

201035002B

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20年—22年度 総合研究報告書

主任研究者 牧野 恒久

平成23年 3月

<目次>

I. 総合研究報告

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 東海大学 医学部	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	19
-------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷.....	129
-----------------------	-----

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

主任研究者 牧野 恒久（社団法人有隣厚生会東部病院 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検討する目的で、新しいエピジェネティクスの評価法を開発することを目的とした。化学物質の人への健康影響を考察する場合、生体試料の真の暴露量を測定し、その暴露量の範囲内でのヒト健康影響を検討した研究は多くは見当たらない。これまでの多くの検討が動物実験系の中で、真の暴露量とはかけ離れた薬物学的高濃度の化学物質を用いての研究が多い。本研究は化学物質による子どもへの健康影響を検討するために、以下の3つの項目、すなわち：① 生体試料中の有害化学物質を測定するための感度・特異性に優れた分析法の開発・構築、② 周産期を中心に化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング、③ 暴露量内での化学物質の毒性評価を行えるエピジェネティクス評価法の開発をワンセットで行うことを研究の主眼とした。

平成14年～16年度の厚生労働科学研究「試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究」（化学物質リスク研究事業）、ならびに平成17年～19年度の厚生労働科学研究「化学物質による子供への健康影響に関する研究」（化学物質リスク事業）を通じて、本研究では多くの化学物質の中から、子どもの健康被害が想定しうる化学物質の絞込みを行った。その結果、樹脂関連化学物質として、樹脂原料のビスフェノールA（BPA）、その可塑剤であるフタル酸エステル類（DEHP、MEHP）、界面活性剤であるノニルフェノール（NP）、同じく撥水剤である有機フッ素系化合物とくにパーフルオロ化合物（PFCs）、樹脂製品の難燃剤として使用されるポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）、家庭で使用されるピレスロイド系農薬、一般農業で多量に使用される有機リン系農薬、喫煙に関してニコチン、コチニン、19種の重金属類などを研究対象とした。

杉野班では、山口大学医学部の倫理規定に則り、十分なインフォームドコンセントのもとに平成20年9月より平成22年6月までに統計処理に耐えうる十分な症例数として、合計145症例から母体血、母体尿、母乳、羊水、臍帯血、胎脂などを採取した。同時に採取器具、採取手技から人工夾雑物が混入しない採取法を確立した。生体試料採取の際に、各症例の生活習慣、住宅環境と生体暴露量との関連性を把握する目的でアンケート調査を行った。

中澤班では真に信頼性を有するこれら化学物質の暴露量を得るために、鋭敏な感度と特異性を有する測定法を開発・確立した。各試料における具体的な暴露量については以下の各項目を参照されたい。本研究の第3年度においては、母児環境の検討を一步進めて、体外受精時の胚培養環境における化学物質の暴露状況を把握する目的で胚培養液、胚培養器具などについても分析を行った。その結果、現時点で臨床に供されている胚培養液のいくつかには、母体血中の暴露量をはるかに超える濃度の化学物質が検出された。

塩田班では中澤班から提供されたヒト試料の暴露濃度に基き、マウスES細胞ならびに京都大学より提供されたヒトiPS細胞を用いて、化学物質の健康影響をエピジェネティクス評価法から検討した。そ

の結果、マウスES細胞のヘテロクロマチン形成ならびにゲノムワイドメチル化解析法で分析すると、有機リン系農薬の代謝産物DEP、重金属のセレン (Se)、水銀 (Hg)、喫煙関連代謝物質コチニン、殺虫剤の共力剤であるオクタクロロジプロピルエーテル (S-421) の5物質が、ヒトiPS細胞ではこれら5物質の混合物ならびに有機フッ素系化合物のPFOAが、ヒト試料の暴露量の範囲の量でDNAのメチル化プロファイルに変化をもたらすことが判明した。この結果は、母体—胎児環境中に検出される濃度で、これら化学物質の影響を受ける遺伝子領域が存在することが示唆されたことになる。

本研究を総括すると、化学物質の毒性評価、健康への影響評価、細胞分化へ影響などを、マウスおよびヒト細胞を用いてヘテロクロマチン、DNAメチル化を指標としたエピミュータゲン検出することにより可能となった。

分担研究者

中澤 裕之：星薬科大学 薬品分析化学 教授
塩田 邦雄：東京大学大学院農学生命科学研究科
細胞生化学 教授
杉野 法広：山口大学大学院医学系研究科産婦人
科学 教授

A. 研究目的

胎児ならびに子どもは外来化学物質に対して脆弱な集団で、有害な化学物質から早期に保護せねばならない。このことは、どのような化学物質にどの程度暴露されているかを知りえた後に、この暴露量の範囲内での速やかな健康評価が下せる方法の存在が必須である。本研究は化学物質によるDNAエピ変異原性の変化の解析法を確立し、最終的にはこの解析法をヒトiPS細胞で検討し、広く汎用性をもって健康政策に応用されることを目的とした。

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。しかしながら、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数多くある。特に、これらの化学物質が母体を介し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や乳児の発生または発育時期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。

本研究は化学物質による子どもへの健康影響を調査するために、以下の3つのユニットで構成される：① 生体試料中の有害化学物質の分析法の開発・構築、② 化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング (胎児期を中心に)、③ 化学物質の胎児発生におけるエピジェネティックな評価法の確立。

本研究は単なる化学物質の測定法を開発するものではなく生涯にわたって影響を及ぼす遺伝子機能の変化を捉えることが出来るエピジェネティク

ス評価法の開発が主眼となる。エピジェネティクスは現在(独)科学技術振興機構にて将来の科学技術の重要なテーマとして採択され、将来にわたってわが国の科学技術の政策テーマとなることが決定している。

化学物質のDNA変異原性についてはすでに確立しているが、生体内の暴露量の範囲内では有意な変化が捉えられていない。本研究ではDNAの変異は伴わないが、細胞世代を超えて継続する遺伝子機能を、エピジェネティックスレベルで解析しうる方法を内外で始めて開発・確立することを研究の目的に据えている。

1. 母児試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬ならびにビスフェノールAの暴露量評価

母児環境における農薬と樹脂原料であるビスフェノールAの暴露状況を検討する目的で、母体血、母体尿、臍帯血のヒト生体試料について測定・分析を行うことを目的とした。有機リン系農薬は世界で用いられている殺虫剤の過半を占めている。一方、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いる。環境庁から示された内分泌かく乱作用が疑われる67物質の中にピレスロイド系、有機リン系農薬が含まれており、少量のピレスロイド(デルタメトリン)を妊娠した実験動物に投与すると、子ネズミの脳に影響が現れ、成熟期になっても障害が残っていることが報告されている。また、脳が発達中の若い動物にピレスロイドを投与すると、行動や脳の機能に大人になっても続く影響を与えることが報告されている。一方、ビスフェノールAについても平成17-19年度の分析結果に、症例数を追加して補完する。

本研究では、ピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬ならびにビスフェノールAについて、これらの生体内代謝産物を中心に信頼性の高い高感度

分析法を構築し、これらの化学物質暴露による胎児、乳児に及ぼす影響を検証する基礎資料を得ることを目的とする。

2. 母児試料中の有機フッ素系化合物およびニコチンならびにコチニンの暴露量評価

1) 有機フッ素系化合物

本研究では、母児環境における有機フッ素系化合物 (PFCs) と、喫煙の影響を検討する目的で母体血ならびに臍帯血についてその暴露状況を測定・分析する。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、界面活性剤などとして、我々の生活環境中で広く用いられている。しかしその一方で、PFCsが極めて高い安定性や環境中での難分解性を有することが明らかとなってきた。ヒトでは主に血液に蓄積し、PFOSにおける血中半減期は8.7年と報告されていることから、ヒト暴露に関する研究も求められている。また、動物実験においては、甲状腺ホルモンへの影響や催奇形性など、次世代に関わる毒性が示唆されている。しかしながら、その暴露源に関しては、未だに研究の途上にあり、PFCsのヒト暴露源および暴露経路の解明が要求されている。

2) ニコチンおよびコチニン

喫煙による母体、胎児、新生児への影響についてはこれまで多くの議論が重ねられてきた。近年、タバコの煙に含まれる有害化学物質は200種類を超えることがわかっており、喫煙による人体への悪影響が明らかとなっている。その中でもニコチンは喫煙により体内に吸収され、ニコチン依存症を引き起こすことから、必然的に喫煙行為を助長させてしまう。また、周産期の妊婦がたばこの煙を吸うことによって、妊婦や胎児に与える影響は深刻なものとされている。それ故、喫煙習慣を把握するために、ニコチンおよびその代謝物質の高感度分析法が求められている。ニコチンの代謝物質のひとつであるコチニンは、半減期が約20時間と長く、生物学的指標として適しており、喫煙習慣を認識するマーカーとして、しばしば分析対象となっている。本研究では、親水性相互作用クロマトグラフィー質量分析法 (HILIC/MS) を用いて、母児試料とりわけ母体血、臍帯血試料中に含まれるニコチンおよびその代謝物質であるコチニンの高感度分析法を構築し、タバコの煙によるヒト妊婦の暴露実態の推量を行った。

3. 母児試料における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) の暴露量評価

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2000年にはわが国では2800トンの生産が記録されている。一方、PBDEsは残留性環境汚染物質として近年問題視されており、げっ歯類での経口投与実験において甲状腺機能や脳神経機能への悪影響が報告されている。米国では1990年代のペンタBDEの使用量が他国より多く、人体中のペンタBDE濃度が我が国や欧州より数十～数百倍高いレベルにあり、その暴露経路としてペンタBDEに汚染された屋内大気・ハウスダストの吸引が示唆されている。

我が国では、これまでにデカBDEを中心としたPBDEsが10万トン程度使用されたと推定されているが、屋内汚染実態および日常的なPBDEs暴露量については不明な点が多いのが実情である。

一方、S-421はハエ、蚊、ゴキブリ、シロアリなどの駆除剤 (殺虫剤) の殺虫効果を増強する目的で添加される共力剤で、ポリ臭素化ジフェニルエーテルと同様、難分解性で生物蓄積性が問題視される化学物質である。そこで本研究では、我が国のハウスダストおよびその場に居住するヒト血清中のこれら化学物質の暴露量をまず把握し、その後母乳、胎脂などへの暴露量を測定・分析することを目的とした。

4. フタル酸エステル類の母児環境における暴露量評価

フタル酸ジエステル類は、主に塩化ビニル樹脂の可塑剤として工業製品中に多用されており、日常的な暴露が危惧される化学物質のひとつである。当該化学物質の暴露により危惧される生体影響として精巣毒性があり、妊婦および胎児もしくは男子乳幼児が高感受性グループとして認識されている。このため、妊婦、胎児および乳児の当該化学物質群の暴露量を把握することは、重要である。しかしながら、国内での情報は、極めて少ないのが実状である。

本研究では、山口大学医学部産婦人科で採取された母体血、臍帯血、羊水、胎脂について、フタル酸ジ (2-エチルヘキシル) (DEHP) およびフタル酸モノ (2-エチルヘキシル) (MEHP) を測定・分析することによりフタル酸エステル類の母児環境における暴露量評価を行うことを目的とした。本研究を遂行することによって、国内における妊婦、胎児および乳児の当該化学物質群の暴露量を推測するうえで有用な情報を得ることが期待される。

5. 母児環境における生体試料中の多元素分析法の開発とその解析

本研究では、周産期試料、とくに同一症例から採取された母体血、羊水についてリチウム、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元素を同時測定する多元素一斉分析法を開発し、新たな暴露評価法を構築することを目的とした。

6. 胎内環境中に存在する化学物質の把握とその解析

化学物質による子どもへの健康影響を考える場合、より幼弱な時期の暴露がより甚大な影響を及ぼすことが危惧される。そのためには、化学物質の母児間の移行の実態の理解は必須である。また化学物質の妊婦を介した胎児・新生児への影響は、単独試料による分析だけでは不十分であり、母児の一連の試料のもとに、母体側暴露状態と、妊娠中の胎児への移行を分析する必要がある。

この目的のために、妊娠37週0日から41週6日までの正常単胎妊娠における、母体血、母体尿、羊水、臍帯血、胎脂など一連の試料を採取し、上記1-6項目の化学物質を測定分析することを目的とした。とくに可及的に同一症例からこれら一連の試料を得ることにより、同一生体内での暴露した化学物質の濃度勾配を分析し、母児間の化学物質の移行について検証・証明することを重要視した研究を行うこととした。同時に生活習慣、住宅環境と生体内の化学物質暴露との関連を解析する目的で試料提供者にアンケート調査を施行することとした。

さらに化学物質暴露の解析を、検討する正常の周産期試料だけでなく、子宮内胎児発育遅延、前置胎盤などの異常妊娠にも検討を加えた。

7. 生殖補助技術における化学物質の暴露評価

近年、基礎・臨床の両分野において Assisted Reproductive Technology (ART) いわゆる生殖補助技術の発展にはめざましいものがある。その結果、基礎医学の分野においては、*in vitro* の胚操作はES細胞などを通じて再生医療の時代への大きな幕開けの役割を果たした。他方、臨床医学の分野では少産少子のわが国の出生数において年間の全出生数の2-3%はいわゆる体外受精児で占めるまでになった。実数にして年間2万件以上の体外受精児の出生、累計20万人を超える体外受精児が本邦にはすでに存在する。

本研究で母児環境における化学物質の暴露状況を胎児レベルまで検証して行く過程で、生命の発

生の critical な場面での化学物質の関わりについて検討することは、科学研究の必然的な流れと思われる。

生殖補助技術における胚操作は、実際の母体の中で展開する受精から着床までの生命現象が極めて巧緻な仕組みで行われるので、*in vitro* でも複雑な人工的な手順、操作が要求される。換言すると、精子、卵子の回収、調整から、媒精、受精、胚の分割、胚移植あるいは胚凍結保存に至るまでの生命発生の各ステップにおいて、胚に宿る生命に最も至適な環境を提供しなくてはならない。生殖補助技術はこの胚に至適な環境を、胚培養液を選択、交換することによって賄ってきた。したがって卵子回収、精液調整に始まり胚移植まで内外には数多くの調整液、培養液、凍結保存液、シーリングオイルなどが存在する。

本研究では、これまで内外で試みられて来なかった初めての検証として、今日入手可能なこれら胚培養液の試料に、胚操作培養用器具を加えて、化学物質の暴露状況を検討することとした。

8. 化学物質の胎児へのエピジェネティックな影響の解析：エピミュタゲン評価法の開発

本班研究の一つの大きな目的は、化学物質の信頼すべき暴露量を手にしたのち、この暴露量を人の健康影響と結び付けていかに評価するか、新しい化学物質の毒性評価法を開発を掲げてきた。

エピジェネティクスは、DNAメチル化やクロマチン構造の変化を伴う細胞種特異的な遺伝子発現の記憶装置と呼ばれる。本研究では、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（エピミュタゲン）の検出・評価法を構築することを目的とした。

近年、発生異常やガン、慢性疾患の原因としてエピジェネティック異常が検出される例が多数報告され、発生異常や病態を誘発する原因因子の探索が重要になってきた。これまでに、人類は多種多様な化学物質を単離、合成することで生活を豊かにしてきたが、日常生活において様々な化学物質に暴露されることによる影響が懸念されている。

本研究では、身近に存在する化学物質で人体への影響が疑われているものについて、その血中に存在している程度の比較的低い濃度でも胎児の発生に影響を与え得るかどうかを検討するために、マウス胚性幹 (ES) 細胞、ヒト iPS 細胞を用いて化学物質暴露によるエピジェネティックな変化や細胞分化能への影響を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1. 母児試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬ならびにビスフェノールAの暴露量評価

1) 試料

山口大学から提供された同一人の母体血、母体尿、臍帯血42組、合計126検体を分析対象試料とした。採取した血液試料は、常法に従って血清を調製し、15分以内に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。

2) 試薬

標準品：3-Phenoxybenzoic acid (3-PBA), 2-Phenoxybenzoic acid (2-PBA), Diethyl thiophosphate (DETP) および Diethyl dithiophosphate (DEDTP)はシグマ・アルドリッチ社製、クロルピリホス代謝物 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP)は林純薬工業製、Dimethyl phosphate (DMP)およびDiethyl phosphate (DEP)はAccuStandard社製、Dimethyl thiophosphate (DMTP)及びDimethyl dithiophosphate (DMDTP)は、AppliChem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50mLに溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液および内部標準溶液とした。

β -グルクロニダーゼ：シグマ社製 (β -Glucuronidase ; 130,000 units/mL, Sulsatase ; 3,200units/mL)を用いた。

精製用カートリッジ：Oasis HLB カートリッジ (200 mg)：Waters製を用いた。カートリッジは予めメタノール5mL、水5mLの順でコンディショニングした後使用した。

その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

3) 装置および測定条件

3-1 尿および血清中の有機リン系農薬代謝物の分析

高速液体クロマトグラフィー質量分析計：HPLC装置には、Waters社製2695 HPLCシステム、質量分析装置には、Quattro micro APIを使用した。

3-2 尿および血清中の3-PBAおよびTCPの分析

高速液体クロマトグラフィー質量分析計：HPLC装置には、Waters社製2695 HPLCシステム、質量分析装置には、Quattro micro APIを使用した。

4) 検量線の作成

4-1 尿およ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, DET, DMTP, DETP, DMDTPおよびDEDTPの各濃度が1, 2, 5, 10及び100ng/mLとなる混合標準溶液を調製し、その10 μ LをLC/MS/MSに注入した。得られたMRM (Multiple Reaction Monitoring)クロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線により検量

線を作成した。

4-2 尿および血清中の3-PBAおよびTCPの分析

内部標準物質として、3-PBAの安定同位体標識内部標準物質が市販されていないことから、3-PBAと構造が類似している2-PBAを用いた。内部標準物質2-PBAを20ng含んだ3-PBAの0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10および100ng/mLの溶液を調製し、その5 μ LをLC/MS/MSに注入した。検出にはMRM法を採用し、それぞれモニターイオン m/z 213>90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と2-PBAの面積比により検量線を作成した。

TCPについては、1.0~100 ng/mLの範囲で数点標準溶液を調製し、得られたMRM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) 試験溶液の調製

5-1 尿および血清中の有機リン系農薬代謝物測定用試験溶液の調製

尿5mL、血清2mLを50mL用ポリプロピレン製チューブに採取し、飽和食塩水2mL、食塩4g及び6mol/L塩酸2mLを加えて後、酢酸エチル-アセトニトリル(7:3)10mLを加え、5分間振とう抽出した。振とう抽出液を3,500rpmで10分間遠心分離後、酢酸エチル-アセトニトリル層を5mL分取し、減圧乾固後20%アセトニトリル溶液1mLに溶解して試験溶液とした。

5-2 尿および血清中の3-PBAおよびTCP試験溶液の調製

5-2-1 遊離体3-PBAおよびTCP測定用試験溶液

尿2mL、血清1mLを採り、内部標準物質である2-PBAを20ng加えた後Oasis HLBカートリッジ(200mg)に負荷した。水(5mL x 2)で洗浄した後メタノール5mLで溶出し、減圧乾固後40%アセトニトリル1mLに溶解して試験溶液とした。

5.2.2 総3-PBAおよびTCP測定用試験溶液

尿2mL、血清1mLを採り、内部標準物質である2-PBAを20ng加えた後、0.2M酢酸緩衝液(pH 5)2mL、 β -グルクロニダーゼ6,500 units/mL (試薬 β -グルクロニダーゼを0.2M酢酸緩衝液(pH 5)で20倍希釈)を50 μ L加え、37℃で90分間インキュベートした。その後の操作は遊離体3-PBA及びTCP測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

2. 母児試料中有機フッ素系化合物および周産期生体試料におけるニコチンならびにコチニンの暴露量評価

2-1 母体血、臍帯血中有機フッ素系化合物の一斉分析法の構築。

測定対象物質は、PFOS、PFOA、PFNA、PFHxSの4

種類とし、内標準物質として $^{13}\text{C}_4$ -PFOSおよび $^{13}\text{C}_2$ -PFOAを使用した。前処理には固相抽出法を用い、Oasis WAXカートリッジによる精製・濃縮を行った。血清5 mLを2%ギ酸で除タンパクして固相抽出により50倍濃縮を行った後にLC-MS/MS分析に供した。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化法を採用し、ネガティブイオンモードのMultiple Reaction Monitoring(MRM)によりLC-MS/MS分析を行った。LCの分離カラムはXbridge (2.1 x 50 mm, 2.5 μm)を用い、移動相として、5 mM酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混液を用いてグラジエント溶出させた。また、血清の測定には、オンライン固相抽出法としてカラムスイッチング-LC-MS/MS法を採用した。

2-2 HILIC/MS を用いた母体血、臍帯血中ニコチンおよびコチニンの分析。

前処理法には固相抽出法を適用し、測定にHILIC/MS を使用した。高精度な分析法を達成するために内標準法を採用し、内標準物質にニコチン- d_3 を使用した。

分離カラムにはWaters社製Atlantis HILICシリカ(150 mm x 2.1 mm, 3.0 μm)を用いた。移動相は0.01%ギ酸を添加した水/アセトニトリルの混液を、アセトニトリル含量が90% [0 min] ~ 50% [10 min] ~ 50% [25 min] ~ 90% [27 min]となるよう、流速0.2 mL/minでグラジエント送液した。カラムオープン温度は40 $^{\circ}\text{C}$ 、試料注入量は5 μL と設定した。MSのイオン化には、エレクトロスプレーイオン化法を用い、キャピラリー電圧は3000 V、フラグメンター電圧は110 Vに設定し、ポジティブイオンモードで測定した。測定には選択イオンモニタリングモードを用い、モニタリングイオンはニコチン (m/z 163)、コチニン (m/z 177)、ニコチン- d_3 (m/z 166) およびコチニン- d_3 (m/z 180) とした。

3. 母児試料における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-4 2.1) の暴露量評価

1) 試料

ハウスダスト9試料、居住者の9血清、山口大学から提供された母乳46検体、胎脂2試料を分析対象とした。

2) 試薬

AccuStandard 社 製 BDE-AAP-A-15X, BDE-196S/197S/203S/208S-0.2X および Wellington 社 製 BDE-206/207/209 をNative体の標準原液として使用し、3-10 臭素化 PBDEs 36 異性体を測定対象とした。クリーンアップスパイク溶液には炭素安定同位体 (^{13}C) で標識化された $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-28, 47, 99, 153, 154, 183, 197, 207, 209 (Wellington

Laboratories 社 製 MBDE-MXC, MBDE-197/207/209) のヘキサン混合溶液を使用した。また、シリンジスパイクには $^{13}\text{C}_{12}$ -PeBDE-126 (CIL 社 製 E0-4930) のヘキサン溶液を使用した。ヘキサン、エタノール (以上、残留農薬・PCB 試験用 5000 倍濃縮保証品)、ノナン (ダイオキシン類分析用)、44%硫酸シリカゲル (ダイオキシン類分析用)、アセトン (試薬特級、器具の一次洗浄に使用) および無水硫酸ナトリウム (PCB・フタル酸エステル試験用) は和光純薬社製を用いた。

3) 操作

試料0.1 gを遠沈管に精密に秤取後、クリーンアップスパイクおよびアセトン10 mL、ヘキサン20 mLを加えて15分間超音波抽出した。遠心処理 (3000 rpm, 5分間) 後、ろ紙ろ過して抽出液を採取した。さらに残渣を同様に超音波抽出し、抽出液を採取した。合わせた抽出液を減圧乾固後、少量のヘキサンに溶解した。この試料溶液を予めヘキサンで洗浄した44%硫酸シリカゲルカラム (充填量1g) に負荷し、ヘキサン10 mLでカラムからPBDEsを溶出した。回収液を減圧乾固後、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により、PBDEsの溶出画分を回収した。回収液を濃縮試験管に移し、シリンジスパイクおよびノナン250 μL を添加し、窒素ガス吹き付けで250 μL に濃縮し、GC/MS測定に供した。

4) 装置条件

4-1 GPC

装置：Waters社GPCシステム

カラム：Shodex CLNpak EV-GAC + EV-2000AC

移動相：アセトン/シクロヘキサン (3:7, v/v)

流速：5 mL/min

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

採取条件：12~28 minの画分を採取

4-2 GC/MS

装置：JEOL JMS-GCmateII GC/MSシステム

注入口温度：250 $^{\circ}\text{C}$

注入法：パルスドスプリットレス, 1 μL

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 x 0.25 mm ID, 膜厚 0.1 μm)

GC カラム昇温条件：100 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) - 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 310 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)

トランスファーライン温度：310 $^{\circ}\text{C}$

イオン源温度：280 $^{\circ}\text{C}$

イオン化電流：300 μA

イオン化エネルギー：35 eV

加速電圧：2500 V

分解能：1000

イオン化モード：EI

検出法：SIM

4. フタル酸エステル類の母児環境における暴露量評価

1) 試薬等および器具

フタル酸モノエチル (MEP), フタル酸モノブチル (MBP), フタル酸モノベンジル (MBzP), フタル酸モノ(2-エチルヘキシル) (MEHP), フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル) (MEHHP) およびフタル酸モノイソノニル (MiNP) を分析対象とした. MEP, MEP-¹³C₄, MBP, MBP-¹³C₄, MBzP, MBzP-¹³C₄, MEHP, MEHP-¹³C₄, MEHHP, MEHHP-¹³C₄, MiNP および MiNP-¹³C₄ の各 100 μg/mL アセトニトリル標準溶液は, Cambridge Isotope Laboratories 社より購入した. β-Glucuronidase (8.5 U/mL; *E. coli* 由来), 酢酸アンモニウム (特級) およびギ酸 (HPLC 用) は, 和光純薬社製を用いた. アセトニトリルは, 環境分析用を用いた (和光純薬). 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) をそのまま用いた. 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, アセトンおよびヘキサンで洗浄した後, 乾熱乾燥機中で 200°C 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

山口大学医学部産婦人科で採取された母体血 97 試料, 臍帯血 99 試料, 羊水 41 試料, 胎脂 28 試料を分析対象とし, 分析時まで -40°C で保存した.

3) 前処理および分析条件

試験液の調製には, 吉村らの方法を用いた. 試料解凍後直ちに尿試料 1.00 g に 100 ng/mL 内部標準混合溶液 100 μL, 0.2 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH 6.5) 1 mL および 8.5 U/mL β-Glucuronidase 60 μL を添加して攪拌後, 40°C で 60 分間インキュベートした. インキュベート後, 氷上に移し, 0.2 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH 8.0) 1 mL を添加した. 全量を予め, アセトニトリル 15 mL および Milli-Q 水 5 mL でコンディショニングした OASIS MAX (6 cc, 150 mg; Waters) に負荷した. 次にカラムを Milli-Q 水 5 mL およびアセトニトリル 5 mL で洗浄し, 1% ギ酸含有アセトニトリル 5 mL で測定対象物質を溶出した. 当固相抽出過程にはビジブレップバキュームマニホールド (SUPELCO) を用い, カラム先端には, ディスポーザブルライナー (SUPELCO) を装着して試料間のコンタミネーションを排除した. 溶出液は, 窒素気流下, 40°C で乾固した後, 20% アセトニトリル含有水 0.5 mL に再溶解して LC/MS/MS の試験液とした.

5. 母児環境における生体試料中の多元素分析法の開発とその解析

1) 対象者および試料

研究目的の十分なインフォームドコンセントを行って山口大学産婦人科で同一症例から採取された母体血, 羊水 32 組, 64 検体を分析対象とした.

2) 分析方法

2-1 試薬および材料

分析対象重金属類 19 元素および内部標準元素 (スカンジウム (Sc), イットリウム (Y), イリジウム (Ir)) の標準品は, メルク製 ICP 分析用標準溶液を使用した.

2-2 測定項目

マグネシウム (Mg), カルシウム (Ca), 鉄 (Fe), 銅 (Cu), 亜鉛 (Zn), マンガン (Mn), コバルト (Co), セレン (Se), モリブデン (Mo), リチウム (Li), ホウ素 (B), アルミニウム (Al), ニッケル (Ni), ルビジウム (Rb), ストロンチウム (Sr), カドミウム (Cd), アンチモン (Sb), 水銀 (Hg), 鉛 (Pb) (19 元素)

2-3 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.

2-4 前処理法および試験溶液の調製法

血清 0.7 mL または羊水 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. 酸分解後の試料をポリエチレン製遠沈管 (15 mL) に入れ, 超純水で分解用容器内を洗い込んで全量を 3 mL にした. 混和後, その 1.8 mL を ICP-MS オートサンプラー用サンプルカップ (15 mL) にとり, 0.1% 硝酸 0.9 mL, 内部標準溶液 (Sc, Y, Ir 各 100 ppb) 0.3 mL を加え, 混和して試験溶液とした.

2-5 分析方法

測定法; 誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 法

定量法; 絶対検量線法

2-6 ICP-MS 条件

装置: ICP-MS (Agilent 7500i, 横河アナリティカルシステムズ)

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

ネブライザー: バビントン型

内部標準元素: Sc (45), Y (89), Ir (193)

干渉補正式:

$$V(51)=(51) \times 1-(53) \times 3.127+(52) \times 0.3534$$

$$Se(78)=(78) \times 1-(76) \times 0.1869$$

2-7 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割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。

6. 胎内環境に存在する化学物質の把握とその分析

6-1 試料採取前の倫理面の配慮

試料採取前に、同意説明書を対象者に配布し、文書および口頭による本研究の十分な説明を行い、被験者の自由意志による参加とし、同意したものについては文書による同意書を作成した。

6-2 アンケート調査

暴露化学物質と生活習慣、住宅環境などとの関連を調査するためにアンケート調査を行った。

6-3 試料の採取

研究の初年度において、生体試料採取の際の夾雑物の混入を避ける採取法を確立した。平成20年9月より平成22年6月の期間、妊娠37週0日から妊娠41週6日までの正常単胎妊娠における母体血、母体尿、羊水、臍帯血、胎脂などを合計145症例から採取した。試料採取に当たり、同一症例から可及的にこれら試料を同時に採取し、同一症例における化学物質の生体内の移行、濃度勾配などを検討できるようにした。異常妊娠としては子宮内胎児発育遅延15症例、前置胎盤4症例の試料も採取した。

6-4 暴露評価の対象化学物質

周産期における母児を暴露する化学物質の中から本研究では、(1)家庭で使用されるピレスロイド系農薬の代謝産物、(2)農業で汎用される有機リン系農薬の代謝産物、(3)喫煙に関連したニコチンとその代謝産物のコチニン、(4)撥水剤などの多用される有機フッ素系化合物、(5)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、(6)殺虫剤に共力剤として添加されているオクタクロロジプロピルエーテル(S-421)、(7)樹脂の可塑剤として多用されるフタル酸エステル類、(8)19元素などを研究対象とした。

6-5 分析・測定方法

本研究における分担研究者、各研究協力者がそれぞれに確立した感度ならびに特異性に優れた分析・測定法を用いて行った。

7. 生殖補助技術における化学物質の暴露評価

7-1 試料

生体の中で展開する受精、着床現象は極めて巧緻である。体外受精-胚移植ではこの複雑な生命現象を補完するために頻雑に調整液、培養液を交換する。本研究では、体外受精-胚移植における化学物質の暴露環境を検討する目的で、最も汎用されている内外のメーカー5社の以下の試料を分析・検討した。

- (1) 精子洗浄液
- (2) 精子調整液
- (3) 胚培養液(受精時)
- (4) 胚培養液(初期)
- (5) 胚培養液(後期)
- (6) 培養液添加ヒト血清アルブミン
- (7) シーリングオイル
- (8) 培養皿

これらの内訳は、精子調整液9種類、ヒト血清液6種類、胚培養液15種類の合計59試料。同一製品の評価のため、期間を置いて異なるロットの同一製品を分析・測定した。

7-2 胚培養器の化学物質溶出の検討

胚培養皿(プレート)から培養液への溶出を見るために培養液をプレンの精製水などに置き換えて、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸類を測定・分析した。

7-3 培養液中に混入する化学物質の検討

胚培養液、調整液、シーリングオイル、添加アルブミン溶液中のノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸エステル類、有機フッ素系化合物、ポリ臭素化ジフェニルエーテルについて測定・分析した。

7-4 コード化

試料のすべてをコード化した。

8. 化学物質の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の開発

8-1 マウスES細胞でのエピミュータゲン探索系の確立

ES細胞を用いてヘテロクロマチン形成への化学物質の影響の解析を行った。

本研究班では、これまでに25種類の化学物質(3-PBA, TCP, DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP, DEDTP, S-421, nicotine, cotinine, PFOA, PFOS, 2-EH, 2-EHA, DCB, Sn, Se, Cd, Hg, Pb, pentaBDE, decaBDE, DEHP, MEHP)について、妊娠母体血中の濃度を決定した。そこで、これらの化学物質について初期発生胎仔のモデルであるES細胞においてヘテロクロマチン形成を指標とした解析を行った。マウス未分化ES細胞をゼラチンコート培養ディッシュに播種し、25種類の化学物質をそれぞれ

れ培地に添加した。暴露後 48 時間で細胞を回収し、酢酸 / エタノール溶液で固定した後、スライドガラス上に塗抹標本を作成した。このうちの一部については、48 時間暴露後に化学物質を除いてさらに 48 時間培養したものと、化学物質に暴露した状態で ES 細胞から胚様体への分化を誘導したものについても同様の解析を行った。作成した塗抹標本について、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核染色、または major satellite 領域を認識するプローブを用いた DNA-FISH を行い、蛍光顕微鏡下で核のヘテロクロマチン状態を観察した。核内の DAPI、major satellite 領域を示すシグナルの数を調べ、化学物質が ES 細胞のヘテロクロマチン形成へ及ぼす影響について検証した。

8-2 CORBA法による遺伝子領域のDNAメチル化解析

本法でDNAメチル化状況が変化する遺伝子を探索するために、ゲノムDNAについてバイサルファイト反応を行い、その後CORBA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について、48か所の遺伝子領域をPCRで増幅後、HpyCH41Vによる切断を行い、切断後マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 (MultiNA) により解析した。

8-3 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、マウスES細胞の検出系ですでに検討した25種類の化学物質を、それぞれ測定された暴露濃度あるいはその10倍量で4日間暴露した。暴露終了後、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗HP1 α 抗体を用いた免疫染色でヘテロクロマチンを可視化して、核内のHP1 α 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について検討した。

C. D. 研究結果 および 考察

1. 母児試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬ならびにビスフェノールAの暴露量評価

1-1 母体血、母体尿、臍帯血中の有機リン系農薬代謝物の分析

本研究で開発した測定法において、尿試料へ添加した有機リン系農薬の添加回収率(25ng/mL)はDMPが72.9 \pm 8.3%, DEPが83.9 \pm 10.2%, DMTPが87.6 \pm 12.8%, DEPTが79.1 \pm 9.4%(n=5)であった。定量限界値はDMPが0.5 ng/mL, その他の化合物は0.2 ng/mLであった。

1-2 ピレスロイド系農薬、クロルホスピスおよびBPA代謝物の分析法。

開発した測定法において、尿試料への添加回収率(5ng/mL添加)は、3-PBAが82.7 \pm 7.5%, TCPが80.5 \pm 6.8%, BPAが85.2 \pm 4.7%(n=5)であった。定量限界値は3-PBAが0.2 ng/mL, TCPとBPAが0.5 ng/mLであった。

1-3 母児環境における農薬の暴露状況。

有機リン系農薬代謝物は母体血中に、DMPは0.9-57.1 ng/mL(検出率36/42)、DEPは0.2-25.9 ng/mL(同34/42)、DMPTは0.2-92.3 ng/mL(同35/42)、DETPは0.3-14.5 ng/mL(同35/42)の濃度範囲で検出された。一方、3-PBAはグルクロン酸抱合体として妊婦11症例から0.4-2.6 ppbの濃度で検出された。この中で4症例の母体血からはお.2および0.3 ppbの3-PBAが検出された。1.3 ppbの濃度で検出された妊婦では0.9 ppbの濃度でTCPが検出された。

妊婦のBPAの暴露状況については、母体尿、母体血、臍帯血42組、126検体ですべて定量限界値以下であった。

以上をまとめると、多くの妊婦から4種類の有機リン系農薬のいずれかの代謝物が検出された。検出濃度は0.2-30 ppbの範囲であった。クロルホスピス代謝物(TCP)は3症例の妊婦から、ピレスロイド系農薬代謝物(3-PBA)は11症例から検出された。BPAは全ての妊婦で検出限界以下であった。このことは、多くの妊婦が低濃度ながら農薬の暴露を受けていることを示すものと思われる結果であった。

2. 母児試料中有機フッ素系化合物およびニコチンならびにコチニンの暴露量評価

2-1 母体血および臍帯血中のPFCsの暴露量。

前処理方法にカラムスイッチングシステムを構築することにより前処理の自動化が図れ分析精度が向上した。また抽出方法に、逆相-弱陰イオン交換ミックスモードのOasisWAXを固相カートリッジに使用することにより、平均回収率87.0%以上の良好な結果が得られた。本法を用いて、母体血、臍帯血(n=40)中のPFCs分析すると、両者からPFOS, PFOAが高頻度に検出された。

2-2 母体血、臍帯血中のニコチン、コチニンの暴露量測定。

試料の抽出方法に逆相-陽イオン交換ミックスモードであるOasisMCXを用いた。高極性物質であるニコチン代謝物を分離・分析するために親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を用いた。測定に際して移動相に加えるギ酸濃度を調整

することにより、良好な面積ならびにピークが得られた。これらの工夫により、ニコチンの測定においては、定量限界0.5 ng/mL、検出限界1ng/mL、1-1000 ng/mLの範囲で直線性を有する極めて優れたHILIC/MS/MS測定法を構築することに成功した。

本法を用いて同一症例から得られた母体血、臍帯血(n=30)を分析したところ、3症例のペア試料からニコチン、コチニン、ヒドロキシコチニンが検出された。

以上の結果は、喫煙歴のある試料からニコチンの代謝物であるコチニン、ヒドロキシコチニンが検出され、これらの症例では母体血、臍帯血中の濃度解析から母体から胎児への移行が窺われた。またその移行量は母体血中濃度の20-30%と推定された。

他方、母体血、臍帯血のPFCsを測定したところ、PFOS、PFOAが高頻度で検出された。この中で同一症例40組の母体血、臍帯血を解析したところ、臍帯血中濃度が母体血中濃度と有意に相関することが証明された(PFOS; $r=0.62$ 、PFOA; $r=0.85$)。このことはPFCsは臍帯血を介して胎児へ移行していることが示唆された。

平成17-19年の本班の研究結果においても、母乳試料を50倍濃縮した際のPFCsの定量限界は、PFHxS、PFOS、PFNAにおいて、0.004 ng/mL、PFOAで0.012 ng/mLと高感度分析が達成された。また、構築した分析法の添加回収試験を実施したところ、平均回収率94.3%以上(RSD<10.3%, n=5)と良好であり、本分析法の有用性が示唆された。構築した分析法をヒト母乳中PFCs分析に適用したところ、すべての検体からPFOSおよびPFOAが検出され、その検出範囲は0.046~0.098 ng/mlおよび0.108~0.27 ng/mlであった。

同様に、母体血からコチニンが検出された同一個人から採取した尿検体からもコチニンが検出されている。母体血、臍帯血の分析から、臍帯血からもコチニンが検出されたことを考え合わせると、胎児がタバコ煙の成分に暴露される可能性は極めて高いといえる。

3. 母児試料における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)の暴露量評価

開発した分析法を用いて大阪府内9家庭のハウスダスト試料を分析した結果、全ての試料からPBDEsが300~1300 ng/gの濃度範囲、平均690 ng/g(12異性体総計、ND=0で換算)の値で、S-421は13-510 ng/gの濃度範囲、平均値170 ng/gで検出された。いずれの試料に

についてもBDE-209の顕著な残留(サブppm~ppmオーダー)が認められ、一般家庭環境における普遍的なデカBDE汚染および乳幼児の慢性的なデカBDE暴露が示唆された。一方、ペンタBDEおよびオクタBDE関連異性体の濃度は比較的low濃度(ppbオーダー)であった。また居住者の血清中のPBDEs濃度はへいきん11 pg/g、S-421のそれは24 pg/gでハウスダスト濃度と血中濃度には相関性が認められなかったが、ハウスダスト濃度とS-421の濃度には相関性が認められた($r=0.71$ 、 $p<0.04$)。

一方、山口大学から提供された母乳試料では、全ての試料からPBDEsが、S-421は46試料中42試料から検出された。その濃度は、平均値でPBDEsは88 pg/g、S-421は56 pg/gであり、これら物質の普遍的な母乳汚染が証明された。

4. フタル酸エステル類の母児環境における暴露量評価

平成20年-平成22年の3年間において母体血97試料、臍帯血99試料、羊水41試料、胎脂28試料についてDEHP、MEHPの暴露状況を測定・分析した。

4-1 母体血、臍帯血、羊水中のDEHP、MEHP。

母体血、臍帯血、羊水中のDEHPの検出率はそれぞれ36.1%、20.4%、51.2%であった。MEHPのそれは22.7%、14.3%、65.9%であった。

DEHPの母体血、臍帯血、羊水中の濃度分布は、それぞれ12-460 ng/mL、10-37.4 ng/mL、10-376 ng/mLとなった。また中央値は10 ng/mL以下、10 ng/mL以下、10.2 ng/mLとなった。

MEHPの母体血、臍帯血、羊水中の濃度分布はそれぞれ2.0-14.7 ng/mL、2.0-5.6 ng/mL、2.0-28.2 ng/mLとなった。中央値は2.0 ng/mL以下、2.0 ng/mL以下、4.4 ng/mLであった。

これらの結果は羊水中には母体血、臍帯血の濃度より高いDEHP、MEHPが存在する可能性を示す結果になった。

4-2 胎脂中のDEHP、MEHP。

胎脂中のDEHP、MEHPを測定・分析したところ、DEHPは検出率64.3%、濃度分布は440-173,500 ng/g、中央値は1,730 ng/gと極めて高濃度に検出された。一方、MEHPは全ての試料で検出限界以下であった。

同一症例から採取された胎脂と羊水中のDEHP、MEHPの濃度を比較した結果、胎脂中のD

DEHPと羊水中のDEHPの濃度には逆相関の関係が強いことが判明した。胎児体表に存在する胎脂の多少は、従来から胎児の成熟度と関連して観察され、成熟児に少なく、未熟児に多くが観察されてきた。一方、胎児の成熟度と胎児肺機能とくに肺サーファクタントは密接に関係する。胎脂はこの肺サーファクタントで容易に体表から羊水中へ溶出するので羊水と胎脂中のDEHPの濃度差はこの現象に起因するものと思われる。またMEHPは水溶性が高く、容易に胎児体表の胎脂から羊水中へ溶出するため、胎脂中から検出されないものと解釈される。

5. 母児環境における生体試料中の多元素分析法の開発とその解析

5-1 分析法の開発。

試料の前処理にマイクロ波分解法を用い、これに誘導結合プラズマ質量分析法 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: ICP-MS) を組み合わせた方法を試みた。この方法で母体血、羊水への添加・回収試験を行ったところ、母体血清では回収率86-100%、変動係数1.2-6.4%、羊水では回収率82-105%、変動係数0.43-3.5%と良好な結果が得られ、多元素を一斉解析する測定・分析法が確立できた。

5-2 母体血、羊水中の19元素の濃度・動態。

母体血に対する羊水の濃度比(羊水/母体血)はCuが0.05、Seが0.11、Hgが0.21と羊水の濃度が低く、一方、Niが3.8、Mnが2.9と羊水濃度が高い結果が得られた。Fe、Zn、Li、Co、Cdを除く14元素で母体血と羊水中で濃度の有意差が認められた。また、Sr、Li、Mg、Ca、Moの5元素で母体血と羊水中で相関がみられた。

5-3 生活習慣と母体血、羊水中の元素動態

食生活、喫煙、サプリメント摂取などについてアンケート調査を実行し、元素濃度との関連を検討した。その結果、Se、Ca、Sbの3元素で食生活を反映すると思われる濃度傾向が観察された。

Cu、Seなどの微量元素は、中枢神経系の高次機能、代謝、免疫、酸化ストレスなど多様な生体機能の調節、ホメオスタシスと密接に関連している。例えば、Seはかつて生物にとって毒物と考えられていたが、抗酸化酵素の一つであるグルタチオンペルオキシダーゼの活性中心に存在することが明らかとなり、細胞構成成分の酸化変性を防ぎ、膜の安定化に関与する重要な因子であり、必須の微量元素として認識されるようになった。Seの欠乏によって引き起こされる各種の疾患は、グルタチオンペルオキシダーゼの活性が低下することに

より、活性酸素が生体膜を不安定化し、さらに膜を構成する蛋白質が酸化変性されることに起因する。Se欠乏症としては、かつて風土病といわれた克山病(Keshan disease)という拡張型心筋症が有名である。中国の克山地方では、土壌中のSe含量が少ないため、食物よりのSe摂取量が少ないため起こると考えられている。

本研究で開発した多元素一斉分析法は、母体血のみの分析では胎児暴露を評価することは困難であるが、本法を羊水分析に応用することにより、胎児暴露評価が可能になることが判明した。

6. 胎内環境中に存在する化学物質の把握とその解析

6-1 周産期試料の収集。

本研究では、山口大学の倫理規定に則り、被験者への十分なインフォームドコンセントの下、母児環境における化学物質の暴露状況を検証する目的で、145症例より、母体血128試料、母体尿111試料、母乳122試料、羊水52試料、臍帯血122試料、胎脂112試料を採取しえた。この中で母体より胎児への化学物質の移行を研究する目的のために、母体血、母体尿、臍帯血、羊水を同一症例から採取しえた症例は95症例に達した。さらに母乳、胎脂を加えたすべての試料を同一症例から提供を受けたケースは30症例であった。化学物質の暴露と生活習慣、食生活との関連を分析する目的で同時にこれら症例にはアンケート調査を実施した。貴重な臨床試料の提供、アンケート調査にご協力いただいた被験者の各位には心から御礼を申し上げたい。

6-2 異常妊娠例。

子宮内発育遅延症例9、前置胎盤症例2の被験者にも同様の協力をえた。

6-3 正常単胎妊娠例において、妊娠37週0日から妊娠41週6日の間で、DEHP、MEHPは母体血、臍帯血において濃度変化を来さなかった。

6-4 同じく妊娠37週0日から41週6日の間で、DEHP、MEHPの母体血、臍帯血中濃度と出生時体重の間には優位な相関はなかった。

6-5 異常妊娠例の母体血、臍帯血中のDEHP、MEHP濃度は正常妊娠群と比較して有意な差は見られなかった。

6-6 妊娠37週0日より妊娠41週6日の間で、有機フッ素系化合物(PFCs)とくにPFOS、PFOA、PFNA、PFHxSは母体血、臍帯血中で有意な変化を来さなかった。

6-6 上記の妊娠期間中、母体血、臍帯血中のPFCsの濃度と出生時体重の間には有意な相関はなかった。

6-7 異常妊娠症例においては母体血、臍帯血中のPFNAが正常妊娠群に比較して有意に高値であった。

6-8 正常妊娠群の妊娠37週0日から41週6日の間で、母体血、母体尿、臍帯血中の有機リン系農薬の代謝物DMP、DEPは週数による変化を来さなかった。

6-9 同様の期間、母体血、母体尿、臍帯血中のDMP、DEP、DMTP、DETPの濃度と出生児体重には有意な相関がなかった。

6-10 このほか、母児試料の中では、他項で報告したように、ビスフェノールAの暴露は認められなかったものの、母乳とポリ臭素化ジフェニルエーテル、母体血・臍帯血とS-421、ニコチンと関連代謝物などとの暴露状況が確認できた。

7. 生殖補助技術における化学物質の暴露評価

7-1 培養皿（プレート）の材質試験。

胚培養を行う培養皿のwellの部分0.5gを細切シクロヘキサン/2-プロパノール混液（1:1）5mlに37度で浸透しながら16時間浸漬した後、その1mlを窒素気流下で乾固シアセトニトリルに溶解し分析に供した結果、ビスフェノールA（BPA）、ノニルフェノール（NP）ともに検出限界（20ng/g）以下であった。

7-2 培養皿（プレート）の溶出試験

胚培養と同一の条件で培養皿に培養液に替えて、DEHP、MEHP含有量がコントロール出来るヘキサン洗浄水を用いて60時間インキュベーションした後、DEHP、MEHPを測定した。この結果、A、Bいずれの製品にも両物質の有意な溶出は見られなかった。同時にBPA、NPも定量下限値（BPA:0.1ppb、NP:0.05ppb）以下であった。

7-3 胚培養液中のBPA、NP。

59試料中からBPAは検出されなかった。一方、NPは分岐型4-NPが5.3-164ppbの濃度で16種、26試料の精子調整液、胚培養液から検出された。また、ヒト添加用血清、アルブミン溶液からは5.5-164ppbの濃度で6種11試料全てから4-NPが検出された。これらの値は正常妊婦の血中値より高い傾向にあった。

7-4 胚培養液中のフタル酸エステル類。

ヒト血漿由来成分（アルブミン溶液、代替血清を含む）を含む胚培養液からはDEHP、MEHPが7.1-1840ng/mLの濃度範囲で検出された。この値は正常妊婦の血中の暴露量をはるかに超える量であった。一方、血漿由来成分を含まない胚培養液からはDEHP、MEHPともに検出されなかった。さらに胚培養液に添加する目的のためのアルブミン溶液または代替血清のみを分析すると極めて高濃度（47.0-1840ng/mL）のDEHP、M

EHPが検出されることから、市販の胚培養液中のフタル酸エステル類の高濃度の混入は添加ヒト血漿成分による可能性が強く示唆された。

7-5 胚培養液中のポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）。

胚培養液、精子調整液、添加ヒトアルブミン液30試料について分析した。その結果、PBDEsの検出率は23試料、77%であった。内訳はヒトアルブミン非添加の胚培養液ではその検出率が12.5%であったのに反して、添加培養液での検出率は100%であった。添加群の濃度分布は0.6-385ng/gと通常のヒト血中の濃度分布4-18pg/gに比較して極めて高値を示す製品が多く存在した。また、胚培養液に添加するヒト血清アルブミン溶液のみを分析すると、平均229pg/gと比較的高濃度のPBDEsが検出されることから胚培養液のPBDEs汚染源は添加されたヒト血漿成分によることが強く示唆された。

7-6 胚培養液中の有機フッ素系化合物。

LC/MS/MSにより胚培養液中のPFCsを測定したところ、血清が添加されている胚培養液ならびに添加血液製剤からPFCsが高頻度（70-100%）検出され、その濃度はPFOSで2.35±2.48ng/mLの値であった。

8. 化学物質の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の開発

8-1 化学物質のマウスES細胞DNAメチル化に及ぼす影響。

先の平成19年度厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク事業「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5種類の化学物質（DEP、Hg、コチニン、Se、S-421）がマウスES細胞に対して母体血中の暴露濃度の範囲でヘテロクロマチンを変化させることを見出した。本研究ではCORBA法を用いて、これら5化学物質が暴露量の範囲内の濃度で遺伝子領域のDNAメチル化に及ぼす影響を検討した。その結果、Hgでは*Rnd2*遺伝子領域（神経分化関連）のメチル化が亢進し、Seにより*Prickle2*遺伝子領域（神経分化関連）および*Aebp2*遺伝子領域（エピジェネティック関連）のメチル化レベルが低下するなど胎児の発生・分化に関わる領域が影響されることが観察された。

8-2 化学物質のヒトiPS細胞ヘテロクロマチンに及ぼす影響。

母体の血中暴露濃度を解析した25種類の化学物質をそれらの暴露量の範囲内でヒトiPS細胞に対して暴露したところ、有機フッ素系化合物の中のPFOAがメチル化プロファイルを有意に変化させた。上記の5つの化学物質は、単独ではiPS

細胞のヘテロクロマチンに影響を及ぼさず、5種の混合物でヘテロクロマチンを示す HP1 α シグナル数を有意に低下させた。マウス ES 細胞とヒト iPS 細胞では化学物質のヘテロクロマチンへの変化のモードに差異が存在することが判明した。

8-3 化学物質の血中暴露 10 倍量がマウス ES 細胞、ヒト iPS 細胞のヘテロクロマチンに与える影響。

マウス ES 細胞においては先の 5 つの化学物質に加え、新たに TCP, DMP, DETP, DM DTP, decaBDE, MEHP の 6 化学物質がヘテロクロマチンを変化させた。一方、ヒト iPS 細胞では 25 種類すべての化学物質で暴露量の 10 倍量でヘテロクロマチンの変化が見られなかった。

解析を行った 25 種類の化学物質の中で、DEP、コチニン、水銀で ES 細胞の核内ヘテロクロマチン数が減少すること、逆にセレン、S-421 ではヘテロクロマチン数が増加することが示唆された。さらに、セントロメア配列をプローブとした FISH 法による解析からは、DEP でセントロメア以外のヘテロクロマチン領域が弛緩すること、および S-421 でのセントロメアヘテロクロマチン領域が増大することも示唆された。次に短期的な暴露の影響が化学物質を除去した後も残存する可能性を検討するために、影響の見られた 5 種類について血中濃度で 48 時間暴露後、化学物質を除いた状態でさらに 48 時間培養した。その結果、5 種類のうちコチニン、水銀、セレン、S-421 では化学物質を除くことでヘテロクロマチンの状態が対照と同程度まで回復したのに対し、DEP では化学物質を除いた後もヘテロクロマチンの異常な状態が持続することが示された。そこでこれまでにヘテロクロマチン異常を引き起こすことが示された化学物質が胎仔の発生に伴う細胞分化に影響を与えるかどうか検討するために、化学物質に暴露した状態の ES 細胞を分化誘導することで胚様体を形成させた。その結果、DEP、水銀、S-421 では、胚様体の大きさが対照群と比較して有為な差があり、細胞分化にも影響を与える可能性が示唆された。この実験では、コチニン、セレンでは胚様体形成への影響は見られなかった。

以上の結果は、化学物質を ES 細胞に血中濃度と同じ濃度で暴露し、ヘテロクロマチン形成を指標にすることにより、ヘテロクロマチン形成の異常をきたす化学物質（エピミュタゲン）を同定することが可能であることを示すものと思われる。本研究から、ヘテロクロマチン形成を指標としてエピジェネティック異常を引き起こす可能性のある化学物質を簡便にスクリーニングする系を確立することができた。

E. 結論

1. 母児試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬ならびにビスフェノールAの暴露量評価

周産期母児試料として母体血、母体尿、臍帯血それぞれ 42 試料を研究対象とした。有機リン系農薬の主代謝物ジアルキルリン酸（Dimethyl phosphate: DMP, Diethyl phosphate: DEP）、ジアルキルチオリン酸（Dimethyl thiophosphate: DMTP, Diethyl thiophosphate: DETP）及びジアルキルジチオリン酸（Dimethyl dithio -phosphate: DMDTP, Diethyl dithiophos -phate: DEDTP）をガスクロマトグラフィー蛍光光度検出器（GC-FPD）を用い、ピレスロイド系農薬および代表的な有機リン系農薬クロルピリホスの曝露量を評価するため、ピレスロイド系農薬の曝露マーカーには主代謝物 3-Phenoxybenzoic acid (3-PBA) を、クロルピリホスでは 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) を指標成分とし、ビスフェノールAを加えて、高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）にて測定・分析した。

その結果、多くの妊婦から有機リン系農薬代謝物 4 種類のいずれかが 0.2-30ppb の濃度で検出された。クロルピリホス代謝体は 3 症例で、ピレスロイド系農薬代謝体（3-PBA）は 11 症例から検出された。BPA は全ての試料で定量限界以下であった。妊婦は低濃度ながら農薬の曝露を受けていることが検証された。

2. 母児試料中の有機フッ素系化合物およびニコチンならびにコチニンの暴露量評価

同一妊婦から提供された母体血、臍帯血それぞれ 40 試料、合計 80 試料を測定・分析の対象とした。

PFCs の中で PFOS, PFOA が高頻度に検出された。同一症例内で濃度分析を行うと、臍帯血中濃度と母体血中濃度に有意な相関性が見られ（PFOS; $r=0.62$, PFOA; $r=0.85$ ）多くの有機フッ素系化合物が母体血から臍帯血を介して胎児へ移行している事実が判明した。

喫煙に関しては、喫煙歴のある妊婦の母体血、臍帯血からコチニン、ヒドロキシコチニンが検出された。両者の曝露量から換算すると、母体の濃度の約 2-3 割の喫煙物質が胎児へ移行することが示唆された。

3. 母児試料における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）の暴露量評価

母乳 42 試料を分析すると PBDEs ならびに S-421 が高頻度に検出され、普遍的な母乳汚染の実態が明らかになった。予備的に行った胎脂

検体からもPBDEsが検出され、胎内のPBDEsの汚染が示唆された。汚染源の一つとしてハウスダストを測定・分析すると、平均値でPBDEsが690ng/g、S-421が170ng/g検出され、屋内汚染が認められた。とくにS-421についてはハウスダストの含まれる濃度と居住者の血中濃度に相関が認められ($r=0.71$ 、 $p<0.04$)、ハウスダストの非意図的な取り込みが主要な汚染源になっている可能性が示唆された。

4. フタル酸エステル類の母児環境における暴量露評価

3年の研究期間中に、母体血97試料、臍帯血99試料、羊水41試料、胎脂28試料に含まれるDEHP、MEHPを測定・分析した。

羊水中のDEHP濃度は臍帯血中濃度に比較して有意に高い値であった。また羊水中のMEHP濃度は母体血、臍帯血中濃度に比較して、有意に高い値であり、羊水中にDEHP、MEHPが貯留する可能性を示した。胎脂には極めて高いDEHPが検出され、胎脂と羊水中のDEHP濃度には逆相関の関係が見られ、子宮内に貯留するDEHPは羊水あるいは胎脂に偏在することが判明した。

5. 母児環境における生体試料中の多元素一斉分析法の開発とその解析

マイクロ波分解法を用いた前処理法と誘導結合プラズマ質量分析(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; ICP-MS)法を組み合わせた分析法を確立し19元素を分析した。

32組の母体血、羊水を同時分析すると、Cu、Se、Hgが羊水中で母体血に比較して濃度が低く、Ni、Mnの濃度が母体血に比較して高値であった。Fe、Zn、Li、Co、Cdを除く14元素で母体血、羊水の間で濃度に有意差が見られた。Sr、Li、Mg、Ca、Moの5元素で母体血中と羊水中の濃度に相関がみられた。

Se、Ca、Sbの3元素で食習慣との関連が認められた。元素の胎児暴露評価には母体血の分析よりは羊水の分析が有用であることが判明した。

6. 胎内環境中に存在する化学物質の把握とその解析

平成20年9月より平成22年6月までに山口大学の倫理規定に則り、被験者への十分なインフォームドコンセントの下に、妊娠37週0日より妊娠41週6日における145症例から母体血128試料、母体尿111試料、母乳122試料、羊水52試料、臍帯血122試料、胎脂112試

料を採取した。

これらの試料を対象に、25種類の化学物質を測定し、同時に分析した試料の臨床背景、母体へのアンケート試料から胎内環境中に存在する化学物質の暴露状態を把握した。その結果、母体血中から臍帯血を介してさまざまな化学物質が移行する動態が明らかになり、胎児は出生前から化学物質に暴露されている事実が判明した。

7. 生殖補助技術における化学物質の暴露評価

次代の社会を担う子どもや胎児は化学物質に極めて脆弱な集団で、早期に危険化学物質の暴露状況を察知し健康影響を来さぬよう手段を講じなければならない。

わが国では近年の少産少子の社会現象が進行する傍らで、生殖補助技術の発展により毎年の総出生児数に占める体外受精による子どもの出生数が年を追うごとに増加しつつある。

本研究では、「子ども」という定義を胎児まで遡り、化学物質の暴露を分析・研究してきたが、最終年度において、「子ども」の定義を、さらに生命の発生の場、すなわち体外受精における胚培養の環境まで遡って化学物質の暴露状況を検証したことは、本研究の必然的な流れと思われる。

その結果、内外で嚆矢となる、化学物質の暴露検証として、*in vitro*の生命操作の環境にはじめてメスを入れてみると、ヒトの胚を取り囲む胚培養液には母体の子宮環境を遥かに上回る化学物質暴露の実態が判明した。

本研究はこの領域における化学物質の暴露状況について、初めて正面から問題を提起したことになり、本研究を起点として今後の多方面からの多くの検討が切に望まれる。

8. 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

本研究では、従来の毒性学試験法等と異なる化学物質の新しい暴露評価法を開発することを目的に開始された。

その結果、ヒト血中濃度程度の低濃度の化学物質(DEP、コチニン、水銀、セレン、S-421、PFOAなど)が、初期発生胚のモデルと考えられるES細胞やiPS細胞において、DNAメチル化状態の変化やヘテロクロマチン形成といったエピジェネティックな現象に影響を与え得ることを明らかにした。

これにより、身近に存在している化学物質が、母体血中に存在するレベルの濃度で、胎児の発生にも影響を与える可能性の有無を検証しうる方法が得られたことになる。

F. 健康危険情報

生殖補助技術、とくに体外受精—胚移植に用いられる各種培養液、調整液、添加血漿成分液などについては、化学物質の暴露とその健康影響について、今後より慎重な検討が基礎、臨床両面から必要と思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi, S., Hirabayashi, K., Sato, S., Li, W., Takahashi, Y., Hirakawa, T., Wu, G., Hattori, N., Hattori, N., Ohgane, J., Tanaka, S., Liu, X. S., Shiota, K.. DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Research*. 18:1969-1978 (2008).
- 2) 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- α gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod*. 14:539-545 (2008).
- 3) Kawaguchi, M., Ito, R., Honda, H., Endo, N., Okanouchi, N., Saito, K., Seto, Y., Nakazawa, H.. Determination of urinary triclosan by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromat B*. 875:577-580 (2008).
- 4) Kawaguchi, M., Ito, R., Honda, H., Endo, N., Okanouchi, N., Saito, K., Seto, Y., Nakazawa, H.. Measurement of Benzophenones in Human Urine Samples by Stir Bar Sorptive Extraction and Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*. 24:1509-1512 (2008).
- 5) Ito, R., Kawaguchi, M., Honda, H., Koganei, Y., Okanouchi, N., Sakui, N., Saito, K., Nakazawa, H.. Hollow-fiber-supported liquid phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in human urine samples. *J Chromat B*. 872:63-67 (2008).
- 6) Ito, R., Miura, N., Kawaguchi, M., Ushiro, M., Iguchi, H., Iwasaki, Y., Saito, K., Nakazawa, H.. *J Liq Chromat Relat Technl*. 31:198-209 (2008).
- 7) 前田千晶、塩田邦郎。再生医療のためのエピジェネティクストエピゲノム。分子消化器病。5:13-19 (2008)。
- 8) 新井良和、八木慎太郎、塩田邦郎。幹細胞をエピジェネティクスで評価する。現代科学。52-55 (2008)。
- 9) HiroSawa-Takamori, M., Lim, H. W., Yagi, S., Shiota, K.. Epigenetics for Biomedical Sciences. *Cornea*. 28:S7-13 (2009).
- 10) 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).
- 11) Ito, R., Kawaguchi, M., Koganei, Y., Honda, H., Okanouchi, N., Sakui, N., Saito, K., Nakazawa, H.. Development of Miniaturized Hollow-fiber Assisted Liquid-phase Microextraction with *in situ* Acyl Derivatization Followed by GC-MS for the Determination of Benzophenones in Human Urine Samples. *Analyt Scienc*. 25:1-5 (2009).
- 12) Ito, R., Miura, N., Ushiro, M., Kawaguchi, M., Nakamura, H., Iguchi, H., Ogino, J., Oishi, M., Wakui, N., Iwasaki, Y., Saito, K., Nakazawa, H.. *Int' l J Pharma*. 376:213-218 (2009).
- 13) Iwasaki, Y., Goto, M., Mochizuki, K., Terayama, E., Ito, R., Saito, K., Sugino, N., 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. *Chromat*. 25:503-510 (2010).
- 14) 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).
- 15) 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*. 84:212-216 (2010).
- 16) Lim, H. W., Iwatani, M., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S., Shiota, K.. Resistance

- to 5-aza-2'-deoxycytidine in Genic Regions compared to Non-genic Repetitive Sequences. *J Reprod Dev.* 56:86-93(2010).
- 17) 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。20:5-6(2010)。
 - 18) 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。28:217-225(2010)。
 - 19) 広沢一高森端子、尾形聡子、塩田邦郎。食の安全—エピゲノム評価に向かつて—。食の安全科学の展開。pp73-80。シーエムシー出版、東京(2010)。
 - 20) Arai, Y., Ohgane, J., Yagi, S., Ito, R., Iwasaki, Y., Saito, K., Akutsu, K., Takatori, S., Ishii, R., Hayashi, R., Izumi, S., Sugino, N., Kondo, F., Horie, M., Nakazawa, H., Makino, T., Shiota, K. Epigenetic Assesment of Environmental Chemicals Detected in Maternal Peripheral and Cord Blood Samples. *J Reprod Dev.* In press.
- 、2. 学会発表
- 1) 高取聡、阿久津和彦、岡本葉、近藤文雄、和泉俊一郎、牧野恒久、中澤裕之。日本人周産期母体尿中フタル酸モノエステル類の分析。環境ホルモン学会第11回研究発表会。東京(2008)。
 - 2) 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、羊水および胎脂中のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)およびフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)の分析。環境ホルモン学会第12回研究発表会。東京(2009)。
 - 3) 塩田邦郎。エピジェネティクスからエピゲノムへ：毒性病理学への応用。第25回日本毒性病理学会教育講演(2009)。
 - 4) 塩田邦郎。エピジェネティクス—環境変異原研究の新しい展開。第38回日本環境変異原学会(2009)。
 - 5) 塩田邦郎。胎児・胎盤評価系としてのエピジェネティクスとエピゲノム。第36回日本トキシコロジー学会(2009)。
 - 6) 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)。
 - 7) 高取聡、阿久津和彦、住江正大、杉野法広、中澤裕之、牧野恒久。臍帯血羊水、および胎脂中のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)およびフタル酸モノ(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。東京(2010)。
 - 8) 石井里枝、堀江正一、中澤裕之、杉野法広、牧野恒久。生体試料中のピレスロイド系および有機リン系農薬の分析および胎児期の暴露評価。日本薬学会第130回年回。おかやま(2010)。
 - 9) 中澤裕之、井之上浩一、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、牧野恒久、和泉俊一郎、岸玲子、杉野法広。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量評価。岡山(2010)。
 - 10) 岩崎雄介、後藤正人、伊藤里恵、斉藤貢一、杉野法広、牧野恒久、中澤裕之。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。日本薬学会大130回年回。岡山(2010)。
 - 11) 岩崎雄介、後藤正人、伊藤里恵、斉藤貢一、杉野法広、牧野恒久、中澤裕之。臍帯血清中のニコチン代謝物の測定。第71回分析化学討論会。島根(2010)。
 - 12) 寺山絵美、岩崎雄介、伊藤里恵、祭津浩一、杉野法広、牧野恒久、中澤裕之。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。東京(2010)。
 - 13) Akutsu, K.. Temporal Trend of Polybrominated diphenyl Ethers in Archived Breast Milk Samples from Osaka Japan. Vth International Symposium on Brominated Flame Retardants. Kyoto(2010)。
 - 14) 林留美子、近藤文雄、中澤裕之、杉野法広、牧野恒久。周産期母親の血清およ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。東京(2011)。

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

II. 研究成果の刊行に関する一覧表.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Arai, Y., Ohgane, J., Yagi, S., Ito, R., Iwasaki, Y., Saito, K., Akutu, K., Takatori, S., Ishii, R., Hayashi, R., Izumi, S., Sugino, N., Kondo, F., Horie, M., Nakazawa, H., Makino, T., Shiota, K.	Epigenetic Assesment of Environmental Chemicals Detected in Maternal Peripheral and Cord Blood Samples	<i>J Reprod Dev</i>			In press
Iwasaki, Y., Goto, M., Mochizuki, K., Terayama, E., Ito, R., Saito, K., Sugino, N., 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	<i>Biomed Chromatgr</i>	25	503-510	2011
Lim, H.W., Iwatani, M., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S., Shiota, K.	Resistance to 5-aza-2' deoxycytidine in Genic Regions Compared to Non-genic Repetitive Sequences	<i>J Reprod Dev</i>	56	86-93	2010
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	<i>Bull Environ Contam Toxicol</i>	84	212-216	2010
Kondo, F., Ikai, Y., Hayashi, R., Okumura, M., Takatori, S., Nakazawa, H., Izumi, S., Makino, T.	Determination of Five Phthalates Monoesters in Human Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry	<i>Bull Environ Contam Toxicol</i>	85	92-96	2010
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	<i>実験医学</i>	28	217-225	2010
広沢一高森瑞子、尾形聡子、塩田邦郎	食の安全—エピゲノム評価に向かって	<i>食の安全科学の展開</i>		73-80	2010
牧野恒久	母児環境における化学物質	<i>日本産婦人科/新生児血液学会</i>	20	5-6	2010
Hirosawa-Takamori, M., Lim, H.W., Yagi, S., Shiota, K.	Epigenetics for Biomedical Sciences	<i>Cornea</i>	28	S7-13	2009
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	<i>Mol Hum Reprod</i>	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: downregulation by progesterone and estrogen	<i>Hum Reprod</i>	24	1126-1132	2009
Ito, R., Kawaguchi, M., Koganei, Y., Honda, H., Okanouchi, N., Sakui, N., Saito, K., Nakazawa, H.	Development of Miniaturized Hollow-fiber Assisted Liquid-phase Microextraction with <i>in situ</i> Acyl Derivatization Followed by GC-MS for the Determination of Benzophenones in Human Urine Samples	<i>Analytical Science</i>	25	1-5	2009
Ito, R., Miura, N., Ushiro, M., Kawaguchi, M., Nakamura, H., Iguchi, H., Ogino, J., Oishi, M., Wakui, N., Iwasaki, Y., Saito, K., Nakazawa, H.	Effect of gamma-ray irradiation on degradation of di(2-ethylhexyl)phthalate in polyvinyl chloride sheet	<i>Int'l J Pharm</i>	376	213-218	2009

Ito,R.,Kawaguchi,M., Honda,H., Koganei,Y., Okanouchi, N., Sakui,N.,Saito,K., Nakazawa,H.	Hollow-fiber-supported liquid phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in human urine samples	<i>J Chromat B</i>	872	63-67	2008
Kawaguchi,M., Ito,R., Honda,H., Endo, N., Okanouchi,N., Saito,K., Seto,Y., Nakazawa,H.	Determination of urinary triclosan by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry	<i>J Chromat B</i>	875	577-580	2008
Ito,R.,Miura, N.,Kawaguchi,M., Ushiro,M., Iguchi,H., Iwasaki,Y., Saito,K., Nakazawa,H.	Simultaneous Determination of Di(2-ethylhexyl)phthalate, Mono(2-ethylhexyl)phthalate, and Phthalic Acid Migrating from Gamma-Ray Irradiated Polyvinyl chloride sheet by Liquid chromatography-Tandem Mass spectrometry	<i>J Liqd Chromat Relat Technol</i>	31	198-209	2008
Kawaguchi,M., Ito,R., Honda,H., Endo,N., Okanouchi,N., Saito,K., Seto,Y., Nakazawa,H.	Measurement of Benzophenones in Human Urine Samples by Stir Bar Sorptive Extraction and Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry	<i>Analytical Sciences</i>	24	1509-1512	2008
Yagi,S., Hirabayashi,K., Sato,S., Li,W., Takahashi,Y., Hirakawa,T., Wu,G., Hattori,N., Hattori,N., Ohgane,J., Tanaka,S., Liu,X.S., Shiota,K.	Dna methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions(T-DMRs)in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression	<i>Genome Research</i>	18	1969-1978	2008
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- α gene hypomethylation and uterine fibroid formation	<i>Mol Hum Reprod</i>	14	539-545	2008
前田千晶、塩田邦郎	再生医療のためのエピジェネティクスとエピゲノム	分子消化器病	5	13-19	2008
新井良和、八木慎太郎、塩田邦郎	幹細胞をエピジェネティクスで評価する	現代科学	11	52-55	2008