

ダイオキシン類および環境ホルモン分析

Analytical Methods of Dioxins and Endocrine Disrupters

石橋耀一 鋼管計測(株)分析センター センター長
Yohichi Ishibashi

はじめに

我が国の鉄鋼業は環境調和型社会の構築と地球環境保全への貢献を企業の行動指針として明示し、自然および社会との共生、資源循環型の企業活動をめざしている。環境問題は大量素材供給型産業である鉄鋼業にとって不可避の課題である。現状では鉄鋼業からのダイオキシン類の排出量は全国のダイオキシン類総排出量の1/20以下でそれほど目立たないが、現在積極的に鉄鋼業もダイオキシン類の排出量削減を実施している。また鉄鋼業では塗装鋼板など極一部で合成樹脂が使用されているだけなので化学品業界や食品業界などのように環境ホルモンについての配慮を行う必要はないが、プラスチック類のリサイクル事業などに関連する場合は環境ホルモンに対する配慮も必要となる。

化学物質による汚染が自然界に広まり、野生動物と人間に悪影響を及ぼしている可能性が指摘されてからすでに久しい。DDT、ダイオキシン類、PCBなどは発ガン性、催奇形成、変異原性について因果関係が科学的に明らかにされている。ここ数年来ある種の化学物質が、人間や野生動物にホルモンのような働きをし、生殖機能を阻害したり、子孫への悪影響の可能性などが指摘され、あらたに環境ホルモン問題として注目をあびるようになった。シーア・コルボーンらによる著書「奪われし未来」(Our Stolen Future)が1997年9月に出版され、日常生活で身近にあるビスフェノールA、ポリスチレン、フタル酸エステルなどが環境ホルモンの可能性があると指摘された。環境庁は1998年5月にこの問題に対する対応方針をまとめ「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」として発表した。これまでの内外の論文をレビューして、環境ホルモン作用の疑いありとして67種類の化学物質のリストを公表し、河川など全国レベルでのモニタリングにより汚染状況を明らかにし対応策を講ずるとしている。

一方、ダイオキシン類は環境レベルの汚染で人体に生殖障

害や免疫抑制などの影響を及ぼしている可能性があるため、世界各国で汚染削減対策が進められている。1998年5月世界保健機関(WHO)はダイオキシン類の耐容一日摂取量(TDI)の基準値を下げるとともに従来のダイオキシン、ポリ塩化ジベンゾフランに加えて新たにコプラナーPCBを対象化合物に加えた。これを受けて我が国でもTDI基準値の見直しが検討され1999年6月にTDI基準値をWHOに準じて10pgTEQ/kg/日から4pgTEQ/kg/日に変更された。またコプラナーPCBもダイオキシン類とすることが決められた。ダイオキシン(ポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン: PCDDs)は75種類の構造異性体が存在するが毒性の強い2, 3, 7, 8-塩素置換体の7異性体を対象として毒性評価が行われる。ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)はPCDDsと類似した物理化学的性質や生体作用を有し、135種類の構造異性体が存在するが生体作用の強い10種類の2, 3, 7, 8-塩素置換体が毒性評価対象となる(表1、表2)。ポリ塩化ビフェニル(PCBs)も209種類の構造異性体が存在するが共扁平構造をもつ13種類または12種類のコプラナーPCB(Co-PCBs)は毒性が強くその生体作用はPCDDsと類似する。表3、表4に示すようにCo-PCBsは各種PCB製品に存在し、廃棄物の焼却過程で生成することからPCDDs、PCDFsとともに広範囲に環境汚染を引き起こしている。従ってこれらの3種類の化合物はダイオキシン類として総称され総合的に毒性評価が行われている。Co-PCBsはノンオルソ(Non-Co-PCBs)、モノオルソ(Mono-Co-PCBs)およびジオオルソ(Di-Co-PCBs)に大別できる。

毒性評価対象となっているダイオキシン類はいずれも2, 3, 7, 8-TCDDの毒性を1としたときの相対毒性、すなわち2, 3, 7, 8-TCDD毒性等価係数(TEF)が定められている(表1、表2)。各異性体の実測濃度にTEFを乗じた値の総和を2, 3, 7, 8-TCDD毒性等価値(TEQ)とし、これを用いてダイオキシン類の毒性評価がおこなわれる。表1の

表1 毒性評価対象のダイオキシン類異性体と2,3,7,8-TCDD毒性等価係数 (TEF)
(1-TEF: 1990)

化合物	TEF	化合物	TEF	化合物	TEF	化合物	TEF
PCDD		PCDF		Non-Co-PCB		Di-Co-PCB	
2378-Te	1	2378-Te	0.1	33' 44' -Te	0.0005	2233445Hp	0.0001
12378-Pe	0.5	12378-Pe	0.05	33' 44' 5-Pe	0.1	2234455Hp	0.00001
123478-Hx	0.1	23478-Pe	0.5	33' 44' 55' Hx	0.01		
123678-Hx	0.1	123478-Hx	0.1	Mon-Co-PCB			
123789-Hx	0.1	123678-Hx	0.1	233' 44' -Pe	0.0001		
1234678-Hp	0.01	123789-Hx	0.1	23' 44' 5-Pe	0.0001		
12346789-Oc	0.001	234678-Hx	0.1	2' 344' 5-Pe	0.0001		
		1234789-Hp	0.01	2344' 5-Pe	0.0005		
		1234678-Hp	0.01	233' 44' 5Hx	0.0005		
		12346789-Oc	0.001	233' 44' 5' Hx	0.0005		
				23' 44' 55' Hx	0.0001		
				233' 44' 55' Hp	0.0001		

表2 毒性評価対象のダイオキシン類異性体と2,3,7,8-TCDD毒性等価係数 (TEF)
(WHO: 1998)

化合物	TEF	化合物	TEF	化合物	TEF
PCDD		PCDF		Non-Co-PCB	
2378-Te	1	2378-Te	0.1	344' 5Te	0.0001
12378-Pe	1	12378-Pe	0.05	33' 44' Te	0.0001
123478-Hx	0.1	23478-Pe	0.5	33' 44' 5Pe	0.1
123678-Hx	0.1	123478Hx	0.1	33' 44' 55' Hx	0.01
123789-Hx	0.1	123678Hx	0.1	Mon-Co-PCB	
1234678Hp	0.01	123789Hx	0.1	233' 44' Pe	0.0001
12346789Oc	0.001	234678Hx	0.1	2344' 5Pe	0.0005
		1234789Hp	0.01	23' 44' 5Pe	0.0001
		1234678Hp	0.01	2' 344' 5Pe	0.0001
		12346789Oc	0.0001	233' 44' 5Hx	0.0005
				233' 44' 5' Hx	0.0005
				23' 44' 55' Hx	0.00001
				233' 44' 55' Hp	0.0001

表3 PCB製品中のノンオルソコプラナPCBsの含有量

製品名	コプラナーPCB含有量 (μg/g)			
	3,3,4,4' TCD	3,3,4,4',5 PeCB	3,3,4,4',5,5' HxCB	合計
カネクロール				
300	4,300	18	ND	4,318
400	8,000	68	0.4	8,068
500	1,700	28	0.6	1,729
600	970	5.3	ND	975
アロクロール				
1242	5,100	19	ND	5,119
1248	6,200	52	ND	6,252
1254	620	38	0.5	659
1260	250	3.2	ND	253

TEFは従来使われていたものである。表2は1998年にWHOが改訂したTEFである。表1と表2では毒性評価対象化合物の種類およびTEF値が若干相違している。我が国では現在改訂されたTEF値を使用している。

2 ダイオキシン類毒性評価の動向^{1,2)}

1998年WHOはダイオキシン類の毒性が従来考えられて

表4 大都市ごみ焼却施設17箇所における排ガス中ダイオキシン類の平均濃度

化合物	濃度 (pgTEQ/m ³)	濃度 (%)
PCDF	20.8	64.7
PCDD	9.91	30.8
Co-PCB	1.48	4.5
	32.17	100

表5 各国におけるダイオキシン類の耐容一日摂取量 (TDI)

国名あるいは規制機関名	TDI (pgTEQ/kg/日)
日本	4
カナダ	10
WHO欧州地域事務局	4 (目標値1)
オランダ	5 (首相承認値1)
スウェーデン	5
ドイツ	10 (目標値1)
イギリス	10
イタリア	1
米国環境保護庁	0.01*
米国カリフォルニア州	0.007*
米国食品医薬品庁	0.06*

*ダイオキシン類を発がん物質として閾値なしの立場での設定値

いたよりもさらに強いことが毒性実験で明らかになったことから、耐容一日摂取量の基準値を10pgTEQ/kg/日から4pgTEQ/kg/日に変更するとともに、目標値を1pgTEQ/kg/日未満に設定した(表5)。これらの基準値変更の根拠にした毒性データを表6に示す。それらは精子数減少、免疫抑制、雌生殖器官の奇形、神経障害、サルの子宮内膜症である。これらの生体障害を起こす母体の蓄積濃度は28,000pg/kg~73,000pg/kgと極めて微量である。WHOではこれらのデータをヒトに外挿するための不確実係数を5と見なし耐容一日摂取量を設定した。WHOの基準値設定変更に伴い我が国でも検討がおこなわれ、表6のグレイラの胎児毒性データが採用され1999年6月に耐容一日摂取量の基

表6 WHOによるTDI変更の基になった3,7,8-TCDDの毒性と体内負荷量

生体影響量	最小毒性量における母体の蓄積濃度 (pg/kg)	左記の蓄積濃度になる推定摂取量 (pg/kg/日)
ラット： 出生仔精子減少	28000	14
ラット： 出生仔の免疫抑制	50000	25
ラット： 出生仔の生殖器奇形	73000	37
サル： 出生仔の神経障害	42000	21
サル： 子宮内膜症	42000	21

準値をWHOに準じて10pgTEQ/kg/日から4pgTEQ/kg/日に改正された。

3 環境ホルモンの作用機構

環境ホルモン物質は公式には外因性内分泌攪乱化学物質 (Endocrine Disrupters or Endocrine Disrupting Chemicals) と呼ばれている。一般的なホルモンは、脳下垂体や甲状腺、腎臓、副腎、すい臓、精巣、卵巣などの内分泌器官において、必要に応じて生成される化学物質である。ある特定のホルモンにとって、結合する相手のレセプターは通常、一種類しかない、すなわちホルモンとレセプターは一対一の関係にある。これはよく鍵と鍵穴にたとえられるが、この鍵穴 (レセプター) に合鍵がないわけではない。例えば、医薬品として合鍵に当たる化学物質を合成した人工ホルモンが作られている。これは意図的に合鍵を作っているのだが、まったく意図しないで作られ、環境中に放出されている化学物質の中に、レセプターと結合しホルモンの合鍵のように働く化学物質が見つかった。それが環境ホルモン物質である。

4 ダイオキシン類の分析^{3,4)}

4.1 ダイオキシン類の同定および定量

ダイオキシン類の同定および定量はキャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフィーに二重収束型高分解能質量分析計を装着した装置 (HR-GC-MS) で行う。質量分析計の設定分解能はダイオキシン類のクロマトグラム上のピークにできるだけ共存する他の成分の影響を抑えるために、10,000以上に設定する。また、使用する内標準物質によってはそのフラグメントイオンが目標とするダイオキシン類のピークに影響を与えることがあるため分解能を12,000以上に設定することが望ましい。ダイオキシン類の検出には精密分子イオ

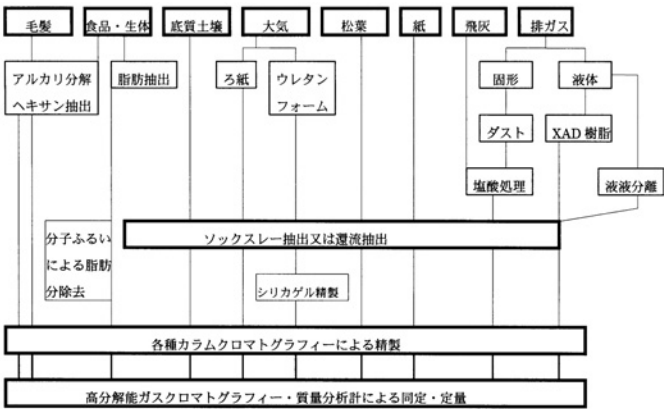


図1 各種試料のダイオキシン類分析法の概要

ン質量数 (m/z) を複数設定して行うため、その繰り返し再現精度を確保する目的で、ロックマス方式を用いる。これはペルフルオロケロセン (PFK) を質量分析計のイオン源部に導入し、繰り返し検出の際にこのPFKイオンをモニターすることによって正確にモニターすべきm/zに設定する方法である。

4.2 抽出溶媒、試薬、器具などの留意点

ダイオキシン類は強い毒性を有するため極めて低濃度の排出基準や環境基準が設定されている。その分析に当たってはpgオーダーあるいはサブpgオーダーの高精度超微量分析が要求される。環境試料、食品、生物、人体などの各分析媒体中には母体マトリックスの他に多種類の汚染物質がダイオキシン類に較べて高濃度で含まれている。そのため夾雑物をいかに効率よく除去し、精製画分中の各ダイオキシン類異性体をいかに高精度で分析するかが重要となる。特に現在毒性評価対象となっているPCDDs7種類、PCDFs10種類、Co-PCBs12種類の化合物を正確に定量する必要がある。有機塩素化合物の超微量分析のためには分析妨害物質の汚染のない試薬や器具類を使用することが重要である。

4.3 試料採取

各種試料の分析法の概要を図1に示す。排ガス濃度は焼却施設によって大きく異なるので高濃度ガスを採取した器具には汚染が残るため低濃度排ガスの採取時には汚染を確実に除去してから使用する。大気試料はハイボリュームエアサンプラーを用い700L/分の捕集速度、24時間で1,000m³を捕集する。

捕集材としてはガラス繊維ろ紙とウレタンフォームが使用される。粒子状ダイオキシン類はガラス繊維ろ紙に、気相状態のものはウレタンフォームに捕集される。河川水、水道水などの水質試料にはPCDFsの骨格であるジベンゾフランが主成分として含まれている。そのため残留塩素があると

PCDFsが生成する。残留塩素を含む試料はその除去が必要になる。

試料採取は信頼性のあるデータを出す上でもっとも重要な作業項目である。さまざまな要因を考慮した時系列および空間的な代表性のあるサンプリングが必要とされる。燃焼排ガスサンプリングではダイオキシン類の損失、変化、二次生成などを極力抑えることが重要である。試料の量、重さ、容積などの正確な測定、周辺情報も必要になる。また吸着剤などの使用前の汚染防止や採取後の試料保管方法にも細心の注意が必要である。

4.4 抽出および精製

4.4.1 内標準物質添加

内標準物質には試料採取時の捕集率を補正する目的で使用するサンプリングスパイク用内標準物質、前処理・精製過程における損失を補正する目的で使用するクリーンアップスパイク用内標準物質、GC-MS分析時における変動を補正する目的で使用するシリジンスパイク用内標準物質がある。多くの場合試料中に含まれるダイオキシン類量は極めて少ない。このような場合サンプリング過程での気散や捕集器への吸着が起こりやすい。抽出や精製過程でも同様なことが起きる。このため内標準物質の添加が義務づけられている。従って信頼性の高い分析結果を得るためには内標準物質の適量添加（一般的には実存量の数倍）が不可欠となる。

4.4.2 抽出操作

図1に示すように固形試料の場合16時間のトルエンソックスレー抽出が行われている。抽出段階で最も重要なのは試料中の水分をできる限り少なくすることである。水分が多いと抽出効率が極端に低くなる。この防止手段としてソックスレー抽出器上部をアルミなどで覆い還流するトルエンの温度を100℃以上に保つと、試料中の水分が気化し冷却器上部に付着するため試料中の水分含有量が低下して抽出効率が高まる。最近迅速抽出法の研究が進展している⁵⁾。

4.4.3 精製法^{6, 7)}

4.4.3.1 多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー

第一段階の精製は夾雑物を除去するための多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーあるいは硫酸処理シリカゲルカラムクロマトグラフィー処理であるが、前者が汎用的に使用されている。多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーは各種分析妨害物の除去効果に優れている。

4.4.3.2 アルミナカラムクロマトグラフィー

精製した調製液についてPCDDs、PCDFsまたはCo-

PCBsのみを測定する場合はPCDDs・PCDFs測定用またはCo-PCBs測定用のアルミナカラムクロマトグラフィー操作を行う。PCDDs・PCDFsおよびCo-PCBsを測定する場合には、PCDDs・PCDFs測定用とCo-PCBs測定用に分けてそれぞれのアルミナカラムクロマトグラフィー操作を行い測定試料を分画する。

4.5 測定

二重収束型質量分析計を用いるガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）がダイオキシン類の同定および定量装置としては不可欠である。質量分析計の分解能は10,000以上でダイオキシン類の各同族体や異性体を正確に測定するために質量校正用標準物質（一般的にはペルフルオロケロセン（PFK））のイオンをモニターし、微小な質量変動を補正可能なロックマス方式を併用した電子衝撃型選択イオン検出法（EI-SIM）により分析を行う。SIMの設定質量数は親イオン群中の2種類のイオンが採用される。標準品と保持時間が一致し塩素同位体比が理論的存在比に対して±15%以内（定量下限値付近の濃度では±25%以内）の誤差で一致することが定性の条件となる。

5 環境ホルモンの分析

環境ホルモンは分析方法では公定法として規格化されているものはビスフェノールAなど極少数で、1998年10月に全国一斉調査が開始された際に、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質、底質、水生生物）」が環境庁より提示された。

5.1 前処理、抽出

前処理・抽出の概要として、水質は液液抽出後にクリーンアップする、底質は固・液抽出し、液液抽出後にクリーンアップする、水生生物はホモジナイズ抽出し、液液抽出後クリーンアップする操作が基本である。環境ホルモンの主要物質の個別前処理法を以下に示す。

アルキルフェノール類（C4～C9）はpH3前後に調製後、塩化ナトリウムを加え、ジクロロメタンで抽出し、脱水、濃縮する。芳香族炭化水素類（ベンゾピレン、ニトロトルエン、スチレン2量体、スチレン3量体など）は塩化ナトリウムを加え、ヘキサンで抽出後脱水、濃縮する。ビスフェノールA、クロロフェノール類はジクロロメタンで抽出し、脱水、濃縮後、トリメチルシリル化を行う。フタル酸エステル類、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルは塩化ナトリウムを加え、ヘキサンで抽出する。

表7 環境ホルモン分析法の概要

対象物質	分析法
ポリ塩化ビフェニール (PCB)	高分解能GC-MS
ポリ臭化ビフェニール (PBB)	高分解能GC-MS
アルキルフェノール類	GC-MS
ビスフェノールA及びクロロフェノール類	誘導体化GC-MS
フタル酸エステル類	GC-MS
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	GC-MS
芳香族化合物	GC-MS
VOC	バージトラップ法GC-MS
有機スズ化合物	GC-MS
女性ホルモン (エストジオール)	ELSA法、GC-MS
有機塩素系農薬	GC-MS
農薬 (多成分分析項目)	GC-MS
フェノキシ酢酸系農薬	誘導体化GC-MS
ベノミル	誘導体化HPLC
アトミロール	誘導体化HPLC
メソミル	誘導体化GC-FPD

5.2 測定

環境ホルモン物質の測定はガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) が基本になる。ポリ塩化ビフェニール (PCBs) やポリ臭化ビフェニール (PBBs) は高分解能GC-MSでの測定が必要になる。PCB、PBB以外の物質は四重極GC-MSによりが測定可能なものが多い。ビスフェノールAや有機スズ化合物やフェノキシ酢酸系農薬は誘導体化処理後にGC-MSで測定する。液体クロマトグラフィー質量分析法 (LS-MS) をもちいると誘導体化せずに直接定量が可能になる。測定法の概要を表7に示す。

5.3 環境ホルモン分析の課題

定量時にマトリックスからの妨害が多く、定量方法の規格化が難しいものが多い。フタル酸エステル類はブランク値の低減を図る必要がある。誘導体化試薬からのブランクにも注意が必要である。誘導体化しない測定法としてLC-MSがある。しかしLC-MSは適用物質の検討が未整備であり、装置の安定性や操作性の問題もあり今後の検討が必要である。定量下限値についても低減化が要求されてくると想定される。現状では交互作用などのため実用化に問題のあるELISA法のようなバイオ手法を用いた測定法についても検討が進んで行くと思われる。

6 まとめ

ダイオキシン類、環境ホルモンの分析は超微量分析であり、サンプリング、抽出、クリーンアップ、測定と煩雑で長時間の処理工程を経て分析値が得られる。精度管理についても多くの検討事項が含まれている。正確で信頼性の高い分析値を得るためにはJISなどに規定されている精度管理項目を確実に実施し、過去の分析データについての知見を蓄積し分析技術を高度化して対応する必要がある。現在ダイオキシン類は法規制を伴った削減策が進展している。我が国の環境の保全状態を監視し改善するためにも信頼性の高いダイオキシン類の分析技術は不可欠である。環境ホルモンの分析では対象物質、定量下限など今後の研究課題が多い。人体への影響についても多くの学説が混在しており未解決の部分が多い。

参考文献

- 1) 宮田秀明：ダイオキシン類分析技術セミナーテキスト，日本分析化学会編，(2000)
- 2) 通商産業省環境立地局監修，産業環境協会発行，公害防止の技術と法規ダイオキシン類編，丸善，(2000)
- 3) JISK0311，排ガス中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定法，日本規格協会，(1999)
- 4) JISK0312，工業用水・工場排水中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定法，日本規格協会，(1999)
- 5) H. Miyamoto, K. Ohtsuka and Y. Ishibashi: Rapid extraction of dioxins from soil, fly ash and XDA-2 resin using accelerated solvent extraction and hot extraction, Organohalogen Compounds, 40 (1999) 1, 215.
- 6) 高菅卓三，八木孝夫：環境微量分析技術の今後の動向，環境研究，19 (2000) 1, 63.
- 7) T. Takasuga, P. Ireland, T. Inoue and T. Takeda: Experience with mass peak profile monitoring in dioxin analysis by HRGC/HRMS-SIM, Chemosphere, 27 (1993) 2, 33.

(2001年7月2日受付)