

厚生労働科学研究費補助金研究  
(食品の安全性高度化推進研究事業)

【 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16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

財団法人 食品薬品安全センター 大 島 赴 夫

国立医薬品食品衛生研究所 渡 邊 敬 浩

平成17年(2005)4月

## 目 次

I. 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 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	1
II. 分担研究報告	
1. 母乳中ダイオキシン類の毒性等量評価における毒性等価係数の 検討およびダイオキシン類の GC/MS 測定における大量注入法の 検討について 中澤 裕之	13
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 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、測定操作マニュアル作成に関する研究 織田 肇	23
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 民雄	79
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 に関する研究 松木 容彦	87
5. 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 大島 赴夫	97
6. 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関わる研究 渡邊 敬浩	139
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	159
IV. 研究成果の刊行物	161

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

「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 16 年度  
総括研究報告書

主任研究者 柳澤健一郎

平成 17 年（2005） 4 月

厚生労働科学研究研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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（平成 16 年度）

主任研究者 柳澤 健一郎（（財）食品薬品安全センター 特別参事）

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、本年度は、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. 生体試料中ダ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 確立に関する研究（松木分担研究）、5. 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（大島分担研究）、6. 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関わる研究（渡邊分担研究）の 6 研究課題を実施したのでその成果を報告する。

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  
秦野研究所特別参事）、大島赴夫（（財）食  
品薬品安全センター秦野研究所部長）、渡邊  
敬浩（国立医薬品食品衛生研究所研究員）

A. 研究目的

ダ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、また、これら汚染物質の地球規模での低減化の推進活動の重要性が叫ばれている。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環境中ならびに食品中ダイオキシン等の化学汚染物質のモニタリング調査が必

須とされる。一方、これら化学物質汚染検査の取り巻く環境を見ると、昨今の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、その検査の信頼性が問題視される事例も少なくなく、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し、評価する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) 毒性等価の比較—従来提示された複数の TEF (I-TEF, WHO-TEF1993, WHO-TEF1998) を基に、先の年度で測定した母乳約 150 検体のデータについて、3 種の TEF を用いて毒性等価を再計算し、相互比較した。2) 試料少量化—市販の多量試料注入装置 (①PTV 注入法、②プレカラム注入法、③LaviStoma 大量注入法) の中から、実用性の高い装置を選択し、ダイオキシン類の測定における試料少量化への利用性について検討した。

2. 織田分担研究：1) 脂質抽出法の再検討—昨年度参加した 8 検査機関について、ばらつきの大きかった血清試料での再バリデーションを試みマニュアルの適切性について確認した。2) 前処理の簡易化—血清

試料を用い、デスク型固相 (C18) 抽出法前処理による簡易操作法の可能性について検討した。3) 母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアル—臭素化ダイオキシン類を添加した牛乳脂肪を用い、昨年度作成した「母乳中の臭素化ダイオキシン類測定マニュアル(案)」の適用性について検証した。4) 実態調査—本マニュアルに従い、母乳中の臭素化ダイオキシン類の測定を行った。

3. 米谷分担研究：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。

4. 松木分担研究—平成 14~15 年度に開発したダイオキシン ELISA キットワコー (キット M: 和光純薬工業) を用い、ダイオキシン類添加凍結乾燥魚肉 (国立医薬品食品衛生研究所作製) 試料測定における食品試料での実用性について、ダイオキシン分析機関、4 社で検討した。

5. 大島分担研究：1) 微生物検査試料作製—食品衛生部外部精度管理調査に用いる微生物検査試料においては、大腸菌群及び大腸菌検査の基材として市販のハンバーグを、また、サルモネラ属菌検査の基材として食鳥卵を用い、試験菌の接種法、接種菌数の設定、試料中での試験菌の安定性及びに均一性について検討した。2) 理化学検査試料作製—重金属検査試料においては粉碎した白米を、残留農薬ではトウモロコシペーストを、残留動物用医薬品の検査においては液卵を用い、均一性と安定性について検討した。3) 貝毒検査試料作製—試料保存中や輸送中に遊離脂肪酸の増加と偽陽性化との関連性に関する基礎的データを得る必要が生じ、最初に遊離脂肪酸を微量かつ効率的に測定してその事実を確認するために、昨年度遊離脂肪酸の微量 HPLC 分析法を確立した。ホタテ剥き身及び中腸腺中の遊離

脂肪酸含量の基礎的データを収集して試料保存期間中での遊離脂肪酸の増加と貝毒の毒性発現との関連性を検討するため、4ヶ月冷凍保存したホタテ貝の剥き身9種類、ホタテ中腸腺9種類について確立したHPLC法を用いて遊離脂肪酸含量を測定した。下痢性貝毒試験法により陰性を確認済みの冷凍ホタテ剥き身125gを解凍後、オカダ酸を80 $\mu$ g吸着させた濾紙ディスクを入れた試料（陽性）と、陰性対象群として濾紙ディスクのみ入れた試料を、また同様に、ホタテ中腸腺（25g）についてはオカダ酸を40 $\mu$ g吸着させた濾紙ディスクを加えた試料と陰性対象群として濾紙ディスクのみ加えた試料を作製し精度管理への利用性について調べた。

6. 渡邊分担研究：1）外部精度管理調査用試料—GM トウモロコシ（Mon810 系統）の調査試料作製と均一性および安定性について検討した。2）精度管理調査—27 機関を対象として外部精度管理調査を実施した。

#### （倫理面への配慮）

① ダイオキシン測定のため、母乳や血液など、ヒトの試料を採取する際には、研究協力者に対する人権擁護上の配慮、研究による研究協力者に対する不利益、危険性の排除等に関する説明を行い、理解（インフォームドコンセント）を得、同意の署名をもらう。さらに、ダイオキシン標準品の取り扱いは、特定の管理区域内で行うこととし、実験担当者は予め、実験手順や廃棄処理法等を含めてプロトコルを作製し、それに従って遂行する。さらに、実務担当者は自らの健康管理に十分配慮し、健康診断等の記録の保管を行う。実験廃棄物は定められた専門業者に搬出する。② 研究に使用する微生物などの扱いは特定の区域内で行

う。実験に使用した微生物や微生物汚染試料は、実験終了後すみやかに廃棄処理方法に従って滅菌処理する。さらに、実務担当者は自らの健康管理に十分配慮し、健康診断などの記録の保管を行う。③ 組換えDNA食品検査に使用する改良遺伝子片のコピーや標準品等の保管管理は、管理責任者を定め、厳重な管理体制下で行い、また、試験に使用するサンプル等の一般試験質等への拡散を防止する。また、これらの試験実施に当たっては、試験実施区分を明確にし、組換え食品や使用する標準品の汚染を防止する。さらに、試験実施に当たっては、研究所等への届出、承認等の手続きにより試験実施許可をもらい実施する。

#### C. 研究結果

1. 中澤分担研究：1）毒性等価の比較—母乳150検体について3種のTEFで再計算し比較した結果、各ダイオキシンのTEQには良好な相関があることが確認された。これらの結果から、過去の文献上のデータにおいて、測定対象のダイオキシン異性体が異なった場合においても、最新のTEQに補正して比較検討することが可能となった。2）試料少量化—市販の試料多量注入装置の中から、精製ダイオキシン試料を多量注入可能な装置を選択し、その実用性を調べた結果、PCDD/Fs およびノンオルト Co-PCBsの何れにおいても、LaviStoma 大量注入法と従来法との間に良好な相関が得られ、十分に実用性があることがわかった。この装置を使用することにより、従来から分析操作上の問題点として指摘されていた、GC/MSに注入する最終液量を極微量に濃縮する操作を省くことができることから、前処理操作が大幅に軽減され、分析操作の迅速化されると共に、窒素パージに際しての実験者

への曝露が低減され、更に測定データの精度向上も期待される。

2. 織田分担研究：1) 脂質抽出法の再検討—7 検査機関での血清中脂質濃度の平均は 5.5mg/g であり、酵素法での測定結果は 5.22mg/g であり、マニュアルの抽出法の妥当性が確認された。2) 前処理の簡易化—デスク型固相抽出法では、TeCB、PECB、TCDD、TECDF、PECDF の回収率が低くなる傾向が見られたが、各物質間の差は 10%程度であり本抽出法が前処理法として利用可能となった。3) 母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアル—① 精度管理：現在入手可能な 12 種の標準物質と内部標準の安定同位体を用いて検量線を作成した結果、OBDF を除く他の物質では 10-100pg/ $\mu$ L または 20-500 $\mu$ L で直線性が得られた。無添加及び添加脂肪測定時の検出下限値は、2,3,7,8-TeBDD では 1pg/g 脂肪であり、また、OBDD では 50pg/g 脂肪が得られた。各検査機関における添加脂肪試料中各臭素化ダイオキシンの測定結果は、いずれの機関でも平均値 $\pm$ 10%以内であり、また、HxBDD と OBDF 以外の化合物の変動係数はいずれも 20%以内であった。さらに、各化合物の回収率は、49-101%であり、1 機関の 1 物質を除いて測定マニュアルに定めた許容回収率内であった。②母乳臭素化ダイオキシン類測定のマニュアル(案)の見直し：①の精度管理の結果を基に測定マニュアルを見直し、標準物質と内部標準物質の設定、目標下限値の設定、分析試料量、前処理法、測定装置の条件等の妥当性について検討を行い、いくつかの点について追加、修正を加えた。4) 実態調査—母乳中の臭素化ダイオキシン類の濃度は、2,3,7,8-TeBDF が主成分であったが、毒性等量相当量で塩素化ダイオキシン類の 1/10-1/100 と極めて

低くかった。粉ミルクや市販の牛乳ではさらに 1/10 以下だった。

3. 米谷分担研究：茶試料を用い、8 ケ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、解析した。濃度の低い異性体では、参加機関の報告値の変動は 30%程度であったが、比較的濃度の高い 3,3',4,4'-TCB(11pg/g)の RSD は 20%、2,3,3',4,4'-TPeCB(21pg/g)の RSD は 11%、2,3',4,4',5-PeCB(48pg/g)の RSD は 13%と良好な結果を得た。TEQ の Z-スコアについては大きく外れた機関は見られなかったが、個々の異性体では、3 以上の値を示した機関が見られた。また、個々の Z-スコアは大部分の機関では、正か負に偏っていた。

4. 松木分担研究：凍結乾燥魚肉を試料に用い、ダイオキシン分析機関 4 社でのダイオキシン ELISA キットワコー(キット P)についてのバリデーション試験を行った結果、各測定機関の測定内、測定間及び機関間の RSD はそれぞれ 5.1-28.5%、15.3-50.8%および 72.4%であった。

5. 大島分担研究：1) 微生物検査試料—①大腸菌、大腸菌群検査試料：ハンバーグを基材に用いた場合、残存する脂肪含有量が少ないほうが試験菌の接種に適しており、試験菌の接種法としては浸透法により安定菌数が得られかつ表面菌の付着を可能とした。また、作製した試料は 5 週間安定であった。②サルモネラ属検査試料：殺菌液卵を用いサルモネラ属検査調査試料の作製を試みた結果、安定化剤を加え、初発菌数を調節することにより菌数の調節が可能であり、また、公定法での接種菌の有無の確認が可能であった。2) 理化学検査試料—①重金属(カドミウム)検査調査試料：カドミウム無添加白米を加えて作製予定濃度の

カドミウム添加粉碎白米を作製する方法では、ほぼ作製予定濃度の調査試料を作製することができること、および小分けした試料容器間のカドミウム濃度のF比（10個の試料容器から n=2 で採取して濃度を測定）が 0.869（5%水準 F値 3.02）と、濃度の均一性も確保でき、当作製方法が、調査試料の作製方法として適切であると判断された。② 農作物の残留農薬（有機リン系農薬）検査調査試料：市販のとうもろこし（収穫後、水蒸気処理して加工したペースト状の製品）に有機リン系農薬（クロルピリホスおよびマラチオン）を添加して、濃度の均一性および安定性（冷蔵、冷凍保存）を調べた結果、作製した有機リン系農薬検査調査試料の濃度は、作製予定濃度に対して、クロルピリホスでは 94.0%およびマラチオンでは 91.3%と作製予定濃度に近似した調査試料を作製することができた。調査試料として作製予定濃度の試料を適切に作製することが分かった。また、安定性は、作製当日と比較して冷凍 1 ヶ月後でクロルピリホス 95.8%、マラチオン 93.9%、冷蔵 7 日後でクロルピリホス 98.6%、マラチオン 99.4%と、いずれも調査試料の保存条件として採用できる可能性を確認できた。③ 残留動物用医薬品（フルベンダゾール）検査調査試料：液状の食材として残留動物用医薬品の規格基準がある液卵を使用して、これに残留動物用医薬品（フルベンダゾール）を添加する作製方法を検討した。市販の液卵は、クロマトグラムにフルベンダゾールの測定を妨害する成分の出現はなく、また、濃度の均一性も確保できた。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、遠心粉碎機で粉碎・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、水蒸気処理したにんじんペー

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、液卵に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。3) 貝毒検査試料— ① 測定法の確立：遊離脂肪酸の微量 HPLC 分析法を確立した。② 保存期間中の遊離脂肪酸産生：4 ヶ月冷凍保存後のホタテの剥き身と中腸腺の遊離脂肪酸組成を比べると単位重量当たりの総遊離脂肪酸含量は中腸腺の方が剥き身より多く含有し、また、中腸腺の方が剥き身より総遊離脂肪酸含量が多い結果が示されたが、個々の脂肪酸組成に関しては、EPA, DHA, ステアリン酸が主要な遊離脂肪酸であり、その組成比は概ね共通であった。③ 調査試料の作製：オカダ酸をサンプル管ビンに添加する方法は、同レベル添加濾紙ディスク法に比較して死亡率が低い傾向（超音波処理中にオカダ酸を揮散漏出している可能性）が観察されディスク法を採用した。ディスク法に関しては、オカダ酸の添加濃度は 40  $\mu\text{g}$  でも 80  $\mu\text{g}$  でもマウスの死亡率に変わりはない、初期の目的を達成した。6. 渡邊分担研究：1) 試料調製方法の妥当性と試料の均一性— 低濃度試料および高濃度試料を使用して CaM 定量系、および GA21 特異的定量系ならびに Mon810 特異的定量系を用いた混入率算出試験を行った結果、低濃度試料に対し CaM 定量系にて 0.37  $\pm$  0.04%、Mon810 特異的定量系にて 0.30  $\pm$  0.08%、GA21 特異的定量系にて trace（定量下限値以下）、また高濃度試料に対し、CaM 定量系にて 5.91  $\pm$  0.94%、Mon810 特異的定量系にて 5.15  $\pm$  0.33%、GA21 特異的定量系にて trace の定量値を得た。これらの結果から、重量混合比率と定量値を比較した場合に有意な差があるとは判断されず、本



試料調製方法の妥当性が確認された。また、CaM 定量系ならびに Mon810 特異的定量系を用いて同一試料に対し、2 回の繰り返し測定を行い、各検体間に認められた差違が、2 回の繰り返し測定間に認められた差違に比べ、有意ではないことが明らかとなった。

2) 試料の安定性— 高濃度試料および低濃度試料のそれぞれを $-20^{\circ}\text{C}$ で 1 ヶ月間保存し、保存の前後について CaM 定量系、Mon810 定量系、GA21 定量系を用いて、保存の前後で定量値を比較した結果、いずれの定量系を用いた場合にも定量値に統計的有意差が認められなかった。

3) 外部精度管理試験— 参加全 27 機関中、22 機関がシリカゲル膜タイプキット法を、4 機関が CTAB 法を、そして残り 1 機関がシリカベースレジントタイプキット法を DNA 抽出法として採用していた。高濃度試料から抽出された 9 点の検体につき解析を行った結果、同一の DNA 抽出法を採用している機関間においても平均収量に大小が認められた。さらに、抽出法の違いにより DNA 収量について比較した結果、シリカゲル膜タイプキット法 (22 機関) による平均収量が CTAB 法 (4 機関) による収量に比べ 3 倍程度高いことが明らかとなった。また、DNA 収量の検体間におけるばらつきの大きさについて、シリカゲル膜タイプキット法および CTAB 法を比較した場合、両法に明確な差は認められなかったが、機関別にみると、明らかにばらつきの大きい機関が複数機関認められた。スクリーニング試験結果において、低濃度試料について CaM 定量系を用いて得られた定量値の統計処理を行った結果、CaM 定量値の平均 $\pm$ S. D. は  $0.331 \pm 0.058\%$ であった。また、使用された定量 PCR 装置の機種に依存して定量値が変動するような傾向は認められず、管理限界を超える定量値を報告した

機関はなかった。次に高濃度試料を対象とした CaM 定量系および Mon810 系統特異的定量系を用いて得られた定量値について解析を行った結果、高濃度試料を対象とした CaM 定量値の平均 $\pm$ S. D. は  $5.785 \pm 1.478\%$ であった。また、ある機種 (機種 F) を使用した機関から報告された定量値については、他の定量 PCR 装置を使用した機関から報告された定量値に比べ有意に高い傾向が認められた。さらに、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関が 2 機関、R が管理限界を超えた機関が 1 機関あった。一方、高濃度試料を対象とし、Mon810 系統特異的定量系を用いて定量を行った結果、平均 $\pm$ S. D. は  $5.753 \pm 1.309\%$ であった。

#### D. 考察

1. 中澤分担研究：1) 毒性等価の比較— これまで従来から提示されてきたダイオキシンの TEF にそれぞれ若干の違いが見られ、既存の論文や報告等の TEQ に関するデータの比較が十分できない状況にあった。そこで当研究班で得られた母乳のデータ基にそれぞれの TEF を用いて TEQ を算出し、相互比較をしたところそれぞれ良好な相関関係が認められ、相関係数が算出できることからいずれの TEF を用いたデータについても相互比較ができるものと考えられた。また、過去の文献データにおいては、モノオルト PCB やジオルト PCB が測定されていない場合もあるが、補正ファクターを用いることにより、たとえ実際に測定していなかった場合においても推定値として算出することが可能と思われる。

2) 試料少量化：試料大量注入装置を導入することにより、従来行われていた煩雑な最終液量の濃縮作業を省力化でき、操作時間の短縮化が図られるとともにより低濃度の検体の測定に有効な

手段と考えられた。また、窒素パーセントに際しての実験者への曝露が低減され、更に測定データの精度向上も期待される。

2. 織田分担研究：1) 脂質抽出法の再検討— 現行の測定マニュアルにより、血清中脂質濃度測定の再現性は良好であり、そのまま修正なしでよいことが明らかになったが、試料の抽出時にエマルジョン化した場合にはその対処法を別記する必要があると判断された。また、ダイオキシン濃度は、脂質 1g 中の塩素化ダイオキシン類濃度と表示してもよいと考えられた。2) 前処理の簡易化— 本処理法は、ダイオキシン類濃度を脂肪重量あたりで算出できない欠点があるが、従来の前処理法に比し処理時間が大幅に短縮できるので危急を要する人でのスクリーニングの汚染調査のための迅速前処理法として有効と思われた。3) 母乳中臭素化ダイオキシン測定マニュアル— ① 精度管理：各検査機関の協力の基、精度管理を試みた結果、添加脂肪試料の平均値は、各化合物とも添加値とよく一致しており、各化合物の機関間変動係数も、2 化合物では 20% を若干超えたものの、他の 10 化合物では 20% 以内と良好であった。また、回収率も、50-120% 内にあった。定量下限値も妥当性があると考えられた。② 母乳中臭素化ダイオキシンの測定マニュアルの見直し：上記の精度管理結果を基に昨年度作成したマニュアル（案）を一部修正しより完成度の高いものにできた。4) 母乳中臭素化ダイオキシンの濃度— 母乳中臭素化ダイオキシン類濃度の実態調査では塩素化ダイオキシン類と比較してその汚染濃度は極めて低いと考えられた。

3. 米谷分担研究：初期には認証標準物質等を調査試料に用いたが、2001 年以降はダイオキシンが含まれる可能性のある食品類

を調査試料に用いて来た。これらの試料は、均一性の観点からも妥当であり、また、自然汚染品であるので分析評価試料としてはふさわしいものと判断される。さらに、低濃度の試料についてもかなり精度よく各機関は測定できている結果が得られており、TEQ1pg/g 程度の試料については、各検査機関の技能水準は高く信頼できると評価される。

4. 松木分担研究：マウスモノクローナル抗体を用いたダイオキシン ELISA キットを使用し、凍結乾燥魚肉を共通試料として 4 機関でバリデーション試験を行い、食品中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、測定機関間での変動はやや大きかったものの、測定機関内変動は簡易測定法として満足できるものであった。本キットは操作が比較的簡便で多検体が同時に測定できるうえ、同時再現性が良好であったことから、安価な簡易測定法として食品中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して有用であることが示された。現在、本キットは生体試料や食品だけでなく、土壌や底質など環境試料も測定できる前処理法を検討しており、2004 年 5 月に米国ミシガン州において実施されたダイオキシン簡易測定法の EPA SITE デモンストレーションに参加し、土壌および底質 200 試料を 1 週間で測定した。したがって、本 ELISA キットは、マトリックスに適した前処理法を検討することにより、適用試料を広げることが可能と思われる。

5. 大島分担研究：1) 微生物検査試料— ① 大腸菌群・大腸菌検査試料：ハンバーグを基材として用いる場合、ハンバーグの材質によって基材として用いるための前処理に注意が必要となるが、今回作製した方法

により試験菌の分散性・均一性ならびに安定性が確保された調査試料の作製が可能となった。特に、調査試料を配布してから少なくとも約5週間は検査可能な調査試料としてその品質を維持する必要があるが、4℃保存ハンバーグの生菌数の推移は大きな増減を認めず、EC培地で44.5±0.2℃による培養、またはBGLB培地で35.0±1℃による培養での判定規準とされているガス産生を確認することは可能であった。但し、推定試験における試験培地への接種菌数ならびに培養時間については適切な条件を満たすよう十分考慮することが必要である。また、今回-20℃で冷凍保存したハンバーグについても検討したが、試料解凍後に各検査法で試験菌の検出を実施した結果、接種菌の検出が可能であることが明らかとなった。凍結保存試料の配布は、保存ならびに輸送時の温度管理の点でまだ問題があるため、冷蔵保存試料の配布を優先して検討してきたが、検査対象となる食品カテゴリーには冷凍食品が含まれており、ハンバーグ基材はこれらの検査にも対応可能な試料であると考えられる。②サルモネラ属菌検査試料：調査試料として殺菌液卵（鶏卵）を採用して検討した結果、安定化剤の添加によって4℃保存下で約4週間、接種菌の死滅は抑制することが可能であった。しかしながら、低温保存でも試験菌の増殖抑制は困難であり、保存4週目では基材の変質に伴う微弱な腐敗臭が感じられ、接種菌数の調整が必要であった。今回の殺菌液卵を用いたサルモネラ属菌検査試料は、前増菌培地や選択増菌培地中で試験菌の十分な発育を認め、殺菌液卵（鶏卵）としてサルモネラ属菌検査用調査試料を配布することは可能な試料となった。しかしながら、基材中での菌の安定性や基材の変質防止など改良し

なければならぬ点が多々あり、適切な調査試料として配布するためには今後のさらなる検討が必要と考える。2) 理化学検査試料— 均一性、安定性の優れ、目的濃度を維持したカドミウム米、クロルピリホス及びマラチオン含有トウモロコシペースト、フルベンダゾール含有液卵が得られ、今後さらに実食材に類似した調査試料作成の展開が期待された。3) 貝毒検査試料— 濾紙ディスク中でのオカダ酸の長期安定性が確保できる様になれば、今後のリファレンスマテリアル作製の効率化に大きく寄与するものと思われる。また、LC-MSを用いたオカダ酸及びその他の毒性成分の同時分析法を導入し、より精度の高いリファレンスマテリアルの評価を行い、安定で再現性の良い外部精度管理調査試料の作製に役立てる事が重要と思われる。

6. 渡邊分担研究：低濃度試料を対象にCaM 定量系を用いて実施されたスクリーニング試験の定量値については、 $\bar{X}$ -R 管理図およびZ-スコア解析の結果、管理限界を超える定量値を報告した機関はなかった。しかし、CaM 定量系により得られた測定値が検量線の最低濃度を下回った機関が4機関あり、統計に含めることができなかった。これら機関から報告された結果について詳しくみると、測定値が $^{obs}LOQ_{method}$ に満たなかった要因には次の4つが考えられた。①採用したDNA抽出法依存的な要因。②定量PCR装置に依存した要因。③試験実施者の操作上の誤差に依存した要因。④上記①-③の複合要因。上記4機関中、1機関は定量PCR装置に機種Fを使用しており、機種Fにおいては試験法としての検量線の設

定上、 $^{abs}LOQ_{method}$  が他の PCR 装置に比べて高め(40 コピー)に設定されていることが結果に影響を与えている可能性も考えられた。CTAB 法を採用した 2 機関から報告された測定値は、検体間でのばらつきが大きく、また、測定値は、シリカゲル膜タイプキット法を採用した機関に比べて小さい傾向が認められた。これらのことから、上記 2 機関においては抽出操作のばらつきおよび吸光度測定時の不備が原因となり、PCR 反応系に加え DNA の量が十分でなかった、あるいは操作の不備により PCR 阻害物質を十分に除去することが出来なかったことが考えられ、それらの結果として、CaM 定量系で得られた測定値が検量線の最低濃度を下回ったものと思われた。高濃度試料を対象とした試験においても、機種 F を使用した機関については、それ以外の定量 PCR 装置を用いた機関に比べて、同一の DNA を異なったランで繰り返し測定した場合に、測定値が大きく変動し、得られる測定値についてのラン間再現性が低い傾向が明らかとなった。なお、機種 F 以外の定量 PCR を用いた場合には、高いラン間再現性が示されていることから、コピー数の測定に対する定量系の影響は少なく、抽出 DNA 由来の要因は、直接測定値に反映されるものと考えられる。以上のように、F 機種を用いた機関以外を対象とした統計処理において  $\bar{X}$ 、Z-スコア、R 管理図で管理限界を上回る定量値を報告した機関では、抽出 DNA の収量あるいは質に問題が認められた。また、DNA 抽出法

別にみると、CTAB 法を使用した 4 機関のうち 2 機関が定量値に異常を示した機関に含まれており、いずれの機関についても抽出 DNA の質が定量 PCR に影響した可能性が考えられた。しかし、DNA 抽出法に CTAB 法を採用した残り 2 機関の結果からはコピー数も含めて問題は認められていない。したがって、今回管理限界を上回った参加機関は、CTAB 法を用いた DNA 抽出の経験が不十分あるいは、正確な操作を習得出来ていない可能性が考えられた。

#### E. 結論

1. 中澤分担研究：本年度は、次の 2 つの課題についての研究を行った。毒性等価の比較を目的に母乳中ダイオキシン類の TEQ 評価における TEF の検討、およびダイオキシン分析における大量注入法の検討を行った。その結果、毒性等価の比較においては、ダイオキシン異性体の種類と毒性係数が異なる三種類の TEF (I-TEF、WHO-TEF1993 及び WHO-TEF1998) によって得られた母乳中の各 TEQ の間には良好な相関性があり、得られた相互補正ファクターにより、過去の文献値を現在の値と比較する際には、今回の研究成果は有用に活用されるものと思われる。試料の少量化の検討においては、母乳と血液中ダイオキシンの GC/MS 測定に際して、大量注入法の導入を検討したところ、十分に実用性が確認された。この装置を使用することにより、GC/MS に注入する最終液量を窒素パージにより極微量に濃縮する操作を省くことができることから、前処理操作が迅速化されると共に、更に測定データの精度向上も期待される

2. 織田分担研究：血清中の脂質濃度およ

びダイオキシン類濃度は「血液中のダイオキシン類測定マニュアル」で再現性のある測定ができることがわかった。現在の入手しうる標準試薬および技術情報のもとでは、完成度の高い「母乳中の臭素化ダイオキシン類測定マニュアル(案)」を策定することができた。また、臭素化ダイオキシン類添加脂肪および無添加脂肪を分析することにより、測定マニュアル(案)の基本的な適切性が確認された。現在、臭素化ダイオキシン類分析において、残されている大きな問題は、適切な臭素化ダイオキシン類標準物質および内標準物質の不足である。今後、臭素化ダイオキシン類の標準物質および内標準物質が充実されれば、測定マニュアル(案)の完成が期待される。

3. 米谷分担研究：技能試験の結果から、TEQが $1\text{pg/g}$ 以下の試料においても、試験室間の変動は20%RSD程度であることが示され、我が国における食品中のダイオキシン類分析値の信頼性が保証された。

4. 松木分担研究：マウスモノクローナル抗体を用いたダイオキシンELISAキットを使用し、凍結乾燥魚肉を共通試料として4機関でバリデーション試験を行い、食品中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結果、測定機関間での変動はやや大きかったものの、測定機関内変動は簡易測定法として満足できるものであった。本キットは操作が比較的簡便で多検体が同時に測定できるうえ、同時再現性が良好であったことから、安価な簡易測定法として食品中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して有用であることが示され、今後、スクリーニング検査への応用が期待される。

5. 大島分担研究：1) 微生物検査試料一

食品衛生外部精度管理調査の特定微生物検査用調査試料として、これまでマッシュポテトを基材とした均一で安定な調査試料を提供してきた。本年度は、実食材を基材とした調査試料配布の要望に対応するため大腸菌群・大腸菌検査用試料としてハンバーグ、サルモネラ属菌検査用試料として殺菌液卵(鶏卵)を選択し調査試料作製を検討した結果、ハンバーグ(大腸菌群・大腸菌検査用調査試料)を基材として用いる場合、ハンバーグの材質によって基材として用いるための前処理に注意が必要となるが、今回作製した方法を用いることにより試験菌の分散性・均一性ならびに安定性が確保された調査試料の作製が可能となった。特に、調査試料を配布してから少なくとも約5週間は検査可能な調査試料としてその品質を維持する必要があるが、 $4^{\circ}\text{C}$ 保存ハンバーグの生菌数の推移は大きな増減を認めず、EC培地で $44.5\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ による培養、またはBGLB培地で $35.0\pm 1^{\circ}\text{C}$ による培養での判定規準とされているガス産生を確認することは可能であった。但し、推定試験における試験培地への接種菌数ならびに培養時間については適切な条件を満たすよう十分考慮することが必要である。また、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存したハンバーグについても検討したところ、試料解凍後に各検査法で試験菌の検出を実施した結果、接種菌の検出が可能であることが明らかとなった。従来、凍結保存試料の配布は、保存ならびに輸送時の温度管理の点でまだ問題があるため、冷蔵保存試料の配布を優先して検討してきたが、検査対象となる食品カテゴリーには冷凍食品が含まれていることから、冷凍輸送に耐えるハンバーグ基材はこれらの検査にも対応可能と考えられる。さらに、サルモネラ属菌検査のための調査試料として殺菌液卵

(鶏卵) を採用して検討した結果、安定化剤の添加によって4℃保存下で約4週間、接種菌の死滅は抑制することが可能であった。しかしながら、低温保存でも試験菌の増殖抑制は困難であり、保存4週目では基材の変質に伴う微弱な腐敗臭が感じられ、接種菌数の調整が必要であった。今回の殺菌液卵を用いたサルモネラ属菌検査試料は、前増菌培地や選択増菌培地中で試験菌の十分な発育を認め、殺菌液卵(鶏卵)としてサルモネラ属菌検査用調査試料を配布することは可能な試料となった。しかしながら、基材中での菌の安定性や基材の変質防止など改良しなければならない点が多々あり、適切な調査試料として配布するためには今後のさらなる検討が必要と考える。2) 理化学検査試料—精度管理調査においては、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須であり、外部調査および内部調査を問わず、いかに適正な調査試料が提供できるかが重要な課題である。昨年度に引き続き、今回作製したカドミウム添加白米、有機リン系農薬(クロルピリホスおよびマラチオン)を添加とうもろこしのペースト(スープ用食材の市販品; 収穫後に水蒸気処理済み)、残留動物用医薬品(フルベンダゾール)添加液卵試料は、ともに濃度の均一性および安定性において適切な調査試料を作製できることが分かった。以上の結果から、今後さらに実食材に類似した調査試料作製可能と考えられる。3) 貝毒検査試料: 今回、試料作製の基礎的検討を行った結果、下痢性貝毒検査試料作製においては、簡易なオカダ酸の定量方法の確立と、精度管理用検体としてオカダ酸の最適添加量の見極めが重要な課題と考えられる。また、4ヶ月冷凍保存した精度管理用ホタテ貝サンプル 18 サンプ

ル中の遊離脂肪酸濃度を測定した時、単位重量当中腸腺の方が剥き身より遊離脂肪酸濃度が高い傾向が観察された。また、今回測定した中腸腺中の遊離脂肪酸を $\omega$ -3系列、 $\omega$ -6系列、その他の脂肪酸に分類して、含量を比較したところ、 $\omega$ -3系列脂肪酸(アラキドン酸とリノール酸)が際立って多いサンプルが観察された。また、このサンプルを用いた場合、マウスアッセイで1/3の死亡が確認されたことから、冷凍保存下で試料中の遊離脂肪酸が増加し、マウスアッセイで擬陽性になるという仮説を支持するものとおもわれるが、今後さらに毒性成分の詳細な解析に加え動物実験の例数を増やすなどして更なる確認が必要と考えている。また、オカダ酸の添加方法としては、現段階では、濾紙ディスク法が良好な結果が得られており、精度管理調査に使える試料形態と思われる。

6. 渡邊分担研究: 遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810系統)を対象とし、精度管理試験用試料の調製法につき検討を行った。試料の均一性、および安定性について検討を行った結果、十分な妥当性が確認された。試験的に実施した外部精度管理試験の結果、高濃度試料を対象としたCaM定量系、およびMon810特異的定量系を用いた測定において、 $\bar{X}$ およびZスコアが管理限界を超えた機関が使用していた定量PCR装置はいずれも機種Fであり、得られる定量値が定量PCR装置依存的に異なる可能性が示唆された。その原因について機種Fの使用に限定すれば、キャピラリー間誤差に比較してラン間誤差が大きかったことから、ラン毎に規定される検量線に誤差が生じていた可能性、および精度管理試験後の調査

検討の結果からは、試薬あるいは機器に問題があった可能性が強く示唆された。機種 F 以外の機器を使用した機関について統計解析の結果をみると、Xbar、Z-スコア、R 管理図のいずれかで管理限界を上回った機関においては、全ての機関において抽出 DNA の収量および質に問題が認められており、これらが主原因となって定量値が影響を受けたものと推察された。その他としては、DNA 濃度測定に系統的な誤差が疑われる機関、また、機種 D を使用している機関中、定量 PCR 装置の検出器付属部品の劣化によるものと思われるデータの不安定性が示唆される機関が認められており、これらのことも得られる定量値の不確かさを増大させる要因になりうると考えられる。また、その他に定量値の解析方法に誤りが認められており、これら解析方法についても十分注意する必要があると考える。さらに、通知法を改変

させた機関独自の方法を用いて試験を実施している機関も見受けられたが、報告された結果には問題がなかった。

#### 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（食品の安全性高度化推進研究事業）

「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 16 年度

分担研究報告書

母乳中ダイオキシン類の毒性等量評価における毒性等価係数の検討および  
ダイオキシン類の GC/MS 測定における大量注入法の検討について

分担研究者 中澤裕之



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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（平成 16 年度）

母乳中ダイオキシン類の毒性等量評価における毒性等価係数の検討および  
ダイオキシン類の GC/MS 測定における大量注入法の検討について

主任研究者	柳澤 健一郎	(財)食品薬品安全センター 特別参事
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	大村 厚子	埼玉県衛生研究所 生体影響担当
協力研究者	竹熊 美貴子	埼玉県衛生研究所 生体影響担当

研究要旨

ダイオキシン類の毒性評価に際して広く使用されている毒性等価係数(TEF)には、制定された年代によってダイオキシン類異性体の種類および毒性係数が異なるものがあるため、文献から得られる毒性等量 (TEQ) をそのまま比較検討することは困難であった。そこで、母乳 150 検体について、これまで最も汎用されてきた I-TEF、WHO-TEF(1993)および WHO-TEF(1998)で対象となったダイオキシン類異性体を全て測定し、各 TEF に基づく TEQ を算出して、それぞれを比較検討することで、TEQ を相互補正するためのファクターの算出を試みた。

また、従来の母乳・血液中のダイオキシン分析では高感度測定が求められており、前処理操作において窒素パージによる濃縮操作が必須とされてきたが、この操作過程は、ダイオキシン類の揮散や実験者への曝露などの問題点が指摘されてきた。そこで、高分解能 GC/MS 測定において大量注入法を導入することで、窒素パージ操作を省くことを目的としてその基礎的検討を行った。

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、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、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ない。特に、ダイオキシン類は毒性評価を行うために異

性体ごとに毒性評価係数(TEF)が定められてきたが、過去 15 年ほどの間に 3 種類の TEF が使われてきたため、文献から得られる毒性等量 (TEQ) をそのまま比較することは難しい。

また、本研究班では、母乳や血液、食品中のダイオキシン分析法マニュアルを作成してきたが、高感度測定が求められていたことから、分析の前処理最終工程の濃縮に際して極微量（蒸発乾固寸前から数  $\mu\text{L}$  程度）まで濃縮しなければならず、操作上でのダイオキシン類の揮散や実験者への曝露などの問題点となっていた。そこで、平成 16 年度の研究では、次の 2 点を重点課題として検討した。

### 検討課題(1) 母乳中ダイオキシン類の TEQ 評価における TEF の検討

母乳中ダイオキシン類の測定データ (TEQ) については、これまでに複数の TEF が設定されてきたことから、TEQ のみで過去の測定データを相互比較して評価することは困難であった。そこで母乳中ダイオキシン類について、分析に際して用いた TEF に依存することなく、最新の TEF で比較できるか否か検討すると共に、TEQ を相互補正するための信頼性の高いファクターを算出する。

### 検討課題(2) ダイオキシン分析における大量注入法の検討

これまで本研究班において、食品・母乳・血液中のダイオキシン分析マニュアルを作成してきたが、これらのマトリックスの中でも特に母乳や血液中のダイオキシン残留量は極めて微量であるため、前処理操作の最終工程において、窒素パージによる濃縮操作が必要とされる。従来から、この窒素パージについては、ダイオキシン類の揮散が危惧されており、実験データの信頼性および実験者への曝露などの問題点が指摘されてきた。そこでこの問題点を改善するために、高分解能 GC/MS 測定における大量注入法を導入することで、窒素パージ操作を省くことを目的としてその基礎検討を行う。

## B. 研究方法

### 検討課題(1) 母乳中ダイオキシン類の TEQ 評価における TEF の検討

母乳試料 (150 検体) の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、多層シリカゲルカラム (市販プレパックカートリッジ) を用いてクリーンアップし、更に、活性炭/シリカゲルカラム (内径 0.8cm のカラムに活性炭埋蔵シリカゲル 0.5g を充填) を用いて分画を行った。活性炭

/シリカゲルカラムでは、始めにヘキサン 10mL でマトリックス由来の夾雑物質および大部分の非プラナー PCBs を溶出させ、続いて 25%ジクロロメタン/ヘキサン 40mL でモノオルト PCBs (WHO・TEF1998 で定められた 8 種類) およびジオルト PCBs (WHO・TEF1993 で定められた 2 種類) を溶出させた後、トルエン 100mL で PCDD/Fs およびノンオルト PCBs を溶出させた。各フラクションを常法に従ってロータリーエバポレーターまたは窒素パージにより濃縮した後、シリンジスパイク (デカン溶液) を添加し、高分解能 GC/MS に供した。

測定対象は PCDD/Fs (17 種類)、ノンオルト Co-PCBs (4 種類)、モノオルト PCBs (8 種類) およびジオルト PCBs (2 種類) とし、毒性等量 (TEQ) の算出に際しては同一試料について以下の 3 通りの計算を行った。

- ① I-TEF および WHO/PCB-TEF (1993) を用いて PCDD/Fs (17 種類) およびノンオルト PCBs (3 種類) の TEQ を算出した。
- ② WHO-TEF (1993) を用いて PCDD/Fs (17 種類)、ノンオルト PCBs (3 種類)、モノオルト PCBs (8 種類) およびジオルト PCBs (2 種類) の TEQ を算出した。
- ③ WHO-TEF (1998) を用いて PCDD/Fs (17 種類)、ノンオルト PCBs (4 種類) およびモノオルト PCBs (8 種類) の TEQ を算出した。

表 1 に各 TEF に基づくダイオキシン類異性体の種類と毒性係数を示した。

それぞれの TEQ の相関性を比較検討すると共に、相互補正に必要なファクターを算出した。

### 検討課題(2) ダイオキシン分析における大量注入法の検討

母乳・血液中ダイオキシン類の分析における抽出・クリーンアップ方法については前記 (1) と同様に行った。高分解能 GC/MS にお

る大量注入法の検討に際しては、従来法（スプリットレス法）との比較を行うため、トルエン溶出画分（PCDD/Fs およびノンオルト PCBs）については窒素パージにより濃縮（母乳試料は 50  $\mu$ L、血液試料は 10  $\mu$ L）後、その 1  $\mu$ L をスプリットレス注入した。その後、大量注入に供するために、残余試料を改めてトルエンで 1mL 程度に希釈して、その 20  $\mu$ L を大量注入した。

高分解能 GC/MS には JEOL MS-700 を用い、GC 注入部には従来のスプリットレス注入部とは別の注入部に大量注入装置を設置した。大量注入装置には LaviStoma（エミネット（株）製）を用いた。

その後、大量注入法の実用性を確認するために、母乳と血液のそれぞれ同一試料について、従来法で測定して得られた値と大量注入法で得られた値（TEQ）との相関性を比較検討した。

#### C. D. 研究結果及び考察

##### 検討課題(1) 母乳中ダイオキシン類の TEQ 評価における TEF の検討

母乳試料のダイオキシン類分析に際して、現行の公定法ではジオルト PCBs を測定対象としていないため、活性炭／シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおける PCBs の分画条件を独自に検討した。その結果、活性炭／シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて、始めにヘキサン 10mL でマトリックス由来の夾雑物質および大部分の非プラナー PCBs を溶出させ、続いて 25%ジクロロメタン／ヘキサン 40mL でモノオルト PCBs（WHO・TEF1993, 1998 で定められた 8 種類）およびジオルト PCBs（WHO・TEF1993 で定められた 2 種類）を溶出させることができた。更に、ノンオルト PCBs については、トルエン 100mL で PCDD/Fs と共に溶出させた。

本分析法を用いて母乳 150 検体の分析を行い、データ解析を行ったところ、各 TEF によって算出された TEQ は当初に予想して

いたとおり、I・TEF < WHO・TEF1993 < WHO・TEF1998 の順に大きくなっていることが確認された。設定された異性体の種類としては、I・TEF が 20 種類（Ahlborg によるノンオルトコプラナー PCB の TEF を含む）、WHO・TEF1998 が 29 種類なのに対して、WHO・TEF1993 は 30 種類と最も多くの異性体を有していたが、生体試料中では比較的多く検出される 1,2,3,7,8-PeCDD の TEF が、WHO・TEF 1998 において 2,3,7,8-TCDD と同じ“1”に設定されたことから、WHO・TEF1998 による TEQ が最も高い値を示したものと思われる。

また、各 TEQ の間には、それぞれ極めて良好な相関性があることが確認された（図 1）。何れの組み合わせの場合においても回帰直線はほぼ原点を通過する一次直線が得られたことから、得られた回帰直線の傾きの値を以て、各 TEQ 間の補正ファクターと見なすことが十分に可能と推察された。それぞれの補正ファクターを表 2 に示した。これらの結果から、過去の文献上のデータにおいて、測定対象のダイオキシン異性体が異なっていた場合においても、最新の TEQ に補正して比較検討することが可能となった。また、過去の文献データにおいては、モノオルト PCB やジオルト PCB が測定されていない場合もあるが、表 2 の補正ファクターを用いることにより、たとえ実際に測定していなかった場合においても推定値として算出することが可能と思われる。

##### 検討課題(2) ダイオキシン分析における大量注入法の検討

GC/MS 測定における最適な大量注入法を選択するために、従来までに報告されている主な方式について比較検討した。従来の大量注入法としては、既に次に示すようないくつかの方式が考案されている。

###### ① PTV 注入法：

Programmed Temperature Vaporizing (PTV) 注入法とは、注入部温度を制御し、

インサート内に注入された大量（数 $\mu\text{L}$ ～数十 $\mu\text{L}$ ）の試料溶液から溶媒を気化・除去してインサート内で濃縮を行った後、注入口温度を一気に上昇させて、インサートからカラム内に分析対象成分を導入する方法である。この方式には、インサート内にグラスウールや Tenax などの充填剤を使用するタイプやインサート管に穴を開けて溶媒排出口を設けた“アットカラム注入法”などがある。これらはいずれも従来の注入装置を大幅に改造することなく、比較的簡便に行うことができる。しかしながら、前者の充填剤を使用する方式では充填剤に目的成分が残ることがあり、また加熱脱着した時に目的成分が熱分解する恐れがある。他方、後者のアットカラム方式では、注入口温度とカラムオープン温度との微妙な温度制御を必要とする。また、溶媒と測定対象成分との沸点差を必要とすることから、トルエンやデカンなどの高沸点溶媒の使用が困難である。更に、インサート管の容量が小さいため、一回の注入量に制限があり、少ない試料を何回も注入するマルチインジェクションや注入速度を調節して（溶媒を除去しながら）連続して注入するスピードコントロールインジェクションが必要とされること、従来のスプリットレス注入法よりも注入口が汚れ易いといった問題点がある。

### ②プレカラム注入法：

複数のカラムを連結した、マルチディメンショナル・ガスクロマトグラフィーを応用した大量注入法も考案されている。これは、従来のオンカラム注入口を用いて、液相のコーティングされていない空カラムをプレカラムとして、これに直接サンプルを注入する方法（Solvent Cut Large Volume Injection System : SCLV 注入法）で、このプレカラムと分離カラムの間に設けた溶媒排出ラインから溶媒を排出する。しかし、この方式ではキャリアガス切り替えのための複数のバルブや試料濃縮のためのコールドトラップ

が必要とされ、これらの制御も複雑となる。

### ③LaviStoma 大量注入法：

LaviStoma 大量注入法は、胃袋型の大容量を有するインサート（図2）を用いるもので、プレカラム法のような複雑な配管システムを必要とせず、アットカラム法のように注入口温度とカラムオープン温度との微妙な温度制御を必要せずに、トルエンなどの高沸点溶媒が使用可能であり、注入量も数十～100 $\mu\text{L}$ 程度まで注入可能であったことから、本研究においてはこの方式を採用することにした。実際に装置を導入して、ダイオキシン分析における基礎的検討を行った。LaviStoma での測定に際しては、図2に示した試料注入時の初期温度と第2ステージのスプリットモードでの濃縮時間がこのシステムにおける最も重要なパラメーターであったので、PCDD/Fs およびノンオルトPCBs のそれぞれ標準溶液（5%デカン/トルエン溶液）を用いて、その最適条件を検討した。その結果、初期温度 120 $^{\circ}\text{C}$ 、スプリット時間 6 秒の条件下で、良好なデータが安定して得られた。更に、このトルエン溶液中にはシリンジスパイクのデカン溶液が 5%程存在していたが、LaviStoma においては、第2ステージのスプリットモード（図2）において、トルエンと共にデカンもほとんど残らずに濃縮乾固できることが確認された。

更に、実用性を確認するために、母乳（17検体）と血液（4検体）中ダイオキシン測定に際して、同一試料について、従来のスプリットレス注入法で測定して得られた値と大量注入法で得られた値との相関性を比較検討した。母乳および血液中ダイオキシン類の分析方法は、前項で述べた方法に準じて行った。従来法（スプリットレス法）によるデータを取得に際しては、その 1 $\mu\text{L}$  をスプリットレス注入した。大量注入に際しては、残余試料を改めてトルエンで 1mL（試料が血液の場合には 200 $\mu\text{L}$ ）程度に希釈して、その 20 $\mu\text{L}$  を注入した。