

3. 胎脂中の DEHP 及び MEHP

測定した 5 検体全てから比較的高濃度の DEHP を検出した。一方、MEHP は、定量下限(10 ng/g 未満)であった。また、この胎脂を付着させていた新生児及びその母体、それぞれの血清(分娩時臍帯血及び母体血由来)中の DEHP 及び MEHP を測定した結果、いずれの検体についても数 ng/mL であった。従って、胎脂中の DEHP は、分娩直前の DEHP の暴露に起因するものでなく、胎脂が胎児体表上に形成される妊娠 6 ヶ月目以降に起因するものである可能性が高い。胎脂は、胎児の体表上に形成される主に脂質及び表皮の剥離物から成るクリーム状の物質であり、羊水からの刺激から胎児を保護する機能があると考えられている。従って、胎脂は、胎児及び羊水と常に接触しており、検出された DEHP は、胎児から皮脂腺を通じて移行したものと羊水から移行したものに由来していると思われる。従って、胎脂中の DEHP は、胎脂が形成された妊娠 6 ヶ月目以降の母体及び胎児の DEHP の暴露履歴を反映している可能性が考えられる。血中の DEHP 濃度を上昇させる事象として、塩ビ製医療器具を用いた医療行為が挙げられる。医療行為履歴と胎脂中の DEHP の間に相関が見いだすことができれば興味深い知見となりえる。また、胎児の DEHP の排出機構として機能していることも考えられる。このような観点から胎脂は、胎児の DEHP を含む化学物質の暴露を評価できる試料として期待される。

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)

1. 重金属類

1.1 愛知職員

愛知職員 36 人より採取した血清及び尿中の重金属類濃度を測定した。その結果、各元素の血清および尿中濃度は、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。性別に各元素濃度を比較した結果、血清では Fe、Mo、尿では Mo において男性が有意に($p < 0.05$)高い値を示した。血清中 Fe の性差についてはよく知られており、医療機関においても男女別に正常濃度範囲が設定されている。血清中 Mo の性差については長谷川らによって同様の報告がなされており、尿中 Mo の性差については、血清中濃度及び尿中の Mo 濃度(クレアチニン補正值)の間に有意な相関($P < 0.01$)が認められたことから、血中濃度を反映した結果と考えられた。また、血清中の元素間の相関では、Mg と Fe、Mg と Sr、Ca と Zn の間に有意な相関($P < 0.01$)が認められた。

1.2 東海患者

東海患者 38 人より採取した血清中の重金属類濃度を測定した。その結果、各元素の血清中濃度は、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。

子宮内膜症の患者(stage I ~IV) 19 人とそれ以外の患者 19 人について各元素濃度を比較した結果、20 元素いずれにおいても有意差は認められなかった。血清中元素間における相関では、Cu と Se、Cu と Li、Al と Ba の間に有意な相関($P < 0.01$)が認められた。今後さらに血清試料を分析し、血清中の多元素バランスと疾病との関連について検討する予定である。

2. フタル酸モノエステル類

2.1 愛知職員

愛知職員 36 人より採取した尿中のフタル酸モノエステル類濃度を測定した。その結果、測定対象 5 物質のうち、MBP と MEP がすべての検体から検出された。MBP の中央値は $58.7 \mu\text{g/g}$ 、検出濃度範囲は $22.8 \sim 554 \mu\text{g/g}$ 、であった。MEP の中央値は $13.7 \mu\text{g/g}$ 、検出濃度範囲は $3.06 \sim 944 \mu\text{g/g}$ であった。一方、MINP はほとんどの検体で検出されなかった(検出率は 6%)。MBzP 及び MEHP の検出率はそれぞれ 75%、56%で、中央値はそれぞれ 11.4 、 $7.76 \mu\text{g/g}$ であった。

6 歳以上の米国居住者 2540 人について測定を行った Silva らの報告と比べた場合、本調査での MEP 濃度は約 1/10 と低く、逆に MBP 及び MEHP 濃度はそれぞれ約 2.7 倍、約 2.5 倍であった。両調査での MEP 濃度の大きな差は、日本と米国での使用実態の違いが要因の 1 つと考えられた。また、Itoh らが東京、横浜居住の一般住民 36 人について調査を行った結果と比べた場合、本調査での MBP 及び MEHP 濃度はそれぞれ約 1.9 倍、約 1.7 倍であった。藤巻らが東京都内の産婦人科を受診した妊婦 42 人について調査を行った結果と比べた場合、本調査での MEHP 濃度は約 1/1.3 であった。

すべての検体から検出された MBP と MEP について、性、年齢、食生活等との関連を検討した。その結果、MBP 及び MEP 濃度ともに女性の方が男性よりも有意($P < 0.05$)に高い値であった。その要因の 1 つとして、ヘアケア製品、化粧品、香水等の使用による暴露が考えられた。また、MEP 濃度で 50 歳未満の方が 50 歳以上よりも有意($P < 0.05$)に高い値であった。

MINP を除く 4 種フタル酸モノエステルについて、その尿中濃度からフタル酸エステル類の推定一日摂取量算出した。

最も高い値(中央値)を示したのは DEHP の $5.69 \mu\text{g/kg/day}$ で、範囲は $1.71 \sim 51.5 \mu\text{g/kg/day}$ であった。次いで DBP が $1.5 \mu\text{g/kg/day}$ (中央値)、範囲 $0.69 \sim 9.41 \mu\text{g/kg/day}$ であった。DEP と BBzP は DEHP、DBP と比べて低く、それぞれ 0.29 、 $0.27 \mu\text{g/kg/day}$ (中央値)であった。

これらの値を各機関が示している耐容 1 日摂取量(TDI)を比べた場合、中央値では 1/17400 ~ 1/6.5 と低かった。しかし、DEHP の最大値($51.5 \mu\text{g/kg/day}$)で EU が示した TDI ($37 \mu\text{g/kg/day}$)を超えていた。また、DEHP の推定 1 日摂取量につ

いて、既報の値と比べた場合、特に大きな差は認められなかった。

2.2 東海患者

東海患者2人より採取した尿中のフタル酸モノエステル類濃度を測定した。その結果、両者からMBP及びMEPが検出された(検出濃度:MBP 13.2~14.0 ng/mL、MEP 4.29~97.4 ng/mL)。また、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. 揮発性有機化合物

東海患者38人より採取した血清中の3種の揮発性有機化合物濃度を測定した。その結果、2-エチル-1-ヘキサノールがすべての検体から検出され、中央値は42ng/mL、検出濃度範囲は10~182ng/mLであった。検出濃度レベルは、過去に調査を行ったシックハウス症候群患者の結果(n=4、<1 ng/mL)と比べて高く、医療行為由来の可能性も考えられた。

2-エチル-1-ヘキサノールは18%の人から検出され、検出濃度範囲は<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-ヘキサノールが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、中央値は3.4 ng/mL、濃度範囲は0.9~53.0 ng/mLであった。既報の研究結果では、シックハウス症候群患者が1.0 ng/mL(中央値、n=18)、愛知職員が4.1ng/mL(中央値、n=27)で、本調査を含めいずれも数 ng/mL レベルであった。一方、米国の一般市民の血中濃度は0.33 ng/mL(中央値、n=1000)で、本調査結果の約1/10と低く、その使用実態の違いを反映している可能性が示唆された。

6. 周産期試料に関して特に脂性試料を対象とした分析

サンプルの提供者の平均年齢は31.9才であった。各サンプルについて、前述の方法で各物質の濃度を測定し、それぞれ0.5ng/mlをカットオフ値とした。水性試料については、BAは母体血で86例中1例(1.2%)、尿中で16例中1例(6.3%)、DEHPは母体血で79例中4例(5.1%)、臍帯血で46例中1例(2.1%)、またNPは母体血で78例中6例(7.7%)、臍帯血で48例中4例(8.3%)、尿で16例中12例(75%)の検出率であった。最も高頻度に検出されたのは、尿中のNP(75%)であった。DEHPが母体血、および臍帯血で最も高値を示した。さらに脂性試料については胎脂に100%高濃度で検出されていた。しかし臍帯での濃度は1/1000以下であった。胎脂と臍帯に相関は認められなかった。

各物質とも母乳からの検出はなかった。また水性試料の中で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。またDEHPは血液中で

は比較的高濃度で検出されているが、尿中からの検出はなく、BAやNPとは異なり、モノ体の測定も必要であることが示唆される。また今回検出された血液・尿の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。一方、脂性試料においては胎脂で高濃度に検出されたが、同一個体(母児)の水性検体においてはまったく検出されおらず、生体防御のための排泄機構の一部として機能している可能性が示唆された。このためDEHPについては今後、脂肪組織など他の検体における濃度についても検討の必要があると思われる。

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 各サンプル中の重金属検出量

アルミニウム、ヒ素、鉛はほぼ全てのサンプルから検出された。また、カドミウムは母体血で7例中5例、母体尿で7例中4例、臍帯血で7例中6例から検出され、母乳、臍帯、胎盤からは全例から検出された。

1.2 母親年齢-重金属蓄積量の相関性

今回用いたサンプルの提供者の年齢は28歳から41歳までで、平均年齢は34歳であった。臍帯血中の鉛の測定値と母親年齢の間に、やや相関性が見られた($r=0.63$)。他の元素の測定値では高い相関性は見られなかった。

1.3 母子間の相関性

測定値の母子間での相関性は、物質の胎盤通過能や胎児期における重金属暴露を評価する上で重要となる。ヒ素、鉛は母体血-臍帯血の測定値に相関性が見られた(ヒ素: $r=0.83$ 、鉛: $r=0.94$)。

1.4 母体血と尿、母乳間の相関性

母体由来の試料として血液、尿、母乳を測定に用いた。各元素の体外への排泄経路を推定するため母体血-尿および母体血-母乳間の相関性を調べた。母体血-母乳間の相関性は母乳を通した小児への重金属暴露を評価する上で特に重要となる母体血-尿間ではヒ素で中程度($r=0.5$)、また鉛で高い相関性が見られた($r=0.9$)。

また、母体血-母乳ではヒ素($r=0.51$)、鉛($r=0.69$)で中程度の相関性が見られた。

1.5 胎児由来組織間の相関性

臍帯、胎盤組織は分娩後医療廃棄物として廃棄されるため入手が臍帯血に比べて容易であることから、重金属の周産期暴露量をモニターする良い試料となりうる可能性がある。そこで胎児由来の試料として臍帯血、臍帯、胎盤を測定に使い、臍帯血-臍帯および胎盤組織の相関性を検討した。臍帯血-胎盤においてヒ素、鉛で低い相関性が見られた(ヒ素: $r=0.43$ 、鉛: $r=0.54$)が、その他の元素では臍帯血-胎盤、臍帯間に相関性は見られなかった。

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

重金属の胎児期暴露が中枢神経系発生に与える影響を *in vitro* で評価するための培養系を確立するため、「ニューロスフェア法」と呼ばれる神経幹細胞培養を用いて重金属暴露の影響を検討した。

2.1 重金属暴露が神経幹細胞の増殖に与える影響

胎児脳由来の神経幹細胞は bFGF, EGF の二つの成長因子存在下で、未分化状態を保ったまま分裂増殖し、ニューロスフェアと呼ばれる細胞塊を形成する。このニューロスフェア培地に 50, 100, 200ppb のヒ素、カドミウム、鉛の混合液を添加して培養をおこない、1 週間後に形成されたニューロスフェアの直径を計測した。100ppb でニューロスフェアの直径が有意に減少し ($p < 0.0001$)、200ppb ではニューロスフェア形成が完全に阻害された。このことから重金属暴露によって、発生段階の中枢神経系で最も早期に出現し成熟ニューロンやグリアの元となる神経幹細胞の増殖が阻害される可能性が示唆された。

2.2 重金属暴露が神経幹細胞の増殖に与える影響

続いて、重金属を添加した状態で形成されたニューロスフェアを分化誘導培地中で成熟させることによって、神経系の分化に対する重金属の影響を検討した。分化誘導後、ニューロスフェア由来の神経幹細胞は、浮遊状態から培養皿に接着した状態となり神経突起を伸長させる像が認められた。しかしながら重金属を添加した際、細胞は培養皿に接着するものの突起伸長など成熟したニューロンやグリアの像は認められなかった。免疫染色により、ニューロンやアストロサイトの分化マーカーを検出したところ、重金属を添加していない場合には分化マーカーに陽性を示す細胞が出現してきたものの、重金属存在下では分化マーカーの発現が認められなかった。このことから、発生段階での一過性の重金属暴露によっても神経幹細胞からニューロン、グリアへの成熟が阻害されることが示唆された。

2.3 重金属暴露による薬物代謝酵素の発現解析

ダイオキシンやたばこの煙に含まれるタールによって、いろいろな細胞種で各種薬物代謝酵素の発現が上昇することが知られている。重金属存在下で培養した神経幹細胞において、このような薬物代謝酵素の発現の上昇が見られるかを検討するため、RT-PCR 法によって薬物代謝酵素のひとつである CYP1a1 の発現を観察した。重金属非存在下では CYP1a1 の発現はほとんど認められなかったが、50, 100ppb の重金属存在下で発現の上昇が認められた。このことからニューロスフェア法は、中枢神経系における重金属の発生毒性評価法として有用であることが示唆された。

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

Neo 耐性をもつクローンのうち、ES 細胞で恒常的に EGFP を発現し、分化を誘導すると発現しなくなるものを選択した結果、1 クローンの Oct4-GFP ES 細胞の樹立に成功した。

2. DsRed-TS 細胞の樹立

G418 存在下で形成された TS 細胞コロニーを個別にピックアップし、G418 を添加したまま継代維持した結果、安定的形質転換株 (DsRed-TS) を 1 つ得ることができた。ゲノム PCR により、導入したプラスミドが持つ Ds-Red タンパク質コード領域とその上流の CMV プロモーター配列もゲノム DNA に組み込まれていることが確認されたが、Ds-Red の発現は一様ではなく、Ds-Red の蛍光を有する細胞の割合は 1% に満たなかった。TSA 処理後、DsRed-TS における Ds-Red の発現は促進され、ほぼ全ての細胞が DsRed の蛍光を発していた。

3. 新たな DNA メチル化プロファイル解析法の開発

細胞の DNA メチル化状態を解析する新たな手法として Restriction tag-mediated amplification (REAM) 法を開発した。REAM 法ではメチル化感受性制限酵素で切断された末端を持つ断片が優先的に増幅される。増幅した断片を、12, 800 遺伝子の転写開始点から上流 1 kb を高密度にタイリングした DNA マイクロアレイとハイブリダイズさせ、これらの遺伝子のメチル化状況を測定することが可能となった。データ解析の結果、非常に再現性の高いデータが得られていることが確認出来た。また、Oct4, Stella などの上流から得られた結果は、すでに他の方法で明らかとなっているメチル化状況の結果や発現の状況に合うものであった。

4. Oct4 遺伝子は、発現のない分化誘導後の ES 細胞や体細胞において、上流転写調節領域の DNA メチル化によりその発現が抑制されている。本年度得られた Oct4-GFP ES 細胞をある種の化合物で処理した際に、未分化条件下で GFP の蛍光を低下させるものがあれば、その化合物にはゲノム DNA のメチル化を誘導する作用があることが期待される。逆に、分化誘導後の Oct4-GFP ES 細胞株を用いれば、ゲノム DNA の低メチル化を誘導する作用を持つ化合物をスクリーニングすることが可能になる。一方、DsRed-TS における Ds-Red の発現が TSA により誘導されたことは、DsRed-TS 細胞株においては Ds-Red の発現がヒストン脱アセチル化により抑制されていることを示唆する。従って、この細胞株を用いれば、ヒストンアセチル化に影響を及ぼす化合物のスクリーニングが可能となる。

これまで我々は、Restriction Landmark Genomic Scanning 法 (RLGS) によりメチル化感受性制限酵素である NotI の認識部位のメチル化状態を解析してきた。CpG アイランドを持たない遺

伝子である Oct4 や CpG が極端に少ない Ins2 でもその発現は DNA のメチル化に依存することを明らかにしてきたが、このような CpG が少ない領域は NotI 認識配列が含まれることはまれであり、NotI を指標とした解析からは漏れてしまう。今回開発した REAM 法を 4 塩基長の認識配列を持つメチル化感受性制限酵素を用いて行うことにより、DNA メチル化解析の解像度を大幅に向上し、従来の解析では対象となっていなかったゲノム領域の DNA メチル化も検出可能となった。

E. 結論

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. 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、クロルピリホスでは 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) を指標成分とした。

2. 尿及び血清中の 3-PBA、TCP の前処理法として、Oasis HLB を用いた固相抽出法を構築した。本法による添加回収率は 2ng/mL 添加でいずれも 80% 以上であった。本法を用いて母体血、母体尿、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 LOD (0.1ng/mL) 以下であった。一方、グルクロン酸抱合体は約半数の健康成人尿から 0.2-0.5ng/mL レベルで検出された。

3. 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 dithio-phosphate:DMDTP, Diethyl dithiophosphate:DEDTP) の LC/MS/MS を用いた高感度分析法を構築した (LOD 2~5ng/mL)。本法を用いて健康成人尿 11 検体中の有機リン系農薬暴露量を測定した結果、いずれも操作ブランクレベル以下であった。

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

本研究では次の 2 つの課題について研究を行った。まず、ヒト母乳中 PFCs の高感度分析法を構築した。測定機器に高感度・選択性を有する LC/MS/MS を用い、前処理として固相抽出法を用いて試料の精製・濃縮を行った。また、本分析法を母乳試料 (n=10) へと応用した結果、すべての検体から PFOS が検出され、血液中の PFCs 分析法と比較しても極めて高感度な分析を行うことができた。

また、喫煙に起因するニコチンの暴露評価を目的として、ヒト血清中ニコチンおよびコチニンを

測定対象とした HILIC/MS 分析法を検討した。その結果、検出下限値 (S/N = 3) は、ニコチンで 0.2 ng/mL またコチニンで 0.1 ng/mL となり、平均回収率はニコチン、コチニン共に 90% 以上と高感度かつ高精度な分析法を構築した。本法をヒト妊婦母体血清および臍帯血清に適用したところ、2002 年に採取された検体に比べ、2006 年に採取された検体ではコチニンの検出率が低かった。

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

トータルダイエット試料中の PBDEs 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-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、スウェーデンやスペイン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。これらの値は、米国環境保護庁が設定する PBDEs 原体の参照用量と比較して十分に小さく、摂取によるリスクは小さいと考えられた。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

1. 母体血清及び臍帯血清から MEP、MBP 及び MEHP を検出した。母体血清中の MEP、MBP 及び MEHP は、それぞれ、0.3, 13.9 及び 3.1 ng/mL (中央値、n = 12) であった。また、臍帯血清中の MEP、MBP 及び MEHP は、それぞれ、0.3, 12.7 及び 2.2 ng/mL (中央値、n = 12) であった。従って、母体血清及び臍帯血清から検出されるフタル酸モノエステル類の種類に差はなく、その濃度は、母体及び胎児間で同程度であると考えられる。

2. 母乳から同様に MEP、MBP 及び MEHP を検出した。母乳中の MEP、MBP 及び MEHP は、それぞれ、0.5, 26.0 及び 27.9 ng/mL (中央値、n = 11) であった。

3. 胎脂中から DEHP (3,570-92,100 ng/g, n = 5) を検出した。MEHP は、10 ng/g 未満であった。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 2.6-5.4 ng/mL であった。よって、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)

1. 愛知職員 36 人の血清と尿、及び東海患者 38 人の血清中の重金属類 (血清 20 元素、尿 21 元素) の濃度は、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。東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者で、子宮内膜症患者 19 人とそれ以外の 19 人の血清中重金属類濃度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. 愛知職員 36 人全員の尿から MBP と MEP が検出されたが、MINP はほとんど検出されなかった (検出率は 6%)。MBzP 及び MEHP の検出率はそれぞれ 75%、56%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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (中央値) であった。東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者 2 人の尿から MBP 及び MEP が、1 人の尿から MBzP がそれぞれ検出され、それ以外の 2 物質は検出されなかった。
3. 東海患者 38 人全員の血清から 2-エチル-1-ヘキサノールが検出され、2-エチル-1-ヘキサノールの検出率は 21%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-ヘキサノールも同時に検出される傾向が認められた。1,4-ジクロロベンゼンも全員から検出された。

6. 周産期試料に関して特に脂性試料を対象とした分析

各物質とも母乳からの検出はなかった。また水性試料の中で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。また DEHP は血液中では比較的高濃度で検出されているが、尿中からの検出はなく、BA や NP とは異なり、モノ体の測定も必要であることが示唆される。また今回検出された血液・尿の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。一方、脂性試料においては胎脂で高濃度に検出されたが、同一個体 (母児) の水性検体においてはまったく検出されておらず、生体防御のための排泄機構の一部として機能している可能性が示唆された。このため DEHP については今後、脂肪組織など他の検体における濃度についても検討の必要があると思われる。

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. ICP-MS による重金属測定法の確立

母体由来サンプルとして、血液・尿・母乳を、また新生児由来サンプルとして臍帯血・臍帯組

織・胎盤を用い、サンプル中に含まれるアルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛を ICP-MS によって測定した。カドミウム以外の物質は全てのサンプルから検出された。母体から胎児への移行の可能性を検討するため、母体血と臍帯血間の相関性を調べたところ、鉛で相関性が見られた ($r=0.94$)。他の物質では相関性は見られなかった。また、母体由来のそれぞれのサンプルに関して相関性を調べたところ、母体血-尿間の鉛で相関性が見られた ($r=0.90$)。また、医療廃棄物として廃棄される臍帯、胎盤組織が重金属の周産期暴露量をモニターするための試料となりうるかを検討するため臍帯血との相関性を調べたところ、臍帯血-胎盤においてヒ素、鉛で低い相関性が見られた (ヒ素: $r=0.43$, 鉛: $r=0.54$) が、その他の元素では臍帯血-胎盤、臍帯間に相関性は見られなかった。今後、測定結果の精度に関する検討を行い、さらに例数を追加していく予定である。

2. 重金属が中枢神経系初期形成に及ぼす毒性評価 (*in vitro* assay)

重金属の中枢神経系初期形成期に及ぼす直接的な影響はあまり知られていないため、中枢神経系の発生段階で最も早期に出現する「神経幹細胞」を用いて、培養系での毒性評価を行った。胎齢 14 日目のマウス (C57BL6) の大脳基底核原器より細胞を分離し、「ニューロスフェア法」と呼ばれる神経幹細胞選択的培養法をおこなった。この培養系にヒ素、カドミウム、鉛の混合溶液を添加し、増殖や分化に与える影響を評価した。200ppb の添加で神経幹細胞の増殖は全く見られず、100ppb でも増殖が有意に抑制された。また 100ppb の重金属に一旦暴露された神経幹細胞はニューロン、アストロサイトといった細胞への成熟が阻害された。また薬物代謝酵素のひとつである CYP1a1 の発現が RT-PCR によって確認された。今後は、各元素単独の毒性評価を行うことに加えて、神経幹細胞の増殖および成熟阻害作用メカニズムを解明していく予定である。

8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

Oct4-GFP ES 細胞、および、DsRed-TS 細胞により、エピジェネティック制御の二つの主要な分子機構である DNA メチル化とヒストンアセチル化に影響を与える化合物の効率的なスクリーニングが可能となった。さらに、高解像度な DNA メチル化解析法を確立することで、化合物の影響を、ゲノムワイドに詳細かつ迅速に解析することが可能となった。これらを利用することで、他研究グループが分析の対象としてきた化合物の、細胞への影響を検討することが今後の課題である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 堀江正一, 竹上晴美, 石井里枝, 中澤裕之, 牧野恒久「LC/MS/MSによるヒト尿中のピレスロイド系殺虫剤の分析」, 第9回環境ホルモロン学会(2006)東京
- 2) 堀江正一, 竹上晴美, 中澤裕之, 牧野恒久「LC/MS/MSによるヒト尿及び血清中のピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬クロルピリホスの分析」, 第68回分析化学討論会(2007)宇都宮
- 3) 中田彩子, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 岸 玲子, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之「LC/MS/MSを用いたヒト母乳中有機フッ素系化合物の高感度分析法の構築」第50回日本薬学会関東支部大会(2006)新潟.
- 4) 中田彩子, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 岸 玲子, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之「母乳栄養によるパーフルオロ化合物の乳幼児への暴露」第127年会 日本薬学会(2007)富山.
- 5) 岡野圭太, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之「親水性相互作用クロマトグラフィー質量分析法によるヒト生体試料中ニコチンおよびコチニンの同時分析法」第50回日本薬学会関東支部大会(2006)新潟.
- 6) 岡野圭太, 日の原聖仁志, 岩崎雄介, 伊東里恵, 斉藤貢一, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之「タバコ煙暴露評価のための母体血中ニコチンおよびコチニンの分析」第127年会 日本薬学会(2007)富山.
- 7) 高取聡, 阿久津和彦, 近藤文雄, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之, 吉池美紀, 野澤資重利, 岩本晃明, 「日本人男性の血清中のフタル酸モノエステル類の分析」第9回環境ホルモロン学会研究発表会(2006)東京.
- 8) 近藤文雄, 猪飼誉友, 林留美子, 木村隆, 高取聡, 中澤裕之, 和泉俊一郎, 牧野恒久; GC/MS法を用いたヒト尿中フタル酸エステル代謝物の測定; 環境ホルモロン学会第9回研究発表会(2006)
- 9) 林留美子, 近藤文雄, 木村隆, 宮崎豊, 中澤裕之, 和泉俊一郎, 牧野恒久; 成人における血清及び尿中の多元素濃度バランス; 台77回 日本衛生学会(2007)

2. 論文発表

- 1) Kondo F., Ikai Y., Goto T., Ito Y., Oka H., Nakazawa H., Odajima Y., Kamijima M., Shibata E., Torii S., Miyazaki Y. Serum levels of volatile organic compounds in patients with sick building syndrome. *Bull Environ Contam Toxicol* 2006; 77: 331-337.
- 2) Kondo F., Ikai Y., Goto T., Ito Y., Oka H., Nakazawa H., Odajima Y., Kamijima M.,

Shibata E., Torii S., Miyazaki Y. Two sensitive sick-building syndrome patients possibly responding to p-dichlorobenzene and 2-ethyl-1-hexanol: case report. *J Health Sci* 2007; 53: 119-123.

- 3) 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-高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計を用いるヒト血しょう中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発; *BUNSEKI KAGAKU*. 2005; 54 (9): 877-884.
- 4) 勝又常信, 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之; 超臨海流体抽出-高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の定量; *BUNSEKI KAGAKU*. 2006; 55 (12): 955-961.
- 5) Misa Iwatani, Kohta Ikegami, Yuliya Kremenska, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro Yagi and Kunio Shiota. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* 24: 2549-2556 (2006)

H. 知的所有権の取得状況

該当なし

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

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及び代表的な有機リン系農薬クロルピリホスの曝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曝露マーカーには、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。本法を用いて母体血、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: DMDTP, Diethyl dithiophosphate: DEDTP)のLC/MS/MSを用いた高感度分析法を構築した。本法を用いて健康成人尿11検体を測定した結果、尿中のジアルキルリン酸、ジアルキルチオリン酸及びジアルキルジチオリン酸濃度は、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曝露量は、一般的に極微量であることが示唆された。

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。しかしながら、日常的に曝露されながらも曝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曝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曝露状況を把握し、これらの化学物質曝露による胎児、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。

B. 研究方法

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。

β -グルクロニダーゼ：シグマ社製(β -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1のとおりとした。

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。

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 μ 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100 ng/mLとなる混合標準溶液を調製し、その10 μ 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2 mL, 血清1 mL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(200 mg)に負荷した。水(5 mL x 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1 mL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2 mL, 血清1 mLを採り、内部標準物質である2-PBAを20 ng加えた後、0.2 M

酢酸緩衝液 (pH 5) 2mL, β -グルクロニダーゼ 6,500 units/mL (試薬 β -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 μ 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 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 (図 1).

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 (図 2).

C. 結果及び考察

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曝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 (表 3, 図 3).

一方, 有機リン系農薬は, 世界でも多く使用され, 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曝露評価法も検討した. 曝露マーカーとして, 主たる代謝物である 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) を指標成分とした (図 4). 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, 表 1 に示す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量であるが, 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, β -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, β -グルクロニダーゼの量は (β -グルクロニダーゼ 6,500 units/mL, スルファターゼ 160 units/mL) 50 μ 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

本法により, 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に勤務する職員, 12 名 (男女各 6) の尿を分析した. 表 4 に示すとおり, 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, β -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.

本法により得られた尿抽出液 (3-PBA : 0.5 ng/mL 検出) の代表的な MRM クロマ

トグラムを図5に示す。

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曝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、これらの曝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(図6, 表5)。そこで、曝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, 表2に示す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ル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

本法により、埼玉県衛生研究所に勤務する職員、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(2~5ng/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曝露レベルは極めて微量であることが示唆された。本法によって得られた代表的な尿試料(DMTP: 5ng/mL検出)のMRMクロマトグラムを図7に示す。

D 結論

1. 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曝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曝露マーカーには、主代謝物3-Phenoxybenzoic acid(3-PBA)を、クロルピリホスでは3,5,6-Trichloro-2-pyridinol(TCP)を指標成分とした。

2. 尿及び血清中の3-PBA, TCPの前処理法として、Oasis HLBを用いた固相抽出法を構築した。本法による添加回収率は2ng/mL添加でいずれも80%以上であった。本法を用いて母体血, 母体尿, 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LOD(0.1ng/mL)以下であった。一方、グルクロン酸抱合体は約半数の健康成人尿から0.2-0.5ng/mLレベルで検出された。

3. 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 dithio- phosphate:DMDTP , Diethyl dithiophosphate :DEDTP) の LC/MS/MS を用いた高感度分析法を構築した (LOD 2~5ng/mL) . 本法を用いて健康成人尿 11 検体中の有機リン系農薬曝露量を測定した結果, いずれも操作ブランクレベル以下であった.

E. 研究業績

学会発表

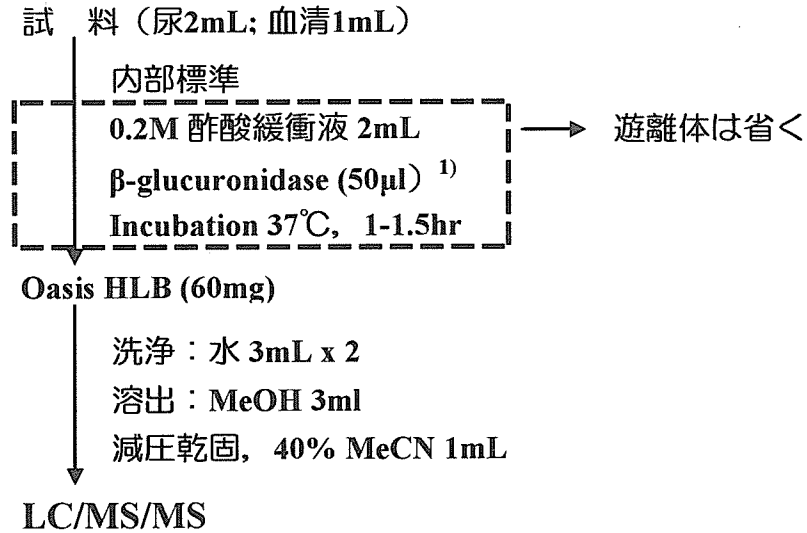
- 1) 堀江正一, 竹上晴美, 石井里枝, 中澤裕之, 牧野恒久「LC/MS/MS によるヒト尿中のピレスロイド系殺虫剤の分析」, 第9回環境ホルモン学会 (2006) 東京
- 2) 堀江正一, 竹上晴美, 中澤裕之, 牧野恒久「LC/MS/MS によるヒト尿及び血清中のピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬クロルピリホスの分析」, 第68回分析化学討論会 (2007) 宇都宮

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし.

G. 健康危険情報

該当なし.



注1) β -glucuronidase は130,000units/mlを0.2M酢酸緩衝液で10倍希釈し、その50 μ lを使用。

図1 尿、血清中の3-PBA及びTCPの分析法

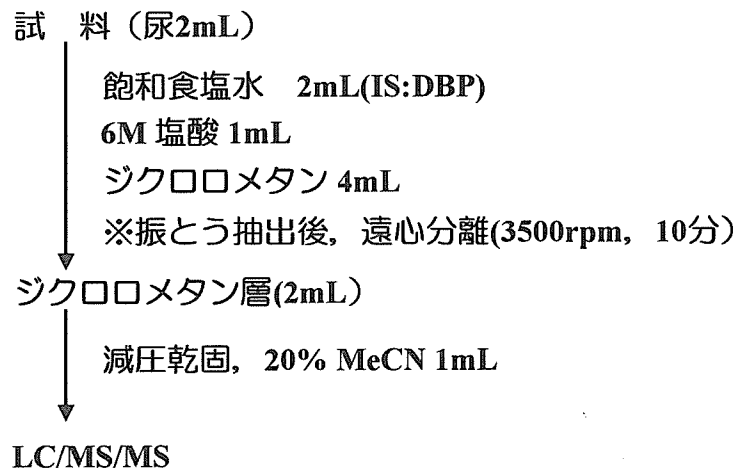


図2 尿中の有機リン系農薬代謝物の分析法

図3 ピレスロイド系農薬の主代謝物

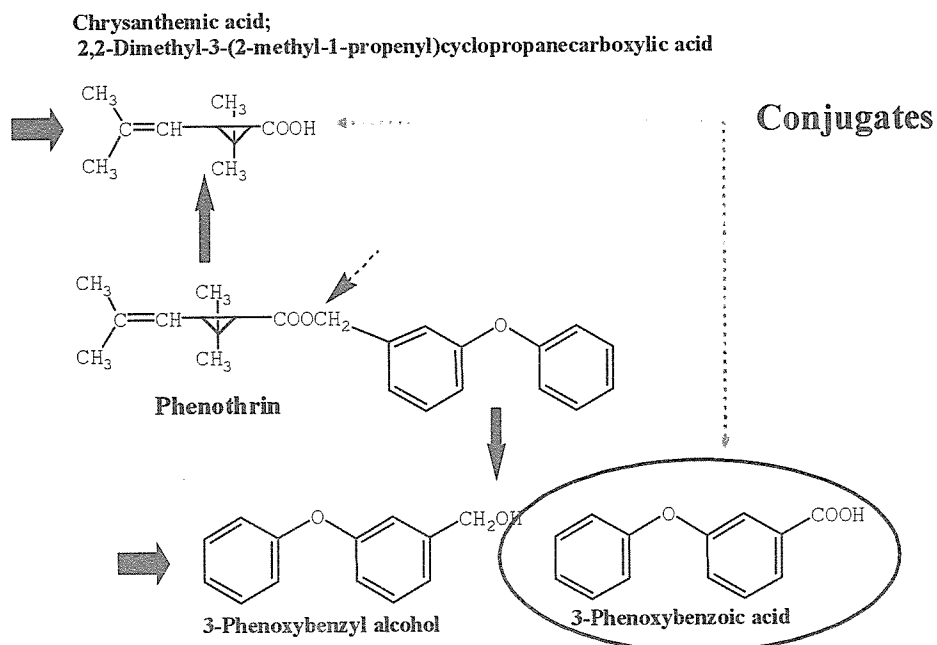


図4 クロルピリホスの主代謝物

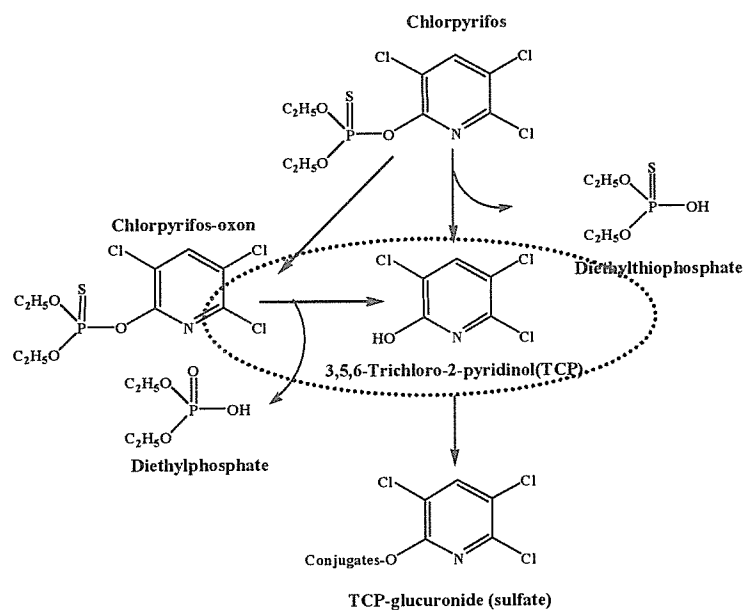


図5 代表的なLC/MS-MRMコマンドグラム

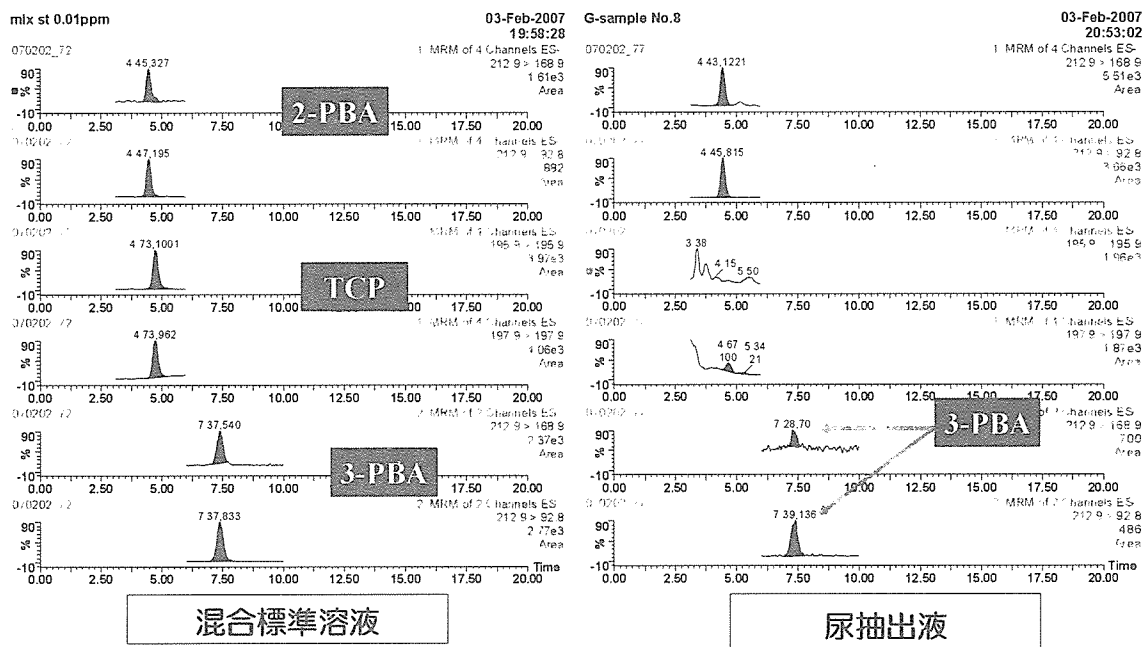


図6 有機リン系農薬分析対象代謝物

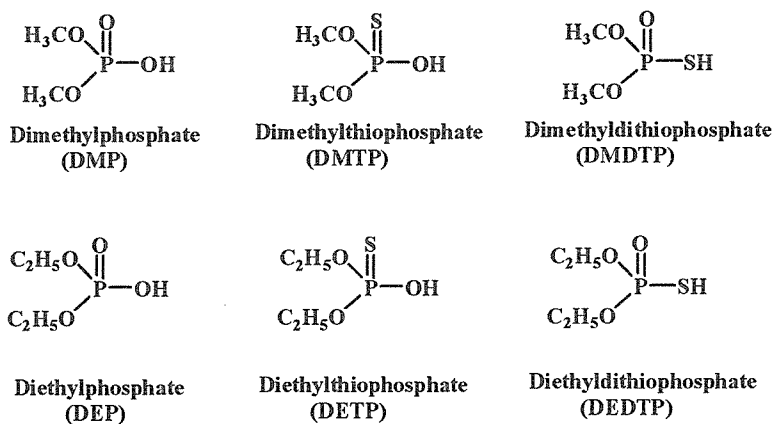


図7 尿中の有機リン系農薬代謝物の分析

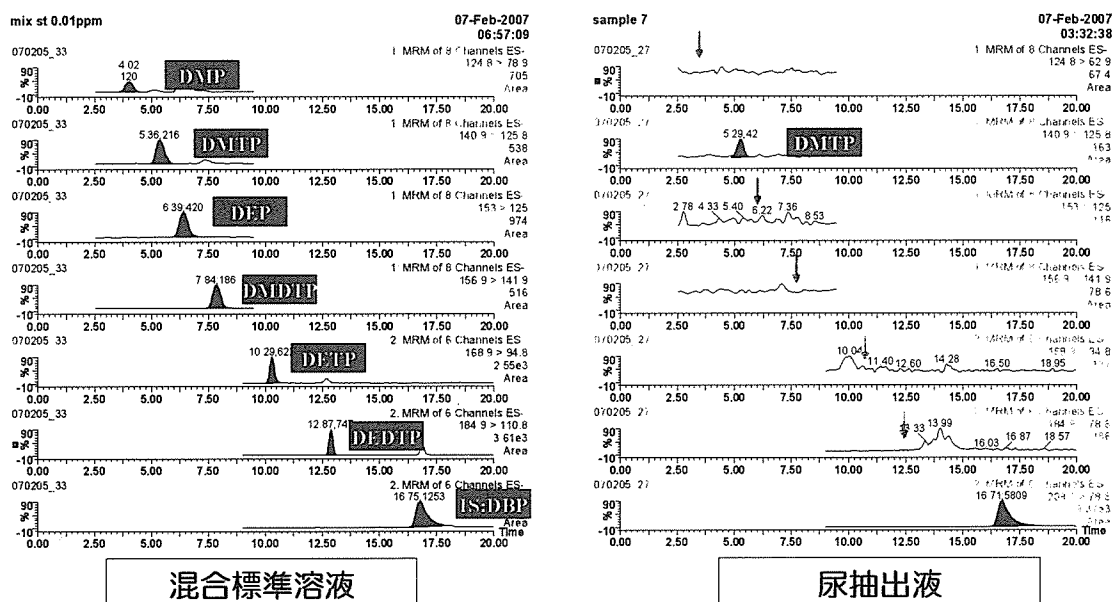


表 1. LC/MS/MS 測定条件 (3-PBA 及び TCP)

LC Conditions				
Column	Symmetry C18 (2.1mm x 5cm, 3µm)			
Eluent	0.1% AcOH-MeCN (65:35)			
Flow rate	0.2 mL/min			
MS/MS Conditions				
Ionization	ESI (Nega)		Cone(V)	Coll(eV)
Monitor ion	3-PBA	213>169	30	10
		213>93	30	20
Monitor ion	TCP	196>196	20	10
		198>198	20	10
Monitor ion	2-PBA(IS)	213>169	20	20
		213>93	20	25

表 2. LC/MS/MS 測定条件 (有機リン系農薬代謝物)

LC Conditions	
Column	Symmetry C18 (2.1mm x 10cm, 3 μ m)
Eluent	A=water, B=MeCN, C=0.1% Acetic acid
Flow rate	0.2 mL/min
MS/MS Conditions	
Ionization	ESI (Nega)
Monitor ion	下記のとおり

Time(min)	A%	B%	C%
0	85	10	5
2	85	10	5
20	5	90	5

No.	化合物	mol wt	ESI-		Cone	Collision
			定量	確認		
1	DMP	126.05	124.8>78.9	124.8>62.9	30	20
2	DMTP	142.10	140.9>125.8	140.9>95.8	30	20
3	DMDTP	158.16	156.9>141.9	156.9>111.7	30	20
4	DET	154.10	153.0>125.0	153.0>78.8	20	20
5	DETP	170.26	168.9>140.9	168.9>94.8	20	20
6	DEDTP	186.23	184.9>110.8	184.9>95.8	30	30
7	DBP (IS)	210.21	209.1>153.0	209.1>78.8	30	20

表 3 代謝物として 3-PBA を産生するピレスロイド系農薬

Pyrethroid pesticides	3-Phenoxybenzoic acid
acrinathrin	●
cycloprothrin	●
cyhalothrin	●
cypermethrin	●
cyphenothrin	●
deltamethrin	●
fenpirithrin	●
fenpropathrin	●
fenvalerate	●
flucythrinate	●
flualinate	●
permethrin	●
phenothrin	●
tralomethrin	●

(Pyrethroid ether pesticides)	
etofenprox	●
halfenprox	●

表 4 母体血，母体尿及び健康成人尿中の 3-PBA 及び TCP 濃度

3-PBA(ppb)		TCP(ppb)		3-PBA(ppb)		TCP(ppb)			
Sample No.	Free	Conjugates	Free	Conjugates	Sample No.	Free	Conjugates	Free	Conjugates
U-1	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	P-1(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-2(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-3	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	P-3(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-4	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	P-4(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-5	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-5(Tokai)	<0.1	0.1	<0.1	<0.1
U-6	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	P-6(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-7	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	P-7(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-8	<0.1	0.5	<0.1	<0.1	P-8(Tokai)	<0.1	0.2	<0.1	<0.1
U-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-9(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-10	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-10(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-11	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1					
U-12	<0.1	0.2	<0.1	1.0					
U-13(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1					
U-14(Tokai)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1					

U-13, 14 : 母体尿, P-1~P-10 : 母体血

表 5 有機リン系農薬の主な尿中代謝物

OP pesticides	DMP	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP
Azinphos-methyl	●	●	●			
Isazaphos-methyl	●	●				
Ethion				●	●	●
Oxydemetonmethyl	●	●				
Chloretoxyphos				●	●	
Chlorpyrifos				●	●	
Chlorpyrifos-methyl	●	●				
Dichlorvos(DDVP)	●					
Coumaphos				●	●	
Dicrotophos	●					
Disulfoton				●	●	●
Dimethoate	●		●			
Sulfotepp				●	●	
Terbufos				●	●	●
Diazinon				●	●	
Tetrachlorviphos	●					
Temephos	●	●				
Trichlorfon	●					
Naled	●					
Parathion				●	●	
Pirimiphos-methyl	●	●				
Fenitrothion	●	●				
Fenthion	●	●				
Phosmet	●	●	●			
Phorate				●	●	●
Malathion	●	●	●			
Methidathion	●	●	●			
Methyl-parathion	●	●				

DMP : Dimethylphosphate
 DMTP : Dimethylthiophosphate
 DMDTP : Dimethyldithiophosphate
 DEP : Diethylphosphate
 DETP : Diethylthiophosphate
 DEDTP : Diethyldithiophosphate

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
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

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 薬品分析化学教室
協力研究者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	岩崎 雄介	星薬科大学 薬品分析化学教室

研究要旨

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、撥水剤、消火剤、界面活性剤など、日常生活用品に汎用されている。そのため、生活環境中に汚染が広がっており、特にヒト血液中から高頻度に検出される。また、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、催奇形性などが報告されている。また、妊娠母体から胎児に移行するとの報告もあり、子どもに及ぼす影響が懸念されている。最近の研究においては、PFCsの母乳移行性についても危惧されていることから、乳幼児におけるPFCs暴露評価が重要である。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を用いたヒト母乳中PFCsの高感度分析法を構築し、暴露評価のための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。

A. 研究目的

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ン酸(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¹⁾。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²⁾。更に実験動物において、甲状腺ホルモンかく乱作用³⁾、催奇形性、パーオキシソーム増殖作用⁴⁾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⁵⁾、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⁶⁾、喫煙による人体への悪影響が明らかとなっている⁷⁾。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⁸⁾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⁹⁾。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¹⁰⁾。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。

B. 研究方法

検討課題(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

本研究では、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(Fig. 1)。内標準物質としては、PFOS、PFOAの安定同位体(¹³C)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。固相抽出条件とLC/MS/MS条件についてはそれぞれFig. 2、Table 1に示す。

検討課題(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 (Fig. 3)。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0.2 mL/minとした。分析カラムにはWaters社製Atlantis、HILICシリカ (2.1 mm × 150 mm, 3 μm)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 (Table 2)。

C. D. 研究結果および考察

検討課題(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

本分析法を用い、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: 0.1 ng/mL、PFNA: 0.008 ng/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 (Table 3)。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 (Table 4)。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 (Table 5)。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。

検討課題(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0.2 ng/mL、コチニンで0.1 ng/mLであった (Table 6)。また検量線を作成したところ、ニコチンでは1 ~ 250 ng/mL、コチニンでは0.4 ~ 250 ng/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 (Table 7)。

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33.3%) 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 (Fig. 4)。この結果は年々喫煙者が減少しているという統計結果 (11) 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。

E. 結論

本研究では、次の2つの課題について研究を行った。まず、ヒト母乳中PFCsの高感度分析法を構築した。測定機器に高感度・選択性を有するLC/MS/MSを用い、前処理として固相抽出法を用いて試料の精製・濃縮を行った。また、本分析法を母乳試料 ($n = 10$) へと応用した結果、すべての検体からPFOSが検出され、血液中のPFCs分析法と比較しても極めて高感度な分析を行うことができた。

また、喫煙に起因するニコチンの暴露評価を目的として、ヒト血清中ニコチンおよびコチニンを測定対象としたHILIC/MS分析法を検討した。その結果、検出下限値 ($S/N = 3$) は、ニコチンで0.2 ng/mLまたコチニンで0.1 ng/mLとなり、平均回収率はニコチン、コチニン共に90%以上と高感度かつ高精度な分析法を構築した。本法をヒト妊婦母体血清および臍帯血清に適用したところ、2002年に採取された検体に比べ、2006年に採取された検体ではコチニンの検出率が低かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 引用文献

- 1) J.P.Giesy, K. Kannan : *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1339-1342 (2001)
- 2) K.Kannan, S. Corsonlini, J.Falandysz, G. Oehme, S. Focardi, J. P. Giesty : *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 2556-2571 (2001)
- 3) J.R.Thibodeaux, R.G.Hanson, J.M.Rogers, B.E.Grey, B.D.Barbee, J.H.Richards, J.L. Butenhoff, L.A.Stevenson, C.Lau : *Toxicol.Sci.*, **74**, 369-381 (2003)
- 4) T.Ikeda, K.Aiba, K.Fukuda, M.tanaka : *J.Biochem.*, **98**, 285, 779-783 (1985)
- 5) K.Inoue, F.Okada, R.Ito, S.Kato, S.Sasaki, S.Nakajima, A.Uno, Y.Saijo, F.Sata, Y.Yoshimura, R.Kishi, H.Nakazawa : *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1204-1027 (2004)
- 6) Robert, D.L : *Recent Adv. Tobacco Sci.*, **14**, 49, (1988)
- 7) Rebagliato, M : *Am. J. Epidemiol.*, **142**, 525, (1995)
- 8) Karaconji IB : *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **56** (4), 363, Review, (2005)
- 9) Ananth CV, Platt RW : *BMC Pregnancy Childbirth.*, **4**(1), 22, (2004)
- 10) Thaqi A, Franke K, Merkel G, Wichmann HE, Heinrich J : *Indoor Air*, **15**(5), 302, (2005)
- 11) JT 「全国たばこ喫煙者率調査」
<http://www.jti.co.jp/News/05/NR20051018/20051>

H. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 中田彩子、勝又常信、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、岸 玲子、和泉俊一郎、牧野恒久、中澤裕之「LC/MS/MSを用いたヒト母乳中有機フッ素系化合物の高感度分析法の構築」第50回日本薬学会関東支部大会（2006）新潟.

2) 中田彩子、勝又常信、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、岸 玲子、和泉俊一郎、牧野恒久、中澤裕之「母乳栄養によるパーフルオロ化合物の乳幼児への暴露」第127年会 日本薬学会（2007）富山.

3) 岡野圭太、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、和泉俊一郎、牧野恒久、中澤裕之「親水性相互作用クロマトグラフィー質量分析法によるヒト生体試料中ニコチンおよびコチニンの同時分析法」第50回日本薬学会関東支部大会（2006）新潟.

4) 岡野圭太、日の原聖仁志、岩崎雄介、伊東里恵、斉藤貢一、和泉俊一郎、牧野恒久、中澤裕之「タバコ煙暴露評価のための母体血中ニコチンおよびコチニンの分析」第127年会 日本薬学会（2007）富山.