

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

脳の発達臨界期にあたる幼児期の殺虫剤ばく露量モニタリング (5-1551)

平成27年度～平成29年度

Biological Monitoring of Insecticide Exposure during Toddler Years
as a Critical Period for Brain Development

〈研究代表機関〉
名古屋市立大学

〈研究分担機関〉
名古屋大学

平成 30 年 5 月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 幼児の殺虫剤ばく露量評価とその由来の探索に関する研究 （名古屋市立大学） 要旨	14
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-2 おむつ尿中の殺虫剤およびその代謝物の測定法開発に関する研究 （名古屋大学） 要旨	34
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
III. 英文Abstract	53

I. 成果の概要

課題名 5-1551 脳の発達臨界期にあたる幼児期の殺虫剤ばく露量モニタリング
 課題代表者名 上島 通浩（名古屋市立大学）
 研究実施期間 平成27～29年度
 累計予算額 104,504千円（うち平成29年度：34,234千円）
 予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード エコチル調査、殺虫剤、幼児、曝露、尿中代謝物、生物学的モニタリング、おむつ、脳、臨界期

研究体制

- (1) 幼児の殺虫剤ばく露量評価とその由来の探索に関する研究（名古屋市立大学）
- (2) おむつ尿中の殺虫剤およびその代謝物の測定法開発（名古屋大学）

1. はじめに（研究背景等）

脳は出生後に急激に発達する臓器であり、3歳までに成人の重量に近づくことが知られている。前頭前野の神経細胞は3歳までに著しく成長し、その後思春期までは発達が緩やかになる。神経線維の髄鞘化は延髄、橋、中脳・小脳、大脳皮質の順に進み、3歳頃に髄鞘化が成人の80%に達し、脳機能の発達の基盤がつくられる。すなわち、生後3歳までは脳の発達の臨界期であり、環境化学物質の子どもの脳への影響を解明するには、この時期の曝露評価が必要となる。

体内半減期が短い化学物質の個人曝露量の評価は、尿中に排泄される代謝物等を測定する生物学的モニタリングによるのが有効である。しかし、排尿が自立する前の乳幼児期は尿採取が困難であることから、世界各国の小児環境保健領域の疫学調査では、0～3歳までの生物学的モニタリングは一般には行われていない。したがって、脳の発達臨界期における曝露量が未知のままにとどまり、この観点での影響評価が不十分となるおそれがある。特に、歩き始めの時期にあたる1歳半前後の幼児は、この時期以降の子どもとは生活行動様式が大きく異なるため、4歳以降に測定した曝露量をこの時期に外挿しても正確性を欠くおそれが強い。

環境省の出生コホート研究である「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」においても、全国統一のプロトコールとしては4歳より前の時期の採尿は行われない。このため、エコチル調査のサブコホート（愛知ユニットセンターにおける同調査参加者）を対象に追加的に行う調査（追加調査）として、1歳半及び3歳時点で尿試料を採取し、神経作動性殺虫剤への曝露量を明らかにする本研究を計画した。対象とする薬剤群は農薬として用いられ、環境や食品中に広く存在するため、採尿と同時に食事調査を行い、生物学的モニタリング結果との関係を解析することで曝露源の推定が可能か検討した。

2. 研究開発目的

脳の発達臨界期である生後3歳までの時期の殺虫剤曝露が、その後の子どもの成長・発達に影響を与えるか、エコチル調査において将来検証することを視野に、エコチル調査の追加調査として実施する本研究では、以下の3点を最終目標とした。

- 1) エコチル調査の参加児を対象に、生体試料を用いた化学物質の曝露評価を実施しない1歳6か月および3歳時点において、曝露情報解析のための尿試料を各1,000検体収集すること
- 2) 神経系を作用点とすることや使用量の多さという点から国民的関心が高い、ピレスロイド系殺虫剤(PYR)、ネオニコチノイド系殺虫剤(NEO)、有機リン系殺虫剤(OP)について、1歳6か月および3歳時点の曝露量を明らかにすること

3) 食事調査を並行して行い、尿中の殺虫剤代謝物プロファイルと食事との関係の推定を行うこと。これは探索的検討であるが、その目的は、将来、農業曝露による脳発達へのリスクが集団として観察された場合に役立つ、曝露源対策の判断材料を創出することにある。

3. 研究開発の方法

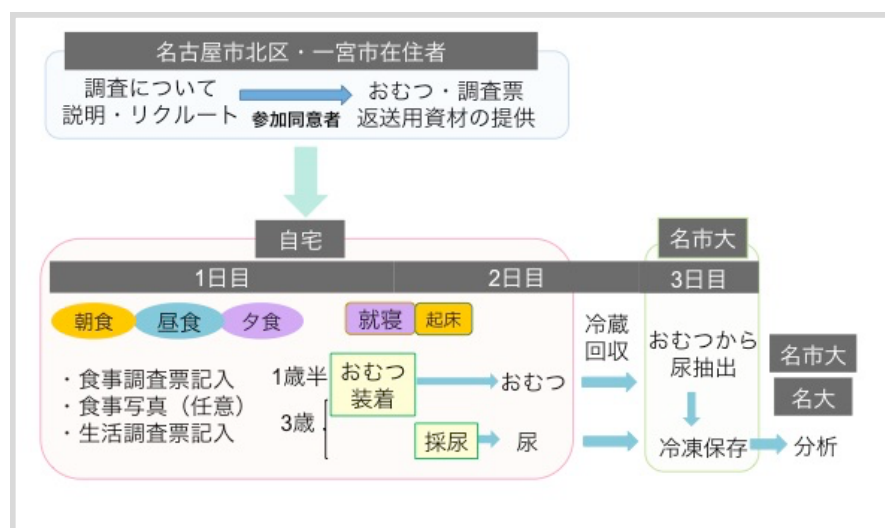
本研究の実施にあたっては、サブテーマ(1)およびサブテーマ(2)それぞれに、名古屋市立大学および名古屋大学の倫理審査委員会の承認を得た。

(1) 幼児の殺虫剤ばく露量評価とその由来の探索に関する研究

①参加者リクルート

エコチル調査参加者のうち、名古屋市北区および一宮市で行われる、1歳6か月児および3歳児健康診査を受診する方を対象に、前者は2015年6月8日～2016年6月28日に、後者は2016年5月11日～2017年12月20日に、本研究への参加を依頼した。同意の得られた方(保護者による代諾)に食事や農業使用状況等に関する調査票、指定銘柄の使い捨て紙おむつを配付した。3歳の時点では、健康診査の受診時期にばらつきが生じたため、調査の途中からは、1歳半時点の調査に協力したが3歳児健康診査未受診の方と、引越しにより別の自治体で受診する方を適宜抽出し、葉書による協力依頼も並行して行った。この協力依頼に同意していただいた場合も、調査資材一式を送付した。

参加者には健康診査受診後1か月以内を目途に調査を行うよう依頼した。調査の流れを図(1)-1に示す。依頼した調査内容は、1)朝食、昼食、夕食について食事調査票への記入、2)食事内容の調査日または直前1週間の生活についての調査票への記入、3)その日の就寝時に、配布した指定銘柄の紙おむつの装着、4)翌朝までに使用した紙おむつ全ての大学への冷蔵下での返却、5)食事写真の撮影(任意での協力事項)の5項目である。返却されたおむつからは後述の方法で尿を抽出し、抽出尿は測定に使用するまで-80℃で保存した。



図(1)-1 調査のながれ

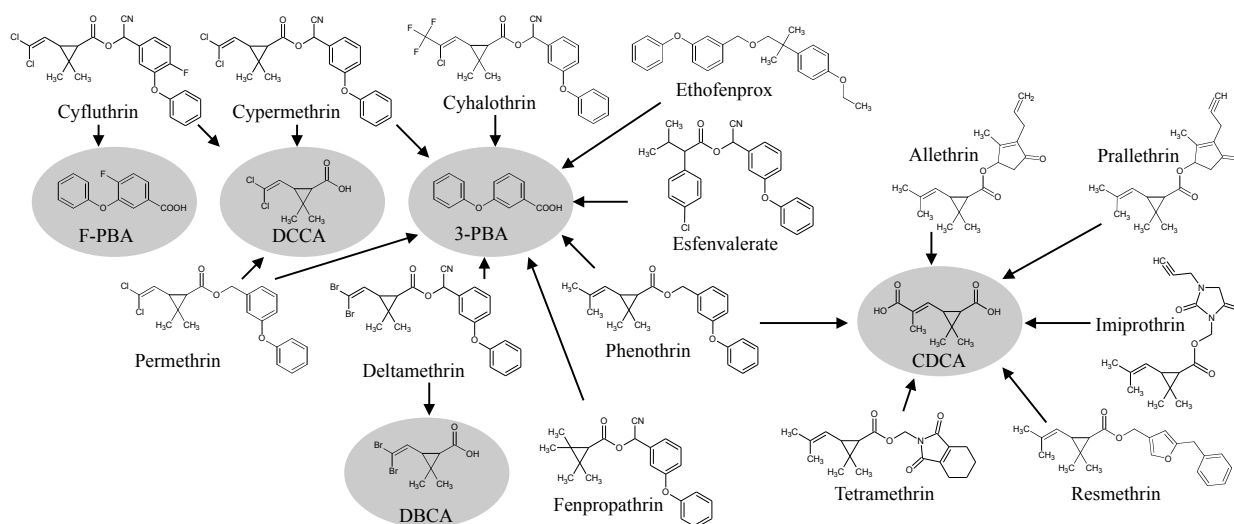
②使用済み紙おむつからの尿の抽出法の改良

紙おむつに排泄吸収された尿を利用したPYR殺虫剤代謝物の高感度測定法を我々は既に公表しているが、本研究ではPYR、NEO、OP殺虫剤の尿中親物質または代謝物量の測定に十分な尿量を確保する必要がある。そこで、採取する尿量を十分確保しつつ、時間とコストを抑えるように抽出法を改良した。

③おむつからの抽出尿（おむつ尿）を用いたPYR代謝物測定

前述の通り、使用済み紙おむつから抽出した尿を用いた高感度測定法を既に確立していたため、おむつが到

着次第PYR代謝物の測定を開始した。しかし、ガスクロマトグラフトンデム質量分析計(GC-MS/MS)を用いれば従来からの測定対象物質である $trans$ -クリサンテマムジカルボン酸($trans$ -CDCA)および3-フェノキシ安息香酸(3-PBA)をより高感度に測定でき、さらに、これまで検出できなかった cis -および $trans$ -3-(2,2-ジクロロビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパン-1-カルボン酸(total DCCA), cis -3-(2,2-ジブロモビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパン-1-カルボン酸(DBCA)および4-フルオロ-3-フェノキシ安息香酸(F-PBA)も測定できることが明らかになった(図(1)-2参照)。このため、計画変更の承認を経て、おむつ尿中のPYR測定は2年目よりGC-MS/MSを有するサブテーマ(2)において行った(結果はサブテーマ(2)に記載した)。



図(1)-2 PYR殺虫剤と尿中代謝物との関係

④おむつ尿中のOP代謝物の測定

サブテーマ(2)で決定したおむつ尿からのOP代謝物抽出法を用いて、尿中OP代謝物を測定した。当初はサブテーマ(2)で行うこととしていたが、本研究費でサブテーマ(1)のためにレンタルした超高速液体クロマトグラフトンデム質量分析計(LC-MS/MS)を使用した方が高感度で測定可能であることが判明した。したがって、計画変更の承認を経て、この測定はサブテーマ(1)において実施した。

⑤おむつ尿中のNEOの測定

サブテーマ(2)で決定したおむつ尿からのNEOの抽出法を用いて、尿中NEOの測定を行った。サブテーマ(2)での検討では、I.Sとしてアセタミプリド重水素置換体(ACE-d)を使用したが高感度で測定可能であることが判明した。したがって、計画変更の承認を経て、この測定はサブテーマ(1)において実施した。

⑥尿中殺虫剤プロファイルと曝露源の探索

1歳半児の尿中OP代謝物、PYR代謝物、NEOの量データと、おむつ装着日又は装着前1週間以内の生活内容や食意識、エコチル調査(全体調査)質問紙で収集した社会経済要因も含めた基本属性、受動喫煙、飲酒、殺虫剤等の直近1年間の使用状況の情報、おむつ装着日に摂取した食材の摂取量のデータとを結合した。生活環境については、尿中殺虫剤代謝物濃度が上位5%の場合のオッズ比を求めた(下位95%が参照カテゴリー)。ロジスティック回帰分析には χ^2 検定又はFisherの正確検定で有意確率15%未満の項目をモデルに組み込んだ。食材については、全体の1割以上が摂取していた食材の摂取量10gを1単位として同様にロジスティック回帰分析を行った。また、殺虫剤代謝物濃度を中央値で2群に分け、食材摂取とのコレスポンデンス分析を行った。最後に生活環境に関する質問項目、食の意識に関する質問項目、摂取食材リストよりそれぞれの傾向スコアを算出し、尿中代謝物濃度を従属変数として重回帰分析を行った。

(2) おむつ尿中の殺虫剤およびその代謝物の測定法開発

① おむつ尿中のNEOの分析法開発

対象物質はNEOであるアセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアメトキサム、クロチアニジン、ジノテフランおよびアセタミプリド代謝物である*N*-デスメチルアセタミプリドの計7物質とした。測定法は、おむつ尿中PYR代謝物の測定法と、おむつを介さずに採取した尿に含まれるNEOの分析法を組み合わせた方法を参考に、検討した。おむつの表面を切り、吸収材約6 gを取り出し、それを10 mLシリンジに詰めた。このシリンジをアセトン12 mLが入った20 mLシリンジとチューブで連結後、各シリンジを交互に5回ずつ押し出し、有機溶媒がおむつ吸収剤を通過することで尿を抽出した。抽出液を窒素ガスの吹き付けにより濃縮したのちに、重量法で推定した尿量まで精製水でメスアップし、これをおむつ尿として各NEOおよび代謝物の分析に供した。おむつ尿を多孔性珪藻土カラムおよび逆相系固相カラムにて精製し、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて分離定量分析を行った。

② 尿中のPYR代謝物の分析

我々が確立した、おむつ尿を利用した高感度殺虫剤代謝物測定法では、3-PBAおよび*trans*-CDCAのみを測定対象としていた。しかし、世界的にはさらに多くの尿中PYR代謝物を分析する研究潮流があるため、PYR代謝物の測定項目として*cis*-および*trans*-DCCA (total DCCA)、DBCA、F-PBAを追加した。また、期間内に測定を終了すべく、ハイスループット分析の実現に向けて各種検討を加えた。1歳半児および3歳児から得られた尿中のPYR代謝物を測定し、それらの濃度分布、性差、季節変動および生活環境要因との関係を考察した。

③ おむつ尿中のOP代謝物の分析法開発と測定

6種類のジアルキルリン酸(DAP)を対象に、NEOと同様に分析法を開発した。測定は前述のようにサブテーマ(1)において行った(分析法を含め結果はサブテーマ(1)に記載した)。

4. 結果及び考察

(1) 幼児の殺虫剤ばく露量評価とその由来の探索に関する研究

① リクルート結果と参加者属性

1歳半調査においては、全体調査参加者1,439人のうち、1,386人に声掛けを行い、1,196人から同意を得た。声掛け率は96.3%、同意率は83.1%であった。その内、期限内におむつ提出して下さった方は1077名(1名はトイレトレーニングが完了しており、早朝尿を提出)であった。

3歳調査においては、全体調査参加者2,776人のうち、2,414人に声掛けを行い、1,839人から同意を得た。声掛け率は87.0%、同意率は76.2%であった。その内、期間内におむつ又は早朝尿を提出して下さった方は1,671名であった。3歳調査のおむつ回収は2月末まで継続したが、解析は2017年9月末日までにおむつ又は早朝尿の提出があった1,470人を対象とした。

1歳半のおむつ・尿提出者1,077人の属性は、男児548人(50.9%)、女児529人(49.1%)、児の月齢は16か月～24か月(最頻値が19か月で46.7%)、母親の出産時年齢は18～46歳(中央値32歳; 四分位範囲29～35歳)、出生時体重は815～4,542g(中央値3,060g; 四分位範囲 2,804～3,319g; 低出生体重児7.9%)であった。3歳のおむつ・尿提出者1,671人の属性は、男児866人(51.8%)、女児805人(48.2%)、児の月齢は34か月～42か月(最頻値が37か月で56.5%)、母親の出産時年齢は18～46歳(中央値32歳; 四分位範囲29～35歳)、出生時体重は815～4,542g(中央値3,050g; 四分位範囲 2,792～3,308g; 低出生体重児7.6%)であった。

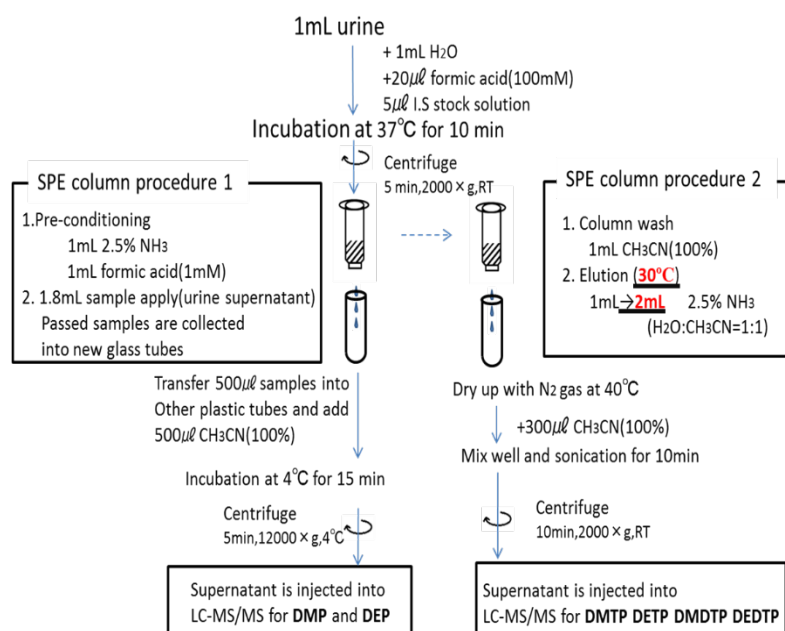
1歳半調査結果の解析には、指定外のおむつを使用した方14名、食事や生活調査票の質問紙の記入日がおむつ装着日ではない可能性がある方27名(2名は指定外おむつの使用者に含まれる)、調査票の記載がない人1名の計40名を除外し、生活環境や摂取食材の寄与の解析を行った。3歳時調査の解析には、指定外のおむつを使用した方17名、食事や生活調査票の質問紙の記入日がおむつ装着日ではない可能性がある方48名(2名は指定外おむつ使用者に含まれる)、服薬の影響の可能性のある方1名の計64名を除外して生活環境の寄与の解析を行った。

②使用済み紙おむつからの尿の抽出法の改良

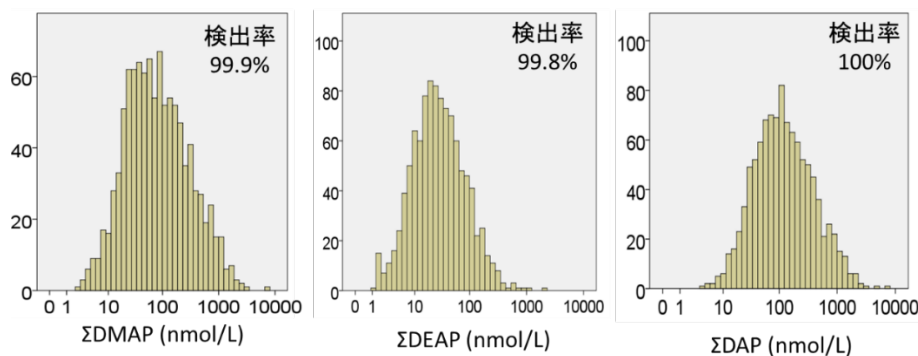
我々は既報³⁾の中で、紙おむつからの尿の抽出の際に、カラムにおむつのポリマーを詰めて抽出する方法を公表しているが、その後改良を加えて、5 mlと10 mlのディスポーザブルシリンジを用いる方法を開発した(学会発表業績⁸⁾)。その結果、多検体を扱えるようになったが、多種類の殺虫剤測定に十分な尿量を得るには、さらに効率化を進める必要があった。そこで、シリンジサイズを大きくし、最大限詰められるおむつのポリマー量を検討し、1人のおむつに対して6回抽出することとした。その結果、おむつへの排尿量が十分ある場合、30 ml弱の尿を抽出回収できるようになった。確立した方法を用いておむつから抽出した尿は、使用まで -80°C で保存した。

③おむつ尿中のOP代謝物の測定

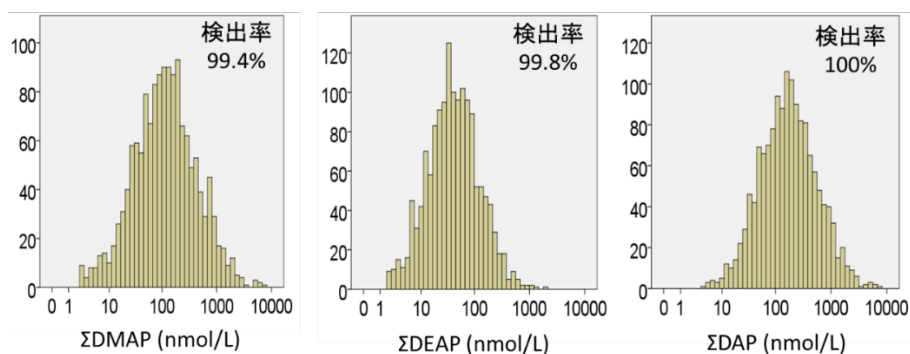
おむつから抽出した尿を用いて、尿中OP共通代謝物であるDAP6種類(ジメチルリン酸, DMP; ジメチルチオリン酸, DMTP; ジメチルジチオリン酸, DMDTP; ジエチルリン酸, DEP; ジエチルチオリン酸, DETP; ジエチルジチオリン酸, DEDTP)を測定した。サブテーマ(2)で決定した尿の前処理方法をレンタルした高感度の分析器の特性に合わせて最適化し、図(1)-3の方法で実施した。1歳半と3歳の尿中OP代謝物量をそれぞれ図(1)-4, 5に示す。メチル系代謝物の総和($\text{DMP}+\text{DMTP}+\text{DMDTP}$, ΣDMP)、エチル系代謝物の総和($\text{DMP}+\text{DMTP}+\text{DMDTP}$, ΣDEAP)、6種類のDAPの総和($\Sigma\text{DMP}+\Sigma\text{DEAP}$, ΣDAP)としてヒストグラムを示した。DAPは1歳半、3歳いずれもほとんどすべての幼児から検出され、対数正規分布に似た分布を示した。



図(1)-3 OP代謝物測定のための前処理方法



図(1)-4 1歳半児の尿中OP代謝物濃度(n=1,077)



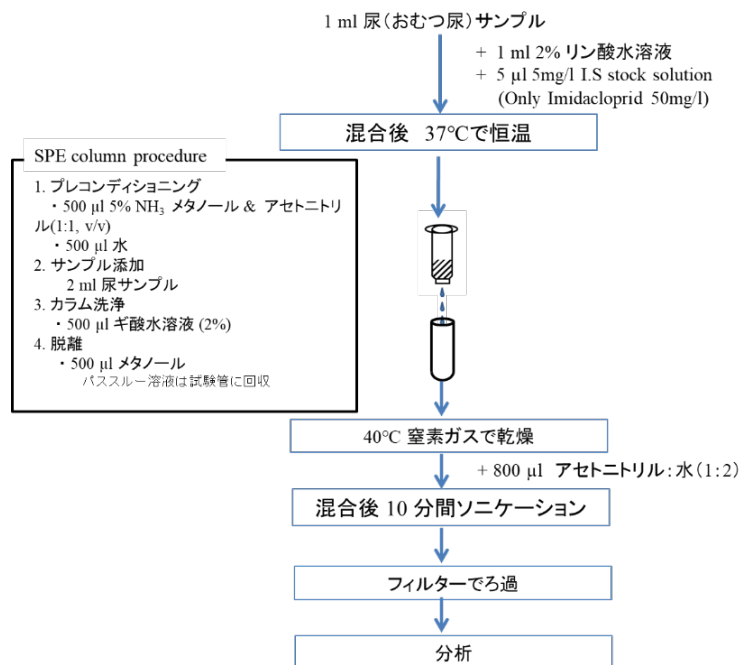
図(1)-5 3歳児の尿中OP代謝物濃度 (n=1,469)

1名は服薬の影響が考えられたため、対象から除外した。

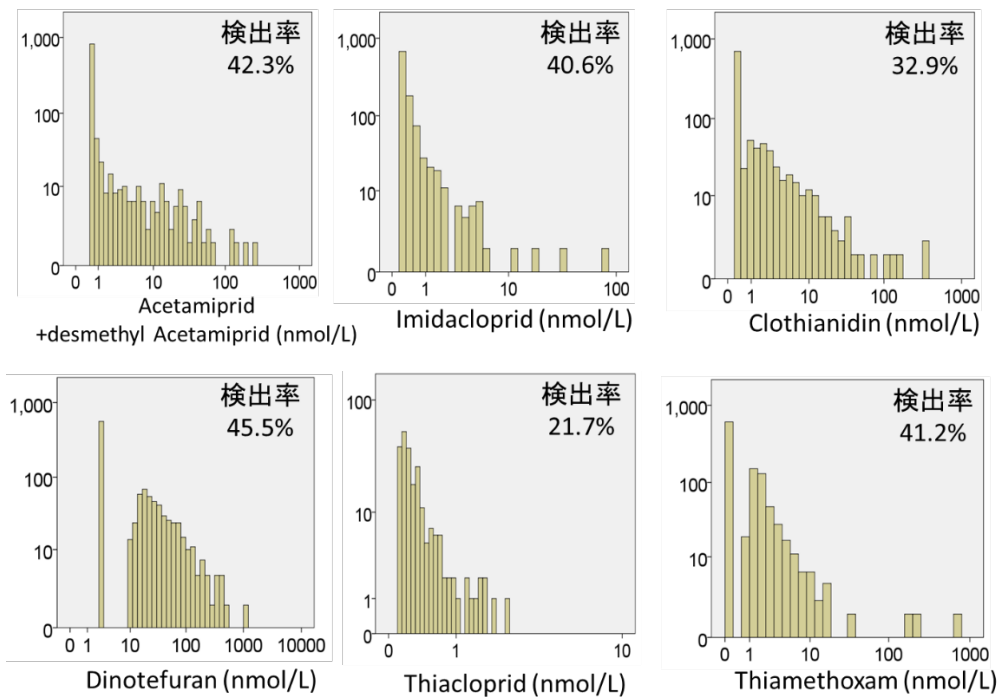
④おむつ尿中のNEOの測定

おむつから抽出した尿を用いて尿中のNEOを測定した。アセタミプリドとその代謝物である

N-デスメチルアセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアメキシサム、クロチアニジン、ジノテフランの7物質を測定対象とした。サブテーマ(2)で決定した尿の前処理方法をレンタルした高感度の機械の特性に合わせて最適化して、図(1)-6の方法で実施した。1歳半と3歳の尿中NEO濃度をそれぞれ図(1)-7, 8に示す。半数以上が検出下限値未満であり、検出された方も低濃度であった。クロチアニジンとチアメキシサムは1歳半の方が3歳に比べて検出率が2倍程度高く、1歳半の方が比較的高い子が多いことが明らかとなった。アセタミプリドとジノテフランも1歳半の方が3歳に比べて検出率が1.5倍程度高かったが、最高値はそれほど変わらなかった。

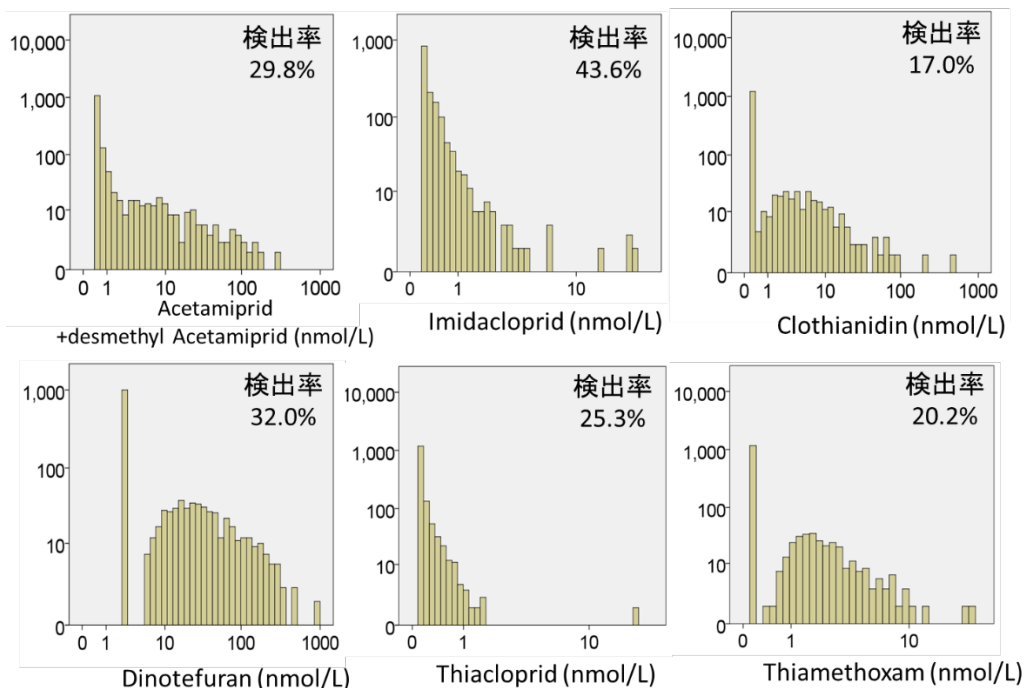


図(1)-6 NEO測定のための前処理方法



図(1)-7 1歳半児の尿中NEO濃度 (n=1,076)

1名は尿量不足のため測定できず

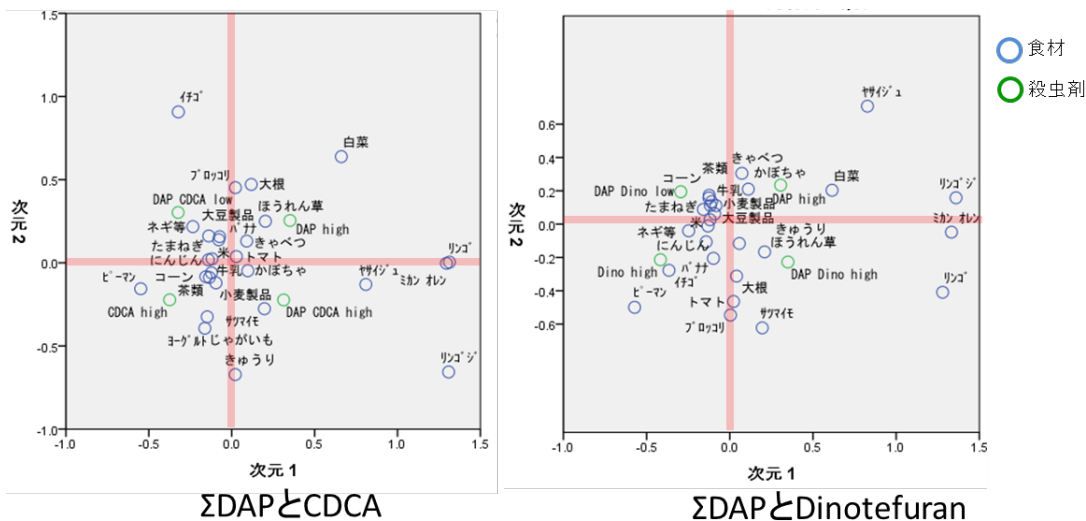


図(1)-8 3歳児の尿中NEO濃度 (n=1,464)

1名は服薬の影響が考えられたため、除外した。5名は尿量不足のため測定できず。

⑤尿中殺虫剤プロファイルと曝露源の探索

1歳半児の殺虫剤排泄量と摂取した食材の相関分析の結果を図(1)-9に示す。PYR代謝物とNEOはそれぞれの総曝露量を示す指標が存在しないため、検出率が高かった物質で解析を行った。例えば、リンゴジュースはOPとPYR高値に寄与するが、ジノテフラン高値とは関連しない可能性が示された。



図(1)-9 1歳児殺虫剤排泄量とおむつ装着日に摂取した食材の関係
各代謝物の排泄量を中央値で2群に分けて解析した。

また、摂取食材パターン、調査直近の生活調査結果や食への意識の回答状況からそれぞれ傾向スコアを算出し、殺虫剤尿中排泄量をどの程度説明できているか示したものが表(1)-1である。いずれにおいても決定係数が高くないが、OPとNEOジノテフランは摂取食材が、PYRは代謝物によって異なるが、生活環境の要因の寄与が相対的に大きいことが示唆された。今回は食材の中には飲料水などは含めておらず、その他の曝露源として今後検討していく必要がある。

表(1)-1 1歳半児殺虫剤排泄量に対するおむつ装着日に摂取した食材、生活環境、食への意識の寄与

		調整済みR ²	標準化係数ベータ		
			食材	生活環境	食への意識
OP	Σ DAP	0.10	0.28	0.06	0.05
PYR	3PBA	0.03	0.14	0.10	0.08
	DCCA	0.20	0.12	0.22	0.09
	CDCA	0.17	0.04	0.27	0.07
NEO	Dinotefuran	0.03	0.13	0.04	0.06

赤色で示したものは有意確率5%未満であった。

(2) おむつ尿中の殺虫剤およびその代謝物の測定法開発

①おむつ尿中のNEOの分析法開発

おむつからの抽出尿にはアセトンが混入しているために、従来の固相抽出法(SPE)ではジノテフランが保持されなかった。このため検討を重ね、ポリマー系陽イオン交換固相抽出カラムを素通りした液を別に回収し、珪藻土カラムによる生成を加えてジノテフランを回収する方法を見出した。回収率や測定値の再現性が不明であったが、検討の結果、概ね良好な妥当性評価の結果を得ることができた。すなわち、既知濃度尿のおむつへの添加実験によってNEOの絶対回収率は41から100%と算出された。検量線はいずれも $r^2 = 0.988$ 以上と良好な直線性を示した(濃度範囲1.25-20 μg/L)。日内変動および日間変動の相対標準偏差(%RSD)は、それぞれ3.3-12.7%および4.3-19.5%であった。検出下限値は0.5 (アセタミプリド)、1.9 (イミダクロプリド)、0.9 (チアクロプリド)、2.8 (チアメトキサム)、3.6 (クロチアニジン)、2.3 (ジノテフラン)、0.4 μg/L (N-デスメチルアセタミプリド)と算出された。予備的な実際の検体測定実験として50人の3歳児から使用済み紙おむつを収集して分析した結果、検出率は74%のジ

ノテフランと68%のN-デスメチルアセタミプリドで高く、その他は10% (アセタミプリド), 4% (イミダクロプリド), 2% (チアクロプリド), 12% (チアメトキサム), 28% (クロチアニジン)であった。おむつ尿を用いた場合の検出下限値は尿を直接分析する既報のそれに比べて高いが、NEOを検出できることが証明された。

②尿中のPYR代謝物の分析

②-1 おむつ尿中のPYR代謝物分析法の検討

おむつ尿中PYR代謝物の分析にあたり、質量分析計の最適化を行った(表(2)-1)。

表(2)-1 GC-MS/MSのPYR代謝物分析条件

	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Collision energy (eV)	Product ion (m/z)
trans-CDCA	10.17	331	9	135(Q), 107
cis-DCCA	11.7	323	28	137(Q), 109
trans-DCCA	12.01	323	28	137(Q), 109
DBCA	16.14	369	28	137(Q), 109
F-PBA	19.59	382	28	215(Q), 187
3-PBA	19.87	364	30	197, 169(Q)
2-PBA	20	364	20	197, 169(Q)

プール尿を用いた検討により、signal-to-noise ratioが3である場合を検出下限値とする場合、*trans*-CDCAは0.04, total DCCAは0.04, DBCAは0.03, F-PBA及び3-PBAは0.02 µg/Lと算出された。

既知濃度の尿を6回連続測定することで日内変動を、6日連続で測定することで日間変動を調査した。

概ねCV%15%以下を示しており、過去の分析法に加えてDBCA、F-PBA及びtotal DCCAを測定項目に加えて実際のおむつから回収した尿に適応する準備が整った。

②-2 おむつ尿中のPYR代謝物量の測定

1076名の1歳半児と1466名の3歳児から得られたおむつ尿(一部は尿)中のPYR代謝物を一斉分析した。その結果、total DCCAおよび3-PBAはほとんどの対象者から検出され、何らかのPYRに曝露していることが強く示唆された。また、代謝物濃度の幅が非常に広く、PYR曝露量の程度はさまざまであることが明らかとなった(表(2)-2)。3-PBAのみに性差が確認された。既報でも3-PBAのみに性差を認めていることから、クレアチニンの性差に起因した差ではなく、男女間でPYRの曝露量が異なる、あるいは曝露量は同じであっても薬物代謝能の差異により3-PBA排泄量が男女間で異なる可能性が示された。さらに、代謝物濃度の季節差が観察された。*trans*-CDCAおよびtotal DCCAは夏に、3-PBAは秋に最も高い値を示した。PYRは家庭用殺虫剤だけでなく農薬としても用いられるため、食事を通じた曝露の可能性も考えられる。すなわち、PYR曝露による健康影響を評価する場合は、曝露量の季節変動を考慮した研究デザインあるいは解析を実施する必要があることを示唆する結果となった。対象者の家庭用殺虫剤使用履歴を調査した結果、「虫よけ剤を置いて・つるしてある」「蚊取り線香を使った」という質問項目に「はい」と答えた保護者の子どもは、「いいえ」の子どもよりも*trans*-CDCAとtotal DCCAが有意に高い結果となり、尿中曝露マーカー量は家庭用殺虫剤の使用と関連することが示された。

表(2)-2 1歳半児および3歳児の尿中ピレスロイド系殺虫剤代謝物濃度(1.5歳児 n=1076; 3歳児 n=1403)

	>LOD (%)	GM	Selected percentile				Max.
			25th	50th	75th	95th	
1.5 years old							
μg/L							
transCDCA	57	-	<LOD	0.09	0.33	1.56	22.87
totalDCCA	96	0.59	0.18	0.51	1.54	10.98	121.34
DBCA	22	-	<LOD	<LOD	<LOD	0.17	2.17
F-PBA	12	-	<LOD	<LOD	<LOD	0.09	1.62
3-PBA	98	1.11	0.71	0.98	1.56	4.86	28.20
μg/g creatinine							
transCDCA		0.23	<LOD	0.17	0.66	3.10	243.06
totalDCCA		1.20	0.42	1.08	2.88	18.91	226.65
DBCA		-	<LOD	<LOD	<LOD	0.26	4.89
F-PBA		-	<LOD	<LOD	<LOD	0.20	3.16
3-PBA		2.25	1.39	2.07	3.35	10.01	52.17
3 years old							
μg/L							
transCDCA	35	-	<LOD	<LOD	0.15	0.90	19.49
totalDCCA	94	0.68	0.30	0.66	1.63	7.04	299.32
DBCA	29	-	<LOD	<LOD	0.05	0.20	2.98
F-PBA	26	-	0.03	<LOD	<LOD	0.12	2.30
3-PBA	99	1.07	0.66	0.98	1.62	4.13	202.91
μg/g creatinine							
transCDCA		-	<LOD	<LOD	0.24	1.65	26.38
totalDCCA		1.12	0.49	1.08	2.54	12.27	256.70
DBCA		-	<LOD	<LOD	0.11	0.27	10.27
F-PBA		-	0.04	<LOD	<LOD	0.19	4.65
3-PBA		1.75	1.09	1.67	2.65	7.12	162.72

*GMs were not calculated due to low detection rates (less than 60% of the samples).
LOD value divided by the square root of 2 were used to calculate GM.

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究の主な科学的意義は、以下の三点である。

第一点目は、使い捨て紙おむつから抽出した尿を用いた有機リン系殺虫剤(OP)、ピレスロイド系殺虫剤(PYR)、ネオニコチノイド系殺虫剤(NEO)の測定法を確立したことである。子どもの成長の過程において、自立排尿が困難な幼児期の化学物質曝露と健康状態との関係を解析した疫学研究は、世界的に非常に少ない。それは、医療の場面以外でこの年齢の子どもからの採尿が容易でなく、尿を用いた生物学的モニタリングが困難であったことによる。OPの測定法については、すでに論文として公表したが(Oya et al. 2017)、これに先立つ学会発表(2nd International Conference on Human Biomonitoring, 平成28年4月)ではこの研究アプローチが注目され、今後の成果についての期待が多く寄せられた。開発した方法は、殺虫剤以外の環境化学物質の測定に拡張できる可能性が大きく、環境保健における応用範囲は広い。

第二点目は、1歳半および3歳の子どものPYR, NEO, OP曝露実態を千人規模で明らかにしたことである。1歳半の時点における3系統の薬剤の曝露評価研究は世界最初である。家庭内の日常生活で使用するPYRの代謝物として、日本人では不明であった *cis*-3-(2,2-ジブロモビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパン-1-カルボン酸(DBCA)および4-フルオロ-3-フェノキシ安息香酸(F-PBA)の尿中レベルが明らかになった。これも特筆すべき点である。

第三点目は本研究により、3系統の薬剤の摂取源に関し、OPとNEOは食材の寄与が、また、PYRは代謝物によって異なるが、生活環境の要因の寄与が相対的に大きいことが示唆されたことである。曝露量が多く健康リスクが問題となる場合、曝露量を減らす対策をとる必要があるが、有効な対策を行うためには曝露源が明らかでなくてはならない。今後、少なくともOPとNEOについては、陰膳調査や飲料水の分析による曝露源の探求が必要であることが明らかになった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省の「化学物質の人へのばく露量モニタリングに関するタスクフォース会合」における分析対象物質・次期調査計画策定の検討にあたり、本研究で明らかにされた殺虫剤の曝露レベルを念頭に委員の発言が行われている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

第5次環境基本計画が掲げる化学物質管理に関して、エコチル調査や化学物質に関する調査研究等の推進に活用することが見込まれる。具体的には以下の3点がある。

第一に、日本における1歳半および3歳児のPYR、NEO、OPへの曝露実態が明らかになった。環境モニタリングとしての生物学的モニタリングへの先進的な取り組みが進むドイツでは、集団の生体試料中の化学物質量の測定結果に基づき、大多数(95%)の国民の曝露量が含まれる参照値(Reference value, RV_{95})を明らかにしている。これにより、特定の個人または集団の曝露レベルがモニタリング測定値として明らかになった時に、一般集団の曝露レベルと比較可能となっている。また、回避すべき健康リスクを判断するための基準値(ガイダンス値)を、HBM-I値およびHBM-II値として設定している。本研究の対象集団の居住地域は、平均的な大都市および耕作地域を含む近郊都市圏であるので、わが国において対象年齢の子どもの RV_{95} 相当値を設定する場合、本研究で得た結果は中心的なデータとなろう。すなわち、今後のリスク評価の前提となるデータであり、環境省が成人を対象に実施する「化学物質の人へのばく露量モニタリング調査」の参考にもなる。また、「国際的な化学物質管理のための戦略アプローチ(SAICM)」で求められる、WSSD2020年目標の達成に向けた実施状況報告の中で、20の指標のうちのリスク削減の取り組み実績のひとつとして報告内容の対象となりうる。

第二に、エコチル調査における農薬類の健康リスク評価への貢献である。エコチル調査で全国に適用されるプロトコルとしては、前述の通り採尿の困難さにより4歳より前の時期には採尿が行われなかった。本研究では、エコチル調査という前向きコホート研究の参加者を対象に、1歳半および3歳時点で採尿し、殺虫剤の曝露評価を行った。今後、子どもの健康および発達のデータと対応して解析することで、エコチル調査の「中心仮説」のひとつである殺虫剤のリスク評価の検討が可能になる。エコチル調査における成果発表ルールにしたがい、今後、検討していきたい。

第三に、エコチル調査において、殺虫剤以外の化学物質についての「中心仮説」検証への貢献である。本研究により、1歳半および3歳時点の尿が、エコチル調査の愛知サブコホートの代表性を維持しつつ千人規模で収集された。すなわち、体内半減期が短く、紙おむつの吸収材などの影響を受けない化学物質について、今後分析可能な検体をストックできた。本研究での対象物質以外の化学物質の曝露濃度を測定する上で、非常に重要な検体になる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) N. OYA, Y. ITO, K. HIOKI, Y. ASAI, A. AOI, Y. SUGIURA, J. UYAMA, T. OGURI, S. KATO, T. EBARA and M. KAMIJIMA: Int J Hygiene Environ Health, 220, 209-216 (2017)
Quantitative Concentration Measurements of Organophosphate Insecticide Metabolites in Urine Extracted from Disposable Diapers in 1.5-Year-old Children in Japan

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) N. OYA, Y. ITO, K. HIOKI, Y. ASAI, A. AOI, Y. SUGIURA, J. UYAMA, T. OGURI, S. KATO, T. EBARA and M. KAMIJIMA: 2nd International Conference on Human Biomonitoring, Berlin, Germany, 2016

- “Measurements of concentrations of organophosphate insecticide metabolites in urine extracted from used diapers in 1.5-year-old children.”
- 2) M. KAMIJIMA, Y. ITO and J. UYAMA: International Society of Exposure Science (ISES) 2016 Annual Meeting, Utrecht, Netherland, 2016 (シンポジウム招待講演)
“Diaper use for exposure assessment of infants and toddlers.”
 - 3) N. OYA, Y. ITO, K. HIOKI, A. AOI, Y. SUGIURA, J. UYAMA, T. OGURI, S. KATO, T. EBARA and M. KAMIJIMA: International Society of Exposure Science 2016 Annual Meeting, Utrecht, Netherland, 2016
“Recovery rates in the measurements of the concentrations of organophosphorus pesticide metabolites in urine extracted from children’s diaper.”
 - 4) Y. ITO, T. EBARA, N. OYA, J. UYAMA, T. OGURI, S. KATO and M. KAMIJIMA: International Society of Exposure Science 2016 Annual Meeting, Utrecht, Netherland, 2016
“A study design to assess exposure levels of insecticides in 1.5-year-old children in Aichi Regional Subcohort of the Japan Environment and Children’s Study.”
 - 5) N. OYA, Y. ITO, T. EBARA, K. HIOKI, A. AOI, J. UYAMA, S. KATO, T. OGURI, N. SHOJI, M. SUGIURA-OGASAWARA, S. SAITOH and M. KAMIJIMA: The 21st International Epidemiological Association World Congress of Epidemiology, Omiya, Japan, 2017
“Exposure assessment of organophosphorus pesticide in Japanese diapered children.”
 - 6) Y. ITO, N. OYA, T. EBARA, K. HIOKI, J. UYAMA, S. KATO, T. OGURI, N. SHOJI and M. KAMIJIMA: Society of Toxicology 57th Annual Meeting, San Antonio, USA, 2018
“Quantitative analysis of urinary organophosphate insecticide metabolites in diapered children in Japan.”
 - 7) Y. ITO, N. OYA, T. EBARA, K. HIOKI, J. UYAMA, S. KATO, SUGIURA-OGASAWARA, S. SAITOH and M. KAMIJIMA: Society of Toxicology 57th Annual Meeting, San Antonio, USA, 2018
“Exposure levels of organophosphorus insecticides in 1.5- and 3-year-old children in Japan.”
 - 8) 杉浦友香、上山 純、上田裕子、伊藤由起、涌澤伸哉、上島通浩: 第43回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2015)
「使用済みおむつを利用した尿中代謝物一斉分析法の開発」
 - 9) 大矢奈穂子、伊藤由起、日置啓介、浅井佑哉、青井亜里沙、上山 純、小栗朋子、加藤沙耶香、榎原 毅、上島通浩: 第86回日本衛生学会(2016)
「使用済みおむつを用いた1歳半児における尿中有機リン系殺虫剤曝露量の測定」
 - 10) 大矢奈穂子、伊藤由起、榎原 毅、日置啓介、青井亜里沙、上山 純、加藤沙耶香、小栗朋子、庄司直人、上島通浩: 第87回日本衛生学会(2017)
「使用済み紙おむつを用いた幼児における有機リン系殺虫剤曝露濃度の測定」
 - 11) 上山 純、生田勇太郎、上田裕子、伊藤由起、榎原 毅、大矢奈穂子、加藤沙耶香、小栗朋子、庄司直人、上島通浩: 第87回日本衛生学会(2017)
「使用済み紙おむつを用いた幼児におけるピレスロイド系殺虫剤の曝露評価」
 - 12) 上山 純、青井亜里沙、伊藤由起、榎原 毅、大矢奈穂子、加藤沙耶香、小栗朋子、庄司直人、佐藤博貴、三宅美緒、上島通浩: 第44回日本毒性学会(2017)
「使い捨ておむつを用いた尿中ネオニコチノイド系殺虫剤のバイオモニタリング手法の開発と小児への実践応用」
 - 13) 伊藤由起、大矢奈穂子、榎原 毅、佐藤博貴、加藤沙耶香、上山 純、庄司直人、松木太郎、杉浦真弓、齋藤伸治、上島通浩: 第45回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2017)
「3歳児の尿中有機リン系殺虫剤代謝物濃度と採尿季節の関係」
 - 14) 伊藤由起、大矢奈穂子、日置啓介、上山 純、青井亜里沙、小栗朋子、加藤沙耶香、齋藤伸治、榎原 毅、上島通浩: 第88回日本衛生学会(2018)
「日本の幼児における有機リン系殺虫剤曝露と生活環境との関連」
 - 15) 大矢奈穂子、伊藤由起、上山 純、青井亜里沙、小栗朋子、加藤沙耶香、齋藤伸治、杉浦真弓、榎原 毅、

上島通浩: 第88回日本衛生学会(2018)

「使用済み紙おむつを用いた1歳半児における尿中ネオニコチノイド系殺虫剤の測定」

- 16) 上山 純、上田裕子、伊藤由起、榎原 毅、大矢奈穂子、加藤沙耶香、小栗朋子、庄司直人、齋藤伸治、上島通浩: 第88回日本衛生学会(2018)

「バイオモニタリング手法を用いた日本人小児ピレスロイド系殺虫剤曝露レベルの国際比較」

7. 研究者略歴

研究代表者

上島 通浩

東北大学医学部卒業、名古屋大学大学院単位取得退学、博士(医学)、現在、名古屋市立大学大学院医学研究科教授

研究分担者

1) 榎原 毅

神奈川大学工学部卒業、名古屋市立大学大学院単位取得退学、博士(医学)、現在、名古屋市立大学大学院医学研究科講師

2) 伊藤 由起

名古屋大学医学部保健学科卒業、名古屋大学大学院修了、博士(医学)、現在、名古屋市立大学大学院医学研究科講師

3) 上山 純

名古屋大学医学部保健学科卒業、金沢大学大学院修了、博士(医学)、現在、名古屋大学大学院医学系研究科准教授

II. 成果の詳細

II-1 幼児の殺虫剤ばく露量評価とその由来の探索に関する研究

名古屋市立大学大学院医学研究科

環境労働衛生学

同

同

上島 通浩

榎原 毅

伊藤 由起

平成27～29年度累計予算額：100,450千円（うち平成29年度：33,034千円）

予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

脳は出生後3歳頃までに急激に発達するため、神経発達への影響の可能性がある物質のリスク評価を行うには、この時期の曝露量を知る必要がある。しかし、自立排尿が確立していない幼児における化学物質の曝露量の報告は、世界的に見ても非常に乏しい。本研究では「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」の参加児を対象に、1歳半と3歳の2時点でそれぞれ1000人を超える方から使い捨て紙おむつに排泄吸収された尿を集め、尿中の有機リン系殺虫剤(OP)代謝物およびネオニコチノイド系殺虫剤(NEO)を測定した。また、1歳半児の測定結果を用いて、おむつ装着日（早朝尿採取の場合は前日）に摂取した食材の種類や摂取量、おむつ装着日の生活内容や直近1週間以内の農薬類の使用状況、基本属性等との関連について検討した。サブテーマ(2)で測定したピレスロイド系(PYR)殺虫剤に関しても、摂取した食材との関連を中心に解析した。

1歳半、3歳いずれの時点においても、尿中の殺虫剤由来物質濃度に大きな個人差が観察された。濃度が上位5%の群に入る要因として、1歳半調査時のOP殺虫剤に関して、調査時の虫よけスプレーの使用や、過去1年以内の家庭用殺虫剤や除草剤の使用との関連が示された。OPやNEOは摂取した食材の寄与が比較的大きく、PYRは生活環境などの影響が相対的に大きいことが明らかとなった。

〔キーワード〕

エコチル調査、殺虫剤、幼児、尿中代謝物、おむつ

1. はじめに

脳は出生後に急激に発達する臓器であり、3歳までに成人の重量に近づくことが知られている。前頭前野の神経細胞は3歳までに著しく成長し、その後思春期までは発達が緩やかになる。神経線維の髄鞘化は延髄、橋、中脳・小脳、大脳皮質の順に進み、3歳頃に髄鞘化が成人の80%に達し、脳機能の発達の基盤がつくられる。すなわち、生後3歳までは脳の発達の臨界期であり、環境化学物質の子どもの脳への影響を解明するには、この時期の曝露評価が必要となる。

体内半減期が短い化学物質の個人曝露量の評価は、尿中に排泄される代謝物等を測定する生物学的モニタリングによるのが有効である¹⁾。しかし、排尿が自立する前の乳幼児期は尿採取が困難であることから、世界各国の小児環境保健領域の疫学調査では、0～3歳までの生物学的モニタリングは一般には行われていない。したがって、脳の発達臨界期における曝露量が未知のままにとどまり、この観点での影響評価が不十分となるおそれがある。特に、歩き始めの時期にあたる1歳半前後の幼児は、この時期以降の子どもとは生活行動様式が大きく異なるため、4歳以降に測定した曝露量をこの時期に外挿しても正確性を欠くおそれ強い。

環境省の出生コホート研究であるエコチル調査においても、全国統一のプロトコールとしては4歳より前の時期の採尿は行われない。このため、エコチル調査のサブコホート（愛知ユニットセンターにおけ

る同調査参加者)を対象に追加的に行う調査(追加調査)として、1歳半及び3歳時点で尿試料を採取した。そして、環境や食品中に広く存在し、行動や知能の発達への影響の有無について関心が持たれている神経作動性殺虫剤²⁾に焦点をあて、測定した。また、尿収集と同時に食事調査を行い、生物学的モニタリング結果との関係を解析し、曝露源の推定が可能か検討した。

2. 研究開発目的

脳の発達臨界期である生後3歳までの時期の殺虫剤曝露が、その後の子どもの成長・発達に影響を与えるか、エコチル調査において将来検証することを視野に、エコチル調査の追加調査として実施する本研究では、以下の3点を最終目標とした。

- 1) エコチル調査の参加児を対象に、生体試料を用いた化学物質の曝露評価を実施しない1歳6か月および3歳時点において、曝露情報解析のための尿試料を各1,000検体収集すること
- 2) 神経系を作用点とすることや使用量の多さという点から国民的関心が高い、ピレスロイド系殺虫剤(PYR)、ネオニコチノイド系殺虫剤(NEO)、有機リン系殺虫剤(OP)について、1歳6か月および3歳時点の曝露量を明らかにすること
- 3) 食事調査を並行して行い、尿中の殺虫剤代謝物プロファイルと食事との関係の推定を行うこと。これは探索的検討であるが、その目的は、将来、農薬曝露による脳発達へのリスクが集団として観察された場合に役立つ、曝露源対策の判断材料を創出することにある。

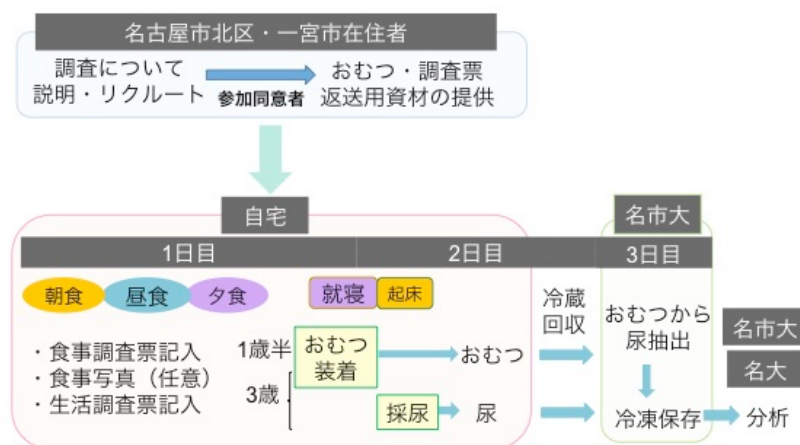
3. 研究開発方法

本研究は、名古屋市立大学の倫理審査委員会の承認を得た後に実施した。

①参加者リクルート

エコチル調査参加者のうち、名古屋市北区および一宮市で行われる、1歳6か月児および3歳児健康診査を受診する方を対象に、前者は2015年6月8日～2016年6月28日に、後者は2016年5月11日～2017年12月20日に、本研究への参加を依頼した。同意の得られた方(保護者による代諾)に食事や農薬使用状況等に関する調査票、指定銘柄の使い捨て紙おむつを配付した。3歳の時点では、健康診査の受診時期にばらつきが生じたため、調査の途中からは、1歳半時点の調査に協力したが3歳児健康診査未受診の方と、引越しにより別の自治体で受診する方を適宜抽出し、葉書による協力依頼も並行して行った。この協力依頼に同意していただいた場合も、調査資材一式を送付した。

参加者には健康診査受診後1か月以内を目途に調査を行うよう依頼した。調査の流れを図(1)-1に示す。依頼した調査内容は、1) 朝食、昼食、夕食について食事調査票への記入、2) 食事内容の調査日または直前1週間の生活についての調査票への記入、3) その日の就寝時に、配布した指定銘柄の紙おむつの装着、4) 翌朝までに使用した紙おむつ全ての大学への冷蔵下での返却、5) 食事写真の撮影(任意での協力事項)の5項目である。返却されたおむつからは後述の方法で尿を抽出し、抽出尿は測定に使用するまで-80℃で保存した。



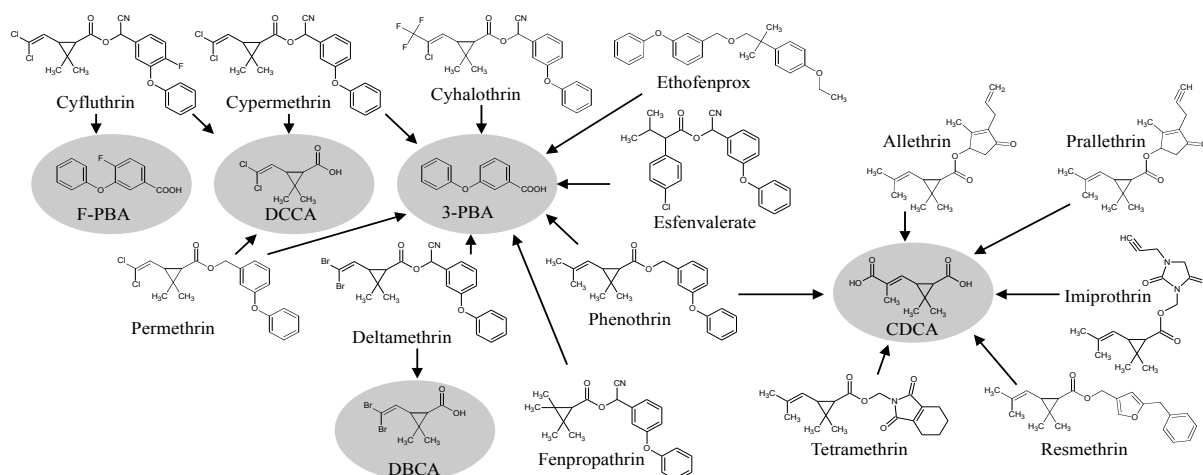
図(1)-1 調査のながれ

②使用済み紙おむつからの尿の抽出法の改良

紙おむつに排泄吸収された尿を利用したPYR殺虫剤代謝物の高感度測定法を我々は既に公表している³⁾が、本研究ではPYR、NEO、OP殺虫剤の尿中親物質または代謝物量の測定に十分な尿量を確保する必要がある。そこで、採取する尿量を十分確保しつつ、時間とコストを抑えるように抽出法を改良した。

③おむつからの抽出尿（おむつ尿）を用いたPYR代謝物測定

前述の通り、使用済み紙おむつから抽出した尿を用いた高感度測定法を既に確立していたため、おむつが到着次第PYR代謝物の測定を開始した。しかし、ガスクロマトグラフタンデム質量分析計(GC-MS/MS)を用いれば従来からの測定対象物質であるクリサンテмамジカルボン酸(CDCA)および3-フェノキシ安息香酸(3-PBA)をより高感度に測定することが可能となり、また、同機器を用いれば、これまで検出できなかった3-(2,2-ジクロロビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパン-1-カルボン酸(DCCA), *cis*-3-(2,2-ジプロモビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパン-1-カルボン酸(DBCA)および4-フルオロ-3-フェノキシ安息香酸(F-PBA)も測定できることが明らかになった(図(1)-2参照)。このため、計画変更の承認を経て、おむつ尿中のPYR測定は2年目よりGC-MS/MSを有するサブテーマ(2)において行った(結果はサブテーマ(2)にまとめて記載した)。



図(1)-2 PYR殺虫剤と尿中代謝物との関係

④おむつ尿中のOP代謝物の測定

サブテーマ(2)で決定したおむつ尿からのOP代謝物抽出法を用いて、尿中OP代謝物を測定した。測定には、レンタルしたultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS, Waters社製、ACQUITY I class-Xevo-TQS, 図(1)-3)を用いて行った。



図(1)-3 分析に用いたLC-MS/MS

⑤おむつ尿中のNEOの測定

サブテーマ(2)で決定したおむつ尿からのNEOの抽出法を用いて、尿中NEOの測定を行った。サブテーマ(2)での検討では、I.Sとしてアセタミプリド重水素置換体(ACE-d)を使用した。検討の過程でNEOそれぞれの安定同位体を使用した方が望ましいことが明らかになったため、市販の標準品以外は新規合成を依頼し、入手した。

⑥尿中殺虫剤プロファイルと曝露源の探索

1歳半児の尿中OP代謝物、PYR代謝物、NEO濃度データと、おむつ装着日又は装着前1週間以内の生活内容や食意識、エコチル調査(全体調査)質問紙で収集した社会経済要因も含めた基本属性、受動喫煙、飲酒、殺虫剤等の直近1年間の使用状況の情報、おむつ装着日に摂取した食材の摂取量のデータとを結合した。生活環境については、尿中殺虫剤代謝物濃度が上位5%の場合のオッズ比を求めた(下位95%が参照カテゴリー)。ロジスティック回帰分析には χ^2 検定又はFisherの正確検定で有意確率15%未満の項目をモデルに組み込んだ。食材については、全体の1割以上が摂取していた食材の摂取量10gを1単位として同様にロジスティック回帰分析を行った。また、殺虫剤代謝物濃度を中央値で2群に分け、食材摂取とのコレスポンデンス分析を行った。最後に生活環境に関する質問項目、食の意識に関する質問項目、摂取食材リストよりそれぞれの傾向スコアを算出し、尿中代謝物濃度を従属変数として重回帰分析を行った。解析は全てIBM SPSSバージョン24を用いて行った。

4. 結果及び考察

①リクルート結果と参加者属性

1歳半調査においては、全体調査参加者1,439人のうち、1,386人に声掛けを行い、1,196人から同意を得た。声掛け率は96.3%、同意率は83.1%であった。その内、期限内におむつ提出して下さった方は1077名(1名はトイレトレーニングが完了しており、早朝尿を提出)であった。

3歳調査においては、全体調査参加者2,776人のうち、2,414人に声掛けを行い、1,839人から同意を得た。声掛け率は87.0%、同意率は76.2%であった。その内、期間内におむつ又は早朝尿を提出して下さった方は1,671名であった。3歳調査のおむつ回収は2月末まで継続したが、解析は2017年9月末日までにおむつ又は早朝尿の提出があった1,470人を対象とした。

1歳半のおむつ・尿提出者1,077人の属性は、男児548人(50.9%)、女児529人(49.1%)、児の月齢は16か月～24か月(最頻値が19か月で46.7%)、母親の出産時年齢は18～46歳(中央値32歳;四分位範囲29～35歳)、出生時体重は815～4,542g(中央値3,060g;四分位範囲 2,804～3,319g;低出生体重児7.9%)であった。3歳のおむつ・尿提出者1671人の属性は、男児866人(51.8%)、女児805人(48.2%)、児の月齢は34か月～42か月(最頻値が37か月で56.5%)、母親の出産時年齢は18～46歳(中央値32歳;四分位範囲29～35歳)、出生時体重は815～4,542g(中央値3,050g;四分位範囲 2,792～3,308g;低出生体重児7.6%)であった。

1歳半調査結果の解析には、指定外のおむつを使用した方14名、食事や生活調査票の質問紙の記入日がおむつ装着日ではない可能性がある方27名(2名は指定外おむつの使用者に含まれる)、調査票の記載がない人1名の計40名を除外し、生活環境や摂取食材の寄与の解析を行った。3歳時調査の解析には、指定外のおむつを使用した方17名、食事や生活調査票の質問紙の記入日がおむつ装着日ではない可能性がある方48名(2名は指定外おむつ使用者に含まれる)、服薬の影響の可能性のある方1名の計64名を除外して生活環境の寄与の解析を行った。

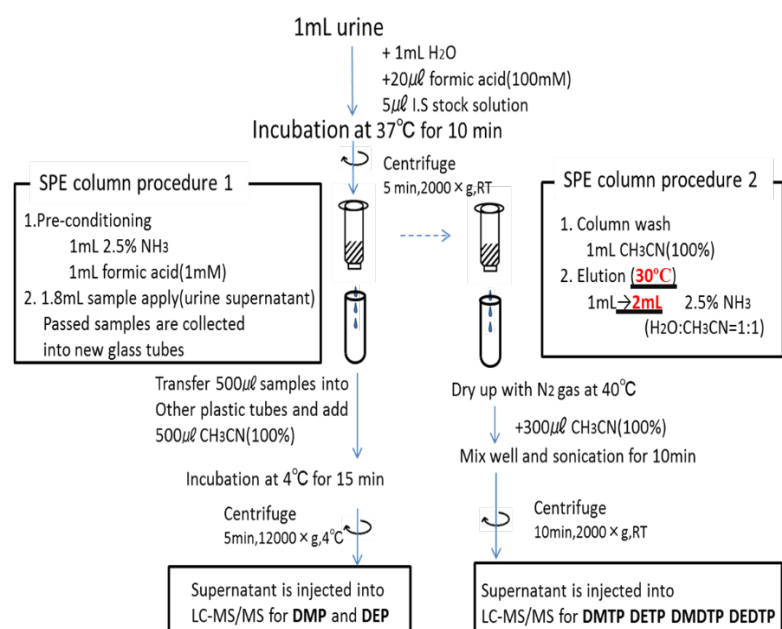
②使用済み紙おむつからの尿の抽出法の改良

我々は既報³⁾の中で、紙おむつからの尿の抽出の際に、カラムにおむつのポリマーを詰めて抽出する方法を公表しているが、その後改良を加えて、5 mlと10 mlのディスポーザブルシリンジを用いる方法を

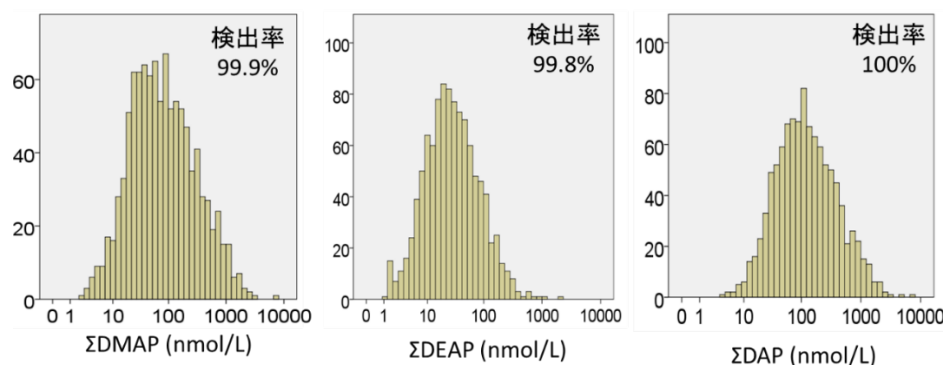
開発した（学会発表業績8）。その結果、多検体を扱えるようになったが、多種類の殺虫剤測定に十分な尿量を得るには、さらに効率化を進める必要があった。そこで、シリンジサイズを大きくし、最大限詰められるおむつのポリマー量を検討し、1人のおむつに対して6回抽出することとした。その結果、おむつへの排尿量が十分ある場合、30 ml弱の尿を抽出回収できるようになった。確立した方法を用いておむつから抽出した尿は、使用まで -80°C で保存した。

③おむつ尿中のOP代謝物の測定

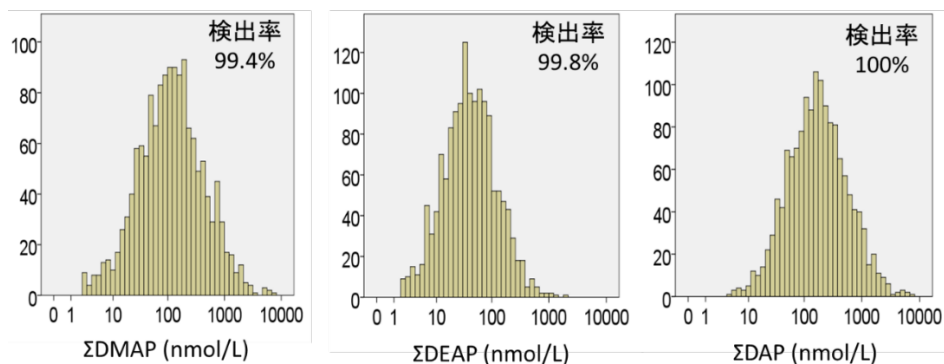
おむつから抽出した尿を用いて、尿中OP共通代謝物であるジアルキルリン酸（DAP）6種類（ジメチルリン酸，DMP；ジメチルチオリン酸，DMTP；ジメチルジチオリン酸，DMDTP；ジエチルリン酸，DEP；ジエチルチオリン酸，DETP；ジエチルジチオリン酸，DEDTP）を測定した。サブテーマ(2)で決定した尿の前処理方法をレンタルした高感度の分析器の特性に合わせて最適化し、図(1)-4の方法で実施した。1歳半と3歳の尿中OP代謝物量をそれぞれ図(1)-5，6に示す。メチル系代謝物の総和（DMP+DMTP+DMDTP， Σ DMAP）、エチル系代謝物の総和（DEP+DETP+DEDTP， Σ DEAP）、6種類のDAPの総和（ Σ DMAP+ Σ DEAP， Σ DAP）としてヒストグラムを示した。DAPは1歳半、3歳いずれもほとんどすべての幼児から検出され、対数正規分布に似た分布を示した。



図(1)-4 OP代謝物測定のための前処理方法



図(1)-5 1歳半児の尿中OP代謝物濃度（n=1,077）

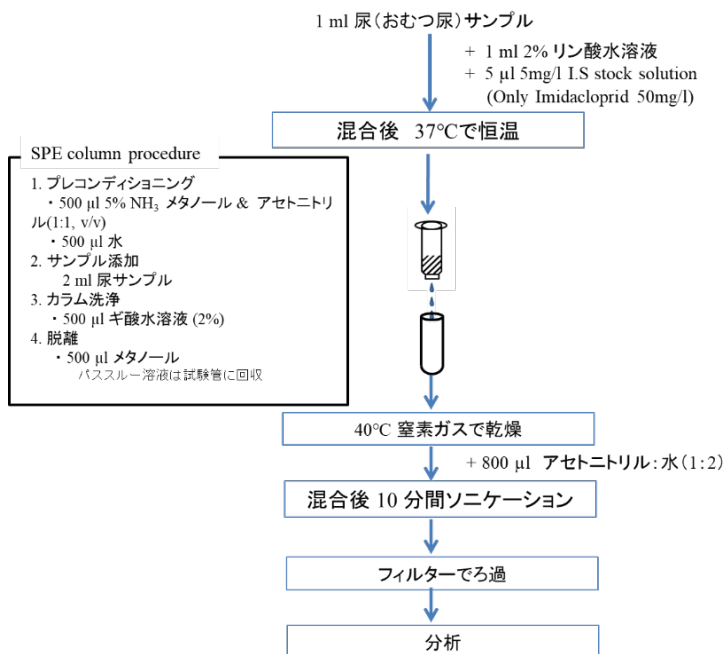


図(1)-6 3歳児の尿中OP代謝物濃度 (n=1,469)

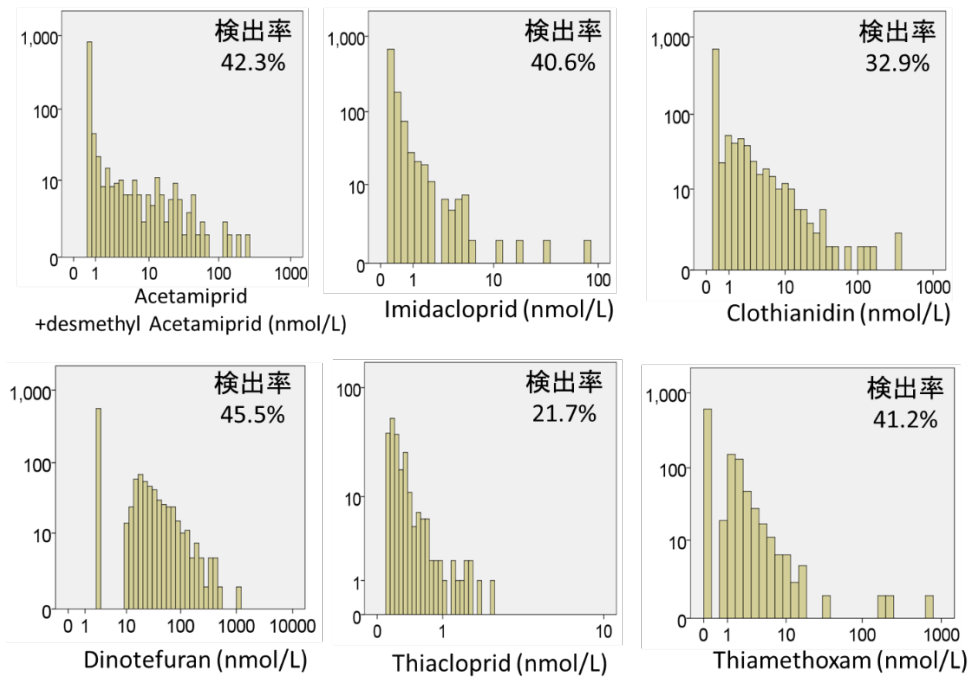
1名は服薬の影響が考えられたため、除外した。

④おむつ尿中のNEOの測定

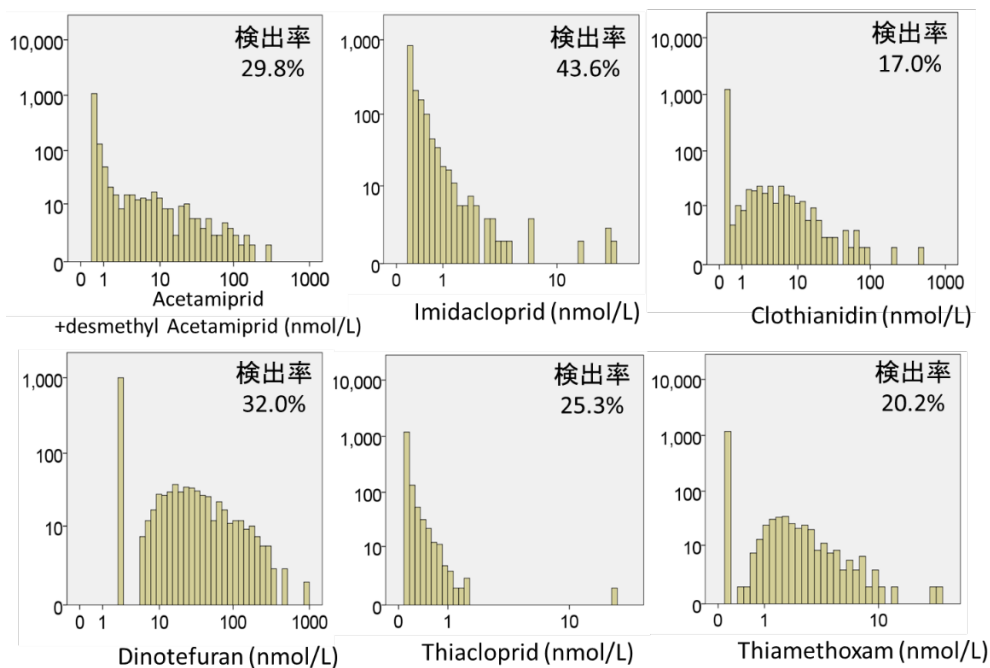
おむつから抽出した尿を用いて尿中のNEOを測定した。アセタミプリドとその代謝物である
 ルデスメチルアセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアメトキサム、クロチアニジン、
 ジノテフランの7物質を測定対象とした。サブテーマ(2)で決定した尿の前処理方法をレンタルした高
 感度の機械の特性に合わせて最適化して、図(1)-7の方法で実施した。1歳半と3歳の尿中NEO濃度をそれ
 ぞれ図(1)-8, 9に示す。半数以上が検出下限値未満であり、検出された方も低濃度であった。クロチア
 ニジンとチアメトキサムは1歳半の方が3歳に比べて検出率が2倍程度高く、1歳半の方が比較的高い子
 が多いことが明らかとなった。アセタミプリドとジノテフランも1歳半の方が3歳に比べて検出率が1.5倍
 程度高かったが、最高値はそれほど変わらなかった。



図(1)-7 NEO測定のための前処理方法



図(1)-8 1歳半児の尿中NEO濃度 (n=1,076)
尿量不足のため1名測定できず



図(1)-9 3歳児の尿中NEO濃度 (n=1,464)
1名は服薬の影響が考えられたため、除外した。5名は尿量不足のため測定できず。

⑤尿中殺虫剤プロファイルと曝露源の探索

1歳半の尿中OP殺虫剤代謝物濃度と基本属性の関連を表(1)-2に示す。採尿季節と母親の出産時年齢が有意確率15%未満であったため、季節のみで調整した場合と、季節と母親の出産時年齢の2つで調整した場合の2パターンのロジスティック回帰分析を行った(表(1)-3)。その結果、全体調査の質問紙で尋ねている、過去1年以内の室内殺虫剤(母の出産時年齢で調整した場合、統計的有意差は消失)や除草剤の

使用、今回の調査用質問紙で尋ねたおむつ装着当日の虫よけスプレーの使用が、 Σ DAPやエチル系OP殺虫剤由来の代謝物である Σ DEAPの高値と有意に関連していた。

表(1)-2 1歳半児の尿中OP殺虫剤代謝物濃度と基本属性情報

	Total		ΣDMAP		p	ΣDEAP		p	ΣDAP		p
	n	(%)	Lower	Top		Lower	Top		Lower	Top	
			95%	5%		95%	5%		95%	5%	
		(%)	(%)	(%)		(%)	(%)		(%)	(%)	
Child's gender											
Male	531	51	51	57	0.47	51	53	0.89	51	57	0.47
Female	506	49	49	43		49	47		49	43	
	1037	100	100	100		100	100		100	100	
Child age (month)											
<18	34	3	3	2	0.70	3	4	0.50	3	2	0.82
18	395	38	38	45		38	43		38	43	
19	460	44	45	39		45	33		45	39	
20	108	10	11	8		10	16		10	10	
21 ≤	40	4	4	6		4	4		4	6	
	1037	100	100	100		100	100		100	100	
Season											
Spring (April-June)	188	18	19	10	0.33	18	27	0.11	18	14	0.67
Summer (July-September)	294	28	28	25		28	35		28	27	
Fall (October-December)	239	23	23	27		23	16		23	29	
Winter (January-March)	316	30	30	37		31	22		31	29	
	1037	100	100	100		100	100		100	100	
Maternal age at delivery											
<25	50	5	5	4	0.03	5	4	0.40	5	4	0.04
25 ≤, <30	262	25	24	43		25	35		24	43	
30 ≤, <35	403	39	40	24		39	35		39	27	
35 ≤, <40	257	25	25	22		25	24		25	18	
40 ≤	65	6	6	8		6	2		6	8	
	1037	100	100	100		100	100		100	100	
Maternal highest level of education											
Junior high school	44	4	4	6	0.22	4	4	0.75	4	6	0.51
High school	266	26	26	18		26	31		26	22	
Technical junior college, Technical/vocational college, Associate degree	385	37	37	50		38	31		37	46	
Bachelor's degree, Graduate degree (Master's or Doctor's)	330	32	33	26		32	35		33	26	
No data	12	1									
	1037	100	100	100		100	100		100	100	
Paternal highest level of education											
Junior high school	52	5	5	2	0.54	5	4	0.32	5	2	0.47
High school	270	26	27	24		27	18		26	26	
Technical junior college, Technical/vocational college, Associate degree	195	19	19	16		19	16		19	14	
Bachelor's degree, Graduate degree (Master's or Doctor's)	504	49	49	58		49	62		49	58	
No data	16	2									
	1037	100	100	100		100	100		100	100	

表(1)-2 続き

	Total		ΣDMAP		p	ΣDEAP		p	ΣDAP		p
	n	(%)	Lower	Top		Lower	Top		Lower	Top	
			95%	5%		95%	5%		95%	5%	
		(%)	(%)	(%)		(%)	(%)		(%)	(%)	
Annual household income											
(million Japanese yen)											
<4	268	26	28	23	0.54	28	24	0.85	28	23	0.65
4≤, <6	373	36	38	35		38	39		38	36	
6≤	337	32	34	42		34	37		34	40	
No data	59	6									
	1037	100	100	100		100	100		100	100	
Mother's smoking history during pregnancy											
Currently smoking	16	2	2	0	0.44	2	0	0.65	2	0	0.12
Previously did, but quit before or after realizing current pregnancy	274	26	28	34		28	30		27	40	
Never	685	66	70	66		70	70		71	60	
No data	62	6									
	1037	100	100	100		100	100		100	100	
Presence of smokers near the child when he/she was 1.5 year old											
Rarely or never	815	79	83	75	0.17	83	80	0.70	83	79	0.56
Ocassionaly or Frequently	174	17	17	25		17	20		17	21	
No data	48	5									
	1037	100	100	100		100	100		100	100	

表(1)-3 生活環境要因の1歳半児における尿中OP殺虫剤代謝物濃度上位5%のオッズ比

model 1 ^a					model 2 ^b			
	ΣDMAP	ΣDEAP	ΣDAP		ΣDMAP	ΣDEAP	ΣDAP	
	OR	OR	OR		OR	OR	OR	
n	95% CI	95% CI	95% CI	n	95% CI	95% CI	95% CI	
Use of household chemicals during preceding one year								
Use of indoor insecticide								
No	580	Ref	Ref	580	Ref	Ref	Ref	
Yes	413	1.5	1.1	413	1.5	1.1	1.8	
	(0.85-2.7)	(0.63-2.0)	(1.02-3.3)		(0.82-2.7)	(0.61-2.0)	(0.98-3.2)	
Use of herbicide								
No	859	Ref	Ref	859	Ref	Ref	Ref	
Yes	134	2.0	1.4	134	1.9	1.4	2.2	
	(0.97-4.0)	(0.68-3.0)	(1.1-4.5)		(0.95-3.9)	(0.67-3.0)	(1.1-4.4)	
Living environment before the survey day								
Use of insect repellent sprays								
No	936	Ref	Ref	936	Ref	Ref	Ref	
Yes	79	2.2	2.7	79	2.1	2.6	2.2	
	(0.84-5.5)	(1.3-5.8)	(0.94-5.5)		(0.79-5.4)	(1.2-5.7)	(0.90-5.4)	

ΣDAP; sum of DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP, and DEDTP, ΣDMAP; the sum of DMP, DMTP, and DMDTP, and ΣDEAP; the sum of DEP, DETP, and DEDTP.

^aModel 1 estimated ORs and 95% CIs adjusting for urine collection season.

^bModel 2 estimated ORs and 95% CIs adjusting for urine collection season and, maternal age at delivery (categorical).

3歳の尿中OP殺虫剤代謝物濃度と基本属性の関連を表(1)-4に示す。採尿季節と児の性別が有意確率15%未満であった。季節で調整しロジスティック回帰分析を行った結果を表(1)-5に示す。有機野菜かどうかを重視すると回答した方のΣDEAPの上位5%のオッズ比の上昇が見られた以外は、曝露の増加に寄与する要因は見つけられなかった。

表(1)-4 3歳児の尿中OP殺虫剤代謝物濃度と基本属性情報

	Total		ΣDMAP			ΣDEAP			ΣDAP		
			Lower 95%	Top 5%		Lower 95%	Top 5%		Lower 95%	Top 5%	
	n	(%)	(%)	(%)	p	(%)	(%)	p	(%)	(%)	p
Child's gender											
Male	732	71	51	64	0.04	52	53	0.90	51	67	0.01
Female	674	65	49	36		48	47		49	33	
	1406	136	100	100		100	100		100	100	
Child age (month)											
<36	57	5	4	7	0.51	4	3	0.46	4	7	0.36
36	324	31	23	17		23	29		23	21	
37	782	75	55	60		55	59		55	60	
38	165	16	12	10		12	7		12	6	
39≤	78	8	6	6		6	3		6	6	
	1406	136	100	100		100	100		100	100	
Season											
Spring (April-June)	323	31	23	14	0.16	23	14	0.01	23	14	0.15
Summer (July-September)	493	48	35	34		34	53		35	40	
Fall (October-December)	298	29	21	30		21	16		21	29	
Winter (January-March)	292	28	21	21		21	17		21	17	
	1406	136	100	100		100	100		100	100	
Maternal age at delivery											
<25	73	7	5	3	0.71	5	6	0.83	5	4	0.82
25≤, <30	321	31	23	20		23	20		23	23	
30≤, <35	544	52	39	37		39	36		39	34	
35≤, <40	378	36	27	33		27	33		27	33	
40≤	90	9	6	7		6	6		6	6	
	1406	136	100	100		100	100		100	100	
Maternal highest level of education											
Junior high school	42	4	3	0	0.47	3	0	0.25	3	0	0.37
High school	363	35	26	29		26	26		26	31	
Technical junior college, Technical/vocational college, Associate degree	545	53	39	38		39	34		39	37	
Bachelor's degree, Graduate degree (Master's or Doctor's)	446	43	32	33		32	40		32	31	
No data	10	1									
	1406	136	100	100		100	100		100	100	
Paternal highest level of education											
Junior high school	74	5	5	6	0.84	6	1	0.37	5	6	0.77
High school	365	26	26	30		26	32		26	31	
Technical junior college, Technical/vocational college, Associate degree	233	17	17	18		17	14		17	18	
Bachelor's degree, Graduate degree (Master's or Doctor's)	715	51	52	46		52	52		52	46	
No data	19	1									
	1406	100	100	100		100	100		100	100	
Annual household income (million Japanese yen)											
<4	379	27	23	25	0.74	29	23	0.55	17	26	0.43
4≤, <6	511	36	39	34		38	42		20	31	
6≤	432	31	38	42		33	35		28	43	
No data	84	6									
	1406	100	100	100		100	100		65	100	

表(1)-4 続き

	Total		ΣDMAP		p	ΣDEAP		p	ΣDAP		p
	n	(%)	Lower	Top		Lower	Top		Lower	Top	
			95%	5%		95%	5%		95%	5%	
		(%)	(%)	(%)		(%)	(%)		(%)	(%)	
Mother's smoking history during pregnancy											
Currently smoking	19	1	2	0	0.54	2	0	0.31	2	0	0.23
Previously did, but quit before or after realizing current pregnancy	363	26	28	25		28	22		28	21	
Never	942	67	71	75		71	78		71	79	
No data	82	6									
	1406	100	100	100		100	100		100	100	
Presence of smokers near the child when he/she was 3 years old											
Rarely or never	1148	82	87	86	1.00	87	81	0.14	87	82	0.56
Ocassionaly or Frequently	178	13	13	14		13	19		13	18	
No data	80	6									
	1406	100	100	100		100	100		100	100	

表(1)-5 生活環境要因の3歳児における尿中OP殺虫剤代謝物濃度上位5%のオッズ比

		DMAP	DEAP	DAP
		OR	OR	OR
	n	95% CI	95% CI	95% CI
Consciousness of diet				
Preference for organic foods				
Strongly disagree	454	Ref	Ref	Ref
Disagree	641	0.80 (0.46-1.4)	0.76 (0.43-1.3)	0.70 (0.40-1.2)
Agree	277	0.90 (0.46-1.8)	0.91 (0.46-1.8)	0.92 (0.48-1.8)
Strongly agree	28	1.3 (0.30-6.0)	4.1 (1.4-12)	1.3 (0.29-5.8)
Conscious of daily action for food safety				
Strongly agree	271	Ref	Ref	Ref
Agree	890	0.56 (0.32-0.99)	0.47 (0.27-0.84)	0.54 (0.30-0.96)
Disagree	203	0.84 (0.40-1.8)	1.0 (0.50-2.0)	0.99 (0.48-2.0)
Strongly disagree	35	0.84 (0.19-3.8)	1.1 (0.32-4.0)	0.83 (0.18-3.8)
Living environment before the survey day				
Spent time indoor facility				
No	1084	Ref	Ref	Ref
Yes	289	0.60 (0.36-0.995)	1.0 (0.59-1.6)	0.92 (0.56-1.5)
Spent in a kindergarten/nursery				
No	507	Ref	Ref	Ref
Yes	502	1.1 (0.61-2.0)	0.35 (0.15-0.82)	0.89 (0.48-1.7)

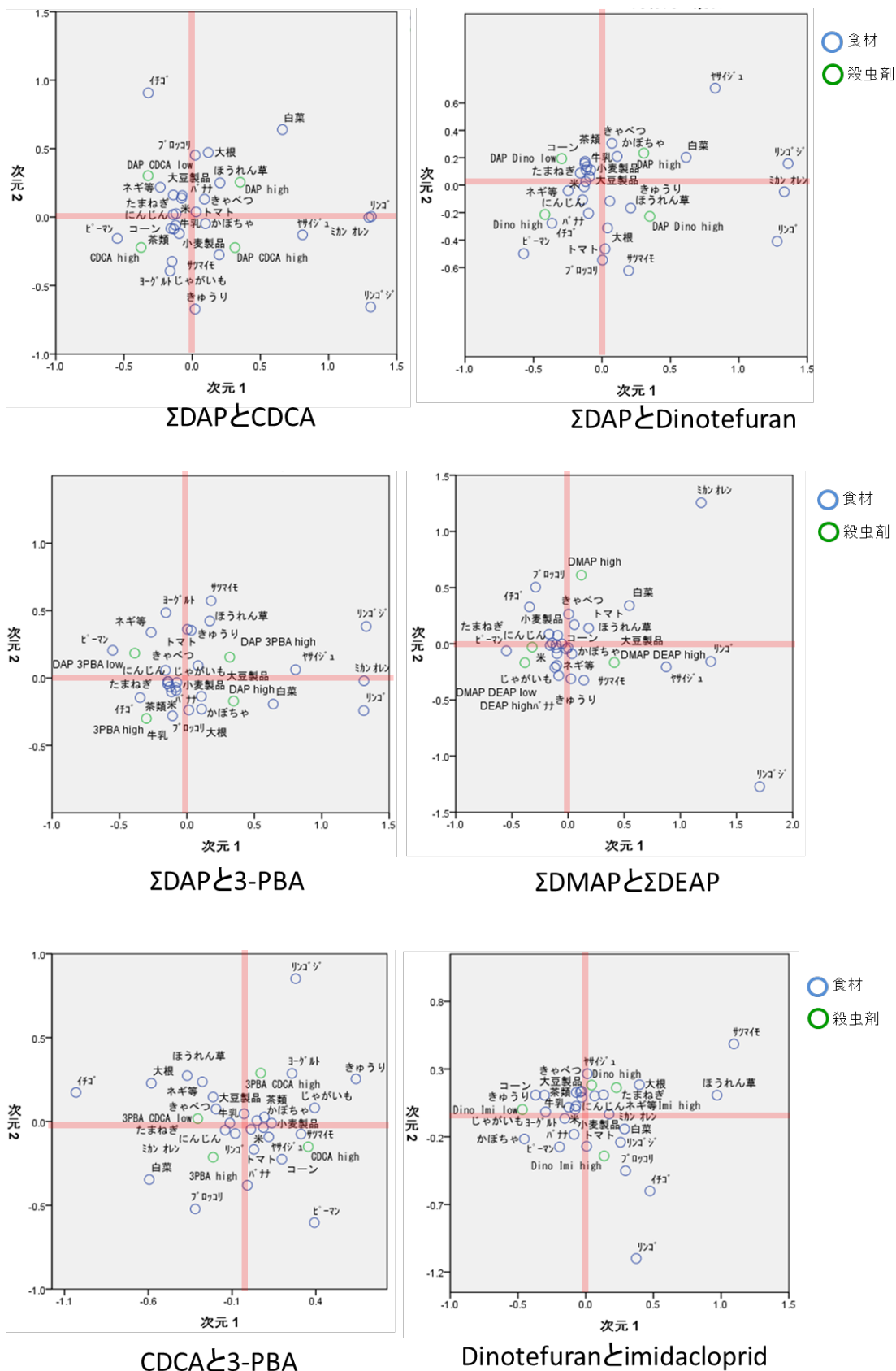
1歳半の尿中NEO殺虫剤濃度と基本属性の関連を表(1)-6に示す。母親の出産時年齢が有意確率15%未満であった。母親の出産時年齢を調整因子としてロジスティック回帰分析を行った結果、ORが上昇している項目は皆無であった(表(1)-7)。食への意識の質問項目において、いくつかオッズを下げる方に影響しているものが見られたが、これについては原因不明である。

表(1)-6 1歳半児の尿中ジノテフラン(NEO殺虫剤)濃度と基本属性情報

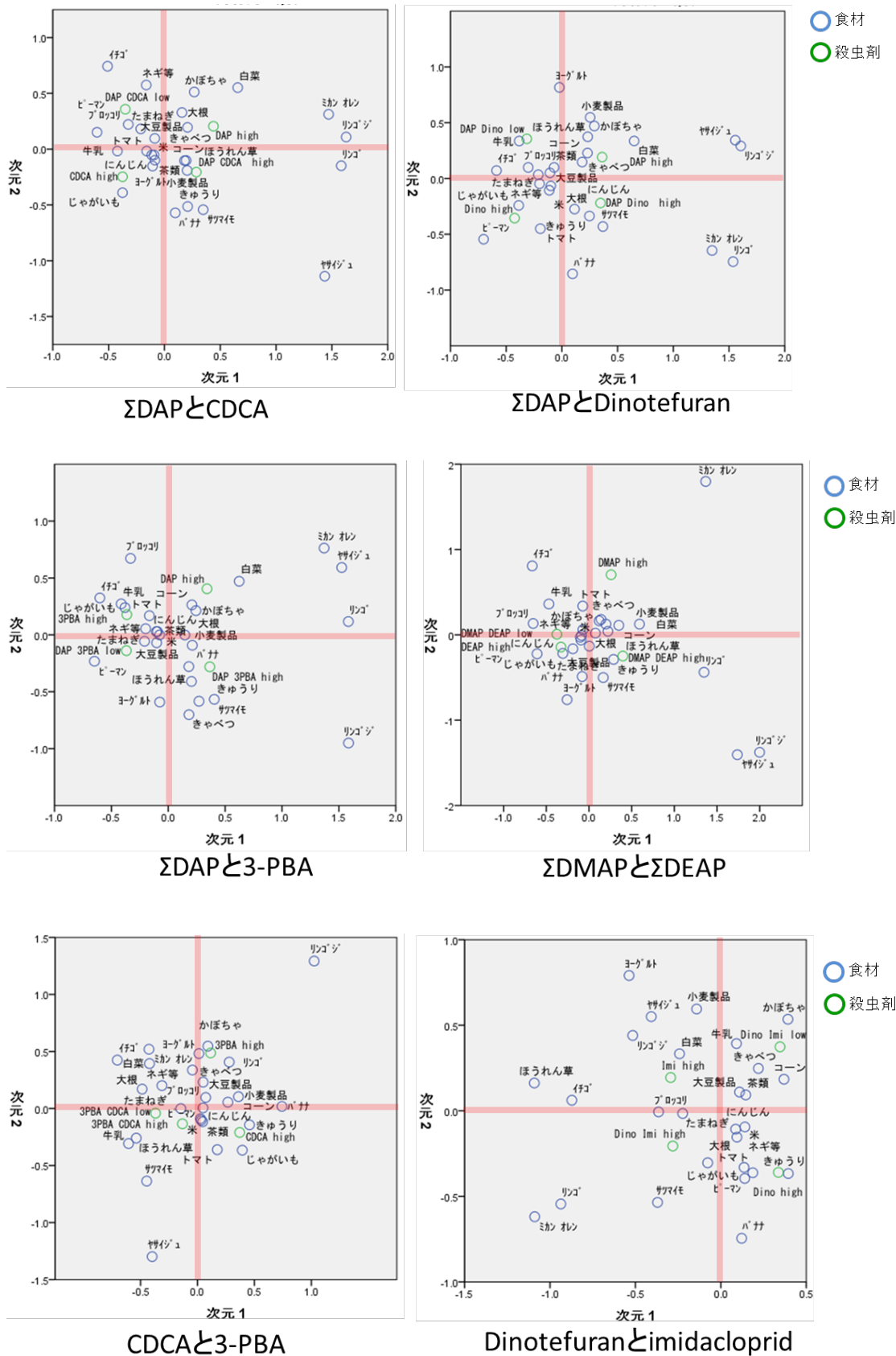
	Total		Dinotefuran		p		Total		Dinotefuran		p
	n	(%)	Lower 95%	Top 5%			n	(%)	Lower 95%	Top 5%	
Child's gender											
Male	530	51	51	49	0.78						
Female	506	49	49	51							
	1036	100	100	100							
Child age (month)											
<36	34	3	3	0	0.52						
36	395	38	38	41							
37	460	44	44	49							
38	108	10	11	6							
39≤	39	4	4	4							
	1036	100	100	100							
Season											
Spring (April-June)	188	18	18	16	0.95						
Summer (July-September)	294	28	28	31							
Fall (October-December)	239	23	23	24							
Winter (January-March)	315	30	30	29							
	1036	100	100	100							
Maternal age at delivery											
<25	50	5	5	4	0.01						
25≤, <30	261	25	25	20							
30≤, <35	403	39	39	29							
35≤, <40	257	25	25	29							
40≤	65	6	6	18							
	1036	100	100	100							
Maternal highest level of education											
Junior high school	44	4	4	4	0.24						
High school	266	26	26	22							
Technical junior college, Technical/vocational college, Associate degree	385	37	37	51							
Bachelor's degree, Graduate degree (Master's or Doctor's)	330	32	33	24							
No data	11	1									
	1036	100	100	100							
Paternal highest level of education											
Junior high school	52	5	5	4	0.69						
High school	270	26	26	31							
Technical junior college, Technical/vocational college, Associate degree	195	19	19	14							
Bachelor's degree, Graduate degree (Master's or Doctor's)	504	49	49	51							
No data	15	1									
	1036	100	100	100							
Annual household income											
<4	268	26	28	25	0.90						
4≤, <6	373	36	38	41							
6≤	337	33	35	33							
No data	58	6									
	1036	100	100	100							
Mother's smoking history during											
Currently smoking	16	2	2	0	0.65						
Previously did, but quit before or after realizing current pregnancy	274	26	28	29							
Never	685	66	70	71							
No data	61	6									
	1036	100	100	100							
Presence of smokers near the child when											
Rarely or never	815	79	83	82	0.85						
Occasionally or Frequently	173	17	17	18							
No data	48	5									
	1036	100	100	100							

表(1)-7 生活環境要因の1歳半児における尿中ジノテフラン(NEO殺虫剤)濃度上位5%のオッズ比

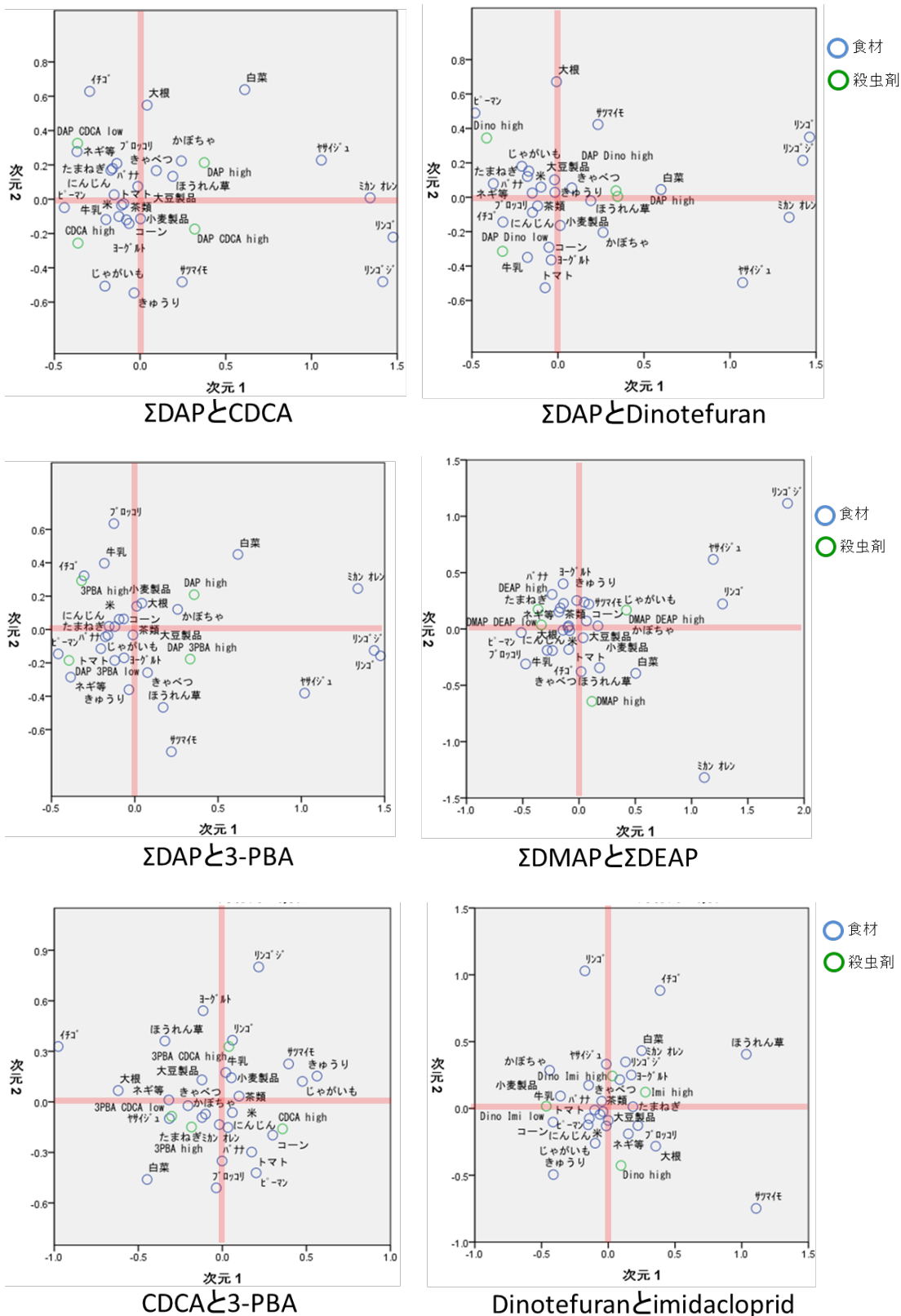
	n	Dinotefuran	
		OR	95% CI
Consciousness of diet			
Care about nutrition balance			
Strongly agree	225	Ref	
Agree	720	0.50	(0.26-0.94)
Disagree	86	1.4	(0.56-3.4)
Strongly disagree	5	-	
Avoid using frozen foods			
Strongly agree	259	Ref	
Agree	475	0.45	(0.22-0.90)
Disagree	245	0.87	(0.43-1.8)
Strongly disagree	57	0.51	(0.11-2.3)
Conscious of daily action for food safety			
Strongly agree	210	Ref	
Agree	679	0.42	(0.22-0.82)
Disagree	122	0.83	(0.34-2.0)
Strongly disagree	24	1.0	(0.20-4.6)



図(1)-10 1歳児殺虫剤排泄量とおむつ装着日に摂取した食材の関係
各代謝物の排泄量を中央値で2群に分けて解析した。



図(1)-11 1歳児殺虫剤排泄量とおむつ装着日の夕食に摂取した食材の関係
各代謝物の排泄量を中央値で2群に分けて解析した。



らず、その他の曝露源として今後検討していく必要がある。

表(1)-9 1歳児殺虫剤排泄量に対するおむつ装着日に摂取した食材、生活環境、食への意識の寄与

		調整済みR ²	標準化係数ベータ		
			食材	生活環境	食への意識
OP	Σ DAP	0.10	0.28	0.06	0.05
PYR	3PBA	0.03	0.14	0.10	0.08
	DCCA	0.20	0.12	0.22	0.09
	CDCA	0.17	0.04	0.27	0.07
NEO	Dinotefuran	0.03	0.13	0.04	0.06

赤色で示したものは有意確率5%未満であった。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

子どもの成長の過程において、自立排尿が困難な幼児期の化学物質曝露と健康状態との関係を解析した疫学研究は、世界的に非常に少ない。それは、医療の場面以外でこの年齢の子どもからの採尿が容易でなく、尿を用いた生物学的モニタリングが困難であったことによる。本研究では、おむつ尿を用いたOP代謝物の測定法を確立し、エコチル調査の追加調査として1歳半および3歳の時点においてOPの曝露レベルを明らかにした。測定法については、すでに論文として公表したが(Oya et al. 2017)、これに先立つ学会発表(2nd International Conference on Human Biomonitoring, 平成28年4月)ではこの研究アプローチが注目され、今後の成果についての期待が多く寄せられた。本研究で開発した方法は、殺虫剤以外の環境化学物質の測定に拡張できる可能性が大きく、環境保健における応用範囲は広い。さらに本研究では、1歳半および3歳の子どものNEO、OP曝露実態を千人規模で明らかにしたが、1歳半の時点におけるこれらの薬剤の曝露評価研究は世界最初である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省の「化学物質の人へのばく露量モニタリングに関するタスクフォース会合」における分析対象物質・次期調査計画策定の検討にあたり、本研究で明らかにされた殺虫剤の曝露レベルを念頭に委員の発言が行われている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

第5次環境基本計画が掲げる化学物質管理に関して、エコチル調査や化学物質に関する調査研究等の推進に活用することが見込まれる。具体的には以下の3点がある。

第一に、日本における1歳半および3歳児のNEO、OPへの曝露実態が明らかになった。環境モニタリングとしての生物学的モニタリングへの取り組みが先進的なドイツでは、集団の曝露結果に基づき、大多数(95%)の国民の曝露量が含まれる参照値(Reference value, RV₉₅)を明らかにしている。これにより、特定の個人または集団の曝露レベルがモニタリング測定値として明らかになった時に、一般集団の曝露レベルと比較可能となっている。また、回避すべき健康リスクを判断するための基準値(ガイダンス値)を、HBM-I値およびHBM-II値として設定している。本研究の対象集団の居住地域は、平均的な大都市および耕作地域を含む近郊都市圏であるので、わが国において対象年齢の子どものRV₉₅相当値を設定する場合、本研究で得た結果は中心的なデータとなろう。すなわち、今後のリスク評価の前提となるデータであり、環境省が成人を対象に実施する「化学物質の人へのばく露量モニタリング調査」の参考にもなる。また、「国際的な化学物質管理のための戦略アプローチ(SAICM)」で求められる、WSSD2020年目標の達成に向けた実施状況報告の中で、20の指標のうちのリスク削減の取り組み実

績のひとつとして報告内容の対象となりうる。

第二に、エコチル調査における農薬類の健康リスク評価への貢献である。エコチル調査で全国に適用されるプロトコールとしては、前述の通り採尿の困難さにより4歳より前の時期には採尿が行われなかった。本研究では、エコチル調査という前向きコホート研究の参加者を対象に、1歳半および3歳時点で採尿し、殺虫剤の曝露評価を行った。今後、子どもの健康および発達のデータと対応して解析することで、エコチル調査の「中心仮説」のひとつである殺虫剤のリスク評価の検討が可能になる。エコチル調査における成果発表ルールにしたがい、今後、検討していきたい。

第三に、エコチル調査において、殺虫剤以外の化学物質についての「中心仮説」検証への貢献である。本研究により、1歳半および3歳時点の尿が、エコチル調査の愛知サブコホートの代表性を維持しつつ千人規模で収集された。すなわち、体内半減期が短く、紙おむつの吸収材などの影響を受けない化学物質について、今後分析可能な検体をストックできた。本研究での対象物質以外の化学物質の曝露濃度を測定する上で、非常に重要な検体になる。

6. 国際共同研究等の状況

研究代表者の上島は、エコチル国際連携調査委員会座長として、ドイツ、米国、中国ほか各国の研究者と連携を取りつつ、各国の状況を踏まえて本研究を実施した。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) N. OYA, Y. ITO, K. HIOKI, Y. ASAI, A. AOI, Y. SUGIURA, J. UYAMA, T. OGURI, S. KATO, T. EBARA and M. KAMIJIMA: Int J Hygiene Environ Health, 220, 209-216 (2017)
Quantitative Concentration Measurements of Organophosphate Insecticide Metabolites in Urine Extracted from Disposable Diapers in 1.5-Year-old Children in Japan

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) N. OYA, Y. ITO, K. HIOKI, Y. ASAI, A. AOI, Y. SUGIURA, J. UYAMA, T. OGURI, S. KATO, T. EBARA and M. KAMIJIMA: 2nd International Conference on Human Biomonitoring, Berlin, Germany, 2016
“Measurements of concentrations of organophosphate insecticide metabolites in urine extracted from used diapers in 1.5-year-old children.”
- 2) M. KAMIJIMA, Y. ITO and J. UYAMA: International Society of Exposure Science (ISES) 2016 Annual Meeting, Utrecht, Netherland, 2016 (シンポジウム招待講演)
“Diaper use for exposure assessment of infants and toddlers.”
- 3) N. OYA, Y. ITO, K. HIOKI, A. AOI, Y. SUGIURA, J. UYAMA, T. OGURI, S. KATO, T. EBARA and M. KAMIJIMA: International Society of Exposure Science 2016 Annual Meeting, Utrecht, Netherland, 2016
“Recovery rates in the measurements of the concentrations of organophosphorus pesticide metabolites in urine extracted from children’s diaper.”

- 4) Y. ITO, T. EBARA, N. OYA, J. UYEYAMA, T. OGURI, S. KATO and M. KAMIJIMA: International Society of Exposure Science 2016 Annual Meeting, Utrecht, Netherland, 2016
 “A study design to assess exposure levels of insecticides in 1.5-year-old children in Aichi Regional Subcohort of the Japan Environment and Children’s Study.”
- 5) N. OYA, Y. ITO, T. EBARA, K. HIOKI, A. AOI, J. UYEYAMA, S. KATO, T. OGURI, N. SHOJI, M. SUGIURA-OGASAWARA, S. SAITOH and M. KAMIJIMA: The 21st International Epidemiological Association World Congress of Epidemiology, Omiya, Japan, 2017
 “Exposure assessment of organophosphorus pesticide in Japanese diapered children.”
- 6) Y. ITO, N. OYA, T. EBARA, K. HIOKI, J. UYEYAMA, S. KATO, T. OGURI, N. SHOJI and M. KAMIJIMA: Society of Toxicology 57th Annual Meeting, San Antonio, USA, 2018
 “Quantitative analysis of urinary organophosphate insecticide metabolites in diapered children in Japan.”
- 7) Y. ITO, N. OYA, T. EBARA, K. HIOKI, J. UYEYAMA, S. KATO, SUGIURA-OGASAWARA, S. SAITOH and M. KAMIJIMA: Society of Toxicology 57th Annual Meeting, San Antonio, USA, 2018
 “Exposure levels of organophosphorus insecticides in 1.5- and 3-year-old children in Japan.”
- 8) 大矢奈穂子、伊藤由起、日置啓介、浅井佑哉、青井亜里沙、上山 純、小栗朋子、加藤沙耶香、榎原毅、上島通浩：第86回日本衛生学会（2016）
 「使用済みおむつを用いた1歳半児における尿中有機リン系殺虫剤曝露量の測定」
- 9) 大矢奈穂子、伊藤由起、榎原 毅、日置啓介、青井亜里沙、上山 純、加藤沙耶香、小栗朋子、庄司直人、上島通浩：第87回日本衛生学会(2017)
 「使用済み紙おむつを用いた幼児における有機リン系殺虫剤曝露濃度の測定」
- 10) 伊藤由起、大矢奈穂子、榎原 毅、佐藤博貴、加藤沙耶香、上山 純、庄司直人、松木太郎、杉浦真弓、齋藤伸治、上島通浩：第45回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2017)
 「3歳児の尿中有機リン系殺虫剤代謝物濃度と採尿季節の関係」
- 11) 伊藤由起、大矢奈穂子、日置啓介、上山 純、青井亜里沙、小栗朋子、加藤沙耶香、齋藤伸治、榎原毅、上島通浩：第88回日本衛生学会(2018)
 「日本の幼児における有機リン系殺虫剤曝露と生活環境との関連」
- 12) 大矢奈穂子、伊藤由起、上山 純、青井亜里沙、小栗朋子、加藤沙耶香、齋藤伸治、杉浦真弓、榎原毅、上島通浩：第88回日本衛生学会(2018)
 「使用済み紙おむつを用いた1歳半児における尿中ネオニコチノイド系殺虫剤の測定」

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 名古屋市立大学「医療・保健 学びなおし講座」（2015年9月16日、2016年9月21日、2017年9月13日、聴講者各約50名）にて子どもの殺虫剤曝露影響の評価について講演
- 2) サイエンスアゴラ2015「レギュラトリーサイエンスの理解と社会応用」（主催：科学技術振興機構、2015年11月15日、日本科学未来館、聴衆約40名）にて農薬の安全性確保のための考え方を講演

3) 測定結果の返却および返却結果に関する相談窓口の設置（1歳半、3歳調査結果の返却希望者全員）

ちゃんのおむつ尿中の殺虫剤由来物質濃度の測定結果

今回の結果は、現在の科学的証拠において、**健康に影響がないレベル**です。

＜有機リン系殺虫剤＞ 主に食事を通して体に入り、尿から出てきます

測定した物質の名前	結果	参考値範囲*
ジメチルリン酸 (DMP)		150
ジメチルチオリン酸 (DMTP)		300
ジメチルジチオリン酸 (DMOTTP)		30
ジエチルリン酸 (DEP)		100
ジエチルチオリン酸 (DETP)		100
ジエチルジチオリン酸 (DEDTTP)		

単位: μg/L

＜ピレスロイド系殺虫剤＞ 食事や室内で使用する殺虫剤の経路などから体に入り、尿から出てきます

測定した物質の名前	結果	参考値範囲*
トランス型グリサンチンマムカルボン酸 (GDCA)		30
トランス型グリサンチンマムカルボン酸 (GDCA)		150
シス型グリサンチンマムカルボン酸 (GDCA)		10
4-フルオロ-3-フェノキシ安息香酸 (FPBA)		10
3-フェノキシ安息香酸 (3-FPBA)		30

単位: μg/L

*参考値範囲とは、ほとんどの尿の測定値がそれ以下である「目安」の範囲です。健康に影響が生じるレベルのある尿の数は1%以下と見なされています。

＜解説＞

①体内に入った殺虫剤は代謝（分解）され、尿には大部分が尿から出てきます（体内には蓄積しません）。尿中の濃度を調べれば、体に取り込まれた量がわかります。

②殺虫剤は食べ物や身のまわりの空気等から体に入ります（→【参考】）。ただし、その量が少なければ健康に影響はありません。

③お子様の測定値のレベルでは日常生活を営む必要はありません。

④このような検査は、エコチル調査以外では実施していません。尿検査の結果は、未来の子供たちのために生かされます。

【参考】

＜今回調べた殺虫剤＞
農業や家庭用その他の用途で使われる有機リン系およびピレスロイド系殺虫剤といわれるものです。農薬としての殺虫剤は、農作物を病害虫から守る目的で使用され、国の審査に合格した薬剤のみが使用され、作物ごとに、使ってもいい農薬、使用量、使用回数が決まっています。

食べ物の中に人間の尿の少し混入することがありますが、健康には心配がたいように、検査には厳しく検出限界値基準を下回ることが確認されています。殺虫剤の経路や家庭用殺虫スプレーの成分はピレスロイド系殺虫剤です。人体に安全な薬剤として知られており、身のまわりの使用が許可されています。

＜単位の説明＞
今回お子様の尿から検出された殺虫剤の濃度は、μg（マイクログラム）という単位で表しています。1 μgは、1という数字は、オリンピックの50mプール（横幅25m、長さ2m）の尿に小さじ半分程度の殺虫剤の成分を溶かしたくらい程度の濃度です。

＜日常生活におけるヒント＞
殺虫剤が検出されるのは、よくある農薬、殺虫剤（キャベツ、レタスなど）は殺虫剤を使いますが、などを意識して食べてください。特定の農薬に頼らず、パンプスよく食べさせることも大切です。

殺虫剤の経路や殺虫スプレー等は、使用目的にあった製品を選んで、使用方法を守りましょう。

・子供の手の届く場所での殺虫剤の経路などの使用

・殺虫剤の経路での殺虫剤の経路などの長時間の使用

・殺虫剤の経路や殺虫スプレーの過度な使用

図. 殺虫剤体内取り込み量の結果返却シート

農薬やリスク概念の知識のない一般スタッフと何度も推敲し作成した。

- 4) なごや環境大学共育講座（主催：なごや環境大学実行委員会、2016年6月18日、名古屋市立大学、聴衆約20名）にて体内に取りこむ化学物質の評価について講演
- 5) リスクの考え方についての主婦との意見交換（2016年7月26、27日 聴衆約15名、2017年8月29日 名古屋市立大学、聴衆約30名）
- 6) 名古屋市立大学「大学丸ごと研究室体験」（2016年8月23日、2017年8月24日 各5名）において高校生対象の尿中殺虫剤代謝物測定法に関する実験教室を開催
- 7) エコチル調査公開講座2018（主催：名古屋市立大学エコチル調査愛知ユニットセンター、2018年2月24日、JRゲートタワー16Fホール、聴衆約120名）における講演および本調査参加者に対しての測定結果相談ブースの開設

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（6）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Schulz, C., Wilhelm, M., Heudorf, U., Kolossa-Gehring, M., 2012. Reprint of "Update of the reference and HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission". Int. J. Hyg. Environ. Health. 215, 150-158.
- 2) Oulhote, Y., Bouchard MF., 2013. Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticides and behavioral problems in Canadian children. Environ. Health Perspect. 121, 1378-1384.
- 3) Saito, S., Ueyama, J., Kondo, T., Saito, I., Shibata, E., Gotoh, M., Nomura, H., Wakusawa, S., Nakai, K., Kamijima, M., 2013. A non-invasive biomonitoring method for assessing levels of urinary pyrethroid metabolites in diapered children by gas chromatography-mass spectrometry. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 24, 200-207.

Ⅱ－２ おむつ尿中の殺虫剤およびその代謝物の測定法開発

名古屋大学大学院医学系研究科 上山 純

平成27～29年度累計予算額：4,054千円（うち平成29年度：1,200千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

検討の対象物質は、ネオニコチノイド系殺虫剤(NEO)であるアセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアメトキサム、クロチアニジン、ジノテフランおよびアセタミプリド代謝物であるN-デスメチルアセタミプリドの計7物質とした。測定法は、使用済み紙おむつから抽出した尿試料（おむつ尿）に含まれるピレスロイド系殺虫剤(PYR)代謝物測定法と、おむつを介さずに採取した尿に含まれるNEO分析法を組み合わせた方法を参考に、検討した。おむつの表面を切り、吸収材約6 gを取り出し、それを10 mLシリンジに詰めた。このシリンジをアセトン12 mLが入った20 mLシリンジとチューブで連結後、各シリンジを交互に5回ずつ押し出し、有機溶媒がおむつ吸収剤を通過することで尿を抽出した。抽出液を窒素ガスの吹き付けにより濃縮したのちに、重量法で推定した尿量まで精製水でメスアップし、これをおむつ尿として各NEOおよび代謝物の分析に供した。おむつ尿は多孔性珪藻土カラムおよび逆相系固相カラムにて精製し、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて分離定量分析を行った。これにより、再現性よく高感度におむつ尿中のネオニコチノイド系殺虫剤をモニタリングできるようになった。また、PYRについては、ガスクロマトグラフタンデム質量分析計(GC-MS/MS)を用いることにより、従来からの測定対象物質である *trans*-クリサンテマムジカルボン酸(CDCA)および3-フェノキシ安息香酸(3-PBA)に加え、これまで検出できなかった *cis*-および *trans*-3-(2,2-ジクロロビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパン-1-カルボン酸(total DCCA), *cis*-3-(2,2-ジプロモビニル)-2,2-ジメチルシクロプロパン-1-カルボン酸(DBCA)および4-フルオロ-3-フェノキシ安息香酸(F-PBA)を高感度かつハイスループットで分析可能となった。この方法を用いて、1歳半児および3歳児から得られた尿でPYR代謝物をモニタリングし、それらの濃度分布、性差、季節変動および生活環境要因との関係を解析した。

【キーワード】

ピレスロイド系殺虫剤、ネオニコチノイド系殺虫剤、使い捨ておむつ

1. はじめに

化学物質が安全であるかどうかは、その化学物質が持つ有害性と曝露量のどちらか一方で実施することはできない。有害性評価は動物実験を軸とした毒性試験を多角的に実施し、「有害性の特定」、「用量相関性の確認」、「無毒性量などの特定」を行っている。一方で曝露評価は「環境モニタリングデータ」や「環境放出量データ」などを利用して、あくまで平均的なヒト推定摂取量を評価することが多い。しかし、実際の生活環境中（具体的には食習慣や住環境）での化学物質曝露量は非常に多様であり、個人レベルでの曝露評価が実現できればこれまでに見逃されていた化学物質リスクを顕在化できる可能性がある。さらに、化学物質の安全性を確認するという意味でも個人レベルでの曝露評価法の発展が急務である。

バイオモニタリング手法を用いた化学物質曝露評価の試み、すなわち、生体試料中の化学物質濃度測定や曝露によって影響を受ける指標(有機リン系殺虫剤の場合は血中コリエステラーゼ活性値の低下)を観察することで、曝露レベルを個別に評価する試みが世界的に進められている。農薬を含めた殺虫剤の曝露評価は、尿中に含まれる殺虫剤あるいはその代謝物を高感度に定量することで実施されているが、生体試料の採取が困難な0歳から2、3歳までのバイオモニタリングは対象外とされている調査がほとんどである。

2. 研究開発目的

我々は神経発達の臨界期である0歳から2、3歳までの殺虫剤曝露評価は、広義の殺虫剤リスク評価に欠かせない作業であると位置づけ、おむつ中に排泄された尿を利用した高感度殺虫剤代謝物測定法を確立している¹⁾。この成果により、おむつを使用している小さな子供を対象として一部のピレスロイド系殺虫剤(PYR)の曝露評価が可能となった。すなわち、尿中に排泄された3-フェノキシ安息香酸(3-PBA)および*trans*-クリサンテムジカルボン酸(*trans*-CDCA)がモニタリング可能となった。しかしながら、殺虫剤は使用する環境や対象とする昆虫に合わせて多種多様な薬剤が使用されているために、世界的にはさらに多くの尿中ピレスロイド系殺虫剤の代謝物を分析し、多様な殺虫剤曝露を評価できる体制が整備されつつある。一方、我々は世界に先駆けて尿中ネオニコチノイド系殺虫剤のバイオモニタリングに成功しているが、おむつから得られた尿サンプルに応用した成果はない。

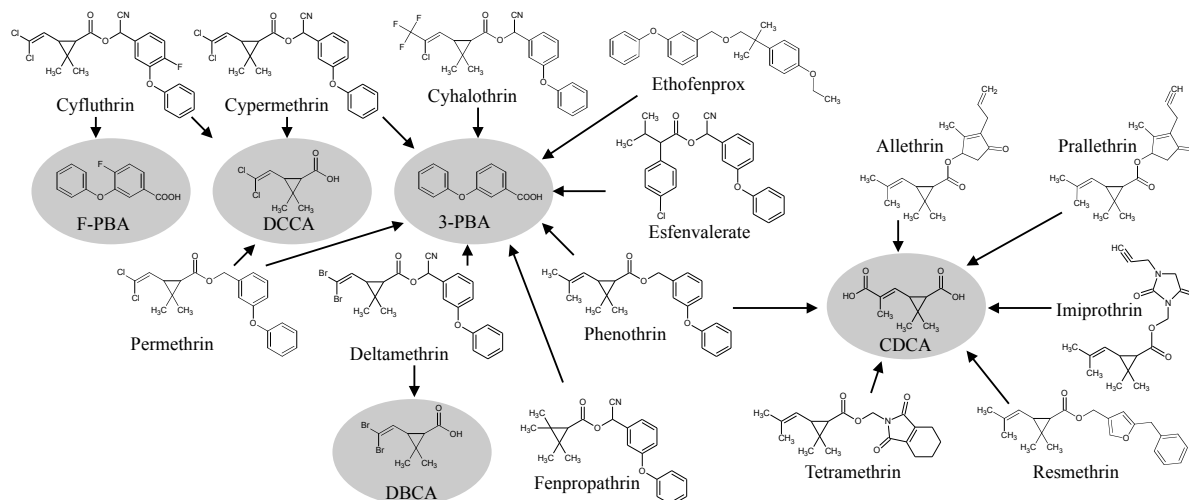
本研究では、既に開発しているおむつ抽出法を応用し、ピレスロイド系殺虫剤(PYR)代謝物の分析項目の追加とネオニコチノイド系殺虫剤の新規分析法の開発を目指した。

3. 研究開発方法

①おむつ尿中のPYR代謝物分析法の開発

図(2)-1にPYRとそれが体内に入った場合に代謝物として尿中に排泄される物質との関係を示す。3-PBAおよび*trans*-CDCAをPYR曝露マーカーとして着目し、おむつ尿を対象とした高感度測定法の本事業開始前に終えている。

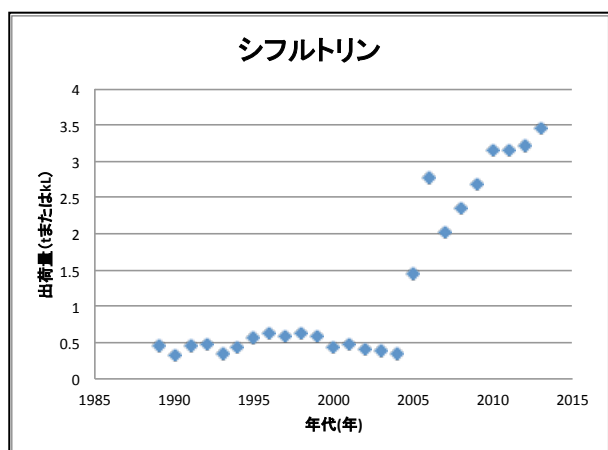
図(2)-1 ピレスロイド系殺虫剤と尿中代謝物との関係



Abbreviations: DCCA, 3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid; F-PBA, 4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid; DBCA, *cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid; CDCA, *trans*-chrysanthemumdicarboxylic acid; 3-PBA, 3-phenoxybenzoic acid.

ガスクロマトグラフ質量分析計(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)は有機物が混合した物質の組成を分離・定量するのに、きわめて有力な分析装置である。過去に我々はGC-MSを使用した*trans*-CDCAおよび3-PBAの分析法を開発したが、他の代謝物を同時に定量しようとした場合、尿あるいはおむつ中に含まれる分析対象物質以外の夾雑物が妨害ピークとなるため、total DCCA、DBCAおよびF-PBAの分析は困難であった。サブテーマ2を担当する上山らはGC-MSに比べてさらに選択性の高いガスクロマトグラフタンデム質量分析系(GC-MS/MS)を導入したため、これを用いておむつ抽出尿から網羅的にPYR

代謝物を高感度検出する方法を確立した。これにより、わが国では全く報告されてこなかったDBCAおよびF-PBAの尿中濃度を子供からモニタリングすることが可能となった。目標検出下限値 (Limit of Detection, LOD) は、2 mlの尿を用いて分析を行った場合、0.1 $\mu\text{g/L}$ 程度とした。この値により見込まれる検出率は、total DCCAおよび3-PBAで90%、*trans*-CDCAで50%(日本人を対象)²⁾、DBCAおよびF-PBAで10% (アメリカ人を対象)³⁾程度である。しかし、F-PBAに代謝されるシフルトリンについては、我が国における近年の出荷量が急増していることを考えると、検出率はさらに上昇する可能性がある(図(2)-2)。



図(2)-2

日本におけるシフルトリンの国内出荷量の経年推移 (化学物質データベース, WebKis-Plus, 化学物質安全情報提供システムより)

測定法はLengら⁴⁾の方法を参考に、サンプル前処理からGC-MS/MSコンディションまで当研究室で実施可能な方法に改良した方法を利用した。なお、本測定では内部標準物質(internal standard, I.S)として2-フェノキシ安息香酸 (2-PBA)を用いた。

②おむつ尿中NEOおよび代謝物分析法の開発

一方、尿中NEOの高感度分析によるモニタリングは、世界に先駆けて我々の研究室が実践している特徴的な取り組みである。この経験を生かし、本研究ではおむつ抽出尿を用いたNEOの分析法の確立を目指した。本研究では、1000検体を超える尿サンプルを分析する必要があるため、簡易的な前処理法を採用するという選択肢もある。しかし尿サンプルは分析を妨害するマトリクスに個人差があり、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)を分析機器として用いることを考えると、安定した分析値を継続的に得るためには堅牢性の高いサンプル処理方法を確認し、分析機器に供する分析系を開発すべきであると考え。堅牢性の高いサンプル処理方法とは、分析環境の変化、すなわちオペレーターの交代、他の研究室での分析法の立ち上げ、実験器具や温度変化等の変化の影響を受けにくい方法である。分析対象物質はアセタミプリド、*N*-デスメチルアセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアメトキサム、クロチアニジンおよびジノテフランである。ニテンプラムは国内での使用量も少なく、尿中からの検出はほとんど見込まれなかったために本研究では対象外とした²⁾。目標とするLODは、おむつを介さずに直接採取した尿に含まれるNEO分析法と同レベル(アセタミプリド 0.03; イミダクロプリドおよびチアクロプリド, 0.3; チアメトキサム, 0.2; クロチアニジン, 1.0; ジノテフラン, 0.3 $\mu\text{g/L}$ 程度)とした。各種再現性実験を実施し、一連の分析過程を通して妥当性が確認され、十分な信頼性を有する方法を目指して基礎検討を行った。

③1歳半児および3歳児の尿中PYR代謝物測定

1歳6か月児健康診査受診時に本研究への参加の代諾を得たエコチル調査愛知ユニットセンター参加者

を対象とした(同意率86.3%)。そのうち、2015年6月から2016年6月の間に夜間使用した紙おむつを回収した幼児1076名と2016年5月から2017年9月までに夜間使用した紙おむつあるいは早朝尿を回収できた1464名を対象とした。個人の尿中代謝物量の分布は、非正規分布であるため、基本的にはノンパラメトリック検定を採用した。具体的には、マン・ホイットニー、クラスカル・ウォリス検定を採用し、多重比較にはボンフェローニ法を用いた。それらの有意水準は0.05(ボンフェローニの補正では0.0125)とした。おむつの表面を切り、吸収材約6gを取り出し、それを10mLシリンジ詰めた。アセトン12 mLが入った20 mLシリンジとチューブで連結後、各シリンジを交互に5回ずつ押し出し、有機溶媒がおむつ吸収剤を通過することで尿を抽出した。抽出液を窒素ガスの吹き付けにて濃縮したのちに、重量法で推定した尿量まで精製水でメスアップし、クレアチニンおよびPYR代謝物分析法に供した。クレアチニンは既報に準じてUPLC-MS/MSにて定量した。PYR代謝物は、液-液抽出、誘導体化、精製を組み合わせた前処理方法でサンプル調整し、Agilent 7000C トリプル四重極 GC-MS システムを用いて定量分析した。尿中PYR代謝物濃度10 $\mu\text{g/L}$ において、本測定法での絶対回収率は61%以上、日内変動(CV%, $n=6$)は7.7%以下、日間変動(CV%, 5 days)は14%以下である。なお、37°C24時間におけるおむつ中PYR代謝物の安定性を確認した結果、最も分解したPYR代謝物は3-PBAであり、その低下の平均は10%程度であったが統計的に有意な低下ではなかった。

④おむつ尿中OP代謝物分析法の開発

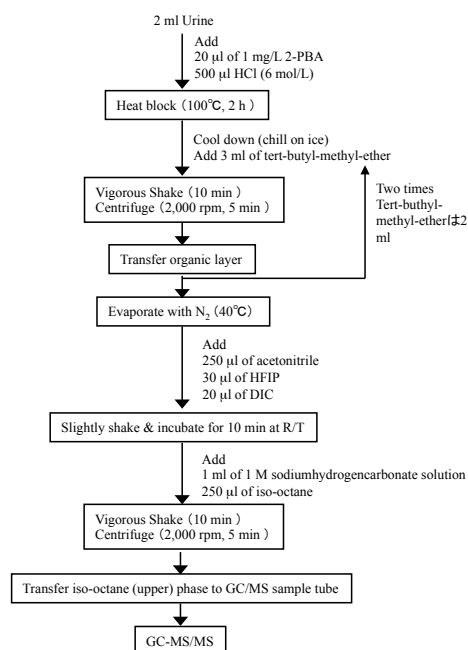
おむつ尿からのOP代謝物測定法を決定した。当初は1歳半および3歳児の尿を用いた測定もサブテーマ(2)で行うこととしていたが、本研究費でサブテーマ(1)のためにレンタルした超高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を使用した方が高感度で測定可能であることが判明した。したがって、計画変更の承認を経て、この測定はサブテーマ(1)において実施した(結果はサブテーマ(1)にまとめて示した)。

4. 結果及び考察

①おむつ尿中ピレスロイド系殺虫剤代謝物分析法の開発

①-1 サンプル前処理方法の検討

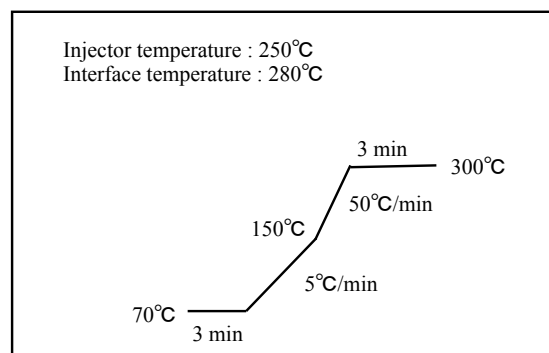
測定法はLengら⁴⁾の方法を参考に、サンプル前処理からGC-MS/MSコンディションまで当研究室で実施可能な方法に改良したものを立ち上げた。図(2)-3にサンプル前処理方法の全体図を示す。なお、本測定では内部標準物質(internal standard, I.S)として2-フェノキシ安息香酸(2-PBA)を用いた。溶媒添加量、窒素乾固方法、遠心力やインキュベーション時間などは適宜検討し、継続的な実施が可能な方法を構築した。



図(2)-3 サンプル前処理方法のフローチャート

①-2 GC-MS/MSの条件設定

分析カラムは中極性Rtx-65 (30m×0.25mm×0.25 m, Restek, Bad Homburg, Germany)を用いた。この分離カラムは汎用性の高い無極性カラム（例えばDB-5）に比べて *trans*-CDCAの保持が秀逸であることが選定理由の一つである。GCカラムオープンの昇温プログラムは図(2)-4に示す通りで、一分析あたり約30分という分析サイクルである。すなわち、1日に48検体程度の処理能力である。

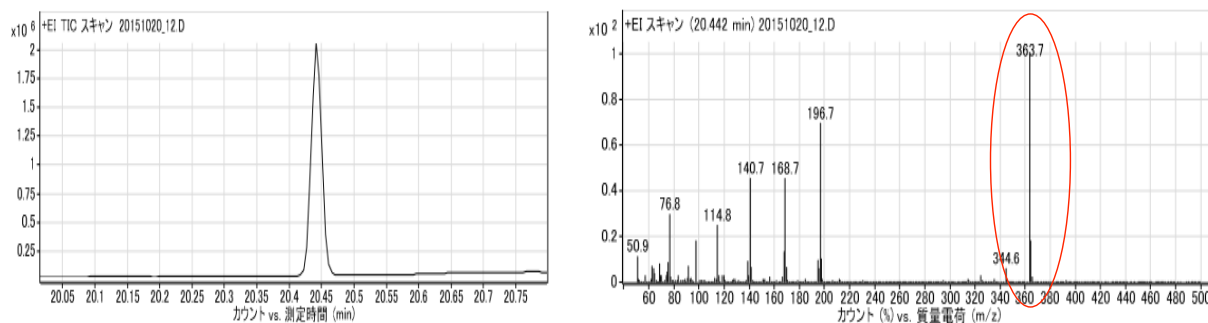


図(2)-4 GCカラムオープンの昇温プログラム

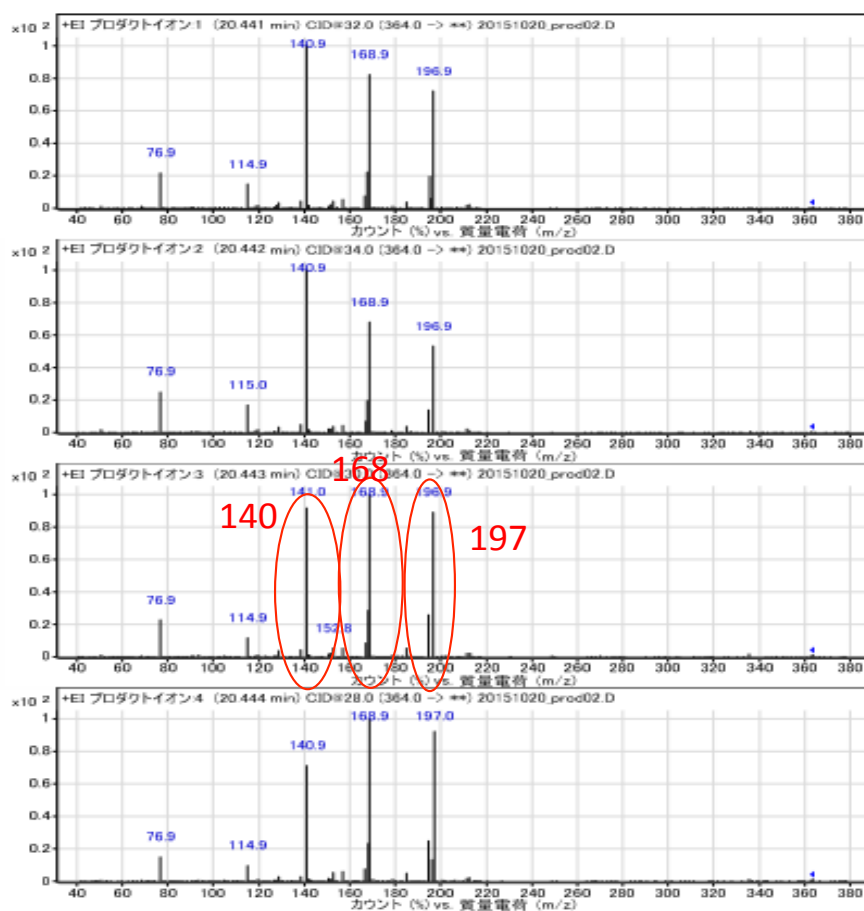
①-3 標準物質の分析結果

a) 3-PBA

以上の分析条件を用いて、各物質のプレカーサーイオンおよびリテンションタイムを検討し、衝突セルに於けるコリジョンエネルギーの最適化条件をプロダクトイオンを観察することで決定した。すなわち、ダイナミックMRM(多重反応モニタリング)を行うための各種パラメータを設定した。以下に3-PBAのトータルイオンクロマトグラム、コリジョンガスoff時のMS2スキャン、コリジョンガスon時のMS2スキャンによるフラグメンテーションを示す(図(2)-5および6)。3-PBA以外の代謝物は、トータルイオンクロマトグラムとCE off時のMS2スキャンのみを示す。

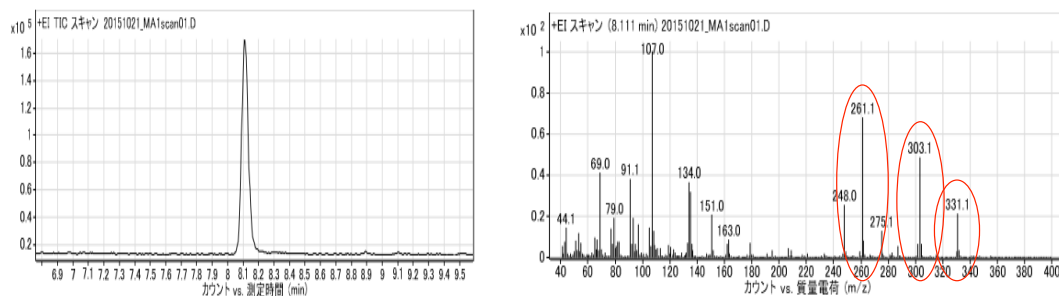


図(2)-5 3-PBA標準液のTICピークとプレカーサーイオン



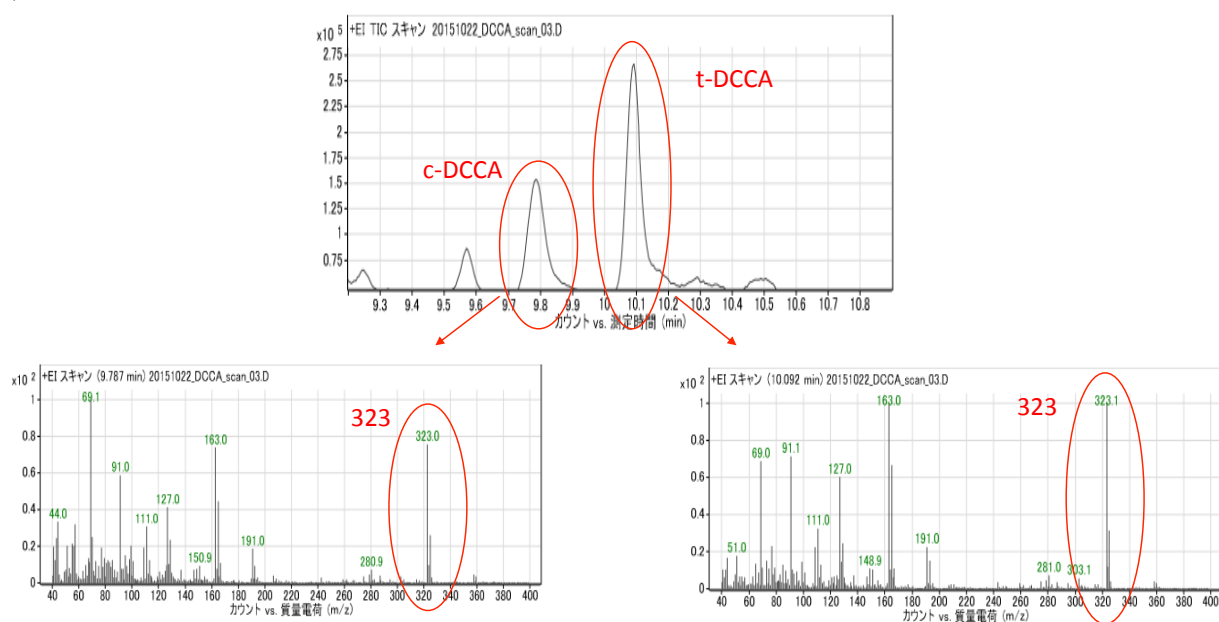
図(2)-6 3-PBA標準液のプロダクトイオンとコリジョンエネルギーとの関係

図(2)-5および図(2)-6の結果より、3-PBAのトラジションはプレカーサーイオンを m/z 364、コリジョンエネルギー(eV)を30、プロダクトイオンを m/z 140, 168, 197として、定量イオンをもっともアバンダンスが高い168とした。以下のPYR代謝物も同様にプレカーサーイオン、コリジョンエネルギー、プロダクトイオンを検出し、定量イオンと定性イオンを決定した。

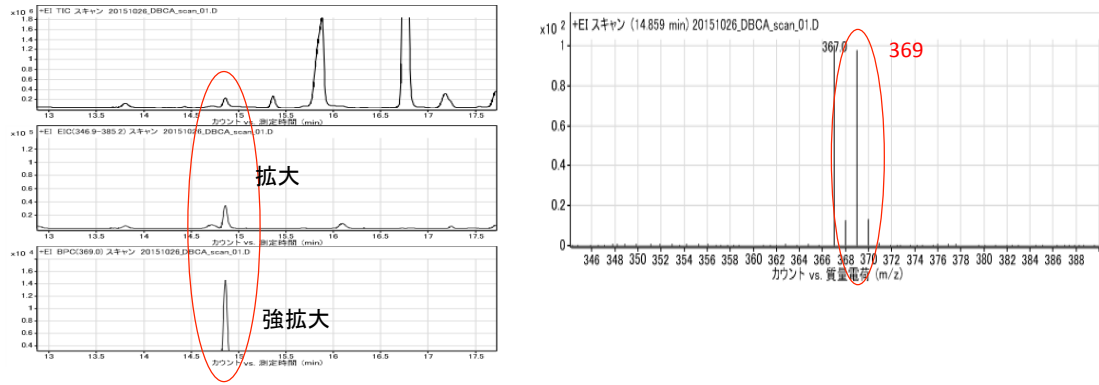
b) *trans*-CDCA図(2)-7 *trans*-CDCA標準液のTICピークとプレカーサーイオン

図(2)-7の結果とその後のコリジョンエネルギー(eV)とプロダクトイオン検出の結果より、標準物質でのトラジションを組み立てることはできた。*trans*-CDCAのトラジションはプレカーサーイオンを m/z 331とした場合、コリジョンエネルギー(eV)を7、プロダクトイオンを m/z 136、107として、定量イオンを暫定的に107に決めることができた。プレカーサーイオンを m/z 303とした場合、コリジョンエネルギー(eV)を26、プロダクトイオンを m/z 136、107として、定量イオンを暫定的に107とした。プレカーサーイオンを m/z 261とした場合、コリジョンエネルギー(eV)を24、プロダクトイオンを m/z 110、82、54として、定量イオンを110とした。

c) total DCCA

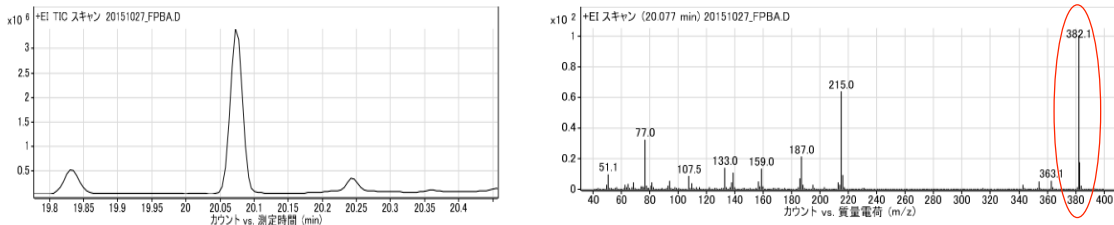
図(2)-8 *cis*-DCCA(c-DCCA)と*trans*-DCCA(t-DCCA)標準液のTICピークとプレカーサーイオン

d) DBCA



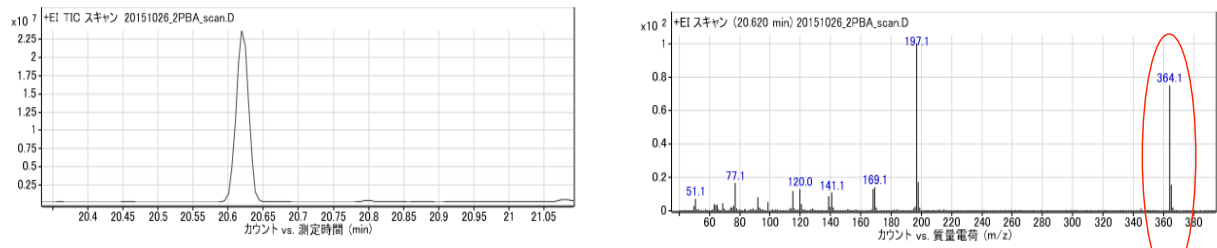
図(2)-9 DBCA標準液のTICピークとプレカーサーイオン

e) F-PBA



図(2)-10 F-PBA標準液のTICピークとプレカーサーイオン

f) 2-PBA



図(2)-11 2-PBA標準液のTICピークとプレカーサーイオン

g) PYR代謝物MRMトラジションまとめ

尿マトリクスからPYR代謝物を分析する場合、様々な夾雑物が定量ピークに影響する可能性を考え、定量イオンは幾つかの候補を有したまま実際の尿サンプルおよびおむつ抽出尿サンプルに応用した結果、表(2)-1のパラメータにおいて低濃度域のPYR代謝物の定量が可能となった。

表(2)-1 標準溶液から得られたMRMトラジションパラメータ (Abbreviation: Q, quantifier ion)

	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Collision energy (eV)	Product ion (m/z)
trans-CDCA	10.17	331	9	135(Q), 107
cis-DCCA	11.7	323	28	137(Q), 109
trans-DCCA	12.01	323	28	137(Q), 109
DBCA	16.14	369	28	137(Q), 109
F-PBA	19.59	382	28	215(Q), 187
3-PBA	19.87	364	30	197, 169(Q)
2-PBA	20	364	20	197, 169(Q)

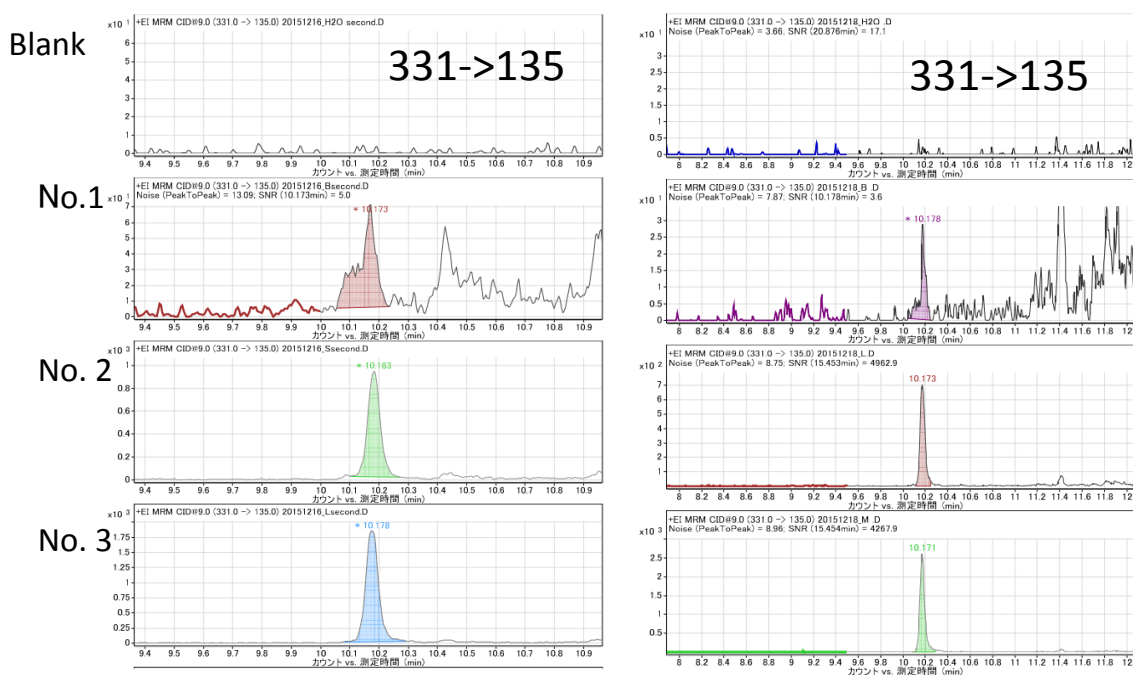
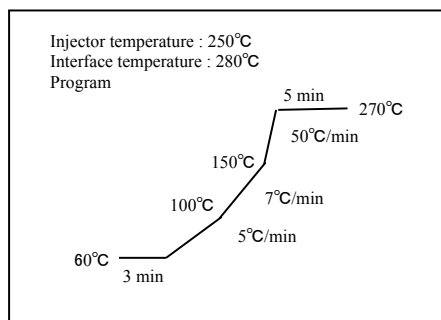
①-4 尿サンプル分析結果

おむつ尿中PYR代謝物を分析するにあたり、まずは尿中PYR代謝物分析の最適化を行った。使用した尿は3歳児から得られたプール尿に既知濃度の標準物質溶液に添加したものである（Quality Control尿、QC尿とする）。それらの濃度は下記の表に示す。

表(2)-2 4濃度の標準物質添加尿(μg/L)

QC尿	3-PBA	CDCA	totalDCCA	DBCA	F-PBA
No. 1	0.5	0.01	0.063	0	0
No. 2	1.75	1.26	1.313	1.25	1.25
No. 3	3	2.51	2.563	2.5	2.5
No. 4	10.5	10.01	10.063	10	10

図(2)-3の手順に従って、これらのQC尿を前述の方法で分析した結果、*trans*-CDCAが最も思わしくないクロマトピークを示した(図(2)-11左)。これは夾雑ピークの存在により、濃度の低い*trans*-CDCAで顕著にその妨害を受けることに起因した結果であると思われた。従って我々は分離カラムの昇温プログラムを工夫し、*trans*-CDCAの低濃度域での選択性の確保に成功した(図(2)-11右)。変更した昇温プログラムを図(2)-12に示す。以後はこの条件で分析を行うこととした。また、定量イオンは最も高感度に分析できるように選択し、確認イオンは次にアバンダンスが高いフラグメントイオンとした(表(2)-1)。

図(2)-11 カラム昇温プログラム変更による低濃度*trans*-CDCAの選択性改善

図(2)-12 変更後のカラム昇温プログラム

①-5 検出下限値

プール尿を用いた検討により、signal-to-noise ratioが3である場合を検出下限値とする場合、*trans*-CDCAは0.04、total DCCAは0.04、DBCAは0.03、F-PBA及び3-PBAは0.02 µg/Lと算出された。

①-6 再現性実験

QC尿を6回連続測定することで日内変動を、QC尿を6日連続で測定することで日間変動を調査した。概ねCV%15%以下を示しており、過去の分析法に加えてDBCA、F-PBA及びtotal DCCAを測定項目に加えて実際のおむつから回収した尿に適応する準備が整った。

表(2)-3 4 濃度の日内変動 (CV%)

QC尿	3-PBA	CDCA	totalDCCA	DBCA	F-PBA
No. 1	8.3	22.3	19.4	-	-
No. 2	4.1	5.2	4	6.6	2.1
No. 3	4	4.9	5.6	3.9	3.6
No. 4	9.1	8.1	8.5	7	7.8

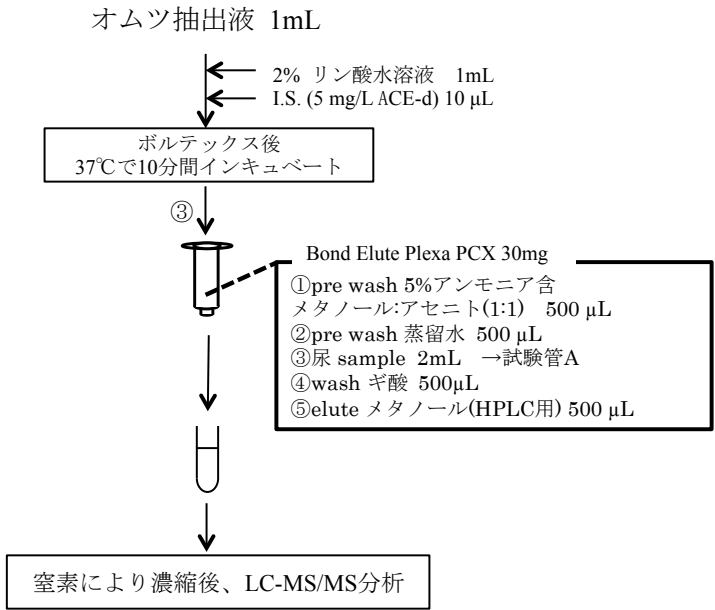
表(2)-4 4 濃度の日間変動 (CV%)

QC尿	3-PBA	CDCA	totalDCCA	DBCA	F-PBA
No. 1	6.4	15.6	5.6	-	-
No. 2	6.6	7.3	9.5	4.8	8
No. 3	3.6	3.1	3	6.6	2
No. 4	4.6	3.7	4.8	5.6	4.8

②おむつ尿中NEOおよび代謝物分析法の開発

②-1 サンプル前処理方法の検討

測定法は Ueyama らの方法⁵⁾を参考にサンプル前処理から LC-MS/MS コンディションまでおむつ抽出液に対応出来る方法に改良した。図(2)-13 に既報を元にしたサンプル前処理方法の全体図を示す。なお、本測定では I.S としてアセタミプリド重水素置換体 (ACE-d)を用いた。



図(2)-13 おむつ尿中ネオニコチノイド検出のためのサンプル前処理方法フローチャート (改良前)

②-2 LC-MS/MSの条件設定

我々がすでに報告している測定法に従って実施したが、分離カラムのみ変更した。既報ではScherzo SM-C18 (100 mm × 2 mm i.d., 3 μm silica)にて分析していたが、ジノテフランの分離が悪く、改良が必要であった。本研究ではCapcell Pak C18 AQ (150 mm x 2 mm i.d.)を試したところ、非常に良好なジノテフランのピークを得ることができたために、変更することとした。

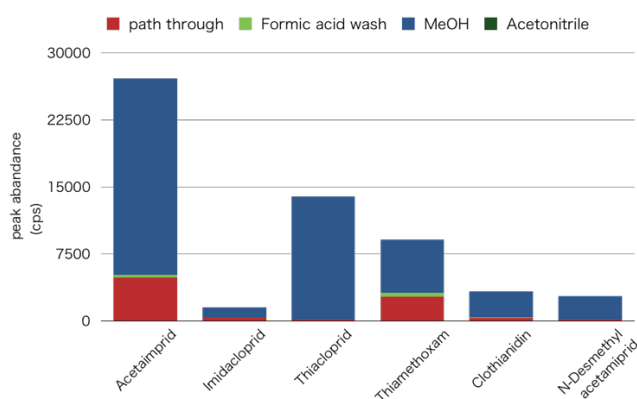
表(2)-5 標準溶液から得られたMRMトラジションパラメータ

Compounds	Fragmentor (V)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)
Acetamiprid	120	223	126(Q) 56(C)	18	8.3
Imidacloprid	140	256	209(Q) 175(C)	10	8.1
Thiacloprid	160	253	126(Q) 99(C)	22	8.9
Thiamethoxam	70	292	211(Q) 132(C)	8	7.4
Clothianidin	80	250	169(Q) 131(C)	16	7.9
Dinotefuran	90	203	129(Q) 157(C)	3	6.3
N-Desmethyl acetamiprid	110	209	126(Q) 90(C)	20	7.9
Flonicamid	120	230	203(Q) 174(C)	15	7.7
Acetamiprid-d ₆ (IS for above 8 NEOs)	100	229	126(Q) 62(C)	24	8.3

Abbreviations; C, confirmation ion. Q, quantification ion. NEO, neonicotinoids. IS, internal standard.

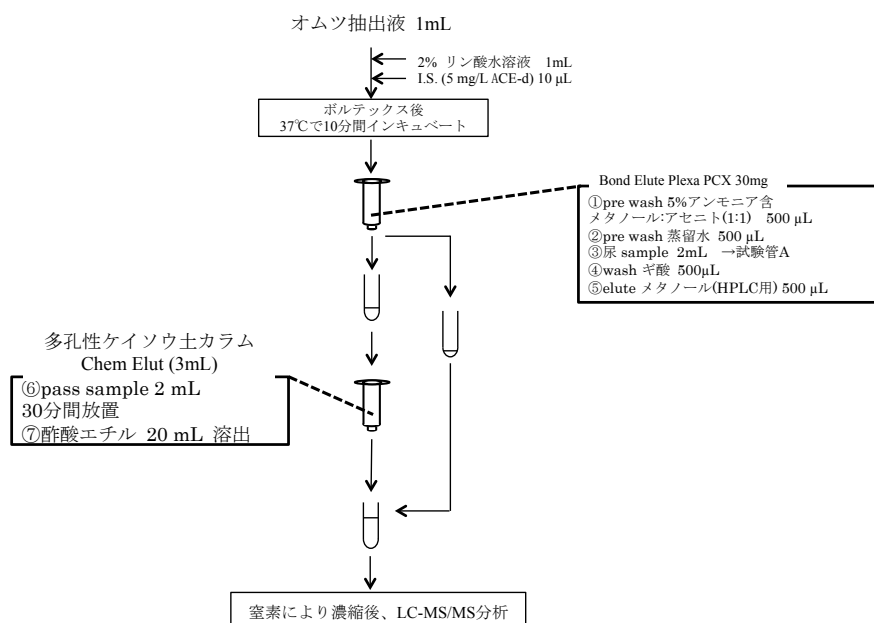
②-3 おむつ抽出尿の前処理法の検討

尿のみで検討していた既報の分析法では、おむつ抽出尿では回収量が低くなる物質があることが判明した。おむつ抽出液中には若干のアセトンが残留しており、これが原因で既報で使用していた固相抽出カラムであるBond Elute Plexa PCXでジノテフランが保持されずに通過してしまうことが判明した。図(2)-13の方法でおむつ抽出尿を分析した場合のネオニコチノイド系殺虫剤の回収率を下に示す(図(2)-14)。



図(2)-14 おむつ抽出尿にネオニコチノイド系殺虫剤を添加し、既報通りに固相抽出した場合の絶対的回収量

そこで我々はBond Elute Plexa PCXを通過したサンプルを回収し、このまま分析するとLC-MS/MSへの汚れという負荷が甚大であるために、精製操作を加えることでジノテフラン等の回収を向上させることを立案し、図(2)-15のように新たな前処理プロセスを加えた。



図(2)-15 おむつ抽出尿からネオニコチノイド系殺虫剤を検出するための前処理法

Bond Elute Plexa PCX通過液の中には、アニオン系物質を含む多くの極性物質が存在していることが予想される。これらを排除するために高純度・多孔性不活性化ケイソウ土カラムを利用することとした。操作が簡単でオペレーター間のばらつきが少ないという点、自動化が可能であるという点、有機溶媒で溶出でき、濃縮が容易となるという点からこれを選択した。検討した珪藻土カラムは、アジレント社製 ChemElute、ジーエルサイエンス社製 InterSepK-solute、メルク社製 EXtrelut NT20の充填材である(図(2)-16)。固相抽出カラムにそれぞれの充填材を詰め、ネオニコチノイド系殺虫剤の回収率を確認したところ、アジレント社製で最も良いジノテフランの回収率が得られることがわかった。



図(2)-16 検討した 3 種の多孔性珪藻土カラム (市販品)

②-4 おむつ抽出尿を用いた再現性実験

表(2)-6 おむつ中に含まれる尿からの絶対的回収率（％）-改良法を用いて-

	Concentration (μg/L urine)	<i>n</i> ^a	Acetamidiprid	Imidacloprid	Thiacloprid	Thiamethoxam	Clothianidin	Dinotefuran	<i>N</i> -Desmethyl acetamidiprid
Absolute recovery (mean) (%) ^b	2.5	3	47	55	48	60	61	41	44
	10	3	49	72	58	59	100	61	64
Matrix effect (%)	10	5	74	142	62	91	97	59	44

^a *n*: number of observations.

^b Recovery obtained by adding the standards just before the separation analysis step.

表(2)-7 おむつ中に含まれる尿(既知濃度)を用いた同時再現性（CV%, n=5）および検出下限値-改良法を用いて-

	Concentration (μ g/L urine)	<i>n</i>	Acetamidiprid	Imidacloprid	Thiacloprid	Thiamethoxam	Clothianidin	Dinotefuran	<i>N</i> -Desmethyl acetamidiprid
Within-run									
Precision (%RSD)	2.5	5	5.5	10.1	7.6	8.7	11.2	8.2	6.9
	5	5	6.4	7.2	6.7	12.7	10.9	12.4	3.3
	10	5	3.9	5.3	5.8	8.4	12.1	10.7	5.3
Between-run									
Precision (%RSD)	2.5	5	5.1	11.6	11.3	13.8	11.4	17.8	7.1
	5	5	5.3	14.1	11	14.8	15.4	14.8	6.8
	10	5	5.5	13.9	11.9	19.5	13.5	17.1	4.7
	20	5	5.6	16.7	4.3	14.9	9.8	18.1	6.2
<i>R</i> ² of calibration line			0.999	0.988	0.998	0.988	0.989	0.993	0.997
LOD ^c (μ g/L) (S/N = 3)			0.48	1.90	0.85	2.80	3.64	2.30	0.39
LOQ ^d (μ g/L) (S/N = 10)			1.60	6.35	2.82	9.33	12.14	7.67	1.30

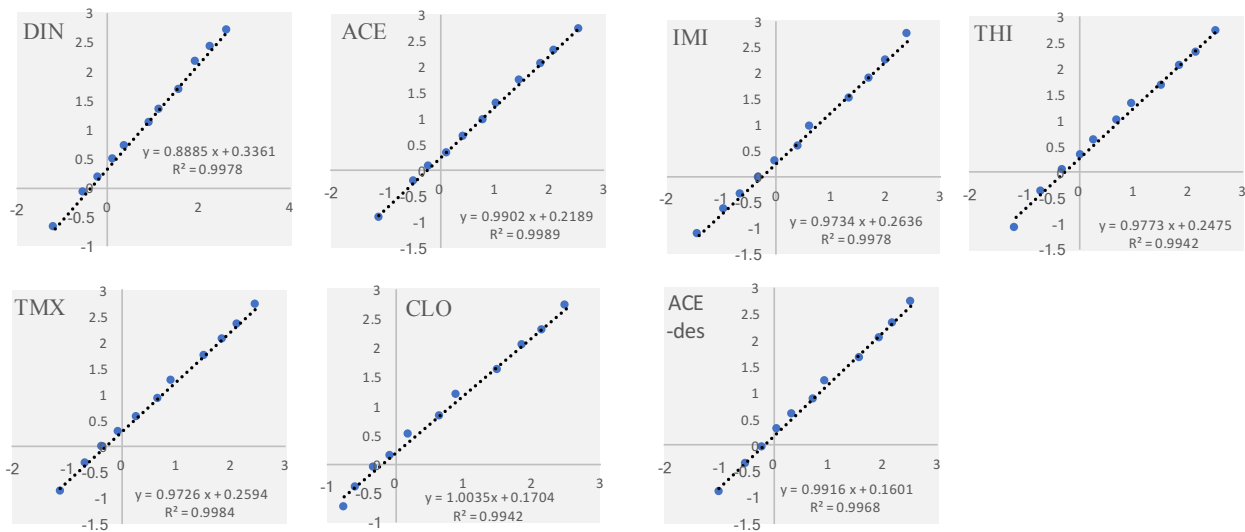
n: number of observations.

RSD: relative standard deviation.

LOD: limit of detection.

LOQ: limit of quantitation.

おおむね実際の尿分析に耐えうる再現性結果を得ることができた。多くはおむつ尿抽出時のばらつきに起因するものと予備検討で明らかにしているが、分析過程におけるおむつ尿抽出以降のばらつきを極限まで低減させるために、調査に用いるおむつの種類は揃えることが必要であると思われる。



図(2)-17 尿を直接分析した場合の分析値と同じ尿をおむつに添加・分析した値の相関関係
y軸には尿、x軸にはおむつ尿で得られた測定値をプロット

尿分析結果とおむつ抽出による分析結果に相関関係があることを確認できたため、調査対象者のおむつ尿分析を進めた。

表(2)-8 NEOのおむつ中、凍結融解操作、前処理後分析サンプルの安定性に関する検討

	Concentration ($\mu\text{g/L}$ urine)	<i>n</i>	time	Acetamidiprid	Imidacloprid	Thiacloprid	Thiamethoxam	Clothianidin	Dinotefuran	<i>N</i> -Desmethyl acetamidiprid
Stability in diapers at 37 °C (%)	2.5	3	6 h	101	89	100	101	103	103	102
	2.5	3	12 h	99	105	97	99	96	101	107
	2.5	3	24 h	102	81	98	95	96	99	97
	10	3	6 h	103	101	101	93	106	100	103
	10	3	12 h	106	120	102	97	103	109	104
	10	3	24 h	105	101	98	94	99	103	99
Stability in extracted urine										
three freeze-thaw cycles (%)	2.5	3		109	109	106	88	102	92	103
	10	3		100	105	102	93	104	94	107
midterm storage at -80 °C (%)	2.5	3	2 weeks	101	102	94	96	106	97	97
	2.5	3	1 month	101	93	101	103	94	102	92
	10	3	2 weeks	103	94	98	103	98	95	99
	10	3	1 month	101	97	93	100	97	104	91
Stability in prepared samples (%)										
at -80 °C	2.5	3	24 h	90	74	89	102	94	80	105
	2.5	3	72 h	99	53	90	94	95	82	104
	10	3	24 h	99	104	92	107	93	82	107
	10	3	72 h	103	95	91	81	99	82	103

n: number of observations.

*: significant difference was observed ($p < 0.05$).

③1歳半児および3歳児の尿中PYR代謝物測定

③-1 尿中ピレスロイド系殺虫剤代謝物濃度の分布

表(2)-9に、1歳半児および3歳児の尿中PYR代謝物濃度($\mu\text{g/L}$)とクレアチニン補正值($\mu\text{g/g creatinine}$)を示す。わが国の類似した先行研究は、Osakaら²⁾の3歳児尿中PYR代謝物(2012年に尿採取、 $n=223$)のモニタリング研究が挙げられる。測定結果を比較した場合、total DCCAおよび3-PBAはほぼ同等の結果であったが、*trans*-CDCAは先行研究に比べて本研究で若干低い値を示した。原因は明らかではないが、家庭で使用されるピレスロイド系殺虫剤の種類の変遷が要因の一つとして考えられる。すなわち、アレスリン、テトラメトリン、プラレトリンなど*trans*-CDCAに代謝される殺虫剤に加えて、メトフルトリンやプロフルトリンなど*trans*-CDCAに代謝されないピレスロイド系殺虫剤も汎用されるようになったことが関連している可能性がある。いずれの代謝物濃度分布も非正規分布を示しており、最大で、中央値からおおよそ1,500倍の値を示す対象者もいた(*trans*-CDCA、1歳半児)。

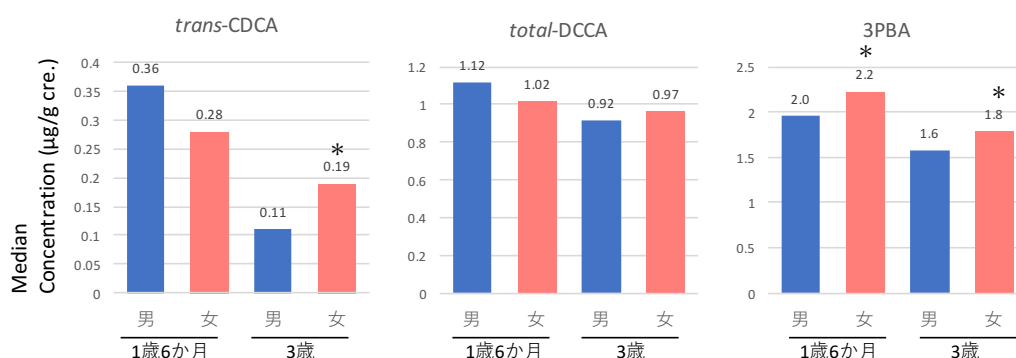
図(2)-18に示すように、検出率が低いDBCとF-PBAを除いた尿中代謝物濃度の性差に関し、1歳半児および3歳児ともに、尿中3-PBA濃度($\mu\text{g/g creatinine}$)が女兒で高値を示した(1歳半児, $p=0.006$; 3歳児, $p=0.04$)。既報²⁾でも3-PBAのみに性差を認めている。男女間でPYRの曝露量が異なる可能性とともに、曝露量は同じであっても「薬物代謝能・排泄能の差異」「クレアチニン排泄量の性差」が関係している可能性を排除できない。

表(2)-9 1歳半児および3歳児の尿中ピレスロイド系殺虫剤代謝物濃度
(1.5歳児 n=1076; 3歳児 n=1403)

		>LOD (%)	GM	Selected percentile				Max.
				25th	50th	75th	95th	
1.5 years old								
μg/L								
transCDCA	57	-	<LOD	0.09	0.33	1.56	22.87	
totalDCCA	96	0.59	0.18	0.51	1.54	10.98	121.34	
DBCA	22	-	<LOD	<LOD	<LOD	0.17	2.17	
F-PBA	12	-	<LOD	<LOD	<LOD	0.09	1.62	
3-PBA	98	1.11	0.71	0.98	1.56	4.86	28.20	
μg/g creatinine								
transCDCA		0.23	<LOD	0.17	0.66	3.10	243.06	
totalDCCA		1.20	0.42	1.08	2.88	18.91	226.65	
DBCA		-	<LOD	<LOD	<LOD	0.26	4.89	
F-PBA		-	<LOD	<LOD	<LOD	0.20	3.16	
3-PBA		2.25	1.39	2.07	3.35	10.01	52.17	
3 years old								
μg/L								
transCDCA	35	-	<LOD	<LOD	0.15	0.90	19.49	
totalDCCA	94	0.68	0.30	0.66	1.63	7.04	299.32	
DBCA	29	-	<LOD	<LOD	0.05	0.20	2.98	
F-PBA	26	-	0.03	<LOD	<LOD	0.12	2.30	
3-PBA	99	1.07	0.66	0.98	1.62	4.13	202.91	
μg/g creatinine								
transCDCA		-	<LOD	<LOD	0.24	1.65	26.38	
totalDCCA		1.12	0.49	1.08	2.54	12.27	256.70	
DBCA		-	<LOD	<LOD	0.11	0.27	10.27	
F-PBA		-	0.04	<LOD	<LOD	0.19	4.65	
3-PBA		1.75	1.09	1.67	2.65	7.12	162.72	

*GMs were not calculated due to low detection rates (less than 60% of the samples).

LOD value divided by the square root of 2 were used to calculate GM.

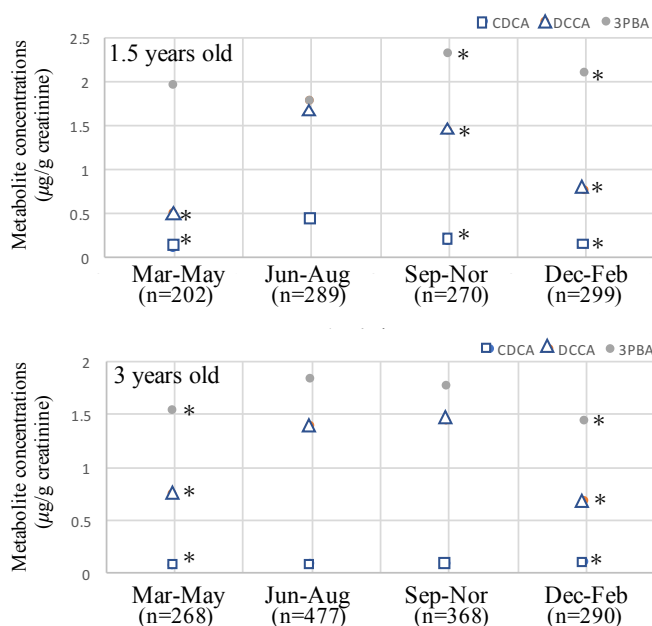


図(2)-18 尿中trans-CDCA, total DCCAおよび3-PBA濃度の男女差

*有意に男児よりも女児で尿中PYR代謝物濃度が高いことを示している (マン・ホイットニー U検定, $p < 0.05$)(各カラムは中央値)

③-2 尿中PYR代謝物濃度の季節変動

図(2)-19に、1歳半児および3歳児の尿中ピレスロイド系殺虫剤代謝物濃度($\mu\text{g/L}$)と尿採取月との関係を示す。代謝物濃度の季節差が観察された。6月から8月を夏、9月から11月を秋とした場合、1歳半児および3歳児において、trans-CDCA, total DCCAおよび3-PBA濃度は夏あるいは秋に高い値を示した。すなわち、PYR全般に、夏から秋にかけて曝露量は多くなっている可能性を示唆する結果となった。曝露とPYR曝露の影響を評価する場合は、季節変動を考慮した研究デザインあるいは解析を実施する必要がある。



図(2)-19 尿中 $trans$ -CDCA, total DCCAおよび3PBA濃度の季節変動

*夏(Jun-Aug)と比較した場合に有意差が検出された季節(Kruskal-Wallisの検定, 夏を基準としたSteel検定, $p<0.01$)(各ポイントは中央値)

③-3 κ 係数を指標とした尿中PYR代謝物濃度の個人内一致度

1歳半児および3歳児調査の両方に参加した701名について、尿中PYR代謝物濃度($\mu\text{g/g creatinine}$)の一致度を観察した。具体的には、1歳半児および3歳児それぞれの調査結果を濃度順に3分位(Q1, Q2, Q3)にカテゴライズし、1歳半時点および3歳時点のカテゴリの一致度を κ 係数を算出することで評価した。

κ 係数は $trans$ -CDCA、total DCCAおよび3-PBAでそれぞれ0.08、0.11、0.13であった。一致度は高いとは言えず、これは殺虫剤比較的良好に使用されると思われる6、7、8、9月に調査した対象者に限定して解析した場合も同様の結果であった。この結果から、1歳半児と3歳児はそれぞれ独立してピレスロイド系殺虫剤の曝露評価を実施する必要がある可能性が考えられる。

③-4 1歳半児および3歳児の尿中ピレスロイド系殺虫剤代謝物の殺虫剤使用との関連

表(2)-10に小児から尿サンプルを採取した時点での家庭内における殺虫剤使用状況と尿中ピレスロイド系殺虫剤代謝物濃度との関係を調査した結果の一部を示す。調査日に「虫除け剤をおいて/吊るしてある」「蚊取り線香を使った」かどうかの問いに対して、「はい」と答えた家庭の1歳半児および3歳児のtotal DCCAは、「いいえ」と答えた場合に比べて有意に高い値を示した。 $trans$ -CDCAは「蚊取り線香を使った」の問いに「はい」と答えた場合にのみ高い値を示した。その他の質問項目において、調査日に「虫除けスプレーを使った」の問いに「はい」と答えた場合に $trans$ -CDCAとtotal DCCAが、「衣類用防虫剤・防虫カバーおよびシート類を使っている」の問いに「はい」と答えた場合に $trans$ -CDCAのみが有意に高い値を示した。「虫除け網戸をつかっている」の問いに「はい」と答えた場合にtotal DCCAのみが有意に高い値を示した。さらなる解析が必要だが、これらの代謝物は鋭敏に家庭内殺虫剤使用状況を反映している。全ての家庭用殺虫剤の使用は把握できないが、子供の曝露の傾向は評価できているようである。一方で、3-PBAはいずれの家庭用殺虫剤使用状況とも関連が見られなかった。3-PBAは農薬として食事からも摂取していることが予想されることから、家庭内における殺虫剤使用を鋭敏に反映する曝露マーカーではないことが示唆された。

表(2)-10 小児から尿サンプルを採取した時点での家庭内における殺虫剤使用状況と尿中ピレスロイド系殺虫剤代謝物濃度との関係

	「虫除け剤を置いて・吊るしてある」		「蚊取り線香を使った」	
	いいえ	はい	いいえ	はい
1.5 years old				
number	696	341	958	75
transCDCA	0.14	0.23	0.15	0.78*
totalDCCA	0.88	1.48*	0.99	1.14*
3-PBA	2.07	2.11	2.06	2.11
3 years old				
number	1237	128	941	433
transCDCA	0.07	0.07	0.06	0.08*
totalDCCA	1.02	1.74*	0.91	1.52*
3-PBA	1.64	1.78	1.64	1.70

*有意に「はい」と回答した保護者の子ども尿中PYRが「いいえ」のそれよりも高いことを示している (マン・ホイットニー U検定, $p<0.01$)

③-5 1歳半児および3歳児の尿中PYR代謝物と住環境等との関連

母親が出産前に鉄筋(鉄骨)の集合住宅(アパート、マンション等)に住んでいた1歳半児の尿中total DCCA濃度($\mu\text{g/g creatinine}$)は、木造の集合住宅や木造一戸建てのそれに比べて有意に低い値を示した(Kruskal-Wallisの検定)。世帯年収と尿中代謝物濃度との関連は見られなかった。調査時点において、パートナーや同居者の中で喫煙者がいる1歳半児の尿中3-PBA濃度は有意に高値を示した。母親の最終学歴が中学・高校である1歳半児の尿中total DCCAは、最終学歴が大学・大学院の1歳半児のそれに比べて有意に高い値を示した。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究(サブテーマ2)により、神経発達の臨界期にあたる1歳半児および3歳児から容易に尿を採取できる方法、おむつ尿抽出法を用いた尿中NEOおよびPYRの曝露マーカー高感度測定法を開発した。実際にそれらの小児を調査した結果、殺虫剤曝露マーカー濃度の分布、季節変動、性差を明らかにした。さらに、生活環境とPYRの曝露マーカーとの関連を調査することによって、家庭用殺虫剤使用状況を反映するマーカーを確認することができた。これらの結果は、殺虫剤から人の健康と環境を保護することを目的とした我が国の種々の取り組みの中で、妊婦や子供の殺虫剤汚染状況の把握、健康な発達への影響評価に利用でき、また、取り組みの有効性評価の根拠情報の構築手法やそれらの基礎的情報を、研究者、行政および一般市民に提供できる有用な成果である。継続的な調査を行うことにより、さらに詳細な殺虫剤リスク評価が可能となり、広く国民に対して科学的根拠に立脚した情報提供や政策立案ができるものと思われる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省の「化学物質の人へのばく露量モニタリングに関するタスクフォース会合」における分析対象物質・次期調査計画策定の検討にあたり、本研究で明らかにされた殺虫剤の曝露レベルを念頭に委員の発言が行われている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

化学物質(既存)のリスク評価は、環境モニタリングデータやPRTR情報(環境中排出量データ)等が用いられて、生活環境中(食事も含む)からの摂取量の推定モデルにより簡易的に実施されている。第5次環境基本計画が掲げる化学物質管理に関して、本研究で明らかにされた小児を対象とした曝露モニタリング手法およびその応用結果は、人の体内濃度の実測データとして曝露評価の精緻化に貢献できるものと思われる。

第一に、日本における1歳半および3歳児のPYRへの曝露実態が明らかになった。環境モニタリングとしての生物学的モニタリングへの取り組みが先進的なドイツでは、集団の曝露結果に基づき、大多数(95%)の国民の曝露量が含まれる参照値(Reference value, RV_{95})を明らかにしている。これにより、特定の個人または集団の曝露レベルがモニタリング測定値として明らかになった時に、一般集団の曝露レベルと比較可能となっている。また、回避すべき健康リスクを判断するための基準値(ガイダンス値)を、HBM-I値およびHBM-II値として設定している。本研究の対象集団の居住地域は、平均的な大都市および耕作地域を含む近郊都市圏であるので、わが国において対象年齢の子どもの RV_{95} 相当値を設定する場合、本研究で得た結果は中心的なデータとなろう。すなわち、今後のリスク評価の前提となるデータであり、環境省が成人を対象に実施する「化学物質の人へのばく露量モニタリング調査」の参考にもなる。また、「国際的な化学物質管理のための戦略アプローチ(SAICM)」で求められる、WSSD2020年目標の達成に向けた実施状況報告の中で、20の指標のうちのリスク削減の取り組み実績のひとつとして報告内容の対象となりうる。

第二に、エコチル調査における農薬類の健康リスク評価への貢献である。エコチル調査で全国に適用されるプロトコールとしては、前述の通り採尿の困難さにより4歳より前の時期には採尿が行われなかった。本研究では、エコチル調査という前向きコホート研究の参加者を対象に、1歳半および3歳時点で採尿し、殺虫剤の曝露評価を行った。今後、子どもの健康および発達のデータと対応して解析することで、エコチル調査の「中心仮説」のひとつである殺虫剤のリスク評価の検討が可能になることが見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

本研究での殺虫剤代謝物の測定は、The German External Quality Assessment Scheme for Analyses in Biological Materialsの認証を取得後進めている。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 杉浦友香、上山 純、上田裕子、伊藤由起、涌澤伸哉、上島通浩：第43回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2015)
「使用済みおむつを利用した尿中代謝物一斉分析法の開発」
- 2) 上山 純、生田勇太郎、上田裕子、伊藤由起、榎原 毅、大矢奈穂子、加藤沙耶香、小栗朋子、庄司直人、上島通浩：第87回日本衛生学会(2017)
「使用済み紙おむつを用いた幼児におけるピレスロイド系殺虫剤の曝露評価」
- 3) 上山 純、青井亜里沙、伊藤由起、榎原 毅、大矢奈穂子、加藤沙耶香、小栗朋子、庄司直人、佐藤博貴、三宅美緒、上島通浩：第44回日本毒性学会(2017)
「使い捨ておむつを用いた尿中ネオニコチノイド系殺虫剤のバイオモニタリング手法の開発と小児への実践応用」
- 4) 上山 純、上田裕子、伊藤由起、榎原 毅、大矢奈穂子、加藤沙耶香、小栗朋子、庄司直人、齋藤伸治、上島通浩：第88回日本衛生学会(2018)

「バイオモニタリング手法を用いた日本人小児ピレスロイド系殺虫剤曝露レベルの国際比較」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Saito, S., Ueyama, J., Kondo, T., Saito, I., Shibata, E., Gotoh, M., Nomura, H., Wakusawa, S., Nakai, K., Kamijima, M., 2013. A non-invasive biomonitoring method for assessing levels of urinary pyrethroid metabolites in diapered children by gas chromatography-mass spectrometry. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 24, 200-7.
- 2) Osaka, A., Ueyama, J., Kondo, T., Nomura, H., Sugiura, Y., Saito, I., Nakane, K., Takaishi, A., Ogi, H., Wakusawa, S., Ito, Y., Kamijima, M., 2016. Exposure characterization of three major insecticide lines in urine of young children in Japan-neonicotinoids, organophosphates, and pyrethroids. Environ. Res. 147, 89-96.
- 3) Lu, C., Barr, D.B., Pearson, M., Bartell, S., Bravo, R., 2006. A Longitudinal Approach to Assessing Urban and Suburban Children's Exposure to Pyrethroid Pesticides. Environ. Health Perspect. 114, 1419-1423.
- 4) Leng, G., Gries, W., 2005. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 814, 285-94.
- 5) Ueyama, J., Nomura, H., Kondo, T., Saito, I., Ito, Y., Osaka, A., 2014. Biological Monitoring Method for Urinary Neonicotinoid Insecticides Using LC-MS / MS and Its Application to Japanese Adults 461-468.

III. 英文Abstract

Biological Monitoring of Insecticide Exposure during Toddler Years as a Critical Period for Brain Development

Principal Investigator: Michihiro KAMIJIMA

Institution: Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku,
Nagoya 467-8601, JAPAN
Tel: +81-52-853-8171 / Fax: +81-52-859-1228
E-mail: kamijima@med.nagoya-cu.ac.jp

Cooperated by: Nagoya University Graduate School of Medicine

[Abstract]

Key Words: Japan Environment and Children's Study, Insecticides, Toddlers, Exposure, Urinary metabolites, Biological monitoring, diaper, Brain, Critical period

After birth, the brain develops rapidly during the infant and toddler period, and it is thus important to measure exposure to chemicals with possible adverse effects on neurodevelopment. Biological monitoring (biomonitoring) is an effective approach to precisely quantify individual exposure levels. However, such exposure during the period has rarely been addressed in epidemiological studies since urine collection that is necessary for exposure assessment is not feasible outside clinical settings for children who cannot control urination.

Therefore, the present study aimed to establish measurement methods of exposure to insecticides acting on the nervous system, using urine extracted from disposable diapers after use, to collect urine from more than 1,000 participants of the Japan Environment and Children's Study (JECS), to clarify urinary concentration ranges of chemicals derived from three insecticides lines, i.e., organophosphates, pyrethroids and neonicotinoids, and to explore contribution of dietary exposure as an exposure route.

Diapers after use were collected from JECS participants in the Aichi subcohort when they reached 1.5 and 3 years old. They were also asked about what they ate on the day of diaper use for the study and what they did including household use of pesticides. As for the assessments of insecticide exposure, methods of collecting urine from diapers and of measuring organophosphate and pyrethroid metabolites and neonicotinoid compounds were successfully developed.

The methods were then applied to the urine samples collected in the present study, and the concentration ranges of the urinary markers were clarified. At present the reference values of insecticide-derived urinary markers have not been set in Japan. The results can be used to determine such values in the Japanese toddler population. In addition, the relationship between the marker concentrations and health and development outcomes can be analyzed in future studies as adjunct studies of JECS when the outcome information becomes available. Furthermore, urine samples collected in this study can be used in the future as well to investigate

the possible effects of chemicals other than the insecticides on children's health and development after establishing the methods to measure the biomarkers of interest. In the present study, some associations between the urinary marker levels and possible exposure routes were also suggested. The present study could thus contribute to the development of JECS.