

尿中代謝産物分析に基づく  
フタル酸エステル曝露評価と健康影響評価  
～DEHPの女性ホルモンへの影響～

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 環境学専攻  
環境システムコース・環境健康システム学分野研究室

46758 藤巻可弓

指導教員 吉永淳助教授

# 目次

## 第1章 背景

### 1-1 はじめに

### 1-2 フタル酸エステル

#### 1-2-1 可塑剤について

#### 1-2-2 塩ビと可塑剤

#### 1-2-3 可塑剤の用途・生産量

### 1-3 フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)

#### 1-3-1 化学・物理的特性

#### 1-3-2 生体毒性

##### 1-3-2-1 一般毒性 (動物実験)

##### 1-3-2-2 発生・生殖毒性 (動物実験)

##### 1-3-2-3 ヒトへの影響

###### 1-3-2-3-1 体内動態

###### 1-3-2-3-2 健康影響

#### 1-3-3 曝露レベル

##### 1-3-3-1 食物経由の DEHP 摂取量の推定

##### 1-3-3-2 尿中代謝産物濃度からの DEHP 摂取量の推定

### 1-4 女性ホルモン

#### 1-4-1 はじめに

#### 1-4-2 卵巣におけるエストロジェンの産生、分泌、代謝

#### 1-4-3 エストロジェンの生理作用

#### 1-4-4 月経周期におけるエストロジェンの変動と測定値

## 第2章 尿分析に基づく日本人の DEHP 曝露評価

### 2-1 はじめに

### 2-2 方法

#### 2-2-1 尿のサンプリング

##### 2-2-1-1 被験者

##### 2-2-1-2 サンプル

#### 2-2-2 実験方法

##### 2-2-2-1 採尿用器具からの溶出試験

##### 2-2-2-2 試薬

##### 2-2-2-3 器具および装置

##### 2-2-2-4 分析操作

###### 2-2-2-4-1 クレアチニン測定

- 2-2-2-4-1-1 Jaffe 法について
- 2-2-2-4-1-2 分析手順
- 2-2-2-4-2 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定
- 2-2-2-4-2-1 分析手順

## 2-3 結果

- 2-3-1 採尿用器具からの溶出
- 2-3-2 尿分析の測定精度
  - 2-3-2-1 検出下限
  - 2-3-2-2 再現性
  - 2-3-2-3 回収率
- 2-3-3 尿中 DEHP 代謝産物濃度
- 2-3-4 尿中 DEHP 代謝産物濃度から推定した DEHP 摂取量

## 2-4 考察

# 第3章 尿分析に基づく DEHP 健康影響評価～DEHP の女性ホルモンへの影響～

## 3-1 はじめに

## 3-2 方法

- 3-2-1 尿のサンプリング
  - 3-2-1-1 被験者
  - 3-2-1-2 サンプル
- 3-2-2 実験方法
  - 3-2-2-1 採尿用器具からの E1・E2 溶出試験
  - 3-2-2-2 試薬
    - 3-2-2-2-1 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定
    - 3-2-2-2-2 尿中 E1・E2 濃度測定
  - 3-2-2-3 器具および装置
    - 3-2-2-3-1 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定
    - 3-2-2-3-2 尿中 E1・E2 濃度測定
  - 3-2-2-4 分析手順
    - 3-2-2-4-1 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定
    - 3-2-2-4-2 尿中 E1・E2 濃度測定

## 3-3 結果

- 3-3-1 採尿用器具からの E1・E2 溶出試験
- 3-3-2 尿分析の測定精度（尿中 E1・E2 濃度測定）
  - 3-3-2-1 検出下限
  - 3-3-2-2 再現性

3-3-2-3 回収率

3-3-2 尿中 DEHP 代謝産物濃度

3-3-3 尿中 DEHP 代謝産物濃度から推定した DEHP 摂取量の推定

3-3-4 尿中 DEHP 代謝産物濃度の個人内・個人間変動

3-3-5 尿中 E1・E2 濃度

3-4 考察

## 第 4 章 結言

4-1 3種の尿中 DEHP 代謝産物濃度測定方法の確立

4-2 成人女性の DEHP 曝露評価

4-3 尿分析に基づく DEHP 健康影響評価～DEHP の女性ホルモンへの影響～

4-4 今後の方針

## 参考文献

## 謝辞

## Appendix A

1. MEHP、MEOHP、MEHHP 標準溶液の MRM クロマトグラム

2. 尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP の MRM クロマトグラム

## Appendix B

1. E1、E2 標準溶液の MRM クロマトグラム

2. 尿中 E1、E2 の MRM クロマトグラム

## Appendix C 学会発表資料

1. 第 14 回環境化学討論会

2. 第 8 回環境ホルモン学会

# 第1章 背景

## 1-1 はじめに

この論文では、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (以下 DEHP) のヒトの曝露レベルと性ホルモンへの影響について調べる。

DEHPをはじめとするフタル酸エステル類は、プラスチックの可塑剤として用いられており、われわれの生活環境の中に広く用いられている化学物質である。急性毒性が低いことから、長い間、生体に無害であると考えられて大量に生産・使用されてきたが、最近になって環境ホルモン作用が問題となり、環境省の SPEED'98 にもリストアップされた。

これまで動物実験で DEHP の毒性の様々な側面が調べられてきた。成熟メス動物への影響についても明らかとなってきた。しかしながらヒトの生殖影響に関するデータはほとんどないばかりではなく、ヒトが日常的にどれだけ DEHP に曝露しているのかさえ実はあまり調査が行われていない。そこで、本研究では、ヒトの曝露レベルについて尿中代謝産物濃度測定に基づき摂取量を推定し、個人間・個人内の摂取量変動について考察した後、成人女性の女性ホルモンレベルの変動と DEHP の曝露との関連を調べることにした。

## 1-2 フタル酸エステル

### 1-2-1 可塑剤について (可塑剤工業会, 2004)

可塑剤とは、プラスチックやゴムに添加して柔軟性を与え、加工性を改良する物質である。可塑剤には多くの種類があるが、その中でも主要なものがフタル酸エステル類である。フタル酸エステルは、無水フタル酸とアルコールとの化学反応により合成される。この反応をエステル化反応と呼ぶ。

可塑剤の製造工程は、無水フタル酸とアルコールを触媒のもとで反応(エステル化)させ、その後苛性ソーダで中和してから水で洗浄し、これを蒸留して過剰なアルコールを回収し、最後に精製・ろ過するというものである (Fig. 1)。

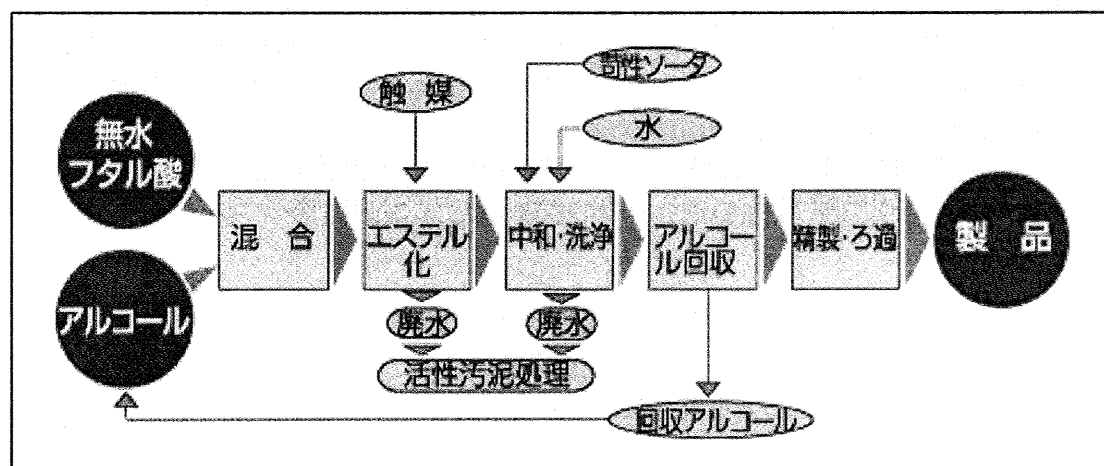


Fig. 1 フタル酸エステル類の製造工程

## 1-2-2 塩ビと可塑剤（可塑剤工業会, 2004）

可塑剤は主に、ポリ塩化ビニル（以下、塩ビ）を中心としたプラスチックを軟らかくするために用いられ、そのほとんどが酸とアルコールから合成される化合物（一般にエステルといわれるもの）である。塩ビは常温では硬い樹脂であるが、これを加熱すると、互いに引きつけ合う力よりも分子の運動量のほうが大きくなり、分子間の距離が広がり、“軟らかい”状態になる。その状態の時に可塑剤の分子を入り込ませると（Fig. 2）塩ビ分子の接近が妨げられ、冷却して常温に戻っても“軟らかい”状態を保つことができるようになる（可塑化）。塩ビの分子は、プラス、マイナスといった電氣的に偏りがある性質（極性）を持っている。一方、可塑剤の分子はプラス、マイナスを持つ極性部と持たない非極性部とに分けられる。そして、塩ビと可塑剤はこの極性部で電氣的に結びつき、しかも非極性部が塩ビ分子相互の間隔を広げて軟らかさを保っている（Fig. 3）。

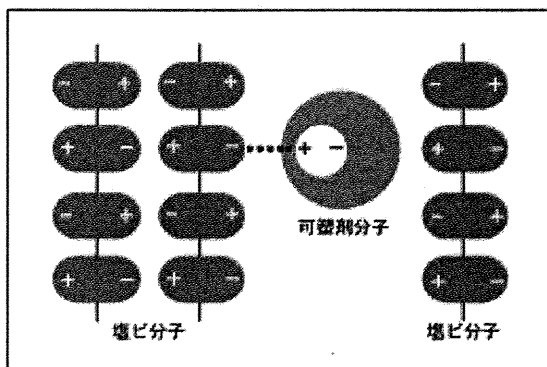


Fig. 2 塩ビと可塑剤分子

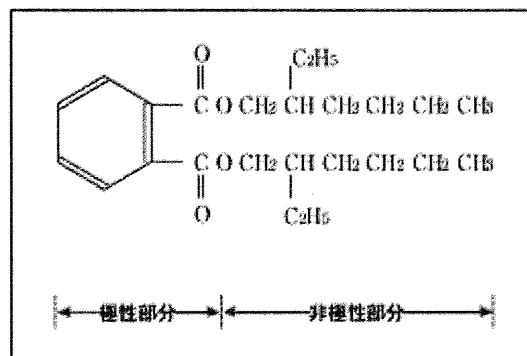


Fig. 3 DEHP の構造式

## 1-2-3 可塑剤の用途・生産量（可塑剤工業会, 2004）

軟質塩ビは耐久性、柔軟性、経済性等の特長をいくつも合わせ持ち、優れた加工性によって多様に変化できるため、他の物質ではまねのできないほどに各種の製品を生み出してきた。フタル酸エステルは、そうした軟質塩ビ製品の最も重要な成分として、生活の中のいろいろな場面で役立っている（Fig. 4）。可塑剤には数多くの種類があるが、その中でも特に優れた 20～30 種類の可塑剤が一般的に使用されており、その主要なものがフタル酸エステルである。その中でも特に DEHP は代表的な汎用可塑剤として広く使われており、その生産量はフタル酸エステルの 60% 以上（全可塑剤のおよそ半分）を占め（Fig. 5）、我が国における 2005 年の DEHP 生産量は 20 万トン強である。

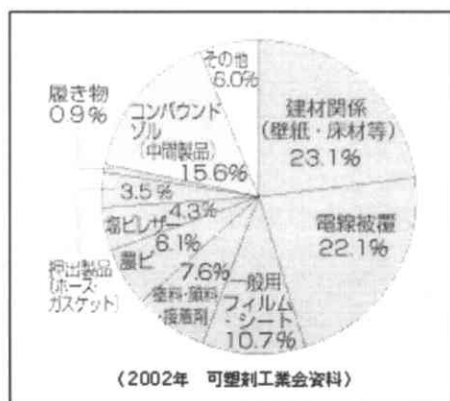


Fig. 4 フタル酸エステルの用途別構成比

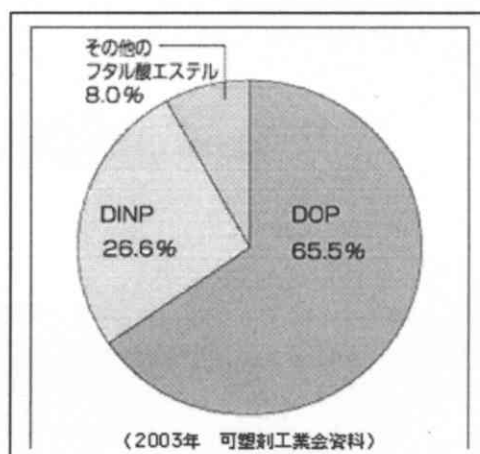


Fig. 5 フタル酸エステルに占める DOP (DEHP) の割合

## 1-3 フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)

### 1-3-1 化学・物理的特性

Table 1 (中西ら, 2005) に示した通りである。

Table 1 DEHP の物理化学的性状

分子量	390.56
外観	無色粘稠性液体
融点	-50 °C (IPCS, 2002) 、 -55 °C (HSDB, 2001)
沸点	385 °C (IPCS, 2002) 、 約 230 °C (7 hPa) (IUCLID, 2000)
引火点	215 °C (o.c.) (IPCS, 2002)
発火点	350 °C (IPCS, 2002)
爆発限界	0.1 % (下限) (IPCS, 2002)
比重	0.9861 (HSDB, 2001)
蒸気密度	13.46 (空気=1)
蒸気圧	0.304×10 <sup>-4</sup> Pa (2.28×10 <sup>-7</sup> mmHg) (20 °C) (環境庁環境化学物質研究会、1998) 0.16 kPa (1.2 mmHg) (200 °C) (環境庁環境化学物質研究会、1998)
分配係数	log K <sub>ow</sub> ; 7.60 (実測値) 、 8.39 (KOWWIN ver. 1.67 推定値) (U.S.EPA, 2004)
加水分解性	水中で加水分解を受けてフタル酸と 2-エチルヘキサノールを生じる。 加水分解半減期 ; 5.3 年 (pH7、25 °C、HYDROWIN ver. 1.67 推定値) (U.S. EPA, 2004) 、 195 日 (pH7、25 °C、HYDROWIN ver. 1.67 推定値) (U.S. EPA, 2004)
解離定数	解離基なし
スペクトル	主要マススペクトルフラグメント m/z 149 (基準ピーク : 1.0) 、 57 (0.32) 、 113 (0.10) 、 279 (0.07) (NIST, 2002)
吸脱着性	文献なし
粒度分布	該当せず
溶解性	水 ; 0.0006~1.3 mg/L
換算係数	1 ppm=16.24 mg/m <sup>3</sup> (気体、20 °C) 、 1 mg/m <sup>3</sup> =0.062 ppm (気体、20 °C)



## 1-3-2 生体毒性

### 1-3-2-1 一般毒性（動物実験）

・ Moore et al., 1996

F344 ラット、オス・メス各 70~85 匹/群を用いて、オスには 0、5.8、28.9、146.6、789 mg/kg/day、メスには 0、7.3、36.1、181.7、938.5 mg/kg/day を 104 週間混餌投与したところ、オスでは 146.6、メスでは 181.7 mg/kg/day で腎臓の絶対・相対重量の増加がみられた。これにより、NOAEL をオスは 28.9 mg/kg/day、メスは 36.1 mg/kg/day とした。

・ Poon et al., 1997

SD ラット、オス・メス各 10 匹/群を用いて、オスには 0、0.4、3.7、38、375 mg/kg/day、メスには 0、0.4、42、419 mg/kg/day を 90 日間混餌投与したところ、38 mg/kg/day 投与でオスにおいて精巣セルトリ細胞空胞化がみられた。これにより、NOAEL を 3.7 mg/kg とした。

・ David et al., 2000a

F344 ラット、オス・メス各 60、65 あるいは 70 匹/群を用いて、オスには 0、5.8、29、147、789 mg/kg/day、メスには 0、7.3、36、182、939 mg/kg/day を 104 週間混餌投与したところ、29 mg/kg/day でオスにおいて精子形成欠如がみられた。これにより NOAEL を 5.8 mg/kg/day とした。

### 1-3-2-2 発生・生殖毒性（動物実験）

・ Lamb et al., 1987

CD-1 マウス（11 週齢）、オスメス 20 組を用いて、0、14、141、425 mg/kg/day を 105 日間（交配前 7 日と 98 日の交配期間中）、混餌投与したところ、141 mg/kg/day で妊娠率の低下、同腹中の生存仔数の減少がみられた。これにより NOAEL は 14 mg/kg/day とした。

・ Tyl et al., 1988

CD-1 マウス、30 匹/群を用いて、0、44、91、191、293 mg/kg/day を妊娠 0~17 日に混餌投与したところ、91 mg/kg/day で骨格、内臓、外表に奇形がみられた。これにより、NOAEL は 44 mg/kg/day とした。

・ Arcadi et al., 1998

Long Evans ラット、オスメス各 70~85 匹/群を用いて、3.0~3.5 mg/kg/day あるいは 30~35 mg/kg/day を妊娠 1~21 日に摂水投与したところ、3.0~3.5 mg/kg/day で仔において精巣相対重量の減少、肝相対重量の増加、精巣の組織病理学的変化がみられた。これにより LOAEL は 3.5 mg/kg/day とした。

### 1-3-2-3 ヒトへの影響

#### 1-3-2-3-1 体内動態

摂取された DEHP は様々な体内組織中に存在する加水分解酵素（リパーゼ）により MEHP と 2-エチルヘキサノールに分解される。特に、膵臓に最も高レベルで存在するリパーゼ等の消化酵素を含む膵液が消化管に分泌されるため、消化管内で DEHP は容

易に加水分解される。げっ歯類では、消化管でリパーゼにより DEHP は急速に加水分解され、MEHP として吸収される (Pollack et al., 1985)。ヒトへの投与試験では、DEHP は体内で MEHP、5carboxy-MEPP、MEOHP および MEHHP 等に変換され、それぞれ尿中に排泄された全代謝産物の 9.6、29.7、21.9 および 29.4 % を占めることを報告している (Schmid et al., 1985)。また、彼らは DEHP をヒトに単回投与 (30 mg) または連続投与 (10 mg/day、4 日間) したところ、単回投与試験での投与量 30 mg の 11~15 % が尿中に代謝産物として排泄されており、投与後 24 時間以内に尿中に排泄された代謝産物の約 35 % が未抱合体であったと報告している (Schmid et al., 1985)。さらに、連続投与試験から吸収率は 15~25 % と推定されている (Huber et al., 1996)。また、Huber et al. (1996) は、ヒトにおいては尿中代謝産物の 65~80 % をグルクロン酸抱合体が占めると報告している。また、DEHP の半減期は約 12 時間と報告されている (Schmid et al., 1985)。

### 1-3-2-3-2 健康影響

経口および経皮曝露に伴う DEHP のヒトへの健康影響に関する情報は無い。

## 1-3-3 曝露レベル

### 1-3-3-1 食物経由の DEHP 摂取量の推定

Table 2 では外海ら (2000) による市販弁当、定食および病院給食中の DEHP 濃度をまとめた。全ての検体において DEHP が検出され、各媒体での最大値は市販弁当、定食および病院給食においてそれぞれ 8,930 (2000 年度は 517)、304 および 4,400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。

Table 2 モニタリングデータ：食物 (市販弁当・定食・病院給食)

	測定年度	検出数	検体数	最小値 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	最大値 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	平均値 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
市販弁当	1999	10	10	803	8,930	4,420
	2000 <sup>1)</sup>	10	10	45	517	198
定食	1999	10	10	12	304	68
病院給食						
V 病院	1999	21	21	42	1,820	384
W 病院	1999	21	21	10	271	46
X 病院	1999	21	21	25	4,400	478

### 1-3-3-2 尿中代謝産物濃度からの DEHP 摂取量の推定

Kohn et al. (2000) はヒトの尿中 MEHP 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{g cre}$ ) から DEHP 摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) を推定するための換算式を構築し、Blount et al. (2000b) が報告した Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) 対象者の一部である 289 名のアメリカ人の DEHP 摂取量を中央値 0.71  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と推定した。さらに、Koch et al. (2003) は 85 名のドイツ人を対象に、Itoh et al. (2005) は 35 名の日本人を

対象に、DEHP 摂取量をそれぞれ 10.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、0.37- 7.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  (中央値 1.80  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) と推定している。なお、Kohn et al. (2000) が構築した換算式の詳細は第 3 章の 3-3-4 に記載してある。

## 1-4 女性ホルモン

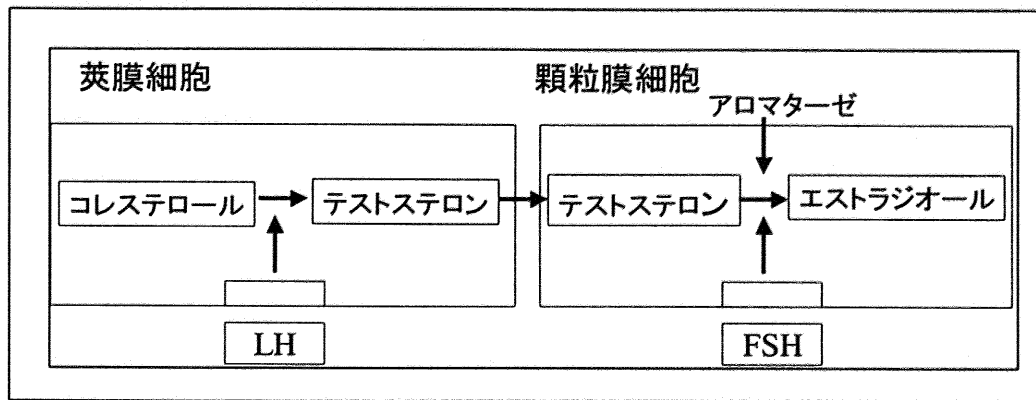
### 1-4-1 はじめに

女性ホルモンには卵胞ホルモン (エストロジェン) と、黄体ホルモン (プロゲステロン) があり、いずれも主として卵巣で産生されるステロイドホルモンであるが、他に胎盤で、または少量ではあるが副腎、精巣でも産生される。また、エストロジェンは卵巣から産生されるホルモンのなかで検査、生理作用、治療上、最も重要なホルモンである。

### 1-4-2 卵巣におけるエストロジェンの産生、分泌、代謝 (図説産婦人科 VIEW)

エストロジェンにはエストロン (以下 E1)、エストラジオール (以下 E2)、エストリオール (以下 E3) があり、分子量はそれぞれ 270、272、288 である。エストロジェンは卵巣の顆粒膜細胞でアロマターゼによりアンドロゲンから転換され産生される。コレステロールからプロゲステロンを経てアンドロゲンまでの経路は、莖膜細胞において主に下垂体から分泌される黄体化ホルモン (以下 LH) により制御されており、その後の転換酵素であるアロマターゼの活性は顆粒膜細胞において、主に、下垂体からの卵胞刺激ホルモン (以下 FSH) により制御されている (Fig. 6)。

卵巣から分泌される時は主にエストラジオールの形で、一部がエストロンになっている。血液中ではエストラジオールはエストロンと平衡しており、代謝されるとエストリオールになる。作用はエストラジオールが最も強く (エストロンの 10 倍)、エストリオールが最も弱い (エストロンの 1/5)。代謝は肝臓で行なわれ、硫酸やグルクロン酸で抱合された誘導体となり、尿中に排泄されるのはエストラジオールの代謝産物である。



**Fig. 6** 卵胞期におけるエストロゲン産生

性ステロイドホルモンは血中から取り込まれたコレステロールから合成される。コレステロールはまず莢膜細胞に取り込まれ、そこでアンドロゲンに転換される。この反応に必要な酵素は莢膜細胞に存在する LH 受容体到下垂体からの LH が作用することにより誘導される。この反応を芳香化と呼ぶ。芳香化に必要な酵素は顆粒膜細胞に存在する FSH 受容体に FSH が作用することにより誘導される。産生されたエストロゲンは顆粒膜細胞の FSH 受容体をさらに誘導し、その結果、発育卵胞では FSH に対する反応性がますます亢進することにより、顆粒膜細胞でのエストロゲンの産生は加速度的に増加する。

LH：黄体化ホルモン、FSH：卵胞刺激ホルモン

### 1-4-3 エストロジェンの生理作用（図説産婦人科 VIEW）

エストロジェンの作用する最大の標的臓器は生殖器である。子宮、膣、外陰部、卵管、乳房などの臓器にエストロジェンのレセプターが存在し、エストロゲンが作用することを示している。例えば、エストロゲンが子宮の筋層に作用し子宮を発育させるし、子宮内膜を増殖させ、子宮としての機能を発揮させる。

エストロジェンの第2の作用は視床下部-下垂体からのゴナドトロピン系分泌を制御することである。通常エストロゲンが増加すれば正のフィードバック作用によりゴナドトロピン系分泌は抑制され、減少すれば負のフィードバック作用により促進される。月経周期で見れば、卵胞期に FSH により卵胞の発育、エストロゲン分泌増加がゴナドトロピン系分泌を制御するが、排卵前になればエストロゲンはピークに達した後やや減少することにより LH、FSH が増加し、排卵を誘発することになる。

エストロゲンは、生殖器以外の自律神経、皮膚、脂肪、血管、骨に対しても重要な作用がある。まず、エストロゲンは自律神経を安定させるので、閉経などによりエストロゲンが欠乏すれば自律神経失調症となる。さらに、エストロゲンは皮膚のコラーゲン量、水分貯留などに働き皮膚を若々しく保ち、脂肪代謝を介して血管を強くし、骨塩量を増加させ骨を強くする作用がある。

### 1-4-4 月経周期におけるエストロジェンの変動と測定値（図説産婦人科 VIEW）

エストロゲンは月経周期内（卵胞期・排卵期・黄体期）で卵胞の状態とともに変動し、月経異常の場合は異常の程度に比例して低値となる。通常、月経周期において

は E2 と E1 はほぼ平行して変動し、E3 はほとんど分泌されない。月経周期の長さは人によってかなり異なるが、月経第 1 日から次の月経が始まる日までは平均して 28 日間である。一般に周期中の日は月経の最初の日を第 1 日として数え、数字で表わされる。正常月経周期の E2 変動パターン (Fig. 7) と血中および尿中 E2 濃度 (Table 3) を示す。また、既往の研究から血中 E2 濃度と尿中総エストロゲン濃度の間には相関がある (高橋ら, 1988) ことや血中 E2 濃度と尿中 E1 濃度の間にも相関があることが報告されている (Kesner JS., 1992)。

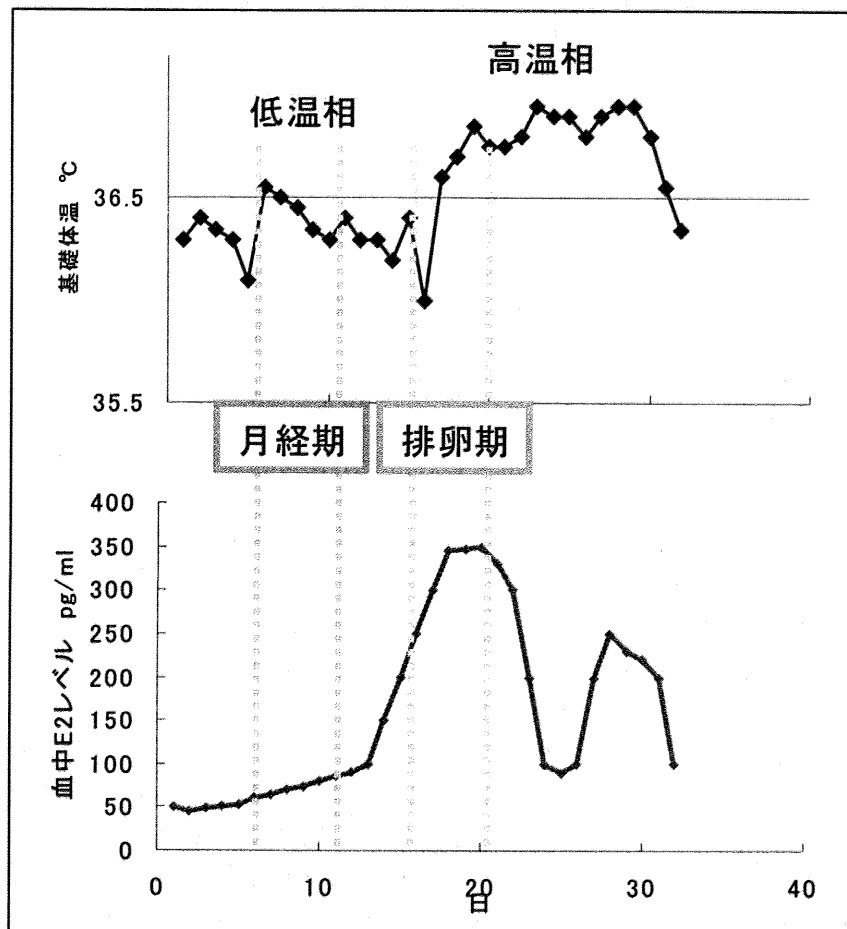


Fig. 7 月経周期に伴う基礎体温と血中 E2 レベルの変化

Table 3 月経周期における血中および尿中 E2 濃度

	血中 E2 濃度 (pg/ml)	尿中 E2 濃度 (ng/ml)
卵胞期前期	11~ 82	—
卵胞期後期	52~ 230	—
排卵期	120~ 390	65~ 75 以上
黄体期	9~ 230	—

## 第2章 尿分析に基づく日本人の DEHP 曝露評価

### 2-1 はじめに

かつて内分泌攪乱物質の一つとされていた DEHP は、塩化ビニル（以下、塩ビ）など各種プラスチック類の可塑剤として大量に生産・使用されているために、人体へ比較的高レベルの曝露が起こりうる可能性があり、健康影響が懸念される。最近詳細なリスク評価がされたが（中西ら, 2005）、ヒトを対象とした健康影響調査はこれまで十分に行なわれていない。

一般に、ある化学物質のヒトへの健康影響を評価するうえで、その化学物質への曝露評価は必要不可欠である。塩ビをはじめとするプラスチック類がわれわれの生活環境中に広く使用されている事実を考慮すると、ヒトの DEHP 曝露レベルは高い可能性がある。1999 年、外海ら（2000）は市販弁当、定食および病院給食中の DEHP 濃度を調査し、各媒体での最大濃度はそれぞれ 8,930、304、4,400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり、このような市販弁当や病院給食を摂取した場合、EU の耐容一日摂取量（TDI: 37  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）を上回ることを報告した。これらの汚染原因を調査した結果、食品製造工程で使われていた塩ビ製手袋から溶出した DEHP が主たる原因と判明したため、2000 年 6 月厚生省は DEHP の暫定耐容一日摂取量を 40~140  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と定めるとともに、DEHP を含有する塩ビ製手袋の食品への使用自粛通知を出した（厚生省, 2000）。しかし各種プラスチック類への添加剤としての用途を考えると、必ずしも食物だけでなく、さまざまな生活用品からの曝露も無視できない可能性がある。しかし、これまで日本国内における DEHP の曝露評価（Tsumura et al., 2001、Tsumura et al., 2003）はきわめて数が限られている上に、トータルダイエットの分析など、食物中レベルの測定に基づくもののみであり、ヒトの総摂取量あるいは internal dose に関する報告はごく最近になるまでなかった（Itoh et al., 2005）。しかしわれわれの生活にプラスチックが氾濫している現状と DEHP 等フタル酸エステル類の用途を考えると、必ずしも食物だけでなく、各種 consumer product からの曝露（Hirayama et al., 2001）や室内空気からの曝露（Otake et al., 2004）も決して無視することができない場合がある。しかし最近になって尿中フタル酸エステル類代謝産物の分析法が報告された（Silva et al., 2003）ことによりバイオマーカーを用いた包括的な曝露評価が可能になった。さらに、食物中 DEHP レベルをもとにした曝露評価では、DEHP が環境中に遍在することから、食物類の DEHP 測定操作段階における汚染による摂取量の過大評価が懸念されていたが、分析操作における汚染の可能性がほとんどない尿中代謝産物排泄量を用いることで、そうした技術的な懸念なしに、実際にヒトが取り込んだ DEHP 量を評価することが可能である点も代謝産物に基づく生物モニタリングの利点である。しかし、これまで我が国においては総合的な DEHP 摂取レベルを尿中代謝産物排泄レベルから推定するという研究は限られており（Itoh et al., 2005）、また測定している代謝産物も DEHP 代謝産物の一つであるフタル酸モノエチルヘキシル（以下 MEHP）のみにとどまっている。また、これまで行なわれている尿中 DEHP 代謝産物の分析例をみると全てスポット尿を用いている。しかし、DEHP は生物学的半減期の短い物質であることから、スポット尿を用いた分析の場合、摂取と採尿のタイミングのずれによって、尿中濃度の個人間変動が大きいと考えられる。よって、スポット尿を用いて個人の日常的な曝露レベルを把握するには、DEHP 一日排泄量の個人内（日間）変動を評価した上で、摂取量の推計を行なうことも必要である。一方で、実験動物やヒトへの投与試験から、DEHP の体内動態が明らかにされつつある。ヒトにおいては DEHP は主に MEHP、フタル酸 2-エチル-5-カ

ルボキシルペンチル（以下 5carboxy-MEPP）、フタル酸 2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル（以下 MEHHP）、2-エチル-5-オキシルヘキシル（以下 MEOHP）等に変換されることから、本研究では DEHP の尿中代謝産物である MEHP、MEHHP、MEOHP 濃度の定量法を確立し、代謝産物の尿中排泄レベルから日本人の DEHP 曝露レベルを推定することを第一の目的とした。

## 2-2 方法

### 2-2-1 尿のサンプリング

#### 2-2-1-1 被験者

2003 年 6～10 月の期間中、都内某病院の産婦人科を定期検診で受診し、担当医師から本調査の目的、方法等の説明を受け、尿提供の同意の得られた 42 名の妊婦を対象とした。

#### 2-2-1-2 サンプル

尿提供を口頭で同意した対象者について、一般尿検査用に採取されたスポット尿の残りをサンプルとした。受診時検査用に採取され、検査が終わった尿を病院の検査部において 50 ml ポリプロピレン製ボトル（アズワン製）に分注し、一時冷凍保存した。その後、保存サンプルを解凍し、尿中 DEHP 代謝産物濃度測定用・尿中クレアチニン濃度測定用に 15 ml ポリプロピレン製スピッツ（イワキ製）に分注し、測定まで再度冷凍保存した。採尿器具として用いたポリプロピレン製ボトル、ポリプロピレン製スピッツはいずれも中性洗剤で洗浄後、水道水、超純水の順ですすぎ、乾燥させ、メタノールで洗浄したものを使用した。

## 2-2-2 実験方法

### 2-2-2-1 採尿用器具からの溶出試験

本調査の尿サンプリングに使用した採尿カップ、ポリプロピレン製ボトル、ポリプロピレン製スピッツからの DEHP 代謝産物汚染を調べた。容器類はそれぞれストックの中からランダムに 3 検体を選び、採尿カップとポリプロピレン製ボトルには 25 ml の、ポリプロピレン製スピッツには 10 ml のアセトンを入れ約 1 時間室温に放置した。試験後のアセトン中 DEHP 代謝産物溶出量は HPLC/MS/MS を用いて定量した。

### 2-2-2-2 試薬

MEHP の標準品（純度：99.3 %）は林純薬社製を使用した。MEOHP（>98 %）、MEHHP（>98 %）の標準品および内標準物質として用いた MEHP（99 %）、MEOHP（99 %）および MEHHP（99 %）の 13C4 体（全て 100  $\mu$ g/ml）は Cambridge Isotope Laboratories 製を使用した。 $\beta$ -グルクロニダーゼ（200 units/ml、E. coli K12）は Roche Diagnostics 社製を使用した。アセトニトリル（>99.8 %、高速液体クロマトグラフ用特製試薬）、ギ酸（>98 %、試薬特級）はナカライテスク社製を、アンモニア水（25-

28%、有害金属測定用)、酢酸アンモニウム (>97 %、試薬特級)、クレアチニン濃度測定にはクレアチニン-テストワコーキット (和光純薬) を使用した。尿サンプルの前処理には Waters 社製の固相抽出カートリッジ (OASIS-MAX 150mg/6 cc) を使用した。

### 2-2-2-3 器具および装置

遠沈管やピーカーなどのガラス器具は、洗剤で超音波洗浄後、超純水ですすぎ、メタノール洗浄し、乾燥させ、400℃で4時間加熱したものを使用した。メスシリンダーやメスフラスコなどの熱をかけることのできないものは、2.2のサンプル採取用容器と同様の方法で洗浄、乾燥後、メタノールで洗浄したものを使用した。

高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (HPLC/MS/MS) は、質量分析計は Micromass 社製 Quattro Ultima、HPLC は Agilent Technologies 社製 HP1100 を使用した。測定条件を Table 4-6 に示した。質量分析計や HPLC の測定条件は Blount et al.

(2000) や Silva et al. (2003) の報告をもとに測定条件の最適化を行なった。クレアチニン濃度の測定には日本分光社製 CV-500 を使用した。



**Table 4** 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定における HPLC 測定条件

HPLC	Agilent 1100 (Agilent Technologies)				
Column	Inertsil ODS-3 5 $\mu$ m (2.1 $\times$ 50 mm, GL Sciences, Japan)				
Column Temperature	30 $^{\circ}$ C				
Gradient Program					
Time (min)	0	5.0	15.0	15.2	19.0
%A	90	0	0	90	90
%B	10	100	100	10	10
Mobile phase	A: 0.1 % acetic acid in water, B: 0.1 % acetic acid in acetonitrile				
Flow Rate	0.2 ml/min				
Injection Volume	10 $\mu$ l				

**Table 5** 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定における MS 測定条件

Mass spectrometer	Quattro- Ultima (MICROMASS, UK)
Ionization	Electrospray
Mode	Multiply Reaction Monitoring
Polarity	Negative
Source Temperature	130 $^{\circ}$ C
Desolvation Temperature	300 $^{\circ}$ C

**Table 6** MEHP、MEOHP、MEHHP の MRM (Multiply Reaction Monitoring) 分析

	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Retention time (min)	Cone (V)	Capillary (kV)
MEHP	277	134	7.55	40	2.2
$^{13}$ C <sub>4</sub> - MEHP	281	137	7.53	40	2.2
MEOHP	293	121	6.22	40	2.2
$^{13}$ C <sub>4</sub> - MEOHP	297	124	6.19	40	2.2
MEHHP	291	121	6.33	40	2.2
$^{13}$ C <sub>4</sub> - MEHHP	295	124	6.29	40	2.2

## 2-2-2-4 分析操作

### 2-2-2-4-1 尿中クレアチニン濃度測定

尿中クレアチニン排泄量は、主として筋肉のクレアチン総量(筋の総量)に比例し、成人では体重 kg 当たりほぼ一定で、食事性因子や尿量などにほとんど影響されない。このことから、今回のサンプルはスポット尿であるため、尿量を補正するために、HPLC/MS/MS 法で尿中 DEHP 代謝産物濃度を Jaffe 法で測定した尿中クレアチニン濃度で補正する。

#### 2-2-2-4-1-1 Jaffe 法について

試料に除蛋白試薬を加えて遠沈後、上澄みを分離する。この上澄みにピクリン酸を作用させると、試料中のクレアチンはアルカリ溶液中でピクリン酸と反応して赤色の縮合物を生じる (Jaffe 反応)。この赤色の吸光度を測定することにより試料中のクレアチニン濃度を求める。

#### 2-2-2-4-1-2 分析手順

尿試料 0.25 ml を採取し、超純水 4.75 ml を添加して 20 倍希釈したものを試料とした。この試料 0.5 ml に除蛋白試薬を添加した後、室温に 10 分間放置した後、2,500 rpm で 10 分間遠心分離にかけた。上澄み 2 ml を採取し、ピクリン酸ナトリウム 1 ml と 0.75 N 水酸化ナトリウム 1 ml を添加し、25~30 °C の水槽中で 20 分間放置した。最後に、吸光分光光度計 (520 nm) を用いて測定を行った。

### 2-2-2-4-2 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定

#### 2-2-2-4-2-1 分析手順

遠沈管に尿試料 1 ml をとり、内標準物質 (各々 300 µg/ml) 100 µl、酢酸アンモニウム (pH6.5) 250 µl と β-グルクロニダーゼ 5 µl を添加し、35~37 °C で 60 分間反応させ、DEHP 代謝産物のグルクロン酸抱合体を加水分解し、フリーの代謝産物とした。その後、アンモニア水 (pH8.0) 3 ml 添加し、あらかじめアセトニトリル 10 ml、精製水 5 ml でコンディショニングしておいた固相抽出カートリッジに通した。カートリッジを精製水 5 ml、アセトニトリル 5 ml で洗浄後、1 %ギ酸アセトニトリル 5 ml で溶出した。溶出液を窒素気流下で濃縮し、精製水 200 µl に再溶解したものを HPLC/MS/MS を用いて測定した。

## 2-3 結果

当初、Blount et al. (2000) の報告通りに前処理し、HPLC/MS/MS を用いて測定を行っていたが、測定を進めるにつれて著しい感度の低下がみられたことから、この方法では尿中夾雑物質を十分に除去することができないと考えた。そこで、吉村ら (2004) の報告している前処理方法を参考に固相抽出カートリッジ等を替えて前処理

し、測定したところ感度の低下がみられなくなり、後述するように尿中 DEHP 代謝産物濃度を測定するのに十分な回収率、検出下限、再現性が得られ、3種の尿中代謝産物分析による DEHP 曝露評価が可能となった。

### 2-3-1 採尿用器具からの溶出

いずれの容器からも DEHP 代謝産物は検出されなかった。

### 2-3-2 尿分析の測定精度

#### 3-3-2-1 検出下限

本研究で測定した検量線用標準液最低濃度 1 ng/ml のクロマトグラムの S/N をもとに算出したところ、尿中濃度に換算して表わすと MEHP が 0.01 ng/ml、MEOHP が 0.005 ng/ml、MEHHP が 0.005 ng/ml であった。

#### 2-3-2-2 再現性

尿サンプル前処理・測定のパッチごとに（計 6 パッチ）同一の尿サンプルを未知サンプルとともに入れ、本研究で用いた尿中 DEHP 代謝産物濃度測定の再現性を評価した。再現性は相対標準偏差（RSD、%）で表すと MEHP では 11 %、MEOHP では 7 %、MEHHP では 7 % であった。

#### 2-3-2-3 回収率

各代謝産物の既知量を尿に添加した後、通常操作を行って求めた回収率の平均値（ $n=5$ ）は、尿 1 ml に対し 30 ng 添加においては MEHP では  $96 \pm 7$  %、MEOHP では  $90 \pm 10$  %、MEHHP では  $90 \pm 2$  % であり、150 ng 添加においてはそれぞれ  $97 \pm 6$  %、 $91 \pm 4$  %、 $93 \pm 3$  % であった。

### 2-3-3 尿中 DEHP 代謝産物濃度

今回の対象者の尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度はそれぞれ 2.20- 29.5 ng/ml（中央値 9.50 ng/ml）、0.23- 61.5 ng/ml（中央値 9.96 ng/ml）、1.81- 31.2 ng/ml（中央値 8.63 ng/ml）（全て  $n=42$ ）であった。42 名の対象者のうち尿中クレアチニン濃度測定を行った 40 名に関して、前述の尿中 DEHP 代謝産物濃度を、各人の尿中クレアチニン濃度を用いてクレアチニン 1 g の排泄量あたりに換算したところ、それぞれ 3.27- 39.5  $\mu\text{g/g cre}$ （中央値 9.83  $\mu\text{g/g cre}$ ）、1.51- 41.0  $\mu\text{g/g cre}$ （中央値 10.4  $\mu\text{g/g cre}$ ）、4.60- 26.6  $\mu\text{g/g cre}$ （中央値 10.9  $\mu\text{g/g cre}$ ）（全て  $n=40$ ）であり、これらをヒストグラムで示したところ、対数正規分布に近似した分布となった（Fig. 8）。また、クレアチニン補正した尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度をモル換算すると、それぞれ 0.012- 0.14  $\mu\text{mol/g cre}$ （中央値 0.035  $\mu\text{mol/g cre}$ ）、0.0052- 0.14  $\mu\text{mol/g cre}$ （中央値 0.036  $\mu\text{mol/g cre}$ ）、0.015- 0.090  $\mu\text{mol/g cre}$ （0.037  $\mu\text{mol/g cre}$ ）となり、これらの間に有意な正の相関がみられた（Fig. 9）。

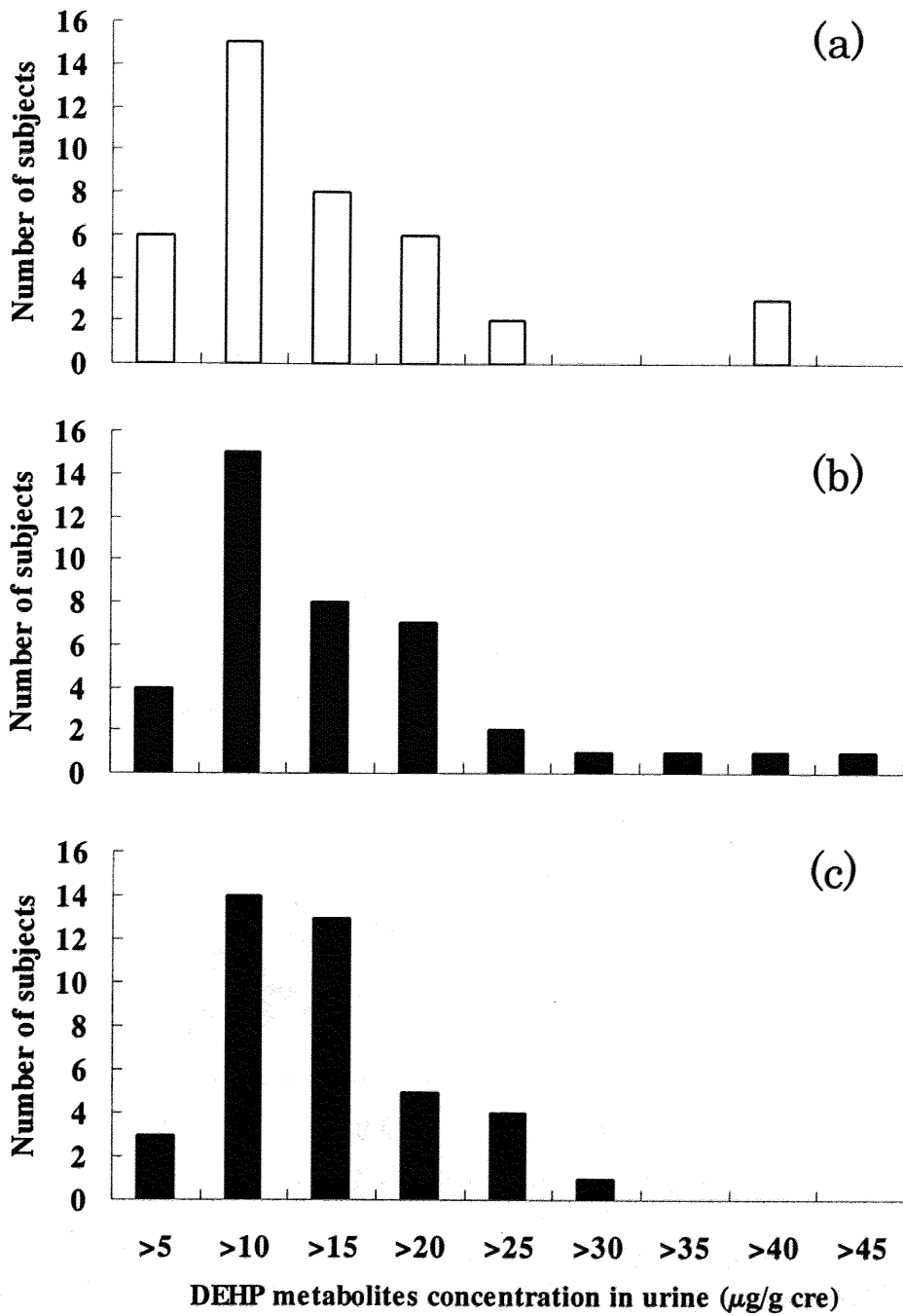


Fig. 8 対象者 40 名の尿中 DEHP 代謝産物濃度 (µg/kg) のヒストグラム  
 (a) 尿中 MEHP 濃度  
 (b) 尿中 MEOHP 濃度  
 (c) 尿中 MEHHP 濃度

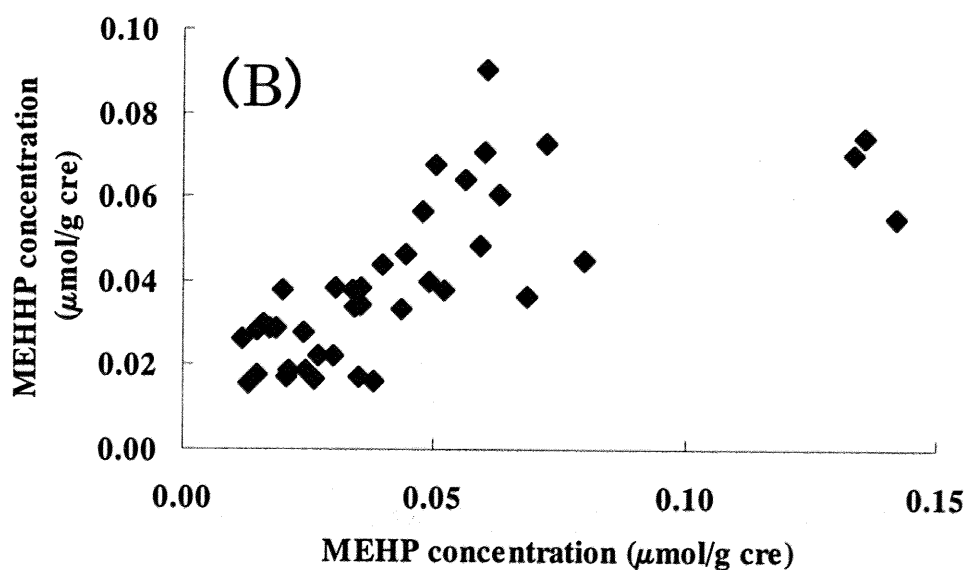
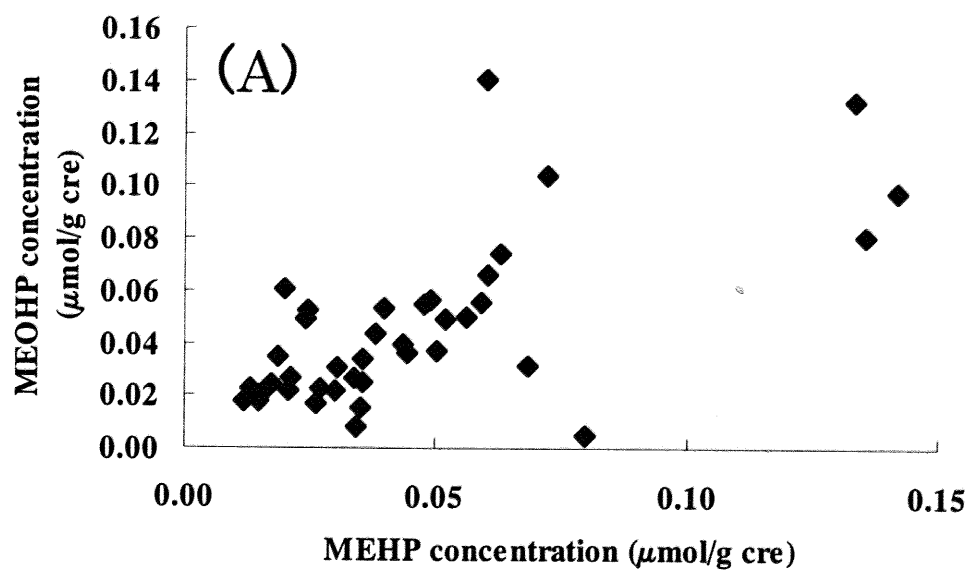


Fig. 9 尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度の関係 (n=40)  
 (A) 尿中 MEHP 濃度と MEOHP 濃度の相関 ( $r=0.675$ ,  $p<0.01$ )  
 (B) 尿中 MEHP 濃度と尿中 MEHHP 濃度の相関 ( $r=0.698$ ,  $p<0.01$ )

### 2-3-4 尿中 DEHP 代謝産物濃度から推定した DEHP 摂取量

Kohn et al. (2000) の報告した DEHP 摂取量換算式 [1] を用いて本研究対象者の体重あたり、1日あたりの DEHP 摂取量を推定した。[1] 式中、ME はクレアチニン 1 g あたりの各代謝産物排泄量、CE はクレアチニン一日排泄量で、Kohn et al. (2000) と Koch et al. (2003) は女性の場合は 18 mg/kg/day、男性の場合は 23 mg/kg/day を使用している。本研究では日本人女性の明確な根拠のある CE が得られなかったことから、Kohn et al. (2000) や Koch et al. (2003) の使用した欧米人女性の平均排泄量 18 mg/kg/day を仮に採用した。欧米人との体格差を考慮すると、日本人の CE はこの値よりやや少なくなるはずであるので、今回の推定値は実際よりやや大きめの値となっていると考えられる。MEHP、MEOHP および MEHHP の  $f$  (尿中排泄速度定数と全消失速度定数の比) はそれぞれ 0.024、0.055、0.074 (Koch et al., 2003) である。MW<sub>d</sub> と MW<sub>m</sub> はそれぞれ、DEHP と各代謝産物の分子量である (DEHP、MEHP、MEOHP および MEHHP の分子量は各々 390.56、278.3、292.3、294.3)。今回の対象者の尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度から [1] 式によって推定した DEHP 摂取量はそれぞれ 3.45- 41.6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  (中央値 10.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )、0.66- 17.9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  (中央値 4.55  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )、1.47- 8.57  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  (中央値 3.51  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) (全て  $n=40$ ) であった。尿中 DEHP 代謝産物濃度から摂取量を推定した既往の研究ではそれぞれ異なる  $f$  が使用されているので、報告値どうしの単純比較は不可能である。そこで比較のために既往の研究で報告された推定 DEHP 摂取量中央値をもとに、 $f$  を 0.024 として算出した DEHP 摂取量を Table 7 に示した。

$$\text{Intake}(\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}) = \frac{\text{ME}(\mu\text{g}/\text{g}) \times \text{CE}(\text{mg}/\text{kg}/\text{day})}{f \times 1000(\text{mg}/\text{g})} \times \frac{\text{MW}_d}{\text{MW}_m} \quad [1]$$

Table 7 既往の研究もとに推定した DEHP 摂取量

研究	*摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )
Kohn et al., 2000 (n=289)	3.14
Koch et al., 2003 (n=85)	10.3
Itoh et al., 2005 (n=36)	5.48
This study (n=40)	10.4

\*既往の研究で報告されている推定 DEHP 摂取量をもとに、 $f$  0.024 (Koch et al., 2003) として摂取量の換算を行なった。

## 2-4 考察

今回、ヒトの DEHP の主な尿中代謝産物である MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度を測定するにあたって、当初、Blount et al. (2000b) の報告に従って前処理し、HPLC/MS/MS を用いて測定していたが、測定を行うにつれて感度の著しい低下がみられた。そこで、吉村ら (2004) の報告する前処理方法を参考に前処理し、HPLC/MS/MS で測定したところ、これまでみられていたような感度の低下はみられず、尿中 DEHP 代謝産物濃度を測定するのに十分な回収率、検出下限、再現性が得られ、我が国においてはじめて 3 種の尿中代謝産物分析による DEHP 曝露評価が可能となった。

DEHP の生体影響は動物実験などで明らかになってきているものの、ヒトへの健康影響については十分に調査されていない。ヒト健康影響の評価を行なう上で、ヒトの曝露レベルの把握が必須であるが、これまで我が国では DEHP 曝露評価はトータルダイエットの分析など、食物中レベルの測定に基づくものが主であった。しかしわれわれの生活にプラスチックが氾濫している現状と DEHP 等フタル酸エステル類の用途を考えると、必ずしも食物だけでなく、各種 consumer product からの曝露 (Hirayama et al., 2001) や室内空気からの曝露 (Otake et al., 2004) も決して無視することができない場合がある。最近になって尿中フタル酸エステル類代謝産物の分析法が可能となってきた (Silva et al., 2003) ことによりバイオマーカーを用いた包括的な曝露評価が可能になった。さらに、環境中に遍在する DEHP とは異なり、分析操作における汚染の可能性がほとんどない尿中代謝産物排泄量を用いることで、実際にヒトが取り込んだ DEHP 量を評価することが可能になった。

一般に化学物質の尿中排泄量に基づいて摂取量を推定するにあたって、今回のようにスポット尿を用いて個人の日常的な摂取量の代表値を推定することは一般的には困難であると考えられる。しかし、対象者数を多くすることで、スポット尿を使用しても集団レベルの日常的な摂取量の代表値を推定することが可能であると考えられる。一方で、Hoppin et al. (2002) は 46 名のアメリカ人女性を対象とした、連続 2 日間の早朝尿中の MEHP および他のフタル酸モノエステル類濃度に相関がみられたことを報告し、スポット尿でもフタル酸類の個人レベルの摂取量評価が可能であると結論している。

既往の研究で報告されている尿中 MEHP 濃度は、例えば、NHANES III (Blount et al., 2000b) で 1988~1994 年にサンプリングした 289 名のアメリカ人男女 (20~60 歳) を対象にした尿中 MEHP 濃度中央値は  $2.7 \mu\text{g/g cre}$ 、Koch et al. (2003) が 2002 年にサンプリングした 85 名のドイツ人男女 (7~64 歳) の尿中 MEHP 濃度中央値は  $9.2 \mu\text{g/g cre}$ 、Itoh et al. (2005) が 2004 年にサンプリングした 36 名の日本人男女 (4~70 歳) の尿中 MEHP 濃度中央値は  $4.5 \mu\text{g/g cre}$  である。本研究では 2003 年にサンプリングした妊婦の尿中 MEHP 濃度中央値は  $9.83 \mu\text{g/g cre}$  であり、既往の研究と同レベルであることから、生活習慣、年齢および性別などによらず、DEHP 摂取量に桁が違うほどの大きな差はないということが示唆される。

Fig. 9 に示したように、今回われわれが測定した、クレアチニン補正・モル変換した妊婦の尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度間に有意な正の相関がみられたのは、これらの代謝産物が同じ代謝経路上にあるためであることを考えるとうなずける結果である。また、妊婦のクレアチニン補正し、モル換算した尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度中央値 ( $n=40$ ) はそれぞれ  $0.035 \mu\text{mol/g cre}$ 、 $0.036 \mu\text{mol/g cre}$ 、 $0.037 \mu\text{mol/g cre}$  であり、これを比で表わすとほぼ MEHP : MEOHP : MEHHP = 1 : 1 : 1 となった。一方、Koch et al. (2003) が報告している尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度中

中央値 (n=85) を同様に計算すると、MEHP : MEOHP : MEHHP=1 : 3 : 4 となった。このように Koch et al. (2003) の対象者と今回われわれが対象とした妊婦の3種類の尿中 DEHP 代謝産物排泄量の相対割合は異なった。このことは、Koch et al. (2003) とわれわれの対象者で MEHP、MEOHP、MEHHP の代謝速度が異なる可能性を示している。

また、尿中 MEHP 濃度とクレアチニン排泄量をもとに各研究が推定した摂取量中央値は、Kohn et al. (2000) の 289 名のアメリカ人のデータを対象に、[1] 式の  $f$  に 0.106 が採用されて  $0.71 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、Koch et al. (2003) の 85 名のドイツ人を対象にした研究では  $f$  を 0.024 として  $10.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、Itoh et al. (2005) の 35 名の日本人 (4 歳の子供を除いた) を対象とした研究では  $f$  を 0.073 として  $1.80 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と報告されている。一方、本研究の対象者の尿中 MEHP 濃度中央値にクレアチニン排泄量 ( $18 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、欧米人女性のデータを代入) をかけ、 $f$  を 0.024 として DEHP 摂取量を推定したところ、 $10.4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  となった。このように尿中 MEHP 濃度はほぼ同レベルであったにもかかわらず、研究によって採用する  $f$  が異なることで DEHP 摂取量推計値が大きく変わるため、現在報告されている推定摂取量を単純に各研究間で比較することはできない。仮に、われわれが採用した  $f$  0.024 を用いて、全ての研究における尿中 MEHP 濃度をもとに摂取量を推定すると、 $3\text{-}10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  という結果が得られた

(Table 7)。今のところ、尿中に排泄される MEHP 濃度に対応する  $f$  は数多く報告され、どの  $f$  を採用すべきか明確ではない。また上記のように、尿中 MEHHP や MEOHP 濃度をもとにした場合の  $f$  も、対象者による代謝の違いを考慮に入れる必要があることが示唆されている。今後、尿中代謝産物排泄量に基づく定量的な摂取量-影響関係を樹立するうえでヒトのより詳細な代謝、排泄等の体内動態を明らかにすることや  $f$  の決定は重要なことである。

3 地域の 3 病院において提供された給食各 1 週間分 (63 検体) における 1 日当りの摂取量 (Tsumura et al., 2003) と市販弁当 (10 検体) の弁当 1 食当りの平均 DEHP 摂取量 (津村ら, 2001) をもとに、体重 50kg の人が食べた場合の一日 DEHP 摂取量を推定すると、それぞれ  $3.2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、 $4.9 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  である。本研究で推定した妊婦 40 名の摂取量中央値、 $3.51\text{-}10.4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  はほぼ同レベルであったことから、本研究の対象者の DEHP 摂取量に食事以外の摂取が大きく寄与している可能性は低いと考えられる。

日本の厚生省による DEHP の一日耐容摂取量 (TDI) は、精巣毒性及び生殖毒性試験結果から得られた無毒性量 (NOAEL)  $3.7 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  及び  $14 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  に安全率 1/100 を掛けて求められた  $40\text{-}140 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  (厚生省, 2000) である。本研究で推定した日本人妊婦の摂取量中央値は推算の根拠とする代謝産物によって、 $3.51\text{-}10.4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  という幅があったが、最大に見積もっても厚生省が設定した DEHP の TDI の 1/4 である。一方、Hoppin et al. (2002) の「スポット尿でもフタル酸類の個人レベルの摂取量評価が可能である」という立場を基にして、今回の対象者の推定摂取量を個人レベルでみると、推定摂取量は最大で  $41.6 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であり、現行の TDI とほぼ同レベルである。また、米国環境保護庁 (U.S. Environmental Protection Agency (EPA)) による DEHP の参照容量 (RfD) は、反復投与毒性試験結果から得られた最小毒性量 (LOAEL)  $19 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  に安全率 1/1000 をかけて求められた  $20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であり、今回の対象者の最大推定摂取量は EPA の RfD を超過している。

また、本研究では妊婦を対象としたが、これまでに報告されている次世代影響をエンドポイントとした毒性試験の最小毒性量 (LOAEL) の最小値は、妊娠ラットに DEHP を投与した際に仔の精巣相対重量の減少がみられた、 $3.0\text{-}3.5 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  である (Arcadi et al., 1998)。しかし、この試験の投与量や毒性について不明確であるなど報告に不備があるとして、我が国の厚生省は DEHP について暫定の TDI を設定した際に採用しなかった (厚生省, 2000)。仮にこの試験の LOAEL に厚生省同様に安全率



1/100 をかけ、さらに環境省の報告に基づき（環境省, 2004）LOAEL から NOAEL への変換として安全率 1/10 をかけて、TDI 同様に算出すると 3.0~3.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  となり、今回の対象者の尿中の各代謝産物濃度から推定した摂取量中央値 3.51- 10.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  はほぼ同レベルであり、また最大推定摂取量 41.6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  はこの TDI 同様に算出した値 3.0~3.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の約 10 倍となるため、ヒトにおいても妊娠中の母親が DEHP 曝露することによる次世代への影響はまったくないと断定することはできない。引き続き DEHP 曝露レベルの低減化を図る必要があることが指摘できる一方で、ヒトにおける低レベルの DEHP 曝露による健康影響に関する調査研究を行なっていく必要も指摘できる。

## 第3章 尿分析に基づく DEHP 健康影響評価～DEHP の女性ホルモンへの影響～

### 3-1 はじめに

Davis et al. (1994a) は、成熟雌ラットへの経口投与実験 (2 g/kg) による、卵巣での血清エストラジオール (以下 E2) レベルの低下、性周期の延長を報告している。また、Lovekamp-Swan et al. (2001、2003) は in vitro における実験より、MEHP が、DEHP とともに卵巣内の PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor) を活性化することにより、ステロイド合成酵素であるアロマターゼ活性ならびにアロマターゼ mRNA 発現量を抑制し、E の産生を低下させることを報告している。このように、成熟した雌動物への DEHP 曝露は生殖機能に大きな影響を及ぼすことから、ヒト女性の DEHP 曝露による生殖影響が懸念される。

本章では、尿中代謝産物排泄量を用いた DEHP 摂取量の生物学的モニタリング結果と DEHP の生殖影響のひとつとして E2 レベルへの影響との関連について調べる。なお、第1章 1-4-4 でも述べたように、血中 E2 濃度と尿中 E1 濃度の間には相関がみられることから、本研究では、血中 E2 濃度を反映する尿中 E1、E2 排泄量を定量し、DEHP 摂取量との関連を調査する。

### 3-2 方法

#### 3-2-1 尿のサンプリング

##### 3-2-1-1 被験者

2005年6～8月の期間中、本調査の目的方法等の説明を受け、同意の得られた5名の非喫煙かつホルモン剤非使用の日本人女子学生 (22～26歳) を対象とした。

##### 3-2-1-2 サンプル

対象者に1ヶ月間の基礎体温測定と月経を申告してもらうことで各人の月経周期を把握し、次の月経周期の月経期に連続5日間、排卵期に連続5日間の計10日間に、朝起きて一番最初の尿を採尿用カップに採取し、それを50 ml ポリプロピレン製ボトル (アズワン製) に一時保存してもらった。その後、尿中 DEHP 代謝産物濃度測定用・尿中クレアチニン濃度測定用・尿中 E1、E2 測定用に 15 ml ポリプロピレン製スピッツ (イワキ製) に分注し、測定まで再度冷凍保存した。採尿用器具は 2-2-1-2 に示したものと同様である。

#### 3-2-2 実験方法

##### 3-2-2-1 採尿用器具からの E1・E2 溶出試験

本調査の尿サンプリングに使用した採尿カップ、ポリプロピレン製ボトル、ポリプロピレン製スピッツからの E1、E2 汚染を調べた。方法は 2-2-2-1 で示したとおりである。

### 3-2-2-2 試薬

#### 3-2-2-2-1 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定

2-2-2-2 に示したとおりである。

#### 3-2-2-2-2 尿中 E1・E2 濃度測定

E1 (純度: >98%)、E2 (97-103%) の標準品、ヘキサン (>96%、残留農薬・PCB 試薬用)、アセトン (>99.8%、残留農薬・PCB 試薬用)、ジクロロメタン (>99.5%、残留農薬・PCB 試薬用) およびジエチルエーテル (>99%、残留農薬試験用) は和光純薬社製を使用した。内標準物質としてエストロゲン測定用サロゲード物質混合溶液 (b-E2-13C<sub>4</sub>、E1-13C<sub>4</sub>、E3-13C<sub>4</sub> 各 100 ppm、メタノール溶液) は林純薬社製を使用した。β-グルクロニダーゼ (200 units/ml、E. coli K12) は Roche Diagnostics 社製を使用した。アセトニトリル (>99.8%、高速液体クロマトグラフ用特製試薬)、トリメチルアミン (>99%) および酢酸アンモニウム (>97%、試薬特級)、無水硫酸ナトリウム (残留農薬試験用特製試薬) はナカライテスク社製を使用した。尿サンプルの前処理にはバリアン社製の固相抽出カートリッジ (FL フロリジル PR 500 mg/3 ml) を使用した。

### 3-2-2-3 装置および器具

#### 3-2-2-3-1 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定

2-2-2-3 に示したとおりである。

#### 3-2-2-3-2 尿中 E1・E2 濃度測定

器具の洗浄方法と使用する装置装置は 3-2-2-3 で示した通りである。測定条件を Table 8-10 に示した。質量分析計や HPLC の測定条件は環境水中エストロジェン測定を行なっている Isobe et al. (2003) の報告をもとに測定条件の最適化を行なった。

**Table 8** 尿中 E1、E2 濃度測定における HPLC 測定条件

HPLC	Agilent 1100 (Agilent Technologies)					
Column	Extend-C18 5 $\mu$ m (2.1 $\times$ 50 mm, GL Sciences, Japan)					
Column Temperature	30 $^{\circ}$ C					
Gradient Program						
Time (min)	0	10.0	12.0	15.0	18.0	20.0
%A	100	100	50	50	20	20
%B	0	0	50	50	80	80
Mobile phase	A: 20mM triethylamine in water, B: 20mM triethylamine in acetonitrile					
Flow Rate	0.2 ml/min					
Injection Volume	10 $\mu$ l					

**Table 9** 尿中 E1、E2 濃度測定における MS 測定条件

Mass spectrometer	Quattro- Ultima (MICROMASS, UK)
Ionization	Electrospray
Mode	Multiply Reaction Monitoring
Polarity	Negative
Source Temperature	130 $^{\circ}$ C
Desolvation Temperature	300 $^{\circ}$ C

**Table 10** E1、E2 の MRM 分析

	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Retention time (min)	Cone (V)	Capillary (kV)
E1	268.9	144.8	15.78	70	2.8
$^{13}$ C <sub>4</sub> - E1	272.9	148.9	15.78	70	2.8
E2	270.9	144.8	14.96	70	2.8
$^{13}$ C <sub>4</sub> - E2	274.9	148.8	14.96	70	2.8

### 3-2-2-4 分析操作

#### 3-2-2-4-1 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定

##### 3-2-2-4-1-1 分析手順

2-2-2-4-2-1 に示したとおりである。

#### 3-2-2-4-2 尿中 E1・E2 濃度測定

##### 3-2-2-4-2-1 分析手順

遠沈管に尿試料 1 ml をとり、内標準物質（各々 100  $\mu\text{g/ml}$ ）100  $\mu\text{l}$ 、酢酸アンモニウム（pH6.5）250  $\mu\text{l}$  と  $\beta$ -グルクロニダーゼ 5  $\mu\text{l}$  を添加し、35~37  $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間反応させ、E1、E2 のグルクロン酸抱合体を加水分解して、フリーの代謝産物とし、酢酸 50  $\mu\text{l}$  添加した。その後、ジエチルエーテル 3 ml 添加・混合した後、2500 rpm で 10 分間遠心分離にかけ、エーテル層のみを採取して無水硫酸で脱水するという操作を 3 セット行ない、採取した溶液を窒素気流下で濃縮し、ヘキサン：ジクロロメタン混合溶液（3：1）1 ml に再溶解したものを、あらかじめアセトン 5 ml、ヘキサン：ジクロロメタン混合溶液（1：1）5 ml でコンディショニングしておいた固相抽出カートリッジに通した。さらに、アセトン：ジクロロメタン（1：9）5 ml で溶出し、溶出液を窒素気流下で濃縮し、5 % アセトニトリル 200  $\mu\text{l}$  に再溶解したものを HPLC/MS/MS を用いて測定した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 採尿用器具からの E1・E2 溶出試験

いずれの容器からも E1、E2 は検出されなかった。

#### 3-3-2 尿分析の測定精度（尿中 E1・E2 濃度測定）

##### 3-3-2-1 検出下限

本研究で測定した検量線用標準液最低濃度 1 ng/ml のクロマトグラムの S/N をもとに算出したところ、尿中濃度に換算して表わすと E1 が 0.01 ng/ml、E2 が 0.005 ng/ml であった。

##### 3-3-2-2 再現性

尿サンプル前処理・測定のバッチごとに（計 3 バッチ）同一の尿サンプルを未知サンプルとともに入れ、本研究で用いた尿中 E1、E2 濃度測定の再現性を評価した。再現性は相対標準偏差（RSD、%）で表すと E1 では 3 %、E2 では 9 % であった。

##### 3-3-2-3 回収率

各代謝産物の既知量を尿に添加した後、通常操作を行って求めた回収率の平均値 (n=3) は、尿 1 ml に対し 5 ng 添加においては E1 では 83±3 %、E2 では 97±1 %、25 ng 添加においてはそれぞれ 86 ±3 %、91 ±2 %であった。

### 3-3-3 尿中 DEHP 代謝産物濃度

各人のクレアチニン補正した尿中 DEHP 代謝産物濃度は Table 11 に示したとおりである。この結果をもとに、各人のモル換算した尿中 MEHP/MEOHP/MEHHP 濃度の関係をみたところ (Fig. 10-14)、対象者 D を除く 4 名では MEHP と MEHHP、MEHP と MEOHP の間には弱い相関がみられるか、あるいは相関はみられなかったが、MEHHP と MEOHP の間には強い相関がみられた。一方、対象者 D では、MEHP と MEHHP の間には強い相関がみられ、MEHP と MEOHP、MEHHP と MEOHP の間には相関はみられなかった。

Table 11 対象者 5 名の 10 日間の尿中 DEHP 代謝産物濃度  
(平均±標準偏差) (μg/g cre)

	A	B	C	D	E
尿中 MEHP 濃度	2.75±0.88	5.15±1.33	4.55±1.66	6.40±2.70	4.97±1.24
尿中 MEOHP 濃度	10.7±3.63	12.1±3.50	9.34±2.11	17.3±7.10	8.36±1.77*
尿中 MEHHP 濃度	6.01±1.95	8.81±2.71	5.99±1.21	7.90±3.90	5.31±1.91

\* 5 日間の尿サンプル

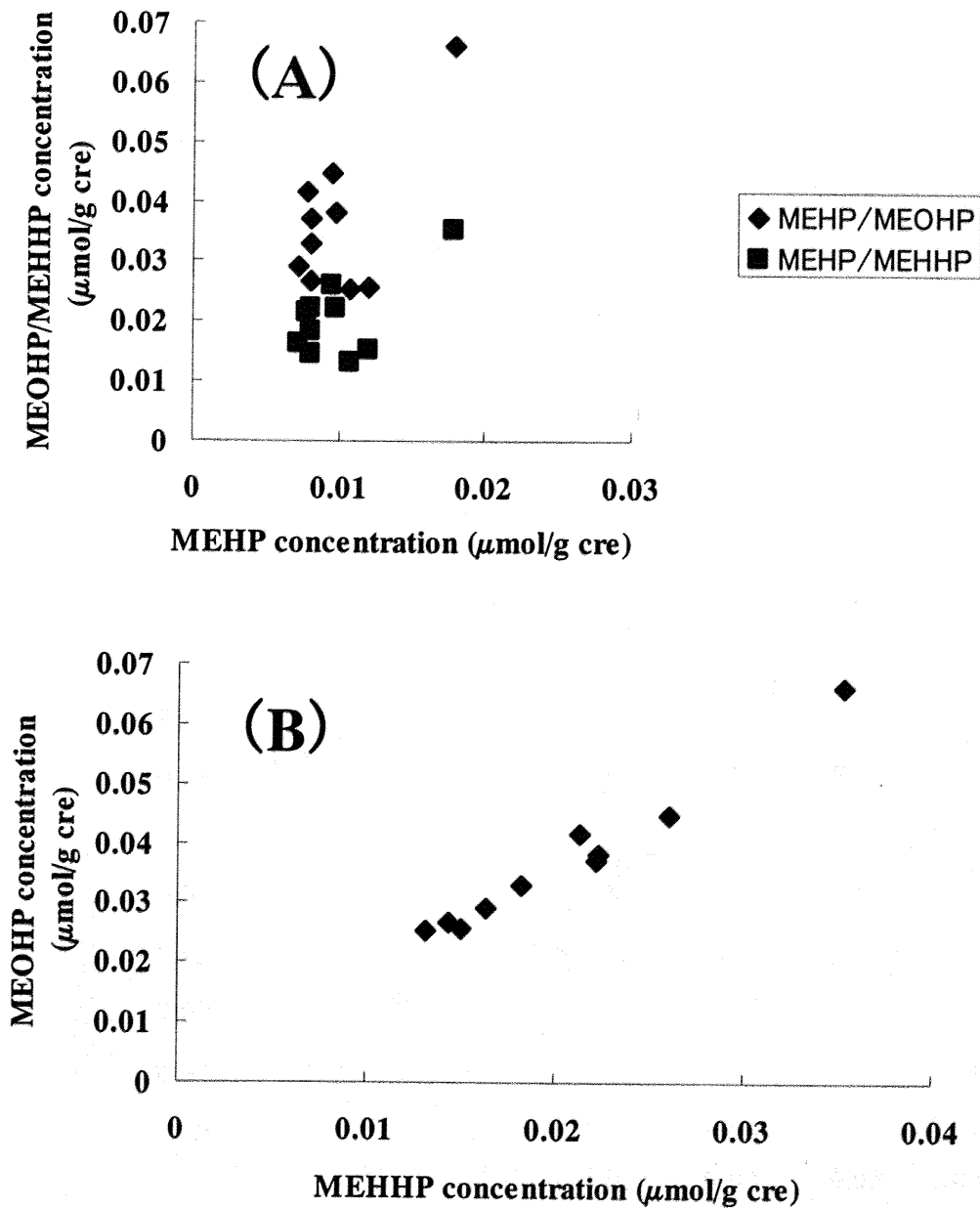


Fig. 10 対象者 A の尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度の関係 (n=10)

- (A) 尿中 MEHP 濃度と尿中 MEOHP、MEHHP 濃度の相関  
 (MEHP-MEOHP  $r=0.006$ ,  $p=0.987$ , MEHP-MEHHP  $r=0.134$ ,  $p=0.713$ )
- (B) 尿中 MEHHP 濃度と尿中 MEOHP 濃度の相関 ( $r=0.952$ ,  $p<0.01$ )

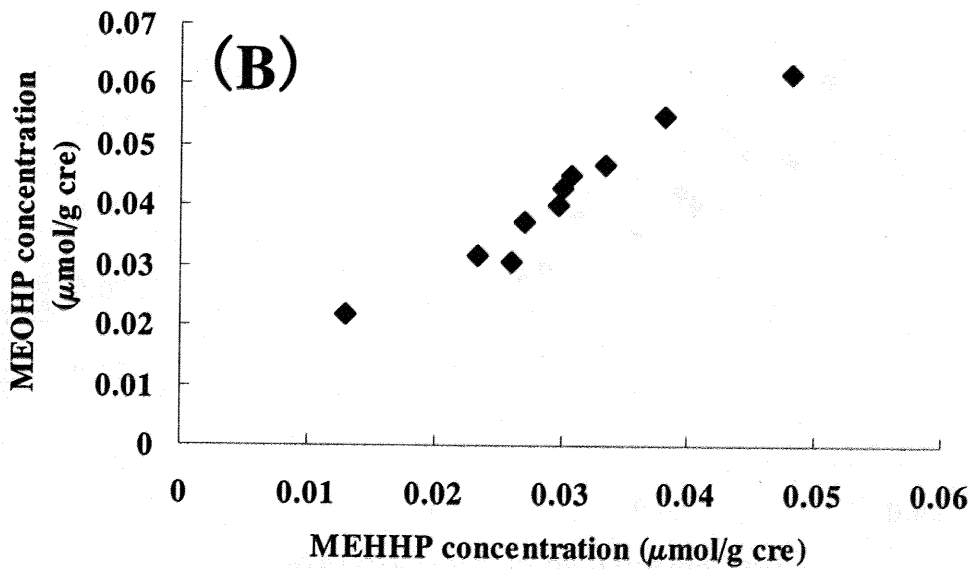
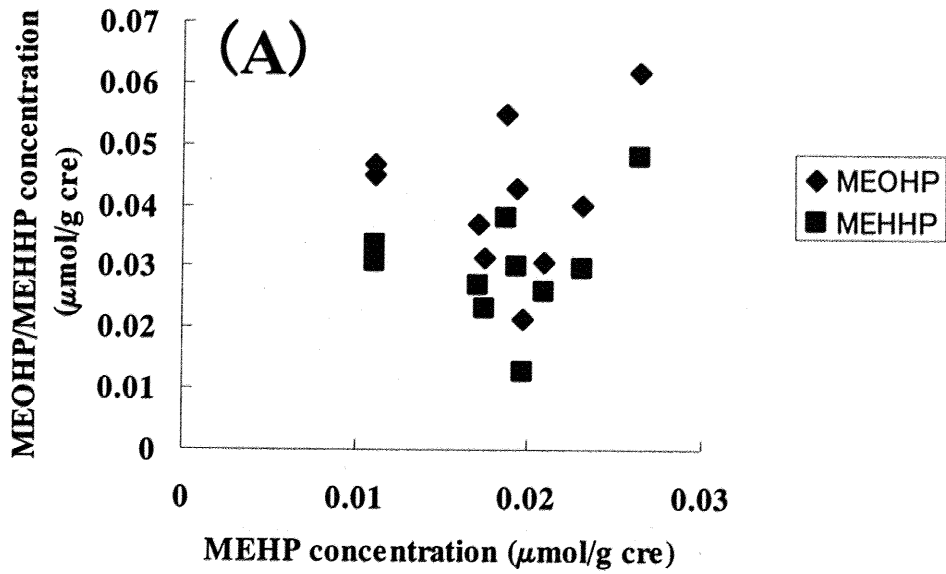


Fig. 11 対象者 B の尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度の関係 (n=10)

- (A) 尿中 MEHP 濃度と尿中 MEOHP、MEHHP 濃度の相関  
 (MEHP-MEOHP  $r = -0.091$ ,  $p = 0.803$ , MEHP-MEHHP  $r = -0.042$ ,  $p = 0.907$ )
- (B) 尿中 MEHHP 濃度と尿中 MEOHP 濃度の相関 ( $r = 0.988$ ,  $p < 0.01$ )



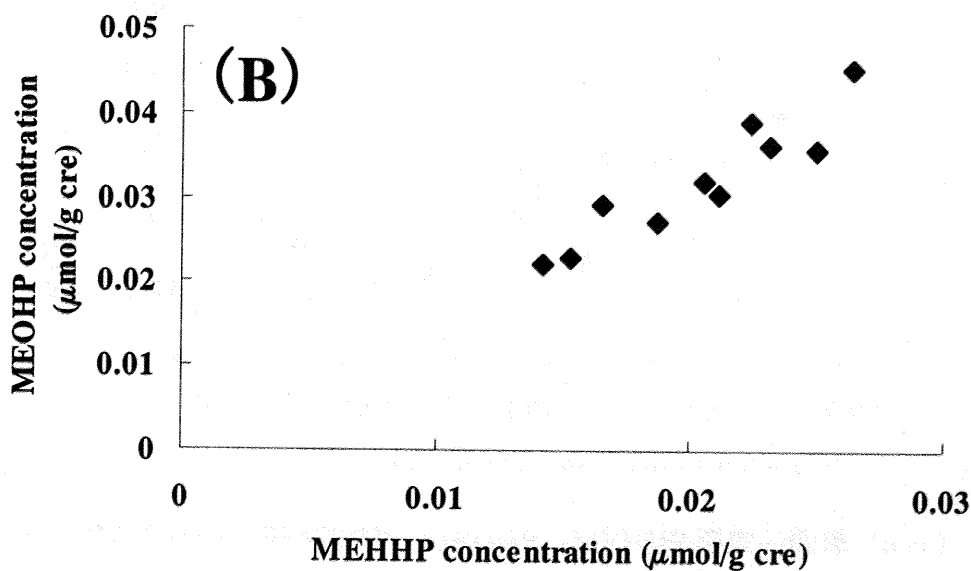
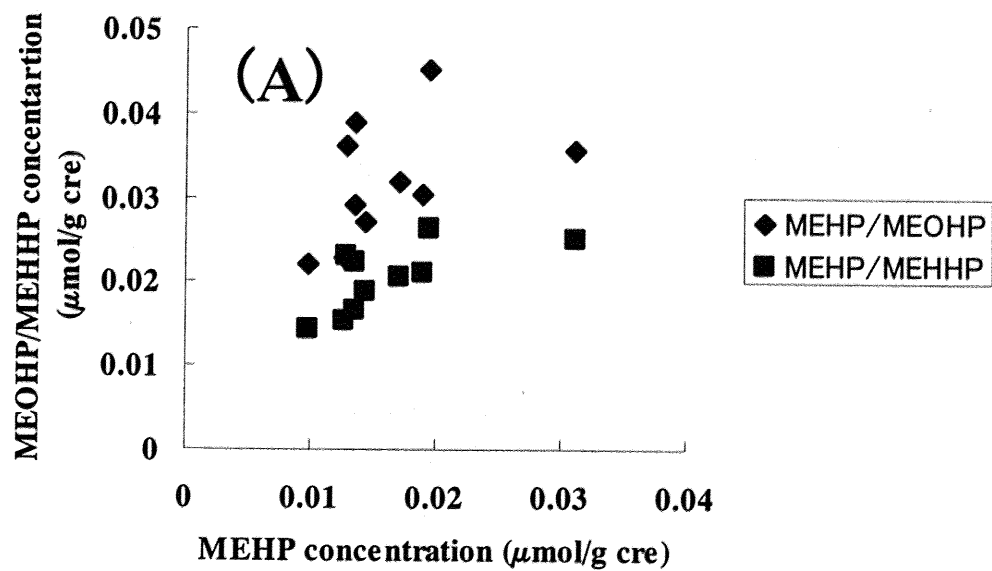


Fig. 12 対象者 C の尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度の関係 (n=10)

(A) 尿中 MEHP 濃度と尿中 MEOHP、MEHHP 濃度の相関

(MEHP-MEOHP  $r=0.515$ ,  $p=0.128$ , MEHP-MEHHP  $r=0.685$ ,  $p<0.05$ )

(B) 尿中 MEHHP 濃度と尿中 MEOHP 濃度の相関 (相関係数 ( $r$ ) =0.927,  $p<0.01$ )

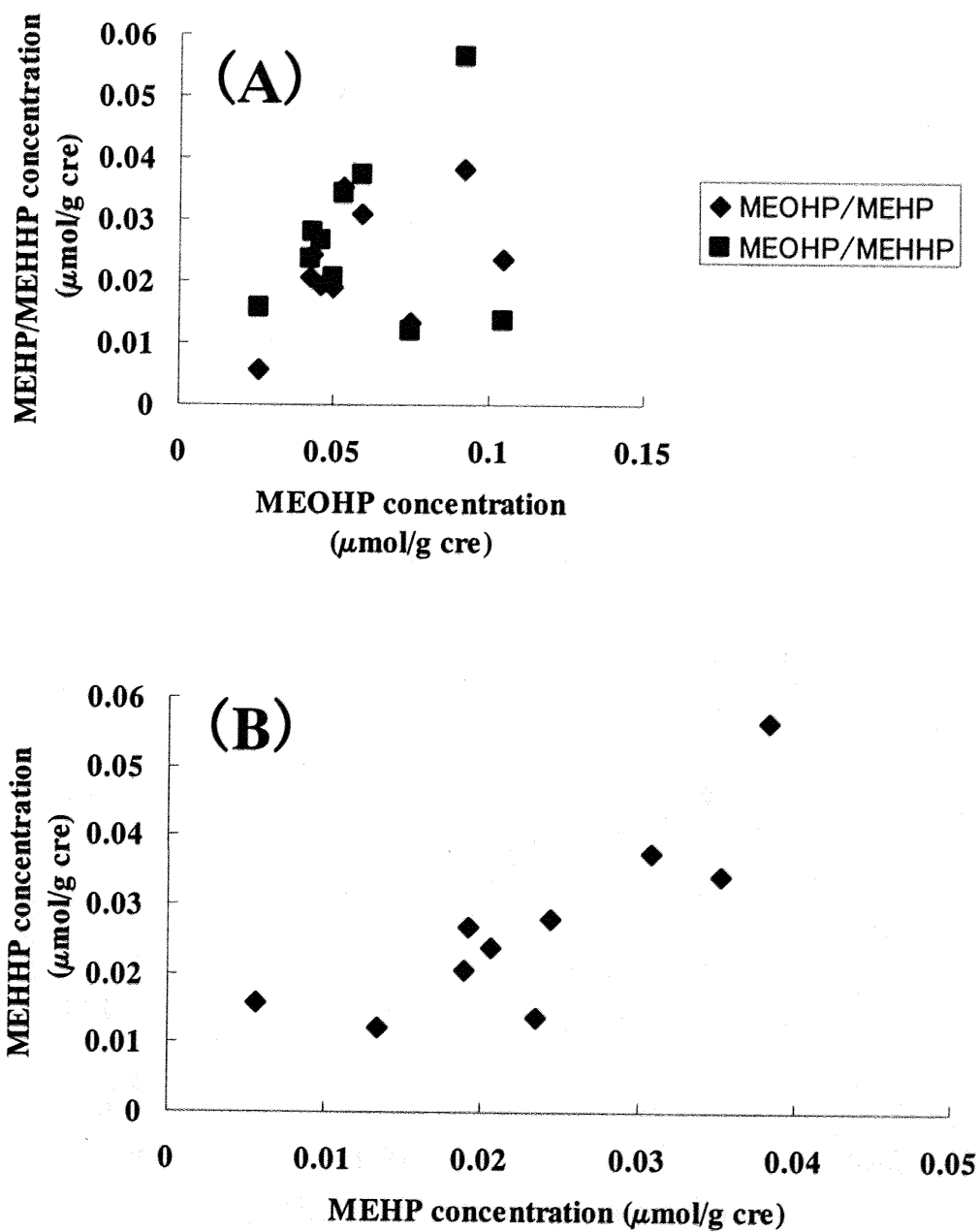


Fig. 13 対象者 D の尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度の関係 (n=10)

(A) 尿中 MEOHP 濃度と尿中 MEHP、MEHHP 濃度の相関

(MEOHP-MEHP  $r=0.442$ ,  $p=0.200$ , MEOHP-MEHHP  $r=0.055$ ,  $p=0.881$ )

(B) 尿中 MEHP 濃度と尿中 MEHHP 濃度の相関 (相関係数 ( $r$ ) =0.830、 $p<0.01$ )

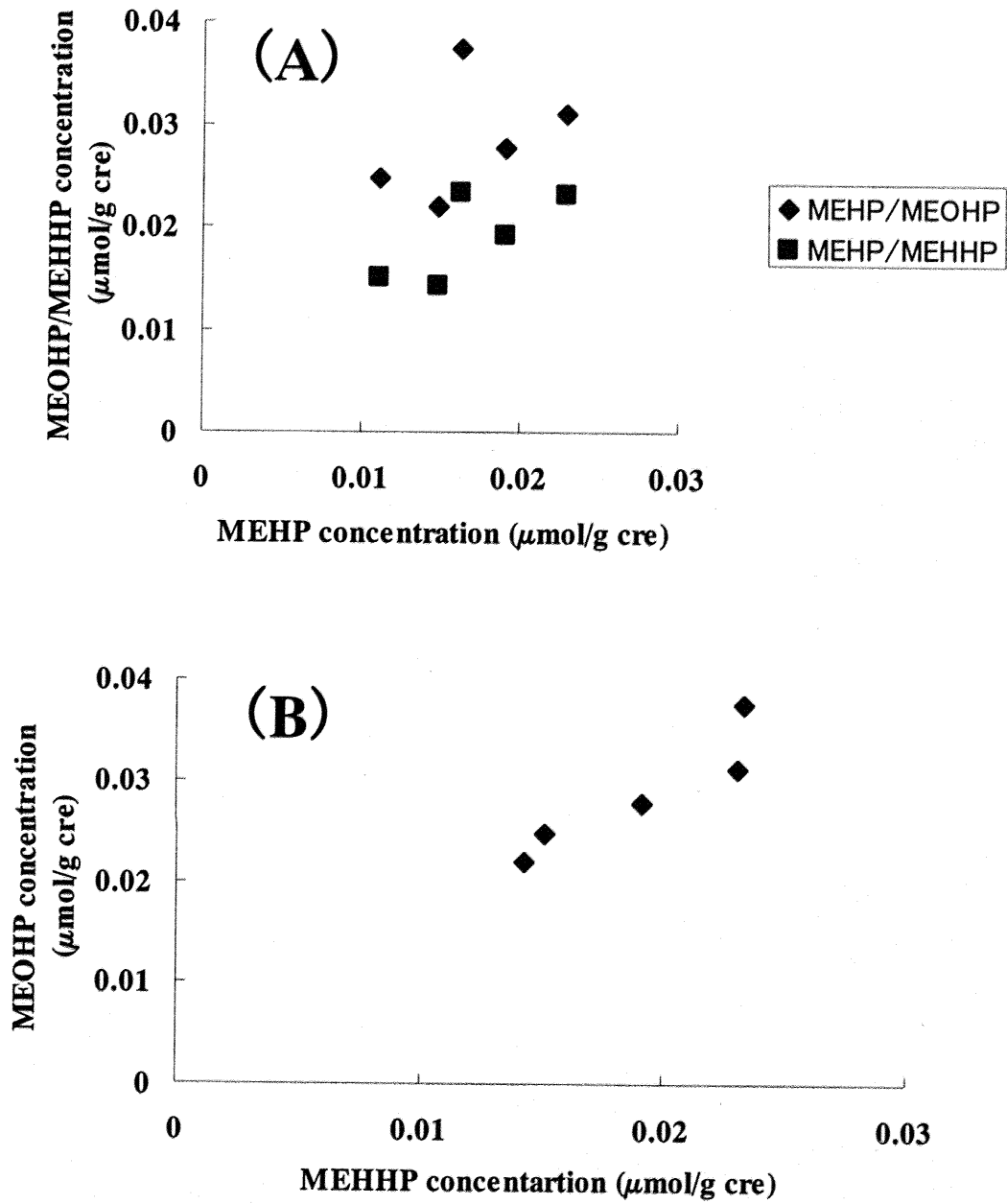


Fig. 14 対象者 E の尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度の関係 (n=5)

- (A) 尿中 MEHP と尿中 MEOHP、MEHHP 濃度の相関  
 (MEHP-MEOHP  $r=0.600$ ,  $p=0.285$ , MEHP-MEHHP  $r=0.600$ ,  $p=0.285$ )
- (B) 尿中 MEHHP 濃度と尿中 MEOHP 濃度の相関 (相関係数 ( $r$ ) =1.000,  $p<0.01$ )

### 3-3-4 尿中 DEHP 代謝産物濃度から推定した DEHP 摂取量

2-3-4 で示したのと同様の方法で各人の DEHP 摂取量を推定した (Table 12)。

Table 12 対象者 5 名の推定 DEHP 摂取量 (平均±標準偏差) ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )

	A	B	C	D	E
尿中 MEHP 濃度 から算出	2.90 $\pm 0.93$	5.42 $\pm 1.39$	4.79 $\pm 1.75$	6.70 $\pm 2.90$	5.23 $\pm 1.30$
尿中 MEOHP 濃度 から算出	4.70 $\pm 1.59$	5.30 $\pm 1.50$	4.08 $\pm 0.92$	7.60 $\pm 3.10$	3.63 $\pm 0.77^*$
尿中 MEHHP 濃度 から算出	1.29 $\pm 0.63$	2.84 $\pm 0.88$	1.93 $\pm 0.39$	2.60 $\pm 1.30$	1.72 $\pm 0.62$

\*5 日間の尿サンプル

### 3-3-5 尿中 DEHP 代謝産物濃度における個人間変動と個人内変動

Fig. 15-19 に、対象者 5 名の合計 10 日間の早朝尿中 MEHP 濃度をプロットした（尿中 MEOHP、MEHHP 濃度は省略）。これをもとに分散分析を適用して算出した（Table 13-15）、各人の MEHP、MEOHP、MEHHP の個人間変動は 87%、90%、70% であり、個人内（日間）変動は各々 36%、37%、37% と、個人内（日間）変動は ~40% 以内と比較的小さかった。また、一元配置分散分析を行ったところ、全ての代謝産物濃度において個人間変動 > 個人内変動という結果となり、さらに Scheffe の多重比較検定を行なったところ、対象者 D のみ尿中 DEHP 代謝産物濃度が他の対象者よりも有意に高かった。

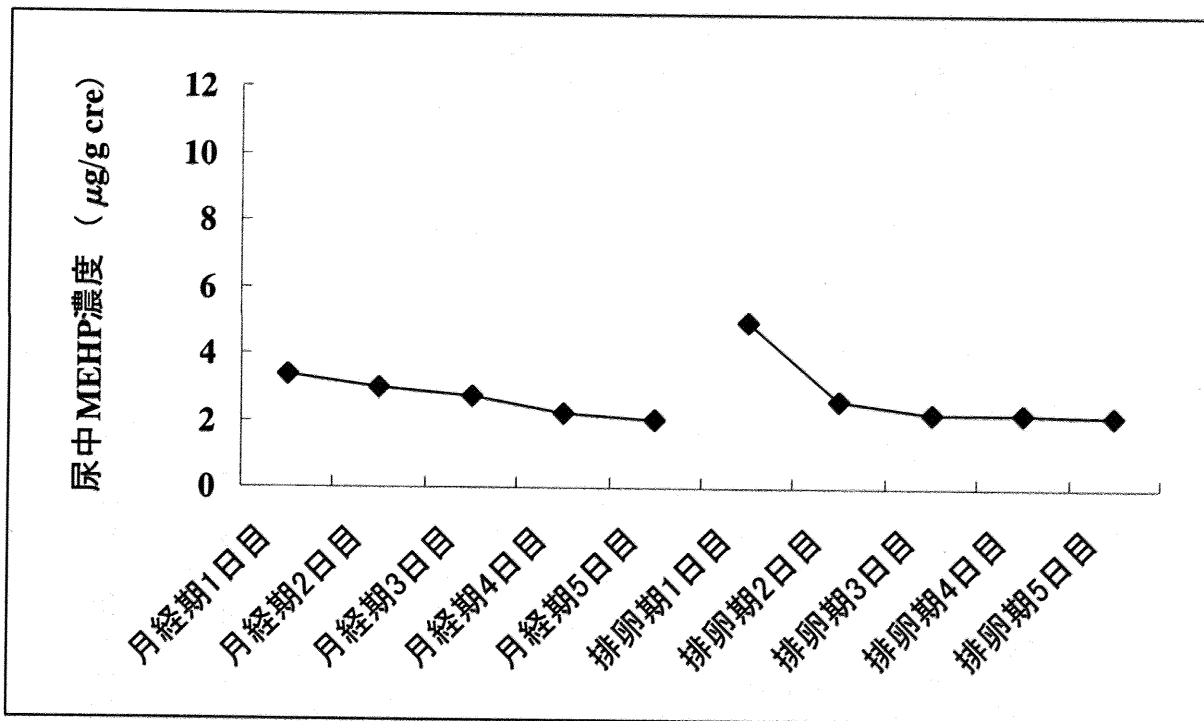


Fig. 15 対象者 A の月経期・排卵期の尿中 MEHP 濃度

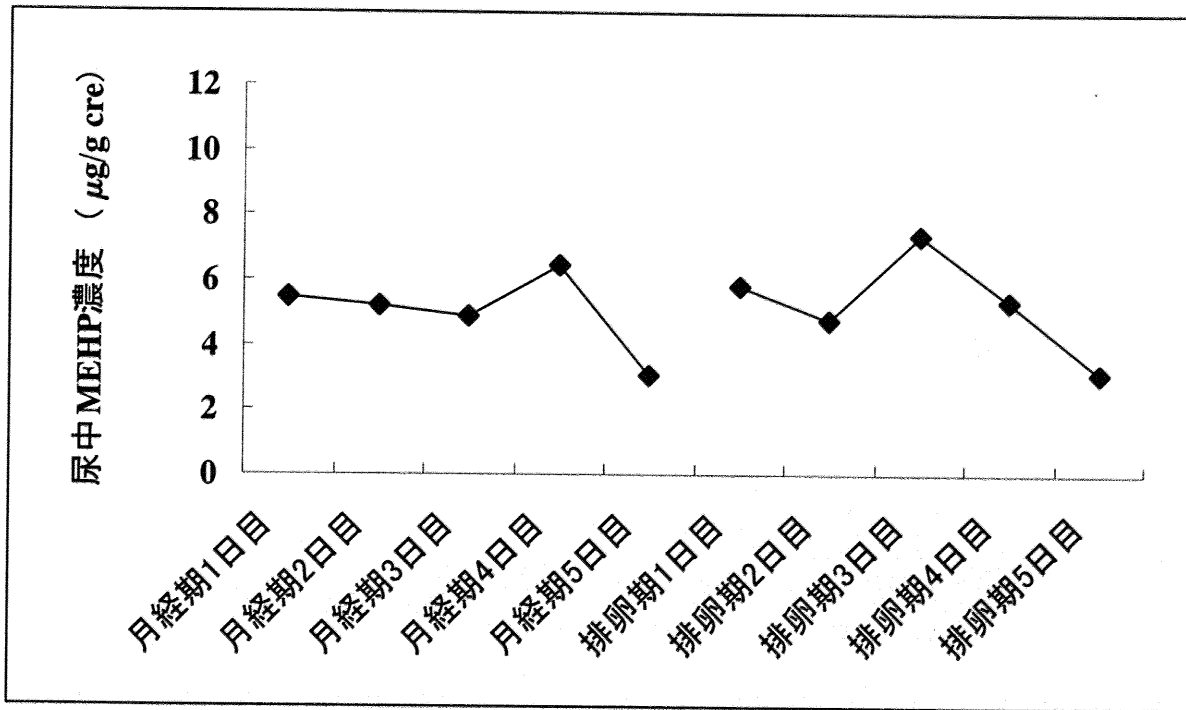


Fig. 16 対象者 B の月経期・排卵期の尿中 MEHP 濃度

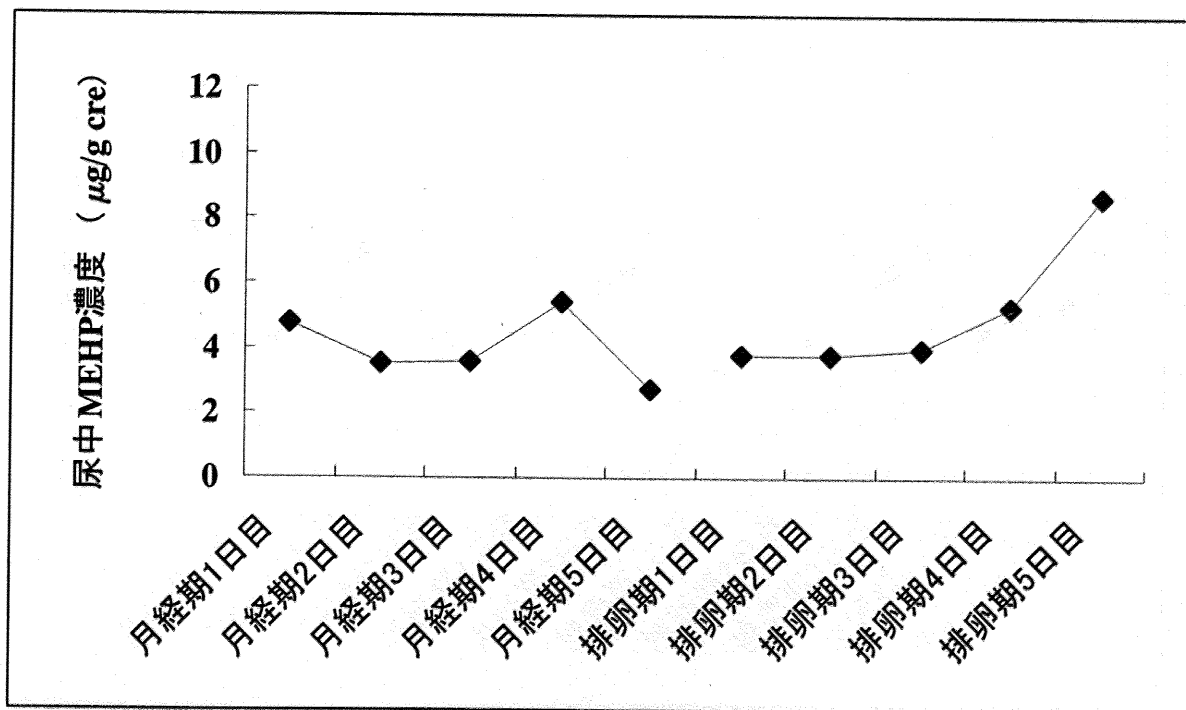


Fig. 17 対象者 C の月経期・排卵期の尿中 MEHP 濃度

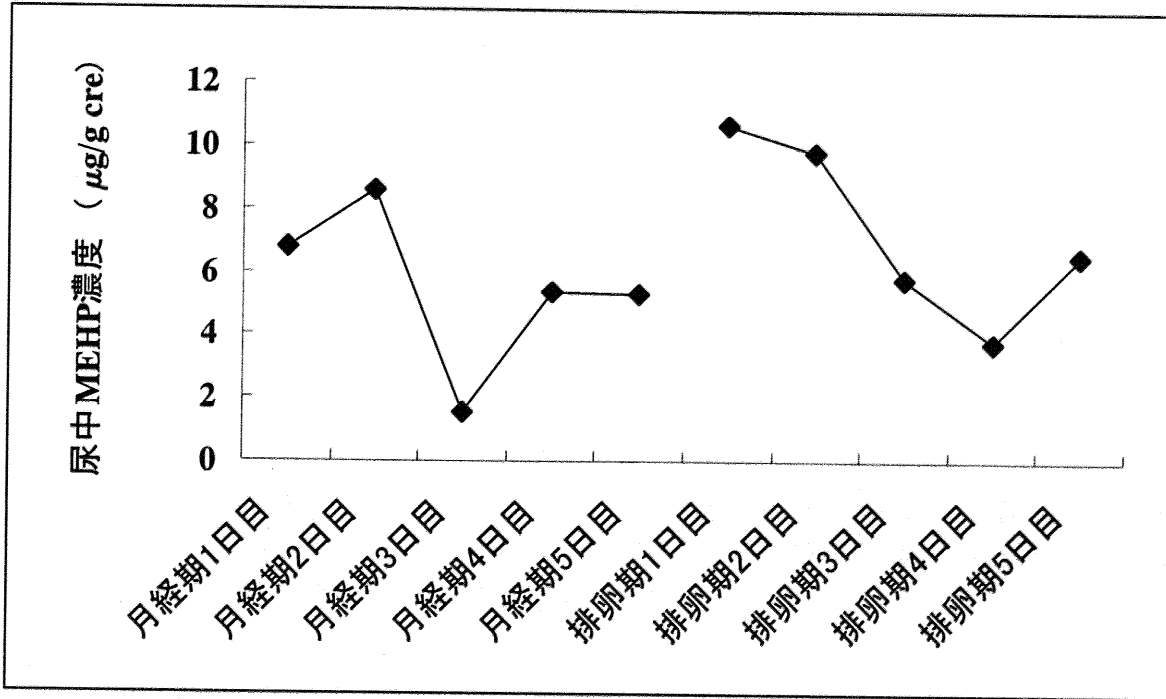


Fig. 18 対象者 D の月経期・排卵期の尿中 MEHP 濃度

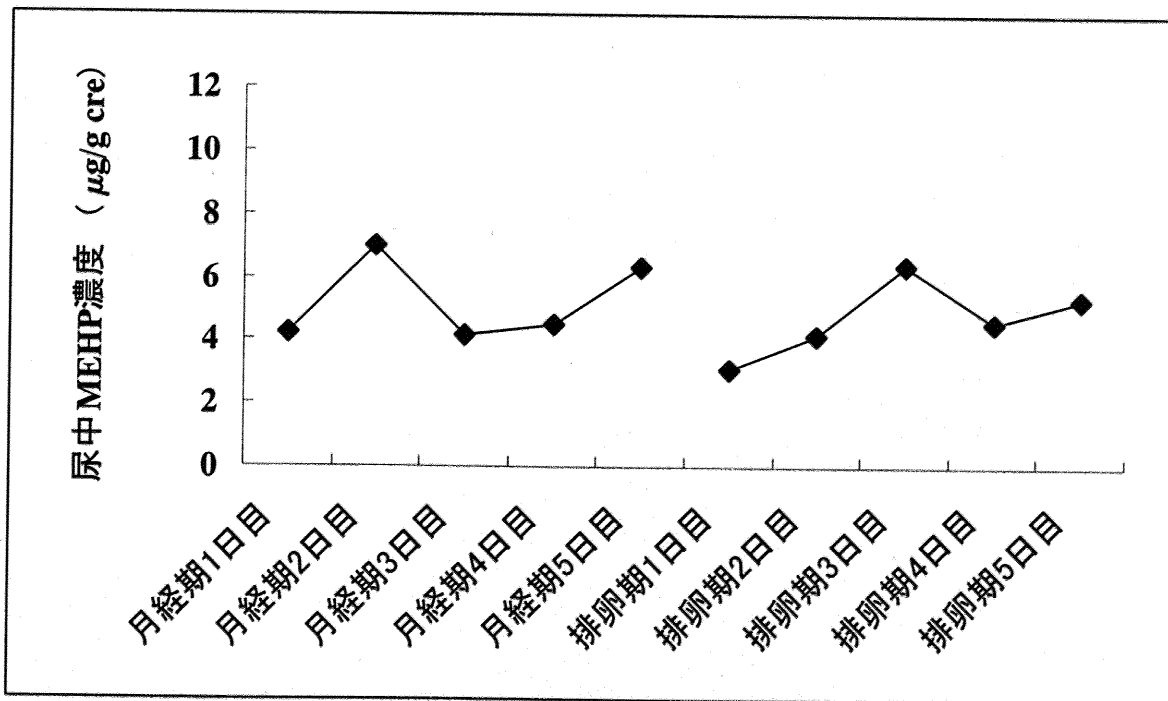


Fig. 19 対象者 E の月経期・排卵期の尿中 MEHP 濃度

Table 13 分散分析表 (尿中 MEHP 濃度)

概要

グループ	標本数	合計	平均	分散
A	10	27.52828	2.752828	0.780971473
B	10	51.51387	5.151387	1.755971849
C	10	45.54886	4.554886	2.772171198
D	10	63.97076	6.397076	7.542091638
E	10	49.65136	4.965136	1.526146505
総平均			4.764262	

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	69.46005	4	17.36501	6.03901624	0.00056	2.578737
グループ内	129.3962	45	2.875471			
合計	198.8562	49				



Table 14 分散分析表 (尿中 MEOHP 濃度)

概要

グループ	標本数	合計	平均	分散
A	10	107.3414	10.73414	13.14727577
B	10	120.5376	12.05376	12.03266985
C	10	93.37471	9.337471	4.432502585
D	10	172.7333	17.27333	50.83664378
E	5	41.78103	8.356205	3.115645806
総平均			11.55098	

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	431.0116	4	107.7529	5.852124745	0.000835	2.605972
グループ内	736.5044	40	18.41261			
合計	1167.516	44				

Table 15 分散分析表 (尿中 MEHHP 濃度)

概要

グループ	標本数	合計	平均	分散
A	10	60.11323	6.011323	3.811698384
B	10	88.07851	8.807851	7.350893819
C	10	59.86385	5.986385	1.453044338
D	10	79.0131	7.90131	15.50896813
E	10	53.13932	5.313932	3.641532611
総平均			6.80416	

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	87.36645	4	21.84161	3.437876553	0.015537	2.578737
グループ内	285.8952	45	6.353227			
合計	373.2617	49				

### 3-3-6 尿中 E1、E2 濃度測定

各人の月経期および排卵期の尿中 E1、E2 濃度は Fig. 20-24 に示したとおりである。

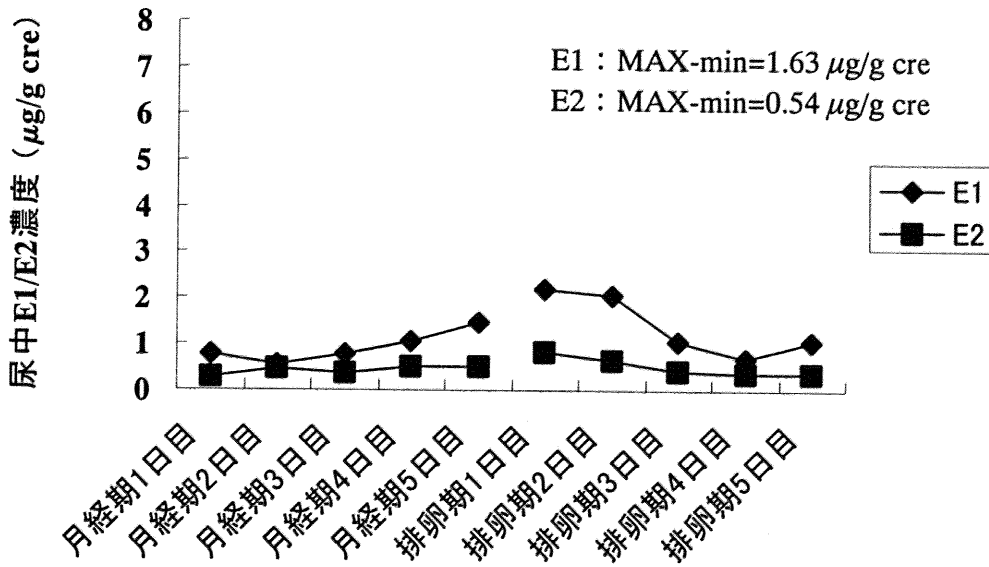


Fig. 20 対象者 A の月経期および排卵期の尿中 E1、E2 濃度

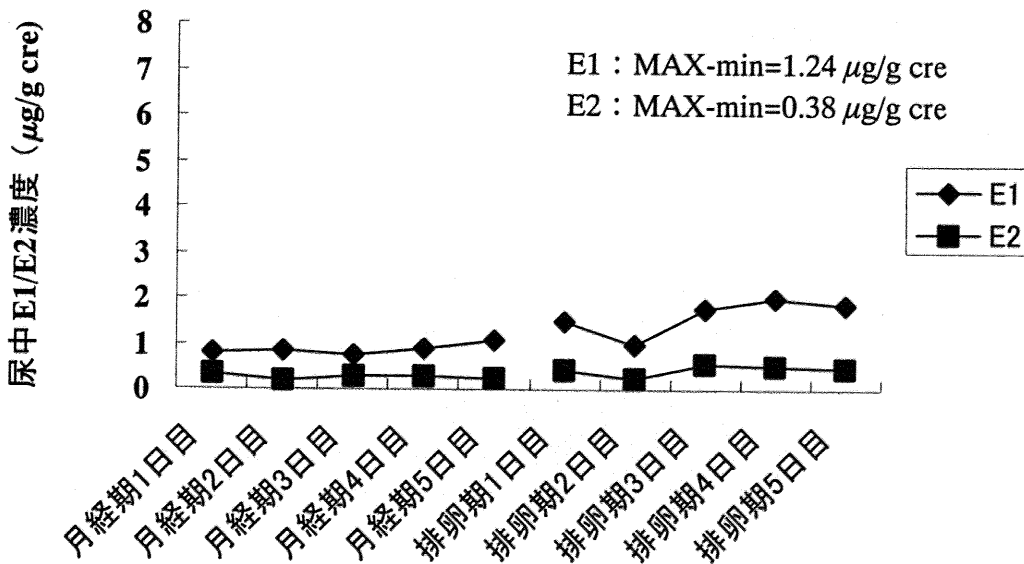


Fig. 21 対象者 B の月経期および排卵期の尿中 E1、E2 濃度

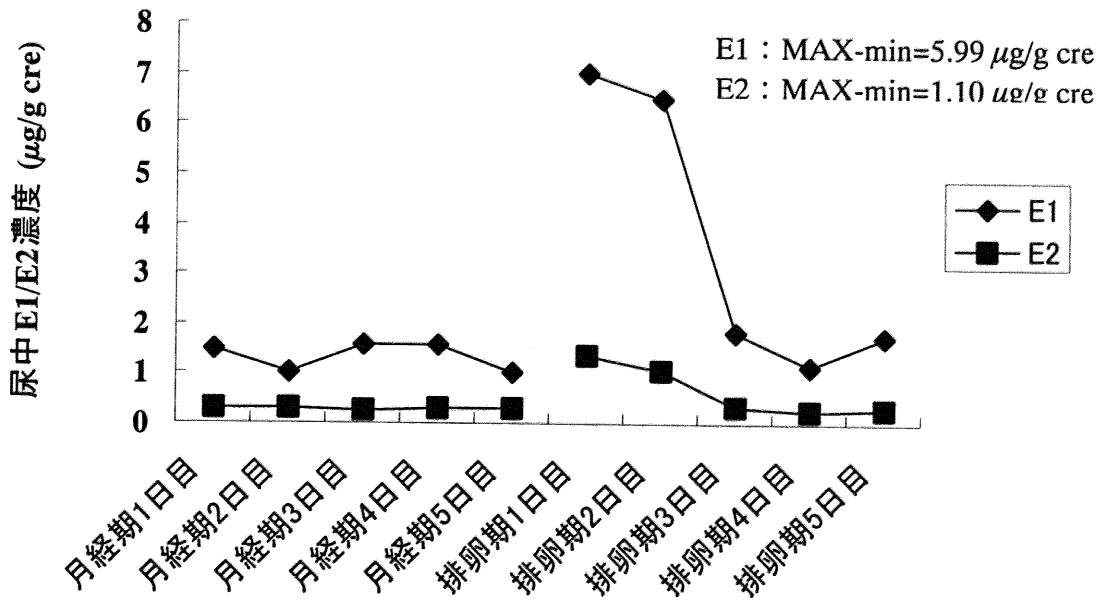


Fig. 22 対象者 C の月経期および排卵期の尿中 E1、E2 濃度

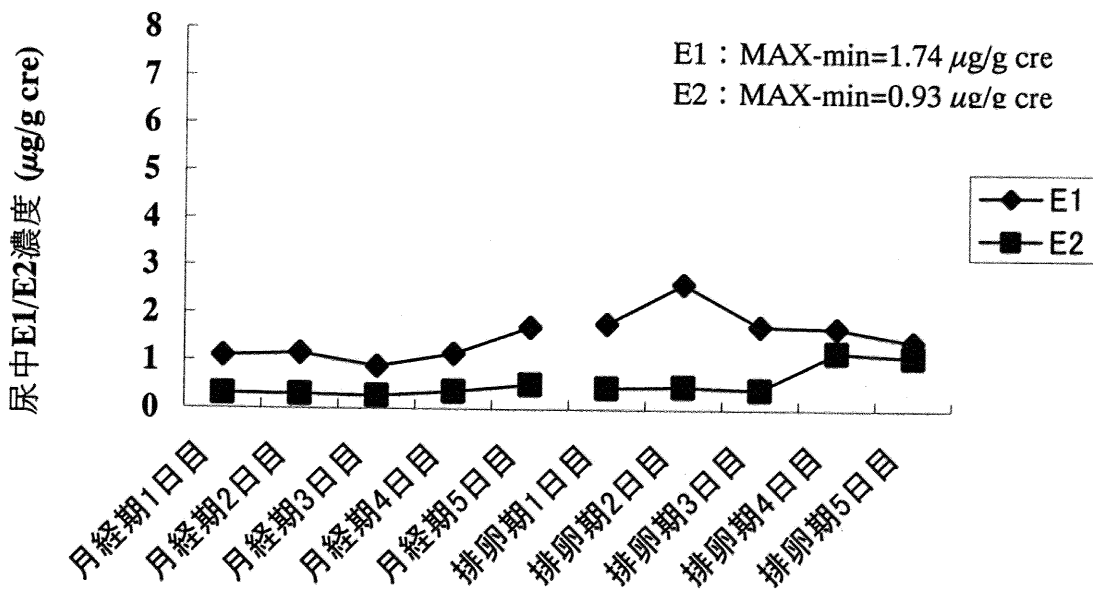


Fig. 23 対象者 D の月経期および排卵期の尿中 E1、E2 濃度

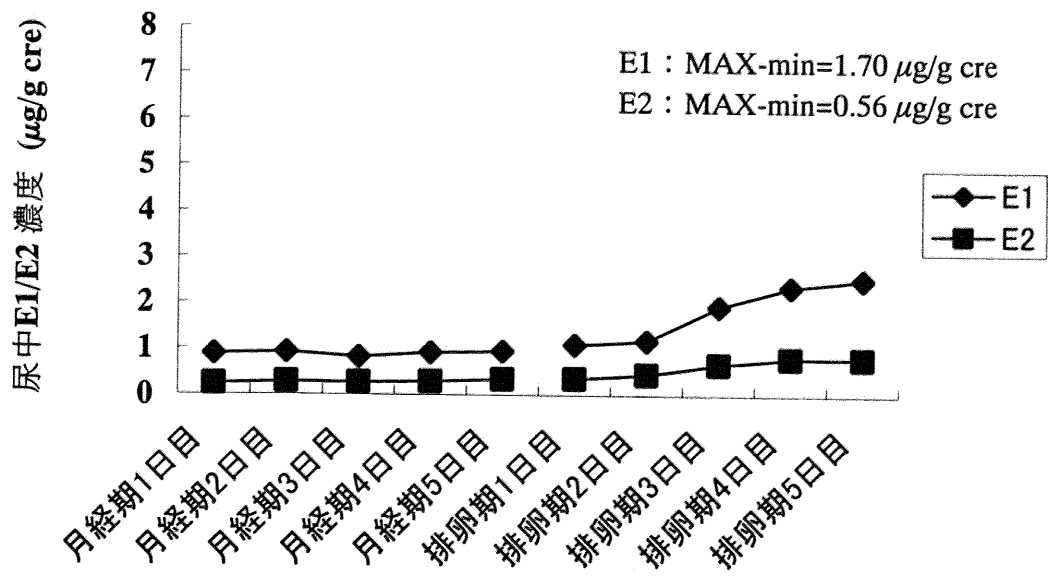


Fig. 24 対象者 E の排卵期および月経期の尿中 E1、E2 濃度

### 3-4 考察

今回の5名の女子学生の各人の10日間の尿中MEHP濃度平均値 (Table 11) は、第3章で報告している妊婦40名の尿中MEHP濃度中央値  $9.83 \mu\text{g/g cre}$  や Itoh et al.

(2005) の報告している36名の日本人男女 (4~70歳) の尿中MEHP濃度中央値は  $4.5 \mu\text{g/g cre}$  とほぼ同レベルであるということから、年齢や性別などによらず、日本人のDEHP曝露レベルに桁が違ふほどの大きな差はないということが示唆される。また、Blount et al. (2000b) が報告している289名のアメリカ人男女 (20~60歳) の尿中MEHP濃度中央値  $2.7 \mu\text{g/g cre}$  や Koch et al. (2003) が報告している85名のドイツ人男女 (7~64歳) の尿中MEHP濃度中央値  $9.2 \mu\text{g/g cre}$  と比較してみてもほぼ同レベルであった。また、MEHP以外の代謝産物においても同レベルであった (Table 16)。これらのことから、第3章の3-4でも述べているように、やはり生活習慣による集団レベルのDEHP摂取量代表値の差は大きくないようである。

第3章では、妊婦42名の尿中MEHP、MEOHP、MEHHP濃度の間には有意な相関がみられた。しかし、今回の対象者5名の各人の尿中MEHP/MEOHP/MEHHP濃度の関係をみたところ (Fig. 10-14)、対象者Dを除く4名ではMEHPとMEHHP、MEHPとMEOHPの間には弱い相関がみられるか、あるいは相関はみられないが、MEHHPとMEOHPの間には相関がみられた。一方、対象者Dでは、MEHPとMEHHPの間には相関がみられ、MEHPとMEOHP、MEHHPとMEOHPの間には相関はみられなかった。今回の結果から、3つの代謝産物は同じ代謝経路上にあるにもかかわらず、①なぜMEHPとMEHHP、MEHPとMEOHPの間に相関がないのか、②なぜMEHHPとMEOHPの間の相関は高いのか、③なぜ相関のある代謝産物のペアが対象者によって異なるのか、という3つの疑問点が挙げられた。このように、個人間 (妊婦の測定結果より) と個人内 (女子学生の測定結果より) では成分間の相関の様子が異なっていた。しかし、これまでにこのような報告はなく、原因は今のところ不明であり、今後の検討課題とする。

尿中DEHP代謝産物濃度をもとに算出した推定DEHP摂取量 (Table 12) は精巢毒性及び生殖毒性試験結果から得られた無毒性量 (NOAEL)  $3.7 \text{ mg/kg/day}$  及び  $14 \text{ mg/kg/day}$  に安全率1/100を掛けて求められた日本の厚生省によるDEHPの一日耐容摂取量 (TDI)  $40 \sim 140 \mu\text{g/kg/day}$  (厚生省, 2000) よりもはるかに低い値であった。また、米国環境保護庁 (U.S. Environmental Protection Agency (EPA)) によるDEHPの参照容量 (RfD) は、反復投与毒性試験結果から得られた最小毒性量 (LOAEL)  $19 \text{ mg/kg/day}$  に安全率1/1000をかけて求められた  $20 \mu\text{g/kg/day}$  と比較してみても低い値であった。このように、今回の対象者5名のDEHP摂取量代表値はわが国におけるTDI ( $40 \sim 140 \mu\text{g/kg/day}$ ) やEPAのRfD ( $20 \mu\text{g/kg/day}$ ) の1桁から2桁低い値であり、TDIやRfDからみるとヒト健康に問題ない摂取レベルであった。

今回の測定結果 (Table 11) に分散分析 (Table 13-15) を適用して算出した、尿中MEHP、MEOHP、MEHHP濃度の個人内変動は87%、90%、70%であり、個人内 (日間) 変動は各々36%、37%、37%と比較的小さかった。個人内 (日間) 変動が $\sim 40\%$ と比較的小さいことから、日常生活を送る上でDEHPへの曝露はある種の加工食品から起こるということを考慮すると、現在は、PVC製手袋使用規制前の市販弁当のような高レベルのDEHP汚染食品は存在しないことが示唆される。さらに、この結果は、スポット尿を用いても、各個人の日常のDEHP摂取量を推定できることを示唆しており、今後、DEHPのヒト健康影響評価を行う際の曝露評価を行う上で、重要な知見を得ることができた。また、Scheffeの多重比較検定を行なったところ、Dのみ尿中DEHP代謝産物濃度が他の対象者よりも有意に高かった。このことから、Dを除く4名の尿中

DEHP 代謝産物濃度には差がない。しかし、本研究の対象者と我が国における既往の研究で報告されている尿中 DEHP 代謝産物濃度を比較したところ (Table 16)、既往の研究のデータ幅は女子学生よりもやや大きい。今回の対象者が全て女子学生であるという、均質的な集団であったことが考えられる。

DEHP 曝露による健康影響評価に関して、Davis et al. (1994a) の動物実験では、比較的高用量の DEHP 経口投与によって成熟雌ラットの発情前期 (排卵期) の血清 E2 濃度の低下が報告されていることから、今回の対象者について、DEHP 曝露レベルと排卵期の尿中 E レベルの関連を検討したが、両者の間に関係は見出せなかった (Fig. 25、26)。なお、ここで対象者の DEHP 曝露レベルは、10 日間分のクレアチニン補正およびモル換算した各尿中 DEHP 代謝産物濃度平均値の合計をとって用いた。

Lovekamp-Swan et al. (2001、2003) は *in vitro* における実験で、MEHP が、DEHP とともに卵巣内の PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor) を活性化することにより、ステロイド合成酵素であるアロマトラーゼ活性ならびにアロマトラーゼ mRNA 発現量を抑制し、E2 の産生を低下させることを報告していることから、ヒトにおいても DEHP 曝露が卵巣機能に影響を及ぼし、月経期から排卵期にかけての E2 レベルの上昇が小さくなるということが考えられる。よって、DEHP 曝露レベルと月経期・排卵期における尿中 E1、E2 レベルの差の関連を検討したが、両者の間に関係は見出せなかった (Fig. 27、28)。なお、ここで対象者の DEHP 曝露レベルは、先に述べたのと同様に、対象者の DEHP 曝露レベルは、10 日間分のクレアチニン補正およびモル換算した各尿中 DEHP 代謝産物濃度平均値の合計をとって用いた。

以上のように、今回は対象者が 5 人と少ないことから尿中 E1、E2 レベルと DEHP 曝露量との間に関係があるともないともいえないが、さらに対象者数を多くすることで、両者の関係をみるのが可能であると考えられる。また、今回の対象者の DEHP 曝露量は動物実験で E2 に影響を及ぼすと報告されている用量に比べると数桁低かったが、環境ホルモン類には低用量作用が見られることがあること、動物実験では女性ホルモンへの影響以外の健康影響 (たとえば精子産生など) にはもっと低い用量で影響があることが疑われていることなど、今後もヒト影響に関する検証を続けていく必要がある。その際に本研究で確立した尿中代謝産物定量法が有用になるであろう。

Table 16 既往の研究における尿中 DEHP 代謝産物濃度 ( $\mu\text{g/g cre}$ )

	日本人妊婦 (n=40) (中央値)	日本人男女 (n=36) *1 (中央値)	アメリカ人男女 (n=289) *2 (中央値)	ドイツ人男女 (n=85) *3 (中央値)
尿中 MEHP 濃度	3.27-39.5 (9.83)	0.79-27.0 (4.50)	<LOD*4-192 (2.70)	<LOQ*5-123 (9.20)
尿中 MEOHP 濃度	1.51-41.0 (10.4)	—	—	6.40-262 (30.4)
尿中 MEHHP 濃度	4.60-26.6 (10.9)	—	—	6.90-449 (40.2)

\*1 Itoh et al., 2005、 \*2 Blount et al., 2000b、 \*3 Koch et al., 2003、 \*4 LOD 1.2 ng/ml、 \*5 LOQ 0.5- 1.2 ng/ml

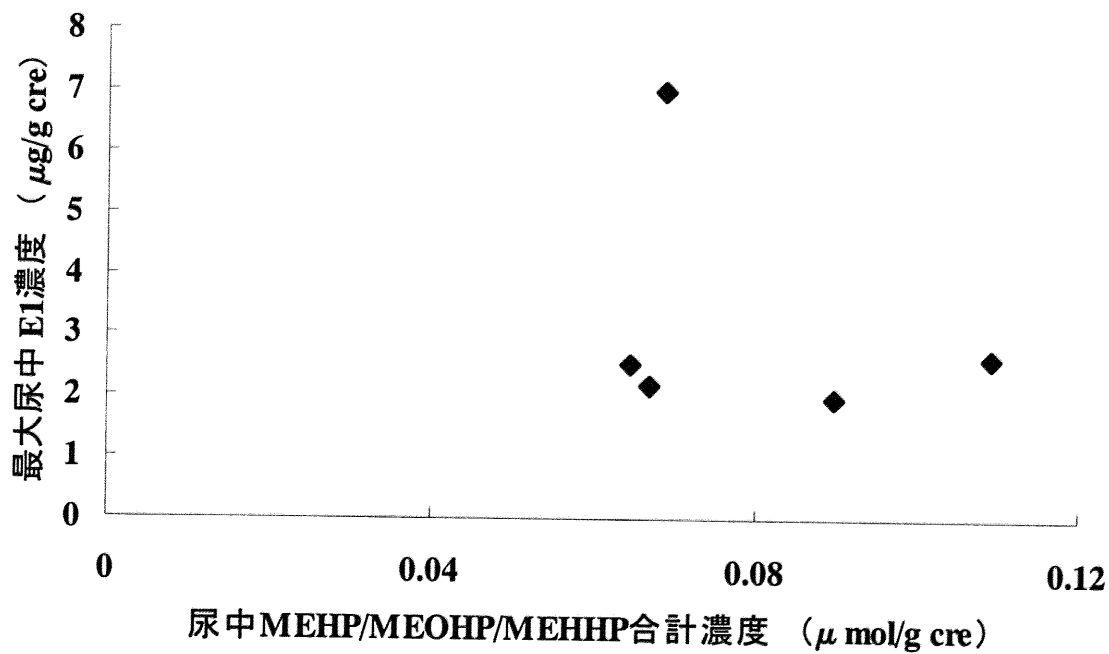


Fig. 25 尿中 MEHP/MEOHP/MEHHP 合計濃度と最大尿中 E1 濃度の相関

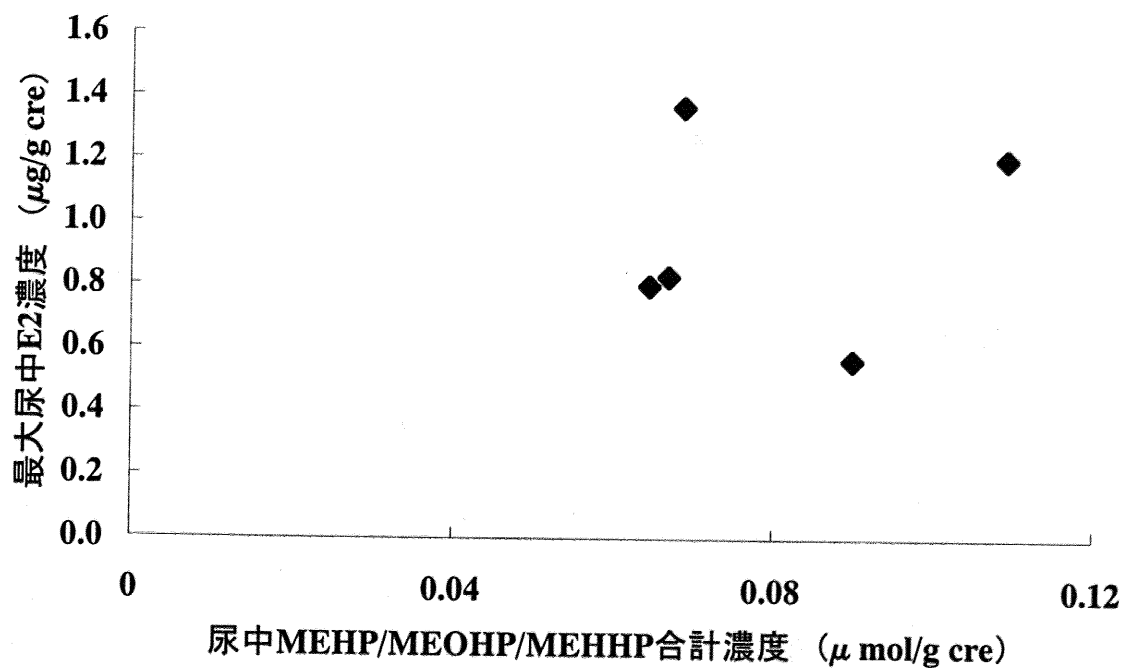


Fig. 26 尿中 MEHP/MEOHP/MEHHP 合計濃度と最大尿中 E2 濃度の相関



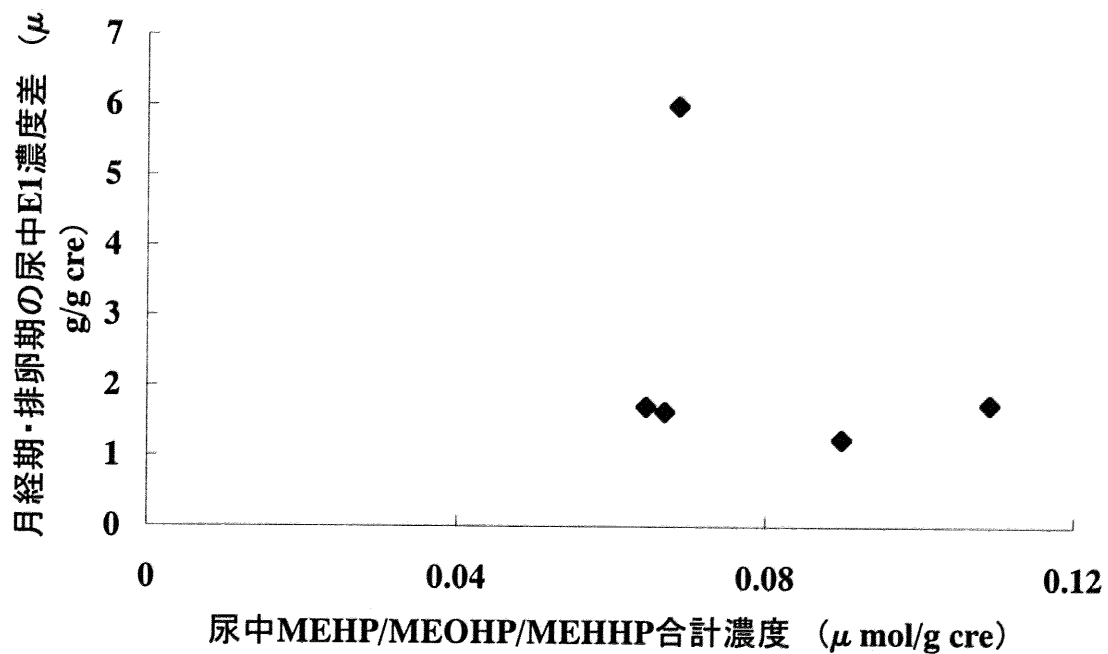


Fig. 27 尿中 MEHP/MEOHP/MEHHP 合計濃度と月経期・排卵期の尿中 E1 濃度差の相関

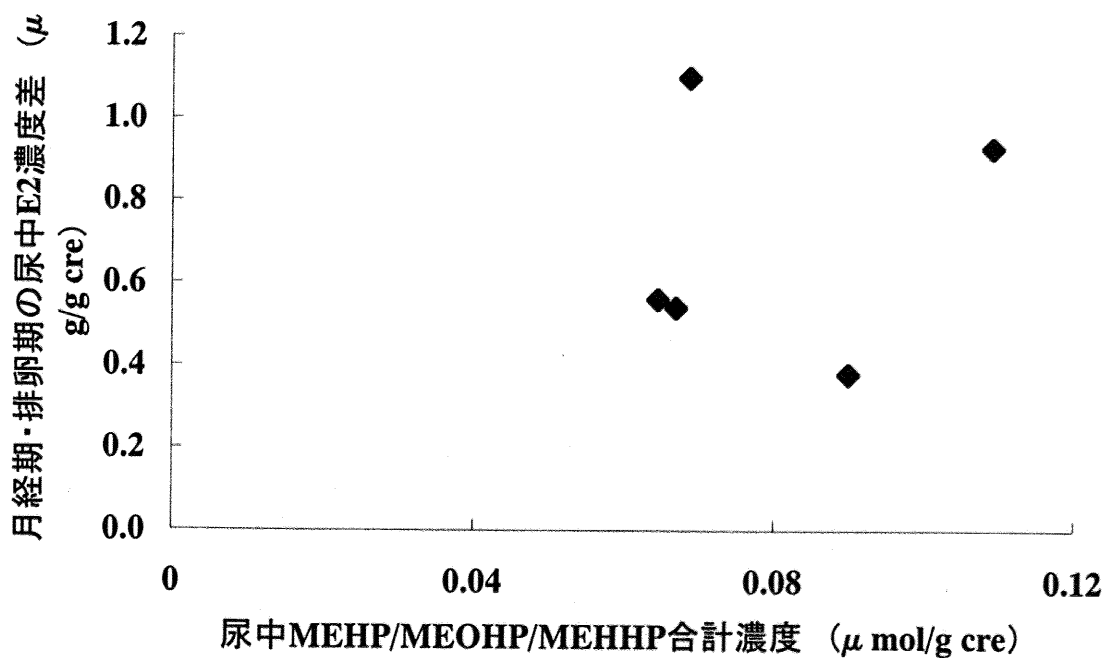


Fig. 28 尿中 MEHP/MEOHP/MEHHP 合計濃度と月経期・排卵期の尿中 E2 濃度差の相関

## 4 結言

### 4-1 3種の尿中 DEHP 代謝産物濃度測定方法の確立

既往の研究に改良を加え、検出下限は尿中濃度に比較しては十分低く、再現性 (RSD、%) は 10 % 程度、添加回収率は >90 %、またサンプリング時の汚染のない尿中 DEHP 代謝産物濃度測定方法を確立したことにより、我が国においてはじめて3種の尿中代謝産物 (MEHP、MEOHP、MEHHP) 分析による包括的な DEHP 曝露評価を可能にした。

### 4-2 成人女性の DEHP 曝露評価

既往の研究に改良を加えて著者が確立した DEHP 代謝産物濃度定量法を用いて、3種の尿中 DEHP 代謝産物 (MEHP、MEHHP、MEOHP) 排泄量を定量することで成人女性の DEHP 曝露評価を行なった。その結果、今回の対象者 (妊婦および女子学生) の曝露量は既往の研究の代表値と同程度であり、生活習慣、年齢および性別等による差は小さかった。また、本研究では DEHP 摂取量の日間変動が小さいことをはじめて明らかにし、スポット尿を用いた日常の摂取レベルの推定が可能であることを示した。また、今回の対象者を含めた日本人の推定 DEHP 摂取量代表値は、我が国における TDI (40~140  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) あるいは EPA の RfD (20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) を下回っていた。

### 4-3 尿分析に基づく DEHP 健康影響評価~DEHP の女性ホルモンへの影響~

DEHP 曝露量 (尿中 DEHP 代謝産物濃度) と女性ホルモン (尿中 E1、E2 濃度) の間には関係は見出せなかった。

### 4-4 今後の方針

環境ホルモン類には低用量作用が見られることがあること、動物実験では女性ホルモンへの影響以外の健康影響 (たとえば精子産生など) にはもっと低い用量で影響があることが疑われていることなど、今後もヒト影響に関する検証を続けていく必要がある。その際に本研究で確立した尿中代謝産物定量法が有用になるであろう。

## 【参考文献】

### 英文雜誌・資料

- Arcadi FA, Costa C, Imperatore C, Marchese A, Rapisarda A, Salemi M, Trimarchi GR, Costa G. Oral toxicity of bis (2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food Chem Toxicol.* 1998; 36: 963-970.
- Blount BC, Milgram KE, Silva MJ, Malek NA, Reidy JA, Needham LL, Brock JW. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC – APCI-MS/MS. *Anal Chem.* 2000; 72: 4127-4134.
- Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, Needham LL, Pirkle JL, Sampson EJ, Lucier GW, Jackson RJ, Brock JW. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect.* 2000b; 108: 979-982.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994a; 128: 216-223.
- Hirayama K, Tanaka H, Kawana K, Tani T, Nakazawa H. Analysis of plasticizers in cap-sealing resins for bottled foods. *Food Add Contam.* 2001; 18: 357-362.
- Hoppin JA, Brock JW, Davis BJ, Baird DD. Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ Health Perspect.* 2002; 110: 515-518.
- Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R. Hepatocarcinogenic potential of di (2-ethylhexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol.* 1996; 26: 365-481.
- Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M, Shinoda A, Suzuki H, Morita M. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2003; 984: 195-202.
- Itoh H, Yoshida K, Masunaga S. Evaluation of the effect of governmental control of human exposure to two phthalates in Japan using a urinary biomarker approach. *Int J Hyg Environ Health.* 2005; 208: 237-245.
- Kesner JS, Wright DM, Schrader SM, Chin NW, Krieg EF. Methods of monitoring menstrual function in field studies: efficacy of methods. *Reprod Toxicol.* 1992; 6: 385-400.
- Koch HM, Drexler H, Angerer J. An estimation of the daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg Environ Health.* 2003; 206: 77-83.
- Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerer J. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates – determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res.* 2003; 93: 177-185.
- Kohn MC, Parham F, Masten SA, Portier CJ, Shelby MD. Human exposure estimates for phthalates. *Environ Health Perspect.* 2000; 108: A440-A442.
- Lamb JC, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987; 88: 255-269.

- Lovekamp TN, Davis BJ. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 172: 217-224.
- Lovekamp-Swan T, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect.* 2003; 111: 139-145.
- Moore MR. Oncogenicity study in rats with di (2-ethylhexyl) phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses, Corning Hazelton Inc Study CHV 663-135, (Cited in KEMI, 2000).
- Otake T, Yoshinaga J, Yanagisawa Y. Exposure to esters from indoor environmental. *J Exp Anal Environ Epidemiol.* 2004; 14: 524-528.
- Pollack GM, Li RCK, Ermer JC, Shen DD. Effects of route of administration and repetitive dosing on the disposition kinetics of di (2-ethylhexyl) phthalate and its mono-de-esterified metabolite in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985; 79: 246-256.
- Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol.* 1997; 35: 225-239.
- Schmid P, Schlatter CH. Excretion and metabolism of di (2-ethylhexyl)-phthalate in man. *Xenobiotica.* 1985; 15: 251-256.
- Silva MJ, Malek NA, Hodge CC, Reidy JA, Kato K, Barr DB, Needham LL, Brock JW. Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2003; 789: 393-404.
- Tsumura Y, Ishimitsu S, Saito I, Sakai H, Kobayashi Y, Tonogai Y. Eleven phthalate esters and di (2-ethylhexyl) adipate in one-week duplicate diet samples obtained from hospitals and their estimated daily intake. *Food Add Contam.* 2001; 18: 449-460.
- Tsumura Y, Ishimitsu S, Saito I, Sakai H, Tsuchida Y, Tonogai Y. Estimated daily intake of plasticizers in 1-week duplicate diet samples following regulation of DEHP-containing PVC gloves in Japan. *Food Add Contam.* 2003; 20: 317-324.
- Tyl RW, Price CJ, Marr MC, Kimmel CA. Developmental toxicity evaluation of dietary di (2-ethylhexyl) phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol.* 1988; 10: 395-412.
- U.S. Environmental Protection Agency 米国環境保護庁 (EPA) Integrated risk information System (IRIS) , Di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (CASRN 117-81-7)(03/01/1997). (<http://www.epa.gov/iris/subst/0014.htm>)

## 和文雑誌・資料

環境省環境保健部環境リスク評価室 化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン（平成 14 年 1 月版）、環境物質の環境リスク評価 第 3 巻、2004.

([http://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/pdf/chap01/02\\_1\\_a.pdf](http://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/pdf/chap01/02_1_a.pdf))

環境庁、内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画 SPEED'98－（2000 年 11 月版）

(<http://www.env.go.jp/chemi/end/endindex.html>)

厚生省生活衛生局食品化学課通知 “食品衛生調査会毒性部会・器具容器包装部会合同部会の審議結果について” 2000.

坂元正一．図説産婦人科 VIEW．東京：メジカルビュー、1993.

外海泰秀．フタル酸エステル類及びフェノール類の食品汚染実態及び摂取量に関する調査研究．平成 11 年度厚生科学研究費助成金（生活安全総合研究事業）研究分担報告書、2000.

高橋健太郎、吉野和男、白井孝昭、西垣新、草刈万寿夫、内田昭弘、山本和彦、北尾学．高感度尿中 estrogen の微量測定法と血中 estradiol - 17 $\beta$  との相関に関する検討．日本不妊学会雑誌 1998；33：23－26.

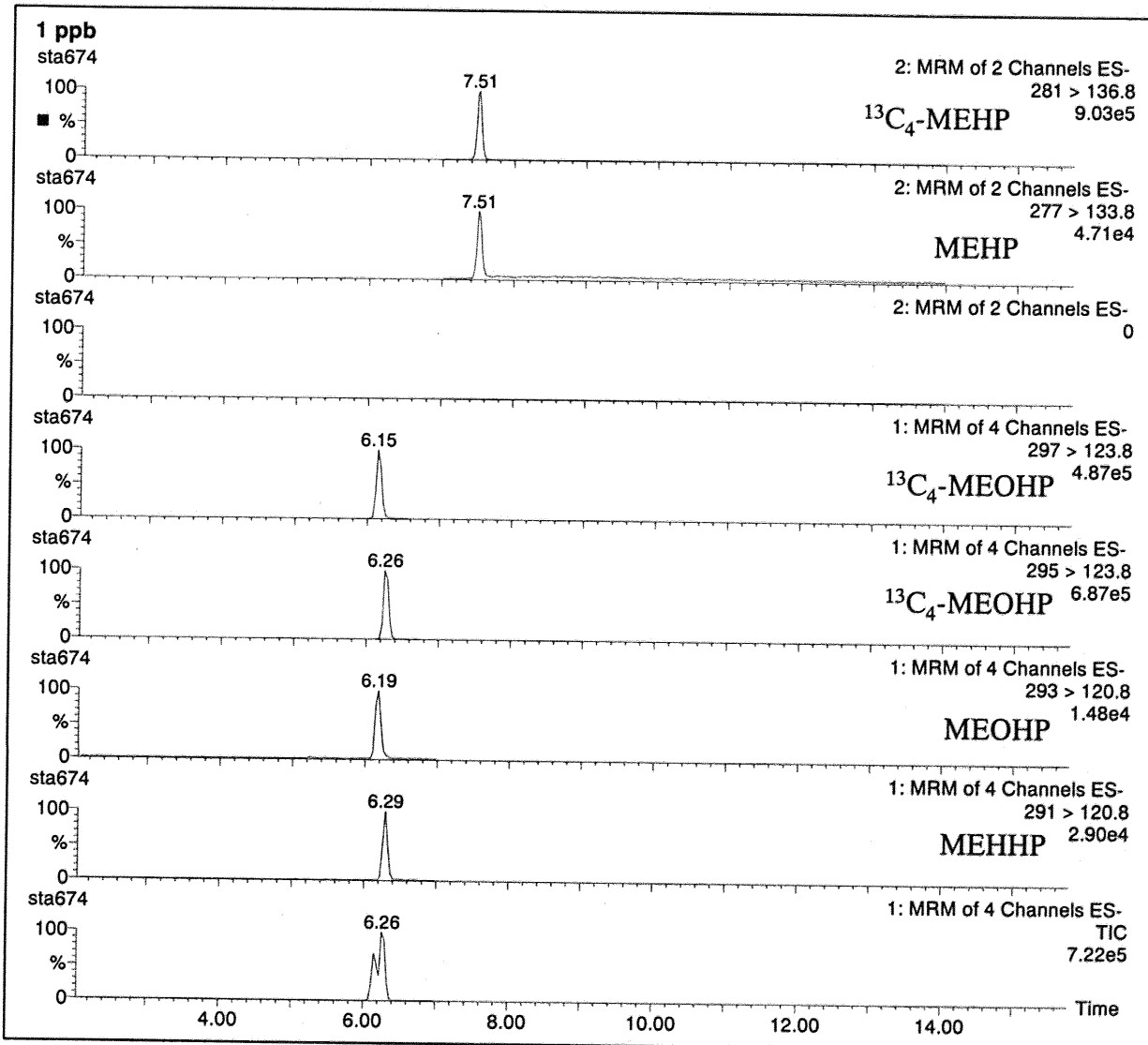
中西準子、吉田喜久雄、内藤航．詳細リスク評価書シリーズ 1 フタル酸エステル－DEHP－．東京：丸善、2005.

藤巻可弓，吉永淳，渡辺知保，芹澤滋子，白石寛明，水本賀文．3 種の尿中代謝産物分析に基づく日本人妊婦のフタル酸ジ（2－エチルヘキシル）（DEHP）摂取量の推定．日本衛生学雑誌 投稿中．

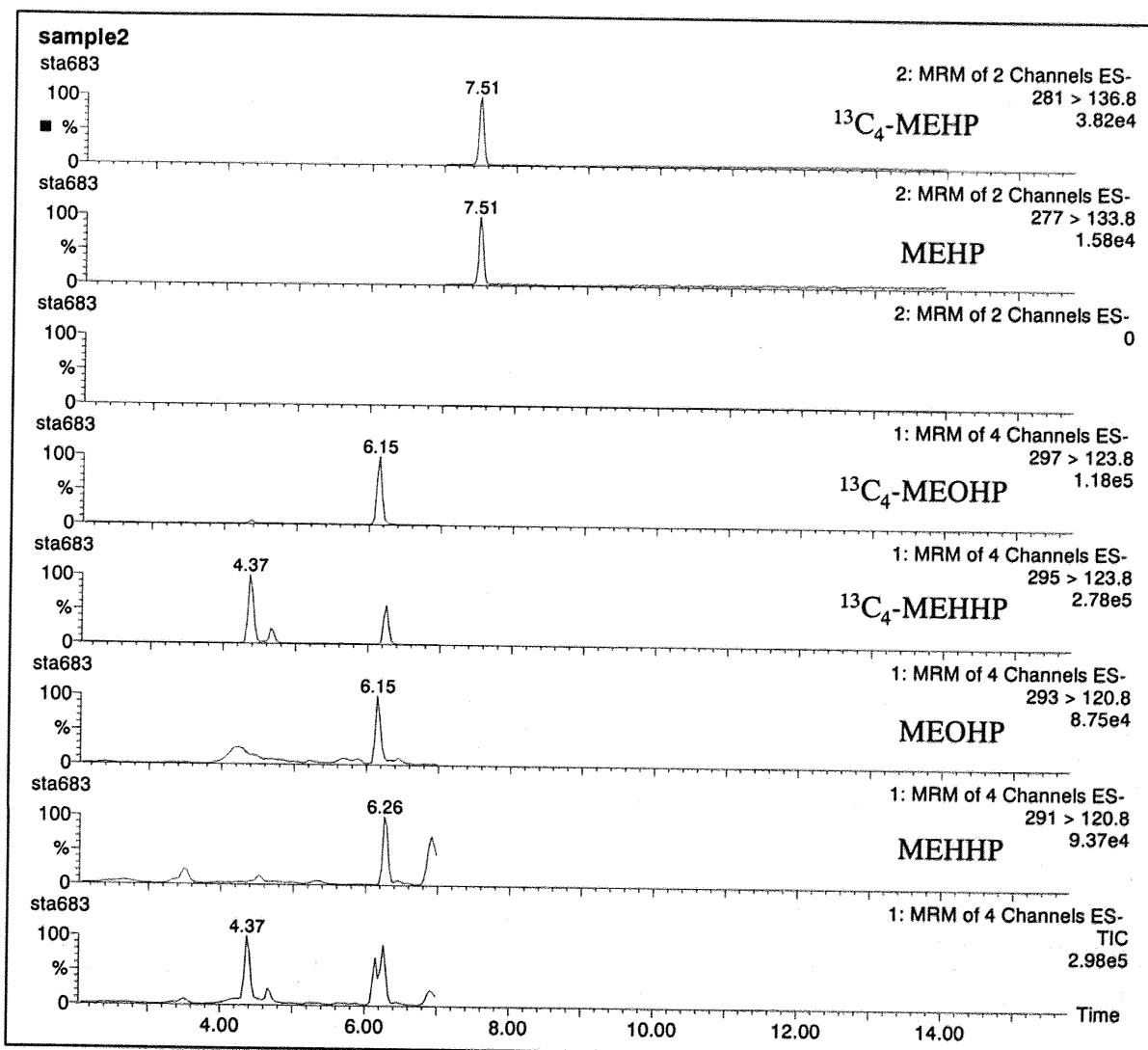
吉村真理子，井之上浩一，花岡知之，伊藤里恵，斎藤貢一，高橋謙，山野優子，津金昌一郎，中澤裕之．LC-MS/MS によるヒト尿中のフタル酸モノエステル類の分析及び暴露量評価．第 7 回環境ホルモン学会 講演要旨集 2004；162.

# Appendix A

## 1. MEHP, MEOHP, MEHHP 標準溶液の MRM クロマトグラム

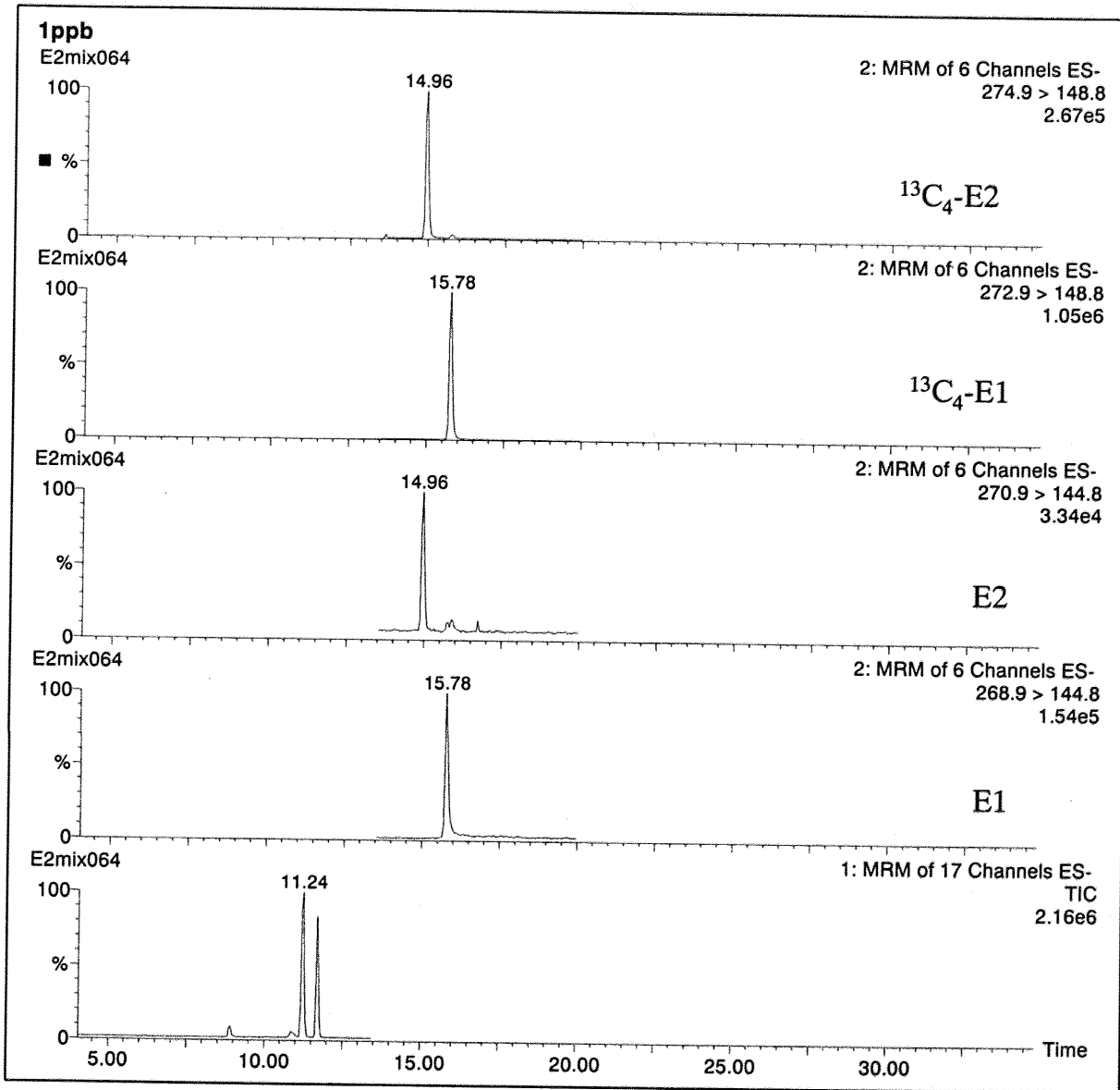


## 2. 尿中 MEHP, MEOHP, MEHHP の MRM クロマトグラム



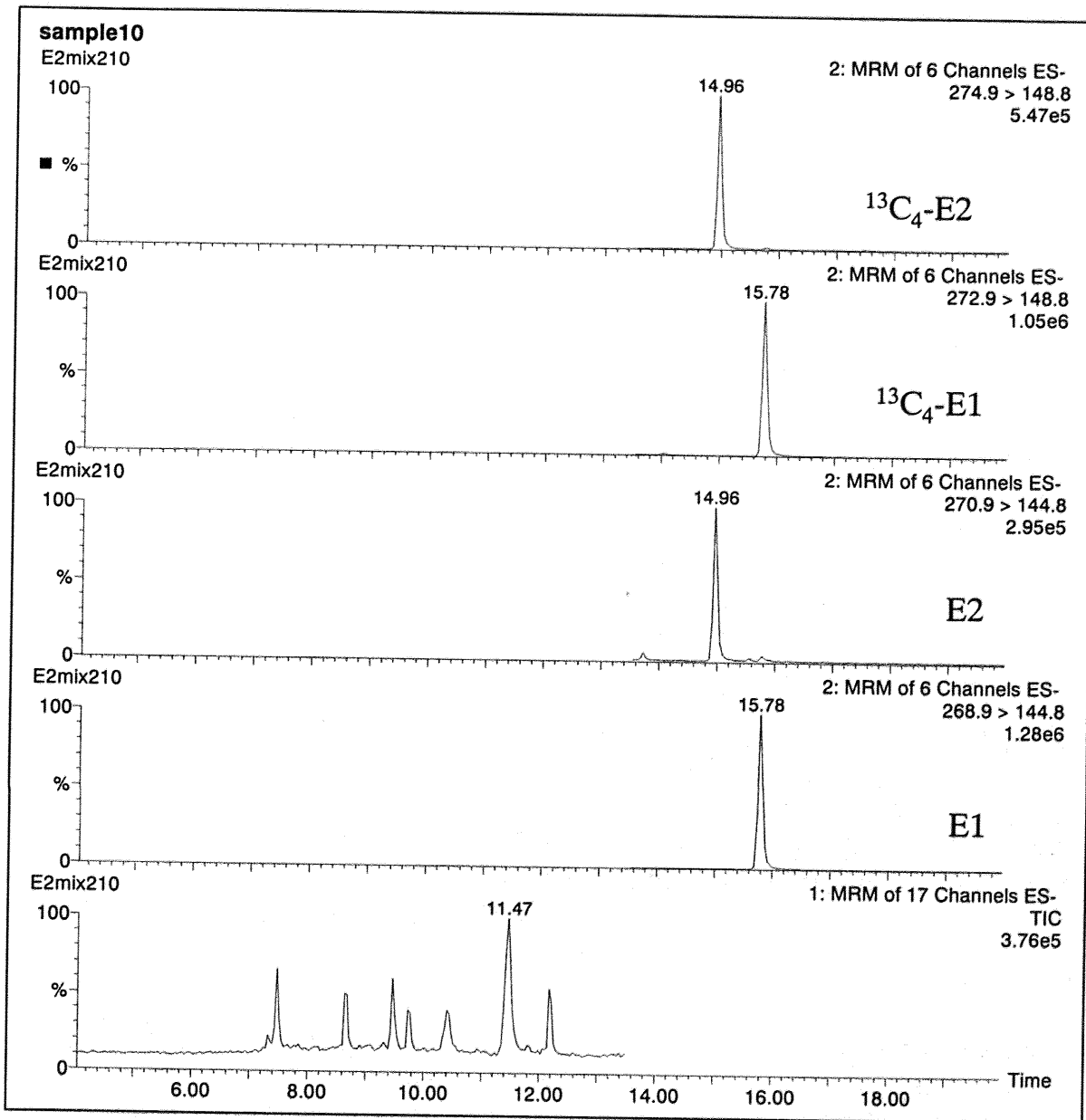
# Appendix B

## 1. E1、E2 標準溶液の MRM クロマトグラム





## 2. 尿中 E1、E2 の MRM クロマトグラム



## Appendix C 学会発表資料

### 1. 第14回環境化学討論会(2005年6月15~17日)

尿中代謝産物分析に基づく日本人妊婦のフタル酸エステル摂取量評価

○ 藤巻可弓、吉永淳(東大・新領域)、芹澤滋子、白石寛明(国立環境研)、  
水本賀文(自衛隊中央病院)

#### 【はじめに】

各種プラスチックの可塑剤として大量に生産・使用されているフタル酸エステル類は、特にその内分泌攪乱作用について様々な研究が行われてきたが、ヒト健康への影響については依然としてほとんど何の知見もないのが現状である。ヒト健康影響の評価には曝露レベルの把握が不可欠であるが、これまで日本国内におけるフタル酸エステル類の曝露評価は極めて数が限られている上に、トータルダイエットの分析など、食物中レベルの測定に基づくもののみである。しかし各種プラスチック類への添加剤としての用途を考えると、必ずしも食物だけでなく、各種 consumer product からの曝露も無視できない可能性があり、バイオマーカーを利用した包括的な曝露評価が望まれていた。最近になって尿中フタル酸エステル類代謝産物の分析法が確立した<sup>1)</sup>ので、尿を用いた包括的な曝露評価が可能になった。そこで本研究では、尿中代謝産物排泄量測定に基づく曝露評価を検討した。対象とするフタル酸エステルとしては、国内で最も可塑剤としての使用量の多いフタル酸ジエチルヘキシル(以下 DEHP)とし、曝露評価をする対象は妊婦とした。動物実験では、妊娠中の曝露によって生まれてきた仔の生殖器や発達への影響が特に注目を集めており、胎児がフタル酸エステル類曝露による影響を最もこうむりやすいと考えるからである。首都圏在住の妊婦の尿中に含まれる3種類の DEHP 代謝産物(MEHP, MEHHP, MEOHP)尿中排泄量を定量し、DEHP 摂取量の評価を試みた。

#### 【方法】

##### 尿試料の採取

2003年6月から、都内某病院産婦人科を受診した妊婦を対象とし、対象者の同意を得たうえで、検査用に採取したスポット尿の残りを提供してもらった。受診時検査用に採取され、検査が終わった尿を病院の検査部において50mlポリプロピレン製ボトルに分注し、一時冷凍保存した。その後、保存サンプルを解凍し、尿中 DEHP 代謝産物濃度測定用・尿中クレアチニン濃度測定用に15mlポリプロピレン製スピッツに分注し、測定まで再度冷凍保存した。なお、本調査の実施にあたっては、当該病院の倫理審査委員会で承認を得た。  
操作方法 2)

全ての尿試料1mlに対し、内標準物質100 $\mu$ l、酢酸アンモニウム(pH6.5)250 $\mu$ lとグルクロニダーゼ5 $\mu$ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間酵素処理した。これにアンモニア水(pH8.0)3mlを加えた。これを、予めアセトニトリル10ml、精製水5mlでコンディショニングした固相抽出カートリッジ(OASIS-MAX 6cc/150mg)にロードし DEHP 代謝産物を保持した。カートリッジを精製水5ml、アセトニトリル5mlで洗浄後、1%ギ酸アセトニトリル5mlで溶出後、窒素気流下で濃縮し、精製水200 $\mu$ lで再溶解したものを高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(HPLC/MS/MS)を用いて測定した。質量分析計は Quattro Ultima (Micromass)、HPLCは HP1100 (Agilent Technologies)を用いた。MEHP、MEOHP、MEHHP 定量においては、内標準物質としてはそれぞれの <sup>13</sup>C4-ラベル体 (Cambridge Isotope Laboratories) を用いた。

## 【結果および考察】

### 採尿用器具からの溶出試験

本調査の尿サンプリングに使用した採尿カップ、ポリプロピレン製ボトル、ポリプロピレン製スピッツからの DEHP 代謝産物汚染を調べた。容器類はそれぞれストックの中からランダムに 3 検体を選び、採尿カップとポリプロピレン製ボトルには 25 ml の、ポリプロピレン製スピッツには 10 ml のアセトンを入れ約 1 時間室温に放置した。試験後のアセトン中 DEHP 代謝産物溶出量は HPLC/MS/MS を用いて定量した。いずれの容器からも DEHP 代謝産物は検出されなかった (表 1)。後述する尿中 DEHP 代謝産物濃度から考えて、汚染レベルは定量に影響のないレベルということがいえる。

### 添加回収試験

各代謝産物の回収率平均値 (n=5) は、尿 1 ml に対し 30 ng 添加においては MEHP では 96 % (85-104 %)、MEOHP では 90 % (75-104 %)、MEHHP では 90 % (87-91 %) であり、150 ng 添加においてはそれぞれ 97 % (91-105 %)、91 % (87-98 %)、93 % (89-96 %) であった。なお本法による尿中濃度に換算した検出下限は MEHP が 0.01 ng/ml、MEOHP が 0.005 ng/ml、MEHHP が 0.005 ng/ml であった。

### 本法による尿中 DEHP 代謝産物測定における再現性

本研究で用いた尿中 DEHP 代謝産物濃度測定の再現性を、精度管理用尿サンプルを 3 バッチで前処理・測定し、評価した。再現性は相対標準偏差 (RSD, %) で表わすと MEHP では 2.8 %、MEOHP では 5.7 %、MEHHP では 6.8 % であり、測定の再現性は良いといえる。以上より、尿中 MEHP、MEHHP、MEOHP 濃度の定量は、回収率、測定精度、再現性について満足できる結果であった。尿中 DEHP 代謝産物濃度 都内某病院に通院する妊婦より提供された尿中 MEHP、MEOHP、MEHHP 濃度はそれぞれ 7.97-25.0 ng/ml (中央値 10.7 ng/ml)、6.10-61.5 ng/ml (中央値 13.05 ng/ml)、4.39-31.2 ng/ml (中央値 6.32 ng/ml) (全て n=10) であった。これを、尿中クレアチニン濃度を用いてクレアチニン 1 g の排泄量あたりに換算したところ、それぞれ 6.78-39.5  $\mu$ g/g cre (中央値 26.9  $\mu$ g/g cre)、6.35-41.0  $\mu$ g/g cre (中央値 19.5  $\mu$ g/g cre)、4.70-21.8  $\mu$ g/g cre (中央値 13.7  $\mu$ g/g cre) (全て n=8) であった。

## 【謝辞】

測定にご協力いただいた東京大学 渡辺知保教授、尿サンプルを提供して下さった対象者の方々、採尿にご協力下さった自衛隊病院検査部のスタッフの方々に深謝いたします。

## 【参考文献】

- 1) Blount BC et al., Quantitative Detection of Eight Phthalate Metabolites in Human Urine Using HPLC-APCI-MS/MS. Anal Chem 2000; 72: 4127-4134
- 2) 吉村真理ら：LC-MS/MS によるヒト尿中のフタル酸モノエステル類の分析及び暴露量評価、環境ホルモン学会 第 7 回研究発表会 ポスター発表 (2004)

## 2. 第8回環境ホルモン学会(2005年9月27~29日)

### 日本人女性の尿中 DEHP 代謝産物排泄量の日間変動

藤巻 可弓<sup>1</sup>、吉永 淳<sup>1</sup>、芹澤 滋子<sup>2</sup>、白石 寛明<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>東京大学、<sup>2</sup>国立環境研究所

#### 【目的】

かつて内分泌攪乱物質の一つとされていたフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) は、各種プラスチック類の可塑剤として多用されているために、人体へ比較的高レベルの曝露が起こりうる可能性があり、健康影響が懸念される。しかし、ヒトに関する DEHP 摂取量や代謝に関するデータが数少ないため、曝露評価をより詳細に行うことが健康影響評価を行ううえでも重要である。本研究では3種類の尿中 DEHP 代謝産物 (MEHP、MEOHP、MEHHP) 排泄量を定量し、その日間変動を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

日本人女性3名を対象とし、連続5日間のセットを2セット分、計10日間分の早朝尿を採取した。尿中 DEHP 代謝産物濃度は HPLC/MS/MS を用いて測定し、クレアチニン排泄量で補正して DEHP 代謝産物排泄量を定量した。

#### 【結果】

表1 尿中 DEHP 代謝産物排泄量 (平均値±標準偏差)

測定の結果、3名の尿中 DEHP 代謝産物排泄量 ( $\mu\text{g/g cre}$ ) の10日間の平均値と標準偏差を表1に示した。その変動係数を日間変動とすると、MEHP、MEOHP、MEHHP ともほぼ30%であり、これが3名の対象者のこの期間の DEHP 摂取量の日間変動を反映していると考えられる。予想に比べて DEHP 摂取量の変動幅が小さいことが判明した。

	A ( $\mu\text{g/g cre}$ )	B ( $\mu\text{g/g cre}$ )	C ( $\mu\text{g/g cre}$ )
尿中 MEHP 濃度	2.75±0.88	5.15±1.33	4.55±1.66
尿中 MEOHP 濃度	10.7±3.63	12.1±3.50	9.34±2.11
尿中 MEHHP 濃度	6.01±1.95	8.81±2.71	5.99±1.21

動とすると、MEHP、MEOHP、MEHHP ともほぼ30%であり、これが3名の対象者のこの期間の DEHP 摂取量の日間変動を反映していると考えられる。予想に比べて DEHP 摂取量の変動幅が小さいことが判明した。

#### Between-day variation in the urinary excretion of DEHP metabolites in Japanese women

Kayumi Fujimaki<sup>1</sup>, Jun Yoshinaga<sup>1</sup>, Shigeko Serizawa<sup>2</sup>, Hiroaki Shiraishi<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>University of Tokyo; <sup>2</sup>National Institute for Environmental Studies

Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) has been widely used as plasticizer. Its endocrine disrupting potential has been pointed out, however, its human health risk is not yet fully elucidated. Apparently more information on human exposure, metabolism and toxicities of DEHP are needed. The purpose of the present study was to determine daily variation in the urinary excretion of DEHP metabolites (MEHP, MEOHP, and MEHHP) to characterize variation in human DEHP exposure levels in Japanese.

Spot urine samples were collected for 10 days from 3 Japanese women. The concentrations of DEHP metabolites were measured from the urine samples by HPLC/MS/MS. The between-day variation in the urinary excretion of MEHP, MEOHP and MEHHP was calculated to be 26-37%, 23-34%, 20-32%, respectively.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心にご指導してくださった東京大学大学院新領域創成科学研究科環境健康システム学分野の吉永淳助教授に感謝の意を表します。

実験の分析等にあたり、東京大学大学院医学系研究科人類生態学分野の渡辺知保教授、国立環境研究所の芹澤滋子さん、白石寛明先生にはひとかたならぬお世話になりました。ありがとうございました。

サンプリングにご協力いただいた自衛隊中央病院の水本賀文先生、妊婦さん、女子学生の皆さまには、感謝の念にたえません。

さらに、研究室の先輩、同輩、後輩の皆さんのおかげで無事に2年間研究をすることができました。本当にありがとうございました。