

分担研究報告書

ダイオキシン類の個別食品の汚染実態調査

分担研究者 飯田 隆雄

(福岡県保健環境研究所)

厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)
分担研究報告書

ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究
(2)ダイオキシン類の個別食品の汚染実態調査

分担研究者 飯田隆雄 福岡県保健環境研究所

研究要旨

魚介類, 畜肉, 野菜, 果実, 乳及びそれらの加工品等 170 試料について, PCDDs 7 種, PCDFs 10 種及び Co-PCBs 12 種の計 29 種のダイオキシン類濃度を調査した。

その結果, 鮮魚(55 試料)から, 0.013 ~ 7.310 (平均 1.287) pgTEQ/g, 貝類(11 試料)から 0.001 ~ 0.979 (平均 0.349) pgTEQ/g, 魚干物(13 試料)から, 0.051 ~ 2.697 (平均 0.872) pgTEQ/g のダイオキシン類が検出された。鯨肉(9 試料)からは 0.003 ~ 2.353 (平均 0.531) pgTEQ/g, 鯨脂肪(1 試料)からは 124.89 pgTEQ/g のダイオキシン類が検出されたが, 同一個体の肉から検出された濃度と fat basis で比較すると同レベルであった。

畜肉(9 試料)から平均 0.075 pgTEQ/g, レバー(9 試料)から平均 0.160 pgTEQ/g 検出された。

乳製品 19 試料中 18 試料から 0.001 ~ 0.139 pgTEQ/g のダイオキシン類が検出された。

野菜, 果実(13 試料)では, ほうれんそう, ちんげんさい(6 試料)から 0.001 ~ 0.104 pgTEQ/g 検出されたが, 果実(6 試料)は検出限界以下であった。

茶葉(4 試料)と切り干し大根(3 試料)からは, それぞれ 0.053 ~ 0.104 pgTEQ/g, 0.022 ~ 0.087 pgTEQ/g が検出された。また, 乾燥海藻類では 8 試料全てから 0.001 ~ 0.172 pgTEQ が検出された。

鮮魚, 干物では約 70 %, 鯨では 95 % 以上が Co-PCB であったが, 乳製品, 野菜とその加工品, 海藻では Co-PCB より PCDD/Fs 濃度が高い傾向が認められた。

研究協力者

福岡県保健環境研究所

中川礼子, 堀 就英, 飛石和大

(財)日本食品分析センター

丹野憲二, 野村孝一, 柳 俊彦, 河野洋一

国立医薬品食品衛生研究所

佐々木久美子, 堤 智昭, 天倉吉章

A. 研究目的

一般の国民は主に食品を介してダイオキシン類に暴露されている。本研究では食品のダイオキシン類汚染実態を把握し, 個人別暴露量を正確に評価するために, 魚介類をはじめとして, 畜肉, 野菜, 果実, 卵, 乳及びそれらの加工品について, ダイオキシン類含有量を調査した。

B. 研究方法

1. 試料

平成15年度に採取した国内産食品(156試料)及び輸入食品(14試料)を対象とした。鯨7試料以外の各食品は東京及び福岡で購入した。鯨脂肪を含む鯨7試料は, 平成12~13年に北海道内で食用として市販されていたものを北海道立衛生研究所から分与を受けた。

2. 試験項目及び検出限界

WHO が毒性等価係数(TEF)を定めた下記の PCDDs 7 種, PCDFs 10 種及び Co-PCBs 12 種の計 29 種を分析対象とした。

()内の数字は検出限界(pg/g)を示す。

PCDDs

- 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD (0.01)
- 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (0.02)
- 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD (0.05)

PCDFs

- 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF (0.01)
- 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,7,8,9-HxCDF, 2,3,4,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF (0.02)
- 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF (0.05)

Co-PCBs

- 3,3',4,4'-TCB(#77), 3,4,4',5-TCB(#81), 3,3',4,4',5-PeCB(#126), 3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169) (0.1)
- 2,3,3',4,4'-PeCB(#105), 2,3,4,4',5-PeCB(#114), 2,3',4,4',5-PeCB(#118), 2',3,4,4',5-PeCB(#123), 2,3,3',4,4',5-HxCB(#156), 2,3,3',4,4',5'-HxCB(#157), 2,3',4,4',5,5'-HxCB(#167), 2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(#189) (1)

3. 試験方法

「食品中のダイオキシン類測定方法ガイドライン」(平成11年10月)に従って分析した。なお、野菜・果実・乳製品・加工食品試料の抽出には、高速溶媒抽出装置を使用した。

4. 分析結果の表記

測定結果は湿重量あたりの毒性等量(pgTEQ/g)で示した。検出限界以下の異性体濃度はゼロとして計算した。

C. 研究結果及び考察

各食品の調査結果を表1に示した。

1. 魚介類の調査結果

生鮮魚類(あなご～まだら) 55 試料のダイオキシン類濃度は平均 1.287 pgTEQ/gであった。「厚生科学研究:ダイオキシン類の食品経路総摂取量調査研究」報告書に示された平成11及び12年度及び本研究における平成13, 14年度調査の平均値は 1.756, 2.002, 0.600, 1.862 pgTEQ/gであった。調査対象の魚種が年度によっ

て異なることから、経年変化ととらえることはできないが、0.6～2.0 pgTEQ/gで推移している。

貝類(あさり～しじみ) 11 試料のダイオキシン類濃度は平均 0.349 pgTEQ/gであった。カニは2試料を調査したが、1試料から 3.471 pgTEQ/gの比較的高い濃度が検出された。

塩干物(塩さけ～めざし 13 試料)の平均値は 0.872 pgTEQ/gであり、平成13年度(12試料)及び14年度(16試料)の平均値はそれぞれ 1.502, 0.910 pgTEQ/gであった。13年度は塩サケ1試料が 6.09 pgTEQ/gの高濃度であったため平均値が他の2年より高かった。

煮干しは 2.702 pgTEQ/gであり、14年度調査の 1.252 及び 4.657 pgTEQ/gと同程度であった。

生鮮魚及び塩干物中のダイオキシン類濃度に占める Co-PCBs の割合は、それぞれ平均 75.0% 及び 65.01%であり、何れも Co-PCB が PCDD/Fs より多かった。しかし、貝類では Co-PCB が 41.6% と PCDD/Fs より少なかった。

2. 鯨の調査結果

鯨肉 9 試料及び鯨脂肪 1 試料を分析した結果、鯨肉中のダイオキシン類濃度は平均 0.531 pgTEQ/g であり、生鮮魚の平均濃度より低かった。

鯨脂肪(脂肪含量 97.1%)からは、124.89 pgTEQ/g のダイオキシン類が検出されたが、同一個体の肉(脂肪含量 1.3%)では、2.353 pgTEQ/g であり、fat basis に換算すると同程度の濃度であった。

鯨から検出されたダイオキシン類の 94～100%は Co-PCB であり、魚介類に比べて Co-PCB の比率が非常に高かった。

3. 畜肉、卵及び畜肉加工品の調査結果

牛肉、豚肉、鶏肉各 3 試料のダイオキシン類濃度は平均 0.075 pgTEQ/g、牛レバー、豚レバー、鶏レバー各 3 試料の平均値は 0.160 pgTEQ/g であった。肉とレバーの脂肪含量は、それぞれ 12～42%、4～6%であり、レバーは低脂肪であるにも係わらず肉より高濃度にダイオキシン類を蓄積している傾向が認められたが、試料の肉とレバーは同一個体のものではないので、断定はできない。

ソーセージ、ベーコン、サラミ、コーンビーフは各

1 試料を分析したが、これらの中でサラムのダイオキシン濃度が最も高いのは、14年度調査と同様の結果であった。

鶏卵とうずら卵4試料のダイオキシン濃度は平均0.089 pgTEQ/gであった。

4.牛乳, 乳製品の調査結果

牛乳, アイスクリーム, チーズ及びヨーグルト 19試料中 18 試料から 0.001 ~ 0.139 pgTEQ/g のダイオキシン類が検出された。これらの食品では Co-PCB よりも PCDD/Fs の濃度が高い傾向が認められた。

5.野菜, 果実の調査結果

平成 10 ~ 12 年度に調査された穀類・野菜・果実の中で、ダイオキシン類濃度が比較的高かったのは葉菜類であったが、今回もほうれんそう、ちんげんさいから、0.001~0.104 pgTEQ/gが検出された。検出されたダイオキシン類の大半はPCDD/Fsであった。ぶどう、りんご及び柿からは検出されなかった。

6.加工食品の調査結果

茶葉と切り干し大根からは、それぞれ 0.053 ~ 0.104 pgTEQ/g, 0.022 ~ 0.087 pgTEQ/g が検出された。クッキーの 1 試料は 0.224 pgTEQ/g の比較的高濃度であった。乾燥した昆布、海苔、ひじき及びわかめ 8 試料全てから、0.001 ~ 0.172 pgTEQ/g のダイオキシン類が検出された。

加工食品では Co-PCB より PCDD/Fs の濃度が高い傾向が認められた。

D. 結論

魚介類, 畜肉, 野菜・果実, 乳製品等の各種食品 170 試料について、ダイオキシン類濃度を調査した結果、最も濃度が高いのは生鮮魚類であり、平均 1.287 pgTEQ/g (0.013 ~ 7.310 pgTEQ/g) であった。あなご、かじき、さば、すずき、ぶり、ほっけでは、一切れを摂食することによりダイオキシン摂取量が TDI を超えるものも散見されたことから、食品選択が偏らない食生活が重要と考えられた。

特に高濃度汚染が懸念される魚介類, 畜肉, 乳

製品等のダイオキシン類濃度データを用いて年齢別, 多食者の場合など, きめ細かな暴露量評価が行えるように, 今後も個別食品調査データを集積する必要がある。

謝辞

鯨試料を提供下さった北海道立衛生研究所に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) 厚生科学研究「ダイオキシン類の食品経路総摂取量調査研究」(平成 10 ~ 12 年度)総合研究報告書
- 2) 厚生科学研究「ダイオキシン類の食品経路総摂取量調査研究」平成 11 年度研究報告書
- 3) 厚生科学研究「ダイオキシン類の食品経路総摂取量調査研究」平成 12 年度研究報告書
- 4) 厚生労働科学研究「ダイオキシンの汚染実態の把握及び摂取低減化に関する研究」平成 13 年度及び 14 年度研究報告書

E. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Tsutsumi, T.*¹, Amakura, Y.*¹, Yanagi, T.*², Nakamura, M.*², Kono, Y.*², Uchibe, H.*², Iida, T.*³, Toyoda, M.*⁴, Sasaki, K.*¹ and Maitani, T.*¹: Levels of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in retail fish and shellfish in Japan

23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (2003.8)

*¹ National Institute of Health Sciences

*² Japan Food Research Laboratories

*³ Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

*⁴ Jissen Woman's University

表1 平成15年度 食品中のダイオキシン類の濃度 (pgTEQ/g)

食品	産地	ダイオキシン類 (pgTEQ/g)			
		PCDD/Fs	Co-PCB	Total	
魚介類 (鮮魚)	あなご	国産	0.739	1.899	2.638
	あなご	国産	0.476	0.939	1.415
	うなぎ	輸入	0.128	0.205	0.333
	うなぎ	輸入	0.200	0.292	0.493
	うなぎ	輸入	0.152	0.285	0.437
	かじき	国産	0.936	3.381	4.317
	かじき	国産	1.916	3.569	5.484
	かじき	国産	0.142	1.024	1.166
	かつお	国産	0.046	0.230	0.276
	かつお	国産	0.058	0.266	0.323
	かます	国産	0.163	0.415	0.578
	かます	国産	0.368	0.932	1.300
	かます	国産	0.428	1.277	1.705
	かれい	国産	0.061	0.050	0.111
	かれい	国産	0.100	0.109	0.209
	きす	国産	0.083	0.162	0.245
	きす	国産	0.284	0.520	0.804
	きす	国産	0.112	0.161	0.272
	金目鯛	国産	0.050	1.106	1.156
	金目鯛	国産	0.070	1.761	1.831
	金目鯛	国産	0.205	1.018	1.222
	さけ	国産	0.014	0.053	0.067
	さけ	国産	0.015	0.052	0.067
	さけ	国産	0.008	0.026	0.034
	さけ	輸入	0.070	0.383	0.453
	さけ	輸入	0.007	0.085	0.092
	さば	国産	0.845	1.672	2.517
	さば	国産	0.441	1.194	1.635
	さば	国産	0.323	0.790	1.113
	すけとうたら	国産	0.002	0.027	0.029
	すけとうたら	国産	0.011	0.366	0.377
	すずき	国産	1.185	6.126	7.310
	すずき	国産	1.672	5.520	7.192
たちうお	国産	0.156	0.645	0.801	
たちうお	輸入	0.042	0.034	0.076	
ひらめ	国産	0.054	0.133	0.187	
ひらめ	国産	0.056	0.147	0.202	
ぶり	国産	0.831	2.735	3.566	
ぶり	国産	1.043	3.347	4.391	
ぶり	国産	0.717	1.951	2.668	
ほっけ	国産	1.306	3.305	4.612	
ほっけ	国産	0.084	0.210	0.293	
ほっけ	国産	0.102	0.160	0.261	

食品	産地	ダイオキシン類 (pgTEQ/g)			
		PCDD/Fs	Co-PCB	Total	
魚介類 (鮮魚)	まあじ	国産	0.228	0.450	0.679
	まあじ	国産	0.613	0.694	1.308
	まあじ	国産	0.311	0.457	0.767
	まいわし	国産	0.173	0.595	0.768
	まいわし	国産	0.093	0.229	0.322
	まいわし	国産	0.139	0.468	0.607
	まぐろ	国産	0.091	0.304	0.395
	まぐろ	国産	0.321	1.177	1.498
	まぐろ	国産	<0.001	0.013	0.013
	まだら	国産	0.002	0.065	0.067
まだら	国産	0.004	0.075	0.079	
まだら	国産	<0.001	0.027	0.027	
魚介類 (貝類)	あさり	国産	0.190	0.054	0.244
	あさり	国産	0.001	<0.001	0.001
	かき	国産	0.099	0.262	0.361
	かき	国産	0.410	0.204	0.614
	かき	国産	0.033	0.047	0.080
	しじみ	国産	0.519	0.369	0.888
	しじみ	国産	0.549	0.430	0.979
	しじみ	国産	0.126	0.130	0.256
	ホタテ貝	国産	0.044	0.068	0.112
	ホタテ貝	国産	0.094	0.193	0.288
ホタテ貝	国産	0.014	0.001	0.015	
魚介類 (甲殻類)	かに	国産	1.408	2.062	3.471
	かに	国産	0.249	0.220	0.469
魚介類 加工品	塩さけ	国産	0.011	0.040	0.051
	塩さけ	国産	0.136	0.256	0.392
	塩さけ	輸入	0.168	0.296	0.463
	塩さば	国産	1.222	1.475	2.697
	塩さば	国産	0.457	0.969	1.426
	塩さば	輸入	0.173	0.296	0.469
	塩さば	輸入	0.082	0.371	0.453
	ししゃも	輸入	0.572	0.866	1.438
	ししゃも	輸入	0.559	0.820	1.379
	ちりめんじゃこ	国産	0.283	0.492	0.775
	ちりめんじゃこ	国産	0.055	0.204	0.258
	ちりめんじゃこ	国産	0.238	0.217	0.455
	煮干し	国産	1.033	1.668	2.702
めざし	国産	0.433	0.648	1.081	
鯨肉	鯨肉	国産	<0.001	0.013	0.013
	鯨肉	国産	<0.001	0.038	0.038
	鯨肉	国産	<0.001	0.013	0.013
	鯨肉	国産	0.082	2.271	2.353
	鯨(脂肪)	国産	4.943	119.950	124.893
	鯨肉	国産	<0.001	0.003	0.003
	鯨肉	国産	<0.001	0.039	0.039
	鯨肉	国産	<0.001	0.039	0.039

食 品		産 地	ダイオキシン類 (pgTEQ/g)		
			PCDD/Fs	Co-PCB	Total
鯨肉	鯨	国産	0.107	1.735	1.842
	鯨	国産	0.011	0.215	0.226
	鯨	国産	0.006	0.246	0.252
畜産食品	牛肉	国産	0.161	0.057	0.219
	牛肉	国産	0.067	0.038	0.105
	牛肉	国産	0.004	0.003	0.006
	豚肉	国産	0.001	0.002	0.003
	豚肉	国産	<0.001	0.002	0.002
	豚肉	国産	<0.001	0.003	0.004
	鶏肉	国産	0.024	0.053	0.077
	鶏肉	国産	0.003	0.168	0.171
	鶏肉	国産	0.034	0.052	0.086
	牛レバー	国産	0.009	<0.001	0.009
	牛レバー	国産	0.177	0.021	0.198
	牛レバー	国産	0.018	<0.001	0.019
	豚レバー	国産	0.110	0.010	0.120
	豚レバー	国産	0.232	0.071	0.303
	豚レバー	国産	0.114	<0.001	0.114
	鶏レバー	国産	0.008	<0.001	0.008
	鶏レバー	国産	0.012	0.613	0.625
	鶏レバー	国産	0.018	0.025	0.043
	コンビーフ	国産	0.065	0.023	0.087
	サラミ	国産	0.062	0.076	0.139
	ソーセージ	国産	0.006	0.003	0.008
	ベーコン	国産	0.001	0.002	0.002
	うずら卵	国産	0.035	0.038	0.074
	うずら卵	国産	0.044	0.039	0.083
	鶏卵	国産	0.005	0.024	0.029
	鶏卵	国産	0.133	0.038	0.171
乳製品	アイスクリーム	輸入	0.065	0.033	0.098
	アイスクリーム	輸入	0.006	0.001	0.007
	アイスクリーム	国産	0.018	0.001	0.019
	アイスクリーム	国産	0.045	0.017	0.062
	アイスクリーム	国産	0.039	0.001	0.040
	アイスクリーム	輸入	<0.001	<0.001	<0.001
	アイスクリーム	輸入	0.061	0.033	0.095
	アイスクリーム	国産	0.102	0.035	0.137
	アイスクリーム	国産	0.044	0.021	0.066
	アイスクリーム	国産	0.018	0.013	0.031
	牛乳	国産	<0.001	<0.001	0.001
	牛乳	国産	0.031	0.001	0.032
	牛乳	国産	0.001	<0.001	0.001

食品		産地	ダイオキシン類 (pgTEQ/g)		
			PCDD/Fs	Co-PCB	Total
乳製品	チーズ	国産	0.031	0.040	0.071
	チーズ	国産	0.038	0.081	0.119
	チーズ	国産	0.103	0.037	0.140
	ヨーグルト(はっ酵乳)	国産	0.010	0.001	0.011
	ヨーグルト(はっ酵乳)	国産	<0.001	<0.001	0.001
	ヨーグルト(はっ酵乳)	国産	0.021	<0.001	0.021
野菜	ちんげんさい	国産	0.011	<0.001	0.011
	ちんげんさい	国産	0.001	<0.001	0.001
	ちんげんさい	国産	<0.001	<0.001	<0.001
	ほうれんそう	国産	0.033	0.001	0.034
	ほうれんそう	国産	0.002	<0.001	0.002
	ほうれんそう	国産	0.105	<0.001	0.105
	ほうれんそう	国産	0.002	<0.001	0.002
	ほうれんそう	国産	0.002	<0.001	0.002
果実	柿	国産	<0.001	<0.001	<0.001
	柿	国産	<0.001	<0.001	<0.001
	ぶどう	国産	<0.001	<0.001	<0.001
	ぶどう	国産	<0.001	<0.001	<0.001
	りんご	国産	<0.001	<0.001	<0.001
	りんご	国産	<0.001	<0.001	<0.001
加工食品	切り干し大根	国産	0.023	<0.001	0.024
	切り干し大根	国産	0.022	<0.001	0.022
	切り干し大根	国産	0.087	<0.001	0.087
	茶葉	国産	0.069	0.017	0.086
	茶葉	国産	0.056	0.020	0.076
	茶葉	国産	0.078	0.026	0.104
	茶葉	国産	0.031	0.022	0.053
	クッキー	国産	0.004	<0.001	0.005
	クッキー	国産	0.081	0.138	0.219
	クッキー	国産	0.002	<0.001	0.002
	ビスケット	国産	0.001	<0.001	0.002
	ビスケット	国産	0.002	<0.001	0.002
	乾昆布	国産	0.001	<0.001	0.001
	乾昆布	国産	0.007	0.001	0.008
	乾海苔	国産	0.170	0.002	0.172
	乾海苔	国産	0.096	0.013	0.108
	乾ひじき	国産	0.028	0.001	0.029
	乾ひじき	国産	0.032	0.001	0.033
	乾わかめ	国産	0.002	0.001	0.003
	乾わかめ	国産	0.009	0.021	0.030

分担研究報告書

ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び
分析の精密化に関する研究（その1）

分担研究者 堤 智昭

（国立医薬品食品衛生研究所）

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究
(3) ダイオキシン類の迅速測定法及び分析の精密化に関する研究
(3-1) ELISA による市販魚中のコプラナーPCBs 及び総 PCBs のスクリーニング法の開発

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

市販魚中のコプラナーPCBs (Co-PCBs) 及び総 PCBs に対するスクリーニング法として、ELISA キット (EnBio Coplanar-PCB EIA system) の検討を行った。魚試料はアルカリ分解後、クリーンアップを行い、Co-PCBs を含む分画を ELISA に供した。その結果、従来法である HRGC/HRMS 分析の Co-PCBs 毒性等量濃度と、良好な相関が得られた ($r = 0.91$, $n = 32$)。従来法の分析値に対する相関を考慮すると、本キットは数 pg-TEQ/g 程度の汚染魚試料に適用可能であると考えられた。さらに、GC/ECD 分析の総 PCBs 濃度に対しても良好な相関を有した ($r = 0.98$, $n = 20$)。本法は、安価で簡便に多数検体の Co-PCBs 毒性等量及び総 PCBs 濃度を測定できるため、スクリーニング法として有用であると考えられる。今後は、より多くの比較検体の分析を行い、従来法に対する濃度推定の精度を高めていく必要があると考えられる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所・食品部

天倉吉章、佐々木久美子

株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ

奥山 亮

第一ファインケミカル株式会社

坂田一登、谷岡洋平

いが、存在量が多いため容易に検出できる利点がある。

近年、PCB 118 に対して特異性が高く、高感度に測定できる酵素免疫測定法 (ELISA) キットが開発された²⁾。そこで、本研究では市販魚中の Co-PCBs 由来の TEQ 濃度をスクリーニングする方法として、本 ELISA キット (EnBio Coplanar-PCB EIA system) の適用を検討した。さらに、PCB 118 は PCBs 汚染の主要汚染源であるカネクロールに含まれる主要異性体の一つであることから³⁾、本キットの総 PCBs に対する適用についても検討を行った。

A. 研究目的

ダイオキシン類の摂取は、そのほとんどが食事経由であり、わが国では、魚介類を介したダイオキシン類の摂取が多い¹⁾。魚介類中では、特にコプラナー PCBs (Co-PCBs) の汚染濃度が高く、Co-PCBs 由来の毒性等量 (TEQ) 濃度をスクリーニングできる方法があれば、食品衛生上有意義である。

現在までに我々が行った個別食品 (鮮魚) における、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC/HRMS) の分析結果から、Co-PCBs の異性体の一つである PCB 118 は、Co-PCBs 由来の TEQ 濃度と良い相関を有していた ($r = 0.85$, $n = 181$)。本異性体は毒性等価係数が小さいため、Co-PCBs 由来の総 TEQ 濃度に占める割合は低

B. 研究方法

1. 試薬、試液及び器具

ELISA の前処理で使用するアセトン、ジクロロメタン、ヘキサンは和光純薬工業 (株) のダイオキシン分析用試薬を用いた。メタノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、硫酸、水酸化カリウム、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウムは和光純薬工業 (株) 製の特級試薬を用いた。シリカゲルは和光純薬工業 (株) の PCB 分析用 (ワコーゲル S-1) を、2% 水酸化カリウムシリカゲル、22% 硫酸シリ

カゲル、44%硫酸シリカゲル、10%硝酸銀シリカゲルは和光純薬工業(株)のダイオキシン分析用試薬を用いた。また、アルミナは ICN 社のダイオキシン分析用試薬を用いた。多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムの作製は、以下の手順で行った。

多層シリカゲルカラム:ガラス製カラム(内径 16 mm&長さ 100 mm)に石英フィルター(ワットマン、QM-A)を入れた後、シリカゲル(0.18 g)、2%水酸化カリウムシリカゲル(0.6 g)、シリカゲル(0.18 g)、44%硫酸シリカゲル(0.9 g)、22%硫酸シリカゲル(1.2 g)、シリカゲル(0.18 g)、10%硝酸銀シリカゲル(0.6 g)、無水硫酸ナトリウム(1.2 g)を順次、乾式充填した。最上部に石英フィルターを入れ、ヘキサン(10 ml)で洗浄後、使用した。

アルミナカラム:ガラス製カラム(内径 10 mm&長さ 140 mm)に石英フィルターを入れた後、アルミナ(2.5 g)及び無水硫酸ナトリウム(1.0 g)を順次、乾式充填する。最上部に石英フィルターを入れ、ヘキサン(10 ml)で洗浄後、使用した。

2. 試料

魚試料は、東京都内のスーパーマーケットで購入したものを、ホモジナイザーで均一化し、使用した。

3. 装置

ホモジナイザーは(株)日本精機製作所製マルチブレンダーミルを用いた。また、マイクロプレート分光光度計は Wallac 社製 1420victor2 を、HRGC/HRMS は日本電子製(JMS-700)を使用した。

4. ELISA による魚試料中のダイオキシン類測定

4-1) 前処理

均一化した試料(20 g)を採取し、2 mol/L 水酸化カリウム水溶液(40 ml)を加え、室温で一晩放置(16~20 時間)しアルカリ分解処理を行った。アルカリ分解液はメタノール(30 ml)を加えた後、ヘキサン(40 ml)で攪拌抽出(10 分×3 回)を行った。抽出液は 2%(w/v)塩化ナトリウム水溶液(40 ml)で 2 回洗浄後、濃硫酸(約 10 ml)を加え硫酸処理を行った。硫酸層の着色が無くなるまで繰り返し洗浄した後、2%塩化ナトリウム水溶液(40 ml)で 2 回洗

浄し、さらに 5%(w/v)炭酸水素ナトリウム(10 ml)で 1 回洗浄した。その後、多層シリカゲルカラムに負荷し、ヘキサン(50 ml)により溶出した。溶出液は、さらにアルミナカラムに添加し、ヘキサン(10 ml)で洗浄後、Co-PCBs を含む分画を 5%(v/v)ジクロロメタン/ヘキサン(45 ml)により溶出した。溶出液は濃縮後、DMSO(100 μ l)に置換し、超音波処理(5 分)を行った後、ELISA に供した。

4-2) ELISA

(株)エンバイオテック・ラボラトリーズ社製の ELISA キット(EnBio coplanar PCB EIA system)を使用し、説明書に従い使用した。前処理済の DMSO 試料を、付属の西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識競合体溶液と 1:3 の割合で混合した。また、検量線作製のための標準溶液として、PCB 118 類似標準品(3,3',4-trichloro-4-methoxybiphenyl (MeO-PCB))について希釈系列(PCB 118 換算量として 0~1,000 ng/ml)を作製し、同様に混合した。各混合液は、96 ウェルマイクロタイタープレートの 2 ウェルに 50 μ l ずつ加えた。室温で 30 分間インキュベーションした後、付属の洗浄液で各ウェルを洗浄した。その後、各ウェルに付属の基質溶液を加え、室温で 20 分間静置した。各ウェルに反応停止液を 50 μ l ずつ加え、450 nm における吸光度を分光光度計により測定した。

なお、本キットでは、MeO-PCB を PCB 118 の代替標準品として使用している。本化合物に対する抗体の反応性は、PCB 118 と比較し約 18 倍弱い。同様な形状の標準曲線が得られる(図 1)。また図 2 に、本 ELISA による魚試料の測定操作の概略を示した。

5. HRGC/HRMS による魚試料中のダイオキシン類測定

平成 13 年度厚生科学研究費補助金研究事業「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」の分担研究「ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究」⁴⁾と同様に行った。

6. GC/ECD による魚試料中の総 PCBs 測定

(財)日本食品分析センターに依頼し、衛生試験

法注解⁵⁾に従い、ピークパターン法により定量した。検体(湿重量として 20 g)に 1 mol/L 水酸化カリウムエタノール溶液(100 ml)を加え、水浴上(90℃)で1時間還流抽出を行った。得られた抽出液にヘキサン(100 ml)及び精製水(100 ml)を加え、振とう抽出(10 分)を行った。ヘキサン層を採取し、精製水(100 ml)で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。濃縮後、フロリジルカラム(20 g)に添加し、ヘキサン(200 ml)で溶出した。溶出液は濃縮後、ヘキサンで 1~10 ml に定容し、最終溶液とした。

総 PCBs の測定には Agilent Technologies 製のカラム HP-1(内径 0.53 mm、長さ 10 m、膜厚 2.65 μ m)を使用し GC/ECD により定量を行った。最終溶液(2 μ l)を GC 部に注入した後、170℃(1 分)→5℃/分→230℃の昇温条件で測定した。注入口温度は 240℃、検出器温度は 300℃、ガス(ヘリウム)圧力は 40 kPa とした。なお、標準溶液として KC-300、KC-400、KC-500 及び KC-600 の各々 0.1 μ g/ml ヘキサン溶液並びに、これらの溶液を任意の割合で混合した溶液を使用した。試料中の定量下限は 2 ng/g であった。

C. 研究結果

1. ELISA の定量範囲の設定

図 3 には、異なった日に複数回作製した平均の標準曲線を示した。約 20~90%の結合阻害を示す 10~250 ng/ml(PCB 118 換算量)を定量範囲とした。定量下限である 10 ng/ml における吸光度は、標準物質を含まない場合の吸光度(バックグラウンド)と比較し、有意差(バックグラウンドにおける標準偏差の 3 倍以上)が認められた。魚試料 20 g を使用した場合、試料中の定量下限値は 50 pg /g (PCB 118 換算量)に相当した。

定量域に相当する PCB 118 の繰り返し測定結果を、表 1 に示した。同一プレート内で測定した場合は、変動係数が 5%以内、測定値も真値から \pm 10%以内におさまり、良好な精度及び正確度であった。また、異なった日に別プレートで複数回測定した場合も、変動係数は 10%以内、測定値の真値も \pm 10%以内であり、同様に良好な精度及び正確度であった。

2. 前処理済み魚試料に対する添加回収試験及び希釈直線性試験

最終検液に含まれる試料由来のマトリックスが、本 ELISA に与える影響を検討するため、添加回収試験及び希釈直線性試験を行った。添加回収試験では、4種の魚の前処理済み溶液に既知量の PCB 118 を添加し、ELISA により分析した。その結果、添加量に応じ良好な回収率(78.7~112.3%)が得られた(表 2)。

希釈直線性試験では、魚の前処理済み溶液を、DMSO により 2 倍系列で希釈し、希釈測定時の定量値の変化について検討した。その結果、希釈率を掛けた定量値に大きな変化みられず、希釈していない場合の濃度に対して 74~108%の定量値が得られた(図 4)。このように、本研究で開発した前処理法により、本 ELISA に影響すると考えられるマトリックスを、効果的に除くことが可能であった。

3. 魚試料に対する添加回収試験

さらに実試料への本法の適応性を検討するため、魚試料に対する添加回収試験を行った。魚試料に既知量の PCB 118 を添加し前処理後、ELISA により測定した。その結果、60.2~82.3%の回収率が得られ、許容範囲内の値であった(表 3)。従って、本研究で確立した前処理法との組み合わせで、大幅な損失を生じることなく PCB 118 を良好に測定することが可能であった。

4. ELISA の測定再現性

本 ELISA の測定値の再現性について検討するため、実試料の繰り返し測定試験を行った。同一の魚試料を使用して、前処理から ELISA による測定までの一連の操作を、異なった日に複数回行った。その結果、得られた定量値の変動係数は 5.7~29.0%であり、許容範囲内の変動であった(表 4)。

5. ELISA と HRGC/HRMS の比較試験

本 ELISA と、従来法(HRGC/HRMS 分析)の Co-PCBs 測定値の相関を検討するため、魚試料(32 検体)について比較試験を行った(表 5)。図 5(a)には、本法の測定値と、従来法の PCB 118 実測濃度の相関を示した。相関係数は良好であり(r

= 0.99)、回帰直線の傾きも 1 に近いことから、本法により実試料中の PCB 118 が良好に測定できていることが示唆された。なお、本 ELISA は Co-PCBs 異性体である PCB 77 及び PCB 156 にも若干の交差反応性を示すが、これら異性体の試料中の存在濃度は PCB 118 に比べ著しく低いため、ELISA の測定値への影響は無視できると考えられる。本 ELISA の交差反応性に関するデータは付表 1 に示した。

図 5(b)には、本法の測定値と、従来法の Co-PCBs の TEQ 濃度の相関を示した。良好な相関係数が得られ($r = 0.91$)、本法は Co-PCBs の TEQ 値を予測するスクリーニング法として、有用であることが示唆された。また、図 5(c)には、低濃度域における回帰直線の 95%予測信頼区間を表した。予測信頼区間に従うと、従来法で 2.5 pg-TEQ/g に相当する魚試料は、本法では約 1,000~4,700 pg/g の定量値に相当すると考えられた。本法の定量下限が 50 pg/g であることを考慮すると、本法は、比較的高濃度に汚染された市販魚のスクリーニングに十分適用が可能であると考えられた。

また図 5(d)には、本法の測定値と PCDD/Fs を含めた総ダイオキシン類の TEQ 濃度の相関を示した。本 ELISA は PCDD/Fs とは交差反応性を示さないが(付表 1)、相関係数は比較的良好であった($r = 0.87$)。

6. ELISA と GC/ECD の比較試験

本 ELISA は、カネクロール中の PCBs の主要異性体の一つである PCB 118 に対して特異性が高い。そこで、本法の総 PCBs 濃度に対するスクリーニング法としての可能性を検討するため、魚試料(20 検体)に対し、本法と従来法(GC/ECD 法)による総 PCBs 濃度の比較試験を行った(表 5)。その結果、両方の測定値に良好な相関($r = 0.98$)が得られ(図 6)、本法は総 PCBs 濃度のスクリーニングにも有用であることが示唆された。

D. 考察

本 ELISA キットは、本研究で行った前処理法との組み合わせで、魚試料中の PCB 118 を良好に測定することが可能であった。本法は魚試料中の

Co-PCBs の TEQ 濃度に対し良好な相関性が見られたことから、TEQ 濃度の推定法としての利用が期待できた。さらに、本法は総 PCBs に対しても良好な相関を示したことから、総 PCBs 濃度の推定法としての利用も期待できた。

本法の魚試料における測定値は、PCB 118 に対する反応を主として表していると考えられる。本 ELISA は PCB 118 の他に、PCB 31、PCB 66、PCB 70、PCB77 及び PCB 156 に対しても若干の交差反応性(5-20%)を示す(付表 1)。本研究では Co-PCBs に分類されない PCB 31、PCB 66 及び PCB 70 の定量は行っていないため、試料中の濃度は不明である。これら異性体が多量に存在した場合、ELISA により得られた測定値が HRGC/HRMS 分析の PCB 118 実測濃度より大きくなることが予想される。しかし、両測定値の相関を表す回帰直線の傾きが 1 に近いことから(図 5(a))、全体的にはこれら異性体に対する反応性が ELISA 測定値に大きく加算されていることは少ないと考えられる。

また、本 ELISA は PCDD/Fs に対して交差反応性を示さないが、PCDD/Fs を含めた総 TEQ 濃度に対しても、比較的良好な相関を示した(図 5(d))。おそらく、魚試料では総 TEQ 濃度に占める Co-PCBs の割合が大きいため、良好な相関がえられたと考えられる。しかしながら、試料によっては、総 TEQ 濃度に対する Co-PCBs の割合は変化することが考えられ、本法の総 TEQ 濃度に対するスクリーニング法としての使用には注意が必要である。

PCBs 類の中にはアンタゴニスト作用を示す異性体が報告されており、このような異性体が大量に共存した場合、芳香族炭化水素レセプター(AhR)を介した毒性発現機構に基づくバイオアッセイ(CALUX アッセイ、Ah イムノアッセイなど)では測定値を低めに見積もり疑陰性の結果を与えてしまう可能性がある^{6,7)}。スクリーニング法としては、疑陰性の結果を与えることは望ましくない。しかし、本法は抗原抗体反応に基づき PCBs を検出する測定系であるため、アンタゴニスト作用は生じないと考えられる。魚試料では PCBs 濃度が高い場合が多いことから、アンタゴニスト作用が生じない点は、本 ELISA による Co-PCBs 分析の利点の一つ

と考えられる。

諸外国では、食品にダイオキシン類に関する規制値を設定している場合がある。現在のところ、PCDD/Fs に対してのみ規制値が設けられており、Co-PCBs を含めた規制は行われていない。例えば EU では市販魚に対して 4 pg-TEQ/g wet (PCDD/Fs)が最大許容値として定められているが⁸⁾、Co-PCBs に対しては考慮されていない。しかし、近い将来、Co-PCBs を含めた規制値設定の動きがあり、Co-PCBs の TEQ 濃度に対するスクリーニング法のニーズが高まることが予想される。本法はその際のスクリーニング法の候補の一つとして、有用であると考えられる。規制値が設けられた場合を想定すると、従来法では、分析時間及び分析費用の面から十分に対応することは困難である。本法は従来法と比較すると、短時間(約 4 日)で測定結果がわかり、多数検体に応用が可能で、1検体あたりのコストも約 5 分の 1 である。従って、本法をスクリーニング法として使用することで、従来法の負担を軽減できることが期待される。今後は、より多くの比較検体を測定し、TEQ 濃度を推定する場合の誤差範囲をより明らかにしていく必要があると考えられる。

また、本法は総 PCBs 濃度に対しても良好な相関が得られたことから(図 6)、市販魚中の総 PCBs 濃度に対するスクリーニング法としても有望であると考えられる。現在、日本では総 PCBs について 500~3,000 ng/g の値が、市販魚中の暫定的規制値として定まっている。今回の比較試験では規制値濃度付近の検体が無かったため、本 ELISA における規制値に対するカットオフ値の検討はできなかった。しかしながら、比較試験の結果から推測すると、暫定規制値付近の濃度は十分に本法で定量可能である。今後は、本法の前処理工程が従来法(GC/ECD)の前処理と比較すると、若干、煩雑であることから、より前処理工程の簡略化が望まれる。

E. 結論

- 1) 本法は魚試料中の PCB 118 を良好に測定することが可能であった。
- 2) Co-PCBs の TEQ 濃度に対して良好な相関が

得られ、Co-PCBs の TEQ 濃度を推定するスクリーニング法として有望であった。

- 3) 総 PCBs 濃度に対しても良好な相関が得られ、総 PCBs 濃度のスクリーニング法としても有用であると考えられた。
- 4) 本 ELISA は従来法と比較すると、コストが安く(5 分の 1 程度)、また迅速(4 日程度)に結果が得られ、さらに多数検体にも応用可能なことから、市販魚中の Co-PCBs の TEQ 濃度のスクリーニング法として期待できる。

F. 参考文献

- 1) Tsutsumi T, Iida T, Hori T, Nakagawa R, Tobiishi K, Yanagi T, Kono Y, Uchibe H, Matsuda R, Sasaki K, Toyoda M. Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere*, 45 (2001) 1129-1137.
- 2) Okuyama A, Takenaka H, Nishi K, Mizukami H, Kozaki S, Kirihara M, Miyatake K, Takigami H, Sakai S, Morita M. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for the pre-screening of coplanar polychlorinated biphenyls. *Organohalogen Compounds*, 58 (2002) 333-335.
- 3) Takasuga T, Noma Y, Sakai S. Polychlorinated biphenyls and PCDD/Fs in Kanechlor technical PCB formulation from Japan by isotope dilution method using HRGC-HRMS. *Organohalogen Compounds*, 62 (2003) 491-494.
- 4) 厚生科学研究「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」平成 13 年度研究報告書
- 5) 衛生試験法・注解(1990)日本薬学会編
- 6) 中西俊夫、小林康男、中尾晃幸、宮田秀明: Ah イムノアッセイ™によるダイオキシン類簡易測定技術の実証研究 -Ah レセプターに対する Co-PCBs のアンタゴニスト効果- 第 11 回環境化学討論会講演要旨集(2002) 84-85.
- 7) Aarts JMMJG, Denison MS, Cox MA, Schalk MAC, Garrison PM, Tullis K, de Haan LHJ,

- Brouwer A. Species-specific antagonism of Ah receptor action by 2,2',5,5'-tetra chloro- and 2,2',3,3',4,4'-hexa chlorobiphenyl. Eur. J. Pharmacol., 293 (1995) 463-474.
- 8) EU, 2001. Commission proposes strategy to reduce dioxin in food and feed, 20 July.

G. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Tsutsumi T, Amakura Y, Okuyama A, Mizukami H, Tanioka Y, Ueda K, Sakata K, Sasaki K, Maitani T. Applicability of ELISA to screen for dioxin-like PCBs in retail fish Organohalogen Compounds, 66 (2004) 603-607.

2. 学会発表

- 1) 奥山 亮、水上春樹、谷岡洋平、上田和恵、坂田一登、堤 智昭、天倉吉章、佐々木久美子、森田昌敏、米谷民雄. ELISA による市販魚中のコプラナーPCB 簡易測定法の開発 第6回環境ホルモン学会(2003.12)
- 2) 堤 智昭、天倉吉章、奥山 亮、水上春樹、谷岡洋平、上田和恵、坂田一登、佐々木久美子、米谷民雄. ELISA による市販魚中のコプラナーPCBs および総 PCBs のスクリーニング 第124回薬学会(2004.3)

表1 PCB 118の測定正確度及び精度¹⁾

PCB 118 Conc. ng/ml	Intra-assay (<i>n</i> = 6)				Interassay (<i>n</i> = 6)			
	Mean ± ng/ml	SD	Redisual error %	CV %	Mean ± ng/ml	SD	Redisual error %	CV %
20	22.0 ± 0.5		10.0	2.4	21.5 ± 1.9		7.5	9.1
50	50.0 ± 1.7		0.0	3.5	49.4 ± 3.6		-1.2	7.2

1) PCB 118溶液を同じ日に同一プレート(Intra-assay)、及び異なった日に別プレート(Interassay)で複数回測定した時の正確度及び精度を示す。

表2 前処理済み溶液に対する添加回収試験¹⁾

Sample	Spiked levels	Observed levels	Recovery ²⁾
	ng/ml	ng/ml	%
スズキ	0	28.2	-
	15	41.8	90.7
	30	51.8	78.7
	60	82.2	90.0
サバ	0	22.6	-
	15	38.4	105.6
	30	56.3	112.3
サーモン	0	30.7	-
	15	44.1	89.2
	30	59.6	96.2
マグロ	0	13.7	-
	15	26.4	84.5
	30	45.7	106.6

1) 前処理済み溶液に既知量のPCB 118を加え、ELISAにより回収率を算出した (*n* = 1)。

2) 回収率は無添加条件で得られた測定値(13.7 - 30.7 ng/ml)を差し引き算出した。

表3 魚試料に対する添加回収試験¹⁾

Sample	Spiked levels	Observed levels	Recovery
	pg/g	pg/g	%
マグロ	0	ND	-
	150	115	76.7
	1,500	1,235	82.3
ブリ	0	194	-
	1,500	1,097	60.2 ²⁾

1) 魚試料に既知量のPCB 118を添加し、前処理操作後、ELISAにより測定し回収率を算出した。

2) 回収率は無添加条件で得られた測定値 (194 pg/g)を差し引き算出した。

表4 繰り返し測定試験¹⁾

Sample	ELISA, pg/g		CV
	Mean ± SD	Range	%
ボラ	3,564 ± 204	3,330 - 3,700	5.7
スズキ	417 ± 121	340 - 557	29.0

1) 前処理からELISAによる測定までの一連の操作を、異なる日に行い測定した ($n = 3$)。

表5 ELISAと従来法におけるダイオキシン類及び総PCBs分析の比較

Samples	ELISA (pg/g)	HRGC/HRMS			GC/ECD Total PCBs (ng/g)
		#118 (pg/g)	Co-PCBs (pg-TEQ/g)	Total dioxins (pg-TEQ/g)	
アジ	103	290	0.46	0.77	- ¹⁾
アナゴ	<50	202	0.38	0.47	-
アナゴ	519	1,032	1.50	1.97	19
イシモチ	2,038	2,276	1.25	1.32	38
オヒョウ	3,736	3,815	2.45	3.30	38
カジキ	<50	94	0.27	0.33	-
カジキ	2,223	2,800	2.52	3.72	-
カジキ	2,841	2,400	2.47	3.86	-
カツオ	523	580	0.72	0.92	9
カツオ	<50	23	0.05	0.05	-
サケ	3,224	2,800	1.88	2.77	38
サケ	1,373	1,817	1.54	1.84	25
サケ	393	1,300	1.08	1.27	20
サケ	1,548	1,200	0.87	1.10	-
サケ	1,233	1,300	0.99	1.34	-
サバ	277	335	0.87	1.32	5
サバ	177	590	1.00	1.56	9
スズキ	870	716	0.86	1.30	14
スズキ	18,684	14,861	7.24	8.89	140
スズキ	14,093	13,000	4.29	4.96	90
タチウオ	260	660	0.65	0.80	-
ブリ	1,801	1,559	1.93	2.61	24
ブリ	305	602	0.95	1.32	9
ブリ	<50	310	0.51	0.72	10
ブリ	569	710	1.04	1.34	20
ブリ	3,525	2,789	3.10	4.26	45
ブリ	4,757	3,300	2.75	3.58	46
ブリ	2,801	2,600	2.57	3.58	-
ブリ	3,242	3,816	3.72	4.51	-
ボラ	3,489	2,694	1.19	1.45	26
マグロ	<50	80	0.13	0.13	-
マグロ	373	570	0.75	0.92	16

1) 未測定

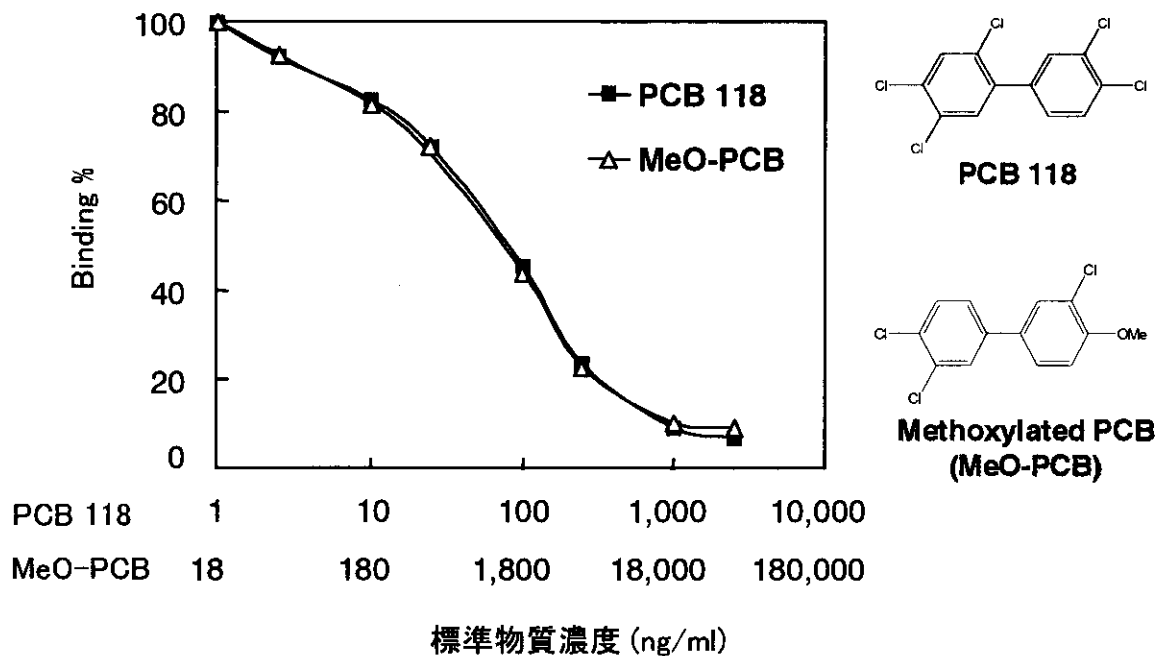


図1 PCB 118とMeO-PCBによる標準曲線の比較

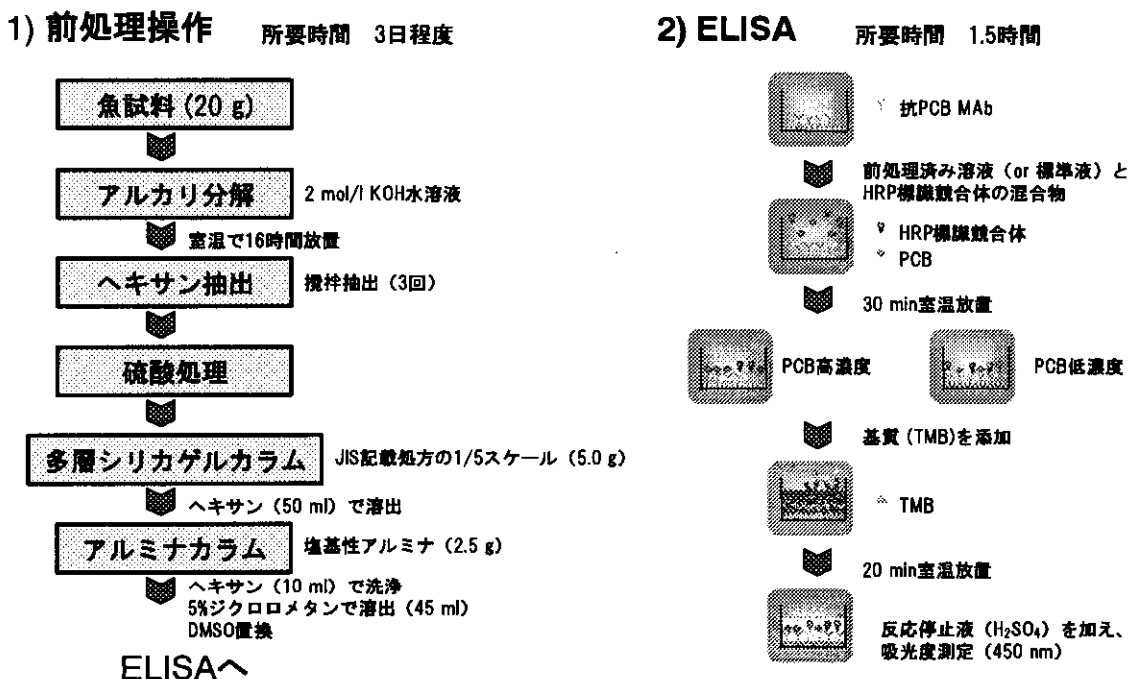


図2 ELISAによる市販魚中のコプラナーPCBs及び総PCBsのスクリーニング法

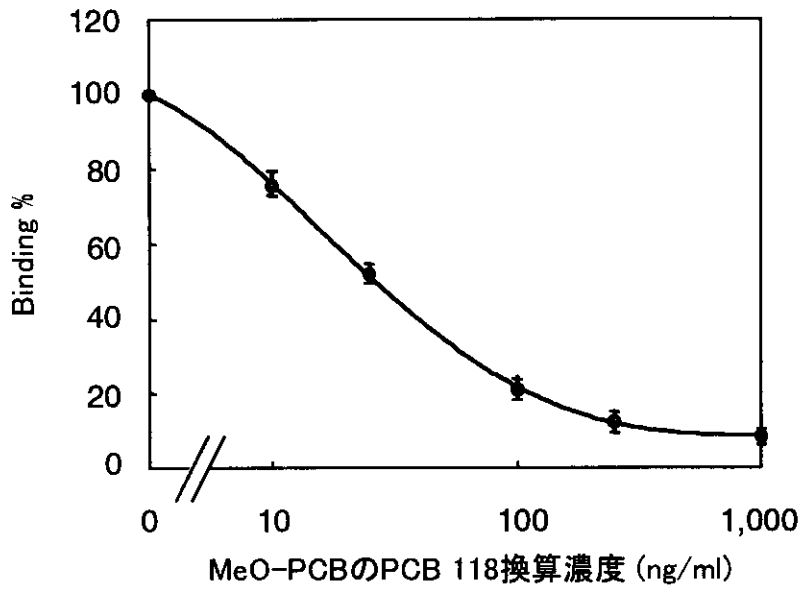


図3 ELISAにおけるMeO-PCB標準曲線

6回の標準曲線の平均と、その標準偏差を示す。

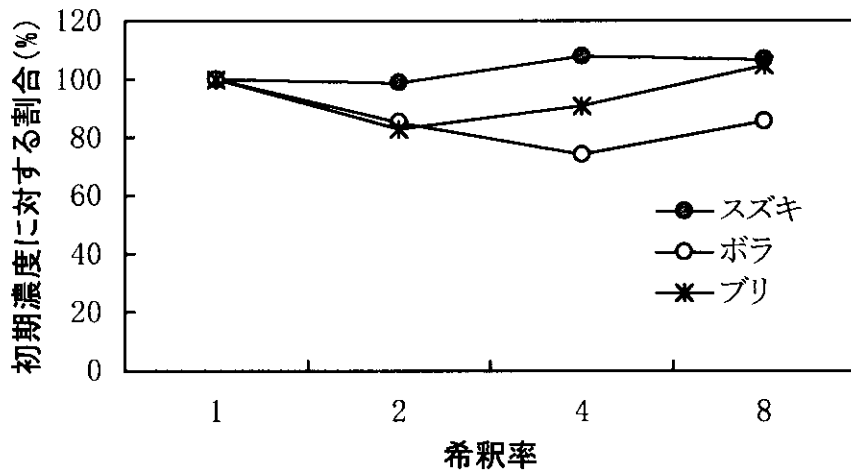


図4 希釈直線性試験

魚の前処理済み溶液をDMSOで2倍系列に希釈し、ELISAにより溶液濃度を算出した ($n = 1$)。