

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18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18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. 生体試料中のピレスロイド系及び有機リン系農薬分析法の開発及び 曝露評価に関する研究 .....	24	
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. ヒト母乳試料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 ヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析に関する研究 .....	35	
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. 生体試料, ハウスダスト, 食品を対象としたポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析法の 構築および実試料の分析 .....	44	
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 .....	53	
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
	近藤 文雄	愛知県衛生研究所
5. ヒト生体試料中の化学物質の分析 (重金属類、フタル酸モノエステル類、揮発性有機化合物) .....	68	
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. 周産期試料に関して特に脂性試料を対象とした分析 .....	82	
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	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

7. フタル酸エステル類について周産期の生体曝露評価に関する研究 ..... 90

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

8. 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 ..... 98

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 ..... 100

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 101

## 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. 生体試料中のピレスロイド系及び有機リン系農薬分析法の開発及び暴露評価に関する研究

ピレスロイド系農薬及び代表的な有機リン系農薬クロルピリホスの暴露量を評価するため、LC/MS/MSを用いた高感度分析法を構築した。ピレスロイド系農薬の暴露マーカーには、主代謝物3-Phenoxybenzoic acid(3-PBA)を、クロルピリホスには3, 5, 6-Trichloro-2-pyridinol(TCP)を選択した。母体血、母体尿及び健康成人尿、計24検体中の3-PBA, TCP濃度を測定した結果、遊離体は殆ど検出限界(0.1ng/mL)以下であった。一方、グルクロン酸抱合体は極微量であるが、約半数の尿検体から0.2-0.5ng/mLレベルで検出された。有機リン系農薬の主代謝物ジアルキルリン酸(Dimethyl phosphate: DMP, Diethyl phosphate: DEP)、ジアルキルチオリン酸(Dimethyl thiophosphate: DMTP, Diethyl thiophosphate: DETP)及びジアルキルジチオリン酸(Dimethyl dithiophosphate: DMOTP, Diethyl dithiophosphate: DETP)のLC/MS/MSを用いた高感度分析法を構築した。健康成人尿11検体を測定した結果、尿中の上記物質濃度は、いずれも操作ブランクレベル(2~5 ng/mL)以下であった。

以上の結果からピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬の暴露量は、一般的に極微量であることが示唆された。

#### 2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発およびLC/MSを用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析に関する研究

パーフルオロオクタンスルホン酸及びパーフルオロオクタン酸に代表される有機フッ素系化合物(PFCs)は、日常生活用品に汎用されヒト血液中から高頻度に検出される。これらPFCsは難分解性・蓄積性が高く、動物実験において甲状腺ホルモンかく乱作用、催奇形性の報告や妊娠母体から胎児に移行するとの報告があり、子どもに及ぼす影響が懸念されている。PFCsの母乳移行性を危惧されていることから、乳幼児におけるPFCs暴露評価のために、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いたヒト母乳中PFCsの高感度分析法を構築し、実試料分析へ適用した。また、タバコの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し、妊婦において臍帯血流量を減少させることで問題視されているニコチンについて、生体内における暴露評価を行うために、ヒト血清中に含まれるニコチンおよびその代謝物であるコチニンの高感度・高精度な分析法を構築し、タバコの煙によるヒト妊婦暴露量についても検討した。

#### 3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析法の構築および実試料の分析

食品(トータルダイエツト試料)中のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs, 3-10 臭素化物 36 異性体)を測定した。その結果、第4群(油脂類)および第5群(豆類)、第10群(魚介類)、第11群(肉・卵類)からPBDEsが1.82, 0.03, 0.48, 0.01ng/gの濃度で検出された。第10群はペンタ-BDE由来、第4群はデカ-BDE由来の異性体の残留が顕著であった。また、ND=0として試算すると、食事から摂取するペンタ-BDEの93%が魚介類経由であった。成人における全食品群からのペンタ-BDE(3-6 臭素化物 26 異性体)の合計一日摂取量は、ND=0として計算した場合で46ng/人/日であり、欧州で報告されている食事由来のPBDEs摂取量と同程度の値であった。また、これまで国内の食用植物油のPBDEs汚染実態は不明であったが、今回、市販の18銘柄の植物油試料を対象にPBDEs(3-10 臭素化物、8 異性体)の残留実態調査を実施した結果、7銘柄の植物油試料(ナタネ油、調合油)から0.7-4.3ng/gのPBDEsが検出され、一部の製品中に低レベルながらもPBDEsが残留していることが明らかとなった。

#### 4. フタル酸エステル類の子どもへの暴露評価に関する研究

周産期に採取された母子関係が明確な試料(母体血清、臍帯血清、母乳及び胎脂)中のフタル酸エステル類を測定した。フタル酸モノエステル類: 母体血清及び臍帯血清からフタル酸モノエチル(MEP)、フタル酸モノブチル(MBP)及びフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)(MEHP)を検出し、それぞれ、0.3, 13.9及び3.1ng/mL(中央値, n=12)であった。また、臍帯血清中では、それぞれ、0.3, 12.7及び2.2ng/mL(中央値, n=12)であった。このことから、フタル酸モノエステル類の血清中の濃度は、母体及び胎児間で同程度であることが示唆された。母乳から同様にMEP, MBP及びMEHPを検出し、それぞれ、0.5, 26.0及び27.9ng/mL(中央値, n=11)であった。フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP): 胎脂中からDEHP(3, 570-92, 100ng/g, n=5)を検出した。MEHPは、10ng/g未満であった。また、当該胎脂を採取した

新生児の臍帯血及びその母体の血清中の DEHP の濃度は、それぞれ、4.1-6.0 及び 2.6-5.4ng/mL であった。胎脂中の DEHP は、胎脂が胎児体表上に形成される 6 ヶ月目以降の期間を通じて蓄積されたものである可能性が高いと考えられた。

#### 5. ヒト生体試料中の化学物質の分析（重金属類、フタル酸モノエステル類、揮発性有機化合物）

昨年度の本研究において、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の分析法を確立した。本年度は、確立した分析法を用いて実試料の分析を行った。

1. 血清および尿中の重金属類の分析：愛知県衛生研究所職員（以下愛知職員）36 人の血清と尿、及び東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者（以下東海患者）38 人の血清の分析を行った。その結果、血清中 20 元素、尿中 21 元素の濃度は、すべての検体で臨床検査法提要に示された基準範囲や、これまでの ICP-MS 法による報告値と同程度であった。また、子宮内膜症患者 19 人とそれ以外の 19 人について比較した結果、20 元素いずれも有意差は認められなかった。

2. 尿中のフタル酸モノエステル類の分析：愛知職員 36 人の尿の分析を行った。その結果、フタル酸モノブチル (MBP) とフタル酸モノエチル (MEP) がすべての検体から検出され、中央値はそれぞれ 60.0、10.7 ng/mL であった。一方、フタル酸モノイソノニル (MINP) はほとんどの検体で検出されなかった（検出率は 6%）。フタル酸モノベンジル (MBzP) 及びフタル酸モノエチルヘキシル (MEHP) の検出率はそれぞれ 75%、56% で、中央値はそれぞれ 10.9、5.75 ng/mL であった。MINP を除く 4 種の尿中フタル酸モノエステル濃度から算出したフタル酸エステルの推定一日摂取量は、0.27~5.69  $\mu$ g/kg/day（中央値）であった。東海患者 2 人の尿分析の結果、共に MBP (13.2~14.0 ng/mL)、MEP (4.29~97.4 ng/mL) が検出された。MBzP が 1 人の患者から検出 (19.0 ng/mL) され、それ以外の 2 物質は検出されなかった。

3. 血清中の揮発性有機化合物（2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナール、1,4-ジクロロベンゼン）の分析：東海患者 38 人の血清の分析を行った。その結果、2-エチル-1-ヘキサノールはすべての検体から検出され、中央値及び濃度範囲はそれぞれ 42、10~182 ng/mL であった。2-エチル-1-ヘキサナールの検出率は 21% (6/28) で、濃度範囲は <1~3 ng/mL であった。2-エチル-1-ヘキサノール濃度が高いと 2-エチル-1-ヘキサナールも同時に検出される傾向が認められた。1,4-ジクロロベンゼンはすべての検体から検出され、中央値及び濃度範囲はそれぞれ 3.4、0.9~53.0 ng/mL であった。

#### 6. 周産期試料に関して特に脂性試料を対象とした分析

子供への影響を検討する第一段階として、まず母子関係を重視し、母体側試料と、その母体より出生した新生児側試料を関連づけて採取した。母体側からは、母体血、母乳を、新生児側からは臍帯血を基準試料とし、昨年度牧野班で策定したガイドラインにそって 3 物質を測定した。さらに生体試料提供協力者の身体的、社会的、環境的背景を記録し、疫学的分析の資料とした。各物質とも母乳からの検出はなかった。また最も高頻度に検出されたのは、尿中の NP であった。また DEHP は決して検出率は高くないが、検出されたサンプルでは母体血、臍帯血で最も高い濃度を示した。今回検出された水性試料検体では危険値を超える濃度を示したものは認められなかったが、胎脂では高濃度に検出されたものもあり、生体防御の排泄機構の一部と考えられた。

#### 7. 周産期の重金属暴露量測定法の確立と神経系初期発生における *in vitro* 毒性評価法の確立

近年、発達障害（特に中枢神経系）と診断される小児の数が急増している。これらの障害では遺伝的要因が明らかにされている場合もあるが、未だに発症メカニズムが不明な場合が多い。環境化学物質の一つである重金属は、小児発達障害を引き起こすことが懸念されているが、この関連性については、疫学的調査の結果から推測されたデータが多く、直接的な証明は少ない。そこで、有害重金属と小児発達障害との関連性を明らかにすることを目的として、周産期の母子一連試料における有害重金属測定法の確立を試みた。ICP-MS を用いて実試料の測定をおこなったところ、ほぼ全ての試料からアルミニウム・ヒ素・カドミウム・鉛が検出された。また、発生段階の中枢神経系における重金属の発生毒性評価法を確立させるため、「神経幹細胞培養法」を用いて毒性評価を行った。この評価系によって神経幹細胞に対する増殖抑制および分化阻害といった発生毒性が示された。

#### 8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

昨年度までの研究で、凍結保護剤や溶媒として多用されているジメチルスルホキシド (DMSO) が、マウス初期胚のモデルである胚性幹細胞 (ES 細胞) やその分化細胞に DNA メチル化プロファイルの変化を引き起こすことを明らかにした。この結果を受け、本年度は、細胞のエピジェネティック状態を変化させる他の化学物質をスクリーニングする実験系を確立した。第 1 に、マウス Oct4 遺伝子の発現を GFP の蛍光によってモニターできるマウス ES 細胞株の樹立を行った。この遺伝子は ES 細胞の多分化能維持に必須であり、体細胞では不活性化されている。この系を用いることにより、初期胚マスター遺伝子の

エピジェネティクスを変化させる化学物質をスクリーニングすることが可能である。第2に、DsRed 遺伝子を導入した組換え栄養膜幹細胞 (DsRed-TS 細胞) の樹立にも成功した。この細胞は、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A 存在下で培養すると DsRed を発現する。すなわち、DsRed-TS 細胞を用いることで、ヒストンアセチル化に影響を及ぼす化学物質のスクリーニングが可能である。以上の細胞系を確立するとともに、DNA メチル化プロファイルをハイスループットで解析する新たな手法も開発した。今後、これらの幹細胞・手法を用いることにより、化学物質が胎児体細胞、および、胎盤の細胞のゲノムに与えるエピジェネティックな影響を解析し、新たな毒性評価系の確立を目指す。

#### 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

### A. 研究目的

#### 1. 生体試料中のピレスロイド系及び有機リン系農薬分析法の開発及び暴露評価に関する研究

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。しかしながら、日常的に暴露されながらも暴露評価が十分になされていない化学物質が数多くある。特に、これらの化学物質が母体を介して胎児にどの程度移行しているのか、移行した化学物質が胎児や乳児の発生または発育時期にどの程度影響を及ぼしているのかについては十分解明されていない。有機リン系農薬は世界で用いられている殺虫剤の過半を占めている。一方、ピレスロイド系農薬は日本の家庭で用いられている殺虫剤の約9割を占めるとされている。環境庁から示された内分泌かく乱作用が疑われる67物質の中にピレスロイド系、有機リン系農薬が含まれており、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、脳が発達中の幼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、本研究では、食品や大気等を介しての高頻度な暴露が危惧されている種々の合成化学物質の中から、殺虫剤などに多用されているピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬について、信頼性の高い高感度分析法を構築する。次に、構築した分析法を用いて母体尿、母体血及び臍帯血中の暴露状況を把握し、これらの化学物質暴露による胎児、乳児に及ぼす影響を検証する基礎資料とすることを目的とする。

#### 2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発およびLC/MSを用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析に関する研究

有機フッ素系化合物(PFCs)であるパーフルオロヘキサンスルホン酸(PFHxS)、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ノ酸(PFOA)、パーフルオロノナン酸(PFNA)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汎用されている。その為、自然環境やヒト生活環境を広く汚染していると報告されている。また、PFCsは極めて安定な化学物質であり、PFCsは河川水、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。更に実験動物において、甲状腺ホルモンかく乱作用、催奇形性、パーオキシソーム増殖作用が懸念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。近年、PFOSおよびPFOAがヒト母体血を介して胎児へ移行するとの報告がなされたが、更に最近では、PFCsの母乳移行性も危惧されており、乳幼児のPFCs暴露評価が必要とされている。そこで本研究では、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いてヒト母乳中PFCsの高感度分析法の構築を行った。

一方、近年、タバコの煙に含まれる有害化学物質は200種類を超えることがわかっており、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てしまう。また、周産期の妊婦がタバコの煙を吸うことによって、妊婦や胎児に与える影響は深刻なものとされている。現在では、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ひと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てしばしば分析対象となっている。そこで本研究では、親水性相互作用クロマトグラフィー質量分析法(HILIC/MS)を用いて、ヒト血清中に含まれるニコチンおよびコチニンの高感度分析法を構築し、タバコの煙によるヒト妊婦の暴露実態の推量を行った。

### 3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析法の構築および実試料の分析

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、子どもを対象としてPBDEs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。PBDEs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。本年度は食品試料中のPBDEsの分析法を開発し、トータルダイエット試料および市販植物油の分析を行った。

### 4. フタル酸エステル類の子どもへの暴露評価に関する研究

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、日常的な暴露が危惧される化学物質のひとつである。当該化学物質の暴露により危惧される生体影響として精巣毒性があり、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。このため、妊婦、胎児及び乳児の当該化学物質群の暴露量を把握することは、重要である。しかしながら、国内での情報は、極めて少ないのが実状である。今年度、研究者らは、昨年度開発した分析法を活用し、周産期に採取された母子関係が明確な試料(母体血清、臍帯血清、母乳及び胎脂)中のフタル酸エステル類を測定することとした。本研究を遂行することによって、国内における妊婦、胎児及び乳児の当該化学物質群の暴露量を推測するうえで有用な情報を得ることが期待される。

### 5. ヒト生体試料中の化学物質の分析(重金属類、フタル酸モノエステル類、揮発性有機化合物)

本研究では、一般人での暴露量が多い重金属類、フタル酸エステル類、揮発性有機化合物に対する生体暴露量を、特に胎児期を中心としてモニタリングする。さらに、暴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、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、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、さらには、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-ヘキサノール、主に防虫剤として用いられる1,4-ジクロロベンゼンとし、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。研究初年度の昨年度は、上記測定対象化学物質のヒト生体試料中の分析法を確立した。本年度は、確立した分析法を用いて実試料

の分析を行った。

### 6. 周産期試料に関して特に脂性試料を対象とした分析

化学物質による子どもへの健康影響を考える場合、まず母児間の移行の実態の理解は必須である。また化学物質の妊婦を介した胎児・新生児への影響は、単独試料による分析だけでは不十分であり、母子の一連の試料のもとに、母体側暴露状態と、妊娠中の胎児への移行を分析する必要がある。更にこれまで検討してきた水性試料(血液・尿等)とは別に脂性試料(胎脂・臍帯血・母乳等)に重点をおいた検討を試みた。試料の採取にあたっては、十分なインフォームドコンセントの上で同意を得て母体側試料と、その母体より出生した新生児の試料を採取し、母子両者の分析結果比較が可能になるよう条件を設けた。更に陽性側については母体側環境、例えば妊娠経過、その間の食生活、嗜好、また、住居付近の生活環境等にも配慮し、疫学的分析のする事も目的とした。

### 7. 周産期の重金属暴露量測定法の確立と神経系初期発生における in vitro 毒性評価法の確立

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、人体への毒性や暴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、重金属の中には成人のみならず、胎児性水俣病の原因となるメチル化水銀のように、妊娠中に胎盤を通過し胎児にも被害をもたらす物質もある。近年急増している自閉症、学習障害、注意欠陥多動性障害など中枢神経系の発達障害の原因の一つとして、環境中の重金属の影響が懸念されている。しかしながら、これまでに報告されている重金属と小児の発達障害に関する研究では、疫学調査のようなレトロスペクティブなデータが多く、直接的な証明となる報告は少ない。そこで有害重金属と小児発達障害との直接的な関連性を明らかにすることを目的として本研究を行っている。

中枢神経系の血管系には「血液脳関門」とよばれる特殊な構造が存在し、血液中の有害物質が脳実質へ侵入することを阻止している。この関門が出来上がるのは生後6ヶ月頃と言われており、胎児は血中の有害物質が脳に侵入することを防ぐことが出来ない。さらに、中枢神経系は全身でも最も早期に形成される組織である。そのため、発生段階の中枢神経系における重金属暴露の影響を評価するためには、妊娠中の母親の暴露状況や母児間移行の実態を明らかにする必要がある。そこで、本研究ではまず母親-新生児一連の試料を採取し、両者の結果を比較するため誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)による重金属分析方法を構築することとした。

一方、重金属による中枢神経系の発生毒性作用のメカニズムはほとんど知られていない。中枢神

経系は発生段階で、神経管周囲に存在する神経幹細胞が対称分裂期、非対称分裂期を経て、目的の部位に移動しながら特定の細胞群（ニューロン、グリア）に分化することにより複雑な神経回路網を形成する。この発生過程は胎児期の非常に早い時期に起こりその過程は非常に複雑であることが、重金属による発生毒性メカニズムを明らかにするための障害となっている。このメカニズム解明のためには、中枢神経系の組織発生を再現し毒性評価に用いることの出来る培養系が有効なツールとなりうると考えられる。そこで、本研究では「ニューロスフェア法」と呼ばれる神経幹細胞の選択的培養法を用いて、分裂→移動→分化→シナプス形成、といった中枢神経系の発生段階における一連の現象を *in vitro* で再現し、重金属毒性作用のメカニズムについての詳細を明らかにすることとした。

## 8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

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。環境中の化学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。昨年度までの研究で、生殖医療の現場でもよく用いられるDMSOが、ES細胞やその分化細胞にDNAメチル化プロファイルの変化を引き起こすことを明らかにした (Iwatani et al., 2006)。この結果は、これまで細胞への影響が未知であった物質、あるいは、形態や増殖能などの変化を起こさないことから無害だと思われていた化学物質の、細胞のエピジェネティック状態に対する影響を改めて見直す必要があることを示している。そこで本年は、種々の化学物質のエピジェネティック状態に対する影響を効率的に解析する実験系および手法の確立を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 生体試料中のピレスロイド系及び有機リン系農薬分析法の開発及び暴露評価に関する研究

#### 1. 試料

母体血、母体尿は東海大学病院から提供されたものを用いた。母体血及び母体尿は産科グループ

のボランティアから採取した。採取した血液試料は、常法に従って血清を調製し、15分以内に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。母体尿は、採取後速やかに凍結し、血清試料と同様に測定するまで-30℃で保存した。

健康成人尿は、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、母体血、母体尿及び成人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。

#### 2. 試薬

標準品 : 3-Phenoxybenzoic acid (3-PBA)、2-Phenoxybenzoic acid (2-PBA)、Diethyl thiophosphate (DETP) 及び Diethyl dithiophosphate (DEDTP) はシグマ・アルドリッチ社製、クロルピリホス代謝物 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) は林純薬工業製、Dimethyl phosphate (DMP) 及び Diethyl phosphate (DEP) は AccuStandard 社製、Dimethyl thiophosphate (DMTP) 及び Dimethyl dithiophosphate (DMDTP) は、AppliChem 社製、Dibutyl phosphate (DBP) は、Fulka 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 50 mL 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。

$\beta$ -グルクロニダーゼ : シグマ社製 ( $\beta$ -Glucuronidase ; 130,000 units/mL, Sulpatase ; 3,200 units/mL) を用いた。

精製用カートリッジ : Oasis HLB カートリッジ (200 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。

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 尿及び血清中の 3-PBA 及び TCP の分析

高速液体クロマトグラフ質量分析計 : 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 尿中の有機リン系農薬代謝物の分析

高速液体クロマトグラフ質量分析計 : 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。

#### 4. 検量線の作成

##### 4.1 尿及び血清中の 3-PBA 及び TCP 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 100 ng/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。

TCPについては、1.0~100 ng/mLの範囲で数点標準溶液を調製し、得られたMRM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。

#### 4.2 尿中の有機リン系農薬代謝物の分析

内部標準物質として、有機リン系農薬代謝物であるDMP、DET、DMTP、DETP、DMDTP及びDEDTPと化学構造が類似しているDibutyl phosphate (DBP)を用いた。内部標準物質DBPを20 ng含んだ各標準品の濃度が1, 2, 5, 10及び100ng/mLとなる混合標準溶液を調製し、その10 $\mu$ LをLC/MS/MSに注入した。得られたMRMクロマトグラムよりピーク面積を求め、DMP、DET、DMTP、DETP、DMDTP及びDEDTPとDBPの面積比により検量線を作成した。

#### 5. 試験溶液の調製

##### 5.1 尿及び血清中の3-PBA及びTCP試験溶液の調製

###### 5.1.1 遊離体3-PBA及びTCP測定用試験溶液

尿2mL、血清1mL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(200mg)に負荷した。水(5mL $\times$ 2)で洗浄した後メタノール5 mL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及びTCP測定用試験溶液

尿2mL、血清1mL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(pH5)2mL、 $\beta$ -グルクロニダーゼ6,500units/mL(試薬 $\beta$ -グルクロニダーゼを0.2M酢酸緩衝液(pH5)で20倍希釈)を50 $\mu$ L加え、37 $^{\circ}$ 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及びTCP測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

##### 5.2 尿中の有機リン系農薬代謝物測定用試験溶液の調製

尿2mLを採取し、内部標準物質DBPを20 ng加えた後、6mol/L塩酸1mL、飽和食塩水2mL及びジクロロメタン4mLを加え、10分間振とう抽出した。振とう抽出液を3,500rpmで10分間遠心分離後、ジクロロメタン層を2mL分取し、減圧乾固後20%アセトニトリル溶液1mLに溶解して試験溶液とした。

## 2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発およびLC/MSを用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析に関する研究

### 1. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の高感度分析法の構築

ヒト血液中における報告例のあるPFHxS、PFOS、PFOAおよびPFNAを測定対象とした。内標準物質としては、PFOS、PFOAの安定同位体( $^{13}$ C)を用いた。測定機器としては、高感度・選択性を有するLC/MS/MSを用いて分析を行った。また、母乳は血液と比較してPFCsの濃度レベルが低いことや、脂

質などの夾雑物質を多く含むことから、試料の濃縮・精製が必要であった。そこで本研究では、前処理法として、濃縮・精製を同時に行うことができる固相抽出法を採用した。母乳試料の前処理としては、内標準物質を添加した母乳試料5 mLに0.1 Mのギ酸15mLを加えて攪拌した後遠心分離を行い、固相抽出へと導入した。固相抽出カートリッジはWaters社製Oasis WAX(3 cc, 60 mg)を採用し、試料の精製と50倍濃縮を行った。

### 2. HILIC/MSを用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析

前処理法には固相抽出法を適用し、測定にHILIC/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- $d_3$ を使用した。移動相に0.01%ギ酸/0.01%ギ酸含有アセトニトリルの混液を使用し、流速は0.2mL/minとした。分析カラムにはWaters社製Atlantis、HILICシリカ(2.1mm $\times$ 150mm, 3 $\mu$ m)を用いて分離を行った後、MS部に導入した。測定は、フラグメンター電圧を110 Vとし、選択イオン検出(SIM)ポジティブイオンモードにて測定を行った。

## 3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析法の構築および実試料の分析

### 1. 試料

#### 1.1. トータルダイエツト試料

平成18年度夏期にトータルダイエツトスタディ方式により調製した食品試料を使用した。すなわち、約130品目の食品を「平成13-15年の大阪府民の栄養状況(国民栄養調査成績)」による「食品群別にみた食品摂取量」に基づき、府内の小売店にて購入し、実際の主たる食事形態に従い、各食品をそのまま、または調理した後に第1群から第14群の各食品群に大別し、食品群ごとに均一に混合したものを分析試料とした。

#### 1.2. 植物油試料

平成18年度9月に大阪府内の小売店で購入した銘柄の異なる食用植物油18検体(ナタネ油6検体、トウモロコシ油3検体、サフラワー油2検体、ゴマ油2検体、オリーブ油1検体、調合油4検体)を分析試料とした。

### 2. 試薬

AccuStandard社製BDE-AAP-A-15X、BDE-196S/197S/203S/208S-0.2XおよびWellington社製BDE-206/207/209を標準原液として使用し、3-10臭素化PBDEs36異性体を測定対象とした。ただし、植物油試料の分析では、3-10臭素化PBDEs8異性体を測定対象とした。クリーンアップスパイク溶液には炭素安定同位体( $^{13}$ C)で標識化された $^{13}$ C $_{12}$ -BDE-28, 47, 99, 153, 154, 183, 197, 207, 209(Wellington Laboratories社製MBDE-MXC、MBDE-197/207/209)のヘキサン混合溶液(1-20ng/mL)を使用した。また、シリンジスパイ

クには<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PeBDE-126 (CIL 社製E0-4930)のヘキサン溶液(1ng/mL)を使用した。ヘキサン、エタノール(以上、残留農薬・PCB試験用5000倍濃縮保証品)、ノナン(ダイオキシン類分析用)、44%硫酸シリカゲル(ダイオキシン類分析用)、アセトン(試薬特級、器具の一次洗浄に使用)および無水硫酸ナトリウム(PCB・フタル酸エステル試験用)は和光純薬社製を用いた。

### 3. 操作

#### 3.1. トータルダイエット試料の分析

試料5g(第4群は1g)を100mL容の三角フラスコに精密に秤取後、クリーンアップスパイクおよび1mol/L水酸化カリウム/エタノール溶液(10%含水)50mLを加え、室温下で攪拌抽出した。抽出液をろ過した後、ヘキサン洗浄水50mLおよびヘキサン50mLを加え5分間振とうした。静置後、分離したヘキサン相を採取した。さらに水相にヘキサン50mLを加え同様に処理しヘキサン相を採取した。合わせたヘキサン相を水洗後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、約5mLに減圧濃縮した。この濃縮液を、予めヘキサン30mLで洗浄した44%硫酸シリカゲルカラム(充填量3g)に負荷し、ヘキサン30mLでカラムを溶出した。回収液を1mL程度まで濃縮後、濃縮試験管に移してノナン50 $\mu$ Lおよびシリンジスパイクを添加し、窒素ガス吹き付けで50 $\mu$ Lに濃縮し、GC/MS測定に供した。添加回収実験では、第10群(魚介類)試料5gに各化合物の混合標準溶液(1-10ng/mL)0.5mLを添加し、同様に抽出・精製操作を行った。

#### 3.2. 植物油試料の分析

試料 0.5 g を 50 mL 容の共栓付試験管に精密に秤取後、クリーンアップスパイクおよびヘキサン 10 mL、ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を加え 10 分間振とうした。遠心処理 (2000 rpm, 10 分間) 後、分離したアセトニトリル相をピペットで採取した。さらにヘキサン相にヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を加え同様に処理しアセトニトリル相を採取した(計 3 回)。合わせたアセトニトリル相を減圧乾固後、少量のヘキサンに溶解した。この試料溶液を予めヘキサン 30 mL で洗浄した 44% 硫酸シリカゲルカラム(充填量 3 g) に負荷し、ヘキサン 30 mL でカラムを溶出した。回収液を 1 mL 程度まで減圧濃縮後、濃縮試験管に移してノナン 50 $\mu$ L およびシリンジスパイクを添加し、窒素ガス吹き付けで 50 $\mu$ L に濃縮し、GC/MS 測定に供した。

## 4. フタル酸エステル類の子どもへの暴露評価に関する研究

### 1. 試薬等及び器具

血清及び母乳中のフタル酸モノエステル類について、以下の 6 種類のフタル酸モノエステル類、すなわち、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) を分析対象とした。また、胎脂については、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) を分析対象とした。MEP, MEP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MBP, MBP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MBzP, MBzP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEHP, MEHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEHHP, MEHHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MiNP 及び MiNP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> の各 100  $\mu$ g/mL アセトニトリル標準溶液は、Cambridge Isotope Laboratories 社より購入した。DEHP 及び DEHP-d<sub>4</sub> は、林純薬工業から購入した。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 (8.5 U/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)。フタル酸モノエステル類の分析に用いる超純水は、ミリポア社製の Milli-Q SP.TOC. により作製したもの (Milli-Q 水) をそのまま用いた。DEHP の分析に用いる超純水は、Milli-Q 水 をヘキサンで洗浄して用いた。

本研究を通じて、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、Milli-Q 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°C で 2 時間以上加熱し、清浄な場所で冷却して用いた。

### 2. 試料

東海大学医学部産婦人科で採取された、母子関係が明確な試料を測定した。母体血清及び臍帯血清は、分娩時に採取された血液から分離された。母乳は、分娩後、4-5 日経過した時点で採取された。また、胎脂は、分娩直後の新生児の体表から採取された。これら試料は、冷凍下で移送され、分析時まで-40°C で保存した。

### 3. 分析法

#### 3.1 血清中のフタル酸モノエステル類

解凍後直ちに血清 1.00g に 1.25mol/L リン酸 100 $\mu$ L を添加した。次に 100ng/mL 内部標準混合溶液 100 $\mu$ L、2.5mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH6.5)、8.5U/mL  $\beta$ -Glucuronidase 60 $\mu$ L 及び 1.0 $\mu$ g/mL 4-MU-Glu 100 $\mu$ L を添加して攪拌後、40°C で 45 分間インキュベートした。その後氷上に移し、25%アンモニア水溶液を添加した。全量を OASIS MAX (6 cc, 150mg; Waters) に負荷した。次に 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 (SUPELCO) を使い、カラム先端には、ディスプレイブルライナー (SUPELCO) 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°C 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。

#### 3.2 のフタル酸モノエステル類

解凍後直ちに母乳 1.00g に 100ng/mL 内部標準

混合溶液 100  $\mu$ L、2.5mol/L 酸性リン酸塩緩衝溶液、酢酸エチル/シクロヘキサン 5mL 及び無水硫酸ナトリウム 2g を添加して 10 分間攪拌した。遠心分離後、有機相を回収し、窒素気流下で乾固した。次にアセトニトリル 50  $\mu$ L、Milli Q 水 1mL の順で添加して溶解した。これに酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH6.5)、8.5U/mL  $\beta$ -Glucuronidase 60  $\mu$ L 及び 1.0  $\mu$ g/mL 4-MU-Glu 100  $\mu$ L を添加して攪拌後、40°C で 45 分間インキュベートした。その後氷上に移し、25%アンモニア水溶液を添加した。以下、OASIS MAX を用いて血清試料と同様のクリンナップを行い LC/MS/MS の試験液を得た。

### 3.3 脂中の DEHP 及び MEHP

胎脂を 0.025 g を目安に採取し、重量を記録した。次に内部標準品 25ng 及びアセトン 2mL を加えて攪拌した後、超音波照射を 2 分間行った。次に 5 分間攪拌し、遠心分離した。アセトン相を別のガラス製試験管に回収し、残渣にアセトン 2mL を加えて 5 分間攪拌し、遠心分離した。アセトン相を回収し、先のアセトン相と合わせて窒素気流下で乾固した。次にヘキサン 1mL を加えて溶解し、アセトニトリル 2mL を加えて 5 分間攪拌し、遠心分離した。アセトニトリル相を別のガラス製試験管に回収した。ヘキサン相にアセトニトリル 2mL を加えて 5 分間攪拌し、遠心分離した。先のアセトニトリル相と合わせて窒素気流下で乾固した。LC/MS/MS における DEHP の定量上限 (1,000ng/mL) 以下になるようにアセトニトリルに溶解して測定した。

### 3.4 血清中の DEHP 及び MEHP

血清 0.5g に内部標準品 50ng 及びアセトン 4mL を加えて攪拌した後、超音波照射を 2 分間行った。次に 5 分間攪拌し、遠心分離した。アセトン相を別のガラス製試験管に回収し、残渣にアセトン 1mL を加えて 5 分間攪拌し、遠心分離した。アセトン相を回収し、先のアセトン相と合わせて窒素気流下で乾固した。次に Milli-Q 水 0.5mL 及び酢酸 4  $\mu$ L を加えて溶解した。ヘキサン 1mL を加えて 5 分間攪拌し、遠心分離した。ヘキサン相を別のガラス製試験管に回収した。水相にヘキサン 1mL を加えて 5 分間攪拌し、遠心分離した。この操作を再度行い、先のヘキサン相と合わせて窒素気流下で乾固した。アセトニトリル 0.5mL に溶解して LC/MS/MS 試験液とした。

## 4. 倫理面への配慮

試料は、東海大学医学部の倫理規定に則って採取された。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。

## 5. ヒト生体試料中の化学物質の分析 (重金属類、フタル酸モノエステル類、揮発性有機化合物)

### 1. 対象者

#### 1.1 重金属類

研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた愛知職員 36 人 (24-59

歳、男 23 人、女 13 人)、及び東海患者 38 人 (25-72 歳)。

#### 1.2 フタル酸モノエステル類

研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた愛知職員 36 人 (24-59 歳、男 23、女 13)、及び東海患者 2 人。

#### 1.3 揮発性有機化合物

研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた東海患者 38 人 (25-72 歳)。

## 2. 重金属類

### 2.1 試薬及び材料

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。

### 2.2 測定項目

#### 2.2.1 血清 (20 元素)

Mg、Ca、Fe、Cu、Zn、Mn、Co、Se、Mo、Li、B、Al、Ni、Rb、Sr、Cd、Sb、Ba、Hg、Pb

#### 2.2.2 尿 (21 元素)

血清 20 元素のうち鉄を除く 19 元素、及び As、Sn

### 2.3 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した。使用前に超純水で洗浄した。

### 2.4 前処理法及び試験溶液の調製法

#### 2.4.1 血清

マイクロ波分解用容器に血清 0.5mL、硝酸 1mL、過酸化水素 0.1 mL を入れて一夜放置し、電子レンジ (200 W) で 5 分、2 回加熱後、氷中で 1 時間冷却した。

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

#### 2.4.2 尿

テフロン試験管に尿 10 mL を入れ、硝酸 2.5 mL を加えて 70°C 水浴中で 5m L 以下になるまで酸分解した。

前処理法に従って酸分解後、ポリエチレン製遠沈管 (15 mL) に入れ、超純水でテフロン試験管内を洗い込んで全量を 5 mL にする (2 倍濃縮)。混和後、その 1.5 mL を ICP-MS オートサンプラー用サンプルカップ (15 mL) にとり、0.1 %硝酸 1.2 mL、内部標準溶液 0.3 mL を加え、混和して試験溶液とした。

## 2.5 分析方法

測定法；誘導結合プラズマ質量分析（ICP-MS）法

定量法；絶対検量線法

## 2.6 ICP-MS 条件

装置：ICP-MS

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

ネブライザー：バビントン型

内部標準元素：Sc(45)、Y(89)、Ir(193)

干渉補正式：

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

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

## 2.7 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. フタル酸モノエステル類

### 3.1 試薬及び材料

フタル酸モノエチル（MEP）、フタル酸モノブチル（MBP）、フタル酸モノエチルヘキシル（MEHP）、フタル酸モノイソノニル（MINP）、フタル酸モノベンジル（MBzP）、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（100 units）、フロリジル 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。尿クレアチニン値は、和光純薬製クレアチニン-テストワコーを用いて測定した。

### 3.2 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、使用直前にアセトン及びヘキサンの洗浄した。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。

### 3.3 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 1 g 及び無水硫酸ナトリウム 2 g を積層した。使用直前にアセトン 10 mL、ヘキサン 10 mL で洗浄した。

### 3.4 試験溶液の調製法

尿 2 mL を共栓付遠心管（10 mL、ガラス製）にとり、1M 酢酸アンモニウム 0.5 mL、内部標準溶液 25 μL、β-グルクロニダーゼ 30 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 5 mL、塩化ナトリウム 1 g を加え、3 分間混和後 3000 rpm 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 0.5 mL 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 5 mL に溶解し、フロリジルカラムに負荷した。ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を窒素気流下で 1 mL に濃縮して試験溶液とした

## 3.5 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）

## 3.6 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。

## 4. 揮発性有機化合物

### 4.1 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-ヘキサノ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。

### 4.2 分析操作

#### 4.2.1 測定

希釈水 10 mL が入ったヘッドスペースバイアルに、試料（血清 0.5 mL、尿 2 mL）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。

#### 4.2.2 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℃で加熱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。

#### 4.2.3 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 1000 ppm 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 1 ppm 添加した。標準溶液 1 (2-エチル-1-ヘキサナール:0.4 ppm / 2-エチル-1-ヘキサノール:0.4 ppm / 1,4-ジクロロベンゼン:0.2 ppm)、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)

#### 4.2.4 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。

#### 4.3 分析条件

##### 4.3.1 ヘッドスペース条件

装置: Tekmer 7000

バイアル容量: 22 mL (Chromacol, CV-22)

バイアル加熱条件: 85 °C (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: 1 mL

サンプルループ温度: 150 °C

トランスファーライン温度: 160 °C

##### 4.3.2 GC/MS 条件

装置: AUTO MASS SYSTEM II

カラム: Vocol (0.25 mm i.d. x 60 m、膜厚:

##### 1.5 μm、Supelco)

カラム温度: 40 °C (4 分) →10°C/分→230°C (5 分)

イオン源: EI

イオン源温度: 210 °C

イオン化電圧: 70 eV

検出法: 選択イオン検出 (SIM)

モニターイオン: 2-エチル-1-ヘキサナール (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)

## 6. 周産期試料に関して特に脂性試料を対象とした分析

試料は、東海大学医学部付属病院産婦人科外来において研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた患者より、全例同意書を得た。

周産期試料としては、分娩時、母体血 20ml、臍帯血全量を採取し、すぐに遠沈し、血清をマイナス 4°C で保存した。採取にあたっては、採取器具からのコンタミネーションを防止するために、本研究開始時の基礎実験の結果に基づいて施行した。母乳採取は分娩 4 日目と 5 日目に可能な限りの量を採取し、マイナス 4°C にて保存した。また、今回は分析対象を生体の脂性分画に拡大する事を試みて、各研究機関からの依頼を受けて、必要

に応じて臍帯、胎脂等の採取も行った。

検査法については厚生労働省牧野班で策定したガイドラインにしたがい、主要 3 物質 (フタル酸エステル類、ビスフェノール A、ノニルフェノール) を検討対象とした。

#### 1. フタル酸エステル類 (母体血、臍帯血、母乳、尿)

##### 1.1 試薬および標準溶液

ヘキサン、アセトニトリル、アセトン、硫酸ナトリウムは関東化学製フタル酸エステル測定用を用いた。フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジイソオクチル (DiOP)、フタル酸ジイソノニル (DiNP) は、関東化学製環境分析用を用いた。また、内部標準物質として用いた DBP-d<sub>4</sub>、BBP-d<sub>4</sub>、DEHP-d<sub>4</sub>、DiOP-d<sub>4</sub>、DiNP-d<sub>4</sub> は、林純薬工業製環境分析用を用いた。フロリジル及びボンデシル PSA は、それぞれ和光純薬工業及びバリアン社製を使用した。フタル酸エステル類の標準溶液は、DBP、BBP、DEHP の濃度が 4 μg/mL、DiOP、DiNP の濃度が 20 μg/mL になるようにヘキサンで希釈した。内部標準溶液は、それぞれの濃度が 4 μg/mL になるようにヘキサンで希釈した。

##### 1.2 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°C 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°C で 2 時間加熱した。

##### 1.3 フロリジル-PSA 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 1 g、PSA 0.5 g、無水硫酸ナトリウム 2 g を積層した。使用直前にアセトン 10 mL、ヘキサン 10 mL で洗浄した。

##### 1.4 試験溶液の調製法

血清 1 g を共栓付遠心管 (10 mL、ガラス製) にとり、アセトニトリル 5 mL、塩化ナトリウム 0.5 g、ヘキサン 1 mL 及び内部標準溶液 (あるいは標準溶液) 25 μL を加えた後、3 分間混和した。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を分取し、減圧留去した。残渣を蒸留水 2 mL、ヘキサン 5 mL に溶解後、ヘキサン層を分取した。残った水層に再度ヘキサン 3 mL を加えて混和後、ヘキサン層を分取した。分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラムに負荷し、ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

##### 1.5 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°C (3 分) →20°C/分→240°C→10°C/分→300°C (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）

#### 1.6 定量法

試料液を GC/MS に注入し、各フタル酸エステル類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。DiOP は主要な 2 本のピークを、DiNP は主要な 5 本のピーク面積をそれぞれ合計して定量対象とした。

### 2. ビスフェノール A（母体血、臍帯血、尿）

#### 2.1. 試料

標準品：ビスフェノール A (BPA) 及びビスフェノール A-d<sub>16</sub> (BPA-d<sub>16</sub>) は関東化学(株)製の環境分析用試薬を、<sup>13</sup>C-BPA はケンブリッジアイソトープ製を用いた。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とした。

Daidzein, Genistein, Glycitein 及びイソフラボン配糖体、Malonyl 体、Acetyl 体は和光純薬工業(株)あるいはナカライ化学(株)製の生化学用試薬を用いた。標準溶液は、各標準品 10mg 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 80%メタノールに溶解して標準溶液とした。

β-グルクロニダーゼ：シグマ社製又は、和光純薬工業(株)製、生化学用（いずれも 100,000 units/mL 以上）を用いた。

精製用カートリッジ：Isolute Multimode カートリッジ (500 mg)：International Sorbent Technology Ltd. 製、又は、スペルコ製、スペルクリン ENVI-18 (0.5g) を用いた。カートリッジは予めメタノール 10mL、水 5mL の順で洗浄した後使用した。

アルミナ-A カートリッジ：Waters 社製、Sep-Pak アルミナ-A カートリッジ (1.7g) を用いた。カートリッジは予めアセトン 5mL、精製水 5mL、アセトン 5mL の順で洗浄して使用した。

BSTFA：ジールサイエンス(株)製を使用した。

その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いた。

#### 2.2. 装置及び測定条件

2.2.1. 高速液体クロマトグラフィー質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。

2.2.2. ガスクロマトグラフィー質量分析計：日本電子(株)製 GC-mate を用いた。測定条件は次のとおりとした。

GC：HP-5890 シリーズ II

カラム：DB-5MS 0.32mm×30m×0.25 μm

カラム温度：70℃ (2min) - 20℃/min - 150℃ - 10℃/min - 300℃ (5min)

注入口温度：250℃

キャリアーガス：He, 1mL/min

注入方法：スプリットレス パージオフ 1min

MS：Jeol GC-mate

イオン源温度：230℃

イオン化電圧：70V

モニターイオン (m/z)：BPA(357, 372), BPA-d<sub>16</sub> (368, 386), <sup>13</sup>C-BPA(369)

#### 2.3. 検量線の作成

##### 2.3.1 LC/MS 測定

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub> を 10 ng 含んだ BPA の 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 100ng/mL の溶液を調製し、その 10 μL を LC/MS に注入する。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 法を採用し、それぞれモニターイオン m/z 227, m/z 241 により得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め、BPA と BPA-d<sub>16</sub> の面積比により検量線を作成した。

##### 2.3.2. GC/MS 測定

試験管に BPA を 10~200ng の範囲で段階的に採り、これに安定同位体標識内部標準物質として <sup>13</sup>C-BPA を 100ng 添加し、BSTFA 200 μL を加え、アセトンで 1mL に定容した。これを一夜放置し、GC/MS-SIM で測定し、<sup>13</sup>C-BPA との面積比で検量線を作成した。

#### 2.4. 試験溶液の調製

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）「試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究」報告書に準拠して次のとおり調製した。

##### 2.4.1. LC/MS 測定用試験溶液の調製

###### ○遊離体 BPA 測定用試験溶液

血清は 1mL を、尿は 2mL を採り、内部標準物質である BPA-d<sub>16</sub> を 5~10 ng 加えた後 Isolute Multimode カートリッジに負荷した。水 3mL 及び 20%メタノール 3mL で洗浄した後メタノール 3mL で溶出し、減圧乾固後 10%メタノール 1mL に溶解して試験溶液とした。

###### ○総 BPA 測定用試験溶液

血清は 1mL を、尿は 2mL を採り、0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) 1mL、β-グルクロニダーゼ 6,500units/mL (試薬 β-グルクロニダーゼを 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) で 10 倍希釈) を 50 μL 加えた後、37℃で 1 時間インキューベートした。その後の操作は遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

##### 2.4.2. GC/MS 測定用試験溶液の調製

###### ○遊離体 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100 mL を共栓付き三角フラスコに採り、<sup>13</sup>C-BPA 0.1 μg を加え、これに (1+1) リン酸 1mL を加え、pH 3 以下にした。これを、予めメタノール 5mL、精製水 10mL で活性化した C18 カートリッジに負荷し BPA を抽出した。カートリッジを 10%メタノール 10mL で洗浄後、3mL のメタノールで BPA を溶出させ、100mL のナス型フラスコに受け、酢酸エチル 20mL を加え、ロータリーエバポレー

タで濃縮乾固した。フラスコに BSTFA 200  $\mu$ L とアセトン 2mL を加え一夜放置し TMS 化し、ロータリーエバポレータでアセトンを留去した。これに n-ヘキサン 2mL を加え、超音波洗浄機で溶解させ、予め n-ヘキサン 5mL で洗浄したフロリジルカートリッジに負荷し、流出液を試験管に採取した。更に、n-ヘキサン 2mL ずつでフラスコを 2 回洗浄し、カートリッジに負荷し、先の流出液と合わせた。流出液に窒素ガスを吹き付け、1mL に濃縮し、これを GC/MS-SIM で定量した。

#### ○総 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100mL を共栓付き三角フラスコに採り、 $\beta$ -グルクロニダーゼ溶液 100  $\mu$ L と  $^{13}\text{C}$ -BPA 0.1  $\mu$ g を加え、37°C で 90 分間酵素処理した。その後の操作は遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

### 3. ノニルフェノール (母体血、臍帯血、尿)

#### 3.1. 試薬・装置

【試薬】ノニルフェノール (NP) は、環境分析用試薬 (関東化学社製) を使用した。内標準物質として用いた 4-(1-メチル)オクチルフェノール- $d_5$  (NP- $d_5$ ) は、環境分析用試薬 (林純薬社製) を用いた。

【溶媒】LC/MS の移動相に使用したアセトニトリルは和光純薬社製 HPLC 用を、酢酸アンモニウムは和光純薬社製特級を選択した。また、前処理に利用した溶媒は、全て和光純薬社製残留農薬用を使用した。精製水は日本ミリポア社製 Milli-Q (EDS ポリッシャー付き) で精製した水を使用した。

【実験用器具】ガラス製の実験器具は、すべて 200°C 以上で加熱後使用した。

#### 【LC/MS 装置及び測定条件】

LC/MS 装置 (機種: Agilent 1100 LC/MSD-SL)

#### LC 条件

- ・分析用カラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2.1 x 100 mm, 5  $\mu$ m)
- ・ガードカラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2 x 5 mm, 5  $\mu$ m)
- ・前処理用カラム: TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5  $\mu$ m)
  - ・移動相: アセトニトリル+0.02 %酢酸アンモニウム/0.02 %酢酸アンモニウム溶液 (70:30 (8 min)→95:5 (10 min) (V/V))
- ・流速: 0.2 ml/min (分析カラム)、0.5 ml/min (前処理カラム)
- ・カラム温度: 40 °C
- ・注入量: 30  $\mu$ l

#### MS 条件

- ・イオン化法: Electrospray (ESI), Negative
- ・Nebulizer gas:  $\text{N}_2$  (35 psi)
- ・Drying gas:  $\text{N}_2$  (12 l/min, 350 °C)
- ・フラグメンター電圧: 130 V (NP, NP- $d_5$ )
- ・モニタリングイオン ( $m/z$ ): 219 (NP), 224 (NP- $d_5$ )

### 3.2. オンライン前処理-LC/MS 法の測定概要

血清試料に同量のアセトニトリルを加え、遠心分離を行った。その後、上清を取り、暫定濃度になるように内標準物質を添加し、測定用試料とした。抽出精製・濃縮は、オンライン前処理固相カラムを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質を分離部及び検出部 (LC/MS) に導入する。検出には、ESI-MS による SIM モードネガティブで測定を実施した。

#### 測定試料の調製法

測定対象とした血清は神奈川県食肉衛生検査所にてした屠殺した血液を用い、神奈川県衛生研究所で遠心分離 (3000rpm、10 分間) を行い、使用に供するまで -80°C にて凍結保存した。測定時には室温解凍し、転倒混和を行った後に、ピペッターで正確に 1 ml を量り取り、試験管に移した。この試験管は、あらかじめ洗浄後に精製水、アセトンを通液したものを使用した。血清が入った試験管に標準溶液を血清中 50  $\mu$ g/ml となるように添加した。次に、血清と同量のアセトニトリルを加え混和後、遠心分離 (3000rpm、30min、4°C) を行った。その後、上清 1 ml をバイアル瓶に正確に量り取り、暫定濃度になるように内標準物質である、NP- $d_5$  を加え、測定に供した。

#### 標準試料の調製法

各標準品を化学天秤で 100 ml 用メスフラスコに 100 mg 量り取り、標準原液としてアセトニトリルで 1.0 mg/ml とする。その後、0.2~100  $\mu$ g/ml の濃度範囲になるようにアセトニトリル/水=1/1 (V/V) 溶液を加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう希釈する。

その後、LC/MS-SIM 法により標準試料溶液を測定し、内標準法を用いて各濃度範囲内における検量線を作成し、定量分析を行った。

### 4. ノニルフェノール及びビスフェノール A (母乳、胎脂、臍帯)

母乳、胎脂、臍帯中のノニルフェノール及びビスフェノール A については、エチル誘導体化 GC/MS 法で測定を行った。

#### 4.1 前処理方法

母乳、胎脂、臍帯中のノニルフェノール及びビスフェノール A 測定時前処理方法は以下の通りである。

##### 4.1.1 母乳中からの抽出方法

母乳からノニルフェノール及びビスフェノール A を抽出するため、母乳 1mL を採取後、BPA- $d_{16}$  を 100ng、m-OP- $d_5$  を 100ng 添加した。ジエチルエーテル:ヘキサン (3:2) を 2mL 加え、Voltex ミキサーで攪拌した。遠心分離 (3,000rpm、5 分) を行い、有機溶媒層を回収した。水溶液層には再度ジエチルエーテル:ヘキサン (3:2) を 2mL 加え、Voltex ミキサーで攪拌後、遠心分離 (3,000rpm、5 分) を行い、有機溶媒層を回収した。回収した有機溶媒を足し合わせ、窒素気流下、40°C で濃縮・乾固し、母乳抽出溶液を得た。

#### 4.1.2 胎脂からの抽出

胎脂からノニルフェノール及びビスフェノールAを抽出するため、胎脂を採取し、胎脂の秤量値を記録した。採取した胎脂にBPA-d16を100ng、m-OP-d5を100ng添加後、十分に攪拌し、胎脂溶液とした。

#### 4.1.3 臍帯からの抽出

臍帯からノニルフェノール及びビスフェノールAを抽出するため、臍帯をはさみで細断後、重さを量り、秤量値を記録した。細断した臍帯にBPA-d16を100ng、m-OP-d5を100ng添加した。メタノール30mLを加え、ポリトロンホモジナイザーで更に細かくすりつぶした後、遠心分離(3,000rpm、5分)を行い、メタノール層を回収した。遠心分離後の沈殿物には、再度メタノール30mLを加えた後、ポリトロンホモジナイザーで抽出を行った。その後、遠心分離(3,000rpm、5分)を行い、メタノール層を回収した。回収したメタノール溶液を足し合わせて、ロータリーエバポレーターで濃縮し、臍帯抽出溶液を得た。

#### 4.1.4 誘導体化及び精製処理

母乳、胎脂及び臍帯抽出溶液に1mol/L KOHエタノール溶液を0.5mL、ジエチル硫酸を0.1mL加え、十分に攪拌した。室温で1時間静置し、ノニルフェノール及びビスフェノールAのフェノール性水酸基をエチルエーテル処理した。誘導体化処理終了後、1mol/L KOHエタノール溶液2mLを加え、60°Cで1時間静置し、アルカリ化水分解処理を行った。アルカリ化水分解処理終了後、蒸留水3mL、n-ヘキサン1mLを加え、Voltexミキサーで攪拌し、ヘキサン層を回収した。水溶液層には再度n-ヘキサン1mLを加え、攪拌後、ヘキサン層を回収した。回収したヘキサン層を足し合わせ、窒素気流下、40°Cで約0.2mLまで濃縮した。この濃縮溶液を、予め5%ジエチルエーテル/ヘキサン溶液10mLで洗浄したフロリジルカラムに負荷した。5%ジエチルエーテル/ヘキサン溶液10mLで溶出させ、溶出溶液を回収した。回収溶液を窒素気流下、40°Cで約0.1mLまで濃縮し、GC/MS測定溶液とした。

#### 4.2. 測定方法

試料溶液をGC/MS装置にセットし、以下の条件で分析した。

##### GC条件

GC : Trace GC  
注入方法 : Splitless (1min)  
注入量 : 1  $\mu$ L  
カラム : SGE社、BPX-35 25 m  
×0.2 2mm I.D. ×0.25  $\mu$ m Film  
カラム温度 : 60 °C  
(1min)---10 °C/min→300 °C (Hold for 3 min)  
キャリアーガス : He (流速 1.4 mL/min)  
インターフェース温度 : 280 °C

##### MS条件

イオン化法 : EI

イオン化電圧 : 70 eV  
イオン源温度 : 250 °C  
検出モード : SIM  
定量イオン  
モニターイオン

Monoethyl-NP : m/z 177  
Monoethyl-m-OP-d5 : m/z 154  
Diethyl-BPA : m/z 269  
Diethyl-BPA-d14 : m/z 280

#### 4.3 検量線

NP標準溶液を用いて、NP濃度が5~100ng/mLの範囲、m-OP-d5濃度100ng/mLの検量線溶液を調整し、エチル誘導体化処理後、GC/MSで測定を行った。

BPA標準溶液を用いて、BPA濃度が0.5~10ng/mLの範囲、BPA-d16濃度100ng/mLの検量線溶液を調整し、エチル誘導体化処理後、GC/MSで測定を行った。

#### 4.4 定量

内標準法にて定量計算を行った。

NPの定量計算時には、検量線溶液のNP濃度を横軸に、NPとm-OP-d5の面積比(NP/m-OP-d5)を縦軸にプロットし、最小二乗法で回帰式を算出した。試料中濃度算出時には、試料中NPとm-OP-d5の面積比(NP/m-OP-d5)を、先に算出した回帰式に代入し、定量値を得た。

BPAの定量計算時には、検量線溶液のBPA濃度を横軸に、BPAとBPA-d16の面積比(BPA/BPA-d16)を縦軸にプロットし、最小二乗法で回帰式を算出した。試料中濃度算出時には、試料中BPAとBPA-d16の面積比(BPA/BPA-d16)を、先に算出した回帰式に代入し、定量値を得た。

#### 5. フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(胎脂、臍帯)

胎脂、臍帯中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルについては、アセトニトリル抽出GC/MS法で測定を行った。

##### 5.1 前処理方法

胎脂、臍帯中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシル測定時前処理方法は以下の通りである。

##### 5.1.1 胎脂中からの抽出方法

胎脂からフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを抽出するため、胎脂を採取し胎脂の秤量値を記録した。秤量した胎脂にDEHP-d4を100ng添加後、n-ヘキサン1mLで溶解した。このn-ヘキサン溶液に、蒸留水1mL、塩化ナトリウム0.5g、アセトニトリル5mLを加え、Voltexミキサーで攪拌後、遠心分離(3,000rpm、5分間)を行った。遠心分離終了後の溶液層から、アセトニトリル層を回収し、胎脂からのアセトニトリル抽出溶液を得た。

##### 5.1.2 臍帯からの抽出方法

臍帯からフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを抽出するため、臍帯をはさみで細断後、全重量を測定し、秤量値を記録した。細断した臍帯に、DEHP-d4を100ng添加後、蒸留水1mL、塩化ナトリウム0.5g、n-ヘキサン1mL、アセトニトリル5mLを加



え、ポリトロンホモジナイザーで、攪拌を行った。攪拌終了後の溶液を遠心分離(3,000rpm、5分)し、アセトニトリル層を回収した。残り溶液には再度アセトニトリル 5mL を加え、ポリトロンホモジナイザーによる攪拌、遠心分離を行い、アセトニトリル層を回収した。回収したアセトニトリル層を足し合わせ、臍帯からのアセトニトリル抽出溶液を得た。

### 5.1.3 精製処理

胎脂及び臍帯からのアセトニトリル抽出溶液を窒素気流下、40℃で濃縮、乾固した。残さを、蒸留水 2mL に溶解し、n-ヘキサン 5mL を加え、Voltex ミキサーで攪拌後、n-ヘキサン層を回収した。水溶液層には再度 n-ヘキサン 3mL を加え、Voltex ミキサーで攪拌後、n-ヘキサン層を回収した。回収した n-ヘキサン層を足し合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水処理した。この n-ヘキサン溶液を予めアセトン 10mL、n-ヘキサ 10mL で事前洗浄した無水硫酸ナトリウム(上部、1g)、PSA(0.5g、中間部)、フロリジル(1g、下部)積層カラムに負荷した。n-ヘキサン 3mL で洗浄後、5% アセトン含有 n-ヘキサン 10mL で溶出し、溶出溶液を得た。窒素気流下、40℃で約 1mL まで濃縮し、GC/MS 測定用試料溶液とした。

## 7. 周産期の重金属暴露量測定法の確立と神経系初期発生における *in vitro* 毒性評価法の確立

### 1. 重金属測定

#### 1.1 試料の採取

東海大学医学部産婦人科外来において、インフォームドコンセントを行い、同意書を得て試料の採取をおこなった。母体由来の試料として血液、母乳、尿を採取した。また、新生児由来の試料として臍帯血、臍帯、胎盤を採取した。試料は採取後、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。

#### 1.2 測定元素

測定元素および内標元素はそれぞれ、アルミニウム:Al (コバルト:Co)、ヒ素:As (イットリウム:Y)、カドミウム:Cd (ロンジウム:Rh)、鉛:Pb (ビスマス:Bi) の4元素とした。(括弧内は内標として用いた元素)

#### 1.3 試薬および器具

試料の分解には、関東化学社製の硝酸(1.42 Ultrapur-100) および過酸化水素(Ultrapur)を用いた。Al, As, Cd, Pb, Co, Y, Rh, Bi の標準溶液は和光純薬社製を用いた。試料の希釈等には、ミリポア社製 MilliQ SP (電気伝導度 18.3Ω) で精製した超純水を使用した。サンプル水溶液、内標準溶液、ライン洗浄用超純水は全て 0.5%濃度の硝酸を添加して用いた。

溶液の計量に使用するピペットマンチップは 5%硝酸溶液に一晩浸漬した後、超純水で流水洗浄した。サンプル調整に用いるビーカー、メスフ

ラスコは使用直前に 0.5%硝酸溶液でとも洗いをした後に使用した。

#### 1.4 試料の前処理および分析溶液の調整

マイクロウェーブによる分解は、出力 200W の電子レンジおよびマイクロ波分解容器(ジーエルサイエンス社製 MV-7 用 PFA 小容器)を用いた。3分間の分解を4回を行い、各々の反応の間には分解容器ごと3分間氷上冷却した。

#### 1.5 ICP-MS 条件

装置:HP-4500 (横河アナリティカル社製)

RF パワー:1400W

プラズマガス (Ar) 流量:15L/min

キャリアガス (Ar) 流量:1.25L/min

サンプリング位置:8mm

ネブライザ:バビントンネブライザ

試料導入:オートサンプリング使用

測定ポイント数:3

繰り返し回数:3回

積分時間:0.1

測定方法:絶対検量線法(内部標準補正)

検量線濃度:

#### 1.6 検量線濃度

検量線に用いた標準駅の濃度は以下の通りである。

Al: 0, 0.5, 2, 5, 10(ppb)

As: 0, 0.05, 0.2, 1, 5(ppb)

Cd, Pb: 0, 0.02, 0.08, 0.4, 2(ppb)

### 2. 神経幹細胞培養による重金属の発生毒性評価法の確立

#### 2.1 ニューロスフェア培養

胎齢14日(E14)のC57BL6マウスE14マウスの大脳より線状体原器より細胞を分離した。ニューロスフェア培地に0、50、100、200ppbの重金属混合溶液(カドミウム・ヒ素・鉛)を添加し、1週間培養を行った。ニューロスフェア培地の組成は以下の通りである。

DMEM/F12 (#11330-032 GIBCO)

basic-Fibroblast growth factor: bFGF(20ng/ml #13256-029 GIBCO)

Epidermal growth factor: EGF (20ng/ml #13247-051 GIBCO)

B27 supplement (1:50 #17504-044 GIBCO)

Penicillin/streptomycin (1% #15070-063 GIBCO)

#### 2.2 増殖能および分化能アッセイ

重金属添加、または非添加条件で培養したニューロスフェアの増殖能を、形成されたニューロスフェアの直径を計測することにより評価した。培養1週間後、形成されたニューロスフェアをAxiophotoにて写真撮影し、同ソフトウェア内でニューロスフェアの直径を計測した。

続いて、ニューロスフェアを培養後1週間目にラミネンコートした培養ディッシュに播種し、さらに1週間分化誘導培地で培養を行った。培養後、4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を免疫組織科学的にニューロン、グリア細胞に対する

分化マーカー ( $\alpha$ -tubulin, glial fibrillary acidic protein) の発現を観察した。

### 2.3 重金属暴露による薬物代謝酵素の発現解析

重金属暴露による神経幹細胞の反応性を観察するため、重金属添加または非添加条件で培養したニューロスフェアからRNAを抽出し、RT-PCRにて薬物代謝酵素であるチトクロム・グルクロン酸抱合酵素CYP1a1の発現を観察した。

## 8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

### 1. Oct4-GFP ES細胞の樹立

マウス Oct4 遺伝子の upstream 約 18 kb の転写調節領域に緑色蛍光タンパク EGFP をコードする cDNA につないだトランスジーンと Neo 耐性遺伝子をもつコンストラクトを作製した。これを RI ES 細胞に安定的に導入し、G418 によりこのコンストラクトの導入された ES クローンを樹立した。

### 2. DsRed-TS 細胞の樹立

トリプシン処理により浮遊させた ICR 系統マウス胚由来 TS 細胞に、pDsRed-Express-N1 プラスミド DNA (Clontech) を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて導入した。導入プラスミド DNA がゲノムに組み込まれた安定形質転換株の選択には、G418 を用いた。得られた形質転換株 DsRed-TS に対するヒストン脱メチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA; Sigma-Aldrich) の効果は、200 nM TSA 存在下で 48 時間 DsRed-TS を培養後、蛍光顕微鏡下で確認した。

### 3. 倫理面への配慮

本研究に用いられた細胞は研究用マウス胚由来のものであり、倫理上の問題は全くない。

## C&D. 研究結果、考察

### 1. 生体試料中のピレスロイド系及び有機リン系農薬分析法の開発及び暴露評価に関する研究

#### 1. 3-PBA 及び TCP の分析法の検討

##### 1.1 LC/MS/MS 測定条件の検討

昨年度に引き続き、ピレスロイド系農薬の暴露評価を行う為の高感度分析法を検討した。

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。現在、数多くの合成ピレスロイド系殺虫剤が用いられているが、その多くのピレスロイド系殺虫剤は、3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) に代謝される。

一方、有機リン系農薬は、世界で最も多く使用され、殺虫剤としての使用量では、5 割以上を占めている農薬である。中でもシロアリ駆除剤や家庭用殺虫剤としても汎用されてきたクロルピリホスは、神経系や脳の発育に影響を与えることが指摘されている。そこで、本年度はクロルピリホスの暴露評価法も検討した。暴露マーカーとして、主たる代謝物である 3,5,6-Trichloro-

2-pyridinol (TCP) を指標成分とした。イオン化モードは、3-PBA はカルボキシル基を、TCP は 3 個の塩素原子を有していることからネガティブモードが適していた。コーン電圧、コリジョンエネルギー等の最適化を試み、測定条件を設定した。

#### 1.2. 尿及び血清中の分析法の検討

##### 1.2.1 遊離体 3-PBA、TCP の前処理

3-PBA 及び TCP はカルボキシル基や水酸基を有するものの、構造的に疎水性を有する化合物と考えられる。そこで、親水性及び疎水性化合物の保持能にも優れたポリマー逆相系カートリッジ Oasis HLB を用いた前処理法を採用することにした。カートリッジの充填剤であるが、60mg 充填で殆ど問題は無かったが、保持の安全性を考慮して 200mg 充填のカートリッジを採用した。尿及び血清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。本法による尿及び血清中の 3-PBA、TCP の添加回収率 (2 ppb 添加) は、それぞれ平均で 92.7%、90.5%、相対標準偏差 RSD は 4.7%及び 5.7% (n=5) であった。本法による検出限界は 0.1ng/mL であった。

##### 1.2.2 総 3-PBA、TCP の前処理

3-PBA 及び TCP は、主にグルクロン酸抱合体として尿中へ排泄されることが知られている。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、インキュベーションは 90 分、 $\beta$ -グルクロニダーゼの量は ( $\beta$ -グルクロニダーゼ 6,500units/mL、スルファターゼ 160 units/mL) 50  $\mu$ L とした。本法による 3-PBA 及び TCP の添加回収率 (2 ng/mL 添加) は、それぞれ平均で 82.7%、80.5%、相対標準偏差 RSD は 7.5%及び 6.8% (n=5) であった。本法による検出限界は 0.1 ng/mL であった。

#### 1.3. 尿及び血清中の 3-PBA、TCP 濃度

東海大学病院で採取された母体血 10 検体、母体尿 2 検体及び埼玉県衛生研究所職員 (以下埼玉職員) 12 名 (男女各 6) の尿を分析した。遊離体の 3-PBA 及び TCP とも、いずれも操作ブランクレベル (0.1ng/mL) であった。一方、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理した一部の試料からは、極微量 (0.5ng/mL) の 3-PBA 及び TCP が検出されたが、いずれも 1ng/mL 以下であった。

ピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬は、農業用殺虫剤や家庭用殺虫剤として最も汎用されている化合物である。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暴露されていることが示唆された。

なお、ピレスロイド系農薬の中には、構造中に 3-PBA を有していないものもあることから、これらの暴露評価法についても検討する必要があると考える。

#### 2. 尿中の有機リン系農薬の分析

## 2.1 LC/MS/MS 測定条件の検討

有機リン系農薬の多くは、生体内で代謝を受け、ジアルキルリン酸 (Dimethyl phosphate (DMP)、Diethyl phosphate (DEP))、ジアルキルチオリン酸 (Dimethyl thiophosphate (DMTP)、Diethyl thiophosphate (DETP)) 及びジアルキルジチオリン酸 (Dimethyl dithiophosphate (DMDTP)、Diethyl dithiophosphate (DEDTP)) 等を産生する。そこで、暴露マーカーとしてこれらの代謝物を指標成分とした。イオン化モードは、いずれの成分もネガティブモードが適していた。コーン電圧、コリジョンエネルギー等の最適化を試み測定条件を設定した。

## 2.2. 尿中の分析法の検討

ピレスロイド系農薬の主代謝物である 3-PBA や代表的な有機リン系農薬クロロピリホスの主代謝物 TCP は、グルクロン酸抱合等を受けて尿中に排泄される。しかし、有機リン系農薬の主たる代謝物である DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP 及び DEDTP は抱合を受けることなく遊離の形で尿中に排泄される。

尿中に排泄される種々の化合物の前処理法として固相抽出法 (SPE) が最も汎用されている。そこで、逆相モード、順相モード、イオン交換モードのカートリッジを用いて種々検討したが、十分な回収率が得られず且つ夾雑成分の除去が不十分であった。そこで、液-液分配法を用いた前処理法を検討した。DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP 及び DEDTP は、親水性が極めて高い弱酸性物質であることから、6M 塩酸を用いた強酸性条件化でジクロロメタンで抽出する方法を採用した。本法による添加回収率は DMP を除き、50ng/mL の添加で 60% 以上であった。本法における検出限界は DMP 及び DEP を除き 2ng/mL であった。DMP は、マトリックスの影響を強く受けることから、前処理法の更なる改良が必要であった。

## 2.3. 尿中の有機リン系農薬代謝物濃度

埼玉職員 11 名 (男 6、女 5) の尿を分析した。いずれも操作ブランクレベル (2 ~ 5 ng/mL) であった。農業従事者の有機リン系農薬散布後の尿から数百 ng/mL レベルの有機リン系農薬代謝物 (DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP 及び DEDTP) が検出される事例が報告されているが、空中散布等が殆ど無くなった今日において、有機リン系農薬による暴露レベルは極めて微量であることが示唆された。

## 2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発および LC/MS を用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析に関する研究

### 1. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の高感度分析法の開発とバリデーション

血漿試料における定量下限値を求めたところ、それぞれ PFHxS: 0.004 ng/mL、PFOS: 0.004 ng/mL、PFOA: 0.1ng/mL、PFNA: 0.008ng/mL であった。また、

検量線を作成したところ、0.2~20 ng/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 94.3% 以上と良好な結果を得ることができた。本分析法を用いてヒト母乳中 PFCs の分析を行ったところ、すべての検体から PFOS が検出され、他の PFCs に関しても高頻度で検出された。このことから、PFCs がヒト母体から母乳中へ移行している可能性が示唆された。

### 2. HILIC/MS を用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析

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、構築した HILIC/MS 法の検出下限値 ( $S/N=3$ ) は、ニコチンで 0.2ng/mL、コチニンで 0.1ng/mL であった。また検量線を作成したところ、ニコチンでは 1~250ng/mL、コチニンでは 0.4~250ng/mL の範囲で良好な直線性 (相関係数;  $r=0.999$ ) が得られた。さらに、血清試料を用いた添加回収試験 ( $n=6$ ) においても、平均回収率はニコチン、コチニン共に 90.0% 以上と良好な結果を得ることができた。

本法をヒト妊婦母体血清および臍帯血清の測定に適用したところ、2002年に採取された検体 (38検体中13検体; 検出率38.3%) に比べ、2006年に採取された検体 (13検体中2検体; 検出率11%) ではコチニンの検出率が低かった。この結果は年々喫煙者が減少しているという統計結果と同様の傾向を示している。また臍帯血清では11検体中1検体からコチニンが検出された。臍帯血清でコチニンが検出された検体では、ペアとなる母体血清でもコチニンが検出された。今後は、検体数の増加、喫煙の有無や副流煙暴露の可能性等の家庭環境の調査、ヒト妊婦尿中ニコチンおよびコチニンの分析を行う予定である。

## 3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析法の構築および実試料の分析

添加回収実験 ( $n=3$ ) の結果、主要な測定対象化合物の回収率は 80~110%、RSD 10% の範囲内であり、満足できる結果であった。PBDEs は第 4 群 (油脂類) および第 5 群 (豆類)、第 10 群 (魚介類)、第 11 群 (肉・卵類) から各々 1.82, 0.03, 0.48, 0.01ng/g の濃度で検出された。第 10 群はペンタ-BDE 由来、第 4 群はデカ-BDE 由来の異性体の残留が顕著であった。また、ND=0 として計算すると、食事から摂取するペンタ-BDE の 93% が魚介類経由であり、デカ-BDE では 100% が油脂由来であった。全食品群からのペンタ-BDE (3-6 臭素化物 26 異性体) の合計一日摂取量は、ND=0 として計算した場合で 46ng/人/日、ND=1/2 LOD で計算した場合で 329ng/人/日であり、欧州で報告されている食事由来の PBDEs 摂取量と同程度の値であった。また、成人の体重を 50kg として計算すると、上記の摂取量は 0.0009  $\mu$ g/kg/日、0.007  $\mu$ g/kg/日となり、米国

環境保護庁が設定するペンタ-BDE原体の参照用量( $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ )の約 $1/2200$ ,  $1/300$ に相当する値であった。同様に、デカ-BDE(9-10臭素化物4異性体)の合計一日摂取量は $\text{ND}=0$ として計算した場合で $21\text{ng}/\text{人}/\text{日}$ ( $0.0004\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ )、 $\text{ND}=1/2$  LODで計算した場合で $309\text{ng}/\text{人}/\text{日}$ ( $0.006\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ )であり、各々参照用量( $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ )の約 $1/24000$ ,  $1/1600$ に相当する値であった。以上の結果から、我が国の成人における食事経由のPBDEs摂取による健康影響上のリスクは小さいことが示唆された。

第4群(油脂類)から $1.82\text{ng}/\text{g}$ のPBDEsが検出された件に関して植物油が原因試料と推定されたが、これまで国内市場に流通する植物油中のPBDEs濃度について報告例は無く、その汚染実態は不明であった。そこで、市販の18銘柄の植物油試料を対象にPBDEs(3-10臭素化物、8異性体)の残留実態調査を実施した。その結果、7銘柄の植物油試料(ナタネ油、調合油)から $0.7$ - $4.3\text{ng}/\text{g}$ のPBDEsが検出された。その他の植物油からはPBDEsは検出されなかった(検出下限値: Tr-HxBDEs:  $0.01\text{ng}/\text{g}$ , HpBDE:  $0.02\text{ng}/\text{g}$ , DeBDE:  $0.1\text{ng}/\text{g}$ )。PBDEsが出された植物油のうち、6銘柄(No. 1, 3, 4, 7, 16, 18)ではデカ-BDE由来の異性体(DeBDE-209)の残留が顕著であり、トータルダイエット試料の分析結果と一致した。一般的に土壌や大気粉塵中ではDeBDE-209濃度が高いことから、これらの植物油の汚染原因として、原料植物に付着した土壌や大気粉塵が十分除去されないまま油脂が圧搾され、土壌や大気粉塵中のPBDEsが抽出油に移行・残留したことが考えられる。また、油脂の原料植物が、生育中に土壌中のPBDEsを取り込んだ可能性もある。Muellerらは、アブラナ科のダイコン(*Raphanus sativus L.*)やウリ科のズッキーニ(*Cucurbita pepo L.*)を用いてモデル実験を行い、土壌に添加したペンタ-BDEの一部がこれらの植物組織中に取り込まれたと報告している。一方、土壌中のデカ-BDEの植物への取り込みについては報告例が無く、その挙動は明らかではない。なお、今回、同一メーカー(N社)製の3種類の植物油製品(No. 2, 9, 12)について、ナタネを原料とした製品(No. 2)からはPBDEsが検出されたが、トウモロコシ、またはサフラワーを原料とした製品(No. 9, 12)ではPBDEsは検出されなかった。これら3つの製品の容器は、同一規格のPET容器(600g用)であり、品質は同等のものと推定される。したがって、上記ナタネ油(No. 2)のPBDEs汚染は容器に由来するものではなく、原料の汚染度を反映したものである可能性が高い。なお、ナタネを主原料とした6つの食用ナタネ油製品(No. 1-6)のうち、No. 5およびNo. 6の試料からはPBDEsは検出されなかった。類似の製品間で汚染レベルが異なっていた原因として、原料に使用されたナタネの汚染度や油脂の精製工程の違いが影響していることが予想されるが、その説明は今

後の検討課題である。これまで国内の食用植物油のPBDEs汚染実態は不明であったが、今回の分析結果から、一部の製品中に低レベルながらもPBDEsが残留していることが明らかとなった。今後、植物油へのPBDEsの混入経路や高温調理時のPBDEsの分解挙動の解明が望まれる。

以上の研究結果は、食事を介した母体や幼児のPBDEs暴露状況を把握するうえで重要な知見であり、植物油脂を利用したより安全性の高い食品の開発・応用にも役立つと期待される。

#### 4. フタル酸エステル類の子どもへの暴露評価に関する研究

##### 1. 血清中のフタル酸モノエステル類

母体血清からは、MEP, MBP 及び MEHP が高頻度で検出された。臍帯血清からも同じく MEP, MBP 及び MEHP が高頻度で検出された。これら MEP, MBP 及び MEHP について、母子関係に基づいてプロットした。双方の濃度に明確な相関は認められなかった。しかしながら、双方の血清から検出されたフタル酸モノエステル類の濃度は同程度であることから、この濃度域では、母体血中のフタル酸モノエステル類は、ほぼ直接胎児に到達していると考えられる。このことは、母体が暴露したフタル酸ジエステル量を評価することにより、間接的に胎児の臍帯血流を介した当該化学物質の暴露量を推察するうえで重要な知見である。ただし、高濃度の暴露が疑われる事例については、今回の試料には含まれないことから、検討が必要である。

##### 2. 母乳中のフタル酸モノエステル類

母乳からは、MEHHP を除く全てのフタル酸モノエステル類を検出した。母乳中の濃度は、母体血清中の濃度と比較して高濃度になる傾向が認められた。今回分析した試料については、採血時と採乳時との間に時間差がある。今後、フタル酸モノエステルの動態を解明し、血清及び母乳間の濃度関係を評価するためには、採血時と採乳時の時間差がより短い試料を分析することが必要であると考えられた。

本研究結果と海外の分析事例と比較した。デンマーク及びフィンランドでの母乳中のフタル酸モノエステル類の分析事例を示した。中央値での比較において、MBP 及び MEHP について日本(本研究結果)の方が高い傾向にあると推測された。一方、MiNP については、デンマーク及びフィンランドの方が高い傾向にあると思われた。この地域差については、欧州では、DEHP の生殖器官への毒性が指摘された当初より、代替品として DiNP を候補に挙げていたことに起因すると推測される。また EU は、DiNP の安全性について、特別な規制を設ける必要がないことを報告している。これを受けて、欧州の可塑剤工業界は、DiNP の安全性を前面に押し出している。今後の欧州の母乳試料中の MiNP の濃度について、注目していく必要があると思われる。