類の毒性を評価する場合には、ダイオキシンと同様に母乳を普遍的に汚染している HCB の毒性を無視できないことが確認された。また、今回の測定結果 (表 2) が示すように、母乳はダイオキシン類や HCB 以外にもヘプタクロルエポキシサイド、 $\beta$ -HCH、DDEs などの有機塩素系農薬によっても高濃度に汚染されていた。このことは従来から多くの研究者によって報告されてきた。現在のところダイオキシン類似毒性が確認されているのは HCB だけであるが、今後 HCB の他にも同様にダイオキシン類似毒性を有する環境汚染化学物質が見いだされる可能性も否定できないことから、本分析法のように、貴重な生体試料を用いてできるだけ多くの有害化学物質を測定する試みは重要であると考えられる。

#### 検討課題②ヘビーフード中ダイオキシン類の分析とその摂取量評価

今回の調査では、体重当たりの 1 日摂取量が 1.2 pg TEQ/kgbw /day (ND=定量下限値 $\times$ 1/2 で算出) であったが、この値は我が国がダイオキシン摂取量に対して定めた耐容 1 日摂取量 (TDI Tolerable Daily Intake) の 4pg と照らし合わせた場合、十分に下回っており、また、厚生労働省がこれまでに行ってきた一般成人を対象としたトータルダイエットスタディによる食品からのダイオキシン類 1 日摂取量調査 (平成 9 年度から 13

年度) の値 (1.45~2.41pg TEQ/kgbw /day) よりも下回っていることから、市販ベビーフードからのダイオキシン摂取量は直ちに問題になる量ではないと考える。

なお、参考データとして、平成 13 年度に購入したヘビーフードについても、本研究で提案した 6 つの食品群に分類して、それぞれダイオキシン類摂取量の評価を行った。その結果、食品群ごとに比較すると、いずれもかなり濃度差があるものの、総摂取量としての 1 日摂取量及び体重当たりの 1 日摂取量は、0.079 pg TEQ/kgbw /day (ND=0 で算出)、及び 1.3 pg TEQ/kgbw /day (ND=定量下限値 $\times$ 1/2 で算出) となり、今回 (平成 15 年度調査) の評価 (表 3) とほぼ同等の結果となった (表 4)。これらの結果から、本研究で提案したベビーフードの食品群分類方法及び総摂取量算出方法が妥当であると考えられる。また、我が国においてダイオキシン汚染が問題となってから、様々な対策が講じられてきており、母乳中濃度や食品中のダイオキシン濃度は減少傾向にあることがこれまでの多くの研究で示されている。今回分析した市販ベビーフードにおいても、ダイオキシン削減の効果が食材において現れてきたものと思われる。今後は更に多くの市販ベビーフードを用いて同様な調査を継続して、ベビーフードにおけるダイオキシン汚染のサーベイランス方法を確立していく予定である。

#### E. 結論

本年度は、次の 2 つの課題についての研究を行った。一つは母乳に残留する HCB とダイオキシン類の系統分析法の検討、及び HCB を加味した総合的毒性評価について検討を行った。その結果、ダイオキシン分析の前処理過程の分画を再検討することにより、新たに母乳を採取することなく、ダイオキシン分析に付随して派生するフラクションを用いて、HCB、ヘプタクロルエポキシサイド、 $\beta$ -HCH、DDEs の分析が可能となった。これにより、貴重な生体試料である母乳の有効利用が図られると共に、過去にダイオキシン分析に際



して派生したフラクションを保存してあれば HCB の測定が可能となった。

実際に、母乳 100 検体について HCB の測定を行ったところ全ての検体から HCB が検出された。既報の研究データによる HCB の TEF を当てはめてダイオキシンと合わせた毒性を再評価したところ、HCB は総合毒性を 16% (I-TEF で算出)、または 10%(WHO-TEF 1998 で算出)増加させることがわかった。

2 つ目の研究課題として、市販ベビーフード中のダイオキシン類の分析と乳幼児におけるその摂取量について検討した。その結果、成人のトータルダイエット方式に準じて、本研究ではベビーフードを 6 つの食品群に分類し、更に、1 日の摂取量算出に際して独自の算出方法を考案した。すなわち、1 日に食事を 3 回と副食でおやつを食べると仮定し、更に、野菜、フルーツ、魚、肉、及び乳製品の 5 つの食品群を平均的に食べるものとして、これらの総摂取量に 3/5 を乗じたものに、副食(菓子)からの摂取量を加えるものとした。ダイオキシン分析結果をこの評価方法に適用したところ、乳幼児(月齢 7.5 ヶ月、体重 8kg)の体重当たりの 1 日摂取量は、我が国で定めた TDI(4 pg TEQ/kgbw /day)を大きく下回り、また、成人を対象としてこれまでに厚生労働省が行ってきたトータルダイエット方式による食品からのダイオキシン類摂取量をも下回った。これらの結果から、本研究で提案した食品群分類法及び総摂取量の算出法が妥当であることが確認された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Koichi Saito, Mikiko Takekuma, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Msahiro Ishizuka, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki, Enzyme-linked immunosorbent assay toxicity evaluation method for

dioxins in human milk, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 70, 636-643 (2003).

Koichi Saito, Mikiko Takekuma, Masahiko Ogawa, Susumu Kobayashi, Yukio Sugawara, Msahiro Ishizuka, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki, Extraction and cleanup methods of dioxins in house dust from two cities in Japan using ASE and a disposable multi-layer silica-gel cartridge, *Chemosphere*, 53, 137-142 (2003).

Mikiko Takekuma, Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Ryuji Matumoto and Susumu Kobayashi Levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in human milk in Saitama, Japan, and epidemiological research, *Chemosphere*, 54, 127-135 (2004).

Kemmochi, Y., Tsutsumi, K. and Nakazawa, H. Enhanced mass resolution tandem mass spectrometry method for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin detection with ion trap mass spectrometry using high damping gas pressure. *J. Chromatogr. A*. 1016, 249-256 (2003)

### 2. 学会発表

齋藤貢一, 石塚昌宏, 菅原幸雄, 小川政彦, 竹熊美貴子, 浦辺研一, 中澤裕之, 松木容彦, 母乳中ダイオキシンの酵素免疫測定法の開発, 日本薬学会第 123 年会, 長崎.

## 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
2. その他  なし

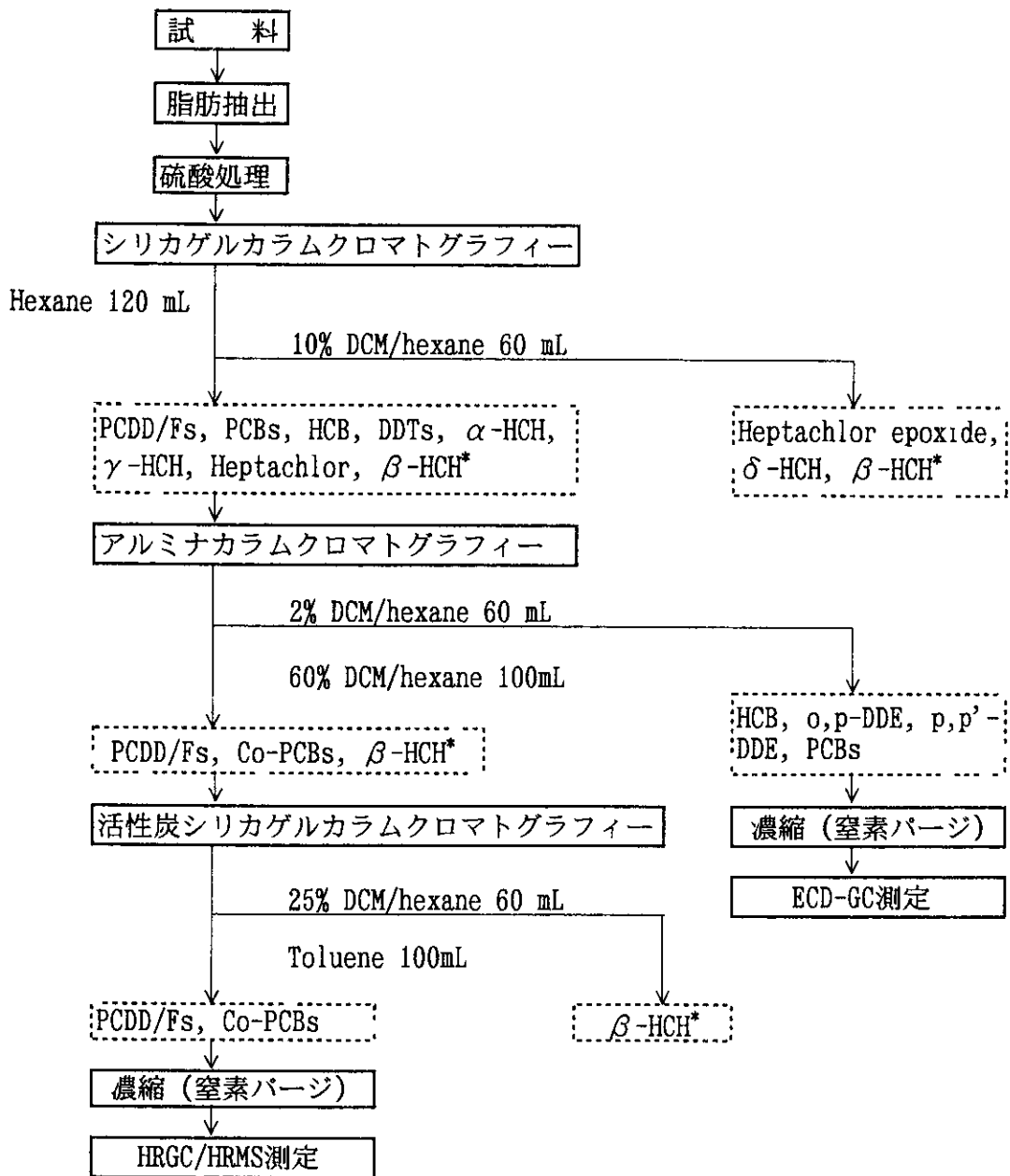


図1. 母乳中ダイオキシン類及びヘキサクロロベンゼン等，有機塩素系農薬の系統分析法

(\* β-HCHはシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより2つの画分に溶出される)

表1. HCB等, 有機塩素系農薬の回収率

有機塩素系農薬	添加量 (ng/g)	回収率 (%) <sup>*</sup>	SD
HCB	10	68.1	7.9
Heptachlor epoxide	10	60.3	7.8
$\beta$ -HCH <sup>**</sup>	10	70.5	8.8
Total DDE <sup>***</sup>	10	104.8	12.1

添加試料にはヒト母乳の代用として牛乳を使用

\* 平均値 (n=4)

\*\*  $\beta$ -HCHの回収率はシリカ及び活性炭シリカゲルカラムからの合計値

\*\*\* o,p-DDE & p,p'-DDE

表2 母乳中に残留するHCB等, 有機塩素系農薬濃度

	濃度 <sup>*</sup> (ng/g fat)	Min	Max	SD
HCB	33.9	4.1	91.8	16.2
Heptachlor epoxide	7.4	1.4	22.1	4.0
$\beta$ -HCH <sup>**</sup>	62.7	8.1	610.3	80.8
Total DDEs <sup>***</sup>	289.5	15.8	1000.1	176.6
脂肪含有率 (%)	3.7%	0.9%	10.5%	1.6

\* 100検体の平均値

\*\*  $\beta$ -HCHの回収率はシリカ及び活性炭シリカゲルカラムからの合計値

\*\*\* o,p-DDE & p,p'-DDE

表3 幼児によるベビーフード中ダイオキシンの1日摂取量 (平成15年度調査)

食品群	分類	品名 (重量)	適用月齢	(ND=0で算出)		(ND=定量下限値×1/2で算出)	
				1日摂取量 (pg TEQ/day)	体重当たりの摂取量** (pg TEQ/kgbw/day)	1日摂取量 (pg TEQ/day)	体重当たりの摂取量** (pg TEQ/kgbw/day)
1群	菓子類	たまごビスケット (20g)	9ヶ月	0.025	0.0032	0.56	0.070
2群	野菜	野菜ささみうどん (130g)	10ヶ月	0.059	0.0073	3.5	0.44
3群	フルーツ	フルーツヨーグルト (70g)	5ヶ月	0.012	0.0015	1.8	0.23
4群	魚	白身魚のドリア (130g)	7ヶ月	0.028	0.0035	3.5	0.44
5群	肉	野菜とレバーのうま煮 (130g)	9ヶ月	0.056	0.0070	3.5	0.44
6群	乳製品	チーズビスケット (70g)	5ヶ月	0.62	0.077	2.3	0.28
総摂取量*				0.49	0.061	9.4	1.2

\* 総摂取量 = (1群の摂取量) + 3/5 (2群~6群の摂取量の総和)

\*\* 適用月齢の平均値 (7.5ヶ月) における幼児の体重を8kgとして算出

表4 幼児によるベビーフード中ダイオキシンの1日摂取量 (平成13年度調査)

食品群	分類	品名 (重量)	適用月齢	(ND=0で算出)		(ND=定量下限値×1/2で算出)	
				1日摂取量 (pg TEQ/day)	体重当たりの摂取量** (pg TEQ/kgbw/day)	1日摂取量 (pg TEQ/day)	体重当たりの摂取量** (pg TEQ/kgbw/day)
1群	菓子類	どうふつのビスケット (20g)	7ヶ月	0.490	0.061	0.88	0.11
2群	野菜	ほうれん草 (113g)	5ヶ月	0.076	0.0095	3.1	0.39
3群	フルーツ	りんご (71g)	6ヶ月	0.00043	0.000054	1.9	0.24
4群	魚	白身魚のドリア (130g)	7ヶ月	0.035	0.0044	3.5	0.44
5群	肉	牛煮込みうどん (128g)	8ヶ月	0.0030	0.00038	3.5	0.43
6群	乳製品	チーズグラタン (130g)	10ヶ月	0.12	0.015	3.6	0.45
総摂取量*				0.63	0.079	10.3	1.3

\* 総摂取量 = (1群の摂取量) + 3/5 (2群~6群の摂取量の総和)

\*\* 適用月齢の平均値 (7.2ヶ月) における幼児の体重を8kgとして算出