

なお、モノオルト PCBs は、PCDD/Fs およびノンオルト PCBs に比べて残留レベルが高く、通常、窒素パージを行わずに十分に濃縮できることから、あえて大量注入の必要はないものと判断した。

その結果、図 3 に示したように、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。

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、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。

また、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Koihci Saito, Masakazu Ogawa, Mikiko Takekuma, Atsuko Ohmura, Migaku Kawaguhci, Rie Ito, Koichi Inoue, Yasuhiko Matsuki, and Hioryuki Nakazawa: Systematic analysis and the overall toxicity evaluation of dioxins and hexachlorobenzene in human milk. *Organohalogen Compounds*, 66, 38-41 (2004)

2) Koichi Saito, Andreas Sjodin, Courtney D. Sandau, Mark D. Davis, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, and Donald G. Patterson, Jr.: Development of a Accelerated Solvent Extraction and Gel Permeation Chromatography Analytical Method for Measuring Persistent Organohalogen Compounds in Adipose and Organ Tissue Analysis. *Chemosphere*, 57, 373-381 (2004)

3) Koihci Saito, Masahiro Ishizuka, Yukio Sugawara, Hioryuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki: Cleanup Method Using Disposable Tandem Cartridge System for the Determination of Dioxins in Human Milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 73, 17-23 (2004)

2. 学会発表

1) 斉藤貢一, 小川政彦, 竹熊美貴子, 大村厚子, 中澤裕之, 松木容彦, 母乳中ダイオキシンとヘキサクロルベンゼンの系統分析及び総合的毒性評価, 日本薬学会第 124 年会, 大阪.

2) 斉藤貢一, 大村厚子, 竹熊美貴子, 伊藤里恵, 井之上浩一, 松木容彦, 中澤裕之, ベビーフード中ダイオキシン類の

分析および摂取量評価, 環境ホルモン学会 2004, 名古屋.

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 |

表1. 各種TEFの比較

毒性評価対象ダイオキシン類	I-TEF(1988)	WHO-TEF(1993)	WHO-TEF(1998)
ポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン(7種類)			
2,3,7,8-TCDD	1	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0.5	0.5	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01	0.01
OCDD	0.001	0.001	0.0001
ポリ塩化ジベンゾフラン(10種類)			
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.05	0.05
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.5	0.5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01	0.01
OCDF	0.001	0.001	0.0001
ノンオルトコプラナーPCB(4種類)			
3,4,4',5'-TeCB (#81)			0.0001
3,3',4,4'-TeCB (#77)	[0.0005]	0.0005	0.0001
3,3',4,4',5'-PeCB (#126)	[0.1]	0.1	0.1
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	[0.01]	0.01	0.01
モノオルトコプラナーPCB(8種類)			
2',3,4,4',5'-PeCB (#123)		0.0001	0.0001
2,3',4,4',5'-PeCB (#118)		0.0001	0.0001
2,3,4,4',5'-PeCB (#114)		0.0005	0.0005
2,3,3',4,4'-PeCB (#105)		0.0001	0.0001
2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)		0.00001	0.00001
2,3,3',4,4',5'-HxCB (#156)		0.0005	0.0005
2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)		0.0005	0.0005
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)		0.0001	0.0001
ジオルトコプラナーPCB(2種類)			
2,2',3,4,4',5,5'-HpCB (#180)		0.0001	
2,2',3,3',4,4',5'-HpCB (#170)		0.00001	

[]で示したTEFは、Ahlborg TEF (Ahlborg et al., 1994): Ahlborg, U.G., Becking, G.C., Birnbaum, L.S., Brower, A., Derks, H.J.G.M., Feeley, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J.C., Liem, A.K.D., Safe, S.H., Schlatter, C., Wærn, F., Younes, M., Yrjänheikki, E. 1994. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Report on a WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. Chemosphere, 28, 1049-1967.

表2. 各種のTEFを用いた場合のTEQ補正ファクター*

	I-TEF	WHO-TEF 1993	WHO-TEF 1998
PCDD/Fs (TEQ)	1	1	1.19
Co-PCBs (TEQ)	1	1.23	1.20
Total TEQ	1	1.14	1.23

*: I-TEFによって得られたTEQを1とした補正值

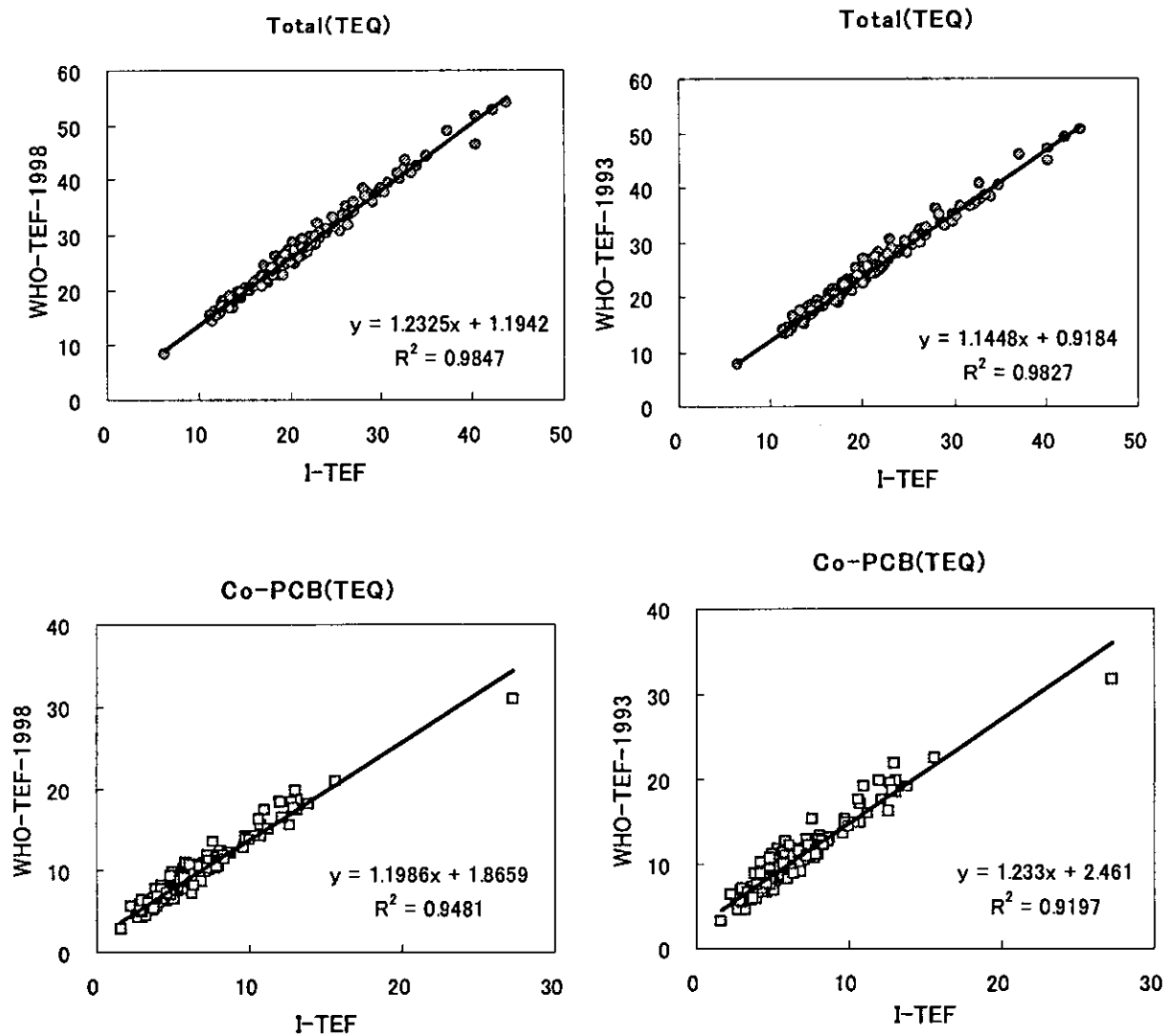


図1. 各TEFによって得られたTEQ(母乳中ダイオキシン類)間の相関性

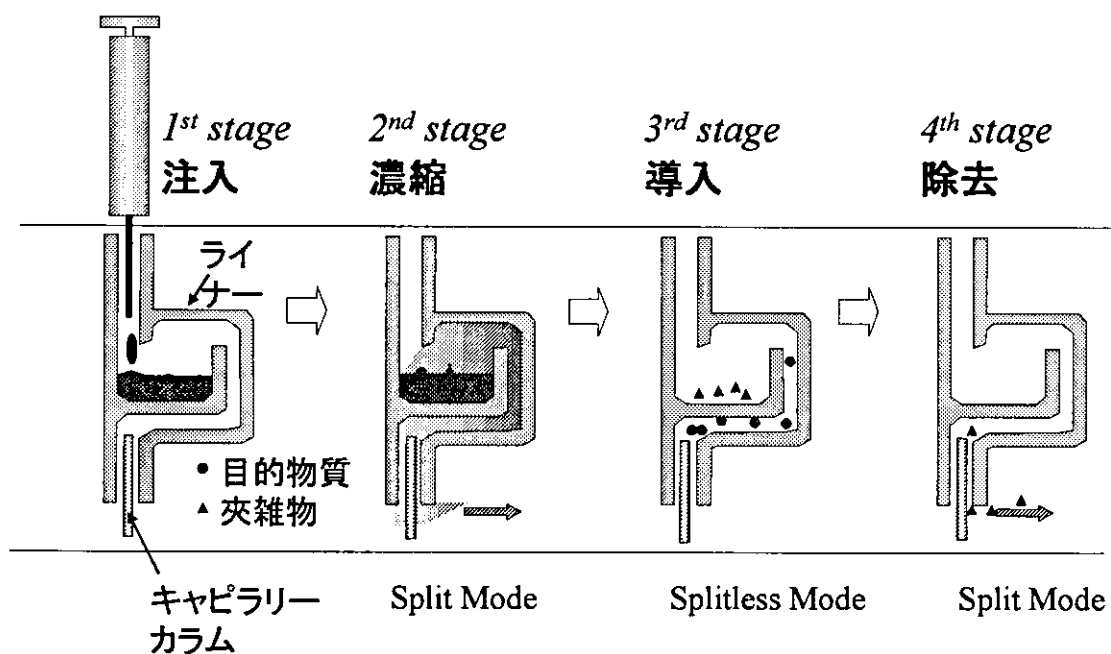


図2. 大量注入法 (LaviStoma) の原理

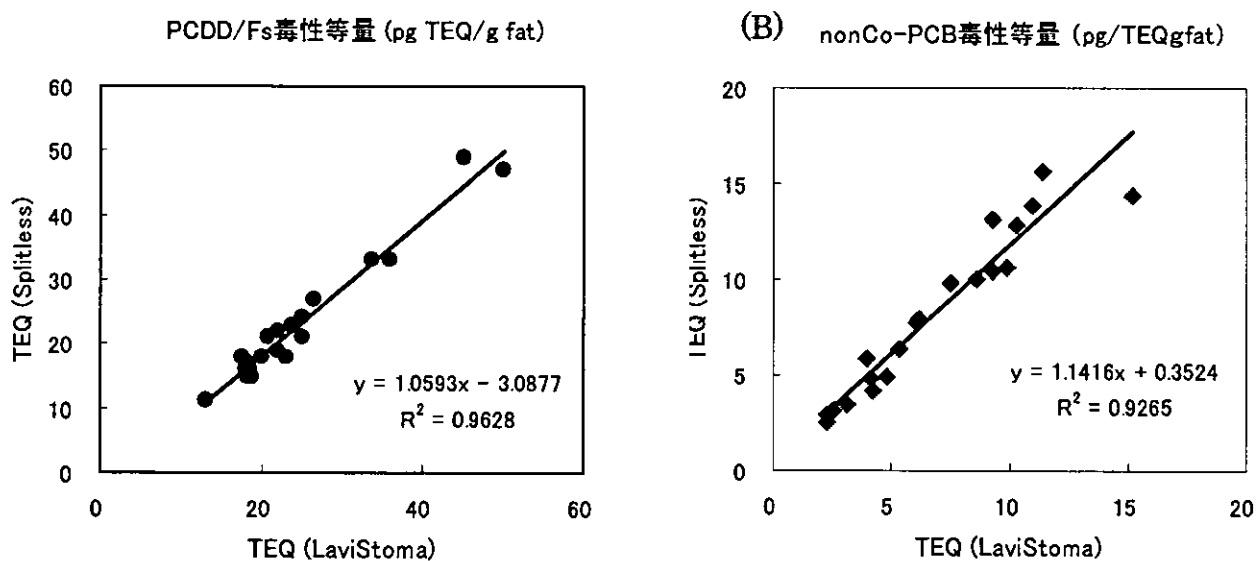


図3. 大量注入法 (LaviStoma) と従来法 (スプリットレス) による測定データの比較 ; (A) 母乳及び血液中 PCDD/Fs (TEQ), (B) ノンオルト Co-PCBs (TEQ)

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

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

分担研究者 織田 肇

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）

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

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	織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所 所長
協力研究者	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	(株)大塚製薬
	宮崎 徹	(株)ニッテクリサーチ
	田中 之雄	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

昨年度は粉乳および血清の精度管理を実施したが、その中で血清中脂質濃度に研究機関間のばらつきが見られた。このため、今年度は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、血清中脂質濃度は酵素法による測定値とよく一致しており、また研究機関間の変動係数は13%とかなり改善された。したがって、現行の測定マニュアルにより、血清中脂質濃度が再現性よく測定できることがわかった。ただし、エマルジョンが生成した場合に誤差が生じる可能性が示唆されたため、エマルジョンが生成した時の対処法を記載する必要がある。

また、血清の前処理をディスク型固相（C18）抽出法により簡便化することを検討した。その結果、ディスク型固相抽出法は液々抽出法およびカートリッジ型固相抽出法とほぼ同一の結果が得られた。この方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点が欠点であるが、従来法と比べ処理時間が大幅に短縮できるため、危急を要する人体ダイオキシン類汚染スクリーニングのための有効な迅速前処理法として期待できる。

さらに、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）」の検証を行うため、牛乳脂肪に一定量の臭素化ダイオキシン類を添加した試料および無添加試料を精度管理試料とし、協力研究機関で測定した。また、操作ブランクについても合わせて検討した。測定の結果、添加脂肪試料の各研究機関の平均値は、各化合物とも添加値とよく一致し

しており、各化合物の機関間変動係数も、2化合物は20%を若干超えたものの、他の10化合物については変動係数20%以内と良好な結果を示した。また、回収率も良好で大半の報告値が50～120%の範囲内であった。次に、目標とする定量下限値についても、添加および無添加脂肪試料分析により、達成可能な値を得ることができた。これにより、「母乳中の臭素化ダイオキシソ類測定マニュアル(案)」の基本的な適切性を確認すると共に、今年度の検討によって得られた情報を基に、昨年度の測定マニュアル(案)を再度見直し、必要な追加・修正を加え、測定マニュアル(案)をより完成度の高いものとすることができた。

また、現在の母乳の臭素化ダイオキシソ類による汚染実態の概要を把握するため、若干例の母乳について、臭素化ダイオキシソ類濃度を測定した。その結果、母乳中の臭素化ダイオキシソ類の濃度は非常に低く、毒性等量相当量で、塩素化ダイオキシソ類のおよそ1/10～1/100であると考えられた。しかし、臭素化ダイオキシソ類は発生源、環境挙動や人体への移行等不明な点が多く、国レベルでの母乳中の臭素化ダイオキシソ類の実態調査が望まれる。

A. 研究目的

血液中の塩素化ダイオキシソ類測定マニュアルについては、昨年度、精度管理を実施したが、その中で血清中脂質濃度に協力研究機関間のばらつきが見られた。このため、今年度はこの点に絞って精度管理を行い、より完成度の高いマニュアルを作成することを目的とした。また、血清の前処理をディスク型固相(C18)抽出法により簡便化することを検討した。

母乳中の臭素化ダイオキシソ類測定マニュアルについては、臭素化ダイオキシソ類を一定量添加した脂肪試料および無添加脂肪試料を用い、昨年度作成した測定マニュアル(案)に基づき、協力研究機関で精度管理を実施した。得られた結果を解析し、測定マニュアル(案)の適切性を検証すると共に、それらの情報を基に、測定マニュアル(案)を再度見直し、必要な追加・修正を加え、臭素化ダイオキシソ類測定マニュアル(案)をより完成度の高いものにすることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 血液中塩素化ダイオキシソ類測定マニ

ュアルにおける脂質抽出法の検討

日常的にダイオキシソ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 EX)中の脂質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-2. 血清試料の前処理の簡易化に関する検討

血清試料の前処理の簡便さと大幅な時間短縮を目指して、ディスク型固相(C18)抽出法により血清中ダイオキシソ類分析を行い、液々抽出法およびカートリッジ型固相抽出法との比較検討を行った。

B-3. 母乳中臭素化ダイオキシソ類測定マニュアル(案)の検討

1) 精度管理

牛乳脂肪に一定量の臭素化ダイオキシソ類を添加した試料および無添加試料を用い、協力研究機関で測定した。また、操作ブランクについても同時に検討した。精度管理結果について、無添加脂肪試料の報告値、添加脂肪試料の報告値および添加値との比較、報告値の機関間変動、回収率、検量線

濃度および直線性、検出下限等の解析を行い、測定マニュアル（案）の適切性を検証した。また、各協力研究機関で使用した標準物質、内標準物質、前処理法条件、測定装置条件等についても情報の提供を得た。

2) 臭素化ダイオキシン類測定マニュアル（案）の見直し

精度管理解析結果および協力研究機関より提供された標準物質、内標準物質、前処理法条件、測定装置条件等の情報を基に、測定マニュアル（案）を再度見直し、必要な追加・修正を加えた。

B-4. 母乳中の臭素化ダイオキシン類濃度の実態調査

母乳の臭素化ダイオキシン類による汚染実態の概要を把握するため、若干例の母乳について、臭素化ダイオキシン類濃度を測定した。またヒトへの暴露評価のため、母乳中の塩素化ダイオキシン類も合わせて測定した。さらに、粉ミルクや市販乳についてもこれらのダイオキシン類を測定した。

C. 研究結果

C-1. 血液中塩素化ダイオキシン類測定マニュアルについて

血清中脂質濃度を表1に示す。7研究機関の平均で5.54mg/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5.22mg/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。各研究機関の平均値は4.21~6.31mg/gであった。研究機関間の変動係数は13%と少し大きい、昨年度（110%）と比較するとかなり改善された。誤差要因の検討では、エマルジョン除去のためにエタノールを使用すると、リン脂質などがエタノールを含む水槽に移行する可能性が考えられた。

C-2. 血清試料の前処理の簡易化について（別添1参照）

回収率については、ディスク型固相抽出法はTeCB, PeCB, TCDD, TeCDF, PeCDFで最も低くなる傾向があったが、その差は10%程度であったため十分に適用可能であると判断できた。実測値において、ディスク型固相抽出法は、液々抽出法およびカートリッジ型固相抽出法とほぼ同一の結果が得られ、3回の繰り返し検討におけるそれぞれの化合物濃度の変動係数は20%未満であり、再現性は良好であった。

C-3. 母乳中臭素化ダイオキシン類測定マニュアルについて

1) 精度管理結果について

①測定対象化合物

測定対象化合物は、現在標準品が入手できる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, 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およびOBDFの12化合物とした。また、HpBDDは、適切な標準が入手できないが、OBDDの不純物として検出されるため参考として対象化合物に追加した。

②検量線および内標準物質

測定対象化合物の検量線濃度および内標準物質は、各研究機関で準備したものを使用した。検量線は、各機関によって異なるが、一般的に、2,3,7,8-TeBDDでは0.1~100pg/ μ l, OBDDで2~500pg/ μ lの濃度範囲で5段階の標準溶液が使用された。また、検量線用標準溶液中のクリーンアップ内標準物質濃度は、一般的に、¹³C-2,3,7,8-TeBDDでは10~100pg/ μ l, ¹³C-OBDDで20~500pg/ μ lであった。検量線の直線性に関しては、OBDFを除き、良好であった。OBDFにつ

いては、機関により、相対感度係数 (RRF) が濃度により大きく異なることが認められた。これは OBDF の適切な内標準物質 (^{13}C -OBDF) が得られないことに原因するものであった。

③操作ブランク

操作ブランクについては、1 機関より、微量の 2,3,7,8-TeBDF および OBDD が検出された。2,3,7,8-TeBDF については、前処理で使用するカラムクロマトグラフのろ材から、また OBDD はガスクロマトグラフのインジェクション部分からの汚染によるものと推定した。他の機関からはいずれの測定対象化合物も検出下限値以下であった。

④検出下限値

今回の無添加および添加脂肪を分析した場合の検出下限値は、各機関の機器の感度や測定条件によって異なるが、2,3,7,8-TeBDD では、5 機関において 1pg/g-脂肪 を達成できた。また、OBDD については、6 機関において 50pg/g-脂肪 を達成できた。なお、今回の脂肪試料分析量は 3~5g、最終溶液量は 50 μ l である。

⑤無添加脂肪試料中の臭素化ダイオキシン類濃度

無添加脂肪試料中の測定結果を表 2 に示す。いずれの分析機関においても、すべての測定対象化合物は検出されず、検出下限値以下であった。ただし、1,2,3,4,7,8-HxBDD および 1,2,3,6,7,8-HxBDD についてはガスクロマトグラフでの分離が困難なため、両者を合わせた報告値となっている。

⑥添加脂肪試料中の臭素化ダイオキシン類脂肪中濃度

添加脂肪試料中の臭素化ダイオキシン類濃度、平均値、変動係数および添加値を表 3 に示す。協力研究機関の平均値は、いずれの測定対象化合物についても添加値と \pm 10%以内でよく一致していた。またそれら

の変動係数も、1,2,3,4,7,8-/1,2,3,6,7,8-HxBDD および OBDF がそれぞれ 25%および 32%と 20%を越えたが、他の化合物は 20%以内と良好な結果を得ている。なお、HpBDD は適切な標準品が入手できないため、1,2,3,4,6,7,8-HpBDF の RRF 値を用いて参考値として報告されているが、報告のあった 4 機関での報告値はよく一致していた。

⑦回収率

次に、クリーンアップスパイクに用いた内標準物質の回収率を表 4 に示す。機関によって用いた内標準物質の種類が異なるので、回収率が報告されている化合物の種類は機関によって異なっている。各化合物の回収率は 49~101%で、1 機関の 1 化合物 (49%) を除き、測定マニュアル (案) で定めた望ましい回収率である 50~120%の範囲に入っており、良好な結果を得た。なお、一般的に、高臭素化 PBDDs/DFs の回収率は低臭素化の回収率より低い傾向を示した。

⑧クロマトグラム

高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS) によって得られた添加脂肪中臭素化ダイオキシン類のクロマトグラムは、一般的にいずれの化合物においても、S/N が 10~200 の範囲であり、良好なクロマトグラムを示した。図 1 に、無添加脂肪および添加脂肪中の 2,3,7,8-TeBDD および OBDD の SIM クロマトグラムを示す。

2) 臭素化ダイオキシン類測定マニュアル (案) の見直し (別添 2 参照)

上記の精度管理解析結果および各協力研究機関より提供された標準物質、内標準物質、前処理法条件、測定装置条件等の情報を基に、測定マニュアル (案) を再度見直した。

①測定対象化合物

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とされる 2,3,7,8-位臭素置換異性体を調査対象とする事とし、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するが入手可能になり次第、調査対象物とすることとした。現在、入手可能な標準物質は 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 6 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, OBDF) である。

②内標準物質

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内標準物質をクリーンアップスパイクとして使用することとするが、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も多い。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、現在 2 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、現在入手しうる内標準物質を用いて、標準物質と内標準物質の対応例を示すこととした。今後、新たな内標準物質が入手可能になり次第変更していく必要がある。

③目標定量下限値

昨年度案では、目標定量下限値を、tetra: 1pg/g-脂肪, penta: 2pg/g-脂肪, hexa: 20pg/g-脂肪, hepta: 200pg/g-脂肪, octa: 500pg/g-脂肪と仮に設定していた。今年度の臭素化ダイオキシン類添加脂肪および無添加脂肪試料の分析結果、大半の機関で 2,3,7,8-TeBDD は 1pg/g-脂肪、また、OBDD は 50pg/g-脂肪 を達成できた。一方、現在の母乳中の PCDDs/DFs の毒性等量はおおよそ 10~20pgTEQ/g-脂肪と言わ

れている。臭素化ダイオキシン類の TEQ への寄与を塩素化ダイオキシン類と比較する場合(臭素化ダイオキシン類の TEF は公に認められたものはないが、対応する塩素化ダイオキシン類の異性体の TEF を使用する)、臭素化ダイオキシン類が検出されなかった時の最大見積 TEQ 相当量は塩素化ダイオキシン類の寄与(10~20pgTEQ/g-脂肪)を十分に下回る必要性がある。今回、これらの点と実際の脂肪分析を通して得られた検出下限値と考慮し、臭素化ダイオキシン類の定量下限値を設定した。すなわち、測定マニュアル(案)の目標定量下限値は、tetra: 1pg/g-脂肪, penta: 1pg/g-脂肪, hexa: 5pg/g-脂肪, hepta: 20pg/g-脂肪, octa: 50pg/g-脂肪とした。

④分析試料量

母乳分析試料量は、昨年度案の通り、母乳試料量は 50~100g とする事とした。

⑤前処理

前処理は、昨年度案の通り、母乳試料より脂肪を溶媒抽出後、脂肪試料(約 1g 程度)をアルカリ分解あるいは硫酸処理を行い、その後、カラムクロマトグラフ操作で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操作では、シリカゲルカラムクロマトグラフおよび多層シリカゲルカラムクロマトグラフでクリーンアップした後、フロリジルカラムクロマトグラフ、アルミナカラムクロマトグラフ、活性炭シリカゲルカラムグラフのいずれかあるいはこれらを組み合わせにより、さらなるクリーンアップおよび臭素化ダイオキシン類の分画を行うこととした。今年度、測定マニュアル(案)に示した分析フロー例を一部修正した。

⑥GC-MS 測定

昨年度、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、質量分析計の

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、機器および測定条件により1~2桁の大きな差があることを認めた。今回、精度管理試料分析結果もふまえ、望ましい質量分析計の条件として、2,3,7,8-TeBDDで100fg、OBDDで5000fgでS/N>5の検出感度を得られるものであることを測定マニュアル(案)に記述することとした。

また、GC導入部、分離カラム、MS条件等は、昨年度どおり、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(0.1μm)長さの短い(15m)カラムを使用することとし測定マニュアル(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。

C-4. 母乳中の臭素化ダイオキシン類濃度(別添3参照)

母乳中の臭素化ダイオキシン類は2,3,7,8-TeBDFを主成分として検出されたが、その濃度は非常に低く、毒性等量相当量で、塩素化ダイオキシン類のおよそ1/10~1/100であった。また、粉ミルクや市販母乳中の臭素化ダイオキシン類濃度はさらに低く、母乳より1桁低いレベルであった。

D. 考察

血清中脂質濃度は酵素法による測定値とよく一致していた。また研究機関間の変動係数は13%であり、昨年と比較するとかなり改善された。したがって、現行の測定マニュアルにより、血清中脂質濃度が再現性よく測定できることがわかった。ただし、エマルジョンが生成した場合の対処法を記

載する必要がある。昨年度の精度管理により、血清中塩素化ダイオキシン類濃度(毒性等量)は研究機関間で比較的良く一致していたので、脂質1g中の塩素化ダイオキシン類量として試料中濃度を表示しても大きな誤差を生じないと言える。

ディスク型固相抽出法による血清中ダイオキシン類分析では、従来の液々抽出法およびカートリッジ型固相抽出法とほぼ同一の結果が得られた。この方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点が欠点であるが、従来法と比べ処理時間が大幅に短縮できるため、危急を要する人体ダイオキシン類汚染スクリーニングのための有効な迅速前処理法として期待できる。

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)」の検証を行うため、牛乳脂肪に一定量の臭素化ダイオキシン類を添加した試料および無添加試料を精度管理試料とし、各協力研究機関で測定した。また、操作ブランクについても合わせて測定した。測定の結果、添加脂肪試料の各研究機関の平均値は、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化合物は20%を若干超えたものの、他の10化合物については変動係数20%以内と良好な結果を示した。また、回収率も良好で大半の報告値が50~120%の範囲内であった。次に、目標とする定量下限値についても、添加および無添加脂肪試料分析により、達成可能な値を得ることができた。したがって、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)」の基本的な適切性を確認することができた。また、今年度の検討によって得られた情報を基に、昨年度の測定マニュアル(案)を再度見直し、必要な追加・修正を加え、測定マニュアル(案)をより完成度の高いものとすることができた。

母乳中臭素化ダイオキシン濃度の実態調

査では、塩素化ダイオキシン類と比べると非常に低いことがわかった。しかし、塩素化ダイオキシン類については、発生源、環境挙動、人体への移行のメカニズム等が解明され発生源対策が取られているのに対し、臭素化ダイオキシン類は発生源を含め未解明な点が非常に多い。したがって、母乳中の臭素化ダイオキシン類の正確な実態把握や将来予測を行うために、発生源調査と合わせ、国レベルでの母乳中の臭素化ダイオキシン類調査が望まれる。

E. 結論

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できれば、測定マニュアル(案)の完成が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 熊谷信二、織田 肇、田淵武夫、赤阪進、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 46:1-9 (2004)

H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. 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	6.25	5.39	4.21	5.84	6.31	5.31	5.46	5.54	13

表 2. 無添加脂肪中の臭素化ダイオキシン類濃度

機 関 測定化合物		濃度 (pg/g 脂肪)						
		ア	イ	ウ	エ	オ	カ	キ
PBDDs 異性体	2,3,7,8-TeBDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,2,3,7,8-PeBDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,2,3,4,7,8-HxBDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,2,3,6,7,8-HxBDD							
	1,2,3,7,8,9-HxBDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	HpBDD	ND	ND	-	-	ND	ND	-
	OBDD	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
PBDFs 異性体	2,3,7,8-TeBDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,2,3,7,8-PeBDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2,3,4,7,8-PeBDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,2,3,4,7,8-HxBDF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,2,3,4,6,7,8-HpBDF	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
	OBDF	ND	ND	-	-	ND	ND	ND

ND : 検出下限値以下 (検出下限値は各機関により異なる)

- : 測定せず

表 3. 添加脂肪中の臭素化ダイオキシン類濃度

機 関 測定化合物		濃度 (pg/g 脂肪)									添加 値 (pg/ g 脂 肪)	
		ア	イ	ウ	エ	オ	カ	キ	平均	SD		CV %
PBDDs 異性体	2,3,7,8-TeBDD	20	16	16	20	13	16	15	17	2.6	16	17
	1,2,3,7,8-PeBDD	37	30	35	37	33	36	37	35	2.6	8	33
	1,2,3,4,7,8-HxBD D	86	78	37	83	71	77	98	76	19	25	83
	1,2,3,6,7,8-HxBD D											-
	1,2,3,7,8,9-HxBD D	68	69	61	101	67	78	67	73	13	18	83
	HpBDD	ND	15	-	-	15	14	-	11	0.6	5	*
	OBDD	730	793	740	-	850	780	769	777	43	6	830
PBDFs 異性体	2,3,7,8-TeBDF	16	13	14	21	14	15	16	16	2.6	17	17
	1,2,3,7,8-PeBDF	33	32	32	41	30	35	33	34	3.5	11	33
	2,3,4,7,8-PeBDF	35	33	32	34	30	33	33	33	1.6	5	33
	1,2,3,4,7,8-HxBDF	55	48	57	50	53	60	55	54	4.1	8	53
	1,2,3,4,6,7,8-HpB DF	160	188	-	-	210	210	240	202	30	15	220
	OBDF	1000	880	-	-	1100	790	399	834	270	32	830

ND: 検出下限値以下 (検出下限値は各機関により異なる)

-: 測定せず

*: 標準物質が入手困難なため添加はしていない。OBDD の不純物として存在したものが添加されているが添加値は不明。

表4. 回収率

機 関 測定化合物		回収率 (%)								
		ア	イ	ウ	エ	オ	カ	キ	平均	SD
PBDDs 異性体	¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TeBDD	81	79	63	-	96	81	90	82	11
	¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeBDD	91	73	61	-	88	84	83	80	11
	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxBDD	82	93	78	-	80	-	64	79	10
	¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxBDD	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxBDD	-	-	61	-	-	76	63	67	8
	¹³ C ₁₂ -OBDD	66	81	53	-	54	84	52	65	14
PBDFs 異性体	¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TeBDF	86	73	59	-	101	77	90	81	15
	¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeBDF	-	85	54	-	-	-	82	74	17
	¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeBDF	72	89	54	-	89	86	77	78	14
	¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxBDF	68	97	49	-	-	78	-	73	20

- : 測定せず

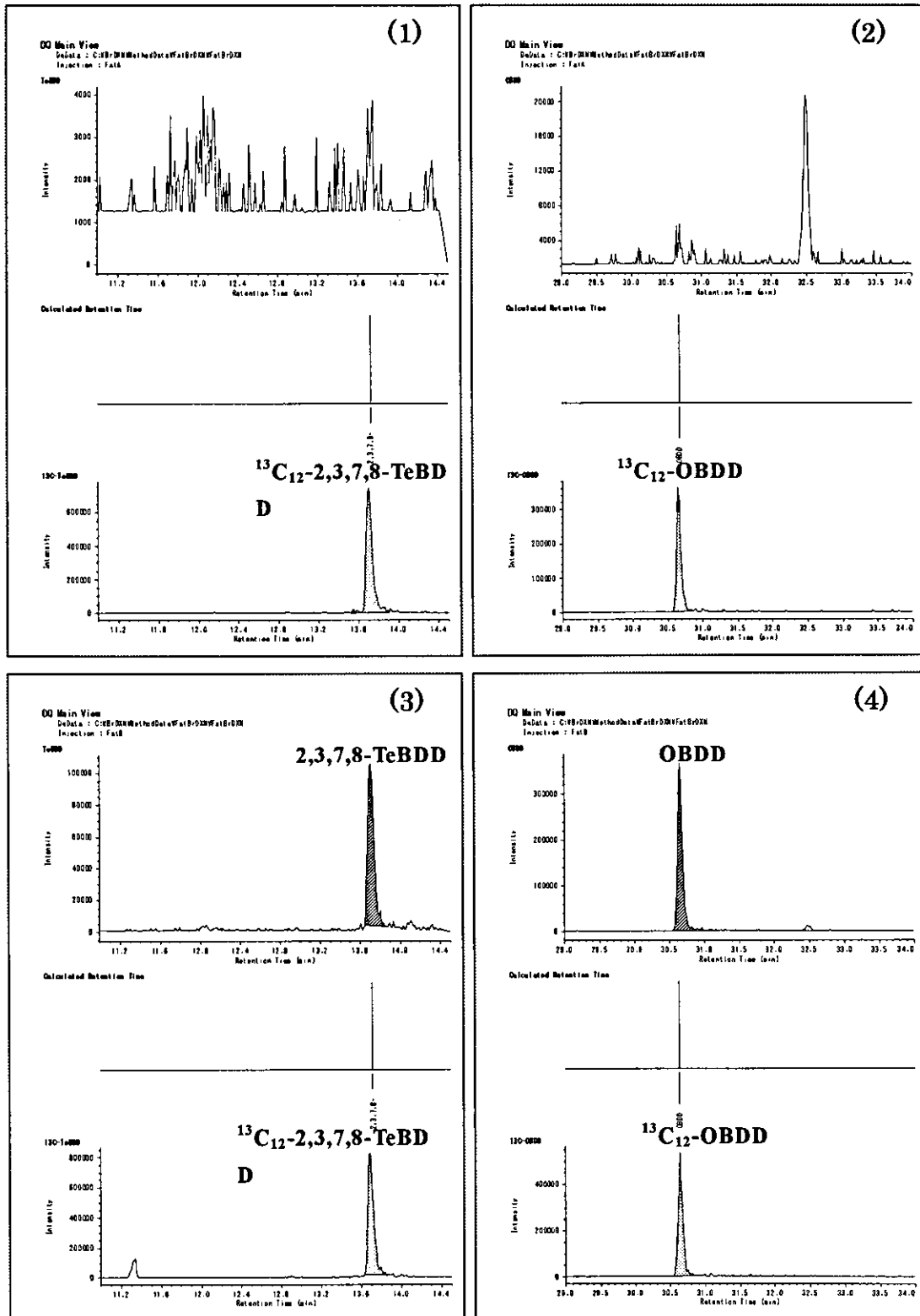


図 1. 無添加脂肪および添加脂肪中の 2,3,7,8-TeBDD および OBDD の SIM クロマトグラム - (1)無添加脂肪 (2,3,7,8-TeBDD), (2)無添加脂肪 (OBDD), (3)添加脂肪 (2,3,7,8-TeBDD), (4)添加脂肪 (OBDD)

別添 1.

血清中ダイオキシン類分析のための簡易前処理法の研究
—ディスク型固相による血清試料への適用—

森田昌敏、北村公義

(国立環境研究所； 環境ホルモン・ダイオキシンプロジェクト)

研究要旨

ディスク型固相 (C18) 抽出法の血清中ダイオキシン類 (17PCDDs と 12Co-PCBs) 分析における評価を液々抽出法およびカートリッジ型固相抽出法との比較検討を実試料における添加回収率並びに実測値を用いて行った。回収率において、ディスク型固相抽出法は T-PeCB, TCDD, T-PeCDFs で有意ではないが最も低くなる傾向があったがその差は 10%程度であったため十分に適用可能であると判断できた。実測値において、ディスク型固相抽出法は他の 2 法と遜色ないデータが得られ、3 回の繰り返し検討におけるそれぞれの化合物濃度の RSD%は 20%未満であり、トレース分析データの再現性としても良好であった。ディスク型固相抽出法は従来の液々抽出法、カートリッジ型固相抽出法と比べてそれぞれ 1/6-8、1/3-4 の時間 (1 時間未満) しか必要としなかった。これまでに血清試料のダイオキシン類抽出法の中でこれだけ短時間で達成できた報告はなく、本法は危急を要する人体ダイオキシン類汚染スクリーニングのための有効な迅速前処理法として期待できる。

A. 研究目的

人体暴露調査のためダイオキシン類分析では一般には全血が用いられる¹⁻⁶⁾が、全血試料は赤血球のマトリックスがあるため、前処理に対する手間が必然的についてしまう。これに対して血清試料はそれが除かれているために全血試料では適用不可能であった簡便な C18 シリカゲルを用いた固相抽出法⁷⁻¹⁰⁾が適用できる利点がある。この方法は従来全血試料に汎用されている液々抽出法¹⁻⁵⁾よりも操作が簡便であり、高圧溶媒抽出法⁶⁾のように特別な機器を必要としない。その反面、別途に血清試料を用意して脂質量を測定しない限り脂質量当たりのダイオキシン類濃度の表示はできない一面もある。しかし、操作の簡便さと大幅な時間短縮から危急を要する人体汚染のスクリーニングの場合には大いに期待できる方法であるため、本研究では固相法のさらなる簡易迅速化を目指した。

従来の固相法はカートリッジ⁷⁻¹⁰⁾を用い、これに試料を通液させた後、目的物質を吸着させた固相から目的物質を溶出するためには乾燥する必要があるが、この工程に 2 時間前後の時間を要することや通液の流速を安定させることが試料自体のつまりなどのために簡単ではないなどの問題があり、改善する余地がある。そこで血清試料のための簡易前処理法としてディスク型固相を用いた抽出を検討した。

B.研究方法

1. 研究の概要と背景

研究の概要と背景（従来法の問題点と簡易法による利点）は図 1 に示した。

2. 試薬、試液及び器具

ダイオキシン類(Co-PCB: 12Mono-*ortho*-と 4Non-*ortho*-PCBs、7PCDDs 並びに 10PCDFs)のネイティブ標準品および ¹³C₁₂ 標識化標準品は Wellington laboratories 社製(Guelph, ON, Canada)を使用した。対照化合物は表 1 に示した。使用した溶媒および無水硫酸ナトリウムは、全てダイオキシン類分析用（関東化学（株））を使用した。シリカゲルは Kiesel gel 60、70-230mesh(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Germany)を 130°Cで 18 時間加熱活性化後にデシケーター内で保存し、使用前にはヘキサンで十分に洗浄した。10%硝酸シリカゲルおよび 44%硫酸シリカゲルはダイオキシン分析用（和光純薬工業（株））、活性炭分散シリカゲルはダイオキシン分析用（関東化学（株））を使用した。

3. 試料

血清試料は国立環境研究所の標準プール血清を用いた。

4. 抽出とクリーンアップ方法

C18 カートリッジ(C)およびディスク(D)による固相抽出法からそれ以降のクリーンアップ法は対照の液々抽出法を含めそれぞれ図 2 および 3 に示した。

5. 装置と測定

高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC/HRMS) はヒューレットパッカード社/日本電子社製 (JMS-700) を使用した。測定条件は表 2 に示した。

C.研究結果及び考察

1.従来法とカートリッジ型並びにディスク型固相抽出法における添加回収率の比較

図4に測定した全化合物の従来法とカートリッジ型並びにディスク型固相抽出法における添加回収率の比較検討の結果を示す。TCDs (#77、#81)、PeCBs (#126、#123、#118、#114、#105)、TCDD、T-、PeCDFs(1,2,3,7,8-と2,3,4,6,7,8-)、において従来法、カートリッジ型、ディスク型法の順で回収率が低下する傾向があったがそれぞれの方法間で有意差は確認されなかった。しかし、Non-ortho-TCDs (#77、#81)はディスク型と従来法での回収率差が最もあり、その他の化合物でも質量数の少ない化合物であるほどその傾向がみられることから固相抽出後の吸引における乾燥工程での若干の損失の可能性が見出された。しかしながら、その差は10%程度であり、最も回収率の低かったカートリッジ型でも回収率が60%を超えているため、十分に適用可能であると判断した。

2.ディスク型固相による血清試料中ダイオキシン類抽出へのアプリケーションの可否

ディスク型はカートリッジ型並びに液々抽出法と比較して全ての同族体において遜色ないデータが得られた(表3)。またそれぞれの化合物濃度の3回の繰り返し実験におけるRSD%は20%未満であり、トレース分析データの再現性として満足な結果が得られた。固相抽出工程においてディスク型はカートリッジ型に対して試料の通液工程で約1/10、通液後の固相の乾燥工程に1/6の時間しかかからず、結果的に2時間以上の作業工程時間の短縮が可能となった。本法以外の有力な迅速な方法としては高圧液体抽出法(PLE)がある。しかしながらこの方法は固体試料には適しているが血清のような液体試料には適しているとは言い難い面がある。液体試料のPLEへの適用には2通りの方法がある。1つは凍結乾燥を行い粉末状にしてからの適用、もう一つは珪藻土に試料を含浸させてからの適用である。前者に関しては、凍結乾燥の工程にはPLE機器の他にさらに凍結乾燥器が必要な上、その工程に数時間から1日要する。その上、ダイオキシン類は半揮発性物質であるため、水分がより多い試料であればあるほど、あるいは脂質量が少ない試料であればあるほど乾燥中にダイオキシン類の一部が揮発する可能性がある。後者に関しては、適用可能な最大の抽出セルである99mLセル一杯に珪藻土を十分に充填しても25gの血清試料を適用させると抽出前の段階でセルの下部の穴から試料が漏れるため、2本のセルで抽出する必要があり、そのために時間及び使用溶媒ともに2倍必要である。その上、抽出液に含まれる水分も多いため脱水工程も必要である。これらの理由から簡易化とし