

資料 [     ]  
懸念される新規汚染物質の  
モニタリング

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）  
総合研究報告書 資料3

ネオニコチノイド農薬摂取量を尿試料により評価する生物学的モニタリングの  
手法の開発

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

近年開発され、使用量が増加してきているネオニコチノイド系農薬の摂取量は明らかではない。動物実験の結果では、イミダクロプリド、クロチアニジン、アセタミプリド、ジノテフランの4種類の主たるネオニコチノイド農薬は、消化管からの吸収率が高く、生物学的半減期が短く尿中に大部分が排泄されることから、24時間尿中濃度から一日摂取量を推定できる可能性が高い。しかし、モニタリングの指標となる尿中代謝産物は現在まで報告されていない。

そこで、これら4種類のネオニコチノイド農薬について、負荷前後の24時間尿を採取し、負荷量に対応して増加する尿中代謝産物を見出し、その物質についてバイオリジカルモニタリングの指標となり得るかどうかを検討した。以上をもって、モニタリング手法を確立した。京都府下の市民373名のスポット尿サンプルの採取を行い、モニタリング指標となる産物の尿中濃度から、4種類のネオニコチノイド農薬の一日摂取量の推定を行った。以上より食品安全委員会の2012年に報告された推定値と実測値との比較・評価を行った。

負荷後、尿中濃度の上昇が認められ、クロチアニジンは3日以内、ジノテフランは1日で大部分が未変化体として回収された。イミダクロプリドについては、未変化体の排泄が少なく、アセタミプリドについては、未変化体はごく僅かであり、代謝物である脱メチルアセタミプリドがあり、排出速度も他の化合物よりも遅かった。摂取量と尿中濃度の関係から推定される一日摂取量は平均で0.53 $\mu$ gから3.66 $\mu$ gであり、集団の最大値はジノテフランで64.5 $\mu$ gであった。これは農薬評価書の推定平均値10%程度であり、一日許容摂取量の1%未満であった。

一般集団で、ネオニコチノイドの曝露量を推定でき、現時点で大きなリスクはないと考えられた。

A．研究目的

ネオニコチノイド系農薬は、稲、果樹、野菜などに幅広く使用されており、主要な害虫、特にカメムシに優れた防除効果を持ち、ヒトや水生生物に対する毒性が弱いことから多くの都道府県で使用されている。一方で、EUで農薬審査を行う欧州食品安全機関

(EFSA)が、2013年1月に、3種類のネオニコチノイド系農薬(イミダクロプリド、クロチアニジンおよびチアメトキサム)について、蜜蜂への影響に関する評価結果を公表し、EU理事会はこれら3種類の農薬を規制した(Regulation (EU) No 485/2013)。さらに、2013年12月、EFSAはネオニコチ

ノイド系農薬2品目（アセタミプリドおよびイミダクロプリド）の発達・神経毒性の潜在的な関連性を評価した（EFSA Journal 2013;11(12):3471. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3471）。日本人の平均推定摂取量はイミダクロプリド307 $\mu\text{g}$ /人/日、クロチアニジン206 $\mu\text{g}$ /人/日、チアメトキサム265 $\mu\text{g}$ /人/日、ジノテフラン713 $\mu\text{g}$ /人/日とされている（食品安全委員会農薬評価書）。しかしこれらの推定値は、一定の使用条件で観察された最大値で、加工・調理による残留農薬の増減が全くないとの仮定であり、実測による評価が喫緊の課題である。また個人の曝露量を測定するための簡便なバイオマーカーを同定し、生物モニタリングを確立することが必要である。

動物実験の結果では、イミダクロプリド、クロチアニジン、アセタミプリド、ジノテフランの4種類の主たるネオニコチノイド系農薬は、消化管からの吸収率が高く、生物学的半減期が短く尿中に大部分が排泄されることから、24時間尿中排泄量から一日摂取量を推定できる可能性が高い。しかし、モニタリングの指標となる尿中代謝産物は現在まで報告されていない。そこで、これら4種類のネオニコチノイド農薬について、摂取による負荷前後の24時間尿を採取し、負荷量に対応して増加する尿中代謝産物を見出し、その物質についてバイオリジカルモニタリングの指標となり得るかどうかを検討する。以上をもってモニタリング手法を確立する。

京都府下健康な男女373名の随時尿試料の採取を行う。モニタリング指標となる産物の尿中濃度から、373名の4種類のネオニコチノイド系農薬の一日摂取量の推定を行う。以上をもって食品安全委員会の報告された推定値

と実測値との比較を行う。

## B．研究方法

### ・測定試料

採尿容器を調査対象者に配布し、調査開始後24時間までの尿を採取した。ネオニコチノイド系農薬のうち、安定同位体である重水素化されたものがある、アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフランについては、ベースラインを考慮しなくてよいため、摂取量を2 $\mu\text{g}$ /人/日程度と5 $\mu\text{g}$ /人/日程度に分けることで、用量反応関係性を評価した。負荷後の24時間尿を採取した。尿中ネオニコチノイドを分析し、24時間での排泄量を計算した。曝露前をコントロールとした。

随時尿は1回を採尿容器に取った。尿中クレアチニン、尿中ネオニコチノイドを分析し、クレアチニン濃度で補正したネオニコチノイド濃度を計算した。

性別・年齢・身長・体重・BMI・職業・既往歴は採尿容器を配布する前に聞き取りを行った。

食事記録は、24時間尿群は採尿開始後48時間後まで記録し、尿試料とともに回収した。随時尿群は、採尿容器を配布する前に採尿前24時間までの内容を聞き取った。

尿中クレアチニンは臨床検査機関で測定した。

尿中ネオニコチノイド代謝産物はLC-MS/MSで測定した。

### ・実験計画と試験集団

重水素標識ネオニコチノイド（クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリドおよびアセタミプリド）を健康成人9名に5 $\mu\text{g}$ の単回経口摂取し、24時間蓄尿を、摂取後の連続した4日間に亘り集めた（図1）。非重水素標

識ネオニコチノイド(2 µgの単回経口投与)を使用して、健常成人12人でモデルを検証するために負荷試験を実施した。24時間蓄尿を摂取前後の日に回収した後、随時尿試料を摂取後168時間まで24時間毎に採取した。

健康な男女373名の随時尿試料(2009年から2014年)を、宇治市、京都市で収集し、また京都大学生体試料バンクに保存されている試料を使用した。年齢、喫煙習慣、家庭での農薬使用量、前日の野菜の消費量を、自記式質問紙を用いて記録した(表1)。

尿試料は、京都大学生体試料バンクで分析まで-30℃で保管した。

書面によるインフォームドコンセントを、すべての被験者から研究への参加前に得た。研究計画書は京都大学医の倫理委員会によって審査、承認された(E25およびE2166)。

#### ・試薬

アセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアメトキサム、ニテンピラムはAccuStandard(ニューヘブン、CT、USA)から入手した。クロチアニジン、ジノテフラン、およびチアクロプリドアミドは和光純薬(大阪、日本)から入手した。デスメチル-アセタミプリドおよびデスメチル-チアメトキサムは、Sigma-Aldrich社(セントルイス、MO、USA)から入手した。重水素標識アセタミプリド(アセタミプリド-d6)は林純薬(大阪、日本)から入手した。重水素標識アセタミプリド-d3、クロチアニジン-d3、イミダクロプリド-d4、およびチアメトキサム-d4は、Dr. Ehrenstofer社(アウグスブルク、ドイツ)から入手した。重水素標識ジノテフラン-d3とチアクロプリド-d4は、それぞれ、@rtMolecule(ボワティエ、フランス)とCDN isotopes

(ケベック州、カナダ)から入手した。

・尿試料中のネオニコチノイドの抽出  
尿試料1mLと回収率サロゲート(アセタミプリド-d3、クロチアニジン-d3、イミダクロプリド-d4、チアクロプリド-d4、およびチアメトキサム-d4)は0.2 ng、ジノテフラン-d3は2ng)を合わせ、珪藻土カラムにロードした(InertSep K-solute 2mL、ジーエルサイエンス、東京、日本)(図2)。負荷後10分、標的分析対象をジクロロメタン25mLで2分間溶出した。溶出液を約10mLにロータリーエバポレーターで減少させ、さらに窒素気流下で約1mLにした。溶液をSupelclean ENVIcarb-II/PSA固相カートリッジに通した(A500 mg、B500mg、Sigma-Aldrich社)。標的分析対象を、10分間で、10mLの20%ジクロロメタン/アセトニトリル(v/v)を用いてチューブに溶出した。溶液を窒素気流を用いて乾燥するまで蒸発させ、30%メタノール水中に再溶解した。

#### ・機器分析

分析は、島津Nexeraシステム(島津製作所、京都、日本)と6500トリプル四重極MS/MS装置(AB SCIEX、MA、USA)で陽イオンモード大気圧エレクトロスプレーインターフェースを用いて行った。分離は、Atlantis T3(100mm、2.1 mm、3 µm、Waters、MA、USA)で行った。カラムは、40°Cに維持した。注入容量は10 µLであり、流速は200 µL/minとした。勾配プログラムは、0.1%ギ酸/10 mM酢酸アンモニウム水とアセトニトリルからなる二つの移動相を用いた(表2)。各分析物に対して最適化されたパラメータを有する多重反応モニタリングプログラムで、各物質2つの生成物イオン

の測定に使用した(表2)。

装置検出限界(IDL)がSN比3のピークを生成する分析物の質量として定義された(表3)。回収率の平均は64%から100%となった(表3)。変動係数は最大で21%であった。

ストック溶液を希釈し、少なくとも7点検量線のために使用した(表3)。

#### ・質保証

アセタミプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド、チアクロプリド、およびチアメトキサムの定量は、重水素標識化合物を用いた内部標準法を用いて行った。他の標的分析物のために、外部標準法を使用した。尿試料の回収率は表2に記載されている。操作ブランクはそれぞれ16個のサンプルごとにを評価し、検出可能なネオニコチノイド汚染はなかった(N=29)。

#### ・統計分析

全ての統計分析は、JMPソフトウェア(SASインスティテュート社)を用いて行った。p < 0.05の値は統計的有意性を示すと考えられた。検出限界以下の濃度は、0とした。平均値間の差異は、分散分析(ANOVA)により行った。

#### ・薬物動態学的モデリング

尿中代謝動態を記述するために、クロチアニジン、イミダクロプリドおよびジノテフランについては1コンパートメントモデル、アセタミプリドについては2コンパートメントモデルの薬物動態学的モデルを導入した。薬物動態学的モデルを開発するために、重水素標識ネオニコチノイドが、経口摂取され、尿中動態を追跡した試験を実施した。この試験では、標識されたネオ

ニコチノイドのボラス投与として扱われ、投与後に瞬間的に体内に入ることができると仮定した(図3)。この試験では、投与後の尿試料を24時間ごとに収集した。

統計解析では、それらの化合物の薬物動態学的挙動が開発した薬物動態学的モデルに従うと仮定して、クロチアニジン、イミダクロプリド、ジノテフランおよびアセタミプリドの統計的特性を分析した(Koizumi, 1983)。さらに、これらの化合物の毎日の摂取量は、繰り返しボラス投与計画で近似できると仮定した。

標識クロチアニジン、イミダクロプリド、ジノテフランおよびアセタミプリドのための薬物動態モデル

#### 1. 1コンパートメント薬物動態モデル

クロチアニジン、イミダクロプリドおよびジノテフランについては、投与量の大部分は、親化合物として尿中に排泄されることが報告されている。そこで1コンパートメントモデルを適用した(図4)。以下のように24時間の尿中排泄量を算出する。

$$V \frac{dc}{dt} = M \times r - k \times c \quad \text{----- Eq1}$$

Vは分布体積であり、cは濃度であり、Mは、単一のボラス投与量であり、rはコンパートメント分布する割合、kがクリアランスである(図4)。投与は、ボラスを与えられていることから、M × rはEq1から消える。

$$V \frac{dc}{dt} = -k \times c \quad \text{----- Eq2}$$

初期条件は次式  $c_1(0) = \frac{M \times r}{V}$  で与えられる。

$$U(N) = \int_{24(N-1)}^{24N} k \times r \, dt \quad \text{----- Eq3}$$

$$U(N) = M \times r \times \{e^{-\alpha \times 24(N-1)} - e^{-\alpha \times 24N}\} \quad \text{----- Eq4}$$

は、 $\frac{k}{V}$  に等しい。

U(N) はN-1日目とN日の間、尿中に排泄されるネオニコチノイドの量である (Nは1以上)。

a. 2コンパートメント薬物動態モデル  
2コンパートメントモデルでは、第一コンパートメントは親化合物、第二コンパートメントは代謝産物の動態速度を示している。モデルは、アセタミプリドおよびその代謝物であるデスメチルアセタミプリドの速度を示している。つまり2つの微分方程式を有する (図4)。

$$V_1 \frac{dc_1}{dt} = M \times r - k_1 \times c_1 - k_2 \times c_1 \quad \text{-----Eq5}$$

$M \times r$  は投与後、すぐに消える。

$$V_1 \frac{dc_1}{dt} = -k_1 \times c_1 - k_2 \times c_1 \quad \text{-----Eq6}$$

$$V_2 \frac{dc_2}{dt} = -k_2 \times c_1 - k_3 \times c_2 \quad \text{-----Eq7}$$

初期条件は  $c_1(0) = \frac{M \times r}{V_1}$  および  $c_2(0) = 0$  ととることができる。次のように尿中排泄が与えられる。

$$U_1(N) = \int_{24(N-1)}^{24N} k_1 \times c_1 dt$$

$$U_1(N) = M \times r \times \frac{k_1}{k_1 + k_2} \times \left( e^{-\frac{k_1+k_2}{V_1} \times 24(N-1)} - e^{-\frac{k_1+k_2}{V_1} \times 24N} \right) \quad \text{-----Eq8}$$

同様に、尿中代謝物の排泄量を得られる。

$$U_2(N) = \left( \frac{M \times r \times k_2}{k_3 \times V_1 - (k_1 + k_2) \times V_2} \right) \times \left( \frac{k_3 \times V_1}{k_1 + k_2} \times \left( e^{-\frac{(k_1+k_2) \times 24(N-1)}{V_1}} - e^{-\frac{(k_1+k_2) \times 24N}{V_1}} \right) - V_2 \times \left( e^{-\frac{k_3 \times 24(N-1)}{V_2}} - e^{-\frac{k_3 \times 24N}{V_2}} \right) \right)$$

Eq9に上記の式を簡素化することができる。

$$= \frac{(k_2 \times k_3 \times M \times r)}{k_3 \times (k_1 + k_2)} \times \frac{1}{\left(\frac{1}{\alpha} - \frac{1}{\beta}\right)} \times \left[ \frac{1}{\alpha} \left( e^{-\alpha \times 24(N-1)} - e^{-\alpha \times 24N} \right) - \frac{1}{\beta} \left( e^{-\beta \times 24(N-1)} - e^{-\beta \times 24N} \right) \right]$$

$$\text{Where } \alpha = \frac{k_1+k_2}{V_1}, \beta = \frac{k_3}{V_2}.$$

N日の総尿中排泄は下記のようになる。

$$U(N) = U_1(N) + U_2(N) \quad \text{-----Eq10}$$

When  $k_1 \ll k_2$ , then  $U_1 \ll U_2$  and thus  $U \cong U_2$ . Thus we will obtain Eq11.

$$U(N) = \frac{M \times r}{\frac{1}{\alpha} - \frac{1}{\beta}} \times \left[ \frac{1}{\alpha} \left( e^{-\alpha \times 24(N-1)} - e^{-\alpha \times 24N} \right) - \frac{1}{\beta} \left( e^{-\beta \times 24(N-1)} - e^{-\beta \times 24N} \right) \right]$$

-----Eq11

実際には、アセタミプリドの大部分は、デスメチルアセタミプリドとして排泄される。

b. クロチアニジン、イミダクロプリド、ジノテフランおよびアセタミプリドの統計的特性

1.前提

i番目の個人が  $M(i, j)$  の一日摂取量とj番目のサンプリングで  $U(i, j)$  の尿中排泄量を持つと仮定する。 $M(i, j)$  は  $E[M(i, j)]$  と  $V[M(i, j)]$  を持つと仮定する。

i および j にかかわらず、 $E[M(i, j)] = E(M)$ 、 $V[M(i, j)] = V(M)$  とする。

これらの仮定は、単に毎日の摂取量は、任意の日ですべての被験者に共通の単一の平均と分散を持っていることを意味する。反復投与における毎日の尿中排泄量 (定常状態下での尿中排

泄) UStを、導入する。この仮説のもと、以下の関係を得ることができる。

$$E [USt (i, j)] = E (USt) \text{ と } V [USt (i, j)] = V (USt)$$

UStは、Mに等しい摂取量に対応する尿中排泄に対応する。以下の議論では、E (USt) とV (USt) で、E (M) とV (M) を相関させることができる方法を検討する。

c. 1コンパートメントモデルにおける平均と分散推定

統計的特性を調べるために、確率過程を定義し、

$$M_0, \dots, M_j, \dots, M_i, \dots, M_0,$$

M<sub>0</sub>は0日目、すなわち、サンプリング日の摂取量を意味し、M<sub>j</sub>をサンプリングするj日前を示す。

下記方程式となる。

$$USt = M_0 \times r \times (1-a) + M_1 \times r \times (1-a)a + \dots + M_i \times r \times (1-a)a^i + \dots$$

$$M_j \times r \times (1-a)a^j + \dots$$

$$USt = \sum_0^\infty M_j r (1-a) \times a^j$$

Eq12

$a = e^{-aT}$ 、 $M_i \times r \times (1-a)a^i$ 、または  $M_j \times r \times (1-a)a^j$  は、採尿前iまたはj日の食事摂取に起因するキャリーオーバーを表す。M<sub>i</sub>とM<sub>j</sub>は独立した確率変数である。毎日の摂取量が関心である場合、Tは24(時間)に等しい。Eq12から、以下の式を得ることができる。

$$E[USt] = E$$

$$(Mr(1-a) \sum_0^\infty a^i) = r \times E[M] \quad \text{Eq13}$$

次に摂取量の分散を考慮する。観察

により尿中排出量の分散を得ることができる。以下の議論では、摂取量の分散と、尿中排泄量の分散の関係を得る。

UStの分散V[USt], は、

$$V(USt) = \left( \sum_0^\infty r^2 (1-a)^2 \times a^{2j} \right) \times V(M)$$

$$= r^2 \times (1-a)^2 \times \frac{1}{(1-a^2)} \times V(M)$$

$$= r^2 \times \frac{1-a}{1+a} \times V(M) \quad \text{Eq14}$$

$$a = e^{-aT}.$$

と与えられる (M<sub>j</sub>、M<sub>i</sub>は独立)。

したがって、

$$V(M) = \frac{1+e^{-aT}}{r^2(1-a^{-aT})} V(USt) \quad \text{Eq15}$$

薬物動態が1コンパートメントモデルに従うネオニコチノイドは、Eq15からV (M) の分散を推定することができる。

d. 2コンパートメントモデル分散推定

同様の論理は2コンパートメントモデルでE [USt]に適用することができる。

$$E[USt] = r \times E[M]$$

分散について、以下の確率過程を検討する。

アセタミプリドの尿中排泄は微量であることから

$$USt = M_0 \times r \times \left( \frac{1}{L} \right) \times \left[ \frac{1}{a} \times (1-a) - \frac{1}{\beta} (1-b) \right] + \dots$$

$$M_i \times r \times \left( \frac{1}{L} \right) \times \left[ \frac{1}{a} \times (1-a)a^i - \frac{1}{\beta} (1-b)b^i \right] + \dots + M_j \times r \times \left( \frac{1}{L} \right) \times \left[ \frac{1}{a} \times (1-a)a^j - \frac{1}{\beta} (1-b)b^j \right] + \dots \quad \text{Eq16}$$

ここで、

$$L =$$



$$\frac{1}{a} - \frac{1}{\beta} \text{ and } \alpha = \frac{k_1+k_2}{V_1}, \beta = \frac{k_3}{V_2}, \alpha = e^{-aT} \text{ and}$$

bは $e^{-\beta T}$ である。

$$V[USI] = V \left\{ \sum_{i=0}^{\infty} \left( M_i \times r \times \left( \frac{1}{L} \right) \times \left[ \frac{1}{a} \times (1-a)a^i - \frac{1}{\beta} (1-b)b^i \right] \right) \right\}$$

$$= \left\{ \sum_{i=0}^{\infty} \left( r \times \left( \frac{1}{L} \right) \times \left[ \frac{1}{a} \times (1-a)a^i - \frac{1}{\beta} (1-b)b^i \right] \right)^2 \right\} V^{(M)}$$

$$= \left\{ \frac{r^2}{L^2} \left( \frac{1-e^{-aT}}{1+e^{-aT}} \right) + \frac{1}{\beta^2} \left( \frac{1-e^{-\beta T}}{1+e^{-\beta T}} \right) - \frac{2}{a\beta} \frac{(1-e^{-aT})(1-e^{-\beta T})}{(1-e^{-aT-\beta T})} \right\} V^{(M)}$$

..... Eq17

$$V^{(M)} = \frac{V[USI]}{\left\{ \frac{r^2}{L^2} \left( \frac{1-e^{-aT}}{1+e^{-aT}} \right) + \frac{1}{\beta^2} \left( \frac{1-e^{-\beta T}}{1+e^{-\beta T}} \right) - \frac{2}{a\beta} \frac{(1-e^{-aT})(1-e^{-\beta T})}{(1-e^{-aT-\beta T})} \right\}}$$

..... Eq18

薬物動態が2コンパートメントモデルに従うネオニコチノイドは、Eq18から $V(M)$ の分散を推定することができる。

### C. 研究結果

#### ・体内動態パラメータと摂取量推定

標識化ネオニコチノイド5 $\mu$ g瞬時投与後96時間で観察された尿中排泄をEq3、Eq10に当てはめてパラメータ $r, a, b$ を得た(表4、図5)。

2 $\mu$ g瞬時投与前後24時間で観察された尿中排泄をモデル化されたものと比較し、有意な相関(表5と図6)が見られた。投与前が定常状態と仮定すると、クロチアニジン、イミダクロプリド、ジノテフラン、およびデスメチルアセタミプリドの毎日の摂取量は、Eq13、Eq15、およびEq18に基づいて推定 $1.26 \pm 1.12, 1.58 \pm 3.37, 5.18 \pm 6.40,$  および $2.93 \pm 12.4 \mu$ gのようになった。

#### ・健康な男女での尿中排出量と推定摂取量

クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド、チアメトキサム、デスメチルアセタミプリドは半分以上の試料で検出された(表6)。平均排出量としてはジノテフランが3.29

$\mu$ g/day、デスメチルアセタミプリドが1.14  $\mu$ g/day、クロチアニジンが0.51  $\mu$ g/dayとなり、ついでイミダクロプリドが0.07  $\mu$ g/dayであった。分布としては正規分布に従わず、大きく裾を引いた形となった(図7)。

これを摂取量に換算するとジノテフランが3.66  $\mu$ g/day、アセタミプリドが1.94  $\mu$ g/day、クロチアニジンが0.86  $\mu$ g/dayとなり、ついでイミダクロプリドが0.53  $\mu$ g/dayであった。本研究の対象者でもっとも高いのはジノテフランで64.5 $\mu$ gであった。これは農薬評価書の推定平均値10%程度であり、一日許容摂取量の1%未満であった。

#### ・ネオニコチノイド濃度と関連する要因の探索

ここでは、検出される割合の高い5物質について検討した。クロチアニジン、デスメチルアセタミプリド、ジノテフラン、チアメトキサムは年齢、出産回数と相関していた(表7)。前日の食品摂取量との関係では、クロチアニジン、デスメチルアセタミプリド、ジノテフラン、イミダクロプリドが果実類と相関していた。野菜類とは、ジノテフラン、イミダクロプリドが相関していた。またジノテフランは穀類摂取量とも相関していた。茶類の摂取量、殺虫剤使用数とは有意な相関はなかった。性別との関連は見られなかった。野菜類の摂取習慣が多い群で尿中排出が高い傾向があったが有意ではなかった。クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリドが飲酒、喫煙習慣と関連があったが、理由は分からなかった。

#### ・ネオニコチノイド農薬の間での相関関係

相関係数は最大で0.54でクロチア二



ジンとデスメチルアセタミプリドの間、またジノテフランとニテンピラムの間で0.49、チアクロプリドとニテンピラムの間で0.49と比較的高い相関が見られた(表8)。アセタミプリドはイミダクロプリド、デスメチルアセタミプリドと弱い相関が見られた。クロチアニジンはチアメトキサム、イミダクロプリド、チアクロプリドと弱い相関が見られた。

#### D. 考察

体内動態試験では、クロチアニジンは3日以内、ジノテフランは1日で大部分が未変化体として回収された。イミダクロプリドについては、未変化体の排泄が少なく、アセタミプリドについては、未変化体はごく僅かであり、代謝物である脱メチルアセタミプリドがあり、排出速度も他の化合物よりも遅かった。尿中濃度ではイミダクロプリド、アセタミプリドは低いが、摂取量はクロチアニジンに並ぶ。

体内動態試験を行った4物質以外では、チアメトキサムが多くの試料で検出されたが濃度は低かった。ニテンピラム、チアクロプリドはほとんど検出されなかったが、使用量、摂取量が少ないのか、体内で代謝されているのかは今後の検討が必要である。

ネオニコチノイド排出量と関連する要因に年齢があったが、野菜などの摂取量と交絡していると考えられた。関連した食材が農薬ごとに差異が見られたのは、農薬使用パターン、残留度合いに違いがあったためと考えられた。ジノテフランは家庭用殺虫剤で多く使用されているが、相関は見られなかった。

ネオニコチノイドの中で相関が見られたが、アセタミプリド、デスメチルアセタミプリドは親化合物、代謝物

という関係である。クロチアニジンはそれ自体が農薬として使用されているが、チアメトキサムの代謝物でもあるため、今回見られたクロチアニジンのいくらかはチアメトキサムに由来すると考えられた。チアメトキサムからデスメチルチアメトキサムへの代謝はほとんどないと考えられた。その他、代謝物の関係にない相関関係については、混用あるいは土壌で残留していた可能性が考えられた。

#### E. 結論

ネオニコチノイド4種の体内動態モデルを確立することができた。

一般集団で、ネオニコチノイドの曝露量を推定でき、現時点で大きなリスクはないと考えられた。

#### 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

原田浩二、新添多聞、田中恵子、坂本裕子、今中美栄、大島匡世、草川浩一、奥田裕子、小林果、小泉昭夫、ヒトにおけるネオニコチノイド農薬の体内動態の検討、第85回日本衛生学会学術総会(2015年3月26-28日 和歌山)

#### 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

EU commission, Amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances.

COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 485/2013 of 24 May 2013

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues. Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. EFSA Journal 2013;11(12):3471.

Koizumi A. Development of

methodological and theoretical basis for preventive toxicology with special reference to hepatotoxicity. Ph. D thesis, Tohoku University. 1983;

<http://hdl.handle.net/10097/19566>.

食品安全委員会. 農薬評価書アセタミプリド2008年8月, イミダクロプリド

2007年6月, チアメトキサム (第2版)

2012年3月, クロチアニジン (第5版)

2014年1月, ジノテフラン(第5版)2013

年12月

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/list?itemCategory=001>

**Table 1.** Demographic characteristics and vegetable intake of the study participants

		Total	Male	Female		
<i>n</i>		373	45	328		
		mean±SD range	mean±SD range	mean±SD range		
Age	(yr)	37.9±23.3 18–87	48.2±23.5 21–85	36.5±23.0	18–87	
Height	(cm)	158.2±7.3 120–185	169.5±6.4 156–185	156.7±5.9	120–171	
Weight	(kg)	52.9±8.7 34–87	66.2±7.6 50–87	51.0±7.1	34–80	
Parity		- -	- -	0.6±1.0	0–4	
Food consumption	(g/day)					
	cereal	245±155 0–720	253±144 0–540	244±157	0–720	
	potato	25±54 0–600	39±51 0–150	23±54	0–600	
	vegetable	245±207 0–1338	297±290 0–1338	239±196	0–1265	
	fruits	57±105 0–545	113±167 0–545	50±94	0–520	
	tea	143±250 0–1500	231±289 0–1000	133±244	0–1500	
Insecticide use	(No. of items)	0.3±0.8 0–5	0.2±0.7 0–3	0.3±0.8	0–5	
		%	%	%		
Vegetable eating habit <sup>a</sup>	often	74.7%	73.9%	74.8%		
	sometimes	25.3%	26.1%	25.2%		
Drinking	current drinker	34.6%	75.6%	28.9%		
	ex-drinker	4.1%	11.1%	3.1%		
	non-drinker	61.4%	13.3%	68.0%		
Smoking	current smoker	0.8%	0.0%	0.9%		
	ex-smoker	7.3%	40.0%	2.8%		
	non-smoker	91.9%	60.0%	96.3%		

<sup>a</sup> 'often' means eating vegetable at least once a day.

**Table 2.** LC-MS/MS conditions for the determination of neonicotinoids

Liquid chromatography					
Instrument	SHIMADZU Nexera				
Column	Atlantis T3 (2.1 mm(i.d.)×100 mm, 3 μm) (Waters)				
Column temperature	40°C				
Mobile phase	A: 0.1% formic acid/10 mM ammonium acetate in water B: Acetonitrile				
Mobile phase gradient	0–4 min	A95		B5	
	4–15 min	A95>50		B5>50	
	15–18 min	A50>0		B50>100	
	18–23 min	A0		B100	
	23–30 min	A90		B10	
Mobile phase flow	0.2 mL min <sup>-1</sup>				
Injection volume	10 μL				
Mass spectrometer					
Instrument	TripleQuad 6500 (AB SCIEX)				
Ionization	Electrospray positive ionization (multiple reaction monitoring)				
Monitored ion (m/z)			Declustering	Collision	Retention
		Quantification	Confirmation	potential (V)	energy (V) (min)
Acetamiprid	223.0 > 126.0	223.0 > 90.0	71	29	12.7
Clothianidin	249.9 > 169.0	249.9 > 132.0	21	19	11.7
Dinotefuran	203.0 > 129.0	203.0 > 114.1	1	17	8.4
Imidacloprid	256.0 > 175.1	256.0 > 209.0	56	25	12.1
Nitenpyram	271.0 > 99.0	271.0 > 125.9	51	39	9.7
Thiacloprid	252.9 > 125.9	252.9 > 90.0	76	29	13.9
Thiamethoxam	291.8 > 211.1	291.8 > 181.0	41	17	10.7
Desmethyl-acetamiprid	209.1 > 125.9	209.1 > 90.0	61	25	11.9
Desmethyl-thiamethoxam	278.0 > 132.0	278.0 > 174.0	36	25	12.6
Thiacloprid amide	271.0 > 125.9	271.0 > 73.0	31	35	11.8
Acetamiprid-d3	226.0 > 126.0		71	31	12.7
Acetamiprid-d6	226.0 > 126.0		71	31	12.7
Clothianidin-d3	253.0 > 172.1		1	19	11.7
Dinotefuran-d3	206.1 > 132.1		56	19	8.4
Imidacloprid-d4	260.1 > 179.1		26	25	12.1
Thiacloprid-d4	296.0 > 215.0		91	29	13.9
Thiamethoxam-d4	296.0 > 215.0		41	17	10.7
Desmethyl-acetamiprid-d3	212.1 > 125.9		61	25	11.9

**Table 3.** Calibration curves, detection limits, and recoveries for neonicotinoids analyses

Target analytes	Range (ng mL <sup>-1</sup> )	Calibration curves (Y=ax+b) <sup>a</sup>		Linearity (r)	Detection limit <sup>b</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	Recovery % (RSD%) <sup>c</sup> (n=7)
		Slope (a)	Intercept (b)			
Acetamiprid	0.005-2	0.886	0.00529	0.9999	0.005	91 (10)
Clothianidin	0.02-5	0.905	-0.00721	0.9999	0.020	100 (15)
Dinotefuran	0.01-10	1.29	0.00201	0.9999	0.010	64 (21)
Imidacloprid	0.01-1	0.881	0.0168	0.9999	0.010	97 (17)
Nitenpyram	0.01-2	7.87E+05	1.04E+03	0.9999	0.010	72 (6)
Thiacloprid	0.005-2	1.02	0.00442	0.9999	0.005	80 (5)
Thiamethoxam	0.01-1	0.909	0.00396	0.9999	0.010	89 (16)
Desmethyl-acet amiprid	0.005-2	1.66E+06	8.55E+03	0.9999	0.005	72 (12)
Desmethyl-thia methoxam	0.02-2	2.43E+05	2.30E+03	0.9999	0.020	75 (4)
Thiacloprid amide	0.005-2	4.24E+06	1.30E+04	0.9999	0.005	69 (8)

<sup>a</sup>Y and X are Area counts and Concentration (ng/mL), respectively, for external standard method; and are Analyte Area / IS Area ratio and Analyte Conc. / IS Conc. Ratio, respectively, for internal standard method.

<sup>b</sup> 1-mL sample

<sup>c</sup> RSD: relative standard deviation

**Table 4.** The model parameters in Eq3 and Eq10 determined based on the observed urinary excretion of labeled compounds after instantaneous dosing.  $R^2$  values indicate correlation of the observed excretions and the modeled ones.

	$r$	$\alpha$ (day <sup>-1</sup> )	$\beta$ (day <sup>-1</sup> )	$n$	$R^2$
Clothianidin	0.596	1.20	—	31	0.88
Imidacloprid	0.133	0.479	—	34	0.46
Dinotefuran	0.899	4.20	—	15	0.96
Desmethyl-acetamiprid	0.586	3.08	0.419	32	0.42

**Table 5.** The estimated daily intake  $M$  (Mean  $\pm$  SD) based on Eq13, Eq15, and Eq18 assuming steady state conditions before 2  $\mu\text{g day}^{-1}$  of instantaneous dosing.  $R^2$  values indicate correlation of the observed excretions and the modeled ones.

	$M$ ( $\mu\text{g day}^{-1}$ )	$n$	$R^2$
Clothianidin	1.26 $\pm$ 1.12	90	0.20 ( $p << 0.05$ )
Imidacloprid	1.58 $\pm$ 3.37	89	0.11 ( $p = 0.0012$ )
Dinotefuran	5.18 $\pm$ 6.40	83	0.077 ( $p = 0.011$ )
Desmethyl-acetamiprid	2.93 $\pm$ 12.4	93	0.057 ( $p = 0.021$ )

**Table 6.** Levels of urinary excretion of neonicotinoids and estimated daily intake.

	Urinary excretion (ug/day) <sup>a</sup>					
	n>LOD	mean±SD	median	75%ile	90%ile	max
Acetamiprid	91	0.02±0.09	n.d.	n.d.	0.04	1.38
Clothianidin	360	0.51±0.95	0.27	0.53	1.15	12.3
Dinotefuran	348	3.29±5.80	1.02	4.20	8.63	57.9
Imidacloprid	286	0.07±0.20	0.03	0.06	0.14	2.59
Nitenpyram	44	0.07±0.34	n.d.	n.d.	0.01	3.62
Thiacloprid	29	0.004±0.019	n.d.	n.d.	n.d.	0.22
Thiamethoxam	343	0.18±0.36	0.07	0.16	0.41	3.64
Desmethyl-acetamiprid	373	1.14±2.07	0.40	1.16	2.92	20.48
Desmethyl-thiamethoxam	4	0.0004±0.0040	n.d.	n.d.	n.d.	0.06
Thiacloprid amide	0	-	-	-	-	-

	Intake (ug/day) <sup>b</sup>					
	mean±SD	median	75%ile	90%ile	max	
Acetamiprid	1.94±3.53	0.67	1.97	4.98	34.9	
Clothianidin	0.86±1.59	0.46	0.89	1.93	20.7	
Dinotefuran	3.66±6.45	1.13	4.67	9.60	64.5	
Imidacloprid	0.53±1.52	0.19	0.43	1.06	19.5	

<sup>a</sup> Urinary excretion was calculated assuming that daily creatinine excretion was 1.5 g for males and 1 g for females.

<sup>b</sup> Intake was calculated based on portion distributed in the compartment 'r', derived from dosing study.



**Table 7.** Association between urinary excretion of neonicotinoids and participants characteristics

		Clothianidin		Desmethyl-acetamiprid	
		r	p value <sup>a</sup>	r	p value <sup>a</sup>
Age		0.21	<.0001	0.19	0.0002
Height		0.01	0.79	-0.01	0.81
Weight		0.01	0.88	0.01	0.81
Parity		0.25	<.0001	0.24	<.0001
Food consumption					
	cereal	0.06	0.28	-0.05	0.41
	potato	0.03	0.58	0.004	0.94
	vegetable	0.09	0.14	0.06	0.28
	fruits	0.14	0.02	0.14	0.02
	tea	0.10	0.10	0.05	0.40
Insecticide use		-0.05	0.38	-0.05	0.37
		mean±SD	p value <sup>a</sup>	mean±SD	p value
Sex	male	0.7±1.8	0.16	1.3±3.1	0.48
	female	0.5±0.8		1.1±1.9	
Vegetable eating habit <sup>b</sup>	often	0.6±1.1	0.08	1.2±2.2	0.055
	sometimes	0.3±0.3		0.6±1.0	
Drinking	current drinker	0.5±0.6	0.02	1.2±1.8	0.20
	ex-drinker	1.2±3.1		2.0±5.2	
	non-drinker	0.5±0.8		1.0±1.8	
Smoking	current smoker	0.13±0.15	0.77	0.31±0.31	0.70
	ex-smoker	0.5±0.5		1.3±1.2	
	non-smoker	0.5±1.0		1.1±2.1	

<sup>a</sup> ANOVA.

<sup>b</sup> 'often' means eating vegetable at least once a day.

**Table 7. (continued)**

Dinotefuran		Imidacloprid		Thiamethoxam	
r	p value <sup>a</sup>	r	p value <sup>a</sup>	r	p value <sup>a</sup>
0.21	<.0001	0.23	<.0001	0.06	0.23
0.05	0.29	-0.10	0.06	0.01	0.90
0.08	0.15	-0.10	0.07	-0.05	0.40
0.24	<.0001	0.17	0.004	0.07	0.24
0.18	0.002	-0.02	0.74	0.02	0.71
0.04	0.47	-0.007	0.91	-0.05	0.36
0.12	0.03	0.27	<.0001	0.03	0.56
0.14	0.02	0.17	0.005	0.004	0.94
0.10	0.13	0.11	0.09	0.04	0.55
-0.07	0.24	0.01	0.81	-0.004	0.94
mean±SD	p value	mean±SD	p value	mean±SD	p value
4.1±9.0	0.34	0.07±0.20	0.98	0.17±0.23	0.86
3.2±5.2		0.07±0.20		0.18±0.37	
3.2±4.4	0.12	0.06±0.10	0.07	0.19±0.43	0.07
2.3±3.1		0.03±0.06		0.09±0.11	
3.9±8.1	0.23	0.11±0.31	0.02	0.21±0.42	0.29
4.0±4.6		0.03±0.03		0.21±0.23	
2.9±4.1		0.05±0.11		0.15±0.33	
0.07±0.12	0.005	0.05±0.04	0.66	0.04±0.04	0.72
6.7±11.6		0.11±0.25		0.15±0.19	
3.1±5.0		0.07±0.20		0.18±0.37	

**Table 8.** Parametric correlation coefficients among neonicotinoids.

	Acetamiprid	Clothianidin	Dinotefuran	Imidacloprid	Nitenpyram	Thiacloprid	Thiamethoxam	Desmethyl-acetamiprid	Desmethyl-thiamethoxam
Acetamiprid	1								
Clothianidin	<b>0.15</b>	1							
Dinotefuran	0.09	<b>0.19</b>	1						
Imidacloprid	<b>0.31</b>	<b>0.26</b>	<b>0.12</b>	1					
Nitenpyram	<b>0.11</b>	<b>0.13</b>	<b>0.49</b>	<b>0.30</b>	1				
Thiacloprid	0.07	<b>0.21</b>	<b>0.26</b>	<b>0.30</b>	<b>0.49</b>	1			
Thiamethoxam	0.04	<b>0.33</b>	<b>0.15</b>	0.09	0.07	0.05	1		
Desmethyl-acetamiprid	<b>0.30</b>	<b>0.54</b>	<b>0.14</b>	<b>0.26</b>	0.05	0.07	<b>0.18</b>	1	
Desmethyl-thiamethoxam	-0.02	-0.02	0.02	-0.03	-0.02	-0.02	-0.03	-0.04	1

Bold figures indicate statistical significance (p<0.05).

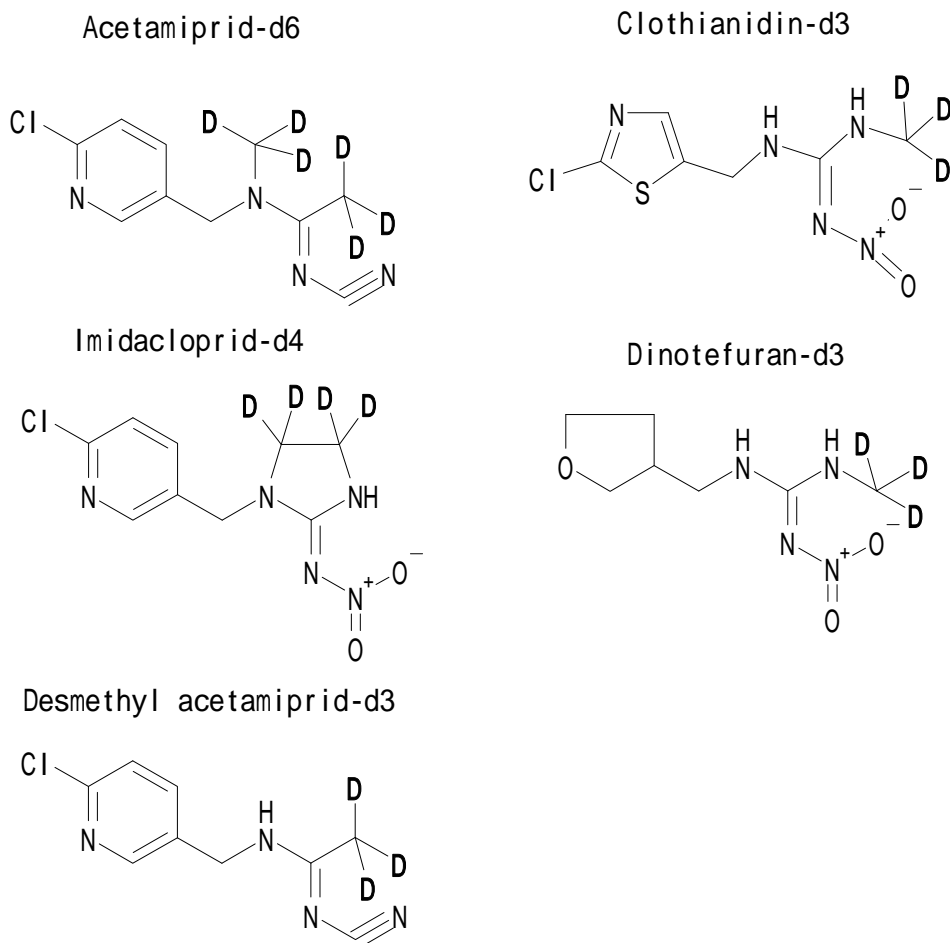


図 1 負荷試験に用いた重水素標識ネオニコチノイド

前処理法

尿試料	1mL I.S.添加(各0.2 ng, Dinotefuran-d3のみ2 ng)
抽出	Inertsep K-solute 2ml
溶出	ジクロロメタン 25 mL
濃縮	エバポレーター&窒素パージ
精製	ENVI Carb /PSA
溶出	20%DCM/アセトニトリル 10 mL
濃縮	窒素パージ
定容	1mL(30%メタノール/水)
測定	LC-MS/MS

図 2 尿試料の前処理フロー

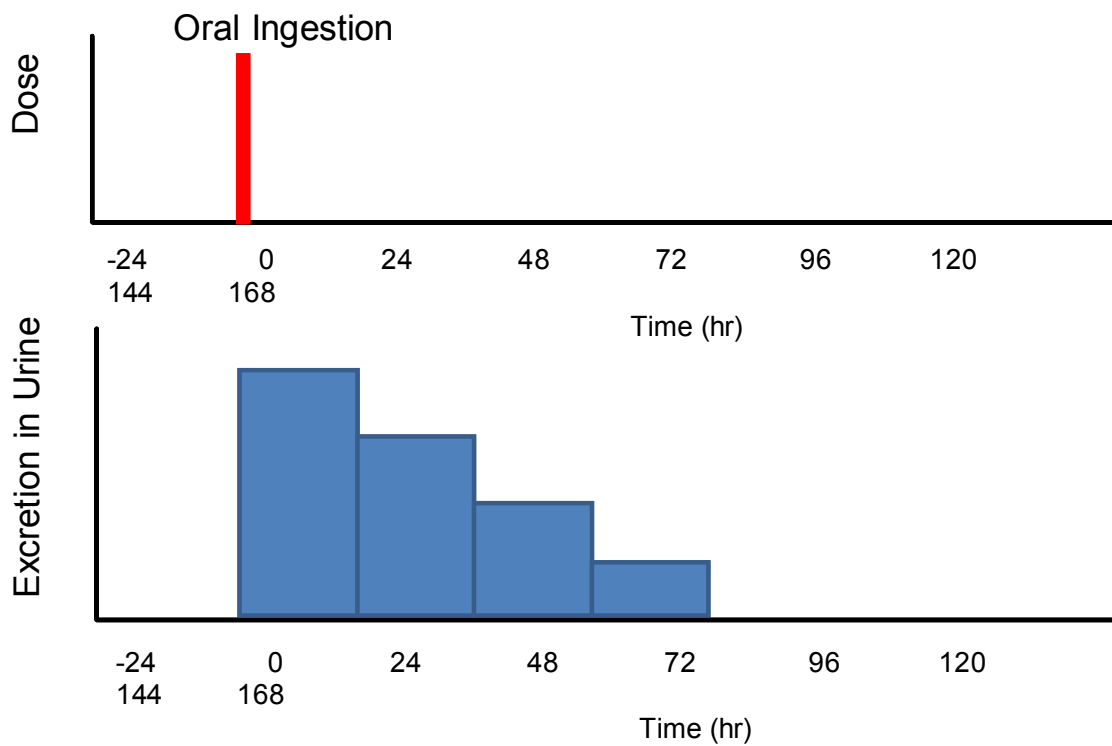
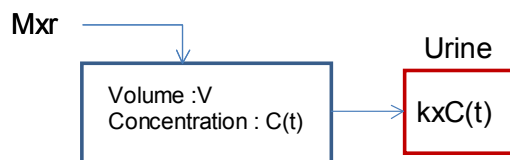


図 3 標識ネオニコチノイド負荷試験におけるポータル投与の仮定

A. One compartment model



B. Two compartment model

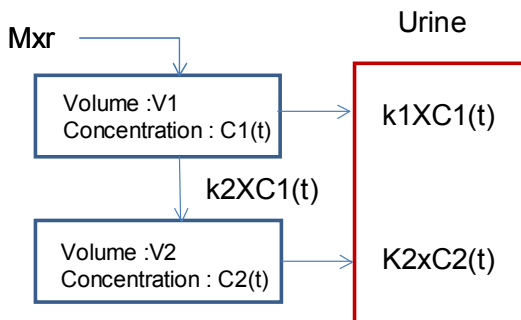
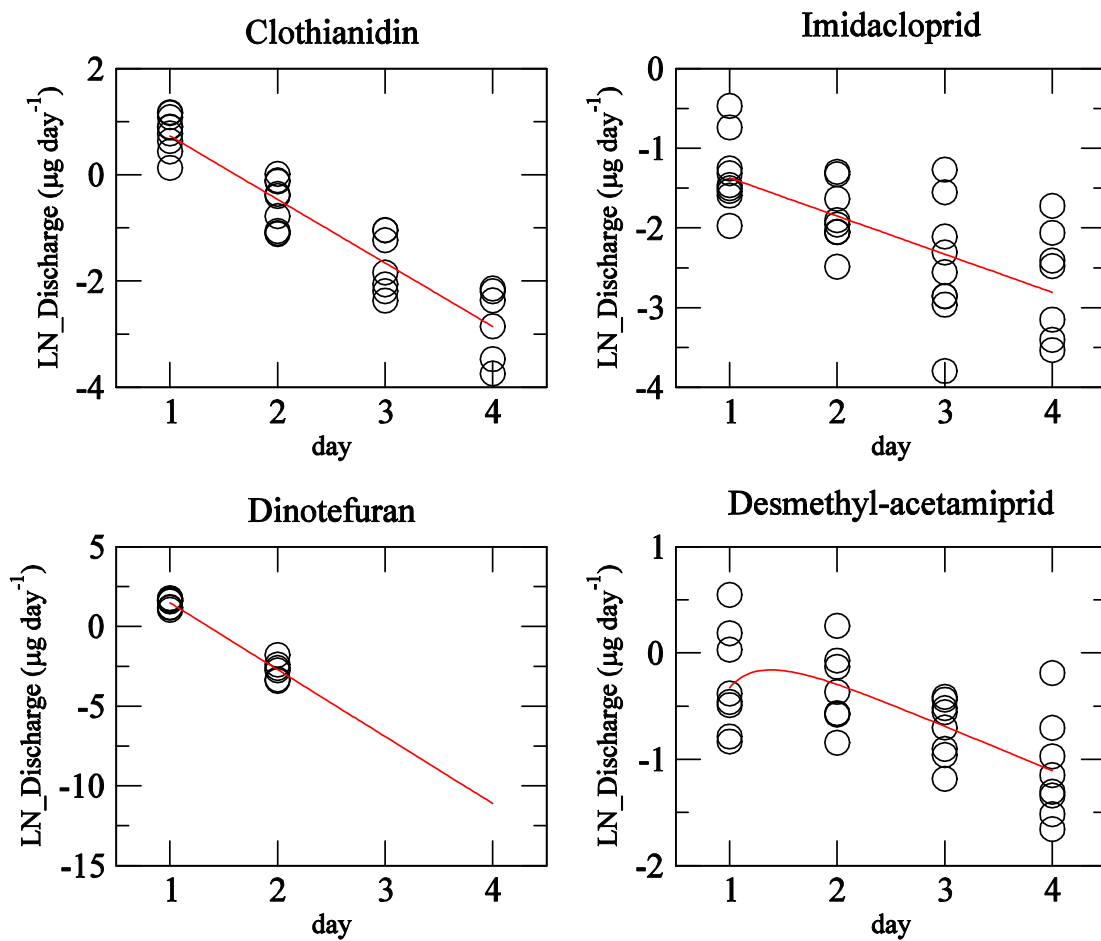


図 4 薬物動態のコンパートメントモデル



☒ 5 The observed urinary excretion ( $\mu\text{g day}^{-1}$ ) of labeled compounds in every 24hours after instantaneous dosing (circles) and the modeled ones (lines).

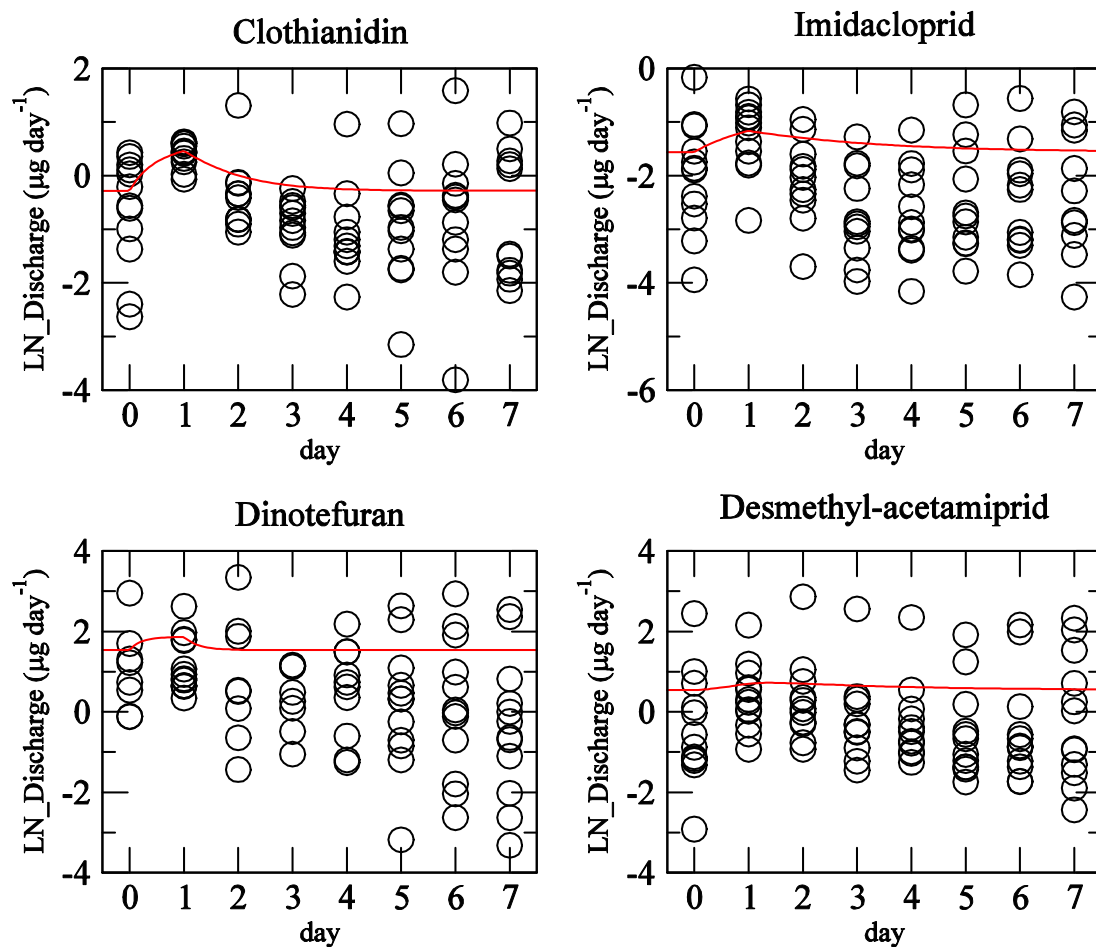


Figure 6 The observed urinary excretion in every 24hours before (day0) and after  $2 \mu\text{g day}^{-1}$  of instantaneous dosing (circles) and the modeled ones (lines).



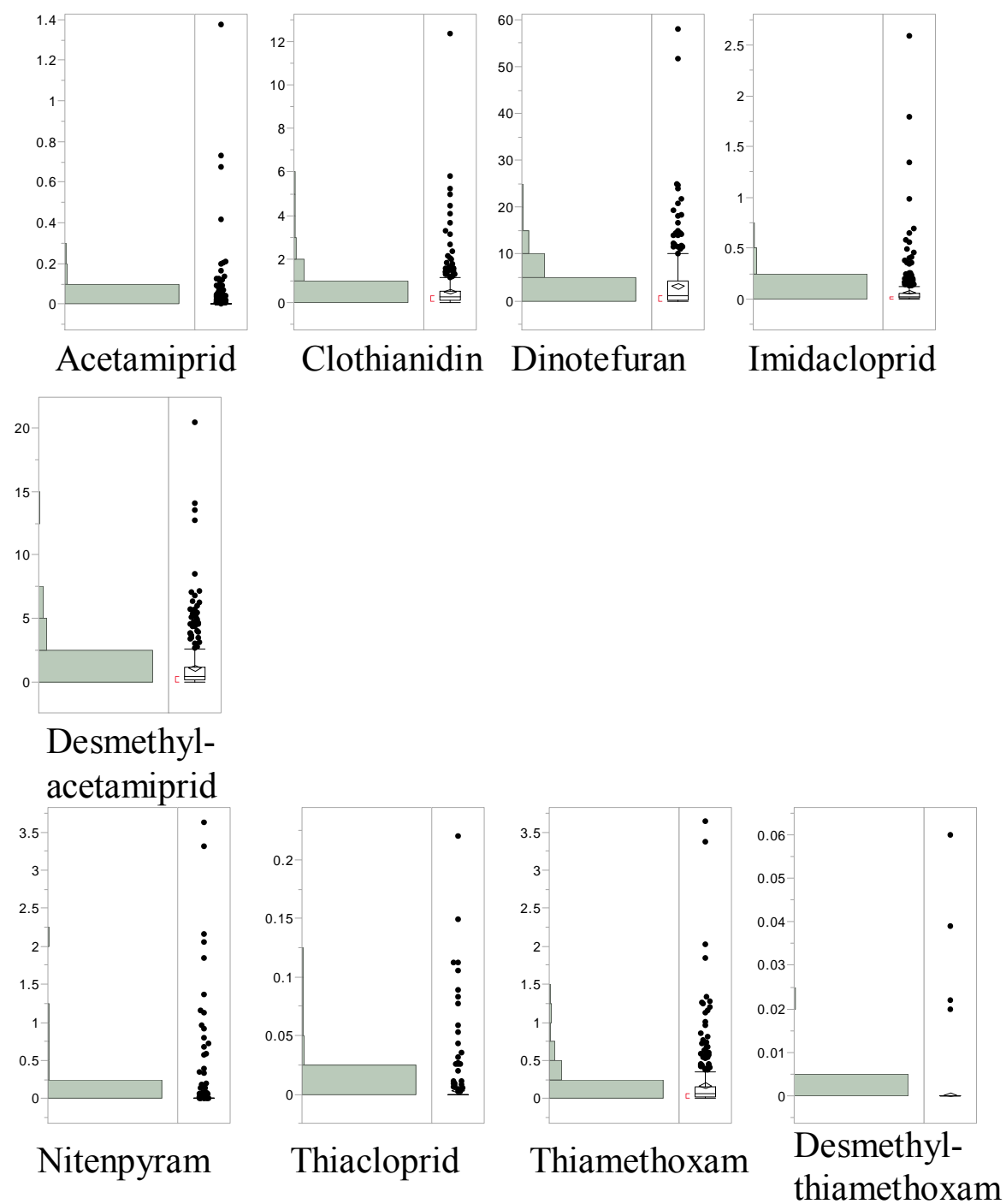


図7 健康な男女の尿中ネオニコチノイド排出量の分布 (単位  $\mu\text{g/day}$ )

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）  
総合研究報告書 資料4

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 京都大学大学院医学研究科・教授  
研究分担者 原田 浩二 京都大学大学院医学研究科・准教授

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がストックホルム条約におり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 - 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り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。<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-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<sup>13</sup>C<sub>12</sub>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うる可能性がある。生体中で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/general/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.

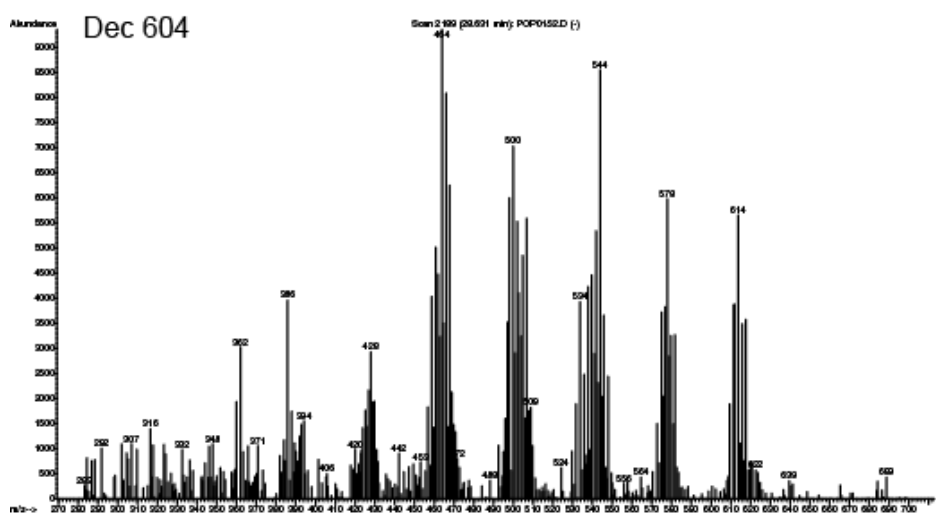
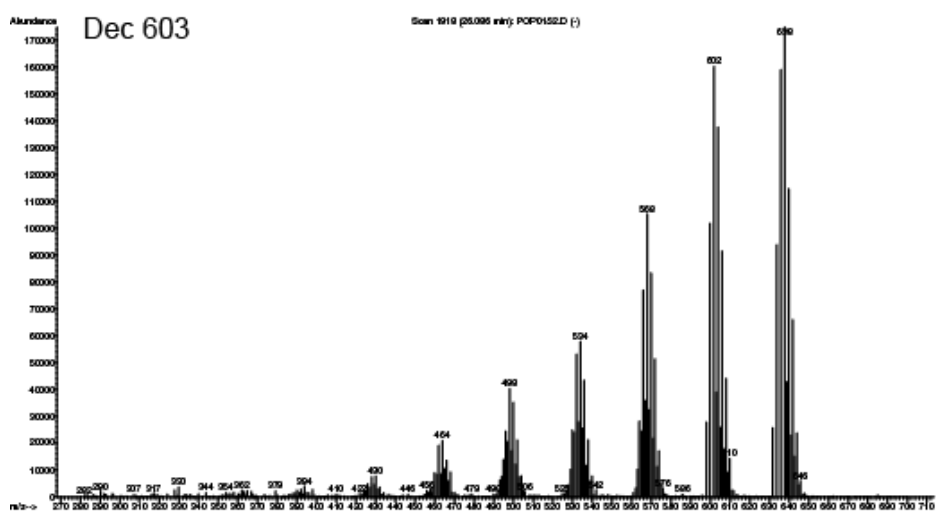
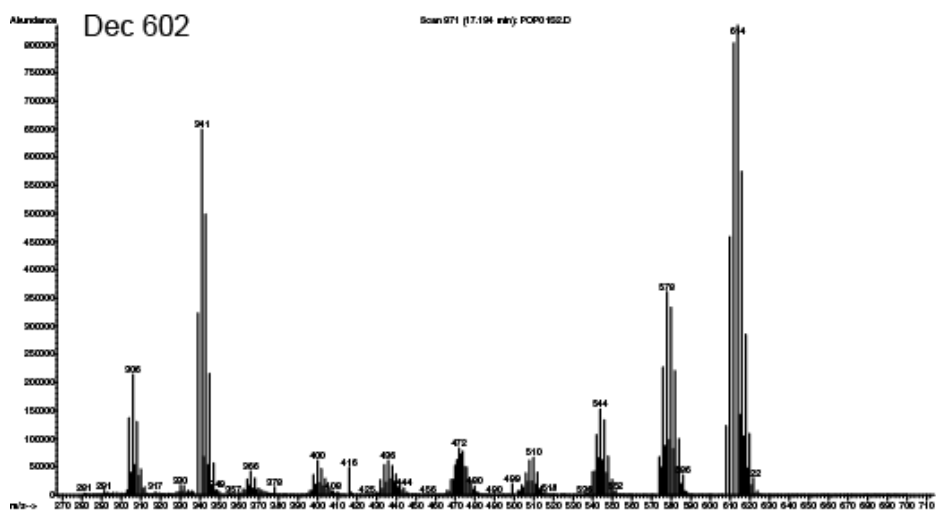


図1. 陰イオン化学イオン化におけるDechlorane類の質量スペクトラム

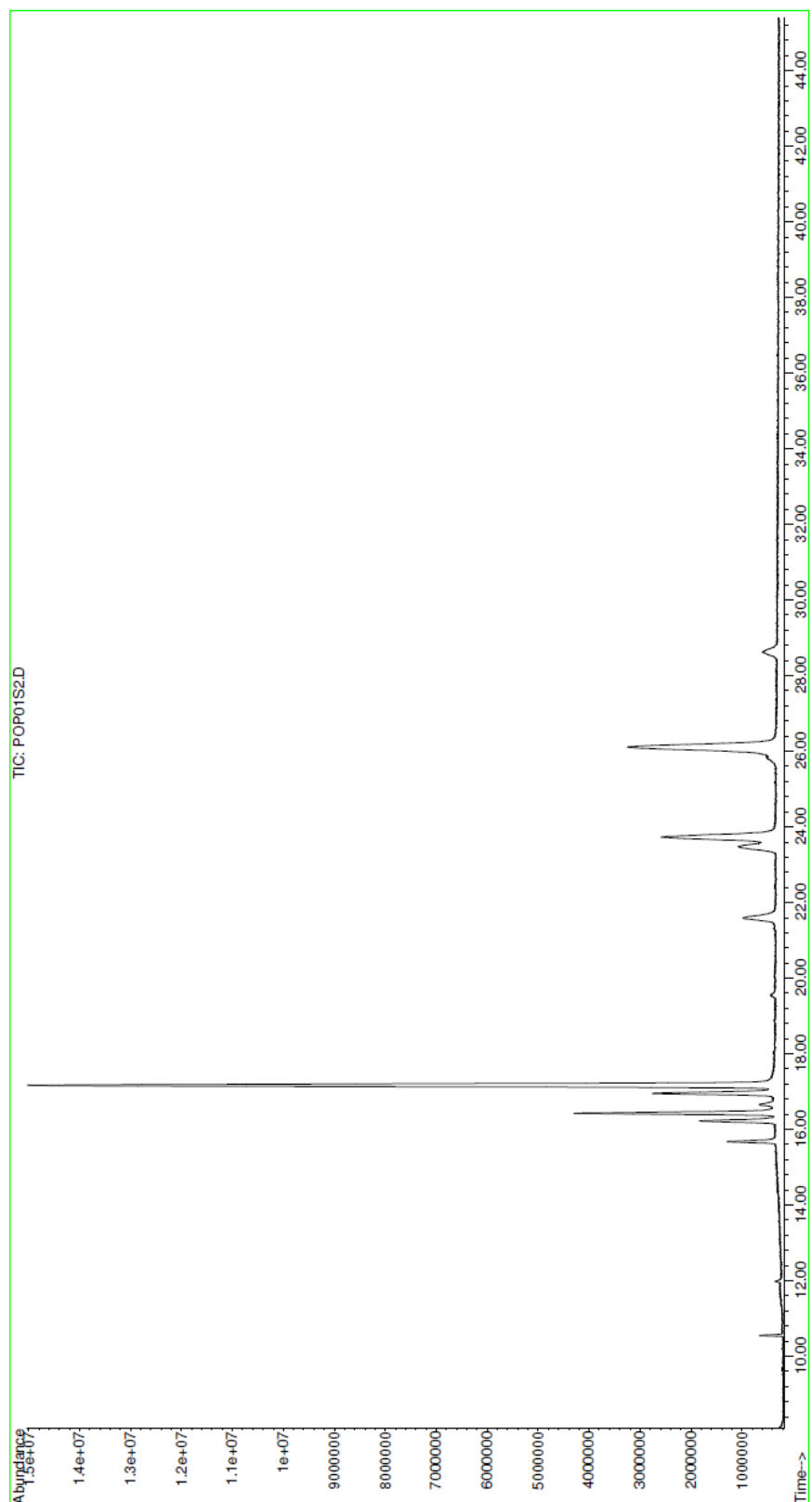


図2. 陰イオン化学イオン化におけるDechlorane類のクロマトグラム



図3. 食事試料におけるDechlorane 602(8.0 min)と $^{13}\text{C}$ 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）  
総合研究報告書 資料5

京都の食事試料におけるフェノール性臭素化合物の残留調査と経年変化

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

本研究では、日本人の食事に汚染が懸念される物質のうち、フェノール性ハロゲン化合物 (tribromophenol, tetrabromobisphenol A, pentachlorophenol, hydroxyl-PBDE) の食事からの摂取量の経年変化を古典的 POPs (DDTs, HCHs, CHLs, HCB) および新規 POPs 関連物質 (endosulfan および dicofol) と比較した。1993 年、2004 年および 2011 年に京都地域において陰膳方式で収集した食事ホモジネートを用いた。古典的 POPs の 2011 年の一日摂取量は 1993 年の約 49% と推定され、また dicofol や endosulfan の摂取量にも減少傾向を示した。一方、フェノール性臭素系難燃剤である tribromophenol はすべての食事から検出されたが、摂取量の経年減少傾向は見られなかった。tetrabromobisphenol A は 1993 年の食事 3 検体、2004 年の食事 4 検体、2011 年食事 1 検体で検出された。フェノール性農薬 pentachlorophenol は 1993 年の 19.8 ng/day から 2011 年の 4.0 ng/day に減少した。水酸化 PBDE として 6-OH-BDE47 が 11 検体から検出されたが、そのメトキシ体のほうがより高濃度で検出され、推移に方向性は見られなかった。新規に 2',6-dimethoxy-BDE68 とその脱メチル化体を 2004 および 2011 年の食事から検出した (最大摂取量 4780 ng/day)。これらのフェノール性成分と残留農薬の摂取量との相関性を示すデータは得られなかった。

A. 研究目的

食品への汚染が懸念される新規 POPs や POPs 候補物質として endosulfan、pentachlorophenol (PCP)、2,4,6-tribromophenol (TBP)、tetrabromobisphenol A (TBBPA)、さらに polybrominated diphenyl ether (PBDE) の水酸化体 (OH-PBDE) 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、胎盤や母乳を通じ胎児 (乳児) への移行が報

告されている (Meerts et al 2000; 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現在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 PBDE と類似しており、環境生物中でも検出されている。しかし、それらの食品汚染およびヒトの摂取量に関するデータは少ない。

一方、PCB や PBDE は、ヒト体内で

水酸化体に代謝され、生体内に残留し悪影響を及ぼすことも考えられる。最近、環境中にhydroxy-PBDEが検出されているが、その発生源や挙動については不明な点が多い。また、環境中でPCPやTBPなどのフェノール性ハロゲン化合物は、脂溶性の高いメチル化体に変換され体内に取り込まれ、体内曝露量が増すことも考えられる。

本研究の目的は、食品に汚染が懸念される化学物質のうち、フェノール性臭素化合物を中心に汚染実態を明らかにし、摂取量の過去20年間の推移を明らかにすることである。そこで京都地域において陰膳方式で収集した食事を用いて、1993、2004および2011年の時点での汚染実態と汚染物質の摂取量の経年変化を調べた。分析対象は、古典的POPs 4種 ( DDTs, CHLs, HCHs, HCB )、POPs 関連物質 ( dicofol, endosulfan )、フェノール性農薬 ( PCP )、フェノール性難燃剤 ( TBP および TBBPA )、水酸化PBDE ( 6-hydroxy-BDE47 ) およびそのメトキシ体とし、それらの食事からの摂取量の推移を比較した。

## B . 研究方法

### 1) サンプル収集

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。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 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

TBP, TBBPA および PCP は Wellington Laboratories社製を用いた。内標準として用いた $\alpha$ - $[^{13}\text{C}]$ endosulfan, および 4-OH- $[^{13}\text{C}]$ PCB187 は Cambridge Isotope 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、(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-液分配抽出と誘導体化 (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. 1 に示す。

(1) 試料10g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 ( $\alpha$ - $[^{13}\text{C}]$ endosulfan, および 4-OH- $[^{13}\text{C}]$ PCB187、各1.0 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 (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96-mL溶出で脂質を除去し、その後の 64-mL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1 mLまで濃縮した。フェノール性分画は 1M HCl 2 mL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 1 mLとた。

(4) 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 $\mu$ 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 2 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 (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。4,4'-DDE, HCB, trans-nonachlor, BDE-47について分析した結果、いずれも認証値の15%以内であった。

### C. 研究結果

#### 1. 食事の POPs 汚染物質の推移

京都の食事 (1993, 2004 および 2011 年) から POPs として DDTs, HCHs, CHLs および HCB を、POPs 候補として dicofol および endosulfan を、フェノール性化合物として PCP, TBP, TBBPA および hydroxy-PBDE を分析し、その結果を Table 3 に示す。経年変化を Fig. 2 に示す。食事ホモジネートの 1993 年の平均摂取量をみると、TBBPA > DDTs > CHLs > endosulfans > Cl<sub>7</sub>-MBP > HCHs の順であったが、2011 年では DDTs > TBBPA > endosulfans > CHLs の順であった。2011 年の POPs 摂取量 (DDTs, HCHs, HCB, CHLs の合計) は 1993 年に比べて 49%に減少した。dicofol は 20 ng/day から 0.6 ng/day へ、endosulfan は 40 ng/day から 20 ng/day へ減少した。成人(50kg)の 1kg あたりの一日摂取量 (EDI, ng/kg · bw/day) を求めると、dicofol, endosulfans の EDI はそれぞれ最大 0.3 および 5 ng/kg · bw/day となり、FAO/WHO による暫定耐容摂取量 (PTDI, 2 $\mu$ g/kg bw/day for dicofol) (JMPR, 1992) および許容摂取量 (ADI, 6 $\mu$ g/kg bw/day for endosulfans) (Lu, 1995) の 0.015% および 0.08% に相当した。

#### 2. 食事のフェノール類およびメトキシ体の推移

フェノール性分画で、TBP をすべての食事試料から検出し、各年代とも平均 10.7 ~ 27.8 ng/day の摂取量であったが、減少傾向は見られなかった。PCP 濃度は、1993 年の 19.8 ng/day から 2011 年の 4.0ng/day へ低下した。TBBPA は 30 検体中 8 検体から検出され、平均値は 90 ng/day と推定された。hydroxy-PBDE のうち、6-OH-BDE47 は 11 試料(平均 6.8 pg/g wet) から、2'-OH-BDE68 は 5 検体(最大 12.6 ng/day) から検出されたが、経年変化は推定できなかった。摂取許容量(ADI) が設定されている TBBPA の EDI は 1.8 ng/kg bw/day で、最大摂取した場合でも ADI より 4 桁以上低い値であった。食事の中性分画で、上記フェノール類の methoxy 体である TBA、PCA および 6-MeO-BDE47 および 2'-MeO-BDE68 を検出した。1993 年の食事における TBA の TBP に対する含有比は 0.05 であったが、2011 年では 0.09 であった。PCA の PCP に対する残留比は 1993 年で 0.01、2011 年で 0.05 であった。一方、6-OH-BDE47 と 6-MeO-BDE47 の食事での濃度比は約 1:1 であった。TBBPA の dimethoxy 体は今回の食事試料では検出されなかった。

### 3. 新規 MeO-PBDE の検出

食事試料 30 検体中 13 検体から新規に 1 種類の dimethoxy-PBDE を検出した。それはマススペクトルから 2',6-dimethoxy-2,4,3',5'-tetrabromodiphenyl ether (diMeO-BDE68) と推定され、合成標準物質との比較でも一致した (Fig. 3)。この成分は 1993 年食事から検出されず、2004 年の食事では 90%、2010 年の食事では 10% の頻度で検出された。最高摂取量は、2010 年食事で 4800 ng/day であった。4 検体の食事か

ら、この脱メチル化されたと思われるフェノール体が検出された。この化学構造は 2'-OH-6-MeO-BDE68, 2'-MeO-6-OH-BDE68, 2',6-dihydroxy-BDE68 のいずれかであると推定した(標準試料が得られないため未定量)。

## D. 考察

### 1. 食事中の dicofol および endosulfan の推移

POPs の摂取量については過去 20 年間に減少傾向がみられた。dicofol, endosulfan および臭素化合物(HexaBB, TetraBB) でも減少傾向にあった。endosulfan は日本、ソウル、北京の母乳中に残留しているため (Fujii et al 2012a) 引き続きモニタリングが必要と思われる。今回の endosulfan の食品汚染レベルは、最近の調査結果とほぼ同じであった (Desalegn et al 2011)。食品中には  $\alpha$ -型と  $\beta$ -型が 1:1 ~ 2:1 で含まれているが、型は北極大気圏から長距離輸送されて拡散している (Weber et al 2010)。したがって、食事以外の曝露として  $\alpha$ -endosulfan の大気からの吸入にも起因すると考えられる。

### 2. 食事中のフェノール性物質の推移

TBP は調査したフェノール性成分の中では最も多い摂取量であった。経時的には 2004 年食事で摂取量が多く、1993 年と 2010 年ではその摂取量に増減は見られなかった。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、海洋魚で 39  $\mu$ g/kg dry wet と推定されている (Whitfield et al 1999)。一方で TBP は難燃剤として年間 3000 トン以上の需要があり、ハウスダスト成分にも含まれている (Watanabe and Sakai, 2003; Suzuki et al 2008)。このた



め、TBP のヒト曝露は食事由来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。さらに食事中は TBA が TBP の 1/10 のレベルで混在していた。TBA は環境中の TBP が海洋微生物によりメチル化されたものと考えられる (Allard et al 1987)。

今回の調査した TBBPA は 30 検体中 5 検体から最大 1080 ng/day が検出され、前回の沖縄での調査結果と類似した。しかし検出数が少ないため、推移は不明である。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(Ashizuka et al 2008 ; Watanabe et al 1983b)。このため食事中の TBBPA は海産物と農産物の両方に由来すると考えられる。中国の食品では最大 2000pg/g wet の TBBPA が報告され、今回の我々の調査結果とほぼ同じであった (Shi et al 2009)。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、今回の調査では dimethoxy-TBBPA は検出限界以下なので実態はまだ不明である(Watanabe et al 2003)。日本人の食事による TBBPA の推定一日摂取量(EDI)を求めると、英国のトータルダイエツトスタディの EDI より高く (Driffield et al 2008)。中国の食事からの TBBPA の EDI と大きな違いはみられない。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。これを基準にした場合、今回の TBBPA の EDI/ADI 比はかなり低い。TBBPA は血液で短い半減期を有する (Hagmer et al 2000)。このため 2011 年の 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。

PCP の食品汚染は、1993 年では 99

ng/day と推定されたが、2004 年、2010 年とも 20 ng/day 以下であった。PCP はハウスダスト成分でもあり、吸入による取込みも考えられる (Suzuki et al 2008)。PCA は PCP の 1/20 以下のレベルで検出された。これは PCP が環境微生物 (土壌) によりメチル化され、食品へ混入したのと考えられる (Mardones et al 2009; Watanabe et al 1983)。

食事中の 11 検体から水酸化 PBDE として、6-OH-BDE47 が検出された。この水酸化体は BDE-47 の代謝物の可能性は低く、海洋生物由来 (Haraguchi et al 2011) と考えられ、食事(海産物)経路で体内に入り、そのまま血液中に残留すると考えられる。もう 1 つの成分 2'-OH-BDE68 も微量に検出されたが、食事中にはそのメチル化体 (2'-MeO-BDE68) の方が高濃度であった。両者の体内挙動に違いがあると予想されるが、詳細については不明である。こうして、hydroxy-PBDE は hydroxy-PCB と発生源は異なるものの、体内曝露による発達期の T4 の減少による脳神経発達への影響など (Meerts et al 2000) が懸念されるため、今後も食品残留濃度に注視する必要がある。

今回、はじめて食事中に dimethoxy-PBDE およびその脱メチル化体が混入していることがわかった。この成分は 2'-MeO-BDE68 と同様に海洋生物で生産され、海産物でも頻繁に検出されているが、単独で高濃度で検出された例はこれまでにない。これは PBDE の代謝物ではないが、PBDE と類似構造を有し、体内残留性があると思われる。dimethoxy-PBDE68 は 2'-methoxy-BDE68 との相関性は低かった。このため、dimethoxy-PBDE は独自の発生源に由来すると考えられる。

一方、バクテリアなどにより生成するPCA, TBAおよびMeO-BDEのようなO-メチル化体は高等動物の体内に入ると脱メチル化が起こることが知られている。太田ら(2012)の報告では、TBA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。またPCAは脱メチル化されてPCPを生じることとも報告されている(Ikeda and Sapienza 1995)。今回検出したhydroxy-PBDEについてもmethoxy-PBDEの脱メチル化が推測される(Wan et al 2010)。このようなフェノール類はいずれも内分泌かく乱性が指摘されているため、メトキシ体を含めてモニタリングする必要がある。

#### E . 結論

今回、「陰膳方式」による食事の汚染調査では、従来の塩素系POPsに加えて、フェノール性ハロゲン化合物の汚染実態を調査するとともに経年変化があるかどうかについて調べた。古典的POPsおよびおPOP候補物質の2011年の摂取量は1993年との比較では半減していたが、フェノール性ハロゲン化合物のうち、天然由来成分については変化が見られなかった。TBP, TBBPAおよびhydroxy-PBDEの摂取量はPOPs摂取量に近い量で摂取していると推定された。endosulfanおよびTBBPAのEDIについてはADIを大きく下回っており現段階のレベルでは健康影響はないと考えられるが、hydroxy-PBDEや新規に検出したdimethoxy-PBDEとその脱メチル化体については影響評価はされていない。今後、そのヒト曝露量についての動向と毒性評価を検討することが重要と思われる。

#### 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

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

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, 269-274.
- George, K. W.; Haggblom, M. M., Microbial O-methylation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A. *Environ Sci Technol* 2008, 42, 5555-5561.
- Gerhard, I.; Frick, A.; Monga, B.; Runnebaum, B., Pentachlorophenol exposure in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environ Res* 1999, 80, 383-388.
- 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., Koizumi, A., Inoue, K., Harada, K.H., Hitomi, T., Minata, M., Tanabe, M., Kato, Y., Nishimura, E., Yamamoto, 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., Levels and regional trends of persistent organochlorines and polybrominated diphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries. *Environ Int* 2009, 35, 1072-1079.
- 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 tolerable daily intake (PTDI)  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  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  $6\mu\text{g}/\text{kg}$  bw/day for endosulfans set by FAO/WHO)
- Meerts, I. A.; Assink, Y.; Cenijn, 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.
- Sakai, S. I.; Watanabe, J.; Honda, Y.; Takatsuki, H.; Aoki, I.; Futamatsu, M.; Shiozaki, K., Combustion of brominated flame retardants and behavior of its byproducts. *Chemosphere* 2001, 42, 519-531.
- Shen, L.; Wania, F.; Lei, Y. D.; Teixeira, C.; Muir, D. C. G.; Bidleman, T. F., Atmospheric distribution and long-range transport behavior of organochlorine pesticides in North America. *Environ Sci Technol* 2005, 39, 409-420.
- 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.
- 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.
- 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 dietary homogenates in duplicate diet study from Kyoto 1993, 2004 and



2011.

Area	Sampling year	n	Homogenate (g)	Age	Body weight (kg)	Fat (%)
Kyoto	1993	10	2205	53 (47-59)	54.6	2.20
Kyoto	2004	10	1905	69 (63-76)	48.4	1.66
Uji	2011	10	2972	65 (62-75)	51.0	1.19

Table 2. 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), and ion source (150 °C)		
Ionization mode	Electron capture negative ionization (ECNI)		
Reagent gas	Methane		
Analytes	GC t <sub>R</sub> (min)	Target ion (m/z)	LOQ* (ng/mL)
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)	0.4
HCB	9.47	284 (286)**	0.1
α-HCH <sub>1</sub>	9.37	71 (255)	0.2
β-HCH	9.65	71 (255)	0.2
γ-HCH	9.74	71 (255)	0.2
<i>trans</i> -chlordane	11.77	412 (410)	0.2
<i>cis</i> -chlordane	12.14	412 (410)	0.2
oxychlordane	11.78	424 (426)	0.4
<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
hexaBB	15.91	79 (161)	0.1
tetraBB	9.62	79 (161)	0.1
BDE-47	16.45	79 (161)	0.2
Cl <sub>7</sub> -MBP	12.46	386 (388)	0.2
Br <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> -DBP	17.98	79 (544)	0.2
2'-OH-BDE68 (methylated)	17.74	79 (161)	0.2
2'-MeO-BDE68	17.74	79 (161)	0.2
6-OH-BDE47 (methylated)	18.29	79 (161)	0.2
6-MeO-BDE47	18.29	79 (161)	0.2
2',6-diMeO-BDE68	19.51	79 (161)	0.5
TBP (methylated)	8.90	79 (81)	0.05
TBA	8.90	79 (81)	0.05
PCP (methylated)	9.52	278 (280)	0.05
PCA	9.52	278 (280)	0.1
TBBPA (methylated)	22.13	79 (81)	10
Dimethoxy-TBBPA	22.13	79 (81)	10
4-OH-[ <sup>13</sup> C]-PCB187	17.38	438 (422)	0.2
α- [ <sup>13</sup> C] endosulfan (IS)	12.40	385 (387)	0.1

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

Table 3. Dietary intake (ng/day) of organohalogenes in dietary homogenate collected in 1993, 2004 and 2011 from Kyoto

analyte	freq	LOQ	1993					2004					2011					total				
			ng/mL	mean	SD	median	min	max	mean	SD	median	min	max	mean	SD	median	min	max	mean	SD	median	min
4,4'-DDE	100	1.0	144.62	110.88	102.21	37.51	369.00	127.19	76.42	123.04	28.21	216.59	86.64	93.03	55.76	7.07	282.27	119.48	94.46	95.62	7.07	369.00
4,4'-DDT	100	1.0	48.12	42.18	32.72	14.07	137.35	14.51	15.45	8.89	1.04	50.53	17.61	11.42	16.51	1.77	35.15	26.75	30.08	17.95	1.04	137.35
4,4'-DDD	100	1.0	41.85	52.73	21.38	6.15	180.36	11.51	7.86	10.74	1.30	23.97	11.66	8.64	7.80	.89	26.79	21.67	33.40	14.02	.89	180.36
dicofof	87	0.4	3.10	4.62	1.07	.56	15.27	1.26	.96	.80	.20	2.71	.58	.34	.54	.20	1.13	1.65	2.85	.80	.20	15.27
HCB	100	0.1	8.21	8.73	5.68	1.50	25.83	10.55	9.03	6.01	1.67	26.84	12.35	16.30	4.12	.61	44.72	10.37	11.59	5.34	.61	44.72
α-HCH	100	0.2	10.52	7.71	8.21	1.75	26.02	1.88	1.63	1.41	.43	6.04	2.62	1.22	2.74	.87	4.09	5.01	5.96	2.74	.43	26.02
β-HCH	100	0.2	19.61	5.28	21.26	8.20	27.06	6.03	7.25	3.54	.32	23.44	5.94	3.31	4.80	3.29	14.06	10.53	8.43	6.11	.32	27.06
γ-HCH	100	0.2	5.92	3.44	4.91	2.28	14.17	2.02	2.07	1.21	.45	6.30	2.05	1.09	2.03	.63	4.02	3.33	2.97	2.40	.45	14.17
trans-CHL	100	0.2	5.23	4.29	3.33	1.15	12.78	1.18	.94	.96	.28	3.62	10.72	8.79	6.63	1.22	24.42	5.71	6.77	2.63	.28	24.42
cis-CHL	100	0.2	15.95	16.93	7.57	3.65	53.03	1.96	.76	2.04	1.04	3.72	4.47	1.53	4.13	2.67	7.48	7.46	11.32	3.81	1.04	53.03
trans-NC	100	0.2	43.45	43.62	20.35	5.50	126.28	13.02	8.98	13.47	2.32	26.53	20.11	15.28	14.83	4.06	58.47	25.53	29.37	15.96	2.32	126.28
cis-NC	100	0.2	25.04	26.92	6.01	2.09	70.76	5.15	3.90	5.16	.52	13.53	7.04	5.67	6.15	1.43	20.88	12.41	17.96	6.01	.52	70.76
oxy-CHL	100	0.4	10.45	9.51	6.86	3.25	33.83	4.81	3.46	4.60	1.07	11.05	4.65	3.97	2.92	1.52	14.50	6.64	6.65	4.25	1.07	33.83
α-endosulfan	100	0.1	38.57	44.49	13.42	4.31	112.53	22.09	7.00	21.83	12.13	33.19	35.53	16.82	30.98	15.22	65.44	32.06	27.75	23.51	4.31	112.53
β-endosulfan	100	0.1	41.09	46.60	19.47	3.59	140.37	11.46	7.70	10.42	3.62	29.87	16.35	7.21	13.97	6.52	30.14	22.97	29.71	13.93	3.59	140.37
HexaBB	33	0.1	.51	.89	.10	.05	2.56	.78	1.02	.64	.05	3.16	.11	.20	.11	.05	.69	.47	.81	.09	.05	3.16
TetraBB	40	0.1	.13	.09	.10	.05	.30	.34	.31	.26	.05	.88	.05	.00	.05	.05	.17	.22	.08	.05	.05	.88
BDE-47	73	0.2	7.11	10.71	1.82	.78	28.70	6.33	5.41	4.90	1.26	15.79	2.18	3.82	.90	.71	13.05	5.21	7.35	1.47	.71	28.70
2'-OH-BDE68	17	0.2	.1	.0	.1	.1	.1	8.3	4.5	8.8	.1	12.8	.3	.7	.3	.1	2.2	1.2	2.8	.5	.1	12.8
2'-MeO-BDE68	100	0.2	9.1	9.0	5.6	3.6	33.5	39.5	55.7	16.7	3.8	184.2	117.0	341.1	8.7	.2	1087.4	55.2	198.1	6.7	.2	1087.4
6-OH-BDE47	37	0.2	6.3	10.3	5.7	.1	26.8	26.5	38.1	10.8	.1	122.3	4.5	8.1	2.3	.1	22.3	12.4	25.1	3.3	.1	122.3
6-MeO-BDE47	73	0.2	9.05	13.92	2.15	.10	36.07	17.20	24.86	5.15	.10	78.95	12.35	27.66	4.49	.10	90.62	12.87	22.38	3.99	.10	90.62
2'-6-diMeO-BDE68	43	0.2	.10	.00	.10	.10	.10	13.7	18.1	8.6	.1	61.0	482.8	1611.4	1.1	.1	4784.5	185.6	872.5	1.0	.1	4784.5
B4Cl2-DBP	53	0.2	1.03	1.55	.39	.10	5.05	3.02	4.77	1.28	.00	15.79	2.76	5.94	2.12	.10	17.58	2.27	4.42	2.40	.00	17.58
C7-MBP	97	0.2	41.58	72.85	7.71	.10	215.25	43.00	55.35	15.23	.76	150.64	4.80	8.80	.62	.33	26.37	29.79	54.27	25.00	.10	215.25
TBP	100	0.1	10.72	8.23	8.21	2.93	26.84	27.80	16.35	24.51	3.20	59.96	15.02	15.48	8.59	1.73	51.16	17.85	15.26	11.68	1.73	59.96
TBA	97	0.1	.53	.45	.36	.05	1.53	6.55	9.01	3.50	.56	30.13	1.35	1.62	.66	.05	4.42	2.61	5.78	.79	.05	30.13
PCP	100	0.1	19.76	14.89	17.49	1.52	44.80	4.30	2.80	3.83	.67	9.10	3.99	3.28	3.30	.51	11.19	9.35	11.43	4.06	.51	44.80
PCA	57	0.1	.18	.25	.12	.05	.85	1.17	.85	1.15	.05	2.71	.21	.25	.11	.05	.77	.52	.69	.20	.05	2.71
TBBPA	27	10	176.76	355.40	60.40	5.00	1088.04	15.68	18.20	13.40	5.00	62.50	76.73	226.84	76.73	5.00	722.34	89.72	244.61	10.12	5.00	1088.04

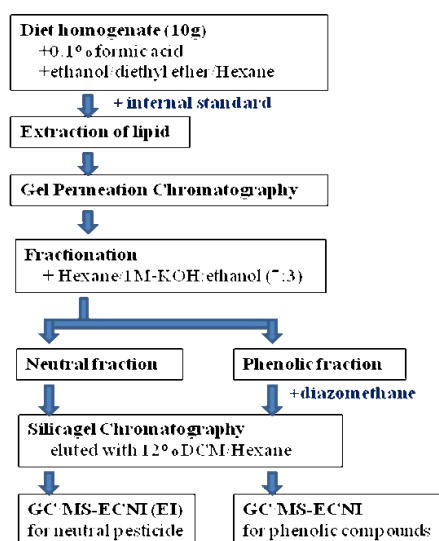


Fig. 1 Analytical methods for neutral and phenolic organohalogenes in dietary homogenate from Kyoto area.

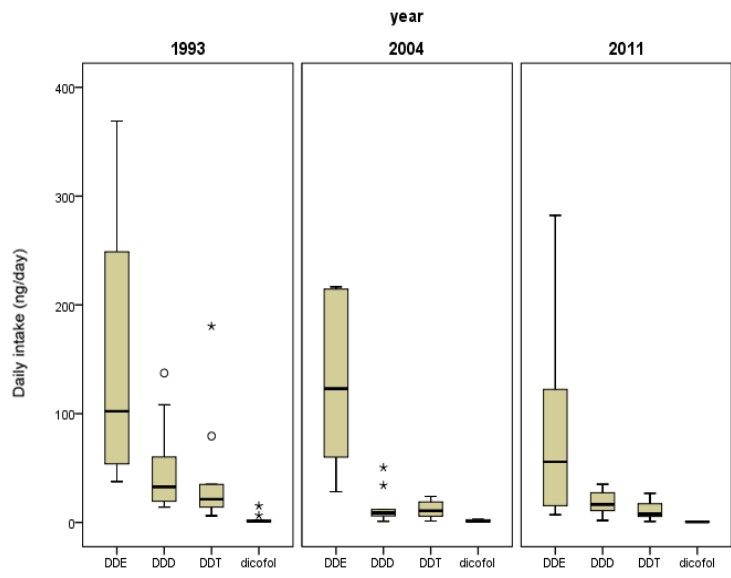


Fig. 2-1 Temporal trend of organohalogen contaminants (DDTs and dicofol) in duplicate diet study from Kyoto

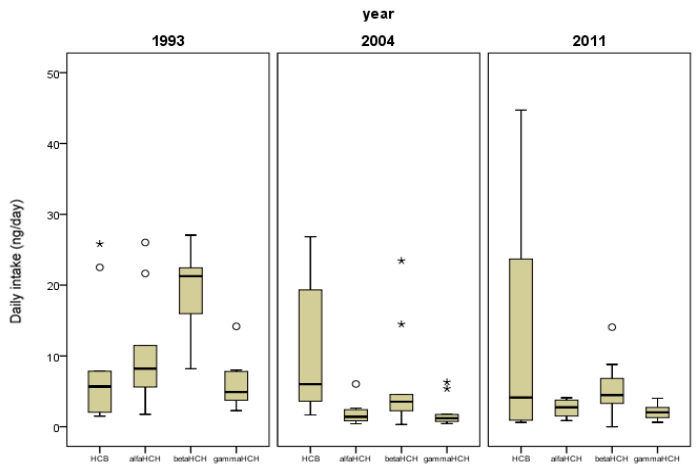


Fig. 2-2 Temporal trend of organohalogen contaminants (HCB and HCH) in duplicate diet study from Kyoto

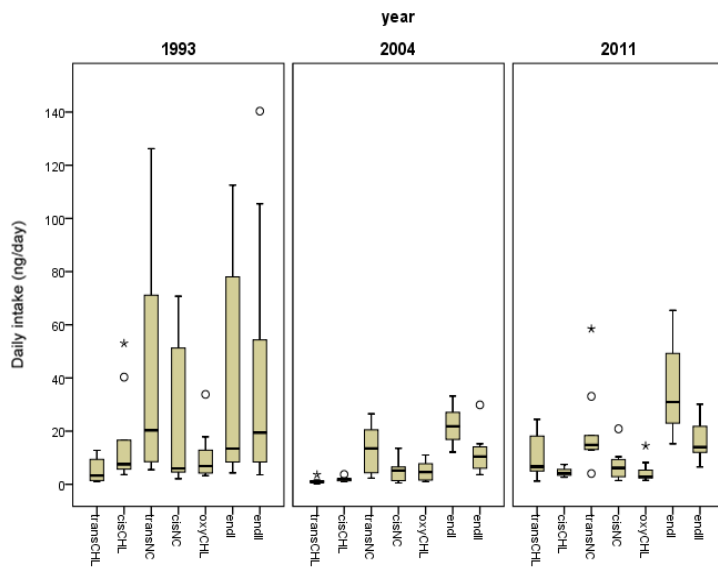


Fig. 2-3 Temporal trend of organohalogen contaminants (CHLs and endosulfan) in duplicate diet study from Kyoto

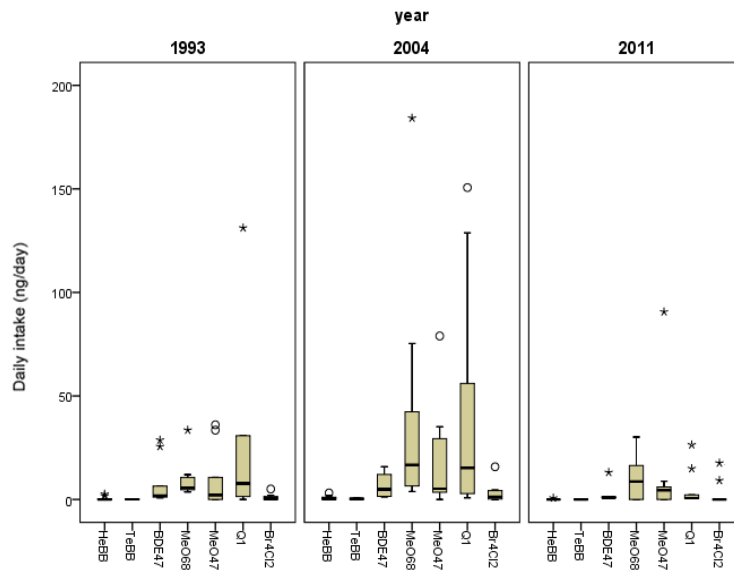


Fig. 2-4. Temporal trend of organohalogen contaminants (HBB and bipyrrrole) in duplicate diet study from Kyoto

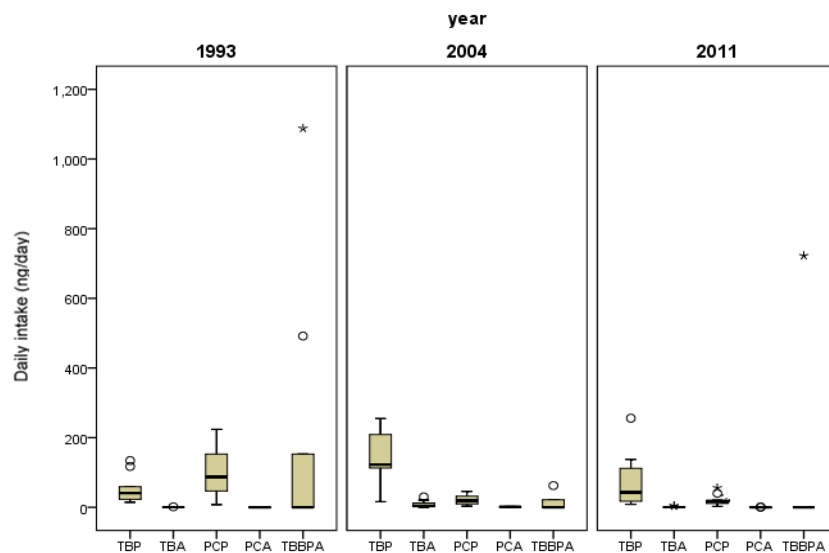


Fig. 2-5 Temporal trend of organohalogen contaminants (TBP, PCP and TBBPA) in duplicate diet study from Kyoto

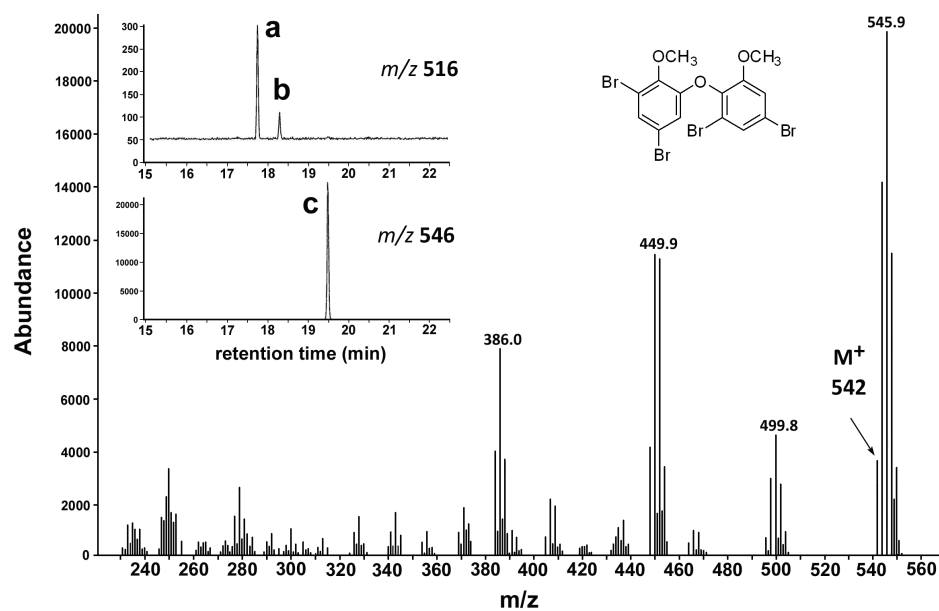


Fig. 3. GC/MS (EI mode) of brominated contaminants (peak C) found in diet homogenate from Kyoto 2011. Interposed chromatograms are selected ion monitoring profiles for methoxylated tetrabromodiphenyl ethers in neutral fraction from diet homogenate; Peaks a and b represent 2'-MeO-BDE68 and 6-MeO-BDE47, 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）  
総合研究報告書 資料6

長崎の母乳中の臭素系難燃剤および関連化合物の調査

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

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 Br<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>-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POPs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 $\alpha$ -[ $^{13}\text{C}$ ]endosulfan, はPOPs定量用に、4-OH-[ $^{13}\text{C}$ ]PCB187はフェノール性化合物の定量用にAccuStandard社から購入した。シリン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℃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/n-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10g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( $\alpha$ -[ $^{13}\text{C}$ ]endosulfan および4-OH-[ $^{13}\text{C}$ ]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回繰り返し、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 $\mu$ 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 (Br<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>-DBP および Cl<sub>7</sub>-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、-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 Br<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>-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を検出したこと( 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(5 kg)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

### 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

- 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 tolerable daily intake (PTDI 2µg/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.; Cenijn, 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	sam pling year	age	occupation	parity	fat%
N agasaki 1	Sasebo	2009	28	事務職	2	1.16
N agasaki 2	Sasebo	2009	30	主婦	3	1.09
N agasaki 6	Sasebo	2009	34	サービス業	2	3.02
N agasaki 7	Sasebo	2009	35	事務職	3	3.37
N agasaki 8	Sasebo	2009	18	主婦	1	1.83
N agasaki 11	Sasebo	2009	24	サービス業	1	3.11
N agasaki 12	Sasebo	2009	22	主婦	1	2.18
N agasaki 16	Sasebo	2010	29	外交員	2	1.57
N agasaki 17	Sasebo	2010	33	主婦	2	1.31
N agasaki 18	Sasebo	2010	28	製造業	1	2.07
N agasaki 19	Sasebo	2010	25	製造業	3	2.07
N agasaki 20	Sasebo	2010	29		2	1.62
N agasaki 21	Sasebo	2010	34	主婦	1	2.20
N agasaki 22	Sasebo	2010	29	事務職	2	1.28
N agasaki 23	Sasebo	2010	30	事務職	1	1.14
N agasaki 25	Sasebo	2010	34	主婦	2	2.35
N agasaki 27	Sasebo	2010	30	サービス業	1	2.53
N agasaki 28	Sasebo	2010	26	主婦	2	1.72
N agasaki 29	Sasebo	2010	34	主婦	3	1.55
N agasaki 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 <sub>R</sub> (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 <sub>7</sub> -MBP	12.46	386 (388)	0.1
Br <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> -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-[ <sup>13</sup> C]endosulfan (IS)	12.29	385 (387)	0.1
4-OH-[ <sup>13</sup> 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
HCB	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	31.60	6.69	3.44	5.81	1.77	13.25	8.79	6.71	6.64	1.35	31.60
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
BrdCl2-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

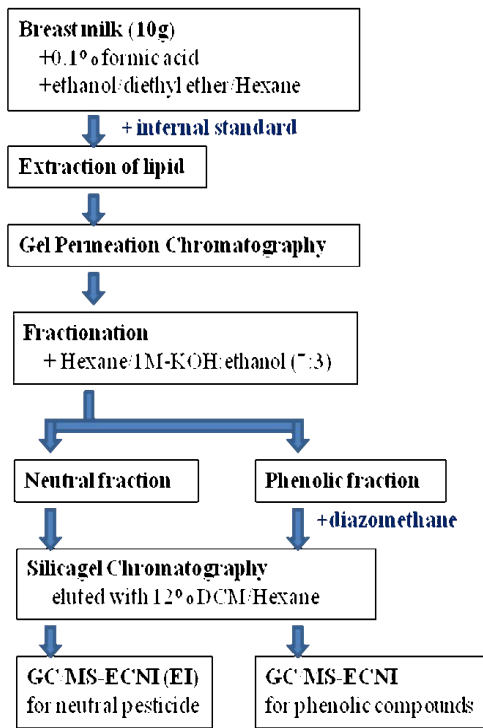


Fig. 1 Flow chart of analysis for organochlorines in breast milk

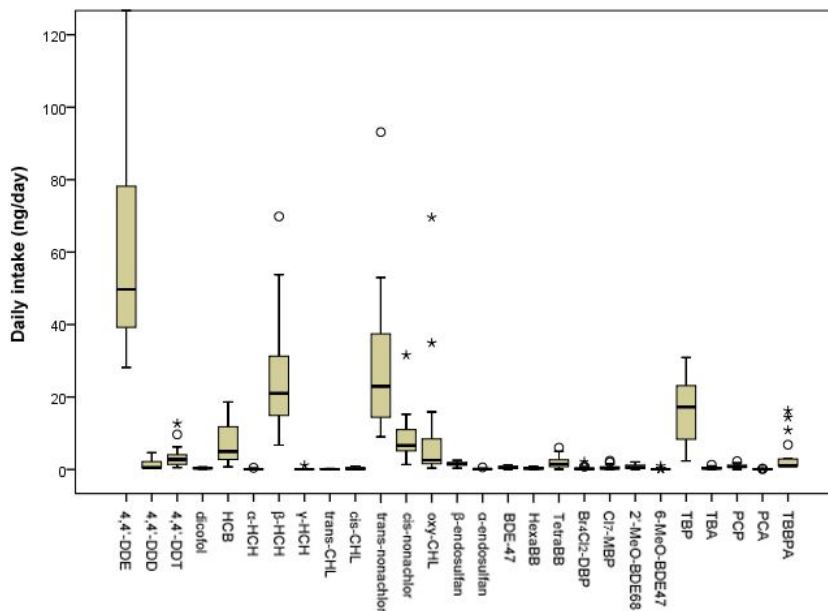


Fig. 2. Concentrations of organohalogenes in breast milk from Sasebo 2011



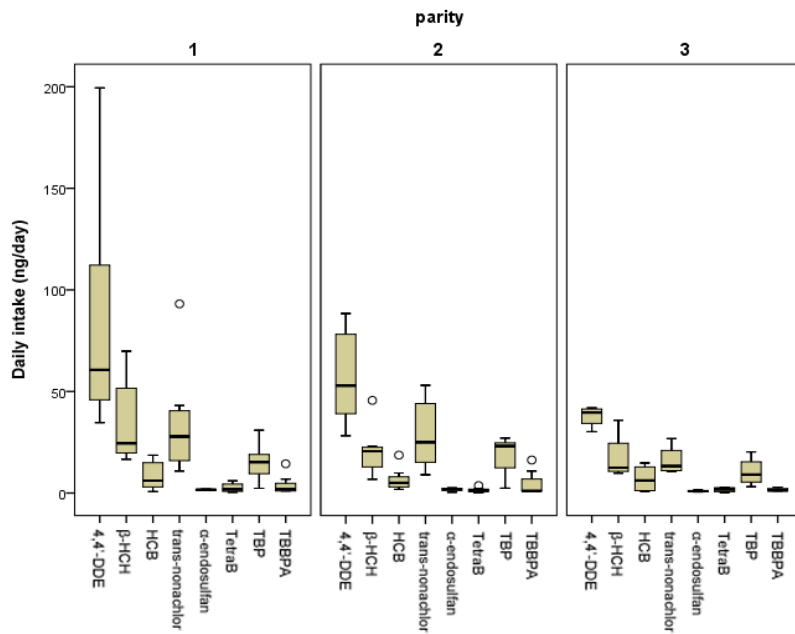


Fig. 3. Comparison of selected organohalogen between multiparous mothers from Sasebo

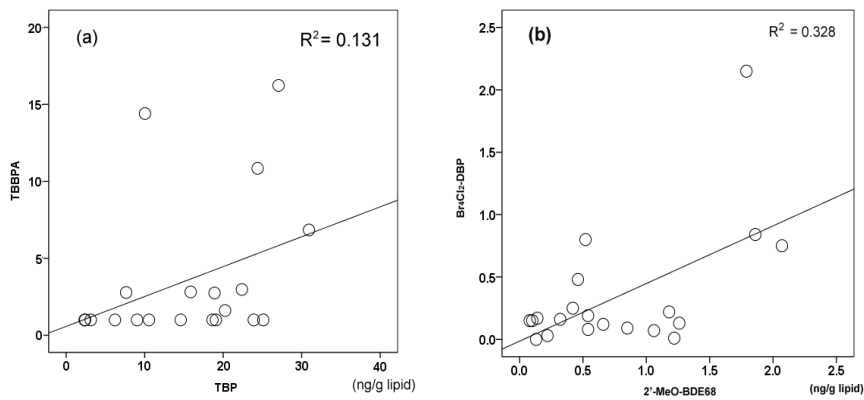


Fig. 4. Correlation in concentration between TBP and TBBPA (a), and between 2'-MeO-BDE68 and Br<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>-DBP (b). Pearson's correlation coefficients, (a)  $r=0.362$ ,  $p=0.117$ , (b)  $r=0.573$ ,  $p=0.008$

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）  
総合研究報告書 資料7

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中的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POP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 $^{13}\text{C}$ -triclosan、 $^{13}\text{C}$ -methyltriclosan、 $^{13}\text{C}$ -endosulfan、および4-OH-[ $^{13}\text{C}$ ] 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 (GPC)、(3) KOH+EtOH/ヘキサンによる液-液分配抽出と誘導体化 (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 ( $^{13}\text{C}$ -triclosan,  $^{13}\text{C}$ -methyltriclosan,  $^{13}\text{C}$ -endosulfan, および4-OH-[ $^{13}\text{C}$ ] 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 µL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) 食事の中の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 ng/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 ng/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 ng/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 ng/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800g/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 ng/g lipid (約2.3 ng/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50mg/kg/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) 食事中の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 (Rüdel 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が一様に食事経路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.; Hagglblom, 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)		
Ionization mode	ion source (150 °C for ECNI, 230 for EI)		
Reagent gas	Electron ionization (EI) and electron capture negative ionization (ECNI)		
	Methane for ECNI		
Analytes	GC t <sub>R</sub> (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)
trans-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-[ <sup>13</sup> C]-PCB187	17.38	438 (422)	0.2(ECNI)
α- [ <sup>13</sup> C] endosulfan (IS)	12.40	385 (387)	0.1(ECNI)
<sup>13</sup> C-triclosan (methylated)	12.14	314 (316)	0.1 (EI)
<sup>13</sup> C-methyltriclosan	12.14	314 (316)	0.1 (EI)

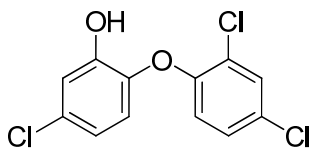
\*Limits of quantification; S/N = 10, \*\*confirmation ion

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

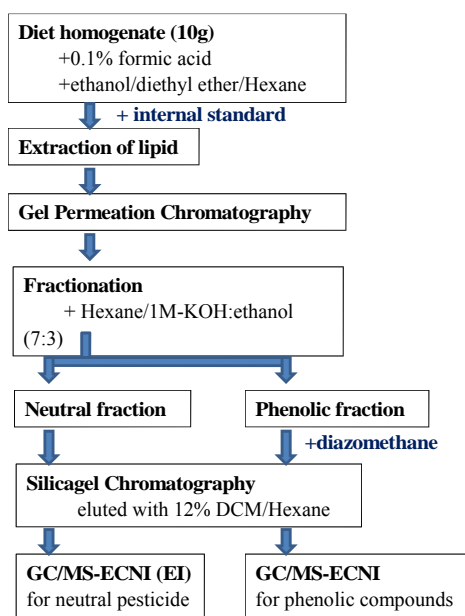
Congener	Concentration (ng/g lipid, mean± SD)		
	Korea (Seoul)	China (Beijing)	Japan (Kyoto)
<i>phenolic</i>			
triclosan (TCS)	49±29 (13-101)	45±61 (13-217)	77±69 (16-199)
2,4,6-tribromophenol (TBP)	19±20 (4.0-7.3)	25±30 (6.9-89)	4.3±3.0 (1.4-12)
pentachlorophenol (PCP)	0.6±0.4 (0.1-1.5)	0.8±1.0 (0.2-3.2)	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**

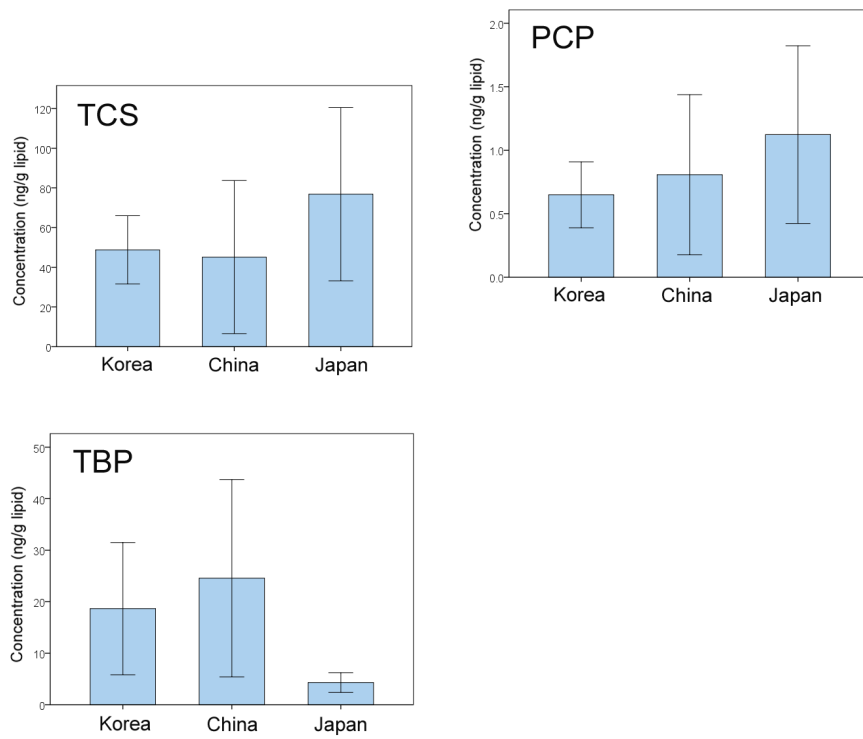
Congeners	Mean dietary intake ng/day					
	Korea (seoul)		China (Beijing)		Japan (Kyoto)	
	1990	2009	1990	2009	1990	2009
<i>phenolic</i>						
triclosan (TCS)	1474	3346	3308	3731	2470	3346
2,4,6-tribromophenol (TBP)	890	2336	1134	1328	1804	925
pentachlorophenol (PCP)	371	587	3143	567	868	94
2'-hydroxy-BDE68	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



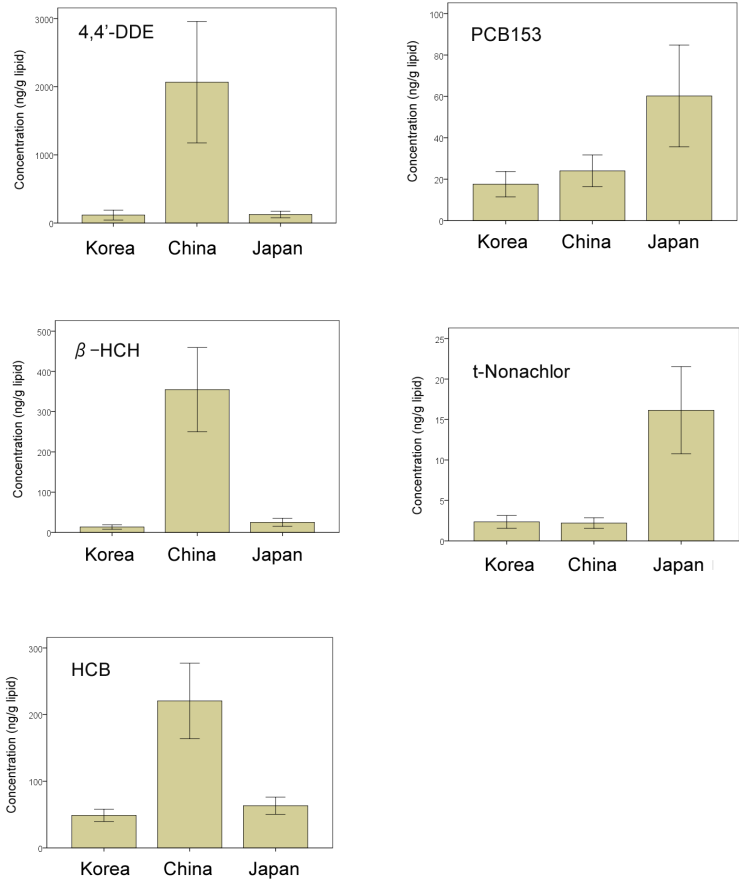
**Fig. 1 Structure of TCS**



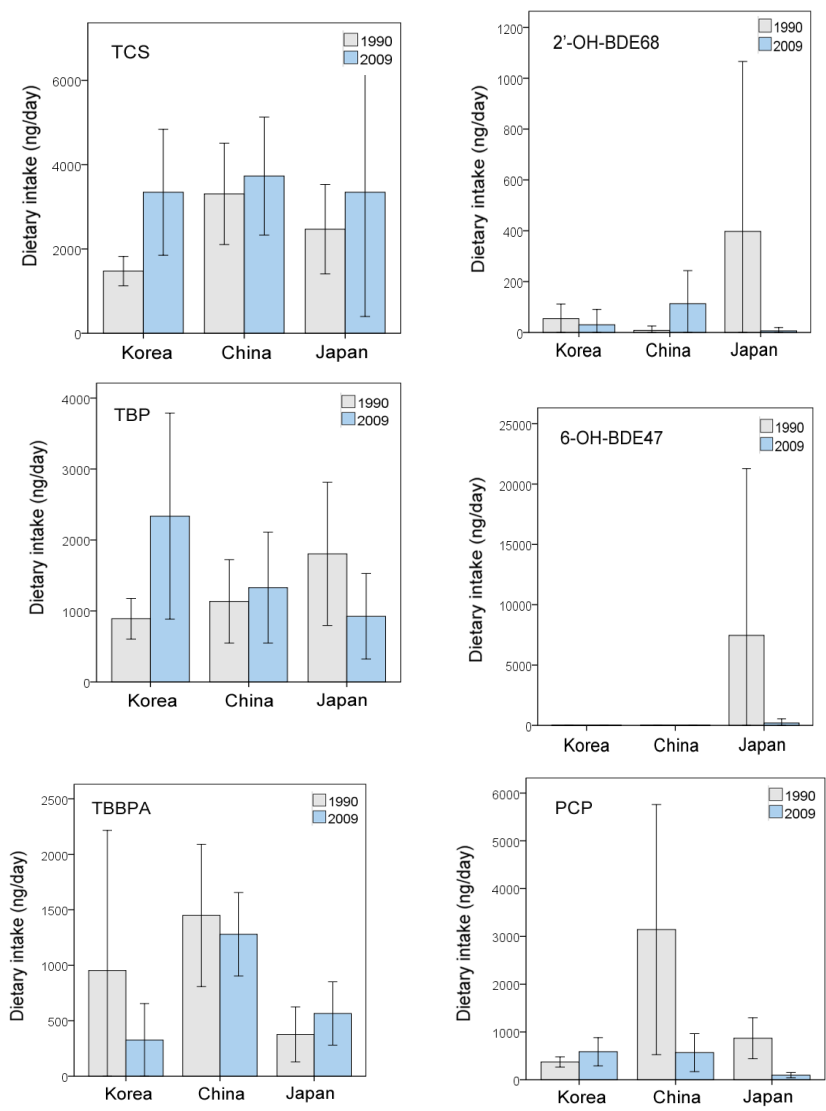
**Fig. 2 Analytical methods for neutral and phenolic organohalogen pesticides in breast milk and dietary homogenates.**



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

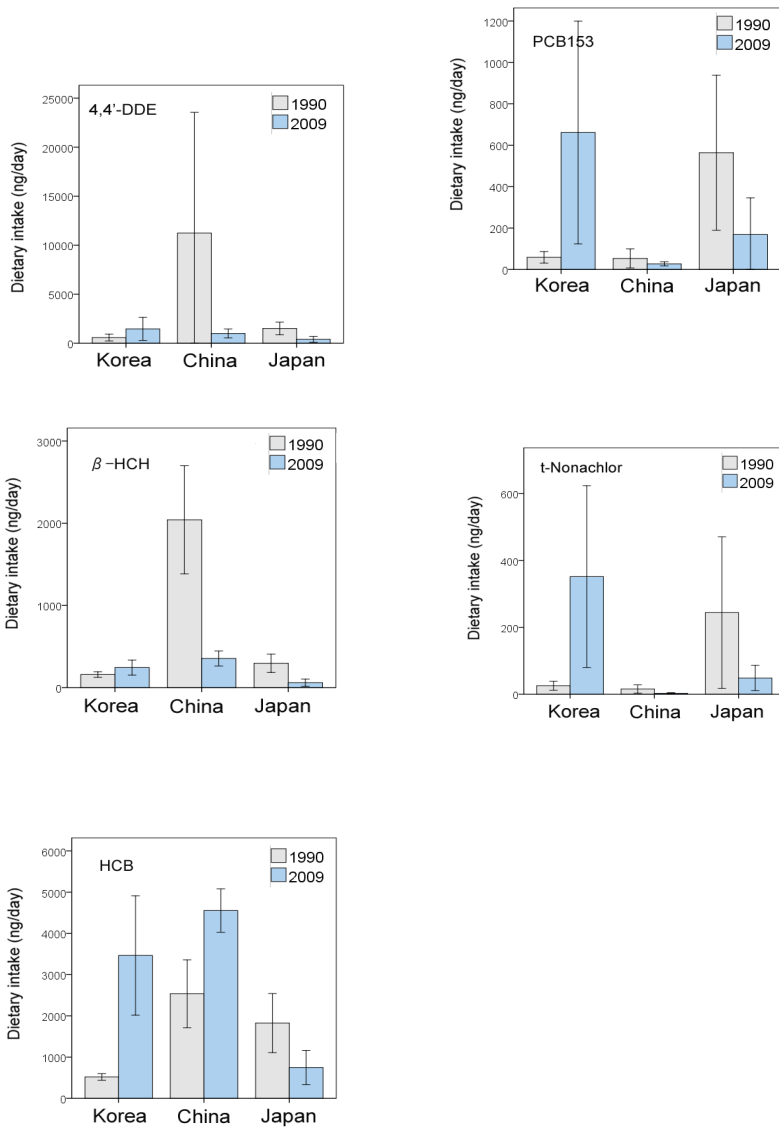


**Fig. 4 Comparison of POPs concentrations in breast milk from Korea, China and Japan.**



**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）  
総合研究報告書 資料 8

日本人母乳中の臭素系難燃剤HBCDs、2,4,6-TBP、TBBP-Aの汚染実態の解明

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 第一薬科大学薬学部・助教

近年、有機ハロゲン物質のリスクアセスメントの一環として臭素系難燃剤（brominated flame retardants :BFR）のヒトへの曝露評価が注目されている。本研究では BFR の中でヘキサブROMシクロドデカン類（HBCDs）、トリプロモフェノール（2,4,6-TBP）、テトラプロモビスフェノール A（TBBP-A）に焦点を当て、母乳分析によりヒト曝露実態の解明を行なった。日本の 6 地域で採取された母乳 64 検体について LC/MS/MS による定量を行なった結果、HBCDs 濃度の幾何平均は、 $\alpha$ -HBCD で 2.21 ng/g-lipid、 $\beta$ -HBCD で 0.19 ng/g-lipid、 $\gamma$ -HBCD で 0.29 ng/g-lipid、2,4,6-TBP で 0.53 ng/g-lipid、TBBP-A で 2.97ng/g-lipid であった。日本の母乳中の HBCDs の汚染はこの 10 年間で増加傾向を示し、他のアジア諸国と比べても高いことが明らかになった。本研究では母乳中 BFR 濃度と年齢、出産回数との強い関係は見られず、母乳中 BFR 濃度は他の要因（食事や使用する電化製品等）の影響を受けていると考えられる。

#### A . 研究目的

最近二十年の間に、POPs モニタリングの範囲は、現在使用中の臭素化合物へと拡大している。特にポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDEs）などの臭素系難燃剤（brominated flame retardants :BFR）は、海洋哺乳動物及びヒトで検出されて注目を集めている（Kajiwara et al., 2008; Isobe et al., 2011; Tanabe et al., 2008）。BFR は 2004 年、アジア市場の PBDE 製品の規制を受け、ヘキサブROMシクロドデカン類（HBCDs）とテトラプロモビスフェノール A（TBBP-A）のような他の難燃剤の使用へとシフトしてきている（Tanabe et al., 2008; Isobe et al., 2007; Ueno et al., 2010; Law et al., 2006）。

PBDEs については日本における野生生物組織とヒトへの蓄積について

いくつかの先行研究があるが（Kajiwara et al., 2008; Isobe et al., 2009; 2011; Lam et al., 2009; Moon et al., 2010）、HBCDs と TBBP-A についての情報は少ない。本研究では現在不足している母乳中 HBCD、TBBP-A、2,4,6-TBP の汚染実態の把握とその濃度に影響を与える要因を解明するために、日本の 6 地域に住む異なる年齢と出産回数の母親から採取した 64 検体の母乳試料の分析を行なった。

#### B . 研究方法

分析母乳試料の詳細を Table 1 に示す。2008 年から 2010 年の間に日本の 6 地域（宮城、東京、岐阜、京都、兵庫、長崎）で採取した母乳を用いた（Fig.1）。母乳約 5mL に内標準として 3 種の  $^{13}\text{C}_{12}$ -labelled HBCD 異性体、

$^{13}\text{C}_{12}$ -labelled TBBP-A、 $^{13}\text{C}_6$ -labelled 2,4,6-TBP を添加した。次にジクロロメタン/ヘキサン(1:1, v/v)を加え、抽出液を濃縮し脂肪量を測定した。GPC 処理後、回収率を見るために d18- $\beta$ -HBCD を添加した。LC/MS/MS の詳細設定とクロマトグラムを Table 2 と Fig. 2 に示す。

### C. 研究結果・考察

64検体の母乳試料に含まれる脂質は0.8~2.9%、幾何平均で12%であった。分析結果をTable 3に示す。全試料中で HBCD 異性体の  $\alpha$ -HBCDs、 $\beta$ -HBCDs および  $\gamma$ -HBCDs はそれぞれ 100%、91%、64%の割合で検出された。 $\alpha$ -HBCDの幾何平均値は2.2ng/g lipidであり、全HBCD異性体合計の平均値の83% (24-100%)を占めた。一方 $\beta$ -HBCDと $\gamma$ -HBCDはそれぞれ9.6% (0.08-51%)と7.0% (0.12-75%)であった。HBCD合計では幾何平均値で2.2ng/g lipidであった。フェノール性BFRのうち、2,4,6-TBPとTBBP-Aは90%と97%で検出され、それぞれ幾何平均値で0.9と2.9ng/g lipidであった。HBCDsの異性体の中で、 $\alpha$ -HBCDの割合が高いことは先行研究と一致している ( Abdallah and Harrad, 2011, Kakimoto et al., 2008; Polder et al., 2008, Shi et al., 2009, Eljarrat et al., 2009 )。今回の $\alpha$ -HBCDの平均濃度(2008-2010年の母乳試料)は先行研究 ( Kakimoto et al., 2008 : 1988-2006年の母乳試料) よりも高く、日本の環境中におけるHBCDの濃度の増加を示している。現在の日本のHBCDsの濃度はスウェーデン、ロシア、フィリピン、ノルウェー(0.25-0.86ng/g lipid)よりも高く、中国、ベルギー、カナダ、ベトナム、イギリス(1.0-3.8ng/g lipid)と同程度であった( Carignan et al., 2012; Abdallah and Harrad, 2011; Polder

et al., 2008; Shi et al., 2009; 2013; Eljarrat et al., 2009; Malarvannan et al., 2009; Thomsen et al., 2010; Colles et al., 2008; Tue et al., 2010; Harrad et al., 2009 )。試料収集や分析方法は一部で異なるものの、HBCDsがアメリカにくらべ、アジアやヨーロッパで高い傾向は先行研究と一致している ( Watanabe et al., 2003; Law et al., 2008 )。Isobe et al (2009) は日本人の脂肪組織中のHBCDs (0.85-39 ng/g lipid) がアメリカのものより高いことを報告している ( Johnson-Restrepo et al., 2008 )。母乳中のHBCDsとTBBP-Aは先行研究のPBDEsと同程度の濃度であった ( Haraguchi et al., 2009 )。TBBP-Aは $\alpha$ -HBCDとPBDEsと同レベルで検出された。TBBP-Aは日本での先行研究が少なく比較はできないが、本研究でのTBBP-A (幾何平均, 2.9 ng/g lipid) は中国の都市部居住者の母乳中濃度(平均 0.4 ng/g lipid) ( Shi et al., 2013 ) よりも高く、イギリスやフランスと同程度であった( Abdallah and Harrad, 2011; Cariou et al., 2008 )。本研究では3検体において非常に高濃度のTBBP-A (>100 ng/g lipid) が検出された。これは職業曝露によるものと思われる。2,4,6-TBPの日本人中濃度についての研究は妊娠中女性についてのみ報告されており ( 130 pg/g lipid, Kawashiro et al., 2008 )、本研究の分析結果はそれと同程度であった。また、ノルウェーの母乳試料の分析結果 ( 0.077-26 pg/g wet, Thomsen et al., 2002 ) と同程度であった。

各測定物質と年齢、出産回数の相関関係を Table 4 と Fig. 3 に示す。2,4,6-TBP および TBBP-A の間には正の相関が見られ( $r = 0.286$ ,  $p < 0.05$ )、これら 2 つのフェノール性 BFR が類似の動態を示すことが示唆された。

HBCD 異性体の  $\beta$ -HBCD と  $\alpha$  及び  $\gamma$ -HBCD との間に相関は見られなかったが、 $\beta$ -HBCD とフェノール性 BFR との間には相関が見られた ( $r = 0.44$ 、 $p < 0.01$ )。年齢との相関関係は  $\gamma$ -HBCD においてのみ見られた ( $r = 0.278$ 、 $p < 0.01$ )。出産回数との関連は、 $\gamma$ -HBCD においてのみ正の相関が見られた。Table 3 において、TBBP-A、 $\gamma$ -HBCD は経産婦で初産婦より高い傾向が見られたが有意差はなかった ( $p > 0.05$ )。

#### D . 結論

本研究では 2008 ~ 2010 年の母乳試料中に同程度の HBCDs と TBBP-A の検出が確認された。本研究では日本の母乳中 HBCDs 濃度は先行研究と比較して、上昇傾向を示すことを明らかにした。HBCDs の中で  $\alpha$ -HBCD が最も高濃度であったが、 $\beta$ -HBCD はフェノール性 BFR と相関を示し、 $\gamma$ -HBCD は年齢との相関がみられた。日本国内のフェノール性 BFR の経年変化については先行研究がないことから現在も不明である。本研究は BFR の体内負荷量は出産回数や年齢とは無関係であることを示唆し、別の要因、例えば食事内容や使用する電化製品等の個々人のライフスタイルとの関連が考えられる。

#### E . 健康危険情報

なし

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表・その他

なし

#### G . 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

#### H . 文献

- Abdallah, M. A. E.; Harrad, S., Tetrabromobisphenol-A, hexabromocyclododecane and its degradation products in UK human milk: Relationship to external exposure. *Environment International* **2011**, *37*: 443-448.
- Carignan, C. C.; Abdallah, M. A. E.; Wu, N.; Heiger-Bernays, W.; McClean, M. D.; Harrad, S.; Webster, T. F., Predictors of tetrabromobisphenol-A (TBBP-A) and hexabromocyclododecanes (HBCD) in milk from Boston mothers. *Environmental Science and Technology* **2012**, *46*: 12146-12153.
- Colles, A.; Koppen, G.; Hanot, V.; Nelen, V.; Dewolf, M. C.; Noël, E.; Malisch, R.; Kotz, A.; Kypke, K.; Biot, P.; Vinkx, C.; Schoeters, G., Fourth WHO-coordinated survey of human milk for persistent organic pollutants (POPs): Belgian results. *Chemosphere* **2008**, *73*: 907-914.
- Cariou, R.; Antignac, J. P.; Zalko, D.; Berrebi, A.; Cravedi, J. P.; Maume, D.; Marchand, P.; Monteau, F.; Riu, A.; Andre, F.; Le Bizec, B., Exposure assessment of French women and their newborns to tetrabromobisphenol-A: occurrence measurements in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum. *Chemosphere* **2008**, *73*: 1036-1041.
- Eljarrat, E.; Guerra, P.; Martínez, E.; Farré, M.; Alvarez, J. G.; López-Teijón, M.; Barceló, D., Hexabromocyclododecane in Human Breast Milk: Levels and Enantiomeric

- Patterns. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*: 1940-1946.
- Harrad, S.; de Wit, C. A.; Abdallah, M. A.-E.; Bergh, C.; Björklund, J. A.; Covaci, A.; Darnerud, P. O.; de Boer, J.; Diamond, M.; Huber, S.; Leonards, P.; Mandalakis, M.; Östman, C.; Haug, L. S.; Thomsen, C.; Webster, T. F., Indoor Contamination with Hexabromocyclododecanes, Polybrominated Diphenyl Ethers, and Perfluoroalkyl Compounds: An Important Exposure Pathway for People? *Environmental Science & Technology* **2010**, *44*: 3221-3231.
- Haraguchi, K.; Koizumi, A.; Inoue, K.; Harada, K. H.; Hitomi, T.; Minata, M.; Tanabe, M.; Kato, Y.; Nishimura, E.; Yamamoto, 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., Levels and regional trends of persistent organochlorines and polybrominated diphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries. *Environment International* **2009**, *35*: 1072-1079.
- Isobe, T.; Oda, H.; Takayanagi, N.; Kunisue, T.; Komori, H.; Arita, N.; Ueda, N.; Nose, M.; Yamada, T.; Takahashi, S.; Tanabe, S., Hexabromocyclododecanes in human adipose tissue from Japan. *Environmental Chemistry* **2009**, *6*: 328-333.
- Isobe, T.; Oshihoi, T.; Hamada, H.; Nakayama, K.; Yamada, T. K.; Tajima, Y.; Amano, M.; Tanabe, S., Contamination status of POPs and BFRs and relationship with parasitic infection in finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) from Seto Inland Sea and Omura Bay, Japan. *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *63*: 564-571.
- Isobe, T.; Ramu, K.; Kajiwara, N.; Takahashi, S.; Lam, P. K. S.; Jefferson, T. A.; Zhou, K.; Tanabe, S., Isomer specific determination of hexabromocyclododecanes (HBCDs) in small cetaceans from the South China Sea - Levels and temporal variation. *Marine Pollution Bulletin* **2007**, *54*: 1139-1145.
- Lam, J. C.; Lau, R. K.; Murphy, M. B.; Lam, P. K., Temporal trends of hexabromocyclododecanes (HBCDs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and detection of two novel flame retardants in marine mammals from Hong Kong, South China. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*: 6944-6949.
- Law RJ, Bersuder P, Allchin CR, Barry J. Levels of the flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A in the blubber of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded or bycaught in the U.K., with evidence for an increase in HBCD concentrations in recent years. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40*: 2177-2183.
- Law RJ, Herzke D, Harrad S, Morris S, Bersuder P, Allchin CR. Levels and trends of HBCD and BDEs in the European and Asian environments, with some information for other BFRs. *Chemosphere* **2008**, *73*: 223-241.
- Malarvannan, G.; Kunisue, T.; Isobe, T.; Sudaryanto, A.; Takahashi, S.; Prudente, M.; Subramanian, A.; Tanabe, S., Organohalogen compounds in human breast milk from mothers living in Payatas and Malate, the Philippines: Levels, accumulation kinetics and infant health risk. *Environmental Pollution* **2009**, *157*: 1924-1932.
- Moon, H. B.; Kannan, K.; Choi, M.; Yu, J.; Choi, H. G.; An, Y. R.; Choi, S. G.; Park, J. Y.; Kim, Z. G., Chlorinated and brominated contaminants

- including PCBs and PBDEs in minke whales and common dolphins from Korean coastal waters. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *179*: 735-741.
- Johnson-Restrepo, B.; Adams, D. H.; Kannan, K., Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecanes (HBCDs) in tissues of humans, dolphins, and sharks from the United States. *Chemosphere* **2008**, *70*: 1935-44.
- Kakimoto, K.; Akutsu, K.; Konishi, Y.; Tanaka, Y., Time trend of hexabromocyclododecane in the breast milk of Japanese women. *Chemosphere* **2008**, *71*: 1110-1114.
- Kajiwara, N.; Kamikawa, S.; Amano, M.; Hayano, A.; Yamada, T. K.; Miyazaki, N.; Tanabe, S., Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorines in melon-headed whales, *Peponocephala electra*, mass stranded along the Japanese coasts: Maternal transfer and temporal trend. *Environmental Pollution* **2008**, *156*: 106-114.
- 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*: 1071-84.
- Law, R. J.; Herzke, D.; Harrad, S.; Morris, S.; Bersuder, P.; Allchin, C. R., Levels and trends of HBCD and BDEs in the European and Asian environments, with some information for other BFRs. *Chemosphere* **2008**, *73*: 223-241.
- Park, J. S.; Bergman, A.; Linderholm, L.; Athanasiadou, M.; Kocan, A.; Petrik, J.; Drobna, B.; Trnovec, T.; Charles, M. J.; Hertz-Picciotto, I., Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia. *Chemosphere* **2008**, *70*: 1676-84.
- Polder, A.; Gabrielsen, G. W.; Odland, J. Ø.; Savinova, T. N.; Tkachev, A.; Løken, K. B.; Skaare, J. U., Spatial and temporal changes of chlorinated pesticides, PCBs, dioxins (PCDDs/PCDFs) and brominated flame retardants in human breast milk from Northern Russia. *Science of the Total Environment* **2008**, *391*: 41-54.
- Polder, A.; Thomsen, C.; Lindström, G.; Løken, K. B.; Skaare, J. U., Levels and temporal trends of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants in individual human breast milk samples from Northern and Southern Norway. *Chemosphere* **2008**, *73*: 14-23.
- 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. *Environmental Science and Technology* **2009**, *43*: 4314-4319.
- Shi, Z.; Jiao, Y.; Hu, Y.; Sun, Z.; Zhou, X.; Feng, J.; Li, J.; Wu, Y., Levels of tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecanes and polybrominated diphenyl ethers in human milk from the general population in Beijing, China. *Science of the Total Environment* **2013**, *452-453*: 10-18.
- Tanabe, S.; Ramu, K.; Isobe, T.; Takahashi, S., Brominated flame retardants in the environment of Asia-Pacific: An overview of spatial and temporal trends. *Journal of Environmental Monitoring* **2008**, *10*: 188-197.
- Thomsen, C.; Leknes, H.; Lundanes, E.;

- Becher, G., A new method for determination of halogenated flame retardants in human milk using solid-phase extraction. *J Anal Toxicol* **2002**, *26*: 129-37.
- Thomsen, C.; Stigum, H.; Frøshaug, M.; Broadwell, S. L.; Becher, G.; Eggesbø, M., Determinants of brominated flame retardants in breast milk from a large scale Norwegian study. *Environment International* **2010**, *36*: 68-74.
- Tue, N. M.; Sudaryanto, A.; Minh, T. B.; Isobe, T.; Takahashi, S.; Viet, P. H.; Tanabe, S., Accumulation of polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants in breast milk from women living in Vietnamese e-waste recycling sites. *Science of the Total Environment* **2010**, *408*: 2155-2162.
- Ueno, D.; Isobe, T.; Ramu, K.; Tanabe, S.; Alaei, M.; Marvin, C.; Inoue, K.; Someya, T.; Miyajima, T.; Kodama, H.; Nakata, H., Spatial distribution of hexabromocyclododecanes (HBCDs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorines in bivalves from Japanese coastal waters. *Chemosphere* **2010**, *78*: 1213-1219.
- Watanabe, I.; Sakai, S. I., Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environment International* **2003**, *29*: 665-682.

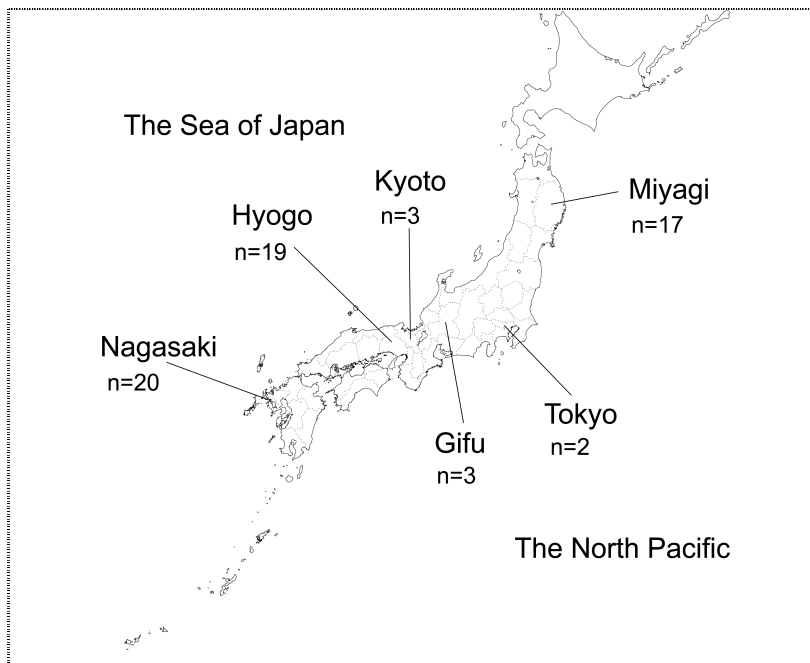


Fig. 1 Sampling site of breast milk in Japan

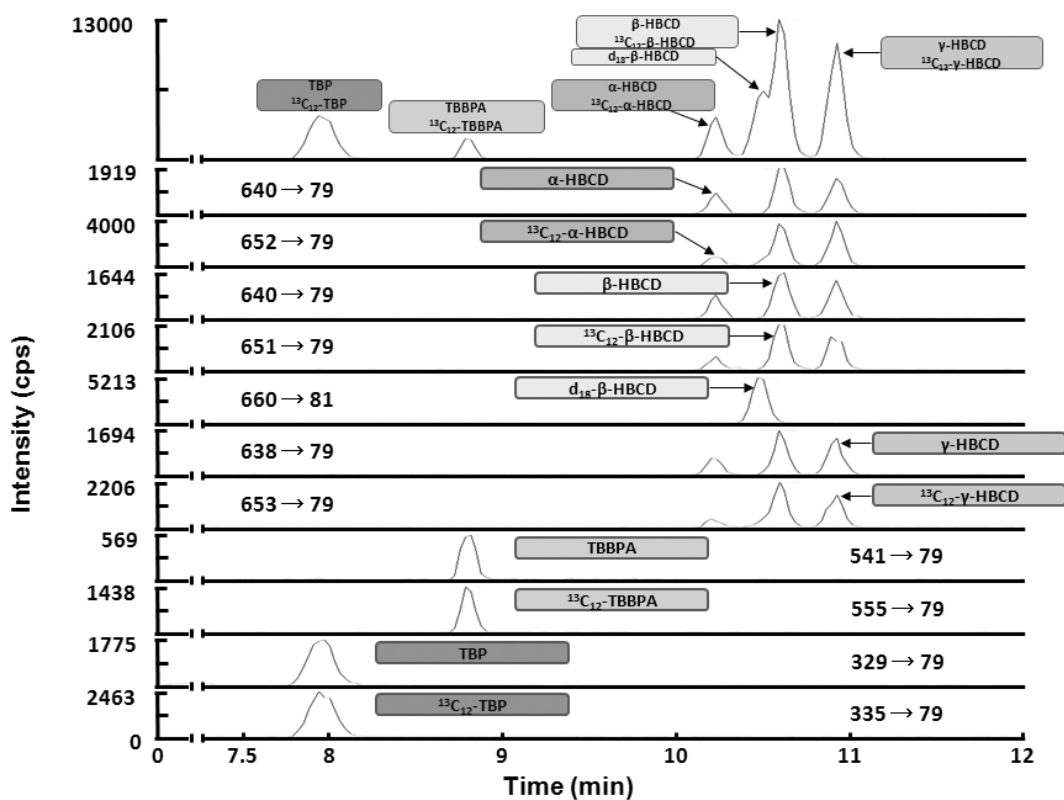


Fig. 2 Chromatograms of (A) TBP, (B) TBBPA, (C)  $\alpha$ -HBCD, (D)  $d_{18}$ - $\beta$ -HBCD, (E)  $\beta$ -HBCD, (F)  $\gamma$ -HBCD in matrix match calibration standard (milk) at concentration 0.5 ng/mL.



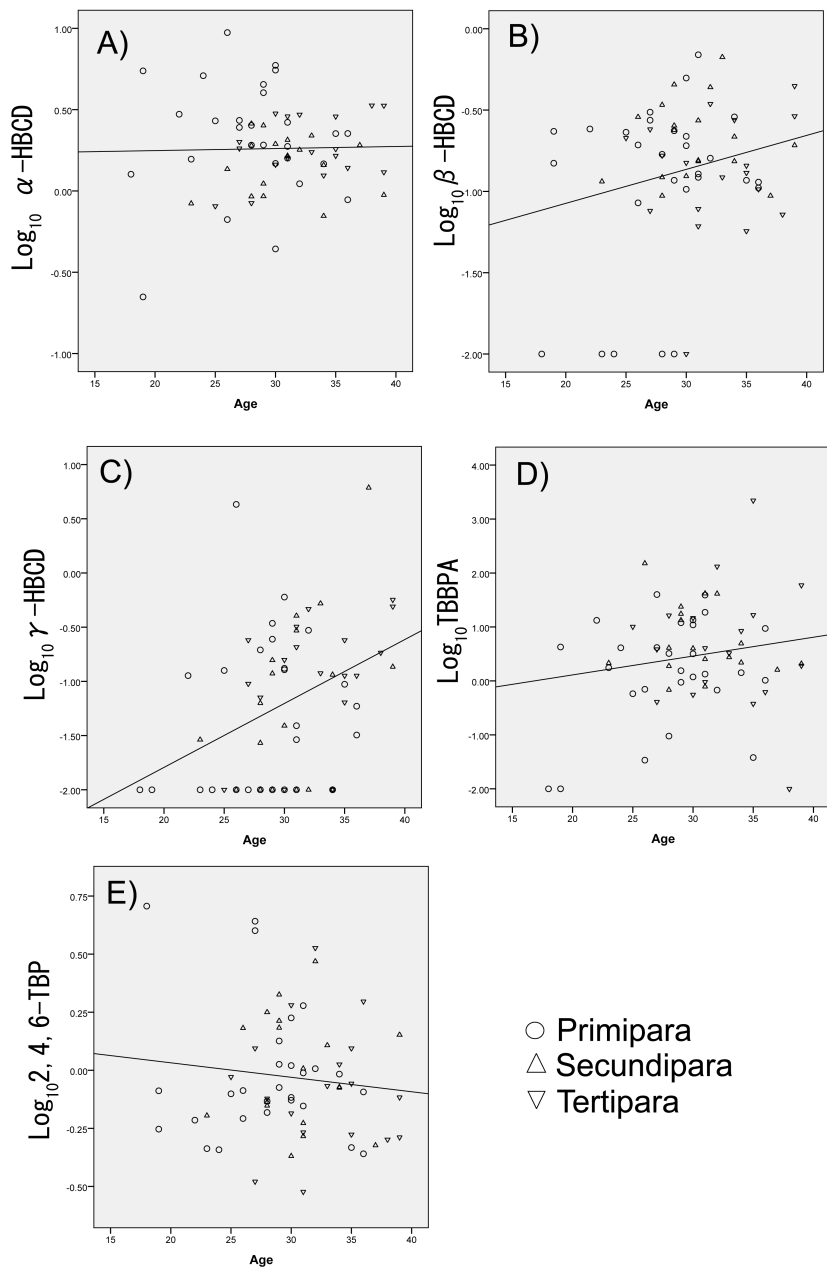


Fig. 3 Relationship between the age of mothers and concentrations of analytes  
 Gamma HBCD  $r=0.278$ ,  $p=0.002$ .

Table 1. Sample information of human breast milk in Japan

Region	N	Sampling year	Number of births			Mean age
			1st	2nd	3rd	
Miyagi	17	2009	10	4	3	29.7
Tokyo	2	2010	-	-	2	28.5
Gifu	3	2009	-	-	3	32.0
Kyoto	3	2009	-	-	3	33.3
Hyogo	19	2008-2009	10	6	3	30.9
Nagasaki	20	2009-2010	8	8	4	28.9

Table 2. List of analytes and parameters of LC-MS/MS detection

Compound	Abbreviation	Formula	t <sub>r</sub> (min)	MRM-transition (m/z)	DP (V)	CP (V)	DEP (V)	CE (V)	CXP (V)
2,4,6-tribromophenol	2,4,6-TBP	C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>3</sub> O	7.9	328.6—78.8	50	3.0	14	52	2
Tetrabromobisphenol A	TBBP-A	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8.8	540.5—78.9	80	7.0	32	86	0
α-hexabromocyclododecane	α-HBCD	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>6</sub>	10.2	640.4—78.7	25	8.5	30	48	2
β-hexabromocyclododecane	β-HBCD	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>6</sub>	10.6	640.4—79.0	40	6.0	28	30	2
γ-hexabromocyclododecane	γ-HBCD	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>6</sub>	10.9	638.4—78.9	45	4.0	48	56	0
<sup>13</sup> C-2,4,6-tribromophenol	<sup>13</sup> C-2,4,6-TBP	C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>3</sub> O	7.9	334.6—78.7	55	11.5	32	54	2
<sup>13</sup> C- Tetrabromobisphenol A	<sup>13</sup> C-TBBP-A	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8.8	554.6—79.6	80	7.5	50	86	0
<sup>13</sup> C-α-hexabromocyclododecane	<sup>13</sup> C-α-HBCD	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>6</sub>	10.2	652.5—78.7	30	6.0	26	32	2
<sup>13</sup> C-β-hexabromocyclododecane	<sup>13</sup> C-β-HBCD	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>6</sub>	10.6	650.5—78.8	30	9.5	25	32	2
<sup>13</sup> C-γ-hexabromocyclododecane	<sup>13</sup> C-γ-HBCD	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>6</sub>	10.9	652.5—78.7	35	8.0	26	28	2
d <sub>18</sub> -β-hexabromocyclododecane	d <sub>18</sub> -β-HBCD	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>6</sub>	10.4	659.5—81.0	40	7.0	26	50	0

API 3200 MS/MS parameters of declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision cell entrance potential (CEP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP), and the retention times were also presented for all targeted analytes and internal standards.

Table 3. Concentrations of  $\alpha$ -HBCD,  $\beta$ -HBCD,  $\gamma$ -HBCD, TBBPA and 2,4,6,-TBP in Japanese breast milk

		Concentration (ng/g-lipid wt)					
		$\alpha$ -HBCD	$\beta$ -HBCD	$\gamma$ -HBCD	TBBPA	2,4,6-TBP	$\Sigma$ HBCD
Primipara	n>LOQ (%)	28 (100)	23 (82)	15 (54)	27(96)	28(100)	28(100)
	Mean±SD	2.8 ± 2.1	0.18 ± 0.15	0.24 ± 0.80	6.7±10.6	0.71±0.44	3.17 ± 2.67
	Median (Range)	2.3 (0.22-9.4)	0.15 (<LOQ-0.7)	0.031 (4.3-0.01)	1.65(39.9-0.01)	0.73(1.90)	2.48(0.46-13.9)
	GM (GSD)	2.1 (0.00)	n 0.1 (0.00)	n 0.034 (0.04)	n 1.56(0.94)	n 0.44 (0.00)	n 2.44(0.00)
Secundip	n>LOQ (%)	18 (100)	18 (100)	12(67)	18(100)	18(100)	18(100)
	Mean±SD	1.6 ± 0.6	0.24 ± 0.15	0.45 ± 1.42	17.6±35.7	0.80 ±0.54	2.27±1.62
	Median (Range)	1.6 (0.7-2.6)	0.20 (0.09-0.7)	0.051 (6.1-0.01)	3.37(151-0.7)	0.72(1.78)	1.95(0.86-8.12)
	GM (GSD)	1.5 (0.0)	n 0.2 (0.0)	n 0.055 (0.1)	n 5.34(0.0)	n 0.44(0.0)	n 1.95(0.0)
Tertipara	n>LOQ (%)	18(100)	17(94)	15(83)	17(94)	18(100)	18(100)
	Mean±SD	2.0 ± 0.8	0.17 ± 0.12	0.19 ± 0.17	138±517	1.02±0.75	2.36±0.92
	Median (Range)	1.8 (0.8-3.4)	0.14 (<LOQ-0.4)	0.14 (0.57-0.0)	3.96(2209-0.0)	0.81(3.36-0.30)	2.01(1.02-4.28)
	GM (GSD)	1.8 (0.0)	n 0.1 (0.0)	n 0.11 (0.0)	n 4.47(4.7)	n 0.84(0.0)	n 2.19(0.0)
Total	n>LOQ (%)	64(100)	58(91)	42(66)	62(97)	64(100)	64(100)
	Mean±SD	2.2 ± 1.5	0.19 ± 0.14	0.29 ± 0.92	46.7±276	0.82±0.57	2.69±2.04
	Median (Range)	1.9 (0.2-9.4)	0.15 (<LOQ-0.7)	0.08 (6.1-0.0)	3.20(2209-0.0)	0.75(3.36)	2.20(0.46-13.9)
	GM (GSD)	1.8 (0.0)	0.13 (0.0)	0.06 (0.0)	2.97(0.9)	0.53(0.0)	2.22(0.0)

LOQ: Limit of quantification, SD: standard deviation; GM: geometric mean; GSD: geometric standard deviation. Concentrations lower than the detection limits were considered to be equal to half of the detection limit for statistical analyses. <sup>a</sup>Means and GMs with different letters differ significantly ( $p<0.05$ , Tukey–Kramer HSD test). For example, the letters A and B indicate that the corresponding values differ significantly at  $p<0.05$ , while A and AB or AB and B indicate that the corresponding values do not differ significantly

Table 4. Spearman's rank correlation coefficients between analytes (N=64).

	Age	Parity	$\alpha$ -HBCD	$\beta$ -HBCD	$\gamma$ -HBCD	TBBP-A	TBP
Parity	<b>0.374**</b>						
$\alpha$ -HBCD	-0.039	-0.144					
$\beta$ -HBCD	0.05	0.005	0.000				
$\gamma$ -HBCD	<b>0.378**</b>	<b>0.263*</b>	0.171	0.161			
TBBP-A	0.057	0.169	0.059	<b>0.440**</b>	-0.103		
2,4,6-TBP	0.188	0.147	0.000	<b>0.320**</b>	0.185	<b>0.286*</b>	
$\Sigma$ HBCD	0.040	-0.108	<b>0.960**</b>	0.096	<b>0.296*</b>	0.111	0.031

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

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）  
総合研究報告書 資料9

日本および韓国人血清中のトリクロサン汚染実態の解明

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 第一薬科大学薬学部・助教

汚染が懸念されるフェノール性ハロゲン化合物（POC）のうち、トリクロサン（TCS）のヒト曝露の実態調査を行う目的で、日本および韓国人女性の血清中の残留濃度を調べた。2009-2010年のヒト血清中におけるTCSの平均残留量は韓国（ソウル）で1.07 ng/mL、日本（京都）で3.08ng/g lipidとなり、日本人のTCS濃度が有意に高い値を示した。日本人のTCS血中濃度は年齢に依存せず、増加傾向を示さなかった。前回の調査結果を考慮すると、TCSの多くは食事経路で曝露された後、その一部が血清中に残留していると思われる。一方、血清中の残留農薬のうちHCB、エンドスルファン、ジコホールが<LOQ~0.66 ng/mLの範囲で検出された。TCSは、日本ではHCH、trans-NCおよびPCB153と関連したが、韓国では相関性は見られなかったことから、TCSの起源が食事由来以外の可能性が示唆された。

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）のうち、我々はこれまでに2,4,6-tribromophenol (TBP)、pentachlorophenol (PCP)、tetrabromobisphenol A (TBBP-A)およびhydroxy-tetrabromodiphenyl ether (OH-BDE)の残留実態を母乳を用いて調査してきた(Fujii et al., 2014)。汚染が懸念されるトリクロサン(5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol; TCS)については、日本の食事、母乳中濃度を昨年度の報告書にまとめた。TCSは、OH-BDEと同様の骨格を有し、広く医療現場で消毒剤として用いられている。また日常の化粧品や歯磨き粉に添加されて利用されており、環境中に流出すると一部は河川や海底に蓄積される(Rodoricks et al., 2010)。TCSの毒性は低いとされるが、

その疎水性や難分解性のため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)。TCSは、動物実験で内分泌かく乱性が指摘されている(Axelstad et al., 2013; Paul et al., 2012)。また、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(Chen et al., 2011; Sandborgh-Englund et al., 2006; Pycke et al., 2014)。日本における魚介類からもTCSが検出され(Miyazaki et al., 1984; Okumura et al., 1996)。ヒトの食事からの摂取量が推定されている(Canosa et al., 2008)。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 2008; Dayan et al 2007)。継続的なモニタリングと毒性評価が行われている(Dann et al 2011; Dayan et al 2007)。我々は前回の報告で日本人の食事からのTCSの

曝露量と母乳中濃度を報告した。しかし、血清中の濃度について他のアジア諸国との比較はなされていない。

本研究は、京都大学ヒト試料バンクに保管してある日本および韓国の血清試料を用いて、TCS の血清中濃度を計測するための分析法を確立し、日韓両国での調査結果を海外の先行研究結果と比較検証することを目的とした。また、TCS の比較対象物質として、古典的 POPs および関連残留農薬であるエンドスルファン、ジコホールについても測定し、相関性を調べたので合わせて報告する。

## B . 研究方法

### 1) 血清収集

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、2007年に韓国(ソウル市)の24~48歳の女性19名(平均年齢35歳)および2009年に日本(京都市)の24~69歳の女性19名(平均年齢52歳)から提供された血清を使用した(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。

### 2) 化学物質

TCS 標準品は Cambridge Isotope Laboratories 社製を用いた。内標準として<sup>13</sup>C-triclosan、<sup>13</sup>C-methyltriclosan および <sup>13</sup>C-endosulfan (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。TCSの誘導体化剤として pentafluorobenzoate chloride(Sigma-Aldrich社製)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

血清の前処理は、従来の方法を一部変更した(Fujii et al., 2014; Haraguchi et al., 2009)。(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-液分配抽出と誘導体化(PFB)、(4) シリカゲルカラムによる精製の手順で行った。

(1) 血清 1 mL 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) 20 mLの有機溶媒および内標準物質(<sup>13</sup>C-triclosan, <sup>13</sup>C-methyltriclosan および <sup>13</sup>C-endosulfan 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) 抽出液は濃縮後、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, Bio-Rad 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96-mL溶出で脂質を除去し、その後の 64-mL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1 mLまで濃縮し、(4)で述べるシリカゲルカラムに付した。分配抽出の下層に 1M 塩酸 2 mL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 2 mL(フェノール性分画)とした。その 1 mLについてPFB(10 μL)を加え40、30分で誘導体化を行った(PFB 誘導体分画)。残りの1 mLについてはジアゾメ

タンでメチル化し、メチル化誘導体とした。

(4) 中性分画およびメチル化誘導体分画はともに、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 $\mu$ 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、負イオン化学イオン化 (ECNI)法で分析した。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 1 に示す。TCSの定量はイオンクロマトグラム上のシグナルを内標準PFB-<sup>13</sup>C-TCSのシグナル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 1 に記載分について0.2-10 ng/mL) の血清への添加回収率は74 ~ 99 %、相対標準偏差は12% 以下であった (n=5)。PFB-TCSの定量限界 (LOQ)はシグナル/ノイズ比 = 10で算出すると、0.10 ng/mLであった (Table 1)。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0.2 ~ 10 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-NC 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) TCS 分析法の検討

TCS の分析法として、ECNI-GCMS を用い、(1) 直接定量、(2) O-メチル化体としての定量および (3) O-PFB 体としての定量を検討した。検出イオンにおける定量下限値はそれぞれ (1) 0.25 ng/mL (*m/z* 266)、(2) 0.18 ng/mL (*m/z* 302)、(3) 0.05 ng/mL (*m/z* 484)で O-PFB 誘導体化が良好な結果を示した。少量の血清 (0.1 mL) を用いて、従来の GPC 処理およびシリカゲル処理を省略し PFB 誘導体化法を検討した結果、添加回収率 93%で LOQ 0.06 ng/mL の良好な結果が得られた。

### 2) 血清中の TCS (PFB 誘導体)

Table 2 に、日本 (京都) および韓国 (ソウル) の女性の血清中の TCS 濃度を示す。TCS はすべての血清から検出され、その平均値は日本で 3.08 ng/mL (0.97 ~ 7.7 ng/mL)、韓国で 1.07 ng/mL (0.4 ~ 3.5 ng/mL) で、有意に日本の TCS 濃度が高かった ( $p < 0.001$ )。

### 3) 血清中の POPs 濃度

血清中の中性分画から検出される古典的 POPs のうち、trans-NC、dicofol および PCB153 は日本の血清で有意に高濃度であった。残留農薬のうち、HCB、 $\beta$ -HCH および  $\alpha$ -endosulfan 濃度は <LOQ ~ 0.66 ng/mL の範囲で残留したが、日韓両国で有意差は見られなかった。

### 4) TCS 濃度の年齢および他の POPs 濃度との関連性

日韓における TCS 濃度と年齢との関連を Fig. 1 に示す。両国とも TCS 濃

度に年齢との関連性は見られなかった。TCS と他の POPs 濃度との相関係数を Table 3 および Table 4 に示す。韓国の血清では、TCS は他の POPs と相関性は見られなかったが、日本の血清では、TCS と HCH、trans-NC および PCB153 との間に正の相関性がみられた( $p < 0.05$ )。

## D . 考察

### 1) 血清中の TCS

従来、TCS の定量は LC/MS/MS または GC/MS/ECNI で行われている (Dirtu et al 2008)。今回、Geens らが報告した GCMS-ECNI による定量法 (Geens et al., 2009) を改良し、TCS の PFB 誘導体化法を確立した。実際の測定は血清 1 mL を用いたが、本法誘導体化剤を用いれば、TCS モニタリングに 0.1 mL 量の血清で十分足りること分かった。日本および韓国の血清中の TCS 濃度を比較すると、日本での TCS 曝露量が多いことがわかる。昨年度の報告でも日本人母乳中の TCS が韓国母乳より高い結果がでており、TCS 曝露は日本人に比較的多いことが推察される。Hong Kong で測定された TCS 血清濃度は 0.15 ~ 10 ng/mL (Wu et al., 2012) であり、本結果と同濃度であった。ベルギーの血清では、0.1 ~ 9.2 ng/mL (total TCS) が検出されている (Geens et al., 2009)。スウェーデンの血清での TCS 濃度は中央値で 0.52 ng/mL を示した (Dirtu et al., 2008)。オーストラリアでは 4.1 ~ 13 ng/mL の範囲で抱合体を含む TCS が検出され (Allmyr et al., 2008) また、アメリカでも TCS 血清中濃度の平均値は 1.1 ng/mL と示された (Ye et al., 2008; 2009)。なお、今回の調査結果は抱合体を算出していないが、その free TCS の割合は total TCS の約 10%程度であるとの報告が多い。

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ている。TCS 製品の使用頻度により食事以外からの曝露が母乳や血清濃度に反映されていると考えられる。ラット授乳による仔の TCS の NOAEL は 50mg/kg/day とされており (Dayan et al., 2007) 前回の母乳中の値はこれの約 1/20 のレベルに相当した。このため現状の TCS 血清レベルがヒトに影響を与える可能性は低いと思われる。

### 2) 血清中の TCS 濃度と年齢および他の残留農薬との関連性

前回の調査で、TCS は 2009 年の食事では、日韓ともほぼ同レベルを示した。このことは東アジア (日本と韓国) の生活用品のなかに含まれる TCS が一様に食品へ混入し、ヒトは日常的に食事経由で TCS に曝露されていることを示唆した。食事での TCS は魚介類に由来すると考えられる。TCS は環境中で海洋細菌により O-メチル化され (Allard et al., 1987) methoxy-TCS (MeTCS) として生体内分布する報告がなされている。今回、血清中の MeTCS の検出を試みたが、定量下限値以下 ( $< 0.2$  ng/mL) であった。これは、MeTCS のヒト曝露後、体内で容易に脱メチル化されることに起因すると考えられる (Balmer et al., 2004)。

こうして TCS を含む POCs は、食事 (海産物) 経由で体内に入り、そのまま血液中に残留する場合と、食事での POC のメチル化体が体内で脱メチル化されて POCs として残留する場合が考えられる (James et al., 2012; 太田ら 2012)。TCS や他の POCs の体内曝露により、発達期の T4 の減少の結果、脳神経発達への影響 (Meerts et al.,

2000; Suzuki et al., 2008; Axelstad et al., 2013; Paul et al., 2012) が懸念される。

#### D . 結論

今回、TCSのGC-ECNIによる定量法を検討した結果、誘導体化しない方法やO-メチル誘導体化法よりも、pentafluoro- benzoate (PFB)誘導体化を行うと、100  $\mu$ Lの血清使用量で分析が可能となり、血液や尿の試料のTCSモニタリングにも応用できると思われる。本法を用いて東アジア(日本と韓国)におけるヒト血清中のTCS濃度を測定した結果、日本(京都)で3 ng/mL前後を示し、韓国(ソウル)のそれより高濃度であった。TCSの血清濃度はほかのPOPsと異なり年齢に依存せず、また他の残留性化学物質との相関性は低かった。このことから、TCSはPOPsと異なる経路で曝露されていることも示唆された。今回調査したTCSはhydroxy-BDEと同じ骨格を有するハロゲン化合物であり、日本人のTCS曝露による影響評価を今後も継続する必要があると思われる。

#### E . 健康危険情報

なし

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表・その他

なし

#### G . 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

#### H . 文献

- 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. *Science of the Total Environment* **2006**, 372: 87-93.
- Allmyr, M.; Harden, F.; Toms, L. M. L.; Mueller, J. F.; McLachlan, M. S.; Adolfsson-Erici, M.; Sandborgh-Englund, G., The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum. *Science of the Total Environment* **2008**, 393: 162-167.
- Axelstad, M.; Boberg, J.; Vinggaard, A. M.; Christiansen, S.; Hass, U., Triclosan exposure reduces thyroxine levels in pregnant and lactating rat dams and in directly exposed offspring. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, 59: 534-540.
- 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. *Environmental Science and Technology* **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. *Environmental Science and Pollution Research* **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. *Journal of*



- Chromatography A* **2008**, *1188*: 132-139.
- Chen, J.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Zi, Y.; Qian, Y.; Gao, H.; Lin, S., Binding of triclosan to human serum albumin: insight into the molecular toxicity of emerging contaminant. *Environmental science and pollution research international* **2011**, *19*: 2528-2536.
- Dann, A. B.; Hontela, A., Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology* **2011**, *31*: 285-311.
- Dayan, A. D., Risk assessment of triclosan [Irgasan®] in human breast milk. *Food and Chemical Toxicology* **2007**, *45*: 125-129.
- Dirtu, A. C.; Roosens, L.; Geens, T.; Gheorghe, A.; Neels, H.; Covaci, A., Simultaneous determination of bisphenol A, triclosan, and tetrabromobisphenol A in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative-ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*: 1175-1181.
- 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. *Environment International* **2014**, *63*: 19-25.
- Geens, T.; Neels, H.; Covaci, A., Sensitive and selective method for the determination of bisphenol-A and triclosan in serum and urine as pentafluorobenzoate-derivatives using GC-ECNI/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2009**, *877*: 4042-4046.
- Haraguchi, K., Koizumi, A., Inoue, K., Harada, K.H., Hitomi, T., Minata, M., Tanabe, M., Kato, Y., Nishimura, E., Yamamoto, 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., Levels and regional trends of persistent organochlorines and polybrominated diphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries. *Environ Int* **2009**, *35*: 1072-1079.
- 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 Toxicology* **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.
- Miyazaki, T.; Yamagishi, T.; Matsumoto, M., Residues of 4-chloro-1-(2,4-dichlorophenoxy)-2-methoxybenzene (triclosan methyl) in aquatic biota. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **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. *Analytica Chimica 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.
- Paul, K. B.; Hedge, J. M.; Bansal, R.;

- Zoeller, R. T.; Peter, R.; DeVito, M. J.; Crofton, K. M., Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal, and early neonatal thyroxine: A dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. *Toxicology* **2012**, *300*: 31-45.
- Pycke, B. F. G.; Geer, L. A.; Dalloul, M.; Abulafia, O.; Jenck, A. M.; Halden, R. U., Human fetal exposure to triclosan and triclocarban in an urban population from Brooklyn, New York. *Environmental Science and Technology* **2014**, *48*: 8831-8838.
- Rodricks, J.V., Swenberg, J.A., Borzelleca, J.F., Maronpot, R.R., Shipp, A.M., 2010. Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Critical Reviews in Toxicology* **2010**, *40*: 422-484.
- Sandborgh-Englund, G.; Adolfsson-Erici, M.; Odham, G.; Ekstrand, J., Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* **2006**, *69*: 1861-1873.
- 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. *Environmental Science and Technology* **2008**, *42*: 1794-1800.
- Wu, J. L.; Leung, K. F.; Tong, S. F.; Lam, C. W., Organochlorine isotopic pattern-enhanced detection and quantification of triclosan and its metabolites in human serum by ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *26*: 123-132.
- Ye, X.; Zhou, X.; Furr, J.; Ahn, K. C.; Hammock, B. D.; Gray, E. L.; Calafat, A. M., Biomarkers of exposure to triclocarban in urine and serum. *Toxicology* **2011**, *286*: 69-74.

Table 1. Selected ion monitoring (SIM) used in the GC/MS analysis

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 capture negative ionization		
Reagent gas	Methane		
Analytes	GC tr (min)	Target ion (m/z)	LOQ* (ng/mL)
HCB	9.604	284 (286)**	0.05
β-HCH	9.787	71 (255)	0.35
dicofol	11.387	250 (252)	0.25
<i>trans</i> -nonachlor	12.745	444 (446)	0.20
α-endosulfan	12.627	404 (406)	0.10
<sup>13</sup> C-α-endosulfan	12.627	415(417)	0.10
PCB153	14.216	360 (362)	0.15
TCS (triclosan)	12.271	252 (254)	0.32
methyl-TCS	12.404	266 (304)	0.20
PFB-TCS	17.127	482 (484)	0.10
<sup>13</sup> C-TCS	12.271	266 (268)	0.32
methyl- <sup>13</sup> C-TCS	12.404	288 (290)	0.20
PFB- <sup>13</sup> C-TCS	17.127	494 (496)	0.10

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

Table 2. Concentrations (ng/mL wet) of triclosan and POPs in human serum from Japan and Korea

	Japan (Kyoto)			Korea (Seoul)			p value
	n>LOQ(%)	mean ± SD	(range)	n>LOQ(%)	mean ± SD	range	
age		52.3 ± 14.9	(24-69)		34.8 ± 7.81	(24-48)	
TCS	19 (100)	3.08 ± 1.56	(0.97-7.73)	19 (100)	1.07 ± 0.66	(0.4-3.5)	<0.001
HCB	19 (100)	0.06 ± 0.05	(0.01-0.18)	19 (100)	0.11 ± 0.15	(0.01-0.66)	0.160
β-HCH	19 (100)	1.48 ± 2.28	(0.11-8.0)	19 (100)	0.37 ± 1.12	(0.02-5.0)	0.065
trans-NC	19 (100)	0.68 ± 0.81	(0.13-3.73)	19 (100)	0.17 ± 0.10	(0.02-0.34)	0.001
α-endosulfan	19 (100)	0.22 ± 0.11	(0.07-0.50)	18 (95)	0.03 ± 0.03	(<LOQ-0.15)	0.155
dicofol	19 (100)	0.03 ± 0.02	(0.02-0.09)	17 (89)	0.01 ± 0.01	(<LOQ-0.04)	0.006
PCB153	19 (100)	1.92 ± 1.76	(0.53-8.5)	19 (100)	0.40 ± 0.36	(0.11-1.42)	0.001

LOQ: Limit of quantification, SD: standard deviation; Concentrations lower than the detection limits were considered to be equal to half of the detection limit for statistical analyses.

Table 3. Spearman's rank correlation coefficients between age and concentrations of analytes in Japanese women (N=19).

	Age	TCS	HCB	β-HCH	trans-NC	α-endosulfan	dicofol
TCS	0.267						
HCB	0.263	-0.069					
β-HCH	<b>0.593**</b>	<b>0.490**</b>	0.282				
trans-NC	0.413	<b>0.647**</b>	0.341	<b>0.642**</b>			
α-endosulfan	-0.069	0.123	0.626	0.056	0.327		
dicofol	0.059	0.244	0.066	0.429	0.332	0.189	
PCB153	<b>0.618**</b>	<b>0.675**</b>	0.036	<b>0.674**</b>	<b>0.748**</b>	0.005	<b>0.458*</b>

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Table 4. Spearman's rank correlation coefficients between age and concentrations of analytes in Korean women (N=19).

	Age	TCS	HCB	β-HCH	trans-NC	α-endosulfan	dicofol
TCS	-0.386						
HCB	0.428	0.006					
β-HCH	0.107	-0.409	0.005				
trans-NC	0.264	-0.194	0.224	<b>0.764**</b>			
α-endosulfan	-0.186	0.269	0.178	0.364	0.345		
dicofol	0.278	-0.420	0.011	-0.011	<b>0.567*</b>	-0.066	
PCB153	0.394	-0.058	0.193	<b>0.960**</b>	<b>0.844*</b>	0.269	0.561

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

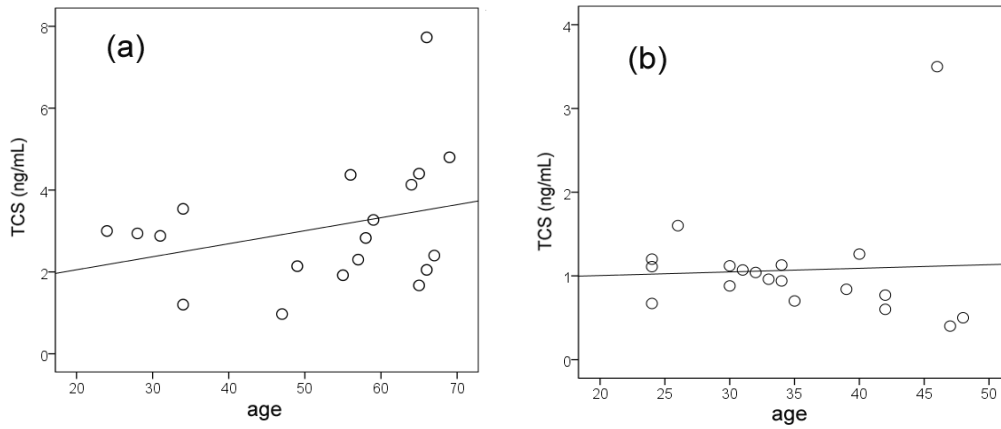


Fig. 1. Relationships between the age of females in Japan, Kyoto (a) and Korea, Seoul (b) and serum concentrations of TCS. Spearman's rank correlation coefficients, (a)  $r = 0.267$ ,  $p = 0.269$ ; (b)  $r = 0.386$ ,  $p = 0.102$

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）  
総合研究報告書 資料10

生体試料バンクの保存試料を使用した食事経由のPFCA<sub>s</sub>摂取量と血清中濃度の  
長期動向調査

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科・教授

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 (PFCA<sub>s</sub>)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の経年的変化を明らかにすることを目的に、1980年前後から2010年代までの食事中、血清中のPFCA<sub>s</sub> (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PFCA<sub>s</sub>総摂取量 (C8からC14の合計、幾何平均値)は2010年代 (2011年、122ng/day)が最も高く、続いて2000年代 (2003-2004年、79ng/day)、1990年代 (1993年、67ng/day)、最後は1980年前後 (1979年、21ng/day)であった。東北におけるPFCA<sub>s</sub>の総摂取量 (C8からC14の合計、幾何平均値)も2010年代 (2011年、89ng/day)が最も高く、続いて1990年代 (1992年、70ng/day)、2000年代 (2004年、45ng/day)、1980年前後 (1981年、37ng/day)であった。このように総PFCA<sub>s</sub>摂取量は東北の2000年代を除き一貫して上昇傾向であるが、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%)。血清中濃度も同様に上昇傾向が見られ、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。食事由来の摂取量の増減と一致しない部分については、近年PFCA<sub>s</sub>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 (PFCA<sub>s</sub>)は全ての水素原子がフッ素原子に置換した炭素鎖 (CF<sub>3</sub> (CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>: 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)。

PFCA<sub>s</sub>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 PFCA の長期動向が明らかにされ、長鎖 PFCA (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の 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 (Kärrman 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 の血清中濃度の長期動向に加え、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 年度の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、1980 年前後から、2010 年代にかけて、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 7 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 Table1 に示す。陰膳食事試料は東北地域 (宮城・福島) は 1981 年、1992 年、2004 年、2011 年、関西地域 (京都・和歌山) は 1979 年、1993 年、2003-2004 年、2011 年に採取された各年 12-26 試料の分析を行った。血清試料は東北地域 (宮城) 1981 年、1997 年、2003 年、2011 年、関西地域 (京都・和歌山) で 1983 年、1993 年、2004-2005 年、2011 年に採取された各年 15-30 試料の分析を行った。また対象者は全て女性とした。

### 3 . 分析法

新規の分析法 (平成 23 年度の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、分析を行った。

食事試料は約 1g、血清試料は 0.1ml をそれぞれ分注し分析用試料とした。分注後、<sup>13</sup>C 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) 0.3ml、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 <sup>11</sup>H-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/5973MSD, 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 $\mu$ 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 として。昇温条件は70で2分保持後、100 まで20 /min、280 まで30 /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-PFUnDAと比較することで確認を行った (Table2)。

### 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 $\pm$ 11%、73 $\pm$ 15%、79 $\pm$ 7%、83 $\pm$ 5%、91 $\pm$ 11%、89 $\pm$ 12%、104 $\pm$ 20%であった (Table2)。PFCAsの一日摂取量 (ng/day)をTable3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2010年代 (2011年、122ng/day)が最も高く、続いて2000年代 (2003-2004年、79ng/day)、1990年代 (1993年、67ng/day)、最後は1980年前後 (1979年、21ng/day)であった (Fig.1.上グラフ)。コンジェナー毎に見ると、C11が1980年前後から2000年代

を通じてもっとも摂取量が多かったが、2010年代はC8に抜かれている (Fig.1.下グラフ)。C8に関しては1980年前後から一貫した上昇が見られている。C13は1990年代ではC8と並ぶ摂取量があるが、2000年代、2010年代と減少傾向が確認された。C9は1980年前後から1990年代にかけて上昇し、2000年代でいったん下降後、2010年代で再び上昇している。

**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)も2010年代 (2011年、89ng/day)が最も高く、続いて1990年代 (1992年、70ng/day)、2000年代 (2004年、45ng/day)、1980年前後 (1981年、37ng/day)であった (Fig.1.上グラフ)。コンジェナー毎に見ると、C11が全年代を通じてもっとも摂取量が高かった (Fig.1.下グラフ)。C11は1980年前後から1990年代にかけて上昇し、2000年代でいったん下降後、2010年代で再び上昇している。同様の傾向は他のコンジェナーではC8、C13で見られた。

#### 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 $\pm$ 12%、94 $\pm$ 8%、87 $\pm$ 6%、95 $\pm$ 7%、96 $\pm$ 5%、99 $\pm$ 6%、106 $\pm$ 7%であった (Table2)。血清中のPFCAs濃度の測定結果はTable4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2010年代 (2011年、15.2ng/ml)が最も高く、続いて2000年代 (2004-2005年、10.2ng/ml)、1990年代 (1993年、60.4ng/ml)、最後は1980年前後 (1979年、29.1ng/ml)であった (Fig.1.上グラフ)。コンジェナー



毎に見ると、C8が全年代を通じてもっとも高く、続いてC9であった（1993年を除く）(Fig.2.下グラフ)。全年代を通じて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1980年代（1981年、0.4ng/ml）が最も低く、続く1990年代では約13倍に増加していた（1992年、5.2ng/ml）。その後の2000年代（2003年、69.9ng/ml）、2010年前後（2007年、67.6ng/day）は大きな上昇は見られなかった（Fig.2.上グラフ）。コンジェナー毎に見ると、関西と同様にC8が全年代を通じてもっとも高かったが、続いて高いのは関西とは異なりC11であった（Fig.2.下グラフ）。またC8についても関西とは異なり2004年から2011年にかけて減少が見られた。

#### 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PFCAs総摂取量は1482ng/day（内PFOA；100ng/day）であった（2011年京都の採取試料）。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%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

米国3M社の2002年のC8 PFOA製造中止以降、米国では成人血中のC8

が25%減少し(Calafat et al. 2007)、特定汚染源を持つとされる大阪市でも同様にC8血中濃度は減少が確認されている(Harada et al. 2011)。しかしながら本研究ではそのC8について、関西地方の対象集団において2003-2004年から2011年においても継続した増加が確認された。一方東北では2004年から2011年にかけてC8の減少が見られるもののC8からC14までを合計した総PFCAs濃度では両方の地域で増加傾向である。食事中のPFCAsも2004年の宮城を除き増加傾向であった。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を例にとると食品から摂取量されたPFCAsから計算される血清中濃度から以下ようになる。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、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、食品経由のPFCAs総摂取量（C8からC14の合計、幾何平均値）から血中濃度を求めると、関西で2010年代は6.2ng/ml、2000年代は2.9ng/ml、1990年代で1.8ng/ml、1980年前後で0.5ng/mlであり、東北で2010年代は2.1ng/ml、2000年代は0.7ng/ml、1990年代で1.3ng/ml、1980年代で0.4ng/mlであった。この値はTable4の実際の血清中のC8の測定値と近く、1981年の宮城を除き血清中のC8は3割から9割が食事由来であると推測できる。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 (Fujii et al. 2013)、それらによる汚染を受け

ている可能性も考えられる。今後は生活様式等を含めた解析を行う必要がある。

#### E . 結論

本研究では京都大学生体試料バンクの保存試料を使用し、1980年前後から、2010年代にかけて、食事試料と血清試料中に含まれるPFCAsの測定を行い、日本におけるPFCAsの食事を通じた摂取量と血清中濃度の長期動向を明らかにした。その結果、総PFCAs摂取量は2000年代の東北を除いて上昇傾向であるが、最大値でもPFOAの耐容一日摂取量より十分に低い値であった。血清中濃度も同様に上昇傾向が見られ、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。

#### 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

藤井由希子、小林果、新添多聞、原田浩二、人見敏明、小泉昭夫、関西の血清中ペルフルオロアルキルカルボン酸 (PFCAs) の経年変化 (1980-2010年代)、第84回日本衛生学会学術総会 (2014年5月25-27日岡山)

#### 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

- Apelberg, B.J., Witter, F.R., Herbstman, J.B., Calafat, A.M., Halden, R.U., Needham, L.L., Goldman, L.R., 2007. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Persp* 115, 1670-1676.
- Calafat AM, Wong LY, Kuklennyik Z, Reidy JA, Needham LL. 2007. Polyfluoroalkyl chemicals in the us population: Data from the national health and nutrition examination survey (nhanes) 2003-2004 and comparisons with nhanes 1999-2000. *Environmental Health Perspectives* 115:1596-1602.
- D'Hollander W, de Voogt P, De Coen W, Bervoets L. 2010. Perfluorinated substances in human food and other sources of human exposure. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 208 208:179-215.
- Fujii Y, Harada KH, Koizumi A. 2013. Occurrence of perfluorinated carboxylic acids (pfcas) in personal care products and compounding agents. *Chemosphere* 93:538-544.
- Glynn A, Berger U, Bignert A, Ullah S, Aune M, Lignell S, et al. 2012. Perfluorinated alkyl acids in blood serum from primiparous women in sweden: Serial sampling during pregnancy and nursing, and temporal trends 1996-2010. *Environmental Science & Technology* 46:9071-9079.
- Harada KH, Hitomi T, Niisoe T, Takanaka K, Kamiyama S, Watanabe T, et al. 2011. Odd-numbered perfluorocarboxylates predominate over perfluorooctanoic acid in serum samples from japan, korea and vietnam. *Environment International* 37:1183-1189.
- Kärman A, Harada KH, Inoue K, Takasuga T, Ohi E, Koizumi A., 2009. Relationship between dietary exposure and serum perfluorochemical (PFC) levels--a case study. *Environ Int* 35, 712-7.
- Loccisano AE, Campbell JL, Jr., Butenhoff JL, Andersen ME, Clewell HJ, 3rd. 2012.

- Comparison and evaluation of pharmacokinetics of pfoa and pfos in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetic model. *Reproductive toxicology* 33:452-467.
- Niisoe T, Harada KH, Ishikawa H, Koizumi A. 2010. Long-term simulation of human exposure to atmospheric perfluorooctanoic acid (pfoa) and perfluorooctanoate (pfo) in the osaka urban area, japan. *Environ Sci Technol* 44:7852-7857.
- Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. 2007. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 115:1298-1305.
- Vestergren, R., Ullah, S., Cousins, I.T., Berger, U., 2012. A matrix effect-free method for reliable quantification of perfluoroalkyl carboxylic acids and perfluoroalkane sulfonic acids at low parts per trillion levels in dietary samples. *J Chromatogr A*
- Yeung LW, Robinson SJ, Koschorreck J, Mabury SA. 2013. Part i. A temporal study of pfcas and their precursors in human plasma from two german cities 1982-2009. *Environ Sci Technol* 47:3865-3874.

Table 1 Study area and study population

Sample type	Study Area	Year	City	N (All females)	Age	
					Mean (SD)	Range
Diet	Kansai	1979	Wakayama	15	52.0 (11.6)	35-69
		1993	Kyoto	25	53.7 (4.0)	47-61
		2003, 2004	Kyoto	18	51.8 (21.1)	21-76
		2011	Kyoto	18	66.0 (4.9)	57-75
	Tohoku	1981	Miyagi	18	44.8 (8.6)	31-57
		1992	Miyagi	12	52.9 (10.8)	31-68
		2004	Miyagi	16	21.5 (0.5)	21-22
		2011	Fukushima	26	55.1 (13.0)	30-79
Serum	Kansai	1983	Kyoto	15	43.7 (3.2)	40-50
		1993	Kyoto	30	44.1 (3.0)	40-50
		2004, 2005	Kyoto, Wakayama	30	37.7 (11.9)	24-63
		2011	Kyoto	30	57.1 (14.3)	23-69
	Tohoku	1981	Miyagi	27	45.3 (8.2)	33-57
		1997	Miyagi	30	20.9 (1.2)	19-23
		2003	Miyagi	30	45.2 (8.6)	30-59
		2007	Miyagi	30	42.8 (9.9)	23-59

Table 2

Recoveries and method detection limits for PFCAs analysis of serum and diet

Compound (carbon atoms)	Quantification ions (confirmation ions) m/z	Instrument detection limit <sup>a</sup> (pg)	Recovery of PFCAs <sup>b</sup> % (SD%)		Procedural blank (SD) (pg, n=8)
			Serum (500ng spiked, n=6)	Diet (50pg spiked, n=6)	
PFOA (C8)	413 (394)	0.003	87(12)	72(11)	1.2(0.4)
PFNA (C9)	463 (444)	0.003	94(8)	73(15)	1.4(0.9)
PFDA (C10)	513 (494)	0.004	87(6)	79(7)	1.1(0.3)
PFUnDA (C11)	563 (544)	0.004	95(7)	83(5)	1.3(0.4)
PFDoDA (C12)	613 (594)	0.005	96(5)	91(11)	n.d.
PFTTrDA (C13)	663 (644)	0.005	99(6)	89(12)	n.d.
PFTeDA (C14)	713 (694)	0.007	106(7)	104(20)	n.d.

SD: relative standard deviation

<sup>a</sup> 1 µL injection<sup>b</sup> All native PFCAs were spiked into samples before extraction.

Table 3

Dietary intake of PFCAs from composite food samples (ng day<sup>-1</sup>)

Area	Year (No. of pooled diets)	City		ng day <sup>-1</sup>				
				PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDODA (C12)
Kansai	1979 (n=15)	Wakayama	% of detection	73	40	67	67	33
			Median (Range)	2.6(0.4-9.8)	0.7(0.4-8.9)	2.5(0.9-7.9)	9.6(2.6-24.1)	0.6(0.4-14.3)
			Mean±SD	3.7±3.0	2.1±2.5	3.2±2.2	10.7±7.7	3.3±4.5
			GM	2.4	1.2	2.5	8.0	1.3
	1993 (n=25)	Kyoto	% of detection	92	96	64	92	60
			Median (Range)	11.7(0.6-27.8)	8.6(0.7-22.8)	3.4(0.8-33.7)	27.3(3.3-69.6)	2.3(0.3-15.3)
			Mean±SD	12.8±8.1	9.9±5.2	4.3±6.3	28.2±18.9	3.6±3.9
			GM	9.3	8.3	2.8	21.0	2.0
	2003-2004 (n=18)	Kyoto	% of detection	100	78	61	83	56
			Median (Range)	16.4(2.3-72.1)	6.3(0.4-32.2)	2.8(0.7-34.4)	17.0(2.1-203.6)	1.5(0.4-40.0)
			Mean±SD	18.9±16.3	7.8±8.3	7.5±10.2	50.1±67.0	9.1±12.6
			GM	14.6	3.9	3.2	20.5	2.4
2011 (n=18)	Kyoto	% of detection	100	100	89	83	44	
		Median (Range)	31.2(14.6-99.5)	12.8(3.5-379.5)	6.3(0.9-603.2)	32.5(2.5-336.5)	1.0(0.5-67.6)	
		Mean±SD	34.6±18.9	35.2±86.5	41.7±140.3	68.2±92.0	14.1±20.1	
		GM	31.2	15.2	8.2	29.6	3.5	
Tohoku	1981 (n=18)	Miyagi	% of detection	56	67	11	67	83
			Median (Range)	2.5(0.6-10.3)	7.0(0.5-24.4)	1.5(1.0-14.7)	9.2(2.7-24.6)	4.3(0.5-27.0)
			Mean±SD	3.5±3.2	8.8±8.3	2.3±3.1	10.6±7.0	6.2±6.9
			GM	2.2	4.3	1.7	8.6	3.9
	1992 (n=12)	Miyagi	% of detection	83	83	92	83	67
			Median (Range)	9.0(0.6-21.0)	6.9(0.6-26.2)	7.1(1.0-14.1)	28.4(2.9-98.5)	6.0(0.6-26.4)
			Mean±SD	9.2±6.3	10.4±9.4	7.0±4.1	32.7±27.9	8.1±8.9
			GM	6.4	5.9	5.7	20.9	3.9
	2004 (n=16)	Miyagi	% of detection	81	88	94	88	38
			Median (Range)	5.2(0.4-14.4)	7.5(0.4-18.6)	4.4(0.8-7.9)	14.1(2.3-41.3)	0.6(0.3-73.1)
			Mean±SD	5.7±4.5	8.2±5.1	4.6±1.9	16.3±11.6	6.8±18.0
			GM	3.5	5.8	4.1	12.5	1.5
2011 (n=26)	Fukushima	% of detection	96	92	58	81	65	
		Median (Range)	8.0(0.6-217.6)	6.5(0.6-239.5)	4.6(0.7-43.3)	31.0(3.2-182.3)	11.8(0.4-61.0)	
		Mean±SD	21.9±42.1	19.2±46.2	8.5±10.3	58.0±59.7	16.4±17.8	
		GM	10.5	7.5	4.2	28.3	6.0	

SD: standard deviation; GM: geometric mean;

Concentrations lower than the detection limits were given a value of half the detection limit for statistical analyses.

Table 4

Concentration of PFCAs in serum samples ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

Area	Year (No. of pooled diets)	City		$\text{ng day}^{-1}$				
				PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDODA (C12)
Kansai	1983 (n=15)	Wakayama	% of detection	100	100	100	100	80
			Median (Range)	1475(220-7098)	331(141-2498)	150(80-707)	311(164-1646)	45(0-269)
			Mean $\pm$ SD	2274 $\pm$ 2222	736 $\pm$ 813	218 $\pm$ 174	496 $\pm$ 425	53 $\pm$ 65
			GM	1580	454	175	377	17
	1993 (n=30)	Kyoto	% of detection	100	100	100	100	100
			Median (Range)	3169(1082-9894)	991(260-1925)	423(93-1770)	1086(279-2899)	84(17-216)
			Mean $\pm$ SD	3777 $\pm$ 2137	1017 $\pm$ 459	546 $\pm$ 369	1272 $\pm$ 694	94 $\pm$ 52
			GM	3183	887	430	1066	80
	2004-2005 (n=30)	Kyoto	% of detection	100	100	100	100	90
			Median (Range)	5051(2153-35337)	1864(571-9701)	609(178-3603)	1337(224-9040)	96(0-1401)
			Mean $\pm$ SD	7051 $\pm$ 6325	2430 $\pm$ 2197	854 $\pm$ 730	1697 $\pm$ 1590	157 $\pm$ 246
			GM	5694	1899	697	1379	67
2011 (n=30)	Kyoto	% of detection	100	100	100	100	100	
		Median (Range)	8504(1610-16837)	3759(867-11384)	1123(243-7587)	2033(499-4998)	144(31-527)	
		Mean $\pm$ SD	9075 $\pm$ 4230	4123 $\pm$ 2532	1419 $\pm$ 1389	2144 $\pm$ 1047	172 $\pm$ 99	
		GM	7914	3451	1057	1896	147	
Tohoku	1981 (n=27)	Miyagi	% of detection	100	96	100	100	19
			Median (Range)	175(60-654)	54(0-335)	26(4-54)	139(71-246)	0(0-46)
			Mean $\pm$ SD	195 $\pm$ 116	73 $\pm$ 87	27 $\pm$ 11	143 $\pm$ 43	5 $\pm$ 12
			GM	171	45	24	140	1
	1997 (n=30)	Miyagi	% of detection	100	100	100	100	100
			Median (Range)	2237(1134-10531)	849(335-3332)	378(206-1295)	1203(593-2845)	84(46-229)
			Mean $\pm$ SD	2586 $\pm$ 1659	1043 $\pm$ 699	410 $\pm$ 191	1242 $\pm$ 454	99 $\pm$ 41
			GM	2292	885	377	1163	92
	2003 (n=30)	Miyagi	% of detection	100	100	100	100	100
			Median (Range)	2523(1147-5858)	1114(396-2631)	421(191-767)	1418(748-3108)	93(13-231)
			Mean $\pm$ SD	2703 $\pm$ 1115	1178 $\pm$ 434	443 $\pm$ 131	1598 $\pm$ 622	107 $\pm$ 57
			GM	2499	1103	424	1490	90
2007 (n=30)	Miyagi	% of detection	100	100	100	100	77	
		Median (Range)	2185(686-6382)	1655(656-3906)	549(200-1161)	1662(589-5053)	124(0-465)	
		Mean $\pm$ SD	2617 $\pm$ 1364	1771 $\pm$ 837	633 $\pm$ 304	2053 $\pm$ 1201	143 $\pm$ 119	
		GM	2314	1585	555	1714	36	

SD: standard deviation; GM: geometric mean;

Concentrations lower than the detection limits were given a value of half the detection limit for statistical analyses.

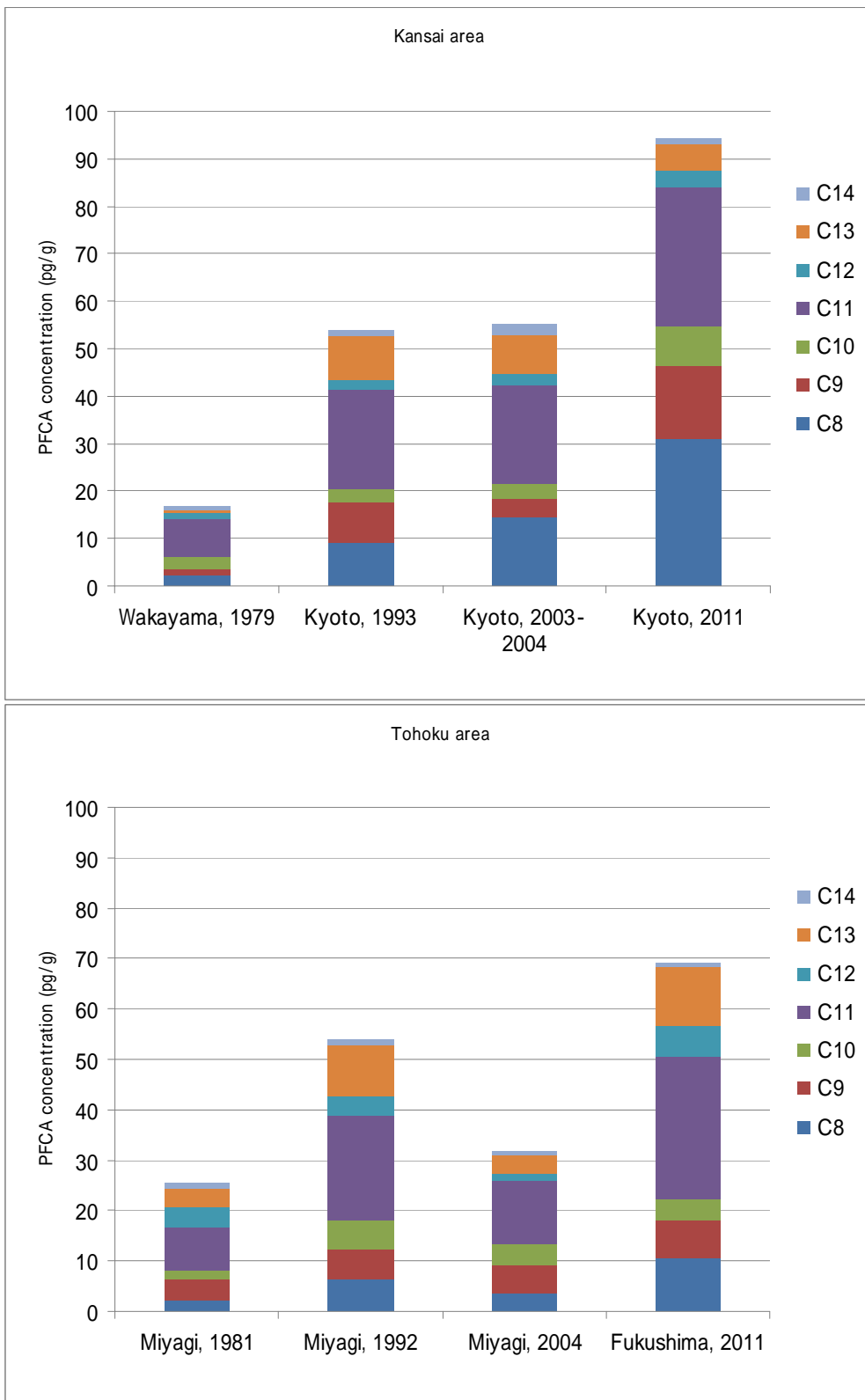


Figure 1. Profile and trend of PFCA levels in food samples

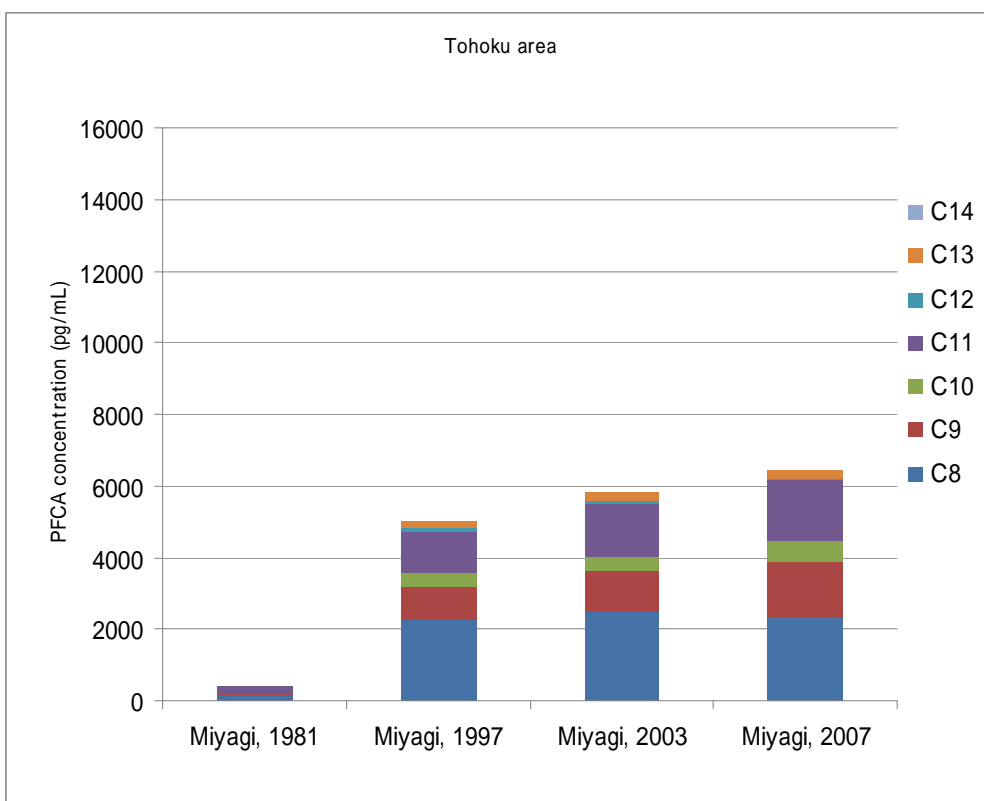
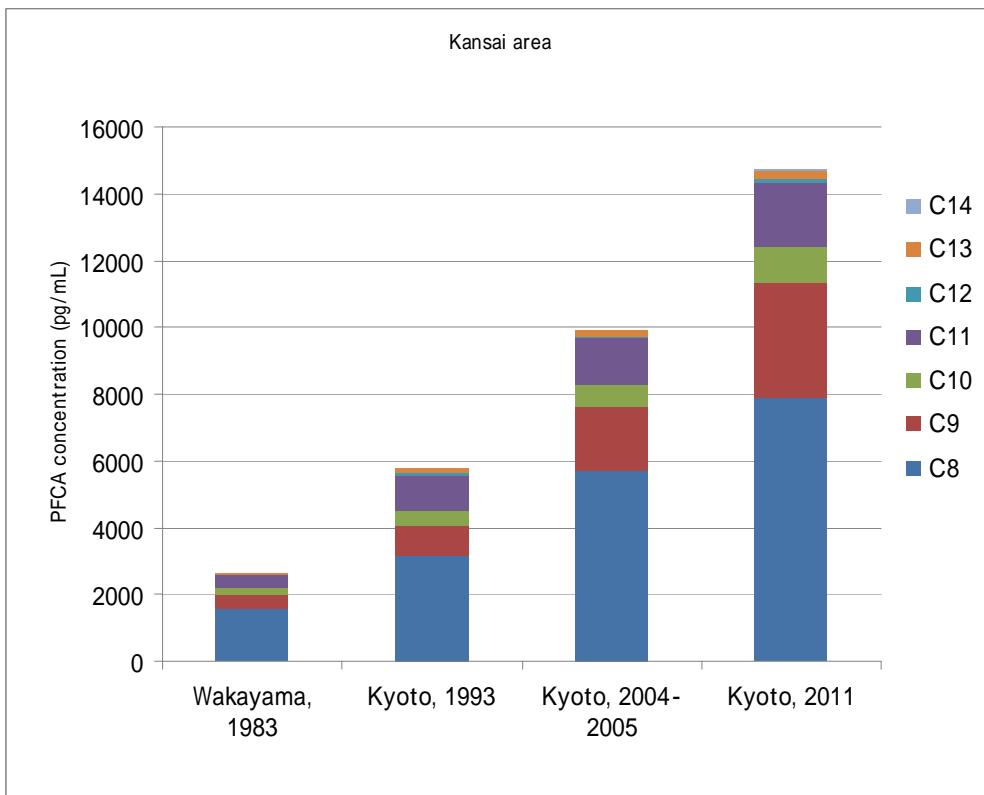


Figure 2. Profile and trend of PFCA levels in serum samples



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）  
総合研究報告書 資料 1 1

炭素鎖の異なる有機フッ素カルボン酸と魚類摂取に由来する不飽和脂肪酸との  
関連の検討

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

ヒト血清には PFOA のほか、長鎖 PFCAs が認められるが、その濃度を規定する因子は不明である。本研究では京都の健常者 131 名の血清中 PFCAs と n-3 系不飽和脂肪酸を同時定量した。単変量解析では、魚介類摂取のバイオマーカーであるエイコサペンタエン酸/アラキドン酸比と PFOA、PFNA、PFUnDA は正の相関を示した。年齢、性別をさらに調整し、共分散分析を行っても有意な因子であった。

A．研究目的

有機フッ素化合物は界面活性剤、フッ素樹脂製造の添加剤として用いられてきた。残留性のほか、疫学研究で出生体重の低下が示唆されるなど懸念が示されている。米国 3M 社が製造を 2002 年から中止した後、米国では成人血中 PFOS 濃度が 60%、PFOA 濃度が 25%減少したと報告された (Olsen et al., 2008)。近年ペルフルオロオクタン酸 PFOA(C8)以外の長鎖 PFCA 類 (C9-C13) の血中での増加が認められた (Harada et al., 2011)。長鎖 PFCAs の濃度を規定する因子は不明である。そのため、本研究では血清中 PFCAs と魚介類摂取の生物学的指標である n-3 系多価不飽和脂肪酸との関連を検討した。

B．研究方法

2013年の京都在住の成人131名の血清試料を京都大学生体試料バンクから選択した (Koizumi et al., 2009)。試料0.5mLに0.5M テトラブチルアン

モニウム塩水溶液(pH10) 0.5mL、サロゲート標準溶液 (PFC-MXA, Wellington Laboratories; Docosahexaenoic Acid-d5, Cayman Chemical) を加え、1 mL の methyl t-butyl ether (MTBE) で抽出し、再度 1 mL MTBE で抽出した。有機層を乾固させ、PFCAs は 0.1M 臭化ペンタフルオロベンジル/0.1M 18-Crown-6 アセトン溶液、炭酸水素カリウム粉末 1 片、内部標準溶液 11H-PFUnDA を加えて、60 で 60 分間加熱して、ペンタフルオロベンジルエステル誘導体とした。Agilent 6890GC/5973MSD inert で、HP-5MS を用いて分離し、化学イオン化 (メタンガス、負イオン化モード) で測定した。測定対象の脂肪酸類は全て  $[M-C_7H_2F_5]^-$  により定量した。

C．研究結果

分析値の要約を表 1 に示す。C8、C9、C10、C11 が全ての試料で検出された。C8 より鎖長の長い PFCAs が全

PFCAs の 50%以上を占めており、以前の報告と同様の結果となった。また奇数鎖 C9、C11、C13 が偶数鎖 C10、C12 より高かった。

血清中PFCAs濃度と関連する因子について検討を行った。性別で有意な差は見られなかった(表1)。単変量解析では、年齢との相関はC8、C9、C10、C11、C12で有意になった(図1)。魚介類摂取のバイオマーカーであるエイコサペンタエン酸/アラキドン酸比(EPA/AA)とC8、C9、C10、C11、C12は正の相関を示した(図2)。EPA/AAは年齢と相関していたため年齢、性別をさらに調整し、共分散分析を行ってもEPA/AAとC8、C9、C11、C12との間に有意な相関が認められた。

#### D . 考察

PFCAs、特に長鎖PFCAsは陰膳食事で検出され、食事が主要な曝露源であると考えられる(Fujii et al., 2012)。生物濃縮性の高い長鎖PFCAsは魚類に比較的蓄積し、食事からの摂取に占める割合が高くなっている可能性がある。

#### E . 結論

健康な男女血清中PFCAs濃度と魚介類摂取の生物学的指標EPA/AA比は有意な相関を示した。

#### 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

原田浩二、藤井由希子、趙山、大島匡世、大澤めぐみ、巖俊霞、藤原登司一、新添多聞、小林果、人見敏明、小泉昭

夫、ヒト血清中ペルフルオロアルキルカルボン酸とn-3系不飽和脂肪酸との関連、第23回日本環境化学会討論会(2014年5月14-16日 京都)

#### 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

Fujii Y, Harada KH, Koizumi A. Analysis of perfluoroalkyl carboxylic acids in composite dietary samples by gas chromatography/mass spectrometry with electron capture negative ionization. *Environ Sci Technol* 2012;46:11235-42.

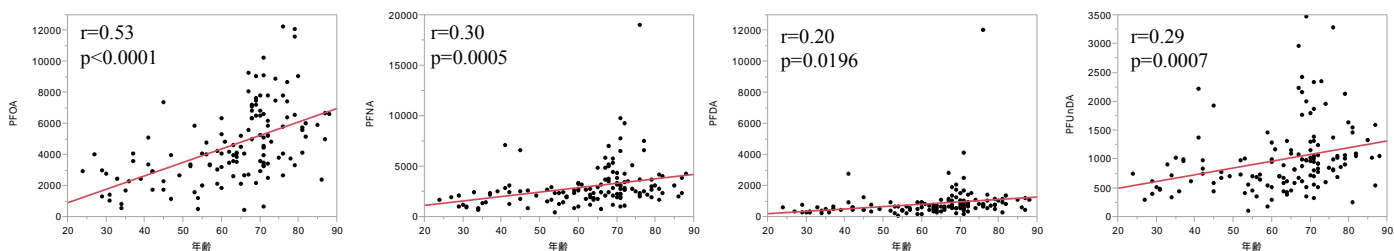
Harada KH, Hitomi T, Niisoe T, Takenaka K, Kamiyama S, Watanabe T, Moon CS, Yang HR, Hung NN, Koizumi A. Odd-numbered perfluorocarboxylates predominate over perfluorooctanoic acid in serum samples from Japan, Korea and Vietnam. *Environ Int* 2011;37:1183-9.

Koizumi A, Harada K, Inoue K, Hitomi T, Yang HR, Moon CS, Wang P, Hung N, Watanabe T, Shimbo S, Ikeda M. Past, present, and future of environmental specimen banks. *Environ Health Prev Med* 2009;14:307-18.

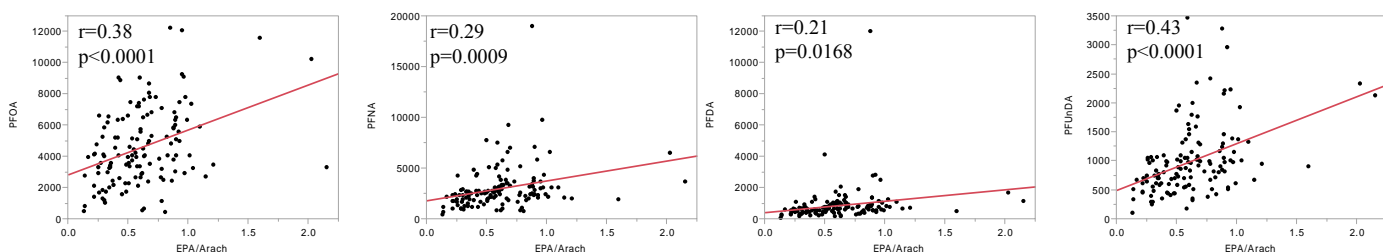
Olsen GW, Mair DC, Church TR, Ellefson ME, Reagen WK, Boyd TM, Herron RM, Medhdizadehkashi Z, Nobiletti JB, Rios JA, Butenhoff JL, Zobel LR. Decline in perfluorooctanesulfonate and other polyfluoroalkyl chemicals in American Red Cross adult blood donors, 2000-2006. *Environ Sci Technol* 2008;42:4989-95.

**Table 1. Serum concentrations of PFCAs in Kyoto, Japan in 2013**

	n	Mean±SD	Age (yr)	Concentration (pg mL <sup>-1</sup> )								
				PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	PFTTrDA	PFTeDA	
Total	131	Mean±SD	63±15	63±30	4626±2449	3020±2202	869±1132	998±602	141±79	191±72	17±113	
		Median	67	57	4079	2509	659	895	124	183	ND	
Male	37	Mean±SD	60±18	61±37	4102±2629	3022±3025	1024±1968	920±568	131±67	203±101	26±150	
		Median	66	52	3305	2229	618	813	115	195	ND	
Female	94	Mean±SD	64±14	64±27	4832±2358	3019±1799	808±529	1029±615	144±83	187±57	14±95	
		Median	68	60	4571	2695	686	933	126	183	ND	



**Fig. 1. Association between serum PFCAs concentrations and age of donors.**



**Fig. 2. Association between serum PFCAs concentrations and eicosapentaenoic acid/arachidonic acid ratio.**

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）  
総合研究報告書 資料12

炭素鎖の異なる有機フッ素カルボン酸のヒト・マウス体内動態モデル

研究代表者	小泉 昭夫	京都大学大学院医学研究科・教授
研究分担者	原田 浩二	京都大学大学院医学研究科・准教授
研究分担者	小林 果	京都大学大学院医学研究科・特定助教
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
研究協力者	新添 多聞	京都大学防災研究所・研究員

研究要旨

ペルフルオロアルキルカルボン酸(PFCAs)は多数の炭素鎖の異なる同族体をもつ残留性有機汚染物質である。前年度の課題でヒトとマウスともにPFCAsの尿中クリアランスは鎖長が長くなるにつれ低下し、糞中クリアランスは増加することを見出した。今年度はさらに中枢神経系への移行を評価し、また2-コンパートメントモデルによる体内動態のモデル化を試みた。血中PFCA濃度の推移を2-コンパートメントモデルに当てはめて、パラメータ解析を行ったところ、分布容積は鎖長が大きくなるにしたがい増加し、AUCはC8で最大となり、より大きいPFCAsでは減少した。また糞便中クリアランスを静脈投与、経口投与と比較し、PFCAsの理論的腸管吸収率を計算したところ、94%・104%と極めて高い吸収率を示した。2-コンパートメントモデルで既報の高用量PFOA反復投与実験の経口投与量をシミュレートしたところ、実験値に近い結果が得られた。また排出と分布の速度は十分離れているため、1-コンパートメントモデルとしても記述しうると考えられた。総クリアランスはマウスでC10、ヒトでC9が最も低くなるが、その大きさは50・100倍の差があった。脳脊髄液へのPFCAsの移行は小さく、血液脳関門の障壁があると考えられた。以上のPFCAs特性と体内動態モデルはPFCAsの蓄積性の理解に資するものであった。

A．研究目的

ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)やペルフルオロオクタン酸[PFOA,8個の炭素原子を持ち(C8)と略称する]のような過フッ素化学物質は、環境で検出されており、それらの毒物動態学は広範囲に検討されてきた。それらの生物学的半減期は、他の実験動物モデルよりもヒトでかなり長い(Ohmori et al. 2003; Olsen et al. 2007)。ヒトにおけるより長い生物学

的半減期の理由は明らかでない。

PFOAは肝毒性、発生毒性、免疫毒性および内分泌攪乱を引き起こすことが判明している(Lau et al. 2007)。したがって、PFOA以外のより短鎖長のペルフルオロカルボン酸塩(PFCAs)、例えばペルフルオロブタン酸とペルフルオロヘキサン酸(C4からC6)が、商用アプリケーションに使用されている(EPA, 2012)。これらの短鎖PFCAsはPFOAよりも毒性が低いと考えられ(Chengelis et al.

2009a; Das et al. 2008)、おそらくそれは、PFOAに比べて比較的短い半減期に起因する(Chang et al. 2008; Chengelis et al. 2009b)。対照的に、ペルフルオロノナン酸(PFNA、C9)とペルフルオロデカン酸(PFDA、C10)などの長鎖PFCAsは、げっ歯類においてPFOAよりも比較的長い半減期を示した(Kudo et al. 2001; Ohmori et al. 2003; Tatum-Gibbs et al. 2011)。直鎖PFCAsが生物学的に代謝されないことはよく知られている(Vanden Heuvel et al. 1991)。さらに、いくつかのインビトロ研究は、生物学的活性は、親化合物のアルキル鎖長に依存することを見出している(Liao et al. 2009; Matsubara et al. 2006; Upham et al. 1998)。それにもかかわらず、長鎖PFCAsレベルの増加は、最近10年でヒト血清中、日常の食事で認められている(Glynn et al. 2012; Harada et al. 2011; Fujii et al. 2012)。

本研究では、マウスおよびヒトにおけるC6-C14のPFCAsの毒物動態学の違いを調査することを目的とした。マウスにおけるPFCA強制経口投与後、静脈内投与(IV)後の24時間について、血清濃度、組織分布および排出が評価された。ヒトのPFCAsの尿クリアランス、胆汁クリアランスおよび脳脊髄液(CSF)移行は、比較のために収集した。これらの比較は、これまで、その毒性学的重要性にもかかわらず、報告されていない。

## B. 研究方法

### B-1. 動物実験

動物:全ての実験は、8~10週齢(体重20~30g)マウスを用いて行った。

FVB / NJCLマウスは日本クレア(東京)から購入し、京都大学動物実験施設に収容した。標準的な市販の実験用固形飼料(F-2、3.73kcal/g、船橋農場(株)、千葉県、日本)を用いた。全ての動物は、12時間の明/暗サイクルで周囲温度 $24\pm 2$ 、 $50\pm 10\%$ の湿度に維持した。マウスを個々に代謝ケージに入れ、水および食物に自由にアクセスさせた。

試料収集:各PFCAは、IVまたは強制経口投与した。PFCAsをエタノール/水/ジメチルスルホキシド(5:4:1)に溶解し、IVおよび強制経口投与の両方にMilli-Q水により最終調製した。単回用量PFCAsを尾静脈(IV用量 $0.31\ \mu\text{mol}/\text{kg}$ 、注入体積 $0.1\ \text{mL}/\text{kg}$ )を介して、または経口投与(強制経口投与量 $3.13\ \mu\text{mol}/\text{kg}$ 、注入体積 $0.1\ \text{mL}/\text{kg}$ )で投与した。各投与群は、9雄マウスと9雌マウスの18匹を含んでいた。

PFCA血清中濃度の経時変化を観察するために、全血試料を、IV又は強制経口投与後0、1、3、6、12および24時間後に尾静脈から採取した。追加の採取は、静脈内投与の0.5時間目に行われた。研究プロトコルは、表1にまとめている。

24時間後まで、尿と便を代謝ケージに集めた。次いで、マウスをセボフルラン麻酔下に置き、頸椎脱臼により安楽死させた。全血の一部を採取し、遠心分離し(370g)血清を単離した。肝臓、腎臓および脳組織を回収し、秤量した。脂肪組織は、腹部腸間膜脂肪から採取した。マウスにおける総血清は、雄マウス $56\ \text{mL}/\text{kg}$ マウス体重および雌マウス $65\ \text{mL}/\text{kg}$ マウス体重と推定された(Riches et al. 1973)。総脂肪組織をマウスの総体重の2.3%であると仮定した(Riches et al. 1973)。全ての実験手順は、京都大学動物実験委員会

により承認された( MedKyo11067 )。

#### B-2. ヒト試料：尿、胆汁および脳脊髄液と対血清

胆汁、CSFおよび尿、血清データを含むすべてのヒト試料は京都大学生体試料バンクの保存試料から採取した(Koizumi et al. 2005; Koizumi et al. 2009)。提供者の属性を表 2 に要約した。24時間胆汁試料は経鼻胆道ドレナージ、経皮経肝胆道ドレナージや経皮経肝胆嚢ドレナージによって撮影された。5mLの血液試料を同じ日にポリプロピレンチューブに肘静脈から採取した。CSF試料は脳室ドレナージ、腰椎ドレナージ、脳室シャントまたは硬膜形成術の際に採取された。血液試料10mLも同じ日に提供された。24時間の蓄尿試料を健常者から収集し、採尿の最後に10mLの血液を採取した。京都大学の倫理委員会によって研究計画書は検討、承認された(E25)。書面によるインフォームドコンセントは、サンプル採取の前にすべての参加者から得られた。

#### B-3. 生物試料中のPFCA濃度の決定

試料の均質化と準備：マウス組織及び糞便を秤量し、マウス組織グラムあたり15mLの水/メタノール(1:1)で希釈した。試料ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートの一部(PFCA濃度に応じて0.1~1mL)を15mLのポリプロピレンチューブに移した。全血、血清および尿試料について、各試料約10~100 μLと1mLのメタノール1.5mLをマイクロ遠心チューブに入れ、3時間混合した。得られた溶液の一部(濃度に応じて0.1~1mL)を15mLのポリプロピレンチューブに移した。ヒト試料については、各試料の約0.5~30mLを、直接15または

50mLのポリプロピレンチューブに移した。

PFCAの化学分析:全ての試料においてPFCA濃度の決定は、以前に報告された方法(Fujii et al. 2012)を用いて行った。測定対象化学物質はペルフルオロヘキサン酸(PFHxA、C6)、ペルフルオロヘプタン酸(PFHpA、C7)、PFOA(C8)、PFNA(C9)、PFDA(C10)、ペルフルオロウンデカン酸(PFUnDA、C11)、ペルフルオロドデカン酸(PFDoDA、C12)、ペルフルオロトリデカン酸(PFTrDA、C13)とペルフルオロテトラデカン酸(PFTeDA、C14)であった。操作ブランクのコントロールは、10試料ごとに分析した。分析法検出限界(MDL)は、シグナル/ノイズ比3倍となる濃度として定義した(表3)。総回収率は表4に示した。

#### B-4. PFCAの毒物動態学解析

24時間で、全血と血清との間のPFCAの比は、血清PFCA濃度を全血試料中のPFCA濃度に変換するために使用した。血清濃度データは、以下の式によって記載される2-コンパートメントモデルを用いて分析した。

$$C(T) = C_1 \exp(-\lambda_1 * t) + C_2 \exp(-\lambda_2 * t) \quad \text{--- eq ( 1 )}$$

$C_1$ 、 $C_2$ 、 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ を取得するために、血清中PFCAレベルを最小二乗アプローチと非線形最適化により2-コンパートメント毒物動態学モデルに適合させた(Rao et al., 1999)。IV投与試験では分布容積は次のように定義された。

$$\text{分布容積} = \text{用量} / C(0) \quad \text{--- eq ( 2 )}$$

#### B-5. マウスおよびヒト試料中の

## PFCAクリアランス

マウスの尿クリアランス( $CL_{U-mice}$ )を、24時間中尿中排泄総量を0~24時間の各PFCA血清濃度の曲線下面積(AUC)で割ることによって決定した。マウス糞便クリアランス( $CL_{F-mice}$ )は、24時間中糞便中排泄総量を0~24時間の各PFCA血清濃度のAUCで割ることによって決定した。

各PFCAのヒト尿( $CL_{U-human}$ )と胆汁クリアランス( $CL_{B-human}$ )は、24時間累積尿・胆汁排泄量を各PFCA血清濃度で割ることによって決定した。

## B-6. 統計分析

検出限界よりも低い濃度値は、検出限界の半分を与えた。ヒトCSF中の各PFCA平均値間の差はスチューデントのt検定を用いて検定した。p値< 0.05を統計的に有意とみなした。

## C. 研究結果

### C-1. IV投与後のマウス毒物動態解析

各PFCAのための血清濃度に対する全血濃度の割合(平均±SD)は、PFOAで $0.60 \pm 0.1$ 、PFNAで $0.43 \pm 0.1$ 、PFDAで $0.50 \pm 0.1$ 、PUnDAで $0.53 \pm 0.1$ 、PDoDAで $0.70 \pm 0.2$ 、PTrDAで $0.88 \pm 0.2$ 、PTeDAで $1.05 \pm 0.2$ であった。各化学物質の平均比率を、対応する血清濃度に変換するために、全血濃度に乗じた。

対数目盛で血清中PFCA濃度の時間経過とその当てはめ曲線を図1に示す。C6は投与後0.5時間であっても血清中に検出されなかったため、その血中動態を解析しなかった。他のPFCA(C7-C14)の場合は、血清レベルはMDLを超えていた。図1に示すように、C7は時間依存的に血清から消失した。他の化合物(C8-14)は血

清からの遅い消失が特徴の非常にユニークな動態プロファイルを示した(表5)。2-コンパートメントモデルは、マウスにおいてPFCAの動態を十分記載できた。血清PFCA濃度から得られたパラメータを表5に示す。

PFCA(C7-C14)の分布容積は、雌雄ともにPFCAの鎖長の増加に相関し、雌雄間で差を示さなかった(図2)。その分布容積は、C7は血液、C8とC9は細胞外の水分、C11とC12は体水分の総量にほぼ対応していた。特異的組織結合は、C13およびC14について示唆された。これらの結果は、鎖長が分布容積の決定要因であることを示した(表5)。AUCはC8で最大に達し、鎖長が増加すると減少した(表5)。表6では、投与後24時間PFCAの組織分布を示す。C6からC14のPFCAの総回収率は男性で76%より大きく、雌でやや低かった(58%より大きい)。C6、C7のPFCAについては、投与用量のほぼ全ては、わずかな部分だけ糞便中に排泄され、24時間後までに尿中に回収した。対照的に、C8のごく一部が尿(6~7%)で、さらに少ない量が糞便(<1%)中に排泄された。大部分が血清および肝臓(61~79%)に保持され、腎臓にも部分的に分布した(1.3~1.4%)。C9からC14のPFCAについては、分布パターンはC8と同様であった。しかし、C9からC14のPFCAは雌雄とも尿と糞便中排泄はC8のそれよりもはるかに低く、ほとんどが肝臓に保持された(雄で64~80%、雌で46~55%)。

### C-2. マウスでの強制経口投与後のPFCA毒物動態学

強制経口投与後、C6は、全てのサンプリング時点の血清中に検出されなかった。したがって、2-コンパートメ

ント分析をC6では行わなかった。図3に示すように、C7からC14のタイムコースは性別で違いはなく、よく2-コンパートメント毒物動態モデルによってシミュレートされた(表5)。AUCは、C8で最大となり、炭素数の減少に伴って増加した。静脈内投与に対する強制経口投与の投与量調整後のAUC比は炭素数7~13のPFCAsでは1に近く、C14では1未満となった(表5)。物質収支の検討では、静脈内投与と比べて強制経口投与でC6、C7、C12およびC14のPFCAsの総回収は低かった(表6、表7)。C8~11のPFCAsの総回収率は類似していた。これらの結果は、IVおよび強制経口投与の両方の分布様式を反映していた。C6、C7のPFCAsが尿中に回収され、C8~14のPFCAsの大部分は、肝臓や血清中に回収された。PFCAsのわずかな量が糞便中に排泄され、腸からの効率的な吸収とそれによる腸肝循環を示唆した。

### C-3. マウスにおけるPFCAsの尿と糞便クリアランス

マウスでのIVおよび強制経口投与後のPFCAs尿・糞便クリアランスを表8に示す。IV投与で、C8の尿クリアランス(雄:13.1 mL/d/kg、雌:9.8 mL/d/kg)は、C7と比較して有意に少なかった(雄:336.7 mL/d/kg、雌:216.3 mL/d/kg)(表8)。C7は、糞便クリアランスが最も高かったが、C7の尿クリアランスよりも小さかった。糞便クリアランスはC9で最も低かった。総クリアランスはC7が最大で(雄:347.4 mL/d/kg、雌:265.7 mL/d/kg)、C10が最低であった(雄:2.2 mL/d/kg、雌:2.8 mL/d/kg)。男女間の有意な差はなかった。

強制経口投与ではIV投与のものと類似のPFCAsクリアランスパターン

を示した。C8尿クリアランス(雄:9.2 mL/d/kg、雌:6.6 mL/d/kg)は、C7(雄:248.8 mL/d/kg、雌:166.7 mL/d/kg)より有意に低かった(表8)。C7は、糞便クリアランスが最も高かったが、C7の尿クリアランスよりも小さかった。糞便クリアランスはC9で最も低かった。総クリアランスはC7が最大で(雄:292.5 mL/d/kg、雌:190.2 mL/d/kg)、C10が最低であった(雄:3.9 mL/d/kg、雌:2.2 mL/d/kg)。

強制経口投与およびIV投与のPFCAs糞便クリアランスを比較すると、長鎖PFCAs(C13とC14)に違いが存在した(表8)。強制経口投与後24時間の糞便は、排出された胆汁と腸を通過し吸収されなかったPFCAs両方を含んでいると考えられた。PFCAsの実質的な糞便クリアランスはIV投与の糞便クリアランスで示される。PFCAsの腸管吸収係数を評価するために、次式を用いて理論的に吸収された部分を計算した。

$$\begin{aligned} \text{理論的吸収率 (\%)} &= \\ &100 - \text{recovery in feces by gavage (\%)} \\ &\times \frac{\text{Fecal CL by gavage} - \text{Fecal CL by IV}}{\text{Fecal CL by gavage}} \end{aligned}$$

--- eq ( 3 )

結果を表8に記載した。理論的吸収率はPFCAsが効率的に腸内で吸収されることを示唆し、雌雄とも94%から104%の範囲であった。

### C-4. 毒物動態学モデル評価

ラットとサルにおけるPFOAの生理学的薬物動態モデルは、これまでにいくつかの動物実験から入手した化学的パラメータを使用して開発されている(Loccisano et al. 2011; 2012)。本研究では、マウスの血清中のPFCA



濃度に基づいた単純な2-コンパートメントモデルを開発した。このモデルは、 $3.13 \mu\text{mol}$  (PFOA  $1.3 \text{ mg}$ ) / kgの用量を強制経口投与後の、血清中濃度の経時変化をよく説明した。このモデルを評価するために、反復強制経口投与 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) での血清濃度の毒物動態に適用した(Lou et al. 2009)。 $40 \text{ mg/kg}$ 以上の単回強制経口投与は、マウスにおいてPFOAの非線形薬物動態がみられるため(Lou et al. 2009)、強制経口投与 ( $20 \text{ mg/kg}$ ) を用いて、図4に示す用量モデルを推定した。血清PFOA濃度は、初回投与後約8日までに定常状態に達し、最小および最大の血清濃度は、雄マウスでそれぞれ約 $260$ および $185 \mu\text{g/mL}$ 、雌マウスでそれぞれ $300$ および $400 \mu\text{g/mL}$ であった。以前の研究では、 $20 \text{ mg/kg}$ を毎日強制経口投与により、7日後には雄マウスで $181 \mu\text{g/mL}$ 、雌マウスで $178 \mu\text{g/mL}$ 、17日後には、雄マウスで $199 \mu\text{g/mL}$ 、雌マウスで $171 \mu\text{g/mL}$ の血清中PFOA濃度を示した(Lou et al. 2006)。本研究では、モデルによる予測血清濃度は、雌マウスでわずかに高かった一方、雄マウスで同様の結果が得られたことがわかった(図4)。これらの結果は、反復投与実験をPFOA単回投与による単純な2-コンパートメント毒物動態学モデルを用いてシミュレートすることができることを確認した。また、このモデルは他のPFCAsについて適用し、単回経口投与のモデルから、反復経口投与におけるPFCAクリアランスを予測することが可能である。用量はまた、 $1.3 \text{ mg/kg}$ から $20 \text{ mg/kg}$ にスケールアップすることができた。

表5は、モデルの数値結果を示す。IVおよび強制経口投与の両方で、 $>C7$ のPFCAsの $\lambda_2$ は $\lambda_1$ よりもはるかに小

さく、PFCAsが体内組織に急速に分配し、初期の段階で血液および組織間で平衡化した可能性があることを示していた。これらの結果は、モデルの最初の指数関数は、長期的な観測では無視でき、1-コンパートメント毒物動態学モデルで $>C7$ のヒト血清中PFCAsの毒物動態学を予測するために十分であることが示唆された(Niisoe et al. 2010)。

#### C-5. ヒトでの尿中および胆汁クリアランス

ヒトでのPFCAs尿中および胆汁中クリアランスを表9に示す。ヒト血清、胆汁および尿中PFCAs濃度を表11に示している。ヒト血清ではC6は検出されなかったためクリアランスを分析しなかった。ヒトのPFCAs尿クリアランスは、マウスのものより2倍以上小さく、鎖長が長いほど減少した(図5)。胆汁クリアランスは、C9で最低であり、C9からC14でPFCAs鎖長が長いほど増加した(表9)。

糞便への排泄率を計算するために、胆汁中PFCAsが再吸収され腸肝循環する際の、PFCAs再吸収率を推定した。マウス実験に基づいて報告された $200 \text{ mL/kg}$ の分布容積(Harada et al. 2007; Niisoe et al. 2010)と、ヒトでの3.8年の血清半減期(Olsen et al., 2007)、およびそのC8が尿と胆汁を経由した糞中排泄のみであると仮定して、胆汁排泄されたC8の再吸収率は0.98と算出された。我々は、この再吸収率が他のPFCAsに適用されると仮定した。表9は、胆汁クリアランスから推定されたPFCAs糞便クリアランスを示している。推定糞便クリアランスも同様にヒトでマウスより2倍小さかった。総クリアランス(尿・糞便クリアランス)の鎖長との関係は、ヒト

とマウスの間で類似していた。クリアランスは鎖の長さの関数として減少し、C9 (0.062 mL/d/kg) で最も低かった(図5)。それにもかかわらず、ヒトでの総クリアランスはマウスより50~100倍小さかった。

#### C-6. マウスと人間の中枢神経系におけるPFCA

PFOS及びPFOA(C8)が細胞膜電位を変化させ、チャネルゲーティング特性に影響を与えることが知られている(Harada et al. 2005b; Harada et al. 2006; Matsubara et al. 2007)。これはPFCAが神経毒性を引き起こす可能性を示唆している。我々は以前、CSF、血清との間で、PFOSとPFOA(C8)の大きな濃度勾配があることを報告しており、これらの物質は血液脳関門のため中枢神経系に入ることができないことを示唆していた(Harada et al. 2007)。これらのことから、マウスの脳と血清との間でPFCAの濃度勾配を評価した(表10)。勾配は、一般的には鎖長が長いほど増加し、C8、C9とC10で大きく、C11-C14で小さかった。これらの結果は、PFCAがヒト血液脳関門も自由に通過しない可能性を示唆された。

ヒトでは、CSF中のPFCA濃度は、血清濃度の100倍以下であった(表10)。脳出血及び髄液漏患者では平均PFCA濃度は1.3 pg/mLから70 pg/mLの範囲であったのに対し、水頭症患者では、0.38 pg/mLから37 pg/mLの範囲であった。血清に対するPFCAの比率は、脳出血や髄液漏患者に比べて水頭症患者で小さかった。CSF中の実質的により高いPFCA (C11、C12およびC13) が脳出血及び髄液漏患者において検出されたことは興味深い。この現象は、中枢神経系への血清の直接流入

と関連付けることができるかもしれない(Yang and Rosenberg 2011)。

#### C-7. この研究の限界

本研究では、いくつかの限界がある。まず、PFCA毒物動態学モデルは短期的な観察期間によるものだった。それにもかかわらず、我々のモデルは、単回および反復投与、またC8用量をスケールアップしてシミュレートすることができた。モデルは、他のPFCAに適用されるかどうか、さらなる検討が必要である。第二に、ヒト腸肝循環でのPFCA再吸収率やマウスでのCSF/血清の比などのいくつかのパラメータは、推定であり、不確実性がある。

#### C-8. PFCAの生物蓄積に関連して

本研究により明らかにPFCAの毒物動態は二分類できた。C6およびC7のPFCAが尿中に体内から急速に排泄され、C8より長いアルキル鎖を有するPFCAは主に肝臓で堆積していた。尿による排泄は肝臓による排出よりも急速であった。このような毒物動態特性はPFCAが体内に蓄積されるかどうかを予測することができる。C10からC14のPFCAの総クリアランスは鎖長に伴い増加し、PFCAの親油性との関わりを意味し、主に胆汁を經由して糞中に排出された。それゆえに、C9-C11のPFCAはマウスではほとんど蓄積した。効率的に尿を通じて排泄されたC6とC7のPFCAは、他のより長い鎖長のPFCAよりも有意に短い半減期を示した。

鎖長に伴い生物蓄積を引き起こすメカニズムはよく理解されていない。我々の研究は鎖長とともにPFCAの分布容積が増加することが観察された。これは長鎖PFCAの血清および肝

臓脂肪酸結合タンパク質との親和性が高いことを示唆し、鳥類の血清タンパク質が短鎖PFCAとは結合が強くなく、より長い鎖に親和性が増加することを示す以前の研究によって支持される(Jones et al. 2003)。これらの結果より、未結合のC6とC7のPFCAは糸球体濾過により排泄され、一方C7より長いPFCAはタンパク質との親和性から、腎臓での排泄を妨げるのかもしれないと考えられた。長鎖PFCA (>C8) が肝臓に優先的に蓄積することは、肝臓脂肪酸結合タンパク質との高い親和性に理由があるかもしれない(Zhang et al. 2013)。PFCAとの結合親和性は、より長鎖PFCAで増加することが知られている(Zhang et al. 2013)。さらなる研究が、PFCA(>C7)の肝臓での蓄積を理解するために必要である。

#### C-9. 種差への示唆

本研究では、ヒトとマウスで9種類の炭素鎖長の異なるPFCAの毒物動態学プロファイルを報告した。総クリアランス(尿・糞便クリアランス)の鎖長依存性が2種間で類似していたが、その速度には大きな違いがあることがわかった。種間のPFCA排出速度の差が生じる機構はわかっていない。3Mが運営するC8(PFOA)製造工場の退職労働者の疫学研究では、血清半減期が3.8年であったことを明らかにした(Olsen et al. 2007)。別の研究では、C8(PFOA)の血清消失半減期は、マウス(15~20日)、ラット(<1~15日)およびカニクイザル(20~35日)と、はるかに短いことがわかっている(Lau et al. 2007)。

今回の研究では、ヒトでのPFCAの長い半減期は、腎臓からの乏しい除去に起因していた(Harada et al.

2005a; Niisoe et al. 2010)。マウスでは、C7とC8の尿中クリアランスはヒトのものよりそれぞれ500倍、300倍だった。これとは対照的に、糞便クリアランスの大きさは10倍の範囲内であった。以前のトランスポーター実験では、腎臓におけるトランスポーターが関与している可能性があることを示唆した(Minata et al. 2010; Tan et al. 2008; Yang et al. 2010)。しかし、種間で異なる排出パターンとなる理由には決定的ではない。また、わずかに高い脳/血清分配率が、長鎖PFCAについてマウスで観察された。ヒトCSF中PFCAは血清の1.0%から2.5%の範囲であった。この結果は、ヒト血液脳関門が例えばOAT3のようないくつかの有機アニオン輸送体によって維持され、積極的にCSFから血清中に、これらの化合物を輸送することがあり得ることを示した(Mori et al. 2004)。

#### D. 結論

本研究でマウスおよびヒトにおけるPFCAの包括的な毒物動態研究が示された。この研究のハイライトは、マウスおよびヒトで異なるアルキル鎖長の様々なPFCAを評価したことである。PFCA(>C7)の大きな蓄積は、肝臓に特異的結合タンパク質があることを示唆し、PFCAの生物蓄積のために重要な役割を持つと考えられた。また、PFOAの単純な2-コンパートメント毒物動態モデルは、単回投与又は反復投与、小用量または大用量の両方で血清濃度をシミュレートすることが示された。これらの情報は、他の種でもPFCAの生物蓄積性を評価するために有用であろう。

#### E. 健康危険情報

なし

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表・その他

なし

## G . 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

## H . 文献

Chang SC, Das K, Ehresman DJ, Ellefson ME, Gorman GS, Hart JA, et al. 2008. Comparative pharmacokinetics of perfluorobutyrate in rats, mice, monkeys, and humans and relevance to human exposure via drinking water. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 104:40-53.

Chengelis CP, Kirkpatrick JB, Myers NR, Shinohara M, Stetson PL, Sved DW. 2009a. Comparison of the toxicokinetic behavior of perfluorohexanoic acid (pfhxa) and nonafluorobutane-1-sulfonic acid (pfbs) in cynomolgus monkeys and rats. *Reproductive toxicology* 27:400-406.

Chengelis CP, Kirkpatrick JB, Radovsky A, Shinohara M. 2009b. A 90-day repeated dose oral (gavage) toxicity study of perfluorohexanoic acid (pfhxa) in rats (with functional observational battery and motor activity determinations). *Reproductive toxicology* 27:342-351.

Das KP, Grey BE, Zehr RD, Wood CR, Butenhoff JL, Chang SC, et al. 2008. Effects of perfluorobutyrate exposure during pregnancy in the mouse.

*Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 105:173-181.

Fujii Y, Harada KH, Koizumi A. 2012. Analysis of perfluoroalkyl carboxylic acids in composite dietary samples by gas chromatography/mass spectrometry with electron capture negative ionization. *Environmental science & technology* 46:11235-11242.

Glynn A, Berger U, Bignert A, Ullah S, Aune M, Lignell S, et al. 2012. Perfluorinated alkyl acids in blood serum from primiparous women in sweden: Serial sampling during pregnancy and nursing, and temporal trends 1996-2010. *Environmental Science & Technology* 46:9071-9079.

Harada K, Inoue K, Morikawa A, Yoshinaga T, Saito N, Koizumi A. 2005a. Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environ Res* 99:253-261.

Harada K, Xu F, Ono K, Iijima T, Koizumi A. 2005b. Effects of pfos and pfoa on l-type ca<sup>2+</sup> currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 329:487-494.

Harada KH, Ishii TM, Takatsuka K, Koizumi A, Ohmori H. 2006. Effects of perfluorooctane sulfonate on action potentials and currents in cultured rat cerebellar purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351:240-245.

Harada KH, Hashida S, Kaneko T, Takenaka K, Minata M, Inoue K, et al. 2007. Biliary excretion and cerebrospinal fluid partition of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate in humans. *Environmental toxicology and pharmacology* 24:134-139.

Harada KH, Hitomi T, Niisoe T, Takanaka K, Kamiyama S, Watanabe T, et al. 2011. Odd-numbered perfluorocarboxylates predominate over perfluorooctanoic acid in serum samples from japan, korea and vietnam.

- Environment International  
37:1183-1189.
- Jones PD, Hu W, De Coen W, Newsted JL, Giesy JP. 2003. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 22:2639-2649.
- Koizumi A, Yoshinaga T, Harada K, Inoue K, Morikawa A, Muroi J, et al. 2005. Assessment of human exposure to polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Japan using archived samples from the early 1980s and mid-1990s. *Environmental Research* 99:31-39.
- Koizumi A, Harada KH, Inoue K, Hitomi T, Yang HR, Moon CS, et al. 2009. Past, present, and future of environmental specimen banks. *Environmental health and preventive medicine* 14:307-318.
- Kudo N, Suzuki E, Katakura M, Ohmori K, Noshiro R, Kawashima Y. 2001. Comparison of the elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats. *Chemico-biological interactions* 134:203-216.
- Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Narotsky MG, Rogers JM, Lindstrom AB, et al. 2006. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 90:510-518.
- Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. 2007. Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 99:366-394.
- Liao CY, Wang T, Cui L, Zhou QF, Duan SM, Jiang GB. 2009. Changes in synaptic transmission, calcium current, and neurite growth by perfluorinated compounds are dependent on the chain length and functional group. *Environmental Science & Technology* 43:2099-2104.
- Loccisano AE, Campbell JL, Jr., Andersen ME, Clewell HJ, 3rd. 2011. Evaluation and prediction of pharmacokinetics of pfoa and pfos in the monkey and human using a pbpk model. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 59:157-175.
- Loccisano AE, Campbell JL, Jr., Butenhoff JL, Andersen ME, Clewell HJ, 3rd. 2012. Comparison and evaluation of pharmacokinetics of pfoa and pfos in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetic model. *Reproductive toxicology* 33:452-467.
- Lou I, Wambaugh JF, Lau C, Hanson RG, Lindstrom AB, Strynar MJ, et al. 2009. Modeling single and repeated dose pharmacokinetics of pfoa in mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 107:331-341.
- Matsubara E, Harada K, Inoue K, Koizumi A. 2006. Effects of perfluorinated amphiphiles on backward swimming in *paramecium caudatum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339:554-561.
- Matsubara E, Nakahari T, Yoshida H, Kuroiwa T, Harada KH, Inoue K, et al. 2007. Effects of perfluorooctane sulfonate on tracheal ciliary beating frequency in mice. *Toxicology* 236:190-198.
- Minata M, Harada KH, Karrman A, Hitomi T, Hirose M, Murata M, et al. 2010. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in hepatobiliary injury induced by ammonium perfluorooctanoate in mouse liver. *Industrial health* 48:96-107.
- Mori S, Ohtsuki S, Takanaga H, Kikkawa T, Kang YS, Terasaki T. 2004. Organic anion transporter 3 is involved in the brain-to-blood efflux transport of

- thiopurine nucleobase analogs. *Journal of neurochemistry* 90:931-941.
- Niisoe T, Harada KH, Ishikawa H, Koizumi A. 2010. Long-term simulation of human exposure to atmospheric perfluorooctanoic acid (pfoa) and perfluorooctanoate (pfo) in the osaka urban area, japan. *Environ Sci Technol* 44:7852-7857.
- Ohmori K, Kudo N, Katayama K, Kawashima Y. 2003. Comparison of the toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length. *Toxicology* 184:135-140.
- Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. 2007. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* 115:1298-1305.
- Rao CR, Toutenburg H, Fieger A, Heumann C, Nittner T, Scheid S. 1999. *Linear Models: Least Squares and Alternatives*. Springer Series in Statistics.
- Riches AC, Sharp JG, Thomas DB, Smith SV. 1973. Blood volume determination in the mouse. *The Journal of physiology* 228:279-284.
- Tan YM, Clewell HJ, 3rd, Andersen ME. 2008. Time dependencies in perfluorooctylacids disposition in rat and monkeys: A kinetic analysis. *Toxicology letters* 177:38-47.
- Tatum-Gibbs K, Wambaugh JF, Das KP, Zehr RD, Strynar MJ, Lindstrom AB, et al. 2011. Comparative pharmacokinetics of perfluorononanoic acid in rat and mouse. *Toxicology* 281:48-55.
- US EPA, 2012. *New Chemical Review of Alternatives for PFOA and Related Chemicals*. <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/altnewchems.html> Access date: 13 February 2014
- Upham BL, Deocampo ND, Wurl B, Trosko JE. 1998. Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail. *International Journal of Cancer* 78:491-495.
- Vanden Heuvel JP, Kuslikis BI, Van Rafelghem MJ, Peterson RE. 1991. Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *Journal of biochemical toxicology* 6:83-92.
- Yang CH, Glover KP, Han X. 2010. Characterization of cellular uptake of perfluorooctanoate via organic anion-transporting polypeptide 1a2, organic anion transporter 4, and urate transporter 1 for their potential roles in mediating human renal reabsorption of perfluorocarboxylates. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 117:294-302.
- Yang Y, Rosenberg GA. 2011. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42:3323-3328.
- Zhang L, Ren XM, Guo LH. 2013. Structure-based investigation on the interaction of perfluorinated compounds with human liver fatty acid binding protein. *Environ Sci Technol* 47:11293-11301.

表 1. Study profile of PFCA toxicokinetics in mice

Administration methods	Dosage amount ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Sex (N)	Serum sampling	Urine and feces sampling	Tissue sampling (liver, kidney, brain, adipose tissue)
intravenous (IV)	0.31	Male (9), Female(9)	Time course (0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24hr after dosing)	24 hr after dosing	24 hr after dosing
gavage	3.13	Male (9), Female(9)	Time course (0, 1, 3, 6, 12, 24hr after dosing)	24 hr after dosing	24 hr after dosing

表2. Demographic characteristics of human donors

No	sex	Age (yrs)	Disease	Treatment
<b>CSF<sup>a</sup>-serum pair</b>				
1	male	56	liquorrhoea	spinal drainage
2	male	73	hydrocephalus after cerebral infarction	bone and duraplasty after craniotomy
3	male	74	cerebral hemorrhage	ventriculo-peritoneal shunt
4	male	70	hydrocephalus after cerebral infarction	cerebral drainage after external decompression
5	female	80	cerebral hemorrhage	cerebral drainage
6	male	60	normal pressure hydrocephalus	cerebral drainage
7	male	74	normal pressure hydrocephalus	cerebral drainage
<b>Bile-serum pair</b>				
1	female	68	carcinoma of the head of the pancreas	Nasobiliary drainage
2	male	74	choledocholithiasis	percutaneous transhepatic biliary drainage
3	female	90	choledocholithiasis	Nasobiliary drainage
4	male	75	cholecystolithiasis	percutaneous transhepatic gallbladder drainage
5	male	81	choledocholithiasis	Nasobiliary drainage
<b>Urine-serum pair</b>				
1	male	23	healthy volunteer	-
2	male	21	healthy volunteer	-
3	male	22	healthy volunteer	-
4	male	21	healthy volunteer	-
5	male	21	healthy volunteer	-
6	female	22	healthy volunteer	-
7	female	22	healthy volunteer	-
8	female	21	healthy volunteer	-
9	female	22	healthy volunteer	-
10	female	28	healthy volunteer	-

a. cerebrospinal fluid



表3. Target ions and method detection limits

Compound (carbon atoms)	Quantification ions (confirmation ions)	m/z	Method detection limit <sup>a</sup>					
			Animal samples		Human samples			
			IV <sup>b</sup> nmol g <sup>-1</sup>	gavage <sup>c</sup> nmol g <sup>-1</sup>	Serum <sup>d</sup> ng mL <sup>-1</sup>	Bile <sup>e</sup> ng mL <sup>-1</sup>	Urine <sup>f</sup> pg mL <sup>-1</sup>	CSF <sup>g</sup> pg mL <sup>-1</sup>
PFHxA	(C6)	313 (294)	0.02	0.2	-	-	-	-
PFHpA	(C7)	363 (344)	0.02	0.2	0.04	1.2	6.4	5.6
PFOA	(C8)	413 (394)	0.003	0.03	0.2	1.0	3.5	16
PFNA	(C9)	463 (444)	0.001	0.01	0.1	0.4	1.3	4.0
PFDA	(C10)	513 (494)	0.001	0.01	0.05	0.3	0.8	1.3
PFUnDA	(C11)	563 (544)	0.001	0.01	0.04	0.3	0.5	2.5
PFDoDA	(C12)	613 (594)	0.0003	0.003	0.02	0.1	0.3	1.0
PFTTrDA	(C13)	663 (644)	0.0003	0.003	0.02	0.1	0.8	1.0
PFTeDA	(C14)	713 (694)	0.0003	0.003	0.01	0.1	0.2	0.2

a. The method detection limit is defined as the concentration that produces a signal three times higher than that of the blank.

b. Sample volume was approximately 10mg.

c. Sample volume was approximately 1mg.

d. Sample volume was approximately 0.5mL.

e. Sample volume was approximately 1mL.

f. Sample volume was approximately 30mL.

g. Sample volume was approximately 10mL.

表4. Recoveries of PFCA in each sample

Compound (carbon atoms)						
Mice		Liver	Kidney	Brain	Adipose tissue	Feces
		1 ng spiked (n=3)	1 ng spiked (n=3)	1 ng spiked (n=3)	1 ng spiked (n=3)	1 ng spiked (n=3)
PFHxA	(C6)	116(10)	101(21)	133(12)	59(16)	120(51)
PFHpA	(C7)	108(6)	125(22)	144(26)	84(26)	166(64)
PFOA	(C8)	105(5)	128(22)	139(23)	89(34)	90(16)
PFNA	(C9)	109(7)	134(27)	145(23)	97(38)	89(5)
PFDA	(C10)	100(4)	127(25)	128(20)	91(35)	81(3)
PFUnDA	(C11)	98(8)	120(23)	115(17)	93(39)	103(3)
PFDoDA	(C12)	95(3)	96(20)	98(17)	80(36)	107(2)
PFTTrDA	(C13)	84(4)	107(29)	98(14)	89(45)	74(1)
PFTeDA	(C14)	91(5)	106(20)	100(14)	89(38)	62(6)

Humans		Serum	Bile	Urine	CSF
		1 ng spiked (n=3)	0.1 ng spiked (n=3)	0.1 ng spiked (n=3)	0.1 ng spiked (n=3)
PFHxA	(C6)	69(15)	74(7)	100(15)	74(24)
PFHpA	(C7)	58(14)	84(19)	76(4)	80(27)
PFOA	(C8)	65(14)	97(10)	72(3)	80(22)
PFNA	(C9)	73(13)	97(6)	68(2)	90(23)
PFDA	(C10)	71(10)	80(7)	71(3)	90(25)
PFUnDA	(C11)	67(11)	69(5)	77(1)	74(22)
PFDoDA	(C12)	68(7)	56(10)	82(6)	58(14)
PFTTrDA	(C13)	57(8)	54(3)	70(5)	61(16)
PFTeDA	(C14)	62(7)	64(7)	63(4)	79(16)

<sup>a</sup> All native PFCAs were spiked into samples before extraction

表5. Elimination of PFCAs determined by the two-compartment model in mice after IV or gavage administration

a. Intravenous injection with a target dose of 0.313  $\mu\text{mol/kg}$

	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
<b>Male</b>								
$C_1$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.8(0.3)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.4(0.2)	0.3(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.3(0.1)
$\lambda_1$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	1.59 (0.50)	0.03 (0.02)	0.18 (0.11)	1.20(0.37)	0.82 (0.25)	0.75 (0.33)	0.62(0.32)	0.38 (0.22)
$C_2$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	3.8(0.9)	1.6(0.4)	1.3(0.4)	1.0(0.2)	0.7(0.2)	0.4(0.1)	0.4(0.1)	0.4(0.1)
$\lambda_2$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.20(0.1)	0.00014 (0.0001)	0.00004 6 (0.0000 4)	0.00013 (0.0001)	0.000052 (0.00004)	0.00035 (0.0002)	0.00058 (0.0003)	0.0043 (0.002)
AUC of 24 hours ( $\mu\text{mol/L hr}$ (0 to 24hr))	22.2(8.4)	42.2(9.9)	33.2 (10.3)	24.2(6.0)	17.6(3.7)	9.5(3.1)	9.2(3.1)	9.0(3.2)
Volume distribution (L/kg) <sup>a</sup>	0.07 (0.01)	0.18 (0.04)	0.22 (0.06)	0.25(0.06)	0.33 (0.06)	0.57 (0.21)	0.58(0.20)	0.55 (0.18)
<b>Female</b>								
$C_1$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.9(0.2)	0.5(0.3)	0.6(0.3)	0.4(0.2)	0.3(0.2)	0.5(0.2)	0.4(0.2)	0.5(0.2)
$\lambda_1$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	1.40 (0.63)	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.11(0.07)	0.61 (0.16)	1.50 (0.70)	0.98(0.51)	1.24 (0.62)
$C_2$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	3.5(1.1)	1.7(0.5)	1.6(0.4)	1.3(0.3)	0.9(0.3)	0.5(0.1)	0.4(0.1)	0.3(0.1)
$\lambda_2$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.18 (0.08)	0.00021 (0.0001)	0.00042 (0.0003)	0.00046 (0.0003)	0.00043 (0.0003)	0.00023 (0.0002)	0.00027 (0.0002)	0.00079 (0.0005)
AUC of 24 hours ( $\mu\text{mol/L hr}$ (0 to 24hr))	23.6 (14.2)	49.5 (11.9)	47.4 (11.0)	33.4(8.4)	22.2(6.9)	11.9(3.3)	9.3(2.6)	7.5(1.7)
Volume distribution (L/kg) <sup>a</sup>	0.08 (0.02)	0.15 (0.04)	0.15 (0.04)	0.20(0.05)	0.28 (0.08)	0.35 (0.10)	0.43(0.14)	0.43 (0.13)

表5. (続き)

b. Gavage administration with a target dose of 3.13  $\mu\text{mol/kg}$

	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
Male								
$C_1$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	-19(2)	-20(2)	-19(3)	-18(4)	-15(4)	-11(4)	-9(3)	-6(3)
$\lambda_1$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.8(0.3)	0.3(0.1)	0.3(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)
$C_2$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	29(6)	23(4)	20(4)	19(4)	16(4)	11(4)	9(3)	6(2)
$\lambda_2$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.18 (0.06)	0.025 (0.004)	0.014 (0.004)	0.021(0.01)	0.033 (0.01)	0.041 (0.01)	0.042 (0.01)	0.040 (0.01)
AUC of 24 hours ( $\mu\text{mol/L hr}$ (0 to 24hr))	141(51)	348(76)	335(63)	277(44)	170(30)	90(21)	69(21)	44(17)
Female								
$C_1$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	-15(1)	-17(5)	-16(5)	-14(4)	-8(3)	-4(1)	-4(0)	-3(1)
$\lambda_1$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.3(0.1)	0.2(0.1)
$C_2$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	38(6)	30(3)	27(3)	22(3)	14(4)	6(1)	4(1)	3(1)
$\lambda_2$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	0.14 (0.05)	0.021 (0.0004)	0.0022 (0.001)	0.0070(0.002)	0.0081 (0.003)	0.0058 (0.002)	0.0021 (0.0002)	0.0048 (0.001)
AUC of 24 hours ( $\mu\text{mol/L hr}$ (0 to 24hr))	215(156)	495(64)	535(63)	414(61)	248(78)	117(27)	84(23)	51(12)

c. Ratio of dose adjusted AUC (gavage average AUC / IV average AUC ratio, both are adjusted with administrated dose)

	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
Male								
	0.6	0.8	1.0	1.1	1.0	0.9	0.7	0.5
Female								
	0.9	1.0	1.1	1.2	1.1	1.0	0.9	0.7

Values are mean (SD).

a. See text (Section 2.4)

表6. Distribution and excretion of PFCAs 24 hr after IV administration (0.313 μmol/kg)

	PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
Male (N=9), Average body weight of mice (g) 25.9 (1.5), Average of administrated dose (nmol) 8.2 (0.5)									
Serum <sup>a</sup>	nmol<0.03	<0.03	2.65(0.5)	2.23(0.4)	1.61(0.3)	1.13(0.2)	0.62(0.1)	0.50(0.1)	0.47(0.2)
	% <sup>b</sup> -	-	32.3%(4.5%)	27.2%(6.0%)	19.6%(4.1%)	13.7%(2.4%)	7.5%(1.5%)	6.1%(1.2%)	5.7%(0.9%)
Liver	nmol<0.03	0.10(0.2)	3.88(0.4)	5.62(0.9)	6.55(1.3)	6.43(1.4)	5.46(1.3)	5.97(1.4)	5.26(1.5)
	% <sup>b</sup> -	1.3%(2.6%)	47.4%(4.8%)	68.5%(12.3%)	79.9%(17.5%)	78.4%(9.2%)	66.6%(18.3%)	72.8%(18.7%)	64.2%(18.9%)
Kidney	nmol<0.01	0.02(0.04)	0.11(0.02)	0.09(0.02)	0.09(0.01)	0.10(0.02)	0.09(0.02)	0.16(0.03)	0.21(0.03)
	% <sup>b</sup> -	0.2%(0.5%)	1.3%(0.2%)	1.1%(0.1%)	1.1%(0.2%)	1.2%(0.2%)	1.2%(0.2%)	1.9%(0.4%)	2.6%(0.5%)
Brain	nmol<0.01	<0.01	0.01(0.003)	0.01(0.01)	0.02(0.01)	0.03(0.01)	0.02(0.01)	0.03(0.01)	0.03(0.01)
	% <sup>b</sup> -	-	0.1%(0.0%)	0.1%(0.1%)	0.2%(0.1%)	0.3%(0.1%)	0.3%(0.1%)	0.4%(0.1%)	0.4%(0.1%)
Adipose tissue <sup>c</sup>	nmol<0.01	0.01(0.01)	0.13(0.20)	0.05(0.03)	0.04(0.03)	0.05(0.04)	0.05(0.04)	0.09(0.06)	0.12(0.08)
	% <sup>b</sup> -	0.1%(0.1%)	1.5%(2.3%)	0.6%(0.4%)	0.5%(0.4%)	0.7%(0.4%)	0.6%(0.4%)	1.1%(0.7%)	1.5%(0.9%)
Urine	nmol8.31(5.1)	8.11(4.2)	0.61(0.4)	0.11(0.1)	0.021(0.027)	0.008(0.007)	0.004(0.004)	0.004(0.004)	0.003(0.003)
	% <sup>b</sup> 101.3%(27.5%)	99.0%(27.3%)	7.4%(4.5%)	1.3%(0.7%)	0.3%(0.1%)	0.1%(0.03%)	0.0%(0.02%)	0.1%(0.03%)	0.04%(0.01%)
Feces	nmol0.38(0.4)	0.26(0.4)	0.05(0.04)	0.04(0.02)	0.04(0.02)	0.05(0.02)	0.04(0.02)	0.06(0.03)	0.09(0.05)
	% <sup>b</sup> 4.7%(5.4%)	3.2%(5.3%)	0.6%(0.5%)	0.5%(0.2%)	0.5%(0.2%)	0.6%(0.2%)	0.5%(0.2%)	0.8%(0.3%)	1.1%(0.6%)
Total <sup>d</sup>	nmol8.72(1.9)	8.51(2.1)	7.44(0.8)	8.14(1.1)	8.37(1.4)	7.80(1.5)	6.30(1.4)	6.81(1.4)	6.19(1.5)
Total recovery <sup>d</sup>	% <sup>b</sup> 106.3%(48.2%)	103.7%(42.9%)	90.7%(9.8%)	99.2%(11.9%)	102.1%(17.3%)	95.1%(19.2%)	76.8%(18.3%)	83.1%(18.4%)	75.5%(18.6%)

表6. (続き)

	PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
Female (N=9), Average body weight of mice (g) 20.1 (1.2), Average of administrated dose (nmol) 6.4 (0.4)									
Serum <sup>a</sup>	nmol<0.02	<0.02	2.01(0.8)	2.06(0.8)	1.45(0.5)	0.93(0.3)	0.48(0.2)	0.36(0.2)	0.27(0.3)
	% <sup>b</sup> -	-	31.5%(7.1%)	32.2%(9.7%)	22.7%(5.9%)	14.6%(3.5%)	7.5%(1.6%)	5.7%(1.6%)	4.2%(1.8%)
Liver	nmol<0.03	0.03(0.1)	1.93(0.3)	2.93(0.4)	3.41(0.5)	3.41(0.5)	3.00(0.5)	3.49(0.5)	3.01(0.4)
	% <sup>b</sup> -	0.5%(1.0%)	30.2%(4.1%)	45.8%(7.2%)	53.3%(8.9%)	53.3%(8.2%)	46.9%(6.7%)	54.6%(7.5%)	47.1%(6.4%)
Kidney	nmol<0.01	<0.01	0.09(0.01)	0.10(0.01)	0.10(0.02)	0.11(0.02)	0.10(0.02)	0.14(0.03)	0.16(0.03)
	% <sup>b</sup> -	-	1.4%(0.2%)	1.6%(0.2%)	1.6%(0.4%)	1.7%(0.4%)	1.6%(0.4%)	2.2%(0.5%)	2.5%(0.6%)
Brain	nmol<0.01	<0.01	0.01(0.002)	0.01(0.003)	0.02(0.01)	0.03(0.01)	0.03(0.01)	0.03(0.01)	0.03(0.01)
	% <sup>b</sup> -	-	0.1%(0.03%)	0.2%(0.06%)	0.4%(0.1%)	0.5%(0.1%)	0.4%(0.1%)	0.5%(0.2%)	0.5%(0.2%)
Adipose tissue <sup>c</sup>	nmol<0.01	0.01(0.01)	0.06(0.02)	0.07(0.05)	0.08(0.07)	0.09(0.08)	0.09(0.07)	0.15(0.09)	0.19(0.10)
	% <sup>b</sup> -	0.1%(0.2%)	0.9%(0.3%)	1.1%(0.7%)	1.3%(1.0%)	1.5%(1.2%)	1.4%(1.0%)	2.3%(1.2%)	2.9%(1.4%)
Urine	nmol5.05(1.7)	4.23(2.3)	0.41(0.3)	0.14(0.1)	0.03(0.01)	0.01(0.002)	0.004(0.003)	0.004(0.002)	0.003(0.003)
	% <sup>b</sup> 79.0%(29.1%)	66.1%(37.6%)	6.4%(3.8%)	2.2%(1.2%)	0.4%(0.2%)	0.1%(0.04%)	0.1%(0.05%)	0.1%(0.03%)	0.1%(0.04%)
Feces	nmol1.00(0.85)	0.84(0.85)	0.08(0.06)	0.06(0.03)	0.05(0.03)	0.06(0.03)	0.04(0.02)	0.05(0.02)	0.06(0.04)
	% <sup>b</sup> 15.6%(13.5%)	13.1%(13.5%)	1.3%(1.0%)	0.9%(0.4%)	0.8%(0.4%)	0.9%(0.4%)	0.7%(0.3%)	0.8%(0.4%)	1.0%(0.6%)
Total <sup>d</sup>	nmol6.13(1.8)	5.32(2.4)	4.09(0.5)	4.43(0.5)	4.61(0.6)	4.35(0.5)	3.68(0.5)	4.26(0.5)	3.83(0.5)
Total recovery <sup>d</sup>	% <sup>b</sup> 94.9%(43.4%)	79.9%(48.9%)	71.7%(8.2%)	84.1%(11.2%)	80.5%(10.3%)	72.5%(8.6%)	58.6%(6.6%)	66.2%(7.9%)	58.3%(7.2%)

Values are mean (SD). Lower values in parentheses are the mean percentages.

a. calculated by assuming 56 mL/kg-mice body weight for male-mice blood volume and 65 for female-mice (Richers et al., 1972)

b. % of administrated dose

c. calculated by assuming 2.3 % for mice body-fat percentage (Richers et al., 1972)

d. Total of Blood, Liver, Kidney, Brain, Adipose tissue, Urine and Feces.

表7. Distribution and excretion of PFCAs 24 hr after gavage administration (3.13 μmol/kg)

	PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDODA (C12)	PFTTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
Male (N=9), Average body weight of mice (g) 24.3 (1.6), Average of administrated dose (nmol) 77.1 (5.0)									
Serum <sup>a</sup>	nmol<0.32	<0.32	20.85(5.9)	23.74(3.8)	19.05(3.0)	10.96(2.0)	5.48(1.4)	3.88(1.3)	2.57(1.1)
	% <sup>b</sup> -	-	27.0%(6.4%)	30.8%(3.9%)	24.7%(3.1%)	14.2%(2.3%)	7.1%(1.7%)	5.0%(1.7%)	3.3%(1.5%)
Liver	nmol<0.36	<0.36	30.30(2.9)	54.11(7.1)	63.08(11.8)	69.48(10.0)	54.81(10.4)	51.24(9.7)	34.53(7.6)
	% <sup>b</sup> -	-	39.3%(3.1%)	70.2%(7.0%)	81.8%(12.3%)	90.1%(11.9%)	71.1%(10.9%)	66.5%(10.5%)	44.8%(8.8%)
Kidney	nmol<0.07	<0.07	1.02(0.3)	0.74(0.2)	0.73(0.2)	0.76(0.2)	0.74(0.2)	0.99(0.3)	1.12(0.3)
	% <sup>b</sup> -	-	1.3%(0.1%)	1.0%(0.1%)	0.9%(0.05%)	1.0%(0.1%)	1.0%(0.05%)	1.3%(0.1%)	1.5%(0.1%)
Brain	nmol<0.07	<0.07	0.10(0.1)	0.11(0.1)	0.18(0.1)	0.29(0.2)	0.21(0.1)	0.22(0.1)	0.16(0.1)
	% <sup>b</sup> -	-	0.1%(0.0%)	0.1%(0.1%)	0.2%(0.1%)	0.4%(0.1%)	0.3%(0.05%)	0.3%(0.04%)	0.2%(0.03%)
Adipose tissue <sup>c</sup>	nmol<0.11	<0.11	0.07(0.07)	0.06(0.06)	0.04(0.03)	0.03(0.02)	0.02(0.01)	0.02(0.01)	0.02(0.01)
	% <sup>b</sup> -	-	0.1%(0.1%)	0.1%(0.1%)	0.05%(0.04%)	0.04%(0.03%)	0.03%(0.02%)	0.03%(0.02%)	0.02%(0.01%)
Urine	nmol47.01(9.5)	36.42(26.2)	3.26(2.3)	0.32(0.2)	0.08(0.05)	0.03(0.02)	0.02(0.01)	0.02(0.01)	0.01(0.01)
	% <sup>b</sup> 61.0%(10.3%)	47%(31%)	4%(3%)	0.4%(0.2%)	0.1%(0.1%)	0.04%(0.02%)	0.02%(0.01%)	0.03%(0.01%)	0.02%(0.01%)
Feces	nmol5.90(5.6)	6.06(5.5)	1.38(0.9)	1.05(0.6)	0.99(0.5)	0.94(0.4)	0.83(0.4)	2.36(1.2)	4.73(2.0)
	% <sup>b</sup> 7.7%(7.6%)	7.9%(7.5%)	1.8%(1.2%)	1.4%(0.8%)	1.3%(0.7%)	1.2%(0.6%)	1.1%(0.5%)	3.1%(1.6%)	6.1%(2.7%)
Total <sup>d</sup>	nmol52.92(8.6)	43.25(23.9)	54.31(5.6)	67.74(8.3)	73.95(12.1)	78.06(10.0)	61.01(10.2)	59.16(9.4)	44.45(7.2)
Total recovery <sup>d</sup>	% <sup>b</sup> 68.6%(10.0%)	55.5%(28.5%)	73.9%(7.1%)	103.9%(8.6%)	109.1%(12.3%)	107.0%(11.3%)	80.6%(10.4%)	76.2%(9.7%)	56.0%(7.6%)

表7. (続き)

Female (N=9), Average body weight of mice (g) 20.6 (2.2), Average of administrated dose (nmol) 65.3 (7.1)									
Serum <sup>a</sup>	nmol	<0.22	24.56(4.4)	20.08(4.5)	16.70(4.2)	10.20(2.9)	5.41(1.5)	4.05(1.1)	2.79(0.7)
	% <sup>b</sup>	-	37.6%(4.8%)	30.8%(4.8%)	25.6%(4.9%)	15.6%(3.5%)	8.3%(1.9%)	6.2%(1.4%)	4.3%(0.8%)
Liver	nmol	<0.30	1.18(1.7)	17.68(3.2)	33.10(6.3)	41.48(8.0)	45.17(9.4)	37.32(8.4)	35.02(8.6)
	% <sup>b</sup>	-	1.8%(2.7%)	27.1%(5.0%)	50.7%(10.6%)	66.3%(13.8%)	69.2%(16.4%)	57.1%(14.8%)	53.6%(15.1%)
Kidney	nmol	<0.05	0.10(0.2)	0.90(0.3)	0.83(0.2)	0.81(0.2)	0.86(0.2)	0.81(0.1)	1.07(0.2)
	% <sup>b</sup>	-	0.2%(0.1%)	1.4%(0.1%)	1.3%(0.1%)	1.2%(0.05%)	1.3%(0.04%)	1.2%(0.04%)	1.6%(0.04%)
Brain	nmol	<0.06	0.07(0.02)	0.08(0.02)	0.15(0.04)	0.21(0.06)	0.17(0.05)	0.18(0.05)	0.13(0.04)
	% <sup>b</sup>	-	0.1%(0.01%)	0.1%(0.01%)	0.2%(0.02%)	0.3%(0.04%)	0.3%(0.04%)	0.3%(0.04%)	0.2%(0.03%)
Adipose tissue <sup>c</sup>	nmol	<0.11	0.04(0.01)	0.03(0.01)	0.04(0.01)	0.03(0.01)	0.03(0.02)	0.03(0.02)	0.02(0.02)
	% <sup>b</sup>	-	0.1%(0.03%)	0.1%(0.02%)	0.1%(0.03%)	0.05%(0.03%)	0.05%(0.05%)	0.05%(0.04%)	0.04%(0.03%)
Urine	nmol	43.10(13.3)	29.95(15.6)	2.62(1.5)	0.38(0.2)	0.10(0.1)	0.03(0.01)	0.01(0.005)	0.01(0.004)
	% <sup>b</sup>	66.0%(17.3%)	45.9%(21.5%)	4.0%(2.5%)	0.6%(0.3%)	0.1%(0.1%)	0.04%(0.02%)	0.02%(0.01%)	0.02%(0.01%)
Feces	nmol	3.68(4.3)	3.98(3.5)	0.93(0.6)	0.65(0.5)	0.62(0.4)	0.58(0.3)	0.47(0.3)	1.10(0.7)
	% <sup>b</sup>	5.6%(7.9%)	6.1%(6.1%)	1.4%(1.0%)	1.0%(0.7%)	1.0%(0.6%)	0.9%(0.6%)	0.7%(0.5%)	1.7%(1.3%)
Total <sup>d</sup>	nmol	46.78(13.4)	38.05(14.0)	39.06(6.5)	47.85(7.5)	52.54(8.2)	53.53(9.4)	43.14(8.2)	41.41(8.4)
	Total recovery <sup>d</sup> % <sup>b</sup>	71.6%(17.0%)	53.9%(21.1%)	71.7%(7.7%)	84.5%(12.6%)	69.1%(13.9%)	87.4%(15.6%)	67.7%(14.3%)	63.5%(14.8%)

Values are mean (SD). Lower values in parentheses are the mean percentages.

a. calculated by assuming 56 mL/kg-mice body weight for male-mice blood volume and 65 for female-mice (Richers et al., 1972)

b.% of administrated dose

c. calculated by assuming 2.3 % for mice body-fat percentage (Richers et al., 1972)

d. Total of Blood, Liver, Kidney, Brain, Adipose tissue, Urine and Feces.



表8. Urinary and fecal clearance of perfluoroalkyl carboxylates in mice

a. IV administration <sup>c</sup> Compound (carbon atoms)								
Agerage (mL/day/kg)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
Male (N=9)								
Urinary clearance	336.7(93.5)	13.1(8.1)	2.9(1.6)	0.8(0.4)	0.4(0.1)	0.4(0.2)	0.4(0.3)	0.4(0.1)
Fecal clearance	10.7(18.1)	1.1(0.8)	1.0(0.4)	1.4(0.6)	2.4(0.9)	4.0(1.6)	6.3(2.5)	9.7(4.7)
Total clearance b	347.4(86.1)	14.2(8.4)	3.9(1.9)	2.2(0.9)	2.8(1.0)	4.4(1.6)	6.8(2.5)	10.0(4.6)
Female (N=9)								
Urinary clearance	216.3(120.9)	9.8(5.9)	3.6(1.9)	1.0(0.4)	0.4(0.1)	0.4(0.3)	0.5(0.3)	0.5(0.4)
Fecal clearance	40.4(43.6)	2.0(1.6)	1.5(0.7)	1.8(0.9)	3.0(1.4)	4.4(2.2)	6.7(3.1)	9.9(5.8)
Total clearance b	256.7(124.4)	11.8(6.1)	5.1(2.3)	2.8(1.2)	3.4(1.5)	4.8(2.4)	7.2(3.2)	10.4(6.0)
Total (Male; N=9, Female; N=9)								
Urinary clearance	276.5(121.8)	11.4(7.0)	3.3(1.7)	0.9(0.4)	0.4(0.1)	0.4(0.2)	0.4(0.3)	0.4(0.3)
Fecal clearance	25.5(36.3)	1.5(1.3)	1.2(0.6)	1.6(0.7)	2.7(1.2)	4.2(1.9)	6.5(2.8)	9.8(5.1)
Total clearance b	302.1(113.4)	13.0(7.2)	4.5(2.1)	2.5(1.0)	3.1(1.3)	4.6(2.0)	7.0(2.8)	10.2(5.2)
b. Gavage administration <sup>a</sup>								
Male (N=9)								
Urinary clearance	248.8(169.0)	9.2(6.2)	0.9(0.5)	0.3(0.2)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.3(0.1)	0.3(0.1)
Fecal clearance	43.6(40.3)	4.0(2.5)	3.1(1.7)	3.6(1.8)	5.5(2.6)	9.2(4.1)	33.9(17.6)	106.0(46.6)
Total clearance b	292.5(153.8)	13.1(7.4)	4.0(1.7)	3.9(1.8)	5.7(2.6)	9.4(4.1)	34.2(17.6)	106.3(46.6)
Female (N=9)								
Urinary clearance	166.7(76.0)	6.6(3.8)	0.9(0.5)	0.3(0.2)	0.1(0.1)	0.1(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)
Fecal clearance	23.5(21.7)	2.4(1.5)	1.5(1.0)	1.9(1.1)	2.9(1.7)	5.1(3.2)	16.9(12.0)	48.5(38.1)
Total clearance b	190.2(21.7)	9.0(1.5)	2.4(1.0)	2.2(1.1)	3.1(1.7)	5.2(3.2)	17.1(12.0)	48.7(38.1)
Total (Male; N=9, Female; N=9)								
Urinary clearance	207.8(133.9)	7.9(5.1)	0.9(0.4)	0.3(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.2(0.1)	0.3(0.1)
Fecal clearance	33.6(33.1)	3.2(2.2)	2.3(1.6)	2.7(1.7)	4.2(2.5)	7.1(4.1)	25.4(17.1)	77.3(50.8)
Total clearance b	241.4(128.6)	11.1(6.3)	3.2(1.7)	3.0(1.7)	4.4(2.5)	7.3(4.2)	25.6(17.1)	77.5(50.8)
c. Theoretical absorbed portions from the gut <sup>d</sup> (% of administrated dose)								
Male	94.1	98.7	99.1	99.2	99.3	99.4	97.5	94.4
Female	104.4	99.8	100.0	100.0	100.0	99.9	99.0	97.6
Total	98.3	99.2	99.5	99.6	99.6	99.6	98.2	96.0

Values are mean (SD).

a) PFCAs which eliminated between 0 to 24hr after gavage administration (gavage dose: 3.13  $\mu$ mol/kg)

b) Sum of urinary clearance and fecal clearance

c) PFCAs which eliminated between 0 to 24hr after IV administration. (IV dose: 0.313  $\mu$ mol/kg)

d) See text (Section 3.3)

表9. Urinary, biliary and fecal clearances of PFCAs in humans

(mL/day/kg) <sup>b</sup>	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
Urinary clearance (Male=5, Female=5)	0.674(0.374)	0.044(0.01)	0.038(0.01)	0.015(0.01)	0.005(0.00)	0.005(0.00)	0.006(0.01)	< MDL <sup>d</sup>
Biliary clearance (Male=3, Female=2)	<MDL <sup>c</sup>	2.62(3.6)	1.20(1.2)	2.51(2.1)	3.02(3.0)	3.27(3.2)	3.57(3.3)	11.22(4.4)
Estimated fecal clearance <sup>a</sup>	-	0.052(0.05)	0.024(0.02)	0.050(0.04)	0.060(0.04)	0.065(0.04)	0.071(0.05)	0.224(0.20)
Total Clearance (Urinary clearance + Estimated fecal clearance)	0.674	0.096	0.062	0.066	0.065	0.070	0.077	0.224

Values are mean (SD).

a) See text (section 3.5)

b) calculated by assuming human body weight as 50kg,

c) PFHpA concentration in bile are less than method detection limits.

d) PFTeDA concentration in human urine are less than method detection limits.

表10. Concentration gradients of PFCAs between the serum and brain in mice and the serum and CSF in humans

Compound (carbon atoms)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUnDA (C11)	PFDoDA (C12)	PFTrDA (C13)	PFTeDA (C14)
a. Whole Brain tissue in mice (Male N=9, Female N=9) <sup>b</sup>								
Brain tissue concentration (pmol/g) <sup>b</sup>	4(3)	25(7)	66(23)	66(23)	93(29)	82(23)	104(28)	97(27)
Brain /Serum ratio	<MDL(Serum)	0.015(0.01)	0.059(0.02)	0.059(0.02)	0.125(0.03)	0.211(0.06)	0.360(0.12)	0.413(0.15)
b. Cerebral spinal fluids in Human (Male N=6, Female N=1)								
Total								
CSF concentration (pg/mL)	<5.6	50.8(19.1)	18.2(8.1)	9.1(6.7)	19.4(25.7)	2.2(2.3)	3.3(3.9)	0.8(0.7)
CSF/Serum ratio	n.d.(n.d.)	0.021(0.013)	0.015(0.012)	0.015(0.016)	0.010(0.012)	0.016(0.022)	0.011(0.011)	0.025(0.024)
hydrocephalus (Male N=4)								
CSF concentration (pg/mL)	<5.6	36.7(8.8)	13.8(7.4)	5.6(3.9)	5.8(2.7)	0.5(0.0)	1.0(1.0)	0.4(0.2)
CSF/Serum ratio	n.d.(n.d.)	n.s. 0.013(0.005)	n.s. 0.007(0.003)	n.s. 0.005(0.002)	n.s. 0.003(0.003)	* 0.003(0.001)	n.s. 0.003(0.003)	* 0.011(0.005) n.s.
cerebral hemorrhage and liquorrhoea (Male N=2, Female N=1)								
CSF concentration (pg/mL)	<5.6	69.6(7.0)	24.1(5.0)	13.8(7.4)	37.4(33.5)	4.4(1.6)	6.5(4.1)	1.3(0.7)
CSF/Serum ratio	n.d.(n.d.)	n.s. 0.031(0.015)	n.s. 0.025(0.012)	n.s. 0.029(0.015)	n.s. 0.020(0.012)	* 0.035(0.024)	n.s. 0.021(0.008)	* 0.045(0.025) n.s.

Values are mean (SD).

a. Brain tissues are collected after 24hr IV injection. (IV dose: 0.313 μmol/kg)

b. \* indicates values are significantly different between the CSF/Serum ratios (p<0.05 by Student's t test)

表 1 1. Levels of PFCAs in human urine and bile

a. Urine-Serum pair

		Compound (carbon atoms)							
(Male=5, Female=5)		PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	PFTTrDA	PFTeDA
		(C7)	(C8)	(C9)	(C10)	(C11)	(C12)	(C13)	(C14)
Urine	ng/day	2.72(1.27)	13.15(5.46)	1.80(0.60)	0.26(0.20)	0.25(0.21)	0.02(0.02)	0.04(0.07)	<0.01
Serum	ng/mL	0.07(0.05)	5.96(2.82)	0.95(0.34)	0.33(0.11)	0.96(0.37)	0.07(0.03)	0.15(0.05)	0.01(0.01)

b. Bile-Serum pair

		Compound (carbon atoms)							
(Male=3, Female=2)		PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	PFTTrDA	PFTeDA
		(C7)	(C8)	(C9)	(C10)	(C11)	(C12)	(C13)	(C14)
Bile	ng/day	<332	562(300)	125(105)	134(156)	385(441)	54(64)	90(112)	37(38)
Serum	ng/mL	0.21(0.11)	8.17(7.78)	2.35(1.78)	1.23(1.39)	2.79(2.81)	0.31(0.29)	0.44(0.44)	0.06(0.02)

Values are mean (SD).

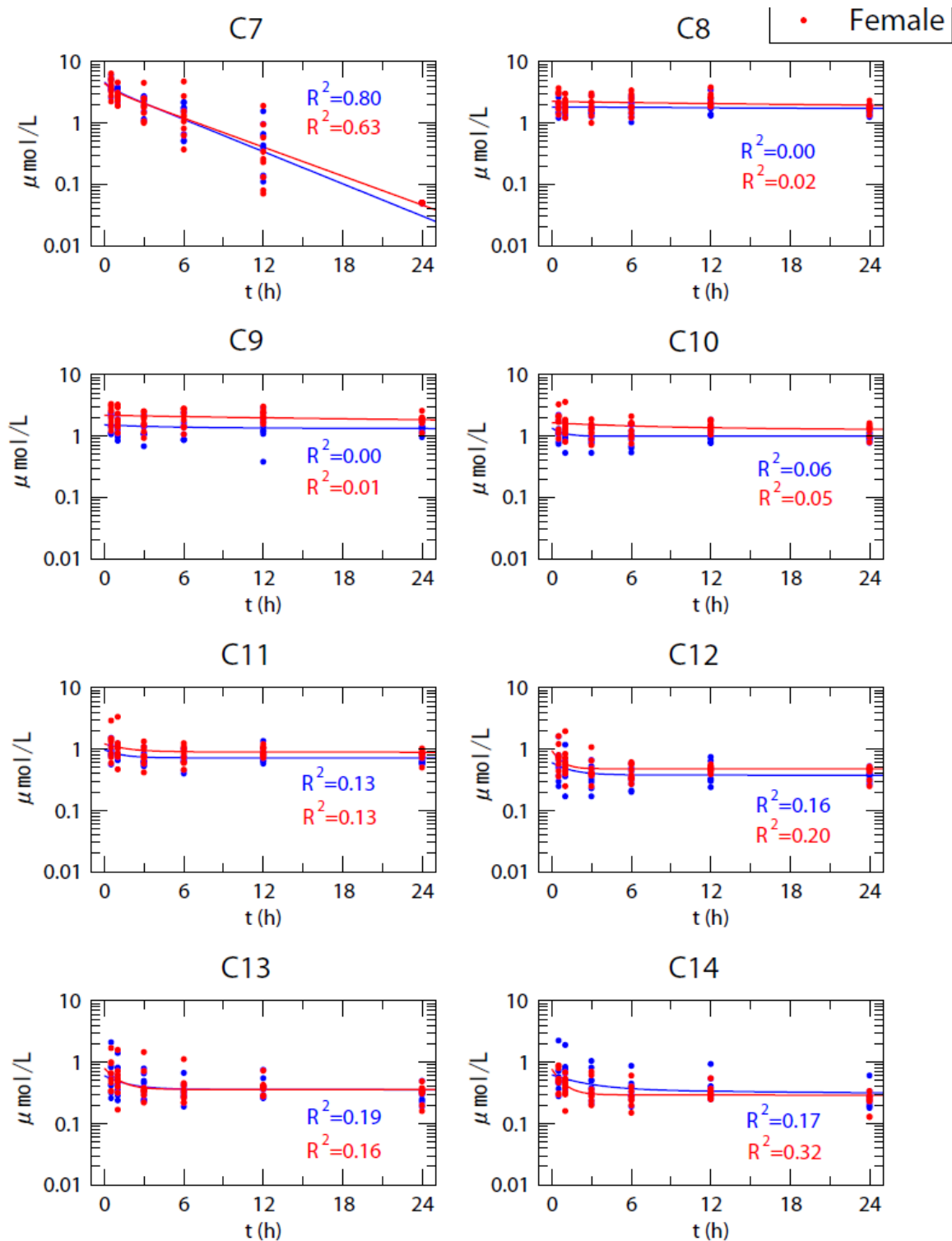
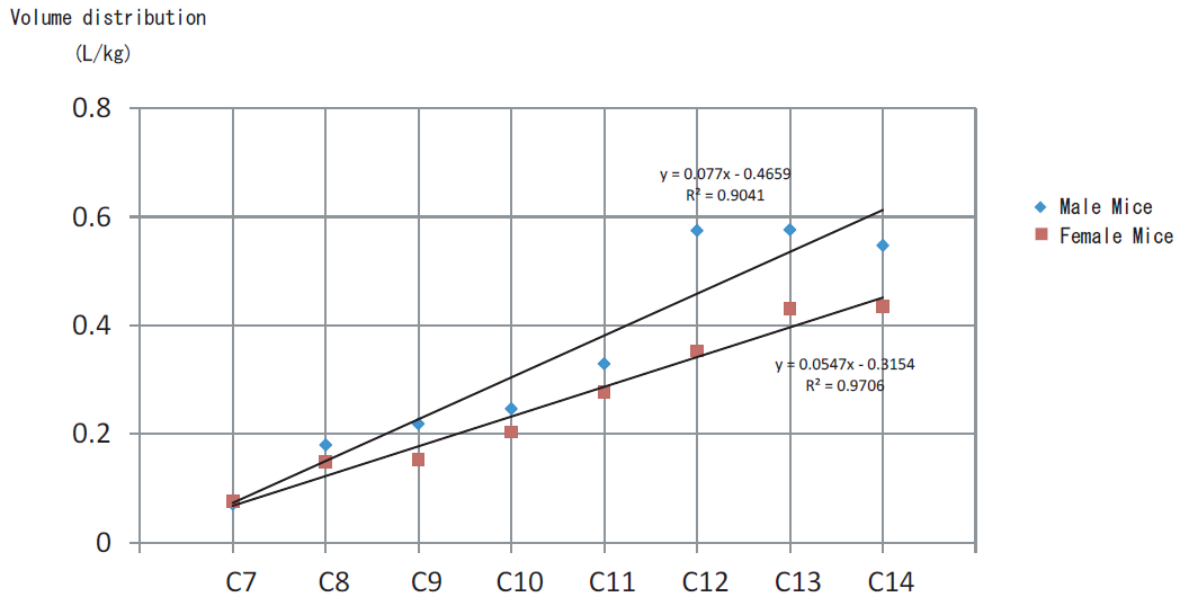


图 1. Simulated serum concentrations in mice after IV administration (0 to 24 hr).

Values derived from 表 1.

Dots indicate the observed values with IV administration.



☒ 2. Volume distribution of IV administered PFCAs in male and female mice

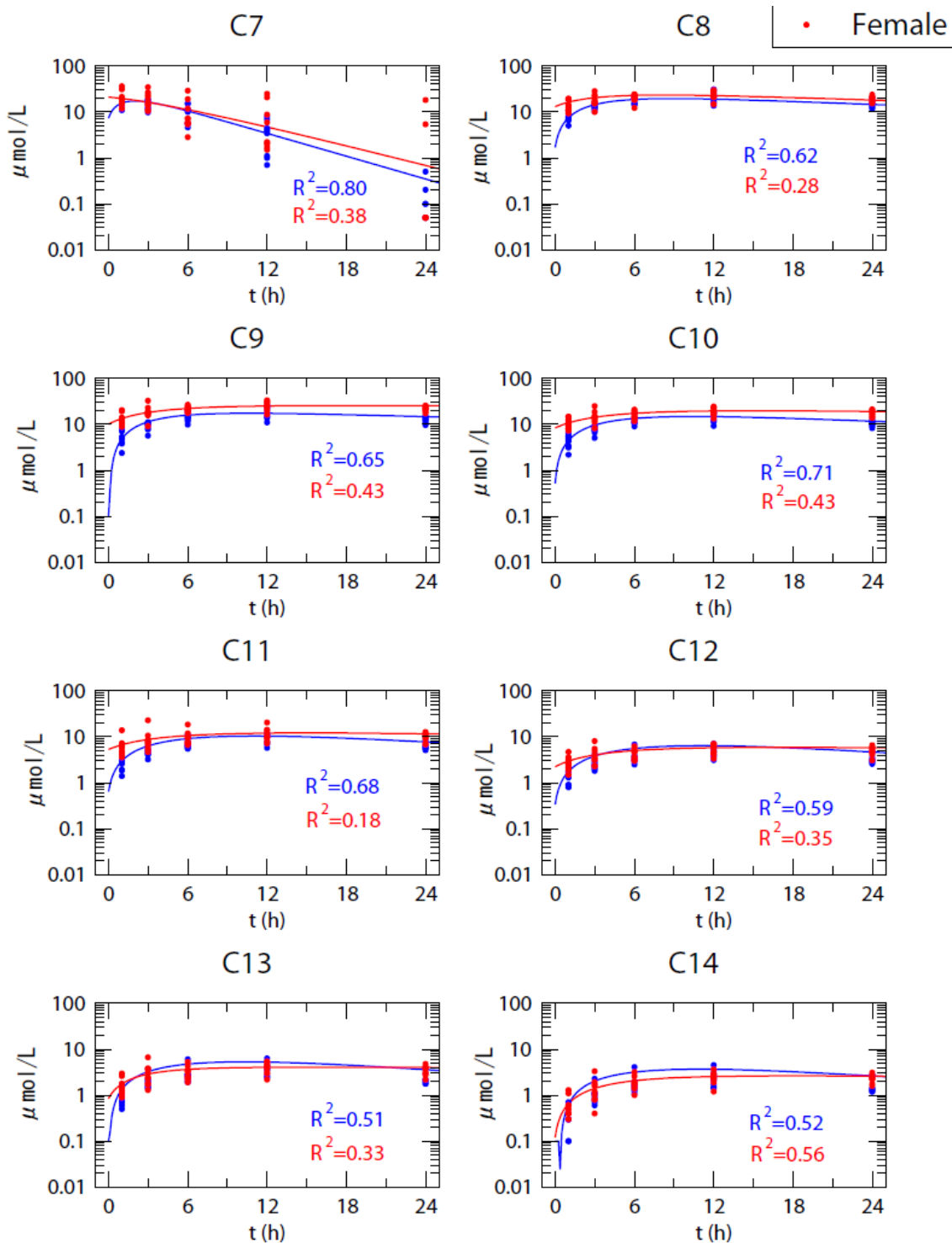
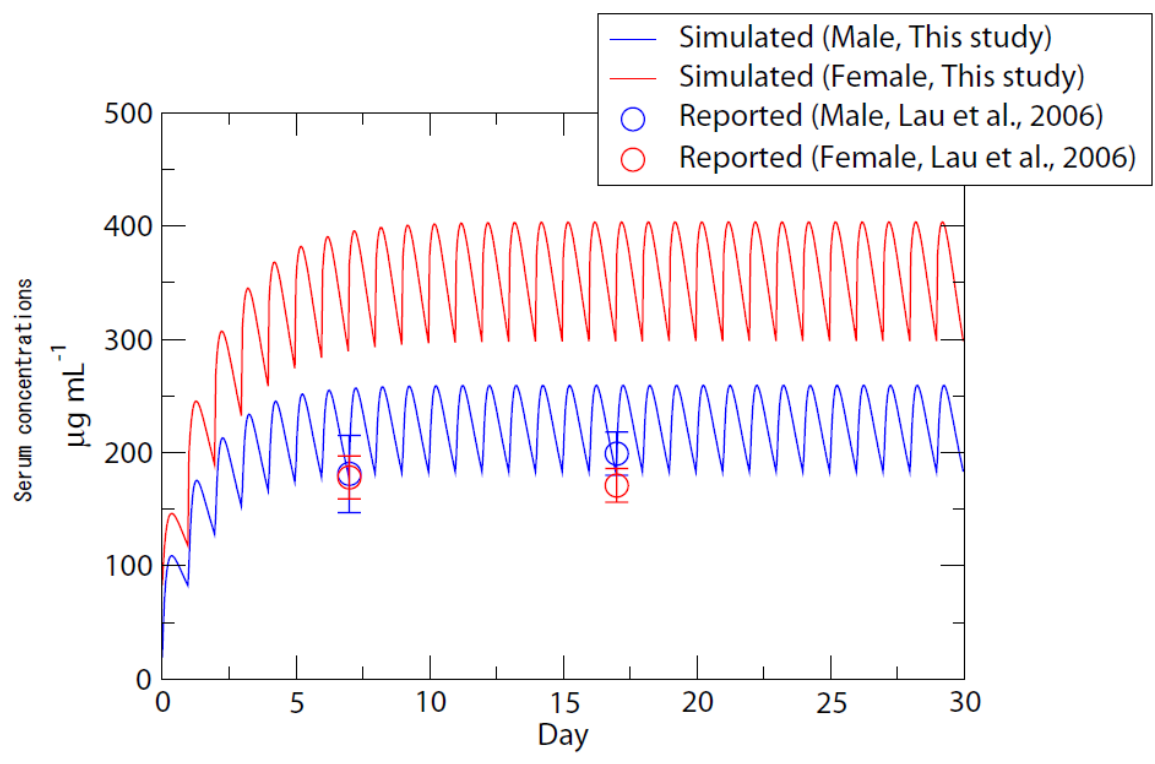


图 3. Simulated serum concentrations in mice after gavage administration (0 to 24 hr).

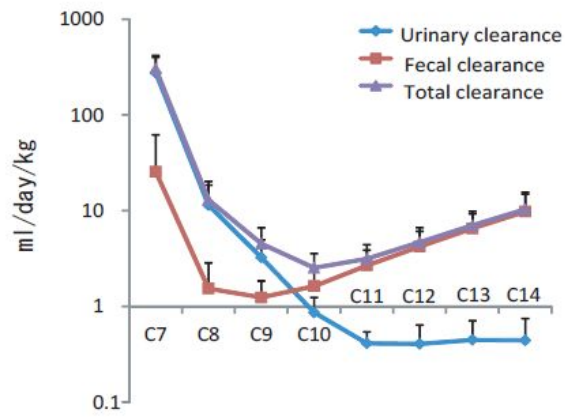
Values derived from 表 1.

Dots indicate the observed values with gavage administration.

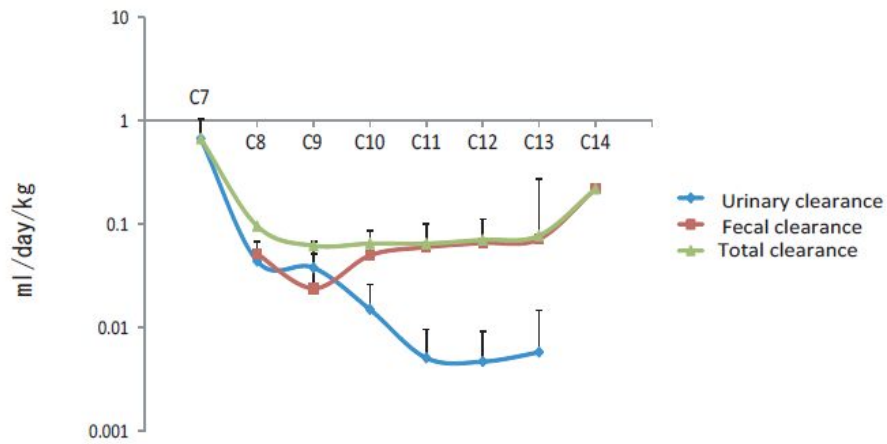


☒ 4. Simulated serum PFOA levels with repeated daily dosing

a. Mice PFCA clearances (IV administration)



b. Human PFCA clearances



c. Comparison of PFCA clearances in mice and human

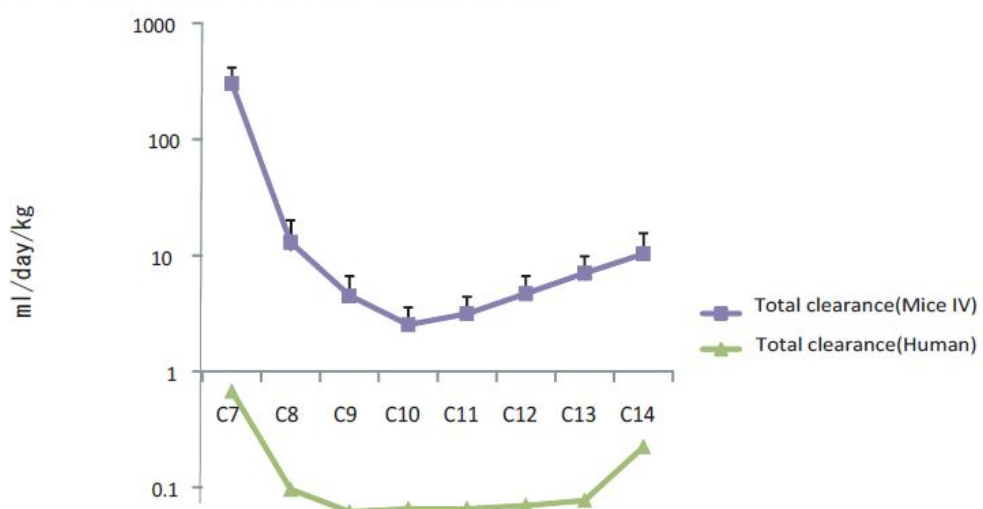


图 5. PFCA clearances in mice and humans



## マウスを用いた母乳中PFCA分泌割合の検討

研究代表者 小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科・教授  
研究分担者 原田 浩二 京都大学大学院医学研究科・准教授  
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

有機フッ素カルボン酸(PFCAs)は環境中に検出される汚染物質である。ヒトにおいても血清を始め母乳中からも炭素鎖が異なる PFCA 類の検出が確認されているが、血清から母乳への移行係数についての検討はされていない。本研究では PFOA(C8)を含む炭素鎖 5 から 13 (C5-C13)の PFCA 類に注目しマウスを用いて母乳中への分泌を評価した。投与 24 時間後のマウスの血清中と母乳中の PFCAs の移行係数 (母乳中 PFCAs/血清中 PFCAs) は C7 が 1.56 最も高く、C8 から C13 までは 0.22 から 0.54 の幅に収まった。(C8:0.36, C9:0.34, C10:0.22, C11:0.23, C12:0.35 C13:0.54)。このように炭素鎖長で大きく異なり、短鎖 PFCAs (C7)と中長鎖 PFCAs(C8-C13)の間には血中からの分泌において大きな差があることが確認された。

### A. 研究目的

有機フッ素カルボン酸(PFCA 類)は環境中に検出される汚染物質である。近年、主たる汚染物質である PFOA(炭素鎖 8, C8)以外の炭素鎖長の異なる類縁物質 (炭素鎖 9~14, C9~C14)の血清中増加が東アジア地域において見られている(Harada et al., 2011)。

PFOA 曝露が乳児の発達に与える影響について近年多くの研究がなされてきた。その中で、乳児の曝露経路として母乳を介する経路が注目されている。しかし、母体血中から母乳への移行の動態について十分な知見がない。我々の報告では、母乳中からも炭素鎖が異なる PFCA 類(C8-C13)を検出しており(Fujii et al., 2012)、異なる炭素長の有機フッ素カルボン酸の

母体から母乳への移行を評価する必要がある。しかしながら、比較的先行研究が豊富な PFOA(C8)を除き、PFCAs の母乳中への移行割合は現在まで明らかにされていない。

本研究の目的は、マウスを用いて、化学物質の母乳中への移行動態を評価する手法を開発することである。

### B. 研究方法

本研究計画は京都大学動物実験委員会で承認されている。

出産14-9日後の野生型FBV/Nマウスの雌 (n=4) に PFCAs(C5-C14) 各 3.17nmol/gを尾静脈注射投与した。マウス用搾乳機の詳細は写真1に示す。24時間後に麻酔下で搾乳を行った。一匹のマウスから約10分の作業で約1-2mlの母乳を採取し(写真2)、直

後に血清を回収した。検体に対してイオンペア抽出、誘導体化後ガスクロマトグラフィー・質量分析法により各PFCAs濃度を測定した。

## C . 研究結果

結果は Table1 に示す。マウス血清中 PFCAs は C8 をピークに短鎖(C7)もしくは長鎖(C9-C13)ほど低い濃度になった(nmolg/ml-serum; C7:1.43, C8:15.56, C9:13.71, C10:3.82, C11:3.47, C12:1.22, C13:0.68)。母乳中 PFCAs も同様の傾向を示した(nmolg/ml-milk; C7:2.16, C8:5.58, C9:4.73, C10:0.79, C11:0.66, C12:0.39 C13:0.30)。母乳中へのPFCAs 分泌割合(母乳/血清)は C7 が 1.56 最も高く、C8 から C13 までは 0.22 から 0.54 の幅に収まった。(C8:0.36, C9:0.34, C10:0.22, C11:0.23, C12:0.35 C13:0.54)。

## D . 考察

投与 24 時間後のマウスの血清中と母乳中の PFCAs の関係(母乳中PFCAs/血清中PFCAs)は C7 (1.56)と C8-C13(C8:0.36, C9:0.34, C10:0.22, C11:0.23, C12:0.35 C13:0.54)と両者の間で大きく異なり、短鎖 PFCAs (C7)と中長鎖 PFCAs(C8-C13)の間には血中からの分泌において大きな差があることが確認された。

また PFOA(C8)のみについて母乳中分泌の検討を行った先行研究(Fenton te al., 2009)では、分泌割合は 37%であり、今回の 36%に近い数値となっており、本研究の妥当性が検証された。

## E . 結論

本研究ではマウスの搾乳に成功し、母乳中PFCAs分泌割合の検討を行った。結果として投与24時間後の母乳中PFCAs/血清中PFCAsは短鎖PFCAs(C7: 156%)と中長鎖PFCAs(C8-C13(54-22%))と両者の間で大きく異なることが確認された。今後は投与されたPFCAsの他の臓器への分配を含めた評価が必要とされる。

## 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

- Harada, K.H., Hitomi, T., Niisoe, T., Takanaka, K., Kamiyama, S., Watanabe, T., Moon, C.S., Yang, H.R., Hung, N.N., Koizumi, A., 2011. Odd-numbered perfluorocarboxylates predominate over perfluorooctanoic acid in serum samples from Japan, Korea and Vietnam. *Environ Int* 37, 1183-1189.
- Fujii Y, Yan J, Harada KH, Hitomi T, Yang H, Wang P, Koizumi A. 2012. Levels and profiles of long-chain perfluorinated carboxylic acids in human breast milk and infant

formulas in East Asia.  
Chemosphere 86, 315-321.  
Fenton SE, Reiner JL, Nakayama SF,  
Delinsky AD, Stanko JP, Hines EP,  
White SS, Lindstrom AB, Strynar  
MJ, Petropoulou SS. 2009. Analysis

of PFOA in dosed CD-1 mice. Part 2.  
Disposition of PFOA in tissues and  
fluids from pregnant and lactating  
mice and their pups. Reprod Toxicol.  
27:365-72

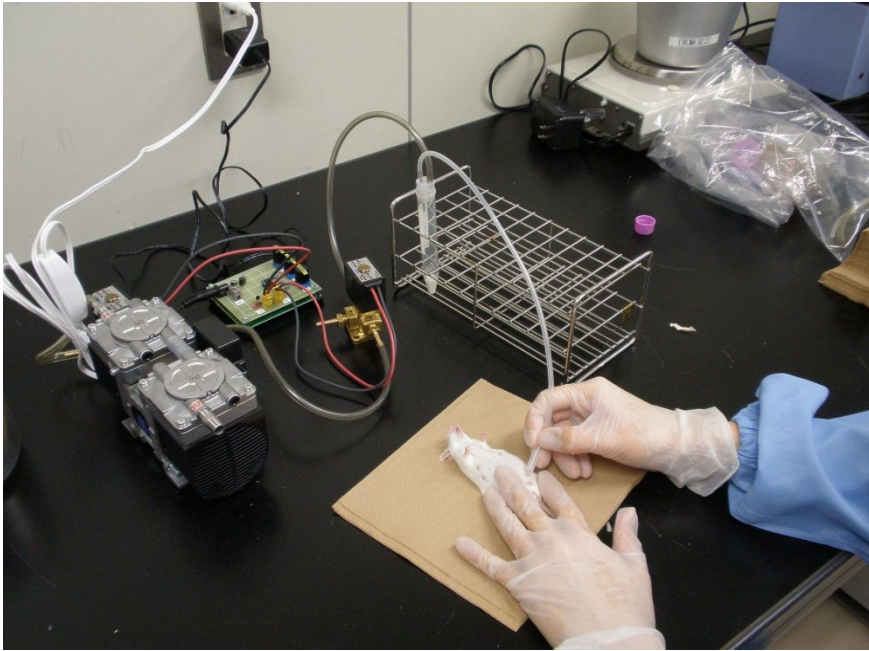


写真 1. マウス搾乳機

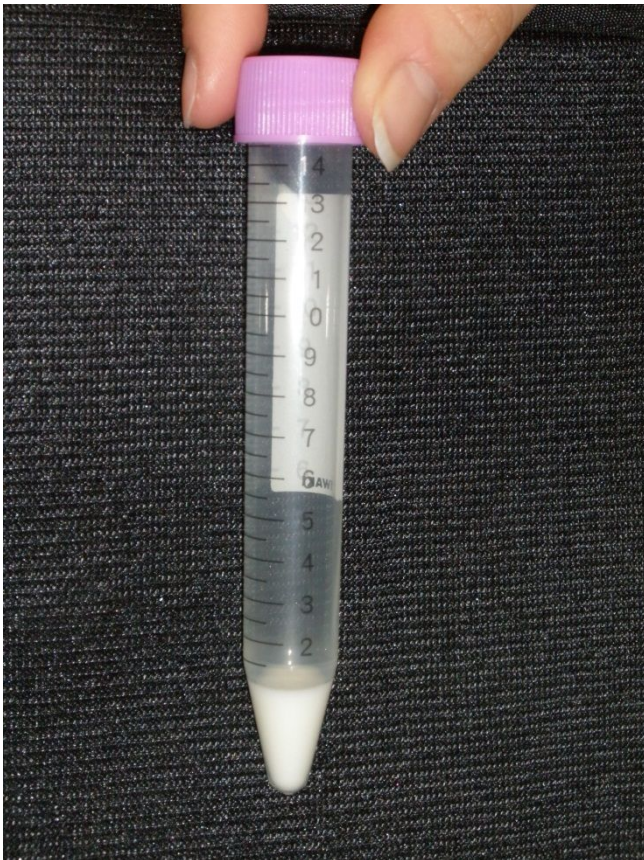


写真 2. 採取されたマウス母乳