

Fig. 8 Time course of cumulative amount of monobutyl phthalate after applied monobutyl phthalate through hairless rat intact (closed symbols) or stripped skin (open symbols) with DFP; ◆, ◇ or without DFP; ●, ○. Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).

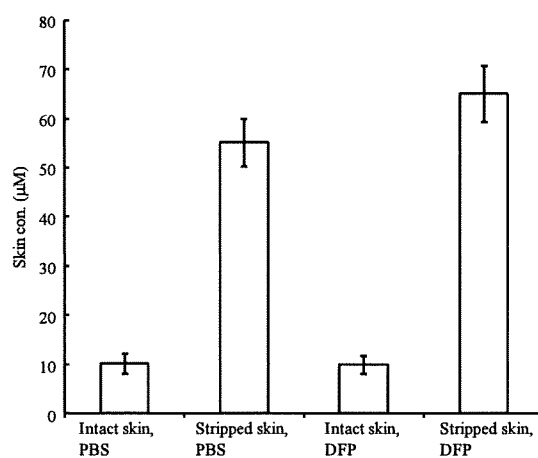


Fig. 9 Skin conc. of monobutyl phthalate (open column) after applied monobutyl phthalate. Each value shows the mean \pm S.D.(n = 3).

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

家庭用品に由来する化学物質の多経路暴露評価手法の開発に関する研究

曝露経路依存的な異物代謝予測手法の開発に関する研究

研究分担者：埴岡伸光 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 準教授
研究協力者：高原佑輔 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
研究協力者：成松鎮雄 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：室内環境中に存在するフタル酸エステル類の生体内代謝の個人差を解明し、異物代謝の要因を考慮したリスク評価法を確立すること目的としている。本年度は、その中で dibutyl phthalate (DBP)、bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)及び butyl benzyl phthalate (BBP)を取り上げ、これらの代謝に関与するカルボキシエステラーゼ (carboxylesterase, CES) の寄与の可能性、程度及び関与する分子種の同定するための CES 酵素の発現系の構築及び3種のフタル酸エステル類の加水分解代謝物の HPLC 定量法の確立を行った。その結果、検討した哺乳動物細胞 (HepG2、HEK293、Caco2 細胞 COS7 細胞) の中で HEK293 細胞が最も内在性 CES 酵素 (CES1、CES2 及び CES3) が量的 (mRNA 発現量) 及び質的 (酵素活性) に低レベルであり、CES 酵素過剰発現に適している細胞であることが明らかとなった。また、フタル酸エステル類及び CES により代謝されると推測できる代謝物の HPLC 分析は、移動相に 0.1%リン酸/アセトニトリルを用いるグラジエント溶出がそれぞれの基質及びそれらの代謝物の分離を可能にすることが明らかとなった。

A. はじめに

我々が最も長く生活する室内環境中には、多種多様の化学物質が存在する。その中でプラスチックの可塑剤として広く用いられているフタル酸エステル類は容易に揮散され、経気道的に暴露される場合がある。体内に曝露されたフタル酸エステル類は、セリン水解酵素のカルボキシエステラーゼ (carboxylesterase, CES) に代謝されることが示唆されている。フタル酸エステル類は、発癌性及び内分泌

攪乱作用を示すことが指摘されている。

これら毒性は親化合物よりも加水分解物のモノエステル体の方が強いことが報告されている。そのモノエステル体はさらに UDP-グルクロン酸転移酵素により解毒的代謝され、グルクロン酸抱合体として尿中に排泄される。

CES は医薬品や農薬などの多くの化学物質の代謝に関与し、その酵素機能には大きな個人差があることが知られている。フタル酸エステル類からモノエステ

ル体はいわゆる代謝的活性化であるが、ヒトにおいてどの CES 分子種がどの程度関与しているかはほとんど解明されていない。

本研究は、フタル酸エステル類の代謝に関与する CES 分子種を明らかにし、フタル酸エステル類のリスク評価法を科学的に基づいて確立することを目的としている。そのために、dibutyl phthalate (DBP)、bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)及び butyl benzyl phthalate (BBP)を取り上げ、これらの代謝に関与するカルボキシエステラーゼ (carboxylesterase, CES) の寄与の可能性、程度及び関与する分子種の同定するための CES 酵素の発現系の構築及び3種のフタル酸エステル類の加水分解代謝物の HPLC 定量法の確立を行った。

B. 研究方法

B.1 実験材料

実験に用いた試薬は、以下に示す会社からそれぞれ購入あるいは供与された。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、Fetal bovine serum (FBS)、NaHCO₃、Opti-MEM : Gibco ; penicillin-streptomycin solution : Sigma ; 炭酸ガス培養機 : タバイエスティック ; 0.25% Trypsin-EDTA solution、trypan blue : Nacalai Tesque ; 血球計算版 : Nitrin ; カバーガラス : ミナトメディカル ; その他の細胞培養機器 : Iwaki ; RNeasy mini Kit、QIA shredder : Qiagen ; UV-1600 分光光度計 : SHIMADZU ; Access RT-PCR System、mouse anti-V5-HRP antibody : Promega ; Gene Amp PCR-DYDTEM 2700A : applied Biosystems ; *p*-nitrophenyl acetate、Agarose

S、DBP、DEHP、BBP、mono benzyl phthalate (monoBzP)、mono butyl phthalate (monoBuP)、mono (2-ethylhexyl) phthalate (monoEHP)、phthalic acid (PA) : Wako ; Lipofectamine LTX : Invitrogen ; DC protein assay kit、PVDF 膜 : Bio-Rad ; ECL plus Western blotting detection system : Amersham Biosciences ; プールドヒト肝ミクロゾーム (pHLM) : BD Biosciences。pcDNA-DEST40/CES1、pcDNA-DEST40/CES2 及び pcDNA-DEST40/CES3 は、国立医薬品食品衛生研究所の香川 (田中) 聡子先生より供与された。HepG2 (ヒト肝癌由来)、HEK293 (ヒト胎児腎)、Caco2 (ヒト結腸癌) 及び COS7 細胞 (アフリカミドリザル腎) は理化学研究所バイオリソースセンターより供与された。その他試薬は分析用、特級及び HPLC 用試薬を購入した。

B.2 細胞培養

HepG2、HEK293、Caco2 及び COS7 細胞は 10%FBS 及び penicillin (100 units/mL)、streptomycin (100 µg/mL) 含有 DMEM 培地中で培養した。継代は細胞が 80-90%まで生育した時点で行った。細胞数は、細胞の一部を 0.1%トリパンブルーで染色し、改良ノイバウエル血球計算盤を用いて光学顕微鏡 CK30 (OLYMPUS) で観察することにより求めた。

B.3 内在性 CES の mRNA 発現量の測定

細胞が 80-90%まで生育した 10 cm プレート 3 枚から RNeasy mini Kit を用い total RNA を抽出した。得られた total RNA の一部をとり RNase free water で 100 倍に希

積し、260 nm と 280 nm の吸光度を測定して濃度と純度を測定した。抽出した total RNA を用いて CES1、CES2 及び CES3 mRNA 発現量を RT-PCR 解析により半定量した。用いたプライマーのオリゴヌクレオチド配列を表 1 に示す。RT-PCR は、Access RT-PCR System の添付プロトコールに従って行った。それぞれの PCR 産物 10 μ L に loading buffer 1 μ L を混合し、アガロース電気泳動に付した。分子量マーカー 2 μ L をアプライした後、泳動槽で 100 V、約 40 分間泳動し、0.01% ethidium bromide で 15 分染色し、バンドの染色強度を Quantity One を用いて測定した。

B.4 内在性 CES の酵素活性の測定

RT-PCR 解析から HEK293 あるいは COS-7 細胞を培養した。細胞が 80-90%まで生育した 15 cm プレート 3 枚から細胞をスクレーパーで回収し、20% glycerol を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で懸濁した。その細胞懸濁液は氷上で 1 秒間、4 回 (1 分間隔) で超音波処理し細胞を破碎した。次に、600 \times g で 10 分間遠心し、上清を 9000 \times g で遠心してその上清を S9 画分とした。タンパク質量は牛血清アルブミンを標準タンパク質にして、DC protein assay kit (BIO RAD) を用いて定量した。内在性エステラーゼ活性は、HEK293 及び COS7 細胞の S9 画分 (50 μ g protein) 並びにプールドヒト肝ミクロソーム (0.5 μ g protein) を酵素源に用いて、*p*-nitro phenyl acetate (*p*-NPA) (100 μ M) に対する活性を経時的に吸光度 (OD₄₀₅) を測定することにより行った。

B.5 ヒト CES1、CES2 及び CES3 酵素の発現

10 cm プレートを用いて HEK293 細胞を 10% FBS 含有 DMEM 中に 3.0×10^6 cell となるように継代し、細胞がプレートの約 70%になるまで培養した。培地を除去後、滅菌 PBS で洗浄し、DMEM を 15 mL 加えた。次に、pcDNA-DEST40/CES1、pcDNA-DEST40/CES2 あるいは pcDNA-DEST40/CES3 (24 μ g) をそれぞれ PLUS Reagent (15 μ L) 及び Lipofect amine LTX (60 μ L) を全量 1.5 mL になるように Opti-MEM I Reduced-Serum Medium で希釈し、この DNA-Lipofect amine 複合体を加えてトランスフェクションした。24 時間培養した後、細胞を回収し、20%20% glycerol を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で懸濁した。ネガティブコントロール (CONTROL) は、いずれのプラスミドもトランスフェクションしない HEK293 細胞を用いた。

B.6 ウェスタンブロット分析

得られた S9 画分を Laemmli の方法に準じて、10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動に付した。泳動後、Towbin らの方法に従いタンパク質を PVDF 膜に転写した PVDF 膜は 5% スキムミルクを含む PBS 溶液に漬け、一晚ブロッキング処理した。標識抗体として Mouse anti-V5-HRP antibody (5% スキムミルクを含む 5000 倍希釈) を加え 2 時間反応した。反応終了後、PBS 溶液及び 0.1% Tween20 を含む PBS 溶液で洗浄した後、化学発光法によって抗体と結合したバンドを検出した。

B.7 CES の活性測定

B.4 と同様の方法で行った。

B.8 フタル酸エステル類及びそれらの代謝物の HPLC 分析

DBP、DEHP、BBP、monoBzP、mono monoBuP、monoEHP 及び PA はそれぞれメタノールに溶解し、50 mM リン酸カリウム緩衝液に希釈して試料溶液を作製した。HPLC 条件は以下に示す。

Column: Inertsil ODS-SP (4.6×150 mm)
Column temperature: 40°C
Elution: 0.1% H₃PO₄ (A)/acetonitrile-(B)
Flow rate: 1.2 mL/min
Detection: UV 254 nm
Injection: 20 µL

1) DBP のグラジエントタイムテーブル

min	0	5	15	30	40	50	60	65
(A)	85	85	55	55	15	15	85	85
(B)	15	15	45	45	85	85	15	15

2) DEHP のグラジエントタイムテーブル

min	0	5	15	30	40	50	60	65
(A)	85	85	55	55	15	15	85	85
(B)	15	15	45	45	85	85	15	15

3) BBP のグラジエントタイムテーブル

min	0	5	15	30	45	55	65	70
(A)	85	85	65	65	15	15	85	85
(B)	15	15	35	35	85	85	15	15

C. 結果及び考察

C.1 内在性 CES 活性の低い哺乳動物細胞発現系の検討

HepG2、HEK293、Caco2 及び COS7 細胞の内在性 CES について mRNA 発現量及

び酵素活性の見地から検討した。mRNA 発現量の解析は RT-PCR により行った。その結果を図 1 に示す。HepG2 細胞では、CES1、CES2 及び CES3 のいずれも mRNA も発現が確認された。HEK293 細胞では CES2 mRNA のみが、Caco2 細胞では、CES1 及び CES2 mRNA 発現が発現していた。一方、COS7 細胞においては、本研究で用いた条件ではいずれの CES mRNA の発現は確認出来なかった。さらに、HEK293 及び COS7 細胞では、S9 画分を酵素源にして *p*-NPA に対するエステラーゼ活性を測定した。結果を図 2 に示す。HEK293 及び COS7 細胞のエステラーゼ活性はそれぞれ 16 及び 14 nmol/min/mg protein であり、いずれも pHLM と比較し顕著に低かった。COS7 細胞では、CES1、CES2 及び CES3 のいずれにおいても目的バンドは検出がされなかったが、エステラーゼ活性は HEK293 と同程度であった。これは、本研究で用いた RT-PCR 解析のためのプライマーはヒトの CES cDNA の塩基配列に基づいて設計したものである。従って、ヒトアカゲザル腎臓由来の COS7 細胞では内在性 CES が発現するが、RT-PCR においてはヒト CES プライマーでは目的 PCR 産物が増幅しなかったものと考えられる。

C.2 CES1、CES2 及び CES3 酵素の発現

C.1 の結果から本研究では、HEK293 細胞を用いて CES1、CES2 及び CES3 酵素を過剰発現することにした。ヒト CES1、CES2 及び CES3 cDNA を HEK293 細胞にトランスフェクションした。CES 酵素タンパク質の発現は S9 画分のウエスタンブ

ロット分析により確認した。その結果を図3に示す。CES1、CES2及びCES3のいずれにおいてもタグのV5エピトープを認識したバンドが検出された。また、S9画分を酵素源にして発現CES酵素タのp-NPAに対するエステラーゼ活性を測定した。その結果、CES1、CES2及びCES3のいずれもコントロール細胞の3.0~5.4倍高い活性を示した(図4)。

C.3 フタル酸エステル類及びそれらの代謝物のHPLC分析

DBP、DEHP及びBBPとそれらのCESにより生成すると思われる代謝物のモノ体及びフタル酸のHPLC分析条件を検討した。移動相に0.1%リン酸/アセトニトリルを用い、グラジエント溶出を行った。B.8に示した条件下でそれぞれのフタル酸エステル類及びそれらの代謝物を良好に分離することができた(図5~7)。

D. 結論

本研究では、DBP、DEHP及びBBPの代謝に関与するCES分子種を同定することを目的として、CES酵素の発現系の構築及び3種のフタル酸エステル類の加水分解代謝物のHPLC定量法の確立を行った。その結果、検討した哺乳動物細胞(HepG2、HEK293、Caco2細胞COS7細胞)の中でHEK293細胞が最も内在性CES酵素(CES1、CES2及びCES3)が量的(mRNA発現量)及び質的(酵素活性)に低レベルであり、CES酵素過剰発現に適している細胞であることが明らかとなった。また、フタル酸エステル類及びCESにより代謝されると推測できる代謝物の

HPLC分析は、移動相に0.1%リン酸/アセトニトリルを用いるグラジエント溶出がそれぞれの基質及びそれらの代謝物の分離を可能にすることが明らかとなった。今後は、リコンビナントCES酵素を用いてフタル酸エステル類の代謝に関与するCES分子種を定量的に解析する。また、その後はフタル酸エステル類代謝の種差を明らかにするためヒト、マウス、ラット及びサル(サル)の肝臓及び小腸のミクロソームを用いエステラーゼ活性測定を行う。

E. 研究発表

E.1 論文発表

なし

E.2 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

F.1 特許取得

なし

F.2 実用新案登録

なし

F.3 その他

なし

表 1 CES mRNA の RT-PCR 解析に用いたプライマー

Primer	Sequence	Tm (°C)
CES1-FP	5'-CTATTACAAACCGAAAGGAGAACA-3'	55.6
CES1-RP	5'-ATGGAGACAAAACAAGAACAGAGAC-3'	57.2
CES2-FP	5'-CAATTAACAAGCCTTTC AAGATGAT-3'	53.9
CES2-RP	5'-GATGCTGGA ACTCGTAGAAGTACAC-3'	60.5
CES3-FP	5'-AGATCTTCTCCGTTTCAGAGGAC-3'	58.7
CES3-RP	5'-GTCCGAGTTGCTTCCTAGGTATT-3'	58.7

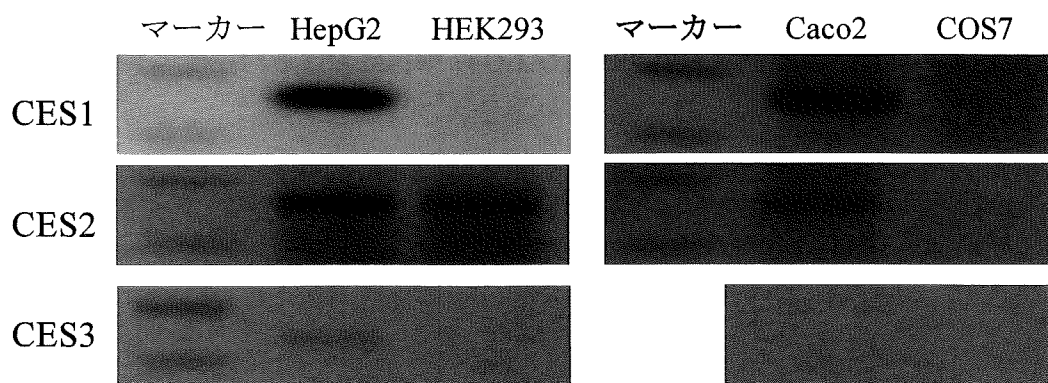


図 1 哺乳動物細胞における内在性 CES1、CES2 及び CES3 の mRNA 発現レベル

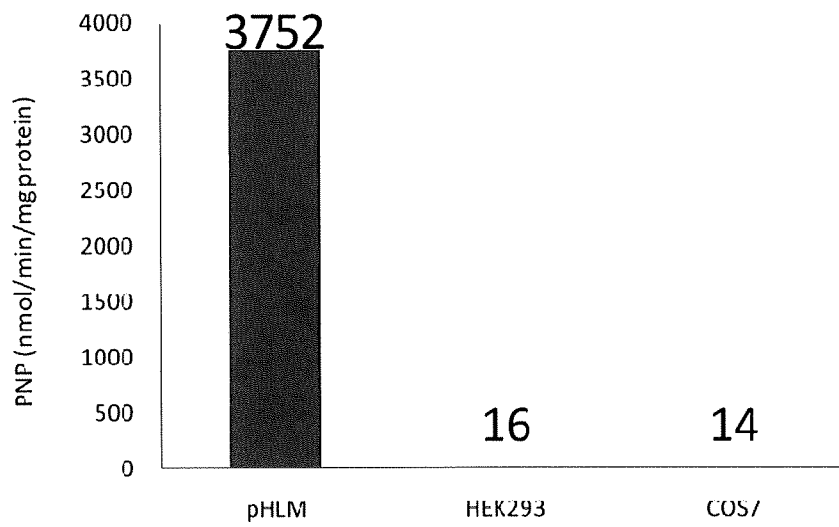


図2 肝マイクロゾーム並びに HEK293 及び COS7 細胞における内在性エステラーゼ活性

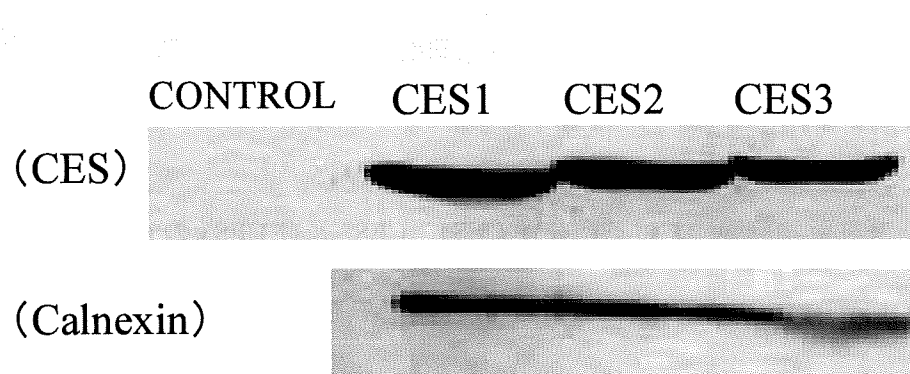


図3 リコンビナント CES1、CES2 及び CES3 酵素のウェスタンブロット分析

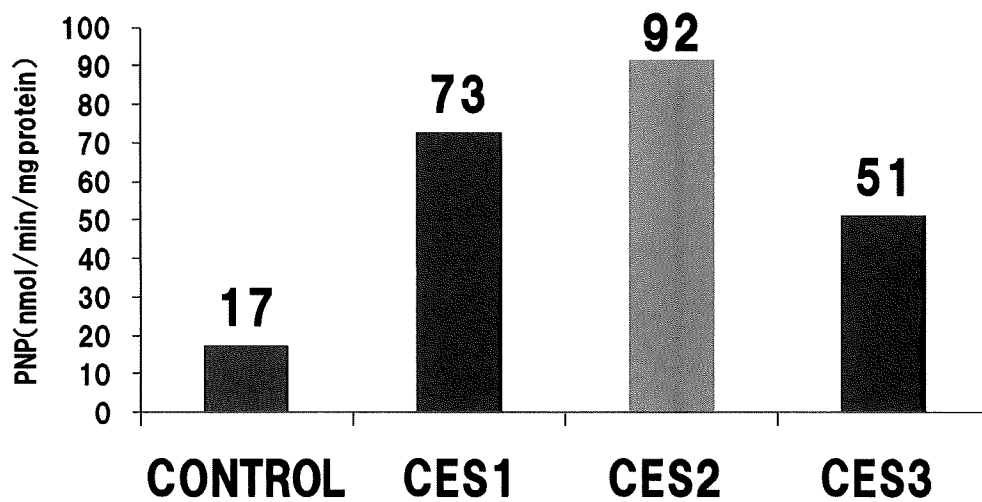


図4 リコンビナント CES1、CES2 及び CES3 酵素のエステラーゼ活性

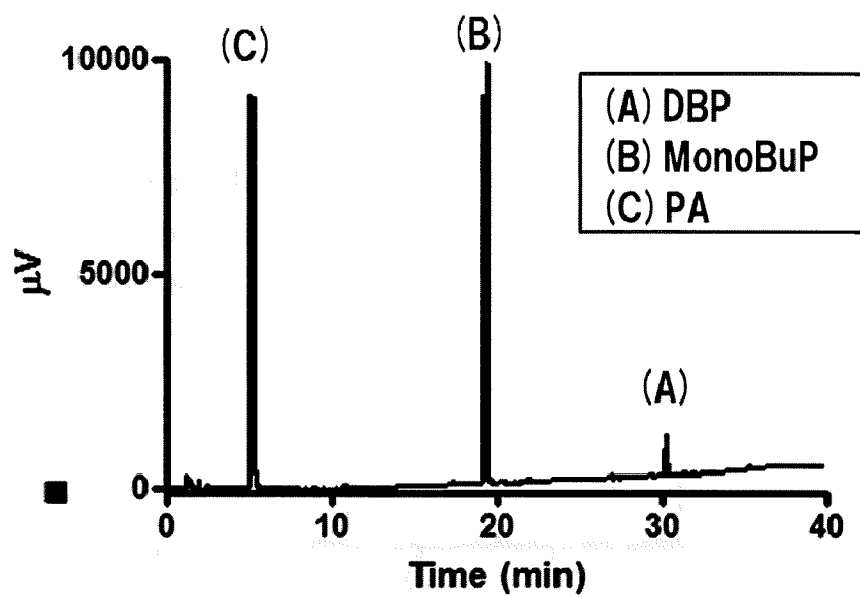


図5 DBP 及びその加水分解代謝物の HPLC クロマトグラフィー

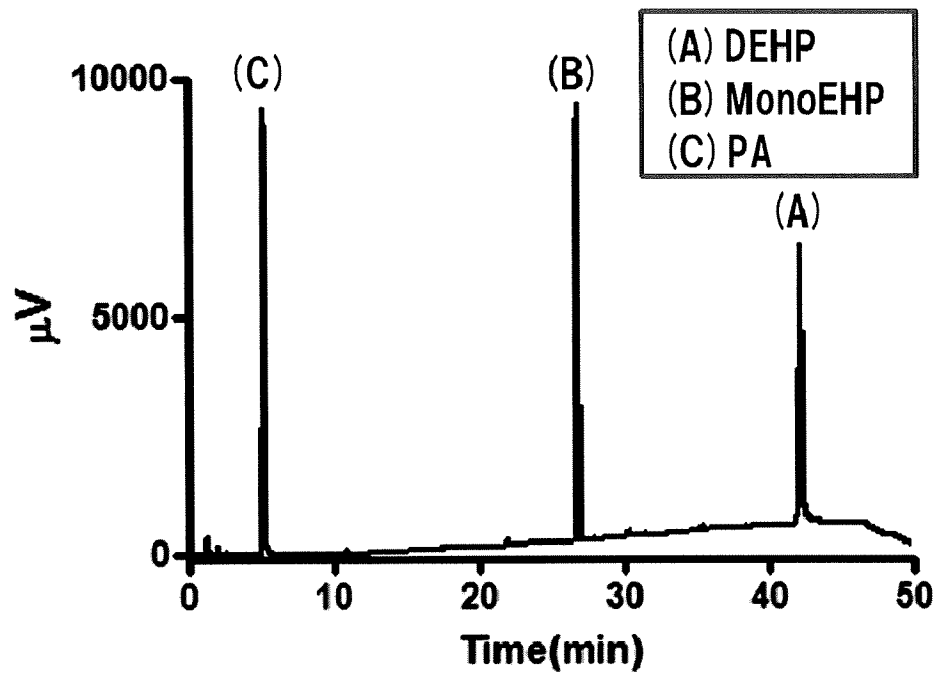


図 6 DEHP 及びその加水分解代謝物の HPLC クロマトグラフィー

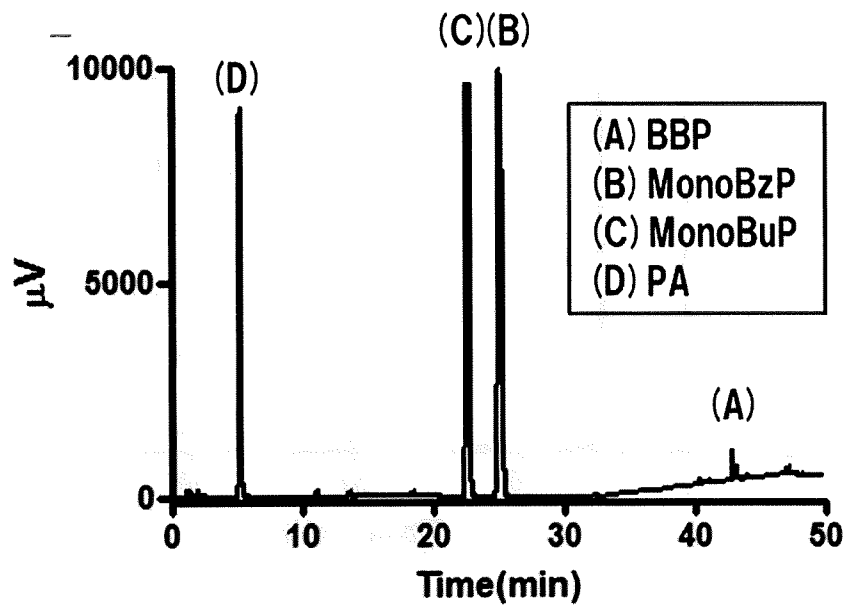


図 7 BBP 及びその加水分解代謝物の HPLC クロマトグラフィー

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

家庭用品に由来する化学物質の多経路暴露評価手法の開発に関する研究

家庭用品に由来する室内環境化学物質の網羅的解析手法の開発に関する研究
室内環境におけるフタル酸ジエステル類の暴露量評価

研究分担者	香川(田中) 聡子	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部
研究代表者	神野 透人	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部
研究協力者	古川 容子	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部
研究協力者	大田 悠紀子	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部

研究要旨：フタル酸エステル類は塩化ビニル樹脂用の可塑剤としてのみならず塗料や接着剤等の用途に幅広く用いられており、空気中への揮散及びハウスダストへの吸着等によって室内環境を汚染していると考えられるが、特にハウスダストを介するフタル酸エステル類の暴露状況に関しては情報が極めて限られている。そこで、本研究では一般家庭室内を対象としてハウスダスト中のフタル酸エステル類の濃度を明らかにするとともに、室内空気中に存在するフタル酸エステル類について粒子状及びガス状物質の分別捕集法並びに加熱脱離 (Thermal Desorption:TD)-ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC/MS) による測定法を確立し、併せて室内環境における汚染状況を調査した。その結果、一般家庭 24 件のハウスダスト中のフタル酸エステル類濃度の中央値及び最大値はそれぞれ Dibutyl phthalate (DBP) ; 0.014 mg/g Dust、0.12 mg/g Dust、Benzyl butylphthalate (BBP) ; 0.0011mg/g Dust、0.017 mg/g Dust、Diethylhexyl phthalate (DEHP) ; 0.86 mg/g Dust、5.3 mg/g Dust であった。居間及び寝室 48 室の室内空気中の DBP の中央値は 0.10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ガス状)、0.31 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (粒子状)、最大値は 0.61 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ガス状)、0.99 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (粒子状) であった。DEHP に関してはそのほとんどが粒子状で存在し、中央値は 0.16 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最大値は 1.05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。BBP はガス状及び粒子状いずれも定量下限値未満であった。ハウスダスト及び室内空気中の濃度については本測定結果の 95th Percentile を用い、また、飲料水中及び食物中の濃度については化学物質の初期リスク評価書の評価値を採用し、暴露シナリオとして呼吸量 20 m^3/day の成人(体重 50 kg) が 1 日あたり 50 mg のハウスダストを摂取し (RIVM Report, 2008)、室内で 24 時間過ごすとして室内環境由来の暴露量を概算すると、DBP に関しては、1 日推定摂取量のほとんどが食物及び飲料水を介した暴露によるのに対して、DEHP については食物及び飲料水を暴露媒体として摂取する量の約 80% に相当する量をハウスダストから摂取する可能性のあること、さらに肝臓、腎臓及び精

巢への影響を指標とした NOAEL (3.7 mg/kg/day) と比較すると暴露マージンは 300 となることが明らかになった。ただし、ハウスダストを介した暴露は生活様式を反映することから、今後我が国独自の暴露シナリオの設定を含めた暴露評価手法の確立が必要であると考えられる。

A. 研究目的

室内環境化学物質に起因すると考えられる健康被害の増加に伴って、建材や家具等の家庭用品から放散される化学物質に大きな関心が寄せられている。主要な発生源の一つである建材に関しては、建築基準法の改正によって放散化学物質の低減化策が講じられている。一方、居住者によって家庭内に持ち込まれる家庭用品には多種多様な化学物質が使用されているものの、それらの製品から放散される化学物質の室内環境への負荷については情報が限られている。フタル酸エステル類は塩化ビニル樹脂用の可塑剤としてのみならず塗料や接着剤等の用途に幅広く用いられており、空気中への揮散及びハウスダストへの吸着等によって室内環境を汚染していると考えられる。そこで、本研究では一般家庭室内を対象としてハウスダスト中のフタル酸エステル類（ジエステル体）の濃度を明らかにするとともに、室内空気中に存在するフタル酸エステル類について粒子状及びガス状物質の分別捕集並びに加熱脱離 (Thermal Desorption:TD)-ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC/MS)による測定法を確立し、併せて室内環境における汚染状況を調査した。

B. 研究方法

B.1 調査方法

一般家庭（関東近郊）を対象として調査開始に先立ち、調査協力に意思確認を目的としたアンケート調査 (Appendix 1) を行った後に、調査協力の了解を得られた 25 件に寝室及び居間のハウスダスト及び室内空気のサンプリングを依頼した。調査協力者に配布したサンプリング要領及び試料採取状況に関するアンケートを Appendix 2 及び Appendix 3 に示した。捕集管及びハウスダストはサンプリング終了後速やか（サンプリング終了当日～2 日後まで）に回収した。回収したハウスダストは抽出操作直前まで -20℃ で保存した。（倫理面への配慮）

調査の実施に際して、調査協力者に関して知り得た個人情報については外部に漏えいすることのないようアンケート用紙等は書庫に保管しに厳重に管理した。また、検体及び測定結果については番号によって識別することとし、管理者以外は個人を特定できないように加工した。

B.2 試料採取方法

B.2.1 ハウスダストのサンプリング

ハウスダストはシリカ繊維円筒濾紙を装着したステンレス製ダスト採取管を家庭用掃除機に接続して採取した。尚、サンプリング過程でのフタル酸エステル類の汚染を避ける目的で、ダスト採取に用いる部材はすべてステンレスないしはテフロン樹脂製とした。ハウスダストのサ

ンプリングに使用したデバイスを Fig. 1 に示す。ハウスダストは寝室及び居間の床・棚からほぼ同じ面積をほぼ同じ時間掃除機で吸引するように調査協力者に依頼した。採取したダストを振動ふるいで分級し、63 μm 以下の画分の一部を試験に用いた。ハウスダスト試料 25 mg にアセトン 2 mL を加えて超音波抽出し GC/MS により分析を行った。なお、Diethylhexyl phthalate に関しては濃度が高かったため 5 倍希釈液を分析に用いた。

B.2.2 室内空気のサンプリング

予めサンプリングスケジュールをプログラムした Pocket Pump (SKC Inc.) をサンプリング協力者に配布した。Tenax TA 捕集管 (ガス状物質捕集用) の前段に粒子状物質捕集用の石英フィルターを装着したステンレス製濾紙ホルダー (内径 13 mm) を接続して Pocket Pump に装着し、流速 40 mL/min で居室及び寝室それぞれ 8 時間 (19.2 L) 室内空気を採取した。粒子状物質捕集用の石英フィルターはあらかじめ 5 w/v%ジメチルジクロロシラン トルエン溶液 (和光純薬、ガスクロマトグラフ用) で 10 時間以上処理した後にメタノールで洗浄しヘリウムガスを送風して乾燥させたものを用いた。ガス状物質捕集用の Tenax TA 捕集管の両端のガラスウールはシラン処理済み石英ウール (GLサイエンス社製)につめかえて使用した。室内空気のサンプリングに使用したデバイスを Fig. 2 に示す。

室内空気のサンプリングはハウスダスト採取のために掃除機を駆動させる前、あるいは掃除機を駆動させた後 6 時間以

上の経過した後に室内空気のサンプリングを開始した。1 家庭におけるハウスダスト及び室内空気のサンプリングは 36 時間以内に実施することとした。

B.3 ガスクロマトグラフ/質量分析 (GC/MS) 法によるハウスダストサンプル中のフタル酸ジエステル類の定量

GC/MS 測定には GCMS-QP2010 (島津製作所)を使用し、Rtx-5 カラム (0.18 mm i.d. \times 20 m, 0.2 μm)を用いて、80°C - (40°C/min) - 200°C - (20°C/min) - 320°C の昇温条件で分離した。SIM 法で DBP (m/z 149, 223)、BBP (m/z 149, 206)、DEHP (m/z 149, 279) の各イオンを測定し、それぞれの重水素標識化合物添加による内部標準法で定量した。GC/MS 測定で得られたクロマトグラムを Fig. 3 (upper)に示した。

B.4 加熱脱離 (Thermal Desorption:TD)-ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC/MS) による空気中フタル酸エステル類の定量法の確立

TD-GC/MS 測定には TDTS-2010 及び GCMS-QP2010 (島津製作所)を使用した。50 mL/min の流速で He ガスを通して吸着管を 300°C に加熱し、脱離した化合物を予め -10°C に冷却した Tenax TA トラップ管に再吸着させた。その後トラップ管を 300°C まで急加熱し、気化したフタル酸エステル類をスプリット比 20 で Rtx-1 カラム (0.32 mm i.d. \times 60 m, 1 μm)に導入し、80°C (5 min) - (20°C/min) - 320°C (11 min) の昇温条件で分離した。

室内空気サンプリング後の石英フィル

ターは清浄なガラスチューブに充填し、Tenax TA 捕集管と同様に TD-GC/MS により分析を行った。SIM 法で DBP (m/z 149, 223)、BBP (m/z 149, 206)、DEHP (m/z 149, 279) の各イオンを測定し、それぞれの重水素標識化合物添加による内部標準法で定量した。TD-GC/MS 測定で得られた標準溶液のクロマトグラムを Fig. 3 (lower) に示した。

B.5 統計的解析手法

結果の解析は Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。

C. 研究結果

C.1 ハウスダスト及び室内空气中フタル酸エステル類 (ジエステル体) の濃度

関東近郊の 25 家庭において居間及び寝室のハウスダスト及び室内空気をサンプリングした。今回の調査で対象とした 25 件のうち 1 件については、分析に要する充分量のハウスダストが得られなかったため、結果の解析対象から除外した。

一般家庭 24 件の居間及び寝室のハウスダスト中のフタル酸エステル類濃度の分布及び基本統計量を Fig. 5 および Table 1 に示した。ハウスダスト中のフタル酸エステル類濃度の中央値及び最大値はそれぞれ DBP ; 0.014 mg/g Dust, 0.12 mg/g Dust、BBP ; 0.0011mg/g Dust、0.017 mg/g Dust、DEHP ; 0.86 mg/g Dust、5.3 mg/g Dust であった。

24 件の居間及び寝室計 48 室の室内空气中のフタル酸ジエステル類の濃度を Fig. 5 に示した。室内空气中の DBP の中

央値は $0.10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (ガス状)、 $0.31 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (粒子状)、最大値は $0.61 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (ガス状)、 $0.99 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (粒子状) であった。DEHP に関してはそのほとんどが粒子状で存在し、中央値は $0.16 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最大値は $1.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。BBP はガス状及び粒子状いずれも定量下限値未満であった。

尚、室内空气中濃度とハウスダスト中濃度にはいずれのフタル酸エステル類についても相関関係は認められなかった。

C.2 フタル酸エステル類の暴露評価

各経路からの摂取量を推定する際、成人 (体重 50 kg) の空気吸入量を $20 \text{ m}^3/\text{人}/\text{day}$ 、飲料水摂取量を $2\text{L}/\text{人}/\text{day}$ 、食物摂取量を $2\text{kg}/\text{人}/\text{day}$ とした。ハウスダストの摂取量に関しては、オランダの国立研究機関が 2008 年に発表した RIVM, 2008 より $50 \text{ mg}/\text{人}/\text{day}$ (成人) とした。以下のように 1 日当たりの暴露量を推計した。

推定摂取量は以下の仮定に従って算出した。

ハウスダスト中及び室内空气中のフタル酸エステル類濃度に関しては本研究結果を用いた。尚、空气中濃度に関しては、外気に比べて室内の濃度が検出頻度も濃度も高いことが報告されているが (環境省、2002a, 東京都 2001a)、DBP および DEHP とともにいずれの初期リスク評価書においても室内の消費者製品からの暴露の可能性も考慮した安全側に立ち室内濃度の測定値の 95th Percentile を用いて 1 日推定摂取量を求めていることから、本報告書においてもそれに倣い、今回の調査結果から居間と寝室の濃度 (ガス状及び粒子状の濃度を加算した値) の平均値を

空気濃度として、その 95th Percentile 値に相当する濃度で24時間吸入するものとして算出した。

飲料水中及び食物中の濃度については化学物質の初期リスク評価書 No.11 フタル酸ジ-n-ブチル (製品評価技術基盤機構, 2005)、及び 化学物質の初期リスク評価書 No.7 フタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (製品評価技術基盤機構, 2005) で採用されている数値を用いた。すなわち、飲料水中の濃度については、水道技術研究センターによる2001年度の浄水についての調査結果より、DBPについては70 µg/L (最大値)、DEHPについては13 µg/L (最大値)を採用した。また、食物中濃度については環境省による2001年度の調査結果 (環境省, 2002b)より、DBPについては0.029 µg/L (95th Percentile)、DEHPについては0.16 µg/L (95th Percentile)を採用した。また、暴露マージンの算出に用いる無毒性量は、DBP、DEHPいずれもそれぞれの初期リスク評価書で採用されている値を用いた。

上記の仮定のもとに推定したDBPの1日摂取量を暴露媒体ごとに示すと以下のようなになる。

ハウスダスト:

$$0.1 (\mu\text{g}/\text{mg}) \times 50 (\text{mg}/\text{day}) = 5 (\mu\text{g}/\text{day})$$

室内空気:

$$1.2 (\mu\text{g}/\text{m}^3) \times 20 (\text{m}^3/\text{day}) = 24 (\mu\text{g}/\text{day})$$

飲料水:

$$70 (\mu\text{g}/\text{L}) \times 2 (\text{L}/\text{day}) = 140 (\mu\text{g}/\text{day})$$

食物:

$$0.029 (\mu\text{g}/\text{g}) \times 2,000 (\text{g}/\text{day}) = 58 (\mu\text{g}/\text{day})$$

成人の体重を平均50 kgと仮定して、体重

1 kg当たりの摂取量を求めると次のようになる。

吸入摂取量:

$$24 (\mu\text{g}/\text{day}) / 50 (\text{kg}) = 0.48 (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})$$

経口摂取量 (飲料水+食物):

$$(140 + 58) (\mu\text{g}/\text{day}) / 50 (\text{kg}) = 4.0 (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})$$

経口摂取量 (ハウスダスト):

$$5 (\mu\text{g}/\text{day}) / 50 (\text{kg}) = 0.1 (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})$$

吸入摂取量 + 経口摂取量:

$$(0.48 + 4.0 + 0.1) (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}) = 4.6 (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})$$

上記のようにDBPの1日推定摂取量は4.6 (µg/kg/day)と推計され、ラットを用いた100日間以上混餌投与試験における生殖及び発生への影響を指標としたLOAEL(52 mg/kg/day)と比較すると暴露マージンは11,000であった。

同様にDEHPに関して推定した1日摂取量は以下のとおりである。

ハウスダスト:

$$5.3 (\mu\text{g}/\text{mg}) \times 50 (\text{mg}/\text{day}) = 265 (\mu\text{g}/\text{day})$$

室内空気:

$$0.6 (\mu\text{g}/\text{m}^3) \times 20 (\text{m}^3/\text{day}) = 12 (\mu\text{g}/\text{day})$$

飲料水:

$$13 (\mu\text{g}/\text{L}) \times 2 (\text{L}/\text{day}) = 26 (\mu\text{g}/\text{day})$$

食物:

$$0.16 (\mu\text{g}/\text{g}) \times 2,000 (\text{g}/\text{day}) = 320 (\mu\text{g}/\text{day})$$

成人の体重を平均50 kgと仮定して、体重1 kg当たりの摂取量を求めると次のようになる。

吸入摂取量:

$$12 (\mu\text{g}/\text{day}) / 50 (\text{kg}) = 0.24 (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})$$

経口摂取量 (飲料水+食物):

$$(26 + 320) (\mu\text{g}/\text{day}) / 50 (\text{kg}) = 6.9 (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})$$

経口摂取量 (ハウスダスト) :

$265 (\mu\text{g}/\text{day})/50 (\text{kg})=5.3 (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})$

吸入摂取量 + 経口摂取量 :

$(0.24+6.9+5.3)(\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})=12 (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day})$

上記のように、DEHP の 1 日推定摂取量は $12 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と推計され、ラットを用いた 13 週間混餌投与試験における肝臓、腎臓及び精巣への影響を指標とした NOAEL($3.7 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$) と比較すると暴露マージンは 300 であった。

また、1 日推定摂取量について、それぞれの暴露媒体が寄与する割合を Fig. 6 に示した。DBP に関しては、1 日推定摂取量のほとんどが食物及び飲料水を介した暴露によるのに対して、DEHP については食物及び飲料水を暴露媒体として摂取する量の約 80%に相当する量をハウスダストから摂取する可能性のあることが本研究によって明らかになった。

D. 考察

室内環境において家庭用品に由来する化学物質の暴露を考える上では、ホルムアルデヒドのような高揮発性有機化合物やトルエン及びキシレン等の揮発性有機化合物の室内空気を媒体とした暴露が重要であり、それに関する情報はこれまでに数多く蓄積されている。一方、揮発性の低い準揮発性有機化合物に関しては、粒子に吸着して床に沈降するために、室内空気に比べてハウスダストを暴露媒体として考慮する必要がある。特に、小児の場合は成人に比べて床付近で行動することが多いため床表面のハウスダストを経気道的に摂取したり、口に手を入れるいわゆるハンドトゥマウス行動によっ

て経口的に摂取する可能性が高く、ハウスダストは化学物質の主要な暴露源となりうる。そこで本研究では室内環境からのフタル酸エステル類の暴露状況を把握する目的で特にハウスダストに着目し実態調査を実施した。今回の調査では、室内空気中及びハウスダスト中で検出されたレベルは共に $\text{BBP} < \text{DBP} < \text{DEHP}$ の順であり、また、BBP や DBP に比べて沸点の高い DEHP の場合は食物及び飲料水からの摂取量の約 80%に相当する量をハウスダストを介して暴露する可能性のあることが明らかになった。最も濃度の高かった DEHP について、これまでに報告されている飲料水及び食事中濃度と、今回の調査で得られたハウスダスト中濃度及び室内空気中濃度を用いて 1 日暴露量を推計して評価基準値から暴露マージンを算出したところ、不確実係数積よりも小さい値となったことから、今後も引き続き詳細な調査及び評価等を行う必要があると考えられる。

本研究では成人のハウスダストの摂取量として RIVM, 2008 より $50 \text{ mg}/\text{day}$ を採用した。我が国においては生活様式の違いから欧米に比べて室内に粉塵を持ち込む可能性は低いと考えられることから、本研究結果ではフタル酸エステル類の暴露量を高く見積もっている可能性もある。しかし、RIVM, 2008 では成人に比べて子供のハウスダストの摂取量は 2 倍高く ($100 \text{ mg}/\text{day}$) 設定されており、また、土壌摂取量調査の結果に基づいて、日本人小児のハウスダスト 1 日摂取量の 50%値を $25 \text{ mg}/\text{day}$ 、最大値を $200 \text{ mg}/\text{kg}$ と設定している報告もあることから、いずれ

にしても子供では暴露マージンがさらに小さくなることが予想される。ハウスダスト摂取量を正確に見積もることによってより精度の高いリスク評価が可能になると考えられる。

E. 結論

25 家庭 の室内空気中及びハウスダスト中フタル酸ジエステル類の濃度を調査した。ハウスダスト及び室内空気中の濃度については本調査結果の 95th Percentile を用い、また、飲料水中及び食物中の濃度については化学物質の初期リスク評価書の評価値を採用し、暴露シナリオとして呼吸量 20 m³/day の成人（体重 50 kg）が 1 日あたり 50 mg のハウスダストを摂取し（RIVM Report, 2008）、室内で 24 時間過ごすとして仮定して室内環境由来の暴露量を概算すると、DBP に関しては、1 日推定摂取量のほとんどが食物及び飲料水を介した暴露によるのに対して、DEHP については食物及び飲料水を暴露媒体として摂取する量の約 80%に相当する量をハウスダストから摂取する可能性のあること、さらにラットを用いた 13 週間混餌投与試験における肝臓、腎臓及び精巣への影響を指標とした NOAEL(3.7 mg/kg/day) と比較すると暴露マージンは 300 となることが明らかになった。ただし、ハウスダストを介した暴露は生活様式を反映することから、今後我が国独自の暴露シナリオの設定を含めた暴露評価手法の確立が必要であると考えられる。

F. 引用文献

- 1) 環境省(2002b) 内分泌攪乱化学物質に関する室内空気調査 (フタル酸エステル類) 報告書、平成 13 年度環境省請負業務結果報告書、日本食品分析センター。
- 2) 水道技術研究センター (2004) 「水道水源における有害化学物質等監視情報ネットワーク」 (平成 11~13 年度調査)
- 3) 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (2005) 化学物質の初期リスク評価書 Ver. 1.0 No. 11 フタル酸ジ-n-ブチル。
- 4) 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (2005) 化学物質の初期リスク評価書 Ver. 1.0 No. 7 フタル酸ジビス(2-エチルヘキシル)。
- 5) 環境省(2002a) 内分泌攪乱化学物質に関する室内空気調査 (フタル酸エステル類) 報告書、平成 13 年度環境省請負業務結果報告書、住化分析センター。

G. 研究発表

G.1 論文発表

なし

G.2 学会発表

- 1) 神野透人, 古川容子, 大田悠紀子, 香川 (田中) 聡子, 西村哲治: ハウスダスト中のフタル酸モノエステル類 フォーラム 2009:衛生薬学・環境トキシコロジー (2009.11)
- 2) 香川 (田中) 聡子, 古川容子, 大田悠紀子, 神野透人, 西村哲治: 室内空気及びハウスダスト中のフタル酸エ

ステル類 フォーラム 2009:衛
生薬学・環境トキシコロジー (2009.11)

- 3) 神野透人、古川容子、大田悠紀子、
香川（田中） 聡子、西村哲治：フ
タル酸モノエステル類による室内汚
染ーハウスダストを介する暴露に
ついてー 平成 21 年度室内環境学会
総会・研究発表会 (2009.12)
- 4) 香川（田中）聡子、古川容子、大田
悠紀子、神野透人、西村哲治：ハウ
スダスト及び室内空気中のフタル酸
エステル類の実態調査 平成 21 年度
室内環境学会総会・研究発表会
(2009.12)

H. 知的所有権の取得状況

H.1 特許取得

なし

H.2 実用新案登録

なし

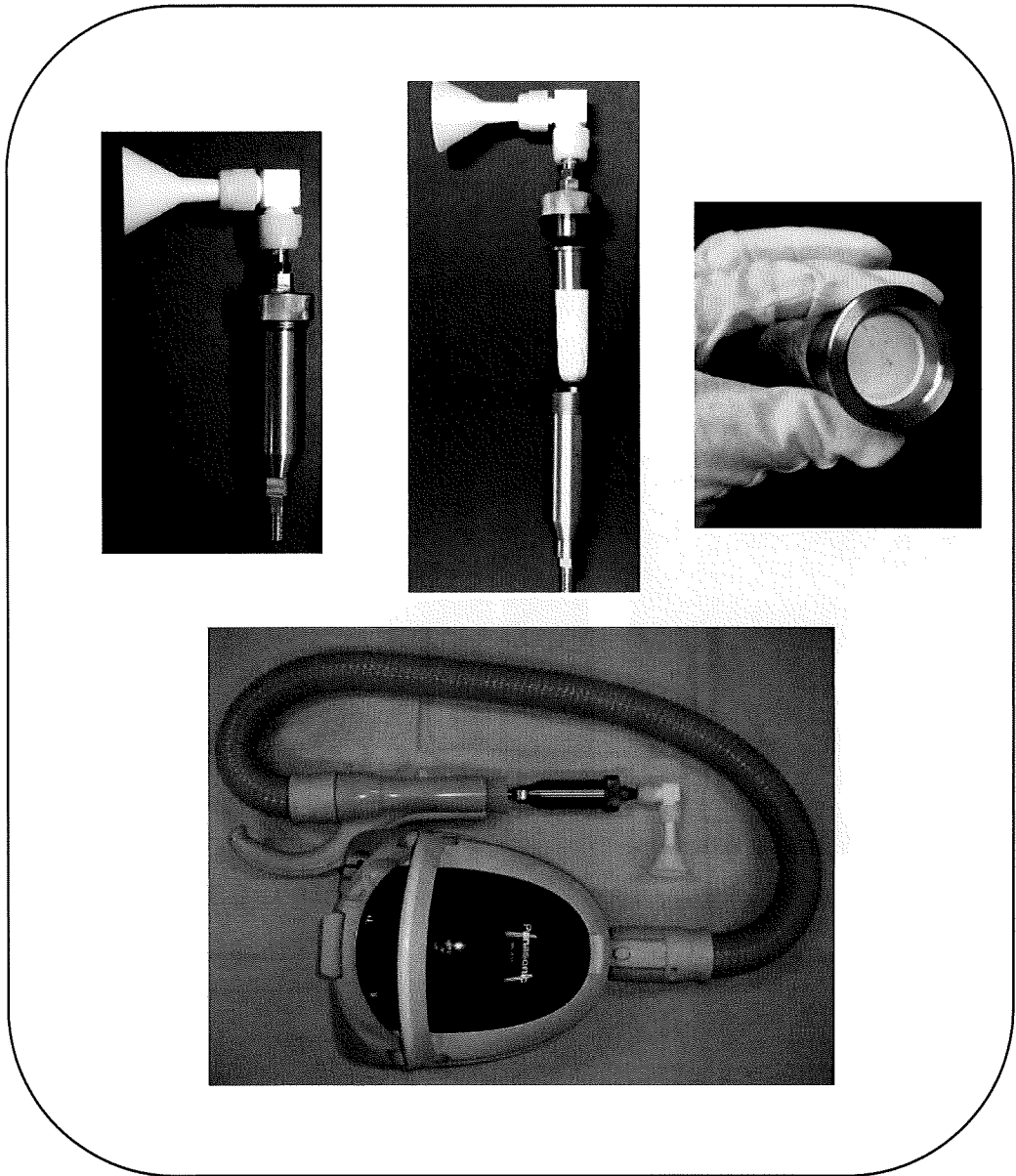


Fig. 1 Sampling Devices (House Dust)