

Fig. 1 測定対象物質の構造式(PFCs)

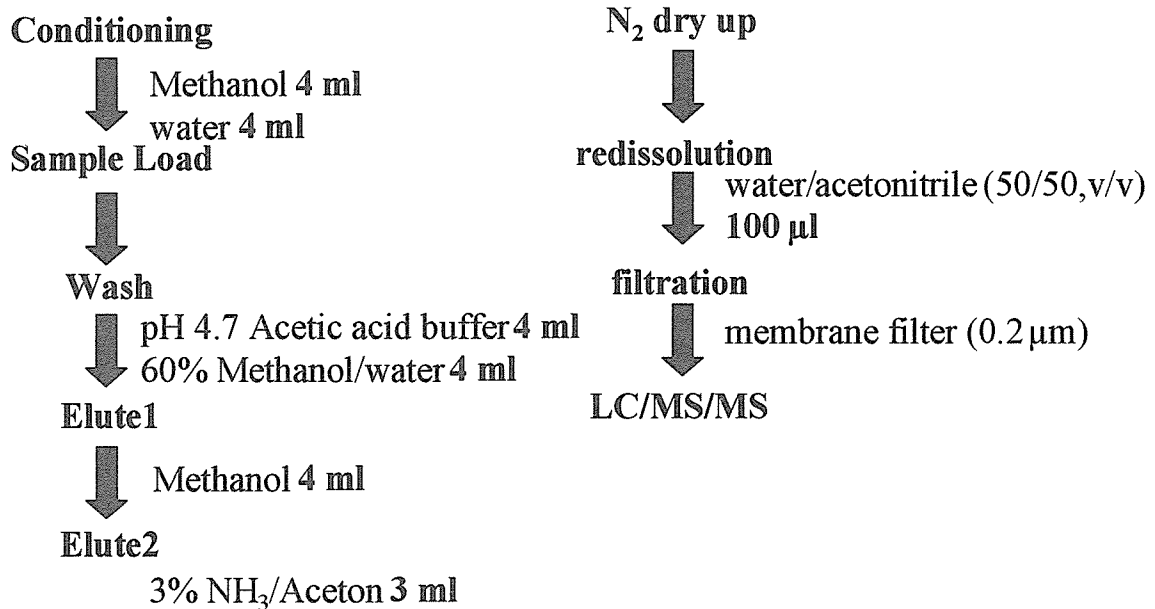


Fig. 2 PFCs における固相抽出条件

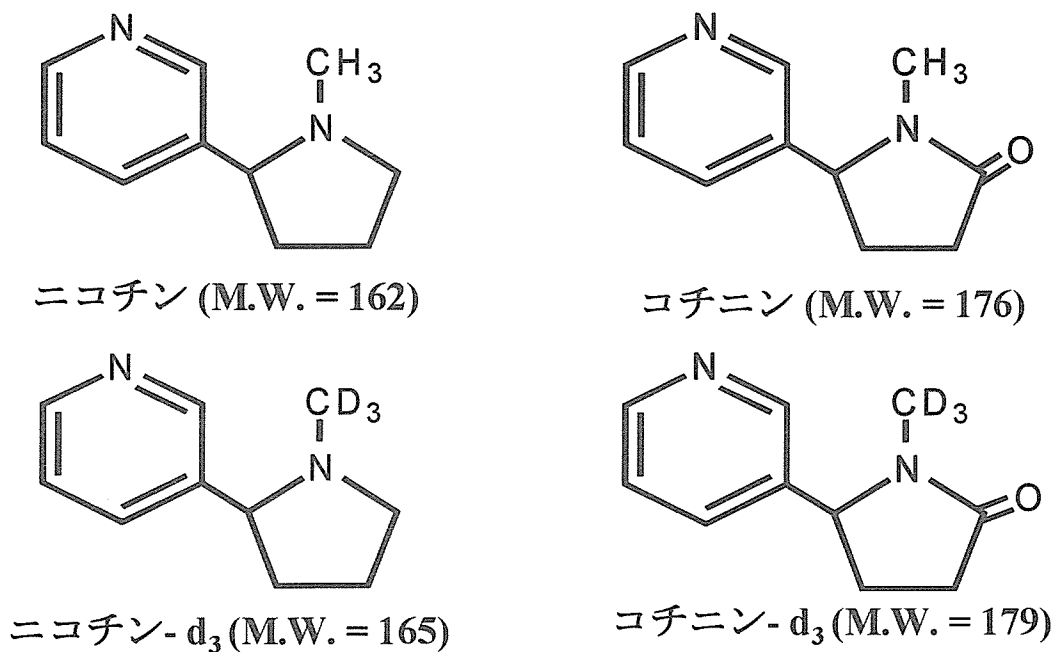
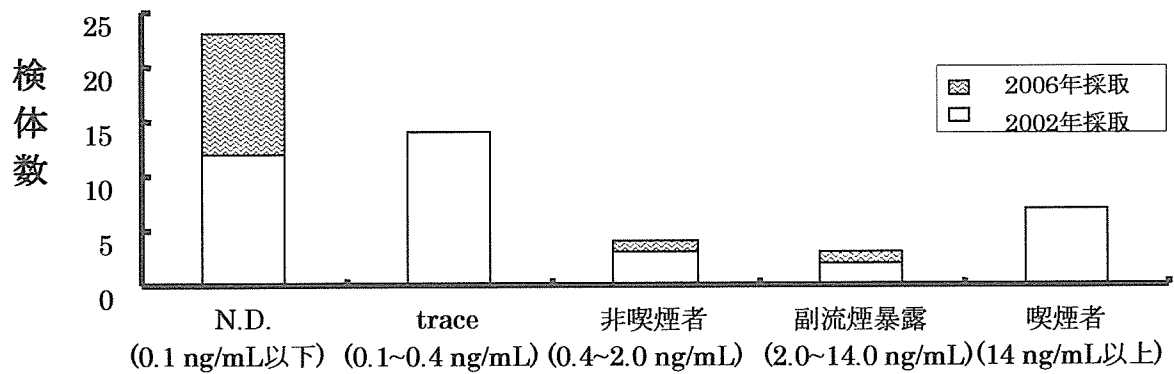


Fig. 3 ニコチン、コチニンおよび各内標準物質の構造式

母体血清 (N = 51)



臍帯血清 (N = 11)

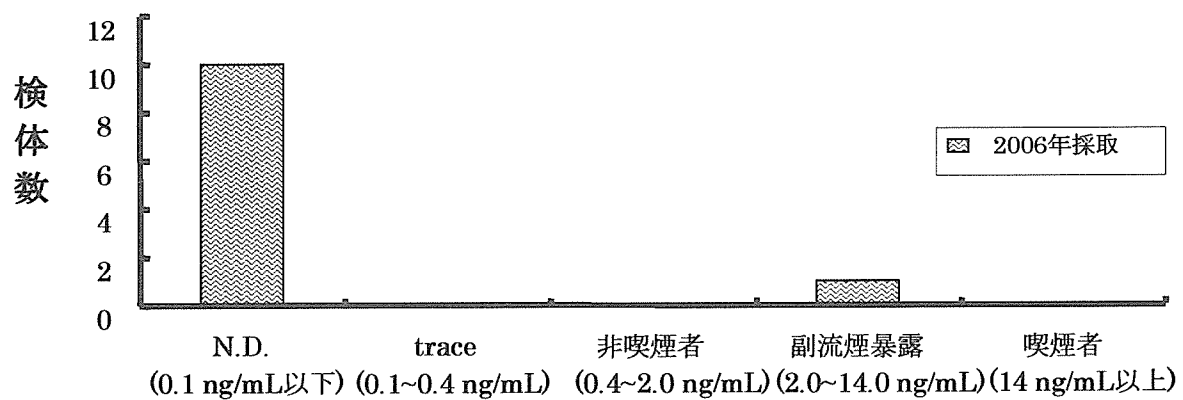


Fig. 4 コチニン濃度による分類

Kalinka * らはコチニン濃度および家庭環境の調査で下記のように区分している。

コチニン濃度： 喫煙者 (14 ng/mL 以上)，副流煙暴露群 (14 ~ 2 ng/mL)，非暴露群 (2 ng/mL 以下)

*Kalinka J, Hanke W, Sobala W. : Am J Perinatol. 22 (1), 41 ~ 47, (2005)

今回の測定結果を上記の文献値を参考に分類すると Fig. 4 となる。

Table 1 PFCs の分析における LC/MS/MS 条件

LC 条件

HPLC system	: Waters 2795
Column	: X Bridge (50 x 2.1 mm, 2.5 μ m)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Injection volume	: 20 μ L
Column temperature	: 40 $^{\circ}$ C
Mobile phase	: A H ₂ O B 20 mM CH ₃ COONH ₄ in H ₂ O C Acetonitrile

グラジエント条件

Time (min)	Mobile phase (%)		
	A	B	C
0.0	85	5	10
10	25	5	70
12	25	5	70
12.5	85	5	10

MS 条件

Mass Spectrometry	: Quattromicro
Capillary	: 0.6 kV
Extractor	: 4 V
Source temperature	: 100 $^{\circ}$ C
Desolvation temperature	: 350 $^{\circ}$ C
Gas flow	
Desolvation	: 350 L/hr
cone	: 50 L/hr

MRM モニタリングイオン

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)
PFHXS	399 [M-K] ⁻	80
PFOS	499 [M-K] ⁻	80
PFOA	413 [M-K] ⁻	369
PFNA	463 [M-K] ⁻	419
13C4-PFOS	503 [M-K] ⁻	80
13C2-PFOA	415 [M-K] ⁻	370

Table 2 ニコチンおよびコチニンの分析におけるHILIC/MSの測定条件

Instrument	
LC system	: Agilent 1100 series
MS detector	: Agilent 1100 series LC/MSD
Column	: Atlantis TM HILIC silica (150 x 2.1 mm, 3 μm)
LC condition	
Mobile phase A	: 0.01% Formic acid
Mobile phase B	: 0.01% Formic acid – Acetonitrile
Flow rate	: 0.2 mL/min
Time program	: 90% B (0 min) ~ 50% B (15 ~ 20 min) ~ 90% B (21 min)
Injection volume	: 20 μL
Column temperature	: 40 □
MS condition	
Ionization	: Electrospray
Mode	: SIM positive ion mode ニコチン (<i>m/z</i> 163), コチニン (<i>m/z</i> 163), ニコチン- <i>d</i> ₃ (<i>m/z</i> 163), コチニン- <i>d</i> ₃ (<i>m/z</i> 163)
Capillary voltage	: 3000 V
Drying gas flow	: N ₂ (12 L/min)
Drying gas temperature	: 350 □
Fragmentor voltage	: 110 V

Table 3 PFCsにおける分析法バリデーション

Compound	Linear range (ng/mL)	Correlation coefficient (r)	LOQ (ng/mL)
PFH _x S	0.2 ~ 20	0.999	0.004
PFOS	0.2 ~ 20	0.999	0.1
PFOA	0.2 ~ 20	0.999	0.004
PFNA	0.2 ~ 20	0.999	0.008

Table 4 ヒト母乳中PFCsにおける添加回収試験

Compound	Spiked Amount in Milk (ng/mL)	Average Recovery (%)	R.S.D. (%)
PFOS	0.2	94.3	4.8
	1	97.1	5.7
PFOA	0.2	104.8	10.0
	1	96.8	5.8
PFH _x S	0.2	113.8	8.8
	1	105.6	7.2
PFNA	0.2	104.8	10.3
	1	97.6	7.6

(n = 6)

Table 5 ヒト母乳中PFCsの測定結果

Compound	検出率(%)	最大値(ng/mL)	最小値(ng/mL)
PFOS	90	0.024	N.D.
PFOA	100	0.40	0.008
PFH _x S	60	0.22	N.D.
PFNA	90	0.15	N.D.

(n = 10)

Table 6 ニコチンおよびコチニンの分析法バリデーション

	MDL (S/N = 3 ng/mL)	MQL (S/N = 10 ng/mL)	Linear range (ng/mL)	Correlation coefficient (r)
ニコチン	0.2	1.0	1 ~ 250	0.999
コチニン	0.1	0.4	0.4 ~ 250	0.999

MDL: method detection limit MQL: method quantitation limit

Table 7 ヒト血清におけるニコチンおよびコチニンの回収率

	Spiked amount (ng/mL)	Average recovery (%)	R.S.D. (%)
ニコチン	100	90.3	3.9
	200	98.7	3.8
コチニン	100	95.1	5.2
	200	96.9	4.1

(n = 6)

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

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
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

研究要旨

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, 0.01 ng/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 46 ng/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 0.7-4.3 ng/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。

A. 研究目的

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¹⁻⁴⁾，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，トータルダイエツト試料および市販植物油の分析を行った。

B. 研究方法

B. 1. 試料

B. 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（表1）。

B. 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（表2）。

B. 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 PBDEs 36 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 PBDEs 8 異性体を測定対象とした。測定対象 PBDEs の構造式と対応する IUPAC ナンバーおよび略号を表3に示した。クリーンアップスパイク溶液には炭素安定同位体 (¹³C) で標識化された ¹³C₁₂-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 (1-20 ng/mL) を使用した。また，シリンジスパイクには ¹³C₁₂-PeBDE-126 (CIL 社製 E0-4930) のヘキサン溶液 (1 ng/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。

B. 3. 操作

B. 3. 1. トータルダイエツト試料の分析

試料 5 g (第 4 群は 1 g) を 100 mL 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 1 mol/L 水酸化カリウム/エタノール溶液 (10% 含水) 50 mL 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 50 mL およびヘキサン 50 mL 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 50 mL 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 5 mL に減圧濃縮した。この濃縮液を、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 程度まで濃縮後、濃縮試験管に移して ノナン 50 μ 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 μ 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 5 g に各化合物の混合標準溶液 (1-10 ng/mL) 0.5 mL を添加し、同様に抽出・精製操作を行った。

B. 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 μ 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 μ L に濃縮し、GC/MS 測定に供した。

B. 4. 装置 (GC/MS) 条件

装置 : JEOL JMS-GCmateII GC/MS system

注入口温度 : 250°C

注入法 : パルスドスプリットレス, 1 μ L

パルス圧 : 20 psi (0-1.6 min)

キャリアガス : ヘリウム (カラム流量 1 mL/min)

GC カラム 1 (トータルダイエツト試料の分析) : Agilent J&W DB-1MS (15 m \times 0.25 mm ID, 膜厚 0.25 μ m)

GC カラム 2 (植物油試料の分析) : Restek

Rtx-1ms (15 m \times 0.25 mm ID, 膜厚 0.1 μ m)

GC カラム昇温条件 : 100°C (2 min) - 10°C/min - 310°C (3 min)

トランスファーライン温度 : 310°C

イオン源温度 : 280°C

イオン化電流 : 300 μ A

イオン化エネルギー : 35 eV

加速電圧 : 2500 V

マルチプライヤー電圧 : 400 V

分解能 : 1000

イオン化モード : EI

検出法 : SIM

モニターイオン : 表 3 参照

C. 研究結果・考察

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。標準溶液および食品試料 (第 10 群, 第 4 群) のクロマトグラム例を図 1 に示した。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, 0.01 ng/g の濃度で検出された (表 4)。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 (図 2), 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 46 ng/人/日、ND = 1/2 LOD で計算した場合で 329 ng/人/日であり、欧州で報告されている食事由来の PBDEs 摂取量⁵⁻⁷⁾と同程度の値であった (表 5・表 6)。また、成人の体重を 50 kg として計算すると、上記の摂取量は 0.0009 μ g/kg/日、0.007 μ 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 μ g/kg/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 ND = 0 として計算した場合で 21 ng/人/日 (0.0004 μ g/kg/日)、ND = 1/2 LOD で計算した場合で 309 ng/人/日 (0.006 μ g/kg/日) であり、各々参照用量 (10 μ g/kg/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 ng/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 ng/g の PBDEs が検出された (表 7, 図 3)。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 ng/g, HpBDE: 0.02 ng/g, DeBDE: 0.1 ng/g)。PBDEs が

検出されたナタネ油 (No. 2) のクロマトグラム例を図 4 に示した。PBDEs が検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压榨され、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⁸⁾。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 (600 g 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、その解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 曝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。

D. 結論

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, 0.01 ng/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 46 ng/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 0.7-4.3 ng/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。

E. 参考文献

- 1) Meironyté D, Norén K, Bergman Å. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 58, 329-341, 1999.
- 2) Ikonou MG, Rayne S, Addison RF. Exponential increases of the brominated flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000. *Environmental Science & Technology*, 36, 1886-1892, 2002.
- 3) Akutsu K, Kitagawa M, Nakazawa H, Makino T, Iwazaki K, Oda H, Hori S. Time-trend (1973-2000) of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk. *Chemosphere*, 53, 645-654, 2003.
- 4) Sjödin A, Jones RS, Focant JF, Lapeza C, Wang RY, McGahee EE III, Zhang Y, Turner WE, Slazyk B, Needham LL, Patterson DG Jr. Retrospective time-trend study of polybrominated diphenyl ether and polybrominated and polychlorinated biphenyl levels in human serum from the United States. *Environmental Health Perspectives*, 112, 654-658, 2004.
- 5) Darnerud PO, Eriksen GS, Johannesson T, Larsen PB, Viluksela M. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 109, 49-68, 2001.
- 6) Wijesekera R, Halliwell C, Hunter S, Harrad S. A preliminary assessment of UK human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Organohalogen Compounds*, 55, 239-242, 2005.

7) Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J, Teixido A, Casas C. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3191-3195, 2003.

8) Mueller KE, Mueller-Spitz SR, Henry HF, Vonderheide AP, Soman RS, Kinkle BK, Shann JR. Fate of pentabrominated diphenyl ethers in soil: abiotic sorption, plant uptake, and the impact of interspecific plant interactions. *Environmental Science & Technology*, 40, 6662-6667, 2006.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 トータルダイエットスタディにおける各食品群の分類および近畿ブロックにおける各食品群の摂取量

群	分類	摂取量(g)
第1群	米、米加工品	334
第2群	穀類、種実類、芋類	179
第3群	砂糖類、菓子類	34
第4群	油脂類	11
第5群	豆類、豆加工品	54
第6群	果実類	123
第7群	緑黄色野菜	100
第8群	その他の野菜、きのこ類、海藻類	184
第9群	嗜好飲料	577
第10群	魚介類	89
第11群	肉類、卵類	124
第12群	乳、乳製品	157
第13群	調味料、その他の食品	91
第14群	飲料水	250

国民栄養調査結果表(近畿 I)に基づく値

表 2 植物油試料

試料番号	名称	原材料名	容器材質	JASマーク
1	食用なたね油	食用なたね油	PET	×
2	食用なたね油	食用なたね油	PET	○
3	食用なたね油	食用なたね油	PE、EVOH	○
4	食用菜種油	食用なたね油	PET	×
5	食用なたね油	国内産ナタネ(遺伝子組み換えではない)	ガラス	×
6	食用なたね油	食用なたね油(非遺伝子組み換え)	ガラス	×
7	食用調合油	食用なたね油、食用大豆油	PE、EVOH	○
8	食用調合油	食用大豆油、食用なたね油	PE、EVOH	○
9	食用とうもろこし油	食用とうもろこし油	PET	○
10	食用調理油	食用とうもろこし油、乳化剤(原材料の一部に大豆を含む)	PET	×
11	食用調理油	食用とうもろこし油、乳化剤、酸化防止剤(茶抽出物、ビタミンE)、(原材料の一部に大豆を含む)	PE、EVOH	×
12	食用サフラワー油	食用サフラワー油(ハイオレイック)	PET	○
13	有機食用サフラワー油	有機サフラワー油(ハイオレイック)	PET	○
14	食用胡麻油	胡麻(ごま)	ガラス	×
15	食用ごま油	食用ごま油	ガラス	○
16	食用調合油	食用えごま油(食用しそ科種子油)、食用ごま油、酸化防止剤(ビタミンE、茶抽出物、ビタミンC)	ガラス	×
17	食用オリーブ油	食用オリーブ油	ガラス	×
18	食用調理油	植物性加工油脂、グリセリンエステル、酸化防止剤(ビタミンE、ビタミンC)、(原材料の一部に大豆を含む)	PET	×

PET:ポリエチレンテレフタレート, PE:ポリエチレン, EVOH:エチレン・ビニルアルコール共重合体

表 3 測定対象物質およびモニターイオン

物質名	IUPAC No.	略号	定量イオン	参照イオン
2,4,6-三臭素化ジフェニルエーテル	30	TrBDE-30	405.80	407.80
2,4',6'-三臭素化ジフェニルエーテル	32	TrBDE-32	405.80	407.80
2,2',4'-三臭素化ジフェニルエーテル	17	TrBDE-17	405.80	407.80
2,3',4'-三臭素化ジフェニルエーテル	25	TrBDE-25	405.80	407.80
2,4,4'-三臭素化ジフェニルエーテル	28	TrBDE-28	405.80	407.80
2,3',4'-三臭素化ジフェニルエーテル	33	TrBDE-33	405.80	407.80
3,3',4'-三臭素化ジフェニルエーテル	35	TrBDE-35	405.80	407.80
3,4,4'-三臭素化ジフェニルエーテル	37	TrBDE-37	405.80	407.80
2,4,4',6'-四臭素化ジフェニルエーテル	75	TeBDE-75	485.71	483.71
2,2',4,5'-四臭素化ジフェニルエーテル	49	TeBDE-49	485.71	483.71
2,3',4',6'-四臭素化ジフェニルエーテル	71	TeBDE-71	485.71	483.71
2,2',4,4'-四臭素化ジフェニルエーテル	47	TeBDE-47	485.71	483.71
2,3',4,4'-四臭素化ジフェニルエーテル	66	TeBDE-66	485.71	483.71
3,3',4,4'-四臭素化ジフェニルエーテル	77	TeBDE-77	485.71	483.71
2,2',4,4',6'-五臭素化ジフェニルエーテル	100	PeBDE-100	563.62	565.62
2,3',4,4',6'-五臭素化ジフェニルエーテル	119	PeBDE-119	563.62	565.62
2,2',4,4',5'-五臭素化ジフェニルエーテル	99	PeBDE-99	563.62	565.62
2,3,4,5,6'-五臭素化ジフェニルエーテル	116	PeBDE-116	563.62	565.62
2,3',4,4',5'-五臭素化ジフェニルエーテル	118	PeBDE-118	563.62	565.62
2,2',3,4,4'-五臭素化ジフェニルエーテル	85	PeBDE-85	563.62	565.62
3,3',4,4',5'-五臭素化ジフェニルエーテル	126	PeBDE-126	563.62	565.62
2,2',4,4',6,6'-六臭素化ジフェニルエーテル	155	HxBDE-155	643.53	641.53
2,2',4,4',5,6'-六臭素化ジフェニルエーテル	154	HxBDE-154	643.53	641.53
2,2',4,4',5,5'-六臭素化ジフェニルエーテル	153	HxBDE-153	643.53	641.53
2,2',3,4,4',5'-六臭素化ジフェニルエーテル	138	HxBDE-138	643.53	641.53
2,3,4,4',5,6'-六臭素化ジフェニルエーテル	166	HxBDE-166	643.53	641.53
2,2',3,4,4',5,6'-七臭素化ジフェニルエーテル	183	HpBDE-183	721.44	723.44
2,2',3,4,4',5,6'-七臭素化ジフェニルエーテル	181	HpBDE-181	721.44	723.44
2,3,3',4,4',5,6'-七臭素化ジフェニルエーテル	190	HpBDE-190	721.44	723.44
2,2',3,3',4,4',6,6'-八臭素化ジフェニルエーテル	197	OcBDE-197	641.51	639.52
2,2',3,4,4',5,5',6'-八臭素化ジフェニルエーテル	203	OcBDE-203	641.51	639.52
2,2',3,3',4,4',5,6'-八臭素化ジフェニルエーテル	196	OcBDE-196	641.51	639.52
2,2',3,3',4,4',5,6,6'-九臭素化ジフェニルエーテル	208	NoBDE-208	719.42	721.42
2,2',3,3',4,4',5,6,6'-九臭素化ジフェニルエーテル	207	NoBDE-207	719.42	721.42
2,2',3,3',4,4',5,5',6'-九臭素化ジフェニルエーテル	206	NoBDE-206	719.42	721.42
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-十臭素化ジフェニルエーテル	209	DeBDE-209	799.33	797.34
¹³ C ₁₂ -2,4,4'-三臭素化ジフェニルエーテル (CS)	28	¹³ C ₁₂ -TrBDE-28	417.84	419.84
¹³ C ₁₂ -2,2',4,4'-四臭素化ジフェニルエーテル (CS)	47	¹³ C ₁₂ -TeBDE-47	497.75	495.75
¹³ C ₁₂ -2,2',4,4',5'-五臭素化ジフェニルエーテル (CS)	99	¹³ C ₁₂ -PeBDE-99	575.66	577.66
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5'-五臭素化ジフェニルエーテル (SS)	126	¹³ C ₁₂ -PeBDE-126	575.66	577.66
¹³ C ₁₂ -2,2',4,4',5,6'-六臭素化ジフェニルエーテル (CS)	154	¹³ C ₁₂ -HxBDE-154	655.57	653.57
¹³ C ₁₂ -2,2',4,4',5,5'-六臭素化ジフェニルエーテル (CS)	153	¹³ C ₁₂ -HxBDE-153	655.57	653.57
¹³ C ₁₂ -2,2',3,4,4',5,6'-七臭素化ジフェニルエーテル (CS)	183	¹³ C ₁₂ -HpBDE-183	733.48	735.48
¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',4,4',6,6'-八臭素化ジフェニルエーテル (CS)	197	¹³ C ₁₂ -OcBDE-197	653.55	651.56
¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',4,4',5,6,6'-九臭素化ジフェニルエーテル (CS)	207	¹³ C ₁₂ -NoBDE-207	731.47	733.46
¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-十臭素化ジフェニルエーテル (CS)	209	¹³ C ₁₂ -DeBDE-209	811.37	809.38

CS: クリーンアップスパイク, SS: シリンジスパイク

表 4 トータルダイエツト試料中の PBDEs 濃度 (ng/g)

異性体	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群	第8群	第9群	第10群	第11群	第12群	第13群	第14群
TrBDE-28/33	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	0.04	ND	ND	ND	ND
TeBDE-49	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	ND	ND	ND	ND
TeBDE-47	ND	ND	ND	0.01	0.01	ND	ND	ND	ND	0.22	0.01	ND	ND	ND
TeBDE-66	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.03	ND	ND	ND	ND
PeBDE-100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.04	ND	ND	ND	ND
PeBDE-99	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	ND	ND	0.03	ND	ND	ND	ND
HxBDE-155	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	ND	ND	ND
HxBDE-154	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.03	ND	ND	ND	ND
HxBDE-153	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND
DeBDE-209	ND	ND	ND	1.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Σ36PBDEs (ND = 0)	0	0	0	1.82	0.03	0	0	0	0	0.48	0.01	0	0	0
Σ36PBDEs (ND = 1/2LOD)	0.36	0.36	0.36	2.12	0.38	0.36	0.36	0.36	0.36	0.79	0.36	0.36	0.36	0.36

表 5 ペンタ-BDE およびデカ-BDE の食事経路の推定摂取量 (ng/人/日)

原体	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群	第8群	第9群	第10群	第11群	第12群	第13群	第14群	計
ペンタ-BDE (ND = 0)	0	0	0	0	1.6	0	0	0	0	43	1.2	0	0	0	46
ペンタ-BDE (ND = 1/2LOD)	42	22	4.3	1.5	7.8	15	13	23	72	50	16	20	11	31	329
ペンタ-BDE (ND = LOD)	84	45	8.6	2.9	14	31	25	46	144	57	31	39	23	63	613
デカ-BDE (ND = 0)	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21
デカ-BDE (ND = 1/2LOD)	42	22	4.3	21	6.7	15	13	23	72	11	16	20	11	31	309
デカ-BDE (ND = LOD)	84	45	8.6	22	13	31	25	46	144	22	31	39	23	63	597

ペンタ-BDE: Tr-HxBDEs 26 異性体、デカ-BDE: No-DeBDE 4 異性体

表 6 各国における食事経路の PBDEs 推定摂取量の比較

国	対象異性体	摂取量 (ng/人/日)	備考	文献
日本	Tr-HxBDEs 26 異性体	46	ND = 0	本研究
日本	Tr-HxBDEs 26 異性体	329	ND = 1/2 LOD	本研究
日本	47, 99, 100, 153, 154	32	ND = 0	本研究
日本	47, 99, 100, 153, 154	87	ND = 1/2 LOD	本研究
スウェーデン	47, 99, 100, 153, 154	51	ND = 1/2 LOD	Darnerud et al. 2001. 5)
英国	47, 99, 100, 153, 154	91	-	Wijesekera et al. 2002. 6)
スペイン	Te-OcBDEs	82	ND = 0	Bocio et al. 2003. 7)

表 7 植物油中の PBDEs 濃度 (ng/g)

異性体	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	No.11	No.12	No.13	No.14	No.15	No.16	No.17	No.18
TrBDE-28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TeBDE-47	0.07	0.59	0.15	0.06	ND	ND	0.03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.03	ND	0.01
PeBDE-100	0.02	0.19	0.04	0.01	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PeBDE-99	0.14	1.8	0.45	0.13	ND	ND	0.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.04	ND	0.03
HxBDE-154	ND	0.10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HxBDE-153	ND	0.13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HpBDE-183	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DeBDE-209	2.4	1.5	2.6	1.8	ND	ND	1.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.3	ND	0.7
Σ8PBDEs	2.6	4.3	3.2	2.0	0	0	2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.4	0	0.7

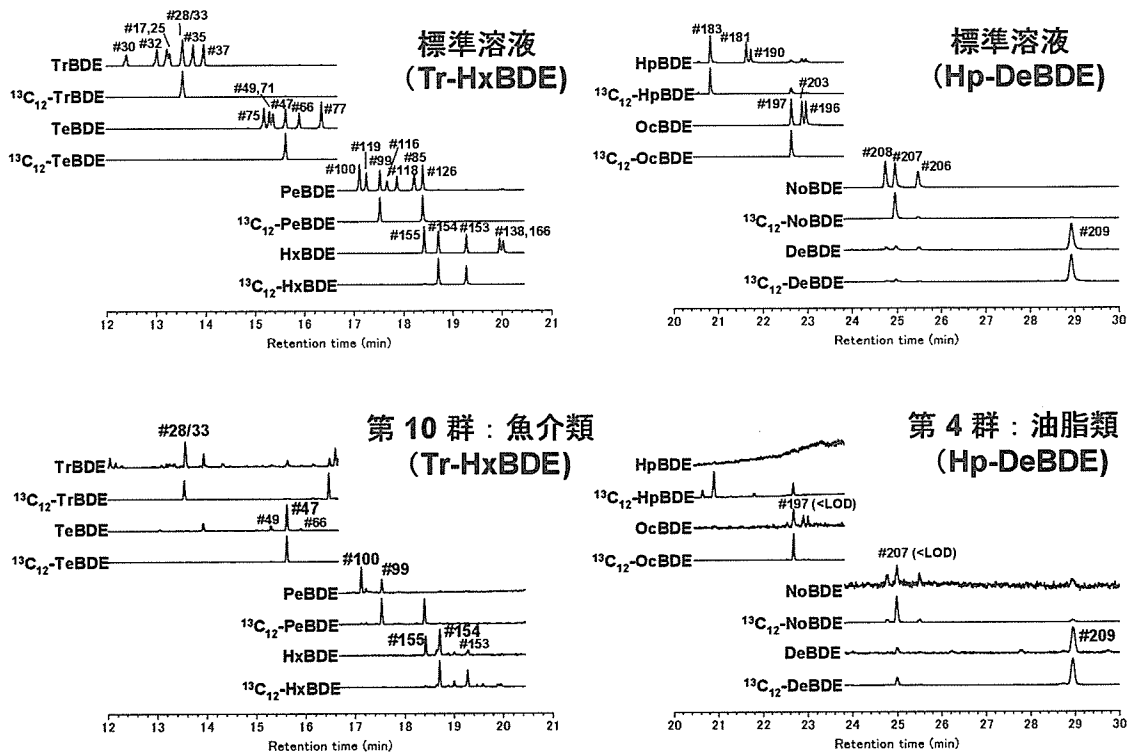


図 1 標準溶液および実試料 (第 10 群、第 4 群) のクロマトグラム例

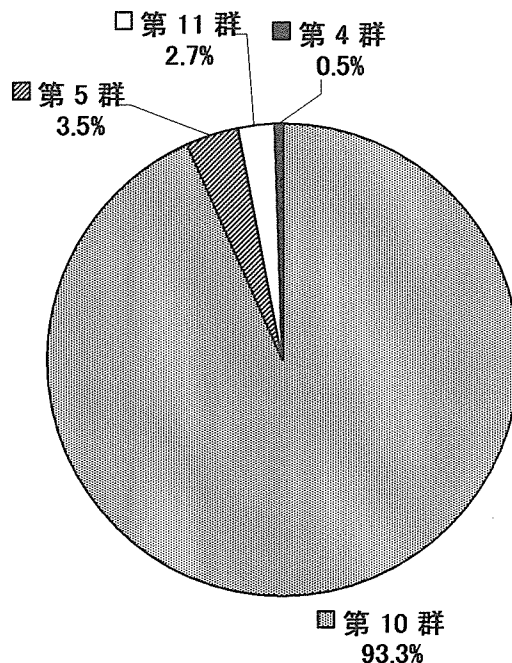


図 2 食事由来のペンタ-BDE 摂取量に占める各食品群の寄与率 (ND = 0)

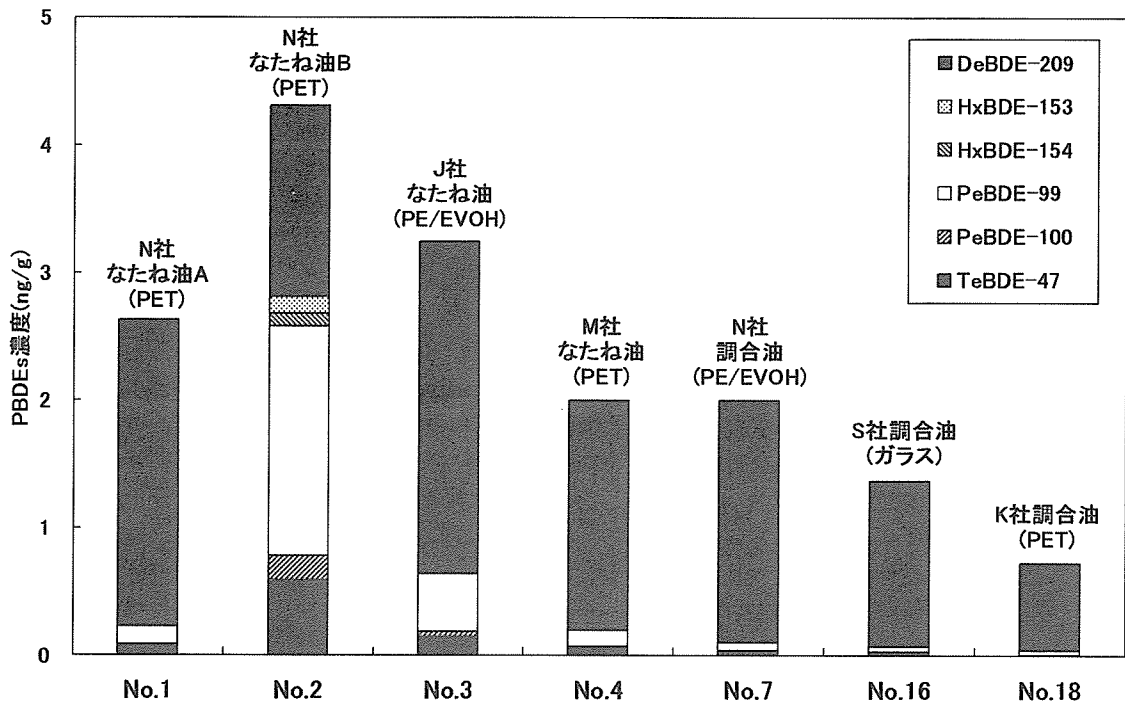


図3 植物油試料の分析結果

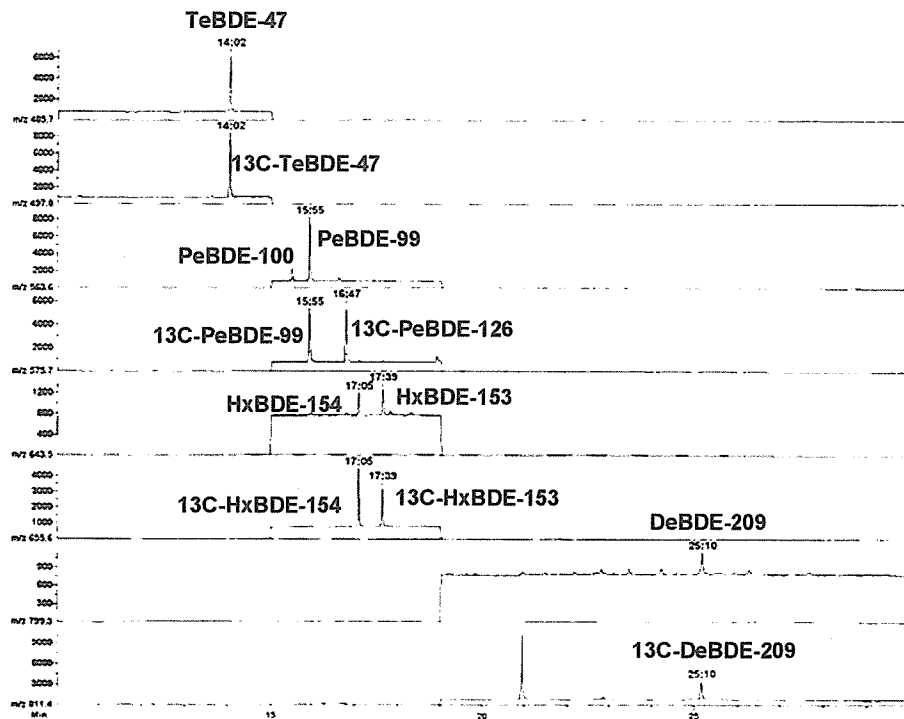


図4 植物油試料のクロマトグラム例 (なたね油、試料 No.2)

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
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

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
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

研究要旨

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。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。フタル酸ジエチルヘキシル（DEHP）：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。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 2.6-5.4 ng/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。

A. 研究目的

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ひとつである。当該化学物質の曝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曝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曝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。

B. 研究方法

(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-¹³C₄、MBP、MBP-¹³C₄、MBzP、MBzP-¹³C₄、MEHP、MEHP-¹³C₄、MEHHP、MEHHP-¹³C₄、MiNP 及び

MiNP-¹³C₄ の各 100 µg/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-d₄ 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。β-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

概要をスキーム 1 に示した。解凍後直ちに血清 1.00 g に 1.25 mol/L リン酸 100 μ L を添加した。次に 100 ng/mL 内部標準混合溶液 100 μ L, 2.5 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH 6.5), 8.5 U/mL β -Glucuronidase 60 μ L 及び 1.0 μ g/mL 4-MU-Glu 100 μ L を添加して攪拌後, 40°C 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 15 mL 及び Milli-Q 水 5 mL でコンディショニングした OASIS MAX (6 cc, 150 mg; Waters) に負荷した (2)。次にカラムを Milli-Q 水 5 mL 及びアセトニトリル 10 mL で洗浄し, 2% ギ酸含有アセトニトリル 5 mL 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プバキュームマニホールド (SUPELCO) を用い, カラム先端には, ディスポーザブルライナー (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 1.00 mL に再溶解して LC/MS/MS の試験液とした。LC/MS/MS の条件は, 表 1 に記した。

(3-2) 母乳中のフタル酸モノエステル類

概要をスキーム 2 に示した。解凍後直ちに母乳 1.00 g に 100 ng/mL 内部標準混合溶液 100 μ L, 2.5 mol/L 酸性リン酸塩緩衝溶液 (リン酸二水素ナトリウム二水和物, 2.18 g 及びリン酸, 1 mL を Milli-Q 水で溶解し, 100 mL に定容したもの), 酢酸エチル/シクロヘキサン (v/v: 95/5) 5 mL 及び無水硫酸ナトリウム 2 g を添加してボルテックスミキサーで 10 分間攪拌した。遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) 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 μ L, Milli-Q 水 1 mL 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 (pH 6.5), 8.5 U/mL β -Glucuronidase 60 μ L 及び 1.0 μ g/mL 4-MU-Glu 100 μ L を添加して攪拌後, 40°C 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。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。LC/MS/MS の条件は, 表 1 に記した。

(3-3) 胎脂中の DEHP 及び MEHP

概要をスキーム 3 に示した。胎脂を 0.025 g を目安に清浄なガラス製試験管に採取し, 重量を記録した。次に内部標準品 25 ng 及びアセトン 2 mL を加えて攪拌した後, 超音波照射を 2 分間行った。次にボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) した。アセトン相を別の清浄なガラス製試験管に回収し, 残渣にアセトン 2 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) 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 1 mL を加えて溶解し, アセトニトリル 2 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し, 遠心分離

(3,000 rpm, 10 分間) した。アセトニトリル相を別の清浄な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 2 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) 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 (1,000 ng/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。LC/MS/MS の条件は, 表 2 に記した。

(3-4) 血清中の DEHP 及び MEHP

概要をスキーム 4 に示した。血清 0.5 g に内部標準品 50 ng 及びアセトン 4 mL を加えて攪拌した後, 超音波照射を 2 分間行った。次にボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) した。アセトン相を別の清浄なガラス製試験管に回収し, 残渣にアセトン 1 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) 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 0.5 mL 及び酢酸 4 μ L を加えて溶解した。ヘキサン 1 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) した。ヘキサン相を別の清浄なガラス製試験管に回収した。水相にヘキサン 1 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) 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 0.5 mL に溶解して LC/MS/MS 試験液とした。LC/MS/MS の条件は, 表 2 に記した。

(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。

C 及び D. 結果及び考察

(1) 血清中のフタル酸モノエステル類

母体血清及び臍帯血清中のフタル酸モノエステル類の測定結果を表 3 に示した。代表的なクロマトグラムを図 1 に示した。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 (図 2)。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, 母体が曝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曝露量を推察するうえで重要な知見である。ただし, 高濃度の曝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

母体血清及び母乳中のフタル酸モノエステル類の測定結果を表4に示した。代表的なクロマトグラムを図1に示した。母乳からは、MEHP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の評価するためには、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。表5に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[1]。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[2]。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。

(3) 胎脂中のDEHP及びMEHP

胎脂中のDEHP及びMEHPの測定結果を表6に示した。代表的なクロマトグラムを図3に示した。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の曝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の曝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を含む化学物質の曝露を評価できる試料として期待される。

[1]:Main, K.M., *et al.*, "Human Breast Milk Contamination with Phthalate and Alteration of Endogenous Reproductive Hormones in Infants Three Months of Age" *Environ. Health Perspect.*, 114, 270-276, 2006.

[2]:http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/SUMMARY/dinpsum046.pdf (報告書のダウンロード)

E. 結論

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。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
学会発表

1. 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回環境ホルモン学会研究発表会(2006)東京。

H. 知的所有権の取得状況
なし

表 1. LC/MS/MS の条件 1 (フタル酸モノエステル類)

・HPLC 条件

カラム	C18 Symmetry (2.1 x 50 mm; 3.5 μ m; Waters) ;		
移動相	A) 2.0 x 10 ⁻⁴ % ギ酸水溶液; B) 2.0 x 10 ⁻⁴ % ギ酸含有アセトニトリル		
流速	200 μ L/min;	注入量	5.0 μ L; カラム温度 40°C

・グラジエントプロフィール

Time (min)	A (%)	B (%)	Mode
0	60	40	Linear
5.0	35	65	
5.0	0	100	Step
10.0	0	100	

・MS/MS 条件

インターフェイス/モード, Electrospray Ionization / Negative (Positive)

キャピラリー電圧/温度, -4500 (4500) V/450°C

Precursor, Product Ions 及びその際の Collision Energy は下表の通り.

化学物質名	Precursor	Product (Collision Energy, eV)
MEP	-193	- 121 (-16)
MEP- ¹³ C ₄	-197	- 79 (-26)
MBP	-221	- 77 (-26)
MBP- ¹³ C ₄	-225	- 79 (-24)
MBzP	-255	- 77 (-32)
MBzP- ¹³ C ₄	-259	- 107 (-20)
MEHP	-277	- 134 (-24)
MEHP- ¹³ C ₄	-281	- 138 (-24)
MEHHP	-293	- 121 (-30)
MEHHP- ¹³ C ₄	-297	- 145 (-20)
MiNP	-291	- 141 (-26)
MiNP- ¹³ C ₄	-295	- 79 (-36)
4-MU	+177	+ 77 (+49)
4-MU-Glu	+353	+ 177 (+23)

表 2. LC/MS/MS の条件 2 (DEHP 及び MEHP 対象)

・HPLC 条件

カラム	Wakosil-II 3C18 (2.0 x 150 mm; 3 μ m; Wako) ;		
移動相	A) 5.0 x 10 ⁻⁴ % 酢酸水溶液 ; B) アセトニトリル		
溶出	イソクラティック A/B : 2/8		
流速	200 μ L/min ;	注入量	5.0 μ L ; カラム温度 50°C

・MS/MS 条件

インターフェイス/モード, Electrospray Ionization / Negative (Positive)

キャピラリー電圧/温度, -4,000 (4,000) V/500°C

Precursor, Product Ions 及びその際の Collision Energy は下表の通り.

化学物質名	Precursor	Product (Collision Energy, eV)
MEHP	-277	- 134 (-22)
MEHP- ¹³ C ₄	-281	- 138 (-22)
DEHP	+391	+ 149 (+27)
DEHP-d ₄	+395	+ 153 (+27)

表 3. 母体血清及び臍帯血清中のフタル酸モノエステル類 (操作ブランク*を含む) .

化学物質	母体血清 (n=12)			臍帯血清 (n=12)		
	中央値	範囲	検出率 (%)	中央値	範囲	検出率 (%)
MEP	0.3	< 0.2 - 0.4	66.7	0.3	0.3 - 0.8	100.0
MBP	13.9	3.6 - 22.9	100.0	12.7	5.3 - 22.7	100.0
MBzP	0.3	< 0.2 - 2.4	75.0	< 0.2	< 0.2 - 1.1	8.3
MEHP	3.1	2.2 - 5.0	100.0	2.2	1.8 - 11.2	100.0
MEHHP	< 0.2	< 0.2 - 0.2	50.0	< 0.2	< 0.2 - 0.2	25.0
MiNP	< 0.2	< 0.2 - 0.7	8.3	< 0.2	< 0.2 - 0.4	25.0

* : 操作ブランク: MEP, MBzP, MEHHP, MiNP < 0.2 ng/mL; MBP 0.6 \pm 0.02 ; MEHP, 0.8 \pm 0.08 (n = 3).