

表5 HCBを加えた場合の母乳中ダイオキシン毒性 (TEQ) の増加率

	毒性等量 (pg TEQ/g fat)*	増加率**
HCB	3.4	
Dioxins (I-TEF)	21.8	
Dioxins (WHO-TEF 1998)***	35.2	
HCB + Dioxins (I-TEF)	25.1	116%
HCB + Dioxins (WHO-TEF 1998)	38.6	110%

* 母乳100検体の平均値

** 各母乳(n=100)の増加率の平均値

*** モノオルトPCBsの寄与率をTotal TEQの20%と推定して算出

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

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と
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

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と
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	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)島津テクノリサーチ	
	野村 孝一	(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	大阪府立公衆衛生研究所	
	渡辺 功	大阪府立公衆衛生研究所	
	熊谷 信二	大阪府立公衆衛生研究所	

研究要旨

昨年度に作成した「母乳中のダイオキシン類測定マニュアル (2003.2.17)」および「血液中のダイオキシン類測定マニュアル (2003.2.17)」の適切性を検討するため、粉乳（模擬母乳）および血清の同一試料を協力研究機関でマニュアルに従って測定し結果の比較を行った。その結果、粉乳中および血清中ダイオキシン類濃度は、一部の物質で、機関間の変動係数が0.3を超えていたが、毒性等量の変動係数は0.2以下であり、このマニュアルでほぼ正確な測定ができることがわかった。ただし、血液中脂質濃度では、一部の機関に大きな誤差が認められたので、今後、脂質濃度に絞ったクロスチェックを実施する必要がある。

一方、母乳中の臭素化ダイオキシン類の分析法については、混合標準液を各協力研究機関で測定し測定条件および検出感度の確認を行い、前処理の条件についても各研究機関の情報を得て、測定条件および前処理条件の追加・修正を行った。これにより、「母乳中の臭素化ダイオキシン類分析マニュアル案」をより完成度の高いものとした。

A 研究目的

昨年度に作成した「母乳中のダイオキシン類測定マニュアル (2003 2.17)」および「血液中のダイオキシン類測定マニュアル (2003 2.17)」の適切性を検討するため、粉乳および血清の同一試料を協力研究機関でマニュアルに従って測定し結果の比較を行った。また、母乳および血液の少量試料を用いてダイオキシン類を測定する方法の検討を行った。さらに、昨年度検討した母乳中の臭素化ダイオキシン類測定マニュアル案をより完成度の高いものとした。

B 研究方法

B-1 母乳中塩素化ダイオキシン類測定マニュアルの検討

日常的にダイオキシン類分析を行っている研究機関において、ダイオキシン類濃度の保証値を有する粉乳（牛乳を乾燥し粉末状にしたもの、European Commission 製 BCRRM534）を測定マニュアルに従って測定し、マニュアルの適切性を検討した。

B-2 血液中塩素化ダイオキシン類測定マニュアルの検討

日常的にダイオキシン類分析を行っている研究機関において、同一ロットの血清試料（日水製薬製 L-コンセーラ II）中のダイオキシン類濃度を測定マニュアルに従い測定し、マニュアルの適切性を検討した。

B-3 試料の少量化に関する検討（別添 1 および 2 参照）

上記の粉乳および血清を、飯田ら（福岡県保健環境研究所、研究協力者）が開発した少量法により測定し、結果の比較検討を行った。また、国立環境研究所が開発した少量法のマニュアルを作成した。

B-4 母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアルの検討

臭素化ダイオキシン類混合標準液を各協力研究機関で測定し測定条件および検出感度の確認を行うとともに、前処理の条件について各研究機関の情報を得て、測定条件および前処理条件の追加・修正を行った。また、実際の母乳について臭素化ダイオキシン類を測定した。

C 研究結果

C-1 母乳中塩素化ダイオキシン類測定マニュアルについて

1) 脂肪濃度について

粉乳中脂肪濃度を表 1 に示す。7 機関の平均値は 240mg/牛乳粉末 1g であり、変動係数は 0.20 であった。F 機関においては 154mg/牛乳粉末 1g と低い値を示したが、その原因は採取試料量が他に比べて少ないことによると思われる。

2) ダイオキシン類濃度について

① 測定値と保証値の比較

粉乳中ダイオキシン類濃度の各研究機関の平均値と試料の保証値を表 2 に示す。ダイオキシン (PCDDs) およびジベンゾフラン (PCDFs) の保証値と 7 機関の平均値を比較すると、全ての物質で保証値よりも低い値が得られ、PCDDs で保証値の 82~94%、PCDFs で 53~94%であった。保証値の 53%であった物質は 1,2,3,7,8-PeCDF であり、この物質を除くと保証値の 75~94%であった。

② 試料中濃度の研究機関間の変動

保証値が無い物質も含めて全ての物質 (PCDDs, PCDFs, Co-PCBs) について、7 機関での機関間の変動を検討した。変動係数が 0.3 を越えた物質は、OCDD、1,2,3,4,7,8,9-HpCDF、OCDF、3,4,4',5-TeCB (#81)、3,3',4,4'-TeCB (#77)、3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)、2',3,4,4',5-PeCB (#123)、

2,3,3',4,4'-PeCB(#105) 、
2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167) 、
2,3,3',4,4',5'-HxCB(#157) 、
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(#189)であった。特に、
0.3 以上の変動係数が多く見られた
Co-PCBs については、G 機関のブランク値が
高く(表3)、ブランク値を引いた値で再計
算すると、殆どの物質で0.3以下になった。
また、毒性等量 (TEQ) の変動係数は PCDDs/
PCDFs(0.17)および Co-PCBs(0.19)ともに
0.2以下であった。

③試料中濃度の研究機関内の変動

各研究機関内での同一試料の3回測定
における変動係数は、全機関において、全
物質で変動係数が0.2以下であった。

④回収率について

内部標準物質の回収率を表4に示す。回
収率は35~134%であり、一部で測定マニ
ュアルで望ましいとする範囲(50~120%)を
超えていた。ただし、再測定の必要のない
範囲(25~150%)には入っていた。

C-2 血液中塩素化ダイオキシン類測定マニ ュアルについて

1) 脂質濃度について

血清中脂質濃度を表5に示す。7機関中
5機関では5.12~5.78mg/gであった。酵素
法で測定した総コレステロール、中性脂肪、
リン脂質は合計で4.61mg/gであり、マニ
ュアルの抽出法によりほぼ正確に脂質が抽出
されていると考えられる。一方、c機関は
29.3mg/gと先の5機関の値の5~6倍であ
り、脂質以外の物質を抽出した可能性、あ
るいは抽出溶媒が十分に蒸発していなかつ
た可能性がある。なお、c機関では、再測
定を実施した結果、5.3mg/gと他の機関と
ほぼ同一になった。g機関は2.92mg/gと
先の5機関の値の約半分であり、水洗時に
リン脂質が失われた可能性が考えられる。

2) ダイオキシン類濃度について

①試料中濃度の研究機関間の変動

血清中ダイオキシン類濃度の各研究機関
の平均値を表6に示す。研究機関間の変動
係数が0.3を超えた物質は、ダイオキシン
では1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,4,7,8-HxCDD
および OCDD、コプラナ PCB では
3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169) および
2',3,4,4',5-PeCB(#123)であった。

各物質ごとに見ると、1,2,3,7,8-PeCDD
では f 機関が平均値の1.7倍に、
1,2,3,4,7,8-HxCDD では e 機関が平均値の
2.0倍に、OCDD では b 機関が平均値の2.1
倍になっている。また、
3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)では f 機関が
平均の1.7倍に、2',3,4,4',5-PeCB(#123)
では b 機関および d 機関が平均の1.6倍お
よび1.5倍になっている。これらの中で
1,2,3,4,7,8-HxCDD については、該当機関
の操作ブランク値を差し引くと他の機関の
測定値とほぼ同程度になるため、ブランク
値が底上げしているものと考えられる。他
の物質については、原因は明確ではない。

毒性等量 (TEQ) 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。

②試料中濃度の研究機関内の変動

各研究機関内での同一試料の3回測定に
おける変動係数は、c機関で
3,4,4',5-TeCB(#81)が、e機関で
2,3,7,8-TeCDD、2,3,7,8-TeCDF および
2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167)が0.3を超え
ていた。この中で3,4,4',5-TeCB(#81)およ
び2,3,7,8-TeCDDについては、試料中濃度
が低く、測定限界近くでの測定のため変動
係数が大きくなったものと考えられる。
2,3,7,8-TeCDF も試料中濃度は低いが、e
機関の値は他の機関に比較してかなり大き
く、汚染等の影響があったものと考えられ

る。2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167)については、変動の大きい原因は明確ではない。

③操作ブランクについて

各研究機関の操作ブランク値を表7に示す。操作ブランク値がマニュアルで定める定量下限目標値を上回ると、試料中濃度の測定に支障をきたす。ただし、その場合でも、試料中濃度が操作ブランク値よりも十分多ければ問題はない。そこで、操作ブランク値が定量下限目標値を上回り、かつ試料中濃度の1/10を超えるケースを検討した。d機関で3,3',4,4'-TeCB(#77)が、e機関で1,2,3,7,8-PeCDD、1,2,3,4,7,8-HxCDD、2,3,4,7,8-PeCDF、1,2,3,6,7,8-HxCDF、1,2,3,4,6,7,8-HpCDF、3,3',4,4'-TeCB(#77)および2,3,4,4',5-PeCB(#114)が該当した。何らかの汚染の影響と考えられる。

④回収率について

内部標準物質の回収率を表8に示す。回収率は43~132%であり、一部で測定マニュアルで望ましいとする範囲(50~120%)を超えていた。ただし、再測定の必要のない範囲(25~150%)には入っていた。

C-3 試料の少量化について(別添1および2参照)

少量法(飯田ら)を血清試料および粉乳試料に応用し、測定マニュアルに従った分析(以下、従来法)との比較を行った。その結果、血清試料ではダイオキシン類濃度は1,2,3,6,7,8-HpCDDおよびOCDDを除いてほぼ従来法と同じ値であった。1,2,3,6,7,8-HpCDDおよびOCDDは従来法に比べて、それぞれ、約1.5倍および2倍高い値を示した。しかし、1,2,3,6,7,8-HpCDDおよびOCDDは毒性等価係数が0.01および0.0001と低いので毒性等量には大きな影響はなかった。また、血清中脂質濃度については、従来法の約1/2となった。この原

因は明確でなく、今後、検討が必要である。

粉乳試料については、ダイオキシン類の各物質濃度は少量法と従来法の測定結果は良く一致していた。また、脂質濃度もほぼ同じ値であった。

以上、血清試料と粉乳試料を少量法と従来法で分析した結果、血清試料では1,2,3,6,7,8-HpCDDおよびOCDD濃度と脂質濃度についてなお検討を要すが、粉乳試料については極めて良い一致を示すことが分かった。

一方、国立環境研究所でも少量法を開発しており、この方法でも血清中ダイオキシン類濃度を適切に測定できることを昨年度の報告書に記載したが、今年度はこの方法のマニュアルを作成した。

C-4 母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアルについて(別添3および4参照)

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影響評価に必要なとされる2,3,7,8-位臭素置換物質を調査対象とする事としているが、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ている。今年度新たな2,3,7,8-位置換体標準品は入手できず、調査対象物は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、OBDFについては、標準品が市販されたものの、純度が悪く約10%のHpBDFを含んでいた。今後、高純度のOBDFが入手可能になればこの物質も調査対象とする。

2) 内標準物質

臭素化ダイオキシン類の内標準物質につ

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ハイクとして使用する事としているが、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い。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類が望ましいが1種を除き入手不可能である。したがって、今回の測定マニュアル案では、現在入手可能な内標準物質を用いて、標準物質と内標準物質の対応例を記載した。今後、新たな内標準物質が入手されれば適時変更していく予定である。

3) 目標定量下限値

昨年度案では、目標定量下限値を塩素化ダイオキシン類と同じ、すなわち、tetra- 1pg/g-fat, penta- 2pg/g-fat, hexa- 20pg/g-fat, hepta-200pg/g-fat, octa- 500pg/g-fat と仮に設定した。しかし、臭素化ダイオキシン類が塩素化ダイオキシン類より GC/MS に対する感度が低いことを考慮すると困難な面が多い。一方、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、今後、GC-MS の高感度分析の検討やクロスチェックによる実試料分析を通して目標定量下限値を決めていく予定である。

4) 分析試料量

母乳分析試料量は、昨年度案の通り、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、母乳試料より脂肪抽出後、アルカリ分解あるいは硫酸処理により脂肪を分解除去し、カラムクロマトグラ

フィーによってクリーンアップおよび分画操作を行うこととした。カラムクロマトグラフでは、シリカゲルカラムクロマトグラフ、多層シリカゲルカラムクロマトグラフ、フロリジルカラムクロマトグラフ、活性炭カラムグラフ、アルミナカラムクロマトグラフを示し、これらを組み合わせることとした。協力研究機関の情報を基に、アルカリ分解、硫酸処理およびカラムクロマトグラフィの具体的条件例および注意点を測定マニュアルに記述するとともに、分析フローの例を示した。

6) GC/MS 測定

①機器の検出下限

GC/MS 測定においては、一般的に臭素化ダイオキシン類は塩素化ダイオキシン類より検出感度がよくないが、現状の機器でどの程度の感度を有しているのかを調査した。協力研究機関に臭素化ダイオキシン類混合標準液を配布し機器の検出下限を測定したところ、2,3,7,8-TeBDD で 10fg～500fg、OBDD で 100fg～20000fg であり、機関により1～2桁の大きな差があることを認めた。これらの差は機器の機種、調整法や分析条件により生じたものと推測されるが、調整法や分析条件等を検討し、大半の機器で可能かつより高感度な検出下限値をマニュアルに取り入れていくことが必要である。

②GC-MS 条件

機器の検出下限の検討と併行して、GC-MS 条件、すなわち、GC 導入部、分離カラム、MS 条件等を各協力研究機関で検討し、測定中の熱分解の少ないかつ高感度の条件を検討した。GC 導入部では、熱分解を軽減するため、オンカラム注入法もしくはスプリットレス法では注入口温度を可能な限り低温(240℃)とし、分析カラムでは膜圧が薄く(0.1 μm)長さの短い(15m)カラムを使用することとした。暫定分析法マニュアル

案に測定条件例を示した。なお、分解能は塩素化ダイオキシン測定と同じ 10,000 以上とした。

7) 母乳中の臭素化ダイオキシン類濃度(別添4参照)

母乳中の PBDDs/DFs については、4~6 臭素化ダイオキシン類を分析した結果、2,3,7,8-TeBDF が主成分として検出され、そのレベルは 1.3~2.3pg/g 脂肪であった。また、一部試料から 2,3,4,7,8-PeBDF も検出した。しかし、1,2,3,4,7,8-HxBDF は検出されなかった。一方、PBDDs に関して、TeBDD および PeBDD が検出されたが、2,3,7,8-位置換異性体以外の成分であった。

D 考察

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。ただし、毒性等量への寄与率が大きい 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 3,3',4,4',5-PeCB の変動係数が 0.16~0.22 であることから毒性等量の変動は PCDDs/PCDFs および Co-PCBs でそれぞれ 0.17 および 0.19 と良好な結果であった。したがって、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。

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

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ン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。この点についてマニュアルでより丁寧に解説する必要があるかもしれない。脂質については、7 機関中 5 機関では適切に抽出されていると考えられたが、2 機関では大きな差が見られた。このため、脂質 1g 中のダイオキシン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。

母乳中の臭素化ダイオキシン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。目標定量下限値等いくつか検討課題点は残されているものの、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ン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ン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。

E 結論

粉乳中塩素化ダイオキシン類の測定では、一部の物質で、機関間の変動係数が 0.3 を越えたが、毒性等量の変動係数は 0.2 以内に収まっていることから、現行の測定マニュアルでほぼ正確な測定ができる

血液中塩素化ダイオキシン類の測定では、一部の物質で、機関間の変動が 0.3 を超えていたが、毒性等量の変動係数は 0.2 以下であり、現行の測定マニュアルでほぼ正確な測定ができることがわかった。ただし、

血液中脂質濃度では、一部の機関に大きな誤差が認められたので、脂質濃度に絞ったクロスチェックを実施する必要がある。

母乳中臭素化ダイオキシン類については、現在の入手しうる標準試薬および技術情報に基づき、より完成度の高い「母乳中の臭素化ダイオキシン類分析マニュアル案」が策定できた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Shinji Kumagai, Shigeki Koda, Hajime Oda Exposure evaluation of dioxins in municipal waste incinerator workers Industrial Health 74, 167-174(2003)

- 2) Kazuhiko Akutsu, Mikiya Kitagawa, Hiroyuki Nakazawa, Tsunehisa Makino, Katsuhiko Iwazaki, Hajime Oda, Shinjiro Hori Time-trend (1973-2000) of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk Chemosphere 53,645-654 (2003)
- 3) 熊谷信二、織田 肇、田淵武夫、赤坂 進、小坂 博、吉田 仁、甲田茂樹、毛利一平 自治体焼却施設における堆積粉塵中ダイオキシン類濃度と労働者の血清中ダイオキシン類濃度との関係 産業衛生学雑誌 (印刷中)

H 知的所有権の取得状況

なし

表 1. 粉乳中脂肪濃度

	試料中濃度 (mg/粉乳 1g)								
	A	B	C	D	E	F	G	平均	CV
脂肪	240	211	280	292	280	154	222	240	0.20

表 2. 粉乳試料中ダイオキシン類濃度

		試料中濃度 (pg/粉乳 1g) *1									
		A	B	C	D	E	F	G	平均	CV	保証値
P C D D 異 性 体	2,3,7,8-TeCDD	0.50	0.36	0.61	0.53	0.60	0.55	0.58	0.53	0.16	0.65
	1,2,3,7,8-PeCDD	1.10	0.78	1.35	1.47	1.30	1.40	1.53	1.28	0.20	1.44
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.56	0.40	0.67	0.85	0.77	0.76	0.69	0.67	0.22	0.80
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	1.50	1.09	1.86	2.37	1.73	1.97	2.07	1.80	0.23	1.92
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.66	0.45	0.71	0.72	0.67	0.76	0.89	0.69	0.19	0.80
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.35	0.23	0.43	0.39	0.53	0.37	0.47	0.39	0.24	
	OCDD	0.80	0.29	1.01	1.15	1.20	0.97	1.29	0.96	0.35	
P C D F 異 性 体	2,3,7,8-TeCDF	0.46	0.29	0.56	0.54	0.65	0.52	0.51	0.50	0.22	0.67
	1,2,3,7,8-PeCDF	0.08	0.05	0.09	0.06	0.10	0.09	0.07	0.08	0.21	0.15
	2,3,4,7,8-PeCDF	2.50	1.73	3.01	2.57	3.10	2.92	2.80	2.66	0.17	3.16
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1.53	0.99	1.63	2.27	1.80	1.68	1.19	1.58	0.26	1.75
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	1.37	0.90	1.57	2.20	1.50	1.57	1.42	1.50	0.26	1.55
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	N.D.	0.03	0.05	0.03	0.05	0.04	N.D.	0.04	0.24	
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	1.50	1.07	2.11	2.03	1.80	2.07	1.88	1.78	0.21	1.90
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.14	0.10	0.17	0.18	0.22	0.16	0.21	0.17	0.24	
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	N.D.	0.01	0.02	0.01	0.04	N.D.	0.03	0.02	0.51	
	OCDF	N.D.	N.D.	0.02	0.05	N.D.	N.D.	0.06	0.04	0.48	
TEQ-PCDDs/PCDFs *2			3.60	2.54	4.39	4.30	4.30	4.38	4.38	3.98	
Co - P CB s 異 性 体	TeCB(#81)	0.48	0.38	0.48	0.30	0.58	0.41	1.89	0.64	0.86	
	TeCB(#77)	1.30	2.03	1.23	0.73	2.30	1.20	21.0	4.26	1.74	
	PeCB(#126)	5.80	4.52	5.40	4.00	7.10	5.33	5.70	5.41	0.18	
	HxCB(#169)	1.09	0.93	1.10	0.58	2.00	1.20	1.40	1.19	0.37	
	PeCB(#123)	8.63	9.84	7.55	5.00	8.00	5.53	17.7	8.89	0.48	
	PeCB(#118)	640	549	590	370	710	660	854	625	0.24	
	PeCB(#105)	120	100	110	74	150	133	206	128	0.33	
	PeCB(#114)	12.3	9.3	11.9	7.8	13.0	12.7	15.2	11.8	0.21	
	HxCB(#167)	43.7	33.2	39.7	21.3	74.0	43.0	54.1	44.1	0.38	
	HxCB(#156)	89.7	70.2	81.1	43.7	100	90.3	123	85.5	0.29	
	HxCB(#157)	16.0	12.0	14.3	13.7	33.0	16.3	18.8	17.7	0.40	
	HpCB(#189)	9.00	7.64	8.26	3.17	12.0	7.93	10.2	8.32	0.33	
TEQ-PCBs *2			0.73	0.57	0.66	0.48	0.89	0.69	0.77	0.68	

*1 試料中濃度はブランク値を差し引いていない

*2 WHO(1998)のTEFを使用して算出した

表3. 粉乳分析における操作ブランク値

		操作ブランク値(pg/粉乳 1g)						
		A	B	C	D	E	F	G
P C D D 異 性 体	2,3,7,8-TeCDD	ND	ND	<0 002	0 001	ND	ND	0 000
	1,2,3,7,8-PeCDD	ND	ND	0 004	ND	ND	ND	0 000
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	ND	ND	<0 001	ND	ND	ND	0 000
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	ND	ND	<0 001	ND	ND	ND	0 000
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	ND	ND	<0 001	ND	ND	ND	0 000
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	ND	ND	0 005	ND	ND	ND	0 000
	OCDD	ND	ND	0 029	0 017	0 095	ND	0 088
P C D F 異 性 体	2,3,7,8-TeCDF	ND	ND	<0 002	0 014	ND	ND	0 000
	1,2,3,7,8-PeCDF	ND	ND	<0 002	ND	ND	ND	0 000
	2,3,4,7,8-PeCDF	ND	ND	<0 002	ND	ND	ND	0 000
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	ND	ND	<0 001	ND	ND	ND	0 000
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	ND	ND	0 002	0 005	ND	ND	0 000
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	0 001	ND	ND	ND	0 000
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND	ND	0 002	ND	ND	ND	0 000
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	ND	ND	0 003	ND	ND	ND	0 000
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	<0 001	ND	ND	ND	0 000
	OCDF	ND	ND	<0 003	ND	ND	ND	0 000
C o - P C B s 異 性 体	TeCB(#81)	ND	ND	<0 005	0 001	ND	ND	0 945
	TeCB(#77)	ND	ND	0 289	0 012	ND	ND	15 3
	PeCB(#126)	ND	ND	<0 011	ND	ND	ND	0 000
	HxCB(#169)	ND	ND	<0 003	ND	ND	ND	0 000
	PeCB(#123)	ND	ND	<0 006	0 280	ND	ND	0 000
	PeCB(#118)	0 22	ND	0 346	0 250	0 160	ND	8 902
	PeCB(#105)	0 09	ND	0 122	0 061	0 070	ND	5 836
	PeCB(#114)	ND	ND	0 040	0 034	ND	ND	0 000
	HxCB(#167)	ND	ND	0 015	ND	ND	ND	0 270
	HxCB(#156)	ND	ND	0 045	ND	ND	ND	0 379
	HxCB(#157)	ND	ND	0 010	ND	ND	ND	0 134
	HpCB(#189)	ND	ND	<0 002	ND	ND	ND	0 000

表 4. 粉乳分析における内部標準物質の回収率

内標準物質	回収率 (%)						
	A	B	C	D	E	F	G
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TeCDD	69	71	74	86	71	43	74
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDD	79	81	76	85	73	46	86
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDD	85	76	78	70	80	50	73
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDD	89	73	79	52	88	51	81
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDD	82	69	72	70	----	47	120
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	89	81	58	66	66	45	118
¹³ C ₁₂ -OCDD	92	60	77	68	72	40	134
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TeCDF	68	74	78	83	58	43	74
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDF	81	73	80	92	----	47	78
¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeCDF	79	73	71	100	76	45	60
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDF	81	71	71	94	82	52	47
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDF	81	75	75	74	71	50	63
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDF	80	68	71	91	----	48	86
¹³ C ₁₂ -2,3,4,6,7,8-HxCDF	84	75	71	83	80	47	82
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	83	62	69	90	63	48	92
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	85	71	----	109	----	43	116
¹³ C ₁₂ -OCDF	91	60	----	93	64	40	----
¹³ C ₁₂ -TeCB(#81)	65	73	80	53	65	35	
¹³ C ₁₂ -TeCB(#77)	69	75	80	60	69	37	61
¹³ C ₁₂ -PeCB(#126)	74	98	104	88	75	42	68
¹³ C ₁₂ -HxCB(#169)	78	95	76	102	71	36	63
¹³ C ₁₂ -PeCB(#123)	80	84	121	62	----	45	90
¹³ C ₁₂ -PeCB(#118)	83	89	97	56	69	43	91
¹³ C ₁₂ -PeCB(#114)	----	96	94	62	----	45	100
¹³ C ₁₂ -PeCB(#105)	81	86	88	71	67	43	----
¹³ C ₁₂ -HxCB(#167)	84	88	89	64	53	45	105
¹³ C ₁₂ -HxCB(#156)	88	90	97	70	----	50	96
¹³ C ₁₂ -HxCB(#157)	86	95	----	----	64	49	115
¹³ C ₁₂ -HpCB(#189)	83	89	----	----	78	58	96

表 5. 血清中脂質濃度

	試料中濃度 (mg/血清 1 g)								
	a	b	c	d	e	f	g	平均	CV
脂質	5.78	5.32	29.3	5.12	5.17	5.30	2.95	8.42	1.10

表6. 血清試料中ダイオキシン類濃度

		試料中濃度(pg/血清 1g) *1								
		a	b	c	d	e	f	g	平均	CV
P	2,3,7,8-TeCDD	0 005	0 009	ND	ND	0 014	ND	0 007		
C	1,2,3,7,8-PeCDD	0 021	0 019	0 021	0 023	0 024	0 043	0 021	0 025	0 34
D	1,2,3,4,7,8-HxCDD	0 022	0 022	0 020	0 022	0 053	0 026	0 024	0 027	0 43
D 異 性 体	1,2,3,6,7,8-HxCDD	0 17	0 18	0 17	0 23	0 26	0 18	0 19	0 20	0 17
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0 027	0 030	0 037	0 035	0 039	0 026	0 028	0 032	0 16
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0 29	0 31	0 28	0 27	0 30	0 27	0 28	0 29	0 05
	OCDD	1 9	5 0	1 9	2 1	2 4	1 9	2 0	2 4	0 46
P	2,3,7,8-TeCDF	0 002	0 003	ND	ND	0 063	ND	0 004		
C	1,2,3,7,8-PeCDF	0 003	0 003	ND	ND	0 006	ND	0 003		
D	2,3,4,7,8-PeCDF	0 023	0 025	0 023	0 027	0 031	0 029	0 027	0 026	0 11
F 異 性 体	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0 027	0 028	0 030	0 032	0 035	0 037	0 030	0 031	0 11
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0 025	0 025	0 027	0 028	0 030	0 034	0 028	0 028	0 11
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0 002	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0 009	0 010	ND	0 008	0 016	0 013	0 009		
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0 061	0 054	0 057	0 065	0 073	0 056	0 068	0 062	0 11
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0 002	0 003	ND	ND	0 009	ND	ND		
	OCDF	0 007	0 007	ND	0 012	0 026	ND	0 015		
TEQ-PCDDs/PCDFs *2		0 070	0 075	0 064	0 075	0 110	0 092	0 077	0 080	0 19
Co	TeCB(#81)	0 009	0 021	0 017	0 021	0 021	ND	ND		
-P	TeCB(#77)	0 12	0 20	0 19	0 31	0 24	0 19	0 18	0 20	0 29
CB 異 性 体	PeCB(#126)	0 076	0 119	0 157	0 098	0 150	0 120	0 080	0 114	0 28
	HxCB(#169)	0 064	0 101	0 076	0 090	0 076	0 150	0 070	0 090	0 33
	PeCB(#123)	0 64	1 51	0 86	1 42	1 01	0 60	0 46	0 93	0 44
	PeCB(#118)	48	70	58	52	62	54	54	57	0 13
	PeCB(#105)	6 4	10 1	8 3	8 4	10 0	7 5	7 7	8 3	0 16
	PeCB(#114)	2 9	4 6	3 8	3 4	4 0	3 2	3 2	3 6	0 16
	HxCB(#167)	8 1	11 6	10 0	11 5	8 2	9 9	9 3	9 8	0 14
	HxCB(#156)	25	36	33	36	26	31	29	31	0 14
	HxCB(#157)	7 5	11 3	10 0	10 6	12 3	15 0	9 0	10 8	0 22
	HpCB(#189)	2 1	3 4	2 7	2 6	1 9	2 7	2 3	2 5	0 19
TEQ-PCBs *2		0 032	0 047	0 047	0 042	0 044	0 045	0 036	0 042	0 14

*1 試料中濃度はブランク値を差し引いていない

*2 WHO(1998)のTEFを使用して算出した

表7. 血清分析における操作ブランク値

		操作ブランク値(pg/血清 1g)							
		a	b	c	d	e	f	g	
P C D D 異 性 体	2,3,7,8-TeCDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1,2,3,7,8-PeCDD	ND	ND	ND	ND	0 016	ND	ND	
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	ND	ND	ND	ND	0 027	ND	ND	
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	ND	ND	ND	ND	0 021	ND	ND	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	0 003	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0 003	ND	ND	ND	0 008	ND	ND	
	OCDD	0 007	ND	ND	0 027	0 039	0 027	0 010	
	P C D F 異 性 体	2,3,7,8-TeCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,2,3,7,8-PeCDF	0 002	ND	ND	ND	0 006	ND	ND	
2,3,4,7,8-PeCDF	0 002	ND	ND	ND	0 011	ND	ND		
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0 002	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0 002	ND	ND	ND	0 013	ND	ND		
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0 002	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0 002	ND	ND	ND	0 005	ND	ND		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0 006	ND	ND	ND	0 014	ND	ND		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0 002	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
OCDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
C o - P C B s 異 性 体	TeCB(#81)	0 003	ND	ND	0 008	0 033	ND	ND	
	TeCB(#77)	0 01	ND	ND	0 11	0 25	ND	0 03	
	PeCB(#126)	ND	ND	ND	ND	0 042	ND	ND	
	HxCB(#169)	0 003	ND	ND	ND	0 039	ND	ND	
	PeCB(#123)	ND	ND	ND	ND	0 27	ND	ND	
	PeCB(#118)	0 08	ND	0 17	0 88	1 1	0 09	0 27	
	PeCB(#105)	0 02	ND	0 07	0 37	0 47	0 03	0 07	
	PeCB(#114)	ND	ND	ND	ND	0 45	ND	ND	
	HxCB(#167)	0 004	ND	ND	ND	0 34	ND	ND	
	HxCB(#156)	0 014	ND	ND	ND	0 17	ND	ND	
	HxCB(#157)	0 004	ND	ND	ND	0 24	ND	ND	
	HpCB(#189)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

表 8 . 血清分析における内部標準物質の回収率

内標準物質	回収率 (%)						
	a	b	c	d	e	f	g
$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TeCDD	91	68	61	87	129	86	55
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8-PeCDD	97	79	69	96	122	87	69
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDD	99	82	73	87	85	84	74
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDD	101	71	75	84	61	94	75
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDD	----	75	69	----	89	----	76
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	80	85	75	86	82	81	63
$^{13}\text{C}_{12}$ -OCDD	58	67	79	75	80	87	53
$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TeCDF	90	71	62	89	91	77	66
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8-PeCDF	90	77	72	89	94	----	70
$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,7,8-PeCDF	97	72	67	94	102	81	70
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8-HxCDF	87	74	72	85	103	78	75
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-HxCDF	88	70	70	84	75	80	72
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDF	90	68	69	88	102	----	70
$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,6,7,8-HxCDF	89	72	70	91	92	87	75
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	73	71	73	80	85	83	59
$^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	69	73	72	90	114	----	63
$^{13}\text{C}_{12}$ -OCDF	----	62	75	----	95	71	48
$^{13}\text{C}_{12}$ -TeCB(#81)	93	67	60	104	43	78	61
$^{13}\text{C}_{12}$ -TeCB(#77)	95	77	62	119	51	77	64
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeCB(#126)	116	92	63	104	74	85	49
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxCB(#169)	91	96	68	118	94	89	39
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeCB(#123)	127	83	65	107	70	----	68
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeCB(#118)	124	85	65	109	75	82	71
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeCB(#114)	132	90	----	93	80	----	64
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeCB(#105)	122	80	64	111	67	----	69
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxCB(#167)	95	86	70	75	78	83	56
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxCB(#156)	93	90	72	78	86	80	54
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxCB(#157)	97	90	71	78	81	----	52
$^{13}\text{C}_{12}$ -HpCB(#189)	109	89	75	87	78	85	50

別添1 ヒト血清及び母乳中ダイオキシン類の分析法の改良
—試料の少量化と精製操作の迅速化・省力化に関する検討—

飯田隆雄¹⁾、熊谷信二²⁾、藤峯慶徳³⁾

- 1) 福岡県保健環境研究所
- 2) 大阪府公衆衛生研究所
- 3) 大塚アノセイ研究所

A 目的

これまでに我々は 5g の血液中のポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン (PCDDs)、ポリ塩素化シベンゾフラン (PCDFs) 及び non-ortho- coplanar ポリ塩化ヒフェニル (coplanar PCBs) 濃度を正確に測定するために分析法を改良した。この改良方法は、大きく 4 つのステップから構成される。すなわち、①ヒト血液の真空凍結乾燥、②血液からの高速溶媒抽出システム (ASE) による脂質抽出、③従来法の 4 分の 1 スケールのカラムクリーンアップ系による精製、④溶媒除去大量注入システム (SCLV) を装備した高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置 (HRGC/HRMS) による精密定量法である。前処理法の改善によって、操作時間は短縮され、溶媒の消費量は大幅に削減された。さらに、SCLV 注入システム装備 GC-MS の感度は、従来に比べて 10 倍向上した。同じ血液 (全血) 試料について、改良された方法及び従来の方法の両方の方法による PCDDs、PCDFs 及び Co-PCBs の測定結果から、測定が血液量 5g で可能であることを確認した¹⁾。この方法は、従来の方法に比べて、高い再現性で迅速に多数のサンプルを処理することかできる。本研究では、この改良法の血液 (全血) 以外の試料に対する有効性を検討するため、今回、血清試料及び粉乳 (模擬母乳) 試料に応用し、従来法との比較を行った。

B 材料及び方法

B-1 材料

B-1.1 試料

血清試料 市販の血清 (コンセーラ L 日水製薬) 2.5g を用いた。

母乳試料 粉乳試料約 4.5g に水 20g を加えて溶かし、その 5g を模擬母乳試料として用いた。

B-1.2 試薬

PCDDs (7 種類) および PCDFs (10 種類) の検量線作成には Wellington 社製 EPA Method 1613 Calibration and Verification Standards CS1-CS-5 を、non-ortho-PCBs (4 種類) の検量線作成には Wellington 社製 EPA Method 1668 Calibration and Verification Standards CS1-CS5 を用いた。内部標準物質には ¹³C₁₂ 標識 PCDDs、PCDFs (Wellington 社製) および ¹³C₁₂ 標識 PCBs (Cambridge Isotope 社製) を用いた。シリンススパイクには Wellington 社製の ¹³C₁₂-1,2,3,4-TCDD (PCDDs/DFs 及び non-ortho-PCBs 分析用) 及び ¹³C₁₂-2,3,3',5,5'-PeCB ((PCB#111) mono-ortho-PCBs 分析用) を用いた。活性炭は、以下のとおり調製した。活性炭 (ナカライテスク、京都、日本) をトルエン中で 1 時間の加熱還流とテカンーションによる精製を 3 回繰り返して、減圧下乾燥した。この活性炭 500mg に 500g の無水硫酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社、東京、日

本)を加え混合した。硝酸銀/シリカゲルは、和光純薬工業株式会社(東京、日本)製を使用した。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。

B-2 方法

B 2 1 抽出

試料を解凍後、ガラス繊維製円筒ろ紙(アイソリュート 4g 入り)を入れた ASE 抽出セル(33ml)に血清試料は約 2.5g を、母乳試料は約 5g を精密に秤取し、一夜真空凍結乾燥した。凍結乾燥後、内部標準(C₄-C₇-PCDDs/DFs 及び C₄-C₆-non-ortho-PCBs は 10pg、OCDDs/DFs は 20pg、C₅-C₇-mono-ortho-PCBs は 50pg)を添加して、抽出セルを ASE 抽出装置に装着し、抽出溶媒アセトン・ヘキサン(1/3, v/v) 50ml、抽出温度 150°C、抽出圧力 2,000psi、静置時間 10 分、フラッシュ容量 60%、パージ時間 90 秒、静置サイクル数 2 回で抽出した。

抽出液は減圧ロータリーエバポレーターで溶媒を除去したのち、ヘキサンで秤量ビンに移し、室温で一夜放置して溶媒を留去、抽出物重量を求め、これを脂質重量とした。

B 2 2 精製

B-2 で得られた抽出物をヘキサン 3ml でスピッチ中に洗い出し、これに濃硫酸 2ml を加えて一夜静置した。遠心分離後、上清を従来量の 1/4 量の硝酸銀カラム及び活性炭カラムを直結したカラムクリーンアップ系で行った。すなわち、上清を硝酸銀シリカゲル(0.25g)カラムに移し、少量のヘキサンでスピッチを洗いこみヘキサン 15ml で溶出させた。溶出液は直接、活性炭 無

水硫酸ナトリウム(0.5g)カラムに流し込んだ。続いて活性炭カラムからジクロロメタン・ヘキサン(1/10, v/v)10ml で PCBs を溶出させて PCBs 画分とした。さらに、トルエン 25ml で PCDDs/DFs および non-ortho-PCBs を溶出させてダイオキシン画分とした。トルエン溶出液を濃縮し、少量のジクロロメタンで GC 用バイアルに洗い込み、溶媒を室温で留去した。シリンジスバイク溶液を加えてノナンで最終検液量を 10 μ とし、PCDDs/DFs 及び non-ortho-PCBs 測定用最終検液とした。第 1 画分は減圧濃縮し、再度、活性炭(関東化学、東京、日本)カラムで mono-ortho-PCBs を分離した。溶出液にシリンジスバイク溶液を加え、ノナンで 20 μ l とし mono-ortho-PCBs 測定用最終検液とした。

B-4 GC/MS 測定条件

B-4 1 PCDDs/DFs 及び non-ortho-PCBs 測定

B-4 1 1 測定機器

ガスクロマトグラフ HP6890 (Hewlett Packard)、オートインジェクター付き。

質量分析計 Autospec-Ultima E (Micromass)

B-4 1 2 操作条件

ガスクロマトグラフ

カラム

プレカラム BPX5 キャピラリーカラム (SGE 社製 Fused Silica Capillary Column, 内径 0.25mm, 膜厚 0.25 μ m, 長さ, 6m)
分析カラム BPX-Dioxin I キャピラリーカラム (SGE 社製 Fused Silica Capillary Column, 内径 0.15mm, 膜厚 0.15 μ m, 長さ, 30m)

カラム温度 180°C (0 分間保持) 320°C まで 20 $^{\circ}$ /min 昇温、320°C (5 分間保持)、70°C

/min 降温、180°C (1 分間保持)、5°C/min 昇温、320°C (5 分間保持)

キャリアーガス He 1.3ml/min

注入量 5 μ l

注入口温度 280°C

注入方法 スプリットレス (60 秒)

インターフェイス温度 280°C

質量分析

加速電圧 8kV

分解能 10000

イオン化電圧 34.3eV

トラップ電流 750 μ A

マルチプライヤー電圧 410V

イオン源温度 270°C

B-4 2 mono-ortho-PCBs 測定

B-4 2 1 測定機器

ガスクロマトグラフ HP6890 (Hewlett Packard)、オートインジェクター付き。

質量分析計 Autospec-Ultima E (Micromass)

B-4 2 2 操作条件

ガスクロマトグラフ

カラム HT-8、長さ 50m、内径 0.22mm、膜厚 0.25 μ m (SGE 社製)

カラム温度 150°C (1 分間保持)、20°C/分で 220°C まで昇温、3°C/分で 320°C まで昇温、320°C (3.2 分間保持)

キャリアーガス He 1.3ml/min

注入量 1 μ l

注入口温度 280°C

注入方法 スプリットレス (60 秒)

インターフェイス温度 320°C

質量分析

加速電圧 8kV

分解能 10000

イオン化電圧 40eV

トラップ電流 750 μ A

マルチプライヤー電圧 410V

イオン源温度 280°C

C 結果及び考察

C-1 測定結果の再現性

血清及び粉乳の 3 回繰り返し測定結果を表 1 及び表 2 に示す。これらの表から分かるように血清及び粉乳で 29 種のダイオキシン類のうち、1,2,3,7,8-HxCDF、1,2,3,4,7,8,9-HpCDF および OCDF を除く 26 種が検出され、3 回の測定結果は良好な再現性を示した。

C-2 ブランク

表 3 にブランク、血清 1g 当りのブランク及び脂質 1g 当りブランクの平均値を示す。この表から分かるように、ブランクは OCDD (0.18pg)、2,3,7,8-TCDF (0.0075pg)、1,2,3,7,8-PeCDF (0.0061pg)、2,3,7,8-PeCDF (0.0048pg)、PCB#81 (0.0025pg)、PCB#77 (0.027pg)、PCB#126 (0.0039pg)、PCB#169 (0.0039pg)、PCB#118 (0.80pg) であった。このうち OCDD (31pg/g Lipid)、2,3,7,8-TCDF (1.3pg/g Lipid)、1,2,3,7,8-PeCDF (1.0pg/g Lipid)、PCB#77 (11pg/g Lipid)、と PCB#118 (134pg/g Lipid) は検出限界値を超えるか、一般にこれらの化合物の人体試料中濃度は高く、また、毒性等価係数 TEF は 0.0001 であるので TEQ にはほとんど影響なく、ブランク補正することによって問題は解決すると考えられる。

C-3 回収率

表 4 に血清及び粉乳の IS 添加回収率を示す。この表から分かるように血清及び粉乳の IS 添加回収率は、それぞれ、52-116% 及

び 68-116%の間であり、いずれの化合物も良好な結果であった。

C-4 測定値の従来法との比較

3つの異なる分析法を用いて測定された血液の測定結果を表5に示す。すなわち、福岡県保健環境研究所(A)はASE抽出、SCLV・GC/MS分析(改良法)、大塚アノセイ研究所(B)は従来の暫定分析法による前処理とSCLV・GC/MS分析、大阪府公衆衛生研究所(C)は前処理、GC/MS測定ともに暫定分析法で分析した。表5から分かるように暫定分析法・SCLV注入を用いた大塚アノセイ研究所(B)及び大阪府公衆衛生研究所(C)の測定結果はほぼ一致していた。これに対してASE抽出・SCLV注入を使用した(A)はHpCDDで約15倍、OCDDで約2倍の高値を示した。この相違はASE抽出に起因すると考えられる。ASE抽出によって血清からのHpCDD及びOCDDの抽出率が向上したのか、HpCDD及びOCDDが生成したのか、あるいはその他の原因によるかは不明である。HpCDD及びOCDDを除くと3者の測定結果はよく一致しており、HpCDD及びOCDDのTEFが、それぞれ、0.01及び0.0001と小さいことから(A)、(B)及び(C)のTotal TEQは、それぞれ、0.10、0.10及び0.12pg/gとよく一致していた。次に、血清中脂質含量を比べると(A)、(B)及び(C)は0.25、0.58及び0.51%で、(A)は(B)及び(C)に比べておよそ半分の値であった。血清中脂質量が異なる原因は不明で今後の検討が必要である。

次に、表6に福岡県保健環境研究所(A)と大塚アノセイ研究所(B)の粉乳(母乳模擬試料)分析結果を示す。(A)及び(B)

測定値はいずれの化合物でもよい一致を示した。また、(A)及び(B)の脂質含量測定値は、それぞれ、平均値で27%及び28%とほぼ同程度の値であった。

まとめ

最近我々は少量の血液(全血)からダイオキシン類を迅速高感度に測定するために分析法を改良した。この改良分析法を血清試料及び粉乳(模擬母乳)試料に応用した。その結果、血清ではダイオキシン類の各化合物の濃度は1,2,3,6,7,8-HpCDD及びOCDDを除いてほぼ従来法と同じ値であった。1,2,3,6,7,8-HpCDD及びOCDDは従来法に比べて、それぞれ、15倍及び2倍高い値を示した。1,2,3,6,7,8-HpCDD及びOCDDは毒性等価係数が0.01及び0.0001と低いのでTEQには大きな影響はなかった。また、血清中脂質抽出量が約1/2であり、血清中脂質含量については今後、検討が必要である。粉乳(模擬母乳)試料については、ダイオキシン類の各化合物濃度は改良法と従来法の測定結果は良く一致していた。また、脂質含量もほぼ同じ値であった。以上、血清試料と粉乳(模擬母乳)試料を改良法と従来法で分析した結果、血清では1,2,3,6,7,8-HpCDD及びOCDD濃度、脂質含量についてなお検討を要するか、粉乳(模擬母乳)試料については極めて良い一致を示すことが分かった。

文献

- 1 T Iida, T Todaka Industrial Health 2003, 41, 197-204
- 2 T Todaka, T Iida Fukuoka Acta Med 2003, 94, 148-157

表 1 血清測定結果

		試料中濃度 (pg/血清 1g)				
		1 回目	2 回目	3 回目	平均	標準偏差
PCDDs 異性体	2, 3, 7, 8-TeCDD	0 0058	0 0059	0 0057	0 0058	0 00008
	1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0 023	0 022	0 022	0 022	0 00044
	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0 020	0 023	0 023	0 022	0 0014
	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0 17	0 18	0 18	0 18	0 0071
	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0 030	0 031	0 030	0 030	0 00055
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0 41	0 44	0 44	0 43	0 019
	OCDD	5 7	5 6	5 4	5 6	0 178
PCDFs 異性体	2, 3, 7, 8-TeCDF	0 0050	0 0042	0 0052	0 0048	0 00055
	1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0 0055	0 0059	0 0050	0 0055	0 00044
	2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0 018	0 021	0 020	0 020	0 0015
	1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0 026	0 025	0 025	0 026	0 00072
	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0 027	0 028	0 025	0 026	0 0016
	1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	-	-	-	-	-
	2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0 0078	0 0076	0 0070	0 0075	0 00040
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0 052	0 050	0 048	0 050	0 0020
	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	-	-	-	-	-
	OCDF	-	-	-	-	-
TEQ-PCDDs/PCDFs		0 062	0 074	0 070	0 069	0 0063
Co-PCBs 異性体	3, 4, 4', 5-TeCB (#81)	0 015	0 014	0 015	0 014	0 00063
	3, 3', 4, 4'-TeCB (#77)	0 16	0 15	0 15	0 15	0 0021
	3, 3', 4, 4', 5-PeCB (#126)	0 083	0 083	0 087	0 084	0 0019
	3, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB (#169)	0 075	0 071	0 069	0 072	0 0030
	2', 3, 4, 4', 5-PeCB (#123)	0 59	0 61	0 63	0 61	0 018
	2, 3', 4, 4', 5-PeCB (#118)	41	43	43	42	1 4
	2, 3, 3', 4, 4'-PeCB (#105)	6 7	6 2	5 5	6 1	0 59
	2, 3, 4, 4', 5-PeCB (#114)	3 0	2 6	3 3	2 9	0 36
	2, 3', 4, 4', 5, 5'-HxCB (#167)	7 3	7 6	6 6	7 2	0 48
	2, 3, 3', 4, 4', 5-HxCB (#156)	26	24	23	24	1 5
	2, 3, 3', 4, 4', 5'-HxCB (#157)	8 0	7 0	6 9	7 3	0 60
	2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'-HpCB (#189)	2 2	2 3	2 0	2 2	0 17
TEQ-PCBs		0 030	0 028	0 029	0 029	0 00062
TEQ-PCDDs/PCDFs/PCBs		0 092	0 103	0 099	0 098	0 0057
脂質 (mg/血清 1g)		2 4	2 5	2 5	2 5	0 078