

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 22 年 5 月 1 日現在

機関番号：30121

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790568

研究課題名（和文） 有機フッ素化合物の妊娠中曝露による次世代影響への解明

研究課題名（英文） Influence of Perfluorinated Chemicals on the health of future generation

研究代表者

樫野いく子（KASHINO IKUKO）

北海道文教大学・人間科学部 健康栄養学科・助手

研究者番号：20515936

研究成果の概要（和文）：日常生活レベルによる有機フッ素化合物(PFCs)曝露の胎児発育への影響を解明することを目的に PFCs 前処理方法及び超高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置による測定法の確立、また妊婦への曝露評価を行った。その結果、(1)血液中の 13 種類の PFCs 濃度を高精度かつ短時間に一斉分析することが可能となった。(2)北海道における妊婦の PFOS, PFOA 濃度は、諸外国および我が国の妊娠可能年齢の女性の血中濃度に比べて低値を示した。(3)2003 年に比べて 2011 年では PFOS, PFOA, PFTrDA 濃度が有意に低下した。(4)妊婦 8,426 名(2003 年～2005 年)のうち、SGA(Small-for-gestational-age)は 7.62%、先天異常は 1.48%であった。日本産婦人科医会先天異常モニタリング(JAOG)報告よりも若干低値であること、などが示された。

研究成果の概要（英文）：

Main goal of our study was to investigate the correlation between exposure to PFCs, perfluorinated chemicals, of dairy life level in maternal blood and physical child development. During study period, first, we developed a method of PFCs measurement in blood with Ultra performance liquid Chromatography and tandem mass spectrometry, through modifying preprocessing of PFCs in blood, which allowed us to analyze 13 types of perfluorinated chemicals in short time with high precision. Second, our results showed significantly lower concentration of PFOS /PFOA/PFTrDA of pregnant women in Hokkaido than that of women of childbearing age in Japan and other countries. Third, the results showed level of PFCs had decreased from 2003 to 2011. Fourth, of 8,426 participated women from 2003 to 2005, percentages of Small-for-gestational-age and congenital anomalies were 7.62% and 1.48%, respectively. Those percentages were slightly lower than the percentages reported in monitoring congenital anomalies by Japanese Association of Obstetricians and Gynecologists.

交付決定

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：公衆衛生学・健康科学

科研費の分科・細目：母子保健

キーワード：有機フッ素化合物・環境・社会医学・測定法

1. 研究開始当初の背景

PFOS, PFOA, PFDA, PFHS, PFNA のような有機フッ素化合物(PFCs)は、撥水の性質を利用して衣類、建材、界面活性剤などに使用されている。環境中に放出され、自然界および生体内で分解を受けず環境中に蓄積されることから人体への蓄積・健康影響が懸念されている。ヒトは、飲料水、食品、ハウスダストなどを通して曝露されており、我が国ではヒト血液中の PFCs 濃度が経年上昇していることが報告されている。また、胎盤透過性がヒトにおいて報告されており、残留性有機汚染物質に対して最も感受性の高い胎児への影響が懸念される。2009年5月にストックホルム条約 第4回締約国会議で制限物質としてPFOSとPFOSFが新たに追加され、地球規模で問題となっていることが国際的に示されたものの他のPFCsは規制の対象外である。血清半減期がPFOS 5年、PFOA 2.3年に比べてPFHxSは8.5年と長いことやPFNA濃度は経年上昇していることから、PFOS, PFOAのみならずPFOS, PFOAの類縁化合物(PFCs)についても評価する必要がある。また、PFOS, PFOAと子どもの発育への影響についての先行研究は少ない。さらに他のPFCsのヒトへの影響については明らかにされていない。日本においてPFOS, PFOAに加えて類縁化合物であるPFCsのヒト次世代影響を研究、評価することは極めて重要である。

2. 研究の目的

日常生活レベルによるPFCs曝露の胎児発育への影響を解明することを目的に、①ヒトへの曝露評価を正確に把握するためのより精度の高い超高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(UPLC/MS/MS)を用いた迅速かつ高感度・高精度な血漿中のPFCs一斉分析法を構築する②北海道内の妊婦のPFCs曝露実態を把握するために、妊婦母体血中濃度を検討した。

3. 研究の方法

(1) 曝露評価のための血漿前処理方法およびUPLC/MS/MS測定法の検討

① 安定同位体標識物質：7種類(PFHxA-¹³C₂, PFHxS-¹³C₃, PFOA-¹³C₄, PFNA-¹³C₅, PFOS-¹³C₄, PFDA-¹³C₂, PFUDA-¹³C₂)を用いた。

② 装置及び分析条件：UPLC/MS/MSを用いて、MS/MSはWaters製Micromass Quattro Premier、分析カラムは、Ethylene-bridged

(BEH) C18 column (1.7 μm, 2.1 × 50 mm)、溶媒由来のブランクピーク低減用カラムには、Ethylene-bridged (BEH) C18 column (1.7 μm, 2.1 × 100 mm)を使用した。この時の、カラム温度は55°C、流速を0.3 mL/min、注入量は5 μLとした。さらに移動相は、

A; 2mM 酢酸アンモニウム in 水

B; 2mM 酢酸アンモニウム in メタノールとした。UPLC Gradientは、表1に示した。

MS条件は、表2に示した。

表1. UPLC/MS/MSによるグラジエント条件

| Time | % A | % B |
|-------|-----|-----|
| 0.00 | 90 | 10 |
| 0.20 | 90 | 10 |
| 9.00 | 0 | 100 |
| 12.00 | 0 | 100 |
| 12.10 | 90 | 10 |
| 15.00 | 90 | 10 |

表2. UPLC/MS/MSによるPFCsのMS条件

| | PFCs | RT | Precursor | Product | Cone (V) | Collision (eV) |
|---------------|-------------------------------------|------|-----------|---------|----------|----------------|
| Time 2-5.0 | PFBA | 2.33 | 213 | 169 | 18 | 8 |
| | PFPeA | 4.38 | 263 | 219 | 15 | 9 |
| | PFHxA | 5.59 | 313 | 269 | 10 | 9 |
| Time 5.0-7.4 | PFHxA- ¹³ C ₂ | 5.59 | 315 | 270 | 10 | 9 |
| | PFHpA | 6.37 | 363 | 319 | 16 | 10 |
| | L-PFHxS | 6.45 | 399 | 80 | 50 | 30 |
| | PFHxS- ¹³ C ₃ | 6.45 | 402 | 80 | 50 | 30 |
| | PFOA | 6.95 | 413.08 | 368.26 | 17 | 11 |
| | PFOA- ¹³ C ₄ | 6.95 | 417.09 | 372.2 | 17 | 11 |
| Time 7.1-8.5 | PFNA- ¹³ C ₅ | 7.42 | 468 | 423 | 15 | 11 |
| | PFNA | 7.42 | 463 | 419 | 15 | 11 |
| | PFOS | 7.43 | 498.99 | 80 | 45 | 40 |
| | PFOS- ¹³ C ₄ | 7.43 | 503.05 | 80 | 45 | 40 |
| | PFDA- ¹³ C ₂ | 7.81 | 515 | 470 | 15 | 13 |
| | PFDA | 7.81 | 513 | 469 | 15 | 13 |
| | PFUDA | 8.15 | 563 | 519 | 15 | 13 |
| Time 8.25-9.5 | PFUDA- ¹³ C ₂ | 8.15 | 565 | 520 | 15 | 13 |
| | PFDaA | 8.42 | 613 | 569 | 20 | 13 |
| | PFTDA | 8.67 | 663 | 619 | 22 | 15 |
| | PFTeDA | 8.89 | 713 | 669 | 15 | 14 |

③ 測定法の精度管理：IDL (装置検出限界値は、検量線用の最低濃度 (S/N=10)を10回繰り返し測定を行い、濃度の標準偏差を計算し求めた。IDL=標準偏差×t値×2、MDL(分析方法の検出下限値)：定量下限値付近の母体血中を用いて前処理操作を行なう。この操作を10回繰り返し、次式によりMDLを算出する。MDL=t(n-1, 0.05)×測定値の標準偏差×2 また、標準血清(NIST standard reference material 1957)を用いて血中のPFCs濃度13種類を世界の7機関と測定値を比較した。

④ 血漿前処理方法：血漿 0.5 mL に安定同位体標識物質 PFHxA-¹³C₂, PFHxS-¹³C₃, PFOA-¹³C₄, PFNA-¹³C₅, PFOS-¹³C₄, PFDA-¹³C₂, PFUdA-¹³C₂ を各 2.5 ng を添加しアセトニトリル 2mL で攪拌後、15 分間遠心分離した。液相を分取した後、Envi-carb 25 mg と酢酸 50 μL を添加し、攪拌、遠心分離を 15 分間行った。次に液相を分取し窒素気流下で 0.25mL まで濃縮し、メタノール 0.25 mL を添加し攪拌したものを試料溶液とした。

(2) 妊婦への PFCs 曝露評価

2003 年から北海道内全域 40 産科病院を受診し同意を得られた妊婦 2 万人のうち、2003 年登録者 30 名、2011 年登録者 30 名を無作為抽出法で抽出し、その研究対象者の妊娠後期検体 (28~31 週) を (1)④の方法で前処理を行い、そこで得た血漿溶液を UPLC/MS/MS で測定した。

4. 研究成果

(1) PFCs 測定法の確立

① PFOS、PFOA については、移動相由来のピークが検出されたが、送液ポンプと試料注入口の間に C18 カラムを取り付けることにより、PFCs のブランクを低減することができた。

② 本測定条件下では、直鎖と分岐鎖を持つ PFOS を分離することができ、規制の対象である直鎖の PFOS 血中濃度を正確に測定することが可能となった。

③ クロマトグラムにおいても、他の夾雑物の影響を受けることなく良好に相互分離することが可能となった。(図 1)

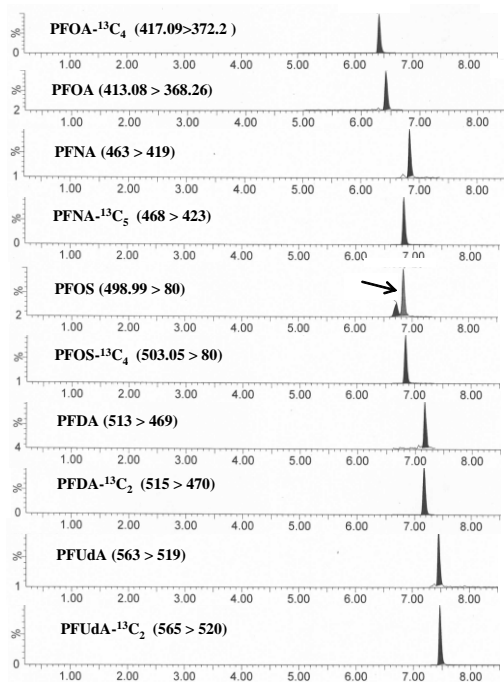


図 1. PFCs のクロマトグラム

④ 標準液による PFCs の検量線においては、13 種類の化合物すべてにおいて R² が 0.997 以上であり、高い直線性を示した。PFCs の機器検出限界 (IDL) は、0.029 ~ 0.19 ng/mL, PFCs 測定検出限界 (MDL) は、0.052 ~ 0.315 ng/mL であった。(表 3)

| ng/ml | 機器検出限界 (IDL) | 測定検出限界 (MDL) |
|---------|--------------|--------------|
| PFBS | 0.072 | |
| PFPeA | 0.029 | 0.111 |
| PFHxA | 0.059 | 0.091 |
| PFHpA | 0.079 | 0.079 |
| PFHxS | 0.065 | 0.115 |
| PFOA | 0.082 | 0.248 |
| PFNA | 0.073 | 0.267 |
| PFOS | 0.190 | 0.315 |
| PFDA | 0.122 | 0.270 |
| PFUdA | 0.106 | 0.131 |
| PFDoA | 0.073 | 0.131 |
| PFTTrDA | 0.056 | 0.052 |
| PFTTeDA | 0.058 | |

表 3. 機器検出限界、測定限界

⑤ 精度管理として標準血清 (NIST standard reference material 1957) を用いて他機関との PFCs 濃度を比較したところ、同等の結果が示された。(表 4)

表 4. 標準血清を用いた PFCs 濃度

| | 北大 (ng/ml) | NIST (ng/g) | CDC (ng/g) | 3M (ng/g) | U. Toronto (ng/g) | Env. Canada (ng/g) | EPA (ng/g) | 京都大学 (ng/ml) |
|--------|------------|-------------|------------|-----------|-------------------|--------------------|------------|--------------|
| PFBA | ND | - | - | <0.05 | - | - | - | - |
| PFPeA | ND | - | - | <0.05 | - | - | - | - |
| PFHxA | ND | <0.093 | <0.4 | <0.05 | <0.05 | - | NR | <0.05 |
| PFHpA | ND | 0.279 | <0.4 | 0.277 | 0.33 | <0.61 | <1.0 | 0.27 |
| PFOA | 5.55 | 4.43 | 4.88 | 5.36 | 4.81 | 5.13 | 5.86 | 4.77 |
| PFNA | 0.474 | 0.762 | 0.833 | 0.97 | - | 0.934 | 0.869 | 0.96 |
| PFDA | 0.299 | 0.393 | <0.2 | 0.285 | 0.327 | 0.53 | <1.0 | 0.26 |
| PFUnDA | 0.359 | 0.176 | <0.2 | 0.159 | 0.216 | 0.105 | <0.5 | 0.174 |
| PFDoA | ND | <0.073 | <0.2 | <0.05 | <0.025 | 0.203 | <0.25 | 0.16 |
| PFBS | ND | <0.075 | <0.1 | <0.02 | - | - | <0.25 | <0.1 |
| PFHxS | 5.17 | 3.01 | 3.22 | 3.53 | 3.88 | 5.15 | 5.23 | - |
| PFOS | 22.0 | 21.0 | 19.8 | 23.6 | 21.0 | 21.9 | 19.5 | - |
| PFOSA | - | 0.116 | <0.1 | <0.1 | - | - | - | - |

Standard血清: NIST standard reference material (SRM) 1957. Keller et al. 2010; Harada et al. 2011 を改変

これらのことから、本測定法の血漿前処理方法を用いることで簡便かつ迅速に、また UPLC/MS/MS の測定では 1 検体 15 分で精度の高い結果を示すことができた。さらに、7 種類の安定同位体標識物質を用いることで血漿中のパーフルオロカルボン酸 10 種類、パーフルオロスルホン酸 3 種類を、高精度かつ高感度に一斉分析することができた。

(2) 妊婦の後期母体血中 PFCs 濃度

ヒト母体血血漿中の PFOA, PFOS, PFUdA, PFDA, PFNA は全ての試料から検出された。

PFHxS, PFPeA, PFTTrDA, PFDoA は、一部の試料から検出された。定量範囲は、PFOA は

0.48~6.93 ng/mL、PFOS は 0.86~10.96 ng/mL、PFUdA は 0.52~3.49 ng/mL、PFNA は 0.43~3.16 ng/mL、PFDA は 0.18~1.17 ng/mL であった。PFHxA, PFHpA, PFBuS, PFTeDA は定量限界以下であった。本研究の北海道における妊婦の PFOS, PFOA 濃度と、諸外国および我が国の妊娠可能年齢の女性の PFOS, PFOA 濃度を比較した結果、他地域と比べ低い濃度となった (Kannan et al. 2004; Harada et al. 2007)。ヒトへの曝露経路は飲料水を介する曝露が多く示されており、河川水の濃度が高い地域ではヒト血液中濃度も高いことが報告されている (Hölzer et al. 2008)。北海道は水系汚染が少ない地域であることが考えられ、PFCs の曝露程度が低いことが示唆された。

(3) 妊婦母体血中 PFCs の年次変化

2011 年の参加登録した妊婦に比べて 2003 年の妊婦の血中 PFOS, PFOA, PFTTrDA 濃度が有意に低い値を示した。(図 2)その他 10 種類の PFCs については差がなかった。これは、2010 年の化審法による PFOS, PFOA 規制が関わっている可能性が示唆される。大阪や仙台、高山でも同様に 2003 年に比べて 2008 年では、PFOS 濃度が有意に低下したとの報告がある。(Kouji H et al. 2010)

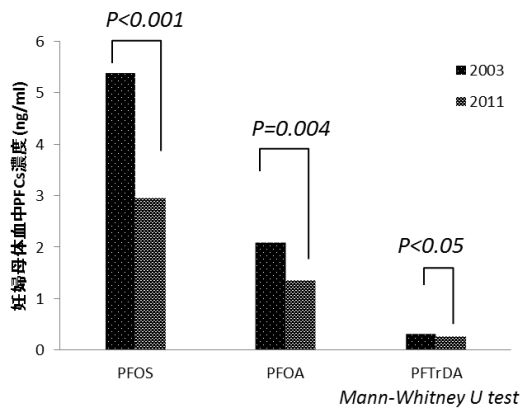


図 2. 妊婦血中 PFOS, PFOA, PFTTrDA の年次変化

本研究では、前向きコホート研究および Nested-ケースコントロール研究のデザインで、PFCs の胎児期曝露による児の体格 (身長・体重・胸囲・頭囲)、Small for gestational age (SGA)、Low birth weight (LBW)、早産、先天異常、アレルギー疾患・感染症への影響を検討することが可能である。Danish National Birth Cohort において胎児期の PFCs 曝露と 5 ヶ月・12 ヶ月時の体格との負の関連が報告されていることから (Andersen

et al. 2010)、本研究でも出生時体格のみならず 1 歳・1 歳 6 ヶ月・3 歳時の体格についても継続して検討する。(図 3)

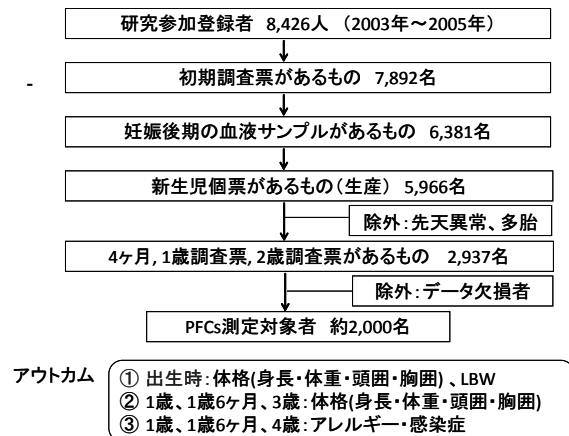


図 3. 研究デザイン

PFCs の測定法の確立に時間を要したが、現在 2000 検体のサンプル抽出が終わっており、今後は、対象者約 2,000 名の母体血中 PFCs 濃度 13 種の一斉分析を行う。北海道における妊婦の PFCs 汚染実態を把握するとともに、PFCs 胎児期曝露による児の健康影響を解明することが可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Yila TA, Sasaki S, Miyashita C, Braimoh TS, Kashino I, Kobayashi S, Okada E, Baba T, Yoshioka E, Minakami H, Endo G, Sengoku K, Kishi R: Effects of Maternal 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Tobacco Smoking on Infant Birth Weight in a Japanese Population. *Journal of Epidemiology*. 2011.

[学会発表] (計 10 件)

(1) 榎野いく子, 岡田恵美子: 有機フッ素化合物曝露評価と児への健康影響評価. 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業 前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と環境化学物質に対する感受性の解明研究班会議, KKR ホテル札幌. Feb. 2012
 (2) Okada E & Kashino I. : Perfluorinated Chemical Exposure and Children's Health. International Research Meeting of

Japan Eco & Child Study in Hokkaido.
February 2011, Hokkaido University
(3) Braimoh T, Sasaki S, Yila TA, Baba T, Miyashita C, Okada E, Kashino I, Ito K, Kobayashi S, Yoshioka E, Kishi R: Effects of prenatal environmental tobacco smoke exposure on infant birth size. The American Public Health Association (APHA) 139th Annual Meeting and Exposition Washington, DC, USA. Oct. 29-Nov. 2, 2011.
(4) Itoh S, Kato S, Yuasa M, Sasaki S, Yoshioka E, Kashino I, Okada E, Miyashita C, Kishi R: The effects of PFOS and PROA in maternal serum on maternal and infant thyroid hormones. ISEE2011:23rd International Society for Environmental Epidemiology Conference Barcelona, Spain. Sep. 13-16, 2011.
(5) 榎野いく子, 岡田恵美子:有機フッ素化合物曝露とアウトカムの検討.厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業 前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と環境化学物質に対する感受性の解明 研究班会議, K K R ホテル札幌. 2011
(6) 伊藤久美子, 佐々木成子, Yila TA, 馬場俊明, 宮下ちひろ, 榎野いく子, 岡田恵美子, 小林澄貴, 吉岡英治, 岸玲子: 妊婦葉酸値と先天異常リスクとの関連-環境と子どもの健康に関する北海道スタディ(1)-. 第81回日本衛生学会学術総会 東京. Mar. 25-28, 2011.
(7) Braimoh T, Sasaki S, Yila TA, Baba T, Miyashita C, Okada E, Kashino I, Kobayashi S, Yoshioka E, Kishi R: Effects of exposure to second-hand smoke during pregnancy on birth size. Women's Health Conference New York, USA. April 2, 2011.
(8) Miyashita C, Sasaki S, Yoshioka E, Yila TA, Baba T, Braimoh T, Kashino I, Okada E, Kobayashi S, Otake Y, Limpar M, Kajiwara J, Todaka T, Kishi R: Prenatal Exposure to Dioxins in Relation to Allergy and Infection in Infancy-Hokkaido Study on Environment and Children's Health-. ISSES-ISEE 2010: Joint Conference of International Society of Exposure Science & International Society for Environment Epidemiology Seoul, Korea. Aug. 28-Sep. 1, 2010.
(9) Yila TA, Sasaki S, Baba T, Miyashita C, Braimoh T, Kashino I, Kobayashi S, Okada E, Yoshioka E, Kishi R: First Trimester Serum Folate Status of Japanese Women in Hokkaido-The Hokkaido Study on Environment and Children's Health (5) -. 80th Annual Meeting of the Japanese Society for Hygiene

Sendai, Japan. May 9-11, 2010.

(10) Braimoh T, Sasaki S, Yila TA, Baba T, Miyashita C, Okada E, Kashino I, Kobayashi S, Yoshioka E, Kishi R: Self-Reported Exposure to Environmental Tobacco Smoke and Plasma Cotinine during Pregnancy-The Hokkaido Study on Environment and Children40.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎野いく子 (KASHINO IKUKO)

研究者番号: 20515936