

が示唆された。子宮内に貯留している DEHP 及び MEHP は、羊水または胎脂に分配されていると推察された。

3. 国内で市販されている体外受精に使用される培養液等を分析した結果、ヒト血漿由来成分を含む複数の製品から 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。
4. 培養液添加用のアルブミン製剤等から 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。このことから、当該物質は、アルブミン製剤等の添加によって培養液中に移行していると考えられる。
5. 複数社の製品を 2 ロットずつ入手して含まれる DEHP 及び MEHP を分析した結果、そのロット差は概ね僅少であった。よって、当該物質は、普遍的にこれら製品中に混在していると推察される。

#### 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(第二報)」環境ホルモン学会第 13 回研究発表会；2010 年 12 月 16-17 日；東京

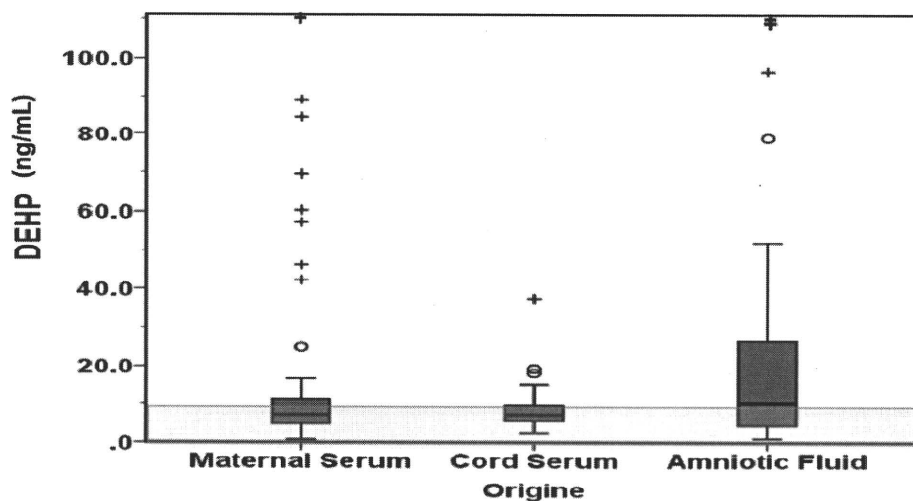
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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。

(A)



(B)

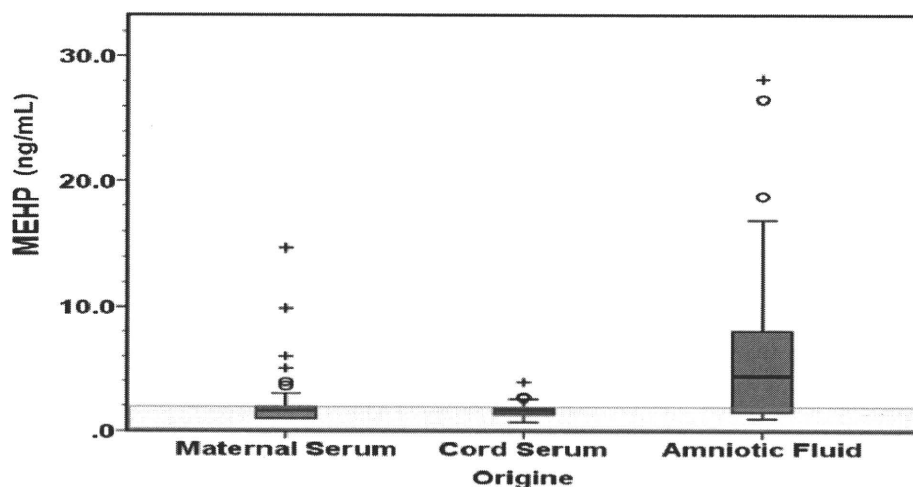


図1. 母体血清・臍帯血清及び羊水中のDEHP (A) 及び MEHP (B) の分析結果  
 実測値をボックスプロットで表現した。なお、定量下限 (DEHP, 10 ng/mL) ; MEHP, 2.0 ng/mL) 未満  
 の範囲は、影付きで示した。

表1. 各試料の分析結果まとめ

試料 (試料数)	DEHP (ng/mL; ng/g)			MEHP (ng/mL; ng/g)		
	検出率 (%)	中央値	範囲	検出率 (%)	中央値	範囲
母体血清 (97)	36.1	< 10	< 10 ~ 460	22.7	< 2.0	< 2.0 ~ 14.7
臍帯血清 (99)	20.4	< 10	< 10 ~ 37.4	14.3	< 2.0	< 2.0 ~ 5.6
羊水 (41)	51.2	10.2	< 10 ~ 376	65.9	4.4	< 2.0 ~ 28.2
胎脂 (28)	64.3	1,730	< 440 ~ 173,500	0	< 80	< 80

血清及び羊水中濃度単位, ng/mL; 胎脂中濃度単位, ng/g

表 2. 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=97)	臍帯血清 (n=99)	羊水 (n=41)
母体血清 (n=97)	—	あり	あり
臍帯血清 (n=99)	あり	—	あり
羊水 (n=41)	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

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=37)	臍帯血清 (n=37)	羊水 (n=37)
母体血清 (n=37)	—	あり	なし
臍帯血清 (n=37)	あり	—	あり
羊水 (n=37)	なし	あり	—

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

表 4. 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=97)	臍帯血清 (n=99)	羊水 (n=41)
母体血清 (n=97)	—	なし	あり
臍帯血清 (n=99)	なし	—	あり
羊水 (n=41)	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

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=37)	臍帯血清 (n=37)	羊水 (n=37)
母体血清 (n=37)	—	なし	あり
臍帯血清 (n=37)	なし	—	あり
羊水 (n=37)	あり	あり	—

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

表 6. 対応する胎脂及び羊水中の DEHP 及び MEHP 濃度

試料	DEHP (MEHP)	
	胎脂 (ng/g)	羊水 (ng/mL)
A	173,500 (ND)	ND (10.0)
B	71,800 (ND)	ND (2.4)
C	8,340 (ND)	ND (ND)
D	7,140 (ND)	11.1 (2.1)
E	5,540 (ND)	ND (3.7)
F	5,480 (ND)	ND (ND)
G	ND (ND)	13.3 (3.3)
H	ND (ND)	26.2 (10.2)
I	ND (ND)	129.4 (6.8)
J	ND (ND)	ND (ND)

ND : 胎脂; DEHP, 440 ng/g; MEHP, 80 ng/g  
: 羊水; DEHP, 10 ng/mL; MEHP, 2.0 ng/mL

表 7. 培養液に対する添加回収試験結果 (n=5)

添加濃度 (ng/mL)	Recovery (RSD)%	
	DEHP	MEHP
50	101 (2.2)	99.8 (3.1)
200	99.5 (5.6)	98.1 (9.1)

表 8. 受精卵用培養液中の DEHP 及び MEHP 濃度

Lot A	Lot B	DEHP (ng/mL)		MEHP (ng/mL)		ヒト血漿由来成分の添加
		Lot A	Lot B	Lot A	Lot B	
A011110	A011120	65.2	46.6	131	102	○
A012110	A012120	62.3	44.8	131	101	○
A013110	A013120	53.3	45.3	128	102	○
A021110	A021120	32.8	31.2	63.4	58.9	○
A022110	A022120	< 10	< 10	8.7	7.1	○
A023110	A023120	< 10	< 10	9.1	7.6	○
A031110	A031120	< 10	< 10	24.7	23.3	○
A032110	A032120	< 10	< 10	24.9	23.0	○
A033110	A033120	< 10	< 10	25.5	22.9	○
A021210	A021220	< 10	< 10	< 2.0	< 2.0	×
A022210	A022220	< 10	< 10	< 2.0	< 2.0	×
A023210	A023220	< 10	< 10	< 2.0	< 2.0	×
A031210	A031220	< 10	< 10	< 2.0	< 2.0	×
A032210	A032220	< 10	< 10	< 2.0	< 2.0	×
A033210	A033220	< 10	< 10	< 2.0	< 2.0	×

各分析値は、試行数 3 の平均値 (RSD は、15%未満)

表 9. 精子調製用培養液中の DEHP 及び MEHP 濃度

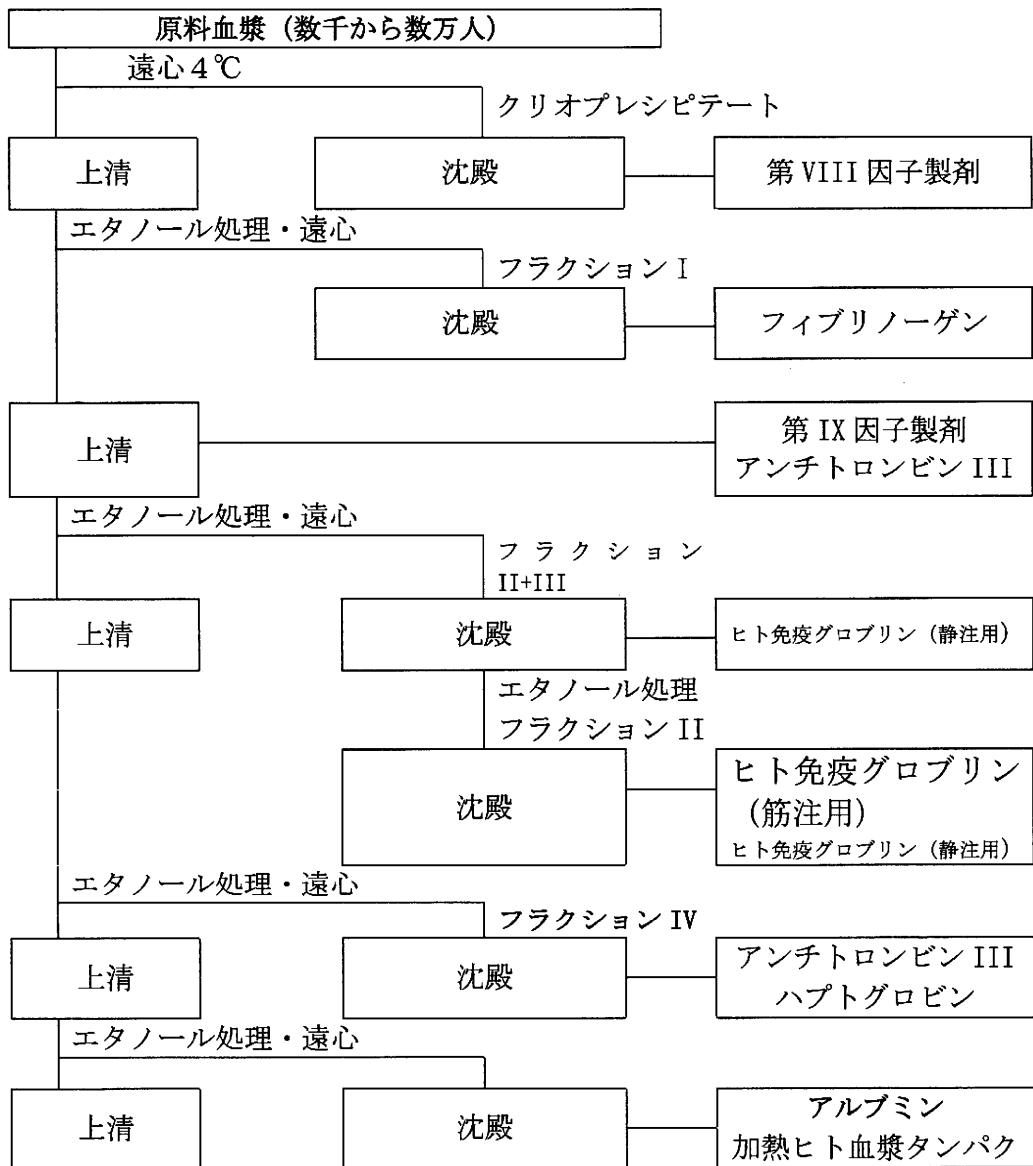
Lot A	Lot B	DEHP (ng/mL)		MEHP (ng/mL)		ヒト血漿由来成分の添加
		Lot A	Lot B	Lot A	Lot B	
A017110	A017120	110	112	252	245	○
A027110	A027120	60.4	55.1	101	99.1	○
A067110	A067120	48.2	32.8	105	93.3	○
A068110	A068120	< 10	11.1	21.0	28.5	○
A037110	A037120	< 10	< 10	24.1	21.9	○
A018110	A018120	111	81.7	263	188	○
A019110	A019120	114	86.8	260	193	○
A038210	A038220	< 10	< 10	< 2.0	< 2.0	×
A039210	A039220	< 10	< 10	< 2.0	2.8	×

各分析値は、試行数 3 の平均値 (RSD は、15%未満)

表 10. ヒト血清アルブミン溶液等中の DEHP 及び MEHP 濃度

Lot A	Lot B	DEHP (ng/mL)		MEHP (ng/mL)	
		Lot A	Lot B	Lot A	Lot B
A024110	A024120	982	< 10	1840	289
A025110	A025120	< 10	< 10	47.0	50.8
A035110	A035120	83.0	73.4	116	98.8
A034110	no data	< 10	no data	401	no data
A044110	A044120	< 10	< 10	240	231
A054110	A054120	59.8	61.4	588	470

各分析値は、試行数 3 の平均値 (RSD は、15%未満)



スキーム 1. コーンの低温エタノール分画法 (社団法人日本血液製剤協会 H.P. より引用)<sup>(5)</sup>

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
分担研究者	中澤裕之	星薬科大学
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

研究要旨

山口大学病院で採取された周産期試料 32 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）濃度比（羊水/血清）は、Cu が 0.05、Se が 0.11、Hg が 0.21 と羊水中の濃度が低く、一方、Ni が 3.8、Mn が 2.9 と、羊水中の濃度が高い値を示した。

（2）Fe, Zn, Li, Co, Cd を除く 14 元素で、血清と羊水で有意差が認められた。

（3）5 元素（Sr, Li, Mg, Ca, Mo）で、血清と羊水で相関が認められた。

（4）3 元素（Se, Ca, Sb）で、食習慣を反映すると考えられる傾向が認められた。

（5）胎盤を通過した元素の状況を少なからず反映すると考えられる羊水中元素濃度を、母体血清中元素濃度から推測することは困難であった。生活環境中の重金属類等による胎児暴露評価においては、羊水試料を用いたモニタリングが有用と考えられた。

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）の血清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<sup>1)</sup>。

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<sup>2)</sup>。研究 2 年目は、前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<sup>3)</sup>。研究最終年度の本年度は、測定例を増やすとともに、得られた分析結果と生活習慣（食習慣、喫煙、飲酒、薬、化粧品・香水、住環境など）に関するアンケートとの関連を解析した。

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）145 名より採取した周産期試料のうち、血清と羊水がペアで採取され、かつ分析に必要な量が確保できた 32 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は、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 ;

$$\text{Se (78)} = (78) * 1 - (76) * 0.1869$$

## 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 を使い、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、生活習慣 (食習慣、喫煙、飲酒、薬、化粧品・香水、住環境など) に関するアンケート (別添 1) との関連は、Mann-Whitney の U 検定及び Kruskal Wallis 検定で解析を行った。

## C. 結果と考察

### 1. 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中の元素濃度を表 1 に、羊水中の元素濃度を表 2 に示した。いずれも臨床検査法提要に示された基準範囲や、これまでの ICP-MS 法による報告値と同程度であった。また、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) を表 3 に示した。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、Se は 0.11、Hg は 0.21 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 3.8 であった。Ni は、ハイブリッドカーの電池などへの使用を始め、日常生活での暴露の機会が今後増加することが予想されるため、今後とも継続的なモニ

タリングが必要と考えられた。

また、Fe ( $p=0.184$ )、Zn ( $p=0.427$ )、Co ( $p=0.056$ )、Li ( $p=0.207$ )、及び Cd ( $p=0.769$ ) を除く 14 元素において、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. 血清と羊水中元素濃度の相関

血清と羊水中の元素濃度の相関を表 4 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 ( $n=32$ ,  $r=0.676$ ,  $p<0.001$ ) で、以下 Li ( $n=32$ ,  $r=0.591$ ,  $p=0.001$ )、Mg ( $n=32$ ,  $r=0.552$ ,  $p=0.001$ )、Mo ( $n=32$ ,  $r=0.379$ ,  $p=0.032$ )、Ca ( $r=0.368$ ,  $p=0.038$ ) の順であった。残る 14 元素は相関が認められず、胎盤を通過した元素の状況を少なからず反映すると考えられる羊水中元素濃度を、母体血清中元素濃度から推測することは困難であると考えられた。生活環境中の重金属類等による胎児暴露評価においては、羊水試料を用いたモニタリングが有用と考えられた。

### 3. 血清及び羊水中の元素濃度と生活習慣等 (食習慣、喫煙、飲酒、薬、化粧品・香水、住環境など) の関連

血清、羊水中の元素濃度と生活習慣等 (食習慣、喫煙、飲酒、薬、化粧品・香水、住環境など) の関連について解析を行った。生活習慣等のアンケートは、食習慣、喫煙、飲酒、薬、化粧品・香水、住環境などについて尋ねた (別添 1)。分析を行った 32 名中 27 名から回答を得た (回収率 84.4%)。得られた分析結果とアンケートとの関連を解析した結果、3 元素 (Se、Ca、Sb) で、食習慣を反映すると考えられる傾向が認められ (図 1)、その概要は以下の通りであった。

まず、魚介類の摂取頻度の高い群 (週 3~5 日,  $n=16$ ) が、低い群 (週 2 日以下,  $n=9$ ) と比べて羊水中の Se 濃度が有意 ( $p=0.023$ ) に高い値を示した ( $13.7 \pm 4.2$  vs  $10.1 \pm 2.6$  ng/mL)。また、牛乳の摂取本数の多い群 (週 7 本以上,  $n=6$ ) が、少ない群 (週 3~6 本,  $n=12$ ) と比べて血清中の Ca 濃度が有意 ( $p=0.014$ ) に高い値を示した ( $86.0 \pm 3.8$  vs  $81.1 \pm 2.4$   $\mu$ g/mL)。さらに、牛乳の摂取本数の多い群 (週 7 本以上,  $n=6$ ) が、少ない群 (週 2 本以下,  $n=9$ ) と比べて羊水中の Sb 濃度が有意 ( $p=0.015$ ) に高い値を示した。

## D. 結論

同一母体からペアで得られた血清及び羊水 32 組について、ICP-MS 法を用いて 19 元素の濃度を測定した。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。測定の結果、血清に対する羊水中の濃度比 (羊水/血清) は、19 元素中 13 元素は羊水中の濃度が低く、特に、Cu は 0.05、Se は 0.11、Hg は 0.21 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 3.8 であった。血清と羊水で相関が認められた

のは5元素 (Sr、Li、Mg、Ca、Mo) のみで、残る14元素は相関が認められず、胎盤を通過した元素の状況を反映すると考えられる羊水中元素濃度を、母体血清中元素濃度から推測することは困難であると考えられた。生活環境中の重金属類等による胎児暴露評価においては、羊水試料を用いたモニタリングが有用と考えられた。

#### 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ピ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) 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21年度分担研究報告書 p53-59.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kondo F, Ikai Y, Hayashi R, Okumura M, Takatori S, Nakazawa H, Izumi S, Makino T. Determination of Five Phthalate Monoesters in Human Urine Using Gas Chromatography -Mass Spectrometry. Bull Environ Contam Toxicol 85: 92-96 (2010).

##### 2. 学会発表

1) 林 留美子、近藤文雄、中澤裕之、杉野法広、牧野恒久;周産期母親の血清及び羊水中多元素分析による胎児への暴露評価研究;第81回日本衛生学会学術総会(2011)東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

#### 謝辞

本報告にあたり、生体試料の採取にご協力いただいたボランティアの皆様、山口大学医学部杉野法広教授、住江正大助教、及び医療関係者の皆様に深謝いたします。

表1 血清の分析結果

元素	n	〔単位:ng/mL〕		
		中央値	最小値	最大値
Ca	32	82000	77000	94000
Mg	32	19000	15000	21000
Cu	32	2000	1400	2500
Fe	32	950	380	3000
Zn	32	560	400	740
Rb	32	150	73	440
Se	32	110	82	160
Sr	32	33	20	68
B	32	12	2.8	20
Al	32	7.8	0.24	19
Mn	32	1.1	0.32	2.3
Mo	32	1.1	0.33	4.1
Hg	32	0.61	0.18	2.1
Li	32	0.51	0.21	1.1
Ni	32	0.37	0.22	0.74
Co	32	0.21	0.049	0.59
Pb	32	0.18	0.11	0.96
Sb	32	0.14	0.014	0.20
Cd	32	0.037	0.019	0.083

表2 羊水の分析結果

元素	n	〔単位:ng/mL〕		
		中央値	最小値	最大値
Ca	32	60000	42000	75000
Mg	32	13000	9700	23000
Zn	32	540	56	3100
Fe	32	620	50	3700
Cu	32	100	23	380
Rb	32	100	66	190
Sr	32	26	16	64
B	32	18	5.4	54
Se	30	12	6.6	23
Al	32	4.3	1.0	13
Mn	30	3.2	0.26	14
Mo	32	2.1	0.54	5.8
Ni	32	1.4	0.14	9.8
Li	32	0.54	0.15	1.2
Sb	32	0.27	0.044	0.49
Pb	26	0.15	0.023	0.32
Hg	24	0.13	0.019	0.51
Co	24	0.094	0.0018	0.87
Cd	31	0.030	0.0058	0.14

表3 血清及び羊水中元素濃度比

元素	濃度比 (羊水/血清)
Ni	3.8
Mn	2.9
Mo	1.9
Sb	1.9
B	1.5
Li	1.1
Zn	0.96
Pb	0.83
Cd	0.81
Sr	0.79
Ca	0.73
Mg	0.68
Rb	0.67
Fe	0.65
Al	0.55
Co	0.45
Hg	0.21
Se	0.11
Cu	0.050

表4 血清と羊水中元素濃度の相関

元素	n	r	p
Ca	32	0.368 *	0.038
Mg	32	0.552 *	0.001
Cu	32	0.289	0.109
Fe	32	0.132	0.473
Zn	32	0.087	0.636
Rb	32	0.131	0.476
Se	30	-0.110	0.564
Sr	32	0.676 *	0.000
B	32	0.312	0.082
Al	32	0.142	0.437
Mn	30	0.106	0.577
Mo	32	0.379 *	0.032
Hg	24	0.398	0.054
Li	32	0.591 *	0.000
Ni	32	-0.028	0.880
Co	24	-0.222	0.298
Pb	26	-0.151	0.463
Sb	32	0.139	0.449
Cd	31	-0.060	0.748

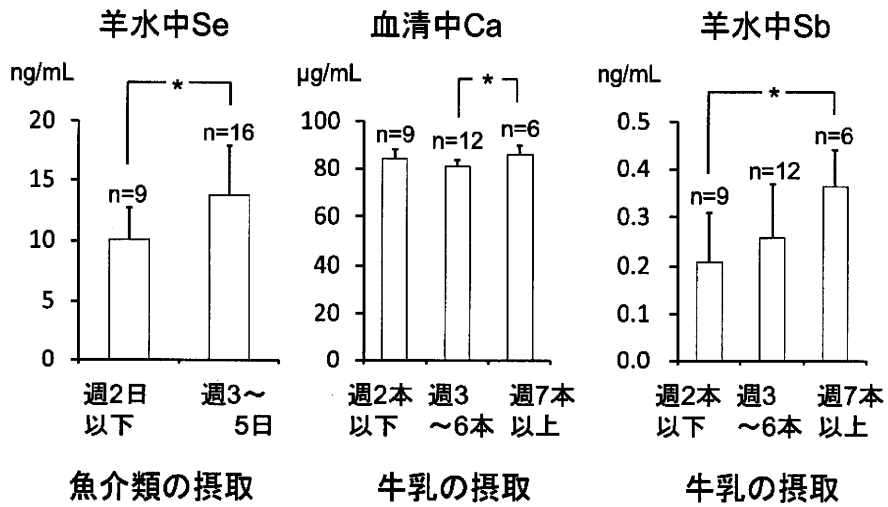


図1 元素濃度と生活習慣との関連

生活習慣と住宅環境についてのアンケートご協力をお願い

記号:

・このアンケートは、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に、あなたの食習慣やご自宅の環境などについておたずねいたします。結果は調査目的以外に使用されることはなく、また、公表の際には個人が特定されるような形では行いません。ご理解のうえ、ご協力をお願い致します。

以下の質問にお答え下さい。 (記入日:平成\_\_年\_\_月\_\_日)

\*\*\*\*\*

住所:	県	市郡	区町	年齢	歳
新生児: 男・女、	平成	年	月	日	誕生、体重
				g、	第 子

[食 習 慣]

米飯は、1日に何回位食べますか	(1) 0~1回/日	(2) 2回/日	(3) 3回/日
魚介類は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3~5日/週	(3) 6日以上/週
肉類は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3~5日/週	(3) 6日以上/週
鶏卵は、週に何個位食べますか	(1) 2個以下/週	(2) 3~6個/週	(3) 7個以上/週
野菜・果物は、どの位食べますか	(1) ほとんど食べない	(2) できるだけ食べる	(3) たっぷり食べる
海藻(ワカメ・ヒジキ等)は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3~5日/週	(3) 6日以上/週
牛乳は、週に何本(200mL/本)位飲みますか	(1) 2本以下/週	(2) 3~6本/週	(3) 7本以上/週

[飲 酒]

(1) 飲まない (2) 以前は飲んでいた( 年前まで) (3) 飲んでいる 1日 合( 年前から)
※ただし、ビール1本は1合に換算

[喫 煙]

今までに喫煙をしたことがありますか	(1)なし (2)現在も喫煙中 (3)過去にあり( 年前まで)
喫煙していた時の1日の平均喫煙本数とタバコの銘柄	1日平均喫煙本数( 本) タバコの銘柄( )
妊娠の時点~妊娠期間中に喫煙されていましたか	(1)なし (2)あり [一日平均喫煙本数( 本)]
妊娠の時点で自宅や職場での受動喫煙の可能性はありますか	(1)なし (2)あり [場所; 自宅・職場・病院・その他( )]
妊娠期間中は、自宅や職場での受動喫煙の可能性はありますか	(1)なし (2)あり [場所; 自宅・職場・病院・その他( )]
最後に喫煙してからどれくらい時間がたっていますか	( )
妊娠中、タバコの煙に対して何か注意を心がけましたか	(1)いいえ (2)はい
タバコの煙が胎児に対して悪影響があると思いますか	(1)いいえ (2)はい

→ウラ面へ続く

[薬]

飲んでいるサプリメント	(1)なし (2)あり ( ) 鉄剤、ビタミン剤等のサプリメントを記入してください。
飲んでいる薬	(1)なし (2)あり ( ) サプリメント以外に、飲んでいる薬を記入してください。
経口避妊薬を使用したことがありますか	(1)なし (2)あり ( ) 年前まで

[化粧品、香水等]

化粧品(化粧水、ファンデーション、口紅、グロス等、顔に塗布するもの)	(1)なし (2)あり (種類と使用の頻度を下欄にご記入ください) 例)ファンデーション(毎日)、口紅(毎日)、マスカラ(週に2回ぐらい)
整髪料(ヘアフォーム、ジェル、ヘアカラー等、頭髮に使用するもの)	(1)なし (2)あり (種類と使用の頻度を下欄にご記入ください) 例)ヘアフォーム(毎日)、ヘアカラー(月に2回ぐらい)
マニキュア、香水等(マニキュア、ネイルアート等、また、香水、オーデコロン等)	(1)なし (2)あり (種類と使用の頻度を下欄にご記入ください) 例)マニキュア(週に1回ぐらい)、香水(毎日)

[住環境等]

住居 (構造と築年数)	(1)一戸建て (2)マンション等の集合住宅
	(1)木造 (2)鉄骨
	築年数(築 年 例、築5年)
リフォーム	(1)なし (2)あり (分かれば施工時期をご記入ください) 例)内装を交換(平成20年3月)
	殺虫剤(衣類用も含む)の使用

おつかれさまでした。ご協力ありがとうございました。

(山口大学医学部産婦人科 杉野法広TEL:0836-22-2286)

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、胎内環境中にどのような化学物質が存在するか、どの程度の暴露量が児の健康に影響を及ぼすかを解明することを目的としている。そのため、種々の化学物質の母体血、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。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、暴露量と子宮内胎児発育遅延や前置胎盤などの異常妊娠との関連性を調べるため、これら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。生体試料の採取は、平成20年9月の試料採取の開始から平成22年6月までの間に、計145症例から試料採取と情報提供を得た。異常妊娠では、子宮内胎児発育遅延15例、前置胎盤4例につき、試料採取を行った。母体血および臍帯血中のジエチルヘキシルフタル酸（DEHP）、モノエチルヘキシルフタル酸（MEHP）、有機フッ素系化合物、有機リン系農薬の濃度は、妊娠週数により変化はなかった。DEHPとMEHPの暴露量と出生児体重や異常妊娠との間に明らかな関連性は認められなかったが、有機フッ素系化合物のパーフルオロノナン酸（PFNA）の母体血と臍帯血中の濃度は、異常妊娠例で有意に高値を示した。また、体外受精-胚移植における受精卵に及ぼす体外培養の影響を検討する目的で、培養液への化学物質の混入を調査した。培養液に用いられる血清にDEHP、MEHP、ノニルフェノールの混入が認められた。

**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。そのため、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、ビスフェノール、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、暴露量と子宮内胎児発育遅延や前置胎盤などの異常妊娠との関連性を調べることも目的とした。

また、受精卵も広い意味での子どもと捉え、体外受精-胚移植における受精卵に及ぼす体外培養の影響を検討する目的で、培養液への化学物質の混入を調査した。

**B. 研究方法**

**B-1. 生体試料の採取**

37週0日から41週6日までの正常単胎妊婦および子宮内胎児発育遅延、前置胎盤などの異常妊娠の妊婦につき、分娩前の母体血と母体尿、分娩時の羊水、分娩後の臍帯から採取した臍帯血、出生後に児の体に付着している胎脂を採取した。採取量は図1に示す。また、分娩後に母乳の提供をうけた。試料は-80度で保存した。

**B-2. 対象培養液の準備**

本邦で使用されている体外受精-胚移植治療用の培養液などを調査した。

**B-3. アンケート調査**

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（参考資料参照）を行った。

（倫理面への配慮）

試料採取前に、同意説明書を対象者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、自由意思によって参加し文書による同意が得られたものを対象とした。

## C. 研究結果

### C-1. 試料採取状況

(1) 生体試料の採取は、平成20年9月の試料採取の開始から平成22年6月までに、計145症例から試料採取と情報提供を得た。母体血、母体尿、母乳、羊水、臍帯血、胎脂それぞれにつき採取できた試料数を図2に示す。対象とした妊婦の概ね80%から試料を採取できているが、羊水は手技上の問題から採取率が低い。

(2) 母体への暴露が胎児にどの程度影響を及ぼしているかを評価するためには、母体血、臍帯血、羊水のセットでの試料採取が望ましい。母体血と臍帯血の両者が採取できた症例数は107例、母体血、臍帯血と羊水が採取できた症例数は35例、母体血、臍帯血、羊水、母乳、胎脂のすべてが採取できた症例数は30例であった。(図3)。

(3) 異常妊娠では、子宮内胎児発育遅延9例、前置胎盤2例の計11例につき化学物質の測定を行った。

(4) 調査対象とする培養液関連試料は、培養液(fertilization medium, cleavage medium, blastocyst medium)、血清、精子調整培養液につき、数社からの製品を選択し、それぞれにつき2ロットを対象とした。

### C-2. 母体血と臍帯血、および培養液関連試料中の化学物質濃度の測定結果

(1) 正常単胎妊婦において、ジエチルヘキシルフタル酸(DEHP)とモノエチルヘキシルフタル酸(MEHP)の母体血と臍帯血の濃度について、37週0日から41週6日までの間で、週数による変化はなかった(図4)。

(2) 37週0日から41週6日までの間の正常単胎妊婦において、DEHPとMEHPの母体血と臍帯血の濃度について、出生児体重との間に有意な相関はなかった(図5)。

(3) 異常妊娠症例について、母体血と臍帯血のDEHPとMEHPの濃度が測定されたが、正常群と比べ有意の差はなかった(表1)。

(4) 正常単胎妊婦において、有機フッ素系化合物であるパーフルオロヘキサンスルホン酸(PFHxS)、パーフルオロノナン酸(PFNA)、パーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)、パーフルオロオクタン酸(PFOA)の母体血と臍帯血の濃度について、37週0日から41週6日までの間で、週数による変化はなかった(図6、図7)。

(5) 37週0日から41週6日までの間の正常単胎妊婦において、有機フッ素系化合物であるPFHxS、PFNA、PFOS、PFOAの母体血と臍帯血の濃

度について、出生児体重との間に有意な相関はなかった(図8、図9)。

(6) 異常妊娠症例について、母体血と臍帯血の有機フッ素系化合物であるPFHxS、PFNA、PFOS、PFOAの濃度が測定された。異常妊娠症例の母体血と臍帯血のPFNA濃度は正常群と比べ有意な高値を示した(表2と表3)。

(7) 子宮内胎児発育遅延症例の母体血と臍帯血のPFNA濃度は正常群と比べ有意な高値を示した(表4と表5)。

(8) 正常単胎妊婦において、有機リン系農薬である2種のジアルキルリン酸(DMP、DEP)、2種のジアルキルチオリン酸(DMTP、DETP)の母体尿、母体血と臍帯血の濃度について、37週0日から41週6日までの間で、週数による変化はなかった(図10、図12、図14)。

(9) 37週0日から41週6日までの間の正常単胎妊婦において、有機リン系農薬であるDMP、DEP、DMTP、DETPの母体尿、母体血と臍帯血の濃度について、出生児体重との間に有意な相関はなかった(図11、図13、図15)。

(10) 培養液そのものには化学物質の混入はなかったが、培養に用いる血清にDEHP、MEHP、ノニルフェノールが検出された(表6)。

## D. 考察

(1) 化学物質の胎児への実際の暴露状況が明らかになった。

(2) 37週0日から41週6日までの間で妊娠週数によりDEHP、MEHP、有機フッ素系化合物であるPFHxS、PFNA、PFOS、PFOA、および有機リン系農薬であるDMP、DEP、DMTP、DETPの暴露量に変化はなかった。

(3) 37週0日から41週6日までの間の正常単胎妊婦において、DEHP、MEHP、有機フッ素系化合物であるPFHxS、PFNA、PFOS、PFOA、および有機リン系農薬であるDMP、DEP、DMTP、DETPの暴露量と出生児体重との間に関連性はなかった。

(4) DEHPとMEHPの暴露量と異常妊娠との間に明らかな関連性は認められなかった。

(5) 有機フッ素系化合物であるPFNAの暴露量と異常妊娠である子宮内胎児発育遅延の間に関連性が示唆された。

(6) 受精卵の環境である体外培養において、培養液に用いられる血清にDEHP、MEHP、ノニルフェノールの混入が認められた。



## E. 結論

母体血中から胎児環境への化学物質の移行が明らかとなり、胎児は種々の化学物質に暴露されていることが示された。さらに、体外受精-胚移植治療において、胚は化学物質に暴露されていることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

杉野法広、前川 亮、浅田裕美、山縣芳明：子宮筋腫のゲノムワイド DNA メチル化プロファイル解析 実験医学 増刊:エビジェネティクスと疾患 28 巻、15 号、217-225, 2010.

Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Aberrant DNA methylation status in human uterine leiomyoma. *Mol Hum Reprod* 15: 259-267, 2009.

Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and oestrogen. *Hum Reprod* 24: 1126-1132, 2009.

Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Hattori N, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Potential link between estrogen receptor- $\alpha$  gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod* 14: 539-545, 2008.

### 2. 学会発表

R. Maekawa, I. Tamura, N. Sugino. Uterine leiomyomas preferentially have aberrant DNA hypomethylation on X chromosome. .

58th Annual meeting of Society for Gynecologic Investigation. March 16-29, 2011 Miami, Florida, USA.  
*Reprod Sci suppl.* 17: 133, 2011

李 理華、浅田裕美、田辺 学、木塚文恵、田村功、前川 亮、竹谷俊明、山縣芳明、田村博史、

杉野法広

ラット顆粒膜細胞の黄体化における Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) 遺伝子発現の epigenetic 制御の関与  
第15回日本生殖内分泌学会学術総会 2010年11月21日 大阪市  
日本生殖内分泌学会雑誌 第86巻 第2号 P.446 2010年

田村功、田辺 学、李 理華、木塚文恵、前川 亮、竹谷俊明、浅田裕美、山縣芳明、田村博史、杉野法広

ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) の脱落膜化によって誘導される IGFBP-1, prolactin (PRL) 遺伝子発現における epigenetic 調節機構  
第15回日本生殖内分泌学会学術総会 2010年11月21日 大阪市  
日本生殖内分泌学会雑誌 第86巻 第2号 P.452 2010年

L. Lee, F. Kizuka, N. Sugino. Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) gene expression in rat granulosa cells during luteinization. International Ovarian Conference 2010 October 16-17, 2010, Kyoto, Japan

N. Sugino. Epigenetic regulation of gene expression in human endometrial stromal cells. 108th Annual meeting of Japan Society of Reproduction and Development, symposium 2010 September 4, 2010, Towada, Japan  
*J Reprod Dev* 56: 49, 2010.

N. Sugino. Differential modification of progesterone in TNF- $\alpha$ -induced cyclooxygenase-2 and manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells.

International symposium for Immunology of Reproduction August 28, 2010 Osaka, Japan  
*Reprod Immunol Biol* 25: 60, 2010

I. Tamura, F. Kizuka, K. Taniguchi, N. Sugino. DNA methylation and histone acetylation sta

tus in the promoter region of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and prolactin (PRL) in human endometrial stromal cells. 43th Annual Meeting of the Society for the Study on Reproduction July 30 - August 3, 2010 Milwaukee, USA  
Biol Reprod. Abstract book suppl. p68, 2010

田村功、浅田裕美、李 理華、木塚文恵、前川 亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広  
ヒト子宮内膜間質細胞 (ESC) において脱落膜化により特異的に発現する IGFBP-1 遺伝子の promoter 領域の DNA メチル化とヒストンアセチル化の解析

第62回日本産科婦人科学会学術講演会 2010年4月23日~25日 東京  
日本産科婦人科学会雑誌 第62巻 第2号 P.573 2010年

R. Maekawa, I. Tamura, N. Sugino.  
DNA methylation and histone acetylation status in the promoter region of insulin-like growth factor-binding protein in human endometrial stromal cells.  
57th Annual meeting of Society for Gynecologic Investigation. March 24-27, 2010 Orlando, Florida, USA.  
Reprod Sci suppl. 17: 133, 2010

I. Tamura, R. Maekawa, N. Sugino.  
Histone acetylation status of promoter regions influences the progesterone action on TNF $\alpha$ -induced cyclooxygenase-2 and manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells.  
57th Annual meeting of Society for Gynecologic Investigation March 24-27, 2010 Orlando, Florida, USA.  
Reprod Sci suppl. 17: 342, 2010

田村功、竹谷俊明、李 理華、木塚文恵、谷口 憲、前川 亮、浅田裕美、松岡亜希、田村博史、杉野法広  
子宮内膜間質細胞 (ESC) における TNF $\alpha$  の cyclooxygenase-2 (COX-2), manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) 発現に及ぼす影響と progesterone の遺伝子特異的な影響  
第60回日本産科婦人科学会学術講演会 2009年4月3日~5日 京都市

日本産科婦人科学会雑誌 第61巻 第2号 P.429 2009年

浅田裕美、山縣芳明、李 理華、木塚文恵、田村功、谷口 憲、前川 亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広  
ヒト子宮内膜間質細胞における IGFBP-1 遺伝子と PRL 遺伝子の DNA メチル化プロファイル解析  
第60回日本産科婦人科学会学術講演会 2009年4月3日~5日 京都市  
日本産科婦人科学会雑誌 第61巻 第2号 P.632 2009年

田村功、竹谷俊明、李 理華、木塚文恵、谷口 憲、前川 亮、浅田裕美、松岡亜希、田村博史、杉野法広  
子宮内膜間質細胞 (ESC) における TNF $\alpha$  の cyclooxygenase-2 (COX-2), manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) 発現に及ぼす作用と progesterone の遺伝子特異的な影響  
第82回日本内分泌学会学術総会 2009年4月23日~25日 前橋市  
日本内分泌学会雑誌 第85巻 第1号 P.221 2009年

浅田裕美、山縣芳明、李 理華、木塚文恵、田村功、谷口 憲、前川 亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広  
ヒト子宮内膜間質細胞における IGFBP-1 遺伝子と PRL 遺伝子の DNA メチル化プロファイル解析  
第82回日本内分泌学会学術総会 2009年4月23日~25日 前橋市  
日本内分泌学会雑誌 第85巻 第1号 P.221 2009年

H. Asada, Y. Yamagata, R. Maekawa, I. Tamura, L. Lee, F. Kizuka, K. Taniguchi, T. Taketani, A. Matsuoka, H. Tamura, N. Sugino.  
Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the human endometrium.  
The 25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Amsterdam, Netherlands June 28 July 1, 2009  
Human Reproduction 24: suppl. 1, p184, 2009.

Tamura, T. Taketani, L. Lee, F. Kizuka, K. Taniguchi, H. Asada, A. Matsuoka, H. Tamura, N. Sugino.

Differential modification of progesterone in TNF $\alpha$ -induced COX-2 and Mn-SOD expression in human endometrial stromal cells.

The 25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Amsterdam, Netherlands June 28-July 1, 2009  
Human Reproduction 24; suppl. 1, p185, 2009.

L. Lee, I. Tamura, F. Kizuka, K. Taniguchi, N. Sugino.

Involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the human endometrium.

42th Annual Meeting of the Society for the Study on Reproduction, Pittsburgh, USA July 18 July 22, 2009.  
Biology of Reproduction suppl. p106, 2009

I. Tamura, L. Lee, F. Kizuka, K. Taniguchi, N. Sugino. Differential modification of progesterone in TNF $\alpha$ -induced COX-2 and Mn-SOD expression in human endometrial stromal cells.

42th Annual Meeting of the Society for the Study on Reproduction, Pittsburgh, USA July 18 July 22, 2009.  
Biology of Reproduction suppl. p138, 2009

浅田裕美、山縣芳明、田村功、前川亮、谷口憲、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜における DNA methyltransferase の発現に関する検討

第60回日本産科婦人科学会学術講演会 2008年4月12日~15日 横浜市  
日本産科婦人科学会雑誌 第60巻 第2号 P.728 2008年

浅田裕美、山縣芳明、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 子宮筋腫の Estrogen receptor- $\alpha$  遺伝子の DNA メチル化情報

第81回日本内分泌学会学術総会 2008年5月16日~18日 青森市  
日本内分泌学会雑誌 第84巻 第1号 P.221

2008年

Hiromi Asada, Ken Taniguchi, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino

Uterine Leiomyomas Associate with DNA Hypomethylation of Oestrogen Receptor- $\alpha$  Gene

The 24th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Barcelona, Spain 6-9 July 2008  
Human Reproduction vol. 23 supplement 1 P.1196 2008.

浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮

宮内膜における DNAmethyltransferase の発現に関する検討

第45回日本生殖医学会中国・四国支部学術講演会 2008年8月30日 徳島市  
日本生殖医学会雑誌 第54巻 第1・2号 P.20 2008年

浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜における DNAmethyltransferase の発現に関する検討

第53回日本生殖医学会学術講演会 2008年10月23日~24日 神戸市  
日本生殖医学会雑誌 第53巻 第4号 P.155 2008年

浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜間質細胞における

Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) 遺伝子と Prolactin (PRL) 遺伝子の DNA メチル化プロファイル解析

第13回日本生殖内分泌学会学術講演会 2008年11月29日 大阪市  
日本内分泌学会雑誌 第84巻 第2号 P.629 2008年

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

図1.採取サンプル量

研究グループ	測定物質	母体血清	母体尿	毛髪	母乳	羊水	臍帯血	胎脂
星薬大	PFOS、ニコチン	2ml	10ml	-	-	-	2ml	-
埼玉	殺虫剤、BPA	2ml	10ml	-	-	-	2ml	-
大阪	フタル酸エステル	2ml	20ml	-	-	5ml	2ml	1g
大阪	PBDEs	5ml	-	-	5ml	-	-	-
愛知	重金属	-	-	0.3g	-	-	-	-

図2.実際に採取したサンプル数

検体	母体血清	尿	母乳	羊水	臍帯血清	胎脂
採取できた検体数 (%)	128 (88%)	111 (77%)	122 (84%)	52 (36%)	122 (84%)	112 (77%)

平成20年9月から平成22年6月まで145症例