

表8 フタル酸エステル類の推定1日摂取量

	DEHP	DBP	DEP	BBzP
中央値	5.69	1.50	0.29	0.27
平均値	8.25	1.80	0.88	0.30
標準偏差	8.62	1.46	2.66	0.20
最小値	1.71	0.69	0.07	0.04
最大値	51.5	9.41	16.1	1.00
TDI*	37 (WHO)	66 (厚労省)	5000 (EU)	200 (EU)

n=36 (単位: $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)

* 耐容1日摂取量tolerable daily intake

表9 東海大学病院産婦人科受診患者の尿中フタル酸モノエステル濃度

試料	MBP	MEP	MBzP	MEHP	MINP
G1	27.4	8.41	<LOQ	<LOQ	<LOQ
G2	25.8	191	37.3	<LOQ	<LOQ

単位: $\mu\text{g}/\text{g creatinine}$

LOQ(定量下限値):

実測値で5 ng/mL(MBzP、MEHP)、1 ng/mL(MINP)

表10 東海大学病院産婦人科受診患者の尿中2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナール濃度

	検出率	中央値	平均値	標準偏差	最小値	最大値
2-エチル-1-ヘキサノール	100	38.5	58.3	48.3	10	18.2
2-エチル-1-ヘキサナール	18	—	—	—	<LOQ	3

n=38

(単位: ng/mL)

LOQ(定量下限値): 1 ng/mL

表11 東海大学病院産婦人科受診患者の血清中1,4-ジクロロベンゼン濃度

	検出率	中央値	平均値	標準偏差	最小値	最大値
東海大学病院産婦人科受診患者	100	3.4	5.7	8.8	0.9	53.0
シックハウス症候群患者 ⁵⁾	61	1.0	5.1	8.5	<LOQ	25.4
愛知県衛生研究所職員 ⁵⁾	85	4.1	16.8	35.9	<LOQ	171
NHANES III ^{*, 7)}	96	0.33	2.1	—	—	49

n=38

(単位:ng/mL)

* National Health and Nutrition Examination Survey III

LOQ (定量下限値) : 0.2 ng/mL

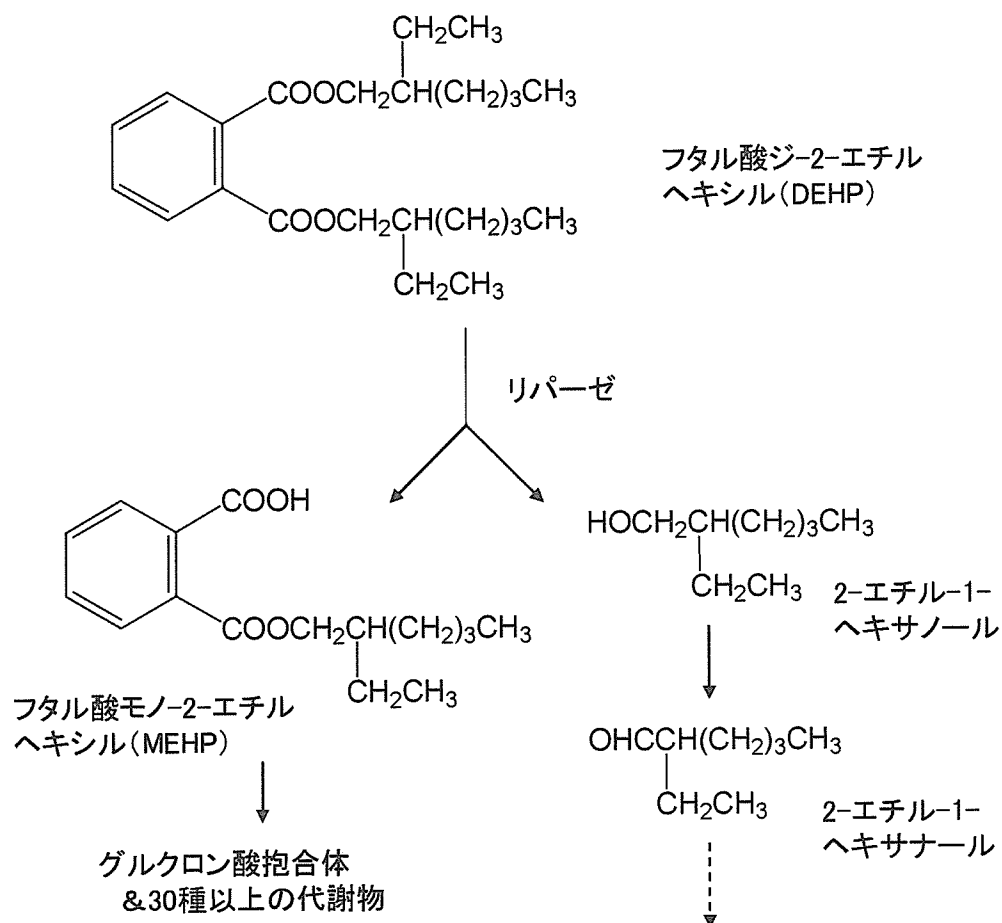


図1 フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) の代謝

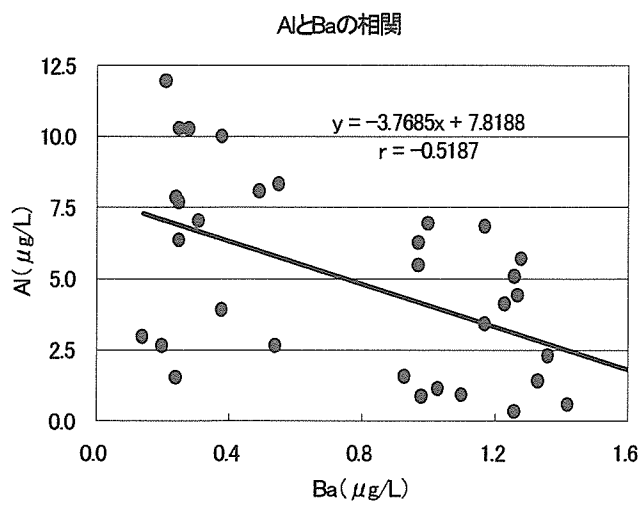
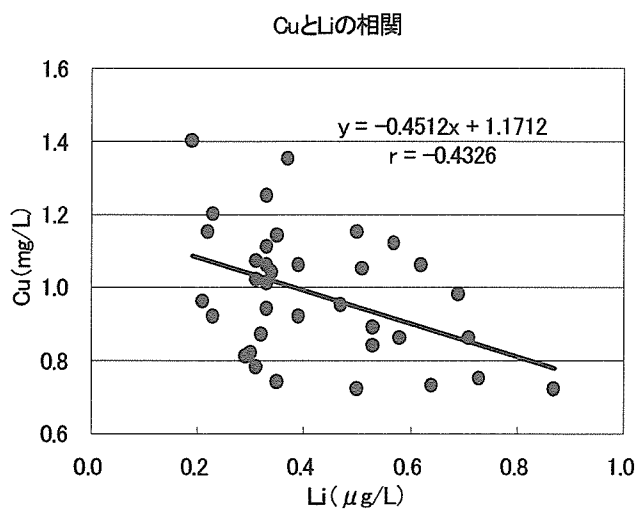
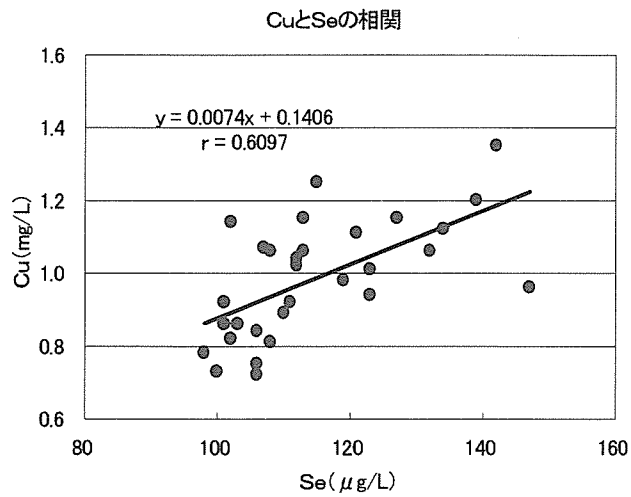


図2 元素間の相関

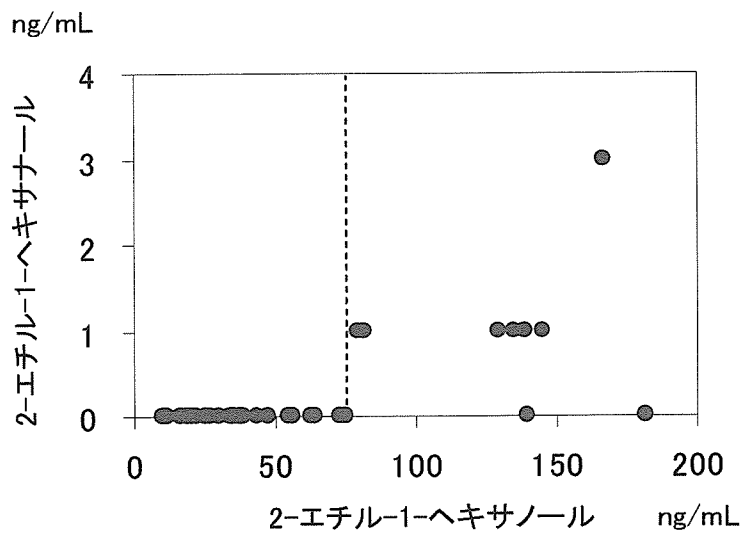


図3 血清中の2-エチル-1-ヘキサノールと2-エチル-1-ヘキサナール濃度の関係

周産期試料に関して特に脂性試料を対象とした分析

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
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

報告要旨

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。ま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。しかし、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。

A. 研究目的

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。

本研究に使用する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。

B. 研究方法

試料は、東海大学医学部附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℃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℃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-d4、BBP-d4、DEHP-d4、DiOP-d4、DiNP-d4 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℃で 2 時間加熱し、使用直前にヘキサンで洗浄した。塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200℃で 2 時間加熱した。

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

試験溶液の調製法の概要を、スキーム 1 に示し

た。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 μ L 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 μ m)

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

試料注入法 : パルスドスプリットレス

四重極温度 : 150°C

イオン源温度 : 230°C

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)

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_{16} (BPA- d_{16}) は関東化学 (株) 製の環境分析用試薬を、 13 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) 製の生化学用 (いずれも 100,000 units/mL 以上) を用いた。

精製用カートリッジ : Isololute 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 : ジーエルサイエンス (株) 製を用いた。

その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いた。

2. 装置及び測定条件

2.1. 高速液体クロマトグラフ-質量分析計 : Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。測定条件は表 1 のとおりとした。

2.2. ガスクロマトグラフ-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 x 30m x 0.25 μ m

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

注入口温度 : 250°C

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°C

イオン化電圧 : 70V

モニターイオン (m/z) : BPA (357, 372), BPA- d_{16} (368, 386), 13 C-BPA (369)

3. 検量線の作成

3.1 LC/MS 測定

安定同位体標識内部標準物質 BPA- d_{16} 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 μ L 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_{16} の面積比により検量線を作成した。

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 13 C-BPA を 100ng 添加し、BSTFA 200 μ L 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、 13 C-BPA との面積比で検量線を作成した。

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曝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。

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_{16} を 5~10 ng 加えた後 Isololute 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 μ L 加えた後、37°C 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。

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、¹³C-BPA 0.1 μ g 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 μ 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、 β -グルクロニダーゼ溶液 100 μ L と ¹³C-BPA 0.1 μ 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)

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-d₅ (NP-d₅) は、環境分析用試薬 (林純薬社製) を用いた。それぞれの構造式を図 1 に示す。

【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 μ m)

・ガードカラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2 x 5 mm, 5 μ m)

・前処理用カラム: TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 μ 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 μ l

MS 条件

・イオン化法: Electrospray (ESI), Negative

・Nebulizer gas: N₂ (35 psi)

・Drying gas: N₂ (12 l/min, 350 °C)

・フラグメンター電圧: 130 V (NP, NP-d₅)

・モニタリングイオン (m/z): 219 (NP), 224 (NP-d₅)

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 μ 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-d₅ 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 μ 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。

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。

a) 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-d16を100ng、m-OP-d5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℃で濃縮・乾固し、母乳抽出溶液を得た。

b) 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。

c) 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。

d) 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℃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℃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℃で約0.1mLまで濃縮し、GC/MS測定溶液とした。

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 μ L
カラム	: SGE社、BPX-35 25 m \times 0.2 2mm I.D. \times 0.25 μ m Film
カラム温度	: 60 $^{\circ}$ C
(1min)---10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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

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. 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。

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。

a) 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、Vortex 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。

b) 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。

c) 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、Vortex 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、Vortex 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。

C. 研究結果

サンプルの提供者の平均年齢は 31.9 才であった。各種サンプル数を図 1 に示した。

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。サンプルごとの各物質の検出頻度を図 3~6 に示す。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。また検出濃度を図 6 に示す。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 (図 8)。

D. 考察

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 は血液中に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。

E. 結論

母児の血清を中心とした水性試料においては、危険値を超える濃度は認められなかった。しかし DEHP については今後脂性試料における検討とあわせてモノ体の測定も必要と思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的所有権の取得状況

該当なし

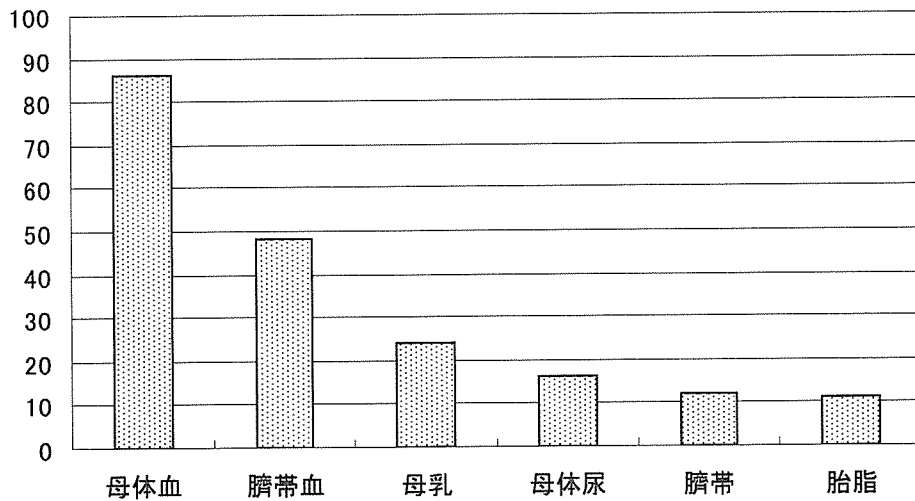
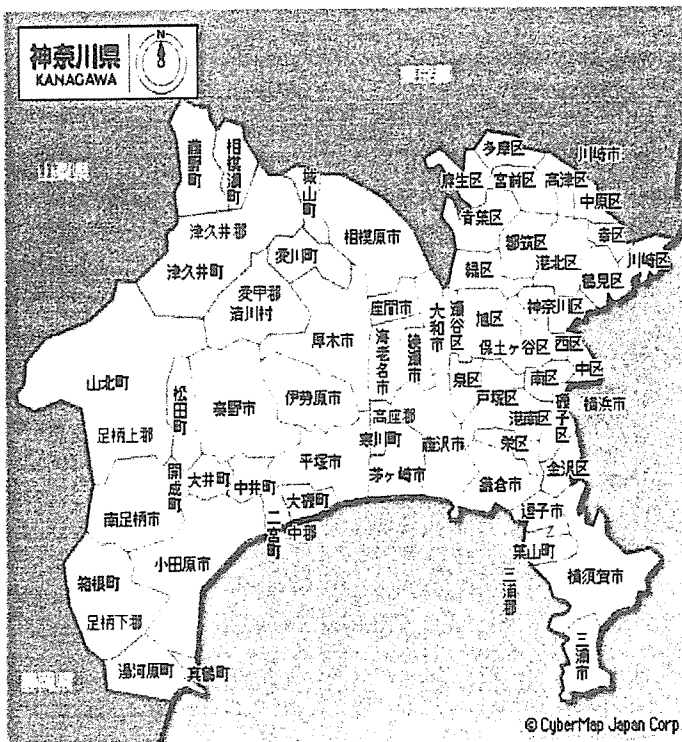


図1 周産期サンプル群



伊勢原市	20	静岡県	8
横浜市	6	東京都	4
平塚市	6	埼玉県	1
秦野市	11	富山県	1
座間市	3	宮崎県	1
小田原市	3	茨城県	1
厚木市	10		
大磯町	2		
茅ヶ崎市	3		
海老名市	1		
大和市	1		
綾瀬市	1		
相模原市	1		
横須賀市	1		
藤沢市	2		
足柄下郡	1		

図2 周産期サンプリング群・地域 (n=84)

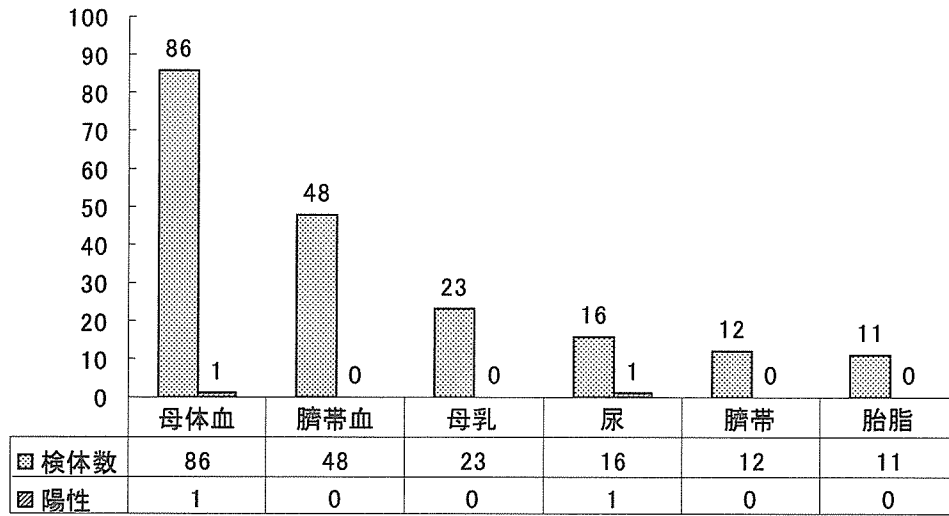


図3 検出頻度 (BA)

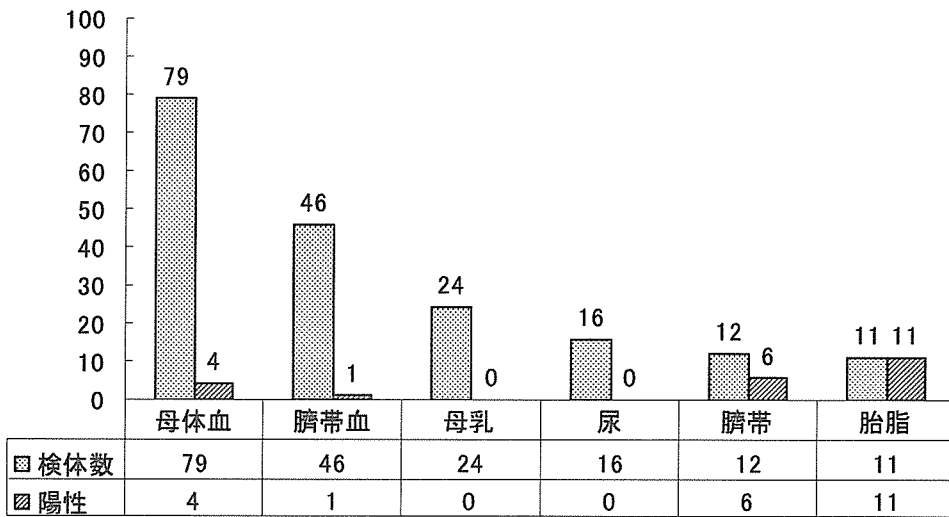


図4 検出頻度 (DEHP)

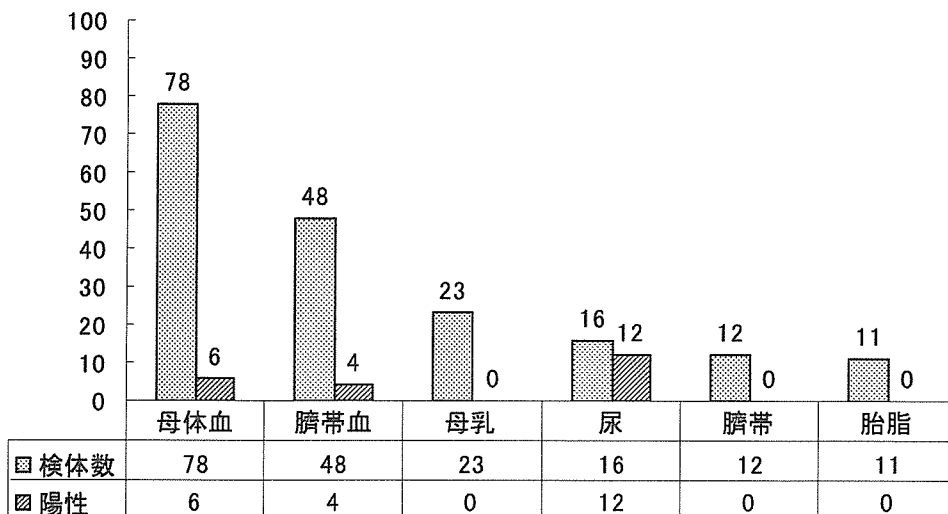


図5 検出頻度 (NP)

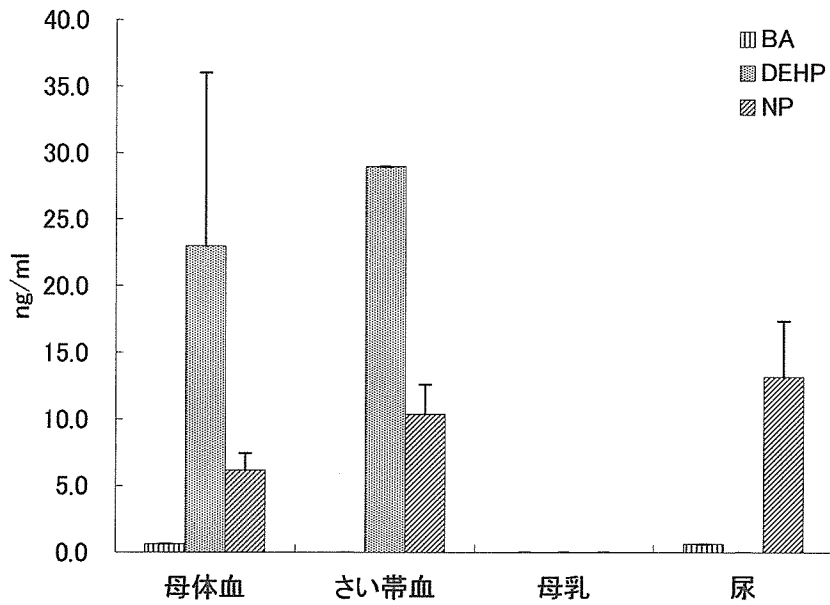


図6 検出濃度

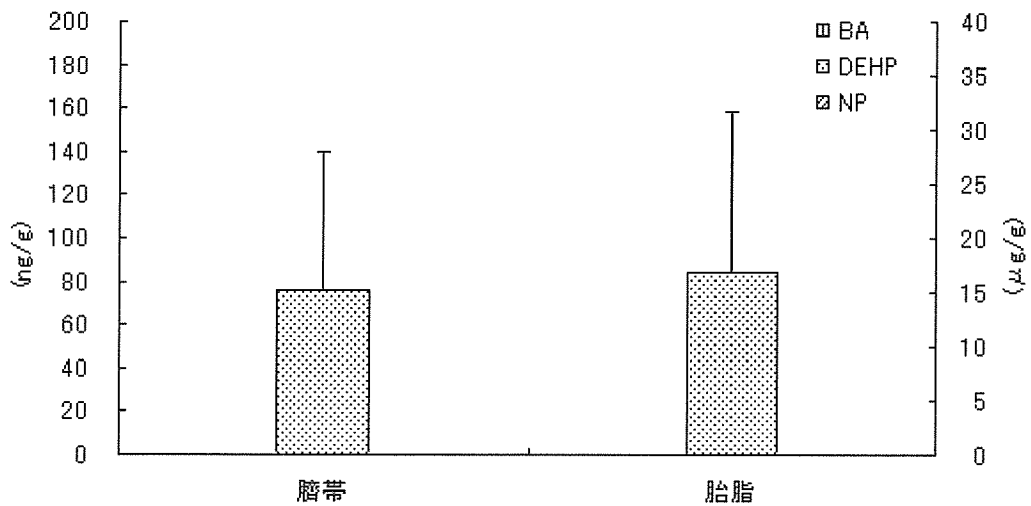


図7 検出濃度 (脂性試料において)

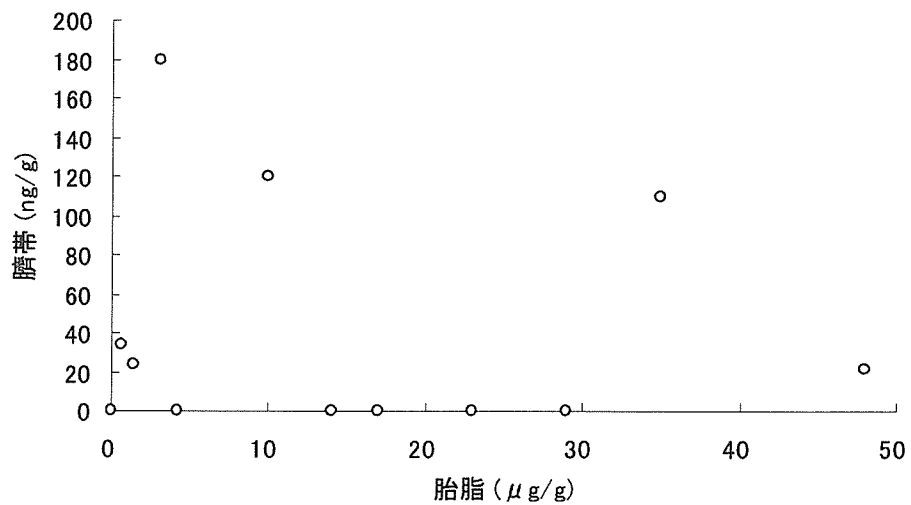


図8 胎脂と臍帯の散布図 (相関なし)

周産期の重金属曝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

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
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

研究要旨

近年、発達障害（特に中枢神経系の発達障害）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。しかしながら、重金属曝露と小児発達障害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。

A. 研究目的

重金属による環境汚染は、かつて深刻な公害病を引き起こしたため、人体への毒性や曝露源などが国内外でよく研究されており、耐用摂取量も制定されている。しかしながら、重金属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曝露の影響を評価するためには、妊娠中の母親の曝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。

B. 研究方法

B-1 重金属測定

B-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。

B-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)

B-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。

B-1.4 試料の前処理および分析溶液の調整

試料の前処理法および分析溶液の調整方法の詳細は Figure.1 に示した。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(ジュ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。

B-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: オートサンブラ使用

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:

B-1.6 検量線濃度

検量線に用いた標準品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)

B-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

B-2.1 ニューロスフェア培養

胎齢14日(E14)のC57BL6マウスE14マウス的大脑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)

B-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週間目にラミニ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%パラフォ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(β -III tubulin, glial fibrillary acidic protein)の発現を観察した。

B-2.3 重金属曝露による薬物代謝酵素の発現解析

重金属曝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。

C. 結果および考察

C-1 重金属測定

C-1.1 各サンプル中の重金属検出量

7例の母子一連試料(母体血、母体尿、母乳、臍帯血、臍帯、胎盤)から検出された重金属類の測定結果を Table.1 に示した。

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。

C-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。年齢と母親または臍帯血中の重金属量の相関性を Table.2 および Figure.2 に示した。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。

C-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曝露を評価する上で重要となる。母子間での測定値の相関性を Table.2 に、また母体血-臍帯血間の相関性を Figure.2 に示した。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： $r=0.94$)。

C-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曝露を評価する上で特に重要となる。結果を Table.2 および Figure.4, 5 に示した。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。

C-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、胎盤を測定に用い、臍帯血-臍帯および胎盤組織の相関性を検討した。結果を Table.2 および Figure.6,7 にそれぞれ示した。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。

C-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

重金属の胎児期曝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曝露の影響を検討した。

C-2.1 重金属曝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(Figure.8)。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曝露によって、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。

C-2.2 重金属曝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(Figure.9-a)。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(Figure.9-b)。このことから、発生段階での一過性の重金属曝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。

C-2.3 重金属曝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(Figure.10)。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。

D. 結論

D-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

帯血一胎盤、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。

D-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 の重金属に一旦曝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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Figure.1 試料の前処理および分析溶液の調整方法のフロー図

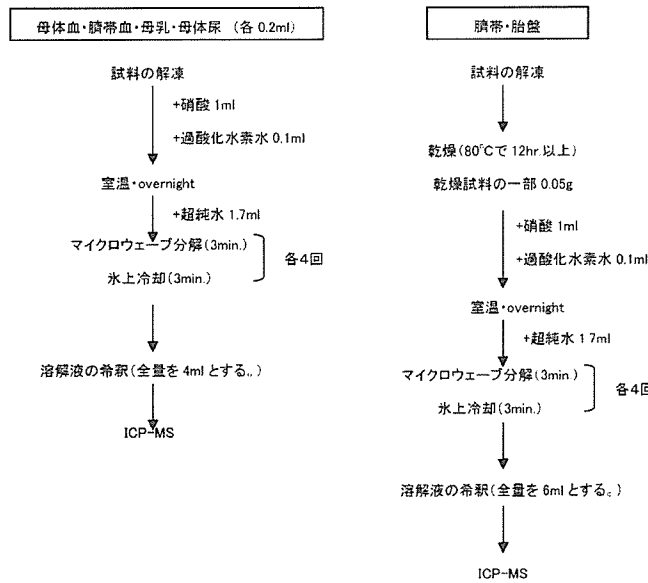


Table.1 各サンプルにおける重金属類の検出量

●Al

Sample ID	母体血(ug/L)	尿(ug/L)	母乳(ug/L)	胎盤(ug/g)	臍帯血(ug/L)	臍帯(ug/g)
1	75.6	53.7	60.3	258.0	62.4	196.0
2	61.5	48.5	49.0	277.3	37.0	228.7
3	41.0	54.5	39.5	129.3	47.0	134.0
4	53.0	53.5	50.5	208.0	48.5	178.7
5	70.0	51.6	77.2	176.0	50.4	94.7
6	91.2	54.6	50.2	237.2	57.2	89.2
7	102.0	57.0	64.8	ND	44.0	144.0
検出数	7	7	7	6	7	7
平均	70.61	53.34	55.93	214.31	49.50	152.17
中央値	70.00	53.70	50.50	222.60	48.50	144.00
標準偏差	21.23	2.68	12.45	55.01	8.37	51.87
最小	41.00	48.50	39.50	129.33	37.00	89.20
最大	102.00	57.00	77.20	277.33	62.40	228.67

●As

Sample ID	母体血(ug/L)	尿(ug/L)	母乳(ug/L)	胎盤(ug/g)	臍帯血(ug/L)	臍帯(ug/g)
1	17.2	58.8	5.4	47.9	13.0	196
2	5.6	87.3	6.7	38.0	8.7	229
3	17.9	18.5	4.1	44.7	16.3	134
4	14.1	43.3	4.4	29.9	12.3	179
5	11.7	31.0	3.2	19.7	11.7	95
6	13.7	103.8	9.2	25.4	10.5	89
7	11.6	91.6	5.6	29.4	12.7	144
検出数	7	7	7	7	7	7
平均	13.13	62.04	5.53	33.57	12.17	152.17
中央値	13.70	58.77	5.44	29.87	12.29	144.00
標準偏差	4.13	32.87	1.99	10.34	2.34	51.87
最小	5.60	18.46	3.18	19.70	8.67	89.20
最大	17.92	103.82	9.24	47.95	16.25	228.67

●Cd

Sample ID	母体血(ug/L)	尿(ug/L)	母乳(ug/L)	胎盤(ug/g)	臍帯血(ug/L)	臍帯(ug/g)
1	0.12	3.21	0.54	106.87	0.06	4.33
2	ND	ND	0.48	33.21	0.38	0.49
3	0.23	ND	0.49	34.91	0.85	1.16
4	0.42	ND	0.37	33.68	0.22	0.49
5	ND	0.09	0.40	20.23	ND	0.48
6	0.35	0.83	0.83	22.96	0.29	1.22
7	0.06	0.27	0.26	28.28	0.06	1.46
検出数	5	4	7	7	6	7
平均	0.24	1.10	0.48	40.02	0.31	1.38
中央値	0.23	0.55	0.48	33.21	0.26	1.16
標準偏差	0.15	1.44	0.18	30.00	0.29	1.36
最小	0.06	0.09	0.26	20.23	0.06	0.48
最大	0.42	3.21	0.83	106.87	0.85	4.33

●Pb

Sample ID	母体血(ug/L)	尿(ug/L)	母乳(ug/L)	胎盤(ug/g)	臍帯血(ug/L)	臍帯(ug/g)
1	0.4	0.4	1.8	13.5	0.2	4.8
2	2.5	1.8	2.2	12.0	2.4	7.7
3	1.7	1.4	2.1	9.8	2.3	5.9
4	2.3	1.8	2.4	7.2	2.3	6.4
5	0.9	0.9	3.6	13.5	0.6	4.9
6	8.3	3.2	0.9	9.1	8.8	4.1
7	3.5	2.7	1.4	14.7	1.2	11.3
検出数	7	7	7	7	7	7
平均	2.79	1.76	2.05	11.39	2.52	6.45
中央値	2.30	1.77	2.11	11.97	2.27	5.87
標準偏差	2.65	0.98	0.85	2.75	2.91	2.47
最小	0.38	0.44	0.90	7.22	0.20	4.10
最大	8.33	3.24	3.55	14.72	8.81	11.33

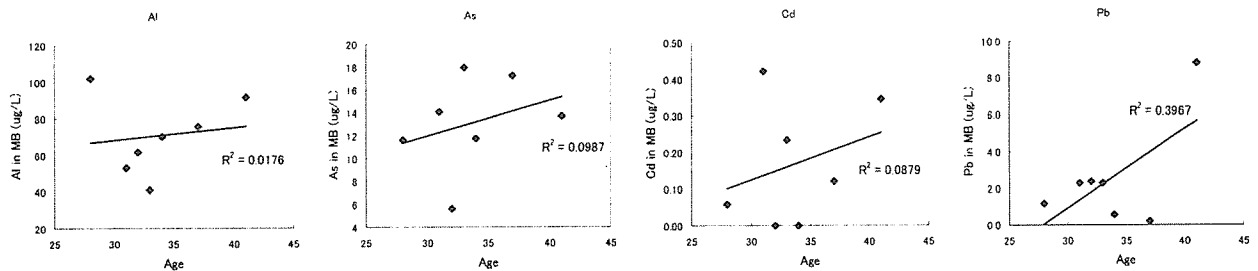
Table.2 母親年齢-重金属検出量または各組織の重金属検出量の相関性

	Maternal age and concentrations in MB	Maternal age and concentrations in UCB	Between maternal and infant tissues			Among maternal tissues		Among infant tissues		
			MB vs. PL	MB vs. UCB	MB vs. UC	MB vs. MU	MB vs. MM	UCB vs. UC	UCB vs. PL	UC vs. PL
Al	0.13	0.73	0.57	0.24	0.29	0.24	0.51	0.33	0.06	0.57
As	0.31	0.17	0.36	0.83	0.37	0.5	0.23	0.05	0.43	0.4
Cd	0.3	0.02	0.13	0.3	0.08	0.04	0.38	0.25	0.26	0.95
Pb	0.46	0.63	0.51	0.94	0.06	0.9	0.69	0.34	0.54	0.13

Abbreviations: MB: Maternal blood, UCB: Umbilical cord blood, PL: Placenta, UC: Umbilical cord, MU: Maternal urine, MM: Maternal milk

Figure.2 母親年齢と母体血および臍帯血中重金属の相関性

a) 母親年齢と母体血(Maternal blood:MB) 重金属の相関



b) 母親年齢と臍帯血(Umbilical cord blood:UCB) 重金属の相関

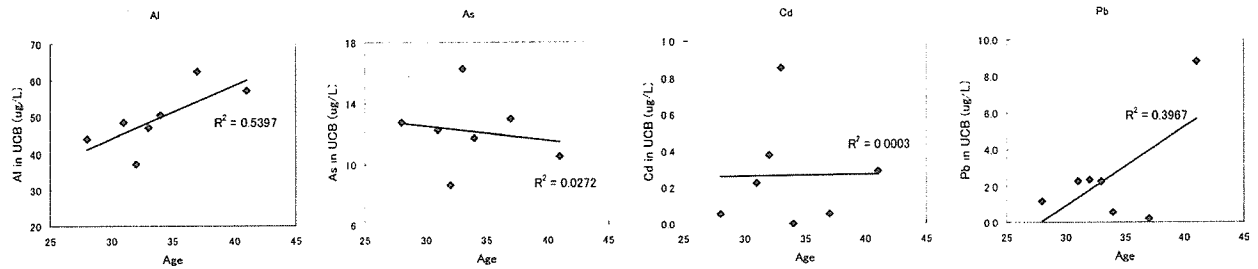


Figure.3 母体血(MB)と臍帯血(Umbilical cord blood: UCB)中重金属の相関性

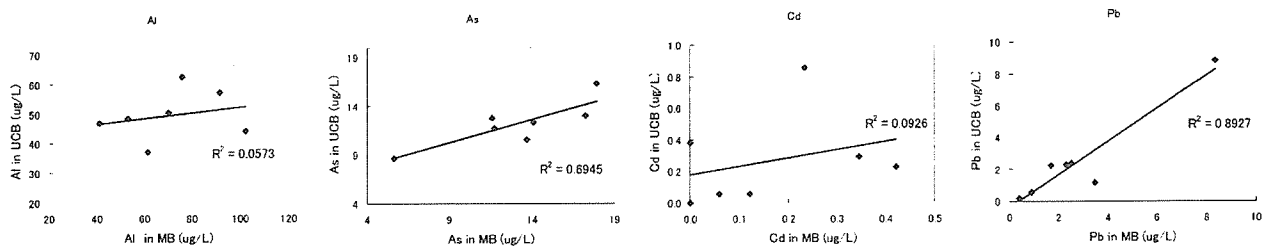


Figure.4 母体血(MB)と母体尿(Maternal urine: MU)中重金属の相関性

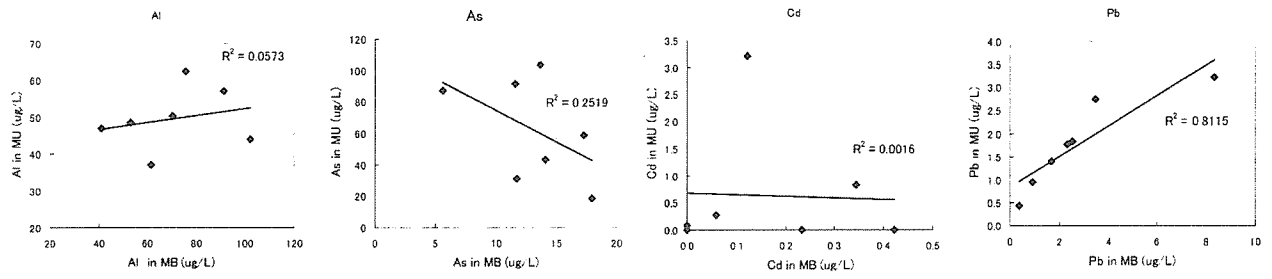


Figure.5 母体血(MB)と母乳(Maternal milk: MM)中重金属の相関性

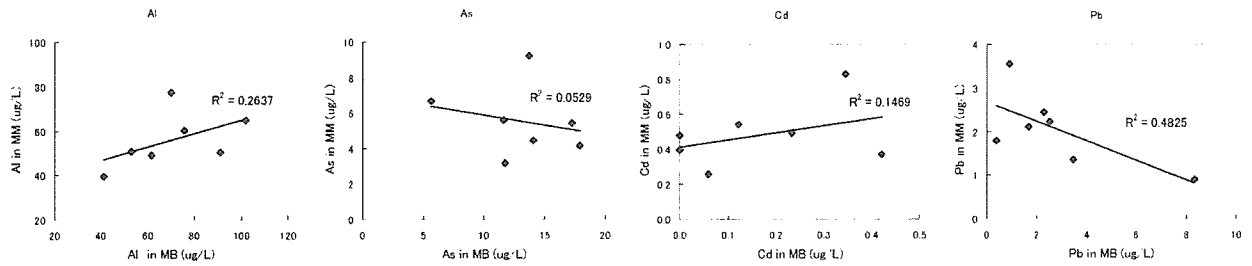
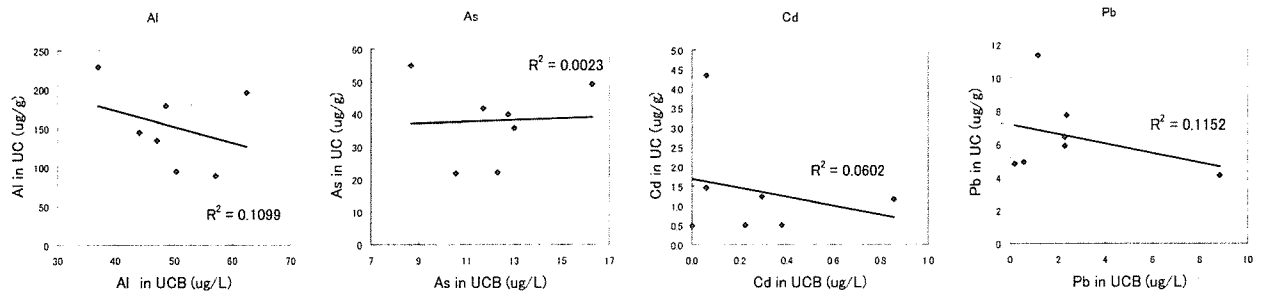


Figure.6 臍帯血(UCB)と臍帯(Umbilical cord:UC)および胎盤(Placenta:PL)中重金属

a) 臍帯血と臍帯中重金属の相関



b) 臍帯血と胎盤中重金属の相関

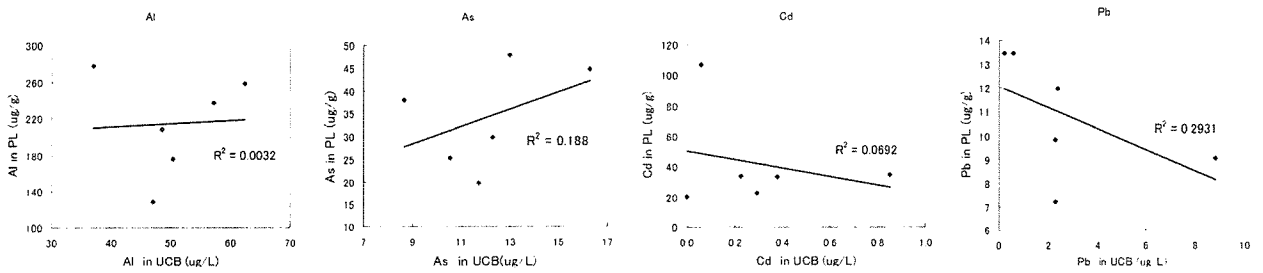


Figure.7 臍帯(UC)と胎盤(PL)中重金属の相関性

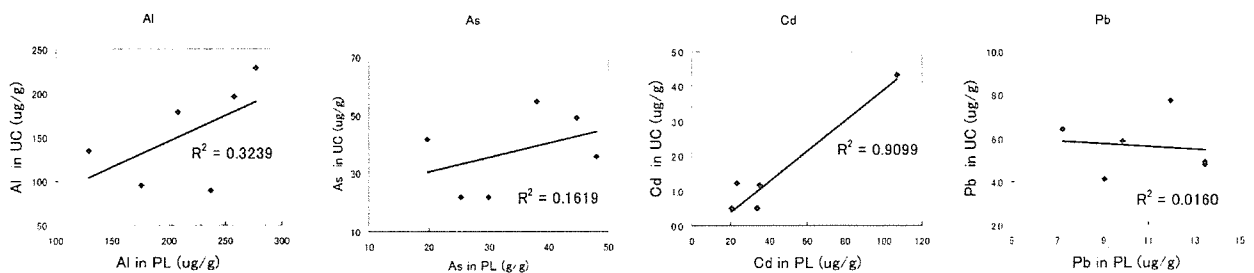


Figure 8 重金属が神経幹細胞の増殖に与える影響

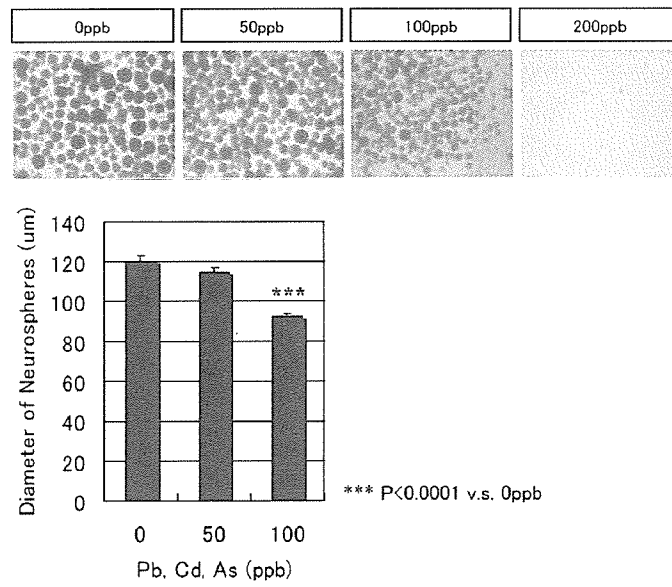


Figure 9 重金属が神経幹細胞の分化に与える影響

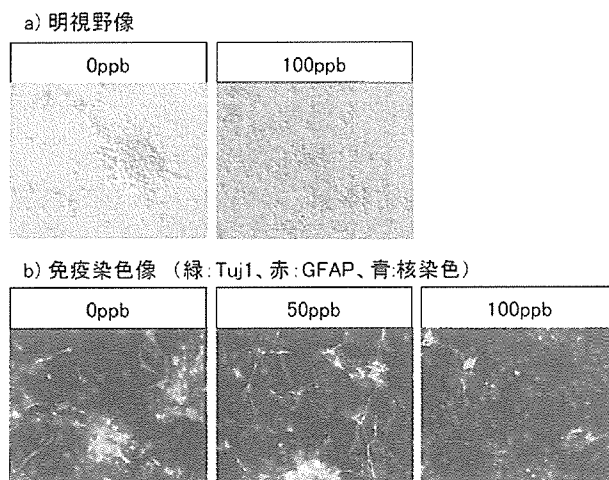


Figure 10 重金属曝露による神経幹細胞の薬物代謝酵素発現

