

平成 20～22 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

表 2 初産婦119名の血液及び母乳中PCDD、PCDFおよびダイオキシン様PCB濃度

Congeners	Concentration (pg/g-lipid)										p Values
	Blood					Breast milk					
	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	
2,3,7,8-TetraCDD	1.1	1.1	0.6	0.5	3.1	0.6	0.5	0.4	0.5	2.8	<0.001
1,2,3,7,8-PentaCDD	4.7	43	1.8	1.6	12	2.9	2.7	1.3	1.4	8.9	<0.001
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	1.8	1.0	1.0	1.0	5.8	ND					
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	16	14	6.7	6.2	44	9.1	8.2	4.2	3.9	30	<0.001
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	2.4	23	1.4	1	7.4	ND					
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	27	24	11	9.6	71	6.3	5.5	3.7	2.1	25	<0.001
OctaCDD	462	421	187	189	1392	47	39	35	13	251	<0.001
Total PCDDs	515	468	203	211	1500	69	60	42	29	308	<0.001
2,3,7,8-TeuacDF	0.8	0.5	0.8	0.5	8.4	ND					
1,2,3,7,8-PentaCDF	ND					ND					
2,3,4,7,8-PentaCDF	6.6	6.1	3.0	0.5	20	4.8	4.3	2.3	2.4	18	<0.001
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	2.5	2.4	1.3	1.0	6.0	ND					
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	3.0	2.6	1.5	1.0	7.0	ND					
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	ND	1	0.4	1	3.7	ND					
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	ND					ND					
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDF	33	2.4	3.1	1	20	ND					
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	ND					ND					
OetaCDF	ND					ND					
Total PCDFs	22	20	7.8	9.5	52	15	14	3.9	12	38	<0.001
TriCB-77	16	12	43	5	475	ND					
TriCB-81	ND					ND					
PentaCB-126	42	37	23	5	142	34	29	20	5	156	0.003
HexaCB-169	29	26	15	5	86	20	18	9.8	5	64	<0.001
Total non-ortho PCBs	92	81	57	27	554	65	59	29	28	254	<0.001
PentaCB-105	1748	1555	945	317	5992	1715	1551	936	409	6952	0.741
PentaCB-114	427	386	242	144	1565	395	357	217	156	1708	0.188
PentaCB-118	7076	6448	3779	1814	25243	7060	6210	3853	1946	29091	0.923
PentaCB-123	137	119	80	5	497	115	101	70	17	531	0.026
HexaCB-156	2231	1966	1235	658	9422	1960	1709	1116	594	7839	0.018
HexaCB-157	541	487	318	184	2713	466	408	255	167	1858	0.011
HexaCB-167	866	788	481	300	3431	704	649	417	225	3184	<0.001
HeptaCB-189	276	239	154	29	950	172	156	96	57	671	<0.001
Total mono-ortho PCBs	13301	12259	6871	4541	49632	12586	11594	6712	4771	51833	0.258
TEQ from PCDDs	8.2	73	3.1	3.2	21	4.8	43	2	2.6	15	<0.001
TEQ from PCDFs	2.9	2.6	1.2	0.6	7.8	2	1.8	0.8	1.2	7	<0.001
TEQ from PCDDs/PCDFs	11	10	4.2	4.6	28	6.8	6.1	2.8	3.9	22	<0.001
TEQ from non-ortho PCBs	5.1	4.5	2.6	0.9	17	4	3.5	2.2	0.9	17	<0.001
TEQ from mono-ortho PCBs	0.4	0.4	0.2	0.1	1.5	0.4	0.3	0.2	0.1	1.6	0.258
TEQ from dioxin-like PCBs	5.5	3.8	2.5	1.1	14	4.4	3.9	2.4	1.1	19	0.397
Total TEQ	16.5	14	5.7	7	36.5	11.2	10	4.9	5.7	41.1	<0.001

ND: less than the determination limit

SD: standard deviation.

CDD: chlorinated dibenzo-p-dioxin.

CDF: chlorinated dibenzofuran.

CB: chlorinated biphenyl.

平成 20～22 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

表 3 初産婦119名の血液及び母乳中非ダイオキシン様PCB濃度

IUPAC#	Concentration (pg /g-lipid)										P Values
	Blood					Breast milk					
	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	
TriCB-28a	1320	1178	671	236	4665	890	813	508	5	2997	<0.001
TriCB-29	21	5	30	5	144	7	5	5	5	32	<0.001
TriCB-37	567	5	1799	5	16060	13	5	22	5	154	0.016
TetraCB-44	297	281	211	5	958	82	70	62	5	306	<0.001
TetraCB-47/48	403	393	259	5	1512	195	180	105	5	612	<0.001
TetraCB-49	202	180	137	5	642	71	57	62	5	365	<0.001
TetraCB-52/69a	823	719	617	5	4389	381	248	435	25	3073	<0.001
TetraCBs-56/60	324	299	178	5	923	265	228	168	23	1115	0.002
TetraCB-63	62	51	41	5	247	60	58	31	5	232	0.638
TetraCB-66	823	723	446	218	2210	817	717	439	151	3153	0.947
TetraCB-70	163	157	95	5	523	51	48	37	5	300	<0.001
TetraCB-71	96	69	90	5	442	29	11	35	5	196	<0.001
TetraCB-74	4011	3450	2272	1337	14083	4504	3829	2604	1593	20023	0.046
PentaCB-85	121	98	114	5	1083	80	70	55	5	317	<0.001
PentaCB-87	333	296	228	5	2071	198	177	111	69	795	<0.001
PentaCB-92	378	321	270	5	1977	326	284	232	22	1555	0.041
PentaCB-93/95/98	444	395	265	5	1696	249	207	175	5	1057	<0.001
PentaCB-99	5011	4613	2534	1748	18662	5164	4749	2572	1800	16596	0.551
PentaCB-101a	861	739	591	91	4390	748	621	516	90	3653	0.029
PentaCB-107/108	393	353	258	56	1676	386	335	246	85	1670	0.704
PentaCB-110	231	201	187	5	1524	113	94	97	13	771	<0.001
PentaCB-117	352	302	217	65	1453	256	217	171	25	1097	<0.001
HexaCB-128	446	346	475	5	4766	336	289	216	67	1219	0.006
HexaCB-130	2539	769	8749	5	77686	815	696	531	5	3674	0.424
HexaCB-132	133	107	130	5	708	96	79	89	5	496	0.007
HexaCB-134	18	5	23	5	129	14	5	18	5	115	0.125
HexaCB-135	190	165	124	5	665	165	138	115	5	621	0.046
HexaCB-137	911	816	492	329	4108	849	792	442	341	3194	0.232
HexaCB-138a	14771	13367	8030	5827	60524	13817	12190	7635	5481	52606	0.228
HexaCB-139/149	295	258	234	5	1367	271	230	183	5	1074	0.482
HexaCB-141	134	106	119	5	733	112	88	86	5	442	0.114
HexaCB-146	2596	2238	3041	5	17344	3458	3108	2083	913	14622	<0.001
HexaCB-147	164	146	122	5	874	155	126	115	5	834	0.306
HexaCB-151	499	397	470	97	3137	404	313	355	41	2337	0.023
HexaCB-153a	26823	24071	15442	9251	120172	24056	21295	14013	9000	100807	0.061
HexaCB-163/164	4950	4510	3010	1548	18475	4194	3850	2362	1267	16592	0.021
HexaCB-165	1249	5	1833	5	8699	5	5	0	5	5	<0.001
HeptaCB-170	5973	5025	4031	1370	24488	3491	3022	2158	1193	15721	<0.001
HeptaCB-172	924	748	634	179	3877	491	404	336	143	2570	<0.001
HeptaCB-177	1966	1670	1362	546	8373	1498	1306	1040	353	7877	0.001
HeptaCB-178	1774	1514	1134	547	7130	1212	1027	812	385	5858	<0.001
HeptaCB-179	94	73	100	5	658	94	71	82	5	469	0.57
HeptaCB-180a	17292	14216	11648	3619	75056	9283	7858	5964	2996	44516	<0.001
HeptaCB-181	36	25	36	5	196	16	14	13	5	66	<0.001
HeptaCB-182/187	8044	6721	5591	2134	36848	5082	3985	3786	1392	30335	<0.001
HeptaCB-183	2192	1853	1544	647	11206	1436	1231	992	521	8141	<0.001
HeptaCB-191	203	168	155	5	748	107	95	66	5	438	<0.001
OctaCB-194	1889	1622	1095	538	6552	834	694	563	248	4123	<0.001
OctaCB-195	489	433	297	83	2062	274	244	170	76	1227	<0.001
OctaCB-196/203	1915	1633	1136	456	7009	738	618	541	5	4045	<0.001
OctaCB-198/201	2249	1993	1287	478	6972	821	635	697	148	5186	<0.001
OctaCB-200	114	93	96	5	648	65	57	50	5	377	<0.001
OctaCB-202	574	477	357	125	2304	342	287	235	89	1798	<0.001
OctaCB-205	84	80	54	5	300	36	30	27	5	195	<0.001
NonaCB-206	592	523	340	5	2316	170	131	118	5	857	<0.001
NonaCB-207	136	112	98	5	631	38	30	29	5	196	<0.001
NonaCB-208	244	219	167	5	1125	75	62	59	5	465	<0.001
DecaCB-209	489	430	225	182	1501	694	58	6851	5	74800	<0.001
Total triCBs	1909	1415	1943	431	17655	910	823	509	45	3007	<0.001
Total tetraCBs	7205	6371	3237	2711	22698	6456	5747	3430	2445	27132	0.007
Total pentaCBs	8125	7388	4039	2721	28570	7521	6757	3849	2519	25609	0.129
Total hexaCBs	55718	48649	34027	19722	240156	48747	42148	27727	17687	196860	0.046
Total heptaCBs	38498	32552	25745	9399	167252	22710	19441	15020	7958	115855	<0.001
Total octaCBs	7313	6299	4190	1919	25789	3110	2629	2202	832	16951	<0.001
Total nonaCBs	972	875	570	308	3916	282	226	200	15	1519	<0.001
Total decaCBs	489	430	225	182	1501	694	58	6851	5	74800	<0.001
Total indicator PCBs	60571	54008	33553	20005	239416	48286	42698	27867	18427	200815	<0.001
Total PCBs	120228	105952	67291	42909	445249	90431	81267	51566	33513	366061	<0.001

a Indicator PCB; CB: chlorinated biphenyl; SD: standard deviation.

平成 20～22 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

表 4 出産年齢と血液及び母乳中PCDD、PCDF、ダイオキシン様PCB及び非ダイオキシン様PCB濃度のSpearmanの順位相関係数

Isomers	Blood		Breast milk	
	P	P Values	P	P Values
TEQ from PCDOs	0.385	<0.001	0.435	<0.001
TEQ from PCDFs	0.297	0.001	0.198	0.031
TEQ. from non-ortho PCBs	0.148	0.108	0.099	0.283
TEQ from mono-ortho PCBs	0.251	0.006	0.314	0.001
TEQ from dioxin-like PCBs	0.143	0.120	0.113	0.223
Total TEQ	0.305	0.001	0.261	0.004
Total indicator PCBs	0.479	<0.001	0.446	<0.001
Total non-dioxin-like PCBs	0.468	<0.001	0.435	<0.001

PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxin.

PCDF: polychlorinated dibenzofuran.

PCB: polychlorinated biphenyl.

表 5 血液及び母乳中PCDD、PCDF、ダイオキシン様PCB濃度と非ダイオキシン様PCB濃度の相関係数

Isomers	Pearson correlations		Spearman correlations	
	p	p Values	p	p Values
TEQ. from PCDDs	0.845	<0.001	0.806	<0.001
TEQ. from PCDFs	0.838	<0.001	0.808	<0.001
TEQ. from non-ortho PCBs	0.92	<0.001	0.899	<0.001
TEQ. from mono-ortho PCBs	0.789	<0.001	0.799	<0.001
TEQ from dioxin-like PCBs	0.678	<0.001	0.727	<0.001
Total TEQ.	0.827	<0.001	0.83	<0.001
Total triCBs	0.501	<0.001	0.503	<0.001
Total tetraCBs	0.818	<0.001	0.715	<0.001
Total pentaCBs	0.846	<0.001	0.824	<0.001
Total hexaCBs	0.859	<0.001	0.854	<0.001
Total heptaCBs	0.779	<0.001	0.883	<0.001
Total octaCBs	0.716	<0.001	0.846	<0.001
Total nonaCBs	0.682	<0.001	0.785	<0.001
Total indicator PCBs	0.857	<0.001	0.881	<0.001
Total PCBs	0.868	<0.001	0.88	<0.001

PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxin.

PCDF: polychlorinated dibenzofuran.

PCB: polychlorinated biphenyl.

平成 20～22 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

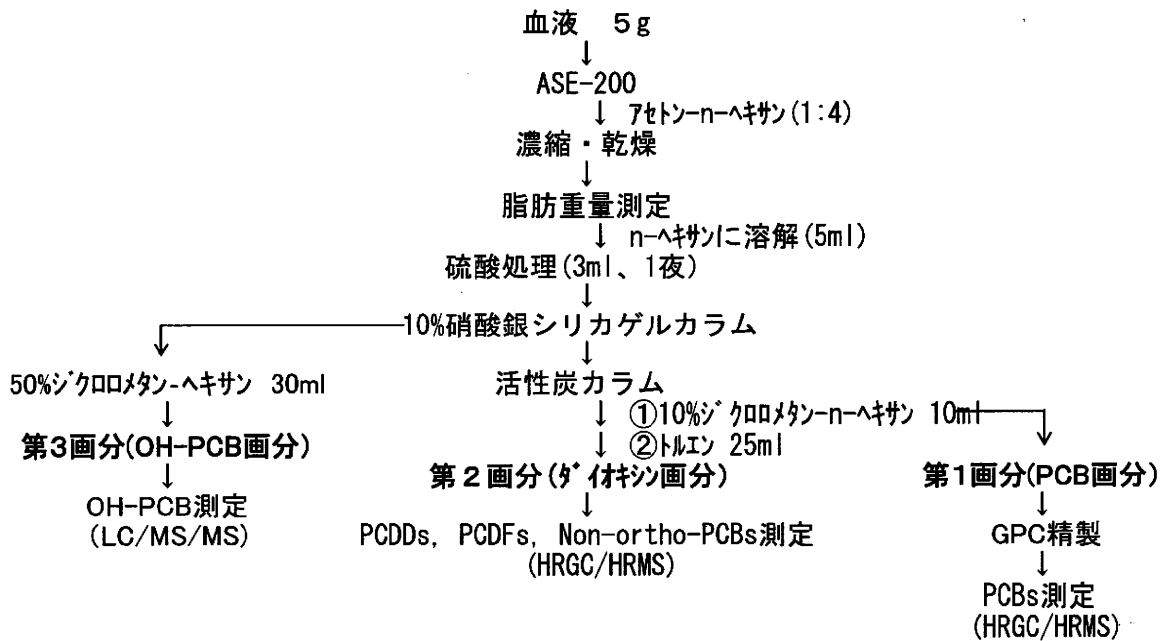


図1 ダイオキシン、PCB,OH-PCB一斉分析法フロー

表 6 LC/MS/MSによるOH-PCB測定条件

Instrument	LC: UPLC(Waters) MS/MS: XEVO(Waters)
Flow Rate	0.2 mL/min.
Injection Volume	10 μ L
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C
Mobile Phase	0.1% Formic acid : Methanol = 40 : 60 \rightarrow 10 : 90 linear gradient
Temperature; Source	120 $^{\circ}$ C
Desolvation	350 $^{\circ}$ 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

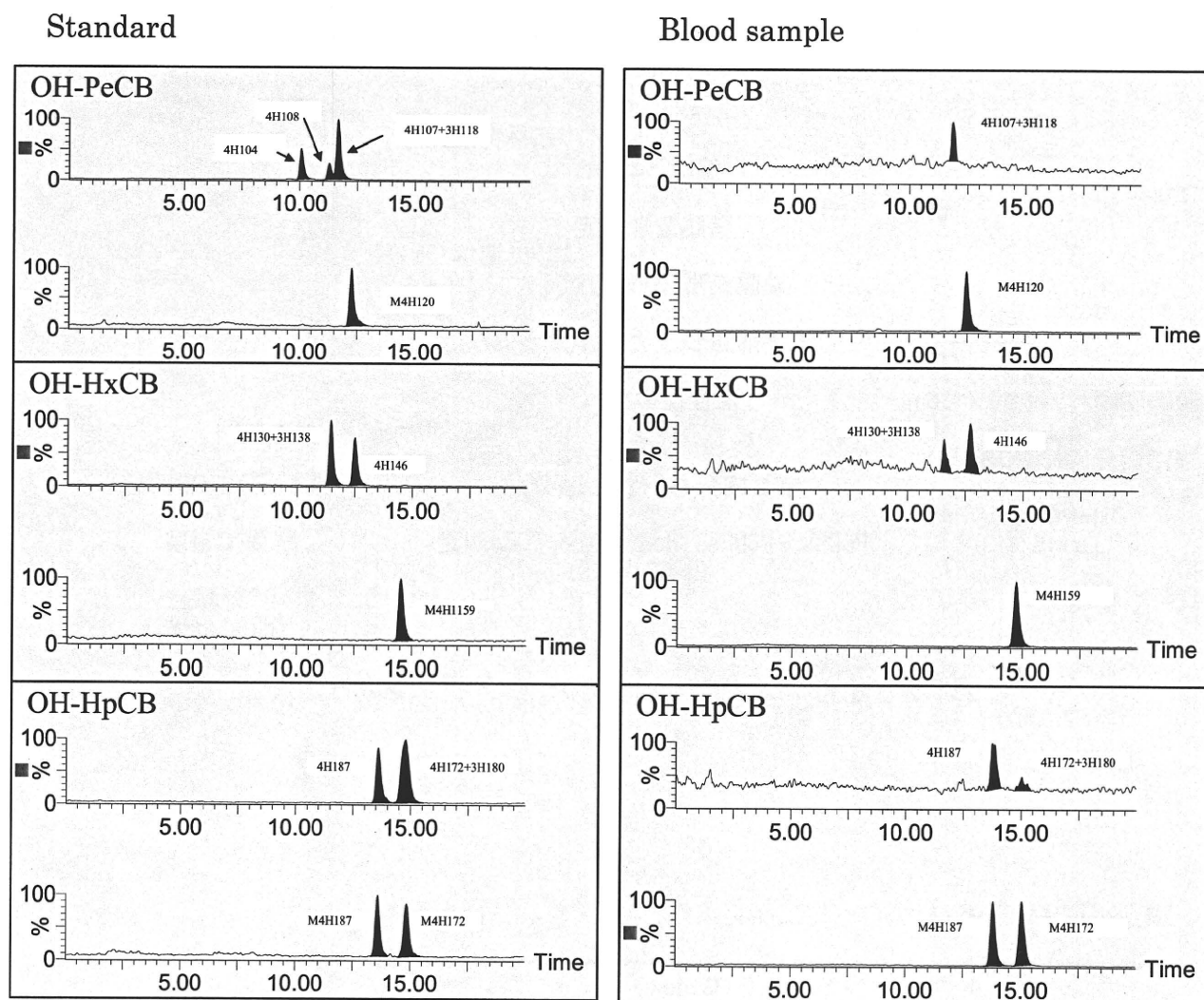


図 2 OH-PCB の LC/MS/MS クロマトグラム

表 7 血液中OH-PCB濃度

	OH-PCB	Blood ¹⁾ (pg/g)	Range ²⁾ (pg/g)
PeCB-OH	4-OH-CB107	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

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(2)

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)

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

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。

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ことができた。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.
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 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

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

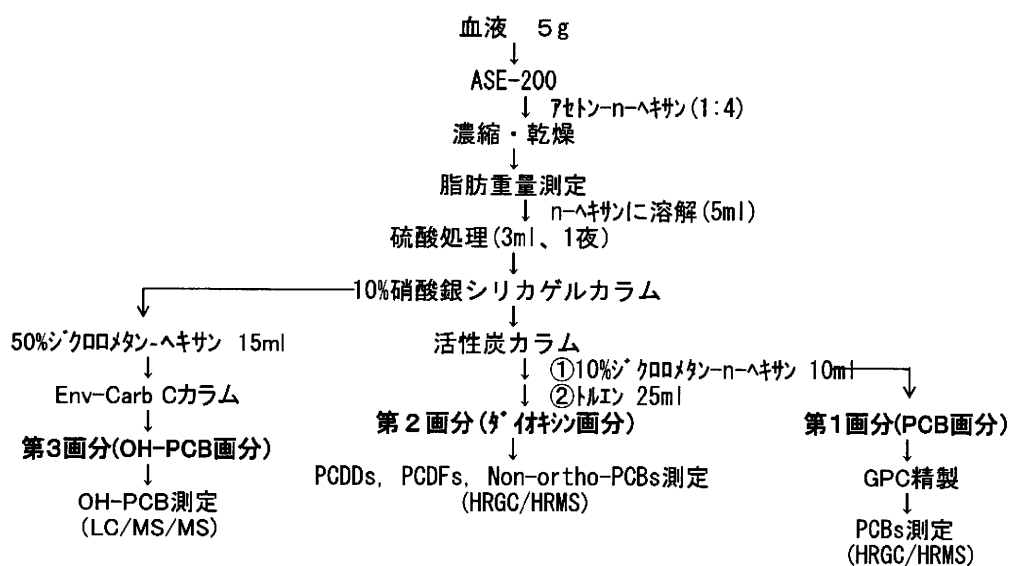


Figure 1. Flow chart of the measurement method for PCDDs, PCDFs, PCBs and OH-PCBs in blood samples.

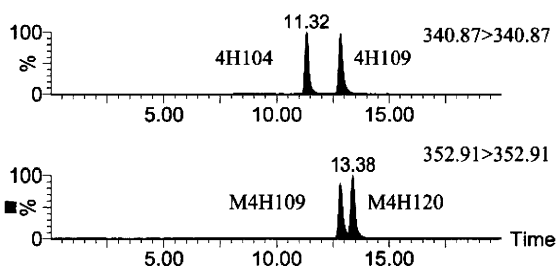


Figure 2. LC/MS/MS chromatograms of 8 ng/mL OH-PeCB standards

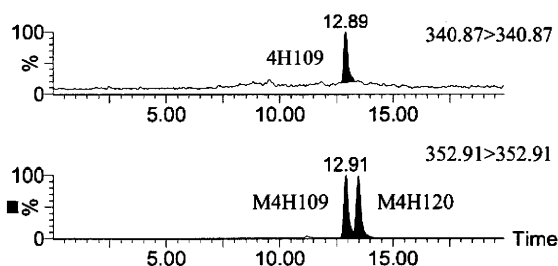


Figure 5. LC/MS/MS chromatograms of OH-PeCBs in human blood

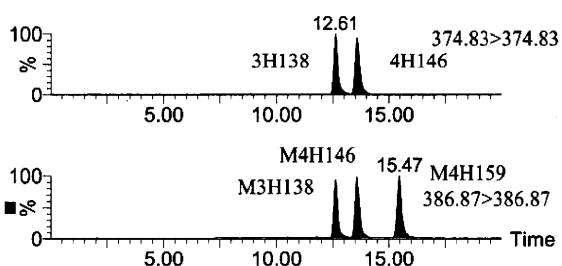


Figure 3. LC/MS/MS chromatograms of 8 ng/mL OH-HxCB standards

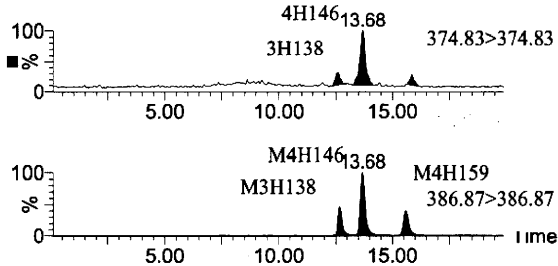


Figure 6. LC/MS/MS chromatograms of OH-HxCBs in human blood

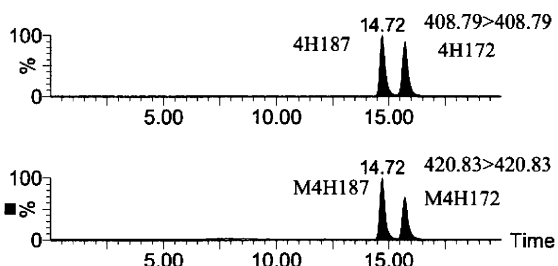


Figure 4. LC/MS/MS chromatograms of 8 ng/mL OH-HpCB standards

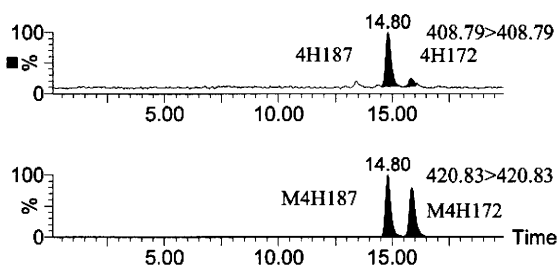


Figure 7. LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCBs in human blood

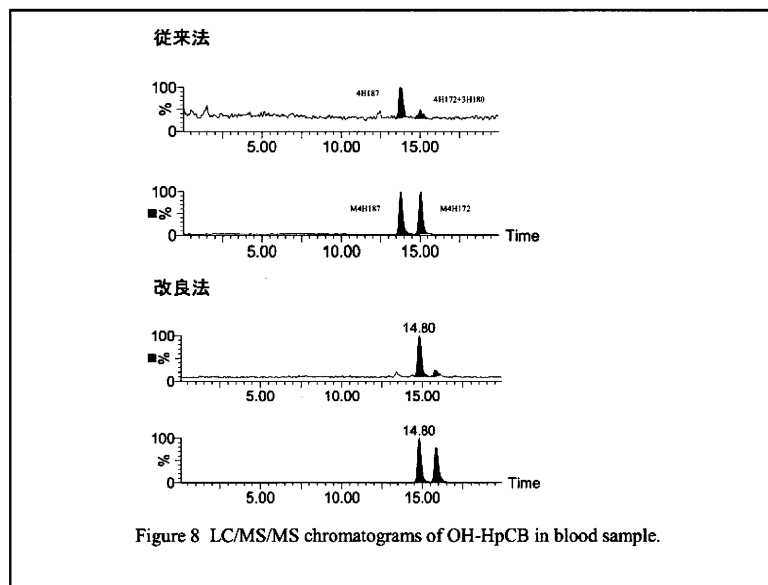


Figure 8 LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCB in blood sample.

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)の分析法の開発(1)

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

ビスフェノール A(BPA)および 4-ノニルフェノール(NP)はヒトに対する健康影響が示差されているが、ヒト血液中の濃度は低濃度であり、現在の所必ずしも確からしい結果で議論されているとは言えない状況にある。本研究ではヒト血液中の BPA および NP を正確に且つ議論可能な濃度レベルで測定する手法を開発することを目的とした。同位体希釈 LC/MS/MS 法を採用し、検討した結果、血中 BPA の分析方法が確立できた。NP については試薬等由来のブランク値が高く、今後の検討課題となった。

研究協力者

山本 潤， 菅木 洋一， 水谷 太
(いであ株式会社 環境創造研究所)

血中の BPA および NP を現在の科学技術レベルにおいて可能なかぎり正確に測定する方法を開発するものである。

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、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、酸化防止剤の TNPP(Tri nonyl phenyl phosphate)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。近年、BPA については尿道下裂との関連性についていくつか報告がなされているが、血中濃度は低濃度であり、有意な濃度差を観測する為には精確な測定値が必要と考えられる。本研究では

B. 研究方法

BPA および NP の分析法としては、ELIZA 法、誘導体化 GC/MS)法、LC/MS)法が考えられるが、本研究では結果が正確で、且つ低濃度に対応可能な感度を得られる手法として内標準物質を用いた同位体希釈 LC/MS/MS 法を採用し、各種基礎試験を行った。基本的な血液中の BPA および NP 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、検討においては、BPA はビスフェノール A-d₁₆(BPA-d₁₆)をクリーンアップスパイク内標準物質、ビスフェノール A-2,2',6,6'-d₄(BPA-d₄)をシリンジスパイク内標準物質として使用し、NP はシリンジスパイク内標準物質として 4-(1-メチル)オクチルフェノール-d₅(Me-OP-d₅)を用いた。対象物質のピーク形状、保持時間等を考慮し、BPA と NP は別々の条件で測定を行った。

C. 研究結果

(1)添加回収試験

添加回収試験の結果を表 2 に示す。検討には 2 種類の血液試料を用い、添加量は、BPA で 0.5ng, NP で 30ng とした。試験の結果、BPA については、良好な回収率を得ることができた。NP については、添加試料と無添加試料を比較した場合、良好な回収率を得ることができたが、操作ブランクが高い値を示した。なお、今回の測定ではクリーンアップスパイクとして用いた Me-OP-d₅ の感度変動が大きかったため、NP については、Me-OP-d₅ による補正なしの値を記載してある。

(2) 下限値等の算出

標準溶液の繰り返し測定による装置検出限界(IDL)の算出を行った。結果を表 3 に示す。また、添加回収試験結果より、操作ブランク値が検出されたため、操作ブランクの繰り返し測定を行い、検出下限値、定量下限値の算出を行った。結果を表 4 に示す。

(3) 試料の分析

検討試料(10 検体および採血管 2 種類)について図 1 に示す分析フローにしたがって前処理を行い、LC/MS/MS で測定した。その結果を表 5 に示す。NP については、Blank 中の濃度と試料の濃度が同程度(IS 補正值は、(Blank)>(試料))であった。BPA については、試料の濃度が低濃度であることが予想された。

(4) ブランクレベルの検討

① 溶媒ブランク

前処理を行ううえで、NP については操作ブランクが問題になる可能性が高いため、使用する可能性がある溶媒についてブランクの確認を行った。各種溶媒を 10mL ずつ量りとり、窒素ガス(40℃)で 1mL まで濃縮後、内標準として Me-OP-d₅ を 10ng 添加して測定を行った。その結果を表 6 に示す。LC 分析でよく用いられるメタノールやアセトニトリルについては、0.2～0.3ng/mL

であった。また、アセトンについては、これらと同様に低濃度であった。原則として、BPA および NP の分析において用いることはないと考えられるが、その他の溶媒からは高濃度で検出されており、前処理に用いることができる方法もかなり限られてくると考えられた。前処理において、固相からの溶出の際、アセトニトリル 5mL を使用するが、0.2～0.3ng/mL の NP を含んでいるため、試料濃度の内、1～1.5ng/mL はアセトニトリルに起因すると考えられる。

② 水およびカートリッジのブランク

『固相カートリッジ』については、アセトニトリル 10mL(*)で洗浄を行った後、アセトニトリル 5mL で溶出を行い、それを窒素ガス(40℃)で 0.5mL まで濃縮を行って測定を行った。『水』の影響については、あらかじめアセトニトリル 10mL と水 5mL でコンデショニングした固相カートリッジを 2 連にし、水 10mL を通液する。10mL のシリンジで脱水を行った後、アセトニトリル 5mL で溶出し、その他の試料と同じように 0.5mL まで濃縮を行って測定した。比較対象として、アセトニトリル 5mL を 0.5mL まで濃縮して測定した。結果を表 7 に示す。それぞれの試料で、NP の濃度が同程度で検出されており、Blank の要因が水やカートリッジよりもアセトニトリルの影響が大きいと考えられた。これらの結果より、使用するアセトニトリルの量(現状は 5mL で溶出)を減らすため、NP の溶出に必要なアセトニトリルの量について検討を行った。血液試料 1mL に BPA 5ng, NP 50ng を添加したものを前処理、測定した。溶出過程において、溶出液を 1mL ごとに分画し、各画分に溶出する目的物質の全体に対する比率を求めた。結果を表 8 に示す。

BPA の前処理において、濃縮率を上げて測定感度の向上を図るための検討を行った。

BPA については、現在、0.5mL までの濃縮を行っているが、0.2mL まで濃縮を行い、現在の方法との比較検討を行った(表 9)。

D. 考察

BPA については開発した手法で実試料に適応可能な状況になったと考える。NP については各種ブランク値が実試料中の評価すべき濃度に比較してまだ高濃度であり、今後の検討課題としてブランク値を下げる工夫が必要である。現在試薬類の蒸留精製によって NP のブランク値を減じる方法を検討中である。

E. 結論

ヒト血液中の BPA および NP を正確に且つ議論可能な濃度レベルで測定する手法を開発するために、同位体希釈 LC/MS/MS 法で検討した結果、血中 BPA の分析方法は確立できたが、NP については試薬等由来のブランク値が高く、今後の検討課題となった。

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

(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

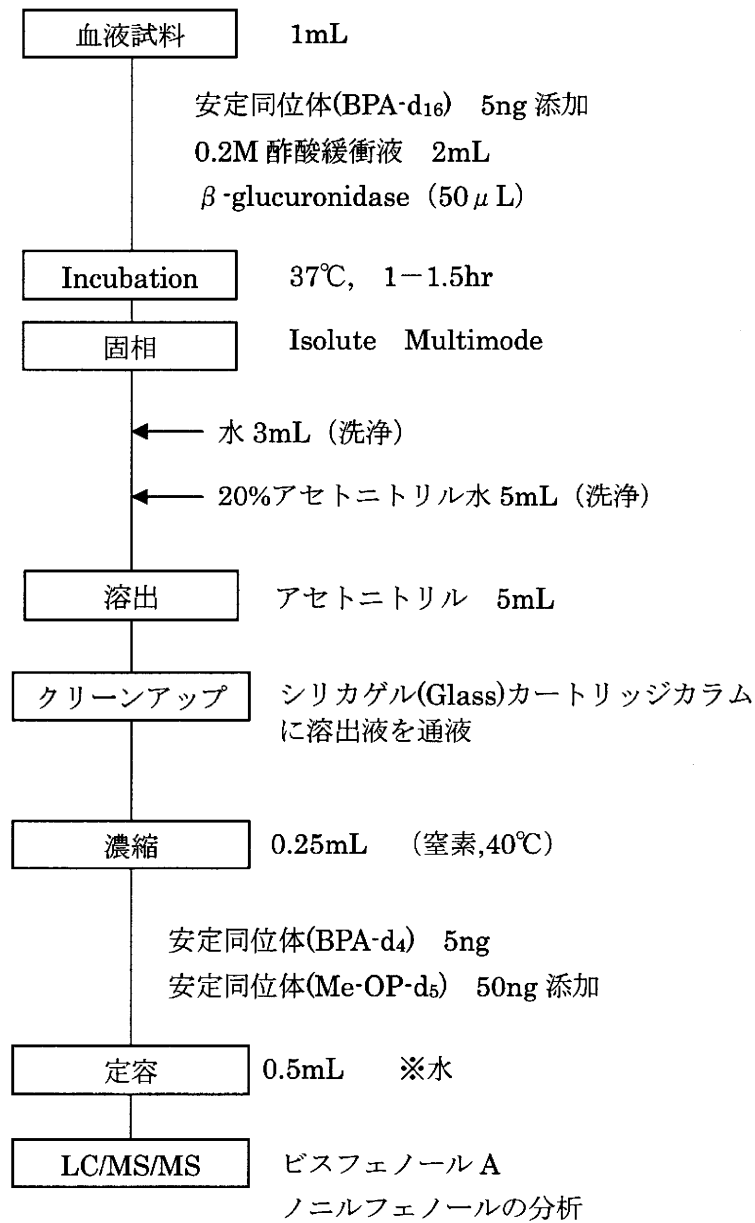


図 1. 血液中の BPA, NP の分析フロー

平成 20～22 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

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)

平成 20～22 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

表 2. 血液中の BPA, NP の添加回収試験結果

物質名	操作ブラン ク (ng/mL)	試料 1		試料 2	
		無添加 (ng/mL)	添加 (ng/mL)	無添加 (ng/mL)	添加 (ng/mL)
BPA	0.06	0.16	0.69	0.14	0.70
NP	6.4	3.6	35	2.9	32

備考 1) 添加量...BPA : 0.5ng, NP : 30ng

備考 2) NP は内標準物質による補正なし

表 3. 標準溶液繰り返し測定による IDL の算出

項 目	BPA (ng/mL)	NP (ng/mL)
試料 1	0.102	1.33
試料 2	0.0959	1.34
試料 3	0.105	1.67
試料 4	0.106	1.50
試料 5	0.116	1.59
試料 6	0.105	1.48
試料 7	0.0897	1.45
平 均	0.103	1.48
標準偏差	0.00838	0.123
IDL	0.0326	0.477
IDL 試料換算値	0.0163	0.239

備考 1) $IDL = (\text{標準偏差}) \times t \text{ 値} \times 2$, $t = 1.943$

備考 2) IDL 試料換算値は試料量 1mL, 最終液量 0.5mL として計算した

表 4. 操作ブランクの繰り返し測定による下限値の算出

項目	BPA (ng/mL)	NP (ng/mL)
試料 1	0.0709	1.43
試料 2	0.0764	2.15
試料 3	0.0821	3.32
試料 4	0.0762	1.19
試料 5	0.0509	1.79
試料 6	0.0791	1.09
試料 7	0.0926	1.24
平均	0.0754	1.74
標準偏差	0.0128	0.789
検出下限値	0.0497	3.07
定量下限値	0.128	7.90

備考 1) 検出下限値=(標準偏差) \times t 値 \times 2, t=1.943

備考 2) 定量下限値=(標準偏差) \times 10

表 5. 検討試料の BPA, NP の分析結果

試料名	BPA (ng/mL)	NP (ng/mL)
操作ブランク 1	0.085	2.7
操作ブランク 2	0.114	2.3
採血管ブランク(緑)	0.049	2.9
採血管ブランク(茶)	0.050	1.9
試料 1	0.211	2.8
試料 2	0.119	5.1
試料 3	0.107	3.3
試料 4	0.090	5.0
試料 5	0.810	2.5
試料 6	0.240	3.8
試料 7	0.678	2.7
試料 8	0.167	2.2
試料 9	0.545	3.1
試料 10	0.173	2.7

表 6. NP の溶媒ブランク

溶媒の種類	試料 1	試料 2	試料 3	平均
メタノール(HPLC 用)	0.24	0.23	0.17	0.21
アセトニトリル(HPLC 用)	0.24	0.31	0.22	0.26
アセトニトリル(HPLC 用)	0.17	—	—	0.17
アセトニトリル(LC/MS 用)	0.19	—	—	0.19
アセトン (残農 300)	0.19	0.18	—	0.18
ジクロロメタン (残農 5000)	5.00	5.28	—	5.14
クロロホルム	6.95	7.39	—	7.17
ヘキサン (残農 5000)	3.80	4.12	—	3.96
ヘキサン (ダイオキシン用)	4.43	4.73	—	4.58
ヘキサン (フタル酸エステル用)	4.11	4.29	—	4.20
トルエン (残農 5000)	24.85	—	—	24.85
トルエン (試薬特級を蒸留)	20.40	—	—	20.40

表 7. NP のブランクに関する検討

検討項目	試料 1 (ng/mL)	試料 2 (ng/mL)	試料 3 (ng/mL)	平均 (ng/mL)
① アセトニトリル	1.21	0.90	1.00	1.04
② カートリッジ	0.91	0.88	0.94	0.91
③ 水(Front)	1.07	0.90	1.02	0.99
④ 水(Back)	1.01	1.03	1.02	1.02

① アセトニトリル：アセトニトリルを濃縮したもの

② カートリッジ：カートリッジを通液したアセトニトリルを濃縮したもの

③ 水 10mL を用いた後、アセトニトリルで溶出、濃縮を行ったもの

※ 評価は内標として Me-OP-d5 を添加し、内標準法を用いて計算した。

※ 結果は、試料 1mL を使用して前処理を行ったときにそれぞれの操作で含まれる NP の量を試料換算したもので評価を行った。