

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 **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 **に関する研究**

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

牧野 恒久 〔社〕有隣厚生会東部病院長

分担研究者

中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教授

塩田 邦郎 東京大学大学院 農学生命科細胞生化学教授

杉野 法広 山口大学大学院研究科 産婦人科学教授

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エピジェネティクス評価法の開発
平成21年度 総括・分担研究報告書

《目次》

I. 総括研究報告

化学物質による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 開発に関する研究.....4
主任研究者 牧野 恒久 [社] 有隣厚生会東部病院長

II. 分担研究報告

1. 「HILIC-MS/MS によるヒト母体、臍帯血清中ニコチン代謝物の同時分析法」 12
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室
齊藤 貢一 星薬科大学薬品分析化学教室
伊藤 理恵 星薬科大学薬品分析化学教室
岩崎 雄介 星薬科大学薬品分析化学教室

2. 生体試料中のピレスロイド系農薬、
有機リン系農薬及びビスフェノールAの暴露評価に関する研究 21
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 石井 里枝 埼玉県衛生研究所

3. 生体試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析 34
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 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

4. 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明 42
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 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

5. 周産期の母親の血清及び羊水中多元素一斉分析による 新たな暴露評価手法に関する研究 53
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 林 留美子 愛知県衛生研究所
近藤 文雄 愛知県医科大学

6. 胎内環境中に存在する化学物質の把握に関する研究.....	60
分担研究者	杉野 法広 山口大学大学院医学系研究科
研究協力者	墨絵 正大 山口大学大学院医学系研究科
7. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析：エピミュータゲン評価法に関する研究.....	68
分担研究者	塩田 邦郎 東京大学大学院 農学生命科学研究科細胞生化学
研究協力者	大鐘 潤 東京大学大学院 農学生命科学研究科細胞生化学
	広沢-高森 瑞子 東京大学大学院 農学生命科学研究科細胞生化学
	新井 良和 東京大学大学院 農学生命科学研究科細胞生化学
	呉 颯英 東京大学大学院 農学生命科学研究科細胞生化学
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	76
IV. 研究成果刊行物・別刷	78

化学物質による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
開発に関する研究

研究代表者 牧野 恒久 〔社〕有隣厚生会東部病院長

研究要旨

本研究では次代の社会の担い手である子どもを取りまく環境中のどのような化学物質が健康影響を及ぼすか、どの程度の生体暴露量が健康障害に結びつくかなどを、新しいエピジェネティクスの手法から解明することを目的とした。とくに化学物質の生体暴露量測定法の開発、信頼しうる暴露量の入手、その暴露量内での健康評価方法の開発をワンセットで行った。

研究期間 3 年の第 2 年度は、多くの化学物質の中から、子どもの健康被害が想定しうる化学物質の絞り込みを行った。その結果、本研究では近年母乳中の汚染が懸念され樹脂の難燃剤として多用されるポリ臭素化ジフェニルエーテル、プラスチックの可塑剤であるフタル酸エステル類、家庭で使用される農薬の 90%以上を占めるピレスロイド系農薬、一般農薬の過半を占める有機リン系農薬、喫煙に関するニコチン、コチニン、樹脂原料のビスフェノール A、24 種の重金属類などを対象物質として選択した。これらの物質の暴露量測定開始にあたり、杉野班で、周産期のヒト試料、とくに母体血、臍帯血、羊水、胎脂などの採取にあたり、採取器具、採取手技などから人工夾雑物が混入しないことを確認した。その上で中澤班では、これら物質に対する感度、特異性に優れた質量分析法を開発した。塩田班では中澤班の生体暴露量情報に基づき、マウス ES 細胞のヘテロクロマチン形成から有機リン系農薬の代謝産物 DEP、重金属のセレン、Hg、コチニン、S-421 が、ヒト iPS 細胞では PFOA がエピジェネティクス変化を惹起する物質として特定し、開発したゲノムワイドメチル化解析法、D-REAM (T-DMR Restriction-tag-mediated amplification) 法により遺伝子領域の DNA メチル化プロファイルを解析した。その結果これら物質は母体・胎児環境中に検出される濃度で、DNA メチル化に影響を与えていること、ならびにこれら化学物質の影響を受ける遺伝子領域が明らかになった。また最終目標ヒト iPS 細胞での解析を確立する準備としてマウス、ヒト両者の iPS 細胞の DNA メチル化プロファイル解析をおこなった。

研究分担者氏名・所属研究機関名及
び所属研究機関における職名

中澤 裕之：星薬科大学薬品分析化学教授
塩田 邦郎：東京大学大学院
農学生命科細胞生化学教授
杉野 法広：山口大学大学院研究科
産婦人科学教授

A. 研究目的

1. 生体資料中のピレスロイド系および有機リン系農薬分析法の開発と暴露評価法に関する研究

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。特にこれらの化学物質が胎児や乳幼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の影響を及ぼしているかについては十分解明されていない。本研究では、食品や大気など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、家庭内で使用されている殺虫剤の9割近くを占めるピレスロイド系農薬、及び殺虫剤として世界的に最も汎用されている有機リン系農薬について、母体血、臍帯血、母体尿中の暴露状況を把握し、これら化学物質による胎児、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した。

2. HILIC/MS/MSによるヒト血清中ニコチン代謝物の同時分析法の開発

ヒト生態系へ影響が懸念される化学物質の中でタバコ煙の構成物質は4000種類ともいわれる。わが国では現在常習的に喫煙している者の割合は年々減少しているにもかかわらず、男性では約4割、女性では約1割とまだまだ高い喫煙率を示している。喫煙による慢性肺疾患やがん等の生体影響が懸念される中、妊婦におけるタバコ煙暴露では臍帯血流量の減少、胎児に低酸素状態、低栄養状態をもたらすことから子宮内胎児発育遅延、早産、死産、先天異常、出生時の体重減少等が高頻度に発生するとされてい

る。タバコ煙暴露実態の評価のバイオマーカーとされるニコチン代謝について、ヒト生体中のニコチン、コチニンを同時分析する親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (HILIC/MS/MS) を開発することを目的とした。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテルの子どもへの暴露評価に関する研究

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。近年、北米地域を中心に世界的なPBDEs汚染の拡大が明らかにされ、環境中でのPBDEsの長期残留性や生物蓄積性が問題視されている。これらPBDEsの一部異性体は、甲状腺機能や脳神経機能のかく乱作用を有することが報告されており、特に子どもへの悪影響が懸念されている。一方、子どものPBDEs暴露実態については未だ不明の点が多い。本研究では胎児期のPBDEs暴露評価を目的として、同位体希釈法を用いてヒト血清、母乳試料ならびにハウスダストの高精度分析法の構築を目的とした。

4. 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明

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、雑貨および医療器具等) に多用されており、日本人は日常的にこの化学物質に暴露されていると考えられる。体内に取り込まれたこの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

ノエステル類の一部は発生・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、子どもへの暴露実態の解明が求められている。本研究ではこの物質の直接影響を受ける胎児の暴露状況を明らかにするために、胎児の生育環境を反映する生体試料（母体・臍帯血清、羊水、胎脂）中のフタル酸エステル類を分析することを目的とした。

5. 化学物質の暴露評価からみた周産期異常に関する研究

妊娠37週0日から41週6日の正常単胎妊娠における各種周産期試料、すなわち母体血、母体尿、母乳、臍帯血、羊水、胎脂などを挟雑物質が含まれない採取法を確立した後試料を採取し、各種化学物質の分析に供した。分析値と子宮内胎児発育不全、妊娠高血圧症候群、前置胎盤、常位胎盤早期剥離などの異常妊娠との相関を検討した。

6. 胚培養環境中に存在する化学物質の把握に関する研究

次代の社会の担い手である子ども、とくに胚培養環境中で、どのような化学物質が児の健康に影響を及ぼすか、どの程度の暴露量が児の健康障害に結びつくか等を、新しいエピジェネティクス的手法を用いて解明することを本研究の目的の一つにした。本年度は生殖補助技術における胚培養環境について、培養器具ならびに胚培養液試料の検討から始めた。

7. 胎児へのエピジェネティクスな影響の解析：エピメュータゲン評価法に関する研究

エピジェネティクスは、塩基配列の変化を伴わない、細胞分裂後も継承される遺伝子機能を研究する学問領域である。近年、発生異常や癌など多くの疾患において様々な遺伝子のエピジェネティクス異常がこれらの病態に関連していることが明らかになりつつある。

本研究では身近に存在する化学物質が胎児発生に及ぼす影響について、初期胚のモデルと考えられるES細胞ならびにヒトiPS細胞を用いたエピジェネティクス解析により、胎児のエピジェネティクス状況に影響を与える可能性のある化学物質（エピメュータゲン）のスクリーニング系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 生体試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬分析法の開発および暴露評価に関する研究

ピレスロイド系農薬の暴露評価では暴露マーカーとして主代謝産物の3-phenoxybenzoic acid(3-PBA)を指標成分として、有機リン系農薬ではシロアリ駆除や家庭用殺虫剤とし汎用されるクロルピリホスの主代謝産物3,5,6-Trichloro-2-pyridinol(TCP)の大容量注入方式による分析法を開発した。同時に有機リン系農薬の主代謝産物、ジアルキルリン酸(DMP,DEP)、ジアルキルチオリン酸(DMTP,DETP)4種も分析対象とした。

2. HILIC/MS/MS を用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの分析に関する研究

HILIC/MS/MS によるヒト生体試料中のニコチンおよびコチニンの分離定量法を検討した。分離カラムには Waters 社製 HILC カラム (2.1 X 100 mm) を用いた。移動相にはギ酸濃度が 0.01% となるように設定した水とアセトニトリルの混液を使用することで、目的物質の良好な相互分離が達成された。試料の前処理として、夾雑成分の除去を目的に固相抽出法を採用し、固相抽出のカートリッジには OasisMCX を使用することで、試料の精製・濃縮が達成された。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテルの子どもへの暴露評価に関する研究

標準物質には Wellington Laboratories 製の PBDEs 混合液 (BDE-MXE) を用い、3~10 臭素化物の代表的な 10 種類の異性体 (#28, #47, #99, #100, #153, #154, #183, #197, #207, #209) を測定対象物質とした。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 (^{13}C) 標準化 PBDEs 混合溶液 (MBDE-MXE および MBDE-139) を用いた。母乳、血清、ハウスダスト試料はクリーンアップスパイクを添加した後、それぞれジエチルエーテル/ヘキサン、アセトニトリル/ヘキサン、アセトン/ヘキサン混合溶媒により抽出し、硫酸シリカゲルカラムし、シリンジスパイクを加えて最終 20 μL のノナン溶液として GC/MS 測定に供した。

4. 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明

血清及び羊水中の DEHP, MEHP の分析
母体血清、臍帯血清、羊水試料 0.5mL に内部標準およびアセトンを加えて攪拌後、超音波照射を 2 分間行った。続いてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000rpm, 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 (3,000rpm, 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 0.5mL および酢酸 4 μL を加えて溶解した。ヘキサン 1mL 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 (3,000rpm, 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 1mL 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 (3,000rpm, 10 分間) した。この操作を再度行い、さき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 0.5mL に溶解して LC/MS/MS 試験液とした。

胎脂中の DEHP および MEHP の分析

胎脂 0.025g 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。次に内部標準およびアセトン 4mL を加えて攪拌した後、超音波照射を 2 分間行った。続いてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌し、遠心分離 (3,000rpm, 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 1mL を加えて溶解し、アセトニトリル 2mL 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 (3,000rpm, 10 分間) した。アセトニトリル層を別の清浄なガラス試験管に回収した。ヘキサン層にアセトニトリル 2mL 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 (3,000rpm, 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. 化学物質の暴露評価からみた周産期異常に関する研究

山口大学病院にて平成20年7月に医薬品等治験臨床研究等審査委員会で承認された計画の下にヒト試料を採取した。本病院で分娩を行う妊娠37週0日から妊娠41週6日までの正常単胎妊婦を対象とした。通院中に妊婦外来において臨床研究 (具体的な検体採取) の説明を行い、後日承諾書を持参した患者に限り分娩前後に検体採取を行った。

アンケート調査票は入院後に配布し、退院前に回収した。

6. 胚培養環境中に存在する化学物質の把握に関する研究

生殖補助技術とくに胚培養の際使用する胚培養皿、胚培養液について、本研究にて開発した方法を用いて、ビスフェノールA (BPA), ノニルフェノール、フタル酸エステル類を測定検討した。

7. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析: エピメータゲン評価法に関する研究

化学物質暴露 ES 細胞、ヒト iPS 細胞における検討

マウス ES 細胞ならびにヒト iPS 細胞をゼラチンコートディッシュ上で25種の化学物質について、すでに測定された血清暴露濃度を、コントロールとして溶媒のみを添加したものを96時間培養し、それらの細胞からゲノム DNA を抽出した。D-REAM 法によりゲノムワイド DNA メチル化解析を行うために、化学物質または溶媒のみに暴露させたマウス細胞、ヒト iPS 細胞から抽出したゲノム DNA をメチル化 HpyCH41V 消化し、その後アダプターライゲーション PCR により非メチル化領域を増幅し、プロモーターアレイとハイブリデーションし遺伝子領域の DNA メチル化解析を行った。COBRA 法による遺伝子領域の DNA メチル化解析を行うために、上記ゲノム DNA についてバイサルファイト反応を行い、その後 COBRA 法による DNA メチル化解析を行った。バイサルファイト反応済みゲノム DNA を PCR 増幅後、HpyCH41V による切断を行い、切断断片をマイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 (MultiNA) により解析した。さらに得られた切断断片の面積値より DNA メチル化率を算出した。

C & D 研究結果、考察

1. 生体試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬、および BPA 分析法の開発と暴露評価に関する研究

3-PBA, TCP, BPA の個々の分析測定については、平成 14 年厚生労働科学研究以来その成果を年次報告してきたが、本研究では血清および尿中の 3-PBA, TCP, BPA を同時に分析可能な前処理法の構築を試みた。これら化学物質は血清、尿中で主にグルクロン酸抱合体として存在することが知られており、 β -グルクロニダーゼ (β -グルクロニダーゼ 6,500units/ml, スルファターゼ 160units/ml) 50 μ L, 90 分処理で脱抱合体処理を行い、親水性および疎水性化合物の保持能に優れたポリマー逆相系 Oasis HLB にて前処理を行った。本法による尿試料 3-PBA および TCP の添加回収率 (5ng/mL 添加) は、それぞれ平均で 82.7%, 80.5%、相対標準偏差 RSD は 7.5%, 6.8% であった。本法による検出限界は 0.2ng/mL であった。DMP, DEP, DMTP, DETP についても同様にガスクロマトグラフ・炎光度検出器 (GC・FPD) を用いた検出方法で検討した。構築されたこれら測定法による実試料分析は山口大学医学部から提供された母体血、母体尿、臍帯血各 22 組、合計 66 検体について行った。その結果、有機リン系農薬代謝産物はほとんどの妊婦から何らかの代謝体が検出された。具体的な濃度は DMP で 0.9-57.1ng/ml, DEP で 0.2-25.9ng/ml, DMTP で 0.4-92.3ng/ml, DETP で 0.7-14.5ng/ml であった。3-PBA はグルクロン酸抱合体として 3 人から 0.6-2.4ng/ml (検出限界値: 0.2ng/ml)、TCP は 2 人から 0.6-1.3ng/ml (検出限界値: 0.5ng/ml) 検出された。一方 BPA は全ての

試料で検出下限値(0.5ng/ml)以下であった。

2. HILIC/MS を用いたヒト血清中ニコチンおよびコチニンの同時分析に関する研究

血清中のニコチン、コチニンを同時分析するため、MS における条件の最適化を図った。ニコチン代謝物は高極性物質であるので、ODS カラムに替えて高極性物質の保持が可能な、親水性相互作用クロマトグラフィ (HILIC) を採用し、それぞれの化合物の相互分離を達成した。血清を対象とした本分析においてサロゲート物質を用いた内部標準法を採用したことにより、精度の高い分析法が構築できた。標準品を用いた検出限界 (S/N=3) および定量限界 (S/N=10) はニコチンにおいて 0.5 および 1ng/ml であった。検量線を作成した結果 LOQ~200ng/ml の濃度範囲において良好な直線性 (0.99) が得られた。ヒト暴露評価のために同一のヒト妊婦の母体、臍帯血 30 組 (n=60) を分析した。その結果、30 検体中三つのペア検体からニコチンの代謝物であるコチニン、ヒドロキシコチニンが検出され、タバコによる胎児汚染が窺われた。有機フッ素系化合物の暴露解析は次年度以降の課題とした。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテルの子どもへの暴露評価に関する研究

大阪市内で採取したハウスダスト (n=9) を分析すると、PBDEs 濃度は平均 690ng/g, S-421 濃度は平均 170ng/g の値が得られ、PBDEs および S-421 による屋内汚染が判明した。居住者の血清試料 (n=9) を検討すると、PBDEs は平均 11pg/g,

S-421 は平均 24pg/g の暴露量であった。母乳(n=20)試料では全てから PBDEs が検出され、平均濃度は 52pg/g であった。

4. 胎児期のフタル酸エステル類の暴露実態の解明

母体血(n=48)、臍帯血(n=50)、羊水(n=28)それぞれの試料中の暴露された DEHP および MEHP 分析結果は以下のようになった。

DEHP は定量下限 (10ng/ml) を超える濃度で母体血清では 47.9%、臍帯血清で 24.0%、羊水中で 60.7%に検出された。

MEHP は母体血清の 25.0%に定量下限 (2.0ng/ml) を超えて、臍帯血清では 11.0%、羊水中では 71.4%にそれぞれ検出された。

これらの結果は、血清中よりも羊水中で DEHP, MEHP いずれもが高濃度で存在することが示唆された。

胎脂中(n=12)では、いくつかの症例で極めて高値の DEHP が検出される一方、MEHP は全ての試料で定量下限値(80ng/g)以下であった。

以上の結果は羊水中には臍帯血清中に比較して、高い割合で DEHP, MEHP 共に検出され、子宮内にこれら物質が貯留している可能性が示唆された。胎児は常に羊水と接しており、羊水はこれら物質の暴露経路のひとつである可能性が示された。

5. 化学物質の暴露評価からみた周産期異常の研究

平成 20 年 9 月より平成 22 年 1 月まで、確立した狭雑物質の混入のない採取法により、母体血、母体尿、母乳、羊水、臍帯血、胎脂などの母児環境の評価対象にな

る合計 119 試料を採取し、本研究班の化学物質測定に供した。同時に子宮内発育不全症例 18、前置胎盤症例 2、妊娠高血圧症候群症例 1 から同様な試料を採取した。

これら症例と化学物質の暴露状態の相関関係を解明すべく、各症例について生活習慣、住宅環境などのアンケート調査を実施した。

6. 胚培養環境中に存在する化学物質の把握に関する研究

胚培養器具から溶出する BPA とノニルフェノール(NP)の胚への暴露状況を検討する目的で、培養液(水)中の BPA および NP を高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計(LC・MS/MS)を用いて測定した。その結果、BPA, NP はヒト胚培養条件において、いずれも定量下限値(BPA:0.1ppb, NP:0.05ppb)以下であった。

DEHP, MEHP についても有意な溶出は認められなかった。

7. 胎児へのエピジェネテイクスな影響の解析：エピニュータゲン評価法に関する研究

マウス ES 細胞を用いた検出系で 25 種類の化学物質のうち 5 種類の化学物質 (DEP, Hg, Se, S-421, コチニン)が暴露量の範囲内でヘテロクロマチン形成に影響を与えることが判明した。とくに有機リン系農薬の代謝産物 DEP による遺伝子領域の DNA メチル化状況への影響について D-REAM 法および COBRA 法を用いて解析したところ、DEP 暴露細胞では、*Cdc6* や *Upk1b* (ガン関連遺伝子) でのメチル化亢進、*Lep* (代謝関連遺伝子) でのメ

チル化低下、*M6pr* (膜輸送関連遺伝子) でのメチル化亢進などいくつかの遺伝子領域で DNA メチル化プロファイルが変化する事実が明らかになった。

同じくマウス ES 細胞を用いて Se の暴露による DNA メチル化プロファイル変化を解析したところ、解析した 119 遺伝子に共通して全体的な DNA 脱メチル化が生じていた。とくに脱メチル化度合いが大きい遺伝子として、*Nes* (神経分化関連遺伝子) や *Lpgat1* (膜局在アシル基転移酵素) が見出された。

これらの結果は、DEP、Se とともに母体血中への暴露量の範囲内でガン関連遺伝子や神経分化に関わる遺伝子などへ影響を及ぼすことが判明し、胎児のエピジェネティクス状況にも影響を及ぼす可能性を示唆したことになる。一方、ヒト iPS 細胞を用いた検出系では、マウス ES 細胞の検出系と異なり、PFOA によってヘテロクロマチンの変化が検出されたが、前出の 5 種類の化学物質ではその変化が検出されなかった。このことはマウスとヒトでは化学物質への感受性が異なるものと考えられる。本研究の結果は化学物質の暴露に対して、ヘテロクロマチン形成、DNA メチル化を指標にエピミュタゲンのスクリーニング系を確立しうることを示した。

E. 結論

本研究の最終ゴールは社会、家庭、職場においてヒト、とくに子どもが暴露される無数の化学物質の中から、生産・輸入量、内外の安全・衛生情報、健康被害報告などから絞り込まれた物質について、真に信頼

すべく測定法の下に、生体内暴露量を測定し、この暴露量の範囲内で次代を担う子どもにいかに関与を及ぼすか、新しい毒性評価法を開発することにある。

三年研究の第二年度に当たる本年度の研究から以下の結論が導かれた。ヒトの測定対象試料、すなわち母体血、臍帯血、羊水、胎脂などの採取手技について、測定前に狭雑物質が混入しない採取法が確立された。各々の試料、各物質に対して、それぞれ特異性、測定感度に優れた質量分析法が開発できた。従来の毒性試験と異なりヒト血清中の暴露濃度の範囲内で、有機リン系農薬の代謝産物 DEP や Se 元素、水銀、ニコチンの代謝産物のコチニン、農薬の強力剤である S-421 などがマウス初期胚のモデルと考えられる ES 細胞において遺伝子領域の DNA メチル化状況に影響を与えることを見出した。ヒト iPS 細胞を用いた系では有機フッ素系化学物質ではパーフルオロ化合物のひとつである PFOA が暴露量の範囲内で遺伝子領域のメチル化プロファイルを変化させた。

3年目の最終年度において、ヒト iPS 細胞を用いてより具体的なエピミュタゲン解析を行う礎が得られた。

F. 健康危険情報

最終年度までに、ヒト iPS 細胞で解析する。

G. 研究発表

報告書巻末の III. IV. および各分担研究報告の終りにまとめた。

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
「HILIC-MS/MSによるヒト母体、臍帯血清中ニコチン代謝物の同時分析法」

研究代表者	牧野 恒久	有隣厚生会	東部病院
研究協力者	中澤 裕之	星薬科大学	薬品分析化学教室
	斉藤 貢一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学	薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学	薬品分析化学教室

研究要旨

妊婦におけるタバコ煙暴露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ことから、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されており、胎児に与える影響は深刻なものとされている。本研究では、タバコ煙による暴露実態を評価するために、親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（HILIC-MS/MS）を用いた、生体試料（母体血清、臍帯血清）中のニコチン代謝物の同時分析法を構築した。本分析法の検出限界および定量限界はニコチンにおいて、0.5 および 1 ng/mL であった。また、ヒト血清におけるニコチンの添加回収試験は、90.1～107.7%であった。構築した分析法をペア検体である妊婦の母体血清、臍帯血清の分析に適用したところ、30 体中 3 体からニコチンの代謝物質であるコチニン、ヒドロキシコチニンが検出された。

A. 研究目的

生活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。中でも、タバコ煙の構成物質は約 4000 種類とも言われている。わが国においても現在常習的に喫煙をしている人の割合は、年々減少しているにも関わらず、男性では約 4 割、女性では約 1 割と未だに高く、喫煙による慢性肺疾患や、がん等の生体影響が懸念されている。特に、妊婦におけるタバコ煙暴露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ことから、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されており、胎児に与える影響は深刻なものとされている。現在、タバコ煙による暴露実態を評価するために、ヒト血清試料中のニコチンの代謝

物がバイオマーカーとして有用とされている。

本研究では親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（HILIC-MS/MS）を用いた、生体試料（母体血清、臍帯血清）中のニコチン代謝物の同時分析法を構築した。

B. 研究方法

B-1. 標準品および試薬

ニコチンは関東化学社製、コチニンはシグマアルドリッチ社製およびノルニコチン、ノルコチニン、ヒドロキシコチニンは Toronto 社製を用いた。生体試料の前処理には固相抽出法を適用し、Waters 社製 Oasis MCX (1 cc, 30 mg) による試料の精製・濃縮を行った。測定には親水性相互作用クロマトグラフ/タンデム質量分析計を使用し

た。精度の高い分析法を達成するために内標準法を採用した。サロゲート物質としてノルニコチン-d₄、ニコチン-d₃、ノルニコチン-d₄、コチニン-d₃、ヒドロキシコチニン-d₃を使用した。

標準溶液は、各標準品 10 mg を秤量し、メタノール 100 mL で溶解して標準原液を作製した。その後、適時希釈して検量線作成用の溶液とした。

B-2. 装置

測定機器には Waters 社製 Quattromicro を用いた。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用し、ポジティブイオンモードの Multiple Reaction Monitoring (MRM) により分析した。LC の分離条件として、カラムには Waters 社製 Atlantis™ HILIC シリカ (100 mm × 2.1 mm, 3 μm) を用いた。移動相はアセトニトリル、水、1% ギ酸を用い、グラジエント操作によって分離を行った。

B-3. 固相抽出条件

血清 500 μL にサロゲート物質 (200 ng/mL) を 50 μL、水を 350 μL、25% トリクロロ酢酸を 100 μL 加え、除タンパク後、遠心分離操作 (10,000 g, 5 min) を行った。その後、得られた上清を Oasis MCX (30 mg) を用いた固相抽出法に適用した。固相抽出条件は、洗浄溶媒に精製水 (2 mL) とメタノール (1 mL) を使用し、1% アンモニア含有メタノール (3 mL) で固相カートリッジからニコチンおよびその代謝物質の脱離を行った。溶出液を 50°C、減圧下で乾固し、得られた残渣にアセトニトリルを加えて再溶解させ、HILIC-MS/MS

の測定試料とした。

B-4. 生体試料

山口大学医学部から提供された同一妊婦の母体血清および臍帯血清 30 組、合計 60 検体を測定試料とした。

B-5. 倫理面の配慮

試料は、山口大学医学部の倫理規定に則って採取された。

C 研究結果

C-1. 測定条件の最適化

MS における条件の最適化を計るため、それぞれの標準品を用い、FIA による測定を行った。その結果、ESI のポジティブイオンモードで大きなイオン化が見られた。ニコチン代謝物質 MRM の条件を Table 1 に示す。

ニコチン代謝物は高極性物質であることから、繁用されている ODS カラムでの保持が困難である。そこで、高極性物質の保持が可能な親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を採用した。また、移動相に加えるギ酸濃度を検討したところ、最終濃度が 0.05% になるように設定した場合、良好な面積およびピーク高さを得ることができた。その結果、Fig. 1 に示すようにそれぞれの化合物の相互分離が達成された。

C-2. 固相抽出法の最適化

測定対象としている血清中にはさまざまな夾雑成分が含まれていることから、固相抽出法を検討した。ニコチンおよびその代謝物質は極性が高いことから、逆相分配モードによる固相カートリッジで目的物質を

保持させることが困難であった。そこで、逆相-陽イオン交換ミックスモードである Oasis MCX を用い、検討を行った。

洗浄溶媒を検討したところ、水とメタノールを用いた場合、最も高い回収率を収めることができた (Fig. 2)。

C-3. 分析法バリデーション

ヒト血清を対象とした分析において、サロゲート物質を用いた内標準法を採用したことで精度の高い分析法が構築された。標準品を用いた検出限界 (S/N=3) および定量限界 (S/N=10) はニコチンにおいて 0.5 および 1 ng/mL であった。また、検量線を作成した結果、1~1000 ng/mL の濃度範囲において良好な直線性 (相関係数 0.99) が得られた (Table 2)。ヒト血清を用いたニコチンの添加回収試験では、10 ng/mL を添加したところ、90.1~107.7% (RSD < 9.6%; n = 6) であった (Table 3)。さらに、日内、日間変動を求めたところ、精度の高い分析法が構築された (Table 4)。これらの結果は全て FDA ガイドライン¹⁾を満たすものであり、高感度、選択的な分析法の構築ができた。

C-3. 母体、臍帯血の分析

ヒト暴露評価のために同一のヒト妊婦の母体血清、臍帯血清 (n = 30) を分析した。Fig. 3 に喫煙歴のある母体血清のクロマトグラムを示す。実試料を測定した結果、30 検体中 3 つのペア検体からニコチンの代謝物質であるコチニン、ヒドロキシコチニンが検出された (Table 5)。これらのことより、胎児がタバコ煙中のニコチンに暴露されている可能性が危惧された。

D. 結論

本研究において測定対象とした母体血清、臍帯血清試料は、多種多様な夾雑成分を含有している。しかし、HILIC-MS/MS を用いて構築した分析法は高感度、選択的に当該化学物質を分析することができた。本法を同一妊婦の母体血清、臍帯血清に適用したところ、喫煙歴のある検体からニコチンの代謝物質であるコチニン、ヒドロキシコチニンが検出された。そこで、ニコチン代謝物質が検出された母体血清、臍帯血清の濃度から胎児への移行性を評価した。結果、母体濃度の 2~3 割の割合で胎児へと化学物質が移行することが示唆された。

E. 参考文献

1) FDA Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

G-1. 学会発表

岩崎雄介¹、後藤正人¹、伊藤里恵¹、斉藤貢一¹、杉野法広²、牧野恒久³、中澤裕之¹(星薬大¹、山口大²、東部病院³)
親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による血清中のニコチンおよびその代謝物の分析

日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28-30

目 岡山県)

Wakui, Y. Iwasaki, K. Saito, H. Nakazawa, J.
Int. Pharm. 376(2009)213-218.

G-2. 発表論文

1) R.Ito, M. Kawaguchi, Y. Koganei, H. Honda,
N. Okanouchi, N. Sakui, K. Saito, H.
Nakazawa, Anal.Sci. 25(2009)1-5.

2) R. Ito, N. Miura, M. Ushiro, M. Kawaguchi,
H. Nakamura, H. Iguchi, J. Ogino, M. Oishi, N.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

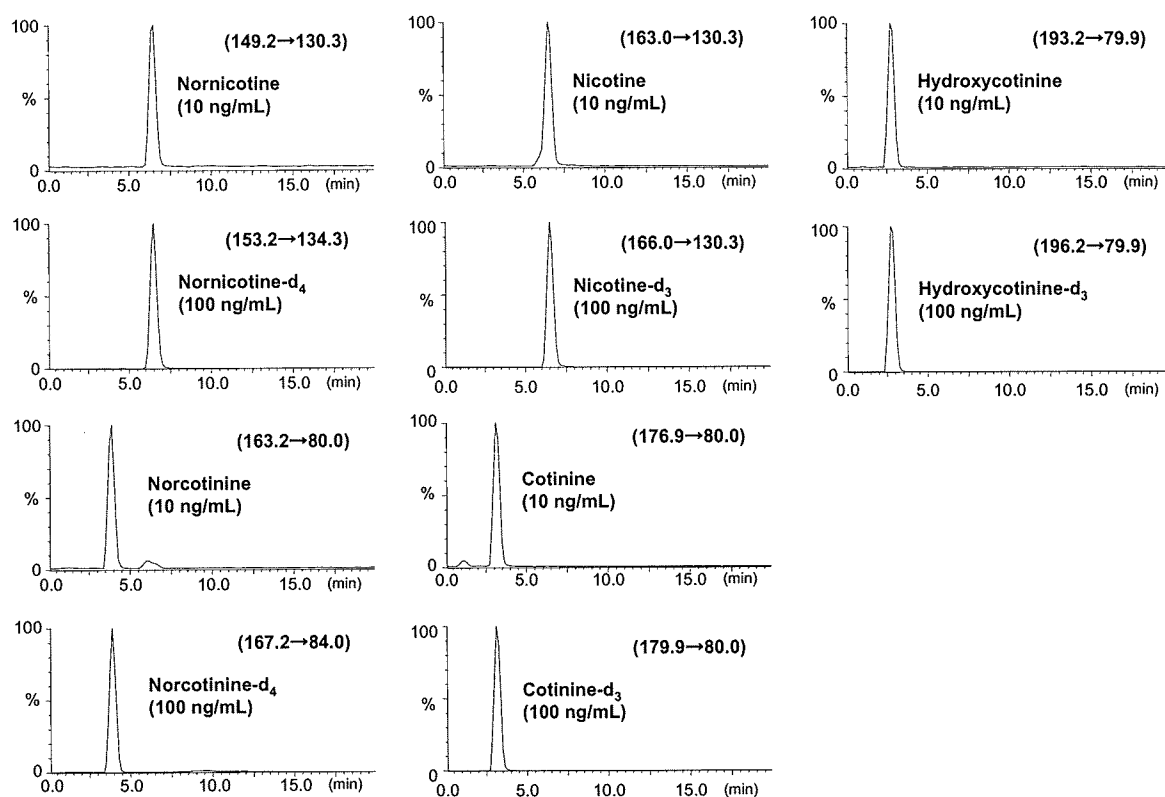


Figure 1

MRM chromatograms of standard samples (10 ng/mL) by HILIC-MS/MS

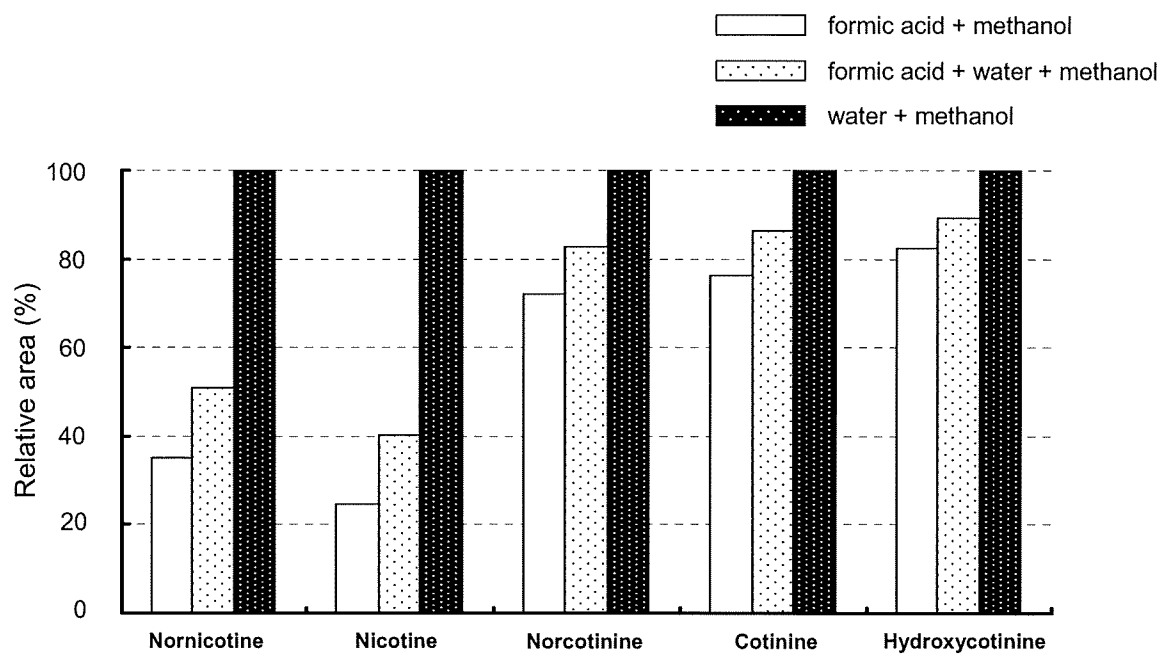


Figure 2

Recoveries of analytes spiked in serum at various conditions for solid phase extraction

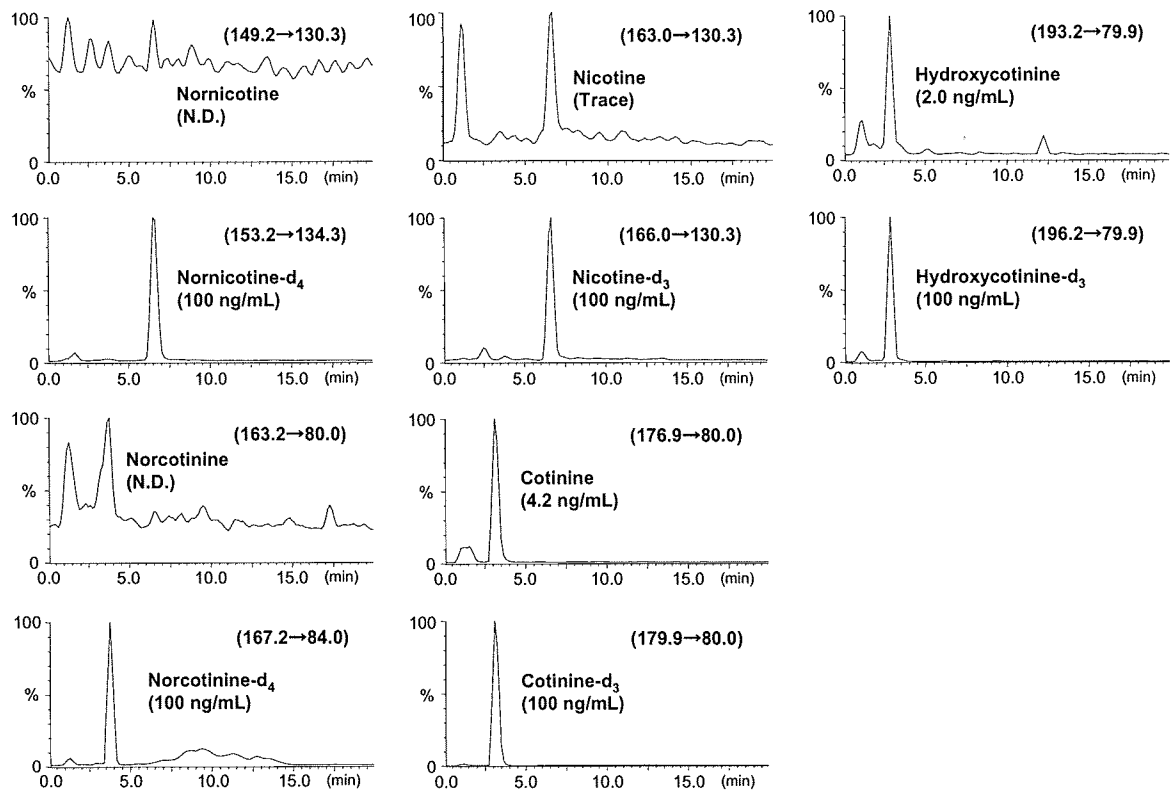


Figure 3

MRM chromatograms of nicotine and its metabolites in maternal serum sample (No. 28) by HILIC-MS/MS

Table 1

MRM conditions for the analysis of nicotine and its metabolites

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision voltage (V)
Nornicotine	149.2	130.3	28	18
Nicotine	163.0	130.3	30	20
Norcotinine	163.2	80.0	38	23
Cotinine	176.9	80.0	35	22
Hydroxycotinine	193.2	79.9	39	23
Nornicotine-d ₄	153.2	134.3	28	18
Nicotine-d ₃	166.0	130.3	30	20
Norcotinine-d ₄	167.2	84.0	38	23
Cotinine-d ₃	179.9	80.0	35	22
Hydroxycotinine-d ₃	196.2	79.9	39	23

Table 2

Validation of LC–MS/MS method for the analysis of nicotine and its metabolites

Compound	Range (ng/mL)	LOD* (ng/mL)	LOQ** (ng/mL)	r	Slope	Intercept
Nornicotine	1-1000	0.5	1	0.9998	0.00218	-0.0010
Nicotine	1-1000	0.5	1	0.9999	0.00465	0.0097
Norcotinine	1-1000	0.5	1	0.9999	0.00456	-0.0031
Cotinine	1-1000	0.5	1	0.9996	0.00159	0.0002
Hydroxycotinine	1-1000	0.5	1	0.9999	0.00473	0.0016

*LOD: S/N = 3

**LOQ: S/N > 10, accuracy > 15% and precision >15%

Table 3

Recovery test of nicotine and its metabolites in serum samples

Compound	Internal standard	Recovery yield (mean ± S.D., %, <i>n</i> = 6)			
		10 ng/mL	20 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
Nornicotine	Nornicotine-d ₄	100.3 ± 6.5	97.5 ± 3.2	103.7 ± 1.0	102.4 ± 2.7
Nicotine	Nicotine-d ₃	90.1 ± 2.6	98.7 ± 5.0	98.2 ± 2.4	98.6 ± 1.4
Norcotinine	Norcotinine-d ₄	107.7 ± 1.9	99.6 ± 3.0	101.4 ± 8.0	92.2 ± 4.8
Cotinine	Cotinine-d ₃	96.6 ± 8.3	93.4 ± 2.5	97.7 ± 1.4	99.2 ± 1.7
Hydroxycotinine	Hydroxycotinine-d ₃	97.3 ± 9.6	96.3 ± 4.0	101.0 ± 2.7	102.2 ± 2.5

Table 4

QC intra-assay, inter-assay, and accuracy during routine analysis

	Blank	10 ng/mL	20 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
Nornicotine					
Mean \pm S.D. (ng/mL)	0.0	9.3 \pm 0.6	19.8 \pm 0.6	45.6 \pm 0.4	100.1 \pm 2.6
% bias		-7.2	-0.9	-8.8	0.1
Intra-assay		6.5	3.2	1.0	2.7
Inter-assay		7.7	2.9	9.8	3.1
Nicotine					
Mean \pm S.D. (ng/mL)	2.8 \pm 0.7	12.5 \pm 0.4	24.1 \pm 1.2	53.3 \pm 1.3	102.2 \pm 1.5
% bias		-3.2	6.4	1.0	-0.6
Intra-assay		2.6	5.0	2.4	1.4
Inter-assay		7.4	6.1	4.9	2.6
Norcotinine					
Mean \pm S.D. (ng/mL)	0.0	10.8 \pm 0.2	21.9 \pm 0.7	52.6 \pm 4.2	101.6 \pm 5.3
% bias		7.7	9.7	5.3	1.6
Intra-assay		1.9	3.0	8.0	4.8
Inter-assay		5.4	9.8	8.7	7.0
Cotinine					
Mean \pm S.D. (ng/mL)	16.6 \pm 1.8	26.4 \pm 2.3	35.2 \pm 0.9	64.3 \pm 0.9	113.8 \pm 2.0
% bias		-1.9	-7.0	-4.6	-2.7
Intra-assay		8.3	2.5	1.4	1.7
Inter-assay		7.9	7.4	4.9	2.5
Hydroxycotinine					
Mean \pm S.D. (ng/mL)	3.1 \pm 0.6	12.6 \pm 1.2	22.4 \pm 0.9	51.7 \pm 1.4	100.6 \pm 2.5
% bias		-4.8	-3.8	-2.8	-2.5
Intra-assay		9.6	4.0	2.7	2.5
Inter-assay		9.1	5.2	2.4	2.1

(n = 6)

Table 5

Quantification of maternal and cord serum

Maternal serum					
Compound	Non-smoker		Smoker		
	Sample No. 1-26	No. 27	No. 28	No. 29	No. 30
Nornicotine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nicotine	N.D.	N.D.	Trace	3.2	7.8
Norcotinine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.4
Cotinine	N.D.	N.D.	4.2	13.6	486.4
Hydroxycotinine	N.D.	N.D.	2.0	N.D.	163.5
(ng/mL)					
Cord serum					
Compound	Non-smoker		Smoker		
	Sample No. 1-26	No. 27	No. 28	No. 29	No. 30
Nornicotine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nicotine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Norcotinine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.6
Cotinine	N.D.	N.D.	2.5	4.8	216.8
Hydroxycotinine	N.D.	N.D.	1.3	N.D.	93.9
(ng/mL)					