

第二編 血液中塩素化ダイオキシン類及び臭素化ダイオキシン類の高感度分析法の開発 (III)

神山 宣彦, 萩原 正義, 鷹屋 光俊

独立行政法人 産業医学総合研究所 作業環境計測研究部

はじめに

労働現場における臭素化ダイオキシン類 (以下 PBDDs/Fs) のリスク評価を行うためには、労働者の PBDDs/Fs 曝露量を推定する手法の開発が重要である。曝露量を推定する方法には労働者が作業を行っている環境の環境濃度を測定する方法と、労働者の尿・毛髪・血液中に含まれるダイオキシン類を測定するバイオロジカルモニタリング法がある。本分担研究では、研究例も少なく、手法が確立していないバイオロジカルモニタリング法、特に、血液中の PBDDs/Fs の測定法の開発を研究している。バイオロジカルモニタリングの分析対象試料に血液を選択した理由は、血液は尿や毛髪に比べて採取が困難で被験者の負担も小さくないが、PBDDs/Fs に比べ測定が容易な塩素化ダイオキシン類(PCDDs/Fs)においても、尿、毛髪を用いたバイオロジカルモニタリングが実現していない現状では血液以外に選択肢がないからである。

このような状況を踏まえ我々は研究初年度に、PCDDs/Fs 測定の必要血液量を減らす研究を行い、血液量 5 g での分析を実現した。最初に PCDDs 測定法の改良を試みた理由は、PBDDs/Fs の健康影響を疫学的に評価する際、PCDDs/Fs による影響を除外するため、PBDDs/Fs と PCDDs/Fs の両者の曝露量を測定する必要があるからである。採血量を減らして少しでも被験者の負担を低減するために、測定が比較的容易な PCDDs/Fs 分析法を改良し、必要血液量を低減した。さらに、PCDDs/Fs の分析法の改良の過程で得た種々の知見を基に、血液中の PBDDs/Fs 分析法を構築した。

それらをもとに昨年度は、(1) 試料処理方法の更なる改良、(2) その血中 PBDDs/Fs 分析法の精度評価、(3) 日本バイオアッセイ研究センターで行われた臭素化ダイオキシン投与実験動物の肝臓および脂肪組織の分析[この試料は、比較的高濃度の臭素化ダイオキシンを含むため測定過程で分析方法の最適化を併せて行うことができた]、(4) 実際の人の血液試料として、廃棄物処理や臭素系難燃剤を扱っていない一般勤労者および(5) 清掃工場に勤めている勤労者から集めた「プール血液」中の PBDDs/Fs 濃度を測定した。

本年度はこれまでの研究成果をもとに、下記の各課題を行った。

A. 臭素化ダイオキシン (2, 3, 7, 8-TeBDD) を経口投与したラットについて

昨年度に引き続き、体重 1kg 当たり 0, 10, 30, 100, 300 μ g の臭素化ダイオキシン (2,3,7,8-TeBDD) を経口投与したラットについて、投与後 2, 7, 36 日の肝臓および脂肪組

織中の 2,3,7,8-TeBDD 濃度を測定した。昨年度、臭素化ダイオキシンの排出速度（半減期）を求めたが、その精度をあげるために検体数を増やした。

B. ヒト血液中の臭素化ダイオキシソ類濃度について

昨年度、インフォームドコンセントの得られた清掃工場従事労働者 20 人の血液を、臭素系難燃剤である臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）の血中濃度によってグループ分けしたプール血液を用いて臭素化ダイオキシソ類を測定し、2,3,7,8-TeBDD などの検出に成功したが、臭素化ジフェニルエーテルとの間に顕著な相関は見られなかった。

（1）上記のデータを対照群と比較するため、「臭素系難燃剤を使用していない職場の労働者」である当研究所職員 14 人の血液を年齢順に 4 人ずつの 4 グループに分けたプール血液を得た。臭素化ダイオキシソ類のバックグラウンドレベルを求めるため、このプール血液各 45mL を用いて臭素化ダイオキシソ類を測定した。

（2）また臭素系難燃剤である臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）は、既に一般環境への汚染が進んでおり、ヒトへの蓄積も進んでいるとの報告もなされているため、臭素化ダイオキシソ類と塩素化ダイオキシソ類および臭素化ジフェニルエーテルとの血中濃度を比較した。

A. TeBDD を経口投与したラットの肝臓および脂肪組織中の TeBDD 濃度変化

昨年度に引き続き、日本バイオアッセイセンターで行われた毒性評価動物実験（平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金「臭素化ダイオキシソ類の毒性評価に関する研究」）に用いた 2,3,7,8-TeBDD を経口投与した実験動物の肝臓および脂肪組織の分析を行い、動物中の臭素化ダイオキシソ類の曝露後の生体内濃度変化に関する知見を得た。昨年度、臭素化ダイオキシソの排出速度（半減期）を求めたが、その精度をあげるために検体数を増やした。

臭素化ダイオキシソ投与実験と臓器試料の概要を表 A-1 に示す。

A-a. 方法

i) 臓器試料

本研究で分析した臓器試料を表 A-2 に示す。これらは日本バイオアッセイ研究センターにおいて解剖時に採取した臓器のうち、10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 の 2,3,7,8-TeBDD を投与後 2, 7, 36 日目のもの、および TeBDD を投与していない 2, 7, 36 日目の対照動物の、それぞれ同一個体の肝臓と脂肪組織である。

表 A-1. 臭素化ダイオキシン投与実験の条件

動物種	ラット (Crj:Wistar、日本チャールス・リバー株式会社) 投与時 6 週齢、雄、雌								
投与方法	強制経口投与								
投与溶液	2,3,7,8-TeBDD をトルエンに溶解し、各設定濃度になるようコーン油 に加え、混合したもの								
投与量	体重 1kg あたり 2,3,7,8-TeBDD を 10, 30, 100 および 300 μ g								
臓器の採取	投与後、2 日、7 日、36 日目に麻酔、と殺、解剖し、下記の各臓器を 採取した								
臓器試料	下記の臓器を解剖時に採取 <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>肝臓</td> <td>左葉の先端側 約 1/2</td> </tr> <tr> <td>脂肪</td> <td>腎臓周囲の脂肪組織</td> </tr> <tr> <td>血液</td> <td>後大動脈から採血、全血、0.5mL 以上 (秤量はしていない)</td> </tr> <tr> <td>脳</td> <td>投与後 36 日に解剖した動物の一部について採取 (ホルマリン固定臓器、秤量はしていない)</td> </tr> </table>	肝臓	左葉の先端側 約 1/2	脂肪	腎臓周囲の脂肪組織	血液	後大動脈から採血、全血、0.5mL 以上 (秤量はしていない)	脳	投与後 36 日に解剖した動物の一部について採取 (ホルマリン固定臓器、秤量はしていない)
肝臓	左葉の先端側 約 1/2								
脂肪	腎臓周囲の脂肪組織								
血液	後大動脈から採血、全血、0.5mL 以上 (秤量はしていない)								
脳	投与後 36 日に解剖した動物の一部について採取 (ホルマリン固定臓器、秤量はしていない)								

ii) 臓器中の臭素化ダイオキシン分析方法

動物臓器中の臭素化ダイオキシン分析は昨年度までとほぼ同じ方法で行った。

即ち、まずホモジナイザーで臓器試料を破碎・均質化した後、珪藻土とよく混合し、これを高速溶媒抽出装置で脂肪分を抽出した。溶媒留去の後、十分乾燥させ、脂肪質量を秤量した。得られた脂肪の 1/100 だけを分取し、内部標準物質 (クリーンアップスパイク) として炭素安定同位体 ^{13}C で標識した各 PBDDs/PBDFs を 200pg 添加後、硫酸処理を行った。次に自動クリーンアップ装置 Power-Prep (FMS 社製) を用いて妨害物質を完全に除去し、ダイオキシン画分を分取した。得られたダイオキシン画分を濃縮後、内部標準物質 (シリンジスパイク) として ^{13}C で標識した各 PBDDs/PBDFs を 200pg 添加し、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS) による分析試料とした。

HRGC-HRMS による測定条件を表 A-3 に示す。これも基本的に昨年度までと同様である。GC 部の分析カラムは臭素化ダイオキシン類の分析用に開発された ENV-5MS (SGE 社製) ものである。

表A-2. 分析臓器試料

2,3,7,8-TeBDD 投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)	投与後経過 日数(日)	動物検体番号	臓器重量(mg)	
			肝臓	脂肪
0	2	1005	1,051	2,744
		1008	1,480	2,910
	1009	1,240	2,450	
	36	1013	1,536	3,324
		2008	637	950
10	2	1103	1,864	1,021
		1104	1,337	1,265
		1105	1,649	1,205
	7	1108	1,127	1,352
		1109	1,091	2,308
		1110	1,121	2,012
		1113	1,879	1,440
	36	1114	2,467	2,587
		1115	1,669	2,800
		1115	1,669	2,800
30	2	1205	1,455	1,675
		1208	1,619	1,554
	7	1209	1,602	2,530
		1210	1,198	1,405
		1215	221	2,578
	36	1213	1,750	1,426
		1214	2,509	2,477
		1215	221	2,578
100	2	1305	1,648	1,087
		1310	1,261	1,263
	7	2305	1,325	645
		1315	2,478	1,301
	36	2310	973	521
		2310	973	521
300	2	1405	1,860	1,716
		1410	1,242	1,458
	7	2404	879	805
		1412	1,526	1,595
	36	1415	3,713	2,403
		2410	1,337	581

表A-3. 臭素化ダイオキシンの高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計測定条件

	項目	条件など
MS部	高分解能質量分析計	Micromass 社製 AutoSpec Ultima NT (二重収束型)
	分解能	10000 以上
	電子加速電圧	35 eV
	イオン化電流	0.5 mA
	イオン源温度	300℃
	検出方法	質量校正用標準物質 PFK を用いたロックマス方式による選択イオン検出 (SIM) 法
GC部	高分解能ガスクロマトグラフ	Agilent 社製 HP6890
	注入方法	スプリットレス注入法 1 μ L
	分析カラム	SGE 社製 ENV-5MS (0.25mm ID \times 30m、膜厚 0.1 μ m)
	注入口温度	260℃
	キャリアガス	He, 150kPa (Constant Pressure Mode)
	カラムオープン昇温条件	120℃ (1min hold) - <20℃/min> - 180℃ (0min hold) - <5℃/min> - 320℃ (10min hold)

A-b. 結果および考察

2,3,7,8-TeBDD 投与実験の行われたラットの肝臓および脂肪組織中の 2,3,7,8-TeBDD 濃度を表A-4に示す。2,3,7,8-TeBDD が経口投与されたラットの肝臓と脂肪組織の全てから、2,3,7,8-TeBDD が検出された。その値は臓器 1g 当たり 2ng 程度から 600 ng 程度と広範囲であった。一方、2,3,7,8-TeBDD が投与されなかった対照実験のラットの臓器からは 2,3,7,8-TeBDD が検出されず、検出限界 (臓器 1g あたり 1ng) 以下であった。

投与後の経過日数に対する肝臓および脂肪組織中の 2,3,7,8-TeBDD 濃度の変化をそれぞれ図A-1および図A-2に示す。減少の割合を指数回帰曲線に近似することで、TeBDD の排出速度 (半減期) を求めた。その精度をあげるために昨年度より検体数を増やしたが、測定値が非常に良くまとまったところもあれば、むしろバラついてしまったところもある。

塩素化ダイオキシン類の (体外への消失) 半減期は動物の種によって大きく違いがあるが、ラットの場合約 21 日と報告されている (Birnbaum, L. S. *Environ. Health Perspect.* 61, 11-20, 1985)。今回の実験結果からは、最も近似曲線の相関係数が良かった 100 μ g/kg 体重の 2,3,7,8-TeBDD を投与したラットの肝臓で TeBDD の半減期が 22 日と、非常に近い値が得られた。その他の投与量のラットの肝臓でも 10~27 日という結果が得られた。

一方、脂肪組織は肝臓に比べてバラツキが大きい。これは 1 匹当たりの臓器重量そのものに大きな個体差があったためなどが考えられる。その中でも相関係数の良い $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を投与したラットの半減期を見ると、同じ肝臓の半減期が 13 日であるのに対し脂肪組織の方は 17 日と長くなっている。傾向として同じことが他の投与量にも言える。また、その傾向は投与量が多くなればなるほど著しくなっている。その原因としては、血流の多い肝臓に比べて脂肪組織の方が TeBDD の取り込みおよび排出に時間がかかっていると考えられることや、TeBDD を排出する能力を超えてしまったためなどが考えられる。しかし、詳細な議論のためには、投与直後からの排泄物や他の臓器中の濃度に至るまで全体的な調査が必要であろう。

表A-4. 2,3,7,8-TeBDD 経口投与ラットの肝臓および脂肪組織中の 2,3,7,8-TeBDD 濃度変化

		2,3,7,8-TeBDD 投与量				
		0 (control)	10 μ g/kg 体重	30 μ g/kg 体重	100 μ g/kg 体重	300 μ g/kg 体重
検体数	2day	1	3	1	1	1
	7day	2	3	3	2	2
	36day	2	3	3	2	3
肝臓中の TeBDD 濃度 (ng/g liver)	2day	N.D.	9.2 13 14	91	289	479
	7day	N.D.	10	32	237	495
		N.D.	34	38	226	442
			11	59		
	36day	N.D.	1.8	8.8	74	143
		N.D.	1.3	5.9	123	125
			2.7	17		524
半減期 (day)		-	10.1	12.7	21.9	26.7
脂肪中の TeBDD 濃度 (ng/g fat)	2day	N.D.	9.0 15 9.8	44	220	299
	7day	N.D.	8.2	42	178	469
		N.D.	4.2	31	218	370
			22	28		
	36day	N.D.	7.0	16	61	473
		N.D.	5.8	11	327	150
			14	6.7		633
半減期 (day)		-	101	17.3	56.5	874

N.D.; 検出下限値 (臓器 1g あたり 1ng) 未満を示す。

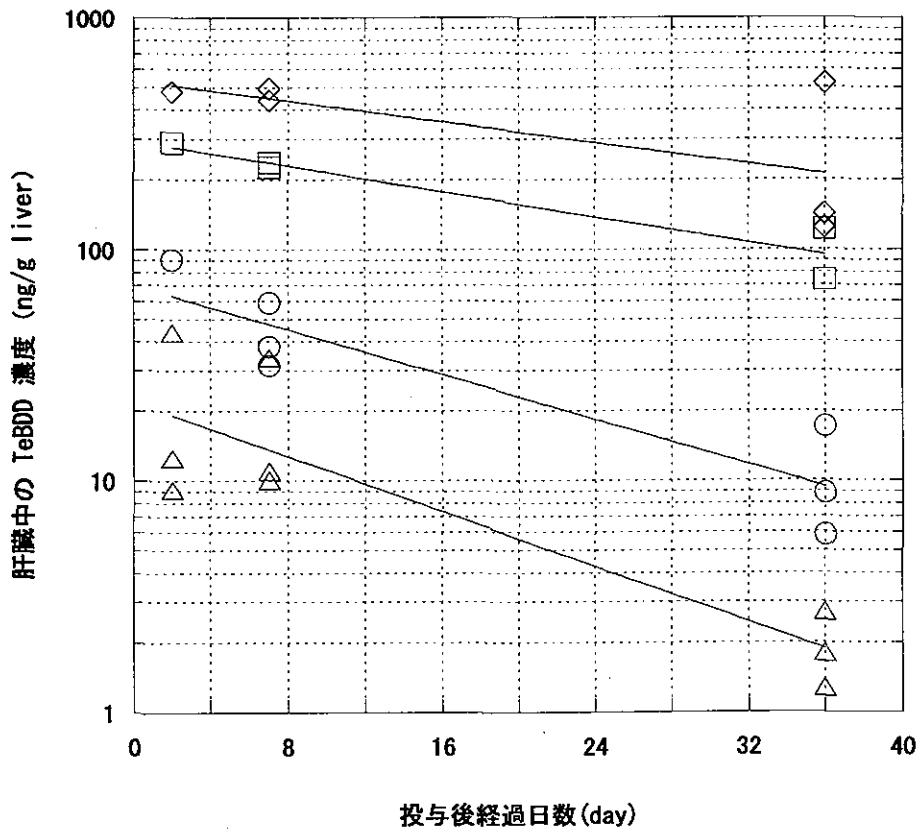


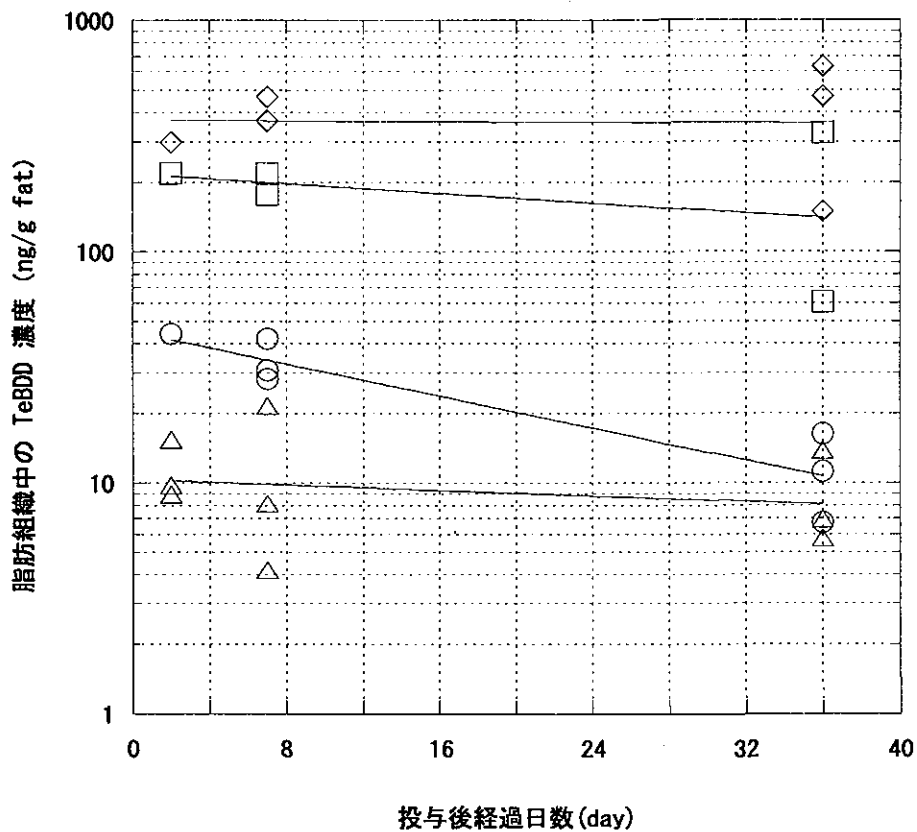
図 A-1. TeBDD 投与実験におけるラット肝臓中の TeBDD 濃度変化

◇ 300 µg/kg
 $y = 539.6 * e^{(-0.026006x)}$ $R = 0.61797$
 半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.026006 = 26.7$ (day)

□ 100 µg/kg
 $y = 295.47 * e^{(-0.03158x)}$ $R = 0.97633$
 半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.03158 = 21.9$ (day)

○ 30 µg/kg
 $y = 70.621 * e^{(-0.055995x)}$ $R = 0.88621$
 半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.055995 = 12.4$ (day)

△ 10 µg/kg
 $y = 22.016 * e^{(-0.068302x)}$ $R = 0.60953$
 半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.068302 = 10.1$ (day)



図A-2. TeBDD投与実験におけるラット脂肪組織中のTeBDD濃度変化

◇ 300 μg/kg
 $y = 370.3 * e^{(-0.00079323x)}$ $R = -0.15708$
 半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.00079323 = 874$ (day)

□ 100 μg/kg
 $y = 218.54 * e^{(-0.012268x)}$ $R = 0.079492$
 半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.012268 = 56.5$ (day)

○ 30 μg/kg
 $y = 45.139 * e^{(-0.039959x)}$ $R = 0.93568$
 半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.039959 = 17.3$ (day)

△ 10 μg/kg
 $y = 10.386 * e^{(-0.0068315x)}$ $R = 0.22493$
 半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.0068315 = 101$ (day)

B. ヒト血液中の臭素化ダイオキシン類濃度

昨年度、インフォームドコンセントの得られた清掃工場従事労働者 20 人の血液を、臭素系難燃剤である臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) の血中濃度によってグループ分けしたプール血液を用いて臭素化ダイオキシン類を測定し、2,3,7,8-TeBDD などの検出に成功した。

これを対照群と比較するため、「臭素系難燃剤を使用していない職場の労働者」である当研究所職員 14 人の血液を年齢順に 4 人ずつの 4 グループに分けたプール血液を得た。臭素化ダイオキシン類のバックグラウンドレベルを求めるため、このプール血液各 45mL を用いて臭素化ダイオキシン類を測定した。

B-a. 方法

i) プール血液試料

臭素化ダイオキシン類のバックグラウンドレベルを求めるため、「臭素系難燃剤を使用していない職場の労働者」として、インフォームドコンセントの得られた当研究所職員 14 人から採血した。その血液を年齢順に 4 人ずつの 4 グループに分け、各グループが 120mL になるようプール血液 NB-1~4 を作成した (表 B-1)。

表 B-1. 「臭素系難燃剤を使用していない職場の労働者」のプール血液

Sample ID	年齢(歳)	NB への分配 血液量(mL)	Group NB-No.	平均年齢 (歳)
N1	62	30	1	59
N2	59	30		
N3	58	30		
N4	56	30		
N5	55	30	2	51
N6	51	30		
N7	50	30		
N8	49	30		
N9	46	30	3	39
N10	46	30		
N11	34	30		
N12	31	30		
N13	39	60	4	37
N14	35	60		

なお、N13 および N14 に関しては、採血日が異なったため、採血量も変え、別グループ NB-4 とした。

ii) プール血液中の臭素化ダイオキシン類分析方法

各プール血液は 120mL ずつしかなく、臭素化ジフェニルエーテルや塩素化ダイオキシン類の測定も行うため、臭素化ダイオキシン類の分析には各々 45mL を用いた。

前処理操作および HRGC-HRMS による測定条件は、昨年度のヒト血液中の臭素化ダイオキシン類分析とほぼ同様である。

即ち、先ず 200mL ビーカー中の珪藻土 10g に血液 15g を秤量し、十分混ぜ合わせた後、高速溶媒抽出装置用の抽出セル（内容量 66mL）に移した。これを 3 本準備した。抽出セルの上側のキャップはせずにアルミ箔でふたをし、これをマイナス 30℃の冷凍庫に一晩静置した。完全に凍らせた抽出セルを真空デシケーターへ移し、真空ポンプで 24 時間減圧し続けた。

凍結乾燥後は、昨年度と同様、内部標準物質（クリーンアップスパイク）として炭素安定同位体 ^{13}C で標識した各 PBDDs/PBDFs を 150pg 添加した後、高速溶媒抽出装置で脂肪分を抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水しながらろ過した後、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。しかしこれでも脱水が不十分であったため、完全に乾燥し切れず、そのままでは脂肪質量を秤量できなかった。再度ヘキサンに溶解し、無水硫酸ナトリウムによる脱水を繰り返した。溶媒留去の後、十分乾燥させ、脂肪質量を秤量した。

得られた脂肪を再びヘキサンに溶解後、硫酸処理を行った。次に自動クリーンアップ装置 Power-Prep を用いて妨害物質を完全に除去し、ダイオキシン画分を分取した。得られたダイオキシン画分を濃縮後、内部標準物質（シリンジスパイク）として ^{13}C で標識した各 PBDDs/PBDFs を 150pg 添加し、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS) による分析試料とした。

HRGC-HRMS による測定条件は、臭素化ダイオキシン (2,3,7,8-TeBDD) を経口投与したラット臓器中の臭素化ダイオキシン分析と同じである。

B-b. 結果および考察

i) 「臭素系難燃剤を使用していない職場の労働者」のプール血液中臭素化ダイオキシン類

「臭素系難燃剤を使用していない職場の労働者」のプール血液 NB-1~4 の臭素化ダイオキシン類分析結果を表 B-2 に示す。また図 B-1~4 に、HRGC-HRMS によって得られたマスキロマトグラムの一例を示す。

今回の測定ではどの臭素化ダイオキシン類も検出限界未満であった。これは、昨年度に比べて測定器 (HRGC-HRMS) の感度が非常に悪く、検出下限値も非常に高い値（四臭素化物で 5 倍、五臭素化物で 10 倍、六臭素化物で 20 倍、七臭素化物で 100 倍）であったためである。検量線作成用の臭素化ダイオキシン類標準溶液を測定しても、濃度の増加率に対するピーク面積値の増加率が極めて低く、高質量すなわち臭素数の多い化合物になれば