

Table 1 Optimization of multiple reaction monitoring for the determination of nicotine compounds

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	Collision (V)
Nornicotine	149.1	130.1	28	18
Anabasine	163.0	92.4	37	25
Nicotine	163.0	130.0	30	20
Norcotinine	163.2	80.0	38	23
Cotinine	177.1	80.0	35	22
Nicotine-1-oxide	179.0	84.0	28	18
Cotinine-N-oxide	193.1	96.3	37	22
Hydroxycotinine	193.2	80.0	39	23

Nornicotine-d ₄	153.1	134.1	28	18
Nicotine-d ₃	165.9	130.0	30	20
Norcotinine-d ₄	167.3	80.0	38	23
Cotinine-d ₃	180.1	80.0	35	22
Hydroxycotinine-d ₃	196.0	79.9	39	23

Table 2 Validation of HILIC/MS/MS method for the determination of nicotine compounds

Compounds	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Correlation coefficient	Recovery (%)	
				50 ng/ml	100 ng/ml
Nornicotine	1	5	0.99	91.7 ± 3.6	95.1 ± 4.9
Anabasine	10	25	0.99	62.9 ± 7.1	80.1 ± 9.7
Nicotine	1	5	0.99	97.9 ± 7.1	94.1 ± 11.9
Norcotinine	2	10	0.99	81.8 ± 5.2	78.6 ± 2.6
Cotinine	1	5	0.99	85.1 ± 3.2	89.8 ± 2.9
Nicotine-1-oxide	2	10	0.99	107.3 ± 5.7	112.5 ± 7.2
Cotinine-N-oxide	2	10	0.99	37.7 ± 10.0	51.0 ± 11.9
Hydroxycotinine	1	5	0.99	62.9 ± 7.1	80.1 ± 9.7

LOD : S/N = 3
 LOQ : S/N = 10
 Calibration range : LOQ-200 ng/ml

Table 3 Concentration of nicotine compounds in maternal and cord blood

Maternal blood										
Compounds	2	5	8	12	17	18	20	22	23	25
Nornicotine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Anabasine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nicotine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Norcotinine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cotinine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.22	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nicotine-1-oxide	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cotinine-N-oxide	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Hydroxycotinine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
(ng/ml)										
Cord blood										
Compounds	2	5	8	12	17	18	20	22	23	25
Nornicotine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Anabasine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nicotine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Norcotinine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cotinine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.50	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nicotine-1-oxide	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cotinine-N-oxide	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Hydroxycotinine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.32	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
(ng/ml)										

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

胎脂試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテルの分析

主任研究者	牧野恒久	有隣厚生会東部病院
分担研究者	中澤裕之	星薬科大学
研究協力者	阿久津和彦	大阪府立公衆衛生研究所
	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所

A. 研究目的

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。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。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 1~2 桁高いレベルにあり、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。

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、子どもの PBDEs 暴露実態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、胎児期の PBDEs 曝露評価を目的として、今回、同位体希釈法を用いた GC/MS による胎脂試料の高精度分析法の構築を試みた。

B. 研究方法

B.1. 試料

山口大学医学部で採取された胎脂および母乳を試料とした。今回提供を受けた胎脂試料の保存量は、全般的に 1 症例あたり 0.5 g 未満（目視による推定）であり、使用可能な試料量が極めて限られていることから、前処理の予備検討には市販の牛ケンネ脂（ウシの腎臓周囲の脂肪組織）を用いた。今回構築した分析法を用いて、胎脂および母乳のセット試料 2 例（症例 No. 12, No. 25）の予備的なモニタリングを行った。なお、今回の分析では、1 症例あたり胎脂試料 0.2~0.3 g、母乳試料 2 g を用いて分析を行った。

B.2. 試薬

標準物質には Wellington Laboratories 製の PBDEs 混合溶液 (BDE-MXE) を用い、以下の 3~10 臭素化物の代表的な 10 種類の異性体を測定対象物質とした。

2, 4, 4'-TrBDE (BDE-28)

2, 2', 4, 4'-TeBDE (BDE-47)

2, 2', 4, 4', 5-PeBDE (BDE-99)

2, 2', 4, 4', 6-PeBDE (BDE-100)
2, 2', 4, 4', 5, 5'-HxBDE (BDE-153)
2, 2', 4, 4', 5, 6'-HxBDE (BDE-154)
2, 2', 3, 4, 4', 5, 6'-HpBDE (BDE-183)
2, 2', 3, 3', 4, 4', 6, 6'-OcBDE (BDE-197)
2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 6, 6'-NoBDE (BDE-207)
2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5', 6, 6'-DeBDE (BDE-209)

また、内標準物質（クリーンアップスパイクおよびシリンジスパイク）には、同社製の炭素安定同位体（¹³C）標識化PBDEs混合溶液（MBDE-MXEおよびMBDE-139）を用いた。

B. 3. 試料の前処理操作

B. 3. 1. 抽出操作（胎脂試料）

牛脂または胎脂試料0.2 gを共栓付試験管に精密に秤取後、クリーンアップスパイクおよび無水硫酸ナトリウム1 g、エタノール/ヘキサン（1:3）4 mLを加えてボルテックスミキサーで1分間激しく攪拌抽出した。遠心処理後、上澄液を採取した。さらに残渣を同様に2回攪拌抽出し、上澄液を採取した。合わせた抽出液を減圧濃縮し、さらに窒素吹き付けにより溶媒を留去し、脂溶性残渣の重量を測定した。

B. 3. 2. 抽出操作（母乳試料）

母乳試料2 gにクリーンアップスパイクおよび飽和シュウ酸カリウム溶液0.4 mL、エタノール2 mL、ジエチルエーテル2 mL、ヘキサン2 mLを加えボルテックスミキサーで1分間激しく攪拌抽出した。遠心処理後、ヘキサン層を採取し、残液にヘキサン2 mLを加えて、同様の攪拌抽出操作をさらに2回繰り返した。合わせたヘキサン層を減圧濃縮し、さらに窒

素吹き付けにより溶媒を留去し、脂溶性残渣の重量を測定した。

B. 3. 3. 精製操作（胎脂試料・母乳試料共通）

上記抽出操作により得られた脂溶性残渣を少量のヘキサンに溶解した後、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3 g）に負荷し、ヘキサン30 mLでカラムからPBDEsを溶出した。回収液を減圧濃縮後、ヘキサン/アセトニトリル分配（2 mL/4 mL、計3回）を行い、回収したアセトニトリル層を減圧乾固した。残渣を少量のヘキサンに転溶して濃縮試験管に移し、シリンジスパイクおよびノナン20 μLを添加し、窒素ガス吹き付けで20 μLに濃縮し、GC/MS測定に供した。

B. 4. 装置条件

B. 4. 1. GC/MS

装置：JEOL JMS-GCmateII GC/MSシステム

注入口温度：250°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

C. 研究結果・考察

GC/MSを用いて胎脂試料中のPBDEsを高精度に測定する手法を構築した。内標準物質には炭素安定同位体 (^{13}C) で標識化したPBDEsの各異性体を用い、抽出液の精製には硫酸シリカゲルカラム処理およびヘキサン/アセトニトリル分配を用いた。胎脂の模擬試料として牛ケンネ脂を用いて本法の添加回収試験 (PBDEs添加量：各0.1~0.5 ng) を実施したところ、測定対象とした10種類のPBDEsの平均回収率は93~101%、相対標準偏差は8%以下であり良好な結果であった (表1)。また、操作ブランク値を基に算出したPBDEsの検出下限値 (ブランク値の平均+3SD) は、胎脂試料で0.01~0.1 ng/g、母乳試料で0.001~0.01 ng/g、定量下限値 (ブランク値の平均+10SD) は胎脂試料で0.02~0.3 ng/g、母乳試料で0.002~0.03 ng/gであった。

構築した分析法を胎脂試料に適用したところ、分析した2例の胎脂 (症例No. 12, No. 25) から湿重量あたり濃度で0.03 ng/gのBDE-153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-HxBDE) が検出され、胎内のPBDEs汚染が示唆された (図1, 表2)。これまでに胎脂試料を対象としたPBDEs分析の報告例は皆無であり、今回の予備的なモニタリングにおいて、微量ではあるが胎脂試料からPBDEs異性体が検出されたことは興味深い知見である。なお、エタノール/ヘキサンによる粗抽出物重量を脂肪重量とみなして換算すると、胎脂試料におけるBDE-153濃度はNo. 12, No. 25について、各々0.4 ng/g lipid, 0.3 ng/g

lipidとなり、対となる母乳試料 (症例No. 12, No. 25) の分析結果 (両者とも0.7 ng/g lipid) と同程度のオーダーであった。なお、今回の胎脂試料の測定結果では、BDE-153以外の異性体については定量下限未満であり、母乳試料で検出された異性体パターンとの詳細な比較検証は困難であった (表2, 表3)。国内外の野生生物やヒト由来試料の分析例において、BDE-153は検出頻度の高い代表的な異性体であり、生体内での残留性が高いと考えられている。今回の結果から、BDE-153はPBDEsによる胎内汚染を評価する際の指標異性体の一つとして有用と考えられた。

D. 結論

胎児期のPBDEs曝露評価を目的として、同位体希釈法を用いたGC/MSによる胎脂試料の高精度分析法の構築を試みた。構築した分析法を胎脂試料に適用したところ、分析した2例の胎脂から各々0.03 ng/gのBDE-153が検出され、胎内のPBDEs汚染が示唆された。

E. 参考文献

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.*,
80, 345-350 (2008).

(2) 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. Part B*, 1 (1), 58-68 (2008).

H. 知的所有権の取得状況
なし

表1 PBDEsの添加回収試験結果 ($n=3$)

異性体	略号	回収率 平均値 (%)	RSD (%)
2,2',4-TrBDE	BDE-28	95	2.1
2,2',4,4'-TeBDE	BDE-47	93	7.8
2,2',4,4',6-PeBDE	BDE-100	98	5.5
2,2',4,4',5-PeBDE	BDE-99	96	7.3
2,2',4,4',5,6'-HxBDE	BDE-154	95	2.3
2,2',4,4',5,5'-HxBDE	BDE-153	96	1.7
2,2',3,4,4',5',6-HpBDE	BDE-183	98	3.6
2,2',3,3',4,4',6,6'-OcBDE	BDE-197	100	5.5
2,2',3,3',4,4',5,6,6'-NoBDE	BDE-207	101	2.0
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DeBDE	BDE-209	99	0.7

対象試料: 牛ケンネ脂

添加濃度: 各0.5~2.5 ng/g

操作ブランク

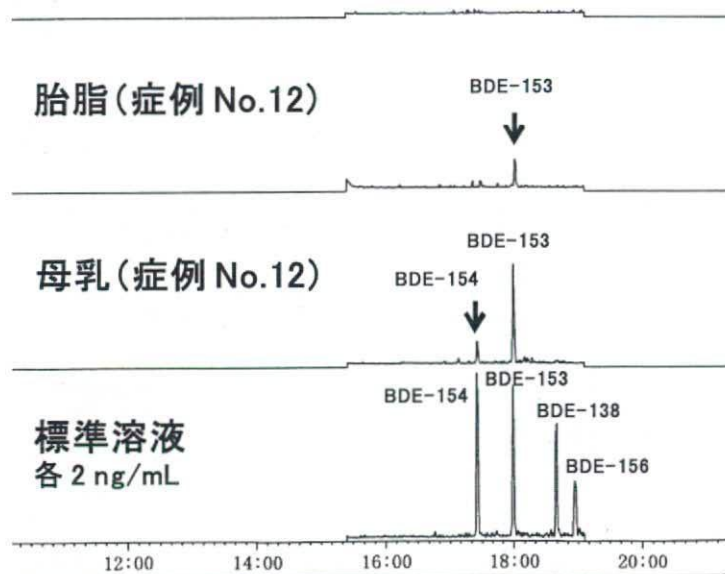


図1 クロマトグラム例 (m/z 643.5)

表2 胎脂試料の分析結果

異性体	湿重量あたり濃度 (ng/g)	
	症例No.12	症例No.25
BDE-28	Tr (0.01)	ND (<0.01)
BDE-47	Tr (0.1)	ND (<0.1)
BDE-100	ND (<0.01)	ND (<0.01)
BDE-99	ND (<0.02)	ND (<0.02)
BDE-154	ND (<0.01)	ND (<0.01)
BDE-153	0.03	0.03
BDE-183	ND (<0.02)	ND (<0.02)
BDE-197	Tr (0.02)	Tr (0.01)
BDE-207	Tr (0.03)	Tr (0.03)
BDE-209	ND (<0.1)	Tr (0.1)

ND: 検出下限未満 (not detected)

Tr: 定量下限未満で検出 (trace)

表3 母乳試料の分析結果

異性体	湿重量あたり濃度 (ng/g)	
	症例No.12	症例No.25
BDE-28	0.018	Tr (0.001)
BDE-47	0.61	Tr (0.01)
BDE-100	0.004	Tr (0.001)
BDE-99	0.005	ND (<0.002)
BDE-154	0.002	ND (<0.001)
BDE-153	0.017	0.016
BDE-183	ND (0.002)	ND (0.002)
BDE-197	0.007	0.007
BDE-207	0.037	Tr (0.008)
BDE-209	0.41	Tr (0.02)

ND: 検出下限未満 (not detected)

Tr: 定量下限未満で検出 (trace)

平成 20 年度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
化学物質の子どもへの健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発

－ 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明 －

主任研究者	牧野恒久	社団法人有隣厚生会東部病院
分担研究者	中澤裕之	星薬科大学
研究協力者	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所
	阿久津和彦	大阪府立公衆衛生研究所
	近藤文雄	愛知医科大学

研究要旨

山口大学医学部産婦人科で採取された周産期試料（母体・臍帯血清、羊水及び胎脂）中のフタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）及びフタル酸モノ（2-エチルヘキシル）（MEHP）を測定した。羊水（n=15）からは、臍帯血清（n=26）と比較して高い割合で DEHP 及び MEHP が検出されることが認められた。予備分析した胎脂の一部にも DEHP を検出したことから、羊水あるいは胎脂中に DEHP 及び MEHP が存在し、子宮内で胎児は、これらを通じて当該化学物質に暴露されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）に代表されるフタル酸ジエステル類は、主に可塑剤として塩化ビニル樹脂製品等（電線被覆、建材、内装品、包装、塗装、雑貨及び医療器具等）に多用されており、日本人は、当該化学物質に日常的に暴露されていると考えられる。体内に取り込まれた当該化学物質は、速やかにフタル酸モノエステル類に代謝される。フタル酸モノエステル類の一部には、発生・発育過程にある精巣に悪影響を及ぼすことが明らかにされており、妊婦を含む子どもへの暴露実態の解明が求められている。本研究では、当該化学物質に直接影響を受ける胎児の暴露状況を明らかにするため、胎児の生育環境を反映する生体試料（羊水及び胎脂）中の

フタル酸エステル類を分析する。本年度は、周産期試料（母体・臍帯血清、羊水及び胎脂）中の DEHP 及びその主要代謝産物のひとつであるフタル酸モノ（2-エチルヘキシル）（MEHP）を測定した。本研究を遂行することによって、フタル酸ジエステル類の適正な使用を促すうえで役立つ情報を提供することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 試薬等及び器具

DEHP 及び MEHP の標準液ならびにそれぞれの安定同位体標準溶液は、Cambridge Isotope Laboratories 社より購入した。抽出に用いるアセトン、ヘキサン及びアセトニトリルは、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) をヘキサンで洗浄して用いた。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 (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

山口大学医学部産婦人科で採取された母体血清 (n=24)、臍帯血清 (n=26) 及び羊水 (n=15) を分析した。これら試料は、冷凍下で移送され、分析時まで -80°C で保存した。

(3) 採取及び保存器具からの DEHP 及び MEHP の溶出

周産期試料中の採取または保存に使用する器具から溶出する DEHP 及び MEHP を把握するため、器具をヘキサンで抽出 (20°C、2 時間) し、ヘキサン中に回収される DEHP を測定した。抽出方法は、器具に応じて行った。すなわち、血液あるいは羊水を吸引する器具については、吸引見込み量のヘキサンを吸引後静置した。また、保存用の試験管等については、その容積に応じたヘキサンを入れて静置した。その他、試料との接触機会が見込まれる器具については、50 mL のヘキサン中に浸漬して静置した。各ヘキサン中に溶出する DEHP 及び MEHP を分析した。浸漬後のヘキサンを回収し、その内の 1 mL を窒素気流下で乾固し、アセトニトリル 1 mL に溶解して、LC-MS/MS で分析した。LC-MS/MS の条件は、表 1 に記した。

(4) 前処理及び分析条件

(4-1) 血清及び羊水中の DEHP 及び MEHP の分析

以前に構築した分析法を活用した (1)。概要をスキーム 1 に示した。試料 0.5 mL に 内部標準及びアセトン 4 mL を加えて攪拌した後、超音波照射を 2 分間行った。次にボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) した。アセトン層を別の清浄なガラス製試験管に回収し、残渣にアセトン 1 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) した。アセトン層を回収し、先のアセトン層と合わせて窒素気流下で乾固した。次に Milli-Q 水 0.5 mL 及び酢酸 4 μ L を加えて溶解した。ヘキサン 1 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) した。ヘキサン層を別の清浄なガラス製試験管に回収した。水層にヘキサン 1 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) した。この操作を再度行い、先のヘキサン層と合わせて窒素気流下で乾固した。アセトニトリル 0.5 mL に溶解して LC-MS/MS 試験液とした。

(4-2) 胎脂中の DEHP 及び MEHP

概要をスキーム 2 に示した。胎脂 0.025 g を目安に清浄なガラス製試験管に採取し、重量を記録した。次に内部標準及びアセトン 4 mL を加えて攪拌した後、超音波照射を 2 分間行った。次にボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) した。上清を回収し、窒素気流下で乾固した。次に

ヘキサン 1 mL を加えて溶解し、アセトニトリル 2 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) した。アセトニトリル層を別の清浄なガラス製試験管に回収した。ヘキサン層にアセトニトリル 2 mL を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) した。先のアセトニトリル層と合わせて窒素気流下で乾固し、アセトニトリルに溶解して測定した。

(5) 倫理面への配慮

試料は、山口大学医学部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。

C. 及びD. 結果及び考察

(1) 採取及び保存器具からのDEHP及びMEHPの溶出
結果を表2にまとめた。

【血清、羊水及び尿の採取器具】採血及び血清の分離に用いる真空採血管及び保存に用いるポリプロピレン製遠心管からのDEHPの溶出は、微量であったことから、当該器具からのコンタミネーションの危険性は低いと判断される。また、チップ、シリンジ、採尿カップ蓋及びラテックスグローブからも5-20 ng/mLのDEHPを検出したが、試料との接触時間が短いことから、許容範囲と考えられる。

【胎脂の採取器具】体表の広範囲に存在する胎脂の採取に用いる舌圧子及びその外装から、比較的高いDEHPを検出した。一方、移し替え

に使用されると思われる綿棒及びその外装からは、殆どDEHPが検出されなかった。また、保存容器であるガラス製試験管から溶出するDEHPは、極めて微量であるが、ゴムキャップからは、注意を要するレベルのDEHPが検出された。分析に供される胎脂は、0.025 gであり、わずかなコンタミネーションが、単位重量当りに換算すると大きく増幅される危険性がある。このため、胎脂の採取には、当該舌圧子を用いないことが望ましい。これら適切な採取器具の選定が、分析値の信頼性を確保するために必要と思われる。

(2) 母体・臍帯血清及び羊水中のDEHP及びMEHPの分析法

(2-1) 定量下限

DEHPは、実験環境中にも広く存在し、分析に使用する溶媒にも存在が認められている。これらが、最終的な試験液中に集積し、分析値の信頼性を損ねる。このため測定日毎に、空試験 (Blank ; 試料と同量のヘキサン洗浄水を試料と見立てる) を併行して実施することで実験操作過程からの混入量を把握し、実試料の分析を行った。

【DEHP】 (定量下限 : 10 ng/mL)

空試験で、 4.5 ± 1.0 ngのDEHPを検出したことから、実験操作過程からのDEHPの混入は、5 ng/mL (Blank) 程度であることが確認された。このため、定量下限を以下の式「定量下限 (ng/mL) = Blank + SD x 5 = $4.5 + 1.0 \times 5 = 10$ 」で定めた。よって、以下に示す、各分析値には、Blank (4.5 ng/mL) 程度のDEHPを含むと考える必要がある。

【MEHP】 (定量下限: 2.0 ng/mL)

空試験で、 0.5 ± 0.3 ngのMEHPを検出したことから、実験操作過程からのMEHPの混入は、0.5 ng/mL (Blank) 程度であることが確認された。このため、定量下限を以下の式「定量下限 (ng/mL) = Blank + SD x 5 = $0.5 + 0.3 \times 5 = 2.0$ 」で定めた。よって、以下に示す、各分析値には、Blank (0.5 ng/mL) 程度のMEHPを含むと考える必要がある。

(2-2) 羊水中のDEHP及びMEHPの回収率
血清中のDEHP及びMEHPを測定する分析法が羊水中の当該物質の定量に適用可能か確認した。すなわち、予備試験の結果においてDEHP及びMEHPの検出濃度の低い羊水を選定し、終濃度20または100 ng/mLになるようDEHP及びMEHPを添加して、添加回収試験を実施した (n=4)。20 ng/mL添加時のDEHP及びMEHPの回収率 (RSD) は、それぞれ、100 (10) 及び110 (5.0)%であった。また、100 ng/mL添加時のDEHP及びMEHPの回収率 (RSD) は、それぞれ、106 (4.0) 及び113 (1.2)%であった。以上の結果より、血清と同一の分析法が適用できることが分かった。

(3) 胎脂中のDEHP及びMEHPの分析法
DEHP及びMEHPについて、空試験で試験液から、それぞれ、 7.0 ± 0.8 ng及び 0.6 ± 0.2 ngを検出した。このことから、暫定的にDEHP及びMEHPの試験液単位での定量下限について、それぞれ、11及び2.0 ng/mLとし、試料1gあたりでは、440及び80 ng/gとした。なお、症例14の胎脂について、DEHP及びMEHPをそれぞれ、1000 ng/g添加した際の回収率は、104及び108% (n = 2)

であった。

(4) 生体試料の分析結果

表3に母体、臍帯血清及び羊水中のDEHP及びMEHPの分析結果を示した。また、その分析結果に基づく、ヒストグラム (図2及び3) 及びボックスプロット (図4及び5) を示した。羊水中の当該化学物質分析時のクロマトグラムの一例を図1に示した。

(4-1) 母体・臍帯血清及び羊水中のDEHP及びMEHPの分析 (概要)

【DEHP】

- 1: 母体血清の66.7%に定量下限を超える当該化学物質を検出した。中央値は、12.7 ng/mLであり、最高検出濃度は、460 ng/mLであった。
- 2: 臍帯血清の11.5%に定量下限を超える当該化学物質を検出した。中央値は、10 ng/mL未満であり、最高検出濃度は、18.2 ng/mLであった。
- 3: 羊水の60%に定量下限を超える当該化学物質を検出した。中央値は、13.1 ng/mLであり、最高検出濃度は、190 ng/mLであった。

【MEHP】

- 1: 母体血清の33.3%に定量下限を超える当該化学物質を検出した。中央値は、2.0 ng/mL未満であり、最高検出濃度は、9.9 ng/mLであった。
- 2: 臍帯血清の3.85%に定量下限を超える当該化学物質を検出した。中央値は、2.0 ng/mL未満であり、最高検出濃度は、3.9 ng/mLであった。

3: 羊水の80%に定量下限を超える当該化学物質を検出した。中央値は、7.7 ng/mLであり、最高検出濃度は、28.2 ng/mLであった。

(4-2) 胎脂中のDEHP及びMEHPの分析
(概要)

【DEHP】

1: 分析した3検体のうち、1検体に比較的高い濃度のDEHP (7,140 ng/g) を検出した。一方、他の検体は、定量下限未満あるいは付近であった。

【MEHP】

1: 分析した3検体について、定量下限未満であった。

(5) 分析結果 (考察等)

(5-1) 母体血清と臍帯血清

【DEHP】過去に分娩時にペアで分析した母体及び臍帯血清中のDEHP濃度は、双方とも5~10 ng/mLの範囲であり (2)、今回の試料については、母体血清中のDEHPが臍帯血清と比較して検出率及び濃度共に高い傾向にある。その原因としては、試料採取の時期の差と思われる。すなわち、本研究では、母体血は、入院後、分娩前に採取されており、その時期にあった医療行為等の影響により、高い検出率と濃度に反映されている可能性がある。一方で分娩時に採取された臍帯血では、その影響は、解除されている可能性があり、過去の分析事例に類似する低い濃度になったと推察される。但し、これらは試料採取状況からの推測であり、胎盤でDEHPの通過が抑制されていることを否定するものではない。今後、母体から胎

児への移行率を検証するためには、分娩時の母体血清を分析する必要があると考えられる。今回の知見は、分娩を控えた母体血清中にDEHPが一定量存在しうることを示しており、妊婦がDEHPに暴露されていることを客観的に示唆した有用なデータといえる。

【MEHP】母体血清では、比較的高い濃度 (40 ng/mL程度) のDEHPを検出した試料から定量下限以上のMEHPが検出されており、このMEHPは、DEHPから生成した代謝物の一部と考えられる。臍帯血清からは、1検体から検出されたのみであり、臍帯血清中のDEHP濃度が低いことに関係すると思われる。ただし、MEHPの検出されたSample No. 7のDEHP濃度は低く、MEHP濃度との因果関係は不明である。

(5-2) 羊水及び胎脂

【DEHP】羊水中から高い頻度でDEHPを検出したことは、興味深い。臍帯血清からDEHPが検出されない症例と対となる羊水からもDEHPが検出されている。また、分析した15組の羊水と対となる臍帯血清の間でDEHP濃度を比較したとき、羊水中のDEHP濃度は、臍帯血清中のDEHP濃度を上回る。このことから、羊水中から検出されるDEHPは、一過性の存在ではなく、子宮内の蓄積物に由来する可能性が示唆される。過去に胎脂から高濃度のDEHPを検出しており、主に胎脂から羊水に移行したDEHPを検出した可能性もある。分析した羊水には、白濁状態の試料も認められた。すなわち、この白濁の原因物質が胎脂由来成分と羊水中から検出されるDEHPの一部は、胎脂に由来するかもしれない。

今回、限られた例数であるが、胎脂を分析した結果、検体間に一定の差があることが認められた。また、胎脂中のDEHP濃度が高いことが、必ずしも羊水中の当該物質の濃度が高いということを示しておらず（表4：Sample No. 14及び22のデータより）、どちらか一方の試料測定で、それぞれのDEHP及びMEHP濃度の高低を推測することが難しいことが示唆された。Nishijimaらは、羊水中に胎児由来の肺サーファクタントが増加することで、胎脂が可溶化することを示している。（3）この場合、DEHP濃度は、羊水で高まる一方、胎脂中で低下する可能性も視野にいれる必要がある。羊水は、胎児の物質循環に深く関与することから、そこに懸濁あるいは溶解する胎脂を含めて、胎児のDEHP暴露経路のひとつである可能性が示唆される。

【MEHP】MEHPは、DEHPの主要代謝物のひとつである。羊水からのMEHPの検出率及び濃度は、母体及び臍帯血清よりも高く、DEHPから生成したMEHPが滞留している可能性が考えられる。すなわち、以下の二つの可能性が考えられる。

1) DEHPを摂取した胎児がDEHPをMEHPに代謝し、排泄している。2) 羊水中に存在するDEHPが羊水中のエステラーゼ活性によって加水分解されて存在している。羊水からのMEHPが検出されたことから、羊水が胎児のMEHP暴露経路のひとつである可能性が示唆される。Silvaらは、ヒトの羊水中のフタル酸モノエステル類を分析し、MEHPの検出濃度範囲を検出下限（0.86 ng/mL）未満～2.8 ng/mL（n=54）と報告している（4）。なお、中央値は、検出下限未満と報告しており、本研究結果と検出濃度

が異なる。これは、各国における親化合物となるDEHPの使用実態の差に由来するかもしれない。ラットを用いた動物実験では、母体に対してDEHPを投与した場合、投与量に応じて羊水中からMEHPが検出されることが報告されており（5）、妊婦のDEHP暴露量が羊水に反映されることが示唆されている。今後、分析例数を重ねることによって、より詳細な日本人妊婦及び胎児の当該化学物質の暴露実態の把握に努める予定である。

参考文献

- (1): 平成14-15年度厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合・医薬品等医療技術リスク評価研究事業）「適用する医薬品の脂溶性等プラスチック製医療器具に使用される可塑剤の溶出度の相関性に関する研究」研究成果総括報告書p. 57-78
- (2): 平成18年度厚生労働科学研究補助金（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」研究成果報告書p. 53-67
- (3): 平成18年度厚生労働科学研究補助金（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」研究成果報告書p. 53-67
- (4): Silva, M. J., et al., Bull. Environ. Contam. Toxicol., 72, 1226-1231 (2004)
- (5): Calafat, A. M., et al., Toxicology., 217, 22-30 (2006)

E. 結論

- 1： 分娩を控えた母体血清からDEHP及びMEHPが検出された。
- 2： 羊水または胎脂中のDEHP及びMEHPの分析法を構築した。
- 3： 羊水中からDEHP及びMEHPが検出された。
- 4： 臍帯血清及び羊水中のDEHP及びMEHPを分析した結果、臍帯血清中よりも羊水中から高い割合で検出される傾向が認められた。
- 5： 羊水及び胎脂は、母体・臍帯血清と同様に胎児期のDEHPまたはMEHPの暴露を評価するうえで有用な試料である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会報告

- 1： 高取聡、阿久津和彦、岡本葉、近藤文雄、和泉俊一郎、牧野恒久、中澤裕之「日本人周産期母体尿中フタル酸モノエステル類の分析」環境ホルモン学会第11回研究発表会 2008年12月13-14日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

謝辞

生体試料をご提供して下さいましたボランティアの皆様、また当該試料をご採取して下さいました山口大学医学部杉野法広教授、住江正大助教並びに医療関係者の皆様に深謝いたします。

表1. LC-MS/MS の条件

・HPLC 条件

カラム	Wakosil-II 3C18 (2.0 x 150 mm; 3 μm; Wako) ;
移動相	A) 5.0 x 10-4% 酢酸水溶液; B) アセトニトリル
溶出	イソクラティック A/B : 2/8
流速	200 μL/min; 注入量 5.0 μL; カラム温度 50°C

・MS/MS 条件
 インターフェイス/モード, Electrospray Ionization / Negative (Positive)
 キャピラリー電圧/温度, -4,000 (4,000) V/500°C
 Precursor, Product Ions 及びその際の Collision Energyは下表の通り.

化学物質名	Precursor	Product (Collision Energy, eV)
MEHP -277	- 134	(-22)
MEHP-13C4	-281 -	138 (-22)
DEHP +391	+ 149	(+27)
DEHP-13C4	+395 +	153 (+27)

表2. 生体試料採取または保存用の器具からのDEHP溶出

器具	DEHP (ng/mL)	用途	試験方法*
A社 15 mL PP試験管	1.0	血清、尿、羊水保存	1
B社 15 mL PP 試験管	1.2	対照	1
真空採血管10mL	1.7	母体血採取	2
真空採血管5mL	1.2	臍帯血採取	2
真空採血管10mL	1.6	対照	2
10mL シリンジ	4.9	臍帯血、羊水、尿採取	2
5mL シリンジ	10.3	臍帯血、羊水、尿採取	2
チップ	22.8	液性試料扱い	4
採尿カップ (カップ)	3.9	尿採取	3
採尿カップ (蓋)	22.7	尿採取	3
ラテックスグローブ	25.5	試料採取	3
ガラス製試験管	1.0	胎脂保存	1
ゴムキャップ	55.8	胎脂保存	3
舌圧子	85.7	胎脂採取	3
舌圧子外装	630.0	器具外装	3
綿棒	1.0	胎脂採取	3
綿棒外装	9.1	器具外装	3
ヘキサン (5mL)	2.6	空試験	3

* 試験法の概要は以下の通り. (いずれも20°Cで実施)

- 1: ヘキサン 5 mL を入れて 2 時間静置 2: ヘキサンを吸引して2時間静置
 3: ヘキサン 50 mL に 2 時間静置浸漬 4: ヘキサン 5 mL に2時間静置浸漬

表3. 母体、臍帯血清及び羊水中のDEHP及び MEHP

DEHP (ng/mL)			MEHP (ng/mL)				
Sample No.	母体血	臍帯血清	羊水	Sample No.	母体血清	臍帯血清	羊水

清

1	15.9	13.1	-	1	< 2.0	< 2.0	-
2	89.2	< 10	36.2	2	9.9	< 2.0	18.8
3	12.5	< 10	-	3	< 2.0	< 2.0	-
4	460.1	< 10	52.1	4	6.0	< 2.0	8.1
5	84.4	< 10	-	5	3.0	< 2.0	-
6	< 10	< 10	190.0	6	< 2.0	< 2.0	28.2
7	12.8	< 10	-	7	< 2.0	3.9	-
8	11.0	< 10	< 10	8	< 2.0	< 2.0	2.4
9	156.3	< 10	-	9	3.9	< 2.0	-
10	< 10	< 10	< 10	10	< 2.0	< 2.0	3.7
11	42.2	< 10	< 10	11	2.3	< 2.0	< 2.0
12	121.4	< 10	< 10	12	< 2.0	< 2.0	< 2.0
13	60.4	< 10	< 10	13	< 2.0	< 2.0	10.0
14	11.3	< 10	13.1	14	< 2.0	< 2.0	5.6
15	46.2	< 10	-	15	2.0	< 2.0	-
16	57.3	< 10	-	16	5.0	< 2.0	-
17	13.3	14.0	-	17	2.5	< 2.0	-
18	< 10	< 10	22.2	18	< 2.0	< 2.0	7.7
19	-	18.2	-	19	-	< 2.0	-
20	11.5	< 10	-	20	< 2.0	< 2.0	-
21	< 10	< 10	37.9	21	< 2.0	< 2.0	8.2
22	< 10	< 10	11.1	22	< 2.0	< 2.0	2.1
23	< 10	< 10	26.6	23	< 2.0	< 2.0	10.2
24	-	< 10	-	24	-	< 2.0	-
25	< 10	< 10	< 10	25	< 2.0	< 2.0	< 2.0
26	< 10	-	-	26	< 2.0	-	-
27	-	< 10	78.9	27	-	< 2.0	13.5
検出率 %	66.7	11.5	60.0	検出率 %	33.3	3.85	80.0
中央値	12.7	< 10	13.1	中央値	< 2.0	< 2.0	7.7
最大値	460.1	18.2	190	最大値	9.9	3.9	28.2
最小値	< 10	< 10	< 10	最小値	< 2.0	< 2.0	< 2.0

表4. 胎脂及び羊水中の DEHP (MEHP) (ng/g)

Sample No.	胎脂	羊水
12	476 (<80)	<10 (< 2.0)
14	< 440 (<80)	13.1 (5.6)
22	7,140 (<80)	11.1 (2.1)
Blank	< 440 (<80)	<10 (< 2.0)

試料 0.5 mL
 ↓ 内部標準, アセトン 4 mL
 攪拌抽出/遠心分離
 ↓ 残渣にアセトン 1 mL
 攪拌抽出/遠心分離
 ↓
 抽出液を乾固 (窒素気流下)
 ↓ 精製水 0.5 mL/酢酸 4 μL
 ヘキサン 1 mL
 ↓
 攪拌抽出/遠心分離 } 2回実施
 ↓
 ヘキサン層を回収 }
 ↓
 抽出液を乾固 (窒素気流下) } 下)
 ↓ アセトニトリル 0.5 mL
 LC-MS/MS 分析

スキーム1. 血清及び羊水中のDEHP及びMEHP分析操作

試料 0.025 g
 ↓ 内部標準/アセトン 4 mL/超音波照射
 攪拌 (5 min) /遠心分離
 ↓
 抽出液を乾固 (窒素気流下)
 ↓ ヘキサン 1 mL/アセトニトリル 2 mL } 2回実施 (2回目は、ヘキサン添
 加せず)
 攪拌 (5 min) /遠心分離
 ↓
 アセトニトリル層を乾固 (窒素気流下)
 ↓ アセトニトリル 0.5 mL
 LC-MS/MS 分析

スキーム2. 胎脂のDEHP及びMEHP分析操作

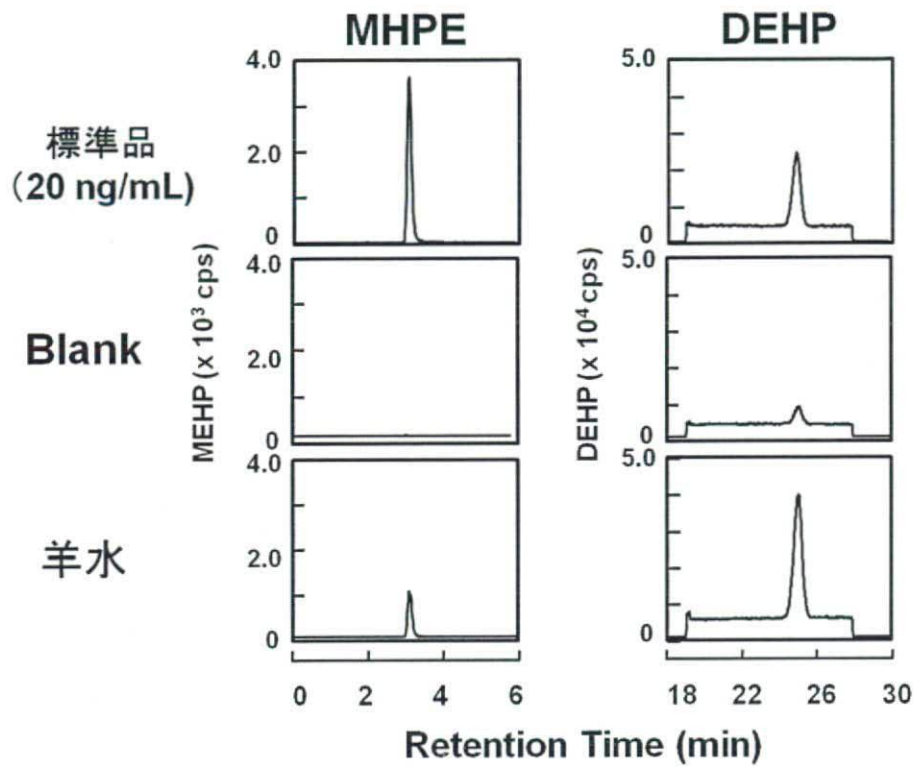


図1. 羊水分析時のMRM クロマトグラムの一例

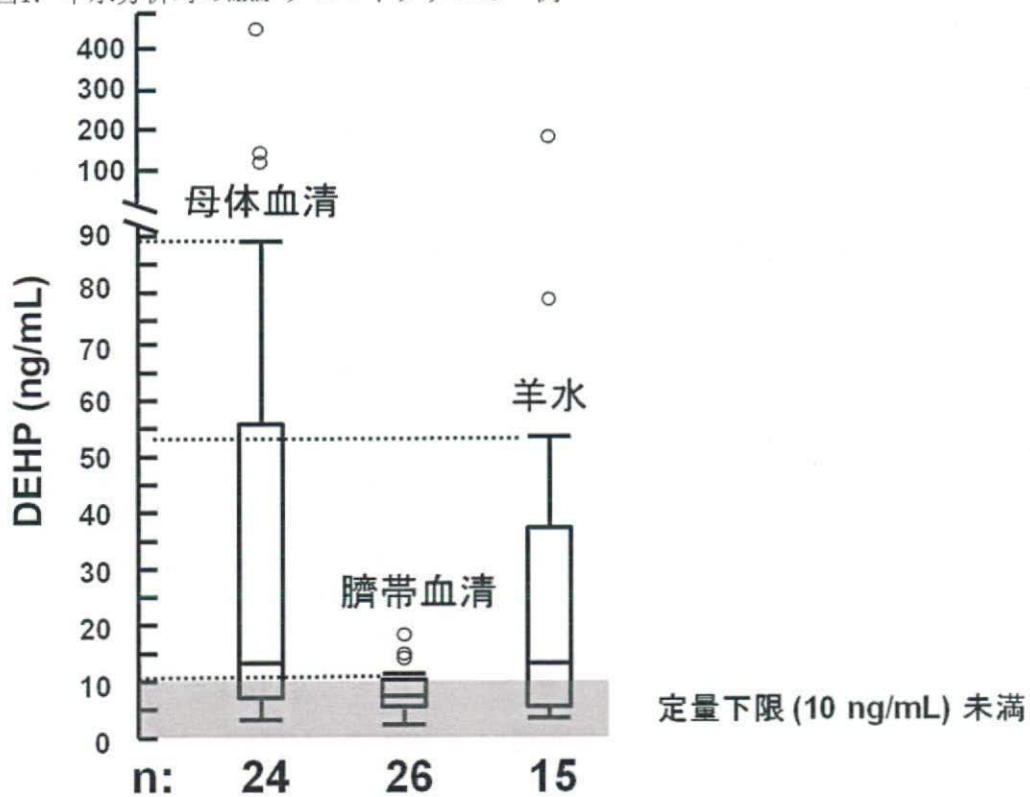


図2. 母体血清 (n=24), 臍帯血清 (n=26) 及び羊水 (n=15) 中のDEHP濃度の分布

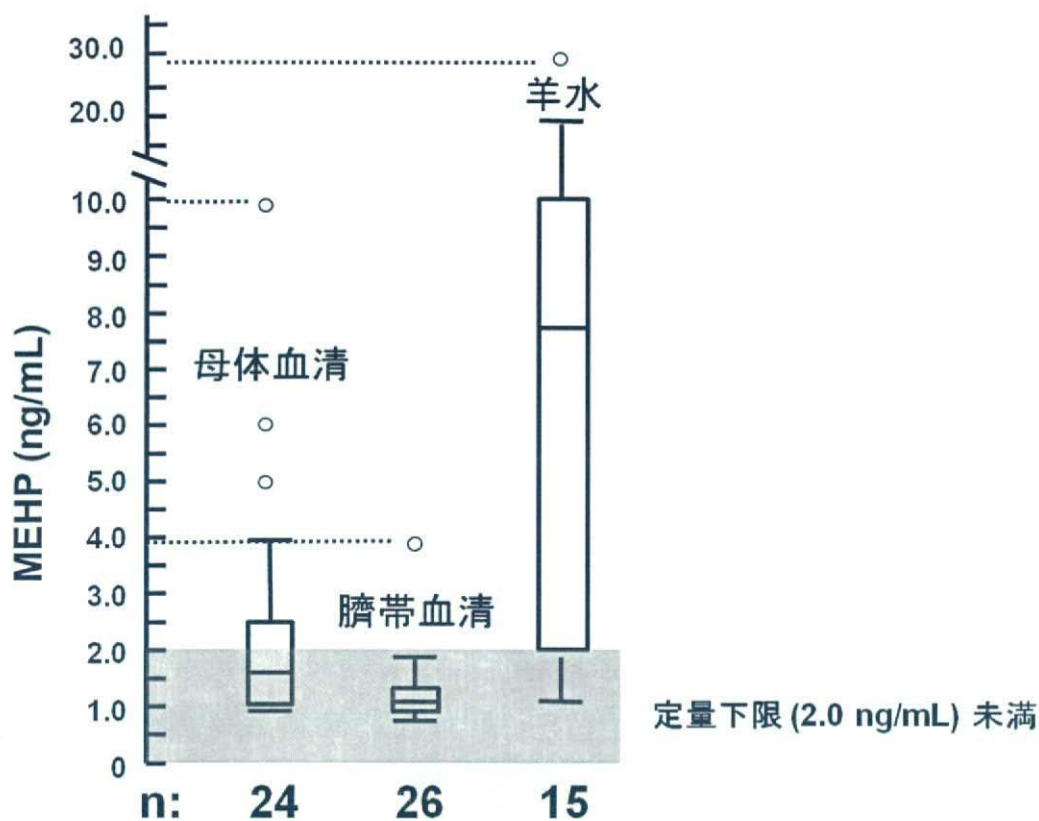


図3. 母体血清 (n=24)、臍帯血清 (n=26) 及び羊水 (n=15) 中のMEHP濃度の分布

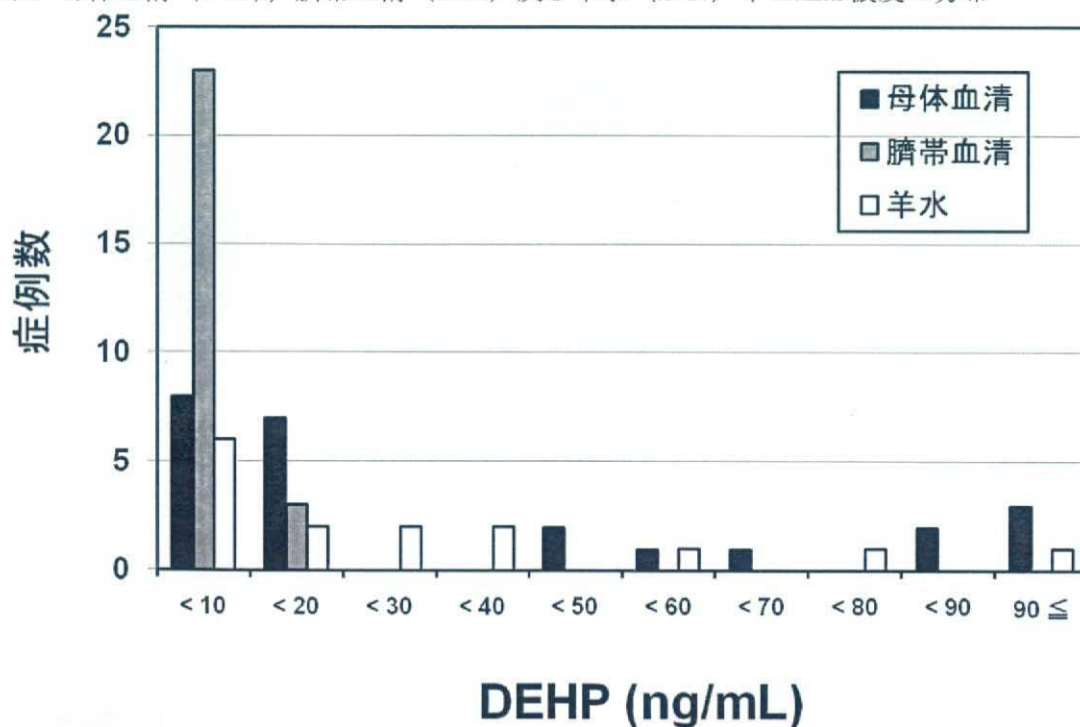


図4. 母体血清 (n=24)、臍帯血清 (n=26) 及び羊水 (n=15) 中のDEHP濃度の分布 (ボックスプロット図) 作図にあたっては、定量下限未満においても分析上の実測値を活用した。