

200501147A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小泉 昭夫

平成 18 (2006) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告書

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 -----	1
小泉昭夫	

II. 分担研究報告書

I] 試料の収集と系統的整備

課題1—試料バンクの現状分析と整備に関する研究-----	26
小泉昭夫・井上佳代子	

課題2—本プロジェクトでの新たな試料の収集—平成17年度の収集状況

1) 新たな試料の採取に関する研究-秋田県での採取-----	39
村田勝敬	
2) 新たな試料の採取に関する研究-宮城県での採取およびメチル水銀ハイ リスク地域での曝露追跡調査に関する研究-----	44
渡辺孝男	
3) 新たな試料の採取に関する研究-関東地方での採取-----	47
大前和幸	
4) 新たな試料の採取に関する研究-岐阜県での採取-----	49
竹中勝信	
5) 新たな試料の採取に関する研究-福井県での採取-----	52
日下幸則	
6) 新たな試料の採取に関する研究-兵庫県での採取-----	55
和田安彦	
7) 新たな試料の採取に関する研究-和歌山県での採取-----	61
竹下達也	
8) 新たな試料の採取に関する研究-高知県での採取-----	65
甲田茂樹	
9) 新たな試料の採取に関する研究-山口県での採取-----	68

廣澤巖夫	
10) 新たな試料の採取に関する研究-沖縄県での採取-----	72
等々力英美	

II] 試料バンクの運用に関する研究

課題4 - 試料バンクの運用に関する研究-----	75
小泉昭夫・井上佳代子	
1) 食餌および血液試料のメチル水銀の分析に関する研究-----	82
蜂谷紀之	
2) 人体試料における臭素系難燃剤、アンチモンの濃度レベル-----	90
東海明宏	

III] 試料バンクの有用性の検証

課題5 - 既存の難分解性化学物質の曝露に関する研究

1) 食事中および血清中ポリ塩素化ビフェニルの経年的調査についての 研究-----	94
小泉昭夫・井上純子・原田浩二	
2) ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)とポリ塩化ビフェニル(PCB)の 授乳中女性の曝露状況と血液から母乳への異性体の移行の分析に 関する研究-----	101
小泉昭夫・井上佳代子・竹中勝信・清水卓・上原茂樹・河野誠	

課題6 - 新たな難分解性化学物質-Perfluorooctane sulfonate (PFOS) およびPerfluorooctanoic acid (PFOA) の分析法および処理法の開発

1) 大気中のPFOS・PFOAの分析法の開発に関する研究-----	114
齋藤憲光	
2) PFOS・PFOAの処理方法の検討-----	124
藤井滋穂	

課題7—新たな難分解性化学物質—Perfluorooctane sulfonate (PFOS)
およびPerfluorooctanoic acid (PFOA) の新たな毒性

- 1) 難分解性化学物質PFOS (Perfluorooctane sulfonate)がラット小脳
プルキンエ細胞の活動電位に及ぼす影響に関する研究----- 131
小泉昭夫
- 2) 難分解性化学物質PFOS (Perfluorooctane sulfonate)がParamecium
caudatum のK⁺誘導性後退泳動時間に及ぼす影響に関する研究----- 134
小泉昭夫
- 3) 難分解性化学物質PFOS (Perfluorooctane sulfonate)がマウスの摂食に
与える影響に関する研究----- 143
小泉昭夫

IV] 試料バンクを用いたリスクコミュニケーションの研究

- 課題8—メチル水銀高摂取地域におけるリスクコミュニケーションと介入
研究----- 146
小泉昭夫・井上佳代子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 152

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----別冊添付

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

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

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院教授

現在我々は多くの環境汚染物質に曝露されている。特に環境中において難分解性のため生物濃縮を受けるPOPs (Persistent organic pollutants) は、化学的に非常に安定であるため新規化合物が次々と産業界に導入される。POPsによる健康影響は多くの国民の関心事であり、不安の原因となっている。そのためこれらの化学物質の有害性同定、用量反応関係、曝露評価のプロセスを通しての迅速なリスク評価、リスク管理が望まれている。対象とする化学物質の環境汚染とヒト曝露との関係を把握することは国民の健康衛生上極めて重要であるが、現実には利用可能なデータは限られており、有害性情報が不確実な中で、施策などの意思決定を行わなければならない。こうした現状において、重点的に施策を行うべき物質の選択には、長期的ヒト曝露傾向の評価が重要であり、過去の生体試料および食物の汚染状況を評価できる食事試料からなる試料バンクが早急に必要であると考えられる。このような状況に対応すべくバンクの創設を行った。本年度は一昨年度、昨年度に引き続き、I. 試料の収集と系統的整備、II. 試料バンクの運用に関する研究、III. 試料バンクの有用性の検証、IV. 試料バンクを用いたリスクコミュニケーション、を行った。

小泉昭夫 京都大学大学院医学研究科・教授
井上佳代子 京都大学大学院医学研究科・講師
大前和幸 慶応大学医学部・教授
日下幸則 福井大学医学部・教授
甲田茂樹 高知大学医学部・教授
齋藤憲光 岩手県環境保健研究センター・部長
竹下達也 和歌山県立医科大学・教授
広澤巖夫 関西医療福祉大学・教授
竹中勝信 高山赤十字病院・部長
等々力英美 琉球大学医学部・助教授
蜂谷紀之 国立水俣病総合研究センター・室長
藤井滋穂 京都大学大学院工学研究科・教授
村田勝敬 秋田大学医学部・教授
渡辺孝男 宮城教育大学・教授
和田安彦 兵庫医科大学・助教授

I. 試料の収集と系統的整備

課題1—試料バンクの試料保存とデータ整備に関する研究

A. 研究目的

平成15年度より厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)「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」でヒトの血液、母乳、食事を試料とするバンクを創設したが、平成15年度、16年度においては京都大学大学院医学研究科内における保存場所が小さかったため、外部倉庫を借用していたが、平成17年度において京都大学大学院医学研究科内にサンプルルームを増設し、保存場所を確保した。外部倉庫と内部サンプルルームとの比較、およびExcel file で保存していたデータをAccess fileでのデータベースとして整備した利点について検討した。また、今後の保存スペースの面も考えて、食事試料の保存の仕方考えた。

B. 研究方法

本研究は京都大学大学院医学研究科医の倫理委員会の承認を得て行なった。

外部倉庫の借用と京都大学大学院医学研究科内のサンプルルーム利用における費用、利便性、試料に与える影響について比較した。またMicrosoft Accessにて作成されたデータベースの利点について検討した。食事試料の保存の仕方については、平成15年度、16年度は、1日3食別々に、それぞれ1L用のボトルに入れて収集していたが、3食を混合して、1日分を1L用ボトル1本で収集することとした。そのため、平成15年度、16年度

に収集した1日3食別々の3本のボトルの分を解凍し、新たにホモジェナイズしなおして、1日分を1L用ボトルに注入して保存しなおすこととした。

C. 研究結果

1) 試料保存場所の検討

平成15年度、16年度は、2種類の外部倉庫を借用した。非常にまれにしか利用しない試料は、配達負荷の賃貸料が安い外部倉庫に保管し、出し入れする可能性のある試料は、配達可能な外部倉庫に保管した。コンテナあたりの費用が生じるため、試料が集まるにしたがい場所借用料が増大していった。試料の出し入れには前日までにFAXでの連絡が必要。運搬には約1時間かかった。保冷車を持たないため、毛布に包んでの移動となり、試料の冷凍性が保たれない可能性もあった。また、機械的に出し入れされており、他のコンテナと同時に保管されているため、コンテナをビニール袋に入れて保管したが汚れが目立った。

しかし、平成17年度には、京都大学大学院医学研究科内に-20℃と4℃のルームが設置されているサンプルルームが創設された。必要なときにすばやく容易に出し入れでき、室内で汚れがなく、清潔に保たれている。運搬も容易でほとんど試料に影響を与えないで運搬できるようになった。

2) Microsoft Accessにて作成されたデータベースの利点

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業) (平成15年度~17年度)により系統的に収集された試料は、Excel file でデータ管理可能であったが、1980年代から1990年代にかけての過去の試料データには、血液生化学データ、

食事中の金属、繊維質、無機質、脂質、タンパク質など多数の測定データが付随しており、専門的なリレーショナルデータベースを構築しないと保存できないことが判明した。そのため、Accessを用いたデータベースのソフトの開発を外部に委託し、完成させた。このデータベースは Microsoft access を用いて作成し、それぞれの試料の持つ情報ごとに分類され、リレーショナルデータベースとしてデータ保存、検索できるようにした。過去の試料については提供者の血液検査などの情報が付随しており、提供者データ管理機能と試料の持つデータ（採取日、採取場所、食事内容、カロリー、蛋白質量、線維質量、ビタミン・金属などの量など）、および収集されてからのデータ（重量、コレステロール値、トリグリセライド値、測定された化学物質濃度など）などが、同一試料にすべて関連付けられて表示できるようになっている。検索条件も多様であり、採取年、採取地域、提供者の性や年齢など、複数の絞り込みも可能であるため、試料の運用に関して検索が容易である。

3) 食事試料混合

平成15年度、16年度に収集した1日3食別々の3本のボトルの分を解凍し、新たにホモジェナイズしなおして、1日分を1L用ボトルに注入して保存しなおした。1716食を562日分にホモジェナイズしなおし、約1/3の容量にした。（平成17年度は、1日分を1L用ボトルで収集した。）

D. 考察

平成17年度は京都大学大学院医学研究科内にサンプルルームの完成を見て、

外部倉庫からすべての試料を大学内に移動した。それにより、経費の削減とともに、試料の保存の面からも利点が認められた。また、Microsoft Accessにて作成されたデータベースは、測定されたデータのリレーショナルデータベースとして有用なものであった。食事試料の保存方法を3食別々の保存方法から、3食を混合して1日分として保存することにより、保存方法としてもスペースの節約になり、運用として提供するときにもより容易に準備できるようになった。

課題2—本プロジェクトでの新たな試料の収集—平成17年度の収集状況

本研究は京都大学医学部・医学研究科医の倫理委員会の承認を得て行ない、すべての参加者から書面によるインフォームドコンセントを得て実施した。

ヒト生体試料バンクの創設において平成18年3月現在、全血7,099検体、血清22,535検体、母乳2,704検体、食事3,400検体（表1～表4）が保存されている。保存場所は京都大学大学院医学研究科G棟3階336号室サンプルルームである。これら保存試料のうち、厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）（平成15年度～17年度）により系統的に収集された試料数は、全血3,322検体、血清6,220検体、母乳2,614検体、食事967検体である。

平成15年度～17年度に収集された試料提供者の性別は全血において、男性60%、女性40%、血清において、男性48%、女性51%であった。各地域の試料の年齢の平均値と標準偏差を表5に示した。

個別分担研究者の採取した試料については分担報告書を参照されたい。

II. 試料バンクの運用に関する研究

課題3－試料バンクの運用に関する研究

A. 研究目的

本研究の最大目的は公的試料バンクの設立である。この目的に向け、平成16年度には試料バンクの運用試用を行った。本年度は2件の使用申請を得て、是非を検討し、申請どおりの試料を提供した。今後、運用を拡大していく上での運営上の問題点を検討した。

B. 研究方法

B-1. 運営委員会の開催

規定により、バンクの試料を外部の研究機関に提供するための運営委員会を開催し審査した。平成17年度の申請者は環境省国立水俣病総合研究センター蜂谷紀之博士と産業技術総合研究所化学物質リスク管理センター東海明弘博士であった。

B-2. 試料の選択

申請どおりの試料提供を行なえるかどうか検討した。

B-3. 測定機関

メチル水銀濃度測定は、環境省国立水俣病総合研究センターで行われ、臭素系難燃剤ならびにアンチモンの測定は、(株)島津テクノリサーチで行われるため、運搬方法を検討した。

B-4. 準備の間に生じた問題を検討した。

C. 研究結果

C-1. 運営委員会

2 機関よりの申請に基づき、平成17年9月17日京都大学百周年時計台記念館 会議室Ⅲにおいて、申請書の内容を審議し、全員の了承を得た。

C-2. 試料の選択

①メチル水銀濃度測定

各地で採取された血液試料
使用数量 1 ml × 70 検体

魚を良く摂取する日本人の一般女性集団における現在のメチル水銀曝露状況を推定するために、2004年から2005年にかけて全国7地域から採取された全血試料のうち、1ml以上の容量が保存されているものから、女性10検体ずつをランダムに選び測定した。

②臭素系難燃剤ならびにアンチモンの測定

臭素系難燃剤のうち、デカブロモジフェニルエーテル、エチレンビスペンタブロモフェニル(デカブロモジフェニルエーテルの代替品)、ヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)ならびにアンチモンのリスク評価を目的にして、主たる摂取経路である食事試料中濃度および体内中濃度レベルとして血液試料を測定するプロジェクトであった。血液については、1.5ml以上の容量が保存されているものから、男性5検体、女性5検体ずつをそれぞれの年代試料からランダムに選び10検体ごとに等量ずつプーリングした。食事は検体によって1日摂取量が異なるため、それぞれの検

体の1日量を比例配分し、男性の分5試料、女性の分5試料をそれぞれの年代試料からランダムに選び30gになるようにプールした。容器は測定機関である(株)島津テクノリサーチが東海博士の連絡を受けて準備し、前日に京都大学ヒト生体試料バンク事務局へ持ち込まれた。

C-3. 測定機関

メチル水銀濃度の測定は試料の測定は環境省国立水俣病総合研究センターで行われ、臭素系難燃剤ならびにアンチモンの測定は、(株)島津テクノリサーチで行われた。環境省国立水俣病総合研究センターへは、クール宅配便を利用して冷凍状態で搬送した。(株)島津テクノリサーチは、準備終了時点で測定担当者が来室し、自ら搬送された。

C-4. 準備の問題点

容器は汚染を防止するために、(株)島津テクノリサーチが申請者と直接相談され準備し持ち込まれた。金属汚染は水道水の使用により簡単に生じるため、三処理などの準備を要し、今後留意すべき点であると考えられた。

D. 考察

試料バンクの運用で試料の選択が重要であることは自明であるが、選択した試料の秤量・分注の過程に労力が必要である。特別な容器の準備は申請者と測定機関とで直接相談され準備し持ち込まれることがよいと考えられた。測定結果は、リレーショナルデータベースに蓄えられデータ保存、検索できるようにした。

このデータベースは検索条件も多様であり、採取年、採取地域、提供者の性や年齢など、複数の絞込みも可能であるため、試料の運用に関して検索が容易である。今後更なる運用に向けてより良い方法を考案していきたい。

III. 試料バンクの有用性の検証

課題4-既存の難分解性化学物質の曝露に関する研究

①PCBs

A. 研究目的

昨年度の研究でポリ塩素化ビフェニル(PCB)の約20年間の曝露の変遷を明らかにした。1980年代から1990年代にかけての調査に続いて2000年代における現状について日本各地の食事中、血清中濃度の調査を行った。今年度はこの結果について詳細な要因分析を試みた。

B. 研究方法

本研究は京都大学医学部・医学研究科医の倫理委員会の承認を得て行ない、すべての参加者から書面によるインフォームドコンセントを得て実施した。昨年度の研究で全国から収集された食事試料および血清試料を用いた。食事試料は秋田県、宮城県、東京都、岐阜県、和歌山県、兵庫県、高知県、沖縄県の試料から各10試料、計80試料を無作為に選定した。血清試料は秋田県、宮城県、岐阜県、福井県、和歌山県、兵庫県、高知県、山口県、沖縄県からの試料から女性のみ各10試料、計90試料を無作為に選定した。

これらの食事試料中および血清中PCBの分析結果について、長期的変遷の

傾向とその要因の解析を試みた。さらに、血清中 PCB との関係で大きな要因として認められた年齢依存性について分析するために、生理的薬物動態モデルを使用し、シミュレーションを行った。

C. 研究結果

総 PCB 濃度 (ng/g lipid) の食事からの摂取量は 63.5ng/day となり、1980 年代で 522.8ng/day であったころから急激に減少してきている。これにともない、血清中でも全体としては 1980 年代の 163.0 ng/g-lipid から、86.5ng/g-lipid と減少してきている。しかしながら年齢により顕著な差が観察された。年齢が上がるほど血清中 PCB 濃度は高く、特に 50 代ではこの 20 年間に増加していることが明らかになった。

異性体グループごとの変化は、食事中では 20 年間に 5 塩素化体、6 塩素化体、7 塩素化体はいずれも同様に減少していたが、血清中では 6 塩素化体、7 塩素化体が 5 塩素化体に比して減少程度が小さく、特に 50 代以上では顕著であった。

各異性体の生体内での分配係数等を用いた薬物動態モデルを使用し、シミュレーションを行った。1940 年生まれの人では、6 塩素化体、7 塩素化体については、PCB 濃度の変遷を予測するためには、老化による代謝能力の低下を考慮に入れる必要があることが示唆された。

D. 考察

食事中 PCB 濃度の減少は、1974 年の PCB 製造禁止後の生活環境中の PCB の減少を反映していると考えられる。血清中濃度も全体としては有意な減少を示したが、強い年齢依存性を示し、生体内では食事

からの摂取と共に、各異性体の代謝されやすさ、個人の代謝能力などのより複雑な要因が POPs の蓄積・排出に作用することが裏付けられた。

各異性体別の血清中濃度は全体では Congener, #74, #118, #99 の低塩素化体の 20 年間での有意な減少が認められたが、高塩素化体の減少は鈍く、特に 50 代以上では高塩素化体濃度の上昇が明らかになった。全体的な血清中 PCB 濃度が低下してきているとはいえ、シミュレーションの結果から示唆されるように、代謝低下などによる高齢人口での POPs のリスク上昇を考慮する必要がある。

② PBDEs

A. 研究目的

平成 15 年度から 16 年度にかけて、PBDEs、PCBs の血清中濃度および母乳濃度の 1980 年代、1990 年代、2000 年代と経年変化を追ってきた。今回、両物質の授乳中の女性における 2005 年の曝露状況の把握と、新生児の曝露状況を考慮するために両物質の異性体の血液中から母乳への移行の分析をおこなった。

B. 研究方法

本研究は京都大学医学部・医学研究科医の倫理委員会の承認を得て行ない、すべての参加者から書面によるインフォームドコンセントを得て実施した。

2005 年 4 月から 6 月の 3 ヶ月間の中に北海道、宮城県、岐阜県、兵庫県から 90 人 (1 人測定不可) の研究協力者を得て、血液と母乳の paired 検体とライフスタイルや食事内容の questionnaire を提供いただいた。血液 10ml と母乳 20ml は、同時に採取され、質問票の記載をお願いした。母乳はポリプロピレン製コニカルチ

ューブに自己採取され-20℃に保存された。血液は5ml採血管2本に分注された後3000g15分間遠心し、血清をポリプロピレン製マイクロピペットチップを用いてポリプロピレン容器に入れ-20℃で保存し、低温条件下で測定機関に搬送した。質問紙票の内容として、年齢、授乳期間、出産回数、最近5年間の居住地、喫煙習慣、飲酒習慣、薬剤あるいはサプリメント服用歴、食習慣、職業、室内装飾品・生活用品・電気製品の使用の有無と使用期間の記載をお願いした。検体の測定は、株式会社島津テクノリサーチ分析本部事業推進開発室高菅卓三博士に依頼した。

PBDEsの13異性体 (IUPAC Nos. 15, 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 196, 197, 206, 207, 209)、PCBsの17異性体 (IUPAC Nos. 74, 99, 118, 138, 146, 153, 156, 163/164, 170, 180, 182/187, 194, 199, 206, 209) を測定した。

定量限界以下の測定値は除外し、50%以上のサンプルで検出できた異性体を構造活性相関分析に用いた。オクタノール-水分配係数 (Kow) は文献により、理論的な種々の記述子、たとえば、水溶性、屈折性、極性、Kowなどを含めて、Dragon software version 5.0 を用いて解析した。

質問紙票に記載された項目 (年齢、授乳期間、出産回数、最近5年間の居住地、喫煙習慣、飲酒習慣、薬剤あるいはサプリメント服用歴、食習慣、職業、室内装飾品・生活用品・電気製品の使用の有無と使用期間) において、平均値の差の検定は分散分析あるいは Student's t-test で行なった。質問紙票の変数の解析は共分散分析を行なった。統計解析には SAS software version 8.2 を用い

た。

C. 研究結果

4地域からの参加協力者89人の平均年齢は 30.1 ± 4.6 歳、平均出産回数は 1.45 ± 0.6 回、平均授乳期間は 13.6 ± 22.1 週であった。

PBDEsの血清中濃度および母乳中濃度の幾何平均値は 2.89 ng/g lipid および 1.56 ng/g lipid であり、PCBsの血清中濃度および母乳中濃度の幾何平均値は 37.5 ng/g lipid および 63.9 ng/g lipid であった。

PBDEs において、BDE-209は、血清中においてはその38%を占める優位な異性体であったが、母乳中においてはわずか8%であった。母乳中においてはBDE-47、BDE-153が主要な異性体であり、それぞれ28%、23%であった。PCBs において、CB-153、CB-138、CB-180が血清中、母乳中ともに主要な異性体であり、それぞれ血清中では28%、16%、15%であり、母乳中では30%、17%、13%であった。

PBDEs、PCBsともに地域差が認められ、母乳中のPBDEsは北海道で高値であり ($p < 0.05$)、血清中では宮城と岐阜が高値であった ($p < 0.05$)。PCBsにおいては、母乳中、血清中とも、宮城と兵庫が岐阜より高値であった ($p < 0.05$)。

共分散分析の結果、PBDEsは血清中、母乳中ともに地理的要因が関係し、PCBsは血清中、母乳中ともに授乳期間が関係することがわかった。そのため一地域 (宮城) において解析を行い、血清中のPBDEs ($p = 0.0187$)、PCBsにおいては血清中 ($p = 0.0002$)、母乳中 ($p = 0.0059$) とも授乳期間が有意な因子であることが判明した。

異性体のうち、50%以上のサンプルで

検出されなかった、BDE-154、BDE-183、BDE-196、BDE-206を除いて、構造活性相関分析を行なった。まず、異性体ごとに、脂質重量あたりの母乳中濃度の、脂質重量あたりの血清中濃度に対する比の平均値を算出した。この平均値とさまざまな因子を用いて重回帰分析を行なったところ、log Kow と分子量の2因子が、必要かつ十分な評価因子であることが明らかになった。

PBDEs、PCBs の血清中から母乳中への移行は下記の式で表されることが判明した ($r=0.964$, $p<.001$)。

$\text{Log (分配係数)} = 1.225 - 0.0909 \log(\text{Kow}) - 0.00105 (\text{分子量})$

算出した分配係数の信頼性を知るために、授乳期間を3期間にわけ、24個の異性体の分配係数のモデル式の期待値と観察値の平均の比較をおこなった。

0-1 週 $n=26$ $Y=1.079X-0.101$
($r=0.891$, $p<.001$) (Fig. 2A)

2-10 週 $n=38$ $Y=0.890X-0.216$
($r=0.920$, $p<.001$) (Fig. 2B)

11 週以降 $n=25$ $Y=0.589X-0.397$
($r=0.781$, $p<.001$) (Fig. 2C)

授乳期間10週までは観察値は、期待値によく近似したが、11週以降はあまり良い近似ではなく、10週までは信頼性の高い結果が導き出せることを確認した。

D. 考察

今回、deca-BDE (BDE-209) も含めて、13異性体を、同時に同一人より採取した血清と母乳で測定した。同時にPCBsにおいても同様に17異性体を測定した。このような試みはまだ世界的になされておらず、我々の報告が最初と考えられる。BDE-209は、血清中濃度は高いが、母乳中への移行は少ないことが判明した。血

清中濃度、母乳中濃度のどちらか一方だけを測定して他方を類推していたこれまでの方法では、評価が誤ることが判明した。

さらに、化学物質の血清中濃度から母乳中濃度を推定するモデルを構築するために、PBDEs、PCBsの各異性体の移行を構造活性相関を用いて解析し、分子量とKowが必要十分な因子であることを見出した。このモデルは授乳期間が10週までの母乳への移行を良くあらわしていた。

諸外国との比較では、日本人女性の母乳中のPBDEsの値は、USA、カナダ、メキシコに比べればずっと少なく、イギリス、スウェーデン、スペイン、イタリア、ドイツ、フィンランドと同程度であった。

今後、授乳期間と化学物質の血液から母乳への移行について、また移行しにくい化学物質と女性の乳房疾患について、更なる研究が必要であると思われる。

課題5－新たな難分解性化学物質－Perfluorooctane sulfonate (PFOS) および Perfluorooctanoic acid (PFOA) の測定法および処理法の開発

①大気粉塵由来のPFOS・PFOAの測定法の開発

A. 研究目的

人工的に合成された有機フッ素系化合物 (fluorinated organic compounds : FOCs) は、「水を弾くと同時に油を弾く」という特殊な性質を有するために、1950年代から様々な日用品の中で幅広く多量に使用してきた。生物への決定的な毒性情報が不足しているとは言え、FOCsが世界中のヒトや野生生物から検出され、環境中で分解され難

く、生物への蓄積性が高いことに関しては多くの報告がある。

今年度は京都府を対象に、大気浮遊粉塵中PFOS及びPFOAの年間変動、地域差及び大気浮遊粉塵の粒度別濃度について測定を行ない、測定法の開発を行なう。

B. 研究方法

大気捕集装置は、紀本電子工業（株）社製 MODEL-120V ハイボリュームエアサンプラーを用い 1000L/min で、東京ダイレック（株）社製 AN-200 アンダーセンエアサンプラーでは 24L/min の流量でそれぞれ捕集を行った。捕集用の石英ろ紙は、あらかじめ 600℃ で 6 時間加熱した PALLFLEX 2500QAT-UP (203×254mm) を用いたが、アンダーセンエアサンプラーに装着する際にはガスケットの形状に切断して用いた。捕集量は、いずれも約 1000m³ とした。

大気中PFOS及びPFOAを捕集した粉塵からの高速溶媒抽出には、DIONEX 社製 ASE-200 高速溶媒抽出装置を用いた。捕集した石英ろ紙を細切し、高速溶媒抽出用ステンレス製の反応セル(11mL)に充填した。この反応セルを、高速溶媒抽出装置にセットし、10%メタノール水溶液を用いて抽出を行った。次に、ガラス製シリンジに Alumina、Agri の順にコンディショニングした固相カートリッジを連結した。高速溶媒抽出装置からの抽出液をガラスシリンジ筒に注入し、加圧しながら抽出液を Agri に通水してPFOS及びPFOAを捕集した。抽出液を通水後、Agri の固相カートリッジに 10mL の精製水を通して洗浄し、更に約 10mL の空気を送って、固相カートリッジ内の間隙水を除去した。

次いで 2mL のメタノールを通してPFOS及びPFOAを溶出し、溶出液は 5mL 容量の KD 目盛付受器に受けた。窒素パーズを行いながら濃縮し、1mL の定容にしたものを LC/MS 分析用の検液とした。

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。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 (Q₁: 499, Q₂: 500, Q₃: 99)・PFOA (Q₁: 413, Q₂: 369)] で分析した。

大気浮遊粉塵の試料採取は、ハイボリュームエアサンプラーが府内南部の 10 地点 (宇治、大山崎、木津、久御山、城陽、田辺、八幡、国道1号、国道24号、国道171号)、アンダーセンエアサンプラーでは 2 地点 (福知山、国道171号) でそれぞれ調査を行った。

C. 研究結果

PFOS 濃度の年平均値は、国道 171 号線沿いの採取地点 (以下 R171) において 6.7pg/m³ (2.3~21.8pg/m³) で、福知山 0.7pg/m³ (0.1~2.1 pg/m³) であり、濃度に地点差が見られた。粉塵重量当たりの PFOS 濃度では、R171 124ng/g (38~427ng/g)、福知山が 24 ng/g (7~61ng/g) で、地点による濃度差が観測された。いずれの地域でも、年間を通して大気浮遊粉塵から PFOS が検出された。

R171及び福知山の粒径分布は0.6と4 μm 付近にピークを持つ2山型を示し、健康影響が大きい粒径2.5 μm 以下の粉塵の割合は、R171; 44%、福知山; 45%であった。R171では、PFOSは4 μm 付近にピークを持つ1山型の分布を示し、PFOAは0.6 μm と4 μm 付近にピークを持つ2山型を示した。福知山では、PFOS、PFOAともに0.6 μm と4 μm 付近にピークを持つ2山型を示した。PFOS及びPFOAの総濃度は、R171ではPFOSが6.4 pg/m^3 でPFOAが319 pg/m^3 、福知山ではPFOSが

2.2 pg/m^3 でPFOAが15 pg/m^3 であった。大気浮遊粉塵を粒度別に見た場合に粒径2.5 μm 以下のPFOS及びPFOA濃度の割合は、R171ではPFOSが39%でPFOAが28%、福知山ではPFOSが42%でPFOAが34%であった。PFOA濃度が特に高いR171では、粒径4 μm 付近でPFOSやPFOA濃度が増加する傾向が見られた。

京都府南部の10地点で捕集した試料で、大気浮遊粉塵中のPFOS及びPFOAを測定した。大気吸引濃度で見た場合、PFOSは最低値が大山崎の0.8 pg/m^3 で、最高値が宇治の6.5 pg/m^3 であった。これに対してPFOAは、最低値が田辺の16.5 pg/m^3 で、最高値が国道1号線沿いの60.7 pg/m^3 であった。PFOSとPFOAを比較した場合、いずれの地点でもPFOSに比べてPFOAの濃度が約10倍高いという結果であった。

D. 考察

高速溶媒抽出装置で抽出し、固層カートリッジで濃縮後、LC/MSで大気浮遊粉塵中のPFOS及びPFOA分析法を開発した。繰り返しの添加回収実験の結果は、個別に採取した試料で行ったにもかかわらず、PFOSとPFOAの回収率が97.5%と

87.5%であり、変動係数も良好であった。本法は、抽出溶媒の使用量を低減し、人為的操作を最小限にしたために、分析誤差が少なく、操作も簡便でルーチン分析法に適している。

今回調査した、京都府南部の10地点の調査結果では、PFOSは岩手県と同じ濃度レベルであるが、PFOAは約10倍高い値で観測された。今後、要因の解明を行うと共に、汚染防止に向けた検討が必要である。

②PFOS・PFOAの処理法の開発

A. 研究目的

3種類の粒状活性炭によるPFOS、PFOAの吸着特性を検討すると共に、PFOS、PFOAの活性炭吸着処理に及ぼす溶存性有機物質(DOM)の影響を回分式実験により検討する。

B. 研究方法

実験に使用した粒状活性炭の粒径はほぼ同じものを選択し、原材料は、木炭、木の実の殻、軟炭の3種類を使用した。これら活性炭は、不順物や細かな粒子を取り除くために超純水で洗浄された。その後、活性炭への初期吸着物質を取り除くため、24時間超純水に浸した。そして、2日間105°Cで乾燥させ、孔内の空気を抜くために実験の直前に30分間吸引脱気した。

PFOS ($\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{SO}_3^-$, Wako 508-53921, perfluorooctane sulfonic acid potassium salt, 98%)、PFOA ($\text{CF}_3(\text{CF}_2)_6\text{COO}^-$, Wako163-09542, perfluorooctanoic Acid, 95%)を、それぞれ超純水に溶かした。PFOSについては4日間攪拌し溶解させたものを標準原液とし、液体クロマトグラフ質量分

析装置(LC/MS/MS、TSQ7000、ThermoQuest社、トリプルステージ四重極型 MS/MSシステム)のLC/MSモードで測定した。LC/MSのイオン化条件設定では、100 μ g/Lの標準液を用いて、ESI Negative Ion法により次の条件で測定した。移動相には、10mM 酢酸アンモニウムとメタノールを用いた。その他、キャピラリーチューブ温度、イオンソース電圧等の最適値を検討した。リテンションタイムは、PFOSが約6.7分、PFOAが約4.3分であった。両物質とも1 μ g/L~100 μ g/Lで線形を得た。最初に対象物質溶液(10 mL)、活性炭懸濁液+精製水(合わせて10 mL)、リン酸緩衝液(0.061MKH₂PO₄、0.031MK₂HPO₄)(10 mL)合計30 mLを60 mL容量のPP容器に入れ、恒温振とう器(EYELA UNI Thermo shaker NTS-1300s)により、25°C、pH7.0、振とう速度120 rpmの条件で実験を開始した。振とう開始後、一定間隔ごとにサンプルを採取し、ろ過後、活性炭乾燥重量、ろ液のPFOS、PFOA濃度をHPLC/MS(UMA、TSQ7000)で測定した。

C. 研究結果

PFOS、PFOAとも短時間で活性炭に吸着した。活性炭2g/L添加後4時間でPFOSで93%、PFOAで99%が吸着された。活性炭の種類による差は、PFOS、PFOAともにあまり大きくなかった。PFOSの吸着速度がPFOAより速く活性炭による吸着量もPFOSの方が高かった。

D. 考察

1) 活性炭F400がWakoに比べてやや高い吸着性を示したが、活性炭の種類による差は、PFOS、PFOAともにあまり大きくなかったこと、2) DOM共存下では

活性炭による吸着効率が低下し、その影響は特にPFOSで顕著に現れたことが分かった。上水でのPFOS、PFOAリスクを低減する際には、水中のDOMの存在を考慮した、最適な処理対策を検討する必要があると考えられた。

課題6—新たな難分解性化学物質—

Perfluorooctane sulfonate (PFOS)

Perfluorooctanoic acid (PFOA)の新たな毒性

A. 研究目的

Perfluorooctane sulfonate (PFOS)、Perfluorooctanoic acid (PFOA)はその構造から、非常に安定で、環境中で分解されにくい。近年、野生生物体内での蓄積が報告されるようになり注目を集めており、またストックホルム条約の新規POPsとしての検討が開始されている。ヒト血清中から検出されており、その影響について懸念されている。PFOSが心室筋Caイオンチャンネルに作用することが知られており、本研究では、PFOS/PFOAの毒性について ①神経細胞に及ぼす影響、②ゾウリムシのK⁺誘導性後退泳動時間に及ぼす影響、③マウスの中枢性の、摂食、胃排出に与える影響に関して検討した。

B. 研究方法

①神経細胞に及ぼす影響

本研究では、ラット胎仔小脳を単離培養2週間目の細胞を使用してPFOSの影響を検討した。電極内液はカリウムグルコン酸溶液、外液は人工脳脊髄液とした。チャンバー温度は35°Cに保った。電流固定法で活動電位を計測した。

②ゾウリムシのK⁺誘導性後退泳動時間に及ぼす影響

本研究では、培養4日目の*Paramecium caudatum* (KNZ82)を使用した。PFOS、およびその関連物質PFOAが*P. caudatum*のK⁺誘導性後退泳動継続時間に影響を及ぼすかについて観察した。*P. caudatum*の後退泳動は、脱分極性の刺激を受容すると、電位依存性Caチャンネルから繊毛細胞内にCa²⁺が流入することにより、繊毛の打ち方が逆転することに起因することが知られている。さらに、界面活性剤である、Nonafluoro-1-butane sulfonate potassium salt (PFBS), Perfluorononanoic acid (PFNA), nonadecafluorodecanoic acid (PFDA), 1*H*, 1*H*, 2*H*, 2*H*-Tetrahydro-perfluorooctane sulfonate sodium salt (THPFOS), dodecafluorosuberic acid (PFODa), hexadecafluorosebacic acid (PFDDa), sodium *n*-caprylate (OA), 1-octanesulfonic acid sodium salt (OS), 1-decanesulfonic acid sodium salt (DeS), sodium laurate (DoDA), 1-dodecanesulfonic acid sodium salt (DoDS), Sodium dodecyl sulfate (SDS), Lauric acid sodium salt, Dodecyl trimethyl amine ammonium (DDTMA), [(heptadecafluoro-1-octanesulfonamide)propyl]trimethyl ammonium iodide (FOSAPrTMA), Polyoxyethylene sorbitan monouralate (TW-20)についても、同様に検討した。さらに、*P. caudatum*後退泳動はCaチャンネルと大きく関わっていることが知られることから、Caチャンネル拮抗剤であるCd (250 μM)及びニフェジピン(500 μM)を用いて、PFOSとの相互作用を検討した。測定した結果は、コ

ントロール群と比較するとともに、濃度-反応性の有無を調べた。統計処理には、統計ソフトJMPを用いた。ANOVA検定でp<0.05であった群についてDunnnett's test またはWilliams' test により検討した。

③マウスの中枢性の、摂食、胃排出に与える影響

本実験はすべて京都大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認の下に、動物愛護に配慮して行われた。

マウス-脳室内(第3脳室)投与系を用い、絶食下において雄性ddyマウスにPFOS (0.03, 0.1, 0.3 mg/kg)を急性投与し、投与後20分、1時間、2時間、4時間、12時間、24時間後の摂食量を測定した。またPFOS (0.1, 0.3 mg/kg)を脳室内に急性投与し、投与2時間後における胃排出能を測定した。

C. 研究結果

①神経細胞に及ぼす影響

Whole cell current patch clampのもとで、PFOSが活動電位に及ぼす影響を評価した。PFOS (10、100 μM)は濃度依存的に静止膜電位を過分極側にシフトさせた(それぞれコントロールと比較して5、7 mV;いずれもp < 0.05)。またPFOS (30 μM)は0.2 nAの電流注入し、400msにおける活動電位発火頻度を減少させた(コントロール(3.7)と比較しての5.1;p < 0.05)。心室筋における研究ではカルシウム電流に対する影響が示されていたため、カルシウムイオンチャンネル阻害剤(Cd 100 μM)の共存下でPFOSの作用に影響するかを評価した。PFOSの作用は100 μM カドミウムの下でも観察さ

れた。

②ゾウリムシのK⁺誘導性後退泳動時間に及ぼす影響

PFOS群において、*P. caudatum*の後退泳動継続時間はコントロール群と比較して有意に延長した。さらに、後退泳動時間延長は濃度依存的であった。また、高濃度のPFOSを含む“K⁺-rich”液では、後退泳動中に死亡してしまった。PFOA群においても、コントロール群と比較して後退泳動継続時間が延長し、濃度-反応性であった。しかし、同濃度のPFOSを含む“K⁺-rich”液と比較すると、その影響は小さく、これら2つの物質には違いが認められた。陰イオン性界面活性剤である、SDS群、DoDA群、また炭素鎖長がPFOSと異なるPFBS群、PFOAと異なるPFNA群、PFDA群においてもコントロール群と比較して後退泳動時間の延長が認められ、炭素鎖長の増加にともない後退泳動を延長させた。

炭素鎖がフッ素化していない物質であるOA群、OS群、DeS群、DoDS群においてはDeS群、DoDS群で有意に後退泳動を延長させた。炭素鎖長は同じであればフッ素数が多い群ほど後退泳動を延長させた。また、有意に後退泳動継続時間が延長したPFOS群にCd²⁺またはニフェジピンを加えると、後退泳動時間は短縮した。

陽イオン性界面活性剤であるDDTMA群、FOSAPrTMA群においては、コントロール群と比較して後退泳動時間を有意に短縮した。

③マウスの中枢性の、摂食、胃排出に与える影響

PFOSは、脳室内投与において用量依存

的に、有意に摂食を抑制した。この摂食抑制作用は、0.3 mg/kg投与においては、投与後20分より認められ、24時間持続した。また、胃排出は、PFOSの0.3 mg/kg投与において有意に抑制された

D. 考察

PFOSがラット小脳プルキンエニューロンの活動電位に影響を与えることが示され、これによる毒性作用が引き起こされる可能性が示唆された。PFOSはまたカルシウムチャンネル以外のイオンチャンネルにも作用していると考えられた。これは予測される作用メカニズムが特定のイオンチャンネル蛋白への作用よりも、細胞膜の電荷への影響を介していることから、電位依存性イオンチャンネル全般への影響が可能性と示唆される。この点はParameciumに対するスクリーニングの結果、多くのフッ素系両親媒性物質がイオンチャンネル関連行動を攪乱したことからも支持される。

PFOSによる後退泳動時間の延長は、Caコンダクタンス変化による繊毛内Ca濃度の上昇によるものであり、間接的であれ、直接的であれ、Caチャンネルと深く関わっていると考えられる。PFOS・PFOAについての先行研究との関連を考えると、いくつか興味深い点が挙げられる。本研究によりPFOAが細胞内Caチャンネルに影響する可能性が示されたことは大変興味深い。本研究では、PFOS (9.5 μM)にて後退泳動継続時間延長が統計的に有意に認められた。Olsenらによると労働者を対象とした調査において、高いヒトでは10ppm (19 μM)を越える血清PFOSが検出されている。この濃度は、本研究の結果から考えると健康影響が懸念されるものであり、今後作業環境の見直し

が必要となるだろう。

AustinらはラットにPFOSを腹腔内投与した後に、脳を摘出しPFOSが視床下部を始めとする脳の領域に蓄積していることを報告している。我々の結果は、生体に取り込まれたPFOSが中枢に作用し、食行動などの情動行動に影響を与える可能性を示唆した。

今後、更なる検討が必要であり、またPFOAの影響も検討する必要があると考えられる。

IV. 試料バンクを用いたリスクコミュニケーションの研究

課題7—メチル水銀高摂取地域におけるリスクコミュニケーションと介入研究

A. 研究目的

わが国では魚類の摂取頻度が高く、特に沿岸部ではマグロやカジキなど大型魚類の摂取頻度が高いことが知られてきた。1980年代、1995年に全国で集められた生体バンクの試料を用いて食事および血液中のメチル水銀濃度を評価した結果、宮城県唐桑町で曝露濃度が高いことが判明し、本バンクの趣旨である地域への情報還元の一環として地域住民にリスクコミュニケーションを行い2004年12月から2005年1月にかけて予備調査を行った。その結果、1980年、1995年と比較して減少していることを確認した。しかし、まだ全国レベルと比較して高値にあるため、地域住民に結果報告とともにリスクコミュニケーションを行ない、希望者には個別に結果説明を行なった。そして「上手に魚を食べてメチル水銀を減らそう」という共通の目標を設定し、2005年7月と12月に毛髪中のメチル水銀

濃度の測定し、これまでの値との比較を行い、試料バンクの試料を用いた調査におけるリスクコミュニケーションの効果进行研究する。

B. 研究方法

本研究は疫学の倫理指針に基づき行われており、京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会の承認を得て実施した。

1. 2005年7月調査：2004年12月から2005年1月にかけての予備調査に参加していただいた方々、および唐桑町にある保育園、幼稚園（全4施設）を対象に母子での参加を募った。毛髪、問診票を入れた返信用封筒は直接、当方に送付していただき、まとめて環境省国立水俣病総合研究センター社会科学研究室へ送付し測定した。結果は、参加者個人に封書で送付し、結果報告会と学習会（10月11日）への参加要請書を同封した。

2. 2005年12月調査：2005年7月調査に参加していただいた方々、および2004年12月から2005年1月にかけての予備調査に参加していただいた方々に参加を募った。7月調査と同様の方法で行い、結果は、参加者個人に封書で送付し、個人ごとに電話で結果の説明を行い、質問に対して返答した。

C. 研究結果

3回の調査において延べ263人（男性99人、女性164人）が参加した。毛髪中メチル水銀濃度測定と結果報告会と学習会をくりかえすという介入によって、参加者の毛髪中メチル水銀濃度は減少した。

D. 考察

唐桑町は、遠洋漁業が盛んであり、マグロなどの高級魚が一年を通じて入手可能であり、これまでメチル水銀のことについては知らず、大量に摂取してきた。今回、個人面接、あるいは電話による聞き取り調査において、多くの参加者がマグロやカツオの大量摂取を控え、摂取する魚の種類を増やす努力をするようになり、毛髪中メチル水銀濃度は減少した。地域住民において曝露量を実測し、結果報告とともにリスクコミュニケーションを行なうことによって、曝露減少効果があることを実証した。

V. 結論

1. ヒト生体試料バンクの創設において平成18年3月現在、全血7,099検体、血清22,535検体、母乳2,704検体、食事3,380検体からなるヒト生体試料バンクが構築された。

2. 京都大学大学院医学研究科内にサンプルルームの完成を見て、外部倉庫からすべての試料を大学内に移動した。また、Microsoft access を用いてリレーショナルデータベースを作成した。それぞれの試料の持つ情報ごとに分類され、同一試料にすべて関連付けられて表示できるようになっている。検索条件も多様であり、採取年、採取地域、提供者の性や年齢など、複数の絞込みも可能であるため、試料の運用に関して検索が容易である。

3. バンク試料の運用は円滑に行われ、機能することが証明された。

4. 試料バンクの有用性の検証プロジェクトで示されたように、汚染物質への曝露モニタリングを経年的に行うことは汚染の実態を的確に知るために極めて有用であることが示された。

5. 試料バンクの試料測定で時に高濃度曝露地域が見出される可能性があり、その場合には、地域へのリスクコミュニケーションが必要であり、それにより地域住民の協力も得、曝露減少が可能であることが実証できた。

VI. 健康危険情報 なし

VII. 研究発表

1. 論文発表

(1) Eriko Matsubara, Kouji Harada, Kayoko Inoue, Akio Koizumi. Effects of Perfluorinated amphiphiles on backward swimming in *Paramecium caudatum*. *BBRC*. 2006;339:554-561.

(2) K. Harada, S. Nakanishi, K. Sasaki, K. Furuyama, S. Nakayama, N. Saito, K. Yamakawa, A. Koizumi. Particle Size Distribution and Respiratory Deposition Estimates of Airborne Perfluorooctanoate and Perfluorooctanesulfonate in Kyoto Area, Japan. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2006;76:306-310.

(3) Shoji Nakayama, Kouji Harada, Kayoko Inoue, Kazuaki Sasaki, Seery Benjamin, Norimitsu Saito, Akio Koizumi. Distribution of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in Japan and their toxicities. *Environ Sci*. 2005; In Press.

(4) Bitu Eslami, Akio Koizumi, Souichi Ohta, Kayoko Inoue, Osamu

Aozasa, Kouji Harada, Takeo Yoshinaga, Chigusa Date, Shigeo Fujii, Yoshinori Fujimine, Noriyuki Hachiya, Iwao Hirosawa, Shigeki Koda, Yukinori Kusaka, Katsuyuki Murata, Haruo Nakatsuka, Kazuyuki Omae, Norimitsu Saito, Shinichiro Shimbo, Katsunobu Takenaka, Tatsuya Takeshita, Hidemi Todoriki, Yasuhiko Wada, Takao Watanabe, Masayuki Ikeda. Large-Scale Evaluation of the Current Level of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Breast Milk from 13 Regions of Japan. *Chemosphere*. 2005; In Press.

(5) Akio Koizumi, Takeo Yoshinaga, Kouji Harada, Kayoko Inoue, Akiko Morikawa, Junko Muroi, Sumiko Inoue, Bitu Eslami, Shigeo Fujii, Yoshinori Fujimine, Noriyuki Hachiya, Shigeki Koda, Yukinori Kusaka, Katsuyuki Murata, Haruo Nakatsuka, Kazuyuki Omae, Norimitsu Saito, Shinichiro Shimbo, Katsunobu Takenaka, Tatsuya Takeshita, Hidemi Todoriki, Yasuhiko Wada, Takao Watanabe, Masayuki Ikeda. Assessment of Human exposure to polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Japan using archived samples from the early 1980s and mid 1990s. *Environmental Research* 2005;99:31-39.

(6) Kouji Harada, Kayoko Inoue, Akiko Morikawa, Takeo Yoshinaga, Norimitsu Saito, Akio Koizumi. Renal clearance of perfluorooctane Sulfonate and

perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environmental Research* 2005;99:253-261.

(7) Akiko Morikawa, Naoya Kamei, Kouji Harada, Kayoko Inoue, Takeo Yoshinaga, Norimitsu Saito, Akio Koizumi. The bioconcentration factor of perfluorooctane Sulfonate is significantly larger than that of perfluorooctanoate in wild turtles (*Trachemys scripta elegans* and *Chinemys reevesii* turtles): an Aii river ecological study in Japan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005; In Press.

(8) Yasuhiko Wada, Akio Koizumi, Takeo Yoshinaga, Kouji Harada, Kayoko Inoue, Akiko Morikawa, Junko Muroi, Sumiko Inoue, Bitu Eslami, Iwao Hirosawa, Akitsu Hirosawa, Shigeo Fujii, Yoshinori Fujimine, Noriyuki Hachiya, Shigeki Koda, Yukinori Kusaka, Katsuyuki Murata, Haruo Nakatsuka, Kazuyuki Omae, Norimitsu Saito, Shinichiro Shimbo, Katsunobu Takenaka, Tatsuya Takeshita, Hidemi Todoriki, Takao Watanabe, Masayuki Ikeda. Secular trends and geographical variations of the dietary intakes of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) using archived samples from the early 1980s and mid 1990s in Japan. *Journal of Occupational Health* 2005;47:236-241.

(9) Kouji Harada, Feng Xu, Kyoichi Ono,