

図3.検体がセットとして採取可能であった症例数

母体血	母体尿	羊水	臍帯血	胎脂	母乳	症例数 (累積)
○	○	○	○	○	○	30
○	○	○	○	○		30
○	○	○	○			35
○	/	/	○	/	/	107

図4.母体血・臍帯血中MEHP、DEHP 濃度と在胎週数との関係

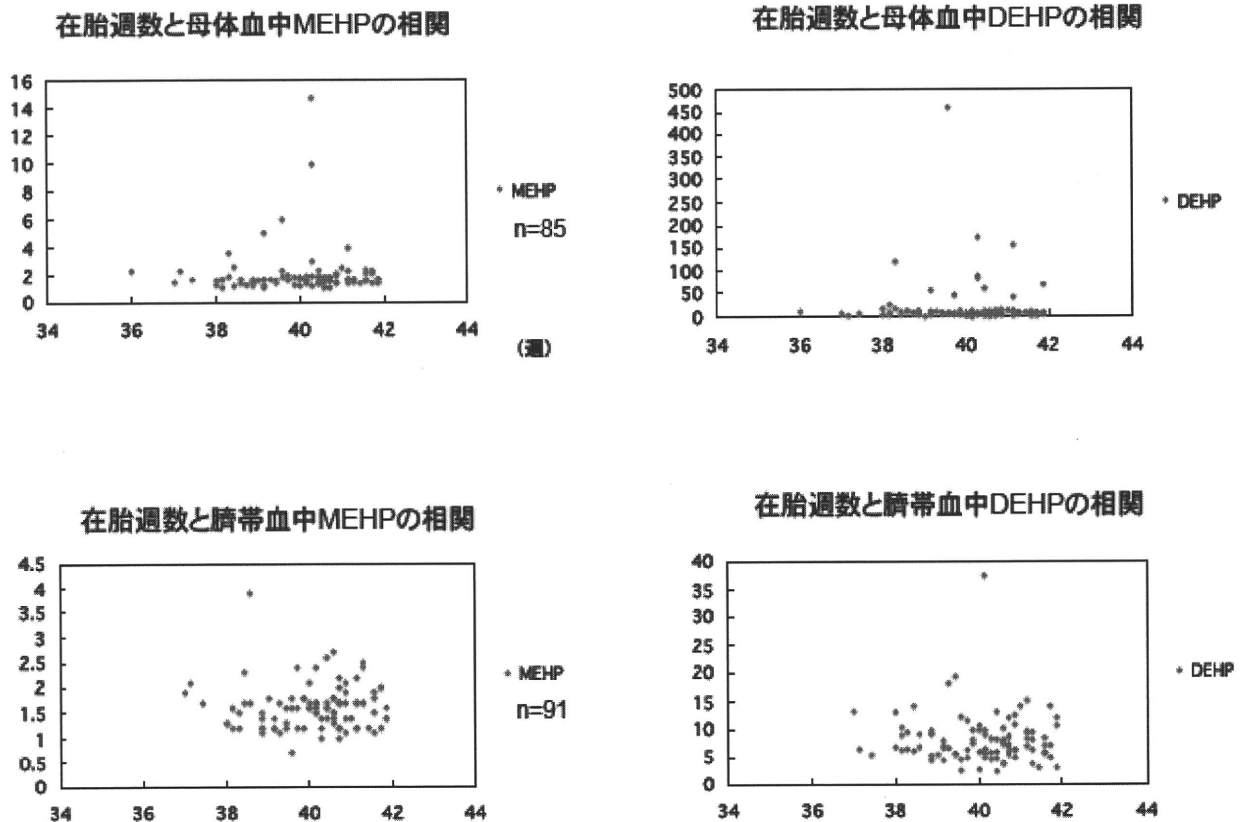


図5.母体血・臍帯血中MEHP、DEHP濃度と児出生体重との関係

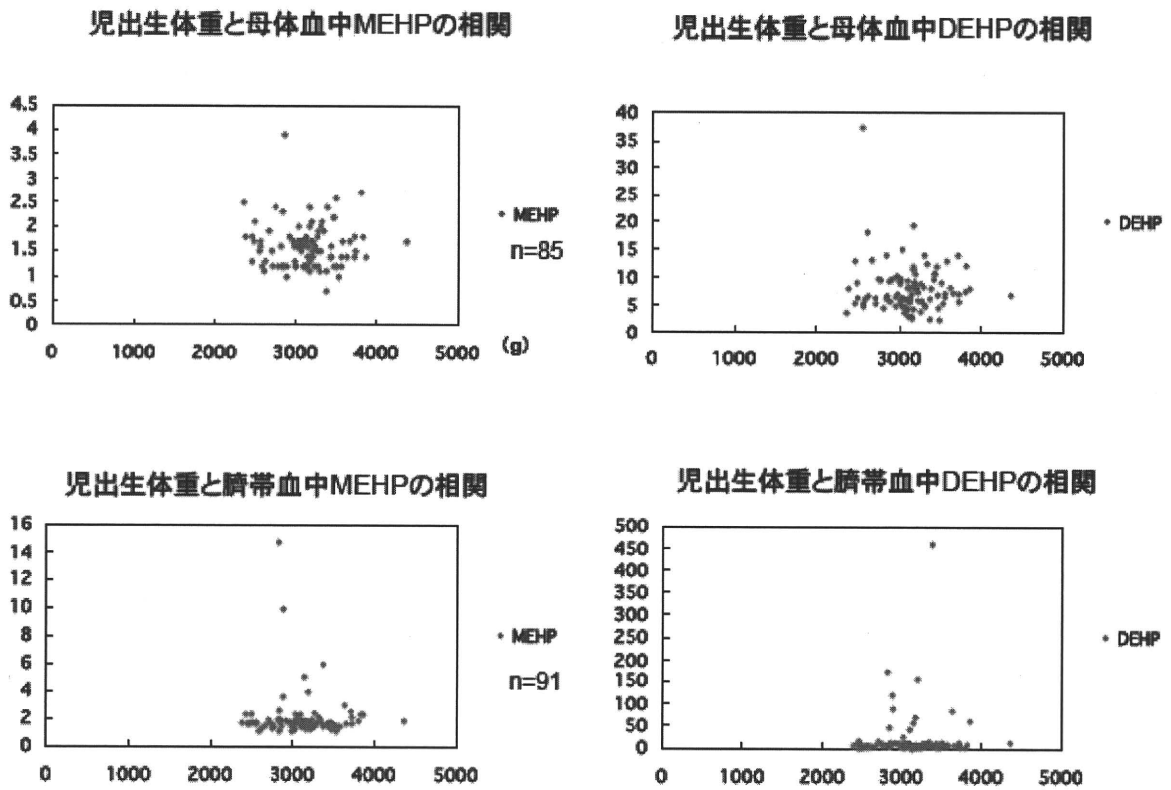


図6.母体血中 PHxS, PFNA, PFOS, PFOA 濃度と在胎週数との関係

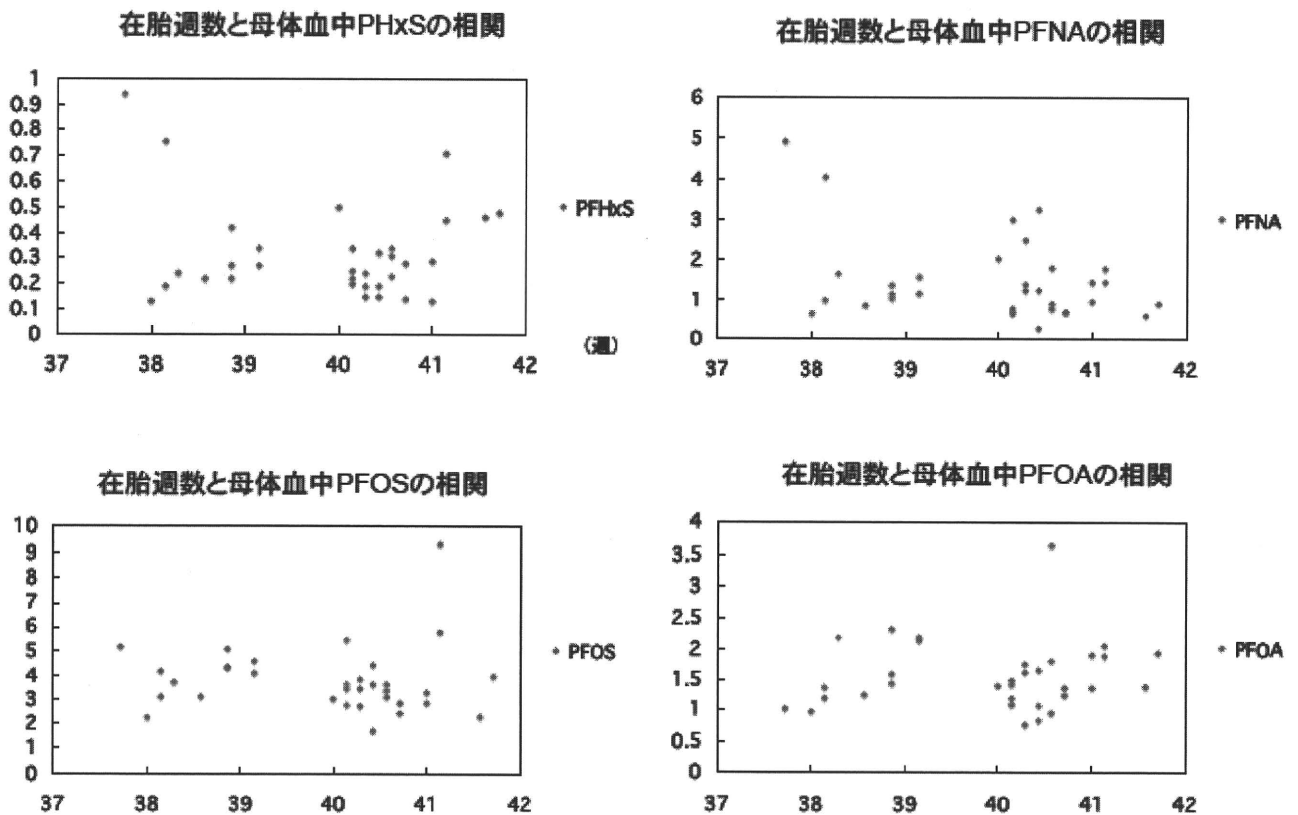


図7.臍帯血中 PHxS, PFNA, PFOS, PFOA 濃度と在胎週数との関係

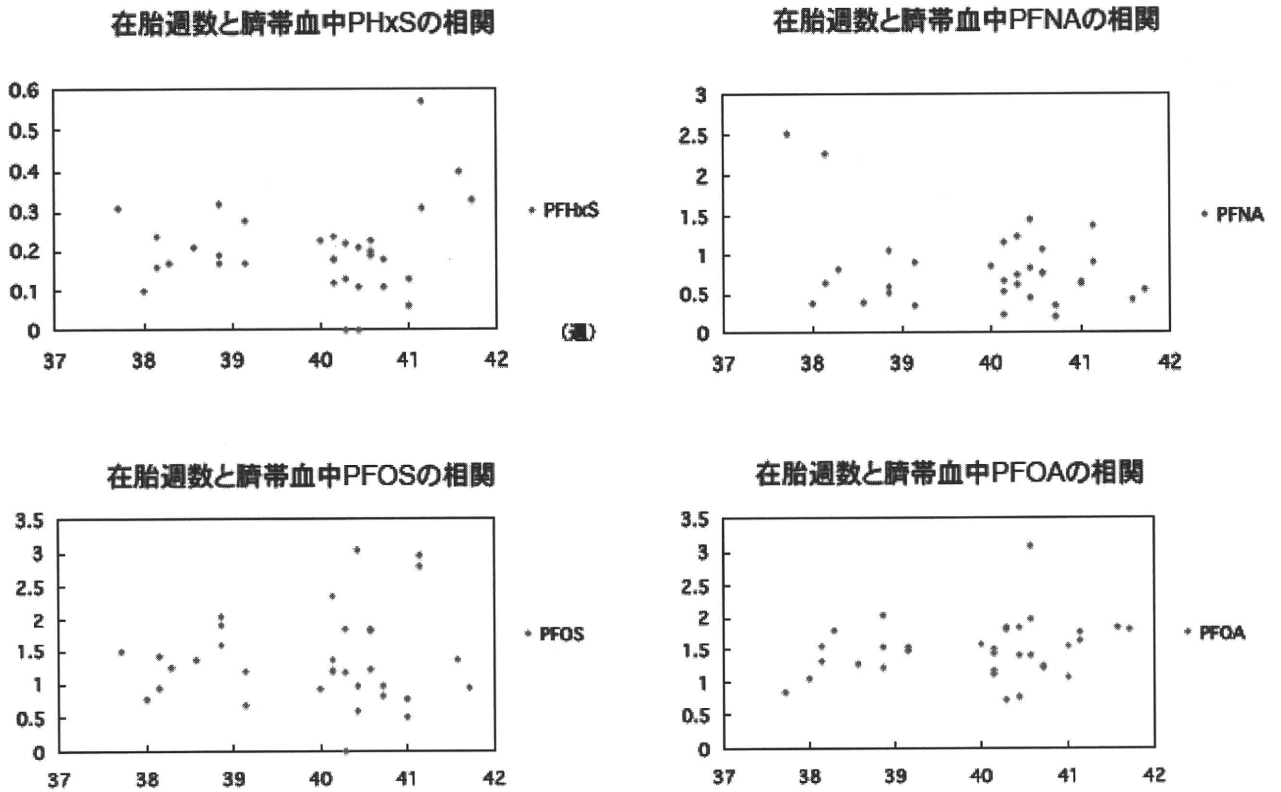


図8.母体血中 PHxS, PFNA, PFOS, PFOA 濃度と児出生体重との関係

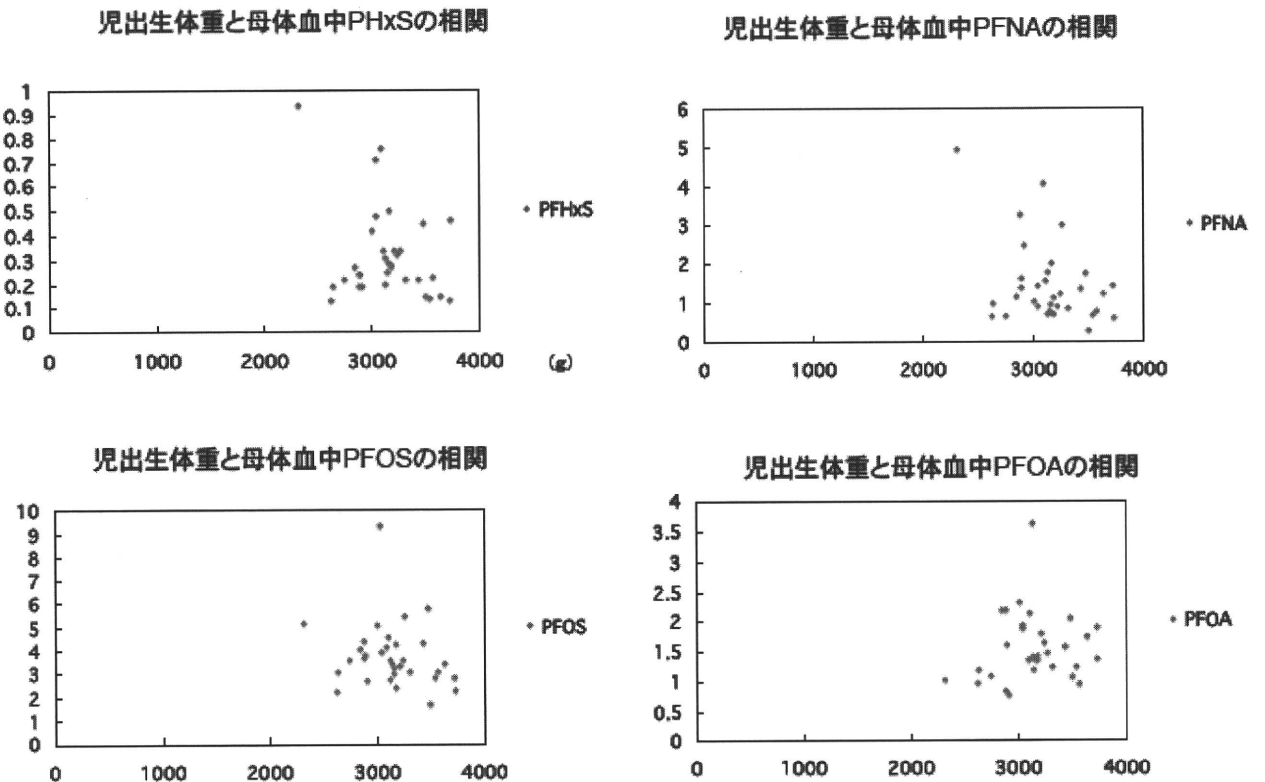


図9.臍帯血中 PHxS, PFNA, PFOS, PFOA 濃度と児出生体重との関係

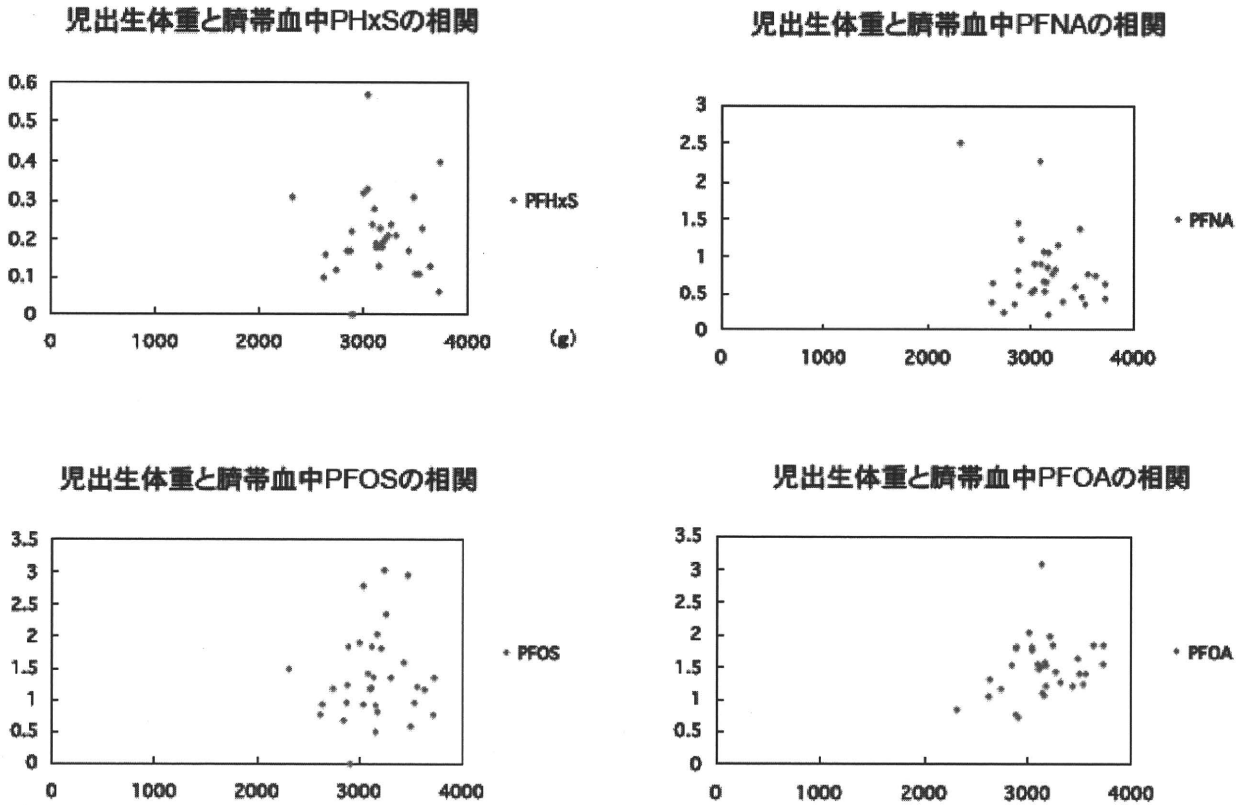


図10.母体尿中DMT, DMTP, DEP, DETP 濃度と在胎週数との関係

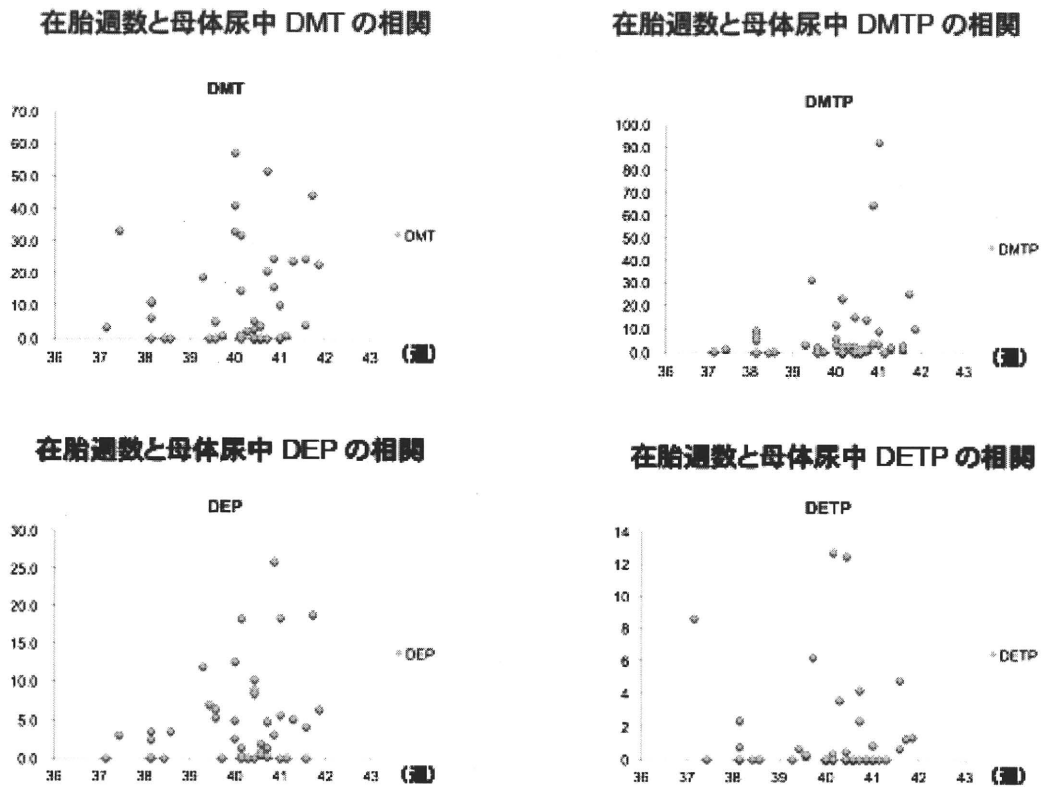
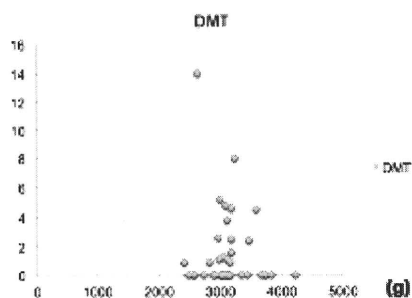


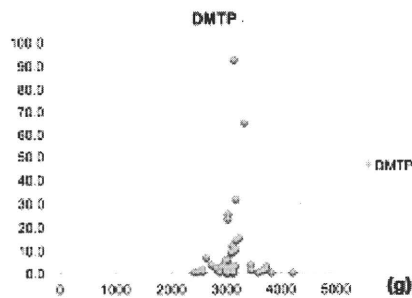


図11.母体尿中DMT, DMTP, DEP, DETP 濃度と出生体重との関係

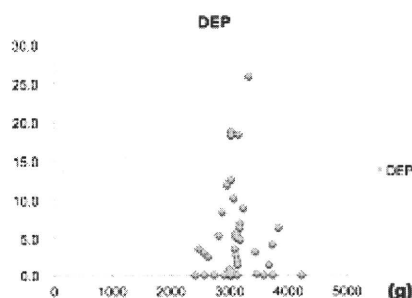
出生体重と母体尿中 DMT の相関



出生体重と母体尿中 DMTP の相関



出生体重と母体尿中 DEP の相関



出生体重と母体尿中 DETP の相関

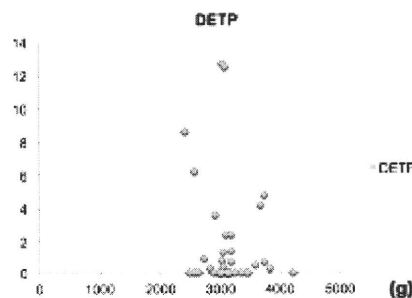
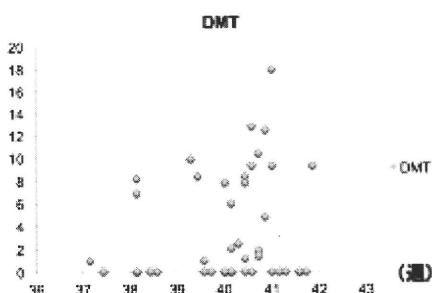
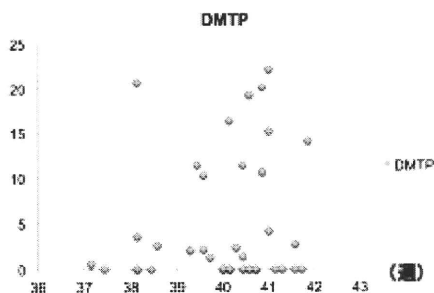


図12.母体血中DMT, DMTP, DEP, DETP 濃度と在胎週数との関係

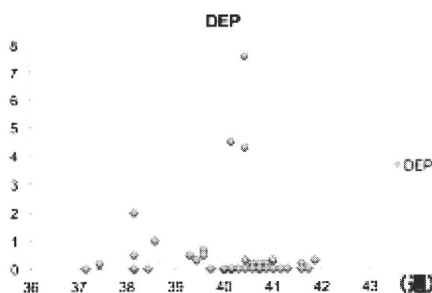
在胎週数と母体血中 DMT の相関



在胎週数と母体血中 DMTP の相関



在胎週数と母体血中 DEP の相関



在胎週数と母体血中 DETP の相関

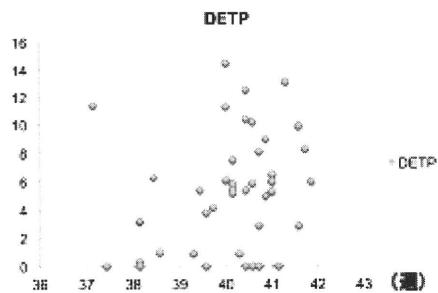
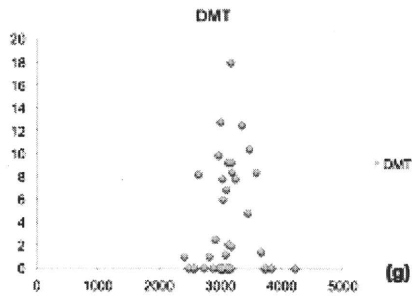
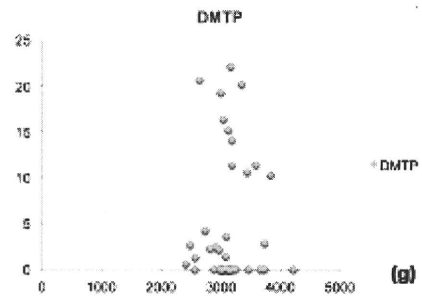


図13.母体血中DMT, DMTP, DEP, DETP 濃度と出生体重との関係

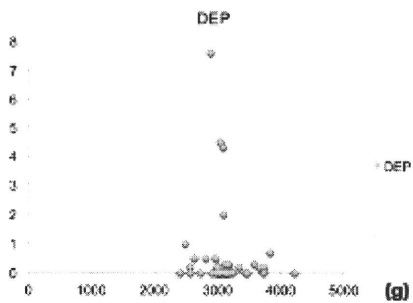
出生体重と母体血中 DMT の相関



出生体重と母体血中 DMTP の相関



出生体重と母体血中 DEP の相関



出生体重と母体血中 DETP の相関

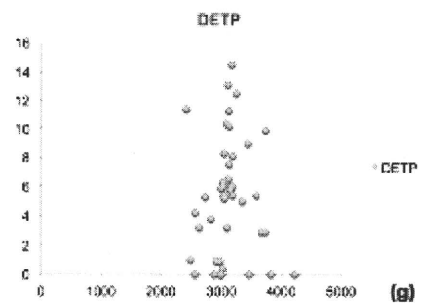
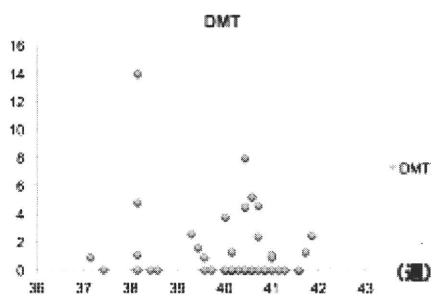
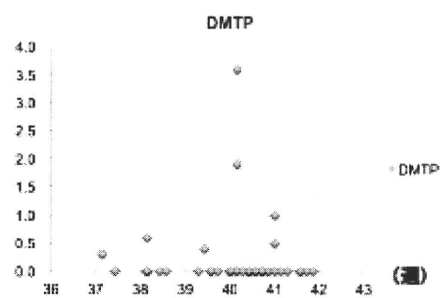


図14.臍帯血中DMT, DMTP, DEP, DETP 濃度と在胎週数との関係

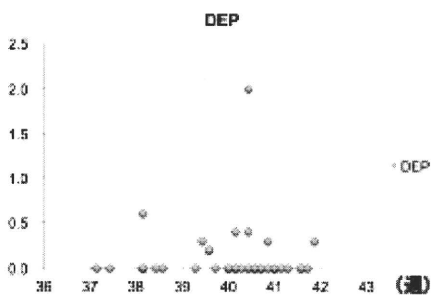
在胎週数と臍帯血中 DMT の相関



在胎週数と臍帯血中 DMTP の相関



在胎週数と臍帯血中 DEP の相関



在胎週数と臍帯血中 DETP の相関

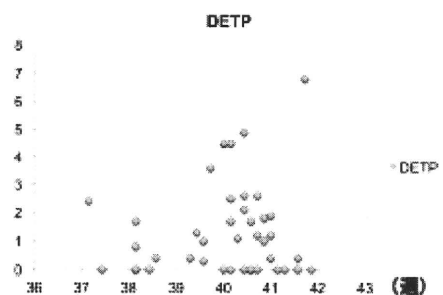
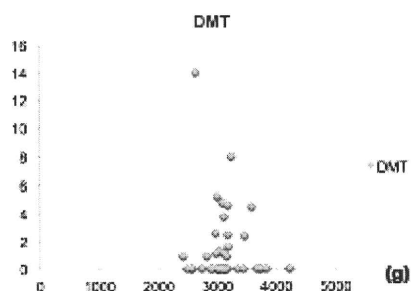
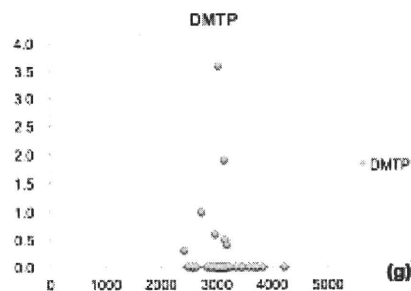


図15.臍帯血中DMT, DMTP, DEP, DETP 濃度と出生体重との関係

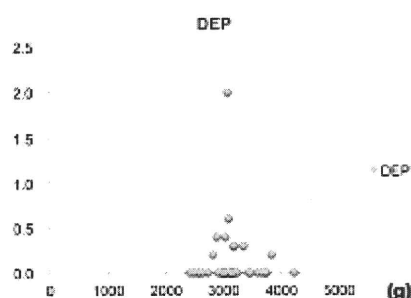
出生体重と臍帯血中 DMT の相関



出生体重と臍帯血中 DMTP の相関



出生体重と臍帯血中 DEP の相関



出生体重と臍帯血中 DETP の相関

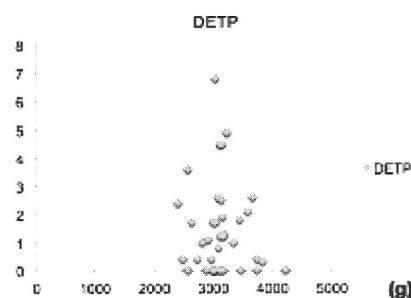


表1. 正常例と異常妊娠例での化学物質濃度の比較

	正常妊娠例 (n=99)	異常妊娠例 (n=11)	P 値
母体血中MEHP	1.6 (1.1-9.9)	1.6 (1.1-2.6)	0.972
母体血中DEHP	9.4 (4.1-460.1)	7.7 (0.7-15.9)	0.351
臍帯血中MEHP	1.4 (0.7-3.9)	1.3 (1.2-2.5)	0.853
臍帯血中DEHP	7.9 (2.3-19.3)	13.1 (6.2-37.4)	0.348

異常妊娠は、子宮内胎児発育遅延9例、前置胎盤2例

表2. 正常例と異常妊娠例での化学物質濃度の比較

	正常例 (n=33)	異常妊娠例 (n=7)	P値
母体血中PFHxS	0.32 ± 0.19	0.44 ± 0.25	NS
母体血中PFNA	1.47 ± 1.03	3.70 ± 2.18	0.002
母体血中PFOS	3.77 ± 1.38	4.40 ± 1.61	NS
母体血中PFOA	1.28 ± 0.67	1.09 ± 0.37	NS

異常妊娠は、子宮内胎児発育遅延5例、前置胎盤2例

表3. 正常例と異常妊娠例での化学物質濃度の比較

	正常例 (n=33)	異常妊娠例 (n=7)	P値
臍帯血中PFHxS	0.20 ± 0.11	0.15 ± 0.07	NS
臍帯血中PFNA	0.82 ± 0.51	1.74 ± 0.65	0.002
臍帯血中PFOS	1.37 ± 0.70	1.24 ± 0.68	NS
臍帯血中PFOA	1.50 ± 0.45	1.09 ± 0.37	NS

異常妊娠は、子宮内胎児発育遅延5例、前置胎盤2例

表4. 正常例と胎児発育遅延例での母体血中化学物質濃度の比較

	正常例 (n=33)	胎児発育遅延例 (n=5)	P値
母体血中PFHxS	0.32 ± 0.19	0.43 ± 0.21	NS
母体血中PFNA	1.47 ± 1.03	3.43 ± 2.31	0.003
母体血中PFOS	3.77 ± 1.38	4.70 ± 1.76	NS
母体血中PFOA	1.28 ± 0.67	1.39 ± 0.79	NS

表5. 正常例と胎児発育遅延例での臍帯血中化学物質濃度の比較

	正常例 (n=33)	胎児発育遅延例 (n=5)	P値
臍帯血中PFHxS	0.20 ± 0.11	0.16 ± 0.07	NS
臍帯血中PFNA	0.82 ± 0.51	1.73 ± 0.75	0.003
臍帯血中PFOS	1.37 ± 0.70	1.43 ± 0.40	NS
臍帯血中PFOA	1.50 ± 0.45	1.20 ± 0.39	NS

表6. 体外受精関連試薬製品中の化学物質濃度

製品コード	4-ニルフェノール(ppb)	4-n-ニルフェノール(ppb)	ビスフェノールA (ppb)	MEHP (ng/ml)	DEHP (ng/ml)	血清添加
A011110	<5.0	<5.0	<5.0	131.4	65.2	+
A012110	<5.0	<5.0	<5.0	130.6	62.3	+
A013110	7.3	<5.0	<5.0	127.8	53.3	+
A021110	<5.0	<5.0	<5.0	63.4	32.8	+
A022110	<5.0	<5.0	<5.0	8.7	<10	+
A023110	<5.0	<5.0	<5.0	9.1	<10	+
A031110	<5.0	<5.0	<5.0	24.7	<10	+
A032110	14.5	<5.0	<5.0	24.9	<10	+
A033110	<5.0	<5.0	<5.0	25.5	<10	+
A021210	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A022210	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A023210	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A031210	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A032210	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A033210	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A024110	77.3	<5.0	<5.0	1835	982	+
A025110	17.1	<5.0	<5.0	47	<10	+
A035110	19	<5.0	<5.0	116	83	+
A034110	69.5	<5.0	<5.0	401	<10	+
A044110	11	<5.0	<5.0	240	<10	+
A054110	164	<5.0	<5.0	588	59.8	+
A017110	<5.0	<5.0	<5.0	252	110.4	+
A027110	16.5	<5.0	<5.0	100.5	60.4	+
A067110	21.7	<5.0	<5.0	104.6	48.2	+
A068110	5.7	<5.0	<5.0	21	<10	+
A037110	7	<5.0	<5.0	24.1	<10	+
A018110	13.7	<5.0	<5.0	262.9	111	+
A019110	11.9	<5.0	<5.0	259.8	113.8	+
A038210	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A039210	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A011120	<5.0	<5.0	<5.0	101.7	46.6	+
A012120	<5.0	<5.0	<5.0	100.7	44.8	+
A013120	<5.0	<5.0	<5.0	101.9	45.3	+
A021120	<5.0	<5.0	<5.0	58.9	31.2	+
A022120	<5.0	<5.0	<5.0	7.1	<10	+
A023120	<5.0	<5.0	<5.0	7.6	<10	+
A031120	<5.0	<5.0	<5.0	23.3	<10	+
A032120	<5.0	<5.0	<5.0	23	<10	+
A033120	6.3	<5.0	<5.0	22.9	<10	+
A021220	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A022220	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A023220	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A031220	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A032220	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A033220	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A024120	54	<5.0	<5.0	288.9	<10	+
A025120	9	<5.0	<5.0	50.8	<10	+
A035120	11.7	<5.0	<5.0	98.8	73.4	+
A044120	5.5	<5.0	<5.0	230.7	<10	+
A054120	85.5	<5.0	<5.0	470.2	61.4	+
A017120	5.3	<5.0	<5.0	244.8	111.6	+
A027120	8.9	<5.0	<5.0	99.1	55.1	+
A067120	14	<5.0	<5.0	93.3	32.8	+
A068120	6.6	<5.0	<5.0	28.5	11.1	+
A037120	<5.0	<5.0	<5.0	21.9	<10	+
A018120	7.3	<5.0	<5.0	188.4	81.7	+
A019120	8.5	<5.0	<5.0	192.8	86.8	+
A038220	<5.0	<5.0	<5.0	<2	<10	-
A039220	<5.0	<5.0	<5.0	2.8	<10	-

・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
氏名:					

[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) たっぶり食べる
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が	(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

[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

[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、頭髪に使用するもの)	(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	(1)よく使う (2)時々使う (3)殆ど使わない

おつかれさまでした。ご協力ありがとうございました。



胎児へのエピジェネティックな影響の解析：エピミュータゲン評価法に関する研究

主任研究者	牧野 恒久	(社)有隣厚生会東部病院
分担研究者	塩田 邦郎	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
研究協力者	大鐘 潤	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
	新井 良和	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室

研究要旨

本研究はエピジェネティクスを指標として、胎児発生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）の検出系を構築することを目的としている。昨年度までにマウス ES 細胞を用いた検出系を確立し、本年度はヒトへの影響を知ることを目的に、ヒト iPS 細胞での検出系の確立を行った。25 種類の化学物質について血清中濃度での影響を調べた結果、マウス細胞の検出系で同定された 5 種類のエピミュータゲン（DEP, Hg, コチニン, Se, S-421）を含め、いずれもヒト iPS 細胞では影響は検出されなかった。ところが、これら 5 種類を混合してヒト iPS 細胞に暴露させるとヘテロクロマチンに変化が生じた。したがって、本研究で検出された化合物のエピジェネティクスレベルでの影響は、ヒトとマウスで異なっていることが明らかになった。さらに、これらの混合暴露は胚様体形成や神経分化にも影響を及ぼすことが示唆された。以上、ヒト iPS 細胞を用いた本エピミュータゲン検出系は、ヒトの健康への影響を検討する上で有用である。次に本研究で確立したエピミュータゲン検出系を用いて、ヒト体外受精卵培地より検出されたフタル酸ジエステル類（DEHP, MEHP）のヒト細胞への影響を検討した。受精卵培地より検出された濃度で DEHP, MEHP をヒト iPS 細胞に混合暴露したところ、ヘテロクロマチン、胚様体形成への影響は検出されなかった。以上より、ヒト iPS 細胞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になった。

A. 研究目的

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。DNA メチル化、ヒストン修飾などのエピジェネティック制御は遺伝子発現やクロマチン構造に関与することが知られており、DNA メチル化によりクロマチンは高度に凝集し、ヘテロクロマチンが形成される。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ック異常が病態に関連していることも明らかになりつつある。これにより、発生異常や慢性疾患の原因解明や新たな治療法の確立のため、エピジェネティクスの重要性が高まっている。農業を始めとする多くの化学物質が我々の身近で使用されているが、一部の化学物質は母体血中と同程度で臍帯血中からも検出されており、化学物質が胎児へ及ぼす影響が懸念されている。本研究では胎児発生に影響を与える化学物質（エピミュータゲン）の検出系を確立することを目的とした。昨年度までに、マウスの初期胚モデルと考えられるマウス ES 細胞を用いたエピミュータゲン検出系を確立し、25 種類の化学物質中、5 種類がエピジェネティクスを変化させることを明らかにした。本年度は、ヒトへの影響を知ることを目的として、化学物質がヒト iPS 細胞のエピジェネティック状況に与える影響を検討した。

B. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞でのエピミュータゲン探索系の確立  
ヒト iPS 細胞をフィーダー細胞（SNL）上で未分化状態を維持したまま培養し、25 種類の化学物質（3-PBA, TCP, DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP, DEDTP, S-421, ニコチン, コチニン, PFOA, PFOS, 2-EHA, 2EH, DCB, Sn, Se, Cd, Hg, Pb, penta BDE, deca BDE, DEHP, MEHP）（表 1）をそれぞれ血清中濃度、またはその 10 倍量で 4 日間暴露した（図 1）。化学物質のエピミュータゲン検出法として、ヘテロクロマチン形成を指標に検討した。細胞を暴露後にパラホルムアルデヒドで固定し、抗 HP1 $\alpha$  抗体を用いた免疫染色によりヘテロクロマチンを可視化して、核内の HP1 $\alpha$  シグナル数を指標に化学物質がヘテロクロマチン形成に及ぼす影響を検討した。さらに、先のマウス ES 細胞の解析でヘテロクロマチンを変化させることが明らかとなった 5 種類の化学物質（DEP, Hg, コチニン, Se, S-421）をそれぞれ血清中濃度で混ぜてヒト iPS 細胞に暴露し、化学物質の混合暴露がヘテロクロマチンに及ぼす影響を検討した。
2. 化学物質がヒト iPS 細胞の細胞分化に与える影響の検討  
ヒト iPS 細胞から胚様体、および神経細胞への分化培養を行い、化学物質が細胞分化に与える影響を検討した。未分化ヒト iPS 細胞に 5 種類の化学物質（DEP, Hg, コチニン, Se, S-421）を血清中濃度で 4 日間混合暴露し、引き続き化学物質を暴露した状態で分化培

養を開始した(図1)。胚様体形成は、ヒト iPS 細胞コロニーを浮遊培養させて20日間の分化を行った。また、神経分化ではヒト iPS 細胞コロニーをフィーダー細胞(PA6)上で20日間培養した。

(倫理面への配慮)

本研究に使用したヒト iPS 細胞は、京都大学にて樹立された細胞株を理研筑波バイオリソースセンターより分与を受けた。ヒト iPS 細胞の使用については、東京大学におけるヒト iPS 細胞の使用に関する規定に基づいて行った。

## C. 研究結果

### 1. 化学物質がヒト iPS 細胞のヘテロクロマチンに与える影響

先のマウス ES 細胞で解析した25種類の化学物質(表1)を血清中濃度、またはその10倍量でそれぞれヒト iPS 細胞に暴露して、ヘテロクロマチン状況を解析した。ヒト iPS 細胞ではマウス ES 細胞における検出系と異なり、血清中濃度の暴露でマウス ES 細胞のヘテロクロマチンを変化させた5種類(DEP, Hg, コチニン, Se, S-421)の化学物質は、ヒト iPS 細胞へのそれぞれの単独暴露ではヘテロクロマチンへの影響は観察されなかった(図2)。さらに、その他の化学物質を含め、PFOAを除く24種類の化学物質ではヘテロクロマチンに変化は認められなかった(表1)。

### 2. 化学物質の混合暴露によるヘテロクロマチンへの影響

マウス ES 細胞のエピジェネティック状況を変化させた5種類の化学物質(DEP, Hg, コチニン, Se, S-421)をそれぞれ血清中濃度で混ぜてヒト iPS 細胞に混合暴露し、化学物質の混合暴露がヘテロクロマチンに与える影響を検討した。それぞれの化学物質の単独暴露ではヒト iPS 細胞のヘテロクロマチンに変化は認められなかったが、混合暴露によりヘテロクロマチンを示すHP1 $\alpha$ シグナス数が有意に低下した(図3)。このことは、化学物質が複数混ざり合わさることで、ヘテロクロマチンに影響を与えることを示している。

### 3. 化学物質の混合暴露による細胞分化への影響

5種類の化学物質(DEP, Hg, コチニン, Se, S-421)の混合暴露が細胞分化に及ぼす影響について、培養下での初期発生胎児モデルである胚様体形成、および神経分化系を用いて検討した。胚様体分化20日において、対照群では卵黄嚢様の構造が確認された。一方、暴露群では卵黄嚢様の構造が認められず、化学物質の混合暴露が胚様体形成に影響を与えることが示された(図4A)。さらに、神経分化においても、暴露群では対照群に比べて細胞の生着率が低く、細胞増殖も遅い傾向にあった(図4B)。以上の結果より、ヘテロクロマチンを変化させた化学物質の混合暴露は、ヒト iPS 細胞の細胞分化にも影響を及ぼすことが示唆された。

### 4. ヒト受精卵培地中に含まれるフタル酸ジエステル類がヒト iPS 細胞のヘテロクロマチンに与える影響

当研究班の高取らの分析より、市販されているヒト受精卵培地中には母体・臍帯血清中濃度の数十倍の濃度でフタル酸ジエステル類(DEHP, MEHP)が含まれていることを明らかとなった(平成22年度の高取らの報告書を参照)。これらのDEHP, MEHPがヒト受精卵のエピジェネティック状況に与える影響を検討するために、体外でのヒト初期胚モデルであるヒト iPS 細胞にヒト受精卵培地より検出された濃度で4日間、DEHPとMEHPを混合暴露した。ヘテロクロマチン解析の結果、ヒト受精卵培地中から検出された濃度でのDEHP, MEHPによるヘテロクロマチン変化は観察されなかった(図5)。また、胚様体形成と共にDEHP, MEHPをヒト受精卵培地中の濃度で暴露したところ、暴露群でも対照群と同様に卵黄嚢様の構造が確認され、DEHP, MEHPによる影響は検出されなかった。

#### D. 考察

これまでに本研究班では母体・臍帯血清中に存在する様々な化学物質の生体暴露濃度を基に、ヒト胎児のエピジェネティック状況に影響をもたらすエピミュータゲンの検出系の確立を進めてきた。本年度はヒト iPS 細胞を用いた検出系を確立し、化学物質の混合暴露がヒト iPS 細胞のヘテロクロマチンを変化させることが明らかとなり、ヒト細胞を用いたエピミュータゲン検出に成功した。さらに、本研究で確立したエピミュータゲン検出系により、母体・胎児環境での化学物質が胎児のエピジェネティック状況に与える影響を検出すると共に、体外培養下でヒト胚に影響を与えるエピミュータゲンを検出・評価することも可能となった。

先の解析より同定した、マウス ES 細胞のエピジェネティック状況を変化させた 5 種類の化学物質 (DEP, Hg, コチニン, Se, S-421) については、いずれもヒト iPS 細胞ではヘテロクロマチンに変化は観察されなかった。一方、これまでの生体試料中における化学物質の暴露状況の分析結果から、母体や胎児は単独ではなく複数の化学物質に曝されていると考えられる。このことから 5 種類の化学物質を血清中濃度で混合暴露したところ、ヒト iPS 細胞の検出系でもヘテロクロマチンの変化が観察された。また、これらの化学物質の混合暴露は、胚様体形成、神経分化などの細胞分化にも影響を与えることが示唆された。

このように、単独暴露ではエピジェネティックな変化が検出されなかったとしても、混合暴露では、ヒト初期胚のモデルである iPS 細胞でエピジェネティックな変化を引き起こすことが明らかになった。したがって今後は、同一血清サンプルから検出される複数の化学物質の組み合わせや、母体内で共存する可能性のある化学物質とその一連の代謝物の組み合わせについての複合暴露影響の解析が重要となる。本研究班の解析から検出された同一サンプル内での複数の化学物質の生体暴露状況の把握、およびそれらの暴露量を元にした化学物質のエピミュータゲン検出は、化学物質がヒト胎児のエピジェネティック状況に与える影響を検討する上で有効になると考えられる。

#### E. 結論

昨年度までのマウス ES 細胞での検出系に引き続き、ヒト iPS 細胞を用いたエピミュータゲン検出系を確立した。本研究では従来の毒性学試験等と異なり、ヒト血清中で検出される非常に低濃度の化学物質が誘起するか否かのエピジェネティック異常の検出を試みた。その結果、マウスとヒトでは化学物質のエピジェネティック状況への影響が異なることが明らかとなった。さらに、血清中濃度での単独暴露ではエピジェネティックな変化を引き起こさなかった化学物質

についても、複数を混合して暴露した場合には、ヘテロクロマチン形成や細胞分化に変化を引き起こすことが示唆された。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

(1) Yoshikazu Arai, Jun Ohgane, Shintaro Yagi, Rie Ito, Yusuke Iwasaki, Koichi Saito, Kazuhiko Akutsu, Satoshi Takatori, Rie Ishii, Rumiko Hayashi, Shun-ichiro Izumi, Norihiro Sugino, Fumio Kondo, Masakazu Horie, Hiroyuki Nakazawa, Tsunehisa Makino and Kunio Shiota.

Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples. J Reprod Dev (submitted).

(2) 広沢-高森瑞子、尾形聡子、塩田邦郎  
食の安全-エピゲノム評価に向かって-。食の安全科学の展開-食のリスク予測と評価に向けて-。シーエムシー出版、78-80、2010。

##### 2 学会発表

(1) 塩田邦郎

環境リスクのエピジェネティクスとエピゲノム研究、日本薬学会環境衛生部主催フォーラム 2010 : 衛生薬学・環境トキシコロジーにおけるフォーラム (2010)

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Kondo F, Okumura M, Oka H, Nakazawa H, Izumi S, Makino T. Determination of Phthalates in Diet and Bedding for Experimental Animals Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Bull Environ Contam Toxicol. 2010;84:212-216.
2. Sato S, Yagi Y, Hirabayashi K, Hattori N, Iwatani M, Okita K, Ohgane J, Tanaka S, Wakayama T, Ynamanaka S, Shiota K. Genome-wide DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) residing in mouse pluripotent stem cells. Cells. 2010;15:607-618.
3. Lim H-W, Iwatani M, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Residence to 5-aza-2-deoxycytidine in gene regions compared to non-genic repetitive sequence. J Reprod Dev. 2010;56:86-93.
4. Iwasaki Y, Goto M, Mochizuki K, Terakawa E, Ito R, Saito K, Makino T, Nakazawa H. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry for quantification of nicotine and its metabolites in human maternal and cord sera. Biomed Chromatogr. 2011; 25:502-510.
5. Arai Y, Ohgane J, Yagi S, Ito R, Iwasaki Y, Saito K, Akutsu K, Takatori S, Ishi R, Hayashi R, Izumi S, Sugino N, Kondo F, Horie M, Nakazawa H, Makino T, Shiota K. Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples. J Reprod Dev. In press.
6. 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. 2010; 85:92-96.
7. 牧野恒久。母児環境における化学物質。日本産婦人科・新生児血液学会誌。2010; 20:5-6。
8. 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。2010; 28:217-225。

### 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

なし。

### V. 健康危険情報

ヒト体外受精-胚移植に際して、現時点で使用されている各種培養液、調整液、ヒトアルブミン溶液などに混入する化学物質については、本研究で指摘するように、今後より集学的に慎重な検討が必要である。

# Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry for quantification of nicotine and its metabolites in human maternal and cord sera

Yusuke Iwasaki<sup>a</sup>, Masato Goto<sup>a</sup>, Keisuke Mochizuki<sup>a</sup>, Emi Terayama<sup>a</sup>, Rie Ito<sup>a</sup>, Koichi Saito<sup>a</sup>, Norihiro Sugino<sup>b</sup>, Tsunehisa Makino<sup>c</sup> and Hiroyuki Nakazawa<sup>a\*</sup>

**ABSTRACT:** A selective and sensitive HILIC-MS/MS method for the simultaneous quantification of nicotine and its metabolites in human maternal and cord sera was developed and validated. After solid-phase extraction, LC separation was achieved on a hydrophilic interaction chromatography. The validated method is capable of selective identification as well as accurate and sensitive quantification. Analyte recovery ranged from 86.2 to 107.7% and intra- and inter-day assay precision were less than 15% relative standard deviation. This sensitive HILIC-MS/MS method can be used to determine nicotine and its metabolic profile in smokers. This validated method is useful for the determination of nicotine and its metabolites in human serum in future studies of the effects of nicotine exposure on neonatal outcome. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** nicotine; metabolite; hydrophilic interaction chromatography; tandem mass spectrometry; serum

## Introduction

Nicotine (NIC), the principal active constituent and primary alkaloid in tobacco products, is a widely consumed natural product. NIC is the major tobacco-specific component in both mainstream tobacco smoke and environmental tobacco smoke (ETS). NIC contributes to diseases that are related to smoking.

There are numerous reports on tobacco-related health risks in women, children and neonates. Women are at risk of lung cancer (Freedman *et al.*, 2008), hypertension (Bowman *et al.*, 2007), chronic obstructive pulmonary disease and cancer (Pope *et al.*, 1999). For the fetus, maternal smoking is associated with premature birth and intrauterine growth restriction (Andres and Day, 2000; Bouckaert, 2000). Neonates and young children who are exposed to second-hand smoke in their homes are at an increased risk of the development of asthma and other respiratory disorders later in childhood, and death from the sudden infant death syndrome (Windham *et al.*, 2000).

NIC reaches the central nervous system (CNS) within 20 s of tobacco smoke inhalation; it has a plasma half-life of 2–4 h and a brain half-life of 52 min (Benowitz *et al.*, 1994). Because of the health risks associated with tobacco exposure, research into suitable biomarkers of tobacco smoke exposure has surged (Pérez-Stable *et al.*, 1995; Benowitz, 1996). Smoking is one of the main causes of newborn premature death in Japan and has been shown to increase the incidence of various types of cancers (Seltzer, 2003). Smokers generally have plasma cotinine (COT) levels higher than 15 ng/mL, while heavy smokers (>20

cigarettes/day) usually have levels higher than 300 ng/mL. Second-hand smoke, or ETS, has been an area of active study in the health sciences for several decades. The National Health and Nutrition Examination Survey data from 1988 to 1991 showed that 88% of non-smokers in the USA had detectable concentrations of serum COT (Pirkle *et al.*, 1996), which is one of the major oxidative metabolites of NIC, accounting for 70–80% of NIC metabolites in serum (Hukkanen *et al.*, 2005). COT has a relatively long half-life of 10–40 h in humans (Russell and Feyerabend, 1978), which makes it a suitable marker to assess the exposure to tobacco smoke.

\* Correspondence to: H. Nakazawa, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan. E-mail: nakazawa@hoshi.ac.jp

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, Tokyo, Japan

<sup>b</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Japan

<sup>c</sup> Toubu Hospital, Shizuoka, Japan

**Abbreviation used:** COT, cotinine; ETS, environmental tobacco smoke; HCOT, *trans*-3'-hydroxycotinine; NCOT, norcotinine; NIC, nicotine; NNIC, normicotine.

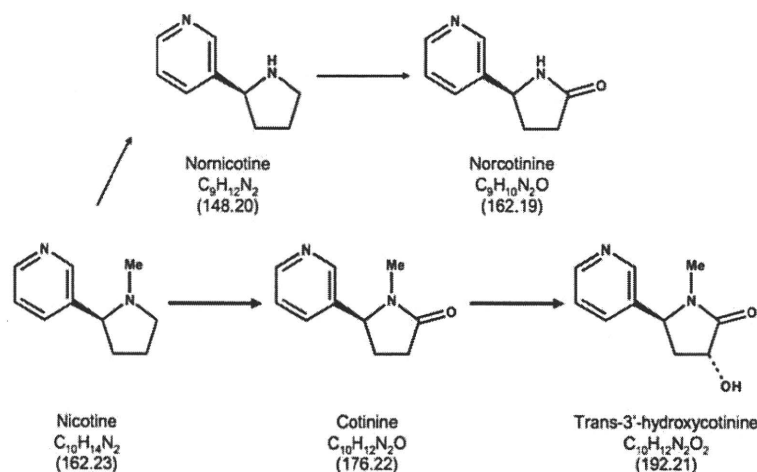


Figure 1. Chemical structures of nicotine and its metabolites.

Table 1. MRM conditions for the analysis of nicotine and its metabolites

Compound	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Cone voltage (V)	Collision voltage (V)
NNIC	149.2	130.3	28	18
NIC	163.0	130.3	30	20
NCOT	163.2	80.0	38	23
COT	176.9	80.0	35	22
HCOT	193.2	79.9	39	23
NNIC-d <sub>4</sub>	153.2	134.3	28	18
NIC-d <sub>3</sub>	166.0	130.3	30	20
NCOT-d <sub>4</sub>	167.2	84.0	38	23
COT-d <sub>3</sub>	179.9	80.0	35	22
HCOT-d <sub>3</sub>	196.2	79.9	39	23

When inhaled, tobacco smoke is efficiently absorbed from the lung, where 82–92% of NIC is absorbed into the pulmonary circulation, followed by rapid permeation through the blood–brain barrier (Lockman *et al.*, 2005).

A variety of methods have been reported for the determination and quantification of NIC and its metabolites in biological fluids, i.e. serum, urine, saliva and whole blood. These include high-performance liquid chromatography (HPLC) (Pacifi *et al.*, 1993; Abu-Qare and Abou-Donia, 2001) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) (Davoli *et al.*, 1998; Jacob *et al.*, 2000; Man *et al.*, 2006). Some methods require a large sample volume (1 mL) of plasma (Xu *et al.*, 2004). A liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) method (McManus *et al.*, 1990; Okano *et al.*, 2007) was reported for the simultaneous detection of NIC and COT in biological fluids. Several liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods have been reported. However, some of the methods require troublesome extraction procedures and/or multiple sample preparation steps prior to the assay. Moreover, these methods use a large volume sample (about 0.5–1.0 mL; Bernert *et al.*, 1997; Moyer *et al.*, 2002; Shakleya and Huestis, 2009; Miller *et al.*, 2010). Hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) methods, which measured only NIC and COT, have been reported (Shou and Naidong, 2005;

Murphy *et al.*, 2007). Conventional methods have low selectivity and/or require a large volume serum for the determination of analytes. A high-sensitivity and accurate analytical method is needed, using very low volume sample because it is difficult to obtain a large amount of cord blood.

In the present study, we developed a HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of NIC and its metabolites in human serum. This method was used to determine NIC and its metabolites in human maternal and cord sera, to study the effects of the exposure on neonatal outcome.

## Experimental

### Materials

(–)-Nicotine (NIC) and (–)-cotinine (COT) were purchased from Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan). *Trans*-3'-hydroxycotinine (HCOT), (*R,S*)-normicotine (NNIC) and (*R,S*)-norcotinine (NCOT) were from Toronto Research Chemicals (Toronto, USA). Chemical structures and metabolic pathways are shown in Fig. 1. (±)-Nicotine-d<sub>3</sub> (NIC-d<sub>3</sub>), (±)-cotinine-d<sub>3</sub> (COT-d<sub>3</sub>), (*R,S*)-normicotine-d<sub>4</sub> (NNIC-d<sub>4</sub>), (*R,S*)-norcotinine-d<sub>4</sub> (NCOT-d<sub>4</sub>) and *trans*-3'-hydroxycotinine-d<sub>3</sub> (HCOT-d<sub>3</sub>) used as internal standard (IS) were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, USA). All other reagents of analytical grade were obtained from Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan). Solid-phase extraction (SPE) Oasis MCX (1 mL, 30 mg)



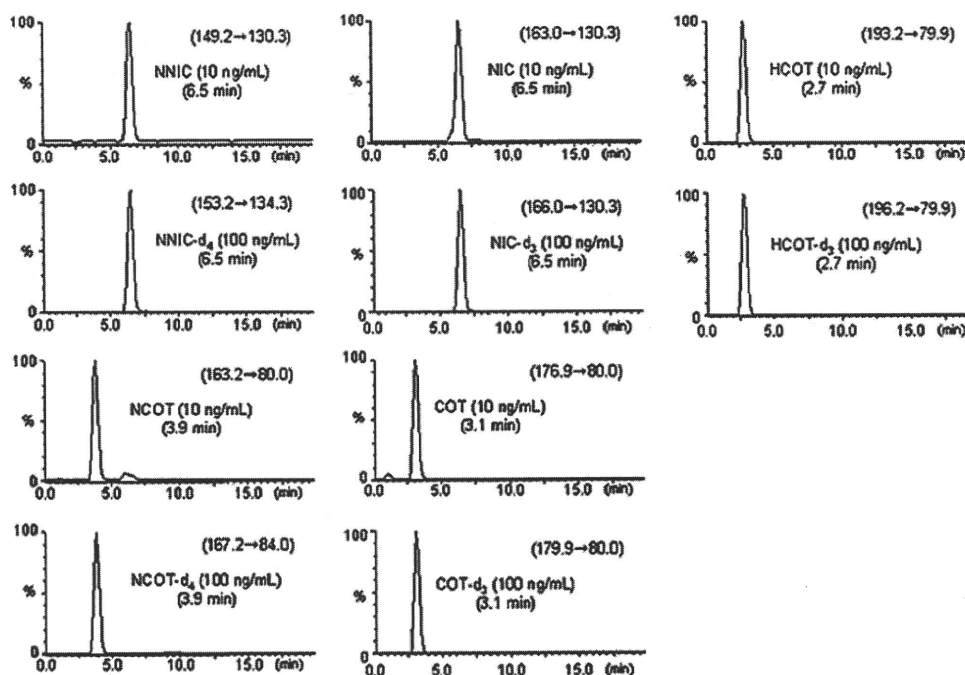


Figure 2. MRM chromatograms of standard samples (10 ng/mL).

Table 2. Recovery test of nicotine and its metabolites in serum samples

Compound	LOQ	Recovery yield (mean $\pm$ SD, %, $n = 6$ )			Matrix effect
		10 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL	
NNIC	96.7 $\pm$ 5.5	100.3 $\pm$ 6.5	103.7 $\pm$ 1.0	102.4 $\pm$ 2.7	81.7 $\pm$ 9.6
NIC	107.6 $\pm$ 10.1	90.1 $\pm$ 2.6	98.2 $\pm$ 2.4	98.6 $\pm$ 1.4	75.9 $\pm$ 8.5
NCOT	103.3 $\pm$ 4.0	107.7 $\pm$ 1.9	101.4 $\pm$ 8.0	92.2 $\pm$ 4.8	97.1 $\pm$ 14.8
COT	96.1 $\pm$ 6.1	96.6 $\pm$ 8.3	97.7 $\pm$ 1.4	99.2 $\pm$ 1.7	108.9 $\pm$ 15.8
HCOT	86.2 $\pm$ 11.0	97.3 $\pm$ 9.6	101.0 $\pm$ 2.7	102.2 $\pm$ 2.5	67.4 $\pm$ 11.0

cartridges were from Waters (Tokyo, Japan). Deionized water was distilled before passing through a Millipore water purification system.

This study was performed in accordance with the protocol approved by the Institutional Review Board of Yamaguchi University Graduate School of Medicine. Written informed consent was obtained from all study participants. Maternal blood samples were obtained from 20 Japanese normal pregnant women at admission for labor (pregnancy 37–42 weeks of gestation) in Yamaguchi University Hospital. Cord blood samples were obtained immediately after labor. After blood sampling, serum fractions were separated by centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

#### LC-MS/MS Conditions

LC-MS/MS analyses were performed using an Alliance HPLC system (Waters, Japan) interfaced to a Micromass Quattro micro API triple quadrupole mass spectrometer (Waters) equipped with an electrospray ionization (ESI) probe. Chromatographic separation was achieved using an Atlantis HILIC column (100  $\times$  2.1 mm, 3.0  $\mu\text{m}$ ; Waters, Japan) and a gradient mobile phase. Column temperature was maintained at  $40^{\circ}\text{C}$  and flow rate was set to 0.2 mL/min. Mobile phases were (A) acetonitrile, (B) water and (C) 1% formic acid. A gradient program was used according to the

following profile: 0–3 min, 25% B and 5% C; 3–4 min, 25–45% B and 5% C; 4–11 min, 45% B and 5% C; 11–12 min, 45–25% B and 5% C; and 12–20 min, 25% B and 5% C. Autosampler temperature was set to  $4^{\circ}\text{C}$  and 5  $\mu\text{L}$  was injected.

MS/MS characterization of the analytes was achieved using the triple quadrupole with an ESI probe. The analytes that were dissolved in methanol to a concentration of 100 ng/mL were infused through an integrated syringe pump into the ESI probe at a rate of 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  to tune the mass spectrometer and optimize the acquisition parameters. Optimization results for the two most abundant ion transitions of analytes in the multiple reaction monitoring (MRM) mode are given in Table 1. The following optimized conditions were set: source temperature at  $120^{\circ}\text{C}$  and desolvation temperature at  $300^{\circ}\text{C}$ . Cone and desolvation gas flow rates were set at 50 and 300 L/h, respectively.

#### Preparation of Standards

Stock solutions of analytical compounds (2 mg/mL) were prepared in methanol. Working solutions of analytical compounds were prepared by serial dilution of the stock solutions in methanol. Quality control (QC) solutions for the determination of accuracy, precision and the stability of samples under storage conditions were added to 100  $\mu\text{L}$  of human serum

**Table 3.** Validation of LC-MS/MS method for the analysis of nicotine and its metabolites

Compound	Range (ng/mL)	LOD <sup>a</sup> (ng/mL)	LOQ <sup>b</sup> (ng/mL)	<i>r</i>	Slope	Intercept
NNIC	7.5–500	0.5	7.5	0.9999	0.0023	–0.0010
NIC	1–500	0.5	1	0.9999	0.0049	0.0008
NCOT	5–500	0.5	5	0.9999	0.0050	–0.0031
COT	1–500	0.5	1	0.9999	0.0019	0.0003
HCOT	1–500	0.5	1	0.9999	0.0053	0.0013

<sup>a</sup> LOD: S/N = 3.

<sup>b</sup> LOQ: S/N > 10, accuracy < 15% and precision < 15%.

**Table 4.** Accuracy, intra-day assay and inter-day assay for serum (*n* = 6)

	LOQ	10 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
<b>NNIC</b>				
Accuracy (%)	101.1	92.8	91.2	100.1
Intra-day (%RSD)	3.3	6.5	1.0	2.7
Inter-day (%RSD)	10.8	7.7	9.8	3.1
<b>NIC</b>				
Accuracy (%)	109.2	96.8	101.0	99.4
Intra-day (%RSD)	10.0	2.6	2.4	1.4
Inter-day (%RSD)	7.1	7.4	4.9	2.6
<b>NCOT</b>				
Accuracy (%)	109.0	107.7	105.3	101.6
Intra-day (%RSD)	3.0	1.9	8.0	4.8
Inter-day (%RSD)	8.5	5.4	8.7	7.0
<b>COT</b>				
Accuracy (%)	97.5	98.1	95.4	97.3
Intra-day (%RSD)	7.5	8.3	1.4	1.7
Inter-day (%RSD)	4.8	7.9	4.9	2.5
<b>HCOT</b>				
Accuracy (%)	85.8	95.2	97.2	97.5
Intra-day (%RSD)	10.0	9.6	2.7	2.5
Inter-day (%RSD)	11.1	9.1	2.4	2.1

creating final concentrations from LOQ, 10, 50 and 100 ng/mL, respectively, and stored at –80°C until analysis.

**Sample Preparation by Solid-phase Extraction**

Serum sample (100 µL) was added to 50 µL of IS solution (200 ng/mL), 750 µL of water and 100 µL of 25% (w/v) trichloroacetic acid to remove proteins. The solutions were centrifuged at 10,000g for 5 min after vortexing. The supernatant (900 µL) was applied to SPE cartridges.

An Oasis MCX cartridge (Waters) was conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water. Serum samples were loaded and allowed to flow by gravity. Cartridges were washed with 1 mL × 2 water and 1 mL methanol, and dried for 5 min. Analytes were eluted with freshly prepared 1 mL × 3 methanol with 1% ammonia (v/v). Eluates were evaporated to dryness under a nitrogen stream at 50°C. Samples were reconstituted in 90 µL of acetonitrile with 0.1% formic acid (v/v) and transferred to polypropylene autosampler vials.

**Validation Procedures**

Prior to the application to real samples, the method was tested in a validation protocol following the accepted criteria for bioanalytical

method validation. Selectivity, recovery, matrix effect, linearity, limits of detection and quantification (LOD and LOQ), precision, accuracy and stability were determined.

Recovery was calculated from the peak area ratios (in percent) of extraction samples to control samples at each concentration. For the evaluation of the matrix effect, the peak areas of extracted pooled serum samples spiked with standards at QC concentrations after the extraction procedure were compared with the peak areas of QC samples.

Calibration curves were tested over the calibration range for all the analytes. Peak area ratios between compounds and IS were used for calculations. The correlation coefficient (*r*) should be more than 0.99 and deviation of the calculated concentrations should be within ±15% from nominal concentrations.

Five replicates of pooled serum samples were used to calculate LOD and LOQ. The standard deviation (SD) of the mean noise level of each analyte was used to determine LOD (S/N = 3) and LOQ (S/N > 10). To be accepted, the calculated LOQ had to show precision and accuracy within 15% relative SD (RSD) and relative error, respectively.

Six replicates of each of four different QC sample concentrations were analyzed for the determination of intra-day assay precision and accuracy. Inter-day assay precision and accuracy were determined for six independent experimental assays of the aforementioned replicates. Precision was expressed as the RSD of the concentrations calculated for QC samples.