

2014年度

博士学位論文

# 水酸化 PCB 類の高感度定量法に関する研究

Study on Sensitive Measurement Method  
for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls

中部大学大学院

応用生物学研究科 応用生物学専攻

飛石 和大

## - 目 次 -

1. はじめに.....	7
2. 水試料中水酸化ビフェニル類の定量法.....	14
2-1. はじめに.....	15
2-2. 試料および分析方法.....	18
2-2-1. 試薬.....	18
2-2-2. 試料の前処理.....	19
2-2-3. 水酸化ビフェニルの定量.....	21
2-3. 結果と考察.....	23
2-4. 結論.....	34
3. 血液中水酸化ポリ塩化ビフェニル類(OH-PCBS)の定量法.....	36
3-1. はじめに.....	37
3-2. 試料および分析方法.....	39
3-2-1. 試薬.....	39
3-2-2. 試料の前処理.....	41
3-2-3. LC/MS/MS 測定.....	43
3-3. 結果と考察.....	45
3-3-1. LC/MS/MS 測定.....	45
3-3-2. LC カラムの最適化.....	49
3-3-3. 試料注入量の最適化.....	52
3-3-4. 検量線.....	54
3-3-5. 血液試料中の水酸化 PCB 類の測定.....	55
3-4. 結論.....	60
4. 血液中の水酸化ポリ塩化ビフェニル類(OH-PCBS)の濃度.....	61

4-1. 油症患者 (2010) .....	62
4-1-1. はじめに.....	62
4-1-2. 試料および分析方法.....	64
4-1-3. 結果と考察.....	66
4-1-4. 結論.....	79
4-2. 妊婦 (日本在住者) .....	80
4-2-1. はじめに.....	80
4-2-2. 試料および分析方法.....	81
4-2-3. 結果と考察.....	83
4-2-4. 結論.....	86
5. 総括および今後の展望.....	87
6. 謝辞 .....	90
7. 参考文献.....	92

Table 2-1	Physicochemical properties of hydroxybiphenyls.....	16
Table 2-2	Analytical Conditions .....	22
Table 2-3	Calculated IDL of hydroxybiphenyls.....	29
Table 2-4	Calculated MDL of hydroxybiphenyls.....	31
Table 2-5	Result of recovery experiment from water samples.....	33
Table 3-1	OH-PCBs standards .....	40
Table 3-2	OH-[ <sup>13</sup> C <sub>12</sub> ]-PCBs for internal standards.....	40
Table 3-3	Analytical conditions for the LC/MS/MS measurement.....	44
Table 3-4	Mass method for the LC/MS/MS measurement.....	48
Table 3-5	Recoveries of internal standards .....	58
Table 4-1	Concentrations of OH-PCBs, PCBs, PCDDs and PCDFs in the blood of Yusho patients collected in 2010 (pg/g-wet, n=183) .....	69
Table 4-2	Concentrations of OH-PCBs in blood of pregnant women (pg/g-wet, n=253).....	84
Table 4-3	Concentrations of OH-PCBs in blood of Yusho patients (pg/g-wet, n=183).....	85

Figure 1-1	Chemical structure of 4-OH-PCBs .....	9
Figure 1-2	Formation pathway of 4-OH-HxCB from HxCBs.....	10
Figure 2-1	Chemical structure of hydroxybiphenyls.....	17
Figure 2-2	Flow chart of the measurement method for hydroxybiphenyls in environmental water.....	20
Figure 2-3	GC/MS chromatograms of hydroxybiphenyls (20 ng/mL).....	24
Figure 2-4	Mass spectrum of 2-hydroxybiphenyl .....	25
Figure 2-5	Mass spectrum of 3-hydroxybiphenyl .....	26
Figure 2-6	Mass spectrum of 4-hydroxybiphenyl .....	27
Figure 2-7	Mass spectrum of <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -2-hydroxybiphenyl .....	28
Figure 2-8	Chromatograms of hydroxybiphenyls in the IDL measurement.....	30
Figure 2-9	Chromatograms of hydroxybiphenyls in the MDL measurement.....	32
Figure 2-10	Chromatograms of hydroxybiphenyl in seawater in Omuta city .....	35
Figure 3-1	Flow chart of the measurement method for OH-PCBs in blood samples .....	42
Figure 3-2	Product ion mass spectra of OH-HpCBs under different collision energy .....	46
Figure 3-3	Chromatograms of each product ion.....	47
Figure 3-4	LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCBs with an of L-column2 ODS (2.1mm×150mm, 5μm).....	50
Figure 3-5	LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCB with an L-column2 ODS (2.1mm×100mm, 2μm) .....	51
Figure 3-6	Chromatograms of OH-HpCBs at various injection volumes; from the top to the bottom, the injection volume is 5, 10, 20, 40 and 80μL in that order. ....	53
Figure 3-7	Calibration curve of 4-OH-CB187 (0.1~8.0 ng/mL; IS 4.0 ng/mL).....	54
Figure 3-8	Chromatograms of OH-HpCBs in blood with the conventional method .....	56
Figure 3-9	Chromatograms of OH-HpCBs in blood under the improved method .....	57
Figure 3-10	SRM chromatograms of OH-PCBs in the blood of Yusho patient (PeCB: Pentachlorobiphenyl, HxCB: Hexachlorobiphenyl, HpCB: Heptachlorobiphenyl).....	59
Figure 4-1	Chemical structures of OH-PCBs found in the blood of Yusho patients.....	67
Figure 4-2	Relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCBs in the blood of Yusho patients .....	71
Figure 4-3	Relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCDD/DFs in the blood of Yusho	

patients ..... 72

Figure 4-4 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and lipid in the blood of Yusho patients  
..... 73

Figure 4-5 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and their congeners ..... 75

Figure 4-6 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and their congeners ..... 76

Figure 4-7 Relationship between the concentrations of OH-PCB congeners and related PCBs ..... 77

Figure 4-8 Relationship between the concentrations of OH-PCB congeners and related PCBs ..... 78

1. はじめに

ポリ塩化ビフェニル (PCB) は、水に溶けない、化学的に安定、絶縁性が良い、沸点が高いなどの性質を持つ化合物で、工業的需要の高さから1950年代後半から1980年代前半にかけては年間1~8万トン生産され、先進工業国を中心に世界中で使用されたが、現在は保管されている。PCB類は、難分解性であり、生物蓄積性が高いため、生物の脂肪組織に蓄積され様々な悪影響を及ぼす懸念があり [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]、ヒトにおいても同様の観点で報告がなされている [11, 12, 13, 14, 15, 16]。PCB類が多様な毒性を示すことは知られているが、近年、甲状腺ホルモン介在の脳神経系への影響が懸念され、生物の行動異常に関わる物質として水酸化PCB類の影響が懸念されており、野生の鯨類の脳内から水酸化PCB類を検出した報告 [17] は、PCB代謝物の影響が生態リスクとして無視できないことを示唆している。

PCB類の代謝は、肝小胞体に局在するチトクロムP450による誘導であって、その主要な産物は一水酸化体、二水酸化体、メチルチオ体、メチルスルホン体である。Blochら [18] は、4-塩素化ビフェニルをウサギに投与し、尿中から代謝物として、4'-水酸化-4-塩素化ビフェニルとそのグルクロン酸抱合体を初めて見出した。人体中においても、水酸化ポリ塩化ビフェニル (OH-PCB; Figure 1-1) は、PCBの代謝物として重要な役割を持つと考えられる [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30]。



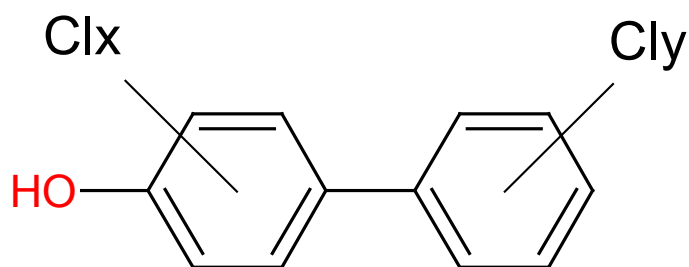


Figure 1-1 Chemical structure of 4-OH-PCBs

Figure 1-2は、ヒト血液中におけるPCBの予想される代謝経路の1例である。つまり、4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB (4-OH-CB146) は、2,2',3,4',5,5'-HxCB (HxCB146) を親化合物とした4位の直接的な水酸化反応で生成するだけでなく、2,2',3,4,4',5'-HxCB (HxCB138) や2,2',4,4',5,5'-HxCB (HxCB153) を親化合物とし、エポキシド生成、NIH転移を経由しても生成すると考えられる。[31, 32, 33, 34]

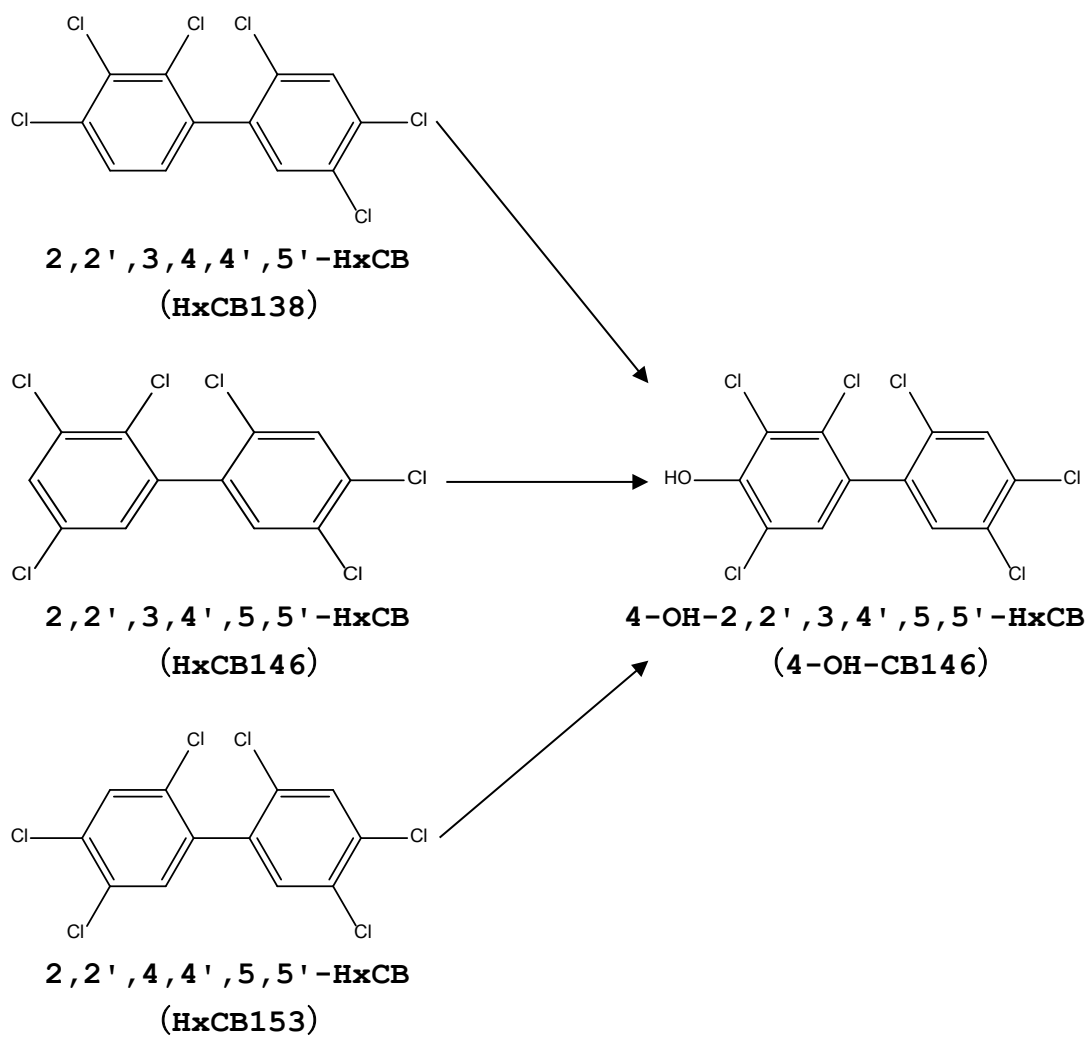


Figure 1-2 Formation pathway of 4-OH-HxCB from HxCBs

PCB及びOH-PCBの検出のためには、かつてガスクロマトグラフィー (GC)、ガスクロマトグラフ-電子捕獲型検出器 (GC-ECD) やガスクロマトグラフ-質量分析法 (GC/MS) が利用されてきたが、これらの方法では、抽出、クリーンアップ、および誘導体化操作を通じて、サンプルの前処理を必要としていた。ガスクロマトグラフィーにおいては、分析時にサンプルをガス化させる必要があることから、熱安定性が求められる。GC/MSによるOH-PCBの分析においては、誘導体化反応により、揮発性や熱安定性を与えている [35, 36]。

他方、著者らの研究事業において [37, 38, 39, 40]、ヒト血液中のOH-PCB類測定を考える場合、試料の提供者 (油症患者、妊婦等) の負担を考慮すれば、試料の使用量を極力制限する必要がある。可能であるならば、PCB類、Co-PCB類 (co-planar PCBs)、PCDD類 (polychlorinated dibenzo-p-dioxins) 及びPCDF類 (polychlorinated dibenzofurans) 分析に供試される血液試料から新たな血液を採取することなくOH-PCB類を検査項目として追加したいとの要望が強かった。

著者らはかつて、ヒト血液中のダイオキシン類 (PCDD、PCDF 類及び Co-PCB類) 分析の高感度ならびに迅速化に関する検討において、5 g の血液量でダイオキシン類分析を可能にする測定系および血液試料の前処理法の検討を行った。すなわち、高速溶媒抽出装置 (ASE) による血液試料からの脂質の抽出法、従来法の 1/4 スケールでのカラムクリーンアップ法および大量溶媒注入装置 (SCLV injection system) を装備した高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析法 (HRGC/HRMS) を用いて、高感度迅速分析法を確立した [41]。

他方、水酸化 PCB 類は熱的に不安定で HRGC/HRMS を用いるには安定な誘導体化合物に変換するなどが必要であるが、分析方法として難点が少なくない (3-1. はじめに)。著者らは本研究以前の研究として水酸化 PCB 類の LC/MS における検出条件の検討[42]、ヒト血液試料での条件検討[43]、前処理手法の改良を行い[44]、油症患者血液を用いた分析[45, 46]、妊婦血液を用いた分析[47]を行ったが、“新たに血液を採取することなく OH-PCB 類を検出する”には分析方法の感度 (20 pg/g-wet) の向上が必要であると判断された。

本研究の目的は、ヒト血液中の水酸化ポリ塩化ビフェニル類 (OH-PCBs) を PCB 類、Co-PCB 類、PCDD 類及び PCDF 類分析に供試される 5g の血液試料から、新たに血液を採取することなく高感度で測定する方法を開発することである。

第 2 章では、水酸化ポリ塩化ビフェニルは安定同位体が高価で、抽出、精製、イオン化など分析法を詳細に検討することが難しいため、最も基本的な化学構造を持つ水酸化ビフェニル類について、環境水中の水酸化ビフェニル類の定量法について検討を行った[48]。環境中の水酸化ビフェニル類濃度を把握することは、塩素化により水酸化ポリ塩化ビフェニル類が生成する可能性がある点でも重要である。

次に第 3 章では、血液中の水酸化ポリ塩化ビフェニル類 (OH-PCBs) の高感度定量法の研究では、より粒径の細かい LC カラムによる溶出ピークの先鋭化、可能な最大 LC 注入量の検討、およびイオン化、コリジョン、反応イオン検出 (SRM) などの MS/MS 法の測定条件の最適化、分画、濃縮など試料処理方法を検討し、それらを総合して油症患者血液中の水酸化ポリ塩化ビフェニル類 (OH-PCBs) を

従来の約 4 倍の高感度 (5pg/g-wet) で分析出来る方法を開発した[49]。このことによって、同じ血液サンプルを使用して PCB 類、PCDD 類及び PCDF 類を測定しつつ、それとは異なる画分に OH-PCB を分離させ、LC/MS/MS 法で高感度分析が可能になり、新たな血液試料を必要としないため、第 4 章で報告する多数の油症患者、妊婦から採取された血液試料中水酸化 PCB 類の定量的評価が可能になった。

第 4 章では、開発を行った血液中水酸化 PCB 類の高感度定量法を利用して、183 名の油症患者から採取された血液試料、および 253 名の日本人妊婦から採取された血液試料について測定を行い、定量法の有効性の確認と定量結果の解析から得られた新たな知見について論じた[50]。

最後に第 5 章では、本研究を総括し、本研究課題の今後を展望した。

## 2. 水試料中水酸化ビフェニル類の定量法

## 2-1. はじめに

対象物質である水酸化ビフェニルの物理化学的性状を Table 2-1 に、また、Figure 2-1 に 2-, 3-, 4- hydroxybiphenyl の化学構造を示す。

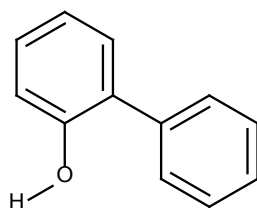
水酸化ビフェニルと水酸化 PCB (OH-PCBs) の化学構造は比較的類似しており、水酸化 PCB よりは疎水性は低いですが、環境中の挙動、試料処理過程の挙動は類似性が比較的高いと考えられる。水酸化 PCB の標準物質は多種類あり、水酸化 PCB の定量分析に用いる同位体希釈法では高価な安定同位体を必要とするため、水系試料からの抽出等に関する基礎的検討には基本骨格が共通する水酸化ビフェニルの分析法開発が有効と考えた。また、水酸化ビフェニルは塩素置換によって水酸化 PCB を生成するため、試料処理過程での塩素化等による分析の妨害となる可能性も考えられ、本検討を行った。

著者らは、これまで水環境中の化学物質の分析法の開発を行ってきたが、水酸化ビフェニルのようなフェノール性水酸基を持ち、ある程度水溶性のある物質の経験は少ない[51, 52]。また化学物質分析法開発調査報告書では、水質や底質中のフェニルフェノール(=水酸化ビフェニル)を GC/FID 法にて定量、GC/MS 法にて確認する方法[53]。また、水質、底質、生物試料中のフェノール類 14 種を GC/MS-SIM 法にて定量する方法[54]があるが、いずれも  $^{13}\text{C}_6$  でラベル化された内部標準物質を用いた同位体希釈法を採用していない。そこで、著者らは水酸化ビフェニルの 3 種の異性体 (Table 2-1 および Figure 2-1 参照) を対象とする、水試料からの GC/MS による分析法を検討し、良好な結果を得た。

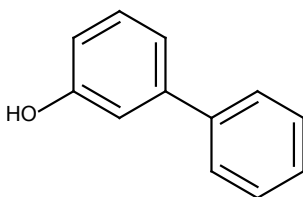
**Table 2-1 Physicochemical properties of hydroxybiphenyls**

	Molecular Weight (monoisotopic mass)	Melting point (°C)	Solubility (mg/L)	log P <sub>ow</sub>
2 - Hydroxybiphenyl	170.21 (170.2072)	59	700 (Exp.)	3.09 (Exp.)
3 - Hydroxybiphenyl	170.21 (170.2072)	78	407 (Exp.)	3.23 (Exp.)
4 - Hydroxybiphenyl	170.21 (170.2072)	166	56.2 (Exp.)	3.20 (Exp.)

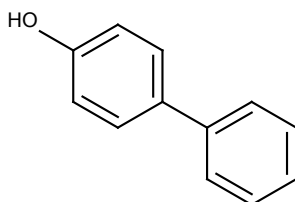




**CAS No. : 90-43-7, Formula : C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O**



**CAS No. : 580-51-8, Formula : C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O**



**CAS No. : 92-69-3, Formula : C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O**

**Figure 2-1 Chemical structure of hydroxybiphenyls**

## 2-2. 試料および分析方法

### 2-2-1. 試薬

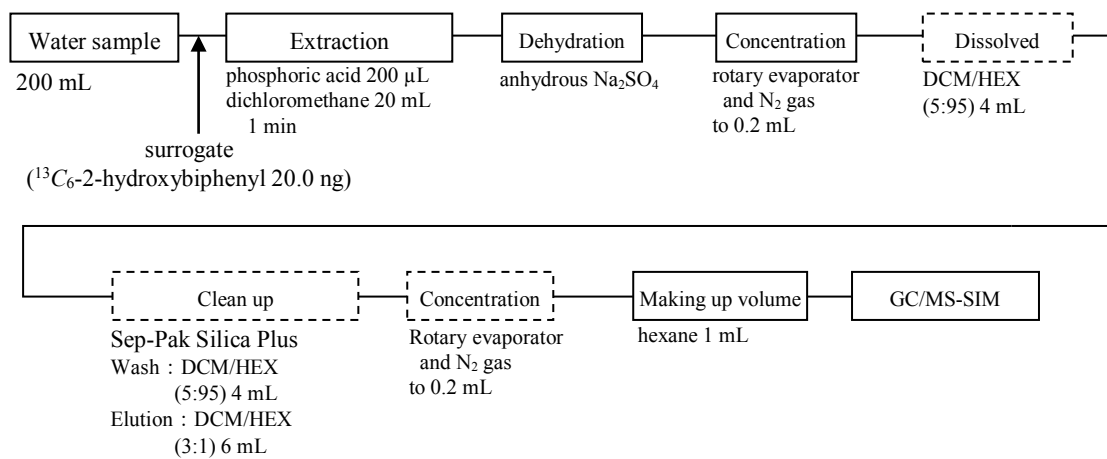
2-hydroxybiphenyl (2HB), 3-hydroxybiphenyl (3HB), 4-hydroxybiphenyl (4HB)、ヘキサン、ジクロロメタン、および無水硫酸ナトリウムは、残留農薬試験用試薬を Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から、 $^{13}\text{C}_6$ -2-hydroxybiphenyl ( $^{13}\text{C}_6$ -2HB; 100  $\mu\text{g/mL}$  in nonane) は Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (MA, US.) からそれぞれ購入した。

メタノールおよび超純水 (LC/MS 分析用試薬)、アセナフテン- $\text{d}_{10}$ 、りん酸は、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。固相抽出カートリッジ Sep-Pak Silica Plus は、Waters Corporation (MA, US.) 製を使用した。

### 2-2-2. 試料の前処理

水質試料 200 mL を 300 mL 分液ロートに取り、サロゲート内標準液 ( $^{13}\text{C}_6$  - 2 - ヒドロキシビフェニル、1.00 mg/L) を 20  $\mu\text{L}$ 、りん酸 200  $\mu\text{L}$ 、ジクロロメタン 20 mL を加え、10 分間振とう抽出後、無水硫酸ナトリウムにて脱水し、100 mL なす型フラスコに移す。ロータリーエバポレーター及び窒素気流下で 0.2 mL まで濃縮する。精製が不十分な試料では、濃縮液をジクロロメタン/ヘキサン (5:95) 4 mL に溶解し、Sep-Pak Silica Plus 固相カートリッジに負荷する。更にジクロロメタン/ヘキサン (5:95) 4 mL を通液し、これを捨てる。次に、ジクロロメタン/ヘキサン (3:1) 6 mL で対象物質を溶出し、窒素気流下で 0.2 mL まで濃縮する。濃縮液にシリンジスパイク内標準液 (アセナフテン- $\text{d}_{10}$ 、1.00 mg/L) を 20  $\mu\text{L}$  添加し、ヘキサンで 1 mL に定容したものを試験液とする。

この分析方法のフローチャートを Figure 2-2 に示す。



**Figure 2-2** Flow chart of the measurement method for hydroxybiphenyls in environmental water

### 2-2-3. 水酸化ビフェニルの定量

分析条件の概要を Table 2-2 に示す。GC/MS 装置は Agilent 6890 ガスクロマトグラフ (GC) と四重極質量分析計 JMS-K9 (JEOL Corporation, Tokyo, Japan) からなる装置を用い選択イオン検出 (SIM) により定量した。GC 分析カラムとして、HP-5MS, 0.25 mm × 30 m, 1.0 μm film thickness (Agilent Technologies, Inc., CA, US) を用い、キャリアーガスは 1.2 mL/min の定流量モードで、試料注入量は 1.0 μL で測定した。

Table 2-2 Analytical Conditions

---

GC/MS	: GC : JEOL JMS-K9、 MS : Agilent 6890N
Column	: HP-5MS 30m×0.25mm×1.0μm
Column oven	: 60°C(1min)→ 20°C/min →280°C(8min)
Injector temperature	: 280°C
Injector	: Spitless (Purge on time: 1 min)
Injection volume	: 1.0 μL
Carrier gas	: He (1.2mL/min Const. flow)
Interface temperature	: 280°C
Ionization temperature	: 280°C
Ionization energy	: 70 eV
Monitoring mode	: SIM
Monitor ion	: Hydroxybiphenyl; $m/z$ 170, (141, 169) $^{13}\text{C}_6$ -2- Hydroxybiphenyl; $m/z$ 176, (147) Acenaphthene- $d_{10}$ ; $m/z$ 164

---

### 2-3. 結果と考察

Figure 2-3 に、各 20 ng/mL の水酸化 PCB 異性体標準物質、 $^{13}\text{C}$  標識体の  $^{13}\text{C}_6$  - 2 - hydroxybiphenyl および重水素標識体のアセナフテン -  $\text{d}_{10}$  の SIM クロマトグラムを示す。また、Figure 2-4、Figure 2-5、Figure 2-6 にはそれぞれ 2-, 3-, 4 - hydroxybiphenyl の質量スペクトルを、Figure 2-7 には  $^{13}\text{C}_6$  - 2 - hydroxybiphenyl の質量スペクトルを示す。2 - hydroxybiphenyl および  $^{13}\text{C}_6$  - 2 - hydroxybiphenyl は  $[\text{M}-\text{H}]^+$  イオンが他の異性体に比べ安定であることを除けば、フラグメンテーションは概ね同じと考えられ、異性体をモニターイオンで分離する方法はないと判断した。

装置検出限界 (Instrumental Detection Limit :IDL) の計算値を Table 2-3 に、IDL 測定時の水酸化ビフェニル異性体の低濃度のクロマトグラムを Figure 2-8 に示す。分析法検出限界 (Method Detection Limit :MDL)、分析法定量限界 (Method Quantification Limit :MQL) は Table 2-4 のとおりである。また、MDL 測定時のクロマトグラムを Figure 2-9 に示す。海水に 10 ng/L (ppt) 相当を添加した際の 7 回の繰り返し実験における回収率を Table 2-5 に示す。例えば 2 - hydroxybiphenyl の平均回収率は 94 %、標準偏差は 2.5 % と極めて良好な回収率を得た。

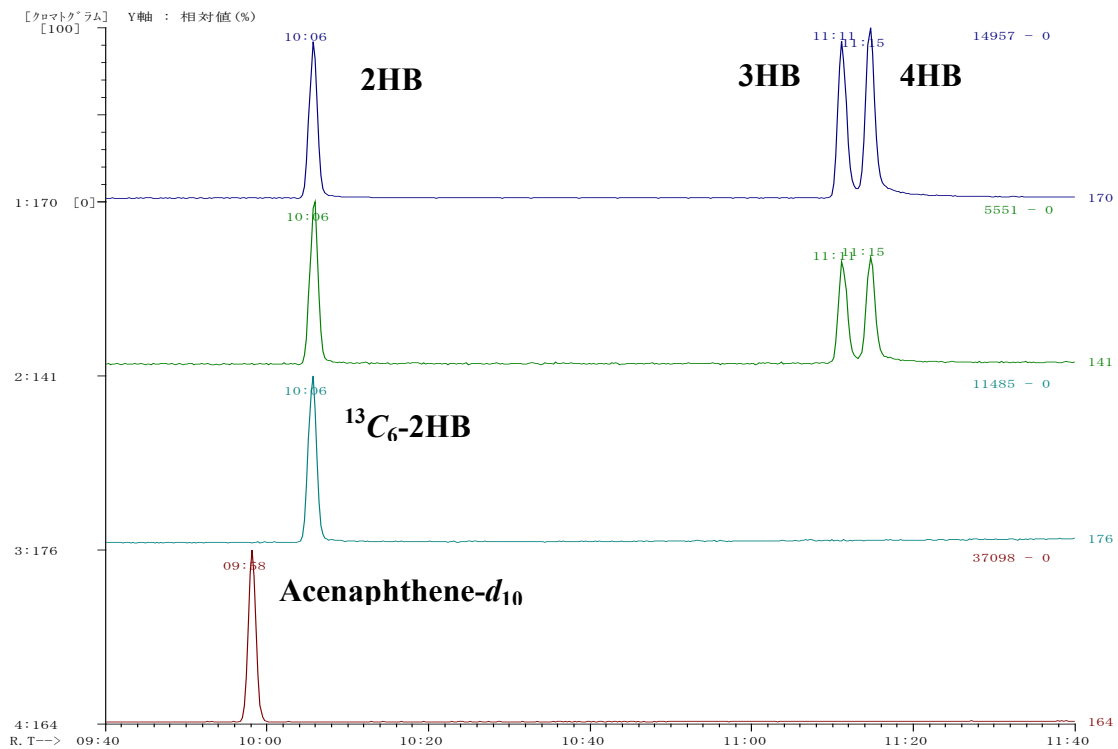


Figure 2-3 GC/MS chromatograms of hydroxybiphenyls (20 ng/mL)



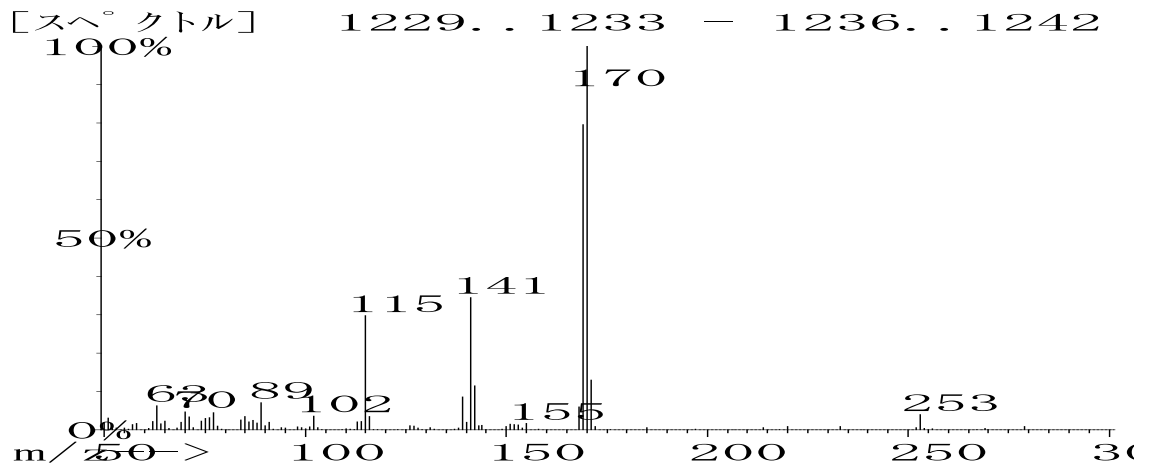


Figure 2-4 Mass spectrum of 2-hydroxybiphenyl

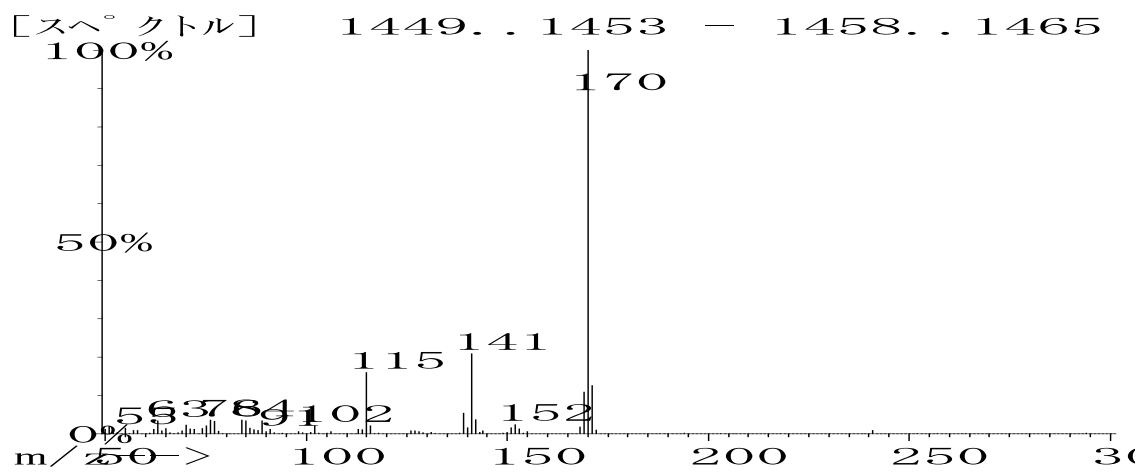


Figure 2-5 Mass spectrum of 3-hydroxybiphenyl

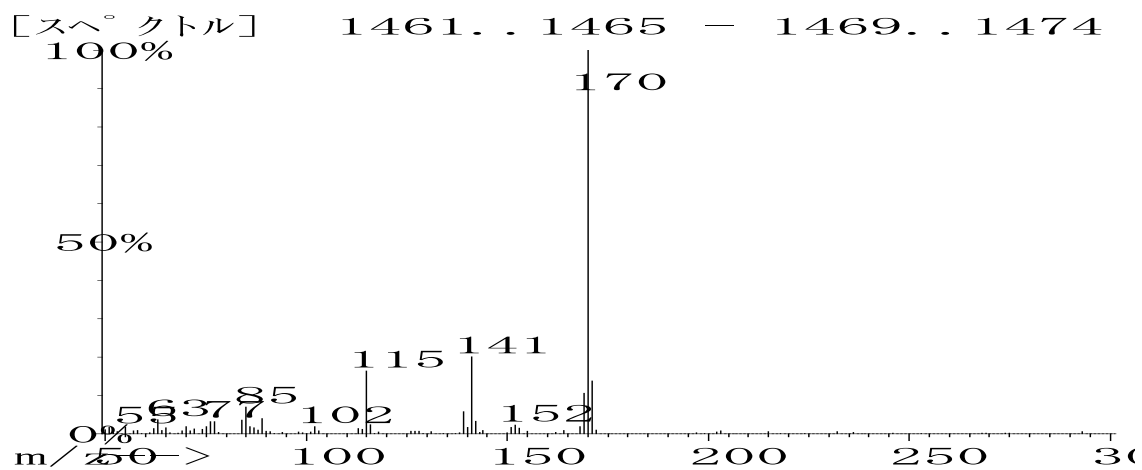


Figure 2-6 Mass spectrum of 4-hydroxybiphenyl

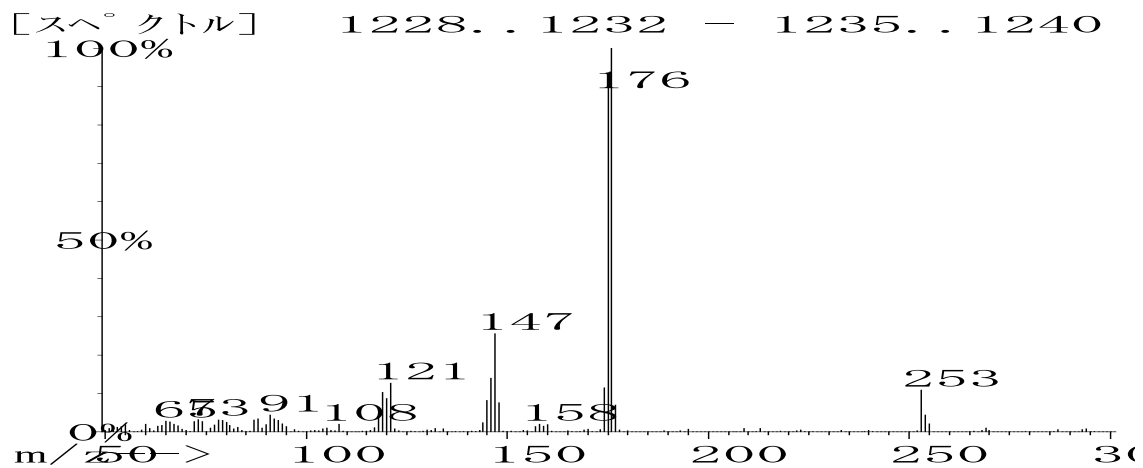
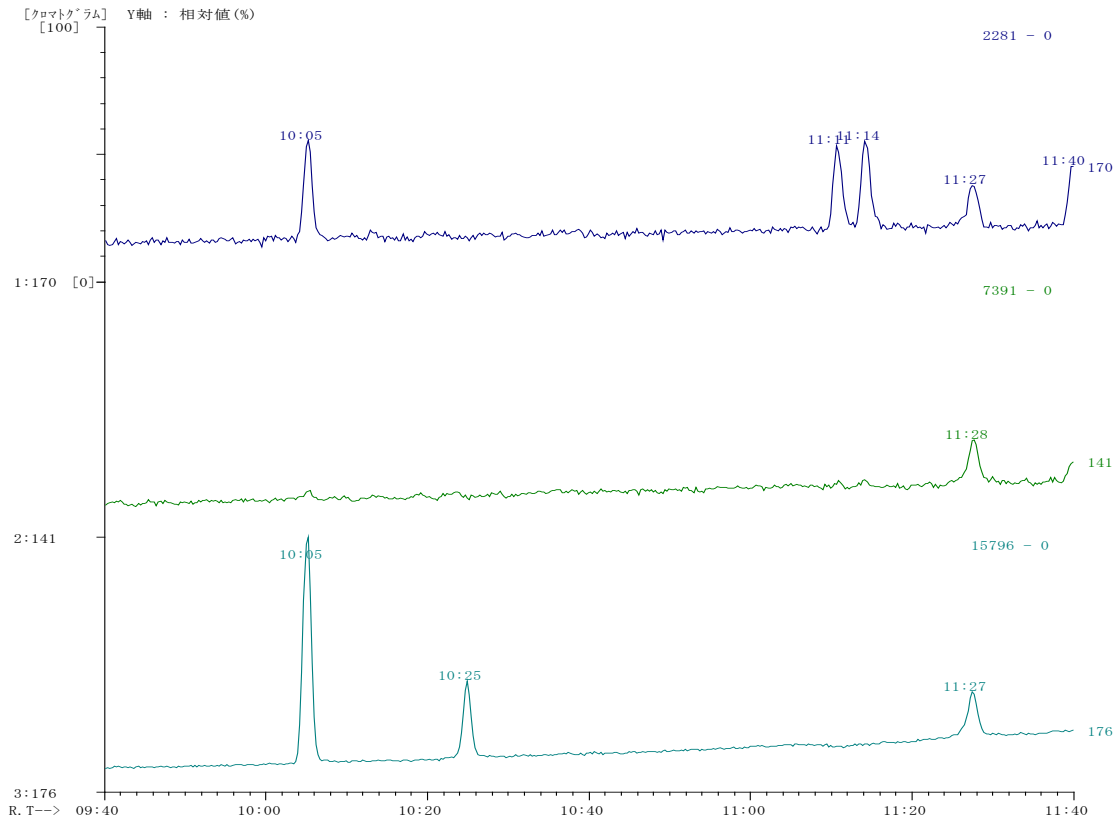


Figure 2-7 Mass spectrum of  $^{13}\text{C}_6$ -2-hydroxybiphenyl

Table 2-3 Calculated IDL of hydroxybiphenyls

	Hydroxybiphenyl		
	2HB	3HB	4HB
Sample amount (L)	0.200	0.200	0.200
Final volume (mL)	1	1	1
Concentration (ng/mL)	1.00	1.00	1.00
Injection volume ( $\mu$ L)	1	1	1
Result 1 (ng/mL)	1.01	1.04	0.951
Result 2 (ng/mL)	1.07	1.01	1.01
Result 3 (ng/mL)	1.07	0.993	0.943
Result 4 (ng/mL)	1.04	0.988	1.06
Result 5 (ng/mL)	1.03	1.04	1.03
Result 6 (ng/mL)	1.06	0.918	1.00
Result 7 (ng/mL)	1.01	0.909	0.874
Average (ng/mL)	1.042	0.9851	0.9809
Standard deviation (ng/mL)	0.0278	0.0528	0.0622
IDL (ng/mL)*	0.11	0.21	0.25
IDL (Sample based, ng/L)	0.54	1.1	1.3
S/N ratio	14	11	11
CV (%)	2.7	5.4	6.3

\* :  $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$



**Figure 2-8 Chromatograms of hydroxybiphenyls in the IDL measurement**

Table 2-4 Calculated MDL of hydroxybiphenyls

	Hydroxybiphenyl			Recovery (%)
	2HB	3HB	4HB	
Sample type	Water	Water	Water	-
Sample amount (L)	0.200	0.200	0.200	-
Standard amount (ng)	2.00	2.00	2.00	-
Concentration (ng/L)	10	10	10	-
Final volume (mL)	1	1	1	-
Final conc. (ng/mL)	2.00	2.00	2.00	-
Injection volume (μL)	1	1	1	-
Blank (n=2, ng/L)	0	0	0	80
Sample (n=2, ng/L) <sup>*2</sup>	1.77	0	0	79
Results 1 (ng/L)	9.48	8.98	7.50	63
Results 2 (ng/L)	9.03	8.22	6.07	74
Results 3 (ng/L)	9.18	7.40	5.36	71
Results 4 (ng/L)	9.28	9.77	8.10	90
Results 5 (ng/L)	9.34	9.25	7.24	79
Results 6 (ng/L)	9.75	10.1	8.66	80
Results 7 (ng/L)	9.46	9.42	8.47	77
Average (ng/L)	9.361	9.026	7.343	76.3
Standard deviation (ng/L)	0.232	0.941	1.24	
MDL (ng/L) <sup>*1</sup>	0.91	3.7	4.9	
MQL (ng/L) <sup>*2</sup>	2.4	9.5	13	
S/N ratio	21	17	17	
CV (%)	2.5	10	17	

\*1 : MDL =  $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

\*2 : MQL =  $\sigma_{n-1} \times 10$

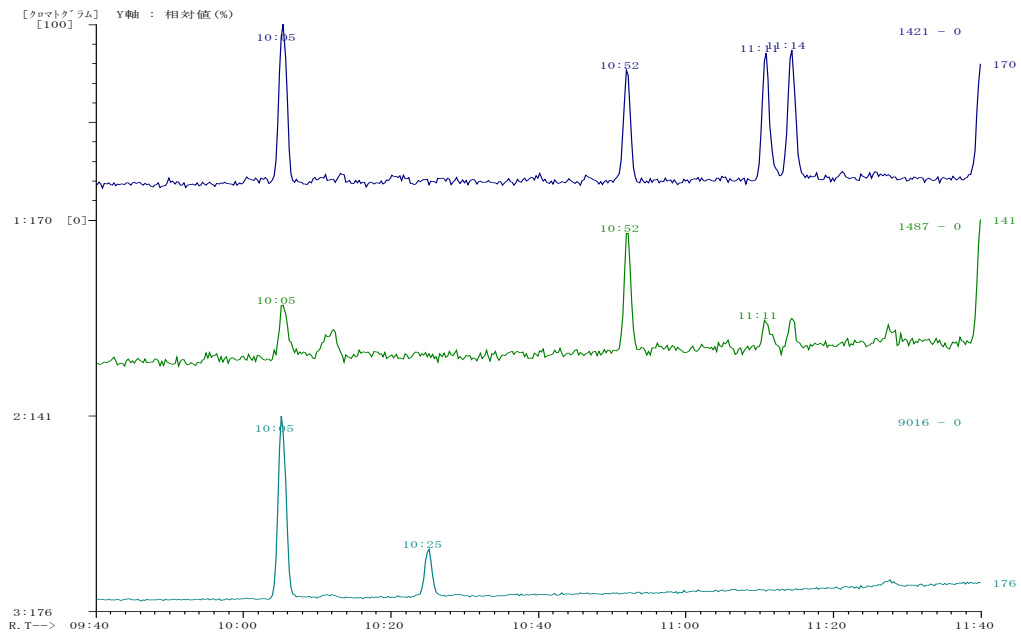


Figure 2-9 Chromatograms of hydroxybiphenyls in the MDL measurement



**Table 2-5 Result of recovery experiment from water samples**

	Sample type	Sample amount (L)	n	Standard amount (ng)	Concentration (ng/L)	Recovery (%)	CV (%)
2HB	Pure water	0.2	2	0	ND	-	-
		0.2	2	2.00	8.7	87	-
	Sea water	0.2	1	0	1.8	-	-
		0.2	7	2.00	9.4	94	2.5
		0.2	1	20.0	100	100	-
3HB	Sea water	0.2	1	0	ND	-	-
		0.2	7	2.00	9.0	90	10
		0.2	1	20.0	120	120	-
4HB	Sea water	0.2	1	0	ND	-	-
		0.2	7	2.00	7.3	73	17
		0.2	1	20.0	99	99	-

## 2-4. 結論

海水を対象とした水酸化ビフェニルの高感度分析法を開発した。本分析法の開発の目的は、（１）環境水中の水酸化ビフェニルの高感度定量法の開発、および（２）水酸化 PCB 分析の妨害物質としての試料処理過程での挙動を把握することであった。目的（１）では、本分析法により大牟田市沖の海水試料から水酸化ビフェニルを MDL レベルで検出した (Figure 2-10)。目的（２）では、水酸化ビフェニルの回収率は 100 % に近く、懸念された試料処理過程での水酸化ビフェニルの塩素化の影響は少ないと考えられること、また、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでは、水酸化 PCB がジクロロメタン/ヘキサン (1:1) で溶出するのに対し、水酸化ビフェニルはより極性の高いジクロロメタン/ヘキサン (3:1) で溶出することが明らかになり、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって水酸化ビフェニルの大部分と水酸化 PCB を分離できる知見を得た。

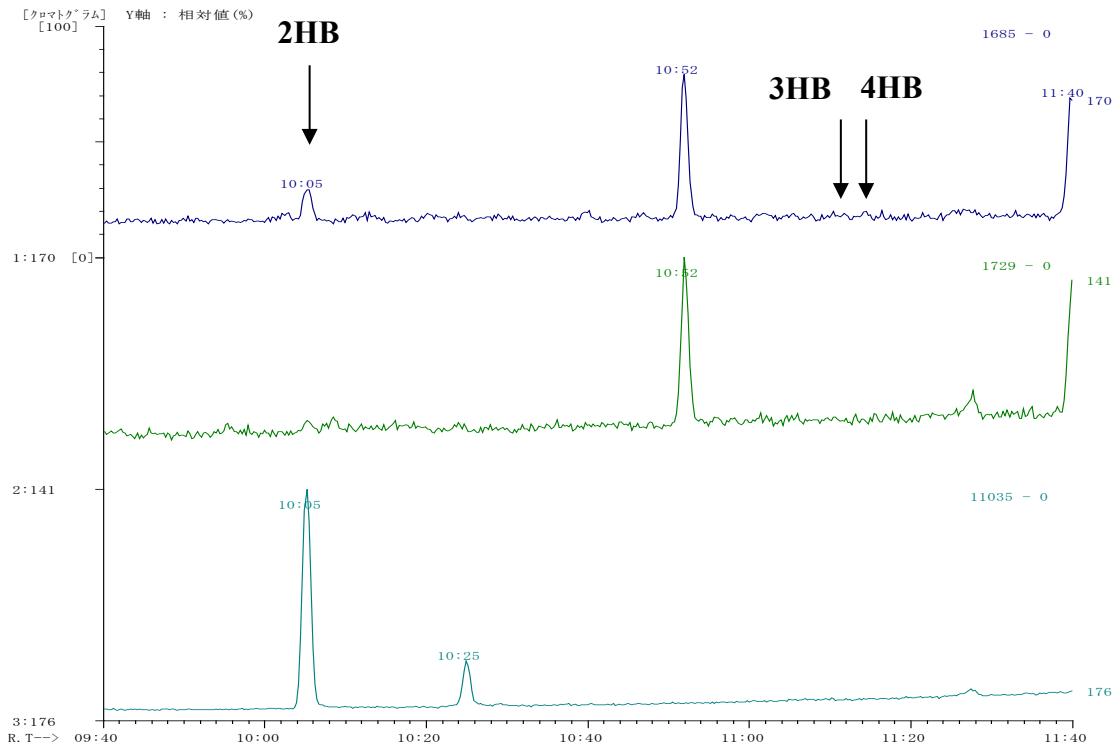


Figure 2-10 Chromatograms of hydroxybiphenyl in seawater in Omuta city

3. 血液中水酸化ポリ塩化ビフェニル類(OH-PCBs)  
の定量法

### 3-1. はじめに

水酸化ポリ塩化ビフェニル (OH-PCB) 類は、人体中の PCB 代謝物としてよく知られている。Sakiyama らの手法[55]、または、環境大気を対象媒体とした手法[56]では、ジメチル硫酸を用いて、OH-PCB 類を熱的に安定な化合物、メトキシ化 PCB を誘導し、それらを、高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析 (HRGC/HRMS) を用いて定量できることを報告した。また、Matsumoto ら[57]は、トリメチルシリルジアゾメタンを用いたメチル化法が、OH-PCB 類の定量にとって最も効果的な誘導体化法であることを報告した。更に、Yasutake ら[58]は、HRGC/HRMS を使用して、誘導体化反応を用いない測定方法について報告した。一方で、R. J. Letcher ら[59]は、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いて、カナダのシロクマの血漿中の OH-PCB 濃度の定量を行った。

著者らは、かつて 5 g の血液試料による、ダイオキシン類の高感度迅速分析法を開発した。この同じサンプルから同時に OH-PCB 類の測定が可能となれば、OH-PCB 類の測定のために余分な血液を必要としないため、ダイオキシン類を測定した血液中の OH-PCB 濃度が測定でき、血液試料の提供者の余分な負担がないことから、ダイオキシン類と同じ試料数の大規模な調査を行うことができる。そこで、かつて開発した血液中のダイオキシン類の分析法をもとに、カラムクロマトグラフィーによる分画で、ダイオキシン類と OH-PCB 類を極力損失がないように分離する条件を検討した。また、OH-PCB の測定感度を暫定的に開発した OH-PCB に比べ飛躍的に拡大するため、クロマトグラフィーの分離、MS/MS のイ

オン化条件、コリジョン条件、SRM イオンセットの s/n など詳細に検討し、それらの結果の包括として、血液中の pg/g-wet レベルの濃度の OH-PCB を分析する方法を開発した。

## 3-2. 試料および分析方法

### 3-2-1. 試薬

水酸化 PCB 類の標準物質は、Wellington Laboratories, Inc. (Ontario, Canada)、Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Massachusetts, US) から購入した。購入した標準物質を Table 3-1 にまとめた。アセトニトリルにて各 1 mg/L の標準液を調製した。内部標準液として  $^{13}\text{C}$  にてラベル化した OH- [ $^{13}\text{C}_{12}$ ] - PCBs を調製し Table 3-2 にまとめた。4 - OH - [ $^{13}\text{C}_{12}$ ] - 2', 3, 3', 4', 5, 5' - HxCB (4' - OH - CB159) は、シリンジスパイクとして用いた。Table 3-1 および Table 3-2 に示した OH-PCB 同族体を用いて検量線を作成した。

アセトニトリル、メタノール、酢酸アンモニウム、超純水 (LC/MS グレード) は、和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した。この研究で用いた、硝酸銀/シリカゲルおよびその他の試薬・溶媒 (ダイオキシン分析グレード) も同様に、和光純薬工業から入手した。Envi-18 (500 mg / 6 mL glass tube) 固相抽出カートリッジは、Sigma - Aldrich, Inc. (MO, US) 製を利用した。

**Table 3-1 OH-PCBs standards**

Compounds	Abbreviations	
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	4-OH-CB109	4H109
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	3H138
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	4H146
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	4H172
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	4H187

PeCB: Pentachlorobiphenyl, HxCB: Hexachlorobiphenyl, HpCB: Heptachlorobiphenyl

**Table 3-2 OH-[<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]-PCBs for internal standards**

Compounds	Abbreviations	
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB	4-OH-CB109	M4H109
4-OH-2',3,4',5,5'-PeCB	4'-OH-CB120	M4H120
3-OH-2,2',3',4,4',5-HxCB	3'-OH-CB138	M3H138
4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB	4-OH-CB146	M4H146
4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB	4'-OH-CB159	M4H159
4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB	4'-OH-CB172	M4H172
4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB	4-OH-CB187	M4H187

PeCB: Pentachlorobiphenyl, HxCB: Hexachlorobiphenyl, HpCB: Heptachlorobiphenyl



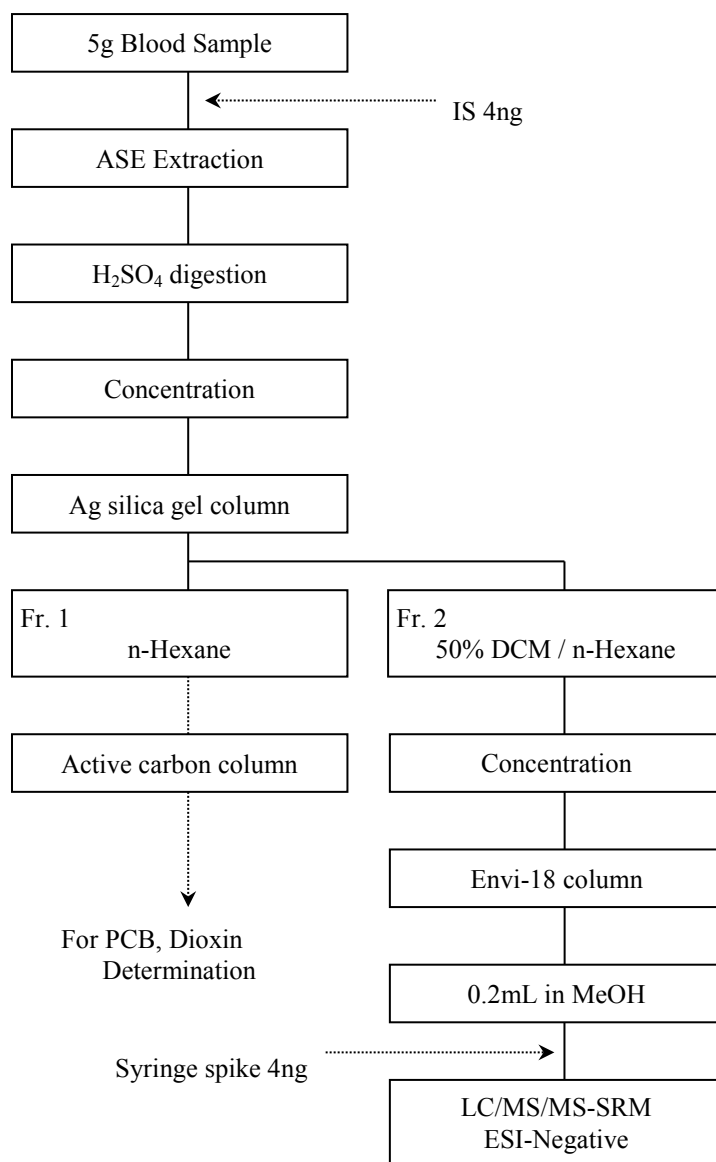
### 3-2-2. 試料の前処理

血液試料 5g を、アイソリユートを充填した抽出セルにロードした。そこへ、内部標準として OH - [ $^{13}\text{C}_{12}$ ] - PCBs、 [ $^{13}\text{C}_{12}$ ] - PCDDs、 [ $^{13}\text{C}_{12}$ ] - PCDFs および [ $^{13}\text{C}_{12}$ ] - PCBs を添加した後、凍結乾燥機 (VirTis Co. Inc., NY, US) にて、15 時間凍結乾燥させた。アセトン : n-ヘキサン (1 : 4, v / v) を高速溶媒抽出装置 (ASE-200, Thermo Scientific Dionex, CA, US) のための抽出溶媒として使用した。抽出液を乾固近くまで濃縮させた後、残渣を n-ヘキサンに溶解した。その、ヘキサン抽出液に濃硫酸を加え、一晩静置した。ヘキサン相を硫酸相から分離し、硝酸銀/シリカゲルカラム (0.5g) に負荷した。

硝酸銀/シリカゲルカラムを、n-ヘキサン 15 mL で溶出し、第 1 画分とした。この画分は、PCDD 類、PCDF 類および Co-PCB 類を含む。

次に、50%ジクロロメタン/ n-ヘキサン 15 mL で溶出したものを、第 2 画分とし、OH-PCB 類を含む。第 2 画分を濃縮装置により、ほぼ乾固付近まで濃縮した後、残渣をメタノール 2 mL に溶解した。メタノール溶液は、ENVI-18 カートリッジ上に負荷した後、OH-PCB 類をメタノール 4 mL で溶出した。その後、溶出液を約 0.1 mL まで窒素気流下で濃縮し、メタノール溶液 0.2 mL に定容後、LC バイアルに移した。

分析のフローチャートを Figure 3-1 に示す。



**Figure 3-1** Flow chart of the measurement method for OH-PCBs in blood samples

### 3-2-3. LC/MS/MS 測定

試料の LC/MS/MS 測定には、Alliance 2695 および Quattro micro API (Waters Corporation, MA, US) を用いた。分析カラムには、L-column 2 ODS (2.1 mm × 100 mm, 2 μm, CERI, Tokyo, Japan) を用い、流速 0.2 mL/min とした。また、従来分析法の分離効果比較用として L-column 2 ODS (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) を用いた。初期移動相条件は、メタノール : 2mM 酢酸アンモニウム = 40 : 60 であり、試料注入量は 20 μL とした。

水酸化 PCB 類の定量は、ESI-Negative、SRM 法にて行い、コーンガスおよび脱溶媒ガスは、窒素である。イオン化のためのキャピラリー電位は 1.0 kV、コーンおよびコリジョン電位は最適化を行った。

その他、LC/MS/MS 測定条件を Table 3-3 にまとめた。

**Table 3-3 Analytical conditions for the LC/MS/MS measurement**

---

Flow Rate		0.2 mL/min.
Injection Volume		20 $\mu$ L
Column Temperature		50 $^{\circ}$ C
Mobile Phase		2mM Ammonium acetate : Methanol = 60 : 40 $\rightarrow$ 5 : 95 linear gradient
Temperature;	Source	120 $^{\circ}$ C
	Desolvation	350 $^{\circ}$ C
Gas Flow;	Cone	Nitrogen, 50 L/hr
	Desolvation	Nitrogen, 600 L/hr
Voltage;	Cone	30-50 V
	Capillary	1.0kV
Collision		Argon, 15eV
Ionization		ESI-Negative

---

### 3-3. 結果と考察

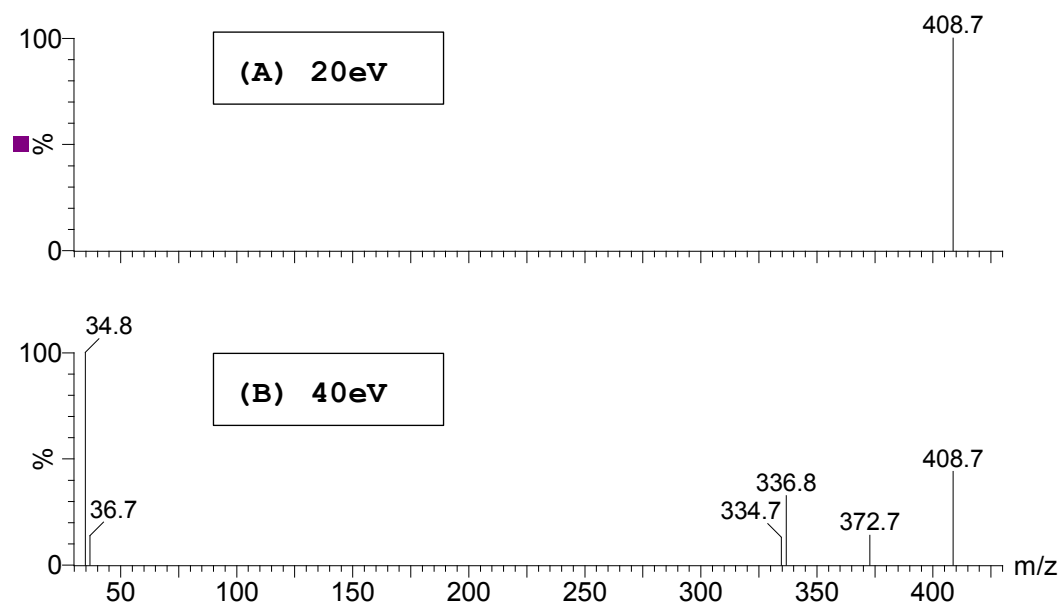
#### 3-3-1. LC/MS/MS 測定

##### コリジョンエネルギーとプロダクトイオンの最適化

Figure 3-2 は、異なるコリジョンエネルギー下で、水酸化 PCB 類 (OH-HpCBs) のプロダクトイオンの質量スペクトルを示す。(A) コリジョンエネルギーが 20 eV の場合、および (B) コリジョンエネルギーが 40 eV の場合である。(A) において、 $[M-H]^-$  の単一ピーク ( $m/z$  408.7) が観察された。ここでは、フラグメントイオンが生成しなかった。一方、(B) において、 $[M-HCl]^-$  ( $m/z$  372.7) および  $[Cl]^-$  ( $m/z$  34.8) の各イオンが観察された。

Figure 3-3 は、プロダクトイオンのクロマトグラムを示す。 $[M-H]^-$  のイオンピーク強度は 3 つのイオンの中で最も高かった。他方、 $[Cl]^-$  イオンピーク強度は、3 つの中で強度は最低であったが、シグナル・ノイズ比では、最も高かった。よって、プロダクトイオンとして塩素イオンを選択した。すなわち、OH - HpCBs を定量するためには、 $m/z$  408.79  $\rightarrow$  34.97 のイオンセットをモニターした。

その他の LC/MS/MS 条件は、Table 3-4 のとおりである。



**Figure 3-2** Product ion mass spectra of OH-HpCBs under different collision energy

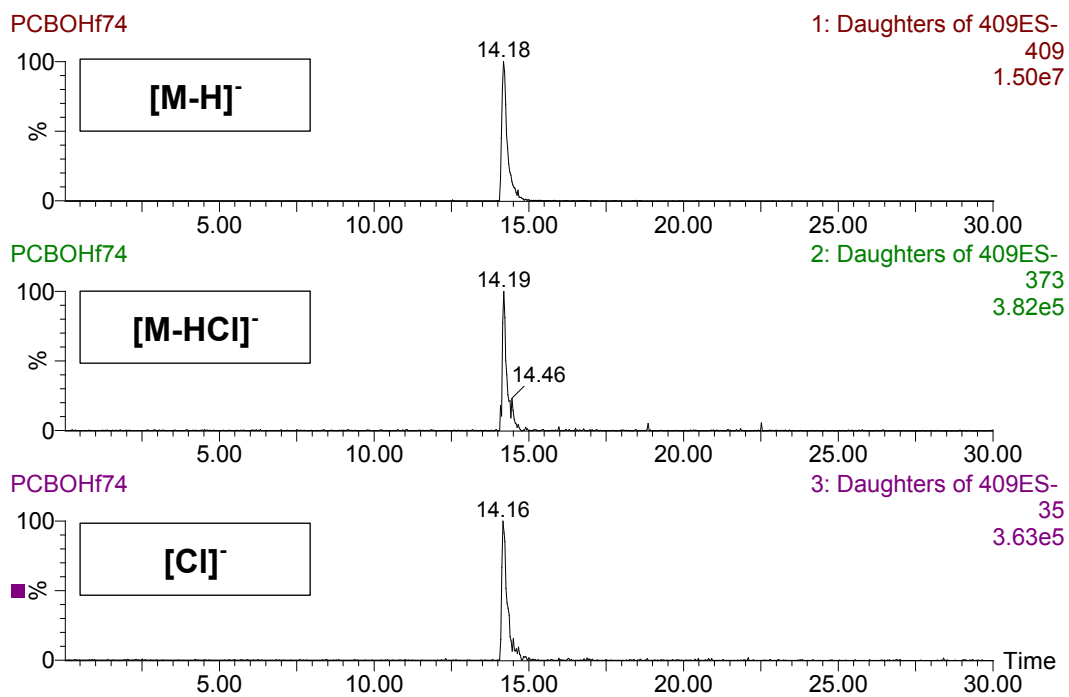


Figure 3-3 Chromatograms of each product ion

**Table 3-4 Mass method for the LC/MS/MS measurement**

Compounds		Precursor ion → product ion <i>m/z</i>
OH- PeCBs	$^{12}\text{C}_{12}^-$	340.87 → 34.97
	$^{13}\text{C}_{12}^-$	352.91 → 34.97
OH- HxCBs	$^{12}\text{C}_{12}^-$	374.83 → 34.97
	$^{13}\text{C}_{12}^-$	386.87 → 34.97
OH- HpCBs	$^{12}\text{C}_{12}^-$	408.79 → 34.97
	$^{13}\text{C}_{12}^-$	420.83 → 34.97

PeCB: Pentachlorobiphenyl, HxCB: Hexachlorobiphenyl, HpCB: Heptachlorobiphenyl



### 3-3-2. LC カラムの最適化

これまでの研究において、著者らは血液試料のような生物学的試料においては、カラムの詰まり等を回避するために、比較的大きな粒子サイズのカラムを選択していた。しかし、血液試料の高感度分析に対応するため、カラム充填剤、粒径を含む最適なカラムを見つける必要があった。

これまでの検討において、カラムについては、逆相系の L-column2 ODS が最も効率が良かったため、この最適化においては、カラムの粒子サイズに注目した。粒子サイズの異なる (5  $\mu\text{m}$  と 2  $\mu\text{m}$ ) 2つのカラムを用いて、OH - HpCBs 標準溶液を測定し、両者の SRM クロマトグラムの比較を行った。Figure 3-4 が粒径 5  $\mu\text{m}$  のカラム(L-column2 ODS, 2.1 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )によるクロマトグラムであり、Figure 3-5 が粒径 2  $\mu\text{m}$  のカラム(L-column2 ODS, 2.1 mm  $\times$  100 mm, 2  $\mu\text{m}$ )によるクロマトグラムである。なお、LC 装置の最高耐圧力の関係で、粒径 2  $\mu\text{m}$  のカラムには、長さ 100 mm のものを使用した。

検討の結果、粒径 2  $\mu\text{m}$  のカラムを用いて得られたクロマトグラムのシグナル・ノイズ比は、粒径 5  $\mu\text{m}$  のカラムのそれよりも高かった。より小さな粒径のカラムは、分析時間の短縮も図ることができ、分離効率を向上させることができる。以上のカラムの最適化により、血液中水酸化 PCB 類を測定するための感度と選択性の向上のために寄与することが明らかとなった。

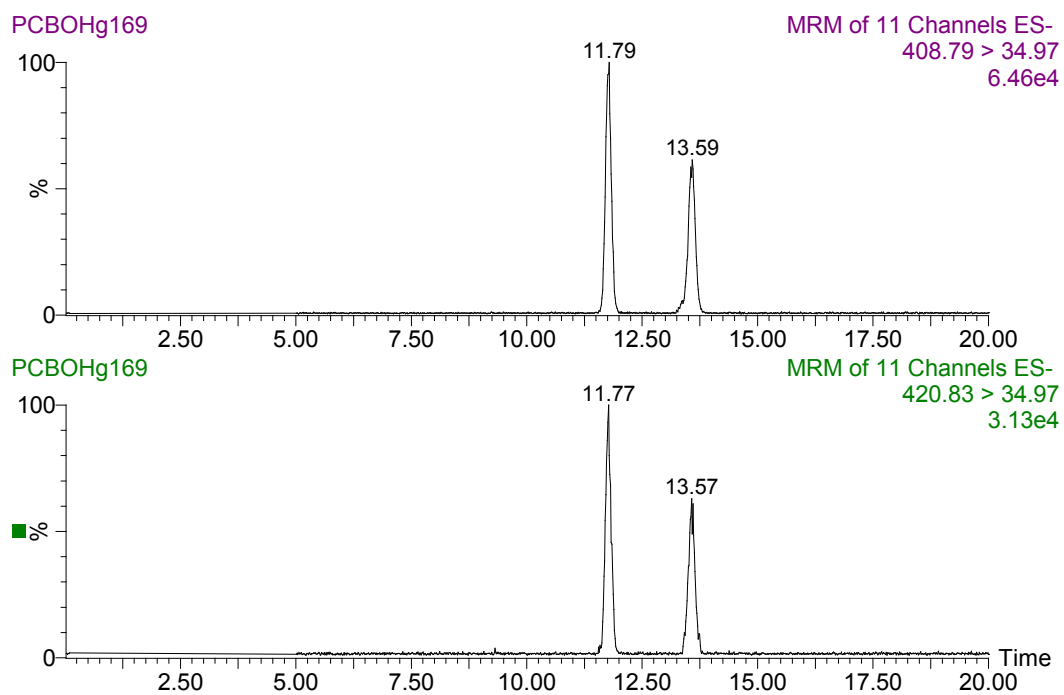


Figure 3-4 LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCBs with an of L-column2  
ODS (2.1mm×150mm, 5μm)

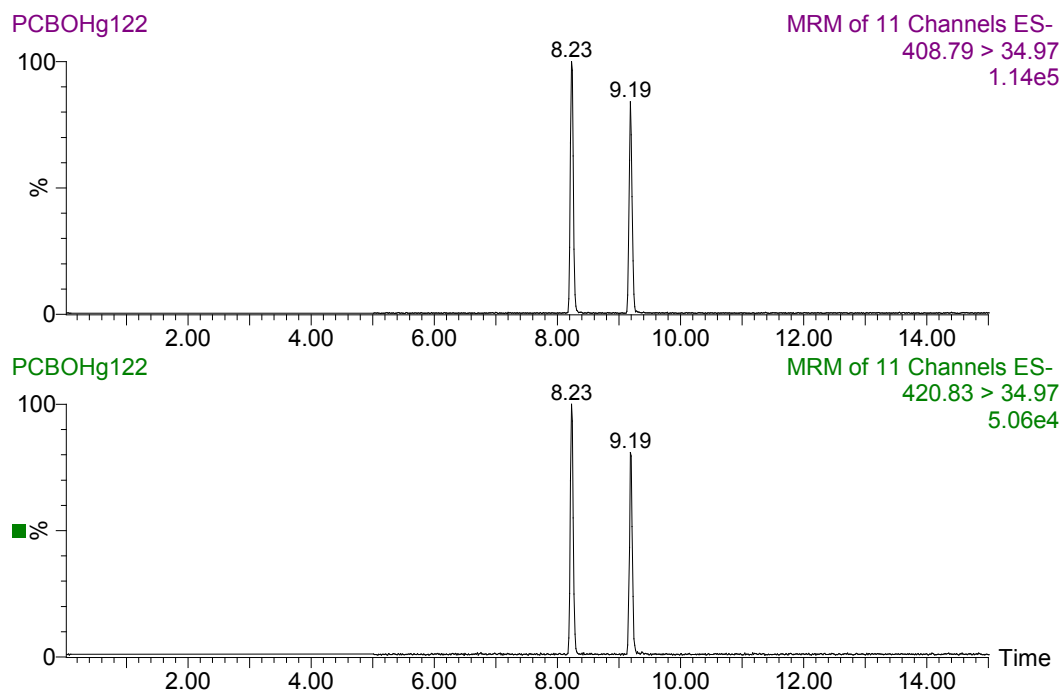
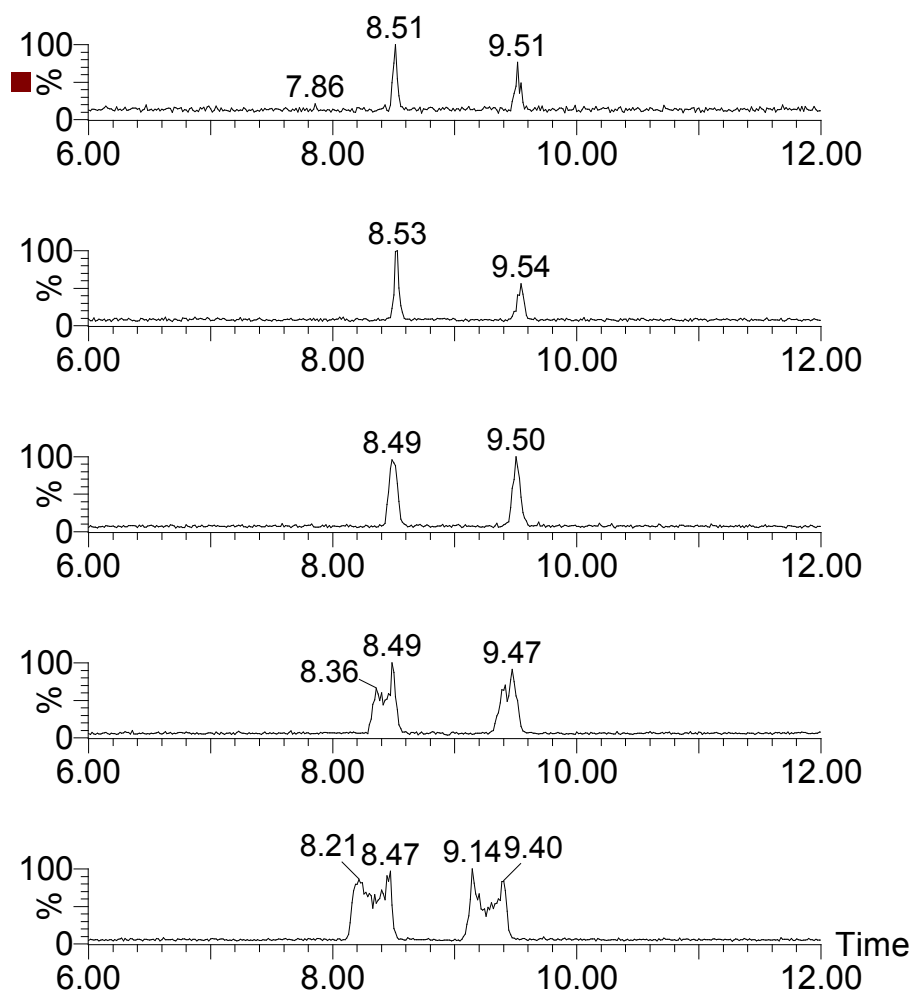


Figure 3-5 LC/MS/MS chromatograms of OH-HpCB with an L-column2 ODS  
(2.1mm×100mm, 2μm)

### 3-3-3. 試料注入量の最適化

測定感度や選択性の向上のため、水酸化 PCB 類の測定における、注入量の効果について検討を行った。この最適注入量に関しては、カラム充填材、移動相組成、試料溶液等に依存することが知られている。そこで、高い分離効率を維持しつつ、より大きな注入量について検討を行った。

Figure 3-6 は、さまざまな注入量 (5 ~ 80  $\mu$ L) における OH - HpCBs のクロマトグラムを示している。注入量の増加に応じて分離効率は低下したが、シグナル・ノイズ比は、向上した。注入量が 40  $\mu$ L を超えた場合、クロマトグラム上のピークが分離し、不適切な注入量であることがわかった。よって、20  $\mu$ L 注入の場合には、より高いシグナル・ノイズ比と許容可能な分離効率が得られることがわかった。



**Figure 3-6** Chromatograms of OH-HpCBs at various injection volumes; from the top to the bottom, the injection volume is 5, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{L}$  in that order.

### 3-3-4. 検量線

これまでの検討の結果を反映し、水酸化 PCB 類の測定方法に基づく、装置検出限界を確認するために検量線の作成を行った。Figure 3-7 は、その代表例として 4-OH-CB187 における 0.1 から 8.0 ng/mL の範囲での検量線である。検量線は、内部標準の 4 - OH - [ $^{13}\text{C}_{12}$ ] - CB187 と 4 - OH - CB187 の濃度比、および、そのピーク面積比から作成した。検量線の最低濃度 0.1 ng/ mL は、血液中濃度の 4 pg/g に対応している。検量線は、良好な直線性を示し、相関係数についても良好な結果であった。

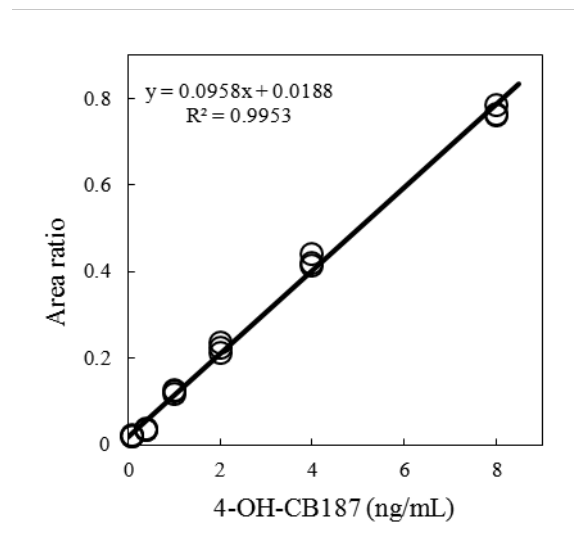
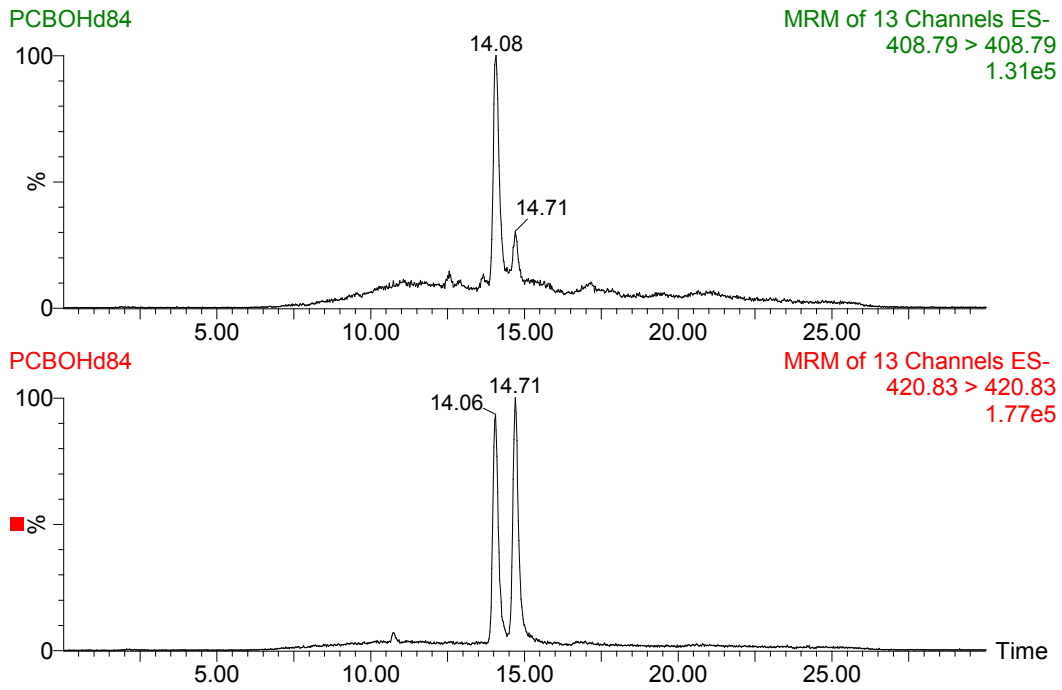


Figure 3-7 Calibration curve of 4-OH-CB187 (0.1~8.0 ng/mL; IS 4.0 ng/mL)

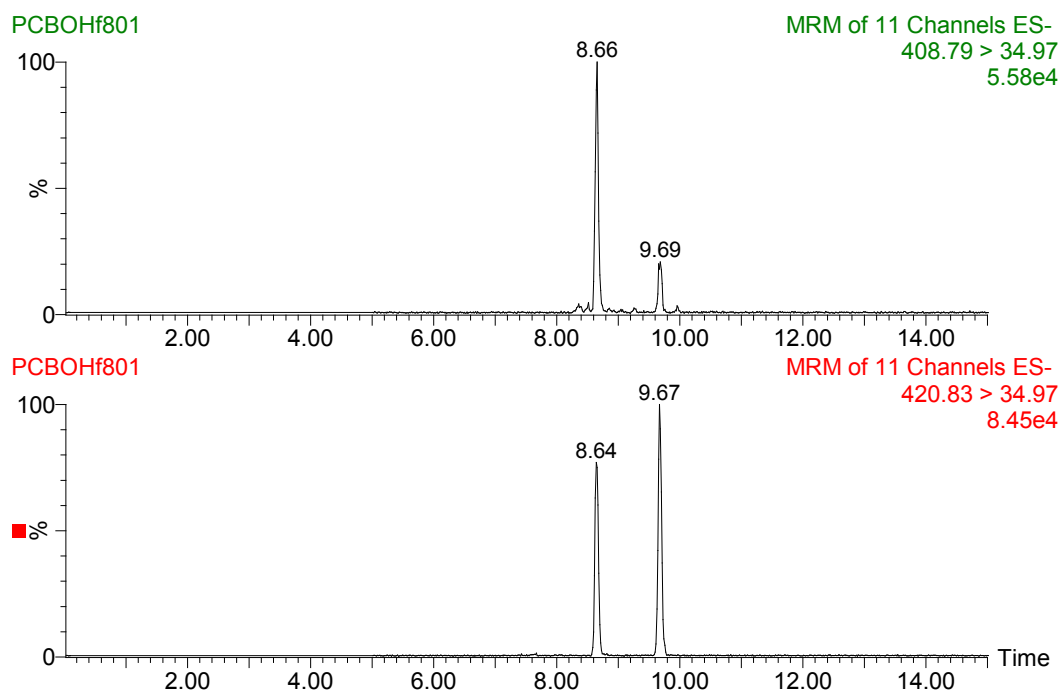
### 3-3-5. 血液試料中の水酸化 PCB 類の測定

開発された高感度測定方法の応用例として、血液試料中の水酸化 PCB 類の測定を行った。血液試料中の OH - HpCBs のクロマトグラムについて、従来法と改良された方法との間で比較を行った。従来の方法によるクロマトグラムが、Figure 3-8 であり、改良された方法によるクロマトグラムが、Figure 3-9 である。シグナル強度に注目した場合、従来の方法は、改良された方法より約 2 倍高かったが、バックグラウンドレベルで比較した場合、従来の方法は改良された方法より相対的に高かった。また、改良された方法は、クロマトグラム上のピークの分離度も向上していた。



**Figure 3-8 Chromatograms of OH-HpCBs in blood with the conventional method**





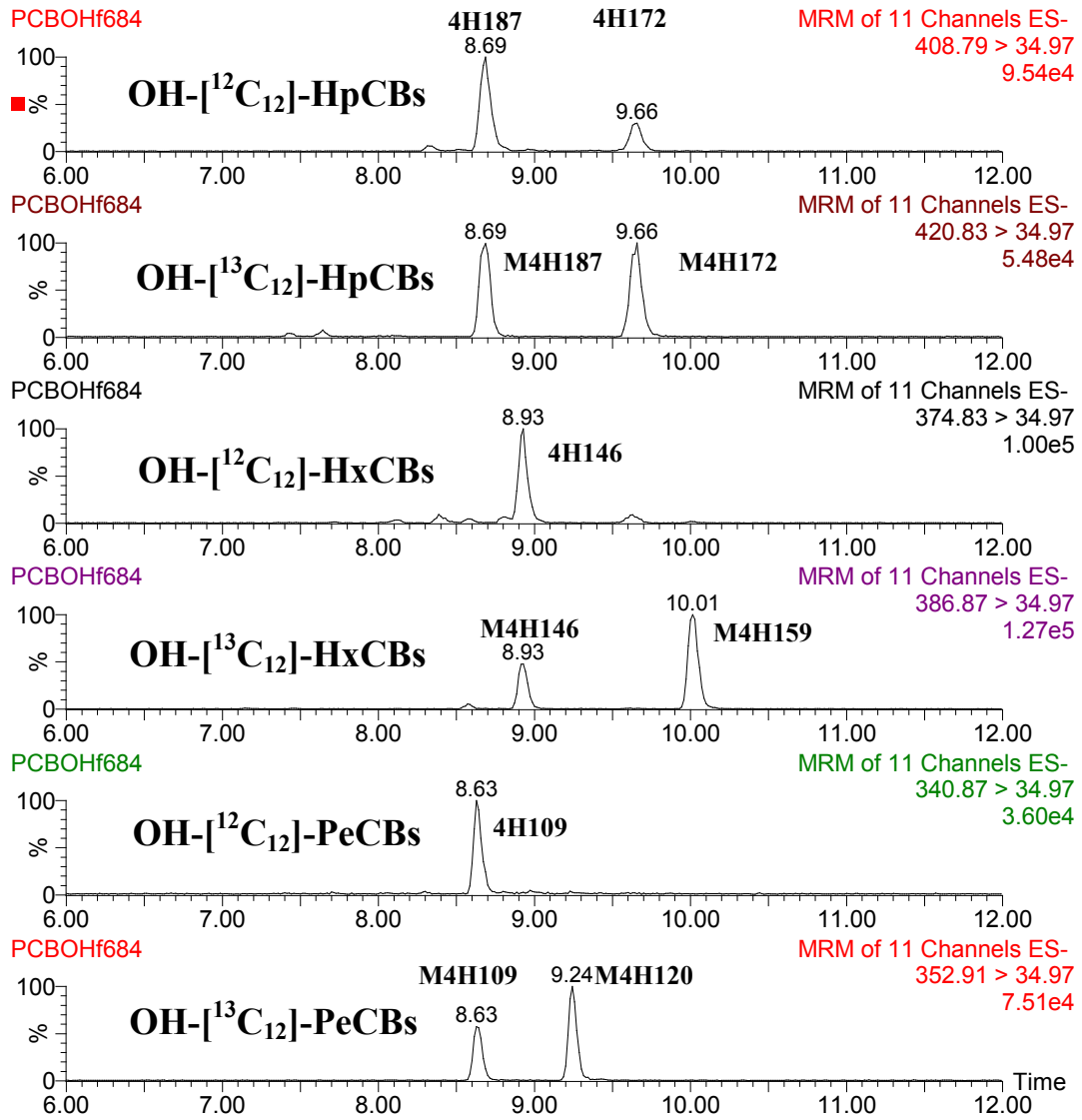
**Figure 3-9 Chromatograms of OH-HpCBs in blood under the improved method**

Figure 3-10 は、油症患者血液中の水酸化-5、6、7塩素化ビフェニルの SRM クロマトグラムを示している。4-OH-CB109、4-OH-CB146 + 3-OH-CB153、4-OH-CB187 および 4'-OH-CB172 が検出されたが、4-OH-CB146 および 3-OH-CB153 は、本分析条件では不分離であった。

Table 3-5 は、本分析法における内部標準物質の平均回収率である。本分析法では、PCB 類、ダイオキシン類との同時分析法を目的としているため、ASE 抽出や硫酸処理を行っている。そのため、平均回収率は一般的な分析法と比べ低めであるが、血液試料を分取した直後に  $^{13}\text{C}$  ラベル化水酸化 PCB 類を内部標準法とした同位体希釈法であるため、低回収率であっても濃度の補正が有効と考えられる。ただし、3'-OH-CB138 は極端な低回収率により検出できず、分析対象から外した。本分析法において、3'-OH-CB138 は、硫酸条件下で分解しているものと想定される。

**Table 3-5 Recoveries of internal standards**

Congeners	Mean	SD
4-OH-CB109	32.4	4.7
3'-OH-CB138	3.8*	1.7
4-OH-CB146*	44.7	5.1
4-OH-CB187	33.6	6.3
4'-OH-CB172	42.2	5.9



**Figure 3-10 SRM chromatograms of OH-PCBs in the blood of Yusho patient (PeCB: Pentachlorobiphenyl, HxCB: Hexachlorobiphenyl, HpCB: Heptachlorobiphenyl)**

### 3-4. 結論

著者らは、5 g の血液試料から、PCB 類、ダイオキシン類と水酸化 PCB を高感度 (pg/g-wet) に定量する方法を開発した。この方法は、かつて開発したダイオキシン類の高感度迅速分析法を改良し、カラムクロマトグラフィー分画で、ダイオキシン類と水酸化 PCB 類を極力損失がないように分離し、クロマトグラフィーの分離、MS/MS のイオン化条件、コリジョン条件、SRM イオンセットのシグナル・ノイズ比を詳細に検討することで達成した。このことによって、ダイオキシン類と同じ試料数の大規模な水酸化 PCB 類の調査を行うことが可能となった。

4. 血液中の水酸化ポリ塩化ビフェニル類(OH-PCBs)  
の濃度

## 4-1. 油症患者 (2010)

### 4-1-1. はじめに

油症とは、1968年に西日本一帯で発生した、PCB及びその関連化合物による大規模な食中毒事件によって引き起こされた重篤な疾患である。ライスオイル製造過程において、熱媒体として使用中にPCBからダイオキシン類(PCDDs、PCDFs、Co-planner PCBs)が生成していた[60]。その熱媒体が混入し、同製品を摂取することによって引き起こされたものである。後の研究により、同製品には、高濃度のPCBやダイオキシン類が含まれていたことが明らかとなり[61, 62, 63]、患者の組織から検出されている[64]。著者らはこれまで、PCBやダイオキシン類の分析法について検討を重ね[65, 66, 67]、それに基づき油症患者血液中の分析を実施してきた[68, 69, 70, 71]。

また、分析法の検討を通じて蓄積された技術は、血液試料を対象とするだけでなく、食品試料等の分析への応用[72, 73, 74, 75, 76, 77]、および異なるラボ間でのクロスチェックなど[78]、を通して普及を図ってきた。

Enomotoら[79]は、日本のヒト血漿中のOH-PCBの濃度を調査した結果、主要な同族体レベルが、4-OH-CB109 (10-230 pg/g-wet)、4-OH-CB146 (13-340 pg/g-wet)、4-OH-CB187 (12-110 pg/g-wet)であったことを報告している。また、Linderholmら[80]は、9名の油症患者からの血清サンプル中のOH-PCB代謝物は、4-OH-CB187、4-OH-CB146、OH-CB109および4'-OH-CB120の順に高濃度であったことを報告した。さらに、6つのOH-PCB代謝物の合計値は、390~1300 pg/g (血清) の範囲であり、その平均値は780 pg/g (血清) であった。

この章では、本研究で開発された高感度分析法を使用して、2010年に183名の油症患者から採取した血液中の水酸化PCB類、PCB類、ダイオキシン類の血中濃度を測定し、これら化合物の比較をすることを目的とした。

#### 4-1-2. 試料および分析方法

##### 試料採取

本研究で分析に供した血液試料は、2010年の検診において183名の油症患者から採取した。すべて、インフォームドコンセントを得て、血液試料を10 mLのヘパリンを含む真空採血管を使用して採取し、分析を開始するまで4℃で保存した。

##### 試薬

水酸化PCB類の標準物質は、Wellington Laboratories, Inc. (Ontario, Canada) および Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (MA, US) から購入した。Table 3-1が水酸化PCB類の標準液のリストである。各標準液は、アセトニトリルで希釈し、各1 mg/L標準液となるよう調製した。同位体希釈法における内部標準液として用いる<sup>13</sup>Cラベル化標準液(OH-[<sup>13</sup>C<sub>12</sub>]-PCBs)は、Table 3-2にまとめた。4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB(4'-OH-CB159)は、シリンジスパイクとして用いた。

また、アセトニトリル、メタノール、酢酸アンモニウム、超純水は、LC/MSグレードの和光純薬工業(Osaka, Japan)製を用いた。固相抽出カートリッジには、Sigma-Aldrich Inc. (MO, US)製のEnvi-18(500mg / 6mL glass tube)を用いた。



### 試料の前処理

本研究において血液試料 5 g を分析に供した。試料の前処理方法の詳細は、「3-2-2. 試料の前処理」の項で述べたとおりである。分析のフローチャートを Figure 3-1 に示す。

### 水酸化 PCB 類の定量

LC/MS/MS 分析には、Alliance 2695 シリーズ高速液体クロマトグラフ、また、それに接続された Quattro micro API 質量分析計 (Waters Corporation, MA, US) を用いた。分析カラムには、L-column2 ODS, 2.1 mm × 100 mm, 2 μm (CERI, Tokyo, Japan) を用い、移動相は流速 0.2 mL/min にて、メタノール : 2mM 酢酸アンモニウム、40 : 60 からグラジエント条件下にて分析を行った。試料の装置注入量は 20 μL である。その他、分析条件の詳細は、Table 3-3 の通りである。

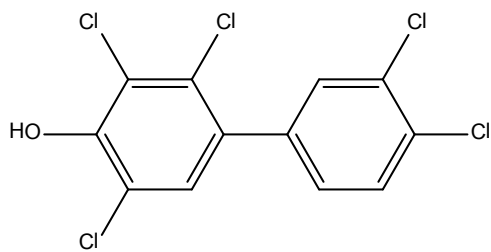
水酸化 PCB 類の検出は、エレクトロスプレーイオン化方式 (ESI - ) による選択反応モニタリングモード (SRM) にて測定を行った。コーンガスおよび脱溶媒ガスとして窒素を使用した。キャピラリーに印可されるイオン化ポテンシャルは 1.0 kV であった。コリジョンエネルギーは、各イオンのために最適化され、コリジョンガスにはアルゴンを使用した。その他、質量分析計に設定した質量 (イオンセット) の詳細は Table 3-4 にまとめた。

### 4-1-3. 結果と考察

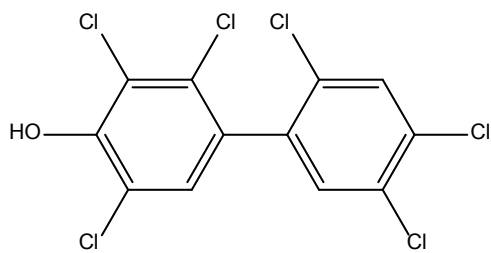
#### *血液試料中水酸化PCB類の測定*

油症患者血液中の水酸化 PCB 類を測定した結果、次の4つのピークが検出された。すなわち 4-OH-CB109、4-OH-CB146+3-OH-CB153、OH-CB187 および 4'-OH-CB172 である。これ以外の異性体に起因するピークは検出されなかった。

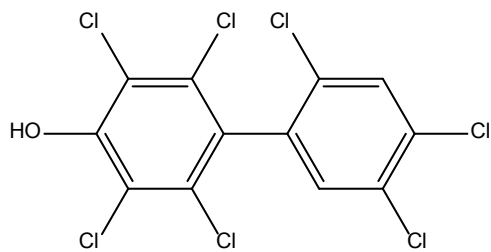
Figure 4-1 は、油症患者血液中から検出された水酸化 PCB 類の構造を示している。これらの化学物質は、構造が類似しており、4位に水酸基、3位と5位が塩素置換されている共通の構造を持つ。このことは水酸化 PCB 類の中でも、血液中において何らかの受容体とバインドして存在している可能性があることを示唆している。



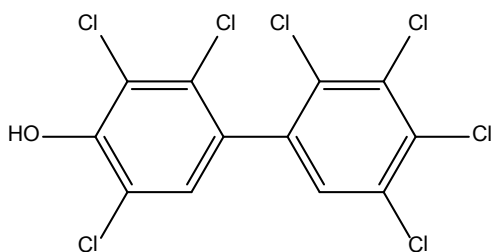
4-OH-2,3,3',4',5-PeCB (4-OH-CB109)



4-OH-2,2',3,4',5,5'-HxCB (4-OH-CB146)



4-OH-2,2',3,4',5,5',6-HpCB (4-OH-CB187)



4-OH-2,2',3,3',4',5,5'-HpCB (4'-OH-CB172)

**Figure 4-1 Chemical structures of OH-PCBs found in the blood of Yusho patients**

### 血液試料中水酸化PCB類の濃度

183名の油症患者血液中の水酸化PCB類、PCB類、PCDD類及びPCDF類の濃度をまとめたものがTable 4-1である。濃度の平均値で比較した場合、水酸化PCB類が310 pg/g-wetであったのに対して、PCB類が2300 pg/g-wet、ダイオキシン類(PCDDs + PCDFs + Co-PCBs)が4.1 pg/g-wetであった。

主要な水酸化PCB類の代謝物(濃度範囲)は、以下の通り。高濃度に検出されたものから順に、4-OH-CB187 (ND - 1300 pg/g-wet)、4-OH-CB146 + 3-OH-CB153 (8.4 - 1200 pg/g-wet)、4-OH-CB109 (ND - 530 pg/g-wet)、4'-OH-CB172 (ND - 380 pg/g-wet)であった。検出された4つの水酸化PCB類の総量は、36から3800 pg/g-wetの範囲であり、その平均値は310 pg/g-wetであった。これらの結果は、Linderholmらによって報告されたものとよく一致した。

**Table 4-1 Concentrations of OH-PCBs, PCBs, PCDDs and PCDFs in the blood of Yusho patients collected in 2010 (pg/g-wet, n=183)**

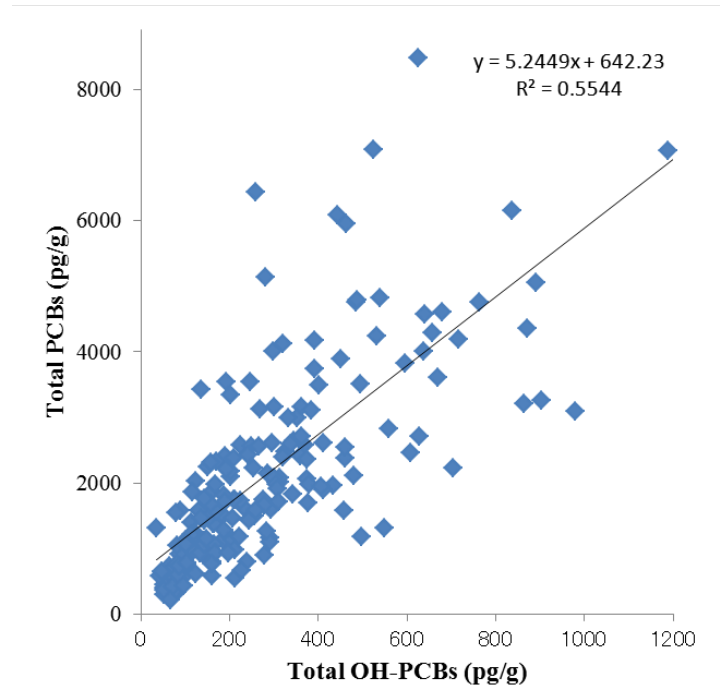
Congeners	Mean	Median	Min.	Max.	SD	CV
4-OH-CB109	67	49	ND	530	68.8	1.02
4-OH-CB146 + 3-OH-CB153	96	71	8.4	1200	106	1.10
4-OH-CB187	120	77	ND	1300	131	1.12
4'-OH-CB172	29	20	ND	380	35.1	1.22
Total OH-PCBs	310	230	36	3800	340	1.09
Total PeCBs	150	130	11	830	111	0.734
Total HxCBs	1000	820	80	6300	785	0.774
Total HpCBs	840	620	86	6600	793	0.942
Total PCBs	2300	1800	210	15000	1800	0.799
Total PCDDs	2.4	2.0	0.49	7.5	1.32	0.558
Total PCDFs	0.70	0.31	0.034	5.5	0.922	1.32
Total PCDD/DFs	3.1	2.7	0.54	11	1.79	0.584
Total Co-PCBs	1.0	0.90	0.13	4.8	0.686	0.663
Total dioxins	4.1	3.8	0.74	13	2.23	0.545
Lipid (%)	0.25	0.25	0.15	0.62	0.0606	0.238

SD: Standard deviation; CV: Coefficient of variation; CB: chlorinated biphenyl; Pe: penta; Hx: hexa; Hp: hepta; ND: not detected; PCDD: polychlorinated dibenzo-p-dioxin; PCDF: polychlorinated dibenzofuran; Co: coplanar.

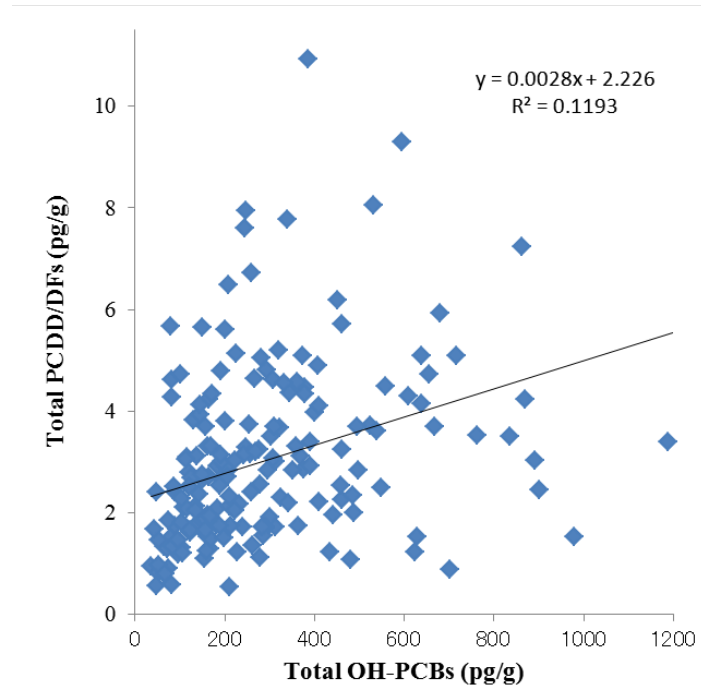
### 血液試料中水酸化 PCB 類とその関連化合物の関係

Figure 4-2 は、油症患者血液中の水酸化 PCB 類濃度と PCB 類濃度との関係を示している。正の相関関係が水酸化 PCB 類濃度と PCB 類濃度との間で観察された。しかし、水酸化 PCB 類濃度とダイオキシン類 (PCDDs + PCDFs) 濃度との間には、有意な関係は認められなかった。(Figure 4-3) また、水酸化 PCB 類濃度と脂肪含量との間にも相関関係は観察されなかった。(Figure 4-4)

水酸化 PCB 類は、PCB 類から誘導されるため、ある程度の相関は想定される。一方で、水酸化 PCB 類とダイオキシン類は、脂溶性の高いダイオキシン類と脂肪含量と相関の無い水酸化 PCB 類との関係であるので、相関関係が観察されなかったものと考えられる。よって、水酸化 PCB 類は、ダイオキシン類と違い、脂質部分に局在しているとは考えられない。

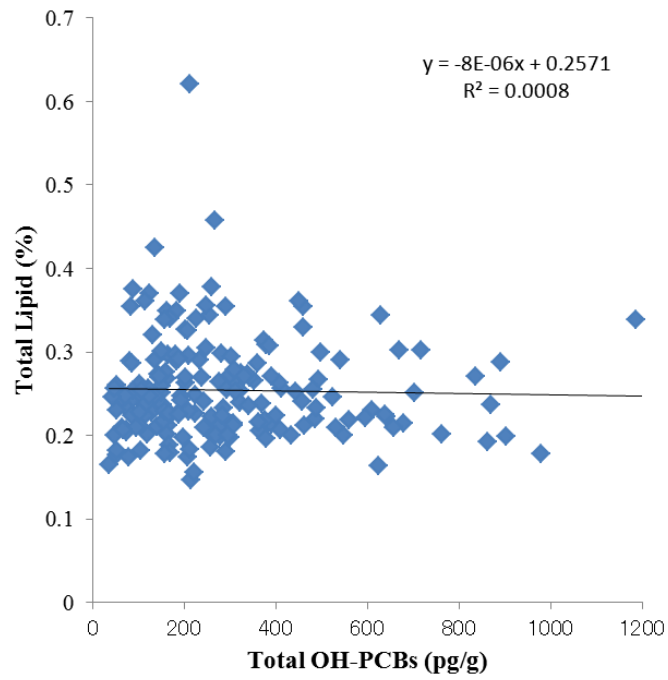


**Figure 4-2 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCBs in the blood of Yusho patients**



**Figure 4-3 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and PCDD/DFs in the blood of Yusho patients**

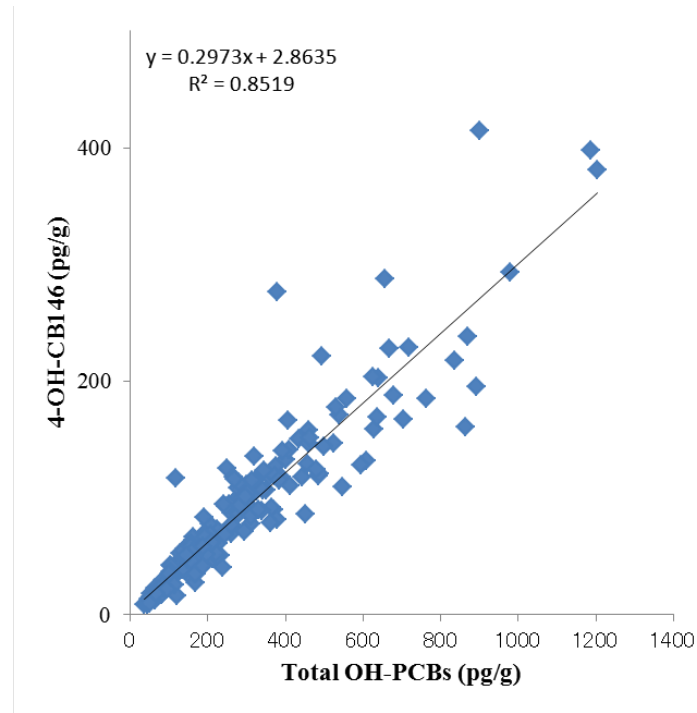




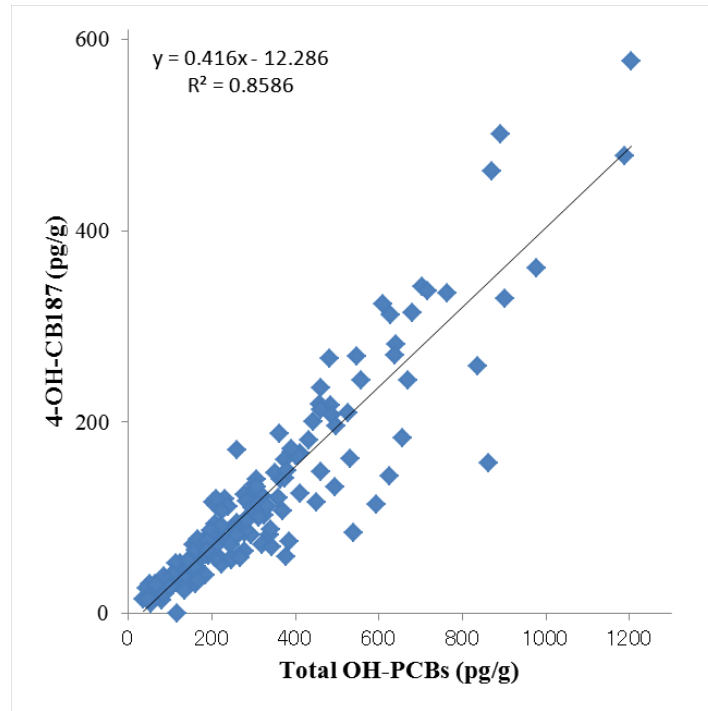
**Figure 4-4 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and lipid in the blood of Yusho patients**

Figure 4-5 および Figure 4-6 は、それぞれ、総水酸化 PCB 類濃度と 4 - OH - CB146 濃度および 4 - OH - CB187 濃度との関係を示したものである。両異性体とも、総水酸化 PCB 類濃度との間で良好な相関関係が認められることから、特異な濃度パターンを示す試料は存在しないものと考えられる。

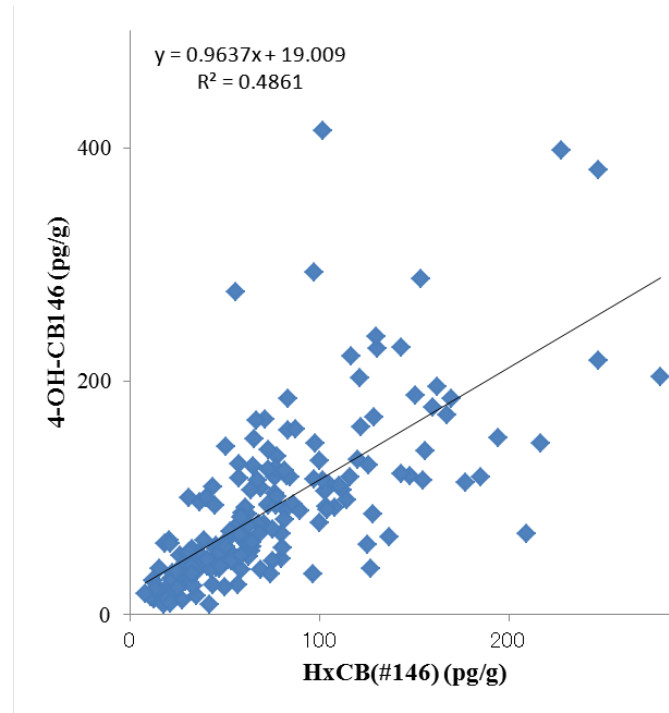
また、Figure 4-7 と Figure 4-8 は、それぞれ、関連化合物同士の関係を示したものである。すなわち、4 - OH - CB146 と HxCB (#146)、および 4 - OH - CB187 と HpCB (#182 + #187) である。両者とも、PCB 類とその代謝物の関係において、ある程度の相関関係が認められることが明らかとなった。



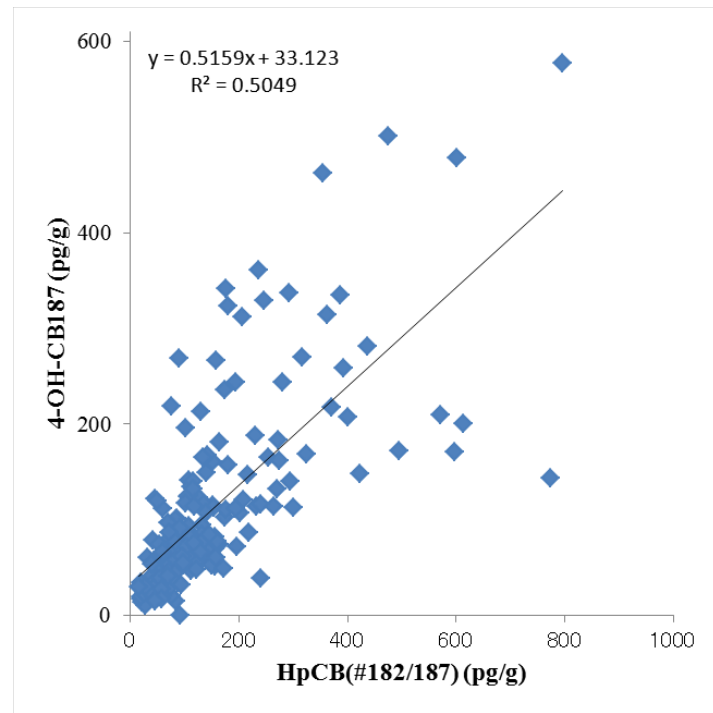
**Figure 4-5 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and their congeners**



**Figure 4-6 Relationship between the concentrations of OH-PCBs and their congeners**



**Figure 4-7 Relationship between the concentrations of OH-PCB congeners and related PCBs**



**Figure 4-8 Relationship between the concentrations of OH-PCB congeners and related PCBs**

#### 4-1-4. 結論

著者らは、開発した血液試料中水酸化 PCB 類の高感度定量法により、183 名の油症患者から採取された血液試料を測定した。総水酸化 PCB 類濃度は、36 から 3800 pg/g-wet の濃度範囲であった。また、その平均値は、310 pg/g-wet であった。

また、同じ 5 g の血液試料から、水酸化 PCB 類、PCB 類、PCDD 類及び PCDF 類の同時定量が可能であった。その平均濃度は、水酸化 PCB 類が 310 pg/g-wet、PCB 類が 2300 pg/g-wet、ダイオキシン類 (PCDDs + PCDFs + Co-PCBs) が 4.1 pg/g-wet であった。

血液中の水酸化 PCB 類濃度と PCB 類濃度との間に正の関係が観察されたが、水酸化 PCB 類濃度とダイオキシン類濃度との間には有意な関係は認められなかった。このことは、両者の化学構造の違いに起因する脂溶性の違いによるものと考えられる。すなわち水酸化 PCB 類とダイオキシン類は互いに変換する化学構造ではないが、脂溶性 (疎水性) など物理化学的性状に差が少なればある程度の相関を示すと考えられる。この結果は水酸化 PCB 類とダイオキシン類の体内挙動が異なることを示唆するものと考えられる。

## 4-2. 妊婦（日本在住者）

### 4-2-1. はじめに

著者らは、これまで妊婦の血液中[81]および母乳中[82]のダイオキシン類、およびその関連性について検討してきた[83]。これまでの検討結果から高濃度暴露群の油症患者に対して、低濃度暴露群と考えられる妊婦血液中の水酸化 PCB 類の濃度について調べた。

本研究で用いた血液試料は、札幌市在住の 253 名の妊婦から採取された。この章では、水酸化 PCB 類の濃度が比較的低濃度と想定される妊婦血液中の水酸化 PCB 類濃度を測定し、改良によって高感度化を達成した分析法の検証を行うとともに、油症患者血液中の水酸化 PCB 類濃度と比較を行うことを目的とする。



## 4-2-2. 試料および分析方法

### 試料採取

本研究で用いた血液試料は、北海道大学大学院医学研究科における前向きコホート研究の下で、2009年から2012年の間に採取された。血液試料は、インフォームドコンセントを得た後に、札幌市内およびその周辺地域に在住の253名の妊婦から採取された。採取後、血液試料は測定を開始するまでの間、 $-30^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

### 試薬

水酸化 PCB 類の標準物質は、Wellington Laboratories, Inc. (Ontario, Canada) および Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (MA, US) から購入した。Table 3-1 が水酸化 PCB 類の標準液のリストである。各標準液は、アセトニトリルで希釈し、各 1 mg/L 標準液となるよう調製した。同位体希釈法における内部標準液として用いる  $^{13}\text{C}$  ラベル化標準液 (OH- $^{13}\text{C}_{12}$ )-PCBs) は、Table 3-2 にまとめた。4-OH-2',3,3',4',5,5'-HxCB (4'-OH-CB159) は、シリンジスパイクとして用いた。

また、アセトニトリル、メタノール、酢酸アンモニウム、超純水は、LC/MS グレードの和光純薬工業 (Osaka, Japan) 製を用いた。

### 試料の前処理

本研究において血液試料 5 g を分析に供した。試料の前処理方法の詳細は、

「3-2-2. 試料の前処理」の項で述べたとおりである。分析のフローチャートを Figure 3-1 に示す。

### **LC/MS/MS 測定**

LC/MS/MS 分析には、Alliance 2695 シリーズ高速液体クロマトグラフ、および Quattro micro API 質量分析計 (Waters, US) を用いた。分析カラムには、L-column2 ODS, 2.1 mm × 100 mm, 2 μm (CERI, Japan) を用い、移動相はグラジエント条件下にて分析を行った。分析条件の詳細は、Table 3-3 の通りである。

### 4-2-3. 結果と考察

日本人 253 名の妊婦の血液中の水酸化 PCB 類の濃度について測定した結果、主要な水酸化 PCB 同族体のほとんどを、開発した分析方法で測定することができた。その結果を Table 4-2 にまとめる。主要な水酸化 PCB 類の代謝物（濃度範囲）は、以下の通り。高濃度に検出されたものから順に、4 - OH - CB187 (ND - 52 pg/g-wet)、4 - OH - CB146 + 3 - OH - CB153 (ND - 50 pg/g-wet)、4 - OH - CB109 (ND - 38 pg/g-wet)、4' - OH - CB172 (ND - 12 pg/g-wet)であった。検出された4つの水酸化 PCB 類の総量は、不検出レベルから 140 pg/g-wet の範囲であり、その平均値は 32 pg/g-wet であった。

他方、油症患者の血液中の4つの水酸化 PCB 類の総量は、36 から 3800 pg/g-wet の範囲であり、その平均値は 310 pg/g-wet であった。(Table 4-3) この結果より、油症患者の総水酸化 PCB 類の平均値は、日本の妊婦のそれよりも約 10 倍高かったことが明らかになった。

**Table 4-2 Concentrations of OH-PCBs in blood of pregnant women (pg/g-wet, n=253)**

Congeners	Mean	Median	Min.	Max.	SD	CV
4-OH-CB107	5.6	ND	ND	38	8.0	1.42
4-OH-CB146 + 3-OH-CB153	12	11	ND	50	10	0.875
4-OH-CB187	13	11	ND	52	10	0.797
4'-OH-CB172	1.2	ND	ND	12	2.4	2.03
Total OH-PCBs	32	26	ND	140	25	0.807

ND: Not detected, SD: Standard deviation, CV: Coefficient of variation

**Table 4-3 Concentrations of OH-PCBs in blood of Yusho patients (pg/g-wet, n=183)**

Congeners	Mean	Median	Min.	Max.	SD	CV
4-OH-CB107	67	49	ND	530	68.8	1.02
4-OH-CB146 + 3-OH-CB153	96	71	8.4	1200	106	1.10
4-OH-CB187	120	77	ND	1300	131	1.12
4'-OH-CB172	29	20	ND	380	35.1	1.22
Total OH-PCBs	310	230	36	3800	340	1.09

ND: Not detected, SD: Standard deviation, CV: Coefficient of variation

#### 4-2-4. 結論

著者らは、LC/MS/MS法を用いた血液試料中水酸化PCB類の高感度定量法により、日本人253名の妊婦から採取された血液試料を測定した。妊婦の血液試料中の主要な水酸化PCB類を、本研究で開発された方法によって定量することができた。総水酸化PCB類濃度は、不検出レベルから140 pg/g-wetの濃度範囲であった。また、その平均値は、32 pg/g-wetであり、油症患者血液中の約10%の濃度に相当することが明らかとなった。

5. 総括および今後の展望

LC/MS/MS-SRM 法を用いた血液中の水酸化 PCB 類の高感度定量法を開発した。特に、MS/MS 条件の検討、試料注入量の最適化、より粒径の細かい LC カラムの採用等で総合的に感度の向上を達成した。この手法では、PCB 類、PCDD 類及び PCDF 類の測定に、追加の試料を必要とすること無く、水酸化 PCB 類の測定を追加することが可能となった。

また、開発された定量法を用いて、油症患者血液 (n=183) 中の水酸化 PCB 類の定量を行った。その総水酸化 PCB 類濃度は、36~3800 pg/g-wet (平均 310 pg/g-wet) であった。主要異性体は、高濃度から順に、4-OH-CB187 (ND-1300 pg/g-wet)、4-OH-CB146 + 3-OH-CB153 (8.4-1200 pg/g-wet)、4-OH-CB109 (ND-530 pg/g-wet)、4'-OH-CB172 (ND-380 pg/g-wet) であった。

本研究は、ヒト血液中の PCB 類、PCDD 類、PCDF 類及び水酸化 PCB 類の同時定量であって、その母集団も極めて大規模であり、他に例を見ない成果であった。得られたデータより、総水酸化 PCBs と総 PCB 濃度間には正の相関関係が認められたが、総水酸化 PCBs 濃度と脂肪含量やダイオキシン類との間には有意な関係は認められなかった。

他方、妊婦の血液 (n=253) 中の総水酸化 PCB 類濃度は、ND ~ 140 pg/g-wet (平均 32 pg/g-wet) であった。これは、油症患者の平均値の約 10%に相当する。

Sato ら[84]は、ヒト尿と同じ人から採取した血液サンプル中の水酸化 PCB 類濃度を測定した。彼らは、その検出パターンが、血液および尿サンプル間で異なることを示した。このことは、ヒトにおける PCB 類の代謝経路において、水酸化 PCB 類は重要な役割を果たしていることを意味している。著者らは、本研



究から得られた知見を元に、PCB 類の代謝経路の解明、および他の代謝物の定量法に応用していきたいと考えている。

## 6. 謝辞

本研究の実施ならびに本論文の執筆にあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました、中部大学大学院、山本敦教授、堤内要准教授ならびに鈴木茂教授に心から厚く御礼申し上げます。

また、本研究の実施にあたり多大なご協力を頂きました福岡県保健環境研究所の皆様には感謝申し上げます。

## 7. 参考文献

1. Kunisue, T. and Tanabe, S., Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the blood of mammals and birds from Japan: lower chlorinated OH-PCBs and profiles. *Chemosphere*. 74(7): 950-961 (2009)
2. Nomiya, K., Murata, S., Kunisue, T., Yamada, T.K., Mizukawa, H., Takahashi, S., and Tanabe, S., Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) in the blood of toothed and baleen whales stranded along Japanese coastal waters. *Environmental science & technology*. 44(10): 3732-3738 (2010)
3. Nomiya, K., Tanizaki, T., Ishibashi, H., Arizono, K., and Shinohara, R., Production mechanism of hydroxylated PCBs by oxidative degradation of selected PCBs using TiO<sub>2</sub> in water and estrogenic activity of their intermediates. *Environ Sci Technol*. 39(22): 8762-8769 (2005)
4. Ochiai, M., Nomiya, K., Isobe, T., Mizukawa, H., Yamada, T.K., Tajima, Y., Matsuishi, T., Amano, M., and Tanabe, S., Accumulation of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) and implications for PCBs metabolic capacities in three porpoise species. *Chemosphere*. 92(7): 803-810 (2013)
5. Mizukawa, H., Nomiya, K., Nakatsu, S., Yachimori, S., Hayashi, T., Tashiro, Y., Nagano, Y., and Tanabe, S., Species-specific differences in the accumulation features of organohalogen contaminants and their metabolites in the blood of Japanese terrestrial mammals. *Environ Pollut*. 174: 28-37 (2013)
6. Berg, V., Lyche, J.L., Gutleb, A.C., Lie, E., Skaare, J.U., Aleksandersen, M., and Ropstad, E., Distribution of PCB 118 and PCB 153 and hydroxylated PCB metabolites (OH-CBs) in maternal, fetal and lamb tissues of sheep exposed during gestation and lactation. *Chemosphere*. 80(10): 1144-1150 (2010)
7. Berger, U., Herzke, D., and Sandanger, T.M., Two trace analytical methods for determination of hydroxylated PCBs and other halogenated phenolic compounds in eggs from Norwegian birds of prey. *Anal Chem*. 76(2): 441-452 (2004)
8. Bergman, A., Klasson-Wehler, E., and Kuroki, H., Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ Health Perspect*. 102(5): 464-469 (1994)
9. Buckman, A.H., Brown, S.B., Hoekstra, P.F., Solomon, K.R., and Fisk, A.T., Toxicokinetics of three polychlorinated biphenyl technical mixtures in rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem.* 23(7): 1725-1736 (2004)
10. Campbell, L.M., Muir, D.C., Whittle, D.M., Backus, S., Norstrom, R.J., and Fisk, A.T., Hydroxylated PCBs and other chlorinated phenolic compounds in lake trout (*Salvelinus namaycush*) blood plasma from the Great Lakes region. *Environ Sci Technol.* 37(9): 1720-1725 (2003)
  11. Hovander, L., Malmberg, T., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Rahm, S., Bergman, A., and Wehler, E.K., Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Arch Environ Contam Toxicol.* 42(1): 105-117 (2002)
  12. Fangstrom, B., Athanasiadou, M., Grandjean, P., Weihe, P., and Bergman, A., Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ Health Perspect.* 110(9): 895-899 (2002)
  13. Otake, T., Yoshinaga, J., Enomoto, T., Matsuda, M., Wakimoto, T., Ikegami, M., Suzuki, E., Naruse, H., Yamanaka, T., Shibuya, N., Yasumizu, T., and Kato, N., Thyroid hormone status of newborns in relation to in utero exposure to PCBs and hydroxylated PCB metabolites. *Environ Res.* 105(2): 240-246 (2007)
  14. Park, J.-S., Bergman, Å., Linderholm, L., Athanasiadou, M., Kocan, A., Petrik, J., Drobna, B., Trnovec, T., Charles, M.J., and Hertz-Picciotto, I., Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia. *Chemosphere.* 70(9): 1676-1684 (2008)
  15. Fernandez, M.F., Kiviranta, H., Molina-Molina, J.M., Laine, O., Lopez-Espinosa, M.J., Vartiainen, T., and Olea, N., Polychlorinated biphenyls (PCBs) and hydroxy-PCBs in adipose tissue of women in Southeast Spain. *Chemosphere.* 71(6): 1196-1205 (2008)
  16. Hisada, A., Shimodaira, K., Okai, T., Watanabe, K., Takemori, H., Takasuga, T., Koyama, M., Watanabe, N., Suzuki, E., Shirakawa, M., Noda, Y., Komine, Y., Ariki, N., Kato, N., and Yoshinaga, J., Associations between levels of hydroxylated PCBs and PCBs in serum of pregnant women and blood thyroid hormone levels and body size of neonates. *Int J Hyg Environ Health* 217(4-5): 546-553 (2014)
  17. Kunisue, T., Sakiyama, T., Yamada, T.K., Takahashi, S., and Tanabe, S., Occurrence

- of hydroxylated polychlorinated biphenyls in the brain of cetaceans stranded along the Japanese coast. *Marine pollution bulletin*. 54(7): 963-973 (2007)
18. Bloch, W.D. and Cornish, H.H., Metabolism of biphenyl and 4-chlorobiphenyl in the rabbit. *The Journal of Biological Chemistry*. 234: 3301-3302 (1959)
  19. Grimm, F.A., Hu, D., Kania-Korwel, I., Lehmler, H.-J., Ludewig, G., Hornbuckle, K.C., Duffel, M.W., Bergman, Å., and Robertson, L.W., Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls. *Critical reviews in toxicology*(0): 1-28 (2015)
  20. Gomara, B., Athanasiadou, M., Quintanilla-Lopez, J.E., Gonzalez, M.J., and Bergman, A., Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites in placenta from Madrid mothers. *Environ Sci Pollut Res Int*. 19(1): 139-147 (2012)
  21. Ptak, A., Ludewig, G., Rak, A., Nadolna, W., Bochenek, M., and Gregoraszczyk, E.L., Induction of cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast cancer cells by 4-chlorobiphenyl (PCB3) and the effects of its hydroxylated metabolites on cellular apoptosis. *Environ Int*. 36(8): 935-941 (2010)
  22. Dirtu, A.C., Jaspers, V.L., Cernat, R., Neels, H., and Covaci, A., Distribution of PCBs, their hydroxylated metabolites, and other phenolic contaminants in human serum from two European countries. *Environ Sci Technol*. 44(8): 2876-2883 (2010)
  23. Park, J., Petreas, M., Cohn, B., Cirillo, P., and Factor-Litvak, P., Hydroxylated PCB metabolites (OH-PCBs) in archived serum from 1950-60s California mothers: a pilot study. *Environment international*. 35(6): 937-942 (2009)
  24. Dallaire, R., Dewailly, E., Pereg, D., Dery, S., and Ayotte, P., Thyroid function and plasma concentrations of polyhalogenated compounds in Inuit adults. *Environ Health Perspect*. 117(9): 1380-1386 (2009)
  25. Park, H.Y., Park, J.S., Sovcikova, E., Kocan, A., Linderholm, L., Bergman, A., Trnovec, T., and Hertz-Picciotto, I., Exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the prenatal period and subsequent neurodevelopment in eastern Slovakia. *Environ Health Perspect*. 117(10): 1600-1606 (2009)
  26. Park, J., Bergman, Å., Linderholm, L., Athanasiadou, M., Charles, M., Kocan, A., Petrik, J., Drobna, B., Trnovec, T., and Judith Charles, M., Placental transfer of PCBs and their metabolites (OH-PCBs) in eastern Slovakia birth cohort. *Chemosphere*. 70: 1676-1684 (2008)

27. Otake, T., Yoshinaga, J., Enomoto, T., Matsuda, M., Wakimoto, T., Ikegami, M., Suzuki, E., Naruse, H., Yamanaka, T., and Shibuya, N., Thyroid hormone status of newborns in relation to in utero exposure to PCBs and hydroxylated PCB metabolites. *Environmental research*. 105(2): 240-246 (2007)
28. Linderholm, L., Park, J.-S., Hovander, L., Kocan, A., Trnovec, T., Hertz-Picciotto, I., and Bergman, Å., Human exposure to PCB metabolites in a hot-spot area in eastern slovakia. *Organohalogen Compounds*. 69: 750-753 (2007)
29. Kato, Y., Haraguchi, K., Kubota, M., Seto, Y., Ikushiro, S., Sakaki, T., Koga, N., Yamada, S., and Degawa, M., 4-Hydroxy-2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice occurs through increase in accumulation of thyroxine in the liver. *Drug Metab Dispos*. 37(10): 2095-2102 (2009)
30. Nomiya, K., Yonehara, T., Yonemura, S., Yamamoto, M., Koriyama, C., Akiba, S., Shinohara, R., and Koga, M., Determination and characterization of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in serum and adipose tissue of Japanese women diagnosed with breast cancer. *Environmental science & technology*. 44(8): 2890-2896 (2010)
31. 古江増隆, 赤峰昭文, 佐藤伸一, 山田英之, 吉村健清, 油症研究Ⅱ 治療と研究の最前線. 九州大学出版会 (2010)
32. Koga, N., Nishimura, N., Kuroki, H., Masuda, Y., and Yoshimura, H., Metabolism of 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and purified P4501A1. *Xenobiotica*. 24(8): 775-783 (1994)
33. Koga, N., Kikuichi-Nishimura, N., and Yoshimura, H., Effect of cytochrome P450 inducers on liver microsomal metabolism of tetrachlorobiphenyls in rats, guinea pigs and hamsters. *Biol Pharm Bull*. 18(5): 705-710 (1995)
34. Ohta, C., Haraguchi, K., Kato, Y., and Koga, N., Metabolism of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in guinea pig microsomes. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 96(5): 232-240 (2005)
35. Kuroki, H., Haraguchi, K., Saito, H., Masuda, Y., Wehler, E.K., and Bergman, A., Accumulation of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 84(5): 248-256 (1993)
36. Abraham, V.M. and Lynn, B.C., Jr., Determination of hydroxylated polychlorinated



- biphenyls by ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A. 790(1-2): 131-141 (1997)
37. 古江増隆, 熱媒体の人体影響とその治療法に関する研究 平成15～17年度総合研究報告書. 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 (2006)
38. 古江増隆, 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究 平成18～20年度総合研究報告書. 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 (2009)
39. 古江増隆, 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究 平成21～23年度総合研究報告書. 厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 (2012)
40. 岸玲子, 前向きコホート研究に基づく先天異常、免疫アレルギーおよび小児発達障害のリスク評価と環境化学物質に対する遺伝的感受性の解明 平成23～25年度総合研究報告書. 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 (2014)
41. Todaka, T., Hirakawa, H., Tobiishi, K., and Iida, T., New protocol of dioxin analysis in human blood. . Fukuoka Igaku Zasshi. 94: 148-157 (2003)
42. Tobiishi, K. and Tsukatani, H., Study on Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) by LC/MS. Organohalogen Compounds. 70: 2309 (2008)
43. Tobiishi, K., Todaka, T., Hirakawa, H., and Kajiwara, J., Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Blood by LC/MS/MS. Organohalogen Compounds. 71: 2920 (2009)
44. Tobiishi, K., Todaka, T., Hirakawa, H., and Kajiwara, J., Improvement of the Measurement Method for Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Blood using LC/MS/MS. Organohalogen Compounds. 72: 1643-1645 (2010)
45. Tobiishi, K., Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Kajiwara, J., Hirata, T., Iida, T., Uchi, H., and Furue, M., Measurement method for hydroxylated polychlorinated biphenyls in the blood of Yusho patients by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Fukuoka Igaku Zasshi. 102(4): 153-158 (2011)
46. Tobiishi, K., Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Kajiwara, J., Hirata, T., Iida, T., Uchi, H., and Furue, M., Determination of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Blood of YUSHO Patients by LC/MS/MS. Organohalogen

- Compounds. 73: 1608-1610 (2011)
47. Tobiishi, K., Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Kajiwara, J., Hirata, T., Sasaki, S., Miyashita, C., Yoshioka, E., Yuasa, M., Kishi, R., Iida, T., Uchi, H., and Furue, M., Determination of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Blood of Pregnant Women by LC/MS/MS. *Organohalogen Compounds*. 74: 43 (2012)
48. 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課, ナトリウム=1,1'-ビフェニル-2-オラート. 化学物質分析法開発調査報告書: 182-208 (2013)
49. Tobiishi, K., Suzuki, S., Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Kajiwara, J., Hirata, T., Iida, T., Uchi, H., and Furue, M., Improvement of measurement method for hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in blood samples using LC/MS/MS. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 104(4): 128-135 (2013)
50. Tobiishi, K., Suzuki, S., Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Kajiwara, J., Hirata, T., Iida, T., Uchi, H., and Furue, M., Concentration of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the blood of Yusho patients in 2010. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 104(4): 136-142 (2013)
51. Tsukatani, H., Tobiishi, K., Tanaka, Y., Sakuragi, K., Ikeura, T., and Nakamura, M., Determination of hexaconazole in surface water samples from river and the sea by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72(1): 149-154 (2008)
52. Tsukatani, H., Tobiishi, K., and Imasaka, T., Simple and sensitive determination of 2,4-xyleneol in surface water samples from river and sea by gas chromatography-mass spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol*. 82(2): 153-157 (2009)
53. 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課, o, m, p-フェニルフェノール. 化学物質分析法開発調査報告書: 1104-1110 (1978)
54. 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課,  $\alpha$ -ナフトール、 $\beta$ -ナフトール、o-フェニルフェノール、p-フェニルフェノール. 化学物質分析法開発調査報告書: 126-146 (1998)
55. Sakiyama, T., Yamamoto, A., Kakutani, N., Fukuyama, J., and Okumura, T., Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the aquatic environment: Levels and congener profiles in sediments from Osaka, Japan. *Organohalogen Comp.*

- 71: 1881-1885 (2007)
56. 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課, 水酸化ポリ塩化ビフェニル. 化学物質分析法開発調査報告書: 438-503 (2012)
57. Matsumoto, K., Iseki, N., Kameda, H., Okumura, T., Kashima, Y., and Shiozaki, T., The highly effective methylation method for hydroxylated polychlorinated biphenyls. *Organohalogen Comp.* 68: 2442-2445 (2006)
58. Yasutake, D., Hori, T., Kurokawa, Y., Kajiwara, J., Tsutsumi, T., and Amakura, Y., The Measurement of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls without Derivatization using High-resolution Gas Chromatograph / High-resolution Mass Spectrometer. *Organohalogen Comp.* 73: 625-628 (2011)
59. Letcher, R.J., Li, H.X., and Chu, S.G., Determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) in blood plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem quadrupole mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 29(4): 209-216 (2005)
60. 長山淳哉, 倉恒匡徳, 増田義人, ポリ塩化ビフェニルの加熱によるポリ塩化ジベンゾフランの生成 (油症と PCB<特集>). *福岡医学雑誌.* 72(4): p136-141 (1981)
61. 小栗一太, 赤峰昭文, 古江増隆, 油症研究 30年の歩み. 九州大学出版会 (2000)
62. Nagayama, J., Masuda, Y., and Kuratsune, M., Chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and rice oils used by patients with yusho. *Fukuoka igaku zasshi=Hukuoka acta medica.* 66(10): 593 (1975)
63. Nagayama, J., Kuratsune, M., and Masuda, Y., Determination of chlorinated dibenzofurans in Kanechlors and "Yusho oil". *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* 15(1): 9-13 (1976)
64. 宮田 秀明, 檜本 隆, 国田 信治, Detection and Determination of Polychlorodibenzofurans in Normal Human Tissues and Kanemi Rice Oils Caused "Kanemi Yusho". *食品衛生学雑誌.* 18(3): 260-265\_261 (1977)
65. Nakagawa, R., Ashizuka, Y., Hori, T., Hirakawa, H., Tobiishi, K., and Iida, T., Equality as Yusho diagnosis indices between blood PCB constitution data from using a conventional analytical method and a PCB isomer specific analytical method. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 94(5): 144-147 (2003)

66. Hori, T., Tobiishi, K., Ashizuka, Y., Nakagawa, R., Todaka, T., Hirakawa, H., and Iida, T., Congener specific determination of PCBs in human blood using gel permeation chromatography (GPC) and high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS). *Fukuoka Igaku Zasshi*. 96(5): 220-226 (2005)
67. Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, Y., Tobiishi, K., and Iida, T., Improvements in the method of dioxin isolation from blood of Yusho patients. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 96(5): 185-191 (2005)
68. Iida, T., Todaka, T., Hirakawa, H., Tobiishi, K., Matsueda, T., Hori, T., Nakagawa, R., and Furue, M., Follow-up survey of dioxins in the blood of Yusho patients (in 2001). *Fukuoka Igaku Zasshi*. 94(5): 126-135 (2003)
69. Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Tobiishi, K., and Iida, T., Follow-up survey of dioxin concentrations in the blood of Yusho patients in 2002-2003. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 96(5): 249-258 (2005)
70. Todaka, T., Hirakawa, H., Kajiwara, J., Hori, T., Tobiishi, K., Onozuka, D., Iida, T., Yoshimura, T., and Furue, M., Dioxin concentration in the blood of patients collected during medical check-up for Yusho in 2004-2005. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 98(5): 222-231 (2007)
71. Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Tobiishi, K., Iida, T., and Furue, M., Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho and mono-ortho polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients. *Chemosphere*. 66(10): 1983-1989 (2007)
72. Hori, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Iida, T., Tsutsumi, T., Sasaki, K., and Toyoda, M., Effects of cooking on concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds in green leafy vegetable 'Komatsuna'. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 42(5): 339-342 (2001)
73. Hori, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Iida, T., Tsutsumi, T., Sasaki, K., and Toyoda, M., Effects of cooking on concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds in fish and meat. *J Agric Food Chem*. 53(22): 8820-8828 (2005)
74. Amakura, Y., Tsutsumi, T., Iida, T., Nakagawa, R., Hori, T., Tobiishi, K., Uchibe, H., Nakamura, M., Yanagi, T., Kono, Y., Toyoda, M., Sasaki, K., and Maitani, T.,

- Contamination levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in commercial baby foods in Japan. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 46(4): 148-152 (2005)
75. Nakagawa, R., Hori, T., Tobiishi, K., Iida, T., Tsutsumi, T., Sasaki, K., and Toyoda, M., Levels and tissue-dependent distribution of dioxin in Japanese domestic leafy vegetables--from the 1999 national investigation. *Chemosphere*. 48(2): 247-256 (2002)
76. Tsutsumi, T., Yanagi, T., Nakamura, M., Kono, Y., Uchibe, H., Iida, T., Hori, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Matsuda, R., Sasaki, K., and Toyoda, M., Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere*. 45(8): 1129-1137 (2001)
77. Tsutsumi, T., Iida, T., Hori, T., Nakagawa, R., Tobiishi, K., Yanagi, T., Kono, Y., Uchibe, H., Matsuda, R., Sasaki, K., and Toyoda, M., Recent survey and effects of cooking processes on levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in leafy vegetables in Japan. *Chemosphere*. 46(9-10): 1443-1449 (2002)
78. Kajiwara, J., Todaka, T., Hirakawa, H., Hori, T., Yasutake, D., Miyawaki, T., Tobiishi, K., Takao, Y., Hirata, T., Uchi, H., and Furue, M., Inter-laboratory crosscheck study of dioxins and PCBs in human blood samples. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 104(4): 104-109 (2013)
79. Enomoto, T., Nishio, Y., Matsuda, M., Kawano, M., and Wakimoto, T., Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites (HO-PCBs) in human blood plasma--development of analytical methods and their residue in Japanese general population. *J Environ Chem*. 16: 51-59 (2006)
80. Linderholm, L., Masuda, Y., Athanasiadou, M., and Bergman, Å., PCB and PCB metabolites in serum from Yusho patients 37 years after the accident. *Organohalogen Compounds: Yusho and Yucheng--clinical and epidemiological aspect*. 69: 2141-2144 (2007)
81. Todaka, T., Hirakawa, H., Kajiwara, J., Hori, T., Tobiishi, K., Onozuka, D., Kato, S., Sasaki, S., Nakajima, S., Saijo, Y., Sata, F., Kishi, R., Iida, T., and Furue, M., Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere*. 69(8): 1228-1237 (2007)

82. Todaka, T., Hirakawa, H., Kajiwara, J., Hori, T., Tobiishi, K., Onozuka, D., Kato, S., Sasaki, S., Nakajima, S., Saijo, Y., Sata, F., Kishi, R., Iida, T., and Furue, M., Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood and breast milk collected from 60 mothers in Sapporo City, Japan. *Chemosphere*. 72(8): 1152-1158 (2008)
83. Todaka, T., Hirakawa, H., Kajiwara, J., Hori, T., Tobiishi, K., Yasutake, D., Onozuka, D., Sasaki, S., Miyashita, C., Yoshioka, E., Yuasa, M., Kishi, R., Iida, T., and Furue, M., Relationship between the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in maternal blood and those in breast milk. *Chemosphere*. 78(2): 185-192 (2010)
84. Sato, N., Yonekubo, J., Ezaki, T., Suzuki, M., Matsumura, C., Haga, Y., and Nakano, T., Measurement of Accumulation of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Human Urine and Blood. *Organohalogen Compounds*. 74: 76-79 (2012)