

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

**生体試料バンクを有効活用した
食品および母乳の継続的モニタリング**

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者・ 小泉 昭夫
京都大学大学院医学研究科

平成 27 (2015) 年 5 月 1 日

目 次

I . 総括研究報告

生体試料バンクを有効活用した食品および母乳の継続的モニタリング 小泉 昭夫	----- 1
--	---------

II . 分担研究報告

1. 汚染が懸念される物質のモニタリング (1) 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 小泉 昭夫	-----16
2 . 汚染が懸念される物質のモニタリング (2) 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 原口 浩一 (藤井 由希子)	-----38
3. 汚染が懸念される物質のモニタリング (3) 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 原口 浩一 (藤井 由希子)	-----48
4 . 汚染が懸念される物質のモニタリング (4) 生体試料バンクの保存試料を使用した食事経由の PFCA _s 摂取量と血清中濃度の動向調査 小泉 昭夫	----- 58
5 . 汚染が懸念される物質のモニタリング (5) 炭素鎖の異なる有機フッ素カルボン酸と魚類摂取と関連の不飽和脂肪酸による検討 小泉 昭夫	----- 69

6. 系統的持続的な試料の収集と他機関への試料の提供 -----72

小泉 昭夫

原田 浩二

小林 果

(人見 敏明)

(新添 多聞)

() は研究協力者。

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 75

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 76

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）
総括研究報告書

生体試料バンクを有効活用した食品および母乳の継続的モニタリング

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：

平成23年3月11日に我が国は、東日本大震災という未曾有の災害に見舞われ、同3月15日には福島第一原子力発電所の爆発事故が発生し、東北地域における食糧生産に大きな影響を与えることになった。震災はまた、放射能のみならず化学物質による汚染も引き起こし、多くの国民が重大な懸念を抱いている。平時でも、我が国の食料自給率はカロリーベースで40%程度であり、震災後はより多くを海外に依存している現状がある。食の安全を確保するために、ポジティブリスト制度が導入されたが、実際に検査されるのは約10%であり、諸外国での不正な使用が行われてきたDDTなどのPOPs(Persistent organic compounds：難分解性残留汚染物質)などは捕捉できない可能性がある。適切なリスク管理には、主な生産国および我が国でのランダムサンプリングによる食事からの曝露評価も活用することが必要である。また特殊な事例として乳児に関しては、母乳を通じた間接的な曝露評価を行うことも必要になる。

我々の研究目的は、生体試料バンクを有効活用し、東日本大震災以降の食の化学物質汚染への国民の不安に対して科学的に妥当な情報を提供するとともに、引き続き継続モニタリングを行い、食の安全と安心の基盤を強化することである。

平成26年度においては、近年使用が増加しているネオニコチノイド農薬を含む汚染が懸念される物質の継続的モニタリング、持続的な試料の収集、摂取した汚染物質の体内動態モデリング、および試料のバンキングについて理解を得るためのフォーラムの諸活動を行った。

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	原口 浩一	第一薬科大学薬学部・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	人見 敏明	京都大学大学院医学研究科・特定研究員
研究協力者	藤井 由希子	第一薬科大学薬学部・助教
研究協力者	新添 多聞	京都大学医学研究科・特定研究員

1. 汚染が懸念される物質のモニタリング

(1) 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

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。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。食品安全委員会農薬評価書では日本人の平均推定摂取量はイミダクロプリド307 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ 、クロチアニジン206 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ 、チアメトキサム265 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ 、ジノテフラン713 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ とされている。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した。

京都府下健康な男女373名の随時尿試料の採取を行った。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った。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った。

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 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ 程度と5 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ 程度に分けることで、用量反応関係を評価した。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 μ 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。非重水素標識ネオニコチノイド(2 μ gの単回経口投与)を使用して、健康成人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。

尿試料は、京都大学生体試料バンクで分析まで-30 $^{\circ}$ C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)。

・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。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。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。

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 μ g瞬時投与後96時間で観察された尿中排泄を動態モデルに当てはめてパラメータを得た。

2 μ 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、動態モデルに基づいて推定1.26 \pm 1.12、1.58 \pm 3.37、5.18 \pm 6.40、および2.93 \pm 12.4 μ 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。平均排出量としてはジノテフランが3.29 µg/day、デスメチルアセタミプリドが1.14 µg/day、クロチアニジンが0.51 µg/dayとなり、ついでイミダクロプリドが0.07 µg/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。

これを摂取量に換算するとジノテフランが3.66 µg/day、アセタミプリドが1.94 µg/day、クロチアニジンが0.86 µg/dayとなり、ついでイミダクロプリドが0.53 µg/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64.5µg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15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、出産回数と関連していた。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関連していた。野菜類とは、ジノテフラン、イミダクロプリドが関連していた。またジノテフランは穀類摂取量とも関連していた。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でクロチアニ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。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。相関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。

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。

2. 汚染が懸念される物質のモニタリング

(2) 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

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。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) とテトラブROM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。

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、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

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。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- β -HBCD を添加した。

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。全試料中で HBCD 異性体の α -HBCDs、 β -HBCDs および γ -HBCDs はそれぞれ100%、91%、64%の割合で検出された。 α -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 β -HBCD と γ -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、 α -HBCDの割

合が高いことは先行研究と一致している。今回の α -HBCDの平均濃度(2008-2010年の母乳試料)は先行研究よりも高く、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。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。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が報告されている。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。TBBP-Aは α -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)よりも高く、イギリスやフランスと同程度であった。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)、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)とも同程度であった。

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 β -HBCDと α 及び γ -HBCDとの間に相関は見られなかつ

たが、 β -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 γ -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、 γ -HBCDにおいてのみ正の相関が見られた。TBBP-A、 γ -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($p > 0.05$)。

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 α -HBCDが最も高濃度であったが、 β -HBCDはフェノール性BFRと相関を示し、 γ -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。

3. 汚染が懸念される物質のモニタリング

(3) 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

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、我々は本研究課題で、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。汚染が懸念されるトリクロロサン (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。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。TCS は、動物実験で内分泌かく乱性が指摘されている。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。日本における魚介類からも TCS が検出され、ヒトの食事からの摂取量が推定されている。欧米ではヒトの血清や母乳中で TCS 残留の報告がなされ、継続的なモニタリングと毒性評価が行われている。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

血清収集

京都大学ヒト生体試料バンクに保

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。この研究に関するプロトコル(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。

C . 研究結果

血清中の TCS (PFB 誘導体)

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 ($p < 0.001$)。

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、 β -HCH および α -endosulfan 濃度は $< LOQ \sim 0.66$ 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。

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では、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 濃度との相関係数は、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

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 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。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。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、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。ラット授乳による仔の TCS の NOAEL は 50mg/kg/day とされており、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

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。

4. 汚染が懸念される物質のモニタリング

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

A. 研究目的

有機フッ素化合物のペルフルオロアルキルカルボン酸類(PFCAs)は環境中、生体中で分解不可能でありその多くは環境中に残留する。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。

PFCAs の血清中濃度の経年変化についてはいくつかの先行研究で、2000 年前後からの増加が見られている。現在まで PFCAs 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、曝露管理の視点から食事の PFCAs 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、食事中 PFCAs 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 PFCAs 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、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 の測定を行った。

B. 研究方法

京大生体試料バンクの保存試料を使用した。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。

C. 研究結果

1. 食事経由のPFCAs摂取量

食事試料の添加回収試験の結果はC8、C9、C10、C11、C12、C13、C14について、それぞれ72±11%、73±15%、79±7%、83±5%、91±11%、89±12%、104±20%であった。

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。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が上回っていた。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。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。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±12%、94±8%、87±6%、95±7%、96±5%、99±6%、106±7%であった。

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。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)。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。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。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、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。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。体重50kgと仮定し、1-コンパートメントモデルで評価した場合、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。

5. 汚染が懸念される物質のモニタリング

(5) 炭素鎖の異なる有機フッ素カルボン酸と魚類摂取と関連の不飽和脂肪酸による検討

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。近年ペルフルオロオクタノ酸PFOA(C8)以外の長鎖PFCAs類（C9-C13）の血中での増加が認められた。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。

C. 研究結果

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。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。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。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は陰膳食事中で検出され、食事が主要な曝露源であると考えられる。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。

結論として健康な男女血清中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。

6. 系統的持続的な試料の収集と他機関への試料の提供

A. 研究目的

POPsのリスク評価に向けたヒト曝露の長期モニタリングのための試料バンクの創設が2003年に行われた。以降、試料の継続的な収集が続いている。今年度は生物学的モニタリングを実施するため、国内の成人男女を対象に尿試料を収集し、ヒト生体試料バンクに収納・登録した。

バンクの試料は他機関の研究者の申請に応じて、提供を行ってきた。

また試料の利用を推進するため、環境化学研究者が参加する学術集会でフォーラムを行った。

B. 研究方法

京都大学大学院医学研究科・医学部および医学部附属病院 医の倫理委員会より、E25「POPsのリスク評価に向けてのヒト曝露長期モニタリングのための試料バンク創設に関する研究」の研究計画の承認を得て、本研究は実施された。

尿試料

尿試料は、これまでの継続性を考慮して、京都府京都市、宇治市にて収集した。京都府ではこれまでに1990年代、2000年代にかけて血清試料および食餌試料に加えて、尿試料も収集されている。以上の点から採取対象地域とした。大学生、市民を対象とした健康推進企画において、研究の趣旨を説明して、協力に前向きな参加者に、対面での口頭説明を加え、同意書に書面にて同意を頂いた方を対象とした。

またこの際にこれまでの研究の成果についても紹介する講演を行った。

他機関への試料の提供

食事からの農薬摂取を評価する目的で、名古屋大学へ尿試料102検体(1990年代～2010年)を提供した。

食事からの臭素系難燃剤の摂取を評価するため、血清試料120検体(2007年～2010年)を第一薬科大学に提供した。

食事からの塩素系農薬の摂取を評価するため陰膳食事試料55検体(2011年)を大阪府立公衆衛生研究所に提供した。

バンクの利用の促進

2014年5月15日に京都大学で開催された第23回日本環境化学会討論会において、京都大学生体試料バンク：現在までの成果と現状および将来についてのフォーラムを行った。

C. 研究結果

試料の収集

平成 26 年度を通じて、京都市、宇治市において尿試料 294 検体を収集した。

他機関への試料の提供

第一薬科大学に提供した血清試料 120 検体（2007 年～2010 年）の分析結果は本報告書に記載した。

名古屋大学へ提供した尿試料 102 検体（1990 年代～2010 年）は分析が完了した。

大阪府立公衆衛生研究所へ提供した陰膳食事試料 55 検体（2011 年）は分析が進行中である。

バンクの利用の促進

フォーラムで紹介し、利用の問い合わせが 3 件あり、1 件は提供を実施し、他の問い合わせについては詳細について検討を行っている。

D. 考察

国内での血液、母乳、食事、尿の各検体の採取は 2003 年度の試料バンク創設からほぼ同一方法で行われた。2014 年度の試料収集ではこれまでの対象地域で継続することを基本とした。協力機関への依頼、参加が得られ、当初の目標通りに収集がなされた。

尿試料は生物学的モニタリングにより食事試料からのデータを補完する目的で採取されており、一定の年齢層を対象に提供を依頼し、当初の予定の通り収集できた。

検体の収集に当たってはこれまで生体試料バンクに収集された試料を考え、それに相応する機関、個人に協力をお願いしたことで、試料のほとんどが目標通りに実施できたことが確

かめられた。また、倫理面にも十分に対応を施した検体収集を進めることができた。

また各汚染物質の専門的分析を行う他機関に試料を提供することで食の安全に関する研究の推進に資することができた。

拡充された試料バンクは食品衛生、環境保健研究者へ提供できると期待される。

初期の全体計画に沿って尿 294 検体が収集された。検体収集にはそれぞれの専門的な機関に全面的な協力を得て実施できた。その結果、将来のモニタリングの土台となる試料収集と収納および関連するライフスタイル情報が収載できた。

他機関へ、陰膳食事試料 55 検体、尿試料 102 検体、血清試料 120 検体の提供を試料バンクから行った。

E. 総括の結論

本研究の目的である継続的な食事から摂取する汚染化学物質のモニタリング、そのための分析手法の検討、動態モデリング、系統的持続的な試料の収集、試料を使用する専門家とのコミュニケーションについて、当初の予定の通りに実施できた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fujii, Y.; Sakurada, T.; Harada, K. H.; Koizumi, A.; Kimura, O.; Endo, T.; Haraguchi, K.

- Long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in Pacific cods from coastal areas in northern Japan: A major source of human dietary exposure. *Environ Pollut* 2015, 199, 35-41.
- (2) Zhao, C.; Fujii, Y.; Yan, J.; Harada, K. H.; Koizumi, A. Pentafluorobenzyl esterification of haloacetic acids in tap water for simple and sensitive analysis by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization. *Chemosphere* 2015, 119C, 711-718.
- (3) Fujii, Y.; Niisoe, T.; Harada, K. H.; Uemoto, S.; Ogura, Y.; Takenaka, K.; Koizumi, A. Toxicokinetics of perfluoroalkyl carboxylates with different carbon chain lengths in mice and humans. *J Occup Health* 2015, 57, 1-12.
- (4) Yan, J.; Inoue, K.; Asakawa, A.; Harada, K. H.; Watanabe, T.; Hachiya, N.; Koizumi, A. Methylmercury monitoring study in Karakuwacho peninsula area in Japan. *Bull Environ Contam Toxicol* 2014, 93, 36-41.
- (5) Matsubara, F.; Sagara, Y.; Kato, Y.; Harada, K.; Koizumi, A.; Haraguchi, K. Detection of antibodies to human T-cell leukemia virus types 1 and 2 in breast milk from East asian women. *Biol Pharm Bull* 2014, 37, 311-314.
- (6) Harada, K. H.; Niisoe, T.; Imanaka, M.; Takahashi, T.; Amako, K.; Fujii, Y.; Kanameishi, M.; Ohse, K.; Nakai, Y.; Nishikawa, T.; Saito, Y.; Sakamoto, H.; Ueyama, K.; Hisaki, K.; Ohara, E.; Inoue, T.; Yamamoto, K.; Matsuoka, Y.; Ohata, H.; Toshima, K.; Okada, A.; Sato, H.; Kuwamori, T.; Tani, H.; Suzuki, R.; Kashikura, M.; Nezu, M.; Miyachi, Y.; Arai, F.; Kuwamori, M.; Harada, S.; Ohmori, A.; Ishikawa, H.; Koizumi, A. Radiation dose rates now and in the future for residents neighboring restricted areas of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111, E914-923.
- (7) 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.
- (8) Fujii, Y.; Harada, K. H.; Hitomi, T.; Kobayashi, H.; Koizumi, A.; Haraguchi, K. Temporal trend and age-dependent serum concentration of phenolic organohalogen contaminants in Japanese men during 1989-2010. *Environ Pollut* 2014, 185, 228-233.
2. 著書
なし
3. 学会発表
- (ア) 小泉昭夫、京都大学生体試料バンク：現在までの成果と現状および将来。第23回 日本環境化学会討論会、2014年5月14-16日 京都大学。
- (イ) 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 京都大学.
- (ウ) 原田浩二、今中美栄、桑守豊美、尼子克己、藤井由希子、藤原登司一、新添多聞、人見敏明、小泉昭夫. 福島県相双地方3地域における放射性セシウムの経口、経気摂取量調査. 第84回 日本衛生学会総会、2014年5月25-27日.岡山コンベンションセンター.
- (エ) 趙山、原田浩二、藤井由希子、巖俊霞、人見敏明、小泉昭夫. フルオロベンジル誘導体化による水道水中ハロ酢酸類の簡便・高感度GC-NCI-MS分析法. 第84回 日本衛生学会総会、2014年5月25-27日.岡山コンベンションセンター.
- (オ) 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 (PFCA) の経年変化 (1980-2010年代). 第84回 日本衛生学会総会、2014年5月25-27日.岡山コンベンションセンター.
- (カ) 今中美栄、坂本裕子、尼子克己、上山恵子、久木久美子、原田浩二、小泉昭夫. 福島県川内村帰村支援における食事調査結果から～帰村宣言より2年間の栄養評価と推移～. 第61回 日本栄養改善学会学術総会、2014年9月20-22日.
- (キ) 要石真利、藤原登司一、大原栄二、今中美栄、原田浩二、小泉昭夫. 福島県相馬市玉野地区および南相馬市原町区における原発事故後の栄養摂取状況. 第61回 日本栄養改善学会学術総会、2014年9月20-22日.
- (ク) 山本佳奈子、井上登紀子、大畑仁美、今中美栄、原田浩二、小泉昭夫. 福島県川内村帰村住民の食環境に関する質問紙調査結果(第2報). 第61回 日本栄養改善学会学術総会、2014年9月20-22日.
- (ケ) Toyomi Kuwamori, Yoko Miyaji, Masanori Kuwamori, Kouji Harada, Akio Koizumi. Investigating The Effect Of Food Preparation On Reducing Radioactive Cesium-137 Concentrations Of Foods In Fukushima. The 6th Asian Congress of Dietetics. 2014年8月21-24日, Taipei.
- (コ) 武蔵正明、廣野留都、伊永隆史、原田浩二、小泉昭夫、ヒト血清中アミノ酸の窒素安定同位体組成と魚介類食習慣の関係について. 第6回 日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会. 2014年10月31-11月1日, 東邦大学.
- (サ) 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 日本衛生学会総会、2015年3月26-28日.
- (シ) 上山純、原田浩二、杉浦友香、大坂彩、小泉昭夫、上島通浩、日本人における尿中殺虫剤曝露指標濃度の過去20年間の経年推移. 第85回 日本衛生学会総会、2015年3月26-28日.
- (ス) 新添多聞、原田浩二、藤井由希子、Senevirathna Lalantha、人見敏明、小林果、巖俊霞、大島匡世、大澤めぐみ、小泉昭夫、淀川流域からの有機フッ素カルボン酸排出量の推定. 第85回 日本衛生学会総会、2015年3月26-28日.

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許の取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

汚染が懸念される物質のモニタリング

（１）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ロ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0.53μgから3.66μgであり、集団の最大値はジノテフランで64.5μg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 μg /人/日、クロチアニジン206 μg /人/日、チアメトキサム265 μg /人/日、ジノテフラン713 μg /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 μg /人/日程度と5 μg /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 μg 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 μ g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 $^{\circ}$ C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、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 μ m、Waters、MA、USA)で行った。カラムは、40 $^{\circ}$ Cに維持した。注入容量は10 μ Lであり、流速は200 μ L/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かと仮定した(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。

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

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

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)。

$$V1 \frac{dc1}{dt} = M \times r - k1 \times c1 - k2xc1 \quad \text{----- Eq5}$$

$M \times r$ は投与後、すぐに消える。

$$V1 \frac{dc1}{dt} = -k1 \times c1 - k2xc1 \quad \text{----- Eq6}$$

$$V2 \frac{dc2}{dt} = -k2 \times c1 - k3 \times c2 \quad \text{----- Eq7}$$

初期条件は $c1(0) = \frac{M \times r}{V1}$ および $c2(0) = 0$ をとることができる。次のように尿中排泄が与えられる。

$$U1(N) = \int_{24(N-1)}^{24N} k1 \times c1 \, dt$$

$$U1(N) = M \times r \times \frac{k1}{k1+k2} \times \left(e^{-\frac{k1+k2}{V1} \times 24(N-1)} - e^{-\frac{k1+k2}{V1} \times 24N} \right) \quad \text{----- Eq8}$$

同様に、尿中代謝物の排泄量を得られる。

$$U2(N) = \left(\frac{M \times r \times k2}{k3 \times V1 - (k1+k2) \times V2} \right) \times \left(\frac{k3 \times V1}{k1+k2} \times \left(e^{-\frac{(k1+k2) \times 24(N-1)}{V2}} - e^{-\frac{(k1+k2) \times 24N}{V2}} \right) - V2 \times \left(e^{-\frac{k3 \times 24(N-1)}{V2}} - e^{-\frac{k3 \times 24N}{V2}} \right) \right)$$

Eq9に上記の式を簡素化することができる。

$$= \frac{(k2 \times k3 \times M \times r)}{k3 \times (k1+k2)} \times \frac{1}{\left(\frac{1}{\alpha} - \frac{1}{\beta}\right)} \times \left[\frac{1}{\alpha} \left(e^{-\alpha \times 24(N-1)} - e^{-\alpha \times 24N} \right) - \frac{1}{\beta} \left(e^{-\beta \times 24(N-1)} - e^{-\beta \times 24N} \right) \right]$$

$$\text{Where } \alpha = \frac{k1+k2}{V1}, \beta = \frac{k3}{V2}.$$

N日の総尿中排泄は下記のようになる。

$$U(N) = U1(N) + U2(N) \quad \text{----- Eq10}$$

When $k1 \ll k2$, then $U1 \ll U2$ and thus $U \cong U2$. 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、

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

M₀は0日目、すなわち、サンプリング日の摂取量を意味し、M_j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_iとM_j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_j、M_i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 μ 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 μ 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 ± 1.12 、 1.58 ± 3.37 、 5.18 ± 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

μ g/day、デスメチルアセタミプリドが1.14 μ g/day、クロチアニジンが0.51 μ g/dayとなり、ついでイミダクロプリドが0.07 μ 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 μ g/day、アセタミプリドが1.94 μ g/day、クロチアニジンが0.86 μ g/dayとなり、ついでイミダクロプリドが0.53 μ 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 μ 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 ^a	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%		

^a '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 ⁻¹				
Injection volume	10 μL				
Mass spectrometer					
Instrument	TripleQuad 6500 (AB SCIEX)				
Ionization	Electrospray positive ionization (multiple reaction monitoring)				
Monitored ion (m/z)			Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Retention time (min)
	Quantification	Confirmation			
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 ⁻¹)	Calibration curves (Y=ax+b) ^a		Linearity (r)	Detection limit ^b (ng mL ⁻¹)	Recovery % (RSD%) ^c (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)

^aY 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.

^b 1-mL sample

^c 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	α (day ⁻¹)	β (day ⁻¹)	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) ^a					
	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) ^b				
	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

^a Urinary excretion was calculated assuming that daily creatinine excretion was 1.5 g for males and 1 g for females.

^b 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 ^a	r	p value ^a
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 ^a	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 ^b	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	

^a ANOVA.

^b 'often' means eating vegetable at least once a day.

Table 7. (continued)

Dinotefuran		Imidacloprid		Thiamethoxam	
r	p value ^a	r	p value ^a	r	p value ^a
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	0.15	1							
Dinotefuran	0.09	0.19	1						
Imidacloprid	0.31	0.26	0.12	1					
Nitenpyram	0.11	0.13	0.49	0.30	1				
Thiacloprid	0.07	0.21	0.26	0.30	0.49	1			
Thiamethoxam	0.04	0.33	0.15	0.09	0.07	0.05	1		
Desmethyl-acetamiprid	0.30	0.54	0.14	0.26	0.05	0.07	0.18	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).

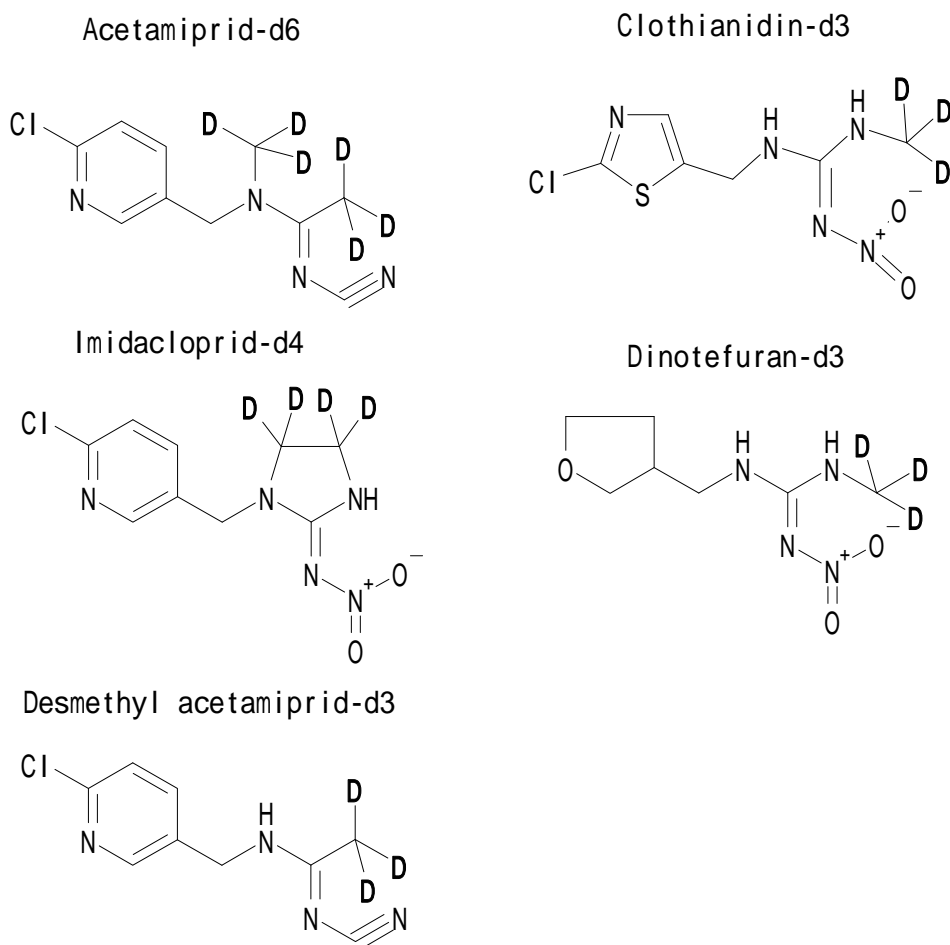


図1 負荷試験に用いた重水素標識ネオニコチノイド

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

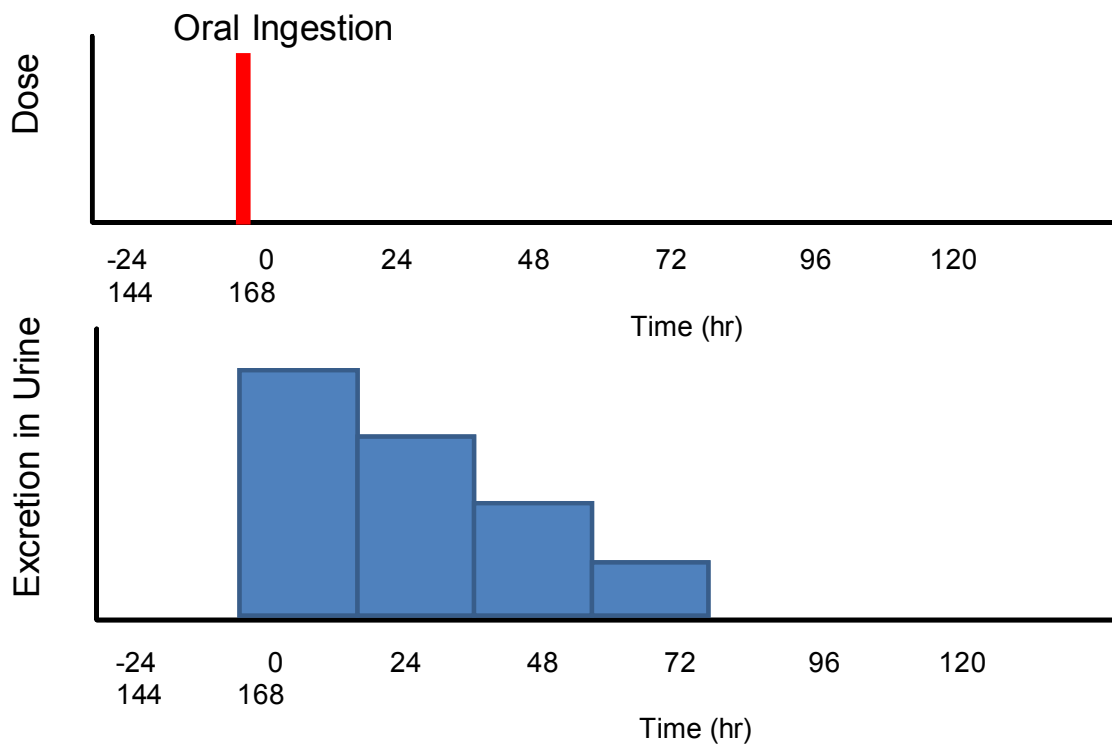
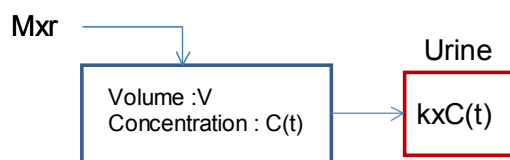


図 3 標識ネオニコチノイド負荷試験におけるポータル投与の仮定

A. One compartment model



B. Two compartment model

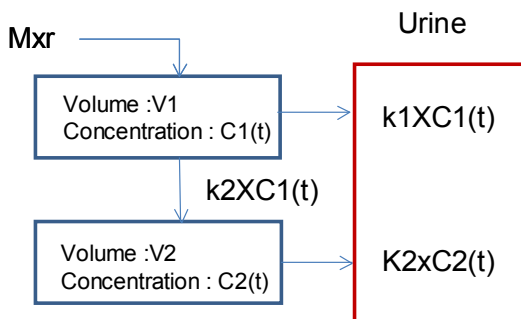
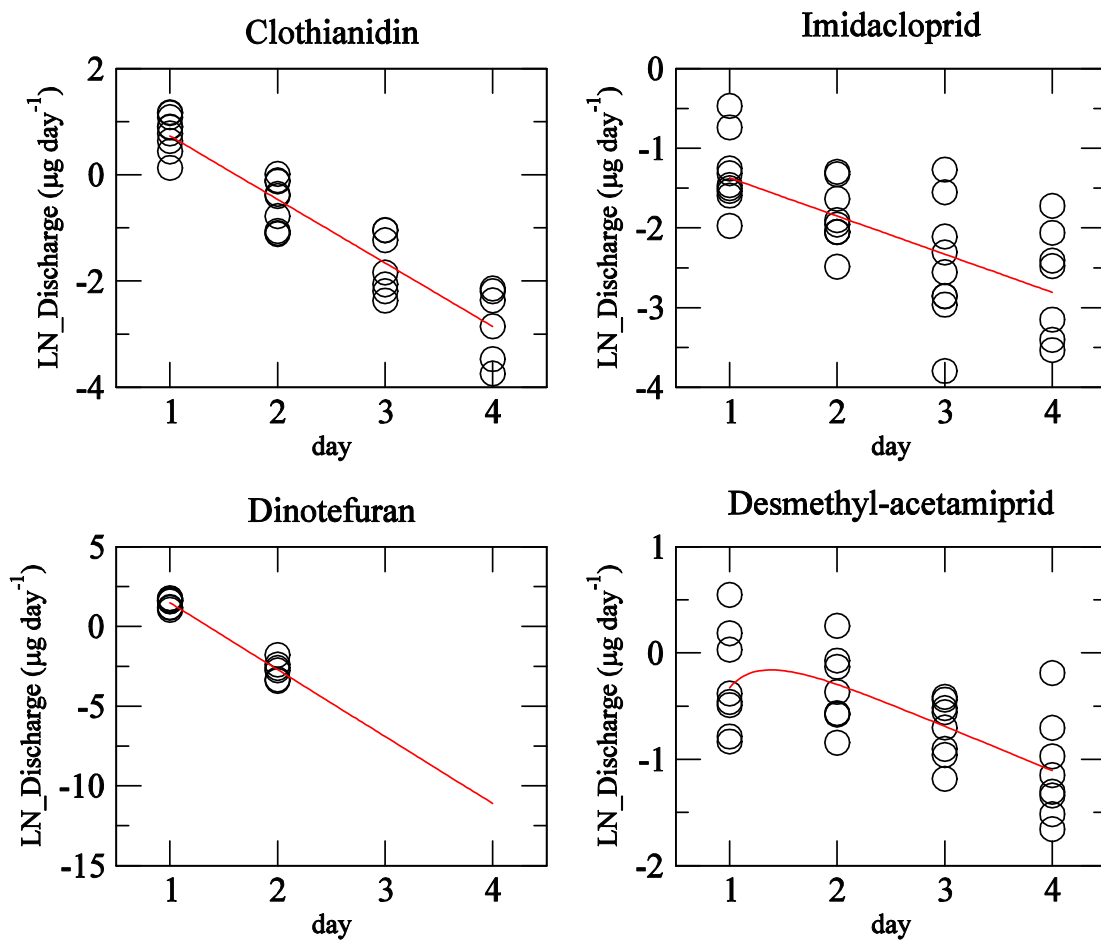
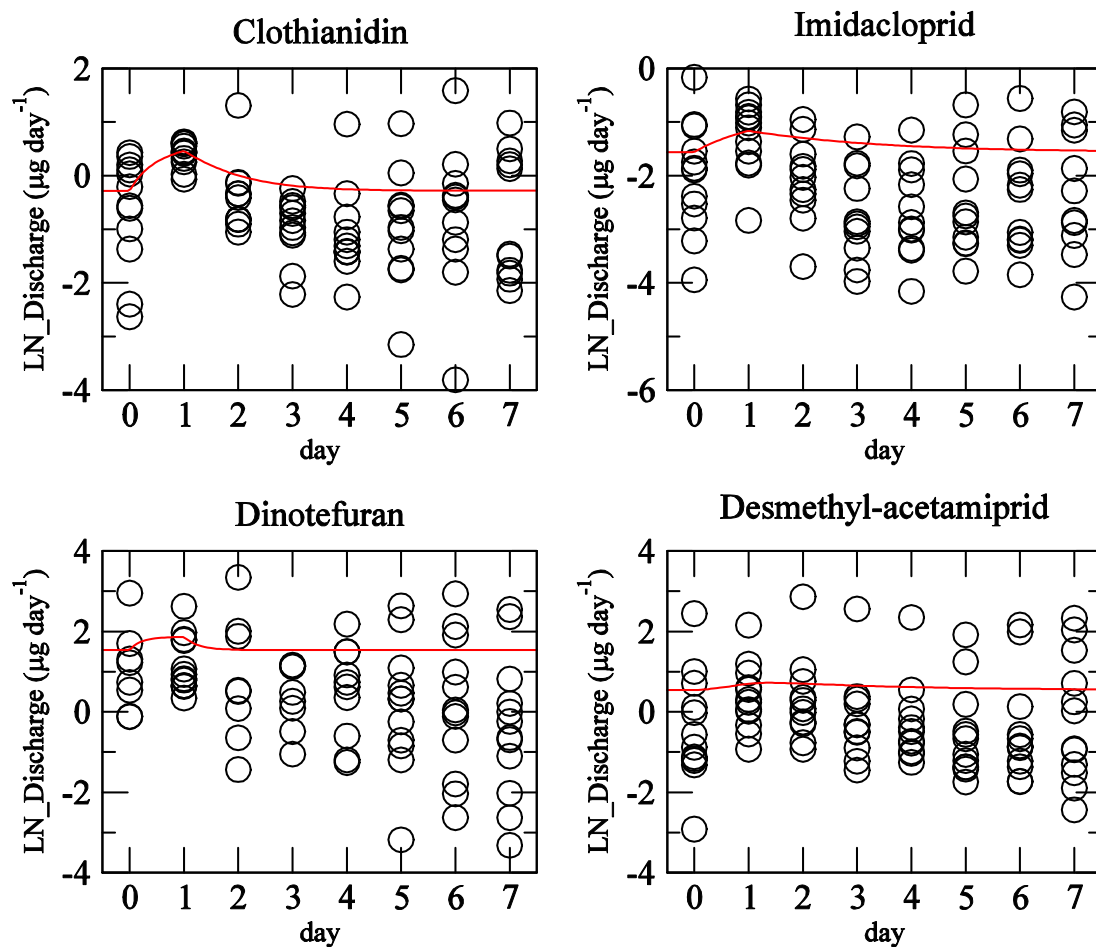


図 4 薬物動態のコンパートメントモデル



☒ 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).



☒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).

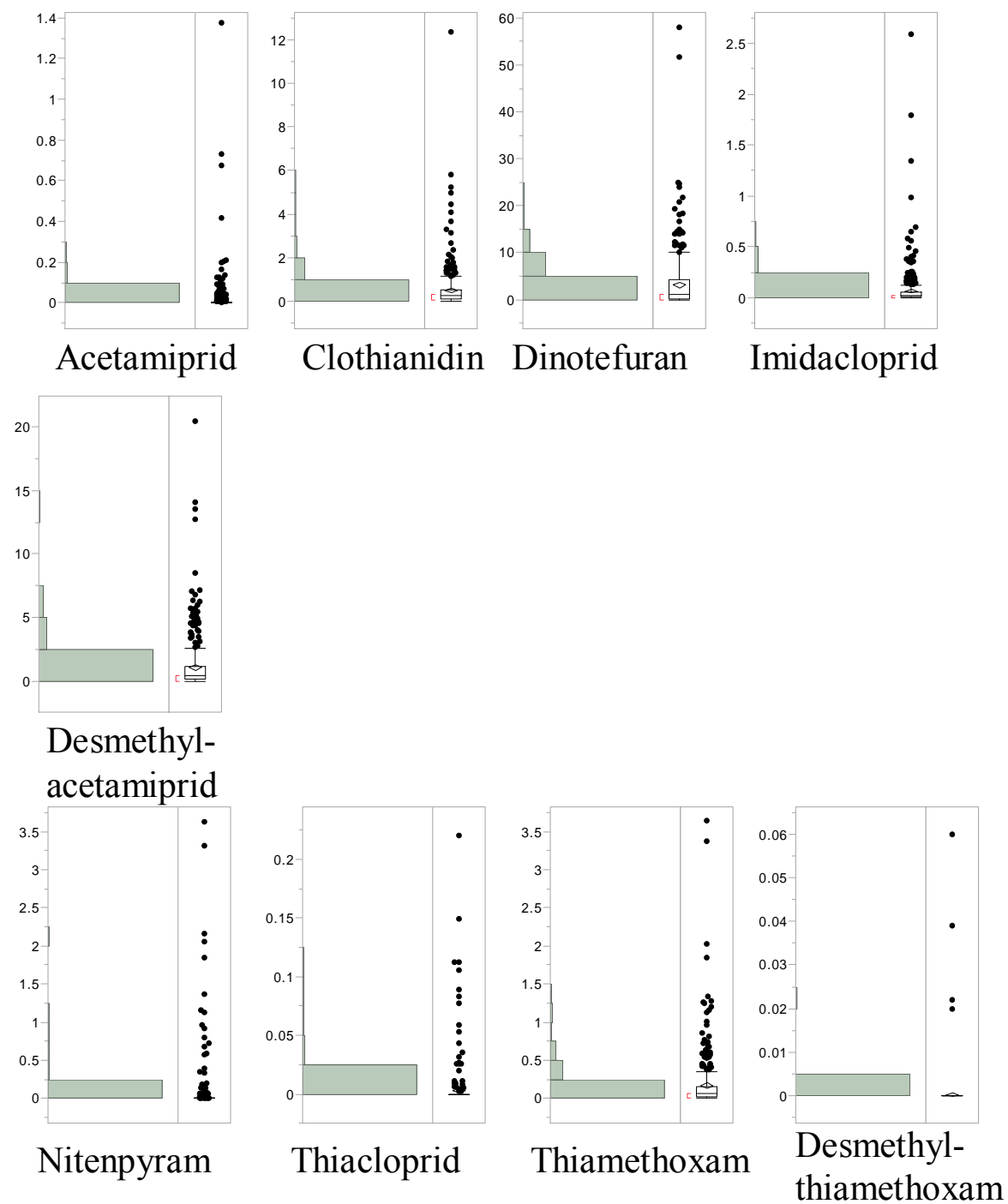


図7 健康な男女の尿中ネオニコチノイド排出量の分布 (単位 $\mu\text{g/day}$)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

汚染が懸念される物質のモニタリング

（２）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 の中でヘキサブプロモシクロドデカン類（HBCDs）、トリブプロモフェノール（2,4,6-TBP）、テトラブ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、 α -HBCD で 2.21 ng/g-lipid、 β -HBCD で 0.19 ng/g-lipid、 γ -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、ヘキサブプロモシクロドデカン類（HBCDs）とテトラブ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¹³C₁₂-labelled HBCD異性体、¹³C₁₂-labelled TBBP-A、¹³C₆-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-β-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α-HBCDs、β-HBCDsおよびγ-HBCDsはそれぞれ100%、91%、64%の割合で検出された。α-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β-HBCDとγ-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、α-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α-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α-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)とも同程度であった。

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 β -HBCD と α 及び γ -HBCD との間に相関は見られなかったが、 β -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 γ -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、 γ -HBCD においてのみ正の相関が見られた。Table 3 において、TBBP-A、 γ -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 α -HBCD が最も高濃度であったが、 β -HBCD はフェノール性 BFR と相関を示し、 γ -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.

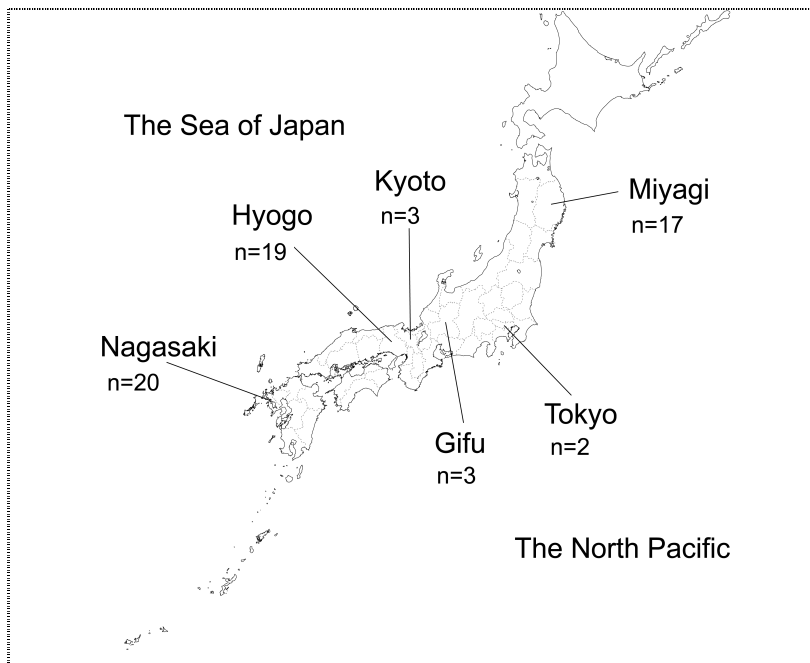


Fig. 1 Sampling site of breast milk in Japan

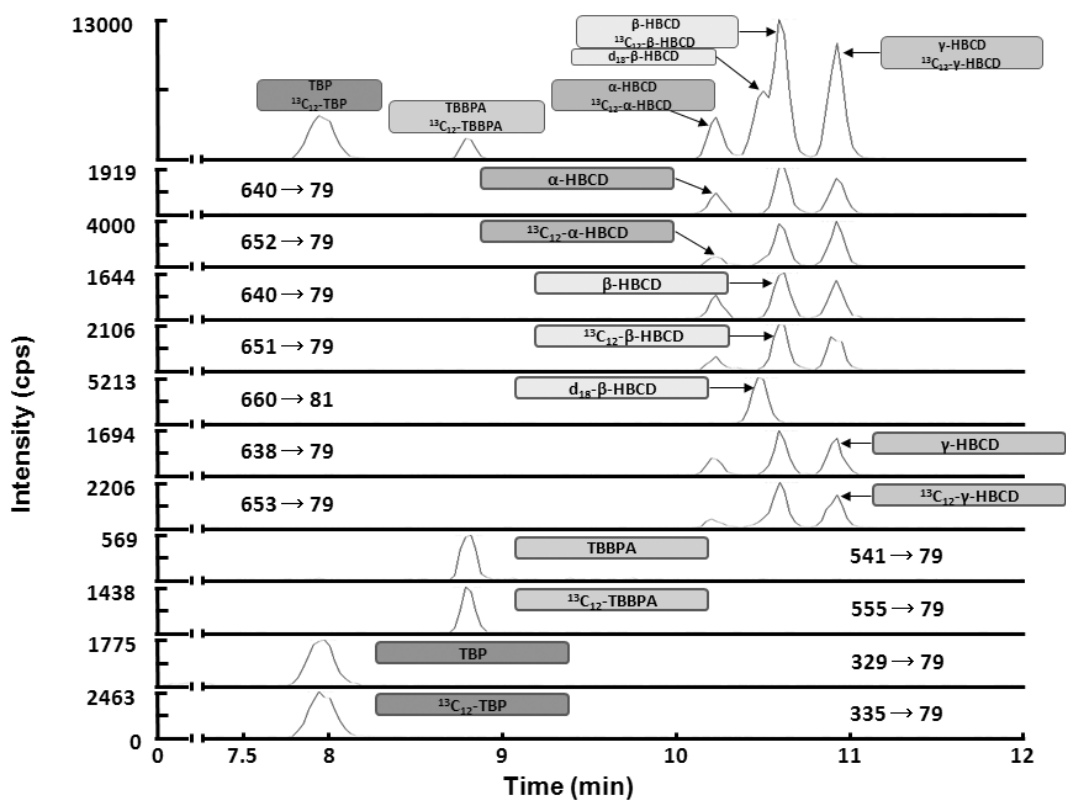


Fig. 2 Chromatograms of (A) TBP, (B) TBBPA, (C) α -HBCD, (D) d_{18} - β -HBCD, (E) β -HBCD, (F) γ -HBCD in matrix match calibration standard (milk) at concentration 0.5 ng/mL.

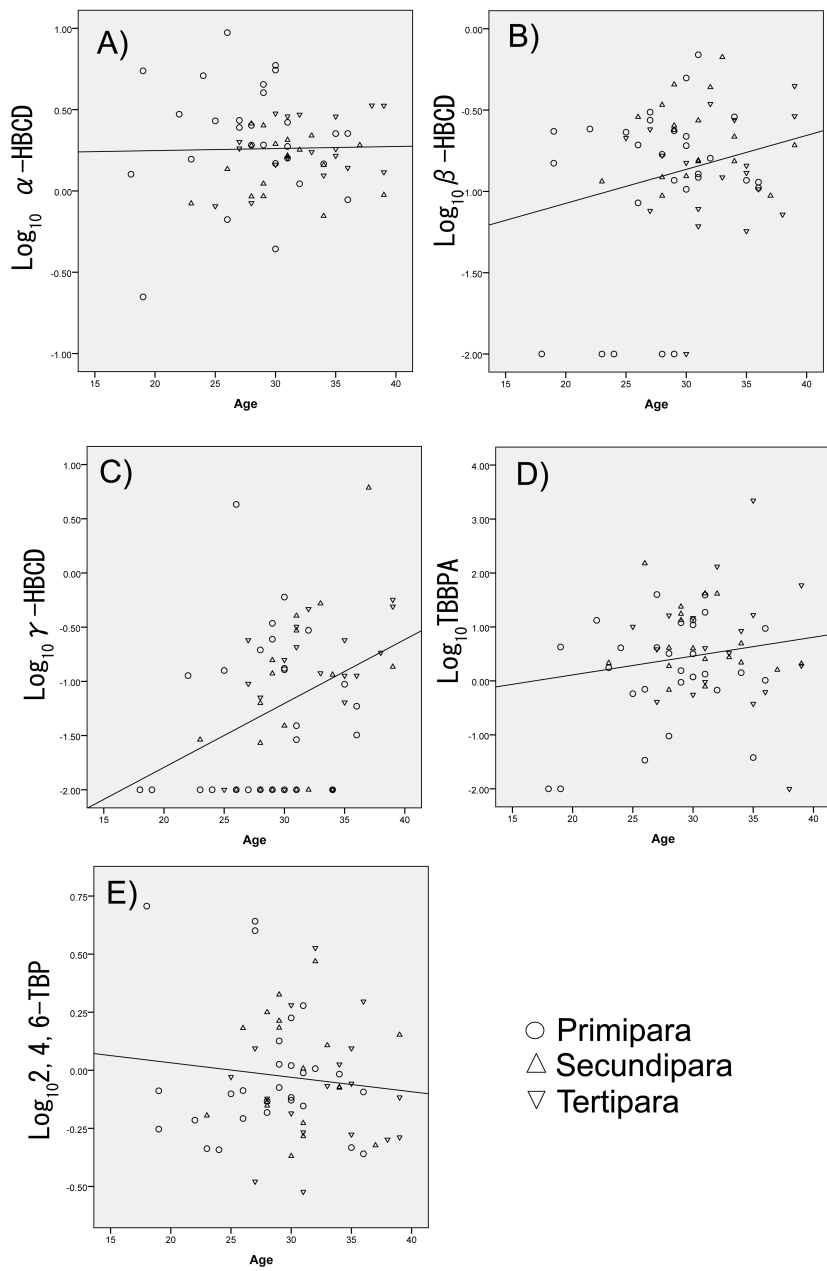


Fig. 3 Relationship between the age of mothers and concentrations of analytes
 Gamma HBCD $r=0.278$, $p=0.002$.

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

		Concentration (ng/g-lipid wt)					
		α -HBCD	β -HBCD	γ -HBCD	TBBPA	2,4,6-TBP	Σ 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. ^aMeans 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	α -HBCD	β -HBCD	γ -HBCD	TBBP-A	TBP
Parity	0.374**						
α -HBCD	-0.039	-0.144					
β -HBCD	0.05	0.005	0.000				
γ -HBCD	0.378**	0.263*	0.171	0.161			
TBBP-A	0.057	0.169	0.059	0.440**	-0.103		
2,4,6-TBP	0.188	0.147	0.000	0.320**	0.185	0.286*	
Σ HBCD	0.040	-0.108	0.960**	0.096	0.296*	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（食品の安心安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

汚染が懸念される物質のモニタリング

（３）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

a 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¹³C-triclosan、¹³C-methyltriclosan および ¹³C-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(¹³C-triclosan, ¹³C-methyltriclosan および ¹³C-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 μ Lにまで濃縮し、GC-MSの分析試料とした。

4) 分析機器と定量

GC-MSはAgilent GC/MSD-5973i に6890N-GCを接続した装置を用い、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-¹³C-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、 β -HCH および α -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 µL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
¹³ 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
¹³ C-TCS	12.271	266 (268)	0.32
methyl- ¹³ C-TCS	12.404	288 (290)	0.20
PFB- ¹³ 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	0.593**	0.490**	0.282				
trans-NC	0.413	0.647**	0.341	0.642**			
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	0.618**	0.675**	0.036	0.674**	0.748**	0.005	0.458*

*. 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	0.764**			
α-endosulfan	-0.186	0.269	0.178	0.364	0.345		
dicofol	0.278	-0.420	0.011	-0.011	0.567*	-0.066	
PCB153	0.394	-0.058	0.193	0.960**	0.844*	0.269	0.561

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

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

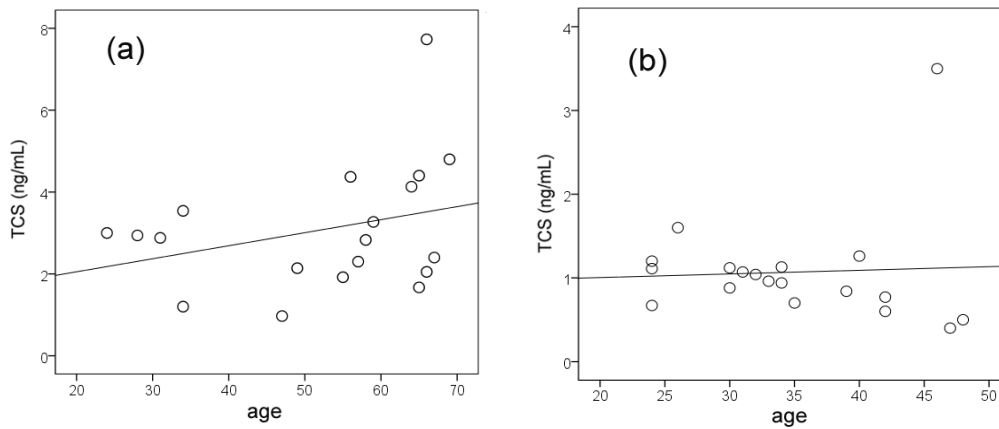


Fig. 1. Relationships between the age of females in Japan, Kyoto (a) and Korea, Seoul (b) and serum concentrations of TCS. Spearman's rank correlation coefficients, (a) $r = 0.267$, $p = 0.269$; (b) $r = 0.386$, $p = 0.102$

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

汚染が懸念される物質のモニタリング

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

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(PFCAs)は撥水加工剤製造等に広く使用されてきた化学物質であるが、ヒト生体試料中から広く検出され広範囲の汚染が懸念されている。本研究では日本におけるその汚染実態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PFCAs(炭素数8から14まで)の測定を関西・東北地域の試料を用いて行った。関西における食品経由のPFCAs総摂取量(C8からC14の合計、幾何平均値)は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。このように総PFCAs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PFCAsを高濃度に含有する化粧品・日焼け止め等の消費者製品の存在も報告されており、それらによる汚染を受けている可能性も考えられる。

A. 研究目的

有機フッ素化合物のペルフルオロアルキルカルボン酸類(PFCAs)は全ての水素原子がフッ素原子に置換した炭素鎖(CF₃(CF₂)_n-: ペルフルオロアルキル鎖/Rf基)を持つ化学物質である。このRf基は環境中、生体中で分解不可能でありその多くは最終的にカルボン酸、スルホン酸となり安

定化し環境中に残留する。カルボン酸の炭素鎖8のものはPFOA(C8)と呼ばれフッ素樹脂合成や界面活性剤として大量に使用され、また疫学研究では出生体重の低下が報告されており、そのヒトへの健康影響が懸念されている(Apelberg et al., 2007, Fei et al., 2007)。

PFCAsの血清中濃度の経年変化に

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

現在まで PFCAs 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 PFCAs の長期動向の把握は重要である。しかしながらその分析法は煩雑であり (Kärman et al., 2009; Vestergren et al., 2012)、食事中 PFCAs 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 PFCAs 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 PFCAs 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 PFCAs 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 . 分析方法

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 PFCAs 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、¹³C 標識の C8、C9、C10、C11、C12 の内部標準、*t*-ブチルメチルエーテル (MTBE) 1ml、0.5M テトラブチルアンモニウム溶液 (TBA) 0.3ml、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/11H-PFUnDA を加えた臭化ベンジルアセトン溶液を添加し、ベンジルエステル誘導体化した。分析は誘導体化後 24 時間以内に行った。

GC/MS (Agilent 6890GC/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 μ m)のカラムで分離し、Single ion monitoringを使用し、化学イオン化陰イオンモードで分析した。試薬ガスにはメタンを用いイオン源温度は150 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)。コンジエナー毎に見ると、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)。コンジエナー毎に見ると、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。食事時のPFCAsも2004年の宮城を除き増加傾向であった。食事経路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、食品経路の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 ^a (pg) (S/N=3)	Recovery of PFCAs ^b % (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

^a 1 µL injection^b All native PFCAs were spiked into samples before extraction.

Table 3

Dietary intake of PFCAs from composite food samples (ng day⁻¹)

Area	Year (No. of pooled diets)	City		ng day ⁻¹				
				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		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.

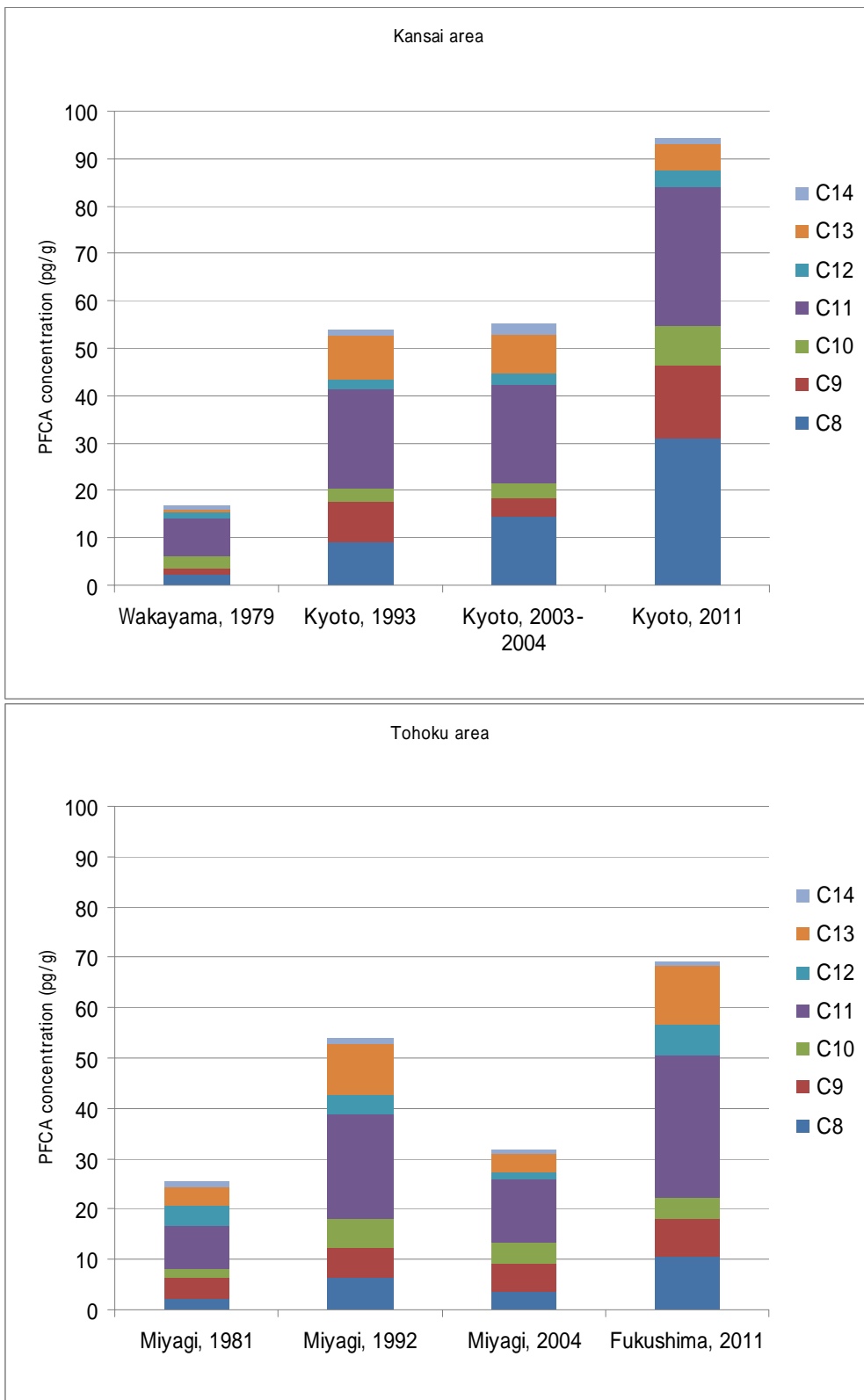


Figure 1. Profile and trend of PFCA levels in food samples

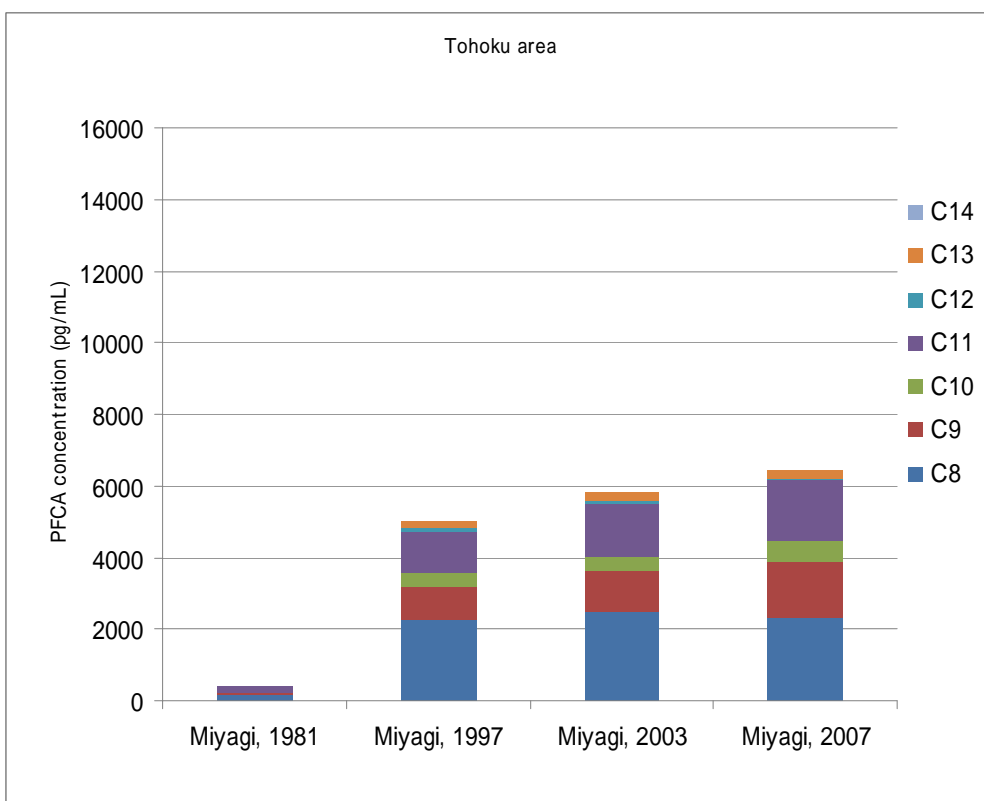
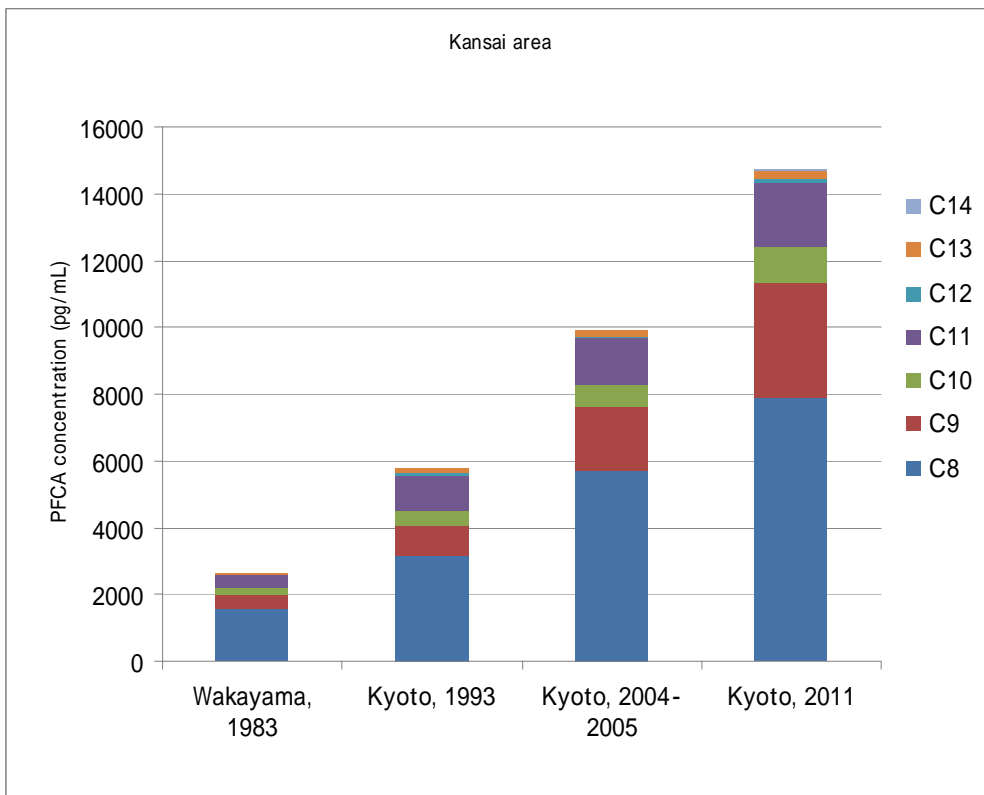


Figure 2. Profile and trend of PFCA levels in serum samples

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

汚染が懸念される物質のモニタリング
(5) 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ノ酸 PFOA(C8) 以外の長鎖 PFCAs 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 名の血清試料を京大生体試料バンクから選択した (Koizumi et al., 2009)。

試料 0.5 mL に 0.5 M テトラブチルアンモニウム塩水溶液 (pH10) 0.5 mL、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 0.1 M 臭化ペンタフルオロベンジル / 0.1 M 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	Age (yr)	Concentration (pg mL ⁻¹)								
			PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFDoDA	PFTrDA	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

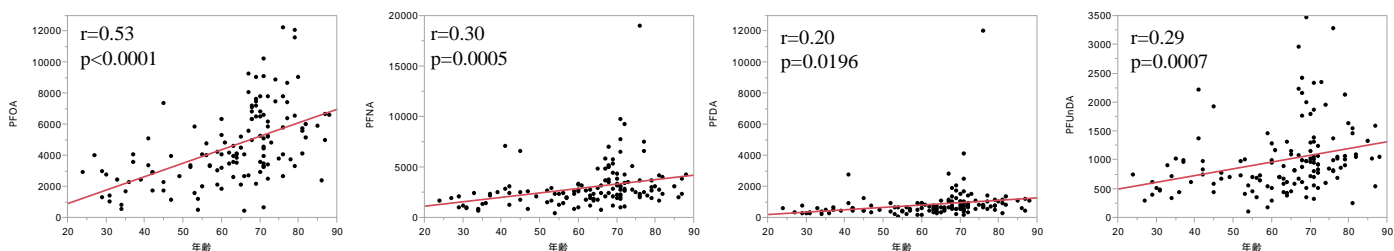


Fig. 1. Association between serum PFCAs concentrations and age of donors.

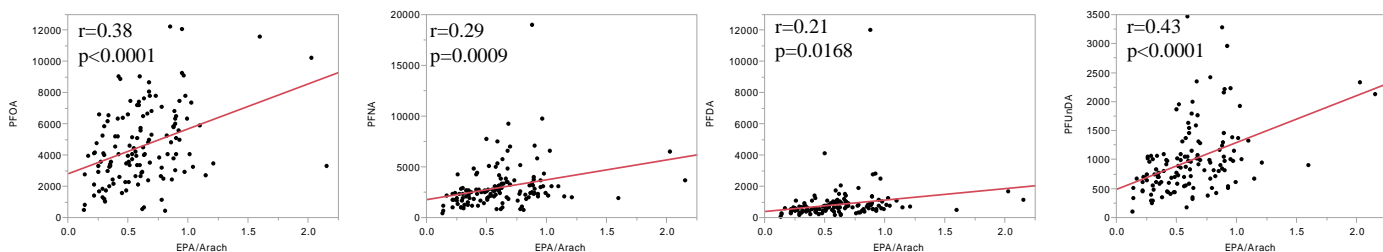


Fig. 2. Association between serum PFCAs concentrations and eicosapentaenoic acid/arachidonic acid ratio.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

系統的持続的な試料の収集と他機関への試料の提供

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	人見 敏明	京都大学大学院医学研究科・特定研究員
研究協力者	新添 多聞	京都大学大学院医学研究科・特定研究員

研究要旨

化学物質曝露を評価し、過去の曝露と現在の曝露を評価するための試料を採取した。京都大学生体試料バンクへ成人男女の尿検体294検体を収納、登録した。

また他機関へ、尿試料102検体（1990年代～2010年）、陰膳食事試料55検体（2011年）、血清試料120検体（2007年～2010年）の提供を試料バンクから行った。

試料の利用を促進するため、環境化学研究者が参加する学術集会でフォーラムを行った。

A．研究目的

POPs のリスク評価に向けたヒト曝露の長期モニタリングのための試料バンクの創設が 2003 年に行われた。以降、試料の継続的な収集が続いている。今年度は生物学的モニタリングを実施するため、国内の成人男女を対象に尿試料を収集し、ヒト生体試料バンクに収納・登録した。

バンクの試料は他機関の研究者の申請に応じて、提供を行ってきた。

また試料の利用を推進するため、環境化学研究者が参加する学術集会でフォーラムを行った。

B．研究方法

京都大学大学院医学研究科・医学部および医学部附属病院 医の倫理委員会より、E25「POPs のリスク評価

に向けてのヒト曝露長期モニタリングのための試料バンク創設に関する研究」の研究計画の承認を得て、本研究は実施された。

尿試料

尿試料は、これまでの継続性を考慮して、京都府京都市、宇治市にて収集した。京都府ではこれまでに 1990 年代、2000 年代にかけて血清試料および食餌試料に加えて、尿試料も収集されている。以上の点から採取対象地域とした。大学生、市民を対象とした健康推進企画において、研究の趣旨を説明して、協りに前向きな参加者に、対面での口頭説明を加え、同意書に書面にて同意を頂いた方を対象とした。

またこの際にこれまでの研究の成果についても紹介する講演を行った。

他機関への試料の提供

食事からの農薬摂取を評価する目的で、名古屋大学へ尿試料 102 検体（1990 年代～2010 年）を提供した。

食事からの臭素系難燃剤の摂取を評価するため、血清試料 120 検体（2007 年～2010 年）を第一薬科大学に提供した。

食事からの塩素系農薬の摂取を評価するため陰膳食事試料 55 検体（2011 年）を大阪府立公衆衛生研究所に提供した。

バンクの利用の促進

2014 年 5 月 15 日に京都大学で開催された第 23 回日本環境化学会討論会において、京大大学生体試料バンク：現在までの成果と現状および将来についてのフォーラムを行った。

C．研究結果

試料の収集

平成 26 年度を通じて、京都市、宇治市において尿試料 294 検体を収集した。

他機関への試料の提供

第一薬科大学に提供した血清試料 120 検体（2007 年～2010 年）の分析結果は本報告書に記載した。

名古屋大学へ提供した尿試料 102 検体（1990 年代～2010 年）は分析が完了した。

大阪府立公衆衛生研究所へ提供した陰膳食事試料 55 検体（2011 年）は分析が進行中である。

バンクの利用の促進

フォーラムで紹介し、利用の問い合わせが 3 件あり、1 件は提供を実施し、他の問い合わせについては詳細につ

いて検討を行っている。

D．考察

国内での血液、母乳、食事、尿の各検体の採取は 2003 年度の試料バンク創設からほぼ同一方法で行われた。2014 年度の試料収集ではこれまでの対象地域で継続することを基本とした。協力機関への依頼、参加が得られ、当初の目標通りに収集がなされた。

尿試料は生物学的モニタリングにより食事試料からのデータを補完する目的で採取されており、一定の年齢層を対象に提供を依頼し、当初の予定の通り収集できた。

検体の収集に当たってはこれまで生体試料バンクに収集された試料を考え、それに相応する機関、個人に協力をお願いしたことで、試料のほとんどが目標通りに実施できたことが確かめられた。また、倫理面にも十分に対応を施した検体収集を進めることができた。

また各汚染物質の専門的分析を行う他機関に試料を提供することで食の安全に関する研究の推進に資することができた。

拡充された試料バンクは食品衛生、環境保健研究者へ提供できると期待される。

E．結論

初期の全体計画に沿って尿 294 検体が収集された。検体収集にはそれぞれの専門的な機関に全面的な協力を得て実施できた。その結果、将来のモニタリングの土台となる試料収集と収納および関連するライフスタイル情報が収載できた。

他機関へ、陰膳食事試料 55 検体、尿試料 102 検体、血清試料 120 検体の提供を試料バンクから行った。

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

小泉昭夫、京都大学生体試料バンク：現在までの成果と現状および将来、第 23 回 日本環境化学会討論会、

(2014年5月14-16日 京都大学)
上山純、原田浩二、杉浦友香、大坂彩、小泉昭夫、上島通浩、日本人における尿中殺虫剤曝露指標濃度の年次推移、第 85 回日本衛生学会(2015年3月26-28日 和歌山)

H．知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
なし

III . 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujii, Y.; Sakurada, T.; <u>Harada, K. H.</u> ; <u>Koizumi, A.</u> ; Kimura, O.; Endo, T.; <u>Haraguchi, K.</u>	Long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in Pacific cods from coastal areas in northern Japan: A major source of human dietary exposure	Environ Pollut	199	35-41	2015
Fujii, Y.; Niisoe, T.; <u>Harada, K. H.</u> ; Uemoto, S.; Ogura, Y.; Takenaka, K.; <u>Koizumi, A.</u>	Toxicokinetics of perfluoroalkyl carboxylates with different carbon chain lengths in mice and humans.	J Occup Health	57(1)	1-12	2015
Zhao, C.; Fujii, Y.; Yan, J.; <u>Harada, K. H.</u> ; <u>Koizumi, A.</u>	Pentafluorobenzyl esterification of haloacetic acids in tap water for simple and sensitive analysis by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization.	Chemosphere	119	711-718	2015
Yan JX, Inoue K, Asakawa A, <u>Harada KH</u> , Watanabe T, Hachiya N, <u>Koizumi A.</u>	Methylmercury Monitoring Study in Karakuwacho, a Peninsula Area in Japan	Bull. Environ. Contam. Toxicol.	93(1)	36-41	2014

IV . 研究成果の刊行物・別刷