

平成 21 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）

研究協力報告書

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に関する研究  
「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 の分析」  
「人工授精卵培養器材由来のビスフェノール A 及びノニルフェノールの分析」

研究代表者 牧野恒久（有隣厚生会 東部病院）

研究分担者 中澤裕之（星薬科大学）

研究協力者 石井里枝（埼玉県衛生研究所）

研究要旨

有機リン系農薬の生体試料中の暴露量を評価するために、ガスクロマトグラフ-炎光光度検出器（GC-FPD）を用い、大容量注入方式による高感度分析法を構築し、暴露評価を行った。有機リン系農薬の主代謝物である 2 種のジアルキルリン酸（Dimethyl phostate : DMP, Diethylphosphate : DEP）及び 2 種のジアルキルチオリン酸（Dimethyl thiophosphate : DMTP, Diethyl thiophosphate : DETP）の計 4 種を分析対象とした。また、ピレスロイド系農薬、クロルピリホス及びビスフェノール A（BPA）についても、これまでに開発した方法により暴露評価した。ピレスロイド系農薬の暴露指標に 3-phenoxybenzoic acid（3-PBA）を、クロルピリホスの指標成分に 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol（TCP）を、BPA はそのもの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。本法を用いて、母体尿、母体血清、臍帯血 22 組合計 66 検体を分析したところ、有機リン系農薬代謝物はほとんどの妊産婦からなんらかの代謝体が検出され、その濃度は DMP で 0.9~57.1 ng/mL, DEP で 0.2~25.9 ng/mL, DMTP で 0.4~92.3 ng/mL, DETP で 0.7~14.5 ng/mL であった。3-PBA はグルクロン酸抱合体として 3 人から 0.6~2.4 ng/mL（検出下限値 : 0.2 ng/mL）、TCP は 2 人から 0.6~1.3 ng/mL（検出下限値 : 0.5 ng/mL）検出された。一方、BPA はすべての試料で検出下限値（0.5 ng/mL）以下であった。

培養器材から溶出する BPA とノニルフェノール（NP）の人工授精卵への暴露状況を把握するために、培養液（水）中の BPA 及び 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。臨床現場で使用する培養条件において、いずれの物質も定量下限値（BPA : 0.1ppb, NP : 0.05ppb）以下であった。

## A. 研究目的

環境中には多種多様な化学物質が放出され、ヒトを含む生態系への影響が強く懸念されている。しかし、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多くある。特に、これらの化学物質が母体を通じて、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の発生、発育にどの程度影響を及ぼしているのかについては十分解明されていない。

有機リン系農薬は世界で用いられている殺虫剤の過半数を占めており、農産物からも多く検出される農薬である。また、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おり、日常的に暴露される可能性が高い。

ビスフェノールA (BPA) については近年、米国やカナダ政府において胎児、乳児及び子供の神経系及び行動、前立腺や乳腺、女性の思春期への影響を懸念する発表がなされており、わが国においても食品安全委員会健康影響評価がなされている。

そこで、本研究では有機リン系農薬について生体試料を対象とした高感度分析法を開発するとともに、すでに開発した分析法を用いてピレスロイド系農薬、有機リン系の中でも使用頻度が高いとされているクロルピリホス、BPA について暴露評価を行なった。

一方、生殖医学の発展に伴い、体外授精による出産が増加している。この領域における胎児環境、すなわち胚培養における培養機材から溶出する化学物質の暴露評価は緊急を要する検討課題である。特に人工授精卵培養時において高分子素材由来の化学物質の暴露の可能性が危惧されている。そこで、本年度は合成樹脂の原材料及び添加剤として現在、使用実態のある BPA とノニルフェノール (NP) について、人工授精卵培養時の培養条件下での溶出状況について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試料

#### 1-1. 生体試料

山口大学から提供された同一人の母体尿、母体血清、臍帯血 2 2 組合計 6 6 検体を試料とした。

#### 1-2. 培養用器材

山口大学から提供された人工授精卵の培養に使用する 4-well プレート 2 種類 (BD Falcon, Nunclon Surface)

### 2. 標準品及び試薬

標準品：3-phenoxybenzoic acid (3-PBA), 2-phenoxybenzoic acid (2-PBA) 及び Diethyl thiophosphate (DETP) はシグマアルドリッチ社製、3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) 及び 4-(1-methyloctyl)phenol-d5 (4-NP-d5) は林純薬工業社製、Dimethyl phostate (DMP) 及び Diethyl-phosphate (DEP) は AccuStandard 社製、Dimethylthiophosphate (DMTP) は AppliChem 社製、ビスフェノール A (BPA) は和光純薬工業社製、4-nonylphenol (分岐型：4-NP), 4-n-nonylphenol-d4 (4-n-NP-d4) 及びビスフェノール A-d16 (BPA-d16) は関東化学社製、4-n-nonylphenol (直鎖型：4-n-NP) は Dr.Ehrenstorfer GmbH 社製を用いた。

標準溶液は、各標準品 20mg を精秤し、メタノールまたはアセトニトリル 50mL に溶解して標準原液を調製した。また、適宜メタノールまたはアセトニトリルで希釈して標準溶液及び内部標準溶液とした。

試薬：β-グルクロニダーゼ Type H-2 (110,000 units/mL) 及びペンタフルオロベンジルブロマイド (PFBBr) はシグマアルドリッチ社製を用いた。炭酸カリウム及びジメチルホルムアミドは和光純薬工業社製特級を、アセトニトリル及びメタノールは高速液体クロマトグラフィー用を、アセトン、n-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を使用した。フロリジルは和光純薬工業社製を、Bondesil-PSA (PSA) はバリアン社製を使用した。

精製用カートリッジ：C18 (50mg : アイスティサイエンス社製) はあらかじめアセトニトリル 2mL, 水 2mL でコンディショニングした後、使用した。

Oasis HLB カートリッジ (60mg : Waters 社製) はメタノール 3mL, 水 3mL でコンディショニングした後, 使用した. Isolute multimode カートリッジ (300mg : International Sorbent Technology Ltd 社製) はアセトニトリル 5mL, 水 5mL でコンディショニングした後, 使用した.

精製用カラム : パスツールピペットに下からフロリジル 0.3g, PSA 0.1g, 無水硫酸ナトリウム 0.5g を乾式充填して使用した.

### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) : LC には Waters 社製 2695 シリーズを, MS/MS には Waters 社製 Quattro Premier を用いた.

ガスクロマトグラフ・炎光光度検出器 (GC-FPD) : Agilent 社製 5890series II を使用した.

### 4. 測定条件

#### 4-1. 尿及び血清中の有機リン系農薬代謝物の分析

分析装置に GC-FPD を用い, 表 1 に示す測定条件により分析した.

#### 4-2. 尿及び血清中のピレスロイド系農薬代謝物及びクロルピリホス代謝物の分析

分析装置に LC-MS/MS を用い, 表 2 に示す測定条件により分析した.

#### 4-3. 尿及び血清中の BPA の分析

分析装置に LC-MS/MS を用い, 表 3 に示す測定条件により分析した.

#### 4-4. 培養器材の BPA 及び NP の分析

分析装置に LC-MS/MS を用い, 表 4 に示す測定条件により分析した.

### 5. 検量線の作成

#### 5-1. 尿及び血清中の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, DEP, DMTP 及び DETP の各濃度が 0.1, 0.5, 2.5, 10 及び 25 ng/mL となる混合標準溶液を調製した. その溶液

1mL にジメチルホルムアミド 0.25mL, PFBBBr 50  $\mu$ L, 炭酸カリウム 15mg を加え, 80°C で 30 分間インキュベートした. 冷後, 反応液に水 2mL 及びヘキサン 4mL を加え, 5 分間振とうし, 3,500 rpm で 5 分間遠心分離した. 上層を採取し, 無水硫酸ナトリウム 1 g で脱水した. ヘキサン層を精製用ミニカラムに負荷し, 2% アセトンヘキサン 5mL で洗浄後, 50% アセトンヘキサン 5mL 溶出した. 溶出液を窒素気流下で乾固し, 残渣をヘキサン 0.5mL に溶解した. その 25  $\mu$ L を GC-FPD に注入し, 得られた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.

#### 5-2. 尿及び血清中のピレスロイド系農薬代謝物及びクロルピリホス代謝物の分析

内部標準物質 2-PBA を 40ng 含んだ 3-PBA 及び TCP の 0.2, 0.5, 2 及び 10 ng/mL の溶液を調製し, その 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入した. 検出には MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を採用し, それぞれの定量用モニターイオンにより得られた MRM クロマトグラムよりピーク面積を求め, 3-PBA は 2-PBA との面積比により検量線を作成した. TCP については絶対検量線法により検量線を作成した.

#### 5-3. 尿及び血清中の BPA の分析

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub> を 40ng 含んだ BPA の 0.2, 0.5, 2 及び 10 ng/mL の溶液を調製し, その 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入した. BPA と BPA-d<sub>16</sub> の面積比により検量線を作成した.

#### 5-4. 培養器材の BPA 及び NP の分析

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub>, 4-n-NP-d<sub>4</sub> 及び 4-NP-d<sub>5</sub> をそれぞれ 50 ng 含んだ 0.5, 2, 5, 10 及び 20 ng/mL の溶液を調製し, その 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入した. 内部標準物質との面積比により検量線を作成した.

### 6. 試験溶液の調製

#### 6-1. 尿及び血清中の尿及び血清中の有機リン系農薬代謝物の分析

試料 0.5g を採り, コンディショニングした C18 カートリッジに負荷後, 10%アセトニトリル 1mL で

溶出した。負荷液及び溶出液を合わせ、アセトニトリル 5mL を添加した後、5 分間振とうした。3,500rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採取した。炭酸カリウム 25mg を添加し、窒素気流下で溶媒を乾固した。残留物にアセトニトリル 1mL を添加し、以下「5-1」で述べた検量線の作成方法と同様に誘導体化し、試験溶液とした。

#### 6-2. 尿及び血清中のピレスロイド系農薬代謝物、クロルピリホス代謝物及び BPA の分析

昨年度報告した方法に従い、調製した。すなわち、試料 0.5g を採取し、内部標準物質である 2-PBA 及び BPA-d<sub>16</sub> を 20ng 加えた後、0.2M 酢酸緩衝液 (pH5) 2mL,  $\beta$ -グルクロニダーゼ (10,000 units/mL 試薬  $\beta$ -グルクロニダーゼを 0.2M 酢酸緩衝液 (pH5) で適宜希釈) を 50  $\mu$ L 加え、37°C で 90 分間インキュベートした。インキュベート後、Oasis HLB カートリッジ (60mg) に負荷し、水 6mL で洗浄後、メタノール 3mL で溶出した。窒素気流下乾固後、40%アセトニトリル 0.5mL に溶解して試験溶液とした。

#### 6-3. 培養器材からの BPA 及び NP の分析

##### 6-3-1. 培養条件

山口大学から提供された人工授精卵の培養に使用する 4-well プレート 2 種類 (BD Falcon, Nunclon Surface) について、臨床での使用状況に即した条件で用いた。ただし、今回は培養プレートからの溶出状況を把握するために、培養液の代わりに BSA 及び NP の含有量を把握した蒸留水を用いた。すなわち、各 well に 0.8mL の蒸留水を満たし、その上に蒸散を防止するため sydney IVF culture oil (Cook 社) を積層した。37°C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で 64 時間、最下段に蒸留水を満たしたバットを置いたインキュベーター内に静置した。その後、下層の蒸留水を合わせ、試料とした。4 プレート分 (16 well, 約 11 mL) の培養液を合わせたものを 1 検体とした。

##### 6-3-2. 培養液 (水) の調製

合わせた培養水 10mL に内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub>, 4-n-NP-d<sub>4</sub> 及び 4-NP-d<sub>5</sub> をそれぞれ 50ng 加えた後、コンディショニングした Isolute multimode カート

リッジに負荷し、アセトニトリル 5mL で溶出した。窒素気流下で 1mL まで濃縮し、試験溶液とした。

##### 6-3-2. 材質試験

培養プレートの well 部分 0.5g を細切し、シクロヘキサン/2-プロパノール混液 (1:1) 5mL に 37°C で振とうしながら、16 時間浸漬した。浸漬液 1 mL を窒素気流下で乾固した後、アセトニトリルに溶解し、試験溶液とした。

## C. 結果及び考察

### 1. 有機リン系農薬代謝物分析法

生体試料中の有機リン系農薬代謝物の分析法はこれまでに本研究班で LC-MS/MS を用いた方法<sup>1)</sup> を検討してきたが、定量下限値が 1ng/mL と高いことや比較的、検出率が高いと報告<sup>2)</sup> されている DMP についての回収率が十分でなく、かつマトリクスの影響を強く受ける等の問題点があった。そこで本年度、GC-FPD を用いた高感度分析法の構築を試みた。

有機リン系農薬代謝物は極性が高く、GC 分析には適さないが、PFBBR で誘導体化することによって、GC 分析が可能となった。また、低濃度レベルまでの検出を目的に、胃袋型インサートを装着した注入口を用いた PTV (Programmed Temperature Vaporizer) 方式による大容量注入法を採用した。胃袋型注入方式は溶媒の沸点よりも低い温度の注入口に低速で試料を注入し、スプリット状態で、はじめ溶媒のみを GC 外へ排出する (濃縮ステージ)。その後、急激な昇温条件によりスプリットレスモードで農薬を分析カラム内に導入する (導入ステージ)。その際にカラム温度を 60°C 程度に低く保たつことにより、導入された農薬代謝物を拡散することなく分析カラム先端に濃縮することができる。最終試験溶液の組成と注入量を検討し、対象とした農薬代謝物が安定して GC へ導入できうる最適な条件を設定した (表 1)。また、リン含有化合物を特異的に検出する炎光光度検出器 (Pモード) を用いることにより、妨害ピークの影響を受けることなく測定が可能であった。

前処理法は試料を C18 カートリッジに通過させることによって、極性の低い夾雑物の除去を図った。

また、アセトニトリルを添加し、除タンパク処理を行った。誘導体化反応時に炭酸カリウムを添加し、モノチオ体 (DMTP 及び DETP) からノンチオ体 (DMP 及び DEP) への酸化を防止した。また、誘導体化した反応液をそのまま GC へ注入すると GC 機器への負荷が大きく、未反応の試薬が分析カラム内に吸着し、数回の試料注入の後に、未反応試薬由来の大きな夾雑ピークが出現することから、フロリジル及び PSA を積層したミニカラムで精製した。

有機リン系農薬の代謝物は今回対象とした4種の他にジチオ体 (Dimethyldithio- phosphate, Diethyldithiophosphate) の2種が存在する。これまでの報告<sup>3)</sup>で尿からの検出率が極めて低いとされているが、本法では未反応試薬の除去操作段階で、十分回収されないことから、分析対象とすることはできなかった。これら2種の分析法の開発については今後の検討課題である。

本法による尿試料への有機リン系代謝物の添加回収率 (25 ng/mL 添加) は DMP が  $72.9 \pm 8.3\%$ , DEP が  $83.9 \pm 10.2\%$ , DMTP が  $87.6 \pm 12.8\%$ , DETP が  $79.1 \pm 9.4\%$  (n=5) であった。本法による検出下限値は DMP が 0.5ng/mL, その他の化合物が 0.2ng/mL であった。本法により測定した標準溶液 50 ng/mL と DMP 15.8 ng/mL, DEP 3.2 ng/mL 及び DMTP 3.8 ng/mL が検出された母体尿のクロマトグラムを図 1 に示す。

## 2. 妊産婦の農薬の暴露状況について

同一人の母体尿, 母体血清, 臍帯血 22 組 66 検体中の農薬代謝物の濃度を表 5 に示す。

有機リン系農薬代謝物は多くの妊産婦から DMP は 0.9~57.1 ng/mL (検出率: 21/22), DEP は 0.2~25.9 ng/mL (20/22), DMTP は 0.4~92.3 ng/mL (19/22), DETP は 0.7~14.5 ng/mL (20/22) の濃度範囲で検出された。

これまでに尿中の有機リン系農薬代謝物の濃度について、いくつか報告されている<sup>2,3)</sup>が、今回の検討結果はそれらとはほぼ同様な検出率, 検出濃度レベルであった。

また、DMP 及び DEP の血清及び臍帯血中濃度は尿中の検出濃度よりも低濃度側に検出数が多かった。

DETP については血清及び臍帯血中濃度は尿中の検出濃度よりも高濃度側に検出数が多かった。また、対象とした4種の代謝物すべてで臍帯血中の濃度は母体血清中の濃度よりも低い傾向にあった (図 2)。

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が検出される事例が報告<sup>4)</sup>されているが、空中散布等がほとんど無くなった今日において、有機リン系農薬による暴露レベルは微量であることが示唆された。

また、3-PBA はグルクロン酸抱合体として3人の尿から 0.6, 1.3 及び 2.4ppb (検出下限値: 0.2ppb) 検出された。このうち 1.3ppb の 3-PBA が検出された妊産婦では母体血清からも 0.3ppb の 3-PBA が検出された。TCP は2人の尿から 0.6 及び 1.3ppb (検出下限値: 0.5ppb) 検出された。1.3ppb 検出された妊産婦では血清からも 0.9ppb の TCP が検出された。ピレスロイド系農薬及びクロルピリホス代謝物の検出率は有機リン系農薬と比較し、低いと言える。

## 3. 妊産婦の BPA の暴露状況について

同一人の母体尿, 母体血清, 臍帯血 22 組 66 検体について分析したが、すべて検出下限値 (0.5ppb) 以下であった。BPA の暴露の可能性は低いものと考えられる。

## 4. 培養液中の BPA 及び NP の分析法

培養液中の BPA 及び NP の分析法について検討した。前処理法を検討するにあたり、実験環境や実験器材・試薬からの 4-NP (分岐型) の微量汚染が問題となった。そこでより 4-NP の溶出量が少ないカートリッジについて検討した。Isolute multimode (300mg), Aquasis PLS-3 (200mg), Sep-pak plus C18, Sep-pak plus PS-2, Oasis HLB について検討したところ、Isolute multimode (300mg) カートリッジでロット差がなく、4-NP の溶出量も少なかった。また、ガラスバイアル瓶のキャップに用いるセプタムからも NP の汚染がみられるものがあった。セプタムには NP の溶出のない両面テフロン製のものを使用した。実験に用いる器具等は使用直前にアセトンで洗浄して用いた。

一般に、操作ブランク値が観測された場合の検出限界は、操作ブランクの平均値 + 3SD と定義されて

いる。そこで培養液（水）中の NP の検出下限値は 0.05ng/mL とした。また、BPA は環境等からのコンタミネーションは認められなかったことから、標準溶液の S/N 比より 0.1 ng/mL とした。培養液（水）に 50 ng/mL 添加した際の回収率は BPA が 99.6±2.7% , 4-NP が 78.3±3.8% , 4-n-NP が 79.1±2.1%であった(n=5)。

#### 5. 人工授精卵培養プレートからの BPA 及び NP の暴露状況について

本法を用いて、臨床で使用する培養条件下における授精卵培養プレート 2 種からの BPA 及び NP の溶出状況について検討した。いずれの物質も検出下限値以下であった。

また、2 種のプレートの well 部分について材質試験を行ったところ、いずれの試料とも検出下限値(20 ng/g)以下であった。BPA や NP は合成樹脂の原材料、添加剤として使用された場合、材質試験では数十～数千  $\mu$ g/g レベルで検出されることから、これらプレートの原材料及び添加剤には BPA 及び NP は使用されていないことが示唆された。

#### D. 結論

##### 1. 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 の分析

多くの妊産婦から 4 種の有機リン系農薬代謝体のうちいずれかの代謝体が検出された。検出濃度は 0.2～数十 ppb の範囲であった。クロルピリホス代謝体 (TCP) は 2 人から、ピレスロイド系農薬代謝体 (3-PBA) は 3 人から極微量検出された。BPA はすべての検体で定量下限値以下であった。このことから低濃度ながらも多くの妊産婦が農薬の暴露を受けていることが示唆された。

##### 2. 人工授精卵培養器材由来のビスフェノール A 及びノニルフェノールの分析

臨床で使用される同じ培養時間では、培養液（水）に溶出した BPA 及び NP は検出下限値以下であり、材質試験においても BPA 及び NP は検出下限値以下であった。このことから授精卵培養時の培養プレートからの暴露の可能性は少ないものと考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究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評価に関する研究 平成 19 年度総括・分担研究報告書 主任研究者 牧野恒久」(2008) p25-29.
- 2) J. Ueyama et al. Simultaneous determination of urinary dialkylphosphate metabolites of organophorus pesticides using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 832 (2006) 58-66.
- 3) S. Dulaurent et al. Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 831 (2006) 223-229.

4) 城石和子他, 水田農薬散布作業者の農薬暴露と生体影響の検討, 富山県衛生研究所報,13 (1990) 177-182.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

石井里枝, 堀江正一, 中澤裕之, 杉野法広, 牧野恒久「生体試料中のピレスロイド系及び有機リン系農薬の分析及び胎児期の暴露評価」第 130 回年会 日本薬学会 (2010) 岡山.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 尿及び血清中の有機リン系農薬代謝物の測定条件

分析カラム:	Agilent社製DB-1701またはDB-5MS(0.25mm i.d. × 30m, 膜厚0.25 μ m)
オープン温度:	60°C(5)-25°C/min-150°C(0min)-3°C/min-190-(0min)-25°C/min-300°C(10min)
キャリアーガス:	ヘリウム
カラム流量:	1.5mL/min
検出器温度:	270°C
注入量:	25 μ L
注入口:	アイステイサイエンス社製LAVI-S200
注入口温度:	70°C(0.8min)-120°C/min-240°C(0min)-50°C/min-280°C

表2. 尿及び血清中のピレスロイド系農薬代謝物及びクロロピリホス代謝物の測定条件

LC条件

分析カラム:	Waters社製symmetry C18(2.1mm i.d. × 50mm, 粒子径 3 μ m)
移動相:	水:アセトニトリル:2%酢酸(60:35:5), アイソクラティックモード
流速:	0.2mL/min
注入量:	5 μ L

MS/MS条件

イオン化条件: ESI, ネガティブ

		コーン電圧(V) コリジョンエネルギー(eV)	
モニターイオン:	3-PBA	213>93	25 20
		213>169	25 15
	TCP	196>196	20 10
		198>198	20 10
		213>93	25 20

表3. 尿及び血清中のBPAの測定条件

LC条件

分析カラム:	Waters社製symmetry C18(2.1mm i.d. × 100mm, 粒子径 3 μ m)
移動相:	水:アセトニトリル:0.05%酢酸(55:35:10), アイソクラティックモード
流速:	0.2mL/min
注入量:	5 μ L

MS/MS条件

イオン化条件: ESI, ネガティブ

		コーン電圧(V) コリジョンエネルギー(eV)	
モニターイオン:	BPA	227>212	40 20
		217>133	40 20
	BPA-d16	241>223	40 20
		241>142	40 20



表4. 培養器材のBPA及びNPの測定条件

LC条件

分析カラム:	Waters社製symmetry C18(2.1 mm i.d.×100mm, 粒子径 3 $\mu$ m)
移動相:	A:水, B:メタノール, C:10mM酢酸アンモニウム, グラジエントモード 0-5min (A:B:C=35:60:5)→5.5-12 min (5:90:5)
流速:	0.2mL/min
注入量:	5 $\mu$ L

MS/MS条件

イオン化条件:	ESI, ネガティブ			
			コロン電圧(V)	コリジョンエネルギー(eV)
モニターイオン:	BPA	227>212	40	20
		217>133	40	20
	4-NP	219>133	45	30
	4-n-NP	219>106	47	20
	BPA-d16	241>223	40	20
	4-NP-d5	224>123	46	30
	4-n-NP-d4	223>110	50	20

表5. 母体尿, 母体血清, 臍帯血中の農薬代謝物の濃度

No.	ID	DMP(ng/mL)		DEP(ng/mL)		DMTP(ng/mL)		DETP(ng/mL)		TCP(ng/mL)		3-PBA(ng/mL)				
		母体尿	臍帯血	母体尿	臍帯血	母体尿	臍帯血	母体尿	臍帯血	母体尿	臍帯血	母体尿	臍帯血			
1	2412089	ND	8.4	4.5	ND	0.3	ND	11.4	ND	0.5	5.4	2.1	ND	ND	ND	ND
2	1886980	ND	18.0	0.9	18.4	0.3	ND	92.3	ND	0.5	6.0	1.9	ND	ND	ND	ND
3	2363506	ND	8.4	1.6	7.0	0.3	0.3	31.6	11.4	0.4	0.7	5.4	1.3	ND	ND	ND
4	1111610	10.0	9.3	1.1	5.7	0.3	ND	9.1	15.2	ND	6.5	1.2	ND	ND	ND	ND
5	80008	10.8	8.2	14.0	2.5	0.5	ND	6.7	20.7	ND	3.2	1.7	ND	ND	ND	ND
6	2544544	22.8	9.3	2.5	6.4	0.3	0.4	10.1	14.4	ND	1.4	6.0	ND	ND	ND	ND
7	2545473	24.6	12.5	ND	25.9	0.2	0.3	64.8	20.2	ND	5.0	1.0	ND	ND	1.3	0.3
8	2472960	3.7	12.8	5.2	0.9	0.2	0.1	1.5	19.3	ND	5.9	1.7	ND	ND	ND	ND
9	1664014	15.8	4.8	ND	3.2	ND	ND	3.8	10.6	ND	9.0	1.8	ND	ND	ND	ND
10	2448275	33.0	ND	3.8	2.7	ND	ND	11.8	ND	ND	11.3	4.5	ND	ND	ND	ND
11	2269985	ND	7.8	8.0	8.9	ND	ND	15.2	ND	ND	12.5	4.9	ND	ND	ND	ND
12	2556353	41.2	ND	ND	5.0	ND	ND	3.1	ND	ND	14.5	4.5	0.6	ND	ND	ND
13	2566850	ND	2.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.5	4.5	ND	ND	0.6	ND
14	2568705	44.4	0.0	1.3	18.8	ND	ND	25.4	ND	ND	1.3	8.3	6.8	ND	ND	ND
15	2166783	51.6	1.9	4.6	4.8	ND	ND	14.1	ND	ND	2.4	8.1	1.2	ND	ND	ND
16	1235979	31.8	ND	ND	1.4	ND	ND	2.2	ND	1.9	5.8	2.5	ND	ND	ND	ND
17	2424282	33.3	ND	ND	3.1	0.2	ND	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	36482	ND	9.3	ND	2.0	ND	ND	ND	ND	ND	10.2	ND	ND	ND	ND	ND
19	962159	24.6	ND	ND	4.2	ND	ND	1.6	ND	0.7	9.9	ND	ND	ND	ND	ND
20	372466	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.3	ND	1.3	0.9	ND	ND
21	902795	57.1	7.8	ND	12.6	ND	ND	5.9	ND	ND	6.1	ND	ND	ND	ND	ND
22	613483	23.8	ND	ND	5.2	ND	ND	2.1	ND	ND	13.1	ND	ND	ND	ND	ND

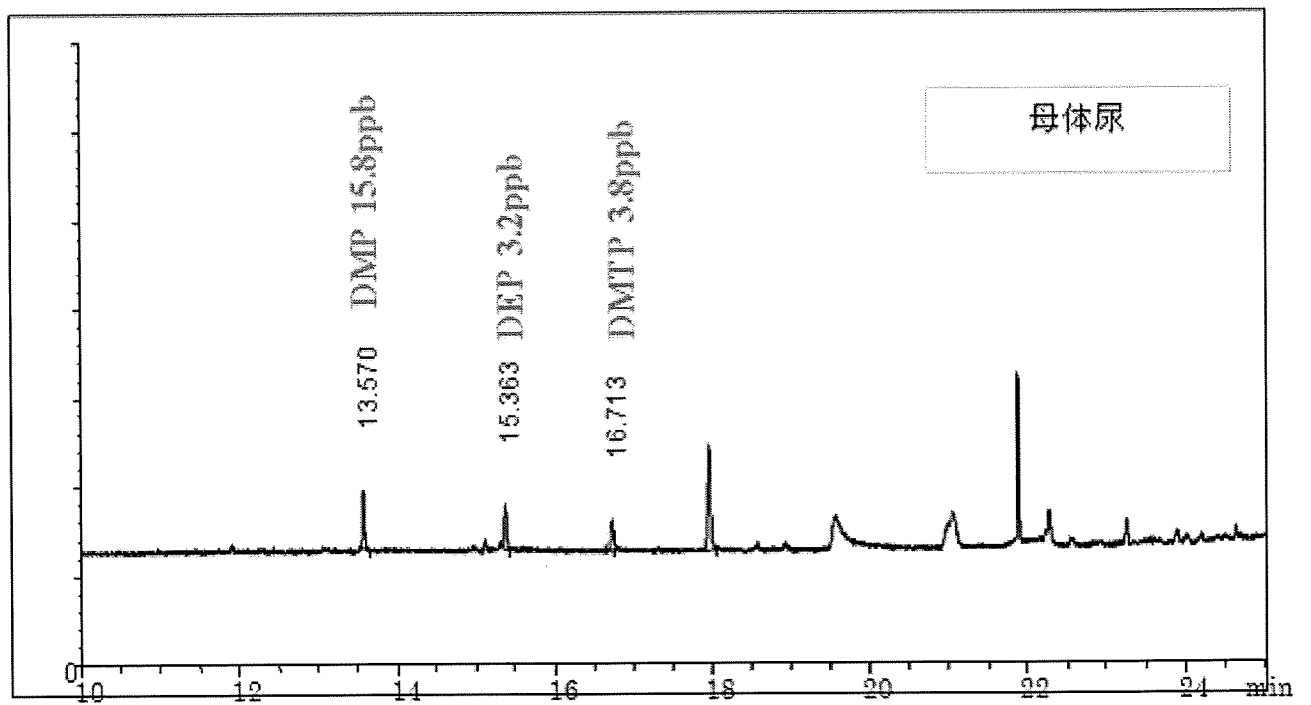
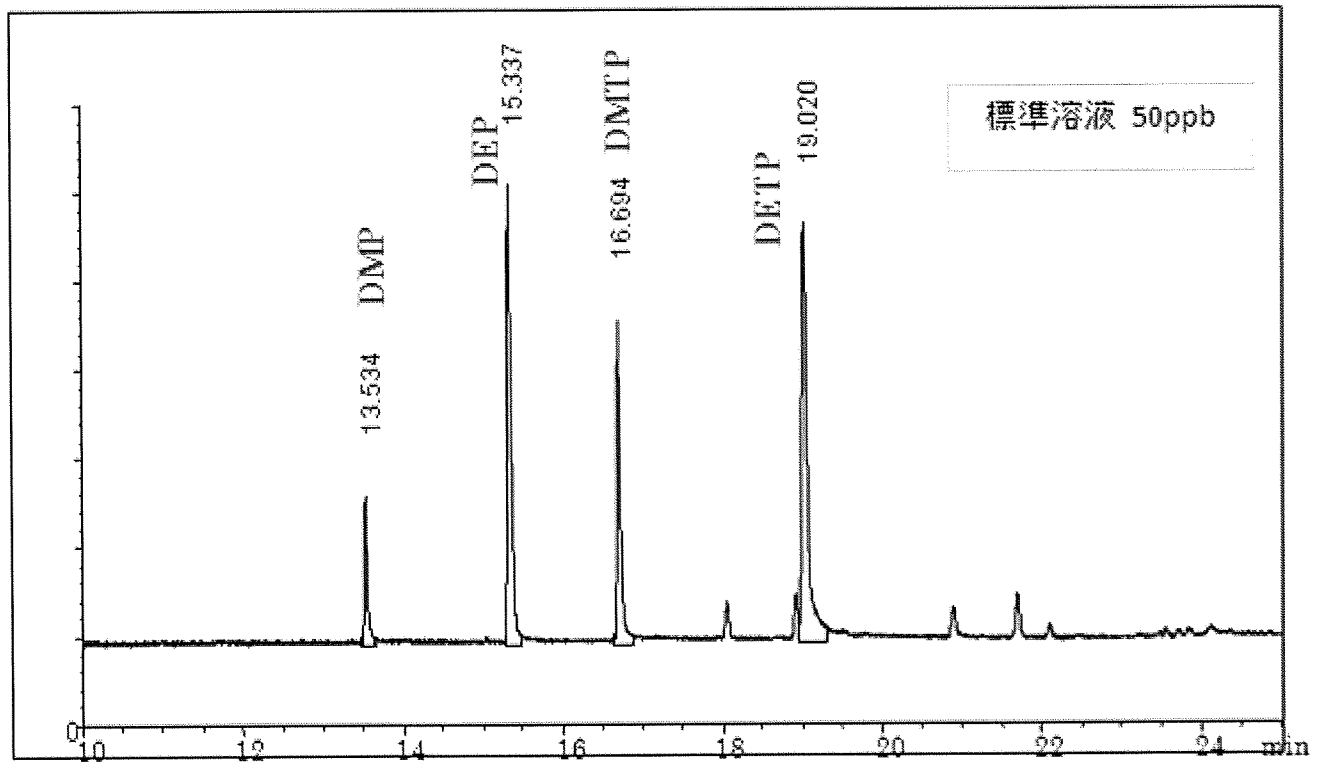
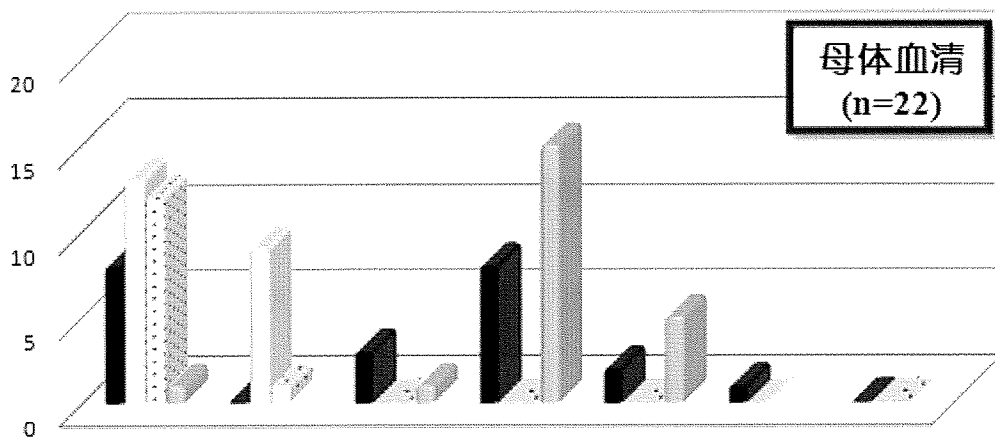
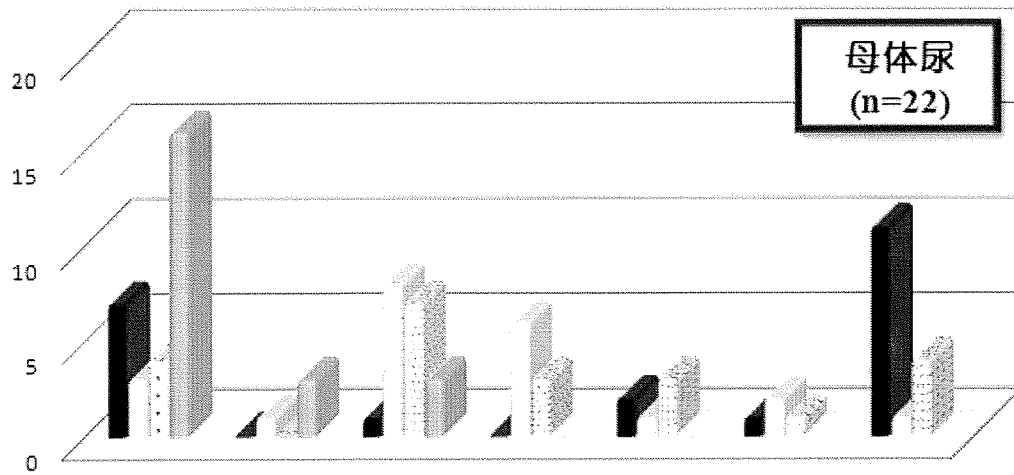


図1. 有機リン系農薬代謝物のクロマトグラム



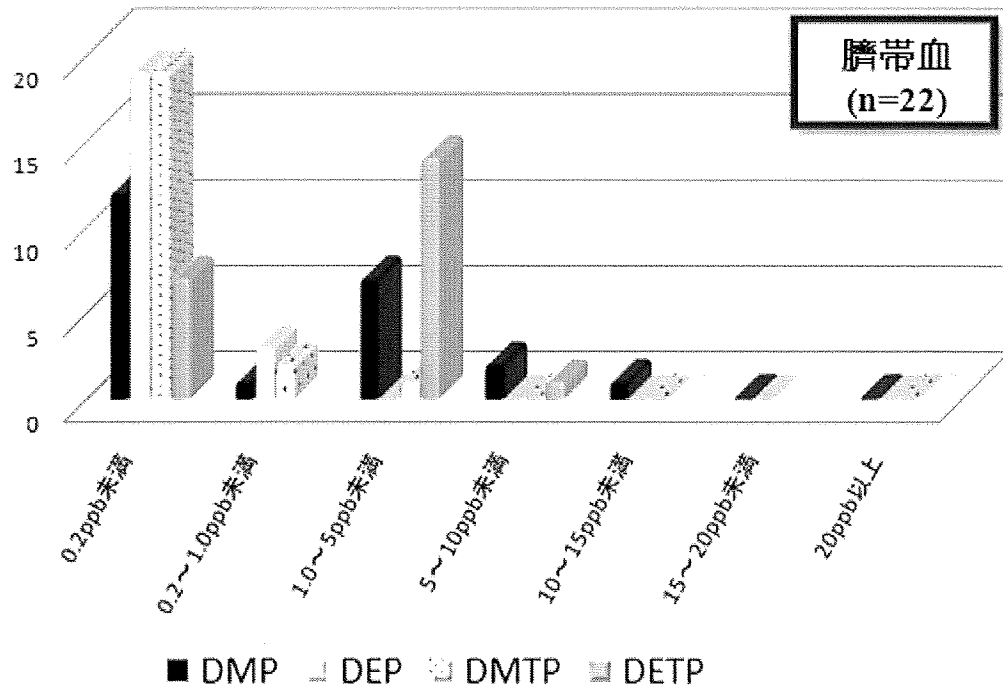


図2. 尿, 血清中の有機リン系農薬代謝物の濃度

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

生体試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析

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

#### 研究要旨

ポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）等の人体暴露評価を目的として、大阪府下で採取された血清・ハウスダスト試料および山口大学医学部附属病院で採取された母乳試料を分析した。

大阪府内で採取したハウスダスト（ $n = 9$ ）を分析した結果、いずれの試料からも PBDEs および S-421 が検出され、PBDEs および S-421 による普遍的な屋内汚染が示唆された。ハウスダスト中の PBDEs 濃度（10 異性体の総計，ND = 0 で換算）は平均 690 ng/g（範囲：300～1300 ng/g）であり、S-421 の濃度は平均 170 ng/g（範囲：13～510 ng/g）であった。また、居住者の血清試料中（ $n = 9$ ）の PBDEs 濃度は平均で 11 pg/g（範囲：4～18 pg/g）であり、S-421 の濃度は平均で 24 pg/g（範囲：<5～64 pg/g）であった。今回、血清試料から検出された PBDEs 異性体について、ハウスダスト中濃度との有意な相関関係は認められなかったが、S-421 については、血清中濃度とハウスダスト中濃度との間に有意な相関関係（ $r = 0.71$ ,  $p < 0.04$ ）が認められた。

山口大学医学部附属病院で採取された母乳（ $n = 20$ ）試料の全てから PBDEs が検出され、PBDEs による普遍的な母乳汚染が示唆された。母乳中の PBDEs 濃度（10 異性体の総計）は平均で 52 pg/g（範囲：16～130 pg/g）であった。

#### 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 PCB や DDT 類似の環境挙動を示す残留性有機汚染物質（POPs）として近年問題視されている。また、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の障害作用が示唆されており、ヒトの健康に対する悪影響が懸念されている。米国では 1990 年代のペンタ BDE の

使用量が他国より多く、血清や母乳中のペンタ 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。

八塩化ジプロピルエーテル（S-421）は、シ

ロアリおよびハエ、カ、ゴキブリ等の衛生害虫の駆除剤（殺虫剤）の殺虫効果を増強するための共力剤として使用されている化学物質であるが、問題点として、難分解性で生物蓄積性を有することが指摘されている。S-421は、食品業（食品工場・飲食店）や畜産業、建築業等で使用される業務用殺虫剤のみならず、一般家庭用の蚊取り線香や殺虫スプレー、掃除機の紙パック等にも含有されていることから、屋内環境汚染による慢性的暴露・高濃度暴露が懸念されるが、ヒトの暴露実態に関する報告は数少ない。

そこで本研究では、これら化学物質の暴露実態の把握を目的として、一般家庭のハウスダストおよび居住者の血液試料の分析を行った。また、乳児期の化学物質暴露を考慮する上で重要な母乳試料の分析を行った。

## B. 研究方法

### B. 1. 試料

#### B. 1. 1. ハウスダスト試料

2008年1月に大阪府内の一般家庭からハウスダスト試料9検体を採取した。ハウスダストは、ハンディクリーナー（日立製 PV-H22, 紙パックGP-S35F）を用いて採取し、最終100  $\mu$ mメッシュで篩い分けしたもの（各0.1 g）を分析に供した。上記試料と併せてPBDEs濃度認証済の米国立標準技術研究所（NIST）のハウスダスト標準参照試料（SRM 2585）を分析した。

#### B. 1. 2. 血清試料

ハウスダストを採取した上記家庭の居住者（インフォームドコンセントを得た20～30歳の男女）から2008年1月に血液試料9検体を

採取した。血液はテルモ製ベノジェットIIシリーズの真空採血管に採取し、その遠心処理（3000 rpm, 10分間）後の上清各6 gを分析に供した。また、分析法の評価を目的として、上記試料と併せてPBDEs濃度認証済のヒト血清標準参照試料（SRM 1589a）を分析した。

#### B. 1. 3. 母乳試料

2009年1月～4月に山口大学医学部附属病院で採取された20検体の母乳試料（各2 g）を分析に供した。また、分析法の評価を目的として、上記試料と併せてPBDEs濃度認証済の母乳標準参照試料（SRM 1954）を分析した。

## B. 2. 試薬

PBDEsの標準溶液は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（ $^{13}\text{C}$ ）標識化PBDEs混合溶液（MBDE-MXEおよびMBDE-126またはMBDE-139）を用いた。

S-421標準品はRiedel-de Haën製を用いた.

### B. 3. 試料の前処理操作

#### B. 3. 1. ハウスダスト試料

秤取した試料0.1 gにクリーンアップスパイクを添加した後, 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処理およびゲル浸透クロマトグラフィーにより精製し, シリンジスパイクを加えて最終250  $\mu$ Lのノナン溶液としてGC/MS測定に供した.

#### B. 3. 2. 血清試料

秤取した試料6 gにクリーンアップスパイクおよび抽出助剤 (飽和硫酸アンモニウム溶液, エタノール) を添加した後, 脂溶性成分をヘキサンで抽出し, 硫酸シリカゲルカラム処理およびアセトニトリル/ヘキサン分配処理により精製し, シリンジスパイクを加えて最終10  $\mu$ Lのノナン溶液としてGC/MS測定に供した.

#### B. 3. 3. 母乳試料

秤取した試料2 gにクリーンアップスパイクおよび抽出助剤 (シュウ酸カリウム溶液, エタノール) を添加した後, 脂溶性成分をジエチルエーテル/ヘキサン混合溶媒により抽出し, 硫酸シリカゲルカラム処理およびアセトニトリル/ヘキサン分配処理により精製し, シリンジスパイクを加えて最終20  $\mu$ Lのノナン溶液として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  $\mu$ L

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  $\times$  0.25 mm ID, 膜厚 0.1  $\mu$ m)

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または310°C

イオン化電流 : 300  $\mu$ A

イオン化エネルギー : 35 eV

加速電圧 : 2,500 V

分解能 : 1,000

イオン化モード : EI

検出法 : SIM

### C. 研究結果・考察

各分析法について添加回収試験を実施したところ, 測定対象とした10種類のPBDEsおよびS-421の平均回収率は80~120%の範囲内であり良好な結果であった. また, ハウスダスト, ヒト血清, ヒト母乳のNIST標準参照試料 (SRM 2585, SRM 1589a, SRM 1954) のPBDEs定量値は認証濃度 (Certified concentration) または参照濃度 (Reference concentration) と全体的に良好な一致を示し, 構築した分析法が十分な分離能および定量性を有することが示された (図1, 図2). 例外として, SRM 1589a (ヒト血清の標準参照試料) におけるBDE-154の実測濃度が参照濃度の約1/10の値となり, 両者の間に著しい差異が認められた (図2中段). SRM 1589a付属のデータシートによれば,



BDE-154の参照濃度は負化学イオン化を用いたGC/NCI-MS法による1手法のみの定量結果に基づいた値である。モニターイオンに関する情報は不明であるが、GC/NCI-MS法によるPBDEsの簡易定量では一般的に臭素イオン ( $m/z = 79, 81$ ) をモニターイオンに用いることが多く、その場合、BDE-154のピークとGC保持時間がほぼ等しい2, 2', 4, 4', 5, 5'-六臭素化ビフェニル (BB-153) のピークをBDE-154と誤認して (ピーク面積を上乗せして) 定量してしまう可能性がある<sup>1)</sup>。また、これまで報告されている米国内および各国のヒト生体試料中のBDE-154/BDE-153の一般的な濃度比 (BDE-154/BDE-153 < 1)<sup>3)</sup> から判断しても、SRM 1589aにおけるBDE-154のNIST参照濃度は、無視できないプラスの誤差を含んでいる疑いが強く、複数の分析機関による今後の濃度検証が必要と考えられた。なお、SRM 1589aは、米国内の血液バンクからNISTに供与された39パックの血漿 (1996年に採取) を原料とした“未添加”のプール試料であるのに対して、SRM 1954は、米国内の母乳バンクから供与された母乳を原料として、既知濃度の169種類の化学物質 (うちPBDEsは17種類) の混合溶液を人為的に“添加”して調製された試料であることを参考情報として追記する<sup>2)</sup>。

大阪府内で採取したハウスダストを分析した結果、いずれの検体からもPBDEsおよびS-421が検出された。ハウスダスト中のPBDEs濃度 (10異性体の総計, ND = 0で換算) は平均690 ng/g (範囲: 300~1300 ng/g) であり、S-421の濃度は平均170 ng/g (範囲: 13~510 ng/g) であった (表1)。また、居住者の血清試料中 (n = 9) のPBDEs濃度は平均で11 pg/

g (範囲: 4~18 pg/g) であり、S-421の濃度は平均で24 pg/g (範囲: <5~64 pg/g) であった (表2)。今回、血清試料から検出されたPBDEs異性体について、ハウスダスト中濃度との有意な相関関係は認められなかったが、S-421については、血清中濃度とハウスダスト中濃度との間に有意な相関関係 ( $r = 0.71, p < 0.04$ ) が認められた (図3)。

山口大学医学部附属病院で採取された母乳 (n = 20) 試料の全てからPBDEsが検出され、PBDEsによる普遍的な母乳汚染が示唆された。母乳中のPBDEs濃度 (10異性体の総計) は平均で52 pg/g (範囲: 16~130 pg/g) であった (表3)。母乳脂肪あたり濃度で換算すると、平均で2.1 ng/g lipid (範囲: 0.7~3.6 ng/g lipid) であり、国内の幾つかの報告例と比較して、概ね同程度の汚染レベルであった。

#### D. 結論

大阪府下で採取されたハウスダストを分析した結果、いずれの検体からもPBDEsおよびS-421が検出され、PBDEs (10臭素化物主体) およびS-421による普遍的な屋内汚染が示唆された。また、S-421について、ハウスダスト中濃度と居住者の血清中濃度との間に有意な相関関係が認められ、ハウスダストの非意図的な取込がS-421の主要な暴露経路の一つである可能性が示唆された。

山口大学医学部附属病院で採取された母乳試料の全てからPBDEsが検出され、PBDEsによる普遍的な母乳汚染が示唆された。今後、母乳試料の分析例数を追加することにより、さらに詳細な暴露実態の把握に努める予定である。

E. 参考文献

- 1) Sjödin, A., *et al.*, Brominated flame retardants in serum from U.S. blood donors. *Environ. Sci. Technol.*, **35**(19), 3830-3833 (2001).
- 2) Schantz, M.M., *et al.*, Certification of SRM 1589a PCBs, pesticides, PBDEs, and dioxins/furans in human serum. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**(4), 1201-1208 (2007).
- 3) Hites, R.A., *et al.*, Polbrominated diphenyl ethers in the environment and in people: a meta-analysis of concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, **38**(4), 945-956 (2004).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

表1 ハウスダスト中のPBDEsおよびS-421の濃度 (ng/g)

化合物	検出範囲	平均値
BDE-28	<1 ~ 3	<1
BDE-47	1 ~ 9	4
BDE-100	<1 ~ <1	<1
BDE-99	1 ~ 8	3
BDE-154	<1 ~ 2	<1
BDE-153	<1 ~ 11	3
BDE-183	1 ~ 33	6
BDE-197	<2 ~ 16	5
BDE-207	22 ~ 81	47
BDE-209	260 ~ 1200	620
Σ10PBDEs	300 ~ 1300	690
S-421	13 ~ 510	170

表2 血清中のPBDEsおよびS-421の濃度 (pg/g)

化合物	検出範囲	平均値
BDE-28	<1 ~ <1	<1
BDE-47	2 ~ 5	3
BDE-100	<1 ~ 4	<1
BDE-99	<1 ~ <1	<1
BDE-154	<1 ~ 1	<1
BDE-153	3 ~ 10	6
BDE-183	<2 ~ <2	<2
BDE-197	<2 ~ 5	1
BDE-207	<5 ~ <5	<5
BDE-209	<20 ~ <20	<20
Σ10PBDEs	4 ~ 18	11
S-421	<5 ~ 64	24

表3 母乳中のPBDEs濃度 (pg/g)

化合物	検出範囲	平均値
BDE-28	<2 ~ 5	2
BDE-47	5 ~ 32	12
BDE-100	<2 ~ 6	3
BDE-99	<2 ~ 4	<2
BDE-154	<2 ~ 2	<2
BDE-153	8 ~ 24	14
BDE-183	<5 ~ 6	<5
BDE-197	<5 ~ 12	5
BDE-207	<5 ~ 21	7
BDE-209	<40 ~ 70	<40
Σ10PBDEs	16 ~ 130	52

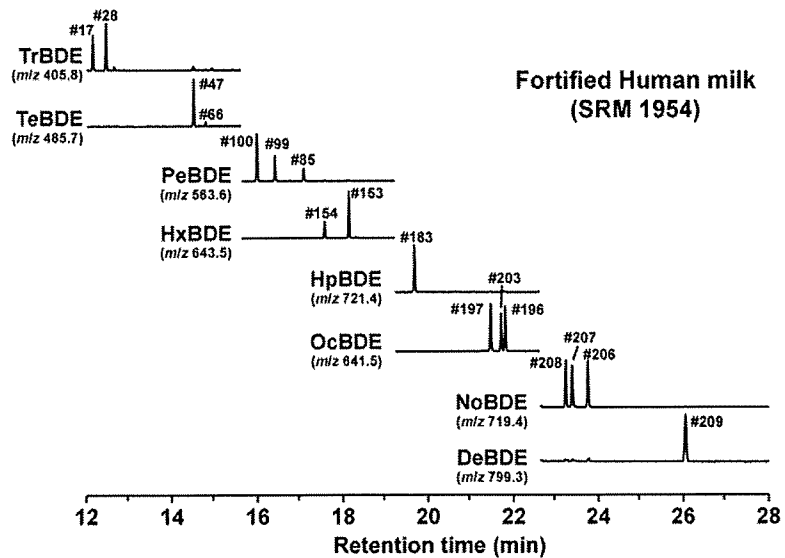
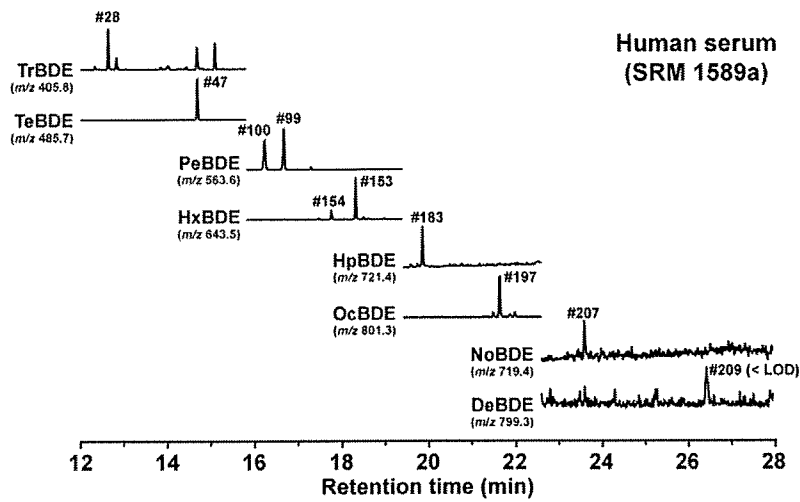
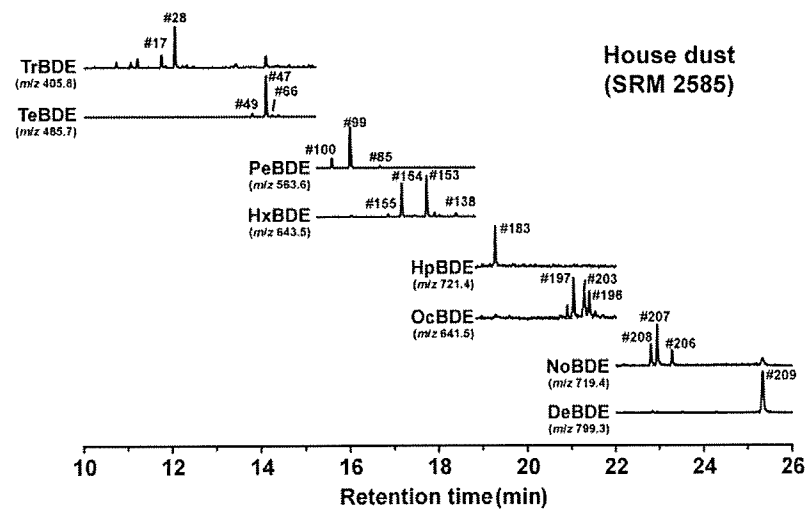


図1 標準参照試料のクロマトグラム

上段：SRM2585（ハウスダスト），中段：SRM1589a（血清），下段：SRM1954（母乳）