

宮城県における神経芽細胞腫マス・スクリーニング事業 — 18年間のまとめ —

Mass-screening for Neuroblastoma in Miyagi Prefecture — 18years —

菅原 直子 佐藤 由美 秋山 和夫
林 富*¹ 中村 潤*¹ 土屋 滋*²

Naoko SUGAWARA, Yumi SATO, Kazuo AKIYAMA
Yutaka HAYASHI, Megumi NAKAMURA, Shigeru TSUCHIYA

宮城県で行われた神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査事業について事業開始から終了まで約18年間の結果を6ヶ月児マス・スクリーニング（以下6MS）、1歳6ヶ月児マス・スクリーニング（以下18MS）それぞれについてまとめ、その結果を比較した。発見患児のBrodeur分類は、6MSでは72.5%が腫瘍の自然退縮が考えられるType1（予後良好群）に分類されたが、18MSでのType1の割合は57.1%と低く、18MSがより効果的なマス・スクリーニング（以下MS）であることが示唆された。しかし、この18年間において、MS陰性または未受検で発症したMS以外の発見例も29例確認され、これらの症例は発見時期が遅く、病期がⅢ、ⅣA、Brodeur分類がType3治療困難群のより重篤な症状を呈するものが多かった。

キーワード：神経芽細胞腫；マス・スクリーニング；Brodeur分類

Keywords：Neuroblastoma；Mass-screening；Classification of Brodeur

1 はじめに

小児がんの一種である神経芽細胞腫は、神経冠細胞由来の細胞から発生し、腫瘍細胞の多くはカテコールアミンを産生・分泌する。そのため、腫瘍が存在する場合、カテコールアミンの代謝産物であるバニルマンデル酸（VMA）、ホモバニリン酸（HVA）が尿中へ大量に排泄されることが多く、これらを指標とする神経芽細胞腫マス・スクリーニングが可能と考えられていた。

宮城県では1985年から、「宮城県神経芽細胞腫検査実施要綱」に基づき、6か月児を対象とした6ヶ月児神経芽細胞腫マス・スクリーニング事業（6MS）を開始し（1985～1991年までは全県在住児、1992年からは仙台市を除く県内在住児）本年度までに40名の患児を発見した。また、1992年5月からは6MS受検後に発症する症例の発見を目的とした、1歳6ヶ月児が対象のマス・スクリーニング事業（18MS）を開始し、2002年3月までの約10年間実施、この間7名の患児を発見した。

しかし、2003年7月に厚生労働省は、現行のマス・スクリーニングでは、神経芽細胞腫による死亡減少効果が明確でないこと、また、腫瘍が自然退縮する可能性のある症例を発見し、過剰診断等の不利益を受ける可能性が否定できないこと等を理由に2004年度からの集団検診の一時休止を通知、これを受け、宮城県においても2004年

* 1 東北大学大学院医学系小児腫瘍学分野

* 2 東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野

3月で事業を休止した。

今回、事業開始から終了までの約18年間の検査実施状況と結果をまとめ、考察を加えたので報告する。

2 マス・スクリーニング実施方法

2.1 対象

神経芽細胞腫マス・スクリーニングシステムを図1に示す。6MS及び18MSは、県内（仙台市を除く）に在住する6か月児及び1歳6か月児を対象とし、3、4か月と1歳6か月の健康診査時に、保健師が神経芽細胞腫マス・スクリーニングについて説明し採尿セット（ろ紙、封筒、説明書）を保護者に配布した。検体は6MSが生後6～7ヶ月となった時点、18MSが健康診査直後に保護者が採尿、郵送されたろ紙を検体とした。

2.2 検査方法

6MS、18MSともに既報のとおり測定した。¹⁾

判定はVMA、HVAそれぞれの測定値をクレアチニン値（尿濃度）に換算した値を使用し、カットオフ値は、平均値+2.5SDに設定した。6MSのカットオフ値はVMA 15.2 μg/mgCRE、HVA 24.1 μg/mgCRE。18MSのカットオフ値はVMA 13.5 μg/mgCRE、HVA 24.3 μg/mgCREとした。

VMA、HVAそれぞれの換算値がカットオフ値以上となった場合を異常高値とし、疑陽性や精密検査の基準とした。

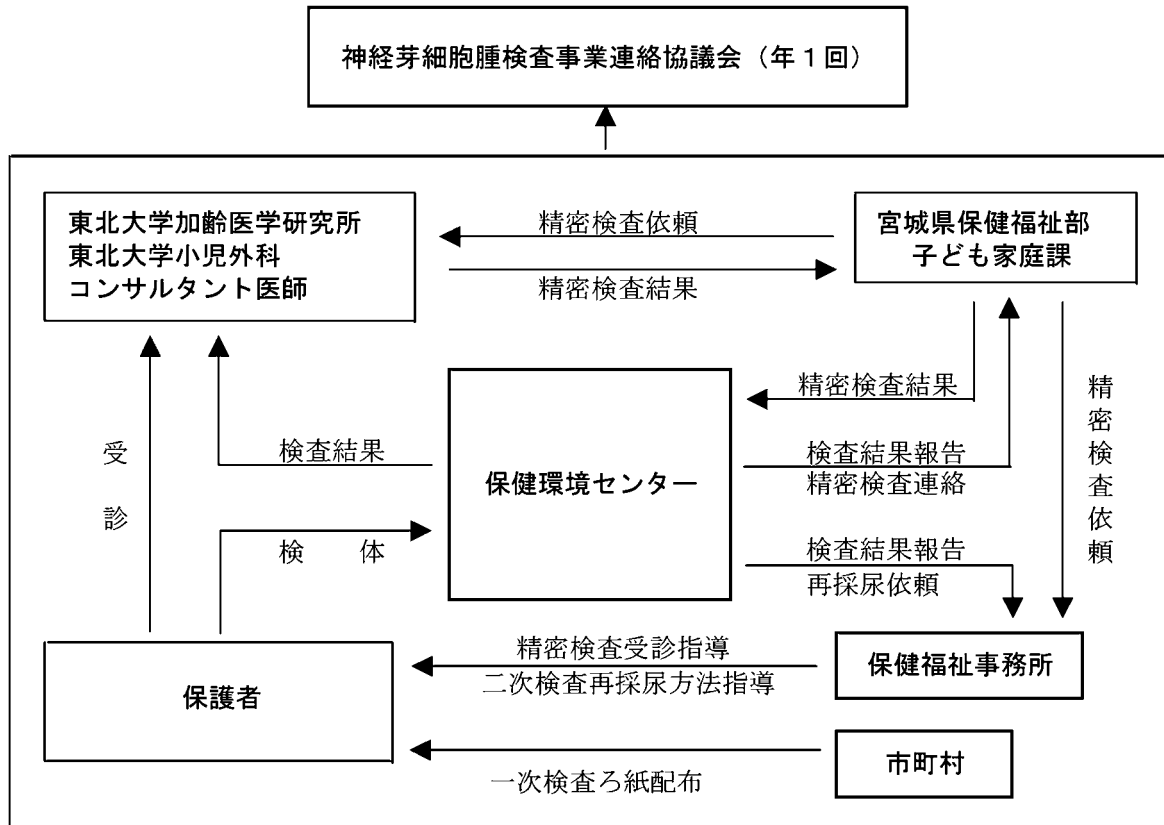


図1 検査事業システムフローチャート

3 結果および考察

3.1 マス・スクリーニング検査結果

表1に18年間の各年度毎の結果を示した。

対象児数は6MS、18MSともに受付期間6ヶ月前、1歳6ヶ月前の届出出生数、検査数は初回受付検体数、精密検査数は東北大学に精密検査を依頼した人数、患児数は精密検査数の中で患児と診断された人数である。

18年間の6MS対象児数は308,528人で255,846名が受検し、平均受検率は82.9%であり、そのうち、193名を対象に精密検査を行い、40名の患児を発見した。患児発見率は0.0156% (40/255,864)、陽性反応適中率は21.8% (40/193)であった。

また、約10年間実施した18MSの対象児数は121,853名で83,065名 (平均受検率は68.2%)が受検し、うち、32名の精密検査を行い、7名の患児を発見した。患児発見率は0.0084% (7/83,065)、陽性反応適中率は21.9% (7/32)で6MSと同程度であった。6MSに比べ18MSの平均受検率が約20%低い原因は、保護者が6MSの結果が陰性であったことに安心し、18MSへの関心が薄れたためと考えられた。

また、1988年に測定法を定性法のDip法から定量法の高速度液体クロマトグラフ法へ変更したことにより、検査精度が向上した結果、6MSと比較するとDip法では1/28,217人であったのに対し、HPLC導入後は1/5,247と患児発見率が上昇した。

3.2 マス・スクリーニング発見患児とBrodeur分類

神経芽細胞腫は病理学的・腫瘍生物学的および臨床的に著しい多様性を示し、様々な因子により予後が決定する²⁾と言われている。一般的な予後不良因子としては、腫瘍発生部位が副腎や後腹膜であること、N-myc遺伝子の増幅やDNAploidyがdiploidやtetraploidであること、また、日本小児外科学会の腫瘍の進行度に基づいた病期分類 (病期I、II、III、IVA、IVB、IVS:数字大が予後不良、ただし、IVSは予後良好) などがある。更に、これらを総合的に分類したBrodeur分類³⁾があり、Type1予後良好群 (自然退縮に向かうと思われるもの)、Type2治療有効群 (治療が必要で化学療法に反応するもの)、Type3治療困難群 (化学療法に反応し難いもの) に分類される。そこで、18年間に発見された6MSの40症例と18MSの7症例について、各々の予後因子や分類の比較を表2、表3に示した。

6MSで発見され死亡したNo.2症例はN-myc遺伝子の増幅が認められ、病期IVA、Brodeur分類Type3でいづれも予後不良または治療困難群であった。その他の症例からはN-myc遺伝子の増幅、Brodeur分類Type3は認められず、病期IIIでType2が8例、病期IVAでType2が1例、病期I、II、IVAでType1が29例であった。

また、6MS発見患児症例をBrodeur分類のみで見ると、Type1が72.5% (29症例)、Type2及びType3は併せて27.5% (11症例)であった。一方、18MSは、Type1が57.1%

表 1 宮城県（仙台市を除く）におけるマス・スクリーニング検査結果

年 度	6 か児マス・スクリーニング (6 MS)				1 歳6 か月児マス・スクリーニング (18MS)				検 査 法
	対象児数	検 査 数	精密検査数	患 児 数	対象児数	検 査 数	精密検査数	患 児 数	
1985 (10月～)	14, 539	9, 523	3	0					Dip法 (定性試験)
1986	27, 508	20, 961	10	1					
1987	27, 043	20, 931	4	0					
1988 (4～6月)	25, 733	5, 019	3	1					
1988 (7～3月)		15, 439	5	3					HPLC法 (定量試験)
1989	24, 341	21, 055	12	2					
1990	23, 650	20, 954	19	4					
1991	22, 901	20, 680	17	5					
1992	12, 920	11, 538	12	1	11, 791	7, 912	4	0	
1993	12, 334	11, 113	12	2	12, 928	9, 644	13	2	
1994	12, 447	10, 879	10	3	12, 362	8, 975	0	0	
1995	12, 474	10, 902	4	0	12, 451	8, 691	2	1	
1996	11, 906	10, 365	11	4	12, 476	8, 928	2	0	
1997	12, 192	10, 580	9	3	11, 906	8, 283	2	2	
1998	12, 053	10, 031	13	1	12, 192	8, 089	3	2	
1999	11, 879	9, 726	10	1	11, 997	7, 870	3	0	
2000	11, 865	9, 650	9	4	11, 892	7, 347	0	0	
2001	11, 758	9, 674	14	2	11, 858	7, 326	3	0	
2002	11, 672	9, 612	12	2					
2003	9, 313	7, 214	4	1					
計	308, 528	255, 846	193	40	121, 853	83, 065	32	7	

対 象 児 数：(6 か月児) 受付期間の6 か月前の届出出生数, (1 歳6 か月児) 受付期間の1 歳6 か月前の届出出生数
 検 査 数：その年度に初回検査を受けた数
 精密検査数：その年度に精密検査依頼となった数
 患 児 数：その年度に精密検査依頼となり, その中で患児と診断した数

表 2 6 MS発見症例

症例 No.	精検依頼時 年 齢	性別	部位	N-myc 増 幅	病 期	Brodeur 分 類	予後
1	0Y7M	男	副 腎	-	IVS	Type 1	生
2	0Y10M	男	副 腎	+	IVA	Type 3	死
3	0Y11M	男	後腹膜	-	III	Type 2	生
4	0Y8M	女	副 腎	-	II	Type 1	生
5	0Y10M	男	副 腎	-	I	Type 1	生
6	0Y8M	女	副 腎	-	II	Type 1	生
7	0Y7M	女	副 腎	-	IVS	Type 1	生
8	0Y7M	男	後腹膜	-	III	Type 2	生
9	0Y8M	女	後腹膜	-	III	Type 2	生
10	0Y7M	男	副 腎	-	I	Type 1	生
11	0Y7M	男	副 腎	-	I	Type 1	生
12	1Y0M	女	後腹膜	-	III	Type 2	生
13	0Y7M	男	骨盤腔	-	II	Type 1	生
14	0Y7M	男	骨盤腔	-	II	Type 1	生
15	0Y7M	女	副 腎	-	II	Type 1	生
16	1Y0M	女	骨盤腔	-	IVS	Type 1	生
17	0Y7M	女	後腹膜	-	II	Type 1	生
18	0Y8M	男	後腹膜	-	II	Type 1	生
19	0Y8M	女	副 腎	-	II	Type 1	生
20	0Y7M	男	副 腎	-	II	Type 1	生
21	1Y0M	男	縦 隔	-	II	Type 1	生
22	0Y10M	男	副 腎	-	II	Type 1	生
23	0Y7M	男	副 腎	-	I	Type 1	生
24	0Y7M	男	後腹膜	-	II	Type 1	生
25	0Y7M	女	副 腎	-	I	Type 1	生
26	0Y6M	男	後腹膜	-	III	Type 2	生
27	0Y7M	女	副 腎	-	II	Type 1	生
28	0Y8M	女	副 腎	-	IVA	Type 2	生
29	0Y6M	女	後腹膜	-	III	Type 2	生
30	0Y7M	男	副 腎	-	III	Type 2	生
31	0Y6M	男	後腹膜	-	I*	Type 1	生
32	0Y9M	男	副 腎	-	I	Type 1	生
33	0Y7M	男	副 腎	-	I*	Type 1	生
34	0Y7M	男	骨盤腔	-	I*	Type 1	生
35	0Y7M	男	副 腎	-	I*	Type 1	生
36	0Y7M	女	縦 隔	-	I*	Type 1	生
37	0Y8M	男	副 腎	-	I*	Type 1	生
38	0Y8M	男	副 腎	-	III	Type 2	生
39	0Y8M	男	副 腎	-	I*	Type 1	生
40	0Y8M	男	後腹膜	-	III	Type 2	生

*は無治療経過観察

表 3 18MS発見症例

症例 No.	精検依頼時 年 齢	性別	部位	N-myc 増 幅	病 期	Brodeur 分 類	予後
1	1Y8M	女	副 腎	-	III	Type 2	生
2	1Y9M	女	副 腎	-	II	Type 1	生
3	1Y9M	女	副 腎	-	III	Type 2	生
4	2Y5M	男	後腹膜	-	I	Type 1	生
5	1Y9M	女	後腹膜	-	III	Type 2	生
6	1Y7M	女	縦 隔	-	II	Type 1	生
7	1Y6M	女	縦 隔	-	I	Type 1	生

(3 症例) と予後良好群の割合が6 MSに比べ低かった。この結果は、腫瘍が自然退縮する可能性のあるType 1 の発見率が低く、過剰診断を避けるには6 MSよりも18MS の有効性が高いことが示唆された。

3.3 マス・スクリーニング以外での発症例

マス・スクリーニング実施期間中に東北大学加齢医学研究所及び東北大学小児外科にて、宮城県のマス・スクリーニング対象者にもかかわらず、6 MS, 18MS陰性判定後に発症またはMS未受検で発症し、発見された患児が29 例あった。これら29例の診断時年齢, 病期およびBrodeur 分類により整理した結果を図2に示した。

このうち、MS未受検例は8例、MSで陰性判定後、発症したのは21例であった。この21例の診断時年齢は1～7歳で平均が2歳6ヶ月であり、一般に予後不良例が多いとされる2歳以上⁴⁾で診断されていた。Brodeur分類も治療困難群のType 3が52.3% (11例)、病期もIII以上の進行例が多くを占め、MS発見例に比べより重篤な症状を呈していた。

また、29例中5例がVMA, HVAが尿中に大量排泄され

表4 MS以外での発見例

発見時 年齢 病期	0～	1歳～	2歳～	3歳～	4歳以上
I		△			
II		△*◎	◎		
III		△*△△●		◎	△*◎
IV A		●●	△*●●●●●	◎●	△*△●●
IV B			△*△*●	△*	
IV S					

(Brodeur分類) ○: Type 1 ◎: Type 2 ●: Type 3 △: 不明
*はMS未受験例

ないタイプの症例⁵⁾であったことから、重篤患児の早期発見とVMA、HVA非分泌型の症例の発見にはMS手法の再検討が必要であると考えられた。

4 ま と め

宮城県で行われた1985年10月から2004年3月までの18年間の6MS、18MS全対象児430,381名に対し患児47名を発見した。宮城県独自の事業として実施した18MSの結果は、全国で行われていた6MSよりType 2治療有効群の発見率が高く、これは、過剰診断を避ける意味で18MSは6MSに比べ、より有効なMSであることが示唆された。また、

この期間中MS以外で発見された症例が29例あり、VMA、HVA非分泌型のものが5例、平均診断年齢が2歳6ヶ月、Type 2以上が多くを占め、且つMS発見例に比べより重篤な症状を呈していた。一般に2歳以上の発症は予後不良の例が多いとされており、この重症例の早期発見のためのスクリーニング手法の検討が課題であると考えられた。

以上の成績は、今回の集団検診休止の条件となっているMS実施時期の検討やスクリーニング手法の開発や評価を行う上で、有用な情報の一つと考えられ、その活用が望まれる。

参 考 文 献

- 1) 佐藤由美, 菊地奈穂子, 沖村容子, 秋山和夫: 宮城県保健環境センター年報, 21, 119 (2003).
- 2) 西平浩一: 医学のあゆみ, 177, 534 (1996).
- 3) Brodeur GM, Nakagawara A: *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 14, 111 (1992).
- 4) 澤田淳: “神経芽細胞腫マス・スクリーニング精度管理”, p.10 (1994) (社会福祉法人 恩賜財団母子愛育会).
- 5) 沢田淳: 医学のあゆみ, 155, 59 (1990).

日常食品中の残留農薬実態調査

Survey of Pesticide Residues in Daily Foods

長船 達也* 氏家 愛子 佐藤 信俊

Tatsuya OSAFUNE, Aiko UJIIE, Nobutoshi SATO

マーケットバスケット方式により購入した13の食品群を対象とし残留農薬の実態調査を行った結果、多数の農薬が検出されたが、その一日摂取量はADIと比較して十分に低いレベルであった。しかし、日本では使用法として認められていないポストハーベスト処理による農薬の残留や残留基準の設定のない家畜飼料からの汚染が認められた。

キーワード：残留農薬；GC/MS；ポストハーベスト；一日摂取量

Keywords：Pesticide Residue；GC/MS；Postharvest；Daily Intake

1 はじめに

食品表示の偽装事件、無認可添加物の使用、輸入された生鮮・冷凍野菜の残留農薬問題、無登録農薬の販売及び使用など健康を脅かす問題が相次ぎ浮上する昨今、消費者の「食の安全性」に対する関心が高まってきた。この食の安全性を確保し、健康被害の発生を未然に防ぐためには、農薬・重金属・PCB等の汚染物質のモニタリングは欠かせないものであるが、従来行っているような食品個別の検査では労力的に限界があり、その汚染実態を的確に把握することは困難である。

そこで当部では、消費者が日常の食事を介してどの程度の汚染物質を摂取しているのかを把握するため、13の食品群から代表的食材をマーケットバスケット方式に基づき購入し、汚染状況の実態調査を行ってきた。ここでは、残留農薬汚染についてターゲットを絞り、その調査結果を報告する。

2 方 法

2.1 調査対象試料

厚生労働省国民栄養調査¹⁾に基づき分類した13の食品

群うち、本県及び他県²⁻⁴⁾の過去データを勘案した結果、農薬残留の可能性の低いIV（油脂）、IX（調味料・酒・ドリンク類）群を除く食品群の調理後試料各4ヶ年分（平成11～14年度）を対象とした（表1）。

2.2 調査対象農薬

GC/MS分析対象である92農薬（殺虫剤50種類、殺菌剤20種類、除草剤18種類、殺ダニ剤3種類、成長調整剤1種類）とした（表2）。

2.3 調査方法

ルーチンの方法に改良を加え、以下の3つの方法で前処理をした後、GC/MSで定性・定量を行った。また同時に農薬標準の添加回収試験を行い抽出効率についても評価を行った。

① I・VI・VII・VIII群：

試料10g（水分のないものには精製水半量添加）→アセトニトリル抽出・塩析→脱水→濃縮→SAX/PSAカラム精製→濃縮→アセトン1ml定容→GC/MS分析

② II・III・V・XI・XII群：

アセトニトリル抽出・濃縮後に脱脂工程（ヘキサン／

表1 調査対象試料一覧

群	食品群名	具 体 例
I	米 類	精白米、切り餅
II	雑穀・芋類	小麦粉、パン、うどん、そうめん、即席めん、ポップコーン、アーモンド、さつまいも、じゃがいも、ながいも、こんにゃく、ポテトチップ
III	砂糖・菓子	砂糖、ジャム、あめ、あられ、羊羹、かりんとう、クラッカー、ビスケット、シュークリーム、ケーキ、ワッフル、チョコレート
V	豆・豆加工品	みそ、豆腐、凍り豆腐、おから、油揚げ、小豆
VI	果 実	みかん、りんご、いちご、干し柿、洋なし、バナナ、メロン、りんごジュース、ぶどうジュース
VII	有色野菜類	にんじん、ほうれん草、かぼちゃ、春菊、トマト、ピーマン、アスパラガス
VIII	野菜・海藻類	玉ねぎ、白菜、なす、きゅうり、もやし、大根、かぶ、しめじ、キャベツ、ブロッコリー、漬け物、のり、わかめ
X	魚 介 類	まぐろ、さんま、あじ、いか、うなぎ、海老、鮭、鯛、あさり、かまぼこ
XI	肉 ・ 卵 類	牛肉、豚肉、鶏肉、鰻肉、鴨肉、卵、ハム
XII	乳 ・ 乳 製 品	牛乳、チーズ、ヨーグルト、生クリーム
XIII	加 工 食 品	カレールー、酢

* 現 食と暮らしの安全推進課

表2 調査対象農薬一覧

用 途	農 薬 名
殺 虫 剤	BHC, DDT, EPN, アクリナトリン, アセタミプリド, アセフェート, アミトラズ, アルドリシ, イソフエンホス, エトプロホス, エトリムホス, エンドリン, カズホス, キナルホス, キノメチチアゾール, クロルピリホス, クロルフェナピル, クロルフェンピホス, ジクロルボス, シハロトリン, シフルトリン, シベルメトリン, ジメトエート, ダイアジノン, チオメトリン, デイルトリン, テフルトリン, デルタメトリン, パラチオン, パラチオンメチル, ピフェントリン, ピラクロホス, ピリダベン, ピリプロキシフェン, ピリミホス, メチル, ビレトリン, フェニトロチオン, フェンソルホチオン, フェンチオン, フェントエート, フェンバシレート, フルシトリン, フルバリネート, プロチオホス, プロホキシル, ベルメトリン, ホスチアゼート, ホスメット, マラチオン, メタミドホス
	イソプロチオラン, エディフェンホス, キャプタン, クロロタロニル, ジクロラルアニド, シプロナゾール, テブコナゾール, トリアジメゾール, トルクロホスメチル, ビテラタノール, ビリフェノックス, ビロキロン, フェナリセル, フルジオキソニル, フルシラゾール, フルトラニル, フロベナゾール, ミクロブタニル, メタラキシル, メブロニル
殺 菌 剤	イソプロチオラン, エディフェンホス, キャプタン, クロロタロニル, ジクロラルアニド, シプロナゾール, テブコナゾール, トリアジメゾール, トルクロホスメチル, ビテラタノール, ビリフェノックス, ビロキロン, フェナリセル, フルジオキソニル, フルシラゾール, フルトラニル, フロベナゾール, ミクロブタニル, メタラキシル, メブロニル
除 草 剤	EPTC, アラクロール, エスプロカルブ, クロルプロファム, シメトリン, チオベンカルブ, トリフルリン, ビフェノックス, ビリチカルブ, ブタクロール, ブタミホス, プレチラクロール, ベンチメタリン, メトラクロール, メトリブジン, メフェナセット, モリネート, レナシル
殺ダニ剤	クロルベンジレート, ジコホール, テブフェンピラド
成長調整剤	バクロブトラゾール

ヘキサン飽和アセトニトリル分液)を追加。以下同様の操作。

③ X・XIII群:

上記の方法に更なる脱脂工程(脱脂後の飽和アセトニトリル層を10%食塩水で分液)を追加。以下同様の操作。
なお、GC/MS分析条件を(表3)に示す。

3 結果及び考察

3.1 残留農薬検出結果

検出された農薬数は、農産物の群を上回りⅢ群が最高で12種類であった。また動物性食品群であるX・XI・XII群からも2~6種類の農薬が検出された。なお、検出された農薬を下記の一覧表に示す(表4)。

① Ⅲ群(砂糖・菓子)とXIII群(加工食品)とで検出農薬に同様の傾向があったため、共通の原材料から推測して、Ⅲ群中のビスケットやクラッカーまたはXIII群中のカレールーなどに使用される小麦に由来するものと

考えた。

② X群から(魚介類)検出された農薬は、比較的安定で生物濃縮係数も高いため、汚染土壌から海への流入により、食物連鎖を介し魚類に蓄積されたものであると考えた。

③ XI(肉類)及びXII群(乳・乳製品)で検出された農薬は、家畜飼料経路であることが疑われたため、更に再調査を行うこととした。

3.2 家畜飼料調査結果

XI及びXII群で検出された農薬は、家畜飼料(トウモロコシ・大豆皮・ふすま・配合飼料)を調査した結果、XII群で検出された農薬を含む8種類の農薬が検出され、飼料経路で肉に蓄積または乳に移行したものであることが示唆された。なお予備試験を含め(データ掲載せず)、牛乳の全検体(十数検体)から検出されたマラチオンは、ふすまで高濃度に検出された(表5)。

表3 GC/MS分析条件

カラム: HP-5MS
0.32mm i.d. × 30m (膜厚0.25 μm)
昇温条件: 60°C(2min)→20°C/min→180°C(2min) →4°C/min→230°C→10°C/min→300°C(10min)
試料注入法: スプリットレス
試料注入量: 2 μl
注入口温度: 180°C
インターフェイス温度: 300°C
検出法: SIM

表5 飼料からの検出農薬 (μg/g)

No.	農薬名	用途	トウモロコシ	大豆皮	ふすま	配合	定量下限値
1	p,p'-DDE	殺虫剤			*		0.005
2	ピリミホスメチル	殺虫剤	*	*		0.01	0.01
3	フェニトロチオン (MEP)	殺虫剤			*		0.01
4	フェンチオン (MPP)	殺虫剤			*		0.01
5	マラチオン	殺虫剤	0.02	*	0.23		0.01
6	トルクロホスメチル	殺虫剤			*		0.02
7	フルシラゾール	殺虫剤		*	*		0.01
8	トリフルラリン	殺虫剤	*		*		0.005

注1: *は、定量下限値未満であるが、検出されたもの
注2: 〇はXI, XII群で検出された農薬

表4 検出農薬一覧 (μg/g)

No.	農薬名	用途	I	II	III	V	VI	VII	VIII	X	XI	XII	XIII	定量下限値
1	o,p'-DDT	殺虫剤								◎				0.005
	p,p'-DDD	殺虫剤			○					◎				0.005
	p,p'-DDE	殺虫剤			◎					◎	◎	◎		0.005
	p,p'-DDT	殺虫剤								○				0.005
2	クロルピリホス	殺虫剤			○									0.005
3	クロルフェナピル	殺虫剤					○							0.02
4	クロルフェンビンホス	殺虫剤			△									0.0025
5	ダイアジノン	殺虫剤						△						0.01
6	テフルトリン	殺虫剤						△						0.005
7	ピリダベン	殺虫剤						△						0.04
8	ピリミホスメチル	殺虫剤			○						△		◎	0.01
9	フェニトロチオン (MEP)	殺虫剤			◎								○	0.01
10	フェンスルホチオン	殺虫剤			○						○			0.02
11	フェンバレレート	殺虫剤					△							0.01
12	プロチオホス	殺虫剤					◎							0.01
13	マラチオン	殺虫剤			◎			△				◎	◎	0.01
14	トルクロホスメチル	殺菌剤	△	○	○		△				○	○		0.02
15	フルジオキシソニル	殺菌剤				○								0.01
16	フルシラゾール	殺菌剤											◎	0.01
17	ミクロブタニル	殺菌剤			△			△						0.02
18	メタラキシル	殺菌剤						△	△					0.01
19	メプロニル	殺菌剤						△						0.05
20	EPTC	除草剤							△					0.01
21	クロルプロファミ	除草剤		○										0.001
22	トリフルラリン	除草剤		△	△		△	△	△	○	△	○		0.005
23	ジコホール (ケルセン)	殺ダニ剤		△	○	○						△	△	0.01
24	テブフェンピラド	殺ダニ剤		○	○		△				△			0.02

◎: 全年度で検出 ○: 2または3ケ年で検出 △: いずれか1ケ年で検出

3.3 食品群別の農薬含有濃度

食品群別の農薬含有濃度について調査した結果、VI群が最も高い値を示した。これは、VI群が果実類であるため、試料調製の際に全く調理を行わなかったことが一つの要因であると考えた。

一方で、加工度合いの高いIII及びVIII群の農薬含有濃度が、野菜類であるVII及びVIII群を上回る結果となった。これは原材料として用いた小麦由来のポストハーベスト(収穫後)農薬による影響が疑われた(図1)。

3.4 ポストハーベスト農薬の含有濃度

検出された農薬のうち、海外でポストハーベストとしても使用されるもの⁵⁾をピックアップした。ここでII群(雑穀・芋類)で検出されたクロルプロファムは、ジャガイモの貯蔵に使用されるポストハーベスト農薬であるが、調査試料に用いた芋類はすべて国産品であるため、通常の収穫前使用による残留とみなした。

一方、III及びVIII群では予期したとおり、ポストハーベスト農薬汚染の影響が示唆された(図2)。

3.5 農薬一日摂取量の食品群別割合

食品群別の農薬含有濃度に食品群ごとの一日摂取量をかけて農薬摂取量を算出した結果、人一日の農薬摂取量

は6.2 μg であった。また食品群別の農薬摂取割合は、VI群で最高の27.7%、以下II、V、VIII群でそれぞれ15%程度であった(図3)。

3.6 農薬別一日摂取量及びADI比較

検出された農薬ごとの体重当たり(日本人の平均体重を50kgとして計算)の一日摂取量を算出し、それぞれの農薬のADI(一日摂取許容量)とを比較した結果、対ADI比の最高はプロチオホスの1.7%、続いてフェンスルフォチオンの1.1%で、その他はすべて1%未満であった(図4)。

4 ま と め

- (1) 今回検出された農薬の一日摂取量は、いずれもADIの数%以下であり、健康上問題のないレベルであった。しかし、加工度合いの高いIII(菓子)及びVIII(加工食品)群に野菜類を上回る濃度の農薬が検出された。また、XI(肉類)及びXII(乳・乳製品)群に間接的な農薬汚染が見受けられた。
- (2) III及びVIII群で検出された農薬は、共通の原材料である小麦に由来するものと推定した。現在、日本の小麦自給率は低く、90%程度を輸入に頼っているため⁶⁾(輸

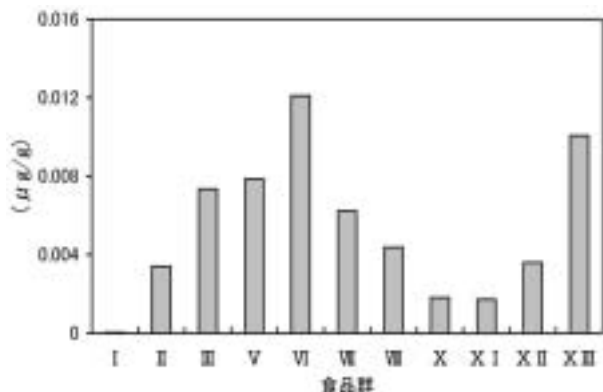


図1 食品群別農薬含有濃度(平成11~14年度平均)

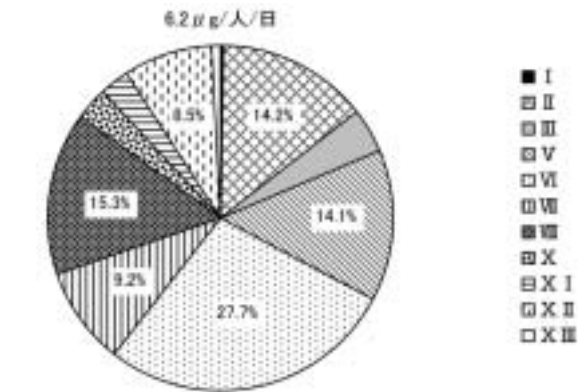


図3 農薬一日摂取量群別割合(平成11~14年度平均)

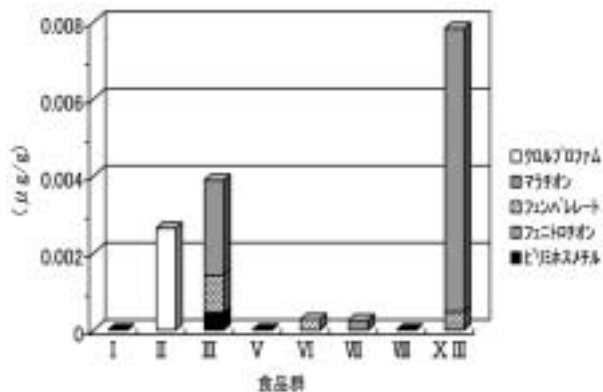


図2 ポストハーベスト農薬含有濃度(平成11~14年度平均)

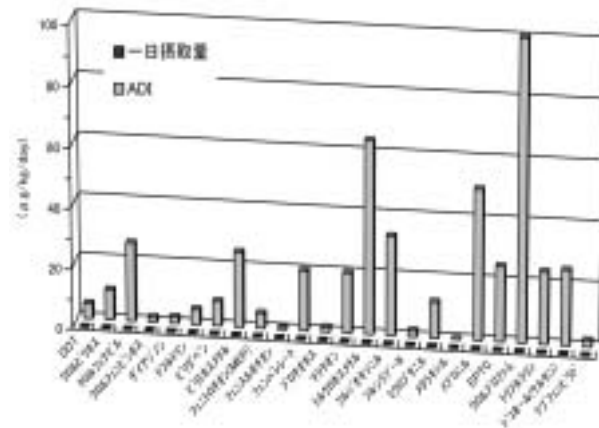


図4 農薬別摂取量とADI比較(平成11~14年度平均)

入内訳:米国52%, カナダ27%, オーストラリア21%), 原産国の倉庫での貯蔵あるいは輸送段階でポストハーベストとして使用された農薬の残留が主に影響しているものと考えた。

なお小麦は、II群の食材(小麦粉やパンなど)においても使用されているが、II群にポストハーベストの影響は見られなかった。その違いの要因として、原材料として使用される小麦の精製度が異なることによるものと推測した。

- (3) XI及びXII群で検出された農薬は、家畜(牛)の飼料を調査した結果、飼料経路で肉に蓄積または乳に移行したものであることを確認した。
- (4) 日本では、一部の燻煙剤を除き、使用法として認められていないポストハーベスト処理による農薬の残留や残留基準の設定がない家畜飼料からの汚染など、農薬の使用実態についての留意が必要である。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省：“平成12年度国民栄養調査”，(2002)。
- 2) 保坂久義，福島悦子，長谷川康行，佐伯政信：千葉衛研報告，15，34 (1991)。
- 3) 保坂久義，長谷川康行，鈴木尚，佐伯政信：千葉衛研報告，18，17 (1994)。
- 4) 長谷川康行，保坂久義，遠藤幸男，佐伯政信：千葉衛研報告，21，13 (1997)。
- 5) 東京都生活文化局消費生活部：“収穫後使用の農薬に関する調査(その2)”，
http://www.anzen.metro.tokyo.jp/pdf/report_102.pdf。
- 6) 帝国書院：“小麦の生産トップ10と日本の輸入先”，
http://www.teikokushoin.co.jp/11_toukei/world/top.html

遺伝子組換え食品検知法の検討（第2報）

A Study of Detection Method of Recombinant DNA in Genetically Modified Foods (II)

曽根 美千代 高橋 紀世子 佐藤 信俊

Michiyo SONE, Kiseko TAKAHASHI, Nobutoshi SATO

遺伝子組換え大豆の定量PCR測定におけるポリエチレングリコール処理は、短鎖長域のDNAを除去し、内在性遺伝子及び組換え遺伝子のコピー数を十分に確保できる有効な方法であることがわかった。定性PCR検査で陽性とされた豆腐及び大豆の遺伝子組換え体混入率は、非意図的混入として許容される5%を超えるものは無く、分別生産流通管理が正しく行なわれていることがわかった。

キーワード：遺伝子組換え食品；定量PCR；PEG処理

Keywords : Genetically Modified Foods ; Quantitative PCR ; PEG treatment

1 はじめに

平成13年4月より、食品衛生法上安全性未審査の遺伝子組換え食品及びこれを用いた食品の輸入・販売が禁止され、安全性審査済みの5品目（大豆、とうもろこし、じゃがいも、菜種、綿実）については食品への表示が義務づけられている。また、これら安全性審査済みのものについては、分別生産流通管理されていれば混入率5%以下のものについては非意図的混入として許容することとされている。したがって、これら組換え遺伝子の定性試験で陽性となった場合、分別生産流通管理されていたかを確認すると共に、定量試験で混入率を測定し基準以下であることを確認する必要がある。

一方、DNAの抽出はこれまで検討してきたシリカゲル膜法（DNeasy plant mini kit）が大豆抽出において公定法から除外されたため¹⁾他の方法に切替える必要が生じた。しかし、CTAB法による抽出では内在性遺伝子のコピー数が十分得られない場合があり、精度上の問題が生じた。

以上のことから、DNAの抽出・精製と定量PCRの精度等について検討すると共に、これまで実施した定性検査で陽性となった試料の定量検査を実施したので報告する。

2 分析試料および試薬・機器

2.1 試料

ラウンドアップレディ大豆混入大豆粉末（以下GMO大豆）4件、豆腐9件、輸入大豆（分別流通管理されたもの）4件、国産大豆1件、昨年度定性PCR陽性DNA抽出液（豆腐及び大豆粉末）9件合計27件を検査対象とした。

2.2 試薬

（抽出用）

- ・CTAB 分子生物学用
- ・DNeasy plant mini kit (Quiagen)
- ・その他試薬特級 (PEG処理用)
- ・ポリエチレングリコール8000 (シグマ社)
- ・その他試薬特級 (定量PCR用)
- ・TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- ・大豆プライマー & プローブ：内在性遺伝子用：Le1-n02&Le1-Taq, 組換え遺伝子用：RRS-01&RRS-Taq (各々ニッポンジーン)
- ・検量線用標準液：GM大豆 (RRS) プラスミドセット (ニッポンジーン)
- （電気泳動用）
- ・アガロースS, エチジウムブロミド溶液 (各々ニッポンジーン)
- ・DNAマーカー：λ-Hind III (BioLabs), 50 Ladder (インビトロジェン)
- ・その他試薬特級

2.3 機器

- ・定量PCR装置：ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems)
- ・電気泳動装置：Mupid-21 (アドバンス)

3 方法

3.1 試料からのDNA抽出

試料からのDNA抽出は、当初シリカゲル膜法（DNeasy

plant mini kit) を用いたが、平成15年11月の厚生労働省通知¹⁾以降はCTAB法を用いた。告示法によるCTAB法では、フェノール・クロロホルム抽出時の中間層が多く分取する上清が十分得られなかったため、松岡ら²⁾の方法と平成13年度厚生科学研究³⁾の方法をもとに平成14年度に著者らが改良したCTAB法⁴⁾で行なった。

平成14年度定性PCR検査で陽性だったDNA抽出液(豆腐及び大豆粉末)については、公定法に準じイソプロパノールを用いDNAを沈殿させ、70%エタノール溶液でリンスし、乾燥後TE溶液に溶解し、定量PCR試験用とした。

3.2 定量PCR

大豆の内在性遺伝子及び組換え遺伝子の対象プライマー対及びプローブは公定法に準じた。TaqMan Chemistryを応用した定量PCRを公定法のプロトコルに従いABI PRISM 7900HTで実施した(図1)。なお、遺伝子組換え体の混入率は、下記の式により求めた。

$$\text{遺伝子組換え体混入率(\%)} = \frac{\text{組換え遺伝子のコピー数}}{\text{内在性遺伝子のコピー数}} \times \frac{1}{\text{内標比}} \times 100$$

3.3 電気泳動

抽出したDNA液について、平成14年度と同様に0.8%アガロースゲルを用い、50V定電圧電気泳動を行いDNAパターンを確認した⁵⁾。DNAマーカーはλ-Hind III (BioLabs)を用いた。

3.4 PEG処理によるDNAの再精製

CTAB法で抽出したDNA液の短鎖長域のDNA断片と残存するRNAを除去するためポリエチレングリコール(以下PEG)によるDNAの再精製⁶⁾を行なった。すなわち、抽出したDNA溶液に等量のPEG溶液(1.6M NaCl含有)を加え、4℃で1時間放置しDNAを共沈させる。その後4℃で15,000rpm、20分冷却遠心しDNAをペレット状に沈殿させ、70%エタノールでリンスし、上清除去後乾燥させTE溶液に溶解し、DNA再精製液とした(図2)。

4 結果及び考察

4.1 内在性遺伝子のコピー数と検出下限

検出下限値を0.1%とした場合、組換え遺伝子のコピー

数を検量線作成に使用する標準プラスミド液の下限値の20コピーとすると、理論上内在性遺伝子は20,000コピー必要となる⁷⁾。しかし、実際には数10コピーとなることがあり、この場合、検出下限値を上げることになり、精度上問題が生じる。特に二度挽きした大豆及び凍結した検体において激減した。

また、定量PCRではDNA濃度を20ng/μlに調整するが、CTAB法によるDNA抽出液では抽出量が多い検体で測定された内在性遺伝子のコピー数が低くなる傾向が見られた。

したがって、安定した検査結果を得るためには内在性遺伝子のコピー数を高める必要がある。

4.2 DNA抽出液の鎖長とPEG処理

これらのDNA抽出液について電気泳動を行うと長鎖長域側のバンドだけでなく短鎖長域側にもスメア上のバンドが見られた(図4のPEG処理前の電気泳動像)。これらは壊れたDNA断片や残存するRNAと考えられた。この短鎖長域のDNA断片と残存するRNAの混入を防ぐためシーケンス用のプラスミド精製に用いられるPEG処理⁶⁾を用いDNAの再精製を試みた。

PEGはDNAの水和水を奪うことでDNA分子の凝集を促進し沈殿させる。また、RNAはDNAに比べリボース2位の水酸基分だけ親水性が高いため凝集されずに除去されると考えられている⁶⁾。

図3にDNAマーカーの50ラダーを試料としてPEGの濃度を変えてPEG処理を行ったDNA液の電気泳動像を示す。第1レーンのDNAマーカーに対して第2レーンのPEG13%濃度では500bp以下の小さい短鎖長域のDNAが、第3、第4レーンのPEG10%及び8.7%濃度では800bp以下のDNAが除去されていることがわかる。ラウンドアップレディー大豆の内在性遺伝子(Le1-n02)のDNA増幅長は118bp、組換え遺伝子(RRS-01)のDNA増幅長は121bpであり、これ以下の短鎖長域のDNAはPCRによる増幅には直接関係しない。

また、試料の前処理や抽出によりDNAの切断部位が様々であると推測されるので、ターゲットとなる増幅鎖長域を確保するにはある程度以上の長さが必要である。豆腐のDNAはおよそ500bp以上の鎖長域であったことが

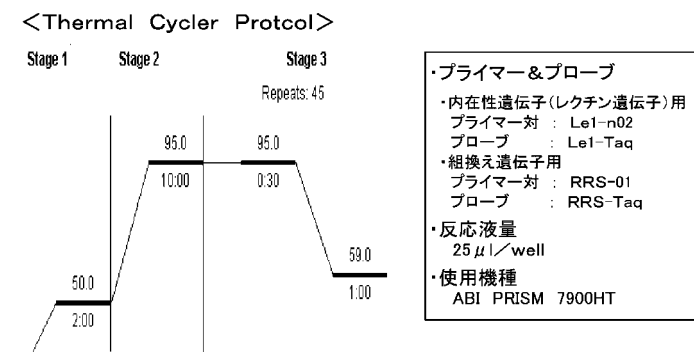


図1 定量PCR条件

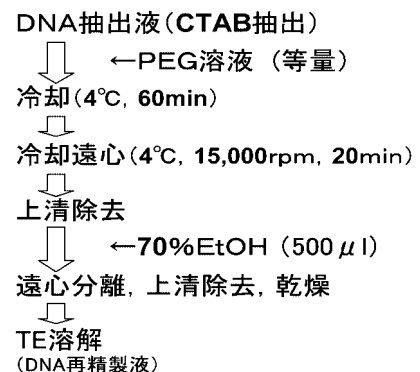


図2 PEG処理

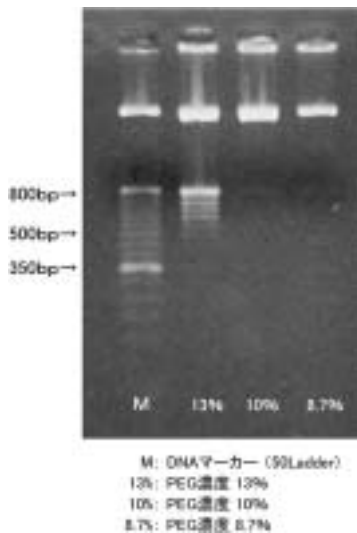


図3 PEG処理後のDNA

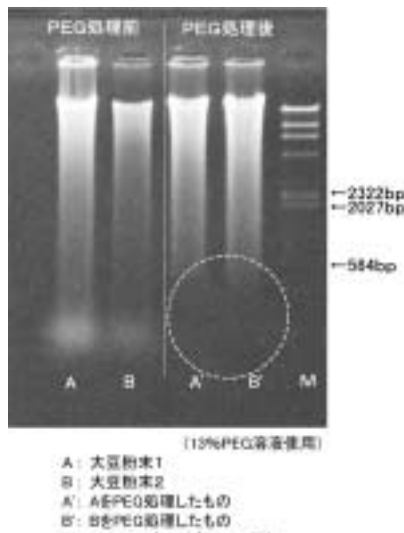


図4 PEG処理前後の電気泳動像

表1 PEG処理前後の内在性遺伝子のコピー数の変化

No.	前	後	試料
1	16580	112719	GMO大豆50mg
2	18462	87559	GMO大豆50mg
3	19325	78611	GMO大豆50mg
4	1513	83864	GMO大豆100mg
5	137	87416	GMO大豆100mg
6	465	78818	GMO大豆100mg
7	58	87482	GMO大豆100mg
8	40	69006	GMO大豆100mg
9	77	110827	GMO大豆100mg
10	38	151252	GMO大豆100mg
11	67	79197	原材料大豆100mg
12	8013	93300	原材料大豆100mg
13	63	83605	原材料大豆100mg
14	6384	49914	豆腐200mg
15	987	46523	豆腐200mg
16	539	27571	豆腐200mg
17	292	33890	豆腐200mg
18	661	33742	豆腐200mg
19	1071	61978	豆腐200mg
20	2077	28564	豆腐200mg
21	180	53638	豆腐200mg
22	472	36939	豆腐200mg

表2 GMO大豆による繰返し試験

GMO混入率(%)	組換え遺伝子コピー数	内在性遺伝子コピー数	測定値(%)				相対値	H13年度厚生科学研究報告(%)
			AVE	SD	C.V%	n		
5.0	4049	83071	4.69	0.51	11	8	0.94	5.01±1.00
1.0	936	93971	1.03	0.43	42	6	1.03	1.14±0.41
0.5	378	83249	0.44	0.09	21	8	0.88	0.63±0.30
0.1	72	84558	0.08			1	0.82	

ら、500bp以下の短鎖長域のDNA断片を除去できる13%濃度のPEG溶液を用いることにした。

4.3 PEG処理による定量PCRへの影響

図4に大豆のPEG処理前後のDNA抽出液の電気泳動像、表1にPEG処理前後の定量PCRによる内在性遺伝子のコピー数の変化を示す。図4の電気泳動像ではおよそ500bpより小さい短鎖長域側DNAが除去されていることがわかる。また、表1ではPEG処理により内在性遺伝子のコピー数が大幅に改善され、大豆で70,000~150,000コピー、豆腐で30,000~60,000コピーまで増加し、PCRの増幅が効率よく行なわれていることがわかる。

4.4 混入率既知試料による繰返し精度

表2に平成13年度厚生科学研究で配布された混入率既知のGMO大豆を用いた定量PCRの繰返し試験の結果を示す。いずれもCTAB法で抽出されたDNA液をPEG処理し、定量PCRを実施したものである。内在性遺伝子のコピー数が90,000コピー前後まで増加し、0.1%混入試料の組換え遺伝子のコピー数も72コピーとなり20コピーを超えている。測定した混入率も表示値に近似し、表示値に対する相対値は0.82~1.03となり、低濃度域でも良好な結果であった。また、C.V.%は11~42%で、低濃度試料で大きくなる傾向が見られたが、同一試料を用いたH13年度厚生科学研究報告³⁾の結果とほぼ同様であった。このようにPEG処理によるDNAの再精製は、CTAB法

で抽出される短鎖長域のDNA断片や残存するRNAを除去し、ターゲット域のDNAを確保するのに有効と考えられた。

4.5 実態調査

過去2年間の定性PCR検査で陽性だった豆腐検体と原材料の大豆について定量PCRを実施した結果を表3、表4に示す。

定性PCR検査陽性だった豆腐検体の遺伝子組換え体混入率は0~0.38%であり、その原材料の大豆についての遺伝子組換え体混入率も0~0.48%であった。義務表示となる5%を超えるものは無く、全て意図しない混入として許容される範囲内であり、分別生産流通管理が正しく行なわれていることが示唆された。

表3の豆腐9は、定性検査で陽性であったが、定量PCRでは組換え遺伝子のコピー数が1コピーと20コピー未満であることから不検出とした。一方、原材料大豆は表4に示すように2種類の大豆(大豆5,6)を使用しており、カナダ産の大豆6から組換え体が微量に検出された。したがってこの違いは、試料のバラツキや定性検査と定量検査の感度の差によるものと考えられる。

また、国産大豆使用と明記されていた豆腐11から組換え遺伝子RRSが検出され、原材料の大豆7からは検出されなかった事例があったが、その後の調査によりこれは、作業工程で外国産大豆と国産大豆の製品切換え時に十分

表3 遺伝子組換え食品定量結果①(豆腐)

(抽出:CTAB法)

No.	定性PCR結果	組換え遺伝子コピー数	内在性遺伝子コピー数	遺伝子組換え体混入率(%)	表 示
豆腐1	+	51	29638	0.16	非遺伝子組換え
豆腐2	+	34	32505	0.10	非遺伝子組換え
豆腐3	+	111	29975	0.35	非遺伝子組換え
豆腐4	+	32	28897	0.11	非遺伝子組換え(100%)
豆腐5	+	35	32935	0.10	非遺伝子組換え
豆腐6	+	68	26161	0.25	非遺伝子組換え
豆腐7	+	33	43916	0.07	
豆腐8	+	84	34263	0.23	非遺伝子組換え
豆腐9	+	1	67566	0.00	非遺伝子組換え
豆腐10	+	130	33065	0.38	非遺伝子組換え
豆腐11	+	46	18426	0.24	非遺伝子組換え 国産大豆使用
豆腐12	+	106	52286	0.20	非遺伝子組換え

表4 遺伝子組換え食品定量結果②(原材料大豆)

No.	組換え遺伝子コピー数	内在性遺伝子コピー数	遺伝子組換え体混入率(%)	原産地	対応する豆腐検体	抽出法
大豆1	115	102075	0.11	アメリカ	No.3	DNeasy plant mini kit法
大豆2	115	97122	0.11			
大豆3	438	95344	0.44		No.4	
大豆4	192	38440	0.48			
大豆5	0	93300	0.00	中国	No.9	CTAB法+PEG処理
大豆6	43	83605	0.05	カナダ		
大豆7	0	79197	0.00	日本		

な洗浄をしないまま同じ機械を使用したことによる製造ラインでのコンタミによるものであることがわかった。このように加工品の場合、原材料大豆の流通過程だけでなく製造工程による組換え体の混入もあり得るため製造業者への十分な指導が必要だと思われる。

5 ま と め

- 1) CTAB法ではDNA抽出量が多いが、定量PCRを実施するためにはDNAの再精製が必要であると思われる。
- 2) PEG処理後の定量PCR検査では、各々の遺伝子のコピー数が増加し、GMO混入大豆の測定値も表示値に近似し、相対値も0.82~1.03であった。PEG処理によるDNA再精製は、CTAB法で抽出される短鎖長域のDNA断片や残存するRNAを除去し、ターゲット域のDNAを確保するのに有効と考えられた。
- 3) 定性PCR検査陽性だった豆腐検体の遺伝子組換え体混入率は0~0.38%、原材料大豆の遺伝子組換え体混入率は0~0.48%と、非意図的な混入として許容される5%以内であり、分別生産流通管理が正しく行なわれていることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査法について(一部改正)”平成15年11月13日、食安発第1113001号(2003)
- 2) 松岡 猛, 川島よしみ, 穂山 浩, 三浦裕仁, 合田幸弘, 瀬畑 環, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛: 食品衛生学雑誌, 40(2), 149(1999)
- 3) 杉田 隆博: 平成十三年度厚生科学研究費補助金健康科学総合研究事業報告書 地方衛生研究所の地域における健康危機管理のあり方に関する研究, 27(2002)
- 4) 曾根 美千代, 高橋紀世子, 大江 浩: 宮城県保健環境センター年報, 21, 70(2003)
- 5) 農林交流センター: 遺伝子組換え体の検知技術 農産物・食品からの定性・定量的検知法 第90回農林交流センターワークショップ 第48回食品技術講習会(2003)
- 6) 中山 広樹, 西方敬人: バイオ実験イラストレイテッド②, p.23(1995)(秀潤社)
- 7) 杉浦 義紹, 伊藤光男, 大石英明, 奴久妻総一, 田中敏嗣: 第40回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p.86(2003)

魚試料中PCBの高速溶媒抽出装置による抽出法の検討

A Study on Condition of PCB Extraction in Fish by Accelerated Solvent Extrator

氏家 愛子 長船 達也* 佐藤 信俊

Aiko UJIIE, Tatsuya OSAFUNE, Nobutoshi SATO

加熱アルカリ分解法による魚介類試料へのPCB標準添加回収試験において、10塩素体等高塩素体の回収率が低く、加熱による分解が示唆された。回収率改善のため、高速溶媒抽出装置による抽出条件の検討を行った。試料は、乳鉢で無水硫酸ナトリウムと十分に摺り合わせ脱水した。抽出条件として、温度150℃、加圧1500psi、抽出溶媒にアセトニトリルを使用することにより、9, 10塩素体の標準添加回収率が95%以上となり、実試料からの抽出も同様に満足の結果が得られた。また、高速溶媒抽出装置による抽出は閉鎖系であり、溶媒使用量も少ないメリットがある。更に、前処理操作の簡便化を目的に、抽出用セルの下部に酸性アルミナを敷き、抽出と同時に精製の検討を行った。しかし、150℃、2000psi以上でのヘキサン抽出では、試料からの水分の流出によりアルミナ活性が失活し、精製効果が得られなかった。

キーワード：PCB；高速溶媒抽出装置；四重極型GC/MS；酸性アルミナ

Keywords : PCB ; Accelerated Solvent Extrator ; GC-Quadrupole Mass Detector ; Alumina A

1 はじめに

食品中のPCBの分析は、従来法では、加熱アルカリ分解法により抽出を行い、バックドカラムGC/ECDによる定量を行ってきた。近年、キャピラリーカラムGC/MSによる異性体毎の定量が可能となり、筆者らも食品中のPCBを四重極型GC/MSで調査した結果を報告¹⁾した。このなかで、筆者らは加熱アルカリ分解法による抽出では、9, 10塩素体の標準添加回収率が低く、分解の可能性を指摘した。また、同法は分解液が強アルカリであり、操作上での危険性が高いことや、抽出溶媒を比較的多量に使用する等の問題点もある。そこで、これらの問題点を改善するため、加熱アルカリ分解法の代替として、高圧溶媒抽出装置（以下ASE）を使用して、各種抽出条件を検討し良好な結果が得られたので報告する。

2 方法

2.1 分析方法

2.1.1 装置

加熱還流抽出用6穴ウォーターバス

高圧溶媒抽出装置：DIONEX ASE-200, 33mlセル, 60ml
バイアル

GC/MS：Agilent GC/MS 6890/5973

GC用カラム：HP-5Ms (25m×0.25mm, 膜厚0.25μm)

*現 食と暮らしの安全推進課

2.1.2 試薬等

n-ヘキサン、アセトン、アセトニトリル：残留農薬、
PCB分析用300, 関東化学(株)

精製水：ヘキサン洗浄をしたMilliQ水

酸性アルミナ：ICN Alumina A-Super I, ICN Biomedicals
GmbH

10%硝酸銀シリカゲル：ダイオキシン類分析用, 和光
純薬工業(株)

硫酸：精密分析用, 和光純薬工業(株)

無水硫酸ナトリウム：残留農薬, PCB分析用

Sep pak Silica：690mg, ウォーターズ(株)製

PCB標準品: Custom PCB Mix (2.5μg/ml), AccuStandard
Inc.製及びカネクロール300, 400, 500, 600
(approx.1μg/ml)；(株)ジーエルサイエンス製

2.1.3 試料調製及び分析方法

試料の調製は以下のとおり行った。均一化した検体を20gをガラス乳鉢に秤り取り、無水硫酸ナトリウム（以下Na₂SO₄）約21~25gと十分に搗りつぶしながら脱水する。これを、予めセルロースろ紙を底部に敷いたASE33mlセルに入れ、挿入工具（棒）で試料に隙間ができないよう上から押し、試料の上部にもセルロースろ紙を敷く。また、DIONEX社のASE技術資料「ASE法による魚組織中PCBの選択的抽出」で報告²⁾のある同時抽出・精製を検討するため、表1のヘキサンを抽出溶媒とする

表1 ASE抽出条件

	ASE-1	ASE-2	ASE-3	ASE-4	ASE-5
圧力(psi)	1500	2000	2000	1500	1500
温度(°C)	100	150	195	150	150
平衡時間(分)	15	15	15	15	15
フラッシュ(%)	60	60	60	60	60
バージ	300	300	300	300	300
サイクル	2	2	2	2	2
酸性アルミナ積層	10g	10g	10g	-	-
抽出媒体1回目	n-ヘキサン	n-ヘキサン	n-ヘキサン	アセトン	アセトニトリル
抽出媒体2回目	10%アセトン /n-ヘキサン	n-ヘキサン	n-ヘキサン	アセトン	アセトニトリル

条件「ASE-1」～「ASE-3」では、ASEの33mlセル下部に酸性アルミナ粉末を10g敷き抽出を行った。抽出は1試料につき2本のバイアルを使用し2回抽出を行った。

ASEの抽出条件を表1に示す。また、GC/MS測定条件は既報¹⁾と同じ条件で行った。

抽出液の前処理は以下のとおり行った。抽出溶媒にヘキサンを使用した「ASE-1」～「ASE-3」は、抽出液の入った60mlバイアルにNa₂SO₄を入れて脱水し、ロータリーエバポレーターで約5mlまで濃縮、Sep pak Silica (690mg)で精製後、濃縮して0.5mlまたは1mlに定容しGC/MSで定量した。「ASE-3」では抽出条件が195°C、2000psiとかなり高い条件であったため、抽出液が2本(1回目、2回目)とも化成場臭に似た臭気と黄色または微黄色の着色があり、シリカゲル精製だけではGC/MS測定に妨害が大きかった。このため、この試験液0.5mlを更に10%硝酸銀シリカゲル(パスツールピペットに200mgをつめたもの)で精製し、0.5mlに定容してGC/MS測定を行った。また、アセトンを抽出溶媒とする条件「ASE-4」の抽出液は、アセトンを留去後、分液ロートに移してヘキサンに転溶し、硫酸及び精製水で洗浄後、Sep pak Silicaで精製した。アセトニトリルを抽出溶媒とする条件「ASE-5」の抽出液は、60mlバイアルにNa₂SO₄を入れて脱水し、ロータリーエバポレーターで約5mlまで濃縮後、分液ロートに移して10%食塩水を約15ml入れ、ヘキサンに転溶した。更に、硫酸及び精製水洗浄後、Sep pak Silicaで精製し、濃縮して0.5mlに定容しGC/MSで定量した。

2.2 分析対象

当所でPCBモニタリングとして分析を行っているスズキを対象として実施した。スズキは、2003年度の冷凍保存検体2検体を使用した。また、結果を検討する上で必要と考えられた脂質含有量について、食品中の脂質分析法³⁾に従い分析を行った。スズキー1は脂質平均2.7%(n=3, C.V.=2.7%)、スズキー2は脂質平均4.0%(n=3, C.V.=2.7%)でスズキー2の方が若干脂質含有量が多い検体であった。

3 結果と考察

3.1 温度及び圧力条件

各抽出条件のPCB同族体毎の濃度を表2に示す。

抽出溶媒にヘキサンを使用した「ASE-1(100°C, 1500psi)」, 「ASE-2(150°C, 2000psi)」, 「ASE-3(195°C, 2000psi)」の抽出結果の比較をすると、「ASE-1」では従来法である加熱アルカリ分解法の値に対し、スズキー1は48%、スズキー2は40%、「ASE-2」では2検体とも67%、「ASE-3」では92%、73%で、温度と圧力が高くなるに従い高い結果となった。ただし、「ASE-1」は2回目の抽出溶媒として10%アセトン/ヘキサンを使用したため、1回目のヘキサン抽出率だけを使用し、その他の条件は2回分のヘキサン抽出物を合わせた結果と比較している。図1に示すように、ASE-2での1, 2回目のヘキサン抽出率を比較すると、2回目は全体の約10%程度が抽出されるものと考えられ、これを加算しても傾向は変わらない。

また、圧力を一定にし、温度を変化させたASE-2とASE-3の比較をすると、スズキー2の温度による抽出率の増加は、スズキー1での増加ほど大きくないことから、脂質含有量など試料の質も、抽出率に影響すると考えられた。

3.2 抽出溶媒の種類

表2に示すように、ヘキサンを抽出溶媒とした「ASE-1」～「ASE-3」の温度及び圧力を変化させた条件では、ASEの最高値を使用する「ASE-3」でも、従来法の加熱アルカリ分解法の値に対し、スズキー1で92%、スズキー2で73%であり、加えて9, 10塩素体の抽出率はゼロで満足のいく結果が得られなかった。更に、この最高値を使用する条件下での抽出液は、試料のタンパク質等の熱変成によるアミン臭が非常に強く、かなりの夾雑物も同時に抽出されてくる。また、同時抽出・精製が可能かどうか、セル下部に酸性アルミナを敷いた試験において、圧力1500psiの「ASE-1」ではNa₂SO₄により脱水した水は流出しなかったが、2000psiの「ASE-2」と「ASE-3」ではヘキサンと一緒に流出し、酸性アルミナが失活してしまい精製効果は得られなかった。

「ASE-1」の2回目の抽出に使用した10%アセトン/ヘキサンの抽出効果について「ASE-2」の抽出率と比較した結果を図2に示す。10%アセトンを使用することによって全体の約30%が抽出され、「ASE-1」と「ASE-2」がほぼ同等の抽出率となった(ただし、6塩素体が「ASE-2」より低い)。図1に示すヘキサン抽出の場合、2回目の抽出率は約10%であり、抽出率に寄与する要因として、温度、圧力だけではなく溶媒の極性も大きいと考えられた。

そこで、温度と圧力を150°C, 1500psiとし、抽出溶媒にアセトンとアセトニトリルを使用して検討を行った。アセトンを使用する条件「ASE-4」では、抽出率はスズキー1とスズキー2でそれぞれ81%、66%であり、抽出量トータルとしては「ASE-2」と「ASE-3」の間もしくは同等であった。しかし、図3に示すように、前2条件

表2 抽出条件別PCB濃度

「スズキー-1」

(ng/g)

塩素数	ASE-1			ASE-2 ヘキサン×2	ASE-3 ヘキサン×2	ASE-4 アセトン×2	ASE-5 アセトニトリル×2	加熱アルカリ 分解法
	ヘキサン	10%-アセトン /ヘキサン	Total					
1								
2								
3	0.23±0.04	0.32±0.05	0.56±0.09		0.25		0.41±0.11	0.53
4	1.2±0.33	0.86±0.16	2.1±0.39	2.2±0.11	2.4	2.0	2.7±0.13	2.6
5	2.3±0.59	1.0±0.16	3.1±0.55	3.1±0.11	4.1	3.4	4.6±0.23	4.1
6	1.6±0.35	0.34±0.10	1.9±0.32	2.1±0.17	3.0	3.2	4.4±0.12	3.8
7	0.49±0.22	0.05±0.08	0.54±0.20	0.62±0.08	1.1	0.98	1.0±0.04	1.1
8				0.02±0.04	0.03	0.14	0.11±0.00	0.04
9						0.02	0.01±0.00	
10						0.02	0.01±0.01	
Total	5.8±1.5	2.6±0.53	8.6±1.7	8.0±0.55	11	9.7	13±0.64	12

「スズキー-2」

(ng/g)

塩素数	ASE-1			ASE-2 ヘキサン×2	ASE-3 ヘキサン×2	ASE-4 アセトン×2	ASE-5 アセトニトリル×2	加熱アルカリ 分解法
	ヘキサン	10%-アセトン /ヘキサン	Total					
1								
2	0.01±0.02		0.01±0.02					
3	0.20±0.08	0.33±0.08	0.53±0.03	0.28±0.25	0.43±0.08	0.09±0.08	0.49±0.16	0.70
4	1.0±0.29	0.94±0.22	2.0±0.08	2.3±0.02	2.1±0.20	1.8±0.06	2.8±0.04	2.8
5	2.1±0.40	1.1±0.27	3.2±0.14	3.5±0.04	3.9±0.39	3.1±0.23	4.4±0.12	4.5
6	1.7±0.17	0.54±0.11	2.2±0.12	2.9±0.05	3.3±0.28	3.3±0.17	5.0±0.50	4.8
7	0.89±0.15	0.23±0.06	1.1±0.09	1.2±0.07	1.4±0.17	1.3±0.06	1.6±0.26	1.7
8	0.10±0.08		0.10±0.08	0.14±0.01	0.13±0.02	0.22±0.02	0.33±0.07	0.24
9						0.04±0.01	0.06±0.01	0.02
10					0.03±0.01	0.03±0.00	0.04±0.02	
Total	6.0±1.1	3.2±0.73	9.2±0.36	10±0.37	11±1.0	9.9±0.43	15±0.88	15

下及び加熱アルカリ分解法では抽出されなかった9,10塩素体が抽出されている。また、アセトニトリルを使用する条件「ASE-5」では、抽出率はスズキー-1とスズキー-2でそれぞれ108%, 100%であり、8, 9, 10塩素体の抽出率も満足のいく結果が得られた。標準添加回収試験(試料換算 1 ng/g)の8, 9, 10塩素体の回収率は、ヘキサン抽出である「ASE-3」では、9塩素体で約95%, 10塩素体で93%の回収率が得られ、アセトニトリルの「ASE-5」とほぼ同等の回収率が得られた。しかし、実試料においては「ASE-3」では全く抽出されず、添加したPCBの回収が良好であっても、細胞中のPCBを抽出するためには、細胞への浸透性が重要な因子であることが判明した。これらの結果から、アセトニトリルを抽出溶媒とする温度150°C、圧力1500psiの抽出条件が最適であると考えられる。

3.3 加熱アルカリ分解法及びASE各抽出条件下での異性体濃度

加熱アルカリ分解法による各異性体濃度をX軸に、ASEの各条件での異性体濃度をY軸に取り、2法の関係をスズキー-2について図4に示す。スズキー-1についてもほぼ同様な結果であった。

加熱アルカリ分解法と「ASE-1」～「ASE-4」との関係においては、図中の線で囲んだ部分が、加熱アルカリ分解法では抽出されているがASEでは抽出されない異性体である。ヘキサン抽出の「ASE-1」～「ASE-3」では、約20~30種の異性体が抽出されず、そのほとんどが0.1ng/g未満の濃度の低いものであった。また、ヘキサン抽出では、アセトン抽出「ASE-4」やアセトニトリル抽出「ASE-5」に比較して若干バラツキも大きい結果となっており、前項で述べた細胞中への浸透性が寄与しているものと考えられた。アセトン抽出「ASE-4」において、加熱アルカリ分解法では抽出されているがASEでは抽出

されない異性体数は、ヘキサン抽出の1/3以下であるが、比較的濃度の高い異性体も抽出されないものがあり、ヘキサン抽出とは傾向を異にしている。また、アセトニトリル抽出「ASE-5」では、濃度の低い異性体もほぼ同程度抽出されており、バラツキも少ない。Y=aXの傾きa及び決定係数 r^2 はそれぞれスズキー-1で1.2, 0.99, スズキ

-2で0.97, 0.98であり各異性体毎に、加熱還流法と良い対応が認められた。脂質含有量の低いスズキー-1は、「ASE-5」による抽出率が加熱アルカリ分解法に対し、2割程度高く、試料の質によっては、ASEによる抽出法の方が従来法より適していることが判明した。

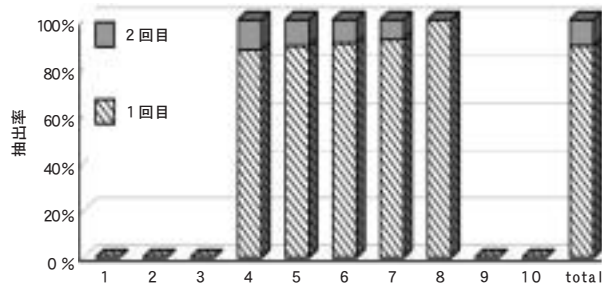


図1 抽出回数による抽出率 (ASE-2)

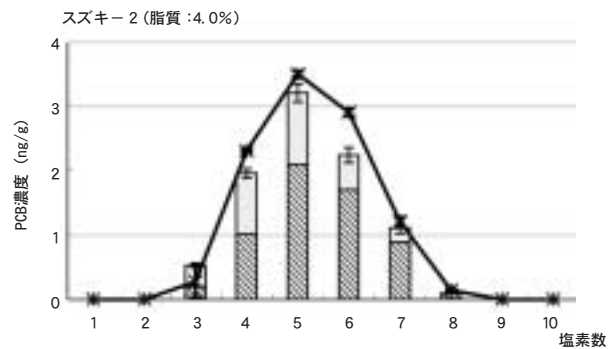
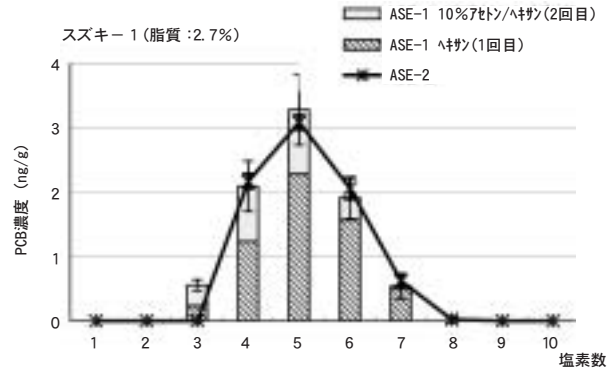


図2 抽出溶媒による抽出率

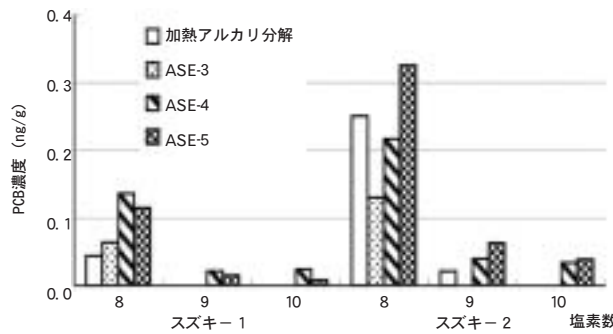
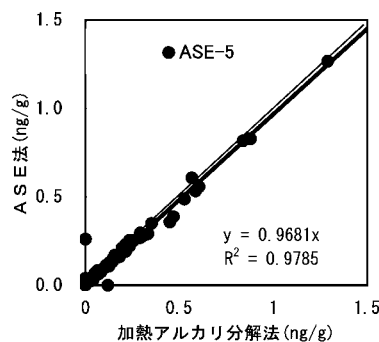
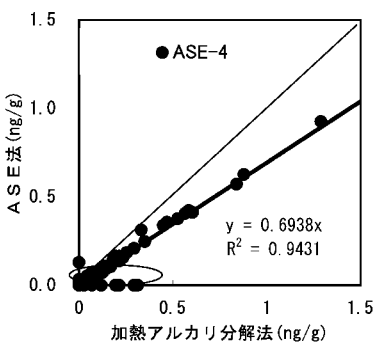
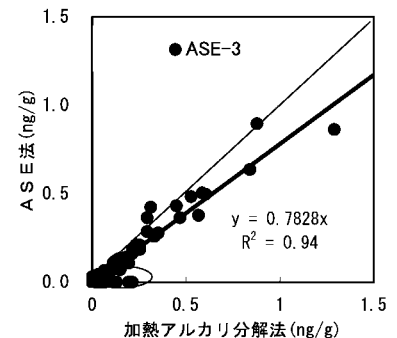
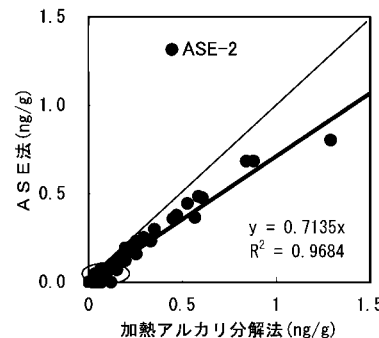
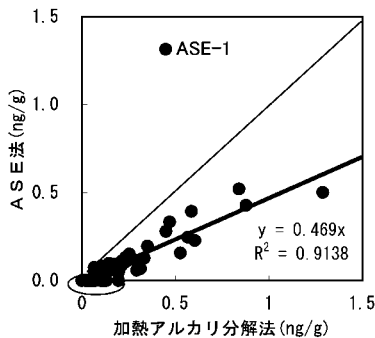


図3 高塩素体の抽出法別濃度比較



○で囲った部分は両者間の対応が悪いもの

図4 加熱アルカリ分解法とASE抽出条件別PCB濃度の相関 (スズキー-2)

表3 ビフェニルの抽出率

	スズキー 1	スズキー 2
加熱アルカリ分解法	1.0	1.0
ASE-1	0.1	0.1
ASE-2	4.0	3.4
ASE-3	30	46
ASE-4	1.0	0.5
ASE-5	0.6	0.9

3.4 ビフェニル

PCBの基本骨格であるビフェニルの抽出率について、加熱アルカリ分解法とASE抽出各条件との比較を表3に示す。

ビフェニル抽出率は、加熱アルカリ分解法を1とした場合、「ASE-1」～「ASE-5」では、それぞれ、0.13、3.7、38、0.77、0.76であり、ヘキサン抽出では、温度及び圧力が高くなる程高くなった。195℃、2000psiの「ASE-3」では、同じ圧力条件で温度が低い「ASE-2」の10倍の値となっており、両条件とも無極性のビフェニルが、試料以外の抽出系器材からヘキサンに溶出する等の、コンタミネーションの可能性が考えられる。

4 ま と め

PCB高塩素体を熱分解せずに抽出する方法として、アセトニトリルを抽出溶媒とするASE抽出法が、加熱アルカリ分解法より優れた方法であることが判明した。この方法は、閉鎖抽出系で行うことや、抽出溶媒が少ないことから、濃縮・精製操作において比較的容量の小さい器具類でコンパクトに実施することができる点でも優れている。しかし、魚試料のマトリックスも多く抽出されてくるため、加熱アルカリ分解法に比較し、夾雑物の除去のため硫酸洗浄の回数が多く、簡便な精製法の検討が必要である。

参 考 文 献

- 1) 氏家愛子, 長船達也, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, 20, 75 (2002)
- 2) DIONEX: ASE REPORT, AS004GU-0057” 高速溶媒抽出装置 (ASE) 法による魚組織中PCBの選択的抽出”
- 3) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解2000”, p 194 (2000), (金原出版株)

酵母Two-Hybridアッセイの食品試料への適用

Application of Yeast Two-Hybrid Assay to The Endocrine Disruptors in Food Samples

石川 潔 氏家 愛子 佐藤 信俊

Kiyoshi ISIKAWA, Aiko UJIIE, Nobutoshi SATO

内分泌かく乱物質を評価する手法として、酵母Two-Hybridアッセイを導入し、種々の食品試料を対象とし、酸性、アルカリ性、中性下での有機溶媒抽出画分のアゴニスト（-S9, +S9）試験、アンタゴニスト（-S9, +S9）試験、細胞毒性試験（-S9, +S9）を実施し、食品試料への適用について検討した。その結果、酵母Two-hybrid法を食品試料に適用する場合には、オレイン酸等のC18不飽和脂肪酸やその誘導体を成分とするマトリックスを十分に除去しておくことが不可欠であることが分かった。また、牡蛎、イボニシにはトリフェニルスズ以外の強いアンタゴニスト活性を有する物質の存在が示唆された。

キーワード：酵母Two-Hybridアッセイ；内分泌かく乱物質；アゴニスト作用；
アンタゴニスト作用；毒性作用

Keywords : Yeast Two-Hybrid Assay ; Endocrine Disruptors ; Agonist ; Antagonist ; Toxicity

1 はじめに

環境中の内分泌攪乱物質をとらえるバイオアッセイの一つとして、白石ら¹⁾²⁾は酵母Y190株にエストロゲン受容体遺伝子、コアクチベーターの発現プラスミド、β-ガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを導入した酵母Two-Hybridアッセイを開発し、多くの化学物質に活性を認めたと報告している。しかし、これを食品のスクリーニングに適用した例はこれまで見られていない。一方、当センターにおけるプロジェクト研究テーマとして生物指標を用いた環境汚染物のスクリーニングを取り上げており、食品部門での適用について検討を行った。

2 方 法

エストロゲン・アゴニスト（以下アゴニスト、-S9, +S9）試験、エストロゲン・アンタゴニスト（以下アンタゴニスト、-S9, +S9）試験及び細胞毒性試験（-S9, +S9）は、白石らの酵母Two-Hybridアッセイにより実施した。

内分泌攪乱物質の疑いがある物質として、SPEED'98の67種類（現在65種類）の対象物質には、DDT等約40種類の農薬、PCB、トリブチルスズ（以下TBT）、トリフェニルスズ（以下TPT）等が掲載されている。国立環境研究所報告書³⁾では、これらの物質を酵母Two-Hybridアッセイによりスクリーニングした結果は、アゴニスト試験（-S9）ではDDTやPCBを含めた10種類（66種類のうち）

が陽性、アンタゴニスト試験（-S9）ではTBTやTPTを含めた6種類（63種類のうち）が陽性と報告している。

今回、酵母Two-Hybridアッセイを食品試料に適用するにあたっては、食品抽出物の調製は、溶媒の種類やpH等の変更による段階的な分画抽出アッセイを取らず、当部のルーティン業務として分析方アッセイが確定している残留農薬類の中性抽出物、PCBのアルカリ加熱還流抽出物、有機スズの酸性抽出物を、それぞれの精製法により精製したものをを用いた。

2.1 標準品

- ・β-エストラジオール：生化学用，和光純薬(株)製，200nM/DMSOに調製
- ・塩化TBT：シグマアルドリッチジャパン製，TBTとして400μM/DMSOに調製
- ・塩化TPT：シグマアルドリッチジャパン製，TPTとして80μM/DMSO，60μM/DMSOに調製
- ・4-ヒドロキシタモキシフェン：SIGMA製，1mM/DMSOに調製
- ・ミリスチン酸：特級，和光純薬(株)製，50mM/DMSOに調製
- ・パルミチン酸：特級，和光純薬(株)製，50mM/DMSOに調製
- ・ステアリン酸：特級，和光純薬(株)製，50mM/DMSOに調製
- ・オレイン酸：特級，和光純薬(株)製，50mM/DMSO，

100mM/DMSOに調製

- ・PCB：カネクロール300：400：500：600（1：1：1：1），5 μ g/ml・DMSOに調製

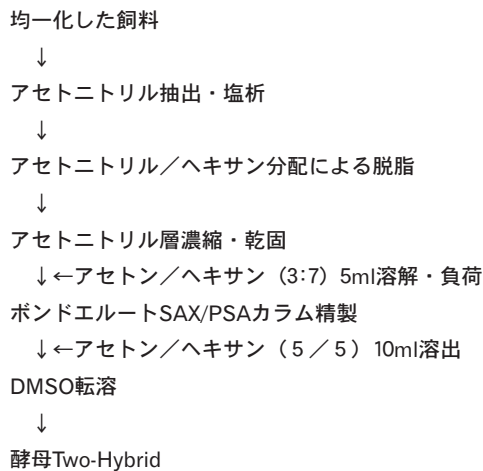


図1 TDS試料の中性抽出試験液調整アッセイ

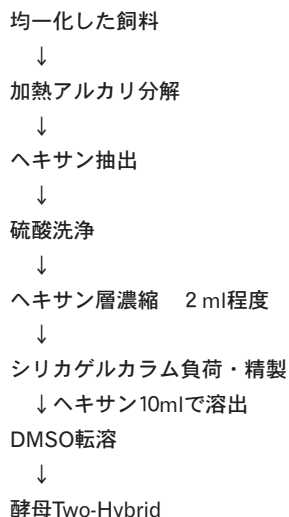


図2 アルカリ抽出試験液調整アッセイ

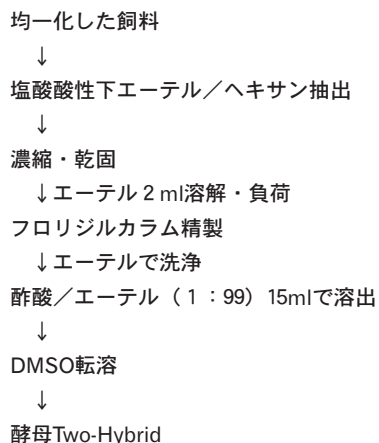


図3 酸性抽出試験液調整アッセイ

- ・pp'-DDT, o,p'-DDT:残留農薬分析用, Dr.Ehrenstorfer GmbH製, 0.5 μ M/DMSOに調製
- ・クロロフィルa: SIGMA製, 100 μ g/ml・DMSOに調製
- ・ β -カロチン: 高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬

2.2 検討対象品目および試験液の調製

アゴニスト試験は, 上記のとおり, 酵母Two-Hybridアッセイスクリーニングによるアゴニスト陽性報告がある残留農薬及びPCBの分析用抽出物を対象とした。対象品目は, 1999年~2002年にマーケットバスケット方式により購入・調製したトータルダイエット (以下TDS) 試料とした。TDS試料は, 全14群のうち, I群 (穀類), II群 (いも類), III群 (菓子類), V群 (豆製品), VI群 (果実類), VII群 (淡黄色野菜), VIII群 (緑黄色野菜), X群 (魚介類), XI群 (肉・肉製品), XII群 (乳・乳製品), XIII群 (嗜好品) の11群を使用した。

アンタゴニスト試験は, アンタゴニスト陽性の報告があるTBTおよびTPTの分析抽出物を対象とした。対象品目は, 県内産牡蠣と環境試料のインボセックス発現イボニシとした。

試料液の調製は, 図1に示す食品中の残留農薬抽出法⁴⁾による中性抽出物, 図2に示すPCBの加熱アルカリ分解法⁵⁾によるアルカリ抽出物, 図3に示す有機スズ試験方法⁶⁾による酸性抽出物を, それぞれDMSOに転溶して調製した。

中性抽出物は, 上記11群のそれぞれの群毎に4年分をまとめて1試料として, 約15~25g (食品重量として) の抽出物を濃縮乾固し, 100 μ lのジメチルスルホキシド (以下DMSO) に溶解し調製した。アルカリ抽出物は同様に, X群, XI群, XII群について, 約20g~45g・食品重量/100 μ l・DMSOに調製した。

また, イボニシ抽出物は, 三沢らがイボニシのインボセックスグレードとイボニシ体内のTBT, TPT濃度との関係について報告⁷⁾した抽出物の半量を, フロリジル精製後, ヘキサン転溶し冷凍保存して使用したものである。両試験において, 全ての試料で細胞毒性試験を実施した。

3 結果及び考察

3.1 試験系の再現性と確認

試験の再現性について, アゴニスト試験は β -エストラジオール (以下E2と略す) 200nM, アンタゴニスト試験は4-ヒドロキシタモキシフェン (以下4-OH-TFと略す) 1mM, TBT400 μ M, TPT80 μ Mを試験液として, 4回の並行試験を実施した結果, 図4に示すように良好な再現性が得られた。

この試験でのE2のコントロールとの化学発光比を10倍誘導する濃度 (以下EC₁₀値) は0.42nM, 4-OH-TFの50%影響 (E2活性抑制) 濃度 (以下EC₅₀値) は1400nM, TBTのEC₅₀値は1100nM, TPTのEC₅₀値は110nMであり, TBT, TPTのEC₅₀値は白石らの報告値560nM, 32nMより若干高い濃度であった。

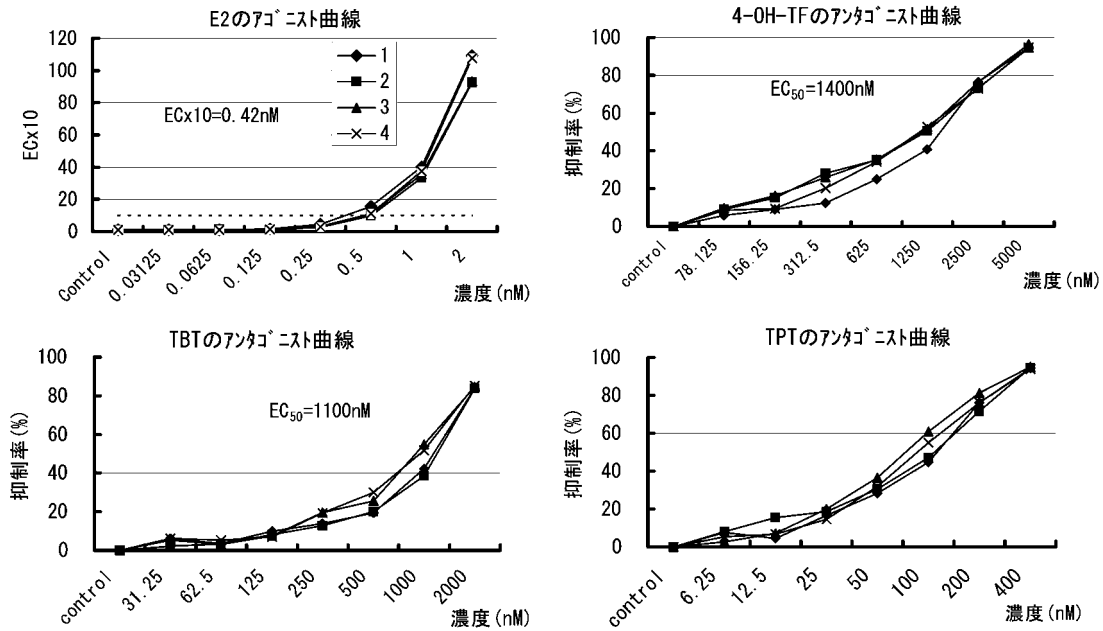


図4 アゴニスト, アンタゴニスト試験の再現性

3.2 TDS試料のアゴニスト活性及び細胞毒性

3.2.1 中性抽出物

TDS試料14群のうち、IV、IX、XIV群を除く11群の中性抽出物のアゴニスト試験結果を表1に示す。

VII群(緑黄色野菜: -S9, +S9)及びXI群(肉類: -S9)にアゴニスト活性が認められた。XI群については、肉類に存在するエストラジオール等による活性と考えられた。VII群については、抽出液が着色し葉緑素がかなり残っていたため、色素の主成分であるクロロフィルa (100ppm) およびβカロチン (250ppm) について市販標準品を用いてアゴニスト試験を行ったが、-S9, +S9ともE2活性は認められなかった(表2)。これらの濃度は、プレート上での懸濁を生ずる限界濃度であり、これ以上の濃度の試験はできなかった。

また、VII群に検出された農薬は、ダイアジノン、テフルトリン、ピリダベン、フルトラニル、マラチオン、ミクロブタニル、メタラキシル、メプロニルの8農薬であるが、このうちアゴニスト活性の無かった他の各群に検出されず、VII群だけに検出された農薬は、ダイアジノン、テフルトリン、ピリダベン、メタラキシル、メプロニルの5農薬であった。各群のアゴニスト試験時の全農薬濃度は、試料換算で0.2ppb (I群) ~120ppb (VI群) で、アゴニスト活性の無かったVI群に比べてVII群は38ppbであり、特に高い濃度ではなかった。農薬毒性辞典⁸⁾では、VII群に特異的に検出された5農薬のうち、テフルトリン、ピリダベン、メタラキシルの3種の農薬は環境ホルモン作用を有しないもの、ダイアジノンは疑いがあり今後検討を要するものとされており、メプロニルについての記載はない。ダイアジノン及びメプロニルのみを対象として算出した場合、試料換算で23ppbとなり、アゴニスト活性が農薬によるものである可能性も否定できない。

表1 TDS試料中性抽出物のアゴニスト試験結果

	-S9		+S9	
	EC _{x10}	IC ₅₀	EC _{x10}	IC ₅₀
I				3.1
II				2.5
III		45		3.0
V		36		3.5
VI				12
VII	4.3	11	>7.7	2.4
VIII		22		16
X				
XI	>51			27
XII				3.5
XIII		15		22

表2 標準品のアゴニスト試験結果

	-S9		+S9	
	EC _{x10}	IC ₅₀	EC _{x10}	IC ₅₀
PCB	-	-	-	-
pp'-DDT (ppb)	-	-	-	-
op'-DDT (ppb)	25	-	27	-
クロロフィルa	-	-	-	-
βカロチン	-	-	-	-

また、細胞毒性は-S9では、III, V, VII, VIII, XIII群に認められたが、+S9では試験を行った各群のうち、X群を除く全群で細胞毒性が強くなった。これらの抽出物について、GC/MS-SCAN測定により定性分析を行った結果、表3に示したとおり、C18のリノレン酸の誘導体等の不飽和脂肪酸とステロイド骨格の不飽和炭化水素類が主成分であった。

3.2.2 加熱アルカリ分解抽出物

X群（魚介類）、XI群、XII群（乳類）の加熱アルカリ分解で脂肪分をけん化することにより、分解・精製したPCB分析用抽出物について、アゴニスト試験結果およびマトリックス成分を表4および表5に示した。-S9では、中性抽出物においてE2活性が見られたXI群は、加

熱アルカリ分解抽出物では加熱分解処理によって肉中に含有するE2等が分解されてしまい、E2活性が消失した。また、抽出物中のマトリックスは、中性抽出物の場合と同様に、細胞毒性に関わる主要な成分と考えられる。この毒性については、XI群では-S9、+S9両方で無かったが、XII群の+S9では中性抽出物より弱い毒性が、中性抽出物で毒性のなかったX群試料に+S9で毒性が認められた。

3.3 アンタゴニスト活性及び細胞毒性

3.3.1 牡蠣抽出物

牡蠣中の有機スズは、図3に示す酸性抽出アッセイで調製するが、抽出物中の脂肪等夾雑物の除去精製に使用するSep Pak Plusフロリジル (910mg) は、ロットにより

表3 中性抽出物の成分 (GC/MS-SCAN測定)

物質名		I	II	III	V	VI	VII	VIII	X	XI	XII	XIII
二重結合を有する化合物	Nicotinamide									◎		
	Butylated hydroxytoluene									◎		
	Caffeine			◎								
	Vitamin E							◎				
	Cholest- 5-en-ol (3 beta) -			◎						◎	◎	
	ergost- 5-en- 3-ol							◎				
	Stigmasterol	◎										
	Clionasterol	◎				◎	◎	◎	◎			
脂肪酸	Palmitic acid						○					
	Ethyl palmitate				○							
炭素数18の化合物	1-Octadecene						●					
	8, 11-Octadecadienoic acid, methyl ester							●				
	9, 12, 15-Octadecatrienoic acid, methyl ester							●				
	Linoleic acid						●					
	Ethyl linoleate		●		●							
	9, 12, 15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester						●					
	Ethyl linoleate		●									
	Oleamide										●	
	Oleic acid, 3-hydroxypropyl ester										●	
	9-Octadecenoic acid (Z)-			●								
	9, 12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,...		●					●				
	2, 6, 10, 14, 18, 22-Tetracosahexaene	●										

表4 TDS試料加熱アルカリ分解抽出物のアゴニスト試験結果 試料量 (mg)

	-S9		+S9	
	EC _{×10}	IC ₅₀	EC _{×10}	IC ₅₀
X群	-	-	-	31
XI群	-	-	-	
XII群	-	-	-	32

表5 加熱アルカリ分解抽出物の成分 (GC/MS-SCAN測定)

物質名	X	XI	XII
Pristane		○	
Cholesterilene		◎	◎

◎：二重結合を有する化合物

活性度の差が大きく、事前に標準品での検討が不可欠である。2段に重ねたSep Pak Plusフロリジル (910mg) 精製の際、洗浄に使用するエーテル量とTBT, TPTの回収率との関係を、予め標準品で検討した結果を図5に示す。TPTは、エーテル3mlの洗浄では100%に近い回収率であるが、10ml以上の洗浄では75%程度に低下した。そこで、アンタゴニスト試験に用いる抽出物は事前にエーテル3mlで洗浄し調製を行った。

牡蠣抽出物 (TPT含有量 $<1.6 \mu\text{M}$) と、この抽出物に、塩化TPT標準液を添加し、TPT標準品で確実にアンタゴニスト活性が認められる濃度 (TPTとして $60 \mu\text{M}$) に調製したものを対象に、アンタゴニスト及び細胞毒性試験を行った。

この結果、図6に示すとおり、アンタゴニスト活性は、TPT無添加の牡蠣抽出物がTPT添加より若干上回り、ほぼ同様な曲線を示した。この結果、TPT無添加の牡蠣抽出物のアンタゴニスト作用の50%影響濃度 (EC_{50}) 値は、牡蠣生重量換算で 0.14mg 、毒性による50%抑制濃度 (IC_{50}) 値は 0.42mg 、 $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}=3.0$ であった。TPT添加の EC_{50} 値は 0.18mg 、 IC_{50} 値は 0.33mg 、 $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}=1.8$ となり、両者とも、白石らのアンタゴニスト陽性評価基準である $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}=4$ より低い値となった。そこで、両試料をDMSOで8倍に希釈し再試験を行ったところ、図7に示すように、細胞毒性が消失し、TPT無添加の牡蠣抽出物の EC_{50} 値は牡蠣生重量換算で 0.08mg 、TPT添加の EC_{50} 値は 0.09mg と算出され、アンタゴニスト活性がほぼ同程度認められた。

これについて、TPT添加牡蠣抽出物のアンタゴニスト活性をTPT濃度で計算すると、 EC_{50} 値はTPTとして 3nM であり、TPT標準品での EC_{50} 値 110nM と比較すると約1/40の低い濃度となった。このことから、牡蠣抽出物にはTPTのアンタゴニスト活性を大きく上回る物質が存在することが示唆された。

そこで、マトリックスをフロリジル精製段階で十分 (エーテル 15ml) 洗浄し、この抽出物で前段と同様の試験を実施したところ、図8のとおり、細胞毒性も40%以下に減少し、牡蠣に添加したTPTの EC_{50} 値は 106nM となった。この値は、TPTの標準品の EC_{50} 値 110nM とほぼ同じ値であり、上記TPT以外の強いアンタゴニスト活性を有する物質は、エーテル洗浄により、洗浄液とともに流出したものと考えられた。

3.3.2 洗浄流出成分の同定とアンタゴニスト活性への影響

強いアンタゴニスト活性を示し、洗浄により除去されるマトリックス成分について、GC/MS-SCAN測定による定性分析を行った。この結果、主成分はミリスチン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸等のC18の飽和・不飽和脂肪酸であった (図9)。そこで、これら 50mM 、 100mM の標準品を、培地またはS9 mixと4%-DMSOで50倍希釈して試験液とし、アンタゴニスト及び細胞毒性試

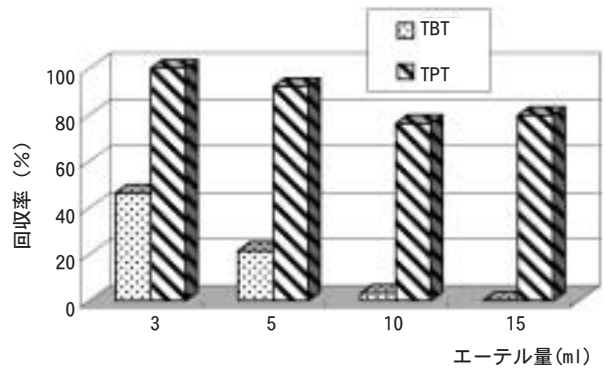


図5 エーテル洗浄量と回収率の関係

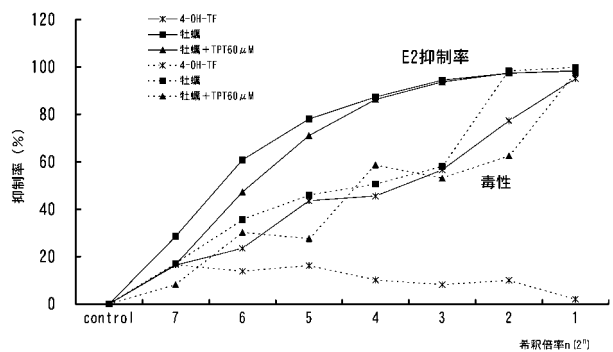


図6 牡蠣抽出物のアンタゴニスト試験 (エーテル洗浄 3ml)

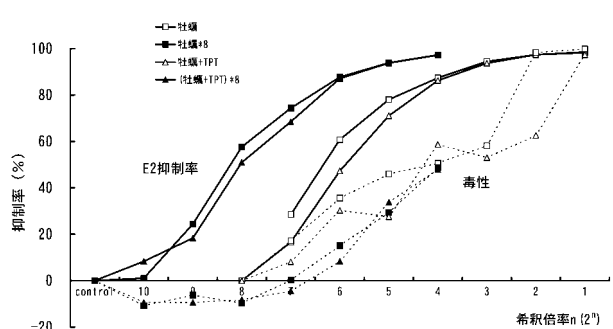


図7 牡蠣抽出物 (8倍希釈) のアンタゴニスト試験

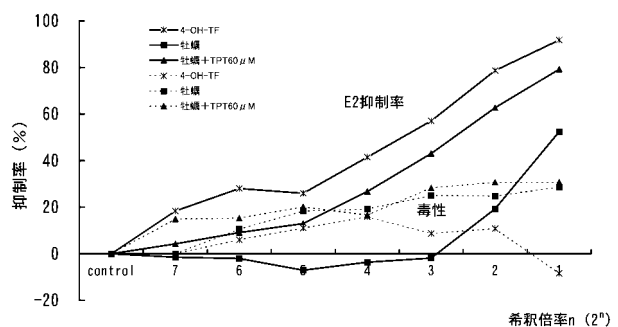


図8 牡蠣抽出物 (エーテル洗浄 15ml)

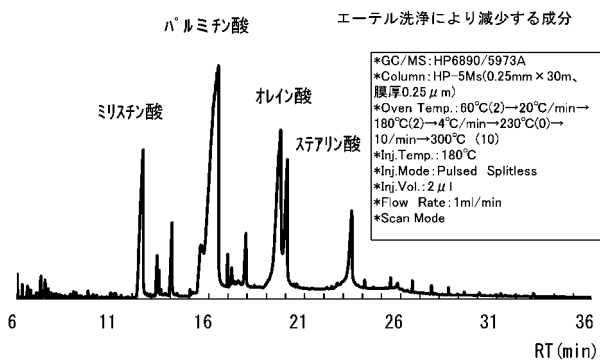


図9 マトリックス成分

表6 脂肪酸類のアンタゴニスト試験結果

(μ M)

脂肪酸名	-S9		+S9	
	EC ₅₀	IC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀
ミリスチン酸 (50mM)	-	-	-	-
パルミチン酸 (50mM)	-	-	-	-
ステアリン酸 (50mM)	-	-	-	-
オレイン酸 (50mM)	190	260	57	47
オレイン酸 (100mM)	370	330	170	81

表7 TPT, オレイン酸のアンタゴニスト試験結果

TPT濃度として (nM)

	-S9		+S9	
	EC ₅₀	IC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀
TPT	120	-	13	-
TPT+オレイン酸 (50mM)	240	300	17	77
TPT+オレイン酸 (100mM)	190	200	80	56

表8 イボニシ抽出物のアンタゴニスト試験結果

(ng/ml)

	-S9		+S9	
	EC ₅₀	IC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀
TPT	47	-	5.1	-
イボニシ	0.80	4.2	-	-

験を行った。結果を表6に示す。

ミリスチン酸等飽和脂肪酸3種は、アンタゴニスト活性(-S9, +S9)、細胞毒性(-S9, +S9)とも認められなかったが、不飽和脂肪酸であるオレイン酸はアンタゴニスト陽性であった。しかし、50mM濃度の-S9及び+S9でのIC₅₀/EC₅₀値は、それぞれ1.4, 0.8であり、アンタゴニスト活性の暫定判定基準であるIC₅₀/EC₅₀=4未満によりアンタゴニスト活性は無いと判断された。また、S9処理をしたオレイン酸は、細胞毒性が非常に強

くなることがわかった。

更に、オレイン酸にTPTを添加し、試料溶液としてそれぞれ50mM, 60 μ Mに調整したものを対象に、アンタゴニスト及び細胞毒性試験を行った。オレイン酸の添加により、TPTのEC₅₀値(-S9)は120nMから240nM, +S9では13nMから37nMに、アンタゴニスト活性が弱められる結果となった。

炭素数が18個の不飽和脂肪酸であるオレイン酸やリノレン酸については、発ガン抑制のアポトーシス誘導能があることが報告⁹⁾されているが、本試験での酵母に対する細胞毒性として発現している現象が、アポトーシス誘導能が酵母増殖抑制に働いた擬似細胞毒性である可能性も考えられる。

また、牡蠣中に存在が示唆された、強力なアンタゴニスト作用を持つ成分の同定はできなかった。

3.3.3 インボセックス発現イボニシ

冷凍保存をしておいたイボニシ抽出液は、更に、孔径20 μ mでろ過後、フロリジル3gと上層にNa₂SO₄5gを積層したカラムに負荷し、エーテル40mlでマトリックスを十分に洗浄、1%酢酸/エーテル40mlで溶出した。溶出液を減圧乾固後、エーテル5mlに定容し、4/5量を酵母試験に、1/5量を有機スズ濃度測定用に用いた。有機スズ濃度は、エチルマグネシウムプロミドでエチル化し、最終検液1mlにしてGC/FPDで測定した結果、DBT, TPTがそれぞれ0.044ppm, 0.025ppm検出され、TBTは検出下限未満であった。この結果、冷凍保存したイボニシ抽出液のTPT全含有量は0.125 μ gで、この値は平成14年度の有機スズの測定結果からの計算値の約1/7であり、冷凍保存中の分解による減少と考えられた。

そこで、計算値から得られる濃度相当量のTPT標準品をイボニシ抽出物に添加し、DMSO溶液に溶解して、各20 μ lずつを-S9, +S9のアンタゴニスト、細胞毒性試験に供した。この結果、原液ではE2活性の抑制が強すぎたため、10倍希釈による再試験を実施したところ、TPTとして計算した場合のEC₅₀(-S9)値は0.8ng/ml, IC₅₀/EC₅₀値は5.2であり、アンタゴニスト活性ありと判定された(表8)。

TPT標準品のEC₅₀値(-S9)は47ng/mlであり、イボニシのTPT換算EC₅₀値(-S9)は0.8ng/mlであることから、イボニシ中にはTPT以外のアンタゴニスト活性の強い物質が存在することが示唆された。この現象は、牡蠣にTPTを添加して行ったアンタゴニスト試験でも同様に認められている。酸性抽出物の主成分の一つであるオレイン酸は、上記試験結果から、酵母に対する細胞毒性作用により、共存するTPTのアンタゴニスト活性を弱める働きをすることが判明しており、アンタゴニスト活性の強い物質が脂肪酸類以外の何であるか、現在のところ不明である。

また、アゴニスト試験も併せて実施したが、E2活性はなかった。

以上の試験結果から、食品試料の大部分の抽出物には、炭素数18個の不飽和脂肪酸やその誘導体が、主成分として抽出されてきており、これら不飽和脂肪酸等は、酵母に対する細胞毒性を持ち、+S9では毒性が強くなることがわかった。従って、食品試料に酵母Two-Hybridアッセイによるアゴニスト試験、アンタゴニスト試験を導入する場合、不飽和脂肪酸等を主成分とするマトリックスを、十分に除去精製することが不可欠である。精製しない場合、細胞毒性の方が強く発現してしまう結果となり、良好な結果が得られないこととなる。上記試験で使用した抽出液は、いずれもミニカラム精製等の処理は行っているものであり、本試験ではGPCによる精製は行わなかったが、GPCでも農薬等と同程度の分子量である脂肪酸類の分離は理論的には難しいと考えられ、ミニカラムやGPC以外の精製法を検討する必要がある。

4 ま と め

- 1) マーケットバスケット方式により調製したトータルダイエツトスタディ試料については、中性抽出液のアゴニスト試験の結果、VII群（緑黄色野菜：-S9, +S9）およびXI群（肉類：-S9）に活性が認められた。XI群については、肉類に存在するエストラジオール等による活性と考えられる。
- 2) 細胞毒性は-S9では、III, V, VII, VIII, XIII群に認められたが、+S9では試験を行った各群のうち、X群を除く全群で細胞毒性が強くなった。これらのマトリックスについて、GC/MSスキャン測定により定性を行った結果、C18のリノレン酸の誘導体等の不飽和脂肪酸とステロイド骨格の不飽和炭化水素類が主成分であった。
- 3) 牡蠣及びインボセックスが発現したイボニシの酸性抽出物アンタゴニスト試験結果から、TPTより強いアンタゴニスト活性物質の存在が示唆される。また、こ

の物質は精製過程でエーテル洗浄により流出することが分かった。

- 4) 不飽和脂肪酸であるオレイン酸は、酵母に対する細胞毒性があり、TPTとの共存下で、TPTのアンタゴニスト活性を低下させる。
- 5) 食品試料に酵母Two-Hybridアッセイによるアゴニスト試験、アンタゴニスト試験を導入する場合、C18の不飽和脂肪酸やその誘導体を主成分とするマトリックスの酵母細胞毒性が、試験結果に大きな影響を与えるため、十分に精製して除くことが不可欠である。

参 考 文 献

- 1) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏: 環境化学, 10, 57 (2000)
- 2) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 曾根義博, 佐野友春, 彼谷邦光, 西原力, 森田昌敏: 環境化学, 11, 65 (2001)
- 3) 独立行政法人 国立環境研究所特別研究報告: “環境ホルモンの新たな計測手アッセイの開発と環境動態に関する研究 (平成11~13年度)”, p29 (2002)
- 4) 菊地秀夫, 氏家愛子, 新目眞弓, 大江浩: 宮城県保健環境センター年報, 19, 173 (2001)
- 5) 保健環境センター生活化学部: 標準作業書, “塩化ビフェニル (PCB)”
- 6) 保健環境センター生活化学部: 標準作業書, “有機スズ化合物”
- 7) 三沢松子, 阿部郁子, 佐久間隆, 氏家愛子, 阿部時男: 宮城県保健環境センター年報, 21, 106 (2003)
- 8) 植村振作, 河村宏, 辻万千子, 富田重行, 前田静夫: “農薬毒性の辞典 改訂版” (2002), (三省堂)
- 9) 溝谷香壽美, 井上郁夫: 埼玉医科大学雑誌, 29, 117 (2002)

ダイオキシン類の発生源推定に関する研究 (市販表計算ソフトを活用した統計処理による県内ダイオキシン類分布の解析)

Study on Estimation of Dioxin Sources (Analysis of the Dioxin Distribution with spreadsheet software)

加藤 謙一 佐々木 多栄子 中村 朋之
鈴木 滋 齋藤 善則

Kenichi KATO, Taeko SASAKI, Tomoyuki NAKAMURA
Shigeru SUZUKI, Yoshinori SAITO

宮城県内でこれまで測定されてきたダイオキシン類に係るデータについてその特性を探り、ダイオキシン類の由来を推定する手法について検討を行ったところ、クラスター分析により明瞭な分類が可能となり、その分類に従いCMB法を適用したところ県内のダイオキシン類の汚染状況が明確に把握された。

キーワード：ダイオキシン；発生源；統計解析；CMB法；クラスター分析

Keyword：Dioxin；Source；Statistics Analysis；CMB；Cluster

1 はじめに

宮城県内のダイオキシン類の測定結果において、現在までに公共用水域で6例（6地点）の環境基準超過が認められた。また、大気中では1例ではあるが環境基準値に近い値が検出されている。当初われわれはダイオキシン類同族体のパターン解析により大まかな発生源の推定を行ってきた。しかしながらパターン解析では視覚的な差を求めるとどまり詳細な結果は期待できない。そこで本研究では県内のダイオキシン類のデータを蓄積し、その異性体データを統計的に解析することにより県内の汚染状況を把握し、さらにダイオキシン類の発生源を推定することを目的とした。統計処理に市販表計算ソフトによる早狩、花石らの手法を用いて検討したので報告する。

2 方法

2.1 解析対象

降下ばいじん；市街部1地点、水田地帯1地点
公共用水域水質；海域を除く平成14年度委託調査結果（34地点）
排ガス；平成14年度産業廃棄物焼却炉測定結果（12施設）
土壌；水路底質5地点
農薬；益永、中西らのデータ¹⁾を用いた
農薬中のCo-PCBについては三井化学㈱のデータ²⁾を用いた

PCB；高菅ら³⁾及び脇本ら⁴⁾のデータを用いた

2.2 統計解析

パソコン上で多変量統計処理を行うためにフリーウェアとして公開されているExcelアドイン工房「早狩」⁵⁾からExcelアドイン（主成分分析、クラスター分析）およびExcelマクロ（CMB 8 J）を用いた。使用したCPU環境はOS；Windows XP Home Edition、アプリケーション；Excel2002である。

使用したデータは表1に示した異性体によるものである。

表1 解析に用いた異性体一覧

同族体	異性体名称	ID	同族体	異性体名称	ID
4DDs	1, 3, 6, 8-TeCDD	dd 1	4DFs	2, 4, 6, 8-TeCDF	df 1
	1, 3, 7, 9-TeCDD	dd 2		1, 2, 7, 8-TeCDF	df 2
	1, 2, 3, 8-TeCDD	dd 3		その他のTeCDFs	df 3
5DDs	その他のTeCDDs	dd 4	5DFs	1, 2, 4, 6, 8-PeCDF	df 4
	その他のPeCDDs	dd 5		その他のPeCDFs	df 5
6DDs	1, 2, 3, 6, 8-PeCDD	dd 6	6DFs	1, 2, 4, 6, 8, 9-HxCDF	df 6
	その他のPeCDDs	dd 7		その他のHxCDF	df 7
	1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	dd 8		1, 2, 3, 4, 6, 8, 9-HpCDF	df 8
7DDs	その他のHxCDDs	dd 9	7DFs	その他のHpCDFs	df 9
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	dd 10		8DF	OCDF
8DD	その他のHpCDDs	dd 11	PCB	totalCo-PCB	cb

3 結 果

3.1 解析手法の選択

最初に採用データ形式であるが、従来の報告では同族体の合計値を使ったものと、異性体値を使用したものがあるが、ここでは異性体情報を解析に使用することにより詳細な結果が得られるものと考え、異性体データを用いることとした。解析手法としてはまず主成分分析を適用し、データの特徴の把握と分類を試みたが、明瞭な結果は得られなかった。次にクラスター分析を使って分類を試みたところ異性体パターン毎にきれいに分類された。またデータは各々単位が異なるためダイオキシン類の合計(PCDDs/DFs+totalCo-PCB)を1とした比率データを採用し、データを規準化した。

クラスター分析による分類に従い分類毎の平均値を用いてCMB 8 Jによる発生源の推定を試みた。ここで現段階でのCMB 8 Jは変数の数が30までの制限があり、分析した全異性体(PCDDs; 11, PCDFs; 15, Co-PCBs; 14)は使用できない。そのため由来が知られている異性体を中心に採用し、顕著な変化の見えない2, 3, 7, 8- 体の中か

らは1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD (PCP, CNP由来)と1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD (PCP由来)を使用した。その他の異性体は各同族体ごとに採用した異性体の値を除いた合計値を採用することにより評価することとした。Co-PCBsは合計値のみを採用した。

3.2 クラスター分析による分類及びCMB 8 Jによる寄与率の推定

使用したクラスター分析は非類似度計算法やクラスター結合法は選択できるようになっている。前者はユークリッド平方距離を用い、後者は一通り計算を実施した後にデータの分類手段として適当と認められたウォード法を採用した。計算結果例を図1に示す。

クラスターの区分(グルーピング)数も計算の途中で設定できるが、取りあえず既定の値‘3’で区分し、各区分ごとに異性体パターンをグラフ化してそのパターンの類似度を確認した。異なるパターンのグラフが混在しパターン的一致が見られない場合には区分数を多くし、再度計算し直してグラフ化する作業を繰り返した。類似パターンに分けられたデータ群ごとに平均値と標準偏差

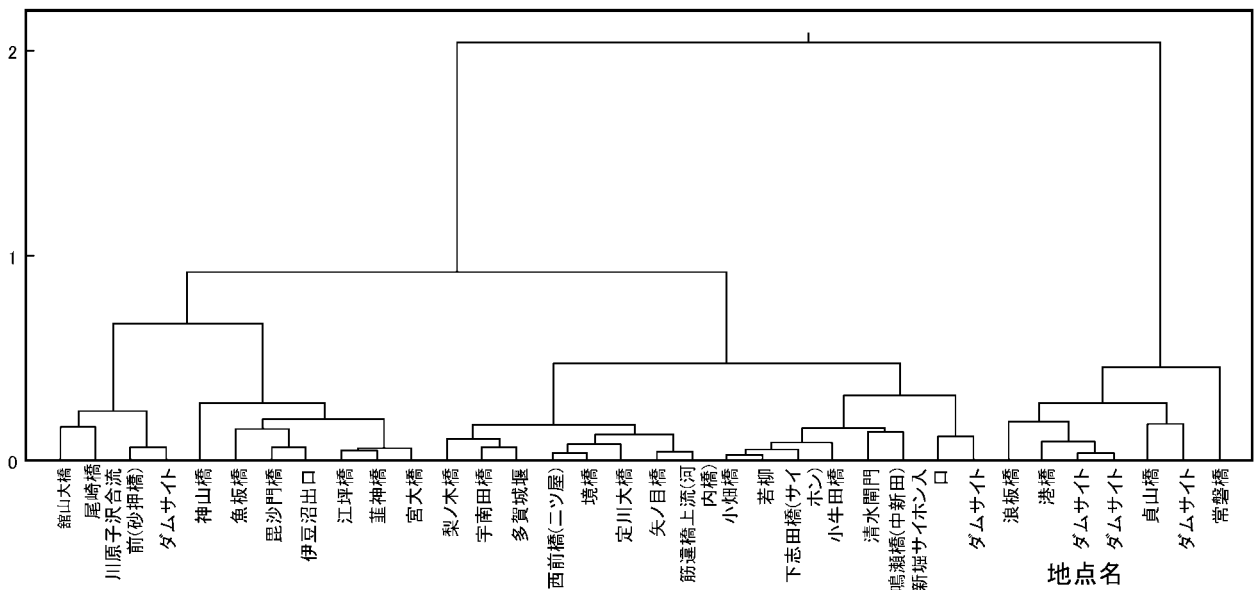


図1 公共用水域のクラスター分析樹形図

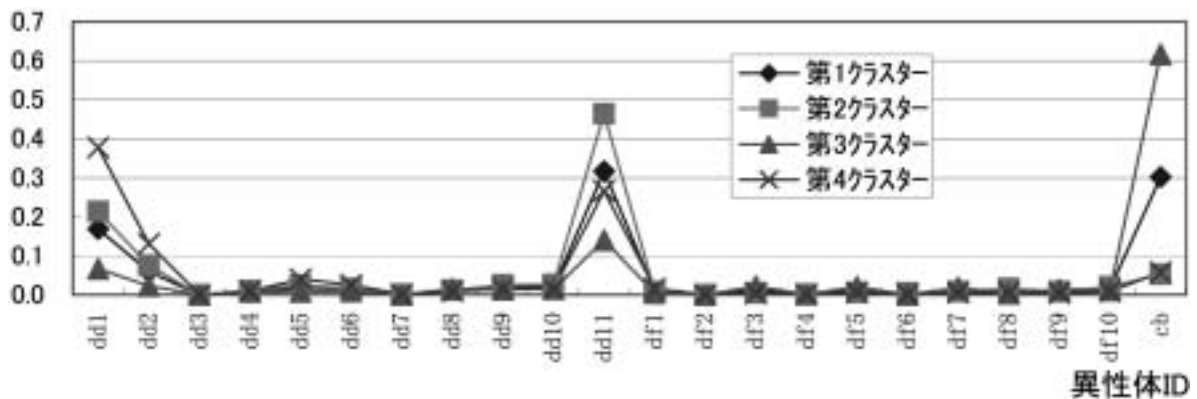


図2 公共用水域クラスター別異性体分布図

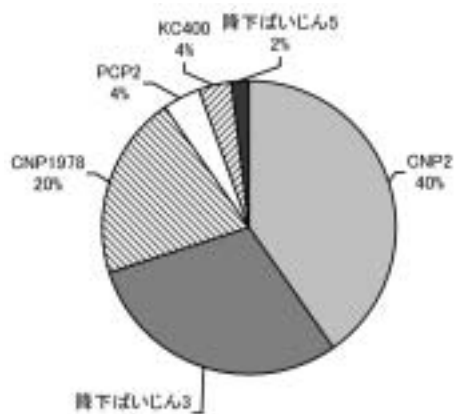


図3 発生源寄与率

を求め、CMB 8 Jに適用した。公共用水域の例を図2に示した。他の土壌、降下ばいじん、排ガス、CNP、PCPについても同様の処理を行った。

公共用水域は1, 3, 6, 8-TCDD, OCDD及びtotal Co-PCBsのバランスの違いから4グループに分類されるようである。これら4グループを個々に個別の環境データとして、土壌（1区分）、降下ばいじん（5区分）、排ガス（3区分）、CNP（2区分）、PCP（2区分）、PCB（4区分）を発生源データとしてCMB 8 Jに適用した。寄与率の計算結果の1例を図3に、図4には同様にして得られた各環境データの寄与率一覧表を示した。

4 考 察

4.1 手法の決定

本研究では濃度データを比率値に置き換えてクラスター分析による分類を行い、クラスターごとにCMB 8 Jを適用することでかなり明確な発生源の推定ができた。はじめに行った主成分分析ではデータ群を重み付けして区分するに止まり、明確な形で推定は行えなかったが、

クラスター分析を用いることで各データ間の特徴が明確になった。公共用水域の例を示すと、第1クラスターではOCDD, 1, 3, 6, 8-Te-CDDと共にCo-PCBが顕著に認められるが、いずれも上流に位置する地点が含まれている。降下ばいじんの比率も高い結果となっているが、比率データ採用により汚染レベルの低い地域的で大気などの環境中に過去の汚染が普遍的に存在しているものが相対的に高くなった結果と思われる。同じく第2クラスターではOCDD, 1, 3, 6, 8-TeCDDが目立っているパターンとなっていて伊豆沼のほかダム下流や河川下流域の地点が多く、PCPをも含む過去の堆積が影響しているものと考えられる。さらに第3クラスターではCo-PCBが圧倒的に高い比率(0.5~0.9)を占めている。ダムサイトの地点では低濃度地点での相対的な結果と考えられるが、そのほかの地点は河口付近であり過去に使用していた船底塗料などの影響と考えられる。第4クラスターでは1, 3, 6, 8あるいは1, 3, 7, 9-TeCDDの値が高く、CNPの寄与が大きいパターンであり多くの地点が属している。

4.2 データ値の採用方法

同族体データではデータ間の特徴が明確に現れず、異性体データを用いることで特徴が明確になり、解析結果に反映したものと思われた。ただし、全異性体情報を得ることは大事なことであるが、現実的には2, 3, 7, 8体の測定が最小要件になっているのみで、そのほかの異性体については特に加えて測定する必要がある。今回用いている異性体についても由来が限られたもので、その他のものについてはその他の異性体合計値で表したためどこまで現象を説明しきれるかは不明である。また、データは本県の一般環境データであり、本県の場合は農業が最もダイオキシン類の負荷量が多いと考えられ、パターンとしてはかなり単純なものと考えられるため、他の発生源の割合の高い地域ではどのような結果が得られるかさらなる検討が必要であろう。

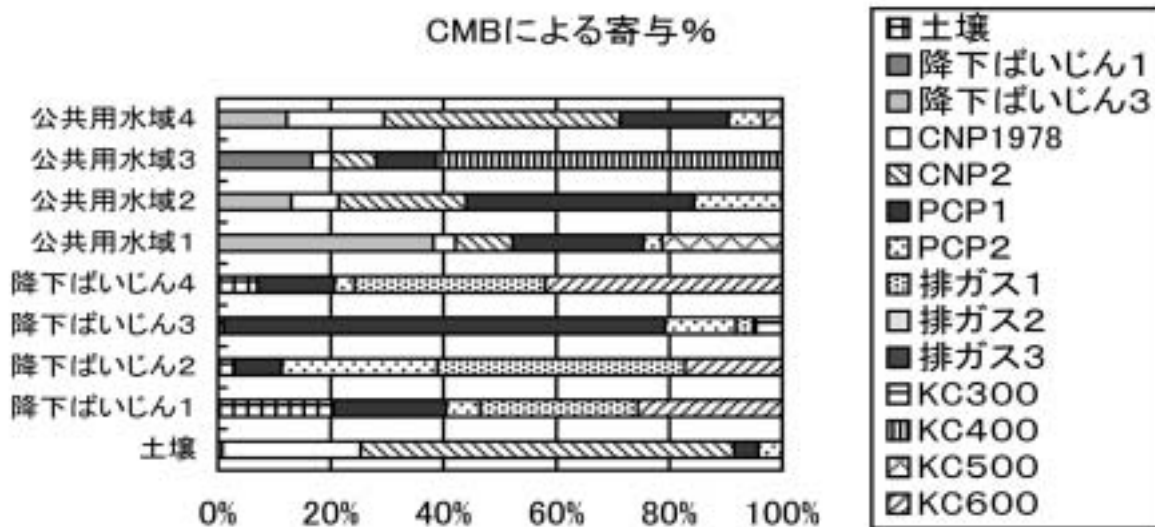


図4 各環境データの寄与率

また、Co-PCBについては解析過程で今ひとつ説明し切れていない感がある。これはPCBについてはダイオキシン類の挙動よりも工業製品由来の影響が強く、ダイオキシン類としてCo-PCBの合計値をひとつのデータとして扱うのは適当でないためと考えられる。つまり、Co-PCBについては独立にその異性体情報について解析すべきと考える。

降下ばいじん、土壌などのデータは、それ自体受容体ではあるが、公共用水域などに対しては発生源とも見なすことができるため、発生源データとしても使用している。しかしながらCMB法については類似データ間の多重共線性が問題になっており、これらのデータはその危険性を含んでいると考えられる。今回はこの点については深く検討していないが、クラスターによるグルーピングを行う際にはグループ間の相関を求めることで過剰なグルーピングによる類似データの設定を避けることができる。例えば、土壌とCNPデータ間では0.969の相関が見られているためデータとしてはCNPで代表される。これらの点については今後の解析に反映していきたい。

4.3 TEQへの適用

ダイオキシン類の分析で最終結果として表示されるTEQ値についても実施したところ説明は可能であった。今まで述べた解析では濃度を基にした物質の発生源を推定できるが、TEQ値での解析の場合は、行政結果として表示されるTEQ値への寄与の高い発生源を端的に探ることができるものと考えられる。ただしTEQ値では2,3,7,8体のデータのみを使用し、2,3,7,8体は概して低濃度であるため、「N.D.」が多く解析できないケースがある。

5 ま と め

本研究は環境基準を超過するような事例あるいは事故に際してその汚染源を推定し、保全対策を効果的にする

ために進めているものである。したがって、通常では同一圏内に存在する発生源データと対応する環境データの間で検討すべきものと考えたが、ダイオキシン類分析では手軽に必要なデータ及び数をそろえることは至難の業である。そこで今回は県内全体をカバーするデータを用いてその手法の確立を試みたものである。言い換えれば県内の汚染の傾向を把握したもので、特定の発生源を推定するものではない。しかしながら複数の地点データを扱う場合でも、クラスター分析による分類で、そのデータ群の特徴を鮮明にし、CMB 8 Jによりそれらの汚染源の寄与を求められることが明らかになった。ただし、使用するデータの精度が結果にかなり影響するので注意を要する。またCMBについてはさらに精度の高い方法も提供されているので今後検討し、モデル地域のデータについて適用をしていく予定である。

6 謝 辞

本研究を進めるに当たり終始ご協力をいただいた青森県の花石氏、早狩氏に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 益永茂樹, 高菅卓三, 中西準子: 横浜国大環境研紀要, 26, 1 (2000)
- 2) 三井化学株式会社. “CNP除草剤中のダイオキシン類分析結果について”
<http://www.mitsui-chem.co.jp/whats/020412a.pdf>, (2003. 12. 1)
- 3) 高菅卓三, 井上毅, 大井悦雅: 環境化学, 5, 647 (1995)
- 4) T.Wakimoto, N.Kannan, M.Ono, R.Tatsukawa and Y.Masuda: *Chemosphere*, 17, 743 (1988)
- 5) 早狩進. “Excel アドイン工房”,
<http://www.jomon.ne.jp/~hayakari>, (2003. 2. 4)