

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月20日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310027

研究課題名（和文） 生体試料を用いた環境中有害化学物質曝露の健康影響評価

研究課題名（英文） Development of Profiling Method for the Health Effect Evaluation of Exposure against Hazardous Environmental Chemicals by analyzing Human Samples

研究代表者

柴田 康行（SHIBATA YASUYUKI）

独立行政法人国立環境研究所・環境計測研究センター・上級首席研究員

研究者番号：80154251

研究成果の概要（和文）：

化学物質曝露による健康影響の総合的な評価、管理手法の確立を目指し、生体試料、特に尿に着目して、様々な化学物質並びに代謝産物の濃度を一斉・包括的に分析できる前処理手法並びに分析手法の開発を進め、実試料に適用してデータの取得と適用性評価を行った。さらに、これらのデータを解析して化学物質管理のための発生源探索につながる解析手法の検討を進めた。

研究成果の概要（英文）：

A series of analytical methods, including extraction/trapping/clean-up and analysis have been developed by the use of advanced analytical techniques, such as GCxGC/HRTOF and on-line SPE-LCMSMS, in order to establish sound management of chemicals by the global profiling of exposure status to the environmental chemicals and assessment of their effects as well as tracing their major sources.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

現代社会は様々な化学物質の利用によって支えられているといっても過言ではない。人間が意図的に製造、使用している化学物質の数は数万種類とも言われるが、その多くについて十分な毒性情報が整備されていない中で、それらの膨大な化学物質に対する適正な監視並びに管理体制の確立が必要とされている。特にヒトの健康影響を考える上で、膨大な数の化学物質に対する曝露状況を知る

ことが必要不可欠である。そのための方法として、血液や尿などのヒト生体試料中の化学物質やその代謝産物の分析が盛んに行われてきているが、部分、部分に注目した個別研究の積み重ねの上にならば、より包括的、総合的な状況把握、ならびに評価のための統一的な手法の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、多くの化学物質を一斉に分析し、その結果を解析して化学物質への曝露状況を

把握するとともにリスクに対する評価を行うための分析手法の体系的な整備ならびにプロファイリング解析手法の開発を目的とする。特に採取が比較的容易で量的にも有利であり、感染症や個人情報保護の観点でも扱いやすい尿を中心として、できるだけ多くの化学物質の一斉分析を目指していくつかの基礎技術開発を行う。すなわち、尿中には主として代謝物が水溶性の抱合体として排泄されることから、抱合体を丸ごとならびに酵素分解後に微量の尿から一斉分析する前処理手法、分析手法の開発、改良を進める。また、血液や母乳に加えて尿中 POPs 類を測定対象としうよう、きわめて高感度に測定可能な前処理手法の開発を進めるとともに、尿、血液、母乳など様々なヒト生体試料中の POPs 一斉分析のより高度化を目指して、二次元GCと高分解能 TOF あるいは MSMS を組み合わせた新たな分析手法の検討と適用性の評価を進める。さらに、尿などの生体試料への排泄が少なく曝露状況の把握の難しい VOC (揮発性有機化合物) の研究のために、装着して大気経由の化学物質曝露の解析に幅広く使える新たなパッシブサンプラの作成を目指してその焼結チューブの開発を行う。最後に、こうした多数の分析データから汚染源情報等を推定、抽出して対策に結びつけていくための解析手法について検討を行う。

### 3. 研究の方法

公的な研究機関と企業との連携により、効率的な研究推進を図った。すなわち、企業に所属する連携研究者の開発した新しいハイブリッドタイプの固相抽出剤を用いた POPs 系の高度濃縮手法、ならびに化学物質代謝物 (抱合体) の選択的かつ包括的抽出手法の開発をベースとして、(独) 国立環境研究所では前処理に関する迅速化、自動化を中心とした課題、並びに GCxGC / TOF あるいは GCxGC / MSMS、LC-TOF を用いた包括的な分析手法の開発を、また兵庫県環境研究センターでは連携研究者との共同で、高分解能 GCMS および LCMSMS による POPs 関連化合物、ならびに PAHs 代謝物の超高感度分析手法の開発を、それぞれ分担して研究を進めた。統計的な解析手法について、国立環境研究所で調査を進めたほか、生体試料の分析では曝露状態の把握の難しい VOC のパッシブサンプラの新しい形の提案を目指して、兵庫県環境研究センターと企業の連携により新たな焼結チューブの作製と評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 酵素分解 + オンライン固相抽出-LCMSMS 法による多成分一斉分析法の改良

既報のオンライン固相抽出-LCMSMS 法をベースとして、尿中フタル酸モノエステル類の迅速一斉分析法開発を進めた。LCMSMS の高感度な特徴を生かして 10 $\mu$ L の尿試料で分析が行えるように固相システムの徹底的なブランク削減を図った結果、疎水性分離のポリマー系樹脂を 2.8%アンモニア水で洗浄することで、対象 8 種

類のブランクを問題ないレベルまで低減できることが示された。ヒト尿測定結果では個人差が大きかったものの、フタル酸モノブチル > フタル酸モノエチルヘキシル代謝物 (MEHHP) > フタル酸モノエチルヘキシルの順に検出された。一部の物質では抱合体のほかフリーのモノエステル体も検出された。

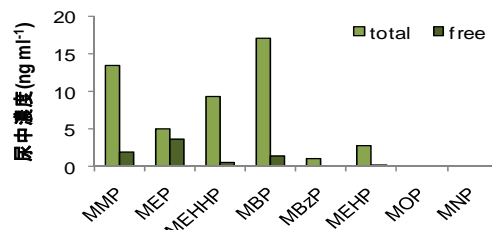


図1 尿中フタル酸モノエステル類の濃度とその存在状態 (色の濃い方がフリー分子濃度、薄緑がグルクロン酸抱合を解いた総濃度)

#### (2) グルクロン酸抱合体の包括的捕集法ならびに POPs 類高感度分析手法の開発

個別物質毎の分析手法開発ではなく抱合体ならびにフリー化合物の一斉捕集・前処理を目指し、新規固相抽出剤の条件最適化と性能評価を進めた。疎水性のジビニルベンゼンを基材として親水性のメタクリレートモノマーの先端にイオン交換基を有するあらたな固相抽出剤で、モデル抱合体の選択的抽出条件を検討、確立し、実試料に適用した。その結果、PCB、フッ素系界面活性剤について、それぞれフリー物質を中心に尿中からの分析と尿中レベル変動の長期モニタリングに成功した。また、PCB 代謝物である水酸化 PCB や、多環芳香族炭化水素 PAHs の代謝産物 (水酸化 PAHs) の GCxGC/TOF ないし LCMSMS による高感度一斉分析法を開発し、これらについても日間変動の様子を追跡した。さらに、船舶運航で職業曝露を受ける可能性のある海技者の尿を測定した。標準物質が入手でき定量できた 6 異性体については、機関士と他の乗組員との間で有意の差は認められなかった。

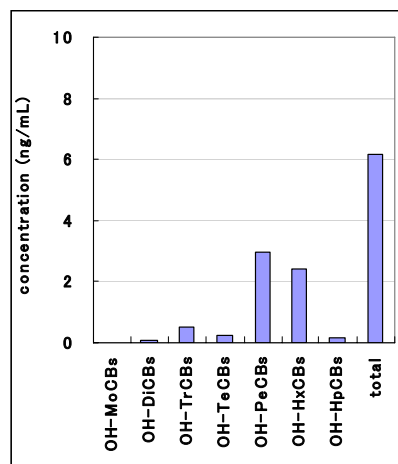


図1 一般人の尿中水酸化 PCB の検出 5、6塩素体が主要成分として検出された

### (3) 包括的、網羅的の化学物質一斉分析手法の開発

有機塩素、有機臭素、有機フッ素化合物のそれぞれ一斉分析を目指して、尿 100mL を出発材料に酵素処理+液液抽出を行い、GCxGC 分離、高分解能 TOF ないし MSMS 分析による検討を進めた。GCxGC/TOF では塩素、臭素の脱離に相当するニュートラルロスに相当する多数のピークが検出された。また、カフェインや性ホルモン代謝物などをふくむ20種類余りの化学物質の仮の同定ができた。一方、MSMS でもニュートラルロス法で選択的な有機ハロゲン化合物の一斉分析をねらったが、感度的には TOF のピークの数学的処理に劣っていた。MSMS はねらった物質の選択的な定量により適当であることが再確認された。

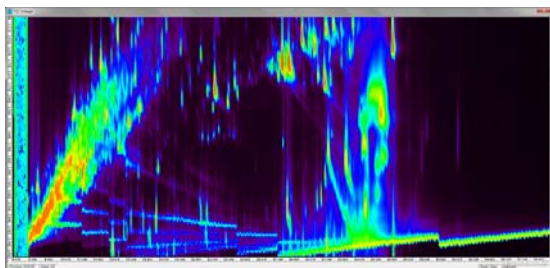


図2 GCxGC/TOF による尿中化学物質検出  
グルクロニダーゼでグルクロン酸抱合体を  
だつ抱合した後分析。ライブラリーサーチ  
から 10 数物質の仮同定を行った

水溶性物質の分析のための LC-TOF 研究では、尿中の各種化合物のポジティブ/ネガティブ各モードの一斉分析をいくつかのカラム条件で比較した。分離状態、検出ピーク数いずれにおいても、ギ酸・メタノール系の溶離液と組み合わせた ODS カラムが良い結果を与え、数千を超えるピークがポジティブモードで検出できることが示された。この検討過程で、採血管の内面に単なる抗凝固剤などではなく様々な化学物質が塗布されている様子が明らかとなり、血液の種類(全血、血清、血漿)、使用採血管の品名などによって化学物質による汚染状況の異なることが明らかにされた。

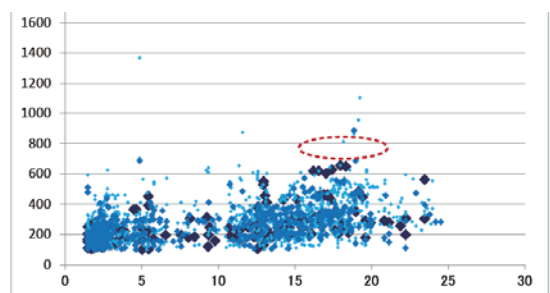


図3 LC-TOF によるヒト尿分析例  
横軸は保持時間、縦軸は質量数。数千本の  
ピークを検出可能。赤点線円内はクワリ  
ロマイシンとその代謝物が観測された領域。

### (4) 新たな焼結チューブの開発

生体試料では曝露状況の把握が困難な VOC 曝露の把握を目的として、従来法より簡便かつ高感度に測定可能なパッシブサンプラの形式を考え、捕集材を全量GCの加熱脱着装置に入れて捕集化合物の全量分析を行うための焼結チューブの作製を行った。ポリエチレンで孔径を制御しながら各種チューブを作製し、活性炭を充填して捕集効率などを検討し、最適化を進めた。

### (5) 分析データの統計解析手法の調査

膨大な分析データを取得したあとの解析手法については多くの研究がなされ、市販の分析機器等には付属、あるいはオプションでこうした解析ソフトが掲載されている場合も少なくない。しかしながらこれらの多くは病気の発生など、適当な影響指標との関連を解析するためのものであり、化学物質管理で重要な発生源へのトレースが可能な方法は限られる。いわゆるレセプターモデルなどを中心に文献調査を進めた結果、Polytopic Vector Analysis (PVA) と呼ばれる方法が化学物質情報の解析に有効に利用できる解析手法として浮かび上がってきた。PVA は主成分分析と類似する数学的手続きにより、環境試料、生体試料中の化学物質濃度/組成情報を End Member と呼ばれる少数のパターンの組み合わせで説明していくものである。実際の環境試料や生体試料中のダイオキシンの異性体組成などの解析から、燃焼起源、農薬不純物等少数の発生源に特徴的な End Member の抽出に成功した例、あるいは河川に沿った各地点でのフッ素系界面活性剤組成から各地での特徴的組成をもった汚染源の負荷状況を解析した例などが報告されている。生体試料への適用性を検討した結果、生物濃縮計数の違いなどで環境試料と大きく組成が変動する場合には、発生源情報と解析結果 (End Member) との対応関係の評価が難しくなり、注意して適用する必要があることが明らかとなった。

### (6) 成果報告会の開催

全米疾病管理センター (CDC) の進める化学物質曝露状態の全米調査 NHANES において尿中、血中化学物質の LCMSMS 測定を担当している事業の中心人物である Antonia Calafat 博士を招へいし、2011年5月に兵庫県環境研究センターで生体試料中化学物質測定法に関するミニシンポジウムを開催した。Calafat 博士には基調講演をお願いするとともに、各班員、連携研究者から研究を報告してもらい、相互の意見交換と情報共有を進めた。網羅的な分析の意義と、その方向にむかう世界的な研究の流れを改めて確認した。その中で、多数のデータあるいは長期にわたるデータ蓄積の重要性とその有意義な解析のための精度管理の進め方について、今後の研究推進に非常に役に立つ意見交換を行うことができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Hirai, T., Fujimine, Y., Watanabe, S. and Nakano, T.; Distribution of polybrominated diphenyl ethers in various Japanese autopsy samples., Environmental risk assessment and concentration trend of atmospheric volatile organic compounds in Hyogo Prefecture, Japan, Environ Sci Pollut Res. (2012) in press、査読有り
- ② Shibata Y., Yoshikane M, Takagi M, Tanabe K, Hashimoto S., Sasaki Y, Ito H, Nitta H, Satoh H; Blood-sampling method for POPs and other chemicals analysis in Japanese birth cohort study “Japan Environment and Children’s Study, Organohalogen Comp., 73, 1464-67 (2011)査読有り
- ③ Suzuki M, Okuno T, Matsumura C, Sato N, Yonekubo J, Ezaki T, Inoue Y., Imaishi H, Nakano T.; Development of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl (OH-PCBs) Analytical Method in Human Urine With UPLC/Q-TOF MS, Organohalogen Comp., 73, 1215-18 (2011)査読有り
- ④ 橋本俊次, 本田守, 高菅卓三, 生方正章, 田中一夫, 田邊潔, 柴田康行; 多次元ガスクロマトグラフ-飛行時間型質量分析計による水酸化PCBの測定に関する検討、環境化学、20、161-172(2010)査読有り

[学会発表] (計 18 件)

- ① 羽賀雄紀, 鈴木元治, 奥野俊博, 矢本善也, 鶴川正寛, 松村千里, 英保次郎, 井上嘉則, 中野武; 誘導体化 GC/MS 法を用いた生体試料中の OH-PCBs 分析、日本水環境学会シンポジウム、2011年9月10日～11日、仙台
- ② 羽賀雄紀, 鈴木元治, 奥野俊博, 鶴川正寛, 松村千里, 英保次郎, 井上嘉則, 中野武; 誘導体化 GC/MS 法による尿中の OH-PCBs 分析、環境化学討論会、2011年7月16日～18日、熊本
- ③ 米久保淳, 佐藤信武, 江崎達哉, 鈴木元治, 奥野俊博, 松村千里, 今石浩正, 中野武; 高分解能 LC/MS による水酸化 PCBs スクリーニング分析法の開発(II)、環境化学討論会、2011年7月16日～18日、熊本
- ④ 平井哲也, 鈴木元治, 奥野俊博, 松村千里, 井上嘉則, 中野武; LC/MS/MS を用いた生体試料中の OH-PCBs 分析、環境化学討論会、2011年7月16日～18日、熊本
- ⑤ 矢本善也, 竹峰秀祐, 松村千里, 鈴木元治, 川崎英也, 中野武, 荒川隆一; LC/MS による前駆体および中間代謝体を含む有機フッ

素化合物の一斉分析法の検討、環境化学討論会、2011年7月16日～18日、熊本

- ⑥ 高木麻衣, 吉兼光葉, 小林美哉子, 小森住美子, 矢内美幸, 柴田康行; オンライン固相抽出による生体試料中フタル酸モノエステル類分析の高感度・高精度化の検討、第20回環境化学討論会、2011年7月16日～18日、熊本
- ⑦ Nakano, T.; Congener-specific and enantioselective analysis of POPs, UNU International Symposium on Existing and Emerging Chemicals in the Environment(招待講演), 2011年3月9日, Shanghai
- ⑧ 柴田康行; 環境計測の現在と将来—Next 50 Years- (基調講演) 2nd Korea - Jpn. Symp. Environ. Chem./韓国環境分析学会秋季学術大会、2010年11月4日、ソウル
- ⑨ 橋本俊次, 伏見暁洋, 高澤嘉一, 田邊潔, 柴田康行; GCxGC-MS/MS による環境および生体試料中の有機ハロゲン系化合物の網羅分析の検討、2nd Korea-Jpn.Symp.Environ.Chem./韓国環境分析学会秋季学術大会、2010年11月5日、ソウル
- ⑩ M Yoshikane, Y Takazawa, K Tanabe, Y Shibata; A Preliminary study on the analysis of chemicals in blood/urine samples by LC-TOF, 2nd Korea - Jpn. Symp.Environ.Chem./韓国環境分析学会秋季学術大会、2010年11月5日、ソウル
- ⑪ 鈴木元治, 竹峰秀祐, 鶴川正寛, 松村千里, 中野武, 奥野俊博, 今石浩正; ヒト生体試料中の有機フッ素化合物の組成、第13回水環境学会シンポジウム、2010年9月9日、京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 康行 (SHIBATA YASUYUKI)  
独立行政法人国立環境研究所・環境計測研究センター・上級主席研究員  
研究者番号：80154251

### (2) 研究分担者

中野 武 (NAKANO TAKESHI)  
財団法人ひょうご環境創造協会兵庫県環境研究センター・参与  
研究者番号：00446791  
橋本 俊次 (HASHIMOTO SHUNJI)  
独立行政法人国立環境研究所・環境計測研究センター・主任研究員  
研究者番号：80321719  
中山 祥嗣 (NAKAYAMA SHOJI)  
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員  
研究者番号：00368705

(3) 連携研究者

井上 嘉則 (INOUE YOSHINORI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・非常勤  
講師

研究者番号 : 90382225

高菅 卓三 (TAKASUGA TAKUMI)  
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・客  
員教授

研究者番号 : 10451379