

の場合、約 480 (四臭化物) から 800 以上 (八臭化物) と 2 倍近い幅がある。

(イ) 分解能

更に、必要とされる分解能も 10,000 では不十分である。ここでいう分解能とは、ある質量数 m と $(m + \Delta)$ とが同じピーク高で、その 10% の高さで両者を分離できるとき (m / Δ) が分解能である。質量分析計で、同時に測定するグループには同じ臭素数の PBDD と PBDF およびそれらの ^{13}C 標識化合物が含まれている。測定条件で「臭素原子の天然同位体存在比から推定される最も強い二つのイオンの質量数を測定」するとしたが、Native-PBDD の M^+ , $(M+2)^+$, $(M+4)^+$ が内標準として添加した ^{13}C -PBDF の $(M+4)^+$, $(M+6)^+$, $(M+8)^+$ とそれぞれ非常に近い質量数である。これらを区別するために必要な分解能は、四臭化物で約 12,000、五臭化物で約 14,000、六臭化物で約 15,800、七臭化物で約 17,800、八臭化物では 19,700 も必要である。

(ウ) 質量校正用標準物質 (PFK)

また、チューニングおよび測定時 (ロックマス) の質量校正用標準物質 PFK にも注意が必要である。質量校正用の標準物質である PFK を質量分析計に流しながらチューニングおよび測定を行うが、そのときモニターする質量数に近い PFK のフラグメントイオンを使用しなければならない。しかし臭素化ダイオキシン類のように高分子量になると、それに対応する質量数の PFK のフラグメントイオンは非常に微弱な強度しか持っていない。最大強度を示す質量数 68.99521 の強度を 100% とすると、質量数 480 (四臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度は 0.5% 程度、質量数 570 (五臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度は 0.2% 程度、質量数 650 (六臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度も 0.2% 程度、質量数 730 (七臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度は 0.06% 程度、質量数 810 (八臭化物) 付近のフラグメントイオンの強度に至っては 0.01% 程度しかない。そんなイオンをずっと捕捉しながら測定しなければならず、容易に妨害物質の影響を受ける。常に PFK のイオンを元にモニターする質量を校正しているので、妨害を受ければ即、モニターする質量も正しくなくなってしまう。

先ずは上に挙げた測定上の問題点の対策を考案し、解消することが最優先である。現時点で考えられる対策をいくつか挙げる。

1) ガスクロマトグラフに関して

(ア) 試料注入口

これに関しては、大量注入装置 (SCLV) で対応する。この装置は通常より高圧で試料をカラムへ送り込んでいる点、コールドトラップにより試料のバンド幅を再凝縮している点、分析対象物質の前後の妨害物質を排出し質量分析計へ導入しない点、などが有効であると思われる。当然、検出下限値の引き下げにも貢献する。ただし、そのプログラムの最適化が必要である。

(イ) キャピラリーカラム

これに関しては、種々のキャピラリーカラムを試す以外にない。例えば短いカラムや液

相の極性が低いもの、液相の膜厚が薄いものを用いることで、より早く・低温で溶出させることが可能である。ただしこれは概して分離を悪くするので、それとの兼ね合いが必要である。

2) 質量分析計に関して

(ア) チューニング

測定そのものを臭素数ごとに分けて行い、その質量数にあった専用のチューニングを用意する。

(イ) 分解能

チューニングの際、単純に分解能を上げることは可能である。しかし分解能を上げれば上げるほど、検出器に入ってくるイオンを制限するので検出感度が悪くなる。

では、分解能 10,000 のままで対処できないだろうか。キャピラリーカラムで PBDD と PBDF とが少しも重ならなければ問題はない。しかしそれには、ここでは測定していない異性体も含め、全てのピーク位置を確かめておく必要がある。これは標準試薬がないと不可能である。

別の方法としては、お互いその質量になり得ない臭素同位体数のイオンをモニターする。例えば、 ^{13}C -PBDF なら最も軽い M^+ 、Native-PBDD なら最も重い方の $(M+8)^+$ などをモニターする。或いは、これまでのように分子イオンをモニターするのではなく、別のフラグメントイオンをモニターする。しかしこれらの場合もやはり、イオン強度が弱くなるので検出感度も悪くなると予想される。

分析装置によらない対処方法としては、前処理操作から PBDD と PBDF とで血液試料を別々に分けて行い、内部標準物質も別々に加えることでこの問題を回避できる。しかし、その分、血液試料も倍必要となる。

(ウ) 質量校正用標準物質 (PFK)

この質量数で測定する限り、チューニングおよび測定時 (ロックマス) の質量校正用標準物質 PFK を大量に流しながらチューニングおよび測定を行う他ない。或いは PFK の代わりに、高質量数のイオンをより強く出す質量校正用標準物質、例えばトリス (ペルフルオロアルキル) -s- トリアジンなど、を使用する。しかし測定器および制御プログラムがそれに対応可能かどうかは未確認ある。

前項の分解能とあわせて考えると、質量数のもっと小さいフラグメントイオンをモニターする方が、現実的かもしれない。

全てを満足する測定条件は無いかも知れない。複数の方法を組み合わせながら、ある部分では妥協しつつ、結果的にはこちらの方が感度が得られるという方法を選んで対応すべきであろう。

D. 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

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「臭素化ダイオキシン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ン類の曝露後の生体内濃度変化に関する知見を得た。また、これらの試料は比較的高濃度の 2,3,7,8-TeBDD 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出来ると考えた。

臭素化ダイオキシン投与実験と臓器試料の概要を表 D-1 に示す。

表 D-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
臓器試料	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)

D-a. 臓器試料

本研究で分析した臓器試料を表 D-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 μ g/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 D-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
	36	1113	1,879	1,440
		1114	2,467	2,587
		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
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		

D-b. 臓器中の臭素化ダイオキシン分析方法

前処理方法に関しては動物臓器も血液試料もほぼ同じ方法でよいと考えられる。即ち脂肪分を抽出してその重量を測定後、妨害物質を分解・除去しながら臭素化ダイオキシン類を濃縮し、HRGC-HRMS によって測定する。しかし、HRGC-HRMS での臭素化ダイオキシン類の測定条件、特に大量注入装置のプログラム等についてはまだ十分に検討できていなかったが、経口投与量から

- ・ ヒト血液試料よりはるかに高濃度であると予想される、
- ・ 投与された臭素化ダイオキシンが 2,3,7,8-TeBDD のみである、
- ・ 試料量が豊富にある、

などから、通常のスプリットレス注入法で 1 μ L の注入でも、臭素化ダイオキシン類の分析が可能であると考えた。

D-b-i. 前処理方法

基本的には血液試料と同じ方法で臓器試料の前処理を行った。しかし試料形態が血液とは異なるので、脂肪抽出する前に臓器試料を破碎し、均質化するところから始めた。破碎・均質化で、脂肪および臭素化ダイオキシンが臓器内で偏在していても、その偏在を均一化すれば試料の分取を可能にできる。

前処理操作：

[試料の準備]

まず、凍結保存された各臓器試料を自然解凍した後、50mL のビーカーに全量を秤量する。そこへ高速溶媒抽出装置と同じ抽出溶媒のアセトン/ヘキサン (50:50) を 20mL 少しずつ加えながら、ホモジナイザー「ポリトロン PT3100」(KINEMATICA 社製) で臓器試料を破碎、均質化する。

[試料からの脂肪抽出]

血液のときと同様、珪藻土 10g を加え、よく混合した。それを高速溶媒抽出装置用のセルに移し、血液のときと同条件で脂肪分の抽出を行う。

[脂肪重量測定]

得られた抽出液は、同じく無水硫酸ナトリウム 15g による脱水・ロータリーエバポレーターによる濃縮・窒素気流下での溶媒留去の後、脂肪重量を秤量する。

この時、脂肪量が非常に多かったこと、更に臭素化ダイオキシンも非常に高濃度であると予想されたので、得られた脂肪の 1/100 だけを分取して引き続き前処理を行い、残りは冷凍保存することとした。

[硫酸による脂肪分解]

脂肪重量測定後、ヘキサンに再び溶かし、50mL メスフラスコへ移し換え、メスアップする。そこから 0.5mL ホールピペットを用いて 1/100 量を先細り遠沈管に分取する。そこへクリーンアップスパイクを 200pg 添加してから、全液量を 4mL に揃える。これに濃

硫酸 2mL を静かに滴下し、そのまま一晩静置する。

一晩静置後、ヘキサン層（上層）にまだ着色が残っている時は、濃硫酸 1mL を追加し、更に半日程度静置する。ヘキサン層が無色であることを確認した後、遠心分離器（毎分 2800 回転、10 分）により硫酸層と分離し、上澄み液を 15mL スピッチへ移す。

[ダイオキシン類の分取]

硫酸処理後、同じく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する。

[濃縮]

得られたダイオキシン画分を濃縮して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。なお、今回 1/100 を分取した試料は依然として非常に高濃度の臭素化ダイオキシンを含んでいると予想されたので、シリンジスパイクを 200pg 添加した後の最終液量が 1mL になるようにした。

D-b-ii. HRGC-HRMS による測定

HRGC-HRMS による測定も基本的には血液試料と同様である。しかし、

- ・ 大量注入装置の条件検討が不十分であったこと
- ・ 非常に高濃度の臭素化ダイオキシンが含まれていると予想されたこと

から、通常のスプリットレス注入法で 1 μ L を注入し、臭素化ダイオキシンを測定することとした（表 D-3）。なお、検量線もこれと同条件で標準液を測定して作製した。

表 D-3. 動物臓器中臭素化ダイオキシンの HRGC-HRMS 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C
	キャリアガス	He, 150kPa (Constant Pressure Mode)
	カラムオープン昇温条件	120 $^{\circ}$ C (1min hold) - <20 $^{\circ}$ C/min> - 180 $^{\circ}$ C (0min hold) - <5 $^{\circ}$ C/min> - 320 $^{\circ}$ C (10min hold)

D-c. 結果と考察

D-c-i. 検量線作成用標準液の測定結果

先ず、臓器試料と同条件で測定した検量線作製用標準液の結果と、それらの一次回帰直線から求めた各化合物の相対感度係数(RRFcs)を表 D-4 に示す。

表 D-4. 通常のスプリットレス注入法による臭素化ダイオキシン類検量線作製用標準液の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 (R ²)
		CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	傾き (RRFcs)	y 切片	
2,3,7,8-TeBDF	面積比	0	0.91266	3.6578	30.3660	58.427	238.87	1.8524	8.4661	0.9926
	濃度比	0.0625	0.25	1.25	5	25	125			
2,3,7,8-TeBDD	面積比	0	0.09696	0.2985	0.7511	2.976	10.75	0.8405	0.3427	0.9952
	濃度比	0.00625	0.025	0.125	0.5	2.5	12.5			
1,2,3,7,8-PeBDF	面積比	0	5.15649	10.1444	48.7891	194.031	1006.46	1.6054	1.6650	0.9998
	濃度比	0.3125	1.25	6.25	25	125	625			
2,3,4,7,8-PeBDF	面積比	0	3.09704	8.8246	56.4027	187.760	1046.96	1.6711	-0.9245	0.9992
	濃度比	0.3125	1.25	6.25	25	125	625			
1,2,3,7,8-PeBDD	面積比	0	0.63472	0.9772	3.7673	10.832	116.82	1.8860	-2.9095	0.9881
	濃度比	0.03125	0.125	0.625	2.5	12.5	62.5			
1,2,3,4,7,8-HxBDF	面積比	0	1.49306	3.4259	46.2535	116.685	481.60	0.7090	11.5348	0.9960
	濃度比	0.33333	1.33333	6.6667	26.6667	133.333	666.67			
1,2,3,4,7,8-HxBDD + 1,2,3,6,7,8-HxBDD	面積比	0	0.79234	4.3447	51.3482	113.078	469.83	0.5511	12.8781	0.9947
	濃度比	0.41667	1.66667	8.3333	33.3333	166.667	833.33			
1,2,3,7,8,9-HxBDD	面積比	0	0.30387	1.1761	17.9066	50.123	204.19	0.4825	4.3955	0.9963
	濃度比	0.20833	0.83333	4.1667	16.6667	83.333	416.67			
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	面積比	0.54313	0.88018	3.5292	41.0800	104.933	511.22	0.3034	5.7152	0.9983
	濃度比	0.83333	3.33333	16.6667	66.6667	333.333	1666.67			

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): 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

1,2,3,4,7,8-HxBDD + 1,2,3,6,7,8-HxBDD: クロマトグラム上で分離できなかったため合計値として計算。

一次回帰直線: CS1 は検出限界以下であったため、ここでは除外して計算した。

検量線作製用標準液を測定した結果、特に高分子量側の PBDD で検出感度が著しく悪くなることが分かった。そのため一次回帰直線の相関も悪く、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)も 1 から大きくかけ離れた値となった。これは、今回高分子量に対応した質量分析計の調整が不完全であったことが主な原因と考えられる。また臭素化ダイオキシン類は沸点も非常に高いため、温度と時間をかけないとガスクロマトグラフから溶出しにくい。これがクロマトグラムのピークをブロードにし、定量性を悪くする原因となる。また、比較的熱に対する安定性が低い臭素化ダイオキシン類は途中で分解している可能性もある。

しかし、その段階ではこの相対感度係数(RRFcs)を用いるしかなく、その RRFcs を用いて臓器試料中の臭素化ダイオキシン類濃度を計算した。尚、CSI はピークを検出出来なかったため、ここでは除外して一次回帰直線を求めた。

D-c-ii. TeBDD 経口投与ラットの肝臓および脂肪組織の測定結果

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 D-5 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 D-1 および図 D-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同条件の検体を複数分析したが、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。

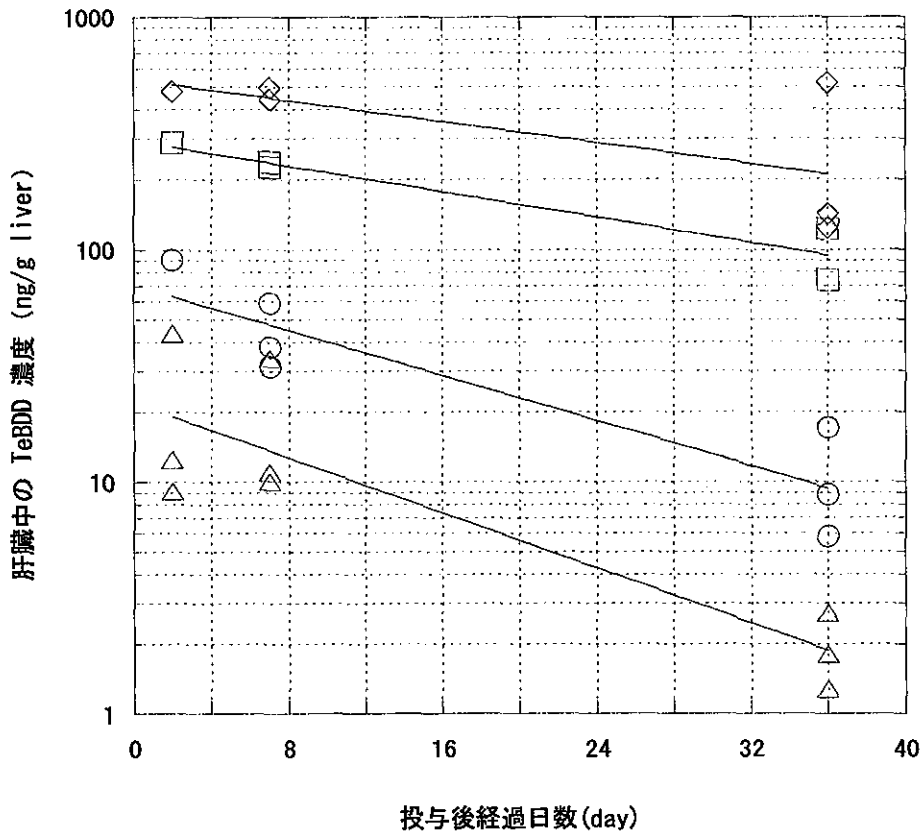
塩素化ダイオキシン類の（体外への消失）半減期は動物の種によって大きく違いがあるが、ラットの場合約 21 日と報告されている (Birnbaum, L. S. *Environ. Health Perspect.* 61, 11-20, 1985)。今回の実験結果からは、最も近似曲線の相関係数が良かった 100 μ g/kg 体重の 2,3,7,8-TeBDD を投与したラットの肝臓で TeBDD の半減期が 22 日と、非常に近い値が得られた。その他の投与量のラットの肝臓でも 10~27 日という結果が得られた。

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 μ g/kg 体重を投与したラットの半減期を見てみると、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 D-5. 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

		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	91	289	479
			13			
			14			
	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	44	220	299
			15			
			9.8			
	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D-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

— $y = 295.47 * e^{(-0.03158x)}$ $R = 0.97633$

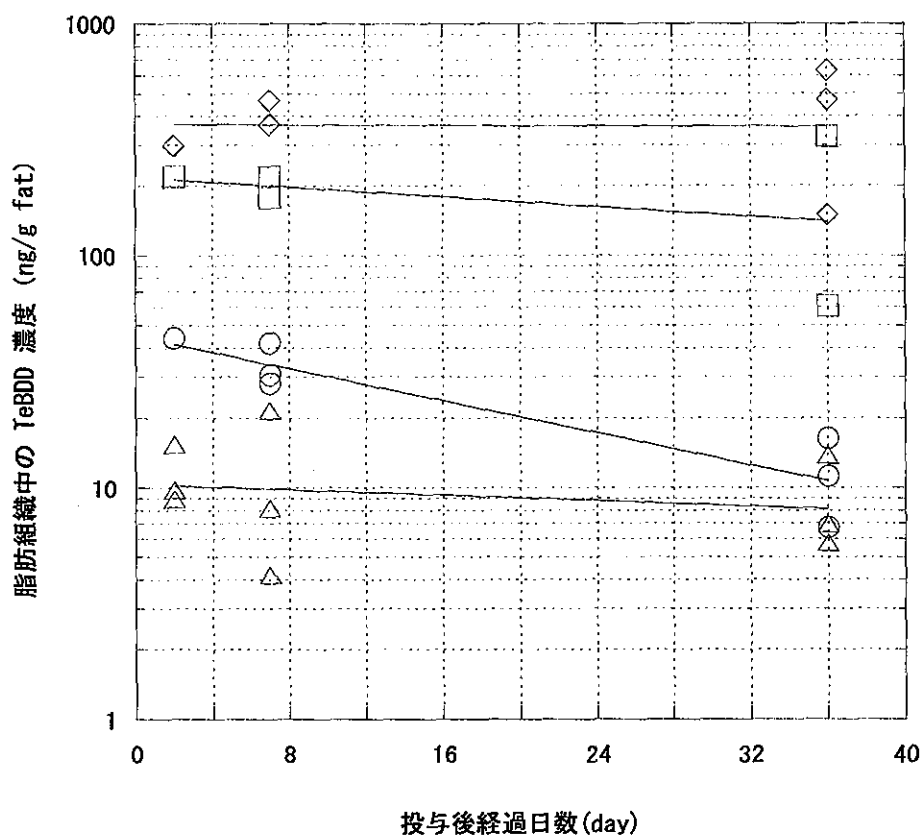
半減期 $T(1/2) = \ln 2 / 0.03158 = 21.9$ (day)
- 30 μg/kg

— $y = 70.621 * e^{(-0.055995x)}$ $R = 0.88621$

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D-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)

E. ヒト血液試料中の臭素化ダイオキシン類

2,3,7,8-TeBDD を経口投与したラット臓器の分析で得られた知見をもとに、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

- 1) 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。
- 2) そ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。

E-a. ヒト血液中の臭素化ダイオキシン類分析方法

基本的な分析法は図 B-1 に示した方法と同様である。

しかし本実験では 50mL もの血液から抽出しなければならず、高速溶媒抽出装置用の抽出セル 1 本にそれだけの血液をしみ込ませた珪藻土を入れるのは不可能である。そこで抽出セル 1 本当たり血液 10~15mL になるよう分割することで対応した。またこれまで抽出セルの底には円形のろ紙を敷いていたが、今回から筒状のろ紙を用いることで、細かい不溶物の流出を抑えることができた。更にこれは抽出後のセルの内側の汚れを抑え、洗浄作業の軽減にも貢献した。

また、血液 10 mL の抽出でさえも前処理を煩雑にしていた抽出液中の水分が、本実験では更に大きな問題となることが予想された。そこで抽出前に凍結乾燥することで予め水分を除いておくこととした。血液をそのまま凍結乾燥する方が確実に水分を除去できるであろうが、粉末状にした血液を扱うことは感染症などの観点から非常に危険である。凍結乾燥後はほぼそのまま高速溶媒抽出装置に仕掛けられるよう、珪藻土にしみ込ませ、抽出セルに詰めた状態で凍結乾燥させた。

1) 前処理操作：

先ず、200mL ビーカー中の珪藻土 10g に血液 10~15g 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 4 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、真空ポンプで一晩減圧し続けた。抽出セルの重量は凍結乾燥前後で、秤量した血液重量の 50% 程度の減少であった。それ以上の減量はあまり見られなかったため、次の操作へと移した。

凍結乾燥後は図 B-1 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、そのままでは脂肪重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、脂肪重量を秤量した。

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。

2) HRGC-HRMS による測定：

HRGC-HRMS による測定条件は、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（表 D-3）と同じである。

E-b. 清掃工場従事労働者の血中臭素化ダイオキシン類の分析

この分析法の疫学研究への応用の手始めとして一般ゴミを扱う清掃工場に勤める 20 人から採取した血液を、臭素系難燃剤であるポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）の血中濃度で四群に分けた、いわゆる「プール血液」試料 50g 中の臭素化ダイオキシン類濃度を測定した。

E-b-i. 清掃工場従事労働者のプール血液試料

清掃工場従事労働者の血液として、同じ厚生労働科学研究費補助金「臭素化ダイオキシン類に係る労働現場のリスク評価研究」の分担研究グループ（小川ら）によって、既に PBDEs および塩素化ダイオキシン類などについて分析されている清掃工場従事労働者 20 人の血液を用いた。

これらを表 E-1 に示すように、臭素化ダイオキシン類の前駆物質として考えられているポリ臭素化ジフェニルエーテルの合計濃度（Total PBDEs）の順番にグループ分けし、各グループが 100mL になるよう YB-1~4 のプール血液を作成した。

各プール血液は 100mL ずつしかないため、再測定などに備え半分残しておくこととし、今回は各々 50mL を用いて、前節 E-a の分析法により臭素化ダイオキシン類濃度を測定した。

表 E-1. 清掃工場従事労働者の血中 Total PBDEs 濃度によるグループ分け

Sample ID	Total PBDEs (pg/g-lipid)	YB への分配 血液量 (mL)	Group YB-No.
Y9	776.7	25	1
Y11	780.0	25	
Y20	851.6	25	
Y12	858.0	25	
Y13	1047.8	15	2
Y1	1073.6	15	
Y14	1085.0	15	
Y5	1206.5	15	
Y18	1230.5	15	
Y8	1304.7	15	
Y15	1356.2	15	
Y2	1760.4	20	3
Y16	1778.8	20	
Y19	1819.5	20	
Y6	1973.4	20	
Y7	1988.6	20	
Y4	2660.2	25	4
Y3	2743.6	25	
Y17	2767.2	25	
Y10	4464.1	25	

E-b-ii. 結果および考察

図 E-1~4 に、HRGC-HRMS によって得られたマスクロマトグラムの一例を示す。また Total PBDEs 濃度の順でグループ分けした清掃工場従事労働者のプール血液 YB-1~4 の臭素化ダイオキシン類の測定結果、および血中臭素化ダイオキシン類の検出下限・定量下限を表 E-2 に示す。臭素化ダイオキシン類についてはその毒性について不明な点が多く、国際的に同意が得られた毒性等価係数 (TEF) はない。しかし、IPCS (国際化学物質安全性計画) の環境保健クライテリアにおいて、ある種の臭素化ダイオキシン類同族体とそれに対応する塩素化物の間には毒性学的な類似性が存在するように考えられており、塩素化ダイオキシン類同族体に用いられている TEF を、対応する臭素化ダイオキシン類同族体に暫定的に適用してもよいのではないかと考えられている。このため本研究では、臭素化ダイオキシン類の実測値とともに、対応する塩素化ダイオキシン類の WHO-TEF (1998) を実測値にかけた毒性等量 (TEQ) 相当値についても参考値として併記した。

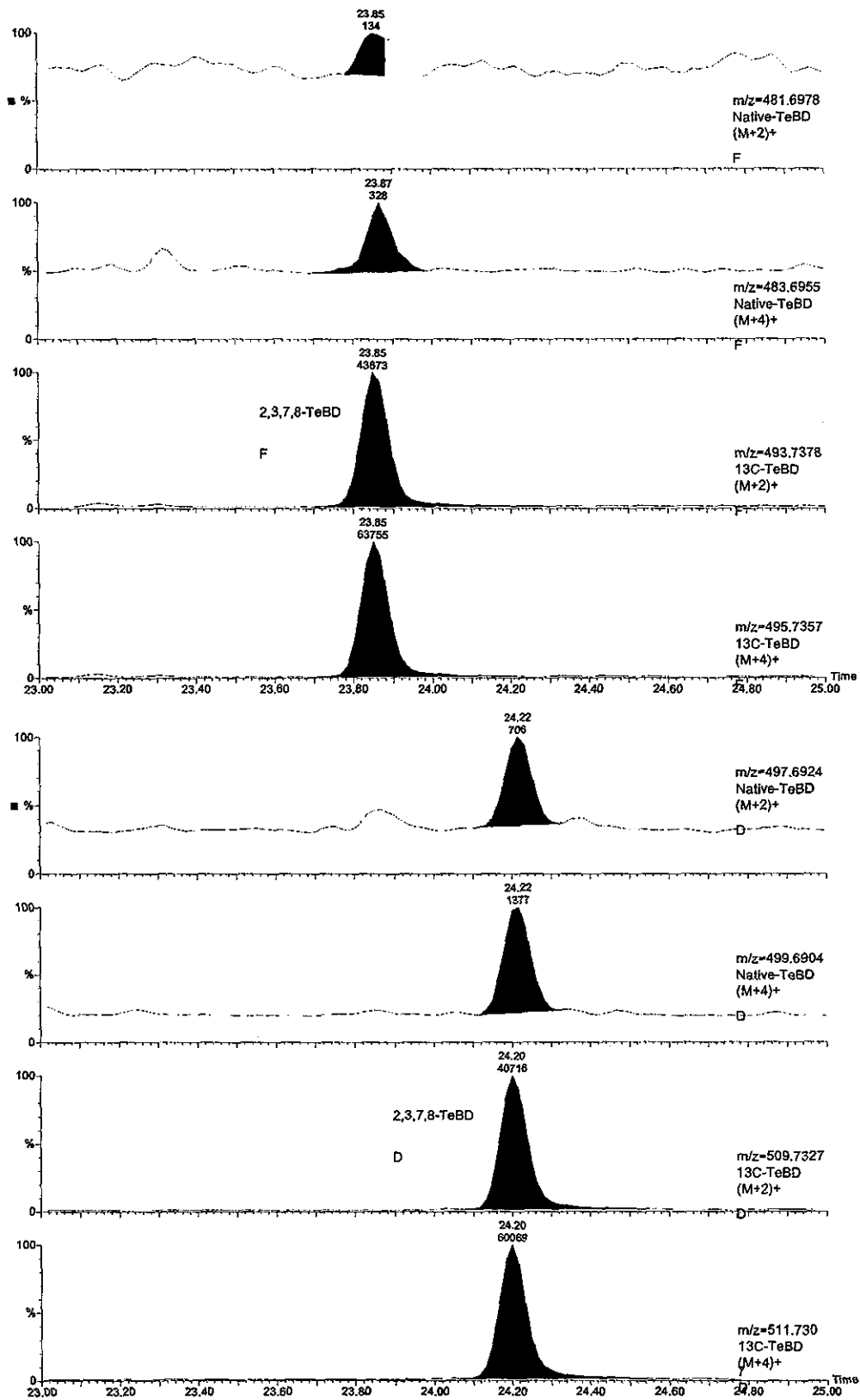


図 E-1. 清掃工場従事労働者のプール血液中の TeBDDs および TeBDFs のマスクロマトグラム

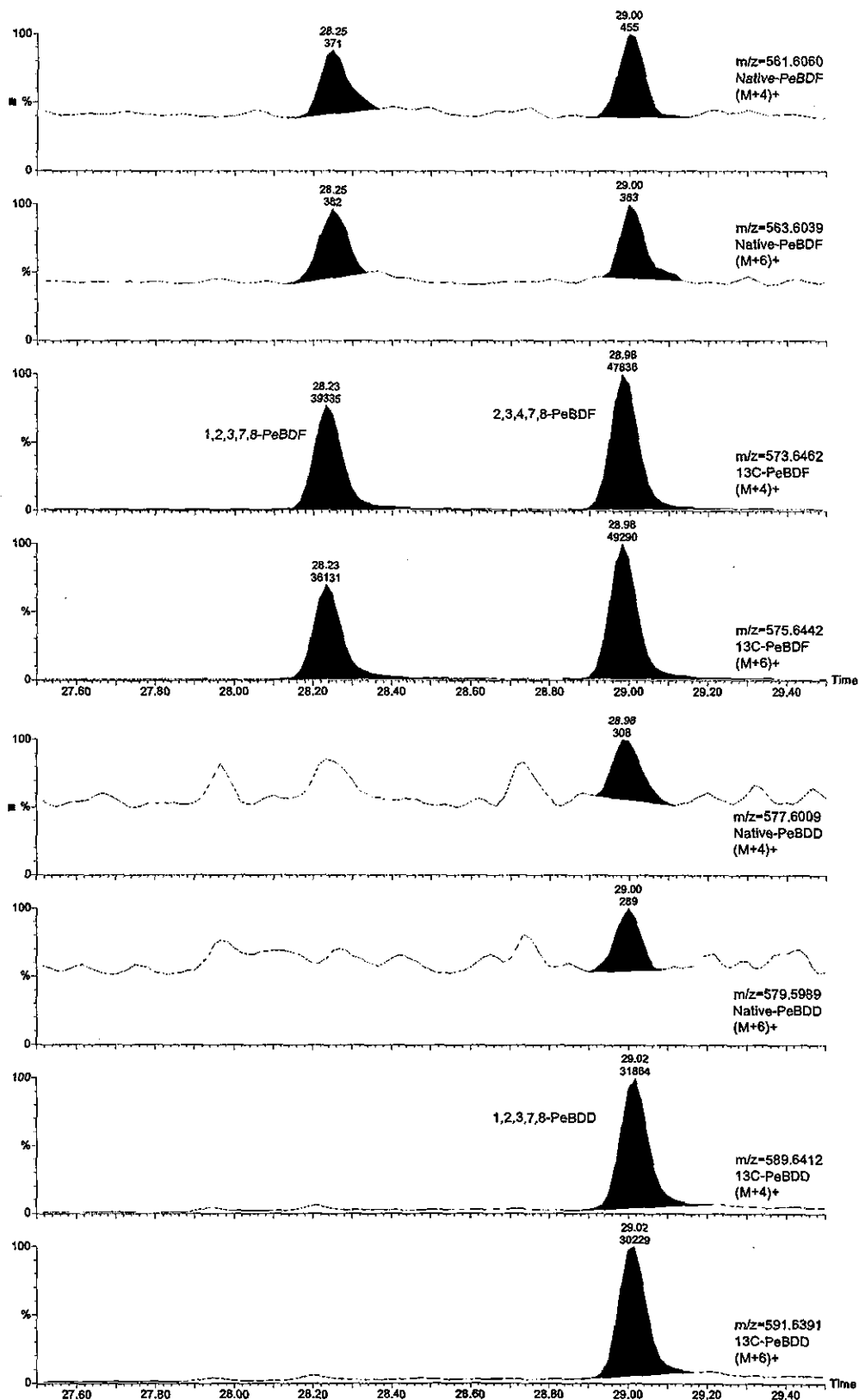


図 E-2. 清掃工場従事労働者のプール血液中の PeBDDs および PeBDFs のマスクロマトグラム

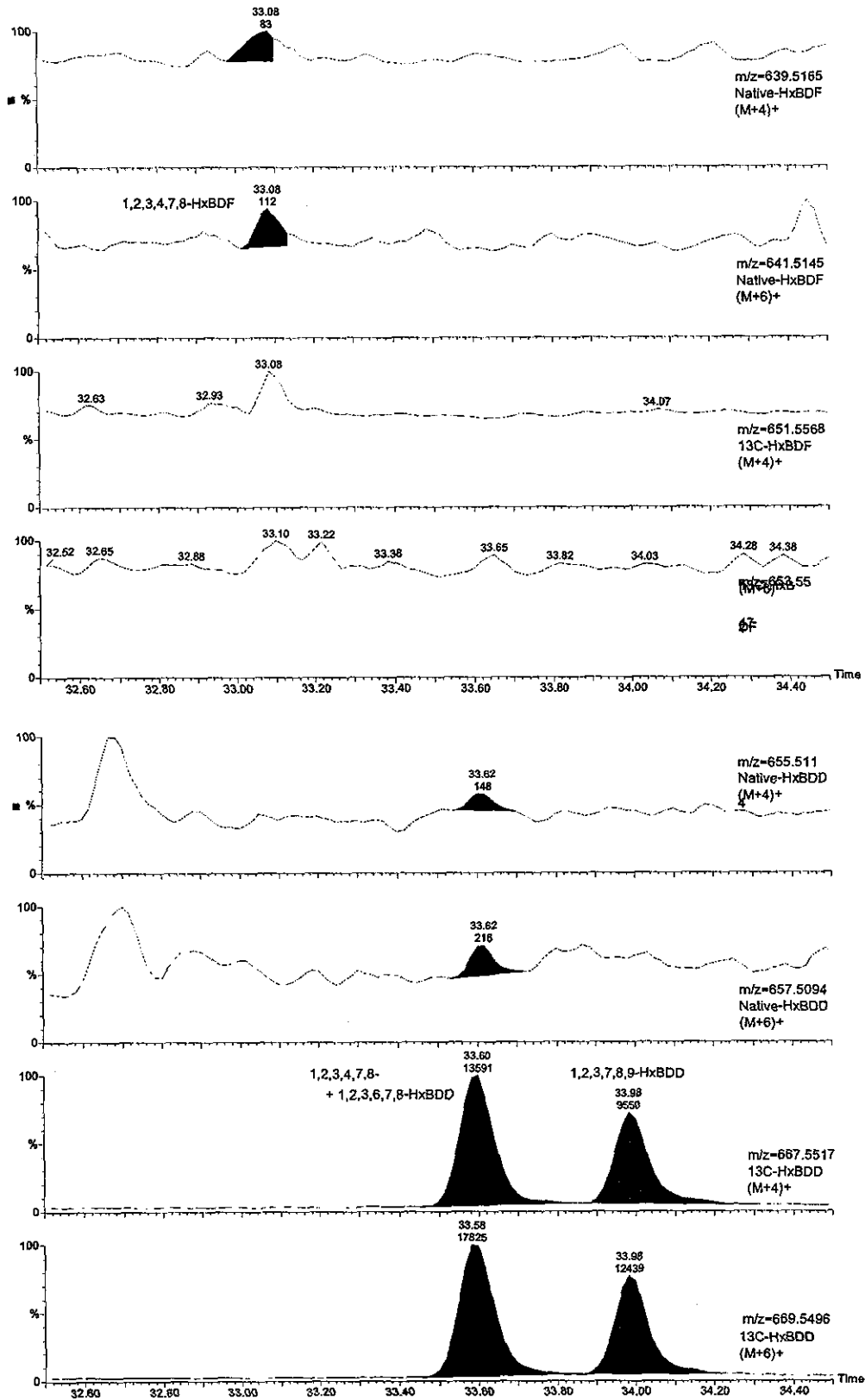


図 E-3. 清掃工場従事労働者のプール血液中の HxBDDs および HxBDFs のマスクロマトグラム

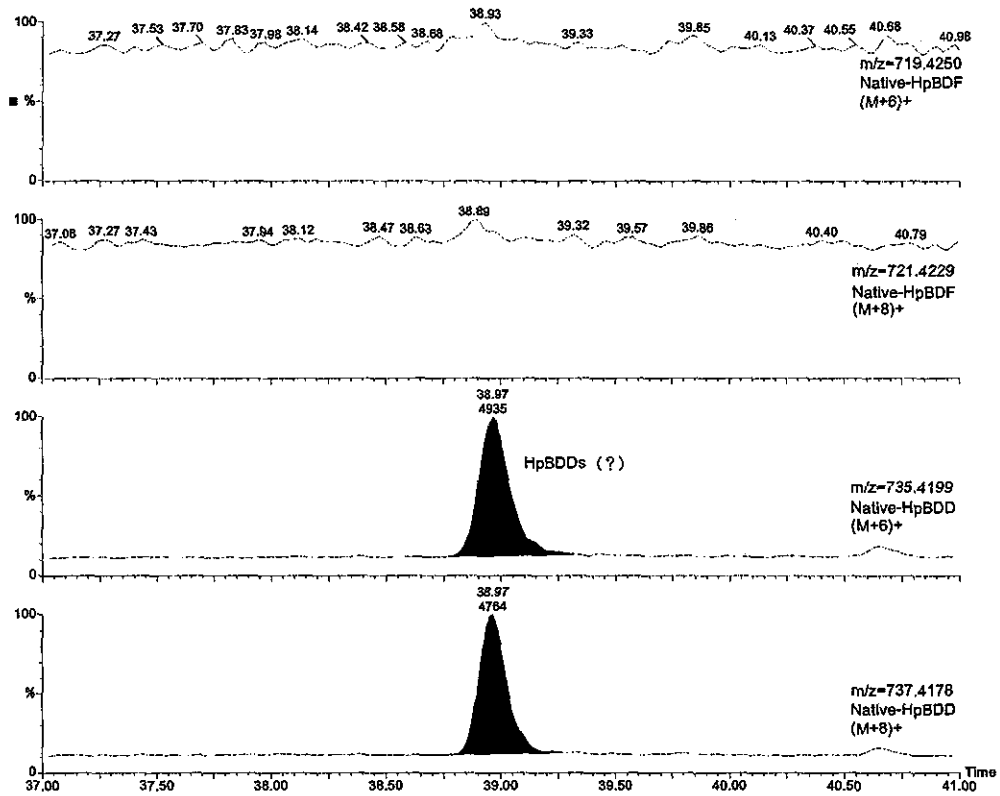


図 E-4. 清掃工場従事労働者のプール血液中の HpBDDs および HpBDFs のマスクロマトグラム

注) HpBDD および HpBDF の ^{13}C 標識化合物が市販されていないため、クリーンアップ内標準物質は添加していない。それ故そのイオンもモニターせず、その分を Native 体の検出に充てた。

表 E-2. 清掃工場従事労働者のプール血液中臭素化ダイオキシン類の測定結果

Sample	YB-1		YB-2		YB-3		YB-4		検出	定量	
Total PBDEs 平均 濃度(pg/g-lipid)	817		1186		1864		3159		下限	下限	
Compound	毒性 係数 TEF	実測濃度 pg/g- lipid	毒性等量 pg-TEQ /g-lipid	実測濃度 pg/g- lipid	毒性等量 pg-TEQ /g-lipid	実測濃度 pg/g- lipid	毒性等量 pg-TEQ /g-lipid	実測濃度 pg/g- lipid	毒性等量 pg-TEQ /g-lipid	pg/g- lipid	pg/g- lipid
2378- TeBDD	1	10	10	9.9	9.9	24	24	20	20	1.0	1.4
12378- PeBDD	1	4.5	4.5	2.5	2.5	8.6	8.6	N.D.	0	1.1	1.8
123478- & 123678- HxBDD	0.1	18	1.8	N.D.	0	25	2.5	30	3.0	7.0	12
123789- HxBDD	0.1	27	2.7	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0	10	17
Total PBDDs	-	59	19	12	12	58	35	50	23		
2378- TeBDF	0.1	3.0	0.30	2.6	0.26	3.0	0.30	3.5	0.35	0.8	1.0
12378- PeBDF	0.05	16	0.81	6.6	0.33	11	0.53	9.9	0.49	1.2	1.9
23478- PeBDF	0.5	12	6.2	6.1	3.1	11	5.3	12	5.9	1.0	1.7
123478- HxBDF	0.1	11	1.1	9.5	0.95	9.0	0.90	N.D.	0	4.6	7.5
1234678- HpBDF	0.01	N.D.	0	20	0.20	N.D.	0	21	0.21	7.0	13
Total PBDFs	-	43	8.5	45	4.8	33	7.0	46	7.0		
Total PBDDs +PBDFs	-	102	27	57	17	91	42	96	30		

毒性係数；対応する塩素化ダイオキシン類同族体の WHO-TEF (1999) を暫定的に適応した。

N.D.；実測定の検出下限値（測定試料中のピーク高さが S/N=3 に相当するピークの面積値を換算した値）未満を示す。

清掃工場従事労働者プール血液の臭素化ダイオキシン類を測定した結果、最も毒性が強いと考えられる 2,3,7,8-TeBDD が 10~24pg/g-lipid と非常に高濃度で検出された。また、2,3,7,8-TeBDD と同じく最も毒性が強いと考えられる 1,2,3,7,8-PeBDD も 8.6pg/g-lipid と高濃度な試料もあった。HxBDDs/Fs や HpBDF などの臭素数の多い化合物は 20~30 pg/g-lipid 検出される試料と、検出限界以下の試料との両極端な結果となった。

C の動物 (ウシ) 血液に臭素化ダイオキシン類を添加した精度管理用標準試料を用いたクロスチェックでもそうであったが、高速溶媒抽出装置を用いた本研究では総じて高めに検出されるようである。このことは、以前から高速溶媒抽出装置を用いて油症患者の血液中塩素化ダイオキシン類を分析してきた福岡県保健環境研究所の飯田隆雄氏も指摘していることである (Iida, T. and Todaka, T., *Industrial Health*, 41, 197-204 (2003), および私信)。その理由は明らかではないが、従来法と高速溶媒抽出装置を用いた方法とでは、抽出されてくる脂質成分に違いがあるためと考えられている。あるいはダイオキシン類そのものの、特に多塩素化体の、抽出されやすさが異なるためとも考えられている。

しかし本研究の結果はそれだけが原因ではなく、むしろ測定器の感度が悪く、検出下限が高いためと考えられる。特に高質量側ほど悪く、それ故、ほんの少しの測定値 (面積値) の違いが大きな定量値の違いとなって現れるためと考えられる。

ポリ臭素化ジフェニルエーテルは臭素化ダイオキシン類の前駆物質として考えられているので、プール血液中の Total PBDEs 平均濃度に対して、PBDDs および PBDFs 濃度をプロットした (図 E-5, E-6)。しかし両者の間に顕著な相関は見られなかったことから、これらの化合物の曝露経路が同じである可能性を示す証拠は得られなかった。