

平成17～19年度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

OCDD	-0.028	0.866	-0.031	0.847
2,3,7,8-TCDF	0.083	0.553	0.025	0.855
1,2,3,7,8-PeCDF	0.07	0.637	0.042	0.77
2,3,4,7,8-PeCDF	-0.268	0.112	-0.312	0.071
1,2,3,4,7,8-HxCDF	-0.217	0.177	-0.177	0.279
1,2,3,6,7,8-HxCDF	-0.322	0.034	-0.275	0.066
2,3,4,6,7,8-HxCDF	-0.21	0.1	-0.153	0.238
1,2,3,7,8,9-HxCDF	-0.237	0.071	0.116	0.574
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-0.123	0.403	0.188	0.167
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-0.275	0.06	0.246	0.107
OCDF	-0.226	0.119	0.229	0.122
344'5-TCB(#81)				
33'4'4'-TCB(#77)	0.187	0.13	0.192	0.135
33'44'5-PenCB(#126)	-0.222	0.15	-0.254	0.107
33'44'55'-HxCB(169)	-0.278	0.099	-0.323	0.052
2'344'5-PenCB(#123)	-0.142	0.278	-0.174	0.236
23'44'5-PenCB(#118)	-0.195	0.17	-0.12	0.446
2344'5-PenCB(#114)	-0.141	0.369	-0.155	0.34
233'44'-PenCB(#105)	-0.21	0.127	-0.153	0.321
23'44'55'-HexCB(#167)	-0.181	0.224	-0.151	0.347
233'44'5-HexCB(#156)	-0.182	0.267	-0.22	0.212
233'44'5'-HexCB(#157)	-0.202	0.2	-0.272	0.11
22'344'55'-HpCB(#180)	0.12	0.57	0.02	0.91
22'33'44'5-HpCB(#170)	0.19	0.38	0.11	0.61
233'44'55'-HpCB(#189)	-0.221	0.12	-0.188	0.2
Total PCDD	-0.046	0.781	-0.121	0.443
Total PCDF	-0.029	0.048	-0.247	0.088
Total PCDD/PCDF	-0.146	0.354	-0.19	0.212
Total Non-ortho PCBs	-0.14	0.372	-0.19	0.206
Total Mono-ortho PCBs	-0.195	0.183	-0.153	0.342
Total Coplanar PCB	0.186	0.153	-0.308	0.038
Total	0.129	0.325	-0.312	0.036
◆【WHO-98】◆				
T PCDDs-TEQ	-0.359	0.044	-0.353	0.036

T PCDFs-TEQ	-0.347	0.032	-0.285	0.056
T PCDDs/PCDFs-TEQ	-0.41	0.019	-0.357	0.026
T Non-ortho PCBs-TEQ	-0.227	0.144	-0.287	0.054
T Mono-ortho PCBs-TEQ	-0.19	0.219	-0.191	0.256
T Coplanar PCBs-TEQ	-0.205	0.165	-0.278	0.065
Total TEQ	-0.329	0.043	-0.344	0.027

母親の年齢、身長、妊娠前の体重、学歴、出産回数、アレルギーの既往、喫煙習慣、受動喫煙の有無、出産週数、父親の年齢、学歴、アレルギーの既往、喫煙習慣、子の性別、体重、身長、胸囲、頭囲、Apgar score(1分後採点)、世帯の年収で調整



## マイクロアレイを用いた遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB濃度との関連

分担研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野  
分担研究者 藤田 正一 北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学講座毒性学分野  
分担研究者 飯田 隆雄 福岡県保健環境研究所  
分担研究者 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所

### 研究の要旨

Cytochrome P450 (P450、CYP)、GSTP1、NAT2、PPAR $\gamma$ 、AhRなどは外来異物代謝に大きく関わっていることから、体内の環境化学物質には、体内の様々な外来異物代謝系分子の影響が考えられる。また、これまでに外来異物代謝系の様々な分子において、遺伝子多型がその活性に影響を及ぼすことが数多く知られていることから、これらの遺伝子型を迅速、簡便かつ安価に判定する方法を開発することは、非常に有益であると考え、我々は、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調整因子として、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR $\gamma$ の10遺伝子、28アレルをスポットした試験版ガラスアレイとMultiplex-PCR法を用いたマイクロアレイ法を開発した。本研究では、このマイクロアレイ法の妥当性を検討するとともに、判定した遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB類濃度との関連を調べた。その結果、マイクロアレイ法においてCYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K遺伝子多型について妥当性を得ることができた。また、喫煙群では、各血中PCB類濃度が非喫煙群と比較して有意に低い値を示した。CYP1B1 L432V、GSTP1 I105Vと血中ダイオキシンTEQ値との間で、有意ではなかったが相関傾向がみられた。

### 【共同研究者】

岸 玲子、坂 晋、佐田文宏、西條泰明、  
近藤朋子、加藤静恵、佐々木成子、中島そのみ、  
小西香苗、鷲野考揚

北海道大学大学院医学研究科予防医学講座  
公衆衛生学分野

石塚真由美

北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医科学  
講座毒性学分野

中川礼子、松枝隆彦、梶原淳睦、平川博仙、堀  
就英、飛石和夫、芦塚由紀、戸高 尊

福岡県保健環境研究所

### A. 研究目的

Cytochrome P450 (P450、CYP)は、微生物から高等生物、哺乳動物に至るまで、多くの生物に存在している。ヒトをはじめとした動物では主に肝に存在するが、赤血球や精子など一部を除くほぼすべての臓器にも少量ながら存在することが知られている。CYPは、種々の生理活性物質の生合成や代謝の他に、多くの外来性異物代謝なども行っている。CYPには様々な分子種が存在し、巨大なスーパーファミリーを形成している。また、GSTP1やNAT2などは代謝の第2相反応を担い解毒に関わる。さらに、PPAR $\gamma$ 、AhRなどは、外来異物代謝系CYPの分子種の調整因子であり、ダイオキシンやPCB類、フタル酸エステルなどのリガンド受容体で



もあることが知られている。しかし、これらの外来性異物代謝に関わる分子の遺伝子多型とダイオキシンや PCB 類などの環境化学物質の感受性についての報告は少ない。

体内の環境化学物質には、体内の様々な外来異物代謝系分子の影響が考えられること、また、これまでに外来異物代謝系の様々な分子において、遺伝子多型がその活性に影響を及ぼすことが数多く知られていることから、これらの遺伝子型を迅速、簡便かつ安価に判定する方法を開発することは、非常に有益であると考え、我々は、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調整因子として、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR $\gamma$  の 10 遺伝子、28 アレルをスポットした試験版ガラスアレイと Multiplex-PCR 法を用いたマイクロアレイ法を開発した。また、これらの代謝系分子は喫煙との相互作用も十分考えられる。そこで、今回マイクロアレイ法の妥当性を検討するとともに、マイクロアレイ法で判定した遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB 濃度との関連について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

対象者は札幌市内の産科において、インフォームドコンセントを得られた妊娠 23 週-35 週の妊婦である。リクルート時に自記式調査票にて、喫煙の有無を調べた。また、遺伝子多型判定ならびに血中ダイオキシン、PCB 類濃度を測定するために、血液を採取した。

### 2. マイクロアレイ法による遺伝子多型判定の妥当性評価

我々は、これまで P450 として CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調整因子として、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR $\gamma$  の 10 遺伝子、28 アレルをスポットした試験版ガラスア

レイと Multiplex-PCR 法を用いたマイクロアレイ法を開発した。このマイクロアレイ法の妥当性を、約 200 サンプルについて、遺伝子多型の判別としては信頼性の高い TaqMan 法ならびに Allelic discrimination 法を用いた結果から  $\kappa$  統計量を計算し一致率の検定を行うことにより、検討した。

### 3. 各遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB 類との関連

上記の評価で、妥当と判断した遺伝子ならびに喫煙の有無について、遺伝子多型と血中ダイオキシン、PCB との関連を二元配置分散分析により検討した。喫煙については、喫煙経験がない対象を非喫煙群、妊娠判明時に喫煙していた対象を喫煙群とした。また、喫煙経験はあるが、妊娠判明前にすでに喫煙をやめていた対象は除外した。血中ダイオキシン、PCB 類濃度はそれぞれ対数変換したものを解析に使用した。二元配置分散分析には、SPSS12.0J を使用した。

（倫理面への配慮）

北海道大学医学研究科医の倫理委員会および研究協力施設の研究倫理委員会に諮り、承認を得たうえで実施した。

## C. 研究結果

### 1. マイクロアレイ法による遺伝子多型判定の妥当性評価

試験版ガラスアレイにスポットした 10 遺伝子、28 アレルのうち、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K については、安定した発色を得ることができたため、信頼性の高い TaqMan 法ならびに Allelic discrimination 法での結果を比較した。その結果、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K について、（一致率、 $\kappa$  係数）はそれぞれ（0.97、0.94）、（0.95、0.86）、（0.86、0.66）、（0.93、0.89）であった。CYP2A6



I471T、NAT2 R197Q、NAT2 G286E、CYP2C19 681G>Aについては、安定した発色を得ることができなかった。

## 2. 各遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB類との関連

上記の評価で、妥当と判断した遺伝子ならびに喫煙の有無について、遺伝子多型と血中ダイオキシン、PCBとの関連を解析した結果、各血中ダイオキシン類TEQ値（Total PCDDs-TEQ値、Total PCDFs-TEQ値、Total PCDDs/PCDFs-TEQ値）は、喫煙群では、非喫煙群と比較して低い傾向がみられたが、有意な相関ではなかった。また、各血中PCB類TEQ値（Total Nonortho PCBs-TEQ値、Total Monoortho PCBs-TEQ値、Total Coplanar PCBs-TEQ値）ならびにTotal-TEQ値は、喫煙群では非喫煙群と比較して、有意に低い値であった。

また、CYP1A1 I462V遺伝子多型と、各血中ダイオキシン、PCB類濃度との間には、関連はみられなかった（表1）。

次に、CYP1B1 L432V遺伝子多型と各血中ダイオキシン、PCB類濃度との相関を調べた結果、Total PCDDs-TEQ値、Total PCDDs/PCDFs-TEQ値、Total-TEQ値は、有意ではなかったが、（L/V + V/V）型では、L/L型と比較して低い傾向がみられた。また、Total PCDFs-TEQ値は、（L/V + V/V）型では、L/L型と比較して有意に低い値であった（L/L: 1.39 ± 0.40, L/V + V/V: 1.24 ± 0.39,  $P = 0.03$ ）。CYP1B1 L432V遺伝子多型と各血中PCB類濃度との間には、関連はみられなかった（表2）。

GSTP1 I105V遺伝子多型と各血中ダイオキシン、PCB類濃度との相関を調べた結果、Total PCDDs-TEQ値、Total PCDFs-TEQ値、Total-TEQ値は、有意ではなかったが、（I/V + V/V）型では、I/I型と比較して低い傾向がみられた。また、Total PCDDs/PCDFs-TEQ値は、（I/V + V/V）型では、I/I型と比較して有意に

低い値であった（I/I: 2.43 ± 0.38, I/V + V/V: 2.28 ± 0.46,  $P = 0.04$ ）。GSTP1 I105V遺伝子多型と各血中PCB類濃度との間には、関連はみられなかった（表3）。

また、AhR R554K遺伝子多型と、各血中ダイオキシン、PCB類濃度との間には、関連はみられなかった（表4）。

いずれの遺伝子多型においても血中ダイオキシン、PCBに対して、多型と喫煙との間に交互作用はみられなかった（表1-4）。

## D. 考察

今回、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554Kについては、マイクロアレイ法で安定した結果を得ることができた。これら4遺伝子8アレルほどの検出力であれば、遺伝子型を網羅的に判定するための初期スクリーニングとして、十分活用できると考えられる。しかし、CYP2A6 I471T、NAT2 R197Q、NAT2 G286E、CYP2C19 681G>Aについては、発色を得ることができなかった。また、その他の遺伝子については、妥当性は検討していないものの、妥当性を得られた4遺伝子8アレルと比較すると、発色の安定という点では劣っており、今後、発色を安定させることが重要である。今回のmultiplex PCR法を利用したマイクロアレイ法は、従来のPCR-RFLP法と比較して、簡便に多くの遺伝子アレルの検出を行うことができるが、PCRの正確性、ハイブリダイゼーションの条件など、多くの遺伝子アレルについて安定した結果を得ることは難しいと考えられる。また、薬物代謝関連遺伝子の遺伝子多型は日本人でこれまでに約4000個報告されていることから、今後、精度を高めることが必要である。現在マイクロアレイ法による遺伝子多型の解析として、Invader法やArrayed primer extension (APEX)法が主流となっている。これらの方法は最終的に蛍光シグナルを検出することによって多型を判別す



ることから、特殊な機器を必要としなくてはならない。しかし、APEX法の原理である on chip で DNA サンプルの extension を検出する原理などを利用した方法に、最終的に本研究で用いた HRP 発色法を組み合わせることができれば、特殊な機器を必要とすることなく、より精度の高いマイクロアレイ法による遺伝子多型の判定を行うことができる可能性がある。

マイクロアレイ法で妥当性を得られた、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K 遺伝子多型と喫煙について、各ダイオキシン TEQ 値、PCB 類 TEQ 値との関連について検討した。喫煙と血中 PCB 類については、関連がみられないという報告もある (1) が、本研究では、喫煙と各血中 PCB 類濃度との間に有意な関連（喫煙群<非喫煙群）がみられた。また、各血中ダイオキシン類濃度との間にも、有意ではなかったが、喫煙群では非喫煙群と比較して低い傾向がみられた。このことから、喫煙により、血中ダイオキシン、PCB 類濃度は減少することが示唆された。近年、喫煙群の母親より生まれた新生児の血中 PCB 類濃度は、受動喫煙群、非喫煙環境群の母親より生まれる新生児と比較して、有意に高いことが報告されていること (2) から、本研究の結果も踏まえて、妊婦においては、喫煙によって、体内に蓄積する PCB 類が胎児へ移行し、蓄積していることも考えられる。

CYP1B1 L432V 遺伝子多型と GSTP1 I105V 遺伝子多型では、血中 PCB 類濃度との間に関連はみられなかったが、血中ダイオキシン類濃度との間に、それぞれ関連傾向がみられた。また、CYP1A1 I462V ならびに AhR R554K と各ダイオキシン、PCB 類濃度との間に関連はみられなかった。これまで、多環芳香族炭化水素 (PAHs) やダイオキシン類は、AhR の活性化によって、CYP1A1 ならびに CYP1B1 の活性化を誘導するとの報告がされている (3、4)。そのことから、ダイオキシン類と AhR R554K、

CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V 遺伝子多型との関連が考えられたが、AhR R554K、CYP1A1 I462V と血中ダイオキシン類濃度との間に関連はみられなかったことから、AhR R554K、CYP1A1 I462V 遺伝子多型は、血中ダイオキシン類濃度に影響を与えていないと考えられる。CYP1B1 L432V 遺伝子多型については、ダイオキシン類曝露量との間に、関連がみられたことが、最近報告されている (5)。しかし、その一方でダイオキシン類曝露量との間に関連がみられない報告もある (6)。本研究では、前者と同様の結果が、血中ダイオキシン濃度との間にみられたが有意な結果ではなかった。今後、サンプル数を増やすなどして、この関連について解析を進めていく必要がある。しかし、各遺伝子多型は複合的に血中 PCB 類と関連していることも考えられることから、今後、他の遺伝子多型も含めた解析を行い、さらに各遺伝子の組み合わせによる分類と血中ダイオキシン、PCB 類との関連を明らかにしていくことが重要だと考えられる。

## E. 結論

マイクロアレイ法について、CYP1A1 I462V、CYP1B1 L432V、GSTP1 I105V、AhR R554K 遺伝子多型について妥当性を得ることができた。また、喫煙群では、血中 PCB 類濃度が非喫煙群と比較して有意に低いことが示唆された。

## F. 参考文献

- 1) Apostoli P, Magoni M, Bergonzi R, Carasi S, Indelicato A, Scarcella C, Donato F (2005) Assessment of reference values for polychlorinated biphenyl concentration in human blood. *Chemosphere* 61: 413-421.
- 2) Lackmann GM, Angerer J, Tollner U (2000) Parental smoking and neonatal serum levels of polychlorinated biphenyls

- and hexachlorobenzene. *Pediatr. Res.* 47: 598-601.
- 3) Kress S, Geeenlee WF (1997) Cell-specific regulation of human CYP1A1 and CYP1B1 genes. *Cancer Res.* 57: 1264-1269.
  - 4) Whitlock Jr. JP (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev.Pharmacol. Toxicol.* 39: 103-125.
  - 5) Hu SW, Chen CC, Kuo CY, Lin P (2006) Increased cytochrome P4501B1 gene expression in peripheral leukocytes of municipal waste incinerator workers. *Toxicol. Lett.* 160: 112-120.
  - 6) Baccarelli A, Pesatori AC, Masten SA, Patterson Jr. DG, Needham LL, Mocarelli P, Caporaso NE, Consonni D, Grassman JA, Bertazzi PA, Landi MT (2004) Aryl-hydrocarbon receptor-dependent pathway and toxic effects of TCDD in humans: a population-based study in Seveso, Italy. *Toxicol. Lett.* 149: 287-293.

## G. 研究発表

### 学会発表

- 1) 坂 晋、近藤朋子、佐々木成子、加藤静恵、中島そのみ、前田信彦、飯田隆雄、西條泰明、佐田文宏、岸 玲子、「胎児期の化学物質暴露による次世代影響に関する前向きコホート研究－血液中ダイオキシン濃度とマイクロアレイを用いた遺伝子多型の関連」第76回日本衛生学会総会、山口県宇部市、2006年3月



表1 CYP1A1 I462V 遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB類との関連

	CYP1A1			Smoking			CYP1A1と Smokingの 交互作用
	I/I	I/V or V/V	P	Never	Smoking	P	
Total PCDDs -TEQ (pg/g lipid)	1.96±0.40	1.95±0.47	0.92	2.01±0.42	1.88±0.44	0.08	0.55
Total PCDFs -TEQ (pg/g lipid)	1.35±0.40	1.32±0.41	0.77	1.39±0.38	1.27±0.43	0.07	0.77
Total PCDDs/PCDFs -TEQ (pg/g lipid)	2.40±0.38	2.38±0.44	0.91	2.45±0.39	2.32±0.42	0.08	0.67
Total Nonortho PCBs -TEQ (pg/g lipid)	1.29±0.58	1.34±0.58	0.38	1.46±0.53	1.09±0.57	0.00*	0.30
Total Monoortho PCBs -TEQ (pg/g lipid)	0.74±0.49	0.79±0.51	0.51	0.84±0.50	0.65±0.46	0.01*	0.66
Total Coplarnar PCBs -TEQ (pg/g lipid)	1.77±0.50	1.81±0.52	0.45	1.91±0.49	1.61±0.47	0.00*	0.63
Total-TEQ (pg/g lipid)	2.84±0.39	2.84±0.44	0.79	2.92±0.40	2.73±0.41	0.01*	0.65

The results are expressed as Mean ± SD.

表2 CYP1B1 L432V 遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB類との関連

	CYP1B1			Smoking			CYP1B1と Smokingの 交互作用
	L/L	L/V or V/V	P	Never	Smoking	P	
Total PCDDs -TEQ (pg/g lipid)	2.00±0.41	1.87±0.46	0.11	2.01±0.41	1.89±0.45	0.17	0.56
Total PCDFs -TEQ (pg/g lipid)	1.39±0.40	1.24±0.39	0.03*	1.40±0.37	1.28±0.43	0.10	0.90
Total PCDDs/PCDFs -TEQ (pg/g lipid)	2.44±0.39	2.30±0.42	0.06	2.45±0.39	2.33±0.42	0.14	0.69
Total Nonortho PCBs -TEQ (pg/g lipid)	1.35±0.58	1.25±0.56	0.23	1.47±0.53	1.10±0.58	0.00*	0.72
Total Monoortho PCBs -TEQ (pg/g lipid)	0.79±0.49	0.70±0.49	0.27	0.84±0.50	0.65±0.46	0.02*	0.93
Total Coplarnar PCBs -TEQ (pg/g lipid)	1.82±0.49	1.72±0.51	0.16	1.91±0.49	1.62±0.47	0.00*	0.71
Total-TEQ (pg/g lipid)	2.88±0.40	2.76±0.43	0.07	2.93±0.49	2.74±0.41	0.01*	0.98

The results are expressed as Mean ± SD.



表3 GSTP1 I105V 遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB類との関連

	GSTP1			Smoking			GSTP1 と Smoking の 交互作用
	I/I	I/V or V/V	<i>P</i>	Never	Smoking	<i>P</i>	
Total PCDDs -TEQ (pg/g lipid)	1.99±0.41	1.55±0.50	0.06	2.00±0.42	1.89±0.44	0.13	0.74
Total PCDFs -TEQ (pg/g lipid)	1.38±0.40	1.23±0.42	0.05	1.39±0.38	1.27±0.43	0.16	0.97
Total PCDDs/PCDFs -TEQ (pg/g lipid)	2.43±0.38	2.28±0.46	0.04*	2.44±0.40	2.32±0.42	0.14	0.77
Total Nonortho PCBs -TEQ (pg/g lipid)	1.32±0.55	1.23±0.66	0.48	1.45±0.53	1.10±0.58	0.00*	0.86
Total Monoortho PCBs -TEQ (pg/g lipid)	0.77±0.49	0.70±0.51	0.50	0.82±0.50	0.65±0.46	0.04*	0.78
Total Coplarnar PCBs -TEQ (pg/g lipid)	1.80±0.48	1.72±0.56	0.48	1.90±0.49	1.62±0.47	0.00*	0.89
Total-TEQ (pg/g lipid)	2.87±0.39	2.75±0.47	0.11	2.91±0.40	2.74±0.41	0.02*	0.77

The results are expressed as Mean ± SD.

表4 AhR R554K 遺伝子多型、喫煙と血中ダイオキシン、PCB類との関連

	CYP1A1			Smoking			CYP1A1 と Smoking の 交互作用
	R/R	R/K or K/K	<i>P</i>	Never	Smoking	<i>P</i>	
Total PCDDs -TEQ (pg/g lipid)	1.99±0.42	1.95±0.44	0.60	2.01±0.41	1.89±0.44	0.19	0.46
Total PCDFs -TEQ (pg/g lipid)	1.39±0.40	1.32±0.41	0.40	1.39±0.38	1.28±0.43	0.18	0.61
Total PCDDs/PCDFs -TEQ (pg/g lipid)	2.43±0.40	2.38±0.41	0.56	2.45±0.39	2.33±0.42	0.19	0.54
Total Nonortho PCBs -TEQ (pg/g lipid)	1.35±0.53	1.29±0.61	0.98	1.47±0.53	1.10±0.58	0.00*	0.64
Total Monoortho PCBs -TEQ (pg/g lipid)	0.71±0.48	0.79±0.50	0.11	0.84±0.50	0.65±0.46	0.01*	0.36
Total Coplarnar PCBs -TEQ (pg/g lipid)	1.79±0.48	1.79±0.52	0.51	1.91±0.49	1.62±0.47	0.00*	0.96
Total-TEQ (pg/g lipid)	2.86±0.41	2.84±0.42	0.97	2.92±0.40	2.74±0.41	0.02*	0.63

The results are expressed as Mean ± SD.

## 妊婦の喫煙状態と血中ダイオキシン類との関連について

分担研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授

分担研究者 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所専門研究員

### 研究要旨

これまで、妊婦の喫煙により母乳中ダイオキシン類が低下するとの報告がされている。また近年、喫煙群の母より出生した新生児の血中 PCB 濃度が受動喫煙群、非喫煙群の母親より出生した新生児と比較して、有意に高いことが報告されていることから、妊婦の喫煙によるダイオキシン類の胎児への蓄積が懸念されている。そこで、本研究は、血中コチニンをバイオマーカーとして、その妥当性を検証するとともに、妊婦の喫煙と血中ダイオキシン類との関連について明らかにすることを目的とした。その結果、喫煙者では非喫煙者と比較して、血中 Total non-ortho PCBs、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar-ortho PCBs TEQ が、それぞれ有意に低いことが明らかになった（それぞれ  $\beta$  (SD),  $P$  値 = -12.466 (5.712),  $P=0.030$ ; -0.952 (0.362),  $P=0.009$ ; -1.171 (0.517),  $P=0.024$ ）。その結果、高受動喫煙群では、低受動喫煙群と比較して、Total non-ortho PCBs、Total PCDFs TEQ、Total PCDDs /PCDFs TEQ、Total TEQ が有意に低いこと（それぞれ  $\beta$  (SD) = -9.826 (4.691),  $P=0.049$ ;  $\beta$  (SD) = -0.460 (0.205),  $P=0.026$ ;  $\beta$  (SD) = -1.173 (0.560),  $P=0.037$ ;  $\beta$  (SD) = -1.794 (0.909),  $P=0.050$ ) が明らかになった。このことから、今後は妊婦の喫煙習慣だけでなく、周囲の環境も考慮する必要があることが示唆された。

### 【研究協力者】

吉村 健清、中川 礼子、平川 博仙、  
堀 就英、芦塚 由紀、村田 さつき、  
松枝 隆彦、飛石 和大、安武 大輔

福岡県保健環境研究所

坂 晋、湯浅資之、吉岡英治、小西香苗、  
鷺野考揚

北海道大学大学院医学研究科予防医学講  
座公衆衛生学分野

れていることから、妊婦の喫煙によるダイオキシン類の胎児への蓄積が懸念されている(5)。そこで本研究は、血中コチニンをバイオマーカーとして、その妥当性を検証するとともに、妊婦の喫煙と血中ダイオキシン類濃度との関連について明らかにすることを目的として実施した。

### B. 研究方法

#### 1. 対象ならびに方法

対象者は 2002-2004 年に札幌市内の産科において、インフォームドコンセントを得られた妊娠 23 週-35 週の妊婦である。出産前における血中ダイオキシン類の測定を実施した 254 名のうち、血中ダイオキシン類濃度の異常値を示したもの(1名)、血清コチニン値不明者 12 名を除外した 242 名を解析対象者とした。リクルート時に自記式調査票にて、対象者の基本属性を

### A. 研究目的

妊婦の喫煙が妊婦ならびに胎児へ悪影響を及ぼすことが知られている(1)。これまで、妊婦の喫煙により母乳中ダイオキシン類が低下するとの報告がされている(2-4)。また近年、喫煙群の母より出生した新生児の血中 PCB 濃度が受動喫煙群、非喫煙群の母親より出生した新生児と比較して、有意に高いことが報告さ



得るとともに、妊娠中期における喫煙状況（非喫煙、妊娠判明時に禁煙、喫煙）の情報を得た。また、出産前に採血した血液を用いて、血中ダイオキシン類を測定した。また、血清コチニン値を Cozart EIA cotinine Kit (Cozart)を用いた ELISA 法により 2 回測定を行い、平均値を解析に用いた。

## C. 研究結果

### 1. 血清コチニン値による喫煙状態の妥当性

本研究対象者における血清コチニンの分布は図 1 のようになった。非喫煙者と喫煙者のカットオフ値を 15 ng/mL と定義し、質問調査票に基づく喫煙状態（妊娠時に非喫煙、妊娠判明時に禁煙、喫煙）と比較した（表 1）。その結果、質問調査票に基づく非喫煙者 147 名のうち、144 名（98.0%）が血清コチニン 15 ng/mL 以下であった。また、質問調査票に基づく喫煙者 35 名のうち、32 名（85.7%）が血清コチニン 15 ng/mL 以上であった。さらに、妊娠判明時に禁煙した対象者 60 名のうち、53 名（88.3%）が血清コチニン 15 ng/mL 以下であった。この結果から、本研究の対象者において、血清コチニン値 15 ng/mL による喫煙の分類は妥当であると考え、本研究ではこの血清コチニン・カットオフ値を用いた分類による喫煙状態（非喫煙者 200 名、喫煙者 42 名）を使用した。

### 2. 喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響

本研究対象者の基本属性を表 2 に示した。喫煙者では、非喫煙者と比較して、高い血清コチニン値、低学歴、低所得、高いカフェイン摂取であった。

重回帰分析により、喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響を調べた（表 3）。その結果、喫煙者では非喫煙者と比較して、血中 Total non-ortho PCBs、Total non-ortho PCBs TEQ、Total coplanar-ortho PCBs TEQ が、それぞれ

有意に低いことが明らかになった（それぞれ  $\beta$  (SD),  $P$  値 = -12.466 (5.712),  $P = 0.030$ ; -0.952 (0.362),  $P = 0.009$ ; -1.171 (0.517),  $P = 0.024$ )。

### 3. 環境的喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響

次に、非喫煙者を 2 分位（低受動喫煙群 100 名、高受動喫煙群 100 名）し、喫煙者 42 名を加えた 3 群を用いて、受動喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響を調べた（表 4）。その結果、高受動喫煙群では、低受動環境的喫煙群と比較して、Total non-ortho PCBs、Total PCDFs TEQ、Total PCDDs /PCDFs TEQ、Total TEQ が有意に低いこと（それぞれ  $\beta$  (SD) = -9.826 (4.691),  $P = 0.049$ ;  $\beta$  (SD) = -0.460 (0.205),  $P = 0.026$ ;  $\beta$  (SD) = -1.173 (0.560),  $P = 0.037$ ;  $\beta$  (SD) = -1.794 (0.909),  $P = 0.050$ ) が明らかになるとともに、Total PCDDs TEQ、Total non-ortho PCBs TEQ が低い傾向（それぞれ  $P = 0.059, 0.088$ ）を示した。その一方で、喫煙者では、低受動喫煙群と比較して、Total non-ortho PCBs、Total PCDDs /PCDFs TEQ、Total non-ortho PCBs TEQ、Total non-ortho PCBs TEQ、Total TEQ（それぞれ  $\beta$  (SD) = -17.319 (6.183),  $P = 0.006$ ;  $\beta$  (SD) = -1.472 (0.738),  $P = 0.047$ ;  $\beta$  (SD) = -1.219 (0.392),  $P = 0.002$ ;  $\beta$  (SD) = -1.496 (0.562),  $P = 0.008$ ;  $\beta$  (SD) = -2.968 (1.199),  $P = 0.014$ ) が有意に低いことが明らかになるとともに、Total mono-ortho PCBs、Total coplanar-ortho PCBs、Total PCDDs TEQ、Total PCDFs TEQ が低い傾向（それぞれ  $P = 0.066, 0.065, 0.057, 0.054$ ）が示された。

## D. 考察

本研究の結果から、喫煙状況により母体血中の PCB・ダイオキシン類 TEQ 値が低下する結果が得られたが、Choi AL らの報告における対象集団においても、非喫煙群と比較して喫煙群

において、Total PCB 値が有意に低いことが示されている（6）。これらの結果のメカニズムは不明であるが、喫煙による PCB・ダイオキシン類代謝系の亢進、血中タンパク質の影響などが考えられる。また、喫煙により血中 PCB・ダイオキシン類濃度が低下することによる健康影響についても明らかではないが、近年、喫煙群の母親より出生した新生児の血中 PCB 濃度は、受動喫煙群、非喫煙群の母親より出生した新生児と比較して、有意に高いことが報告されていることから、妊婦の喫煙による PCB・ダイオキシン類の胎児への蓄積性が懸念される（7）。本研究において、能動的喫煙のみでなく、受動

喫煙曝露による血中ダイオキシン類濃度の低下が明らかになった。血中ダイオキシン類の児への移行の危険性が考えられることから、今後は妊婦自身の喫煙習慣だけでなく、受動喫煙による妊婦への影響も考慮する必要がある。

## E. 結論

本研究において、能動的喫煙のみでなく、受動喫煙曝露による血中ダイオキシン類濃度の低下が明らかになった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

## 2. 学会発表

- (1) Ban S., Kondo T., Sasaki S., Konishi K., Washino N., Kajiwara J., Todaka T., Hirakawa H., Ishizuka M., Fujita S. and Kishi R. "Correlations among serum PCB/Dioxin levels, smoking status, and gene polymorphisms in mothers from Hokkaido, Japan." (27<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, 2007, Sep., Tokyo, Japan).

## 【参考文献】

- (1) Cnattingius S (2004) The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob. Res.* 6: S125-S140.
- (2) Uehara R, Nakamura Y., Matsuura N., Kondo N and Tada H. (2007) Dioxins in human milk and smoking of mothers. *Chemosphere* 68: 915-920.
- (3) Hedley AJ, Wong TW, Hui LL, Malisch R and Nelson EAS (2006) Breast milk dioxins in Hong Kong and Pearl River Delta. *Environ. Health Perspect.* 114: 202-208.
- (4) Takekuma M, Saito K, Ogawa M, Matsumoto R and Kobayashi S (2004) Levels of PCDDs, PCDFs, and Co-PCBs in human milk in Saitama, Japan, and epidemiological research. *Chemosphere* 54: 127-135.
- (5) Lackmann GM, Angerer J and Tollner U (2000) Parental smoking and neonatal serum levels of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene. *Pediatr. Res.* 47: 598-601.



- (6) Choi AL, Levy JI, Dockery DW, Ryan LM, Tolbert PE, Altshul LM and Korrick SA (2006) Does living near a Superfund site contribute to higher polychlorinated biphenyl (PCB) exposure? *Environ. Health Perspect.* 114: 1092-1098.
- (7) lackmann GM, Angerer J and Tollner U (2000) Parental smoking and neonatal serum levels of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene. *Pediatr. Res.* 47: 598-601.

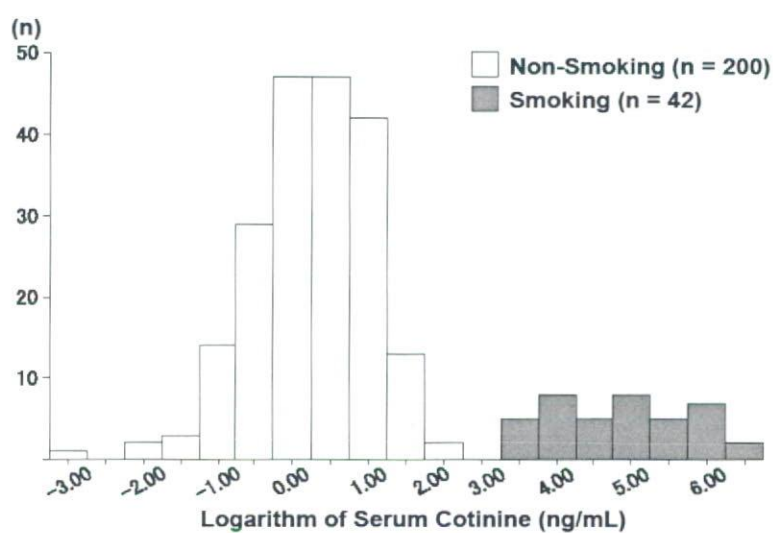


図1 血清コチニン値分布図

表1 血清コチニン値と質問調査票に基づく喫煙状態との比較

Serum Cotinine Concentration (ng/mL)	Smoking Status based on the Questionnaire at 2nd Trimester			Total
	Non-Smoking	Quitting in the 1st Trimester	Smoking	
≤ 15	144	53	3	200
> 15	3	7	32	42
Total	147	60	35	242



表2 対象者の基本属性

Characteristics	All (n = 242)	Low Environmental Smoking (n = 100)	High Environmental Smoking (n = 100)	Smoking (n = 42)	P-value <sup>c</sup>
Serum Cotinine Concentration, ng/mL	1.69 (0.05-389.41)	0.80 (0.05-1.36) <sup>a</sup>	2.16 (1.38-7.59) <sup>a</sup>	76.89 (16.68-389.41) <sup>a</sup>	< 0.001
Maternal Age, mean ± SD, year	30.58 ± 4.49	30.98 ± 4.51	30.62 ± 4.34	29.52 ± 4.70	0.209
BMI, mean ± SD, kg/m <sup>2</sup>	21.38 ± 3.47	21.45 ± 3.50	21.13 ± 3.31	21.82 ± 3.80	0.544
Parity, n (%)					
0	122 (50.6)	45 (45.0)	54 (54.5)	23 (54.8)	
≥1	119 (49.4)	55 (55.0)	45 (45.5)	19 (45.2)	0.339
Educational Levels, n (%)					
≤ 9 (years)	4 (1.7)	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (4.8)	
10-12	96 (39.7)	30 (30.0)	43 (43.0)	23 (54.8)	
13-16	138 (57.0)	67 (67.0)	55 (55.0)	16 (38.1)	
≥17	4 (1.7)	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (2.4)	0.044
Economic Status; Annual Income, n (%)					
< 3,000,000 (yen)	41 (16.9)	15 (15.0)	13 (13.0)	13 (31.0)	
3,000,000-5,000,000	119 (49.2)	43 (43.0)	59 (59.0)	17 (40.5)	
5,000,000-7,000,000	52 (21.5)	23 (23.0)	20 (20.0)	9 (21.4)	
7,000,000-10,000,000	24 (9.9)	15 (15.0)	6 (6.0)	3 (7.1)	
≥10,000,000	6 (2.5)	4 (4.0)	2 (2.0)	0 (0.0)	0.040
Alcohol Intake during Pregnancy, g/day	1.39 (0.36-51.83) <sup>b</sup>	1.19 (0.36-51.83) <sup>a,b</sup>	1.16 (0.36-19.18) <sup>a,b</sup>	2.10 (0.46-14.76) <sup>a,b</sup>	0.374
Caffeine Intake during Pregnancy, mg/day	114.00 (2.00-542.50)	101.75 (3.00-420.25) <sup>a</sup>	108.63 (2.00-425.50) <sup>a</sup>	157.38 (17.00-542.50) <sup>a</sup>	0.005

<sup>a</sup>; Median (min-max), Kruskal-Wallis test was conducted to estimate associations.

<sup>b</sup>; 28 low environmental smokers, 33 high environmental smokers and 18 smokers.

表3 妊婦の喫煙が血中ダイオキシン類濃度に与える影響

(pg/g lipid)	Non-Smoking (n = 200)		Smoking (n = 42)	
	Ref.	$\beta$ (SD)	$\beta$ (SD)	P-value
Total PCDDs	Ref.	-0.074 (0.065)		0.251
Total PCDFs	Ref.	-0.096 (0.060)		0.113
Total PCDDs/PCDFs	Ref.	-0.076 (0.064)		0.236
Total non-ortho PCBs	Ref.	-0.186 (0.069)		<b>0.008</b>
Total mono-ortho PCBs	Ref.	-0.113 (0.072)		0.115
Total coplanar-ortho PCBs	Ref.	-0.170 (0.077)		<b>0.028</b>
Total	Ref.	-0.177 (0.098)		0.072
Total PCDDs TEQ	Ref.	-0.088 (0.063)		0.166
Total PCDFs TEQ	Ref.	-0.082 (0.064)		0.196
Total PCDDs/PCDFs TEQ	Ref.	-0.089 (0.061)		0.145
Total non-ortho PCBs TEQ	Ref.	-0.297 (0.094)		<b>0.002</b>
Total mono-ortho PCBs TEQ	Ref.	-0.113 (0.072)		0.115
Total coplanar-ortho PCBs TEQ	Ref.	-0.221 (0.081)		<b>0.007</b>
Total TEQ	Ref.	-0.134 (0.063)		<b>0.035</b>

Logarithm of each Dioxin values and serum cotinine were used for multiple regression analysis.

Adjusted for maternal age, BMI before pregnancy, parity and educational level



表4 妊婦の環境的喫煙曝露ならびに喫煙が血中ダイオキシン類濃度に与える影響

(pg/g lipid)	Low Environmental Smoking (n = 100)		High Environmental Smoking (n = 100)		Smoking (n = 42)	
	Ref.	$\beta$ (SD)	$\beta$ (SD)	P-value	$\beta$ (SD)	P-value
Total PCDDs	Ref.	-41.487 (32.922)	-53.970 (43.399)	0.209		0.215
Total PCDFs	Ref.	-1.089 (2.044)	-2.865 (2.694)	0.595		0.289
Total PCDDs/PCDFs	Ref.	-42.575 (33.950)	-56.835 (44.753)	0.211		0.205
Total non-ortho PCBs	Ref.	-9.826 (4.691)	-17.319 (6.183)	<b>0.049*</b>		<b>0.006**</b>
Total mono-ortho PCBs	Ref.	-706.422 (842.611)	-2048.417 (1110.746)	0.403		0.066
Total coplanar-ortho PCBs	Ref.	-715.708 (846.452)	-2065.738 (1115.811)	0.399		0.065
Total	Ref.					
Total PCDDs TEQ	Ref.	-0.713 (0.376)	-0.949 (0.496)	0.059		0.057
Total PCDFs TEQ	Ref.	-0.460 (0.205)	-0.524 (0.270)	<b>0.026*</b>		0.054
Total PCDDs/PCDFs TEQ	Ref.	-1.173 (0.560)	-1.472 (0.738)	<b>0.037*</b>		<b>0.047*</b>
Total non-ortho PCBs TEQ	Ref.	-0.509 (0.298)	-1.219 (0.392)	0.088		<b>0.002**</b>
Total mono-ortho PCBs TEQ	Ref.	-0.113 (0.150)	-0.278 (0.198)	0.454		0.161
Total coplanar-ortho PCBs TEQ	Ref.	-0.622 (0.426)	-1.496 (0.562)	0.146		<b>0.008**</b>
Total TEQ	Ref.	-1.794 (0.909)	-2.968 (1.199)	<b>0.050*</b>		<b>0.014*</b>

Adjusted for maternal age, BMI before pregnancy, parity and educational level

## オンライン固相抽出ー液体クロマトグラフ／タンデム質量分析計を利用した ヒト母体血中有機フッ素系化合物の分析及び次世代影響の検討

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室

### 研究要旨

有機フッ素系化合物（PFCs）は、生体内における蓄積性が高く、また臍帯血を介して胎児へ移行する可能性があることから次世代への影響が懸念されている。本研究では、前向きコホート研究に伴う先天性異常モニタリングとして、PFCsに注目し、ヒト血液試料におけるPFCsの高感度分析法の構築及び次世代影響について検討した。分析法に関しては、オンライン固相抽出-LC/MS/MS法を採用してヒト血漿中PFOS, PFOSA, PFOA, PFNA, PFDAを測定対象とした。本法を用いて検量線を作成したところ、0.5～100ppbの範囲で良好な直線性が得られた。ヒト血漿試料を用いた添加回収試験においては、回収率93.3%以上（RSD<8.9, n=6）と良好な結果が得られた。本分析法を用いて母体血447検体を分析した結果、PFOS及びPFOAがそれぞれ100%、93.1%と高い頻度で検出された。これらの化合物は妊娠する度に減少していく傾向が見られた。次世代への影響は年齢や妊娠回数などを考慮し、統計解析を進めていく必要がある。本法により、有機フッ素系化合物5種類の高感度・高精度な分析が達成され、さらに、PFCsの暴露状況の把握及び妊娠回数との新たな関連性を知ることができた。

### 【研究協力者】

斉藤 貢一、伊藤 里恵、岩崎 雄介、  
仲田 尚生、勝又 常信、中田 彩子  
星薬科大学薬品分析化学教室

### A. 研究目的

有機フッ素系化合物であるペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）、ペルフルオロオクタンスルホンアミド（PFOSA）、ペルフルオロオクタン酸（PFOA）、ペルフルオロノナン酸（PFNA）、ペルフルオロデカン酸（PFDA）は、繊維類の撥水剤、界面活性剤、レベリング剤、消火剤、潤滑油及び消泡剤等として用いられている。また、PFOAにおいては、テフロン加工製品にも応用されていることから、PFCsは、我々の生活環境中で広範囲に存在している。PFCsは、直鎖状に並んだ炭素原子すべてにフッ素原子が結合しており、末端にスルホン酸基またはカルボン酸基を有する構造をしている。

炭素原子とフッ素原子の結合は非常に強いため、PFCsは、極めて安定な化学物質であると考えられている。この高い安定性のためPFCsは、河川水、海洋性哺乳類、魚類及び鳥類等、生態系で分解することなく、長期にわたり残留することが報告されている<sup>1)</sup>。また、実験動物に対して、催奇形性、甲状腺ホルモンへの影響<sup>2)</sup>、ペルオキシソーム増殖作用<sup>3)</sup>が報告されていることから次世代への影響や発ガン作用、コレステロール代謝かく乱作用等が懸念されている。さらに最近の報告では、PFOS及びPFOAがヒト母体血を介して胎児へ移行する報告もある<sup>4)</sup>。それ故、PFCsによる生態系及びヒト、特に子どもへのリスク評価を行うためにサーベイランスが必要となっている。

そこで本研究では、生体暴露評価に応用できる迅速かつ高感度・高精度な分析法を開発し、本法を北海道在中妊婦447名の血液の分析に応用し、得られた結果をもとに、次世代への影響



について検討した。

## B. 研究方法

### B.1 試薬

PFOS (Perfluorooctane sulfonate) : 和光純薬工業社製

PFOSA (Perfluorooctane sulfonamide) : ABCR GmbH & Co.KG 社製

PFOA (Perfluorooctanoic acid) , PFNA (Perfluorononanoic acid) : Fluka 社製

PFDA (Perfluorodecanoic acid) : Lancaster 社製

Internal Standard ( IS ) PFHpA (Perfluoroheptanoic acid) : Aldrich 社製

アセトニトリル : 和光純薬工業社製 HPLC 用及び残留農薬用 300

メタノール : 和光純薬工業社製 HPLC 用

酢酸アンモニウム : 和光純薬工業社製 特級

精製水 : Millipore 社製 EDS Polisher 付 Milli-Q gradient A10 で精製

### B.2 オンライン固相抽出-LC/MS/MS 法の測定概要

前処理操作の簡便化、測定時のコンタミネーションを軽減化及び高感度化を目的に、前処理操作を閉鎖系で実施するため、オンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー (LC) / タンデム質量分析法 (MS/MS) からなる測定システムを構築した。本システムは、アセトニトリルで除タンパクした試料溶液をオートサンプラーにより LC へ注入後、5 分間 50 mM 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH=4.7) / メタノール (90/10, v/v) を送液することで、固相抽出カートリッジ上で測定対象物質の濃縮とクリーンアップを行った。次に六方バルブを切り替え、1mM 酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混液をバックフラッシュ法によりグラジエント溶出することで、測定対象物質を固相

抽出カートリッジから溶出させ、分離部及び検出部に導入した。

### 測定試料の調製法

-80 °C で凍結保存してある血液試料を常温で解凍し、転倒混和操作後、ピペッターで正確に 100 µl を量り取り、アシストチューブ (アシスト社製, 2 ml) に移す。同様に内標準物質 (PFHpA) を添加したアセトニトリル溶液を 200 µl 量り取り、ゆっくりと添加する。溶液をよく混ぜ、タンパク質を十分変性させた後、遠心分離 (3000 rpm, 10 分) で除タンパク操作を行う。遠心後の上清をパスツールピペットで取り、0.20 µm のメンブランフィルターでろ過したものを測定試料とした。

### 標準試料の調製法

各標準品をメタノールに溶解させ、1.0 mg/ml の溶液を調製し、0.5~100 µg/ml の範囲で標準溶液を水で適宜希釈して測定用試料を調製した。

### 測定条件

MS/MS 装置 : Waters 社製 Quattro micro

LC 装置 : Waters 社製アライアンス

HPLC2795 システム

### LC 条件

- 分析用カラム : GL サイエンス社製 Inertsil ODS-3 (2.1×50 mm, 5µm)
- 前処理用カラム : OASIS HLB (2.1×20 mm, 25µm)
- 移動相 : アセトニトリル+1.0 mM 酢酸アンモニウム/1.0 mM 酢酸アンモニウム溶液 (45 : 55→85 : 15 v/v , 5-12 分)
- 流速 : 0.2 ml/min
- カラム温度 : 40°C
- 注入量 : 30 µl

### MS 条件

- ・ イオン化法： Electrospray（ESI），  
Negative
- ・ Nebulizer gas： N<sub>2</sub>（35 psi）
- ・ Drying gas： N<sub>2</sub>（50 L/min, 350 °C）
- ・ キャピラリー電圧： 0.6 V
- ・ モニタリングイオン（*m/z*）： 499→80  
（PFOS），498→78（PFOSA），369→169  
（PFOA），419→169（PFNA），469→169  
（PFDA），319→169（PFHpA）

## C. 研究結果

### C.1 分析法バリデーション

本分析法を用い、血漿試料における検出限界（S/N=3）を求めたところ、それぞれ PFOS: 0.08 ng/ml, PFOSA: 0.11 ng/ml, PFOA: 0.11 ng/ml, PFNA: 0.10 ng/ml, PFDA: 0.14 ng/ml であった。

また、検量線を作成したところ、0.5~100 ng/ml の範囲で良好な直線性（相関係数:  $r=0.999$ ）が得られた。血漿試料を用いた添加回収試験（ $n=6$ ）においても、平均回収率 93.3%以上と良好な結果を得ることができた（表 1）。

### C.2 精度管理

#### C.2.1 内部精度管理

内部精度管理は、主に再現性の維持、向上を目的としており、このためには同一検体を測定したときの測定値が、いつも一定であるかどうかを評価しなくてはならない。

本研究では、内部精度管理を行うにあたり、10 ng/ml PFOS 標準溶液を用い、一日 4 検体を 20 日にわたって測定した。この結果をもとに管理図を作成し、本分析法の再現性について評価した（図 1）。その結果、全ての日において、処置線を越える日が存在しなかった。このことから、本分析法の高い安定性が確認された。

#### C.2.2 外部精度管理

外部精度管理とは、自施設及び他施設の測定者が同一の試料を分析して、得られた結果の平均値と個々の測定値を比較することで、その分析法の正確性を評価する方法である。

そこで、本研究では、本分析法の正確性を評価するため、2005 年 8 月にカナダ・トロントで開催された PFCs 国際精度管理プロジェクトに参画した。

この国際プロジェクトでは、測定対象試料として標準試料、環境試料及び生体試料があり、それぞれの試料の PFCs 濃度を測定することで測定値の評価を行う。この中で、我々は、標準試料と生体試料の測定を行った。標準試料は、未知濃度の PFCs 標準品が 0.1%ギ酸水溶液により希釈されており、生体試料は、血漿及び全血試料であった。標準溶液からは、PFOS、PFOSA、PFOA 及び PFDA、血漿及び全血試料からは、PFOS、PFOA 及び PFNA が検出された。また、測定値の評価については、ほぼ全ての機関が測定対象としていた PFOS 及び PFOA について行われた。参加した全機関の PFOS 及び PFOA の測定結果を表 2 に、Z-スコアを図 2 に示す。図 2 より、我々の測定値は、全ての試料において範囲内に入っていることから、本分析法における測定値は、高い正確性を有することを確認した。

#### C.3 母体血（血漿）の測定結果

本分析法を用いて、北海道在住妊婦ボランティア 447 名の母体血（血漿）を測定した。その結果を表 3 に示す。PFOS は全ての検体から、PFOA 及び PFNA に関してはそれぞれ、93.1%、43.9%の検体から検出された。また、検出範囲は、PFOS は 1.3~16.2 ng/ml、PFOA は N.D. (< 0.5 mg/ml) ~5.2 ng/ml、PFNA は N.D. (< 0.5 ng/ml) ~1.6 ng/ml であった。PFOSA 及び PFDA に関しては、ほとんど検出されること