

令和7年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

曝露情報を考慮した化学物質のリスク評価法に関する研究（25KD2001）

研究分担者 田中 庸一
国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長

研究要旨

化学物質のリスク評価では、動物試験等により得られた最小毒性量等を基に、種差や個体差などを考慮した不確実係数を適用することで、有害性評価値が算定される。適切な有害性評価値を得るためには、不確実係数を科学的データに基づいて精緻化することが重要である。不確実係数の精緻化に必要な情報としては、当該化学物質摂取時における各臓器の曝露濃度、血中濃度、代謝・排泄などの体内動態に関するデータが挙げられる。多くの化学物質について有害性評価は実施されているものの、化学物質の代謝物の体内動態と毒性影響との関連性を評価した報告は限られている。本研究では、これまでにハザード評価が実施されている化学物質の中から、体内曝露評価の検討が重要と考えられる物質について、化学物質及びその代謝物の体内動態を評価し、毒性影響との関連性について評価することを目的に検討を開始した。

本年度は、対象物質として選定されたアクリルアミド (acrylamide) 及びアセタミプリド (acetamiprid) について、化学物質及びその代謝物を定量する方法を検討することとした。アクリルアミド及び主要代謝物であるグリシダミド (glycidamide) について、生体試料中の濃度を定量するために LC-MS/MS で定量法を構築した。さらに、次年度以降に対象物質として予定されているアセタミプリド及びその主要代謝物 N-デスメチルアセタミプリド (N-desmethyl acetamiprid) について、LC-MS/MS で定量法を構築した。

今後は、構築した化学物質定量法を用いて in vivo 及び in vitro 実験において得られたサンプルを対象に化学物質及びその代謝物の定量を実施し、体内曝露量及びそのパラメータ取得を目指す。

A. 研究目的

化学物質のリスク評価では、動物試験等により得られた最小毒性量 (NOAEL、BMDL 等) を基に、種差や個体差を考慮した不確実係数を適用することで、有害性評価値が算定されてきた。一方、近年は 3Rs 原則の遵守や ヒト予測性の向上の観点から、ヒト細胞試験や in silico 評価手法を含む New Approach Methodologies (NAMs) の活用に関する国際的議論が進展している。これらの新たな評価手法をリスク評価に実装するためには、動物試験とヒトにおける予測性の差異、すなわち in vitro と in vivo を橋渡しする外挿 (IVIVE: In Vitro-In Vivo Extrapolation) に関する課題への対応が不可欠である。

しかしながら、IVIVE の具体的手法や、毒性発現機序に基づいた適切な評価エンドポイントの設定については、いまだ十分に確立されていない。動物試験に依存した従来の評価体系から、ヒト予測性の高い in vitro・in silico 手法へと移行するためには、in vivo 体内動態情報を含めた科学的根拠に基づく外挿手法の構築が求められている。

本研究では、農薬や食品などに含まれる化学物質およびその代謝物について、臓器ごとの体内曝露情報を収集・整理し、既存のハザード評価結果や文献情報と統合することにより、毒性に関与する代謝物や想定される作用メカニズムを含めた包括的解析を行う。これにより、不確実係数の精緻化を通じた有害性評価値の適切な算定など、化学物質管理に資するリスク評価手法

の確立を目指す。

不確実係数の精緻化に関しては、WHO により 化学物質特異的調整係数 (Chemical-Specific Adjustment Factor; CSAF) の概念が提唱され、体内動態データの活用が国際的に進められている。しかし、十分な動態データが得られている化学物質は限られており、とくに血中濃度以外の 脳など臓器特異的な曝露データは極めて乏しい。複数の化学物質カテゴリーを対象とした体内曝露のケーススタディを蓄積することで、化学物質管理法 (化審法、毒劇法、家庭用品規制法等) における優先評価化学物質や新規規制候補物質、基準値見直し対象物質の評価に必要な曝露関連データおよびその収集手法に関する知見が得られ、規制への直接的な活用が期待される。

そこで本年度は、対象物質としてアクリルアミド (Acrylamide) を選定した。アクリルアミドは食品の加熱調理過程等により生成され、ヒトにおける慢性的曝露が懸念されている化学物質である。また、体内で反応性の高い代謝物である グリシダミド (Glycidamide) に代謝されることが知られており、神経毒性の定量的評価が重要な課題とされている。また、アセタミプリド (Acetamiprid) はネオニコチノイド系殺虫剤であり、農作物の管理において使用されており、長期曝露による神経系への影響が懸念される化学物質である。そのため、令和8年度以降にその評価が計画されている。

本研究では、上記化学物質の in vitro 及び in vivo 評価において化学物質曝露量を評価するために必要と

なる濃度定量法をLC-MS/MSで構築することを目的とする。

B. 研究方法

1. アクリルアミド及びグリシダミドの定量

標準物質であるアクリルアミドは富士フイルム和光純薬より購入した。グリシダミドはメルクより購入した。内標準物質として Acrylamide-13C3 を Tronto Research Chemicals より購入した。分析に用いたアセトニトリル、メタノール、蒸留水はLC/MSグレード、ギ酸はLCグレードを関東科学より購入した。分析カラム (InertSustain AQ-C18, 1.9 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm) はGLサイエンスより購入した。LC/MSは、サーモフィッシャー社 Ultimate3000 及び TSQ Vantage を用いた。LC/MSの分析条件を決定するに当たり、移動相のグラジエントプログラム及びMS条件 (polarity, resolution等) の検討を行った。分析法の評価に用いたLC/MS条件を表1, 2に示す。標準品の検出強度と濃度の直線性は100 - 7500 μ g/mLの範囲で評価した。各サンプルのアクリルアミド及びグリシダミドのピーク面積をAcrylamide-13C3のピーク面積で除した値から Peak Ratioを算出し、アクリルアミド及びグリシダミドの検量線を作成 (アクリルアミド10 - 3,000 ng/mL, グリシダミド200 - 3,000 ng/mL) した。アクリルアミド及びグリシダミドの各3濃度の既知濃度サンプルをtriplicateで定量し、精度と真度を確認した。

2. アセタミプリド及びN-デスメチルアセタミプリドの定量

標準物質であるアセタミプリド及びN-デスメチルアセタミプリドはメルクより購入した。分析に用いたアセトニトリル、メタノール、蒸留水はLC/MSグレード、ギ酸はLCグレードを関東科学より購入した。分析カラム (InertSustain AQ-C18, 1.9 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm) はGLサイエンスより購入した。LC/MSは、サーモフィッシャー社 Ultimate3000 及び TSQ Vantage を用いた。LC/MSの分析条件を決定するに当たり、移動相のグラジエントプログラム及びMS条件 (polarity, resolution等) の検討を行った。分析法の評価に用いたLC/MS条件を表4, 5に示す。標準品の検出強度と濃度の直線性はアセタミプリド50 - 10,000 pg/mL、N-デスメチルアセタミプリド500 - 10,000 pg/mLの範囲で評価した。

C. 結果・考察

1. アクリルアミド及びグリシダミドの定量

「評価書 加熱時に生じるアクリルアミド」(食品安全委員会2016年)に記載されている30 mg/kg体重をラットに投与した試験における生体試料中濃度(16.45~383.7 μ g/g)を参考に、体内動態試験を実施した際の濃度評価が実施可能な範囲を設定してLC/MSによる分析系の構築を行った。既報告 (Twaddle NC et al. Cancer Letters. 2004, 207: 9 - 17. Harahap Y et al. International Journal of Analytical Chemistry. 2020, 2020:2015264)を参考に初期値を設定し、使用した質量分析計における条件の最適化を行った。LC条件は、適切なピーク形状が得られるようにアセトニトリ

ル濃度のグラジエント条件の最適化を行った。当初の検討では、アクリルアミドとグリシダミドを同時に定量できる分析系を検討していたが、in vitro試験で使用するHank's平衡塩溶液をインジェクトした際に現れるピークがアクリルアミドの検出時間にピークが重なることが確認された。そのため、アクリルアミドとグリシダミドをそれぞれ単独で定量する分析系を構築することとした。各標準品を定量する分析条件を表1及び表2に示した。また、アクリルアミド及びグリシダミドの標準品を2,000 ng/mLのサンプルを分析した際のクロマトグラムを図1A, Bに示した。またブランクサンプルはピークが検出されないことを確認した (図1C, D)。

最適化した条件 (表1, 2) で各標準物質を複数濃度で作成し、直線性を評価した。アクリルアミドでは10 - 3000 ng/mLの範囲で直線性が認められた (図2A)。グリシダミドでは200 - 3,000 ng/mLの範囲で直線性が認められた (図2B)。また、各標準物質の3,000 ng/mLをインジェクトした直後のブランク測定を行い、キャリアオーバーは認められなかった。さらに、既知濃度3濃度をtriplicateで定量して測定内の真度及び精度を評価した。アクリルアミドを15 ng/mL, 1,500 ng/mL, 3,000 ng/mLに調製して各3回測定した。精度は2.0 - 8.7 %CV, 真度は81.0 - 104.1%であった (表3)。グリシダミドを500 ng/mL, 1,500 ng/mL, 3,000 ng/mLに調製して各3回測定した。精度は12.0 - 14.3 %CV, 真度は86.5 - 100.2%であった (表3)。十分な分析性能であることが確認できた。

アクリルアミドは食品等と共に摂取され、消化管で直ちに吸収されて、様々な臓器や神経、筋肉へ分布するとされている。代謝は肝臓のミクロソームでCYP2E1によりグリシダミドに代謝され、グリシダミドはエポキシドハイドロラーゼによってグリセラミドへ代謝され無毒化される。また、アクリルアミドやグリシダミドはグルタチオンS-トランスフェラーゼによってグルタチオン (GSH) と結合し、GSH 抱合体を生成して生体より排出される。さらに、アクリルアミドやグリシダミドはDNAと反応してプリン塩基付加体を形成したり、ヘモグロビンのバリン末端に共有結合してヘモグロビン付加体を形成する。そのため、血液及び臓器中のアクリルアミド及びグリシダミドを定量することで、アクリルアミドの曝露量を評価することが可能と考えられる。本研究ではアクリルアミド10 - 3,000 ng/mL、グリシダミド200 - 3,000 ng/mLの定量範囲で分析系を構築したが、グリシダミドの代謝は種差があるため濃度範囲を推定することが難しい。そのため、in vitro及びin vivo実験で得られたサンプルの測定時には、必要に応じて固相抽出等を利用したサンプルの濃縮や高濃度サンプルの希釈した際の直線性を確認する必要があると考えられる。

2. アセタミプリド及びN-デスメチルアセタミプリドの定量

「農薬評価書 アセタミプリド」(食品安全委員会2008年)に記載されている1 mg/kg体重をラットに単回及び反復投与した血中濃度推移 (アセタミプリド

0.47 - 1.0 $\mu\text{g/mL}$) 及び体内分布試験 (アセタミプリド 0.01 - 30 $\mu\text{g/g}$) を参考に、体内動態試験を実施した際の濃度評価が実施可能な範囲を設定して LC/MS による分析系の構築を行った。既報告 (Halawa E et al. PLoS One. 2021, 16: e0259383. Environ Int. 2020, 145:106120) を参考に初期値を設定し、使用した質量分析計における条件の最適化を行った。LC 条件は、適切なピーク形状が得られるように緩衝液の種類及びアセトニトリル濃度のグラジエント条件の最適化を行った。アセタミプリド及び N-デスメチルアセタミプリドを同時に定量できる分析系を構築し、各標準品を定量する分析条件を表 4 及び表 5 に示した。また、アクリルアミド及びグリシダミドの標準品を 500 pg/mL のサンプルを分析した際のクロマトグラムを図 3A、B に示した。またブランクサンプルはピークが検出されないことを確認した (図 3C, D)。
最適化した条件 (表 4, 5) で各標準物質を複数濃度で作成し、直線性を評価した。アセタミプリドでは 50 - 10,000 pg/mL の範囲で直線性が認められた (図 2A)。グリシダミドでは 500 - 10,000 pg/mL の範囲で直線性が認められた (図 2B)。また、各標準物質の 10,000 pg/mL をインジェクトした直後のブランク測定を行い、キャリーオーバーは認められなかった。

アセタミプリドは哺乳類では、肝臓においてアルデヒドデヒドロゲナーゼやチトクロム P450 によって速やかに代謝され、代謝物として存在すると考えられる。主要な代謝物のうち毒性に影響する化合物は N-デスメチルアセタミプリドであると考えられ、濃度定量することによって曝露量を評価することが可能と考えられる。

D. 結論・次年度の計画

本年度は、本研究班で体内動態を評価することが計画されているアクリルアミド及びグリシダミド、アセタミプリド及び N-デスメチルアセタミプリドの定量法について LC-MS/MS で条件検討を実施した。各化学物質について、評価が必要となる定量感度を得るために、各組織において固相抽出等を用いた濃縮または希釈が必要になると考えられ、これらの前処理に伴う真度や精度への影響について検討を行い、体内動態試験の評価に利用すべきであると考えられる。

次年度は、研究班内でアクリルアミド、アセタミプリド等を用いた in vitro または in vivo 実験が実施される予定であり、実験で採取されたサンプルの濃度を定量し、毒性影響との関連性について評価を実施する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表1 アクリルアミド及びグリシダミド定量のためのLC分析条件

	Acrylamide	Glycidamide
分析カラム	InertSustain AQ-C18 (1.9 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm) (GLサイエンス)	InertSustain AQ-C18 (1.9 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm) (GLサイエンス)
カラム温度	30 ° C	30 ° C
移動相A	0.05%ギ酸添加蒸留水	0.05%ギ酸添加蒸留水
移動相B	0.05%ギ酸添加アセトニトリル	0.05%ギ酸添加アセトニトリル
流速	0.3 mL/min	0.3 mL/min
グラジエント (移動相B)	1% 0 - 0.5 min 1%→10% 0.5 - 1 min 10%→80% 1 - 1.5 min 80% 1.5 - 1.9 min 80%→1% 1.9 - 2.1 min 1% 2.1 - 5 min	1% 0 - 2 min 1%→15% 2 - 4 min 15% 4 - 4.5 min 15%→1% 4.5 - 5 min 1% 5 - 8.5 min
注入量	10 μ L	10 μ L
ニードル洗浄	50%メタノール	50%メタノール
オートサンプラ ー温度	室温	室温

表2 アクリルアミド及びグリシダミド定量のためのMS分析条件

Ionization mode	ESI
Scan type	SRM
Detection mode	Positive
Ion source voltage (V)	4500
Ion source gas (AU)	Sheath/Aux/Sweep: 30/5/0
Ion source temperature (° C)	Capillary 270 Vaporizer 300
Collision energy (V)	Acrylamide 10 Glycidamide 23
Collision gas type and pressure (AU)	Ar, 1.5
Resolution	0.7 (Q1), 0.7 (Q3)
S lens	Acrylamid 45 Glycidamide 40

表3 アクリルアミド及びグリシダミドの精度・真度の評価

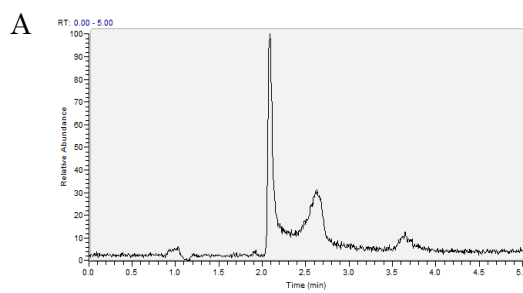
	アクリルアミド (N = 3)			グリシダミド (N = 3)		
	理論濃度 (ng/mL)	精度 (%CV)	真度 (%)	理論濃度 (ng/mL)	精度 (%CV)	真度 (%)
LQC	15	8.7	81.0	500	12.0	100.2
MQC	1,500	5.6	104.1	1,500	14.3	86.5
HQC	3,000	2.0	105.0	3,000	12.6	93.6

表4 アセタミプリド及びN-デスメチルアセタミプリドの定量のためのLC分析条件

	Acetamipride
分析カラム	InertSustain AQ-C18 (1.9 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm) (GLサイエンス)
カラム温度	30 ° C
移動相A	0.05%ギ酸添加蒸留水
移動相B	0.05%ギ酸添加アセトニトリル
流速	0.3 mL/min
グラジエント (移動相B)	40% 0 - 3.5 min 40%→95% 3.5 - 3.7 min 95% 3.7 - 4.2 min 95%→40% 4.2 - 8 min
注入量	5 μ L
ニードル洗浄	50%メタノール
オートサンプラー温度	4 ° C

表5 アセタミプリド及びN-デスメチルアセタミプリドの定量のためのMS分析条件

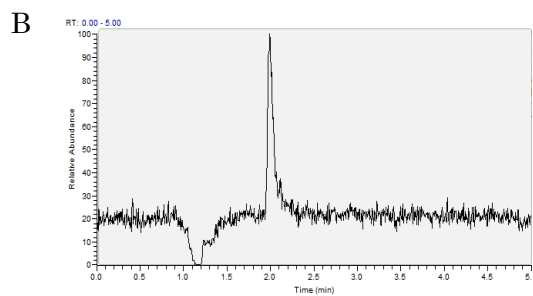
Ionization mode	ESI
Scan type	SRM
Detection mode	Positive
Ion source voltage (V)	4500
Ion source gas (AU)	Sheath/Aux/Sweep: 30/10/0
Ion source temperature (° C)	Capillary 200 Vaporizer 450
Collision energy (V)	Acetamipride 22 N-desmethyl acetamipride 16
Collision gas type and pressure (AU)	Ar, 1.5
Resolution	0.7 (Q1), 0.7 (Q3)
S lens	Acetamipride 80 N-desmethyl acetamipride 75



Acrylamide

72 m/z → 55 m/z

RT : 2.09



Glycidamide

88 m/z → 44 m/z

RT : 1.99

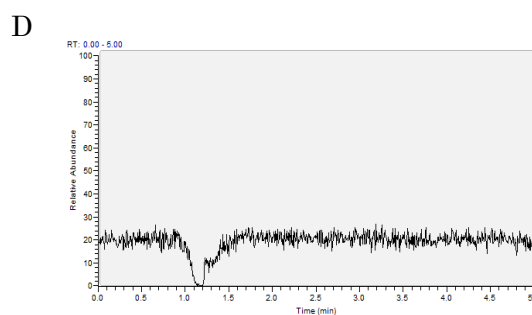
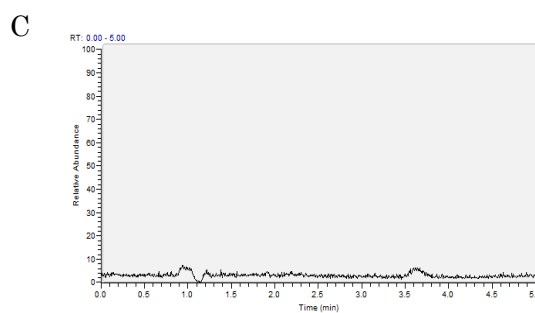


図1 アクリルアミド及びグリシダミドのクロマトグラム

A Acrylamide 2,000 ng/mL

B Glycidamide 2,000 ng/mL

C Blank (Acrylamide)

D Blank (Glycidamide)

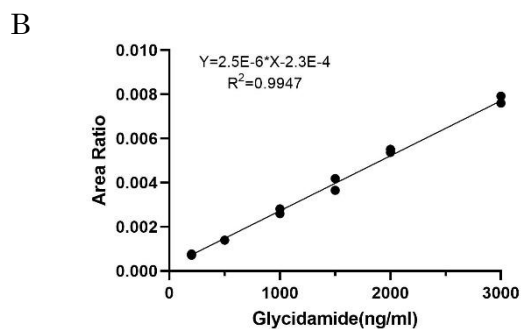
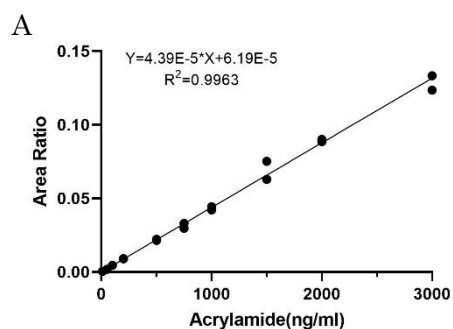
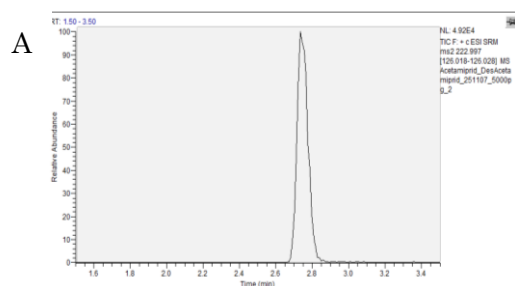


図2 アクリルアミド及びグリシダミドの検量線

A Acrylamide

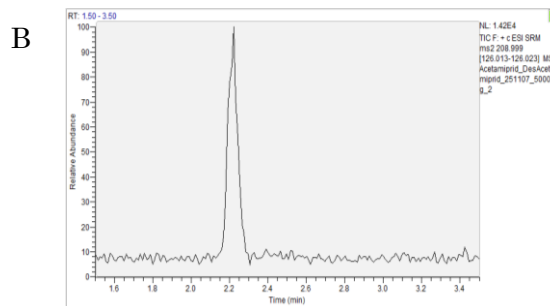
B Glycidamide



Acetamidrid

222 m/z → 126 m/z

RT : 2.73 min



N-desmethyl acetamidrid

208 m/z → 126 m/z

RT : 2.22

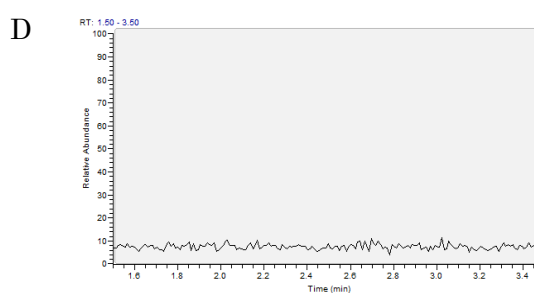
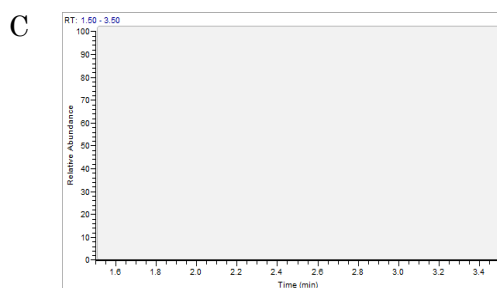


図3 アセタミプリド及びN-デスメチルアセタミプリドのクロマトグラム

A Acetamidride 500 pg/mL

B N-desmethyl acetamidride 500 pg/mL

C Blank (Acetamidride)

D Blank (N-desmethyl acetamidride)

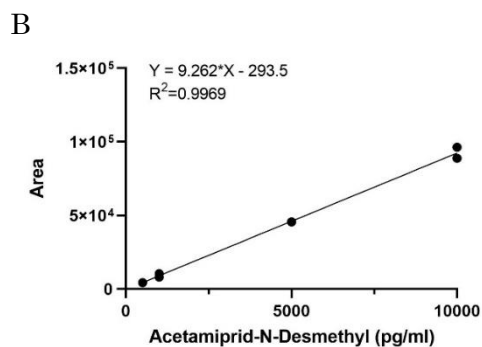
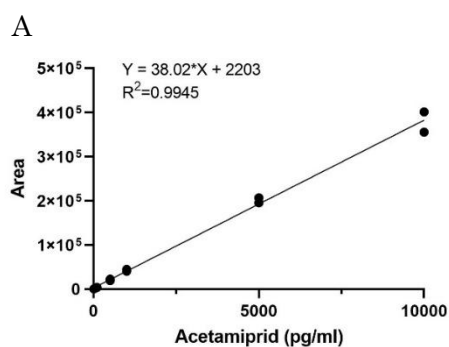


図4 アセタミプリド及びN-デスメチルアセタミプリドの検量線

A Acetamidrid

B N-desmethyl acetamidrid