

## 微量ダイオキシン類，水酸化 PCB（OH-PCB）測定法の開発（1）

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。

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

### 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，

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、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、

LC/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、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

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

- 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 sccelerated 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)

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

- 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 scelerated 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

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. 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-[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]-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

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 LC/MS/MSによるOH-PCB測定条件(Mass)

Compounds	Precursor ion → product ion m/z	
OH- PeCB	<sup>12</sup> C	340.87 35.0
	<sup>13</sup> C	352.91 35.0
OH- HxCB	<sup>12</sup> C	374.83 35.0
	<sup>13</sup> C	386.87 35.0
OH- HpCB	<sup>12</sup> C	408.79 35.0
	<sup>13</sup> C	420.83 35.0

表 4 血液中OH PCB濃度

	OH-PCB	Pregnant Blood	Cont. Blood <sup>1)</sup>	Cont. Range <sup>2)</sup>
PeCB-OH	<b>4-OH-CB109</b>	2 (nd - 23)	21	1.6-16
HxCB-OH	3'-OH-CB138	16 (nd - 35)	21	0.8-14
	<b>4-OH-CB146</b>	19 (nd - 38) <sup>4)</sup>	48 <sup>4)</sup>	2.2-19
	3-OH-CB153	-	-	0.8-11
HpCB-OH	4'-OH-CB172	nd	5.6	0.5-5.6
	<b>4-OH-CB187</b>	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

