

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

# 化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

## 主任研究者

牧野 恒久 東海大学 医学部

## 分担研究者

中澤 裕之 星薬科大学 薬品分析化学

和泉 俊一郎 東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科

近藤 文雄 愛知県衛生研究所 毒性部

堀江 正一 埼玉県衛生研究所 水・食品担当

塩田 邦雄 東京大学大学院 農学生命科学研究科 細胞生化学

厚生労働科学研究研究費補助金 化学物質リスク研究事業  
化学物質による子どもへの健康影響に関する研究  
平成17年度 総括・分担研究報告書

<< 目 次 >>

I. 総括研究報告

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究 .....	1
主任研究者	牧野 恒久 東海大学 医学部

II. 分担研究報告

1. 生体試料等中のピレスロイド系殺虫剤の分析法の開発及び曝露評価に関する研究 .....	17
分担研究者	堀江 正一 埼玉県衛生研究所
協力研究者	石井 里枝 埼玉県衛生研究所
	竹上 晴美 埼玉県衛生研究所
2. ヒト血液試料とハウスダスト中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発および LC/MSを用いたヒト尿中ニコチンの分析に関する研究 .....	22
分担研究者	中澤 裕之 星薬科大学 薬品分析化学教室
	斉藤 貢一 星薬科大学 薬品分析化学教室
	伊藤 里恵 星薬科大学 薬品分析化学教室
	岩崎 雄介 星薬科大学 薬品分析化学教室
3. ハウスダスト中のポリ臭素化ジフェニルエーテルおよび有機塩素化合物の一斉分析法の 開発 .....	29
分担研究者	中澤 裕之 星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	阿久津 和彦 大阪府立公衆衛生研究所
	高取 聡 大阪府立公衆衛生研究所
4. フタル酸エステル類の子どもへの曝露評価に関する研究 .....	36
分担研究者	中澤 裕之 星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	高取 聡 大阪府立公衆衛生研究所
	阿久津 和彦 大阪府立公衆衛生研究所
5. ヒト生体試料中の化学物質の分析 .....	46
分担研究者	近藤 文雄 愛知県衛生研究所
研究協力者	林 留美子 愛知県衛生研究所
	猪飼 誉友 愛知県衛生研究所
	高取 聡 大阪府立公衆衛生研究所
	中澤 裕之 星薬科大学

6. 胎盤・臍帯を生体試料とした重金属・微量元素の同時多元素分析法の開発 .....	58
分担研究者	和泉 俊一郎 東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科
研究協力者	藤田 裕子 国立成育医療センター研究所
	田上 昭人 国立成育医療センター研究所
	内田 能安 東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科
	呉屋 憲一 東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科
	池田 仁恵 東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科
	近藤 文雄 愛知県衛生研究所
	林 留美子 愛知県衛生研究所
	猪飼 誉友 愛知県衛生研究所
7. 化学物質の胎盤機能と胎児発生におけるエピジェネティックな影響の解明 .....	63
分担研究者	塩田 邦郎 東京大学大学院 農学生命科学研究科細胞生化学
研究協力者	田中 智 東京大学大学院 農学生命科学研究科細胞生化学
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	65
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	66

## 化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

主任研究者 牧野 恒久 東海大学医学部 教授

### 研究要旨

#### 1 ハウスダストを含めた主に室内曝露に関する研究；

1-① ピレスロイド系農薬の生体曝露調査：ピレスロイド系農薬は、3-phenoxybenzoic acid(3-PBA)に代謝されるため、これを曝露指標成分に選択し、LC/MS/MSによる3-PBAの高感度分析法を構築した。尿中に含まれる3-PBAの前処理法として、 $\beta$ -グルクロニダーゼによる脱抱合化処理後、Oasis HLBカートリッジを用いた固相抽出法によりクリーンアップを行った。添加回収率（2 ppb 添加）は82.7%、RSDは7.5%(n=5)であった。本法を用いて、10名の成人尿（男女各5）中の3-PBA濃度を測定したところ、遊離体は殆どが検出下限値(0.02ppb)以下であったが、グルクロン酸抱合体は平均で0.58ppb検出された。ごく微量であるがヒトはピレスロイド系農薬に曝露されていると考えられるため、曝露源としてトータルダイエツト法により食品を調査したところ、ピレスロイド系農薬は検出されなかった。

1-② 有機フッ素系化合物とニコチンの生体試料測定系の開発と曝露調査：有機フッ素系化合物(PFCs)の中でも生活環境中で広範囲に存在し、生態系やヒトへの汚染が懸念されているパーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)、パーフルオロオクタンスルホンアミド(PFOSA)、パーフルオロオクタン酸(PFOA)、パーフルオロノナン酸(PFNA)、パーフルオロデカン酸(PFDA)について、ヒト成人および胎児期への曝露評価を試みた。ヒト血液試料を対象としたPFCsの高感度分析法を構築し、分析法バリデーションについても検討した。更に、PFCsのヒトへの曝露源を解明するために、ハウスダストに着目してその分析法の構築を試みた。また、タバコ煙に含まれる有害化学物質の中でも喫煙依存性を引き起こすことで問題視されているニコチンについて、生体内における曝露評価を行うために、ヒト尿中に含まれるニコチンの高感度・高精度な分析法を構築し、喫煙によるヒト曝露量評価についても検討した。

1-③ ポリ臭素化ジフェニルエーテルのハウスダストからの曝露についての研究：ハウスダスト中のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)および有機塩素化合物の分析法を開発した。検討の結果、ハウスダスト抽出液を44%硫酸含浸シリカゲルカラムおよびゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)カラムで精製し、GC/MSで測定することにより、マトリックスによる妨害を受けずに精度良く測定対象化合物を定量できることが分かった。本分析法を用いて一般住宅等で採取したダスト試料の予備分析を実施した。その結果、PBDEsやクロルデン類、S-421等がppb~ppmオーダーで検出され、呼吸による非意図的なハウスダストの吸引によりこれらの化合物の日常的な人体曝露が起こっていることが示唆された。

#### 2 子供の化学物質曝露のモニタリングに関する研究；

2-① フタル酸モノ体の血清分析法の開発：血清中のフタル酸モノエステル類[フタル酸モノメチル(MMP)、フタル酸モノエチル(MEP)、フタル酸モノブチル(MBP)、フタル酸モノベンジル(MBzP)、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)(MEHP)、フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル)(MEHHP)及びフタル酸モノイソノニル(MINP)]の高精度分析法を開発した。上記分析対象物質5.0または50 ppbをヒト血清に添加した際の回収率は、93.1~103%(RSD<10%)であった。本法の定量下限値は、0.2~1.0ppbであった。本法を用いてヒト血清を分析したところ、グルクロン酸抱合体を含めてMBP(0.65ppb)及びMEHP(<1.0ppb)を検出した。本法は、血清中のフタル酸モノエステル類を分析するうえで有用である。

2-② フタル酸モノ体の尿中分析法と重金属類、揮発性有機化合物の測定法の開発：尿中のフタル酸モノエステル類、血清及び尿中の重金属類、血清及び尿中の揮発性有機化合物(1,4-ジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナール)の分析法を確立した。

1)尿中のフタル酸モノエステル類：測定対象物質は、MEP、MBP、MEHP、MINP、MBzPとした。試料を $\beta$ -グルクロニダーゼにより加水分解し、メチル化後フロリジルカラムで精製した。測定にはGC/MSを用い、定量には安定同位体内部標準法を用いた。対象とした5種類のフタル酸モノエステルの検量線は、いずれも良好な直線性(相関係数0.999以上)を示した。測定対象5物質の標準品を添加して行った試験(n=3)では、回収率が86.3~119%、相対標準偏差が6.1%以下であった。

2)血清及び尿中の重金属類：誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いた血清及び尿中の多元素同時分析法を確立した。測定対象元素は、血清では20元素、尿では24元素とした。前処理法とし

ては、血清ではマイクロ波分解法、尿では酸分解法が最適であった。血清及び尿に標準品を添加し、各試料の前処理法に従って行った試験(n=5)では、回収率が血清では85.5~99.5%、尿では84.6~101%、相対標準偏差が血清では6.5%以下、尿では3.6%以下であった。

3) 血清及び尿中の揮発性有機化合物(1,4-ジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナール)：標準添加法によるヘッドスペース-GC/MS法を用いた血清及び尿中の上記3物質の同時分析法を確立した。血清、尿ともに3物質すべて良好な直線性(相関係数0.998以上)を示した。測定対象3物質の標準品を添加して行った試験(n=10)では、相対標準偏差が血清では8.5%以下、尿では10.5%以下であった。

2-③ 胎盤中微量元素の分析法の開発：児の重金属微量元素の汚染実態を評価するために、まず周産期における胎児期に着目し、臍帯および胎盤組織を生体試料として用いる分析システムを構築する事を目的として研究を行った。誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を分析測定方法として導入し、本年度は臍帯・胎盤の溶解方法の検討に主力を注いだ。検討により、マイクロウェーブによる溶解法が最も組織を完全に溶解することが判明した。

### 3 代謝物質の胎盤発生におけるエピジェネシスへの影響の研究；

化学物質がDNAメチル化やクロマチン構造といったエピジェネティック機構の変化を引き起こす可能性を検証する目的で、まず、凍結保護剤や溶媒として多用されるジメチルスルホキシド(DMSO)の、細胞ゲノムへの影響を、マウスES細胞をモデルに用いて解析した。その結果、DMSOにより、DNAメチル化を担う酵素の1つであるDnmt3aの発現が促進されることを発見した。これに伴い、反復配列のメチル化が亢進していた。また興味深いことに、DMSO処理によって逆にメチル化が低下するゲノム領域の存在も見出された。DMSOはヒストン修飾にも影響しながら、領域特異的なエピジェネティック変化を引き起こしていることが伺われる。この結果はDNAメチル化を変えうる身近な化合物が他にも数多く存在する可能性をも示唆する。

#### 分担研究者

中澤 裕之：星薬科大学 薬品分析化学 教授

和泉俊一郎：東海大学 医学部 専門診療学系  
産婦人科 助教授

近藤 文雄：愛知県衛生研究所 毒性部  
主任研究員

堀江 正一：埼玉県衛生研究所 水・食品担当  
部長

塩田 邦雄：東京大学大学院 農学生命科学研究  
科 細胞生化学 教授

イド系農薬の曝露レベルを把握し、胎児、乳児に及ぼす影響を検証する資料とする目的で、主代謝物である3-phenoxybenzoic acid(3-PBA)を指標成分とした信頼性の高い高感度分析法の構築を試みた。更に、本分析法を用いてヒト尿中の3-PBA曝露レベルを把握することを目的とした。

#### 1-② 有機フッ素系化合物とニコチンの生体試料測定系の開発と曝露調査：有機フッ素系化合物

(PFCs)であるパーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)、パーフルオロオクタンスルホンアミド(PFOA)、パーフルオロオクタン酸(PFOA)、パーフルオロノナン酸(PFNA)、パーフルオロデカン酸(PFDA)は、繊維類の撥水剤、界面活性剤、レベリング剤、消火剤、潤滑油および消泡剤等として用いられている。また、PFOAにおいては、テフロン加工製品にも応用されていることから、PFCsは、我々の生活環境中で広範囲に存在している。他方、PFCsは極めて安定な化学物質であると考えられており、河川水、海洋性哺乳類、魚類および鳥類等、生態系で分解することなく、長期にわたり残留することが報告されている。また、実験動物に対して、催奇形性、甲状腺ホルモンへの影響、パーオキシソーム増殖作用が報告されていることから、次世代への影響や発ガン作用、コレステロール代謝かく乱作用等が懸念されている。更に最近の報告では、PFOSおよびPFOAがヒト母体血を介して胎児へ移行する報告もある。そこで本研究では、ヒト血液試料におけるPFCsの高感度分析法の構築について検討した。

一方、近年、タバコ煙に含まれる有害化学物質

#### A. 研究目的

##### 1 ハウスダストを含めた主に室内曝露に関する研究；

1-① ピレスロイド系農薬の生体曝露調査：環境中には多種多様な化学物質が放出され、ヒトを含む生態系への影響が強く懸念されている。ピレスロイドとは、除虫菊の花に含まれる主殺虫成分ピレトリンとその類縁化合物の総称であり、現在では、合成ピレスロイドが蚊取線香やエアゾールとして家庭用に汎用されている。環境庁から示された内分泌かく乱作用が疑われる67物質の中に4種(ペルメトリン、シペルメトリン、フェンバレート、エスフェンバレート)が含まれている。少量のピレスロイド(デルタメトリン)を妊娠した実験動物に投与すると、子ネズミの脳に影響が現れ、成熟期になっても障害が残っていることが報告されている。また、脳が発達中の若い動物にピレスロイドを投与すると、行動や脳の機能に大人になっても続く影響を与えることが報告されている。そこで、ピレスロ

は 200 種類を超えることが報告されており、喫煙による人体への悪影響が明らかとなっている。その中でもニコチンは喫煙により体内に吸収され、ニコチン依存症を引き起こすことから、必然的に喫煙行為を助長させる。また、女性の喫煙率は高まっており、周産期の妊婦がたばこの煙を吸うことによって、妊婦や胎児に与える影響は大きいと考えられている。そこで、喫煙習慣を把握するために、ニコチンおよびその代謝物質の高感度分析法が求められている。ニコチンの代謝物質の一つであるコチニンは、半減期が約 20 時間と長く、生物学的指標として適しており、喫煙習慣を認識するマーカーとししばしば分析対象となっている。そこで本研究では、カラムスイッチング-LC/MS を用いて、ヒト尿中に含まれるニコチンおよびその代謝物質であるコチニンの高感度分析法を構築し、喫煙者と非喫煙者の暴露実態の検討を行った。

1-③ ポリ臭素化ジフェニルエーテルのハウスダストからの曝露についての研究：ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) は 1970 年代から近年に掛けて国内外の人体や環境試料中での濃度上昇傾向が認められている化学物質であるが、国内における胎児・乳幼児期の汚染実態に関する知見は少ない。また、八塩化ジプロピルエーテル (S-421) は、主としてピレスロイド系農薬の共力剤として蚊取り線香等に含有されていることから、夏場を中心に比較的高レベルの人体汚染が起こっていると予想されるが、本化合物による人体汚染に関する報告は世界的にも数少ないのが実情であり、特に子どもの暴露実態に関しては不明な点が多い。また、子どもを対象として上記有機ハロゲン化合物の暴露実態と各種疾患との因果関係について詳細に比較検証した報告は少ない。これらの化合物は、食事を介した経口暴露のみならず、屋内汚染による慢性的な経気道暴露が懸念されることから、総合的な観点からの暴露実態の把握および健康影響の解明が望まれる。また、PBDEs と他の有機ハロゲン汚染物質の濃度相関データは、これら化学物質の暴露経路を推定する上で重要である。そこで、本年度はハウスダスト中のポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) および有機塩素化合物の分析法を開発した。

## 2 子供の化学物質曝露のモニタリングに関する研究；

2-① フタル酸モノ体の血清分析法の開発：フタル酸ジエステル類は、主に塩化ビニル樹脂の可塑剤として工業製品中に多用されており、日常的な曝露が危惧される化学物質の一群である。当該化学物質群に危惧される生体影響としてフタル酸モノエステル類による精巣毒性があり、妊婦及び胎児もしくは男子乳幼児が高感受性グ

ループとして認識されている。当該化学物質群の暴露量を把握するうえで、生体試料中のフタル酸ジエステル類の主要代謝物であるフタル酸モノエステル類 (グルクロン酸抱合体を含む) を測定することは、重要である。今年度、研究者らは、血清中のフタル酸モノエステル類の高精度分析法を開発することとした。本研究は、当該化学物質群に対する適切かつ安全な利用を促進し、子どもを主眼においた健康影響対策を講ずるうえで役立つと期待される。

2-② フタル酸モノ体の尿中分析法と重金属類、揮発性有機化合物の測定法の開発：本研究では、一般人での暴露量が多いフタル酸エステル類、重金属、揮発性有機化合物に対する生体曝露量を、特に胎児期を中心としてモニタリングする。さらに、曝露と子宮内膜症等産婦人科領域の疾患発症との因果関係を比較検証することを目的とする。具体的な測定対象物質は、フタル酸エステル類の代謝物であるフタル酸モノエステル類、ヒトにおいて健康との関連が大きいと考えられる必須ミネラルを始めとする重金属類、さらには、主に防虫剤として用いられる 1,4-ジクロロベンゼン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝物である 2-エチル-1-ヘキサノール及び 2-エチル-1-ヘキサナールとし、同一母体から得られる母体血、臍帯血、胎盤、胎便、母乳、尿、毛髪等を測定する。研究初年度の本年度は、上記測定対象化学物質のヒト生体試料中の分析法について検討を加えた。

2-③ 胎盤中微量元素の分析法の開発：重金属による環境汚染は、かつて深刻な公害病を引き起こしたため、人体への毒性や曝露源などが国内外でよく研究されており、耐用摂取量も制定されている。しかしながら、重金属は成人のみならず、胎児性水俣病に代表されるように、妊娠中に胎盤を通過し胎児にも被害をもたらすことが報告されており、感受性が成人とは異なる胎児や小児への被害を防ぐため、これまでの基準値を見直さなければならない、との声も上がっている。米国では水銀による小児の神経発達遅延の被害が生産性の低下などにもつながり、年間 87 億ドルの経済的損失を招いていると推定されている。このようなことから、早急に周産期の重金属曝露の実態を明らかにし、妊婦や小児に対して曝露源と考えられる飲料水や食品などの基準値を見直す必要がある。

しかしながらこれまで重金属測定のための生体試料として用いられている毛髪などのサンプルを新生児から採取することは困難であることから、本研究では重金属の周産期曝露量を高精度かつ簡便に測定する方法を構築することを目的として、通常は出産後、医療廃棄物として廃棄される「臍帯および胎盤」を利用して周産期の重

金属汚染を評価するシステムを構築することを本年度の目的とした。重金属の高感度分析を行うため、広いダイナミックレンジを持ち多元素同時分析が可能な誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を導入し分析方法の開発を試みた。

### 3 代謝物質の胎盤発生におけるエピジェネシスへの影響の研究；

ヒト受精卵は 200 種もの異なる細胞へと分化する。この過程は「細胞は同じ DNA 塩基配列を持つが異なる性質を持つようになり、その性質は細胞分裂後も維持される」エピジェネティックなプロセスである。DNA メチル化は遺伝子サイレンシング・クロマチン構造の変換を伴う遺伝子発現の制御機構であるとともに、細胞分裂後も維持される、エピジェネティクスの分子機構である。各々の細胞はゲノム上の異なる座位がメチル化・脱メチル化され、細胞特異的な DNA メチル化プロファイルを持つようになる。近年、ヒ素などの環境汚染物質が DNA メチル化レベルでの異常を引き起こすことが懸念されている。もしこれらの物質が母体を通じて初期胚の DNA メチル化プロファイルに異常を生じさせ、個体発生にエピジェネティックな異常を生じさせている可能性がある場合、その異常は生後も引き継がれ、生涯を通じて遺伝子発現が異常になる可能性を秘めている。

本研究では、ジメチルスルホキシド (DMSO) などの化学物質が DNA メチル化やクロマチン構造といったエピジェネティック機構の変化を引き起こす可能性の検証をおこなった。本研究の成果によって、化学物質の安全基準濃度範囲の規定といった評価基準に新たな基礎的知見を与えることが可能となると考えられる。また、初期胚の発生には複数のマスター遺伝子が重要な役割を有することが明らかになっており、化学物質がこれらのマスター遺伝子にどのようなエピジェネティック変化を誘発するかを解析することで、化学物質が奇形などの異常を誘発する場合の機序や治療法解明へ貢献することが期待される。

## B. 研究方法

### 1 ハウスダストを含めた主に室内曝露に関する研究；

#### 1-① ピレスロイド系農薬の生体暴露調査；

##### 1. 試料

尿は、埼玉県衛生研究所職員のボランティアから採取した。採取した尿は速やかに分析に供した。なお、尿の採取と使用に関しては、いずれもインフォームドコンセントを十分行い、理解が得られたボランティアから採取するなど、倫理面への配慮を行った。

マーケットバスケット用試料は、さいたま市内で市販されている食品、約 200 品目を購入し、国

民栄養調査に基づき各品目を採取して 1 群から 13 群までのマーケットバスケット用試料を調製した。第 14 群の飲料水は埼玉県衛生研究所内の水道水を用いた。

## 2. 試薬

標準品：3-Phenoxybenzoic acid(3-PBA) 及び 2-Phenoxybenzoic acid(2-PBA) はシグマ社製を用いた。標準溶液は、各標準品 20mg を精秤し、メタノール 100mL に溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液及び内部標準溶液とした。

残留農薬標準品 (有機リン系 48 種、ピレスロイド系 9 種) は、和光純薬 (株)、関東化学 (株) 及び林純薬 (株) 製を用いた。各標準品 20mg を精秤し、ヘキサン 100mL に溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液とした。

$\beta$ -グルクロニダーゼ：シグマ社製 (130,000 units/mL) を用いた。

精製用カートリッジ：Oasis HLB カートリッジ (60 mg)：Waters 製を用いた。カートリッジは予めメタノール 5 mL、水 5 mL の順でコンディショニングした後使用した。

カラムクロマトグラフィー用フロリジル：フロリジル PR、和光純薬 (株) 製を用いた。

その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いた。

## 3. 装置及び測定条件

### 3.1 尿中の 3-PBA の分析

高速液体クロマトグラフィー質量分析計：HPLC 装置には、Waters 社製 2695 HPLC システム、質量分析装置には、Quattro micro API を使用した。

### 3.2 食品中のピレスロイド系農薬、有機リン系農薬の分析

FPD 検出器付きガスクロマトグラフ (FPD-GC) 及び ECD 検出器付きガスクロマトグラフ (ECD-GC)：Agilent 社製 6890 GC システムを用いた。

測定条件は次のとおりとした。

○有機リン系農薬 (FPD-GC)

カラム：DB-1 0.25mm×30m×0.25  $\mu$ m

カラム温度：130°C (2min) - 10°C/min - 180°C - 5°C/min - 240°C (15min)

注入口温度：250°C

検出器温度：250°C

キャリアーガス：He, 1.5mL/min

注入方法：スプリットレス

試料注入量：2  $\mu$ L

○ピレスロイド系農薬 (ECD-GC)

カラム：DB-17 0.25mm×30m×0.25  $\mu$ m

カラム温度：80°C (10min) - 10°C/min - 270°C (20min)

注入口温度：250°C

検出器温度：250°C

キャリアーガス：He, 1.5mL/min

注入方法：スプリットレス

試料注入量：1  $\mu$ L

#### 4. 検量線の作成

##### 4.1 尿中の3-PBAの分析

内部標準物質として、3-PBAの安定同位体標識内部標準物質が市販されていないことから、3-PBAと構造が類似している2-PBAを用いた。内部標準物質2-PBAを20 ng 含んだ3-PBAの0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10及び100ng/mLの溶液を調製し、その5 $\mu$ LをLC/MS/MSに注入した。検出にはMRM(Multiple Reaction Monitoring)法を採用し、それぞれモニターイオンm/z 213>90により得られたMRMクロマトグラムよりピーク面積を求め、3-PBAと2-PBAの面積比により検量線を作成した。

##### 4.2 マーケットバスケット試料中の農薬の分析

各農薬標準品の濃度が0.05, 0.1, 0.2, 0.5及び1 $\mu$ g/mLとなる混合標準溶液を調製し、その1~2 $\mu$ LをGCに注入した。得られたGCクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

#### 5. 試験溶液の調製

##### 5.1 3-PBA試験溶液の調製(尿)

###### 5.1.1 遊離体3-PBA測定用試験溶液

尿2mLを採り、内部標準物質である2-PBAを20 ng 加えた後Oasis HLBカートリッジに負荷した。水(3mL x 2)で洗浄した後メタノール3mLで溶出し、減圧乾固後40%アセトニトリル1mLに溶解して試験溶液とした。

###### 5.1.2 総3-PBA測定用試験溶液

尿2mLを採り、内部標準物質である2-PBAを20 ng 加えた後、0.2M酢酸緩衝液(pH 5)2mL、 $\beta$ -グルクロニダーゼ6,500 units/mL(試薬 $\beta$ -グルクロニダーゼを0.2 M酢酸緩衝液(pH 5)で20倍希釈)を50 $\mu$ L加え、37°Cで90分間インキュベートした。その後の操作は遊離体3-PBA測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

##### 5.2 残留農薬測定用試験溶液の調製

マーケットバスケット用試料20gを採り、アセトン80 mLを加えてホモジナイズ抽出し、吸引ろ過した。残渣を更にアセトン40mLを加え、ホモジナイズ抽出した後、同様に吸引ろ過した。ろ液を合わせ、あらかじめ飽和塩化ナトリウム水溶液50mLの入れてある分液ロートに移し、ヘキサン50mLで振とう抽出した。ヘキサン層を分取し、減圧乾固した後、ヘキサン5mLに溶解し、その1mLを有機リン系農薬分析用試験溶液とした。なお、2~5、10~12群については、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を追加した。

ピレスロイド系分析用試験溶液は、先のヘキサン溶液3mLをフロリジルカラムクロマトグラフィー(内径10mm、長さ300mmのカラムにフロリジルPR3gをヘキサンを用いて湿式充填)で精製した。ヘキサン溶液3mLをカラムに負荷し、15%エーテル-ヘキサン40mLで溶出し、試験溶液とした。

#### 1-② 有機フッ素系化合物とニコチンの生体試料測定系の開発と曝露調査:

#### 検討課題(1)ヒト血液試料およびハウスダスト中有機フッ素系化合物の一斉分析法の構築とバリデーション

①血液試料:分析法に関しては、ヒト血漿中PFOS、PFOSA、PFOA、PFNAおよびPFDAを測定対象とし、前処理操作の簡便化、測定時のコンタミネーションの軽減化および高感度化を目的に、可能な限り前処理操作を閉鎖系で実施するため、オンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー(LC)/タンデム質量分析法(MS/MS)からなる測定システムを構築した。本システムは、アセトニトリルで除タンパクした試料溶液をオートサンプラーによりLCへ注入後、5分間50 mM酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液(pH=4.7)/メタノール(90/10、v/v)を送液することで、固相抽出カートリッジ上で測定対象物質の濃縮とクリーンアップを行った。次に六方バルブを切り替え、1 mM酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混液をバックフラッシュ法によりグラジエント溶出することで、測定対象物質を固相抽出カートリッジから溶出させ、分離部および検出部に導入した。

②ハウスダスト:ハウスダストは固体試料であるため、前処理には固体試料にも応用可能な、超臨界流体抽出法を採用し、測定機器には高感度・高選択性を有するLC-MS/MSを用いた。ハウスダスト試料は、ダニの生息領域および家庭内特有のダストの領域だと考えられる75 $\mu$ m~1mmの領域を採取した。また、抽出条件の最適化を目的として、モディファイアの種類、流量および抽出時間の影響を検討した。実試料としてハウスダスト20検体の分析に応用し、PFOS濃度の測定を行った。検討課題(2)LC/MSを用いたヒト尿中ニコチンの分析

前処理法には固相抽出法を適用し、測定にLC/MSを使用した。高精度な分析法を達成するために内標準法を採用し、内標準物質にニコチン-d<sub>3</sub>を使用した。移動相に水/メタノール(20/80、v/v)を使用し、流速は0.2ml/minとした。分析カラム(GL Sciences社製Inertsil-3 diol column(2.1mm x 150mm, 5 $\mu$ m))で分離を行った後、MS部に導入した。測定は、フラグメンター電圧を110Vとし、選択イオン検出(SIM)ポジティブイオンモードにて行った。モニタリングイオンは、分子量関連イオンであるm/z163[M+H]<sup>+</sup>とした。

#### 1-③ ポリ臭素化ジフェニルエーテルのハウスダストからの曝露についての研究:

##### 1. 試料

一般住宅のハウスダスト(電気掃除機捕集物、H17.12.6に採取)および大阪府立公衆衛生研究所内の実験室通気口内部に付着したダスト(H17.7.15に採取)を予備実験に使用した。一般住宅ハウスダストはステンレス製ふるいにより、(1)425 $\mu$ m以下、(2)0.425~1mm、(3)1mm以上のサイズに粗分けして分析を行った。添加回収試験には

ハウスダスト代用物として無水硫酸ナトリウムを用いた。

## 2. 試薬

クリーンアップスパイク溶液には炭素安定同位体 ( $^{13}\text{C}$ ) で標識化された $^{13}\text{C}$ -BDE-28, 47, 99, 153, 154, 183, 209,  $^{13}\text{C}$ -CB-28, 52, 118, 153, 180および $^{13}\text{C}$ - $\delta$ -HCHのヘキサン混合溶液 (各5ng/mL、 $^{13}\text{C}$ -BDE-209については50ng/mL) を使用した。また、シリンジスパイクには $^{13}\text{C}$ -BDE-77のヘキサン溶液 (5ng/mL) を使用した。

## 3. 操作

3.1. 前処理カラムにおける各化合物の溶出パターンの確認

### 3.1.1. GPCカラム

後述のGPC条件において標準溶液 (化合物濃度4~100ng/g、アセトン/シクロヘキサン溶液) 5mLを注入し、カラム溶出液を2分間隔 (10mLずつ) で分画した。各フラクションにクリーンアップスパイク溶液1mLおよびノナン1mLを加えた後、窒素ガス吹き付けで1mLに濃縮し、GC/MS測定に供した。

### 3.1.2. 硫酸シリカゲルカラム

パスツールピペットに44%硫酸シリカゲルを1g乾式充填したミニカラムに標準溶液 (化合物濃度20~500ng/g、ヘキサン溶液) 1mLを負荷し、リザーバーにヘキサン10mLを加え溶出を行った。同様にヘキサン10mLで2回カラムを溶出し、3回の溶出液を別の容器に回収した。各フラクションにクリーンアップスパイク溶液1mLおよびノナン1mLを加えた後、窒素ガス吹き付けで1mLに濃縮し、GC/MS測定に供した。

### 3.2 試験溶液の調製法

ダスト試料0.5gを50 mL容のねじ蓋付遠沈管に精密に秤取後、クリーンアップスパイク溶液1mLを添加し、アセトン10mL、ヘキサン20mLを加えて超音波抽出を行った。抽出液を遠心処理 (3000rpm, 5min) し、上澄液をろ紙 (No. 5A) ろ過した。試験管内の残留物にアセトン10mL、ヘキサン20mLを加えて再度超音波抽出および遠心処理を行い、採取したろ液を合わせて濃縮乾固した。残渣をヘキサン1mLに溶解し、予めヘキサン10mLで洗浄した44%硫酸シリカゲルカラム (充填量1g) に負荷した。ヘキサン10mLでカラムを溶出し、溶出液を濃縮乾固した。残渣をアセトン/シクロヘキサン (3:7) に溶解して10mLとし、5mLをゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) で精製した。回収液を1mL程度まで濃縮後、濃縮試験管に移し、シリンジスパイク溶液0.5mLおよびノナン250 $\mu$ Lを添加し、窒素ガス吹き付けで250 $\mu$ Lに濃縮し、GC/MS測定に供した。添加回収実験では、無水硫酸ナトリウム0.5gに各化合物の混合標準溶液 (20~500ppb) 0.5mLを添加し同様に抽出・精製操作を行った。

## 4. 装置条件

### 4.1. GPC条件

装置: abc laboratories AS-2000

カラム: Shodex CLNpak EV-GAC (ガードカラム) + CLNpak EV-2000AC

移動相: アセトン/シクロヘキサン (3:7, v/v)

流速: 5mL/min

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

採取条件: dump 14min, collect 18min, wash 8min (total 40min)

### B. 4. 2. GC/MS条件

装置: JEOL JMS-GCmateII GC/MS system

注入口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

注入法: パルスドスプリットレス、1 $\mu$ L

パルス圧: 20psi (0~1.6min)

キャリアガス: He (カラム流量1mL/min)

カラム: Restek社製Rtx-1ms (15 m $\times$ 0.25mm ID、膜厚0.1 $\mu$ m)

昇温条件: 100 $^{\circ}\text{C}$  (2min) -10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -310 $^{\circ}\text{C}$  (3min)

トランスファーライン温度: 310 $^{\circ}\text{C}$

イオン源温度: 280 $^{\circ}\text{C}$

イオン化電流: 300 $\mu$ A

イオン化エネルギー: 35eV

加速電圧: 2500V

マルチプライヤー電圧: 400V

分解能: 500

イオン化モード: EI

検出法: SIM

モニターイオン: 省略

## 2 子供の化学物質曝露のモニタリングに関する研究;

### 2-① フタル酸モノ体の血清分析法の開発:

#### 1. 試薬等及び器具

以下の7種類のフタル酸モノエステル類、すなわち、MMP、MEP、MBP、MBzP、MEHP、MEHHP及びMINPを分析対象とした。MMP、MEP、MEP- $^{13}\text{C}_4$ 、MBP、MBP- $^{13}\text{C}_4$ 、MBzP、MBzP- $^{13}\text{C}_4$ 、MEHP、MEHP- $^{13}\text{C}_4$ 、MEHHP、MEHHP- $^{13}\text{C}_4$ 、MINP及びMINP- $^{13}\text{C}_4$ の各100ppmアセトニトリル標準溶液は、Cambridge Isotope Laboratories社より購入した。4-Methylumbelliferone (4-MU) 及び4-Methylumberriferyl glucuronide (4-MU-Glu) は、SIGMA製を用いた。beta-Glucuronidaseは、和光純薬社製 (8.5U/mL; E. coli由来) を用いた。リン酸及びギ酸は、HPLC用を用いた (和光純薬)。酢酸アンモニウムは、特級を用いた (和光純薬)。25%アンモニア水溶液は、精密分析用を用いた (和光純薬)。アセトニトリルは、環境分析用を用いた (和光純薬)。超純水は、ミリポア社製のMilli-Q SP.TOC.により作成したもの (MilliQ水) をそのまま用いた。

コンタミネーションの原因となりうる樹脂製器具を可能な限り排除し、加熱可能なガラス器具は、MilliQ水、アセトン及びヘキサンで洗浄した後、乾熱乾燥機中で200 $^{\circ}\text{C}$ で2時間以上加熱し、清浄な場所で冷却して用いた。

## 2. 採血及び血清の調製

大阪府立公衆衛生研究所に在籍する健康な 30 代の男性より採血した。採血用具は、予め調べた結果、測定対象物質の混入が認められなかった、テルモ社製真空採血管(ベノジェクト II プレーン)及び採血針(ベノジェクト II 21G)を用いた。採血後、室温で 30 分間静置して血球成分の凝固を認めたものを 3,000rpm で 10 分間遠心分離して上清となる血清を清浄な試験管に分取して実験まで-40℃で保存した。

## 3. 標準溶液

フタル酸モノエステル標準混合溶液：MMP, MEP, MBP, MBzP, MEHP, MEHHP 及び MINP の各 100ppm アセトニトリル溶液及びアセトニトリルを混和して 5.00ppm の標準原液とした。これを適宜、MilliQ 水及びアセトニトリルで希釈して用いた。

フタル酸モノエステル内部標準混合溶液：

MMP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MBP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MBzP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEHHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> 及び MINP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> の各 100ppm アセトニトリル溶液及びアセトニトリルを混和して 5.00ppm の内部標準原液とした。これを適宜、MilliQ 水及びアセトニトリルで希釈して用いた。

## 4. 試験液の調製及び分析条件

解凍後直ちに血清 1.00g に 1.25 mol/L リン酸 100 μL を添加し混和した。次に 100 ppb 内部標準混合溶液 100μL、2.5mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH6.5)、8.5U/mL beta-Glucuronidase 60μL 及び 1.0ppm 4-MU-Glu 100μL を添加して攪拌後、40℃で 45 分間インキュベートした。インキュベート後、氷上に移し、25%アンモニア水溶液を添加した。全量を予め、アセトニトリル 15mL 及び MilliQ 水 5mL でコンディショニングした OASIS MAX(6cc, 150mg; Waters)に負荷した。次にカラムを MilliQ 水 5mL 及びアセトニトリル 10mL で洗浄し、2%ギ酸含有アセトニトリル 5mL で測定対象物質を溶出した。当固相抽出過程にはビジプレッパバキュームマニホールド(SPELCO)を用い、カラム先端には、ディスポーザブルライナー(SPELCO)を装着して試料間のコンタミネーションを排除した。溶出液は、窒素気流下、40℃で乾固した後、20%アセトニトリル含有水 1.00mL に再溶解して LC/MS/MS の試験液とした。

## 5. 倫理面への配慮

実験試料となる血液の採取は、大阪府立公衆衛生研究所の倫理規定に則って行った。すなわち、採血に先だって本研究目的の趣旨を文書により説明し、同意書を得た。採血は、医師の立ち会いの下、有資格者によって行われた。また、実験に用いた有機溶媒等は、環境中へ排出されないよう回収を徹底した。

## 2-② フタル酸モノ体の尿中分析法と重金属類、揮発性有機化合物の測定法の開発：

### 1. フタル酸モノエステル類

### (1) 試薬及び材料

MMP、MEP、MBP、MEHP、MINP、MBzP、MMP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MEP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MBP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MEHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MINP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MBzP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> は Cambridge Isotope Laboratories 社製、β-グルクロニダーゼ溶液(100units)、フロリジー-PR は和光純薬製、酢酸アンモニウムは和光純薬製特級、硫酸ナトリウムは和光純薬製残留農薬用、Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) は関東化学製水質試験用、ヘキサン、アセトン、塩化ナトリウムは関東化学製フタル酸エステル試験用、N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine はジーエルサイエンス製を使用した。

### (2) 器具・試薬の前処理

ホールピペット、メスフラスコ以外の器具は、200℃で 2 時間加熱し、使用直前にヘキサンで洗浄した。

塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200℃で 2 時間加熱した。

### (3) フロリジルカラムの調製

内径 15 mm、長さ 110 mm のガラス製カラムの底に、ガラス繊維濾紙を敷き、フロリジル 1g 及び無水硫酸ナトリウム 2g を積層した。使用直前にアセトン 10mL、ヘキサン 10mL で洗浄した。

### (4) 試験溶液の調製法

尿 1mL を共栓付遠心管(10mL、ガラス製)にとり、0.1M 酢酸アンモニウム 0.25mL、内部標準溶液 25 μL、β-グルクロニダーゼ 15 μL を加え混和した後、37℃で 1 時間インキュベートした。10%硫酸で pH2 に調整後、ヘキサン 5mL、塩化ナトリウム 0.25g を加え、3 分間混和後 3000rpm で 5 分間遠心分離した。ヘキサン相を分取し、窒素気流下で乾固した。残渣にジアゾメタン-MTBE 溶液 0.5mL を加え、30 分間放置後、窒素気流下で乾固した。残渣をヘキサン 5mL に溶解し、フロリジルカラムに負荷した。ヘキサン 3mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10mL で溶出した。溶出液を窒素気流下で 0.5mL に濃縮して試験溶液とした。

### (5) ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 条件

装置：Agilent 6890N GC/5973N MSD

イオン源：EI

カラム：HP-5MS SV (30 m x 0.25 mm ID、膜厚 0.5 μm)

カラム温度：80℃ (3 分) → 20℃/分 → 240℃ → 10℃/分 → 300℃ (5 分)

キャリアガス：He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度：250℃

試料注入法：パルスドスプリットレス

四重極温度：150℃

イオン源温度：230℃

検出法：選択イオン検出 (SIM)

### (6) 定量法

試験溶液 2 μL を GC/MS に注入し、各メチル化フタル酸モノエステルのピーク面積を内部標準

のピーク面積で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。

## 2. 重金属類

### (1) 試薬及び材料

ICP-MS Quality Control Sample 2 (25 Components) はメルク製を、マグネシウム(Mg)、カルシウム(Ca)、鉄(Fe)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)、リチウム(Li)、ホウ素(B)、アルミニウム(Al)、ヒ素(As)、ルビジウム(Rb)、ストロンチウム(Sr)、スズ(Sn)、水銀(Hg)、スカンジウム(Sc)、イットリウム(Y)、イリジウム(Ir)はメルク製 ICP 標準液を、硝酸、過酸化水素は関東化学製 Ultrapur を使用した。また、血清標準試料(Seronorm N00371 Level 2)は SERO 製を、血清試料(コントロール血清 I ワコー/B)は和光純薬製を、尿標準試料(Lyphochek 1)は BIO-RAD 製を使用した。

### (2) 測定項目

測定対象元素は、Mg、Ca、Fe、Cu、Zn、クロム(Cr)、マンガン(Mn)、コバルト(Co)、セレン(Se)、モリブデン(Mo)、Li、B、Al、バナジウム(V)、ニッケル(Ni)、As、Rb、Sr、カドミウム(Cd)、Sn、アンチモン(Sb)、バリウム(Ba)、Hg、鉛(Pb)の 24 元素とした。

### (3) 器具の洗浄

ピペットチップ、サンプルカップ等の使用器具は、10%硝酸槽に一夜浸漬し、水道水及びイオン交換蒸留水で十分に洗浄後、乾燥・保存し、使用前に超純水で洗浄した。

### (4) 試料の前処理法

#### 1) 血清

マイクロ波分解法；マイクロ波分解用容器(MV-7 専用 PFA 小容器、ジーエルサイエンス製)に血清 0.5mL、硝酸 1mL、過酸化水素 0.1mL を入れて一夜放置し、電子レンジ(200 W)で 5 分、2 回加熱後、水中で 1 時間冷却した。

酸分解法；テフロン試験管に血清 0.5mL、硝酸 1mL を入れ、80℃アルミブロックバス中で過酸化水素及び硝酸を適宜追加し、ほとんど無色となるまで酸分解した。

2) 尿 酸分解法；テフロン試験管に尿 10mL を入れ、硝酸 2.5mL を加えて 70℃水浴中で 5mL 以下になるまで酸分解した。

ろ過法；尿をメンブランフィルター(0.45 μm)でろ過した。

### (5) 試験溶液の調製法

血清：前処理法に従って酸分解後、ポリエチレン製遠沈管(15mL)に入れ、超純水で分解用容器内を洗い込んで全量を 3mL にする(6 倍希釈)。混和後、その 1.8mL を ICP-MS オートサンプラー用サンプルカップ(15mL)にとり、0.1%硝酸 0.9mL、内部標準溶液(Sc, Y, Ir 各 100 ppb)0.3mL を加え、混和して試験溶液とした(10 倍希釈)。

尿：前処理法に従って酸分解後、ポリエチレン製遠沈管(15mL)に入れ、超純水でテフロン試験管

内を洗い込んで全量を 5mL にする(2 倍濃縮)。混和後、その 1.5mL を ICP-MS オートサンプラー用サンプルカップ(15mL)にとり、0.1%硝酸 1.2mL、内部標準溶液 0.3mL を加え、混和して試験溶液とした。

### (6) 誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)条件

装置：ICP-MS (Agilent 7500i、横河アナリティカルシステムズ)

測定条件：RF パワー；1500 W

サンプリング位置；8 mm

プラズマガス；Ar 15 L/min

ネブライザ型；バビントン型

内部標準元素；Sc(45)、Y(89)、Ir(193)

干渉補正式；

$V(51) = (51) \cdot 1 - (53) \cdot 3.127 + (52) \cdot 0.3534$

$Se(78) = (78) \cdot 1 - (76) \cdot 0.1869$

### (7) 定量法

試験溶液を ICP-MS に導入し、各元素のカウント数を内部標準のカウント数で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。

## 3. 揮発性有機化合物

### (1) 試薬および材料

2-エチル-1-ヘキサナール標準品はアルドリッチ製を、トルエン-d<sub>8</sub> 及び 2-エチル-1-ヘキサナール標準品は和光純薬製を、1,4-ジクロロベンゼン標準品は GL サイエンス製を、メタノールは関東化学製の残留農薬・PCB 測定用を、塩化ナトリウムは関東化学製の特級をそれぞれ用いた。血清はと畜場においてと殺直後の豚血液を採取し、3000 rpm で遠心分離したものを、尿試料についてはボランティアより採取したものをそれぞれ使用した。

### (2) 分析操作

測定：希釈水 10mL が入ったヘッドスペースバイアルに、試料(血清 0.5mL、尿 2mL)及び混合標準溶液 1 μL を加えた後、テフロン張りのシリコンゴムセプタムおよびアルミシールで密封した。これらの操作は、活性炭による空気浄化機能を有するグローブボックス(自家製)内で行った。このバイアルをヘッドスペースオートサンプラーにセットし、ヘッドスペース-GC/MS により測定を行った。

希釈水：300℃で 5 時間加熱処理した塩化ナトリウムと Milli Q 水とで調製した飽和食塩水を、80℃で加温しながら高純度ヘリウムを 5 分間ばっ気(約 1 L/分)した。その後、超音波水槽中でアスピレーターにより脱気する処理を 3 回繰り返すことにより、揮発性の溶質を除去した。

混合標準溶液：2-エチル-1-ヘキサナール、2-エチル-1-ヘキサノール及び 1,4-ジクロロベンゼン標準品をメタノールに溶解して 1000ppm 溶液とし、それらをメタノールで段階的に希釈して、次の 6 段階の混合標準溶液を調製した。なお、各標準溶液には内部標準としてトルエン-d<sub>8</sub> を 1ppm 添加した。標準溶液 1 (2-エチル-1-ヘキサナール

ル:0.4ppm / 2-エチル-1-ヘキサノール:0.4ppm / 1,4-ジクロロベンゼン:0.2ppm)、標準溶液2(同0.8 / 0.8 / 0.4)、標準溶液3(同1.6 / 1.6 / 0.8)、標準溶液4(同4.0 / 4.0 / 2.0)、標準溶液5(同8.0 / 8.0 / 4.0)、標準溶液6(同20.0 / 20.0 / 10.0)

検量線/定量方法:内部標準のみを添加した試料、及び一定濃度の標準溶液(内部標準を含む)を添加した試料を測定し、測定対象化合物とトルエン-d<sub>8</sub>のピーク面積比を基に検量線を作成後、その傾き及び切片から試料中の濃度を算出した。

### (3) 分析条件

ヘッドスペース条件 装置:Tekmer 7000(Tekmer)、バイアル容量:22mL(Chromacol, CV-22)、バイアル加熱条件:85℃(20分)、バイアル振とう機能:使用(Power 5:3分)、サンプルループ容量:1mL、サンプルループ温度:150℃、トランスファーライン温度:160℃

GC/MS 条件:装置:AUTO MASS SYSTEM II(日本電子) カラム:Vocol(0.25mm i.d. x 60m、膜厚:1.5μm、Supelco) カラム温度:40℃で4分間保持し、230℃まで毎分10℃で昇温後、230℃で5分間保持。イオン源温度:210℃ イオン化:EI、イオン化電圧:70eV、検出方法:SIM法、モニターイオン:2-エチル-1-ヘキサノール(m/z 72)、2-エチル-1-ヘキサノール(m/z 57)、1,4-ジクロロベンゼン(m/z 146)、トルエン-d<sub>8</sub>(m/z 98)

### 2-③ 胎盤中微量元素の分析法の開発:

1. 試料の採取:試料は東海大学医学部で、十分なインフォームドコンセント(IC)のもとに文書による同意を得て採取された臍帯・胎盤を用いた。試料は分娩後、マイナス20℃で凍結保存し、分析の前処理直前に解凍して使用した。尚、本研究の骨子並びにICの実際的方法等については、既に医学部内の倫理委員会において許可を得ている。

2. 装置:ICP-MSは横河アナリティカル社製HP-4500を使用した。マイクロウェーブによる試料前処理には、ACTAC社製スピードウェーブMWS-2を使用した。

3. 試薬および標準液の調整:標準溶液には、SPEX社製混合標準液XSTC-469(5%硝酸ベース)を用いた。内標準液は同社製混合内標液XSTC-538を用いた。試料の希釈等には、ミリポア社製MilliQ SP(電気伝導度18.3Ω)で精製したものを使用した。試料前処理に使用するアルカリ溶液として和光純薬工業社製の精密分析用25%テトラメチルアンモニウム-ヒドロキシド溶液を、酸溶液として関東化学工業社製の超高純度硝酸を用いた。また、同硝酸溶液は使用器具の洗浄にも用いた。

4. 測定対象元素および内標元素:測定対象元素およびそれぞれの元素の内標元素は分担報告書に記載した。

5. 試料の前処理:それぞれの試料は解凍後、約2cmの組織片に細切したものを1サンプルとした。各サンプルの重量を測定し、80℃の恒温インキュベータ内で重量の変化がなくなるまで乾燥させた。試料の溶解にはマイクロウェーブ分解法、硝酸分解法、アルカリ分解法をそれぞれ行った。

6. 添加回収試験:それぞれの測定元素における添加回収試験を超純水を用いて行った。超純水に標準溶液を1/1000に希釈して加えた。回収率は回収率=[添加試料の測定濃度]/[添加濃度]x100の式で計算した。

### 3 代謝物質の胎盤発生におけるエピジェネシスへの影響の研究;

1. DMSO存在下でのマウスES細胞の分化:

マウスES細胞を、DMSO存在下(0.02%、0.1%、0.5%、1.0%)で4日間浮遊培養することで分化を誘導し、胚様体(embryoid body; EB)を形成させた。

2. DMSOがエピジェネティック制御因子の発現におよぼす影響の解析

DMSO存在下、および、非存在下で形成したEBからRNAを抽出し、DNAメチル化を担うDNAメチル転移酵素3種(Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b)および、ヒストン修飾を担う酵素5種(メチル化:G9a、Suv39h1、Suv39h2、mDot1;アセチル化:Sir2a)のmRNAの発現を、定量的リアルタイムPCRにより解析した。

3. DMSOがマウスES細胞のゲノムDNAメチル化状態におよぼす影響の解析

DMSOがES細胞ゲノムにおよぼすエピジェネティックな影響(DNAメチル化状態の変化)を、繰り返し配列のサザンハイブリダイゼーション解析、および、Restriction landmark Genomic Scanning(RLGS)法と呼ばれる手法を用いて解析した。RLGS法は、メチル化感受性制限酵素(活性が認識配列のメチル化で阻害される)であるNotI、および、その他の制限酵素でゲノムDNAを断片化し、NotI切断端を放射性標識したのち2次元電気泳動で展開する手法である。NotI認識部位がメチル化されていない場合、該当するDNA断片がX線フィルム上にスポットとして検出され、1枚のフィルム上で約1,500カ所の領域の解析が可能である。

4. 倫理面への配慮

本研究に用いられたES細胞はマウス由来のものであり、倫理上の問題は全くない。

### C. D. 研究結果 及び 考察

1 ハウスダストを含めた主に室内曝露に関する研究;

1-① ピレスロイド系農薬の生体暴露調査:

1. 3-PBAのLC/MS/MSによる分析法の検討

ピレスロイド系農薬の多くは、

3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) に代謝される。そこで、3-PBA を指標成分とした LC/MS/MS による高感度分析法を検討した。イオン化モードは、3-PBA がカルボキシル基を有していることからネガティブモードが適していた。

## 2. 尿中の 3-PBA の分析法の検討

大気あるいは食品を介して摂取されたピレスロイド系農薬は、肝臓において代謝され、尿中へ排泄される。そこで、ピレスロイド系農薬の曝露レベルを評価するために、尿中に含まれるピレスロイド系農薬の主代謝物 3-PBA の測定法を検討した。

### 2.1 遊離体 3-PBA の前処理

3-PBA はカルボキシル基を有するものの、構造的に疎水性に富む化合物と考えられる。そこで、ポリマー逆相系カートリッジを用いた前処理法を採用することにした。尿をカートリッジに直接負荷し、水で洗浄後、メタノールで溶出する簡便な前処理法を構築した。本法による 3-PBA の添加回収率 (2 ppb 添加) は、平均で 92.7%、相対標準偏差 RSD は 4.7% (n=5) であった。

### 2.2 総 3-PBA の前処理

3-PBA は、グルクロン酸抱合体として尿中へ排泄されると考えられる。そこで、 $\beta$ -グルクロニダーゼによる脱抱合体処理条件を検討した。検討の結果、インキュベーションは 1 時間以上、 $\beta$ -グルクロニダーゼの量は 30  $\mu$ L 以上 ( $\beta$ -グルクロニダーゼを 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5) で 20 倍希釈したもの) で十分であった。そこで、インキュベーションは 90 分、 $\beta$ -グルクロニダーゼの量は 50  $\mu$ L とした。

本法による 3-PBA の添加回収率 (2 ppb 添加) は、平均で 82.7%、相対標準偏差 RSD は 7.5% (n=5) であった。

## 3. 成人尿中の 3-PBA レベル

埼玉県衛生研究所に勤務する職員、10 名 (男女各 5) の尿中の 3-PBA レベルは、遊離体は殆どが検出下限値 (LOD, 0.02 ppb) 以下、グルクロン酸抱合体は平均で 0.58ppb であった。今回の 3-PBA 濃度及び成人平均尿量から、構造中に 3-PBA を有するピレスロイド系農薬の尿中排泄量を推定すると約 2  $\mu$ g となる。なお、3.7ppb 検出された職員について、3 日後の尿を採取し、3-PBA 濃度を測定した結果、総 3-PBA は 0.3ppb であった。

なお、3-PBA が 3.7ppb 検出された尿を冷蔵 (5 $^{\circ}$ C) で 7 日間保存し、3-PBA の尿中での安定性を調べた結果、3-PBA のグルクロン酸抱合体は比較的安定であった。

ピレスロイド系農薬は、農産物から有機リン系農薬について多く検出されている。また、家庭用殺虫剤として使用されている化学物質の 90%以上がピレスロイド系農薬とする調査報告がなされている。今回の測定結果から、ヒトは大気及び食品を介して極微量であるが、ピレスロイド系農薬に曝露されていることが示唆された。

今後は、夏季及び冬季の成人及び子どもの一日尿を採取し、ピレスロイド系農薬の季節による曝露量の相違等を調査する予定である。更に、家庭用として汎用されているピレスロイド系防虫剤の中には、構造中に 3-PBA を有していないものもあることから、これらの曝露評価法についても検討する予定である。

## 4. 食品に含まれるピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬の分析

家庭用殺虫剤として使用されている化学物質の 90%以上がピレスロイド系農薬とする調査報告がなされていることを先に述べた。また、農産物から最も高頻度で検出される農薬は有機リン系農薬であり、次いでピレスロイド系農薬が多く検出されている。そこで今回、私たちが日常の食生活を介してどの程度これらの農薬に曝露されているか調べた。トータルダイエツト法により、食品中のピレスロイド系農薬 9 種及び有機リン系農薬 48 種の分析を実施した結果、今回の調査では、いずれの食品群からもピレスロイド系農薬、有機リン系農薬とも検出されなかった。

## 1-② 有機フッ素系化合物とニコチンの生体試料測定系の開発と曝露調査:

### 検討課題 (1) ヒト血液試料中およびハウスダスト有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発とバリデーション

①血液試料: 本分析法を用い、血漿試料における検出限界 (S/N=3) を求めたところ、それぞれ PFOS: 0.08ng/ml、PFOSA: 0.11ng/ml、PFOA: 0.11ng/ml、PFNA: 0.10ng/ml、PFDA: 0.14ng/ml であった。また、検量線を作成したところ、0.5~100ng/ml の範囲で良好な直線性 (相関係数; r=0.999) が得られた。血漿試料を用いた添加回収試験 (n=6) においても、平均回収率 93.3%以上と良好な結果を得ることができた。

開発した分析法の信頼性を確保するため、内部精度管理を行った。10ng/ml PFOS 標準溶液を用い、一日 4 検体を 20 日にわたって測定し、この結果をもとに管理図を作成し、本分析法の再現性について評価した。その結果、全ての測定日において、処置線を越える日が存在せず、本分析法の高い安定性が確認された。

更に、本分析法を用いて健常者の血液 6 検体を分析した結果、PFOS と PFOA は全員から検出され、それぞれ 2.11~21.3ng/ml、0.73~4.57ng/ml であったが、PFOSA と PFDA は検出されなかった。また、PFOS と PFOA の間に有意な相関性 (r=0.879、n=6) が見られた。

②ハウスダスト試料: モディファイアにはメタノールを用い、抽出時間は 1 時間とした。本分析法を用い、ハウスダスト試料における検出限界を求めたところ、0.04ng/g であった。また、検量線を作成したところ、0.5~100ng/ml の範囲で良好な直線性 (相関係数; r=0.999) が得られた。ハウスダ

スト試料を用いた添加回収試験(n=6)においても、回収率 93%以上と良好な結果を得ることができた。また、ハウスダスト 20 検体において PFOS はすべての検体から検出された(1.5~41.0ng/g)。このことより、ハウスダストを介しての子どもへの PFOS の移行や影響が危惧される。

今後の展開として、母体血および臍帯血に応用し、羊水、母乳などに適用可能かどうか実証する予定である。また、PFCs のヒトへの暴露源を解明するために、ハウスダストと居住者の血液中 PFCs の調査を行う必要があると考える。

#### 検討課題(2)LC/MS を用いたヒト尿中ニコチンの分析

標準品を用いて構築した LC/MS 法の検出下限値は 0.5ng/ml であった。ニコチンとコチニンの各安定同位体(重水素置換体)をサロゲートとした内標準法を選択することで、高感度・高精度な分析法が達成できた。更に、尿を用いた添加回収試験では、コチニンについてはクリーンアップが不十分で実試料分析では良好なピークを得ることはできなかったが、ニコチンは夾雑物の影響を受けることなく、平均回収率 90%以上(n=3)が得られた。そこで本年度の研究においてはニコチンのみを分析対象化合物として、本法を喫煙者および非喫煙者の尿に適用したところ、喫煙者におけるニコチン濃度が、非喫煙者に比べ有意に増加していることが観察され、暴露実態が明らかとなった。今後は、妊婦の尿中に含まれるニコチンを測定し、暴露レベルを把握する予定である。

#### 1-③ ポリ臭素化ジフェニルエーテルのハウスダストからの曝露についての研究：

上述のGPC条件において目的化合物は試料注入後14~32minの範囲に溶出した。また、44%硫酸シリカゲルを1g充填したミニカラムにおいて、目的化合物はヘキサン10mLでほぼ100%溶出することが分かった。

まず硫酸シリカゲルカラム処理のみを施したハウスダスト抽出試料をGC/MSに注入したところ、比較的妨害の少ないSIMクロマトグラムが得られたが、数回の注入で注入口の汚染やカラムの劣化によると思われる著しいピークテーリングおよびBDE-209の感度低下が認められ、マトリックスの除去が不十分であることが示唆された。そこでさらにGPC処理を追加し測定を行ったところ、上記のような悪影響はほとんど認められなかった。また、測定対象化合物の回収率は概ね80~110%の範囲内であり満足できる結果であった。

以上から、硫酸シリカゲルカラム処理とGPCを組み合わせた手法がハウスダストの前処理法として有用であることが分かった。

なお、今回予備実験で使用したハウスダスト試料から比較的高濃度のPBDEsが検出され、食事以外からのPBDEs暴露経路としてハウスダストの吸引は無視できないことが示唆された。

#### 2 子供の化学物質曝露のモニタリングに関する研究；

##### 2-① フタル酸モノ体の血清分析法の開発：

###### 【結果】

##### 1. 試験液の調製

グルクロン酸抱合体の脱抱合反応の条件は、Kato らの報告を参考にした。インキュベーション時間の最適化には、4-MU-Glu から 4-MU への変換を指標とした。その結果、40°Cで 45 分間でプラトーに達することが分かった。固相抽出の条件は、吉村らの報告を参考にした。溶出液を 2%ギ酸含有アセトニトリルに変更することで測定対象物質に加えて 4-MU-Glu 及び 4-MU を同時に回収することが可能となった。

##### 2. 測定及び定量の条件

測定対象物質を 0.05%ギ酸含有 50%アセトニトリル水溶液に 0.1ppm になるよう希釈し、MS/MS にインフュージョンで導入して MS/MS 条件の最適化を行った。また、分析に際して移動相に添加するギ酸の濃度は、感度が最高となる、 $2.0 \times 10^{-4}\%$ とした。

検出下限値(LOD)は、無添加の血清から得た試験液に標準混合溶液を添加した際に S/N=5 をクリアできる濃度である 0.1ppb とした。ただし、無添加血清中に存在が認められる MBP 及び MEHP については、標準溶液を用いて評価した。

操作ブランクは、測定対象となるフタル酸モノエステル類が検出されない MilliQ 水を試料として一連の操作を実施した際に試験液中に認められるフタル酸モノエステル類の濃度とした。脱抱合反応を行わない場合または行う場合、それぞれに調べた。脱抱合反応を行う場合は、行わない場合と比較して MBP 及び MEHP の双方で高くなる傾向にあった。これは、使用試薬量の追加と操作過程の延長に起因する。

操作ブランク中に存在が認められた、MBP 及び MEHP の定量下限値(LOQ)は、操作ブランクにその標準偏差の 10 倍を加算した濃度とした。また、操作ブランク中に存在が認められない、MMP, MEP, MBzP, MEHPH 及び MINP については、S/N=10 以上をクリアできる 0.2ppb とした。

検量線は、0.2-5.0 及び 1.0-200ppb のいずれにおいても直線性が認められた( $r^2 > 0.999$ )。

##### 3. 添加回収試験

ヒト血清に測定対象とするフタル酸モノエステル類を 5.0 または 50ppb 添加して本法の回収率を調べた。用いた血清に MBP 及び MEHP が含まれるため、それらを差し引いて回収率を求めた。その結果、回収率は、93.1~103%となり、RSD についても 10%未満であった。

##### 4. 実試料の予備測定

グルクロン酸脱抱合反応の有無に関わらず、MBP 及び MEHP が検出された。脱抱合反応を行った際の MBP の定量値には、操作ブランク(0.35ppb)が含まれる。これを差し引いた

0.65ppb が実質的濃度と算出される。脱抱合反応なし（フリー体）でMBPの血清中濃度は、0.49ppbであり、脱抱合反応あり（フリー体及び抱合体の合算値）で0.65ppbであったことから抱合体は、0.16ppbと算出された。MEHPについては、LOQ未満であった。また、トレースレベルのMEHPの存在が認められた。

【考察】血清中のフタル酸モノエステル類の分析に際しては、血清中に存在するエステラーゼ活性が、操作過程で混入したフタル酸ジエステル類を加水分解し、見かけ上のフタル酸モノエステル類の濃度の上昇を引き起こすこと及び血清1mLあたり125 $\mu$ molのリン酸を添加することでエステラーゼ活性を阻害することができることを報告している。本研究者らも同一の添加量でヒト血清にフタル酸ジエステル類（DMP, DEP, DBP, BzBP, DEHP, DINP）を添加して記載の脱抱合反応を行った際にこれらフタル酸ジエステル類の加水分解を示唆するフタル酸モノエステル類の濃度の上昇が認められないことを確認した。同時にこのことは、用いたbeta-Glucuronidase溶液に由来するエステラーゼ活性も適切にコントロールされている状況を保証する。更に研究者らは、加えてフタル酸ジエステル類測定のガイドラインの注意事項を遵守し、フタル酸モノエステル類の混入の潜在的原因となるフタル酸ジエステル類の混入の低減化を計った。

精製過程の固相抽出法については、吉村らが開発した尿中のフタル酸モノエステル類の分析法にあるものを一部改良して採用した。本法は、1種類のマルチモード固相カートリッジでLC/MS/MSで分析できる精製度に到達していた。2%ギ酸含有アセトニトリルを溶出液とすることで脱抱合反応進行の指標となる4-MU-Glu及び4-MUが回収することが可能となった。本法は、簡便であり、予備実験では乳汁中のフタル酸モノエステル類の分析過程においても適応可能と考えられる結果を得ている。

本分析法の回収率、操作ブランク値及び定量下限値等の基本的な分析性能について評価した結果、良好な結果を得た。Silvaらは、National Health Examination Surveyの一環として血清中のフタル酸モノエステル類の分析を行っている。その結果、米国人の血清中から抱合体を含めてMEP, MBP及びMEHPを検出しており、それらの幾何平均値は、4.49, 13.54及び4.96ppbと報告している。この分析対象範囲において本法は、適用可能と考えられる。

実試料1検体について繰り返し分析した結果、MBP及びMEHPが検出されたが、MEPは、検出されなかった。予備実験として他の3名の健康な30代男性から採取した血清を分析したところ、同様にMBP及びMEHPが検出されたが、MEPは検出されなかった。現時点での例数は少ないが、MEPの検出頻度において米国人と日本人との間で差が

あることも予測される。

フタル酸ジエステル類の暴露評価については、血中よりも高濃度にフタル酸モノエステル類が検出される尿を分析の方が効率的であると考えられる。また、尿中への排泄速度定数と全消失速度定数を知ることによって摂取量を推計することも可能である。しかしながら、フタル酸エステル類に対するハイリスク群に位置づけられる胎児に対する暴露量の評価に際しては、母体血と臍帯血との間での濃度関係を明らかにする必要がある。本法は、血液（血清）中の高濃度にフタル酸モノエステル類を分析するうえで有用である。現在、乳児の主要な暴露源となりうる母乳中のフタル酸モノエステル類の分析法を検討している。

## 2-② フタル酸モノ体の尿中分析法と重金属類、揮発性有機化合物の測定法の開発：

### 1. 尿中のフタル酸モノエステル類の分析

尿中のフタル酸モノエステル類の分析法として、ジアゾメタンでメチル化後、GC/MSで分析する方法を検討した。5種のフタル酸モノエステル（MEP, MBP, MEHP, MINP, MBzP）のメチル化体のマススペクトル上には、m/z163がいずれもベースピーク（最も強く検出されるイオン）として観察され、次いでm/z149が強く観察される。また、内部標準物質として使用したフタル酸モノエステルの安定同位体のメチル化体のマススペクトル上には、同様にm/z167とm/z153が強く検出される。フラグメントイオンm/z163とm/z167はフタル酸モノエステルのメチル化体に特徴的なイオンで、一方、m/z149とm/z153は、o-フタル酸化合物に特徴的なイオンである。

5種の標準物質及びそれらの安定同位体のメチル化体のピークは良好に分離しており、分析に支障のないことが確認された。

前処理法を検討した結果、方法を確立した。この方法を用いて尿を分析して得られたSIMクロマトグラムを示した。MINPを除く4物質が検出され、特にMEPとMBPのピークが強い強度で検出された。なお、尿試料を分析した場合、内部標準物質として添加したMBP- $^{13}C_4$ のメチル化体のベースピーク（m/z167）の測定に妨害となる夾雑ピークが認められた。そこで、定量イオンとしてm/z153を用いた。これに伴い、MBPの定量イオンも、同じ分子構造のフラグメントイオンであるm/z149とした。他の4物質及びそれらの安定同位体の定量イオンは、m/z163及びm/z167とした。

5種のフタル酸モノエステルについて、安定同位体内部標準法を用いて作成した検量線では、いずれも相関係数が0.999以上と良好な直線性を示したことから、安定同位体内部標準法が定量分析に適用可能であることが明らかとなった。

尿の代わりに蒸留水を試料として用いて試験

を行い、試験操作に由来するバックグラウンド値を求めた。その結果、MEPとMEHPが検出され、検出濃度の平均値はMEPが1.6ppb、MEHPが3.0ppbであった。MBP、MINP、MBzPは検出されなかった。なお、定量下限値は、ブランクの標準偏差の10倍あるいは、検量線に使用した最も低濃度の標準溶液を5回繰り返し測定した時の標準偏差の10倍とした。MEP、MBP、MINPは1.0 ppb、MEHP、MBzPは5.0ppbであった。

回収率の平均値は、MEPが86.3%、MBPが119%、MEHPが100%、MINPが98.0%、MBzPが89.1%であった。MEPとMBPの回収率にややばらつきが認められたが、試料中に含まれている両物質の濃度が高いことが要因の一つと考えられた。相対標準偏差は、0.55~6.1%と良好な結果であった。また、本分析法の再現性を検証するために、同一試料を繰り返し分析した結果、4回の分析での相対標準偏差は、0.0~7.5%と良好な結果であった。

本分析法を用いて尿試料の予備的な測定を行った。MEP、MBP及びMEHPは全ての検体から検出され、検出濃度範囲はそれぞれ12~160 ppb、100~500 ppb、5.5~34 ppbであった。MINP、MBzPは各1名から検出され、濃度は7.3ppb、17ppbであった。

## 2. 重金属類

### (1) 血清中の多元素分析法

24元素の表示値が示された血清標準試料(Seronorm N00371 Level 2)を、マイクロ波分解法及び酸分解法で前処理し、ICP-MSで分析を行った。その結果、マイクロ波分解法では20元素において、酸分解法では17元素において、業務管理基準(GLP)内部精度管理の許容範囲に用いられる表示値の±30%以内の測定値が得られた。この結果から、血清の前処理は、20の元素を精度よく測定することができたマイクロ波分解法で行うこととした。

また、血清試料に20元素の標準品を添加(血清中濃度として10~10000 ppb)し、前処理法にマイクロ波分解法を用いて回収試験を実施した結果、各元素の回収率は85.5~99.5%、相対標準偏差は6.5%以下(n=5)と、良好な結果を示した。

以上の結果から、血清中の重金属類の分析法として、マイクロ波分解法によって共存する有機物を酸分解し、ICP-MSを用いてMg, Ca, Fe等の20元素を同時分析する方法を確立した。

### (2) 尿中の多元素分析法

24元素のうち13元素の表示値が示された尿標準試料(Lyphochek 1)を、酸分解法及びろ過法で前処理し、ICP-MSで分析を行った。その結果、酸分解法では表示値が示されている13元素すべてにおいて、ろ過法ではそのうち11元素において、表示値に併せて示された許容範囲内の測定値が得られた。この結果から、尿の前処理は、

表示値が示された13元素すべてが測定可能であった酸分解法で行うこととした。

また、尿中の24元素を同時分析する方法を検討するために、尿試料に24元素の標準品を添加(尿中濃度として25~5000 ppb)し、前処理法に酸分解法を用いて回収試験を実施した結果、各元素の回収率は84.6~101%、相対標準偏差(RSD)は3.6%以下(n=5)と、良好な結果を示した。従って、尿試料では24元素すべてのICP-MSによる同時分析が可能であると考えられた。

以上の結果から、尿中の重金属類の分析法として、酸分解法によって共存する有機物を分解し、ICP-MSを用いてMg, Ca, Fe等の24元素を同時分析する方法を確立した。

### (3) 揮発性有機化合物

揮発性有機化合物を分析するための代表的な前処理法としては、ページ&トラップ法とヘッドスペース法がある。前者は高感度ではあるが、試料をばっ気する必要があるため、血液や尿など発泡しやすい試料に適用することが難しいという短所がある。それに対して、後者は前者ほどの感度は望めないが、発泡しやすい試料でも測定が可能であるため、今回はこの方法を用いて検討を行った。

ヘッドスペース法は、密封したバイアル中の試料溶液を加熱・振とうすることにより、試料溶液に含まれる揮発性の成分をバイアル上部の気相部分に抽出し、その気相の一部をGCなどの分離・検出装置に導入するという前処理法である。この方法は、気相に抽出される揮発成分の量が、試料中のマトリックスにより大きく影響を受けるため、その影響を補正する目的で内部標準法あるいは標準添加法が用いられるのが一般的である。これらのなかで最も効率的で精度が良いと考えられる方法は、個々の測定対象化合物の安定同位体を内部標準物質に用いる方法であることから、それぞれの測定対象化合物の安定同位体(2-エチル-1-ヘキサナール-d<sub>18</sub>、2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>17</sub>、1,4-ジクロロベンゼン-d<sub>4</sub>)を内部標準物質に用いて測定を試みた。その結果、血清に添加した2-エチル-1-ヘキサナール-d<sub>18</sub>の一部が加熱処理中に2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>17</sub>に変化し、内部標準として十分な機能を果たさないことが明らかとなった。この2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>18</sub>は重水素置換により自家調製したものであり、それに代わるような化合物も現在市販されていないという理由から、今回は、標準添加法とトルエン-d<sub>8</sub>による内部標準法を併用するという方法を用いて測定条件を検討した。

血清は、使用できる試料量が数mLと少ない上に、標準添加法は1試料につき2~3回の測定が必要である。また、血清はマトリックスとして脂質を含んでおり、それが測定対象化合物の気相への抽出を強く阻害するという問題もある。

そのため、血清試料の場合は1回の測定試料の量を0.5mLに設定し、マトリックスの影響の軽減及び塩析効果による感度向上を目的として、飽和食塩水10mLで希釈してヘッドスペース分析用試料を調製した。一方、尿試料の調製に関しては、血清試料ほどマトリックスの影響が大きいことから、試料量を2mLとし、血清試料と同様に10mLの飽和食塩水で希釈する方法を採用した。

豚血清では2-エチル-1-ヘキサナール及び2-エチル-1-ヘキサノール0~20ppb、1,4-ジクロロベンゼン0~10ppbの添加レベルにおいて、また、尿では0~5ppb及び0~2.5ppb添加においてそれぞれ良好な直線性( $r=0.998\sim 1.000$ )が認められた。いずれの試料においても、測定対象化合物のピークは良好に分離しており、測定の妨害となるピークは認められなかった。豚血清における2-エチル-1-ヘキサナールの相対標準偏差が8.5%、尿における2-エチル-1-ヘキサノールの相対標準偏差が10.5%と幾分か高かった以外は、良好であると評価された。以上の結果より、本法を用いれば血清及び尿試料中の2-エチル-1-ヘキサナール、2-エチル-1-ヘキサノール及び1,4-ジクロロベンゼンの3種類の揮発性有機化合物を精度よく測定出来ると考えられた。定量下限値は、試料及び添加する標準溶液の濃度レベルによっても異なるが、血清中の2-エチル-1-ヘキサナール及び2-エチル-1-ヘキサノールは1ppb、1,4-ジクロロベンゼンは0.2ppb、尿中の2-エチル-1-ヘキサナール及び2-エチル-1-ヘキサノールは0.25ppb、1,4-ジクロロベンゼンは0.1ppb程度であると考えられた。

### 2-③ 胎盤中微量元素の分析法の開発:

#### 1. 試料の前処理法における検討

約2cmの組織片に細切した臍帯は80°Cで5時間の乾燥でほぼ恒量に達したことから、以降の分析はこの乾燥方法を用いて行った。

乾燥した臍帯試料をICP-MSに導入し測定するためには、試料を酸・アルカリなどで溶液化しなければならない。そこで、①酸によるホットプレート分解法、②アルカリによるホットプレート分解法、③マイクロウェーブ分解法、の3種の方法を用いて適切な前処理法の検討を行った。

マイクロウェーブ分解法では、最も短時間で試料を完全に溶解することが出来た。酸およびアルカリによるホットプレート分解法では概ね全ての組織を溶解することが出来たが、組織片の残りが若干観察された。これらの結果からマイクロウェーブ分解法は臍帯・胎盤組織の溶解に最も適していると考えられるが、処理過程での温度上昇中に沸騰による揮発性元素の損失の恐れもあるため、さらに条件検討を行う必要がある。また、酸およびアルカリによるホットプレート分解法は、マイクロウェーブ分解法で用

いた特殊な設備を必要としないため、簡便な分解法として期待される。しかしながら、これらの方法を用いた場合、組織片の残りが試料導入部のペリスタリックポンプに詰まりを生じさせるおそれがあるため、フィルター処理が必要であると考えられた。今後、これらの方法で溶液化した試料はマトリックスの影響、測定試料のpH等を考慮して測定条件を決定しなければならない。

#### 2. 検量線濃度の検討

検量線は、混合標準液を希釈し、1000、500、100倍に希釈した。広い濃度範囲で、全ての測定元素で良好な直線性が得られた。今回は検量線濃度を決定するため、5%硝酸水溶液ベースで検討を行ったが、今後、生体試料の分析にこれらが反映されるかの検証が必要である。

#### 3. 添加回収試験

各元素で約120から140%の回収率が得られた。今後これらの元素を生体試料においても同時測定することが可能かどうかの検証が必要である。

### 3 代謝物質の胎盤発生におけるエピジェネシスへの影響の研究;

#### 【結果】

#### 1. DMSOがエピジェネティック制御因子の発現におよぼす影響の解析

解析した8種のエピジェネティック因子(Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b、G9a、Suv39h1、Suv39h2、mDot1、Sir2a)のうち、Dnmt3aの発現がDMSOの濃度依存的に上昇することがわかった。

#### 2. DMSOがマウスES細胞のゲノムDNAメチル化状態におよぼす影響の解析

DMSO存在下で形成したEBのゲノムDNAを用いたサザンハイブリダイゼーション解析では、DMSOによる繰り返し配列のメチル化の亢進が認められた。また、RLGSでも4個のスポットの消失(すなわち、DMSOによるメチル化誘導)が認められた。さらに、RLGS解析では、逆に11個のスポットがDMSO処理によって新たに検出された。これらの領域では、DMSOによりDNAの脱メチル化が誘導されたことを意味する。

【考察】Dnmt3aは、メチル化されていない2本鎖DNAに新たにメチル基を付加する、いわゆるde novoメチル化活性を有することが示されている。Dnmt3a mRNAのDMSOによる発現促進は、DMSOに、ゲノムDNAのメチル化を亢進する作用があることを示唆する。これは、ゲノムに多コピー存在する反復配列をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション解析において、これらの配列のメチル化が亢進していることが判明した事からも支持される。しかしその一方で、RLGS解析では、DMSO処理によってメチル化の低下を示す領域が、メチル化が亢進した領域の数よりも多く

検出された。DNA メチル基転移酵素の増加が、そのまま全ゲノムの高メチル化をもたらすのではなく、おそらくヒストン修飾とも関連しながら、領域特異的なエピジェネティック変化を引き起こしているものと考えられる。

## E. 結論

### 1 ハウスダストを含めた主に室内曝露に関する研究；

#### 1-① ピレスロイド系農薬の生体曝露調査；

1. ピレスロイド系農薬の曝露量を評価するため、LC/MS/MS を用いた主代謝物 3-PBA の高感度分析法を構築した(検出下限値 LOD, 0.02 ppb)。

2. 尿中の 3-PBA の前処理法として、Oasis HLB を用いた固相抽出法を構築した。本法を用いて成人尿 10 検体 (男女各 5) 中の 3-PBA 濃度を測定した結果、遊離体は殆ど LOD 以下であった。一方、グルクロン酸抱合体は 0.02-3.7ppb (Av. 0.58ppb) レベルで検出された。

3. トータルダイエット法により、ピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬の曝露調査を実施したところ、今回の調査では、分析に供した食品群からピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬とも検出されなかった。

#### 1-② 有機フッ素系化合物とニコチンの生体試料測定系の開発と曝露調査；

本年度は、次の 2 つの課題についての研究を行った。まず、ヒト血漿中 PFOS、PFOSA、PFOA、PFNA および PFDA を測定対象とし、前処理操作の簡便化、測定時のコンタミネーションの軽減化および高感度化を目的として、オンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー (LC) / タンデム質量分析法 (MS/MS) からなる測定システムを構築し、そのバリデーションについて検討した。その結果、精度の高い分析法であることが確認された。更に、本分析法を用いて健常者の血液 6 検体を分析した結果、PFOS と PFOA は全員から検出され、PFOS と PFOA の間に有意な相関があることが示唆された。

また、喫煙に起因するニコチンの曝露評価を目的として、ヒト尿を測定対象とした LC/MS 分析法を検討した。その結果、ニコチンの代謝物であるコチニンについては、クリーンアップが不十分で実試料分析では良好なピークを得ることはできなかったが、ニコチンは夾雑物の影響を受けることなく測定可能であった。本法を喫煙者および非喫煙者の尿に適用したところ、喫煙者におけるニコチン濃度が、非喫煙者に比べ有意に増加していることが観察され、曝露実態が明らかとなった。

#### 1-③ ポリ臭素化ジフェニルエーテルのハウスダストからの曝露についての研究；

ハウスダスト中のポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) および有機塩素化合物の分析法を開発した。一般住宅等で採取したダスト試料か

ら PBDEs やクロルデン類、S-421 等が ppb~ppm オーダーで検出され、呼吸による非意図的なハウスダストの吸引により、これらの化合物の日常的な人体曝露が起こっていることが危惧された。成人と比較して、子ども、特に乳幼児はダストに対して無防備であり、ハイハイやおしゃぶりなどの行動により、ダストを吸引・摂取しやすいと予想される。食事を介した経口曝露のみならず、総合的な観点からの曝露実態の把握および健康影響の解明が急務であろう。

### 2 子供の化学物質曝露のモニタリングに関する研究；

#### 2-① フタル酸モノ体の血清分析法の開発；

血清中のフタル酸モノエステル類 [フタル酸モノメチル、フタル酸モノエチル、フタル酸モノブチル、フタル酸モノベンジル、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)、フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル)及びフタル酸モノイソノニル] の高精度分析法を開発した。本法は、血清中のフタル酸モノエステル類を分析するうえで有用である。

#### 2-② フタル酸モノ体の尿中分析法と重金属類、揮発性有機化合物の測定法の開発；

1. 中のフタル酸モノエステル類の分析法を確立した。対象とした 5 種類のフタル酸モノエステルの検量線は、いずれも良好な直線性 (相関係数 0.999 以上) を示し、また、測定対象 5 物質の標準品を添加して行った試験 (n=3) では、回収率が 86.3~119%、相対標準偏差が 6.1%以下と良好であった。

2. 誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 法を用いた血清及び尿中の多元素同時分析法を確立した。前処理法としては、血清ではマイクロ波分解法、尿では酸分解法が最適であった。本法により、血清では 20 元素、尿では 24 元素の同時分析が可能であった。

3. 血清および尿中の 1,4-ジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノールの同時分析法として、標準添加法とヘッドスペース-GC/MS 法を組み合わせた方法を確立した。血清、尿ともに 3 物質すべて良好な直線性 (相関係数 0.998 以上) を示した。測定対象 3 物質の標準品を添加して行った試験 (n=10) では、相対標準偏差が血清では 8.5%以下、尿では 10.5%以下と良好であった。

#### 2-③ 胎盤中微量元素の分析法の開発；

周産期の重金属曝露量を測定する生体試料として、通常、医療廃棄物として廃棄される「臍帯・胎盤」を利用するシステムを構築するために、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) による分析方法を検討した。本年度は主に試料を ICP-MS に導入するため溶液化する前処理方法の比較、検討を行った。比較した 3 つの方法のう

ちマイクロウェーブを用いた分解方法が、最も短時間で試料が完全溶解したが、簡便なプロトコルを構築するため、マイクロウェーブのような特殊な機器を使用しない他の方法についても、今後は更に検討の余地が残ると考えられる。

### 3 代謝物質の胎盤発生におけるエピジェネシスへの影響の研究；

本年度の研究により、DMSO が細胞のゲノムに、エピジェネティック変化を誘発することが明らかとなった。DMSO が de novo メチル化活性の高い Dnmt3a の発現を促進したにより、ゲノムの大部分を占める繰り返し配列や一部の遺伝子領域のメチル化が亢進されたと考えられる。さらに、脱メチル化も見られた点は、大変興味深い。この研究成果で重要なことは、DNA メチル化を変えうる身近な化合物が、他にも数多く存在する可能性を示唆していることである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 仲田尚生, 中田彩子, 岡田文雄, 伊藤里恵, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之, オンライン固相抽出 - LC/MS/MS を用いたヒト血漿中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発, 分析化学, 54, 877-884 (2005)
- 2) 岩谷美沙, 大鐘潤, 塩田邦郎. 発生・分化とエピジェネティクス. ゲノム医学 5:25-30, 2005
- 3) Misa Iwatani, Kohta Ikegami, Yuliya Kremenska, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro Yagi and Kunio Shiota. Demethyl sulfoxide (DMSO) affects genome-wide DNA methylation profiles and level of Dnmt3a transcript in mouse embryoid body. Stem Cells (in revision)

##### 2. 学会発表

- 1) 仲田尚生, 中田彩子, 岡田文雄, 井之上浩一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之, 「カラムスイッチング - LC/MS/MS を用いた血液試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の構築」第 66 回 分析化学討論会 (2005)
- 2) Hisao Nakata, Migaku Kawaguchi, Teruaki Iwamoto, Koichi Inoue, Shiari Nozawa, Miki Yoshiike, Fumio Okada, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa. Determination of perfluorooctanesulfonic acid in human serum and semen samples by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, Fluoros (2005)
- 3) Hisao Nakata, Ayako Nakata, Migaku

Kawaguchi, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa. Development of analytical method of perfluorochemicals in human plasma and blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction using column switching technique. 25<sup>th</sup>

International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)-Dioxin 2005 (2005)

- 4) Hiroyuki Nakazawa, Migaku Kawaguchi, Hisao Nakata, Tsunenobu Katumata, Ayako Nakata, Fumio Okada, Koichi Inoue, Rie Ito, Koichi Saito, Yasuaki Saijo, Fumihiko Sata, Reiko Kishi. Measurement of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples. The Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC North America 26th Annual Meeting) (2005)
- 5) 中田彩子, 仲田尚生, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 西條泰明, 佐田文宏, 岸 玲子, 中澤裕之. カラムスイッチング - LC/MS/MS によるヒト母体血中の有機フッ素系化合物の測定. 第 126 年会 日本薬学会 (2006) 仙台.
- 6) 勝又常信, 仲田尚生, 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之「HPLC/MS/MS 法によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の分析」第 126 年会 日本薬学会 (2006) 仙台.
- 7) 近藤文雄, 猪飼誉友, 林 留美子, 富田伴一, 高取 聡, 吉村真理子, 中澤裕之, 牧野恒久; GC/MS による尿中フタル酸モノエステル類の分析法の開発; 日本薬学会第 126 年会 (2006)
- 8) 岩谷美沙, 池上浩太, 服部中, 田中智, 八木慎太郎, 塩田邦郎. ジメチルサルフォキシド (DMSO) は Dnmt3a mRNA 発現を上昇させ、DNA メチル化プロファイルを変化させる. (ポスター発表) 第 28 回日本分子生物学会 (2005 年 12 月)

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書  
生体試料等中のピレスロイド系殺虫剤の分析法の開発及び曝露評価に関する研究

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
分担研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
協力研究者	石井 里枝	埼玉県衛生研究所
	竹上 晴美	埼玉県衛生研究所

#### 研究要旨

ピレスロイド系農薬は、3-phenoxybenzoic acid(3-PBA)に代謝されることが知られている。そこで、3-PBAをピレスロイド系農薬の曝露指標成分に選択し、LC/MS/MSによる3-PBAの高感度分析法を構築した。尿に含まれる3-PBAの前処理法として、 $\beta$ -グルクロニダーゼによる脱抱合化処理後、Oasis HLBカートリッジを用いた固相抽出法によりクリーンアップを行った。本法による3-PBAの添加回収率（2 ppb 添加）は、平均で82.7%、相対標準偏差RSDは7.5%(n=5)であった。本法を用いて、10名の成人尿（男女各5）中の3-PBA濃度を測定したところ、遊離体は殆どが検出下限値(0.02ppb)以下であったが、グルクロン酸抱合体は平均で0.58ppb検出された。ごく微量であるがヒトはピレスロイド系農薬に曝露されていると言える。そこで、ピレスロイド系農薬の曝露源の一つである食品について、トータルダイエツト法により調査を実施したところ、今回の調査では、ピレスロイド系農薬は検出されなかった。

#### A. 研究目的

環境中には多種多様な化学物質が放出され、ヒトを含む生態系への影響が強く懸念されている。ピレスロイドとは、除虫菊の花に含まれる主殺虫成分ピレトリンとその類縁化合物の総称であり、現在では、合成ピレスロイドが蚊取線香やエアゾールとして家庭用に汎用されている。環境庁から示された内分泌かく乱作用が疑われる 67 物質の中に4種（ペルメトリン、シペルメトリン、フェンバレレート、エスフェンバレレート）が含まれている。少量のピレスロイド（デルタメトリン）を妊娠した実験動物に投与すると、子ネズミの脳に影響が現れ、成熟期になっても障害が残っていることが報告されている。また、脳が発達中の若い動物にピレスロイドを投与すると、行動や脳の機能に大人になっても続く影響を与えることが報告されている。そこで、ピレスロイド系農薬の曝露レベルを把握し、胎児、乳児に及ぼす影響を検証する資料とする目的で、図1に示す主代謝物である3-phenoxybenzoic acid(3-PBA)を指標成分とした信頼性の高い高感度分析法の構築を試みた。更に、本分析法を用いてヒト尿中の3-PBA曝露レベルを把握することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 試料

尿は、埼玉県衛生研究所職員のボランティアから採取した。採取した尿は速やかに分析に供した。

なお、尿の採取と使用に関しては、いずれもインフォームドコンセントを十分行い、理解が得られたボランティアから採取するなど、倫理面への配慮を行った。

マーケットバスケット用試料は、さいたま市内で市販されている食品、約200品目を購入し、国

民栄養調査に基づき各品目を採取して1群から13群までのマーケットバスケット用試料を調製した。第14群の飲料水は埼玉県衛生研究所内の水道水を用いた。

##### 2. 試薬

標準品：3-Phenoxybenzoic acid(3-PBA)及び2-Phenoxybenzoic acid(2-PBA)はシグマ社製を用いた。標準溶液は、各標準品20mgを精秤し、メタノール100mLに溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液及び内部標準溶液とした。

残留農薬標準品（有機リン系48種、ピレスロイド系9種；表1）は、和光純薬（株）、関東化学（株）及び林純薬（株）製を用いた。各標準品20mgを精秤し、ヘキサン100mLに溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液とした。

$\beta$ -グルクロニダーゼ：シグマ社製（130,000 units/mL）を用いた。

精製用カートリッジ：Oasis HLB カートリッジ（60 mg）：Waters 製を用いた。カートリッジは予めメタノール5 mL、水5 mLの順でコンディショニングした後使用した。

カラムクロマトグラフィー用フロリジル：フロリジルPR、和光純薬（株）製を用いた。

その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

##### 3. 装置及び測定条件

###### 3.1 尿中の3-PBAの分析

高速液体クロマトグラフィー質量分析計：HPLC装置には、Waters社製2695 HPLCシステム、質量分析装置には、Quattro micro APIを使用した。測定条件は表2のとおりとした。

###### 3.2 食品中のピレスロイド系農薬、有機リン系農