

水酸化 PCB（OH-PCB）胎児期曝露による母児甲状腺機能への影響

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長

研究要旨

水酸化 PCB(OH-PCB)は、PCB が生体内で代謝を受け産生される物質である。近年 OH-PCB が PCB と同様に生体内に蓄積し、妊娠中の曝露により胎盤を透過して胎児へ移行することが報告されているが、胎児の発育に必要な母児甲状腺ホルモン値への影響はほとんど研究されていない。そこで本研究では、妊娠期の母体血中 OH-PCB 曝露と母児甲状腺ホルモン値（TSH、FT4）との関連を検討した。2003 年～2005 年に同一産科医院にて参加登録した母児 514 組のうち、母体血中 OH-PCB 濃度および甲状腺ホルモン値の両方が得られた母 205 名、児 219 名（うち男児 103 名、女児 116 名）を解析対象として重回帰分析を行った。その結果、母体血中 Σ OH-PCB 濃度と母児甲状腺ホルモン値との間に crude 解析、交絡要因で調整を行った adjust model での解析ともに有意な関連は認められなかった。今後、さらに詳細な異性体レベルの解析や代謝遺伝子多型が及ぼす PCB 濃度と OH-PCB 濃度との関係も含めて甲状腺ホメオスターシスへの影響を検討し、学童期まで追跡して神経発達や体格成長へ及ぼす影響も評価する必要がある。

研究協力者

伊藤 佐智子
（北海道大学環境健康科学研究教育センター）
戸高 尊（九州大学医学部学術研究員）

A. 研究目的

PCB は毒性が発見されたのち国内で 1972 年に製造が中止され、2004 年にストックホルム条約でその使用と廃棄が禁止された。しかし PCB を含む製品は現在も使用され、安定性と長期にわたる蓄積性のため、環境中や生体から検出され続けている（Schecter 2001）。これまで PCB 胎児期曝露が生後の神経発達を妨げるという報告があり（Grandjean et al. 2001、Jacobson and Jacobson 1996）、成人よりも環境物質に脆弱とされる胎児への影響検討が注目されてきた。

PCB の一部は生体内で Cytochrome450 による酸化を受けた後、大部分が OH-PCB

へ代謝され速やかに体外へ排出されるとされてきたが、近年 OH-PCB は PCB 同様生体内や環境中に蓄積することが報告されている（Letcher et al. 2000）。そのため OH-PCB のヒトへの健康影響が懸念されているが、生体内における PCB の代謝経路は明らかになっていない。またこれまで PCB の健康影響とされてきたものが本来は OH-PCB の影響である可能性があり、早急に解明が必要である。OH-PCB は PCB よりも甲状腺ホルモンによく似た構造を有し、Transthyretin (TTR) と強い結合力を有することから（Brouwer et al. 1998）、PCB よりも体内の甲状腺機能維持へ強く影響を与えるとされており、これまで血清中の OH-PCB 濃度と甲状腺ホルモン FT4 との間に負の関連がみられたが、PCB 濃度と FT4 とは関連がみられなかった（Sandau et al. 2002）という報告や PCB、OH-PCB 濃度ともに T3 との関連がみられ

たという報告（Dallaire et al. 2009）があるが、一致した結果は得られていない。甲状腺ホルモンは胎児発育において重要な役割を示し、胎児は自らの甲状腺が分泌を開始するまでの妊娠初期は母親の甲状腺ホルモンに依存している（de Escobar et al. 2004；Calvo et al. 2002）。OH-PCB は胎盤通過性を有し、母体血中より臍帯血中の OH-PCB/PCB 濃度比が高い（Kawashiro et al. 2008）ことから、感受性が高い胎児への影響を直ちに明らかにする必要があるが、OH-PCB 胎児期曝露による児甲状腺機能への影響についての疫学報告はわずか 1 報である（Dallaire et al. 2009）。さらに甲状腺ホルモンは児の脳神経発達に重要な役割を示すことが知られており、脳神経の発生・発育時期の甲状腺機能異常は脳神経発達障害を招くと考えられる（Haddow et al. 1999）。これまでに OH-PCB 曝露と 5-6 歳の注意力低下との関連が報告され（Roze et al. 2009）、また男児において臍帯中の OH-PCB 濃度と 2 歳、5 歳時の体重との関連がみとめられたとの報告があるが（Yonemoto et al. 2011、Yonemoto et al. 2012）、これらの結果は OH-PCB 曝露による甲状腺ホルモン値変動を介している可能性がある。しかし、胎児期 OH-PCB 曝露による生後の行動情緒や体格成長へ影響を与える可能性については研究が不足しており十分な結果が得られていないため、わが国における早急な検討と予防対策が急務である。

そこで本研究では、一般生活環境レベルでの OH-PCB の妊娠期曝露が及ぼす母児甲状腺ホルモン値への影響を検討することを目的とした。

B. 研究方法

2003 年から前向き出生コホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道研究」を実施中であり、そのうち 2003 年～2005 年に参加登録を行い、2005 年までに札幌市内

同一産科医院にて出産を終えた母児 514 組を対象とした。

妊婦とその配偶者の既往歴、教育歴、世帯収入、喫煙状況などの対象者の属性は妊娠中期から後期に実施した自記式調査票、児の性別、出生時体重、出産経歴などの出生時所見は医療診療録から得た。OH-PCB 曝露評価のため、妊娠中期から後期に採血を行い、貧血のために妊娠中に採血ができなかったものは分娩後に実施した。母体血中 OH-PCB 濃度は福岡県保健環境研究所で測定し、また母児甲状腺ホルモン値（TSH、FT4）は、札幌市が実施しているマスキングの結果を用いた。

母体血中 Σ OH-PCB 濃度と母児甲状腺ホルモン値の関連については多変量解析を行った。多変量解析の独立変数は、母体血中 Σ OH-PCB 濃度とした。なお、 Σ OH-PCB 濃度、母児 TSH、FT4 値は常用対数変換して解析に用いた。従属変数は、母児 TSH、FT4 値とし、母親は出産時年齢、非妊娠時 BMI、出産回数、OH-PCB 測定用採血時期で、児は母親の出産時年齢、非妊娠時 BMI、出産回数、OH-PCB 測定用採血時期に加え、在胎週数、出生時体重、生下時採血日数、帝王切開の有無で調整して性別ごとに重回帰分析を行った。また、他物質の影響も考慮し、母児ともに PFOS、PFOA 濃度での調整も行った。統計解析には SPSS for Windows、version 16.0J を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

（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

514 組の母児のうち、母体血中 Σ OH-PCB 濃度と濃度が得られた 231 名の母親について、母体血中 Σ OH-PCB 濃度と濃度の平均は 35.1pg/g-wet であった。この値は諸外国および国内と比較して低い数値であった。また、甲状腺ホルモン値との関連検討は OH-PCB 測定値および甲状腺ホルモン値の両方を有する母 205 名、児 219 名（うち男児 103 名、女児 116 名）を解析対象とし、母体血中 Σ OH-PCB 濃度と母児甲状腺ホルモン値との間に crude 解析、交絡要因で調整を行った adjust model 解析ともに有意な関連は認められなかった。（表）

D. 考察

本研究では、一般生活環境レベルでの妊娠中 OH-PCB 暴露による母児甲状腺ホルモン値への影響について検討を行ったが、母児ともに有意な関連は認められなかった。

本研究の母体血中 OH-PCB 濃度は先行研究における妊婦と比較して低い濃度であった（Kawashiro et al. 2008; Park JS et al. 2007）。これまでの報告では OH-PCB の体内濃度は代謝前の物質である PCB の濃度と相関がみられ、本研究でも一致した結果が得られた。本研究では事前にコホート内妊婦 20 名の体内 PCB 濃度を過去の報告と比較したところ、PCB の濃度はヨーロッパ諸国より低く、千葉県柏市とインドでの報告よりやや高かったが、OH-PCB/PCB 濃度比は最も低い値を示した（Dirtu AC et al. 2010、Eguchi A et al. 2012、Gómara B et al. 2012、Kawashiro et al. 2008、Soechitram SD et al. 2004、Fångström et al. 2002）。

これは申請者らのコホート内妊婦では他のコホート対象者と比較して、環境中か

らの曝露量が低いことに加え、体内の PCB から OH-PCB への代謝能力が低い、または OH-PCB 体外排泄能力が高いため、体内 OH-PCB 濃度が低くなっている可能性も考えられる。妊娠期は体内の異物動態が変化する時期であるため PCB の代謝環境の変化や個々の代謝能力の違いによることが考えられるが、これまでヒトにおける PCB、OH-PCB の代謝経路は明らかになっておらず、個々人の生体内代謝環境による血中濃度差についての疫学研究はない。今後は代謝遺伝子多型も含めた検討が必要である。また、高塩基の PCB は水酸化されにくく、低塩基の PCB は水酸化されやすいことから、総 PCB 濃度が高値であっても総 OH-PCB 濃度は PCB の異性体の種類によることが多い。よって、PCB および OH-PCB 異性体ごとの検討が今後必要とされる。

児の胎児期 OH-PCB 曝露による甲状腺ホルモン値への影響はみとめられず、これは過去の報告と一致していた（Dallaire et al. 2009）。しかし、Yonemoto らの報告では臍帯中の OH-PCB 濃度と 2 歳時、5 歳時の体重との関連がみられたことから（Yonemoto et al. 2012）、胎児期の OH-PCB 曝露が生後も長期にわたって影響を及ぼすと考えられ、継続的な調査が必要と思われる。甲状腺ホルモンについては、母親の妊娠初期における甲状腺機能低下症と児の IQ 低下や神経心理学発達悪化との関連を示す報告があることから（Haddow et al. 1999）、胎児初期における母親の甲状腺ホルモン値が非常に重要であることが知られている。ラットでの動物実験では母ラットの OH-PCB 曝露後に胎児血清中 T4 値の低下と TSH 値の増加がみられた（Meerts et al. 2002）。T4 値の低下という点では PCB 曝露と同様の結果がみられ（Morse et al. 1996）、これは本来生体内で代謝された OH-PCB による影響であった可能性もある。しかし、ヒトについては

報告が少なく、代謝前の物質である PCB との結果の比較を行いながらさらに検討が必要である。

E. 結論

母体血中 OH-PCB 濃度の妊娠期曝露による母児甲状腺ホルモン値への影響はみとめられなかった。今後、OH-PCB 異性体レベルでの解析や、個人の代謝遺伝子多型が及ぼす PCB 濃度と OH-PCB 濃度との関係も含め、甲状腺ホメオスターシスへの影響を検討し、学童期まで追跡して神経発達や体格へ及ぼす影響も評価する必要があると考える。

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（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

1. Schecter A, Cramer P, Boggess K, Stanley J, Pöpke O, Olson J, Silver A, Schmitz M. 2001. Intake of dioxins and related compounds from food in the U.S. population. *J Toxicol Environ Health A*. May 11;63(1):1-18.
2. Grandjean P, Weihe P, Burse VW, Needham LL, Storr-Hansen E, Heinzow B, et al., 2001.

- Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicol Teratol*. Jul-Aug;23(4):305-17.
3. Jacobson JL, Jacobson SW. 1996. Dose-response in perinatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs): the Michigan and North Carolina cohort studies. *Toxicol Ind Health*. May-Aug;12(3-4):435-45.
 4. Letcher RJ, Klasson Wehler E, Bergman Å. 2000. Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. In: *New Types of Persistent Halogenated Compounds* (Paasivirta J, ed). Berlin:Springer-Verlag, 315-359.
 5. Brouwer A, Morse DC, Lans MC, Schuur AG, Murk AJ, Klasson-Wehler E, Bergman A, Visser TJ. 1998. Interactions of persistent environmental organohalogen with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol Ind Health*. Jan-Apr;14(1-2):59-84.
 6. Sandau CD, Ayotte P, Dewailly E, Duffe J, Norstrom RJ. 2002. Pentachlorophenol and hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites in umbilical cord plasma of neonates from coastal populations in Québec. *Environ Health Perspect*. Apr;110(4):411-7.
 7. de Escobar GM, Obregón MJ, del Rey FE. 2004. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Pract Res Clin*

- Endocrinol Metab. Jun;18(2):225-48.
8. Calvo RM, Jauniaux E, Gulbis B, Asunción M, Gervy C, Contempré B, Morreale de Escobar G. 2002. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J Clin Endocrinol Metab.* Apr;87(4):1768-77.
 9. Kawashiro Y, Fukata H, Omori-Inoue M, Kubonoya K, Jotaki T, Takigami H, Sakai S, Mori C. 2008. Perinatal exposure to brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in Japan. *Endocr J.* Dec;55(6):1071-84.
 10. Dallaire R, Muckle G, Dewailly E, Jacobson SW, Jacobson JL, Sandanger TM, Sandau CD, Ayotte P. 2009. Thyroid hormone levels of pregnant inuit women and their infants exposed to environmental contaminants. *Environ Health Perspect.* Jun;117(6):1014-20.
 11. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, Williams JR, Knight GJ, Gagnon J, 1999. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med.* Aug 19;341(8):549-55.
 12. Roze E, Meijer L, Bakker A, Van Braeckel KN, Sauer PJ, Bos AF. 2009. Prenatal exposure to organohalogen, including brominated flame retardants, influences motor, cognitive, and behavioral performance at school age. *Environ Health Perspect.* Dec;117(12):1953-8.
 13. Yonemoto J., Kawahara J., Sone H., Hattori T, Matsumura T, Sugama S, Hamaguchi M, Ohya Y (2012) PRENATAL EXPOSURE TO OH-PCBs IN RELATION TO PHYSICAL DEVELOPMENT IN A BIRTH COHORT (T-Child) AT 5 YEARS OF AGE. 32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Organohalogen Compounds, 74
 14. Yonemoto J., Kawahara J., Sone H., Hattori T., Matsumura T., Ohya Y., Sugama S. (2011) Prenatal exposure to OH-PCBs in relation to body weight and neurodevelopment. 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Abstract of 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, 73, 1211-1214
 15. Park JS, Linderholm L, Charles MJ, Athanasiadou M, Petrik J, Kocan A, Drobna B, Trnovec T, Bergman A, Hertz-Picciotto I. 2007. Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBS) in pregnant women from eastern Slovakia. *Environ Health Perspect.* Jan;115(1):20-7.
 16. Dirtu AC, Jaspers VL, Cernat R, Neels H, Covaci A. 2010. Distribution of PCBs, their hydroxylated metabolites, and other phenolic contaminants in human serum from two European countries. *Environ Sci Technol.* 2010 Apr 15;44(8):2876-83.
 17. Eguchi A, Nomiya K, Devanathan G, Subramanian A, Bulbule KA, Parthasarathy P, Takahashi S, Tanabe S. 2012. Different profiles of anthropogenic and naturally

- produced organohalogen compounds in serum from residents living near a coastal area and e-waste recycling workers in India. *Environ Int.* 2012 Oct 15;47:8-16.
18. Gómara B, Athanasiadou M, Quintanilla-López JE, González MJ, Bergman A. 2012. Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites in placenta from Madrid mothers. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2012 Jan;19(1):139-47.
 19. Soechitram SD, Athanasiadou M, Hovander L, Bergman A, Sauer PJ. 2004. Fetal exposure to PCBs and their hydroxylated metabolites in a Dutch cohort. *Environ Health Perspect.* 2004 Aug;112(11):1208-12.
 20. Fängström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P, Bergman A. 2002. Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ Health Perspect.* 2002 Sep;110(9):895-9.
 21. Meerts IA, Assink Y, Ceniñ PH, Van Den Berg JH, Weijers BM, Bergman A, Koeman JH, Brouwer A. 2002. Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal and maternal thyroid hormone homeostasis in the rat. *Toxicol Sci.* Aug;68(2):361-71.
 22. Morse DC, Wehler EK, Wesseling W, Koeman JH, Brouwer A. 1996. Alterations in rat brain thyroid hormone status following pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254). *Toxicol Appl Pharmacol.* Feb;136(2):269-79.

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

Table. Results of multiple linear regression analyses in maternal and infant serum TSH and FT4 by maternal OH-PCB levels

variables	log ₁₀ transformed TSH				log ₁₀ transformed FT4				
	Crude		Adjusted		Crude		Adjusted		
	B (95%CI)	p-value	B (95%CI)	p-value	B (95%CI)	p-value	B (95%CI)	p-value	
log ₁₀ transformed OH-PCB (pg/g)									
Mothers (n=205)	0.070 (-0.083 to 0.223)	0.369	0.023 (-0.166 to 0.212) ^a	0.809	-0.025 (-0.079 to 0.030)	0.373	0.015 (-0.049 to 0.080) ^a	0.638	
Male infants (n=103)	0.067 (-0.167 to 0.300)	0.572	0.085 (-0.213 to 0.382) ^b	0.568	-0.025 (-0.078 to 0.027)	0.339	0.009 (-0.059 to 0.077) ^b	0.797	
Female infants (n=116)	0.083 (-0.107 to 0.272)	0.389	0.144 (-0.077 to 0.366) ^b	0.199	0.025 (-0.026 to 0.077)	0.331	0.028 (-0.033 to 0.088) ^b	0.362	

^a; adjusted for maternal age at delivery, BMI, parity, Log10 transformed PFOS and PFOA, blood sampling period of OH-PCBs and PFCs (PFOS, PFOA).

^b; adjusted for maternal age at delivery, parity, maternal BMI, gestational weeks, birth weight, experience of cesarean operation, Log10 transformed PFOS and PFOA, maternal blood sampling period of OH-PCBs and PFCs (PFOS, PFOA), blood sampling day after birth of thyroid hormones.

Statistically significant; * p < 0.05, ** p < 0.01.

血液中のビスフェノール A(BPA)の分析 (1)

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

血液中のビスフェノール A(BPA)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 の分析方法を確立できた。確立した方法を用い、ヒト血液 70 検体に適用し結果を得た。

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である。

BPA の体内負荷量を評価するにはヒト血液中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であることから、本研究ではヒト血液中の BPA 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。

B. 研究方法

開発した同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (ID-LC-MS/MS) をヒト血液試料 70 検体に適用した。内標準物質として、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用いた。また、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。

分析フローを図 1 に LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

C. 研究結果

(1) 操作ブランク

試料 70 検体は、3 ロットにわけて分析を実施した (ロット 1: 試料 ID 1~21, ロット 2: 試料 ID 22~46, ロット 3: 試料 ID 47~70)。操作ブランク試験は各ロットについて 5 回実施した。操作ブランク試験の結果を表 2 に示す。操作ブランクの平均値は 1 回目 0.088ng/mL, 2 回目 0.038ng/mL 及び 3 回目 0.088ng/mL であり 0.1 ng/mL 未満であった。

(2) ヒト血液の分析

血液試料 70 検体の分析結果を表 3 に示す。なお、ロット毎のブランク試験とは別途、実試料の分析を行う前に、全操作

ブランク試験を行い、BPAの汚染が問題ないことを確認した。血液中のBPA濃度は、ND～0.153ng/mL(平均値0.058ng/mL, 中央値0.049ng/mL)であった。なお、表3における血液中のBPA濃度は、操作ブランク値を差し引いた値である。

分析した血液全試料について、BPA濃度分布を図2に示す。

(3)回収率

検体の測定における各試料の回収率(クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)/シリンジスパイク内標準物質(BPA d-4)の値を用い、回収率を計算した。結果を図3に示す。全試料の回収率は71～113%の範囲であった。

(4)装置の変動の確認

装置の変動について確認を行うため、濃度1.0ng/mLの標準溶液を測定試料3～5検体毎に測定し、その相対感度係数(RRF)を検量線作成時のRRFと比較して評価を行った。試料70検体を3回にわけて分析した各測定日別の結果を表4～6に示す。

各測定日におけるRRFは、検量線におけるRRFの±20%の範囲であった。また、各測定の平均値は、1.02、1.05及び1.01であった。

D. 考察

本研究ではヒト血液中のBPAを議論可能な濃度レベルで精確に測定する手法を開発した。昨年度までに、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)法を検討した。さらに、血液中BPAの分析においてはブランク値の低減が最も重要であったため、試薬ブランク、個々の前処理段階におけ

るブランク、カートリッジからの溶出ブランク及び全操作ブランク、並びに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を行い、最終的にブランク値を0.1ng/mL未満のレベルに安定して抑えることが可能となった。

E. 結論

血液中のビスフェノールA(BPA)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の分析方法を確立できた。確立した方法を用い、ヒト血液70検体に適用し結果を得た。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

- (1)山本潤,羽山真介,佐藤修之,松村徹,岸玲子,佐々木成子,宮下ちひろ.生体試料中ビスフェノールA分析の検討.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

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

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

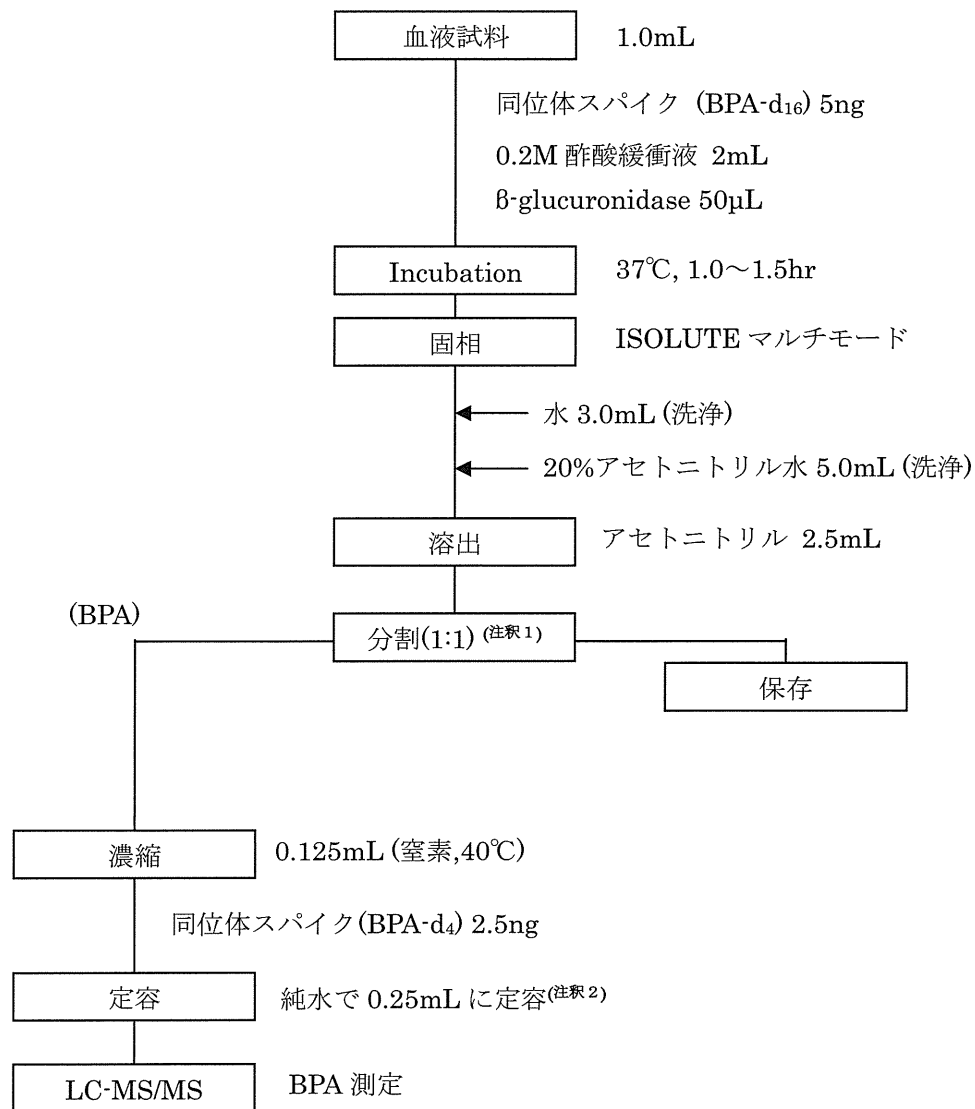


図 1. 血液中の BPA の分析フロー

(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。

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. BPA 分析における LC/MS/MS 測定条件

測定装置	LC : Agilent-1100 MS : API-4000 Q Trap
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°C
モード	ESI-Negative
m/z	227.0 > 132.9(BPA) 241.0 > 142.0(BPA-d ₁₆) 231.0 > 134.9(BPA-d ₄)

表 2 操作ブランク試験の結果

試料名	ブランク値	ブランク値	ブランク値
	(ng/mL) 1 回目	(ng/mL) 2 回目	(ng/mL) 3 回目
試料 1	0.086	0.041	0.093
試料 2	0.074	0.030	0.081
試料 3	0.097	0.047	0.099
試料 4	0.096	0.044	0.092
試料 5	0.090	0.030	0.074
平均 (ng/mL)	0.088	0.038	0.088
標準偏差	0.00944	0.00758	0.01014
t 値(危険率 5%、片側)	2.132	2.132	2.132
MDL (ng/mL)	0.041	0.033	0.044

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 血液中の BPA 分析結果

試料 ID	血中の BPA 濃度 (ng/mL) (※)	回収率(%) (※)	試料 ID	血中の BPA 濃度 (ng/mL) (※)	回収率(%) (※)
試料 1	0.12	83	試料 36	0.035	83
試料 2	0.093	78	試料 37	0.071	75
試料 3	0.061	79	試料 38	0.052	89
試料 4	0.081	74	試料 39	0.046	87
試料 5	0.047	72	試料 40	0.043	76
試料 6	0.047	81	試料 41	0.063	75
試料 7	0.094	71	試料 42	0.048	76
試料 8	0.085	77	試料 43	ND	80
試料 9	0.080	83	試料 44	0.097	74
試料 10	0.12	77	試料 45	0.068	82
試料 11	0.11	77	試料 46	0.063	91
試料 12	0.072	80	試料 47	ND	79
試料 13	0.13	77	試料 48	ND	85
試料 14	0.12	80	試料 49	ND	78
試料 15	0.056	73	試料 50	ND	77
試料 16	0.048	80	試料 51	ND	82
試料 17	0.065	79	試料 52	ND	78
試料 18	0.061	88	試料 53	ND	79
試料 19	0.099	77	試料 54	ND	80
試料 20	0.091	78	試料 55	ND	79
試料 21	0.12	78	試料 56	ND	82
試料 22	ND	74	試料 57	ND	73
試料 23	0.092	89	試料 58	0.048	83
試料 24	0.044	84	試料 59	0.069	77
試料 25	ND	80	試料 60	0.081	80
試料 26	ND	79	試料 61	ND	113
試料 27	ND	80	試料 62	ND	85
試料 28	0.047	77	試料 63	0.072	85
試料 29	ND	73	試料 64	0.070	84
試料 30	0.048	77	試料 65	0.090	86
試料 31	ND	83	試料 66	0.15	90
試料 32	ND	80	試料 67	0.090	78
試料 33	ND	78	試料 68	0.054	86
試料 34	0.050	82	試料 69	0.091	84
試料 35	0.040	78	試料 70	0.14	79

備考 1) 試料 ID の欄は、緑色（ロット 1）、黄色（ロット 2）及びオレンジ色（ロット 3）における分析を示す。

備考 2) 報告値（血中の BPA 濃度）は、有効数字 2 桁で記載してある。

備考 3) 回収率は、クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)/シリンジスパイク内標準物質(BPA d-4)の値を用い、
 (試料液) / (標準液の平均) ×100 で記載してある。

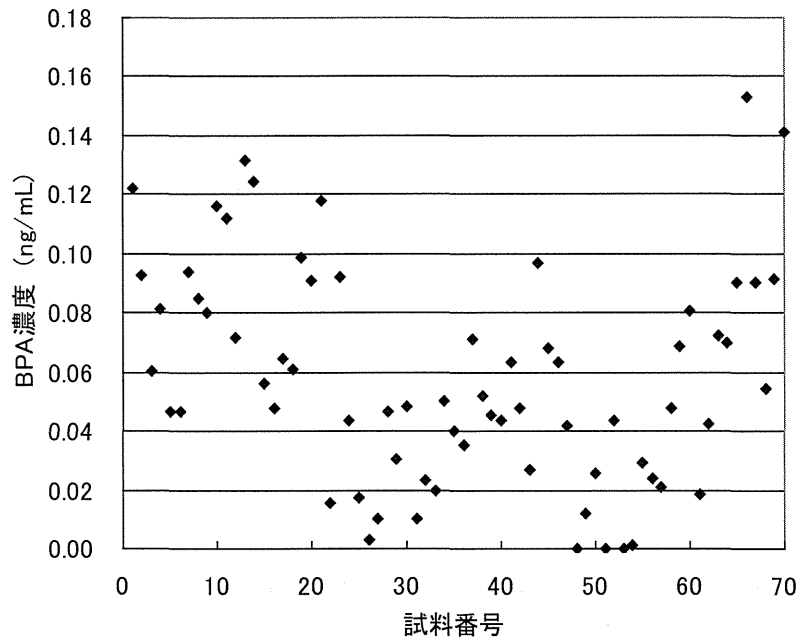


図.2 血液試料中の BPA 濃度

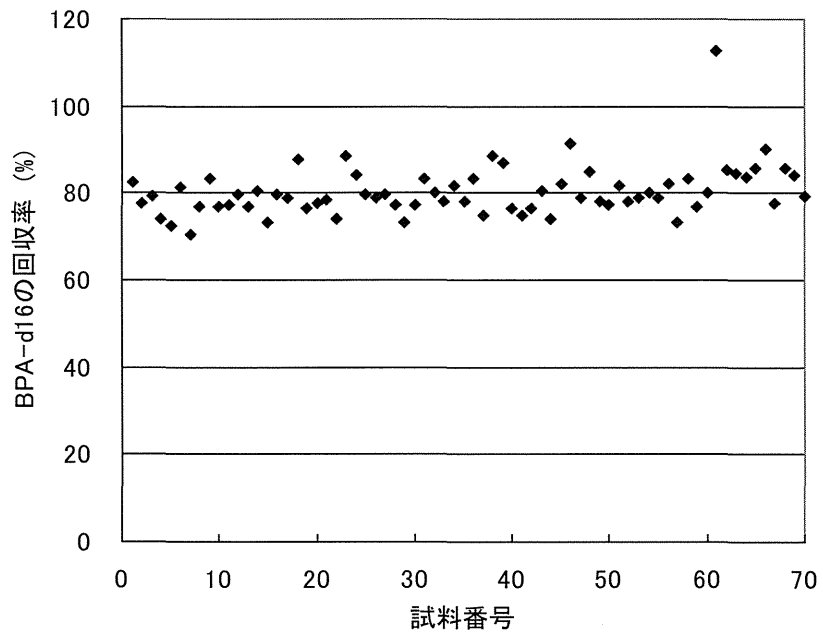


図.3 試料における内標準物質の回収率

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表 4 装置の変動の確認（1 回目の分析）

	RRF	相対比(%)(※)
検量線作成時	1.03	100
Check(1 回目)	1.11	107
Check(2 回目)	1.08	104
Check(3 回目)	1.06	103
Check(4 回目)	1.03	100
Check(5 回目)	0.99	96
Check(6 回目)	0.96	93
Check(7 回目)	0.92	89
Check(8 回目)	0.98	95
平均値	1.02	99
最大値	1.11	107
最小値	0.92	89

※相対比 (%) = RRF(測定した標準液の値) / RRF (検量線の平均値)。

表 5 装置の変動の確認（2 回目の分析）

	RRF	相対比(%)(※)
検量線作成時	1.05	100
Check(1 回目)	1.08	103
Check(2 回目)	0.99	94
Check(3 回目)	1.05	100
Check(4 回目)	1.06	101
Check(5 回目)	1.07	102
Check(6 回目)	1.05	100
Check(7 回目)	1.07	102
Check(8 回目)	1.03	98
Check(9 回目)	1.04	99
Check(10 回目)	1.05	100
平均値	1.05	100
最大値	1.08	103
最小値	0.99	94

表 6 装置の変動の確認（3 回目の分析）

	RRF	相対比(%)(※)
検量線作成時	0.95	100
Check(1 回目)	1.04	109
Check(2 回目)	0.99	104
Check(3 回目)	1.01	105
Check(4 回目)	1.04	109
Check(5 回目)	1.01	105
Check(6 回目)	0.98	103
Check(7 回目)	1.03	108
Check(8 回目)	1.04	109
平均値	1.01	106
最大値	1.04	109
最小値	0.95	100

血液中のビスフェノール A（BPA）の分析（2）

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

昨年度までに検討し、開発した血液中のビスフェノール A（BPA）の測定分析方法を用い、ヒト血液 101 検体（母体血 44 検体及び臍帯血 57 検体）に適用し結果を得た。全操作ブランク、MDL、二重測定及び回収率の品質管理項目の結果も安定しており血液試料 1mL を用いる測定分析手法としては完成したものと考える。

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（以降 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。

BPA の体内負荷量を評価するにはヒト血液中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 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）法を検討した。血液中 BPA の分析においてはブランク値の低減が最も重要であったため、試薬ブランク、個々の前処理段階におけるブランク、カートリッジからの溶出ブランク及び全操作ブランク、並びに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を行い、最終的にブランク値を 0.1ng/mL 未満のレベルに安定して抑えることに成功した。本年度は確立した方法を実際のヒト血液試料 101 検体に適用し、結果を得た。

B. 研究方法

開発した同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計（以降 ID-LC-MS/MS）をヒト血液試料 101 検体（母体血 44 検体及び臍帯血 57 検体）に適用した。内標準物質として、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用いた。また、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。

最終的に決定した分析フローを図 1 に LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

C. 研究結果・考察

(1) 操作ブランク及び分析法の検出下限値（MDL : Method Detection Limit）

試料 101 検体は、4 ロットにわけて分析を行い、各ロットについて操作ブランク試験をそれぞれ 5 回実施した。操作ブランク試験の結果を及びそれによって計算された MDL を表 2 に示す。操作ブランクの平均値は 1 回目 0.040ng/mL、2 回目 0.030ng/mL、3 回目 0.049ng/mL 及び 4 回目 0.036ng/mL と 0.1 ng/mL 未満であった。また 4 回の操作ブランク試験の結果より計算された MDL は 1 回目 0.032ng/mL、2 回目 0.015ng/mL、3 回目 0.048ng/mL 及び 4 回目 0.045ng/mL であった。昨年度と同様に、操作ブランク及び MDL は、0.1ng/mL 未満であった。

(2) 二重測定

測定分析における品質管理の一環として 8 試料（全検体数の 7.9%）について二重測定を実施した。結果を表 3 に示す。二重測定における差は 5.3～20%であった。

(3) ヒト血液の分析

ヒト血液試料 101 検体（母体血 44 検体及び臍帯血 57 検体）について BPA の測定分析を行った。結果を表 4 に示す。血液中の BPA 濃度は、ND～0.18ng/mL（平均値 0.075ng/mL、中央値 0.069ng/mL）であった。なお、表 4 における BPA 濃度は、操作ブランク値を差し引いた値で、ND は、4 回の分析ロットごとに求めた検出下限値（MDL）未満であることを示す。

(4) 回収率

検体の測定における各試料の回収率（クリーンアップスパイク内標準物質（BPA d-16）/シリンジスパイク内標準物質（BPA d-4））の値を用い、回収率を計算した。結果を表 4 に示す。全試料において回収率は 60～96%の範囲であった。なお、本分析方法は内標準法であるので回収率の数値は結果に影響を与えない。

(5) 装置の応答変動の確認

装置の応答変動の確認のため、チェック用標準液（PA 濃度 1.0ng/mL）を実試料 7～10 検体ごとに測定し、その相対感度係数（RRF）を検量線作成時の RRF と比較した。4 回の分析ロットにおける測定時の装置の応答変動を表 5 に示す。各測定におけるチェック標準液の RRF は、4 回の分析ロットで 89～101%の範囲であった。また、測定ごとの RRF（平均）は、0.98、0.99、0.98 及び 0.98 であり、測定間の差がないことが確認された。

D. 結論

本研究で開発した分析方法によって血液中の BPA を評価可能な濃度レベルでデータ取得可能となった。昨年度から実試料計 171 検体へ適用したが、全操作ブランク、MDL、二重測定及び回収率の品質管理項目の結果も安定しており、試料 1mL を用いる手法の開発としては現在の科学技術レベルの範囲においては完成したものとする。ただし、試薬及び実験器具の品質管理には細心の注意が必要である。MDL の更なる低減に関しては装置本体の検出感度に依存するので今後の装置の進歩に期待したい。

E. 健康危険情報

該当なし

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(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
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.

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

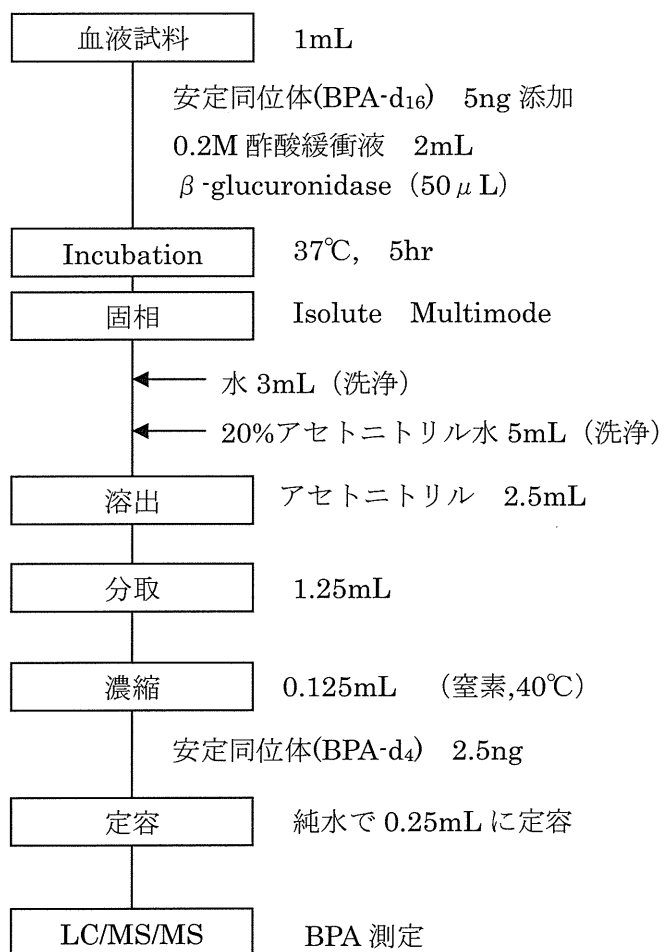


図 1. 血液中の BPA の分析フロー

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. BPA 分析における LC/MS/MS 測定条件

測定装置	LC : Agilent-1100 MS : API-4000 Q Trap
分析カラム	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 2.1×50mm,1.7μm
溶離液	A : 水 B : アセトニトリル
グラジエント(B)	20%(0min)→20%(1min)→60%(7min)→99%(7.1min)→99%(13min) →20%(13.1min)→20%(19min)
注入量	20μL
カラム温度	40°C
モード	ESI-Negative
m/z	227.0 > 132.9(BPA) 241.0 > 142.0(BPA-d ₁₆) 231.0 > 134.9(BPA-d ₄)

表 2 分析ロット毎の全操作ブランク試験の結果及び MDL.

試料名	BPA濃度 (ng/mL)			
	分析ロット No.1	分析ロット No.2	分析ロット No.3	分析ロット No.4
Blank 1	0.036	0.030	0.066	0.049
Blank 2	0.037	0.031	0.056	0.043
Blank 3	0.053	0.025	0.042	0.032
Blank 4	0.037	0.031	0.040	0.021
Blank 5	0.037	0.034	0.042	0.034
平均値	0.040	0.030	0.049	0.036
標準偏差	0.00745	0.00329	0.0111	0.0105
t値(危険率5%, 片側)	2.132	2.132	2.132	2.132
MDL	0.032	0.015	0.048	0.045

【注釈】

$$\text{MDL} = (\text{標準偏差}) \times t \text{ 値} \times 2$$

分析ロット No.4 については、血球試料と血漿試料を全量混合して分析試料とした。