

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

飲料水中の有機リン化合物の  
健康影響評価に関する研究  
(22KA3004)

令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 徳村 雅弘

令和5年(2023)年 3月

## 目次

### I. 総括研究報告

飲料水中の有機リン化合物の健康影響評価に関する研究 徳村雅弘	・・・・・・・・・・ 1
-----------------------------------	--------------

### II. 分担研究報告

1. 飲料水中の有機リン化合物の実態調査 徳村雅弘	・・・・・・・・・・ 13
2. 飲料水中の有機リン化合物および非意図的変化体の分析法の開発 王齊	・・・・・・・・ 32

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・・・・・・・・ 48
---------------------	---------------

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

総括研究報告書

飲料水中の有機リン化合物の健康影響評価に関する研究

研究代表者 徳村 雅弘 静岡県立大学 助教

**研究要旨：**

有機リン化合物はプラスチックの難燃剤や可塑剤として使用され、室内空気やハウスダストを介した曝露が主要とされている。一方、近年、我が国においてウォーターサーバーを設置し常飲する家庭が急増しているが、海外の事例では、その水中から水道水と比較して高い濃度の有機リン化合物が検出されたことが報告されている。

飲料水は調理過程にて加熱されることがあり、また、COVID-19の影響から、紫外線照射などの化学反応を伴う浄水器も普及し始めている。有機リン化合物は、加熱や光照射により置換基の脱離など、非意図的变化体を生成し、毒性が向上する場合もある。

本研究では、飲料水に含まれる有機リン化合物の分析方法の精緻化および汚染実態調査を行う。また、非意図的变化体についても測定・毒性試験（アセチルコリンエステラーゼ阻害能評価）を行う。以上により、多様化する飲料水中の有機リン化合物に対し、優先的に取り組みを進めるべき物質や広く事業者がリスク低減に取り組めるような提案を行うことを目的とする。

本年度は、飲料水中濃度レベルにおける有機リン化合物の一斉分析法の開発を行い、開発した測定法を使用して、ウォーターサーバーの水中の有機リン化合物の分析を行った。本研究で測定対象とした有機リン化合物19種類のうち、9種類の有機リン化合物が検出頻度50%以上で検出された。濃度が高かった有機リン化合物は、tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) であり、次にtris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), tris(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP) が続いた。得られたウォーターサーバーの水中の有機リン化合物濃度より推定一日摂取量を推算してハザード比を求めたところ、本研究で対象としたすべての有機リン化合物は $10^{-5}$ から $10^{-7}$ の値となった。

また、*in vitro*試験および*in silico*評価による有機リン化合物のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害能評価を行った。評価結果に加え、ウォーターサーバーの水中の有機リン化合物の分析結果を考慮して、有機リン化合物の非意図的变化体の分析法を開発した。

## 研究分担者（所属機関名・職名）

王 齊（静岡県立大学 特任助教）

### A. 研究目的

有機リン化合物はプラスチックの難燃剤や可塑剤として使用され、室内空気やハウスダストを介した曝露が主要とされている<sup>1</sup>。一方、近年、我が国においてウォーターサーバーを設置し常飲する家庭が急増しているが、海外の事例では、参照用量は下回るものの、その水中から  $170,000 \text{ ng L}^{-1}$  を超える濃度（水道水： $0.1\text{--}100 \text{ ng L}^{-1}$ ）の有機リン化合物が検出されることが報告されている<sup>1</sup>。

飲料水は調理過程にて加熱されることがあり、また、COVID-19の影響から、紫外線照射などの化学反応を伴う浄水器も普及し始めている<sup>2</sup>。有機リン化合物は、加熱や光照射により置換基の脱離など、非意図的变化体を生成し、毒性が向上する場合もある<sup>3</sup>。

本研究では、飲料水に含まれる有機リン化合物の分析方法の精緻化および汚染実態調査を行う。また、非意図的变化体についても測定・毒性試験（アセチルコリンエステラーゼ阻害能評価）を行う。以上により、多様化する飲料水中の有機リン化合物に対し、優先的に取り組みを進めるべき物質や広く事業者がリスク低減に取り組めるような提案を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

#### B.1. 有機リン化合物の汚染実態調査

##### B.1.1. 使用器具・試薬

Trimethyl phosphate（TMP）, triethyl

phosphate（TEP）, tributyl phosphate（TBP）, tris(2-chloroethyl) phosphate（TCEP）, tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate（TDCPP）, tris(butoxyethyl) phosphate（TBOEP）, tris(2-ethylhexyl) phosphate（TEHP）, triphenyl phosphate（TPhP）, cresyl diphenyl phosphate（CsDPhP）, tricresyl phosphate（TCsP）, 2-ethylhexyl diphenyl phosphate（EHDPhP）は東京化成工業（東京都）から購入した。Triphenyl phosphine oxide（TPhPO）, tris(2-chloroisopropyl) phosphate（TCPP）, tripropyl phosphate（TPP）は富士フィルム和光純薬株式会社（大阪府）から購入した。6-Benzylbenzo[*c*] [2,1] benzoxaphosphinine 6-oxide（BzIDOPO）は三光株式会社（大阪府）より購入した。Naphthalen-2-yl diphenyl phosphate（NDPhP）はBiosynth AG（スイス）より購入した。5-Ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphorinan-5-yl) methyl methyl methylphosphonate（PMMMP）と bis[(5-ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphinan-5-yl) methyl] methylphosphonate（BPMMP）はMatrix Scientific（USA）より購入した。2,2-Bis(chloromethyl)-propane-1,3-diyltetrakis(2-chloroethyl) bisphosphate（V6）はToronto Research Chemicals（カナダ）より購入した。TBP-*d*<sub>27</sub>, TCEP-*d*<sub>12</sub>, TPhP-*d*<sub>15</sub>, TCsP-*d*<sub>21</sub>, TEHP-*d*<sub>51</sub>は林純薬工業株式会社（大阪府）から購入した。

アセトニトリルはシグマアルドリッチジャパン合同会社（東京都）から購入した。アセトン、トルエン、ヘキサン、酢酸エチルは富士フィルム和光純薬株式会社（大阪府）から購入した。すべての実験で、Milli-Q水（Merck Millipore社）を使用した。

### B.1.2. サンプル情報

静岡県の商業施設や住宅に設置された5台のウォーターサーバーから水サンプル（100 mL）をガラス瓶に採取した（Table 1）。サンプリング前にはガラス瓶をアセトンとヘキサンで洗浄し、電気炉にて500°Cで5時間加熱して、自然冷却した。

### B.1.3. 分析方法

水サンプル100 mLと酢酸エチル:ヘキサン（1:1, v/v）100 mL、クリーンアップスパイク（*d*体mix4種: TPhP-*d*<sub>15</sub>, TEHP-*d*<sub>51</sub>, TCsP-*d*<sub>21</sub>, TCEP-*d*<sub>12</sub>）を分液漏斗に加え、振とう機で30分間振とうした。有機層をナスフラスコに移し、エバポレーターでおよそ1 mLまで濃縮した。窒素パージで約80 μLまで濃縮した後、アセトニトリルで溶媒置換し、シリンジスパイクとしてTBP-*d*<sub>27</sub>を20 μL加え、最終液量を100 μLとした。有機リン化合物の分析には、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計（LC-MS/MS : TSQ Endura Thermo Fisher Scientific）を使用して測定した。イオン化法には大気圧化学イオン化（APCI）法およびエレクトロスプレーイオン化（ESI）を用いた。

### B.1.4. 経口曝露量の推算方法

以下の式から一日あたりの曝露量を推測した。

$$EDI = \frac{C \times DC \times AP}{BW}$$

ここで、*EDI* は推定一日摂取量（ng kg-bw<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>）、*C* は飲料水中の有機リン化合物濃度（ng L<sup>-1</sup>）、*DC* は飲料水の日平均摂取量（mL day<sup>-1</sup>）、*AP* は吸収率、*BW* は体重（kg-bw）を表している。本研究では、一日平均摂取量として1957 mL<sup>4</sup>、体重として60.5 kgを用いた<sup>5</sup>。吸収率については安全側の評価を行うため100%とした。

ハザード比を求めるための式を下記に示す。

$$HQ = \frac{EDI}{RfD}$$

ここで、*HQ*はハザード比（-）、*RfD*は参照用量（ng kg-bw<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>）を表している。

## B.2. 非意図的変化体の分析法の開発

*in vitro*試験において50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）が低かった物質や*in silico*評価において結合エネルギーが大きかった物質などの毒性試験における優先度に加え、汚染実態調査での検出率や濃度を考慮して、優先的に評価すべき有機リン系化合物の非意図的変化体について、分析法の開発を行った。研究方法については、「有機リン化合物の汚染実態調査」における「有機リン化合物の一斉分析法の開発」と同様である。

## B.3. AChE活性阻害能評価

### B.3.1. *in silico*評価によるAChE阻害活性能評価法

本研究では、被検物質のAChEへの結合能をリガンドドッキング計算によりスクリーニングすることで、バイオアッセイ試験とは異なる視点より評価を行った。計算に用いたパソコンはHP Compaq 8100 Elite SF/CTであり、オペレーティングシステムはWindows 7であった。

リガンドドッキング計算用の初期入力構造を得るため、まず量子化学計算を行った。ソフトウェアはGaussian R 09W（ver. 7.0）を使用した。入力分子構造はGauss View ver. 5.0を使用し、分子動力学法による構造安定化を実施した後、これを初期構造として計算を行い、最適分子構造とした。この時、Becke型-3パラメーター密度汎関数法でLee-Yang-Parrの相関関数を用いるB3LYPとBase Setとして

6-31G\*\*を用いた。また、一部の分子は構成原子数が多いため、あらかじめ半経験的分子軌道計算であるPM6で最適化した後、得られた構造を初期値として上述の量子化学計算を行った。計算過程において、分子内対称性は可能な限り考慮した。また、最適構造の探索にはGEDIISによるBernyのアルゴリズムを用いた。

リガンドドッキング計算ではThe Scripps Research Instituteより提供されているソフトウェアAutoDock Vinaを使用した。まず、リガンド分子の入力データを以下の手順で作成した。上述した量子化学計算により得られた最適化構造を再度Gauss View ver. 5.0で読み込み、PDB (Protein Data Bank) 形式に変換した。次に、AutoDock Tool ver. 1.5.4で読み込み、PDBQT (Protein Data Bank, Partial Charge, & Atom Type) 形式にさらに変更した。この時、重原子（水素原子以外の原子）間の全ての単結合を回転可能な結合として設定した。

一方、AChEの構造データは日本蛋白質構造データバンク (PDBj: Protein Data Bank Japan) より入手した。具体的には、AChEの場合ではPDBjのホームページよりシビレエイ由来のAChEを検索した。該当した数種の蛋白 (X-線結晶構造データ) の中から、回折値が小さいものを選定した。今回は1 qtiをFASTA形式でダウンロードした。このデータをGauss View ver. 5.0で読み込み、水分子、キャップ分子、そして結晶化の際に添加された金属イオン種を同様に消去し、アミノ酸残基の配列のみから成る新たな構造データを作成した。その後、上述のAutoDock Tool ver. 1.5.4により、リガンド-分子の入力位置を確認した。

AChEではリガンド-分子と受容体を構成するアミノ酸残基の距離より、Ser-200, Glu-327, His-440がドッキング時に重要な役割を

果たしていることが知られている。そこで、これら3種のアミノ酸残基については、ドッキング過程において単結合が自由に回転できる「フレキシブル」と設定し、この3種のアミノ酸残基全てを被覆することができる空間内をドッキング領域とし、ドッキング計算を行った。

### B.3.2. *in vitro*試験によるAChE活性阻害能評価法

#### B.3.2.1. 使用器具・試薬

塩化ナトリウム, 0.1 M Phosphate Buffer Solution, Acetylthiocholine iodide (ATCI) は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪府) から購入した。塩化マグネシウム六水和物, Albumin from bovine serum (BSA), AChE from electrophorus electric eelは、シグマアルドリッチジャパン合同会社 (東京都) から購入した。Galantamine hydrobromide (Gal), 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) は東京化成工業株式会社 (東京都) から購入した。

吸光度測定用の透明平底96ウェルアッセイプレート3881-096はAGCテクノグラス株式会社 (IWAKI) (静岡県) から購入した。Air-O-Seal Hydrophobic Gas Permeable Seal (マイクロプレート用シール) は日本ジェネティクス株式会社 (4titude) (東京都) から購入した。

#### B.3.2.2. 測定方法

本研究では、有機リン化合物のAChE阻害活性を評価するため、Ellmanら<sup>6</sup>の方法を改良した96ウェルマイクロプレート法によるAChE阻害活性試験を行った。なお、ポジティブコントロールとしてガラントミン (Gal) を使用した。具体的には、AChE from electrophorus electric eelを0.1 M Phosphate Buffer Solutionに溶解させた。これをバイアル

へ分注し、冷凍保存 (-80°C) した。NaClとMgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>Oを0.1 M Phosphate Buffer Solutionに溶解させた。この発色bufferに、5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)を溶解させ、冷蔵保存 (4°C) した。Albumin from bovine serum (BSA)を0.1 M Phosphate Buffer Solutionに溶解させた。次に、BSA bufferを分取し、1000 U/mL AChE溶液に溶解させた。Acetylthiocholine iodide (ATCI)は超純水に溶解させた。マイクロプレートにそれぞれの試薬を分注した後、40秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、37°Cのインキュベーターでそれぞれの反応時間0.25 hr放置した。15 mM ATCI溶液を添加した後、3 mM DTNB溶液を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌後、アルミホイルで遮光し、室温で30 min放置した。その後、マイクロプレートリーダーで波長412 nmの吸光度を測定し、試料の阻害率を求めた。試料によるAChEの阻害が50%以上みられ、用量-反応関係が有意にみられる場合をAChE阻害活性陽性とする。陽性の時、試料の50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)を回帰式(シグモイド式)により求め、AChE阻害活性の指標とした。

## C. 研究結果および考察

### C.1. 有機リン化合物の汚染実態調査

#### C.1.1. 有機リン化合物の一斉分析法の妥当性の検証

本研究で用いる分析法が、本研究の目的を達成するために必要な精度を有しているか確認するため、農林水産省の「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」<sup>7</sup>を基に性能を評価した。具体的な結果を下記に示す。

19種類の有機リン化合物の混合標準溶液 (1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ng mL<sup>-1</sup>)を用いて、既往研究<sup>1</sup>で報告されている飲料水中の有機リン化合物濃度をカバーできる濃度範囲で検量線を作成した。これらの濃度範

囲内にてLC-MS/MSのレスポンスと濃度が比例関係にあることを確認した (決定係数 ( $R^2$ ) > 0.99)。

本研究で対象とした有機リン系化合物物質の混合標準溶液を分析し、得られたエリアから、S/N (signal-to-noise) 比 = 10となる濃度を定量下限値 (LOQ) とした。既往研究<sup>1</sup>で報告されている飲料水中の有機リン化合物濃度を測定できるLOQであることを確認した。

ヘキサン洗浄したMilli-Q水を用いて有機リン化合物の添加回収試験を行った ( $n=3$ )。各有機リン化合物の添加濃度は5 ppbである。結果をTable 2に示す。既往研究にて飲料水中から検出される主要な有機リン化合物 (例えばCsDPhPやEHDPPhP, TCEP, TPhPなど) の回収率は、「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」<sup>7</sup>で許容される範囲内 (40%–120%) であった。ただし、TDCPPについては、135%であったため、今後、検討を進める。

有機リン化合物の汚染実態調査に用いた水サンプルに添加したクリーンアップスパイクの回収率は ( $n=3$ )、全てのサンプルで、「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」<sup>7</sup>で許容される範囲内であり、良好であった (Table 3)。

繰り返し測定 ( $n=3$ ) においても、「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」<sup>7</sup>で許容される相対標準偏差 (RSD) である44%以下の値となった (Table 2)。

以上のことから、本研究で用いる分析法は、ウォーターサーバーの水に含まれる有機リン化合物を分析するという目的に対し、十分な感度および精度を有していることを確認できた。ただし、TDCPPについては、今後の検討が必要である。

### C.1.2. 飲料水中の有機リン化合物の濃度

ウォーターサーバーの水からは測定対象とした有機リン化合物 19 種類のうち、9 種類の有機リン化合物が検出頻度 50%以上で検出された。特に濃度が高かった有機リン化合物は、TCEP ( $32 \text{ ng L}^{-1}$ : 中央値) であり、次に TDCPP ( $7.5 \text{ ng L}^{-1}$ ), TCPP ( $7.5 \text{ ng L}^{-1}$ ) が続いた。ただし、TDCPP については、回収率が 135%であったため、参考値とした。

### C.1.3. 飲料水中の有機リン化合物の曝露評価

EDI は、TCEP および TCPP, TDCPP でそれぞれ 1.0 および 0.2,  $0.2 \text{ ng kg-bw}^{-1} \text{ day}^{-1}$  であった。これらの結果より、ウォーターサーバーからの飲料水の摂取がヒトへの TCEP 曝露の重要な曝露経路となる可能性が示唆された。

EDI から推算した本研究で対象としたすべての有機リン化合物の HQ は  $10^{-5}$  から  $10^{-7}$  の値となった。

## C.2. 非意図的変化体の分析法の開発

*in vitro* 評価および *in silico* 評価により得られた優先順位の高い変化体のなかから、有機リン化合物の汚染実態調査の結果も考慮して、TCEP, TDCPP, TEHP の非意図的変化体 (BCEP, BDCPP, BEHP) に対して、標準試薬を入手し、LC-MS/MS (イオン化法: ESI) を用いて分析方法の開発を行った。今回の測定で得られたクロマトグラムは、それぞれの非意図的変化体で良好なピーク形状が得られた。

## C.3. AChE 活性阻害能評価

### C.3.1. *in silico* 評価による AChE 阻害活性能評価

有機リン化合物を対象として AChE への相

互作用をリガンドドッキング法で評価した。AChE と有機リン化合物の相互作用をポジティブコントロール (Gal) のそれと比較しながら評価を行った。リガンドドッキング計算で得られた TPhPO, TPhP, CsDPhP, TCsP, NDPhP, BzIDOPO-R, BzIDOPO-S と Gal の結合エネルギーを比較したとき、前者はより結合エネルギーが大きく、安定しているという結果となった。結合エネルギーの大きい有機リン化合物の構造をみたとき、どの有機リン化合物もベンゼン環を有していることが確認できた。このことから、本研究で対象とした化学物質においては、ベンゼン環のような大きな構造をもつものは AChE にはまりやすく、結合エネルギーが大きくなる可能性が考えられた。また、NDPhP, TEP, TPP, TBP, TPhPO, TCEP, TCPP-RRR, TCPP-SRR, TCPP-SSR, TCPP-SSS, EHDPhP-R, EHDPhP-S, TBOEP, TDCPP, TEHP-RRR, TEHP-SRR, TEHP-SSR, BzIDOPO-R, BzIDOPO-S と Gal を比較したとき、前者は AChE の活性中心の Ser-200 と距離が Gal より近いことが分かった。リン酸エステル内の P 原子と結合している O 原子は、電気陰性度が大きいので、P 原子が正に帯電し、AChE の活性中心の Ser-200 との反応性が高くなり、P 原子と Ser-200 が相互作用することで Gal と比較して AChE を阻害する可能性が示唆された。コリンエステラーゼ阻害は安定性に加え、Ser との距離も考慮する必要があるため今後、さらなる検討が必要である。

### C.3.2. *in vitro* 試験による AChE 活性阻害能評価

試験したどの有機リン化合物 (TMP, TEP, TPP, TBP, TPhPO, TCEP, TCPP, TPhP, CsDPhP, EHDPhP, TCsP, TBOEP, TDCPP, TEHP, NDPhP) においても  $IC_{50}$  値は N.D. と



なり、AChE 阻害は検出されなかった。今回は反応時間を 0.25 時間として実験を行い<sup>6</sup>、有機リン化合物の AChE 阻害能の評価を試みた。しかし、これまで有機リン化合物の急性毒性の報告はないため、反応時間を長く設定した場合、AChE 阻害が検出される可能性も考えられるため、引き続き検討を続けていく。

#### D. 結論

飲料水中の有機リン系化合物の測定法を開発した。飲料水としてウォーターサーバーの水中の有機リン化合物濃度を測定した結果、9 種類の有機リン化合物が検出頻度 50% 以上で検出され、TCEP, TDCPP, TCPP の濃度が高い傾向にあった。EDI は、TCEP および TCPP, TDCPP でそれぞれ 1.0 および 0.2, 0.2 ng kg-bw<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> であった。EDI から推算した HQ は 10<sup>-5</sup> から 10<sup>-7</sup> の値となった。

有機リン系化合物の非意図的変化体については、引き続き、より詳細な評価を進めていく。

#### E. 参考文献

1. Hou, M.; Shi, Y.; Na, G.; Zhao, Z.; Cai, Y. Increased Human Exposure to Organophosphate Esters via Ingestion of Drinking Water from Water Dispensers: Sources, Influencing Factors, and Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology Letters* **2021**. DOI: 10.1021/acs.estlett.1c00592.
2. 日本紫外線水処理技術協会, 一. ニュースレター No.13. 2021. <http://www.juva.jp/pdf/newsletterNo13.pdf>.
3. Yao, C.; Yang, H.; Li, Y. A review on organophosphate flame retardants in the

environment: Occurrence, accumulation, metabolism and toxicity. *Science of The Total Environment* **2021**, 795, 148837.

DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148837>.

4. Ohno, K.; Asami, M.; Matsui, Y. Is the default of 2 liters for daily per-capita water consumption appropriate? A nationwide survey reveals water intake in Japan. *Journal of Water and Health* **2018**, 16 (4), 562-573. DOI: 10.2166/wh.2018.281 (accessed 1/25/2023).
5. 厚生労働省. 令和元年国民健康・栄養調査報告.
6. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, 7 (2), 88-95. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
7. 農林水産省. 分析法の妥当性確認に関するガイドライン. 2019. [https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/pdf/guide\\_validation.pdf](https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/pdf/guide_validation.pdf).

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### G.1. 論文発表

なし

##### G.2. 学会発表

- 1) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 齊, 野呂 和嗣, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの飲料水の摂取

に伴う有機リン化合物のリスク評価に向けた分析法の検討, 第57回日本水環境学会年会, 愛媛. (2023年3月)

- 2) 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 篠原 直秀, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機の使用に伴うプラスチック添加剤の経皮曝露量の推定, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 3) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 4) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ウォーターサーバーの飲料水中に含まれる有機リン化合物の実態調査, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 5) Maho Ishida, Mana Oishi, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Dermal Exposure to Phosphorus Flame Retardants in Car Seat through Actual Clothing, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)
- 6) Yuichi Miyake, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Occurrence of Novel Phosphorus-based Flame Retardants in Indoor Dust Collected from Japanese Dwellings, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)
- 7) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の初期曝露評価, 環境科学会

2022年会, Web. (2022年9月)

- 8) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 9) 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の実態調査とその使用に伴う経皮曝露量の推定, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 10) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内製品中リン系難燃剤の連続曝露と断続曝露における経皮曝露量への影響の比較, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)
- 11) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の分析法の検討, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)
- 12) 西山 裕那, 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の定性・定量分析法の初期検討, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)

### G.3. 市民向け説明会

- 1) 車内部材由来物質の車内環境への影響とその評価方法, 2022年9月6日(火), Web, 約30名, 技術情報協会, プレゼンター及び講習会の受講者
- 2) 環境サマースクール2022 「環境浄化と食品,化粧品との意外な関係」, 2022年8月5日(金), 静岡, 約40名, 静岡県立大学, 教員及びサマースクールの受講者

(高校生)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H.1. 特許取得

なし

### H.2. 実用新案登録

なし

### H.3. その他 (受賞)

- 1) 2022年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 篠原 直秀, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機の使用に伴うプラスチック添加剤の経皮曝露量の推定 (2022年12月)
- 2) 2022年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価 (2022年12月)
- 3) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞 (富士電機賞), 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との

非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築 (2022年9月)

- 4) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞 (富士電機賞), 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の実態調査とその使用に伴う経皮曝露量の推定 (2022年9月)
- 5) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞 (富士電機賞), 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水に含まれる有機リン化合物の初期曝露評価 (2022年9月)
- 6) 第30回 環境化学討論会 Transtech賞, 西山 裕那, 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の定性・定量分析法の初期検討 (2022年6月)

Table 1 ウォーターサーバーに関する情報

	ウォーターサーバーの材質		取水源	使用年数	製造国
	タンク	管			
Sample 1	ポリカーボネート	不明	静岡県 富士宮市	2年	韓国
Sample 2	ポリカーボネート	不明	群馬県 みかなみ町	1年以内	韓国
Sample 3	ポリエチレンテレフタレート	不明	静岡県 富士市	3年	中国
Sample 4	ポリエチレンテレフタレート	不明	山梨県 北杜市 白州町	3年	韓国
Sample 5	不明	不明	水道水	8年	韓国

Table 2 添加回収試験における回収率と相対標準偏差 (RSD)

	回収率 (%)	RSD (%)
BPMMP	ND	-
BzIDOPO	101	7.2
CsDPhP	107	11
EHDPPhP	104	3.8
NDPhP	113	6.9
PMMMP	ND	-
TBOEP	ND	-
TBP	89	2.2
TCEP	117	2.7
TCPP	117	10
TCsP	106	4.5
TDCPP	135	15
TEHP	110	3.1
TEP	39	5.3
TMP	4	7.7
TPhP	120	7.6
TPhPO	107	2.9
TPP	67	0.68
V6	96	25

ND = not detected

- = no data

Table 3 クリーンアップスパイクの回収率

	回収率 (%)	RSD (%)
TCEP- <i>d</i> <sub>12</sub>	73	11
TCsP- <i>d</i> <sub>21</sub>	86	9.5
TEHP- <i>d</i> <sub>51</sub>	86	11
TPhP- <i>d</i> <sub>15</sub>	86	15

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

飲料水中の有機リン化合物の実態調査

研究代表者 徳村 雅弘 静岡県立大学 助教

**研究要旨：**

有機リン化合物はプラスチックの難燃剤や可塑剤として使用され、室内空気やハウスダストを介した曝露が主要とされている。一方、近年、我が国においてウォーターサーバーを設置し常飲する家庭が急増しているが、海外の事例では、その水中から水道水と比較して高い濃度の有機リン化合物が検出されたことが報告されている。

飲料水は調理過程にて加熱されることがあり、また、COVID-19の影響から、紫外線照射などの化学反応を伴う浄水器も普及し始めている。有機リン化合物は、加熱や光照射により置換基の脱離など、非意図的変化体を生成し、毒性が向上する場合もある。

本研究では、飲料水に含まれる有機リン化合物の分析方法の精緻化および汚染実態調査を行う。また、非意図的変化体についても測定・毒性試験（アセチルコリンエステラーゼ阻害能評価）を行う。以上により、多様化する飲料水中の有機リン化合物に対し、優先的に取り組みを進めるべき物質や広く事業者がリスク低減に取り組めるような提案を行うことを目的とする。

本分担課題では、開発した飲料水中濃度レベルにおける有機リン化合物の一斉分析法を用いて、ウォーターサーバーの水中の有機リン化合物の分析を行った。本研究で測定対象とした有機リン化合物19種類のうち、9種類の有機リン化合物が検出頻度50%以上で検出された。濃度が高かった有機リン化合物は、tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) であり、次にtris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), tris(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP) が続いた。得られたウォーターサーバーの水中の有機リン化合物濃度より推定一日摂取量を推算してハザード比を求めたところ、本研究で対象としたすべての有機リン化合物は $10^{-5}$ から $10^{-7}$ の値となった。また、*in vitro*試験および*in silico*評価による有機リン化合物のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害能評価を行った。

**A. 研究目的**

有機リン化合物はプラスチックの難燃剤や可塑剤として使用され、室内空気やハウス

ダストを介した曝露が主要とされている<sup>1</sup>。一方、近年、我が国においてウォーターサーバーを設置し常飲する家庭が急増しているが、海外の事例では、参照用量は下回っている者の、その水中から  $170,000 \text{ ng L}^{-1}$  を超える濃度（水道水： $0.1\text{--}100 \text{ ng L}^{-1}$ ）の有機リン化合物が検出されることが報告されている<sup>1</sup>。

飲料水は調理過程にて加熱されることがあり、また、COVID-19の影響から、紫外線照射などの化学反応を伴う浄水器も普及し始めている<sup>2</sup>。有機リン化合物は、加熱や光照射により置換基の脱離など、非意図的変化体を生成し、毒性が向上する場合もある<sup>3</sup>。本分担課題では、飲料水に含まれる有機リン化合物の汚染実態調査を行い、アセチルコリンエステラーゼ阻害能評価を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### B.1. 有機リン化合物の汚染実態調査

#### B.1.1. 使用器具・試薬

Trimethyl phosphate (TMP), triethyl phosphate (TEP), tributyl phosphate (TBP), tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP), tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), tris(butoxyethyl) phosphate (TBOEP), tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP), triphenyl phosphate (TPhP), cresyl diphenyl phosphate (CsDPhP), tricresyl phosphate (TCsP), 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPHP) は東京化成工業(東京都)から購入した。Triphenyl phosphine oxide (TPhPO), tris(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP), tripropyl phosphate (TPP) は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府)から購入した。6-Benzylbenzo[*c*][2,1] benzoxaphosphinine 6-oxide (BzIDOPO) は三光株式会社(大阪府)

より購入した。Naphthalen-2-yl diphenyl phosphate (NDPhP) はBiosynth AG (スイス)より購入した。5-Ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphorinan-5-yl methyl methylmethylphosphonate (PMMMP) と bis[(5-ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphinan-5-yl) methyl] methylphosphonate (BPMMP) はMatrix Scientific (USA) より購入した。2,2-Bis(chloromethyl)-propane-1,3-diyltetrakis(2-chloroethyl) bisphosphate (V6) はToronto Research Chemicals (カナダ) より購入した。TBP-*d*<sub>27</sub>, TCEP-*d*<sub>12</sub>, TPhP-*d*<sub>15</sub>, TCsP-*d*<sub>21</sub>, TEHP-*d*<sub>51</sub> は林純薬工業株式会社(大阪府)から購入した。

アセトニトリルはシグマアルドリッチジャパン合同会社(東京都)から購入した。アセトン、トルエン、ヘキサン、酢酸エチルは富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府)から購入した。すべての実験で、Milli-Q水(Merck Millipore社)を使用した。

#### B.1.2. サンプル情報

静岡県の商業施設や住宅に設置された5台のウォーターサーバーから水サンプル(100 mL)をガラス瓶に採取した(Table 1)。サンプリング前にはガラス瓶をアセトンとヘキサンで洗浄し、電気炉にて500°Cで5時間加熱して、自然冷却した。

#### B.1.3. 分析方法

本研究で測定対象とした有機リン化合物をTable 2に示す。また、物質の性質についてはTable 3に示す<sup>4</sup>。

水サンプル100 mLと酢酸エチル:ヘキサン(1:1, v/v) 100 mL, クリーンアップスパイク(*d*体mix4種:TPhP-*d*<sub>15</sub>, TEHP-*d*<sub>51</sub>, TCsP-*d*<sub>21</sub>, TCEP-*d*<sub>12</sub>)を分液漏斗に加え、振とう機で30分間振とうした。有機層をナスフラスコに移



し、エバポレーターでおよそ1 mLまで濃縮した。窒素パージで約80  $\mu$ Lまで濃縮した後、アセトニトリルで溶媒置換し、シリンジスパイクとしてTBP-*d*<sub>27</sub>を20  $\mu$ L加え、最終液量を100  $\mu$ Lとした。有機リン化合物の分析には、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS : TSQ Endura Thermo Fisher Scientific) を使用して測定した。イオン化法には大気圧化学イオン化 (APCI) 法およびエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用いた。

#### B.1.4. 経口曝露量の推算方法

以下の式から一日あたりの曝露量を推測した。

$$EDI = \frac{C \times DC \times AP}{BW}$$

ここで、*EDI* は推定一日摂取量 ( $\text{ng kg-bw}^{-1} \text{day}^{-1}$ )、*C* は飲料水中の有機リン化合物濃度 ( $\text{ng L}^{-1}$ )、*DC* は飲料水の一日本平均摂取量 ( $\text{mL day}^{-1}$ )、*AP* は吸収率、*BW* は体重 ( $\text{kg-bw}$ ) を表している。本研究では、一日平均摂取量として 1957  $\text{mL}^5$ 、体重として 60.5  $\text{kg}$  を用いた<sup>6</sup>。吸収率については安全側の評価を行うため 100%とした。

ハザード比を求めるための式を下記に示す。

$$HQ = \frac{EDI}{RfD}$$

ここで、*HQ* はハザード比 (-)、*RfD* は参照用量 ( $\text{ng kg-bw}^{-1} \text{day}^{-1}$ ) を表している。

## B.2. AChE活性阻害能評価

### B.2.1. *in silico*評価によるAChE阻害活性能評価法

本研究では、被検物質のAChEへの結合能をリガンドドッキング計算によりスクリーニングすることで、バイオアッセイ試験とは異なる視点より評価を行った。計算に用いた

パソコンはHP Compaq 8100 Elite SF/CTであり、オペレーティングシステムはWindows 7であった。

リガンドドッキング計算用の初期入力構造を得るため、まず量子化学計算を行った。ソフトウェアはGaussian R 09W (ver. 7.0) を使用した。入力分子構造はGauss View ver. 5.0 を使用し、分子動力学法による構造安定化を実施した後、これを初期構造として計算を行い、最適分子構造とした。この時、Becke型-3パラメーター密度汎関数法でLee-Yang-Parrの相関関数を用いるB3LYPとBase Setとして6-31G\*\*を用いた。また、一部の分子は構成原子数が多いため、あらかじめ半経験的分子軌道計算であるPM6で最適化した後、得られた構造を初期値として上述の量子化学計算を行った。計算過程において、分子内対称性は可能な限り考慮した。また、最適構造の探索にはGEDIISによるBernyのアルゴリズムを用いた。

リガンドドッキング計算ではThe Scripps Research Instituteより提供されているソフトウェアAutoDock Vinaを使用した。まず、リガンド分子の入力データを以下の手順で作成した。上述した量子化学計算により得られた最適化構造を再度Gauss View ver. 5.0で読み込み、PDB (Protein Data Bank) 型式に変換した。次に、AutoDock Tool ver. 1.5.4で読み込み、PDBQT (Protein Data Bank, Partial Charge, & Atom Type) 形式にさらに変更した。この時、重原子 (水素原子以外の原子) 間の全ての単結合を回転可能な結合として設定した。

一方、AChEの構造データは日本蛋白質構造データバンク (PDBj : Protein Data Bank Japan) より入手した。具体的には、AChEの場合ではPDBjのホームページよりシビレエイ由来のAChEを検索した。該当した数種の蛋白 (X-線結晶構造データ) の中から、回折

値が小さいものを選定した。今回は1 qtiをFASTA形式でダウンロードした。このデータをGauss View ver. 5.0で読み込み、水分子、キャップ分子、そして結晶化の際に添加された金属イオン種を同様に消去し、アミノ酸残基の配列のみから成る新たな構造データを作成した。その後、上述のAutoDock Tool ver. 1.5.4により、リガンド-分子の入力位置を確認した。

AChEではリガンド-分子と受容体を構成するアミノ酸残基の距離より、Ser-200, Glu-327, His-440がドッキング時に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、これら3種のアミノ酸残基については、ドッキング過程において単結合が自由に回転できる「フレキシブル」と設定し、この3種のアミノ酸残基全てを被覆することができる空間内をドッキング領域とし、ドッキング計算を行った。

## B.2.2. *in vitro*試験によるAChE活性阻害能評価法

### B.2.2.1. 使用器具・試薬

塩化ナトリウム, 0.1 M Phosphate Buffer Solution, Acetylthiocholine iodide (ATCI) は富士フイルム和光純薬株式会社(大阪府)から購入した。塩化マグネシウム六水和物, Albumin from bovine serum (BSA), AChE from electrophorus electric eelは、シグマアルドリッチジャパン合同会社(東京都)から購入した。Galantamine hydrobromide (Gal), 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) は東京化成工業株式会社(東京都)から購入した。

吸光度測定用の透明平底96ウェルアッセイプレート3881-096はAGCテクノグラス株式会社(IWAKI)(静岡県)から購入した。Air-O-Seal Hydrophobic Gas Permeable Seal(マイクロプレート用シール)は日本ジェネティ

クス株式会社(4titude)(東京都)から購入した。

### B.2.2.2. 測定方法

本研究では、有機リン化合物のAChE阻害活性を評価するため、Ellmanら<sup>7</sup>の方法を改良した96ウェルマイクロプレート法によるAChE阻害活性試験を行った。なお、ポジティブコントロールとしてガラントミン(Gal)を使用した。具体的には、AChE from electrophorus electric eelを0.1 M Phosphate Buffer Solutionに溶解させた。これをバイアルへ分注し、冷凍保存(-80°C)した。NaClとMgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>Oを0.1 M Phosphate Buffer Solutionに溶解させた。この発色bufferに、5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)を溶解させ、冷蔵保存(4°C)した。Albumin from bovine serum (BSA)を0.1 M Phosphate Buffer Solutionに溶解させた。次に、BSA bufferを分取し、1000 U/mL AChE溶液に溶解させた。Acetylthiocholine iodide (ATCI)は超純水に溶解させた。マイクロプレートにそれぞれの試薬を分注した後、40秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、37°Cのインキュベーターでそれぞれの反応時間0.25 hr放置した。15 mM ATCI溶液を添加した後、3 mM DTNB溶液を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌後、アルミホイルで遮光し、室温で30 min放置した。その後、マイクロプレートリーダーで波長412 nmの吸光度を測定し、試料の阻害率を求めた。試料によるAChEの阻害が50%以上みられ、用量-反応関係が有意にみられる場合をAChE阻害活性陽性とする。陽性の時、試料の50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を回帰式(シグモイド式)により求め、AChE阻害活性の指標とした。

## C. 研究結果および考察

### C.1. 有機リン化合物の汚染実態調査

### C.1.1. 飲料水中の有機リン化合物の濃度

ウォーターサーバーの水サンプル中の有機リン化合物濃度の結果と、既往研究<sup>1,8-10</sup>で示されている水サンプル中の有機リン化合物濃度のまとめを Figure 1 に示す。ウォーターサーバーの水からは測定対象とした有機リン化合物 19 種類のうち、9 種類の有機リン化合物が検出頻度 50%以上で検出された。特に濃度が高かった有機リン化合物は、TCEP (32 ng L<sup>-1</sup>:中央値)であり、次に TDCPP (7.5 ng L<sup>-1</sup>), TCPP (7.5 ng L<sup>-1</sup>) が続いた。

### C.1.2. 飲料水中の有機リン化合物の曝露評価

飲料水中の有機リン化合物の曝露量の推算結果と既往研究<sup>11-13</sup>との比較を Figure 2 に示す。EDI は、TCEP および TCPP, TDCPP でそれぞれ 1.0 および 0.2, 0.2 ng kg-bw<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> であった。これらの結果より、ウォーターサーバーからの飲料水の摂取がヒトへの TCEP 曝露の重要な曝露経路となる可能性が示唆された。

EDI から推算した本研究で対象としたすべての有機リン化合物の HQ は 10<sup>-5</sup> から 10<sup>-7</sup> の値となった。

## C.2. AChE活性阻害能評価

### C.2.1. *in silico*評価によるAChE阻害活性能評価

有機リン化合物を対象としてAChEへの相互作用をリガンド-ドッキング法で評価した。AChEと有機リン化合物の相互作用をポジティブコントロール (Gal) のそれと比較しながら評価を行った。結果のまとめをTable 4に示す。リガンド-ドッキング計算で得られた TPhPO, TPhP, CsDPhP, TCsP, NDPhP, BzIDOPO-R, BzIDOPO-SとGalの結合エネルギーを比較したとき、前者はより結合エネルギー

が大きく、安定しているという結果となった。結合エネルギーの大きい有機リン化合物の構造をみたとき、どの有機リン化合物もベンゼン環を有していることが確認できた。このことから、本研究で対象とした化学物質においては、ベンゼン環のような大きな構造をもつものはAChEにはまりやすく、結合エネルギーが大きくなる可能性が考えられた。また、NDPhP, TEP, TPP, TBP, TPhPO, TCEP, TCPP-RRR, TCPP-SRR, TCPP-SSR, TCPP-SSS, EHDPhP-R, EHDPhP-S, TBOEP, TDCPP, TEHP-RRR, TEHP-SRR, TEHP-SSR, BzIDOPO-R, BzIDOPO-SとGalを比較したとき、前者はAChEの活性中心のSer-200と距離がGalより近いことが分かった。リン酸エステル内のP原子と結合しているO原子は、電気陰性度が大きいため、P原子が正に帯電し、AChEの活性中心のSer-200との反応性が高くなり、P原子とSer-200が相互作用することでGalと比較してAChEを阻害する可能性が示唆された。コリンエステラーゼ阻害は安定性に加え、Serとの距離も考慮する必要があるためFigure 3および4の結果やPの電荷、実際の実験結果と合わせた評価が必要である。

### C.2.2. *in vitro*試験によるAChE活性阻害能評価

有機リン化合物の AChE 阻害活性試験結果のまとめを Table 4 に示し、また、結果の例を Figure 5 に示す。試験したどの有機リン化合物においても IC<sub>50</sub> 値は N.D.となり、AChE 阻害は検出されなかった。今回は反応時間を 0.25 時間として実験を行い<sup>6</sup>、有機リン化合物の AChE 阻害能の評価を試みた。しかし、これまで有機リン化合物の急性毒性の報告はないため、反応時間を長く設定した場合、AChE 阻害が検出される可能性も考えら

れるため、引き続き検討を続けていく。

#### D. 結論

飲料水中の有機リン系化合物の測定法を開発した。飲料水としてウォーターサーバーの水中の有機リン化合物濃度を測定した結果、9種類の有機リン化合物が検出頻度50%以上で検出され、TCEP, TDCPP, TCPPの濃度が高い傾向にあった。EDIは、TCEPおよびTCPP, TDCPPでそれぞれ1.0および0.2,  $0.2 \text{ ng kg-bw}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。EDIから推算したHQは $10^{-5}$ から $10^{-7}$ の値となった。

有機リン系化合物の非意図的変化体については、引き続き、より詳細な評価を進めていく。

#### E. 参考文献

1. Hou, M.; Shi, Y.; Na, G.; Zhao, Z.; Cai, Y. Increased Human Exposure to Organophosphate Esters via Ingestion of Drinking Water from Water Dispensers: Sources, Influencing Factors, and Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology Letters* **2021**. DOI: 10.1021/acs.estlett.1c00592.
2. 日本紫外線水処理技術協会, 一. ニュースレター No.13. 2021. <http://www.juva.jp/pdf/newsletterNo13.pdf>.
3. Yao, C.; Yang, H.; Li, Y. A review on organophosphate flame retardants in the environment: Occurrence, accumulation, metabolism and toxicity. *Science of The Total Environment* **2021**, 795, 148837. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148837>.
4. EPA. *EPI Suite ver.4.11*. <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/download-epi-suite-tm-estimation-program-interface-v411>.
5. Ohno, K.; Asami, M.; Matsui, Y. Is the default of 2 liters for daily per-capita water consumption appropriate? A nationwide survey reveals water intake in Japan. *Journal of Water and Health* **2018**, 16 (4), 562-573. DOI: 10.2166/wh.2018.281 (accessed 1/25/2023).
6. 厚生労働省. 令和元年国民健康・栄養調査報告.
7. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, 7 (2), 88-95. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
8. Ding, J.; Shen, X.; Liu, W.; Covaci, A.; Yang, F. Occurrence and risk assessment of organophosphate esters in drinking water from Eastern China. *Science of The Total Environment* **2015**, 538, 959-965. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.101.
9. Park, H.; Choo, G.; Kim, H.; Oh, J.-E. Evaluation of the current contamination status of PFASs and OPFRs in South Korean tap water associated with its origin. *Science of The Total Environment* **2018**, 634, 1505-1512. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.068>.
10. Zhang, S.; Li, Y.; Yang, C.; Meng, X.-Z.; Zheng, H.; Gao, Y.; Cai, M. Application of Hi-throat/Hi-volume SPE technique in analyzing occurrence, influencing factors and human health risk of

organophosphate esters (OPEs) in drinking water of China. *Journal of Environmental Management* **2021**, *291*, 112714. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112714>.

11. Lee, S.; Jeong, W.; Kannan, K.; Moon, H.-B. Occurrence and exposure assessment of organophosphate flame retardants (OPFRs) through the consumption of drinking water in Korea. *Water Research* **2016**, *103*, 182-188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.034>.
12. Zhang, X.; Zou, W.; Mu, L.; Chen, Y.; Ren, C.; Hu, X.; Zhou, Q. Rice ingestion is a major pathway for human exposure to organophosphate flame retardants (OPFRs) in China. *Journal of Hazardous Materials* **2016**, *318*, 686-693. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.055>.
13. Cequier, E.; Ionas, A. C.; Covaci, A.; Marcé, R. M.; Becher, G.; Thomsen, C. Occurrence of a Broad Range of Legacy and Emerging Flame Retardants in Indoor Environments in Norway. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48* (12), 6827-6835. DOI: 10.1021/es500516u.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G.1. 論文発表

なし

### G.2. 学会発表

- 1) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 齊, 野呂 和嗣, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの飲料水の摂取に伴う有機リン化合物のリスク評価に向けた分析法の検討, 第57回日本水環境学会年会, 愛媛. (2023年3月)
- 2) 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 齊, 篠原 直秀, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機の使用に伴うプラスチック添加剤の経皮曝露量の推定, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 3) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 齊, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 4) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 齊, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ウォーターサーバーの飲料水中に含まれる有機リン化合物の実態調査, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 5) Maho Ishida, Mana Oishi, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Dermal Exposure to Phosphorus Flame Retardants in Car Seat through Actual Clothing, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)
- 6) Yuichi Miyake, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Occurrence of Novel Phosphorus-based Flame Retardants in Indoor Dust Collected from Japanese Dwellings, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)
- 7) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王

斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の初期曝露評価, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)

- 8) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 9) 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の実態調査とその使用に伴う経皮曝露量の推定, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 10) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内製品中リン系難燃剤の連続曝露と断続曝露における経皮曝露量への影響の比較, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)
- 11) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の分析法の検討, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)
- 12) 西山 裕那, 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の定性・定量分析法の初期検討, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)

### G.3. 市民向け説明会

- 1) 車内部材由来物質の車内環境への影響とその評価方法, 2022年9月6日(火), Web, 約30名, 技術情報協会, プレゼンター及び講習会の受講者
- 2) 環境サマースクール2022 「環境浄化

と食品,化粧品の意外な関係」, 2022年8月5日(金), 静岡, 約40名, 静岡県立大学, 教員及びサマースクールの受講者(高校生)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### H.1. 特許取得

なし

#### H.2. 実用新案登録

なし

#### H.3. その他(受賞)

- 1) 2022年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 篠原 直秀, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機の使用に伴うプラスチック添加剤の経皮曝露量の推定 (2022年12月)
- 2) 2022年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価 (2022年12月)
- 3) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築 (2022年9月)
- 4) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の実態調査とその使用に伴う経皮曝露量の推定 (2022年9月)
- 5) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 内田 亜美, 石田 真穂, 徳

村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の初期曝露評価 (2022年9月)

6) 第30回 環境化学討論会 Transtech賞,

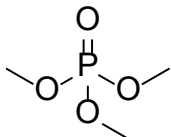
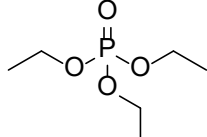
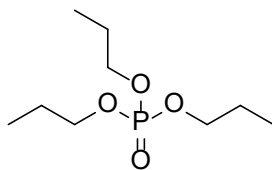
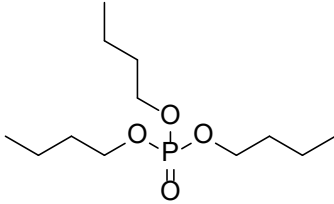
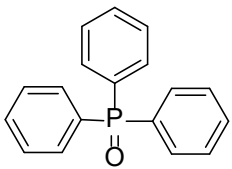
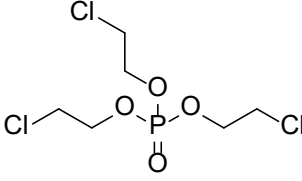
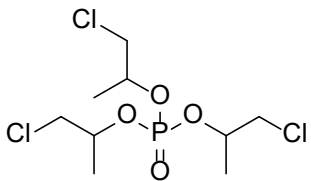
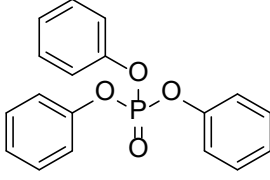
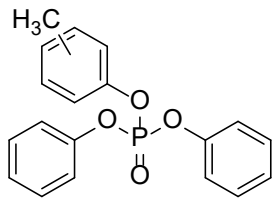
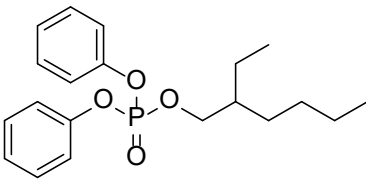
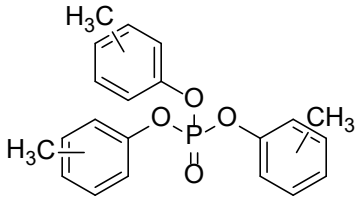
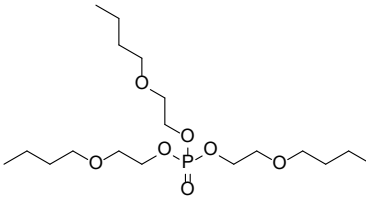
西山 裕那, 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の定性・定量分析法の初期検討 (2022年6月)

Table 1 ウォーターサーバーに関する情報

	ウォーターサーバーの材質		取水源	使用年数	製造国
	タンク	管			
Sample 1	ポリカーボネート	不明	静岡県 富士宮市	2年	韓国
Sample 2	ポリカーボネート	不明	群馬県 みかなみ町	1年以内	韓国
Sample 3	ポリエチレンテレフタレート	不明	静岡県 富士市	3年	中国
Sample 4	ポリエチレンテレフタレート	不明	山梨県 北杜市 白州町	3年	韓国
Sample 5	不明	不明	水道水	8年	韓国



Table 2 本研究にて測定対象とした有機リン化合物のリスト

	化学構造		化学構造
trimethyl phosphate TMP		triethyl phosphate TEP	
tripropyl phosphate TPP		tributyl phosphate TBP	
triphenyl phosphine oxide TPhPO		tris(2-chloroethyl) phosphate TCEP	
tris(2-chloroisopropyl) phosphate TCPP		triphenyl phosphate TPhP	
cresyl diphenyl phosphate CsDPhP		2-ethylhexyl diphenyl phosphate EHDPHP	
tricresyl phosphate TCsP		tris(butoxyethyl) phosphate TBOEP	

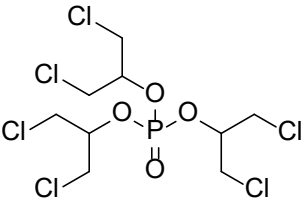
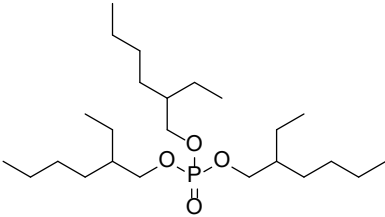
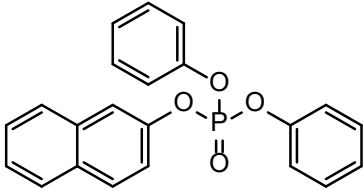
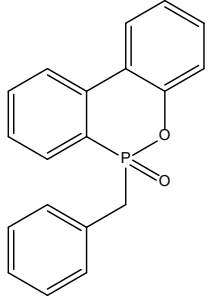
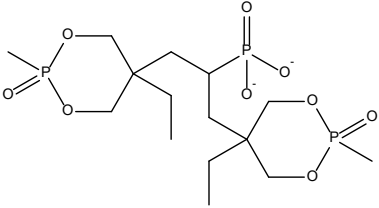
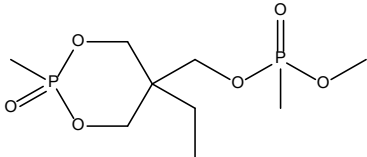
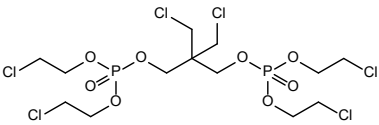
<p>tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate TDCPP</p>		<p>tris(2-ethylhexyl) phosphate TEHP</p>	
<p>naphthalen-2-yl diphenyl phosphate NDPhP</p>		<p>6-benzylbenzo[c][2,1]benzoxaphosphine 6-oxide BzIDOPO</p>	
<p>bis[(5-ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphinan-5-yl) methyl] methylphosphonate BPMMP</p>		<p>(5-ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphinan-5-yl) methyl methylphosphonate PMMMP</p>	
<p>2,2-bis(chloromethyl)-propane-1,3-diyltetrakis(2-chloroethyl) bisphosphate V6</p>			

Table 3 本研究にて測定対象とした有機リン化合物の物性値<sup>8</sup>

	CAS	化学式	分子量	融点 (°C)	沸点 (°C)	LogK <sub>ow</sub>	蒸気圧 (Pa, at 25°C)
TMP	512-56-1	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> P	140.08	-30.61 (-46)	174.19 (197.2)	-0.60 (-0.65)	55.3 (113)
TEP	78-40-0	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	182.16	3.54 (-56.4)	233.27 (215.5)	0.87 (0.80)	22 (52.4)
TPP	513-08-6	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	224.23	26.84	284.22 (252)	2.35 (1.87)	3.08
TBP	126-73-8	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> P	266.32	64.73 (-79)	327.03 (289)	3.82 (4.00)	0.466 (0.151)
TPhPO	56803-37-3	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> OP	278.29	86.97 (156.5)	405.10 (>360)	2.87 (2.83)	3.76 × 10 <sup>-5</sup> (3.47 × 10 <sup>-7</sup> )
TCEP	115-96-8	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	285.49	82.99 (-35)	351.67 (330)	1.63 (1.44)	0.0522 (8.17)
TCPP	13674-84-5	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	327.57	72.27 (-40)	365.49 (>270)	2.89 (2.59)	0.00753
TPhP	115-86-6	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	326.29	86.50 (50.5)	441.27 (245)	4.70 (4.59)	6.29 × 10 <sup>-5</sup> (8.37 × 10 <sup>-4</sup> )
CsDPhP	26444-49-5	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> P	340.32	87.63	452.87	5.25 (4.51)	1.39 × 10 <sup>-5</sup> (6.27 × 10 <sup>-4</sup> )
EHDPhP	1241-94-7	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> P	362.41	86.66 (-54)	442.95 (375)	6.30 (5.73)	0.00445 (6.67 × 10 <sup>-3</sup> )
TCsP	1330-78-5	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	368.37	89.89 (-33)	476.06 (265)	6.34 (5.11)	1.62 (8.00 × 10 <sup>-5</sup> )
TBOEP	78-51-3	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	398.48	85.78 (-70)	433.84 (221)	3.00 (3.75)	0.000165
TDCPP	13674-87-8	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>4</sub> P	430.91	88.20 (27)	458.73 (236-237)	3.65 (3.65)	- (3.82 × 10 <sup>-5</sup> )
TEHP	78-42-2	C <sub>24</sub> H <sub>51</sub> O <sub>4</sub> P	434.65	86.99 (-74)	446.31 (215)	- (9.49)	8.09 × 10 <sup>-5</sup> (1.10 × 10 <sup>-5</sup> )
NDPhP	18872-49-6	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> P	376.35	90.27	480.00	- (5.88)	2.74 × 10 <sup>-6</sup>
BzIDOPO	113504-81-7	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> P	306.30	-	-	-	-
BPMMP	42595-45-9	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> O <sub>9</sub> P <sub>3</sub>	448.33	90.27	480.00	- (0.06)	2.74 × 10 <sup>-6</sup>
PMMMP	41203-81-0	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> P <sub>2</sub>	286.20	85.46	356.94	- (-0.26)	- (0.00284)
V6	38051-10-4	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub>	583.00	90.27	480.00	3.31	- (2.74 × 10 <sup>-6</sup> )

※カッコ内の数字は実測値を示す

Table 4 *in silico*評価によるAChE阻害活性性能評価の結果のまとめ

Substance name	$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	Å
TMP	-3.975	9.2
TEP	-5.05	7.2
TPP	-6.25	6.5
TBP	-6.475	8.7
TPhPO	-10	7.3
TCEP	-5.45	6.2
TCPP-RRR	-6.525	8.4
TCPP-SRR	-6.5	8.1
TCPP-SSR	-6.425	8.1
TCPP-SSS	-6.425	7.9
TPhP	-10.075	9.3
CsDPhP	-10.45	9.3
EHDPhP-R	-9.15	8.5
EHDPhP-S	-9.275	8.8
TCsP	-10.8	9.4
TBOEP	-6.3	8.0
TDCPP	-6.375	7.8
TEHP-RRR	-7.425	7.8
TEHP-SRR	-7.425	6.9
TEHP-SSR	-7.375	7.5
TEHP-SSS	-7.375	9.7
NDPhP	-11.45	9.1
BzIDOPO-R	-11.3	7.8
BzIDOPO-S	-10.95	7.9
BPMMP-EE	-8.9	8.9

BPMMP-ZZ	-8.925	11.3
BPMMP-EZ-S	-8.65	9.7
BPMMP-EZ-R	-8.675	9.3
PMMMP-RE	-7.125	5.3
PMMMP-SE	-7	3.4
PMMMP-RZ	-7.125	5.4
PMMMP-SZ	-7.05	5.5
V6	-7.05	3.7
<hr/>		
Galantamine	-9.3	8.9
<hr/>		

Table 5 有機リン化合物およびポジティブコントロール (Galantamine) に対する AChE の IC<sub>50</sub>

Compound	AChE inhibition assay ( <i>n</i> =3)		Compound	AChE inhibition assay ( <i>n</i> =3)	
	IC <sub>50</sub> (μM)	RA <sup>a</sup>		IC <sub>50</sub> (μM)	RA <sup>a</sup>
TMP	N.D.	–	CsDPhP	N.D.	–
TEP	N.D.	–	EHDPhP	N.D.	–
TPP	N.D.	–	TCsP	N.D.	–
TBP	N.D.	–	TBOEP	N.D.	–
TPhPO	N.D.	–	TDCPP	N.D.	–
TCEP	N.D.	–	TEHP	N.D.	–
TCPP	N.D.	–	NDPhP	N.D.	–
TPhP	N.D.	–	Galantamine	1.10±0.00	1.00

<sup>a</sup> : Galantamine に対する相対的な活性

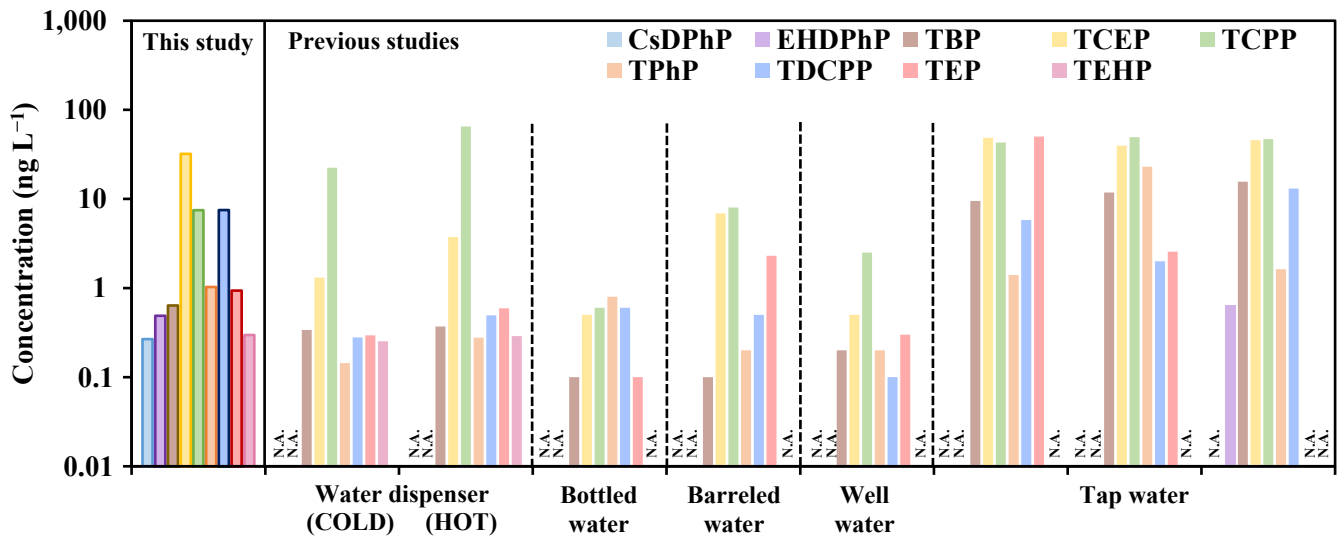


Figure 1 飲料水中の有機リン化合物の濃度 (ng L<sup>-1</sup>)<sup>1, 8-10</sup>

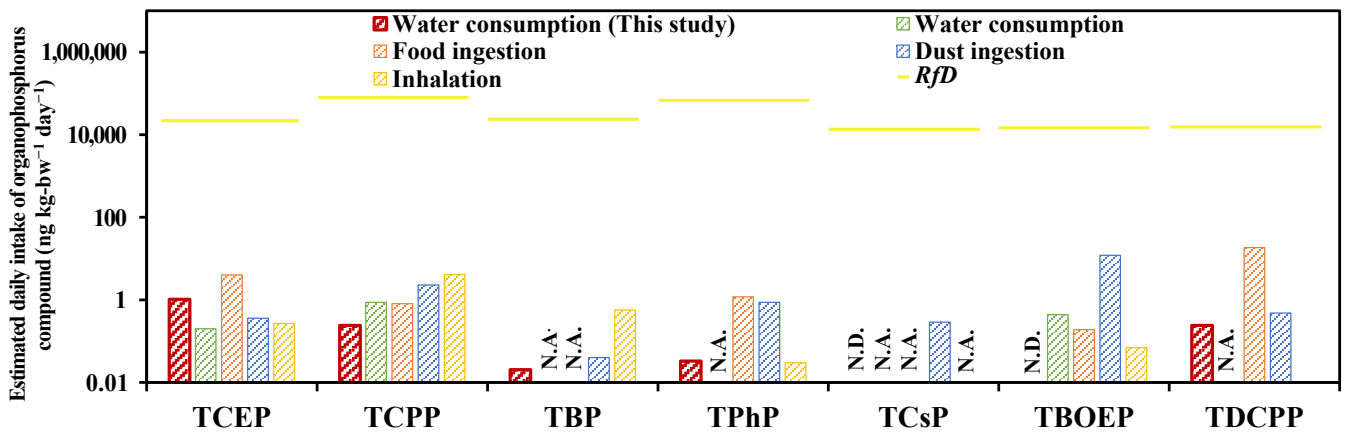


Figure 2 飲料水の摂取に伴う有機リン化合物の曝露量とその比較<sup>11-13</sup>

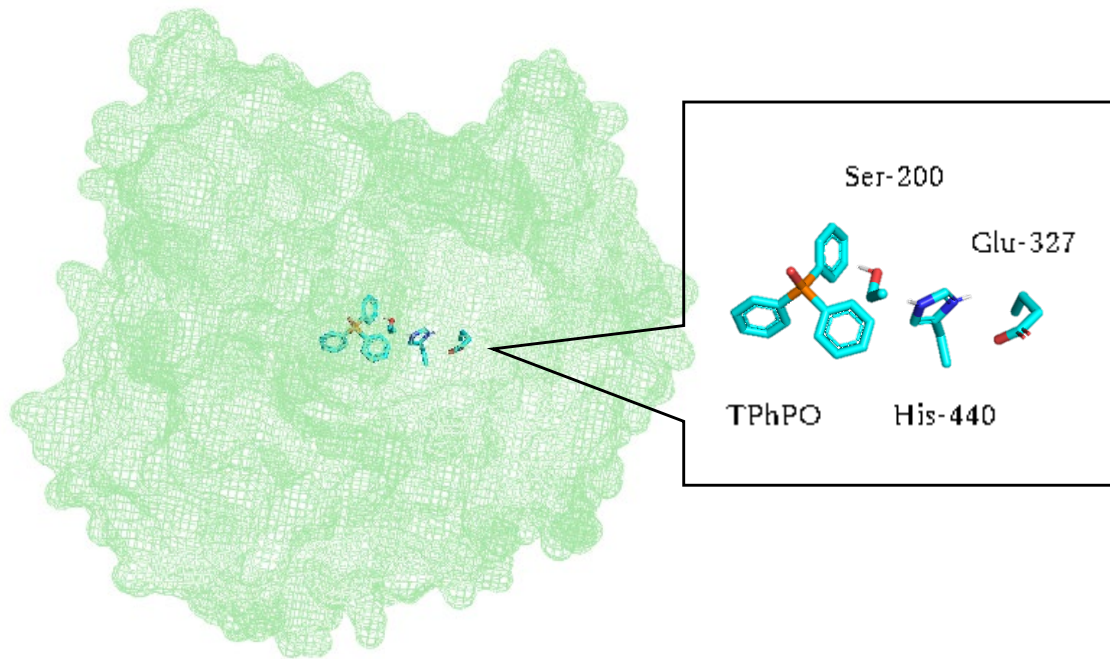


Figure 3 AChEにおけるTPhPOのリガンドドッキング計算結果

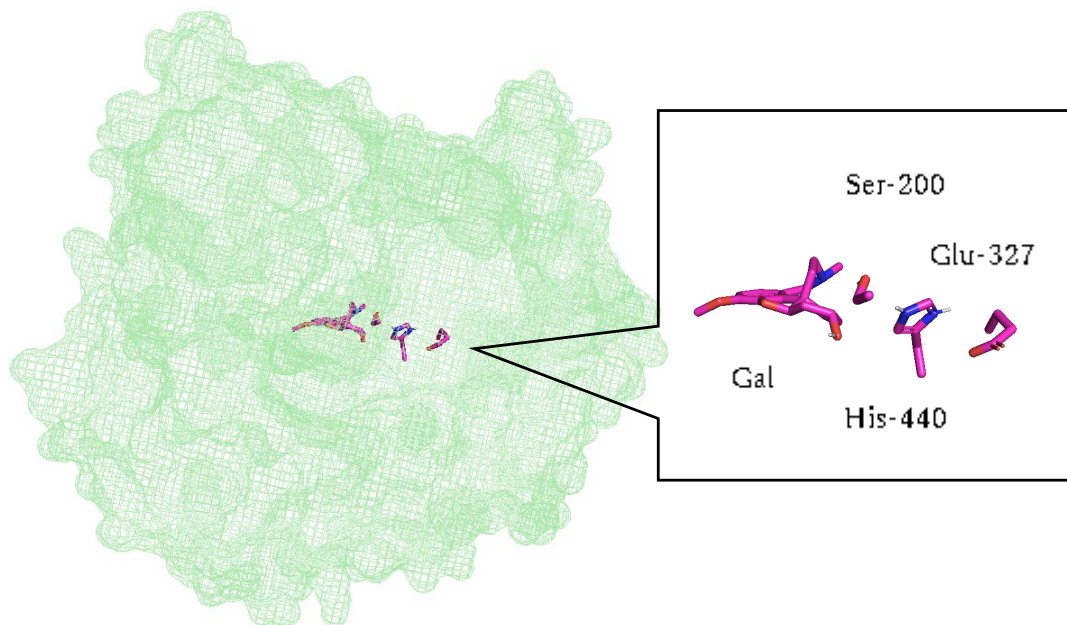


Figure 4 AChEにおけるGalのリガンドドッキング計算結果



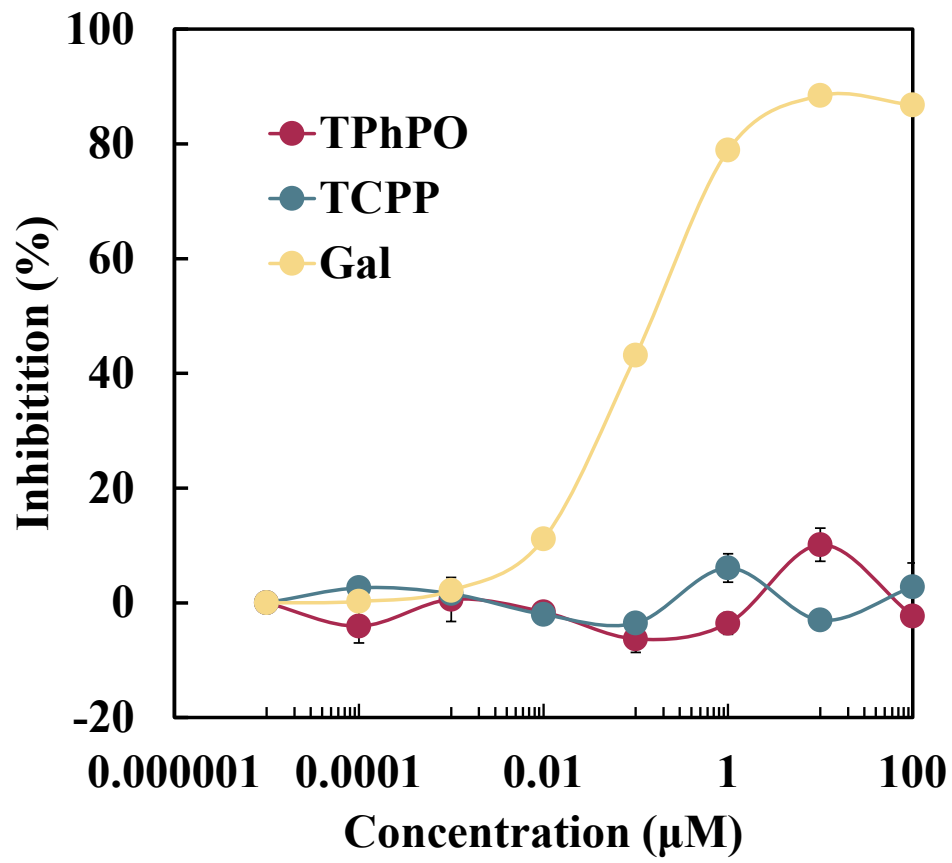


Figure 5 有機リン化合物とGalのAChE阻害能の比較

令和 4 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

飲料水中の有機リン化合物および非意図的变化体の分析法の開発

研究分担者 王 齊 静岡県立大学 特任助教

**研究要旨：**

有機リン化合物はプラスチックの難燃剤や可塑剤として使用され、室内空気やハウスダストを介した曝露が主要とされている。一方、近年、我が国においてウォーターサーバーを設置し常飲する家庭が急増しているが、海外の事例では、その水中から水道水と比較して高い濃度の有機リン化合物が検出されたことが報告されている。

飲料水は調理過程にて加熱されることがあり、また、COVID-19の影響から、紫外線照射などの化学反応を伴う浄水器も普及し始めている。有機リン化合物は、加熱や光照射により置換基の脱離など、非意図的变化体を生成し、毒性が向上する場合もある。

本研究では、飲料水に含まれる有機リン化合物の分析方法の精緻化および汚染実態調査を行う。また、非意図的变化体についても測定・毒性試験（アセチルコリンエステラーゼ阻害能評価）を行う。以上により、多様化する飲料水中の有機リン化合物に対し、優先的に取り組みを進めるべき物質や広く事業者がリスク低減に取り組めるような提案を行うことを目的とする。

本分担課題では、飲料水中濃度レベルにおける有機リン化合物の一斉分析法の開発を行い、非意図的变化体の分析法についても開発した。

**A. 研究目的**

有機リン化合物はプラスチックの難燃剤や可塑剤として使用され、室内空気やハウスダストを介した曝露が主要とされている<sup>1</sup>。一方、近年、我が国においてウォーターサーバーを設置し常飲する家庭が急増しているが、海外の事例では、参照用量は下回るものの、その水中から $170,000 \text{ ng L}^{-1}$ を超える濃度（水道水： $0.1\text{--}100 \text{ ng L}^{-1}$ ）の有機リン化合物

が検出されることが報告されている<sup>1</sup>。

飲料水は調理過程にて加熱されることがあり、また、COVID-19の影響から、紫外線照射などの化学反応を伴う浄水器も普及し始めている<sup>2</sup>。有機リン化合物は、加熱や光照射により置換基の脱離など、非意図的变化体を生成し、毒性が向上する場合もある<sup>3</sup>。

本分担課題では、飲料水に含まれる有機リン化合物および非意図的变化体の分析方法

の開発を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### B.1. 有機リン化合物の分析法の開発

#### B.1.1. 使用器具・試薬

Trimethyl phosphate (TMP), triethyl phosphate (TEP), tributyl phosphate (TBP), tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP), tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), tris(butoxyethyl) phosphate (TBOEP), tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP), triphenyl phosphate (TPhP), cresyl diphenyl phosphate (CsDPhP), tricresyl phosphate (TCsP), 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPHP) は東京化成工業(東京都)から購入した。Triphenyl phosphine oxide (TPhPO), tris(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP), tripropyl phosphate (TPP) は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府)から購入した。6-Benzylbenzo[c][2,1]benzoxaphosphinine 6-oxide (BzIDOPO) は三光株式会社(大阪府)より購入した。Naphthalen-2-yl diphenyl phosphate (NDPhP) はBiosynth AG(スイス)より購入した。5-Ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphorinan-5-yl) methyl methyl methylphosphonate (PMMMP) と bis[(5-ethyl-2-methyl-2-oxido-1,3,2-dioxaphosphinan-5-yl) methyl] methylphosphonate (BPMMP) はMatrix Scientific (USA) より購入した。2,2-Bis(chloromethyl)-propane-1,3-diyltetrakis(2-chloroethyl) bisphosphate (V6) は Toronto Research Chemicals (カナダ) より購入した。TBP-*d*<sub>27</sub>, TCEP-*d*<sub>12</sub>, TPhP-*d*<sub>15</sub>, TCsP-*d*<sub>21</sub>, TEHP-*d*<sub>51</sub> は林純薬工業株式会社(大阪府)から購入した。

アセトニトリルはシグマアルドリッチジャパン合同会社(東京都)から購入した。アセトン, トルエン, ヘキサン, 酢酸エチルは

富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府)から購入した。すべての実験で, Milli-Q水(Merck Millipore社)を使用した。

#### B.1.2. 分析方法

水サンプル100 mLと酢酸エチル:ヘキサン(1:1, v/v) 100 mL, クリーンアップスパイク(*d*体mix4種: TPhP-*d*<sub>15</sub>, TEHP-*d*<sub>51</sub>, TCsP-*d*<sub>21</sub>, TCEP-*d*<sub>12</sub>)を分液漏斗に加え, 振とう機で30分間振とうした。有機層をナスフラスコに移し, エバポレーターでおよそ1 mLまで濃縮した。窒素パージで約80 μLまで濃縮した後, アセトニトリルで溶媒置換し, シリンジスパイクとしてTBP-*d*<sub>27</sub>を20 μL加え, 最終液量を100 μLとした。有機リン化合物の分析には, 液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS: TSQ Endura Thermo Fisher Scientific)を使用して測定した。イオン化法には大気圧化学イオン化(APCI)法およびエレクトロスプレーイオン化(ESI)を用いた。LC-MS/MSの分析条件と分析対象物質ごとのトランジションのパラメーターをTable 1とTable 2に示す。

### B.2. 非意図的変化体の分析法の開発

*in vitro*試験および*in silico*評価により優先順位の高かったリン系化合物の非意図的変化体について, 分析法の開発を行った。研究方法については, 「有機リン化合物の汚染実態調査」における「有機リン化合物の一斉分析法の開発」と同様である。

## C. 研究結果および考察

### C.1. 有機リン化合物の分析法の開発

#### C.1.1. 有機リン化合物の一斉分析法の妥当性の検証

本研究で用いる分析法が, 本研究の目的を達成するために必要な精度を有しているか

確認するため、農林水産省の「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」<sup>4</sup>を基に分析法の妥当性の検証を行った。

19種類の有機リン化合物の混合標準溶液 (1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 ng mL<sup>-1</sup>) を用いて検量線を作成した (Figure 1)。これらの濃度範囲内にてLC-MS/MSのレスポンスと濃度が比例関係にあることを確認した (決定係数 ( $R^2$ ) >0.99)。

本研究で対象とした有機リン系化合物物質の混合標準溶液を分析し、得られたエリアから、 $S/N$  (signal-to-noise) 比 = 10となる濃度を定量下限値 (LOQ) とした。有機リン化合物のLOQをTable 3に示す。

ヘキサン洗浄したMilli-Q水を用いて有機リン化合物の添加回収試験を行った。各有機リン化合物の添加濃度は5 ppbである。実験結果をTable 4に示す。既往研究にて飲料水中から検出される主要な有機リン化合物 (例えばCsDPhPやEHDPPhP, TCEP, TPhPなど) の回収率は「分析法の妥当性確認に関するガイドライン」<sup>4</sup>で許容される範囲内 (40%–120%) であった。ただし、TDCPPについては、135%であったため、今後、検討を進める。

有機リン化合物の汚染実態調査に用いた水サンプルに添加したクリーンアップスパイクの回収率は、全てのサンプルで良好であった (Table 5)。

## C.2. 非意図的変化体の分析法の開発

*in vitro*評価および*in silico*評価により得られた優先順位の高い変化体のなかから、有機リン化合物の汚染実態調査の結果も考慮して、TCEP, TDCPP, TEHPの非意図的変化体 (BCEP, BDCPP, BEHP) に対して、標準試薬を入手し、LC-MS/MS (イオン化法: ESI) を用いて分析方法の開発を行った。測定条件をTable 6に示す。また、今回の測定で得られ

たクロマトグラムをFigure 2に示す。それぞれの非意図的変化体で良好なピーク形状が得られた。

## D. 結論

飲料水中の有機リン系化合物の測定法を19種類の有機リン化合物を対象に開発した。開発した分析法は、飲料水中の有機リン化合物を測定するのに十分な感度を有することが示唆された。また、主要と考えられる有機リン系化合物の非意図的変化体についても分析法を開発した。

## E. 参考文献

1. Hou, M.; Shi, Y.; Na, G.; Zhao, Z.; Cai, Y. Increased Human Exposure to Organophosphate Esters via Ingestion of Drinking Water from Water Dispensers: Sources, Influencing Factors, and Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology Letters* **2021**. DOI: 10.1021/acs.estlett.1c00592.
2. 日本紫外線水処理技術協会, 一. ニュースレター No.13. 2021. <http://www.juva.jp/pdf/newsletterNo13.pdf>.
3. Yao, C.; Yang, H.; Li, Y. A review on organophosphate flame retardants in the environment: Occurrence, accumulation, metabolism and toxicity. *Science of The Total Environment* **2021**, 795, 148837. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148837>.
4. 農林水産省. 分析法の妥当性確認に関するガイドライン. 2019. [https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/pdf/guide\\_validation.pdf](https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/pdf/guide_validation.pdf)

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G.1. 論文発表

なし

### G.2. 学会発表

- 1) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 野呂 和嗣, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの飲料水の摂取に伴う有機リン化合物のリスク評価に向けた分析法の検討, 第57回日本水環境学会年会, 愛媛. (2023年3月)
- 2) 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 篠原 直秀, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機の使用に伴うプラスチック添加剤の経皮曝露量の推定, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 3) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 4) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ウォーターサーバーの飲料水中に含まれる有機リン化合物の実態調査, 2022年室内環境学会学術大会, 東京. (2022年12月)
- 5) Maho Ishida, Mana Oishi, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Dermal Exposure to Phosphorus Flame Retardants in Car Seat through Actual Clothing, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)
- 6) Yuichi Miyake, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Takashi Amagai, Occurrence of Novel Phosphorus-based Flame Retardants in Indoor Dust Collected from Japanese Dwellings, International Society of Exposure Science (ISES) 2022, Lisbon, Portugal. (September 2022)
- 7) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の初期曝露評価, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 8) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 9) 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の実態調査とその使用に伴う経皮曝露量の推定, 環境科学会2022年会, Web. (2022年9月)
- 10) 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内製品中リン系難燃剤の連続曝露と断続曝露における経皮曝露量への影響の比較, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)
- 11) 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の分析法の検討, 第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)
- 12) 西山 裕那, 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の定性・定量分析法の初期検討,

第30回環境化学討論会, 富山. (2022年6月)

### G.3. 市民向け説明会

- 1) 車内部材由来物質の車内環境への影響とその評価方法, 2022年9月6日(火), Web, 約30名, 技術情報協会, プレゼンター及び講習会の受講者
- 2) 環境サマースクール2022 「環境浄化と食品,化粧品の意外な関係」, 2022年8月5日(金), 静岡, 約40名, 静岡県立大学, 教員及びサマースクールの受講者(高校生)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H.1. 特許取得

なし

### H.2. 実用新案登録

なし

### H.3. その他(受賞)

- 1) 2022年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 篠原 直秀, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機の使用に伴うプラスチック添加剤の経皮曝露量の推定 (2022年12月)
- 2) 2022年室内環境学会学術大会 大会長奨励賞, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 高橋 亮平, 宮崎 高則, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内プラスチック製品中難燃剤の経皮曝露評価 (2022年12月)
- 3) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品との非接触時における皮膚中残留化学物質の経皮曝露を考慮するためのモデル構築 (2022年9月)
- 4) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 西山 裕那, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の実態調査とその使用に伴う経皮曝露量の推定 (2022年9月)
- 5) 環境科学会 2022年会 優秀発表賞(富士電機賞), 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, ウォーターサーバーの水中に含まれる有機リン化合物の初期曝露評価 (2022年9月)
- 6) 第30回 環境化学討論会 Transtech賞, 西山 裕那, 内田 亜美, 石田 真穂, 徳村 雅弘, 王 斉, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 家庭用ゲーム機に含まれるリン系難燃剤の定性・定量分析法の初期検討 (2022年6月)

Table 1 LC-MS/MS 分析条件

HPLC		
Instrument	Ultimate 3000 LC Systems (Thermo Scientific)	
Column	Accucore Vanquish C18 (100 mm × φ2.1 mm, 1.5 μm)	
Mobile	Solvent A: water Solvent B: 20% acetonitrile/methanol	
Flow rate	0.3 mL min <sup>-1</sup>	
Column oven temperature	50°C	
Injection volume	2 μL	
Gradient	0~0.5 min	A:95%, B:5%
	~7.0 min	B:100%
	~15 min	B:100%
	~15.1 min	A:95%, B:5%
	~17 min	A:95%, B:5%
MS/MS		
Instrument	TSQ Endura (Thermo Scientific)	
Ionization mode	APCI & ESI	
Polarity	APCI (+) for PFRs	ESI (-) for Bis-PFRs
Positive ion discharge current	4 μA	4 μA
Negative ion discharge current	4 μA	4 μA
Seath gas (Arbitrary unit)	25	25
Aux gas (Arbitrary unit)	5	5
Sweep gas (Arbitrary unit)	0	0
Ion transfer tube temp	250°C	250°C
Vaporizer temp	300°C	300°C

Table 2 有機リン系化合物のLC-MS/MSの分析条件 (イオン化法: APCI)

Compound	Start Time (min)	End Time (min)	Polarity	Precursor ( $m/z$ )	Product ( $m/z$ )	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
TMP	1	4	Positive	141.025	79.217	23	69
	1	4	Positive	141.025	109.086	18	69
TEP	3	7	Positive	183.102	81.129	39	73
	3	7	Positive	183.102	99.114	20	73
TPP	5	8	Positive	225.12	81.191	46	74
	5	8	Positive	225.12	99.116	20	74
TBP	6	9	Positive	267.175	81.155	53	76
	6	9	Positive	267.175	99.088	19	76
TPhPO	5	8	Positive	279.11	77.214	48	148
	5	8	Positive	279.11	201.036	28	148
TCEP	4.5	7	Positive	286.953	81.123	57	97
	4.5	7	Positive	286.953	99.089	26	97
	4.5	7	Positive	286.953	125.06	19	97
TCPP	5	8	Positive	327.002	81.142	59	97
	5	8	Positive	327.002	81.142	59	97
	5	8	Positive	327.002	99.119	25	97
TPhP	6	9	Positive	327.14	215.205	28	166
	6	9	Positive	327.14	250.98	28	166
CsDPhP	6	9	Positive	341.076	152.084	39	114
	6	9	Positive	341.076	229.033	29	114
EHDPhP	7	10	Positive	363.15	77.226	45	88
	7	10	Positive	363.15	251.019	12	88
TCsP	6.5	9.5	Positive	369.12	165.074	44	142
	6.5	9.5	Positive	369.12	243.028	30	142
TBOEP	6	9	Positive	399.225	57.304	25	141
	6	9	Positive	399.225	99.094	30	141
	6	9	Positive	399.225	143.052	21	141
TDCPP	6	8.5	Positive	430.875	75.113	46	109
	6	8.5	Positive	430.875	77.237	44	109



	6	8.5	Positive	430.875	81.153	51	109
	6	8.5	Positive	430.875	99.101	28	109
TEHP	8.5	11.5	Positive	435.327	71.186	22	116
	8.5	11.5	Positive	435.327	81.145	58	116
	8.5	11.5	Positive	435.327	99.107	19	116
NDPhP	6	9	Positive	377.211	127.058	42	140
	6	9	Positive	377.211	202	34	140
	6	9	Positive	377.211	203.032	25	140
BzIDOPO	5	8	Positive	306.971	91.169	31	126
	5	8	Positive	306.971	198.946	25	126
	5	8	Positive	306.971	214.946	24	126
BPMMP	3	6	Positive	449.151	97.097	44	157
	3	6	Positive	449.151	177.058	25	157
	3	6	Positive	449.151	273	20	157
PMMMP	2.5	5.5	Positive	287.031	97.111	26	116
	2.5	5.5	Positive	287.031	135	23	116
	2.5	5.5	Positive	287.031	177	16	116
V6	5.5	8.5	Positive	583.774	359.817	17	164
	5.5	8.5	Positive	583.774	361.817	18	164
TEHP- <i>d</i> <sub>51</sub>	8.5	11.5	Positive	486.654	102.146	22	108
	8.5	11.5	Positive	486.654	103.134	18	108
	8.5	11.5	Positive	486.654	82.28	24	144
TCsP- <i>d</i> <sub>21</sub>	6.5	9.5	Positive	390.225	173.1	45	138
	6.5	9.5	Positive	390.225	175.137	36	138
	6.5	9.5	Positive	390.225	254.199	35	138
	6.5	9.5	Positive	390.225	255.114	33	138
TPhP- <i>d</i> <sub>15</sub>	6	9	Positive	342.151	82.25	43	109
	6	9	Positive	342.151	159.108	44	109
	6	9	Positive	342.151	160.138	44	109
TBP- <i>d</i> <sub>27</sub>	6	9	Positive	294.325	82.151	59	94
	6	9	Positive	294.325	83.173	59	94

	6	9	Positive	294.325	102.099	22	94
TCEP- <i>d</i> <sub>12</sub>	4.5	7	Positive	299.001	67.275	27	108
	4.5	7	Positive	299.001	69.621	27	108
	4.5	7	Positive	299.001	102.103	28	108
TCP- <i>d</i> <sub>18</sub>	5	8	Positive	345.151	102.04	23.298	153
	5	8	Positive	345.151	183	13.236	153

Table 3 有機リン化合物の定量下限値

PFRs	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )
TMP	0.53
TEP	0.071
TPP	0.044
TBP	0.069
TPhPO	0.051
TCEP	0.22
TCPP	0.16
TPhP	0.13
CsDPhP	0.11
EHDPhP	0.034
TCsP	0.032
TBOEP	0.49
TDCPP	0.59
TEHP	0.047
NDPhP	0.23
BzIDOPO	0.046
BPMMP	10
PMMMP	0.34
V6	1.3

Table 4 添加回収試験における回収率と相対標準偏差 (RSD)

	回収率 (%)	RSD (%)
BPMMP	ND	-
BzIDOPO	101	7.2
CsDPhP	107	11
EHDPhP	104	3.8
NDPhP	113	6.9
PMMMP	ND	-
TBOEP	ND	-
TBP	89	2.2
TCEP	117	2.7
TCPP	117	10
TCsP	106	4.5
TDCPP	135	15
TEHP	110	3.1
TEP	39	5.3
TMP	4	7.7
TPhP	120	7.6
TPhPO	107	2.9
TPP	67	0.68
V6	96	25

ND = not detected

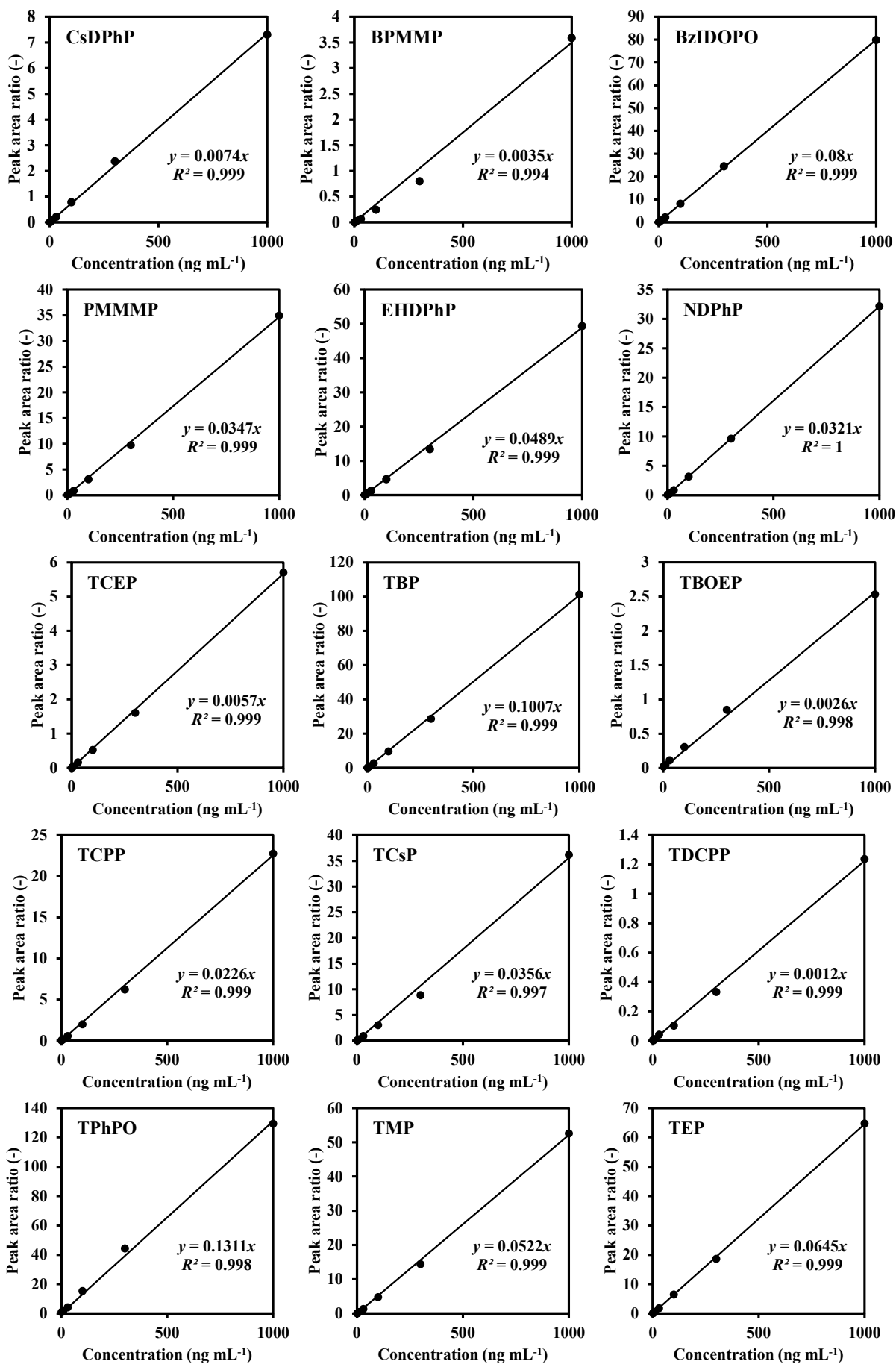
- = no data

Table 5 クリーンアップスパイクの回収率

	回収率 (%)	RSD (%)
TCEP- <i>d</i> <sub>12</sub>	73	11
TCsP- <i>d</i> <sub>21</sub>	86	9.5
TEHP- <i>d</i> <sub>51</sub>	86	11
TPhP- <i>d</i> <sub>15</sub>	86	15

Table 6 有機リン化合物の非意図的変化体のLC-MS/MSの分析条件 (イオン化法: ESI)

Compound	Start Time (min)	End Time (min)	Polarity	Precursor ( <i>m/z</i> )	Product ( <i>m/z</i> )	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
BCEP	1	5	Negative	221.891	37	10.253	75
	1	5	Negative	223.941	39	10.253	77
BDCPP	5	10	Negative	317.501	281.667	10.253	108
	5	10	Negative	317.501	283.595	10.253	107
BEHP	10	15	Negative	321.801	80.556	32.803	263
	10	15	Negative	321.801	210.071	20.82	263



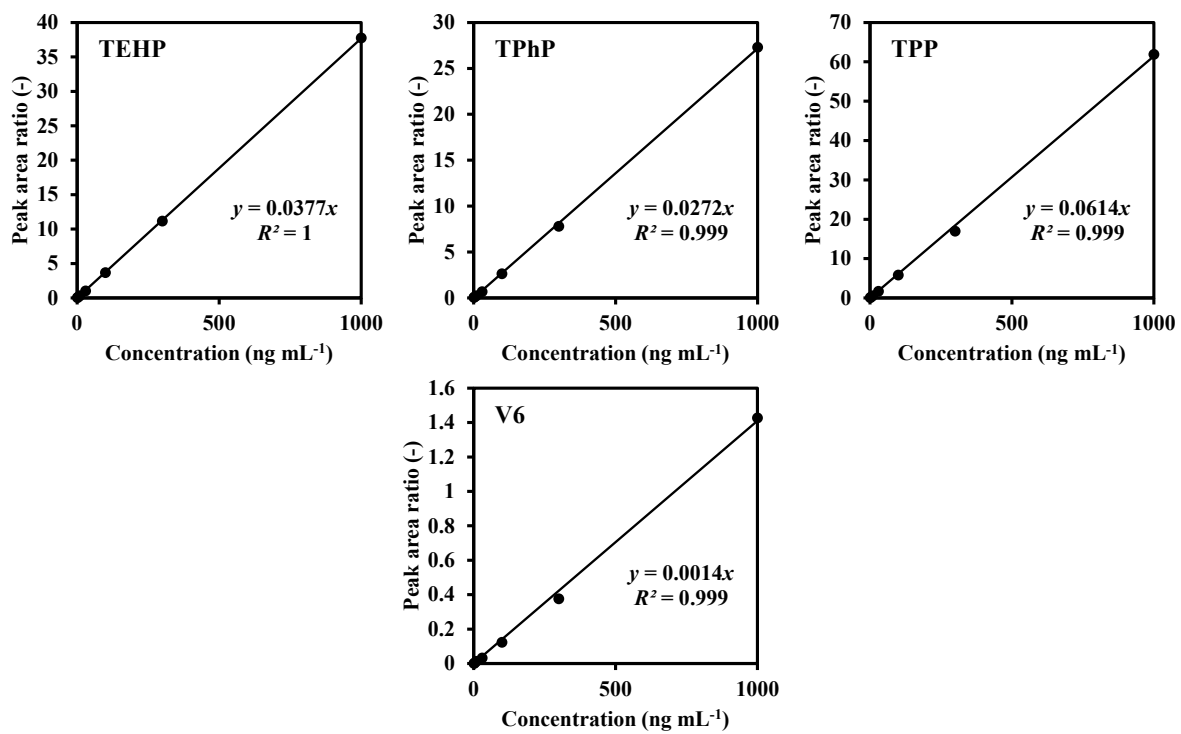


Figure 1 有機リン化合物の検量線



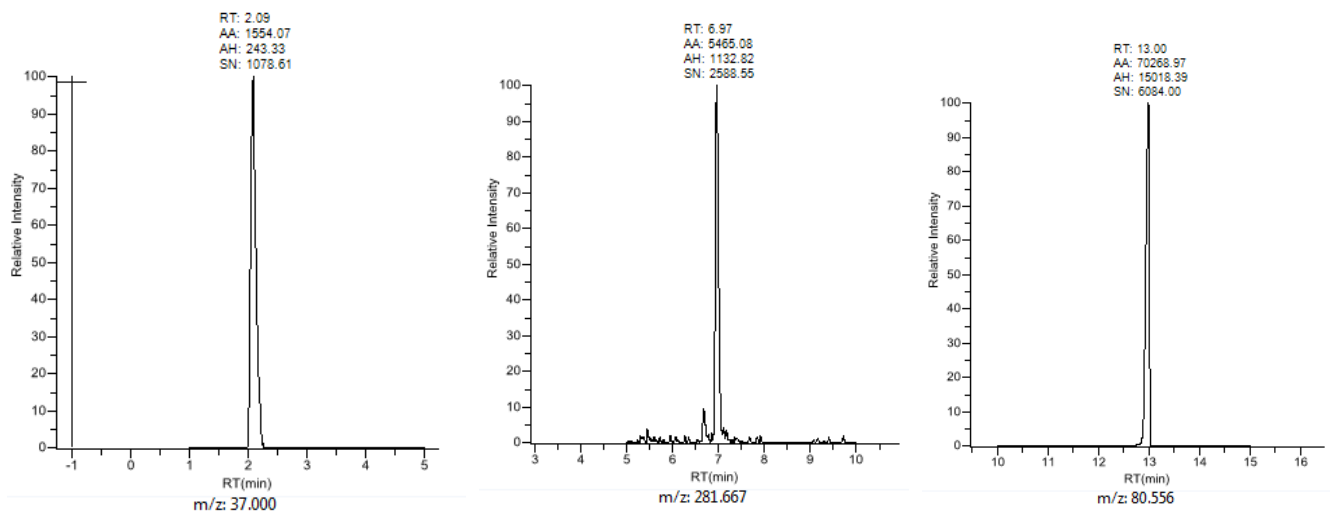


Figure 2 有機リン系化合物の非意図的変化体のクロマトグラム  
(左 : BCP,中央 : BDCPP,右 : BEHP)

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

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
	該当なし				

令和5年4月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 尾池 和夫

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 飲料水中の有機リン化合物の健康影響評価に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品栄養科学部・助教  
(氏名・フリガナ) 徳村 雅弘 (トクムラ マサヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称： )	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

