

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（総合）研究報告書

難分解性有機フッ素化合物へのヒト曝露に関する研究（平成16-17年度）

主任研究者 小泉昭夫 京都大学大学院教授  
研究協力者 原田浩二 京都大学大学院博士課程

研究要旨

本研究では血清試料中のPFOS類の経年変化、地域差、その他要因を明らかにした。昨年度の研究により、宮城県における過去の血清試料によりPFOS・PFOA濃度がこれまでの25年にわたって、それぞれ、3、14倍に増加したことが明らかになったが、他地域でも同様であるのか、また採集時点を十分にするため、京都における保存血清試料により評価を行った。83年以降、2003年までにPFOAは4倍ほどの上昇が見られ、増加傾向が続いていると考えられた。PFOSでは明らかな増加傾向は見られなかった。現在の国内11地域での比較ではPFOSは郊外の地域で低いものの全国的に大きな違いは見られなかった。一方、PFOAについては近畿で全国的に突出して高い曝露が生じていることが明らかになった。

A. 研究目的

ペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）の主要な生産者であった3M社は2000年に、環境中、野生生物への蓄積を理由に、2002年の終わりまでにPFOS・PFOAの生産を停止することを発表し、それらの化学物質の曝露と有害性について注目されるようになった[1]。

PFOS、PFOAによる地球規模での海生哺乳類、鳥類の汚染が報告されている[2, 3]。ヒトへの曝露に関する情報は米国での報告が多く、国内地域ごとの違い、今後の汚染動向は本研究班の昨年度のパイロットスタディに限られる[4-6]。

本研究では日本におけるPFOS・PFOA曝露の地域的多様性、最近20年間での詳細な経時傾向を調査し、今後のリスク評価・管理のための基礎的情報を提

供することを目的とした。

B. 研究方法

生物試料中PFOS・PFOAの測定のために高速液体クロマトグラフィ・質量分析法LC/MSを用いた。血清試料では対イオン添加有機溶媒抽出を行い、前処理を行い、LC/MSで分析した[6, 7]。

1983年から2003年にかけての長期傾向を明らかにするため、生体試料バンクから京都における血清試料を4年間隔で5時点について男女10名ずつ計100検体を無作為に抽出した。

また現在のヒト曝露を国内各地域について評価するため、秋田、宮城、岐阜、福井、京都、兵庫、山口、高知、沖縄の9地域で居住歴があり、20代から50代の男女各10名、計180名について、生体試料バンクから無作為に抽出した。

表1に研究対象集団の特性を掲げる。いくつかの地域で年齢に有意差があるが、これまでの研究から血清中濃度に影響を及ぼすものではないと判断した。

生体試料の取得のため、京都大学医学部・大学院医学研究科医の倫理委員会に研究計画を申請し、承認を得た。

### C. 研究結果

京都における血清中PFOA濃度の経年的傾向調査の結果を図1に示す。昨年度の研究では宮城、秋田の保存血清試料を用いた評価で血清中PFOA濃度の増加が見られていたが、京都においてもPFOAの増加が見られ、80年代初めからの指数関数的に増加し続けた。

これに対して血清中PFOS濃度の経年変化はPFOAにくらべれば緩やかなものであった(図2)。1983年と1999年の間では男女全体の平均に有意差がみられた。

血清中PFOA・PFOS濃度の地域的な傾向を図3に示す。PFOSについて地域間での差は横手市、大和町、仙台市が低いグループを、京都、兵庫、高知で高いグループを作っていた。

PFOAでは京都、兵庫で突出して高い結果となった。

昨年度の研究で明らかになった男女差は本研究でもほぼ一貫して確認された。

### D. 考察

米国での研究では1974年と1989年の間でヒト血清中PFOS・PFOAの有意な増加が見られたが、2003年との間には有意な差がないとする報告がなされたが[8]、京都においては83年から99年にかけてPFOA・PFOSともに上昇して

きており、特にPFOAは急激な増加を示している。この傾向は昨年度の東北地方での経年変化とも合致し、日本におけるPFOA曝露がこの20年で増加傾向にあることが強く示唆される。

地域差の点ではPFOSは採取地域、自治体規模による明確な差は見られなかった。個々の曝露についての評価が現時点で行われていないため今回認められた有意差の原因までは到達しなかった。一方でPFOAは京都、兵庫において他地域より有意に高い血清中濃度を示した。これに関連して、京都、大阪、兵庫での飲料水中PFOA濃度は東京都、東北地方に比べて高いものであった[7]。また京都国道沿線における大気粉塵中PFOA濃度の調査ではPFOSに比べて100倍ほど高い濃度を示し、一方東北地方ではわずかにしか検出されなかった[9]。また推定される曝露量では飲料水からの曝露と同程度であった。

PFOA・PFOSの尿中排泄量は1日20ngほどであるが[10]、飲料水や大気からの推定曝露量も10ngほどとなり、近畿地方での高い曝露への一定の関与が示唆された。

今後は曝露と排泄のマスバランスを詳細に検討を行い、この20年間の曝露の増加の原因を明らかにしていくことが必要であると考えられる。

### E. 結論

ヒト血清中PFOA濃度はこの20年間で上昇を続けており、また近畿地方において高い値を示した。ヒト血清中PFOS濃度はこの20年間でわずかながら上昇していた。

### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Harada K et al.

Renal clearances of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human, and their species-specific excretion.

Environ Res. Available online 18 January 2005

doi:10.1016/j.envres.2004.12.003

Harada K et al.

Airborne Perfluorooctanoate (PFOA) may be a Substantial Source Contamination in Kyoto Area, Japan Bull Environ Contam Toxicol. 2005 Jan, 74(1):64-69

### 2. 学会発表・その他

第75回 日本衛生学会総会、2005年3月27-30日

原田浩二、ヒトにおけるペルフルオロオクタン酸(PFOA)とペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)の腎クリアランスの調査と薬物動態シミュレーション

米国トキシコロジー学会 (Society of Toxicology) 第44回年次総会、2005年3月6-10日

Renal clearances of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans, and species-specific excretion of these chemicals.

Kouji Harada; K. Inoue; A.

Morikawa; T. Yoshinaga; N. Saito;

M. Kimura; S. Shimbo; A. Koizumi

第44回 近畿産業衛生学会、2004年11月6日

ヒトにおけるペルフルオロオクタン酸(PFOA)とペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)の腎クリアランスと種差の血中濃度に及ぼす影響

原田浩二、井上佳代子、森川亜紀子、

吉永侃夫、齋藤憲光、木村みさか、新保慎一郎、小泉昭夫

China-Japan Joint Symposium on Environmental Chemistry, 2004 (日中環境化学連合シンポジウム)、2004年10月20-23日

Analytical Method for Perfluorooctanoate (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) in Ambient Air

SASAKI, K., YOSHIDA, T., OZAWA, K., SAITO, N., JIN-Y. H., KOIZUMI, A. Perfluorooctanoate and Perfluorooctane sulfonate Concentrations in Surface Waters in Japan

SAITO, N., SASAKI, K., HARADA, K., KOIZUMI, A.

第7回 日本水環境学会シンポジウム、2004年9月13-14日

PFOS及びPFOAによる環境汚染の現状について

佐々木和明、齋藤憲光、金一和、小泉昭夫

第77回 日本産業衛生学会、2004年4月13-16日

過去25年間にわたるヒト血清中ペルフルオロオクタン酸・ペルフルオロオクタン酸濃度に及ぼす、時間、性、地理的要因の影響

原田浩二、井上佳代子、吉永侃夫、渡辺孝夫、小泉昭夫

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## I. 文献

- [1] A. Wood, and W. Clarin, 3M to phase out PFOS, Chem Week 162 (2000) 9-9.
- [2] K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Oehme, S. Focardi, and J. P. Giesy, Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas, Environ Sci Technol 36 (2002) 3210-3216.
- [3] K. Kannan, J. C. Franson, W. W. Bowerman, K. J. Hansen, P. D. Jones, and J. P. Giesy, Perfluorooctane sulfonate in fish-eating water birds including bald eagles and albatrosses, Environ Sci Technol 35 (2001) 3065-3070.
- [4] G. W. Olsen, T. R. Church, E. B. Larson, G. van Belle, J. K. Lundberg, K. J. Hansen, J. M. Burris, J. H. Mandel, and L. R. Zobel, Serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in an elderly population from Seattle, Washington, Chemosphere 54 (2004) 1599-1611.
- [5] G. W. Olsen, T. R. Church, J. P. Miller, J. M. Burris, K. J. Hansen, J. K. Lundberg, J. B. Armitage, R. M. Herron, Z. Medhdizadehkashi, J. B. Nobiletti, E. M. O'Neill, J. H. Mandel, and L. R. Zobel, Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of american red cross adult blood donors, Environ Health Perspect 111 (2003) 1892-1901.
- [6] K. Harada, N. Saito, K. Inoue, T. Yoshinaga, T. Watanabe, S. Sasaki, S. Kamiyama, and A. Koizumi, The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years, J Occup Health 46 (2004) 141-147.
- [7] N. Saito, K. Harada, K. Inoue, K. Sasaki, T. Yoshinaga, and A. Koizumi, Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan, J Occup Health 46 (2004) 49-59.
- [8] G. W. Olsen, H. Huang, K. J. Helzlsouer, K. J. Hansen, J. Butenhoff, and J. H. Mandel, Historical Comparison of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorooctanoate and Other Fluorochemicals in Human Blood, Environ Health Perspect (2005).
- [9] K. Harada, S. Nakanishi, N. Saito, T. Tsutsui, and A. Koizumi, Airborne perfluorooctanoate may be a substantial source contamination in Kyoto area, Japan, B Environ Contam Tox 74 (2005) 64-69.
- [10] K. Harada, K. Inoue, A. Morikawa, T. Yoshinaga, N. Saito, and A. Koizumi, Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in

humans and their  
species-specific excretion,

Environ Res (2005).

表1. 研究対象地域と研究対象者の人口特性

Sampling site	Time	Male			female		
		N	Age		N	Age	
(Historical)							
Kyoto	1983	10	37.3±9.0		10	36.8±10.2	
	1987	10	37.1±9.3		10	33.3±9.9	
	1991	10	40.5±11.7		10	34.8±13.6	
	1995	10	38.5±10.1		10	37.5±10.5	
	1999	10	40.6±11.8		10	38.2±12.7	
	2003a	28	36.6±11.7		26	37.1±10.9	
(Geographic)							
Akita city	2004	10	41.7±11.3	BCD	10	37.9±11.8	BC
Sendai city (Miyagi)	2003	10	41.4±12.0	BCD	10	35.1±10.8	ABC
Takayama city	2003-4	10	44.9±8.8	D	10	35.9±10.1	BC
Yoshida county (Fukui)	2004	10	38.9±9.8	BCD	10	39.8±10.2	C
Kyoto city	2003-4a	10	40.0±12.5	BCD	10	36.2±11.9	BC
Nishinomiya city	2003-4a	12	33.9±12.9	AB	15	38.7±8.1	C
Shimonoseki city	2004	10	34.4±10.2	ABC	10	39±10.7	C
Kochi city	2004	10	39.7±10.7	BCD	10	39.2±11.8	C
Naha city	2004	10	35.9±9.1	ABCD	10	33.9±8.9	ABC

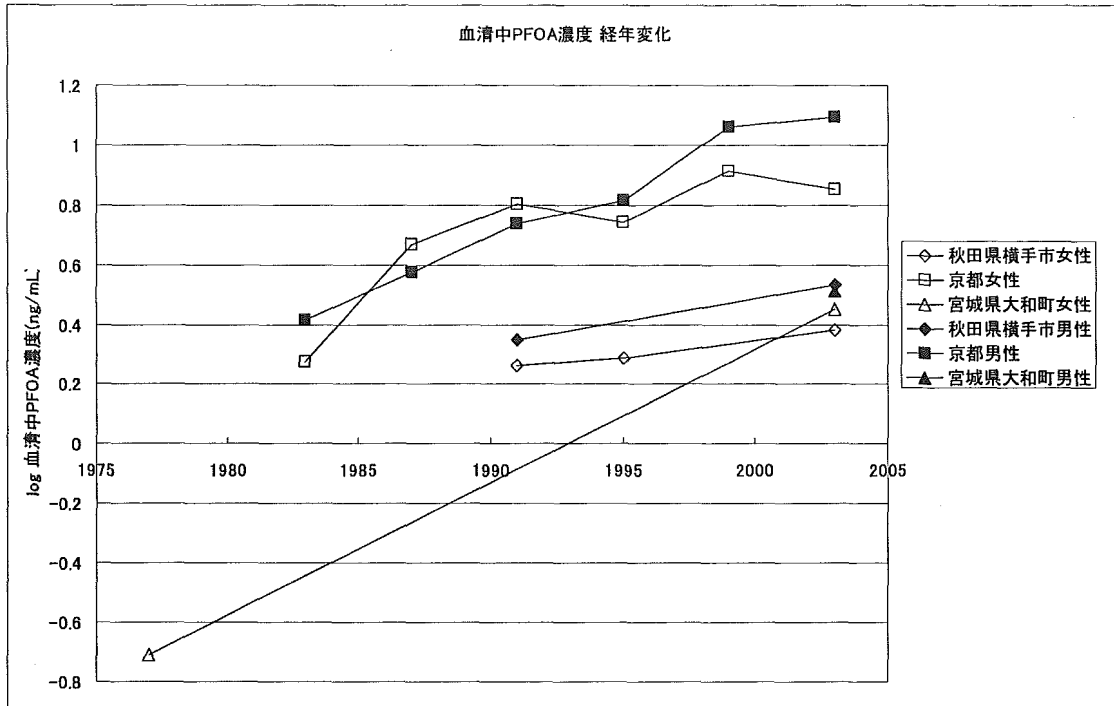


図 1. 血清中 PFOA 濃度の経年変化

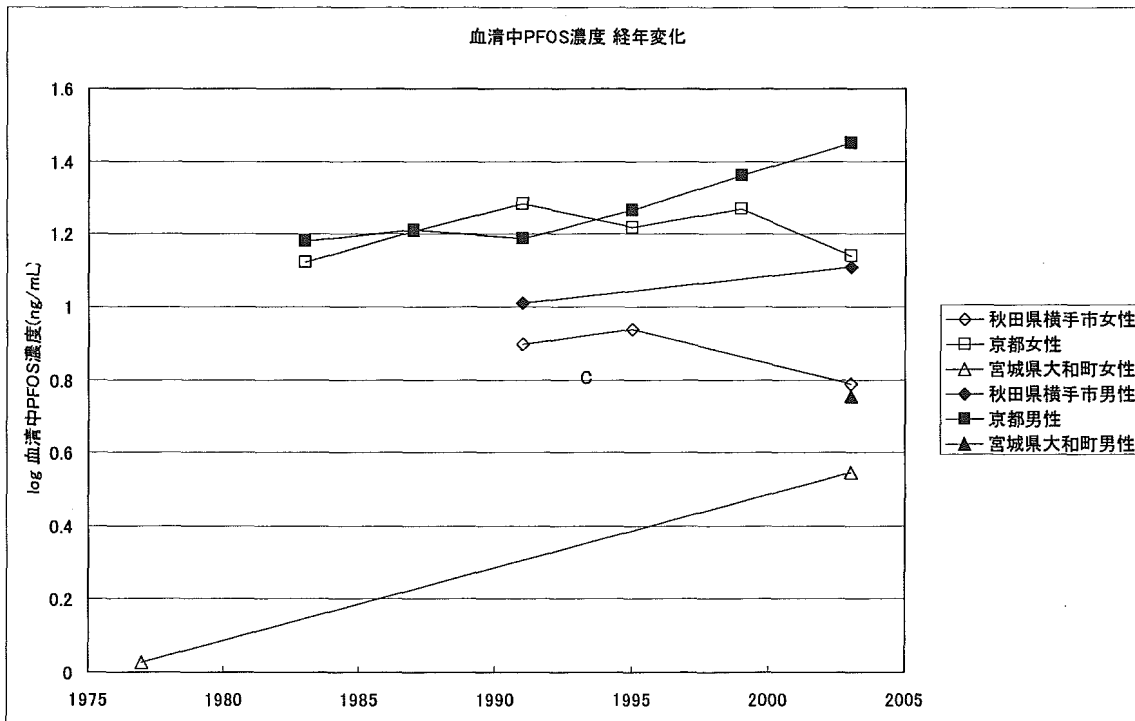


図 2. 血清中 PFOS 濃度の経年変化

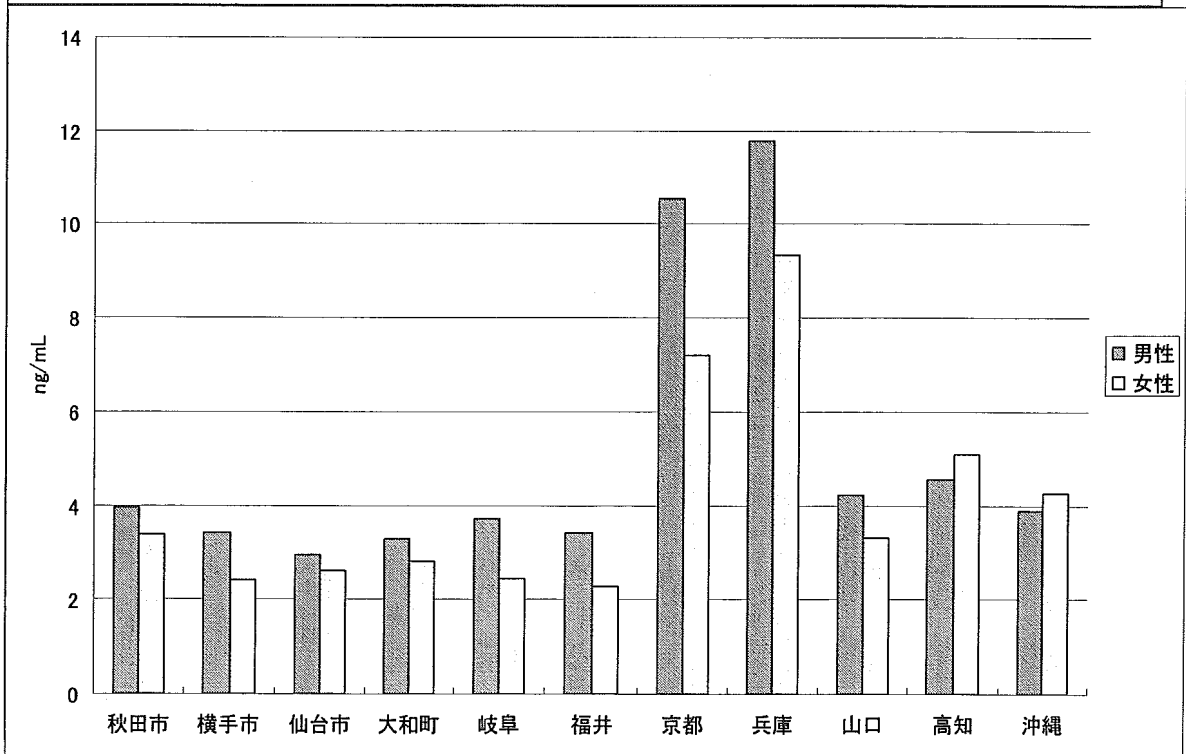
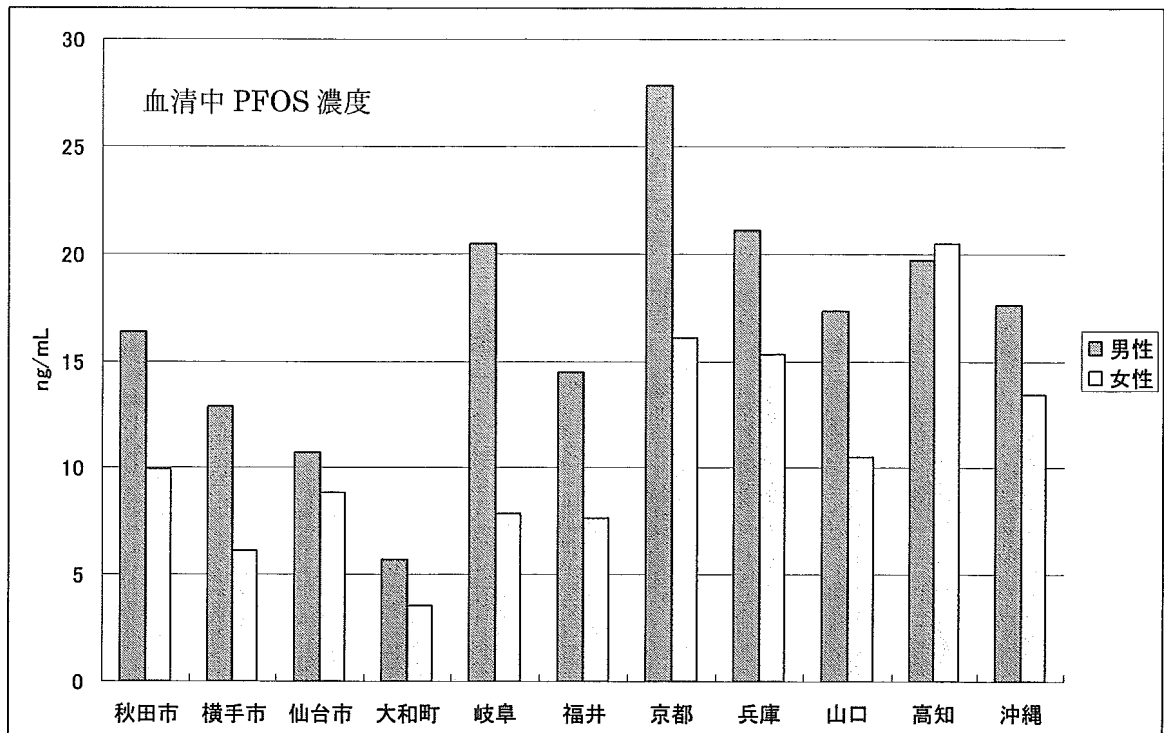


図 3. 国内各地域におけるヒト血清中 PFOS・PFOA 濃度

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（総合）研究報告書

PFOS 及び PFOA の分析法開発と大気粉塵の測定に関する研究  
（平成 15-17 年度）

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

小泉研究班の分担研究として、有機フッ素系化合物の PFOS 及び PFOA の分析法開発及び実サンプルの分析を行なった。研究開始した当初、PFOS や PFOA は世界中の現代人や生物から検出されていた。しかし、血液以外の報告がなく、汚染経路が問題視されている時期であった。汚染経路が明らかになれば、本研究目標である POPs の「ヒト曝露の評価と動向予測」を行う上で、FOCs は最適な汚染物質と予測された。

分析法開発・改良に取り組んだ試料は、環境水、大気浮遊粉塵、血液、尿などである。その結果、環境水が 0.1 ng/L 以上の濃度、大気浮遊粉塵が 0.1 pg/m<sup>3</sup> 以上、血液が 0.1 μg/mL 以上、尿が 1ng/L 以上の濃度で測定できる分析法を開発した。開発した分析法を適用し、小泉研究班が取り組んだ研究課題を通して、日本における環境水の汚染状況、大気浮遊粉塵経路での汚染濃度（世界初）、日本人の血液への蓄積濃度、尿中からの排泄濃度（世界初）などを明らかにした。

#### A. 研究目的

パーフルオロオクタンスルフォネート (perfluorooctane sulfonate:PFOS) は、人工的に合成された有機フッ素系化合物 (fluorinated organic compounds: FOCs) で、「環境中で分解し難い」という難分解性有機化合物の性状と、「水を弾くと同時に油を弾く」という特殊な性質を有する。この便利な特性のために人類は、1950 年代から工業的に PFOS を生産し、有機合成の分野のみならず、現代文明の様々な日用品（焦げ付かないフライパン、家庭で使用される様々なクリーナー、室内装飾品、繊維・衣類・カーペット・テーブルクロス、革製品、織物の表面処理、紙のコーティング、食品の包装紙、床用光

沢剤、化粧品、歯のクリーナー、シャンプー、防水スプレー、消火剤、車やスキー用品などのワックスなど）の中で幅広く多量に使用してきた<sup>1)2)</sup>。

1999 年以降の調査で、FOCs の製造従業員や米国で調査した一般市民全員の血清からもこの PFOS が検出されたことで、にわかに注目された<sup>3)4)</sup>。それは、一般市民の血液中から、数十 ppb (μg/L) 以上の高濃度で検出するような有機汚染物質の存在を、研究者たちも初めて体験したからである。その後、世界各地の野生生物調査が行われた<sup>5)6)</sup>。

その結果、多種類の野生生物からも、PFOS やその類縁化合物が検出され、FOCs の汚染が広範囲で発生している状況が明らかになった。今や、FOCs 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。

FOCs の中で、最初に問題にされたのは、ヒトや野生生物から高濃度で検出される PFOS であった。必然的に、汚染の拡散経路、生物やヒトに蓄積される被曝経路が問題にされたが、環境試料の測定には分析法の開発が必要であった。

これまで FOCs 分析は、LC/MS-MS で行われてきた<sup>7-10)</sup>。対象となった試料は、 $\mu\text{g/L}$  (ppb) オーダーのヒト及び野生生物の血液や臓器、工場下水が流入する河川などで、濃度が高いサンプルであった。

汚染経路が問題視されたが、 $\text{ng/L}$  (ppt) という環境試料や尿などを測定するために、更に高感度で測定するための分析法開発を行わなければならなかった。

以上のような背景を踏まえ、小泉研究班の分担研究として、「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」研究を行う上で、FOCs が最適な汚染物質である。その理由として、総ての現代人の血液から FOCs が検出し、しかも試料の所要量が 0.2-1.0mL と少量で分析できるために、一人ひとりの汚染量を簡単に分析できること。飲料水を含めた環境試料の分析法開発を行った結果、飲料水を通しての摂取量や大気への被曝量の調査が行えることが挙げられる。

この 3 年間の分担研究として、これまで測定されていなかったサンプルについて、分析法開発及び実サンプルの分析を行った。分析法開発の対象となったのは、環境水(河川水・上水・

海水)、大気、血液、尿、食事などのサンプルである。その結果、食事については、混入するでんぷん質や脂質の精製が不十分で測定することができなかったが、その他のサンプルについてはルーチン分析法に適用可能な分析法を開発したので、その成果について報告する。

## B. 研究方法

### 1. 試薬及び材料

1) PFOS 及び PFOA 標準 : PFOS は Fluka 社の

Perfluorooctansulfonic 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  $1,000\text{ mg-C}_8\text{F}_{17}\text{SO}_3^-/\text{L}$  及び  $1,000\text{ mg-C}_7\text{F}_{15}\text{CO}_2^-/\text{L}$  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。

2) 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 ( 200 mg ) を捕集用とした。

アルミナを充填した Presep-C Alumina はクリーンアップ用カートリッジとして使用した。これらのカートリッジは、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。

3) 脱イオン水 : 標準系列の調製及びカートリッジや器具類の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。

4) 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

環境水の濃縮及び尿からの抽出及び濃縮は、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。

大気浮遊粉塵からの抽出は、高速溶媒抽出用セル (11 mL) に粉塵を採取したろ紙を充填し、高速溶媒抽出装置 (DIONEX ASE-200) を使用して行った。

## 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. 研究成果

### 1. LC/MS 分析法の検討

FOCs 分析には、従来から LC/MS-MS が使用されてきた。今回、LC/MS-MS に比べて安価で汎用機器の LC/MS での FOCs 分析法について検討した。FOCs の中で対象とした化合物は、野生生物やヒト血清中からの検出率と濃度が高い PFOS 及び PFOA である。

その結果、LC/MS 装置を利用した PFOS 及び PFOA 測定は可能であり、最適な分析条件を決定して表1に示した。

PFOS 及び PFOA とも、LC/MS で  $0.1 \mu\text{g/L}$  以上の濃度での検量線作成が可能であった。S/N 比から算出した LC/MS (10  $\mu\text{L}$  注入時) の検出限界は、PFOS が  $0.4 \text{ pg}$  で PFOA が  $0.5 \text{ pg}$  であり、定量下限値はいずれも  $1 \text{ pg}$  で LC/MS-MS の従来法に比べても高感度分析が可能であった (図1)。

### 2. 環境水の分析法開発

環境水中の FOCs 濃度は、ヒト血清よりも低く  $\text{ng/L}(\text{ppt})$  濃度レベルである。LC/MS の検出限界値から判断しても、濃縮しないで直接に環境水を測定することは不可能である。環境水を濃縮し、特に ppt レベルの測定が可能な分析法を開発するにあたり、以下の3点を考慮して分析法を組み立てた。

- ① 縮倍率が高い濃縮法の導入
- ② 分析操作上のコンタミネーションが小さいこと
- ③ 分析エラーが小さく、再現性が良いこと

そのために、固層カートリッジでの濃縮とコンセントレーターの導入について検討した。その結果、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、コンセントレーター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ら、1,000 倍の濃縮を実現した。図2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  $101.0 \pm 6.5\%$  及び PFOA が  $92.6 \pm 4.4\%$  であり、海水は PFOS が  $99.8 \pm 4.8\%$ 、PFOA が  $91.5 \pm 3.7\%$  と良好であった (表2)。

### 3. 大気浮遊粉塵の分析分析法開発

G大気の捕集は、ハイボリュームエアサ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される。大気粉塵捕集用の石英ろ紙は、600℃で6時間加熱し、ろ紙のブランクを除去してから使用した。ろ紙からの PFOS・PFOA 抽出法は、操作ブランクや人為的実験誤差を最小にするために、高速溶媒抽出装置を用いた。抽出液は、環境水と同様に固層カートリッジで濃縮・精製し、LC/MS で分析を行った。操作フローを、図3 に示した。大気浮遊粉塵試料は、均一で同じ試料を多数捕集することができず、実試料を用いての繰り返し実験を行うことは不可能である。そこで、未使用の捕集用ろ紙に PFOS を添加して、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  $0.1\text{pg}/\text{m}^3$  の低濃度までの測定が可能であった。

#### 4. 血液の分析法開発

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討した<sup>4)</sup>。同一のヒト血清で繰り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、本法は分析精度も高く完成度が高い分析法であると判断された。

今回は、LC/MS 分析を行うことを考慮し、分離カラムが目詰まりして LC/MS 装置がシャットダウンしないように、フィルターろ過の操作を行ったから測定するように改良を行った。

#### 5. 尿の分析法開発

尿中 PFOS 及び PFOA は、ヒト血清と比べて低濃度であり、LC/MS の感度

から判断しても、濃縮と生成の操作が不可欠である。そこで最初、環境水分析で用いた Presep-C Agri のカートリッジでも捕集について検討した。尿の場合、Presep-C Agri カートリッジだけの濃縮・精製では、PFOS は定量可能であるが、PFOA は尿成分の夾雑物の影響を受けて定量できなかった。PFOA のクリーンアップ法について検討した結果、Presep-C Agri の後ろに Presep-C Alumina 固層カートリッジを装着して精製する方法が、夾雑物の除去に有効であった。

同一の尿による 5 回の繰り返し添加実験を行った（表2）。この実験に用いた尿の濃度は、PFOA が 2.96 ppt、PFOS が 7.44ppt であった。各  $50\text{ng}/\text{L}$  濃度の PFOA 及び PFOS を添加した尿試料の平均回収率は、PFOA が 80.1%、PFOS が 79.2% と良好な結果であった。

#### 7. 食事の分析法開発

食事試料は、コンビニエンスストアで購入したトンカツ弁当に、 $200\text{mL}$  の市販ウーロン茶を添加しホモジナイズしたものを用いた。

食事試料には、多量の水分、油分、デンプンを含むために、濃縮と精製の操作が分析法を組み立てる上で重要である。

食事分析法は、凍結乾燥で水分を除去し、高速溶媒抽出装置を用いて抽出し、Presep-C Agri と Presep-C Alumina 固層カートリッジに抽出液を通して濃縮・精製する方法について検討した。

その結果、食事のみ（上段：標準無添加）のクロマトグラムでは、PFOS 及び PFOA のピークは、夾雑物由来の乱れたベースラインに消えてしまい、定量可能な状態ではなかった。標準添加した食事（下段： $1\text{ppb}$  添加）では、

ピークの形状はシャープで定量可能な状態で、PFOS が 67%、PFOA が 63% の回収率であった。PFOS について、6 回の繰り返しのある添加回収実験を行った (表 4)。平均回収率は 80% と良好なもの、回収実験のデータで異常に高い値が出現して再現性に問題がある事が解った。更に、食事中 PFOS 及び PFOA 濃度に比べて高濃度の操作ブランクが生じ、ブランクを完全にコントロールすることが困難であった。そのために今回は、食事分析法を完成させることができなかった。

#### D. 考察

##### 1. LC/MS 分析法の検討

LC/MS による PFOS と PFOA の同時分析法について、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-酢酸アンモニウムでの分析条件について検討した。その結果、汚れの少ない試料の分析は、酢酸アンモニウム溶液を 10 mM 以下の濃度にしても可能であるが、汚れた試料を分析した場合には LC/MS のベースラインが乱れて、分析精度の低下が見られた。そこで本法では、溶離液はアセトニトリル-10mM 酢酸アンモニウムを使用することにした。MS のフラグメント電圧は、PFOS が 200V で PFOA が 100V でそれぞれ最大感度を示した。Vcap 電圧を 4000V とし、negative の SIM mode で測定した。LC/MS でモニターした化合物は、PFOS では  $Q_1$  : 499,  $Q_2$  : 500,  $Q_3$  : 99 を、PFOA は  $Q_1$  : 413,  $Q_2$  : 369 の質量イオンであるが、定量は PFOS が 499 及び PFOA が 413 の質量で行い、確認は PFOS が 500 と 99 で PFOA が 369 の質量でそれぞれ行った。

これまで PFOS のデータは、LC/

MS/MS で測定されてきた。本法で使用した LC/MS は、LC/MS/MS に比べて定性能力が劣るという欠点が指摘されていた。しかし、今回使用した LC/MS は、確認イオンを発生させる分析条件の設定が可能であり、化合物の定性を確認しての定量が可能であった。

LC/MS-MS は、化合物ごとに測定条件を切り替える機能がある装置は、未だ開発されていない。LC/MS-MS では、複数の化合物を同時に測定する場合には、どの化合物も検出する機器の条件を選択することになり、化合物ごとの最高感度で測定できない装置である。このことが、化合物ごとの検出感度を下げていく。これに対して LC/MS は、化合物ごとに最高感度で測定できるような、電圧の切り替え機能がついている。従って、今回検討した LC/MS 法の方が、従来法の LC/MS-MS 法で報告された検出感度と比較し、より高感度な分析が可能であった。

本法は、安価でランニングコストも低く、かつコントロール性に優れた LC/MS での分析法であり、将来のルーチン分析の現場で活用性が高い分析方法である。

##### 2. 環境水の分析法開発

環境水中の PFOS・PFOA 濃度は、ppt オーダーで極端に低濃度である。分析法開発は、操作ブランクを低減させて、如何に 1,000 倍の濃縮操作を再現性良く行うかが課題であった。血液分析で行われている溶媒抽出法は、1,000 倍に濃縮するために、数百 mL の溶媒量が必要である。溶媒由来のブランク値が高く、再現性の良い測定が不可能であった。そこで、固層カートリッジとコンセンレーターを組み合わせで濃縮する方法について検討した。

その結果、Presep-C Agri の固層カ

ートリッジは、広い液性 (pH) 範囲での PFOS・PFOA 捕集に優れていることが確認された。Presep-C Agri に環境水を通して濃縮する場合、アスピレーターによる吸引式捕集法と、コンセントレーターによる加圧式捕集法がある。吸引式捕集法は環境水の状態により一定流量で通過させることは困難で、加圧式捕集法は環境水の状態に関係なく一定流量で通過させることが可能であった。Presep-C Agri は、一定の速度で環境水を通させた場合に、測定値の再現性が向上するという特性が見られた。そこで、本法では加圧式捕集が可能なコンセントレーターとの組み合わせを採用した。

Presep-C Agri の固層カートリッジをコンセントレーターにセットして、環境水を 1,000 倍の濃縮することにより、定量下限値 0.1 ppt を実現した。本法で環境水を測定した場合の定量下限値は、PFOS・PFOA とも 0.1ng/L であり、我国の総ての河川水が測定値として分析された。環境水を 1,000 倍も濃縮して、再現性良く測定できる分析技術は、過去にも報告されていなかった。その理由は、加圧式コンセントレーターが、日本国内だけで流通していたことによる。

本法は、環境水を正確かつ簡便に測定できる分析法として、ルーチン分析法に適している。

### 3. 大気浮遊粉塵の分析法開発

これまでに、大気中から PFOS を直接に検出したという報告は発表されていなかった。PFOS や PFOA は沸点が高く、大気中の PFOS・PFOA は、ハイボリュームエアサプラーにセットした石英ろ紙で捕集することができる。

捕集した石英ろ紙は、従来法のソッ

クスレー抽出を行うと、数百 mL の溶媒が必要になる。実験器具類も大きいものが必要で、溶媒や器具類由来のブランクが高くなり正確な測定値が得られなかった。そこで、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、石英ろ紙からの抽出に高速溶媒抽出装置を用いる方法を検討した。

この分析方法を組み立てるに当たり、高速溶媒抽出装置による石英ろ紙からの抽出操作と、抽出液の濃縮・精製操作が必要になる。抽出液の濃縮・精製操作として、環境水で導入した Presep-C Agri を用いる方法を検討した。

その結果、高速溶媒抽出装置を用いると、2 回の 10% メタノール溶媒で完全に抽出された。約 30mL のメタノール抽出液は、ガラスシリンジに Presep-C Agri をセットして濃縮・精製を行った。この作業は手動操作であるが、抽出液の量が少ないために、測定値のバラツキは見られなかった。

本法を適用して、京都府で採取した粉塵について調査し、総てのサンプルから PFOS 及び PFOA が検出された。この調査は、大気経由によっても人が暴露されていることを示した、最初のデータである。

### 4. 血液の分析法開発

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、溶媒をペ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て改良を行った。

小泉研究班が行った、全国各地の住民の血液分析の結果で、日本人からも数 ppb レベルで検出されることが明らかにされた。本法を用いた場合、この濃度測定に必要な血清の量は、 $0.5\text{--}1.0\ \text{mL}$  の少量である。

## 5. 尿の分析法開発

尿中 FOCs を分析した例は、これまで報告されていない。今回、Presep-C Agri のカートリッジで PFOS 及び PFOA を捕集し、Presep-C Alumina で脂質成分を除去し精製する分析方法の開発を行った。

Presep-C Agri は、環境水や大気浮遊粉塵の分析法でも、その抽出・精製の有効性は立証されていたが、尿成分の脂質まで除去することができなかった。そこで脂質を除去するために、固層カートリッジについて検討したが、Presep-C Alumina が有効であった。この操作は、尿などの狭雑物が多い試料を分析する上で、手軽に利用できる利点がある。更に、分析操作上のブランクやエラーを最小限にできたことが、ppt レベルの尿分析を可能にした。

本法の回収率は、PFOS が  $79.2\%$  で PFOA が  $80.1\%$  と良好で、モニタリング分析に適用可能な分析法であることが確認された。

## 6. 食事の分析法開発

食事を分析した報告はない。食事分析の困難さは、食事が多量の水溶性化合物と脂溶性の組成からなることに起因する。

今回は、操作ブランクを最小限にする方法として、一旦凍結乾燥して食事の水分を除去した。水分除去後の粉末試料を、高速溶媒抽出装置で抽出操作を行った。本法は、各  $1\ \text{ppb}$  濃度の標準を添加した食事試料には、十分に適用可能であることが証明された。しかし、実際の食事中 PFOS・PFOA 濃度は、操作ブランクレベルであり、実際の食事分析にこの分析方法を適用することができなかった。

## E. 結論

分担研究として分析法開発に取り組んだ試料は、環境水、大気浮遊粉塵、血液、尿、食事などである。その中で、食事だけがでんぷん質と脂質を完全に除去する方法見つからず、完成させることができなかった。食事以外の分析法は、環境水が  $0.1\ \text{ng/L}$  以上の濃度、大気浮遊粉塵が  $0.1\ \text{p g/m}^3$  以上、血液が  $0.1\ \mu\text{g/mL}$  以上、尿が  $1\ \text{ng/L}$  以上の濃度で測定できるルーチン分析法を開発した。今回は、分析の初心者でも比較的容易に操作できる、LC/MS での分析法を開発したことに価値がある。開発した分析法を適用し、小泉研究班が取り組んだ課題を通して様々な実サンプルの分析を行った。

その中で、日本における環境水の汚染状況（世界で始めて行われた系統的

な河川調査)、大気浮遊粉塵経由での汚染状況の証明(世界初)、日本人の血液への蓄積濃度と住民の地域差(日本人の汚染レベルを明らかにした初めての調査)、尿中からの排泄濃度レベル(世界初)などが明らかにされた。

研究開始当初は、人や野生生物のデータだけが報告され、誰も PFOS や PFOA の汚染経路や暴露濃度を論じることができなかった。これらの疑問に対して、「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」を通して、日本人の汚染状況、我国の環境水汚染レベル、大気由来の暴露証明、人体からの排泄レベルなどを次々に明らかにしたことの意義は非常に大きい。今では、この PFOS や PFOA 汚染問題に対し、日本の汚染状況から PFOS・PFOA の低減プログラムまで論じられる時代になった。これまでに研究者が考えていた疑問に対し、この研究課題を通して、科学的データで次々と証明したのが最大成果であり、PFOS・PFOA 問題解明で小泉研究班の果たした役割は大きかった。

## 文献

- 1) 斎藤憲光, 佐々木和明, 八重樫香 (2005) : 有機フッ素系化合物による環境染とその分析法, ぶんせき, 6, 299-307
- 2) Moody CA, Martin JW, Kwan WC, Muir DC, Mabury SA (2002) : Monitoring perfluorinated surfactants in biota and surface water samples following an accidental release of fire-fighting foam into Etobicoke Creek., Environ Sci Technol., 36(4), 545-551
- 3) Olsen GW, Burris JM, Mandel JH, Zobel LR (1999) : Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees., J. Occup. Environ. Med., 41(9), 799-806
- 4) Hansen KJ, Clemen LA, Ellefson ME, Johnson HO (2001) : Compound-specific, Quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices., Environ. Sci. Technol., 35(4), 766-770
- 5) Giesy JP, Kannan K (2001) : Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife., Environ. Sci. Tec., 35(7), 1339-1342
- 6) Kannan K, Koistinen J, Beckmen K, Evans T, Gorzelany JF, Hansen KJ, Jones PD, Helle E, Nyman M, Giesy JP (2001) : Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals., Environ, Sci, Technol., 35(8), 1593-1598
- 7) Hansen KJ, Johnson HO, Eldridge JS, Butenhoff JL, Dick LA (2002) : Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River., Environ. Sci. Technol., 36(8), 1681-1685
- 8) Sottani C, Minoia C (2002) : Quantitative determination of perfluorooctanoic acid ammonium salt in human serum by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry., Rapid Commun Mass Spectrom. 16(7), 650-654
- 9) Kuklennyik Z, Reich JA, Tully JS,

Needham LL, Calafat AM (2004) : Automated solid-phase extraction and measurement of perfluorinated organic acids and amid in human serum and milk., Environ. Sci. Technol., 38, 3698-3704

10) Olsen GW, Church TR, Larson EB, Belle G, Lundberg JK, Hansen KJ, Burris JM, Mandel JH, Zobel LR (2004) : Serum concentration of perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in an elderly population from Seattle, Washington, Chemosphere, 54, 1599-1611

F. 健康危機情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Sasaki, K. Harada, N. Saito, T. Tsutsui, S. Nakanishi and K. Koizumi (2003): Impact of Airborne Perfluorooctane Sulfonate on the Human body Burden and the Ecological System., Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 408-413
- 2) K. Harada, N. Saito, K. Sasaki, K. Inoue and K. Koizumi (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.
- 3) N. Saito, K. Sasaki, K. Harada, T. Yoshinaga and K. Koizumi (2003): Perfluorooctane Sulfonate Concentrations in Surface Water in Japan., Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 149-158.

4) K. Harada, N. Saito, K. Inoue, T. Yoshinaga, T. Watanabe, S. Sasaki, S. Kamiyama, A. Koizumi (2004) : The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years., J Occup Health. 46(2), 141-147.

5) 齋藤憲光, 佐々木和明, 八重樫香, (2005) : 有機フッ素系化合物による環境汚染とその分析法, ぶんせき, 2005(6), 299-307

2. 学会発表

- 1) 佐々木和明, 齋藤憲光, 金一和\*, 原田浩二, 小泉昭夫, (2003) : 環境試料中の PFOS の分析. 第 12 回環境化学討論会, 新潟市, 2003 年 6 月 25 日-27 日.
- 2) Yi-he Jin, Kazuaki Sasaki, Norimitsu Saito, Kouji Harada, Akio Koizumi, (2003) : Current Perfluorooctane Sulfonate Pollution in Aquatic Environment of China. The 6th Annual Meeting of Japan Society of Endocrine Disrupters Research, Sendai, 2003 年 12 月 2 日-3 日.
- 3) 金一和, 劉曉, 秦紅梅, 麻懿馨, 范新欧, 張穎花, 齋藤憲光, 佐々木和明, 小泉昭夫\* (2004) : 我国部分地区自来水和不同水体中的 PFOS 污染 (The status of perfluorooctane sulfonate (PFOS) pollution in tap water and different waters in partial areas of China.), China Environmental Science. Beijin, 24(2), 166-169.
- 4) 佐々木和明, 齋藤憲光, 金一和, 小泉昭夫 (2004) : PFOS 及び PFOA による環境汚染の現状について, 第 7

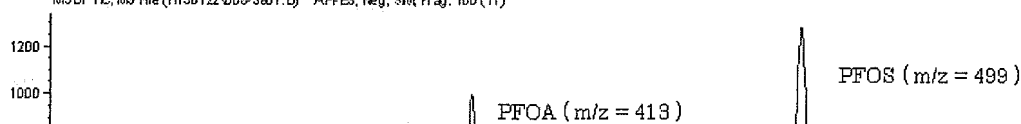


- 回日本水環境学会シンポジウム, 東京, 2004年9月13-14日
- 5) N. Saito, K. Sasaki, K. Harada, A. Koizumi, (2004): Perfluorooctanoate and Perfluorooctane sulfonate Concentrations in Surface Waters in Japan. China-Japan Joint Symposium on Environmental Chemistry, 2004 (日中環境化学連合シンポジウム), 北京市, 2004年10月20-23日.
- 6) K. Sasaki, T. Yoshida, K. Ozawa, N. Saito, Y. Jin, A. Koizumi (2004) : Analytical Method for Perfluorooctanoate (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) in Ambient Air, . China-Japan Joint Symposium on Environmental Chemistry, 2004 (日中環境化学連合シンポジウム), 北京市, 2004年10月20-23日.
- 7) Y. Jin, H. Qin, Y. Fan, Y. Ma, Y. Zhang, G. Dong, N. Saito, (2004): The status of perfluorooctane sulfonate pollution in water environment and human body in China, 2004 (日中環境化学連合シンポジウム), 北京, 2004年10月20-23日.
- 8) 齋藤憲光, 佐々木和明, 八重樫香, 原田浩二\*, 井上佳代子\*, 小泉昭夫\*, (2005): 日本人における血清中 PFOS 及び PFOA 汚染—地理的差異と経年変化, 第14回環境科学討論会, 大阪, 2005年6月15-17日
- 9) N. Saito, K. Sasaki, K. Yaegashi, Y. Jin, K. Harada, A. Koizumi, (2005) : Pollution of perfluorinated organic compounds in Japan, The International Conference on Environmental and Genetical Damage, and the 12th Congress of the Chinese Environmental Mutagen Society, Chungking (China), 2005年11月3-7日
- H. 知的財産の出願・登録  
状況  
なし

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-(linear 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.



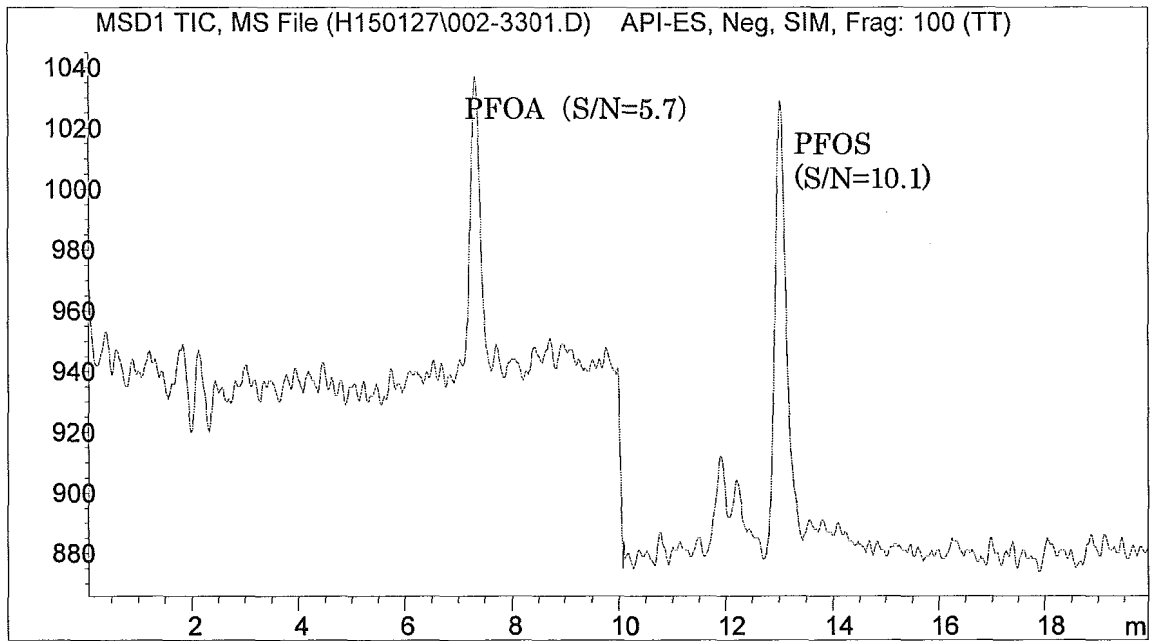


図1 LC/MS クロマトグラム及びS/N比  
 (0.1ng/LのPFOS及びPFOA標準液をLC/MSに10μL注入)

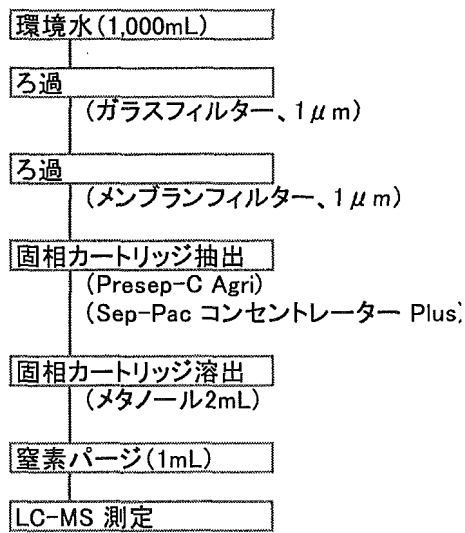


図2 環境水の分析操作フロー

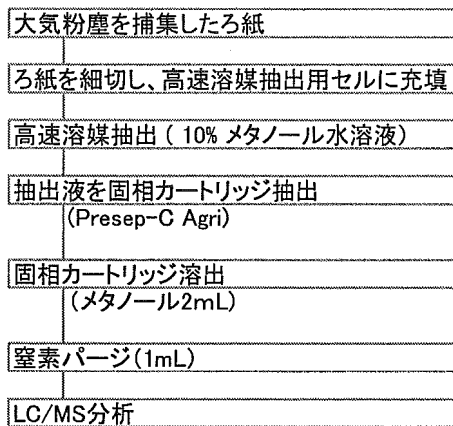


図3 大気浮遊粉塵の分析操作フロー

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)  $L$  (添加回収量) - (濃度平均値)  $\times 100$  / (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)  $L$  (添加回収量) - (濃度平均値)  $\times 100$  / (添加濃度)

表3. 大気浮遊粉塵捕集紙の添加回収実験

	PFOA <sup>a)</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 GR-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、次式で回収率を計算した。

$$\text{Recovery (\%)} = \text{Found} * 100 / 10$$

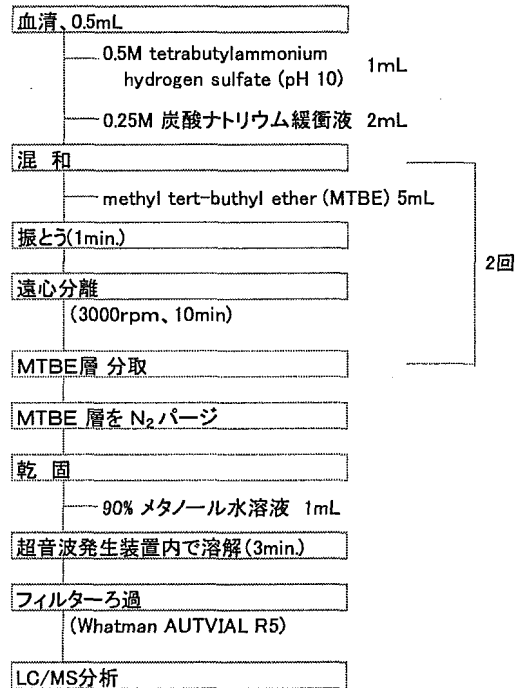


図4 血清の分析操作フロー

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