

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 牧野 恒久

平成20（2008）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究	1
主任研究者 牧野 恒久 東海大学 医学部	

(資料) 資料名

(資料) 資料名

(資料) 資料名

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	31
------------------------	----

主任研究者 牧野 恒久 （東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科 教授）

研究要旨

本研究は化学物質による子どもへの健康影響を調査するために、以下の3つのユニットで構成される：① 生体試料中の危害化学物質の分析法の開発・構築、② 化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング（胎児期を中心に）、③ 化学物質の胎盤、機能と胎児発生におけるエピジェネティックな影響の解明。また、とくに②に関しては、平成14年～16年度の厚生労働科学研究「試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究」（化学物質リスク研究事業）で分析ガイドライン（「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補その2」に収載）を作成した3物質（ビスフェノールA、ノニルフェノール、フタル酸エステル類）の継続的生体暴露量のモニタリングの意味もある。

① および②については、以下の1～7に細分して分担研究された：

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

ピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬の暴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暴露量を測定した。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暴露マーカーには、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。また、念のため曝露源としてトータルダイエット法により食品を調査したところ、ピレスロイド系農薬は検出されなかった。以上の結果からピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬の暴露量は、一般的に極微量であることが示唆された。

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

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、ヒトへの広範囲な曝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曝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分析法を構築し、母体血、臍帯血の分析法を妊婦の尿試料分析へも応用し、広範な暴露量解析を行った。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析

ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) および有機塩素化合物の分析法を開発し、食品中とハウスダスト試料で検討した。食品(トータルダイエツト試料)中のポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs, 3-10 臭素化物 36 異性体)を測定した。その結果、第 4 群(油脂類)および第 5 群(豆類)、第 10 群(魚介類)、第 11 群(肉・卵類)から PBDEs が 1.82, 0.03, 0.48, 0.01ng/g の濃度で検出された。第 10 群はペンタ-BDE 由来、第 4 群はデカ-BDE 由来の異性体の残留が顕著であった。また、ND=0 として試算すると、食事から摂取するペンタ-BDE の 93%が魚介類経由であった。成人における全食品群からのペンタ-BDE (3-6 臭素化物 26 異性体)の合計一日摂取量は、ND=0 として計算した場合で 46ng/人/日であり、欧州で報告されている食事由来の PBDEs 摂取量と同程度の値であった。また、これまで国内の食用植物油の PBDEs 汚染実態は不明であったが、今回、市販の 18 銘柄の植物油試料を対象に PBDEs (3-10 臭素化物、8 異性体)の残留実態調査を実施した結果、7 銘柄の植物油試料(ナタネ油、調合油)から 0.7-4.3ng/g の PBDEs が検出され、一部の製品中に低レベルながらも PBDEs が残留していることが明らかとなった。また、大阪府内の 4 家庭から採取したハウスダスト試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) を分析した。全てのハウスダスト試料からデカ BDE 関連成分を中心とする PBDEs が 190~1100 ng/g の濃度で検出され、一般家庭環境における普遍的なデカ BDE 汚染および乳幼児の慢性的なデカ BDE 暴露が示唆された。ハウスダストの非意図的摂取による乳幼児の PBDEs 暴露量試算値(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、各原体の参照用量(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暴露評価

血清中のフタル酸モノエステル類[フタル酸モノメチル(MMP)、フタル酸モノエチル(MEP)、フタル酸モノブチル(MBP)、フタル酸モノベンジル(MBzP)、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)(MEHP)、フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル)(MEHHP)及びフタル酸モノイソノニル(MiNP)]の高精度分析法を開発した。周産期に採取された母子関係が明確な試料(母体血清、臍帯血清、母乳及び胎脂)中のフタル酸エステル類を測定した。母体血清及び臍帯血清からフタル酸モノエチル(MEP)、フタル酸モノブチル(MBP)及びフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)(MEHP)を検出し、それぞれ、0.3, 13.9 及び 3.1ng/mL (中央値, n=12)であった。また、臍帯血清中では、それぞれ、0.3, 12.7 及び 2.2ng/mL (中央値, n=12)であった。このことから、フタル酸モノエステル類の血清中の濃度は、母体及び胎児間で同程度であることが示唆された。母乳から同様に MEP, MBP 及び MEHP を検出し、それぞれ、0.5, 26.0 及び 27.9ng/mL (中央値, n=11)であった。妊婦 (n = 51), 及び健康な 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) を分析した。全ての尿から, 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(妊婦中央値: MEP, 12.7; MBP, 44.9; MBzP, 6.73; MEHP, 3.54; MEHHP; 15.5; MiNP, < 0.5 μ g/g creatinine)。当該分析値から DBP 及び DEHP の推定一日暴露量を算出した結果, 耐容一日摂取量 (DBP, 66; DEHP, 37 μ g/kg/day) を越える事例は認められなかった。

フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP): 胎脂中から DEHP (3, 570-92, 100ng/g, n=5)を検出した。MEHP は、10ng/g 未満であった。また、当該胎脂を採取した新生児の臍帯血及びその母体の血清中の DEHP の濃度は、それぞれ、4.1-6.0 及び 2.6-5.4ng/mL であった。胎脂中の DEHP は、胎脂が胎児体表上に形成され

る6ヶ月目以降の期間を通じて蓄積されたものである可能性が高いと考えられた。

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）

東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者（以下「患者」と省略する。）の血清及び尿試料の分析を行うとともに、得られた分析結果と子宮内膜症との関連について解析を行った。

1) 血清中の重金属類の分析及び解析：患者48人の血清の分析を行った結果、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。昨年度分析を行った36人と合わせた84人の結果について、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（Cu; $0.89 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$ 、Se; $110 \pm 16 \text{ ng/mL}$ ）が対照群（Cu; $0.99 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$ 、Se; $120 \pm 18 \text{ ng/mL}$ ）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) 尿中のフタル酸モノエステル類の分析及び解析：患者29人の尿中のフタル酸モノエステル類（フタル酸モノブチル、フタル酸モノエチル、フタル酸モノエチルヘキシル、フタル酸モノイソノニル、フタル酸モノベンジル）の分析を行った結果、フタル酸モノブチルとフタル酸モノエチル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 $35.2 \mu\text{g/g}$ 、 $16.4 \mu\text{g/g}$ 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、フタル酸モノブチルでは1.6倍高く、フタル酸モノエチル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、 $0.46 \mu\text{g/kg/day}$ （いずれも中央値）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) 血清中の揮発性有機化合物（2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナール、1,4-ジクロロベンゼン）の分析及び解析：患者38人の血清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。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

初期の子供への影響を検討するため、母子関係を重視し、新生児側試料をその母体側試料と関連づけて採取しペアで分析した。母体側の母体血、母乳を、新生児側は臍帯血を基準試料とし、平成14年～16年度の厚生労働科学研究の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。また、さらに妊娠予備時期と考えられる、生殖年齢の婦人への暴露を検討するために、生殖年齢の婦人から腹水を含む生体試料を採取した。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。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。また、この検討から危惧された生殖婦人の体内脂肪において、DEHPは検出されなかった。最終的には、以上の3測定物質以外の化学物質についても、共同研究班の結果を集め、一括して暴露評価ができるよう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

周産期の生体試料（母体血、母乳、母体尿、臍帯血、臍帯、胎盤）に含まれる重金属（アルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛）の測定法開発を試みた。誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）により母乳中ヒ素を除く全元素の測定が可能となった。この方法により30例の母子一連試料を測定した結果、高レベルでの重金属汚染が疑われるサンプルはみとめられなかった。

また、発生段階の中枢神経系における重金属の発生毒性を評価するため、「神経幹細胞」を用いた毒性評価法の開発を試みた。この評価系によって神経幹細胞に対する増殖抑制、未分化維持能の阻害、分化阻害といった発生毒性を評価することが可能となった。そこで、臍帯血清レベルの重金属毒性を評価したところ、顕著な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（＝③）

エピジェネティクスは、DNA メチル化とヒストン修飾によるクロマチン構造の変化を伴う遺伝子発現の記憶装置である。人は様々な化学物質に暴露されており、その一部は胎児の発生にも影響を与える事が懸念されている。そこで、本研究ではこれまでに当研究班で明らかにされた母体中に存在する化学物質について胎児の発生への影響の有無を検討するために、初期発生胎児のモデルと考えられる ES 細胞を用いて、エピジェネティクスを指標とした解析を行った。その結果、DEP、コチニン、水銀、セレン、S-421 といった化学物質は、血中濃度程度の比較的低濃度で暴露した場合でも、DNA メチル化状態やヘテロクロマチン形成に影響を与え得る事が示唆された。この中で特に重篤な影響の見られた DEP については、本研究で開発したゲノムワイドなメチル化解析法である D-REAM (T-DMR Restriction-tag-mediated amplification) 法を用いて遺伝子領域の詳細な解析を行った。

分担研究者

中澤 裕之：星薬科大学 薬品分析化学 教授
和泉俊一郎：東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科 教授
近藤 文雄：愛知医科大学 医学部 薬理学講座 准教授
堀江 正一：埼玉県衛生研究所 水・食品担当部長
塩田 邦雄：東京大学大学院農学生命科学研究科 細胞生化学 教授

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、日常的に暴露されながらも暴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。本研究は化学物質による子どもへの健康影響を調査するために、以下の3つのユニットで構成

される：① 生体試料中の危害化学物質の分析法の開発・構築、② 化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング（胎児期を中心に）、③ 化学物質の胎盤、機能と胎児発生におけるエピジェネティックな影響の解明。また、とくに②に関しては、平成14年～16年度の厚生労働科学研究「試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究」（化学物質リスク研究事業）で分析ガイドライン（「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補その2」に収載）を作成した3物質（ビスフェノール A、ノニルフェノール、フタル酸エステル類）の継続的生体暴露量のモニタリングの意味もある。

① および② については常に連動しているが、物質別に、以下の1～7に細分して分担研究された：

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

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。

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

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ナ酸（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、未だに研究の途上にあり、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。

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、周産期の妊婦がタバコ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、ヒト生体試料中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。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析

ポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）は、合成樹脂の難燃剤として国内外で広く使用されてきた化学物質である¹⁾。一方、PBDEsは残留性環境汚染物質として近年問題視されており、げっ歯類での経口投与実験において甲状腺機能や脳神経機能への悪影響が報告されている²⁾。米国では1990年代のペンタBDEの使用量が他国より多く、人体中のペンタBDE濃度が我が国や欧州より数十~数百倍高いレベルにあり、その暴露経路としてペンタBDEに汚染された屋内大気・ハウスダストの吸引が示唆されている³⁾。

我が国でも、これまでにデカBDEを中心としたPBDEsが10万トン程度使用されたと推定されているが、屋内汚染実態および日常的なPBDEs暴露量については不明な点が多いのが実情である。そこで本研究では、我が国のハウスダスト中のPBDEs残留実態の把握および一日暴露量の推定を目的とした。

4. フタル酸エステル類の子どもへの暴露評価

フタル酸ジエステル類は、主に塩化ビニル樹脂の可塑剤として工業製品中に多用されており、日常的な暴露が危惧される化学物質のひとつである。当該化学物質の暴露により危惧される生体影響として精巣毒性があり、妊婦及び胎児もしくは男子乳幼児が高感受性グループとして認識されている。

このため、妊婦、胎児及び乳児の当該化学物質群の暴露量を把握することは、重要である。しかしながら、国内での情報は、極めて少ないのが実状である。研究者らは、妊婦の尿中フタル酸モノエステル類を測定し、その測定値から推定一日暴露量を評価することとした。本研究を遂行することによって、国内における妊婦、胎児及び乳児の当該化学物質群の暴露量を推測するうえで有用な情報を得ることが期待される。

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)

本研究では、一般人での暴露量が多い重金属類、フタル酸エステル類、揮発性有機化合物に対する生体暴露量をモニタリングする。さらに、暴露と子宮内膜症等産婦人科領域の疾患発症との因果関係を比較検証することを目的とする。具体的な測定対象物質は、ヒトにおいて健康との関連が大きいと考えられる必須ミネラルを始めとする重金属類、フタル酸エステル類の代謝物であるフタル酸モノエステル類、さらには、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝物である 2-エチル-1-ヘキサノール及び 2-エチル-1-ヘキサナール、主に防虫剤として用いられる 1,4-ジクロロベンゼンとし、血液及び尿を分析する。研究初年度は、上記分析対象化学物質について、ヒト生体試料中の分析法を確立した。研究 2 年目の昨年度は、確立した分析法を用いて実試料の分析を行った。本年度は、さらに実試料を分析するとともに、得られた分析結果と子宮内膜症との関連について解析を行った。

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

化学物質による子どもへの健康影響を考える場合、より幼弱な時期の暴露がより甚大な影響を及ぼすことが危惧される。そのためには、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周産期試料だけでなく、妊娠予備時期と考えられる、生殖年齢の婦人への暴露も検討することが必要と考えられるために、生殖年齢の婦人から腹水を含む生体試料を採取した。さらに、水性試料(腹水・血液・尿等)とは別に脂性試料(胎脂・臍帯・母乳・体内脂肪)にも検討項目を拡大して測定を試みた。

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、生殖年齢婦人の試料を採取した。同様に、母体側

試料と新生児試料を採取し、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。

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

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。これらの障害は、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。重金属の中には成人のみならず、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存在する。そこで、本研究で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ために、母親-新生児一連の生体試料を採取し誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いて重金属量を測定することを目的とした。

また、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も、重金属の影響が懸念されている。しかしながら、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。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から、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。そこで本研究では、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構築を試みた。

8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

近年、発生異常やガン、慢性疾患の原因としてエピジェネティック異常が検出される例が多数報告され、発生異常や病態を誘発する原因因子の探索が重要になってきた。これまでに、人類は多種多様な化学物質を単離、合成することで生活を豊かにしてきたが、日常生活において様々な化学物質に暴露されることによる影響が懸念されている。そこで本研究では、身近に存在する化学物質で人体への影響が疑われているものについて、その血中に存在している程度の比較的低い濃度でも胎児の発生に影響を与え得るかどうかを検討するために、マウス胚性幹(ES)細胞を用いて化学物質暴露によるエピジェネティック状態や分化能への影

響を解析する。

B. 研究方法

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) 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。

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 50 mL 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, Sulsatase ; 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 5 mL、水 5 mL 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。

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。

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 100 ng/mL となる混合標準溶液を調製し、その

10 μ 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 100 ng/mL の溶液を調製し、その 5 μ 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 5 mL, 血清 2 mL を 50 mL 用ポリプロピレン製チューブに採取し、飽和食塩水 2 mL, 食塩 4 g 及び 6 mol/L 塩酸 2 mL を加えて後、酢酸エチル-アセトニトリル (7:3) 10 mL を加え、5 分間振とう抽出した。振とう抽出液を 3,500 rpm で 10 分間遠心分離後、酢酸エチル-アセトニトリル層を 5 mL 分取し、減圧乾固後 20% アセトニトリル溶液 1 mL に溶解して試験溶液とした。

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 2 mL, 血清 1 mL 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 (200 mg) 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 1 mL 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 2 mL, 血清 1 mL を採り、内部標準物質である 2-PBA を 20 ng 加えた後、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5) 2 mL, β -グルクロニダーゼ 6,500 units/mL (試薬 β -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 μ L 加え、37℃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。

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) 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 $^{13}\text{C}_4$ -PFOS及び $^{13}\text{C}_2$ -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。

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_3 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 $^{\circ}\text{C}$ 、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_3 (m/z 166) 及びコチニン- d_3 (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。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析

1) 試料

PBDEs濃度認証済のハウスダスト標準参照試料(NIST SRM 2585)および2007年11月に紙パック捕集型ハンディクリーナー(Hitachi Model PV-H22, 紙パックGP-S35F)を用いて大阪府内の4家庭で採取したしたハウスダスト(最終100 μm メッシュで篩い分けしたもの)を試料とした。また、ブランク試料には無水硫酸ナトリウムを用いた。

NIST SRM 2585中のPBDEsの分析結果については、公表されている水分含量(2.1%)⁴⁾に基づき補正した結果(乾燥重量あたり濃度)を認証値⁴⁾と比較

した。一方、大阪府内の4家庭で採取したハウスダスト試料については、試料の絶対量が少なく、正確な水分含量の測定が困難と予想されたことから、水分含量の測定は実施せず、今回の調査では湿重量あたり濃度を用いて考察を行った。

2) 試薬

AccuStandard 社 製 BDE-AAP-A-15X, BDE-196S/197S/203S/208S-0.2X および Wellington 社製 BDE-206/207/209 をNative体の標準原液として使用し、3-10 臭素化 PBDEs 36 異性体を測定対象とした。クリーンアップスパイク溶液には炭素安定同位体(^{13}C)で標識化された $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-28, 47, 99, 153, 154, 183, 197, 207, 209 (Wellington Laboratories 社製 MBDE-MXC, MBDE-197/207/209)のヘキサン混合溶液を使用した。また、シリンジスパイクには $^{13}\text{C}_{12}$ -PeBDE-126 (CIL 社製 EO-4930)のヘキサン溶液を使用した。ヘキサン、エタノール(以上、残留農薬・PCB 試験用 5000 倍濃縮保証品)、ノナン(ダイオキシン類分析用)、44%硫酸シリカゲル(ダイオキシン類分析用)、アセトン(試薬特級、器具の一次洗浄に使用)および無水硫酸ナトリウム(PCB・フタル酸エステル試験用)は和光純薬社製を用いた。

3) 操作

試料0.1 gを遠沈管に精密に秤取後、クリーンアップスパイクおよびアセトン10 mL、ヘキサン20 mLを加えて15分間超音波抽出した。遠心処理(3000 rpm, 5分間)後、ろ紙ろ過して抽出液を採取した。さらに残渣を同様に超音波抽出し、抽出液を採取した。合わせた抽出液を減圧乾固後、少量のヘキサンに溶解した。この試料溶液を予めヘキサンで洗浄した44%硫酸シリカゲルカラム(充填量1g)に負荷し、ヘキサン10 mLでカラムからPBDEsを溶出した。回収液を減圧乾固後、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)により、PBDEsの溶出画分を回収した。回収液を濃縮試験管に移し、シリンジスパイクおよびノナン250 μL を添加し、窒素ガス吹き付けで250 μL に濃縮し、GC/MS測定に供した。

4) 装置条件

4-1 GPC

装置: Waters社GPCシステム

カラム: Shodex CLNpak EV-GAC + EV-2000AC

移動相: アセトン/シクロヘキサン (3:7, v/v)

流速: 5 mL/min

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

採取条件: 12~28 minの画分を採取

4-2 GC/MS

装置: JEOL JMS-GCmateII GC/MSシステム

注入口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$

注入法: パルスドスプリットレス, 1 μL

パルス圧: 20 psi (0-1.6 min)

キャリアガス：ヘリウム（カラム流量 1 mL/min）
GC カラム：Restek Rtx-1ms (15 m × 0.25 mm ID, 膜厚 0.1 μm)
GC カラム昇温条件：100°C (2 min) - 10°C/min - 310°C (3 min)
トランスファーライン温度：310°C
イオン源温度：280°C
イオン化電流：300 μA
イオン化エネルギー：35 eV
加速電圧：2500 V
分解能：1000
イオン化モード：EI
検出法：SIM

4. フタル酸エステル類の子どもへの暴露評価

1) 試薬等及び器具

フタル酸モノエチル (MEP), フタル酸モノブチル (MBP), フタル酸モノベンジル (MBzP), フタル酸モノ(2-エチルヘキシル) (MEHP), フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル) (MEHHP) 及びフタル酸モノイソノニル (MiNP) を分析対象とした。MEP, MEP-¹³C₄, MBP, MBP-¹³C₄, MBzP, MBzP-¹³C₄, MEHP, MEHP-¹³C₄, MEHHP, MEHHP-¹³C₄, MiNP 及び MiNP-¹³C₄ の各 100 μg/mL アセトニトリル標準溶液は, Cambridge Isotope Laboratories 社より購入した。β-Glucuronidase (8.5 U/mL; *E. coli* 由来), 酢酸アンモニウム (特級) 及びギ酸 (HPLC 用) は, 和光純薬社製を用いた。アセトニトリルは, 環境分析用を用いた (和光純薬)。分析に用いる超純水は, ミリポア社製の Milli-Q SP.TOC. により作製したもの (Milli-Q 水) をそのまま用いた。本研究を通じて, コンタミネーションの原因となりうる樹脂製器具を可能な限り排除し, 加熱可能なガラス器具は, Milli-Q 水, アセトン及びヘキサンで洗浄した後, 乾熱乾燥機中で 200°C で 2 時間以上加熱し, 清浄な場所で冷却して用いた。

2) 試料

東海大学医学部産婦人科で採取された, 分娩翌日の母親の尿試料 (n=51; 平均年齢 31.4 歳) を測定した。これら試料は, 冷凍下で移送され, 分析時まで -40°C で保存した。なお, 試料採取時に提供者母子について, 健康上の異常は認められなかった。また, 対照群として健康な 20 及び 30 歳代のボランティア (n=12; 男性, 7 名; 女性, 5 名; 平均年齢 31.8 歳) の尿を大阪府立公衆衛生研究所で採取し, 分析時まで -40°C で保存した。

3) 前処理及び分析条件

試験液の調製には, 吉村らの方法を用いた。解凍後直ちに尿 1.00 g に 100 ng/mL 内部標準混合溶液 100 μL, 0.2 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH 6.5) 1 mL 及び 8.5 U/mL

β-Glucuronidase 60 μL を添加して攪拌後, 40°C で 60 分間インキュベートした。インキュベート後, 氷上に移し, 0.2 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH 8.0) 1 mL を添加した。全量を予め, アセトニトリル 15 mL 及び Milli-Q 水 5 mL でコンディショニングした OASIS MAX (6 cc, 150 mg; Waters) に負荷した。次にカラムを Milli-Q 水 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL で洗浄し, 1% ギ酸含有アセトニトリル 5 mL で測定対象物質を溶出した。当固相抽出過程にはジグプレッパバキューummマニホールド (SUPELCO) を用い, カラム先端には, ディスポーザブルライナー (SUPELCO) を装着して試料間のコンタミネーションを排除した。溶出液は, 窒素気流下, 40°C で乾固した後, 20%アセトニトリル含有水 0.5 mL に再溶解して LC/MS/MS の試験液とした。なお, 尿中クレアチニンの測定には, Jaffe 反応に基づくクレアチニンアッセイキット (Cayman Chemical) を用いた。

4) 倫理面への配慮

試料は, 東海大学医学部及び大阪府立公衆衛生研究所の倫理規定に則って採取された。また, 実験に用いた有機溶媒等は, 環境中へ排出されないよう回収を徹底した。

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) 対象者及び試料

研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い, 承諾の得られた東海大学医学部附属病院産婦人科受診患者 (以下「患者」と省略する。) の血清及び尿を使用した。重金属類は 48 人の患者の血清、フタル酸モノエステル類は 29 人の患者の尿について分析を行った。

2) 重金属類の分析

2-1 試薬及び材料

分析対象重金属類 24 元素及び内部標準元素 (スカンジウム (Sc)、イットリウム (Y)、イリジウム (Ir)) の標準品は, メルク製 ICP 分析用標準溶液を使用した。硝酸、過酸化水素は関東化学製 Ultrapur を使用した。

2-2 測定項目

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

(19 元素)

2-3 器具の洗浄

ピペットチップ、サンプルカップ等の使用器具は, 10 %硝酸槽に一夜浸漬し, 水道水及びイオン

交換蒸留水で十分に洗浄した。使用前に超純水で洗浄した。

2-4 前処理法及び試験溶液の調製法

マイクロ波分解用容器(MV-7 専用 PFA 小容器、ジーエルサイエンス製)に血清 0.7 mL、硝酸 1.8 mL、過酸化水素 0.5 mL を入れて一夜放置し、電子レンジ(200 W)で 5 分、2 回加熱後、氷中で 1 時間冷却した。酸分解後の試料をポリエチレン製遠沈管(15 mL)に入れ、超純水で分解用容器内を洗い込んで全量を 3 mL にした。混和後、その 1.8 mL を ICP-MS オートサンプラー用サンプルカップ(15 mL)にとり、0.1 %硝酸 0.9 mL、内部標準溶液(Sc, Y, Ir 各 100 ppb) 0.3 mL を加え、混和して試験溶液とした。

2-5 分析方法

測定法；誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)法

定量法；絶対検量線法

2-6 ICP-MS 条件

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

RF パワー：1500 W

サンプリング位置：8 mm

プラズマガス：Ar 15 L/min

ネブライザー：バビントン型

内部標準元素：Sc(45)、Y(89)、Ir(193)

干渉補正式：

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

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

2-7 定量法

試験溶液を ICP-MS に導入し、各元素のカウント数を内部標準のカウント数で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。

3) フタル酸モノエステル類の分析

3-1 試薬及び材料

フタル酸モノエチル (MEP)、フタル酸モノブチル (MBP)、フタル酸モノエチルヘキシル (MEHP)、フタル酸モノイソノニル (MINP)、フタル酸モノベンジル (MBzP)、MEP- $^{13}\text{C}_4$ 、MBP- $^{13}\text{C}_4$ 、MEHP- $^{13}\text{C}_4$ 、MINP- $^{13}\text{C}_4$ 、MBzP- $^{13}\text{C}_4$ は Cambridge Isotope Laboratories 社製、 β -グルクロニダーゼ溶液 (100 units)、フロリジル PR は和光純薬製、酢酸アンモニウムは和光純薬製特級、硫酸ナトリウムは和光純薬製残留農薬用、Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) は関東化学製水質試験用、ヘキサン、アセトン、塩化ナトリウムは関東化学製フタル酸エステル試験用、N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine はジーエルサイエンス製を使用した。尿クレアチニン値は、和光純薬製クレアチニン-テストワコーを用いて測定した。

3-2 器具・試薬の前処理

ホールピペット、メスフラスコ以外の器具は、200℃で 2 時間加熱し、使用直前にアセトン及びヘキサンで洗浄した。

塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200℃で 2 時間加熱した。

3-3 フロリジルカラムの調製

内径 15 mm、長さ 110 mm のガラス製カラムの底に、ガラス繊維濾紙を敷き、フロリジル 1 g 及び無水硫酸ナトリウム 2 g を積層した。使用直前にアセトン 10 mL、ヘキサン 10 mL で洗浄した。

3-4 試験溶液の調製法

尿 2 mL を共栓付遠心管 (10 mL、ガラス製) にとり、1M 酢酸アンモニウム 0.5 mL、内部標準溶液 25 μL 、 β -グルクロニダーゼ 30 μL を加え混和した後、37℃で 1 時間インキュベートした。10%硫酸で pH2 に調整後、ヘキサン 5 mL、塩化ナトリウム 1 g を加え、3 分間混和後 3000 rpm で 5 分間遠心分離した。ヘキサン相を分取し、窒素気流下で乾固した。残渣に用時調製したジアゾメタン-MTBE 溶液 0.5 mL を加え、30 分間放置後、窒素気流下で乾固した。残渣をヘキサン 5 mL に溶解し、フロリジルカラムに負荷した。ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を窒素気流下で 1 mL に濃縮して試験溶液とした。

3-5 ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 条件

装置：Agilent 6890N GC/5973N MSD

イオン源：EI

カラム：HP-5MS SV (30 m x 0.25 mm ID、膜厚 0.5 μm)

カラム温度：80℃ (3 分) → 20℃/分 → 240℃ → 10℃/分 → 300℃ (5 分)

キャリアガス：He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度：250℃

試料注入法：パルスドスプリットレス

四重極温度：150℃

イオン源温度：230℃

検出法：選択イオン検出 (SIM)

モニターイオン：

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

3-6 定量法

試験溶液 2 μL を GC/MS に注入し、各メチル化フタル酸モノエステルのピーク面積を内部標準のピーク面積で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。

4) 解析方法

症例の子宮内膜症の有無は、腹腔鏡によりその進行期分類 (American Society Reproductive Medicine (ASRM) 改訂版) とともに確定診断を行った。統計処理は、SPSS11.5 for Windows を用い、検定は Mann-Whitney の U 検定で行った。

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。生殖年齢の婦人からの採血、腹水採取に際しては、採取器具からのコンタミネーションを防止するために、本研究開始前の基礎実験の結果に基づいた方法に従って施行した。

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) 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。

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。

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。

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 µL 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。

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 µm)

カラム温度: 80℃ (3 分) → 20℃/分 → 240℃ → 10℃/分 → 300℃ (5 分)

キャリアガス: He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度: 250℃

試料注入法: パルスドスプリットレス

四重極温度: 150℃

イオン源温度: 230℃

検出法: 選択イオン検出 (SIM)

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-d₁₆ (BPA-d₁₆) は関東化学製 (株) の環境分析用試薬を、¹³C-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、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：Isolute 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。

2) 装置及び測定条件

2-1 高速液体クロマトグラフィー質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。

2-2 ガスクロマトグラフィー質量分析計：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×30m×0.25 μm

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

注入口温度：250℃

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℃

イオン化電圧：70V

モニターイオン (*m/z*)：BPA(357, 372), BPA-*d*₁₆ (368, 386), ¹³C-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 μL 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 ¹³C-BPA を 100ng 添加し、BSTFA 200 μL 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、¹³C-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 Isolute 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 μL 加えた後、37℃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 μg 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 μL 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 μL と ¹³C-BPA 0.1 μg を加え、37℃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。

【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℃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 μm)
- ・ガードカラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2 x 5 mm, 5 μm)
- ・前処理用カラム: TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 μm)
 - ・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 μl

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℃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 μg/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℃) 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 μg/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、Vortex 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、Vortex 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 1 mol/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化処理した。誘導体化処理終了後、1 mol/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、Vortex 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℃ (1min) $\rightarrow$ 10℃/min $\rightarrow$ 300℃ (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℃

MS 条件

イオン化法 : EI
 イオン化電圧 : 70 eV
 イオン源温度 : 250℃
 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。

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

1-1 試料の採取

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。

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)

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%硝酸溶液に一晚浸漬した後、超純水で流水洗浄した。サンプル調整に用いるピーカー、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。

1-4 試料の前処理および ICP-MS 条件

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。

2) 神経幹細胞培養による重金属の発生毒性評価

胎齢 14 日 (E14) の C57BL6 マウス E14 マウスの大脳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)および陽性コントロールとして 200ppb の重金属混合溶液

(Al・Cd・As・Pb) を添加し、1 週間培養を行った。ニューロスフェア培地として B27 (1:50)、bFGF (20ng/ml)、EGF (20ng/ml) および抗生物質を含む DMEM/F12 培地を用いた。

培養後 1 週間目に重金属添加、または非添加条件でニューロスフェアの直径を計測して増殖能を評価した。また、形成されたニューロスフェアから RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR で未分化マーカー遺伝子 (Nestin, Sox2, Notch1) の発現量を比較定量した。続いて、ニューロスフェアを培養後 1 週間目にファイブロネクチ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、ニューロンに対する特異抗体である抗- α -III tubulin 抗体を用いて免疫染色をおこなった。

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

本研究班では、これまでに 25 種類の化学物質 (3-PBA, TCP, DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP, DEDTP, S-421, nicotine, cotinine, PFOA, PFOS, 2-EH, 2-EHA, DCB, Sn, Se, Cd, Hg, Pb, pentaBDE, decaBDE, DEHP, MEHP) について、妊娠母体血中の濃度を決定した。そこで、これらの化学物質について初期発生胎仔のモデルである ES 細胞においてヘテロクロマチン形成を指標とした解析を行った。マウス未分化 ES 細胞をゼラチンコート培養ディッシュに播種し、25 種類の化学物質をそれぞれ培地に添加した。暴露後 48 時間で細胞を回収し、酢酸 / エタノール溶液で固定した後、スライドガラス上に塗抹標本を作成した。このうちの一部については、48 時間暴露後に化学物質を除いてさらに 48 時間培養したものと、化学物質に暴露した状態で ES 細胞から胚様体への分化を誘導したものについても同様の解析を行った。作成した塗抹標本について、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核染色、または major satellite 領域を認識するプローブを用いた DNA-FISH を行い、蛍光顕微鏡下で核のヘテロクロマチン状態を

観察した。核内の DAPI、major satellite 領域を示すシグナルの数を調べ、化学物質が ES 細胞のヘテロクロマチン形成へ及ぼす影響について検証した。

2) D-REAM 法による DEP 暴露により DNA メチル化状態が変化する遺伝子領域の探索

マウス ES 細胞をゼラチンコートディッシュ上で DEP を添加したものとコントロールとして溶媒のみを添加した 48 時間培養し、それらの細胞からゲノム DNA を抽出した。これをメチル化感受性制限酵素 HpyCH4IV 処理とその後のアダプターライゲーション PCR により脱メチル化領域を増幅し、マウスプロモーターアレイを用いた遺伝子領域の DNA メチル化解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、最終的にはヒト胎児への化学物質の影響を明らかにする事が目的であるが、実際の実験にはマウス由来細胞のみを用いており、倫理面への問題はないと判断した。

C. D. 研究結果 及び 考察

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) 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。

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。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。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、その曝露量は極めて微量であることが示唆された。

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) 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。

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。

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の尿検体からも、コチニンが検出された。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。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析

SRM 2585の分析結果は認証値と概ね良好な一致を示し、開発した分析法の妥当性が示された。また、ハウスダスト試料と同様に処理したブランク試料(無水硫酸ナトリウム)から、いずれのPBDEsも検出されなかったことから、捕集装置由来のコンタミネーションは無視できると判断した。

開発した分析法を用いて大阪府内4家庭のハウスダスト試料を分析した結果、全ての試料からPBDEsが190~1100 ng/gの濃度で検出された。いずれの試料についてもBDE-209の顕著な残留(サブppm~ppmオーダー)が認められ、一般家庭環境における普遍的なデカBDE汚染および乳幼児の慢性的なデカBDE暴露が示唆された。一方、ペンタBDEおよびオクタBDE関連異性体の濃度は比較的低濃度(ppbオーダー)であった。以上の結果は、我が国におけるPBDEsの使用実態(相対的にデカBDE使用量が多い)を反映したものと推定された。ハウスダスト中PBDEs濃度の平均値から、乳幼児(体重5kg, ハウスダスト取込量0.1 g/日と仮定⁵⁾)のPBDEs暴露量を推定した結果、ペンタBDE:0.4 ng/kg/日、オクタBDE:0.2 ng/kg/日、デカBDE:15 ng/kg/日と試算された。いずれの値も各原体の参照用量*(RfD: 各々2000, 3000, 10000 ng/kg/日⁶⁻⁸⁾)より十分低い値であり、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暴露評価

1) 添加回収試験及び定量下限

尿に分析対象とするフタル酸モノエステル類を10又は100 ng/mL添加し、添加回収試験を行った。いずれの濃度においても、回収率は95~108%, RSDは、5%未満となり、良好な結果を示した。また、操作ブランクの評価には、分析対象とするフタル酸モノエステル類を含まないMilli Q水を試料として前処理し、測定した結果、MBP及びMEHPが、それぞれ、 0.3 ± 0.09 及び 0.2 ± 0.10 ng/mL検出された(n=3)。このため、尿試料中MBP及びMEHPの定量下限(LOQ)を次の式[$LOQ = \text{Blank 試料平均検出値} + \text{Blank 試料検出値のSD} \times 5$]で算出し、それぞれ、0.8及び0.7 ng/mLに規定した。その他フタル酸モノエステル類は、0.1 ng/mL未満であった。従って、尿試料中におけるその他のフタル酸モノエステル類のLOQについては、S/N比が10以上となる0.2 ng/mLとした。

2) 尿中フタル酸モノエステル類の測定

妊婦及び対照群として妊婦と同世代の健康な男女から採取した尿を分析した。フタル酸モノエステル類の分析と併せてクアチニン濃度を測定し、尿濃度の影響を補正し、MiNP を除く 5 種類のフタル酸モノエステル類について、全ての検体から検出した。このことから、妊婦及び対照群を含む 20～30 歳代の日本人は、これらの親化合物となる各フタル酸ジエステル類に日常的に暴露されていることが示唆される。また、MiNP の親化合物である DiNP は、DEHP に次ぐ使用実績があるが、MiNP の検出率は低かった。これは、DiNP から生成した MiNP から更に代謝され、その側鎖部分の水酸化様式が多岐に渡るため MiNP として検出されなかったことによると推測される。従って、DiNP の暴露量の評価には、MiNP に加えて、側鎖部分に水酸化を受けた主要な代謝物の分析が必要と思われる。

検出されたフタル酸モノエステル類の種類と濃度の比較において、妊婦と対照群とした健康なボランティアとの間に大きな差は認められなかった。検出濃度範囲の幅から推測される個人間の差は、妊婦と対照とした健康なボランティアと共に MEP が最も大きく、当該代謝物の親化合物である DEP が香水、ヘアスプレー及び化粧品等のパーソナルケアプロダクト製品に使用されることに起因すると考えられる。

MEHP と MEHP は、共に DEHP の代謝物であるため、MEHP と MEHP との間には、相関関係があることが報告されている。本研究結果においても、高い相関関係が認められた。その濃度の比 $[MEHP]/[MEHP]$ は、およそ 3-8 であり、既報と一致した。

3) フタル酸ジエステル類の推定一日暴露量

尿中のフタル酸モノエステル類の濃度から、フタル酸ジエステル類の一日暴露量の推定式が報告されている。

$$DP_{Total} = (MP_{Urine} \times CE) / (f \times 1000) \times (MW_{DP} / MW_{MP})$$

DP_{Total} : フタル酸ジエステル推定暴露量 ($\mu\text{g/kg/day}$)

MP_{Urine} : 尿中フタル酸モノエステル濃度 ($\mu\text{g/g creatinine}$)

CE : クレアチニン排泄速度 ($\text{mg creatinine/kg/day}$)

f : フタル酸モノエステル全排泄に対する尿中排泄率

(MEP, 0.69; MBP, 0.69; MBzP, 0.73; MEHP, 0.024)

MW_{DP}/MW_{MP} : フタル酸ジエステル分子量/フタル酸モノエステル分子量

算出式内に使用されるフタル酸モノエステル類の全排泄に対する尿中排泄率 (f) は、統一性を図

るため昨年度の報告書に記載した値を使用した。また、クレアチニン排泄速度 (CE) は、試料提供者の身長、体重、年齢及び性別を基に川崎らの式に従って算出した。本研究結果と昨年度の一般的な日本人を対象とした昨年度の報告及び妊婦を対象とした藤巻らの報告と比較した場合、概ね一致すると考えられ、本研究を含め、日本人の代表的数値を反映しているものと考えられる。また、本研究結果と Marsee らによる米国在住妊婦に対する調査結果とを比較した。日本で最も高い値を示したものは、DBP であった。また、DEHP についても、米国在住妊婦よりも高い傾向にあると推察された。一方、DEP については、米国在住妊婦の方が高く、日本在住妊婦のおよそ 20 倍の数値であった。日本人では、DBP 及び DEHP の暴露量が高く、米国では DEP の暴露量が高いとの特徴は、各国内での当該フタル酸ジエステル類の使用実態の差を示していると推察される。これら推定一日暴露量は、厚生労働省もしくは EU の示す TDI と比較して低いことから、直ちに健康影響が危惧されるレベルと考えられない。しかしながら、Swan らによる胎児期暴露による男性生殖器の発育不全の疫学調査では、発育不全が認められた事例に見られる推定暴露量と本研究結果で示された推定暴露量について比較したとき、重なるケースもあることから、日本においても母体のフタル酸ジエステル類の暴露量と出生男児の発育状況等を視野において研究も重要と考えられる。

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) 重金属類

患者 46 人より採取した血清の分析を行った。その結果、昨年度分析を行った 38 人の結果と同様に、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。全試料 84 検体中 26 検体は溶血していたため、それらの試料の Fe の分析値は除外した。また、Mn と Cu については、妨害となる干渉が各 1 検体ずつ認められたため、それらについても分析値から除外した。

患者 84 人の結果について、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) で比較を行った。その結果、Cu と Se において有症群 (Cu: $0.89 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$, Se: $110 \pm 16 \text{ ng/mL}$) が対照群 (Cu: $0.99 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$, Se: $120 \pm 18 \text{ ng/mL}$) より有意に低い ($p < 0.01$) 値であった。そこで、Cu と Se について、進行期分類 (r-ASRM 分類) による stage 別で比較を行った。その結果、いずれも有意差や一定の傾向は認められなかった。

Cu、Se などの微量元素は、中枢神経系の高次機能、代謝、免疫、酸化ストレスなど多様な生体機