

200939037A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

生体試料バンクを有効活用した
食の安全と安心の基盤形成

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者・ 小泉 昭夫
京都大学大学院医学研究科

目 次

I. 総括研究報告	
生体試料バンクを有効活用した食の安全と 安心の基盤形成に関する研究 -----	1
小泉 昭夫	
II. 分担研究報告	
1. 食事中試料の汚染化学物質の分析手法の検討 -----	10
小泉 昭夫	
高菅 卓三	
原田 浩二	
2. 汚染が懸念される物質のモニタリングー日中韓越の食事試料 小泉 昭夫 -----	17
高菅 卓三	
原田 浩二	
3. 汚染が懸念される物質のモニタリングー日中韓越の母乳試料：	
(1) 汚染が懸念される化学物質の評価 -----	28
原口 浩一	
(2) Positive list chemicals の評価 -----	33
原口 浩一	
4. 日本における難分解性汚染物質のモニタリング -----	36
原口 浩一	
5. 系統的持続的な試料の収集ー中韓越の母乳および食事試料の採取 小泉 昭夫 -----	43
渡辺 孝男	
原田 浩二	
(人見 敏明)	
(新添 多聞)	
6. 系統的持続的な試料の収集ー国内試料の採取 -----	48
小泉 昭夫	
原田 浩二	
(人見 敏明)	
(藤井 由希子)	

※ () は研究協力者。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

生体試料バンクを有効活用した食の安全と安心の基盤形成

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院

研究要旨：

我が国の食料自給率はカロリーベースで40%程度であり、多くの食料を海外に依存している。食の安全を確保するために、平成18年の5月から、799種類にわたる農薬・抗生物質等を登録したポジティブリスト制度が導入されることになった。本制度は、画期的な法制度と考えられるが、実際に検査されるのは約10%であり、諸外国での不正な使用が行われてきたDDTなどのPOPs(Persistent Organic Pollutants)やメラミンなどは捕捉できない可能性がある。そこで、適切なリスク管理には、主な生産国および我が国でランダムサンプリングによる食事からの曝露評価の情報も活用することが安全である。また特殊な事例として、乳児に関しては母乳を通じた間接的な曝露評価を行うことも必要になる。我々の研究目的は、生体試料バンクを有効活用し、現行のポジティブリスト制度を補完し、食の安全と安心の基盤を強化することである。1) 食事中試料の汚染化学物質の分析手法の検討、2) 汚染が懸念される物質への対応、3) 系統的持続的な試料の収集、以上を行った。

小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科・教授
原田 浩二 京都大学大学院医学研究科・准教授
小林 果 京都大学大学院医学研究科・研究員
原口 浩一 第一薬科大学・教授
高菅 卓三 愛媛大学沿岸環境科学研究センター・島津テクノリサーチ 部長
渡辺 孝男 宮城教育大学 名誉教授
中塚 晴夫 宮城大学 教授

I. 食事中試料の汚染化学物質の分析手法の検討

A. 研究目的

化学物質曝露を捉える上で、既存の情報に基づかず探索することは、汚染の未然予防に必要である。しかしながら、食品・生物試料は多種多量の成分から構成されているため、微量の汚染物質を捉えるためには、高感度、高分

解能な分析方法が必要である。

ガスクロマトグラフ-飛行時間型(Time Of Flight)質量分析計(GC-TOFMS)は、最近様々な分野に用いられつつある。環境分析におけるGC-HRTOFMSの高感度・高精度スクリーニング分析の有用性について評価した。

B. 研究方法

対象は環境試料、生物試料とした。微量物質の検索には、得られた抽出液の一部を分取してクリーンアップ後測定を行った。試料に含まれる成分の全体像を把握する為に、TIC の他、縦軸に m/z 、横軸に保持時間の2次元Mapを作成、検出された成分のミリマススペクトルを抽出し、その精密質量から元素組成を計算ソフトにより推定した。一部の成分については標準物質による確認を行った。また、高分解能表示でのExact マスクロマトグラフィーにより、想定物質や類似物質の検索やSIM 法との比較を行った。評価した内容は、ミリマスの測定精度のばらつき、直線性、感度、定量性、一斉スクリーニング分析法の有用性などである。

C. 研究結果

ダイオキシンや主要POPs標準品を用いて、数pgの量で十分なシグナルノイズ比が得られ、全質量域のミリマススペクトルの理論値との差は0.3~1mDa以内と良好な精密質量測定精度であった。大量の成分が同時に溶出する場合には測定は困難となるため、前処理は必要であった。また近接イオンがある場合には、存在比の大きいイオンの影響で質量数がずれて目的イオンのピークが検出されなくなる等の問題があったが、その他は概ね良好で、検量線の変動係数も10%程度以内であった。

GC-TOFMS では、実試料でも微量レベルのミリマススペクトルが得られ、元素組成の推定が可能であった。幅広い範囲の精密質量のマスマスペクトルを1回または最小限の測定回数で取得して効率化を図った。GC-HRMS のSIM法とGC-HRTOFMS のマスクロマトグラムを比較すると、測定感度は劣るが、

ほぼ同様の測定結果が得られた。また、それ以上に一回の測定で得られる情報量の多さを有効に活用できることが可能であった。得られたクロマトグラムを相互比較することで、汚染物質のパターン比較などが容易になり、汚染原因の解明等にも役立てられると考えられる。

D. 考察

今回、GC-HRTOFMSでは測定感度は十分であり、また幅広い質量数にわたってスクリーニング可能であった。これは本課題の目的にかなったものであると考えられた。しかしながら、近接するイオンの妨害などについては留意する必要があった。環境、生物試料での測定から、各種汚染物質を捉えることができ、GC-HRMSでの結果と同等であることを示すことができ、TOFMS法の妥当性を検証できたと考えられた。今後、検体の測定を実施していく。

II. 汚染が懸念される物質のモニタリング

課題1-日中韓越の食事試料

A. 研究目的

本研究では、海外で収集された陰膳食事試料を用いて、各国の化学物質曝露のパターンを比較評価する。ポジティブリスト農薬、食品の生産国での不正使用が報告されているDDTなど残留性有機汚染物質POPsを対象に行う。

B. 研究方法

食事試料は、京都大学生体試料バンクに保存されている日本(京都:2005年)、中国(北京:2008年)、韓国(釜山:2008年)の陰膳食事検体を日本で10日食、中国・韓国で5日食分を混合したものを用いた。

ポジティブリスト農薬の分析については「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）にある一斉分析法を採用した。標的物質はポジティブリスト制度に係る農薬等(356物質)に4物質追加しメタミドホス、アセフェート、ジクロロボス・ナレドとし、GC/MS/MS法(一部GC法、LC/MS/MS法)にて、0.01ppm以上の感度で分析・定量した。

POPsおよび候補物質について、抽出操作は、農薬と同様に、ホモジナイズした試料を溶媒抽出、濃縮、抽出液の一部をとって内標準を添加後フロリジルカラムクロマトグラフィーを行い、GC-HRMS SIM法で定量した。トキサフェン、短鎖塩素化パラフィンとエンドスルファンはNCI(負化学イオン化)法、その他は通常のEI法によりイオン化を行った。

C. 研究結果

ポジティブリスト制度に係る農薬等、また上記追加4物質は日中韓の試料とも定義による感度以下(0.01ppm以下)であった。特定の関心のある農薬であるメタミドホス、アセフェート、ジクロロボス及びナレドもすべて0.01ppmの定量下限で検出せずとなった。POPsでは濃度の高い成分としては、最も高濃度の $\mu\text{g}/\text{kg}$ -食品湿重量オーダーで短鎖塩素化パラフィンが検出され、中国が最も高く291、続いて日本17.7、韓国11.0であった。他のPOPsは ng/kg 食品湿重量オーダーで検出された。中国ではヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサンは中国で高い。一方、PCB、DDT、クロルデン、ヘプタクロルは日本で最も高かった。

またトキサフェンとディルドリン、マイレックスは日本で64、62、6が検出されたが、韓国、中国では検出されなかった。エンドスルファンは韓国、中国、日本の順で高くそれぞれ712、281、44であった。アルドリン、エンドリンの検出はなかった。

D. 考察

今回、POPs全般では日本の食事試料で高く見られ、これはPCB、DDTが多くを占めている。母乳中POPsの分析結果との比較では、日本ではPCB、クロルデンが高いので、食事試料と同じ傾向にある。ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサンは中国で高かったが、これも母乳中の傾向と同じであった。一方、母乳中DDTは中国で高く、食事以外の曝露源が予想された。

POPs候補物質であるエンドスルファン、また短鎖塩素化パラフィンも検出され、食事由来曝露の寄与を解明する必要があると考えられた。

課題2—日中韓越の母乳試料

A. 研究目的

本課題では、国内外で収集された母乳試料を用いて、各国の化学物質曝露のパターンを比較評価する。ポジティブリスト農薬、残留性有機汚染物質POPsを対象に行う。

残留が懸念されているPOPs化合物HCHs、HCB、DDTs、CHLs、残留農薬toxaphene、mirexおよび難燃剤hexabromocyclododecane(HBCD)について対象とした。

B. 研究方法

2007年から2008年に採取した中国母乳(北京20検体)、韓国母乳(釜山10検体、ソウル10検体)日本(仙台10検体、高山10検体、兵庫10検体)につい

て5人からそれぞれ5mLを混合し、合計25mLをPOPs、農薬分析試料とした。母乳から脂肪を抽出したのち、ゲル浸透クロマトグラフィで脱脂したのち、抽出した化学物質をシリカゲルカラムにより精製したものをGC/MS試料とした。標準溶液を用いた回収率は86-101% (n=4) と良好であった。

HBCDについては、2007-2008年に採取した日本人(30名)、韓国人(20名)および中国人(20名)の母乳からそれぞれ1mLをとり合計10mLのpooled milkを作成した。試料にシュウ酸カリウム 0.2g, ethanol:diethylether (1:1) 5mL, hexane 10mLを加え、遠心分離して上層を抽出分離した。この抽出液を濃縮し、脂肪重量を測定した。ゲルろ過クロマトグラフィにて脂肪を除去した。溶出液を乾固し、アセトニトリル溶液にしたものをLC/MS/MS試料とした。

C. 研究結果

中国母乳ではHCHsが246 ng/g lipidを、DDTsが1458 ng/g lipidを示し、日本および韓国の母乳レベルよりも1桁高い値であった。一方、CHLsについては日本母乳で25.8 ng/g lipidを示し、中国、韓国母乳より有意に高い値であった。ポジティブリスト52種の検索の結果、新規にジコホールが検出された。検出イオンはEI法では、m/z 139, 250を、ECNIではm/z 250イオンで確認した。濃度は中国母乳で10.9 ng/g lipidであり、韓国および日本母乳でも低い値で検出された。トキサフェンは日本 (22-37 ng/g lipid) > 韓国 (9-14 ng/g lipid) > 中国 (2.6-7.3 ng/g lipid) の順に濃度が高い傾向が見られた。2つの異性体 (palar #26, #50) の比率に地域差はみられなかった。

HBCDは兵庫で3.6 ng/g lipid、高山

で2.7 ng/g lipid、北京で2.9 ng/g lipid、ソウルで1.3 ng/g lipidを示し、仙台、釜山では検出されなかった(検出限界 0.5 ng/g lipid)。

D. 考察

今回、初めてジコホールを母乳中に検出した。ジコホールはDDTの分解物との関係があり、今後母乳中DDTおよびdicofolの汚染源の解明と再評価が必要である。今後、母乳のポジティブリスト化学物質のECNI法によるスクリーニングをさらに続ける。日本ではトキサフェンは登録されたことはないが、中国や韓国からの越境よりも日本国内での汚染またはUSAやロシアから大気または輸入食品を通じて日本へ流入していることが考えられる。しかし、サンプル数が少ないことおよび限られた地域の試料であることから、さらに継続した調査が必要である。アジアではPBDEが1990年をピークに汚染状況は改善されているのに対し、HBCDは使用制限がなく、海洋哺乳動物中のHBCD残留濃度は増加傾向にある。ヒトでもHBCDの傾向、汚染源の詳細を検討する必要がある。

課題3—日本における難分解性汚染物質のモニタリング

A. 研究目的

PCBは過去、日本で多量に用いられたPOPsのひとつであり、未だにヒト体内に蓄積が見られる。PCBはヒト体内で代謝され、血液にOH-PCBとして残留する。一方、PBDEも一部代謝され、OH-PBDEとして血液中で検出されている。OH-PCBやOH-PBDEは内分泌系に影響を与えることが懸念されている。そこで、本研究では、宮城県仙台市、岐阜県高山市、大阪府大阪市、京都府京都市、京都府宇治市5か所の30-60歳

代女性の血清中のPCBおよびOH-PCBを調べ、年齢と濃度の関係を明らかにする。同時にPBDEおよびその代謝物についても検索した。

B. 研究方法

宮城県仙台市、岐阜県高山市、大阪府大阪市、京都府京都市、京都府宇治市5か地域に在住する30, 40, 50, 60代の女性5名（計100名）の血清1.5mLにPCB分析のISとして13C-PCB153を5ng添加した。OH-PCB分析のISとして、13C-4-OH-PCB107, 13C-4-OH-PCB146, 13C-4-OH-187をそれぞれ0.2ngを添加した。次に塩酸、acetone/hexaneを加え、抽出液を濃縮し脂肪量を測定。GPC処理後、neutralとphenolic fractionに分離した。Neutral fractionはシリカゲルカラムで精製しGC/MS (EI)でPCBの9異性体を分析した。Phenolic fractionは5検体分をpooled sampleとし、HCl酸性としたのちdiethylether/hexaneで逆抽出した。この液を濃縮し、ジアゾメタンにてO-メチル化を行った後、シリカゲルカラムで精製し、GC/MSの試料とした。

C. 研究結果

血清 (n=100) 中の PCB 総濃度 (13isomers) は 432-8532 pg/g wet (mean 2008 pg/g wet) であった。年齢と PCB 濃度の関係では 30, 40 代の PCB レベルは 50, 60 代と比べて有意に低かった。一方、OH-PCB 総濃度は 60-536 pg/g wet (mean 249 pg/g wet) を示し、年代の上がるにつれて有意に上昇した。OH-PCB の主成分は、4-OH-CB107, 4-OH-CB146 および 4-OH-CB187 で、ほかに 3-OH-CB153, 3'-OH-CB138, 4'-OH-CB172 が検出された。PCB 濃度と OH-PCB 濃度の間に正の相関がみられた。一方、PBDE 濃度は 18-29 ng/g wet

であり、各年代による濃度の変化に有意差はみられなかった。OH-PBDE を検索した結果、6-OH-BDE47 が主成分として検出され、2'-OH-BDE68 および 2, 2'-dihydroxy-3, 3', 5, 5'-tetrabromo-biphenyl (2, 2'-diOH-BB80) が検出された。これらの総濃度は 202 pg/g wet を示し、PBDE 濃度より 1桁高い値であった。Neutral fraction には 2'-MeO-BDE68 が 10 pg/g wet 以下の濃度で検出された。

D. 考察

今回得られた血清 PCB, OH-PCB 濃度はこれまでに国内で報告されている定量値の範囲内であった。日本人血液中の PCB 濃度は欧米と比べ低いことを確認した。PCB の使用が禁止された 1970 年代以降に生まれた 30 代の PCB 濃度はかなり低く、PCB の食品汚染がかなり改善されていることを示唆する。しかし、高年齢世代は PCB 濃度は依然として高い。一方、OH-PCB の濃度では、年齢とともに上昇し、60 代の OH-PCB レベル (440 pg/g wet) は 30 代の OH-PCB (120 pg/g wet) レベルより 3倍ほど高い。異性体別でみると代謝物-母化合物の濃度の相関性はいずれも有意に高かった。

一方、PBDE レベルは欧米で報告されている値より低く、主成分 BDE47 のレベルは欧米の 1/10 以下であった。6-OH-BDE47 などの OH-PBDE は血液の transthyretin (TTR) に親和性が高く、TTR と結合して甲状腺ホルモンの恒常性に影響を与えることが指摘されている。血清で検出された 6-OH-BDE47 および 2'-OH-BDE68 の由来は PBDE 代謝物でなく、海藻などが産出する化学物質 OH-PBDE や MeO-PBDE が食物連鎖を通じてヒトへ到達している可能性がある。由来の検討が必要と考えられた。

Ⅲ. 系統的持続的な試料の収集

課題4—中韓越の母乳および食事試料の採取

A. 研究目的

POPs のリスク評価に向けたヒト暴露の長期モニタリングのための試料バンクの創設が 2003 年に行われた。これは日本国内のみでなく、アジア地域で得られた試料も含んでいる。

今後、食品の輸入の増加により、国内のモニタリングのみでは十分に暴露の評価、予測ができなくなることが予想される。そのためにも近隣諸国での試料を得て、各国での食品、母乳を介した化学物質曝露の現状、変遷について情報を得ることが望まれる。

今年度はこれまでに試料バンクに収集されてきた東アジアの地域について、追跡調査を実施する。成人女性を対象に母乳、食事の各試料を収集し、ヒト生体試料バンクに収納・登録した。

B. 研究方法

京都大学大学院医学研究科の「医の倫理委員会」より、「POPs のリスク評価に向けてのヒト曝露長期モニタリングのための試料バンク創設に関する研究」の承認を得て、本研究は実施された。また各国の協力機関の倫理委員会、関係当局から承認、許可を得た。

試料収集にあたり、採血器具の違いによるコンタミネーションを極力抑え、均一な状態を確保するため、日本より持参した。また生体試料採取前日の 24 時間陰膳食事試料の提供を受けた。試料の提供とともに質問紙の回答をお願いし、年齢、転居歴、生活習慣についての情報を得た。

血漿、全血試料は中国の法令で持ち出しができないので、北京大学王培玉

教授の研究室で保管され、他の試料は京都大学へ輸送された。

本年度は中国北京市、韓国釜山市、ベトナム・ハノイ市で調査を実施した。

また釜山カトリック大学の Moon 教授より、2000 年に実施された食事調査の保存検体の提供を受けた。

C. 研究結果

母乳試料について、中国では 35 名の授乳婦より提供を受けた。韓国では釜山市から 35 名の授乳婦より提供を受けた。ベトナムではハノイ市より 38 名の授乳婦より提供を受けた。

陰膳食事・血液試料の収集では、中国・北京市に居住する労働者、学生で、21～41 歳までの女性 35 名の陰膳食事試料、血液検体を試料バンクに収納、登録した。韓国・釜山市に居住する住民で 25～54 歳までの女性 50 名の陰膳食事試料、血液検体、尿試料を試料バンクに収納、登録した。また 2000 年に行われた調査の成人女性の陰膳食事試料、血液試料 60 検体、またその児の血液試料 36 検体の提供を受けた。ベトナム・ハノイ市に居住する住民で 23～44 歳までの女性 33 名の陰膳食事試料、血液検体、を試料バンクに収納、登録した。また小学校児童の血液試料 33 名分を収納した。

D. 考察

中国、韓国での血液、食事の各検体の採取は 1990 年代に行われたが、現在の状況と比較するための試料が今回得られた。またその中間である 2000 年の試料を釜山市より得られ、近年の動向を捉えるのに有用であると考えられる。また中国に隣接するベトナムでも調査を行い、今後の経済発展でどのような化学物質が発生するかを捉えていくことが考えられる。児童への

曝露についても検討するため、血液試料が得た。このように日本での曝露と比較するための基本的試料が得られた。

課題5—国内試料の採取

A. 研究目的

POPsのリスク評価に向けたヒト曝露の長期モニタリングのための試料バンクの創設が2003年に行われた。以降、試料の継続的な収集が続いている。今年度はこれまでの定点調査地のほか、次年度からの化学分析に用いるために母乳試料を国内8カ所より収集した。また引き続き国内の成人男女を対象に血清、食事の各試料を収集し、ヒト生体試料バンクに収納・登録した。

B. 研究方法

京都大学大学院医学研究科の「医の倫理委員会」より、「POPsのリスク評価に向けてのヒト曝露長期モニタリングのための試料バンク創設に関する研究」の承認を得て、本研究は実施された。採取された血液10 mLはエチレンジアミン四酢酸二カリウム塩により抗凝固処理された。血液は全血3 mLを分取した後、遠心分離器により3000 rpmで10分間遠心し、血漿成分を分離し、おおよそ5 mLを分取した。

試料の提供とともに質問紙の回答をお願いし、年齢、転居歴、生活習慣についての情報を得た。

血液試料は、これまでの継続性を考慮して、岐阜県高山市、また京都府宇治市にて収集した。母乳試料は、これまでの継続性、また協力機関の状況から、8地点を選定した。

食事検体は成人男女が市場、小売店を利用して一日3食の食事献立とする統一的方法を用い、採取法は買い取り方式でおこなった。対象者の性別、年

齢を想定し、一般市場に出回っている食品、弁当、総菜、飲料を購入し、サンプルバンク事務局のある京都大学へ送付した。食品の流通が広域化したことから、今年度の採集地域は京都に加えて、北海道、沖縄と対称的になるように選定した。またこれらの地域では1980年代、1990年代の調査でも選定されていることから、曝露の変遷を捉えることを目的とした。

C. 研究結果

平成21年度を通じて、高山市において血清、全血試料各122検体を収集した。宇治市に居住する住民で50名血液検体を試料バンクに収納、登録した。平成21年度を通じて、国内8地域において母乳試料1110検体を収集した。食事者は20代から30代の男女を想定した。沖縄県54検体、北海道50検体、京都府30検体の合計134日食分の検体を試料バンクに収納、登録した。

D. 考察

国内での血液、母乳、食事の各検体の採取は2003年度の試料バンク創設からほぼ同一方法で行われた。2009年度の試料収集では母乳試料を用いた生物モニタリングのため、これまでより対象地域を増やして行った。検体の収集にあたっては、これまで生体試料バンクに収集された試料を考え、それに相応する機関、個人に協力をお願いしたことで、収集された血液、母乳、食事の各試料のほとんどが目標通りに実施できたことが確かめられた。また、倫理面にも十分に対応を施した検体収集を進めていただくことができた。

IV. 結論

本研究の目的である食事中試料の

汚染化学物質の分析手法の検討、汚染が懸念される物質への対応、系統的持続的な試料の収集について、当初の予定の通りに実施できた。

V. 健康危険情報

なし

VI. 研究発表

1. 論文発表

- Koizumi A, Azechi M, Shirasawa K, Saito N, Saito K, Shigehara N, Sakaue K, Shimizu Y, Baba H, Yasutake A, Harada K, Yoshinaga T, Ide-Ektessabi A.
Reconstruction of human exposure to heavy metals using synchrotron radiation microbeams in prehistoric and modern humans. *Environ Health Prev Med.* 2009; 14:52-59.
- A. Koizumi, K. Harada, B. Eslami, Y. Fujimine, N. Hachiya, I. Hirose, K. Inoue, S. Inoue, S. Koda, Y. Kusaka, K. Murata, K. Omae, N. Saito, S. Shimbo, K. Takenaka, T. Takeshita, H. Todoroki, Y. Wada, T. Watanabe and M. Ikeda.
Paradoxical increases in dietary intakes from 1980 to 2003 in Japan, *Environ. Health Prev. Med.* 2009, 14:235-246
- A. Koizumi, K. Harada, K. Inoue, T. Hitomi, H-Y. Yang, C-S. Moon, P. Wang, N.N. Hung T. Watanabe, S. Shimbo and M. Ikeda. Past., present, and future of environmental specimen banks, *Environ. Health Prev. Med.* 2009, DOI 10.1007/s12199-009-0101-1
- Kärman A, Harada KH, Inoue K, Takasuga T, Ohi E, Koizumi A. Relationship between dietary exposure and serum perfluorochemical (PFC) levels - a case study. *Environ Int* 2009; 35: 712-717.
- Niisoe T E, Nakamura, K. Harada, H. Ishikawa, T. Hitomi, T., Watanabe, Z. Wang, A. Koizumi, A global transport model of lead in the atmosphere. *Atmos Environ.* Accepted 7 Jan 2010
- Harada KH, Yang HR, Moon CS, Nguyen GH, Hitomi T, Inoue K, Niisoe T, Watanabe T, Kamiyama S, Takenaka K, Kim MY, Watanabe K, Takasuga T, Koizumi A, Levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in female serum samples from Japan in 2008, Korea in 1994-2008 and Vietnam in 2007-2008. *Chemosphere.* Accepted 18 Jan, 2010
- Haraguchi K, Hisamichi Y, Kotaki Y, Kato Y, Endo T. Halogenated bipyrroles and methoxylated tetrabromodiphenyl ethers in tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) from the southern coast of Japan. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 2288-2294.
- Haraguchi K, Hisamichi Y, Endo T. Accumulation and mother-to-calf transfer of anthropogenic and natural organohalogenes in killer whales (*Orcinus orca*) stranded on the Pacific coast of Japan. *Sci. Total Environ.*, 2009, 407, 2853-2859.
- M. Ikeda, T. Watanabe, F. Ohashi and S. Shimbo. Effects of variations in cadmium and lead levels in river sediments on local foods and body burden of local residents in non-polluted areas in Japan, *Biol. Trace Elem. Res.* 2009, DOI 10.1007/s12011-009-8436-4
- K. Haraguchi, A. Koizumi, K. Inoue, K. Harada, T. Hitomi, M. Minata, M. Tanabe, Y. Kato, E. Nishimura, Y. Yamamoto, T. Watanabe, K. Takenaka, S. Uehara, H-R. Yang, C-S. Moon, H-S. Kim, P. Wang, A. Liu and N. N. Hung. Levels and regional trends of persistent organochlorines and polybrominated diphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries, *Environment International* 2009, 35:1072-1079
- Endo T, Hisamichi Y, Kimura O, Kotaki Y, Kato Y, Ohta C, Koga N, Haraguchi K. Contamination levels of mercury in the muscle of female and male spiny dogfishes (*Squalus acanthias*) caught off the coast of Japan. *Chemosphere*, 2009, 77, 1333-1337.
- Kato Y, Haraguchi K, Kubota M, Seto Y, Ikushiro S, Sakaki, T, Koga N, Yamada S, and Degawa M: 4-Hydroxy-

2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice occurs through increase in accumulation of thyroxine in the liver. *Drug Metab. Dispos.* 2009, 37, 2095-2102.
Kato Y, Okada S, Atobe K, Endo T, Matsubara F, Oguma T, Haraguchi K. Simultaneous determination by APCI-LC/MS/MS of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers found in marine biota. *Anal. Chem.* 2009, 81, 5942-5948.
Kato Y, Haraguchi K, Kubota M, Seto Y, Okura T, Ikushiro S, Koga N, Yamada S, Degawa M. A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by a TCDD-like PCB congener, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in mice. *Drug Metab. Dispos.* 2009, in press.

2. 学会発表

原田浩二、Moon Chan-Seok、Yang Hye-Ran、人見敏明、井上佳代子、新添多聞、渡辺孝男、加美山茂利、竹中勝信、小泉昭夫、東アジアにおける血中有機フッ素化合物の変遷、日本産業衛生学会 第37回有機溶剤中毒研究会・第42回生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会、2009年10月17日
藤井由希子、原口浩一、井上佳代子、原田浩二、人見敏明、Moon Chan-Seok、Yang Hye-Ran、渡辺孝男、竹中勝信、上原茂樹、小泉昭夫、日中韓越の母乳試料中残留性有機塩素化合物と臭素系難燃剤濃度の特徴的分布、日本産業衛生学会 第37回有機溶剤中毒研究会・第42回生物学的モニタリング・バイオマーカー研究会、2009年10月17日
廣野留都、武蔵正明、中下留美子、鈴

木彌生子、伊永隆史、原田浩二、小泉昭夫、炭素・窒素安定同位体比分析によるヒト血清中アミノ酸と食料源の関係評価、2009年度 日本地球化学会年会、2009年9月15-17日

原田浩二、高橋慧、桜町惟、古川和良、大野佐代子、小泉昭夫、受動捕集法による室内空气中フルオロテロマー類の分析とヒト曝露の推定、第18回 日本環境化学会討論会、2009年6月9-11日

高菅卓三、松神秀徳、嶽盛公昭、GC-HRTOFMS による環境試料の高感度・高精度スクリーニング分析の有用性評価、第18回 日本環境化学会討論会、2009年6月9-11日

Takumi Takasuga, Hiroaki Takemori, Hidenori Matsukami, Tsuyoshi Inoue, EVALUATION OF GC-HR-TOFMS TECHNIQUES APPLIED FOR ENVIRONMENTAL ANALYSIS, DIOXIN2009 - the 29th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) 2009年9月2-7日

VII. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

食事中試料の汚染化学物質の分析手法の検討

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科
研究分担者 高菅 卓三 愛媛大学沿岸環境科学研究センター・島津テクノリサーチ
研究分担者 原田 浩二 京都大学大学院医学研究科

研究要旨：

ガスクロマトグラフ-飛行時間型(Time Of Flight)質量分析計(GC-TOFMS)が簡便に高感度・高分解能で幅広い質量範囲の高速マススペクトル・精密質量測定が可能な利点を生かし、本研究では環境分析分野で応用した。GC-HRTOFMSでは残留性有機汚染物質について数pgでも十分なS/Nが得られ、微量汚染物質の分析が可能であると考えられた。また検索する全質量域のミリマススペクトルの理論値との差は0.3~数mDa以内と良好な精密質量を得られ、質量の近い物質同士を分離できる測定精度であった。微量でもミリマススペクトルから元素組成の推定が可能で、未知物質について高い同定精度の結果が得られた。魚試料について分析を行い、HRMSでの結果と比較し、良好な定量結果を示した。

A. 研究目的

化学物質曝露を捉える上で、既存の情報に基づかず、探索することは、汚染の未然予防に必要である。しかしながら、食品、生物試料は多種多量の成分から構成されているため、微量の汚染物質を捉えるためには、高感度、高分解能な分析方法が必要である。

ガスクロマトグラフ-飛行時間型(Time Of Flight)質量分析計(GC-TOFMS)は、最近様々な分野に用いられつつある。TOFMSは全イオンが検出器に到達するため高感度である点や、GC-HRMSと比べより簡便に高感度・高分解能で幅広い質量範囲の高速マススペクトル・精密質量測定が可能な利点を生かし、環境分析分野で応用と、ダイオキシン汚染土壌の数多くの塩素化芳香族炭化水素を推測してき

た(参考文献1-5)。さらに、海棲哺乳類中の有機臭素系化合物の検索などを行ってきた(参考文献6-10)。本研究では環境分析におけるGC-HRTOFMSの高感度・高精度スクリーニング分析の有用性について評価した。

B. 研究方法

GC-HRTOF MSの機種はWaters (Micromass)社製 GCT Premierで、半値幅分解能7,000、極性の異なる複数のカラムを用いて測定を行い、特にEIとNCI法の併用による有機ハロゲン化合物の検索を中心に行なった(表1)。微量物質の検索には、得られた抽出液の一部を分取してクリーンアップ後測定を行った。試料に含まれる成分の全体像を把握する為に、TICの他、縦軸にm/z、横軸に保持時間の2次元Map

を作成し、検出された成分のミリマススペクトルを抽出し、その精密質量から元素組成を計算ソフトにより推定した。一部の成分については標準物質による確認を行った。また、高分解能表示でのExact マスクロマトグラフィにより、想定物質や類似物質の検索やSIM 法との比較を行った。

評価した内容は、ミリマスの測定精度のばらつき、直線性、感度、定量性、一斉スクリーニング分析法の有用性などである。対象は環境試料、野生生物・生体試料とした。

C. 研究結果

ダイオキシンや主要POPs 標準品のマスクロマトグラムでは、数pg でも十分なS/N で得られ(図1)、また、全質量域のミリマススペクトルの理論値との差は0.3~1mDa 以内と良好な精密質量測定精度であった(図2)。大量の成分が同時に溶出する場合には測定は困難となるため、前処理は必要である。また近接イオンがある場合には存在比の大きいイオンの影響でMass がずれて目的イオンのピークが検出されなくなる等の問題があったが、その他は概ね良好で、検量線の変動係数も10%程度以内(4.5~9%)であった。内標準の利用には妨害イオンとしての注意が必要である。

GC-TOFMS では、実試料でも微量レベルのミリマススペクトルが得られ、元素組成の推定が可能で、未知物質について高い同定精度の結果が得られた。EI 及びNCI 法を併用し、幅広い範囲の精密質量のマススペクトルを1回または最小限の測定回数で取得して効率化を図り、高感度での新たな定性手法として環境試料中の有機ハロゲン化合物を調査することが可能であった。GC-HRMS のSIM 法と

GC-HRTOFMS のマスクロを比較すると、測定感度は劣るが、ほぼ同様の測定結果が得られた(図3、表2)。また、それ以上に一回の測定で得られる情報量の多さを有効に活用できることが可能であった。得られたMap を相互比較することで、汚染物質のパターン比較などが容易になり、汚染原因の解明等にも役立てられると考えられる(図4)。

D. 考察

今回、GC-HRTOFMSでは測定感度は十分であり、また幅広い質量数にわたってスクリーニング可能であった。これは本課題の目的にかなったものであると考えられた。しかしながら、近接するイオンの妨害などについては留意する必要があった。環境、生物試料での測定から、各種汚染物質を捉えることができ、GC-HRMSでの結果と同等であることを示すことができ、TOFMS法の妥当性を検証できたと考えられた。今後、検体の測定を実施していく。

E. 結論

GC-HRTOFMSの評価ができた。数pgでも十分なS/Nが得られ、全質量域のミリマススペクトルの理論値との差は0.3~数mDa以内と良好な精密質量測定精度であった。検量線の変動係数も10%程度以内(4.5~9%)で微量でもミリマススペクトルから元素組成の推定が可能で、未知物質について高い同定精度の結果が得られた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 1. 論文発表 なし

2. 学会発表・その他

高菅卓三, 松神秀徳, 嶽盛公昭
GC-HRTOFMS による環境試料の高感
度・高精度スクリーニング分析の
有用性評価; 第18 回環境化学討論会,
講演要旨集, 541 (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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. 嶽盛公昭ら; 第16 回環境化学討論会講
演要旨集, 374 (2007)

2. 嶽盛公昭ら; 第17 回環境化学討論会, 講
演要旨集, 368 (2008).
3. 松神秀徳ら; 第11 回日本水環境学会シ
ンポジウム, 講演集, 148 (2008)
4. 高菅卓三ら; 第19 回廃棄物学会研究発
表会, 講演論文集II, 878 (2008)
5. 松神秀徳ら; 第16 回環境化学討論会講
演要旨集, 1501 (2007)
6. Takasuga T. et.al.; Organohalogen
Compounds; 69, 1134 (2007)
7. Matsukami H. et.al.; Organohalogen
Compounds; 69, 1218 (2007)
8. 高菅卓三ら; 第17 回環境化学討論会,
講演要旨集, 541 (2008)
9. 松神秀徳ら; 第17 回環境化学討論会講
演要旨集, 52 (2008)
10. Matsukami, H., et.al.; Organohalogen
Compounds;70, 46 (2008)

表1 GC-TOFMSの分析条件

GC	HP 6890 Series GC System (Agilent)
Injector	7683 Series Injector (Agilent)
Auto sampler	7683 Series Auto Sampler (Agilent)
Column①	DB-5MS (J&W) 30m x 0.25mm(id) 0.25 or 0.1 μm
Column②	DB-17HT (J&W) 30 m x 0.32 mm, 0.15 μm
Column ①Temp.	120°C (1 min)-(20°C/min)-220°C (0 min)-(3°C/min)-280°C (0 min) - (5°C/min)-300°C (10 min)
Column ②Temp.	130°C (1 min)-(20°C/min)-200°C (0 min)-(3°C/min)-250°C(0 min) - (5°C/min)-300°C (10 min)
Column ②Temp. for POPs	120°C (1 min)-(20°C/min)-160°C (0 min)-(3°C/min)-220°C (0 min) - (10°C/min)-300°C (10 min)
He flow ratio	1.0 mL/min
Injection	Splitless or ON-Column injection
Injection Temp.	280°C
ON-Column Injection Temp.	120 or 130°C-(100°C/min)-300°C
Injection Volume	1 or 2 μL
MS	GCT Premier (Micromass)
Ionization method	EI or NCI (methane)
Ionization Volt.	40 - 70 eV
Trap current	200 μA
Interface Temp.	280 - 300 °C
Ion source Temp.	260 or 300 °C
Resolution	M/ΔM >7,000
Monitor ion range	m/z = 30~500
Cycle time	0.5 sec

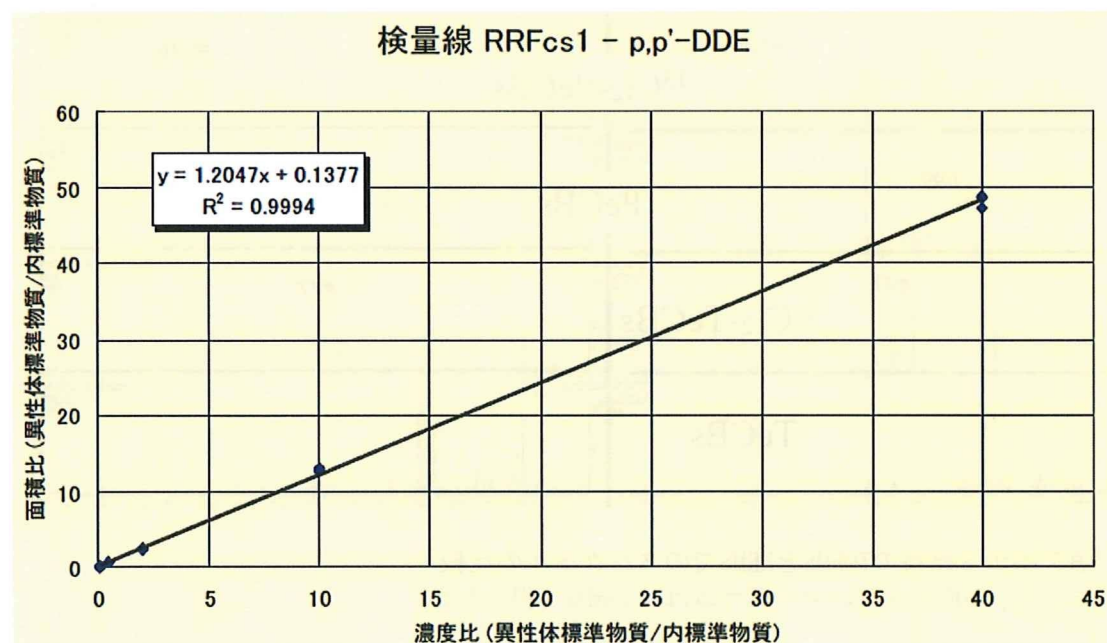


図1 p, p' -DDEの検量線

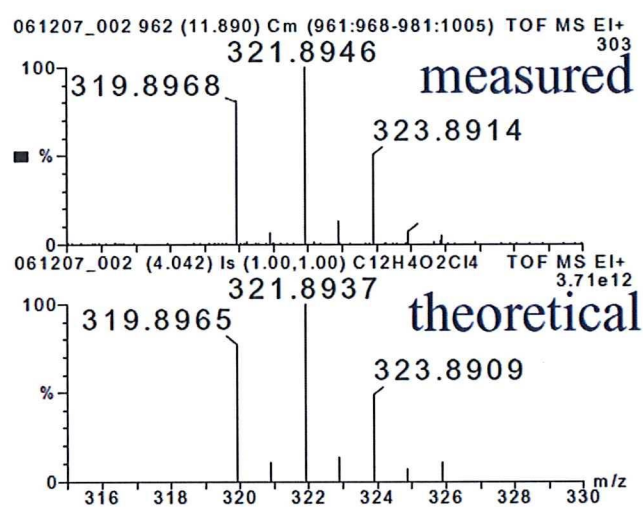


図2 TeCDDのマススペクトル
上段は実測されたスペクトル、下段は理論値

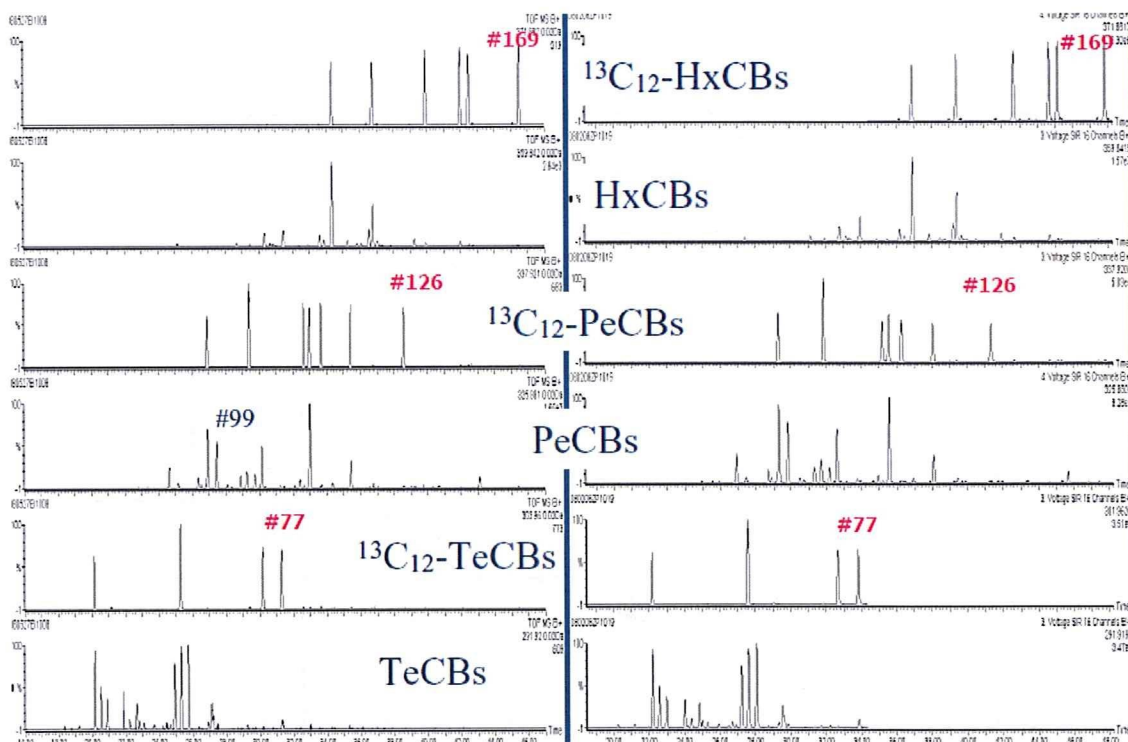


図3 魚アイナメ試料のTOFMSとHRMSでのスペクトルの比較
PCBについて、TOFマスクロマトグラムは±10mDaで得られた。

表2 TOFMSとHRMSでの測定値の比較

Sample Instrument unit	shelfish		sea bass	
	GC-HRMS pg/g	GC-TOFMS pg/g	GC-HRMS pg/g	GC-TOFMS pg/g
δ-HCH	4	ND	6	ND
γ-HCH	17	(14)	25	ND
β-HCH	45	(59)	130	110
α-HCH	27	(29)	47	(35)
Mirex	2	ND	25	(26)
HCB	16	(17)	290	320
trans-Heptachlor epoxide	33	ND	ND	ND
Heptachlor	ND	ND	4	ND
Aldrin	26	(12)	4	ND
Oxychlordane	1200	1400	190	(270)
cis-Nonachlor	180	180	1400	1400
trans-Nonachlor	630	710	2700	2700
cis-Chlordane	11000	11000	2000	1900
trans-Chlordane	580	590	650	600
p, p'-DDD	8	(10)	2100	2100
o, p'-DDD	7	(9)	640	660
p, p'-DDE	630	670	7000	9700
o, p'-DDE	69	71	970	1000
p, p'-DDT	63	59	990	840
o, p'-DDT	27	(21)	350	360

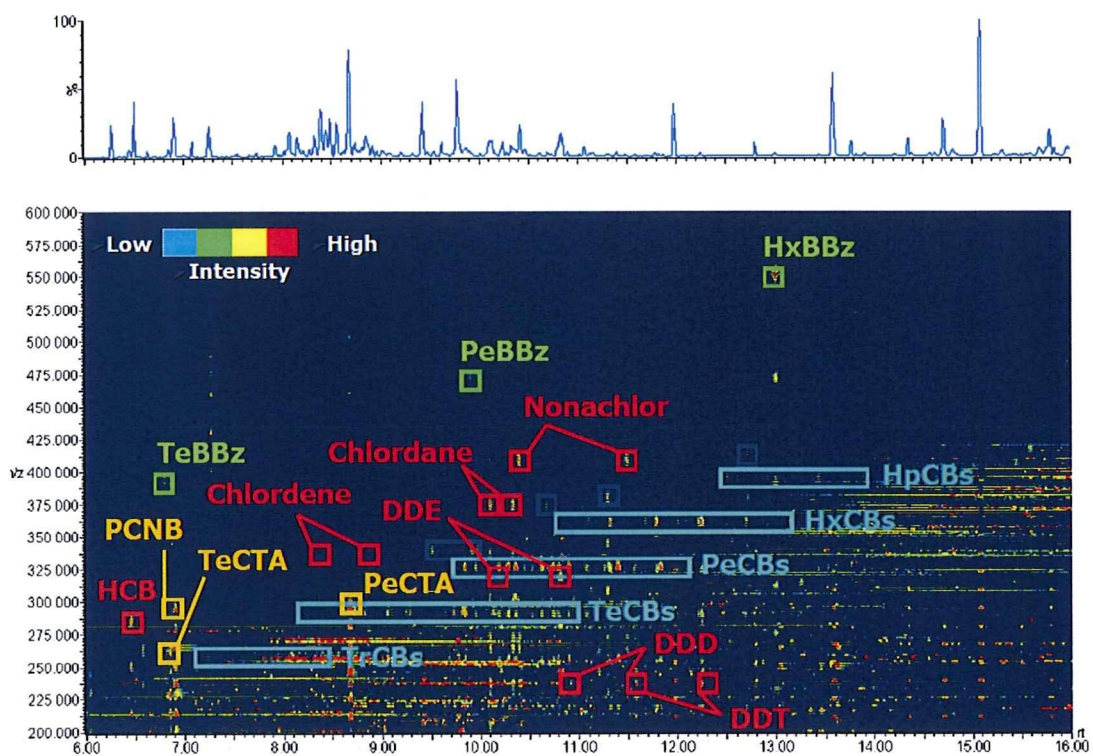


図4 クロマトグラムとマススペクトルの二次元プロット
各化学物質を群別に表記している。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

汚染が懸念される物質のモニタリングー日中韓越の食事試料

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科
研究分担者 高菅 卓三 愛媛大学沿岸環境科学研究センター・島津テクノロジー
研究分担者 原田 浩二 京都大学大学院医学研究科

研究要旨：

本研究では、海外で収集された陰膳食事試料を用いて、各国の化学物質曝露のパターンを比較評価する。ポジティブリスト農薬、食品の生産国での不正使用が報告されているDDTなど残留性有機汚染物質POPsを対象に行った。食事試料は、京都大学生体試料バンクに保存されている日本(京都:2005年)、中国(北京:2008年)、韓国(釜山:2008年)の陰膳食事検体を日本で10日食、中国・韓国で5日食分を混合したものをを用いた。ポジティブリスト農薬は通知一斉分析法、POPsはGC-HRMSで測定した。今回の分析ではポジティブリスト農薬は調理された食事試料では見られなかった。これは洗浄や調理の段階で除去、分解し、最終的にはほとんど残留しない可能性があった。一方、POPsは各国食事試料中で特徴的な分布で検出された。短鎖塩素化パラフィンがppbオーダーの高濃度で中国の食事では検出され、日韓においても検出された。またマイレックスやトキサフェンのように国内での使用実態のなかったものも検出された。今後、越境汚染、食糧輸入の変化から日本人のこれら化学物質への曝露にもさらなる変化が出てくると考えられる。そのために各国で引き続き追跡評価していくことが必要である。

A. 研究目的

我が国は食料を海外に依存しており、近年中国、韓国からの輸入の増大がある。食の安全を確保するために、平成18年の5月から、ポジティブリスト制度が導入された。本制度は、画期的な法制度であるが、実際に検査されるのは約10%であり、諸外国で不正使用されてきたDDTなどのPOPsや不正使用された化学物質などは捕捉できない可能性がある。そこで適切なリスク管理には、主な生産国と我が国におけ

る食事からの曝露評価の情報も活用することが安全である。

本研究では、海外で収集された陰膳食事試料を用いて、各国の化学物質曝露のパターンを比較評価する。ポジティブリスト農薬、食品の生産国での不正使用が報告されているDDTなど残留性有機汚染物質POPsを対象に行う。

B. 研究方法

食事試料は、京都大学生体試料バンクに保存されている日本(京都:2005

年)、中国(北京:2008年)、韓国(釜山:2008年)の陰膳食事検体を日本で10日食、中国・韓国で5日食分を混合したものを用いた。

ポジティブリスト農薬の分析については「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)にある一斉分析法を採用した。標的物質はポジティブリスト制度に係る農薬等(356物質)に4物質追加しメタミドホス、アセフェート、ジクロルボス・ナレドとし、GC/MS/MS法(一部GC法、LC/MS/MS法)にて、0.01ppm以上の感度で分析・定量した。

POPsおよび候補物質について、抽出操作は、農薬と同様に、ホモジナイズした試料を溶媒抽出、濃縮、抽出液の一部をとって内標準を添加後フロリジルカラムクロマトグラフィーを行い、GC-HRMS SIM法で定量した。トキサフェン、短鎖塩素化パラフィンとエンドスルファンはNCI(負化学イオン化)法、その他は通常のEI法によりイオン化を行った。

C. 研究結果

ポジティブリスト制度に係る農薬等、また上記追加4物質は日中韓の試料とも定義による感度以下(0.01ppm以下)であった。特定の関心のある農薬であるメタミドホス、アセフェート、ジクロルボス及びナレドもすべて0.01ppmの定量下限で検出せずとなった(表1-7)。

すべての調査した化学物質で、濃度の高い成分としては、最も高濃度の $\mu\text{g}/\text{kg}$ -食品湿重量オーダーで短鎖塩素化パラフィンが検出され、中国が最も高く291、続いて日本17.7、韓国11.0

であった(表9)。他のPOPsは ng/kg 食品湿重量オーダーで検出され、ヘキサクロロベンゼンも84と中国で最も高い(日本40 韓国17)(表8)。ヘキサクロロシクロヘキサンは中国、日本、韓国と続いて高く、それぞれ85、71、26であった(表8)。一方、PCBは日本が700と最も高く、韓国180、中国100であった(表9)。またDDT、クロルデン、ヘプタクロルも日本が最も高く、それぞれ486、147、13であった(中国:100、 <5 、 <4 、韓国:68、9、11)。トキサフェンとディルドリン、マイレックスは日本で64、62、6が検出されたが、韓国、中国では検出されなかった。エンドスルファンは韓国、中国、日本の順で高くそれぞれ712、281、44であった(表8、9)。アルドリン、エンドリンの検出はなかった。

D. 考察

今回の分析ではポジティブリスト農薬は調理された食事試料では見られなかった。これは洗浄や調理の段階で除去、分解し、最終的にはほとんど残留しない可能性があった。

一方、POPsは各国食事試料中で特徴的な分布で検出された。POPs全般では日本の食事試料で高く見られた。これはPCB、DDTが日本で高いことによる。クロルデンも1980年代に使用があった日本で高かった。母乳中POPsの分析結果は、日本ではPCB、クロルデンが高いので、食事試料と同じ傾向にある(参考文献1、表10)。一方、母乳中DDTは中国で高く、食事以外の曝露源が予想される。

ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサンは中国で高かったが、これも母乳中の傾向と同じであった。

POPs候補物質であるエンドスルフ