

### 第三編 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

主任研究者 神山 宣彦 独立行政法人 産業医学総合研究所 作業環境計測研究部  
研究協力者 萩原 正義 独立行政法人 産業医学総合研究所 作業環境計測研究部  
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た。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、

- A) 先ず、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。また採血量を減らし、少しでも被験者の負担を軽くするためにも、測定が比較的容易な PCDDs/Fs 分析法を改良し、必要血液量を低減する必要があるからである。
  - B) この PCDDs/Fs 分析法の改良の過程で得た種々の知見を基に、PBDDs/Fs の分析法を構築した。
  - C) 構築した PBDDs/Fs 分析法を評価するために、精度管理用（臭素化ダイオキシン類添加）標準動物血液を作成し、他機関と測定結果を比較した。
- また、更なる改良を加えるために、
- D) 日本バイオアッセイ研究センターで行われた毒性評価実験に用いた実験動物の臓器試料を分析した。臭素化ダイオキシン（2,3,7,8-TeBDD）を経口投与したラットの肝臓および脂肪組織の分析を行い、曝露後の 2,3,7,8-TeBDD の濃度変化に関する知見を得た。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。

これらの知見をもとに、血液中の PBDDs/Fs 分析法の手順を確定した。その分析法の実際のヒト血液試料への応用として

- E) 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) の血中濃度の順に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た。
- F) 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めるため、このプール血液を用いて臭素化ダイオキシン類を測定した。

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、臭素化ダイオキシン類と塩素化ダイオキシン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. 血液中の塩素化ダイオキシン類の分析

本研究所では以前からヒト血液試料を用いたバイオリジカルモニタリングのための塩素化ダイオキシン類分析法の高度化を進めている。そのバイオリジカルモニタリングでは、被験者負担軽減のためにできるだけ少量の試料を用いた分析方法と分析の簡易・迅速化を図っている。そのために新しい分析機器を積極的に導入している。この章では、臭素化ダイオキシン類の分析法の検討結果の報告の前に、まずそれら塩素化ダイオキシン類の測定法の開発に導入した最新の分析機器を用いた方法とその分析例を示す。

ダイオキシン類の測定は、定量目的の化合物 (ダイオキシン類) と同じ化学構造を持つ化合物の炭素を全て炭素安定同位体  $^{13}\text{C}$  に置き換えた標識化合物を内部標準物質として前処理操作の初めに試料に添加 (スパイク) する「同位体希釈法」で行う。この内部標準物質を試料中のダイオキシン類と共に抽出・精製した試料中のダイオキシン類の同位体比 ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) を高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS) により測定する。そして、はじめに既知量添加した内部標準物質との比から試料中の含有量を計算する。この方法は定量結果が回収率に左右されないという利点があるので、血液中のダイオキシン類の測定もこの方法で行っている。

なお、従来の環境その他の試料中の塩素化ダイオキシン類分析法の公定法や暫定マニュアルで認められている抽出方法は、ソックスレー抽出あるいは振とう抽出による液-液抽出である。またカラムクロマトグラフィによるダイオキシン類の分画には、ガラスカラムクロマト管の使用などが定められている。これらは、本研究で採用している方法とは大きく異なる点である。

##### A-a. 血液試料の前処理方法

###### A-a-i. 試薬および実験器具

塩素化ダイオキシン類の標準試薬は、ダイオキシン分析用として市販されているものを使用する。溶媒その他の試薬も可能な限りダイオキシン分析用として市販されているものを、無い場合は出来るだけ高純度のものを精製して使用する。

ガラス器具は十分に洗浄した後、電気炉を用いて 500℃で 4 時間加熱処理してから使用する。加熱処理できない場合は、使用する溶媒等で十分に洗浄してから使用する。

#### A-a-ii. 試料からの脂肪抽出

血液中のダイオキシン類は主に脂肪にとけ込んでいるため、はじめに脂肪分を抽出する。「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」（厚生省，平成 12 年）などの抽出方法では、先ずシュウ酸アンモニウム飽和水溶液や硫酸アンモニウム飽和水溶液などを加えて化学的に細胞を破壊するか、またはホモジナイザー等を用いて物理的に細胞を破壊して、次に分液ロート中で有機溶媒と共に振とうし、脂肪分を抽出する方法がとられている。この方法では、時間と大量の有機溶媒を必要とする。本研究所では、高温高压の条件下で抽出を行う高速溶媒抽出装置を用いて、時間と有機溶媒の節約を図っている。高速溶媒抽出装置は、土壌・底質・固形廃棄物からの多環芳香族炭化水素・殺虫剤・除草剤などの抽出装置として米国環境保護庁（EPA）の公定法に採用されるなど、最近、環境汚染物質の抽出に採用されるようになってきている。従来、高速溶媒抽出装置は主に固形試料からの抽出に用いられているが、分散剤として珪藻土を混合させることにより、血液などの液体試料にも応用可能である。

**高速溶媒抽出操作：**先ず、予め分析試料と同条件で抽出操作を行って洗浄した珪藻土 10 g を 200mL ビーカーにとる。それを上皿電子天秤にのせ、ヒト血液 10g (約 10mL) を徐々に加えながら精秤する。血液を十分にしみこませ混合した珪藻土を、高速溶媒抽出装置用抽出セルに移す。取り残しの無いよう先のビーカーに新たに珪藻土 5g を入れて内壁を十分に洗い込み、これも抽出セルに加える。

なお、血液を含んだ珪藻土を抽出セルの一番下に入れると、血球などの組織が抽出液に混入してしまう。また抽出セル内に空隙が多いと抽出溶媒を無駄に必要とする。そのため、抽出セルの容量を見込んで一番下と上に新たな珪藻土を入れ、試料を含んだ珪藻土を挟むように充填する。

各抽出セルに内部標準物質（クリーンアップスパイク）として炭素安定同位体  $^{13}\text{C}$  で標識した各 PCDDs/Fs を 20pg 添加した後、以下の条件で脂肪分の抽出を行った。

表 A-1. 高速溶媒抽出装置（ASE300、ダイオネクス社製）抽出条件

項目	条件
抽出セルサイズ	66mL 抽出セル
分散剤	珪藻土
抽出溶媒	アセトン／ヘキサン (50 : 50)
抽出圧力	1500psi (10MPa)
オープン温度	150℃
オープン昇温時間	7 分

設定温圧静置時間	10分
フラッシュ容積	セル容積の50%
窒素ガスパーズ時間	180秒
静置サイクル数	2回

#### A-a-iii. 脂肪重量測定

血液中の脂肪量は個人の体質・食事の内容・食事からの経過時間などに大きく左右されるため、主に脂肪中に溶け込んでいるダイオキシン類の濃度を単位血液量当たりで表すとその影響によるばらつきが大きく比較が難しくなる。一方、脂肪重量当たりの濃度として表すと、その影響を受けないので比較しやすいなどの利点が多い。そのため、前処理の過程で脂肪重量を量る必要がある。

分析時間短縮のためには、一般に抽出液を二分し、一方は脂肪重量測定用のみ使用し、もう一方はダイオキシン分析用としてすぐに次の操作へ移す方法が行われている。しかしそれでは貴重な血液試料の一部が脂肪重量を測定しただけで無駄になってしまう。被験者負担軽減のためには、脂肪重量を測定した試料をダイオキシン分析用に使用すべきと考え、以下のように行った。

**脂肪重量測定操作：**高速溶媒抽出装置で得られた抽出液を、無水硫酸ナトリウム 15g を入れたロートでろ過しながら脱水し、500mL ナスプラスコに受ける。これを真空調節器付きのロータリーエバポレーターで減圧濃縮する。突沸あるいは乾固させないように注意しながら数十 mL 程度まで穏やかに濃縮する。これを 200mL ナスプラスコへ移し、同様に 2mL 程度まで更に濃縮する。

この濃縮液を、予め分析用精密上皿電子天秤で質量を量っておいた専用の秤量瓶（ンプル管の肩から上を切り落とした物）に移し、窒素気流下で更に濃縮する。溶媒がほぼ無くなったところでドラフト内に一晚静置し、溶媒を留去する。これを容器ごと秤量し、増加分を脂肪重量とする。

なお各容器の移し換えの際は、容器の大きさに応じて数 mL のヘキサンで洗い込みを行う。新しいヘキサンを加えては、超音波洗浄機を用いて内壁を洗い、これも次の容器に移す。この操作をそれぞれ3回行い、回収率を向上させる。

#### A-a-iv. 硫酸による脂肪分解

有機溶媒による抽出物中および脂肪中のダイオキシン類を、脂肪、その他の有機物から分離するには、濃硫酸を加えて攪拌するのが極めて有効である。着色物質や多環芳香族炭化水素・不飽和炭化水素など、抽出物中に存在する有機物の大部分はこの処理によって分解される。化学的に安定なダイオキシン類はこの操作ではほとんど影響されない。

**脂肪分解操作：**まず、ヘキサン 1mL を脂肪重量測定後の容器に加えて脂肪を溶かす。こ

れを 10mL 先細り遠沈管に移す。前述と同様、1mL のヘキサンで洗い込みを 3 回行う。全液量を 4mL に揃え、そこへ濃硫酸 2mL を静かに滴下する。エマルジョンが出来ると分離が困難になるため、振ったり混ぜたりせず、そのまま一晩静置する。

翌日、ヘキサン層（上層）が無色であることを確認し、遠心分離器（毎分 2800 回転、10 分）により硫酸層と分離する。もし着色が残っている場合は濃硫酸を 1mL 追加し、更に半日程度静置する。場合によっては硫酸層（下層）を取り除き、ヘキサン層が無色になるまでこれを繰り返す。

得られた上澄み液を 15mL スピッチへ注意深く移す。ここでの洗い込みは超音波洗浄機を使用せずに、加えたヘキサンをパスツールピペットで吸い上げては内壁を洗い落とす操作を繰り返す。最終的に全液量が 12mL になるようにヘキサンを加える。

#### A-a-v. 妨害物質のクリーンアップ（ダイオキシン類の分取）

前述の硫酸処理によって大部分の妨害物質は除去できる。しかし、それだけでは不十分である。試料中の含有量が非常に少ないダイオキシン類を定量するためには、桁違いに高い濃度で存在する妨害物質から分離し、濃縮することが極めて重要である。超微量物質を分析する高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計の性能維持のためにも、目的物質以外の妨害物質を可能な限り完全に除去する必要がある。

この目的に従来は、何種類かのカラムクロマトグラフィを順次行う方法がとられている。すなわち除去目的物質に応じてアルミナ（酸化アルミニウム）やフロリジル（ケイ酸マグネシウム）・硫酸や水酸化カリウムあるいは硝酸銀を添加したシリカゲル・活性炭などをガラスカラムクロマト管に充填する。そこに濃縮した試料を入れ、種々の溶媒によって各成分を溶離し、ダイオキシン類を含む画分を捕集する。しかしこの方法は、1 本 1 本充填剤を詰める作業、得られたダイオキシン画分を次のカラムクロマトグラフィのために再度濃縮する作業などに非常に時間と労力を必要とする。

本研究では、予め充填されたカラムを使い、連続してカラムクロマトグラフィを行える自動クリーンアップ装置 Power-Prep (Fluid Management System (FMS) 社製) を用いた。これによって妨害物質からダイオキシン画分を効率よく分取できるようになった。この装置は、3 種類のカラムクロマトグラフ管とポンプおよび各電磁弁が全て連結されており、コンピューター制御によって各種溶離液を自動的に流す装置である。原理も含め、基本的な動作は従来のカラムクロマトグラフィと同じである。またこの装置は開発されてからまだ間もないが、既に米国環境保護庁 (EPA) が環境試料中のダイオキシン類分析の公定法に採用している。

自動カラムクロマトグラフ操作：今回、カラムや溶離液の種類などの条件および動作プログラムは、ダイオキシン類分析用として FMS 社から提供されたものを用いた。その概要を以下に示す。

[使用カラム]

- カラム 1：多層シリカゲルカラム (Disposable multi-layer silica column)  
カラム 2：塩基性アルミナカラム (Disposable basic alumina column)  
カラム 3：活性炭カラム (Disposable carbon/celite column)

[溶出条件]

- 1) 各カラム及び流路を使用する溶媒で洗浄・コンディショニングした後、ヘキサン溶液 (12mL) にした試料をカラム 1 へ添加。
- 2) カラム 1 からヘキサン 90mL (10mL/min) でカラム 2 へ溶出。
- 3) カラム 2 へ 2%ジクロロメタン/ヘキサン 60mL (10mL/min) を流した後、50%ジクロロメタン/ヘキサン 120mL (10mL/min) でカラム 3 へ溶出。
- 4) カラム 3 へ 50%酢酸エチル/トルエン 4mL (10mL/min)、ヘキサン 10mL (10mL/min) を流した後、逆側からトルエン 75mL (5mL/min) を流し、これをダイオキシン画分として 100mL ナスフラスコに採取した。

**A-a-vi. クリーンアップ後の試料の濃縮**

濃縮操作：得られたダイオキシン画分をロータリーエバポレーターで乾固寸前まで減圧濃縮する。このとき乾固させないように十分な注意をする。これをガスクロマトグラフ用オートサンプラーのバイアルへ移す。バイアルには予め 15  $\mu$ L の印を付けておく。これにダイオキシン画分を少量ずつ移しては、窒素ガスを穏やかに吹き付けて濃縮し、洗い込みも含め全てを移す。最終的に液面が、15  $\mu$ L の印のところになるように濃縮する。

定容後すぐに、各バイアルへ内部標準物質 (シリンジスパイク  $^{13}\text{C}$  標識化合物 各 1pg/ $\mu$ L) 10  $\mu$ L を添加し、これを高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計の測定試料とする。

以上で説明した血液試料の前処理操作のフローチャートを図 A-1 に示した。

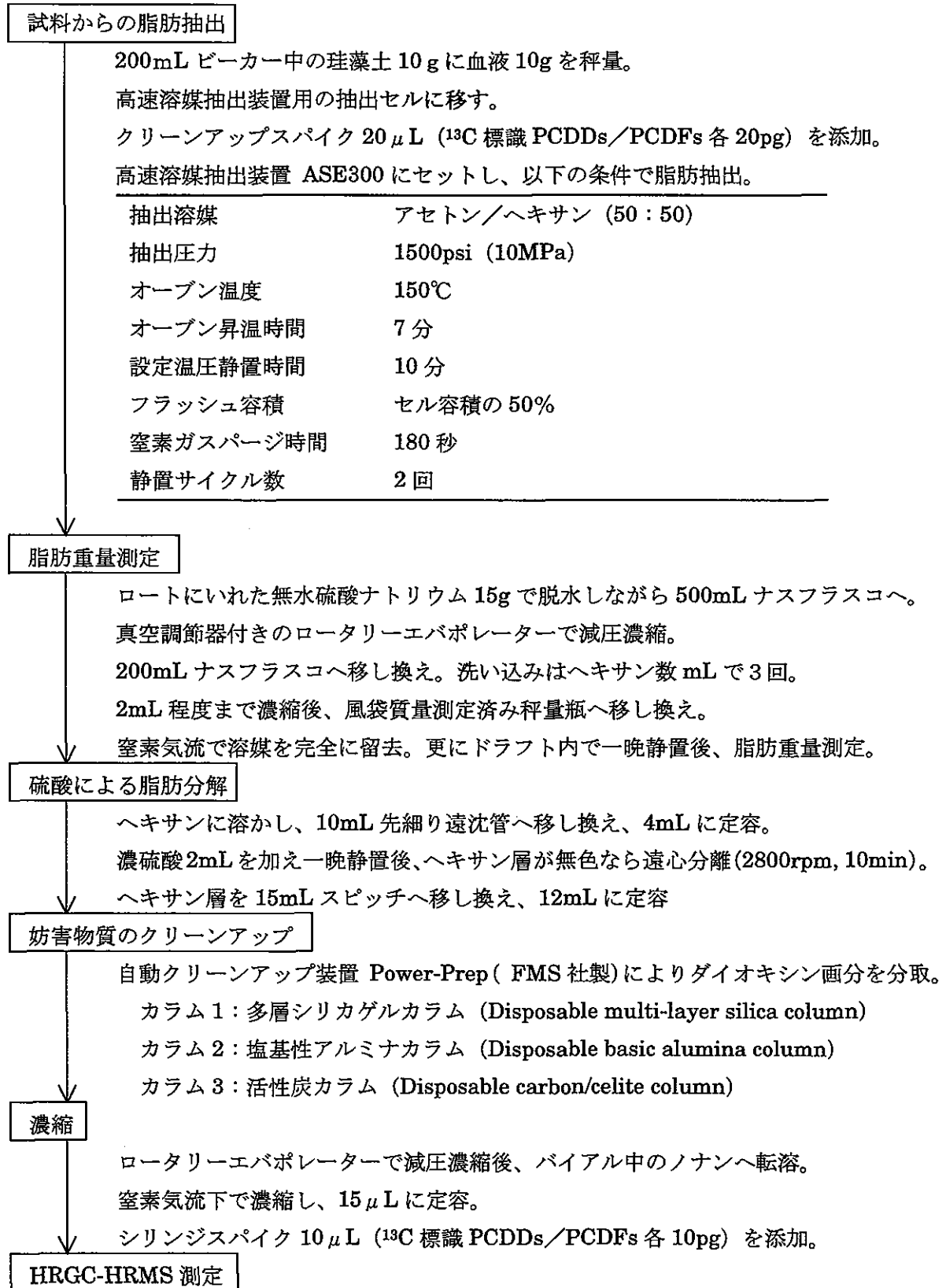


図 A-1. 血液中の塩素化ダイオキシン類分析の前処理フローチャート

## A-b. 高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS) による測定

### A-b-i. 分析機器

塩素化ダイオキシン類 (PCDDs および PCDFs) には多くの異性体が存在する。同位体希釈法によってそれらの定量を行うには、高感度・高選択的に測定できる高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS) を用いる必要がある。本研究では、ダイオキシン類分析で既に数多くの実績をあげ、高い評価を得ている Micromass 社製の AutoSpec Ultima NT (二重収束型) を使用した。

本研究所では、この HRGC-HRMS の試料注入部に、SGE 社製の大量注入装置 (SCLV Injection System) を取り付けた。この装置を用いることにより、通常  $1\mu\text{L}$  しか注入出来ないところを、最大  $20\mu\text{L}$  まで注入することが出来るようになった。

#### [大量注入装置の概要と特長]

- 1) 注入された試料は、プレカラムにて溶媒と分析対象成分とに粗分離され、溶媒はソルベントカットバルブから排出される。このことで HRGC-HRMS の真空度が改善され、汚染も低減される。
- 2) 溶媒の排出後、ソルベントカットバルブを閉じると、分析対象成分は液化炭酸ガスによるコールドトラップへ導かれる。大量の溶媒のために広がった試料バンドを再凝縮する。トラップ内の容積は通常の注入口の  $1/1000 \sim 1/10000$  であるので、分析カラムに導入される分析成分のバンド幅が狭くなる。そのため、HRGC-HRMS のピークはよりシャープになるのでピークの分離性が良くなり、定量性が向上する。
- 3) 再びソルベントカットバルブを開いて分析対象成分以降に溶出する不必要な高沸点の不純物を排出する。これもまた分析カラムやイオン源の汚染および性能劣化の防止に貢献する。
- 4) 次に液化炭酸ガスの供給を止めてトラップを解除する。分析対象成分を分析カラムへと導き、測定を開始する。大量の溶媒や高沸点の不純物などは除去され、分析対象成分のみが分析カラムへと導かれる。そのため、カラムへの試料負荷量も小さくて済むので、分析カラムに内径の細かいカラムを使用できる。内径の細かいカラムは試料負荷量が小さいため、通常の分析での使用は制限されるが、分離性能が優れており定量性も良い。

### A-b-ii. 測定条件

分析対象のダイオキシン類およびそれらの内部標準物質の種類ごとに、塩素原子の天然同位体存在比から推定される最も強い 2 つのイオンの質量数を測定する。また、保持時間によって分割したグループごとに、そこで測定する質量範囲内にあるロックマス用 PFK のイオンの質量数を測定する。なお、1 つのピークに対して十分な測定点を確保するため、選択イオン検出のサンプリング周期は 1 秒以下になるよう設定する。



表 A-2. 高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計の塩素化ダイオキシン類測定条件

	項目	条件など
HR-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°C
	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
	注入装置	SGE 社製 溶媒除去大量注入システム (SCLV Injection System)
	プレカラム	SGE 社製 BPX5 (0.25mm ID×6m、膜厚 0.25 μm)
	分析カラム	SGE 社製 BPX-Dioxin-I (0.15mm ID×30m)
	注入口温度	280°C
	カラムオープン昇温条件	160°C (3min hold) -<20°C/min>-300°C (8min hold) -<-100°C/min>-150°C (0.5min hold) -<5°C/min>-300°C (5min hold)
	注入口キャリアガス圧力条件	469kPa (2.75min hold) -<418kPa /min>-678kPa (14.75min hold) -<-271kPa /min>-271kPa (0.5min hold) -<5.7kPa /min>-442kPa (5min hold)
	追加キャリアガス (Aux#3) 圧力条件	455kPa (2.75min hold) -<414kPa /min>-662kPa (14.75min hold) -<-271kPa /min>-255kPa (0.5min hold) -<4.9kPa /min>-403kPa (4.79min hold)
	溶媒追い出しガス (Aux#5) 圧力条件	416kPa (2.75min hold) -<-576kPa /min>-128kPa (14.75min hold) -<76kPa /min>-242kPa (0.5min hold) -<4.1kPa /min>-364kPa (5.24min hold)
	ソルベントカットバルブ (Valve 5) 動作プログラム	0 → 2.75 → 18 (min) Off → On → Off
	コールドトラップバルブ (Valve 6) 動作プログラム	0 → 2.25 → 20 (min) Off → On → Off

### A-c. 検量線の作製

#### A-c-i. 検量線作製用標準液の調製

検量線作製用の標準液は、Cambridge Isotope Laboratories (CIL) 社製 ダイオキシン標準溶液 EDF-9999, Method 1613 Calibration Solutions [CS1~CS5] を購入し、それぞれを 100 倍に希釈したものをを用いた。

これらの標準液は、分析対象物質であるダイオキシンおよびフランの 2,3,7,8-位塩素置換異性体が 5 段階の濃度系列をなしている。また全ての溶液には各異性体に対応する内部標準物質(クリーンアップスパイク;cs およびシリンジスパイク;rs として使用する  $^{13}\text{C}$  標識化合物) が一定濃度で含まれている。

#### A-c-ii. 検量線作製用標準液の測定

この検量線作製用標準液を、HRGC-HRMS により、実際の分析試料と同条件で測定した。化合物ごとに塩素同位体組成の異なる二つの質量数を測定し、それぞれのクロマトグラムにおけるピーク面積を合計した。この値をその化合物のピーク面積とし、以降の計算に用いた。

#### A-c-iii. 検量線の作製 (相対感度係数の計算)

まず、各分析対象物質のピーク面積 ( $A_s$ ) とその分析対象物質に対応する内部標準物質(クリーンアップスパイク) のピーク面積 ( $A_{cs}$ ) との比 ( $A_s/A_{cs}$ ) を求めた。次に、その標準液における各分析対象物質と内部標準物質(クリーンアップスパイク) の濃度比 ( $C_s/C_{cs}$ ) を求めた。これら濃度比とピーク面積比をそれぞれ x 軸と y 軸にとり、検量線を作製した。最小自乗法により一次回帰直線を求め、その傾きを相対感度係数 (RRF<sub>cs</sub>) とした。実際の試料中のダイオキシン類の濃度はこの相対感度係数 (RRF<sub>cs</sub>) を用いて計算する。

同じく検量線作製用標準液を測定し、シリンジスパイク内部標準物質に対するクリーンアップスパイク内部標準物質のピーク面積比 ( $A_{cs}/A_{rs}$ ) と、標準液における濃度比 ( $C_{cs}/C_{rs}$ ) とを比べ、その平均値を相対感度係数 (RRF<sub>rs</sub>) とした。実際の試料に添加したクリーンアップスパイクの回収率 (R<sub>cs</sub>) は、この相対感度係数 (RRF<sub>rs</sub>) を用いて計算する。

#### A-c-iv. 結果と考察

この検量線作製用標準液を実際の分析試料と同条件で測定した結果を基に検量線を作製した(表 A-3)。各分析対象物質とそれに対応する内部標準物質(クリーンアップスパイク) の、ピーク面積比 ( $A_s/A_{cs}$ ) と濃度比 ( $C_{cs}/C_{rs}$ ) とはほぼ直線関係となった。最小自乗法により一次回帰直線を求めた結果、相関係数 ( $R^2$ ) は 0.9996 以上と非常に良好であった。

表 A-3. 塩素化ダイオキシン類検量線作製用標準液測定結果と相対感度係数(RRFcs)の計算結果

化合物		検量線作製用標準液					一次回帰直線		相関係数 (R <sup>2</sup> )
		CS1X100	CS2X100	CS3X100	CS4X100	CS5X100	傾き(RRFcs)	y 切片	
2,3,7,8-TeCDF	面積比	0.005575	0.018682	0.095896	0.352174	1.76094	0.878990399	0.002763	1.0000
	濃度比	0.005	0.02	0.1	0.4	2			
2,3,7,8-TeCDD	面積比	0.005522	0.020782	0.10267	0.396271	2.020662	1.010209526	-0.00097	1.0000
	濃度比	0.005	0.02	0.1	0.4	2			
1,2,3,7,8-PeCDF	面積比	0.018431	0.076078	0.415643	1.532394	7.741286	0.773520652	0.003627	1.0000
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
2,3,4,7,8-PeCDF	面積比	0.021111	0.082526	0.400801	1.77984	8.417314	0.841646544	0.015161	0.9998
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,7,8-PeCDD	面積比	0.023327	0.092198	0.468109	1.840409	9.120612	0.91155377	0.007258	1.0000
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,4,7,8-HxCDF	面積比	0.023809	0.087845	0.457689	1.76726	8.650767	0.863983741	0.015915	1.0000
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,6,7,8-HxCDF	面積比	0.018384	0.082702	0.429858	1.70791	8.503922	0.85038772	0.001326	1.0000
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
2,3,4,6,7,8-HxCDF	面積比	0.019269	0.085035	0.418824	1.651417	7.906458	0.789296878	0.023226	0.9999
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,7,8,9-HxCDF	面積比	0.024382	0.09335	0.424149	1.781551	8.979969	0.898611163	-0.00831	1.0000
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,4,7,8-HxCDD	面積比	0.019843	0.102262	0.570292	2.231025	10.67556	1.066225538	0.027576	0.9999
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,6,7,8-HxCDD	面積比	0.021989	0.094055	0.456386	1.851922	8.670477	0.865296479	0.034092	0.9998
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,7,8,9-HxCDD	面積比	0.019803	0.102945	0.530299	2.108772	10.26183	1.025483146	0.015384	1.0000
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	面積比	0.023174	0.091288	0.472328	1.763333	9.209417	0.921201531	-0.01413	0.9999
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	面積比	0.024236	0.082197	0.445953	1.72322	8.584663	0.857979412	0.005656	1.0000
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	面積比	0.020037	0.082608	0.454562	1.676746	8.699012	0.870015833	-0.0102	0.9999
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
OCDF	面積比	0.020407	0.07749	0.393338	1.900862	8.743142	0.874819131	0.01813	0.9996
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			
OCDD	面積比	0.026193	0.093462	0.475875	1.929625	9.493737	0.949081036	0.007349	1.0000
	濃度比	0.025	0.1	0.5	2	10			

注) 面積比：各分析対象物質のピーク面積 (As) と、対応する内部標準物質 (クリーンアップスパイク) のピーク面積 (Acs) との比。As/Acs。

濃度比：標準液における分析対象物質と対応する内部標準物質 (クリーンアップスパイク) の濃度の比。Cs/Ccs。

傾き(RRFcs)：一次回帰直線の傾きを、クリーンアップスパイクに対する分析対象物質の相対感度係数(RRFcs)とした。

#### A-d. ヒト血液試料中の塩素化ダイオキシン類

実際のヒト血液試料を用いた塩素化ダイオキシン類の測定例を示す。

##### A-d-i. 試料

試料には、インフォームドコンセントの得られた本研究所職員の血液を用いた。

##### A-d-ii. 分析方法

これを前述した通りに前処理を行い、HRGC-HRMSにより塩素化ダイオキシン類の測定を行った。

##### A-d-iii. 結果と考察

図 A-2～A-6 に HRGC-HRMS によって得られたヒト血液中の塩素化ダイオキシン類のマスキロマトグラムの例を示す。

ダイオキシン類の測定は同位体希釈法で行った。最初に既知量の内部標準物質（クリーンアップスパイク）を試料に添加し、目的物質であるダイオキシン類と共に抽出・精製する。これを HRGC-HRMS で測定し、同位体比を求める。この同位体比から試料中の含有量を計算する。

分析試料中の各分析対象物質の量  $Q_s$  は、それぞれ対応する検量線から求めた相対感度係数  $RRF_{cs}$  を用いて次式により算出した。

$$Q_s = (A_s \times Q_{cs}) / (A_{cs} \times RRF_{cs})$$

$Q_s$  : 分析試料中の各分析対象物質の量 (pg)

$A_s$  : 分析試料中の各分析対象物質のピーク面積

$Q_{cs}$  : 対応する内部標準物質（クリーンアップスパイク）の分析試料への添加量 (pg)

$A_{cs}$  : 分析試料中の対応する内部標準物質（クリーンアップスパイク）のピーク面積

$RRF_{cs}$  : 検量線から求めた内部標準物質（クリーンアップスパイク）に対する分析対象物質の相対感度係数

またクリーンアップスパイクの回収率  $R_{cs}$  は、対応する相対感度係数  $RRF_{rs}$  を用いて次式により算出した。

$$R_{cs} = (A_{cs} \times Q_{rs}) / (A_{rs} \times RRF_{rs}) \times 100 / Q_{cs}$$

$R_{cs}$  : 分析試料中のクリーンアップスパイクの回収率 (%)

$A_{cs}$  : 分析試料中の内部標準物質（クリーンアップスパイク）のピーク面積

$Q_{rs}$  : 対応する内部標準物質（シリンジスパイク）の分析試料への添加量 (pg)

$A_{rs}$  : 分析試料中の対応する内部標準物質（シリンジスパイク）のピーク面積

**RRFrs** : 検量線から求めたシリンジスパイクに対するクリーンアップスパイクの相対感度係数

**Qcs** : 内部標準物質（クリーンアップスパイク）の分析試料への添加量 (pg)

その結果、実際にヒト血液試料 10g を用いて分析し、一般人レベル（バックグラウンドレベル）と考えられる塩素化ダイオキシン類を測定することができた。またクリーンアップスパイクの回収率も概ね 90% と良好なものであった。

なお定量下限値は、「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」（厚生省、平成 12 年）に従って算出した。すなわち各化合物のマスキングマトグラムにおいて、ピークの高さがノイズレベルの 10 倍 (S/N=10) に相当するピークの面積値を化合物の量に換算した。その暫定マニュアルでは血液 50g を用いて分析しているが、そこでの目標定量下限値を、本分析法では血液 10g でも十分満たせることが明らかとなった。

そこで、この分析方法を次の本研究の主目的である臭素化ダイオキシン類のバイオロジカルモニタリング測定にも適応させた。

D30121T-N (CS-CL20BR20,RS-CL10BR20/25uL) 4uL Inj.

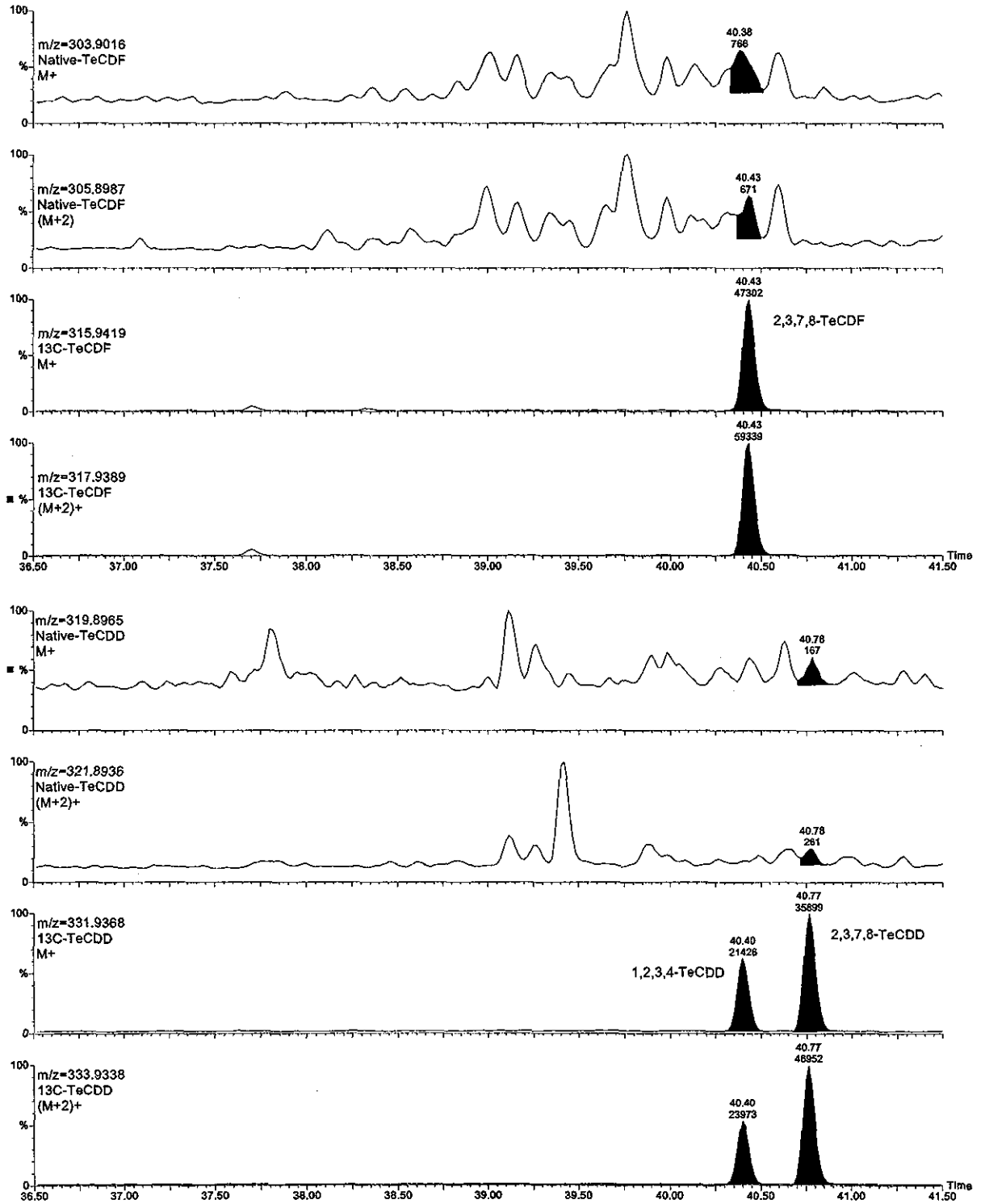


図 A-2. ヒト血液中の TeCDDs および TeCDFs のマスクロマトグラム

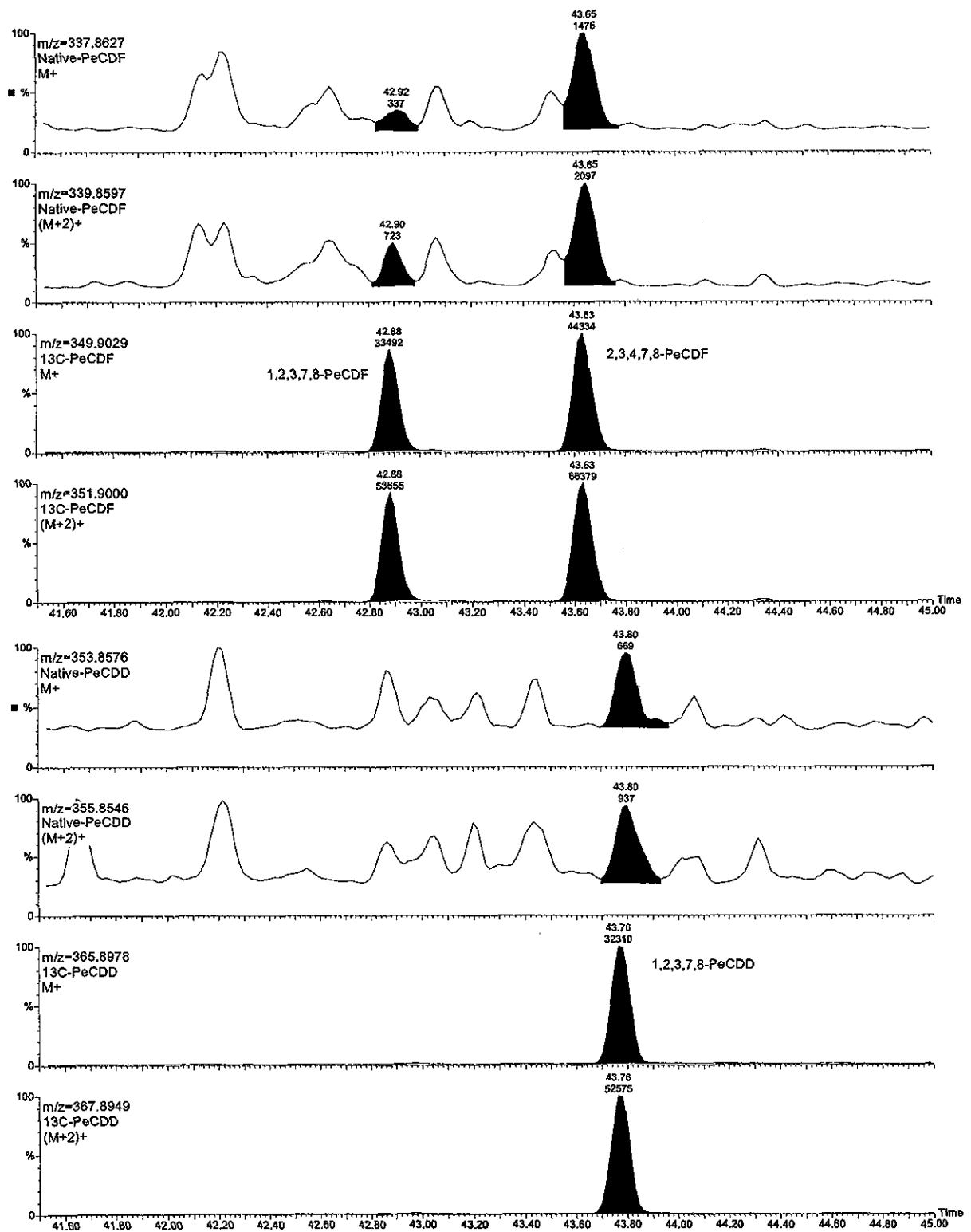


図 A-3. ヒト血液中の PeCDDs および PeCDFs のマスクロマトグラム

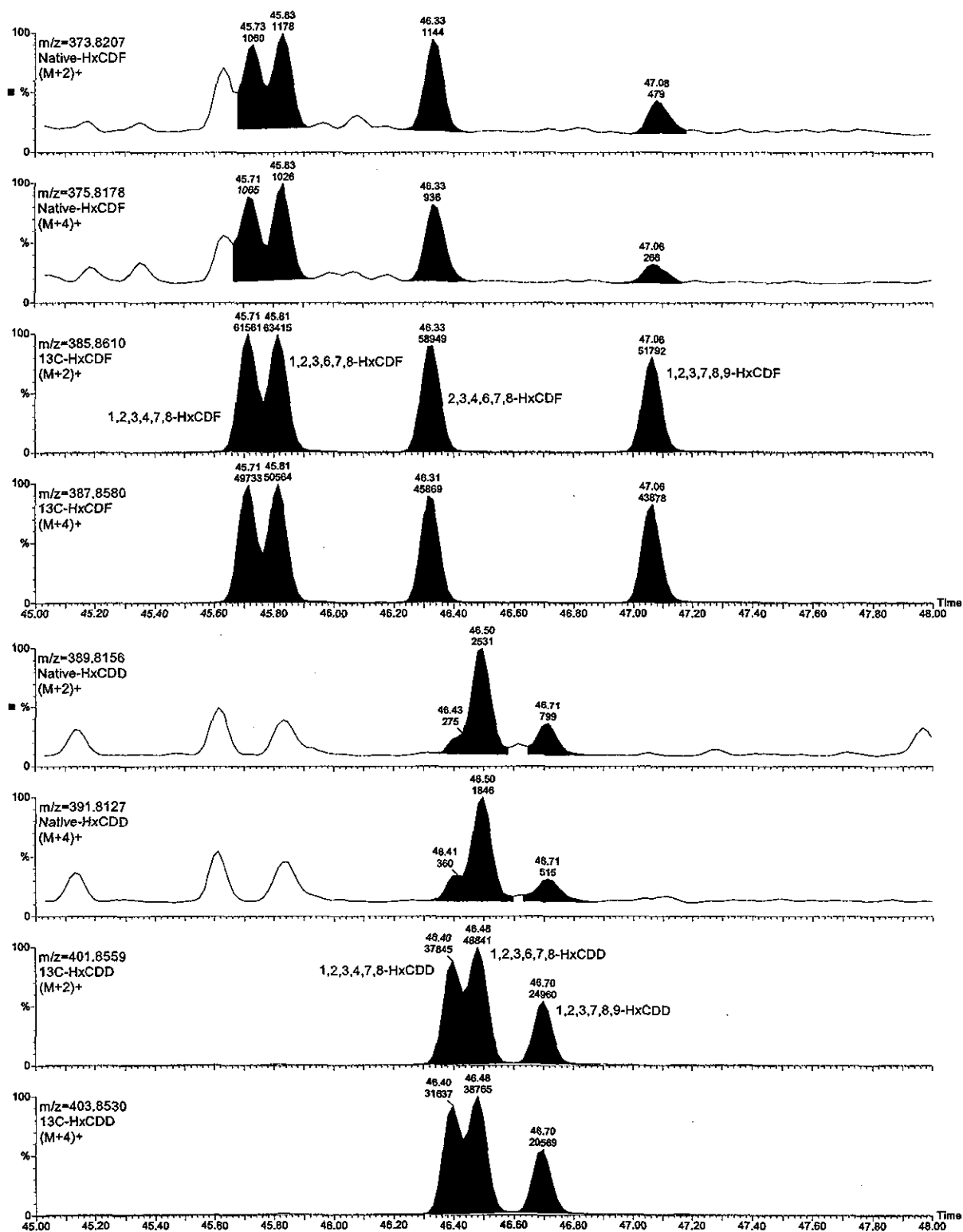


図 A-4. ヒト血液中の HxCDDs および HxCDFs のマスクロマトグラム



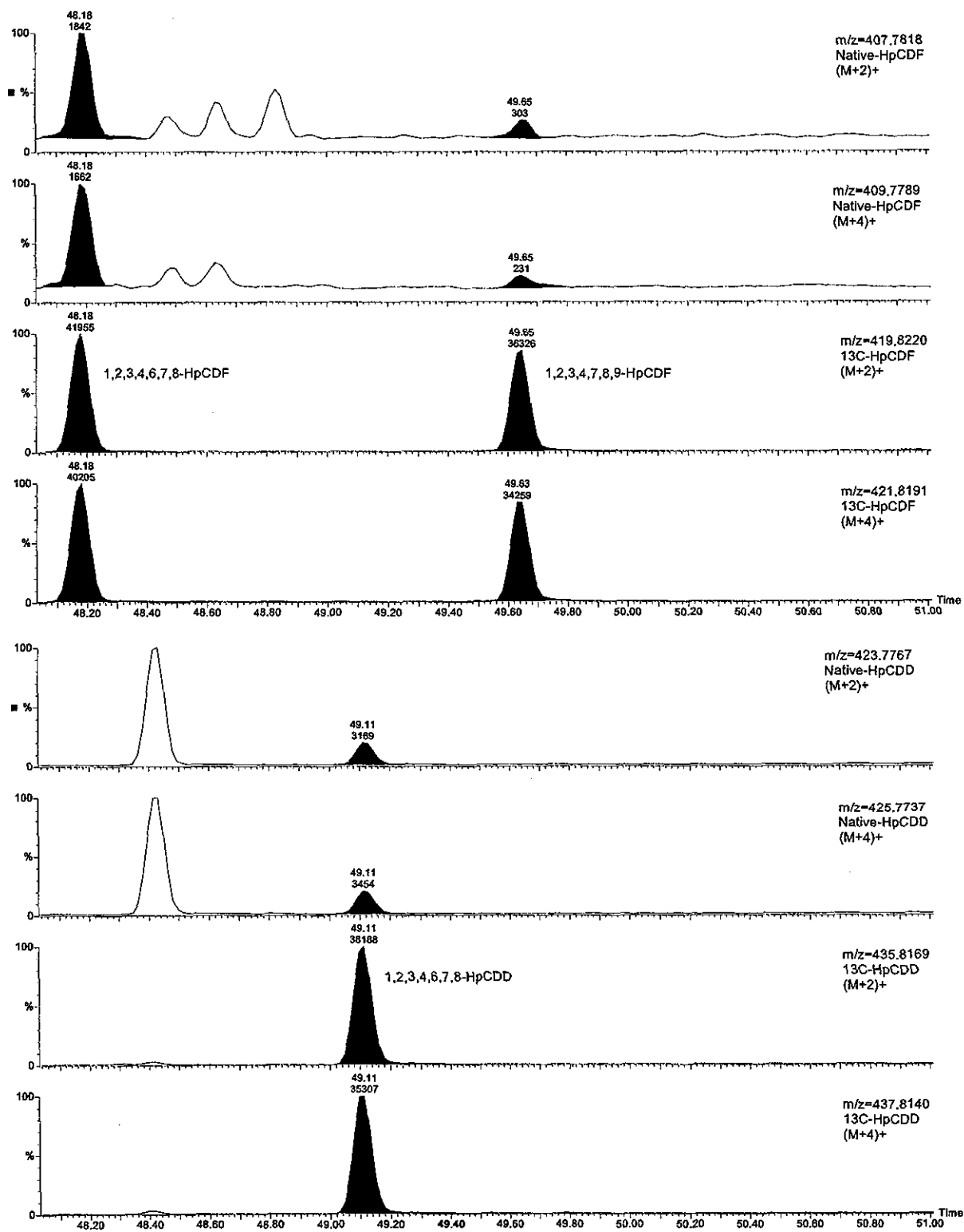


図 A-5. ヒト血液中の HpCDDs および HpCDFs のマスクロマトグラム

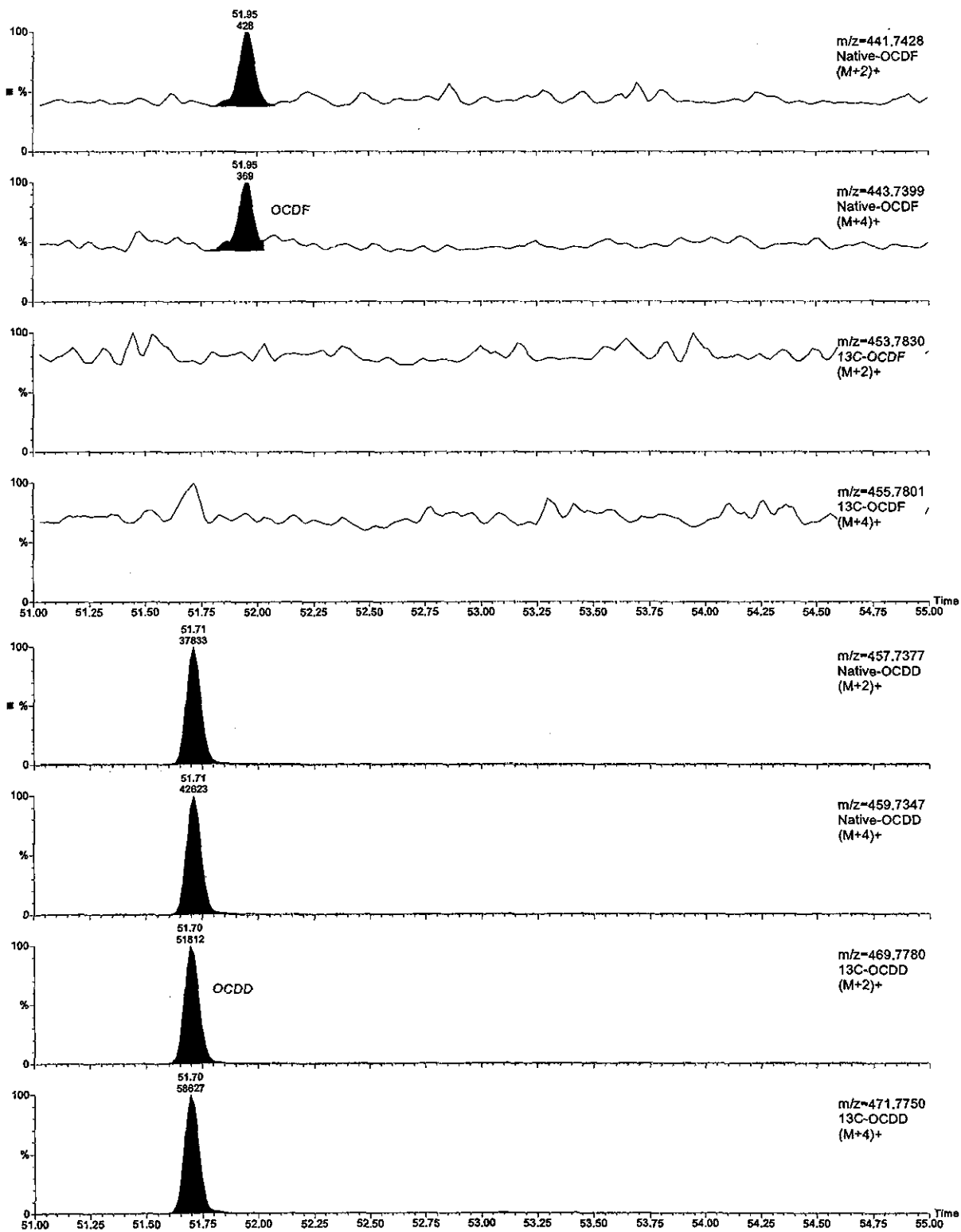


図 A-6. ヒト血液中の OCDD および OCDF のマスクロマトグラム

表 A-4. ヒト血液中の塩素化ダイオキシン類の測定結果

化合物の名称等	実測濃度 (pg/g- lipid)	WHO, 1998-TEF		
		毒性係数 TEF	毒性等量 TEQ (pg-TEQ/g-lipid)	
PCDDs	2,3,7,8-TeCDD	1.7	1	1.7
	1,2,3,7,8-PeCDD	7.0	1	7.0
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.4	0.1	0.24
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	19	0.1	1.9
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	4.9	0.1	0.49
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	35	0.01	0.35
	OCDD	530	0.0001	0.053
Total PCDDs	600	-	12	
PCDFs	2,3,7,8-TeCDF	4.1	0.1	0.41
	1,2,3,7,8-PeCDF	2.6	0.05	0.13
	2,3,4,7,8-PeCDF	12	0.5	6.0
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	6.8	0.1	0.68
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	7.8	0.1	0.78
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	2.2	0.1	0.22
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	8.6	0.1	0.86
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	15	0.01	0.15
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	3.1	0.01	0.031
	OCDF	3.9	0.0001	0.00039
Total PCDFs	66	-	9.3	
Total (PCDDs+PCDFs)	670	-	21	

注) Total PCDDs 及び Total PCDFs は PCDDs 及び PCDFs それぞれにおける各 2,3,7,8-位塩素置換異性体の合計を表す (その他の化合物は含んでいない)。

Total (PCDDs+PCDFs) は各 2,3,7,8-位塩素置換異性体の合計を表す (その他の化合物は含んでいない)。

表 A-5. 内部標準物質（クリーンアップスパイク）の回収率

化合物の名称等	クリーンアップスパイク			備考	
	添加量 (pg)	定量値 (pg)	回収率 (%)		
PCDDs	<sup>13</sup> C-2,3,7,8-TeCDD	20	18	92	Te
	<sup>13</sup> C-1,2,3,7,8-PeCDD	20	20	100	Te
	<sup>13</sup> C-1,2,3,4,7,8-HxCDD	20	18	91	Hx
	<sup>13</sup> C-1,2,3,6,7,8-HxCDD	20	19	94	Hx
	<sup>13</sup> C-1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	20	18	90	Hx
	<sup>13</sup> C-OCDD	40	34	85	Hx
PCDFs	<sup>13</sup> C-2,3,7,8-TeCDF	20	17	85	Te
	<sup>13</sup> C-1,2,3,7,8-PeCDF	20	15	75	Te
	<sup>13</sup> C-2,3,4,7,8-PeCDF	20	20	98	Te
	<sup>13</sup> C-1,2,3,4,7,8-HxCDF	20	18	91	Hx
	<sup>13</sup> C-1,2,3,6,7,8-HxCDF	20	15	76	Hx
	<sup>13</sup> C-1,2,3,7,8,9-HxCDF	20	20	99	Hx
	<sup>13</sup> C-2,3,4,6,7,8-HxCDF	20	16	82	Hx
	<sup>13</sup> C-1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	20	17	85	Hx
	<sup>13</sup> C-1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	20	19	97	Hx
平均	-	-	89		

注) Te : <sup>13</sup>C-1,2,3,4-TeCDD のシリンジスパイク量を基準に計算。

Hx : <sup>13</sup>C-1,2,3,7,8,9-HxCDD のシリンジスパイク量を基準に計算。