

## MEASUREMENT OF PERFLUORINATED COMPOUNDS IN HUMAN MILK AND HOUSE DUST

Nakata A<sup>1</sup>, Katsumata T<sup>1</sup>, Iwasaki Y<sup>1</sup>, Ito R<sup>1</sup>, Saito K<sup>1</sup>, Izumi S<sup>2</sup>, Makino T<sup>2</sup>, Kishi R<sup>3</sup>, Nakazawa H<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, 2-4-41, Ebara Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8501, Japan; <sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Tokai University School of Medicine, 143, Shimokasuya, Isehara-shi, 259-1193, Japan; <sup>3</sup> Department of Public Health, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Department of Public Health, North 15 West 7 Kita-ku, Sapporo, 060-8501, Japan;

### Abstract

The purpose of the present study is to evaluate the exposure sources of perfluorinated compounds (PFCs) for infants. Highly sensitive methods for measuring four kinds of PFCs (perfluorooctanesulfonate; PFOS, perfluorooctanoic acid; PFOA, perfluorononanoic acid; PFNA and perfluorohexanesulfonate; PFHxS) in house dust and human milk were developed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The average recovery which was assessed at two different concentrations were more than 97.9% in house dust samples and 94.3 % in human milk samples, respectively. The detection limits of the methods for each PFCs were assessed as being 0.58 ng/g to 0.72 ng/g in house dust and 0.004 ng/mL to 0.1 ng/mL in human milk. To investigate the source of PFCs exposure for infants, house dust samples (n = 20) and breast milk samples (n = 51) were measured by the developed methods. PFOS and PFOA were detected in all dust samples (PFOS: 7.0 to 41 ng/g; PFOA: 18 to 89 ng/g). In human milk sample, PFOS was detected in all samples with the range from 0.008 to 0.401 ng/mL. Based on our experiments, house dust or human milk might be one of the human exposure sources of PFCs.

### Introduction

Perfluorinated compounds (PFCs), such as perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA), which have their biological and chemical stability are widely used in the manufacture of plastic, electronics, textile, and construction material in the apparel, leather, and upholstery industries<sup>1</sup>. However, PFCs may be detrimental to rodent development possibly affecting thyroid hormone levels, so affect of PFCs on infant is concerned<sup>2</sup>. Moreover, environmental pollution and human exposure<sup>3,4,5</sup> of PFCs have been reported. According to these studies, PFCs level in human blood is significantly higher than that in environment. So, it is very important to elucidate human exposure of PFCs. House dust is a curious sample to give an assessment of PFCs exposure in infant who is exposed though maternal feeding as indoor environment. PFCs level of human milk is very low compared to that of human blood, but infant takes a lot of milk during lactational period, so it is required to estimate intake amount of PFCs. Although human exposure of PFCs is widely reported, very few information about exposure source of PFCs have indicated so far. In this study, we have developed an analytical method for the determination of PFCs in house dust and human milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) to investigate exposure source of PFCs.

### Materials and Methods

Chemicals: Perfluorohexane sulfonate (PFHxS; 98%) was purchased from Wellington Laboratories Inc., Japan. Perfluorooctane sulfonate (PFOS; 98%) were purchased from Wako Pure Chemicals Industries, Ltd., Japan. perfluorooctanoic acid (PFOA; >90%) and perfluorononanoic acid (PFNA; 95%) were purchased from Fuluka Chemie AG, Buchs, Switzerland. <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS was purchased from Wellington Laboratories Inc., Japan. <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFOA was purchased from PerkinElmer Inc., USA. Other chemicals were purchased from Wako Pure Chemicals Industries, Ltd., Japan. Water was purified using a Milli-Q cartridge system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### Instrumentation and analytical conditions of LC/MS/MS:

LC/MS/MS analysis was performed using a Waters Quattro micro system. Separation was achieved on an Xbridge column (2.1 × 50 mm, 2.1 μm, Waters Inc., Japan). The column oven was maintained at 40°C. The separation was carried out using a mobile phase of 1.0 mM ammonium acetate in water/acetonitrile at a flow rate of 0.2 mL/min. The gradient profile of mobile phase was as follows: 0-10 min. using a linear increase from 10 to

70% acetonitrile solution, and holding at 70%. The conditions of MS/MS were as follows: the desolvation and source temperatures were set at 350 and 100°C, respectively; the capillary was held at a potential of 600 V relative to the counter electrode in the negative ion mode for all compounds. The cone gas and desolvation gas were 50 and 350 L/hr, respectively. The cone and collision voltage were 48 and 40 V for PFHxS, 60 and 65 V for PFOS, and 14 and 11 V for PFOA, 18 and 10 V for PFNA, respectively.

#### **Sample preparation of human milk sample by solid phase extraction**

Because of very low concentrations of PFCs in the sample matrix, the solid phase extraction (SPE) has been applied for the sample extraction and concentration. The average extraction recoveries for PFCs and relative standard deviation (R.S.D.) were over 94.3% and 10.3%, respectively. The milk samples were extracted using a solid-phase extraction cartridge (Waters Oasis WAX, Milford, MA, USA). Internal standards (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-PFOA and <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFOS) and 15 mL of 0.1 mol/L formic acid were added to 5 mL of milk. The solution was sonicated for 15 min and centrifuged at 6000 rpm for 15 min. The supernatant was loaded onto the cartridge and rinsed by wash solvent. The PFCs were eluted from the SPE cartridge with 3 mL of 3% ammonium hydroxide in acetone. The extracts were concentrated by dry nitrogen stream, and finally, filtered through a nylon membrane filter. The final sample volume for the milk extracts was adjusted to 100 µL. This SPE method using the Oasis WAX<sup>®</sup> was successfully used for the pretreatment of PFCs in human milk samples.

#### **Sample preparation of house dust sample by SFE**

House dust samples contained several compounds. It was necessary to clean up for the determination of PFCs. We tried to use Supercritical fluid extraction (SFE) method for PFCs extraction in house dust. First of all, the dust samples were collected from the dust bags of vacuum cleaners from residential homes in Japan, and were passed through two different size of sieves (mesh size: 1 mm and 75 µm). The relatively large solids and minute powders were removed. The selected dust samples having a particle size of 75 µm-1 mm were used for analysis. A 0.5 g of house dust was charged in cell for SFE and internal standard was added. Then, the samples were extracted for one hour by SFE at 0.5 mL/min with carbon dioxide as extraction solvent, and 4% v/v methanol were added as a modifier. The SFE extract was got through same procedure on human milk samples. The final volume for the dust extracts was adjusted to 2.5 mL.

### **Result and Discussion**

#### **Validation of the LC/MS/MS method:**

To validate of the LC/MS/MS method, several experimental parameters, such as limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ), were examined. LOD was 0.08 to 0.15 ng/mL in house dust sample. LOQ was 0.004 to 0.1 ng/mL and 0.5 ng/mL in human milk and house dust, respectively (S/N = 10). The calibration curves were obtained by analyzing mixtures containing and the internal standard in the range from 0.2 to 20 ng/mL for PFCs, respectively. The average recoveries and relative standard deviation (R.S.D.) were over 94.3 and 10.3% for PFCs at the spiked. On the other hand, the average recoveries and relative standard deviation (R.S.D.) were over 93.4% and 8.6% for PFCs at the spiked. Our methods were enabled to prepare in the human milk and the house dust samples.

#### **Determination of PFCs in human milk and house dust samples:**

The proposed method was applied to the analysis of human milk samples from healthy mother volunteers. The representative chromatogram of the milk sample is shown in Fig. 1. PFCs were detected in all the samples, and PFOS from the milk samples ranged from 0.008 to 0.4 ng/mL, as shown in Table 1. The house dust samples were relatively high concentrations of PFCs were detected (Table 2).

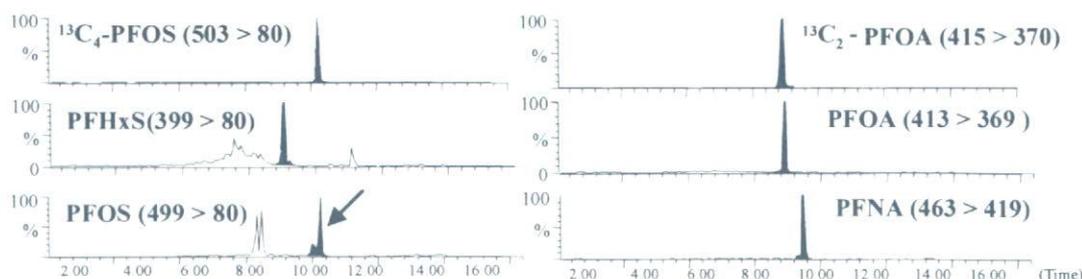


Fig. 1 Chromatogram of PFCs in the milk sample

Table 1 Concentration of PFCs in human milk samples

Compound	Detection rate (%)	Maximum (ng/mL)	Minimum (ng/mL)
PFHxS	64	0.025	N.D.
PFOS	100	0.401	0.008
PFOA	44	0.339	N.D.
PFNA	86	0.150	N.D.

Table 2 Concentration of PFCs in house dust samples

Compound	Detection rate (%)	Maximum (ng/g)	Minimum (ng/g)
PFHxS	40	5.5	N.D.
PFOS	100	41.0	7.0
PFOA	100	88.5	17.5
PFNA	100	69.0	5.5

**Conclusion**

The proposed LC/MS/MS method enabled the simultaneous determination of PFCs in human milk and house dust samples. In addition, interferences from sample matrix were removed by using the SPE for human milk or SFE for house dust, respectively. To investigate the source of PFCs exposure for infants, house dust samples (n = 20) and human milk samples (n = 51) were measured by developed methods. PFOS and PFOA were detected in all dust samples (PFOS: 7.0 to 41 ng/g; PFOA: 18 to 89 ng/g). Based on our results, house dust might be one of exposure sources of PFCs. Further studies are necessary to make sure the exposure source of PFCs for infant from indoor condition. In addition, PFOS was also detected in all samples in human milk (PFOS: 0.008 to 0.401 ng/g; ). The infants will be exposed to PFCs from not only the umbilical cord blood but also human milk with maternal feeding.

**Acknowledgments**

We are grateful to participants who donated their human milk samples. This study was supported by grants from the Ministry of the Health, Labor and Welfare and Ministry of Educations, Culture, Sports, Science and Technology.

**References**

1. M. E. Austin, B. S. Kasturi, M. Barber, K. Kannan, P. MohanKumar, S. M. J. MohanKumar, *Environ. Health Perspect.*, 2003;35:111:
2. J. R. Thiboeaux, R. G. Hanson, J. M. Rogers, B. E. Grey, B. D. Barbee, J. H. Richards, J. L. Butenhoff, L. A. Stevenson, C.Lau., *Toxicol. Sci.*, 2003;74:369
3. K.Inoue, F.Okada, R.ITO, S.Kato, S.Sasaki, S.Nakajima, A.Uno, Y.Saijo, F.Sata, Y.Yoshimura, R.Kishi, H.Nakazawa : *Environ. Health Perspect.*, 2004;112:1204
4. A. Karrman, B. B. Van, U. Jarnberg, L. Hardell, G. Lindstrom, *Anal. Chem.*, 2005;77:864
5. M. K. SO, S. Taniyasu, N, Yamashita, J. P. Giesy, J. Zheng, Z. Fang, S. H. IM, P. K.S. Lam., *Environ. Health Technol.*, 2005;38:4056

ノート

## 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

岡野 圭太<sup>1</sup>, 日の原聖仁志<sup>1</sup>, 岩崎 雄介<sup>1</sup>, 伊藤 里恵<sup>1</sup>,  
齊藤 貢一<sup>1</sup>, 和泉俊一郎<sup>2</sup>, 牧野 恒久<sup>2</sup>, 中澤 裕之<sup>®1</sup>

### 1 緒 言

タバコ煙には、4000種類以上の化学物質が存在し、その中にはニコチン、一酸化炭素、アンモニア、またフェノール類等の200種類以上の有害化学物質及びニトロソアミン、ベンゾピレン、また4アミノピフェニール等の40種類以上の発がん物質が含まれている<sup>1)~3)</sup>。タバコ煙は主流煙と副流煙に分類されるが、副流煙はフィルターによる汜過が行われないため、主流煙と比較して多くの有害物質及び発がん物質を含有しており<sup>4)</sup>、タバコ煙による環境汚染の大半は副流煙に起因する。

成人の喫煙により肺がん、食道がん、心臓血管疾患及び慢性肺疾患等といった生体への悪影響が明らかとなっており<sup>4)~7)</sup>、特に、妊婦の喫煙では、臍帯の血流量が減少し、胎児に低酸素状態や低栄養状態をもたらす<sup>8)</sup>。その結果、子宮内胎児発育遅延、早産、死産、先天異常や出生体重低下等が高頻度に発生すると報告<sup>9)~13)</sup>されている。また、乳幼児では家庭環境における副流煙の暴露や、タバコの抽出液を誤飲することによるニコチン中毒<sup>7)</sup>が報告されている。

ニコチンは喫煙により肺毛細血管を通じて速やかに体内に吸収され、全身に分布した後、肝臓でその約80%がコチニンに代謝され、約10%は腎臓で尿中に排泄される。ニコチン依存症は、ニコチンが脳内のドーパミン神経系に影響を及ぼすことで引き起こされ、必然的に喫煙行為を助長させてしまう<sup>7)</sup>。また、乳幼児において、タバコの副流煙暴露により心臓血管疾患、呼吸器疾患、成長抑制等の生体影響が危惧されている<sup>13)</sup>。現在、タバコ煙による暴露実態を評価するために、喫煙者では、ニコチン及びコチニンを指標とし、非喫煙者では、ニコチン(血中半減期1~4時間)に比べて半減期の長いコチニン(血中半減期18~20時間)を指標とする暴露評価が有用とされている<sup>14)~20)</sup>。

血清中のニコチン及びコチニンの測定法として、夾雑成

分の影響を避けるため、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いた報告<sup>21)</sup>があるが、現在のところ広く普及しているとは言い難い。そこで本研究では、より普及している測定機器を検出器とし、またニコチン及びコチニンを夾雑成分から分離させるため親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)<sup>22)</sup>を用いた、ヒト血清中ニコチン及びコチニンの高感度な分析法を構築した。更に主流煙よりも副流煙による暴露が大きいと推測される妊婦について、タバコ煙による暴露実態の評価を行うことを目的とした。

### 2 実 験

#### 2.1 試 薬

ニコチン(>97%)の標準物質は、和光純薬製を用いた。コチニン(>98%)、ニコチン-d<sub>3</sub>(>98%)及びコチニン-d<sub>3</sub>(>98%)の標準物質は、Sigma製を用いた。構造式をFig. 1に示す。また、アセトニトリル[高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用及び残留農薬・ポリクロロビフェニル(PCB)試験用]、メタノール[残留農薬・PCB試験用]、ギ酸(特級)、水酸化ナトリウム(特級)、トリクロロ酢酸(特級)、リン酸二水素ナトリウム(特級)及びリン酸水素二ナトリウム(特級)は和光純薬製を用いた。精製水はEDSポリリッシャーを搭載したミリポア製超

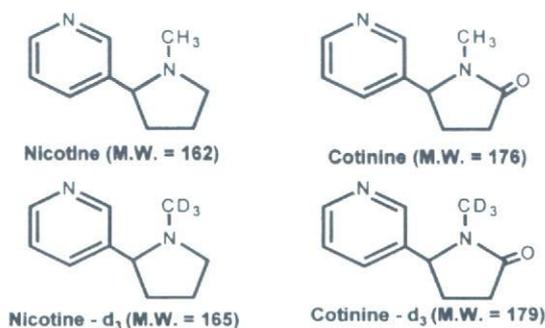


Fig. 1 Structures of nicotine, cotinine, nicotine-d<sub>3</sub> and cotinine-d<sub>3</sub>

<sup>1</sup> 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

<sup>2</sup> 東海大学医学部産婦人科: 259-1193 神奈川県伊勢原市望星台

純水装置 (Milli-Q gradient A 10) を用いて調製した。固相抽出のカートリッジに Waters 製 Oasis HLB (1 cc, 30 mg) を用いた。

## 2・2 標準溶液の調製

各標準溶液をアセトニトリルに溶解させて、100 µg/mL の溶液を調製し、0.5～2.0 µg/mL の範囲で標準溶液をアセトニトリルで適宜希釈して測定用試料を調製した。また、ニコチン- $d_3$  及びコチニン- $d_3$  を用いて内標準法により検量線を作成した。

## 2・3 LC/MS 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析 (MS) 計には Agilent 製 Agilent 1100 series LC/MSD を用いた。分離カラムには Waters 製 Atlantis HILIC シリカ (150 mm × 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% (15 min)～50% (20 min)～90% (23 min) となるようリニアグラジエントで送液 (流量 0.2 mL/min) した。カラム温度は 40°C、試料注入量は 5 µL とした。MS のイオン化には、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 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 を採用し、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検出 (SIM) モードを用い、モニタリングイオンにはニコチン ( $m/z$  163)、コチニン ( $m/z$  177)、ニコチン- $d_3$  ( $m/z$  166) 及びコチニン- $d_3$  ( $m/z$  180) とした。

## 2・4 ヒト血清試料

東海大学医学部産婦人科で分娩を行った女性ボランティアから、母体血清 51 検体及び臍帯血清 11 検体 (同一個人における母体血清-臍帯血清のペアは 10 検体) を採取した。採取した血清は分析に供するまで、遮光、-80°C で保存した。なお、母体血清及び臍帯血清の採取と分析に関しては、いずれもインフォームドコンセントを十分に行い、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・5 試料の前処理

アシストチューブに血清 500 µL とサロゲート物質 (ニコチン- $d_3$ ; 5 µg/mL、; コチニン- $d_3$ ; 10 µg/mL) 10 µL を加えかくはんした。除タンパクのため 25% トリクロロ酢酸 160 µL を加えた後、かくはん・遠心分離 (10000 g, 5 分) を行った。固相抽出カートリッジにおけるニコチン及びコチニンの保持の向上を目的とし、1 M の水酸化ナトリウム水溶液 330 µL を加え試料を塩基性にし、再び遠心分離 (10000 g, 5 分) を行った後、得られた上澄み 750 µL

を固相抽出に適用し、試料の濃縮・精製を行った。溶出液をエバポレーターで濃縮乾固後、アセトニトリル 75 µL に再溶解させ、測定に供した。

添加回収試験には、一般人から採取したブルー血清に、ニコチン及びコチニンが 100 ng/mL 又は 200 ng/mL となるように標準溶液を加えて、同様の前処理操作を行い、HILIC/MS にて測定した。

## 3 結果及び考察

### 3・1 LC/MS 測定条件の検討

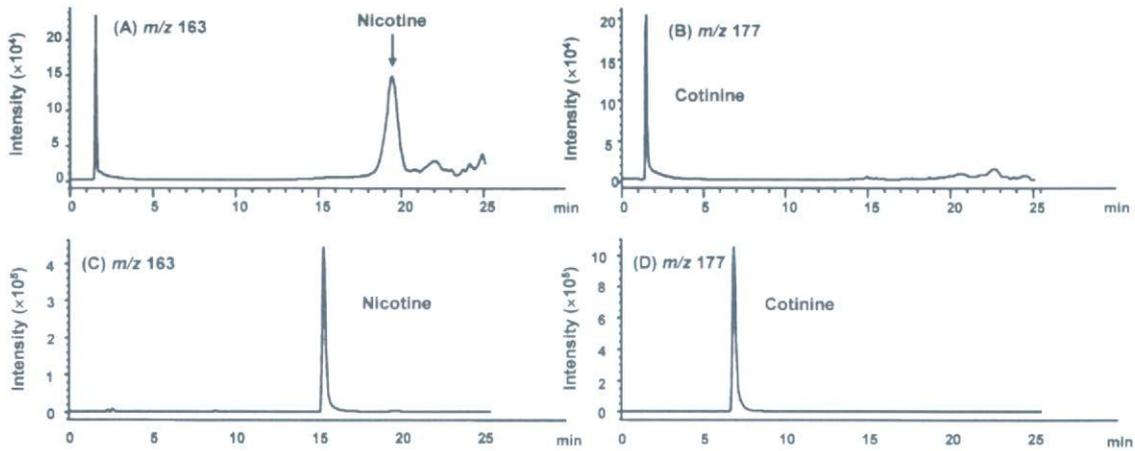
コチニンは高極性物質であるため通常のオクタデシルシリカ (ODS) カラムでは保持が困難であるといわれているため、ODS と HILIC を比較検討した。ODS カラムにおいては移動相の組成を変更してもコチニンの保持時間に大きな変化はなかったことから、カラムにほとんど保持されていないと考えられた (Fig. 2)。そこで、ニコチン及びコチニンの分離を改善し、また移動相の有機溶媒の割合を多くして MS でのイオン化向上を目的として、カラムには HILIC カラムを使用した。分離条件として、移動相に添加するギ酸の濃度を検討したところ、0.01% ギ酸及び 0.01% ギ酸含有アセトニトリルの混液をグラジエント送液することで、目的物質の良好な相互分離を達成した。MS でのイオン化には ESI 法のポジティブイオンモードを用い、フラグメンター電圧を検討した結果、110 V が最適であった。

### 3・2 固相抽出法の条件検討

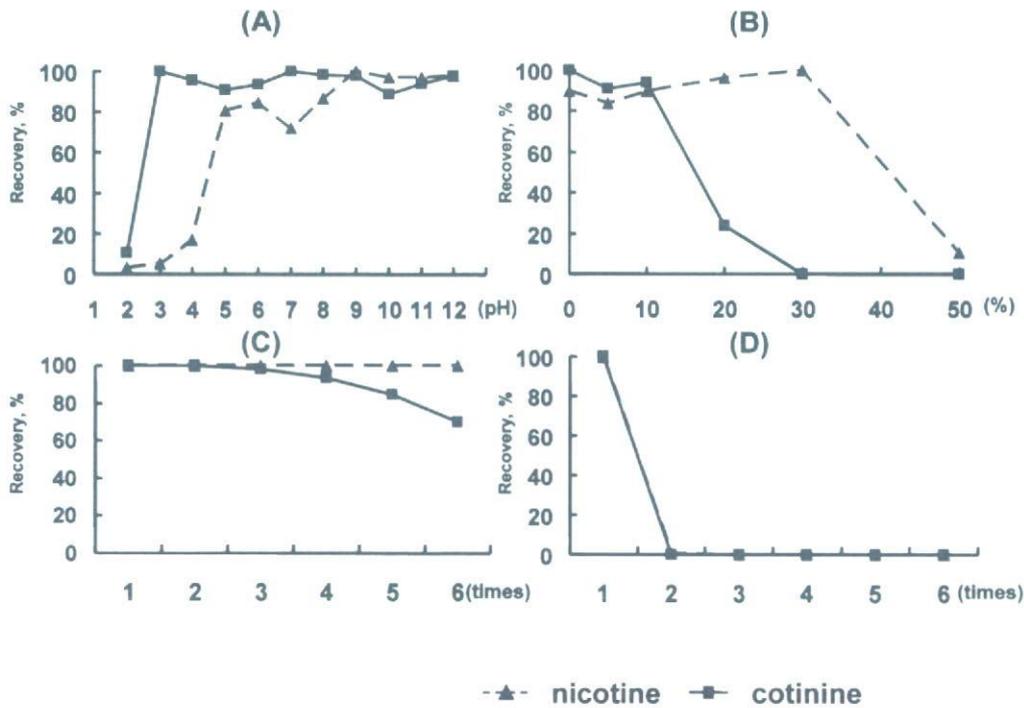
HILIC カラムは陽イオン交換能を有するため、高極性物質の除去を目的に固相抽出カートリッジには逆相系の Oasis HLB (Waters 製) を採用した。固相抽出法において試料の負荷後にカートリッジを洗浄し、夾雑成分の除去を行う洗浄溶液の pH、メタノールの含有率及び洗浄回数の検討をした。また、保持された目的物質を選択的に抽出するため、抽出の回数を検討した。Fig. 3 に示すように、洗浄溶液に 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 9): メタノール = 90:10 を採用し、1 mL で 2 回の洗浄が最適条件であった。また、抽出工程において 1% ギ酸含有メタノールを用い、1 mL で抽出することにより、試料のクリーンアップを行った。最適化した固相抽出の手順を Fig. 4 に示す。

### 3・3 検出下限値及び定量下限値

標準溶液を用いて検出下限値及び定量下限値を求めた結果、ニコチン及びコチニンの検出下限値 ( $S/N = 3$ ) は 0.2 ng/mL 及び 0.1 ng/mL となった。また、定量下限値 ( $S/N > 10$ ) は 1 ng/mL 及び 0.4 ng/mL となり、高感度な分析法が構築できた。LC/MS/MS を用いた従来法<sup>21)</sup>では試料量は 1000 µL、定量下限値は 2 ng/mL である。本



**Fig. 2** Comparison of chromatograms using ODS and HILIC column  
 (A) chromatogram of nicotine obtained with ODS column; (B) chromatogram of cotinine obtained with ODS column; (C) chromatogram of nicotine obtained with HILIC column; (D) chromatogram of cotinine obtained with HILIC column; Gradient profile of mobile phase for ODS column separation: Acetonitrile/water = 10/90 (0 ~ 5 min) → 90/10 (20 ~ 25 min)



**Fig. 3** Optimization of conditions for solid phase extraction  
 (A) pH of wash solution; (B) methanol concentration in wash solution; (C) times of wash; (D) times of elution

法は従来法と比較し、試料量は少量 (500  $\mu$ L) であり、感度の面からも良好な分析法である。検量線を作成した結果、ニコチンは 5.0 ~ 2000 ng/mL, コチニンは 2.0 ~ 2000 ng/mL の濃度範囲で相関係数 0.999 以上と良好な結果が得られた。ニコチン及びコチニンの標準溶液のクロマ

トグラムを Fig. 5 に示す。

**3.4 添加回収試験**

ヒト血清中で 100 ng/mL 又は 200 ng/mL となるようにニコチン及びコチニンを添加し、本法に従い添加回収試験

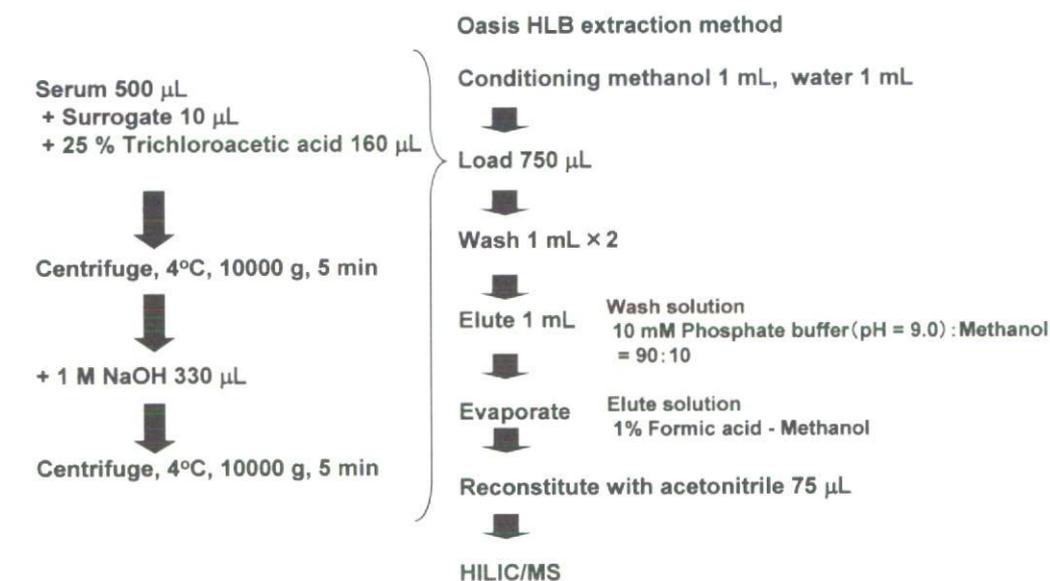
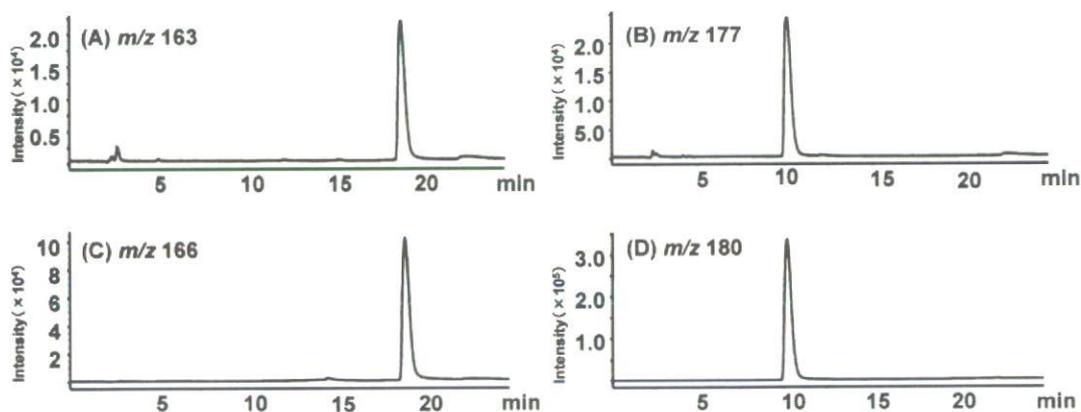


Fig. 4 Procedure of sample preparation

Fig. 5 SIM chromatograms of standard for (A) nicotine, (B) cotinine, (C) nicotine- $d_3$  and (D) cotinine- $d_3$ 

を行った。プール血清におけるクロマトグラムを Fig. 6 に示す。ニコチン及びコチニン共に平均回収率 ( $n = 6$ ) は 90.0% 以上、相対標準偏差 (RSD) は 6.0% 未満と良好な結果が得られた (Table 1)。

### 3.5 実試料の分析結果

本分析法を母体血清 51 検体及び臍帯血清 11 検体 (同一個人における母体血清-臍帯血清のペアは 10 検体) の分析に適用した。Table 2 に示すとおり、母体血清では 51 検体中 14 検体 (検出率 = 検出された検体数 / 総検体数  $\times 100 = 27.5\%$ ) から、N.D. ~ 177.2 ng/mL の濃度範囲でコチニンが検出された。母体血清からコチニンが検出された検体では、ニコチンも同様に検出され、採血した直前

もタバコ煙に暴露されていたことが推察された。母体血清中のニコチン検出率は、64.7% であり、検出濃度範囲は ND ~ 12.4 ng/mL であった。また、臍帯血清では 11 検体中 1 検体からコチニンが検出された。同一個人における母体血清-臍帯血清のペアとなる検体において、母体血清でコチニンが検出された検体からは、臍帯血清でもコチニンが検出された (母体血清; 3.0 ng/mL, 臍帯血清; 8.7 ng/mL)。

母体血清及び臍帯血清ペア検体から共にコチニンが検出されたことから、臍帯を介して胎児がタバコ煙に暴露されることが危惧される。また、本分析法はヒト血清中のニコチン及びコチニンの測定に有用であることが示唆された。今後、本分析法を用いたタバコ暴露評価が望まれる。

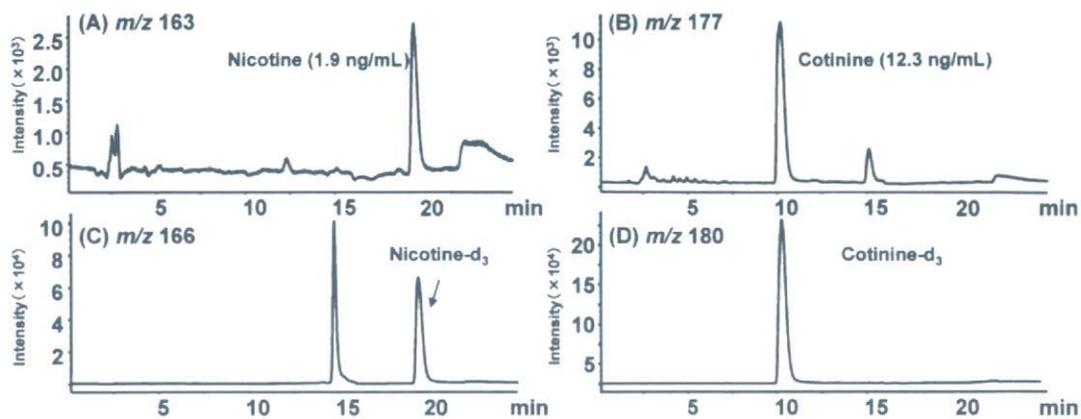


Fig. 6 SIM chromatograms of pool of human serum for (A) nicotine, (B) cotinine, (C) nicotine- $d_3$  and (D) cotinine- $d_3$

Table 1 Average recoveries of nicotine and cotinine from human serum

	Blank/ ng mL <sup>-1</sup>	Spiked amount/ ng mL <sup>-1</sup>	Recovery, %	RSD, %
Nicotine	1.9	100	90.3	3.9
		200	98.7	3.8
Cotinine	12.3	100	95.1	5.2
		200	96.9	4.1

(n = 6)

Table 2 Concentration of nicotine and cotinine in human serum

	n	Analyte	Detection range/ ng mL <sup>-1</sup>	Detection rate, %
Pregnant woman serum	51	Nicotine	N.D. ~ 12.4	64.7
		Cotinine	N.D. ~ 177.2	27.5
Umbilical cord serum	11	Nicotine	N.D. ~ 1.7	18.0
		Cotinine	N.D. ~ 8.7	9.0

(Nicotine: N.D. < 1.0 ng/mL, Cotinine: N.D. < 0.4 ng/mL)

## 文 献

- 喫煙と健康—喫煙と健康問題に関する検討会報告書, 新版, p. 39 (2002), (保健同人).
- E. L. Wynder, D. Hoffmann: *N. Engl. J. Med.*, **300**, 894 (1979).
- S. L. Stock: *Lancet*, **2**, 1082 (1980).
- M. Rebagliato: *Am. J. Epidemiol.*, **142**, 525 (1995).
- S. Kono, M. Ikeda, S. Tokudome, M. Nishizumi, M. Kuratsune: *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 1323 (1987).
- J. L. Labandeira-Garcia: *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 125 (2002).
- I. B. Karaconji: *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **56**, 363 (Review), (2005).
- J. Kalinka, W. Hanke, W. Sobala: *Am. J. Perinatol.*, **22**, 41 (2005).
- P. H. Shiono, M. A. Klebanoff, G. G. Rhoads: *JAMA.*, **255**, 82 (1986).
- J. L. Peacock, J. M. Bland, H. R. Anderson: *BMJ.*, **311**, 531 (1995).
- J. Andrews, J. M. McGarry: *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.*, **79**, 1057 (1972).
- C. V. Ananth, R. W. Platt: *BMC Pregnancy Childbirth.*, **4**, 22 (2004).
- A. Bouckaert: *Stat. Med.*, **19**, 239 (2000).
- P. Tutka, J. Mosiewicz, M. Wiclosz: *Pharmacol. Rep.*, **57**, 143 (Review), (2005).
- N. L. Benowitz, Jacob P. 3rd, I. Fong, S. Gupta: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 296 (1994).
- P. Dhar: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**, 155 (2004).
- S. Pichini, X. B. Basagana, R. Pacifici, O. Garcia, C. Puig, O. Vall, J. Harris, P. Zuccaro, J. Segura, Sunyer: *Environ. Health Perspect.*, **108**, 1079 (2000).
- Y. Akiyama, K. Arashidani, W. Kawano, N. Kunugita: *J. UOEH*, **28**, 245 (2006).
- A. Thaqi, K. Franke, G. Merkel, H. E. Wichmann, J. Heinrich: *Indoor Air*, **15**, 302 (2005).
- G. Bazylak, H. Brozik, W. Sabanty: *J. Pharm. Biomed.*

- Anal.*, **24**, 113 (2000).  
21) T. P. Moyer, J. R. Charlson, R. J. Enger, L. C. Dale, J. O. Ebbert, D. R. Schroeder, R. D. Hurt: *Clin. Chem.*, **48**, 1460 (2002).  
22) B. Y. Zhu, C. T. Mant, R. S. Hodges: *J. Chromatogr.*, **548**, 13 (1991).

---

Determination of Nicotine and Cotinine in Human Serum for  
Evaluation of Tobacco Smoke Exposure by  
Hydrophilic Interaction Chromatography/Mass Spectrometry

Keita OKANO<sup>1</sup>, Masatoshi HINOHARA<sup>1</sup>, Yusuke IWASAKI<sup>1</sup>, Rie ITO<sup>1</sup>,  
Koichi SAITO<sup>1</sup>, Shun-ichiro IZUMI<sup>2</sup>, Tsunehisa MAKINO<sup>2</sup> and Hiroyuki NAKAZAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Tokai University, Bouseidai, Isehara-shi, Kanagawa 259-1193

(Received 13 April 2007, Accepted 9 June 2007)

Tobacco smoke contains more than 200 harmful compounds and 40 carcinogenic compounds. Tobacco smoke exposure is a significant risk of growth suppression for fetuses and infants. A highly sensitive and selective method for the determination of nicotine and cotinine in human serum samples, to evaluate the exposure amount of tobacco smoke, was developed. Solid-phase extraction was employed for sample preparation, and a measurement was performed by hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry (HILIC/MS). The limits of detection of nicotine and cotinine were 0.2 and 0.1 ng/mL, respectively. Moreover, the limits of quantification of nicotine and cotinine were 1.0 and 0.4 ng/mL, respectively. The average recoveries of nicotine and cotinine were over 90% (RSD < 6%,  $n = 6$ ). The proposed method was applied to measure the serum and umbilical cord serum of a pregnant woman. The detection rate of cotinine in the pregnant woman serum and umbilical cord serum were 51 to 14 and 11 to 1.

**Keywords** : tobacco; nicotine; cotinine; solid phase extraction; HILIC/MS; pregnant woman serum; umbilical cord serum.

## 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

Fujita Y<sup>1,2</sup>, Urano H<sup>1,2</sup>, Izumi S<sup>3</sup>, Uchida N<sup>3</sup>, Goya K<sup>3</sup>, Makino T<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Oukura, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan; <sup>2</sup>Department of Research and Development Division, Biomaster, Inc., Yokohama Excellent III 8F, 3-35, Minami Nakadori, Naka-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan, 231-0006;

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Tokai University School of Medicine, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, Japan, 259-1143

### Abstract

Although previous studies have suggested a relationship between the environmental toxicant such as heavy metals and neurodevelopmental disorders, these involvements have not been fully investigated. In this study, we measured concentrations of neurotoxic metals (aluminium, arsenic, cadmium and lead) in 6 types of human perinatal samples (maternal blood, urine, breast milk, umbilical cord blood, placenta and umbilical cord) by inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) to assess the transplacental contamination during pregnancy. Detectable levels of metals were found in almost all samples, suggesting that fetuses are exposed to these metals during pregnancy. In addition, effects of neurotoxic metals on developing neural cells were investigated using murine neurosphere culture, which is a selective culture method for neural stem cells. As the results, exposure to 100 µg/L metals decreased size of neurospheres. Immunohistochemical analysis showed beta III tubulin positive neurons and GFAP positive astrocytes remarkably decreased in culture treated with 100 µg/L of metals. By using this culture technique, we also found exposure to metals caused up-regulation of dioxin-inducible gene, *Cyp1a1*, in neural stem cells. These results suggested even transient exposure to metals during early neurodevelopmental stage causes adverse effects on proliferation and differentiation of neural stem cells.

### Introduction

A number of children diagnosed the neurodevelopmental disorders such as attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism and learning disorder have been increasing in recent years<sup>1</sup>. The exact etiology is complicated and not understood completely. Environmental pollutions are suspected of causing neurological disruption in children<sup>2,3</sup>. Although heavy metals such as lead, cadmium, arsenic and methyl mercury are known as neurotoxic chemicals against all people, fetuses are more sensitive to these heavy metals. Many kinds of heavy metals can easily cross the placenta and invade umbilical cord blood<sup>4</sup>. Also, the blood-brain barrier, which protects brain parenchyma from toxic chemical in the adult brain, is not completely formed until 6 months after birth<sup>5</sup>. The fetal exposure to heavy metals is great concerns considering the involvement of environmental pollutions in neurodevelopmental disorders. However, we know little about the effect of heavy metals on early stage of neural development. Therefore, first aim of this study was to assess the fetal exposure levels of neurotoxic metals by measuring perinatal maternal and fetal samples.

In addition, we investigated the effect of neurotoxic metals on neural stem cells, which are the most primitive cells in the developing central nervous system. Neural stem cells are characterized by their abilities of self-renewal, proliferation and differentiation into all types of neural cells. To perform the present study, we used neurosphere method, which is a selective culture method for neural stem cells.

### Materials and Methods

#### *Sample collections and analysis for ICP-MS*

All perinatal samples including maternal blood (MB), maternal urine (MU), breast milk (BM), placenta (PL), umbilical cord blood (UCB) and umbilical cord (UC) were collected from healthy female volunteers at Tokai University after the procedure of informed consent. Samples were frozen at -20°C until analysis. After thawing samples, placenta and umbilical cord were dried at 80°C oven and weighed. All samples were pre-treated with ultrapure nitric acid and hydrogen peroxide at room temperature and then digested with microwave.

Concentrations of aluminium (Al), arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) in resulting samples were analyzed

by ICP-MS (HP4500, Yokokawa analytical systems).

#### Cell isolation and Cultures

Ganglionic eminences were dissected from E14.5 (The day of appearance of the vaginal plug is E0.5.) C57BL6 mice. Tissues were collected into  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  free Hanks balanced salt solution (Invitrogen), and mechanically triturated by using a blue tip and yellow tip sequentially. Dissociated cells were suspended into Neurosphere medium (DMEM/F-12 [Invitrogen] supplemented with EGF [Peprotech, 20 ng/ml], FGF2 [Peprotech, 20 ng/ml], and B27 [Invitrogen, 1:50]) at  $1 \times 10^5$  cells/ml, and cultured in 25cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Iwaki) for 7 days. To evaluate effects of metals, mix solution including arsenic, cadmium and lead were added into neurosphere medium at final concentrations ranging from 50 to 200ug/L.

#### Proliferation and differentiation assay

To evaluate effects of metals on proliferating potential, we measured the diameter of neurospheres after 7days in culture with or without metals. Additionally, to study effects of exposure of metals on differentiation potential, neurospheres were collected and re-plated onto poly L-lysine- coated dishes in differentiation medium (DMEM/F-12 supplemented with B27). After 7 days, cells were fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde. Immunocytochemistry was performed by using primary antibodies against beta-III tubulin (Tuj1, SIGMA) and glial fibrillary acidic protein (GFAP, DAKO) to detect neurons and astrocytes, respectively. Appropriate fluorescent conjugated-secondary antibodies were used to visualize specific immunoreactions.

#### RT-PCR analysis

Total RNA was prepared from neurospheres after 7days in culture using the RNA extraction kit ISOGEN (Nippon Gene), and 1ug of RNA was transcribed using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), following the manufacture's recommendations. Resulting cDNA was subjected to the PCR using Ex-Taq kit (Takara Bio). The sense and antisense primers, respectively, were as follows: GAPDH, 5'-GGTCATCATCTCCGCCCTTC-3' and 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'; Cyp11a1, 5'-AACACTTCCAAGTGCAGATGCGGTC-3' and 5'-TCAAACCAGTTAGCCACTGGAGCAC-3'.

## **Results and Discussion**

#### Detection of metals in maternal and fetal samples

Table 1 shows the mean concentrations and S.D. of the metals in maternal and fetal samples. Al, As and Pb were detected in almost all samples in this study. Cd was detected 5 of 7 MB, 4 of 7 MU, and 6 of 7 UCB samples. Cd was also detected all of BM, PL and UC samples. Thus, it became clear that fetuses were contaminated with multiple neurotoxic metals during pregnancy. It has been reported that concentrations of several toxic chemicals were higher in maternal than in umbilical cord blood<sup>6,7</sup>. However, there are no significant differences between the levels of MB and UCB in all elements investigated.

#### Association between maternal age and fetal samples

Previous studies have reported a positive correlation between maternal age and blood concentrations of toxic chemicals such as DDE and PCBs<sup>8</sup>, because older women have a greater opportunity for exposures to these chemicals. 7 mothers aged  $34 \pm 4.2$  years (range 28-41) and their children participated in this study. Correlation coefficients between maternal age and UCB are shown in Table 2. Between maternal age versus UCB, Al and Pb showed a relatively high correlation coefficient (Al:  $r=0.73$ , Pb:  $r=0.83$ ).

#### Association between maternal and fetal samples

The association between maternal and fetal samples of toxic metals is important to evaluate the transplacental exposure of fetuses. Correlation coefficients between maternal and fetal samples are shown in Table2. Between MB versus UCB, As and Pb showed high correlation coefficient (As:  $r=0.83$ , Pb:  $r=0.949$ ).

#### Association among maternal samples

There is the great concern that some toxic chemicals might be transferred to nursing infants via breast milk. We compared the concentrations of metals among maternal samples (Table 2). Between MB versus BM, As and Pb showed a relatively high correlation coefficient (As:  $r=0.51$ , Pb:  $r=0.69$ ).

#### Association among fetal samples

The umbilical cord blood has been used to assess the exposure to toxic chemicals during pregnancy. However, the umbilical cord is easier to collect technically without ethical problems. The use of umbilical cords to assess the chemical exposure seems to be an ideal method. Thus, we compared the concentrations of metals among fetal samples. Correlation coefficients among fetal samples are shown in Table2. Cd showed a significant correlation between PL and UC ( $r=0.95$ ). However, there was no correlation between UCB versus UC in any elements.

Adverse effects of metals on fetal neural development

In order to investigate effects of metals on fetal neural development, we used neurosphere method, in which neural stem cells can proliferate as maintaining abilities to differentiate into mature neurons and glial cells. First, the effect of metals on neural stem cell proliferation was evaluated by measuring size of neurospheres treated or untreated with metals for 7 days. At 50µg/L metals concentration, there was no significant difference as compared with control neurospheres.

Exposure to 100µg/L of metals significantly reduced the size of neurospheres (Figure1 A,B). Treatment with 200µg/l of metals completely inhibited the formation of neurosphere (data not shown). Thus, it was suggested that fetal exposure to metals prevent proliferation of neural stem cells. We next examined the effect of metals on the subsequent differentiation potential of neural stem cells derived from neurosphere culture. In control culture, cells derived from neurospheres attached onto Poly L lysine and fibronectin coated-dishes and elongated

processes (Figure 1C). Immunohistochemical analysis detected beta III tubulin positive neurons and GFAP positive astrocytes in control culture (Figure 1D). On the other hand, process elongation could not be found in culture pre-treated with 100mg/L metals (Figure 1C). The number of differentiated neurons and astrocytes decreased compared to control culture (Figure 1D), suggesting prenatal transient exposure of metals impairs differentiation of neural stem cells.

**Table1.** Concentrations of metals in maternal and fetal samples

●Aluminium							
Sample ID	MB µg L <sup>-1</sup>	MU µg L <sup>-1</sup>	BM µg L <sup>-1</sup>	PL µg g <sup>-1</sup> *	UCB µg L <sup>-1</sup>	UC µg g <sup>-1</sup> *	
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	110	44.0	144.0	
Mean±SD	70±21.23	53.7±2.68	50.5±12.45	222.6±55.01	48.5±8.37	144±51.87	
●Arsenic							
Sample ID	MB µg L <sup>-1</sup>	MU µg L <sup>-1</sup>	BM µg L <sup>-1</sup>	PL µg g <sup>-1</sup> *	UCB µg L <sup>-1</sup>	UC µg g <sup>-1</sup> *	
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	
Mean±SD	13.70±4.13	58.77±32.87	5.43±1.99	29.87±10.34	12.29±2.34	144±51.87	
●Cadmium							
Sample ID	MB µg L <sup>-1</sup>	MU µg L <sup>-1</sup>	BM µg L <sup>-1</sup>	PL µg g <sup>-1</sup> *	UCB µg L <sup>-1</sup>	UC µg g <sup>-1</sup> *	
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	
Mean±SD	0.23±0.15	0.55±1.44	0.48±0.18	33.20±30.00	0.26±0.29	1.16±1.36	
●Lead							
Sample ID	MB µg L <sup>-1</sup>	MU µg L <sup>-1</sup>	BM µg L <sup>-1</sup>	PL µg g <sup>-1</sup> *	UCB µg L <sup>-1</sup>	UC µg g <sup>-1</sup> *	
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	
Mean±SD	2.30±2.65	1.77±0.98	2.11±0.85	11.97±2.75	2.27±2.91	5.87±2.47	

Abbreviations: MB, maternal blood; MU, maternal urine; BM, breast milk; PL, placenta; UCB, umbilical cord blood; UC: umbilical cord  
\* Dry weight

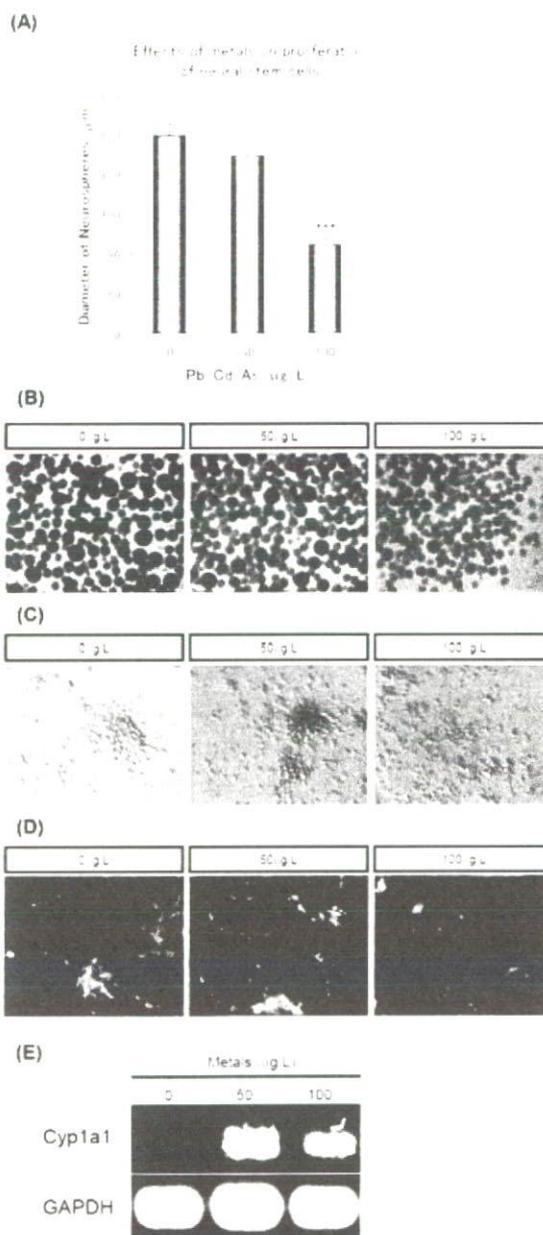
**Table2.** Correlation coefficients (r) of metals between maternal age and MB, between maternal age and UCB, between maternal and fetal samples, among maternal samples, and among fetal samples

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

Up-regulation of dioxin-inducible gene, Cyp1a1, in neural stem cells.

Expression of Cyp1a1 has been used as a biomarker for aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation and a warning of dioxin-like toxicity. Recently, it has been demonstrated that Cyp1a1 is up-regulated by heavy metals such as Pb, Cu and As in several types of cells. We performed RT-PCR analysis to investigate whether Cyp1a1 expression is induced by metals in neural stem cells or not. There was no detection level of Cyp1a1 in neurospheres untreated with metals (Figure 1 E). On the other hand, treatment with metals (50 and 100 µg/L) remarkably increased Cyp1a1 expression. In this study, we could not clarify whether up-regulation of Cyp1a1 in neural stem cells by exposure of metals is mediated by AhR-XRE pathway or not. To understand this mechanism, further studies are required.

In conclusion, our results demonstrated (1) fetus tissues were contaminated with multiple neurotoxic metals during pregnancy, and (2) these metals caused adverse effects on proliferation and differentiation of neural stem cells.



**Figure 1. Effects of metals on neural stem cells.** Neural stem cells were cultivated with or without Pb, Cd and As within neurosphere culture medium for 7 days. Subsequently, neurospheres were collected and transferred into differentiation medium to induce neuronal and glial maturation. (A) Exposure of 100 µg/L metals significantly decreases proliferation of neural stem cells. (\*\*\*)  $P < 0.001$ . (B) Representative images of neurosphere cultures showing metals decrease neurosphere size. (C) Phase contrast microscopy of neurosphere-derived cells treated or untreated with metals. Exposure of 100 µg/L metals inhibits cells to elongate their processes. (D) Immunostaining for neurons (anti-beta III tubulin green) and astrocytes (anti-GFAP red). Nucleus were stained with DAPI (blue). Exposure of 100 µg/L metals prevents differentiation into neurons and astrocytes. (E) RT-PCR analysis for detecting Cyp1a1 mRNA. Expression of Cyp1a1 is up-regulated by exposure of metals.

**References**

1. Parris MK. *Alternative Medicine* 2000; 5:402
2. Grandjean P, Landrigan PJ. *Lancet* 2006; 368:2163
3. Chen A, Dietrich KN, Ware JH, Radcliffe J, Rogan WJ. *Environ Health Perspect* 2005; 113:597
4. Zhang Y, Zhao Y, Wang J, Zhu H, Liu Q, Fan Y, Wang N, Liu A, Liu H, Ou-Yang L, Zhao J, Fan T. *Biol Trace Elem Res* 2004; 102:39
5. Adinolfi M. *Dev Med Child Neurol* 1985; 27:532
6. Sarcinelli PN, Pereira ACS, Mesquita SA, Oliveira-Silva JJ, Meyer A, Menezes MAC. *Environ Res* 2003, 91:143
7. Walker JB, Seddon L, McMullen E, Houseman J, Tofflemire K, Corriveau A. *Sci Total Environ* 2003, 302:27
8. Laden F, Neas LM, Spiegelman D. *Environ Health Perspect* 1999; 107:75

平成18年度 厚生労働科学研究(化学物質リスク研究)

# 家庭で使用している化学物質と子どもの健康

Chemical Substances in Household Utensils and Child Health

東海大学医学部産婦人科

牧野恒久

Tokai University School of Medicine  
Department of Obstetrics & Gynecology  
Center for Growth and Reproductive Medicine

Tsunehisa MAKINO, M.D., Ph.D.

## Summary

内分泌かく乱化学物質のなかで生体影響が懸念されるいくつかの物質について、信頼すべき曝露量を得るために高感度・高特異性を合わせもつ測定法を新たに開発した。得られた微量な絶対値に即した生体影響評価法を見直し、Epigeneticsの観点から評価し得る手法を構築した。

## I はじめに

少産少子の社会にあっても、ひとたび子どもの未来を考えると、そこに無限の可能性を感じるのはわれわれ大人すべてに共通した感慨である。それゆえ、その未来に人為的な害を及ぼしてはならないという思いも共通している。にもかかわらず人類は過去に何度も次代の子どもたちに対して過ちを犯してきた。サリドマイドの薬禍、胎児性水俣病、ジメチルスチルベストール(DES)による次世代の発がんなどがその好例である。

20世紀の後半から、有機塩素系農薬、プラスチック製品やその可塑剤、洗剤中の界面活性剤などの一連の化学物質が生体内の内分泌系をかく乱して、人の健康に影響を及ぼすことが懸念されてきた。しかしながら、内分泌かく乱化学物質(環境ホルモン)に対する社会的な関心は、今世紀に入ってやや薄れてきた傾向にある。このことは、以前のようにわれわれの周囲を取り巻くすべての物質があたかも生殖現象に深刻な影響をもたらすという懸念が徐々に払拭され始めた結果だろうか。また内分泌かく乱化学物質としてあげられた膨大

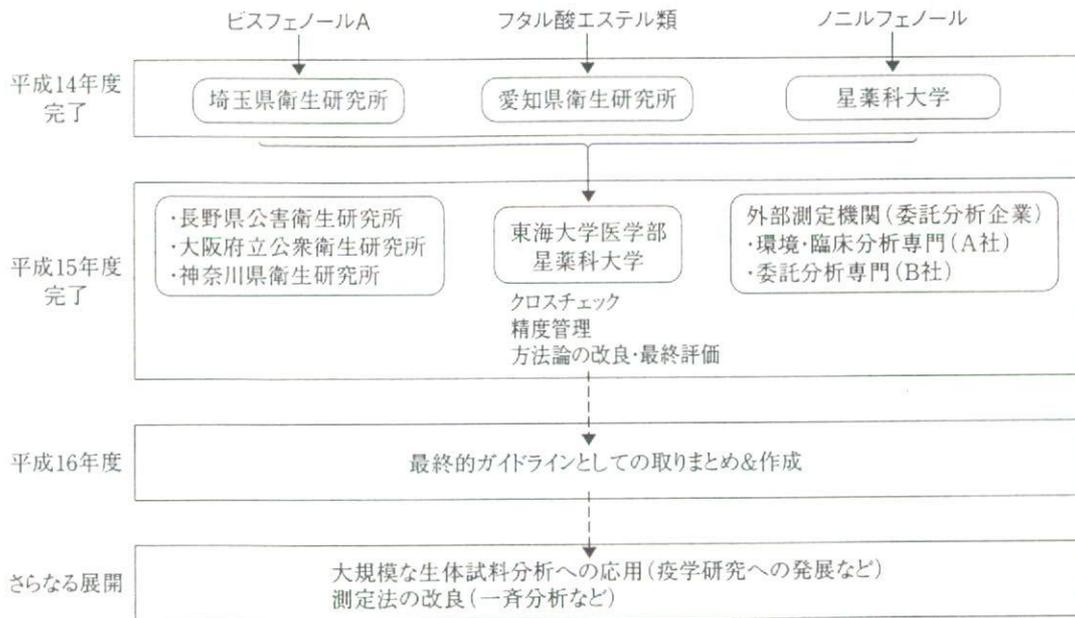


図1 化学物質測定法開発のスキーム

な数の物質群も次第に整理され始めた。

このような社会や科学の潮流が果たして正しいものか、信頼すべき測定法の開発、ヒトとくに周産期の母児への曝露量、健康影響に対する真の評価法、など今一度この機会に本稿で検証してみたい。

## II 化学物質測定の問題点

内分泌かく乱化学物質の障害に関する世論の沈静化とは別に、科学的に未解明な点もいまだ多く残されており、健康への影響が完全に払拭されたわけではない。その1つが真の人体への曝露量をどのように捉えるかという問題である。

各物質の測定法は現在、質量分析法によるか、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法によるかに大別できる。このほか幼弱動物の臓器重量を測定する生物学的測定法は生物学的影響をみるには優れているが測定感度は低い。一方、高感度の観点からは免疫学的測定法(RIA, ELISA法など)が優れているが似て非なるものをも測定し絶対値は総じて大きい。かつて、河川・湖沼などの化学物質による汚染が進み、人類の臓器、組織は多量の化学物質を含み、工業化学物質の汚染で人類は減びるのではないかと喧伝された際の化学物質の測定法はこの方法によるものが多かった。現時点で

ポスター

### 2つの顔をもつノロウイルス

●縦62×横28cm ●定価100円(96+税) ●送料 実費

社団法人 日本食品衛生協会

感度、特異性の両面で信頼できる測定方法は、質量分析法で、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーなどを組み合わせて測定物質に最も適した測定法をそれぞれ開発する。私どもは従来より図1に示すように、測定法のガイドラインとして耐え得る測定法をそれぞれの物質で開発してきた。

その際、測定法を開発しても、精度管理を常に行う必要がある。このなかには、試料採取の際の汚染の排除、採取容器の検討、バックグラウンドの値の検討、試料へ既知濃度の物質を添加しての回収率の検討など恒常的に行って、初めて真の曝露量を手に入れることになる。

### Ⅲ 化学物質の検討— 1

環境ホルモンとしてリストアップされた物質は過去多数にのぼる。このなかで、1999年から始まった厚生科学研究で表1のような物質が研究対象とされた。

表1 測定対象物質

1	ビスフェノールA
2	フタル酸エステル類
3	ノニルフェノール
4	ブチルスズ化合物
5	クロロベンゼン、パラベン類

ビスフェノールA(BPA)はポリカーボネートに

代表される年間推定26万トンの生産量が報告されたいわゆる樹脂原料である。その化学構造式から弱いエストロゲン作用が懸念されていた。

フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤として年間約30万トンの生産が報告されていた。代表的な用途として塩ビシート、電線の被覆材料などがあげられる。体内では多くの分解代謝産物があり、ジエステル、モノエステル型などに大別できる。

ノニルフェノール(NP)はアルキルフェノールとして総称される一群の化学物質で特にC9のノニルフェノールは界面活性剤、フェノール樹脂などに多用され、早くから内分泌かく乱化学物質として注目されていた。年間2万トンを超える生産量が報告された年度もあり、環境省でも初期から環境濃度を検討していた。メダカでの催奇形性は $6.08\mu\text{g}/\text{l}$ だが日本の河川、湖沼の標準環境濃度は $0.03\mu\text{g}/\text{l}$ とされている。

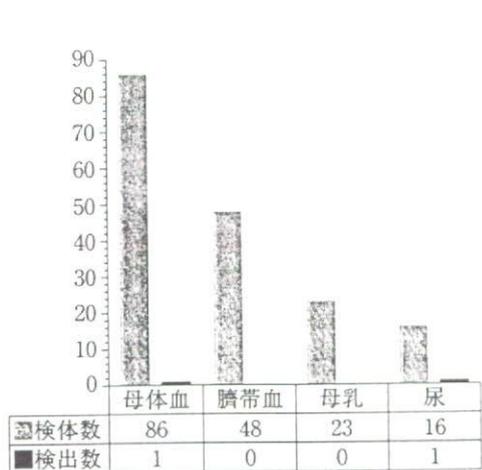
ブチルスズ化合物はかつて、漁網、船底の塗料として使用されていたが、現在開放形の用途には製造も使用も禁止されている。

クロロベンゼン、パラベン類は殺虫剤、防虫剤に用いられている。

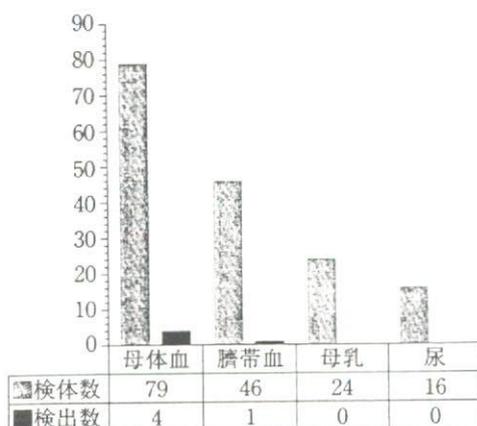
これらの物質の測定にあたり、新たに構築した前三者の測定法の感度、特異性について表2に示した。

表2 新たに開発した生体由来試料中のBPA、DEHP、NP測定法の測定感度

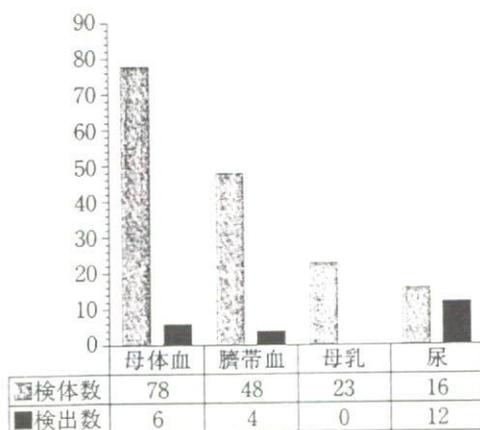
	必要サンプル量	測定法	ブランク値	検出限界 (ng/ml)	定量限界 (ng/ml)
ビスフェノールA (BPA)	1ml	LC/MS/MS	1.5 ppb (n = 8)	0.1	0.5
フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)	1ml	GC/MS	5 ppb (n = 20)	3	10
ノニフェノール (NP)	1ml	LC/MS	< 5 ppb	2	5



(a) BPA



(b) DEHP



(c) NP

図2 ヒト周産期試料中の(a)BPA, (b)DEHP, (c)NPの検出例

図2にはこれら物質の子どもへの健康影響として、周産期の試料特に母体血、臍帯血、母乳および尿について測定した結果を掲げた。その曝露量の詳細は、BPAはカットオフ値を0.5 ng/mlとして、その値以上で検出されたのは母体血、尿で各1例のみでその値も測定感度ぎりぎりの値であった。BPAについては今回新たに開発した高感度の測定法を用いても、生体試料の98.8%は検出できなかった。フタル酸ジエステルについてはカットオフ値を10 ng/mlとした場合、検出された試料数は母体血で4例、臍帯血で1例のみとなり、それらの測定値も低値で、全試料の96.9%は測定限界以下であった。アルキルフェノールについてはカットオフ値を5 ng/mlとした場合、母体血で6例、臍帯血で4例、尿で12例で全試料の13.3%は測定されたが、それらの測定値は前二者と同じく低値であった。

#### IV 化学物質の測定—2

上記の測定結果をふまえ、2005年度より表3に掲げる物質につき再度人体への曝露量を検討した。測定に際しては前項と同じく、まず感度・特異性に優れた測定法をそれぞれの物質について開発した。

表3 測定対象物質

1	ポリ臭素化ジフェニールエーテル
2	有機フッ素系化合物
3	ピレスロイド系農薬
4	有機リン系農薬
5	ニコチン, コチニン
6	フタル酸モノエステル, 2-EH <sub>ol</sub> , 2-EH <sub>al</sub>

ポリ臭素化ジフェニールエーテルは衆知のように合成樹脂の難燃材として電子機器に多量に使用されている。その化学構造から内分泌かく乱化学物質に指定され、早くから環境汚染物質に指定されている。近年、北欧で母乳中の増加が報告されているが、1980年以降年間少なくとも数万トン消

表4 ハウスダストに含まれる有機フッ素系化合物

測定対象物質	検出数	平均値 (ng/g)	最小値 (ng/g)	最大値 (ng/g)
PFOS	20/20	20.8	7.0	41.0
PFHxS	8/20	1.9	ND(<0.5)	5.5
PFNA	20/20	24.3	5.5	69.0
PFOA	20/20	39.8	17.5	88.5

費するわが国では健康への影響、とくに子どもに対する報告はきわめて少ない。

有機フッ素系化合物とくにパーフルオロ化合物は繊維の撥水剤、消火剤、界面活性剤として多方面で使用されている。野生の動物、海中の魚類への汚染は以前から報告されていたが、人体への取込みについては憂慮すべきいくつかの特徴が指摘されている。すなわち、PFOS(Perfluorooctanesulfonate)で8年、PFOA(Perfluorooctanoic acid)で4年と血中半減期がきわめて長い物質である。さらに生体内で難分解性で血液に特異的に蓄積し、すでに甲状腺機能かく乱作用、催奇形性などの報告がある。一方、臍帯血を通しての胎児への汚染、母乳を通しての新生児への汚染については情報が少ない。

ピレスロイド系農薬は家庭で使用される殺虫剤の約90%に用いられており、その多くが3-PBA(3-phenoxy benzoic acid)に生体内で分解される。

有機リン系農薬は現時点で世界で最も多く使用されており、殺虫剤としての使用量は全農薬の50%以上にのぼる。このなかでもクロルピリホスは以前から神経系や脳の発達に影響を及ぼすことが報告されており、メキシコの農業地帯では、子どもたちの体力、記憶力、協調性などの低下が報告されている。しかしながら、母体、胎児への曝露、影響の詳細は検討されていないのが実情である。

タバコ煙中には約4,000種類の化学物質が含まれ、そのうち約200種類は有害物質で、発がん物質も40~60種類含まれるとされている。これらの物質すべての曝露量を検討することは難しく、

本研究ではいわゆるニコチンとコチニンの同時測定法を構築し生体試料で検討した。

フタル酸エステルについては環境中に存在する意義をさらに検討するため、モノエステル類について検討した。

これらの物質について測定検討した結果のいくつかを以下にまとめてみた。子ども、とくに歩行開始前の幼児の生活空間(床面からの高さ)は成人と大きく異なる。そこで床面に集積するハウスダストを同位体希釈法ならびにGC/MSを使用した高精度微量分析法で検討したところ、収集したハウスダストにppmのオーダーで臭素化体の残留が認められた。

有機フッ素系化合物、とくにPFOSはすべてのヒト血中から検出され、PFOAも同じく高頻度に測定される。曝露源として飲食物、水、大気中の有機フッ素系化合物の濃度は低く新たに上記の臭素化化合物と同様、ハウスダストについて検討した結果が表4である。表のように、PFOS、PFOAのほかにPFNA(Perfluorononanoic acid)もハウスダストからは全例検出され、PFOAのほうがPFOSより高い、生体試料とは異なった挙動を示したが、いずれにせよハウスダストはほかの環境試料に比べ高い濃度の有機フッ素系化合物を含んでおり、幼児と接するハウスダストは、この物質の1つの曝露源となることが判明した。また母乳試料について検討したところ、本邦婦人の母乳中には平均60ng/lのPFOSが残留していることが初めて明らかになった。

表5 ヒト尿中におけるピレスロイド系殺虫剤 (3-PBA)の濃度

Sample No.	Sex	(ppb)	
		Free	Glucuronide
1	F	< 0.02	0.32
2	M	< 0.02	0.76
3	M	< 0.02	0.07
4	M	< 0.02	0.23
5	F	< 0.02	< 0.02
6	F	< 0.02	0.17
7	F	0.20	3.70
		< 0.02	0.23
8	M	< 0.02	0.28
9	M	0.09	0.50
10	F	< 0.02	0.15
		0.58 ± 1.05	

家庭で使用されるピレスロイド系殺虫剤の代謝産物 3-PBA については高感度 LC/MS-MRM 法で検討した。その結果、尿中では表5に示すように、3-PBA は遊離体ではすべてが測定感度以下 (0.02 ppb 以下) であったが、グルクロン酸抱合体は 0.02 ~ 3.7 ppb のレベルで検出されてきた。

フタル酸エステル類については、胎児、幼児は樹脂、塗料、化粧品、医療器具などから曝露される機会が多く、依然その毒性について懸念する声が消えない。そこで本研究の第2弾としてジエステル類から代謝されるモノエステル類について LC/MS/MS 法を開発して検討した。その結果を表6に示した。この表に見られるように、ヒト血中ではフタル酸モノブチル (MBP) が遊離型、抱合型のいずれでも検出される。

フタル酸エステル類の人体への曝露を総括すると、高感度、高特異性を有する測定法を用いて、そのジエチル型、モノエステル型を測定するといずれの型のフタル酸もヒト試料中から測定されてくる。ただしフタル酸全体の代謝経路を眺めると、最終的にはグルクロン酸との抱合型となって尿中へ排泄されるので、尿中のこれら物質を測定し、

表6 ヒト血清中フタル酸モノエステルの分析 (LOD: 0.1 ppb)

Compounds	Concentration (ppb)	
	Glucuronidase (-)	Glucuronidase (+)
1 MMP	< LOD *	< LOD
2 MEP	< LOD	< LOD
3 MBP	0.49 ± 0.08	1.00 ± 0.11
4 MBzP	< LOD	< LOD
5 MEHP	< LOQ (0.61 ± 0.04)	< LOQ (0.80 ± 0.12)
6 MEHHP	< LOD	< LOD
7 MNP	< LOD	< LOD

クリアランス値で補正して逆に人体への曝露量を推定する方法が合理的とも思える。

本研究で、特筆すべき結果の1つとして、子宮内で発育中の胎児の体表に付着するいわゆる胎脂に高濃度 (ng/g) のフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) が検出された点である。胎脂の生理的意義を含めて今後さらに検討すべき結果である。

同じく興味ある結果の1つとして子どもの健康とシックハウス症候群との関係である。DEHP の代謝はリパーゼによって、モノエステル型のフタル酸と 2-エチル-1-ヘキサノール (2-EHoI), 2-エチル-1-ヘキサナール (2-EHaI) などに分解されるが、成人女性血中 (n=38) には 2-EHoI 高頻度かつ高濃度 (ng/ml) に検出された。床材、壁材として多用されるフタル酸エステル類の存在とこれら曝露量との関係には今後検討の余地が多く残されている。

## V 化学物質の健康への影響の評価方法—新しい評価法の始まり—

これまで述べてきたように、生活のなかでわれわれを取り囲む化学物質のヒトへの曝露量と組織中の濃度については、測定感度・特異性に優れた測定法の開発と真に信頼すべき測定値の報告により、それ以前の社会不安を惹起した多くの報告数値が淘汰されたといってよい。それならば、その

信頼すべき測定値をもつていかにヒトの健康への影響を評価するかが次の課題である。

従来、今回得られた真の曝露量と比較すると極端に多量の化学物質を使用しての動物実験、培養組織への検討は、現実の健康への影響の評価方法としてはそぐわない点も多い。しかし、内外の基礎研究を網羅・整理してもごく微量の化学物質の人体への影響の評価方法は皆無に等しい。

本研究ではこれらの事情を背景に、微量な化学物質の生物への作用の評価方法を、今一度細胞工学的観点から見直した。

最新のヒトの全遺伝情報(いわゆるゲノム)が解読された後も、なぜ細胞の種類に特徴的な形質が生じるか、またそれが維持されるか、真のメカニズムは依然不明である。具体的には、ヒトは1個の細胞(受精卵)から始まり最終的には200種以上の細胞に分化し生命を維持する。これら細胞の

DNA塩基配列はすべての細胞で同一にもかかわらず、異なった細胞の特徴はどこから生じるのか。あるいは各細胞をから発症する多くの疾患のonまたはoffのメカニズムはどこに存在するのか。本研究では細胞内のDNA塩基配列はすべての細胞で不変でも、DNA中のシトシンのメチル化、ヒストンのアセチル化の有無が細胞機能の制御機構を担っているとするEpigeneticsに着目して研究を開始してきた。

本研究は、これまで述べてきた化学物質の測定法の開発と同様、Epigeneticsではその理論とは別に手技的な方法をまず開発しなくてはならない。具体的には化学物質評価のためのEpigeneticsのツール化の開発が不可欠である。「化学物質の人体への作用が、遺伝子(DNA)そのものの変化を生じさせるのではなく、それら後天的要因がDNA上(epi)の環境を変化させ、メチル基、アセチル基に

文部科学省認定・通信教育 「統計手法」を「仕事」に活かす。「統計実務講座」

# 統計の資格と実力



**資格** — 「統計士」の資格が取得できる。  
(「統計士」資格認定試験制度・詳細は資料で)

**受講生募集中**  
**詳しい案内書**  
**無料進呈**  
ご希望の方は下記へ！



★統計の基本から統計的手法がマスターできる!  
★いろいろな統計的手法が実際に活用できる!  
★エクセルによる統計解析力をつける!

●あらゆる分野でパソコン活用の今日、統計の基本をマスターした人が求められています。●本講座なら、統計の基本から、回帰相関、推定検定、調査法、品質管理、実験計画法など、各種統計的手法が実例を通して身につきます。  
●企画・調査・医学・薬学・品質管理・看護・金融・証券・生保・損保関係者に最適です。●大学生・院生には、研究や就職に必須の講座・資格です。●修了後は、統計スペシャリストとして活躍できます。  
●指導委員=芳賀敏郎・野澤昌弘先生他。修了者に「修了書」と「統計士」資格認定証書を交付します。  
◆無料進呈中!ご希望の方はハガキかTEL、FAXで下記まで!

●特 色●本講座のテキストに対応したパソコン利用の方法をまとめた「エクセルによるデータ解析・統計プログラム集/CD付き」を特別に提供いたしますので初心者には最適!

**財団法人 実務教育研究所** 食品衛生研究係

〒160 東京都新宿区大京町4の408 TEL.03-3357-8153  
http://www.jitsumu.or.jp FAX.03-3358-7259

160-0015  
東京 東京都新宿区  
大京町4の408  
財団法人  
実務教育研究所  
食品衛生研究係

氏名 住所 〒 「統計」資料を希望

●ご希望の方は、ハガキか電話で左記へ ●  
●FAXの場合は、統計講座「食品衛生研究」係へ ●

27