

博 士 論 文

生体試料中環境汚染物質の高感度分析法の開発と
人体曝露の実態把握に関する研究

平成 25 年 7 月

神戸大学大学院海事科学研究科

平井 哲也

目 次

第 1 章	緒論	1
第 1 節	はじめに	1
第 2 節	質量分析計	3
第 3 節	本研究の目的及び概要	4
第 2 章	血液中 PCBs 及び水酸化 PCBs 異性体分析法の開発と 異性体濃度分布調査	6
第 1 節	はじめに	6
第 2 節	血液中 PCBs 全異性体分析法の開発	8
2-2	実験材料及び方法	8
2-2-1	標準品・試薬	8
2-2-2	サンプル	8
2-2-3	脂肪抽出・重量測定	8
2-2-4	PCBs 異性体分析のための抽出・精製・濃縮	9
2-2-5	PCBs 異性体の HRGC/HRMS 分析	9
2-2-6	精度管理	10
2-2-7	統計解析	10

第3節	血液中 PCBs 全異性体分布調査結果と考察	10
第4節	血清中 HO-PCBs 主要異性体分析法の開発	18
2-4	実験材料及び方法	18
2-4-1	標準品・試薬	18
2-4-2	サンプル	19
2-4-3	LC/MS/MS システム及び測定条件	19
2-4-4	血清試料の前処理法	21
2-4-5	精度管理	22
2-4-6	統計解析	22
第5節	血液中 PCBs と HO-PCBs 主要異性体調査結果と考察	22
2-5-1	血液中 PCBs と HO-PCBs の主要異性体濃度調査	22
2-5-2	PCBs と HO-PCBs 異性体濃度と年齢との関係	23
2-5-3	Dioxin, PCBs, HO-PCBs 異性体濃度と糖尿病との関係	26
2-5-4	既調査との比較	28
第6節	まとめ	28
第3章	生体試料中 PBDEs 異性体分析法の開発と異性体濃度分布調査	31
第1節	はじめに	31

第 2 節	生体試料中 PBDEs 主要異性体分析法の開発	32
3-2	実験材料及び方法	32
3-2-1	標準品・試薬	32
3-2-2	サンプル	33
3-2-3	脂肪抽出	33
3-2-4	アルカリ分解	33
3-2-5	多層シリカゲルカラム	33
3-2-6	濃縮	34
3-2-7	HRGC/HRMS 測定	34
3-2-8	精度管理	37
3-2-9	統計解析	37
第 3 節	結果と考察	38
3-3-1	PBDE の人体サンプル中濃度	38
3-3-2	PBDEs 異性体分布	43
3-3-3	生体試料中 PBDEs 濃度の相関	44
3-3-4	PBDEs 濃度と年齢及び性別との関係	47
3-3-5	PBDEs 濃度と死亡病気との関係	48
第 4 節	まとめ	48

第4章	尿中水酸化 PAHs 異性体分析法の開発と海技者における曝露調査	50
第1節	はじめに	50
第2節	尿中多環芳香族炭化水素代謝物分析法の開発	51
4-2	実験材料及び方法	51
4-2-1	標準品・試薬	51
4-2-2	標準溶液の調製	52
4-2-3	尿試料	52
4-2-4	LC/MS/MS システム及び測定条件	52
4-2-5	尿中クレアチニンの測定	53
4-2-6	尿試料の前処理法	53
4-2-7	統計解析	55
第3節	結果と考察	55
4-3-1	尿中水酸化 PAHs の分析法バリデーション	55
4-3-2	測定結果の検討	57
第4節	まとめ	59
第5章	総合結論	60

参考文献	64
研究業績	74
謝辞	78

第1章 諸論

第1節 はじめに

残留性有機汚染物質(Persistent Organic Pollutants ; POPs)は、環境中で分解されにくく、生物体内に蓄積しやすい化学物質であるため人体の健康に悪影響を及ぼす化学物質である。また、POPは、地球上で長距離を移動するため、地球規模での環境汚染が問題となっている。

日本では、POPの製造及び使用を既に法律で原則として禁止しているが、POPの中には非意図的に生成する物質も含まれている。また、海外でのPOPの使用や、十分な対策を取っていない国もあり日本においてもPOPによる環境・食品汚染が問題となっている。

2001年5月にPOP(12物質)について、製造・使用・輸出入の禁止と廃棄のほか、ごみ焼却などで発生するダイオキシン類の排出削減などを定めた残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約(POP条約)が採択された。また、2004年5月に50ヶ国が条約を締結したことによりPOP条約が発効された。2009年7月現在において、日本を含む164カ国及びECが締結している。また、2009年5月に新たに9物質についてPOP条約対象リストへの追加が承認された。POP対象化学物質のリストをTable 1-1に示す。

日本国内では、POPの環境中(大気、水、底質や野生生物)濃度については、定期的な測定によるモニタリング調査が行われている。最終的な人体への曝露については、この環境モニタリング調査データより曝露状況の推定が行われているのが現状である。しかしこの環境モニタリング調査も、測定地点数やサンプル数とも十分であるとはいえず、また、これらの環境サンプル中の測定値から環境汚染物質による人への曝露状況や健康影響を的確に評価するには不十分である。

Table 1-1 List of POPs compounds

	条約発効時からの附属書掲載物質	第4回締約国会議*で附属書に追加された物質
付属書A (廃絶)	アルドリ クロルデン ディルドリン エンドリン ヘプタクロル ヘキサクロロベンゼン マイレックス トキサフェン ポリ塩化ビフェニル(PCB)	4,5臭素化ジフェニルエーテル クロルデコン ヘキサブロモビフェニル リンデン(γ -HCH) α -ヘキサクロロシクロヘキサン β -ヘキサクロロシクロヘキサン 6,7臭素化ジフェニルエーテル
付属書B (制限)	DDT	パーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)とその塩、及び パーフルオロオクタンスルホン酸フルオリド(PFOSE)
付属書C (非意図的生成物)	ポリ塩化ジベンゾパラジオキシン(PCDD) ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF) ポリ塩化ビフェニル(PCB) ヘキサクロロベンゼン	ペンタクロロベンゼン

* : 2009年5月

POPs は分解されにくく、難分解性で蓄積されやすいことから、環境汚染や食物連鎖を通じて最終的に人体への曝露が問題となる。また、POPs は長距離を移動するため、今後も、POPs 条約非加盟国や対策が十分にとられていない国々からの越境環境汚染が懸念される。

このように、環境汚染物質による人への曝露状況の調査や健康影響評価については未だ十分とは言えない状況である。また、生体試料中の環境汚染物質及びその代謝物の測定は、生体試料では、環境試料に比べ試料量が限られること、また、濃度が極微量であることから、高感度測定法の開発が必要不可欠である。これらのことより、環境汚染物質による人体曝露も含めた包括的な環境汚染リスク評価を行うためには、環境試料中の環境汚染物質モニタリング調査の視点からだけでなく、人体曝露調査という新たな視点から環境汚染の把握・評価することが重要であると考えられる。そこで本研究では、生体試料中環境汚染物質の高感度分析法の開発と人体曝露調査を行うことを目的とした。本研究の概要を

Fig. 1-1 に示した。

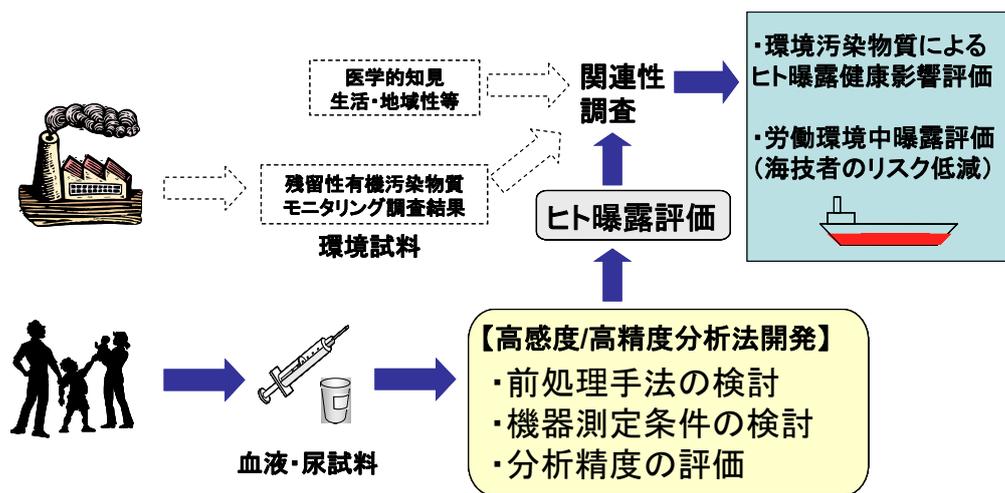


Fig.1-1 Outline of this study

第2節 質量分析計

現在、数万種類にも及ぶ化学物質が年間数億トンもの規模で生産され、さらに新たな化学物質が研究開発され続けており、これら化学物質による環境汚染と人を含む生体影響が社会問題となっている。そこで、新規な化学物質の製造・取り扱いに関しては「化学物質審査規制法」による規制を受け、環境、人、生態系等への影響試験を実施し、その結果を基に審査を受けることとなっている。また、1999年交付の「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」に基づく環境汚染物質排出・移動登録 (PRTR) 制度により、その使用量及び環境への排出量が把握されている。しかしながら、PRTR制度により把握されている化学物質は約 350 物質程度であり、使用量の少ない化学物質、個人事業や家庭内等で使用される化学物質に関しての実態は把握さ

れていない。現在使用されない化学物質であっても、残留性の高い化学物質、遺棄された化学兵器や化学物質、副次的に発生するダイオキシン等の有害性の高い化学物質による環境汚染も無視することはできない。

これら環境中に存在する化学物質の検出測定には、様々な機器分析技術が使用されてきた。種々検出器の中でも近年高感度かつ高選択性を有する検出器として注目され目覚しく発展をとげているのが質量分析計である。質量分析計には多くのタイプの装置があり、環境や生命科学分野関連測定において広く使用されている。

本研究では、生体試料中の超微量環境汚染化学物質の測定系開発のために高感度かつ高選択性分離検出法に関して優れている高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法(HRGC/HRMS)や高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法(LC/MS/MS)の質量分析装置を用いた。また、安定同位体ラベル化内部標準試薬を用いて同位体希釈法による高精度かつ高感度な分析法の開発を行った。

第3節 本研究の目的及び概要

本研究では、日本人における環境汚染物質による人体曝露実態の把握を目的とし、従来から実施されている環境試料モニタリングによる環境汚染や人体曝露評価とは異なった視点から環境汚染物質による人体曝露について評価を行う。また、本研究では、質量分析計(HRGC/HRMSとLC/MS/MS)と安定同位体ラベル化内部標準試薬を用いた同位体希釈法による環境汚染物質及びその代謝物の生体試料中高感度分析法を開発し、生体試料中環境汚染物質の曝露実態調査を行う。本研究で測定対象とした環境汚染物質は、ポリ塩素化ビフェニル(PCBs)及びその体内代謝物である水酸化PCBs、ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)、多環芳香族炭化水素(PAHs)の体内代謝物である水酸化PAHs

である。水酸化 PAHs については、海事作業中に機関士にて PAHs による曝露懸念があるため、海事作業環境中の機関士の尿を採取し、尿中水酸化 PAHs を測定することにより PAHs による機関士の作業環境中曝露実体について調査評価した。以下に本論文の研究概要を示す。

第 2 章 血液中 PCBs 及び水酸化 PCBs 異性体分析法の開発と異性体濃度分布調査

血液中 PCBs 全異性体分析法の開発を目的として、HRGC/HRMS を用いて血液中 PCBs 全異性体の分析法を開発し、日本の健康成人の血液中 PCBs 異性体濃度分布を調査することを目的とする。また、PCBs 体内代謝物である水酸化 PCBs の主要異性体についても LC/MS/MS を用いた血清中高感度分析法の開発を行い日本人血清中主要異性体分布調査することを目的とする。

第 3 章 生体試料中 PBDEs 異性体分析法の開発と異性体濃度分布調査

生体試料中 PBDEs 主要異性体分析法の開発を目的として、HRGC/HRMS を用いて生体試料中 PBDEs 主要異性体の分析方法を検討し、日本人解剖試料を用いて PBDEs 主要異性体濃度分布と体内分布調査を目的とする。

第 4 章 尿中水酸化 PAHs 異性体分析法の開発と海技者における曝露調査

尿中 PAHs 代謝物である水酸化 PAHs の 8 化合物について LC/MS/MS を用いた高感度分析法の開発と海技者の作業環境中 PAHs 曝露評価調査を目的とする。

第 5 章 総合結論

本論文から得られた総合結論を章ごとにまとめとする。

第 2 章 血液中 PCBs 及び水酸化 PCBs 異性体分析法の開発と異性体濃度分布調査

第 1 節 はじめに

PCBs は脂溶性が高く、生体内で代謝されにくく蓄積性がある。過去に使用され環境中に放出された PCBs による環境汚染の結果として、ヒトは食物連鎖を通じて生体内に PCBs を取込み蓄積している。日本では 1954～1971 年に約 58,000 トンの PCBs が製造された。カネクロールは日本で製造された製品である。各カネクロール製品の PCB 異性体混合含有率はカネクロール製品が製造された過程と最終塩素重量%を反映する。過去に 5500 トン（総 PCBs 量の 10%以下）の PCBs について分解処理が実施された。その後、日本では PCBs 分解処理に関する法律が 2001 年施行され、2027 年までにすべての PCBs 廃棄物の分解処理が行われる予定で現在、保管されている PCBs の分解処理作業が進捗している。

血液中 PCBs 分析において一般的に PCBs 異性体分析の詳細な分析までは実施されていないのが現状である。しかし、一般健康成人の PCBs による曝露実態の評価や PCBs 廃棄物分解処理過程での作業労働者の PCB 曝露を詳細に評価するためには PCBs 異性体分析が必要不可欠であると考えられる。現在、ダイオキシン類の人体曝露とリスク評価において血中 Dioxin Like-PCBs の分析が行われている。しかしながら、Dioxin Like-PCBs 以外の他の多くの Non-Dioxin Like PCBs 異性体の毒性について、既報 (Giesy and Kannan, 1988) では内分泌攪乱作用を示すことが報告されている。

本研究では、HRGC/HRMS と PCBs 異性体分別分析用に開発された HT8-PCB カラム (Matsumura et al, 2002) を用いて血液中 PCBs 全異性体分

析法を開発した。また、開発した分析法を用いて、日本の健康成人 24 名の PCBs 異性体濃度分布調査を実施した。本研究では、健康成人の PCBs 曝露の実態と血液中異性体分布を明らかにした。

PCBs 全異性体分析は、日本人 24 名の健康成人ボランティア（男女各 12 名；年齢 25～46 歳）から得た全血について HRGC/HRMS にて実施した。血液中 PCBs 209 異性体分析は PCBs による直接的な人体曝露評価が可能のため、環境汚染調査と合わせて PCBs の環境汚染評価に役立つと考える。

また、PCBs は、生体内においてチトクロム P450 の酸化により水酸化 PCBs (HO-PCBs) に代謝され、抱合体となって速やかに尿中に排泄される(Letcher et al, 2000)しかし、HO-PCBs の一部異性体では、甲状腺ホルモンと分子構造が似ている (Fig.2-1) ことから甲状腺ホルモン結合タンパク質であるトランスサイレチンと結合し、体外に排泄されずに体内に残留し、内分泌ホルモン攪乱性を有すると考えられている (Kitamura et al, 2005)。また、HO-PCBs の一部異性体は、子どもの IQ 値の低下など脳の発達障害に影響していることが報告されている (黒田,2003)。HO-PCBs の体内異性体分布については、PCBs ほど詳細に調査が行われていない現状である。一方、HO-PCBs の分析法については、誘導体化を行い HRGC/HRMS での分析が報告されている(Sakiyama et al, 2007)。誘導体化を行う測定では、前処理操作が煩雑で、誘導体化効率が条件により異なる可能性も考えられる。そこで本研究では、LC/MS/MS を用いて、誘導体化不要の HO-PCBs 高感度測定系の開発を行い、日本人成人血清 102 検体について HO-PCBs 主要異性体濃度調査を行った。

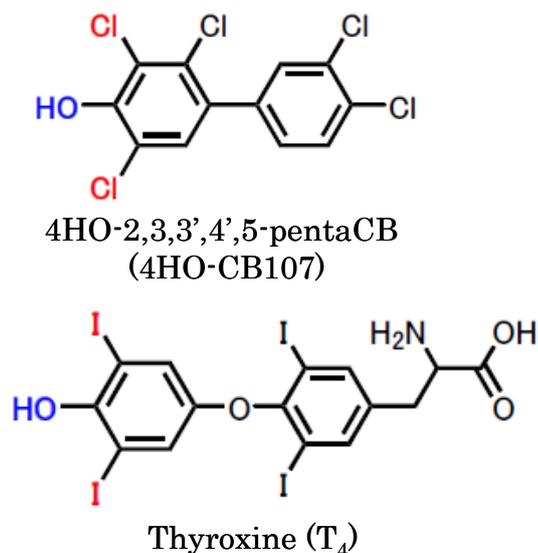


Fig.2-1 The chemical structural formula of HO-PCBs and Thyroxine

第2節 血液中 PCBs 全異性体分析法の開発

2-2 実験材料及び方法

2-2-1 標準品・試薬

PCBs 標準溶液と ¹³C ラベル化 PCBs 標準溶液は CIL 社製を用いた。他全ての溶媒と試薬は Dioxins または PCBs 分析用を用いた。

2-2-2 サンプル

全血サンプルは、インフォームドコンセントを得た 24 名の健康成人（男女各 12 名；年齢 25～46 歳）より採血した。採血は早朝空腹時に実施した。全血サンプルは分析まで -20 °C にて保管した。

2-2-3 脂肪抽出・重量測定

脂肪抽出はヒト血液中ダイオキシン類分析暫定マニュアル（厚生労働省，2000）に従い実施した。15 g の血液に 6 mL の飽和硫酸アンモニウム水溶液，3 mL のエタノールと 9 mL の n-ヘキサンを添加し 30 分間振とう抽出を行い n-ヘキサン層を分取した。次に，12 mL の n-ヘキサンにて 30 分間 2 回振とう抽

出を行った。抽出した n-ヘキサン溶液はヘキサン洗浄水にて洗浄後無水硫酸ナトリウムにて脱水し、エバポレーターにて乾固した。その後、脂肪重量測定を行った。

2-2-4 PCBs 異性体分析のための抽出・精製・濃縮

全血 15 g に ^{13}C ラベル化 PCBs 内部標準溶液を 100 pg 添加した。その後、血液を 2 mol/L 水酸化カリウム/エタノール 10% 水溶液にて室温で 2 時間アルカリ分解を行った。アルカリ分解後、15 mL の n-ヘキサンにて 30 分振とう、PCBs を n-ヘキサン層に抽出後、n-ヘキサン層を分取した。この抽出操作を 2 回繰り返した。抽出液はエバポレーターにて約 2 mL に濃縮後、多層シリカゲルカラムにアプライした。多層シリカゲルカラムは内径 10 mm、長さ 250 mm のガラスカラムに下から順に、0.9 g の無水硫酸ナトリウム、0.5 g のシリカゲル、2.7 g の 44% (W/W) 硫酸シリカゲル、0.5 g のシリカゲル、0.8 g の 10% (W/W) 硝酸銀シリカゲル、0.5 g のシリカゲル、0.9 g の無水硫酸ナトリウムを詰め、多層シリカゲルカラムを作成した。抽出液をアプライする前に 60 mL の n-ヘキサンにて洗浄した。抽出液をアプライ後、100 mL のジクロロメタン/n-ヘキサン(1:9 v/v)にて溶出精製した。溶出液に数滴のノナンを加えエバポレーターにて約 0.5 mL まで濃縮し、GC バイアルに窒素気流下で濃縮しながら移した。バイアルに 50 pg の ^{13}C ラベル化 PCBs シリンジスパイク溶液を加え、最終濃縮液を 20 μL とした。その 1 μL を HRGC/MS に注入し分析した。

2-2-5 PCBs 異性体の HRGC/HRMS 分析

HRGC/HRMS は、MS 装置は AutoSpec-Ultima NT (Micromass 社製) を GC 装置は HP6890 シリーズ (Agilent 社製) を用いた。分離カラムは HT8-PCB キャピラリーカラム (内径 0.25 mm-長さ 60 m) (関東化学社製) を用いた。カラムの昇温条件は、1-5 塩素 PCBs 分析では、120~180 $^{\circ}\text{C}$ まで 20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で昇温後、

180～252 °Cまで 2 °C/分にて昇温する。その後、310 °Cまで 50 °C/分で昇温し 5 分間維持した。6～10 塩素 PCBs 分析では、120～180 °Cまで 20 °C/分で昇温後、180～260 °Cまで 2 °C/分にて昇温した。その後、310 °Cまで 5 °C/分で昇温し 5 分間維持した。インジェクター温度は、290 °C、イオン源温度は 280 °C に設定した。キャリアーガスには高純度ヘリウムを用い、流量は 1.0 mL/min. とした。イオン化エネルギーは 35 eV、加速電圧 8 kV に設定した。MS の分解能は 12000 とし Selected ion mode (SIM)モードにて定量分析を行った。

2-2-6 精度管理

検量線溶液 (EC-4976) は CIL 社製を用いた。1～400 ng/mL の範囲で 4 濃度の検量線を作成した。各異性体の直線性 r^2 は 0.99 以上と良好であった。分析全工程での内部標準物質の回収率は 70～120%以内であることを確認した。全操作ブランク試験は 20 サンプル毎に 1 本の割合で実施した。ブランクは全て LOD 以下であることを確認した。

2-2-7 統計解析

結果の統計解析は、SPSS 11.0J (SPSS 社) を用いて実施した。

第 3 節 血液中 PCBs 全異性体分布調査結果と考察

24 名の健康成人血液の PCBs 異性体濃度測定を行った。血液中脂肪含量範囲は 0.3～0.7% 平均 0.53% 中央値 0.54%であった。全血中総 PCBs 範囲は 317.1～1521.8 pg/g-血液 (55.4～318.1 ng/g-脂肪) 平均 771.9 pg/g-血液 (139.6 ng/g-脂肪) 中央値 675.2 pg/g-血液 (112.3 ng/g-脂肪) であった。Fig. 2-2 に PCB 濃度と年齢 (男女, 男性, 女性) の相関関係を示す。被験者の年齢は 25～46 歳であった。また、主要 PCBs 異性体濃度と年齢との相関関係を Table 2-1 に示す。総 PCBs と主要異性体 PCBs 濃度と年齢の間には、いくつかの異性体

を除いて良好な正の相関関係が見られた。血液中総 PCBs 濃度と年齢との間には相関係数 $r=0.62$, $p<0.01$ の有意な正の相関があった。他の調査報告 (Miller et al, 1991, Gerstenberger et al, 1997) においても血液中 PCBs 濃度は加齢とともに増加する傾向が報告されている。また、性別による年齢と血液中総 PCBs 濃度との相関について、女性は特に経産婦の場合、母乳育児による PCBs の一時的な排泄が考えられるため、男性ほど年齢との有意な相関は見られなかった (Fig.2-2)。

血液中の 3~7 塩素 PCBs の典型的な SIM クロマトグラムを Fig. 2-3 に示す。図中に主要な異性体ピークのアサインを示した。以下、異性体番号の表記は BZ 番号 (Ballschmitter and Zell, 1980) に従った。血液中より平均 95 の PCBs 異性体が検出された。詳細を Table 2-2-1,2,3 に示す。その中で主要な 32 異性体が判明した。

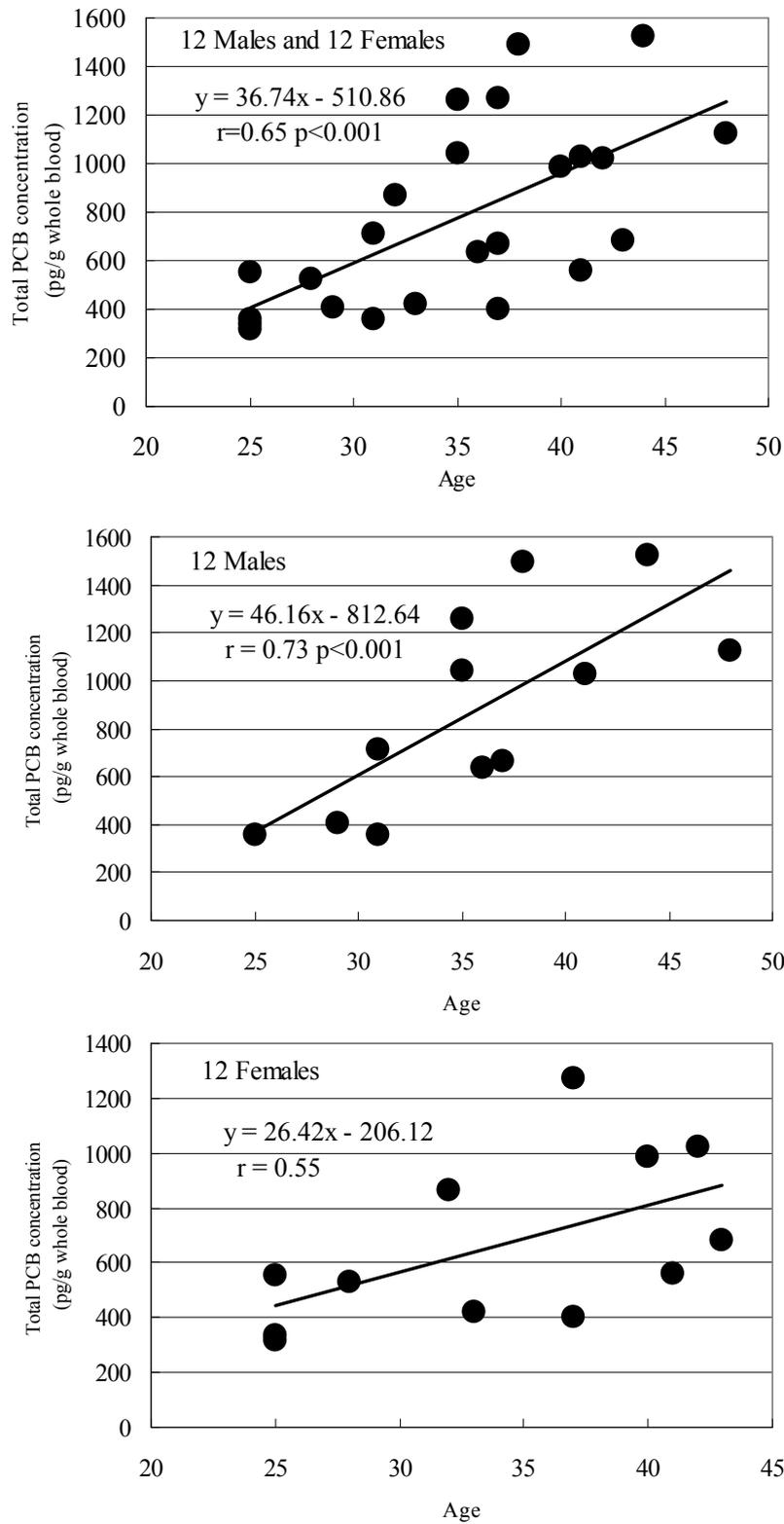


Fig.2-2 Age versus total PCB concentration in human blood samples

Table 2-1 Relationship between age and PCB predominant congeners concentrations in human blood samples

Congeners (BZ#)	Regression equation*		Correlation Coefficient	p value
	a	b		
28	0.13	1.6	0.27	>0.05
66	0.19	0.56	0.28	>0.05
74	1.4	-20	0.61	<0.01
99	1.2	-12	0.47	<0.05
105	0.29	-0.50	0.40	>0.05
114	0.18	-2.4	0.66	<0.01
118	1.5	-11	0.49	<0.05
137	0.22	-3.1	0.66	<0.01
138	2.9	-36	0.59	<0.01
146	1.2	-17	0.63	<0.01
153	8.7	-132	0.65	<0.01
156	1.0	-16	0.73	<0.01
157	0.21	-3.2	0.71	<0.01
163,164	1.8	-26	0.65	<0.01
167	0.28	-4.0	0.65	<0.01
170	1.3	-22	0.68	<0.01
172	0.24	-3.9	0.67	<0.01
177	0.39	-5.1	0.60	<0.01
178	0.49	-8.0	0.66	<0.01
180	4.8	-77	0.64	<0.01
182,187	2.6	-42	0.65	<0.01
183	0.53	-7.6	0.59	<0.01
190	0.32	-5.2	0.68	<0.01
194	0.73	-14	0.68	<0.01
196,203	0.71	-13	0.68	<0.01
199	0.22	-0.50	0.19	>0.05
201	0.62	-15	0.44	<0.05
202	0.29	-5.2	0.67	<0.01

*: Regression equation, $y=ax+b$ (pg/g whole blood),
 $x=age$ (year)

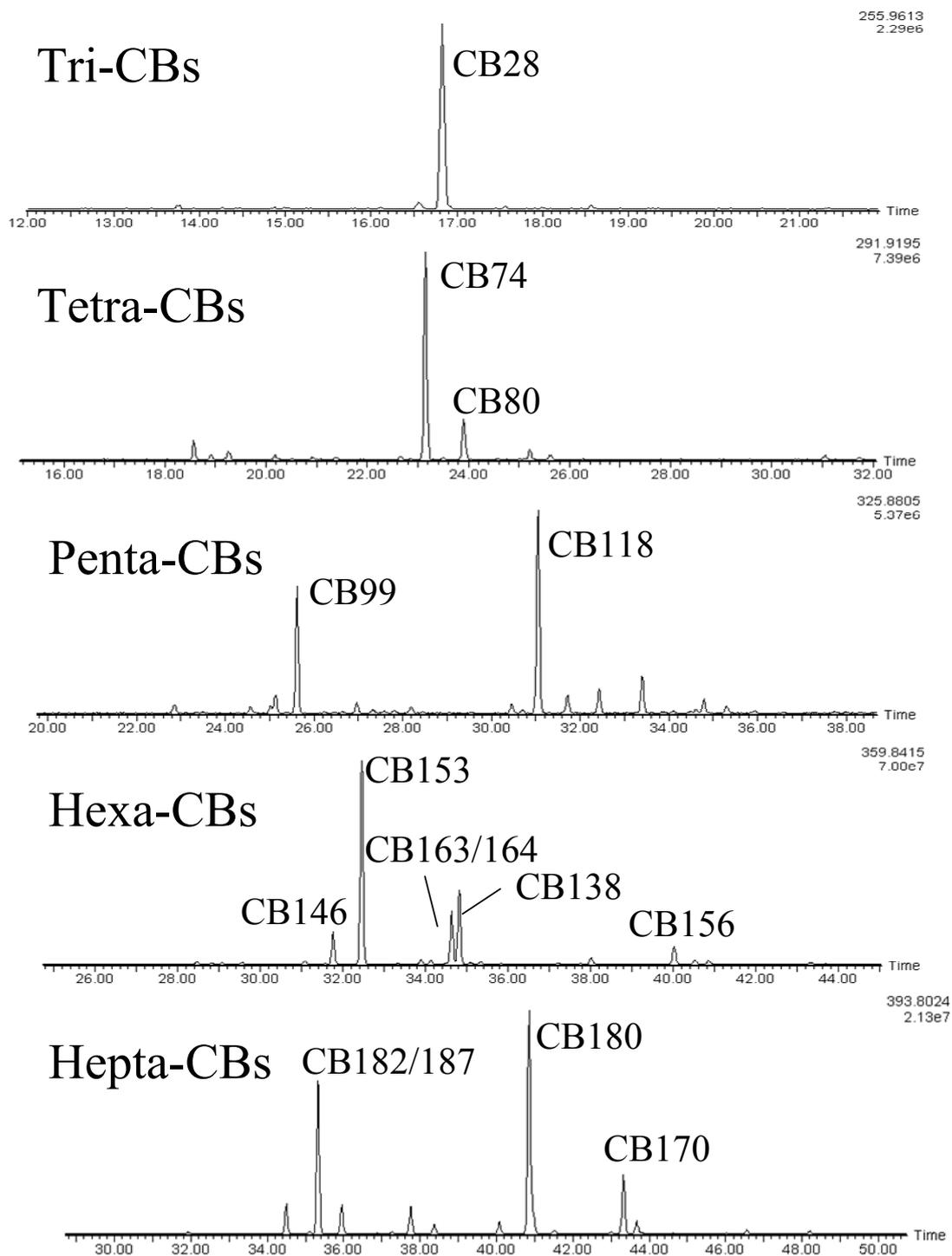


Fig.2-3 Typical chromatograms of the tri- to hepta- CBs in human blood samples from healthy volunteers

Table 2-2-1 PCB congeners in human blood samples

(n=24)

Congeners (BZ#)	Substitution	Concentrations (pg / g on a whole blood basis)			S.D.	% of N.D.
		Mean	Minimum	Maximum		
<i>Total-MonoCB</i>						
#11	3,3'	0.1	N.D.	0.8	0.2	75.0
<i>Total-DiCB</i>						
#18	2,2',5'	0.0	N.D.	0.3	0.1	79.2
#20,33	2,3,3'- / 2',3,4'	0.0	N.D.	0.1	0.0	87.5
#28	2,4,4'	6.3	1.6	15.4	3.4	0.0
#31	2,4',5'	0.2	N.D.	0.6	0.2	29.2
#36	3,3',5'	0.0	N.D.	0.2	0.1	91.7
#38	3,4,5'	0.2	N.D.	3.8	0.8	95.8
<i>Total-TriCB</i>						
#42	2,2',3,4'	0.0	N.D.	0.2	0.1	83.3
#43	2,2',3,5'	0.4	N.D.	1.7	0.4	16.7
#44	2,2',3,5'	0.5	0.2	1.7	0.4	0.0
#47,48	2,2',4,4'- / 2,2',4,4'	1.4	0.4	4.0	0.8	0.0
#49	2,2',4,5'	0.2	N.D.	2.4	0.6	83.3
#52,69	2,2',5,5'- / 2,3',4,6'	2.8	0.4	11.4	3.2	0.0
#55	2,3,3',4'	0.0	N.D.	0.3	0.1	79.2
#58	2,3,3',5'	0.0	N.D.	0.2	0.1	79.2
#60	2,3,4,4'	1.8	N.D.	5.3	1.1	4.2
#63	2,3,4',5'	0.2	N.D.	1.1	0.3	54.2
#64	2,3,4',6'	0.2	N.D.	0.5	0.2	62.5
#66	2,3',4,4'	7.2	1.6	19.9	4.5	0.0
#68	2,3',4,5'	0.3	N.D.	1.1	0.2	8.3
#70	2,3',4',5'	0.3	N.D.	0.8	0.2	4.2
#72	2,3',5,5'	0.1	N.D.	1.1	0.3	79.2
#74	2,4,4',5'	28.1	8.9	53.1	14.8	0.0
<i>Total-TetraCB</i>						
#83	2,2',3,3',5'	0.3	N.D.	0.7	0.2	20.8
#84,92	2,2',3,3',6' / 2,2',3,5,5'	2.0	0.2	7.5	1.6	0.0
#85	2,2',3,4,4'	0.6	N.D.	1.9	0.4	4.2
#86,97,117	2,2',3,4,5'- / 2,2',3',4,5'- / 2,3,4',5,6'	1.9	0.5	4.4	1.1	0.0
#87,115	2,2',3,4,5'	1.0	0.4	2.7	0.6	0.0
#89	2,2,3,4,6'	0.0	N.D.	0.9	0.2	95.8
#90	2,2',3,4',5'	0.2	N.D.	2.7	0.6	91.7
#91	2,2',3,4',6'	0.0	N.D.	0.3	0.1	79.2
#93,95,98,102	2,2',3,5,6'- / 2,2',3,5',6'- / 2,2',3',4,6'- / 2,2',4,5,6'	2.2	0.5	7.2	1.5	0.0
#99	2,2',4,4',5'	29.9	12.1	62.8	16.8	0.0
#101	2,2',4,5,5'	5.7	0.9	22.6	4.9	0.0
#105	2,3,3',4,4'	9.6	3.1	21.4	4.8	0.0
#107,108	2,3,3',4',5'- / 2,3,3',4,5'	2.5	0.5	6.7	1.7	0.0
#109	2,3,3',4,6'	0.0	N.D.	0.1	0.0	95.8
#110,120	2,3,3',4',6'- / 2,3',4,5,5'	1.7	0.4	5.5	1.1	0.0
#111	2,3,3',5,5'	0.4	N.D.	0.8	0.2	8.3
#113	2,3,3',5',6'	0.1	N.D.	0.3	0.1	70.8
#114	2,3,4,4',5'	4.0	1.4	7.2	1.9	0.0
#118	2,3',4,4',5'	42.8	13.2	85.6	20.6	0.0
#119	2,3',4,4',6'	0.2	N.D.	0.6	0.2	41.7
#121	2,3',4,5',6'	0.2	N.D.	0.6	0.2	75.0
#123	2',3,4,4',5'	0.7	0.2	1.4	0.3	0.0
#126	3,3',4,4',5'	0.3	N.D.	0.8	0.2	8.3
<i>Total-PentaCB</i>						
		106.4	36.7	238.5	51.9	-

Table 2-2-2

Congeners (BZ#)	Substitution	Concentrations (pg / g on a whole blood basis)			S.D.	% of N.D.
		Mean	Minimum	Maximum		
#128	2,2',3,3',4,4'-	1.3	0.3	5.2	1.1	0.0
#129	2,2',3,3',4,5'-	1.9	N.D.	4.5	1.2	4.2
#130	2,2',3,3',4,5'-	3.4	1.3	7.1	1.7	0.0
#132	2,2',3,3',4,6'-	0.1	N.D.	1.2	0.3	87.5
#133	2,2',3,3',5,5'-	2.8	1.0	6.0	1.4	0.0
#134	2,2',3,3',5,6'-	0.0	N.D.	0.2	0.1	70.8
#135	2,2',3,3',5,6'-	0.9	0.2	2.4	0.5	0.0
#136	2,2',3,3',6,6'-	0.2	N.D.	0.6	0.2	25.0
#137	2,2',3,4,4',5'-	4.5	1.7	9.0	2.2	0.0
#138	2,2',3,4,4',5'-	64.7	26.6	124.4	32.4	0.0
#141	2,2',3,4,5,5'-	0.6	0.1	2.0	0.4	0.0
#146	2,2',3,4',5,5'-	25.1	8.7	50.1	12.5	0.0
#147	2,2',3,4',5,6'-	1.1	0.3	2.9	0.7	0.0
#149	2,2',3,4',5',6'-	1.8	0.5	5.5	1.1	0.0
#151	2,2',3,5,5',6'-	2.6	0.6	7.9	1.7	0.0
#153	2,2',4,4',5,5'-	171.0	66.8	350.1	88.5	0.0
#154	2,2',4,4',5,6'-	0.4	N.D.	1.1	0.3	4.2
#155	2,2',4,4',6,6'-	0.0	N.D.	0.2	0.1	83.3
#156	2,3,3',4,4',5'-	17.1	5.1	37.2	8.6	0.0
#157	2,3,3',4,4',5'-	4.2	1.4	8.0	2.0	0.0
#158	2,3,3',4,4',6'-	1.6	0.5	4.2	1.0	0.0
#159	2,3,3',4,5,5'-	0.0	N.D.	0.2	0.1	66.7
#162	2,3,3',4',5,5'-	0.2	N.D.	0.6	0.2	29.2
#163,164	2,3,3',4',5,6- / 2,3,3',4',5',6-	38.9	15.1	72.6	18.7	0.0
#165	2,3,3',5,5',6'-	0.3	N.D.	0.7	0.2	12.5
#166	2,3,4,4',5,6'-	0.7	0.2	1.7	0.4	0.0
#167	2,3',4,4',5,5'-	5.8	2.3	10.6	2.9	0.0
#169	3,3',4,4',5,5'-	0.3	N.D.	0.6	0.1	4.2
<i>Total-HexaCB</i>		<i>351.8</i>	<i>142.2</i>	<i>694.4</i>	<i>174.0</i>	<i>-</i>
#170	2,2',3,3',4,4',5'-	23.2	5.1	51.5	12.6	0.0
#171	2,2',3,3',4,4',6'-	3.0	1.1	6.1	1.5	0.0
#172	2,2',3,3',4,5,5'-	4.6	1.5	10.0	2.4	0.0
#174	2,2',3,3',4,5,6'-	0.6	0.2	1.6	0.4	0.0
#175	2,2',3,3',4,5',6'-	0.6	N.D.	1.4	0.4	4.2
#177	2,2',3,3',4',5,6'-	8.5	3.1	17.7	4.3	0.0
#178	2,2',3,3',5,5',6'-	9.2	2.6	20.6	4.9	0.0
#179	2,2',3,3',5,6,6'-	0.7	0.2	1.8	0.4	0.0
#180	2,2',3,4,4',5,5'-	89.7	28.4	196.3	49.1	0.0
#181	2,2',3,4,4',5,6'-	0.1	N.D.	0.3	0.1	54.2
#182,187	2,2',3,4,4',5,6'- / 2,2',3,4',5,5',6-	50.7	15.0	108.8	27.0	0.0
#183	2,2',3,4,4',5',6'-	11.0	4.6	22.9	6.0	0.0
#184	2,2',3,4,4',6,6'-	0.0	N.D.	0.2	0.0	91.7
#185	2,2',3,4,5,5',6'-	0.0	N.D.	0.1	0.0	95.8
#189	2,3,3',4,4',5,5'-	1.9	0.7	4.5	1.0	0.0
#190	2,3,3',4,4',5,6'-	5.8	2.0	12.7	3.1	0.0
#191	2,3,3',4,4',5',6'-	1.3	0.5	2.8	0.7	0.0
<i>Total-HeptaCB</i>		<i>211.0</i>	<i>68.6</i>	<i>455.0</i>	<i>111.8</i>	<i>-</i>

Table 2-2-3

Congeners (BZ#)	Substitution	Concentrations (pg / g on a whole blood basis)			S.D.	% of N.D.
		Mean	Minimum	Maximum		
#194	2,2',3,3',4,4',5,5'-	11.3	2.9	28.7	7.0	0.0
#195	2,2',3,3',4,4',5,6'-	2.5	0.8	5.9	1.5	0.0
#196,#203	2,2',3,3',4,4',5,6'- / 2,2',3,4,4',5,5',6'-	11.7	3.6	29.3	6.9	0.0
#197	2,2',3,3',4,4',6,6'-	0.3	N.D.	3.4	0.7	20.8
#199	2,2',3,3',4,5,6,6'-	7.2	N.D.	24.0	7.5	37.5
#200	2,2',3,3',4,5',6,6'-	0.3	N.D.	1.7	0.5	62.5
#201	2,2',3,3',4',5,5',6'-	6.3	0.4	33.7	9.3	0.0
#202	2,2',3,3',5,5',6,6'-	4.8	1.2	11.9	2.8	0.0
#205	2,3,3',4,4',5,5',6'-	0.6	0.2	1.1	0.3	0.0
<i>Total-OctaCB</i>		<i>45.0</i>	<i>13.7</i>	<i>112.7</i>	<i>26.6</i>	-
#206	2,2',3,3',4,4',5,5',6'-	3.1	1.1	6.8	1.6	0.0
#207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-	0.7	0.3	1.6	0.3	0.0
#208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-	1.2	0.4	3.2	0.7	0.0
<i>Total-NonaCB</i>		<i>5.0</i>	<i>1.8</i>	<i>11.6</i>	<i>2.6</i>	-
#209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-	2.1	1.0	4.3	1.0	0.0
<i>Total-DecaCB</i>		<i>2.1</i>	<i>1.0</i>	<i>4.3</i>	<i>1.0</i>	-
<i>Total-PCBs</i>		<i>771.9</i>	<i>317.1</i>	<i>1521.8</i>	<i>377.3</i>	-

** most abundant PCB congeners.

* predominant PCB congeners

N.D. : not detected

Fig. 2-4 には血液中 PCBs 濃度の同族体分布を示す。6 塩素 PCBs がヒト血液中で主要な同族体であり総 PCBs 濃度の 46%を占めていた。1,2,9,10 塩素 PCBs は総 PCBs 濃度に占める割合は無視できる程度であった。最も高濃度な 13 異性体を Table 2-1,2 に示した。この 13 異性体合計濃度は血液中総 PCBs 濃度の 75%を占めていた。この 13 異性体以外の他の PCBs 異性体はいずれも総 PCBs 濃度の 3%以下であった。13 異性体の中で、CB153, CB138, CB180, CB74, CB99, CB118, CB187 の合計 7 異性体濃度は総 PCBs 濃度の 60%を占め、これらの異性体は、いずれも 2-, 4-, 5-位に塩素が置換していたものであった。この 2-, 4-, 5-位塩素置換主要異性体については、既報 (Konishi et al, 2001, Nakano et al, 2002) の日本人の母乳中 PCBs 濃度の報告と同様であった。本研究での血液中 PCBs 濃度の主要異性体分布は母乳中 PCBs 主要異性体分布と一致した。

更に, CB138 と CB153 は PCBs 製品にも含まれており, 既報(Koga et al, 2001) では体内代謝を受けにくい異性体として報告されている。日本人血液中の主要 PCBs 異性体には, 2-, 4-, 5-位塩素置換性体が大部分を占めることが判明した。

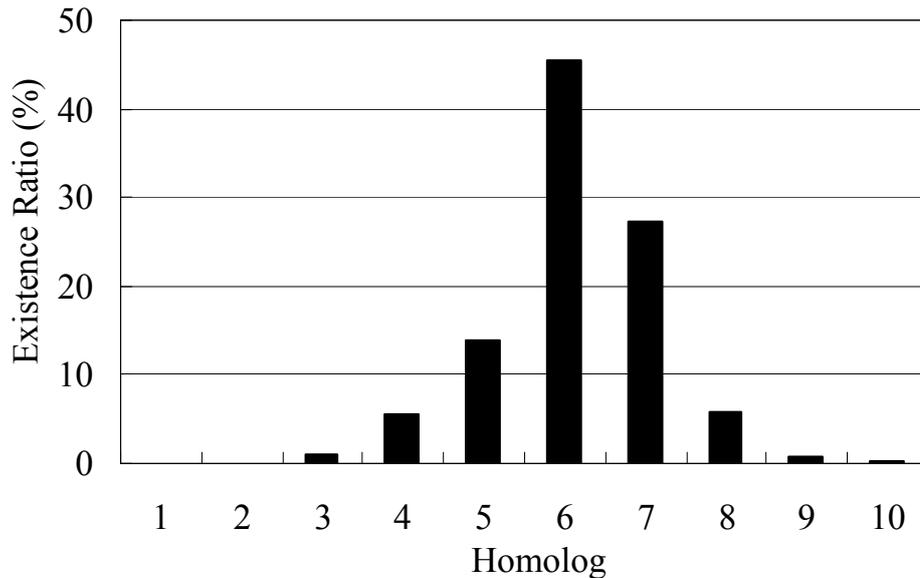


Fig.2-4 Homolog distribution of PCBs in human blood samples

しかし, 2 塩素等の低塩素 PCBs のいくつかにおいて血液中に存在する報告 (Litten et al, 2000) がある。これは環境汚染からの曝露が原因と考えられる。例えば CB11 異性体について, CB11 はカネクロール製品にはほとんど含まれていないが, 血液中に存在することが判明しその曝露経路が問題となっている。この汚染原因としては現在 3,3'-ジクロロベンジジン塩が関連していると考えられているが, 更なる調査が必要である。本研究においても 24 人中 13 人の血液中で CB11 が検出された。

第 4 節 血清中 HO-PCBs 主要異性体分析法の開発

2-4 実験材料及び方法

2-4-1 標準品・試薬

HO-PCBs 標準溶液として、和光純薬社製の 4HO-CB107, 3HO-CB118, 3'HO-CB138, 4HO-CB146, 4'HO-CB172, 4HO-CB187 の混合標準溶液と Wellington 社製 3HO-CB153 を用いた。¹³C ラベル化 HO-PCBs 標準溶液は和光純薬社製の 4HO-CB107, 3HO-CB118, 3'HO-CB138, 4HO-CB146, 4'HO-CB172, 4HO-CB187 の混合標準溶液を用いた。他全ての溶媒と試薬は Dioxins または PCBs 分析用を用いた。

2-4-2 サンプル

血清サンプルは、The Saku Control Obesity Program (SCOP)(Watanabe et al, 2007)の参加者よりインフォームドコンセントを得た 102 名の成人（男性 50 名, 女性 52 名；年齢；47～70 歳）より採血した。血清は分析まで-20℃にて保管した。

2-4-3 LC/MS/MS システム及び測定条件

LC/MS/MS 装置は、MS 装置は ABSCIEX 社製 QTRAP5500 を LC 装置は Agilent 社製 1260 シリーズを用いた。LC への試料注入量は 10 μL, カラムオープン温度は 40 °C とした。分析カラムには Sigma-Aldrich 社製 Ascentis Express C18 (2.1 mmID × 100 mm, 2.7 μm) を用いた。移動相の流量は 0.35 mL/min, 2 mM 酢酸アンモニウム水溶液(A), メタノール(B)によるグラジエント分析を行った。グラジエント条件は、測定開始 (A : 60%, B : 40%) より 20 分まで (A : 5%, B : 95%) となるようリニアグラジエントとした。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法のネガティブイオンモードを採用し、標準品及び実試料の測定は Selected Reaction Monitoring (SRM) モードで行った。温度は 700 °C, Ion Spray Voltage を -4000 μA と設定し、モニタリングイオン (¹²C ; [M-H]⁻ → Cl⁻, [(M+2)-H]⁻ → Cl⁻, ¹³C ; [(M+2)-H]⁻ → Cl⁻) は各々 HO-PeCB : ¹²C ; m/z 339 → 35, m/z 341 → 35, ¹³C ; m/z

353 → 35, HO-HxCB : ¹²C ; m/z 375 → 35, m/z 377 → 35, ¹³C ; m/z 387 → 35, HO-HpCB : ¹²C ; m/z 409 → 35, m/z 411 → 35, ¹³C ; m/z 423 → 35 を設定した。また, MS/MS の declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP) の最適化を行った。モニタリングイオン及び DP, EP, CE 及び CXP の詳細条件を Table 2-3 に示す。また, 血清でのクロマトグラム例を Fig. 2-5 に示す。

Table 2-3 Mass transition monitored and MS/MS conditions

Analytes	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP(V)	EP(V)	CE(V)	CXP(V)	
HO-PeCBs	¹² C-1	339	35	-90	-12	-74	-5
	¹² C-2	341	35	-110	-12	-75	-5
	¹³ C	353	35	-90	-12	-74	-5
HO-HxCBs	¹² C-1	375	35	-100	-12	-78	-5
	¹² C-2	377	35	-100	-12	-90	-6
	¹³ C	387	35	-100	-12	-78	-5
HO-HpCBs	¹² C-1	409	35	-120	-12	-82	-5
	¹² C-2	411	35	-120	-12	-92	-5
	¹³ C	423	35	-120	-12	-82	-5

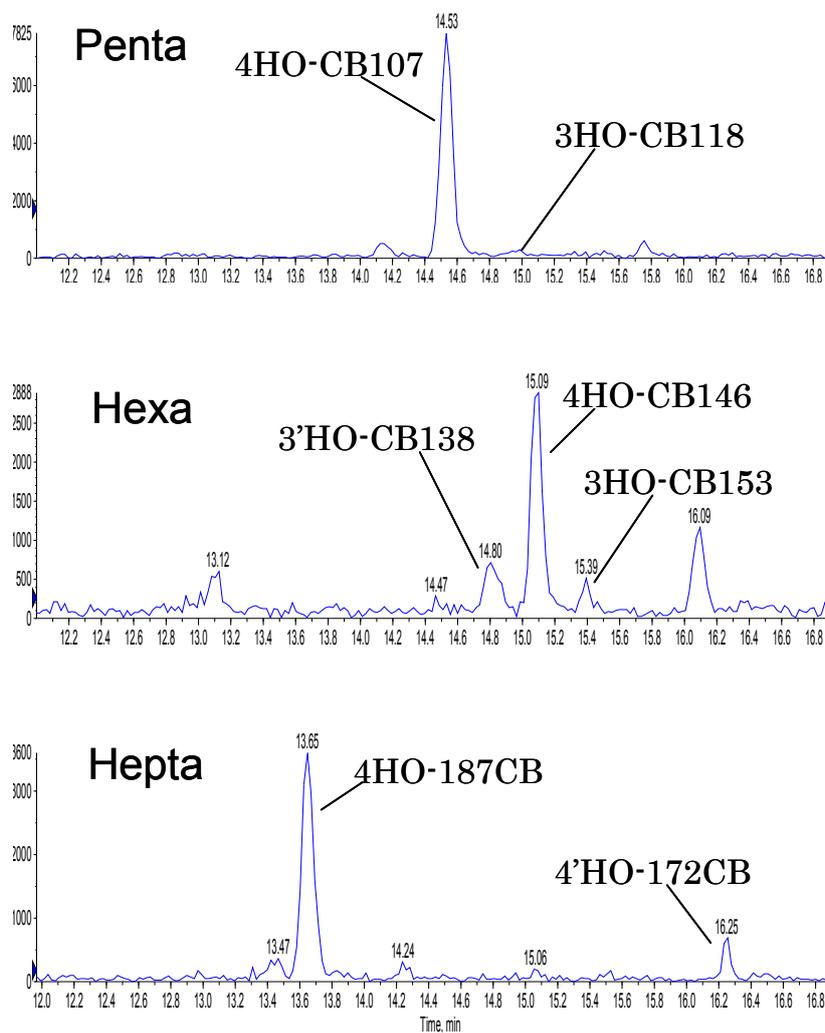


Fig.2-5 Typical chromatograms of the penta- to hepta- HO-CBs in serum samples from healthy volunteers

2-4-4 血清試料の前処理法

血清試料の前処理は、血清試料 0.5 mL に、 $^{13}\text{C}_{12}$ ラベル化 HO-PCBs 内部標準溶液 0.4 ng 添加し、超純水 0.5 mL、ギ酸 0.25 mL 加え、攪拌したものを逆相カートリッジ(Waters 製 Sep-pak C18, 500 mg)による固相抽出を行った。固相カートリッジは、メタノール 5 mL と精製水 10 mL でコンディショニング後、試料をカートリッジに負荷した。その後、4.0 mL の 50%ジクロロメタン/

メタノール,V/Vにて溶出した。溶出液を窒素気流下で乾固し、アセトニトリル 250 μ L に再溶解して測定用試料とした。

2-4-5 精度管理

検量線溶液は和光純薬社製混合標準溶液と ^{13}C ラベル化標準溶液 (CIL 社製) を適宜混合希釈して作成したものをを用いた。0.01~5 ng/mL の範囲で 6 濃度の検量線を作成した。各異性体の直線性 r^2 は 0.99 以上と良好であった。分析全工程での内部標準回収率は 70~117%であることを確認した。全操作ブランク試験は 20 サンプル毎に 1 本の割合で実施した。ブランクは全て LOD 以下であることを確認した。LOD は SN 比の 3 倍より算出した。本法での LOD は 1.6~5.4 pg であった。

2-4-6 統計解析

結果の統計解析は、SPSS 11.0J (SPSS 社) を用いて実施した。

第 5 節 血液中 PCBs と HO-PCBs 主要異性体調査結果と考察

2-5-1 全血中 PCBs と血清中 HO-PCBs の主要異性体濃度調査

102 名の日本人成人血液中 PCBs と血清中 HO-PCBs 主要異性体濃度測定を行った。血清中 $\Sigma_7\text{HO-PCBs}$ 範囲は 27~648 pg/g-血清, 中央値 156 pg/g-血清であった。また, 全血中 $\Sigma_{13}\text{PCBs}$ 範囲は 182~3097 pg/g-血液, 中央値 558 pg/g-血液であった。血清中 HO-PCBs と全血中 PCBs 主要異性体濃度結果を Table 2-4 に示す。親 PCBs 異性体濃度とその代謝 HO-PCBs 異性体濃度との間の相関関係について Table 2-5 に示す。親 PCBs 異性体濃度測定は、HRGC/MS にて測定を行った。チトクロム P450 の酸化による親 PCBs から HO-PCBs への代謝時に塩素の NIH-shift または酸素の direct-insertion が起こり HO-PCBs 異性体が生成する。Table 2-5 より親 PCB 異性体濃度とその代謝物の HO-PCBs 異

性体濃度の中に 3'HO-CB138 / CB138 を除いて有意な相関関係が見られた。

2-5-2 PCBs と HO-PCBs 異性体濃度と年齢との関係

主要 HO-PCBs 異性体濃度，主要 PCBs 異性体濃度と年齢との相関関係を Table 2-6,7 に各々示す。被験者の年齢は 47-70 歳であった。Σ₁₃PCBs と主要 PCBs 異性体濃度と年齢の間には，有意な正の相関関係 (p<0.01) が見られた。Σ₇HO-PCBs と主要 HO-PCBs 異性体濃度と年齢の間には，一部有意な正の相関関係が見られた。しかし，HO-PCBs 異性体と年齢との相関関係は，親 PCBs 濃度と年齢との間に有意な相関関係があるため，親 PCBs 異性体濃度を制御変数として偏相関係数を評価したところ (Table 2-8)，いずれの HO-PCBs 主要異性体と年齢との間に有意な相関関係は見られなかった。この結果より，HO-PCBs は加齢による蓄積傾向が大きくないことが示唆された。

Table 2-4 Median concentrations, range and detection frequencies (DF) of HO-PCBs and PCBs in human serum samples from Japanese

Congeners	Structure	DF(%)	Samples (N=102)				
			(pg/g wet wt)				
			min	25th percentile	median	75th percentile	max
4HO-CB107	4-HO-2,3,3',4',5'-PeCB	97	<LOQ	31	43	62	232
3HO-CB118	3-HO-2,3',4,4',5'-PeCB	68	<LOQ	15	17	21	41
3'HO-CB138	3'-HO-2,2',3',4,4',5'-HxCB	54	<LOQ	14	20	25	80
4HO-CB146	4-HO-2,2',3,4',5,5'-HxCB	94	<LOQ	21	34	49	119
3HO-CB153	3-HO-2,2',4,4',5,5'-HxCB	53	<LOQ	12	14	17	45
4'HO-CB172	4'-HO-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	22	<LOQ	11	13	20	24
4HO-CB187	4-HO-2,2',3,4',5,5',6'-HpCB	99	<LOQ	24	44	57	145
Σ_7 HO-PCBs			27	90	156	209	648
CB74	2,4,4',5'-TeCB	100	9.4	21	31	44	121
CB99	2,2',4,4',5'-PeCB	100	5.4	16	22	31	124
CB118	2,3',4,4',5'-PeCB	100	16	40	56	79	294
CB138	2,2',3,4,4',5'-HxCB	100	23	51	76	101	406
CB146	2,2',3,4',5,5'-HxCB	100	6.0	16	22	31	132
CB153	2,2',4,4',5,5'-HxCB	100	51	110	155	216	948
CB156	2,3,3',4,4',5'-HxCB	100	6.2	12	16	22	73
CB163/164	2,3,3',4',5,6'- / 2,3,3',4',5',6'-HxCB	100	10	26	37	50	200
CB170	2,2',3,3',4,4',5'-HpCB	100	7.8	15	20	26	111
CB180	2,2',3,4,4',5,5'-HpCB	100	29	58	75	105	446
CB182/187	2,2',3,4,4',5,6'- / 2,2',3,4',5,5',6'-HpCB	100	11	28	40	56	243
Σ_{13} PCBs			182	417	558	807	3097

DF ; Detection frequencies

Table 2-5 Relationship between HO-PCB congeners and their possible precursor PCB congeners in human serum

precursor PCBs	metabolites	r	p	hydroxylation
Σ_{13} PCBs	Σ_7 HO-PCBs	0.65	<0.01	
CB118	4HO-CB107	0.44	<0.01	NIH-shift
CB118	3HO-CB118	0.29	<0.05	direct-insertion
CB138	3'HO-CB138	0.16	>0.05	direct-insertion
CB138	4HO-CB146	0.56	<0.01	NIH-shift
CB146	4HO-CB146	0.64	<0.01	direct-insertion
CB153	4HO-CB146	0.64	<0.01	NIH-shift
CB146	3HO-CB153	0.28	<0.05	NIH-shift
CB153	3HO-CB153	0.27	<0.05	direct-insertion
CB170	4'HO-CB172	0.57	<0.01	NIH-shift
CB180	4'HO-CB172	0.60	<0.01	NIH-shift
CB182/187	4HO-CB187	0.56	<0.01	direct-insertion

Table 2-6 Relationship between age and HO-PCB predominant congeners concentration in human serum samples

(N=102)		
	r	p
4HO-CB107	0.20	<0.05
3HO-CB118	0.13	>0.05
3'HO-CB138	0.10	>0.05
4HO-CB146	0.33	<0.01
3HO-CB153	-0.0060	>0.05
4'HO-CB172	0.15	>0.05
4HO-CB187	0.39	<0.01
Σ_7 HO-PCBs	0.40	<0.01

spearman's rank correlation

Table 2-7 Relationship between age and PCB predominant congeners concentration in human serum samples

(N=102)		
	r	p
CB118	0.49	<0.01
CB138	0.37	<0.01
CB146	0.43	<0.01
CB153	0.42	<0.01
CB170	0.37	<0.01
CB180	0.40	<0.01
CB182/187	0.42	<0.01
Σ_{13} PCBs	0.45	<0.01

spearman's rank correlation

Table 2-8 Relationship between age and HO-PCBs predominant congeners concentration in human serum samples.

(N=102)

	control variable	partial correlation coefficient	p value
Σ_7 HO-PCBs	Σ_{13} PCBs	0.060	>0.05
4HO-CB107	CB118	-0.10	>0.05
3HO-CB118	CB118	-0.17	>0.05
3'HO-CB138	CB138	-0.075	>0.05
4HO-CB146	CB138	0.038	>0.05
4HO-CB146	CB146	0.0017	>0.05
4HO-CB146	CB153	0.0038	>0.05
3HO-CB153	CB146	-0.25	>0.05
3HO-CB153	CB153	-0.25	>0.05
4'HO-CB172	CB170	-0.072	>0.05
4'HO-CB172	CB180	-0.049	>0.05
4HO-CB187	CB182/187	0.13	>0.05

2-5-3 Dioxins, PCBs, HO-PCBs 異性体濃度と糖尿病との関係

糖尿病は世界的に増加傾向にあり、日本においても 1000 万人以上が糖尿病と報告されている。糖尿病の主な原因は、遺伝、年齢、肥満、生活習慣等がある。また、糖尿病の発症には多くの原因因子が関連していると考えられている。糖尿病の原因因子の一つとして環境汚染物質がある。Dioxins や PCBs 異性体血液中濃度と糖尿病との関連について調査を行った。

血液中 Dioxins 濃度については、総 TEQ 濃度（平均±標準偏差）で 2 型糖尿病患者(n=49)では 33.7±13.7 pgTEQ/g-lipid, 境界型糖尿病患者(n=12)では 30.8±11.5 pgTEQ/g-lipid, コントロール群(n=49)では 23.4±11.2 pgTEQ/g-lipid とコントロール群に比べ有意に血液中濃度が高い結果となり、糖尿病と血液中

Dioxins 濃度との関連が判明した。また、本研究において各原因因子における糖尿病罹患のオッズ比は、家族歴で 20.4、血液中 Dioxins の一部異性体濃度で 2.2-2.8 であり、これらは他の原因因子に比べ有意に高い結果となった。また、糖尿病の罹患と血液中 PCB 主要異性体濃度との関係においては、PCBs 異性体の CB146, CB180 が正の、CB163/164, CB170 が負の関連を示すことを報告 (Tanaka et al, 2011) した。また、血清中 HO-PCBs 主要異性体濃度と糖尿病との関係についての調査では、本研究の被験者 102 名の内、糖尿病と診断された 21 名 (男性 11 名, 女性 10 名) と対照群について HO-PCBs 主要異性体, Σ_7 HO-PCBs 濃度を Table 2-9 に示す。

血清中 HO-PCBs 主要異性体濃度と糖尿病との関係について、検定を行った (Mann-Whitney Utest, $p > 0.05$) が、各異性体濃度についても糖尿病との有意な関係は見られなかった。PCBs の CB146 が糖尿病と有意な正の関連が見られたが、その代謝物の 4HO-CB146, 3HO-CB153 は CB138, CB146, CB153 の代謝により生成し、一般的な血中 PCBs 濃度は $CB153 > CB138 > CB146$ である。このため CB146 の代謝水酸化物は、CB138 や CB153 の代謝生成割合が多く、CB146 の血中濃度の代謝による生成が少なく、糖尿病との関連が不明瞭になったものと考えられる。

Table 2-9 Concentration of OH-PCBs in human serum

(pg/g-serum wet wt)

Congeners	Males		Females	
	Control (N=39)	DM* (N=11)	Control (N=42)	DM* (N=10)
	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD
4HO-CB107	59.6 ± 43.7	41.6 ± 18.2	46.1 ± 24.2	50.0 ± 26.8
3HO-CB118	19.0 ± 7.2	14.6 ± 2.5	17.8 ± 4.3	22.2 ± 6.1
3'HO-CB138	22.3 ± 11.5	24.3 ± 25.0	18.8 ± 5.7	18.5 ± 7.6
4HO-CB146	49.2 ± 25.8	37.6 ± 18.4	28.6 ± 14.3	34.2 ± 13.9
3HO-CB153	17.6 ± 7.9	13.2 ± 1.7	13.9 ± 3.0	12.2 ± 2.7
4'HO-CB172	16.8 ± 5.5	13.4 ± 3.5	13.6 ± 5.2	11.9 ± 2.3
4HO-CB187	59.4 ± 33.3	45.0 ± 22.0	34.5 ± 19.8	43.9 ± 17.6
Σ ₇ HO-PCBs	210.3 ± 123.2	156.1 ± 74.4	129.7 ± 72.3	163.5 ± 69.6

* : DM ; Diabetes Mellitus

2-5-4 既調査との比較

既報の血清中 HO-PCBs 主要異性体濃度中央値について Table 2-10 にまとめた。日本を含め 4 カ国での調査結果について、Σ₆HO-PCBs 濃度範囲は、156～520 pg/g-血清であり同等であった。主要異性体分布では、EU で 4HO-CB187 または 4HO-CB146 が高い傾向であったが、本研究を含め日本の調査報告では、4HO-CB107 または 4HO-CB187 が高い傾向であった。この主要異性体分布の違いは、親 PCB の曝露や人種による代謝の違い等が関連しているのではないかと考える。

第 6 節 まとめ

本研究では、HRGC/HRMS と HT8-PCB キャピラリーカラムを用いて、血液中 PCBs 全異性体分析法の開発を行った。開発した分析法を用いて健康日本人成人 24 名の血液中 PCBs 異性体分析を行った結果、共通した 13 の主要な血中

PCBs 異性体が判明した。この 13 種異性体は総 PCBs 濃度の 75%を占めていた。この主要な PCBs 異性体には 2-, 4-, 5-位塩素置換性体が多く含まれていることが判明した。これらの異性体は食物連鎖を通じて体内に取り込まれて血液中に代謝されず残存し蓄積傾向が大きいことが考えられた。これらの結果は、体内での PCBs 異性体代謝とも深く関連していることが示唆された。今後、環境中 PCBs 調査結果と合わせると更に詳細な汚染経路が判明すると考える。

また、LC/MS/MS を用いた血清中 HO-PCBs 主要異性体測定法についても開発を行い、日本人成人の血清中異性体濃度の調査を行った。血清中の水酸化 PCBs 測定法は、誘導体化後 HRGC/MS にて測定する報告が主に報告されているが、本研究では、誘導体化無しで直接 LC/MS/MS にて高感度に測定する方法を開発した。また、102 名の血清中 HO-PCBs 主要異性濃度調査を行い、親 PCBs 異性体濃度、年齢や糖尿病との関連について評価した。糖尿病との関連については、Dioxins と PCBs 主要異性体濃度については、一部の異性体で糖尿病との関連が判明したが、HO-PCBs 主要異性体濃度では、複数の親 PCBs からの代謝により生成する HO-PCBs 異性体については、より高濃度の親 PCBs 異性体の影響を受けることが考えられ明瞭な関連性は認められなかった。今後、本研究が HO-PCBs 曝露評価に貢献できると期待される。

Table 2-10 Median Concentrations (pg/g wet weight) of selected HO-PCBs in human serum samples from present study together with those from other previous studies cited from the literature

country	region	number	sex	year	4HO- CB107	3HO- CB138	4HO- CB146	3HO- CB153	4HO- CB172	4HO- CB187	Σ_6 HO- PCBs	references
Slovakia	Michalovec	131	Females	2002-2004	30	70	110	70	40	200	520	Park et al, 2007
Slovakia	Svidnik / Stropkov	31	Females	2002-2004	20	30	50	40	20	110	270	Park et al, 2007
Belgium	-	20	4 males and 16 females	2000	78	22	92	15	11	57	275	Dirtu et al, 2010
Romania	-	53	22 males and 31 females	2006-2007	12	14	37	8	12	51	134	Dirtu et al, 2010
Japan	Kagoshima	20	Females	2001	100	33	88	34	15	110	380	Nomiyama et al, 2010
Japan ^a	Ehime	16	Males and females	2005	56	5.9	45	9.4	5	36	157	榎本ら, 2006
Japan	Nagano	102	50 males and 52 females	2009	43	20	34	14	13	44	156	present study

a ; Concentrations reported as arithmetic mean

3 章 生体試料中 PBDEs 異性体分析法の開発と異性体濃度分布調査

第 1 節 はじめに

臭素系難燃剤 (BFRs) は難燃目的で PC, TV, 絨毯, 車等多くの製品で使用されている。BFRs の使用量は 2004 年日本において 73,900 トンに達した。臭素系難燃剤の年間需要量の推移を Table 3-1(環境省 HP 資料より作成)に示す。

近年, BFRs の環境汚染が重大な問題となっている。臭素系難燃剤の PBDEs は構造的に POPs の PCBs に似ており, 脂溶性であり, 環境中に広く残留している (Law et al, 2006)。2009 年 5 月に製品である Penta BDEs と Octa BDEs は第 4 回締約国会議(COP4)にて POPs 化合物の付属書 A に追加された(UNEP, 2009)。

Table 3-1 Transition of the amount demanded of brominated flame retardants in Japan

(t / year)

year	demand
2000	67,250
2001	57,550
2002	63,300
2003	65,700
2004	73,900
2005	69,500
2006	71,650
2007	65,750
2008	60,500
2009	48,520
2010	53,690

PBDEs の毒性は、構造的に PCBs と似ていることから、甲状腺ホルモン (T4) のアンタゴニストや、Ah レセプターの結合について報告(Hallgern and Darnerud, 1998, Zhou et al, 2002)されている。

PBDEs は世界中の広い範囲での環境汚染物質として人体中の血液、母乳、脂肪組織での検出報告 (Akutsu et al, 2003, Bi et al, 2006, Covaci et al, 2008, Harrad and Porter, 2007, Moon et al, 2012, Ohta et al, 2002, Sjodin et al, 1999,2008, Weiss et al, 2004) がある。スウェーデンにて PBDEs の母乳中濃度の報告(Noren and Meironyte, 2000)にて、Dioxins や PCBs が経年的に減少傾向であるのに対し、PBDEs は増加傾向である。北米では PBDEs 多くの工業製品において多く使用されており、EU と比べ特に低臭素化異性体において高濃度の人体曝露が報告(Chen et al, 2011, Johnson et al, 2005, Schechter et al, 2003, She et al, 2002)されている。PBDEs の血液や母乳中濃度はこの 30 年間で急速に増加した(Noren and Meironyte, 2000, Park et al, 2011, Schechter et al, 2005, Sjodin et al, 2004)。しかしながら、人体中さまざまな組織中での PBDEs 分布の情報は少ない。

本研究の目的は、20 の解剖例での血液、肝臓、胆汁、脂肪組織中でのヒト曝露について調査することである。我々は、人体内の PBDEs 異性体の蓄積、分布状況について評価する。

第 2 節 生体試料中 PBDEs 主要異性体分析法の開発

3-2 実験材料及び方法

3-2-1 標準品・試薬

本研究において分析対象とした PBDEs 異性体を Table 3-2 に示す。PBDEs 標準溶液は、CIL 社より購入した。他の溶媒や試薬は、Dioxins 分析用を使用し

た。

3-2-2 サンプル

20 例の胆汁・血液・肝臓・脂肪組織は遺族の許可を得て 1999～2001 年に慶應大学にて採取した。サンプルの年齢幅は 44～90 歳であった。サンプルは分析まで -20 °C にて保管した。Table 3-3 にサンプルの詳細について表示する。

3-2-3 脂肪抽出

血液 30 g, 胆汁 30 g, 肝臓 1 g, 脂肪組織 1 g それぞれに安定同位体内部標準溶液を添加後, 液-液抽出にて脂肪抽出を行った。血液に ^{13}C ラベル化 PBDEs 内部標準溶液を添加後, 12 mL の飽和硫酸アンモニウム, 6 mL のエタノールを添加後, 18 mL の n-ヘキサンにて 30 分間振とう抽出した。その後, 更に n-ヘキサンにて 2 回抽出した。胆汁は内部標準溶液を添加後, 50 mL のアセトン/n-ヘキサン (2:1,v/v) にて 30 分間振とう抽出した。その後, 更に n-ヘキサンにて 2 回抽出した。肝臓と脂肪組織は 5 倍量の無水硫酸ナトリウムとを添加後, ホモジナイズして安定同位体内部標準溶液を添加後, 50 mL のアセトン/n-ヘキサン (2:1,v/v) にて 30 分間振とう抽出した。その後, 更に n-ヘキサンにて 2 回抽出した。抽出液は, ヘキサン洗浄水にて洗浄後, 有機層は脱水して, エバポレーターにて乾固し, 脂肪重量の測定を行った。

3-2-4 アルカリ分解

抽出した脂肪は 2 M の水酸化カリウム 10% エタノール含有水溶液 10 mL に溶解後, 室温にて 2 時間振とうし, アルカリ分解を行った。アルカリ分解後, 15 mL の n-ヘキサンにて 30 分 2 回振とう抽出を行った。抽出液はエバポレーターで約 2 mL まで濃縮後, 多層シリカゲルカラムにアプライした。

3-2-5 多層シリカゲルカラム

多層シリカゲルカラムは内径 10 mm, 長さ 250 mm のガラスカラムに下から

順に、1.5 gの無水硫酸ナトリウム、0.9 gのシリカゲル、3 gの2%(W/W)水酸化カリウムシリカゲル、0.9 gのシリカゲル、4.5 gの44%(W/W)硫酸シリカゲル、6 gの22%(W/W)硫酸シリカゲル、0.9 gのシリカゲル、3 gの10%(W/W)硝酸銀シリカゲル、0.9 gのシリカゲル、1.5 gの無水硫酸ナトリウムを詰め、多層シリカゲルカラムを作成した。抽出液をアプライする前に100 mLのn-ヘキサンにて洗浄した。抽出液をアプライ後、100 mLのヘキサンを流す、その後、200 mLのジクロロメタン/n-ヘキサン(1:9 v/v)にてPBDEsを溶出精製した。

3-2-6 濃縮

精製溶出液を窒素気流下でGCバイアルに濃縮後、20 pgの¹³Cラベル化PBDEsシリンジスパイク溶液を添加して最終20 μLまで濃縮を行った。この濃縮液の1.5 μLをGCに注入して分析した。

3-2-7 HRGC/HRMS 測定

HRGC/HRMSはMS装置はAuto Spec-Ultima NT(マイクロマス社製)をGC装置はHP6890シリーズ(Agilent社製)を用いた。分析カラムはDB17HT 30 m x 0.25 mmID 0.15 μm(アジレント社製)を用いた。カラム昇温条件は120度から180度まで20度/分にて昇温後、180度で2分維持後、240度まで3度/分にて昇温した。その後、320度まで20度/分にて昇温後、320度にて10分維持した。注入口温度は240度、イオン源とインターフェイス温度は290度を設定した。キャリアーガスはヘリウムを用い流量は1.0 mL/min.とした。イオン化エネルギーは40 eV、加速電圧は8 kVとし、分解能は10,000にて分析を実施した。測定はSIMモードにて実施した。血液中PBDEs主要異性体(4~6臭素)の典型的なクロマトグラムをFig. 3-1に示す。図中に主要な異性体ピークのアサインを示した。

Table 3-2 PBDE congeners used in this study and their monitor ions.

	Congener	Substitution	IUPAC#	Monitor ions (m/z)		
Unlabeled	TrBDE	2,2',4'-	BDE-17	403.8047	405.8027	
		2,3',4'-	BDE-25	403.8047	405.8027	
		2,4,4'-	BDE-28	403.8047	405.8027	
		2,4,6'-	BDE-30	403.8047	405.8027	
		2,4',6'-	BDE-32	403.8047	405.8027	
		2',3,4'-	BDE-33	403.8047	405.8027	
		3,3',4'-	BDE-35	403.8047	405.8027	
		3,4,4'-	BDE-37	403.8047	405.8027	
	TeBDE	2,2',4,4'-	BDE-47	483.7132	485.7111	
		2,2',4,5'-	BDE-49	483.7132	485.7111	
		2,3',4,4'-	BDE-66	483.7132	485.7111	
		2,3',4',6'-	BDE-71	483.7132	485.7111	
		2,4,4',6'-	BDE-75	483.7132	485.7111	
		3,3',4,4'-	BDE-77	483.7132	485.7111	
	PeBDE	2,2',3,4,4'-	BDE-85	561.6237	563.6216	
		2,2',4,4',5'-	BDE-99	561.6237	563.6216	
		2,2',4,4',6'-	BDE-100	561.6237	563.6216	
		2,3,4,5,6'-	BDE-116	561.6237	563.6216	
		2,3',4,4',6'-	BDE-119	561.6237	563.6216	
		3,3',4,4',5'-	BDE-126	561.6237	563.6216	
	HxBDE	2,2',3,4,4',5'-	BDE-138	641.5322	643.5301	
		2,2',4,4',5,5'-	BDE-153	641.5322	643.5301	
		2,2',4,4',5,6'-	BDE-154	641.5322	643.5301	
		2,2',4,4',6,6'-	BDE-155	641.5322	643.5301	
		2,3,4,4',5,6'-	BDE-166	641.5322	643.5301	
	¹³ C-labeled	TrBDE	2,4,4'-	BDE-28	417.8429	419.8409
		TeBDE	2,2',4,4'-	BDE-47	495.7534	497.7514
			3,3',4,4'-	BDE-77	495.7534	497.7514
PeBDE		2,2',4,4',5'-	BDE-99	575.6619	577.6599	
		2,2',4,4',6'-	BDE-100	575.6619	577.6599	
		2,3',4,4',5'-	BDE-118	575.6619	577.6599	
		3,3',4,4',5'-	BDE-126	575.6619	577.6599	
HxBDE		2,2',4,4',5,5'-	BDE-153	653.5724	655.5704	

Table 3-3 Age, sex and cause of death of decedents from which samples were obtained for this study.

No.	Age	Sex	Cause of death
1	49	Male	Liver cancer
2	54	Male	Renal insufficiency
3	50	Male	Sepsis
4	77	Female	Uterine / Ovarian cancer
5	73	Male	Esophageal cancer
6	90	Male	Aneurysm
7	85	Female	Cerebral hemorrhage
8	86	Female	Bile duct cancer
9	58	Male	Multiple organ insufficiency
10	76	Male	Rectal cancer
11	65	Male	Lung cancer
12	64	Male	Lung cancer
13	63	Male	Cerebral hemorrhage
14	49	Female	Vena cava thrombosis
15	68	Female	Breast cancer
16	55	Female	Uterine sarcoma
17	58	Male	Liver cancer
18	53	Female	Athsma
19	59	Female	Lung cancer
20	44	Female	Leukemia

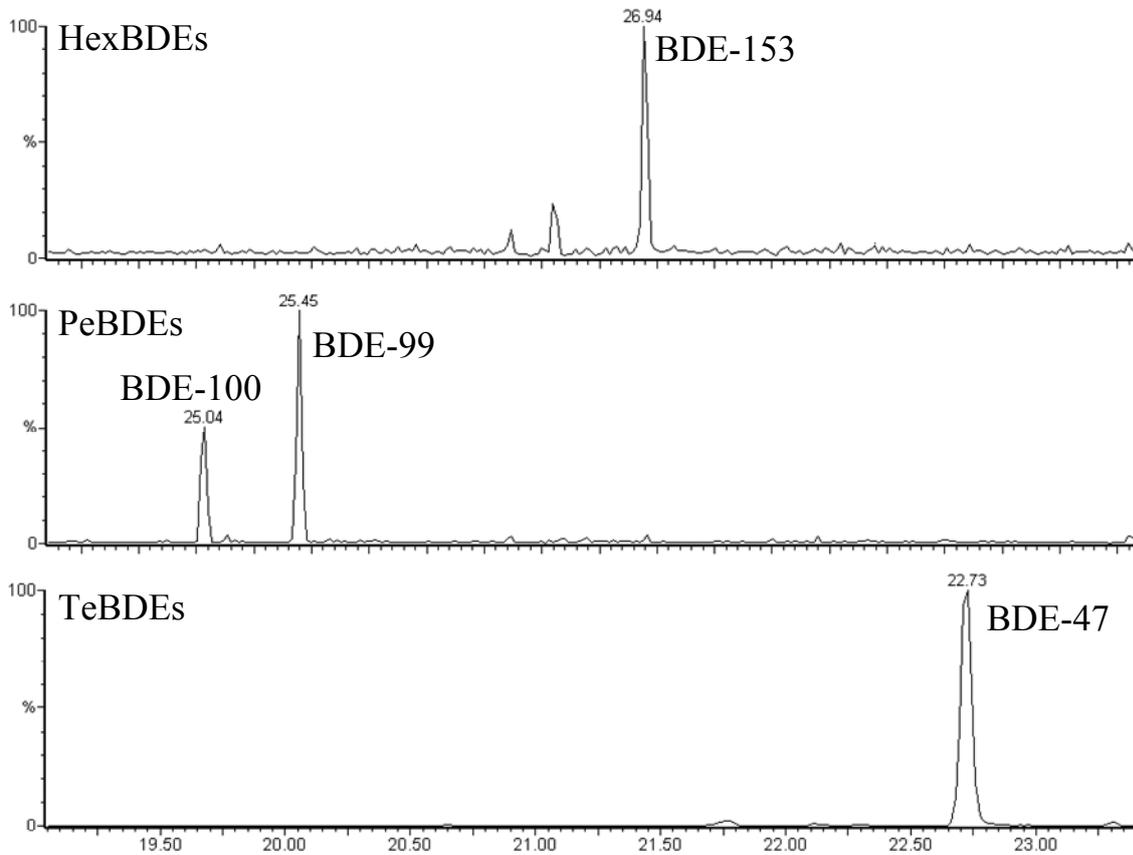


Fig.3-1 Typical chromatograms of the tetra- to hexa- BDEs in human blood samples

3-2-8 精度管理

検量線溶液 (EO-5104) は CIL 社製を用いた。0.2~100 ng/mL の範囲で 5 濃度の検量線を作成した。直線性 r^2 は 0.99 以上と良好であった。分析全工程での内部標準回収率は 64~118%と良好であった。全操作ブランク試験は 10 サンプル毎に 1 本の割合で実施した。ブランクは全て LOD 以下であることを確認した。LOD は SN 比の 3 倍より算出した。本法での LOD は 0.001~0.06 ng/g-lipid であった。

3-2-9 統計解析

本研究では、PBDEs 濃度において、幾何平均と中央値を算出した。

Spearman's rank 相関係数にて有意差の評価を実施した。

ノンパラメトリックデータとして Mann-Whitney U 検定にて Σ PBDEs 濃度の検定を実施した。データの統計解析は SPSS11.0J (IBM 社) を用いた。

第 3 節 結果と考察

3-3-1 PBDEs の人体サンプル中濃度

脂肪含量の平均値は、血液、胆汁、肝臓、脂肪組織でそれぞれ $0.49 \pm 0.16\%$ (範囲 0.28~0.80%), $1.5 \pm 0.67\%$ (範囲 0.69~2.9%), $8.9 \pm 2.7\%$ (範囲 4.1~15%), $79 \pm 7.0\%$ (範囲 67~91 %) であった。ND 以上の割合が 50 %を超える異性体の合計濃度 (Σ PBDEs) を Table 3-4-1,2 に示した。血液、胆汁、肝臓、脂肪組織中の Σ PBDE 濃度の中央値 (25th~75th %タイル値) はそれぞれ、2.4 (1.4~4.6), 1.4 (0.61~3.0), 2.6 (1.4~4.5), 4.3 (2.3~5.7) ng/g-lipid であった。人体試料において PBDEs 濃度は脂肪組織で一番高く、血液と肝臓と同様であった。 Σ PBDEs 濃度の幾何平均は脂肪組織で胆汁の約 3 倍高く、血液と肝臓は同様であった。

Table 3-5 に 7 国での人体試料中 PBDEs 濃度の最近の報告をまとめた。これらの報告で共通して分析している主な異性体は BDE-47, 99, 100, 153, 154 であった。全ての報告において分析されていた 3 異性体(BDE-47+99+153) の合計濃度を Sum PBDEs として計算した。本研究での Sum PBDEs は米国の報告よりかなり低い結果であった。EU と他のアジア諸国との比較では同様またはわずかに低い結果となった。他の日本の報告とは同様な結果となった。

BDE-209 については他の報告でもわずかに報告があるのみで、また、本研究でも BDE-209 については分析していない。他の日本人についての血液中

BDE-209 測定報告 (Inoue et al, 2006, Kunisue et al, 2007, Takasuga et al, 2004, Uemura et al, 2010) によると低臭素化異性体より高い結果である。これは近年の 10 臭素化体の製品の使用を反映している結果である。以前の報告においても BDE-209 は血液や組織中で総 PBDEs 濃度の大部分を占めることが示されている。10 臭素化体製品は低臭素化体に比べ毒性が低く、脱臭素による分解がおきやすいことから、日本で多く使用されていた(Watanbe and Sasaki, 2003)。日本では工業製品由来の 8~10 臭素化体の曝露が考えられる。また、BDE-209 は体内代謝され水酸化 PBDEs となる(Morck et al,2003, Sandholm et al, 2003)。この水酸化 PBDEs は甲状腺ホルモンと構造が似ている事から、甲状腺ホルモン様作用を示す(Legler and Brouwer, 2003)。今後人体への影響を評価するためには水酸化 PBDEs に焦点をあてた研究が必要であると考えられる。

Table 3-4-1 Concentration of PBDE congeners in human samples (ng/g lipid)

Blood (n=20)							
	Percent detection ^a	GM	Min	25th percentile	Median	75th percentile	Max
BDE-17	65	0.015	<LOD	0.0081	0.011	0.021	0.10
BDE-25	65	0.015	<LOD	0.0099	0.14	0.19	0.18
BDE-28/33	100	0.11	0.041	0.067	0.10	0.15	1.2
BDE-35	5.0	-	<LOD	0.012	0.012	0.012	0.012
BDE-37	60	0.017	<LOD	0.010	0.012	0.032	0.091
BDE-47	100	0.61	0.15	0.28	0.42	1.0	7.5
BDE-66	70	0.026	<LOD	0.014	0.022	0.041	0.19
BDE-71	100	0.046	0.013	0.024	0.041	0.079	0.82
BDE-77	10	-	<LOD	0.016	0.022	0.029	0.029
BDE-85	5.0	-	<LOD	0.026	0.026	0.026	0.026
BDE-99	100	0.13	0.037	0.076	0.11	0.22	1.1
BDE-100	100	0.20	0.047	0.10	0.16	0.36	1.4
BDE-116	35	-	<LOD	0.029	0.046	0.076	0.28
BDE-126	5.0	-	<LOD	0.039	0.039	0.039	0.039
BDE-138	0.0	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
BDE-153	100	0.94	0.31	0.60	0.79	1.9	3.8
BDE-154	90	0.045	<LOD	0.021	0.035	0.084	0.73
BDE-155	90	0.031	<LOD	0.018	0.026	0.054	0.35
ΣPBDE ^a	100	2.4	0.75	1.4	2.0	4.6	14
Bile (n=20)							
BDE-17	80	0.0093	<LOD	0.0054	0.0067	0.019	0.092
BDE-25	95	0.010	<LOD	0.0035	0.0082	0.028	0.13
BDE-28/33	100	0.11	0.013	0.050	0.10	0.22	1.2
BDE-35	35	-	<LOD	0.0018	0.0040	0.015	0.018
BDE-37	85	0.0091	<LOD	0.0036	0.0091	0.018	0.063
BDE-47	100	0.31	0.041	0.12	0.30	0.76	2.7
BDE-66	95	0.013	<LOD	0.0068	0.013	0.029	0.087
BDE-71	90	0.037	<LOD	0.016	0.028	0.094	0.79
BDE-75	5.0	-	<LOD	0.0095	0.0095	0.0095	0.0095
BDE-77	20	-	<LOD	0.0010	0.0028	0.0063	0.0070
BDE-85	20	-	<LOD	0.0069	0.021	0.046	0.052
BDE-99	100	0.063	0.0075	0.024	0.074	0.14	0.44
BDE-100	100	0.12	0.018	0.048	0.13	0.25	1.0
BDE-126	5.0	-	<LOD	0.051	0.051	0.051	0.051
BDE-153	100	0.53	0.096	0.23	0.53	1.2	7.4
BDE-154	90	0.033	<LOD	0.012	0.029	0.077	0.36
BDE-155	90	0.025	<LOD	0.010	0.021	0.074	0.30
ΣPBDE ^a	100	1.4	0.21	0.61	1.5	3.0	8.7

Table 3-4-2

Liver (n=20)							
	Percent detection ^a	GM	Min	25th percentile	Median	75th percentile	Max
BDE-17	90	0.022	<LOD	0.015	0.020	0.027	0.13
BDE-25	95	0.024	<LOD	0.014	0.023	0.039	0.11
BDE-28/33	100	0.15	0.049	0.091	0.13	0.22	0.71
BDE-37	60	0.022	<LOD	0.0150	0.021	0.035	0.097
BDE-47	100	0.71	0.26	0.36	0.64	1.2	7.6
BDE-49	5.0	-	<LOD	0.021	0.021	0.021	0.021
BDE-66	80	0.026	<LOD	0.014	0.022	0.051	0.13
BDE-71	100	0.066	0.022	0.039	0.058	0.11	0.38
BDE-99	100	0.14	0.068	0.084	0.12	0.24	0.60
BDE-100	100	0.21	0.055	0.11	0.19	0.38	0.79
BDE-116	5.0	-	<LOD	0.059	0.059	0.059	0.059
BDE-153	100	0.97	0.37	0.57	1.0	1.2	7.2
BDE-154	90	0.050	<LOD	0.031	0.046	0.088	0.22
BDE-155	70	0.046	<LOD	0.029	0.036	0.084	0.14
ΣPBDE ^a	100	2.6	1.1	1.4	2.2	4.5	11
Adipose tissue (n=20)							
BDE-17	95	0.0069	<LOD	0.0039	0.0079	0.014	0.020
BDE-25	100	0.0059	0.0016	0.0035	0.0060	0.0093	0.027
BDE-28/33	100	0.27	0.064	0.13	0.27	0.51	1.9
BDE-35	35	-	<LOD	0.0019	0.0023	0.0095	0.012
BDE-37	95	0.017	<LOD	0.0082	0.015	0.037	0.077
BDE-47	100	0.93	0.28	0.48	1.0	1.5	5.6
BDE-49	5.0	-	<LOD	0.0060	0.0060	0.0060	0.0060
BDE-66	100	0.029	0.011	0.015	0.026	0.044	0.19
BDE-71	100	0.060	0.021	0.032	0.051	0.094	0.75
BDE-77	75	0.0036	<LOD	0.0024	0.0030	0.0066	0.024
BDE-85	15	-	<LOD	0.0053	0.022	0.066	0.066
BDE-99	100	0.19	0.065	0.11	0.18	0.25	1.2
BDE-100	100	0.37	0.13	0.20	0.29	0.67	1.9
BDE-126	5.0	-	<LOD	0.047	0.047	0.047	0.047
BDE-153	100	1.6	0.48	1.1	1.4	2.6	17.5
BDE-154	100	0.099	0.024	0.052	0.098	0.16	0.55
BDE-155	100	0.080	0.020	0.036	0.073	0.14	0.57
ΣPBDE ^a	100	4.3	1.4	2.3	3.8	5.7	20

Abbreviations: GM, geometric mean; Max, maximum; Min, minimum; <LOD, below limit of detection. We did not calculate geometric means for congeners with detection frequencies < 50%.

^a Sum of the concentrations of congeners with detection frequencies > 50%.

Table 3-5 Comparison of the mean concentration (ng/g lipid) of PBDEs in various human tissues and body fluids by country.

Country	n	Sex	Sample	Sampling year	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	Sum PBDEs ^a	Reference	
Japan	20	11 Males and 9 Females	Adipose tissue	1999-2001	0.93	0.19	0.37	1.6	NA	2.7	Present study
Japan	28	18 Males and 10 Females	Adipose tissue	2003-2004	0.79	0.13	0.29	1.2	0.92	2.1	Kunisue et al.,2007
Korea	53	Females	Adipose tissue	2008-2009	NA	NA	NA	NA	NA	16	Moon et al.,2012
Singapore	88	Females	Adipose tissue	2004-2006	4.4	1.3	1.2	2.4	NA	8.0	Tan et al.,2008
Belgium	25	18 Males and 7 Females	Adipose tissue	2003-2005	1.2	0.55	0.34	2.0	NA	3.8	Covaci et al.,2008
Spain	20	Females	Adipose tissue	2003	1.0	0.46	0.31	1.5	NA	3.0	Fernandez et al.,2007
USA	52	12 Males and 40 Females	Adipose tissue	2003-2004	132	74	68	92	NA	298	Johnson et al.,2005
Japan	20	11 Males and 9 Females	Blood	1999-2001	0.61	0.13	0.20	0.94	NA	1.7	Present study
Japan	72	41 Males and 31 Females	Blood	2007-2008	0.46	0.057	0.21	0.87	1.0	1.4	Uemura et al.,2010
Japan	156	-	Blood	-	0.89	0.22	0.29	0.73	9.2	1.8	Takasuga et al.,2004
USA	271	Females	Serum	2003-2004	26	5.5	4.3	6.1	NA	38	Chen et al.,2011
USA	270	Females	Serum	1999-2000	15.3	4.5	2.8	2.4	NA	22	Chevrier et al.,2010
Netherlands	78	Females	Serum	2001-2002	3.2	0.92	0.69	4.5	NA	8.6	Weiss et al.,2004
Japan	20	11 Males and 9 Females	Liver	1999-2001	0.71	0.14	0.21	0.97	NA	1.8	Present study
Belgium	25	18 Males and 7 Females	Liver	2003-2005	0.95	0.38	0.17	1.2	NA	2.5	Covaci et al.,2008
Japan	20	11 Males and 9 Females	Bile	1999-2001	0.31	0.063	0.12	0.53	NA	0.90	Present study

NA: no data available

a : BDE-47+99+153.

3-3-2 PBDEs 異性体分布

Fig.3-2 に血液, 胆汁, 肝臓, 脂肪組織中の主要な PBDEs 異性体分布を示す。主要な異性体は, BDE-47 と BDE-153 で続いて BDE-99, 100, 28+33 であった。BDE-47 と BDE-153 の合計濃度は, 人体試料の中では Σ PBDEs 濃度の 70% 以上であった。BDE-47 と BDE-153 の異性体分布は, 個人毎に異なっていた。しかしながら, BDE-153 は 20 例中 15 例で一番高濃度な異性体であった。他の 5 例では BDE-47 が最も高濃度な異性体であった。また, BDE-47 と BDE-153 の高濃度検出例がいくつか見られた。同様の報告は他にもあり, Harrad et al (2007) は, 血液中 PBDEs の高濃度の割合は調査の 5% 程度において見られると報告している。

本研究では主要な異性体として検出された BDE-153 は, ベルギー, スペイン, オランダ, 日本での人体組織中の検出でも同様であった。しかしながら, 米国では, 工業製品で 5 臭素化体が多く使用されていたため人体試料からは BDE-47 が最も高濃度に検出されると報告がある。米国の居住者の血清では, BDE-47 が本研究で検出された濃度の約 50 倍以上の高濃度で検出されるとの報告がある。Covaci et al(2008) は, 種々 PBDEs 製品からの曝露は, 食生活や普段の生活と関連していると報告しており, それ以上にハウスダストからの曝露が重大な影響を及ぼすことを報告している。Fig. 3-3 に本研究での体液と組織中の主要な異性体分布を示す。主要な異性体の中でより脂溶性の高い異性体(BDE-100, 153)は, 肝臓と血液中よりも胆汁と脂肪組織中で高い傾向が見られた。Covaci et al (2008) も, これらの異性体濃度分布が脂肪組織と肝臓で本研究と同様の結果を報告している。この臓器間での異性体分布の違いは, 脂肪組織と比較して肝臓の方が脂溶性の高い化合物の代謝活性が高いことで説明できる。さらに, 脂溶性の高い化合物は, 肝臓から胆汁に排泄されたため, 体液中で血液より胆汁中で脂

溶性の高い異性体の濃度が高い結果となっていることが考えられる。

3-3-3 生体試料中 PBDEs 濃度の相関

本研究で分析した生体試料間での主要異性体と Σ PBDEs 濃度について Spearman's 相関係数を評価した。相関係数の結果は Table 3-6 に示した。

Σ PBDEs 濃度での相関係数の範囲は 0.53~0.91 であり, 良好な正相関 ($p < 0.01$) を示した。異なった生体試料間での異性体分布は, 個人毎において同様であった。しかしながら, いくつかの症例の生体試料間において異なった異性体分布を示すものがあったが, 特別な傾向は確認できなかった。

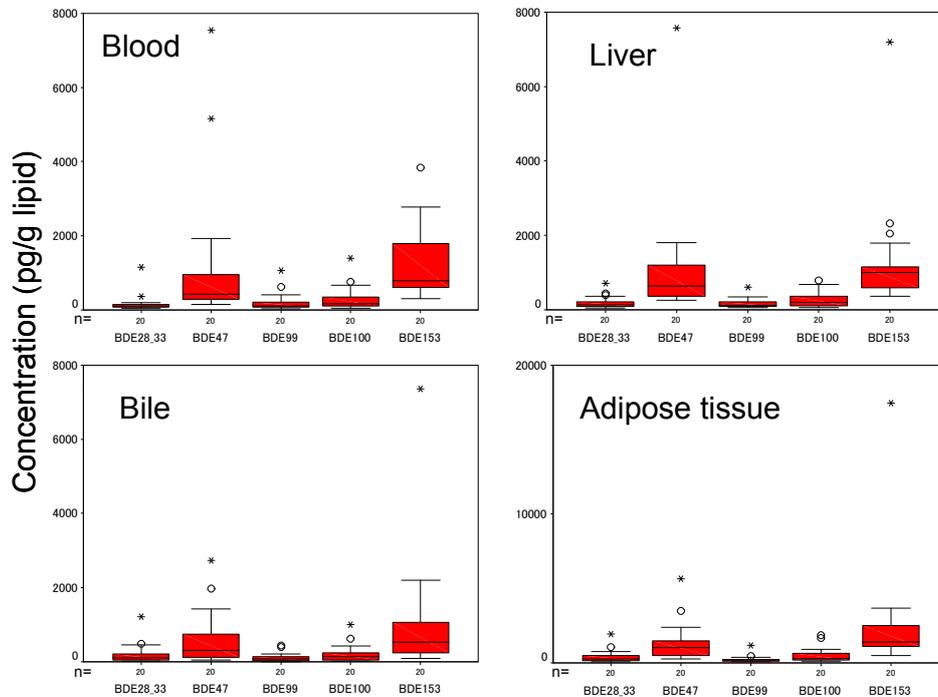


Fig. 3-2 Distribution of the concentration of predominant PBDE congeners in blood, bile, liver and adipose tissue

Outliers (between U1* and U2**) are denoted with circles.

Extreme values (greater than U2**) are denoted with asterisks.

* : upper quartile + 1.5 times interquartile range (IQ).

** : upper quartile + 3 times IQ.

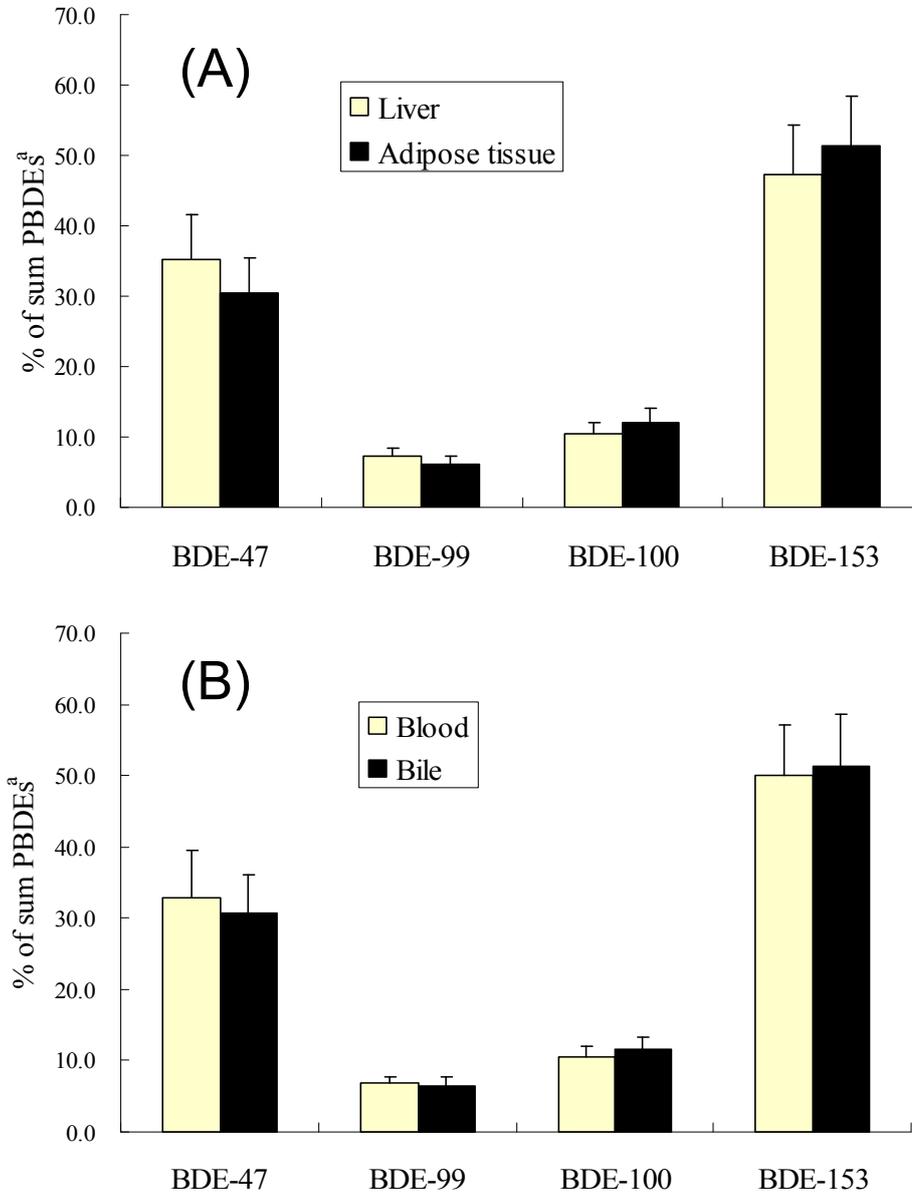


Fig. 3-3 PBDE congener profiles in tissues (A) and body fluids (B)

Error bars represent 2* standard error.

The data represent the geometric mean of the concentration of each congener calculated using the 20 samples analyzed.

Table 3-6 Correlation between PBDE congener concentration and tissue or body fluid.

BDE-28/33			
r	Blood	Liver	Bile
Liver	0.54*		
Bile	0.41	0.65**	
Adipose tissue	0.14	0.36	0.67**
BDE-47			
r	Blood	Liver	Bile
Liver	0.91**		
Bile	0.73**	0.78**	
Adipose tissue	0.89**	0.90**	0.77**
BDE-99			
r	Blood	Liver	Bile
Liver	0.78**		
Bile	0.82**	0.75**	
Adipose tissue	0.73**	0.66**	0.60**
BDE-100			
r	Blood	Liver	Bile
Liver	0.88**		
Bile	0.78**	0.79**	
Adipose tissue	0.91**	0.83**	0.79**
BDE-153			
r	Blood	Liver	Bile
Liver	0.59**		
Bile	0.61**	0.53**	
Adipose tissue	0.71**	0.82**	0.57**
Σ PBDE			
r	Blood	Liver	Bile
Liver	0.88**		
Bile	0.73**	0.73**	
Adipose tissue	0.87**	0.82**	0.67**

** $p < 0.01$

Correlation coefficients determined using Spearman's rank correlation an

3-3-4 PBDEs 濃度と年齢及び性別との関係

本研究において、血液、胆汁、肝臓、脂肪組織中 Σ PBDEs と主要異性体濃度と年齢の関係を評価するため Spearman 相関関数を計算した。回帰分析の結果、 Σ PBDEs と年齢との相関係数は 0.38 以下で、本研究での人体サンプルでは Σ PBDEs と年齢との有意な相関はなかった。一般的に、血液中 PCBs と Dioxins 濃度で加齢との正相関の傾向があると報告 (Gerstenberger et al, 1997, Wittsipec et al, 2000) されている。しかしながら、 Σ PBDEs 濃度は年齢と相関が見られなかった。これは、本研究では 44 歳以下の年齢のサンプルがなく、若い人のサンプルがなかったことが、原因のひとつであると考ええる。また、他の主要な PBDEs 異性体濃度と年齢についても相関が見られなかった。人体組織中への PBDEs の蓄積性について年齢と関連がないことは、米国、ベルギー、スペインの調査において報告されている。これらの報告から、PBDEs の人体濃度は直近の曝露を反映していることを示すと考える。本研究では、肝臓中 BDE-153 にて年齢とのわずかに有意な正の相関関係 ($p < 0.05$) が見られた。BDE-153 については他のサンプルにおいても相関係数は他の主要異性体と比べて高い傾向であった。Geyer et al (2004) は、PBDEs は難分解性でヒトでの生体内半減期は 1.3 から 12.4 年と試算している。BDE-153 の平均的な生体内半減期は、6.5 年 (3.6~12.4 年) であり、BDE-47, 99, 100 の主要な異性体より長い。Lupton et al, 2009 は、BDE-153 は BDE-47 や BDE-99 より人体中に高い割合で蓄積することを報告している。

本研究の第 2 章において、日本の健康成人血液中 PCBs 主要異性体について 13 異性体を特定した。この 13 異性体の合計濃度は総 PCBs 濃度の 75% を占めていた。異性体の塩素置換位置がフェニル基の 2,4,5 位の異性体が日本の健康成人血中に高濃度で存在している。Koga et al (2001) は、CB153 が人体中では代

謝されにくいことを報告している。我々は、BDE-153についても同様であると考える。BDE-47, 99, 100 は比較的最近の曝露を示し、BDE-153 については過去 10～20 年から現在までに受けた曝露を示しているのではないかと考える。

本研究で我々は、 Σ PBDEs 濃度と性別との関係も調べた。性別による Σ PBDEs 濃度に有意差は見られなかった (Mann-Whitney U test, $p > 0.05$)。しかしながら、Kunisue et al (2007) は、男性の脂肪組織において高 PBDEs 濃度を報告している。女性の場合、母乳育児が、PCBs や Dioxins と同様に PBDEs を排泄する役割を持っている。しかしながら、人体内の PBDEs 濃度については、家庭や職場環境中での曝露や食生活等の他の理由が考えられる。

3-3-5 PBDEs 濃度と死亡病気との関係

本研究サンプルでの死因では、20 例中 12 例で種々悪性腫瘍であった。3 例は肺ガン、2 例は肝臓ガン、1 例はそれぞれ食道、直腸、胆管、乳、子宮/卵巣、子宮肉腫ガンと白血病であった (Table 2)。ガン症例での血液、胆汁、肝臓、脂肪組織中 Σ PBDEs 濃度の中央値はそれぞれ 1.7 (0.87～5.9), 2.1 (0.20～8.7), 2.2 (1.1～8.7), 3.7 (1.4～20) ng/g-lipid であった。ガン死亡例と Σ PBDEs 濃度との間に有意な関係は見られなかった (Mann-Whitney U test, $p > 0.05$)。我々は、ガンによる個人生体内代謝動態に大きな変化があると想定したが、PBDEs 濃度と死亡病因との間に関連は見られなかった。

第 4 節 まとめ

本研究では、日本成人の解剖例から得た組織や体液中 PBDEs 濃度について報告した。調査結果では、脂肪組織中濃度が一番高く、広く体液・組織中に PBDEs が分布していることを確認した。本研究での PBDEs 濃度は過去の日本人 PBDEs 濃度の報告と同様であった。種々人体組織や体液中での PBDEs 異性体

分布の研究は PBDEs 異性体の代謝・排泄について評価するために欠くことのできないものである。

第4章 尿中水酸化 PAHs 異性体分析法の開発と海技者における曝露調査

第1節 はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は火による有機物質の不完全燃焼により放出される2つ以上の縮合芳香環をもつ化合物の総称である。PAHs は自動車排ガスや化石燃料、木材、紙、タバコ等、様々な燃焼の際に発生する煙の中に含まれている。

PAHs の毒性については、WHO の国際がん研究機関 (IARC) が 2012 年現在、17 種の PAHs が「2B (ヒトに対する発がん性の可能性がある) 以上」と報告 (International Agency for Research on Cancer) しており、PAHs のヒトに対する発ガン性が懸念されている。PAHs が体内に吸収されると、チトクローム P450 等により代謝され水酸化体となり、さらに抱合体となって尿中に排泄される。非職業的な PAHs による人体への曝露経路はタバコの煙、大気環境、食品が主な要因であると報告 (Hattemer et al, 1991; Phillips, 1999) されている。

船舶はディーゼルエンジンを用いており、燃料や排ガスに含まれる PAHs による環境汚染の報告 (安藤裕友 ら, 2011; Cooper, 2001, 2003) があり問題となっている。また、海技者の PAHs 曝露については、船上での生体試料のサンプル採取が難しく、サンプル数が限られていることより、現在まで、海技者の労働環境下で生体試料を測定して環境汚染との関連性を見出した研究は少ない。既報 (Forcell et al, 2007) において船舶機関士の職業曝露として肺がんと中皮腫のリスク評価について症例調査を行い、その原因関連物質に PAHs を指摘している。エンジンからの排ガス、すす、油付着による機関士の PAHs 曝露が懸念されている。既報 (Forcell et al, 2007; Moen et al, 1996) では、機関士の PAHs 曝露については pyrene の代謝物である 1-hydroxypyrene (1-OH-Pyr) のみ調査

を行っているが、他の PAHs 代謝物についての調査は実施されておらず、1-OH-Pyr を含めた他の PAHs 水酸化物についての調査の必要性を報告している。

本研究では、船舶の燃料由来 PAHs が機関士の曝露源となっているか調査するために、LC/MS/MS を用いて非誘導体化法にて、1-OH-Pyr を含む水酸化 PAHs 3 化合物 (hydroxynaphthalene (OH-Nap), hydroxyphenanthrene (OH-Phe) 及び OH-Pyr) 8 異性体について分析法の検討を行い、海技者への曝露評価への適用性を確認した。また、既報 (Forsell et al, 2007, Moen et al, 1996) と比較し尿中 PAHs 代謝物測定対象化合物を増やすことでより詳細な PAHs 曝露状況の把握について検証することを目的とした。

第 2 節 尿中多環芳香族炭化水素代謝物分析法の開発

4-2 実験材料及び方法

4-2-1 標準品・試薬

LC/MS/MS 分析には関東化学社製 LC/MS 用メタノールと和光純薬社製特級の酢酸アンモニウムを用いた。また、精製水は MilliQ Gradient 超純水製造システム(ミリポア社製)で精製したものをを用いた。脱グルクロン酸抱合用酵素は、Sigma-Aldrich 社製 β -グルクロニダーゼ溶液 (Type H-2 from *Helix pomatia*) を用いた。

水酸化 PAHs 標準品として和光純薬社製の 1-OH-Nap, 2-OH-Nap 及び 1-OH-Pyr と Toronto Reserch Chemicals 社製の 1-OH-Phe, 3-OH-Phe 及び 4-OH-Phe を用いた。内部標準物質として Toronto Reserch Chemicals 社製の 3-OH-Phe- d_9 及び 1-OH-Pyr- d_9 を用いた。塩酸、酢酸アンモニウム及び酢酸ナトリウム三水和物は和光純薬社製試薬特級を用いた。

4-2-2 標準溶液の調製

各標準品をメタノールに溶解させて、標準溶液を調製し、0.016~280 ng/mLの範囲で標準溶液を水/メタノール = 50/50 (v/v) にて適宜希釈して測定用標準溶液を調製した。また、分子内の9個の水素が重水素に置換された3-OH-Phe-d₉及び1-OH-Pyr-d₉を用いて、OH-Nap及びOH-Pheは3-OH-Phe-d₉にて、1-OH-Pyrは1-OH-Pyr-d₉にて内標準法により検量線を作成した。2-OH-Pheについては3-OH-Pheの検量線にて、1-9-OH-Pheについては1-OH-Pheの検量線にて定量を行った。

4-2-3 尿試料

尿試料は、神戸大学海事科学部附属練習船深江丸にて2011年度夏季研究航海期間中の3日間に乗組員10名(機関士4名・他6名)よりインフォームドコンセントを得て採取した合計29検体を用いた。採尿は、航海3日間の朝一番尿を採取し、採取後冷蔵状態にて持ち帰り分析までは-30℃以下で保存した。尿中濃度は、尿中クレアチニン量にて補正を行った。

4-2-4 LC/MS/MS システム及び測定条件

LC/MS/MS 装置は、MS 装置は ABSCIEX 社製 QTRAP5500 を LC 装置は Agilent 社製 1260 シリーズを用いた。LC への試料注入量は 10 μL, カラムオープン温度は 40℃とした。分析カラムには Sigma-Aldrich 社製 Ascentis Express C18 (2.1 mmID × 100 mm, 2.7 μm) を用いた。移動相の流量は 0.3 mL/min, 2 mM 酢酸アンモニウム水溶液(A), メタノール(B)によるグラジエント分析を行った。グラジエント条件は、測定開始 (A : 45%, B : 55%) より 12 分まで (A : 20 %, B : 80 %) となるようリニアグラジエントとした。

イオン化法はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法のネガティブイオンモードを採用し、標準品及び実試料の測定は Selected Reaction Monitoring (SRM)

モードで行った。温度は 700 °C, Ion Spray Voltage を-4500 μ A と設定し, モニタリングイオン ($[M-H]^- \rightarrow [M-H-CO]^-$) は各々 OH-Nap : m/z 143 \rightarrow 115, OH-Phe : m/z 193 \rightarrow 165, OH-Phe- d_9 : m/z 202 \rightarrow 174, OH-Pyr : m/z 217 \rightarrow 189, OH-Pyr- d_9 : m/z 226 \rightarrow 198 をモニタリングした。代表例として, 2-OH-Nap, 1-OH-Phe 及び 1-OH-Pyr の MS/MS スペクトルとモニタリングイオンの開裂様式を示す (Fig. 4-1)。また, MS/MS の declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP) の最適化を行った。モニタリングイオン及び DP, EP, CE 及び CXP の詳細条件を Table 4-1 に示す。

4-2-5 尿中クレアチニンの測定

リスクリット方式臨床化学自動分析装置 JCA-BM 1650 (日本電子社製) にてクレアチニン測定試薬キット シカリキッド・S CRE (関東化学社製) を用いて尿中クレアチニンを測定した。

4-2-6 尿試料の前処理法

尿試料の前処理は, 既報 (Li et al, 2000) を参考に, 尿中の脱抱合体を測定対象とするため, β -グルクロニダーゼにより脱抱合処理を行った。尿試料 5.0 mL を 1M 塩酸にて pH5.0 に調製後, 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 5.0 mL 添加した。 β -グルクロニダーゼ溶液を 10 μ L (≥ 850 units) 加え, 37°C で一晩 (約 15 時間) 脱抱合反応を行った。その後, 内部標準溶液 (200 ng/mL の 1-OHPyr- d_9 及び 50 ng/mL の 3-OHPhe- d_9) 50 μ L を加え, 逆相系カートリッジ (Waters 製 Sep-pak C18, 500 mg) による固相抽出を行った。固相カートリッジは, メタノール 5 mL と精製水 10 mL でコンディショニング, 脱抱合した尿試料を負荷した。その後, 精製水 8 mL で洗浄し, メタノール 8 mL にて溶出した。溶出液を窒素気流下で乾固し, メタノール及び 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝

液 (500 μ L, 50/50 v/v) により再溶解して測定用試料とした。

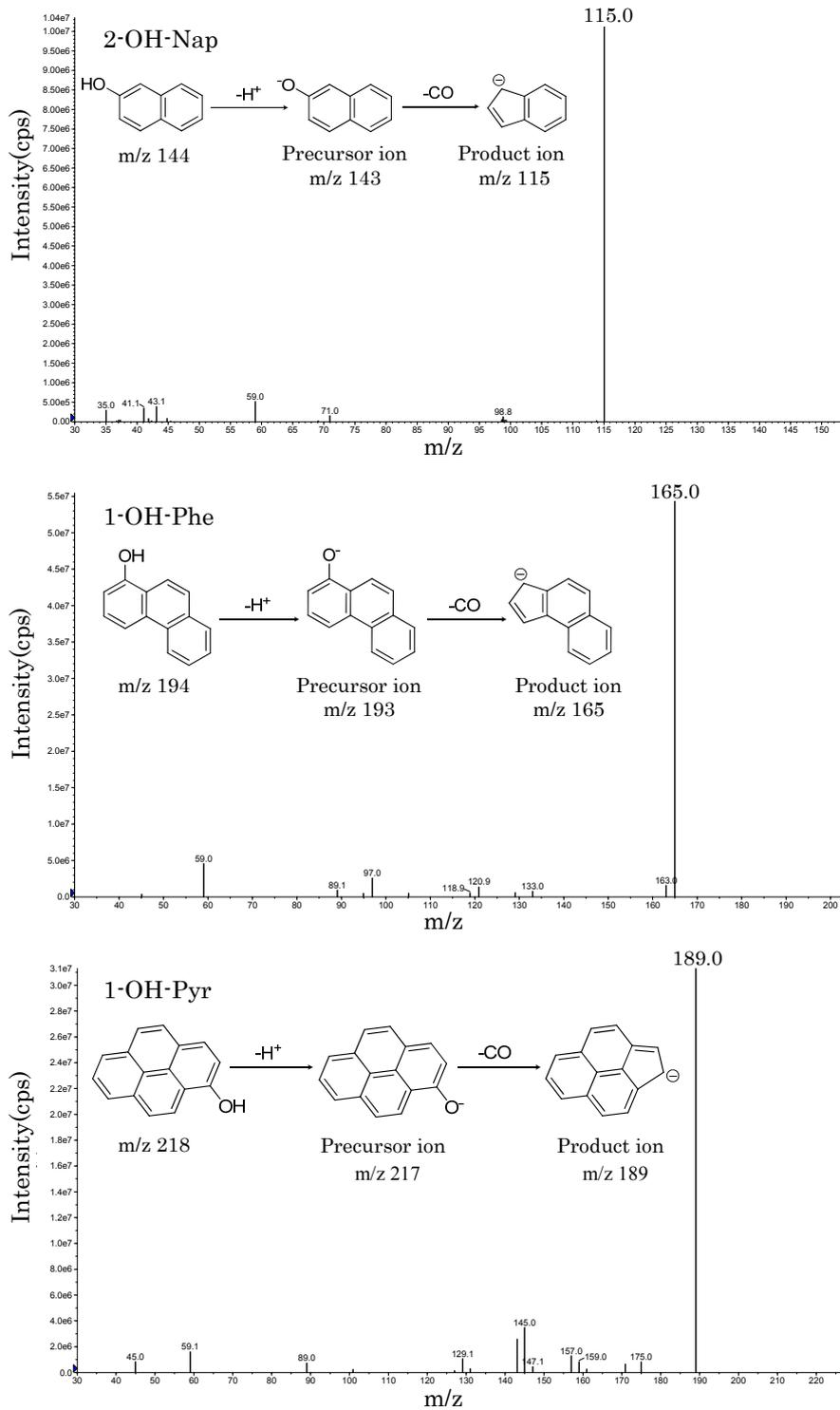


Fig.4-1 MS/MS spectra of 2-OH-Nap, 1-OH-Phe and 1-OH-Pyr

Table 4-1 Mass transition monitored and MS/MS conditions

Analytes	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP(V)	EP(V)	CE(V)	CXP(V)
OH-Nap	143	115	-120	-2	-30	-10
OH-Phe	193	165	-175	-4	-50	-20
OH-Pyr	217	189	-60	-10	-30	-16
OH-Phe-d9	202	174	-175	-4	-50	-20
OH-Pyr-d9	226	198	-60	-10	-30	-16

4-2-7 統計解析

有意差検定については、IBM 社の SPSS 11.0J を用いて解析を行った。

第 3 節 結果と考察

4-3-1 尿中水酸化 PAHs の分析法バリデーション

測定対象物標準品の SRM クロマトグラムを Fig. 4-2 に示す。全ての分析対象物が 12 分以内に分離された。また、内部標準物質に用いた重水素化体の保持時間が分析対象物より早くなっているが、これは既報 (Ramsauer et al, 2011)とも一致する。今後は、保持時間の差が少ない ^{13}C 標識体等の内部標準物質の使用も考慮したい。検量線の直線範囲は、OH-Nap, OH-Phe で 0.016~30 ng/mL, OH-Pyr で 0.28~280 ng/mL で良好な直線性 ($r > 0.999$) と相対標準偏差 (RSD<4.5%) が得られた (n=4)。また、ヒト尿試料を用いて添加回収試験を行った。ヒト尿試料に分析最終濃度が、0.06~0.12 ng/mL 及び 0.6~1.2 ng/mL の OH-Nap 及び OH-Phe 標準溶液, 1.1 ng/mL 及び 11 ng/mL の OH-Pyr 標準溶液を各々添加して添加回収試験を行った。OH-Nap, OH-Phe 及び OH-Pyr 各々の平均回収率は、88.6~102.3 %, 相対標準偏差は 6.9 %以下と良好な結果

を得ることができた (Table 4-2)。

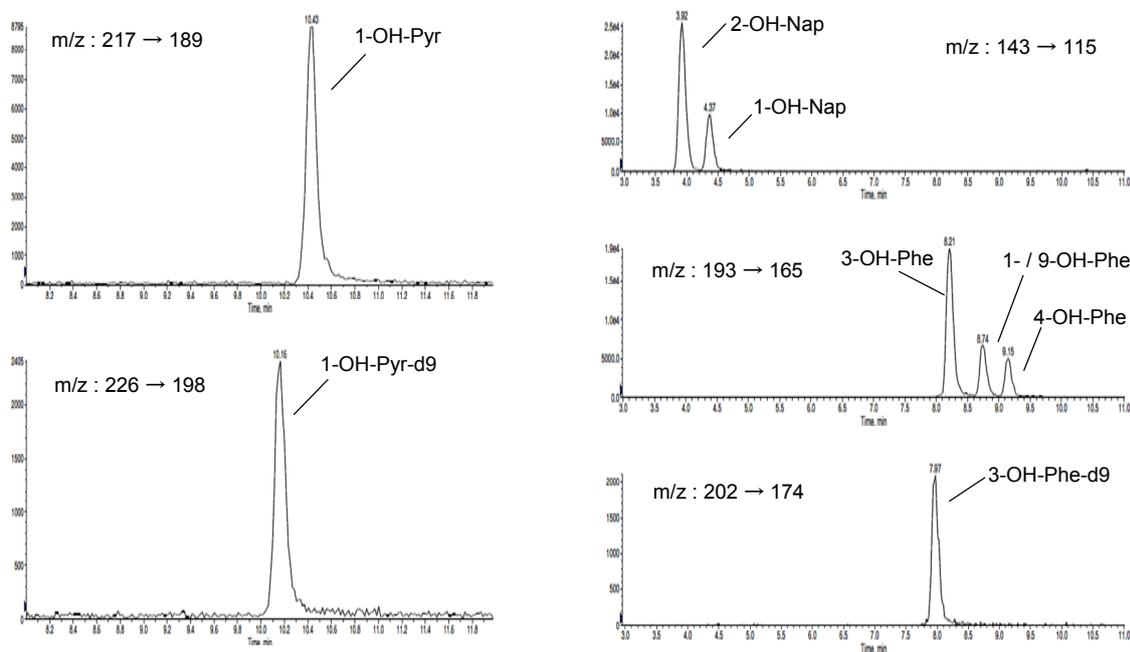


Fig. 4-2 Typical SRM chromatogram of the standard mixture

Table 4-2 Recovery of OH-Nap, OH-Phe and OH-Pyr from urine

(n=6)

	Added Concentration(ng/mL)	Average(%)	RSD(%)	Added Concentration(ng/mL)	Average(%)	RSD(%)
1-OH-Nap	0.060	98.5	3.4	0.60	90.5	4.2
2-OH-Nap	0.11	91.8	6.7	1.1	88.6	1.0
1-OH-Phe	0.10	94.7	6.3	1.0	99.9	5.8
3-OH-Phe	0.12	95.3	6.9	1.2	99.8	0.9
4-OH-Phe	0.083	91.0	3.9	0.83	101.6	1.2
1-OH-Pyr	1.1	102.3	4.9	11	100.0	1.4

4-3-2 測定結果の検討

乗組員 10 名 3 日間計 29 検体の尿試料分析結果より、OH-Nap 及び OH-Phe はすべての検体から検出された。また、1-OH-Pyr は検出下限以下

(<0.28 ng/mL)であった 2 検体を除いた 27 検体から検出された。尿試料 SRM クロマトグラムを Fig. 4-3 に示す。検出された値をクレアチニン値により補正を行い、測定値としたところ、全体の中央値（濃度範囲）は 1-OH-Nap で 0.36 ($0.18\sim 4.96$) μ g/gCre, 2-OH-Nap で 0.57 ($0.22\sim 13.05$) μ g/gCre, 1-/9-OH-Phe で 0.12 ($0.03\sim 0.54$) μ g/gCre, 2-OH-Phe で 0.07 ($0.003\sim 0.18$) μ g/gCre, 3-OH-Phe で 0.14 ($0.08\sim 0.35$) μ g/gCre, 4-OH-Phe で 0.07 ($0.02\sim 0.29$) μ g/gCre, 1-OH-Pyr で 0.11 ($0.01\sim 0.69$) μ g/gCre であった。また、PAHs による機関士の作業曝露の可能性を検討した。機関士の PAHs 曝露経路について、機関室内大気中 PAHs 測定を実施し、曝露経路調査を行った報告 (Moen et al, 1996)では、機関室大気より高濃度の PAHs は検出されず、機関士への PAHs の主な曝露経路はエンジン捕集作業時等での油の皮膚付着による経皮曝露が主であると報告されている。本研究では機関士への PAHs 曝露を直接評価可能な尿試料分析にて曝露評価を行った。

本研究参加者において喫煙習慣の有無について調査したところ機関士 1 名が喫煙者であった。喫煙と PAHs 曝露の関係について多くの調査報告 (Li et al, 2005; Ramsauer et al, 2011; Strickland et al, 1999; Stephen, 2002) があるため喫煙者 1 名を除いた 9 名 (機関士 3 名・他乗組員 6 名) 26 検体について機関室内での作業曝露について検討した。機関士と他乗組員の水酸化 PAH 尿中濃度についての平均濃度分布を Fig.4 に示す。機関士と他の乗組員の結果について Mann-Whitney 検定を行ったが、有意差 ($p>0.05$) は見られなかった。本研究で尿の採取を実施した深江丸の機関室内環境はクリーンに保たれていたため

PAHs 曝露も無かったと考えられる。しかし、船舶エンジンから排出される PAHs 量については使用燃料の違い、エンジンの種類、運転状況、気温等の条件により変化すると報告 (安藤裕友 ら, 2011; Cooper DA, 2001, 2003)されており、船舶の違いや機関士の作業条件等により PAHs 曝露量が異なることが予想される。今後、更に本法を用いて調査を継続し、調査数を増やし PAHs による機関士の曝露測定及びリスク評価を検証することが課題と考える。

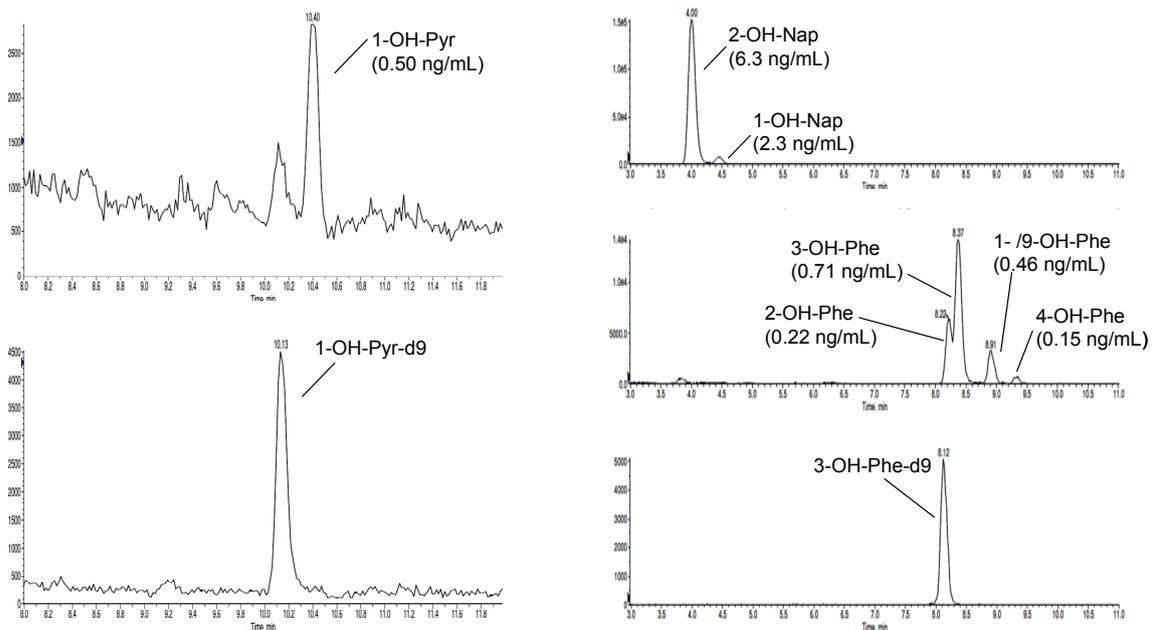


Fig. 4-3 Typical SRM chromatograms of OH-PAHs in human urine samples

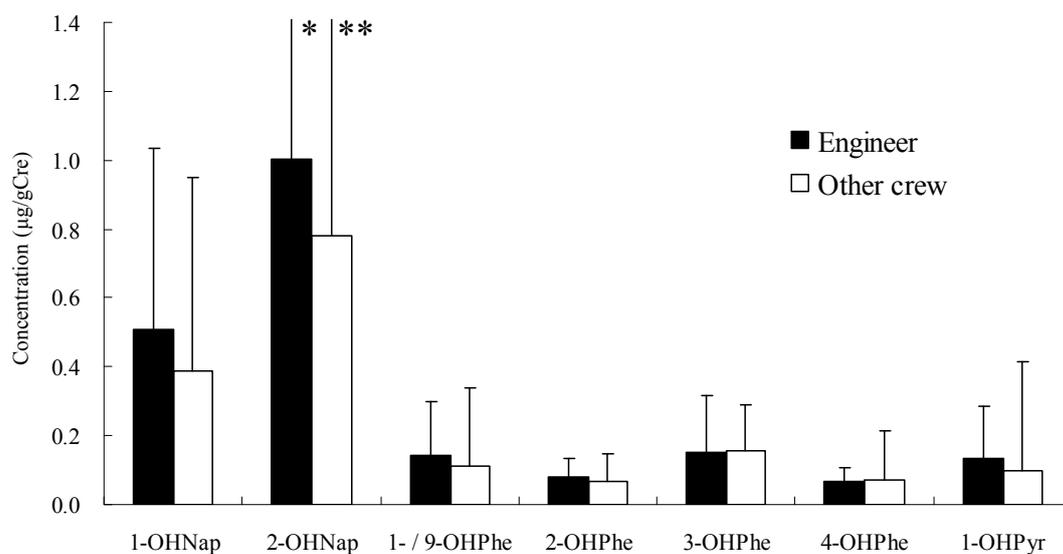


Fig.4 OH-PAHs concentrations in urine for engineers and other crew members

Error bars represent the 2x standard error (2SD).

The data represent the geometric mean of the concentration of each congener.

2SD: *,3.5 ; **,6.3

第4節 まとめ

本研究では、PAHs 曝露による肺がんのリスクが報告 (Forsell et al, 2007, Moen et al, 1996)されている機関士の尿中水酸化 PAHs について調査した。船舶機関士の尿試料はサンプル数が限られており、船上での採取が難しいことから、PAHs 水酸化物 8 異性体について曝露調査を実施した報告は初めてである。本法が PAHs 曝露評価に貢献できると期待される。

第5章 総合結論

本研究では生体試料中環境汚染物質濃度を測定することにより人体曝露状況の把握を行い、食品や環境汚染の評価を行うという新しい視点からのモニタリング方法を提案することを目的とした。モニタリング対象環境汚染物質として PCBs, HO-PCBs, PBDEs と OH-PAHs を選定し、それぞれの環境汚染物質について、まず、生体試料中環境汚染物質濃度測定のための質量分析計を用いた高感度分析法を開発し、開発した分析法を用いて、日本人の環境汚染物質による曝露状態を把握することを目的とし以下の研究成果が得られた。

第2章では、血液中 PCBs 異性体濃度と異性体分布調査することを目的として、HRGC/HRMS を用いた血液中の PCBs の高感度全異性体分析方法を開発し、以下の研究成果が得られた。

日本の健康成人24名のボランティアから得た全血について分析を実施し異性体分布と濃度調査を実施した。血液から平均95の PCBs 異性体が検出された。全血中総 PCB 濃度の平均値は 771.9 pg/g-全血 (139.6 ng/g-lipid) であった。主要な血液中 PCBs 異性体として CB153(22.2%), CB180(11.6%), CB138(8.4%), CB182/187(6.6%), CB118 (5.6%), CB163/164(5.0%), CB99(3.9%), CB74(3.6%), CB146(3.3%), CB170(3.0%), CB156(2.2%)を確認し、これらの異性体は血液中総 PCBs 濃度の 75.6%を占めていた。主要 PCBs 異性体の CB153, 180, 138, 187, 118, 99, 74 は、フェニル基の 2,4,5 位に塩素が置換した異性体であった。これらの異性体は PCBs の摂取と代謝の関係に基づき、一般的な日本人について特徴的なものであると推測された。209 種 PCBs 異性体の測定は他の媒体の異性体パターンとの比較することにより血液中の PCBs 異性体分布に関する詳細情報を得ることができる。血液中 PCBs 全異性体分析法は PCBs による直接的な人体曝露評価が可能のため、環境汚染調査と合わせて PCBs の環境汚染評

価に役立つと考える。

また、PCBs の体内代謝物である HO-PCBs について、5-7 塩素 PCBs の主要代謝物異性体について LC/MS/MS を用いた血清中濃度分析法を開発した。

また、開発した分析法を用いて日本の成人 102 名について血清中 HO-PCBs 異性体分析を行った。また、同時に PCBs 主要 13 異性体濃度についても HRGC/MS にて測定し、親 PCBs 異性体濃度と HO-PCBs 異性体濃度との関連、年齢や糖尿病との関連について考察を行い、以下の研究成果が得られた。

被験者 102 名の HO-PCBs と PCBs 主要異性体濃度測定結果について、血清中 Σ_7 HO-PCBs 範囲は 27~648 pg/g-血清、中央値 156 pg/g-血清であった。また、血液中 Σ_{13} PCBs 範囲は 182~3097 pg/g-血液、中央値 558 pg/g-血液であった。

また、102 名の内、糖尿病と診断された 21 名（男性 11 名、女性 10 名）と対照群について血清中 HO-PCBs 主要異性体濃度と糖尿病との関係について、検定を行ったが（Mann-Whitney Utest, $p > 0.05$ ）、各異性体濃度について糖尿病との有意な関係は見られなかった。糖尿病と血中 PCBs 主要異性体との関連では、CB146 と CB180 で正の、CB163/164 と CB170 で負の有意な関連を認めた。血液中 PCBs 主要異性体濃度と糖尿病について CB-146 で有意な正の関連について報告した。しかし、その代謝物の 4HO-CB146, 3HO-CB153 については糖尿病との関連は見られなかった。これは、4HO-CB146, 3HO-CB 153 が、複数の親 PCBs 異性体（CB138, CB146, CB153）からの代謝により生成し、また、一般的な血中 PCBs 異性体濃度順は $CB153 > CB138 > CB146$ であるため、4HO-CB146 は、CB146 からの代謝生成の影響が小さく関連が認められなかったものとする。

HO-PCBs 主要異性体濃度、PCBs 主要異性体濃度と年齢との相関関係につい

では、 $\Sigma_{13}\text{PCBs}$ と PCBs 主要異性体濃度と年齢の間には、全ての主要異性体において有意な正の相関関係 ($p < 0.01$) が見られた。 $\Sigma_7\text{HO-PCBs}$ と HO-PCBs 主要異性体濃度と年齢の間には、一部で有意な正の相関関係が見られた。しかし、 HO-PCBs 主要異性体濃度と年齢との相関関係については、 PCBs 主要異性体濃度と年齢との間に有意な相関関係が報告されているため、親 PCBs 異性体濃度を制御変数として偏相関係数を評価したところ、 HO-PCBs 主要異性体と年齢との間に有意な相関関係は見られなかった。

血液中 HO-PCBs 主要異性体濃度と親 PCBs 主要異性体濃度との関係、糖尿病との関連について調査した。 HO-PCBs 異性体濃度と糖尿病との関連については、複数の親 PCBs 異性体からの代謝により生成する HO-PCBs 異性体について、より高濃度の親 PCBs 異性体の影響を受けることが考えられ明瞭な関連性は認められなかった。

第3章では、臭素系難燃剤である PBDEs について HRGC/HRMS を用いた生体試料中分析法の開発を行い、開発した分析法を用いて日本人 20 名の解剖サンプルを用いて、生体試料中の PBDEs 異性体濃度と分布について検討を行い、以下の研究成果が得られた。

解剖 20 例の血液、肝臓、胆汁、脂肪組織濃度について調査した。3~6 臭素化体の主要 25 異性体について測定した。各試料において 50%以上の割合で検出された PBDEs 異性体の合計濃度は、血液、肝臓、胆汁、脂肪組織中の幾何学平均において各々 2.4, 2.6, 1.4, 4.3 ng/g-lipid であった。脂肪組織で濃度が高い結果となった。 PBDEs は脂溶性が高いため脂肪組織に蓄えられている傾向が判明した。また、測定した異性体の生体試料中で最も主要な異性体は、 BDE-47 と BDE-153 であり続いて、 BDE-100 , BDE-99 , BDE-28/33 であった。これら異性体濃度分布は日本人の他の報告と同様であったが、米国の報告よりは著し

く低い濃度であった。EU とは同程度の濃度であった。4 種類のサンプル間での Σ PBDE 濃度と各主要異性体濃度には有意に高い相関が見られた。PBDEs は体内組織や体液中に広く分布し蓄積していることが判明した。

第 4 章では、PAHs の尿中代謝物である水酸化 PAHs について、海技者特に機関士の労働環境中での PAH 曝露量評価法について検討した。naphthalene, phenanthrene, pyrene の尿中水酸化代謝物 8 化合物について分析法を検討開発した。尿の前処理には SepPak C18 による固相抽出を、測定には LC/MS/MS を用い、非誘導体化法にて測定した。本研究により以下の成果が得られた。

PAHs 曝露による肺がんのリスクが報告されている機関士の尿中水酸化 PAHs について調査した。船舶機関士の尿試料はサンプル数が限られており、船上での採取が難しいことから、PAHs 水酸化物 8 異性体について曝露調査を実施した報告は初めてである。各水酸化物について機関士と他の乗組員と比較を行った。今回測定した機関士においては、深江丸の機関室内環境がクリーンに保たれていたため、作業環境中での PAHs による曝露について確認できなかったが、本分析法が PAHs の海技者曝露測定及びリスク評価に応用可能であることが示唆された。開発した本法が今後、PAHs 曝露評価に貢献できると期待される。

参考文献

- Akutsu K, Kitagawa M, Nakazawa H, Makino T, Iwazaki K, Oda H, Hori S. (2003): Time trend (1973-2000) of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk. *Chemosphere*, **53**, 645-654.
- 安藤裕友, 宮田 修, 今井祥子, 高橋千織, 仁木洋一, 徐 芝徳, 西尾澄人 (2011): 船舶ディーゼルエンジンの排ガス中に含まれる有害物質に関する分析, *海上技術安全研究所報告*, **11**, 41 -56.
- Ballschmiter K, Zell M. (1980): Baseline studies of the global pollution. I. Occurrence of organohalogenes in pristine European and antarctic aquatic environments. *J Environ Anal Chem*, **8**(1), 15-35.
- Bi X, Qu W, Sheng G, Zhang W, Mai B, Chen D, Yu L, Fu J. (2006): Polybrominated diphenyl ethers in South China maternal and fetal blood and breast milk. *Environ Pollut*, **144**(3), 1024-1030.
- Chen A, Chung E, DeFranco EA, Pinney SM, Dietrich KN. (2011): Serum PBDEs and age at menarche in adolescent girls: Analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environ Res*, **111**,831-837.
- Chevrier J, Harley KG, Bradman A, Gharbi M, Sjodin A, Eskenazi B. (2010): Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants and thyroid hormone during pregnancy. *Environ Health Perspect*, **118**, 1444-1449.
- Covaci A, Voorspoels S, Roosens L, Jacobs W, Blust R, Neels H. (2008): Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human liver and adipose tissue samples from Belgium.

- Chemosphere*, **73**, 170-175.
- Cooper DA (2001): Exhaust emission from high speed passenger ferries. *Atmospheric Environ*, **35**, 4189-4200.
- Cooper DA (2003): Exhaust emission from ships at berth. *Atmospheric Environ*, **37**, 3817-3830.
- Dirtu AC, Jaspers VL, Cernat R, Neels H, Covaci A, (2010): Distribution of PCBs, Their Hydroxylated Metabolites, and Other Phenolic Contaminants in Human Serum from Two European Countries. *Environ Sci Technol*, **44**, 2876-2883.
- 榎本剛司, 西尾悠, 松田宗明, 河野公栄, 脇本忠明 (2006): ヒト血液中 PCBs 水酸化代謝物(HO-PCBs)に関する研究-分析法の検討及び日本人健常者における濃度レベルと蓄積特性-, *環境化学*, **16**, 51-59.
- Forsell K, Hageberg S, Nilsson R (2007): Lung cancer and mesothelioma among engine room crew – case reports with risk assessment of previous and ongoing exposure to carcinogens. *Intermat Marit Health*, **58**, 1-4.
- Fernandez MF, Araque P, Kiviranta H, Molina-Molina JM, Rantakokko P, Laine O, Vartiainen T, Olea N. (2007): PBDEs and PBBs in the adipose tissue of women from Spain. *Chemosphere*, **66**, 377-383.
- Gerstenberger SL, Tavris DR, Hansen LK, Pratt-Shelly J, Dellinger JA. (1997): Concentrations of blood and hair mercury and serum PCBs in an Ojibwa population that consumes Great Lakes region fish. *Clin Toxicol*, **35**, 377-386.
- Geyer HJ, Schramm K-W, Darnerud PO, Aune M, Feicht A, Fried KW. (2004): Terminal elimination half-lives of the brominated flame

- retardants TBBPA, HBCD, and lower brominated PBDEs in humans. *Organohalogen Compounds*, **66**, 3867-3872.
- Giesy JP and Kannan K. (1998): Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol*, **28**(6), 511-569.
- Hallgern S, Darnerud PO. (1998): Effect of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyl (PCBs) on thyroid hormone levels and enzyme activities in rats. *Organohalogen Compounds*, **35**, 391-394.
- Harrad S, Porter L. (2007): Concentrations of polybrominated diphenyl ethers in blood serum from New Zealand. *Chemosphere*, **66**(10): 2019-2023.
- Hattemer-Frey H. A., Travis C. C. (1991): Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure. *Toxicol Ind Health*, **7**, 141-157
- Inoue K, Harada K, Takenaka K, Uehara S, Kono M, Shimizu T, Takasuga T, Senthilkumar K, Yamashita F, Koizumi A. (2006): Levels and concentration ratios of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in serum and breast milk of Japanese mothers. *Environ Health Perspect*, **114**, 1179-1185.
- International Agency for Research on Cancer : Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1-104. Available online at <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- Johnson-Restrepo B, Kannan K, Rapaport DP, Rodan BD. (2005): Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue from New York. *Environ Sci Technol*, **39**(14), 5177-5182.

- Kitamura S, Jinno N, Suzuki T, Sugihara K, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N (2005): Thyroid hormone-like and estrogen activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology*, **208**, 377-387.
- Koga N, Kanamaru T, Oishi N, Kato Y, Kimura R, Haraguchi K, Masuda Y. (2001): Species differences in the in vitro metabolism of 2,4,5,2',3',4'-hexachlorobiphenyl. *Fukuoka Igaku Zasshi*, **92**(5) 167-176.
- Konishi Y, Kuwabara K, Hori S. (2001): Continuous surveillance of organochlorine compounds in human breast milk from 1972 to 1998 in Osaka, Japan. *Arch Environ Contam Toxicol*, **40**(4), 571-578.
- 厚生労働省 (2000): 血液中のダイオキシン類測定暫定マニュアル, 4-10.
- Kunisue T, Takayanagi N, Isobe T, Takahashi S, Nose M, Yamada T, Komori H, Arita N, Ueda N, Tanabe S. (2007): Polybrominated diphenyl ethers and persistent organochlorines in Japanese human adipose tissues. *Environ Int*, **33**, 1048-1056.
- 黒田洋一郎 (2003): 子どもの行動異常・脳の発達障害と環境化学物質汚染: PCB, 農薬などによる遺伝子発現のかく乱, *科学*, **88**, 1234-1243.
- Law RJ, Allchin CR, de Boer J, Covaci A, Herzke D, Lepom P, Morris S, Tronczynski J, de Wit CA. (2006): Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere*, **64**, 187-208.
- Legler J, Brouwer A. (2003): Are brominated flame retardants endocrine disruptors? *Environ Int*, **29**, 879-885.
- Letcher RJ, Klasson-Whehler E, Bergman A (2000): Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *In The Handbook of Environmental Chemistry : New Types of Persistent Halogenated*

Compounds.

- Li H, Krieger RI, Li QX (2000): Improved HPLC method for analysis of 1-hydroxypyrene in human urine specimens of cigarette smokers. *Sci Total Environ*, **257**, 147-153.
- Litten S, Brain Fowler, Diane Luszniak. (2000): Determination of PCDD/PCDF and 209 PCB congeners in New York Harbor and Hudson Basin using filtration / XAD integrating samplers and US EPA Methods 1668 and 1613b. *Organohalogen Compounds*, **46**, 369-372.
- Li Y, Li AC, Shi H, Zhou S, Shou WZ, Jiang X, Naidong W, Lauterbach JH. (2005): The use of chemical derivatization to enhance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of 1-hydroxypyrene, a biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, **19**, 3331-3338.
- Lupton SJ, Mc Garrigle BP, Olson JR, Wood TD, Aga DS. (2009): Human liver microsome-mediated metabolism of brominated diphenyl ethers 47, 99, and 153 and identification of their major metabolites. *Chem Res Toxicol*, **22**, 1802-1809.
- Matsumura C, Tsurukawa M, Nakano T, Ezaki T, Ohashi M. (2002): Elution orders of all 209 PCBs congeners on capillary column "HT8-PCB". *J Environ Chem*, **12**(4), 855-866.
- Miller DT, Condon SK, Kutzner S, Phillips DL, Krueger E, Timperi R, Burse VW, Cutler J, Gute DM. (1991): Human exposure to polychlorinated biphenyls in Greater New Bedford, Massachusetts: a prevalence study. *Arch Environ Contam Toxicol*, **20**(3), 410-416.

- Moen BE, Nilsson R, Nordlinder R, Ovrebo S, Bleie K, Skorve AH, Hollund BE. (1996): Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine rooms by measurement of urinary 1-hydroxypyrene. *Occup Environ Med*, **53**, 692-696.
- Moon HB, Lee DH, Lee YS, Choi HG, Kannan K. (2012): Polybrominated diphenyl ethers, Polychlorinated biphenyls, and Organochlorine Pesticides in adipose tissues of Korean women. *Arch Environ Contam Toxicol*, **62**(1), 176-184.
- Morck A, Hakk H, Orn U, Klasson Wehler E. (2003): Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Drug Metab Dispos*, **31**, 900-907.
- Nakano T, Tanno K, Kitamoto H, Matsumura C, Goto M, Majima Y, Masho R, Tohyama C, Okuno T. (2002): Congener specific analysis of polychlorinated biphenyls in the environment and human samples. *Organohalogen Compounds*, **55**, 339-342.
- Nomiyama K, Yonehara T, Yonemura S, Yamamoto M, Koriyama C, Akiba S, Shinohara R, Koga M. (2010): Determination and characterization of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in serum and adipose tissue of Japanese women diagnosed with breast cancer. *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 2890-2896.
- Noren K, Meironyte D. (2000): Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere*, **40** (9-11), 1111-1123.
- Ohta S, Ishizuka D, Nishimura H, Nakao T, Aozasa O, Shimidzu Y, Ochiai F,

- Kida T, Nishi M, Miyata H. (2002): Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables, and meats and levels in human milk of nursing pan. *Chemosphere*, **46**, 689-696.
- Park JS, Linderholm L, Charles MJ, Athanasiadou M, Petrik J, Kocan A, Drobna B, Trnovec T, Bergman A, Hertz-Picciotto I. (2007): Polychlorinated Biphenyls and Their Hydroxylated Metabolites (OH-PCBs) in Pregnant Women from Eastern Slovakia. *Environ Health Perspect*, **115**, 20-27.
- Park JS, She J, Holden A, Sharp M, Gephart R, Souders-Mason G, Zhang V, Chow J, Leslie B, Hooper K. (2011): High postnatal exposures to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via breast milk in California: does BDE-209 transfer to breast milk? *Environ Sci Technol*, **45**(10), 4579-4585.
- Phillips DH. (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res*, **443**, 139-147.
- Ramsauer B, Sterz K, Hagedorn HW, Engl J, Scherer G, McEwan M, Errington G, Shepperd J, Cheung F (2011): A liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in urine of non-smokers and smokers. *Anal Bioanal Chem*, **399**, 877-889.
- Sakiyama T, Yamamoto A, Kakutani N, Fukuyama J, Okumura T (2007): Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the aquatic environment : Levels and congener profiles in sediments from Osaka, Japan. *Organohalogen Compounds*, **69**, 1380-1383.

- Sandholm A, Emanuelsson BM, Wehler EK. (2003): Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. *Xenobiotica*, **33**, 1149-1158.
- Schechter A, Pavuk M, Papke O, Ryan JJ, Birnbaum L, Rosen R. (2003): Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mother's milk. *Environ Health Perspect*, **111**(14), 1723-1729.
- Schechter A, Papke O, Tung KC, Joseph J, Harris TR, Dahlgren J. (2005): Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the U.S. population: current levels, temporal trends, and comparison with dioxins, dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls. *J Occup Environ Med*, **47**(3), 199-211.
- She J, Petreas M, Winkler J, Visita P, McKinney M, Kopec D. (2002): PBDEs in the San Francisco Bay area: measurements in harbor seal and human breast adipose tissue. *Chemosphere*, **46**, 697-707.
- Sjodin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Kronholm-Diab K, Jakobsson E, Bergman A. (1999): Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. *Environ Health Perspect*, **107**, 643-648.
- Sjodin A, Jones RS, Focant JF, Lapeza C, Wang RY, McGahee EE III, Zhang Y, Turner WE, Slazyk B, Needham LL, Patterson DG Jr. (2004): Retrospective time-trend study of polybrominated diphenyl ether and polybrominated and polychlorinated biphenyl levels in human serum from the United States. *Environ Health Perspect*, **112**, 654-658.
- Sjodin A, Wong LY, Jones RS, Park A, Zhang Y, Hodge C, Dieptro E, McClure

- C, Turner W, Needham LL, Patterson DG Jr. (2008): Serum concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyl (PBB) in the United States population: 2003-2004. *Environ Sci Technol*, **42**(4), 1377-1384.
- Stephen SH. (2002): Human urinary carcinogen metabolites : biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis*, **23**, 907-922.
- Strickland P, Kang D. (1999): Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter. *Toxicol Lett*, **108**, 191-199.
- Takasuga T, Senthilkumar K, Takemori H, Ohi E, Tsuji H, Nagayama J. (2004): Impact of fermented brown rice with *Aspergillus oryzae* (FEBRA) intake and concentrations of polybrominated diphenylethers (PBDEs) in blood of humans from Japan. *Chemosphere*, **57**, 795-811.
- Tan J, Li QQ, Loganath A, Chong YS, Xiao M, Obbard JP. (2008): Multivariate data analysis of persistent organic pollutants in maternal adipose tissue in Singapore. *Environ Sci Technol*, **42**, 2681-2687.
- Tanaka T, Morita A Kato M, Hirai T, Mizoue T, Terauchi Y, Watanabe S, Noda M. (2011): Congener-specific polychlorinated biphenyls and the prevalence of diabetes in the Saku Control Obesity Program (SCOP). *Endocrine Journal*, **58**, 589-596.
- Uemura H, Arisawa K, Hiyoshi M, Dakeshita S, Kitayama A, Takami H, Sawachika F, Yamaguchi M, Sasai S. (2010): Congener-specific body burden levels and possible determinants of polybrominated diphenyl ethers in the general Japanese population. *Chemosphere*, **79**, 706-712.

- UNEP. (2009): The Nine New POPs. An introduction to the nine chemicals added to the Stockholm Convention by the Conference of the Parties at its fourth meeting. Available online at <http://chm.pops.int/Programmes/NewPOPs/Publications/tabid/695/language/en-US/Default.aspx>
- Watanabe S, Morita A, Aiba N, Miyachi M, Sasaki S, Morioka M, Noda M, Takebayashi T, Kimura M (2007): Study design of the Saku Control Obesity Program (SCOP). *Anti-aging Medicine*, **4**, 70-73.
- Watanabe I, Sakai S. (2003): Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environ Int* , **29**, 665-682.
- Weiss J, Meijer L, Sauer P, Linderholm L, Athanassiadis I, Bergman A. (2004): PBDE and HBCDD levels in blood from Dutch mothers and infants – Analysis of a Dutch Groningen in Infant Cohort. *Organohalogen Compounds*, **66**, 2647-2652.
- Wittsipek J, Schrey P, Ewers U, Selenka F, Wilherm M. (2000): Decrease of PCDD/F levels in human blood from Germany over the past ten years (1989-1998). *Chemosphere*, **40**, 1103-1109.
- Zhou T, Taylor MM, DeVito MJ, Crofton KM. (2002): Developmental exposure to brominated diphenylethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicol Sci* , **66**, 105-116.

研究業績

学術論文

- 1) Tetsuya Hirai, Yoshinori Fujimine, Syunkichi Watanabe, Takeshi Nakano
(2005): Congener-specific analysis of polychlorinated biphenyl in human blood from Japanese. *Environmental Geochemistry and Health*, **27**, 65-73
- 2) Shaw Watanabe, Masahiro Morioka, Tetsuya Hirai and Shoichi Mizuno
(2007): Dioxin exposure and type 2 diabetes mellitus : Case control study. *Anti-aging Medicine*, **4**, 51-56
- 3) Tetsuya Hirai, Yoshinori Fujimine, Shaw Watanabe, Takeshi Nakano
(2012) : Distribution of polybrominated diphenyl ethers in Japanese autopsy tissue and body fluid samples. *Environmental Science and Pollution Research*, **19**, 3538-3546
- 4) 平井哲也, 木下啓明, 岡村秀雄, 矢野吉治, 中野 武 (2012) : 高速液体クロマトグラフィー/タンデムマス質量分析法による海技者尿中の多環芳香族炭化水素代謝物の定量と曝露評価, *分析化学*, 61(11), 925-930

学会発表

(国際学会)

- 1) Tetsuya Hirai, Yoshinori Fujimine, Tsukasa Kodaira and Shaw Watanabe
(2001):SIMPLE SOLID-PHASE LIPID EXTRACTION OF DIOXINS FROM MATERNAL BREAST MILK; Poster presentation, Dioxin2001
- 2) Tetsuya Hirai, Hiromi Furutani, Miya Myouren, Yoshinori Fujimine,

- Tsukasa Kodaira, Junnichi Hata and Shaw Watanabe (2002):
CONCENTRATION OF POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS
(PBDES) IN THE HUMAN BILE IN RELATION TO THOSE IN THE
LIVER AND BLOOD; Poster presentation, Dioxin2002
- 3) Tetsuya Hirai, Yoshinori Fujimine, Syunkichi Watanabe, Junnichi Hata
and Shaw Watanabe (2003): CONCENTRATION OF
POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS (PBDES) IN HUMAN
SAMPLE IN JAPANESE; Poster presentation, Dioxin2003
- 4) Tetsuya Hirai, Yoshinori Fujimine, Syunkichi Watanabe and Takeshi
Nakano (2003): ANALYSIS OF ALL 209 POLYCHLORINATED
BIPHENYLS CONGENERS IN HUMAN POOLED BLOOD
SAMPLE IN JAPAN; Poster presentation, Dioxin2003
- 5) Tetsuya Hirai, Yoshinori Fujimine, Syunkichi Watanabe, Yumi Nakamura,
Hiroshi Shimomura and Jyunya Nagayama (2004):
MATERNAL-INFANT TRANSFER OF POLYBROMINATED
DIPHENYLETHERS AND POLYCHORINATED BIPHENYLS; Oral
presentation, Dioxin2004
- 6) Tetsuya Hirai, Yoshinori Fujimine and Akio Koizumi (2004): Congener
specific analysis of polychlorinated biphenyls in human blood
samples and duplicate-diet samples; Poster presentation, 3rd PCB
Workshop
- 7) Tetsuya Hirai, Yoshinori Fujimine, Syunkichi Watanabe and Akio Koizumi
(2006): Blood Polychlorinated biphenyls predominant isomers level
among Japanese Residents; Poster presentation, 4th PCB Workshop

8) Tetsuya Hirai, Hiroaki Kinoshita, Hideo Okamura, Yoshiji Yano and Takeshi Nakano (2012): Determination of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in mariner's urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Poster presentation, 19th IMSC

(国内学会)

- 1) 平井哲也, 藤峰慶徳, 小平司 (2000): 生体試料におけるダイオキシン類の簡易前処理法の検討, 口頭発表, 第 48 回 質量分析総合討論会
- 2) 平井哲也, 藤峰慶徳, 小平司 (2000): 生体試料におけるダイオキシン類の簡易前処理法の検討, 口頭発表, 第 9 回 環境化学討論会
- 3) 平井哲也, 藤峰慶徳, 小平司 (2000): 生体試料 (血液, 母乳) 中ダイオキシン類濃度定量法と精度管理について, 口頭発表, 平成 12 年度 日環協・環境セミナー全国大会
- 4) 平井哲也, 藤峰慶徳, 小平司 (2001): 生体試料におけるダイオキシン類の簡易前処理法の検討 (第 2 報), 口頭発表, 第 10 回 環境化学討論会
- 5) 平井哲也, 藤峰慶徳, 小平司, 渡邊昌 (2002): 生体試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)の分析, 口頭発表, 第 11 回 環境化学討論会
- 6) 平井哲也, 望月あゆみ, 藤峰慶徳, 渡部俊吉, 渡邊昌 (2003): 健常人血中の臭素系難燃剤等の分析について, ポスター発表, 第 12 回 環境化学討論会
- 7) 平井哲也, 藤峰慶徳, 中野武 (2003): 健常人血液中PBDEs, PCBs異性体濃度等について, 口頭発表, 環境ホルモン学会 第 6 回研究発表会
- 8) 平井哲也, 幸浦実, 藤峰慶徳, 渡部俊吉, 中村優美, 下村宏, 長山淳哉(2004):

- 母子間移行について I (PCBs), 口頭発表, 第 13 回 環境化学討論会
- 9) 平井哲也, 幸浦実, 藤峰慶徳, 渡部俊吉, 中村優美, 下村宏, 長山淳哉(2004):
母子間移行について II (PBDEs), 口頭発表, 第 13 回 環境化学討論会
- 10) 平井哲也, 藤峰慶徳, 渡部俊吉, 小泉昭夫 (2005): 血液少量化分析法による
健康人PCB主要異性体の分析, 口頭発表, 第 14 回 環境化学討論会
- 11) 平井哲也, 鈴木元治, 奥野俊博, 松村千里, 井上嘉則, 中野武 (2011):
LC/MS/MSを用いた生体試料中のOH-PCBs分析, 口頭発表, 第 20 回
環境化学討論会
- 13) 平井哲也, 木下啓明, 岡村秀雄, 矢野吉治, 中野武 (2012): 海技者の尿中PAH
代謝物の分析, 口頭発表, 第 21 回 環境化学討論会
- 14) 平井哲也, 木下啓明, 渡邊昌, 中野武 (2013): 日本人血中水酸化PCBs / PCBs
異性体濃度と糖尿病との関連について, 口頭発表, 第 22 回 環境化学討
論会

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり，終始，ご指導ご鞭撻を賜りました中野武教授に衷心より感謝いたします。また，ご多忙の中，本論文に關しまして忌憚なきご意見とご指導を賜りました岡村秀雄教授，福士恵一教授，平木隆年教授に深謝いたします。また，本研究の遂行にあたり，ご助言ご指導いただきました，生命科学振興会 渡邊昌理事長に深謝いたします。深江丸研究航海にて試料採取にご協力いただきました，深江丸船長 矢野吉治教授，深江丸乗組員の皆様に感謝いたします。

神戸大学大学院 海事科学研究科博士課程での修学をご支援していただき，学位取得の機会を与えていただきました大塚製薬株式会社 診断事業部 常務執行役員 飯塚伸司事業部長，管理部 木下啓明部長に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり，ご協力いただきました大塚製薬株式会社 診断事業部 管理部 藤峰慶徳課長，分析センターの皆様ならびに本研究に関係いたしました多くの方々に心から感謝いたします。

最後に，著者が研究を行うことを常に応援してくれました家族に深く感謝いたします。