

201035002A

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22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
平成22年度 総括・分担研究報告書

《目次》

I. 総括研究報告

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 3
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. 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
「LC/MS/MSを用いた胎児へのPFCs暴露量評価」 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の分析」
「人工授精卵培養液中のビスフェノールA及びノニルフェノールの分析」 18
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. 「ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の子どもへの暴露評価に関する研究」 31
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 37
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.....	47
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.....	54
分担研究者	杉野 法広 山口大学院医学系研究科
研究協力者	住江 正大 山口大学院医学系研究科
研究協力者	前川 亮 山口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：エピメュータゲン評価法に関する研究.....	72
分担研究者	塩田 邦郎 東京大学大学院 能楽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 能楽生命科学研究科細胞生化学
	新井 良和 東京大学大学院 能楽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	75
IV. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況.....	75
V. 健康危険情報	75
VI. 研究成果刊行物・別刷	76

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

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 3 年度は、多くの化学物質の中から、すでに絞り込まれた子どもの健康被害が想定しうる化学物質、とくに撥水剤などに多用される有機フッ素系化合物、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、19 種の重金属類などを研究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、体外受精各種培養液、周産期のヒト試料、とくに母体血、臍帯血、羊水、胎脂など 145 症例の試料を、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採取・提供した。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 細胞ではこれら 5 種の混合物ならびに 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、CORBA 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。以上より、マウス ES 細胞、ヒト iPS でのヘテロクロマチンを指標としたエピミュータゲン検出法を確立し、ヒト細胞のヘテロクロマチン形成、細胞分化への影響を評価することが可能となった。

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、およ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. LC/MS/MSを用いた胎児へのPFCs暴露量評価の研究

有機フッ素系化合物 (PFCs) であるパーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)、パーフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS)、パーフルオロオクタン酸 (PFOA)、パーフルオロノナン酸、(PFNA) は繊維類の撥水剤、界面活性剤、レベリング剤、消火剤、潤滑油および消泡剤などとして生活環境中で多用されている。PFCs は血中では極めて安定した難分解性の化学物質で、海洋性哺乳類、魚類および鳥類などの生態系で分解されることなく長期に残留することが報告されている。本研究では高感度、高特異性を有するLC/MS/MSを用いて、母体および臍帯血中のこれら物質を測定し、胎児への移行性の評価を行うことを目的とした。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル、オクタクロロジプロピルエーテル (S-421) 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。オクタクロロジプロピルエーテル (S-421) は殺虫剤の共力剤として使用され、生体内で難分解性、生物蓄積性が指摘されている。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。本研究では母乳試料46検体ならびに各種胚培養液について暴露状況を検討することを目的とした。

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。なお、平成22年度はそれまでの2年間の分析の延長として分析試料数をさらに追加して検討した。

5. 周産期の母親の血清および羊水中多元素一斉分析による新たな暴露評価法に関する研究

胎児に対する有害元素を含む多元素の暴露状況を明らかにするとともに、新たな多元素の暴露評価法を確立することを目的とした。この目的のために、すでに前年度までに確立したマイクロ波分析法による前処理法とICP-MS法を組み合わせた多元素一斉分析法を測定分析に供した。分析対象は山口大学病院で採取された同一32症例からの母体血、羊水合計64試料とした。

6. 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。同時に声ら145症例についてその生活習慣、住宅環境などアンケート解析した。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も検討した。

7. 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、とくに体外受精、胚培養、胚移植環境中で、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の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。生殖補助技術における胚培養環境について、現在生殖医療に使用されている培養器具ならびに胚培養液試料を可及的多数収集し分析の対象とした。本研究の分析・検討対象物質として、有機フッ素系化合物、フタル酸 (DEHP, MEHP),

ビスフェノールA (BPA), ノニルフェノール (NP), ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) とした。

8. 胎児へのエピジェネティクスな影響の解析： エピミ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(エピミュータゲン)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. LC/MS/MSを用いた胎児へのPFCS暴露

評価に関する研究

LC/MS/MSによるヒト生体試料、とくに母体血、臍帯血へのパーフルオロ化合物の暴露状態を分析した。PFOS, PFHxS, PFOA, PFNAは関東化学社製の標準品を用い、PFOS- $^{13}\text{C}_4$, PFOA- $^{13}\text{C}_2$ を内部標準とする定量法を採用した。試料はカラムスイッチング法で前処理し、胚培養液などはOasisWaxによる固層抽出法を用いた。測定にはWaters社製Quiattromicroを用いるLC/MS/MSで行った。測定対象は40組の同一症例から得られた母体血、臍帯血合計80試料ならびに各種胚培養液を分析した。

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

標準物質にはWellingtonLaboratories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、胚培養液などの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

血清および羊水中の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。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。

胎脂ならびに胚培養液中の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製試験管に回収した。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. 周産期の母親の血清およ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

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、鉛の19元素を分析対象とした。測定元素標準品は ICP Multi-Element Standard (AccuStandard) を、内部標準元素としてスカンジウム (Sc), イットリウム (Y), イリジウム (Ir) は ICP 標準液 (メルク) を用いた。マイクロ波前処理法のあと、Agilent 7500i (横河アナリチカルシステムズ) を使用して ICP-MS 法にて母体血、羊水32組計64試料を測定分析した。

6. 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。その結果、平成22年6月までに計145症例の母体血、母体尿、母乳、羊水、臍帯血、胎脂を採取した。アンケート調査票は入院後に配布し、退院前に回収した。

7. 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(NP), 有機フッ素系化合物 (PFCS), ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs), フタル酸エステル類を測定検討した。体外受精-胚移植に関する試料は、精子調整液、fertilization medium, cleavage medium, blastocyst medium, 血清など臨床で汎用されている製品を数社から時間的な間隔をとって2ロットずつ入手し分析対象とした。

8. 胎児へのエピジェネティクスな影響の解析:

エピミュ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量を、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。また 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 20 組、合計 60 検体について行い前年度までの 22 症例と併せて分析した。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 11 人から 0.4-2.6ng/ml (検出限界値: 0.2ng/ml)、TCP は 3 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 126 試料全てで検出下限値 (0.5ng/ml) 以下であった。

2. LC/MS を用いた胎児への F E C s 暴露評価に関する研究

試料をカラムスイッチング法による前処理自動化を図ることにより分析精度が向上した。その結果、測定限界値を PFOS, PFOA, PFNA は 0.5ng/ml, PFHxS, PFBS, PFOSA は 1.0ng/ml に設定することに成功した。この分析法を用いて 40 症例の母体血、臍帯血の P F C s を解析したところ、PFOS, PFOA が高頻度で検出され、母体血から臍帯血への移行する相関性が認められた。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル、S-421 の子どもへの暴露評価に関する研究

前年度のハウスダスト分析に引き続き、本年度は合計 46 症例の母乳試料測定・分析した。その結果全て検体から PBDEs が検出され、その濃度は平均で 88pg/g (range: 14-340pg/g), S-421 は 42 検体から平均濃度 56pg/g (range: 10-330pg/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

本年度は母体血 49 症例、臍帯血は 44 症例、羊水 13 例を新たに追加し、それぞれ合計 97、99、41 症例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 36.1%, 臍帯血清で 20.4%、羊水で 51.2% に検出された。

MEHP は母体血清の 22.7% に定量下限 (2.0ng/ml)

を超えて、臍帯血清では 14.3%、羊水では 65.9% 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, MEPH 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=28) 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. 周産期の母親の血清およ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

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) にて母体血中、羊水中の 19 元素を測定・分析し、以下の結果を得た。羊水/母体血清の濃度比は Cu が 0.05、Se が 0.11、Hg が 0.21 と羊水中の濃度が低く、Ni が 3.8、Mn が 2.9 と羊水中の濃度が高い傾向を示した。Fe, Zn, Li, Co, Cd を除く 14 元素で母体血中と羊水中で有意差が見られた。Sr, Li, Mg, Ca, Mo で母体血と羊水中で濃度の相関が見られた。

6. 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 6 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 145 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 15、前置胎盤症例

4 からも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。

その結果、測定対象の多くの化学物質が母体血中、臍帯血中で検出し得て、わが国におけるこれら化学物質の暴露標準濃度の情報を得ることが出来た。

7. 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。

一方、実際の体外受精—胚移植に供されている各種培養液、精子調整液、血清などを分析すると、本研究で周産期の母児環境で検討した多くの化学物質が、母児への暴露量をはるかに超える高濃度で検出された。具体的には、ノニルフェノールが 16 種 26 試料から 5.3-164ppb の濃度で、MEHP は胚培養液で最高値 131ng/ml、精子調整液で 263ng/ml、添加用人血清アルブミン溶液からは 1840ng/ml の濃度でそれぞれ検出された。DEHP の検出最高値は胚培養液で 65.2ng/ml、精子調整液で 112ng/ml、添加用人血清アルブミン溶液で 982ng/ml であった。有機フッ素系化合物については PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS いずれの化合物とも高頻度 (60-100%) で検出され、とくに PFOS は添加用人血清アルブミン溶液で 2.35 ± 2.48 ng/ml、最高値は 6.73ng/ml であった。ポリ臭素化ジフェニルエーテルは胚培養液、精子

調整液、添加用アルブミン液など合計30試料の内、23試料から検出され、その検出濃度は0.6-385pg/gの範囲であった。

8. 胎児へのエピジェネティクスな影響の解析

解析：エピミ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(DEF, 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 DEF 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、DEF 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、DEF、Se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ー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。

三年研究の第三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、測定前に挟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 DEF 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、化学物質の新しい毒性評価として、エピジェネティクスの手法を応用し、ヒト iPS 細胞を用いてより具体的なエピミュータゲンを解析する新しい評価方法を確立した。

F. 健康危険情報

体外受精に用いる各種培養液、調整液に混入する化学物質については、今後より慎重な検討が必要である。

G. 研究発表

報告書巻末の III. 研究成果の刊行に関する一覧表、IV. 研究成果の刊行物・別冊の項に一括してまとめた。

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
「LC/MS/MS を用いた胎児への PFCs 暴露量評価」

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

胎児は臍帯血を通じて妊婦からさまざまな化学物質に暴露される可能性がある。有機フッ素系化合物 (PFCs) は撥水剤などに使用され、生活環境中で広範囲に存在しているため、ヒトへの暴露が懸念されている。本研究では、これら化学物質の胎児への暴露実態を評価するために、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いた、生体試料 (母体血清、臍帯血清) 中の当該化学物質の分析法を構築した。また、細胞培養液中の PFCs の測定も行い、体外授精による胎児への暴露評価も併せて行った。

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。

有機フッ素系化合物 (PFCs) であるパーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)、パーフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS)、パーフルオロオクタン酸 (PFOA)、パーフルオロノナン酸 (PFNA) は、繊維類の撥水剤、界面活性剤、レベリング剤、消火剤、潤滑油および消泡剤等として用いられている。特に、PFOA は、テフロン加工製品にも使用されていることから、PFCs は、我々の生活環境中で広範囲に存在している。しかし、PFCs は極めて安定な化学物質であると考えられており、河川水、海洋性哺乳類、魚類

および鳥類等、生態系で分解することなく、長期にわたり残留することが報告されている。このため、環境省でも PFOS および PFOA は第二種化学物質に設定された。他方、当研究室でも約 700 検体のヒト血液中の PFCs 測定において、PFOS は血液中から高い頻度で検出されている。ヒト血清は、輸血以外に血液製剤や体外受精の細胞培養の操作においても使用される。そのため、ヒト血清を材料とする細胞培養液を使用することで、受精卵への PFCs 暴露が懸念される。

本研究では、高感度・選択性を有する LC/MS/MS を用いて母体および臍帯血清中の当該化学物質を測定し、胎児への移行性評価を行った。また、細胞培養液と細胞培養液に添加する血清関連製剤中における

PFCs の分析を試みた。

B. 研究方法

B-1. 標準品および試薬

パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)、パーフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS)、パーフルオロオクタン酸 (PFOA)、パーフルオロノナン酸 (PFNA) は関東化学社製を使用した。サロゲート物質として PFOS-¹³C₄、PFOA-¹³C₂ を用いた内標準法によって定量した。細胞培養液の前処理には固相抽出法を適用し、Waters 社製 Oasis WAX (1 cc、30 mg) による試料の精製・濃縮を行った。測定には液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計を使用した。

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、Multiple Reaction Monitoring (MRM) により分析した。LC の分離条件として、Xbridge C18 (100 mm × 2.1 mm、5 μm) を使用した。

ヒト血清中 PFCs の測定は、試料の前処理方法としてカラムスイッチング法を採用し、測定対象物質の濃縮とクリーンアップを閉鎖系で行った。細胞培養液中 PFCs の前処理方法には固相抽出法を採用し、試料の精製、濃縮を行った。

B-3. PFCs の前処理方法

ヒト血清中 PFCs の前処理操作はカラムスイッチング法によって行い、固相抽出法の自動化を図った。

細胞培養液中 PFCs の測定には、Oasis WAX による固相抽出法を採用し、試料の精製と

濃縮を行った。固相抽出条件は、洗浄溶媒に精製水 (1 mL)、10 mM ギ酸溶液とメタノール (1 mL) を使用し、3 %アンモニア含有アセトン (1 mL) で固相カートリッジから PFCs 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 0.1 mL 加えて再溶解させ、LC/MS/MS の測定に供した。

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 40 組、合計 80 検体を測定試料とした。

また、細胞培養液は山口大学から提供された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. 母体および臍帯血清中 PFCs の測定

C-1-1. 試料前処理方法の最適化

母体および臍帯血清中 PFCs の測定は仲田ら¹⁾の方法を参考に行った。前処理方法にカラムスイッチングシステムを構築したことで、前処理の自動化を図ることができ、分析精度が向上した。本分析法を用い、血清試料における定量限界 (S/N > 10) を求めたところ、PFOS、PFOA および PFNA は 0.5 ng/mL、PFHxS、PFBS および PFOSA は 1.0 ng/mL と高感度な分析法の構築が達成された。

他方、細胞培養液中にはさまざまな夾雑物質が含まれており、検出される PFCs の濃度が微量であることが推定されたため、試

料の精製、濃縮が可能な固相抽出法を検討した。固相カートリッジの選定にはNISTで推奨されている、逆相-弱陰イオン交換ミックスマードのOasis WAXを用いて、検討した²⁾。添加回収試験の結果、平均回収率87.0%以上 (R. S. D. \leq 8.7%, n = 6) と良好な結果を得ることができた。

C-1-2. 母体、臍帯血中 PFCs の測定

PFCs の臍帯への移行性を評価するために、ヒト妊婦の母体血清、臍帯血清 (n = 40) の分析を行った。その結果、母体、臍帯血清ともに、PFOS、PFOA が高頻度で検出された。得られた定量結果をもとに、胎児への移行性評価を試みたところ、PFOS および PFOA で相関性が認められた (Fig. 1)。

C-1-3. 細胞培養液中 PFCs の分析

体外授精に使用されている細胞培養液中の PFCs の測定を行った。LC/MS/MS により、測定を行った結果、血清が添加されている培養液から PFCs が検出された。また、血液関連製剤からは、ヒトから検出される濃度で検出された (Table 1 および Fig. 2)。

D. 結論

本研究において測定対象とした母体血清、臍帯血清試料には、多種多様な夾雑物質が含有されている。

母体、臍帯血清中 PFCs の測定を行ったところ、PFOS および PFOA は高頻度に検出された。そのため、ペア検体の母体および臍帯血清 (n = 40) について解析を行った。その結果、臍帯血清中の濃度が母体血清中の濃度との間に有意な相関性が見られた (PFOS; $r = 0.62$, PFOA; $r = 0.85$)。

このことから、PFCs は、ヒト母体血から臍帯血を介して、胎児へ移行していることが示唆された。また、細胞培養液からも PFCs が低濃度ではあるが検出された。

臍帯血の分析結果は、化学物質が母体血から胎盤を介して臍帯血に移行することが示唆しており、子どもは胎児期からさまざまな化学物質に暴露していることが示唆された。そのため、感受性の高い幼児については慎重な評価が必要であると考えられる。

E. 参考文献

1. 仲田 尚生, 中田 彩子, 岡田 文雄, 伊藤 里恵, 井之上 浩一, 斉藤 貢一, 中澤 裕之: 分析化学 54 (2005) 877-884.
2. Keller J.M., Calafat A.M., Kato K., Ellefson M.E., Reagen W.K., Strynar M., O'Connell S., Butt C.M., Mabury S.A., Small J., Muir D.C., Leigh S.D., Schantz M.M. Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 439-451.

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

G-1. 学会発表

- 1) 中澤 裕之¹、井之上 浩一²、岩崎 雄介¹、伊藤 里恵¹、斉藤 貢一¹、牧野 恒久³、和泉 俊一郎⁴、岸 玲子⁵、杉野 法広⁶
(¹星薬大、²金城学院大薬、³東部病院、⁴東海大医、⁵北大医、⁶山口大医)
・有機フッ素系化合物のLC-MS/MSによる微量分析とヒト暴露評価への展開。

日本薬学会第130年会

(2010年3月28-30日 岡山県)

- 2) 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日 岡山県)

- 3) 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

(¹星薬大、²山口大、³東部病院)

・HILIC-MS/MS法を用いた母体および臍
帯血清中のニコチン代謝物質の測定.

第71回分析化学討論会

(2010年5月15-16日 島根大学)

- 4) 寺山 絵美¹、岩崎 雄介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

(¹星薬大、²山口大、³東部病院)

・LC/MS/MS による体外受精用細胞培養
液中の有機フッ素系化合物の分析.

第54回日本薬学会関東支部大会

(2010年10月2日 東京薬科大学)

quantification of nicotine and its
metabolites in human maternal and
cord sera. *Biomed. Chromatogr.* 25
(2011) 502-510.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G-2. 発表論文

- 1) Y. Iwasaki, M. Goto, K. Mochizuki, E.
Terayama, R. Ito, K. Saito, N. Sugino,
T. Makino, H. Nakazawa:
Development and validation of a
hydrophilic interaction
chromatography-
tandem mass spectrometry for

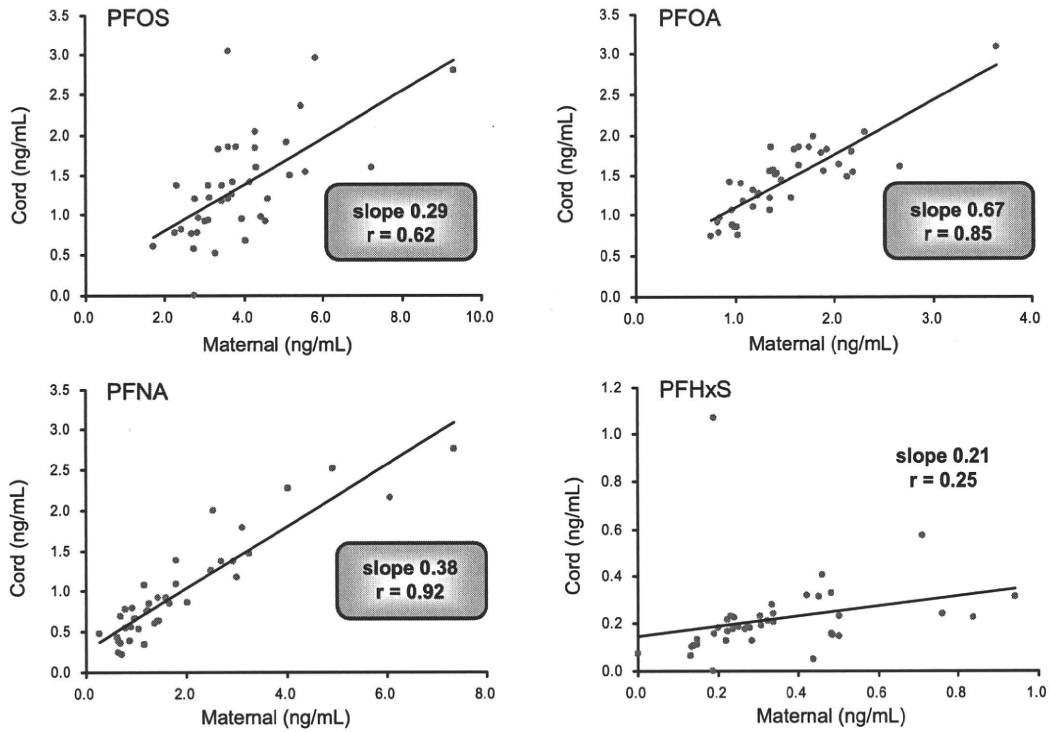


Figure 1

Correlation of PFCs between maternal and cord serum (n = 40)

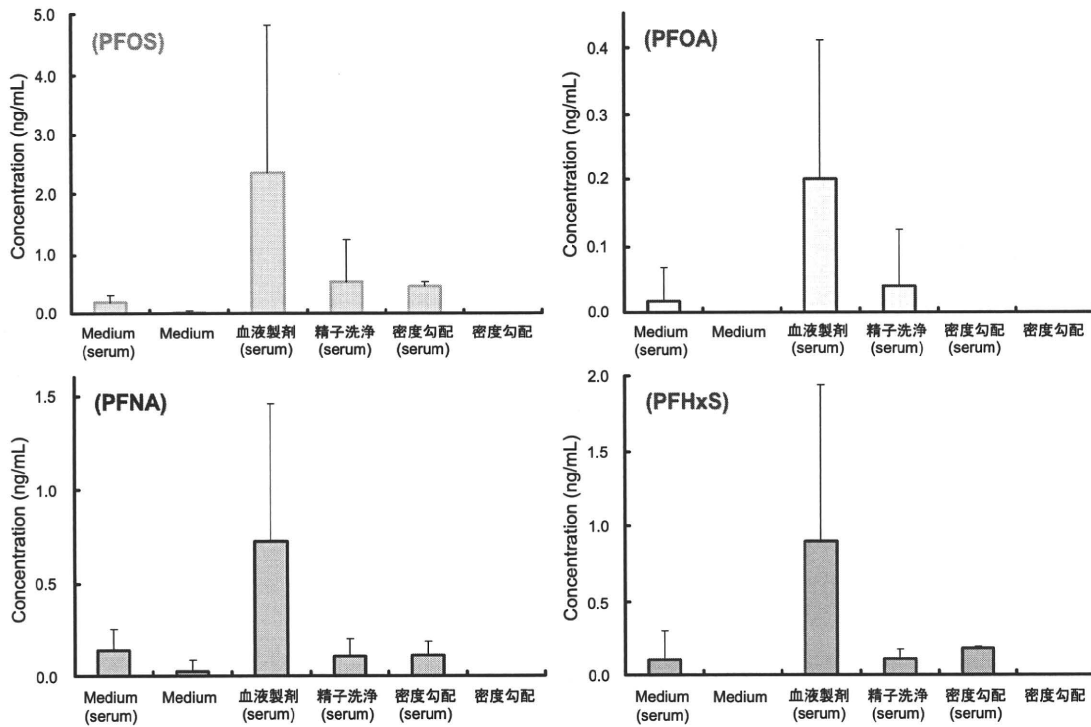


Figure 2

Comparison of PFCs in artificial nutrient medium

Table 1

Quantification of artificial nutrient medium

Analytes	(ng/mL)	PFOS	PFOA	PFNA	PFHxS	PFBS
Medium	Rate (%)	89 (16/18)	11 (2/18)	67 (12/18)	78 (14/18)	0 (0/18)
(+ serum)	Ave.	0.20 ± 0.12	0.02 ± 0.05	0.14 ± 0.12	0.10 ± 0.20	-
	Max	0.42	0.19	0.27	0.89	-
Medium	Rate (%)	8 (1/12)	0 (0/12)	17 (2/12)	0 (0/12)	0 (0/12)
	Ave.	0.01 ± 0.04	-	0.02 ± 0.06	-	-
	Max	0.14	-	0.21	-	-
.....						
Human serum	Rate (%)	100 (11/11)	55 (6/11)	82 (9/11)	55 (6/11)	9 (1/11)
(+ serum)	Ave.	2.35 ± 2.48	0.20 ± 0.21	0.72 ± 0.74	0.90 ± 1.04	0.13 ± 0.43
	Max	6.73	0.58	2.50	2.17	1.42
.....						
Sperm medium	Rate (%)	100 (10/10)	20 (2/10)	60 (6/10)	90 (9/10)	0 (0/10)
(+ serum)	Ave.	0.54 ± 0.71	0.04 ± 0.09	0.11 ± 0.10	0.11 ± 0.07	-
	Max	2.53	0.22	0.25	0.21	-
.....						
Sperm gradient	Rate (%)	100 (4/4)	0 (0/4)	75 (3/4)	100 (4/4)	0 (0/4)
(+ serum)	Ave.	0.46 ± 0.08	-	0.11 ± 0.08	0.18 ± 0.01	-
	Max	0.54	-	0.18	0.20	-
Sperm gradient	Rate (%)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)

「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」
「人工授精卵培養液中のビスフェノール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

胎児及び妊産婦への農薬及びビスフェノール A の暴露評価を行った。有機リン系農薬については昨年度、開発した農薬の主代謝物である2種のジアルキルリン酸 (Dimethyl phosphate: 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高感度分析法を用いた。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) については、一昨年度、開発した分析法を用いて、ピレスロイド系農薬は暴露指標に 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) を、クロルピリホスは 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) を、BPA はそのものを対象とした。妊産婦20人の母体尿、母体血清、臍帯血中の分析を行い、すでに昨年度までに測定が終了している22人の結果と併せて暴露評価を行った。有機リン系農薬代謝物はほとんどの妊産婦からいずれかの代謝体が検出され、その濃度は DMP が 0.9~57.1 ng/mL, DEP が 0.2~25.9 ng/mL, DMTP が 0.2~92.3 ng/mL, DETP が 0.3~14.5 ng/mL の濃度範囲であった。3-PBA はグルクロン酸抱合体として11人から 0.2~2.6 ng/mL 検出された。TCP は3人から 0.6~1.3 ng/mL 検出された。一方、BPA はすべての試料で定量下限値以下であった。

人工授精卵への培養液を介した BPA とノニルフェノール (NP) の暴露状況を把握するために、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた培養液中の BPA 及び NP の同時分析法を開発した。培養液及びヒト血清 30 種各 2 ロットについて分析したところ、16 種 26 試料から 5.3~164ppb の濃度範囲で NP を検出した。BPA は定量下限値以下であった。

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。

その中で有機リン系農薬は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で健康影響評価がなされている。

そこで、今年度は昨年度までに開発した有機リン系農薬及びピレスロイド系農薬代謝物、ビスフェノールAを対象化合物とした高感度分析法を用いて、妊産婦20人の母体尿、母体血清及び臍帯血の生体試料60試料について分析を行った。また、すでに昨年度までに測定を終了した22人の分析結果と併せて暴露評価を行った。

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環境を介した化学物質の暴露評価は緊急を要する検討課題である。昨年度は培養器材（培養ディッシュ）からの暴露評価を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) を対象物質として実施した。そこで、今年度は、人工授精卵培養時の培養液を介した暴露を評価するために、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた分析法を開発し、汎用されている

培養液及びヒト血清30種各2ロットを対象に分析を行った。

B. 研究方法

1. 試料

1-1. 生体試料

山口大学から提供いただいた同一人の母体尿、母体血清及び臍帯血20組合計60検体を分析対象試料とした。

1-2. 培養液及びヒト血清

山口大学から提供いただいた市販の人工授精卵の培養液15種、ヒト血清6種、精液調製液9種それぞれ2ロットの合計59試料（ヒト血清1種については1ロットのみ）を分析対象試料とした。

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-methyl)octylphenol-d5 (4-NP-d5) は林純薬工業社製, Dimethyl phostate (DMP) 及び Diethylphosphate (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