

胎児期の抗エストロゲン様 PCBs 曝露が出生時体格に与える影響

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター センター長・特任教授

研究分担者 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所 保健科学部生活化学課 課長

研究分担者 佐々木 成子 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 助教

研究要旨

低レベルの母体血中抗エストロゲン様作用 PCBs 曝露と出生時体格との関連を検討した。対象者は一般病院・産科を受診した妊娠 23 週～35 週の妊婦で、妊婦とその配偶者から、自記式調査票により既往歴、教育歴、世帯収入、ライフスタイルなどを、また、医療診療録から母児の分娩・出産情報・児の出生時所見を得た。426 名の妊娠中期～後期の母体血中 PCBs 濃度を測定した。414 名についてエストロゲン様作用・抗エストロゲン様作用・その他に分類した PCBs 濃度と、出生時体重・身長・胸囲・頭囲との関連を多変量解析で検討した。交絡因子調整後の結果では、母体血中抗エストロゲン様作用 PCBs 濃度(log10)と出生時体格(体重: $\beta=-0.032$, $p=0.49$, 身長: $\beta=0.015$, $p=0.8$, 胸囲: $\beta=0.015$, $p=0.8$, 頭囲: $\beta=-0.05$, $p=0.32$)との関連は認められなかった。さらに男女別および出産歴別(初産か経産)で解析を行ったが、有意な関連は認められなかった。低レベルの胎児期抗エストロゲン様作用 PCBs 曝露は児の出生時体格に影響しない可能性が示唆された。

研究協力者

宮下 ちひろ, 金澤 文子, 坂 晋,
鷺野 考揚, 小西 香苗, 馬場 俊明,
Yila Thamar, Braimoh Titilola,
檜野 いく子, 岡田 恵美子,
小林 澄貴, 大竹 裕子, 伊藤 久美子,
Mariko Limpar
(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)
平田 輝昭, 千々和 勝己, 黒川 陽一
平川 博仙, 堀 就英, 中川 礼子,
芦塚 由紀, 小野塚 大介, 高尾 佳子
飛石 和夫, 安武 大輔
(福岡県保健環境研究所)
戸高 尊
(九州大学 医学部)
飯田 隆雄
(北九州生活科学センター)

胎児期のポリ塩化ビフェニル(PCBs)曝露が児の発育に負の影響を与えることが示唆されているが、一般環境レベル(低レベル)の PCBs に関する報告は結果が一致していない⁽²⁾。Murphy ら(2010)は、受胎前の母親の抗エストロゲン様作用 PCBs 濃度が増加するほど出生時体重が低下すると報告したが、一方で、妊娠中の PCBs 濃度と出生時体重との関連は認められなかった⁽³⁾。

これ以外に PCBs 濃度をエストロゲン様作用別に検討した報告はないことから、本研究では低レベルの母体血中抗エストロゲン様作用 PCBs 曝露と出生時体格との関連を検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象者は 2002 年 7 月から 2005 年 10 月に札幌市の一般病院・産科を受診した妊娠 23 週～35 週の妊婦で、インフォームドコンセントを得られた母児 514 組で

A. 研究目的

わが国において、近年、低出生体重児の増加が報告されている⁽¹⁾。

ある。妊婦とその配偶者から、自記式調査票により既往歴、教育歴、世帯収入、ライフスタイルなどを、また、医療診療録から母児の分娩・出産情報・児の出生時所見を得た。妊娠中期～後期に母親から採血し、高分解能ガスクロマトグラフィー・高分解能マスペクトメトリー(HRGC/HRMS)で、426名の母体血中PCBs濃度(合計70異性体)を測定した。Cookeら(2001)の分類に従い70異性体PCBs濃度をエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、およびその他、の3群に分類した⁽⁴⁾。対数変換した各エストロゲン様作用別PCBs濃度、非ダイオキシン様PCBs濃度(58異性体)と総PCBs濃度(70異性体)の5群を曝露とし、出生時体格(体重・身長・胸囲・頭囲)をアウトカムとして、在胎週数、非妊娠時BMI、採血時期、出産歴、母親の年齢、帝王切開の有無、妊娠時飲酒歴、児の性別、世帯収入で調整して多変量解析を行った。さらに、母親の出産歴(初産か経産)と児の性別によって全体を4群に分類し、在胎週数、非妊娠時BMI、採血時期、母親の年齢、帝王切開の有無、妊娠時飲酒歴、世帯収入で調整後、解析を行った。妊娠高血圧症候群の妊婦・双胎は対象から除外した。

(倫理面への配慮)

北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび北海道大学大学院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

母体血中PCBs濃度および出生時体格の両方が得られた母児414名を解析に用いた。各5群のPCBs濃度は幾何平均値で、エストロゲン様作用PCBs 27616 pg/g lipid, 抗エストロゲン様作用PCBs

3949 pg/g lipid, その他のPCBs 72640 pg/g lipid, 非ダイオキシン様PCBs(58異性体) 93123 pg/g lipid, および総PCBs(70異性体) 104142 pg/g lipidであった(表1)。また、出生時体格は、平均体重:3077g, 身長:48.1cm, 胸囲:31.5cm, および頭囲:33.3cmであった(表2)。全体で解析した結果では、母体血中抗エストロゲン様作用PCBs濃度(log10)と出生時体格(体重: $\beta=-0.032, p=0.49$, 身長: $\beta=0.015, p=0.8$, 胸囲: $\beta=0.015, p=0.8$, 頭囲: $\beta=-0.05, p=0.32$)との関連は認められなかった(表3)。さらに男女別および出産歴別で解析を行ったが、有意な関連は認められなかった(表4,5)。全体の解析では、エストロゲン様PCBs, その他のPCBs, 非ダイオキシン様PCBs(58異性体), および総PCBs(70異性体)と出生時体格との有意な関連は認められなかったが、初産女兒群では、エストロゲン様作用PCBs濃度と出生時身長とに有意な正の関連が認められた($\beta=0.202, p=0.004$)。

D. 考察

本研究では、母体血中抗エストロゲン様作用PCBs曝露による出生時体格低下への影響は認められなかった。また、出産歴および性別で解析しても関連は認められなかった。しかし、初産女兒では母体血中エストロゲン様作用PCBs濃度が増加するほど出生時身長が増加した。

環境化学物質に汚染された魚を高頻度に摂取する釣り人(平均血中PCB濃度4.7ng/g)を対象にしたMurphyら(2010)の研究では、妊娠中の抗エストロゲン様作用PCBs濃度と出生時体重との関連は認められなかった。

本研究対象者の母体血中PCBs濃度は国内および諸外国と比較して低いレベルであり(平均血中PCB濃度0.45ng/g)⁽⁵⁾、解析結果からより低レベルの胎児期抗エストロゲン様作用PCBs曝露は出生

時体重、身長、胸囲、および頭囲に影響しない可能性が示唆された。

本研究では、男児より女児でPCBsのエストロゲン様作用に対して感受性が高い可能性が示された。しかし、環境からヒトは複合的な化学物質曝露を受けるため、他の環境化学物質の影響もさらに検討する必要がある。

E. 結論

低レベルの胎児期抗エストロゲン様作用PCBs曝露は、出生時体格に影響を与えないことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1)宮下ちひろ, 佐々木成子, 岡田恵美子, 小林澄貴, 西條泰明, 馬場俊明, 吉岡英治, 梶原淳睦, 戸高尊, 岸玲子「抗エストロゲン様作用PCBs曝露と出生体格との関連-環境と子どもの北海道スタディ(2)-」(第81回日本衛生会学術総会, 東京, 2011.3.25-28)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

- (1)賀数いづみ, 加藤尚美, 金城忠雄: 低出生体重児の出生要因とリスクに関する研究—沖縄県A病院で出生した低出生体重児の分析—. 沖縄県立看護大学紀要. 4:48-56, 2003.
- (2) Tajimi M, Uehara R, Watanabe M, Oki I, Ojima T, Nakamura Y: Relationship of PCDD/F and Co-PCB concentrations in breast milk with infant birthweights in Tokyo, Japan. *Chemosphere*. 61(3): 383-388, 2005.

- (3) Murphy LE, Gollenberg AL, Buck Louis GM, Kostyniak PJ, Sundaram R: Maternal serum preconception polychlorinated biphenyl concentrations and infant birth weight. *Environ Health Perspect*. 118(2): 297-302, 2010.

- (4)Cooke PS, Sato T, Buchanan DL: Disruption of steroid hormone signaling by PCBs. In: PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects (Robertson LW, Hanson LG, eds). Louisville:University Press of Kentucky, 257-263, 2001.

- (5)Konishi K, Sasaki S, Kato S, Ban S, Washino N, Kajiwara J, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Yasutake D, Kishi R: Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res*. 109(7):906-913, 2009.

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

表1 母体血中PCBレベル (pg/g lipid) (n=414)

	GM	(95%CI)	Minimum	Percentile			
				25th	50th	75th	Maximum
Estrogenic PCBs	27615.6	(26307.0-28989.3)	3800.6	19544.2	28513.6	39842.4	146164.6
Anti-estrogenic PCBs	3949.3	(3755.8-4152.7)	621.1	2744.1	4069.6	5527.1	21741.7
Others PCBs	72640.2	(69123.9-76335.4)	11692.3	50653.5	74642.4	104085.9	331730.7
Non-dioxin-like PCBs PCBs(58)	93123.4	(88657.4-97814.2)	16016.9	64763.9	94990.7	132484.0	445249.4
Total PCBs(70)	104142.2	(99159.1-109375.7)	17814.8	72560.0	107372.5	148127.8	495062.9

estrogenic congeners: 4 + 10, 8 + 5, 15 +17, 18, 31, 44, 47, 48, 52, 70, 77 + 110, 99, 101, 126, 136, 153, and 188

anti-estrogenic congeners: 77 + 110, 105, 114,118, 126, 156 + 171, and 169

others congeners: expected estrogenic and anti-estrogenic congeners

表2 出生時体重、身長、胸囲、および頭囲(414)

	Mean	SD	Mini	Percentile			
				25th	50th	75th	Max
Birth weight (g)	3077	374	1594	2857	3069	3300	4292
Length (cm)	48.1	1.9	33.0	47.0	48.0	49.2	53.0
Chest circumference (cm)	31.5	1.5	25.0	30.5	31.5	32.5	36.5
Head circumference (cm)	33.3	1.3	28.0	32.5	33.2	34.0	37.0

表3 母体血中のPCBレベル(pg/g lipid)と出生時の体重、身長、胸囲、および頭囲との関連 (n=414)

	Birth weight (g)		Length (cm)		Chest circumference (cm)		Head circumference (cm)	
	crude	adjusted	crude	adjusted	crude	adjusted	crude	adjusted
	β	β	β	β	β	β	β	β
	p	p	p	p	p	p	p	p
Estrogenic PCBs	-0.018	-0.034	0.048	0.043	0.062	0.047	-0.066	-0.073
	0.71	0.47	0.33	0.38	0.21	0.33	0.18	0.15
Anti-estrogenic PCBs	-0.023	-0.035	0.02	0.013	0.03	0.014	-0.051	-0.053
	0.64	0.46	0.68	0.79	0.54	0.78	0.31	0.3
Others PCBs	-0.036	-0.049	0.028	0.03	0.039	0.026	-0.068	-0.082
	0.46	0.32	0.57	0.56	0.43	0.61721	0.17	0.12
Non-Dioxin like PCBs (58)	-0.032	-0.043	0.032	0.035	0.045	0.034	-0.072	-0.084
	0.51	0.38	0.52	0.5	0.36	0.51	0.14	0.11
Total PCBs(70)	-0.031	-0.045	0.033	0.033	0.045	0.032	-0.068	-0.08
	0.53	0.36	0.5	0.52	0.36	0.53	0.17	0.13

β : standardized partial regression coefficients

adjusted for infant sex, parity, gestational age, pre-pregnancy BMI, blood sampling period, maternal age, type of delivery, maternal alcohol intake during pregnancy, annual household income, maternal smoking during pregnancy.

Because PCB levels were log₁₀-transformed, standardised partial regression coefficients represent the expected change in dependent variables as a result of a 10-fold change in PCB levels.

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

表4 母体血中のPCBレベル(pg/g lipid)と出生時の体重、身長、胸囲、および頭囲との関連（初産）

	Primiparous	Birth weight (g)		Length (cm)		Chest circumference (cm)		Head circumference (cm)	
		crude	adjusted	crude	adjusted	crude	adjusted	crude	adjusted
		β	β	β	β	β	β	β	β
		p	p	p	p	p	p	p	p
Male	Estrogenic PCBs	-0.116	-0.072	-0.065	-0.043	-0.044	-0.037	-0.084	-0.034
		0.27	0.47	0.54	0.71	0.67	0.71	0.43	0.74
	Anti-estrogenic PCBs	-0.089	-0.101	-0.073	-0.002	-0.043	-0.053	-0.059	-0.028
		0.4	0.32	0.49	0.98	0.67	0.61	0.58	0.8
	Others PCBs	-0.122	-0.111	-0.088	0.019	-0.045	-0.078	-0.074	-0.028
		0.24	0.29	0.41	0.87	0.67	0.46	0.48	0.8
Non-Dioxin like PCBs (58)	-0.116	-0.097	-0.082	0.027	-0.04	-0.065	-0.078	-0.029	
	0.27	0.35	0.43	0.81	0.71	0.54	0.46	0.79	
Total PCBs(70)	-0.12	-0.101	-0.082	0.024	-0.043	-0.066	-0.076	-0.029	
	0.25	0.33	0.44	0.83	0.68	0.53	0.47	0.79	
Female	Estrogenic PCBs	0.067	0.008	0.202	0.165	0.149	0.075	0.077	0.056
		0.49	0.94	0.04*	0.08	0.12	0.43	0.43	0.58
	Anti-estrogenic PCBs	0.06	0.013	0.165	0.122	0.082	0.018	0.042	0.025
		0.54	0.89	0.09†	0.18	0.4	0.84	0.67	0.8
	Others PCBs	0.062	0.013	0.18	0.139	0.121	0.055	0.051	0.036
		0.53	0.89	0.06†	0.13	0.22	0.55	0.6	0.72
	Non-Dioxin like PCBs (58)	0.064	0.016	0.185	0.146	0.126	0.061	0.053	0.041
		0.51	0.86	0.06†	0.11	0.2	0.52	0.59	0.69
	Total PCBs(70)	0.063	0.012	0.187	0.146	0.126	0.058	0.056	0.04
		0.52	0.9	0.05†	0.11	0.2	0.53	0.57	0.69

β : standardised partial regression coefficients

adjusted for gestational age, pre-pregnancy BMI, blood sampling period, maternal age, type of delivery, maternal alcohol intake during pregnancy, annual household income, maternal smoking during pregnancy.

Because PCB levels were log10-transformed, standardised partial regression coefficients represent the expected change in dependent variables as a result of a 10-fold change in PCB levels.

*, **Statistically significant ($p < 0.05$, $p < 0.01$ respectively)

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

表5 母体血中のPCBレベル(pg/g lipid)と出生時の体重、身長、胸囲、および頭囲との関連（経産）

Multiparous		Birth weight (g)		Length (cm)		Chest circumference (cm)		Head circumference (cm)	
		crude	adjusted	crude	adjusted	crude	adjusted	crude	adjusted
		β	β	β	β	β	β	β	β
		p	p	p	p	p	p	p	p
Male	Estrogenic PCBs	-0.057	-0.049	0.026	-0.043	-0.022	-0.02	-0.165	-0.156
		0.56	0.62	0.8	0.68	0.83	0.84	0.09†	0.16
	Anti-estrogenic PCBs	-0.07	-0.014	0.02	-0.013	-0.014	0.005	-0.158	-0.137
		0.48	0.89	0.84	0.9	0.89	0.96	0.11	0.23
	Others PCBs	-0.093	-0.027	0.016	-0.031	-0.046	0.013	-0.169	-0.147
		0.35	0.8	0.87	0.78	0.64	0.9	0.09†	0.22
Non-Dioxin like PCBs (58)	-0.088	-0.033	0.015	-0.034	-0.043	0.004	-0.177	-0.158	
	0.37	0.75	0.88	0.76	0.66	0.97	0.07†	0.18	
Total PCBs(70)	-0.083	-0.032	0.02	-0.033	-0.04	0.005	-0.17	-0.151	
	0.4	0.76	0.84	0.76	0.69	0.96	0.09†	0.2	
Female	Estrogenic PCBs	0.035	0.012	0.056	0.016	0.146	0.141	-0.063	-0.085
		0.72	0.88	0.56	0.85	0.13	0.1	0.51	0.37
	Anti-estrogenic PCBs	0.007	-0.007	-0.016	-0.053	0.09	0.091	-0.016	-0.03
		0.94	0.93	0.86	0.54	0.35	0.29	0.87	0.75
	Others PCBs	-0.002	-0.017	0.016	-0.02	0.1	0.104	-0.078	-0.096
		0.98	0.83	0.87	0.82	0.3	0.23	0.41	0.31
Non-Dioxin like PCBs (58)	0.005	-0.008	0.025	-0.01	0.112	0.117	-0.078	-0.097	
	0.96	0.92	0.8	0.91	0.24	0.18	0.42	0.31	
Total PCBs(70)	0.008	-0.01	0.025	-0.013	0.114	0.115	-0.073	-0.093	
	0.93	0.91	0.8	0.88	0.24	0.18	0.45	0.33	

β : standardised partial regression coefficients

adjusted for gestational age, pre-pregnancy BMI, blood sampling period, maternal age, type of delivery, maternal alcohol intake during pregnancy, annual household income, maternal smoking during pregnancy.

Because PCB levels were log10-transformed, standardised partial regression coefficients represent the expected change in dependent variables as a result of a 10-fold change in PCB levels.

妊婦血液中のダイオキシン、PCB および水酸化 PCB(OH-PCB)類濃度分析法の開発

研究分担者 梶原 淳睦 福岡県保健環境研究所 保健科学部生活化学課 課長

研究要旨

化学物質による先天異常の疫学研究の基礎資料を得ることを目的に、妊婦の母体血、母乳のダイオキシン、PCB および OH-PCB 類濃度分析法を開発した。方法は従来の血液および母乳中ダイオキシンおよび PCB 類一斉分析法の精製工程を検討し、OH-PCB 類を同時に測定できる分析法を追加した。しかし、近年環境および食品中のダイオキシン、PCB 類濃度は低下しており、妊婦の血液中 OH-PCB を測定するためには、より高感度に OH-PCB を検出できるように分析法の改良を加えた。本分析法の開発により少量の血液で多種類の化学物質の測定が可能になり、母体の化学物質による汚染実態の解明に大きく貢献するものと期待される。

研究協力者

平田 輝昭, 千々和 勝己, 黒川 陽一
平川 博仙, 堀 就英, 中川 礼子,
芦塚 由紀, 小野塚 大介, 高尾 佳子
飛石 和夫, 安武 大輔
(福岡県保健環境研究所)
戸高 尊
(九州大学 医学部)
飯田 隆雄
(北九州生活科学センター)

が報告され、PCB よりも強い EDC 作用があるのではないかと懸念されている。さらに、これら化学物質が母体に取り込まれ、母体内で胎児に影響を及ぼし先天異常や発達障害を引き起こすのではないかと危惧されている。なぜなら胎児は EDC の影響を最も敏感に受けると考えられているからである。従って、妊婦体内に蓄積されたダイオキシン、PCB 類および OH-PCB と出生児の先天異常との関係を明らかにすることは極めて重要である。

A. 研究目的

科学技術の発展に伴い様々な化学物質が生産、副生あるいは非意図的に生成され環境や人体に蓄積されている。特に、ダイオキシン類および PCB 類は環境中で極めて安定で、環境汚染物質として広く分布し、食物連鎖を介してヒト体内に蓄積され、内分泌かく乱物質(EDC)として働くことが知られている。また、ヒト体内に蓄積された PCB 類は、チトクローム P450 等の酵素により OH-PCB に代謝され排泄されるが、一部の OH-PCB は甲状腺ホルモンと類似した構造を持つため、生体内に残留すること

本研究では先天異常の疫学研究の基礎資料を得ることを目的に、妊婦血液および母乳中のダイオキシン類濃度(PCDDs7 種, PCDFs10 種, ノンオルソ-PCB4 種, モノオルソ-PCB 8 種 合計 29 種)および非ダイオキシン様 PCB 類(58 異性体)濃度を精密に測定し、母体血 426 件、母乳 250 件のダイオキシン類および PCB 類の異性体ごとの濃度データを明らかにした。さらに、ダイオキシン、PCB 類一斉分析法を改良し、同一試料から OH-PCB も同時に測定できる分析法を開発した。さらに近年、環境および食品中のダイオキシン、PCB 類濃度は

低下しており、妊婦の血液中 OH-PCB を測定するためより高感度に OH-PCB を検出できる分析法の改良を加えた。従来の血液中 OH-PCB 類の分析法は、酸性条件下で溶媒抽出後、シリカゲルカラムで分画し、ジアゾメタン等で誘導体化(メチル化)し高分解能 GC/MS 等を用いて測定する方法が報告されている。我々は血液中の OH-PCB 類濃度を誘導体化せずに LC/MS/MS を用いて直接測定する簡便な一斉分析法を開発した。

B. 研究方法

我々の開発した血液および母乳中ダイオキシン、PCB 類一斉分析方法の精製工程を検討し、市販の OH-PCB 標準物質が一斉分析法の工程のどの画分に分画されるか精査した。次に血液試料を用い夾雑物の有無を検討した。さらに妊婦の血液中 OH-PCB を測定するためより高感度に OH-PCB を検出できる改良として固相カラムによる精製を加えた。表 1 に使用した OH-PCB 標準物質、内部 OH-PCB 類を示した。

また、LC/MS/MS で OH-PCB を測定するため、分離用カラム、泳動バッファーを検討した。

（倫理面への配慮）

ダイオキシン・PCB および OH-PCB 類の測定は、本人の同意が得られた者のみを対象とした。研究成果の発表に際しては統計的に処理された結果のみを使い、個人を特定できるような情報は存在しない。

C. 研究結果

血液および母乳中ダイオキシン、PCB 類一斉分析方法では OH-PCB は硝酸銀シリ

カゲルカラムに保持されていたため、50%ジクロロメタン-ヘキサンで OH-PCB 類を溶出した。さらに、OH-PCB 画分を濃縮・乾固し、0.5ml メタノールに溶解した後、Envi-Carb C カラムで精製した。精製した試料にシリンジスパイクを添加し LC/MS/MS で測定した。Figure 1 に我々が開発した血液中ダイオキシン、PCB および OH-PCB 一斉分析法のフローを示した。また、表 2 に LC/MS/MS の測定条件(装置)、表 3 に LC/MS/MS の測定条件(Mass)を示した。

今回開発した血液中ダイオキシン、PCB および OH-PCB 一斉分析法の 5~7 塩化 OH-PCB LC/MS/MS のクロマトグラムを Figure 2~7 に示した。左(Figure 2-4)が 5 塩化から 7 塩化 OH-PCB の標準物質のクロマトグラムで 10 種の異性体が 7 つのピークに別れ検出された。ピークの重なりは 5 塩化 OH-PCB では 4H と 3H118, 6 塩化 OH-PCB は 4H130 と 3H138, 7 塩化 OH-PCB は 4H172 と 3H180 で見られた。各 OH-PCB の検出下限値は 0.05~1ng/ml であった。右(Figure 3-5)に血液中 OH-PCB の LC/MS/MS のクロマトグラムを示した。ヒト血液中に検出される OH-PCB は主に 6 異性体(4H109, 3H138, 4H146, 4H153, 4H172, 4H187)で各異性体のピークを検出できた。表 4 に今回の分析で検出した異性体別濃度と他機関の分析例での検出濃度を比較した。

D. 考察

OH-PCB は甲状腺ホルモンと類似した構造を持つため、生体内で甲状腺ホルモンレセプターと結合し残留あるいは甲状腺ホルモン作用をかく乱する可能性があることが

報告されており、母体内で胎児に及ぼす影響が危惧されている。OH-PCB 類の分析法は血液から抽出、精製後誘導体化し高分解能 GC/MS 等を用いて測定する方法が報告されている。しかし、①誘導体化の際に異性体により反応性が異なる可能性があること、②LC/MS/MS を用い分離測定が出来れば誘導体化を省略できること、③我々の血液中ダイオキシン、PCB 一斉分析法で同時に OH-PCB も分析することができればより簡便になるため新たな分析法開発を目指した。

ヒト血液中に検出される OH-PCB は 4H109, 3H138, 4H146, 4H153, 4H172, 4H187 の 6 異性体が主要異性体であり、このうち 3 種(4H109, 4H146, 4H187)で血液中 OH-PCB の 70~90%を占めると報告されている。今回開発した分析条件では主要 6 異性体のうち 3 異性体(4H109, 3H138, 4H172)は生体内でほとんど検出されない異性体(3H118, 4H130, 3H180)とピークが重なっている。しかし、ヒト生体内ではこれらの 3 異性体(3H118, 4H130, 3H180)濃度は検出下限以下と推察されるので、検出されたピークはそれぞれ 4H109, 3H138, 4H172 のピークとして定量した。4H146 と 4H153 は今回の分析条件では重なっており今後分離条件の検討を進めるが、合算値として定量した。表 4 に本分析で検出された異性体別濃度と他機関での分析例での検出濃度を比較したが良く一致しており、本分析法は OH-PCB の分析法として有効である。

近年、環境および食品中のダイオキシン、PCB 類濃度は低下しており、人体の血液中 PCB 類濃度も低下していることが報告されている。分析法の開発に用いた血液の

Total PCB 濃度は 2.4ng/g lipid であるが、本研究で対象とする妊婦の血液中 PCB 濃度は平均 1.2ng/g lipid であった。このため、本研究で対象とする妊婦の血液中 OH-PCB 濃度も約半分程度であることが推察される。従って、OH-PCB を測定するためより高感度に OH-PCB を検出できる分析法の改良として固相カラム(Envi Carb C)による精製を加えた。その結果、バックグラウンドが下がり検出下限を下げる事ができた。改良前後の 7 塩化 OH-PCB のチャートを Figure 8 に示した。

本法は OH-PCB 類を誘導体化せずに測定することができるため簡便である。本分析法は 5g の血液からダイオキシン、PCB, OH-PCB 類の一斉分析が可能となるため母体の化学物質による汚染実態の解明に大きく貢献するものと期待される。現在、妊婦の血液中 OH-PCB 濃度を測定中であり、OH-PCB 濃度とダイオキシン、PCB 類濃度との相関や先天異常との関係を解析する。

E. 結論

PCB の代謝物である OH-PCB の一部は、生体内に残留しやすく PCB よりも毒性が強いと考えられていることから、母体内で胎児に及ぼす影響が危惧されている。OH-PCB の体内濃度の事態解明のため、少量の血液からダイオキシン、PCB, OH-PCB 類を同時に測定できる一斉分析法を開発した。本分析法の開発により少量の血液で多種類の化学物質の測定が可能になり、汚染実態の解明が大きく進展するものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Todaka T., Hirakawa H., Kajiwara J., Hori T., Tobiishi K., Yasutake D., Onozuka D., Assaki S., Miyashita C., Yoshioka E., Yuasa M., Kishi R., Iida T., Furue M.: Relationship between the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in maternal blood and those in breast milk. *Chemosphere* 78: 185-192, 2010.
 - 2) Tobiishi K. , Todaka T., Hirakawa H and Kajiwara J. Improvement of the Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Blood by LC/MS/MS.: *Organohalogen Compounds*. 72: in press 2010.
 - 3) Kajiwara J. , Todaka T. , Hirakawa H. ,Hori T. , Tobiishi K., Yasutake D. , Onozuka D. , Takao Y., Uchi H., and Furue M.: Concentrations of Yusho-related polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in blood of Yusho patients.: *Organohalogen Compounds*, 72: in press 2010.
- ORGANIC POLLUTANTS, San Antonio, USA, (2010, September)
- 2) Kajiwara J. , Todaka T. , Hirakawa H. ,Hori T. , Tobiishi K., Yasutake D. , Onozuka D. , Takao Y., Uchi H., and Furue M.: Concentrations of Yusho-related polychlorinated biphenyls and polychlorinated dibenzofurans in blood of Yusho patients. 30TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM HALOGENATED PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, San Antonio, USA, (2010, September)
 - 3) 梶原淳睦, 戸高尊, 平川博仙, 堀就英, 安武大輔, 飛石和大, 小野塚大介, 吉村健清, 岸玲子, 古江増隆: 母乳中ダイオキシン, PCB類濃度のクロスチェック, 第19回環境化学討論会(春日井市), 2010年6月21-23日

G. 知的所有権取得
該当なし

2. 学会発表

- 1) Tobiishi K. , Todaka T., Hirakawa H and Kajiwara J. Improvement of the Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Blood by LC/MS/MS. 30TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM HALOGENATED PERSISTENT

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

表 1. OH-PCBs standards

Compounds	Abbreviation	
4-OH-2,2',4',6,6'-PeCB	4'-OH-CB104	4H104
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	4-OH-CB109	4H109
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	3H138
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	4H146
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	4H172
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	4H187
OH-[¹³ C ₁₂]-PCBs for internal standards		
Compounds	Abbreviation	
4-OH-2',3,4',5,5'-PeCB	4'-OH-CB120	M4H120
4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB	4'-OH-CB159	M4H159
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	3H138
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	4H146
4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB	4-OH-CB159	4H149
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	M4H172
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	M4H187

表 2 LC/MS/MSによるOH-PCB測定条件(装置)

Instrument	LC: UPLC(Waters) MS/MS: XEVO(Waters)
Flow Rate	0.2 mL/min.
Injection Volume	10 μL
Column Temperature	40 °C
Mobile Phase	0.1% Formic acid : Methanol = 40 : 60 → 10 : 90 linear gradient
Temperature; Source	120 °C
Desolvation	350 °C
Gas Flow; Cone	Nitrogen, 50 L/hr
Desolvation	Nitrogen, 600 L/hr
Voltage; Cone	40 V
Capillary	2.0kV
Collision	Argon, 10kV
Ionization	ESI-Negative

表 3 LC/MS/MS による OH-PCB 測定条件(Mass)

Compounds	Precursor ion ? product ion m/z
OH- PeCB	¹² C 340.87 ? 340.87
	¹³ C 352.91 ? 352.91
OH- HxCB	¹² C 374.83 ? 374.83
	¹³ C 386.87 ? 386.87
OH- HpCB	¹² C 408.79 ? 408.79
	¹³ C 420.83 ? 420.83

表 4 血液中OH-PCB濃度

	OH-PCB	Blood ¹⁾ (pg/g)	Range ²⁾ (pg/g)
PeCB-OH	4-OH-CB109	20.6	1.6-16
HxCB-OH	3'-OH-CB138	20.6	0.8-14
	4-OH-CB146	48 ³⁾	2.2-19
	3-OH-CB153	-	0.8-11
HpCB-OH	4'-OH-CB172	5.6	0.5-5.6
	4-OH-CB187	30.5	7.1-26

- 1) プール血液(平均年齢50歳)
2) 榎本剛司, 他 : 環境化学, 16, 91-98, 2006
3) 4-OH-CB146と3-OH-CB153の合算値

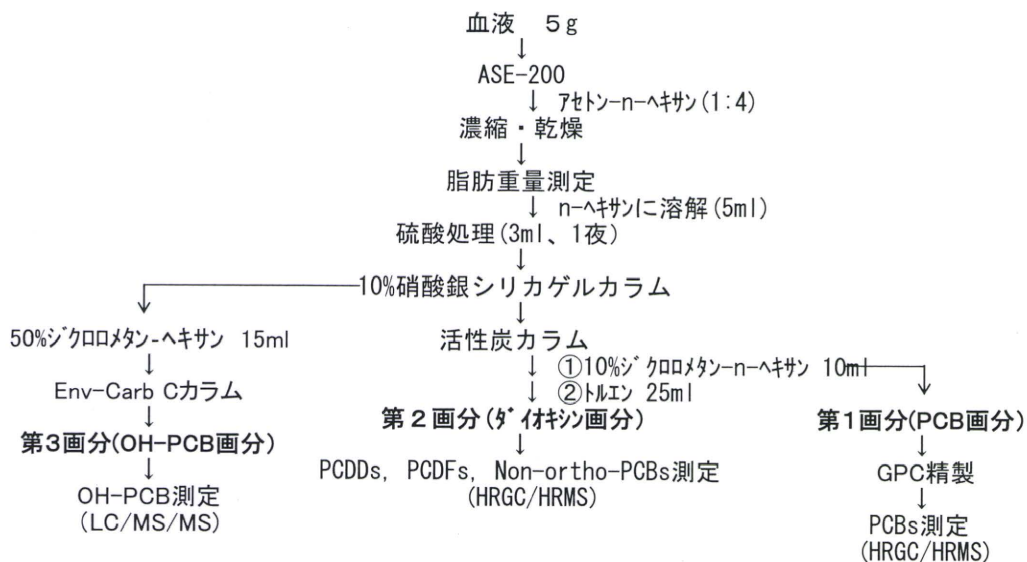


Figure 1. Flow chart of the measurement method for PCDDs, PCDFs, PCBs and OH-PCBs in blood samples.

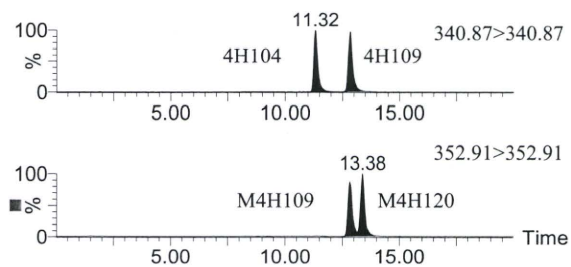


Figure 2. LC/MS/MS chromatograms of 8 ng/mL OH-PeCB standards

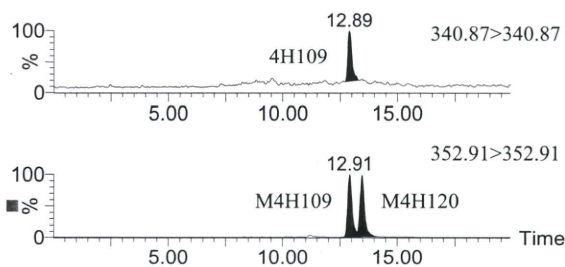


Figure 5. LC/MS/MS chromatograms of OH-PeCBs in human blood

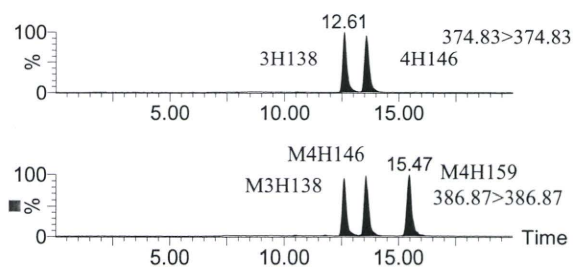


Figure 3. LC/MS/MS chromatograms of 8 ng/mL OH-HxCB standards

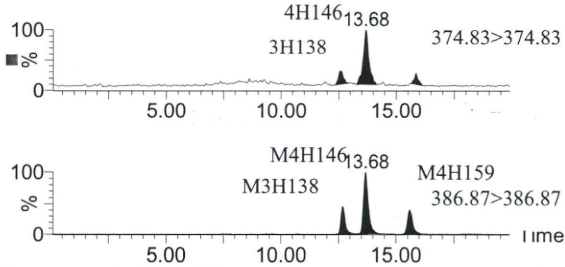


Figure 6. LC/MS/MS chromatograms of OH-HxCBs in human blood

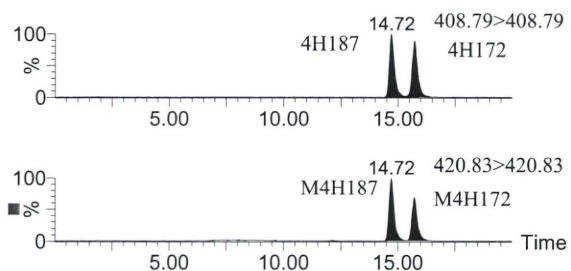


Figure 4. LC/MS/MS chromatograms of 8 ng/mL OH-HpCB standards

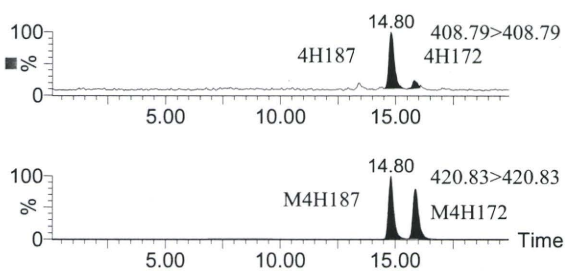


Figure 7. LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCBs in human blood

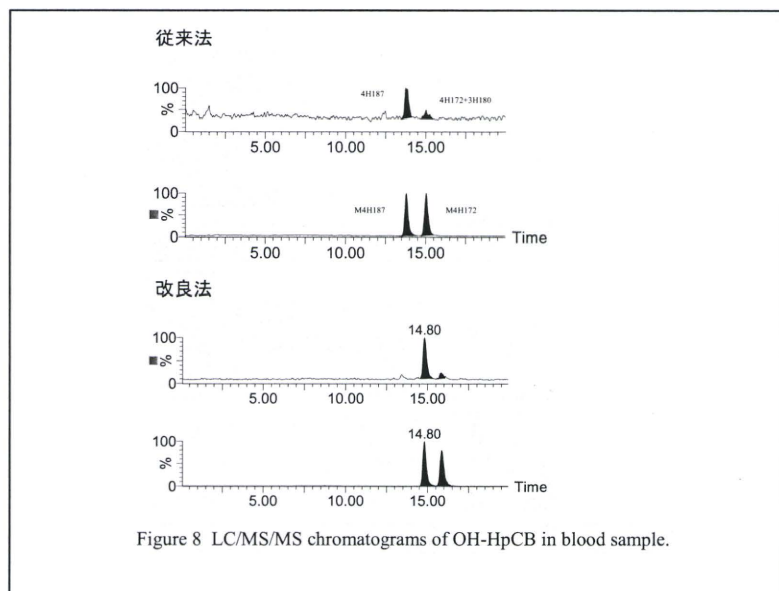


Figure 8 LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCB in blood sample.

血液中のビスフェノール A(BPA)および 4-ノニルフェノール(NP)測定分析法の開発

研究分担者 松村 徹 いであ(株)環境創造研究所 環境リスク研究センター長

研究要旨

血液中のビスフェノール A(BPA)および 4-ノニルフェノール(NP)の測定分析方法を検討した。同位体希釈 LC/MS/MS 法を採用し、前処理方法と組合せて検討した結果、血中 BPA および NP の分析方法を『手法』としては確立できた。しかしながら、NP については試薬等由来のブランク値が非常に高く、現状では血中における一般的な濃度レベルにおいて評価可能なデータを取得することは困難であると考えられた。一方、BPA のブランク値は、用いる分析前処理部材の変更によって大きく低減できたが、定量下限値近傍の血中濃度を評価するまでには至らなかった。

研究協力者

山本 潤
(いであ株式会社 環境創造研究所)

A. 研究目的

ビスフェノール A(BPA)はポリカーボネート製のプラスチックを製造する際、モノマーや、エポキシ樹脂の原料として使用されている化学物質であり、摂取によりエストロゲン受容体が活性化され、エストロゲンに類似した生理作用を表すことが報告されている。低用量仮説の提唱によって注目を受けたが、ヒトに対する健康影響評価に関しては現在も諸説の報告例があり継続して研究が行われているところである。また、近年、BPA については尿道下裂との関連性について幾つか報告がなされているが、血中濃度は極低濃度であり、試料間の有意な濃度差を観測するためには精確な測定値が必要と考えられる。

4-ノニルフェノール(NP)はノニオン性界面活性剤の一種であるノニルフェノールエトキシレートや ゴム用老化防止剤および酸化防止剤の TNPP(Tri nonyl phenyl phosphite)の原料として用いられる化学物質で、エストロゲン作用が示唆される報告がなされている。

BPA および NP の体内負荷量を評価するにはヒト血液における濃度データが必要であるが、存在量は極低く測定分析が困難であり、現在のところ、確からしい結果を用いて議論されてい

るとは言えない状況と考えられる。本研究ではヒト血液中の BPA および NP を議論可能な濃度レベルで精確に測定する手法を開発することを目的とした。

昨年度、固相抽出カラムを用いた前処理とそれに続く同位体希釈・液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (ID-LC/MS/MS)法を検討し、BPA および NP の前処理を操作途中まで同時に実施可能な方法を確立した。しかしながら、BPA および NP の分析においてはブランク値の低減なしに一般被験者の血中濃度を評価することが困難と考えられた。本年度は BPA に的を絞る、詳細にブランク試験を行い、ブランクの起源解明と定量下限値近傍における再現性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

本年度は、BPA のみを測定分析対象化合物とし(NP の同時前処理操作を行わない)、ブランク試験として、全操作ブランク、前処理用カートリッジカラム(コンディショニング方法および構成部材)の検討を行った。測定方法としては、昨年度開発した ID-LC/MS/MS 法を採用した。血液中の BPA の分析フローを図 1 に、LC/MS/MS を用いた測定条件を表 1 にそれぞれ示す。なお、同位体希釈法の内標準スパイクとして、BPA-d₁₆ をクリーンアップスパイク、BPA-2,2',6,6'-d₄(BPA-d₄)をシリンジスパイクとして採用した。なお、試験に

は、固相充填済み樹脂製カートリッジカラムとして ISOLUTE マルチモード (500mg/3mL, Biotage 社製; 904-0050-B)を用いた。

C. 研究結果

(1)BPA 全操作ブランク

全操作ブランク試験における BPA 濃度を表 2 に示す。濃度は血液試料 1mL を用いた場合として算出している(以降、全ての結果も同様)。ケース 1, 2 および 3 は異なった 3 種類の条件を、それぞれのケースにおける試料番号は繰り返し分析の結果をそれぞれ示す。BPA の全操作ブランク値は一定しなかった。

(2)個々の前処理段階におけるブランク

カートリッジカラムのコンディショニングから前処理操作における個々の操作(図 2)についてブランク試験を行った。結果を表 3 に示す。コンディショニングに用いた溶媒中の濃度が、他に比較して高く、コンディショニングの有効性が確認されたが、コンディショニング以降の分析操作段階でもブランク値が観測された。

(3)前処理用カートリッジカラムのコンディショニング方法の検討

本分析で用いる溶媒試薬中の BPA 濃度は十分低濃度であることは確認している(表 4)。そこで、前処理用カートリッジカラムを起源とする BPA をコンディショニングによって低減することを考えた。検討したコンディショニングの方法と得られたブランク値を表 5 に示す。コンディショニングの方法によってブランク値は異なるが、同一の操作でもブランク値には日間変動が観測された。

(4)カートリッジからの溶出

ここまでの検討結果、すなわち、ブランク値に決定的に寄与している要因が特定できず、また、同一操作におけるブランク値の再現性が低いことから考えて、2 種類の原因が想定される。ひとつは、分析に使用し、試料に接する部材からの BPA の溶出、もうひとつは、雰囲気汚染である。そこで、部材から

の BPA の溶出を評価する目的で、カートリッジを分解し、構成される部品単位(充填剤、フリットおよびチューブ)で浸出試験を行った。カートリッジにアセトニトリル 10mL および純水 5mL を順次流すことにより洗浄した後、カートリッジを、充填剤、フリットおよびチューブに分解し、それぞれをアセトニトリルに 1 hr 浸し、BPA の溶出の確認を行った(n=3)。結果を表 6 に示す。カートリッジを構成するチューブからの BPA の溶出が確認された。

(5) カートリッジチューブの変更

チューブからの BPA の溶出が確認されたこと、また、この現症は定常的に出現せず、したがって制御することは現実的でないことから、チューブを変更することを考えた。ISOLUTE マルチモードの固相部を抜き取り、ガラス製カラム(6mL ガラスチューブ,テフロンフリット 1 枚挿入済み, SUPELCO 社製; 504394)および樹脂製カラム (RESERVOIR-1 THK FRIT, 6mL CAPACITY, VARIAN 社製; 12131015)に充填した。フリットとしては、交換用フリット(テフロン製,6mL 用,SUPELCO 社製; 504327)を用いた。作製したこれらのカートリッジカラムについてブランク試験を実施した。結果を表 7 に示す。2 種類のカートリッジカラムのブランク値は ISOLUTE マルチモードに比較して低かった。

(6)全操作ブランクの変動

ここまでの検討において、前処理用カートリッジカラムの樹脂製チューブがブランク値に大きく影響を与える場合があることが判明した。しかしながら、通常の使用において、その影響は定常的ではなく、また、濃度レベルは一定しない。そこで、前処理用カートリッジカラムの樹脂を抜き取り、ガラス製のカラムに充填して全操作ブランク試験を行った(n=83)。結果を図 3 に示す。また、比較のため、樹脂製カートリッジカラムを用いた場合のブランク試験の結果(n=110)を同様に示す(図 4)。ガラス製のカラムを用いることによってブランク値は減少し、また、ブラ

ンク値の再現性も改善された。

(3)Chen M, Chang C, Shen Y, Hung J,
Guo B, Chuang H, Mao I.

Quantification of prenatal
exposure and maternal-fetal
transfer of nonylphenol.

Chemosphere 2008;73:239-245

D. 考察

血液中の BPA および NP 測定分析方法を検討した。NP については試薬等由来のブランク値が非常に高く、現状では血中における一般的な濃度レベルにおいて評価可能なデータを取得することは困難であると考えられた。一方、BPA のブランク値は、用いる分析前処理部材の変更によって大きく低減できたが、定量下限値近傍の血中濃度を評価するまでには至らなかった。

E. 結論

血液中の BPA および NP 測定分析方法を開発するために、同位体希釈 LC/MS/MS 法を採用して、前処理方法と組合せて検討した結果、血中 BPA および NP の分析方法を『手法』として確立できた。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

- (1)Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent Bisphenol A Accumulation in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. *Environ. Health Perspectives* 2002;110:703-707
- (2)Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H. Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J. Pharmaceutical and Biomedical Anal.* 2003;30:1743-1749

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

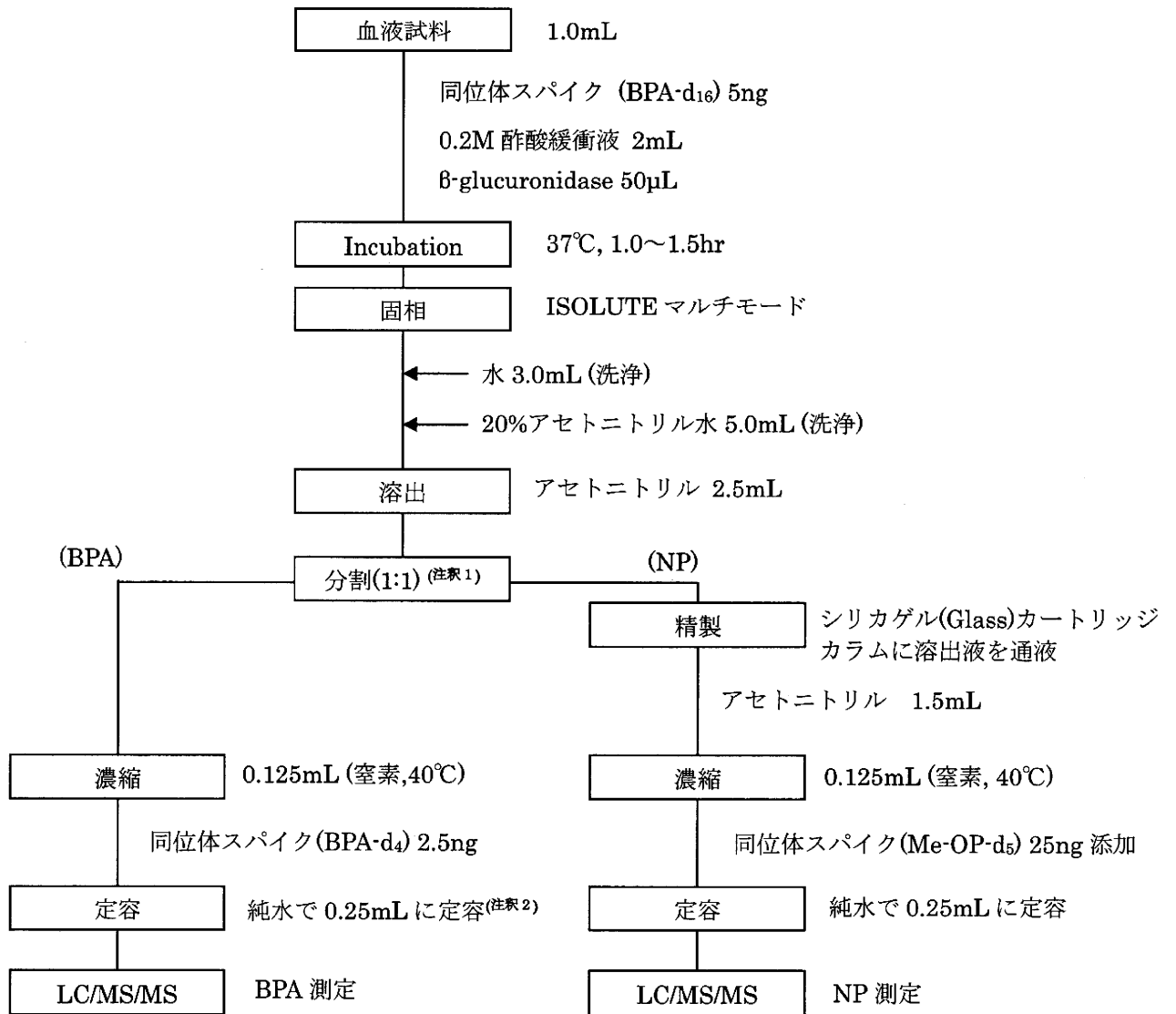


図 1. 血液中の BPA の分析フロー

(注釈 1) BPA のみの検討においては、分割操作を行っていない。

(注釈 2) BPA のみの検討においては、0.50mL に定容。したがって分割操作のありなしにかかわらず本検討における濃縮倍率は同じである。

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

表 1. ビスフェノール A および 4-ノニルフェノールの LC/MS/MS を用いた測定条件

BPA の測定条件	
測定装置	LC Agilent-1100 MS API-4000
分析カラム	Agilent Eclipse XDB-C8 2.1×150mm,5µm
溶離液	A 水 B アセトニトリル
グラジエント(B)	20%(0min)→20%(1min)→100%(17min)→100%(23min)→20%(23.1min) → 20%(31min)
注入量	20µL
カラム温度	40℃
モード	ESI-Negative
m/z	226.9 > 132.9(BPA) 241.0 > 142.0(BPA-d ₁₆) 231.0 > 94.9(BPA-d ₄)
NP の測定条件	
測定装置	LC Agilent-1100 MS API-4000
分析カラム	Agilent Eclipse XDB-C8 2.1×150mm,5µm
溶離液	A 水 B アセトニトリル
グラジエント(B)	50%(0min)→100%(17min)→100%(22min)→50%(22.1min)→50%(30min)
注入量	20µL
カラム温度	40℃
モード	ESI-Negative
m/z	219.0 > 132.9(NP) 224.0 > 122.5(Me-OP-d ₅)

表 2. BPA の全操作ブランク値 (ng/mL)

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	平均
ケース 1	0.50	0.71	0.59	0.81	0.25	0.56	0.52	0.56
ケース 2	0.44	0.26	0.45	0.26	0.16	—	—	0.31
ケース 3	0.47	0.18	0.60	0.20	0.32	—	—	0.35

【備考】

ケース 1：アセトニトリル 2.5mL 使用(2010 年 4 月 16 日)

ケース 2：アセトニトリル 2.5mL 使用(2010 年 4 月 25 日)

ケース 3：アセトニトリル 5.0mL 使用(2010 年 4 月 25 日)

それぞれのケースに含まれる試料番号は繰り返し分析を意味する。繰り返し分析における試薬類は同一の瓶から使用している。

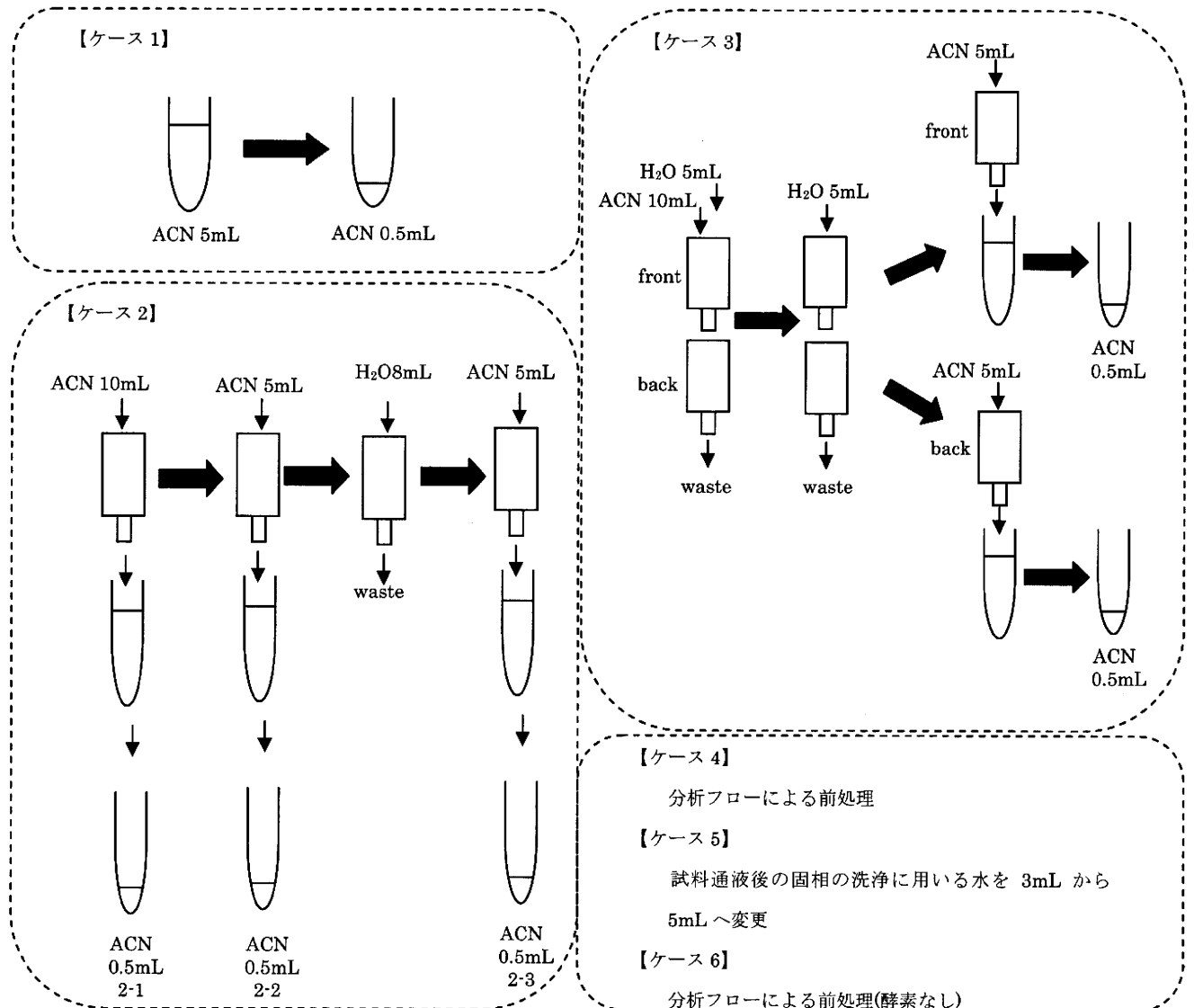


図 2. BPA ブランク検討のための検討ケースイメージ

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

表 3. コンディショニングの各段階と BPA のブランク値 (ng/mL)

検討ケース	試料 1	試料 2	試料 3	平均
ケース 1	N.D. ^(注釈 1)	N.D. ^(注釈 1)	0.019	0.0062
ケース 2-1	0.064	0.10	0.34	0.17
ケース 2-2	0.019	0.019	0.020	0.019
ケース 2-3	0.017	0.023	0.016	0.019
ケース 3_Front	0.023	0.030	0.024	0.025
ケース 3_Back	0.026	0.029	0.034	0.029
ケース 4	1.3	0.40	0.17	0.62
ケース 5	0.23	0.17	0.14	0.18
ケース 6	0.12	0.089	0.14	0.12

(注釈 1)クロマトグラムピークとして検出されず。

表 4. 溶媒試薬中の BPA ブランク値 (ng/mL)

溶媒の種類	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5
アセトニトリル (HPLC 用)蒸留	0.0055	0.0050	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	0.0033
アセトニトリル (HPLC 用)蒸留 10 日後	0.0041	0.0050	0.0032	0.0046	N.D. ^(注釈 2)
アセトニトリル (HPLC 用)-1 ^(注釈 1)	0.0069	N.D. ^(注釈 2)	0.0047	0.0044	0.0034
アセトニトリル (HPLC 用)-2 ^(注釈 1)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)
アセトニトリル (HPLC 用)-3 ^(注釈 1)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)
アセトニトリル (HPLC 用)蒸留	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)	N.D. ^(注釈 2)
アセトン (残留農薬試験用 300)	0.00084	0.0017	0.0015	0.00086	0.0010
メタノール (HPLC 用)	0.0012	0.00049	0.0018	0.0042	0.0024

(注釈 1) アセトニトリル (HPLC 用)の試薬瓶がそれぞれ異なっている。

(注釈 2) クロマトグラムピークとして検出されず。

【備考】本試験結果のみ溶媒 1mL あたりの濃度で表示。