

は、環境中レベルの経年変化や物質の体内半減期に依存する生体の長期的な曝露状況を反映した結果であると考えられる (Glynn et al., 2007; Ibarluzea et al., 2011)。

一方で、わが国の環境モニタリング調査では、PFOS, PFOA の分布および経年変化は物質により異なることが報告されており (Zushi et al., 2010), 本研究で認められた分娩年と PFOS, PFOA 濃度との関連の相違は、環境中や体内曝露量の分布あるいはバックグラウンドレベルの経年変化が物質間で異なることを示していると考えられた。

本研究では、毛髪水銀濃度と母親年齢、分娩年には有意な関連が認められなかったが、体内半減期が 90 日程度の水銀では長期的曝露状況を反映しなかったことが考えられる。

本研究の北海道に 2 年以上住んでいる妊婦は、2 年未満の妊婦より母体血中ダイオキシン類濃度が低かった。我々の先行研究では、北海道の曝露量は日本国内および諸外国より相対的に低いレベルであると報告しており (Konishi et al., 2009), 北海道で長く住んでいる妊婦ほど曝露量が低いという結果は、母体血中濃度が過去 2 年の居住地での曝露状況を反映したと考えられた。

本研究では、喫煙歴がある妊婦で PCBs・ダイオキシン類および PFOS 濃度が低かった。先行研究では喫煙が薬物代謝酵素の誘導促進を起こして、PCBs・ダイオキシン類排出が亢進することが報告されているが (Milbrath et al., 2008), 本研究はダイオキシン類だけでなく、PFOS の代謝亢進も起こる可能性も初めて示した。また、妊娠中の PCBs・ダイオキシン類と PFOS の排出促進は胎児の曝露量増加と直結するため、次世代へのリスク評価を行う上で重要な要因であると考えられた (Lackman et al., 2000)。

本研究では、妊婦の飲酒が PCBs・ダイオキシン類濃度の増加と有意に関連していた。日本の成人を対象者にした先行研究はアルコール摂取が肝臓代謝に悪影響を与え、この変化にダイオキシン類の代謝も影響を受ける可能性を報告しているが (Arisawa 2011), 本研究は、妊娠中のアルコール摂取が母体血中 PCBs・ダイオキシン類濃度を増加させる可能性も初めて報告した。

曝露源や物質の特性が類似するため PCBs とダイオキシン類濃度の間には高い相関がみられたが、関連要因には相違が認められた。PCBs・ダイオキシン類と水銀濃度の中程度の相関は、毛髪水銀が生体の環境化学物質曝露の指標になることを示したが、水銀と PFOS, PFOA 濃度の弱い相関は有機フッ素化合物の物質特性および曝露状況の違いを反映した可能性が考えられた。

E. 結論

本研究では、毛髪水銀濃度は魚摂取量や遠海魚摂取頻度が増えると増加した。遠海魚は体脂肪率が高く、水系食物連鎖の上位にいたため水銀蓄積量が高いと報告されている。一方、PCBs 濃度は牛肉摂取頻度が増えると増加した。近年、わが国では、食生活の欧米化と魚摂取量の減少が報告されていることから (Matsumura 2001), わが国でも肉類が環境化学物質の主要な曝露源となっていることが考えられ、魚摂取に加えて牛肉摂取が PCBs の主要な摂取源である可能性が示唆された。

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, 蜂谷紀之, 岩崎雄介, 中澤裕之, 梶原淳, 戸高尊, 岸玲子. 妊婦血と毛髪の環

境化学物質に関連する要因-環境と子どもの健康北海道スタディー.第 82 回日本衛生会学術総会.京都市.Mar.24-26, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

- (1)Glynn, A., Aune, M., Darnerud, P.O., Cnattingius, S., Bjerselius, R., Becker, W., and Lignell, S. (2007). Determinants of serum concentrations of organochlorine compounds in Swedish pregnant women: a cross-sectional study. *Environ Health* 6, 2.
- (2)Murata K, Yoshida M, Sakamoto M, Iwai-Shimada M, Yaginuma-Sakurai K, Tatsuta N, Iwata T, Karita K, Nakai K.(2011).Recent evidence from epidemiological studies on methylmercury toxicity. *Nihon Eiseigaku Zasshi*. Sep;66(4):682-95.
- (3)Todaka, T., Hirakawa, H., Kajiwar, J., Hori, T., Tobiishi, K., Yasutake, D., Onozuka, D., Sasaki, S., Miyashita, C., Yoshioka, E., et al. (2010). 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.
- (4)Arisawa, K., Uemura, H., Hiyoshi, M., Kitayama, A., Takami, H., Sawachika, F., Nishioka, Y., Hasegawa, M., Tanto, M., Satoh, H., et al. (2011). Dietary patterns and blood levels of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in 1656 Japanese individuals. *Chemosphere* 82, 656-662.
- (5)Tajimi, M., Uehara, R., Watanabe, M., Oki, I., Ojima, T., and Nakamura, Y. (2005). Relationship of PCDD/F and Co-PCB concentrations in breast milk with infant birthweights in Tokyo, Japan. *Chemosphere* 61, 383-388.
- (6)Nakamura, T., Nakai, K., Matsumura, T., Suzuki, S., Saito, Y., and Satoh, H. (2008). Determination of dioxins and polychlorinated biphenyls in breast milk, maternal blood and cord blood from residents of Tohoku, Japan. *Sci Total Environ* 394, 39-51
- (7)Milbrath, M.O., Wenger, Y., Chang, C.W., Emond, C., Garabrant, D., Gillespie, B.W., and Jolliet, O. (2009). Apparent half-lives of dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls as a function of age, body fat, smoking status, and breast-feeding. *Environ Health Perspect* 117, 417-425.
- (8)Ibarluzea, J., Alvarez-Pedrerol, M., Guxens, M., Marina, L.S., Basterrechea, M., Lertxundi, A., Etxeandia, A., Goni, F., Vioque, J., Ballester, F., et al. (2011). Sociodemographic, reproductive and dietary predictors of organochlorine compounds levels in pregnant women in Spain. *Chemosphere* 82, 114-120.
- (9)Zushi Y, Tamada M, Kanai Y, Masunaga S.(2010). Time trends of perfluorinated compounds from the sediment core of Tokyo Bay, Japan (1950s-2004). *Environ Pollut. Mar*;158(3):756-63. Epub 2009 Nov 2.
- (10)Konishi, K., Sasaki, S., Kato, S., Ban,

- S., Washino, N., Kajiwara, J., Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Yasutake, D., et al. (2009). Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res* 109, 906-913.
- (11)Lackmann, G.M., Angerer, J., and Tollner, U. (2000). Parental smoking and neonatal serum levels of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene. *Pediatr Res* 47, 598-601.
- (12)Matsumura, Y. (2001). Nutrition trends in Japan. *Asia Pac J Clin Nutr* 10 Suppl, S40-47.

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. 妊婦の母体血および毛髪中の環境化学物質濃度

	N	GM	(95%CI)	Minimum	Percentile			Maximum
					25th	50th	75th	
Total PCBs (ng/g lipid)	425	105	(47.9-229)	17.8	73.0	107	148	495
Total Dioxins-TEQ (TEQ pg/g lipid)	425	13.5	(6.32-26.9)	3.17	9.94	13.9	18.2	43.4
PFOS (ng/mL)	447	4.94	(2.00-11.0)	1.30	3.40	5.20	7.00	16.2
PFOA (ng/mL)	447	1.16	(0.25-2.90)	0.25	0.80	1.30	1.80	5.30
Hg (ppm)	430	1.34	(0.58-2.95)	0.24	0.96	1.40	1.89	7.55

TEQs were calculated with toxic equivalency factor values (Van den Berg et al. 2006)

GM: geometric mean

表2. 環境化学物質濃度の相関

		Total Dioxins- TEQ (TEQ pg/g lipid)	PFOS (ng/mL)	PFOA (ng/mL)	Hg (ppm)
Total PCBs (pg/g lipid)	r	0.81**	0.09	0.11*	0.38**
	N	425	376	376	378
Total Dioxins-TEQ (TEQ pg/g lipid)	r		0.26**	0.17**	0.32**
	N		376	376	378
PFOS (ng/mL)	r			0.24**	0.12*
	N			447	386
PFOA (ng/mL)	r				0.02
	N				386

*p<0.05, **p<0.01

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. 妊婦の基本的属性、喫煙、および食生活と環境化学物質との関連

Characteristics	N(%)	Mean±SD	Total PCBs (ng/g lipid)	Total Dioxins (pg/g TEQ lipid)	PFOS (ng/mL)	PFOA (ng/mL)	Hg (ppm)
Maternal characteristics							
Maternal age (years)	510	30.37±4.9.10	r=0.399 **	r=0.239 **	r=-0.154 **	r=-0.078	r=0.027
Maternal high	506	158.24±5.2.72	r=0.063	r=0.096 *	r=0.023	r=0.041	r=-0.051
Parity							
0	240(47.7)		127±67.3 *	16.41±7.17 **	6.21±2.88 **	1.72±0.86 **	1.47±0.75
≥1	263(52.3)		111±56.6	13.45±5.62	5.00±2.36	1.10±0.68	1.57±0.85
Blood sampling period							
During pregnancy	354(70.7)		118±59.6	15.17±6.55	6.04±2.64	1.49±0.88 **	1.52±0.82
After delivery	147(29.3)		121±68.7	14.22±6.61	4.26±2.36	1.14±0.60	1.52±0.77
Detection year (2002-2005)	504		r=-0.014	r=-0.199 **	r=-0.558 **	r=0.176 **	r=-0.103 *
Annual household income (million yen)							
<5	345(68.3)		111±55.3 **	14.15±6.21	5.54±2.65	1.39±0.87	1.46±0.80
≥5	160(31.7)		133±72.7	16.28±7.06	5.64±2.75	1.42±0.74	1.62±0.78
Residence duration in Hokkaido (years)							
<2	60(11.7)		138±70.5 *	17.86±8.46	5.15±2.76	1.39±0.65	1.46±0.72
≥2	454(88.3)		117±61.1	14.53±6.23	5.62±2.68	1.40±0.85	1.53±0.81
Maternal smoking history							
No	228(44.9)		124±61.7	15.95±6.76	6.01±2.86	1.47±0.90	1.62±0.81
Yes	280(55.1)		114±62.8	13.88±6.25	5.22±2.49	1.34±0.76	1.44±0.79
Maternal alcohol intake during pregnancy							
No	357(69.5)		115±59.8	14.62±6.57	5.56±2.69	1.40±0.87	1.50±0.82
Yes	157(30.5)		127±67.6	15.47±6.57	5.61±2.68	1.39±0.74	1.57±0.75
Deep-sea fish							
<1time/week	234(46.1)		114±58.1	14.18±6.20	5.41±2.76	1.41±0.85	1.33±0.63 **
≥1time/week	274(53.9)		123±65.7	15.48±6.84	5.71±2.62	1.39±0.82	1.68±0.89
Estimated value of fish intake during pregnancy (g/day)	430	38.8(0.0-400.0) ^a	r=0.185 **	r=0.122 *	r=-0.026	r=-0.042	r=0.229 **
Beef intake during pregnancy							
<1time/week	373(73.9)		116±57.7	14.63±6.41	5.47±2.58	1.41±0.82	1.46±0.73
≥1time/week	132(26.1)		128±74.8	15.58±7.06	5.87±2.94	1.36±0.85	1.68±0.94
Egg intake during pregnancy							
<1time/week	20(4.0)		112±43.3	14.57±5.43	4.37±1.83 *	1.50±1.12	1.54±0.68
≥1time/week	486(96.0)		119±63.1	14.91±6.62	5.62±2.70	1.39±0.82	1.52±0.81
Milk intake during pregnancy							
<1time/week	72(14.2)		104±63.3	12.75±6.37 *	5.34±2.84	1.36±0.86	1.53±0.99
≥1time/week	436(85.8)		121±62.0	15.22±6.55	5.61±2.66	1.40±0.82	1.52±0.77

^aMedian (minimum-maximum)

*, **Statistically significant (p<0.05, p<0.01 respectively) using the t-test, Spearman correlation test

†; p-value < 0.1

表4 妊婦の基本的属性、喫煙、飲酒、食生活に対する環境化学物質の回帰係数および標準化回帰係数(95%信頼区間)

	Total PCBs log10			Total Dioxin-TEQ log10			PFOS(ng/mL)log10			PFOA(ng/mL)log10			Hg (ppm)log10		
	β	Std β	(95%CI)	β	Std β	(95%CI)	β	Std β	(95%CI)	β	Std β	(95%CI)	β	Std β	
Maternal characteristics															
Age (years)	0.022	0.469	(0.018, 0.026)**	0.014	0.348	(0.011, 0.018)**	-0.003	-0.070	(-0.007, 0.000)	0.000	-0.001	(-0.005, 0.005)	0.000	0.001	(-0.004, 0.004)
Pre-pregnancy weight (kg)	0.001	0.021	(-0.002, 0.003)	0.003	0.129	(0.001, 0.005)*	-0.001	-0.056	(-0.003, 0.000)	-0.001	-0.032	(-0.004, 0.002)	0.000	-0.007	(-0.003, 0.002)
Parity	-0.128	-0.292	(-0.167, -0.089)**	-0.138	-0.359	(-0.172, -0.105)**	-0.069	-0.157	(-0.103, -0.035)**	-0.214	-0.379	(-0.264, -0.164)**	-0.001	-0.003	(-0.044, 0.041)
Delivery year (2002-2005)	-0.009	-0.037	(-0.030, 0.012)	-0.043	-0.206	(-0.061, -0.025)**	-0.113	-0.455	(-0.132, -0.094)**	0.065	0.204	(0.038, 0.093)**	-0.024	-0.089	(-0.049, 0.002)
Residence duration in Hokkaido	-0.044	-0.061	(-0.104, 0.017)	-0.081	-0.128	(-0.133, -0.028)*	0.016	0.022	(-0.039, 0.071)	-0.044	-0.046	(-0.124, 0.036)	0.030	0.041	(-0.038, 0.097)
Sampling period	0.002	0.003	(-0.040, 0.043)	-0.006	-0.014	(-0.042, 0.030)	-0.113	-0.226	(-0.151, -0.074)**	-0.089	-0.139	(-0.145, -0.033)*	-0.001	-0.002	(-0.046, 0.044)
Smoking history	-0.016	-0.036	(-0.053, 0.022)	-0.046	-0.120	(-0.079, -0.014)*	-0.069	-0.156	(-0.102, -0.035)**	-0.037	-0.065	(-0.086, 0.012)	-0.038	-0.086	(-0.079, 0.004)
Alcohol drinking during pregnancy	0.057	0.119	(0.016, 0.097)*	0.046	0.110	(0.011, 0.081)*	0.000	0.000	(-0.036, 0.036)	0.042	0.069	(-0.010, 0.095)	0.029	0.060	(-0.016, 0.074)
Estimated values of fish intake (g/day) ^c	0.053	0.082	(-0.003, 0.108)	0.023	0.042	(-0.025, 0.072)	-0.004	-0.006	(-0.051, 0.044)	-0.032	-0.041	(-0.101, 0.037)	0.106	0.185	(0.050, 0.161)**
Beef intake	0.045	0.090	(0.003, 0.088)*	0.027	0.060	(-0.010, 0.064)	0.008	0.017	(-0.029, 0.046)	-0.003	-0.005	(-0.058, 0.051)	0.042	0.084	(-0.005, 0.089)
Deep-fish intake	0.011	0.024	(-0.028, 0.050)	0.015	0.038	(-0.019, 0.048)	0.033	0.075	(-0.002, 0.068)	0.016	0.028	(-0.035, 0.066)	0.065	0.149	(0.023, 0.108)*

β ; regression coefficient provide the expected change in the log-transformed concentrations for a one-unit change in the independent variable.

Std β ; standardized partial regression coefficients

^c coefficient β show the correspondence to 10 fold increase in estimated values, because of the log-transformed values.

*, **Statistically significant ($p < 0.05$, $p < 0.01$ respectively) by using the multiple regression analysis.

微量ダイオキシン類，水酸化 PCB(OH-PCB)測定法の開発

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

血液および母乳中ダイオキシン・PCB 類一斉分析法の精製工程を検討し，水酸化 PCB(OH-PCB)を同時に測定できる分析法を追加した。しかし，1970 年以降に出生した妊婦の血液中総 PCB 濃度平均は 0.3 ppb であり，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精製法および測定法の改良を加えた。血液中総 PCB 濃度の高い検体(0.5ppb 以上)の OH-PCB 濃度を測定したところ，総 OH-PCB 濃度の平均は 37pg/g，最も濃度の高い水酸化 PCB の異性体は 4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB(4OHCB146)であった。今後は，検出感度を検討しながら順次低濃度の検体の OH-PCB 濃度を測定する。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，母体の環境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，平川 博仙
堀 就英，中川 礼子，芦塚 由紀
高橋 浩司，高尾 佳子，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)

チトクローム P450 等の酵素により水酸化 PCB (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 ECD 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・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，

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-PCB 4 種 モノオルソ-PCB 8 種 合計 29 種)および非ダイオ

キシシン様 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 を検出できる精製法の改良を加えた。従来の血液中 OH-PCB 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 濃度を誘導体化せずに LC/MS/MS を用いて直接測定する一斉分析法を開発し、妊婦の血液中 OH-PCB 濃度を測定した。

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、モニターイオンを検討した。

分析対象は札幌市の一般病院・産科を受診した妊婦 268 名の血液であるが、妊婦の多くは PCB の製造および使用が中止された 1970 年以降に出生しており、血液中総

PCB 濃度平均は約 0.3 ppb で比較的低濃度であった。そこで本年度は血液中総 PCB 濃度の高い検体(0.5ppb 以上)の OH-PCB 濃度を測定した。

(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

血液および母乳中ダイオキシシン・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 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、固相カラムを Envi18 カラムに変更した。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シン・PCB 類および 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。モニターイオンは従来最も強度の強い M+イオンを使用したが、塩素イオン(35)を使用しバックグラウンドの低い測定条件に変更した。

今回開発した血液中ダイオキシシン・PCB 類および OH-PCB 一斉分析法で測定した妊婦の血液中総 OH-PCB 濃度の平均は 37pg/g、最も濃度の高い OH-PCB の異性体は 4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB(4OHCB146)であった。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を開発した。現在、誘導体化し高分解能GC/MSを用いた測定を行っている国内の他機関と同一試料を用いたクロスチェックを実施している。

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たが総OH-PCB濃度は1/3程度であり、異性体では1/2から1/10程度であった。2010年度カネミ油症検診の油症患者の血液中OH-PCB濃度を測定した結果、総OH-PCB濃度の平均値は514pg/g (53-1740pg/g)で最も濃度の高いOH-PCBの異性体は4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB (4OHCB187)

であった。油症患者はPCBに汚染された食用油を摂取しているため血液中総PCB濃度の平均は約5ppbと一般人の数倍高い値を示す。油症患者の血液中総OH-PCB濃度は一般人の4倍、本研究対象妊婦の14倍であり、最も濃度の高いOH-PCBの異性体も異なっていた。OH-PCB濃度は生体の代謝機能や体内の化学物質濃度・組成により異なることが推測され今後の解析が必要と思われる。

本研究で開発した分析法は5gの血液からダイオキシン・PCB類、OH-PCBの一斉分析が可能となるため母体の環境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。今後も妊婦の血液中OH-PCB濃度を測定し、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類、OH-PCB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., Onozuka D., Sasaki S., Miyashita C., Yoshioka E., Yuasa M., Kishi R., Iida

- T., Uchi H., Furue M. Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in blood and breast milk collected from pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere*. Dec;85(11):1694-700. 2011
2. Tobiishi K., Todaka T., Hirakawa H, Hori T., Kajiwara J., Hirata T., Iida T., Uchi H., Furue M. Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls in the Blood of Yusho Patients by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Fukuoka Igakuzashi*. 102(4):153-158. 2011
3. Yasutake D., Hori T., Kurokawa Y., Kajiwara J., Tsutsumi T., Amakura Y. The Measurement of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls without Derivatization using a high-resolution gas chromatograph / high-resolution mass spectrometer. *Organohalogen Compounds*. 73:625-628. 2011
4. Takahashi K., Hori Y., Yasutake D., Morokuma S., Otera Y., Fukushima K., Yamamoto T., Kajiwara J., Kawamoto T., Hirata T., Tsukimori K., Furue M. Determination of dioxins in umbilical cord blood samples using accelerated solvent extraction. *Organohalogen Compounds*. 73:645-648. 2011
5. Kajiwara J., Todaka T., Hirakawa H., Hori T., Onozuka D., Takao Y., Hirata T., Iida T., Uchi H., and Furue M.: Sex difference as it is related to the dioxin concentrations in the blood of Yusho patients. *Organohalogen Compounds*. 73:1596-1599. 2011
6. Tobiishi K., Todaka T., Hirakawa H., Hori T., Kajiwara J., Hirata T., Iida T., Uchi H., and Furue M.: DETERMINATION OF HYDROXYLATED POLYCHLORINATED BIPHENYLS (OH-PCBs) IN THE BLOOD OF YUSHO PATIENTS BY LC/MS/MS. *Organohalogen Compounds*. 73:1608-1610. 2011
2. 学会発表
1. Yasutake D., Hori T., Kurokawa Y., Kajiwara J., Tsutsumi T., Amakura Y. The Measurement of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls without Derivatization using a high-resolution gas chromatograph / high-resolution mass spectrometer. 31TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM HALOGENATED PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, Brussels, Belgium, (2011, August)

2. Tkahashi K., Hori Y., Yasutake D., Morokuma S., Otera Y., Fukushima K., Yamamoto T., Kajiwara J., Kawamoto T., Hirata T., Tsukimori K., Furue M. Determination of dioxins in umbilical cord blood samples using sccelerated solvent extraction. 31TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM HALOGENATED PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, Brussels, Belgium, (2011, August)
 3. Kajiwara J. , Todaka T. , Hirakawa H. ,Hori T. , Onozuka D. , Takao Y., Hirata T., Iida T., Uchi H., and Furue M.: Sex difference as it is related to the dioxin concentrations in the blood of Yusho patients. 31TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM HALOGENATED PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, Brussels, Belgium, (2011, August)
 4. Tobiishi K., Todaka T. , Hirakawa H. ,Hori T. ,Kajiwara J., Hirata T., Iida T., Uchi H., and Furue M.: DETERMINATION OF HYDROXYLATED POLYCHLORINATED BIPHENYLS (OH-PCBs) IN THE BLOOD OF YUSHO PATIENTS BY LC/MS/MS. 31TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM HALOGENATED PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, Brussels, Belgium, (2011, August)
 5. 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,平田輝明,岸玲子,古江増隆.血液中ダイオキシン類濃度のクロスチェック.第20回環境化学討論会.熊本市.July.16-18,2011.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
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)
Column	Ascentis Express C18
Flow Rate	0.2 mL/min.
Injection Volume	10 µL
Column Temperature	40 °C
Mobile Phase	2mM Ammonium acetate : 60 : 40 → 5 : 95 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 → 35.0
	¹³ C 352.91 → 35.0
OH- HxCB	¹² C 374.83 → 35.0
	¹³ C 386.87 → 35.0
OH- HpCB	¹² C 408.79 → 35.0
	¹³ C 420.83 → 35.0

表 4 血液中OH-PCB濃度

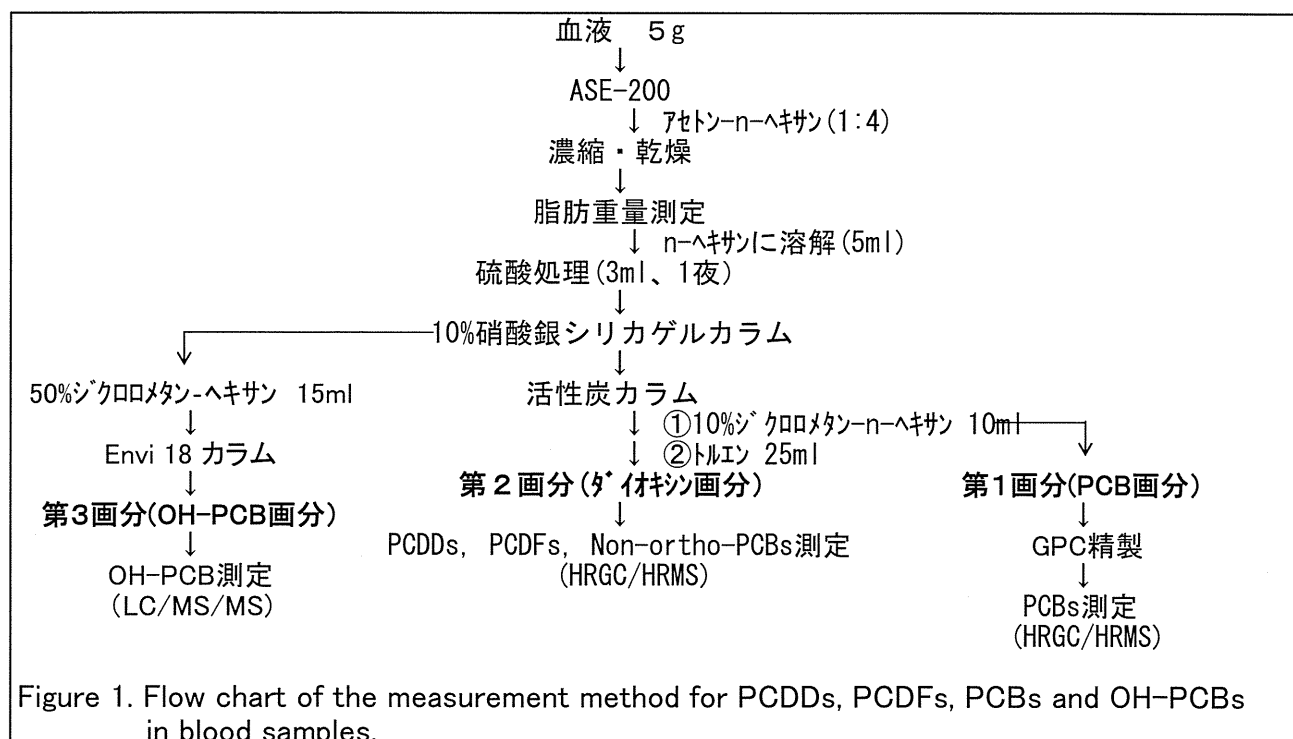
	OH-PCB	Pregnant Blood	Cont. Blood ¹⁾	Cont.Range ²⁾
PeCB-OH	4-OH-CB109	2 (nd - 23)	21	1.6-16
HxCB-OH	3'-OH-CB138	16 (nd -35)	21	0.8-14
	4-OH-CB146	19 (nd - 38) ⁴⁾	48 ⁴⁾	2.2-19
	3-OH-CB153	-	-	0.8-11
HpCB-OH	4'-OH-CB172	nd	5.6	0.5-5.6
	4-OH-CB187	nd	31	7.1-26
Total OHPCB		37 (nd - 88)	126.6	16 - 92

(pg / g)

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



有機フッ素化合物(PFCs)の胎児期曝露評価と児への健康影響評価

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 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
研究分担者 松村 徹 いであ株式会社 環境創造研究所 副所長

研究要旨

本研究対象者において有機フッ素化合物(PFCs)の曝露評価を行うために、ヒト試料のPFCsの測定系の確立を検討した。標準血清(NIST standard reference material (SRM) 1957)を用いて血中PFCs濃度14種を世界の他機関との測定値を比較したところ、同様の測定値が得られた。さらに、研究対象者である妊婦4名の予備測定を実施したところ、母体血漿中PFOS濃度は平均5.94 ng/ml、PFOA濃度は平均1.48 ng/mlであり、東豊コーホートスタディのPFOS・PFOA濃度と同様の結果であった。以上より、ヒト血清中もしくは血漿中PFCsの一斉分析の測定系を確立することができた。今後は、対象者約2,000名の母体血中PFCs濃度14種の一斉分析を行う。また、児への健康影響を評価するために、前向きコーホート研究およびNested-ケースコントロール研究のデザインで、児の体格(身長・体重・胸囲・頭囲)、Small for Gestational Age (SGA)、Low Birth Weight (LBW)、早産、先天異常、アレルギー疾患・感染症への影響を検討する。本分析法によりPFCsの胎児期曝露評価が可能となり、北海道における妊婦のPFCs汚染実態を把握するとともに、出生後の児の健康影響を検討することでPFCsの胎児期曝露の影響を解明できるものと期待される。

研究協力者

檜野 いく子, 岡田 恵美子
(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)
松浦 英幸
(北海道大学農学研究院
応用生命科学部門生命有機化学分野
生物有機化学研究室)
山本 潤
(いであ株式会社 環境創造研究所)

(PFCs)は、撥水の性質を利用して衣類、建材、フッ素系の表面コーティング剤、界面活性剤などに広く使用されている。難分解性・高残留性の物質であり、環境中に放出され自然界および生体内で分解を受けずに蓄積されることから、人体への健康影響が懸念されている。

動物実験では、肝肥大、内分泌障害(甲状腺ホルモン減少、血清コレステロール値減少)、運動機能の低下、発達障害、免疫抑制、仔の出生体重減少などが示されている。ヒトにおいては母体の曝露による胎盤透過性が報告され、胎児への移行が示唆されている。疫学研究では胎児期のPFCs曝露によ

A. 研究目的

PFOS・PFOA・PFNA・PFHxS・PFDA・PFUnDAのような有機フッ素化合物

る出生時体格、出生後の神経行動発達、免疫・アレルギー疾患、甲状腺疾患などへの影響が報告されている。

しかし、これまで多くの先行研究では主に PFOS・PFOA に焦点が当てられ、他の PFCs の影響については明らかにされていない。また、PFOS 以外の PFCs は規制の対象外であるため、ヒトに及ぼす影響を明らかにすることは極めて重要である。

本研究では、妊婦における PFCs の曝露評価を行うために、ヒト試料の測定系の確立を検討することを目的に標準血清(NIST standard reference material (SRM) 1957)を用いて血中 PFCs 濃度 14 種(PFOS・PFOA・PFNA・PFDA・PFUnDA・PFBS・PFHxS・PFBA・PFPeA・PFHxA・PFHpA・PFDoA・PFTrDA・PFTeDA)について海外および国内の他機関との測定値を比較する。また、研究対象者である妊婦 4 名の予備測定を実施する。

B. 研究方法

血漿中の PFCs を測定するのに LC/MS/MS(北海道大学農学研究科に設置)が適した条件かを確認するために、研究対象とする PFCs(PFOS・PFOA・PFNA・PFDA・PFUnDA・PFHxS)の標準品を用いて検量線を作成した。この時の機器の条件設定の詳細については、表 1, 表 2 に示す。

機器の状態を確認後、我々の開発した血漿中 PFCs 前処理方法(図 1)の正確性を検討するために、標準血清(NIST standard reference material (SRM) 1957)を用いて血中 PFCs 濃度 14 種を世界の他機関との測定値を比較した。この時、血清に添加する内部標準物質は、PFOS- $^{13}\text{C}_4$ ・PFOA- $^{13}\text{C}_4$

PFNA- $^{13}\text{C}_9$ ・PFDA- $^{13}\text{C}_9$ ・PFHxS- $^{13}\text{C}_3$ を用いた。

北海道内の約 40 産科医療施設で実施した出生前向きコーホート研究(北海道スタディ)対象者の血漿を実際に測定することで、札幌市の一般病院・産科で実施した東豊コーホートスタディで測定されている結果と比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、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・医の倫理委員会の承認を得た。個人名及び個人データの漏洩については、データの管理保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに、研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように厳重に保管し、取り扱った。

C. 研究結果

標準液を用いて検量線を作成したところ、6 種類すべての PFCs において R^2 が 0.993 以上であり、綺麗な直線性を示した(図 2)。標準血清を用いた血中 PFCs 濃度 14 種を他機関との測定値を比較した結果、ほぼ同様の結果が示された(表 3)。さらに、北海道スタディの検体の測定を行った結果、PFOS・PFOA については、同様の結果を示した(表 4)。また、本研究の対象者は PFOS・PFOA・PFNA・PFDA・PFUnDA が検出可能であった。PFBS・PFHxS・PFBA・PFPeA・PFHxA・PFHpA・PFDoA・PFTrDA・PFTeDA については検出限界以下であった。

D. 考察

血漿中 PFCs の一斉分析の測定系を確立したことにより、本研究の対象者は母体血中 PFOS・PFOA・PFNA・PFDA・PFUnDA 濃度とアウトカムとの関連の検討が可能であると考えられる。PFBS・PFHxS・PFBA・PFPeA・PFHxA・PFHpA・PFDoA・PFTrDA・PFTeDA については低濃度もしくは検出限界以下が予測されるが、北海道における妊婦の PFCs の曝露状況を把握することが可能である。

今後の計画：PFCs の胎児期曝露による児への健康影響評価

本研究では、前向きコホート研究および Nested-ケースコントロール研究のデザインで、PFCs の胎児期曝露による児の体格（身長・体重・胸囲・頭囲）、Small for Gestational Age (SGA), Low Birth Weight (LBW), 早産、先天異常、アレルギー疾患・感染症への影響を検討することが可能である（参考表 1）。Danish National Birth Cohort において胎児期の PFCs 曝露と 5 ヶ月・12 ヶ月時の体格との負の関連が報告されていることから（Andersen et al. 2010）、本研究でも出生時体格のみならず 1 歳・1 歳 6 ヶ月・3 歳時の体格についても継続して検討する。

前向きコホート研究では、2003 年～2005 年の研究参加登録者 8,426 名のうち、初期調査票があるもの 7,892 名、妊娠後期の血液サンプルがあるもの 6,381 名、新生児個票があるもの（生産）5,966 名から先天異常、多胎を除外し、4 ヶ月・1 歳・2 歳調査票があるもの 2,937 名からデータ欠損者を除外した約 2,000 名を対象とする。約 2,000 名の母体血中 PFCs 濃度を測定し、

出生時・1 歳 6 ヶ月・3 歳時の体格、LBW、アレルギー感染症との関連について解析を行う（参考図 1）。

SGA をアウトカムとした Nested-ケースコントロール研究では、前向きコホート研究と同様に母体血中 PFCs 濃度を測定する約 2,000 名の中から、1 対 2 の割合でケースとコントロールを選出する。ケースである SGA 224 名（7.62%）と、児の性別、出産経歴、在胎週数でマッチングを行ったコントロール 448 名で解析を行う（参考図 2）。

先天異常をアウトカムとした Nested-ケースコントロール研究では、前向きコホート研究のデザインで除外した先天異常を有する対象者をケースとし、母体血中 PFCs 濃度の測定を行う。コントロールは、母体血中 PFCs 濃度を測定する約 2,000 名の中から 1 対 2 の割合で選出する。ケースである先天異常 86 名（1.48%）、児の性別、出産病院、母の年齢でマッチングを行ったコントロール 172 名で解析を行う（参考図 3）。

今後は、対象者約 2,000 名の母体血中 PFCs 濃度 14 種の一斉分析を行う。北海道における妊婦の PFCs 汚染実態を把握するとともに、出生後の児の健康影響を検討することで PFCs の胎児期曝露の影響を解明することが可能である。

E. 結論

本研究対象者において PFCs の曝露評価を行うために、ヒト血清中もしくは血漿中 PFCs の一斉分析の測定系を確立した。本分析法により PFCs の胎児期曝露評価が可能となり、北海道における妊婦の汚染実態の解明および児への健康影響の解明に大きく貢献できるものと期待される。

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

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

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. LC/MS/MS による有機フッ素化合物測定条件(装置)

Instrument	LC: ACQUITY UPLC system (Waters) MS/MS: Micromesh Quattro Premier tandem quadrapole mass spectrometer (Waters)																					
Colum	Ethylen-bridged (BEH) C18 column (1.7 μ m, 62.1 \times 100 mm) (Waters)																					
Colum temp	50°C																					
Flow rate	0.3 mL/min																					
Injection volume	10 μ l																					
Mobile phase (vol/vol)	A: 2mM Aq. Ammonium acetate B: 2mM ammonium Columacetate/MeOH																					
Measurement time	8 min																					
LC/MS/MS gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>0.20</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.00</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>6.50</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>7.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>8.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	% A	% B	0.00	70	30	0.20	70	30	5.00	0	100	6.50	0	100	7.00	70	30	8.00	70	30
Time (min)	% A	% B																				
0.00	70	30																				
0.20	70	30																				
5.00	0	100																				
6.50	0	100																				
7.00	70	30																				
8.00	70	30																				

表 2. LC/MS/MS による有機フッ素化合物測定条件(MS)

Function	PFCs	RT	Dwell	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
1. Time 0-3.0	PFBA	0.62	0.1	213	169	18	8
	PFPeA	2.49	0.1	263	219	15	9
	PFBuS	2.75	0.1	299	80	45	29
2. Time 3.0-4.35	PFHxA	3.34	0.08	313	269	15	10
	PFHpA	3.86	0.08	363	319	16	10
	PFHxS	3.91	0.08	399	99	50	30
	PFHxS- ¹³ C ₃	3.95	0.08	402	99	50	30
	PFOA	4.25	0.08	413.03	368.76	17	11
	PFOA- ¹³ C ₄	4.26	0.08	417.09	372.7	17	11
3. Time 4.35-4.7	PFTTrDA	4.42	0.1	663	619	22	15
	PFNA- ¹³ C ₉	4.56	0.1	472	427	16	11
	PFNA	4.57	0.1	463	419	16	11
	PFOS	4.57	0.1	498.99	80	45	40
	PFOS- ¹³ C ₄	4.57	0.1	503.05	80	45	40
3. Time 4.7-8.0	PFDA- ¹³ C ₉	4.82	0.1	522	477	17	12
	PFDA	4.84	0.1	513	469	17	12
	PFUnDA	5.06	0.1	563	519	18	12
	PFDoA	5.26	0.1	613	569	20	13
	PFTeDA	5.56	0.1	713	669	15	14

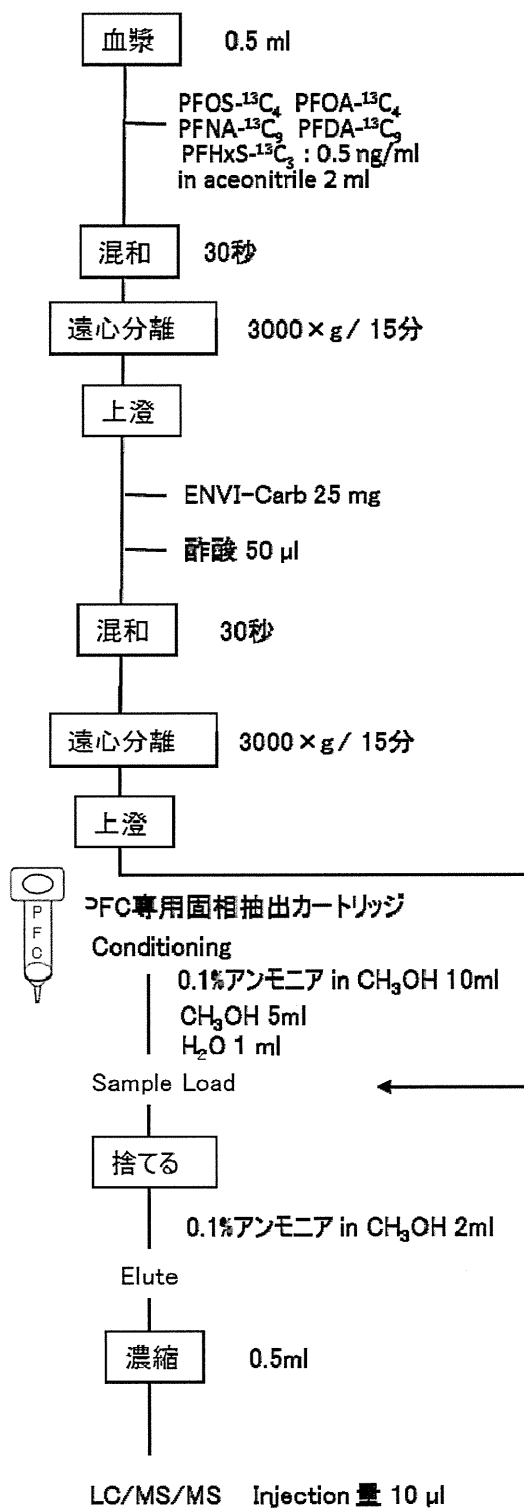
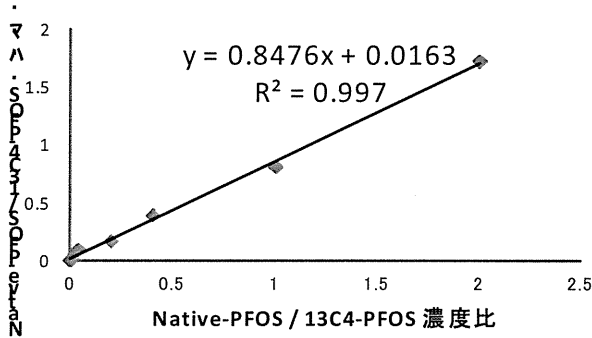
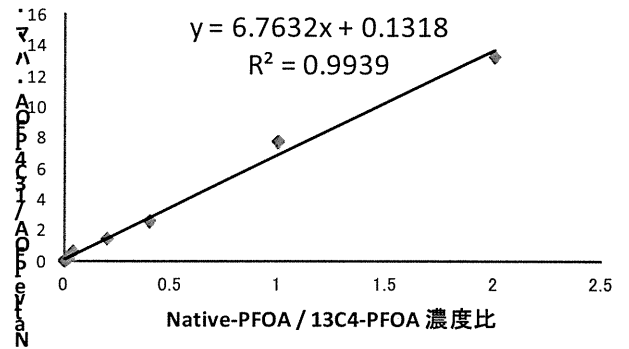


図 1. 血漿中の有機フッ素化合物抽出の前処理方法

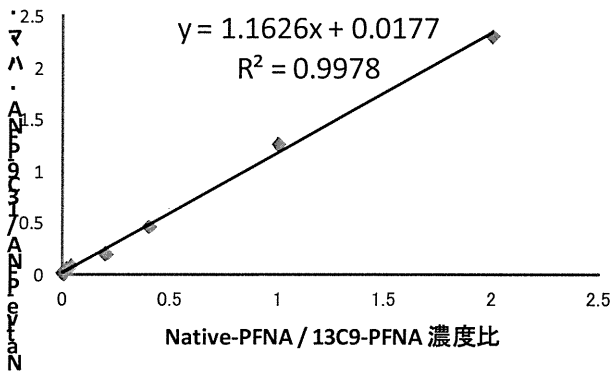
PFOS



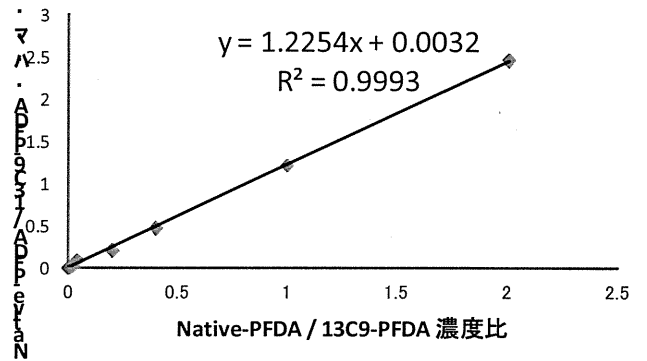
PFOA



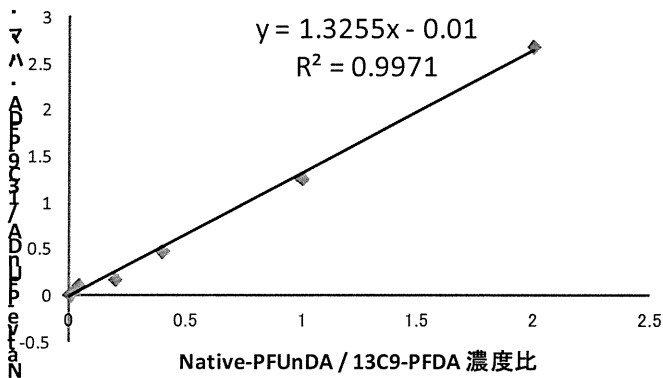
PFNA



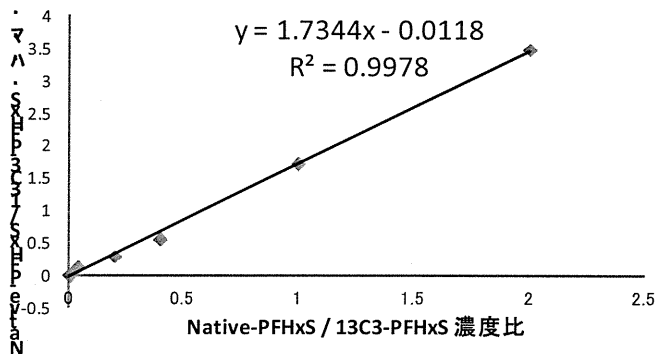
PFDA



PFUnDA



PFHxS



x = Native / Internal standard 濃度比
 y = Native / Internal standard 面積比

図 2. 標準液による検量線