

血液中フタル酸モノエステル類の分析

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	いであ株式会社環境創造研究所	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

血液中のフタル酸モノエステル類 7 種 (Monobutyl phthalate (MnBP) Mono iso butyl phthalate (MiBP) Monobenzyl phthalate (MBzP)、 Mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP) Mono (2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate (MECPP) Mono (4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalate (cx-MiNP)) の分析法を確立し、試料 20 検体の分析を行った。

研究協力者

山本 潤
(いであ株式会社環境創造研究所, 主査研究員)

モノエステル類 7 種 (MnBP、MiBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MECPP、cx-MiNP) について血液試料の分析法を確立し、実試料の測定を行った。

A . 研究目的

フタル酸エステル類は、プラスチック可塑剤や医療材料、香料、化粧品原料をはじめとして、身近で多様な製品に使われている。これらは半減期が短いものの、小児、胎児期での影響が大きい事が懸念されている。

近年、喫煙、ヒ素や鉛などの重金属の胎児期暴露による児のメチル化への影響が報告されているが、その中でこれらフタル酸エステル類や、有機フッ素化合物、PCB 類と臍帯血や胎盤組織の IGF2/H19, AHRR, LINE1 遺伝子などのメチル化との関連が示された (J Expo Sci Environ Epidemiol 2017; Repro Toxicol 2017; Sci Rep 2016; Environ Res 2016)。しかし、網羅的メチル化解析に関しては、世界的にも報告事例が少なく、これらの研究を進めるに当たっては、生体試料中の微量化学物質の正確な濃度の把握が必要となる。

フタル酸エステル類については、ヒトがばく露されると代謝物が生じることが分かっている。今回は、小児、胎児期における影響を調べるため、代謝物である

B . 研究方法

開発した同位体希釈法-液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(以降、LC-MS/MS)をヒト血液試料 20 検体に適応した。対象とするそれぞれの項目の安定同位体をクリーンアップスパイクとして添加し、濃度の計算に用いた。

分析フローを図 1 に、LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

C . 研究結果

血液中のフタル酸モノエステル類 7 種の分析法を確立し、標準液の繰り返し測定、繰り返し分析、操作ブランク試験、添加回収試験等を実施し、必要となる精度管理データを収集した。また、本分析法により 20 名分の血液試料の分析を実施した。

標準液の繰り返し測定の結果を表 2、繰り返し分析の結果を表 3 に示す。血液中のフタル酸モノエステル類 7 種の検出下限値は、MnBP 0.57ng/mL、MiBP 0.44ng/mL、MBzP 0.19ng/mL、MEHP

分担研究報告書

0.31ng/mL、MEHHP 0.23ng/mL、MECPP 0.11ng/mL、cx-MiNP 0.12ng/mLであった。本分析法における操作ブランクはすべての項目で下限値未満、各対象物質を6ng添加した回収試験では、回収率が93～110%であった（表4および表5参照）。

血液試料20検体の分析の結果を表6に示す。その内の1検体で二重測定（同一試料の分析）を実施した。それぞれの項目における差は、最大で6.8%であった。

F．研究発表

1.論文発表
該当なし

2.学会発表
該当なし

G．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. Hanne Frederiksen 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, Journal of Analytical Toxicology 2010, Vol. 34, 400-410
2. Xiaofang Jia et al., Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: a cross-sectional study, Environmental Health and Preventive Medicine 2015, 20, 168-178.
3. Jee Yeon JEON et al., Determination of Phthalate Metabolites in Human Serum and Urine as Biomarkers for Phthalate Exposure Using Column-Switching LC-

MS/MS, Safety and Health at Work 2011, 2, 57-64

4. Erin P. Hines et al., Concentrations of Phthalate Metabolites in Milk, Urine, Saliva, and Serum of Lactating North Carolina Women, Environmental Health Perspectives 2009, vol.117, 86-92
5. Kayoko Kato et al., Quantitative Detection of Nine Phthalate Metabolites in Human Serum Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology 2003, vol.27, 284-289
6. P Monica Lind et al., Serum concentrations of phthalate metabolites are related to abdominal fat distribution two years later in elderly women, Environmental Health 2012, 11:21
7. Manori J. Silva et al., Automated Solid-Phase Extraction and Quantitative Analysis of 14 Phthalate Metabolites in Human Serum using Isotope Dilution-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology 2005, vol.29, 819-824

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

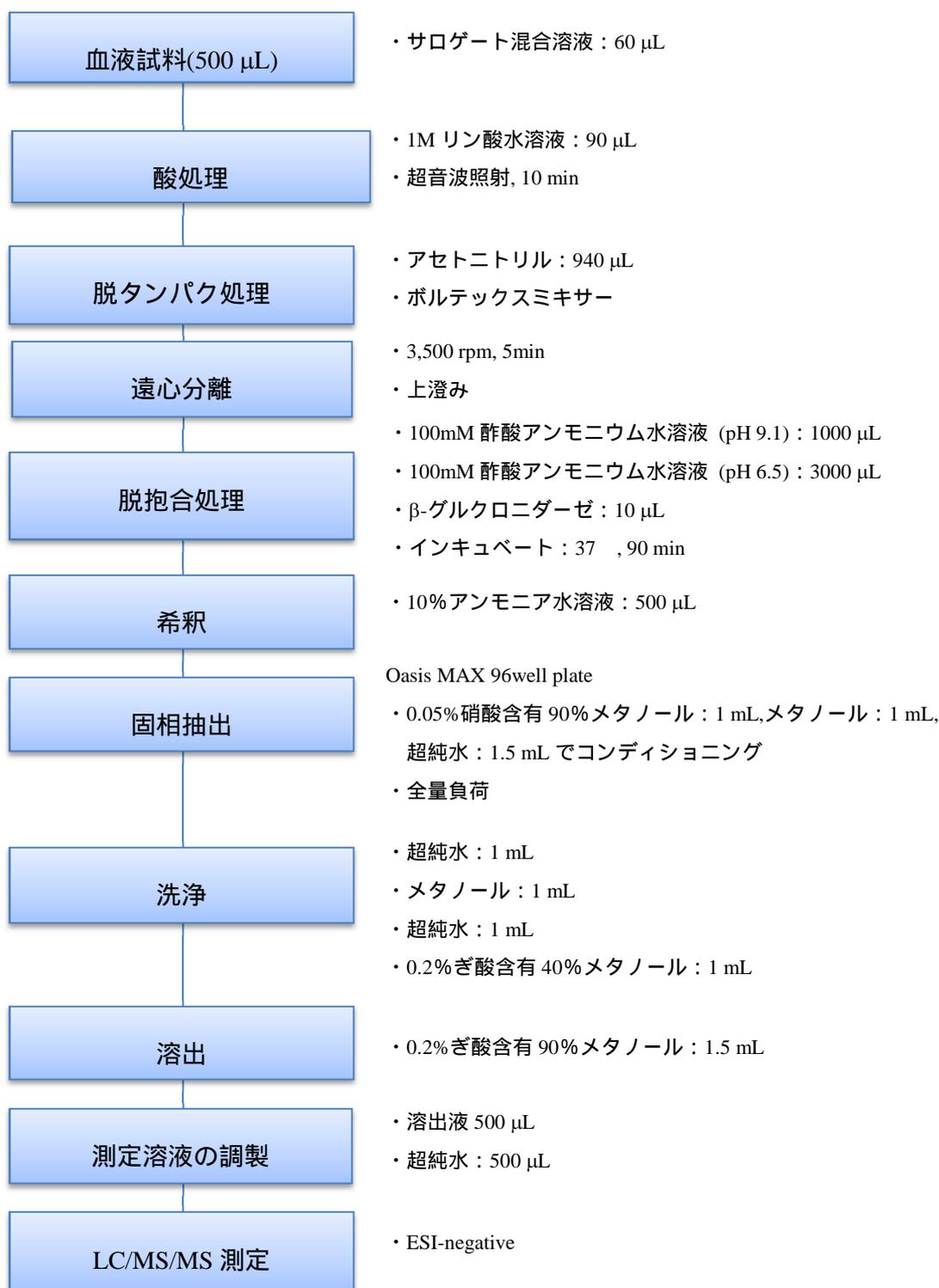


図 1. 血液中のフタル酸モノエステル類の分析フロー

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. フタル酸モノエステル類の分析における LC/MS/MS 測定条件

測定装置	LC : ACQUITY UPLC H-Class (Waters 社製) MS : QTRAP 6500 (AB SCIEX 社製)
分析カラム	BEH Phenyl (2.1×50 mm, 1.7 μm、 Waters 社製)
リテンションギ ャップカラム	Atlantis T3 (2.1×50 mm, 3μm、 Waters 社製)
溶離液	A : 0.02% アンモニア水含有 5mM 酢酸アンモニウム含有水溶液 B : アセトニトリル
グラジエント(B)	2%(0min-0.5min)→7.5%(2.0-5.0min)→15%(6.5min-11min)→40%(11.5min-15min) →80%(15.1min-18min) →2%(18.1min-24min)
注入量	60μL
カラム温度	40
モード	ESI-Negative
m/z	MnBP および MiBP : 220.98 > 76.89 (定量用) , 220.98 > 177.02 (確認用) MBzP : 254.89 > 182.96 (定量用) , 254.89 > 76.93 (確認用) MEHP : 276.99 > 133.91 (定量用) , 276.99 > 126.96 (確認用) MEHHP : 292.95 > 145.08 (定量用) , 292.95 > 120.95 (確認用) MECPP : 306.81 > 158.95 (定量用) , 306.81 > 112.99 (確認用) cx-MiNP : 320.88 > 173.01 (定量用) , 320.88 > 120.88 (確認用) MnBP- <i>d</i> ₄ : 224.98 > 80.95 MiBP- <i>d</i> ₄ : 224.98 > 80.95 MBzP- <i>d</i> ₄ : 258.96 > 187.01 MEHP- <i>d</i> ₄ : 280.99 > 138.03 MEHHP- ¹³ C ₄ : 296.97 > 144.97 MECPP- ¹³ C ₄ : 310.92 > 158.94 cx-MiNP- <i>d</i> ₄ : 324.73 > 173.02

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. フタル酸モノエステル類の IDL

物質名	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
試料量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
希釈係数	3	3	3	3	3	3	3
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
注入濃度 (ng/mL)	0.5	0.2	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02
装置注入量 (μL)	60	60	60	60	60	60	60
結果 1 (ng/mL)	0.511	0.224	0.0483	0.0499	0.0214	0.0205	0.0189
結果 2 (ng/mL)	0.512	0.221	0.0488	0.0504	0.0244	0.0202	0.0194
結果 3 (ng/mL)	0.488	0.207	0.0484	0.0500	0.0216	0.0207	0.0202
結果 4 (ng/mL)	0.496	0.183	0.0498	0.0501	0.0224	0.0223	0.0192
結果 5 (ng/mL)	0.471	0.218	0.0506	0.0466	0.0234	0.0195	0.0192
結果 6 (ng/mL)	0.511	0.200	0.0453	0.0452	0.0212	0.0197	0.0180
結果 7 (ng/mL)	0.516	0.201	0.0500	0.0495	0.0226	0.0200	0.0186
平均値 (ng/mL)	0.501	0.208	0.049	0.049	0.022	0.020	0.019
標準偏差 (ng/mL)	0.0167	0.0146	0.0017	0.0021	0.0012	0.0009	0.0007
IDL (ng/mL)	0.065	0.057	0.0070	0.0090	0.0046	0.0036	0.0028
IDL 試料換算値 (ng/mL)	0.39	0.34	0.042	0.054	0.028	0.022	0.017
CV (%)	3.3	7.0	3.6	4.2	5.2	4.5	3.6

$$IDL = t_{(n-1,0.05)} \times s \times 2$$

s は低濃度標準溶液の繰り返し測定結果より得られた標準偏差、 $t_{(n-1,0.05)}$ は自由度 n-1 および有意水準 = 0.05 における t 値を示す。

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 3. 血液試料中フタル酸モノエステル類の MDL および MQL

物質名	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
試料量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
希釈係数	3	3	3	3	3	3	3
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
装置注入量 (μL)	60	60	60	60	60	60	60
結果 1 (ng/mL)	5.58	2.38	1.08	0.899	1.08	0.666	0.398
結果 2 (ng/mL)	5.91	2.37	1.08	0.836	1.10	0.645	0.443
結果 3 (ng/mL)	5.60	2.35	1.09	0.890	0.953	0.685	0.399
結果 4 (ng/mL)	5.97	2.06	0.953	0.709	1.07	0.663	0.420
結果 5 (ng/mL)	5.74	2.24	1.08	0.725	1.06	0.723	0.409
結果 6 (ng/mL)	5.70	2.26	1.04	0.830	1.11	0.688	0.406
結果 7 (ng/mL)	5.74	2.21	1.05	0.735	1.13	0.645	0.479
平均値 (ng/mL)	5.75	2.27	1.05	0.803	1.07	0.674	0.422
標準偏差 (ng/mL)	0.146	0.112	0.0479	0.0797	0.0568	0.0277	0.0294
MDL (ng/mL)	0.57	0.44	0.19	0.31	0.23	0.11	0.12
MQL (ng/mL)	1.5	1.2	0.50	0.80	0.57	0.28	0.30
CV (%)	2.5	5.0	4.6	9.9	5.3	4.1	7.0
サロゲート回収率 (%)	66	63	55	63	51	53	44

$$\text{MDL} = t_{(n-1,0.05)} \times s \times 2$$

$$\text{MQL} = s \times 10$$

s は低濃度添加試料の繰り返し測定結果より得られた標準偏差、 $t_{(n-1,0.05)}$ は自由度 n-1 および有意水準 = 0.05 における t 値を示す。

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 4. 血液試料中フタル酸モノエステル類の BL 試験

物質名	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
試料量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
希釈係数	3	3	3	3	3	3	3
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
装置注入量 (μL)	60	60	60	60	60	60	60
結果 1 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.11)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 2 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.21)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 3 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.16)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 4 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.17)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 5 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.17)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 6 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.15)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
結果 7 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.18)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)
平均値 (ng/mL)	<0.57 (0.00)	<0.44 (0.00)	<0.19 (0.00)	<0.31 (0.17)	<0.23 (0.00)	<0.11 (0.00)	<0.12 (0.00)

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 5. 血液試料中フタル酸モノエステル類の添加回収試験

物質名	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
試料量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
希釈係数	3	3	3	3	3	3	3
最終液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1
添加量 (ng)	6	6	6	6	6	6	6
調製試料濃度 (ng/mL)	12	12	12	12	12	12	12
装置注入量 (μL)	60	60	60	60	60	60	60
無添加試料 (ng/mL)	0.72	0.00	0.00	0.80	0.31	0.67	0.09
結果 1 (ng/mL)	11.5	13.7	13.1	12.5	11.7	12.0	11.1
結果 2 (ng/mL)	12.4	13.2	12.4	11.3	11.3	13.1	12.1
結果 3 (ng/mL)	13.0	12.9	13.2	12.7	11.4	12.2	11.9
結果 4 (ng/mL)	12.9	13.0	12.8	12.3	12.5	11.3	12.14
結果 5 (ng/mL)	12.4	13.6	13.6	11.7	11.9	12.2	13.23
結果 6 (ng/mL)	12.3	13.0	12.7	12.0	10.3	12.9	13.2
結果 7 (ng/mL)	12.4	13.2	12.8	12.0	11.4	13.3	14.5
平均値 (ng/mL)	12.4	13.2	12.9	12.1	11.5	12.4	12.6
標準偏差 (ng/mL)	0.490	0.308	0.384	0.483	0.656	0.741	1.143
CV (%)	4.0	2.3	3.0	4.0	5.7	6.0	9.1
回収率 (%)	97	110	108	94	93	98	104
サロゲート回収率 (%)	71	72	63	66	68	55	60

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 6. 血液中のフタル酸モノエステル類の分析結果

No.	MnBP	MiBP	MBzP	MEHP	MEHHP	MECPP	cx-MiNP
001	37	6.4	<0.19	8.0	<0.23	0.38	<0.12
002	30	7.1	<0.19	7.8	<0.23	0.20	<0.12
003	18	3.9	<0.19	0.75	<0.23	0.18	<0.12
004	33	10	<0.19	8.6	<0.23	0.35	<0.12
005	12	5.2	<0.19	6.4	<0.23	0.21	<0.12
006	27	8.6	<0.19	<0.31	<0.23	0.28	<0.12
007	27	6.2	<0.19	0.32	<0.23	0.19	<0.12
008	25	8.5	0.74	1.8	0.54	3.1	<0.12
009	27	6.4	<0.19	<0.31	<0.23	<0.11	<0.12
010	38	11	<0.19	0.42	<0.23	0.28	<0.12
011	14	5.2	<0.19	<0.31	<0.23	0.12	<0.12
012	28	12	<0.19	0.58	<0.23	0.38	<0.12
013	18	7.2	<0.19	<0.31	<0.23	0.15	<0.12
014	4.8	1.7	<0.19	<0.31	<0.23	0.16	<0.12
015	6.7	3.3	<0.19	0.34	<0.23	0.46	<0.12
016	8.3	3.8	<0.19	<0.31	<0.23	0.15	<0.12
017	7.4	2.6	<0.19	<0.31	<0.23	0.27	<0.12
018	7.4	3.6	<0.19	0.52	<0.23	0.47	<0.12
019	11	4.6	<0.19	0.39	<0.23	0.35	<0.12
020	19	5.6	<0.19	18	<0.23	0.15	<0.12

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 7. 二重測定結果

項目	本測定 (ng/mL)	二重測定 (ng/mL)	測定値差 (%)
MnBP	30	31	3.3
MiBP	7.1	7.6	6.8
MBzP	<0.19	<0.19	-
MEHP	7.8	8.0	2.5
MEHHP	<0.23	<0.23	-
MECPP	0.20	0.19	5.1
cx-MiNP	<0.12	<0.12	-