

表 4. 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)			母乳 (n=11)		
	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	0.5	0.3 - 1.3	100.0
MBP	13.9	3.6 - 22.9	100.0	26.0	1.8 - 156	100.0
MBzP	0.3	< 0.2 - 2.4	75.0	1.0	0.7 - 74.3	100.0
MEHP	3.1	2.2 - 5.0	100.0	27.9	4.4 - 129	100.0
MEHHP	< 0.2	< 0.2 - 0.2	50.0	< 0.2	<0.2 - 0.2	18.2
MiNP	< 0.2	< 0.2 - 0.7	8.3	1.2	0.7-8.7	100.0

** : 操作ブランク: MEP, MBzP, MEHHP, MiNP < 0.2 ng/mL; MBP 0.7±0.02; MEHP, 1.0±0.09 (n = 3).

表 5. 海外の分析事例: 母乳中のフタル酸モノエステル類 [1] より引用.

化学物質	デンマーク (n = 65)			フィンランド (n = 65)		
	中央値	範囲	検出率 (%)	中央値	範囲	検出率 (%)
MEP	0.93	0.07- 33.6	100.0	0.97	0.25 - 41.4	100.0
MBP	4.3	0.6 - 10,900	100.0	12	2.4 - 123	100.0
MBzP	0.9	0.2 - 14	100.0	1.3	0.4 - 26	100.0
MEHP	9.5	1.5 - 191	100.0	13	4.0 - 1,410	100.0
MEHHP	-	-	-	-	-	-
MiNP	101	27 - 469	100.0	89	28 - 230	100.0

表 6. 胎脂, 母体血清及び臍帯血清中の DEHP 及び MEHP 濃度 (操作ブランク*を含む)

試料	DEHP (MEHP) 濃度 (ng/g**, ng/mL***)		
	胎脂*	母体血清***	臍帯血清***
1	92,100 (< 10)	5.9 (6.9)	3.2 (3.3)
2	3,570 (< 10)	5.3 (4.1)	4.8 (4.9)
3	62,200 (< 10)	6.0 (3.9)	5.4 (15.4)
4	66,600 (< 10)	4.1 (3.5)	4.2 (4.9)
5	22,400 (< 10)	5.4 (3.3)	2.6 (3.1)

* : 操作ブランク: 胎脂対象; DEHP, MEHP < 1 ng/g; 血清対象, DEHP, 3.5±0.2 ng/mL, MEHP < 1 ng/mL.

** , *** : 単位; 胎脂, ng/g; 血清, ng/mL.

血清 (1.00 g) に下記の試薬を1-5の順で添加して混和する.

1 : 1.25 mol/L	リン酸水溶液	100 μ L
2 : 100 ng/mL	内部標準混合溶液	100 μ L
3 : 2.5 mol/L	酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.5)	3 mL
4 : 8.5 U/mL	β -Glucuronidase	60 μ L
5 : 1.0 μ g/mL	4-MU-Glu 水溶液	100 μ L

インキュベート (40°C, 45 min)

25% アンモニア水溶液 100 μ L 添加する.

OASIS MAX (6cc, 150 mg) に全量を負荷する (2).

1 : コンディショニング		
	• アセトニトリル	15 mL
	• Milli-Q 水	10 mL
2 : 洗浄		
	• Milli-Q 水	5 mL
	• アセトニトリル	5 mL
3 : 溶出		
	• 2% ギ酸含有アセトニトリル	5 mL

溶出液を窒素気流下, 40°Cで乾固する.

20%アセトニトリル含有水 1.00 mL に再溶解し, 試験液とする.

LC/MS/MS による分析

スキーム 1. 血清中のフタル酸モノエステル類の分析法.

母乳 (1.00 g) に下記の試薬を 1-4 の順で添加して混和する.

1 : 100 ng/mL	内部標準混合溶液	100 μ L
2 :	酸性リン酸緩衝液	100 μ L
3 :	酢酸エチル/シクロヘキサン (95/5) 混液	5 mL
4 :	無水硫酸ナトリウム	2 g

攪拌 (10 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

有機相を窒素気流下, 40°Cで乾固する.

アセトニトリル 50 μ L 及び Milli Q 1 mL で溶解し, 以下の試薬を加える.

1 : 2.5 mol/L	酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.5)	3 mL
2 : 8.5 U/mL	β -Glucuronidase	60 μ L
3 : 1.0 μ g/mL	4-MU-Glu 水溶液	100 μ L

インキュベート (40°C, 45 min)

25% アンモニア水溶液 100 μ L 添加する.

OASIS MAX (6cc, 150 mg) に全量を負荷する.

1 : コンディショニング		
	・アセトニトリル	15 mL
	・Milli-Q 水	10 mL
2 : 洗浄		
	・Milli-Q 水	5 mL
	・アセトニトリル	5 mL
3 : 溶出		
	・2% ギ酸含有アセトニトリル	5 mL

溶出液を窒素気流下, 40°Cで乾固する.

20%アセトニトリル含有水 1.00 mL に再溶解し, 試験液とする.

LC/MS/MS による分析

スキーム 2. 母乳中のフタル酸モノエステル類の分析法.

胎脂 (0.025 g) に下記の試薬を添加・攪拌し, 超音波照を 2 min 照射する.

1: 2,500 ng/mL	内部標準混合溶液	100 μ L
2: アセトン		2 mL

攪拌 (5 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

残渣

アセトン相

アセトン 2 mL

攪拌 (5 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

アセトン相

窒素気流下, 40°Cで乾固する.

ヘキサン 1 mL

アセトニトリル 2 mL

攪拌 (5 min) 及び静置 (30 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

ヘキサン相

アセトニトリル相

アセトニトリル 2 mL

攪拌 (5 min) 及び静置 (30 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

アセトニトリル相

窒素気流下, 40°Cで乾固する.

アセトニトリル 0.5-5 mL に溶解し, 試験液とする.

LC/MS/MS による分析

スキーム 3. 胎脂中の DEHP 及び MEHP の分析法.

血清 (0.50 g) に下記の試薬を添加・攪拌し, 超音波照を 2 min 照射する.

1: 100 ng/mL	内部標準混合溶液	50 μ L
2: アセトン		4 mL

攪拌 (5 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

残渣

アセトン相

アセトン 1 mL

攪拌 (5 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

アセトン相

窒素気流下, 40°Cで乾固する.

Milli-Q 水 0.5 mL

酢酸 4 μ L

ヘキサン 1 mL

攪拌 (5 min) 及び静置 (30 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

水相

ヘキサン相

ヘキサン 1 mL

攪拌 (5 min) 及び静置 (30 min)

遠心分離 (3,000 rpm, 10 min)

ヘキサン相

窒素気流下, 40°Cで乾固する.

アセトニトリル 0.5 mL に溶解し, 試験液とする.

LC/MS/MS による分析

スキーム 4. 血清中の DEHP 及び MEHP の分析法.

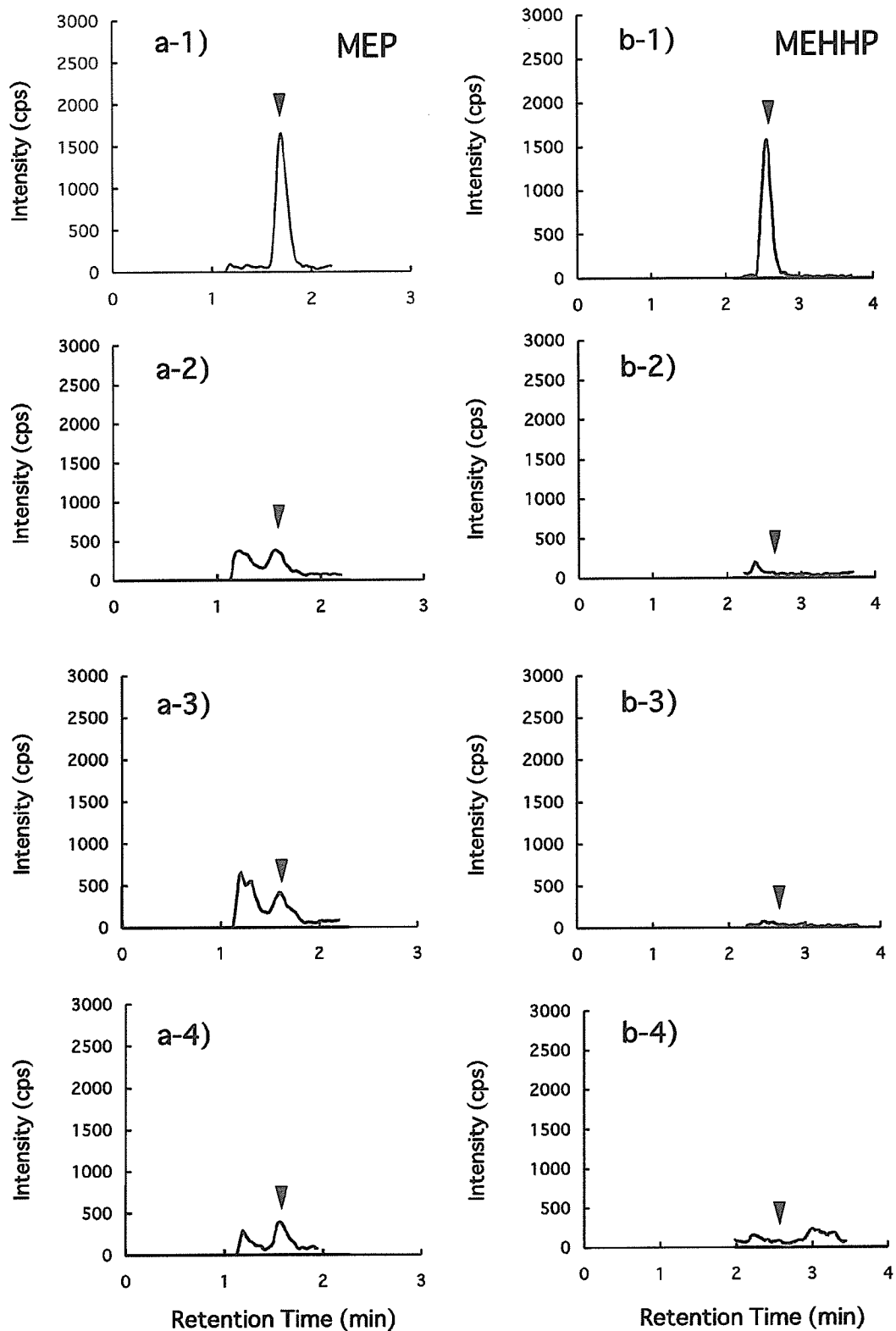


図1-1. フタル酸モノエステル類の代表的クロマトグラム。

a:MEP 1), 1.0 ng/mL 標準品; 2), 母体血清;3), 臍帯血清;4), 母乳

b:MEHHP 1), 1.0 ng/mL 標準品; 2), 母体血清;3), 臍帯血清;4), 母乳

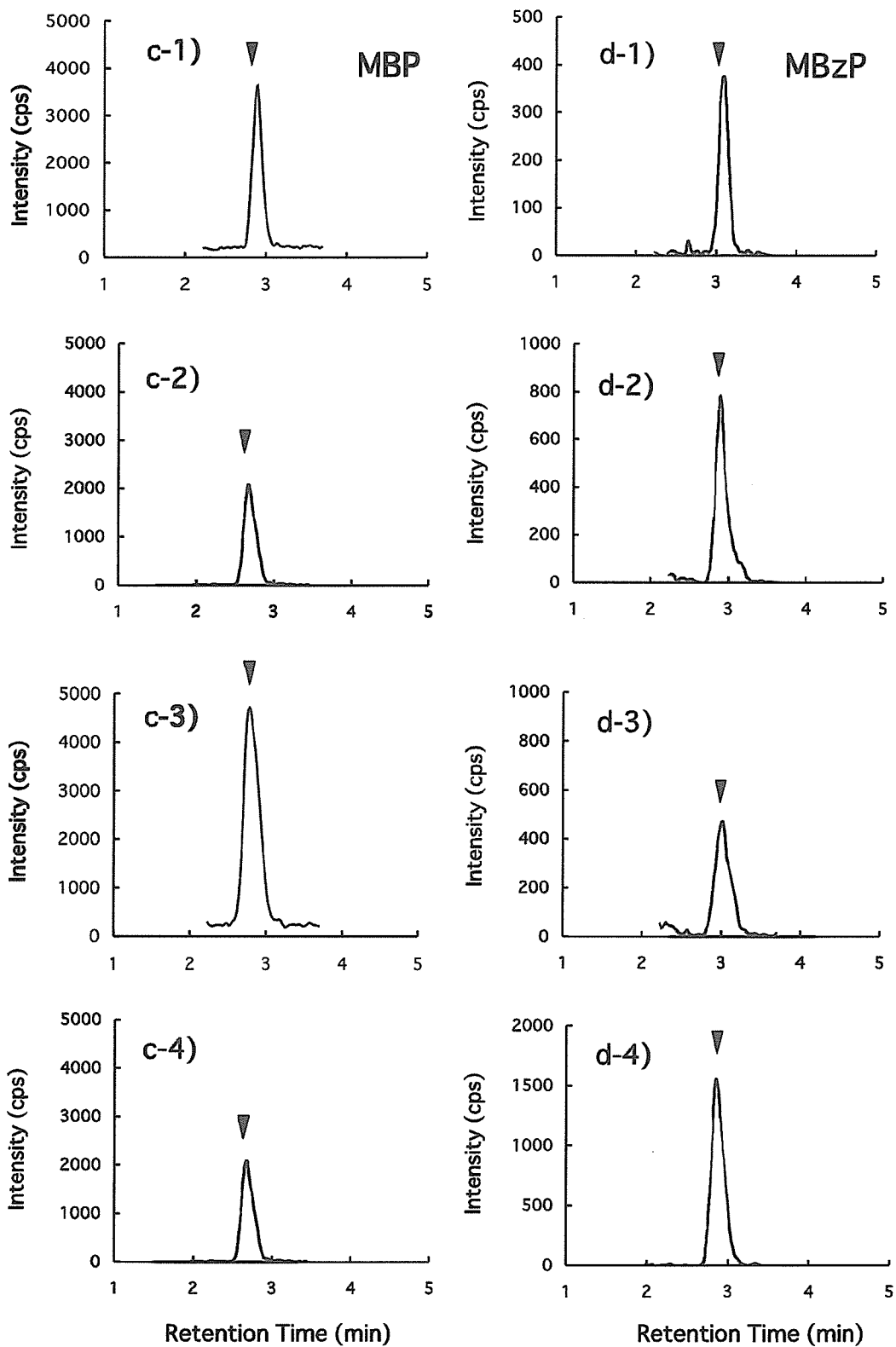


図1-2. フタル酸モノエステル類の代表的クロマトグラム。
 c:MBP 1), 5.0 ng/mL 標準品; 2), 母体血清; 3), 臍帯血清; 4), 母乳
 d:MBzP 1), 1.0 ng/mL 標準品; 2), 母体血清; 3), 臍帯血清; 4), 母乳

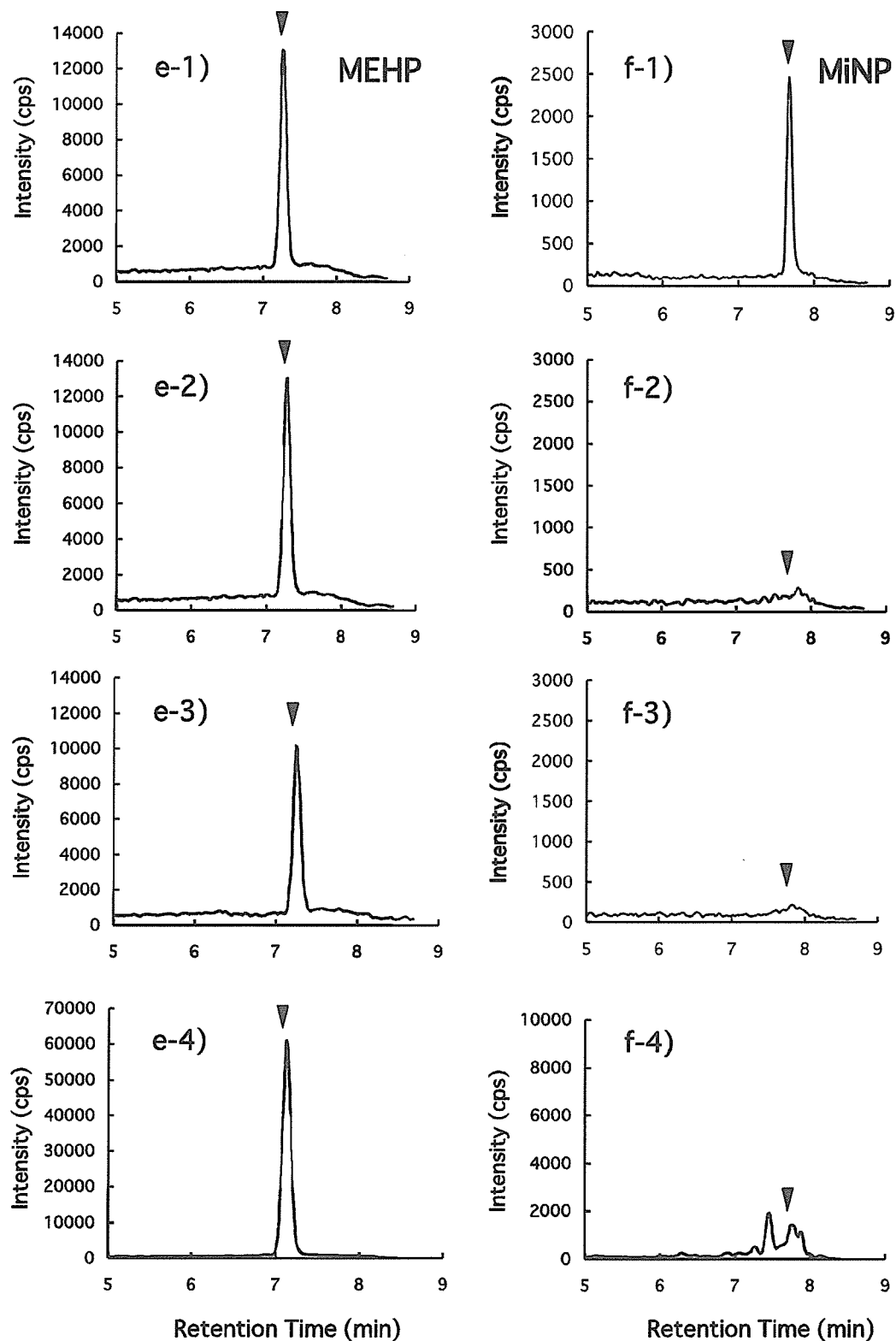


図1-3. フタル酸モノエステル類の代表的クロマトグラム。

e:MEHP 1), 5.0 ng/mL 標準品; 2), 母体血清; 3), 臍帯血清; 4), 母乳
 f:MiNP 1), 1.0 ng/mL 標準品; 2), 母体血清; 3), 臍帯血清; 4), 母乳

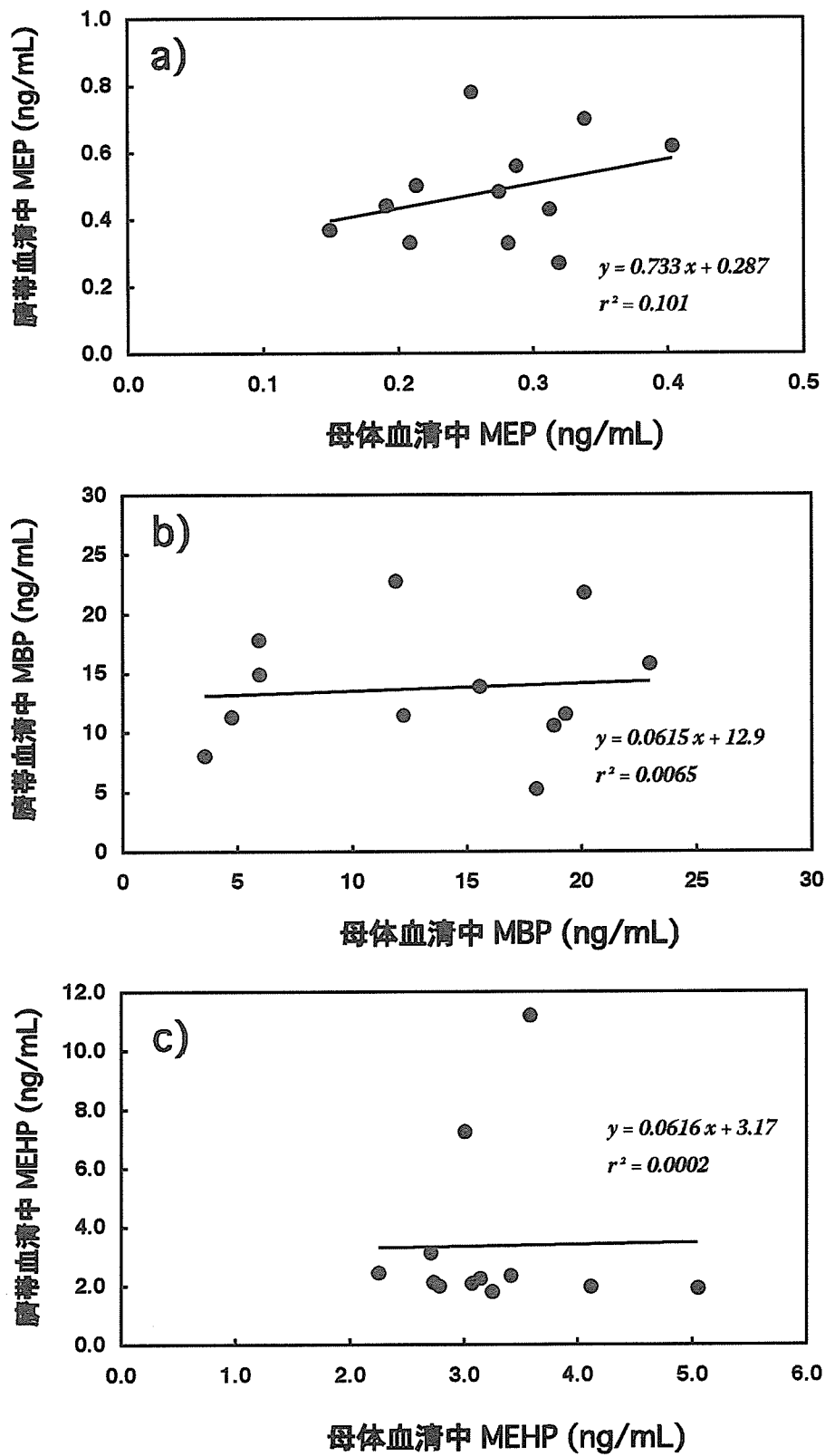


図2. 母体血清中及び臍帯血清中の a) MEP, b) MBP 及び c) MEHP 濃度の相関.

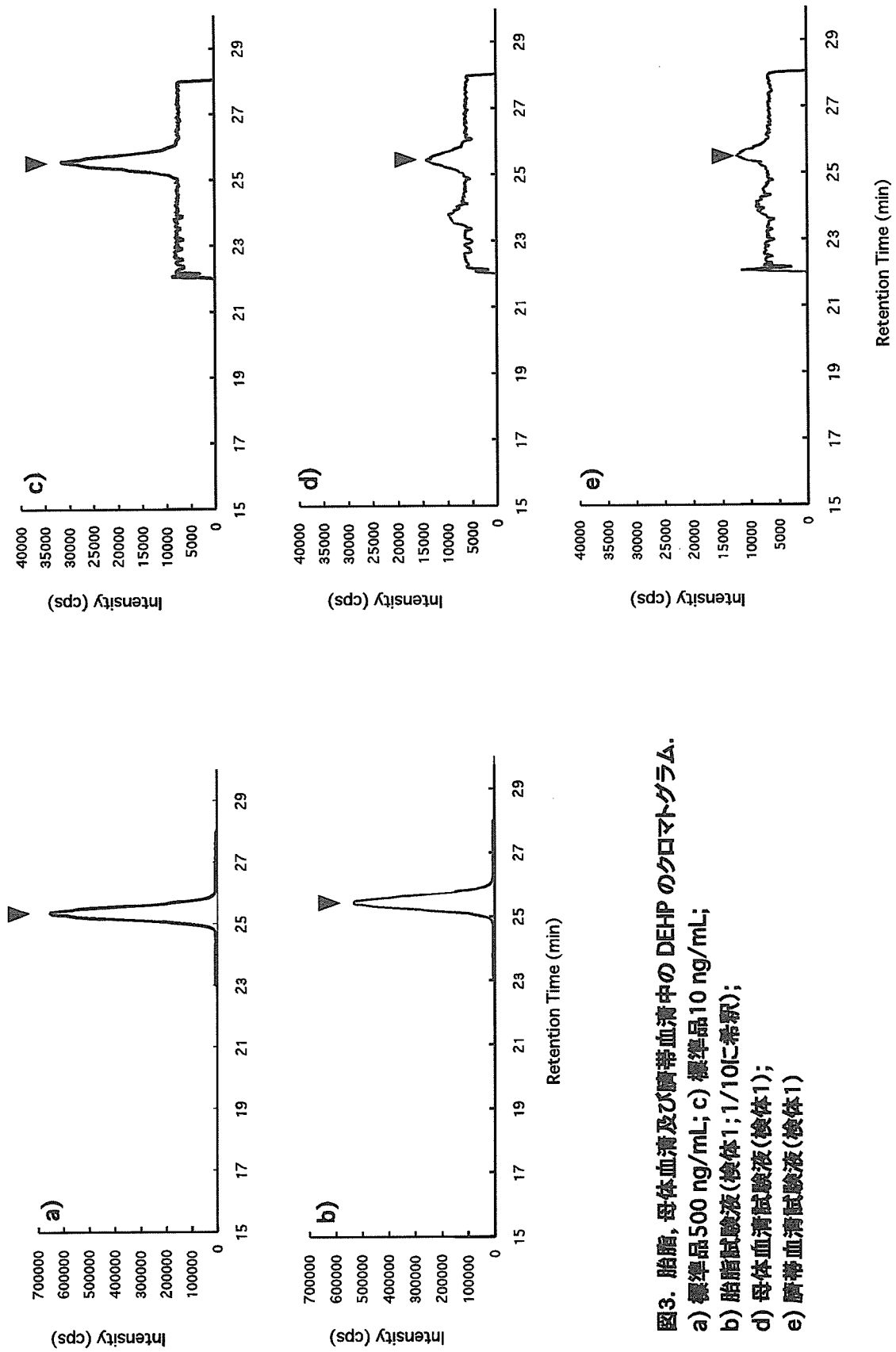


図3. 胎脂、母体血清及び臍帯血清中の DEHP のクロマトグラム.

a) 標準品 500 ng/mL; c) 標準品 10 ng/mL;

b) 胎脂試験液(検体1); 1/10に希釈;

d) 母体血清試験液(検体1);

e) 臍帯血清試験液(検体1)

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）

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
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

研究要旨

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 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 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、東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者において、子宮内膜症患者 19 人とそれ以外の 19 人について各元素濃度を比較した結果、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

愛知県衛生研究所職員 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 μ g/kg/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 人の尿の分析を行った。その結果、両者から MBP 及び MEP が検出された (濃度範囲: MBP 13.2~14.0 ng/mL、MEP 4.29~97.4 ng/mL)。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

東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者 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。

A. 研究目的

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-ヘキサナール (図 1)、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。

B. 研究方法

1. 対象者及び試料

(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県衛生研究所職員 36 人 (24-59 歳、男 23 人、女 13 人)、及び東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者 38 人 (25-72 歳)。

(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県衛生研究所職員 36 人 (24-59 歳、男 23、女 13)、及び東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者 2 人。

(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大学医学部付属病院産婦人科受診患者 38 人 (25-72 歳)。

(4) 試料

分析項目別の試料数を表 1 に示した。

2. 重金属類

(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) 測定項目

1) 血清 (20 元素)

マグネシウム(Mg)、カルシウム(Ca)、鉄(Fe)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)、マンガン(Mn)、コバルト(Co)、セレン(Se)、モリブデン(Mo)、リチウム(Li)、ホウ素(B)、アルミニウム(Al)、ニッケル(Ni)、ルビジウム(Rb)、ストロンチウム(Sr)、カドミウム(Cd)、アンチモン(Sb)、バリウム(Ba)、水銀(Hg)、鉛(Pb)

2) 尿 (21 元素)

血清 20 元素のうち鉄を除く 19 元素、及びヒ素(As)、スズ(Sn)

(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。

(4) 前処理法及び試験溶液の調製法

1) 血清

マイクロ波分解用容器(MV-7 専用 PFA 小容器、ジーエルサイエンス製)に血清 0.5mL、硝酸 1 mL、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) 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 5 mL 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。

(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

(6) ICP-MS 条件

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

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：

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

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

(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

(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-¹³C₄、MBP-¹³C₄、MEHP-¹³C₄、MINP-¹³C₄、MBzP-¹³C₄ は Cambridge Isotope Laboratories 社製、β-グルクロニダーゼ溶液 (100 units)、フロリジール 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。

(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で洗浄した。

塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200℃で2時間加熱した。

(3) フロリジルカラムの調製

内径 15 mm、長さ 110 mm のガラス製カラムの底に、ガラス繊維濾紙を敷き、フロリジル 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。

(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 μ L、 β -グルクロニダーゼ 30 μ L 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

(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 μ m)

カラム温度: 80℃ (3分) \rightarrow 20℃/分 \rightarrow 240℃ \rightarrow 10℃/分 \rightarrow 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)

モニターイオン:

	定量 イオン	参照 イオン
モノエステル体	m/z 163	m/z 149
内標	m/z 167	m/z 153

(6) 定量法

試験溶液 2 μ L 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

(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-d₈ 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。

(2) 分析操作

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 μ L 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。

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。

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-d₈ 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) 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-d₈ のピーク面積比を基に検量線を作成後、その傾き及び切片から試料中の濃度を算出した。

(3) 分析条件

1) ヘッドスペース条件

装置: Tekmer 7000 (Tekmer)

バイアル容量: 22 mL (Chromacol, CV-22)

バイアル加熱条件: 85℃ (20分)

バイアル振とう機能: 使用 (Power 5: 3分)

サンプルループ容量: 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

2) GC/MS 条件

装置：AUTO MASS SYSTEM II (日本電子)

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-d₈ (m/z 98)

C. 結果と考察

1. 重金属類

(1) 愛知県衛生研究所職員

愛知県衛生研究所職員 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¹⁾に示された基準範囲や、これまでの ICP-MS 法による報告値²⁾と同程度であった (表 2、3)。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³⁾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、血清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。

(2) 東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者

東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者 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¹⁾に示された基準範囲や、これまでの ICP-MS 法による報告値²⁾と同程度であった (表 4)。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 (図 2)。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

(1) 愛知県衛生研究所職員

愛知県衛生研究所職員 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 (表 5)。その結果、測定対象 5 物質 (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)) 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 μg/g、検出濃度範囲は 22.8~554 μg/g、であった。MEP の中央値は 13.7 μg/g、検出濃度範囲は 3.06~944 μg/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 μg/g であった

既報の研究結果との比較を表 6 に示した (MINP は本調査での検出率が低かったため除外した)。6 歳以上の米国居住者 2540 人について測定を行った Silva ら⁴⁾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⁵⁾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⁶⁾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 (表 7)。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を次式⁷⁾に従い算出した (表 8)。

$$\text{一日摂取量} = \frac{\text{ME} \times \text{CE} \times \text{MW}_d}{f \times 1000 \times \text{MW}_m}$$

(μg/kg/日)

ME; 尿中フタル酸モノエステル濃度 (クレアチニン補正值) μg/g

CE; クレアチニン一日排泄量 mg/kg/日⁸⁾

男: -12.63 × 年齢 + 15.12 × 体重 + 7.39 × 身長 - 79.90

女: -4.72 × 年齢 + 8.58 × 体重 + 5.09 × 身長 - 74.95

f; 尿中排泄と全排泄の比 (MEP: 0.69, MBP: 0.69, MEHP: 0.024, MBzP: 0.73)

MW_d; DEP: 222, DBP: 278, DEHP: 390, BBzP: 312

MW_m; MEP: 194, MBP: 222, MEHP: 278, MBzP: 256

最も高い値(中央値)を示したのは DEHP の 5.69 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ で、範囲は 1.71~51.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であった。次いで DBP が 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (中央値)、範囲 0.69~9.41 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であった。DEP と BBzP は DEHP、DBP と比べて低く、それぞれ 0.29、0.27 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) で EU が示した TDI (37 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 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) 東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者
東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者 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 (表 9)。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

東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者 38 人より採取した血清中の 3 種の揮発性有機化合物 (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) 濃度を測定した (表 10)。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 42 ng/mL、検出濃度範囲は 10~182 ng/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)⁹⁾ 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-ヘキサナールは 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-ヘキサノールと 2-エチル-1-ヘキサナール濃度の関係を図 3 に示した。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 (表 11)。既報の研究結果¹⁰⁾ では、シックハウス症候群患者が 1.0 ng/mL (中央値、n=18)、愛知県衛生研究所職員が 4.1 ng/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)¹¹⁾ 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。

D. 結論

1. 愛知県衛生研究所職員 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 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. 愛知県衛生研究所職員 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. 東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者 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-ヘキサナールの検出率は 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-ジクロロベンゼンも全員から検出された。

E. 参考文献

1) 臨床検査法提要改訂第 32 版、金井正光編、金原出版、p.1790-1806, 2005.

2) Rodushkin I. et al. Multi-element analysis of body fluids by double-focusing ICP-MS, Transworld Res. Network. Recent Res. Devel. Pure & Applied Chem., 2001; 5: 51-66.

3) 長谷川拓也、原口紘丞. ヒト血清を用いる多元素相関解析による病態診断. Biomed Res Trace Elements 2002; 13(4): 298-299.

4) Silva M. J., Barr D. B., Reidy J. A., Malek N. A., Hodge C. C., Caudill S. P., Brock J. W., Needham L. L. Urinary Levels of Seven Phthalate Metabolites in the U.S. Population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). Environ Health Perspect 2004; 112: 331-338.

5) Itoh H., Yoshida K., Masunaga S. Evaluation of the effect of governmental control of human exposure to two phthalates in Japan using a urinary biomarker approach. Int J Hyg Environ Health 2005; 208: 237-245.

6) Fujimaki K., Yoshinaga J., Watanabe C., Serizawa S., Shiraishi H., Mizumoto Y.

Estimation of intake level of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) of Japanese pregnant woman based on measurement of concentrations of three urinary metabolites. Jpn J Hyg 2006; 61: 340-347.

7) Koch H. M., Drezler H., Angerer J. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. Int J Hyg Environ Health 2003; 206: 77-83.

8) Kawasaki T., Uezono K., Itoh K., Ueno M. Prediction of 24-hour urinary creatinine excretion from age, body weight and height of an individual and its application. Jpn J Public Health 1991; 38: 567-574.

9) 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.

10) 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.

11) Hill R. T., Ashley D. L., Head S. L., Needham L. L., Pirkle J. L. p-Dichlorobenzene exposure among 1000 adults in the United States. Arch Environ Health 1995; 50: 277-280.

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 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.

2. 学会発表

1) 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；環境ホルモン学会第9回研究発表会（2006）

2) 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；第77回日本衛生学会（2007）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

表1 分析試料数

分析項目	愛知県衛生 研究所職員		東海大学病院産 婦人科受診患者	
	血清	尿	血清	尿
重金属類	36	36	38	0
フタル酸モノエステル類	0	36	0	2
揮発性有機化合物	0	0	38	0

表2 愛知県衛生研究所職員の血清中重金属類濃度
(単位:ng/mL、ただし*は μ g/mL)

元素	性	平均値±標準偏差	中央値	範囲
Mg*		20 ± 1	20	18 - 23
Ca*		95 ± 3	95	89 - 101
Fe*、a)	男	1.20 ± 0.20	1.14	0.92 - 1.57
	女	1.00 ± 0.27	0.96	0.37 - 1.38
Cu*		1.00 ± 0.14	1.01	0.76 - 1.30
Zn*		0.86 ± 0.10	0.86	0.69 - 1.03
Li		0.64 ± 0.27	0.59	0.27 - 1.22
B		13.1 ± 4.5	12.1	5.1 - 21.2
Al		3.04 ± 1.31	2.93	0.91 - 6.61
Mn		0.85 ± 0.29	0.85	0.21 - 1.38
Co		0.10 ± 0.06	0.09	0.02 - 0.20
Ni		0.32 ± 0.08	0.31	0.18 - 0.49
Se		132 ± 10	134	108 - 148
Rb*		0.18 ± 0.03	0.17	0.13 - 0.24
Sr		36 ± 12	35	19 - 67
Mo ^{a)}	男	1.61 ± 0.71	1.50	0.53 - 3.35
	女	1.06 ± 0.31	1.06	0.64 - 1.67
Cd		0.04 ± 0.01	0.04	0.01 - 0.07
Sb		0.08 ± 0.03	0.06	0.03 - 0.17
Ba		0.79 ± 0.25	0.72	0.46 - 1.52
Hg		0.77 ± 0.28	0.76	0.30 - 1.25
Pb		0.26 ± 0.08	0.27	0.12 - 0.41

n=36(男=23, 女=13)

a) p<0.05

表3 愛知県衛生研究所職員の尿中重金属類濃度

(単位:ng/mL、ただし*は $\mu\text{g/mL}$)

元素	性	平均値±標準偏差	中央値	範囲
Mg*		53 ± 30	45	9 - 123
Ca*		103 ± 60	94	9 - 219
Cu		14.8 ± 6.9	12.7	4.4 - 27.4
Zn*		0.32 ± 0.21	0.33	0.03 - 0.96
Li		11.3 ± 5.6	10.7	2.9 - 27.6
B*		0.80 ± 0.63	0.65	0.14 - 3.00
Al		3.28 ± 1.67	2.76	1.43 - 9.64
Mn		0.62 ± 0.30	0.57	0.25 - 1.42
Co		0.21 ± 0.18	0.15	0.04 - 1.03
Ni		1.89 ± 1.09	1.71	0.63 - 6.35
Se		41.6 ± 23.3	34.5	7.2 - 105
Rb*		1.14 ± 0.77	1.05	0.31 - 4.36
Sr		142 ± 88	129	19 - 509
Mo ^{a)}	男	108 ± 80	108	14 - 398
	女	51 ± 24	51	22 - 95
Cd		0.81 ± 0.47	0.72	0.15 - 1.83
Sb		0.12 ± 0.05	0.12	0.06 - 0.28
Ba		1.68 ± 1.33	1.26	0.21 - 6.00
Hg		1.37 ± 0.89	1.18	0.23 - 3.09
Pb		1.12 ± 0.59	0.96	0.40 - 2.70
As		142 ± 112	99	13 - 423
Sn		1.02 ± 0.51	0.89	0.34 - 2.38

n=36(男=23, 女=13)

a) p<0.05

表4 東海大学病院産婦人科受診患者の血清中重金属類濃度

(単位:ng/mL、ただし*は $\mu\text{g/mL}$)

元素	実測値			文献値	
	平均値±標準偏差	中央値	範囲	中央値	範囲
Mg*	20 ± 1	20	17 - 23	20	18 - 23
Ca*	96 ± 5	97	87 - 104	95	86 - 100
Fe*	0.99 ± 0.33	1.03	0.44 - 1.77	0.9	0.3 - 1.6
Cu*	0.98 ± 0.18	0.97	0.72 - 1.4	1.0	0.7 - 1.3
Zn*	0.83 ± 0.11	0.82	0.68 - 1.21	0.9	0.66 - 1.2
Li	0.43 ± 0.17	0.36	0.19 - 0.87	0.6	0.2 - 1.3
B	10.4 ± 2.8	9.6	6.0 - 16.5	10	5 - 25
Al	4.9 ± 3.3	4.7	0.3 - 12.0	3	0.5 - 10
Mn	0.73 ± 0.31	0.66	0.3 - 1.7	0.8	0.2 - 1.5
Co	0.14 ± 0.10	0.12	0.01 - 0.38	0.1	0.02 - 0.3
Ni	0.39 ± 0.19	0.33	0.12 - 0.96	0.3	0.1 - 0.6
Se	115 ± 13	111	98 - 147	130	100 - 150
Rb*	0.17 ± 0.03	0.17	0.11 - 0.25	0.17	0.10 - 0.25
Sr	28 ± 10	27	16 - 73	35	15 - 70
Mo	1.38 ± 0.31	1.35	0.89 - 2.25	1.3	0.2 - 3.5
Cd	0.05 ± 0.02	0.04	0.02 - 0.15	0.04	0.01 - 0.1
Sb	0.08 ± 0.04	0.07	0.02 - 0.19	0.06	0.02 - 0.2
Ba	0.82 ± 0.47	0.97	0.14 - 1.68	0.8	0.4 - 2
Hg	0.73 ± 0.32	0.68	0.26 - 1.38	0.8	0.2 - 1.5
Pb	0.28 ± 0.11	0.25	0.11 - 0.57	0.3	0.1 - 0.6

n=38

表5 愛知県衛生研究所職員の尿中フタル酸モノエステル濃度

	MBP	MEP	MBzP	MEHP	MINP
検出率 (%)	100	100	75	56	6
平均値	78.7	47.8	13.6	10.6	—
標準偏差	85.5	157	8.65	9.72	—
中央値	58.7	13.7	11.4	7.76	—
最小値	22.8	3.06	<LOQ	<LOQ	<LOQ
最大値	554	944	39.4	56.2	6.38

n=36

単位: $\mu\text{g/g creatinine}$

LOQ(定量下限値): 実測値で5 ng/mL(MBzP、MEHP)、1 ng/mL(MINP)

表6 既報の研究結果との比較

	例数	MBP	MEP	MBzP	MEHP	対象者
本調査	36	58.7 (22.8-554)	13.7 (3.06-944)	11.4 (<LOQ-39.4)	7.73 (<LOQ-56.2)	愛知県衛生研究所職員
Silvaら ¹⁾	2540	21.9 (7.74-97.5)	141 (33.0-1950)	13.3 (14.0-77.4)	3.08 (<LOD-18.5)	6歳以上の米国居住者
Itohら ²⁾	36	31 (<6.1-140)	—	—	4.5 (0.79-27)	東京、横浜居住の一般住民、4-70歳(20-26歳が26人)、女性は25人
藤巻ら ³⁾	42	—	—	—	9.83 (1.51-41.0)	妊婦(東京都内産婦人科受診者)

測定値はクレアチニン補正值($\mu\text{g/g creatinine}$)の中央値で表した。

括弧内の値は範囲を表す。ただし、Silvaらの括弧内の値は10-90パーセンタイル値。

1) Silva M.J. et al., Environ Health Perspect 112: 331-338 (2004)

2) Ito H. et al., Int J Hyg Environ Health 208: 237-245 (2005)

3) Fujimaki K. et al., Jpn J Hyg 61: 340-347 (2006)

表7 性、年齢、食生活等との関連

項目	n	MBP		MEP		
		平均値*	P値	平均値*	P値	
性別	男	23	58.7	0.031	12.6	0.024
	女	13	114		110.1	
年代別	<50	20	96.3	0.293	76.4	0.036
	50≤	16	56.5		12.0	
BMI	<25	31	82.7	0.163	52.5	0.274
	25≤	5	53.5		18.8	
築後年数	<10	10	60.6	0.377	12.6	0.274
	10≤	26	85.6		61.4	
家種別	戸建て	21	61.4	0.328	20.5	0.344
	集合	15	102.8		86.1	
食事量	いっぱい	12	70.0	0.485	106.1	0.053
	腹八分	15	59.0		10.0	
	どちらとも	9	123		33.0	
規則性	正しく	31	82.9	0.058	23.1	0.507
	不規則	5	55.4		243.7	
味付け	濃い	7	132.5	0.158	23.4	0.435
	薄い	9	53.7		11.3	
	どちらとも	20	71.1		72.8	
米飯回数	0-1	6	73.0	0.834	184	0.731
	2	22	83.6		23.2	
	3	8	69.2		13.4	
魚回数	0-4	23	81.9	0.205	66.32	0.143
	5-7	13	72.9		15.1	
肉回数	0-4	24	79.1	0.214	62.7	0.788
	5-7	12	77.8		18.0	
卵回数	0-2	13	66.6	0.768	89.6	0.846
	3-6	21	86.3		25.2	
	7≤	2	76.6		14.1	
野菜回数	0-6	6	65.8	0.932	166.1	0.966
	7≤	30	81.2		24.1	
わかめ回数	0-4	24	81.0	0.214	64.4	0.159
	5-7	12	74.0		14.6	
缶回数	0-2	25	86.6	0.345	61.0	0.077
	3≤	11	60.7		17.9	
運動	なし	14	99.6	0.987	94.6	0.119
	あり	22	65.3		18.0	
喫煙	なし	27	85.9	0.281	25.4	0.596
	あり	9	57.0		115.8	
酒	飲まない	21	88.4	0.785	62.3	0.885
	飲む	15	65.0		27.1	

* クレアチニン補正值 ($\mu\text{g/g}$)