

標準溶液及び内部標準溶液とした。

試薬： $\beta$ -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 (PFBBBr) 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. 培養液中の 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. 培養液中の 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. 尿及び血清中の有機リン系農薬代謝物の分析

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體化し、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. 培養液中の BPA 及び NP の分析

培養液 5mL 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 250ng 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 2.5mL で溶出した。精製水で 5mL に定容し、試験溶液とした。また、一部のヒト血清試料については「6-2」と同様に脱グルクロン酸抱合体処理を行い、精製操作を行った。

C. 結果及び考察

1. 妊産婦の農薬の暴露状況について

昨年度までに分析の終了した妊産婦 22 人の試料の結果と今年度分析した試料 20

組 60 検体を併せた母体尿，母体血清，臍帯血 42 組 126 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：36/42)，DEP は 0.2~25.9 ng/mL (34/42)，DMTP は 0.2~92.3 ng/mL (35/42)，DETP は 0.3~14.5 ng/mL (35/42) の濃度範囲で検出された (定量下限値：DMP は 0.5ppb，それ以外は 0.2ppb)。

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>1,2)</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，検出された濃度範囲と検出数に関するグラフを図 1 に示した。尿中濃度では DMP，DEP 及び DMTP は 1~5ppb の濃度範囲の検出数が最も多く，また，DMP は 20ppb 以上の濃度で検出される試料があった。DETP は定量下限値以下の試料が多く，また検出されても，定量下限値~1ppb の濃度範囲の試料が多かった。母体血清では逆に DMP，DEP 及び DMTP と比較し，DETP の検出率が高く，検出された濃度範囲も 5~10ppb を中心に分布していた。臍帯血については母体血清と同様な傾向が観察され，検出濃度は母体血清よりも低濃度側分布していた。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。

一方，農業従事者の有機リン系農薬散布後の尿からは数百~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>3)</sup>されている。それらの検出濃度と比較すると，本検討で妊産婦生体試料から検出された濃度は低濃度であるといえる。しかし，全ての妊産婦からいずれかの代謝物が検出されていることから，低濃度ながらも有機リン系農薬の暴露を受けてい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 11 人の尿から 0.4~2.6ppb (検出下限値：0.2ppb) 検出された。そのうち 4 人の母体血清から 0.2 及び 0.3ppb の 3-PBA が検出された。また，4 人の臍帯血からも 0.2ppb の 3-PBA が検出された。TCP は 3 人の尿から 0.6，1.2 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。

## 2. 妊産婦の BPA の暴露状況について

母体尿，母体血清及び臍帯血 42 組 126 検体すべてで定量下限値 (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た。

## 3. 培養液中の BPA 及び NP の分析法

培養液中の BPA 及び NP の分析法については昨年度，培養器材からの溶出について検討した方法を応用した。培養液に 50ppb となるように添加した内部標準物質の平均回収率は BPA-d16 で 95.6±4.7%，4-NP-d5 で 88.4±6.2%，4-n-NP で 92.1±7.9% であった (n=5)。

試料に水を用いたブランク試験で分岐型 NP が検出されたことから，定量下限値はブ

ランク試験 (n=5) で検出した値の平均値+10SD を定量下限値とした (5ng/mL). 直鎖型4-*n*-NP 及び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0.5 ng/mLとした.

本法を用いて、臨床で汎用されている培養液、ヒト血清、代替血清及び精液調製液30種各2ロットの合計59試料について分析を行った。市販されている培養液からBPAは検出されなかったことから、培養液からの授精卵及び精子のBPAの暴露の可能性は低いものと考えられた。

一方、分岐型4-NPについては授精卵培養液及び精子培養液10種15試料から5.3~21.7ppb 検出した。また、ヒト血清アルブミン及び代替血清については全ての試料6種11試料から検出され、その濃度範囲は5.5~164ppbであった。(表6、図2)。4-NPを検出した培養液はいずれもヒト血清を添加している試料であり、検出された4-NPは血清由来である可能性が高いと考えられた。また、2ロットについて分析を行ったが、同じ製品ではロットが異なっても検出濃度について、同様な傾向が見られた。

NPは生体中でグルクロン酸抱合体として存在することが報告されていることから、ヒト血清試料の一部について、脱グルクロン酸抱合体処理を行い、遊離体との濃度を比較したところ、グルクロン酸抱合体として存在していたのは不検出~1ppb程度であった。このことから、ヒト血清中のNPは原料の血清ではなく主として、採血後、製品への製造過程でのコンタミネーションにより検出されたものと考えられた。

## D. 結論

### 1. 妊産婦及び胎児の農薬の暴露

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3人から、ピレスロイド系農薬代謝体(3-PBA)は11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. 人工授精卵の培養液からのBPA及びNPの暴露

授精卵培養液、ヒト血清及び精液調製液中のBPA及びNPの濃度について分析したところ、16種26試料から分岐型NPを5.3~164ppb 検出した。これらはいずれもヒト血清か代替血清あるいはこれらが添加されている試料であることから、血清由来であることが考えられた。

また、BPAはいずれの試料からも検出されなかったことから、暴露の可能性は低いものと考えられた。

## E. 参考文献

- 1) 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.
- 2) S. Dulaurent et al. Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chrom*

atogr. B, 831 (2006) 223-229.

- 3) 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

なし

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 μm)
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 μL
注入口:	アイスティサイエンス社製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 μm)
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 μL

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
		2-PBA	213>93	25

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 μm)
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 μL

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. 培養液中のBPA及びNP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 μm)
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 μL

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
	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、胎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	母体血清	胎帯血	母体尿	母体血清	胎帯血	母体尿	母体血清	胎帯血	母体尿	母体血清	胎帯血	母体尿	母体血清	胎帯血	母体尿	母体血清	胎帯血
1	2412099	N.D.	8.4	4.5	N.D.	0.3	N.D.	N.D.	11.4	N.D.	0.5	5.4	2.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2	1886980	N.D.	18.0	0.9	18.4	0.3	N.D.	92.3	22.2	0.5	N.D.	6.0	1.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	2363506	N.D.	8.4	1.8	7.0	0.3	0.3	31.6	11.4	0.4	0.7	5.4	1.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	1111810	10.0	9.3	1.1	5.7	0.3	N.D.	9.1	15.2	N.D.	N.D.	6.3	1.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	80003	10.8	8.2	14.0	2.5	0.5	N.D.	8.7	20.7	N.D.	N.D.	3.2	1.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	2544544	22.8	9.3	2.5	6.4	0.3	0.4	10.1	14.4	N.D.	1.4	6.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	2545473	24.8	12.5	N.D.	25.9	0.2	0.3	64.8	20.2	N.D.	N.D.	5.0	1.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.3	0.3	N.D.
8	2472980	3.7	12.8	5.2	0.9	0.2	0.1	1.5	19.3	N.D.	N.D.	5.9	1.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9	1664014	15.8	4.8	N.D.	3.2	N.D.	N.D.	3.8	10.6	N.D.	N.D.	9.0	1.8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10	2442275	33.0	N.D.	3.8	2.7	N.D.	N.D.	11.8	N.D.	N.D.	N.D.	11.3	4.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	2289985	N.D.	7.8	8.0	8.9	N.D.	N.D.	15.2	N.D.	N.D.	N.D.	12.5	4.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	2558353	41.2	N.D.	N.D.	5.0	N.D.	N.D.	3.1	N.D.	N.D.	N.D.	14.5	4.5	0.8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13	2568850	N.D.	2.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.5	4.5	N.D.	N.D.	N.D.	0.6	N.D.	N.D.
14	2568705	44.4	0.0	1.3	18.8	N.D.	N.D.	28.4	N.D.	N.D.	1.3	8.3	6.8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	2168783	51.6	1.9	4.8	4.8	N.D.	N.D.	14.1	N.D.	N.D.	2.4	8.1	1.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16	1235979	31.8	N.D.	N.D.	1.4	N.D.	N.D.	2.2	N.D.	1.9	N.D.	5.8	2.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	2424282	83.3	N.D.	N.D.	3.1	0.2	N.D.	1.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	36482	N.D.	9.3	N.D.	2.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
19	962159	24.6	N.D.	N.D.	4.2	N.D.	N.D.	1.6	N.D.	N.D.	0.7	9.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	372466	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.3	N.D.	1.3	0.9	N.D.	2.4	N.D.	N.D.
21	902795	57.1	7.8	N.D.	12.6	N.D.	N.D.	5.9	N.D.	N.D.	N.D.	6.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
22	613483	23.8	N.D.	N.D.	5.2	N.D.	N.D.	2.1	N.D.	N.D.	N.D.	13.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
23	2422060	5.4	1.2	N.D.	10.2	4.3	2.0	2.6	1.4	N.D.	12.5	10.4	2.6	N.D.	N.D.	N.D.	0.9	N.D.	N.D.
24	2253590	5.2	1.0	0.9	5.4	0.5	0.2	2.1	2.2	N.D.	0.3	3.8	1.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
25	2337590	20.7	10.4	2.4	0.2	N.D.	N.D.	1.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.9	N.D.	N.D.
26	1216605	0.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.6	1.3	N.D.	8.2	4.2	3.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
27	2053854	18.9	9.9	2.9	11.9	0.5	N.D.	3.4	2.1	N.D.	N.D.	0.9	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	0.7	0.2	0.2
28	2558985	14.8	6.0	1.3	18.3	4.9	0.4	23.3	16.4	3.8	12.7	5.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.8	0.2	0.2
29	2368823	N.D.	N.D.	N.D.	3.6	1.0	N.D.	0.4	2.8	N.D.	N.D.	1.0	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
30	2661710	N.D.	1.4	N.D.	1.4	0.2	N.D.	1.0	N.D.	N.D.	4.2	2.9	2.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
31	1752455	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.8	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
32	1692859	8.3	N.D.	1.1	0.2	N.D.	N.D.	5.3	N.D.	0.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
33	992322	N.D.	N.D.	N.D.	6.4	0.7	0.2	N.D.	10.3	N.D.	0.3	N.D.	0.3	N.D.	N.D.	N.D.	0.9	N.D.	N.D.
34	1450236	4.2	N.D.	N.D.	N.D.	0.2	N.D.	2.9	2.9	<0.2	4.8	2.9	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	0.4	0.2	0.2
35	1563326	0.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.2	N.D.	N.D.	0.7	N.D.	N.D.
36	1409577	3.4	1.0	0.9	N.D.	N.D.	N.D.	0.4	0.6	0.3	8.6	11.4	2.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
37	2664744	2.9	N.D.	N.D.	8.4	7.8	0.4	0.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.2	N.D.	0.2
38	1934349	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.6	4.2	1.9	0.9	5.3	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
39	620623	11.4	8.9	4.8	3.6	2.0	0.6	9.1	3.8	N.D.	2.4	3.2	0.8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
40	97308	N.D.	N.D.	N.D.	0.5	0.2	N.D.	0.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
41	2651641	1.0	N.D.	N.D.	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.4	5.2	1.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
42	2412188	2.3	2.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.8	2.4	N.D.	3.8	0.9	1.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.



表6.

分類	血清添加	製品名	4-ノニルフェノール		4-n-ノニルフェノール		ビスフェノールA	
			ロット1 ppb	ロット2 ppb	ロット1 ppb	ロット2 ppb	ロット1 ppb	ロット2 ppb
Medium	+	medium 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	medium 2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	medium 3	7.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	medium 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	medium 2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	medium 3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	medium 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	medium 2	14.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	medium 3	N.D.	8.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	-	medium 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	-	medium 2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	-	medium 3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	-	medium 1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	-	medium 2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	-	medium 3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Human serum		serum 1	77.3	54.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		serum 2	17.1	9.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		serum 1	19	11.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		serum 2	69.5	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
		serum 1	11	5.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sperm medium		Human serum albumin	164	85.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	Sp-wash-medium 1	N.D.	5.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	Sp-wash-medium 1	16.5	8.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	Sp-wash/grad-medium-kit 1	21.7	14.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	"	5.7	6.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sperm gradient	+	Sp-wash-medium 1	7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	Sp-gradient-medium 1(high/low)	13.7	7.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	+	"	11.9	8.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	-	Sp-gradient-medium 1(high/low)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
(濃度勾配作製用)	-	"	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

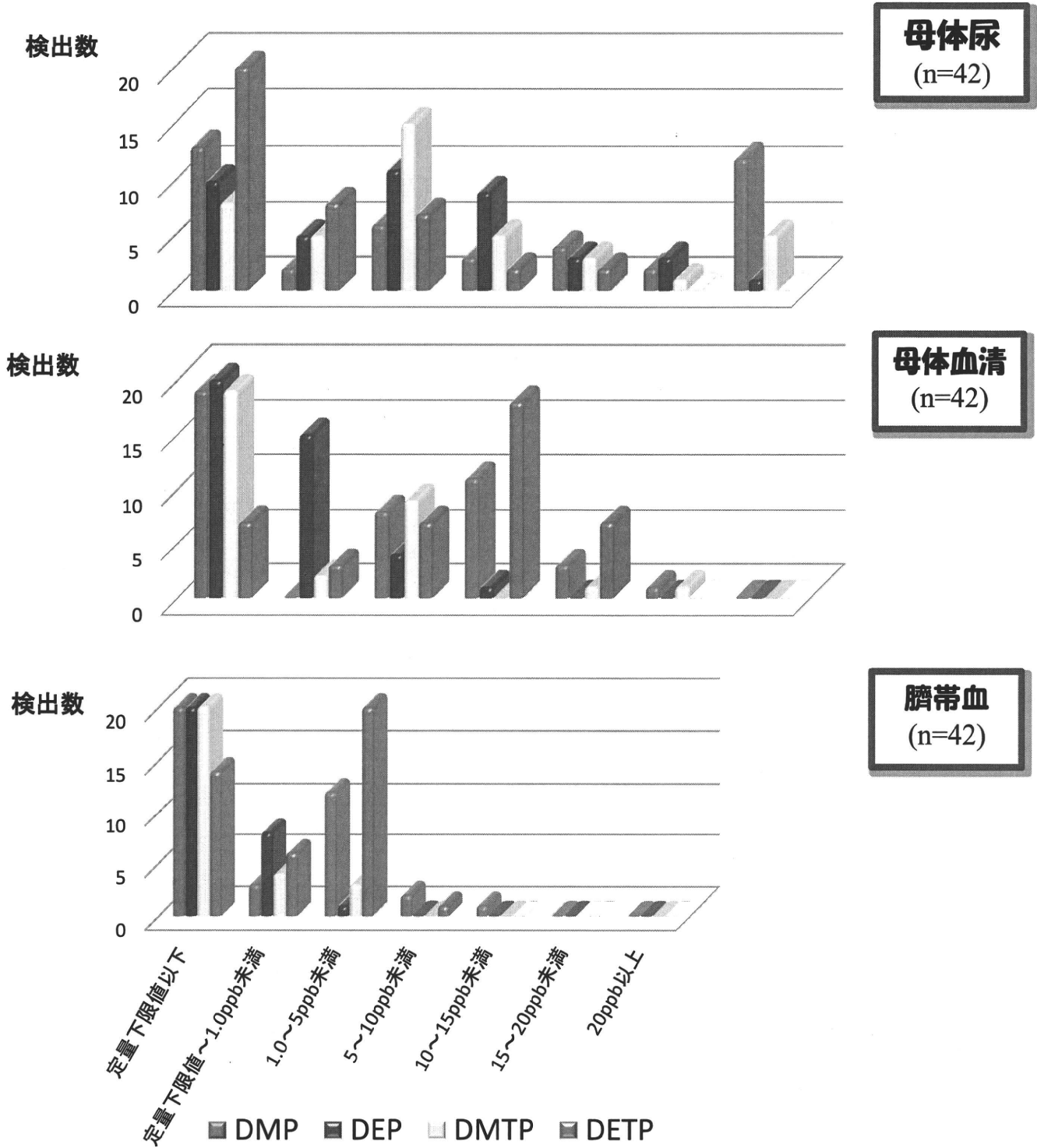
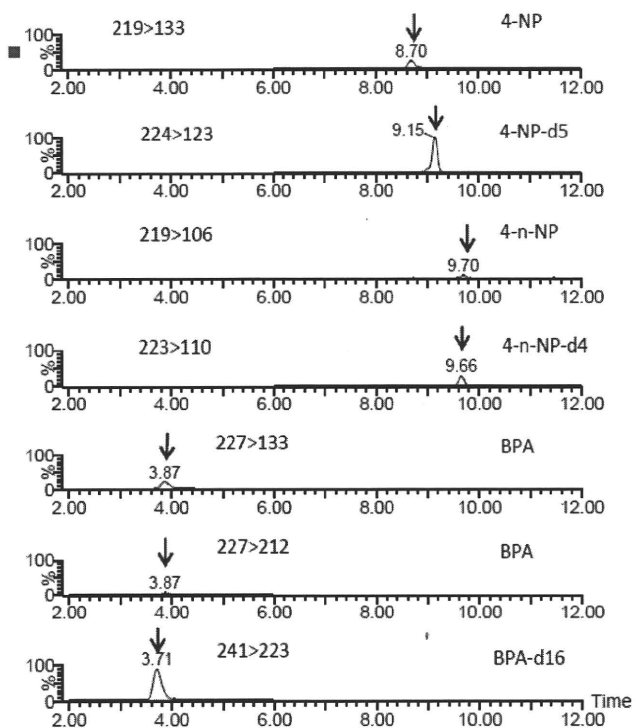
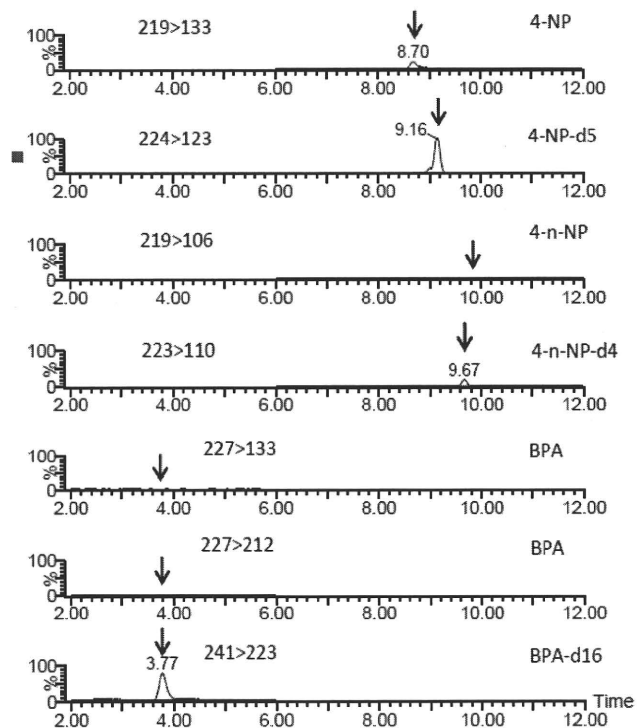


図1. 母体尿, 母体血清及び臍帯血中の有機リン系農薬代謝物の濃度



(A) 標準溶液 10ppb



(B) ヒト血清 (4-NP (11.7ppb) を検出)

図2. ノニルフェノール及びビスフェノールAのクロマトグラム

「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」

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
	高取 聡	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、山口大学医学部附属病院で採取された母乳試料 26 検体中の PBDEs およびオクタクロジプロピルエーテル（S-421）の分析を行い、既に昨年度までに分析が終了している 20 検体の結果と併せて暴露評価を行った。その結果、母乳試料 46 検体の全てから PBDEs が、また 42 検体から S-421 が検出され、PBDEs および S-421 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）および S-421 濃度は平均で各々 88 pg/g（範囲：14～340 pg/g）、56 pg/g（範囲：<10～330 pg/g）であった。

体外受精時の胚培養環境における PBDEs の暴露評価を目的として、体外受精用培養液および関連製剤の分析法を構築し、実試料の分析を行った。山口大学医学部附属病院から提供された体外受精用培養液およびその関連製剤 30 検体を分析した結果、23 検体から PBDEs（範囲：0.6～385 pg/g）が検出され、ヒト血清アルブミン（原料ヒト血液）が主な汚染原因であると推測された。

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。PBDEs は残留性有機汚染物質（POPs）として近年問題視されており、動物実験で甲状腺機能や脳神経機能の障害作用が示唆されていることから、ヒトの健康への悪影響が懸念されている。

オクタク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ている化学物質である。比較的毒性であるが、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。

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、まず、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。さらに先行的研究として体外受精用培養液および関連製剤中の PBDEs 分析法を構築し、実試料の分析を行った。

B. 研究方法

B.1. 試料

B.1.1. 母乳

2009年に山口大学医学部附属病院で採取された26検体の母乳試料を分析に供した。

B.1.2. 体外受精用培養液および関連製剤

山口大学医学部附属病院から提供された海外主要メーカー製の体外受精用各種培養液24検体（このうちアルブミンが添加されたもの16検体）および用時混合用のヒト血清アルブミン製剤4検体、血清タンパク代替製剤2検体を分析に供した。

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（<sup>13</sup>C）標識化PBDEs混合溶液（MBDE-MXEおよびMBDE-139）を用いた。

S-421標準品はRiedel-de Haën社製を用いた。

### B. 3. 試料の前処理操作

#### B. 3. 1. 母乳

昨年度までに開発した分析法を用いた。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. 3. 2. 体外受精用培養液および関連製剤

培養液および関連試料の前処理は、既報<sup>1)</sup>の血清試料の前処理法を一部改変した手法を用いて行った。試料2.5 gにクリーンアップスパイク各200~1000 pgを添加した後、飽和硫酸アンモニウム1.5 mL、エタノール/ヘキサン(1:3)6 mLを加えて30分間振とうした。遠心分離後、上層(ヘキサン相)を採取し、さらに下層にヘキサン5 mL( $\times 2$ )を加えて同様に2回抽出操作を繰り返して上層を採取した。採取液を減圧濃縮後、硫酸シリカゲル2 gを充填したカラムに負荷し、ヘキサン30 mLで溶出して溶出液をナス型フラスコに回収した。回収液を乾固直前まで減圧濃縮後、少量のヘキサンを用いてナス型フラスコを洗い込みながら濃縮液を濃縮用試験管に移した。シリンジスパイク400 pgおよび20  $\mu$ Lのノナンを加えた後、緩やかに加温しながら窒素吹き付けにより約20  $\mu$ Lに濃縮してGC/MS測定に供した。

### B. 4. 装置条件 (GC/MS)

#### B. 4. 1. 母乳試料の測定

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

#### B. 4. 2. 体外受精用培養液試料の測定

装置: JEOL JMS-700D 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: 300°C

イオン源温度: 280°C

イオン化電流: 500  $\mu$ A

イオン化エネルギー: 35 eV

SEM電圧: 1.0 kV

分解能: 1,500

イオン化モード: EI

検出法: SIM

### B. 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. 研究結果・考察

#### C. 1. 母乳の分析結果

昨年度および今年度に分析を行った計46検体の母乳試料の全てからPBDEsが、また42検体(91%)の試料からS-421が検出され、PBDEsおよびS-421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)およびS-421濃度は平均で各々88 pg/g(範囲: 14~340 pg/g)、56 pg/g(範囲: <10~330 pg/g)であった(表1)。母乳脂肪あたり濃度で換算すると、PBDEs濃度は平均で3.5 ng/g lipid(範囲: 0.8~11 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。

#### C. 2. 体外受精用培養液および関連製剤の分析結果

培養液および関連製剤を対象として今回構築した分析法について、添加回収試験(ヒト血清アルブミンを含まない培養液試料2.5 gに各異性体を0.025~0.125 ng添加、または0.125~0.625 ng添加、ヒト血清アルブミンを含む培養液試料2.5 gに各異性体を0.25~1.25 ng添加)を実施したところ、測定対象とした10種類のPBDEsの平均回収率(クリーンアップスパイクによる補正值)は全て90~115%の範囲内、相対標準偏差は10%以下であり良好な結果であった。また、クロマトグラム上に特に妨害となるピークは認められず、構築した手法により培養液中のPBDEsを精度良く定量可能であることが確認された。

分析した体外受精用の培養液およびその関連製剤計30検体のうち、23検体(77%)からPBDEsが検出さ

れた(表2)。ヒト血清アルブミン未添加の培養液では12.5%の検出率であったのに対し、ヒト血清アルブミンが添加された培養液およびヒト血清アルブミン製剤では100%の検出率であった。これらのピーク検出パターンが一般的なヒト血清中のPBDEsパターンに良く一致していること(図1)、さらにヒト血清アルブミン製剤では比較的高濃度(平均229 pg/g)のPBDEsが検出されたことから、主としてヒト血清アルブミン(原料血液)による汚染と推測された。Covaciらは、血液製剤の製造に汎用されているCohnの冷却エタノール分画法において、第5画分(アルブミン画分)に代表的な塩素系POPs(PCB、DDE、HCB)が全体量の約3割~5割程度残留することを報告している<sup>2)</sup>。したがって、原料に用いたヒト血液に由来するPBDEs等のPOPsの一部がアルブミン製剤中に残留する蓋然性は高く、これらの製剤の添加により培養液中に複数のPOPsが混入するものと考えられる。体外受精における化学物質の影響については不明な点が多いことから、今後も引き続き、体外受精用培養液中化学物質の包括的な分析データの蓄積およびリスク評価に向けた取り組みが望まれる。

#### D. 結論

PBDEsおよびS-421による普遍的な母乳汚染が示唆された。体外受精用の培養液およびその関連製剤の一部からPBDEsが検出され、ヒト血清アルブミンが主な汚染原因であると推測された。

#### E. 参考文献

- 1) Akutsu, K., *et al.*, Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 80(4), 345-350 (2008).
- 2) Covaci, A., *et al.*, Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides are eliminated from therapeutic Factor VIII and immunoglobulin concentrates and reduced in albumin by plasma fractionation. *Vox Sang.*, 83, 23-28 (2002).

#### 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

- (1) Akutsu, K., *et al.*, Temporal Trend of Polybrominated Diphenyl Ethers in Archived Breast Milk Samples from Osaka, Japan. *Fifth International Symposium on Brominated Flame Retardants (BFR 2010)*, Kyoto, 7-9 April 2010.

#### 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、前川亮先生および医療関係者の皆様に深謝いたします。

表1 母乳中のPBDEsおよびS-421の濃度 (pg/g)

化合物	検出範囲	平均値
BDE-28	<2 ~ 12	2
BDE-47	<2 ~ 260	19
BDE-100	<2 ~ 22	3
BDE-99	<2 ~ 45	3
BDE-154	<2 ~ 10	1
BDE-153	4 ~ 44	16
BDE-183	<5 ~ 6	1
BDE-197	<5 ~ 38	7
BDE-207	<5 ~ 76	8
BDE-209	<40 ~ 160	27
$\Sigma$ 10PBDEs	14 ~ 340	88
S-421	<10 ~ 330	56

( $n = 46$ )

表2 体外受精用培養液および関連製剤中のPBDEs濃度 (pg/g)

匿名コードNo.	測定対象異性体(括弧内の数値は検出下限値)										Σ 10PBDEs (ND = 0 として算出)	
	BDE-28 (0.5 pg/g)	BDE-47 (0.5 pg/g)	BDE-100 (0.5 pg/g)	BDE-99 (0.5 pg/g)	BDE-154 (1 pg/g)	BDE-153 (1 pg/g)	BDE-183 (2 pg/g)	BDE-197 (5 pg/g)	BDE-207 (10 pg/g)	BDE-209 (10 pg/g)		
A011110	ND	10	2.8	1.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14
A012110	ND	10	2.9	1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15
A013110	ND	9.3	3.0	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13
A021110	ND	5.5	1.6	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.6
A022110	ND	0.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.6
A023110	ND	1.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.2
A031110	0.8	20	5.7	3.0	ND	3	ND	ND	ND	ND	ND	33
A032110	1.2	22	5.9	2.9	ND	3	ND	ND	ND	ND	ND	35
A033110	0.7	20	5.6	3.2	ND	3	ND	ND	ND	ND	ND	33
A021210	ND	0.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.7
A022210	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A023210	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A031210	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A032210	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A033210	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A017110	ND	13	5.5	1.5	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	21
A027110	ND	10	3.0	1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14
A037110	ND	8.1	3.9	1.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13
A067110	ND	5.4	2.4	0.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.5
A068110	ND	0.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.9
A018110	1.0	20	6.2	2.3	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	31
A019110	1.1	19	5.9	2.2	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	30
A038210	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A039210	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A024110	4.8	143	50	18	3	13	ND	ND	ND	ND	ND	232
A025110	ND	4.2	1.7	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.5
A035110	1.6	43	8.3	13	1	16	2	ND	ND	ND	ND	85
A034110	5.5	239	88	30	4	19	ND	ND	ND	ND	ND	385
A044110	ND	8.2	3.2	1.5	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	14
A054110	5.5	173	60	24	3	18	ND	ND	ND	ND	ND	283



図1 ヒト血清アルブミン製剤のクロマトグラム例 (A054110)

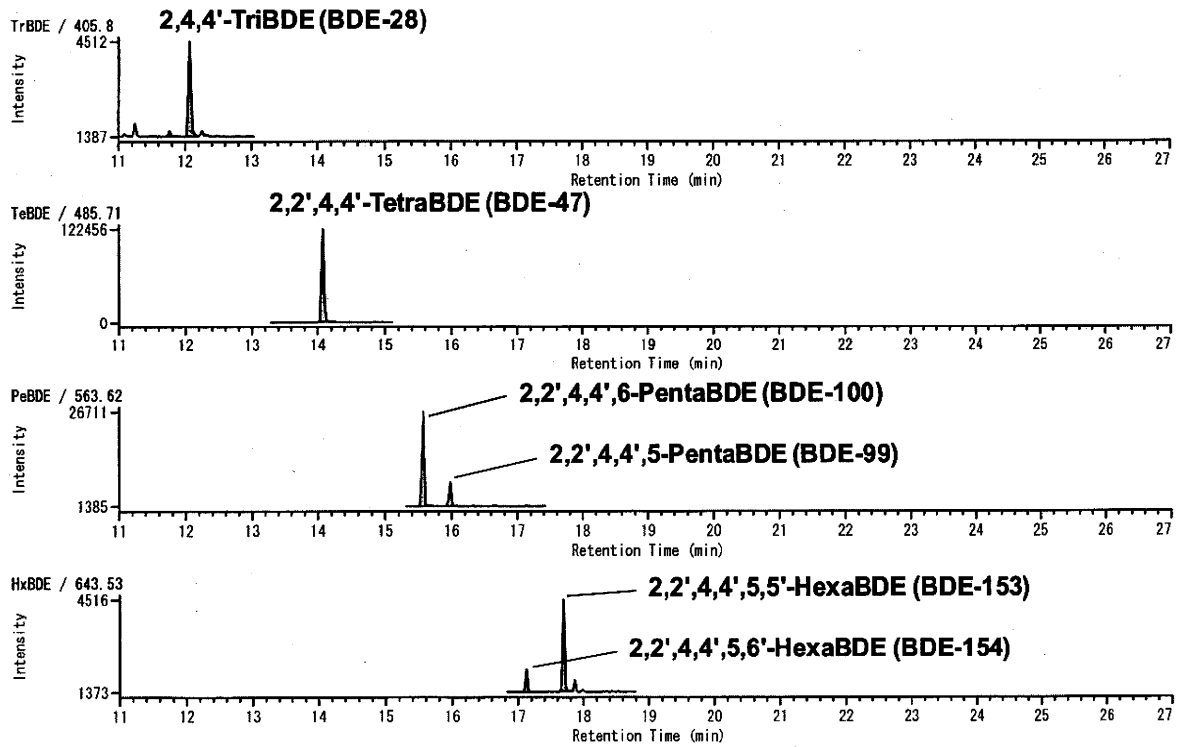


図5 Cohnの冷却エタノール分画法\*における各画分への残留性有機汚染物質 (POPs) の分布 (Covaciらの報告データに基づきグラフを作成)<sup>5)</sup>

\*各種血液製剤の製造に使用される基礎的な血漿タンパク分離手法。

平成22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  
- 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
分担研究者	中澤裕之	星薬科大学
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

#### 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。平成20年度から22年度に亘り分析した試料数は、母体血清(n=97)、臍帯血清(n=99)、羊水(n=41)及び胎脂(n=28)であった。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。また、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。更に一部の胎脂中に高濃度のDEHPを検出した。対応する羊水と胎脂間でDEHP濃度を比較したところ、概ね両者に逆相関の関係が認められた。すなわち、DEHPが高濃度で検出される胎脂と接する羊水中のDEHP濃度は必ずしも高くなく、子宮内において貯留するDEHPは、羊水あるいは胎脂に偏在して貯留していると推察された。

また、体外受精における受精卵培養あるいは精子の調製に使用される培養液中のDEHP及びMEHPを分析したところ、ヒト血漿由来成分(アルブミン溶液及び代替血清)を含む製品からMEHPを検出した。これらの製品の一部からは、MEHPに加えてDEHPも検出した。更に培養液に添加するためのアルブミン溶液及び代替血清を分析した結果、全ての製品からMEHPを検出した。また、これらの製品の一部からは、MEHPに加えてDEHPも検出した。これにより、培養液中のDEHP及びMEHPは、添加されたヒト血漿由来成分に起因すると示唆された。

#### 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(PVC)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(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)を分析した。

不妊治療において体外受精は、主要な治療法のひとつである。体外受精では、自然妊娠とは異なり、卵子、精子及び受精卵は、人工的環境下での生育期間が必要となる。例えば、体外受精において受精卵は、CO<sub>2</sub>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。この人工的環境下にある期間において、意図せざる化学物質の暴露の有無について検証することは重要な課題である。そこで本研究で

は、体外受精における受精卵の生育環境に重点を置き、受精卵の培養に使用される培養液中のDEHP及びMEHPの濃度を分析した。

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ができる。

#### 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(和光純薬製)。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(Milli-Q水)をヘキサンの洗浄して用いた。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) 体外受精用培養液等

国内で入手可能な 30 製品（一部を除き、2 ロット）を分析した。製品名はコードを付与して匿名化した。

#### (3) 実験

##### (3-1) 血清、羊水及び培養液中の DEHP 及び MEHP の分析

昨年度の報告書に従って分析した<sup>(1)</sup>。試料 0.5 mL 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。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  $\mu$ 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。この操作を再度行い、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 タンデム型質量分析計付高速液体クロマトグラフ (LC-MS/MS) で分析した。

##### (3-2) 胎脂中の DEHP 及び MEHP

昨年度の報告書に従って分析した<sup>(1)</sup>。胎脂 0.025 g 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 で分析した。

#### (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) 周産期試料の DEHP 及び MEHP の分析結果

平成 20-22 年度の研究期間に分析した結果を取りまとめて解析を行った。なお、最終的な分析症例数は、以下の通りであった；母体血清 (n=97)；臍帯血清 (n=99)；羊水 (n=41)；胎脂 (n=28)。

##### (1-1) 血清及び羊水中の DEHP 及び MEHP

母体血清、臍帯血清及び羊水中の 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 (図 1)。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 (36.1%)；臍帯血清 (20.4%)；羊水 (51.2%)。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 (22.7%)；臍帯血清 (14.3%)；羊水 (65.9%)。

これらの結果は、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おり、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=37) については、Wilcoxon の符号付き順位和検定を適用した。

#### 【DEHP】

##### (ア) Mann-Whitney の U 検定

「母体血清と臍帯血清」、「母体血清と羊水」及び「臍帯血清と羊水」の間に有意差が認められた (表 2)。

##### (イ) Wilcoxon の符号付き順位和検定

「母体血清と臍帯血清」及び「臍帯血清と羊水」のみに有意差が認められ、「母体血清と羊水」の間に有意差は、認められなかった (表 3)。

(ア) と (イ) で有意差が認められた「母体血清と臍帯血清」及び「臍帯血清と羊水」との間では、DEHP の濃度に、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、臍帯血清中と比較して高い濃度の DEHP が貯留していると考えられた。

## 【MEHP】

### (ア) Mann-Whitney の U 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 (表 4)。

### (イ) Wilcoxon の符号付き順位和検定

「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 5)。

(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、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 MEHP が貯留していると考えられる。

### (1-2) 胎脂水中の DEHP 及び MEHP

胎脂には、高濃度の DEHP が検出される試料が認められた (表 2)。MEHP については、全て ND であった。同一分娩症例から採取された胎脂と羊水中の DEHP 及び MEHP の濃度を比較した結果、胎脂中の DEHP 濃度と羊水中の DEHP 濃度は概ね逆相関の関係にあると推察された (表 6)。すなわち、DEHP が高濃度で検出される胎脂と接する羊水中の DEHP 濃度は低く (試料 A-C)、DEHP 濃度が低い胎脂と接する羊水には、DEHP が高く検出されることがある (試料 G-I)。このことから DEHP は、胎脂あるいは羊水中に偏在していると推察された。胎脂は、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 が検出されないことは、合理的に解釈される。また、胎脂は、羊水中の肺サルファクタントの上昇により溶解し、体表面上から減少することが知られており<sup>(2)</sup>、羊水の組成の変化によって、その存在量の変動することが考えられる。すなわち、胎脂あるいは羊水の一方のみから高く検出される傾向は、このこと由来する可能性があると考えられた。

### (2) 培養液中の DEHP 及び MEHP の分析

国内で複数社により市販されている 30 品目の培養液 (受精卵用培養液、精子調製用培養液及び培養液添加用ヒト血清アルブミン溶液等) 中の DEHP 及び MEHP を分析した。添加回収試験を培養液 A021210 に DEHP 及び MEHP を添加して行った結果、回収率は良好であった (表 7)。培養液を分析した結果、ヒト血漿由来成分を含む製品から MEHP を検出した。これらの製品の一部からは、MEHP に加えて DEHP も検出した (表 8 及び 9)。一方、ヒト血漿由来成分を含まない製品は、DEHP 及び MEHP 共に全て ND であった。また、培養液添加用ヒト血清アルブミン溶液等について DEHP 及び MEHP を分析した結果、全ての製品から MEHP を検出した (表 10)。また、これらの製品の一部からは、MEHP に加えて DEHP も検出

した。このことから培養液に検出される MEHP 及び DEHP は、ヒト血漿由来成分に起因すると考えられた。またロット差を検証したところ、一部を除いてロット差は小さく、ヒト血漿由来成分を含む培養液中には、DEHP 及び MEHP が普遍的に混在していると推察された。ヒト血漿由来成分を含まない製品については、使用時にヒト血清アルブミン溶液等を加えるため、最終的に体外受精に使用される培養液中には MEHP もしくは DEHP 及び MEHP の双方が混在していると考えられた。

DEHP を含む容器等から培養液等に溶出していると仮定した場合、DEHP の濃度は、MEHP の濃度を卓越すると予測される<sup>(3)</sup>。しかし、これら培養液等では、MEHP の濃度が DEHP の濃度を概ね卓越している。アルブミン等の血液分各製剤は、プールした血漿を原料として分画精製される。採血あるいは分画に使用する医療器具には、可塑剤として DEHP を含む PVC 製樹脂製品が使用されることがある。このため、その原料血漿に DEHP あるいはそこで加水分解された MEHP が混在していることが推察される。血漿からアルブミン等の分画で汎用される方法として、コーンの低温エタノール分画法がある (スキーム 1)<sup>(4-5)</sup>。この方法では、プール血漿に混在している DEHP は、アルブミン分画の上流にあるフラクション IV に多く集積される<sup>(6)</sup>。この分画過程でフラクション IV に DEHP が集積し、アルブミン分画に MEHP が多く残存したと仮定すれば、ヒト血清アルブミン溶液及びこれらを含む培養液で、DEHP よりも MEHP が高濃度で検出されることが説明できる。

## 参考文献

- (1) : 平成 21 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ビデネティクス評価法の開発」総括・分担研究報告書 p. 42-52.
- (2) : Nishijima, K., *et al.*, *Pediatric Res.*, **60**, 196-199 (2006)
- (3) : Takatori, S., Okamoto, Y., Kitagawa, Y., Hori, S., Izumi, S., Makino, T., Nakazawa, H., *Int. J. Pharm.* **352**, 139-145 (2008)
- (4) : 寮隆吉、改定版ベッドサイドの新輸血学、メジカルビュー社 p. 48.
- (5) : 社団法人日本血液製剤協会 <http://www.ketsukyo.or.jp/glossary/kal4.html>
- (6) : Gilbo, C. M. and Coles, N. W., *Vox. Sang.* **29**, 242-247 (1975)

## E. 結論

1. 羊水中において、臍帯血清よりも有意に高く DEHP 及び MEHP を検出した。
2. 子宮内に DEHP 及び MEHP が貯留している可能性