

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 8. 固相抽出用カートリッジ(M-M)からの BPA, NP の溶出

物質名	0～1mL (%)	1～2mL	2～3mL	3～4mL	4～5mL	Total
BPA	24.3	74.0	1.7	0	—	100
NP	6.1	89.0	3.7	0.7	0.5	100

※ 5分画の合計を 100%とした

表 9. 濃縮率による BPA の感度低下

	標準液	Blank	血液	Blank(0.2mL)	血液 (0.2mL)
BPA-d4 の Area	100	79.4	61.1	72.2	42.3

※ 評価は内標準物質 BPA-d4 を用い、標準液中の BPA-d4 の Area を 100(%)とし、各試料の BPA-d4 の Area と比較した。

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(2)

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 に的を絞り、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ある(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。フリッツとしては、交換用フリッツ(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。

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
- (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

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

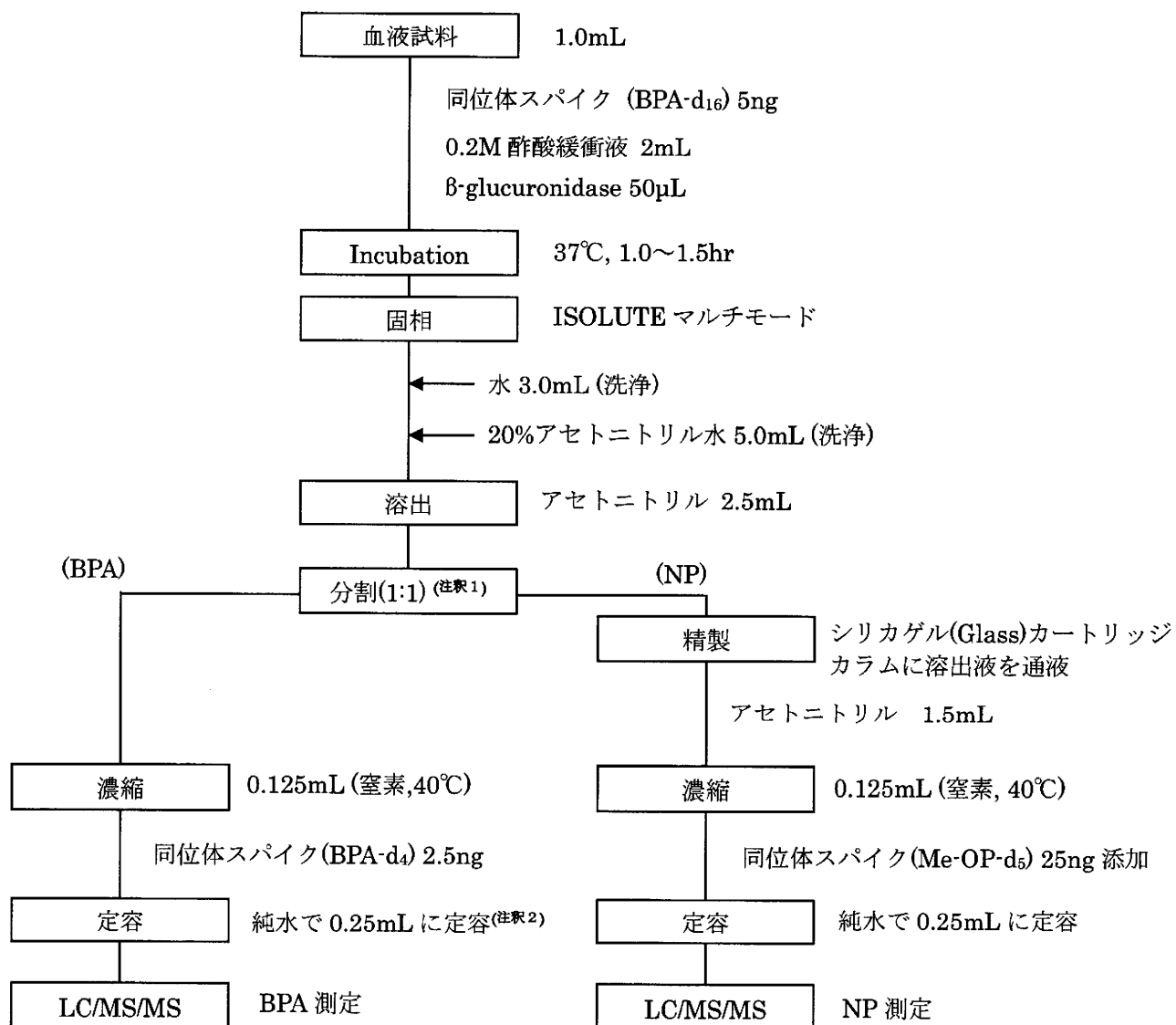


図 1. 血液中の BPA の分析フロー

(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。

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)

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。

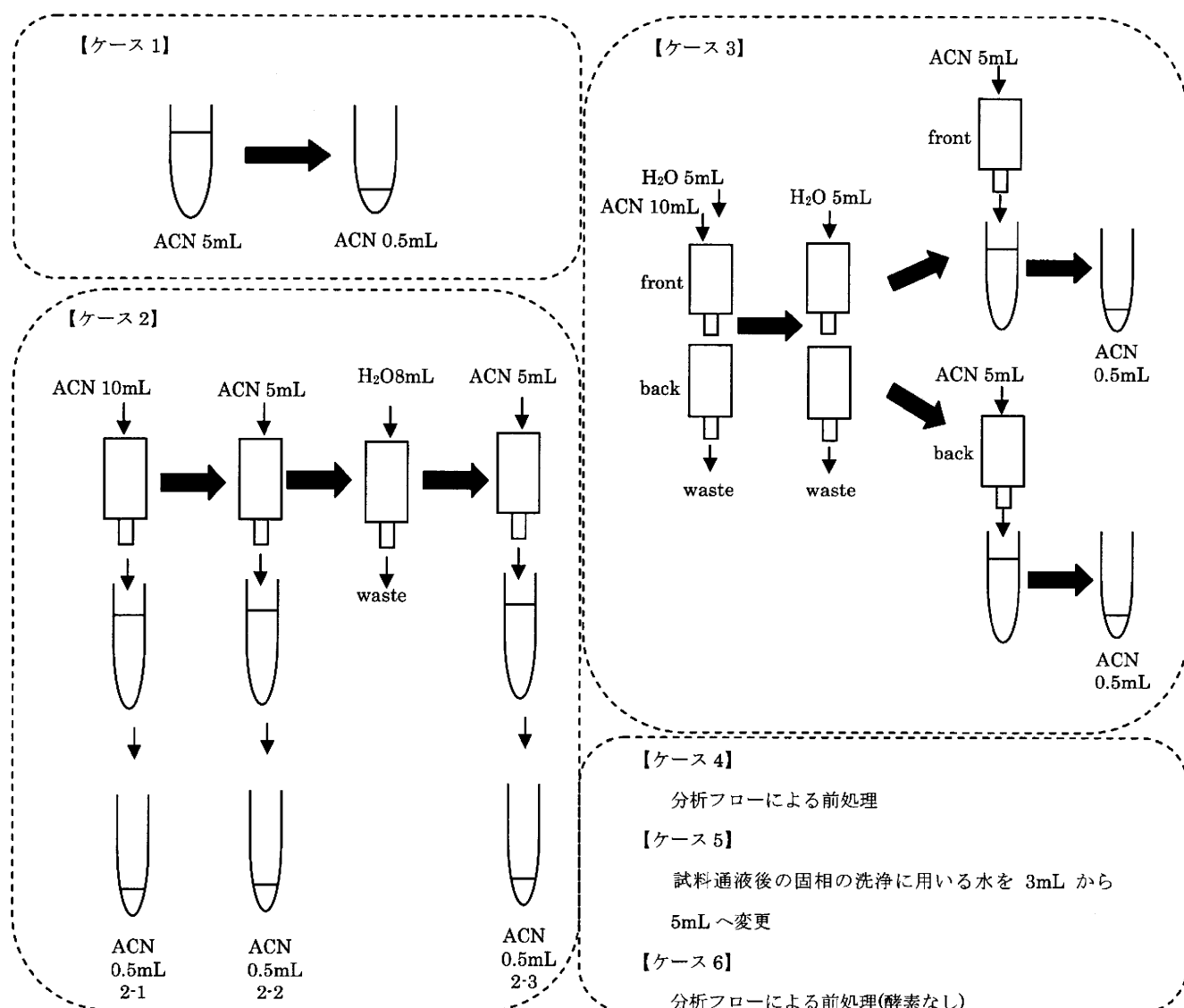


図 2. BPA ブランク検討のための検討ケースイメージ

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. 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。

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 5. コンデショニング方法によるブランク値 (ng/mL)

ケース	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	平均
ケース 1	0.028	0.026	0.018	0.024	0.025	0.024	0.024
ケース 2	0.052	0.055	0.087	—	—	—	0.064
ケース 3	0.050	0.077	0.059	—	—	—	0.062
ケース 4	0.069	0.061	0.056	—	—	—	0.062
ケース 5	0.068	0.071	0.056	—	—	—	0.065
ケース 6	0.075	0.073	0.074	—	—	—	0.074
ケース 7	0.10	0.077	0.085	—	—	—	0.088

【備考】

()内は試験実施日

ケース 1 : アセトン 10mL,メタノール 10mL,アセトニトリル 10mL,水 5mL(2010年6月9日)

ケース 2 : アセトン 10mL,メタノール 10mL,アセトニトリル 10mL,水 5mL(2010年6月15日)

ケース 3 : アセトン 10mL,アセトニトリル 10mL,水 5mL(2010年6月15日)

ケース 4 : メタノール 10mL,アセトニトリル 10mL,水 5mL(2010年6月15日)

ケース 5 : アセトニトリル 10mL,水 5mL(2010年6月15日)

ケース 6 : アセトン 10mL,メタノール 10mL,アセトニトリル 10mL,水 5mL,2時間放置(2010年6月15日)

ケース 7 : アセトン 10mL,アセトニトリル 10mL,水 5mL,2時間放置(2010年6月15日)

表 6.カートリッジカラム(ISOLUTE マルチモード)の部品別ブランク値 (ng/mL)

溶媒の種類	試料 1	試料 2	試料 3	平均
充填剤	0.037	0.055	0.032	0.041
フリット	0.032	0.049	0.078	0.053
カートリッジ	5.0	7.8	5.3	6.1
コントロール(アセトニトリル) ^(注釈1)	0.076	0.046		0.061

(注釈1) 充填剤, フリットおよびカートリッジのアセトニトリル浸出試験と同様にアセトニトリルのみで試験を行った。

表 7. カートリッジの種類による BPA のブランク (ng/mL)

溶媒の種類	試料 1	試料 2	試料 3	平均
ケース 1	2.4	0.23	1.4	1.3
ケース 2	1.7	1.6	3.2	2.2
ケース 3	0.014	0.0082	0.033	0.018
ケース 4	0.0066	0.014	0.028	0.016

【備考】

ケース 1: 固相充填済み樹脂製カートリッジカラム (ISOLUTE マルチモード) をコンデショニングして使用

ケース 2: 固相充填済み樹脂製カートリッジカラム (ISOLUTE マルチモード) をアセトニトリルおよび 20% アセトニトリル水で洗浄後、コンデショニングして使用

ケース 3: 樹脂製カラム (RESERVOIR-1 THK FRIT, 6mL CAPACITY, VARIAN 社製; 12131015) に ISOLUTE マルチモードの樹脂を充填してコンデショニングして使用

ケース 4: ガラス製カラム (6mL ガラスチューブ, テフロンフリッツ 1 枚挿入済み, SUPELCO 社製; 504394) に ISOLUTE マルチモードの樹脂 (中身) を詰め替えてコンデショニングして使用

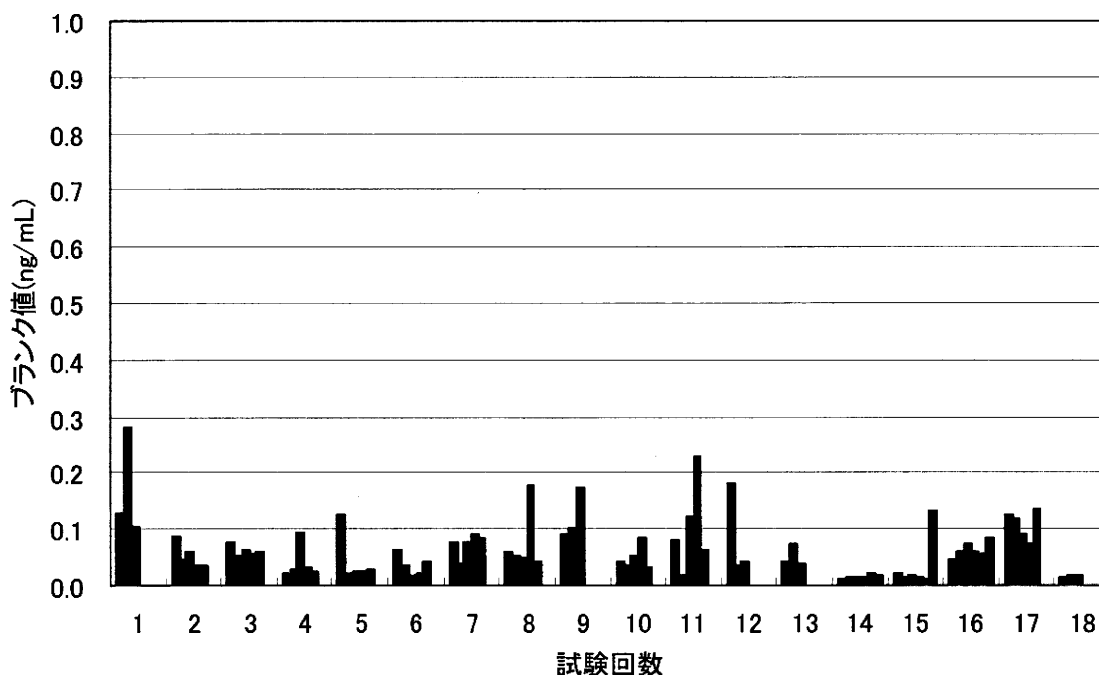


図 3. ガラス製カラム (6mL ガラスチューブ, テフロンフリッツ 1 枚挿入済み, SUPELCO 社製; 504394) に ISOLUTE マルチモードの樹脂 (中身) を詰め替えたカラムを用いた全操作ブランク値の履歴

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

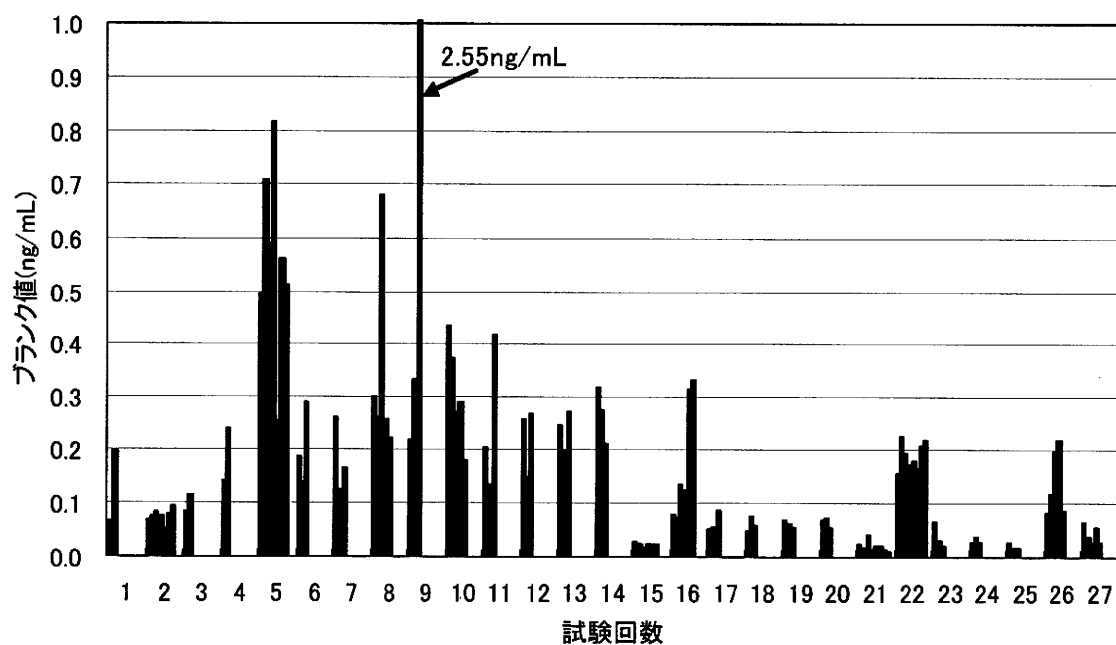


図 4. ISOLUTE マルチモードカラムを用いた全操作空白値の履歴

妊婦の喫煙と血中ダイオキシン類濃度との関連

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 吉岡 英治 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

ダイオキシン類と称される Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs)は、母から児への子宮内曝露や母乳を介した曝露も懸念されている。また、喫煙による体内のダイオキシン類濃度が低下することが指摘されている。そのため、本研究では、妊娠中の喫煙状況と妊娠中の血中ダイオキシン類濃度との関連を異性体レベルで調べた。その結果、喫煙による血中 1,2,3,4,7,8-HxCDD (adjusted e^{β} =0.809, 95% CI: 0.677 to 0.967), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (adjusted e^{β} =0.742, 95% CI: 0.645 to 0.851), 2,3,7,8-TCDF (adjusted e^{β} =0.843, 95% CI: 0.710 to 1.000), 1,2,3,4,7,8-HxCDF (adjusted e^{β} =0.817, 95% CI: 0.678 to 0.985), 1,2,3,6,7,8-HxCDF (adjusted e^{β} =0.809, 95% CI: 0.669 to 0.979), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (adjusted e^{β} =0.733, 95% CI: 0.558 to 0.964), 33'44'-TCB(#77) (adjusted e^{β} =0.802, 95% CI: 0.663 to 0.969), 33'44'5-PeCB(#126) (adjusted e^{β} =0.640, 95% CI: 0.518 to 0.792), 2'344'5-PeCB(#123) (adjusted e^{β} =0.602, 95% CI: 0.478 to 0.760), 23'44'5-PeCB(#118) (adjusted e^{β} =0.773, 95% CI: 0.638 to 0.935) および 233'44'-PeCB(#105) (adjusted e^{β} =0.745, 95% CI: 0.614 to 0.904)の 11 異性体濃度への有意な負の影響がみられた。また、妊娠 13 週以前の喫煙による血中 2,3,7,8-TCDD (adjusted e^{β} =0.799, 95% CI: 0.680 to 0.939), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (adjusted e^{β} =0.873, 95% CI: 0.779 to 0.978), 2,3,7,8-TCDF (adjusted e^{β} =0.852, 95% CI: 0.740 to 0.981)および 33'44'5-PeCB(#126) (adjusted e^{β} =0.809, 95% CI: 0.679 to 0.964)の 4 異性体濃度に対する有意な負の影響も明らかになった。今後、妊娠中の喫煙によるダイオキシン類濃度の低下に対する詳細な機構を明らかにする必要がある。

研究協力者

坂 晋, 佐々木 成子, 金澤 文子,
鷺野 考揚, 小西 香苗, 馬場 俊明,
宮下 ちひろ, Yila Thamar, Braimoh
Titilola, 樫野 いく子, 岡田 恵美子,
小林 澄貴, 大竹 裕子, 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)
吉村 健清, 千々和 勝己, 黒川 陽一
平川 博仙, 堀 就英, 中川 礼子,

芦塚 由紀, 新谷 依子, 小野塚 大介
飛石 和大, 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

ダイオキシン類と称される

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) は、その構造から環境中に蓄積し、催奇形性、神経発達低下、内分泌かく乱、発がんなど様々な影響が示されているばかりでなく、母から児への子宮内曝露や母乳を介した曝露も懸念されている。

たばこの煙には、200 種以上の毒物ならびに 20 種以上の発がん物質をはじめとした 4000 種以上の化学物質が含有されている。また、喫煙による体内のダイオキシン類濃度が低下することが指摘されている。

これらのことから、本研究では、妊娠中の喫煙状況と妊娠中の血中ダイオキシン類濃度との関連を異性体レベルで調べた。

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。リクルート時に自記式調査票にて、対象者の基本属性を得るとともに、妊娠中期における喫煙状況（妊娠時に非喫煙、妊娠判明時に禁煙、喫煙）の情報を得た。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、平均値を用いた。また、採血した血液を用いて、血中ダイオキシン類を測定した。血中ダイオキシン類の測定を実施した 426 名のうち、異常値を示した者(1 名)、出産後に採血した者(130 名)を本研究から除外した。また、妊娠 14 週以降に禁煙した者(10 名)、血清コチニン値不明者(12 名)、自記式調査票における喫煙状況と血清コチニン値が一致しない者(10 名)を除外した。その結果、263 名を本研究の解析対象者とした。

（倫理面への配慮）

本研究は、北海道大学大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施し、インフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。

C. 研究結果

対象者の基本属性を表 1 に示した。対象者の平均年齢は 30.6±4.4 歳であった。非喫煙者、妊娠 13 週以前に禁煙した者、喫煙者はそれぞれ 173 名(65.8%)、53 名(20.2%)および 37 名(14.1%)であった。これら 3 群間における教育歴ならびに世帯収入において、有意な差が認められた($p < 0.01$ ならびに $p < 0.05$)。また、喫煙群のカフェイン摂取量が、他の 2 群と比較して有意に高い結果が得られた。年齢、BMI、アルコール摂取量、推定魚介類摂取量および測定年に関して、3 群間で有意な差は認められなかった。

対象者の血中ダイオキシン類濃度を測定した結果を表 2 に示した。血中の PCDDs, PCDFs, PCDD/PCDFs, *non-ortho* PCBs, *mono-ortho* PCBs, DL-PCBs および total dioxins の幾何平均濃度(範囲)(pg/lipid)はそれぞれ 501.4(101.5-1602.4), 19.8(9.5-192.4), 522.3(112.4-1637.4), 73.4(20.0-281.7), 10925.7(1777.8-36382.2), 11028.4(1797.8-36569.8) および 11603.6(2105.0-37694.5)であった。また、PCDDs, PCDFs, PCDD/PCDFs, *non-ortho* PCBs, *mono-ortho* PCBs, DL-PCBs および total dioxins の WHO2005TEQ 換算濃度(範囲)(TEQ pg/lipid)の幾何平均(範囲)はそれぞれ 6.8(1.6-17.5), 2.5(0.6-7.8), 9.3(2.5-25.1), 4.0(0.6-23.2), 0.3(0.0-1.1), 4.3(0.7-23.9) および 13.8(3.2-42.9)であった。

Table 3 に喫煙による血中ダイオキシン類濃度への影響に対する重回帰分析の結果を示した。喫煙による血中 PCDFs

(adjusted e^{β} =0.854, 95% CI; 0.749 to 0.972), *non-ortho* PCBs (adjusted e^{β} =0.797, 95% CI; 0.686 to 0.927), *mono-ortho* PCBs (adjusted e^{β} =0.836, 95% CI; 0.702 to 0.996), DL-PCBs (adjusted e^{β} =0.836, 95% CI; 0.702 to 0.995), total dioxins (adjusted e^{β} =0.826, 95% CI; 0.715 to 0.953)濃度への有意な負の影響がみられた。また、喫煙による血中 *non-ortho* PCBs TEQ (adjusted e^{β} =0.704, 95% CI; 0.579 to 0.856), *mono-ortho* PCBs TEQ (adjusted e^{β} =0.832, 95% CI; 0.698 to 0.992), DL-PCBs TEQ (adjusted e^{β} =0.714, 95% CI; 0.589 to 0.866), total dioxins TEQ (adjusted e^{β} =0.826, 95% CI; 0.715 to 0.953)濃度への有意な負の影響も明らかになった。禁煙群における血中ダイオキシン類濃度への影響は認められなかった。

Table 4 に喫煙による血中ダイオキシン類各異性体濃度への影響に対する重回帰分析の結果を示した。1,2,3,7,8-PeCDF, 2,3,4,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,7,8,9-HxCDF, 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF, OCDF, and 344'5-TCB(#81)の各異性体では、それぞれ 90%以上のサンプルが下限値以下であったため、本解析では使用しなかった。解析の結果、喫煙による血中 1,2,3,4,7,8-HxCDD (adjusted e^{β} =0.809, 95% CI; 0.677 to 0.967), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (adjusted e^{β} =0.742, 95% CI; 0.645 to 0.851), 2,3,7,8-TCDF (adjusted e^{β} =0.843, 95% CI; 0.710 to 1.000), 1,2,3,4,7,8-HxCDF (adjusted e^{β} =0.817, 95% CI; 0.678 to 0.985), 1,2,3,6,7,8-HxCDF (adjusted e^{β} =0.809, 95% CI; 0.669 to 0.979), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (adjusted e^{β} =0.733, 95% CI; 0.558 to 0.964), 33'44'-TCB(#77) (adjusted e^{β} =0.802,

95% CI; 0.663 to 0.969), 33'44'5-PeCB(#126) (adjusted e^{β} =0.640, 95% CI; 0.518 to 0.792), 2'344'5-PeCB(#123) (adjusted e^{β} =0.602, 95% CI; 0.478 to 0.760), 23'44'5-PeCB(#118) (adjusted e^{β} =0.773, 95% CI; 0.638 to 0.935) および 233'44'-PeCB(#105) (adjusted e^{β} =0.745, 95% CI; 0.614 to 0.904)の 11 異性体濃度への有意な負の影響がみられた。また、妊娠 13 週以前の喫煙による血中 2,3,7,8-TCDD (adjusted e^{β} =0.799, 95% CI; 0.680 to 0.939), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (adjusted e^{β} =0.873, 95% CI; 0.779 to 0.978), 2,3,7,8-TCDF (adjusted e^{β} =0.852, 95% CI; 0.740 to 0.981) および 33'44'5-PeCB(#126) (adjusted e^{β} =0.809, 95% CI; 0.679 to 0.964)の 4 異性体濃度に対する有意な負の影響も明らかになった。

D. 考察

本研究は、妊娠期の喫煙状況と妊娠におけるダイオキシン類濃度との関連を異性体レベルで、初めて明らかにした。

これまで、妊婦において、喫煙者では非喫煙者と比較して、出生後の母乳中ダイオキシン濃度が有意に低いことが報告されている (Takekuma *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2007)。本研究においても、喫煙者では非喫煙者と比較して、妊娠中の多くの血中ダイオキシン類濃度が有意に低いことが明らかになったことから、ダイオキシン濃度を低下させる妊娠中における喫煙の影響は、妊娠中に既に開始し出産後まで持続すると考えられる。

喫煙による妊婦のダイオキシン類濃度低下の理由として、大きくふたつ考えられる。ひとつは、妊婦以外の一般人を対象とした研究で示されているように、喫煙による CYP1A1 や CYP1A2 誘導によ

るダイオキシン類代謝の活性化である (Flesch-Janys *et al.*, 1996; Zevin and Benowitz, 1999; Chen *et al.*, 2005)。もうひとつの理由として、有機塩素化合物である PCB や HCB では、妊婦の喫煙によって、出生直後の新生児の血中濃度が増加することが報告されていることから、胎児へのダイオキシン類移行量増加の可能性が考えられる (Lackmann *et al.*, 2000)。そのため、今後、妊娠中の喫煙によるダイオキシン類濃度の低下に対する詳細な機構を明らかにする必要がある。

本研究では、異性体レベルで妊娠中の喫煙と妊娠 13 週以前の喫煙による影響を調べた結果、喫煙による 10 異性体の血中濃度への有意な負の影響ならびに妊娠 13 週以前の喫煙による 4 異性体の血中濃度への有意な負の影響も明らかになった。これらのことから、喫煙による血中ダイオキシン類への負の影響は、異性体ごとに影響の持続性が異なり、2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, 2,3,7,8-TCDF, 33'44'5-PeCB(#126)などでは、長期にわたってその影響がみられることが示されたことから、妊娠以前における喫煙の影響についても懸念される。

E. 結論

本研究では、妊娠中の喫煙ならびに妊娠 13 週以前による妊娠中の血中ダイオキシン類濃度との負の関連を異性体レベルで明らかにした。

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. Takekuma, M., Saito, K., Ogawa, M., Matumoto, R., Kobayashi, S., 2004. Levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in human milk in Saitama, Japan, and epidemiological research. *Chemosphere*. 54, 127-35.
2. Uehara, R., Nakamura, Y., Matsuura, N., Kondo, N., Tada, H., 2007. Dioxins in human milk and smoking of mothers. *Chemosphere*. 68, 915-20.
3. Flesch-Janys, D., Becher, H., Gurn, P., Jung, D., Konietzko, J., Manz, A., Papke, O., 1996. Elimination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J Toxicol Environ Health*. 47, 363-78.
4. Benowitz, N. L., 1999. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. *Environ Health Perspect*. 107 Suppl 2, 349-55.
5. Chen, H. L., Liao, P. C., Su, H. J., Guo, Y. L., Chen, C. H., Lee, C. C., 2005. Profile of PCDD/F levels in serum of general Taiwanese between different gender, age and smoking status. *Sci Total Environ*. 337, 31-43.
6. Lackmann, G. M., Angerer, J., Tollner, U., 2000. Parental smoking and neonatal serum levels of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene. *Pediatr Res*. 47, 598-601.

Table 1. Maternal characteristics

Characteristics	Smoking status				p-value
	Overall (n = 263)	Non-smoking (n = 173)	Quitting at the pregnancy (n = 53)	Continuous smoking (n = 37)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Age (year)	30.6 ± 4.4 ^b	31.0 ± 4.4 ^b	30.0 ± 3.7 ^b	29.5 ± 5.1 ^b	0.120
BMI (kg/m ²)	21.4 ± 3.5 ^b	21.3 ± 3.3 ^b	21.5 ± 4.0 ^b	21.8 ± 3.6 ^b	0.701
Parity					
0	137 (52.1)	86 (49.7)	30 (56.6)	21 (56.8)	
≥ 1	126 (47.9)	87 (50.3)	23 (43.4)	16 (43.2)	0.563
Educational level (years)					
≤ 12	114 (43.3)	63 (36.4)	26 (49.1)	25 (67.6)	
≥ 13	149 (56.7)	110 (63.6)	27 (50.9)	12 (32.4)	0.002**
Annual household income (yen)					
< 5,000,000	176 (66.9)	106 (61.3)	41 (77.4)	29 (78.4)	
≥ 5,000,000	87 (33.2)	67 (38.7)	12 (22.6)	8 (21.6)	0.026*
Alcohol intake during pregnancy					
No	185 (70.3)	123 (71.1)	40 (75.5)	22 (59.5)	
Yes	78 (29.7)	50 (28.9)	13 (24.5)	15 (40.5)	0.245
Alcohol consumption of drinkers (g/day)	1.2 (0.4-19.2) ^c	1.2 (0.4-19.2) ^c	1.8 (0.5-5.6) ^c	2.3 (0.5-14.8) ^c	0.158
Caffeine intake during pregnancy (mg/day)	108.8 (2.0-640.0) ^c	99.0 (2.0-640.0) ^c	108.8 (15.0-283.0) ^c	149.5 (17.0-542.5) ^c	0.007**
Estimate fish consumption (g/day) ^a	25.0 (1.2-150.0) ^c	25.0 (1.2-150.0) ^c	25.0 (1.2-150.0) ^c	37.5 (7.5-87.5) ^c	0.551
Measurement period (year)					
2003	75 (28.5)	49 (28.3)	13 (24.5)	13 (35.1)	
2004 1st	31 (11.8)	20 (11.6)	8 (15.1)	3 (8.1)	
2004 2nd	28 (10.6)	20 (11.6)	4 (7.5)	4 (10.8)	
2005	41 (15.6)	28 (16.2)	10 (18.9)	3 (8.1)	
2006	59 (22.4)	36 (20.8)	13 (24.5)	10 (27.0)	
2007	29 (11.0)	20 (11.6)	5 (9.4)	4 (10.8)	0.894
Serum cotinine (ng/ml)	5.0 (5.0-389.4) ^c	5.0 (5.0-5.0) ^c	5.0 (5.0-5.0) ^c	86.8 (11.4-389.4)	< 0.001***

BMI; body mass index. ^aMissing data; estimate fish consumption (33). ^bMean ± SD. ^cMedian (min-max).

Statistically significant differences using the Spearman's correlation test and Kruskal-Wallis test were denoted by **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.01.

Table 2. Dioxin concentrations in maternal blood among three smoking groups

Dioxins (pg/g lipid)	Smoking status			p-value
	Non-smoking (n = 173)		Continuous smoking (n = 37)	
	Geometric mean (95% CI)	Quitting smoking (n = 53)	Geometric mean (95% CI)	
<Total>				
Total PCDDs	517.5 (301.3, 971.7)	485.9 (229.5, 942.9)	452.1 (214.4, 915.1)	0.127
Total PCDFs	20.6 (11.8, 37.1)	18.4 (12.0, 32.4)	18.2 (11.3, 39.2)	0.044*
Total PCDDs/PCDFs	539.2 (313.6, 1000.2)	505.2 (244.4, 970.7)	471.1 (227.2, 953.4)	0.113
Total non-ortho PCBs	77.6 (33.8, 140.8) [#]	69.2 (36.1, 126.2)	61.1 (34.6, 148.7) [#]	0.006**
Total mono-ortho PCBs	11475.8 (5125.6, 26795.8)	10509.1 (4385.2, 21676.8)	9330.1 (4298.4, 26529.2)	0.060
Total dioxin-like PCBs	11556.5 (5161.6, 26930.1)	10572.4 (4429.3, 21785.5)	9395.6 (4337.3, 26635.5)	0.059
Total dioxins	12161.1 (5541.4, 28141.5)	11125.6 (4999.0, 22651.9)	9907.0 (4628.6, 27200.8)	0.054
<WHO-2005>				
Total PCDDs TEQ	7.0 (3.5, 13.5)	6.7 (3.3, 14.4)	6.0 (3.2, 15.4)	0.143
Total PCDFs TEQ	2.5 (1.2, 4.7)	2.4 (1.3, 4.3)	2.2 (1.2, 4.9)	0.181
Total PCDDs/PCDFs TEQ	9.6 (4.8, 18.3)	9.1 (4.8, 18.0)	8.3 (4.3, 20.3)	0.129
Total non-ortho PCBs TEQ	4.3 (1.5, 9.4) [#]	3.6 (1.5, 8.1)	3.0 (1.4, 8.6) [#]	0.001**
Total mono-ortho PCBs TEQ	0.3 (0.2, 0.8)	0.3 (0.1, 0.7)	0.3 (0.1, 0.8)	0.055
Total dioxin-like PCBs TEQ	4.7 (1.7, 10.2) [#]	3.9 (1.7, 8.6)	3.3 (1.6, 9.1) [#]	0.002**
Total dioxins TEQ	14.5 (7.8, 26.6) [#]	13.2 (7.0, 23.9)	11.8 (6.0, 29.2) [#]	0.019*

TEQ; toxicity equivalency quantity. WHO; World Health Organization.

*The means of log transformation of dioxin levels were used for calculation for the one-way ANOVA and tukey method.

[#]Statistically significant differences in each other using the tukey method ($p < 0.05$).

Statistically significant differences using the one-way ANOVA were denoted by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Table 3. Regression coefficient between dioxin concentrations in maternal blood and their smoking status

	Smoking status			
	Non-smoking (n = 173)	Quitting smoking (n = 53)	Continuous smoking (n = 37)	p-value
^a Dependent log _e dioxins (pg/g lipid)	e ^β (95% CI)	e ^β (95% CI)	e ^β (95% CI)	p-value
<Total>				
Total PCDDs	Ref.	0.957 (0.853, 1.074)	0.881 (0.766, 1.013)	0.074
Total PCDFs	Ref.	0.900 (0.809, 1.003)	0.854 (0.749, 0.972)	0.018*
Total PCDDs/PCDFs	Ref.	0.954 (0.852, 1.068)	0.878 (0.766, 1.008)	0.064
Total non-ortho PCBs	Ref.	0.908 (0.802, 1.027)	0.797 (0.686, 0.927)	0.003**
Total mono-ortho PCBs	Ref.	0.934 (0.809, 1.078)	0.836 (0.702, 0.996)	0.045*
Total dioxin-like PCBs	Ref.	0.934 (0.809, 1.078)	0.836 (0.702, 0.995)	0.044*
Total dioxins	Ref.	0.934 (0.813, 1.074)	0.839 (0.708, 0.993)	0.041*
<WHO-2005>				
Total PCDDs TEQ	Ref.	0.969 (0.860, 1.090)	0.885 (0.766, 1.023)	0.098
Total PCDFs TEQ	Ref.	0.946 (0.845, 1.058)	0.884 (0.772, 1.013)	0.077
Total PCDDs/PCDFs TEQ	Ref.	0.961 (0.858, 1.076)	0.882 (0.769, 1.012)	0.074
Total non-ortho PCBs TEQ	Ref.	0.851 (0.725, 1.001)	0.704 (0.579, 0.856)	0.001**
Total mono-ortho PCBs TEQ	Ref.	0.933 (0.808, 1.078)	0.832 (0.698, 0.992)	0.040*
Total dioxin-like PCBs TEQ	Ref.	0.857 (0.732, 1.005)	0.714 (0.589, 0.866)	0.001**
Total dioxins TEQ	Ref.	0.924 (0.821, 1.040)	0.826 (0.715, 0.953)	0.009**

TEQ; toxicity equivalency quantity. WHO; World Health Organization.

Statistically significant differences using the multiple linear regression analysis were denoted by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Adjusted for age, BMI, parity, educational level, alcohol intake during pregnancy, caffeine intake during pregnancy, fish intake during pregnancy and blood measurement period.

^aBecause dioxin levels were log_e-transformed, β coefficients represent the e^β-fold change in dependent dioxins of quitting or continuous smoking compare with the non-smoking as a reference.

Table 4. Regression coefficient between concentrations of each dioxin congener in maternal blood and their smoking status

Dependent log _e dioxins (pg/g lipid)	Smoking status					
	Non-smoking (n = 173)		Quitting smoking (n = 53)		Continuous smoking (n = 37)	
	Ref.	e ^β (95% CI)	p-value	e ^β (95% CI)	p-value	
<PCDDs>						
2,3,7,8-TCDD	Ref.	0.799 (0.680, 0.939)	0.007**	0.848 (0.697, 1.031)	0.098	
1,2,3,7,8-PeCDD	Ref.	1.021 (0.887, 1.175)	0.772	0.902 (0.761, 1.070)	0.238	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	Ref.	0.918 (0.792, 1.062)	0.246	0.809 (0.677, 0.967)	0.020*	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	Ref.	1.019 (0.893, 1.164)	0.775	0.925 (0.787, 1.087)	0.342	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	Ref.	0.930 (0.781, 1.105)	0.405	0.848 (0.687, 1.047)	0.125	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	Ref.	0.873 (0.779, 0.978)	0.019*	0.742 (0.645, 0.851)	< 0.001***	
OCDD	Ref.	0.959 (0.852, 1.079)	0.488	0.886 (0.768, 1.023)	0.098	
<PCDFs>						
2,3,7,8-TCDF	Ref.	0.852 (0.740, 0.981)	0.026*	0.843 (0.710, 1.000)	0.050*	
1,2,3,7,8-PeCDF	---	---	---	---	---	
2,3,4,7,8-PeCDF	Ref.	0.980 (0.856, 1.122)	0.774	0.916 (0.776, 1.079)	0.289	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	Ref.	0.918 (0.787, 1.070)	0.272	0.817 (0.678, 0.985)	0.035*	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	Ref.	0.874 (0.747, 1.022)	0.091	0.809 (0.669, 0.979)	0.030*	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	---	---	---	---	---	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	---	---	---	---	---	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	Ref.	0.823 (0.657, 1.029)	0.088	0.733 (0.558, 0.964)	0.026*	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	---	---	---	---	---	
OCDF	---	---	---	---	---	

(Continued)

<Non-ortho PCBs>									
344'5'-TCB(#81)	---							---	---
33'44'-TCB(#77)	Ref.	0.957 (0.819, 1.119)	0.583	0.802 (0.663, 0.969)	0.022*				
33'44'5'-PeCB(#126)	Ref.	0.809 (0.679, 0.964)	0.017*	0.640 (0.518, 0.792)	<0.001***				
33'44'55'-HxCB(#169)	Ref.	1.007 (0.872, 1.164)	0.920	0.976 (0.819, 1.164)	0.786				
<Mono-ortho PCBs>									
2'344'5'-PeCB(#123)	Ref.	0.856 (0.707, 1.036)	0.109	0.602 (0.478, 0.760)	<0.001***				
23'44'5'-PeCB(#118)	Ref.	0.908 (0.776, 1.062)	0.225	0.773 (0.638, 0.935)	0.008**				
2344'5'-PeCB(#114)	Ref.	1.107 (0.897, 1.368)	0.342	0.903 (0.699, 1.168)	0.435				
233'44'-PeCB(#105)	Ref.	0.886 (0.756, 1.038)	0.133	0.745 (0.614, 0.904)	0.003**				
23'44'55'-HxCB(#167)	Ref.	0.926 (0.794, 1.080)	0.324	0.899 (0.747, 1.084)	0.266				
233'44'5'-HxCB(#156)	Ref.	1.011 (0.885, 1.156)	0.869	1.003 (0.853, 1.179)	0.971				
233'44'5'-HxCB(#157)	Ref.	0.995 (0.860, 1.150)	0.945	0.992 (0.831, 1.184)	0.930				
233'44'55'-HpCB(#189)	Ref.	0.870 (0.731, 1.037)	0.119	0.899 (0.727, 1.111)	0.322				

TEQ; toxicity equivalency quantity. WHO; World Health Organization.

Statistically significant differences using the multiple linear regression analysis were denoted by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Adjusted for age, BMI, parity, educational level, alcohol intake during pregnancy, caffeine intake during pregnancy, fish intake during pregnancy and blood measurement period.

*Because dioxin levels were log_e-transformed, β coefficients represent the e^{β} -fold change in dependent dioxins of quitting or continuous smoking compare with the non-smoking as a reference.