

表4 近畿での血清中PFOA/PFOS濃度の居住期間による違い

居住期間	男性			女性		
	2年以上	6ヶ月以上	p値	2年以上	6ヶ月以上	p値
参加者数	14	14		20	6	
PFOS (µg/L)						
GM	28.1	21.8	<0.01	13.8	9.4	0.053
GSD	1.5	1.7		1.5	1.3	
PFOA (µg/L)						
GM	12.4	7.1	<0.01	7.1	3.7	<0.01
GSD	1.4	1.4		1.5	1.3	

p値は居住期間についてのt検定

GM:幾何平均、GSD:幾何標準偏差

表5 国内の河川表層水PFOA/PFOS濃度の地域間の比較

地域	採集数	PFOA		PFOS	
		GM(ng/L)	GSD	GM(ng/L)	GSD
北海道-東北地方	16	0.97	3.06	1.19	2.44
関東地方	14	2.84	3.56	3.69	3.93
中部地方	17	2.50	2.23	1.07	2.36
近畿地方	8	21.5	2.28	5.73	3.61
中国地方	9	1.51	2.28	1.00	3.42
九州-四国地方	15	1.93	2.4	0.89	3.09

GM:幾何平均、GSD:幾何標準偏差

表6 淀川、神崎川水系でのPFOA/PFOS汚染源について系統的調査

位置	PFOA (ng/L)	PFOS (ng/L)	位置	PFOA (ng/L)	PFOS (ng/L)	位置	PFOA (ng/L)	PFOS (ng/L)
淀川水系			神崎川水系			大阪国際空港付近		
Y1	563	6.5	K1	215	4.1	O1	39.2	96.0
Y2	463	5.8	K2	40.6	11.0	O2	40.8	9.6
Y3	313	5.8	K3	153	3.3	O3	36.4	57.2
Y4	271	6.3	K4	44.7	1.4	O4	56.6	526
Y5	46.8	13.3	K5	122	2.5	O5	64.4	73.2
Y6	104	4.9	K6	1040	10.9	O6	55.0	10.2
Y7	31.1	11.0	K7	1270	18.2	O7	41.2	30.4
Y8	31.8	10.1	K8	1690	15.7	安威川流域下水道		
Y9	147	26.9	K9	3750	23.3	中央処理場付近		
Y10	33.7	7.3	K10	430	28.8	A1	19400	11.7
Y11	11.3	3.4	K11	80.9	9.4	A2	24080	9.1
Y12	18.5	2.6	K12	47.6	86.2	A3	39500	8.3
Y13	80.9	27.7	K13	4220	14.1	A4	42950	6.1
Y14	30.8	7.5	K14	7990	13.9	A5	67000	13.0
Y15	64.9	24.8	K15	101	7.0	A6	124	1.9
Y16	39.7	24.1	K16	531	6.2	A7	76.0	1.8
Y17	6.6	1.7				A8	3750	20.2
Y18	6.8	2.6						
Y19	4.5	2.5						
Y20	9.3	3.6						
Y21	7.5	1.5						

表7 飲料水中PFOA/PFOS濃度

地域	府県	市名	採集数	PFOA (ng/L)		PFOS (ng/L)	
				GM	GSD	GM	GSD
近畿	兵庫	尼崎・神戸市	5	12.5 <sup>B</sup>	1.6	1.1 <sup>B</sup>	4.3
		大阪 大阪市	5	40.0 <sup>A</sup>	1.1	12.0 <sup>A</sup>	1.1
	京都 京都市	5	5.4 <sup>C</sup>	1.5	4.9 <sup>A</sup>	2.0	
東北	岩手	盛岡市	5	0.7 <sup>D</sup>	1.5	0.2 <sup>B</sup>	2.0
	宮城	仙台市	5	0.13 <sup>E</sup>	1.3	<LOQ <sup>B</sup>	-
	秋田	横手市	5	0.12 <sup>E</sup>	1.2	<LOQ <sup>B</sup>	-

GM:幾何平均、GSD:幾何標準偏差、<LOQ:定量限界以下(計算上0.1と見なす)  
異なる英字同士はシェフェの検定で有意差を示す (p<0.05).

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
(分担)研究報告書

安威川生態系での観察—カメの調査に関する研究

分担研究者 小泉昭夫 京都大学大学院教授  
(班友)森川亜紀子 京都大学大学院医学研究科大学院生

研究要旨 近年、懸念されている化学物質に PFOS (Perfluorooctane sulfonate) と PFOA (Perfluorooctanoic acid) がある。これらは化学的に非常に安定で、環境中では分解されにくい。PFOS および PFOA の生態系への影響については情報量が少なく、現在の報告は野生の鳥類、魚類、海生哺乳類などについての研究例が主である。野生のカメは河川中において食物連鎖の最上位に位置し、生物濃縮の検討に適している。したがって本研究では、野生のカメ (ミシシippアカミミガメとクサガメ) を対象として、カメが PFOS および PFOA を生物濃縮するのか調査した。カメの血中 PFOS・PFOA 濃度を測定したところ、PFOS においては、カメの血中濃度が河川水濃度と比較して極めて高かった。そのため、カメは PFOS を生物濃縮することが示唆された。また PFOA においては、血中濃度は河川水濃度と同程度の濃度であり、濃縮しているとは言えなかった。PFOS と PFOA は極めて類似した構造を持つ化学物質である。それにもかかわらず、カメの体内において PFOS と PFOA の濃縮傾向に大きな差が見られたことは、着目すべき点であると考えられる。

A.研究目的

難分解性化学物質 (POPs : Persistent Organic Pollutants) は、化学的に非常に安定で環境中では分解されにくく、食物連鎖を通じて生物に高濃度に蓄積すると考えられている。POPs は DDT などの「農薬」、PCB などの「工業原料」、ダイオキシンなどの「非意図的生産物」の3つに分類され、新規化合物が次々と産業界に導入されている。また、近年、生態系への影響が懸念されている化学物質に、有機フッ素化合物である Perfluorooctane sulfonate (PFOS) やその類似化合物の Perfluorooctanoic acid (PFOA) がある (Fig.1 参照)。PFOS は

フッ素で飽和された化合物であり、疎水部はペルフルオロアルキル基 (Rf 基)、親水部はスルホン基からなる界面活性剤である。Rf 基において F はきわめて強い電気陰性度を持ち、C-F 結合は極めて強い結合力を持っている。そのため自然変化や生物代謝を受けないとされており、壊れにくい物質と考えられている。PFOS、PFOA のヒトや生態系への影響は多くの国民の関心事であり不安要因となっているが、環境への放出にいたるライフサイクルについての情報量は少ない。現在報告されているのは、野生の鳥類、魚類、海生哺乳類などの研究が主である。PFOS は世界中の多くの海生哺乳

類の肝臓と血液で検出されている1)。また、PFOSは魚類の体内で生物濃縮し、蓄積性があることが報告されている2)。PFOAにおいては、生物には蓄積するという報告はない。

PFOSとPFOAに関しては、物質が生物へ蓄積する場合、蓄積性の指標となる水・オクタノール分配係数が測定不可能であるため、自然界の生物がどれだけPFOS・PFOAに汚染されているかを調査するためには、生物体内の濃度を実測するしかない。以上のように、PFOSとPFOAの環境中の挙動は、解明されていないことが多く、情報の収集は急務である。

生態系へのPFOS及びPFOAの影響について検討する場合、生物がこれらの物質を生物濃縮するかどうかは重要な情報である。カメは河川の生態系において、食物連鎖の最も上位に位置し、生物濃縮を検討するためには適していると考えられる。したがって本研究では2種類のカメ、ミシシippアカミミガメ(学名: *Trachemys scripta elegans*)とクサガメ(学名: *Chinemys reevesii*)を対象とし、カメがPFOS・PFOAの生物濃縮を行うかどうか検討を試みた。世界的に見てもカメの体内のPFOS・PFOA濃度を測定している研究例は前例がなく、研究としての意義は大きい。

## B. 研究方法

小泉らは、日本において関西地方は特にPFOAの汚染が進んでいることが報告している3)。本研究では、その中でも特に汚染が進んでいる大阪府の安威川の生態系に着目した。

カメの捕獲は安威川においてPFOA濃度が

特に高い地点周辺を5地点(上流からA~E地点)選び(Fig.2参照)、2003年9月から10月までの期間、カメかごを用いて行った。かごに餌として塩サバの頭を串刺しにして5、6個入れ、かごの3分の2が水に浸かるように安威川に仕掛けた。かごを仕掛けた後、2~3時間後に川から引き上げ、中のカメを捕獲して研究室へ持ち帰った。

捕獲したカメは、基本的なデータであるカメの体重・甲長・性別・年齢を測定した。カメの年齢は甲羅にある年輪のような線を数えて判定し、のちに全てのカメの採血を行った。採血方法は、カメの腹部からキリで穴を開け、そこに注射針を刺し心臓から1.5ml採血した。採血後は接着剤(シアノアクリレート系)で、カメに開けた穴をふさいだ。血液は真空採血管にいれ、それを遠心分離機で15分3000rpm遠心させた後に、血清をメタノールで洗浄したチューブに分注して測定までの間、-40℃で冷凍保存した。血清中のPFOSおよびPFOA濃度は、岩手県環境保健研究センターにおいて、LC/MSを用いて測定した(測定方法の詳細は、分担研究者: 齋藤が報告する)。

捕獲したカメのうち日本では全国的に個体数が少なくなっているクサガメは、もとにいた場所へ返した。ミシシippアカミミガメは解剖し、肝臓・腎臓・精巣・卵巣・筋組織・脂肪組織と、一部のカメの尿を摘出した。肝臓はホルマリン保存し、その他は-40℃で冷凍保存した。カメを捕獲すると同時に、カメが餌にしていると思われるタニシや小魚、水草類も採取し冷凍保存した。加えて、カメの捕獲地点で安威川の河川水の採水も行った。河川水は1地点につき4L採水し、測定までの間は4℃で保管した。

河川水の PFOS および PFOA 濃度も、血中濃度と同様に LC/MS で測定し、河川水の濃度とカメの血中濃度を比較して、カメが PFOS および PFOA を生物濃縮しているかどうか検討した。

PFOS は肝臓に蓄積するという報告が多数ある。そこで本研究でも、PFOS と PFOA がカメの肝臓にどのような影響をおよぼしているかを調査するために、ミシシッピアカミミガメの肝臓組織を HE (ヘマトキシリン-リオジン) 染色し、プレパラートを作成して組織を光学顕微鏡で観察した。

#### C.結果と D.考察

捕獲できたカメは、クサガメが 25 匹、ミシシッピアカミミガメが 30 匹の合計 55 匹であった。最も上流の A 地点では、ミシシッピアカミミガメ 1 匹のみの捕獲に留まった。カメの年齢は、歳をとって甲羅の線が消えたり、クサガメの場合は歳をとると黒化(体全体が黒く変色する)してしまうために判定が難しく多少の誤差が考えられる。

河川水の PFOA 濃度は浄水場の放流口がある B 地点で極めて高濃度 (87100ng/L) で検出された (Table1 参照)。A 地点では PFOA が低濃度であり B 地点から下流では漸減的ではあるが PFOA が高濃度に検出された。したがって、浄水場から放流される水に高濃度の PFOA が含まれると考えられる。PFOS については、A 地点では他の地点と比較して低濃度であったが、B 地点より下流においては地点によって大きな濃度差はなかった。(Table.2 参照)

カメの血中濃度と河川水濃度の関係を見ると、PFOA は河川水濃度が低くなるにつれ、血中濃度が低くなる傾向があった(相関係

数-0.35)。また、河川水濃度と比較しても同程度の濃度であった (Table.2 参照)。したがって、カメは PFOA をあまり濃縮しないことが示唆された。PFOS に関しては、血中濃度は河川水濃度と比較して、高い濃度が検出され、生物濃縮係数 (Bioconcentration of PFOS) も 103 以上であり極めて高かった。このことから、PFOS は魚類と同様にカメにも生体濃縮すると考えられた。PFOS と PFOA は構造的にとっても酷似した化学物質である。それにもかかわらず、今回の調査では、カメの体内において、PFOS と PFOA は濃縮傾向に大きな差が見られた。この原因の一つとしては、カメの体内に PFOS と PFOA のわずかな構造の差を識別するタンパク質 (binding protein) が存在し、血中濃度に影響している可能性がある。このタンパク質が PFOS に強く結合し、PFOA の結合力は弱いいため、カメの体内に PFOS が濃縮されるのではないかと考える。それに加え、カメが PFOS を排泄する能力と、PFOA を排泄する能力とでは、差があることも考えられる。これらの仮説については今後も検討が必要である。

次に、カメの血中濃度と河川水濃度の関係を、分散分析によってさらに詳細に調べた。その結果、PFOA の血中濃度はクサガメの方がミシシッピアカミミガメより有意に高かった ( $P<0.01$ ) (Fig.3 参照)。また、PFOS の血中濃度においては、ミシシッピアカミミガメの方が、クサガメより高い濃度で検出された ( $P<0.05$ )。この結果から、カメの血中 PFOS・PFOA 濃度は、カメの種類によって異なることが示唆された。この要因として考えられるのは、クサガメとミシ

シッピアカミミガメの食性の違いである。体内に摂取する餌の種類が異なるために、血中濃度にもカメの種類が関係したものと考えられる。安威川のカメが餌にしていると考えられるタニシや水草の濃度はまだ測定していないが、今後測定して、この結果について検討する予定である。

また、ミシシッピアカミミガメの肝組織を光学顕微鏡で観察したところ、歳をとったカメ（15歳以上と推定した）に、黒い色素の集合体が多数見られた。カメの肝臓は歳をとると脂肪が溜まる傾向があり、またメラノマクロファージという色素が年齢と相関して増加するという報告がある 4)。カエルではカドミウムの影響を受けて、メラノマクロファージが増加する傾向がある 5)。今回観察された色素も、老年のカメに多く見られたことから、メラノマクロファージであると推察した。メラノマクロファージに関しては、肝臓の単位面積あたりのメラノマクロファージが占める面積と、その集合体の数を調査している。そしてその結果と、PFOS・PFOAの血中濃度がどう関連しているか、検討する予定である。また、HE染色だけでなく脂肪染色を行い、カメの肝臓への脂肪の蓄積状態と濃度の関係も、今後は検討していく予定である。

#### E. 結論

現在までの研究においては、PFOAの河川水濃度が他地域の河川と比較して高濃度の河川に生息するカメを対象とした。今後は、汚染の進んでいない地域でもPFOSとPFOAの濃縮係数の差が大きいのか明確にするため、今回の対象地点よりもPFOA汚染が進んでいない地域に生息するカメの捕

獲も行う予定である。また肝組織においても、低濃度に汚染された組織と、高濃度に汚染された組織を比較することによって、より明瞭な結果が得られると考える。

#### 文献

- 1) Giesy, J.P. and K. Kannan, *Environ Sci Technol*, 2001, 35, 1339-42. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife.
  - 2) Martin, J.W., et al., *Environ Toxicol Chem*, 2003, 22, 196-204, Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
  - 3) Saito, N., et al., *Arch Environ Contam Toxicol*, 2003, 45, 149-158. Perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan.
  - 4) James L. Christlamsen, *Pigment cell Res.* 1996 Melanomacrophage aggregations and their age relationship in the yellow mud turtle, *kinosternon flavescens*.
  - 5) N.S Loumbourdis, *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002, Sep. 53(1)52-8 Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *rana ridibunda*.
- #### F. 健康危険情報
- 特になし。
- #### G. 研究発表
1. 論文発表  
1. Saito N, Sasaki K, Nakatome K, Harada K, Yoshinaga T, Koizumi A (2003): Perfluorooctane sulfonate concentration in surface water in Japan.

Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45: 149-158

2. Saito N, Harada K, Inoue K, Sasaki K, Yoshinaga T, Koizumi K (2004) Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentration in surface water in Japan. J Occup. Health. 46: 49-59

3. Sasaki K, Harada K, Saito N, Tsutsui T, Nakanishi S, Tsuzuki H, Koizumi A (2003) Impact of airborne perfluorooctane sulfonate on the human body burden and the ecological system. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71: 408-413

4. Harada K, Saito N, Sasaki K, Inoue K, Koizumi K, (2003) : Perfluorooctane sulfonate contamination of drinking water in the Tama River, Japan: Estimated effects on resident serum

levels., Bull. Environ. Contam. Toxicol.. 71, 31-36.

2. 学会発表

森川亜紀子、亀井直哉、齋藤憲光、原田浩二、井上佳代子、吉永侃夫、小泉昭夫、カメの体内におけるPFOSおよびPFOAの生物濃縮、第74回日本衛生学会総会(2004年3月24-27日)

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

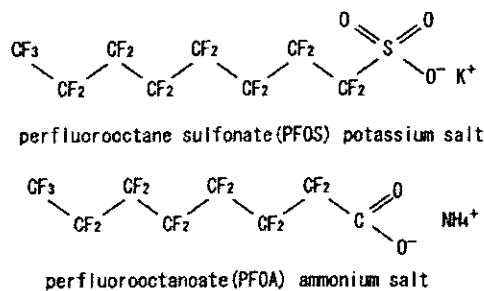


Fig.1 PFOSとPFOAの構造

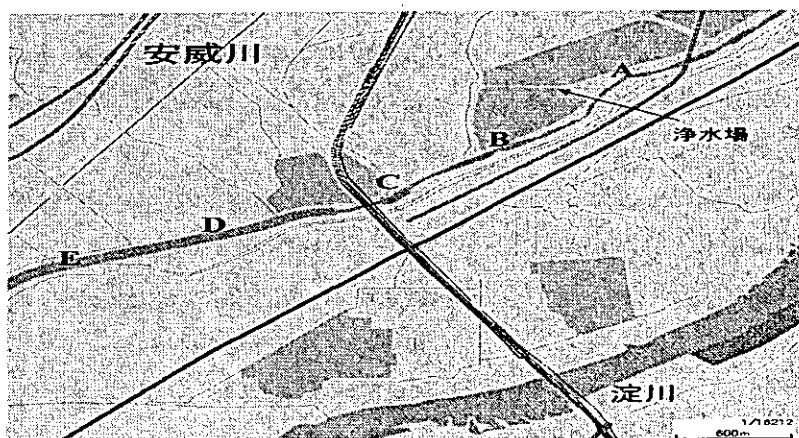


Fig.2 カメの捕獲地点

Table.1 安威川河川水の汚染状況

site	A	B	C	D	E
PFOA(ng/L)	16.7	87,100	56,700	52,300	39,900
PFOS(ng/L)	2.9	11.3	8.4	12.3	11.4

Table.2 地点ごとのカメの血中PFOS・PFOA濃度

Table1 Name of river	Site	N	sex ratio		age		species	Environment PFOA( $\mu\text{g/L}$ )	Serum PFOA( $\mu\text{g/L}$ )	Bioconcentration of PFOA
			F:M		range					
Ai river	A	3	2:1		12.2(1.3)	0-15	T:1 C:2	$16.7 \times 10^{-3}$	LOQ	LOQ
	B	10	3:2		9.1(1.7)	0-15	T:5 C:5	87.1	88.4(5.0)	1.2(4.7)
	C	17	11:6		5.9(1.6)	3-15	T:9 C:8	56.7	47(11.1)	1.2(3.6)
	D	11	9:2		8.0(1.5)	4-15	T:5 C:6	52.3	49.2(5.8)	0.9(5.8)
	E	14	3:4		9.7(1.8)	4-15	T:9 C:5	39.9	115(4.8)	2.9(4.8)

Name of river	Site	N	sex ratio		age		species	Environment PFOS( $\mu\text{g/L}$ )	Serum PFOS( $\mu\text{g/L}$ )	Bioconcentration of PFOS
			F:M		range					
Ai river	A	3	2:1		12.2(1.3)	0-15	T:1 C:2	$2.9 \times 10^{-3}$	108.2(2.8)	$3.8 \times 10^4(2.8)$
	B	10	3:2		9.1(1.7)	0-15	T:5 C:5	$11.3 \times 10^{-3}$	283.3(1.6)	$2.5 \times 10^4(1.6)$
	C	17	11:6		5.9(1.6)	3-15	T:9 C:8	$8.4 \times 10^{-3}$	89.5(3.8)	$1.1 \times 10^4(3.8)$
	D	11	9:2		8.0(1.5)	4-15	T:5 C:6	$12.3 \times 10^{-3}$	127.2(1.9)	$1.0 \times 10^4(1.9)$
	E	14	3:4		9.7(1.8)	4-15	T:9 C:5	$11.4 \times 10^{-3}$	187.2(1.7)	$1.6 \times 10^4(1.7)$

Table.3 クサガメ(C)とアカミミガメ(T)の血中濃度

Name of river	Site	N	sex ratio		age		Environment PFOA( $\mu\text{g/L}$ )	Serum PFOA( $\mu\text{g/L}$ )	Bioconcentration of PFOA
			F:M		range				
Ai river	A	2	1:1		3.2(5.1)	0-10	$16.7 \times 10^{-3}$	LOQ	LOQ
	B	4	1:1		6.3(1.3)	5-7	87.1	224.5(1.7)	2.6(1.7)
	C	7	5:2		6.8(1.3)	5-9	56.7	138.1(5.1)	3.2(5.1)
	D	6	5:1		8.4(1.3)	6-11	52.3	57.5(3.9)	1.3(3.9)
	E	5	2:3		11.7(1.4)	8-15	39.9	431.3(1.4)	11.0(1.4)

Name of river	Site	N	sex ratio		age		Environment PFOS( $\mu\text{g/L}$ )	Serum PFOS( $\mu\text{g/L}$ )	Bioconcentration of PFOS
			F:M		range				
Ai river	A	2	1:1		3.2(5.1)	0-10	$2.9 \times 10^{-3}$	104.1(4.4)	$3.4 \times 10^4(4.4)$
	B	4	1:1		6.3(1.3)	5-7	$11.3 \times 10^{-3}$	212.9(1.6)	$1.9 \times 10^4(1.6)$
	C	7	5:2		6.8(1.3)	5-9	$8.4 \times 10^{-3}$	55.1(4.1)	$5.9 \times 10^3(4.1)$
	D	6	5:1		8.4(1.3)	6-11	$12.3 \times 10^{-3}$	77.8(2.0)	$6.2 \times 10^3(2.0)$
	E	5	2:3		11.7(1.4)	8-15	$11.4 \times 10^{-3}$	176.1(1.9)	$1.5 \times 10^4(1.9)$

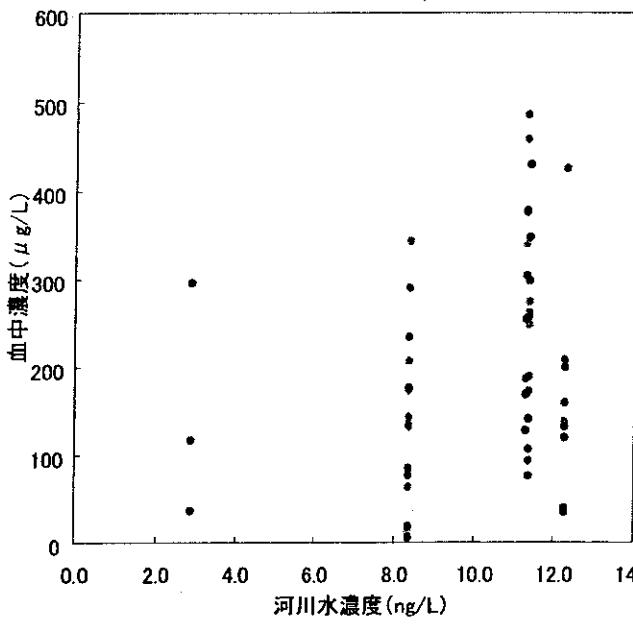
Name of river	Site	N	sex ratio		age		Environment PFOA( $\mu\text{g/L}$ )	Serum PFOA( $\mu\text{g/L}$ )	Bioconcentration of PFOA
			F:M		range				
Ai river	A	1	1:1		15.0(1.0)	0-15	$16.7 \times 10^{-3}$	LOQ	LOQ
	B	6	1:1		15.0(1.0)	0-15	87.1	46.8(6.0)	0.5(6.0)
	C	10	5:2		5.6(1.7)	4-15	56.7	23.9(6.2)	0.2(6.2)
	D	5	5:1		7.8(1.8)	4-15	52.3	35.2(7.7)	0.7(7.7)
	E	9	2:3		8.7(1.9)	4-15	39.9	49.8(4.1)	1.2(4.1)

Name of river	Site	N	sex ratio		age		Environment PFOS( $\mu\text{g/L}$ )	Serum PFOS( $\mu\text{g/L}$ )	Bioconcentration of PFOS
			F:M		range				
Ai river	A	1	1:1		15.0(1.0)	0-15	$2.9 \times 10^{-3}$	116.8	$4.1 \times 10^4$
	B	6	1:1		15.0(1.0)	0-15	$11.3 \times 10^{-3}$	342.7(1.4)	$3.0 \times 10^4(1.4)$
	C	10	5:2		5.6(1.7)	4-15	$8.4 \times 10^{-3}$	124.4(2.7)	$1.5 \times 10^4(2.7)$
	D	5	5:1		7.8(1.8)	4-15	$12.3 \times 10^{-3}$	208.0(1.5)	$1.7 \times 10^4(1.5)$
	E	9	2:3		8.7(1.9)	4-15	$11.4 \times 10^{-3}$	193.7(1.6)	$1.7 \times 10^4(1.6)$



PFOS 河川水濃度-血中濃度



PFOA河川水濃度-血中濃度

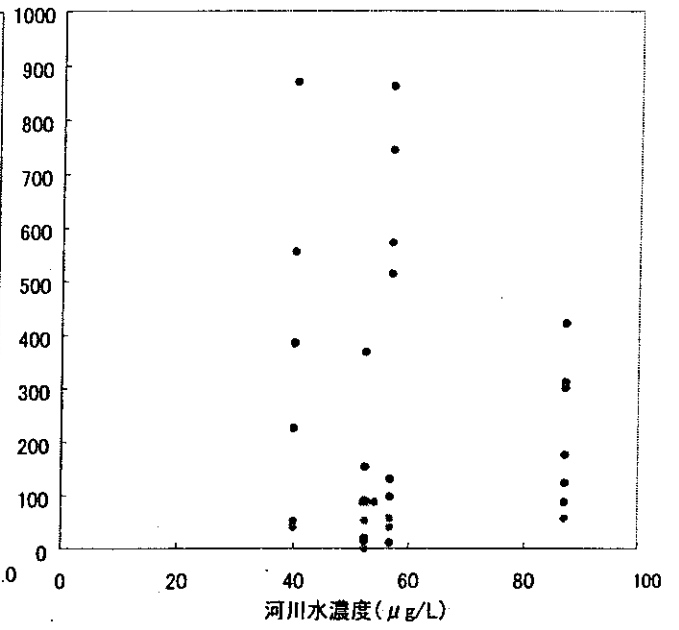


Fig.3 カメの血中濃度と河川水濃度の関係図

- ミシシippiaカミミガメ
- クサガメ

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
研究報告書

微量定量に関する研究－PCB および PBDEs

分担研究者 藤峰慶徳、（大塚製薬株）大塚ライフサイエンス事業部

研究要旨：生体・食事試料は貴重なサンプルであるため限られた量しか採取できない場合がありそこから多くの情報を得るためには分析サンプル量を少量化し正確に分析できるかが重要な課題である。今回我々は生体試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）、ポリ塩素化ビフェニル（PCBs）の分析法を基に分析試料少量化の検討を行いヒトの主要な異性体濃度を迅速高感度に測定する方法を開発し試料バンクサンプルの分析を行った。

#### A. 研究目的

我々は ISO 17025 における母乳・血液中ダイオキシン類測定において認定機関として、これまで生体試料に焦点を置いた分析方法の開発や定量作業を実施してきた。この結果として、15 g から 30 g の血液や人体組織等の生体試料を用いた臭素系難燃剤としてのポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）およびポリ塩素化ビフェニル（PCBs）の各異性体濃度を正確に測定する測定系を開発している<sup>1,2)</sup>。この測定系では、PBDEs および PCBs に存在する 209 種のそれぞれの異性体を区別して定量する事が可能であり、PBDEs および PCBs による人体汚染の解明に極めて重要な情報を与える反面、貴重な生体試料を多量に必要とすることから、PBDEs や PCBs による人体汚染の疫学調査等のマス・スクリーニングに使用することは困難である。今回、我々が協力する試料バンク形成では、取り扱われる試料量は血液および食事試料における採取や保管の問題より、各試料の取扱量は数 g と

考えられ、さらにその試料量において分析を実施するために消費が許容される試料量は 1 g から 2 g 程度と想定される。このような背景より、既に我々が開発した生体試料中 PBDEs と PCBs 測定系を基礎として、試料バンクへの応用を目的に分析対象試料の少量化の検討を行った。なお、この検討においては今後バンクを形成する試料の多検体同時測定なども想定され、さらにはバンクから提供する情報の有用性を考慮して、結果報告の迅速性を目的とした簡易化への検討も重要であると判断した。

#### B. 研究方法

##### B-1. 材料

##### B-1.1. 試料

血液試料：試料バンクより提供された全血試料を用いた。

食事試料：試料バンクより提出された検討用試料を用いた。

##### B-1.2. 試薬

PCBs の検量線作成には CIL（Cambridge

Isotope Laboratories) 社製 EPA Method 1668 A PCB Calibration Solutions CS0.2-CS4 を用い、PBDEs の検量線作成には CIL 社製 Brominated Diphenyl Ether Calibration Solutions CS1-CS6 を用いて作成した。クリーンアップスパイク溶液には  $^{13}\text{C}_{12}$  標識 PBDEs (6 種類) および  $^{13}\text{C}_{12}$  標識 PCBs (4-7 塩素化体 PCBs ; 16 種類) (CIL 社製) を用いた。シリンジスパイクには  $^3\text{C}_{12}$  標識 PBDEs (2 種類) および  $^3\text{C}_{12}$  標識 PCBs (4-6 塩素化体 PCBs ; 3 種類) (CIL 社製) を用いた。

ヘキサン等の各種有機溶媒は和光純薬工業(株)社製のダイオキシン類分析用を用いた。なお、n-ヘキサンをヘキサンと表記する。

全操作ブランクおよびアルカリ分解用水溶液の作製に用いたヘキサン洗浄水はミリポア社製グラジェントより得た超純水にヘキサンを加え 60 分間激しく振とうした後、これを一夜放置して得た。

アルカリ分解用の水酸化カリウム水溶液は Merck 社製の水酸化カリウムをヘキサン洗浄水に溶解して作製した。

食品からの抽出過程では、ソックスレー抽出装置 (BUCHI B-811 型) を用いて熱還流抽出を実施した。

多層カラムシリカゲルカラムクロマトグラフィーに用いる各種充填剤はシリカゲル類を和光純薬工業(株)社製のダイオキシン類分析用を用い、無水硫酸ナトリウムは関東化学社製残留農薬試験・PCB 試験用を用いた。

## B-2.方法

### B.2.1.血液試料

#### B.2.1.1.アルカリ分解

試料を解凍後、ガラス製メスピペットを用い正確に試料量を測定しながら、ガラス製遠沈管へ分注した。これに分析対象物質に対応する内部標準溶液をマイクロシリンジにて正確に添加し、続いて 2 M-KOH を 1 mL 加え共詮により密閉して、2 時間振とう器にて振とうすることによりアルカリ分解を行った。

#### B.2.1.2 抽出および分取

アルカリ分解後の溶液にエタノール/ヘキサン洗浄水 (1/2) 溶液 1.5 mL とヘキサン 1 mL を加え、共詮により密閉して、30 分間振とう器にて振とうした。振とう後、2000 r.p.m.にて 3 分間遠心分離を行い、有機層を分離した。分離した有機層はパスツールピペットを用いて別の遠沈管へ分取した。残渣にはヘキサン 1 mL を加え、共詮により密閉して、30 分間振とう抽出を行い、振とう後、2000 r.p.m.にて 3 分間遠心分離によりヘキサン層を分離した。得られたヘキサン層はパスツールピペットにて分取して先の有機層と合わせた。この抽出および分取過程をさらにもう一度繰り返し、合計 3 回の抽出を実施した。

#### B.2.1.3.洗浄

得られたヘキサン相にヘキサン洗浄水 1 mL を加え、2 分間振とう器にて振とうすることにより洗浄を行った。次に 2000 r.p.m.にて 3 分間遠心分離を行い、分離後、下部の水層をパスツールピペットにて分取し、除去した。この洗浄過程を合計 3 回行った後、ヘキサン相に無水硫酸ナトリウムを加え、5 分間放置して脱水した。

#### B.2.2.多層カラムクロマトグラフィーによる精製

精製に用いる多層カラムクロマト管を次

の手順にて作成した。内径約 15 mm、長さ約 300 mm のガラス製カラムクロマト管にシリカゲル 0.9 g、2%水酸化カリウムシリカゲル 3.0 g、シリカゲル 0.9 g、44%硫酸シリカゲル 4.5 g、22%硫酸シリカゲル 6.0 g、シリカゲル 0.9 g、10%硝酸銀-シリカゲル 3.0 g を順次ヘキサンで充填し、その上部に無水硫酸ナトリウム 1.5 g を積層した。これにヘキサン 100 mL を流速 2.5 mL/min で流し、充填物を洗浄した。洗浄後のカラムクロマト管に先の脱水済みのヘキサン溶液をパスツールピペットにてアプライした。なお、ヘキサン溶液の入っていた容器はおよそ 2 mL のヘキサンで 2 回洗い出し、これを先のヘキサン溶液同様にクロマト管へアプライした。試料のアプライが終わった後、50 mL のヘキサンを流速 2.5 mL/min で流しこの溶出成分は廃棄した。続いて、ジクロロメタン/ヘキサン (1/9) 150 mL を流速 2.5 mL/min で流しこの溶出成分をナスフラスコにて捕集し PBDEs 測定溶液とした。なお、PCB 測定の場合には試料のアプライが終わった後、ジクロロメタン/ヘキサン (1/9) 100 mL を流速 2.5 mL/min で流しこの溶出成分をナスフラスコにて捕集し PCBs 測定溶液とした。

カラムクロマトグラフィーによる溶出液は減圧ロータリーエバポレーターで溶媒を除去し、これを測定用のバイアルへ移し測定対象物質に対応したシリンジスパイクを加え窒素気流下にて濃縮した。測定用最終検液はノナン溶液として、およそ 20  $\mu$ L とした。

## B.2.2. 食事試料

### B.2.2.1. 試料の前処理および抽出

試料解凍後、予備洗浄をしたガラス製の遠沈管へ試料を移し重量を秤量した後、内

部標準物質を加え、遠心分離により固体成分と液体成分に分離した。液体成分は分取後血液と同様のアルカリ分解と抽出作業を行った。一方、固体試料は凍結乾燥により水分除去後無水硫酸ナトリウムと混合して、乳鉢にて粉碎後、ソックスレー抽出装置 (BUCHI B-811型) を用いてトルエン溶媒にて 4 時間の熱還流抽出を行った。抽出液をヘキサン転溶した後、液体成分より得た抽出液とあわせ、サンプル抽出液とした。

### B.2.2.2. 硫酸処理

PCBs 用のサンプル抽出液を分液ロートへ移し濃硫酸を 3 mL 加え、軽く振とうした。振とう後静置して分離させ、硫酸層を除去した。この硫酸処理過程を合計 3 回程度行った。さらに、ヘキサン相にヘキサン洗浄水 1 mL を加え、2 分間振とう器にて振とうすることにより洗浄を行った。次に 2000 r.p.m.にて 3 分間遠心分離を行い、分離後、下部の水層をパスツールピペットにて分取し、除去した。この洗浄過程を合計 3 回行った後、ヘキサン相に無水硫酸ナトリウムを加え、5 分間放置して脱水した。なお、PBDEs 測定の場合には硫酸処理を行わないものとした。

### B.2.2. 多層カラムクロマトグラフィーによる精製

精製に用いる多層カラムクロマト管を次の手順にて作成した。内径約 15 mm、長さ約 300 mm のガラス製カラムクロマト管にシリカゲル 0.9 g、2%水酸化カリウムシリカゲル 3.0 g、シリカゲル 0.9 g、44%硫酸シリカゲル 4.5 g、22%硫酸シリカゲル 6.0 g、シリカゲル 0.9 g、10%硝酸銀-シリカゲル 3.0 g を順次ヘキサンで充填し、その上部に無水硫酸ナトリウム 1.5 g を積層した。これにヘ

キサン 200 mL を流速 2.5 mL/min で流し、充填物を洗浄した。洗浄後のカラムクロマト管に先のヘキサン溶液をパスツールピペットにてアプライした。なお、ヘキサン溶液の入っていた容器はおよそ 2 mL のヘキサンで 2 回洗い出し、これを先のヘキサン溶液同様にクロマト管へアプライした。試料のアプライが終わった後、50 mL のヘキサンを流速 2.5 mL/min で流しこの溶出成分は廃棄した。続いて、ジクロロメタン/ヘキサン (1/9) 150 mL を流速 2.5 mL/min で流しこの溶出成分をナスフラスコにて捕集し PBDEs 測定溶液とした。なお、PCB 測定の場合には試料のアプライが終わった後、ジクロロメタン/ヘキサン (1/9) 100 mL を流速 2.5 mL/min で流しこの溶出成分をナスフラスコにて捕集し PCBs 測定溶液とした。カラムクロマトグラフィーによる溶出液は減圧ロータリーエバポレーターで溶媒を除去し、これを測定用のバイヤルへ移し測定対象物質に対応したシリンジスパイクを加え窒素気流下にて濃縮した。測定用最終検液はノナン溶液として、およそ 20  $\mu$ L とした。

### B-3. GC/MS 測定条件

#### B-3.1. PBDEs 測定

##### B-3.1.1. 測定機器

ガスクロマトグラフ : HP6890 (Hewlett Packard)、オートインジェクター付き。

質量分析計 : Autospec-Ultima (Micromass)

##### B-4.1.2. 操作条件

ガスクロマトグラフ

カラム : DB17HT キャピラリーカラム

長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.15  $\mu$ m (J&W 社)

カラム温度 : 180 $^{\circ}$ C (2 分間保持) 3 $^{\circ}$ C/分で

240 $^{\circ}$ Cまで昇温、20 $^{\circ}$ C/分で 320 $^{\circ}$ C (10 分間保持)、キャリアーガス : He 1.0 mL/min

注入量 : 1  $\mu$ L

注入口温度 : 290 $^{\circ}$ C

注入方法 : スプリットレス (20 秒)

インターフェイス温度 : 290 $^{\circ}$ C

質量分析

加速電圧 : 8 kV

分解能 : 10000

イオン化電圧 : 40 eV

トラップ電流 : 600  $\mu$ A

マルチプライヤー電圧 : 400 V

イオン源温度 : 290 $^{\circ}$ C

### B-4.2. PCBs 測定

#### B-4.2.1. 測定機器

ガスクロマトグラフ : HP6890 (Hewlett Packard)、オートインジェクター付き。

質量分析計 : Autospec-Ultima (Micromass)

#### B-4.2.2. 操作条件

ガスクロマトグラフ

カラム : HT-8PCB キャピラリーカラム、長さ 60 m、内径 0.25 mm (関東化学)

カラム温度 : 120 $^{\circ}$ C 20 $^{\circ}$ C/分で 180 $^{\circ}$ Cまで昇温、2 $^{\circ}$ C/分で 270 $^{\circ}$ Cまで昇温、50 $^{\circ}$ C/分で 310 $^{\circ}$ C (6 分間保持)

キャリアーガス : He 1.0 mL/分

注入量 : 1  $\mu$ L

注入口温度 : 290 $^{\circ}$ C

注入方法 : スプリットレス (60 秒)

インターフェイス温度 : 290 $^{\circ}$ C

質量分析

加速電圧 : 8 kV

分解能 : 11000

イオン化電圧 : 40 eV

トラップ電流：600  $\mu$ A  
マルチプライヤー電圧：400 V  
イオン源温度：290°C

## C. 研究結果

### C-1. 装置の定量下限

検量線作成に使用する標準溶液の最低濃度溶液を用い、これを複数回繰り返し測定を行うことによってその標準偏差の3倍を検出下限とした。得られたPBDEsおよびPCBsの検出下限を表1に示す。得られた検出下限値より、試料1 mLにおける理論定量下限値を以下のような過程に基づき算出した。分析対象の試料を1 mLもしくは1 gとして、これを前処理した後におよそ0.02 mLまで濃縮し、このうち1  $\mu$ Lを装置に注入する。したがって、試料の1/20を装置に注入することとなり、上記の検出下限値のおよそ20倍以上が理論的な試料における検出下限値となる。これらの検出下限値はPBDEsおよびPCBsにおいても1 pg/ml以下であり、本測定では十分な感度を有していることが確認できる。よって、本方法が、バンクされ、僅かな試料量しかない生体および食事試料に関して、対象とする化学物質を正確に測定し定量することが可能であることを確認した。

### C-2. 測定結果

実検体におけるPBDEsの測定結果および全操作ブランクの結果を表2に示す。同様にしてPCBsの結果を表3に示す。なお、用いた測定方法は同位体希釈法のため、定量を対象とする物質およびその異性体の $^{13}\text{C}$ -安定同位体を内部標準物質として分析試料に添加し、この添加した安定同位体が定量を対象とする物質に対して物理的かつ

化学的にほぼ同様の挙動を示すことから、添加した $^{13}\text{C}$ -安定同位体濃度を基準（内部標準）として定量を対象とする物質の濃度を定量する。さらに、本方法では添加した $^{13}\text{C}$ -安定同位体の内部標準に対して、それらとは異なる $^{13}\text{C}$ -安定同位体をシリンジスパイクとして、測定直前の最終濃縮段階にて添加し、このシリンジスパイク濃度を基準として内部標準濃度を比較して、作業工程において精度劣化等の有無を回収率として確認している。この回収率において一部の検体を除いては概ね50%から120%の結果が得られている（平均86.2から94.2% 標準偏差6.3から24.6）。一般的に微量の試料を用いて、かつ、多段階過程を経て分析を行う場合では作業上の精度的な劣化に起因した回収率の低下が想定できる。今回の回収率の結果は上記理由を考慮しても良好な結果であると判断でき、サンプル処理過程を含めた総ての作業において本分析法の精度の高さ、ならびに定量値の信頼性の高さが示唆される。さらに、ブランク値における全操作ブランクと容器ブランクの評価では、これらの値がほぼ同等とみなされ、さらに、分析対象物質の定量値より明らかに低いことから、試料における定量値から全操作ブランク値を減算して、実際の定量結果とした。すなわち、実試料濃度は全操作ブランク値を減じて算出した濃度である。

## D.E. 考察と結論

試料バンクへの貢献として、分析過程に要求される条件は少量サンプルにおいて正確に測定を行うことであり、我々はこの目的達成のため、少量の血液および食事試料においてPBDEsとPCBsの特徴的な異性体

濃度を迅速高感度に測定する方法を開発した。本方法は既に我々が開発した 30 mL 程度の試料量を用いた分析法を基にして、そこからの技術移管により開発を行っているため、感度および精度面においても少量サンプルの評価において十分な能力を有していることを確認した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. H. Hirai, Y. Fujimine:  
Organohalogen Compounds 2003,  
61, 151-154.
2. H. Hirai, Y. Fujimine:  
Organohalogen Compounds 2003,  
63, 417-420.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

## Perfluorooctane sulfonate および Perfluorooctanoic acid の測定に関する研究

分担研究者 齋藤 憲光 岩手県環境保健研究センター 首席専門研究員兼環境科学部長

残留性有機汚染物質（Persistent organic pollutants：POPs）は、生物全般に悪影響を与えるために、廃絶の対象とされている。ダイオキシン・PCB・DDTなどが、代表的な化合物である。しかし、これらの化合物について、一般市民が受けた被曝量をモニタリングすることは、ヒト組織中濃度の低さ・分析操作の複雑性・分析コストなどの面で事実上不可能である。

perfluorooctane sulfonate（PFOS）も POPs のひとつであるが、工業生産を開始して約 50 年の間に汚染が拡大し、食物連鎖の中に組み込まれたと推定することができる。なぜなら、この汚染物質は現代人の血液からも検出できるからである。PFOS はこの点で、これまで体験した POPs とは異なっている。以上のことから、本研究の目標である POPs の「ヒト曝露の評価と動向予測」を行う上で、PFOS はモデル化合物なりうる。

今回 LC/MS による PFOS 及びその類縁化合物である perfluorooctanoate（PFOA）の分析法開発を分担した。分析対象としたのは、環境水・大気浮遊粉塵・血液・食事である。その結果、環境水・大気浮遊粉塵・血液については、LC/MS を用いてルーチン分析にも適用できる方法を開発できた。食事は、妨害成分からの PFOS 抽出および精製が困難であり、現在開発中である。

### A. 研究目的

小泉研究班が「POPs のリスク評価にむけてのヒト曝露長期モニタリングのための試料バンクの創設に関する研究」で目標として掲げた「ヒト曝露の評価と動向予測」を行うために、PFOS（perfluorooctane sulfonate）とその類縁化合物の分析法開発を分担した。

POPs（Persistent organic pollutants）は、環境中で分解し難く、地球規模で汚染が拡散することが懸念されている。そのため 2001 年に「ストックホルム条約（POPs 条約）」が締結され、国際的に協調して POPs の廃絶、削減等を行うことが確認された。PFOS はストックホルム条約の際に問題視されなかった化学物質であるが、毒性が確定していないものの、環境中で分解し難く地球規模で汚染拡散していることから、POPs に分類される汚染物質であると判断される。

POPs 化合物の性状と界面活性剤（水と油を同時に弾く）の特性を有しているがために、人類は 1950 年代から PFOS を工業的に生産し、製造部門のみならずあらゆる日用品の中で使用してきた。1999 年、この PFOS が「製造業の従業員と米国の一般市民の血液から検出された」ことで注目された<sup>1)</sup>。その後、各国の魚類や野生生物からも検出されるに及び、世界中で PFOS 汚染が懸念される状況になっている<sup>2-6)</sup>。

PFOS は、ヒトの肝臓に特異的に蓄積され、血液を循環することが解っている。他の生物でも同様の濃縮が進行し、今や PFOS は食物連鎖の中に組み

込まれ、その頂点に立つ人類が最大の被曝者になる可能性が高い。

これまで PFOS は、ヒトや野生生物・魚類などを対象にして測定されてきた<sup>2-8)</sup>。その理由は、これらの濃度が ppb（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）と高く、分析操作から生ずるコンタミネーションの影響を受けることなく、溶媒抽出するだけで比較的簡単に測定できたためである。一方、環境水中 PFOS 濃度は、生体試料の 1/1,000 濃度の ppt（ $\text{ng}/\text{L}$ ）と極めて低くなる。従って、環境水の測定例は PFOS の流出事故や濃度の高いテネシー川の調査が実施されただけであった<sup>9-11)</sup>。

本研究の目標である「ヒト曝露の評価」を遂行する上で、曝露予測のためにはヒト血液の分析法が必要で、曝露要因究明のためには上水を含む環境水・食品・大気などの分析法が必要である。しかし、環境水をモニタリングできる分析法はなく、食品や大気を分析した報告はない。今回、環境水（上水・河川水・海水）・ヒト血液・食事・大気中の PFOS 及び PFOS の類縁化合物である PFOA（perfluorooctanoate）分析法について検討し、環境水・血液・大気試料についてはモニタリングが可能で分析法の開発ができた。食品は可溶性・脂溶性の共雑物が多い試料であり、更に PFOS 濃度が低いために、分析法を完成するまでには至らなかった。

### B. 研究方法

#### 1. 試薬及び材料



PFOS 及び PFOA 標準：PFOS は Fluka 社の Perfluorooctanesulfonic acid Potassium salt ( F.W. 538.22 ) を、PFOA は WAKO 社の Perfluorooctanoic acid ( F.W. 414.07 ) を用い、それぞれを脱イオン水に溶解して 1,000 mg-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L 及び 1,000 mg-C<sub>7</sub>F<sub>15</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L にしたものを原液として用いた。この原液を使用時に適宜希釈し、標準系列の作成と標準の添加回収実験に使用した。

固相カートリッジ：スチレンジビニルベンゼン-ポリメタクリレートを充填し、高密度ポリエチレンでハウジングした和光純薬製 Presep-C Agri ( 250 mg ) を使用し、5 ml のメタノールと 5 ml の脱イオン水で洗浄してから用いた。

脱イオン水：標準系列の調製及び固相カートリッジ洗浄に用いた脱イオン水は、Presep-C Agri を通し PFOS を除去してから使用した。

その他の試薬：メタノールは WAKO 社の HPLC 用を、アセトニトリルは関東化学社の高速液体クロマト用を使用した。血液分析に用いたイオンペア試薬の Tetrabutylammonium hydrogen sulfate は ACROS 社 HPLC グレードを、抽出溶媒の Methyl tert-butyl ether は WAKO 社の HPLC 用をそれぞれ使用した。

## 2. 抽出と濃縮

環境水からの抽出及び濃縮は、固相カートリッジを Waters Concentrator System Concentrator Plus に装着し、10 mL/min. の流量で試料を通過させて行った。

大気浮遊粉塵は、ハイボリュームエアーサンプラーで 1,000 m<sup>3</sup> を吸引し、ろ紙 ( ADVANTEC QR-100, 203×254mm ) に捕集したものを用了。大気浮遊粉塵の測定にはろ紙の 1/2 量を使用した。抽出は、ろ紙を細切して高速溶媒抽出用セル ( 11mL ) に充填し、高速溶媒抽出装置 ( DIONEX ASE-200 ) で行った。

食事は、高速溶媒抽出用セル ( 33mL ) に充填し、粉塵と同様に高速溶媒抽出装置 ( DIONEX ASE-200 ) で PFOS 及び PFOA 抽出を行った。

## 3. 分析機器

PFOS 及び PFOA の分析は、Agilent 1100 HPLC に Agilent 1100MSD SL 質量分析装置を装着して用いた。

## C. 研究結果

### 1. LC/MS 分析

PFOS 及び PFOA を同時分析する際の、LC/MS 最適条件を表 1 に示した。LC の分離カラムは Zorbax XDB C-18 ( 2.1×150mm ) を、溶離液はアセトニトリル-10mM 酢酸アンモニウム溶液を用いた。MS のフラグメント電圧は PFOS ( 200V ) ・PFOA ( 100V ) 、Vcap 電圧は 4000V とし、negative の SIM mode [ PFOS ( Q<sub>1</sub>: 499, Q<sub>2</sub>: 500, Q<sub>3</sub>: 99 ) ・PFOA ( Q<sub>1</sub>:413, Q<sub>2</sub>: 369 ) ] で分析した。PFOS 及び PFOA のフラグメンターイオンを図 1 に示した。

PFOS 及び PFOA は、ピークが重なり合うことなく完全に分離し、検量線の作成濃度はいずれの化合物も 0.1 μg/L 以上の濃度で作成可能であった。0.1 μg/L 濃度の MS クロマトグラムを図 2 に示したが、S/N 比から見て、検出限界は PFOS が 0.04 μg/L 、PFOA が 0.05 μg/L であり、定量

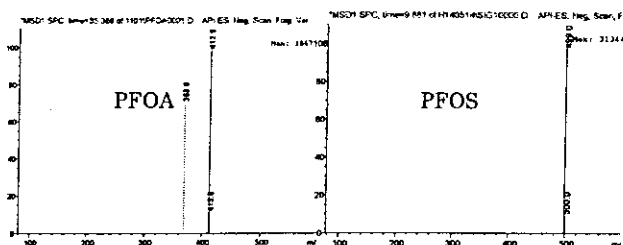


図 1 PFOS と PFOA のフラグメンターイオン

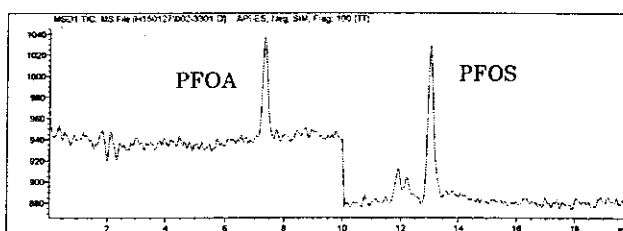


図 2 PFOS 及び PFOA のクロマトグラム ( 0.1 μg/L )

表 1. LC/MS の分析条件

HPLC		MS	
Instrument	: Agilent 1100	Instrument	: Agilent 1100MSD SL
Column	: Zorbax XDB C-18(2.1x150mm)	Ionization	: ESI
Mobile phase <sup>1)</sup>	: A : CH <sub>3</sub> CN B : 10mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O 35 % A-(liner gradient 2 % A/min)-45 % A	Nebulizer	: N <sub>2</sub> (50 psi)
Flow rate	: 0.2 mL/min.	Drying gas	: N <sub>2</sub> (10.0L/min, 350°C)
Oven temp	: 40°C	Polarity	: Negative
Injection volume	: 10.0 μL	Fragmentor	: 100V(PFOA), 200V(PFOS)
		Vcap	: 4000V
		SIM(m/z)	: Q <sub>1</sub> :499, Q <sub>2</sub> :500, Q <sub>3</sub> :99 (PFOS) : Q <sub>1</sub> :413, Q <sub>2</sub> :369 (PFOA)

1) gradient: the proportion of A was 35% for the first 5 min; then increased to 45 % ; then 45% A was maintained till 20 min.

下限値は PFOS 及び PFOA とも 0.1 μg/L 濃度とした。

## 2. 環境水分析

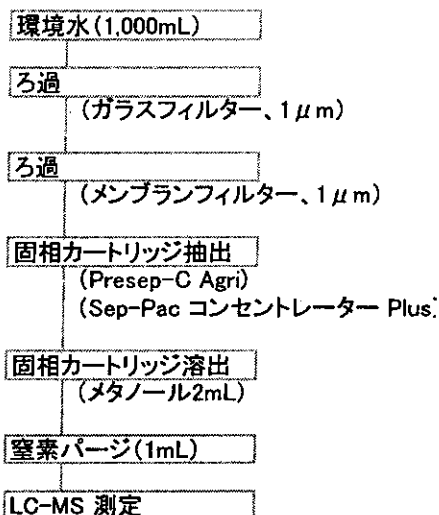


図3. 環境水の分析操作フロー

環境水中 PFOS 及び PFOA は、ヒト血清の約 1/1,000 と極微量濃度である。本法を検討するにあたり、濃縮倍率を上げても、コンタミネーションを低減し、かつ分析エラーが小さい方法の開発を試みた。Presep-C Agri は PFOS 類を選択的に高い濃縮倍率で抽出するのに適した固相カートリッジであった。このカートリッジは、pH 5 - pH 11 の広い範囲で使用可能であり、コンセントレータにセットして加圧濃縮することで、分析者の操作エラーを最小限にしなが 1,000 倍の濃縮を実現した。図 3 に環境水分析の操作フローを示した。環境水分析時における LC/MS クロマトは完全に分離し、他の妨害化合物の影響も小さく、安定的に分析することができた。本法の分析精度を検討するために、大阪近郊で採水した河川水と海水の実試料を用いて、添加回収実験を行った。その結果、河川水での回収率は、PFOS が 101.0 ± 6.5 %

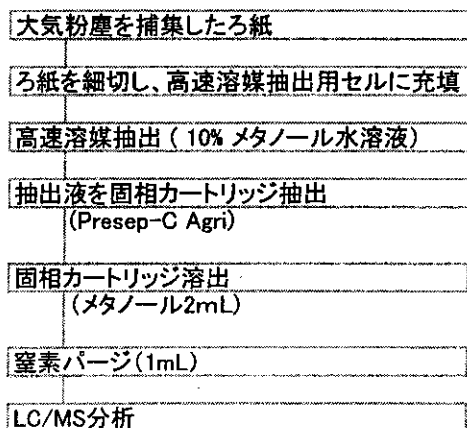


図4. 大気浮遊粉塵の分析操作フロー

及び PFOA が 92.6 ± 4.4 % であり、海水は PFOS が 99.8 ± 4.8 %, PFOA が 91.5 ± 3.7 % と良好であった(表2)。本法での定量下限値は、PFOS 及び PFOA とも 0.1 ng/L である。

表2. 環境水での PFOA 及び PFOS 繰返し添加回収実験

a. 河川水

	PFOA			PFOS		
	濃度 <sup>1)</sup> (ng/L)	回収量 <sup>2)</sup> (ng/L)	回収率 <sup>3)</sup> (%)	濃度 <sup>1)</sup> (ng/L)	回収量 <sup>2)</sup> (ng/L)	回収率 <sup>3)</sup> (%)
	16.5	34.2	86.8	14.7	31.1	90.0
	17.2	34.8	89.8	17.7	34.3	106.0
	14.5	35.9	95.3	15.2	33.6	102.5
	17.2	35.1	91.3	16.0	33.1	100.0
	17.6	36.7	99.3	17.5	32.5	97.0
	18.1	35.5	93.3	17.5	34.7	108.0
mean	16.850	35.367	92.583	16.433	33.217	100.533
$\sigma_{n-1}$	1.266	0.876	4.378	1.311	1.306	6.530
C.V (%)	7.5	2.5	4.7	8.0	3.9	6.5

1) 河川の濃度  
2) 河川水に PFOA 及び PFOS をそれぞれ 20 (ng/L) 添加した濃度  
3)  $(\text{添加回収量}) - (\text{濃度平均値}) \times 100 / (\text{添加濃度})$

b. 海水

	PFOA			PFOS		
	濃度 <sup>1)</sup> (ng/L)	回収量 <sup>2)</sup> (ng/L)	回収率 <sup>3)</sup> (%)	濃度 <sup>1)</sup> (ng/L)	回収量 <sup>2)</sup> (ng/L)	回収率 <sup>3)</sup> (%)
	191	382	92.9	12.0	22.6	105.0
	193	376	89.9	11.5	22.6	105.4
	187	367	85.4	11.7	21.6	95.4
	196	378	90.9	11.6	22.2	101.4
	208	384	93.9	13.2	21.8	97.4
	202	388	95.9	12.6	21.5	94.4
mean	196.17	379.17	91.50	12.10	22.05	99.83
$\sigma_{n-1}$	7.679	7.333	3.666	0.669	0.489	4.801
C.V (%)	3.9	1.9	4.0	5.5	2.2	4.8

1) 海水の濃度  
2) 海水に PFOA を 200 (ng/L) 及び PFOS を 20 (ng/L) 添加した濃度  
3)  $(\text{添加回収量}) - (\text{濃度平均値}) \times 100 / (\text{添加濃度})$

## 3. 大気浮遊粉塵分析

大気の捕集は、ハイボリュームエアースンプラーに石英ろ紙とポリウレタンフォーム (PUF) をセットして行った。PFOS 類は PUF から検出されなかったことからガス状で存在するものではなく、粉塵に吸着した形態で飛散していると推定できる。大気粉塵の分析法として、操作が簡便迅速で実験誤差が少なくかつ高感度測定が可能な方法として、高速溶媒抽出装置を用いる方法について検討した。操作フローを、図 4 に示した。大気浮遊粉塵中 PFOS 類の濃度が低いために、実試料での繰返し実験を行うことは不可能であった。そこで、未使用の捕集用ろ紙に PFOS を添加して、

表3. 大気浮遊粉塵捕集ろ紙の添加回収実験

	PFOA <sup>b)</sup>		PFOS <sup>b)</sup>	
	Found (ng/mL)	Recovery (%) <sup>c)</sup>	Found (ng/mL)	Recovery (%) <sup>c)</sup>
	9.00	90	9.72	97
	9.18	92	10.18	102
	8.64	86	9.28	93
	8.46	85	9.5	95
	9.42	94	10.3	103
Mean	8.940	89.40	9.796	97.96
S.D.	0.391	3.912	0.436	4.362
CV(%)	4.4	4.4	4.5	4.5

a) 石英ろ紙(ADVANTEC QR-100)を用いた。  
b) 石英ろ紙(101.5x127mm)にPFOA及びPFOSを各10ngずつ添加した。  
c) 石英ろ紙のブランク値は、PFOS及びPFOAとも0.16ngであり、次式で回収率: Recovery (%) = Found \* 100 / 10

分析精度の検討を行った。その結果、回収率は PFOS が  $98.0 \pm 4.4\%$ 、PFOA が  $89.4 \pm 3.9\%$  と良好な回収率であり (表 3)、本法で PFOS 及び PFOA とも  $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  の低濃度までの測定が可能であった。

#### 4. 血液 (血清) 分析

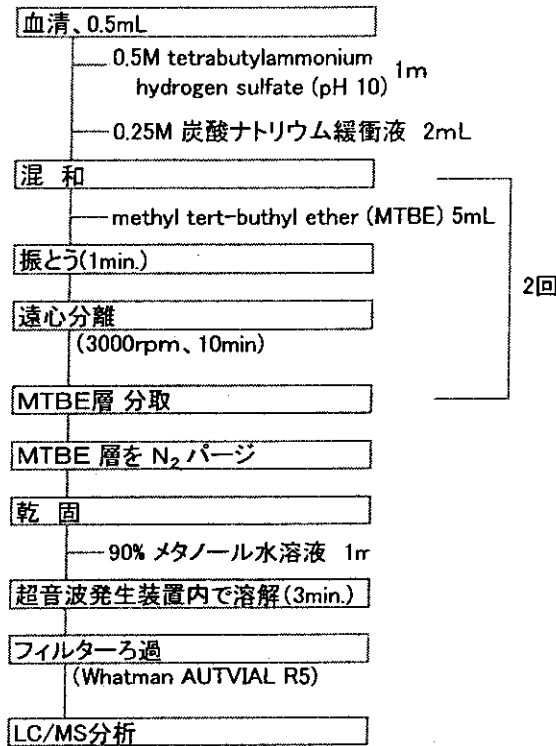


図5. 血清の分析操作フロー

ヒト血清や野生生物の臓器の濃度は、環境水の 1,000 倍以上の  $\mu\text{g}/\text{L}$  濃度で存在する。従って LC/MS の測定感度と比較しても、血液の濃度は十分に高濃度で、これまでの報告にある分析操作は試料の精製に主眼が置かれる方法が用いられてきた。今回、血液分析法は Johnson らが開発した、イオンペア試薬を用いて PFOS 類を溶媒抽出する方法について検証した<sup>12)</sup>。Johnson らの分析法は精度が高く、分析法としての完成度は高いと判断された。本法ではこの方法を採用したが、LC/MS 分析を行うことを考慮して分離カラムが目詰まりして装置がシャットダウンしないよう

表4. 血清におけるPFOS及びPFOA添加回収実験

	PFOA			PFOS		
	濃度1) (ng/g)	回収量2) (ng/g)	回収率3) (%)	濃度1) (ng/g)	回収量2) (ng/g)	回収率3) (%)
	3.78	14.06	102.4	7.88	18.06	100.5
	3.96	14.56	107.4	8.30	17.18	91.7
	3.62	14.86	110.4	7.84	17.78	97.7
	4.08	14.52	107.0	8.18	17.32	93.1
	3.68	15.02	112.0	7.38	17.86	98.5
	3.86	15.00	111.8	8.34	18.04	100.3
	3.74	14.22	104.0	8.12	17.10	90.9
mean	3.817	14.606	107.9	8.006	17.620	96.1
$\sigma_{n-1}$	0.161	0.376	3.759	0.336	0.410	4.097
C.V.(%)	4.2	2.6	3.5	4.2	2.3	4.3

1) 0.5mlの血清を分析

2) 標準10ng/mlを添加して回収した量

3) 回収率 = (回収量 - 濃度) / 0.5 × 100

に、図5に示したような操作とした。同一のヒト血清で繰返しのある添加回収実験の結果、PFOS が  $96.1 \pm 4.4\%$ 、PFOA が  $107.9 \pm 3.7\%$  と良好であった (表4)。本法で血液中濃度は、PFOS 及び PFOA とも  $0.2 \mu\text{g}/\text{g}$  の低濃度までの測定が可能であり、現代人の血液モニタリング分析法として適用性は高いと考えられる。

#### 5. 食事分析

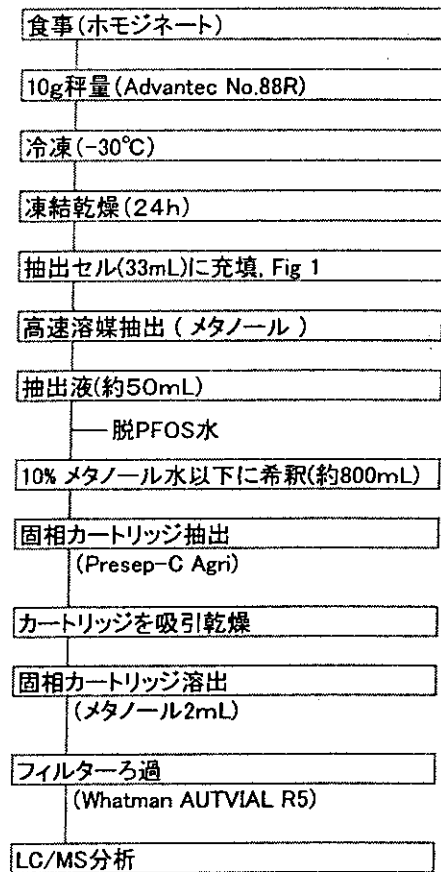


図6. 食事の分析操作フロー

これまでに、食事中 PFOS 分析の報告例はない。食事成分は、水溶性の炭水化物と脂質の両方を含むために、PFOS 抽出とクリーンアップ操作が極端に困難になる。今回、10g の食事を円筒ろ紙に秤量し、凍結乾燥して脱水後に、抽出セル (33mL) に充填しメタノールを用いて高速溶媒抽出を行い、メタノール層を 10 倍以上に希釈してから Presep-C Agri で濃縮する方法について検討した。分析操作フローを、図6に示した。その結果、同一の食事サンプルでも、抽出率にバラつきが生じ、絶対検量線法で定量することは不可能であった。

#### D. E. 考察と結論

##### 1. LC/MS 分析

PFOS 及び PFOA を LC/MS で分離し、同時分析を行う方法を検討した。PFOS のデータは、ヒト血液・野生生物や魚類の血液と臓器、汚

染された河川水などの分析報告例があり、LC/MS/MSで測定されてきた。LC/MS/MSに比べて、本法で使用したLC/MSは定性能力に欠けるという欠点がある。反面、LC/MSは安価でランニングコストも低く、かつ装置をコントロールし易いという長所があるために、ルーチン分析における汎用機器であるといえる。今回、LC/MSでPFOS及びPFOAの同時分析法の条件を決定したことで、将来さまざまな分析試料をモニタリングする上で、ルーチン分析法としての利用価値が大きいと判断される。

## 2. 環境水分析

環境水を分析した報告は、次のようなものがある。Moodyらは空港で起きた消火液流出に伴い、流下した河川水のモニタリングを行った。PFOSの定量下限は、 $0.16\mu\text{g/L}$ であった。Hansenらは、汚染が進行している河川としてテネシー河流域を系統的に調査し、この際行われた分析法の定量下限は $10-25\mu\text{g-PFOS/L}$ であると報告した。Taniyasuらは日本国内8ヶ所から集めた25の環境水を調査したが、検出限界が $2.5\mu\text{g/L}$ であったために不検出のデータが見られた。Taniyasuらの分析法でも、上水を含む環境水をモニタリングすることは困難であった。

固相カートリッジで濃縮操作を行う場合、カートリッジに環境水を通す際の流速のバラツキは、そのままに測定誤差の要因となる。本法は、コンセントレータを用いたことで、1,000倍の濃縮操作を可能にし、かつ一定の流速でカートリッジに送液するので、人為的な分析エラーを最小限にした。そのために、PFOS及びPFOAは $0.1\mu\text{g/L}$ まで測定可能である。

本法を適用して全国79ヶ所の河川水、6ヶ所の沿岸海水の調査を行ったが、すべての環境水からPFOS及びPFOAを検出した。特に、汚染が全く考えられない一部の水道水で、PFOSが定量下限値( $0.1\mu\text{g/L}$ )以下のものが数ヶ所あったが、大部分の水道水からPFOSを測定値として検出し、環境水モニタリングにおける本法の有効性を立証した。

## 3. 大気浮遊粉塵分析

大気中のフッ素化合物をGC/MS(CI mode)で分析した報告がある<sup>13)</sup>。しかし、PFOSそれ自体を直接に分析した報告は出されていなかった。大気中PFOS濃度は、極端に低いことが予想された。そのために、低濃度測定する場合であっても、試薬からのコンタミネーションや分析エラーが小さい方法として、高速溶媒抽出装置を用いる方法について検討した。添加回収実験の結果から、大気粉塵などに吸着したPFOSの抽出に、高速溶媒抽出装置は有効であることが検証された。本法を

用いて、比較的汚染が少ないと考えられる岩手県で採取した大気浮遊粉塵を測定した。8検体のすべての大気浮遊粉塵からPFOSを検出し、本法は大気浮遊粉塵中PFOS汚染のモニタリングに有効であると判断された。

京都府で採取した粉塵の測定結果は、論文に報告したとおりである。この論文は、大気浮遊粉塵からPFOSを測定した初めての論文である。

## 4. 血液分析

ヒトや野生生物の血液中PFOS分析のデータは、数多く報告されている。分析方法は、イオンペア試薬を添加してからPFOSを溶媒抽出し、溶媒をパージしてメタノールなどで再溶解して検液を調整後にLC/MS/MSで測定する方法である。この分析法は、有害な溶媒を使用するという点と操作の煩雑さはあるが、特殊な機器を必要としない。更に、血液試料からPFOSを特異的に抽出・精製できるという点で優れている。血液や試薬の使用量を正確に秤量して操作すれば、検量線法でも正確に測定することが可能であり、分析法自体の完成度は高いと考えられる。

本法では、これまでの分析方法を検証し、ほとんど改良の点を認めなかったが、血液からの不純物混入で分析カラムの目詰まりやLC/MS装置のシャットダウンが頻繁に発生した。このために、溶媒抽出後に検液を調整してから、フィルター( $0.45\mu\text{m}$ , Whatman, AUTOVIAL R5)で不純物をろ過する操作を加えた。

## 5. 食事分析

食事を分析した報告はない。PFOSは、水を弾くと同時に油を弾くという性質がある。しかし、わずかずつ水に溶けだし、PFOSのカリウム塩では、1,000ppmの水溶解性がある。食事試料が、水溶性と脂溶性の組成からなることが分析を極端に困難にしている。イオンペア試薬を添加しての溶媒抽出法では、溶媒が懸濁して水相と分離できず、利用できなかった。本法では、食事を一旦凍結乾燥してから高速溶媒抽出を行い、固相カートリッジで濃縮する方法について検討したが、測定値のバラツキが大きく、現段階で分析法を完成させるに至らなかった。

今後は、測定値バラツキの補正法として、内標準利用を考慮しながら分析法開発を継続したいと考えている。

## 文献

- 1) GW Olsen, JM Burris, JH Mandel and LR Zobel: Serum Perfluorooctane Sulfonate and Hepatic and Lipid Clinical Chemistry Tests in Fluorochemical Production Employees. J Occup Environ Med 41, 799-806 (1999)
- 2) K Kannan, JC Franson, WW Bowerman,