

■ NIST certified conc. (or reference conc. (indicated as "R"))
 □ Measured value (mean of duplicate or triplicate determinations)

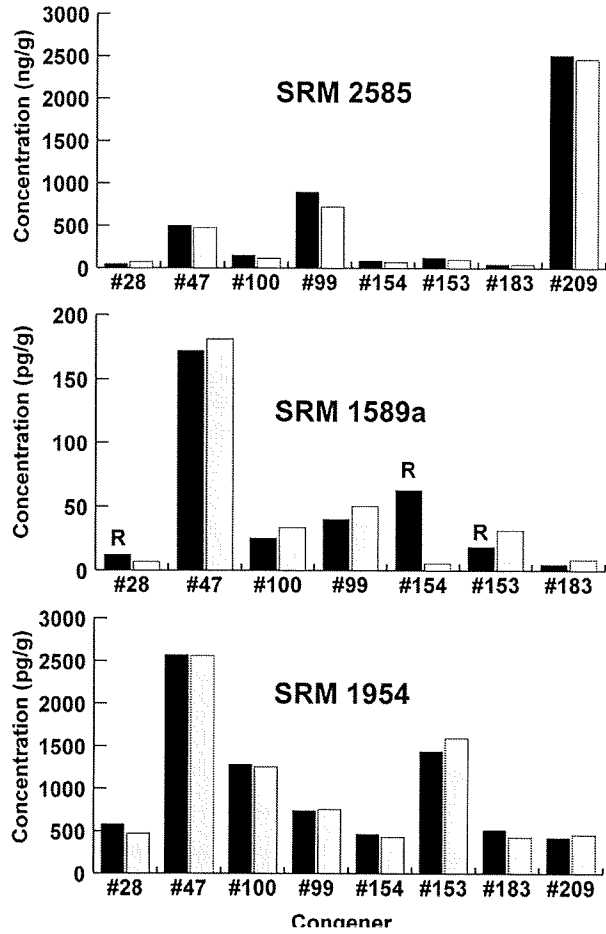


図2 標準参照試料のPBDEs 認証濃度（または参照濃度（R））と実測濃度の比較
 上段：SRM 2585（ハウスダスト），中段：SRM 1589a（血清），下段：SRM 1954（母乳）

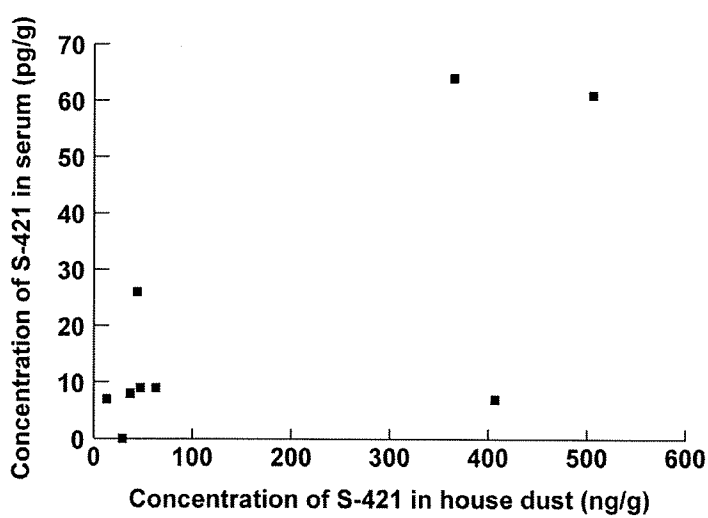


図3 ハウスダスト中の S-421 濃度と居住者の血清中 S-421 濃度の関係 (n = 9)

－ 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
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
	中澤裕之	星薬科大学
	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〔母体血清（n=48）、臍帯血清（n=50）、羊水（n=28）及び胎脂（n=12）〕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。羊水中の DEHP の濃度は、臍帯血清と比較して有意に高いことが示された。一方、羊水中の MEHP の濃度は、母体血清及び臍帯血清と比較して有意に高いことが示された。これらの結果より、羊水中には、DEHP 及び MEHP が貯留されている可能性が示唆された。更に一部の胎脂からは高濃度の DEHP が検出されたが、必ずしも胎脂と接する羊水中の DEHP 濃度は高くなく、子宮内に滞留する DEHP は、羊水あるいは胎脂の一方に偏向して貯留していると推察された。また、体外受精における胚培養に使用される 4 ウェルプレートからは、特筆すべき DEHP 及び MEHP の溶出は、認められなかった。

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、昨年度に引き続き周産期試料（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。更に体外受精における胚培養条件下における当該化学物質の暴

露状況を明らかにする。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（以下、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℃）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

(2-1) 生体試料

山口大学医学部産婦人科で採取された母体血清、臍帯血清、羊水及び胎脂を分析した。これら試料は、冷凍下で移送され、分析時まで-80℃で保存した。

(2-2) 体外受精用製品

体外受精において胚培養に使用される 4 ウェルプレートは、山口大学医学部産婦人科から提供された（製品 A 及び B）。また、培地は、市販品を購入した（製品 X 及び Y）。

(3) 実験

(3-1) 血清及び羊水中の DEHP 及び MEHP の分析

昨年度の報告書に従って分析法した⁽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。アセトン相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。アセトン相を回収し、先のアセトン相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。ヘキサン相を別の清浄なガラス製試験管に回収した。水相にヘキサン 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。先のヘキサン相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。LC-MS/MS の条件は、表 1 に記した。

(3-2) 胎脂中の DEHP 及び MEHP

昨年度の報告書に従って分析法した⁽¹⁾。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、精秤した。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 分間行なった。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。アセトニトリル相を別の清浄なガラス製試験管に回収した。ヘキサン相にアセトニトリル 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相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 LC-MS/MS 試験液とした。

(3-3) 培養用プレートからの DEHP 及び MEHP の溶出

体外授精卵の胚培養に使用される 4 ウェルプレートからの DEHP 及び MEHP の溶出を明らかにするため、当該プレートの各ウェルにヘキサン洗浄水 0.8 mL を満たし、蒸発防止のための専用のカルチャーオイル (クック社製) 0.3 mL を重層した。胚培養時のインキュベーター条件に準じて、ヘキサン洗浄水を満たしたプレートを CO₂ インキュベーター (ESPEC; BNR-110; 37°C、湿度飽和、窒素 90%、二酸化炭素 5%、酸素 5%) 内でインキュベートした。インキュベート後、ヘキサン洗浄水を回収し、等量のアセトニトリルと混和して LC-MS/MS 用試験液とした。

(4) 統計解析 (血清及び羊水)

統計解析には、PASW (Ver. 18) を使用した。定量下限未満の試料は、定量下限の 1/2 (DEHP, 5.0 ng/mL; MEHP, 1.0 ng/mL) を

仮定の定量値として解析を行った。

(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した。

C. 及び D. 結果及び考察

(1) 血清及び羊水中の DEHP 及び MEHP

図 1 及び 2 に母体血清 (n=48)、臍帯血清 (n=50) 及び羊水 (n=28) 中の DEHP 及び MEHP の測定結果 (実測値) をボックスプロットに示した (昨年度のデータを含む)。また、中央値及び検出範囲を表 2 に示した。DEHP (定量下限: 10 ng/mL) について、定量下限を超える症例の割合 (検出率) は、以下の通りであった; 母体血清 (47.9%); 臍帯血清 (24.0%); 羊水 (60.7%)。また、MEHP (定量下限: 2.0 ng/mL) について、検出率は、以下の通りであった; 母体血清 (25.0%); 臍帯血清 (10.0%); 羊水 (71.4%)。

これら昨年度のデータを含めた結果は、羊水中には、血清中よりも高濃度に DEHP 及び MEHP が存在する可能性を示唆している。そこで各試料 (母体血清、臍帯血清及び羊水) 間での当該物質の濃度差について有意差検定を行った。帰無仮説は、「比較する 2 群間に差がない」とし、全症例を対象とした場合は、Mann-Whitney の U 検定を適用した。更にひとつの出産症例から採取した母体血清、臍帯血清及び羊水の試料が揃っている症例 (n=26) については、Wilcoxon の符号付き順位検定を適用した。

【DEHP】

(ア) Mann-Whitney の U 検定

「母体血清と臍帯血清」及び「臍帯血清と羊水」の間に有意差が認められた(表 3)。

(イ) Wilcoxon の符号付き順位検定

「臍帯血清と羊水」のみに有意差が認められ、「母体血清と臍帯血清」の間に有意差は認められなかった(表 4)。

(ア) と (イ) で有意差が認められた「臍帯血清と羊水」との間では、DEHP の濃度に、より明確な有意差があると考えられる。

一方、母体血清においては、DEHP 濃度の高い症例がいくつか認められていることにより、(ア) の対応のある症例に限定しない場合にのみ「母体血清と臍帯血清」との間に有意差が認められた。しかし、羊水との濃度差については、症例の限定によらず、有意差が認められなかった。外界と常に接触している母体の血清中の DEHP 濃度は、臍帯血清及び羊水と比較して、一過性の暴露に伴う濃度変化が反映されやすいと考えられる。このいくつかの DEHP 濃度が高い症例に関して、DEHP の暴露原因について、アンケートあるいはカルテ等で調べる必要があると考えられる。医療行為等により、一過性に DEHP の血清中濃度が高くなったと考えられる症例を合理的に識別することができれば、母体血清と臍帯血清あるいは羊水分間の有意差がより明確に解析できると思われる。

【MEHP】

(ア) Mann-Whitney の U 検定

「母体血清と臍帯血清」、「臍帯血清と羊水」及び「母体血清と羊水」の間に有意差が認められた(表 5)。

(イ) Wilcoxon の符号付き順位検定

「臍帯血清と羊水」及び「母体血清と羊水」の間に有意差が認められた。「母体血清と臍帯血清」の間に有意差は認められなかった(表 6)。

(ア) と (イ) で有意差が認められた「臍帯血清と羊水」及び「母体血清と羊水」の間では、MEHP の濃度に、より明確な有意差があると考えられる。

これらの解析結果より、羊水中には母体血清あるいは臍帯血清中と比較して高い濃度の DEHP 及び MEHP が貯留していると考えられる。

(2) 胎脂水中の DEHP 及び MEHP

昨年度に引き続き、胎脂の分析を行った。その結果、いくつかの症例において、高度に DEHP を含む胎脂が認められた(表 7)。一方、MEHP については、全ての症例において定量下限未満であった(定量下限; DEHP, 440 ng/g; MEHP, 80 ng/g)。表 7 には、対応する羊水の分析が可能であった症例については、その結果を併記している。DEHP 濃度について胎脂と羊水中を比較した結果、症例 E、F、I 及び K のように、胎脂あるいは羊水のどちらか一方が高くなる症例、あ

るいは症例 A のように胎脂及び羊水共に低い症例は認められるが、胎脂及び羊水共に高い症例は認められていない。このことから、子宮内に存在する DEHP は、胎脂に保持されて存在するか、あるいは羊水中に溶解あるいは懸濁された状態で貯留している可能性が推察される。

胎脂は、およそ妊娠 6 ヶ月目以降の胎児の体表に形成されるクリーム状の物質である。胎脂は、脂質と体表から剥離した表皮あるいは体毛を含み、羊水からの保護が主な役割と考えられている。脂質に富むため DEHP が保持され、DEHP と比較して水溶性の高い MEHP が胎脂中から検出されないことは、合理的に解釈される。肺サーファクタントは、肺胞腔に分泌され、肺胞全体を覆うリン脂質とタンパク質からなる複合体であり、肺胞の虚脱を防いで呼吸を円滑に進行させる役割を有する⁽²⁾。胎児期において羊水中の肺サーファクタント濃度が上昇することによって胎脂は溶解し、胎児の体表上から減少することが知られている⁽³⁾。すなわち、胎脂は羊水の組成の変化によって存在量の変動することが考えられる。よって、DEHP が胎脂あるいは羊水の一方に高く検出される傾向は、このことに由来する可能性がある。羊水中の DEHP 及び MEHP の間には、正の相関が認められており (Speaman の順位相関係数, 0.605 ; $p < 0.01$)、羊水中に存在する DEHP が胎児あるいは羊水中で加水分解されて MEHP に変換されている可能性も併せて示唆される。

(3) 培養用プレートからの DEHP 及び MEHP の溶出

体外受精において胚は、CO₂ インキュベーター内で最長 5 日間の培養を経て母体に戻される。この培養には、4 ウェルプレートが使用される。この培養には胚の分割に応じて複数の培地が使用されるが、培地の変更ごとに 4 ウェルプレートは交換され、プレインキュベーションを含めて最長 60 時間、培地と接触する。この期間における 4 ウェルプレートからの DEHP 及び MEHP 溶出量を検討するため、培養条件下で培地に替えて、インキュベーション開始時に DEHP 及び MEHP 濃度をコントロールできるヘキサシ洗浄水を使用して溶出モデル実験を実施した。製品 A 及び B について調べた結果、共に特筆すべき DEHP 及び MEHP の溶出は認められなかった (表 8)。

次に体外受精における胚の育成の場となる培地中の DEHP 及び MEHP 量を検討するため、先行実験として、市販されている胚培養に使用される培地 (2 品目; 製品 X と Y) 中の DEHP 及び MEHP を測定した (n=3)。分析法は、血清及び羊水中の当該化学物質分析法を適用した (先行実験のため、添加回収試験は行っていない)。その結果、製品 X からは、定量下限を超える DEHP (10 ng/mL) 及び MEHP (2.0 ng/mL) は、検出されなかった。一方、製品 Y からは、DEHP (64.7 ng/mL; RSD, 5.1) 及び MEHP (146 ng/mL; RSD, 3.7) が検出された。当該化学物質であることを同定するためにプロダクトイオンスクリーニング法を適用してスペクトラムを採取した結果、標準品と一致した (図 3)。今後、体外受精

における胚培養において使用される培地中の当該化学物質の含有量を調べる必要性が強く示唆された。

参考文献

- (1) : 平成 20 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」総括・分担研究報告書 p. 29-41
- (2) : 黒木由夫ら、肺胞表面を覆うサーファクタントー特異蛋白質の構造, 機能, 病態一、蛋白質 核酸 酵素, 43, 834-846 (1998)
- (3) : Nishijima, K., *et al.*, *Pediatric Res.*, 60, 196-199 (2006)

E. 結論

- 1 : 羊水中には、母体血清あるいは臍帯血清中と比較して高い濃度の DEHP 及び MEHP が存在していると考えられた。
- 2 : 高濃度で DEHP を含む胎脂が認められた。
- 3 : 高濃度で DEHP を含む胎脂と接する羊水中の DEHP 濃度は、必ずしも高くなく、子宮内に貯留する DEHP は、胎脂あるいは羊水に偏在する可能性が示唆された。
- 4 : 胚培養に使用される 4 ウェルプレートから特筆すべき DEHP 及び MEHP の溶出は、認められなかった。
- 5 : 胚培養培養に使用される培地の一部には、DEHP 及び MEHP を含むものがある。

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、住江正大、杉野法広、中澤裕之、牧野恒久「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)及びフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)の分析」環境ホルモン学会第 12 回研究発表会；2009 年 12 月 7～8 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、前川亮先生及び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 Ion	Product Ion (Collision Energy, eV)
MEHP	-277	-134 (-22)
MEHP- ¹³ C ₄	-281	-138 (-22)
DEHP	+391	+149 (+27)
DEHP- ¹³ C ₄	+395	+153 (+27)

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

↓

ヘキサン相を回収

↓

抽出液を乾固 (窒素気流下)

↓ アセトニトリル 0.5 mL

LC-MS/MS 分析

スキーム 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

撈拌 (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

撈拌 (5 min) /遠心分離

↓

アセトニトリル相を乾固 (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

} 2回実施 (2回目は、ヘキサン添加せず)

表 2 母体血清・臍帯血清及び羊水中の DEHP 及び MEHP の中央値と範囲

	母体血清 (n=48)	臍帯血清 (n=50)	羊水 (n=28)
DEHP (ng/mL)	< 10 (< 10~460)	< 10 (< 10~37.4)	11 (< 10~190)
MEHP (ng/mL)	< 2.0 (< 2.0~9.9)	< 2.0 (< 2.0~3.9)	5.5 (< 2.0~28.2)

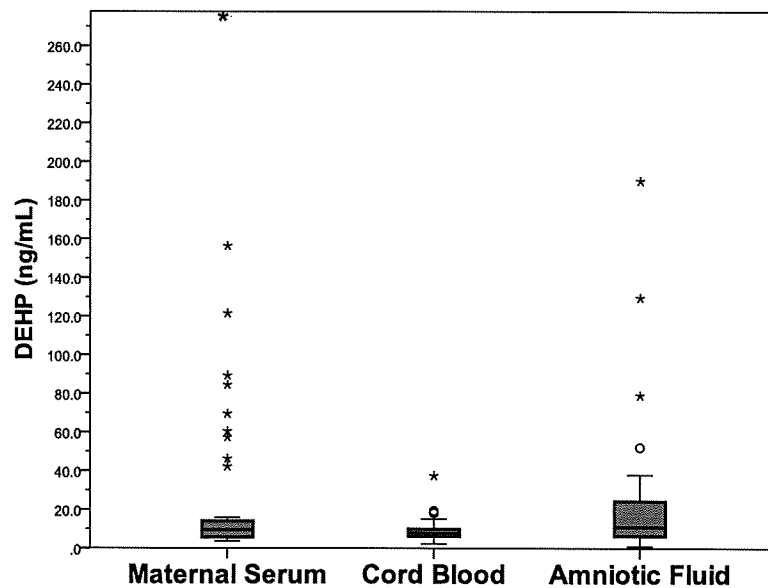


図 1. 母体血清・臍帯血清及び羊水中の DEHP の分析結果

(実測値をボックスプロットで表現した；図中の母体血清に認められる最高値は、460 ng/mL である)

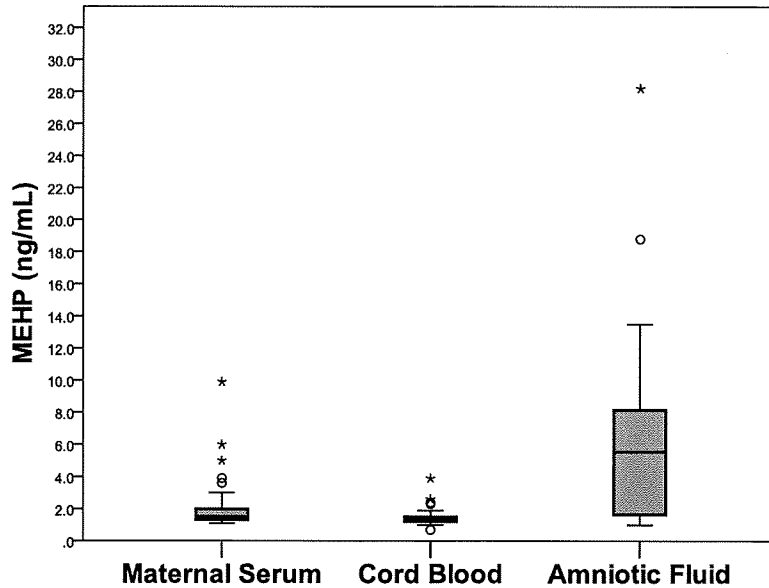


図 2. 母体血清・臍帯血清及び羊水中の MEHP の分析結果
(実測値をボックスプロットで表現した)

表 3. 母体血清・臍帯血清及び羊水中の DEHP の有意差検定結果 ($p < 0.05$)

	母体血清 (n=48)	臍帯血清 (n=50)	羊水 (n=28)
母体血清 (n=48)	—	あり#	なし
臍帯血清 (n=50)	あり#	—	あり#
羊水 (n=28)	なし	あり#	—

対応のないサンプル間の検定として、Mann-Whitney の U 検定を適用

: $p < 0.01$ においても有意差を認める

表 4. 母体血清・臍帯血清及び羊水中の DEHP の有意差検定結果 ($p < 0.05$)

	母体血清 (n=26)	臍帯血清 (n=26)	羊水 (n=26)
母体血清 (n=26)	—	なし	なし
臍帯血清 (n=26)	なし	—	あり
羊水 (n=26)	なし	あり	—

対応のあるサンプル間の検定として、Wilcoxon の符号付き順位検定を適用

表 5. 母体血清・臍帯血清及び羊水中の MEHP の有意差検定結果 ($p < 0.05$)

	母体血清 (n=48)	臍帯血清 (n=50)	羊水 (n=28)
母体血清 (n=48)	—	あり	あり [#]
臍帯血清 (n=50)	あり	—	あり [#]
羊水 (n=28)	あり [#]	あり [#]	—

対応のないサンプル間の検定として、Mann-Whitney の U 検定を適用

: $p < 0.01$ においても有意差を認める

表 6. 母体血清・臍帯血清及び羊水中の MEHP の有意差検定結果 ($p < 0.05$)

	母体血清 (n=26)	臍帯血清 (n=26)	羊水 (n=26)
母体血清 (n=26)	—	なし	あり [#]
臍帯血清 (n=26)	なし	—	あり [#]
羊水 (n=26)	あり [#]	あり [#]	—

対応のあるサンプル間の検定として、Wilcoxon の符号付き順位検定を適用

: $p < 0.01$ においても有意差を認める

表 7. 胎脂中の DEHP 及び MEHP の分析結果

症例	DEHP (MEHP)			
	胎脂 (ng/g)		羊水 (ng/mL)	
A	480	(< 80)	< 10	(< 2.0)
B	< 440	(< 80)	13.1	(5.6)
C	7,140	(< 80)	11.0	(5.5)
D	7,000	(< 80)	—	(—)
E	< 440	(< 80)	190	(28.2)
F	71,800	(< 80)	< 10	(2.4)
G	5,540	(< 80)	< 10	(3.7)
H	2,890	(< 80)	—	(—)
I	173,500	(< 80)	< 10	(10.0)
J	4,140	(< 80)	—	(—)
K	< 440	(< 80)	26.6	(10.2)
L	8,340	(< 80)	< 10	(< 2.0)
Blank	< 440	(< 80)	< 10	(< 2.0)

— : 測定データなし

表 8. 培養用プレートからの DEHP (MEHP) の溶出 (n=3)

インキュベーション時間 (h)	製品 A	製品 B
0	< 2.0 (< 1.0)	< 2.0 (< 1.0)
12	< 2.0 (< 1.0)	< 2.0 (< 1.0)
24	< 2.0 (< 1.0)	< 2.0 (< 1.0)
48	< 2.0 (< 1.0)	< 2.0 (< 1.0)
60	< 2.0 (< 1.0)	< 2.0 (< 1.0)

単位 : ng/mL

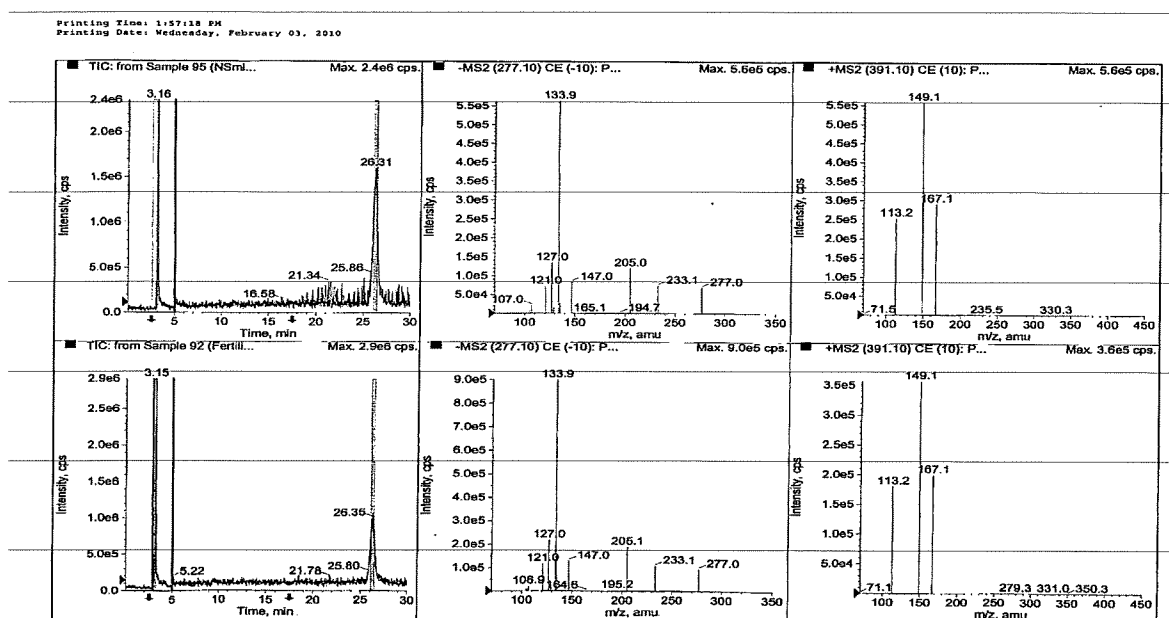


図 3. プロダクトイオンスキンの結果
 上段左より標準品のクロマトグラム、MEHP のスペクトラム、DEHP のスペクトラム ;
 下段左より製品 Y のクロマトグラム、MEHP 相当ピーク (保持時間 ; 3.15 分) のスペクトラム、DEHP 相当ピーク (保持時間 ; 26.3 分) のスペクトラム

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

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

主任研究者	牧野恒久	有隣厚生会東部病院
研究協力者	林 留美子	愛知県衛生研究所
	近藤文雄	愛知医科大学
	中澤裕之	星薬科大学

研究要旨

山口大学病院で採取された周産期試料（同一母体から血清と羊水の両者が得られたもの）25組について、誘導結合プラズマ質量分析（Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; ICP-MS）法を用いて19元素の濃度を測定した。母体血清と羊水中の元素濃度を比較したところ、以下の結果が得られた。

- 1) Fe、Zn、Al、Li、及びCdを除く15元素において、試料間で有意差が認められた。
- 2) Cu、Se及びHgの濃度比（羊水/血清）はそれぞれ0.05、0.1、0.1と、羊水中の濃度が血清中よりも1/10以上低い値であった。
- 3) Li、Mg、Sr、Mo及びHgにおいて、試料間で相関が認められた。

A. 研究目的

平成17年度から19年度に実施した「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」において、一般人での暴露量が多い重金属類、フタル酸エステル類、揮発性有機化合物の生体試料中の分析法を確立し、その分析法を用いて生殖年齢女性（東海大学医学部附属病院産婦人科受診患者）の血中及び尿中濃度の測定、及び子宮内膜症との因果関係の比較検証を行った。その結果、血清中の銅とセレンの濃度において、子宮内膜症有症群（n=36）が子宮内膜症を認めない対照群（n=48）より有意に低い（ $p<0.01$ ）値を示した¹⁾。

本研究は、有害元素を含む多元素に対する胎児の暴露状況を明らかにするとともに、新たな暴露評価手法を確立するこ

とを目的とする。研究初年度の昨年度は、マイクロ波分解法を用いた前処理法とICP-MS法を組み合わせた羊水中の多元素一斉分析法を確立した²⁾。研究2年目の本年度は、昨年度までに確立した血清及び羊水中の多元素一斉分析法を用い、山口大学病院で採取された周産期試料（同一母体から血清と羊水の両者が得られたもの）の測定を行った。

B. 研究方法

1. 対象者及び試料

山口大学病院で分娩を行った正常単胎妊婦（以下「妊婦」と省略する）から採取された血清及び羊水のうち、同一母体からペアで得られた25組の試料を使用した。

（倫理面への配慮）試料の採取及びその

取り扱い、山口大学医学部の倫理規定に従った。

2. 試薬及び材料

測定元素標準品は ICP Multi-Element Standard (AccuStandard)、内部標準元素のスカンジウム(Sc)、イットリウム(Y)、イリジウム(Ir)は ICP 標準液(メルク)を使用した。

3. 測定項目

リチウム、ホウ素、マグネシウム、アルミニウム、カルシウム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、セレン、ルビジウム、ストロンチウム、モリブデン、カドミウム、アンチモン、水銀、鉛(19 元素)

4. 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。

5. 試料の前処理法

血清 0.7 mL、あるいは羊水 3.0 mL を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)に入れ、硝酸 2.0 mL を添加後、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。

6. 試験溶液の調製法

前処理法に従って酸分解後、分解液をポリエチレン製遠沈管(15 mL)に入れ、内部標準溶液(Sc、Y、Ir 各 200 ppb)0.7 mL を添加後、超純水で 7 mL にメスアップした。

7. ICP-MS 条件

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

測定条件 :

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 ; バビントン型

内部標準元素 ; Sc(45)、Y(89)、Ir(193)
干渉補正式 ; $Se(78)=(78)*1-(76)*0.1869$

8. 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除した数値と、試験溶液同様にして得られた標準溶液の数値を比較して定量した。

9. 統計解析

統計処理は、SPSS11.5 for Windows を用い、マトリックス間の差の検定は Wilcoxon の符号付き順位検定、マトリックス間の相関は Pearson の相関係数、妊婦と非妊婦間の濃度差の検定は Mann-Whitney の U 検定でそれぞれ行った。

定量下限値以下の値は、それぞれの定量下限値の 1/2 の値を用いて統計解析を行った。

C. 結果と考察

1. 母体血清、羊水中元素濃度レベル及びそれらの濃度比

妊婦から採取された血清、羊水中元素濃度の測定結果、及びそれらの濃度比を表 1 に示した。濃度比は、それぞれの中央値について、血清に対する羊水中の濃度比(羊水/血清)で表した。測定した 19 元素中 13 元素は羊水中の濃度が低く、特に、Cu は 0.05、Hg は 0.10、Se は 0.11 と低い濃度比を示した。一方、Ni、Mn、Mo 等 6 元素は羊水中の濃度が高く、最も高い濃度比は Ni の 4.84 であった。なお、Fe ($p=0.459$)、Zn ($p=0.590$)、Al ($p=0.326$)、Li ($p=0.226$)、及び Cd ($p=0.600$) を除く 15 元素において、母体血清と羊水中の元素濃度に有意差($p<0.05$)が認められた。

2. 母体血清と羊水中元素濃度の相関

母体血清と羊水中の元素濃度の相関を表 2 に示した。測定した 19 元素中 5 元素(Mg、Sr、Mo、Hg、Li)において、有意な相関が認められた。最も高い相関が認められたのは Sr ($r=0.801$ 、 $p<0.001$)

で、以下 Mo ($r=0.609$, $p=0.001$)、Hg ($r=0.557$, $p=0.004$)、Li ($r=0.557$, $p=0.004$)、Mg ($r=0.485$, $p=0.014$) の順であった。

3. 妊婦と非妊婦の血清中元素濃度の比較

今回測定を行った妊婦 ($n=25$) の血清中元素濃度と、平成 17 年度から 19 年度に実施した「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」の中で測定を行った非妊婦 ($n=48$) の血清中元素濃度を比較した (表 3)。その結果、B、Cu、Mn、Ca、Zn の 5 元素について有意差が認められ、B、Cu、Mn の 3 元素は妊婦の方が高く、Ca、Zn の 2 元素は非妊婦の方が高い値を示した。

これら 5 元素の中で Cu 濃度の差が最も大きく、妊婦の方が非妊婦よりも約 2 倍高い値 (平均値) を示していた。妊娠中は内因性のエストロゲンによりセルロプラスミンの合成が誘導され、血清中の Cu 濃度が高くなることが報告されており³⁾、本研究でも同様の結果が得られた。

Ca 及び Zn の血清中濃度は、妊婦の方が非妊婦よりも高くなることが報告されており⁴⁻⁵⁾、本研究でも同様の結果が得られた。

B 及び Mn の血清中濃度について、妊婦と非妊婦を比較した例はこれまでに報告されていない。今後、これらの元素の変動についても検討する必要があると考えられた。

4. 過去の報告との比較

従来、血清等の生体試料中の元素濃度の測定は、専ら原子吸光光度法を用いて行われてきた。原子吸光光度法は、一元素毎に測定を行う必要があるため、測定元素数が限定される欠点を有していた。近年、ICP-MS 法を用いて健康な一般人の血中多元素濃度を測定し、基準値を確立する試みがいくつか報告されている⁶⁻⁹⁾。その中で、Cd、Pb などの微量有害元素濃度について、原子吸光光度法を用いて測定された過去の値が、ICP-MS 法と比べて 1 オーダーも高く測定されていること

が指摘されている。今回の我々の ICP-MS 法による測定結果も同様の結果が得られており、過去の値を見直す必要があると考えられた。

周産期における母体血清及び羊水中の元素濃度の測定例は、これまでにいくつか報告されているが、主に原子吸光光度法が用いられている¹⁰⁻¹⁷⁾。最近、エチオピアの妊婦と非妊婦の血清中の元素濃度を ICP-MS 法で測定した結果が報告されたが、測定対象は比較的濃度の高い必須元素 (Zn、Cu、Se、Ca、Mg) に限られている¹⁸⁾。

今回、我々は、ICP-MS 法を用いて同一母体から得られた血清及び羊水中の 19 元素を測定した。必須元素に加え、Cd、Pb、Hg などの微量有害元素を含む非必須元素濃度を測定した例はこれまでになく、本研究が初めてである。

今後、測定数をさらに増やすとともに、生活習慣及び住宅環境に関するアンケート結果との総合的な解析を行う予定である。

E. 参考文献

- 1) 「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」平成 19 年度総括・分担研究報告書 p54-62.
- 2) 「化学物質の子どもへの健康影響に関するエビジェネティクス評価法の開発」平成 20 年度分担研究報告書 p42-47.
- 3) Martin-Lagos F et al. Zinc and Copper Concentrations in Serum from Spanish Women During Pregnancy. *Biol Trace Elem Res* 61: 61-70 (1998)
- 4) Erdogan M et al. Effects of nutrition on zinc, folic acid, and vitamin B12 levels during pregnancy. *Biol Trace Elem Res* 109: 105-113 (2006)
- 5) Wang Y et al. Elemental contents in serum of pregnant womwn with gestational diabetes melitus. *Biol Trace Elem Res* 88: 113-118 (2002)

- 6) Krachler M et al. Concentrations of trace elements in sera of newborns, young infants, and adults. *Biol Trace Elem Res* 68:121-135 (1999).
- 7) Forrer R et al. Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS. *Biol Trace Elem Res* 80:77-93 (2001).
- 8) Muniz CS et al. Reference values for trace and ultratrace elements in human serum determined by double-focusing ICP-MS. *Biol Trace Elem Res* 82:259-272 (2001).
- 9) Kobayashi K et al. Rapid and direct determination of selenium, copper, and zinc in blood plasma by flow injection-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biol Trace Elem Res* 115:87-93 (2007).
- 10) Kovar IZ et al. Perinatal lead and cadmium burden in a British urban population. *Arch Dis Child* 59:36-39 (1984).
- 11) Ong CN et al. Concentrations of lead in maternal blood, cord blood, and breast milk. *Arch Dis Child* 60:756-759 (1985).
- 12) Korpela H et al. Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 155:1086-1089 (1986).
- 13) Caroli S et al. The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: a systematic review. *Crit rev anal chem* 24:363-398 (1994).
- 14) Anastasiadis P et al. The concentration of the elements Zn, Cu, Mg, Fe, Na, and K in human amniotic fluid during birth. *J Perinat Med* 9:228-234 (1981).
- 15) Trave TD et al. Zinc concentration of amniotic fluid in the course of pregnancy and its relationship to fetal weight and length. *Gynecol Obstet Invest* 18:152-155 (1984).
- 16) Marsal K and Furgyik S. Zinc concentrations in maternal blood during pregnancy and post partum, in cord blood and amniotic fluid. *Acta Obst et Gynecol Scand* 66:653-656 (1987).
- 17) Mimouni F et al. Decreased amniotic fluid magnesium concentration in diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* 69:12-14 (1987).
- 18) Kassu A et al. Serum zinc, copper, selenium, calcium, and magnesium levels in pregnant and non-pregnant women in Gondar, Northwest Ethiopia. *Biol Trace Elem Res* 122:97-106 (2008).

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kondo F, Okumura M, Oka H, Nakazawa H, Izumi S, Makino T. Determination of Phthalates in Diet and Bedding for Experimental Animals Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol* 84:212-216 (2010).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

表1 血清、羊水中元素濃度と濃度比

元素	血 清		羊 水		濃度比 (羊水/血清)
	中央値	範圍	中央値	範圍	
Ca	82000	78000 - 94000	60000	45000 - 75000	0.73
Mg	19000	15000 - 20000	13000	9700 - 23000	0.68
Cu	2000	1400 - 2500	100	23 - 380	0.05
Fe	840	380 - 3000	740	50 - 3700	0.88
Zn	600	440 - 740	540	56 - 3100	0.90
Rb	130	73 - 440	91	66 - 150	0.70
Se	110	82 - 160	12	7.9 - 23	0.11
Sr	33	20 - 68	29	17 - 64	0.88
B	12	2.8 - 20	19	7.5 - 54	1.58
Al	6.0	0.24 - 19	4.1	1.0 - 13	0.68
Mo	1.1	0.33 - 4.1	2.5	0.87 - 5.8	2.27
Mn	1.1	0.32 - 2.3	3.3	0.26 - 9.7	3.00
Hg	0.59	0.18 - 2.1	0.056	<0.001 - 0.51	0.10
Li	0.50	0.21 - 1.1	0.54	0.15 - 1.2	1.08
Ni	0.31	0.22 - 0.70	1.5	0.14 - 9.8	4.84
Pb	0.21	0.11 - 0.96	0.12	<0.001 - 0.28	0.57
Co	0.17	0.049 - 0.59	0.038	<0.001 - 0.87	0.22
Sb	0.14	0.014 - 0.20	0.28	0.044 - 0.49	2.00
Cd	0.036	0.019 - 0.083	0.030	<0.001 - 0.14	0.83

(濃度單位:ng/mL)

表3 妊婦と非妊婦の血清中元素濃度

元素	妊婦 (n=25)		非妊婦 (n=48)		p値
	平均値	±標準偏差	平均値	±標準偏差	
Ca	83000	± 3700	93000	± 5100	0.000*
Mg	18000	± 1400	19000	± 1500	0.122
Cu	2000	± 310	990	± 170	0.000*
Fe	1100	± 720	1100	± 340	0.438
Zn	580	± 74	780	± 130	0.000*
Rb	170	± 97	150	± 25	0.119
Se	110	± 15	120	± 18	0.460
Sr	33	± 11	30	± 8.9	0.129
B	12	± 4.4	9.3	± 2.6	0.002*
Al	6.1	± 5.0	4.4	± 3.1	0.272
Mo	1.4	± 0.86	1.3	± 0.24	0.450
Mn	1.0	± 0.47	0.81	± 0.29	0.013*
Hg	0.66	± 0.42	0.60	± 0.33	0.667
Li	0.56	± 0.20	0.57	± 0.22	0.917
Ni	0.37	± 0.12	0.37	± 0.14	0.597
Pb	0.31	± 0.22	0.29	± 0.12	0.144
Co	0.20	± 0.13	0.18	± 0.080	0.880
Sb	0.12	± 0.054	0.11	± 0.047	0.146
Cd	0.038	± 0.015	0.038	± 0.018	0.762

(濃度単位:ng/mL)

表2 血清と羊水中の元素濃度の相関

元素	相関係数	p値
Ca	0.142	0.498
Mg	0.485	0.014*
Cu	0.355	0.081
Fe	0.136	0.517
Zn	0.075	0.722
Rb	-0.042	0.840
Se	0.135	0.519
Sr	0.801	0.000*
B	0.377	0.064
Al	0.015	0.943
Mo	0.609	0.001*
Mn	0.140	0.523
Hg	0.557	0.004*
Li	0.557	0.004*
Ni	-0.007	0.974
Pb	0.033	0.875
Co	-0.052	0.807
Sb	0.109	0.605
Cd	-0.022	0.918

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に関する研究

胎内環境中に存在する化学物質の把握に関する研究

主任研究者 牧野 恒久 有隣厚生会東部病院
研究分担者 杉野 法広 山口大学大学院医学系研究科
研究協力者 住江 正大 山口大学大学院医学系研究科
前川 亮 山口大学大学院医学系研究科

研究要旨

本研究は、次代の社会の担い手である子どもを取りまく胎内環境中の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のかを解明することを目的としている。本年度は、昨年度に引き続き、種々の化学物質（有機フッ素系化合物、ピレスロイド系殺虫剤、有機リン系農薬、ジエチルヘキシルフタル酸、ニコチン代謝物、重金属、など）の母体血、臍帯血、母体尿、母乳、羊水、胎脂中での濃度を測定し暴露量を把握することを目的とした。そこで、本研究の分担として、我々は、37週0日から41週6日までの正常単胎妊婦につき、母体血と母体尿、羊水、臍帯血、胎脂、母乳を採取した。さらに、本年度は、暴露量と子宮内胎児発育遅延、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関連性を調べるため、これら異常妊娠からも生体試料を採取した。また、同時に、生活習慣、住宅環境と生体内の化学物質量との関連を調べるためアンケート調査を行った。

A. 研究目的

本研究は、次代の社会の担い手である子どもを取りまく胎内環境中の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のか等を新しいエピジェネティクスの手法を用いて解明することを目的としている。本年度は、昨年度に引き続き、種々の化学物質（有機フッ素系化合物、ピレスロイド系殺虫剤、有機リン系農薬、ジエチルヘキシルフタル酸、ニコチン代謝物、重金属など）

の母体血、羊水、胎脂、臍帯血、母体尿、母乳中での濃度を測定し暴露量を把握することを目的とした。さらに、本年度は、暴露量と子宮内胎児発育遅延、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関連性を調べることも目的とした。