

平成 17 年度 修士論文

尿中 1-hydroxypyrene を用いた
多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の曝露源評価

新領域創成科学研究科 環境システムコース

環境健康システム学分野

46753 鈴木香織

指導教員 吉永淳

目 次

第1章 緒言	4
1.1 はじめに	5
1.2 多環芳香族炭化水素類（PAHs）について	8
1.2.1 物理学的・化学的性質	8
1.2.2 曝露経路と曝露源	10
1.2.2.1 経気道曝露	
1.2.2.2 経口曝露	
1.2.2.3 経皮曝露	
1.2.3 体内動態と代謝	11
1.2.4 毒性	13
1.2.4.1 急性毒性・短期毒性	
1.2.4.2 発ガン性	
1.2.4.3 生殖毒性・発達毒性	
1.3 バイオマーカー	16
1.4 日本における規制への取り組み	19
1.5 一般公衆における PAHs 曝露量の試算	20
1.5.1 大気からの PAHs 曝露量の試算	20
1.5.2 食事からの PAHs 曝露量の試算	21
1.6 本研究の目的	21
1.7 参考文献	22
第2章 尿中 1-OHP 排泄量の個人内変動及び個人間変動	26
2.1 緒言及び目的	27
2.2 調査方法	27
2.3 尿中 1-OHP 分析方法	27
2.3.1 測定方法	27
2.3.2 前処理方法	28
2.3.3 精度管理	29
2.4 結果及び考察	30
2.4.1 個人内変動	30
2.4.2 個人間変動	32
2.4.3 食事内容の尿中 1-OHP 排泄量への影響	32

2.5	結論	33
2.6	参考文献	34
第3章	PAHs 曝露の各経路寄与の重み付け	35
3.1	緒言及び目的	36
3.2	調査方法	36
3.2.1	24時間尿	37
3.2.2	個人曝露空気	37
3.2.3	食事	37
3.3	大気捕集試料中 PAHs 分析方法	37
3.3.1	測定方法	37
3.3.2	前処理方法	39
3.3.3	精度管理	39
3.4	陰膳試料中 PAHs 分析方法	40
3.4.1	測定方法	40
3.4.2	前処理方法	41
3.4.2.1	ASE抽出	41
3.4.2.2	酸処理	43
3.4.2.3	固相精製	43
3.4.3	精度管理	43
3.4.3.1	認証標準物質 SRM2977	44
3.5	結果及び考察	47
3.5.1	尿中 1-OHP 排泄量	47
3.5.2	大気からの PAHs 曝露量	48
3.5.2.1	大気中 PAHs 組成を利用した発生源解析	51
3.5.3	食事からの PAHs 曝露量	54
3.5.4	一般公衆における各経路からの PAHs 曝露量	58
3.5.5	統計学的解析	59
3.6	結論	63
3.7	参考文献	64
第4章	結言及び今後の展望	66
謝辞		67

Appendix

- A-1 行動記録表
- A-2 食事アンケート
- A-3 調査マニュアル
- A-4 調査アンケート
- A-5 クロマトグラム (1-OHP)
- A-6 クロマトグラム (PAHs-air ①)
- A-7 クロマトグラム (PAHs-air ②)
- A-8 クロマトグラム (PAHs-food ①)
- A-9 クロマトグラム (PAHs-food ②)
- A-10 アンケート集計結果
- A-11 各 PAHs 経気道曝露量の相関関係
- A-12 各 PAHs 経口曝露量の相関関係

第 1 章

緒

言

第1章 緒言

1.1 はじめに

あらゆる有機物の不完全燃焼によって発生する多環芳香族炭化水素類 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) は様々な環境媒体中に存在し、その一部は人に対して発ガン性がある環境汚染化学物質として各機関において位置づけられている (IARC, 1983; IRIS, 1998)。PAHs の発ガン性に関する最初の報告は、1775年にイギリスの Sir Percival Pott によるもので、煤を曝露した煙突清掃従事者に陰嚢ガンが生じているというものである (Pott., 1963)。発ガン性が懸念されている多くの PAHs の中でも Benzo(a)pyrene (B(a)P) は最も発ガン性が強い PAHs として広く認識されており、米国 EPA では B(a)P を含む 16 種類の PAHs を発ガン性及び環境中濃度の観点から環境汚染物質として指定されている。アメリカの毒性物質疾病登録機関 (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) は、公衆衛生に重大な影響を与える化学物質、あるいは有害廃棄物と確定された 275 種類の化学物質に優先順位を設けて 2 年毎に「有害物質優先リスト」を作成して公表している。この中で PAHs について、1995 年はランク外であったが、1997 年にはランク 10 に位置づけられており、近年 B(a)P など個々の PAHs の評価だけではなく PAHs を総合的に評価する必要性が重視されてきていることが伺える。さらに、1999 年以降徐々にその優先順位は上昇しており、2005 年にはランク 7 という非常に高い優先ランクに位置づけされている (ATSDR, 1995; ATSDR, 1997; ATSDR, 2005)。

Table 1-1 Priority list of hazardous substances.

rank	2005	1997	1995
1	Arsenic	Arsenic	Lead
2	Lead	Lead	Arsenic
3	Mercury	Mercury	Mercury
4	Vinyl Chloride	Vinyl Chloride	Vinyl Chloride
5	PCBs	Benzene	Benzene
6	Benzene	PCBs	PCBs
7	PAHs	Cadmium	Cadmium
8	Cadmium	B(a)P	B(a)P
9	B(a)P	B(b)F	Chloroform
10	B(b)F	PAHs	B(b)F

(ATSDR, 1995; 1997; 2005)

一方、日本における唯一の環境中の PAHs に関する取り組みは「大気汚染防止法」である (環境省, 1996)。この中では、低濃度であっても長期的な摂取により健康影響が生ずるおそれのある 234 種類の有害大気汚染物質が挙げられており、そのうち特に優先的に対策に取り組むべき物質 (優先取組物質) として B(a)P を含めた 22 種類の物質がリストアップされている。しかし、環境基準を設けた規制は特に行なわれておらず、自主的に排出を規制するに留まっている。

日本において高度経済成長期に急激に大気汚染への関心が高まったこともあり、PAHsの大気からの経気道曝露が注目され始め、1970年代を境として、燃料の良質化や燃焼装置の改良等に伴い大気中PAHs濃度が全国的に低下傾向にあり、1990年代以降1.0-2.0 ng/m³の範囲でほぼ底打ち状態であるということが報告されている（東京都環境科学研究所, 2001）（Fig. 1-1）。また、1970年以前は、工業地域と住宅地域でPAHs濃度に差が見られたが、その後地域差は小さくなり、この頃から固定発生源よりも移動発生源からの影響が強くなっていることも示唆されている（東京都環境科学研究所, 2001）。

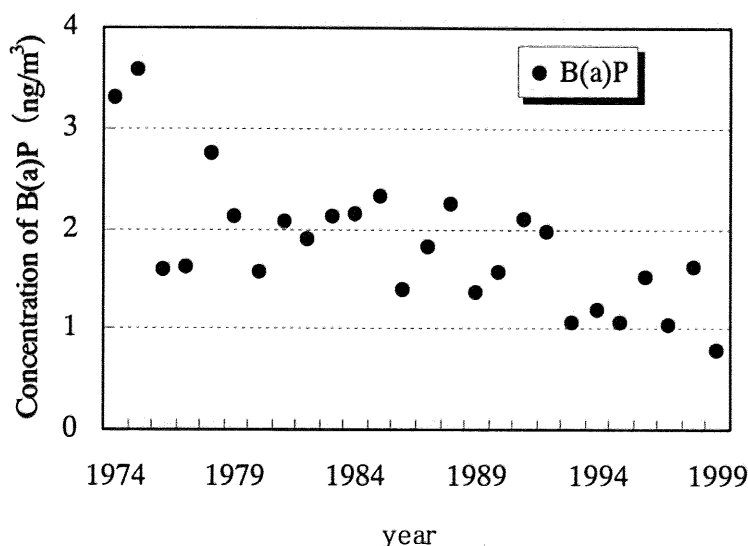


Fig. 1-1 Secular change of B(a)P air concentration.
（東京都環境科学研究所, 2001）

ところで一般にヒトへの化学物質曝露には経気道曝露と並んで経口曝露があるが、PAHsについては食物中濃度に関する情報が欠如しているため、日本人のPAHs経口曝露量についての知見がほとんど得られていないのが現状である。唯一公表されている1984年の尾花らの各食品群中B(a)P量データ（尾花ら, 1984）と国民栄養調査の結果から経口曝露量をかなり大まかに試算してみると、一般公衆の場合、食物からのB(a)P摂取量は約50~200 ng/dayとなり、大気中B(a)P濃度データ（Ohura et al., 2002）から経気道曝露量を試算すると、約10 ng/dayとなる。このように、経口曝露量の方が明らかに高い可能性があるにも関わらず、PAHsに関する研究や規制の取り組みは経気道曝露に集中している。

発ガンリスクの観点からB(a)Pについて、発ガンの評価指標であるOral Slope Factor (OSF) 7.3/mg/kg/day（U.S. EPA, 1987）を用いて、一般的に発ガン性物質の規制値を設ける際に目安とされる生涯発ガンリスク 10^{-5} を許容するリスクとした場合の実質安全用量（Virtually Safe Dose, VSD）を下式のように算出すると、68 ng/dayとなる。ちなみに、生涯発ガンリスク 10^{-5} というのは、日本の人口を1億3000万人として、その 10^{-5} 、すなわち10万分の1である1300人が一生涯のうちにガンになる確率を示しており、生涯発ガンリスクを 10^{-6} と想定した場合、VSDは6.8 ng/dayとなる。

$$\text{生涯発ガンリスク } 10^{-5} = \text{実質安全用量 (VSD)} \times 7.3/\text{mg/kg/day (OSF)} \div \text{体重 } 50 \text{ kg}$$

先に述べた食物からの経口曝露量試算値 50~200 ng/day と比較すると、 10^{-5} のときの VSD と同レベルもしくはそれ以上の B(a)P を日常の食事から摂取していることが懸念される。一方、今回行なった試算はあくまでも古いデータを用いた結果であり、試算方法自体も粗雑であることから、試算のみから食事の寄与を言及することは難しい。以上のことから、食物からの摂取も含めて総合的に PAHs の曝露評価を行なう必要がある。

PAHs の曝露研究において、PAHs の曝露量を反映するバイオマーカーとして pyrene の代謝産物である尿中 1-hydroxypyrene (1-OHP) が広く用いられてきている。尿中の 1-OHP は比較的、半減期が短いことや、尿中に高い割合で排泄されるという性質をもち、多くの PAHs 曝露研究にて PAHs 曝露が高い職業従事者は非職業従事者と比較して尿中 1-OHP 排泄量が有意に高いことが示されている (Jongeneelen et al., 1985; Tolos et al., 1990; Kim et al., 2001)。また、同様のことが喫煙者と非喫煙者についても報告されている。(Kim et al., 2001; Chetiyankornkul et al., 2002)。さらに尿中 1-OHP を定量する必要性の根拠の一つとして、PAHs の発ガン性は各 PAHs 親分子が有しているわけではないことが挙げられる。例えば発癌性の強い B(a)P の場合、DNA に変異を誘起して発ガンを引き起こすのは B(a)P 自身ではなく、酵素群により酸化されたジヒドロジオールエポキシド体であることから、各経路からの曝露量だけでなく、尿中 1-OHP は実際に体に取り込まれ、健康影響を引き起こす PAHs 用量の良い指標と考えられる。

そこで、本研究では、尿中 1-OHP 排泄量を体内へ取り込まれた総 PAHs レベルの指標として、一般公衆の PAHs 曝露における食物からの経口摂取と大気からの経気道摂取のどちらが、体内に取り込まれる PAHs レベルのより強い支配要因となるかを検討することを目的とした。

PAHs 曝露により強い寄与をもつ曝露経路が明確になることによって、今後 PAHs 曝露研究において方向性を定める手がかりになる。また、先にも述べたように世界的に食物に関する PAHs の規制はほとんど取り組まれていない中で、2004 年 EU が主に乳幼児の食品や魚介類、肉類、油脂食品や乾燥食品を対象として、各食品中 B(a)P の最大含有量の設定を行ないはじめている (EU, 2005)。今後日本においても、一般公衆が食事から摂取する PAHs 量に対して規制を設けるなどの際に、食物からの PAHs 曝露量に関する知見は重要な位置づけとなりうるだろう。

1.2 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) について

PAHs は、天然発生源としてバクテリアや藻類による生合成、人為的发生源としては、有機物の不完全燃焼により発生し、環境中の様々な媒体中に存在することが知られており、その一部は発ガン性を有することが多数報告されている。中でも B(a)P は最も発ガン性の高い PAH として位置づけられており、米国 EPA では発ガン性もしくは環境中濃度の観点から測定すべき環境汚染物質として 16 種類の PAHs を指定している。1.2 では PAHs の一般的性質や曝露、毒性などについて述べる。

1.2.1 物理学的・化学的性質

PAHs は 2 つ以上のベンゼン環が縮重して形成されており、Fig. 1-2 のように接合パターンが複数存在するため、環境中において相当数もの PAHs が確認されている。主な PAHs の物性を Table 1-2 に示した。環が 2~3 つの場合は比較的蒸気圧が低く気相における存在率が高く、4 環の場合は気相と固相の両方に存在し、5 環以上になると多くの場合が固相として存在するため (Advanced in Chemistry Series 217, 1988)、大気中に多くの PAHs は粒子に吸着した状態で存在している。Table 1-2 より、同じ環数の PAHs であっても物理学的または化学的性質は異なっており、1.2.4 で述べる毒性も接合パターンによって特異的となる。また、PAHs は水に非常に溶けにくく高い親油性を有している。例えば、Naphthalene など環数の小さい PAHs は約 30 mg/L の水溶性をもっており、分子量が高くなるに従って水溶性は低くなる性質をもっている (Auliffe, 1966)。

また、PAHs は OH ラジカル、オゾン、NO、NO₂、N₂O₅ などと光化学反応を起こす性質を持っており、大気中にて①反応性ラジカル、②潜在的毒性をもった中間酸化生成物、③酸化生成物を生成することが確認されている (Connell et al., 1984)。

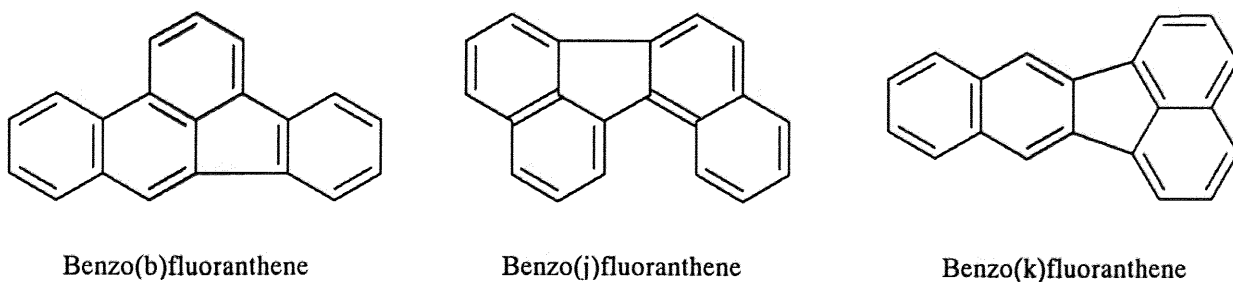
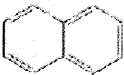
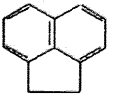
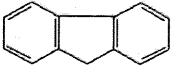
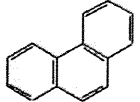
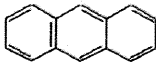
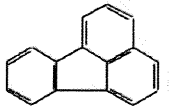
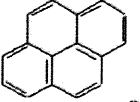
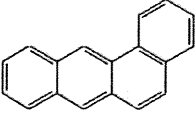
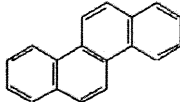
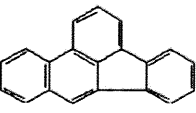
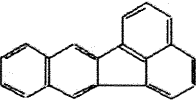
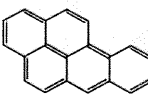
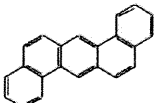
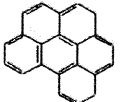
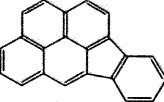


Fig. 1-2 Various five rings PAHs by fused pattern.

Table 1-2 Physical characteristics of main PAHs.

PAH	CAS No.	formula	structural formula	ring	M.W.	m.p. (°C)	b.p. (°C)
Naphthalene	91-20-3	C ₁₀ H ₈		2	128.17	81.0	218
Acenaphthene	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀		3	154.21	96.2	279
Fluorene	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀		3	166.22	115.0	295
Phenanthrene	203-80-5	C ₁₄ H ₁₀		3	178.23	100.5	338
Anthracene	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀		3	178.24	216.4	340
Fluoranthene	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀		4	202.26	108.8	363
Pyrene	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀		4	202.26	150.4	393
Benzo(a)anthracene	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂		4	228.29	160.7	425
Chrysene	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂		4	228.29	253.8	431
Benzo(b)fluoranthene	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂		5	252.32	167.0	480
Benzo(k)fluoranthene	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂		5	252.32	217.0	480
Benzo(a)pyrene	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂		5	252.32	178.1	496
Dibenzo(a,h)anthracene	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄		5	278.35	266.6	535
Benzo(g,h,i)perylene	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂		6	276.34	278.3	542
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	193-39-5	C ₂₀ H ₁₂		6	252.32	178.1	496

1.2.2 曝露経路及び曝露源

1.2.2.1 経気道曝露

一般公衆における PAHs の経気道曝露は、自動車の排気ガスや産業排気ガス等によって汚染された外気やその外気によって汚染された室内空気、化石燃料を利用している暖房器具から発生する煙、調理中の煙が主な曝露源である。大気中 PAHs 濃度は、夏よりも冬の方が高い傾向にあり、これは冬場の暖房器材の利用と空気の対流の安定化によって Fig. 1-3 のような逆転層が形成され、汚染物質が滞留することが影響している。また、喫煙によって発生する煙も経気道曝露量に大きく寄与している。特に受動喫煙の場合に取り込む副流煙は、比較的低温度における不完全燃焼によって発生する煙であるため主流煙よりも PAHs 含有量が高いことが知られており、発ガン性の高い B(a)P については副流煙の方が主流煙よりも 2~5 倍高い含有量であるということが報告されている（厚生労働省ホームページ）。また近年では、1日の大半を室内で過ごす上に感受性が高い小児や胎児を含めた妊婦の環境中タバコ煙（Environmental Tobacco Smoke, ETS）による健康影響が懸念されている。ETS とは、室内において喫煙者の吐き出す呼出煙とたばこの点火部から立ち上がる副流煙が交じり合った煙の総称である（健康ネット HP）。

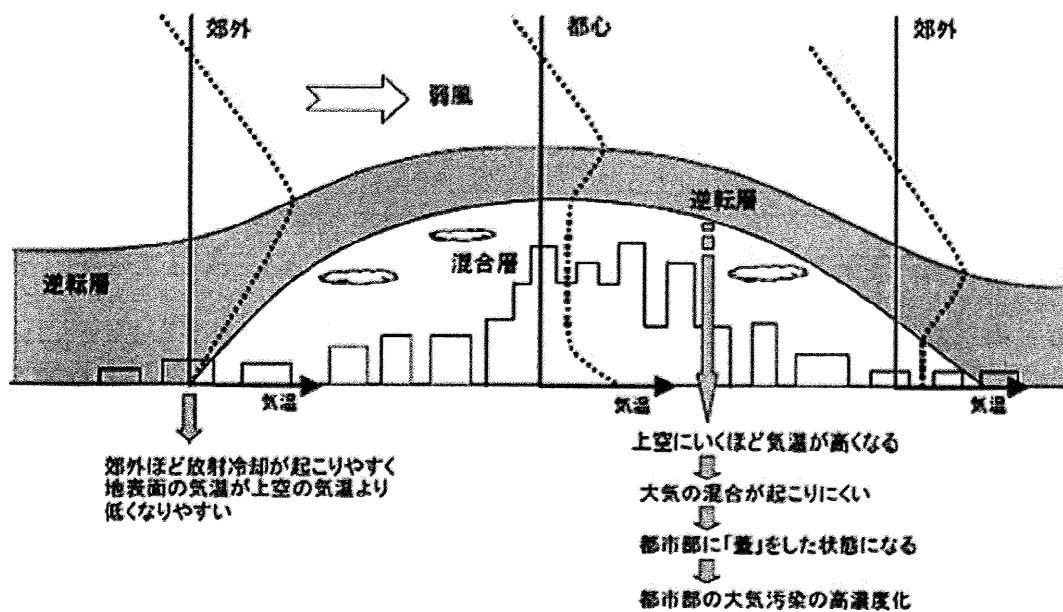


Fig. 1-3 The inversion layer in winter. (科学技術政策研究所 HP)

1.2.2.2 経口曝露

一般公衆の経口曝露の曝露源は主に食物であり、次いで室内環境中の埃や土壌及び母乳が挙げられる。PAHs を多く含む食物は、燻製製品や魚介類、油脂製品、焼きやフライなどの加工を施した食品である。燻製は、香りの良いサクラなどの木材を高温に熱した時に出る煙を食材に当てて風味付けをすると同時に、煙に含まれる殺菌・防腐成分を食材に浸透させる燻煙という食品加工技法で加工した食品である。木材を完全燃焼させるとあまり煙が出ないので、意図的に不完全燃焼の環境を作り多量の煙が出

るように工夫されているため、高濃度の PAHs を含む食品となる。また、魚介類は PAHs によって汚染された海水中から体内に取り込み蓄積しているため、これらの食品からも PAHs が検出される。また、同様に大気汚染レベルが高い地域で育成した野菜等からも PAHs が高濃度で検出されることがある。

また近年、室内環境中の埃や土壌を介した PAHs 曝露について少しずつ研究され始めている。日常の大半を室内で過ごす子供達にとって、埃や土壌を経口摂取することによる PAHs の経口曝露は重要な曝露経路であることが示唆されている (Wilson et al., 2003; Wilson et al., 2001; Chuang et al., 1999)。ドイツ連邦環境庁が唯一室内空気質についてガイドラインを設けており、室内のフローリングに使用されている接着剤が黒くなっている場合に B(a)P の分析を行い、B(a)P が 10 $\mu\text{g/g}$ 以上である場合はそれ以下に低減することを定めている (Heudorf et al., 2001)。

母乳は脂質に富んでおり、ダイオキシンと同様に PAHs も高濃度に含有している。Kishikawa らは、日本人の母乳中の B(a)P 濃度は $0.75 \pm 0.47 \mu\text{g/kg}$ であったと報告しており、母乳を介した乳幼児の PAHs 曝露にも焦点が当てられている (Kishikawa et al., 2003)。

1.2.2.3 経皮曝露

経皮曝露は主に職業曝露において起こる曝露であり、一般公衆ではほとんど確認されていない。経皮曝露が高いのは、コークス炉作業員やクレオソートを木材に注入する作業員であり、これらの作業員は総 PAHs 曝露量の内 95% までが皮膚から曝露している (ICPS, 1998)。

1.2.3 体内動態と代謝

PAHs はどの経路で投与しても全ての臓器に広く分布し、殆ど全ての内臓、特に脂質に富んだ臓器中に検出される。体内に取り込まれた PAHs は代謝により水溶性となり尿中及び糞中に排泄される。PAHs の代謝は複雑である、一般に母物質は酸化酵素であるチトクロム P-450 (cytochrome P450, CYP) によって中間体のエポキシドを経て、フェノール類、ジオール類、テトロール類になり、それらが硫酸、グルクロン酸またはグルタチオンにより抱合される。大部分の代謝は解毒であるが、PAHs の中には DNA アダクト、主としてジオールエポキシドに活性化され、腫瘍を誘発することが知られている。代表例として B(a)P の代謝を挙げる (Fig. 1-4)。

B(a)P はまずミクロソームの CYP により様々な部位の酸化体 (エポキサイド) が形成される。これらのエポキサイドは、フェノールに変換されたり、エポキサイドヒドロラーゼによりジヒドロジオールに変換されたり、グルタチオントランスフェラーゼによる抱合反応を受けたりする。6-OH-BaP はキノン体に変換される。また、3-OH-BaP から 3,6-キノン BaP が生成される。フェノール、キノン、ジヒドロジオールはグルクロン酸や硫酸抱合を受け、ヒドロキノンはグルタチオン抱合を受ける。B(a)P の究極発癌物質を生成する代謝経路は、7-8 部位の酸化から始まる。最初に CYP により BaP-7,8-エポキサイド、続いてエポキサイドヒドロラーゼにより BaP-7,8-ジヒドロジオール、さらに 9,10-エポキサイド化し、BaP-7,8-ジヒドロジオール-9,10-エポキサイドが生成する。この湾領域 (3つのベンゼン環が角度を持って配列した湾型の構造) のジオールエポキサイドが最も反応性に富んでおり、この構造と毒性との関連性については 1.2.4 で詳しく述べる (日本公衆衛生協会, 2003)。

1.2.4 毒性

1.2.4.1 急性毒性・短期毒性

ほとんどの PAHs の急性毒性についてはあまり研究が行なわれておらず、Naphthalene のみ特性が明らかにされており、マウス及びラットに対する LD₅₀ は 350 - 9500 mg/kg b.w. とされている (IPCS, 1998)。また、PAHs に関する短期毒性の研究一覧を Table 1-3 に示した。

Table 1-3 Short-term toxicity of PAHs based on animal studies.

Compound	Species	Duration	Critical effect	NOAEL	Reference
Acenaphthene	mouse	90 days	liver toxicity	175 mg/kg bw	US EPA, 1989a
Anthracene	mouse	90 days	none	1000 mg/kg bw (highest dose)	US EPA, 1989b
Benzo(a)pyrene	rat	90 days	liver weight	3 mg/kg bw	Kroese et al., 2001
Fluoranthene	mouse	13 weeks	liver/kidney toxicity	125 mg/kg bw	US EPA, 1988
Fluorene	mouse	13 weeks	organ weight, haematology	125 mg/kg bw	US EPA, 1989c
Naphthalene	mouse	90 days	none	53 mg/kg bw	Shopp et al., 1984
"	rat	13 weeks	body weight, nephropathy	100 mg/kg bw (71 mg/kg bw adjusted)	BCL, 1980
"	rat	11 weeks	liver/kidney toxicity	150 mg/kg bww (LOAEL, only one dose level)	Kawai, 1979
"	rabbit	4-13 weeks	cataract	500 mg/kg bw (LOAEL)	Wells et al., 1989
Pyrene	mouse	13 weeks	kidney toxicity	75 mg/kg bw	US EPA, 1989d

1.2.4.2 発ガン性

PAHs の主な毒性は発ガン性であり、これまで多くの研究がされてきており、主な発ガン部位としては、肺、胃、食道、胸部、膀胱、結腸直腸、膀胱、皮膚、前立腺、子宮頸部が挙げられている。Dai et al. は乳がんのリスクと強度のフライ調理を施した赤身肉の消費との関連を疫学調査により明らかにしている (Dai et al., 2001)。PAHs の発ガン性に関する最初の報告は、1775 年にイギリスの Sir Percival Pott によるもので、煤を曝露した煙突清掃従事者に陰嚢ガンが生じているというものである (Pott., 1963)。各機関による PAHs の発ガン性評価を Table 1-4 に示した。

PAHsの発ガン性は1.2.3で述べたような代謝行程を経て発揮され、さらにベンゼン環がFig. 1-5のように湾(Bay)型もしくはフィヨルド(Fjord)型の場合に毒性が高くなることが報告されている(Cooper et al., 1994)。

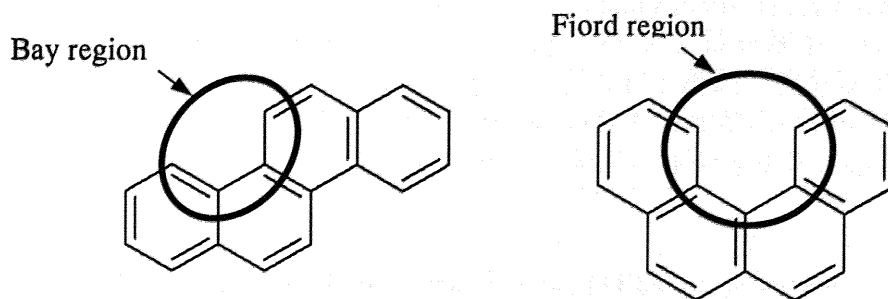


Fig. 1-5 Specific structure, bay- and fjord region.

Table 1-4 Evaluations of genotoxicity and carcinogenicity.

PAHs	IARC ^a	IPCS ^b	EC ^c	EC ^d
Naphthalene		questionable		probably not genotoxic
Acenaphthene		questionable		inadequate data
Fluorene		negative		inadequate data
Phenanthrene	3	questionable		equivocal
Anthracene		negative		not genotoxic
Fluoranthene		positive ?		equivocal
Pyrene	3	questionable		not genotoxic
Benzo(a)anthracene	2A	positive	cat. 2	genotoxic
Chrysene	3	positive	cat. 2	genotoxic
Benzo(b)fluoranthene	2B	positive	cat. 2	genotoxic
Benzo(k)fluoranthene	2B	positive	cat. 2	genotoxic
Benzo(a)pyrene	2A	positive	cat. 2	genotoxic
Dibenzo(a,h)anthracene	2B	positive	cat. 2	genotoxic
Benzo(g,h,i)perylene	3	negative ?		genotoxic
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	2B	positive		genotoxic

^a IARC, 1987; ^b IPCS, 1998; ^c EC, 2001; ^d EC, 2002

Table 1-4 に示したように、PAHs によってその発ガン性や遺伝子の変異原性は異なっており、リスクアセスメントにおいて発ガン性を数値的に評価することを目的として、ダイオキシン類で用いられている毒性等価係数 (Toxicity Equivalency Factor, TEF) が PAHs にも適用されている。PAHs の場合は、B(a)P の発ガン性を基準とした重み付けが行なわれており、研究グループによってその評価は若干異なる部分はあるが、評価の一部を Table 1-5 に示した。主に高分子な PAHs の発ガン性が高い傾向にあり、Dibenzo(g,h,i)perylene については B(a)P よりも高い発ガン性を有するとの評価がなされている。

Table 1-5 Toxicity Equivalency Factors (TEFs) proposed for individual PAHs.

References	TEFs		
	Nisbet et al., 1992	Larsen et al., 1998	U. S. EPA, 1984
Acenaphthene	0.001	-	0
Fluorene	0.001	-	0
Phenanthrene	0.001	0.0005	0
Anthracene	0.01	0.0005	0
Fluoranthene	0.001	0.05	0
Pyrene	0.001	0.001	0
Benzo(a)anthracene	0	0.005	1
Chrysene	0.01	0.03	1
Benzo(b)fluoranthene	0.1	0.1	1
Benzo(k)fluoranthene	0.1	0.05	1
Benzo(a)pyrene	1	1	1
Dibenzo(a,h)anthracene	5	1.1	1
Benzo(g,h,i)perylene	0.01	0.02	0
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.1	-	1

1.2.4.3 生殖毒性・発達毒性

近年、B(a)P が内分泌攪乱物質として注目されており、環境省は内分泌攪乱作用を有する疑いのある物質の1つとして B(a)P を挙げ環境調査が実施されている。B(a)P の生殖毒性に関する動物実験がいくつか行なわれており、マウスでは 10、40、160 mg/kg を妊娠 7-16 日の 10 日間経口投与により、160 mg/kg で妊娠率の低下及び生存出生児数の減少が見られたが、奇形の出現はなかったと報告されている。なお、母マウスには毒性兆候は見られなかった。また、10 mg/kg 以上で受精率及び産児数低下などの生殖障害がみられ、精巣重量減少、精細管の萎縮、精子細胞の無形成、卵巣組織の低形成及び卵胞、黄体の減少が観察された。さらに、100-150 mg/kg を妊娠中及び妊娠後期に投与すると出生児の免疫機能が低下し、ラットでは、10、40、160 mg/kg の妊娠期間中経口投与により出生児に低体重が認められている (ATSDR, 1990; ACGIH, 1991)。

人についても PAHs 曝露による発達影響がいくつか報告されている。妊娠中の女性が自動車排ガスや ETS によって PAHs を曝露することによる、胎児の出生前曝露とそ

れによる影響が近年懸念されてきている。Pereraらの妊娠中の非喫煙女性を対象とした研究によると、出生前に高いPAHs曝露を受けた新生児の体重、頭囲は曝露レベルの低い群と比較して有意に小さかったと報告しており、その後の研究では妊婦のETSレベルと新生児の頭囲とに負の相関が検出されている（Perera et al., 2003; Perera et al., 2004）。また、Bocskayらは大気中PAHs濃度が臍帯血中の染色体異常数と有意な関連があることを報告している（Bocskay et al., 2005）。その他にも新生児の気管支症状の発症とPAHsの胎児期曝露との関連性が報告されている（Jedrychowski et al., 2005）。これらの既存の研究から、PAHsの胎児期曝露は出生時の正常な発育に負の影響を与えたり、遺伝子的な障害を与える恐れが考えられる。

1.3 バイオマーカー

化学物質の曝露評価法の1つにバイオマーカーを用いた方法があり、様々な化学物質曝露について用いられている。バイオマーカー法の利点は、環境濃度から曝露濃度（Exposure concentration）を評価する個人曝露評価とは異なり、Internal doseを評価することができる点である。Fig. 1-6に示したように、実際に人の体に悪影響を与える用量は曝露量よりも低く、より影響を考慮した曝露評価を行なうためには図中のtarget doseに近い用量を評価する必要がある。しかし、target doseを評価するためには多くの場合、人の臓器等を取り扱う必要があり侵襲性が高く現実的ではない。そのため、よりの確な評価手法として尿等の非侵襲的なバイオマーカーを用いた曝露評価が広く用いられている。

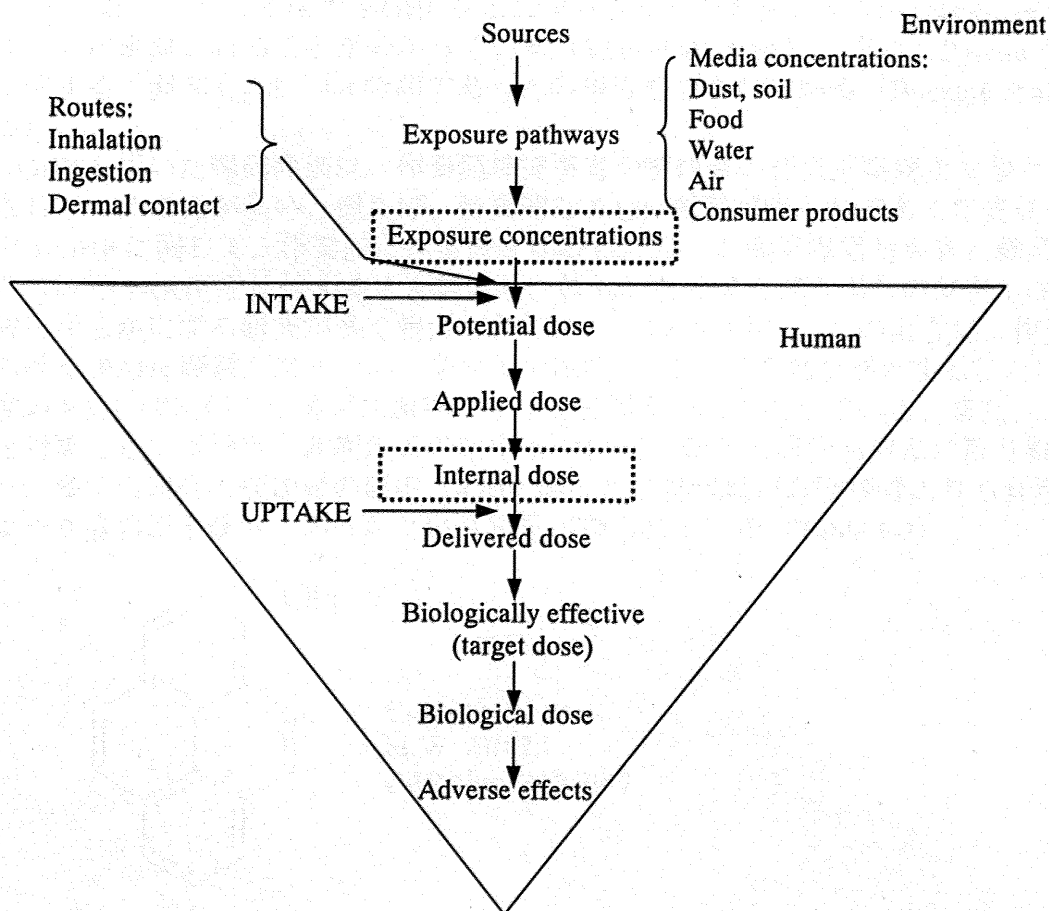


Fig. 1-6 Basic concept of relationship between dose (IPCS, 1999)

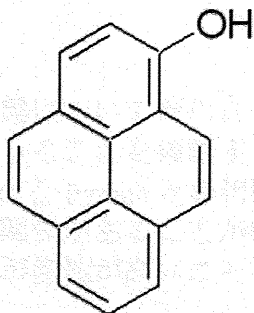
PAHs 曝露評価のバイオマーカーとして要求されることについて以下に示した (Jacob et al., 2002)。

1. 定量に信頼性や再現性がある
2. 尿中濃度が 1-10 ng/L 以上あり、分析感度が 100-200 mL の尿試料に対して十分適用可能である
3. 代謝物の大部分が糞中よりも尿中に排泄される
4. できるだけ多種類の代謝物を定量する
5. 指標として用いる PAHs はすべての排出源の主な組成であり、排出源によって組成がかなり異なる場合は 1 つ以上の PAHs やその代謝物を選択する

PAHs 曝露を反映するいくつかのバイオマーカーの内、Pyrene の代謝物である尿中 1-OHP は上記の必要項目の 1、2、5 を満たしており、PAHs 曝露評価において頻繁にバイオマーカーとして用いられている (Fig. 1-7)。

バイオマーカーを用いて曝露評価を行なう際に考慮すべき点として、生体試料のサンプリング時期が挙げられる。バイオマーカーがどの時点における曝露を反映しているかということが重要であり、尿中 1-OHP に関しても Pyrene の代謝速度を考慮したサンプリング計画が必要である。Pyrene の代謝速度について、経気道曝露と経口曝露それぞれ研究がなされている。経気道曝露における尿中 1-OHP の半減期は、主に作業従事者を対象として尿中 1-OHP をモニタリングし、モデル式を用いて求められている。Jongeneelen らは、尿中 1-OHP の半減期 $t_{1/2}$ を 6-35 時間と報告しており、P. L. Lu らは 18 時間と報告している (Jongeneelen., 1990; Lu et al., 2002)。一方、経口曝露については、特異的な曝露がない一般公衆を対象とした Pyrene の投与研究が報告されており、500 μg を経口投与して尿中 1-OHP をモニタリングした結果、48 時間以内に尿中に平均 3.67% が排泄されることが分かっている (Viau et al., 1995)。また、Pyrene の経口曝露に関する半減期 $t_{1/2}$ は、4.4 時間であるとの報告もなされている (Buckley et al., 1992)。

1-OHP を用いた曝露評価は、作業環境従事者や喫煙者の経気道曝露を対象として適用されていることが多い。例えば、特異的な PAHs 曝露が明らかである作業従事者の尿中 1-OHP に関して、作業前と作業後を比較したり、非職業曝露対象者と職業曝露対象者の尿中 1-OHP を比較することにより、特異的な曝露を伴う場合の尿中 1-OHP への影響を明らかにする研究が多く報告されてきた (Table 1-6)。このように、作業環境における PAHs 曝露があるという条件下で尿中 1-OHP の変動を調査することによって、強度の PAHs 曝露に伴う作業が代謝物に与える影響を明らかにしている。また、一般公衆を対象として喫煙者と非喫煙者の尿中 1-OHP を比較する研究も盛んに取り組みされており、多くの研究で喫煙者の尿中 1-OHP 濃度及び排泄量が非喫煙者よりも有意に高く、およそ 2 倍の尿中濃度であったという知見が得られている (Table 1-7)。



$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$
 M.W. 218.25
 CAS No. 5315-79-7

Fig. 1-7 Structure of 1-OHP.

Table 1-6 Existing study of occupational exposure to PAHs based on level of 1-OHP in urine.

Subjects	No. of subjects	μ g 1-OHP/ g creatinine	μ g 1-OHP/L	Reference
<i>Electrode paste plant</i>				Bentsen - Farmen et al., 1999
Pre-shift	17	7.5 \pm 6.2		
Post-shift	17	19.7 \pm 12.8		
<i>Road paving</i>				Knecht., 1989
Pre-shift	15		0.4-10.9	
Post-shift	15		5.3-92.1	
<i>Ashphalt pavers</i>				Jongeneelen et al., 1988
Pre-shift	43	2.6		
Post-shift	43	3.4		
<i>Aluminum plant workers</i>				Tolos et al., 1990
Pre-shift	55	0.83-1.5		
Post-shift	55	3.7-7.0		

Table 1-7 Existing study of Urinary 1-OHP level of tobacco smokers.

Reference	Smoker (μ g 1-OHP/g creatinine)	Non-smoker (μ g 1-OHP/g creatinine)
Chetiyankornkul et al., 2002	0.12 \pm 0.042 (n=5)	0.044 \pm 0.054 (n=9)
Kim et al., 2001	0.097 \pm 0.077 (n=67)	0.058 \pm 0.039 (n=62)
Scherer et al., 2000	0.23 \pm 0.032 (n=27)	0.114 \pm 0.013 (n=23)
Jongeneelen et al., 1990	0.077-2.40 (n=28)	0.019-1.80 (n=14)

経口曝露について適用させている研究例は少ない。尿中 1-OHP が PAHs の経口曝露を反映していることを確認するために、既存の文献値 (Falco et al., 2003) を元に各食品群中 PAHs と Pyrene との相関関係を Table 1-8 に示した。ほとんどの PAHs で Pyrene と強い相関関係があることが分かり、食品からの PAHs 曝露量は尿中 1-OHP 排泄量に反映される可能性が高いことを表している。

元にした Falco らのデータはあくまでも未調理の食品中の PAHs 濃度であり、実際の食事では加熱等の調理行程が施された食品を含むため同じような相関関係があるかは定かではない。Table 1-8 で示したように各 PAHs で Pyrene と高い相関関係が見られたのは、本章の 1.2.2.2 で述べたように植物中に含まれる PAHs は汚染大気由来であり、魚介類等は汚染された海水から取り込まれたものであるため、もしそれらの大気及び海水の汚染源が大気粉塵で、さらに汚染物質の主な発生源が自動車の排気ガスであるとすれば、野菜類と魚介類中の PAHs 間に相関関係があることに説明がつく。

Table 1-8 Correlations between concentrations of pyrene and other PAHs in some food groups.

PAHs	<i>r</i>	PAHs	<i>r</i>
Naphthalene	0.86	Chrysene	0.92
Acenaphthylene	0.70	B(b)F	0.72
Acenaphthene	0.76	B(k)F	0.78
Fluorene	0.75	B(a)P	0.69
Phenanthrene	0.89	Db(ah)A	0.70
Anthracene	0.85	B(ghi)P	0.79
Fluoranthene	0.93	IP	0.73
Pyrene	1.00	Total PAHs	0.97
B(a)A	0.90		

1.4 日本における規制への取り組み

日本において、環境中の PAHs を規制する取り組みは数少ないのが現状である。唯一、「大気汚染防止法」において、低濃度であっても長期的な摂取により健康影響が生ずるおそれのある 234 種類の有害大気汚染物質が挙げられており、そのうち特に優先的に対策に取り組むべき物質（優先取組物質）として B(a)P を含めた 22 種類の物質がリストアップされている。しかし、環境基準を設けた規制は特に行なわれておらず、自主的に排出を規制するに留まっている。

また、食品中の PAHs に関しては日本においては全く触れられておらず、今後の見通しとしても規制等の動きは見られない。世界の動向としては 2004 年 EU（欧州連合）が、油脂を含む食品やスモークもしくは乾燥行程を経て生産される食品について PAHs、特に B(a)P の食品中最大量を定めることを提案している（EU, 2005）。実際に適用された食品は、乳幼児用食品・ベビーフード・乳児用ミルク・乳児用医療食、スモークした肉及び魚、スモークしていない魚、スモークしていない甲殻類・頭足類、二枚貝であり、Table 1-9 に示したこれらの規制数値は、EU がまとめた PAHs のリスクアセスメントを参考にして定められている（EU, 2002）。

Table 1-9 EU regulations for B(a)P level in foods. (EU, 2005)

Products	Maximum level (ug/kg wet weight)
Oils and fats intended for direct human consumption or use as an ingredient in foods	2.0
Foods for infants and young children	1.0
Smoked meats and smoked meat products	5.0
Muscle meat of smoked fish and smoked fishery products, excluding bivalve molluscs	5.0
Crustaceans, cephalopods, other than smoked	5.0
Bivalve molluscs	10.0

1.5 一般公衆における PAHs 曝露量の試算

1.5.1 大気からの曝露量

一般公衆において、経気道曝露量に大きな影響を与える因子は、自動車の排ガスやタバコの煙が主であると言われている。特に日本の一般公衆を対象とした PAHs 曝露研究では、喫煙者を対象とすることが多く、非喫煙者の PAHs 経気道曝露については大きく取り上げられることは少ない。しかし、ディーゼル車規制やダイオキシン類対策が実施された結果、一般公衆、特に非喫煙者の空気を介した PAHs 曝露がどの程度低減されたのかということ把握することは重要であると考えられる。そこで、近年の大気中 PAHs 濃度から PAHs の経気道曝露量を算出し、その結果を Table 1-10 に示した。試算の方法は室内及び室外中の各 PAHs 濃度測定データ (Ohura et al., 2002) に呼吸量 15 m³ を乗じて算出し、試算は US EPA にて指定されている 16 種類の PAHs を対象とした。また、NHK の生活時間調査より 1 日を室内にて 90% 過ごすことを仮定して試算を行なった。

経気道曝露量 =

$$(\text{室内中 PAHs 濃度}^a \times 9/10 + \text{室外中 PAHs 濃度}^a \times 1/10) \times \text{呼吸量 } 15 \text{ m}^3/\text{day}$$

・・・式 1

^a Ohura et al., 2002

1.5.2 食品からの曝露量

日本の食文化に焦点を当てると、焼魚や燻製など PAHs と関連が深いと考えられる食事がいくつか挙げられるため、日本人の食事からの PAHs 摂取量は他国と少し異なる可能性が考えられる。食事からの PAHs 曝露量を試算は、各食品群中 PAHs 含有量 (Falco et al., 2003 ; 尾花ら, 1984) に国民栄養調査 (厚生労働省) から得られる各食品群の平均摂取量を乗じて算出した。

$$\text{経口曝露量} = \sum \text{食品群 PAHs 含有量}^{a,b} \times \text{食品摂取量}^c \dots \text{式 2}$$

^a 尾花ら, 1984

^b Falco et al., 2003

^c 国民栄養調査, 2002

Table 1-10 The estimations of intake levels via each exposure routes.

	via air (ng/day)	via diet ^a (ng/day)	via diet ^b (ng/day)
Naphthalene	43500	-	331
Acenaphthene	345	-	27
Fluorene	315	-	98
Phenanthrene	615	-	845
Anthracene	24	148	42
Fluoranthene	98	-	356
Pyrene	78	620	433
Benzo(a)anthracene	2	61	118
Chrysene	6	-	245
Benzo(b)fluoranthene	9	103	89
Benzo(k)fluoranthene	3	39	40
Benzo(a)pyrene	5	50	47
Dibenzo(a,h)anthracene	1	-	20
Benzo(g,h,i)perylene	9	70	66
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	9	-	19

^a Calculated from Obana et al., 1984 (in Japan)

^b Calculated from Falco et al., 2003 (in Italy)

1.6 本研究の目的

1.5 の試算結果より、一般公衆の非喫煙者の PAHs 曝露量は食事からの方が空気からの摂取量を大きく上回り、さらに 10^{-5} の時の VSD と同じレベルもしくはその数倍もの B(a)P を食事から曝露している可能性がある。また、燃料の良質化や燃料装置の改良等に伴い、大気中 PAHs 濃度が低下傾向にある可能性があるにも関わらず、日本における PAHs 曝露研究は大気からの曝露に注目した研究が多くを占めており、食事に焦点を当てた研究への取り組みは極めて浅いのが現状である。本研究では、PAHs の曝露指標として広く用いられている Pyrene の代謝物 1-OHP 排泄量をもとに、一般公衆の PAHs 曝露における大気と食事の寄与割合を明らかにすることを目的とした。

1.7 参考文献

尾花裕孝ら, “食品経路による多環芳香族炭化水素の摂取量について”, 食品衛生学雑誌, 25 (1), 35-40, 1984.

環境省, 大気汚染防止法 (昭和 43 年 6 月 10 日法律第 97 号), 1968.

環境省, 大気汚染防止法 (改訂), 1996.

環境化学物質の代謝とその周辺, 日本公衆衛生協会, 2003.

健康ネット, たばこと健康; <http://www.health-net.or.jp/>.

厚生労働省, 平成 14 年度国民栄養調査、健康栄養情報基盤データベースシステム HP ;
http://nihn-jst.nih.go.jp:8888/nns/owa/nns_main.hm01.

厚生労働省ホームページ, 分煙効果判定基準策定検討会報告書概要;
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/06/h0607-3.html>.

浮遊粒子状物質等測定データ集, 東京都環境科学研究所, 2001.

山本桂香, “科学技術動向レポート: 都市におけるヒートアイランド現象の緩和対策”, 科学技術政策研究所, 2005;
http://www.nistep.go.jp/achiev/ftx/jpn/stfc/stt054j/0509_03_feature_articles/200509_fa02/200509_fa02.html.

ACGHI, Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, American Conference of Industrial Hygienists, 1991.

ATSDR, 1995 CERCLA Priority List of Hazardous Substances, The Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995.

ATSDR, 1997 CERCLA Priority List of Hazardous Substances, The Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997.

ATSDR, 2005 CERCLA Priority List of Hazardous Substances, The Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005.

ATSDR, Draft Toxicological Profile for Benzo(a)pyrene, The Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990.

BCL, 1980. Unpublished subchronic toxicity study: Naphthalene (C52904), Fisher 344 rats. By Bartelle Columbus Laboratories (cited in IRIS, 2002).

C. S. Cooper et al., Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I, Chapter 9; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Metabolism, Activation and Tumour Initiation, 327-372, 1994.

C. Viau et al., “Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route”, 163, 179-186, 1995.

D. W. Connell et al., "Chemistry and Ecotoxicology of Pollution", Wiley interscience, 236, 1984.

EU, amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons, Official J. EU, 2005.

EU, Commission Regulation (EC) No 208/2005, Official J. EU, 2005.

EU, European Commission, "Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food", 2002.

F. J. Jongeneelen et al., "1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 57, 47-55, 1985.

F. J. Jongeneelen et al., "Ambient and biological monitoring of cokeoven workers: determinants of the internal dose of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Br. J. Ind. Med.*, 47, 454-461, 1990.

F. P. Perera et al., "Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population", *Environ. Health Perspect.*, 111, 201-205, 2003.

F. P. Perera et al., "Molecular evidence of an interaction between prenatal environmental exposures and birth outcomes in a multiethnic population", *Environ. Health Perspect.*, 112, 626-630, 2004.

G. Falco et al., "Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain", *J. Food Protection*, 66 (12), 2325-2331, 2003.

G. M. Shopp et al., "Naphthalene toxicity in CD-1 mice: General toxicology and immunotoxicology", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 4, 406-419, 1984.

G. Scherer et al., "Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons", *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9, 373-380, 2000.

H. Kim et al., "Urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations in male Koreans", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 74, 59-62, 2001.

IARC, IARC Monographs in the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, Vol. 32, Lyon, France, 1983.

I. C. T. Nisbet et al., "Toxic Equivalency Factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)", *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 16, 290-300, 1992.

IPCS, "Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons", Environmental Health Criteria 202, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, 1998.

IPCS, "Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals", International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 210, World Health Organization, Geneva, 1999.

- J. C. Chuang et al., " Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of children in low-income families", *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 9, 85-98, 1999.
- K. A. Bocskay et al., " Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14, 506-511, 2005.
- Kroese et al., " Tumourigenic effects in Wistar rats orally administered benzo(a)pyrene for two years (gavage studies). Implications for human cancer risks associated with oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons", National Institute of Public Health and the Environment, RIVM Report no. 658603 010, 2001.
- M. D. Guillen et al., " Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods.", In *Food safety: Contaminants and toxins*, ed. J. P. F. D' Mello, 175-197. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- M. Kawai, " Review of toxicological and occupational aspects of naphthalene", *Aromatics*, 31, 168-181, 1979.
- N. Kishikawa et al., " Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk sample by high-performance liquid chromatography with fluorescence", *J. Chromatogr. B*, 798, 257-264, 2003.
- N. K. Wilson et al., " Aggregate exposure of nine preschool children to persistent organic pollutants at day care and at home", *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 13, 187-202, 2003.
- N. K. Wilson et al., " Levels of persistent organic pollutants in several child day care centers", *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 11, 449-458, 2001.
- P. G. Wells et al., " In vivo murine studies on the biochemical mechanism of naphthalene cataractogenesis", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 99, 466-473, 1989.
- P. L. Lu et al., " Urinary 1-hydroxypyrene levels in workers exposed to coke oven emissions at various locations in a coke oven plant", *57 (3)*, 255-261, 2002.
- Pott P., "Chirurgical observations. Reproduced in ", *National Cancer Inst. Monogr.*, 7-13, 1963.
- Q. Dai et al., " Consumption of animal foods and cooking oils, method of meat preparation, and risk of breast cancers", *Pro. Am. Assoc. Cancer Res.*, 42, 765-, 2001
- T. Chetianukornkul et al., " Determination of 1-hydroxypyrene in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a deuterated internal standard", *J. Chrom. A*, 961, 107-112, 2002.
- T. J. Buckley et al., " An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene", *49*, 113-124, 1992.
- T. Ohura et al., " Simultaneous liquid chromatographic determination of 39 polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor and outdoor air and application to a survey on indoor air pollution in Fuji, Japan", *J. AOAC Int.*, 85 (1), 188-202, 2002.
- U. Heudorf et al., " Internal exposure to PAHs of children and adults living in homes with

parquet flooring containing high levels of PAHs in the parquet glue”, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 74, 91-101, 2001.

U.S. EPA, “Health Assessment for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)”, EPA 540/1-86-013, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH, 1984.

U.S. EPA, IRIS, Integrated Risk Information System, Benzo (a) pyrene CASRN 50-32-8, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, 1987.

U.S. EPA, “13-Week mouse oral subchronic toxicity study (fluoranthene). TRL Study No. 042-0088”, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, 104, 1987.

U.S. EPA, “Mouse oral subchronic toxicity study with acenaphthene”, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 89, 1989a.

U.S. EPA, “Subchronic toxicity in mice with anthracene: Final report. HLA Study No. 2399-131”, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 465, 1989b.

U.S. EPA, “Mouse oral subchronic toxicity study (fluorene). TRL Study No. 042010”, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 38, 1989c.

U.S. EPA, “Mouse oral subchronic toxicity of pyrene. TRL Study No. 042-012”, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 102, 1989d.

W. Jedrychowski et al., “Prenatal ambient air exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and the occurrence of respiratory symptoms over the first year of life”, *Euro. J. Epidemiol.*, 20, 775-782, 2005.

W. P. Tolos et al., “1-Pyrenol: a biomarker for occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons”, *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 5, 303-309, 1990.

第2章

尿中 1-OHP 排泄量の 個人内変動及び個人間変動

第2章 尿中 1-OHP 排泄量の個人内変動及び個人間変動

2.1 緒言及び目的

PAHs の特異的な曝露がない一般公衆かつ非喫煙者について、尿中 1-OHP 排泄量の変動に焦点を当てている研究はなく、ラットを対象として各種水酸化代謝物を測定した研究では、尿中 1-OHP 排泄量の個体内変動は 2-11% という結果が得られている (Elovaara et al., 2003)。もし、尿中 1-OHP 排泄量に個人間変動 (個人差) もしくは個人内変動 (日間変動) がないとすれば、尿中 1-OHP 排泄量に影響する因子は個人もしくは日によって状況が変動する空気でも食事でもなく、例えば個人の代謝能力の差が影響している等の可能性が高くなり、尿中 1-OHP 排泄量により支配的に影響する曝露経路を推測することは困難となってしまふ。そのため、尿中 1-OHP 排泄量から食事と空気の寄与割合を推測するためには、一般公衆において生活場所や食生活など生活環境のわずかな違いによって尿中 1-OHP 排泄量に個人差もしくは個人内変動がありうるということを確認することが重要である。そこで本章では、PAHs の曝露経路の重み付けを目的とした研究の予備的な調査として、1 日尿中 1-OHP 排泄量の個人内変動及び個人間変動を検討した。

2.2 調査方法

首都圏在住の非喫煙女子学生 (平均±SD 23±2 歳) 5 名を対象として、2005 年 4 月から 5 月の間で平日連続 5 日間の 24 時間尿を採取し各人の尿中 1-OHP 排泄量を測定した。24 時間尿は採尿当日の 2 番尿から翌日の早朝までとし、ポリエチレン製 500 mL ボトル及びポリプロピレン製 2 L ボトルに蓄尿して、ポリプロピレン製 15 mL 遠沈管に分注後 -20℃ にて分析時まで冷凍保存した。また、調査期間中の行動記録 (A-1) 及び食事アンケート (A-2) も併せて依頼した。尚、空気からの PAHs 曝露をある程度コントロールするために、対象者には毎日の生活パターン (例: 学校に 12 時間、家に 8 時間) をほぼ均一にするよう依頼した。これは、毎日の空気からの PAHs 曝露がある程度一定であると仮定することで、食物の寄与をおおよそ見積もることを意図して行った。

また、対象者 1 名のみに対して期間を分けて同様の調査を 2 回実施し、尿中 1-OHP 排泄量の変動に影響があるかを調査した。

2.3 尿中 1-OHP 分析方法の検討

2.3.1 測定方法

1-OHP の測定は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 蛍光検出器を用いて行った。HPLC システムは HITACHI の LaChrom Elite システムを使用し、L-2130 形低圧ポンプ、L-2480 形蛍光検出器、D-2500 形日立クロマトデータ処理装

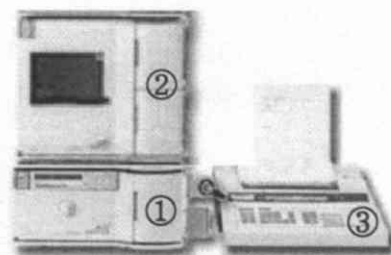


Fig.2-1 System of HPLC-FL

- ① L-2130 Pump
- ② L-2480 Fluorescence Detector
- ③ D-2500 Data

置から構成されている (Fig.2-1)。カラムは Waters PAH C18 カラム (4.6 mm ϕ \times 250 mm, 5 μ m, Waters) を使い、移動相はメタノールと水を 70 : 30 (v/v) で混合した溶媒を流速 1.0 mL/min で流した。また、1-OHP の検出波長は励起波長 λ_{ex} を 388 nm、蛍光波長 λ_{em} を 244 nm とした。試料の導入には、マニュアルサンプルインジェクター (rheodyne 社) を使用しマイクロシリンジでサンプルを 10 μ L 注入して測定を行なった。1-OHP のクロマトグラムを A-5 に示した。

2.3.2 前処理方法

尿 10 mL を酢酸ナトリウム緩衝溶液 20 mL で希釈し β -glucuronidase/aryl sulfatase (type H-2:from *Helix pomatia* : glucuronidase activity 100,000 units/mL and arylsulfatase activity 7,500 units/mL, Sigma) を 15 μ L 加え 37°C で 2 時間インキュベートし抱合体の加水分解処理を行なった。Sep-Pak C18 カラム (Waters 社) の準備として、メタノール (HPLC 用 >99.7%、関東化学株式会社) 5 mL と精製水 10 mL を順に流し、試料溶液をおよそ 10 mL/min の速さで通液した。メタノール : 水 = 40 : 60 (v/v) の混合溶液を流して洗浄しメタノール 10 mL で溶出させた。溶出した溶液を窒素気流下で乾固させ、メタノール 1 mL で再溶解し測定に供した (Chetiyankornkul et al., 2002)。酢酸ナトリウム緩衝溶液は酢酸 (特級 >99.7%、関東化学株式会社) と酢酸ナトリウム三水和物 (特級 >99.0%、関東化学株式会社) を用いて調製した。

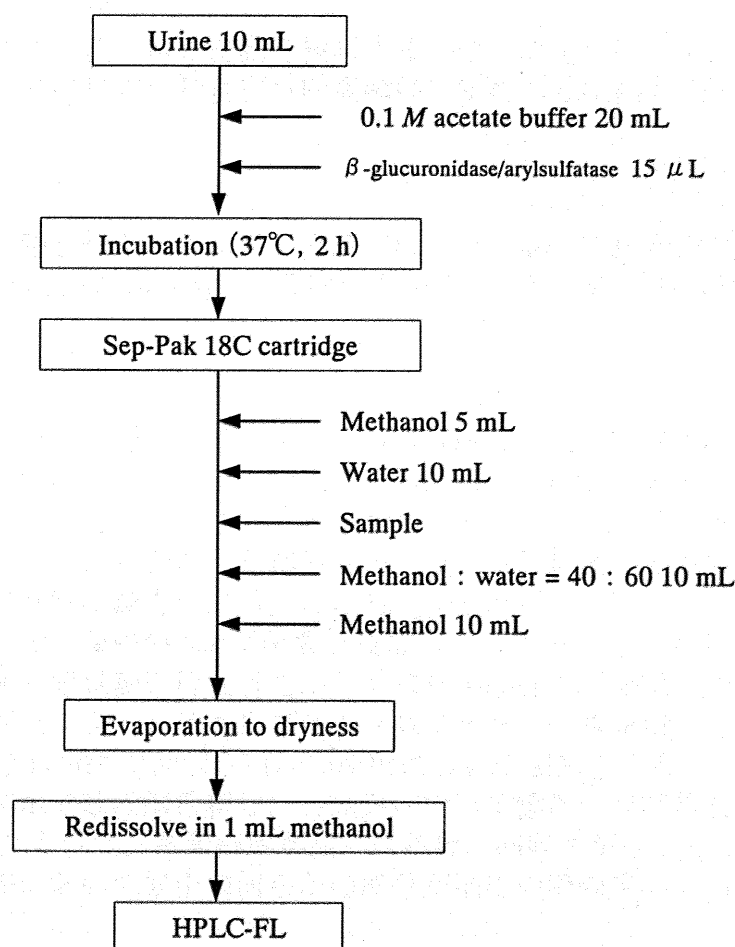


Fig. 2-2 Flow diagram for the food sample preparation procedure. (Chetiyankornkul et al., 2002)

2.3.3 精度管理

尿中 1-OHP 分析の精度管理項目として、検量線の直線性、検出下限値、測定値の日内及び日間変動、添加回収率、ブランク試料、容器からの溶出を検討した。

検量線の直線性

1-OHP の標準溶液は SUPELCO 社から購入した粉体をメタノールで溶解して 1.0 μ g/mL の標準溶液を調製して、この標準溶液を一次標準溶液として冷蔵保存した。検量線は 0.10 ng/mL から 5.7 ng/mL の範囲で異なる 5 種類の濃度の 1-OHP 標準溶液を調製し検討を行なった。その結果、相関係数 r は 0.997 と良好な直線性が得られた。

検出下限値

検出下限値及び定量下限値の検討は、メタノールをブランク試料とした測定で得られたクロマトグラムの 1-OHP のリテンションタイム付近の Peak Area の標準偏差 (SD) から求めた。3SD を検出下限値、10SD を定量下限値として算出したところ、検出下限値は尿中濃度で 0.007 ng/mL、定量下限値は 0.023 ng/mL となり非喫煙者に関する文献値 0.04 ng/mL (Chetiyankornkul et al., 2002) と比較して、実際の尿試料分析におよそ適用可能な下限値であった。

測定値の日内及び日間変動

測定検液の安定性及び測定値の変動を検討するため、測定検液を 1 日 3 回、2 日間測定して得られた測定値の日内変動及び日間変動はいずれも 6% 未満であり良好な測定精度であった。

添加回収試験

また、添加回収試験を行なった結果、高濃度添加 (6 ng) で $108 \pm 7\%$ ($n = 3$)、低濃度添加 (0.4 ng) で $96 \pm 7\%$ ($n = 3$) という回収率が得られ許容範囲内の分析精度であった。

ブランク試料

サンプリング及び分析過程における 1-OHP 汚染の検討として、操作ブランク及びトラベルブランクの測定を行なったがいずれの試料からも 1-OHP は検出下限値未満であったため、サンプリング及び分析における 1-OHP の汚染は影響がない程低いと判断した。本来、尿マトリックスと類似した精製水をブランク試料として用いるべきだが、精製水を用いて添加回収試験を行なったところ、1-OHP が全く回収されないという結果が得られた。そこで、尿中の Na^+ が影響を及ぼしている可能性を考え、生理食塩水を用いて同様に添加回収試験を行なったが、やはり 1-OHP は回収されなかった。そのため、今回は操作ブランク、トラベルブランク共にメタノールを用いて行った。精製水及び生理食塩水で 1-OHP が回収されない原因について明確にすることはできなかったが、尿試料を精製水で数段階希釈し、各試料について添加回収試験を行なったところ、Fig. 2-3 に示したように、希釈倍率が高くなる程、回収率が低下する傾向がみられたため、前処理行程において尿中の何らかの成分が抽出の際効果的に働いている可能性が考えられた。

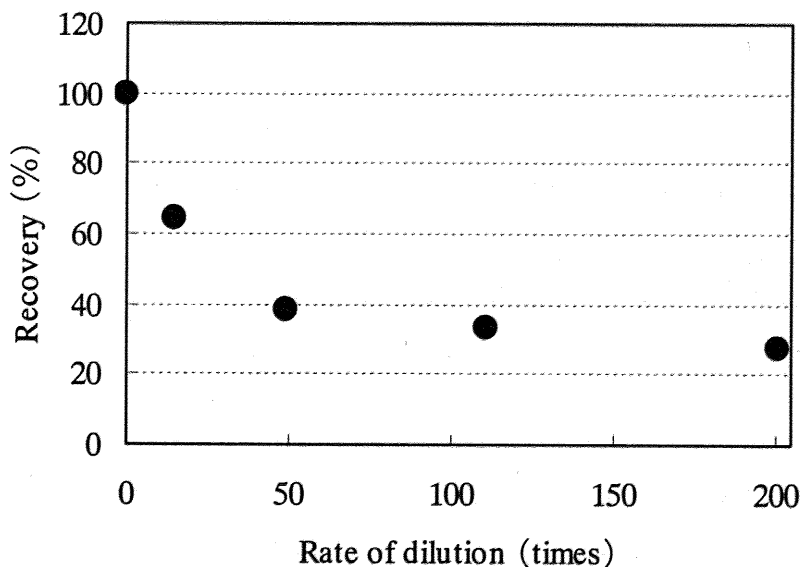


Fig. 2-3 Effect of urinary matrix for recovery rates.

容器からの溶出試験

使用容器からの 1-OHP 溶出の有無を確認するため、尿試料保存用 15 mL ポリプロピレン製遠沈管、採尿用 500 mL ポリエチレン製ボトル及び蓄尿用 2 L ポリプロピレン製ボトルにメタノールを充填し各容器を一晩放置してメタノール溶液を 10 mL 採取し、窒素気流下で乾固後、メタノール 1 mL に再溶解して HPLC-FL 測定に供した。その結果、いずれの容器からも 1-OHP は検出下限値未満であったため、尿試料分析には容器は影響しないことが分かった。

解析方法

得られた分析値の統計学的解析は、統計解析ソフト SPSS Version 12.0J. を用いて一元配置分散分析 (ANOVA, analysis of variance) を行った。

2.4 結果及び考察

2.4.1 尿中 1-OHP 排泄量の個人内変動

各対象者の連続 5 日間の尿中 1-OHP 排泄量を Table 2-1 に、個人内変動 (日間変動) を Fig. 2-4 に示した。Fig. 2-4 より対象者 A のみ 2 日目の 1-OHP 排泄量が比較的高い結果となった。この対象者 A の行動記録表より、1 日目のみ生活パターンが通常と異なっており、強度の受動喫煙をしていることがわかったため、このことが強く影響している可能性が考えられる。また、他の対象者に関しては毎日の生活パターンがほぼ同じであったにも関わらず 1-OHP 排泄量に変動が見られた。また、統計解析を行ったところ個人内変動は 59% という結果が得られた。

Table 2-1 Results of urinary excretion of 1-OHP for 5 days (n=5).

単位: ng/day										
subject	1st. day	2nd. day	3th. day	4th. day	5th. day	max.	min.	mean	SD	RSD (%)
A	100	211	56	17	55	211	17	88	84	96
B	115	71	75	167	77	167	71	101	41	41
C	85	107	93	131	87	131	85	101	19	19
D	7	12	7	10	6	12	6	8	3	32
E	61	20	36	38	30	61	20	37	15	40
total	-	-	-	-	-	211	6	67	38	57

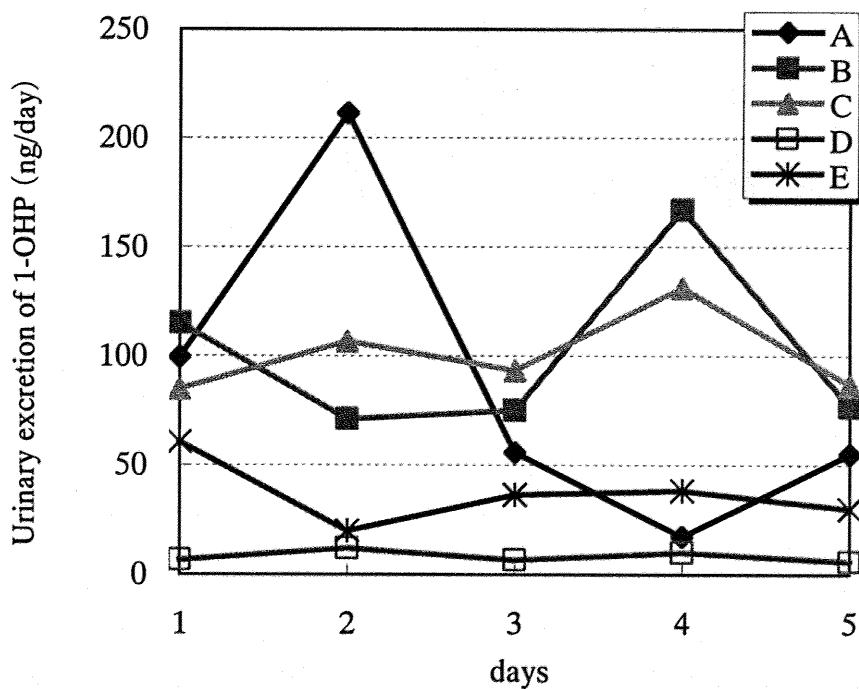


Fig. 2-4 Intra-individual variations of urinary excretion of 1-OHP for 5 days.

2.4.2 尿中 1-OHP 排泄量の個人間変動

各対象者の平均尿中 1-OHP 排泄量を Fig. 2-5 に示した。図中のエラーバーは個人内変動を表している。統計解析の結果、ANOVA が $p < 0.01$ で有意となり、個人間変動が 140% という統計結果が得られた。この変動は、対象者 D の 1-OHP 排泄量が低かったことと、対象者 A の排泄量が高かった日を除いた場合の平均尿中 1-OHP 排泄量が低かったことが大きく影響していると考えられる。しかし、行動記録表から、対象者 B と C は調査期間中に受動喫煙はほぼ全くなかったのに対し、対象者 D や E は期間中に数日、軽度の受動喫煙が確認されているが尿中 1-OHP 排泄量には影響していないように思われる。このことから、受動喫煙が必ずしも尿中 1-OHP 排泄量に影響を与えないとはいえない。

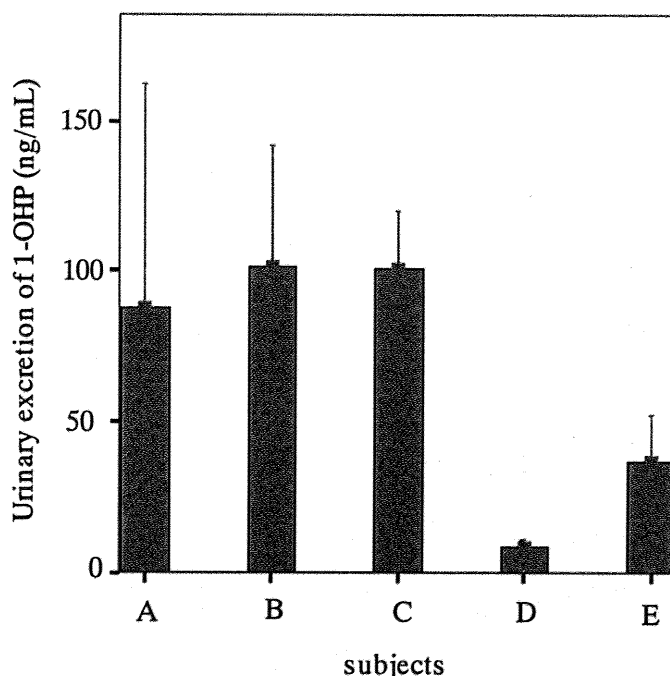


Fig. 2-5 Inter-individual variations of Urinary excretion of 1-OHP. Error bars represent standard deviations.

2.4.3 食事内容の尿中 1-OHP 排泄量への影響

対象者 B に関して 5 日間連続のサンプリングを 2 回行った結果を Fig. 2-6 に示した。どちらの調査期間中でも 4 日目までは、尿中 1-OHP 排泄量が 100 ng/day 未満に納まっていたが、2 回目の調査の最終日に 1-OHP 排泄量が高く検出された。食事アンケートから 5 日目に焼肉屋で食事を摂っていることから、このことが尿中 1-OHP 排泄量に影響している可能性が考えられた。しかし、煙が充満した店内での食事であったため、尿中 1-OHP が煙によるものか加熱調理した肉を摂食したことによるものかの切り分けはできなかった。ただ、一般公衆でも日常生活で高い PAHs 曝露を受ける可能性が考えられた。煙が大きく影響しているとしたら、そのような環境下に長時間滞在する作業従事者の健康影響が懸念される。既存の研究で、お寺の線香や香取線香による PAHs 曝露が報告されている (Fang et al., 2004; Tonne et al., 2004; Lung et al., 2003; Lin et al., 2002)。

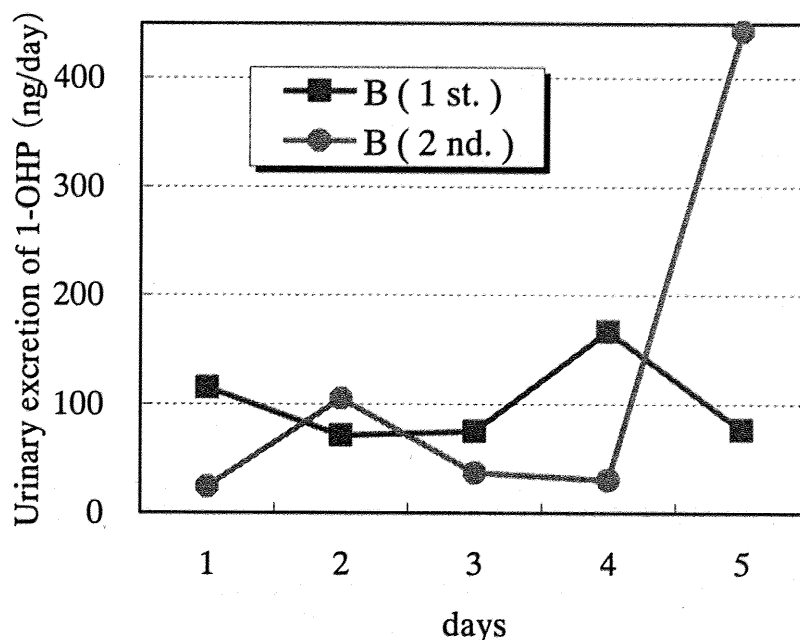


Fig. 2-6 Results of each urinary excretion of 1-OHP of subject B .

2.5 結論

一般公衆かつ非喫煙者の尿中 1-OHP 排泄量には、有意な個人内変動があるにも関わらず、およそ 60% もの個人間変動もあることが示された。これらの変動因子として、受動喫煙が示された対象者もいたが、必ずしも受動喫煙が尿中 1-OHP 排泄量に影響を及ぼすともいえないことが考えられた。そのため、食物も PAHs 曝露量の変動に寄与している可能性が示唆された。しかし、本調査の内容は尿中 1-OHP 排泄量とアンケートのみから曝露源を推定するという、あくまでも予備的なもので決して断定することはできない。

また、焼肉屋など一般公衆が日常で遭遇しうる大気及び食物を含めた環境において、比較的強度な PAHs 曝露がある可能性が示唆された。

2.6 参考文献

- C. C. Tonne et al., "Predictors of personal polycyclic aromatic hydrocarbon exposure among pregnant minority women in New York City", *Environ. Health Perspect.*, 112(6), 754-759, 2004.
- C. Viau et al., "Creatinine normalization in biological monitoring revisited: the case of 1-hydroxypyrene", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 77, 177-185, 2004.
- E. Elovaara et al., "Simultaneous analysis of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: intraindividual variance in the urinary metabolite excretion profiles caused by intervention with β -naphthoflavone induction in the rat", *Arch. Toxicol.*, 77, 183-193, 2003.
- F. J. Jongeneelen et al., "1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environment", *Ann. Occup. Hygiene.*, 32, 35-43, 1988.
- G. C. Fang et al., "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of suburban and industrial regions of central Taiwan", *Chemosphere*, 54, 443-452, 2004.
- H. Kim et al., "Urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations in male Koreans", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 74, 59-62, 2001.
- P. Strickland et al., "Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect", *Environ. Health Perspect.*, 104, 927-932, 1996.
- R. K. Bentsen-Farmen et al., "Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by high-pressure liquid chromatography after purification on immunoaffinity columns in urine from occupationally", *Int. Arch. Environ. Health*, 72, 161-168, 1999.
- S. C. C. Lung et al., "Generation rates and emission factors of particulate matter and particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons of incense stick", *Chemosphere*, 50, 673-679, 2003.
- T. Chetianukornkul et al., "Determination of 1-hydroxypyrene in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a deuterated internal standard", *J. Chromatog. A*, 961, 107-112, 2002.
- T. C. Lin et al., "Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons and total suspended particulate in indoor and outdoor atmosphere of a Taiwanese temple", *J. Hazard. Mater.*, A95, 1-12, 2002.
- U. Knecht et al., "Atmospheric concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons during chimney sweeping", *Br. J. Ind. Med.*, 46, 479-482, 1989.
- W. P. Tolos et al., "1-Pyrenol: a biomarker for occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons", *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 5, 303-309, 1990.

第3章

PAHs 曝露の各経路寄与の重み付け

第3章 PAHs 曝露の各経路寄与の重み付け

3.1 緒言及び調査目的

PAHs の曝露評価研究において、経気道あるいは経口曝露量をモニタリングする手法や尿中 1-OHP などの代謝物を用いた曝露評価が用いられてきた。しかし、前者で得られるのは各経路からの曝露量の情報のみであり、実際に体内へ取り込まれた用量を把握することはできない。一方、後者は体内に取り込まれた用量は評価することが出来るものの、曝露経路の切り分けはできない。また、PAHs の発ガンプロセスを考えると、体内に取り込まれて代謝された用量を評価することが重要であるといえる。以上のことから、双方の利点を組み合わせて各経路からの PAHs の体内への取り込み用量を評価することが必要である。

第2章にて、一般公衆、特に非喫煙者の生活環境の差が、尿中 1-OHP 排泄量に影響を与える可能性が示唆されたことを受けて、比較的曝露の低い一般公衆であっても生活の中のある因子によって PAHs 曝露が変動する可能性が推測された。本章では、総 PAHs 曝露の内、大気からの曝露と食事からの曝露各々が占める割合を明らかにし、また、健康影響を引き起こす PAHs 用量の指標として用いられている尿中 1-OHP 排泄量に影響を与えるより支配的な因子を明らかにすることを目的として調査を行なった。

3.2 調査方法

東京近郊在住の非喫煙男子学生 14 名（平均±SD, 25±2 歳）を対象として、2005 年 4 月から 5 月、及び 10 月から 11 月に調査を実施した。各対象者の 24 時間尿、24 時間個人曝露空気、24 時間分の食事を 3 日間でサンプリングし、各試料の分析結果から、1 日尿中 1-OHP 排泄量及び PAHs の経気道、経口曝露量を求めた。各試料のサンプリングスケジュールは、各経路における Pyrene の代謝速度、即ち半減期に関する文献値（経気道曝露 $t_{1/2} = 18 \text{ hr}$, 経口曝露 $t_{1/2} = 4.4 \text{ hr}$ ）を基に決定した（Lu et al., 2002; Buckley et al., 1992）（Fig. 3-1）。併せて、予備調査と同様の行動記録、食事アンケート及び調査に関するアンケート（A-3, 4）を依頼した。

ちなみに、今回対象者を非喫煙者に限定した理由として、喫煙者の個人曝露空気をよりの確にサンプリングできない可能性が考えられたことが挙げられる。喫煙者は喫煙の際、タバコから直接煙を吸引しており、また、一度肺に入れた空気を再度吐き出しているため、実際に体内に取り込まれた空気をポンプで捕集し、経気道曝露量を求めることは、困難であると考えた。そのため、今回はあくまでも特別な曝露がない条件の下、調査を実施することとした。

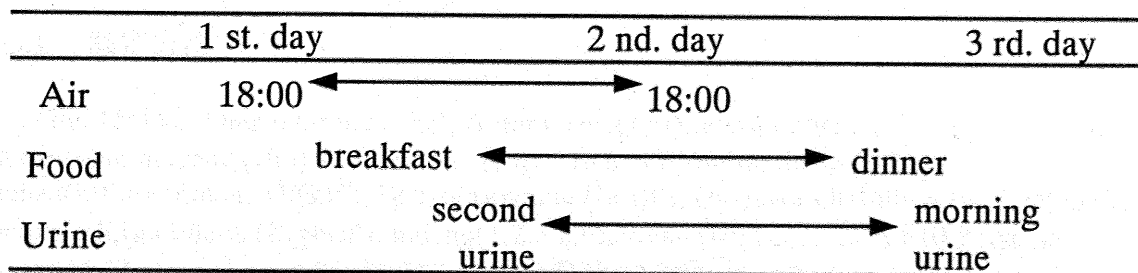


Fig. 3-1 Sampling schedule.

3.2.1 24時間尿

調査開始2日目の2番尿から翌日の早朝尿までの全尿を24時間尿としてポリエチレン製500 mLボトル及びポリプロピレン製2 Lボトルに採取し、ポリプロピレン製15 mL遠沈管に分注後、分析時まで-20℃にて冷凍保存した。

3.2.2 個人曝露空気

空気吸引ポンプ (Air Check²⁰⁰⁰, SKC Inc.) に粒子状 PAHs 捕集用 37 mm φ グラスファイバーフィルター (pore size 1.0 μm, SKC Inc.) と蒸気状 PAHs 捕集用 XAD-2 充填ガラスチューブ (前段/後段 100 mg/50mg, SKC Inc.) を Fig.3-2 のようにセットし、防音ボックスに入れて対象者に調査開始1日目から24時間携帯してもらった。サンプリングは1.5 L/minの吸引速度で24時間実施した。

グラスファイバーフィルターは使用前に、400℃にて5時間加熱することで汚染を防いだ。

大気捕集したフィルターサンプルは、カートリッジに専用の栓をして-20℃にて冷凍保存した。また、XAD-2 サンプルはガラスチューブ両端に専用の栓をしてアルミホイルで遮光して、同じく-20℃にて冷凍保存した。

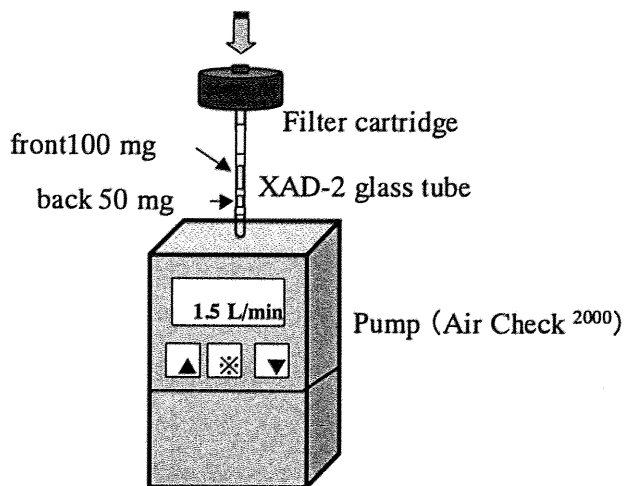


Fig. 3-2 Personal air sampler.

3.2.3. 食事

調査開始2日目の朝から晩までの食事及び飲料を陰膳法にてサンプリングした。陰膳法とは、対象者に食事を2食分用意してもらい、実際に食した食事と同様の食物をすべてサンプリングする方法である。採取した試料は、3 Lフードプロセッサー

(DLC-7JS, Cuisinart 社) でホモジナイズしてドライチャンバー付き凍結乾燥機 (型式 FDU-830、東京理化学器械株式会社) を用いて凍結乾燥処理を行ない分析時まで冷蔵もしくは冷凍保存した。

3.3 大気捕集試料中 PAHs 分析方法の検討

3.3.1 測定方法

分析対象は、Phenanthrene (Phe), Anthracene (Ant), Fluoranthene (Flu), Pyrene (Py), Benzo(a)anthracene (B(a)A), Chrysene (Chy), Benzo(b)fluoranthene (B(b)F), Benzo(k)fluoranthene (B(k)F), Benzo(a)pyrene (B(a)P), Dibenzo(a,h)anthracene (Db(ah)A), Benzo(g,h,i)perylene (B(ghi)P), Indeno(1,2,3-c,d)pyrene (IP) (以上 EPA 610 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Mix, SUPELCO 社)の計12物質とした。

測定は、蛍光検出高速液体クロマトグラフィー（HPLC-FL：High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence）を用い（システムは1-OHP測定と同様）、移動相はアセトニトリル（HPLC用 > 99.8%、関東化学株式会社）と水の混合溶媒を用いた。グラジエントプログラム及び波長プログラムは既存の文献（M. J. Nieva-Cano et al., 2001）を参考にして改変を加えて測定に適用させた（Table 3-1、3-2）。測定試料はマイクロシリンジで 100 μ L 注入して測定を行なった。クロマトグラムを A-6 及び A-7 に示した。

Table 3-1 Solvent gradient program for measurement of PAHs.

time (min)	ACN (%)	H ₂ O (%)
0.0	50	50
5.0	50	50
25.0	95	5
31.0	100	0
40.0	100	0
43.0	50	50

(Modified Nieva-Cano et al., 2001)

Table 3-2 Detection wavelength programs for measurement of PAHs.

Program 1

time (min)	ex. (nm)	em. (nm)	PAH
0.0	285	465	Flu
22.0	270	386	B(a)A, Chy
29.0	305	410	B(k)F
33.0	290	418	Db(ah)A, B(ghi)P

Program 2

time (min)	ex. (nm)	em. (nm)	PAH
0.0	250	375	Phe, Ant
19.0	270	390	Py
28.0	300	440	B(b)F
30.0	290	405	B(a)P
34.0	290	498	IP

(Modified Nieva-Cano et al., 2001)

3.3.2 前処理方法

大気捕集フィルターの前処理フローを Fig. 3-3 に示した。粒子状 PAHs 捕集用グラスファイバーフィルター (37 mmφ, SKC Inc.) は2分割にしてさらに細断して 10 mL 遠沈管に充填した。ジクロロメタン (残留農薬試験用 > 99.5%, 関東化学株式会社) 6 mL を入れ超音波を 15 分間照射して抽出を行なった。その後、回転数 3000 rpm で遠心分離に 15 分間かけて上澄み 4 mL を分取した。得られた抽出試料に 40°C 下で窒素を吹き付けて溶媒を留去した。乾固させた試料をアセトニトリル 1 mL で再溶解して HPLC 測定に供した。

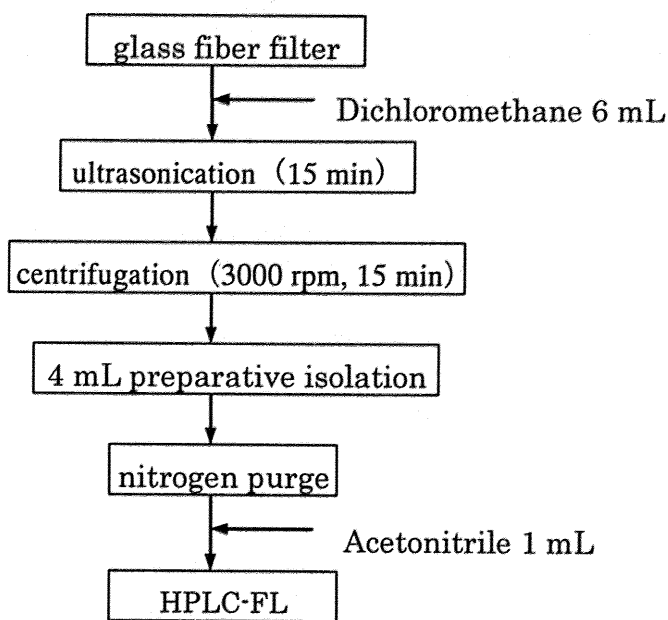


Fig. 3-3 Flow diagram for the filter sample preparation procedure.

3.3.3 精度管理

検量線の直線性

各 PAHs の標準溶液を混合し、アセトニトリルで希釈した溶液を一次混合標準溶液とした。この一次混合標準溶液を希釈して 5 種の濃度の検量線用標準溶液を調製し検量線を作成した。大気捕集試料分析用の各 PAHs の検量線濃度範囲、相関係数 r を Table 3-3 に示した。いずれの PAHs でも相関係数 0.994-1.000 の直線性の良い検量線が得られた。

Table 3-3 Calibration, variation, recovery for analysis of filter sample.

PAH	calibration range (ng/mL)	r	intraday variation	interday variation	recovery (%)
Phenanthrene	0.041-1.1	1.000	5.1	6.0	86±8.4
Anthracene	0.017-0.45	1.000	2.4	7.3	63±2.4
Fluonanthene	0.036-0.94	1.000	4.7	5.7	93±6.7
Pyrene	0.017-0.45	1.000	1.5	2.0	89±5.9
B(a)A	0.016-0.42	1.000	1.3	0.2	111±3.8
Chrysene	0.045-1.2	1.000	1.3	0.7	93±9.4
B(b)F	0.084-2.2	1.000	1.8	2.1	93±9.7
B(k)F	0.045-1.2	1.000	1.8	0.5	91±7.0
B(a)P	0.041-1.1	1.000	2.4	4.8	108±8.7
Db(a,h)A	0.041-1.1	0.994	1.9	0.5	88±4.9
B(g,h,i)P	0.035-0.93	0.999	1.5	1.8	72±5.6
IP	0.044-1.2	1.000	2.3	6.2	93±7.8

検出下限値の検討

分析の検出下限値は、400℃で5時間加熱処理した大気未捕集フィルターに極低濃度のPAHs混合標準溶液を添加して分析した結果のSD値(n=3)を求め、大気中濃度に換算して3SDを検出下限値とした(環境省、2002)。その結果をTable 3-4に示した。既存の大気中濃度データと比較しても、分析に問題ない低いレベルの検出下限値であった。

Table 3-4 Detection limit for analysis of filter sample.

	LOD of measurement sample (ng/mL)	Reference of LOD ^a (ng/mL)	LOD of air concentration (ng/m ³)	Reference of air concentration ^b (ng/m ³)
Phenanthrene	0.015	0.004	0.042	40
Anthracene	0.026	0.0014	0.071	1.2
Fluoranthene	0.0032	0.02	0.0089	7.9
Pyrene	0.027	0.048	0.074	5.3
B(a)A	0.0031	0.014	0.0087	0.14
Chrysene	0.0046	0.08	0.013	0.40
B(b)F	0.0076	0.12	0.021	0.69
B(k)F	0.0028	0.016	0.0078	0.26
BaP	0.0034	0.014	0.0095	0.36
Db(ah)A	0.00019	0.08	0.00054	0.079
B(ghi)P	0.0044	0.14	0.012	0.71
IP	0.89	1.28	0.25	0.65

^a Nieva-Cano et al., 2001; LOD: Limit of detections

^b Ohura et al., 2002

測定値の日内及び日間変動

各PAHs測定値の日内変動及び日間変動をTable 3-3に示した。いずれのPAHでも日内変動、日間変動共に10%未満であり比較的変動は小さいと考えられた。

添加回収試験

各PAHsの添加回収率の結果をTable 3-3に示した。概ね回収率は70%から111%であり、いずれも許容範囲内の結果であった。

3.4 陰膳試料中PAHs分析方法の検討

3.4.1 測定方法

分析対象物質は大気捕集試料と同じ12物質とし、最終的な解析対象物質は測定の再現性、添加回収率及び認証標準物質の分析値が良好なPAHsを選択した。測定方法は、大気捕集試料と同様の方法で行った。また、測定はマイクロシリンジで試料溶液を20 μL注入して行なった。クロマトグラムをA-8及びA-9に示した。

3.4.2 前処理方法

陰膳試料の前処理は、既存の文献 (Wang et al., 1999) を参考にした。前処理のフローを Fig. 3-4 に示した。

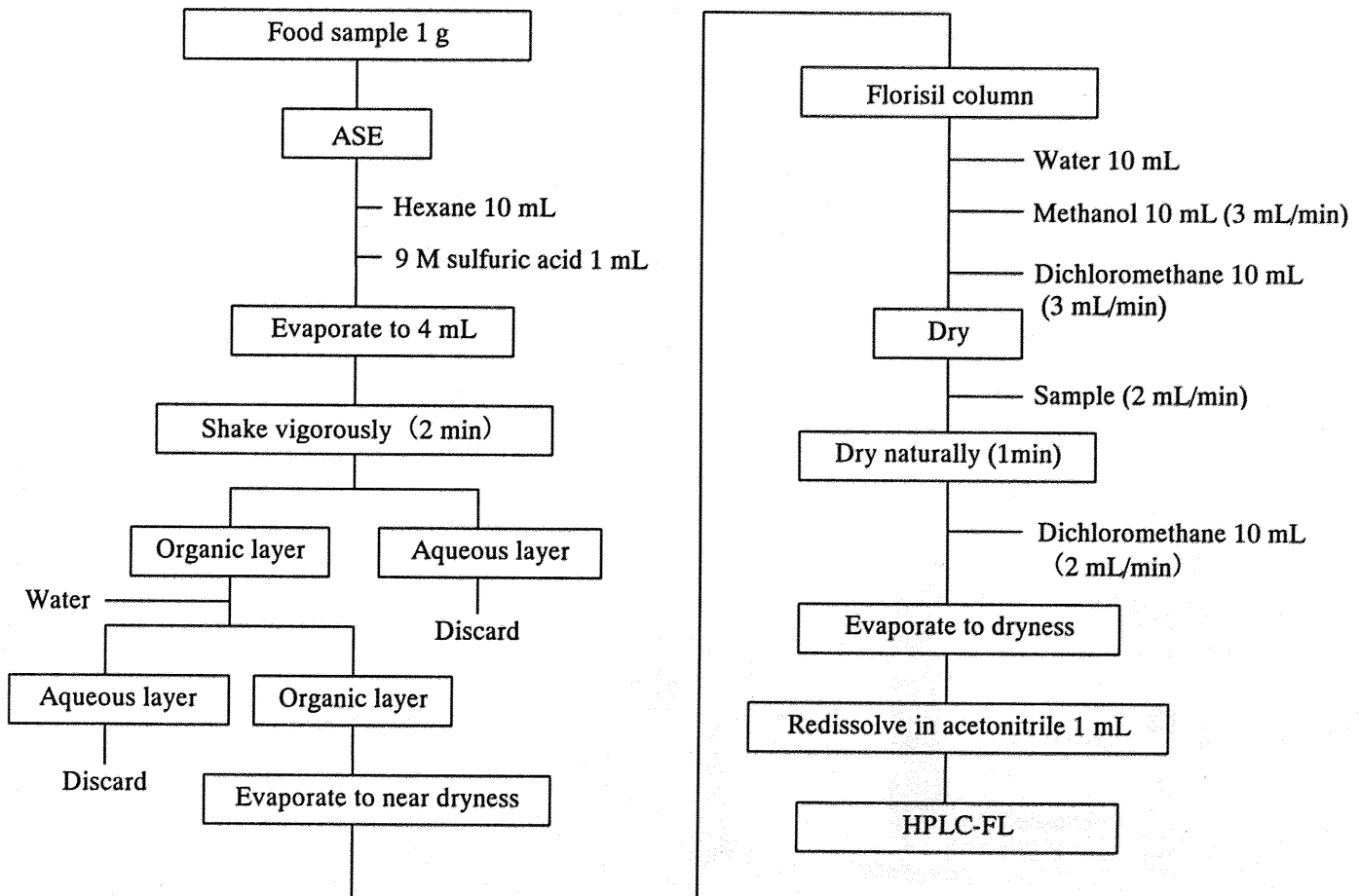


Fig. 3-4 Flow diagram for the food sample preparation procedure. (Wang et al., 1999)

ASE 抽出

抽出は高速溶媒抽出法 (Accelerated Solvent Extraction, ASE) を用いた。ASEは密閉状態で抽出溶媒の温度と圧力を上げて抽出する手法であり、既存の抽出手法であるソックスレー抽出と比較すると迅速かつ使用する溶媒量が低減できるといった特徴をもっている。また、環境安全の観点からも、密閉状態での抽出であるため室内が溶媒で汚染される可能性が低いことも特徴として挙げられる。今回陰膳試料抽出に用いた ASE 抽出条件を Table 3-5 に示した。試料は 11 mL 抽出セル (Dionex 社) に 1 g 取り、さらに加熱処理したガラスビーズでセル内を充填して抽出に供した。抽出溶液を捕集する 40 mL 褐色捕集バイアル及びガラスビーズは、汚染を防ぐため、ヘキサンの洗浄後 400°C にて 5 時間加熱処理してから使用した。また、抽出毎に装置内を溶媒洗浄するプログラムを設定した。用いた抽出溶媒は、ジクロロメタン (残留農薬試験用 > 99.5%、関東化学株式会社) とアセトニトリル (HPLC 用 > 99.8%、関東化学株式会社) である。また、留意点として、捕集バイアルに付属のテフロンコートセパタムが付いているが、汚染の原因となりうるため、セパタムの代替としてアルミホイルを噛ませてセットした。

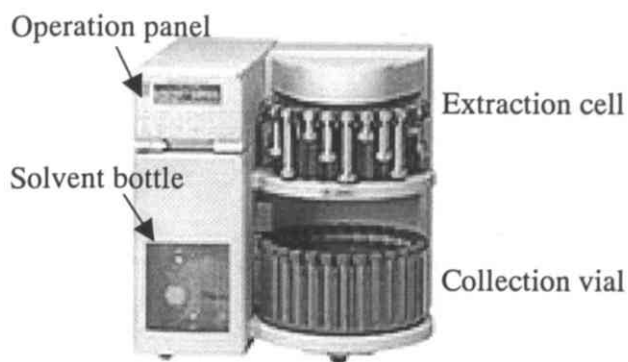


Fig. 3-5 ASE200 (Dionex 社)

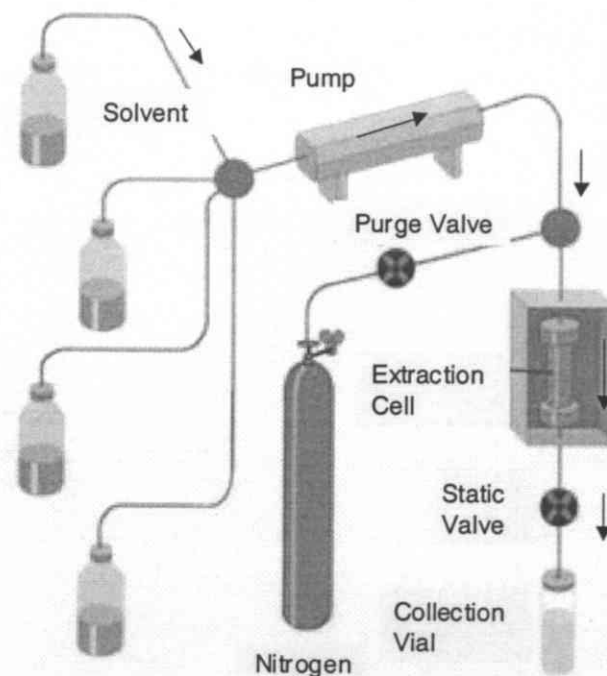


Fig. 3-6 Schematic diagram of ASE (Dionex 社).

Table 3-5 ASE extraction method. ^a

apparatus	: ASE200 (Dionex)
pressure	: 10MPa (1500psi)
oven temperature	: 100°C
heat-up time	: 5 min
sample mass	: 1 g
static time	: 5 min + 5 min
solvent	: Dichloromethane : Acetonitrile, 90 : 10 (v/v)
flush rate	: 60%
purge time	: 1.5 min
cycle	: 2 cycles

^a Wang et al., 1999

酸処理

約 20 mL の抽出溶液に窒素を吹き付けて乾固直前まで溶媒留去し、ヘキサン（残留農薬試験用 > 96.0%、関東化学株式会社）10 mL に再溶解した。このヘキサン転溶溶液を 50 mL 分液漏斗に移し、9 M 硫酸（関東化学株式会社）1 mL を加えた。およそ 2 分間激しく振とうし、分離するまでしばらく静置した後下層の水層を廃棄した。さらに精製水を加えて同様の操作を 3 回繰り返し、有機層を洗浄した。得られた有機層約 10 mL に窒素を吹き付けて 4 mL 程度まで濃縮した。

固相精製

固相カラムの準備として、直径 1 cm のフィルター及びコック付きクロマト管に Florisil（100/200 メッシュサイズ、GLサイエンス株式会社）5 g を充填し、精製水 10 mL、メタノール（HPLC 用 > 99.8%、関東化学株式会社）10 mL、ジクロロメタン（残留農薬試験用 > 99.5%、関東化学株式会社）10 mL を順に通液してしばらく自然乾燥させた。その後、酸処理した試料溶液を通液してさらに 1 分間自然乾燥させ、ジクロロメタン 10 mL で目的物質である PAHs を溶出させた。得られた溶出液に窒素を吹き付けて乾固させ、アセトニトリル（HPLC 用 > 99.8%、関東化学株式会社）1 mL に再溶解して HPLC 測定に供した。

3.4.3 精度管理

Table 3-6 に検量線の範囲及び相関係数、検出下限値、測定値の再現性、添加回収率を示した。

検量線の直線性

各 PAHs について、5 種類の濃度の PAHs 混合標準溶液を調製し検量線を作製した。いずれの PAHs でも相関係数 r が 0.99 以上の直線性の良い検量線が得られた。

検出下限値の検討

検量線の最も低い濃度で測定したクロマトグラムを用いて、 $3S/N$ から検出下限値を算出した。いずれの PAHs でも試算値と比較して十分低い下限値だった。

測定値の再現性

前処理を施した測定試料を 3 回繰り返し測定した時の再現性を検討した。Table 6 より、Phenanthrene、Anthracene、Dibenzo(a,h)anthracene、Indeno(1,2,3-c,d)pyrene は RSD が 10% 以上ととても大きなばらつきを有しているため、陰膳試料分析の対象物質から除外することとした。

添加回収試験

添加した標準物質の量は、概ね実際の陰膳試料中濃度と同レベルもしくは10分の1程度とした。その結果、Phenanthrene、Anthracene及びFluorantheneについては許容範囲外の回収率が得られたため分析対象物質から除外することとした。また、Benzo(g,h,i)peryleneについても回収率が50%を満たさず不十分と考え、同様に除外対象とすることとした。今回多くの物質で回収率が低かった原因として考えられるのは、ピークの妨害物質が多く存在しており、正確な定量ができなかったことが大きいのではないかと考えている。

Table 3-6 Results of precision considerations of analysis.

PAH	calibration range (ng/mL)	<i>r</i>	LOD (pg/g dry weight)	intraday variation	recovery (%), n=2
Phenanthrene	1.13-23.2	1.000	27	24	1019±171
Anthracene	0.608-12.5	1.000	10	80	504±122
Fluoranthene	0.558-11.4	1.000	79	0.2	185±5
Pyrene	0.558-11.4	1.000	41	0.8	78±16
B(a)A	0.0232-0.954	0.997	28	8.4	52±1
Chrysene	0.0488-2.01	0.997	23	2.3	92±3
B(b)F	0.0558-2.29	0.997	28	1.4	56 ^a
B(k)F	0.0234-0.964	0.997	7	5.8	81±12
B(a)P	0.0478-1.96	0.996	19	5.0	78±20
Db(a,h)A	0.0216-0.888	0.997	52	13	67 ^a
B(g,h,i)P	0.0613-2.52	0.992	136	7.6	42±6
IP	0.595-12.2	1.000	159	20	63 ^a

^a n=1

3.4.3.1 認証標準物質 SRM2977

今回用いた分析方法の精度を確認するために、認証標準物質 SRM 2977 Mussel Tissue (National Institute of Standards & Technology, NIST) を分析して認証値との一致性を検討した。

認証標準物質 NIST SRM 2977 は、ムラサキイガイの内臓を均質化して凍結乾燥させた試料であり、PAHs、PCB: Polychlorinated biphenyl 同属体、塩素系農薬、メチル水銀、無機物質の認証値を付している。今回の分析対象物質は、前述の検討を踏まえて Pyrene、B(a)A、Chrysene、B(b)F、B(k)F、B(a)P の計6物質とした。

各 PAHs に関する SRM 2977 の分析結果を Table 3-7 に示した。ここに示した結果は、3.4.3 で求めた添加回収率で補正した値である。この結果から、Pyrene、B(k)F、B(a)P は分析値が認証値の範囲内であったため、分析が精確に行なわれていると考えられる。以上精度管理の検討結果から、陰膳試料の分析対象物質は Pyrene、B(b)F 及び B(a)P とした。Table 3-8 に大気捕集試料と陰膳試料で測定することができた PAHs を一覧にして示した。

Table 3-7 Result of SRM2977 analysis.

	This study ^a (ug/kg)	Certified value ^b (ug/kg)
Pyrene	88.8±7.0	78.9±3.5
B(a)A	33.7±2.7	20.34±0.78
Chrysene	34.2±3.8	49±2 ^c
B(b)F	7.58±0.82	11.01±0.28
B(k)F	3.60±0.29	4±1 ^c
B(a)P	8.50±0.69	8.35±0.72

^a Corrected with recovery rates of Table 3-6

^b NIST, 2000

^c Reference value

Table 3-8 Measurable PAHs in this study.

PAHs	filter sample	food sample	TEFs
Phenanthrene	○	×	0.001
Anthracene	○	×	0.01
Fluonanthene	○	×	0.001
Pyrene	○	○	0.001
B(a)A	○	×	0
Chrysene	○	×	0.01
B(b)F	○	×	0.1
B(k)F	○	○	0.1
B(a)P	○	○	1
Db(a,h)A	○	×	5
B(g,h,i)P	○	×	0.01
IP	○	×	0.1

今回、陰膳試料中の PAHs を分析するにあたり障壁になったのが脂質の酸分解である。既存の文献に沿って 9M の硫酸を 1 mL 添加して脂質分解を行なったが、最終的に得られるアセトニトリルに溶解した測定試料中には白色の沈殿が残存しており、恐らく分解しきらなかった脂質であると考えられる。第1章で述べたとおり、PAHs は脂溶性であるため脂質を分解する必要があるのだが、脂質が完全に分解する程の酸を加えてしまうと、PAHs が分解してしまうという問題が残る (Wang et al., 1999)。実際に、ヘキサン溶液を用いて 9M 硫酸と濃硫酸を加えた場合の添加回収試験を行ったところ、Table 3-9 に示したように濃硫酸を加えると 9M 硫酸添加の場合と比較して低下傾向を示し、やはり酸処理によって PAHs が分解されている可能性が考えられた。

Table 3-9 Effect of sulfuric acid to PAHs.

	9M硫酸(%)	濃硫酸(%)
Phenanthrene	60	55
Anthracene	17	11
Fluoranthene	82	64
Pyrene	79	67
B(a)A	63	46
Chrysene	86	65
B(b)F	70	49
B(k)F	82	45
B(a)P	52	0.0
Db(ah)A	48	36
B(ghi)P	11	0.0
IP	74	0.0

3.5 結果及び考察

3.5.1 尿中 1-OHP 排泄量

尿の分析結果から式 3 を用いて各対象者の尿中 1-OHP 排泄量を算出した (Fig. 3-7)。

$$\text{尿中 1-OHP 排泄量 (ng/day)} = \text{尿中 1-OHP 濃度 (ng/mL)} \times \text{1 日排泄尿量 (mL/day)} \quad \dots \text{式 3}$$

今回の対象者 14 名の平均尿中 1-OHP 排泄量は、32 (2) ng/day (GM (GSD)) であり、最小値-最大値は 10-80 ng/day であった。非喫煙者の尿中 1-OHP 濃度に関する文献値と 1 日クレアチニン排泄量 1.5 g/day を用いて 1 日尿中 1-OHP 排泄量に換算した値と比較したところ、ほぼ同じレベルの排泄量であった (Table 3-10)。アンケート回答から、対象者 7 が低度の受動喫煙を受けていたことが分かったが、尿中 1-OHP 排泄量は 33 ng/day と平均に近く、尿中 1-OHP 排泄量が受動喫煙に影響を受けていた可能性は低い。また、喫煙者に関する文献の平均値と比較すると、今回の対象者らの尿中 1-OHP 排泄量レベルは低い結果であった。しかし、排泄レベルの範囲を比較すると、非喫煙者での最大値は、喫煙者における最小値よりも高く、喫煙者の尿中 1-OHP 排泄量が非喫煙者よりも高いとは必ずしもいえないことが推測される。この原因として以下のことが考えられる。どの原因が一番可能性が高いかということは、次から述べる空気からの PAHs 曝露量と食事からの曝露量が尿中 1-OHP にどの程度影響を与えるかということを検討することで明らかにできであろう。

- ◇ 非喫煙者の経口曝露量が高い場合
- ◇ 非喫煙者が高いレベルの受動喫煙を受けた場合
- ◇ 高濃度の煙を吸っても肺に沈着してしまい、尿中に排泄される割合が低い場合
- ◇ 代謝能力に個人差が相当ある場合

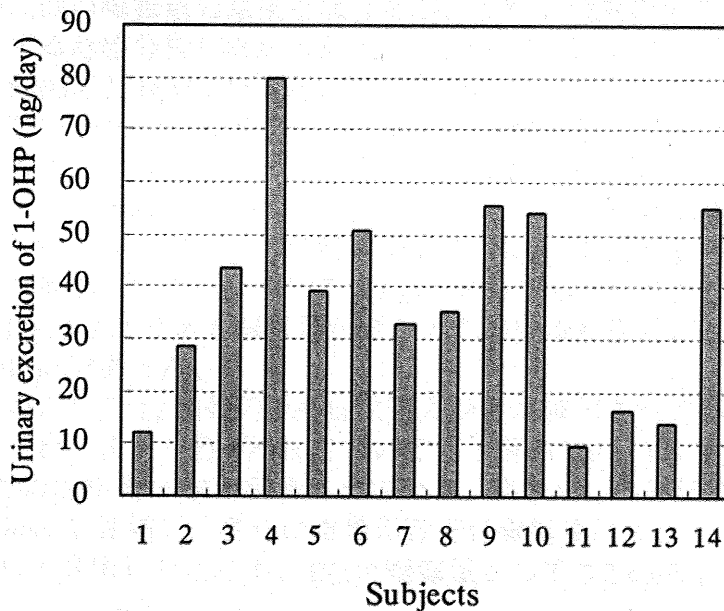


Fig. 3-7 Urinary excretion of 1-OHP of 14 subjects.

Table 3-10 Comparison of urinary excretion level of 1-OHP (GM (GSD)).

Study	Non-smoker (μ g/day)	Smoker (μ g/day)
Chetiyankornkul et al., 2002	0.066 \pm 0.083* (range: 0.023-0.22)	0.18 \pm 0.063* (range: 0.11-0.27)
Kim et al., 2001	0.087 (5.0) (range: 0.029-0.32)	0.12 (5.2) (range: 0.029-0.81)
This study	0.032 (0.002) (range: 0.010-0.080)	-

* AM \pm ASD

3.5.2 大気からの PAHs 曝露量

大気捕集フィルターの分析結果から式 4 を用いて各対象者の PAHs 経気道曝露量を算出した (Fig. 3-8 及び Table 3-11)。今回は XAD-2 を分析しなかったため、フィルター分析の結果のみを取り扱った。また、Table 3-10 の試算値は Table 1-10 と同じである。

$$\text{経気道曝露量 (ng/day)} = \frac{\text{捕集 PAHs (ng)}}{\text{吸引量 (m}^3\text{)}} \times \text{呼吸量 } 15 \text{ m}^3/\text{day} \quad \dots \text{式 4}$$

比較的分子量の低い Phenanthrene や Anthracene は、多くの対象者で検出下限値未満であったが、これは今回分析することができなかった気相を捕集している XAD-2 にほとんどが捕集されており、やはり分子量の低い PAHs は気相に存在する割合が高いことが推測された。Table 3-10 の試算値と比較すると、Pyrene までの 4 物質に関しては試算値よりも明らかに低い曝露量の結果となったが、これも環数の少ない物質は気相中に高い割合で存在するため分析しなかった XAD-2 中に大部分が捕集されていると考えられる。実際に、Pyrene と B(a)A を境として、分子量が大きくなり、沸点も高くなっていることが第 1 章の Table 1-2 から分かり、Pyrene を境として気相と固相における存在率が決定していることが推測される。また、Phenanthrene から Pyrene まではおおよそ 90% が気相中に存在し、B(a)A 及び Chrysene は約 40%、その他分子量が大きい PAHs に関しては、主に固相に存在するという既存の報告 (Menichini et al., 2003) から、試算値よりも実測値が低かったのが、やはり XAD-2 を分析しなかったことが大きい可能性が高い。また、Fig. 3-7 より最も曝露量が高かったのは毒性係数が 0.1 と比較的高い B(b)F、次いで B(ghi)P であった。

本調査で定量対象とした 12 種類の PAHs は発ガン性が確認されている物質とそうでない物質とに分けられ、また、各 PAHs について第 1 章の Table 1-5 に示したような B(a)P を基準とした毒性係数 TEF が報告されている。各 PAHs の経気道曝露量 (ng/day) を nmol/day で評価し、さらに毒性係数を各曝露量に乗じることで、総 PAHs を B(a)P 曝露量として算出したところ、B(a)P 曝露量として 5.2 ng/day という結果が得られた。

今回の調査では、気相中 PAHs を評価することができなかったため、低分子 PAHs の経気道曝露量が過小評価されてしまった可能性は否めないが、高分子 PAHs は室内外の滞在時間を考慮した試算と同じ曝露量レベルの結果となった。一般的に人は1日の約90%を室内で過ごすと言われており、今回の調査で得られた行動記録 (A-10) からいづれの対象者も1日の約80%以上を室内で過ごしていることが分かったため、非喫煙者でかつ受動喫煙頻度が低い一般公衆の PAHs の経気道曝露を支配する因子は、主に室内空気中の PAHs 濃度であることが推測される。この考察をより明確に裏付けるために、次の発生源解析を行なった。

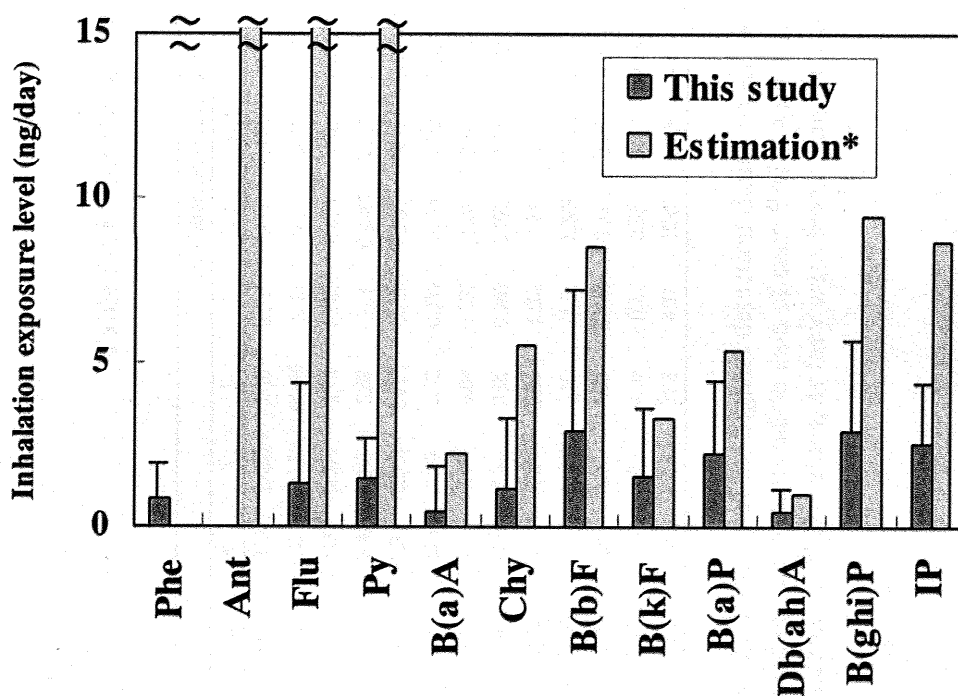


Fig. 3-8 Mean inhalation exposure levels of PAHs and estimations (n=14).
 * Calculated from Ohura et al., 2002.