

ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究

(3) 食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究

(3-1) 表面プラズモン共鳴センサーを用いた市販魚中のダイオキシン類スクリーニング法

分担研究者

堤 智昭

国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

表面プラズモン共鳴センサー装置(ピアコア)を用いた、市販魚中のダイオキシン類に対するスクリーニング法を検討した。コプラナーPCBs に対するスクリーニング法として、抗 PCB 118 モノクローナル抗体(抗 PCB 118 抗体)を使用した競合法を確立した。センサーチップに PCB 類似体-牛アルブミン結合物を固定化し、抗 PCB 118 抗体と測定試料を競合させ、チップ上に結合した抗体を検出した。前処理した試料の測定時間は1試料あたり約12 minであった。PCB 118 に対する定量下限は100 ng/ml であり、魚試料を20 gを使用した場合の試料における定量下限は1 ng PCB 118/g であった。しかし、前処理した魚試料液に対する PCB 118 の添加回収率は低く、マトリックスによる影響が示唆された。そこで測定試料は希釈系列をとり測定し、最も希釈率の大きい試料の測定値を用いて試料濃度を算出した。7検体の魚試料に対して本法を適用し、同じ抗 PCB 118 抗体を使用した酵素免疫測定法(ELISA)と比較試験を行った。その結果、両者の定量値は良く一致し、本法は ELISA と同等の測定能を有することが示唆された。さらに10検体の魚試料に対して HRGC/HRMS と比較試験を行った結果、コプラナーPCBs の毒性等量値と比較的良好な相関($r = 0.89$)が認められ、スクリーニング法として期待できた。しかし、魚の種類(スズキ)によっては、他の魚試料と比較し高めの定量値が得られる傾向があり、注意が必要であった。

また、ダイオキシン類(コプラナーPCBs 及び PCDD/Fs)に対するスクリーニング法として、芳香族炭化水素受容体(AhR)への結合活性に基づく測定法の予備的検討を行った。センサーチップにダイオキシン応答配列DNAを固定化し、2,3,7,8-TCDD、AhR 及び結合に必要なコファクターを添加し、チップ上に結合した TCDD-AhR 複合物の検出を試みた。しかし、TCDD 濃度に依存したシグナルの上昇は認められず、測定系を再検討する必要があった。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所・食品部

佐々木久美子

A.研究目的

我が国では、魚を介したダイオキシン類の摂取量が多いため、市販魚におけるダイオキシ

ン類に対するスクリーニング法が開発できれば、食品衛生上有意義である。魚などの食品を対象にしたダイオキシン類のスクリーニング法としては、培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイや酵素免疫測定法(ELISA)が早くから検討されている。しかし、前処理した試料の測定に半日から数日を要することから、更

なる測定時間の迅速化が望まれている。近年、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) センサーを用いたバイオセンサーの開発が、食品の分野で活発に行われている¹⁾。SPR センサー装置としてはピアコア (ピアコア(株)) が良く使用されており、食品中の抗生物質やビタミンの測定などに利用されている。本法は抗原-抗体反応などの生体分子の相互作用をラベルフリーかつリアルタイムに測定できることから、短時間(数分~10分程度)で測定できる特徴を有している。

我々は、抗 PCB 118 モノクローナル抗体 (抗 PCB 118 抗体) を使用した ELISA が、市販魚中のコプラナー PCBs のスクリーニング法として有用であることを明らかにした²⁻⁴⁾。しかし、前処理した魚試料の測定に 3 時程度を要し、更なる測定の迅速化が望まれていた。そこで、抗 PCB 118 抗体によるスクリーニング法の開発をピアコアにより検討し、バリデーションデータの作製を行った。また、ダイオキシン類 (コプラナー PCBs 及び PCDD/Fs) に対するスクリーニング法の予備的検討として、芳香族炭化水素受容体 (AhR) への結合活性を利用した測定法について、検量線の作製を試みた。

B. 研究方法

1. 試薬

ジクロロメタン、ヘキサン、メタノールはダイオキシン類分析用 (関東化学(株)) を使用した。DMSO (anhydrous, 99.9+%) はシグマ アルドリッチ ジャパン(株)より購入した。多層シリカゲルカラム (ガラス製 4 層) はジーエルサイエンス(株)より購入した。アルミナカラムはガイドライン⁵⁾に従い作製した。活性炭分散シリカゲルカラムは、関東化学(株)より購入した。ダイオキシン類標準品は和光純薬工業(株)、AccuStandard 社製、又は Wellington 社製を使用した。

HBS-EP buffer (10 mM HEPES pH7.4, 150

mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005% Surfactant P20)、アミノカップリングキット、センサーチップ CM5 (カルボキシルメチル基を導入したデキストランを固定化したタイプ)、センサーチップ SA (ストレプトアビジンを固定化したタイプ)、50 mM NaOH はピアコア(株)より購入した。

PCB 類似体-牛アルブミン結合物 (PCB-BSA)、抗 PCB 118 抗体、ELISA キット (コプラナー PCB-EIA システム) は(株)エンバイオテック・ラボラトリーズより購入した。

ダイオキシン応答配列 DNA (dioxin response element, DRE)、Cytosol (AhR を含む)、AhR nuclear translocator (ARNT extract) 及び Activator は Ah イムノアッセイキット (櫛クボタ) の構成試薬を使用した。

2. 試料

魚試料は、東京都内のスーパーマーケットで購入したものを、ホモジナイザーで均一化し使用した。

3. 装置

ホモジナイザーは(株)日本精機製作所製マルチブレンダーミルを用いた。SPR 測定装置はピアコア(株)のピアコア 3000 を使用した。また、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC/HRMS) は日本電子製 (JMS-700) を使用した。

4. 前処理

均一化した試料 (20 g) を採取し、2 M 水酸化カリウム水溶液 (100 ml) を加え、室温で一晩放置 (約 16 hr) しアルカリ分解を行った。アルカリ分解液はメタノール (150 ml) を加えた後、ヘキサン (100 ml) で振とう抽出 (10 min × 3 回) を行った。抽出液は 2% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液 (150 ml) で 2 回洗浄後、濃硫酸を加え硫酸処理を行った。硫酸層の着色が薄くなるまで数回繰り返して洗浄した後、2% 塩化ナトリウム水溶液 (50 ml) で 2 回洗浄し、さらにヘキサン

洗浄水(50 ml)で1回洗浄した。その後、多層シリカゲルカラムに負荷し、ヘキサン(200 ml)により溶出した。溶出液は、さらにアルミナカラムに添加し、ヘキサン(150 ml)で洗浄後、2% (v/v)ジクロロメタン/ヘキサン(150 ml)により第1分画(モノオルト PCBs)を溶出、60%(v/v)ジクロロメタン/ヘキサン(200 ml)により第2分画(ノンオルト PCBs 及び PCDD/Fs)を溶出した。PCB 118 が含まれる第1分画は DMSO (200 μ l)に置換し、遠心操作後(12,000 rpm、5min)、上清をビアコアに供した。また、多層シリカゲルカラム後に活性炭分散シリカゲルカラム処理を行う精製法についても検討した。多層シリカゲルカラムからの溶出液を、活性炭分散シリカゲルに添加後、室温で放置(約 30 min)した。ヘキサン(50 ml)で洗浄後、25% (v/v)ジクロロメタン/ヘキサン(50 ml)により第1分画(モノオルト PCBs)を溶出、トルエン(50 ml)により第2分画(ノンオルト PCBs 及び PCDD/Fs)を溶出した。PCB 118 を含む第1分画は DMSO(200 μ l)に置換し、遠心操作後(12,000 rpm、5min)、上清をビアコアに供した。図1には本前処理法のフローチャートを示した。

5. センサーチップへの固定化

(1)PCB-BSAの固定化

CM5 センサーチップのフローセル(4本のうちの1本)に、アミンカップリングキットを使用して PCB-BSA を固定化した。固定化時のセンサーチップ部の温度は 25°C に設定することが多いが、固定化量を多くするため 37°C に設定した。HBS-EP を移動層(10 μ l/min)とし、キット付属の EDC と NHS の等量混合液を注入(70 μ l)し、センサーチップ表面の活性化を行った。その後、PCB-BSA を酢酸バッファー(pH 4.0)で 40 倍に希釈し、注入(70 μ l)した。さらに、残余の活性型 NHS 基をブロッキングするため、エタノールアミン(1 mol/L)を注入(70 μ l)した。固定化後、センサーチップ部の温度を 25°C に

下げ、流速を 60 μ l/min にあげて、50mM NaOH 水溶液を注入(5 μ l)し、固定化したチップの安定化を行った。

(2)DREの固定化

SA センサーチップのフローセル(4本のうちの1本)に、ビオチン化 DRE を固定化した。固定化時のセンサーチップ部の温度は 25°C に設定した。HBS-EP を移動層(10 μ l/min)とし、50 mM NaOH 水溶液と 2 M NaCl 水溶液の等量混合液を注入(5 μ l)し、チップのコンディショニングを行った。その後、ビオチン化 DRE を 1 M NaCl 水溶液で 10 倍希釈し、注入(15 μ l)した。固定化後、1 M NaCl 水溶液を注入(5 μ l)し、固定化したチップの安定化を行った。

6. ビアコアによる測定

(1)コプラナーPCBs測定法

PCB-BSA を固定化した CM5 センサーチップを使用し、センサーチップ部の温度は 25°C に設定した。HBS-EP:DMSO=9:1 を移動層(20 μ l/min)とし、抗 PCB 118 抗体(5.5 μ g/ml in HBS-EP)と測定試料(DMSO 溶液)をオートサンプラーで混合後(混合比 9:1)、40 μ l を kinject コマンドで注入した。また、チップに対する非特異的な吸着を考慮するため、何も固定化していないフローセル(リファレンスセル)に対しても同時に試料を注入した。固定化物に結合した抗 PCB 118 抗体のレスポンス(RU)は、注入終了後 15 秒に読み取った。なお、測定試料の RU は、固定化セルに対する RU からリファレンスセルに対する RU を差し引いて算出した。注入後、高濃度汚染試料のキャリアオーバーを防ぐため、mix コマンドを使用し DMSO でニードル等を洗浄した。続いて、流速を 60 μ l/min に上げ、50 mM NaOH 水溶液を注入(5 μ l)しセンサーチップの再生処理を行った。再生処理後、試料を変えて、上記の測定操作を繰り返した。なお、再生処理の繰り返しのに伴い PCB-BSA の固定化量が若干、低下していく現象が認められた。本研究では、固定

化量が500~1200 RUの範囲内で全ての実験を行った。標準溶液(PCB 118)は各濃度について2回の測定を行い、検量線は4パラメーターロジスティック回帰により近似した。本法の測定原理を、図2(a)に示した。

(2)ダイオキシン類測定法

DREを固定化したSAセンサーチップを使用し、センサーチップ部の温度は25°Cに設定した。Ahイムノアッセイキットに付属しているCytosol溶液(AhRを含む)、Activator及びARNT extractを混合後(混合比60:3:1)、標準溶液(2,3,7,8-TCDD DMSO溶液)を添加(1/100量)した。室温で20分程度放置した後、HBS-EPを移動層(20 µl/min)とし、20 µlをkinjectコマンドで注入した。また、センサーチップに対する非特異的な吸着を考慮するため、何も固定化していないフローセル(リファレンスセル)に対しても同時に試料を注入した。固定化DREに結合したAhR-TCDD複合物のRUを、注入終了後15秒に読み取った。なお、測定試料のRUは、固定化セルに対するRUからリファレンスセルに対するRUを差し引いて算出した。標準溶液は各濃度について2回の測定を行った。本法の測定原理を、図2(b)に示した。

7. ELISA

抗PCB 118抗体を用いたELISAキットを、説明書⁶⁾に従い使用した。

8. HRGC/HRMS分析

既報⁷⁾に従い、ダイオキシン類を定量した。

C. 研究結果及び考察

1. コプラナーPCBs測定法

(1)検量線の定量範囲

検量線の定量範囲を設定するため、標準溶液(PCB 118)の繰り返し測定を行った。50~600 ng/mlの標準溶液を、異なる日に繰り返

し測定した(表1)。100~600 ng/mlの間では変動係数が5%以内、定量値も真値から±10%以内におさまり、良好な精度及び正確度であった。そこで、100 ng/mlを定量下限、600 ng/mlを定量上限に設定した。魚試料20 gを使用した場合、試料中の定量下限値は1 ng/g(PCB 118換算量)であった。検量線の一例を、図3に示した。

(2)交差反応性

本法のコプラナーPCBsに対する交差反応性について検討した。既知濃度の各異性体を測定し、検量線から得られたPCB 118換算濃度を、各異性体の実濃度と比較し交差反応性を算出した(表2)。本法はPCB 77、PCB 105、PCB 114及びPCB 156に若干の交差反応性(9.8~40.3%)を示したが、それ以外のコプラナーPCBs異性体に対しては極めて低い交差反応性であった(<2.7%)。抗PCB 118抗体を使用したELISAの交差反応性と比較すると、PCB 77、PCB 105、PCB 114及びPCB 156に対して数倍高い交差反応性が得られているが、全体的な交差反応性の傾向は類似していた。

(3)マトリックスの影響

前処理後の魚試料に含まれるマトリックスの影響を検討するため、添加回収試験及び希釈直線性試験を行った。添加回収試験では、前処理済みの魚試料液に対し既知濃度のPCB 118を添加し、本法により測定した(表3)。また、前処理操作として多層カラム後に、アルミナカラムあるいは活性炭カラムによる精製操作を検討した。数種類の魚試料について試験した結果、全体的に回収率は悪かったが、前処理試料を希釈した場合は回収率が改善される傾向が認められた。アルミナカラム処理と活性炭カラム処理による顕著な回収率の違いは認められなかった。操作ブランク試料では良好な回収率が得られていることから、魚試料中のマトリックスが測定に影響していることが示唆され

た。

さらに、前処理済みの魚試料液を使用した希釈直線性試験を行った。魚試料液をDMSOで段階希釈し、希釈測定時の定量値を初期濃度と比較した(図4)。その結果、希釈操作により得られる定量値が最大2倍程度増加する場合があります、添加回収試験結果と同様にマトリックスの影響が疑われた。また、アルミナカラム処理と活性炭カラム処理の結果には顕著な違いは認められなかった。

以上の結果から、測定時のマトリックスの影響を可能な限り低く抑えるため、魚試料を測定する際は希釈系列をとり、希釈率が最も高い試料で得られた定量値から試料濃度を算出した。なお、以後の実験では多層カラム後の精製操作としてアルミナカラム処理を選択した。

(4) 再現性試験

本法の測定再現性について検討するため、同一の魚試料の分析を複数回行った。まず、同一の前処理済み魚試料液について、連続測定した(表4-1)。4回連続して測定した結果、全ての魚試料で定量値の変動係数は極めて低かった(< 3.7%)。次に、同一の前処理済の魚試料について、異なった日に分析を行った(表4-2)。連続測定の場合と同様に、全ての試料で定量値の変動係数は極めて低かった(< 3.5%)。さらに、同一の魚試料を使用し、前処理から測定までの一連の操作を異なる日に複数回行った(表4-3)。その場合でも、全ての試料で定量値の変動係数は低かった(< 5.9%)。以上のように、本法の測定再現性は優れていたことから、魚試料の測定回数は1回とした。

(5) ELISA 及び HRGC/HRMS 分析との比較試験

本法の定量値と、同じ抗体を使用したELISAの定量値を比較するため、市販魚試料(7試

料)について比較試験を行った。その結果、両者で得られた定量値は良く一致した(図5)。本ELISAは魚試料中のコプラナーPCBsを、良好に測定できることが既報²⁻⁴⁾により明らかにされていることから、本法もコプラナーPCBs測定において良好な性能を有すると考えられる。

次に本法の定量値を、HRGC/HRMSのPCB 118定量値と比較した。本法はスズキの2試料で高めの値が得られたが、その他の魚試料ではPCB 118の定量値に概ね近い値を示した(図6(a))。本法の定量値がPCB 118定量値より大きくなる理由としては、コプラナーPCBs以外のPCBsに交差反応していることが考えられる。測定分画に含まれるPCB 118以外のコプラナーPCBs(PCB 105、PCB 114及びPCB 156)に対しても若干の交差反応性を示すが(表2)、これらのコプラナーPCBs濃度は魚試料中ではPCB 118濃度と比較し著しく低い(数分の一から数十分の一程度)。従って、PCB 118以外のコプラナーPCBsが定量値に大きく影響しているとは考えにくい。本抗体はコプラナーPCBs以外のPCBsであるPCB 31、PCB 66及びPCB 70に対しても、ELISAで若干の交差反応性(12.9-15.2% of PCB 118)を示すことが報告されている⁶⁾。仮にこれらの異性体が最終検液に多量に含まれた場合、本法の定量値を上昇させる可能性が高い。なお本研究では、コプラナーPCBsに分類されないPCB 31、PCB 66及びPCB 70のHRGC/HRMS分析は行っていないため、これらの異性体の試料中濃度は不明である。

さらに本法の定量値を、HRGC/HRMS分析のコプラナーPCBs毒性等量値と比較した。比較的良好的な相関($r = 0.89$)が認められ、本法は毒性等量濃度を推測するスクリーニング法として期待できた。しかし、魚の種類(スズキ)によっては、その他の魚試料と比較し高い定量値が得られる傾向があり、注意が必要であった。今後はより多数の比較検体の測定を行

い、本法の実用性を明らかにしていく必要がある。また、現段階ではマトリックスの影響を軽減するため、希釈系列をとり試料を測定する必要がある。従って、試料数が多くなった場合、ELISA より測定時間が長くなり、迅速性が失われる点が今後の検討課題である。

2. ダイオキシン類測定法

AhR を使用したダイオキシン類測定法の予備的検討として、検量線の作製を試みた。各濃度に希釈した標準溶液(2,3,7,8-TCDD)を分析したが、濃度依存的なレスポンスの増加は認められなかった(図 7)。詳細な検討は行っておらず、原因は不明である。AhR と標準溶液のインキュベーション時間、複合物に対する抗体(抗ARNT抗体)の使用等を検討し、測定系を再検討する必要があると考えられる。

D. 結論

- 1) 本法は魚試料中のコプラナーPCBs を、比較的良好に短時間で測定することが可能であった。
- 2) 従来法(HRGC/HRMS 分析)と良い相関が得られたことから、魚中のコプラナーPCBs の毒性等量濃度を推測するスクリーニング法として期待できた。しかし、一部の魚種(スズキ)では他の魚と比較して高い定量値が得られるため、注意が必要であった。
- 3) AhR を使用したダイオキシン類の測定法については、検量線の作製ができなかった。予備的な検討に止まっており、今後検討の余地がある。

E. 参考文献

- 1) Patel PD. Overview of affinity biosensors in food analysis. J. AOAC Int., 89 (2006) 805-818.
- 2) 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助

金研究報告書「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」(分担報告書 3-1 ELISA による市販魚中のコプラナーPCBs 及び総 PCBs のスクリーニング法の開発)

- 3) 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究」(分担報告書 3-1 PCB ELISA と Ah イムノアッセイによる市販魚中のダイオキシン類のスクリーニング法)

- 4) Tsutsumi T, Amakura Y, Okuyama A, Tanioka Y, Sakata K, Sasaki K, Maitani T. Application of an ELISA for PCB 118 to the screening of dioxin-like PCBs in retail fish. Chemosphere, 65 (2006) 467-473.

- 5) 厚生省生活衛生局“食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCB の測定方法暫定ガイドライン”平成 11 年 10 月

- 6) EnBio Coplanar PCB EIA system Instruction booklet. Chiyoda Parion Bldg., 6th Floor, 2-3-16 Kanda Suda-cho, Chiyoda-Ku, Tokyo 101-0041, Japan.

- 7) 平成 13 年度厚生科学研究費補助金研究報告書「ダイオキシンの汚染実態把握及び摂取低減化に関する研究」(分担報告書 1-2 ダイオキシン類の迅速測定法の開発及び分析の精密化に関する研究)

F. 研究業績

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) 堤 智昭、三好紀子、佐々木久美子、米谷民雄: 表面プラズモン共鳴センサーを用いた市販魚中のコプラナーPCBs スクリーニング法. 第 16 回環境化学討論会(2007.6)
国立医薬品食品衛生研究所

表1 PCB 118の測定精度及び正確度

PCB 118 Conc. ng/ml	PCB 118 found (<i>n</i> =6)		
	Mean ± SD ng/ml	CV %	Bias %
50	48.5 ± 14.7	30.4	-3.0
100	101.3 ± 2.6	2.6	1.3
200	198.1 ± 2.7	1.4	-1.0
300	315.3 ± 8.8	2.8	5.1
450	463.6 ± 7.8	1.7	3.0
600	566.7 ± 10.3	1.8	-5.6

1) 標準溶液を異なった日に複数回測定した時の精度及び正確度を示す。

表2 コプラナーPCBsに対する交差反応性

PCB isomers	Cross-reactivities (%)		
	ピアコア ¹⁾	ELISA ²⁾	
ノンオルト	PCB 77	40.3	17.8
	PCB 81	2.7	<3.0
	PCB 126	1.5	<3.0
	PCB 169	<1.0	<0.1
モノオルト	PCB 105	10.3	2.5
	PCB 114	9.8	3.4
	PCB 118	100	100
	PCB 123	<1.0	<0.1
	PCB 156	33.2	7.2
	PCB 157	<1.0	<0.1
	PCB 167	<1.0	<0.1
	PCB 189	<1.0	<0.1

1) PCB 118換算濃度の実濃度に対する割合(%)を算出した。

2) ELISAキット(EnBio Coplanar PCB EIA system)のパンプレット⁶⁾より引用した。

表3 前処理済の魚試料液に対する添加回収試験¹⁾

サンプル	希釈倍率	PCB 118 添加濃度 ng/ml	回収率(%)	
			アルミナカラム処理	活性炭カラム処理
操作ブランク	-	100	99.6	93.9
		200	95.4	93.7
ブリ	-	200	51.8	33.4
	2	200	66.6	46.1
	4	200	77.2	63.5
サーモン	-	200	66.3	73.3
	2	200	77.2	85.4
スズキ	4	200	60.5	63.6

1) 前処理した試料溶液に既知濃度のPCB118を添加し、ビアコアにより測定した。未添加の試料溶液に定量下限以上の測定値が得られた場合は、ブランク値として差し引いて回収率を算出した。

表4 ビアコアによる魚試料測定の再現性

4-1 連続測定した場合の定量値の再現性

サンプル	希釈率	ビアコア, ng/ml						
		1st	2nd	3rd	4th	Mean	SD	CV (%)
スズキ#1	8	124	127	128	125	126	1.8	1.4
スズキ#2	16	136	133	134	144	137	5.0	3.7
サーモン	2	116	113	113	116	115	1.7	1.5

前処理済の同一の魚試料液を、連続してビアコアにより分析した。定量値は同一の検量線を用いて算出した。

4-2 異なった日に分析した場合の定量値の再現性

サンプル	希釈率	ビアコア, ng/ml						
		1st	2nd	3rd	4th	Mean	SD	CV (%)
スズキ#1	8	128	124	130	133	129	3.8	2.9
スズキ#2	16	136	125	131	129	130	4.6	3.5
サーモン	2	116	116	122	116	118	3.0	2.6

前処理済の同一の試料液を、異なる日にビアコアにより分析した。定量値は各測定日に作製した検量線を用いて算出した。

4-3 前処理も含めた一連の操作を行った場合の定量値の再現性

サンプル	希釈率	ビアコア, ng/ml						
		1st	2nd	3rd	4th	Mean	SD	CV (%)
スズキ#1	8	142	139	128	126	134	7.9	5.9
サーモン	2	116	127	128	124	124	5.4	4.4

同一の魚試料を使用して、前処理から測定までの一連の操作を異なる日に実施した。定量値は各測定日に作製した検量線を用いて算出した。また、1、2回目と3、4回目の測定では、固定化日が異なるセンサーチップを使用した。

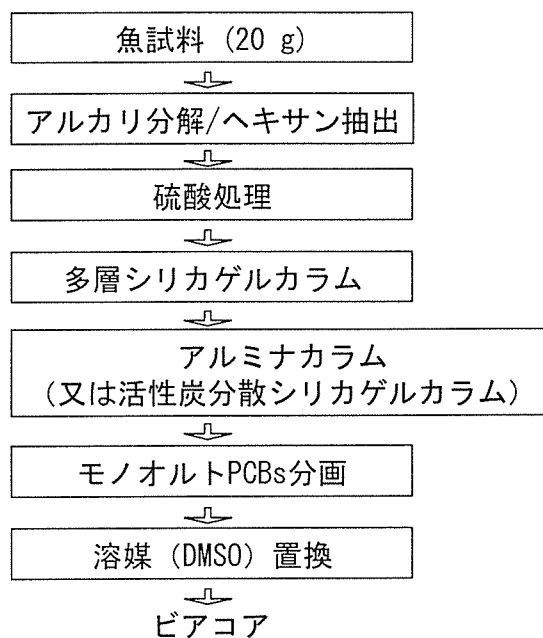
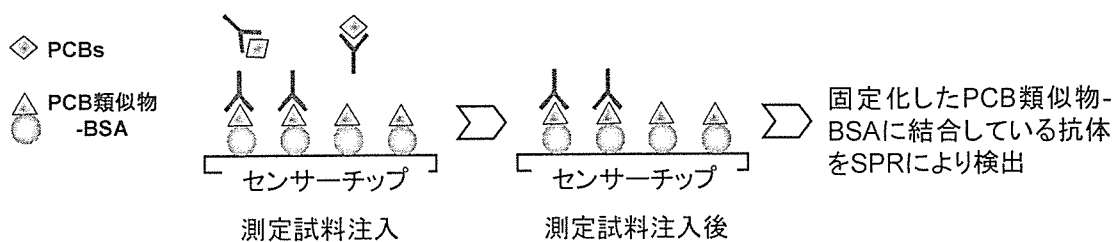


図1 コプラナーPCBs測定のための前処理方法

(a) 抗PCB 118抗体を使用したコプラナーPCBs測定法



(b) AhRを使用したダイオキシン類測定法

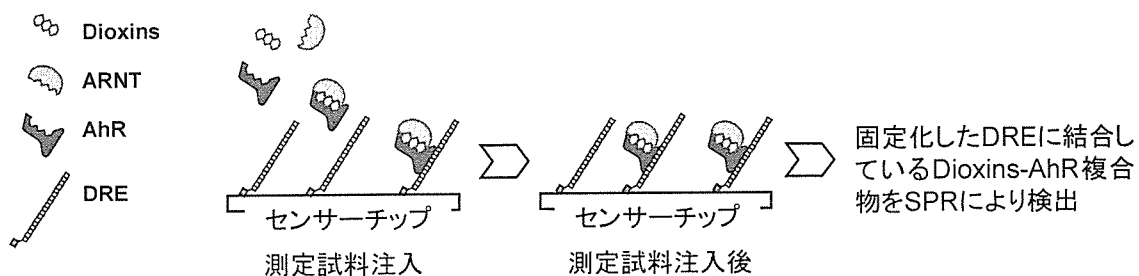


図2 ビアコアを使用したダイオキシン類測定法

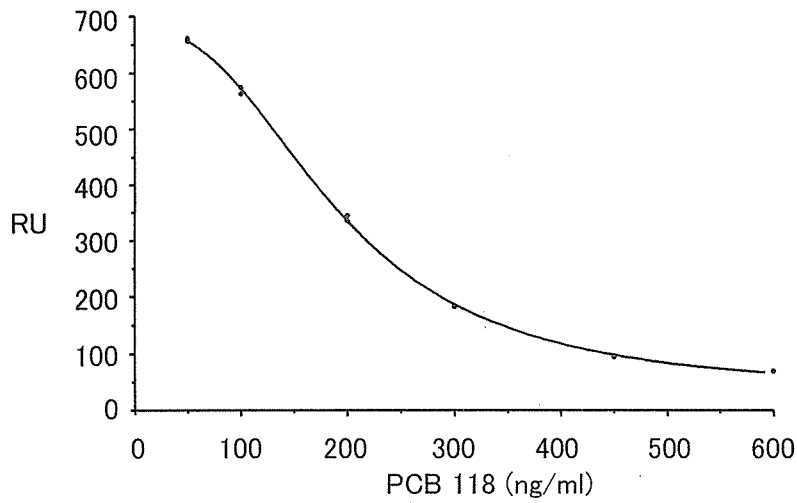


図3 PCB 118標準曲線

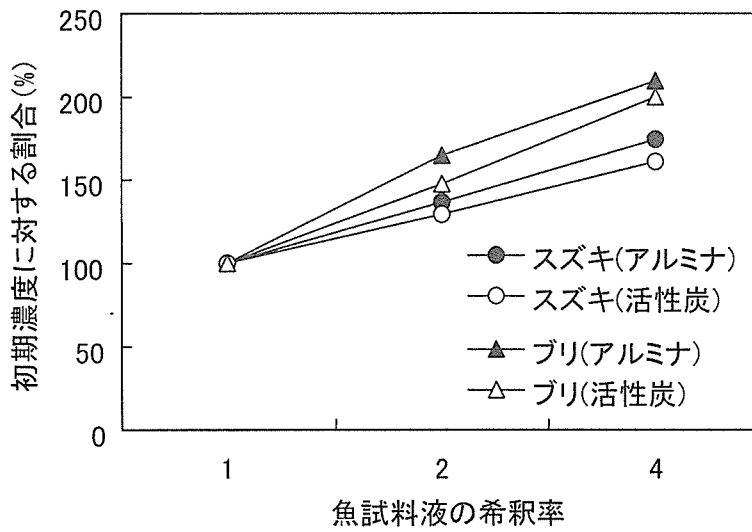


図4 希釈直線性試験

前処理をした魚試料液をDMSOで2倍系列に希釈し、ピアコアで測定した。

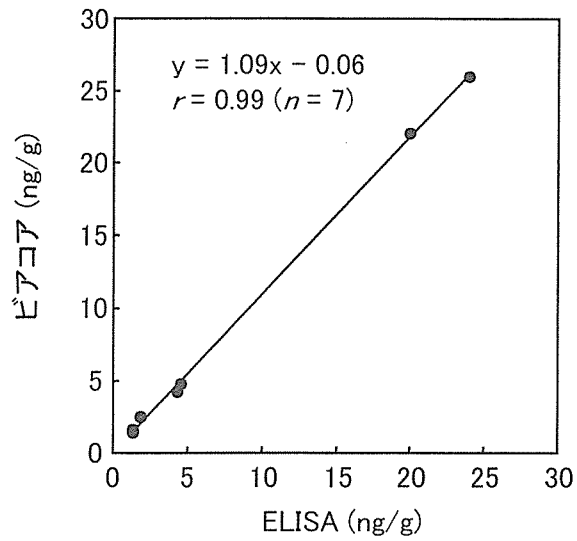


図5 魚試料におけるピアコアとELISAの定量値の比較

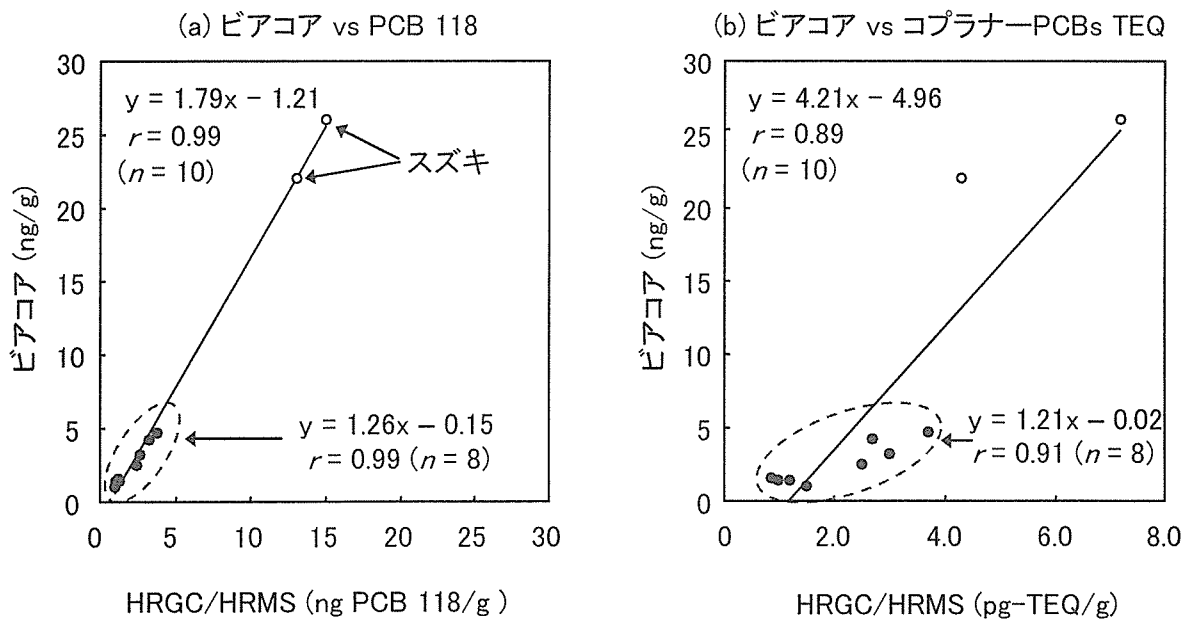


図6 魚試料におけるピアコアとHRGC/HRMSの定量値の比較

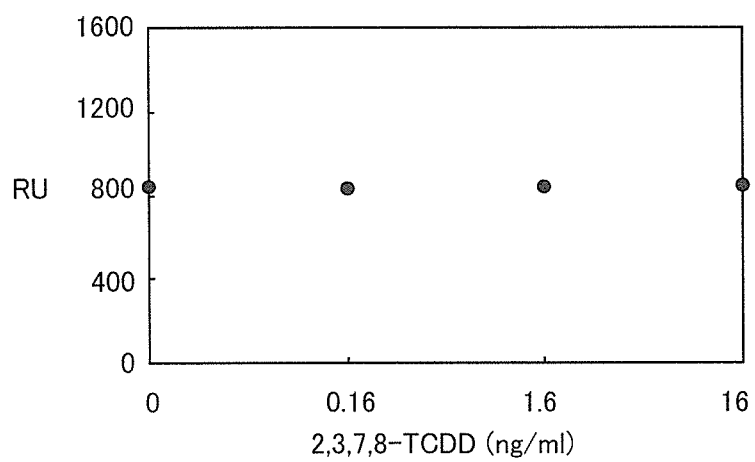


図7 2,3,7,8-TCDD 標準溶液から得られたレスポンス

分担研究報告書

3. 食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究
 - 3-2. 食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究

分担研究者 堤 智昭

(国立医薬品食品衛生研究所)

分担研究報告書

ダイオキシン類による食品汚染実態の把握に関する研究

(3) 食品中ダイオキシン類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究

(3-2) 食品中ダイオキシン類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究
—トータルダイエツト試料の迅速抽出への応用並びに個別食品分析における運用試験—

分担研究者 堤 智昭 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品中のダイオキシン類分析の迅速化を主たる目的として、高速溶媒抽出法(ASE)について検討を行った。本年度はトータルダイエツト(TDS)試料に含まれるダイオキシン類の迅速かつ高感度な検出・定量を検討した。平成 16~17 年度の本分担研究結果より個別食品試料において高い抽出効率の得られた ASE 使用条件を TDS 試料(1~13 群)の抽出に適用した。PCDD/Fs 及びノンオルト PCBs(21 異性体)の測定には、溶媒除去大容量注入装置(SCLV injection system、以下 SCLV)を装着した高分解能ガスクロマトグラフ—質量分析計(HRGC/HRMS)による高感度分析を実施した。TDS 試料の抽出時間は従来法に比べて迅速化(2 時間以上→約 30 分)され、抽出に用いる溶媒量を少量化(400 ml 以上→約 120 ml)することができた。また、SCLV を使用した結果、TDS 試料中のダイオキシン類の検出感度を 5 倍以上向上できた。高感度化の結果、検出下限値未満の異性体について濃度をゼロとした場合と、検出下限値の 2 分の 1 とした場合の総ダイオキシン類濃度の変動が小さくなり、特に検出下限未満の異性体を多く含む TDS 試料からのダイオキシン類摂取量推定の信頼性向上に寄与することが期待できた。しかし、一部の異性体(特に 2,3,7,8-TeCDF 及び 1,2,3,7,8-PeCDF)ではマトリックスの影響を受けやすく、定量値の取り扱いには注意が必要であった。

さらに、植物性食品(10 試料)を分析対象とし、ASE 及び SCLV を装着した HRGC/HRMS を組み合わせた迅速分析法の運用試験を行った。1~2 名の人員によって分析試料の前処理から測定結果の算出までの全工程を、約 7 日間で完了することが可能と考えられた。

研究協力者

福岡県保健環境研究所
堀 就英、安武大輔、中川礼子

A. 研究目的

我が国における食品中ダイオキシン類分析方法の標準は「食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCB の測定方法暫定ガイドライン」

¹⁾(以下ガイドライン)である。ガイドラインによれば、食品中のダイオキシン類測定で要求される検出下限濃度は、食品試料 1g あたり 0.01 ~ 1 pg(ピコグラム、一兆分の一グラム)であり、分析調査においては「超微量」のダイオキシン類を高い精度で計測する技術が求められる。

現在の食品中ダイオキシン類分析における最大の課題は、分析結果を得るまでに長期間

を要することである。20 試料程度の食品を分析する場合、数週間から数ヶ月の分析期間を要するのが実情である。分析操作とりわけ抽出操作が煩雑なため、一度に処理できる試料の数は極めて限られたものとなっている。分析方法を改善して迅速に結果が得られるようになれば、人体曝露に関する研究の進展に大きく寄与するほか、近年重要性を増している「健康危機管理」における行政対応の観点からも有益である。

食品のダイオキシン類分析では試料の種類によって適用される抽出法が異なる。ガイドラインでは野菜や果実などの植物性食品に「アセトン・ヘキサン溶媒抽出」(以下溶媒振とう抽出)、魚介類などの動物性食品に対しては「アルカリ分解・溶媒抽出」や「脂肪抽出・アルカリ分解」(以下アルカリ分解)の適用が例示されている。一方、ダイオキシン類の摂取量調査に用いられるトータルダイエツト(TDS)試料の抽出方法は具体的に示されていない。TDS 試料は全14群から成り、第14群の飲料水を除き各食品群は複数の食品の混合物である。従って当該試料に含まれている食品の性質を考慮し、ガイドライン記載の抽出方法から適切な方法を選ぶ必要がある。過去のマーケットバスケット方式による摂取量調査では、油脂成分を含む第1~4及び9~13群にはアルカリ分解法を、それら以外の食品群には溶媒振とう抽出を適用している²⁾³⁾。

従来のアルカリ分解及び溶媒振とう抽出の難点として、①分解操作や振とう操作に長時間を要する(1検体あたり2~12時間)、②分析一回あたりの試料採取量が多く、抽出に多量の溶媒を必要とする(概ね試料100gに対し400ml)、③使用するガラス器具のサイズが大きく取り扱いが不便である、等が挙げられる。またアルカリ分解では強アルカリ性溶液を取り扱うため操作に危険を伴うほか、アルカリ分解中にダイオキシン類の一部が分解することも指摘されている⁴⁾。

本分担研究では、食品中ダイオキシン類の分析操作、特に抽出操作に着目し、ASEによるダイオキシン類の分析方法の効率化・迅速化について検討した。ASEは従来法と比較して抽出時間が短く、少ない溶媒量で多検体を自動的に抽出できる。平成16、17年度に実施した本研究においてASEを使用すると植物性及び動物性食品試料に含まれるダイオキシン類を迅速かつ高効率に抽出できることが示されている⁵⁾⁶⁾。

今年度はTDS試料を対象としてダイオキシン類分析の迅速化・高感度化を検討した。ASEを使用してTDS試料の抽出液を迅速に調製する手法を検討した。さらに溶媒除去大容量注入装置(SCLV injection system、以下SCLV)を装着した高分解能ガスクロマトグラフー質量分析計(HRGC/HRMS)を用いて当該試料中ダイオキシン類の高感度分析を実施し、TDS試料測定の信頼性向上について検討した。また福岡県内で購入した個別食品10試料(果実・野菜類)に対し、ASEによる迅速抽出法を適用し、試料調製から測定結果算出までの運用試験を行い、全分析工程の期間短縮効果や操作性について考察した。

B.研究方法

1.試料

平成15年度に福岡県保健環境研究所において調製され、密閉容器に凍結保存されていたTDS試料(第1~13群、計13試料)を分析試料とした。内訳は以下の通りである。

第1群:米、米加工品

第2群:米以外の穀類、種実類、芋類

第3群:砂糖類、菓子類

第4群:油脂類

第5群:豆類、豆加工品

第6群:果実類

第7群:緑黄色野菜

第8群:他の野菜類、キノコ類、海草類

第9群:調味・嗜好飲料

第10群:魚介類

第11群:肉類、卵類

第12群:乳、乳製品

第13群:その他の食品(カレールーなど)

個別食品試料は平成19年1月に福岡県内の小売店で購入した。内訳はいちご、にんじん、トマト、キャベツ、レタス、白菜、春菊、ほうれん草、ちんげんさい、茶葉の計10品目の植物性食品であった。各食品の可食部を採取し、フードプロセッサで均一化して分析試料とした。

2. 試薬

平成16年度の本分担研究報告書⁵⁾と同様の試薬を使用した。

3. 測定試料の調製

TDS試料の分析は図1に、個別食品試料の分析は図2にフローチャートにより示した。

4. 装置

ASEには日本ダイオネクス社製の大容量高速溶媒抽出装置「ASE-300」を用いた。凍結乾燥にはバーチス社製の凍結真空乾燥機「アドバンテージ」型を用いた。測定装置は平成16及び17年度の本分担研究報告書⁵⁾⁶⁾と同様のものを使用した。SCLV(SGE社製)を含めたGC部の使用条件を、表1に示した。検出下限の算出方法はガイドラインの手法に従い、標準品のHRGC/HRMSクロマトグラム上でのS/N=3に相当するピーク強度及びブランク試験の結果を勘案して算出した。ダイオキシン類の毒性当量(TEQ)はWHOが定める毒性等価係数(WHO-TEF(1998年))を用いて算出した。

C. 研究結果及び考察

1. ASEとSCLVによるTDS試料中ダイオキシ

ン類分析の迅速化・高感度化

個別食品試料を対象とするダイオキシン類分析で達成されるべき検出下限は、ガイドラインで同族体ごとに定められ、その範囲は0.01~1pg/gである(標準的検出下限値)。一般的にマーケットバスケット方式調査におけるTDS試料の分析においてもこの検出下限値が達成の目途とされ、HRGC/HRMSの検出感度に照らすと分析一回あたりの試料採取量は100gである^{2,3)}。本研究で使用する抽出装置「ASE-300」に装着できる抽出セル容量(一本あたり)は最大で約100mlであり、一本の抽出セルに充填可能なTDS試料は分散剤(珪藻土粉末)の使用を考慮すると約50gである。従って100gの試料を抽出するためには複数のセルに試料を分けて充填し、後に抽出液を合わせる手法が考えられる。しかし今回の検討では操作の効率性を考慮し、出発重量を50gに設定して一試料に一本の抽出セルを使用することとした。

HRGC/HRMSにSCLVを装着すると、通常では1~2 μ lの試料注入量を25 μ l程度にまで増量できる。注入後に溶媒成分のみが系外へ排出される仕組みとなっているため、従来よりも内径の細かいカラムを使用しても過負荷とならない。また溶媒の除去によりMS部イオン源の真空度が保持され、イオン化効率の増大に寄与する。これらの諸要因が奏効して検出感度(S/N比)の向上に繋がる⁷⁾。SCLVを装着したHRGC/HRMSにダイオキシン類標準品(各異性体濃度:0.4pg/ml、5 μ l)を繰り返し注入して得られた測定結果とTDS試料分析における操作ブランク値を考慮し、検出下限値を算出した(表2)。結果として従来の検出下限値よりも約5倍以上の低濃度領域を検出することが可能となり、試料採取量の不足により生じる検出感度の低下はHRGC/HRMSの高感度化で十分に補うことが可能と考えられた。

2. ASE による TDS 試料中ダイオキシン類の抽出

ASE による TDS 試料の抽出は、個別食品試料における検討結果⁵⁶⁾より「抽出温度：150℃、抽出溶媒：アセトン-*n*-ヘキサン(1:1)」の条件を適用して行った。TDS 試料 1~13 群の各試料約 50 g(第 4 群は 7.5 g)を正確に量り取り、珪藻土粉末とよく混合して抽出セルに充填し、抽出液を調製した。その結果、一部の試料で抽出条件に見合った液量が得られず(抽出液量の減少)、抽出率の低下が懸念された。これは抽出セルへの試料の充填度が過密であったため、抽出溶媒がセル内に正しく送液できなかったためと考えられた。珪藻土粉末は試料の水分を吸収して分散性を高め抽出溶媒との親和性を高める(抽出効率を増大させる)。TDS 試料には水分が比較的多く含まれており、その多くは TDS 試料を調製する際に均一性を高めるために添加した蒸留水に由来する。TDS 試料の水分を十分に吸収しうる量の珪藻土粉末を使用すると、一本の抽出セルに収まりにくくなり、自ずと充填度が過密となってしまう。

そこで TDS 試料(50 g)を凍結乾燥処理して水分を除去し、得られた固形物を粉末状に粉碎後、珪藻土と混合してセルに充填した。その結果、適切な抽出液量が得られるようになった。得られた抽出液量を見る限り、凍結乾燥を行うことで 50g 相当の TDS 試料が単独の抽出セルに余裕をもって収まり、抽出が円滑になされたものと推察された。

3. SCLV 装着 HRGC/HRMS による TDS 試料中ダイオキシン類の分析

表 3 に TDS 試料分析時のクリーンアップスパイク(CS)の回収率を示した。概ね回収率は良好でガイドラインに規定された 40~120%の数値であったが、一部の化合物についてはこれに適合しないものも散見された。特に 2,3,7,8-TeCDF と 1,2,3,7,8-PeCDF の回収率は

120%を超過する傾向が強く、回収率の適正な評価が困難であった。HRGC/HRMS 測定時のロックマスキングクロマトグラムをみると、これらの化合物の保持時間付近で大きく変動しており、クリーンアップスパイクに相当するピークが著しく増強され面積が増大していた。これは精製過程で十分に除去されなかった食品由来成分の残留による影響と考えられる。SCLV を介して通常よりも大量の試料を内径の細かいカラムに負荷することから、クロマトグラムはマトリックス成分の影響を受けやすいものと推察された。結論として、TDS 試料を ASE 抽出し、SCLV を使用して分析する場合は、一部の異性体定量値の取り扱いに注意が必要であり、抽出物の精製度の向上を図ることが必要と考えられた。

表 4 は TDS 試料に含まれるダイオキシン類の分析結果を示した。動物性食品を構成食品とする第 10~12 群ではいずれもダイオキシン類が広範に検出された。我が国でダイオキシン類の主要な曝露源とされる魚介類(第 10 群)では 2,3,4,6,7,8-HxCDF と OCDF 以外の 27 異性体を同定できた。一方、摂取量(g)が最も多い米、米加工品(第 1 群)をみると、同定できた異性体は 29 種類中 4 種類にすぎなかった。

一般的に TDS 試料によるダイオキシン類摂取量の算出では、検出下限値未満の化合物についてそれらの濃度をゼロとする場合(ND=0)と、これらの化合物の摂取リスクを見込んで検出下限値の 2 分の 1 を適用する場合(ND=LOD/2)がある。これら 2 つの算出方法を今回の分析結果に適用して総ダイオキシン類濃度(Total DXN、pg TEQ/g)を算出した。ダイオキシン類濃度が最も高かった第 10 群はほとんどの異性体が検出されたため、「ND=0」と「ND=LOD/2」間にほとんど差は生じなかった。同様の傾向は、異性体の検出率が高かった第 3 群、11 群、12 群及び 13 群についても認められた。一方、異性体の検出率が低かった第 1 群では「ND=0」のとき 0.00029 pg

TEQ/g、「ND=LOD/2」では0.0031 pg TEQ/gとなり、両者の Total DXN 濃度の変動は先の食品群に比べて大きかった。しかし仮に今回の分析結果に従来の標準的検出下限値を適用すると、「ND=0」のとき0 pg TEQ/gであったものが「ND=LOD/2」では0.027 pg TEQ/gとなり、高感度分析の場合と比べて両手法間の Total DXN 濃度の変動はさらに拡大した。

以上の結果から、測定感度を向上させると高い検出率が得られるのみならず、不検出の場合に適用される「ND=LOD/2」値が低くなることで、算出方法の違いによって生じる変動が小さくなる。特に検出下限値以下の異性体を多く含む食品群では、ダイオキシン類摂取量推定の信頼性向上に繋がるのが期待できる。

4. 個別食品中ダイオキシン類の迅速分析法の運用

昨年度までの本分担研究において、個別食品試料の抽出に ASE を使用すると試料中のダイオキシン類が適切に抽出され、従来法に比べて抽出に要する時間を著しく短縮することができた。例えば、植物性食品の抽出に ASE を使用した場合、従来法では分液ロートを使用して約 2 時間を要していた抽出時間が約 30 分に短縮された。

今回、福岡県内で採取した食品 10 試料について ASE を使用してダイオキシン類分析を行い、分析操作全体の迅速化について考察した。分析操作は図 2 の方法に従い、各工程に要する時間を記録しながら行った。試料の均一化及びカラムクロマトグラフィーは 2 名の人員で行い、それ以外の工程は 1 名で操作を行った。

図 3 に運用試験の結果概要を示した。結果として運用期間中に計 2 回の中断を挟むこととなったが、仮に全工程を連続して行えたものとなれば作業開始から数えて 7 日目までに 10 試料の定量結果を得ることが可能と考えられ

た。

個別食品試料の分析結果を表 5 に示した。各試料の Total DXN 濃度を近年の全国汚染実態調査結果と比較すると、全般的にダイオキシン類濃度はこれと同等または下回るもので、特段に汚染度の高い試料は認められなかった。

従来の抽出法による個別食品 10 試料の分析を想定すると、抽出操作のみで 2~3 日間を要していた。このように抽出操作が長期間を要する原因は、①一試料あたりの抽出時間が 2 時間以上必要であり、操作の多くを手作業で行わざるを得ないこと、②1 リットル容の分液ロートや吸引濾過に使用する桐山ロートなど大型のガラス器具を多数取り扱う煩雑さ、またこれらの器具の準備や洗浄等に多くの時間を割かなければならないこと、③振とう抽出後に有機層と水層とが十分に分離しない、吸引濾過時に濾紙が目詰まりを起こすなどのトラブルが発生しやすいこと、等が挙げられる。ASE によってこれらの問題は解決され、抽出工程の迅速化に寄与するところが大きかった。

本分析では TDS 試料の分析と同様に HRGC/HRMS に SCLV を装着して高感度化を図り、出発重量 100 g を 20 g にスケールダウンして実施した。小スケール化によって試料を ASE の抽出セル一本に収めることが可能となった。ASE で得られる抽出液の量は従来法の約 1/4 であり、このことは抽出液の濃縮操作の効率化や硫酸処理に必要な硫酸量の少量化に寄与した。

実際のダイオキシン類調査ではデータ解析作業において、ブランクレベルのチェックや CS 回収率の妥当性の評価、定量結果に異常な値が含まれていないか等の精査を行う。異常の原因究明や再分析の実施によって定量値の確定までにさらに日数を必要とする場合がある。今回の運用試験の結果は ASE の使用が分析期間の短縮や実験室の作業効率の著しい向上に役立つことを示している。ダイオ

キシソ類分析における ASE の適用は農作物の汚染が疑われた場合等の対応において、食品の安全性を速やかに確認する手段として有効と考えられる。

D.結論

(1)ASE を用いて TDS 試料中のダイオキシソ類を迅速に抽出した。抽出前に凍結乾燥処理を行うことで TDS 試料 50 g を一本の抽出セルに充填することが可能であった。水分を多く含む TDS 試料の抽出において安定した抽出効率を得るために効果的な手法と考えられる。

(2)SCLV を装着した HRGC/HRMS を使用して TDS 試料中のダイオキシソ類を測定した。検出感度は従来法に比べて約 5 倍以上の高感度が得られた。しかし、一部の異性体ではマトリックスの影響を受けやすく、精製方法の検討が必要であると考えられる。

(3)HRGC/HRMS における検出感度の向上は、検出下限未満の化合物に「ND=0」又は「ND=LOD/2」を適用する際に生じる Total DXN 濃度の変動を小さくし、摂取量推定の際の信頼性向上に寄与すると考えられる。

(4)福岡県内で採取した食品 10 試料について、ASE と SCLV を装着した HRGC/HRMS を組み合わせた迅速試験法を適用したところ、全工程を 1~2 名の人員により 7 日間で終えることが可能であった。本方法は食品中ダイオキシソ類濃度を迅速に測定する手法として有効と考えられる。

E.参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局”食品中のダイオキシソ類及びコプラナー PCB の測定方法暫定ガイドライン”平成 11 年 10 月。
- 2) Tsutsumi, T., Yanagi, T., Nakamura, M., Kono, Y., Uchibe, H., Iida, T., Hori, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Matsuda, R.,

Sasaki, K., Toyoda, M.: Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere*, **45**, (2001) 1129-1137.

3) 豊田正武、内部博泰、柳俊彦、河野洋一、堀就英、飯田隆雄: 日本における食事経路の PCDDs、PCDFs 及び Coplanar PCBs の摂取量、*食衛誌*、**40**、(1999)98-110.

4) 高管卓三、青野さや香、秋月哲也、中川貴之、渡邊清彦、井上毅: アルカリ分解法を用いた PCB、ダイオキシソ分析の課題、第 10 回環境化学討論会講演要旨集(2003)28-29.

5) 平成 16 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「ダイオキシソ類による食品汚染実態の把握に関する研究(3)食品中ダイオキシソ類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究(3-2)食品中ダイオキシソ類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究」

6) 平成 17 年度厚生労働科学研究補助金研究報告書:「ダイオキシソ類による食品汚染実態の把握に関する研究(3)食品中ダイオキシソ類分析の迅速化・信頼性向上に関する研究(3-2)食品中ダイオキシソ類分析における高速溶媒抽出法の応用に関する研究」

7) Tobiishi, K., Hori, T., Kurokawa, Y., Ishiguro, Y., Iida, T.: Comparison of solvent cut large volume (SCLV) injection system with conventional technique in dioxins analysis by HRGC/HRMS. *Organohalogen Compounds*, **55**, (2002)179-182.

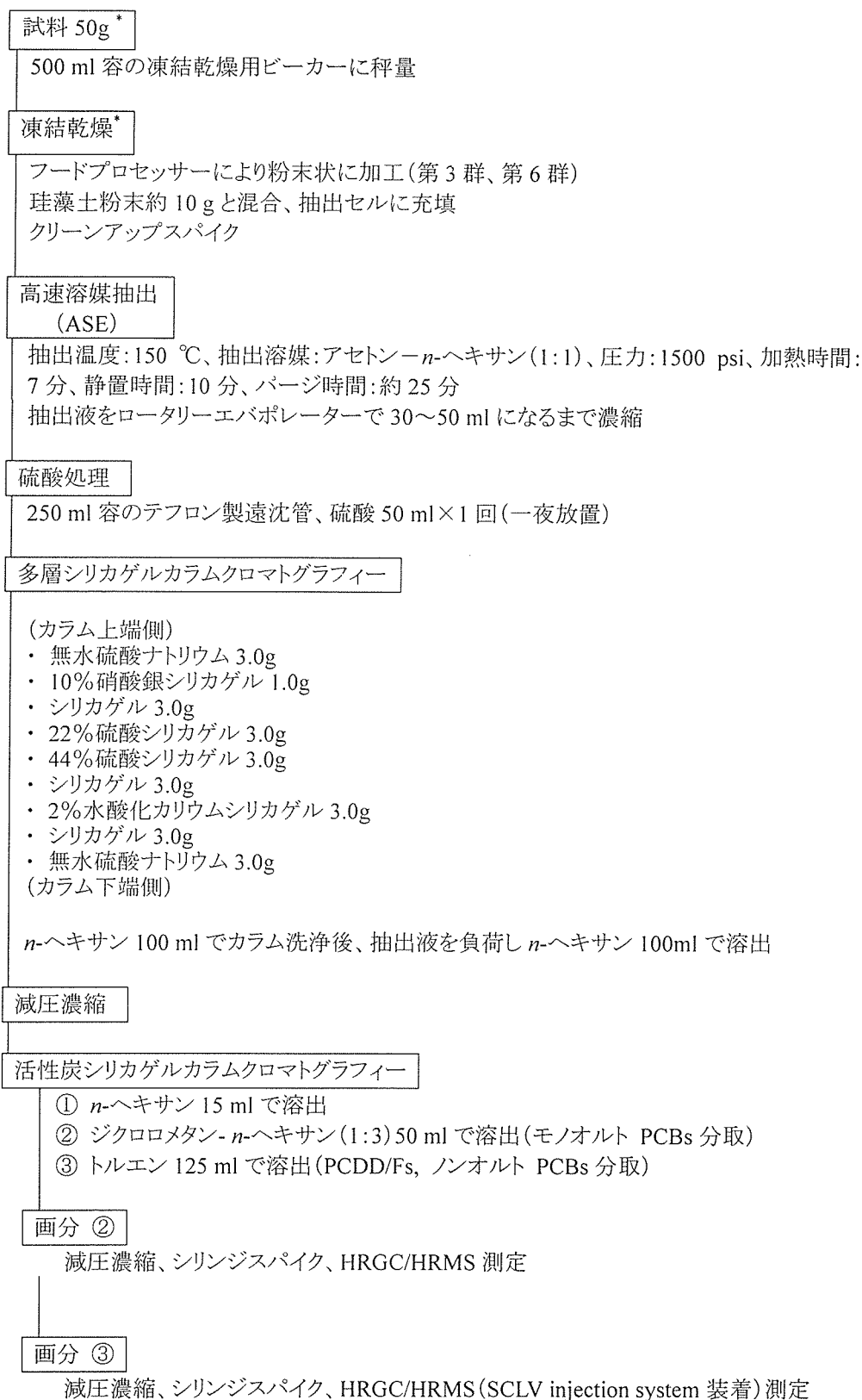
F.研究業績

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし



*第4群(油脂類)においては約 7.5 g を正確に量り取り、凍結乾燥処理を省略して抽出セルに充填した。

図1 TDS 試料中ダイオキシン類の分析フロー