

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 11 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590623

研究課題名(和文)日常生活下の子どもにおける殺虫剤、可塑剤及び難燃剤への曝露とその吸収量の評価

研究課題名(英文)Evaluation of exposure and absorption of insecticides, plasticizers and flame retardants in children in daily life

研究代表者

吉田 俊明 (YOSHIDA, Toshiaki)

大阪府立公衆衛生研究所・企画総務部・主任研究員

研究者番号：00201856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：子どもにおける有機リン剤(殺虫剤10種、難燃剤5種)及び防虫剤2種の曝露指標となる15種の尿中代謝物を正確に再現性よく定量する方法を確立した。また、殺虫剤としての使用が増加しているトランスフルトリン及びプロフルトリンの代謝物の尿中排泄をラットを用いて解析した。それぞれ尿中2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸及び4-メチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコールが最適な曝露指標となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：An accurate and precise analytical method was developed for measurement of urinary metabolites in the children exposed to organophosphorus compounds (10 insecticides and 5 flame retardants) and 2 moth repellents. In addition, the urinary excretion kinetics of the metabolites of transfluthrin and profluthrin, which are widely used as insecticides, were examined in rats. Urinary 2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid and 4-methyl-2,3,5,6-tetrafluorobenzyl alcohol were considered to be optimal biomarkers for monitoring transfluthrin and profluthrin exposure, respectively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：トランスフルトリン メトフルトリン プロフルトリン 防虫剤 曝露指標 尿中代謝物 ラット ガスクロマトグラフィー/質量分析

1. 研究開始当初の背景

子どもを取り巻く生活環境中には様々な化学物質が存在し、食品添加物や医薬品など一部の化学物質を除き、大部分の化学物質は呼吸により空気中から吸収される割合が高いと考えられる。子どもは成人に比較して体重当たりの呼吸量が多いため、経気道的な化学物質の体重当たり吸収量も多い。また、子どもは解毒などの生理機能が未発達であるため体内へ化学物質が蓄積されやすいと考えられる。さらに、子どもは余命が長く、化学物質への長期曝露によるガンなどの疾患発症の危険性が高い。したがって、同じ環境下で過ごす成人よりも化学物質の有害作用を受けやすく、子どもの健康への空気中化学物質の影響が懸念される。

子どもを含め我々は、平均して一日の約8割の時間を室内で過ごしており、室内の空気質は健康に大きな影響を及ぼすと考えられる。建材に使用されるシロアリ防除剤、衣料用防虫剤、カーペット用防ダニ剤などの殺虫剤、プラスチック等樹脂製品に多用される可塑剤、カーテン等に使用される難燃剤などは、いずれも放散速度が遅く、長期間室内空気質に影響を及ぼし、一般住宅等室内空気中からの検出頻度も高い。これらの薬剤の中には内分泌かく乱作用を有する物質や神経毒性作用を示す物質が多数存在する。これらの薬剤は家庭用品や学校設備品などに広範に使用されており、自宅や学校で長時間過ごす子どもたちの体内に相当量吸収、蓄積されていると推定される。しかし、わが国では子どもにおける経気道的なこれら化学物質の吸収量や体内蓄積量に関してほとんど把握されていない。

2. 研究の目的

本研究では、子どもにおける化学物質曝露に着目し、一般生活環境中で広範に使用される殺虫剤(有機リン系、ピレスロイド系)、難

燃剤(有機リン系)及び可塑剤(フタル酸系)を対象として、子どもの通う学校と自宅の室内空気の汚染実態を明らかにするとともに、子どもの尿中に排泄されるこれら薬剤の代謝物量から体内汚染の実態を明らかにし、両者の関係より室内空気質の子どもの体内汚染への寄与について評価することを当初の目的とした。

我々は、これまでに、空気中の同殺虫剤、難燃剤及び可塑剤を正確に再現性よく分析する方法を確立している(Yoshida T.: J. Chromatogr. A, 1216: 5069-5076, 2009、Yoshida T., Matsunaga I., Oda H.: J. Chromatogr. A, 1023: 255-269, 2004)。しかし、本研究期間の初期に、大部分の市販蚊取り・防虫製品の有効成分が、調査対象としていた薬剤から含フッ素ピレスロイド系殺虫剤(トランスフルトリン、プロフルトリン、メトフルトリン)に急速に変更された。これらの殺虫剤の代謝に関する報告は殆ど存在せず、子どもにおける吸収量を把握するためには、曝露の指標となり得る尿中代謝物を確立する必要性が生じた。本研究期間内には、これらの含フッ素ピレスロイド系殺虫剤それぞれについて曝露指標を確立するとともに、有機リン系殺虫剤及び有機リン系難燃剤の曝露指標となる各尿中代謝物のガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)による定量方法を確立するよう研究目的を一部変更した。

3. 研究の方法

(1)有機リン剤(殺虫剤、難燃剤)及び防虫剤の尿中代謝物分析法の確立

化学物質による室内空気汚染に関する過去の調査結果をもとに、有機リン系殺虫剤10種(クロルピリホス、ダイアジノン、ジクロフェンチオン、ジクロルボス、フェントロチオン、フェンチオン、イソキサチオン、マラチオン、ピリダフェンチオン、テトラクロル

ピンホス)、有機リン系難燃剤 5 種(リン酸トリメチル、リン酸トリエチル、リン酸トリブチル、リン酸トリフェニル、リン酸トリス(2-エチルヘキシル)及び 2 種の防虫剤(p-ジクロロベンゼン、ナフタレン)を調査対象化学物質として選択した。尿中に排泄されるこれらの代謝物 15 物質(ジメチルホスフェート、ジエチルホスフェート、ジメチルチオホスフェート、ジエチルチオホスフェート、ジ-n-ブチルホスフェート、ジフェニルホスフェート、ビス(2-エチルヘキシル)ホスフェート、2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジノール、3,5,6-トリクロロ-2-ピリジノール、3-メチル-4-(メチルチオ)フェノール、3-メチル-4-ニトロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2,5-ジクロロフェノール、1-ナフトール、2-ナフトール)を分析対象とした。被験者の尿 5 ml に内部標準 (IS) 溶液(ジイソプロピルホスフェートの 0.5 mg/ml アセトニトリル溶液)3 μ l を添加後、濃塩酸 0.5 ml を加えて 30 分間加熱した(100 $^{\circ}$ C)。冷後 10 M 水酸化ナトリウム溶液 0.1 ml、硫酸アンモニウム 4 g を加え、固相抽出剤 Isolute ENV+ 100 mg を加えて、攪拌した後遠心分離した。水層を除き酢酸メチル 4 ml を加えて攪拌し、遠心分離後液層を分取した。アセトニトリル 2 ml を加えて抽出操作を繰り返し、得られた液層を合わせ、窒素気流中にて 0.5 ml に濃縮した。アセトニトリル 2 ml を加えて同様に 1 ml に濃縮した(2 回)。二亜硫酸ナトリウム 50 mg 及び N-(tert-ブチルジメチルシリル)-N-メチルトリフルオロアセタミド(MTBSTFA)30 μ l を加えて加熱した(90 $^{\circ}$ C、30 分)。冷後遠心分離し、液層を分取して濃縮乾固した。残渣にトルエン 0.15 ml を加え遠心分離し、上清を分析用試料とした。GC/MS の分析条件は以下の通り。装置; 島津製 GCMS-QP2010、注入量; 1 μ l、注入モード; スプリットレス(サンプリング 2 分)、カラム; DB-5ms(30 m \times 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m)、オープン; 70 $^{\circ}$ C(2 分)-10

/分- 280 $^{\circ}$ C、注入口温度; 280 $^{\circ}$ C、キャリアー; He(89.7 kPa)、全流量; 20.0 ml/分、カラム流量; 1.38 ml/分、インターフェース温度; 300 $^{\circ}$ C、イオン化モード; 電子衝撃イオン化モード、イオン化電圧・電流; 70 eV \cdot 60 μ A、イオン源温度; 200 $^{\circ}$ C、分析モード; SIM、定量・参照イオン(m/z); ジメチルホスフェート(183 \cdot 153), ジエチルホスフェート(211 \cdot 155), ジメチルチオホスフェート(199 \cdot 169), ジエチルチオホスフェート(227 \cdot 199), ジ-n-ブチルホスフェート(155 \cdot 267), ジフェニルホスフェート(307 \cdot 308), ビス(2-エチルヘキシル)ホスフェート(155 \cdot 213), 2-イソプロピル-6-メチル-4-ピリミジノール(209 \cdot 210), 3,5,6-トリクロロ-2-ピリジノール(254 \cdot 258), 3-メチル-4-(メチルチオ)フェノール(268 \cdot 196), 3-メチル-4-ニトロフェノール(267 \cdot 210), 2,4-ジクロロフェノール(219 \cdot 221), 2,5-ジクロロフェノール(221 \cdot 219), 1-ナフトール(258 \cdot 201), 2-ナフトール(201 \cdot 258)。

(2) トランスフルトリン、プロフルトリン及びメトフルトリンの尿中代謝物の同定

SD 系雄性ラット(9 週齢)の腹腔内に、オリーブ油に溶かしたトランスフルトリン、プロフルトリンまたはメトフルトリンをそれぞれ別々に単回投与(300 mg/kg)し、24 時間内に排泄される尿を採取した(1 群 3 匹)。尿中の代謝物を、塩酸で加水分解した後または加水分解せずに、酢酸エチルで抽出し、誘導体化(tert-ブチルジメチルシリル化またはトリメチルシリル化)した後または誘導体化せずに、GC/MS により分析した。各代謝物の保持時間及びマススペクトルを標準物質と比較して同定した。

(3) トランスフルトリン、プロフルトリン及びメトフルトリン尿中代謝物分析法の確立

上記(2)において同定された計 8 種の代謝

物 2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸(FB-Ac)、2,2-ジメチル-3-(1-プロペニル)-シクロプロパンカルボン酸(MCA)、4-メチル-2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸(CH3-FB-Ac)、3-(2,2-ジクロロビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパンカルボン酸(DCCA)、2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール(FB-AI)、4-メチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール(CH3-FB-AI)、4-メトキシメチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール(CH3OCH2-FB-AI)及び4-ヒドロキシメチル-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール(HOCH2-FB-AI)を分析対象とした。尿 2 ml に 0.35%-塩酸 0.48 ml、アセトン 40 μ l、酵素(スルファターゼ >50 単位 + α -グルクロニダーゼ >1500 単位)を加え、代謝物を加水分解した(37 $^{\circ}$ C、12 時間)。濃塩酸 0.1 ml、硫酸アンモニウム 2.4 g、IS 溶液(4-メトキシ-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアルコール + 4-メトキシ-2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸の各 5 mg/ml アセトン溶液)5 μ l を加えた後代謝物をトルエン 2 ml で 2 回抽出した。抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウム 1 g で脱水後 1.5 ml づつ分注し(2 本)、窒素気流中(60 $^{\circ}$ C)にて 1 ml に濃縮した。それぞれに MTBSTFA 30 μ l (カルボン酸の *tert*-ブチルジメチルシリル化) または N-トリメチルシリルイミダゾール 50 μ l + トリメチルクロロシラン 10 μ l (アルコールのトリメチルシリル化)を加え加熱(70 $^{\circ}$ C、30 分)した。冷後水洗(1 ml、2 回)し、無水硫酸ナトリウム 0.7 g で脱水して分析用試料とした。GC/MS の分析条件は以下の通り。装置、注入量、注入モード、カラム、キャリアー、全流量、カラム流量、イオン化モード、イオン化電圧・電流、イオン源温度、分析モード; 上記(1)における GC/MS 分析条件と同じ、オープン; 70 (2 分)-12 /分-280 $^{\circ}$ C、注入口温度; 250 $^{\circ}$ C、インターフェース温度; 290 $^{\circ}$ C、定量・参照イオン(*m/z*); FB-Ac(251・252), MCA(211・212),

CH3-FB-Ac(265・266), DCCA(265・267), FB-AI(237・238), CH3-FB-AI(251・252), CH3OCH2-FB-AI(281・282), HOCH2-FB-AI(339・340)。

(4) トランスフルトリンの曝露指標の確立

SD 系雄性ラット(9 週齢)の腹腔内にオリーブ油に溶かした一定量のトランスフルトリンを単回投与(26, 64, 160 及び 400 mg/kg、1 群 5 匹)後、定期的に一週間採尿した。上記(2)で同定された主要な 3 種の代謝物 FB-AI、FB-Ac 及び DCCA を上記(3)で確立された方法により定量し、その時間的推移を薬物力学的に解析(モーメント解析)した。

(5) プロフルトリンの曝露指標の確立

上記(4)と同様の手法を用いて、ラットにプロフルトリンを投与後、4 種の代謝物 CH3-FB-AI、CH3-FB-Ac、HOCH2-FB-AI 及び MCA の尿中排泄を解析した。

4. 研究成果

(1) 有機リン剤(殺虫剤、難燃剤)及び防虫剤の尿中代謝物分析法の確立

各代謝物は 22 分以内に検出され、尿中の他成分との分離も良好であった。検量線は、いずれも 0~200 μ g/L の尿中濃度において良好な直線性を示した。既知量の代謝物を添加した(各 2.0 μ g/L)プール尿(健康者数名から採取して混合した尿)を本法に従い分析し、定量値の標準偏差の 10 倍を定量下限としたところ 0.8~4 μ g/L であった。既知量の代謝物を添加したプール尿(各 200 μ g/L)を本法に従い分析し、各代謝物の回収率を算出したところ、概ね 80%以上であったが、ジメチルホスフェート及びビス(2-エチルヘキシル)ホスフェートでは 50%程度であった。したがって、プール尿に標準物質を添加し、検量線を作成する必要があると考えられた。既知量の代謝物を添加したプール尿(2, 20, 200 μ g/L)

を本法に従い分析し、相対標準偏差及び相対誤差を算出した(n=5)。すべての代謝物各濃度において 20%以下であり、再現性及び正確性は良好であった。既知量の代謝物を添加したプール尿(170 µg/L)を -20 °C において保存後、定期的に分析した。いずれの代謝物においても時間的な増減は見られず、尿試料は 1 ヶ月間冷凍保存可能であると考えられた。本法は、日常生活下の一般住民の有機リン剤及び防虫剤(ナフタレン、p-ジクロロベンゼン)への曝露量を把握するために十分適用できるものと考えられた。[発表論文]

(2) トランスフルトリン、プロフルトリン及びメトフルトリンの尿中代謝物の同定

トランスフルトリン投与ラットの尿中より 3 種(FB-AI、FB-Ac、DCCA)、プロフルトリンでは 4 種(CH₃-FB-AI、CH₃-FB-Ac、HOCH₂-FB-AI、MCA)、メトフルトリンでは 3 種(CH₃OCH₂-FB-AI、HOCH₂-FB-AI、MCA)の代謝物が同定された。いずれのラットの尿中からも投与したピレスロイド剤は検出されず、吸収されたピレスロイド剤の大部分は代謝されたのち尿中に排泄されると推定された。いずれもエステル結合の加水分解、酸化等の反応を受けたのち大部分は抱合体として排泄されることが示唆された。[発表論文]

(3) トランスフルトリン、プロフルトリン及びメトフルトリン尿中代謝物分析法の確立

各代謝物は 14 分以内に検出され、尿中の他成分との分離も良好であった。検量線は、いずれも 0~20 µg/ml の尿中濃度において良好な直線性を示した。既知量の代謝物を添加した(各 0.05 µg/ml)コントロール尿(各ピレスロイド剤を投与していないラットから採取した尿)を本法に従い分析し、定量値の標準偏差の 10 倍を定量下限としたところ 0.01~0.03 µg/ml であった。既知量の代謝物を添加したコントロール尿(各 20 µg/ml)を本

法に従い分析し、各代謝物の回収率を算出したところ、概ね 90%以上であったが、HOCH₂-FB-AI では 87%であった。したがって、正確な定量のためには、コントロール尿に標準物質を添加し、検量線を作成する必要があると考えられた。既知量の代謝物を添加したコントロール尿(0.05、1、20 µg/ml)を本法に従い分析し、相対標準偏差及び相対誤差を算出した(n=7)。すべての代謝物各濃度において 6%以下であり、再現性及び正確性は良好であった。既知量の代謝物を添加したコントロール尿(15 µg/ml)を -20 °C において保存後、定期的に分析した。いずれの代謝物においても時間的な増減は見られず、尿試料は 1 ヶ月間冷凍保存可能であると考えられた。本法は、ラットにおける 3 種のピレスロイド剤の尿中代謝物定量に十分適用できる方法であると考えられた。[発表論文]

(4) トランスフルトリンの曝露指標の確立

吸収されたトランスフルトリンの消失過程において最も重要な経路は尿中排泄であると示唆された。いずれの代謝物においても、投与量に対する尿中排泄率に、投与量による有意な差異は認められなかった(FB-AI 約 25%、FB-Ac 約 50%、DCCA 約 42%)。したがって、各代謝物の尿中排泄量は、広範なトランスフルトリン曝露濃度レベルにおいて、その吸収量に比例すると推定された。DCCA は他の多くのピレスロイド剤曝露時にも尿中に排泄されることが知られているが、FB-Ac 及び FB-AI はトランスフルトリンの特徴的な代謝物である。吸収されたトランスフルトリンの約半量は FB-Ac として尿中に排泄されることから、FB-Ac はトランスフルトリン曝露における最適な吸収量の指標となり得ると考えられた。[発表論文]

(5) プロフルトリンの曝露指標の確立

吸収されたプロフルトリンの消失過程に

において最も重要な経路は尿中排泄であると示唆された。MCA を除く 3 種の代謝物については、いずれも、投与量に対する尿中排泄率に、投与量による有意な差異は認められなかった(CH3-FB-AI 34-40%、HOCH2-FB-AI 15-17%、CH3-FB-Ac 3-4%)。したがって、これら代謝物の尿中排泄量は、広範なプロフルトリン曝露濃度レベルにおいて、その吸収量に比例すると推定された。HOCH2-FB-AI は他の家庭用ピレスロイド剤曝露時にも尿中に排泄されることが知られているが、尿中代謝物として CH3-FB-Ac、CH3-FB-AI を生じる家庭用殺虫剤等日常品はほとんど存在しないと考えられる。吸収されたプロフルトリンの 1/3 以上の量は CH3-FB-AI として尿中に排泄されることから、CH3-FB-AI はプロフルトリン曝露における最適な吸収量の指標となり得ると考えられた。[発表論文]

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Toshiaki Yoshida, Biomarkers for monitoring profluthrin exposure: Urinary excretion kinetics of profluthrin metabolites in rats, *Environmental Toxicology and Pharmacology* (印刷中)[査読有], DOI: 10.1016/j.etap.2014.03.019

Toshiaki Yoshida, Biomarkers for monitoring transfluthrin exposure: Urinary excretion kinetics of transfluthrin metabolites in rats, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 103-109 (2014) [査読有], DOI: 10.1016/j.etap.2013.11.011

Toshiaki Yoshida, Analytical method for urinary metabolites of the fluorine-containing pyrethroids metofluthrin, profluthrin and transfluthrin by gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 913-914,

77-83 (2013) [査読有], DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.11.025

Toshiaki Yoshida, Identification of urinary metabolites in rats administered the fluorine-containing pyrethroids metofluthrin, profluthrin, and transfluthrin, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94, 1789-1804 (2012) [査読有], DOI: 10.1080/02772248.2012.729838

Toshiaki Yoshida, Jin Yoshida, Simultaneous analytical method for urinary metabolites of organophosphorus compounds and moth repellents in general population, *Journal of Chromatography B*, 880, 66-73 (2012) [査読有], DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.11.018

[学会発表](計 3 件)

吉田俊明、ラットにおける含フッ素ピレスロイド剤メトフルトリン、プロフルトリン及びトランスフルトリンの尿中代謝物の同定と定量法、室内環境学会、2012、東京
吉田俊明、吉田 仁、一般住民における有機リン系化合物及び防虫剤の尿中代謝物の分析法、室内環境学会、2011、静岡

6. 研究組織

(1)研究代表者:

吉田 俊明 (YOSHIDA, Toshiaki)
大阪府立公衆衛生研究所・企画総務部・主任研究員

研究者番号: 0 0 2 0 1 8 5 6

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし