

異性体を含めたヒト生体試料中 Diisononyl phthalate (DiNP) 代謝物の定性・定量

研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招へい教授
研究分担者 松村 徹 いであ株式会社 常務取締役
研究分担者 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任准教授
研究分担者 伊藤 佐智子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師

研究要旨

ヒト生体試料中の Diisononyl phthalate (DiNP) の代謝物について、これまでの分析法では 4-メチルオクチル側鎖構造の代謝物のみを対象に分析していたが、これは DiNP 曝露を過小評価する可能性がある。DiNP のヒト曝露実態の把握および健康影響との関連を検討するうえでは、4-メチルオクチル側鎖を有する DiNP 代謝物だけでなく、その他の異性体も含めた定性・定量を行うことが重要である。本研究では、4-メチルオクチル側鎖構造以外の異性体を含む定量方法について検討し、定量イオンおよび確認イオンのクロマトグラムについて同様のパターンが得られる範囲を全異性体の検出範囲とし、ヒト血清 1,786 検体および尿 232 検体を対象に、Mono-carboxy-isononyl phthalate (cx-MiNP；血清，尿)，Mono-isononyl phthalate (MiNP；尿)および Mono-hydroxy-isononyl phthalate (OH-MiNP；尿)について定量した。

血清および尿検体について、それぞれ対象化合物の 4-メチルオクチル側鎖構造のみ (*single*)、全異性体 (*total*) での中央値濃度および検出率を比較した。血清試料では、cx-MiNP の中央値濃度はいずれも検出下限値 (MDL) 未満であったが、検出率は、*single* が 0.39% に対し、*total* は 22% であった。一方、尿試料においては、各 *single* 体の平均濃度は全て MDL 未満であったのに対し、*total* 体では全項目とも MDL 以上 (*total*-MiNP；0.59 ng/mL，*total*-OH-MiNP；1.7 ng/mL，*total*-cx-MiNP；1.2 ng/mL) であった。特に *total*-OH-MiNP，*total*-cx-MiNP の検出率は高く、それぞれ 92%，97% であった。これらの結果より、ヒト生体試料に含まれる DiNP 代謝物は 4-メチルオクチル側鎖構造以外のものが主であることが確認された。

現在のところ、DiNP 代謝物全異性体の標準物質は市販されておらず、化学合成を行うには膨大な費用が掛かる。従って、LC-MS/MS を用いて DiNP 代謝物全異性体を分離し、全ての異性体を正確に定性・定量することは困難である。本研究の手法を用いて各 *total* 体を再定量した結果、定量下限値 (MQL) 以上であれば凡そ正確な定性が可能であることが確認できた。一方で、尿試料中 *total*-MiNP，*total*-OH-MiNP については試料前処理や測定での夾雑物の除去・分離改善、対象化合物の選択性向上などが課題となった。今後、将来的にラウンドロビン試験などにおいて DiNP 代謝物が対象化合物として加わった際には、試験に参加し本定量法の妥当性を検証する必要がある。

研究協力者

小野田 優 (いであ株式会社 環境創造研究所，主査研究員)，アイツバマイ ゆふ (環境健康科学研究教育センター，特任講師)

A．研究目的

DiNP はフタル酸エステル的一种であり、フタル酸エステルはポリ塩化ビニル (PVC) を主成分とするプラスチック

の可塑剤として使用される化学物質である。DiNPは無水フタル酸とイソノニルアルコールのエステル化によって製造されるが、その化学構造は原料として用いるイソノニルアルコールによって異なる。イソノニルアルコールは種々の分岐アルコール異性体の混合物であるため、DiNPについても同様の炭素鎖異性体が存在することが報告されている^[1]。

DiNPはヒト体内に吸収された後、エステル加水分解によりモノエステルであるMiNPに代謝される（一次代謝物）。さらにMiNPは酸化または-1酸化によりそれぞれcx-MiNPやOH-MiNPとなり（二次代謝物）、これら代謝物についても異性体の存在が推測される^[1]。

一方、過去の研究ではイソノニルアルコールの組成として4-メチルオクタノールの割合が多いことが報告されている^[2-4]。その後、4-メチルオクチル側鎖を有するDiNP代謝物の標準物質が製造され、多くの研究が当該標準物質を用いて定性・定量を行っている。過去、我々も同様に4-メチルオクチル側鎖構造のDiNP代謝物のみを対象に多くのヒト生体試料を分析した。しかし、DiNPのヒト曝露の実態を正確に把握するためには、4-メチルオクチル側鎖を有するDiNP代謝物だけでなく、その他の異性体も含めて定性・定量を行うことが重要である。

今年度の研究では、過去に分析したヒト血清試料1,786検体および尿試料232検体を対象に、異性体を含めたcx-MiNP、MiNPおよびOH-MiNPの定性方法を検討し、各代謝物の総量を求めた。

B．研究方法

高速液体クロマトグラフ タンデム

質量分析計（LC-MS/MS）のProduct ion Scanモードによって得たOH-MiNP（Precursor ion：m/z 307）のproduct ion spectrumを図.1に示す。Product ion scanは、市販されているMono(4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalate（4-メチルオクチル側鎖を有するOH-MiNP）の標準物質（Mono-(4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalate 100 µg/mL in MTBE；CIL社）を用いて確認した。得られた結果より、m/z 121や77のフラグメントが強い強度で確認された。各フラグメントの質量数から、それらの構造は安息香酸部およびベンゼン部であることが明らかとなり、これらのフラグメントは、異性体共通で発生すると考えられた。すなわち、OH-MiNPのモニターイオンをm/z 307>121（定量イオン：Q1）、307>77（確認イオン：Q2）とした場合、それぞれは同様のクロマトグラムパターンであり、これらは全異性体に共通して確認できると推測される。同様のクロマトグラムパターンが得られる範囲を全異性体の検出範囲とし、Mono(4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalateの標準物質を用いた同位体希釈法により、異性体を含む総OH-MiNPを定量した（図.2）。cx-MiNP、MiNPについても確認し、同様の手法で定量することとした。

各total体の定性は、検量線試料および実試料のQ1とQ2のピーク面積比（ $Q1/Q2_{RM}$ 、 $Q1/Q2_{sample}$ ）を算出して確認した。検量線試料は各single体の標準物質を用いて調製した。

（倫理面への配慮）

本調査は北海道大学環境健康科学研究教育センター、北海道大学大学院医学研究科の倫理規定に従って実施した。分析対象者のリストは、研究代表者に

よって匿名化された ID のみを記載した。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえ行った。

C. 研究結果と考察

過去に分析したヒト血清試料（1,786 検体）および尿試料（232 検体）を対象に、異性体を含む DiNP 代謝物濃度を算出した。対象項目は cx-MiNP（血清、尿）、MiNP（尿）および OH-MiNP（尿）とした。各媒体における検出率、平均値およびパーセンタイルを表.1 に示す。

血清試料において、*single*-および *total*-cx-MiNP の平均濃度はいずれも MDL 未満であったが、検出率を比較すると、前者の 0.39% に対し後者は 22% であった。尿試料では、各 *single* 体の平均濃度は全て MDL 未満であったのに対し、*total* 体では全項目とも MDL 以上（*total*-MiNP ; 0.59 ng/mL , *total*-OH-MiNP ; 1.7 ng/mL , *total*-cx-MiNP ; 1.2 ng/mL）であった。特に *total*-OH-MiNP , *total*-cx-MiNP の検出率は高く、それぞれ 92% , 97% であった。これらの結果より、ヒト生体試料に含まれる DiNP 代謝物は 4-メチルオクチル側鎖構造以外のものが主であることが確認された。

Frederiksen らの報告^[5]において、血清中 cx-MiNP 濃度（平均）と検出率はそれぞれ 0.67 ng/mL と 43.3% であり、本研究結果と比較すると両者とも高い値を示している。また、尿中 MiNP , OH-MiNP および cx-MiNP 濃度はそれぞれ 1.01 ng/mL , 6.31 ng/mL , 8.85 ng/mL と本研究よりも 2~5 倍高い。一方で尿中検出率はそれぞれ 35% , 95% , 92% と同様の結果であった。

また、*total* 体の定性については

$Q1/Q2_{\text{sample}}$ が $Q1/Q2_{\text{RM}}$ より求めた基準範囲（上限： $Q1/Q2_{\text{RM}} \times 1.3$, 下限： $Q1/Q2_{\text{RM}} \times 0.7$ ）内であるかどうかで確認した（表 2 および図 3~6）。ここでは、MDL または MQL 以上の検体を対象とした。血清試料中 *total*-cx-MiNP では、基準範囲内であった検体数の割合が MDL 以上で 65% , MQL 以上で 89% であった。尿試料中 *total*-MiNP , *total*-OH-MiNP および *total*-cx-MiNP では、MDL 以上でそれぞれ 9.6% , 51% , 76% , MQL 以上で 50% , 51% , 78% であった。両媒体の *total*-cx-MiNP については MQL 以上の検体であれば、おおよそ定性確認の基準範囲内であると考えられた。

一方で、尿試料中 *total*-MiNP , *total*-OH-MiNP では基準範囲内の検体数が MQL 以上でも約 50% と低かった。特に *total*-OH-MiNP では、約 170 検体がクロマトグラムのベースラインやピーク形状不良によって正確な定性が困難であった。尿試料中 *total*-MiNP , *total*-OH-MiNP については、試料前処理におけるクリーンアップ方法の改善、測定における夾雑ピークとの分離改善など選択性の向上が今後の課題と考えられる。

ヒト生体試料中の DiNP 代謝物の分析について、*single* 体のみを定量することは DiNP ばく露を過小評価する可能性があり、*total* 体の濃度レベルも同時に把握することが重要であると考えられる。

今後、将来的にラウンドロビン試験などにおいて DiNP 代謝物が対象化合物として加わった際には、試験に参加し再定量法の妥当性を検証する必要がある。

D. 結論

本研究では、DiNP 代謝物の再定量の必

要性について検討し，ヒト血清 1,786 検体および尿 232 検体を対象に，異性体を含む *cx-MiNP*（血清および尿），*MiNP*（尿），*OH-MiNP*（尿）について定量した。再定量後，全ての代謝物について検出率および中央値濃度が増加し，健康影響との関連について統計解析に用いることが可能となった。本研究の手法を用いて各 *total* 体を再定量した結果，定量下限値（MQL）以上であれば凡そ正確な定性が可能であることが確認できた。一方で，尿試料中 *total-MiNP*，*total-OH-MiNP* については試料前処理や測定での夾雑物の除去・分離改善，対象化合物の選択性向上などが課題となった。今後は，他機関と協力した *DiNP* 代謝物分析精度の検証や，将来的に *DiNP* 代謝物がラウンドロビン試験に加わった際には，試験に参加し本研究の分析法の妥当性を検証する必要がある。

E．研究発表

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

F．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

1. 器具・容器包装評価書フタル酸ジイソノニル（*DINP*）2015年9月食品安全委員会 器具・容器包装専門調査会
2. ECPI (1997). European Council for Plasticizers and Intermediates (ECPI), Information letter of D. Cadogan to the Ministère de l'Environnement and to the Institute National de Recherche et

de Sécurité, on the differences between the various *DINPs*, Brussels, 22 sept. 1997.

3. Hellwig J. et al., Differential prenatal toxicity of one straight-chain and five branched-chain primary alcohols in rats., *Food Chem Toxicol.* 1997 May ; 35 (5) : 489-500.
4. Koch HM. et al., Determination of secondary, oxidised di-iso-nonylphthalate (*DINP*) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial *DINP* plasticizers, *J Chromatogr B. Volume 847, Issue 2, 1 March 2007, Pages 114-125*
5. Frederiksen H. et al., Correlations Between Phthalate Metabolites in Urine, Serum, and Seminal Plasma from Young Danish Men Determined by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 2010, Vol. 34, 400-410

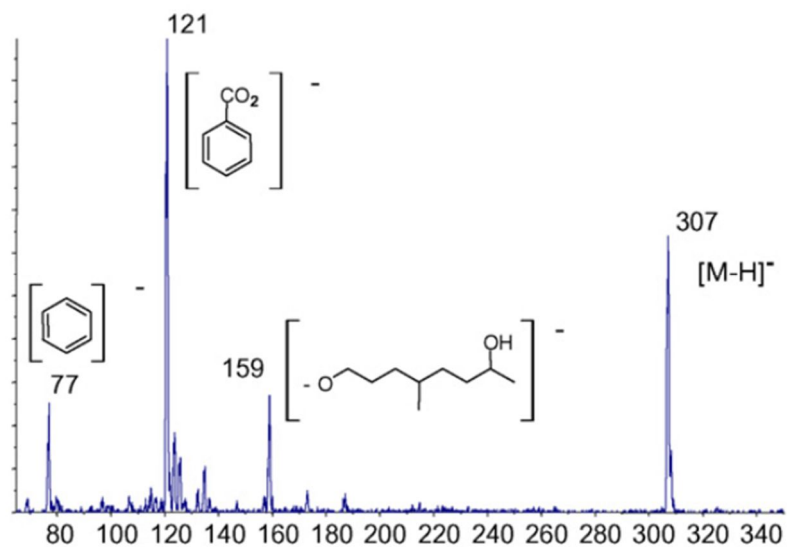


図.1 OH-MiNP の product ion spectrum

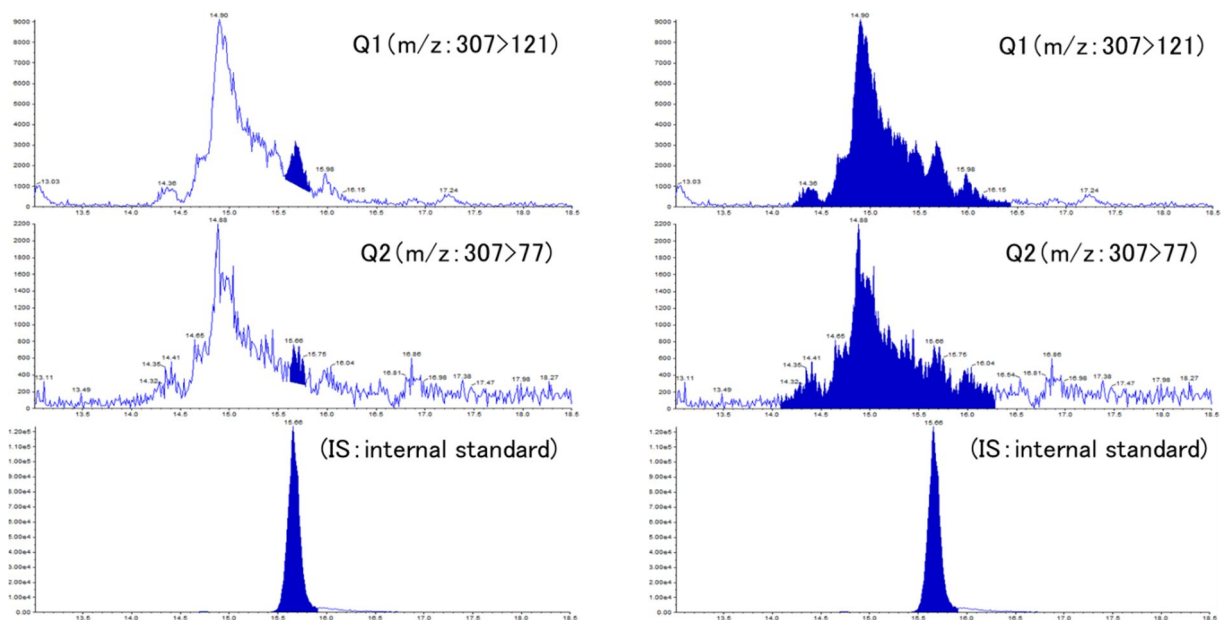


図.2 尿中 OH-MiNP のクロマトグラム
 （左：従来の定性，右：異性体を含めた定性）

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

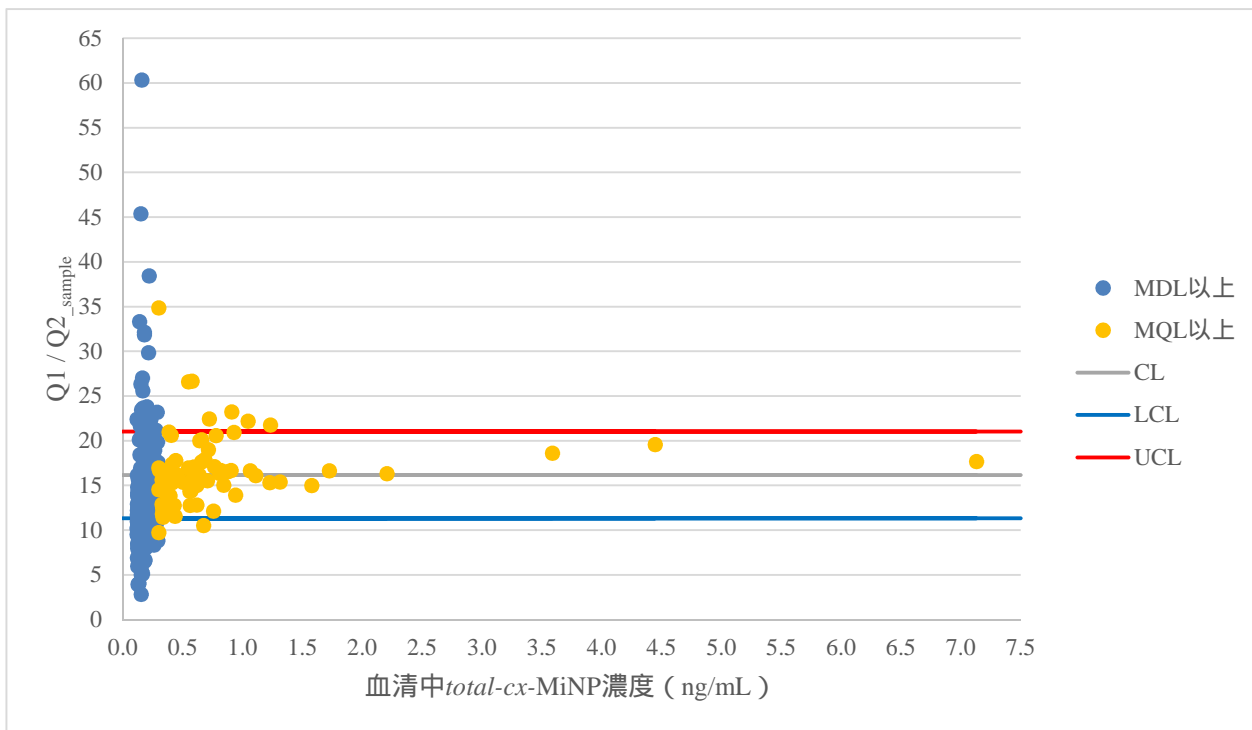


図.3 血清試料中 *total-cx-MiNP* 濃度と $Q1/Q2_{sample}$ の関係

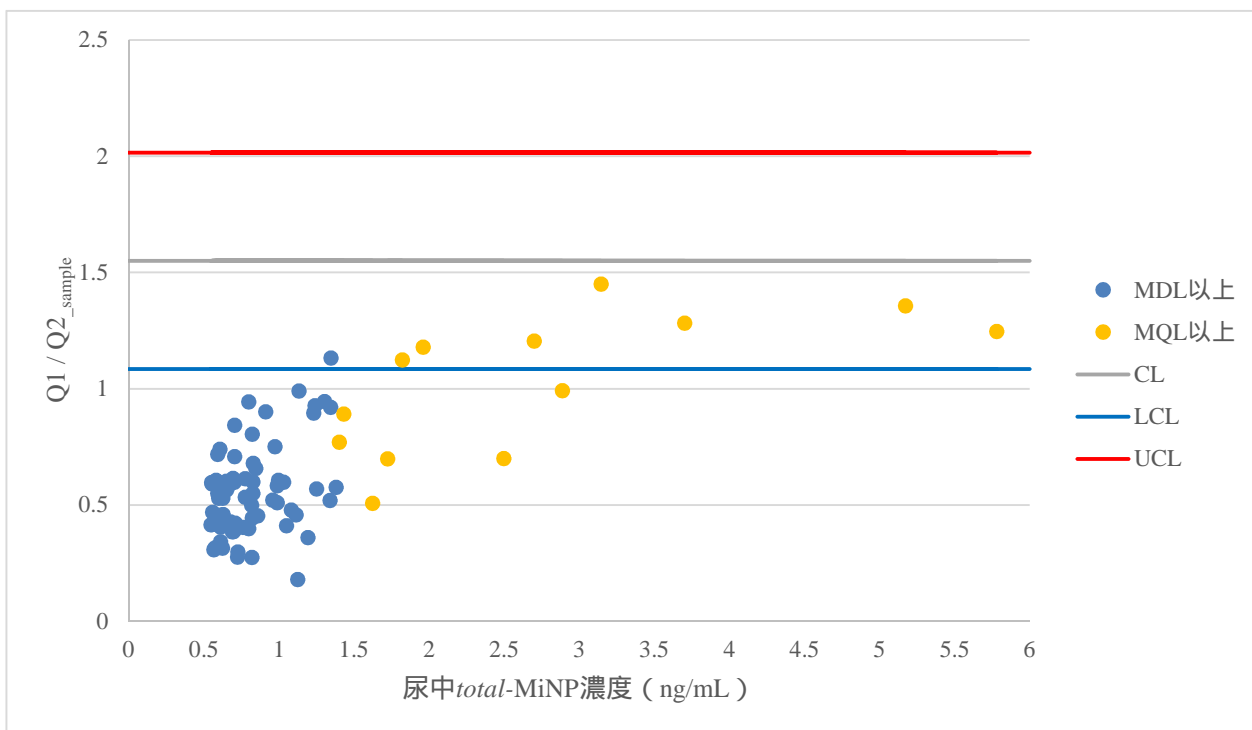


図.4 尿試料中 *total*-MiNP 濃度と $Q1/Q2_{sample}$ の関係

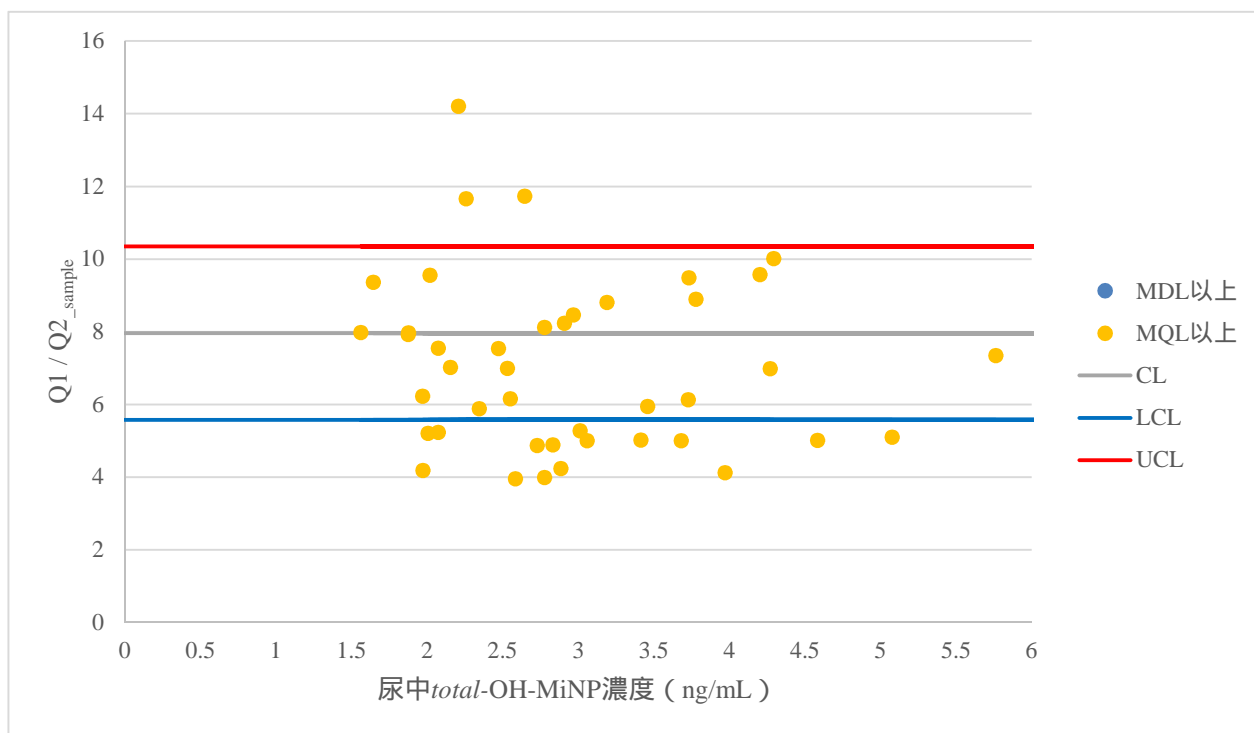


図.5 尿試料中 *total*-OH-MiNP 濃度と $Q1/Q2_{sample}$ の関係

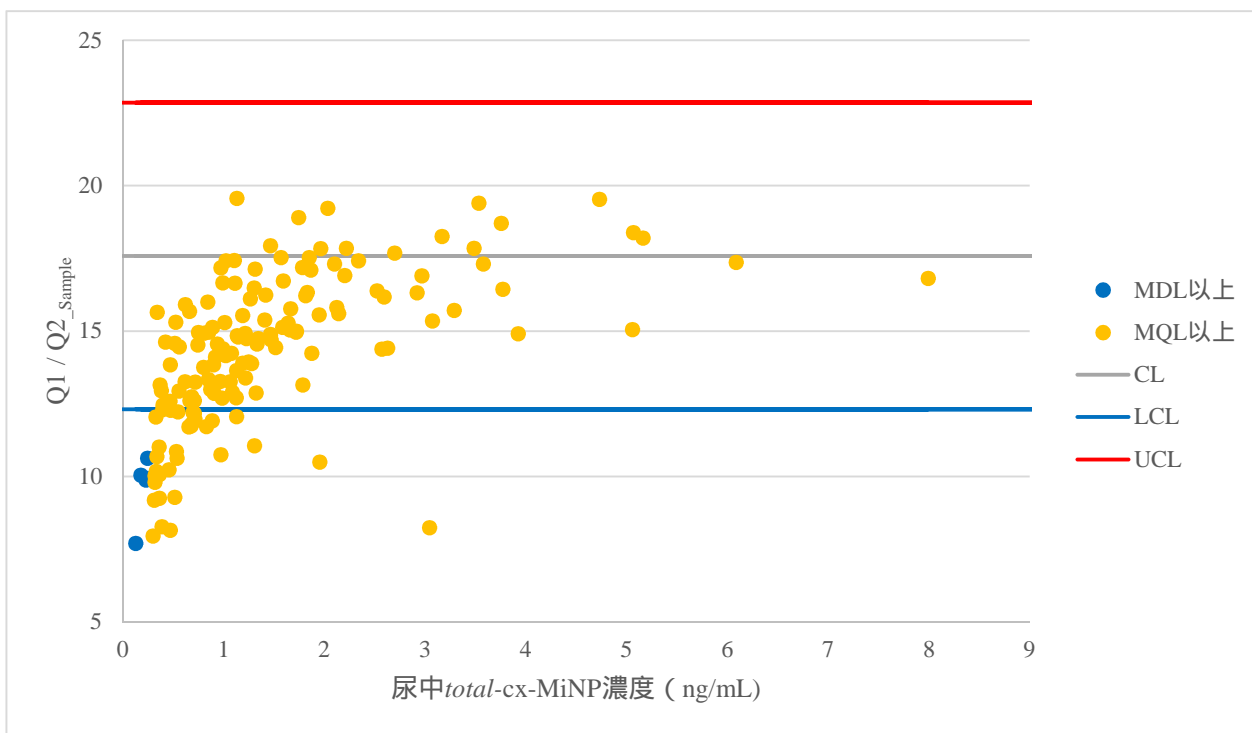


図.6 尿試料中 total-cx-MiNP 濃度と $Q1/Q2_{\text{sample}}$ の関係

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表.1 ヒト生体試料中 DiNP 代謝物濃度 (ng/mL)

Sample	Analyte	MDL ²⁾	Detection		Mean ³⁾	Minimum	Percentiles				Maximum
			N	(%)			25th	Median	75th	95th	
Serum (n=1,786)	<i>single-cx</i> -MiNP ¹⁾	0.12	7	(0.39)	<0.12					<0.12	0.46
	<i>total-cx</i> -MiNP ¹⁾		384	(22)	<0.12 (0.11)				<0.12	0.27	7.1
	<i>single</i> -MiNP	0.54	0	(0)	<0.54						<0.54
	<i>total</i> -MiNP		93	(40)	0.59			<0.54	0.70	1.4	5.8
Urine (n=232)	<i>single</i> -OH-MiNP	0.21	42	(18)	<0.21 (0.16)				<0.21	0.51	1.3
	<i>total</i> -OH-MiNP		213	(92)	1.7	<0.21	0.48	1.2	2.1	4.8	16
	<i>single-cx</i> -MiNP	0.12	14	(6.0)	<0.12				<0.12	0.12	0.36
	<i>total-cx</i> -MiNP		225	(97)	1.2	<0.12	0.39	0.78	1.4	3.5	13

1) *single*- : 4-メチルオクチル側鎖構造の DiNP 代謝物, *total*- : 異性体を含めた総 DiNP 代謝物

2) Method Detection Limit : 検出下限値

3) MDL 未満の検体については MDL の半値を用いて算出した

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

表.2 各 *total* 体の定性結果

判定基準など	血清 (n=1,786)	尿 (n=232)			
	<i>total</i> -cx-MiNP	<i>total</i> -MiNP	<i>total</i> -OH-MiNP	<i>total</i> -cx-MiNP	
MDL (ng/mL)	0.12	0.54	0.21	0.12	
MQL (ng/mL)	0.30	1.4	0.52	0.29	
Q1/Q2 _{RM} (CL)	16.2	1.55	7.96	17.6	
Q1/Q2 _{RM} × 0.7 (LCL)	11.3	1.09	5.57	12.3	
Q1/Q2 _{RM} × 1.3 (UCL)	21.0	2.02	10.3	22.9	
MDL 以上	対象検体数	384	93	213	225
	Q1/Q2 _{sample} が算出可能であった検体数 ¹⁾	384	83	49	156
	基準範囲内であった検体数 ²⁾	249	8	25	119
	基準範囲内検体数の割合(%) ³⁾	65	9.6	51	76
MQL 以上	対象検体数	81	14	213	151
	Q1/Q2 _{sample} が算出可能であった検体数	81	14	49	151
	基準範囲内であった検体数	72	7	25	118
	基準範囲内検体数の割合 (%)	89	50	51	78

1) クロマトグラムおよびピーク形状不良がなく，Q1，Q2 イオンともにピーク面積を算出できた検体数

2) Q1/Q2_{sample} 値が LCL ~ UCL の範囲内であった検体数

3) (基準範囲内であった検体数) / (Q1/Q2_{sample} が算出可能であった検体数) × 100