

Ⅱ. 分担研究報告書

(3) 有害物質(有機フッ素化合物)摂取量推定に
不可欠な分析法開発

研究分担者 井之上 浩一

令和元年度～令和3年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

食品を介したダイオキシン類等有害物質摂取量の評価とその手法開発のための研究

分担研究報告書

(3) 有害物質 (有機フッ素化合物) 摂取量推定に不可欠な分析法開発

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部

研究要旨

LC-MS/MS法を用いて、有機フッ素化合物 (PFCs) の網羅的な解析法の開発と食品経由のばく露実態解明を検討した。分析法に関してはエレクトロスプレーイオン化法によるNegativeモードを採用し、分析対象をR-COOH (9種類)、R-SO₃H (8種類)、その他 (ADONA, Gen-X, F-53B)、内標準物質 (6種類) の26種類とした。国際的な情報収集として、「ワクチン免疫応答とPFCsの関連性」、「飲料水の調査結果」、「食品の調査結果」をまとめた。前処理の検討時、実験前処理での汚染状況を調査した結果、PFNA, PFHxA, PFOAなどの微量のバックグラウンドも観察された。そのため、実験に使用する水の活性炭処理や装置内バックグラウンドをディレーカラムで低減させ、前処理での汚染除去を試みた。そのうえで、今回は、飲料に伴う食品の調査を目的として、添加回収実験を行った結果、良好な回収率や再現性を得ることができた。本分析法を用いて、飲料水や市販飲料などを調査した結果、殆どの試料で5 ng/L以下となった。Oasis WAXの固相抽出カラムを用いた前処理として試料5 gを使用した時の定量範囲を0.1 ng/g~10 ng/gとし、トータルダイエット調査に向けた分析法の構築を試みた。トータルダイエット調査の試料は、令和3年度に作製した東京都と大阪府の試料とした。その結果、各食品群によって検出されたPFCsが異なることも分かり、今後さらなる調査が求められる。

研究協力者

五十嵐 由樹 立命館大学大学院薬学研究科
薬科学専攻修士課程
布目 真梨 立命館大学薬学部助教

A. 研究目的

これまで、有機フッ素化合物 (Perfluorocompounds: PFCs) に関する調査研究において、本報告書で国内外の食品ばく露を含めた現状を議論してきた。そのような中、厚生労働省水質基準逐次改正検討会が開催され、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 及びペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の水質基準等の体系の要検討項

目と位置づけ、暫定目標値を PFOS 及び PFOA の量の和を 0.00005 mg/L (50 ng/L) とすることが議論された。その一方で、具体的な国際的かつ国内の法的処置も進んでおり、現在では、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約 (POPs 条約) において、第14回会合 (POPRC14) では、PFOA とその塩及び PFOA 関連物質について、条約上の廃絶対象物質 (製造・使用・輸出入を禁止する措置を取るべき物質: 附属書 A) への追加が決定され、国内でも今後条約の義務を担保するための各種措置がとられた。そのうえ、ペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS) とその塩及び PFHxS 関連物質

について、リスク管理に関する評価を検討する段階に進めることが決定された。そして、第15回会合(POPRC15)でも、条約対象物質への追加として、PFHxSとその塩及びPFHxS関連物質が検討され、今後はこれらを含めた環境モニタリング調査が国内でも求められると予想される。

2020年9月、欧州食品安全機関(European Food Safety Authority, EFSA)は新たな安全性の閾値(Safety threshold)をもとにPFCsのTolerable weekly intake(TWI)を4.4 ng/kg体重/週として、食品中のPFCs存在量から生じるヒトの健康へのリスクに関する科学的意見を発表した¹⁾。本内容のなかで、EFSAは4つのPFCsを取り上げPFOA, PFOS, PFNA, PFHxSに拡大している。2016年にアメリカ合衆国環境保護庁(Environmental Protection Agency: EPA)では生涯健康勧告値(Health Advisory: HA)を70 ng/L(PFOSとPFOAの合算値)と設定し²⁾、2020年にデンマーク環境保護庁では飲料水中の最大値を2 ng/L(PFOA, PFOS, パーフルオロナノ酸(Perfluorononanoic acid: PFNA), PFHxSの合算値)とした³⁾。

本研究では、国内のヒト曝露実態の必要性と国際的な報告をもとに、独自の検証を実施した。

B. 研究方法

① 国際的な研究報告の収集

PFCs摂取量調査に関連する研究論文を収集するため、立命館大学情報管理システムによる検索から国際的報告(ワクチン免疫応答とPFCsの関連性、飲料水の調査結果、食品の調査結果)をまとめた。

② 新たなPFCsのLC-MS/MS分析法開発

本研究において、分析対象とするPFCsを表1に示す。分類としては、フッ素鎖末端にカルボキシル基をもつPFCs(炭素鎖:2~17)、スルホン酸基をもつPFCs(炭素鎖:3~12)、その他3種類(Sodium dodecafluoro-

3H-4,8-dioxanonoate: ADONA, 6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate: F-53B, Tetrafluoro-2-(heptafluoropoxy)

propanoic acid: GenX)を対象とする。今回のトータルダイエット(TD)試料への適用においては、正確な定量値を求めるため、安定同位体による補正が可能なPFBA, PFHxA, PFOA, PFUdA, PFHxS及びPFOSに分析対象を絞った。

LC装置: Waters社製Acquity H Class

移動相には、酢酸アンモニウム水溶液(A)/メタノール(B)もしくは酢酸アンモニウム水溶液(A)/酢酸アンモニウム含有メタノール(B)を使用した。

カラム: GLサイエンス社製Inersustain C8 (2.1×100 mm, 粒子径3µm), 東ソー社製TSKgelODS-100V (2.0×150 mm, 粒子径3µm)

Delayカラム: GLサイエンス社製Delay Column for PFAS (3.0×30 mm)

カラム温度: 40°C

流速: 0.2 mL/min

注入量: 10 µL

MS装置: Waters社製Xevo TQD

Capillary voltage 2.0 kV

Extractor voltage 3 V

RF lens voltage 2.5 V

Source temperature 150°C

Desolvation temperature 400°C

Cone/desolvation gas flows 50/800 L/hr

MS/daughter scan ranges *m/z* 50-1200

Cone voltage 15-50 V

Collision energy 15-50 eV

測定条件は、エレクトロスプレーイオン化法(ESI: ネガティブモード)で行った。

試薬: アセトニトリル(富士フイルム和光純薬社製), 酢酸アンモニウム(富士フイルム和光純薬社製), メタノール(富士フイルム和光純薬社製), *n*-ヘキサン(富士フイルム和光純薬社製), ギ酸(富士フイルム和光純薬社製), アンモニア水(シグマアルドリッチ社製), 酢酸(富士フイルム和光純薬社

製), トリエチルアミン (富士フイルム和光純薬社製) である。

標準溶液の調製方法: 本標準品はメタノールを用いて, 1000 µg/mL (ppm) の標準原液に調製した。検量線用標準溶液は, 各標準原液からメタノールで希釈し, 100 ng/mL (ppb) の混合液を調整した。その後, 本溶液を段階的に希釈し, 検量線用標準溶液を調製した。

飲料水の前処理を図 1 に, 食品の前処理を図 2 に示す。添加回収試験の際は, 試料に標準品を添加した。

C. 研究結果及び考察

C.1. 国際的な研究報告による PFCs 評価

海外で報告されている飲料水に関する研究結果^{4,6)}より, いずれも PFCs について, 0.1 ng/L 以上の検出値もあるが, カットオフを 50 ng/L (厚生労働省の検討している水道水の限度値) とした場合, それを超えて検出される確率は 10%程度であり, その 10 分の 1 (5 ng/L) とした場合, 30%程度となる。一方で, 飲料水における国際的なガイドラインレベルを検討した報告では, PFOA で 14 ~1000 ng/L, PFOS で 13~560 ng/L としている⁷⁾。

ワクチン免疫応答 PFCs の関連性について代表的な研究論文を表 2 にまとめた。2017 年に報告されている小児を対象とした Systematic Review of the Epidemiologic Literature において, 免疫系, アレルギー, 感染症, 喘息の関連性を示唆し, ワクチンに対する抗体の影響を詳しく論じている⁸⁾。しかしながら, 本研究は, 様々な残留性有機汚染物質の関与も疑われ (例えば, メチル水銀), 暫定的な結果と位置付けられる。Granum らは, コホート研究 (Norwegian Mother and Child Cohort Study) で, 出産時の母体血中 PFCs 濃度と小児の風疹ワクチンに対する抗体値が負の関係性があることを

報告した⁹⁾このように, PFCs ばく露とワクチン接種による免疫応答の関連性は様々見解があるので, 現段階では明確な結論は難しいが, 全般的な免疫応答低下の影響は数多く報告されている。主な PFCs の食品モニタリングに関して, 表 3 にまとめた。主に魚介類などのモニタリング評価が多く報告されていた。残留性有機汚染物質のばく露要因として, 魚介類に注目されているため, その傾向があったものと思われる。PFOA 及び PFOS を中心に高いもので数十 ng/g (ppb) レベルである。近年では食品用容器包装から PFCs が汚染される可能性が指摘されている。例えば, 2021 年 3 月に米国農業研究事業団 (USDA-ARS) より, 食品包装材から PFCs ばく露に関する総説が発表され, その削減を訴えている¹⁰⁾。

C.2. 飲料水からの PFCs 分析に関する検討

令和元年度では, 定量限界値の目標値を 5 ng/L とし, 前処理を図 1 とした。しかし, 前処理過程でのブランクピークが観察された (図 3)。そのため, 最も危惧される実験用水をすべて活性炭処理 (InertSep Slim-J AC, GL サイエンス社製) をすることで, 低減化を目指した。それらを考慮して, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFNA の測定 of 定量限界値を 15 ng/L とした。また, それ以外の PFCs 定量下限値は 5 ng/L と設定した。表 4 に飲料食品 (飲料水, お茶, ジュース) を用いた添加回収実験の結果を示す (図 4)。本手法を用いて, 国内で入手可能なボトル飲料水 (国内産: 14 種類, 海外産: 10 種類), ペットボトル入りお茶 (12 種類), ジュース (18 種類) について分析を実施した。その結果, いずれも定量下限値未満であった。また, 厚生労働省の示す水質管理目標設定項目の PFOS 及び PFOA 合算値 50 ng/L (暫定目標) よりも低い値であった。

C.3. 食品からの PFCs 分析に関する検討

令和2年度では、PFBAは分析装置環境からの汚染が確認され、その削減と逆相系カラムによる保持が重要な課題であった。まずは、昨年までのLC-MS/MS用分離カラムには、InertSustain C₈を用いていたが、PFBAの保持が困難であった。そこで、カラムを各種検討した結果、TSKgel ODS-100Vを用いた条件において、いずれも分離分析することができた。その後、装置（特に移動相）からの影響によるバックグラウンドが観測され、その削減が必須となった。検討の結果、GLサイエンス社製 Delay Column for PFAS（図5）を用いることで装置内のブランクピークの影響を防ぐことが可能であった。次に、前処理過程におけるバックグラウンドを評価した結果、LCバイヤルのセプタム、精製水、有機溶媒、プラスチック製器具類など、多くの実験室環境から汚染されていることが明らかになった。そこで、いずれも、セプタムをアルミ箔に変更、精製水の活性炭による精製、各種プラスチック器具の利用削減、メタノール洗浄などを実施し、定量値1 ng/mLピーク強度以下に低減させる努力を実施した。現段階でのバックグラウンドのピーク強度を図6に示す。今回、定量下限の検出値を1 ng/mL標準液濃度として、装置バックグラウンドはすべてのPFCsにおいて削減された。前処理バックグラウンド（Experimental background; 試料を用いず、図1の操作を実施したときの場合）については、PFBA及びPFPeAで定量下限濃度（1 ng/mL）に対して1/2程度、PFHxA、PFHpA及びPFNAにおいて、1/5程度まで削減することができた。食品の前処理として、FDAの報告でもWAX SPE cartridgesのような逆相-弱陰イオン交換ミックスマードの水湿潤性ポリマーを基質にしたカートリッジを使用する報告が多いため、本研究では、Oasis WAX及びInterSep MA-2で検討行ない、Oasis WAXを固相抽出カラムとして使用することとした。令和3年度に作製した東京都及び大阪府のTD試料の分析対

象をPFBA、PFHxA、PFOA、PFUdA、PFHxS及びPFOSに絞り、分析した。本手法での定量下限値を0.1 ng/gとし、定量範囲を0.1~10 ng/gとした。その結果を表5に示す。また、代表的なSRMクロマトグラムを図7に示す。いずれも、いくつかの食品群において、PFCsが検出されたが、今回は予備的な調査のため、今後は更なる検討が必要と考えられる。

D. 結論

本検討より、下記のことを結論とする。また、今後はさらなる高精度かつ有用な多種類へ対応できる前処理を構築することが望まれた。

- ・16種のPFCsを分析対象としたLC-MS/MS分析法を用いて国内で入手可能な飲料食品を対象にモニタリングを行った結果、いずれも厚生労働省の示す水質管理目標設定項目のPFOS及びPFOA合算値50 ng/L（暫定目標）よりも低い値であった。

- ・飲料食品35 mLに対して、目標とする定量値の下限を5 ng/Lとした。また、PFPeA、PFHxA、PFHpA、PFNAにおいては前処理でのバックグラウンドを考慮して、15 ng/Lとした。

- ・東京都と大阪府のTD試料を分析した結果、複数の食品群から数種類のPFCsが検出された。また、複数のPFCsが定量下限値に近い値で検出された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Igarashi, Y., Takahashi, M., Tsutsumi, T., Inoue, K., Akiyama, H. Monitoring Analysis of Perfluoroalkyl Substances and F-53B in Bottled Water, Tea and Juice Samples by LC-MS/MS. *Chem. Pharm. Bull.* 3,286-290 (2021)

2. 学会発表

1) Igarashi, Y., Takahashi, M., Tsutsumi, T., Akiyama, H., Inoue, K. "Development of LC-MS/MS method for the determination of perfluorocompounds in foods and assessment of human exposure from Japanese food style" DIOXIN 2019, Aug. 25-30, Kyoto International Conference Center (2019)

2) 五十嵐由樹, 高橋未来, 堤 智昭, 穠山 浩, 井之上浩一: 食品中の有機フッ素化合物の摂取量推定を目的とした LC-MS/MS による一斉分析法の開発 第 115 回日本食品衛生学会 (東京), 2019 年 10 月

3) 五十嵐由樹, 高橋未来, 堤 智昭, 穠山 浩, 井之上浩一: PFHxS とその塩及び PFHxS 関連物質に関するヒト曝露実態: 研究報告事例と日本の飲料水調査 第 4 回 日本食品衛生学会近畿地区勉強会, (大阪), 2020 年 2 月

4) 五十嵐由樹, 高橋未来, 堤 智昭, 穠山 浩, 井之上浩一: 国内飲料中の有機フッ素化合物 (PFCs) の一斉分析 日本薬学会第 140 年会 (京都), 2020 年 3 月

5) 五十嵐由樹, 堤智 昭, 穠山 浩, 井之上浩一: LC-MS/MS を用いた清涼飲料水中の有機フッ素化合物の一斉分析法の確立と実態調査 第 70 回日本薬学会関西支部大会 (滋賀), 2020 年 10 月

6) 真宮彩乃, 五十嵐由樹, 高橋未来, 堤 智昭, 穠山 浩, 井之上浩一: LC-MS/MS による有機フッ素化合物の食品分析の基礎検討 バックグラウンド評価と食品からの前処理 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会 (オンライン), 2021 年 6 月

F. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし

G. 健康危機情報

特になし

H. 参考文献

1) EFSA; PFAS in food: EFSA assesses risks and sets tolerable intake.

<https://www.efsa.europa.eu/en/news/pfas-food-efsa-assesses-risks-and-sets-tolerable-intake> (2020)

2) U.S. EPA. Drinking Water Health Advisory for Perfluorooctane Sulfonate (PFOS). Office of Water document, 822-R-16-004 (2016)

3) 「米国および EU における内分泌かく乱物質の規制動向」2021 年 8 月分, JFE テクノリサーチ

4) Kaboré HA, Vo Duy S, Munoz G, Méité L, Desrosiers M, Liu J, Sory TK, Sauvé S. Worldwide drinking water occurrence and levels of newly-identified perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances. *Sci. Total. Environ.* 616-7, 1089-1100. (2018)

5) Harrad S, Wemken N, Drage DS, Abdallah MA, Coggins AM. Perfluoroalkyl Substances in Drinking Water, Indoor Air and Dust from Ireland: Implications for Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 53, 13449-13457. (2019)

6) Ünlü Endirlik B, Bakır E, Boşgelmez İl, Eken A, Narin İ, Gürbay A. Assessment of perfluoroalkyl substances levels in tap and bottled water samples from Turkey. *Chemosphere* 235, 1162-1171. (2019)

7) Cordner A, De La Rosa VY, Schaidler LA, Rudel RA, Richter L, Brown P. Guideline levels for PFOA and PFOS in drinking water: the role of scientific uncertainty, risk assessment decisions, and social factors. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 29, 157-171. (2019)

8) Rappazzo KM, Coffman E, Hines EP. Exposure to Perfluorinated Alkyl Substances and Health Outcomes in Children: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 691. (2017)

9) Granum B, Haug LS, Namork E, Stølevik SB, Thomsen C, Aaberge IS, van Loveren H, Løvik M, Nygaard UC. Pre-natal exposure to perfluoroalkyl substances may be associated with altered vaccine antibody levels and immune-related health outcomes in early

childhood. *J. Immunotoxicol.* 10, 373-379.
(2013)

10) Glenn G, Shogren R, Jin X, Orts W, Hart-Cooper W, Olson L. Per- and polyfluoroalkyl substances and their alternatives in paper food packaging. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* doi: 10.1111/1541-4337.12726. (2021)