

## 2) フタル酸モノエステル類

患者 29 人より採取した尿の分析を行った。その結果、測定対象 5 物質 (MBP、MEP、MEHP、MINP、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 35.2 $\mu$ g/g、検出濃度範囲は 14.9~100 $\mu$ g/g、であった。MEP の中央値は 16.4 $\mu$ g/g、検出濃度範囲は 3.45~230 $\mu$ g/g であった。MBzP 及び MEHP の検出率はそれぞれ 59%、14% で、中央値はそれぞれ 9.66 $\mu$ g/g、<LOQ (定量下限値未満) であった。なお、MINP については、一部の検体で夾雑物と考えられる妨害ピークが認められたため、分析対象から除外した。

本研究 (昨年度実施した職員の結果を含む) と米国居住者について行った。MBP では本研究の方が 1.6~2.7 倍高く、MEP では逆に米国居住者の方が 8.6~10.3 倍高い値を示した。両調査でのフタル酸モノエステル濃度の差は、日本と米国でのフタル酸エステル類の使用実態の違いが要因の 1 つと考えられた。

すべての検体から検出された MBP と MEP について、その濃度からフタル酸エステル類の推定一日摂取量を算出した。その結果、フタル酸ジブチル (DBP) は 1.08 $\mu$ g/kg/day (中央値)、フタル酸ジエチルは 0.46 $\mu$ g/kg/day (中央値) と、厚生労働省や欧州連合 (EU) が示した許容一日摂取量 (TDI) と比べて低い値であった。

フタル酸エステル類は、プラスチックの重要な要素として多くの消費者製品中に見られる。例えば、化粧品とパーソナル・ケア用品中に含まれる主なフタル酸エステル類は、マニキュア中のフタル酸ジブチル、香水中のフタル酸ジエチル、そしてヘアスプレー中のフタル酸ジメチルである。これらが含まれていることをラベルが表示していないことが多い。また、MEHP 及び MBP は、動物実験で精巣毒性を有することが明らかにされている。今回、MBP と MEP がすべての患者の尿中から検出されたことから、患者が日常的にフタル酸ジブチル、フタル酸ジエチルを始めとするフタル酸エステル類に暴露されていることが考えられた。従って、フタル酸エステルに対する暴露状況の把握は、今後も継続的に行っていく必要があると考えられた。

## 3) 揮発性有機化合物

昨年度、患者 38 人の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-ヘキサノール、1,4-ジクロロベンゼン) の分析を行った結果、2-エチル-1-ヘキサノールと 1,4-ジクロロベンゼンがすべての検体から検出された。両物質の濃度について、子宮内膜症有症群 (n=19) と子宮内膜症を認めない対照群 (n=19) で比較を行った。

その結果、2-エチル-1-ヘキサノール (有症群 vs 対照群 = 57.3 $\pm$ 51.8 vs 59.2 $\pm$ 45.9 ng/mL、p=0.751)、1,4-ジクロロベンゼン (有症群 vs 対照群 = 3.7 $\pm$ 2.7 vs 7.6 $\pm$ 12.1 ng/mL、p=0.525) とともに有意差は認められなかった。

## 6. 周産期試料および生殖婦人の生体試料を対象とした分析

周産期サンプルを I 群、生殖婦人サンプルを II 群として、それぞれの提供者の住居地分布を検討した。サンプル提供者の平均年齢は 31.9 才であった。

I 群の周産期サンプルについて、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 79 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 50 例中 1 例 (2.1%)、また NP は母体血で 79 例中 6 例 (7.7%)、臍帯血で 50 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。また検出濃度については、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。しかしその新生児での臍帯での濃度は 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。再現性の検定のために、他の測定機関にて同一の胎脂を再度測定したが、やはり高濃度で検出され、2 つの期間での結果は有意に相関していた。この検討から生殖婦人の体内脂肪においても高濃度に蓄積されていることが危惧された。そこで、同意を得たうえで手術時に提供いただいた皮下脂肪で DEHP を測定したところ高濃度に検出されたが、このサンプルは操作中における紺民への配慮が不十分であったことが判明し、次年度に同意を得た上で手術時に提供いただいた皮下脂肪で再度 DEHP を測定したところ、感度以下で全く検出されなかった。

II 群の生殖婦人サンプルは、生殖婦人が妊娠準備時期と考えられるため、胎児暴露を検討する資料として、生殖年齢の婦人への暴露を検討することが必須であると考えられる。そのために、生殖年齢の婦人から腹水を含む生体試料を採取した。各サンプルについて、前述の方法で 3 物質を測定した。それぞれ 0.5ng/ml がカットオフ値であった。血清および腹水のサンプル数は、おのおの 127 と 107 であった。血清中においては、BA は 127 例中 2 例 (1.5%)、NP は 127 例中 34 例 (26.8%)、DEHP は 126 例中 14 例 (11.1%) でそれぞれ検出された。腹水中では BA が 97 例中 1 例 (1.0%)、NP は 101 例中 10 例 (9.9%)、DEHP は 99 例

中 25 例 (25.3%) で、それぞれ検出された。DEHP が血清および腹水中で最も高い濃度で検出された。年齢別検出率と濃度については、血清では NP で年齢差がないが、DEHP では 30 代後半に高値を示した。一方腹水では、NP で若年層ほど高値を示し、DEHP で年齢差を認めなかった。さらに合併症を検討した。合併症別の検出率、濃度では、明らかな差異は認めなかったが、さらに子宮内膜症での検討を試みた。しかし、子宮内膜症進行期別の検出率、濃度でも明らかな差異は認められなかった。一方、季節変動の検討では、血清中の NP が冬に、腹水中の DEHP が春に高値を示した。

検討した 3 物質とも母乳からの検出はなく、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はないが、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、体内の脂肪組織など他の検体における濃度についても検討が必要と考えられ、生殖婦人の体内脂肪においても DEHP を検討したが最終結論は未検出で問題は見出せなかった。

## 7. 周産期における重金属暴露量測定と神経系初期発生における重金属の *in vitro* 毒性評価

### 1) 重金属測定

母子一連の周産期サンプル (母親血清・尿・母乳・臍帯血清・臍帯組織・胎盤) 中のアルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛濃度の測定法開発を行ってきた。今期、標準試料の測定において正しい結果の得られなかった母乳中ヒ素を測定項目から除外し、計 30 例のサンプル分析を行った。アルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛ともに全てのサンプルから検出された。

環境中の有害物質であるダイオキシンは年齢とともに血中レベルが上昇するという報告がある。そこで、母親および臍帯血清中の重金属量と母親年齢との相関性を調べた。今回用いたサンプル提供者の年齢は 20 歳から 41 歳までで、平均年齢は 30 歳であった。年齢と母親または臍帯血清中の重金属量の相関性については、いずれの元

素の測定値においても高い相関性は見られなかった。

母子サンプル間での相関性は、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。今回測定した母親血清と臍帯血清では、アルミニウム、ヒ素、鉛で弱い相関性がみとめられた (アルミニウム:  $r=0.35$ , ヒ素:  $r=0.26$ , 鉛:  $r=0.33$ )。

母乳からもアルミニウム、カドミウム、鉛が検出されたことから、母乳摂取量および母乳中の重金属含有量を推定し、JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive の制定する耐用週間摂取量に対する割合を求めた。母乳摂取量は乳児の体重 1kg あたり 150ml として算出した。ほとんど全てのサンプルで耐用週間摂取量の 10% 以下という結果が得られた。各元素の耐用週間摂取量に対する割合の平均値は、アルミニウム: 2%、カドミウム: 2.7%、鉛: 4.2% であった。

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-胎盤中のヒ素、臍帯血-臍帯中のカドミウムで弱い相関性がみとめられた (臍帯血-胎盤ヒ素:  $r=0.39$ , 臍帯血-臍帯カドミウム:  $r=0.21$ )。

### 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系の開発をおこなった。確立された評価法を用いて、実サンプル測定によって得られた臍帯血清濃度 (平均値および最高値) の重金属毒性を評価した。

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した。ニューロスフェア培地に臍帯血清濃度の重金属を添加した場合、平均値、最高値いずれのレベルでもコントロールと同様のニューロスフェアを形成した。一方、200ppb の重金属をした際、ニューロスフェアの直径が有意に減少した ( $p<0.001$ )。このことから、臍帯血清レベルの重金属曝露では神経幹細胞の増殖阻害は起こらないことが示唆された。

リアルタイム RT-PCR によって神経幹細胞の未分化マーカー遺伝子の発現量を定量した。その結果、有害濃度の重金属存在下では Nestin, Sox2, Notch1 の有意な発現増加または減少がみとめられたものの、臍帯血清レベルの重金属曝露によ

て遺伝子発現量の変化は認められなかった。

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、コントロールの神経幹細胞は、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。しかしながら有害濃度の重金属を添加した際、細胞は培養皿に接着するものの成熟したニューロンは出現しなかった。一方、臍帯血清レベルでの重金属存在下では、コントロールと同様に・III-tubulin 陽性の神経細胞が軸索突起をのびしている像がみとめられた。このことから、臍帯血清レベルの重金属曝露では神経幹細胞の分化阻害は起こらないことが示唆された。

### 3) 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・胎盤を用いて、アルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛濃度を測定した。全てのサンプルから4元素が検出された。いずれの元素も母親年齢と血清中重金属レベル間に相関性は見られなかった。このことから、年齢との相関性が報告されているダイオキシン類とは異なり、重金属では年齢による体内への蓄積はおこっていないことが示唆された。母体血清および臍帯血清の測定において、いずれのサンプルにおいても高レベルの値は検出されず、母子間の相関性もほとんど見られなかった。すなわち、母体から胎児への移行を示唆する例は今回の測定でみとめられなかった。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曝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。しかしながら、各サンプル間で高い相関性はみとめられなかったことから、低レベルでの検出量では臍帯、胎盤で周産期曝露量をモニターすることは困難であると考えられる。母乳中での検出値から乳児の摂取する重金属量を推定し、耐用週間摂取量と比較したところほとんどの推定値が10%以下であることから、母乳から摂取される重金属量は低レベルであることが示唆された。

### 4) 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。この培養系に臍帯血清レベルおよび高濃度(200ppb)のアルミニウム、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 の重金属存在下では神経幹細胞の増殖阻害、未分化マーカー遺伝子の変化、および成熟ニューロンへの分化阻害がみとめられた。一方、臍帯血清レベルでは変化はみとめられなかったことから、臍帯血清レベルの重金属は、神経幹細胞の成長に対して重大な毒性を持たないことが示唆された。

## 8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

### 1) ES 細胞を用いたヘテロクロマチン形成への化学物質の影響の解析

解析を行った 25 種類の化学物質の中で、DEP、コチニン、水銀で ES 細胞の核内ヘテロクロマチン数が減少すること、逆にセレン、S-421 ではヘテロクロマチン数が増加することが示唆された。さらに、セントロメア配列をプローブとした FISH 法による解析からは、DEP でセントロメア以外のヘテロクロマチン領域が弛緩すること、および S-421 でセントロメアヘテロクロマチン領域が増大することも示唆された。次に短期的な曝露の影響が化学物質を除去した後も残存する可能性を検討するために、影響の見られた 5 種類について血中濃度で 48 時間曝露後、化学物質を除いた状態でさらに 48 時間培養した。その結果、5 種類のうちコチニン、水銀、セレン、S-421 では化学物質を除くことでヘテロクロマチンの状態が対照と同程度まで回復したのに対し、DEP では化学物質を除いた後もヘテロクロマチンの異常な状態が持続することが示された。そこでこれまでにヘテロクロマチン異常を引き起こすことが示された化学物質が胎子の発生に伴う細胞分化に影響を与えるかどうか検討するために、化学物質に曝露した状態の ES 細胞を分化誘導することで胚様体を形成させた。その結果、DEP、水銀、S-421 では、胚様体の大きさが対照群と比較して有為な差があり、細胞分化にも影響を与える可能性が示唆された。この実験では、コチニン、セレンでは胚様体形成への影響は見られなかった。

### 2) DEP についての D-REAM 法を用いたゲノムワイドな遺伝子領域のメチル化解析

これまでの研究からエピジェネティクスへの影響が最も大きいと考えられる DEP 曝露した細胞と溶媒のみを添加した細胞の DNA メチル化状態を D-REAM 法により比較した。その結果、232 遺伝子が DEP 曝露により対照と比べて有為に低メチル化であり、逆に 203 遺伝子が有為に高メチル化であることが示唆された。これらのメチル化異常が認められた遺伝子の中には、ガン関連遺伝子やエピジェネティクス関連遺伝子も含まれていた。

これまでに本研究班では様々な化学物質が妊

妊娠母体中に存在していることを同定し、それらの血中濃度を決定してきた。そこで、これらの濃度の化学物質が胎児の発生過程にも影響を与え得るかを明らかにする事が必要になってきた。我々は、以前に不妊治療用卵の凍結保護剤として使用されていた経緯のある DMSO が、発生初期の胎仔のモデルである ES 細胞で DNA メチル化を始めとしたエピジェネティクスに影響を与えることを示した。そこで、これまでに同定してきた化学物質を ES 細胞に血中濃度と同じ濃度で暴露し、ヘテロクロマチン形成を指標として検討した結果、一部にヘテロクロマチン形成の異常をきたす化学物質が同定された。本研究から、ヘテロクロマチン形成を指標としてエピジェネティック異常を引き起こす可能性のある化学物質を簡便にスクリーニングする系を確立することができた。今後は、エピジェネティック異常を引き起こす可能性のある化学物質について、暴露後の ES 細胞の分化能を検討するとともに、本研究で開発した D-REAM 法を用いて解析することで、これらの化学物質についてのより詳細なエピジェネティック異常誘導機構を明らかに出来ると考えられる。

## 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

1) 昨年度に引き続き、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検討した(検出下限値, DMP を除き 1ng/mL)。本法を用いて母体血 20 検体及び健康成人尿 12 検体中の有機リン系農薬曝露量を測定した。母体血中の有機リン系農薬代謝物濃度は、いずれも操作ブランクレベル (1 ng/mL) であった。一方、尿中からは DEP を中心にトータルで 59ng/mL の有機リン系農薬代謝物が検出された。

2) 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、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。本法を用いて母体血 10 検体及び健康成人尿 12 検体を分析した結果、母体血中の 3-PBA, TCP 濃度はいずれも検出限界値以下であった。一方、健康成人尿からは極微量の 3-PBA (ND~0.3ng/mL) が検出された。

### 2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の分析および周産期生体試料におけるニコチンおよびコチニンの分析

#### 1) 有機フッ素系化合物の測定

PFCs の子どもへの暴露源として、母乳に着目し、LC-MS/MS を用いた高感度分析法を構築した。その結果、全ての検体から PFOS が検出され、検出範囲は 0.046~0.098 ng/ml であった。ヒト母乳から検出された PFCs は前年度までに測定したハウスダストと比較するとごく微量であったが、母乳は乳児が経口的に摂取するものであることから、母乳栄養を介した乳児の PFCs 暴露評価が求められる。

#### 2) ニコチン及びコチニンの分析

また、喫煙に起因するニコチンの暴露評価を目的として、ヒト尿中ニコチン及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、コチニン共に 0.5 ng/ml となり、平均回収率はニコチン、コチニン共に 95% 以上と高感度かつ高精度な分析法を構築した。本法を妊婦尿の分析に適用したところ、コチニンが検出される検体が数例あったものの、検出例数が少なく、血清中の濃度との相関性を検討するには至らなかった。

以上のことから、子どもが母体や生活環境を通じて、種々の化学物質に暴露されていることが明らかとなった。これらの曝露量を定量的に解析することで、疾病等との因果関係を追及するための一助になると考える。

### 3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析

ハウスダストの非意図的摂取による乳幼児の PBDEs 曝露量試算値 (ペンタ BDE: 0.4 ng/kg/日, オクタ BDE: 0.2 ng/kg/日, デカ BDE: 15 ng/kg/日) は、各原体の RfD より十分に低く、直ちに健康影響が危惧されるレベルではなかった。

### 4. フタル酸エステル類の子どもへの曝露評価

1) 妊婦 (n = 51), 及び対照群として健康な 20 及び 30 歳代の一般人 (n = 12) の尿中のフタル酸モノエステル類 (MEP, MBP, MBzP, MEHP, MEHHP 及び MiNP) を分析し、全て検体から、MiNP を除く、測定対象のフタル酸モノエステル類を検出した。

2) 分析値から DBP 及び DEHP の推定一日曝露量を算出した結果、耐容一日摂取量 (DBP, 66; DEHP, 37 µg/kg/day) を越える事例は認められず、直ちに健康影響が危惧される曝露レベルではないと思われる。

## 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) 患者 84 人(昨年度分析を行った 36 人分を含む)の血清中の重金属類濃度は、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。子宮内膜症有症群(n=36)と子宮内膜症を認めない対照群(n=48)で比較した結果、Cu と Se において有症群が対照群より有意に低い(p<0.01)値であった。有症群の Cu、Se 濃度を進行期分類(r-ASRM 分類)による段階別で比較した結果、有意差や一定の傾向は認められなかった。

2) 患者 29 人の尿中のフタル酸モノエステル類(MBP、MEP、MEHP、MBzP)の分析を行った結果、MBP と MEP がすべての検体から検出され、中央値(クレアチニン補正值)はそれぞれ 35.2µg/g、16.4µg/g であった。両物質の濃度は、米国居住者について行われた結果と比べて、MBP では 1.6 倍高く、MEP では逆に米国居住者の方が 8.6 倍高い値を示した。また、両物質の尿中濃度から算出した DBP 及び DEP の推定一日摂取量は、それぞれ 1.08、0.46µg/kg/day(中央値)と、厚生労働省や欧州連合が示した許容一日摂取量と比べて低い値であった。

3) 患者 38 人の血清の揮発性有機化合物の分析を行った結果、すべての検体から 2-エチル-1-ヘキサノールと 1,4-ジクロロベンゼンが検出された(昨年度実施)。両物質の濃度について、子宮内膜症有症群(n=19)と子宮内膜症を認めない対照群(n=19)で比較した結果、いずれも有意な差は認められなかった。

## 6. 周産期試料および生殖婦人の生体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、さい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。しかし、いずれも危険値を超えるほどの濃度には至っていない。またサンプルの提供者の居住地区および疾患と、検出濃度の間には有意な差は認められなかった。化学物質の暴露は提供者の食事、喫煙、飲酒等をふくむ生活習慣によって大きく左右されることが予想される。しかし現時点での検出例数(率)は少なく、今後さらに、モニタリングを続ける必要性も含めて検討が必要であろう。

また、以上の 3 測定物質以外の化学物質について

も、我々の共同研究班は検討していたため、これら共同研究班の結果を集め、一括して生殖婦人・母児の暴露評価の参考のために測定結果一覧表を作成した。

## 7. 周産期における重金属暴露量測定と神経系初期発生における重金属の in vitro 毒性評価

ICP-MS を用いて血清、尿、母乳、臍帯、胎盤中のアルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛の測定方法を検討した。測定精度の保証が得られなかった母乳中ヒ素を除く全サンプルおよび全元素での測定法を確立した。この測定方法により、30 例の母子一連周産期生体サンプルを測定し回帰分析をおこなった。いずれの元素も全てのサンプルから検出されたが、既報値と比較して特に高い値は検出されなかった。母親年齢と血清中の重金属濃度に相関性はみとめられなかった。母体血清\_臍帯血清レベルにおいても高い相関性はみとめられなかった。胎児由来組織間においても高い相関性はみとめられなかった。母乳中での検出値から乳児の摂取する重金属量を推定し、耐用週間摂取量と比較したところほとんどの推定値が 10% 以下であった。以上の結果より、今回測定した母子の生体試料においては重篤な重金属曝露の症例はみとめられなかった。

また、神経幹細胞の選択的培養法である「ニューロスフェア法」を用いて、in vitro での毒性評価方法の確立を試みた。この培養方法を用いて、重金属曝露による神経幹細胞の増殖能、未分化維持能、および分化能に与える影響を評価することが可能であった。そこで、実サンプル測定で得られた臍帯血清レベル重金属の毒性を評価したところ、増殖、未分化維持能、分化能に対する毒性はみとめられなかった。

## 8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

本研究では、従来の毒性学試験等と異なりヒト血中濃度程度の低濃度の化学物質(DEP、コチニン、水銀、セレン、S-421)が、初期発生胚のモデルと考えられる ES 細胞において、DNA メチル化状態の変化やヘテロクロマチン形成といったエピジェネティックな現象に影響を与え得ることを明らかにした。これにより、身近に存在している化学物質が、母体血中に存在するレベルの濃度で、胎児の発生にも影響を与える可能性が示唆された。今後は、本研究で開発したゲノムワイドな DNA メチル化解析法などにより、化学物質によって DNA メチル化変化を受けやすい遺伝子およびエピジェネティック因子を同定してゆく事が必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 - LC/MS/MS を用いたヒト血漿中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発, *分析化学*, 54, 877-884 (2005)
  - 2) Nakata, H., Nakata, A., Kawaguchi, M., Iwasaki, Y., Ito, R., Saito, K. and Nakazawa, H.: Development of analytical method of perfluorochemicals in human plasma and blood by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase extraction using a column-switching technique. *Organohalogen Compounds*, 67, 219-221 (2005).
  - 3) 勝又常信, 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之, 超臨界流体抽出-高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の定量, *分析化学*, 55, 955-962 (2006)
  - 4) 岡野圭太, 日の原聖仁志, 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/質量分析法によるタバコ煙暴露評価のためのヒト血清中ニコチン及びコチニンの定量, *分析化学*, 56, 785-790 (2007)
  - 5) Akutsu, K., Takatori, S., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Izumi, S., and Makino, T. Dietary intake estimations of polybrominated diphenyl ethers based on a total diet study in Osaka, Japan. *Food Addit. Contam., in press.*
  - 6) Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., and Iwamoto, T. Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality, *Bull. Environ. Contam. Toxicol., in press.*
  - 7) TAKATORI, S., OKAMOTO, Y., KITAGAWA, Y., HORI, S., IZUMI, S., MAKINO, T. AND NAKAZAWA, H.: Simulated neonatal exposure to DEHP and MEHP from PVC enteral nutrition products. *Int. J. Pharm.*, 352, 139-145 (2008)
  - 8) TAKATORI, S., AKUTSU, K., KONDO, F., IZUMI, S., MAKINO, T. AND NAKAZAWA, H.: Determination of phthalate monoesters in human breast milk by using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer. *Bunseki Kagaku*, 56, 1025-1031 (2007)
- ### 2. 学会発表
- 1) 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
  - 2) 中田彩子, 仲田尚生, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 西條泰明, 佐田文宏, 岸 玲子, 中澤裕之 「カラムスイッチング - LC/MS/MSによるヒト母体血中の有機フッ素系化合物の測定」 第126年会 日本薬学会 (2006) 仙台.
  - 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パーフルオロ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) 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 「HILIC/MS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.
  - 5) 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.
  - 6) 中田彩子, 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を用いた牛乳および母乳中に残留する有機フッ素系化合物の分析」 第93回食品衛生学会 学術講演会 (2007) 東京.
  - 7) 中田彩子, 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を用いたヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の分析」 第68回分析討論会 (2007) 栃木.
  - 8) Nakata A., Katsumata T., Iwasaki Y., Ito R., Saito K. Izumi S., Makino T., Kishi R., Nakazawa H. 「MEASUREMENT OF PERFLUORINATED COMPOUNDS IN HUMAN MILK AND HOUSE DUST」 27th International Symposium on alogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)-Dioxin 2007 (2007)
  - 9) 岡野圭太, 日の原聖仁志, 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「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。

- 10) Akutsu, K., Takatori, S., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Izumi, S., and Makino, T. Dietary intake estimations of polybrominated diphenyl ethers based on a total diet study in Osaka, Japan. *Organohalogen Compounds: Proceeding of the 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2007)*, 69, 2303–2306, September 2–7, 2007, Tokyo, Japan.
- 11) Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., and Iwamoto, T. Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality. *Organohalogen Compounds: Proceeding of the 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2007)*, 69, 1926–1929, September 2–7, 2007, Tokyo, Japan.
- 12) 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「母体及び臍帯血清中のフタル酸モノエステル類の分析」環境ホルモン学会第10回研究発表会 2007年12月10-11日 東京
- 13) 林留美子、近藤文雄、中澤裕之、和泉俊一郎、牧野恒久；子宮内膜症患者の血清中多元素濃度レベル；環境ホルモン学会第10回研究発表会 (2007)
- 14) Fujita Y, Urano H, Izumi S, Uchida N, Goya K, Makino T. Assessment of prenatal exposure to neurotoxic metals (Aluminium, Arsenic, Cadmium and Lead) and up-regulation of dioxin-inducible gene, *cyp1a1*, in the neural stem cell culture. : DIOXIN meeting (2007)
- 15) Hui Wen Lim, Misa Iwatani, Naoko Hattori, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro Yagi and Kunio Shiota. Distinctive demethylating effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on gene coding regions and non-coding repetitive elements in NIH/3T3 cells. 第1回日本エピジェネティクス研究会年会 (2007年6月)

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録       なし
3. その他             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（東海大学医学部教授）  
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）  
小林晴美（埼玉県衛生研究所）  
月岡 忠（長野県環境保全研究所）

研究要旨

ピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬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。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。本法を用いて母体血20検体及び健康成人尿12検体中の有機リン系農薬曝露量を測定した。母体血中の有機リン系農薬代謝物濃度は、いずれも操作ブランクレベル（1 ng/mL）であったが、尿中からはDEPを中心に最高でトータル59ng/mL検出された。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及び健康成人尿、計22検体中の3-PBA、TCP濃度を測定した結果、約4割の尿検体から3-PBAが0.2-0.3ng/mLレベルで検出された。

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暴露が危惧されている種々の合成化学物質の中から、殺虫剤などに多用されているピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬（図1）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及び母体血中の暴露状況を把握し、これらの化学物質暴露による胎児、乳児に及ぼす影響を検証する基礎資料とすることを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 試料

母体血は東海大学病院から提供されたものを用いた。母体血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。

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社製を用いた。標準溶液は、各標準品20mgを精秤し、メタノール50mL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, Sulstatase ; 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5mL、水5mL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1のとおりとした。

#### 3.2 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2のとおりとした。

### 4. 検量線の作成

#### 4.1 尿及び血清中の有機リン系農薬代謝物の分析

有機リン系農薬代謝物であるDMP,

DET, DMTP, DETP, DMDTP 及び DEDTP の各濃度が 1, 2, 5, 10 及び 100ng/mL となる混合標準溶液を調製し, その 10 $\mu$ L を LC/MS/MS に注入した. 得られた MRM(Multiple Reaction Monitoring)クロマトグラムよりピーク面積を求め, 絶対検量線により検量線を作成した.

#### 4.2 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 100ng/mL の溶液を調製し, その 5 $\mu$ L を LC/MS/MS に注入した. 検出には MRM 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.

### 5. 試験溶液の調製

#### 5.1 尿及び血清中の有機リン系農薬代謝物測定用試験溶液の調製

尿 5mL, 血清 2mL を 50mL 用ポリプロピレン製チューブに採取し, 飽和食塩水 2mL, 食塩 4g 及び 6mol/L 塩酸 2mL を加えて後, 酢酸エチル・アセトニトリル(7:3) 10mL を加え, 5 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, 酢酸エチル・アセトニトリル層を 5mL 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).

#### 5.2 尿及び血清中の 3-PBA 及び TCP 試験溶液の調製

##### 5.2.1 遊離体 3-PBA 及び TCP 測定用試験溶液

尿 2mL, 血清 1mL を採り, 内部標準物質である 2-PBA を 20 ng 加えた後 Oasis HLB カートリッジ(200mg)に負荷した. 水(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 1mL に溶解して試験溶液とした.

##### 5.2.2 総 3-PBA 及び TCP 測定用試験溶液

尿 2mL, 血清 1mL を採り, 内部標準物質である 2-PBA を 20 ng 加えた後, 0.2M 酢酸緩衝液(pH 5)2mL,  $\beta$ -グルクロニダーゼ 6,500 units/mL (試薬  $\beta$ -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 $\mu$ L 加え, 37 $^{\circ}$ C で 90 分間インキュベートした. その後の操作は遊離体 3-PBA 及び TCP 測定用試験溶液と同様に行い, 試験溶液を調製した(図 3).

### C. 結果及び考察

#### 1. 尿及び血清中の有機リン系農薬の分析

##### 1.1 LC/MS/MS 測定条件の検討

昨年度に引き続き, 有機リン系農薬代謝物の LC/MS/MS 分析法を検討した. 有機リン系農薬の多くは, 生体内で代謝を受け, 高極性化合物であるジアルキルリン酸(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)) に代謝される。これらの化合物の中で、特に DMP, DMTP は高極性であり、ODS 系カラムへの保持が弱い。そこで、高極性化合物を強く保持するトリファンクショナル結合型 C18 カラム, Atlantis T3 C18 を用いることとした。今回採用した LC/MS/MS 測定条件を表 1 に示す。

## 1.2. 前処理法の検討

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ことから、これらを分析対象化合物とした (図 1)。DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP 及び DEDTP は極性が高く、特に DMP, DMTP は逆相モード、順相モード、イオン交換モード、活性炭等のいずれのカートリッジを用いても十分な回収率が得られないことを昨年度報告した。

そこで昨年度は、液性を 6M の塩酸を用いて強酸性とした後、クロロホルムを用いた液・液分配法を用いた前処理法を採用した。しかし、クロロホルムには神経毒性や変異原性が知られていることから、これに変わる抽出溶液を検討した。水と混じり合わない系として、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ジエチルエーテル・アセトニトリル混液、酢酸エチル・アセトニトリル混液等について検討した結果、酢酸エチル・アセトニトリル (7:3) 混液を採用した (図 2)。本法による添加回収率は DMP, DMTP を除き、10ng/mL の添加で 60% 以上であった。本法における

検出限界は DMP, DMTP を除き 1ng/mL であった。特に DMP は、回収率が十分でなく且つマトリックスの影響を強く受けることから、更なる前処理法の検討が必要であった。

## 1.3. 尿及び血清中の有機リン系農薬代謝物濃度

本法により、東海大学医学部でサンプリングした血清 (母体血) 20 サンプル及び埼玉県衛生研究所に勤務する職員、12 名 (男 6, 女 6) の尿を分析した。血清サンプル中の DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP 及び DEDTP はいずれも操作ブランクレベル (1 ~ 2 ng/mL) 以下であった。

次に尿サンプルであるが、ND ~ 59ng/mL の範囲で有機リン系農薬代謝物が検出された。農業従事者の有機リン系農薬散布後の尿から数百 ~ 数千 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微量であることが示唆された。

## 2. 尿及び血清中の 3-PBA, TCP 濃度

昨年度構築した試験法を用いて尿及び血清中のピレスロイド系農薬の主代謝物 3-PBA 及び代表的な有機リン系農薬クロルピリホスの主代謝物 TCP 濃度を測定した。

東海大学病院で採取された母体血 10 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。血清及び尿中に含まれる遊離体の 3-PBA 及び TCP は、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

(0.3~0.4ng/mL)の3-PBA及びTCPが検出されたが、いずれも1ng/mL以下であった。

ピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬は、農業用殺虫剤や家庭用殺虫剤として最も汎用されている化合物であるが、今回の測定結果から、その暴露量は極めて微量であることが示唆された。

#### D 結論

1. 昨年度に引き続き、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:DMØTP, Diethyl dithiophos -phate :DEDTP) の LC/MS/MS を用いた高感度分析法を検討した(検出下限値, DMP を除き1ng/mL)。本法を用いて母体血 20 検体及び健康成人尿 12 検体中の有機リン系農薬曝露量を測定した。母体血中の有機リン系農薬代謝物濃度は、いずれも操作ブランクレベル (1 ng/mL) であった。一方、尿中からはDEPを中心にトータルで59ng/mLの有機リン系農薬代謝物が検出された。

2. ピレスロイド<sup>®</sup>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、ピレスロイド<sup>®</sup>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。本法を用いて母体血 10 検体及び健康成人尿 12 検体を分析した結果、母体血

中の3-PBA, TCP濃度はいずれも検出限界値以下であった。一方、健康成人尿からは極微量の3-PBA (ND~0.3ng/mL)が検出された。

#### E. 研究業績

学会発表

1) 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。

図1 分析対象化合物（ピレスロイド系及び有機リン系農薬の主代謝物）

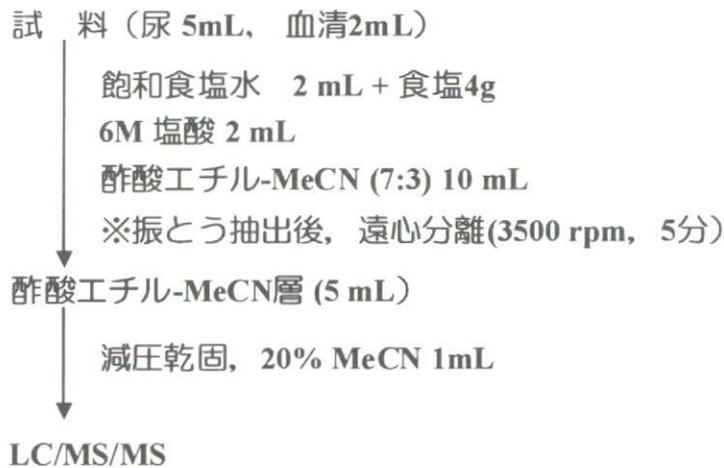
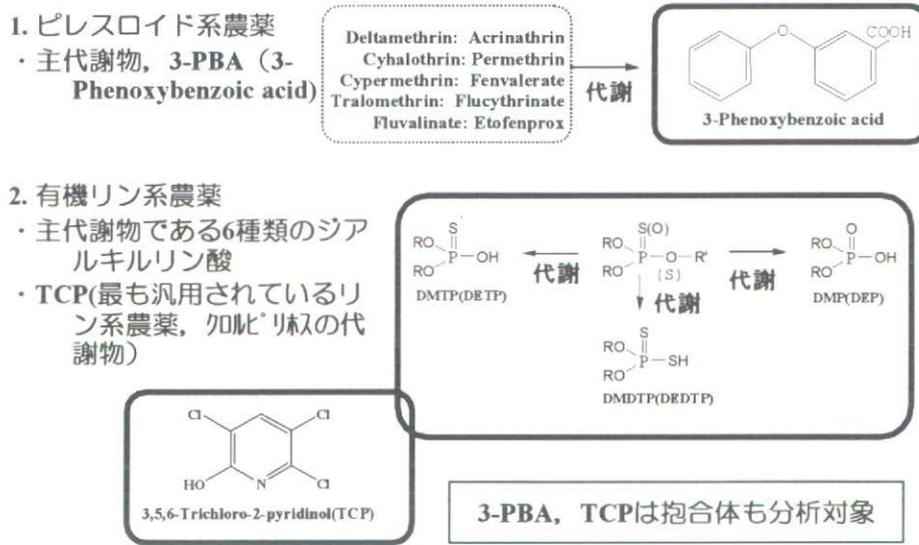
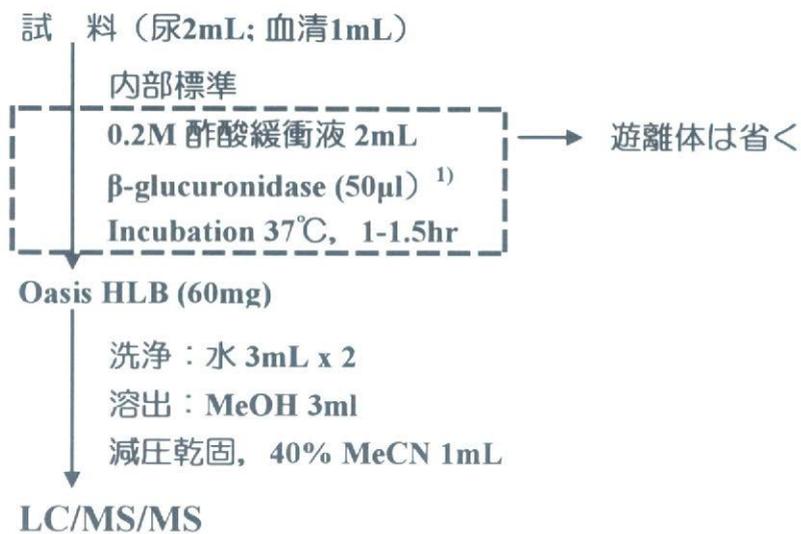


図2 尿及び血清中の有機リン系農薬代謝物の分析法



注1)  $\beta$ -glucuronidase は130,000units/mlを0.2M酢酸緩衝液で10倍希釈し, その50 $\mu$ lを使用.

図3 尿, 血清中の3-PBA及びTCPの分析法

表1. LC/MS/MS測定条件 (有機リン系農薬代謝物)

LC Conditions						
Column	Atlantis T3 C18 (2.1mm x 10cm, 3 $\mu$ m)					
Eluent	A=water, B=MeCN, C=0.1% Acetic acid					
	Gradient					
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>111.1	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

表 2. LC/MS/MS 測定条件 (3-PBA 及び TCP)

LC Conditions				
Column	Symmetry C18 (2.1mm x 5cm, 3 $\mu$ m)			
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
	TCP	196>196	20	10
		198>198	20	10
	2-PBA(IS)	213>169	20	20
		213>93	20	25

表 3 尿及び血清 (母体血) 中の 3-PBA 及び TCP 濃度

Sample No.	3-PBA(ppb)		TCP(ppb)		Sample No.	3-PBA(ppb)		TCP(ppb)	
	Free	Conjugates	Free	Conjugates		Free	Conjugates	Free	Conjugates
U-1	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	P-1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-3	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	P-3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-5	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-5	<0.1	0.1	<0.1	<0.1
U-6	<0.1	0.3	<0.1	<0.1	P-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-8	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	P-8	<0.1	0.2	<0.1	<0.1
U-9	<0.1	0.2	<0.1	0.4	P-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-10	<0.1	0.3	<0.1	<0.1	P-10	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
U-11	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1					
U-12	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1					

U(尿試料), P(血清試料)

生体試料中のニコチン関連物質及び有機フッ素系化合物の分析

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

研究要旨

化学物質による子どもへの健康影響を調査するために、ヒト生体試料中の有害化学物質の分析法を構築し、ヒト生体試料分析へ適用した。対象とした有害化学物質は、有機フッ素系化合物及びタバコ煙中のニコチン、コチニンとした。有機フッ素系化合物は、近年、ヒトへの広範囲な暴露が示唆されており、乳児の主な食事源である母乳中の分析法を構築し、実試料分析へ適用した。また、古くから妊婦や胎児への暴露が問題となっているタバコ煙中のニコチン及びコチニンの暴露量測定として、前年度までに構築した母体血、臍帯血の分析法を妊婦の尿試料分析へ適用可能か検討したところ、同一の分析法で尿試料においても良好なバリデーションが得られた。さらに、ヒト妊婦尿試料の分析に適用し、暴露量解析を行った。

A. 研究目的

A-1. 有機フッ素系化合物

有機フッ素系化合物（PFCs）であるパーフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）、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、界面活性剤などとして、我々の生活環境中で広く用いられている。しかしその一方で、PFCsが極めて高い安定性や環境中での難分解性を有することが明らかとなってきた。ヒトでは主に血液に蓄積し、PFOSにおける血中半減期は8.7年と報告されていることから、ヒト暴露に関する研究も求められている。また、動物実験においては、甲状腺ホルモンへの影響や催奇形性など、次世代に関わる毒性が示唆されている。しかしながら、その暴露源に関しては、未だに研究の途上であり、PFCsのヒト暴露源および暴露経路の解明が要求されている。そこで本研究課題では、子どものPFCs暴露源としてハウスダスト（平成17~18年度）およびヒト母乳（平成18~19年度）に着目し、LC/MS/MSによる高感度分析法を構築することとした。今年度の検討課題として、子ども

に特異的なPFCs暴露源として、母体から子どもへのPFCs移行に着目した。特に母乳は乳児が多量に摂取する食事源であることから、母乳中PFCsの高感度分析法を構築し、実試料の分析へと応用した。

A-2. ニコチン及びコチニン

近年、タバコの煙に含まれる有害化学物質は200種類を超えることがわかっており、喫煙による人体への悪影響が明らかとなっている。その中でもニコチンは喫煙により体内に吸収され、ニコチン依存症を引き起こすことから、必然的に喫煙行為を助長させてしまう。また、周産期の妊婦がたばこの煙を吸うことによって、妊婦や胎児に与える影響は深刻なものとされている。現在では、喫煙習慣を把握するために、ニコチンおよびその代謝物質の高感度分析法が求められている。ニコチンの代謝物質のひとつであるコチニンは、半減期が約20時間と長く、生物学的指標として適しており、喫煙習慣を認識するマーカーとして、しばしば分析対象となっている。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、ヒト生体試料に含まれるニコチンおよびその代謝物質であるコ

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。平成17年度には、ニコチン及びコチニンのヒト血清中の分析法を構築し、喫煙者・非喫煙者（ともに健常人）の血中濃度を比較することで、喫煙者のニコチン及びコチニンの高濃度暴露を確認した。さらに、平成18年度の研究において、母体血、臍帯血を測定し、臍帯血からもコチニンが検出され、母体を通じて胎児が暴露していることが明らかとなった。そこで、今年度（平成19年度）は、生体試料のうち、ヒト尿についても分析法を構築し、暴露量モニタリングを実施した。

## B. 研究方法

### B-1. ヒト母乳中有機フッ素系化合物の一斉分析法の構築

測定対象物質は、PFOS、PFOA、PFNA、PFHxSの4種類とし、内標準物質として<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS及び<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFOAを使用した。前処理には固相抽出法を用い、Oasis WAXカートリッジによる精製・濃縮を行った。ヒト母乳5 mlを2%ギ酸で除タンパクして固相抽出により50倍濃縮を行った後にLC-MS/MS分析に供した。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化法を採用し、ネガティブイオンモードのMultiple Reaction Monitoring(MRM)によりLC-MS/MS分析を行った。LCの分離カラムはXbridge (2.1 x 50 mm, 2.5 μm)を用い、移動相として、5 mM酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混液を用いてグラジエント溶出させた。また、母体血清の測定には、オンライン固相抽出法としてカラムスイッチング-LC-MS/MS法を採用した。分析条件の概要をTable 1に示す。

### B-2. HILIC/MS を用いたヒト尿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<sub>3</sub>を使用した。

分離カラムにはWaters社製Atlantis HILICシリカ(150 mm x 2.1 mm, 3.0 μm)を用いた。移動

相は0.01%ギ酸を添加した水/アセトニトリルの混液を、アセトニトリル含量が90% [0 min] ~ 50% [10 min] ~ 50% [25 min] ~ 90% [27 min]となるよう、流速0.2 mL/minでグラジエント送液した。カラムオープン温度は40 °C、試料注入量は5 μLと設定した。MSのイオン化には、エレクトロスプレーイオン化法を用い、キャピラリー電圧は3000 V、フラグメンター電圧は110 Vに設定し、ポジティブイオンモードで測定した。測定には選択イオンモニタリングモードを用い、モニタリングイオンはニコチン (*m/z* 163)、コチニン (*m/z* 177)、ニコチン-d<sub>3</sub> (*m/z* 166) 及びコチニン-d<sub>3</sub> (*m/z* 180)とした。なお、血清と尿という異なるマトリックス中でも同様の分析法を適用している。

(倫理面への配慮)

東海大学医学部の倫理委員会における承認を受けた上で実施した。インフォームドコンセントは「疫学研究に関する倫理指針」に基づいて行った。対象者のプライバシーの保持に留意し、検体分析時などにおける個人情報に関しては、パスワードによりロックするなど厳重に取り扱った。

## C. 研究結果および考察

### C-1. ヒト母乳中有機フッ素系化合物の一斉分析法の構築

母乳試料を50倍濃縮した際のPFCsの定量限界は、PFHxS、PFOS、PFNAにおいて、0.004 ng/mL、PFOAで0.012 ng/mLと高感度分析が達成された。また、構築した分析法の添加回収試験を実施したところ、平均回収率94.3%以上(RSD<10.3%, n=5)と良好であり、本分析法の有用性が示唆された。構築した分析法をヒト母乳中PFCs分析に適用したところ、すべての検体からPFOSおよびPFOAが検出され、その検出範囲は0.046~0.098 ng/mlおよび0.108~0.27 ng/mlであった (Table 2)。

一方、同一個人から採取した母体血についても測定を行ったところ、PFOS及びPFOAはすべての検体から検出され、その濃度範囲はそれぞれ2.8~13.7 ng/mL、2~5.3 ng/mLであった。

母乳中のPFCs濃度は、血液中に対してPFOSで約1%、PFOAで5.3%であり、母乳中のPFCs濃度は極めて微量であると示唆された。しかしながら、母乳は乳児が多量に摂取するものであることから、母乳栄養を介した乳児のPFCs暴露量評価を行うことが重要であると考えられる。PFCsはいまだに定量的なリスク評価が不十分な化合物である。さらに、化学物質に感受性が高い子どもに及ぼす影響は、より慎重に評価する必要があることと考えられている。したがって、今後ともPFCsのリスク評価において広範囲な暴露量モニタリングが必須であり、さらなる研究の発展が望まれる。

#### C-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

前年度までに報告した血清中のニコチン及びコチニンの分析法を尿試料へ適用したところ、同一の分析法で測定可能であることが分かったことから、構築した分析法がヒト生体試料（血清・尿）の分析に有用であると考えた。尿を対象とした分析においても、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、標準品を用いて構築したHILIC/MS法の検出下限値（S/N = 3）は、ニコチン、コチニン共に0.5 ng/mlであり、定量下限値は2.0 ng/mlであった。また検量線を作成したところ、ニコチン、コチニン共に2～2000 ng/mlの濃度範囲において、良好な直線性（相関係数； $r = 0.999$ ）が得られた。ヒト尿を用いた添加回収試験では、ニコチン、コチニン共に平均回収率が95%以上（RSD: 6.5%以内;  $n = 6$ ）と良好な結果が得られた。

また、ヒト暴露量モニタリングへ応用するために、ヒト妊婦の尿試料分析に適用した。その結果、コチニンが12検体中2検体（検出率16.7%）で検出された。12検体中10検体は、前述の母体血清とペアとなる検体であり、母体血清においてコチニンが検出された検体と同一個人尿の尿検体からも、コチニンが検出された（Table 3）。前年度までの結果である母体血清、臍帯血清の分析において、臍帯血からもコチ

ニンが検出されていることを加味すると、胎児がタバコ煙の成分に暴露される可能性が危惧された。

### D. 結論

#### D-1. 有機フッ素系化合物の測定

PFCsの子どもへの暴露源として、母乳に着目し、LC-MS/MSを用いた高感度分析法を構築した。その結果、全ての検体からPFOSが検出され、検出範囲は0.046～0.098 ng/mlであった。ヒト母乳から検出されたPFCsは前年度までに測定したハウスダストと比較するとごく微量であったが、母乳は乳児が経口的に摂取するものであることから、母乳栄養を介した乳児のPFCs暴露評価が求められる。

#### D-2. ニコチン及びコチニンの分析

また、喫煙に起因するニコチンの暴露評価を目的として、ヒト尿中ニコチン及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、コチニン共に0.5 ng/mlとなり、平均回収率はニコチン、コチニン共に95%以上と高感度かつ高精度な分析法を構築した。本法を妊婦尿の分析に適用したところ、コチニンが検出される検体が数例あったものの、検出例数が少なく、血清中の濃度との相関性を検討するには至らなかった。

以上のことから、子どもが母体や生活環境を通じて、種々の化学物質に暴露されていることが明らかとなった。これらの暴露量を定量的に解析することで、疾病等との因果関係を追及するための一助になると考える。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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 - LC/MS/MS を用いたヒト血漿中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発, 分析化学, 54, 877-884 (2005)

- 2) Nakata, H., Nakata, A., Kawaguchi, M., Iwasaki, Y., Ito, R., Saito, K. and Nakazawa, H.: Development of analytical method of perfluorochemicals in human plasma and blood by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase extraction using a column-switching technique. *Organohalogen Compounds*, 67, 219-221 (2005).
- 3) 勝又常信, 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之, 超臨界流体抽出-高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の定量, 分析化学, 55, 955-962 (2006)
- 4) 岡野圭太, 日の原聖仁志, 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/質量分析法によるタバコ煙暴露評価のためのヒト血清中ニコチン及びコチニンの定量, 分析化学, 56, 785-790 (2007)
- 5) 127年会 日本薬学会 (2007) 富山.
- 5) 中田彩子, 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を用いた牛乳および母乳中に残留する有機フッ素系化合物の分析」第93回食品衛生学会 学術講演会 (2007) 東京.
- 6) 中田彩子, 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を用いたヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の分析」第68回分析討論会(2007) 栃木.
- 7) Nakata A., Katsumata T., Iwasaki Y., Ito R., Saito K. Izumi S., Makino T., Kishi R., Nakazawa H. 「MEASUREMENT OF PERFLUORINATED COMPOUNDS IN HUMAN MILK AND HOUSE DUST」 27th International Symposium on alogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)-Dioxin 2007 (2007)
- 8) 岡野圭太, 日の原聖仁志, 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「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.

## 2. 学会発表

- 1) 中田彩子, 仲田尚生, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 西條泰明, 佐田文宏, 岸 玲子, 中澤裕之「カラムスイッチング-LC/MS/MSによるヒト母体血中の有機フッ素系化合物の測定」第126年会 日本薬学会 (2006) 仙台.
- 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「LC/MS/MSを用いたヒト母乳中パーフルオロ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.
- 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「HILIC/MS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) 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

## G. 知的所有権の取得状況

特許取得	なし
2. 実用新案登録	なし
その他	なし

**Table 1 LC-MS/MS conditions for PFCs analysis**

LC condition				
Instrument	Waters 2795	Mobile phase	A	Water
Column	Xbridge (2.1 x 50 mm, 2.5 $\mu$ m)		B	20 mmol/l Ammonium acetate
			C	Acetonitrile
Flow rate	0.2 ml/min	(A/B/C; v/v/v)		85/5/10 [0 ~ 10 min]→
Injection vol.	20 $\mu$ l			25/5/70 [10 ~ 12 min]→
Column temp.	40 °C			85/5/10 [12.5 min]
MS/MS condition				
Mass spec.	QuattroMicro	Inter-channel delay		0.1
Capillary	0.6 kV	Inter-scan delay		0.1
Source temp.	100	Repeats		1
Desolvation temp.	350	Span		0.5
Gas	Argon (99.9999%)	Monitoring ion		
Gas flow		PFHxS		399 [M-K] → 80
desolvation	350 l/hr	PFOS		499 [M-K] → 80
Cone	50 l/hr	PFOA		413 [M-H] → 369
Ionization; polarity	Electrospray; positive	PFNA		463 [M-H] → 419

**Table 2 Concentration of PFCs in human milk**

Analyte	LOQ (ng/mL)	Detection rate (%)	Average detected (ng/mL)	Minimum (ng/mL)	Maximum (ng/mL)
PFHxS	0.004	100	0.010	0.004	0.020
PFOS	0.004	100	0.071	0.046	0.098
PFOA	0.012	100	0.160	0.108	0.270
PFNA	0.004	100	0.049	0.124	0.017

(n=7)

**Table 3 Concentration of nicotine and cotinine in biological samples**

	n	Analyte	Detection range	Detection rate (%)
Pregnant woman serum	51	Nicotine	N.D. ~ 12.4 (ng/mL)	64.7(33/51)
		Cotinine	N.D. ~ 177.2 (ng/mL)	27.5(14/51)
Umbilical cord serum	11	Nicotine	N.D. ~ 1.7 (ng/mL)	18.0(2/11)
		Cotinine	N.D. ~ 8.7 (ng/mL)	9.0(1/11)
Pregnant woman urine	12	Nicotine	N.D. ~ 12.8 (ng/mg creatinine)	16.7(2/12)
		Cotinine	N.D. ~ 50.6 (ng/mg creatinine)	16.7(2/12)