

## 分担研究報告書

### 油症検診受診者の血液中 PCDF 等（ダイオキシン類）濃度実態調査

研究分担者	香月 進	福岡県保健環境研究所	所長
研究協力者	堀 就英	福岡県保健環境研究所	生活化学課 課長
	飛石 和大	福岡県保健環境研究所	生活化学課 専門研究員
	佐藤 環	福岡県保健環境研究所	生活化学課 主任技師
	古谷 貴志	福岡県保健環境研究所	生活化学課 主任技師
	重富 敬太	福岡県保健環境研究所	生活化学課 技師
	新谷 依子	福岡県保健環境研究所	計測技術課 研究員
	小木曾 俊孝	福岡県保健環境研究所	計測技術課 主任技師
	平川 周作	福岡県保健環境研究所	水質課 研究員
	戸高 尊	公益財団法人北九州生活科学センター	課長
	広瀬 勇氣	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	宮脇 崇	北九州市立大学エネルギー循環化学科	准教授

#### 研究要旨

全国油症一斉検診の受診者について血液中の PCDF 等（ダイオキシン類）の濃度を継続的に測定している。2021 年度の油症検診で血液中ダイオキシン類濃度を測定した認定患者 1 名と未認定者 92 名について結果集計を行った。認定患者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 66 pg/g-fat となり、2, 3, 7, 8-TeCDD 毒性等価係数（WHO-2006）を用いて毒性等量（TEQ）に換算した総ダイオキシン類（Total TEQ）濃度は 57 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は平均 8.5 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 13 pg TEQ/g-fat であった。

血液中ダイオキシン類の微量分析技術を用いて 2021 年度に実施した血液中 PCB 分析精度管理について、データ解析を行った。その結果、当所を含む国内 5 機関の定量値は概ね一致しており、各機関で血液中 PCB の定量分析が適切に実施されていることが分かった。

ヒト体内で最も高濃度に検出される 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (CB153) とヒトチトクローム P450 (CYP) 2A6 組換え酵素を *in vitro* 系で反応させ、生成した水酸化 PCB を HRGC/HRMS で分析した。その結果、生成した水酸化 PCB 異性体は 4'-OH-CB101 と推定され、さらに *in silico* 解析によるドッキング様式のシミュレーション結果を考慮すると、CB153 は脱塩素化を伴う反応で 4'-OH-CB101 に代謝されると推測した。

現在、2022 年度の全国油症一斉検診の受診者のうち 436 名について血液中ダイオキシン類濃度測定を行っている。

## A. 研究目的

2004年に血液中2,3,4,7,8-PeCDF値が新たな油症診断基準に加えられた。また2012年12月には油症診断基準追補(同居家族の条件追補)が加わり、2021年度現在の認定患者数は2,367名である。

全国油症治療研究班では、油症認定患者の治療と追跡、ならびに未認定者の患者診定に資することを目的として、毎年全国で油症一斉検診を行っている。本分担研究では、福岡県保健環境研究所で開発したダイオキシン類分析法を用いて、油症一斉検診受診者のうち、2001年度は福岡県の受診者中の希望者、2002~2006年度の5年間は全国の受診者における希望者、2007年度からは未認定者と油症認定患者のうち初回及び過去3年以内に測定歴の無い認定患者の血液中ダイオキシン類濃度を測定してきた。測定結果は患者認定における指標値として用いられ、患者の血液中ダイオキシン類濃度の解明、血液中濃度の経年推移や体外排泄速度の解析等に活用されている。

本年度は以下の3項目について検討した。

(1) 2021年度全国油症一斉検診の受診者のうち血液中ダイオキシン類濃度の測定を行った93名について結果集計を行った。2013年度から検診が始まった同居認定者の血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度について現状の把握を行った。

(2) 国内で血液中ダイオキシン類・PCB測定を行っている分析機関に共通の血液試料を配布し、各機関の定量結果を統計手法で比較する精度管理を行った。

(3) ヒト体内で最も高濃度に検出される2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl

(CB153)とヒトチトクロームP450(CYP)2A6組換え酵素を*in vitro*系で反応させ生

成する水酸化PCBを分析した。また、*in silico*解析によるドッキング様式のシミュレーション結果と統合することで代謝経路を推測した。

## B. 研究方法

### 1. 血液中ダイオキシン類の測定

血液中ダイオキシン類の測定は、2001年度に開発した高感度分析法に準じて行った。油症一斉検診で要求される条件(分析期間、処理件数、分析感度)に対応するために、必要に応じて抽出法や機器分析法に改良を加えながら現在に至っている。定量結果の信頼性を確保するため、血液試料22件につきブランク試験1件、内部精度管理試料としてヒト血清1件を加えた計24件を「1バッチ」として前処理を実施し、試験操作が適切に実施されているか確認した。

2021年度の油症一斉検診受診者のうち、初回及び過去3年以内に血液中ダイオキシン類測定歴が無い認定患者1名及び未認定者92名から得られた血液を対象に測定を実施した。血液はヘパリン入り真空採血管に採取され、測定まで4℃以下で冷蔵保存された。

ダイオキシン類各異性体濃度の2,3,7,8-TCDD毒性等量(TEQ)への換算には、2005年にWHOが策定した毒性等価係数(WHO-2006)を用いた。各受診者の区分(認定または未認定)は2021年の検診受診時のものを用いた。

### 2. 血液中PCB濃度分析の精度管理

国内の分析機関(4か所)に2種類の血液試料を配付し、PCB異性体の分別定量を依頼した。分析は各機関で通常行っている試験法に従って実施された。

各機関の報告値に福岡県保健環境研究所の測定値を加えた5機関分のデータを集計して解析した。全体解析では各PCB異性体の全血重量あたりの濃度を用い、ピーク分離不可として報告された異性体があった場合は、一律に未分離扱いとし、該当する異性体の濃度を合算した。定量下限未満の異性体濃度はゼロとし、Total PCB濃度や同族体ごとの濃度を集計した。各分析機関の比較にはCV値およびZスコアを用いた。

### 3. ヒトCYP2A6組換え酵素を用いたCB153の*in vitro*代謝試験

市販されているヒトCYP2A6組換え酵素(Human CYP2A6 + P450 Reductase + Cytochrome b5, CORNING)及びCB153(AccuStandard Inc.)を用いて、*in vitro*系で代謝試験を実施し、生成した水酸化PCBをHRGC/HRMSで分析した。代謝試験及び水酸化PCBの測定は、愛媛大学沿岸環境科学研究センター共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」との共同研究により愛媛大学にて実施した。また、これまでに実施した*in silico*解析によるドッキング様式のシミュレーション結果に基づき、生成した水酸化PCBの代謝経路を推測した。

#### (倫理面への配慮)

血液中ダイオキシン類の測定は、本人の同意が得られた者のみを対象とした。研究成果の発表に際しては統計的に処理された結果のみを使い、個人を特定できるような情報は存在しない。また、本研究は「福岡県保健環境研究所疫学研究倫理審査委員会要綱」に基づき、審査を受け承認されたものである(許可番号R第3-7及び-8号、2021

年12月3日承認)。

## C. 研究結果・考察

### 1. ダイオキシン類分析の信頼性確保

#### 1-1. 微量測定技術の確立

血液中の微量ダイオキシン類を高感度に検出、定量するために表1に示す機器分析条件を確立し、以降の測定を実施した。本条件によって得られたダイオキシン類標準品の測定クロマトグラムを図1に示した。

#### 1-2. 内部精度管理

各測定バッチ(24件)のブランク試験結果の取扱いは、厚労省が策定した「血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル」に準じて行った。全測定を通じて定量精度に著しい影響を与えるような操作ブランクの出現は認められなかった。

血液試料と並行分析したヒト血清試料についてダイオキシン類異性体の定量値を各バッチ間で比較したところ、CV値は約10%で再現性は良好であった。

#### 1-3. 外部精度管理

5機関(A~E)の血液中PCB濃度の測定結果(全血重量あたり)を表2に示した。PCB低塩素化体(塩素化数1~3)を計測対象としていない機関、またこれらの同族体濃度を定量下限値未満で報告した機関もあったが、4~10塩素化物は全ての検査機関が実測値を報告した。

血液サンプルFBCC2101の血液中PCB濃度の総和(Total PCB)は平均700 pg/g-wet(範囲:610-750 pg/g-wet)となり、CVは7.7%と良好な結果であった(表2(1))。また図2-Aに示すようにZスコアが±2を超えた機関は認められなかった。

一方、血液サンプルFBCC2102のTotal PCBは平均380 pg/g-wet(範囲:330-400

pg/g-wet) であり、CV は 8.0% と良好な結果であった (表 2(2))。Z スコアが ±2 を超えた機関は無かった (図 2-B)。

## 2. 2021 年度油症一斉検診受診者の血液中ダイオキシン類濃度

2021 年度の血液中ダイオキシン類測定対象者は 93 名 (内訳: 認定患者 1 名及び未認定者 92 名) であった。2020 年度の 80 名に比べて 13 名増加したが、2019 年度以前が 200 名以上で推移していたことを考えると、新型コロナウイルス感染症拡大のため全国的に健診の規模が縮小された影響が続いており、受診者数は回復していない。また、2007 年度以降、ダイオキシン類測定対象者は初回受診者と過去 3 年以内に測定歴の無い認定患者としており、4 年周期で測定件数が多くなる傾向がある。2021 年度はそのピークの前年に当たっていたこと、未認定者の受診者減少には 2012 年 12 月に油症診断基準に同居家族条項が追加され、一部の未認定者が同居家族条件による認定を受けたことが要因として含まれる。

表 3 に 2021 年度の油症一斉検診の油症認定患者及び未認定者の血液中ダイオキシン類濃度の分析結果、ならびに 2004 年度に福岡県内で実施した一般住民の血液中ダイオキシン類濃度を示した。

認定患者 (1 名) の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度は 66 pg/g-fat となり、2, 3, 7, 8-TeCDD 毒性等価係数 (WHO-2006) を用いて毒性等量 (TEQ) に換算した総ダイオキシン類濃度 (Total TEQ) は 57 pg TEQ/g-fat であった。未認定者 92 名の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF の平均濃度は 8.5 pg/g-fat、Total TEQ の平均濃度は 13 pg TEQ/g-fat であった。未認定者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 平均濃度を対照群の

一般住民と比較すると、同等もしくはやや低い濃度であった。

表 4 は未認定者の 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF 濃度の度数分布を示した。未認定者の多くは一般人と同等の 30 pg TEQ/g-fat 未満に分布していたが、油症診断基準で「高い濃度」の区分とされる 50 pg/g-fat 以上の受診者が 1 名認められた (98 pg TEQ/g-fat)。

2020 年度現在の同居家族認定者 306 名のうち血液中ダイオキシン類濃度の測定歴がある 205 名について測定結果を集計したところ、2, 3, 4, 7, 8-pentaCDF 平均濃度は 24 pg/g-fat (範囲 2.8~440 pg /g-fat) であった。油症診断基準で「高い濃度」の区分に属する 50 pg /g-fat 以上を示した患者数は 15 名であった。

## 3. ヒト CYP2A6 による CB153 の代謝

ヒト CYP2A6 組換え酵素と CB153 を使用した *in vitro* 代謝試験を実施し、生成した水酸化 PCB 異性体の測定結果を図 3 に示す。標準品と比較したところ、5 塩素化体の 4'-OH-CB101 であると推定された。また、CB153 は 6 塩素化体の PCB であるが、6 塩素化体の水酸化 PCB の生成は認められなかった。

また、ヒト CYP2A6 と CB153 の *in silico* 解析によるドッキング様式のシミュレーション結果に基づき、予測された代謝標的部位を考慮すると、CB153 の 3 位を標的とした 3, 4-epoxide 体の生成に続き脱塩素されて 4'-OH-CB101 に代謝されたものと推測された (図 4)。

## D. 結論

少量 (約 5 グラム) の血液から 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF を含むダイオキシン類を定量する分析技術と体制を維持し、継続して測定を行

ってきた。測定データの信頼性を確保するためにブランク試験、内部精度管理を実施し、国内の分析機関と共通の血液試料を分析する精度管理を行った。

2021年度の血液中ダイオキシン類濃度測定対象は、認定患者1名と未認定者92名であった。認定患者の2,3,4,7,8-PeCDF濃度は66 pg/g-fat、Total TEQ濃度は57 pg TEQ/g-fatであった。未認定者の2,3,4,7,8-PeCDF平均濃度は8.5 pg/g-fat、Total TEQの平均濃度は13 pg TEQ/g-fatであった。多くの未認定者で血液中ダイオキシン類濃度は一般人と同等のレベルであったが、油症診断基準で「高い濃度」に該当する受診者が1名認められた。2001年度から20年間継続している血液中ダイオキシン類濃度測定の累計数は6030件となった。2021年度の測定結果はすでに油症診断データベースへ追加登録されており、臨床症状との関連性解析などに今後活用される。

ヒト体内で最も高濃度に検出されるCB153とヒトCYP2A6組換え酵素を*in vitro*系で反応させ、生成した水酸化PCBの分析を実施した。また、*in silico*解析によるドッキング様式のシミュレーション結果と統合することにより、脱塩素化を伴う反応で4'-OH-CB101を生成する代謝経路を示すことができた。このように、*in silico*解析によるシミュレーション及び*in vitro*試験を統合した解析手法は、解明が困難な生体内で起こっているCYP分子種とPCBの代謝反応を把握する技術として有用と考えられる。

## E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## F. 研究発表

1. 論文発表           なし
2. 学会発表
  - 1) 堀就英、新谷依子、飛石和大、佐藤環、古谷貴志、戸高尊、広瀬勇氣、辻学、油症発生から50年－患者血液中のダイオキシン類及びPCB濃度の現状－. 第55回日本薬剤師会学術大会、2022年10月9-10日、仙台市.
  - 2) 新谷依子、堀就英、古谷貴志、飛石和大、平川博仙、香月進、辻学、血液中PCB濃度分析のクロスチェック(2021年度). 環境化学物質3学会合同大会(第30回環境化学討論会)、2022年6月13-16日、富山市.
  - 3) 平川周作、堀就英、香月進、宮脇崇、平野将司、岩田久人、辻学、油症患者におけるダイオキシン類の蓄積特性と*in silico*ドッキングシミュレーションによるチトクロームP450を介した代謝予測. 環境化学物質3学会合同大会(第30回環境化学討論会)、2022年6月13-16日、富山市.

## G. 知的所有権取得

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他            なし

表1 共通血液試料中のPCB測定結果（単位：pg/g-wet）

GC conditions		
GC	Thermo Fisher Scientific TRACE 1310	
Column type	BPX-5 (TRAJAN, 0.25mm×5m, 0.25 μm) BPX-DIOX-1 (TRAJAN, 0.15mm×30m)	
Injection	Splitless	
Injection volume	2 μL	
Injector temperature	300 °C	
Carrier gas (Flow rate)	He (0.6 mL/min)	
Oven temperature program	160 °C (1 min) – 30 °C/min – 210 °C – 5 °C/min – 300 °C (14.3 min)	
MS conditions		
MS	Thermo Fisher Scientific Double Focusing Sector Mass Spectrometer	
Ionization mode	EI positive	
Electron energy	45 eV	
Source temperature	280 °C	
Resolution	10,000	
Target masses		
	<sup>12</sup> C <sub>12</sub> <sup>-</sup>	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> <sup>-</sup>
TetraCB	289.9224, 291.9194	303.9597
PentaCB	325.8804, 327.8776	337.9207
HexaCB	359.8415, 361.8385	371.8817
TetraCDF	303.9016, 305.8987	317.9389
PentaCDF	339.8597, 341.8568	351.9000
HexaCDF	373.8208, 375.8178	385.8610
HeptaCDF	407.7818, 409.7789	419.8220
OctaCDF	441.7428, 443.7399	455.7801
TetraCDD	319.8965, 321.8936	333.9339
PentaCDD	353.8576, 355.8546	367.8949
HexaCDD	389.8157, 391.8127	401.8559
HeptaCDD	423.7766, 425.7737	435.8169
OctaCDD	457.7377, 459.7348	471.7750

図1 ダイオキシン類標準溶液の測定クロマトグラム例

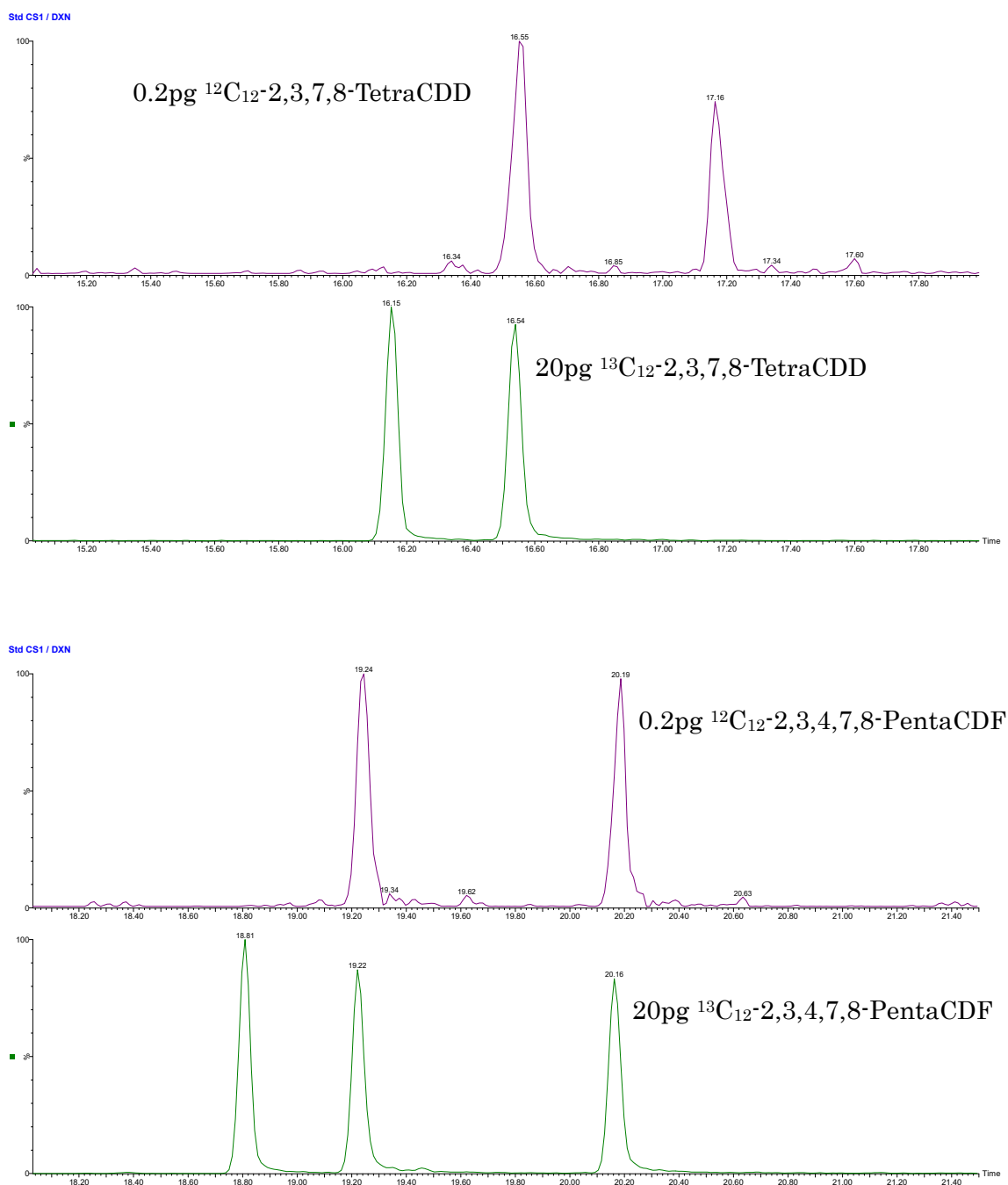


表 2 共通血液試料中の PCB 測定結果 (単位: pg/g-wet)

(1) 試料名 FBCC2101

化合物名	分析機関					Mean	CV%
	A	B	C	D	E		
Total MoCBs	2.8	3.7	2.7	—	—	3.0	—
Total DiCBs	0	2.6	2.0	—	—	1.5	—
Total TriCBs	1.2	3.8	2.0	1.5	0.45	1.8	70
Total TeCBs	12	16	14	11	13	13	15
Total PeCBs	34	42	35	31	41	37	13
Total HxCBs	330	310	300	280	330	310	6.7
Total HpCBs	280	240	290	230	280	270	11
Total OcCBs	66	62	53	56	70	61	12
Total NoCBs	5.8	6.5	5.9	4.5	7.6	6.1	19
DeCB	2.0	2.4	2.4	1.9	4.1	2.6	34
Total PCBs	730	690	710	610	750	700	7.7

(2) 試料名 FBCC2102

化合物名	分析機関					Mean	CV%
	A	B	C	D	E		
Total MoCBs	0	0.9	0.7	—	—	0.53	—
Total DiCBs	0	1.6	0.9	—	—	0.84	—
Total TriCBs	0	6.0	1.5	0.94	0	1.7	150
Total TeCBs	7.0	12	8.8	7.5	10	9.1	21
Total PeCBs	25	30	25	23	27	26	10
Total HxCBs	200	170	190	160	180	180	7.2
Total HpCBs	140	120	150	110	130	130	13
Total OcCBs	30	29	24	24	26	27	10
Total NoCBs	2.5	3.1	3.0	2.2	3.5	2.9	18
DeCB	1.0	1.3	1.2	1.0	1.4	1.2	15
Total PCBs	400	380	400	330	380	380	8.0

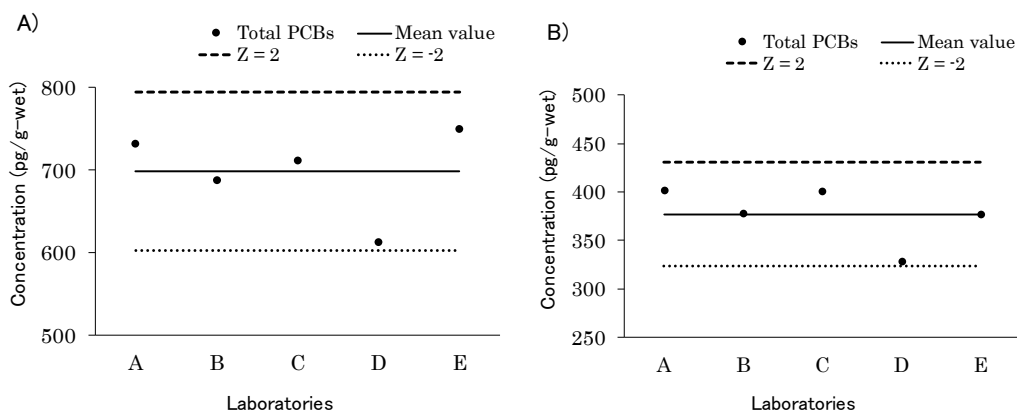


図 2 機関別血液中 Total PCB 濃度の  $\bar{X}$  管理図 (A: FBCC2101、B: FBCC2102)



表3 2021年度血液中ダイオキシン類濃度調査結果(単位: pg/g-fat)

同族体名	認定者 (1名)	未認定者(92名)				一般住民(127名)		
		平均	中央値	範囲		平均	範囲	
				最小	最大		最小	最大
2,3,7,8-TeCDD	2.0	0.73	0.50	0.50	3.3	1.9	0.50	4.3
1,2,3,7,8-PeCDD	9.1	2.8	2.1	0.50	16	9.0	3.2	20
1,2,3,4,7,8-HxCDD	3.1	1.3	1.0	1.0	6.0	3.6	0.50	13
1,2,3,6,7,8-HxCDD	47	8.7	6.5	1.0	51	28	7.3	70
1,2,3,7,8,9-HxCDD	4.6	1.4	1.0	1.0	10	4.5	0.50	16
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	13	10	7.9	2.0	83	78	18	470
OCDD	200	150	106	31	1881	1200	180	7600
2,3,7,8-TeCDF	2.0	0.64	0.50	0.5	2.8	1.0	0.50	4.5
1,2,3,7,8-PeCDF	ND	0.56	0.50	0.5	2.1	0.67	0.50	4.6
2,3,4,7,8-PeCDF	66	8.5	5.0	1.1	98	17	6.0	63
1,2,3,4,7,8-HxCDF	7.2	1.8	1.0	1.0	15	5.0	1.0	20
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5.6	2.0	1.0	1.0	11	5.7	1.0	16
2,3,4,6,7,8-HxCDF	ND	1.0	1.0	1.0	2.9	1.2	1.0	5.2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	ND	ND	-	-	-	ND	-	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	ND	1.3	1.0	1.0	6.5	2.2	1.0	14
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	-	-	-	ND	-	-
OCDF	ND	ND	-	-	-	2.1	2.0	18
3,4,4',5-TeCB(PCB81)	ND	ND	-	-	-	5.6	ND	24
3,3',4,4'-TeCB(PCB77)	ND	6.0	5.0	ND	19	8.4	ND	31
3,3',4,4',5-PeCB(PCB126)	140	38	21	ND	190	110	17	520
3,3',4,4',5,5'-HxCB(PCB169)	150	47	27	5.0	300	64	16	190
Total PCDDs	280	170	130	42	2000	1300	210	8200
Total PCDFs	87	20	15	10	130	37	15	86
Total PCDD/PCDFs	370	190	140	53	2100	1300	220	8300
Total Non-ortho PCBs	300	96	62	20	510	190	59	740
Total Dioxins	670	290	210	73	2500	1500	280	9000
Total PCDDs-TEQ	17	4.8	3.8	1.3	27	16	5.1	35
Total PCDFs-TEQ	22	3.3	2.0	0.80	32	6.6	2.3	14
Total PCDDs/PCDFs-TEQ	38	8.1	5.7	2.2	41	22	7.4	50
Total Non-ortho PCBs-TEQ	19	5.2	3.2	0.65	27	13	2.6	58
Total TEQ	57	13	9.4	2.8	65	37	12	110

(ND: 定量下限値未満)

表4 未認定者(92名)の血液中2,3,4,7,8-PeCDF濃度(単位: pg/g-fat)の度数分布

濃度範囲		未認定者(人)
以上	未満	
95	100	1
45	95	0
40	45	1
35	40	0
30	35	2
25	30	0
20	25	3
15	20	4
10	15	16
5	10	19
0	5	46
人数計		92

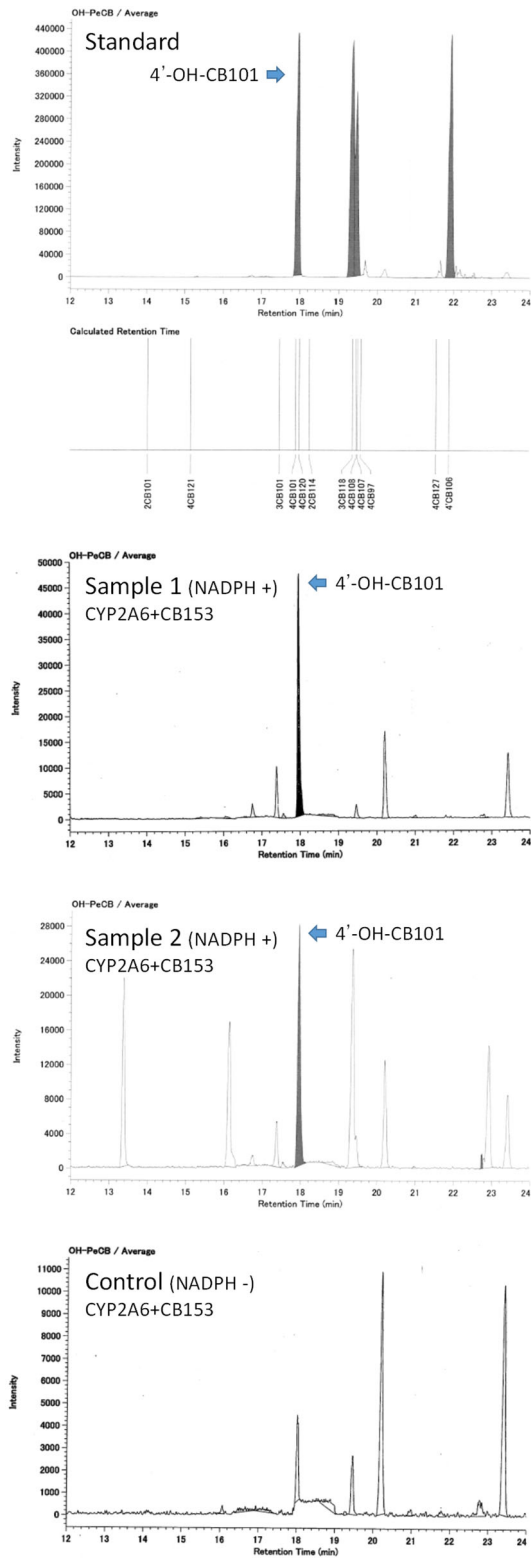


図3 ヒト CYP2A6-CB153 の *in vitro* 代謝試験において生成した 5 塩素化体代謝物の HRGC/HRMS 測定クロマトグラム

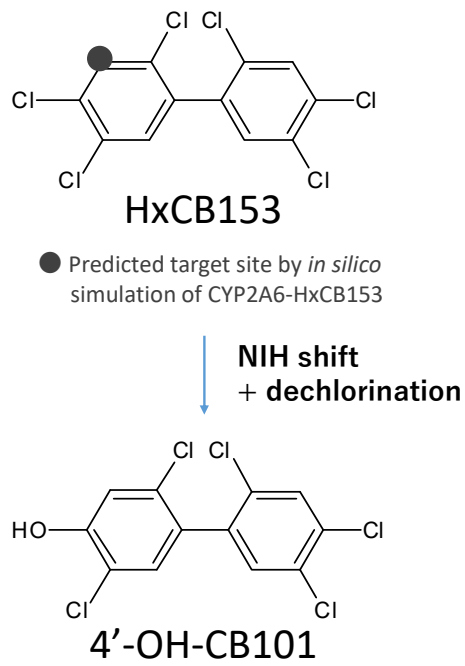


図4 *In vitro*代謝試験及び *in silico*解析から推測されたヒト CYP2A6 による CB153 の代謝経路