

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16200

研究課題名(和文) 思春期前のフタル酸エステル曝露が第二次性徴発来へ及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Prepubertal exposure to phthalates and sexual maturation among 12 years old children: Hokkaido Study

研究代表者

アイツバマイ ゆふ(Ait Bamai, Yu)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任講師

研究者番号：90752907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：思春期前の尿中フタル酸エステル類曝露による第二次性徴発来への影響を明らかにするため、北海道スタディの12歳調査票より、12歳時点の児の第二次性徴発来の有無を評価した。7歳の時に回収し冷凍保存していた児の尿検体よりフタル酸エステル類代謝物10化合物の尿中代謝物濃度をLC-MS/MSで測定した。

質問票の返送があった男児1305名のうち、陰毛あり24.7%、声変わりあり23.3%、女児1222名のうち陰毛あり54.7%、胸の膨みあり76.5%であった。尿中代謝物のMnBP, MEOHP, MEHHP, MECPPは全ての児より検出され、MECPP, MnBP, MEHHPの順に高濃度であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フタル酸エステル曝露による児の思春期発来について日本人を対象に検討した研究は本研究が初めてである。研究代表者らは日本のDEHP曝露量は欧米より高いことを過去に報告したが、本研究対象者の曝露量は海外の先行研究と同程度であり、DEHPの一部のプラスチック製品への使用規制が曝露量の低減に貢献した可能性が示唆された。本研究期間で尿中代謝物濃度測定が必要サンプルサイズまで達しなかったが粗解析では12歳時点の第二次性徴発来の恥毛発育は同年代の中国およびドイツの研究と比較して遅く、今後も尿中代謝物濃度測定を継続し検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to investigate the association between prepubertal exposure to phthalates and sexual maturation among 12 years old children. The guardians of 12 years old children answered a questionnaire covering questions about breaking of voice (boys only), menarche and breast growth (girls only), and pubic hair growth (boys and girls). Ten phthalate metabolites from child's urine taken when they were 7 years old were measured by LC-MS/MS to assess phthalates exposure levels.

Among 1305 boys who returned the questionnaire, 24.7% and 23.3% had pubic hair growth and breaking of voice. Among 1222 girls, 54.7% and 76.5% had pubic hair growth and breast growth, respectively. MnBP, MEOHP, MEHHP, MECPP were detected from all children and dominant metabolite was MECPP, followed by MnBP and MEHHP.

研究分野：環境疫学

キーワード：フタル酸エステル 第二次性徴 学童 化学分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フタル酸エステルはプラスチックの可塑性や化粧品や薬品に使用され、短半減期の環境化学物質である (Wormth et al. 2006)。日本は全可塑性の 78% をフタル酸エステルが占め、そのうち 47% が DEHP (di-2ethylhexyl phthalate)、26% が DiNP である (可塑性工業会 2014)。1990 年代後半より、環境化学物質であるフタル酸エステルの内分泌かく乱作用による児の性腺機能および第二次性徴への影響が懸念されている (Latini 2004)。生物学的半減期は比較的短い、生後も継続的に曝露され続けていることが問題である。

フタル酸エステルの DEHP, DiNP, DnBP (di-n-butyl phthalate) は、動物実験において雄では、胎仔精巣のセルトリ細胞、ライディッヒ細胞の機能を抑制し、テストステロン濃度の低下等の抗アンドロゲン作用、また雌では、卵巣顆粒膜細胞のアロマターゼ活性を抑制し、エストラジオール濃度の低下を引き起こすことが動物実験で認められている (Gray et al. 1977, 2000; Kay et al. 2013)。一方、ヒトを対象とした疫学研究では、胎児期のフタル酸エステル曝露濃度が高いと男児のテストステロン濃度が低下 (Araki et al. 2014 他)、恥毛の発育が遅い (Ferguson et al. 2014) 等、男児の性ホルモン濃度および第二次性徴への抗アンドロゲン作用については動物実験と一致した結果が得られている。一方、生後の曝露に関しては、恥毛の発育が遅い、また逆に早いということが男女共に報告されているが、いずれも第二次性徴期に達した児を含む横断研究 (Watkins et al. 2014, Wolff et al. 2010, 2014) および症例対照研究 (Frederiksen et al. 2012, Mikkil et al. 2012) での報告しかない。フタル酸エステルは第二次性徴の発来を司る性ホルモン濃度に影響を与え、胎児期や性腺機能が未成熟な思春期前の曝露で雄雌のその後の性徴に影響を与えることが動物実験や in vitro で示されており (Schoeters et al. 2008)、思春期に到達する前のフタル酸エステル曝露でも児の性周期確立をかく乱させる可能性が考えられるが、思春期前のフタル酸エステル曝露に焦点を当てて第二次性徴発来への影響を前向きに検討した疫学研究はなく、この点については未だ明らかになっていないかった。

Parent phthalate diesters		Measurable urinary metabolites	
Di-isobutyl phthalate (DiBP)		Mono-isobutyl phthalate (MiBP)	
Di-n-butyl phthalate (DnBP)		Mono-n-butyl phthalate (MnBP)	
Butyl benzyl phthalate (BBzP)		Mono-benzyl phthalate (MIBzP)	
Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)		Mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)	
		Mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEOHP)	
		Mono (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP)	
		Mono (2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate (MECPP)	
Di-isononyl phthalate (DiNP)		Mono-isononyl phthalate (MiNP)	
		Mono (hydroxy-isononyl) phthalate (OH-MiNP)	
		Mono(carboxy-isononyl) phthalate (cx-MiNP)	

表1 フタル酸エステル類代謝物 10 化合物

表2 MS条件

	Quantification Ion		Confirmation Ion		Quantification Ion		Confirmation Ion	
	Precursor/Product	Precursor/Product	Precursor/Product	Precursor/Product	Cone (V)	Collision (eV)	Cone (V)	Collision (eV)
MBP	220.82>76.93	220.82>133.98			15	19	15	12
MnBP	220.82>76.93	220.82>76.93			10	17	10	14
MIBzP	254.79>76.86	254.79>104.42			10	21	10	15
MEHP	277.05>133.91	277.05>126.95			9	14	9	18
MEOHP	290.98>143.03	290.98>120.89			18	12	18	16
MEHHP	292.93>145.03	292.93>120.88			10	13	10	18
MECPP	306.98>158.98	306.98>112.87			9	11	9	29
MiNP	291.15>141.07	291.15>76.99			18	17	18	25
OH-MiNP	307.27>120.95	307.27>159.1	307.27>76.99		18	18	18	16
cx-MiNP	321.0>173.04	321.0>120.95	321.0>76.93		15	16	15	25
MIBP-d ₄	224.82>80.96	224.82>138.0			15	19	15	12
MnBP- ¹³ C ₄	224.76>71.0	224.76>78.95			10	17	10	14
MIBzP- ¹³ C ₄	258.84>106.95	258.84>76.41			10	21	10	15
MEHP- ¹³ C ₄	281.09>136.91	281.09>127.2			9	14	9	15
MEOHP- ¹³ C ₄	294.84>143.02	294.84>123.88			18	12	18	16
MEHHP- ¹³ C ₄	296.73>123.88	296.73>145.04			10	13	10	18
MECPP- ¹³ C ₄	310.97>159.04	310.97>113.01			9	11	9	29
MiNP- ¹³ C ₄	294.7>141.13	294.7>78.95			18	17	18	25
OH-MiNP-d ₄	311.21>124.98	311.21>159.09			18	18	18	16
cx-MiNP-d ₄	325.06>173.09	325.06>124.98			15	16	15	25

表3 LC条件

Time (min)	Initial	0.5	1	10	11	15	15.1	23	23.1	30
% A	90	90	70	65	55	52.5	35	25	90	90
% B	10	10	30	35	45	47.5	65	75	10	10

- 移動相A: 5mM ammonium bicarbonate in water
- 移動相B: 5mM ammonium bicarbonate in 95% methanol
- Analysis: Negative electrospray ionization in multiple reaction mode
- Injection volume: 40 μL
- Flow rate: 0.25 mL/min

2. 研究の目的

研究代表者らは、大規模の出生前向きコーホート「北海道スタディ」の中で、環境要因が妊婦や児の健康や成長発達に及ぼす影響を検討中である。そこで、申請者は北海道スタディの7歳児の尿中のフタル酸エステル DnBP, DiBP (di-isobutyl phthalate), BBzP (butylbenzyl phthalate), DEHP, DiNP 代謝物 10 化合物 (MEHP, MEOHP, MEHHP, MECPP, MiNP, MHiNP, MoINP, MBzP, MnBP, MiBP) 濃度を高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置 (以下 HPLC-ESI-MS/MS; Agilent, CA, USA) を用いて一斉分析にて測定し、(1) 思春期前のフタル酸エステル曝露 (7歳) に着目し、その後 12歳までの児の第二次性徴発来への影響を前向きに検討することで、性周期確立前のフタル酸エステル曝露が児の第二次性徴 (乳房・陰毛の発達、初潮、声変わり、成長率 (cm/年)、等) へ与える影響を明らかにする。(2) これまで疫学研究では検討されていない DiNP による影響についても初めて検討し、DiNP 曝露が第二次性徴へ及ぼす影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

分析対象化合物はMiBP、MnBP、MBzP、MEHP、MEHHP、MEOHP、MECPP、MiNP、OH-MiNP、cx-MiNPとした(表1)。MS条件は各分析対象化合物についてモニターイオン、

Corn Voltage、Collision Energyなどの最適な条件を決定した(表2)。また、10化合物の各ピークが分離可能な分析カラムおよびリテンションギャップカラム、グラジエント条件、移動相などの条件を決定した(表3)10段階に調整した検量線用標準溶液40 μLをLC-MS/MSに注入し、対象物質とサロゲート物質のピーク面積比および濃度比から検量線を作成した。各分析対象物質のIDLを環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き(平成27年度版)平成28年3月」に従い求めた。

サンプルは、尿試料500 μLをマイクロピペットで正確に量り取り、ガラスチューブに移した後、混合サロゲート溶液(MnBP-d4、MiBP-d4、MBzP-d4、MiNP-13C4:400 ng/mL、MECPP-13C4、MEOHP-13C4、MEHHP-13C4、MEHP-d4、cx-MiNP-d4、OH-MiNP-d4:200 ng/mL)40 μLを加える。これに100mM酢酸アンモニウム水溶液(pH 6.5)500 μL、β-グルクロニダーゼ溶液50 μLを加えた後、軽く混合し、インキュベートする(37°C、90 min)。

インキュベート後の試料液に100 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)1 mLを加え、予め1%酸含有90%メタノール1 mL、メタノール1 mL、0.5%アンモニア水1 mLでコンディショニングしておいたOasis MAX 96 well plate(Waters社)に全量負荷する。試料の入っていたチューブを超純水0.5 mLで洗浄後、メタノール0.5 mL、超純水0.5 mL、0.2%酸含有40%メタノール0.5 mLで洗浄し、0.2%酸含有90%メタノール水溶液1.0 mLでコレクションプレート内に溶出する。溶出液をマイクロピペットで250 μL分取し、超純水750 μLと測定バイアル内で混合したものを測定用試料液とし、UPLC-MS/MS(Waters社)で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏えいが一切生じないように、研究者によりデータ保管を厳重に行った。

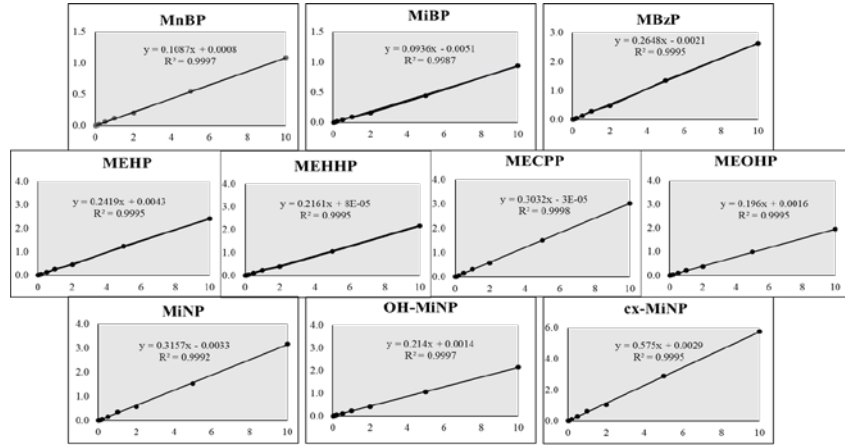


図1 検量線

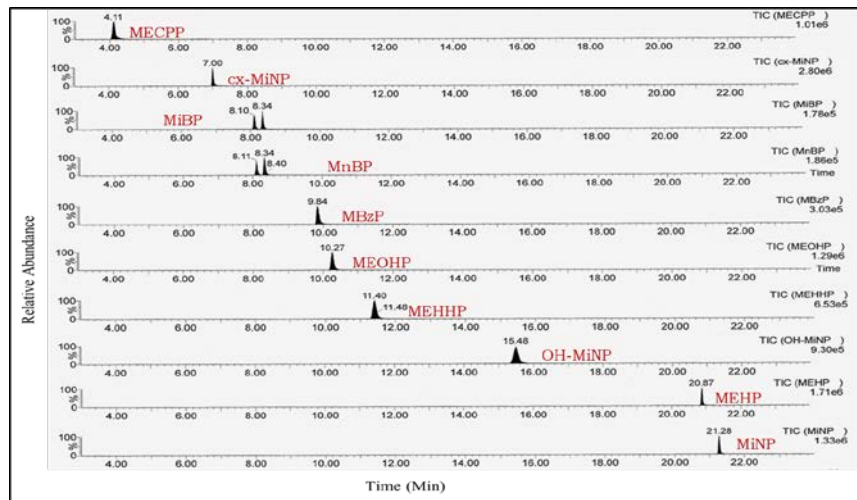


図2 クロマトグラフ

表4 各分析対象化合物の検出限界(MDL)および定量下限値(MQL)

	MiBP	MnBP	MBzP	MEHP	MEOHP	MINP	MEHHP	MECPP	OH-MiNP	cx-MiNP
Sample (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dilution Factor	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Final Volume (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
injection conc ng/mL	3.2	3.2	3.2	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20
Injec Volume (μL)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Result1 (ng/mL)	3.15	3.22	3.17	3.20	3.23	3.12	3.29	3.09	3.21	2.93
Result 2 (ng/mL)	3.12	3.18	3.16	3.20	3.17	3.05	3.39	3.06	3.18	2.87
Result 3 (ng/mL)	3.29	3.26	3.10	3.19	3.16	3.04	3.39	3.06	3.16	2.81
Result 4 (ng/mL)	3.10	3.33	3.10	3.21	3.13	2.99	3.42	3.04	3.15	2.80
Result 5 (ng/mL)	3.41	3.03	3.35	3.22	3.13	2.96	3.43	3.04	3.13	2.79
Result 6 (ng/mL)	2.99	3.03	3.00	3.24	3.13	2.96	3.43	3.04	3.11	2.79
Result 7 (ng/mL)	3.55	3.40	2.98	3.14	3.27	2.86	3.43	3.04	3.10	2.77
Average (ng/mL)	3.23	3.21	3.12	3.20	3.17	3.00	3.40	3.05	3.15	2.82
SD (ng/mL)	0.20	0.14	0.12	0.03	0.06	0.08	0.05	0.02	0.04	0.06
MDL (ng/mL)	0.76	0.54	0.48	0.12	0.22	0.33	0.19	0.06	0.15	0.22
MQL (ng/mL)	1.96	1.40	1.24	0.31	0.56	0.84	0.50	0.16	0.38	0.57
Coefficient Variance (%)	6.08	4.36	3.96	0.98	1.76	2.81	1.47	0.54	1.20	2.03
Recovery rate (%)	97.0	97.4	83.3	80.5	88.2	82.8	83.7	113.0	81.3	96.6

4. 研究成果

対象として10化合物の検量線は全て $R^2 > 0.998$ を満たし(図1)、サロゲート化合物を含む全20化合物のクロマトグラフの分離が可能となった(図2)。

各分析対象化合物の検出限界(MDL)および定量下限値(MQL)を表4に示す。検出限界値(MDL) 0.06~0.76ng/mL、定量下限値(MQL) 0.16~1.96ng/mL、添加回収率 81.3%~113.0%での分析が可能となった。

本研究では、2012年から2017年に回収した7歳児の尿120検体の尿中代謝物濃度を表5に示す。分析対象の10化合物のうち、MnBP、MEOHP、MEHHP、MECPPは全ての児より検出され、最も高濃度であったのはMECPP(中央値: 41.6ng/mL)、次いでMnBP(38.4ng/mL)、MEHHP(27.8ng/mL)であった(表1)。DiNP代謝物のMiNP、cx-MiNP、OH-MiNPは、0%、0.01%、27.3%の検出率であった。2012~2017年ですべての化合物で2MEHPは12.1%の濃度の減少が認められた本研究対象者の尿中フタル酸代謝物濃度は過去の先行研究の濃度よりも同等かやや低めであった(図3)。

これまでに第二次性徴の質問票の返送があった男児1305名のうち、陰毛が生え始めていたのは322名(24.7%)、声変わり認められるのは304名(23.3%)、女児1222名のうち陰毛が生え始めていたのは668名(54.7%)、胸の膨みが見られるのは935名(76.5%)であった。

今後も引き続き、尿中代謝物の測定を継続し、第二次性徴との関連を解析を行うとともに、本研究をさらに発展させるため、フタル酸エステル類のみならず短半減期かつプラスチック可塑剤としても使用されている有機リン系難燃剤との複合曝露による影響についても解析を行う。

Metabolites (ng/mL)	%>LOD	LOD	Min	25%	Median	75%	Max
MiBP	91.4	0.95	<LOD	5.18	10.3	25.7	91.9
MnBP	100	0.78	5.5	22.9	38.4	66.4	1209.5
MBzP	56.4	0.10	<LOD	<LOD	0.3	2.6	84.7
MEHP	96.5	0.15	<LOD	1.6	3.4	6.6	20.4
MEOHP	100	0.05	3.1	14.1	21.1	35.1	112.4
MEHHP	100	0.15	4.3	17.9	27.8	44.4	166.4
MECPP	100	0.12	4.8	28.6	41.6	60.9	208.7
MiNP	0	0.09	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
OH-MiNP	27.3	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5.62
cx-MiNP	0.01	0.11	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.57
Phthalate sum (nmol/mL)							
Σ DEHP metabolites				0.06	0.32	0.5	1.67

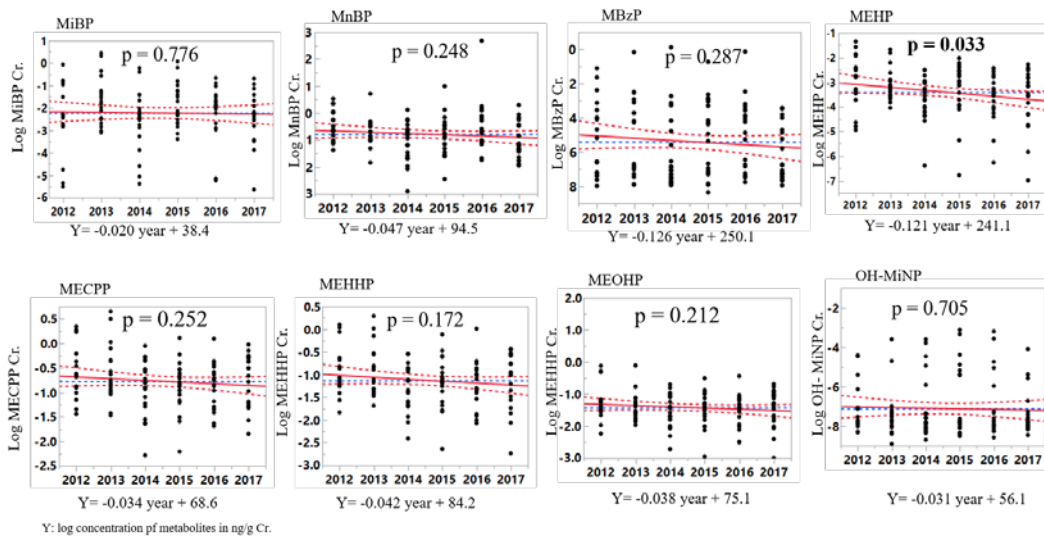


図3 7歳児の尿中フタル酸エステル類代謝物濃度の年次推移

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Bastiaensen, M., Ait Bamai, Y., Araki, A., Van den Eede, N., Kawai, T., Tsuboi, T., Kishi, R., Covaci, A., 2019. Biomonitoring of organophosphate flame retardants and plasticizers in children: Associations with house dust and housing characteristics in Japan. Environ. Res. 172, 543-551. (査読有)
- 2) Minatoya, M., Araki, A., Miyashita, C., Ait Bamai, Y., Itoh, S., Yamamoto, J., Onoda, Y., Ogasawara, K., Matsumura, T., Kishi, R., 2018. Association between prenatal bisphenol A and phthalate exposures and fetal metabolic related biomarkers: The Hokkaido study on Environment and Children's Health. Environ. Res. 161, 505-511. (査読有)
- 3) Ait Bamai, Y., Araki, A., Nomura, T., Kawai, T., Tsuboi, T., Kobayashi, S., Miyashita, C., Takeda, M., Shimizu, H., Kishi, R., 2018. Association of filaggrin gene mutations

and childhood eczema and wheeze with phthalates and phosphorus flame retardants in house dust: The Hokkaido study on Environment and Children's Health. Environ Int 121, 102-110. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Ait Bamai Y., Miyashita C., Okada E., Kashino I., Araki A., Houman G., Matsuura H., and Kishi R. Effect of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances on childhood infectious diseases up to 7 years of age: The Hokkaido Study. International Society of Exposure Science-International society for environmental epidemiology 2018 Joint Annual Meeting. Ottawa, Canada, 2018.8.
- 2) Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Araki A., Van den Eede N., Kishi R., Covaci A. Determination of exposure to phosphate flame retardant for Japanese schoolchildren. 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants Dioxin 2018. Krakow, Poland, 2018.8.
- 3) Ait Bamai Y., Araki A., Nomura T., Kawai T., Tsuboi T., Shimizu H., Kobayashi S., Miyashita C., Kishi R. Filaggrin mutation on the association between phthalates and phosphorus flame retardants in house dust and eczema and wheeze among children. International Society of Exposure Science-International society for environmental epidemiology Asian Chapter 2018. Taipei, Taiwan, 2018.6.
- 4) Ketema Rahel M, Ait Bamai Y., Araki A., Kawai T, Tsuboi T, Yoshioka E, Saito T, Kishi R. Indoor Air 2-Ethyl-1-Hexanol (2EH) level and its Association with Sick House Syndrome (SHS). 北海道公衆衛生学会, 2017.11.
- 5) Ketema Rahel M, Ait Bamai Y., Araki A, Kishi R, Saito T. Development and validation for reliable methods for the analysis of phthalate metabolites in human urine. The 3rd FHS International conference. Sapporo, Japan, 2017. 7.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
ホームページ等
北海道大学 環境健康科学研究教育センター
<https://www.cehs.hokudai.ac.jp/>
北海道スタディ
<https://www.cehs.hokudai.ac.jp/hokkaidostudy/>
環境と健康ひろば
<https://www.cehs.hokudai.ac.jp/hiroba/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。