

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 24 年 5 月 14 日現在

機関番号:84407

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2010~2011

課題番号:22790588

研究課題名(和文)水酸化PCBによる母乳汚染の実態と経年的曝露影響に関する研究

研究課題名(英文) Time trend analysis of hydroxylated PCB in the breast milk

研究代表者 柿本 健作(KAKIMOTO KENSAKU)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部 研究員

研究者番号:40435889

研究成果の概要(和文):

今回分析した母乳試料からはいずれの水酸化PCBも検出されなかった。このことから母乳中に存在する水酸化PCB濃度は報告されている血液中濃度に比べて極めて低いことが推察された。これは、水酸化PCBが血液中において甲状腺ホルモンであるサイロキシン輸送タンパクであるトランスサイレチン(TTR)に結合するなどして母乳には移行し難いことが示唆された。その今回の実験結果から、乳幼児の神経、脳の発達に作用を及ぼす可能性のある水酸化PCBが母乳経由で乳児に移行する危険性はほとんどないことが確認された。

研究成果の概要(英文):

In this study, hydroxylated PCB was not detected in any breast milk samples. This result indicates that the concentration of hydroxylated PCB in breast milk is extremely lower than reported that of blood sample. This is a consequence of difficulty of migration from blood to breast milk for the hydroxylated PCB which is binding to the TTR protein in blood. This study revealed that there is no no risk of exposure to hydroxylated PCB for infant via breast-feeding.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード:水酸化PCB、母乳

1. 研究開始当初の背景

わが国では、2001年にポリ塩化ビフェニル(PCB)廃棄物の適正な処理の推進に関する特別措置法(PCB適正処理法)が制定され、PCB保有者によるPCBの確実かつ適正な廃棄が義務付けられた。その結果、平成28年には保管されているすべてのPC

Bが処理される予定である。しかしながら、約11,000台のPCBを多く含んでいる高圧トランス・コンデンサが不明・紛失となっており、PCBの流出、環境汚染が懸念されている。PCBが環境中に漏れた場合、雨や河川による拡散作用により海に至り、微生物に取り込まれた後、食物連鎖の上位にある

動物、最終的に人間の体内に濃縮される。PCBは生体内で分解されにくい、その一部は代謝され水酸化体やメチルスルフォニル体となる。水酸化体は代謝生成されるだけでなく、下水処理時の微生物またはオゾン処理によるPCBの酸化により生じる可能性も指摘されている。

このように水酸化PCBが生体内および環境中で生成されることから、PCB毒性の全貌を知るためにはPCB自体の毒性だけでなく、代謝物の人体へ与える影響を把握する必要がある。水酸化されたPCBは肝臓で生成後速やかに体外に排泄されるが、*o*-位にOH基を有するものはT4と非常によく似た構造を持つことから、T4輸送タンパクであるトランスサイレチン(TTR)と相互作用する。この相互作用によりT4がTTRと結合できなくなり、血中T4量が減少する。また、水酸化PCBはT4受容体への直接作用も有する。T4は脳の成熟に重要な役割を果たすが、水酸化PCBは脳に選択的に蓄積することが報告されており、胎児の正常な脳の発育を阻害する可能性が示唆されている。脳への影響ではプルキンエ細胞の樹状突起の伸長を促進する作用も認められており、神経発達および脳障害を引き起こす可能性も危惧される。母乳には、種々の栄養素だけでなく、重要な生理活性物質も含まれており、乳児の発達を考える上で不可欠なものである。しかし、授乳を通じて乳児が汚染物質に曝露されることを考えると、母乳中の水酸化PCBの実態把握は臨床的に非常に重要である。また、PCBには理論上塩素の位置や数の違いから209種の異性体が存在するが、OH基が1つ置換するとその異性体の数は840種に増える。水酸化PCBの内分泌かく乱作用、生体内蓄積性は、塩素数、水酸基の置換位置等、構造により異なることが考えられ、水酸化PCBを評価するには異性体別定量が不可欠である。ヒト血液中PCB、水酸化PCBを測定した報告では総PCBに対する総水酸化PCBの割合は約10%で、水酸化PCBを測定するためには微量成分分析が必要である。

2. 研究の目的

PCBの主要代謝物である水酸化PCBは、甲状腺ホルモンのT4と非常によく似た構造を持つことから、内分泌かく乱作用を有する。母乳には、種々の栄養素だけでなく、重要な生理活性物質も含まれており、乳児の発達を考える上で不可欠なものである。しかし、授乳を通じて乳児が汚染物質に曝露されることを考えると、母乳中の水酸化PCBの実態把握は臨床的に非常に重要である。今回、母乳中の水酸化PCBを分析しヒト曝露実態を把握することを最終的な目的とし、分析

方法の検討を行った。本研究は、母乳中の水酸化PCBを分析する方法を確立し、ヒト曝露実態を把握することを目的とする。

3. 研究の方法

試料の前処理

血液中に存在する主要な水酸化PCBは4-OH-CB107、3-OH-CB138、4-OH-CB146、4-OH-CB172、4-OH-CB187であることが既に報告されている。そこでこれらの物質を対象とし、牛乳を用いた添加回収実験を行なった。試料100gに上記標準物質それぞれ2ng、¹³C同位体ラベル化された¹³C-4-OH-CB107、¹³C-4-OH-CB146、¹³C-4-OH-CB172、¹³C-4-OH-CB187をそれぞれ4ng加えた。なお3-OH-CB138に対応するラベル化体が入手できなかったため¹³C-4-OH-CB146を内部標準物質とした。試料に対しシユウ酸カリウム1gとエタノール100mLを加えて脂肪球を破壊した後、ジエチルエーテル50mLとヘキサン100mLおよび塩酸を加えて酸性下抽出した。加える塩酸の量は、0mL、0.5mL、1mL、2mL、4mLの5種類(N=3)を検討した。各々の溶液中のpHは、0mL-pH8、0.5mL-pH5、1mL-pH4、2mL-pH2、4mL-pH1であった。抽出溶媒の水洗には2%NaClを含有するpH2の塩酸水を使用した。抽出した乳脂肪を60mLのヘキサンに溶解し、濃硫酸10mLで5回精製した後、pH2の塩酸水で2回洗浄し、脱水、濃縮し少量のヘキサンに溶かした。これを硝酸銀シリカカラムに負荷した。ヘキサン100mLでPCBを溶出させ、続いてジクロロメタン100mLで水酸化PCBを溶出させた。ジクロロメタンを濃縮乾固した後、メタノールに溶解しその際にシリンジスパイクとして4-OH-CB29を加えて0.1mLとしたものをLC-MS/MSで分析した。フローチャートを図1に示した。これらと同時に中性下で脂肪抽出、水洗を行う方法(従来の母乳からPCB、ダイオキシン等を抽出する方法)における水酸化PCBの回収率を検証し、過去から長期冷凍保存してある母乳脂肪試料から定量的な水酸化PCB分析が可能かどうかを判断した。

実際の母乳試料については、当初に長期冷凍保管している母乳脂肪はいずれも従来の中性条件において抽出したものである。それら混合母乳脂肪(2003~2008までの各年度)1gについて分析を行った。また、2008年度については脂肪抽出前母乳試料が保管されていたためそれらを混合して年度代表試料110gとして酸性条件抽出において分析を行った。

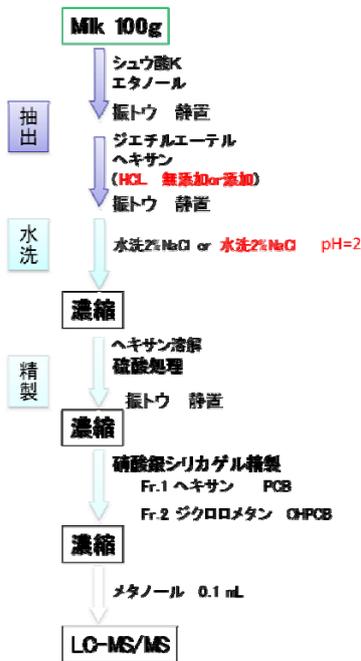


図1 水酸化PCB分析フロー

分析条件

LC-MS/MSによる測定はSRMモードで行った。最適化した定量イオンを表1に示した。

表1

| 化合物名 | 定量イオン(m/z) |
|----------------------------|------------|
| 4-OH-CB107 | 341>305 |
| 3-OH-CB138 | 375>339 |
| 4-OH-CB146 | 375>339 |
| 4-OH-CB187 | 409>372 |
| 4-OH-CB172 | 409>372 |
| ¹³ C-4-OH-CB29 | 283>247 |
| ¹³ C-4-OH-CB107 | 353>317 |
| ¹³ C-4-OH-CB146 | 387>351 |
| ¹³ C-4-OH-CB187 | 421>384 |
| ¹³ C-4-OH-CB172 | 421>384 |

移動相にはA液として10mM酢酸アンモニウム水溶液、B液として10mM酢酸アンモニウム(70%メタノール、15%アセトニトリル)含有水溶液を用いたグラジエント分析を行った{B液:60%(0分)-90%(12分)-90%(22分)}。牛乳を用いた添加回収試験(添加濃度0.02ng/g wet weight)により得られたクロマトグラムの一例を図2に示した。分析機器における検出下限値は10pg/injectionであった。

4. 研究成果

添加回収試験の結果、脂肪抽出時に塩酸酸性とすることで図3のように絶対回収率が大幅に増加した。

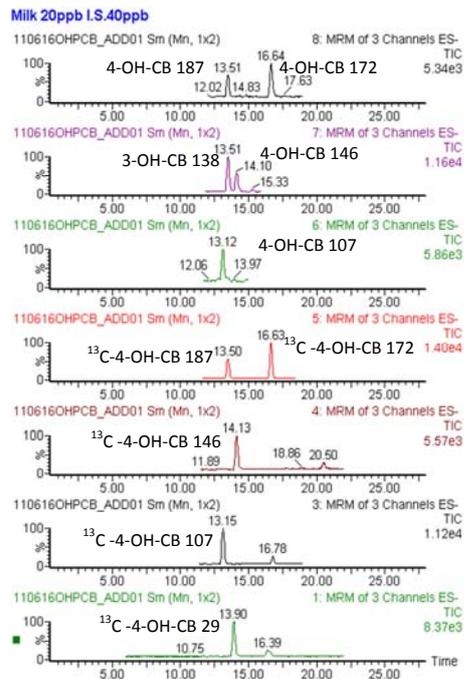


図2 クロマトグラム例

幅に増加した。回収率はpH2が最も良好であった。過去に行ってきた従来の中性条件脂肪抽出法を用いた場合4-OH-CB187についてはほとんど回収できず、他の異性体については全く回収できないことはないが低い回収率であった。

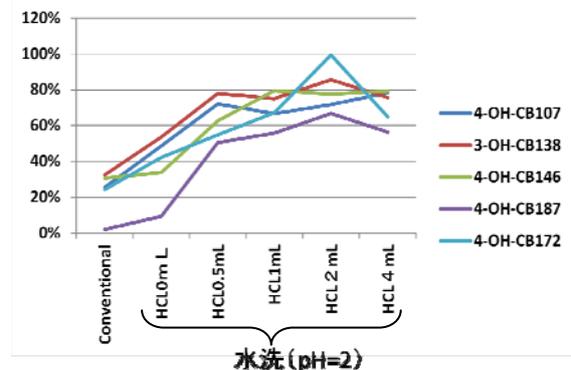


図3 絶対回収率

このことから、過去の冷凍保存母乳脂肪試料から定量的な分析を行うことは困難であると考えられたが、水酸化PCBの存在を確かめるために2003年度から2008年度に採取した母乳試料から従来法により抽出した脂肪について各年度分析を行った。この場合は硫酸処理から前処理を行った。その結果いずれの年度からも水酸化PCBは検出されなかった。2008年度の脂肪抽出前母乳混合試料については、脂肪抽出操作過程をすべて塩酸酸性pH2条件において行った。2008年度混合母乳試料を分析した結果、抽

出脂肪重量は4.6%で今回分析対象とした水酸化PCBはいずれも検出されなかった。一方で母乳中の総PCB濃度は10 ng/g wet weightであった。

このことから母乳中に存在する水酸化PCB濃度は血液中に比べて極めて低いことが推察された。これは、水酸化PCBが血液中において甲状腺ホルモンであるサイロキシン輸送タンパクであるトランスサイレチン(TTR)に結合するなどして母乳には移行し難いことが示唆された。その今回の実験結果から、乳幼児の神経、脳の発達に作用を及ぼす可能性のある水酸化PCBが母乳経路で乳児に移行する危険性はほとんどないことが示唆された。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 柿本健作, 阿久津和彦, 小西良昌, 尾花裕孝、第20回環境化学討論会、母乳中OH-PCB分析の抽出条件検討、2011年7月16日、熊本県立大学
- ② 小西良昌、柿本健作、永吉晴奈、第47回全国衛生化学技術協議会年会、母乳中OH-PCB分析における脂肪抽出時のpHの影響、2010年11月11日、兵庫県民会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿本 健作 (KAKIMOTO KENSAKU)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・研究員

研究者番号：40435889