

3. 学会発表

- (ア) 尼子克己、今中美栄、坂本裕子、上山恵子、藤井由希子、西田梨那、原田由紀、江間麻美、小笠原晶子、原田浩二、小泉 昭夫. 福島県川内村帰村住民の食品による内部被ばくと栄養摂取状況. 第67回 日本栄養・食糧学会大会、2013年5月24日.
- (イ) 高菅卓三、苗田千尋、原田浩二、小泉昭夫. 短鎖塩素化パラフィンのトピックと環境化学的問題点(日本・韓国・中国における調査結果). 第22回 日本環境化学学会討論会、2013年7月31日.
- (ウ) 苗田千尋、原田浩二、高菅卓三、小泉昭夫. 短鎖塩素化パラフィンの日本・韓国・中国の食品・母乳における調査結果. 第22回 日本環境化学学会討論会、2013年7月31日.
- (エ) 要石真利、大原栄二、尼子克己、今中美栄、原田浩二、小泉 昭夫. 福島県川内村帰村住民の24時間陰膳調査(第1報)－食品群別分類とセシウム含有量について－. 第60回 日本栄養改善学会学術総会、2013年9月12日.

(オ) 上山恵子、坂本裕子、久木久美子、松岡幸代、今中美栄、原田浩二、小泉 昭夫. 福島県川内村帰村住民の24時間陰膳調査(第2報)－栄養摂取状況について－. 第60回 日本栄養改善学会学術総会、2013年9月12日.

(カ) 山本佳奈子、井上登紀子、大畑仁美、今中美栄、原田浩二、小泉 昭夫. 福島県川内村帰村住民の食環境に関する調査結果. 第60回 日本栄養改善学会学術総会、2013年9月12日.

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許の取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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

(1) 日中韓の食事および母乳中に汚染の懸念されるフェノール性ハロゲン化合物の残留調査

研究分担者 原口 浩一 第一薬科大学薬学部・教授
研究協力者 藤井 由希子 京都大学大学院医学研究科・大学院生

研究要旨

日本、中国および韓国の母乳および食事のフェノール性ハロゲン化合物（POC）について、その残留濃度を比較調査した。今回、新たに抗菌剤として用いられているトリクロサン（TCS）の母乳での残留実態と食事経由での曝露量について3か国で比較調査した。2009-2010年の母乳中におけるTCSの平均残留量は韓国（ソウル）で49 ng/g lipid、中国（北京）で45 ng/g lipid、日本（京都）で77 ng/g lipidであった。1990年および2009年に陰膳方式で収集した食事試料に基づくTCSの一日摂取量は、韓国で増加傾向を示したが、中国および日本の食事では3 µg/day前後と推定され、両年代で大きな変動は見られなかった。このことから、TCSは、過去10年間は食事経由でヒトは曝露され、一部は母乳中に排泄されるものと思われる。他のフェノール性臭素化合物の母乳中濃度については、tetrabromobisphenol A (TBBPA)が食事、母乳ともに中国で高く、2,4,6-tribromophenol (TBP)は韓国で高かった。水酸化PBDEのうち6-OH-BDE47が日本の食事では検出されたが、母乳中には検出されなかった。

A. 研究目的

ヒトに残留が懸念されるフェノール性ハロゲン化合物(POC)として、我々はこれまでに2,4,6-tribromophenol (TBP)、pentachlorophenol (PCP)、tetrabromobisphenol A (TBBPA)および hydroxy-tetrabromodiphenyl ether (OH-BDE) の日本人における残留実態を食事、血液および母乳を用いて調査してきた (Fujii et al., 2012; Fujii et al 2014)。OH-BDEが海洋生物由来化学物質であるのに対し、これ

と同じ骨格を有するトリクロサン (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol; TCS, Fig.1)は広く病院等で消毒剤として用いられ、また日常の化粧品や歯磨き粉等に添加されて利用されている。TCSは環境中に流出後、一部は河川や海底に蓄積されている (Rodorix 2010)。TCSの毒性は不明な点が多く、その疎水性や難分解性から魚介類から飲料水に至るまで検出され、ヒト体内への曝露が報告されている (Bedoux et al 2012)。また内分泌かく乱性が動物実験で指摘されるほ

か、過剰な使用はTCS耐性菌の出現リスクを高める可能性もある。このため、その継続的なモニタリングと毒性評価が必要となる (Dayan, 2007; Dannand Hontela, 2011)。欧米ではヒトの血清や母乳中でTCS残留の報告がなされ (Allmyr et al 2006; Dayan, 2007)、ヒトの食事からの摂取量が推定されている (Canosa et al 2008)。日本における魚介類からTCSが検出されているが (Miyazaki et al 1984; Okumura et al 1996)、東アジア圏におけるTCSの環境分布、食事やヒト体内の残留実態についての調査はほとんど行われていない。

そこで本研究は、京都大学生体試料バンクに保管してある日本、中国および韓国の食事およびヒト母乳試料を用いて、TCSを含むフェノール性ハロゲン化合物の食事からの摂取量および母乳中の濃度を計測し、3か国での汚染実態を比較することを目的とした。分析対象項目として、古典的POPsの一部も測定したので、合わせて報告する。

B. 研究方法

1) 食事 (陰膳方式) および母乳収集

日本、中国および韓国の食事ホモジネートは24時間に摂取する食事・飲料 (間食等すべて含む) をボランティア (30名) から提供されたものをそれぞれ専用ミキサーで混ぜ均一化し、100g前後の小さなボトルに分け、冷凍保存した。

日本、中国および韓国の母乳試料は京都大学生体試料バンクに保存されている試料のうち、2010年に韓国 (ソウル市) の30~38歳の女性10名 (平均年齢32歳)、2009年に中国 (北京市) の25~30歳の女性10名 (平均年

齢28歳) および2010年に日本 (京都市) の21~37歳の女性10名 (平均年齢32歳) から提供された母乳を使用した (Koizumi et al., 2009)。

この研究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。Table 1およびTable 2に参加者の地域、採取年、年齢、食事量および脂肪含量を示す。

2) 化学物質

TCS、TBP、TBBPAおよびPCPはCambridge Isotope Laboratories社製を用いた。内標準として用いた¹³C-triclosan、¹³C-methyltriclosan、¹³C-endosulfan、および4-OH-[¹³C]PCB187はWellington Laboratories社製を用いた。シリンジスパイクはストックホルム大学 (Dr. G. Marsh) より譲渡された4'-methoxy-BDE121を用いた。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℃で3時間乾燥させた。

3) サンプル前処理

食事ホモジネートから汚染物質の分析法は、従来の方法に従った (Fujii et al 2014)。(1) 脂肪抽出、(2) ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、(3) KOH+EtOH/ヘキサンによる液-液分配抽出と誘導體化 (メチル化)、(4) シリカゲルカラムによる精製の手順で行い、GC-MSにより定量した。その方法をFig. 2に示す。

(1) 母乳試料10g、食事試料15g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 (2:1:7) 20mLの有機溶媒および内標準物質

(13C-triclosan, 13C-methyltriclosan, 13C-endosulfan, および4-OH-[13C] PCB187、各2.0 ng/mL)を加えて、ホモジナイズし、遠心分離により上層を分離した。2回繰り返し抽出した液を濃縮し脂肪含量を測定した。

(2) 脂肪分はジクロロメタン (DCM) : n-ヘキサン(1:1 v/v) に溶解し、Bio-Beads S-X3 カラム (40g, バイオラッド社製) に付した。移動相は同溶媒を用い、流速 4 mL/minで、最初の96mL溶出で脂質を除去し、その後の 64mLを回収した。

(3) GPC 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(2mL)で分配抽出を行い、上層 (中性物質) と下層 (フェノール性物質) を分離した。中性分画は1mLまで濃縮した。フェノール性分画は 1M 塩酸 2mLを加えた後、n-ヘキサン:ジエチルエーテル (8:2, v/v, 10 mL)で逆抽出操作を3回を行い、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 1mLとった。

(4) 両分画とも、シリカゲルカラム (0.2g, 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) を、試薬ガスはメタンを用いた。GC/MSの設定条件と分析対象物質の検出イオンをTable 3に示す。物質の定量はイオンクロマトグラム上のシグナルを内標準と比較

して作成した検量線で行った。

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、妨害ピークが存在しないことを確認した。標準物質および内標準物質 (Table 2 に記載分について1-10 ng/mL) の市販牛乳への添加回収率は74~99%、相対標準偏差は12%以下であった (n=5)。定量限界(LOQ)はシグナル/ノイズ比 = 10で算出すると、0.1 から10 ng/g lipidの範囲であった (Table 2)。分析値がLOQ以下であった場合、LOQの1/2の値を平均値の計算に用いた。検量線は各物質とも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 Non-Fortified Human Milk, NIST) を用いて定量した結果、4,4'-DDE、HCB、trans-nonachlor についての分析値は、いずれも認証値の15%以内であった。

C. 研究結果

1) 母乳中のPOC

Table 4に韓国 (ソウル)、中国 (北京) および日本 (京都) の母乳中のPOCsの濃度を示す。TCSはすべての母乳から検出された。その平均値は韓国で49 ng/g lipid、中国で47 ng/g lipid、日本で77 ng/g lipidで最高値は中国人母乳の217 ng/g lipidであった。TBPについては韓国および中国の母乳でそれぞれ19および25 ng/g lipidを示し、日本の母乳では4 ng/g lipidの低い値を示した。TBBPAについては、韓国の母乳10検体中2検体で、中国の3検体で、日本の3検体で検出され、その最高値は日本人の15 ng/g lipidであ

った。OH-BDEについては、2'-OH-BDE68が韓国および中国の母乳それぞれ1検体で検出されたのみであった。

2) 食事中的POC

食事に混入しているPOCsについて、陰膳方式で収集した食事を調査した。韓国、中国および日本人の一日摂取量をTable 5 に示す。TCS、TBPおよびPCPはすべての食事から検出された。韓国では、TCSの一日摂取量は、1990年で約1.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ の比較的低い値を示したが、2009年には3.4 $\mu\text{g}/\text{day}$ へ増加した。中国および日本人のTCS摂取量はいずれも2.5~3.7 $\mu\text{g}/\text{day}$ で推移し、経年変化は認められなかった。TBPの摂取量は、韓国で増加傾向を示したが、中国では摂取量に経年変化はなく、日本では減少傾向を示した。一方PCPの摂取量は韓国で増加したが、中国および日本の食事では大きく減少した。OH-PBDEのうち、2'-OH-BDE68が、全食事30検体中13検体から検出された。中国では摂取量の増加傾向を示したが、韓国および日本では減少傾向を示した。6-OH-BDE47は日本の食事5検体から検出され、最高値7.4 $\mu\text{g}/\text{day}$ を示したが、韓国および中国の食事からは検出されなかった。

D. 考察

1) 母乳中のTCS

今回の調査で、母乳中のTCS濃度を3か国で比較すると、ほぼ同範囲で分布していることがわかる。母乳中のTCS濃度はスウェーデンで最初に調査され、そのときの濃度はnd(未検出)~300 $\text{ng}/\text{g lipid}$ で (Adolfsson-Erici et al 2002)、今回の調査結果とほぼ同範囲にある。米国での調査では、母乳中に0~2100 $\text{ng}/\text{g lipid}$ の範囲で検出

されている (Dayan 2007)。最近のオーストラリア人の母乳中TCS濃度は平均1.3 $\text{ng}/\text{g milk}$ と報告されている (Toms et al 2011)。この値を脂肪量あたりの濃度に換算すると、脂肪含量を3%とした場合、43 $\text{ng}/\text{g lipid}$ に相当し、今回のアジアでの調査結果よりやや低い値である。Allmyrら(2006)はTCS含有製品を使っている母親の母乳では、使用していない母乳より高いTCS濃度を示すことを明らかにした。TCS含有製品の使用頻度が母乳濃度に影響していると考えられる。

乳児の1日の母乳の摂取量を800 g/day と仮定して日本の乳児の曝露量を計算すると、TCS母乳濃度77 $\text{ng}/\text{g lipid}$ (約2.3 $\text{ng}/\text{g milk}$ に相当)の場合、乳児のTCS摂取量は平均1.8 $\mu\text{g}/\text{day}$ (最大値4.8 $\mu\text{g}/\text{day}$) と推定される。ラット授乳による仔のTCSのNOAELは50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ とされており (Dayan, 2007)、今回の値はこれの4桁低いレベルに相当する。このため現状ではTCS曝露が乳児に影響を与える可能性は低いと思われる。

2) 食事中的POCs

今回調査したフェノール性ハロゲン化合物のうち、TCSは2009年の食事では、3か国ともほぼ同レベルを示した。3か国での生活用品のなかに含まれるTCSが環境中へ放出されたあと魚介類へ蓄積され、食品へ移行していると考えられる (Rúdel et al 2013)。TBPはTCSとほぼ同じ、または低い摂取量であった。2009年の食事では韓国で最もTBP摂取量が多く、中国、日本の順であった。TBPは海藻で生産、放出され、海洋魚で39 $\mu\text{g}/\text{kg dry wet}$ と推定されている (Whitfield et al 1999)。一方で TBPは難燃剤としても使用され、ハウスダスト成分でもある

(Suzuki et al 2008)。このため、TBPのヒト曝露は食事および吸入の両方を考慮する必要がある。

TBBPAは30検体中5検体から最大1080 ng/day が検出され、昨年度の調査結果と類似した。TBBPAは関西地域の内海の魚介類(45中26)や海鳥、海棲哺乳動物のほか、土壌でも検出されている(Watanabe et al 1983)。中国の食品では最大2ng/g wetのTBBPAが報告されている (Shi et al 2009)。今回の中国の食事でのTBBPA調査では1280 ng/dayを示し、Shiら(2009)の報告よりも高い値となっている(Shi et al 2009)。中国の食事の高いTBBPA値が母乳中濃度に反映されると推察される。事実、中国の母乳中のTBBPAは平均4.5 ng/g lipidで日本、韓国より濃度が高い。日本人の食事によるTBBPAの推定一日摂取量(EDI)は、英国の調査結果より高かった (Driffield et al 2008)。しかし、欧州の毒性委員会 (COT) はTBBPAの毒性評価を低く設定し、ADIを1mg/kgbw/dayとしている。今回のTBBPAのEDI/ADI比はかなり低いため、母乳の乳児への影響は少ないと思われる。TBBPAは血液で短い半減期を有するため、母乳でTBBPA検出は過去の曝露の蓄積でなく、最近の曝露を反映していると考えられる (Hagmer et al 2000)。

OH-PBDEとして、2'-OH-BDE68および6-OH-BDE47を定量した。日本の食事では6-OH-BDE47のほうが比較的高濃度で検出されたが、韓国および中国の食事では2'-OH-BDE68のみが検出された。他の異性体は検出されないことから、これらPBDEの代謝物でなく、海洋生物由来 (Haraguchi et al., 2010) と考えられる。食事中にはこれらのOH体がメチル化された2'-MeO-BDE68および6-MeO-BDE47が

検出されたが、これらの濃度比は母乳中の濃度比と大きく異なることから、両者の体内挙動に違いがあると予想される。OH-PBDEの体内曝露は、発達期のT4の減少による脳神経発達への影響など (Meerts et al., 2001) が懸念されている。

環境中のPOCの動態については、環境微生物によるメチル化体の生成と食事中への混入に伴うヒト曝露が考えられる。たとえば、TCSは海洋細菌によりメチル化されmethyltriclosanとして魚介類で検出されている (Balmer et al 2004)。また、TBPやTBBPAは環境微生物によりメトキシ体へ変換する (Allard et al 1987; George and Haggblom 2008)。一方、TBPのメチル化体はラット肝ミクロゾームにより容易に脱メチル化されTBPに代謝されることが報告されている (太田ら 2010)。このため、環境中でPOCのメチル化体が生成し、食品混入によるヒト曝露により体内で再び脱メチルされる挙動 (代謝活性化) が考えられる (Wan et al., 2010; James et al., 2012)。対象となったPOCはいずれも内分泌かく乱性が指摘されているため、今後MeO体の動向を含めてモニタリングを継続する必要がある。

E. 結論

今回、汚染の懸念される物質として、トリクロサン関連物質を中心に調査した結果、フェノール性ハロゲン化合物のなかで、TCSが最も高濃度で食事および母乳から検出された。日中韓の3か国で比較するとTCS濃度差はみられないことから、生活用品に含まれるTCSが一様に食事経由でヒトに曝露され母乳に排泄されていると考えら

れる。TBP、TBBPAおよびPCPなどのPOCのほか、OH-BDEも検出されたが、日中韓でその分布に違いが見られた。OH-BDEはTCSと同じ骨格を有する臭素化合物であり、影響評価に関する報告は少ないので、そのヒト曝露量についての動向と毒性評価を再検討したい。

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

Adolfsson-Erici, M.; Pettersson, M.; Parkkonen, J.; Sturve, J.,
Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 2002, 46: 1485-1489.

Allard, A. S.; Remberger, M.; Neilson, A. H., Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Appl Environ Microbiol* 1987, 53: 839-845.

Allmyr, M.; Adolfsson-Erici, M.; McLachlan, M. S.; Sandborgh-Englund, G.,
Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Sci Total Environ* 2006, 372: 87-93.

Balmer, M. E.; Poiger, T.; Droz, C.; Romanin, K.; Bergqvist, P. A.; Müller, M. D.; Buser, H. R.,
Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environ Sci Technol* 2004, 38: 390-395.

Bedoux, G.; Roig, B.; Thomas, O.; Dupont, V.; Le Bot, B.,
Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environ Sci Pollut Res* 2012, 19: 1044-1065.

Canosa, P.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Ramil, M.; Cela, R.,
Simplified sample preparation method for triclosan and methyltriclosan determination in biota and foodstuff samples. *J Chromatogr A* 2008, 1188: 132-139.

Dann, A. B.; Hontela, A., Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J Appl Toxicol* 2011, 31: 285-311.

Dayan, A. D., Risk assessment of triclosan [Irgasan®] in human breast milk. *Food Chem Toxicol* 2007, 45: 125-129.

- 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.; 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* 2012,162: 269-274.
- Fujii, Y.; Nishimura, E.; Kato, Y.; Harada, K. H.; Koizumi, A.; Haraguchi, K., Dietary exposure to phenolic and methoxylated organohalogen contaminants in relation to their concentrations in breast milk and serum in Japan. *Environ Int* 2014,63: 19-25.
- George, K. W.; Haggblom, M. M., Microbial O-methylation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A. *Environ Sci Technol* 2008,42: 5555-5561.
- Hagmar L, Sjodin A, Hoglund P, Thuresson K, Rylander L, Bergman A. Biological half-lives of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol-A in exposed workers. *Organohalogen Compd* 2000, 47:198–201.
- 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.
- James, M. O.; Marth, C. J.; Rowland-Faux, L., Slow O-demethylation of methyl triclosan to triclosan, which is rapidly glucuronidated and sulfonated in channel catfish liver and intestine. *Aquatic Toxicol* 2012, 124-125: 72-82.
- 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.
- 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.
- Miyazaki, T.; Yamagishi, T.; Matsumoto, M., Residues of 4-chloro-1-(2,4-dichlorophenoxy)-2-methoxybenzene (triclosan methyl) in aquatic biota. *Bull Environ Contam Toxicol* 1984, 32: 227-232.
- Okumura, T.; Nishikawa, Y., Gas chromatography-mass spectrometry determination

- of triclosans in water, sediment and fish samples via methylation with diazomethane. *Anal Chim Acta* 1996, 325: 175-184.
- 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.
- Rodricks, J.V., Swenberg, J.A., Borzelleca, J.F., Maronpot, R.R., Shipp, A.M., Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Crit Rev in Toxicol* 2010, 40:422-484.
- Rüdel, H.; Böhmer, W.; Müller, M.; Fliedner, A.; Ricking, M.; Teubner, D.; Schröter-Kermani, C., Retrospective study of triclosan and methyl-triclosan residues in fish and suspended particulate matter: Results from the German Environmental Specimen Bank. *Chemosphere* 2013, 91:1517-1524.
- Shi, Z. X.; Wu, Y. N.; Li, J. G.; Zhao, Y. F.; Feng, J. F., Dietary exposure assessment of Chinese adults and nursing infants to tetrabromobisphenol-A and hexabromocyclododecanes: occurrence measurements in foods and human milk. *Environ Sci Technol* 2009,43: 4314- 4319.
- 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.
- Toms, L. M. L.; Allmyr, M.; Mueller, J. F.; Adolfsson-Erici, M.; McLachlan, M.; Murby, J.; Harden, F. A., Triclosan in individual human milk samples from Australia. *Chemosphere* 2011, 85: 1682-1686.
- 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., The flame retardant tetrabromobisphenol A and its metabolite found in river and marine sediments in Japan. *Chemosphere* 1983, 12: 1533-1839.
- Whitfield, F. B.; Helidoniotis, F.; Shaw, K. J.; Svoronos, D., Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia. *J Agric Food Chem* 1999, 47: 2367-73.

Table 1. Information of breast milk samples collected in Korea, China and Japan.

Area	year	n	Age (range)	Parity	Lipid %
Seoul	2010	10	32.1 (30-38)	2.0	2.0
Beijing	2009	10	27.8 (25-30)	1.0	2.5
Kyoto	2010	10	31.6 (21-37)	1.6	3.1

Table 2. Information of dietary homogenates in duplicate diet study from Seoul (Korea), Beijing (China) and Kyoto (Japan), 1990 and 2009.

Area	Sampling year	Number of pooled	Age	Dietary homogenate (g)	Lipid (%) of homogenate
Seoul	1990	10 (5 pooled)	37.8(35.8-45.6)	1777	0.73
	2009	10 (5 pooled)	35.8 (33.6-41.6)	2062	1.70
Beijing	1990	10 (5 pooled)	35.5 (33.0-38.4)	2249	1.30
	2009	10 (5 pooled)	26.5 (25.8-27.8)	3054	2.34
Kyoto	1990	10 (5 pooled)	21.6 (21.0-21.8)	1693	1.57
	2009	10 (5 pooled)	26.6 (22.0-36.0)	1579	1.75

Table 3. Selected ion monitoring (SIM) used in the GC/MS analysis for dietary food from Kyoto area.

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) ion source (150 °C for ECNI, 230 for EI)		
Ionization mode	Electron ionization (EI) and electron capture negative ionization (ECNI)		
Reagent gas	Methane for ECNI		
Analytes	GC t _R (min)	Target ion (m/z)	LOQ* (ng/mL)
4,4'-DDE	12.76	318 (316)**	1.0 (EI)
HCB	9.47	284 (286)	0.1(ECNI)
β-HCH	9.65	71 (255)	0.2(ECNI)
<i>trans</i> -chlordane	11.77	412 (410)	0.2(ECNI)
PCB153	13.75	360(362)	0.5(EI)
Triclosan (methylated)	12.14	302 (304)	0.1(EI)
TBP (methylated)	8.90	79 (81)	0.05(ECNI)
PCP (methylated)	9.52	278 (280)	0.05(ECNI)
TBBPA (methylated)	22.13	79 (81)	10(ECNI)
2'-OH-BDE68 (methylated)	17.74	79 (161)	0.2(ECNI)
6-OH-BDE47 (methylated)	18.29	79 (161)	0.2(ECNI)
4-OH-[¹³ C]-PCB187	17.38	438 (422)	0.2(ECNI)
α- [¹³ C] endosulfan (IS)	12.40	385 (387)	0.1(ECNI)
¹³ C-triclosan (methylated)	12.14	314 (316)	0.1 (EI)
¹³ C-methyltriclosan	12.14	314 (316)	0.1 (EI)

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

Table 4. Concentration of selected organohalogen compounds in breast milk from Korea, China and Japan.

Congener	Concentration (ng/g lipid, mean± SD)		
	Korea (Seoul)	China (Beijing)	Japan (Kyoto)
<i>phenolic</i>			
triclosan (TCS)	49±29 (13-101)	45±61 (13-217)	77±69 (16-199)
2,4,6-tribromophenol (TBP)	19±20 (4.0-7.3)	25±30 (6.9-89)	4.3±3.0 (1.4-12)
pentachlorophenol (PCP)	0.6±0.4 (0.1-1.5)	0.8±1.0 (0.2-3.2)	1.1±1.1 (nd-3.8)
2'-hydroxy-BDE68	0.1±0.2 (nd-0.8)	0.0±0.1 (nd-0.3)	nd
6-hydroxy-BDE47	nd	nd	nd
tetrabromobisphenol A (TBBPA)	0.3±0.7 (nd-2.1)	4.5±13 (0.0-4.0)	2.4±4.6 (nd-15)
<i>POPs</i>			
4,4'-DDE	116±115 (17-413)	2067±1409 (172-4977)	125±77 (38-242)
β-HCH	13.4 ±8.7 (4.9-34)	315±198 (0.0-728)	25±16 (7.1-46)
hexachlorobenzene (HCB)	49±14 (22-68)	221±90 (51-346)	63±20 (38-93)
trans-nonachlor (t-NC)	2.4±1.2 (0.7-4.4)	2.2±1.0 (0.9-4.5)	16±8.5 (7.8-33)
PCB153	18±10 (4-35)	24±12 (7.1-43)	60±39 (19-128)

Table 5. Mean dietary intake (ng/day) of organohalogen congeners by women in Korea, China and Japan

Congeners	Mean dietary intake ng/day					
	Korea (seoul)		China (Beijing)		Japan (Kyoto)	
	1990	2009	1990	2009	1990	2009
<i>phenolic</i>						
triclosan (TCS)	1474	3346	3308	3731	2470	3346
2,4,6-tribromophenol (TBP)	890	2336	1134	1328	1804	925
pentachlorophenol (PCP)	371	587	3143	567	868	94
2'-hydroxy-BDE68	54	30	8	113	394	7
6-hydroxy-BDE47	nd	nd	nd	nd	7463	197
tetrabromobisphenol A (TBBPA)	953	327	1449	1280	322	566
<i>POPs</i>						
4,4'-DDE	579	11162	11236	993	1509	394
beta-HCH	159	244	2041	355	236	60
hexachlorobenzene (HCB)	519	3485	2536	4555	1824	747
trans-nonachlor (t-NC)	26	352	16	3	244	49
PCB153	59	661	53	27	554	169

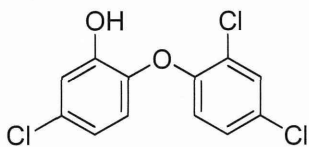


Fig. 1 Structure of TCS

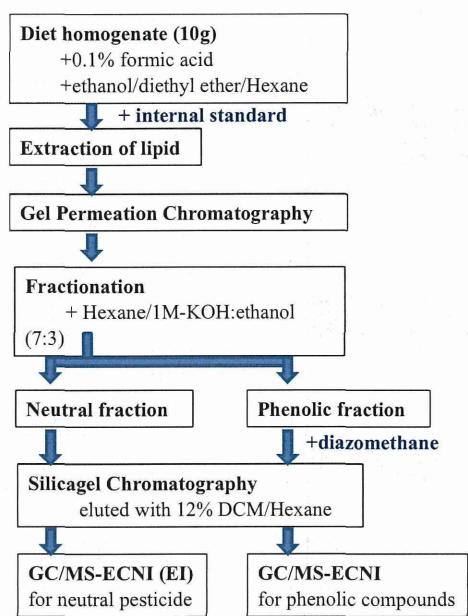


Fig. 2 Analytical methods for neutral and phenolic organohalogens in breast milk and dietary homogenates.

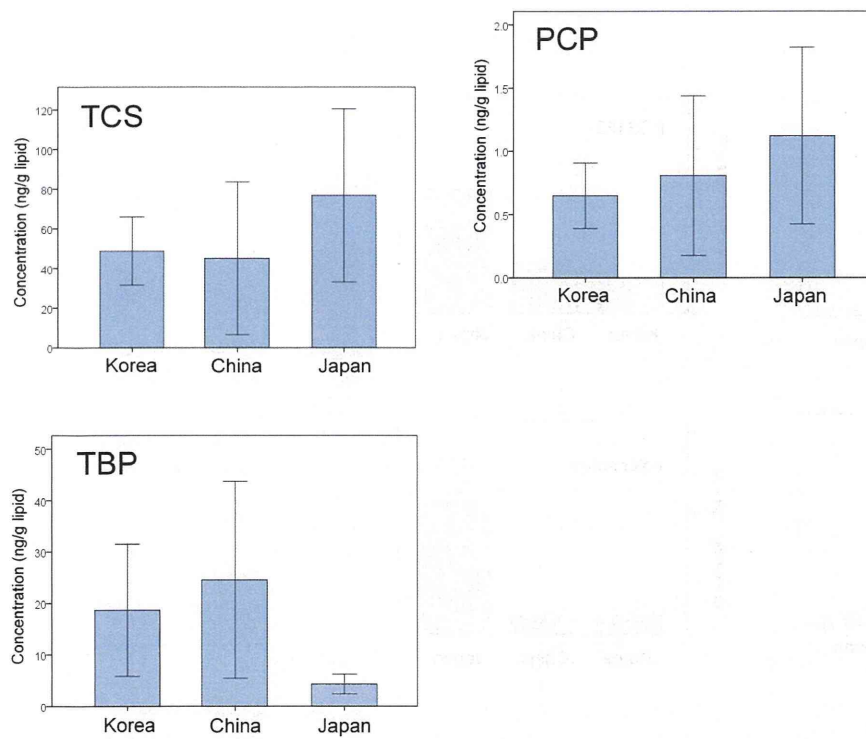


Fig. 3 Comparison of concentrations of POCs in breast milk from Korea, China and Japan.

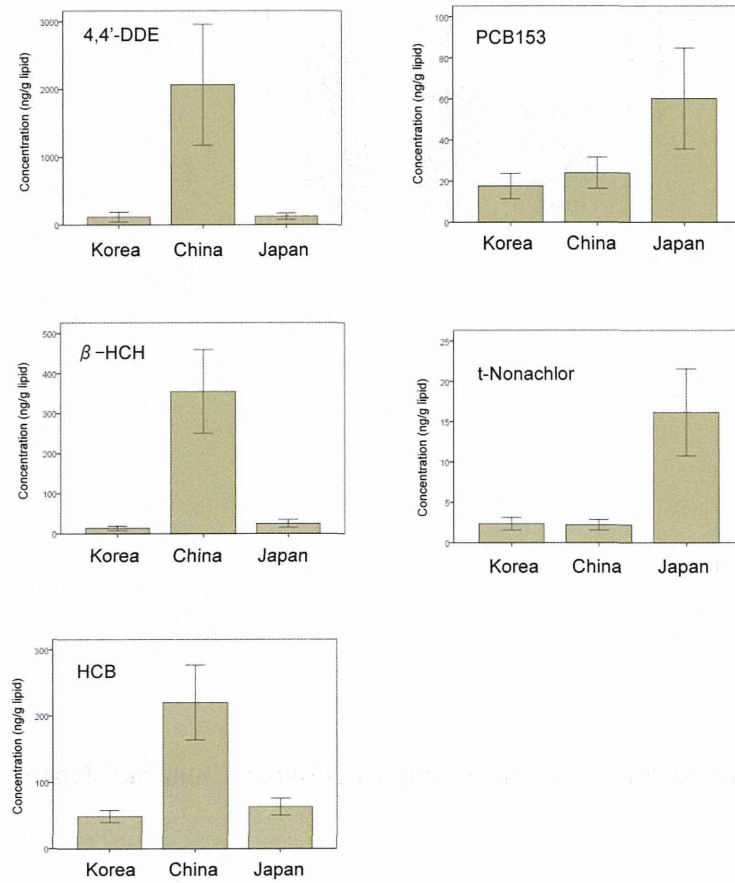


Fig. 4 Comparison of POPs concentrations in breast milk from Korea, China and Japan.

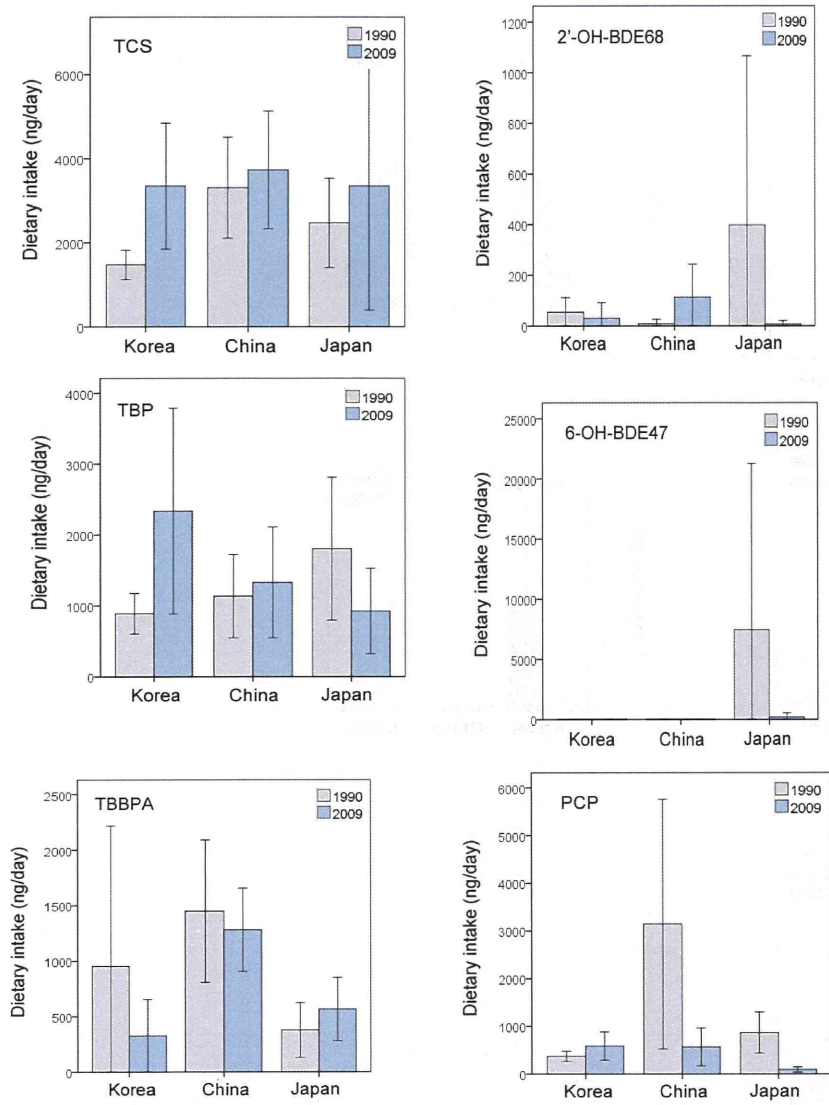


Fig. 5 Dietary intake (ng/day) of phenolic organohalogen in people of Korea, China and Japan.

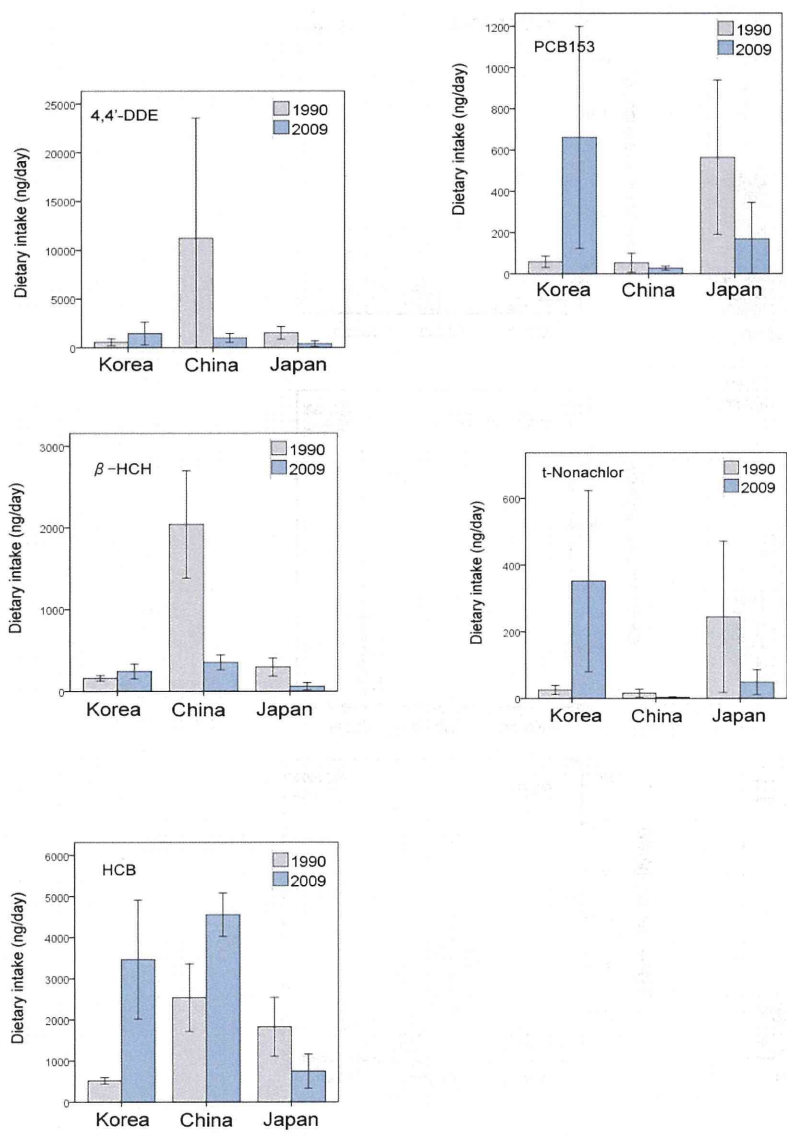


Fig. 6 Dietary intake of POPs in Korea, China and Japan, 1990 and 2009

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

(2) 生体試料バンクの保存試料を使用した食事経由のPFCAs摂取量と血清中濃度の動向調査

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学医学研究科・教授
研究協力者 藤井 由希子 京都大学医学研究科・大学院生

研究要旨

難分解性の有機フッ素化学物質であるペルフルオロアルキルカルボン酸類(PFCAs)は撥水加工剤製造等に広く使用されてきた化学物質であるが、ヒト生体試料中から広く検出され広範囲の汚染が懸念されている。本研究では日本におけるその汚染実態を明らかにすることを目的に、2000年前後の食事中、血清中のPFCAs(炭素数8から14まで)の測定を関西・東北地域の試料を用いて行った。関西における食品経由のPFCAs総摂取量(C8からC14の合計、幾何平均値)は79 ng/day、東北におけるPFCAsの総摂取量(C8からC14の合計、幾何平均値)は45 ng/dayであった。総PFCAs摂取量は最大値でもPFOA(炭素鎖8)の耐容一日摂取量より低い値であった(TDIの0.1%)。血清中濃度は、C8においては3割から9割が食事由来であると推測された。食事由来の摂取量と一致しない部分については、近年PFCAsを高濃度に含有する化粧品・日焼け止め等の消費者製品の存在も報告されており、それらによる汚染を受けている可能性も考えられる。

A. 研究目的

有機フッ素化合物のペルフルオロアルキルカルボン酸類(PFCAs)は全ての水素原子がフッ素原子に置換した炭素鎖(CF₃(CF₂)_n-: ペルフルオロアルキル鎖/Rf基)を持つ化学物質である。このRf基は環境中、生体中で分解不可能でありその多くは最終的にカルボン酸、スルホン酸となり安定化し環境中に残留する。カルボン酸の炭素鎖8のものはPFOA(C8)と呼ばれフッ素樹脂合成や界面活性剤として大量に使用され、また疫学研究で

は出生体重の低下が報告されており、そのヒトへの健康影響が懸念されている(Apelberg et al., 2007, Fei et al., 2007)。

PFCAsの血清中濃度の経年変化についてはいくつかの先行研究で、2000年前後からの増加が見られている(Calafat et al. 2007; Harada et al. 2011)(Glynn et al. 2012)。また最近、ドイツにおいて1982年からの血清中PFCAsの長期動向が明らかにされ、長鎖PFCAs(炭素鎖9, 炭素鎖11)の1990年前後における一時的な増加が報告された(Yeung et al. 2013)。

現在まで PFCA のヒトへの曝露源は不明な点が多いが、食事が主な曝露源とされている報告もあり (D'Hollander et al. 2010)、曝露管理の視点から食事中的 PFCA の長期動向の把握は重要である。しかしながらその分析法は煩雑であり (Kärman et al., 2009; Vestergren et al., 2012)、食事中 PFCA の長期動向を報告した研究はまだない。

本研究では日本における PFCA の血清中濃度の動向に加え、食事経由の摂取量の動向も明らかにすることを目的に、新規の分析法 (平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心安全確保推進研究事業) の「食事試料中の PFCA 分析法の確立」にて報告) を利用し、2000 年前後の食事試料と血清試料中に含まれる PFCA の測定を行った。

B. 研究方法

1) 対象物質

調査対象物質は、PFOA (C8)、perfluorononanoic acid (PFNA; C9)、perfluorodecanoic acid (PFDA; C10)、perfluoroundecanoic acid (PFUnDA; C11)、perfluorododecanoic acid (PFDoDA; C12)、perfluorotridecanoic acid (PFTrDA; C13)、および perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA; C14) の 9 化合物とした。

2) 対象集団

京都大学生体試料バンクの保存試料を使用した。対象集団の詳細は Table 1 に示す。陰膳食事試料は東北地域 (宮城) は 2004 年、関西地域 (京都) は 2003-2004 年に採取された各 16-18 試料の分析を行った。血清試料は東北地域 (宮城) 2003 年、関西地域

(京都) で 2004-2005 年に採取された各 30 試料の分析を行った。また対象者は全て女性とした。

3) 分析方法

食事試料は約 1g、血清試料は 0.1mL をそれぞれを分注し分析用試料とした。分注後、¹³C 標識の C8、C9、C10、C11、C12 の内部標準、t-ブチルメチルエーテル (MTBE) 1mL、0.5M テトラブチルアンモニウム溶液 (TBA) 0.3 mL、0.5M 炭酸ナトリウム緩衝液 0.6mL を加えた。チューブローターにて 24 時間回転混和させた後、遠心分離を行い、上清を量りとった。さらに MTBE を 1mL 追加し、24 時間回転、遠心分離、上清を取る操作を繰り返した (計 2 回の抽出)。この溶液を高純度窒素気流で乾固し、1 ng 11H-PFUnDA を加えた臭化ベンジルアセトン溶液を添加し、ベンジルエステル誘導体化した。分析は誘導体化後 24 時間以内に行った。

GC/MS (Agilent 6890GC/ 5973 MSD, Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。DB-5MS (全長 30m、内径 0.25mm、膜厚 1 μ m) のカラムで分離し、Single ion monitoring を使用し、化学イオン化陰イオンモードで分析した。試薬ガスにはメタンを用いイオン源温度は 150 $^{\circ}$ C とした。昇温条件は 70 $^{\circ}$ C で 2 分保持後、100 $^{\circ}$ C まで 20 $^{\circ}$ C/min、280 $^{\circ}$ C まで 30 $^{\circ}$ C/min で昇温した。Table 2 に示すイオンを測定した。

4) 検出限界、ブランク値、回収率

装置の検出限界 (IDL) はシグナル/ノイズ比=3 にて設定を行った。操作ブランクには Milli-Q water を使用した (計 8)。ブランク値が検出された場合は、ブランク値の平均に、標準偏差の 3 倍

の値を加えた数値を Method detection limit (MDL) として扱った。回収率は血清試料に500pg、食事試料に50pgの各標準物質を、抽出前のサンプルに添加し、抽出後に添加した11H-PFU_nDAと比較することで確認を行った (Table 2)。

C. 研究結果

1) 食事経由のPFCAs摂取量

食事試料の添加回収試験の結果はC8、C9、C10、C11、C12、C13、C14について、それぞれ72±11%、73±15%、79±7%、83±5%、91±11%、89±12%、104±20%であった (Table 2)。PFCAsの一日摂取量(ng/day)をTable 3に示す。

関西地方： 関西におけるPFCAsの総摂取量 (C8からC14の合計、幾何平均値) は2003-2004年、79 ng/dayであった (Table 3)。

東北地方： 東北におけるPFCAsの総摂取量 (C8からC14の合計、幾何平均値) は2004年、45 ng/dayであった (Table 3)。コンジェナー毎に見ると、C11が最も摂取量が高かった。

2) 血清中PFCAs濃度

血清試料の添加回収試験の結果はC8、C9、C10、C11、C12、C13、C14について、それぞれ87±12%、94±8%、87±6%、95±7%、96±5%、99±6%、106±7%であった (Table 2)。血清中のPFCAs濃度の測定結果はTable 4に示す。

関西地方： 関西における血清中PFCAs濃度 (C8からC14の合計、幾何平均値) は2004-2005年、10.2 ng/mLであった。コンジェナー毎に見ると、C8が最も高く、続いてC9であった。C8が全PFCAsの内の半分以上を占め

ていた。

東北地方： 東北における血清中PFCAs濃度 (C8からC14の合計、幾何平均値) は2003年、5.9 ng/mLであった。コンジェナー毎に見ると、関西と同様にC8が最も高かったが、続いて高いのは関西とは異なりC11であった。

D. 考察

1) 耐容一日摂取量との比較

本研究では、食事中PFCAs濃度を測定し、摂取量を計算した。全食事サンプルの分析を通じ、最大のTotal PFCAs摂取量は407.6 ng/day (内PFOA ; 72.1 ng/day) であった (京都の採取試料)。2014年現在まで長鎖を含むPFCAsの体重あたりの耐容一日摂取量 (TDI) は現在まで設定されていないが、PFOAについては欧州食品安全機関 (EFSA) により1500ng/kg-体重/dayと設定されている。体重を50kgと仮定すると、今回のPFOAの分析値はTDIの0.1%以下であり、十分に下回る結果であった。

2) 食事由来のPFCAs摂取量と、血清中濃度との関連

食事経由の曝露量と血中濃度を関連付けるには体内動態を考慮する必要がある。先行研究により、分布容積、半減期等が明らかにされているC8を例にとると、食品より摂取されたPFCAs量から計算される血清中濃度は以下のようなになる。C8の分布容積は200mL/kg (Niisoe et al. 2010)、半減期は3.8年 (Olsen et al. 2007) であり、また腸管での吸収率が高いと考えられている (Loccisano et al. 2012)。これらを考慮すると、体重50kgと仮定し、1-コンパートメントモデルで評価 (Niisoe et al., 2010) した場合、食品経