

Fig. 2-5 Temporal trend of organohalogen contaminants (TBP, PCP and TBBPA) in duplicate diet study from Kyoto

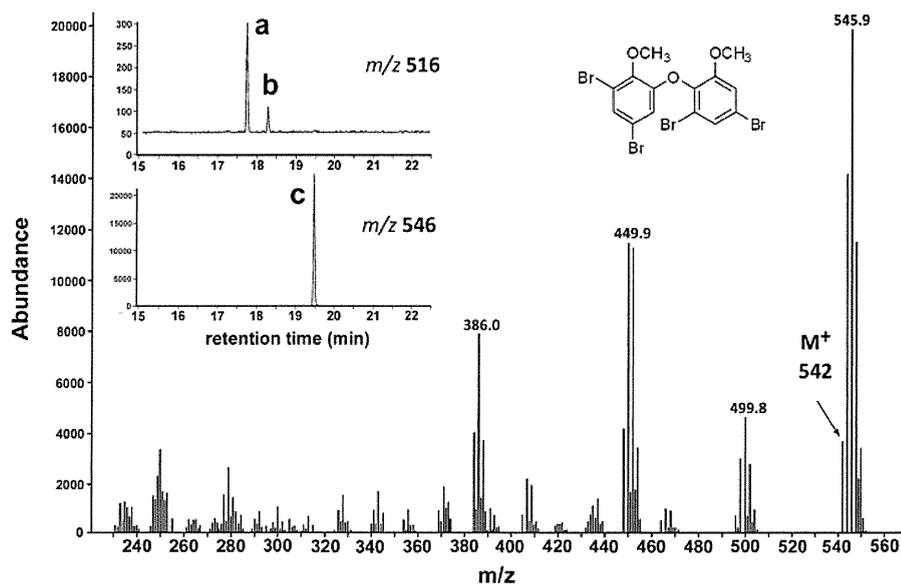


Fig. 3. GC/MS (EI mode) of brominated contaminants (peak C) found in diet homogenate from Kyoto 2011. Interposed chromatograms are selected ion monitoring profiles for methoxylated tetrabromodiphenyl ethers in neutral fraction from diet homogenate; Peaks a and b represent 2'-MeO-BDE68 and 6-MeO-BDE47, respectively. GC/MS conditions are the same as given in a literature (Haraguchi et al 2009)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

汚染が懸念される物質のモニタリング

(3) 長崎の母乳中の臭素系難燃剤および関連化合物の調査

分担研究者 原口浩一 第一薬科大学
研究協力者 藤井由希子 京都大学大学院医学研究科環境衛生学

研究要旨

本研究では、日本人の母乳に汚染が懸念される物質のうち、臭素化難燃剤 hexabromobenzene (HexaBB), 2,4,6-tribromophenol (TBP), tetrabromobisphenol A (TBBPA) および関連化合物の濃度を調査し、古典的 POPs、新規 POPs (endosulfan) および候補物質 (dicofol, pentachlorophenol) の濃度と比較した。ヒト試料バンクに保存されている長崎の 2010 年の母乳 20 検体を用いた。母乳中の HexaBB 濃度は平均 0.33 ng/g lipid であったが、その脱臭素化体、1,2,4,5-tetrabromobenzene (TetraBB) が 1.9 ng/g lipid で検出された。フェノール性難燃剤である TBP はすべての母乳から検出され、平均 15.6 ng/g lipid であった。TBBPA は 9 検体 (45% の頻度) で検出され、平均濃度は 3.6 ng/g lipid (nd~16 ng/g lipid) であった。dicofol, endosulfans および pentachlorophenol の残留濃度は 0.37, 1.7 および 0.9 ng/g lipid で TetraBB より低濃度であった。天然由来の残留臭素化合物として、2'-MeO-BDE68 および Br₄Cl₂-dimethyl bipyrrrole がそれぞれ 0.77 および 0.35 ng/g lipid で検出され、両成分に正の相関が見られた ($r=0.573$, $p<0.01$)。乳児による TBBPA の摂取量は暫定耐容量 PTDI (1mg/kg・bw/day) より 3 桁低いレベルであり、乳児への健康影響はないと考えられる。methoxy-PBDE および bipyrrrole 類の乳児による摂取については健康影響評価が必要と思われる。

A. 研究目的

食品への汚染の懸念される化学物質として、POPs 関連物質 (dicofol, endosulfans および pentachlorophenol (PCP))、難燃剤 (2,4,6-tribromophenol (TBP) および tetrabromobisphenol A (TBBPA))、さらに PCB や

polybrominated diphenyl ether (PBDE) の水酸化体が挙げられる。このような残留農薬やフェノール性ハロゲン化合物は内分泌かく乱性、神経発達毒性、免疫毒性を有し、体内に取り込まれると胎盤や母乳を通じ胎児 (乳児) への移行する可能性がある (Meerts et al., 2001; 2002; Kawashiro et al., 2008)。

フェノール性難燃剤であるTBPおよびTBBPAは紙類・プラスチック・電気製品に添加剤として最もよく使われている (Watanabe and Sakai, 2003)。これらは物理化学的性質がPBDEsと類似しており、環境生物中でも検出されている。しかし、それらのヒト残留量に関するデータは少ない。また環境中のフェノール性ハロゲン化合物は、メトキシ体に変換し、脂溶性が高まり、体内曝露量が増加することも考えられる。

本研究の目的は、ヒトへの影響が懸念される化学物質のうち、臭素化合物に焦点を当て、母乳を指標としてヒト曝露の実態を明らかにすることである。これまでの我々の報告は主に母乳POPが中心であったが、今回は、臭素化合物として、TetraBB, HexaBBおよびBDE-47を、フェノール性化合物としてTBP, TBBPAおよびhydroxy-PBDEを、またそれらのメチル化体を調査した。また残留農薬と比較するため dicofol, endosulfans および pentachlorophenolを定量し、これらの乳児による許容摂取量 (ADI) と比較した。

B. 研究方法

1) サンプル収集

ヒト母乳試料は京都大学ヒト由来試料バンクに保存されている試料のうち、2009~2010年に長崎 (佐世保市) の18~35歳の女性20名 (平均年齢29歳) から提供されたものを使用した (Koizumi et al., 2009)。この研究 (ヒト試料) に関するプロトコール(E25) は京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会により承認され、参加者全員から書面による同意を得た。参加者の地域、採取年、年齢、職業、出産回数、脂肪含量

をTable 1に示す。

2) 化学物質

POPsのうち、DDTs, HCB, HCHs およびクロルデン類(CHLs) の標準液は関東化学 (株) より購入した。PCP, TBP, TBBPA, 2'-OH-BDE68, 6-OH-BDE47 とそれらのメチル化体はWellington Laboratories 社製を用いた。内標準として用いた α -[^{13}C]endosulfan, はPOPs定量用に、4-OH-[^{13}C]PCB187はフェノール性化合物の定量用にAccuStandard 社から購入した。シリジスパイクとして用いた4'-methoxy-BDE121 は、ストックホルム大学 (Dr. G. Marsh) より譲渡された。分析に使用した溶媒は残留農薬試験用または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。シリカゲル (Wako gel S-1) は和光純薬より購入し、使用前に130°Cで3時間乾燥させてから使用した。

3) 精製法

母乳中の汚染物質の分析法は、(1) 脂肪抽出、(2) ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)、(3) KOH:EtOH/ヘキサンにより分離したフェノール類の誘導体化(メチル化)、(4) シリカゲルカラムによる精製、(5) GC-MSの手順に従った。その方法をFig. 1に示す。母乳試料10 gに0.1%ギ酸 (5 mL), エタノール: ジエチルエーテル: n-ヘキサン (2:1:3) 20 mLおよびクリーンアップスパイク (α -[^{13}C]endosulfan および4-OH-[^{13}C]PCB187)を加え、抽出攪拌後、遠心分離して上層を分離した。この操作を2回繰り返す、抽出液を濃縮した後、脂肪含量を測定した。母乳の抽出液は Bio-Beads S-X3 カラム (バイオラッド社製) に付した。移動相はジクロロメタン(DCM) : n-ヘキサン(1:1

v/v)とし、流速4 mL/minで最初の96-mLで脂質を除去し、その後の64-mLの溶出液を回収した。次に、この溶出液をn-ヘキサン(10 mL) 溶液とし、1M KOH/エタノール(7:3) 溶液 (2 mL) で分配抽出を行い、上層(中性成分)と下層(フェノール性成分)を分離した。中性分画は1 mLまで濃縮しシリカゲルカラムに付した。フェノール性分画は2M 塩酸 1mLを加えた後、n-ヘキサン:ジエチルエーテル (8:2, v/v, 10 mL)で逆抽出を3回行った。抽出液を濃縮し、ジアゾメタン(ジエチルエーテル溶液)を加えてO-メチル化を行った後、ヘキサン溶液とした。両分画ともシリカゲルカラム (0.2 g, Wako gel S-1) に付して、DCM/n-hexane (12:88, v/v, 15mL)で溶出した。溶出液はシリンジスパイクとして4'-methoxy-BDE121を加え、200 μ Lにまで濃縮し、GC-MSの分析試料とした。

4) 分析機器と定量

GC-MSはAgilent GC/MSD-5973i に6890N-GCを接続した装置を用いた。イオン化モードは負イオン化化学イオン化(ECNI)で、試薬ガスはメタンを使用した。Table 2にGC/MSの設定条件と分析対象物質の検出イオンおよびLOQを示す。物質の定量はイオンクロマトグラムのシグナルと内標準との検量線によって行なった。定量値は脂肪重量あたりのng数で表示した。

5) 品質管理と品質保証

ブランク操作は10サンプル毎に行い、各成分に妨害ピークが存在しないことを確認した。標準物質(Table 2に記載分について1-10 ng/mL)の牛乳への添加回収率は74-98%、相対標準偏差は12%以下であった(n=5)。定量下限値(LOQ)はシグナル/ノイズ比

= 10で算出した(Table 2)。分析値がLOQ以下であった場合、LOQの1/2の値を平均濃度の計算に用いた。キャリブレーションは各物質とも0.1~5.0 ng/mLの範囲で直線性を示した(>0.99)。精度管理のため、Standard Reference Material (SRM1954, Organic Contaminants in Fortified Human Milk, NIST)を用いて分析法を検証した。4,4'-DDE, HCB, trans-nonachlorおよびBDE-47について定量した結果、認証値との差は15%以内であった。分散分析(ANOVA)による有意差は $p=0.05$ を基準とした。

C. 研究結果

1. 母乳中の臭素化合物

母乳から抽出した残留成分の濃度をTable 3に示す。平均値でDDTs (69 ng/g lipid) > CHLs (46.1 ng/g lipid) > HCHs (25.9 ng/g lipid) > HCB (7.4 ng/g lipid)の順に定量された。臭素化合物では、TBPがすべての母乳から検出され、平均15.6 ng/g lipidであった。次いでTBBPAは9検体から検出され、平均3.6 ng/g lipidであった。ほかに、TetraBB (1.93 ng/g lipid)、endosulfans (1.7 ng/g lipid)、PCP (0.90 ng/g lipid)が微量に検出された。2'-MeO-BDE68(検出率95%)は0.77 ng/g lipidで、BDE-47 (0.61 ng/g lipid)とほぼ同レベルで定量された。20試料中4試料で6-OH-BDE47が最大0.25 ng/g lipidで検出された。HexaBBの濃度はTetraBBの約1/6の濃度であった。ハロゲン化ビピロール類(Br₄Cl₂-DBPおよびCl₇-MBP)はそれぞれ0.35, 0.63 ng/g lipidで検出された。出産回数(1回と複数回)による有意差検定(ANOVA)では、 β -HCHに有意差($p=0.044$)が認められたが、他の成分では認められ

なかった ($P>0.05$, Fig. 3)。母乳中の endosulfans は 4,4' - DDE, dicofol および TBP と正の相関を示した ($p<0.05$, Table 4)。TBP と TBBPA の間には有意な相関性は見られなかったが、2' -MeO-BDE68 と Br₄Cl₂-DBP の間では有意に相関した ($r=0.572$, $p=0.008$, Fig. 4)。

2. 推定一日摂取量

母乳中の濃度から乳児 (5 kg, 700mL 授乳の場合) による一日摂取量 (EDI, ng/kg · bw/day) を推定した結果、dicofol および endosulfans の EDI はそれぞれ 1.0 および 4.8 ng/kg bw/day で暫定耐容量 (PTDI) または許容量 (ADI) より 3 桁低い量であった。TBP および TBBPA の平均 EDI はそれぞれ 44 および 10 ng/kg bw/day であった。CHLs の EDI は 130 ng/kg bw/day を示し、ADI (0.5 μg/kg bw/day) の 26% に相当した。

3. フェノール性ハロゲン化合物とそのメトキシ化体

食事に検出されるフェノール性画分の TBP、PCP および 6-OH-BDE47 濃度と中性分画で検出されるそれらのメチル化体 TBA、PCA および 6-MeO-BDE47 濃度を比較した。母乳における TBA/TBP 比は 0.03、PCA/PCP 比は 0.10 であった。一方、6-OH-BDE47 は 4 検体の平均値は 0.15 ng/kg bw/day で、MeO-BDE の濃度の 1/2 以下であった。2' -OH-BDE68 および dimethoxy-TBBPA は今回の母乳では検出できなかった。

D. 考察

1 母乳中の中性汚染物質

我々は先行研究で、日本、中国お

よび韓国の母乳から dicofol および endosulfan を検出したきした (Fujii et al 2011; 2012b)。今回、長崎の母乳中でも同レベルの dicofol および endosulfan が検出された。食事の endosulfan は α 型と β 型が約 1:1 で残留していると報告されている (Desalegn et al 2011) が、母乳中では約 10:1 と β 型の割合が低い。これは、体内に取り込まれた β 型が α 型に変換したため (Weber et al 2010)、または α 型は大気中に多く含まれるためその吸入摂取により母乳に α 型の割合が大きくなっていることも考えられる。Dicofol および endosulfan の乳児による EDI はそれぞれ許容値 (2 および 6 μg/kg · bw/day) を大きく下回っているため、乳児へのリスクは少ないと思われる (Lu, 1995)。

HexaBB は難燃剤として年間 350 トン (1994-2001) が使用されている (Watanabe and Sakai 2003)。我々は前回、沖縄および北海道の母乳中に HexaBB および TetraBB を検出した (Fujii et al 2012a)。今回の母乳の TetraBB 濃度は沖縄母乳のそれよりわずかに低い程度であった。TetraBB は難燃剤である HexaBB が環境中で脱臭素化されたと考えられる。本年度の食事の残留調査では HexaBB と TetraBB がほぼ同量混入していた。母乳中に HexaBB よりも TetraBB が高濃度で残留している結果は、HexaBB がヒト体内で TetraBB へ代謝されて残留することを示唆している (Yamaguchi et al 1988)。

2. 母乳中のフェノール性ハロゲン化合物とメトキシ体

今回調査した長崎の母乳中の TBP 濃度は、前回調査した沖縄母乳中濃度より高かった。TBP は数種の海洋藻や海洋底生動物によって生産、放出

されている(Haraguchi et al., 2010)。一方、TBPは難燃剤(中間体)として年間3000トン以上の需要がありハウスダスト成分とされている(Watanabe and Sakai 2003; Suzuki et al 2008)。このことから母乳中に残留するTBPは食事からの摂取およびハウスダストによる吸入の両方を考慮する必要がある。

TBBPAは20検体中9検体(検出率45%)で検出され、前回の沖縄母乳のTBBPA(nd-14 pg/g wet, 検出率30%)より高濃度であった。日本の魚介類調査では、関西地域の内海の魚介類(45中26)からTBBPAが10-110 pg/g wet 検出され、土壌でも検出されている(Ashizuka et al 2008; Watanabe et al 1983b)。このため、母乳のTBBPA汚染は食事の海産物と農産物の両方に由来すると考えられる。TBBPAは体内での半減期が短いため(Hagmer et al 2000)、母乳での検出は過去の曝露による蓄積でなく、最近の曝露を反映していると考えられる。TBBPAのADIは欧州の毒性委員会(COT)では、1mg/kgbw/dayとしている(Driffield et al 2008)。乳児(5kg)による母乳TBBPAの推定一日摂取量(EDI)は、ADIより3桁低いことから、健康へのリスクは低い。

PCPは血液残留性が高いことが知られているが、今回の調査で母乳中のPCP濃度はTBPと比べてかなり低かった。したがってPCPは血液から母乳中には移行しにくいと考えられる。

水酸化PBDEでは、6-OH-BDE47が4検体から検出された。これはBDE-47の代謝物ではなく、海洋生物が産生する6-OH-BDE47が食事を通して体内に取り込まれた後、血液に残留し、一部が母乳に移行したと考えられる。6-OH-BDE47は水酸化PCBと同

様、体内曝露により発達期の甲状腺ホルモンT4の減少による脳神経発達への影響などが懸念される(Meerts et al 2001)。

母乳にはOH-PBDEよりもそのメトキシ体が高濃度で検出された。メトキシ体はOH体より脂溶性が高いため血液よりも脂肪を多く含む母乳に移行すると推察される。また、TBBPAは土壌中でメチル化されることが知られている(George and Haggblom, 2008)。しかし今回、母乳中にはそのメチル化体は検出できなかった。

母乳中に検出されたPCA、TBAおよびMeO-BDEのようなメトキシ体は体内で脱メチル化が起こることが想定される。太田ら(2012)はTBAが肝ミクロゾームにより容易に脱メチル化されることを明らかにした。また、PCAは動物体内で脱メチル化によりPCPへ代謝されることが報告されている(Ikeda and Sapienza 1995)。methoxy-PBDEについても一部は脱メチル化される可能性がある(Wan et al 2010)。フェノール性化合物はいずれも内分泌かく乱性が指摘されているため、フェノール体の乳児への健康影響評価を行う際、メトキシ体も考慮する必要がある。

E. 結論

今回、日本人の母乳中の残留成分のうち、従来の塩素系POPsに加えて、臭素系ハロゲン化合物を調査した。中性分画の臭素化合物はTetraBBの濃度が高く、ついでBDE-47とMeO-PBDEの順であった。フェノール性分画では、TBP>TBBPA>PCP>OH-PBDEの順に検出された。ADIが設定されているTBBPAについては、母乳の乳児による摂取量のEDI/ADI

比率は極めて低く、授乳による安全性の点で問題がないと思われる。フェノール性成分の間で濃度に相関性のある成分は見当たらず、これらのヒト残留成分は必ずしも食事由来だけではないことを示唆している。食品中には、フェノール体のメチル化した成分が含まれ、その動向に注視する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

2. 論文発表

なし

2. 学会発表・その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

- Ashizuka, Y.; Nakagawa, R.; Hori, T.; Yasutake, D.; Tobiishi, K.; Sasaki, K., Determination of brominated flame retardants and brominated dioxins in fish collected from three regions of Japan. *Mol Nutr Food Res* 2008, 52, 273-283.
- Desalegn, B.; Takasuga, T.; Harada, K. H.; Hitomi, T.; Fujii, Y.; Yang, H. R.; Wang, P.; Senevirathna, S. T. M. L. D.; Koizumi, A., Historical trends in human dietary intakes of endosulfan and toxaphene in China, Korea and Japan. *Chemosphere* 2011, 83, 1398-1405.
- Driffield, M.; Harmer, N.; Bradley, E.; Fernandes, A. R.; Rose, M.; Mortimer, D.; Dicks, P., Determination of brominated flame retardants in food by LC-MS/MS: diastereoisomer-specific hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A. *Food Addit Contam Part A* 2008, 25, 895-903.
- Fujii, Y.; Haraguchi, K.; Harada, K. H.; Hitomi, T.; Inoue, K.; Itoh, Y.; Watanabe, T.; Takenaka, K.; Uehara, S.; Yang, H.-R.; Kim, M.-Y.; Moon, C.-S.; Kim, H.-S.; Wang, P.; Liu, A.; Hung, N. N.; Koizumi, A., Detection of dicofol and related pesticides in human breast milk from China, Korea and Japan. *Chemosphere* 2011, 82, 25-31.
- Fujii, Y.; Ito, Y.; Harada, K. H.; Hitomi, T.; Koizumi, A.; Haraguchi, K., Comparative survey of levels of chlorinated cyclodiene pesticides in breast milk from some cities of China, Korea and Japan. *Chemosphere* 2012a, 89, 452-457.
- Fujii, Y.; Ito, Y.; Harada, K. H.; Hitomi, T.; Koizumi, A.; Haraguchi, K., Regional variation and possible sources of brominated contaminants in breast milk from Japan. *Environ Pollut* 2012b, 162, 269-74.
- George, K. W.; Haggblom, M. M., Microbial O-methylation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A. *Environ Sci Technol* 2008, 42, 5555-61.
- Haraguchi, K.; Kotaki, Y.; Relox, J. R.; Romero, M. L. J.; Terada, R., Monitoring of Naturally Produced Brominated Phenoxyphenols and Phenoxyanisoles in Aquatic Plants from the Philippines. *J Agric Food Chem* 2010, 58, 12385-12391.
- Ikeda, G. J.; Sapienza, P. P., Distribution, metabolism and excretion of pentachloroanisole in the beagle dog and miniature pig. *Food Chem Toxicol* 1995, 33, 409-421.
- JMPR, Monographs of Toxicological Evaluations. No. 842. Dicofol, Pesticide Residues in Food: 1992 Evaluations. Part II Toxicology. FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues. Percent of provisional trelavble daily intake (PTDI 2 μ g/kg bw for dicofol by FAO/WHO)
- Kawashiro, Y.; Fukata, H.; Omori-Inoue, M.; Kubonoya, K.; Jotaki, T.; Takigami, H.; Sakai, S.; Mori, C., Perinatal exposure to

- brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in Japan. *Endocr J* 2008, 55, 1071-1084.
- Koizumi, A., Harada, K.H., Inoue, K., Hitomi, T., Yang, H.R., Moon, C.S., Wang, P., Hung, N.N., Watanabe, T., Shimbo, S., Ikeda, M., 2009. Past, present, and future of environmental specimen banks. *Environ Health Prev Med* 2009, 14, 307-318.
- Lu, F., A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by the World Health Organization. *Regul Toxicol Pharmacol* 1995, 21, 352-364. (ADI/TDI 6ug/kg bw/day for endosulfans set by FAO/WHO)
- Meerts, I. A.; Assink, Y.; Ceniijn, P. H.; Van Den Berg, J. H.; Weijers, B. M.; Bergman, A.; Koeman, J. H.; Brouwer, A., Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal and maternal thyroid hormone homeostasis in the rat. *Toxicol Sci* 2002, 68, 361-371.
- Meerts, I. A.; Letcher, R. J.; Hoving, S.; Marsh, G.; Bergman, A.; Lemmen, J. G.; van der Burg, B.; Brouwer, A., In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect* 2001, 109, 399-407.
- 太田千穂、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、松原 大、古賀信幸、海洋生物由来の2,4,6-tribromoanisoleの動物肝ミクロゾームによる代謝とその関連化合物の抗酸化活性、中村学園大学研究紀要 2012, 44, 215-223.
- Suzuki, G.; Takigami, H.; Watanabe, M.; Takahashi, S.; Nose, K.; Asari, M.; Sakai, S.-i., Identification of Brominated and Chlorinated Phenols as Potential Thyroid-Disrupting Compounds in Indoor Dusts. *Environ Sci Technol* 2008, 42, 1794-1800.
- Wan, Y.; Wiseman, S.; Chang, H.; Zhang, X.; Jones, P. D.; Hecker, M.; Kannan, K.; Tanabe, S.; Hu, J.; Lam, M. H.; Giesy, J. P., Origin of hydroxylated brominated diphenyl ethers: natural compounds or man-made flame retardants? *Environ Sci Technol* 2009, 43, 7536-7542.
- Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R., Polybrominated anisoles in marine fish, shellfish, and sediments in Japan. *Arch Environ Contam Toxicol* 1983a, 12, 615-620.
- Watanabe, I., Kashimoto, T., Tatsukawa, R., The flame retardant tetrabromobisphenol A and its metabolite found in river and marine sediments in Japan. *Chemosphere* 1983b, 12, 1533-1839.
- Watanabe, I.; Sakai, S., Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environ Int* 2003, 29, 665-682.
- Weber, J.; Halsall, C. J.; Muir, D.; Teixeira, C.; Small, J.; Solomon, K.; Hermanson, M.; Hung, H.; Bidleman, T., Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci Total Environ* 2010, 408, 2966-2984.
- Yamaguchi, Y., Kawano, M., Tatsukawa, R., Moriwaki, S., Hexabromobenzene and its debrominated compounds in human adipose tissues of Japan. *Chemosphere* 1988, 17, 703-707.

Table 1. Information of breast milk used in this study

area	city	sampling year	age	occupation	parity	fat %
Nagasaki 1	Sasebo	2009	28	事務職	2	1.16
Nagasaki 2	Sasebo	2009	30	主婦	3	1.09
Nagasaki 6	Sasebo	2009	34	サービス業	2	3.02
Nagasaki 7	Sasebo	2009	35	事務職	3	3.37
Nagasaki 8	Sasebo	2009	18	主婦	1	1.83
Nagasaki 11	Sasebo	2009	24	サービス業	1	3.11
Nagasaki 12	Sasebo	2009	22	主婦	1	2.18
Nagasaki 16	Sasebo	2010	29	外交員	2	1.57
Nagasaki 17	Sasebo	2010	33	主婦	2	1.31
Nagasaki 18	Sasebo	2010	28	製造業	1	2.07
Nagasaki 19	Sasebo	2010	25	製造業	3	2.07
Nagasaki 20	Sasebo	2010	29		2	1.62
Nagasaki 21	Sasebo	2010	34	主婦	1	2.20
Nagasaki 22	Sasebo	2010	29	事務職	2	1.28
Nagasaki 23	Sasebo	2010	30	事務職	1	1.14
Nagasaki 25	Sasebo	2010	34	主婦	2	2.35
Nagasaki 27	Sasebo	2010	30	サービス業	1	2.53
Nagasaki 28	Sasebo	2010	26	主婦	2	1.72
Nagasaki 29	Sasebo	2010	34	主婦	3	1.55
Nagasaki 34	Sasebo	2010	25	栄養士	1	1.82
average			28.9		1.8	1.95

Table 2. Selected ion monitoring (SIM) used in the GC/MS analysis for breast milk.

Carrier gas	Helium (head pressure 3 psi)		
Injection mode	Splitless		
Column	HP-5MS (30% dimethylpolysiloxane, 30 m × 0.25 mm i.d. and 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, CA, USA)		
Oven	70 °C (1.5 min), then 20 °C/min to 230 °C (0.5 min), and then 4 °C/min to 280 °C (5 min)		
Temperature	Injector (250 °C), transfer line (280 °C), and ion source (230 °C for EI, 150 °C for ECNI)		
Ionization mode	Electron capture negative ionization (ECNI)		
Reagent gas	Methane		
Analytes	GC t _R (min)	Target ion (<i>m/z</i>)	LOQ* (ng/g lipid)
4,4'-DDT	14.45	71 (235)	1.0
4,4'-DDD	13.60	71 (235)	1.0
4,4'-DDE	12.76	318 (316)	1.0
dicofol	11.21	250 (139)	0.2
hexachlorobenzene (HCB)	9.47	284 (286)**	0.05
α-HCH,	9.37	71 (255)	0.1
β-HCH	9.65	71 (255)	0.1
γ-HCH	9.74	71 (255)	0.1
<i>trans</i> -chlordane	11.77	412 (410)	0.1
<i>cis</i> -chlordane	12.14	412 (410)	0.1
oxychlordane	11.78	424 (426)	0.1
<i>trans</i> -nonachlor	12.51	444 (446)	0.1
<i>cis</i> -nonachlor	13.78	444 (446)	0.1
α-endosulfan	12.40	404 (406)	0.1
β-endosulfan	13.51	404 (406)	0.1
hexabromobenzene (HexaBB)	15.91	79 (81)	0.1
tetrabromobenzene (TetraBB)	9.62	79 (81)	0.05
2,2',4,4'-tetraBDE (BDE-47)	16.45	79 (161)	0.1
Cl ₇ -MBP	12.46	386 (388)	0.1
Br ₄ Cl ₂ -DBP	17.98	79 (544)	0.1
2,4,6-tribromophenol (TBP) (methylated)	8.90	79 (81)	0.1
2,4,6-tribromoanisole (TBA)	8.90	79 (81)	0.1
pentachlorophenol (PCP) (methylated)	9.52	278 (280)	0.1
pentachloroanisole (PCA)	9.52	278 (280)	0.1
tetrabromobisphenol A (TBBPA) (methylated)	22.13	79 (81)	0.5
dimethyl-tetrabromobisphenol A	22.13	79 (81)	0.5
2'-OH-BDE68 (methylated)	17.74	79 (81)	0.1
2'-MeO-BDE68	17.74	79 (81)	0.1
6-OH-BDE47 (methylated)	18.29	79 (81)	0.1
6-MeO-BDE47	18.29	79 (81)	0.1
α-[¹³ C]endosulfan (IS)	12.29	385 (387)	0.1
4-OH-[¹³ C]PCB187 (IS) (methylated)	17.38	438 (422)	0.1

*Limits of quantification; S/N = 10, **confirmation ion

Table 3. Concentrations of organohalogenes in human breast milk from Nagasaki 2010

analyte	freq %	LOQ ng/g lw	primiparous, n=8				multiparous, n=12				total, n=20						
			mean	SD	median	min	max	mean	SD	median	min	max	mean	SD	median	min	max
4,4'-DDE	80	1	83.93	55.97	60.61	34.61	199.47	50.68	20.50	41.71	28.18	88.34	63.98	40.95	49.73	28.18	199.47
4,4'-DDD	45	1	1.75	1.55	1.12	.50	4.65	1.21	1.12	1.10	.50	3.32	1.43	1.30	.90	.50	4.65
4,4'-DDT	100	1	4.91	4.24	2.90	1.28	12.69	2.42	1.72	2.47	.50	5.62	3.41	3.15	2.75	.50	12.69
dicofol	95	0.2	.45	.17	.44	.15	.71	.31	.17	.25	.10	.70	.37	.18	.33	.10	.71
HCH	100	0.05	8.43	6.97	6.09	.76	18.63	6.70	5.68	4.98	.90	18.65	7.39	6.11	4.98	.76	18.65
α-HCH	30	0.1	.07	.05	.07	.05	.19	.15	.14	.14	.05	.47	.12	.12	.11	.05	.47
β-HCH	100	0.1	34.75	20.04	24.50	16.57	69.85	19.56	11.49	18.33	6.74	45.59	25.64	16.81	21.02	6.74	69.85
γ-HCH	75	0.1	.10	.05	.10	.05	.20	.18	.31	.07	.05	1.15	.15	.24	.08	.05	1.15
trans-CHL	40	0.1	.14	.10	.16	.05	.30	.11	.10	.08	.05	.30	.12	.10	.09	.05	.30
cis-CHL	75	0.1	.25	.18	.23	.05	.56	.34	.34	.19	.05	.96	.30	.28	.20	.05	.96
trans-NC	100	0.1	34.06	26.40	27.81	10.81	93.13	24.54	15.35	18.44	9.02	53.01	28.35	20.40	22.95	9.02	93.13
cis-NC	100	0.1	11.95	9.20	10.98	1.35	21.60	6.69	3.44	5.81	1.77	13.25	8.79	6.71	6.64	1.35	21.60
oxy-CHL	100	0.1	8.51	11.20	4.94	.51	34.91	9.33	19.47	2.37	.39	69.57	9.00	16.31	2.60	.39	69.57
α-endosulfan	100	0.1	1.61	.28	1.61	1.21	1.99	1.48	.75	1.42	.36	2.55	1.53	.60	1.51	.36	2.55
β-endosulfan	60	0.1	.23	.18	.25	.05	.57	.11	.06	.11	.05	.22	.16	.14	.12	.05	.57
BDE-47	95	0.1	.73	.42	.76	.05	1.24	.53	.29	.43	.13	1.02	.61	.35	.54	.05	1.24
HexaBB	60	0.1	.37	.31	.33	.05	.75	.31	.27	.35	.05	.87	.33	.28	.35	.05	.87
TetraBB	100	0.05	2.57	2.13	1.83	.41	6.03	1.51	1.08	1.23	.07	3.68	1.93	1.62	1.51	.07	6.03
2'-OH-BDE68	0	0	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
2'-MeO-BDE68	95	0.1	.76	.64	.66	.08	1.86	.78	.63	.54	.13	2.07	.77	.62	.54	.08	2.07
6-OH-BDE47	20	0.1	.06	.03	.06	.05	.13	.08	.06	.07	.05	.25	.07	.05	.06	.05	.25
6-MeO-BDE47	20	0.1	.09	.06	.08	.05	.19	.13	.27	.13	.05	.97	.11	.21	.06	.05	.97
BrdC12-DBP	85	0.1	.28	.26	.16	.09	.84	.39	.61	.15	.05	2.15	.35	.49	.16	.05	2.15
C17-MBP (Q1)	90	0.1	.66	.86	.22	.05	2.44	.61	.57	.45	.15	1.99	.63	.68	.36	.05	2.44
TBP	100	0.05	15.10	8.51	15.23	2.35	30.93	15.97	9.29	19.44	2.42	27.05	15.62	8.76	17.25	2.35	30.93
TBA	100	0.05	.33	.15	.32	.07	.56	.46	.40	.37	.03	1.31	.41	.32	.32	.03	1.31
PCP	100	0.05	.75	.35	.79	.19	1.21	1.01	.65	.74	.06	2.29	.90	.55	.74	.06	2.29
PCA	80	0.1	.07	.03	.08	.01	.12	.10	.07	.08	.05	.24	.09	.06	.08	.01	.24
TBBPA	45	2	3.85	4.71	2.40	1.00	14.40	3.45	4.90	1.38	1.00	16.23	3.61	4.70	1.46	1.00	16.23

Table 4. Correlation in concentration between selected organohalogenes in human breast milk from Sasebo 2010.

	dicofol	β-HCH	trans-nonachlor	α-endosulfan	tetraBB	TBP
4,4'-DDE	0.593**	0.346	0.405	0.451*	-0.096	0.172
dicofol	1	0.449*	0.743**	0.620**	0.429	0.428
β-HCH		1	0.719**	0.323	0.460*	0.121
trans-nonachlor			1	0.513*	0.407	0.279
α-endosulfan				1	0.060	0.608*
tetraBB					1	0.051

**<0.01, *<0.05

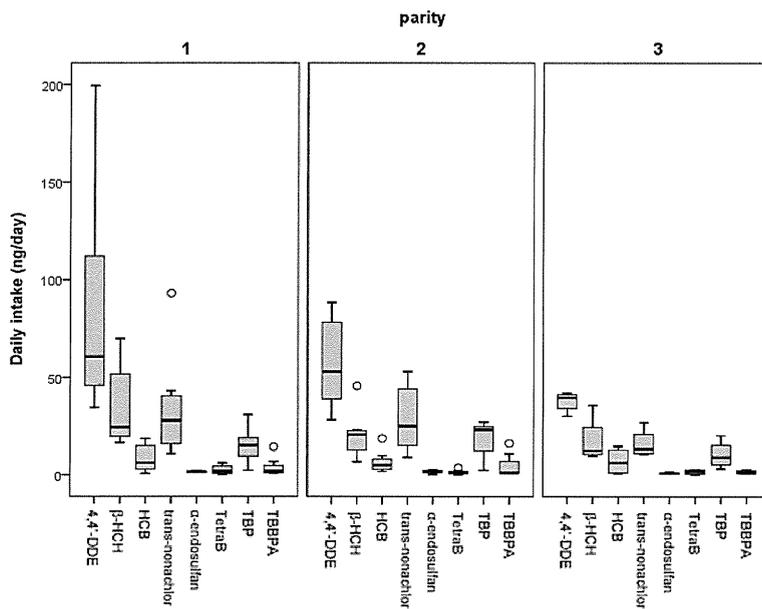


Fig. 3. Comparison of selected organohalogen between multiparous mothers from Sasebo

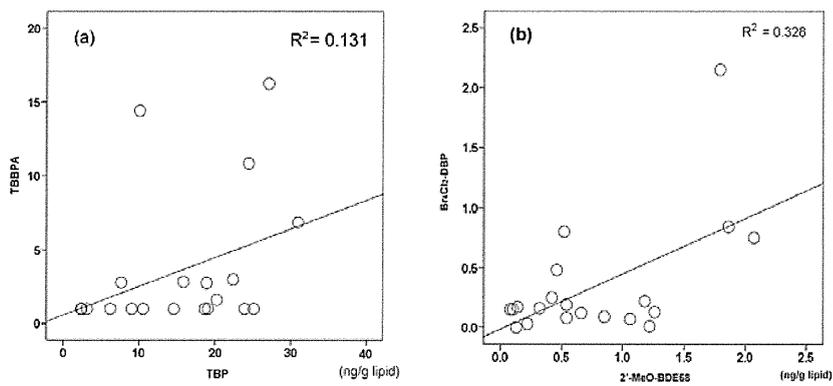


Fig. 4. Correlation in concentration between TBP and TBBPA (a), and between 2'-MeO-BDE68 and Br₄Cl₂-DBP (b). Pearson's correlation coefficients, (a) $r=0.362$, $p=0.117$, (b) $r=0.573$, $p=0.008$

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

新規塩素系難燃剤の分析手法の検討

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学分野
分担研究者 原田 浩二 京都大学医学研究科環境衛生学分野

研究要旨

難燃剤は各種プラスチックの発火を防止するために様々な製品に利用されている。しかし難燃剤の多くは燃焼時のラジカル補足剤としてハロゲンを含む。これらは難分解性と生物蓄積性を引き起こす可能性が高い。難燃剤の内、ポリ臭素化ジフェニルエーテル、ポリ臭素化ビフェニルのいくつかはストックホルム条約において残留性有機汚染物質として指定され、使用禁止となった。このため代替物質へ切り替えが進んでおり、代替物質として繁用される物質のモニタリングは必須不可欠である。このうち、塩素系難燃剤について、高感度高選択性の機器による測定方法を開発した。POPsについて既存の確立された前処理技術と、負イオン化ガスクロマトグラフー質量分析計（GC-ECNI-MS）を用いた分析技術で、より高感度で効率よく測定が可能となった。試行した食品試料中に対象物質が検出されるものもあり、食品を通じた摂取が起こりうると考えられ、次年度以降の調査で検討していく。

A. 研究目的

難燃剤は各種プラスチックの発火を防止するために様々な製品に利用されている。しかし難燃剤の多くは燃焼時のラジカル補足剤としてハロゲンを含む。これらは難分解性と生物蓄積性を引き起こす可能性が高い。難燃剤の内、ポリ臭素化ジフェニルエーテル、ポリ臭素化ビフェニルのいくつかはストックホルム条約において残留性有機汚染物質として指定され、使用禁止となった。このため代替物質へ切り替えが進んでおり、代替物質として繁用される物質のモニタリングは健康影響評価のためには、必須不可欠である。

塩素系難燃剤は、これまでに残留性

有機汚染物質として指定されている塩素化シクロペンタジエン誘導体（ドリン類、クロルデン類、マイレックス）と同様、塩素化シクロペンタジエンから合成され、難分解性である。Dechlorane類は主にDechlorane 602, 603, 604, 605が知られている。Dechlorane 605はDechlorane Plus (DP) と呼ばれ、米国環境保護庁では高生産量化合物に指定している。毒性に関する調査データは少なく、米国環境保護庁は生産者であるOxyChem社に詳細なデータの報告を要請している（USEPA, 1998）。

生産拠点のある五大湖周辺、中国南部での調査では環境試料からDechlorane Plusが検出されている

(Sverko E et al., 2011)。日本では調査事例は少なく、屋内、屋外粉じんの調査のみである(先山ら, 2012)。

そこで本研究では食事試料中の塩素系難燃剤についてガスクロマトグラフィー電子捕獲負イオン化法質量分析計 (GC / ECNI / MS) を用いて測定可能な方法を検討した。

B. 研究方法

定量化のための標準液として使用された化学物質Dec 602 (95%), Dec 603 (98%), Dec 604 (98%) は Toronto Research Chemical Inc. (Toronto, ON,) より購入した。syn-DP, and anti-DPは Cambridge Isotope Laboratoriesより購入した。¹³C₁₂-2,3,3',5,5' - ペンタクロロビフェニル (CB-111、CIL社製) を SCCPs定量の内部標準として使用した。アセトン、トルエン、ヘキサン、ジクロロメタンは残留農薬試験及びポリ塩化ビフェニル試験用 (関東化学社製) を使用した。多層シリカゲル、フロリジルは和光純薬製を使用した。

・抽出、精製と機器分析

陰膳食事試料を攪拌し、凍結乾燥された試料5gを分取し、1:1 (vol / vol) アセトン/トルエン200mL、炭素13標識標準物質DP 10ngを加えて、ソックスレー抽出装置で16時間抽出した。有機層をロータリーエバポレーターを用いて約1 mLに濃縮させた。粗抽出液をメスフラスコを用いてヘキサン10 mLに希釈した。

粗抽出液10mLを酸化銀、40%硫酸シリカゲルカラムに滴下し、1:1 ジクロロメタン/ヘキサン溶液30mLで溶出させた。ロータリーエバポレーターを用いて約1 mLに濃縮させた。溶出液を8g活性化フロリジルカラム (Florisil PR、和光純薬製) に滴下し、ヘキサン30mL

で洗浄した後、10% ジクロロメタン/ヘキサン溶液30 mLで溶出させ、ロータリーエバポレーターを用いて約1 mLに濃縮させた。デカン0.5 mLに濃縮して¹³C₁₂標識CB-111を添加し、GC / ECNI / MS分析に供した。

・測定

GC / ECNI / MSは、Agilent 6890、5973iを用いた。キャピラリーカラムはDB-5MSを用いて、15m×内径0.25 mm、膜厚0.1 μmとした。それぞれの分子イオン[M]を定量イオンとして用いた。検出限界 (IDL) はS/N比3のとして定義した。ブランクサンプルではSCCPsがIDL以下なので、検出限界 (MDL) の値はIDLに等しいとした。抽出効率と回収率は、5g食品試料に標準溶液添加し、評価した。ブランク試料を用いて、抽出精製でのコンタミネーションを評価した。

C. 研究結果

陰イオン化学イオン化は、それぞれ分子量関連イオン[M]をベースピークとして与えた (図1)。Dechlorane類では臭素原子を含むDec604では他のDechlorane類より感度が低かった (比1/20)。またキャピラリーカラムが長く、膜厚が長い場合、塩素原子が脱離したと考えられるピークが認められた (図2)。そのため、キャピラリーカラムは15mで膜厚は0.25umのものを利用した。

今回の前処理過程には多層シリカゲルを用いたが、硫酸シリカゲルによる分解は見られなかった。フロリジルカラムからの溶出もDechlorane類で大きな差はなく、炭素13標識標準物質DPを内部標準として採用できると考えられた。

食事試料のクロマトグラムのベース

ラインノイズから、Dec602, 603, 605の検出限界は1試料について1 ngとなり、Dec 604は20 ngとなった。試行した4試料の内、1検体でDec602が検出され、食事湿重量16 ng/gで、1日摂取量で39µg/dayとなった(図3)。

D. 考察

今回、新規塩素系難燃剤を食餌試料中で測定を試みた。これまでの残留性有機汚染物質測定の前処理同様、多層シリカゲルカラムで精製しても分解などは生じなかった。このため、他の残留性有機汚染物質の測定と平行してスクリーニングすることが可能である。キャピラリーカラムとの相性をあらかじめ調べておく必要があるが、Dechlorane類はいずれも沸点が高く、他のPOPsより遅れて溶出してくるため、測定イオンの干渉は少なく、一般的なカラムでの分離で問題はないと考えられた。今回はまだ試行であったが、Dechlorane類が検出される食事試料があったことから、何らかの経路で曝露が生じる可能性がある。生体中の濃度も今後検討する必要があると考えられた。

E. 結論

Dechlorane類を食事試料で、化学イオン化で高感度に測定する方法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表・その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 文献

(1) USEPA, Letter to Manufacturers/Importers, 10/9/98, High Production Volume (HPV) Challenge. 1998. <http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/genera/ceoltr1.htm>

(2) Ed Sverko, Gregg T. Tomy, Eric J. Reiner, Yi-Fan Li, Brian E. McCarry, Jon A. Arnot, Robin J. Law, and Ronald A. Hites. Environ. Sci. Technol., 2011, 45 (12), pp 5088–5098

(3) 先山孝則, 中野武. 高分解能GC/MS法を用いる環境中の塩素系難燃剤Dechlorane Plusの分析. 分析化学 61(9), 2012.

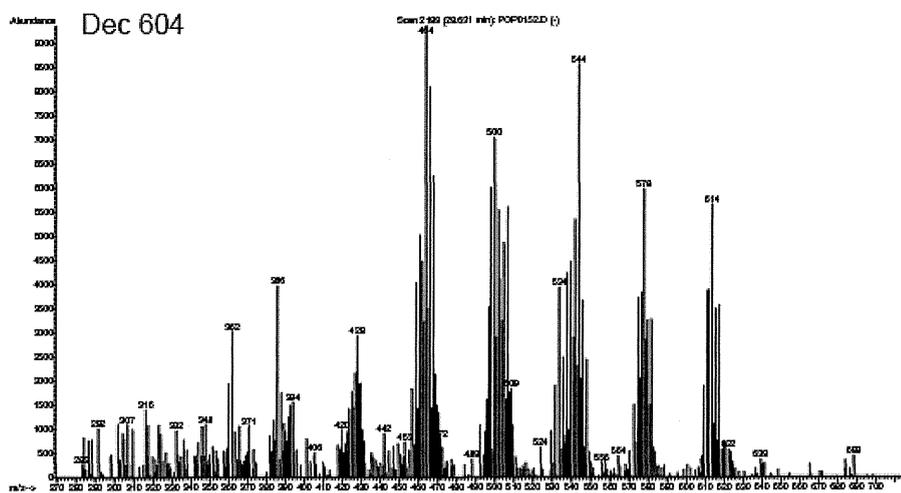
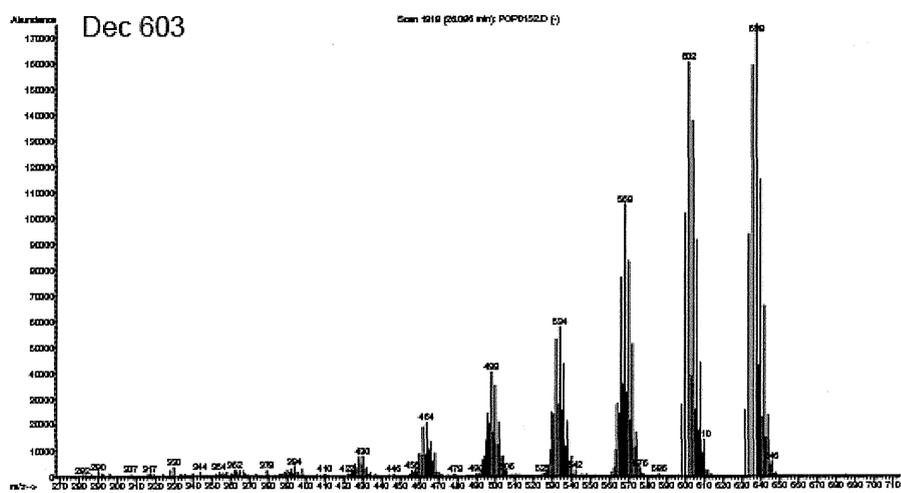
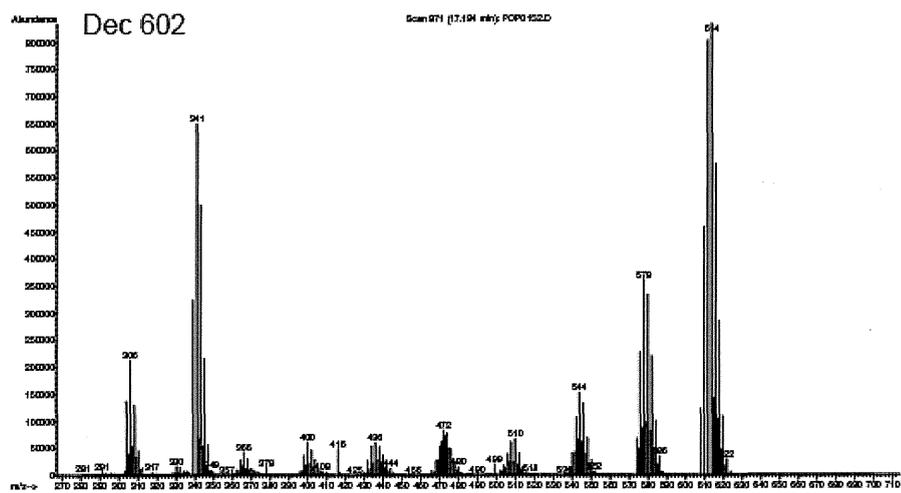
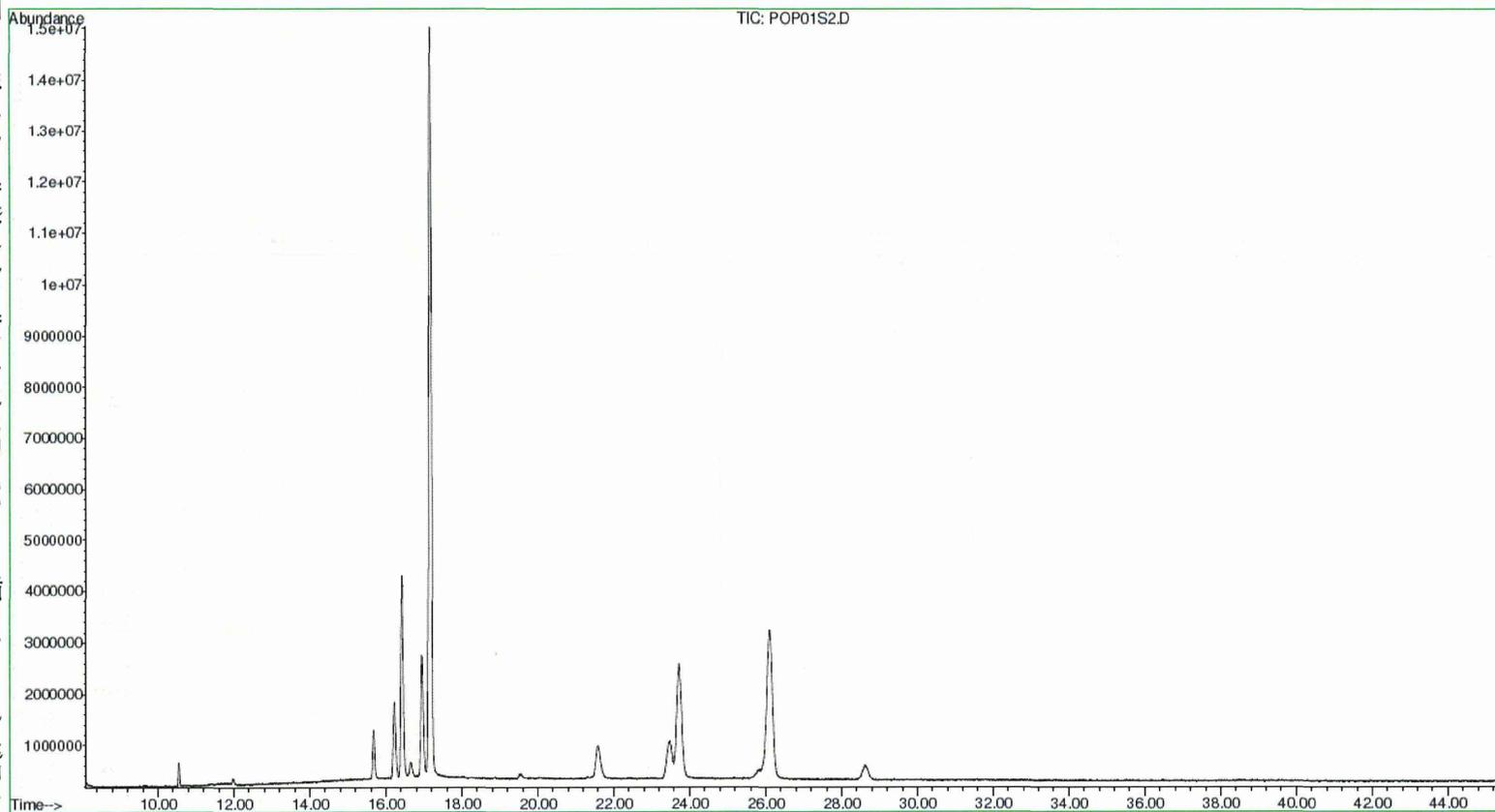


図1. 陰イオン化学イオン化におけるDechlorane類の質量スペクトラム

図2. 陰イオン化学イオン化におけるDechlorane類のクロマトグラム



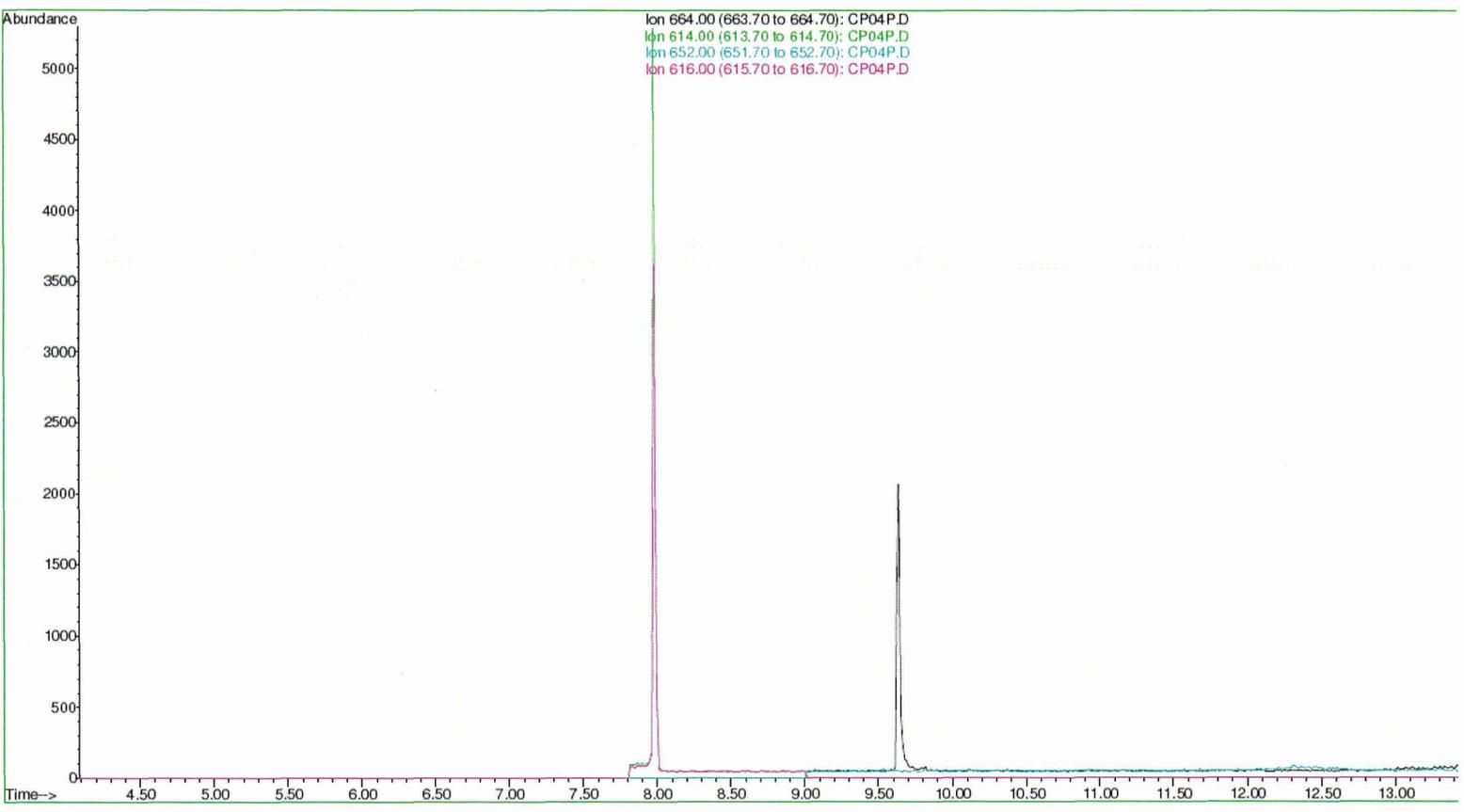


図2. 食事試料におけるDechlorane 602(8.0 min)と¹³C標識Dechlorane 605(9.6 min)のクロマトグラム

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

パーソナルケア製品（化粧品・日焼け止）とその原料中のPFCAsの検出

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科環境衛生学分野
分担研究者 原田 浩二 京都大学医学研究科環境衛生学分野
研究協力者 藤井 由希子 京都大学医学研究科環境衛生学分野

研究要旨

ポリフルオロリン酸エステル(polyfluoroalkyl phosphate esters; PAPs)は、化粧品・日焼け止・油耐性ある食品包装紙等に近年広く使用されている化学物質であり、PAPsの有機フッ素カルボン酸(perfluorinated carboxylic acid; PFCA)への分解がラットを用いた代謝実験で確認されている。同様の代謝経路がヒトでも存在するため、化粧品が残留性のあるPFCAの曝露源の一つである可能性が想定されている。本研究ではPAPsを中心に有機フッ素化合物を含むパーソナルケア製品（化粧品・日焼け止）とPAPsをコーティングとして使用した化粧品原料中のPFCA濃度を測定した。化粧品15製品中13、日焼け止め9製品中8でPFCAが検出された。総 PFCA(炭素鎖6-14)の濃度は化粧品で最大5.9 $\mu\text{g/g}$ 、日焼け止で最大19 $\mu\text{g/g}$ であった。PAPsの表示のある製品からは全てPFCAが検出された。また、化粧品原料のPAPs表面加工マイカは35.0 $\mu\text{g/g}$ 、タルクは2.5 $\mu\text{g/g}$ のPFCAをそれぞれ含んでいた。製品中のPFCAはppmレベルであり、従来の消費者製品類の濃度よりもはるかに高濃度であった。PFCAはPAPsを含んだ化粧品原料中にも高濃度見られたことから、原料のPAPsがPFCAのソースであると推測される。

A. 研究目的

ペルフルオロオクタン酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)などの有機フッ素カルボン酸(perfluorinated carboxylic acids, PFCA)は、ヒトの健康リスクを及ぼすと考えられている残留性有機汚染物質である。ポリフルオロリン酸エステル(polyfluoroalkyl phosphate esters; PAPs)は、化粧品・日焼け止・油耐性ある食品包装紙等に近年広く使用されている化学物質であるが(Daito

Kasei Kogyo., 1993)、PFCAへの分解がラットを用いた代謝実験にて確認され、同様の代謝経路を持つヒトでもPFCAに代謝されるため化粧品はヒトへの曝露源の一つである可能性が指摘されている(D'eon and Mabury, 2011, 2007)。

本研究では、PAPsを中心に有機フッ素化合物を含む消費者段階のパーソナルケア製品（化粧品・日焼け止）とPAPsを使用した化粧品原料のPFCA(鎖長6から14まで)の濃度を測