

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

環境化学物質の複合曝露による
喘息・アレルギー、免疫系へ及ぼす影響の解明
(5-1753)

平成29年度～令和元年度

Combined Exposures to Environmental Chemicals and Effects on Allergies and Immunity

<研究代表機関>

国立大学法人 北海道大学

<研究協力機関>

ベルギー アントワープ大学

令和2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	16
要旨	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
3.1. フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類の複合曝露と喘息・アレルギーとの予備的検討（札幌市小学生を対象とした研究）	
3.2. 環境化学物質曝露による喘息・アレルギーおよび炎症マーカーへの影響（北海道7歳児を対象とした研究）	
3.3. アレルギーに関する対面詳細調査	
4. 結果及び考察	
4.1. 研究開発目的の達成状況	
4.2. フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類の複合曝露と喘息・アレルギーとの予備的検討（札幌市小学生を対象とした研究）	
4.3. 環境化学物質曝露による喘息・アレルギーおよび炎症マーカーへの影響（北海道7歳児を対象とした研究）	
4.4. アレルギーに関する対面詳細調査	
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	58

I. 成果の概要

課題名 5-1753 環境化学物質の複合曝露による喘息・アレルギー、免疫系へ及ぼす影響の解明

課題代表者名 荒木 敦子 (国立大学法人北海道大学 特任准教授)

研究実施期間 平成29～令和元年度

研究経費 (累計額) 132,033千円

(平成29年度：44,757千円、平成30年度42,519千円、平成31・令和元年度：44,757千円)

本研究のキーワード 環境化学物質、複合曝露、アレルギー、子ども、疫学、炎症マーカー、バイオモニタリング

研究体制

(1) 環境化学物質の複合曝露による喘息・アレルギー、免疫系へ及ぼす影響の解明 (国立大学法人北海道大学)

研究協力機関

ベルギー アントワープ大学

1. はじめに (研究背景等)

我が国において過去30年間、子どものアレルギー疾患が増加し、有病割合は親世代の約3～4倍である。この原因として遺伝要因、住環境・食生活・生活習慣の変化等に加え、近年、増加する環境化学物質には、免疫・アレルギーへの影響が報告されているものがある。フタル酸エステル類はプラスチック製品や塩化ビニル製品の可塑剤、化粧品や洗浄剤等の賦香剤として添加され、リン酸トリエステル類は難燃性可塑剤、床のワックスや光沢剤に用いられる。研究代表者らは戸建て住宅でダスト中フタル酸エステル類やリン酸トリエステル類濃度が高いと居住者のアレルギーのリスクをあげ、さらに大人と比べて子どもでその影響が顕著であることを報告した。また、出生コホート「北海道スタディ」では、母体血中フタル酸エステルDEHPの濃度が高いと、臍帯血中のIgE濃度が有意に低く、7歳までの食物アレルギー、中耳炎、水痘の罹患のリスクが有意に高かった。ビスフェノール類は缶のコーティング剤やポリカーボネート製品の硬化剤として使用され、BPA濃度が高いと児の呼吸機能低下、喘鳴や呼吸器感染症リスクの増加が報告されている。これら化学物質への曝露によるアレルギーの増加や免疫系への影響が懸念されるものの、学童ではこれら化学物質の曝露実態そのものが殆ど把握されていない。さらに、ヒトはこのような環境化学物質に複合的に曝露されるが、複合曝露による喘息やアレルギーへの影響を検討した疫学研究は世界的にない。

2. 研究開発目的

本研究では、日用品や生活環境において多く使用される環境化学物質であるフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類を対象に、これまでほとんど報告がない学童の曝露実態を明らかにする。さらに、個々の化合物および複合曝露による学童の喘息、アレルギー及ぼす影響を解明する。具体的には、①学童の尿中のフタル酸エステル類6代謝物およびリン酸トリエステル類13代謝物の測定済みデータを用いて、単一化合物曝露、複合曝露による子どもの喘息・アレルギーとの関連を予備的に検討する。②既存の出生コホート「北海道スタディ」北海道コホートで、2017年から2019年の3年間で、学童期(7歳児)を対象に、喘息、アレルギーに関する質問紙を送付する(3250人を想定)。曝露評価に用いるため、児の尿を冷蔵輸送にて収集する(970人を想定)。学童期の環境化学物質濃度として、

フタル酸エステル類代謝物、リン酸トリエステル類代謝物、ビスフェノール類を測定する（400検体程度）。7歳の学童期におけるフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類への曝露実態と、個別の化学物質濃度および複数の化学物質への複合曝露を考慮して、喘息・アレルギーおよび炎症バイオマーカー（8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、4-hydroxynonenal (HNE)、Hexanoyl-lysine (HEL)）との関連を明らかにする。③アレルギーに関して、ISAAC調査票のみでは把握できない気道炎症や抗体価を明らかにする詳細調査を行う。札幌市および近郊に居住する9-11歳の学童を対象に医療機関にて対面調査と採血を行い、調査票に加えて呼気中一酸化窒素濃度、総IgE/特異的IgE、予防接種抗体価を明らかにする（430人を想定）。詳細調査で収集した尿及び血中有機フッ素化合物濃度を測定し（300検体程度）、詳細調査で得られたバイオマーカーによる影響および7歳からのアレルギー症状の経緯とのリスク評価を行う。

3. 研究開発の方法

本報告の中で用いる化学物質とその代謝物について、略称とスペルアウトを表1に示す。

表1 フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類とその尿中代謝物

親化合物		代謝物	
フタル酸エステル類			
DiBP	di- <i>iso</i> -buthyl phthalate	MiBP	mono- <i>iso</i> -buthyl phthalate
DnBP	di- <i>n</i> -buthyl phthalate	MnBP	mono- <i>n</i> -buthyl-phthalate
BBzP	buthyl benzyl phthalate	MBzP	monobenzyl phthalate
DEHP	di(2-ethylhexyl) phthalate	5cx-MEPP	mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate
		5OH-MEHP	mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate
		MEHP	mono(2-ethylhexyl) phthalate
		5oxo-MEHP	mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate
DiNP	di- <i>iso</i> -nonyl phthalate	MiNP	mono- <i>iso</i> -nonyl phthalate
		cx-MiNP	carboxy-MiNP
		7cx-MMePP	mono(4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalate
		OH-MiNP	Hydroxy-MiNP
		7OH-MMeOP	mono(4-methyl-7-hydroxyloctyl) phthalate
リン酸トリエステル類			
TNBP	tri- <i>n</i> -butyl phosphate	DNBP	di- <i>n</i> -butyl phosphate
TPHP	triphenyl phosphate	DPHP	diphenyl phosphate
		4HO-DPHP	4-hydroxyphenyl diphenyl phosphate
		3HO-TPHP	3-hydroxyphenyl diphenyl phosphate
		4HO-TPHP	4-hydroxyphenyl diphenyl phosphate
EHDPHP	ethylhexyl diphenyl phosphate	5HO-EHDPHP	5-hydroxy-2-ethylhexyl diphenyl phosphate
		EHPHP	ethylhexyl phenyl phosphate
TBOEP	tris(2-butoxyethyl) phosphate	BBOEP	bis(2-butoxyethyl) phosphate
		BBOEHEP	bis(2-butoxyethyl) 2-hydroxyethyl phosphate
		TBOEP-OH	bis(2-butoxyethyl) 3-hydroxy-2-butoxyethyl phosphate
TCIPP	tris(1-chloro- <i>iso</i> -propyl) phosphate	BCIPHIPP	bis(1-chloro- <i>iso</i> -propyl) 1-hydroxy-2-propyl phosphate
		BCIPP	bis(1-chloro- <i>iso</i> -propyl) phosphate
TCEP	tris(2-chloroethyl) phosphate	uTCEP	tris(2-chloroethyl) phosphate
TDCIPP	tris(1,3-dichloro- <i>iso</i> -propyl) phosphate	BDCIPP	bis(1,3-dichloro- <i>iso</i> -propyl) phosphate

(1) 環境化学物質の複合曝露による喘息・アレルギー、免疫系へ及ぼす影響の解明

3.1. フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類の複合曝露と喘息・アレルギーとの予備的検討（札幌

市小学生を対象とした研究)

ヒトは日々様々な化学物質に同時に曝露しているにもかかわらず、過去のアレルギー症状（喘鳴、鼻結膜炎、湿疹）と環境化学物質曝露との関連については、いずれも「単一化合物」との関連を検討したのみであった。そこで、異なる統計モデルを用いて「単一化合物曝露」「WQSモデル」「上位2化合物の組合せモデル」の予備的検討を行った。予備検討には、既存の札幌市小学生の調査で収集したデータを用いた。

札幌市公立小学校に通う児童128人を対象に調査を実施したアレルギーと測定済みのフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類のデータを用いた。学童の保護者が回答したISAAC調査票から、「喘鳴」「鼻結膜炎」「湿疹」を定義した。学童のスポット尿を収集し、個人曝露評価としてフタル酸エステル類代謝物とリン酸トリエステル類代謝物を分析した。化学物質代謝物濃度はLimit of quantification (LOQ) 濃度以下は、各化合物のLOQ以上の検出割合を求め、LOQに検出割合を掛けた値を代入した。子どものクレアチンクリアランスは性別や体格によって異なるため、標準化クレアチニン値を求め、尿中代謝物濃度を補正した。1つの化合物について2代謝物以上を測定した場合は、代謝物のモル濃度の総和として Σ DBP、 Σ DEHP、 Σ TBOEP、 Σ TCIPP、 Σ TPHPを曝露評価に用いた。

本研究では、アレルギーと化学物質曝露との関連について、「単一化合物曝露」は個々の化合物との関連、「複合曝露」では「WQSモデル」で分析した複数の化合物 (Mixture) との関連、「上位2化合物の組合せモデル」ではアウトカムへの寄与が大きい2化合物の組み合わせの曝露との関連を検討した。「単一化合物曝露」では、個々の化合物濃度を三分位とし、第1三分位をReferenceとした時の第2三分位、第3三分位のオッズ比 (OR) と95%信頼区間 (CI) をロジスティック回帰分析により求めた。「WQSモデル」はフタル酸エステル類3化合物 (Σ DBP、MBzP、 Σ DEHP) とリン酸トリエステル類 6化合物 (Σ TPHP、EHDPHP、 Σ TBOEP、 Σ TCIPP、uTCEP、BDCIPP) の合計9化合物のWeighted Quintile Sum (WQS) を求め、回帰分析によるOR(95%CI)を求めた。「上位2化合物の組合せモデル」は、quintile g-computation (qg-computation)で求めた各アウトカムへの寄与が大きい2物質を高曝露群 (High) と低曝露群 (Low) の2値に分割、LowとHighを組み合わせ、Low \times LowをReferenceとしたときのLow \times High, High \times Low, High \times HighのOR(95%CI)をロジスティック回帰分析で求めた。解析は、ロジスティック回帰分析はSPSS (version 26.0J)、qWQSとqgcomp (version1.3.0)はRパッケージを用いた。

3.2. 環境化学物質曝露と喘息・アレルギーおよび炎症マーカーへの環境化学物質曝露による影響（北海道7歳児を対象とした研究）

北海道スタディへの参加同意が得られた20926名のうち、2017年8月時点で7歳に到達し、7歳児調査票の返送があり、かつデータクリーニングが完了している6218名のうち、7歳児調査票のデータおよび尿より回収した尿サンプルが揃う者は2541名を対象とした。7歳児質問票のISAACの項目から「喘鳴」、「鼻結膜炎」、「湿疹」を各アレルギーのケースと定義した。また、「喘鳴」「鼻結膜炎」「湿疹」について1つ以上の項目について「あり」である場合を「いずれかのアレルギー」と定義した。7歳児調査票と尿の尿サンプルが揃う2541名のうち、「喘鳴」「鼻結膜炎」「湿疹」のケースはそれぞれ328名、318名、552名であり、この中から各100名をそれぞれのケースとしてランダムに抽出した。比較対象のコホートは、いずれのケースでもない243名を無作為抽出した。喘鳴における気道の再構築と過剰反応による炎症の病因を引き起こすマーカーとして、DNA損傷マーカーである8-OHdG、およびオメガ6とオメガ3脂肪酸の脂質過酸化反応マーカーであるHELとHNEの尿中濃度を測定した。

曝露測定は、尿中リン酸トリエステル類代謝物14化合物 (BCIPP、BCIPHIPP、DNBP、DHPH、4HO-DHPH、4HO-TPHP、3HO-TPHP、TCEP、BDCIPP、BBOEP、BBOEHEP、TBOEP-OH、EHPHP、5HO-EHDPHP) 濃度の測定をLC-MS/MSで、尿中ビスフェノール類7化合物 (BPAF、BPF、BPA、BPB、BPZ、BPS、BPAP) 濃度の測定はGC-MS/MSで測定した。リン酸トリエステル類とビスフェノール類の測定は、ベルギーアントワープ大学との共同で実施した。尿中フタル酸エステル類代謝物10化合物 (MiBP、MnBP、MBzP、MEHP、5OH-MEHP、5oxo-MEHP、5cx-MEHP、MiNP、OH-MiNP、cx-MiNP) 濃度の測定はUPLC-MS/MSで、本分担研究者らが測定した。DiNPは、DiNP-1、DiNP-2、DiNP-3の異性体の混合物として製造されている。これまで我々は、DiNPの一

つの異性体の代謝物として、標準品の合成が可能であったMono methyloctyl phthalate、7cx-MMePPと70H-MMeOPのみを定性・定量してきた。しかし、DiNPの数ある異性体の混合物のうち、一つの異性体のモノ体、水酸化体、カルボキシ体代謝物のみを定性・定量することは環境中に存在するDiNPの曝露評価としては過小評価となることが懸念された。そこで、欧州のバイオモニタリング (Human Biomonitoring for EU: HBM4EU) 同様の定性・定量を行うこととし、既に測定済みであった検体についても再度定量の見直しを行い、新たな測定値とした。

次いで、児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類曝露濃度とアレルギー（喘鳴、鼻結膜炎、湿疹）との関連を、尿中代謝物濃度として検出率が50%以上の化合物について検討を行った。尿中濃度を児の尿中クレアチニン値で補正した濃度を自然対数に変換し、単一化合物曝露については、曝露濃度と喘鳴、鼻結膜炎、湿疹の有無との関連をロジスティック回帰分析によりORと95%CIを求めた。リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類の複合曝露については、各代謝物の喘鳴、鼻結膜炎、湿疹への影響の寄与割合をWQS回帰分析により推定した。

喘鳴、鼻結膜炎、湿疹のいずれかのアレルギーおよび尿中炎症マーカーへの影響については、児のリン酸トリエステル類の各代謝物の検出率が50%以上の化合物について検討した。単一化合物曝露については、曝露濃度および尿中炎症マーカー値を児の尿中クレアチニン値で補正した濃度を、自然対数に変換後、いずれかのアレルギーとの関連はロジスティック回帰分析、炎症マーカーとの関連は重回帰分析により最小二乗平均値 (LSM) と95%CIを求めた。単一化合物の重回帰分析において $p < 0.05$ を示したリン酸トリエステル類については、検出率が75%以上のリン酸トリエステル類濃度は四分位に、75%未満のリン酸トリエステル類濃度は未検出、検出の2群としてカテゴリカルモデルでの量反応関係も検討した。リン酸トリエステル類の複合曝露では、各代謝物のいずれかのアレルギーおよび尿中炎症マーカー値への影響の寄与割合をWQS回帰分析により推定した。

3.3. アレルギーに関する対面詳細調査

これまでアレルギーの評価は、小児領域における世界標準のISAAC調査票を用いて行ってきたが、参加者の保護者による自記式であることが限界である。そこで、北海道コーホート参加者のうち札幌市およびその近郊に在住し、2017年9月から2020年3月までに9-11歳を迎える児1930人を対象として対面での詳細調査を実施した。札幌市および近郊の協力小児科医療機関を1回受診し、ISAACを含む調査票の記入、身長・体重の測定、呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO) の測定、医師の診察、採尿約50 mL、採血約16 mLを実施した。採取した血液からは、白血球像・白血球数、非特異的および特異的IgE 13項目、ジフテリアおよび破傷風抗体価を測定した。血漿および残余血清は化学物質など測定のため -80°C で冷凍保存している。尿は比重を測定し、8-OHdG、HNE、HELを測定し、残余尿は化学物質など測定のため、分注後 -30°C で冷凍保存している。

胎児期の環境化学物質曝露と児のアレルギーとの関連を検討するため、保存してあった母体血中フタル酸エステル類7代謝物の分析をUPLC-MSMSを用いて実施した(分析はいであ株式会社環境創造研究所)。

4. 結果及び考察

(1) 環境化学物質の複合曝露による喘息・アレルギー、免疫系へ及ぼす影響の解明

4.1. 研究開発目的の達成状況

2017年から2019年の3年間で、学童期 (7歳児) への調査を対象に、喘息、アレルギーに関する質問紙を想定3250人のところ3107人に送付、2212人から調査票を回収し (回収率約71.2%)、当初の目的をほぼ達成した。曝露評価に用いる児の尿を、想定970人のところ、冷蔵輸送にて1042人から収集し、目的を達成した。学童期の環境化学物質濃度として、計画通り400検体の、フタル酸エステル類10代謝物、リン酸トリエステル類14代謝物、ビスフェノール類7物質をそれぞれ測定し、目的を達成した。この結果、環境化学物質の曝露実態と経年変化について明らかにし、また環境化学物質の複合曝露も含めた児の喘息・アレルギーへの影響を解明し、目的を達成した。加えて、収取した尿を用いてアレルギーに関連する3種類の炎症マーカー (8-OHdG、HEL、HNE) を測定し、リン酸トリエステル類代謝物の複合

曝露も含めた検討を行った。これらの結果は「4.3. 環境化学物質曝露による喘息・アレルギーおよび炎症マーカーへの影響（北海道7歳児を対象とした研究）」に詳細を記す。札幌市および近郊に居住する9-11歳の学童を対象に医療機関にて対面で実施する詳細調査は、430人を想定していたところ428人に調査を実施し、当初の目的を達成した。調査票に加えて呼気中一酸化窒素濃度、採血・採尿を行い、総IgE/特異的IgE、予防接種抗体価を測定した。一方、収集した尿及び血中有機フッ素化合物濃度を測定については、詳細調査での検体収集に丸3年間を要し、分析を行う時間を確保できず達成できなかった。収集した検体を用いた曝露評価は研究期間外になるが、継続する。7歳および9-11歳のアレルギー症状の経緯については、喘鳴と湿疹は減少したが、鼻結膜炎は増加する傾向を明らかにした。これらの結果は、「3.3. アレルギーに関する対面詳細調査」に詳細を記す。成果として、英文査読付きの科学論文5報を発表した。

4.2. フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類の複合曝露と喘息・アレルギーとの予備的検討（札幌市小学生を対象とした研究）

対象学童128人のうち、喘鳴、鼻結膜炎、および湿疹の有病人数（%）はそれぞれ、29人（22.7%）、47人（36.7%）、36人（28.1%）だった。曝露レベルは Σ DEHPが最も高く中央値442 nM、次いで Σ DBP 236 nMだった。リン酸トリエステル類濃度はフタル酸エステル類と比較して最も高い Σ TPHPでもDEHPの200分の1以下と低く、最も高い Σ TPHPが2.13 nM、 Σ TBOEPが1.88 nMだった。各フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類の単一化合物曝露は、BDCIPPの第2三分位と第3三分位の鼻結膜炎はOR(95%CI)がそれぞれ2.95(1.04-8.37)、2.93(1.04-8.28)で量-反応関係が認められた。 Σ TCIPPは第3三分位のORが4.13(1.59-12.90)で、量-反応関係が認められた。そのほかの化合物とアレルギーとの関連は認められなかった。WQSモデルでは、WQS index値が25%値から75%値になった時の正の方向のモデルで鼻結膜炎のOR(95%CI)は2.60(1.38-5.14)で統計学的に有意だった。湿疹は1.91(0.99-3.85)であったが統計学的には有意ではなかった。qg-computationモデルでは鼻結膜炎のORは1.29と正の方向だったが統計学的有意さは認められなかった。WQSモデルによる鼻結膜炎のリスク上昇に最も寄与している化合物は Σ TCIPPと Σ TPHPだった。qg-computationで最も寄与の大きかった Σ TCIPPと Σ TPHPの組み合わせによる複合曝露と鼻結膜炎との関連を検討した結果、どちらも低濃度曝露群と比較して、どちらも高濃度曝露群の場合は鼻結膜炎になるリスクはOR(95%CI) = 7.14(2.11-24.15)で統計学的に有意差を認めた。本研究では各化合物を個別に検討した単一化合物モデルでは、アレルギーとの関連が認められたのはBDCIPPと Σ TCIPPと鼻結膜炎であった。混合モデルではフタル酸エステル類とリン酸トリエステル類曝露によって鼻結膜炎のリスクが上がり、また寄与割合の大きい Σ TCIPPと Σ TPHPの組み合わせではどちらも高濃度曝露群の場合にどちらも低濃度曝露群と比べて有意にリスクの上昇が認められた。

フタル酸エステル類曝露と喘鳴あるいは喘息との関連については、ハウスダスト中濃度を曝露指標として、横断研究でブルガリア、デンマーク、スウェーデンではDEHP濃度が高いことが、またスウェーデンではBBzP濃度が高いことが喘鳴、鼻炎、アトピー性皮膚炎のリスクをあげた。一方、近年は尿中代謝物を曝露指標としている報告が増加し、横断研究で、米国、ノルウェー、台湾の研究ではDEP、BBzP、DnOP、DiDP、DEHPが喘鳴のリスクをあげた。リン酸トリエステル類とアレルギーとの関連を検討した報告は、ダスト中のTDCIPPおよびTCIPP濃度が高いことがアトピー性皮膚炎の、TNBP濃度が高いことが喘息のリスクをあげた。本研究では尿中代謝物に加えてダスト中濃度も測定しており、ダスト中TDCIPP濃度が高いと湿疹のリスクが上がり、単一化合物で Σ TCIPPは鼻結膜炎のリスクを、TBOEP代謝物は湿疹のリスクを上げるあることを報告した。人々は生活する中で複数の化合物に同時に曝露しているが、これまでに複数の化合物の混合モデルを検討した報告はない。今回検討した9化合物のアレルギーへの寄与はリスクを上げる方向に働くのみならずリスクを下げる方向に寄与している化合物もある。相反する方向で関係する化合物を同一モデルに含めるとそれら化合物が互いの関連を打ち消しあい、結果として統計モデルとしては複合曝露によるリスクには関連が認められなくなる。今回の結果は、あくまでも統計モデルとしての結果に過ぎない点にも注意する必要がある。

4.3. 環境化学物質曝露と喘息・アレルギーおよび炎症マーカーへの影響（北海道7歳児を対象とした研究）

4.3.1. 児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類の曝露実態

尿中リン酸トリエステル類代謝物は、もっとも検出率が高かったのはBBOEHEP、次いでBCIPHCPP、DHPH、EHPHPが90%以上の尿サンプルから検出された。その他の代謝物は50%以下の検出率であった。EHPHPはEHDPHPの代謝物で、その他のEHDPHP代謝物である5-HO-EHDPHP、およびEHDPHPとTPHPの共通代謝物であるDHPHと強い正の相関があることを報告した。子どものばく露実態については、TBOEP代謝物のBBOEHEP濃度はオーストラリアの児より約2.5倍高かった。米国のNational Health and Nutrition Examination Surveyで2013-2014年のデータと比較してBDCIPPとDHPHは本研究の方が低かった。また、4.1で報告した札幌市小学生とほぼ同程度であった。また、TBOEPは床の光沢剤やプラスチックの可塑剤として使用されており、ハウスダスト中から高頻度かつ高濃度で検出され、諸外国のハウスダスト中TBOEP濃度と比較して高かったことを我々の過去の研究で報告している。このことから我が国のTBOEPの曝露量は諸外国と比較して高めであることが示唆された。加えて、本研究のDHPH、BDCIPP、BCIPHIPP濃度はヨーロッパや中国の児の曝露濃度と同程度である一方、アメリカと比較して低かった。EHPHP濃度は2012-2013年と比較して2016-2017年で有意に高かった。さらに、BDCIPP濃度とEHPHP濃度は2012年から2017年の間でそれぞれ年あたり13.3%および6.7%上昇していることが認められた。

尿中ビスフェノール類は検出率が高かったのはBPAの90%で、BPF、BPSがおよそ80%の児の尿より検出された。その他の対象化合物BPAF、BPB、BPZ、BPAPはいずれも検出率は50%以下であった。BPA以外のビスフェノール類（BPFやBPS）について子どもを対象に測定した報告は殆どないが、アメリカの3-6歳児、および6-11歳児を対象に測定した中央値濃度と比較すると、BPAおよびBPS濃度ともに本研究対象者の曝露濃度は低かった。日本におけるBPAの缶や感熱紙などの製品への使用は独立行政法人 製品評価技術基盤機構によると1990年代より減少し、代替物質への移行が進んでいると報告されており、アメリカ、日本、韓国、中国、ベトナム、他アジア諸国で2-82歳の集団で尿中ビスフェノール類を比較した研究でも、日本人の尿中BPS濃度はアメリカやその他のアジア諸国より高濃度であったと報告されている。しかし、本研究はこれとは異なった結果であった。本研究は北海道に居住する7歳児であるのに対し、Liaoらの研究における日本人の対象集団は松山市および熊本市の成人であり、対象集団の居住地域や年齢が曝露濃度に影響している可能性が考えられる。しかし、日本人を対象に尿中ビスフェノール類濃度を測定した報告は殆どなく、今後もエコチル調査などでも曝露実態を明らかにする必要があることが示唆された。

尿中フタル酸エステル類代謝物は、DEHP代謝物のMEHP、5oxo-MEHP、5OH-MEHP、5cx-MEPPおよびDiNP代謝物のOH-MiNPは全ての児から検出された。その他の代謝物についても95%の児より検出された。最も中央値濃度が高かったのは5cx-MEPPで次いでMnBPであった。一方、最も中央値濃度が低かったのはMiNPについてMBzPであった。子どもの尿中フタル酸エステル類代謝物濃度を測定した諸外国の結果と比較すると、本研究対象者の尿中MBzP濃度は他の報告値よりも低い傾向が見られた。我々は過去の研究でハウスダスト中BBzP濃度が諸外国よりも低いことを報告しており、北海道もしくは日本の室内環境中BBzP濃度が欧米など諸外国より低いこと子どもの曝露レベルの結果は一致した。DiNPの尿中代謝物については、標準品とその内標準物質として用いたMiNP、7cx-MMePPと7OH-MMeOPのクロマトグラムのピークのみを定量していたMiNP、OH-MiNP、cx-MiNPのそれぞれの検出率（中央値濃度）は18.1%（0.1 ng/mL）、33.6%（0.1 ng/mL）、75.8%（1.6 ng/mL）であったのに対し、異性体を含む定量方法に見直後は、それぞれ96.9%（0.7 ng/mL）、100%（4.1 ng/mL）、99.7%（2.5 ng/mL）と検出率、中央値濃度ともに増加した。

尿中リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類濃度の相関を尿中濃度の検出率が50%以上であった化合物全ての組み合わせについて検討した。フタル酸エステル類の代謝物間での相関は相関係数(ρ)0.38-0.88と高く、中でもDEHPの代謝物間およびDiNPの代謝物間での相関はそれぞれ、 $\rho=0.47-0.95$ および $\rho=0.77-0.88$ と非常に強い正の相関を示した。また、ビスフェノール類間については有意な正の相関はあるものの $\rho=0.21-0.32$ の弱い相関であった。リン酸トリエステル類の代謝物間で

はTBOEPの代謝物であるBBOEPとBBOEHEPの相関が $\rho=0.75$ と強い正の相関を示した。また、DPHPはEHDPHPの代謝物である50H-EHDPHPおよびEHHPとそれぞれ $\rho=0.54$ および $\rho=0.56$ の相関を示した。その他、リン酸トリエステル類のDPHPおよびEHHPはフタル酸エステル類のDEHP代謝物およびDiNP代謝物の二次代謝物とそれぞれ $\rho=0.39-0.51$ の相関を示し、DHEPやDiNPと共通した曝露源を有している可能性が示唆された。

4.3.2. 児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類の単一化合物曝露および複合曝露と喘鳴・鼻結膜炎・湿疹との関連

単一化合物ごとのロジスティック回帰分析では、児のBDCIPP、 Σ TBOEP濃度が高いことが喘鳴のオッズが有意に高かった。一方、児のBPS濃度が高いことが児の喘鳴のオッズが有意に低かった。その他、いずれの化合物においても鼻結膜炎、湿疹ともに有意な関連は見られなかった。

児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類の複合曝露による喘鳴・鼻結膜炎・湿疹への影響についてWQS回帰分析の正と負の方向でそれぞれ検討した。正の方向のモデルでは、オッズ比(95%信頼区間)が喘鳴で2.12 (1.38-3.30)、鼻結膜炎で1.62 (1.03-2.58) で有意 ($p<0.05$) であったが、湿疹は有意ではなかった1.30 (0.89-1.91)。各化合物のうち、喘鳴はBDCIPP(30.6%)、 Σ DiNP(29.0%)、 Σ TNBP (13.3%)の曝露の寄与が大きく、鼻結膜炎は Σ DEHP(25.3%)、 Σ TNBP (15.4%)、BPA(14.4%)の寄与が大きかった。一方、負の方向のモデルでは、喘鳴のオッズ比(95%信頼区間)が0.54 (0.35-0.82)、皮膚炎で0.58 (0.37-0.89)で有意であったが、鼻結膜炎は1.01(0.65-1.58)で有意ではなかった。喘鳴はBPS (46.8%)、ついでBPF(18.0%)、MBzP(9.9%)の寄与割合が大きく、皮膚炎は Σ TNBP(29.0%)、次いでBPF(21.0%)、MiBP (12.3%)の寄与が大きかった。

WQSモデルで最も寄与の大きかった上位2化合物の組み合わせによる複合曝露と喘鳴および鼻結膜炎との関連を検討した結果、BDCIPPと Σ DiNPの両方の濃度が低かった群と比較して両方高かった群で喘鳴のオッズ比(95%信頼区間)が2.11(0.93-4.78)でリスクが高くなる傾向が見られた($p=0.074$)。鼻結膜炎は、 Σ DEHPと Σ TNBPの両方の濃度が低かった群と比較して両方高かった群で有意差は認められなかった($p=0.164$)。負の方向では、喘鳴との関連についてBPSとBPFの両方の濃度が低かった群と比較して両方高かった群で喘鳴のオッズ比(95%信頼区間)が0.29(0.11-0.80)と有意な低下が認められ、湿疹は、 Σ TNBPとBPFの両方の濃度が低かった群と比較して両方高かった群で湿疹のオッズ比(95%信頼区間)が0.42(0.17-1.01)の低下傾向が認められた($p=0.052$)。複合曝露によるアレルギーへの影響について2つの異なる集団(札幌市小学生、北海道スタディの7歳)を用いて検討したが、一致した関連は認められなかった。北海道スタディの7歳の集団を用いた検討では、札幌市小学生の集団で検討したリン酸トリエステル類、フタル酸エステル類にビスフェノール類およびフタル酸エステル類のDiNP代謝物も新たに複合曝露評価として加えており、2つの集団で曝露評価対象化合物が若干異なることがその理由として考えられる。しかし、リン酸トリエステル類のうちどちらも塩素系のTCIPP、TDCIPPが鼻結膜炎や喘鳴のアレルギーのリスクに影響する可能性を示唆した。リン酸トリエステル類曝露による健康影響に関する科学的知見は動物実験、疫学研究ともに非常に限られる。しかし、過去の我々の研究においてもハウスダスト中のTDCIPPと湿疹の関連について報告しており、塩素系リン酸トリエステル類曝露は何らかのアレルギー発症メカニズムを有する可能性が示唆される。今後、塩素系のリン酸トリエステル類によるアレルギー発症メカニズムに関する更なる研究が必要である。一方、本研究ではBPFとBPSおよびTNBPとBPFの組み合わせによる喘鳴および皮膚炎のリスクの低下を示した。BPAの代替物質のBPFやBPSとアレルギーに関する科学的知見はなく、本研究結果のみではBPFおよびBPS曝露によるアレルギーへの影響は結論できない。今後も疫学研究、動物実験ともに更なる知見が必要である。

これまでに、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類の単一化合物ごとでアレルギーとの関連を検討した疫学研究はあるが、これらの複合曝露によるアレルギーの影響を検討した報告はなく、本研究が初めての報告となる。いずれの化合物も日用品に汎用される短半減期化合物であり、我々は日常的に複合的に曝露されているため本研究で検討した成果はより現実的に即した曝露による

アレルギーへの影響を反映した結果であると考えられる。一方で、本研究で着目した環境化学物質以外の化合物による曝露については検討できておらず、この点は本研究の限界である。加えて、日内および日間変動がある短半減期化合物の尿中濃度測定を本研究では1回しかしておらず、この点も限界点である。しかし、全ての尿検体について朝一番尿を回収しており、日内変動についてはある程度コントロールできていると考える。

4.3.3. 児のリン酸トリエステル類代謝物濃度といずれかのアレルギー、尿中炎症マーカーとの関連

BBOEHEP濃度が高い児でいずれかのアレルギーのオッズが有意に高かった。また、尿中リン酸トリエステル類代謝物の複合曝露によるアレルギーへの影響においても、WQS indexが上がるとうずれかのアレルギーのオッズが有意に高かった。いずれかのアレルギーへの影響の寄与割合は、BBOEHEPが35.0%と最も高く、次いでEHPHPが29.8%、TCEPが16.2%であった。リン酸トリエステル類代謝物の単一および混合的な曝露の両方でBBOEHEP曝露によるアレルギーへの影響が懸念され、またこれは、別集団である札幌市小学生の結果とも一致していることから、この親化合物であるTBOEP曝露によるアレルギーへのリスクが示唆され、今後も注意深く検討する必要がある。

リン酸トリエステル類代謝物と尿中炎症マーカーについては、単一化合物曝露ではEHPHPおよびBBOEP濃度と8-OHdG値の高値、DHPH濃度とHEL値、EHPHP濃度とHNE値その間に有意な正の相関を認めた。さらに、WQSモデルとHEL、HNEはそれぞれ有意な正の相関が見られた。各炎症マーカーへの寄与割合は8-OHdGはEHPHPが52.9%と最も高く、次いでBCIPHIPPが13.6%、HELへはDHPHが62.3%と最も高く、次いでBDCIPPは12.2%、HNEはEHPHPが49.7%と最も高く、次いでBDCIPPは17.7%であり、いずれの関連も最も寄与の高い代謝物が50%以上で、2番目は20%以下であった。寄与割合の大きかった上位2化合物の組合せモデルで関連を検討したところ、HNEとの関連について、EHPHPとBDCIPPともに高濃度であった児 (High × High) はともに低濃度であった児 (Low × Low) と比較して有意にHNE値が高かった (P = 0.020)。

本研究では、尿中リン酸トリエステル類代謝物を測定し、児のいずれかのアレルギーおよび炎症関連炎症マーカー (HEL、HNE、8-OHdG) との関連を検討した。HELおよびHNEは、炎症の病因や気道高感受性の中心的役割を果たす炎症マーカーであり、HELは特に過酸化脂質のオメガ6、HNEはオメガ3脂肪酸の過酸化の指標である。また8-OHdGはDNA損傷炎症マーカーであり、また喘息の重症度が高いほど高値を示す。HEL、HNE、8-OHdGと児のISAAC調査票より評価したいずれかのアレルギー有無との間に有意な関連は認められなかったが、リン酸トリエステル類代謝物といずれかのアレルギーとの間には、BBOEHEP濃度が高い児でオッズが有意に高く、また、特にアレルギーのある児でリン酸トリエステル類代謝物のBBOEHEP濃度とHEL、HNE、8-OHdGとの間に有意な量反応関係が認められたことから、リン酸トリエステル類の曝露、特にBBOEHEPの親化合物であるTBOEPの曝露が何らかの炎症反応としてHEL、HNE、8-OHdGの値に影響したことが示唆された。またこの関連を、リン酸トリエステル類代謝物の複合曝露による影響を検討したところ、BBOEHEPおよびEHPHPがアレルギーへの寄与割合が高く、EHPHPとBCIPHIPPが8-OHdG、DHPHとBDCIPPがHEL、EHPHP、BDCIPPがHNEへ最も寄与していた。寄与割合の大きかった上位2化合物の組合せモデルでの関連については、2つの代謝物がともに高濃度の児はともに低濃度の児と比較し有意にHNE値が高かったが、1番目の寄与割合を示したEHPHPが50%程度であるのに対し、2番目のBDCIPPの寄与割合が20%程度であることから、HNEへの影響はEHPHPが大部分を占めていることが示唆された。本研究は横断研究であるため、各代謝物がどのようにアレルギー症状および炎症マーカーへ影響しているのか、また、アレルギー症状と炎症マーカーとの間のメカニズムは本研究では明らかにすることはできない。しかし、我々がこれまでに3つの異なる集団でリン酸トリエステル類とアレルギー症状との関連について検討した結果、TBOEPがアレルギーのオッズを上げる結果はどの集団においても一致しており、TBOEPについて今後も注意深く検討する必要があると考えられる。

4.4. アレルギーに関する対面詳細調査

4.4.1 アレルギーに関する対面詳細調査

2017年9月から2020年3月初旬までに、北海道スタディ参加者のうち札幌市およびその近郊に在住する

9-11歳を迎える児1930人へ調査の案内を発送し、428人の調査を実施した。保護者記入によるISAAC調査票を用いた喘鳴、鼻結膜炎、湿疹を有する割合は、それぞれ9.2%、21.2%、22.4%であった。男女別に検討すると、喘鳴、鼻結膜炎、は男児が女児よりも割合が高く、湿疹は女児の方が高かった。北海道スタディで過去にアレルギー症状の有無について質問した1歳、2歳、4歳、7歳の調査票から、喘鳴、鼻結膜炎、湿疹、およびいずれのアレルギーの有症割合は、喘鳴が全年齢中で最も低く、鼻結膜炎は最も高かった。湿疹およびいずれかのアレルギーでは、1歳から4歳までは有症割合が上昇し、4歳、7歳、9-11歳ではほぼ横ばいであった。

アレルギーの指標として、FeNO、採取した血清から好酸球数、総IgE値、特異的IgE値、CC-16の測定、尿から8-OHdG、HEL、HNEを測定した。感染症罹患へのマーカーとしては、血清から予防接種の抗体であるジフテリアおよび破傷風抗体値を測定した。この結果、喘息バイオマーカー3種（好酸球数、総IgE値、FeNO）とCC-16の値について検討したところ、中央値（25-75パーセンタイル値）はそれぞれ、好酸球数が231.4(122.8-425.5)、総IgE値が129(35.6-395.5) IU/mL、FeNOが17(9-37) p. p. b. Plasma CC16が5.5(4.3-7.0) ng/mLであった。喘息バイオマーカーが高値であった児は、好酸球数(> 300/ μ l)が420人中162人(38.5%)、総IgE (\geq 173 IU/mL)が417人中183人(43.8%)、FeNO (\geq 20 p. p. b)が423人中195人(46.0%)であった。調査票から喘鳴あり32人、喘鳴なし396人により、receiver operating characteristic (ROC) カーブを用いてFeNOのカットオフ値を検討したところ、38.0 ppbであった。アメリカ胸部疾患学会臨床ガイドラインにおける臨床応用に向けた呼気中一酸化窒素濃度の解釈では、小児で35 ppbを超える場合は好酸球性の気道炎症が存在する可能性が高いとされる。本結果の喘鳴有・無間のカットオフ値38 ppbは、この解釈とほぼ一致する数値となった。日本人の成人健常者におけるFeNO正常値やカットオフ値についてはすでに37ppb報告されているが、小児の報告はこれまでなく、本研究で初めて示すことができた。13種の特異的IgEについては、ヤケヒョウダニのIgE値は275人(65.9%)が検出下限値0.1以上であったが、それ以外の2種は、半数以上の参加児においてIgE値は0.1未満であった。牛乳、卵白、小麦、ピーナッツについては、調査票で得た各食物アレルギーの診断有無情報とあわせて各IgEの値を検討したが、診断有の参加児が少なく（牛乳10人、卵白4人、小麦1人、ピーナッツ0人）、診断の有無によるIgE値に有意な差はみられなかった。

次いで、炎症バイオマーカーの値を示す。中央値（25-75パーセンタイル値）はそれぞれ、8-OHdGが9.3(5.8-11.9) ng/mL、HELが100.1(61.5-152.2) nmol/L、HNEが24.6(13.7-41.0) μ g/mLであった。喘息バイオマーカーと炎症バイオマーカー値の関連については、喘息バイオマーカー間には強い相関がみられた。炎症バイオマーカーでは8-OHdGとHEL、HELとHNEに強い関連がみられた。喘息バイオマーカー3種と炎症バイオマーカー4種との間に有意な関連はみられなかった。調査票の回答による9-11歳時の喘鳴、鼻結膜炎、湿疹の症状の有無と、喘息バイオマーカー3種（好酸球数、総IgE、FeNO）の値をt検定で検討したところ、喘鳴、鼻結膜炎、湿疹すべての症状について、症状有と回答した群の喘息バイオマーカー値が、症状無と回答した群と比較して有意に高かった。これらの結果から、喘息バイオマーカーはアレルギー症状の判定に用いるバイオマーカーに成り得る可能性が示唆された。一方、アレルギー症状の有無と尿中炎症バイオマーカー3種（8-OHdG、HNE、HEL）の値に有意な差はみとめられなかった。CC-16について、調査票の回答による9-11歳時の喘鳴、鼻結膜炎、湿疹の症状の有無と、血中CC-16濃度の値をt検定で検討したところ、喘鳴では症状有と回答した群が、症状無と回答した群に比べてCC-16の値が有意に低かった一方、湿疹では症状有と回答した群が、症状無と回答した群に比べてCC-16の値が有意に高かった。鼻結膜炎の症状の有無とCC-16の値に有意な差はみとめられなかった。

感染症罹患のしやすさの指標として、予防接種の抗体価を測定した。血中ジフテリア抗体価は、測定した290人のうち47人(16.6%)が0.1 IU/mL<の検出下限値未満であった。また、23人が2.0 IU/mL<の検出上限値を超えていた。本研究の参加児428名のうち、これまでジフテリアおよび破傷風にかかった児はいない。出生から2歳までの間に2回以上3種混合DPT接種(第1期)を受けたのは427名であった。第2期のboostとして10-12歳の間に2種混合DT接種を受けた59人のジフテリアおよび破傷風抗体値平均値は、該当年齢に達していない参加児も含めて2種混合DT接種を受けていない366人のジフテリアおよび破傷風抗体値より有意に高かった。

4.4.2 アレルギーに関する対面詳細調査参加時の胎児期曝露

アレルギーに関する対面詳細調査の参加児の胎児期曝露評価として測定した、妊娠中初期母体血清の保存があった314人の児の母のフタル酸エステル類濃度は、最も高濃度かつ高頻度で検出されたのは中央値（検出率）がMnBP 23.5 ng/mL(100%)、次いでMiBP 3.40 ng/mL (99.0%)だった。DEHP代謝物はMEHP、5OH-MEHP、5cx-MEPPがそれぞれ0.43 ng/mL (89.8%)、5cx-MMPP 0.24 ng/mL (92.4%)、5OH-MEPP (5.1%)で総和は Σ DEHPの中央値が1.78 ng/mLだった。DiNP代謝物は Σ cx-MiNPのピークは検出率25.2%と低かった。胎児期曝露と9-11歳児のアレルギー有病およびアレルギー関連バイオマーカーとの関連は引き続き解析を実施する。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

- 2017年から2019年の3年間で、学童期（7歳児）の喘息、アレルギーに関するデータを2212人から調査票を回収し（回収率約71.2%）、曝露評価に用いる児の尿を1042人から収集し、目的を達成した。これらは本研究のみならず今後環境化学物質曝露と児の健康影響を解明するためのデータ・試料となる。収集した尿400検体を持ちいて、フタル酸エステル類代謝物、リン酸トリエステル類代謝物、ビスフェノール類をそれぞれ測定し、曝露実態と経年変化を明らかにし、曝露による児の喘息・アレルギーによる複合曝露も含めた影響解明を達成した。加えて、ISAAC調査票のみでは把握できない炎症マーカー3種を測定し、リン酸トリエステル類の複合曝露による影響を明らかにした。9-11歳の学童を対象に医療機関にて対面による詳細調査を428人に実施し、目的を達成した。詳細調査での検体収集に丸3年を要したため環境化学物質分析を行う時間を確保できず、曝露評価は達成できなかった。しかし、呼気一酸化窒素濃度、免疫に関わるバイオマーカーの測定は実施し、また尿・血液試料の保管により、今後曝露評価に利用できる。成果として、英文査読付の科学論文5報を発表した。
- 我が国で、学童の曝露実態に関するデータが少ないフタル酸エステル類については5化合物10代謝物の曝露実態に関する知見を得た。学童のリン酸トリエステル類7化合物14代謝物、およびビスフェノール類7化合物については、世界的に見ても知見は少ない。フタル酸エステル類はすべての代謝物が尿中から検出された。リン酸トリエステル類はTDCIPP、TPHP、およびBPAは米国NHANESよりも低かった。TBOEPは米国では分析しておらず、世界的にも貴重なデータである。
- リン酸トリエステル類とビスフェノール類はベルギーアントワープ大学と共同で実施しており、分析法は欧州バイオモニタリングやその他のラウンドロビン・テスト（試験所間比較）で妥当性が確認されている。また、尿中ビスフェノールについては、10 pg/mLレベルの非常に低濃度まで定量できている。フタル酸エステル類は環境健康科学研究教育センターで分析しており、本研究で用いた分析法についてもラウンドロビン・テストで妥当性が確認されている。
- フタル酸エステル類DiNPは異性体の混合物である。本研究ではDiNPの異性体の代謝物の一つとして標準品の合成が可能である7cx-MMePPおよび7OH-MMeOPをサロゲートとしてその他の異性体も含む混合物としてのDiNP代謝物の定性・定量により曝露レベルを明らかにした。この手法は欧州のバイオモニタリングでも共通プロトコルとしている方法で、曝露レベルに関する比較の妥当性が確保できる。
- 現実により近い複合曝露によるアレルギーとの関連について、従来から行われてきた単一化合物との関連に加えて、札幌市小学生と北海道スタディの7歳児の2つ集団で、それぞれフタル酸エステル類とリン酸トリエステル類、また7歳児の集団ではビスフェノール類も加え「WQSモデル」「上位2化合物の組合せモデル」を考慮した統計モデルを用いてアレルギーとの関連を評価した。小学生の集団ではWQSモデルが鼻結膜炎のリスクを上げ、その寄与としてはTCIPPとTPHPの組合せによる可能性を示唆した。北海道スタディ7歳児の集団では、WQSモデルが喘鳴のリスクを上げ、

その寄与としてはBDCIPPとDiNPの組合せによる可能性を示唆した。また負の方向のモデルでは、喘鳴および皮膚炎のリスクを下げ、その寄与としてはそれぞれBPSとBPFおよびTNBPとBPFの組み合わせによる可能性を示唆した。リン酸トリエステル類のWQSモデルはアレルギー関連の炎症マーカーHEL、HNEとの相関を示したが、この影響はHELはDHPH、HNEにはEHPHPの曝露による寄与が大きく、複合曝露の影響は認められなかった。アレルギーへの影響を、「単一化合物曝露」、「WQSモデル」、「上位2化合物の組合せモデル」で異なるモデルを同時に考慮することで、寄与の大きい化合物を検討した初めての研究である。

6. 学童の一般集団において、世界的に用いられるアレルギーのISAAC調査票に加えて、呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO) および血液・尿中のアレルギーに関連すると考えられるバイオマーカーを測定した。以前より用いられてきた好酸球数、総IgEおよびFeNOはいずれもISAAC調査票による喘鳴、鼻結膜炎、湿疹が有りの児で無い児よりも高く、また相互に相関を示した。また、FeNOについては喘鳴のカットオフ値として38ppbを示し、米国の章にともほぼ同じ値が得られたことは、臨床においても有益である。一方、CC-16は喘息の有る児で無い児よりも低かったが湿疹の有る児は無い児よりも高かった。また、8-OHdG、HEL、HNEについてはアレルギーとの関連は認められなかった。本研究ではアレルギーとバイオマーカーとの関連を横断的に解析しているが、コーホート研究である利点を生かして今後もアレルギー症状について追跡していくことで、発症早期のバイオマーカーとなるか、検討を継続できる。

(2) 環境政策への貢献

1. わが国における学童のフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類の曝露実態を明らかにした。これらは、一般集団の学童の基礎データとして活用することができる。
2. 学童のフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類への複合曝露によるアレルギーとの関連を明らかにした。類縁化合物が複数存在する中で、どの化合物に注視すべきかに対する知見は、化学物質の使用・管理などの環境政策に貢献できる。
3. 上記の知見は、環境省「子どもの環境と健康に関する全国調査（エコチル調査）」において暴露評価の検討において資料となりうる。また、学童期における対面調査への応諾率、採血やFeNOの実行可能性や実施方法などの経験は、エコチル調査推進の参考になる。
4. 世界的にも懸念される、複合曝露に関するヒトでの研究成果は、我が国のみならずグローバルな環境政策にとっても有益な知見となり得る。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

1. 曝露実態のデータは、化学物質の人への曝露量モニタリング調査において、他の集団での測定事例として活用できる。
2. DiNP代謝物の分析において異性体も含めた定量評価値として参照できる。
3. 環境省「子どもの環境と健康に関する全国調査（エコチル調査）」において曝露評価および研究及び実施計画立案時の参考資料となる。

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) Araki A., Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Mesfin R. K., Covaci A., Kishi R.: Environment International, 119, 438-446 (2018)

Associations between allergic symptoms and phosphate flame retardants in dust and their urinary metabolites among school children.

- 2) Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Araki A., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Kishi R., Covaci A.: *Environmental Research*, 172, 543-551 (2019)
Biomonitoring of organophosphate flame retardants and plasticizers in children: associations with house dust and housing characteristics in Japan.
- 3) Ait Bamai Y., Bastiaensen M., Araki A., Goudarzi H., Konno S., Ito S., Miyashita C., Yao Y., Covaci A., Kishi R.: *Environment International*, 131, 105003 (2019)
Multiple exposures to organophosphate flame retardants alter urinary oxidative stress biomarkers among children: The Hokkaido Study.
- 4) Araki A., Ait Bamai Y., Bastiaensen M., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Miyashita C., Itoh S., Goudarzi H., Konno S., Covaci A.: *Environmental Research*, 183, 109212 (2020)
Combined exposure to phthalate esters and phosphate flame retardants and plasticizers and their associations with wheeze and allergy symptoms among school children.
- 5) Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Araki A., Goudarzi H., Konno S., Ito S., Miyashita C., Yao Y., Kishi R., Covaci A.: *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 228, 113523 (2020)
Temporal trends and determinants of PFR exposure in the Hokkaido Study.

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) Chen M., Chang C., Minatoya M.,: Eds. Kishi R., Grandjean P., *Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals.*, Springer Nature, 405-437 (2020)
“Chapter 16: Bisphenols and Alkylphenols”
- 2) Ait Bamai, Y.: Eds. Kishi R., Norbäck D., Araki A. : *Indoor Environmental Quality and Health Risk toward Healthier Environment for All.*, Springer Nature, 159-178 (2019)
“Chapter 8: Semi-Volatile Organic Compounds (SVOCs): Phthalates and Phosphorous Frame Retardants and Health Risks”

(2) 主な口頭発表 (学会等)

- 1) Ketema R. M., Ait Bamai Y., Araki A., Kishi R., Saito T.: The 3rd FHS International conference. Hokkaido University, Sapporo, Japan. (2017.7.7)
“Development and validation of a reliable method for the analysis of phthalate metabolites in human urine.”
- 2) Bastiaensen M., Van den Eede N., Araki A., Ait Bamai Y., Kishi R., Covaci A.: The 37th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs DIOXIN 2017, Vancouver, Canada. (2017.8.20-25)
“Urinary biomonitoring of organophosphate flame retardants in Japanese children and correlations with house dust concentrations.”
- 3) Araki A., Ait Bamai Y., Kawai T., Tsuboi T., Miyashita C., Kishi R.: International Society of Exposure Science 27th Annual Meeting, North Carolina, USA (2017.10.15-19)
“Phthalates and organophosphate flame retardants in house dust and their relation to allergies and oxidative stress marker 8-OHdG: the Hokkaido Study”
- 4) Araki A., Ait Bamai Y., Miyashita C., Kishi R.: Asia-Pacific Children’s Health Symposium, Taipei, Taiwan (2017.11.8-9)
“Indoor Air Pollution and Children’s health- focused on phthalates, PFRs and

allergies”

- 5) 荒木敦子、アイツバマイゆふ、Michiel Bastiaensen、Nele Van den Eede、Rahel Ketem Mesfin、伊藤佐智子、宮下ちひろ、Adrian Covaci、岸玲子：第88回日本衛生学会学術総会，東京都大田区(2018.03.24-26)
「尿中リン酸トリエステル類代謝物と児の喘息・アレルギーとの関連－札幌市学童調査－」
- 6) Ait Bamai Y., Arak A., Nomura T., Kawai T., Tsuboi T., Shimizu H., Kobayashi S., Miyashita C., Kishi R.: International Society for Environmental Epidemiology / International Society of Exposure Science Asia Chapter 2018 (ISEE/ES AC2018), Taipei, Taiwan, (2018.6.21-25)
“Filaggrin mutation on the association between phthalates and phosphorus flame retardants in house dust and eczema and wheeze among children : The Hokkaido Study on Environment and Children’ s Health”
- 7) Araki A., Ait Bamai Y., Kawai T., Tsuboi T., Kishi R.: International Society for Environmental Epidemiology / International Society of Exposure Science Asia Chapter 2018 (ISEE/ES AC2018), Taipei, Taiwan, (2018.6.21-25)
“Organophosphate flame retardants in house dust and their association with school children’ s asthma and allergies”
- 8) Goudarzi H, Konno S, Kimura H, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Ait Bamai Y, Kimura H, Shimizu K, Suzuki M, Ito YM, Nishimura M, Kishi R.: Japanese Society of Allergology (JSA) 67th Annual Meeting, Chiba, Japan, (2018.6.22-24)
“Contrasting associations of maternal smoking and BMI with wheeze and eczema in children.”
- 9) Araki A., Ait Bamai Y., Bastiaensen M., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Itoh S., Miyashita C., Covaci A., kishi R.: The Joint Annual Meeting of the International Society of Exposure Science and the International Society for Environmental Epidemiology (ISES-ISEE 2018), Ottawa, Canada, (2018.8.26-30)
“Mixed phthalate ester and phosphate flame retardant exposure and asthma and allergies in school children”
- 10) Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Araki A., Van den Eede N., Kishi R., Covaci A.: 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants Dioxin 2018 & 10th International PCB Workshop, Kraków, Poland, (2018.8.26-31)
“Determinants of exposure to phosphate flame retardants for Japanese schoolchildren.”
- 11) 荒木敦子、アイツバマイゆふ、Michiel Bastiaensen、Nele van den Eede、河合俊夫、坪井樹、Rahel Ketem Mesfin、伊藤佐智子、宮下ちひろ、Adrian Covaci、岸玲子；第70回北海道公衆衛生学会。北海道科学技術大学，北海道札幌市，(2018.10.20)
「室内ダスト中リン酸トリエステル類とその尿中代謝物濃度と学童の喘鳴・アレルギー症状との関連：札幌市学童調査。」
- 12) Ketema Rahel Mesfin; 第89回日本衛生学会学術総会。名古屋大学東山キャンパス、愛知県名古屋市。(2019.2.1-3)
“Urinary phthalate metabolites concentration and temporal trends in 7 years old children, 2012-2017: Hokkaido Study.”
- 13) アイツバマイゆふ：第89回日本衛生学会学術総会。名古屋大学東山キャンパス、愛知県名古屋市。(2019.2.1-3)
「学童の尿中リン酸トリエステル類代謝物濃度と尿中炎症関連マーカーとの関連」
- 14) Ketema R. M.; CHEMICAL HAZARD Symposium. Sapporo, Japan (2019.3.20)
“Secular trend of phthalate metabolites in children urine 2012-2017, Hokkaido Birth

Cohort Study.”

- 15) Mesfin R. K., Ait Bamai Y., Araki A, Saito T, Kishi R.: The 4th FHS International Conference, Sapporo, Hokkaido, Japan (2019.6.5)
 “Urinary phthalate metabolites and oxidative stress biomarkers in 7 years old children from Hokkaido.”
- 16) Goudarzi Houman, 荒木敦子, 伊藤 佐智子, アイツバマイゆふ, 宮下ちひろ, 木村孔一, 今野哲, 岸 玲子: 第1回日本アレルギー学会北海道支部地方会. 札幌市教育文化会館、北海道札幌市. (2019.6.23)
 「Contrasting associations of maternal smoking and pre-pregnancy BMI with wheeze and eczema in children.」
- 17) Gys C., Ait Bamai Y., Araki A., Caballero-Casero N., Covaci A.: ISESISIAQ2019, Kaunas, Lithuania (2019.8.18-22)
 “Monitoring exposure levels to alternative bisphenols for Japanese schoolchildren.”
- 18) Araki A., Ait Bamai Y., Kishi R.: ISESISIAQ2019, Kaunas, Lithuania (2019.8.18-22)
 “Exposure to organophosphate esters in Japan: associations among their concentrations in house dust, urinary metabolite levels, and allergies.”
- 19) Gys C., Ait Bamai Y., Araki A., Caballero Casero N., Kishi R., Covaci A.: 11th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health., Leuven, Belgium (2019.8.28-30)
 “Monitoring exposure levels to bisphenols in Japanese schoolchildren.”
- 20) Goudarzi H., Konno S., Araki A., Ito S., Ait Bamai Y., Miyashita C., Kishi R.: European Respiratory Society International Congress, Madrid, Spain, (2019.9.28-10.2)
 “Childhood allergies and obesity relationship: Identification of non-invasive biomarkers.”

7. 研究者略歴

研究代表者

荒木 敦子

北海道大学大学院医学研究科修了、博士（医学）、現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター特任准教授

研究分担者

1) 岸 玲子

北海道大学大学院医学研究科修了、医学博士、現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター特別招へい教授

2) 宮下 ちひろ

北海道大学大学院医学研究科修了、博士（医学）、現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター特任准教授

3) アイツバマイ ゆふ

北海道大学大学院医学研究科修了、博士（医学）、現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター特任講師

4) 伊藤 佐智子

北海道大学大学院歯学研究科修了、博士（歯学）、現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター特任講師

5) 小林 澄貴

北海道大学大学院医学研究科修了、博士（医学）、現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター特任講師

6) 三浦 りゅう

北海道大学大学院理学研究科修了、博士（理学）、現在、北海道大学環境健康科学研究教育センター客員研究員

7) 今野 哲

北海道大学大学院医学研究科修了、博士（医学）、現在、北海道大学大学院医学研究院教授

8) ゴウダルジ ホウマヌ

北海道大学大学院医学研究科修了、博士（医学）、現在、北海道大学大学院医学研究院助教

9) 有賀 正

北海道大学大学院医学研究科修了、医学博士、現在、北海道大学大学院医学研究院名誉教授

10) 西村 正治

北海道大学大学院医学研究科修了、医学博士、現在、北海道大学大学院医学研究院名誉教授

11) 湊屋 街子

札幌医科大学大学院医学研究科修了、博士（医学）、現在、北海道大学大学院保健科学研究センター特任講師

II. 成果の詳細

環境化学物質の複合曝露による喘息・アレルギー、免疫系へ及ぼす影響の解明

<サブテーマ代表者>

国立大学法人北海道大学

環境健康科学研究教育センター：荒木 敦子

<研究分担者>

国立大学法人北海道大学

環境健康科学研究教育センター：岸 玲子、宮下 ちひろ、伊藤 佐智子、アイツバマイ ゆふ、
小林 澄貴、湊屋 街子、三浦 りゅう

医学研究院：今野 哲、ゴウダルジ ホウマヌ、有賀 正、西村 正治、

<研究協力者>

国立大学法人北海道大学

環境健康科学研究教育センター：ケテマ メスフィン ラヘル

札幌医科大学：堤 裕幸

ベルギー アントワープ大学：コバチ アドリアン、バスチアエンセン ミヒエル、ギェス セリー
ン、ヤオ イミン、バンデンイーデ ネレ

平成29(開始年度)～令和元年度研究経費(累計額)：132,033千円(研究経費は間接経費を含む)
(平成29年度：44,757千円、平成30年度：42,519千円、令和元年度：44,757千円)

[要旨]

近年子どものアレルギーの増加が報告されており、その要因の一つに環境化学物質曝露による影響が懸念されている。そこで、本研究では、これまでほとんど報告がない学童の環境化学物質曝露としてフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類への曝露実態を明らかにするとともに、それら化学物質曝露への複合曝露も含めたアレルギー症状およびアレルギーと関連するバイオマーカーへの影響を明らかにすることを目的とした。加えて、調査票のみで把握できない気道炎症や免疫に関わるバイオマーカーや予防接種ワクチンの抗体価を明らかにする詳細調査を対面で実施した。まずはフタル酸エステル類とリン酸トリエステルへの単一化合物曝露、複合曝露とアレルギーとの関連をそれぞれ異なる統計モデルを用いて検討するための予備的検討として、既存の小学生128名のデータを用いた解析を行った。この結果、単一化合物曝露では Σ TCIPPとBDCIP濃度が高いと鼻結膜炎のリスクが上がった。加えて、フタル酸エステル類3化合物とリン酸トリエステル6化合物のWeight Quantile Sum (WQS)モデルによるIndexが25%値から75%値に上がった時の鼻結膜炎のリスクはオッズ比(OR)(95%信頼区間[95%CI])は2.6(1.38-5.14)だった。さらにquantile g-computationモデルで鼻結膜炎への寄与が大きい2化合物である Σ TCIPPと Σ TPHPの組み合わせが低濃度の場合と比較して高濃度ではOR(95%CI)は5.78(1.81-18.43)だった。これらのことから、フタル酸エステル類とリン酸トリエステルの複合曝露は鼻結膜炎のリスクを上げ、寄与の大きい Σ TCIPPと Σ TPHPの組み合わせにリスクを上げる交互作用があることが明らかになった。次いで本調査として、出生コホート「北海道スタディ」に参加する7歳児について、尿中フタル酸エステル類10代謝物・リン酸トリエステル類14代謝物・ビスフェノール類7化合物の曝露評価を行い、さらにアレルギーおよび関連炎症マーカーの関連を明らかにした。約400人の曝露評価を行った結果、フタル酸エステル類はDBP、BBzP、DEHP、DiNPのすべての代謝物が97%以上で検出され、DiNP代謝物は異性体も含めて定量をすることが可能となった。リン酸トリエステル類は8代謝物が50%以上検出、TPHP代謝物DHPが最も高濃度、次いでTCIPP代謝物DCIPHIPPだった。ビスフェノール類は、BPA、BPS、BPFが80%以上で検出、米国より低めだった。リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸

エステル類の複合曝露によるアレルギーへの影響については、喘鳴はBDCIPP、*cx*-MiNPの曝露の寄与が大きく、鼻結膜炎はBPF、BPA、湿疹はBBOEHP、5oxo-MEHPの寄与が大きかった。炎症マーカーへの寄与割合は8-OHdGはEHPHP、BCIPHIPPの曝露の寄与が大きく、HELへはDHPHとBDCIPP、HNEはEHPHPとBDCIPPの曝露の寄与が大きかった。寄与割合の大きかった2つの代謝物濃度がともに高かった児とともに低かった児の炎症マーカー値を比較したところともに高濃度であった児は低かった児と比較して有意にHNE値が高かった。最後に、医療機関にて9-11歳児428人のFeNO、血液・尿中バイオマーカーを測定、曝露評価に向けて検体保存した。調査票によるアレルギーとFeNO、血中好酸球数および総IgE値は高い相関を示し、今後母体血中フタル酸エステル類による胎児期曝露および収集した血液・尿中の環境化学物質曝露との関連を解析していく。

[キーワード]

環境化学物質、複合曝露、アレルギー、子ども、疫学

1. はじめに

我が国において過去30年間、子どものアレルギー疾患が増加し、有病割合は親世代の約3~4倍である(平成27年度学校保健統計)。この原因として遺伝要因だけでは説明がつかず、住環境・食生活・生活習慣の変化等が考えられるが、その一つとして増加する合成化学物質への曝露による影響が懸念されている。発育途中の小児は化学物質に対して成人よりも脆弱である。近年、免疫・アレルギーへの影響が報告されている環境化学物質を挙げる。フタル酸エステル類はプラスチック製品や塩化ビニル製品の可塑剤、化粧品や洗剤等の賦香剤として添加される物質で、ハウスダスト中濃度が高いと児の喘息・アレルギー有病のリスクが増加することが報告されている¹⁻⁴⁾。リン酸トリエステル類は難燃性可塑剤、床のワックスや光沢剤に用いられる。研究代表者らは、戸建て住宅でダスト中フタル酸エステル類やリン酸トリエステル類濃度が高いと居住者のアレルギーのリスクをあげ、さらに大人と比べて子どもでその影響が顕著であることを報告した⁵⁻⁷⁾。ビスフェノール類(Bisphenols: BPs)は缶のコーティング剤やポリカーボネート製品の硬化剤として使用され、BPA濃度が高いと児の呼吸機能低下、喘鳴や呼吸器感染症リスクの増加が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。有機フッ素化合物(Per and polyfluoro Alkyl Substances)は撥油・撥水剤としての化学的特性から、テフロン製品や繊維製品、食品包装材として使用される。胎児期の有機フッ素化合物類曝露は乳幼児期のアレルギー発症低下¹¹⁾、感染症罹患の増加¹²⁾、予防接種抗体価との負の相関¹³⁻¹⁵⁾が報告されている。研究代表者らが進めてきた出生コホート「北海道スタディ」では、胎児期の環境化学物質曝露が児のアレルギー・感染症発症に与える影響を報告してきた。母体血中有機フッ素化合物類濃度が高いと臍帯血中のIgE濃度が有意に低く¹⁶⁾、2歳時の喘息発症リスクが有意に低かった¹⁷⁾。さらに4歳ではアレルギー発症リスクが有意に低い一方、感染症罹患のリスクが有意に高かった^{18,19)}。また、母体血中フタル酸エステルDEHPの濃度が高いと、臍帯血中のIgE濃度が有意に低く、7歳までの食物アレルギー、中耳炎、水痘の罹患のリスクが有意に高かった²⁰⁾。従って、これら化学物質への曝露によるアレルギーの増加や免疫系への影響が懸念されるものの、学童ではこれら化学物質の曝露実態そのものが殆ど把握されていない。さらに、ヒトはこのような環境化学物質に複合的に曝露されるが、複合曝露による喘息やアレルギーへの影響を検討した疫学研究は世界的にない。

2. 研究開発目的

本研究では、日用品や生活環境において多く使用される環境化学物質であるフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類を対象に、これまでほとんど報告がない学童の曝露実態を明らかにする。さらに、個々の化合物および複合曝露による学童の喘息、アレルギー及ぼす影響を解明する。具体的には、①学童の尿中のフタル酸エステル類6代謝物およびリン酸トリエステル類13代謝物の測定済みデータを用いて、単一化合物曝露、複合曝露による子どもの喘息・アレルギーとの関連を予備的に検討する。②既存の出生コホート「北海道スタディ」北海道コホートで、2017年から2019年の

3年間で、学童期（7歳児）を対象に、喘息、アレルギーに関する質問紙を送付する（3250人を想定）。曝露評価に用いるため、児の尿を冷蔵輸送にて収集する（970人を想定）。学童期の環境化学物質濃度として、フタル酸エステル類代謝物、リン酸トリエステル類代謝物、ビスフェノール類を測定する（400検体程度）。7歳の学童期におけるフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類への曝露実態と、個別の化学物質濃度および複数の化学物質への複合曝露を考慮して、喘息・アレルギーおよび炎症バイオマーカー（8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、4-hydroxynonenal (HNE)、Hexanoyl-lysine (HEL))との関連を明らかにする。③アレルギーに関して、ISAAC調査票のみでは把握できない気道炎症や抗体価を明らかにする詳細調査を行う。札幌市および近郊に居住する9-11歳の学童を対象に医療機関にて対面調査と採血を行い、調査票に加えて呼気中一酸化窒素濃度、総IgE/特異的IgE、予防接種抗体価を明らかにする（430人を想定）。詳細調査で収集した尿及び血中有機フッ素化合物濃度を測定し（300検体程度）、詳細調査で得られたバイオマーカーによる影響および7歳からのアレルギー症状の経緯とのリスク評価を行う。

3. 研究開発方法

本報告の中で用いる化学物質とその代謝物について、略称とスペルアウトを表1に示す。

表1 フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類とその尿中代謝物

親化合物		代謝物	
フタル酸エステル類			
DiBP	di- <i>iso</i> -buthyl phthalate	MiBP	mono- <i>iso</i> -buthyl phthalate
DnBP	di- <i>n</i> -buthyl phthalate	MnBP	mono- <i>n</i> -buthyl-phthalate
BBzP	buthyl benzyl phthalate	MBzP	monobenzyl phthalate
DEHP	di(2-ethylhexyl) phthalate	5cx-MEPP	mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate
		5OH-MEHP	mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate
		MEHP	mono(2-ethylhexyl) phthalate
		5oxo-MEHP	mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate
DiNP	di- <i>iso</i> -nonyl phthalate	MiNP	mono- <i>iso</i> -nonyl phthalate
		cx-MiNP	carboxy-MiNP
		7cx-MMePP	mono(4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalate
		OH-MiNP	Hydroxy-MiNP
		7OH-MMeOP	mono(4-methyl-7-hydroxyloctyl) phthalate
リン酸トリエステル類			
TNBP	tri- <i>n</i> -butyl phosphate	DNBP	di- <i>n</i> -butyl phosphate
TPHP	triphenyl phosphate	DPHP	diphenyl phosphate
		4-HO-DPHP	4-hydroxyphenyl diphenyl phosphate
		3-HO-TPHP	3-hydroxyphenyl diphenyl phosphate
		4-HO-TPHP	4-hydroxyphenyl diphenyl phosphate
EHDPHP	ethylhexyl diphenyl phosphate	5-HO-EHDPHP	5-hydroxy-2-ethylhexyl diphenyl phosphate
		EHPHP	ethylhexyl phenyl phosphate
TBOEP	tris(2-butoxyethyl) phosphate	BBOEP	bis(2-butoxyethyl) phosphate
		BBOEHEP	bis(2-butoxyethyl) 2-hydroxyethyl phosphate
		TBOEP-OH	bis(2-butoxyethyl) 3-hydroxy-2-butoxyethyl phosphate
TCIPP	tris(1-chloro- <i>iso</i> -propyl) phosphate	BCIPHIPP	bis(1-chloro- <i>iso</i> -propyl) 1-hydroxy-2-propyl phosphate
		BCIPP	bis(1-chloro- <i>iso</i> -propyl) phosphate
TCEP	tris(2-chloroethyl) phosphate	uTCEP	tris(2-chloroethyl) phosphate
TDCIPP	tris(1,3-dichloro- <i>iso</i> -propyl) phosphate	BDCIPP	bis(1,3-dichloro- <i>iso</i> -propyl) phosphate

3.1. フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類の複合曝露と喘息・アレルギーとの予備的検討（札

幌市小学生を対象とした研究)

3.1.1. 調査の概要

ヒトは日々様々な化学物質に同時に曝露しているにもかかわらず、過去のアレルギー症状（喘鳴、鼻結膜炎、湿疹）と環境化学物質曝露との関連については、いずれも「単一化合物」との関連を検討したのみであった。そこで、異なる統計モデルを用いて「単一化合物曝露」「WQSモデル」「上位2化合物の組合せモデル」の予備的検討を行った。予備検討には、既存の札幌市小学生の調査で収集したデータを用いた。

札幌市公立小学校に通う児童128人を対象に調査を実施したアレルギーと測定済みのフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類のデータを用いた。調査の概要は、質問票調査への協力が得られた札幌市立小学校12校で全児童6393人に調査票を配付、4445人から回答を得た。さらに、自宅環境調査を実施しても良いと回答した中から実際に日程調整が可能であった128人の自宅訪問を実施した。学童の保護者が回答したInternational Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)調査票から、「喘鳴」「鼻結膜炎」「湿疹」を定義した。学童のスポット尿を収集し、個人曝露評価としてフタル酸エステル類代謝物とリン酸トリエステル類代謝物を分析した。フタル酸エステル類代謝物6化合物は中央労働災害防止協会大阪労働衛生総合センターにてGas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)を用いて、リン酸トリエステル類代謝物13化合物はLiquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry (LC/MSMS)を用いてアントワープ大学毒性学センターで測定した。クレアチニン値はenzyme-linked immunosorbent assay法を用いて株式会社SRLで測定した。

3.1.2. 曝露評価の方法

子どものクレアチンクリアランスは性別や体格によって異なるため、化学物質代謝物濃度はLimit of quantification (LOQ)濃度以下は、各化合物のLOQ以上の検出割合を求め、LOQに検出割合を掛けた値を代入し、その後標準化クレアチニン値で補正した²¹⁾。標準化クレアチニン値補正濃度の計算方法を示す。まずは、各学童の性別と身長 (height (Ht))、体重 (weight, Wt) から以下の計算式(1)(2)から各児のクレアチンクリアランス (CE) とリファレンスクレアチニン (RC)を求め²²⁾、RCを測定されたクレアチニン値で除した値を標準化クレアチニン値とした。

$$\text{男児 (Ht 90-168 cm)} : \text{CE (mg/day)} = \text{Ht} (6.265 + 0.0564(\text{Ht}-168)) \quad (1)$$

$$\text{女児 (Ht 90-172 cm)} : \text{CE (mg/day)} = 2,045 \exp[0.01552(\text{Ht}-90)] \quad (2)$$

子どもの時間当たりの平均尿量1 mL/kg/hから、1日の尿量(L/day)を以下の式(3)で求めた。

$$\text{Daily urine output (L/day)} = [0.001(\text{L/kg/h}) \times \text{Wt (kg)} \times 24(\text{h})] / \text{day} \quad (3)$$

RC濃度は以下の式(4)で求めた。

$$\text{Reference Creatinine (mg/L)} = \text{CE (mg/day)} / \text{Daily urine output (L/day)} \quad (4)$$

最後に、測定されたクレアチニン値とRCで調整した濃度を標準化クレアチニン補正濃度とした。

$$\text{標準化クレアチニン補正濃度 (nmol/g standardized Cr.)} = \text{代謝物濃度} \times (\text{reference creatinine} / \text{observed creatinine}) \quad (5)$$

1つの化合物について2代謝物以上を測定した場合は、代謝物のモル濃度の総和 ($\Sigma \text{DBP} = \text{MiBP} + \text{MnBP}$, $\Sigma \text{DEHP} = \text{MEHP} + 5x_o\text{-MEHP} + 5c_x\text{-MEPP}$, $\Sigma \text{TBOEP} = \text{BBOEP} + 3\text{HO-TBOEP} + \text{BBOEHP}$, $\Sigma \text{TCIPP} = \text{BCIPHIPP} + \text{BCIPP}$, $\Sigma \text{TPHP} = \text{DHPH} + 4\text{HO-DHPH}$) を曝露評価に用いた。DNBPの検出は8.3%と低かったため、曝露評価には用いなかった。

3.1.3. 統計解析

本研究では、アレルギーと化学物質曝露との関連について、「単一化合物曝露」「WQSモデル」「上位2化合物の組合せモデル」をそれぞれ異なる統計モデルで検討した。「単一化合物曝露」では個々の化合物との関連、「WQSモデル」では分析した複数の化合物の混合 (Mixture) との関連、「上位2化合物の組合せモデル」ではWQSモデルでの寄与が大きい2化合物の組み合わせの曝露との関連を検討した。まずは「単一化合物曝露」では、個々の化合物濃度を三分位とし、第1三分位をReferenceとした時の第2三分位、

第3三分位を独立変数、「喘鳴」「鼻結膜炎」「湿疹」を従属変数としてロジスティック回帰分析によりオッズ比 (OR) と95%信頼区間 (CI) を求めた。次いで「WQSモデル」として、フタル酸エステル類3化合物 (Σ DBP, MBzP, Σ DEHP) とリン酸トリエステル類 6化合物 (Σ TPHP, EHDPPH, Σ TBOEP, Σ TCIPP, uTCEP, BDCIPP) の合計9化合物の複合曝露によるリスク評価を行った。Weighted Quantile Sum (WQS) ²³⁻²⁵⁾ を求め、回帰分析によるOR(95%CI)を求めた。WQSは、個々の化合物の四分位から、quartile (Q) 1=0, Q2=1, Q3=2, Q4=3を充て、その総和をWQS indexとして独立変数とする。このWQS indexがinter quartile range、すなわち25%値から75%値になった時のOR (95%CI)を求める回帰モデルである。1つの回帰式の中で正の関連 (Positive) または負の関連 (Negative) のいずれかしか求めることができず、相反する向きへの影響を同一モデルで検討することができない。そこで、この課題を解決するために正と負の両方向を一つのモデルで検討できるquantile-based g-computation (qg-computation)を用いた²⁶⁾。qg-computationはWQS回帰を発展させたモデルで、WQS同様にWQS indexが四分位動くときのOR (95%CI) 、および9化合物のそれぞれがORにどう寄与しているかを求めることができる。本研究ではWQS、qg-computationの解析ともにブートストラップを200回行い、値の正確性を求めた。最後に、「上位2化合物の組合せモデル」によるリスク評価として、qg-computationで求めた各アウトカムへの寄与が大きい2物質についてそれぞれ66.7%値 (第2三分位値) をカットオフとして高曝露群 (High) と低曝露群 (Low) の2値に分割し、LowとHighを組み合わせた複合曝露変数 (Low \times Low, Low \times High, High \times Low, High \times High) 作成して独立変数とし、Low \times LowをReferenceとしたときのLow \times High, High \times Low, High \times Highそれぞれの喘息・アレルギーへのOR(95%CI)をロジスティック回帰分析で求めた。いずれのモデルにおいても性、年齢、世帯年収、両親のアレルギー既往、およびダンプネス指数で調整した。ダンプネス指数は「結露」、「カビ臭」、「目で見えるカビの生育」、「5年以内の水漏れ」、「浴室のタオルの乾きにくさ」の5項目について、「あり」の場合を1としてその和 (0-5) を求めた^{27,28)}。「上位2化合物の組合せモデル」モデルのP値はBonferroniの補正により、両側P<0.017を有意とした。解析は、ロジスティック回帰分析はSPSS (version 26.0J) 、WQSモデルとqg-computationモデルはR studio (R version 3.6.1)を使用し、それぞれWQS(version 2.0.0) ²³⁾、qgcomp (version1.3.0) ²⁶⁾パッケージを用いた。

3.2. 環境化学物質曝露による喘息・アレルギーおよび炎症マーカーへの影響 (北海道7歳児を対象とした研究)

北海道コーホートは2003年2月～2012年3月に北海道内40産科医療機関を受診した妊婦で、調査への参加を同意した20926人からなる。妊娠13週未満の器官形成期に母の食生活、喫煙、飲酒、カフェイン摂取、社会経済状況などの基本属性・ライフスタイルに関する情報を収集済みである。出生後の児を追跡しており、7歳時にアレルギーに関する質問票および朝一番尿の回収を2011年度より継続している。

3.2.1. 本研究対象者の抽出

北海道スタディへの参加同意が得られた20926名のうち、2018年4月現在データ利用可能であったのは20787名である。脱落 (n=5102) および多胎の第二子以降 (n=172) を除外した15757名のうち、2017年8月時点で7歳に到達しているのは10655名であった。このうち、7歳児調査票の返送があり、かつデータクリーニングが完了しているのが6218名。7歳児調査票のデータおよび児より回収した尿サンプルが揃う者は2541名であった。曝露評価にかかるコストと労力を考慮し、本研究ではケース・コーホートの研究デザインを選択し、先行研究をもとに必要なサンプルサイズを各群100名と推定した。7歳児質問票のISAACの項目から「喘鳴」、「鼻結膜炎」、「湿疹」を各アレルギーのケースと定義した。また、「喘鳴」「鼻結膜炎」「湿疹」について1つ以上の項目について「あり」である場合を「いずれかのアレルギー」と定義した。7歳児調査票と児の尿サンプルが揃う2541名のうち、「喘鳴」「鼻結膜炎」「湿疹」のケースはそれぞれ328名、318名、552名であり、この中から各100名をそれぞれのケースとしてランダムに抽出した。比較対象のコーホートは、炎症マーカーの測定は2541名の約24%となる503名を無作為抽出したサブコーホート、曝露測定においては約10%となる243名を無作為抽出したサブコーホートとした (図1)。

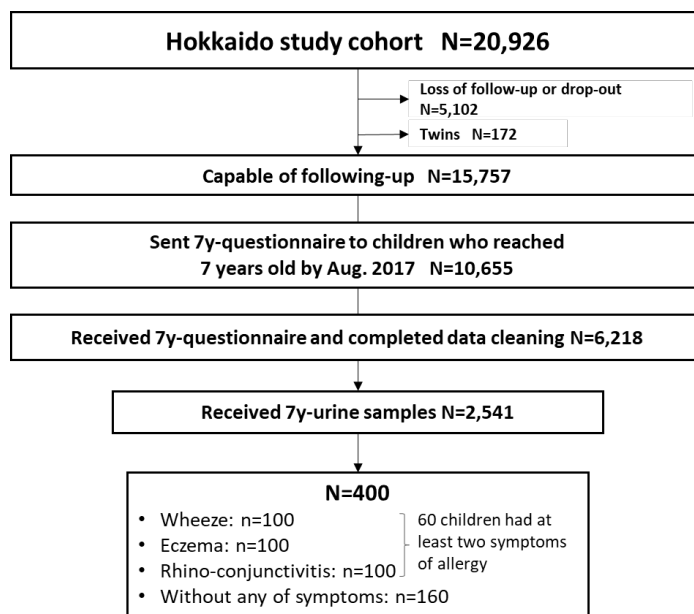


図1 対象者の抽出

3.2.2. 炎症マーカーの測定

近年、炎症の病因を引き起こし、喘鳴における気道の再構築と過剰反応を引き起こす炎症マーカーとして²⁹⁾、DNA損傷のマーカーである8-OHdG、およびオメガ6とオメガ3脂肪酸の脂質過酸化反応のマーカーであるHELとHNEの3種を尿を用いて測定した。8-OHdGはNew 8-OHdG Check ELISAキット（日研ザイル株式会社日本老化制御研究所）を用いて、日研ザイル株式会社で測定した。HEL、HNEはいずれも脂質過酸化の初期段階をとらえることが可能な酸化ストレスマーカーで、HELはリノール酸ヒドロペルオキシドとリジン残基との反応によって生じる新規な脂質-リジン付加体であり、HNEはリジン、ヒスチジン、システイン残基と反応した付加体である。それぞれHexanoyl-Lys adduct: HEL ELISAキット（日研ザイル株式会社日本老化制御研究所）、OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA Kit (Cell Biolabs, Inc.)を用いて、自然免疫応用技研株式会社にて測定した。併せて、尿中クレアチニン値をELISA法で測定した。

3.2.3. 曝露測定

3.2.3.1. 尿中リン酸トリエステル類代謝物14化合物の測定（アントワープ大学との共同）

分析対象化合物は、BCIPP、BCIPHIPP、DNBP、DHPH、4HO-DPHP、4HO-TPHP、3HO-TPHP、TCEP、BDCIPP、BBOEP、BBOEHP、TBOEP-OH、EHPHP、5HO-EHDPHP。尿試料2 mLに混合内標準物質溶液50 µL、リン酸水溶液1.5mLを加えた後、β-グルクロニダーゼ溶液50 µLを加え軽く混合し、インキュベートする（37℃、2h）。インキュベート後の試料液にぎ酸100 µLを加え、混和後メタノール3 mLおよびミリQ 2 mLでコンディショニングしておいたBond Elut C18 (Agilent社)に全量負荷する。試料の入っていたチューブをミリQ 1 mLで洗浄後、ミリQ 1.5 mLで洗浄し、メタノール水溶液3 mLでコレクションプレート内に溶出する。溶出液にミリQ 50 µLを加え軽く混合し、窒素ガスで50 µLまで濃縮後、ミリQ:メタノール (1:1) 溶液100 µLを加え、0.2 µmフィルター付きエッペンチューブ (VWR社)に定容後に遠心分離させた試料全量を測定バイアルに移しLC-MS/MS (Agilent社 1290-6460)、dynamicMRM±switching modeで測定した。分析カラムはKinetex Biphenyl (Phenomenex社100x2.1 mm, 2.6 µm)、移動相は (A) 5 mM酢酸アンモニウム2%メタノール水溶液、(B) 5 mM酢酸アンモニウム98%メタノール水溶液、注入量5 µL。

3.2.3.2 尿中ビスフェノール類濃度の測定

分析対象化合物はBPAF、BPF、BPA、BPB、BPZ、BPS、BPAP。尿試料1 mLに混合内標準物質溶液 20 µL (BPA: 4 ng, BPA以外の化合物: 2 ng)、酢酸ナトリウム(1 M, pH 5) 750 µL、β-グルクロニダーゼ/ア

リルスルファターゼ10 μL を加え混合し、インキュベートする (37°C、1h)。インキュベート後のサンプルを15分超音波処理し、処理後の溶液を予め10 mLメタノールおよび2 mL 超純水で洗浄したOasis WAXカートリッジ(3 mL, 60 mg, Waters, Milford, MA, USA) に全量負荷する。試料の入っていたチューブを1 mLの超純水で2回洗い込み、2 mLの5%メタノール水溶液を加え、吸引式マニホールドでカートリッジを20分間吸引し乾燥させる。乾燥後のカートリッジに2 mLのメタノールで新しいチューブに抽出し、窒素ガスで乾固させる。乾固させた試料に100 μL の誘導化剤(10% BSTFA in toluene)を加え、恒温器に60 °C 1 時間入れ、対象化合物をトリメチルシリル誘導体とする。恒温器から取り出した試料を測定バイアルに全量移しGC-MS/MS (Agilent 7890B, Agilent 7000C triple quadrupole mass spectrometer, Santa Clara, CA, USA)で測定した。分析カラムはAgilent DB-5MS (30 m x 250 μm x 0.25 μm)、注入量1 μL 。

3.2.3.3. 尿中フタル酸エステル類代謝物濃度の測定

分析対象化合物はMiBP、MnBP、MBzP、MEHP、5OH-MEHP、5oxo-MEHP、5cx-MEPP、MiNP、OH-MiNP、cx-MiNP。サンプルは、尿試料500 μL をマイクロピペットで正確に量り取り、ガラスチューブに移した後、混合内標準物質溶液 (MnBP-d4、MiBP-d4、MBzP-d4、MiNP-13C4: 400 ng/mL、5cx-MEPP -13C4、5oxo-MEHP -13C4、5OH-MEHP -13C4、MEHP-d4、cx-MiNP-d4、OH-MiNP-d4: 200 ng/mL) 40 μL を加える。これに100mM酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.5) 500 μL 、 β -グルクロニダーゼ溶液50 μL を加えた後、軽く混合し、インキュベートする (37°C、90 min)。インキュベート後の試料液に100 mM酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) 1 mLを加え、予め1%ギ酸含有90%メタノール1 mL、メタノール1 mL、0.5%アンモニア水1 mLでコンディショニングしておいたOasis MAX 96 well plate (USA, Waters社) に全量負荷する。試料の入っていたチューブを超純水0.5 mLで洗浄後、メタノール0.5 mL、超純水0.5 mL、0.2%ギ酸含有40%メタノール0.5 mLで洗浄し、0.2%ギ酸含有90%メタノール水溶液1.0 mLでコレクションプレート内に溶出する。溶出液をマイクロピペットで250 μL 分取し、超純水750 μL と測定バイアル内で混合したものを測定用試料液とし、UPLC-MS/MS (USA, Waters社) で測定した。

分析カラムはCSH Phenyl Hexyl (2.1×50 mm, 1.7 mm, USA, Waters社) ガードカラムはCSH Phenyl Hexyl (2.1×5 mm, 1.7 mm, USA, Waters社)、移動相は(A) 5 mM酢酸アンモニウム含有水溶液、(B) 5 mM酢酸アンモニウム含有90%メタノール水溶液、注入量40 μL 。

DiNPは、DiNP-1、DiNP-2、DiNP-3の異性体の混合物として製造されている (European Commission, 2003)。これまで我々は、DiNPの一つの異性体の代謝物として、標準品が市販されているMono-(3,5,5-trimethyl-1-hexyl)phthalate、および標準品の合成が可能であったMono methyloctyl phthalate、Mono (4-methyl-7-hydroxyoctyl) phthalate、Mono (4-methyl-7-carboxyheptyl) phthalateのみを定性・定量してきた。しかし、DiNPの数ある異性体の混合物のうち、一つの異性体のモノ体、水酸化体、カルボキシ体代謝物のみを定性・定量することは環境中に存在するDiNPの曝露評価としては過小評価となることが懸念された。欧州のバイオモニタリング (Human Biomonitoring for EU: HBM4EU) では、DiNPを異性体の混合物として各代謝物の曝露評価することを共通のプロトコルとしており、本研究でも同様の定性・定量を行うこととした。そのため、既に測定済みであった検体についても再度定量の見直しを行い、新たな測定値とした。

3.2.4. 統計解析

児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、およびフタル酸エステル類の複合曝露による喘鳴、湿疹との関連は、尿中濃度として検出率が50%以上の化合物について、リン酸トリエステル類6化合物 (Σ TCIPP、 Σ TNBP、 Σ TPHP、BDCIPP、 Σ TBOEP、 Σ EHDHP)、ビスフェノール類3化合物 (BPA、BPS、BPF)、フタル酸エステル類5化合物 (MiBP、MnBP、MBzP、 Σ DEHP、 Σ DiNP) の検討を行った。曝露濃度を児の尿中クレアチニン値で補正した濃度を自然対数に変換後、各代謝物の寄与割合をWQS回帰分析により推定した。次に「上位2化合物の組合せモデル」によるリスク評価として、WQSで求めた各アウトカムへの寄与(weight%)が大きい2物質についてそれぞれ66.7%値 (第2三分位値) をカットオフとし

て高曝露群 (High) と低曝露群 (Low) の2値に分割し、LowとHighを組み合わせた複合曝露変数 (Low × Low, Low × High, High × Low, High × High) 作成して独立変数とし、Low × LowをReferenceとしたときのLow × High, High × Low, High × Highそれぞれの喘息・アレルギーへのOR(95%CI)をロジスティック回帰分析で求めた。いずれのモデルにおいても性別、児のBody Mass Index (BMI)、家庭内喫煙者の有無で調整した。次いで、児のリン酸トリエステル類の単一化合物曝露およびWQSモデルによる喘鳴、鼻結膜炎、湿疹のいずれかのアレルギー、および尿中炎症マーカーとの関連の検討を行った。リン酸トリエステル類濃度および尿中炎症マーカー値を児の尿中クレアチニン値で補正した濃度を自然対数に変換後、リン酸トリエステル類濃度を独立変数、炎症マーカー値を従属変数として、重回帰分析により最小二乗平均値 (LSM) と95%CIを求めた。このモデルにおいて $p < 0.05$ を示したリン酸トリエステル類については、検出率が75%以上のリン酸トリエステル類濃度は四分位に、75%未満のリン酸トリエステル類濃度は未検出、検出の2群としてカテゴリカルモデルでの量反応関係も検討した。いずれかのアレルギーとの関連についてはロジスティック回帰分析によりORと95%CIを求めた。複合曝露によるいずれかのアレルギーおよび尿中炎症マーカーへの影響について、各代謝物の寄与割合をWQS回帰分析により推定した。アレルギーとの関連は、性別、母のアレルギー歴の有無、室内喫煙者の有無、世帯年収300万以上か否かで調整した。炎症マーカー値との関連は、性別、室内喫煙者の有無、BMIで調整した。

3.3. アレルギーに関する対面詳細調査

3.3.1. アレルギーに関する対面詳細調査

これまでアレルギーの評価は、小児領域における世界標準のISAAC調査票を用いて行ってきたが、参加者の保護者による自記式であることが限界である。そこで、北海道コーホート参加者のうち札幌市およびその近郊に在住し、2017年9月から2020年3月までに9-11歳を迎える児1930人を対象として対面での詳細調査を実施した。

本調査では、札幌市内およびその近郊の協力小児科医療機関を1回受診し、ISAACを含む調査票の記入、身長・体重の測定、呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO) の測定、医師の診察、採尿約50 mL、採血約16 mLを実施した。調査実施前には対面にて説明を行い、保護者への説明と同意に加え児へも説明とアセントを取得した。協力を得た医療機関は以下の通りである。

1. すずらん小児科 (札幌市西区: H29年10月開始)
2. めばえこどもクリニック (札幌市北区: H29年10月開始)
3. わたなべ小児科アレルギー科クリニック (札幌市手稲区: H29年11月開始)
4. 円山ため小児科 (札幌市中央区: H29年12月開始)
5. まつぞの小児科医院 (札幌市豊平区: H30年1月開始)
6. 岩見沢こども産科婦人科クリニック (岩見沢市: H30年1月開始、H30年3月末で小児科閉鎖)
7. 山中たつる小児科 (札幌市白石区: H30年5月開始)
8. すえおかこどもクリニック (札幌市清田区: H30年5月開始)
9. なかた小児科 (札幌市白石区: H30年7月開始)
10. 清田小児科医院 (札幌市清田区: H30年7月開始)
11. 椿原こどもクリニック (札幌市厚別区: H30年7月開始)
12. ながの小児科 (札幌市清田区: H31年1月開始)

採取した血液からは、全血から白血球像・白血球数、血清から非特異的および特異的IgE 13項目 (ヤケヒョウヒダニ (ダニ1)、スギ、シラカンバ、カモガヤ、ブタクサ、ヨモギ、ネコ、イヌ、アルテルナリア、卵白、牛乳、小麦、Ara h2 (ピーナッツ由来)) をImmunoCap法で、Club cell protein 16 (CC-16) をELISA法で、ジフテリア、破傷風抗体価をEIA法 (enzyme immunoassay) にて測定した。なお、血漿および残余血清は化学物質など測定のため -80°C で冷凍保存している。採取した尿は比重を測定し、炎症マーカーであるHNE、HEL、8-OhdG、を測定した。残余尿は化学物質など測定のため、分注後 -30°C で

冷凍保存している。

3.3.2. アレルギーに関する対面詳細調査参加時の胎児期曝露評価

胎児期の環境化学物質曝露と児のアレルギーとの関連を検討するため、保存してあった母体血中フタル酸エステル類7代謝物の分析を行った。フタル酸エステル代謝物はMinatoyaら³⁰⁾の方法を用いた。分析法の概要は、妊娠初期の血清500 μ LにMnBP-d4、MiBP-d4、MBzP-d4、MEHP-d4、MEHHP-13C4、MECPP-13C4、およびcx-MiNP-d4を各90 μ Lと1Mリン酸を添加して混合、940 μ Lのアセトニトリルをさらに加えて3500rpmで5分間遠心後上清を別の試験管に採取した。そこに、1000 μ Lのアンモニウム酢酸(100mM, pH 9.1)を、3000 μ Lのアンモニウム酢酸(100mM, pH 6.5)、10 μ Lの β -glucuronidase、100mMのアンモニウム酢酸を加えて37 $^{\circ}$ Cで1.5時間恒温層に入れてディコンジュゲーションを行った。Oasis MAX 96 well plate (30mg, 30 μ m, Waters, Milford, MA, USA)で固相抽出した溶液500 μ Lをバイアルに分取し、500 μ Lの超純水を入れてUPLC (ACQUITY UPLC H-Class, Milford, MA, USA)-MSMS(QTRAP6500, AB SCIEX, Framingham, MA)で分析した。分析カラムは、インラインフィルター(2.1 \times 5mm, 1.7 μ m, Vanguard Phenyl column, Waters, Tokyo, Japan)とBEH フェニルカラム(2.1 \times 50mm, 1.7 μ m, Waters, Tokyo, Japan)、およびリテンションギャップカラムAtlantis T3(2.1 \times 50mm, 3 μ m, Waters, Tokyo, Japan)を用いた。カラム温度は40 $^{\circ}$ C、UPLCサイクルは平衡化も含めて20分間、カリブレーションは0.02~20ng/mLで直線性を確認した($r^2 > 0.999$)。ブランクは0.5mLの超純水を用いて確認した。分析はいで株式会社環境創造研究所で実施した。

4. 結果及び考察

4.1. 研究開発目的の達成状況

2017年から2019年の3年間で、学童期(7歳児)への調査を対象に、喘息、アレルギーに関する質問紙を想定3250人のところ3107人に送付、2212人から調査票を回収し(回収率約71.2%)、当初の目的をほぼ達成した。曝露評価に用いる児の尿を、想定970人のところ、冷蔵輸送にて1042人から収集し、目的を達成した。学童期の環境化学物質濃度として、計画通り400検体の、フタル酸エステル類10代謝物、リン酸トリエステル類14代謝物、ビスフェノール類7物質をそれぞれ測定し、目的を達成した。この結果、環境化学物質の曝露実態と経年変化について明らかにし、また環境化学物質の複合曝露も含めた児の喘息・アレルギーへの影響を解明し、目的を達成した。加えて、採取した尿を用いてアレルギーに関連する3種類の炎症マーカー(8-OHdG、HEL、HNE)を測定し、リン酸トリエステル類代謝物の複合曝露も含めた検討を行った。これらの結果は「4.3. 環境化学物質曝露による喘息・アレルギーおよび炎症マーカーへの影響(北海道7歳児を対象とした研究)」に詳細を記す。札幌市および近郊に居住する9-11歳の学童を対象に医療機関にて対面で実施する詳細調査は、430人を想定していたところ428人に調査を実施し、当初の目的を達成した。調査票に加えて呼気中一酸化窒素濃度、採血・採尿を行い、総IgE/特異的IgE、予防接種抗体価を測定した。一方、収集した尿及び血中有機フッ素化合物濃度を測定については、詳細調査での検体収集に丸3年間に要し、分析を行う時間を確保できず達成できなかった。採取した検体を用いた曝露評価は研究期間外になるが、継続する。7歳および9-11歳のアレルギー症状の経緯については、喘鳴と湿疹は減少したが、鼻結膜炎は増加する傾向を明らかにした。これらの結果は、「3.3. アレルギーに関する対面詳細調査」に詳細を記す。成果として、英文査読付きの科学論文5報を発表した。

4.2. フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類の複合曝露と喘息・アレルギーとの予備的検討(札幌市小学生を対象とした研究)

対象者の属性を表2に示す。学童128人のうち、喘鳴、鼻結膜炎、および湿疹の有病人数(%)はそれぞれ、29人(22.7%)、47人(36.7%)、36人(28.1%)、72人(56.3%)だった。

表2 対象者の特徴

		n	%
性	男児	68	53.1
	女児	60	46.9
年齢	2年生	14	10.9
	3年生	35	27.3
	4年生	27	21.1
	5年生	24	18.8
	6年生	28	21.9
両親のアレルギー既往	なし	29	22.7
	あり	99	77.3
世帯年収	<300万円	6	4.7
	3-500万円	25	19.5
	5-800万円	50	39.1
	>800万円	28	21.9
	欠損	19	14.8
ダンプネス指数	平均±標準偏差	2.10±1.25	

フタル酸エステル類およびリン酸トリエステル類代謝物濃度分布を表3に示す（上段は代謝物の和（nM）、下段は標準化クレアチニン値補正濃度（nmol/g標準化Cr.）。曝露レベルはΣDEHPが最も高く中央値442 nM、次いでΣDBP 236 nMだった。リン酸トリエステル類濃度はフタル酸エステル類と比較して最も高いΣTPHPでもDEHPの200分の1以下と低く、最も高いΣTPHPが2.13 nM、ΣTBOEPが1.88 nMだった。

表3 フタル酸エステル類およびリン酸トリエステル類代謝物の濃度分布

親化合物	代謝物 (nM)	n	>LOD (%)	Min	0.25	0.50	0.75	Max
DBP	Σ2DBP	128	96.7	<LOD	98.42	236.19	759.26	31500
BBzP	MBzP	128	78.1	<LOD	31.23	71.29	140.14	7140
DEHP	Σ3DEHP	127	100.0	82.29	264.99	441.67	631.34	29100
EHDPPH	5HO-EHDPPH	113	80.0	<LOD	0.05	0.11	0.24	3.05
TDCIPP	BDCIPP	128	55.3	<LOD	<LOD	0.20	0.29	10.2
TNBC	DNBC	113	8.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3.69
TECP	uTCEP	113	85.2	<LOD	0.10	0.19	0.36	1.13
TBOEP	Σ3TBOEP	128	99.2	<LOD	1.08	1.88	4.29	15.1
TCIPP	Σ2TCIPP	128	95.3	<LOD	0.62	0.95	2.29	42.0
TPHP	Σ2TPHP	128	83.6	<LOD	1.41	2.13	3.65	23.4
尿中クレアチニン (μg/mL)		128	100	69.9	802	1010	1430	2750
標準化クレアチニン補正濃度 (nmol/g標準化Cr.)								
	Σ2DBP			11.0	78.0	184	537	34700
	MBzP			3.68	23.5	52.8	106	2620
	Σ3DEHP			58.5	179	330	512	20300
	5HO-EHDPPH			0.01	0.05	0.08	0.16	4.72
	BDCIPP			0.03	0.08	0.13	0.26	6.83
	uTCEP			0.02	0.08	0.15	0.27	2.39
	Σ3TBOEP			0.14	0.77	1.63	3.40	15.2
	Σ2TCIPP			0.10	0.48	0.77	1.82	37.9
	Σ2TPHP			0.59	1.28	1.69	2.78	27.4

各フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類の単一化合物曝露とアレルギーとの関連を表4に示す。鼻結膜炎はBDCIPPの第2三分位と第3三分位のOR(95%CI)がそれぞれ2.95(1.04-8.37)、2.93(1.04-8.28)でP-for trendも0.045で統計学的に有意だった。ΣTCIPPは第3三分位のORが4.13(1.59-12.90)で、P-for trendが0.004と統計学的に有意だった。そのほかの化合物とアレルギーとの関連は認められ

なかった。

表4 フタル酸エステル類およびリン酸トリエステル類とアレルギーとの関連（単一化合物曝露）

	1st		2nd		3rd		trend						
	n	OR	n	OR	95%CI	P-value		n	OR	95%CI	P-value	P-value	
喘鳴													
ΣDBP	43	ref	43	0.83	0.29	2.37	0.724	42	0.48	0.15	1.54	0.217	0.223
MBzP	43	ref	43	0.29	0.08	1.10	0.069	42	1.20	0.41	3.48	0.737	0.703
ΣDEHP	43	ref	43	0.83	0.26	2.59	0.745	42	0.75	0.23	2.37	0.620	0.623
5-HO-EHDPHP	38	ref	38	2.43	0.70	8.43	0.162	37	3.21	0.86	11.89	0.082	0.082
BDCIPP	45	ref	48	1.21	0.40	3.69	0.731	35	1.25	0.39	4.03	0.712	0.706
uTCEP	38	ref	38	1.95	0.59	6.40	0.273	37	1.61	0.46	5.61	0.457	0.434
ΣTBOEP	43	ref	43	0.89	0.28	2.81	0.846	42	1.33	0.43	4.13	0.627	0.630
ΣTCIPP	43	ref	43	0.88	0.30	2.58	0.816	42	0.56	0.18	1.78	0.327	0.332
ΣTPHP	43	ref	43	1.02	0.33	3.20	0.972	42	1.64	0.53	5.05	0.392	0.395
鼻結膜炎													
ΣDBP	43	ref	43	1.39	0.53	3.61	0.502	42	0.84	0.32	2.24	0.731	0.733
MBzP	43	ref	43	1.18	0.45	3.12	0.736	42	0.88	0.33	2.36	0.799	0.787
ΣDEHP	43	ref	43	1.64	0.61	4.39	0.328	42	1.09	0.40	2.99	0.864	0.870
5-HO-EHDPHP	38	ref	38	0.59	0.21	1.64	0.310	37	1.06	0.39	2.91	0.910	0.951
BDCIPP	45	ref	48	2.95	1.04	8.37	0.042	35	2.93	1.04	8.28	0.043	0.045
uTCEP	38	ref	38	0.50	0.18	1.41	0.189	37	1.37	0.48	3.88	0.558	0.642
ΣTBOEP	43	ref	43	1.69	0.63	4.58	0.299	42	2.11	0.75	5.91	0.157	0.160
ΣTCIPP	43	ref	43	1.31	0.46	3.73	0.614	42	4.53	1.59	12.90	0.005	0.004
ΣTPHP	43	ref	43	1.67	0.60	4.63	0.322	42	2.67	0.97	7.36	0.057	0.056
湿疹													
ΣDBP	43	ref	43	1.09	0.39	3.06	0.875	42	0.69	0.24	2.02	0.501	0.506
MBzP	43	ref	43	0.38	0.12	1.16	0.088	42	0.83	0.29	2.36	0.726	0.741
ΣDEHP	43	ref	43	4.91	1.47	16.48	0.010	42	2.92	0.82	10.37	0.098	0.131
5-HO-EHDPHP	38	ref	38	1.58	0.49	5.08	0.446	37	2.59	0.79	8.46	0.116	0.115
BDCIPP	45	ref	48	1.29	0.43	3.82	0.652	35	1.96	0.66	5.84	0.225	0.223
uTCEP	38	ref	38	0.63	0.21	1.92	0.417	37	0.79	0.25	2.47	0.681	0.642
ΣTBOEP	43	ref	43	0.70	0.22	2.19	0.538	42	1.85	0.63	5.42	0.260	0.220
ΣTCIPP	43	ref	43	0.90	0.30	2.66	0.847	42	1.03	0.36	2.96	0.954	0.942
ΣTPHP	43	ref	43	1.02	0.35	2.92	0.973	42	1.11	0.38	3.25	0.846	0.845

OR (95% CI)はロジスティック回帰分析

個々の化合物は個別にモデルに投入し、性、年齢、年収、ダンプネス指数で調整。

p<0.05は太字

次いで、フタル酸エステル類3化合物とリン酸トリエステル類6化合物の複合曝露によるアレルギーとの関連を表5に、またqq-computationによる喘鳴、鼻結膜炎、湿疹への各化合物の寄与を図2に示す。表5の上段はWQS回帰による複合曝露とアレルギーとの正（リスクを上げる）または負（リスクを下げる）の方向の関連を示している。WQS indexが25%値から75%値になった時の正の方向のモデルで鼻結膜炎のOR(95%CI)は2.60(1.38-5.14)で統計学的に有意だった。湿疹についても1.91(0.99-3.85)であったが統計学的には有意ではなかった。正と負の両方を同時に考慮するqq-computationモデルでは鼻結膜炎のOR(95%CI)は1.29(0.49-3.40)と正の方向だったが統計学的有意差は認められなかった。図2に見られるように、qq-computationによる鼻結膜炎のリスク上昇に最も寄与している化合物はΣTCIPP次いでΣTPHPだった。湿疹と喘鳴は5OH-EHDPHPとBDCIPPの正方向への寄与が大きかった。BDCIPPとΣTBOEPは、喘鳴、鼻結膜炎、湿疹のリスクをいずれも上げる方向に寄与していたが、ΣDBP、ΣDEHPはいずれもリスクを下げる方向に寄与していた（図2）

表5 フタル酸エステル類およびリン酸トリエステル類とアレルギーとの関連（複合曝露）

	OR	95%CI	p-value		
Weighted quantile sum 回帰モデル					
正の方向のモデル					
喘鳴	1.52	0.67 3.50	0.315		
鼻結膜炎	2.60	1.38 5.14	0.004		
湿疹	1.91	0.99 3.85	0.060		
負の方向のモデル					
喘鳴	0.96	0.83 1.79	0.109		
鼻結膜炎	0.58	0.29 1.12	0.110		
湿疹	0.54	0.24 1.18	0.131		
Quantile g-computation モデル					
	OR	95%CI	p-value	正の推定値の和	負の推定値の和
喘鳴	0.95	0.33 2.70	0.918	1.23	-1.28
鼻結膜炎	1.29	0.49 3.40	0.612	1.76	-1.51
湿疹	1.00	0.37 2.72	0.996	0.77	-0.78

性、年齢、年収、ダンプネス指数で調整。

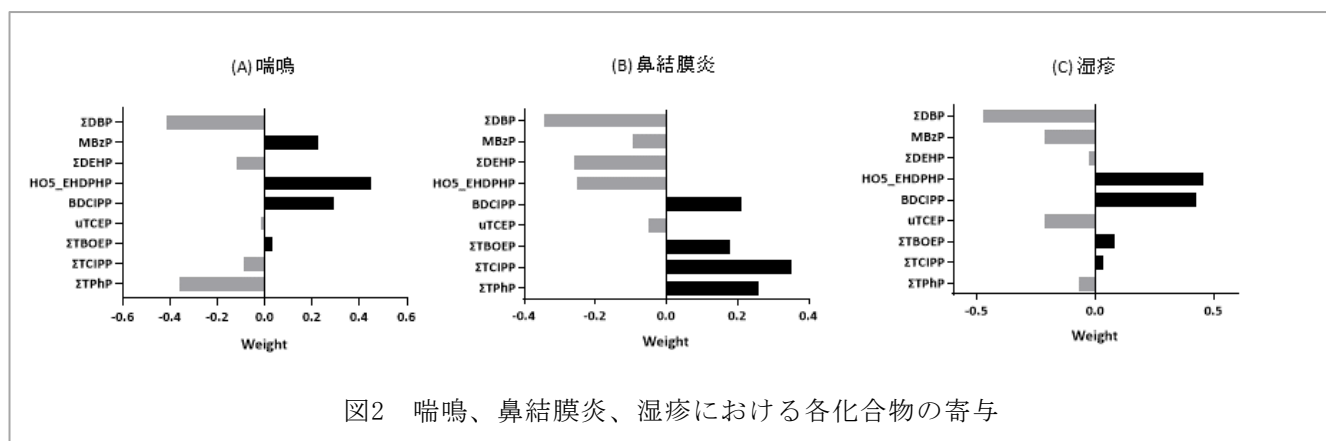


図2 喘鳴、鼻結膜炎、湿疹における各化合物の寄与

WQSモデルによる関連が示唆された鼻結膜炎について、qg-computationで最も寄与の大きかった Σ TCIPPと Σ TPhPの組み合わせによるモデルと鼻結膜炎との関連を検討した結果を表6、およびそれを図式化したものを図3に示す。 Σ TCIPPと Σ TPhPのどちらも低濃度曝露の組合せと比較して、どちらも高濃度曝露の組合せの場合は鼻結膜炎になるOR(95%CI)は7.14(2.11-24.15)で統計学的に有意差を認めた。

表6 フタル酸エステル類およびリン酸トリエステル類と鼻結膜炎との関連（複合曝露モデル）

	Low × Low Ref		Low × High			High × Low			High × High				
	n	n	OR	95%CI		n	OR	95%CI		n	OR	95%CI	
ΣTCIPP と ΣTPHP	19/63	6/23	0.97	0.29	3.19	9/23	2.32	0.75	7.13	13/19	7.14	2.11	24.15

性別、学年、世帯年収、ダンプネス指数で調整、太字は $p < 0.05$ (Bonferroni adjustment)

n=number case/total

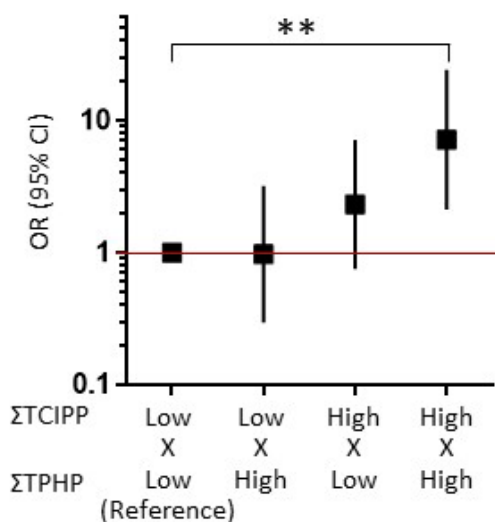


図3 ΣTCIPPとΣTPHPの複合曝露と鼻結膜炎との関連

TCIPPとΣTPHPを3分位にし、第1,2三分位をLow、第3三分位をHighとし、Low×Lowをリファレンスとしたときの鼻結膜炎のOR(95%CI)をロジスティック回帰分析で計算。第2三分位のカットオフ値：

ΣTCIPP, ≥ 1.30 nM/g Standardised-Cr.; ΣTPHP, ≥ 2.29 nM/g Standardised-Cr.。

ORを■、95%CIをバーで示す。** $P < 0.01$ 。性別、学年、世帯年収、ダンプネス指数で調整

本研究では各化合物を個別に検討した単一化合物モデルでは、アレルギーとの関連が認められたのはBDCIPPとΣTCIPPと鼻結膜炎であった。混合モデルではフタル酸エステル類とリン酸トリエステル類曝露によって鼻結膜炎のリスクが上がり、また寄与割合の大きいΣTCIPPとΣTPHPの組み合わせではどちらも高濃度曝露群の場合にどちらも低濃度曝露群と比べて有意にリスクの上昇が認められた。

フタル酸エステル類曝露と喘鳴あるいは喘息との関連についてはいくつかの報告がある。ハウスダスト中濃度を曝露指標として、横断研究でブルガリア、デンマーク、スウェーデンではDEHP濃度が高いことが、またスウェーデンではBBzP濃度が高いことが喘鳴、鼻炎、アトピー性皮膚炎のリスクをあげた。一方、ハウスダストは必ずしも個人の曝露量を反映しないことから近年は尿中代謝物を曝露指標としている報告が増加している。横断研究で、米国、ノルウェー、台湾の研究ではDEP、BBzP、DnOP、DiDP、DEHPが喘鳴のリスクをあげた³¹⁻³³。我々は、本研究と同じ集団でハウスダスト中フタル酸エステル類濃度を測定し、ダスト中DEHP濃度が高いことが鼻結膜炎のリスクをあげたが、尿中代謝物濃度を曝露指標としたときにはアレルギーとの関連がみられなかったことを報告している⁵。しかし、MBzP曝露が高く、かつ5HO-EHDPHP濃度が高い複合曝露ではリスクがあがる可能性が示唆され、今後も注意深く検討する必要があるといえる。

一方、代謝物濃度そのものはリン酸トリエステル類の方がフタル酸エステル類よりも低かったが、本結果からはフタル酸エステル類よりもリン酸トリエステル類の方がアレルギーへの寄与が大きかった。リン酸トリエステル類とアレルギーとの関連を検討した報告は、我々が過去に日本全国の182件の

戸建て住宅で実施した研究では⁷⁾、ダスト中のTDCIPPおよびTCIPP濃度が高いことがアトピー性皮膚炎の、TNBP濃度が高いことが喘息のリスクをあげた。本研究では尿中代謝物に加えてダスト中濃度も測定しており、ダスト中TDCIPP濃度が高いと湿疹のリスクが上がり、単一化合物で Σ TCIPPは鼻結膜炎のリスクを、TBOEP代謝物は湿疹のリスクを上げるあることを報告した³⁴⁾。人々は生活する中で複数の化合物に同時に曝露しているが、これまでに複数の化合物の混合モデルを検討した報告はない。多くの化合物は互いに相関しているが、相関性の高い変数を一つのモデルに投入するとモデルの適合性が低くなるため、同一のロジスティック回帰モデルの変数として複数の化合物を用いることは好ましくない。そこで、本研究では、比較的新しいモデルであるWQSと qg -computation、および二つの化合物の曝露レベルの組み合わせによるモデルを用いることで、この課題を解決した。単一化合物で鼻結膜炎と関連を示した Σ TCIPPはWQSモデルでも最も寄与割合が大きい化合物であった。単一化合物モデルでの Σ TCIPPと Σ TPHPの第3三分位のORはそれぞれ4.53と2.67だった。これに対して、 Σ TCIPPと Σ TPHPの両方が第3三分位の時は両方が第1と2三分位に対してORが7.14だった。したがって、 Σ TCIPPと Σ TPHPの両方に曝露することは一方のみよりもリスクが上がると考えられるが、その作用が相加的、あるいは相乗的かを結論付けるのは難しい。また、図2から、今回検討した9化合物のアレルギーへの寄与はリスクを上げる方向に働くのみならずリスクを下げる方向に寄与している化合物もある。このように相反する方向で関係する化合物を同一モデルに含めるとそれら化合物が互いの関連を打ち消しあい、結果として統計モデルとしては複合曝露によるリスクには関連が認められなくなる。今回WQSや qg -computationといった相関の高い化合物を一つの統計モデルとして検討する手法を用いたが、あくまでも統計モデルとしての結果に過ぎない点にも注意する必要がある。

フタル酸エステル類あるいはリン酸トリエステル類がアレルギー症状を引き起こすメカニズムに関する知見は限られている。フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類ともに、アレルギーへの関与には、免疫系への作用あるいは炎症の誘発など複数の経路が考えられる³⁵⁾。フタル酸エステル類については、DEHPが動物実験および細胞実験でアレルギーに関与する分子の産生を促進し、炎症性サイトカインであるIL-5、IL-6、およびTNF- α へのアジュバント作用が報告されている。^{36,37)} DEHPとBBzPはTNF- α とIFN- β の産生を抑制し、T-cellの刺激と応答に作用することが報告されている³⁸⁾。一方、リン酸トリエステル類に関する知見は少ないが、*in vitro*研究ではTDCIPP、TPHPあるいはTBOEPが免疫毒性を持つ、あるいは免疫応答をかく乱して酸化ストレスを発生させることが報告されている³⁹⁻⁴¹⁾。TCIPPとTCEPは炎症抑制のカスケードに作用することが報告されている⁴²⁾。ゼブラフィッシュを用いた研究では、TDCIPPがperoxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α)、エストロゲン、およびグルココルチコイド受容体の発現に関与する遺伝子ネットワークのmRNAを促進させることを報告した⁴³⁾。フタル酸エステル類もまたPPAR- α を活性化させて酸化ストレス8-OHdG値を上げることが報告されていることから⁴⁴⁾、フタル酸エステル類とリン酸トリエステル類は類似したメカニズムを有するかもしれない。本報告書4.2で詳しく示すとおり、リン酸トリエステル類の混合が酸化ストレスマーカーであるHELと4-hydroxynonenal(HNE)と相関することを示した⁴⁵⁾。同様に、フタル酸エステル類についても横断研究で子どもの尿中8-hydroxy-2'-deoxyguanosineとmalondialdehydeと正の相関を示すことが報告され^{46,47)}、フタル酸エステル類とリン酸トリエステル類は類似の作用を持つことが示唆される。また、*in vitro*の研究でTPHPの代謝物がエストロゲン受容体 α と β の拮抗作用があることが報告され⁴⁸⁾、さらに同じ親化合物でもその代謝物によって、例えばTPHPとOH-DPHPではアゴニストあるいはアンタゴニストといった異なる作用を持つ可能性が示された⁴⁸⁾。一方、フタル酸エステル類、リン酸トリエステル類とも体内で速やかに代謝される^{49,50)}。さらに、塩素を含むリン酸トリエステル類の半減期はアリルまたはアルキル基を持つリン酸トリエステル類の半減期よりも長いことから、⁵¹⁾、その生体内での作用も複雑であると考えられる。結果として、個々の化合物または代謝物における生理作用も非常に複雑であると考えられる。

本研究の限界としては横断研究であり、因果関係は明らかにできない。さらに統計学的に有意な結果が得られていても95%CIが広く、サンプル数が少ないことが限界である。複合曝露は統計モデルであり、実際のばく露レベルや毒性の大きさを考慮していない点にも注意が必要である。今後、北海道コー

ホート7歳児の曝露評価を行い、アレルギーとの関連を検討することでサンプルサイズを拡大する。

(以上の結果は、Araki et al., Environ Int, 119, 438-446, 2018; Bastiaensen et al., Environ Res, 172, 543-551, 2019; Araki et al., Environ Res, 183, 109212, 2020 として論文発表済み)

4.3. 環境化学物質曝露による喘息・アレルギーおよび炎症マーカーへの影響 (北海道7歳児を対象とした研究)

4.3.1. 児のアレルギーと尿中炎症マーカーとの関連

尿中炎症マーカーを測定した児のうち外れ値を除き458人について解析した。このうち、喘鳴、鼻結膜炎、および湿疹のケースはそれぞれ110人、106人、127人だった。256人は、いずれのアレルギーもなかった。測定した3つの炎症マーカーはすべての児の尿から検出され、その中央値 (Interquartile range) は8-OHdGは10.3 (7.5-13.2) ng/mL、HEL 119 (77.2-179.4) nmol/L、HNE 52.8 (27.4-113.0) µg/mLだった。尿中クレアチニン値は、100.6 (72.9-132.7) µg/dLだった。Mann-Whitney U検定による炎症マーカーの濃度比較においては、8-OHdG値は鼻結膜炎の児でアレルギーの無い児よりも有意に低く ($p = 0.043$)、またいずれかのアレルギーのある児でアレルギーの無い児よりも有意に低かった ($p = 0.014$)。しかし、尿中クレアチニン値で調整後、アレルギーの有無と8-OHdGに有意な関連は認められなかった。また、HELについては、喘鳴のある児でアレルギーの無い児よりも高い傾向が見られたが、統計学的有意差には至らなかった ($p=0.146$)。HNEといずれのアレルギーにおいても有意な関連は認められなかった。さらに、児のBMIで調整した場合においても、いずれのアレルギーと尿中炎症マーカーとの間に有意な関連は認められなかった。

本研究では、ISAAC調査票に加えて尿中炎症マーカーを測定した。一般的に、尿の収集は非侵襲性であり、加えて本研究で測定したバイオマーカーは比較的安定性が高くまた変動が少ない^{52, 53})。一方、喘息との臨床的な関連は未だ明らかになっていない。本研究では、世界的にも初めて、児のISAACによるアレルギーと炎症マーカーであるHEL、HNEとの関連を検討したが、明確な関連は得られなかった。その理由としては、ISAACによる喘鳴・アレルギーは過去1年の症状を定義しており、尿の収集時の状況とは誤分類を起こしていることが考えられる。一方、炎症マーカーは喘鳴やアレルギー症状には至っていない、より初期の状態を反映している可能性がある。今後児を追跡していくことで、将来の喘息やアレルギーとの関連がみられるか、検討が必要であると考ええる。

4.3.2. 児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類の曝露実態

4.3.2.1. リン酸トリエステル類の曝露実態

尿中リン酸トリエステル類代謝物の濃度分布を表7に示す。もっとも検出率が高かったのはBBOEHP、次いでBCIPHCPP、DPHP、EHPHPが90%以上の尿サンプルから検出された。BCIPP、DNBP、4HO-DPHP、4HO-TPHP、3HO-TPHP、TBOEP-OHは50%以下の検出率であった。

表7 リン酸トリエステル類代謝物の濃度分布 (ng/mL)

リン酸トリエステル類 親化合物	代謝物	LOQ	>LOQ(%)	25 th	Median	75th	Max
<i>TCIPP</i>	BCIPP	1.00	0	<LOQ	<LOQ	<LOQ.	1.81
	BCIPHIPP	0.04	99	0.18	0.38	0.95	14.67
<i>TNBP</i>	DNBP	0.15	12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4.34
<i>TPHP</i>	DPHP	0.10	97	0.28	0.46	0.73	12.94
	4HO-DPHP	0.50	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.44
	4HO-TPHP	0.01	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ.	0.07
	3HO-TPHP	0.01	2	<LOQ	<LOQ	<LOQ.	0.25
<i>TDCIPP</i>	BDCIPP	0.05	74	<LOQ	0.13	0.28	22.73
<i>TBOEP</i>	BBOEP	0.05	62	<LOQ	0.11	0.27	4.69
	BBOEHEP	0.01	99	0.09	0.22	0.55	8.14
	3HO-TBOEP	0.01	8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.11
<i>EHDPPH</i>	EHPHP	0.05	93	0.18	0.31	0.58	4.84
	5HO-EHDPPH	0.01	53	<LOQ	0.01	0.02	1.51

LOQ: limit of quantification

EHPHPはEHDPPHの代謝物の大部分を占める代謝物であり、もう1つのEHDPPH代謝物である5-HO-EHDPPH、およびEHDPPHとTPHPの共通代謝物であるDPHPと強い正の相関があることが報告されている⁵⁴⁾。TBOEP代謝物のBBOEHEP濃度はオーストラリアの児より約2.5倍高かった⁵⁵⁾。北海道スタディの7歳児の集団のリン酸トリエステル類の曝露濃度は、先の報告で述べた札幌市の小学生を対象集団としたリン酸トリエステル類曝露濃度⁵⁶⁾とほぼ同程度であった。また、TBOEPは床の表面仕上げ材や光沢剤、ワックス、プラスチックの可塑剤として使用されており⁵⁷⁾、ハウスダスト中から高頻度かつ高濃度で検出され、諸外国のハウスダスト中TBOEP濃度と比較して高かったことを我々の過去の研究で報告している^{56, 58)}。尿中代謝物の結果とハウスダスト中濃度の結果は一致しており、このことから我が国のTBOEPの曝露量は諸外国と比較して高めであることが示唆された。加えて、本研究のDPHP、BDCIPP、BCIPHIPP濃度はヨーロッパや中国の児の曝露濃度と同程度である一方、アメリカのNational Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)の2013-2014年と比較して低かった。⁵⁹⁻⁶⁴⁾。また、本研究では尿検体と同時にハウスダストを収集しており、フタル酸エステル類およびリン酸トリエステル類ともダスト中濃度と尿中代謝物濃度に相関が認められた^{5, 65)}。従って、ダスト中濃度が高いDEHPやTBOEPは尿中代謝物濃度も高く、これらの曝露源はハウスダストと考えられる。

児の尿中リン酸トリエステル類代謝物濃度の2012-2017年の年次推移を図4に示す。EHPHP濃度は2012-2013年と比較して2016-2017年で有意に高かった。さらに、BDCIPP濃度とEHPHP濃度は2012年から2017年の間でそれぞれ13.3%/年および6.7%/年の上昇していることが認められた⁶⁶⁾。

(これらの結果は、Bastiaensen et al., Int J Hyg Environ Health, 228, 113523, 2020 にて論文発表済み)

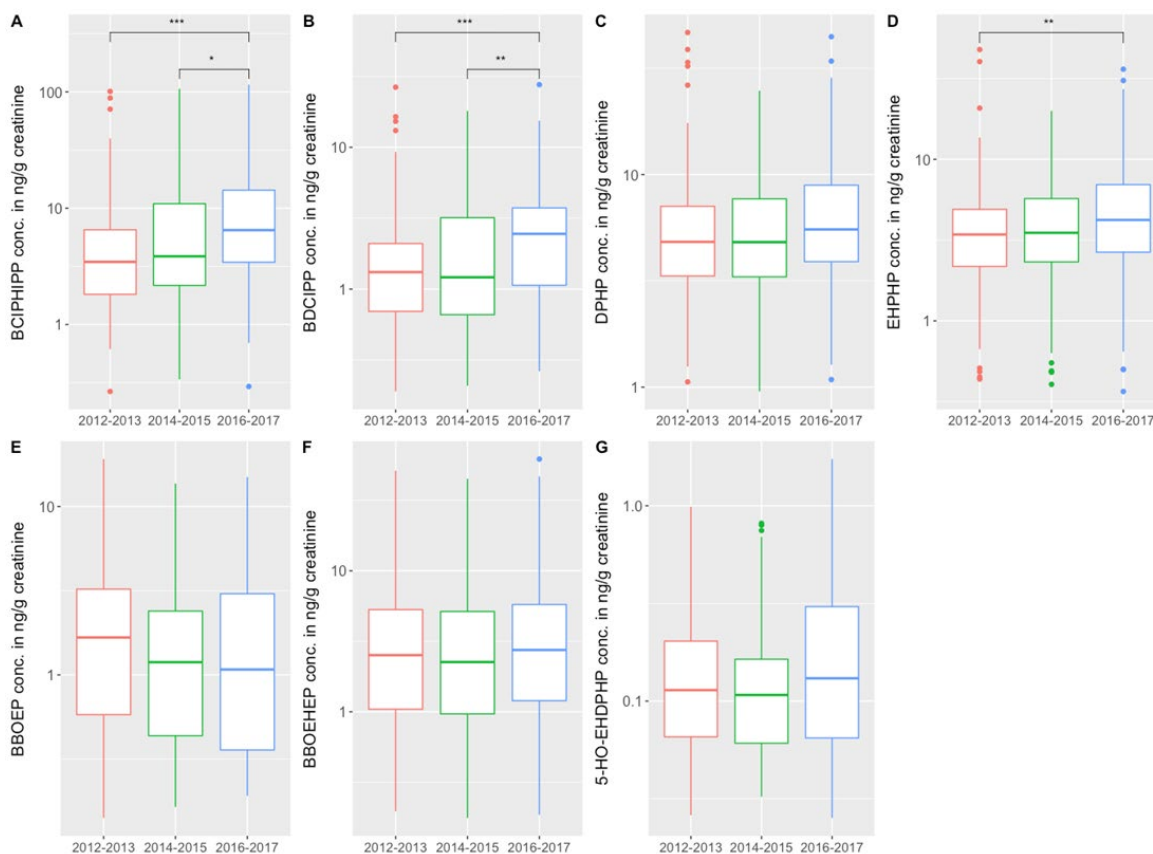


図4 児の尿中Pリン酸トリエステル類代謝物濃度の2012-2017年の年次推移

(A) BCIPHIPP, (B) BDCIPP, (C) DPHP, (D) EHPHP, (E) BBOEP, (F) BBOEHP, (G) 5-HO-EHDPHP
尿中代謝物濃度は児のクレアチニン値で補正、Bonferroni補正後のp値

*:p<0.05; **:p<0.01; ***: p<0.001

Reprinted from Temporal trends and determinants of PFR exposure in the Hokkaido Study, 228, 113523, Bastiaensen et al., Copyright (2020), with permission from Elsevier License Number 4837990155467.

4.3.2.2. ビスフェノール類の曝露実態

尿中ビスフェノール類の濃度分布を表8に示す。もっとも検出率が高かったのはBPAで90%の児から検出された。BPF, BPSがおおよそ80%の児の尿より検出された。その他の対象化合物BPAF, BPB, BPB, BPZ, BPAPはいずれも50%以下の検出率であった。

BPA以外のビスフェノール類 (BPFやBPS) について、子どもを対象に測定した報告は殆どないが、アメリカの3-6歳児⁶³⁾および6-11歳児⁶⁷⁾を対象に測定した中央値濃度と比較すると、BPAおよびBPS濃度ともに本研究対象者の曝露濃度は低かった。日本におけるBPAの缶や感熱紙などの製品への使用は1990年代より減少し、代替物質への移行が進んでいる⁶⁸⁾と報告されている。アメリカ、日本、韓国、中国、ベトナム、他アジア諸国で2-82歳の集団で尿中ビスフェノール類を比較した研究でも、日本人の尿中BPS濃度はアメリカやその他のアジア諸国より高濃度であったと報告されている⁶⁹⁾。しかし、本研究はこれとは異なった結果であった。本研究は北海道に居住する7歳児であるのに対し、Liaoらの研究における日本人の対象集団は松山市および熊本市の成人であり、対象集団の居住地や年齢が曝露濃度に影響している可能性が考えられる。しかし、日本人を対象に尿中ビスフェノール類濃度を測定した報告は殆どなく、今後もエコチル調査などでも毛曝露実態を明らかにする必要があることが示唆された。

表 8 児の尿中ビスフェノール類濃度 (pg/mL)

	LOQ	> LOQ (%)	Min	25th	50th	75th	Max
BPAF	20	19.4	>LOQ	>LOQ	>LOQ	>LOQ	93
BPF	20	83.3	>LOQ	31	66	166	95888
BPA	300	90.2	>LOQ	523	893	1678	19439
BPB	20	30.6	>LOQ	>LOQ	>LOQ	23	209
BPZ	40	13.9	>LOQ	>LOQ	>LOQ	>LOQ	911
BPS	40	79.3	>LOQ	46	106	242	21420
BPAP	40	23.0	>LOQ	>LOQ	>LOQ	>LOQ	471

4.3.2.3. フタル酸エステル類の曝露実態

尿中フタル酸エステル類代謝物の濃度分布を表9に示す。DEHP代謝物のMEHP, 5oxo-MEHP, 5OH-MEHP, 5cx-MEPPおよびDiNP代謝物のOH-MiNPは全ての児から検出された。その他の代謝物についても95%の児より検出された。最も中央値濃度が高かったのは5cx-MEPPで次いでMnBPであった。一方、最も中央値濃度が低かったのはMiNPついてMBzPであった。

子どもの尿中フタル酸エステル類代謝物濃度を測定した諸外国の結果と比較すると、本研究の学童のフタル酸エステル類の尿中代謝物濃度は、MEHP、5OH-MEHPは諸外国よりは少し高め、5cx-MEPPは同程度だった⁷⁰⁾。本研究対象者の尿中MBzP濃度は他の報告値よりも低い傾向が見られた。我々は過去の研究でハウスダスト中BBzP濃度が諸外国よりも低いことを報告しており⁶⁾、北海道もしくは日本の室内環境中BBzP濃度は欧米など諸外国の環境中濃度より低いことが示唆された。

表 9 児の尿中フタル酸エステル類代謝物濃度 (ng/mL)

	LOD	>LOD (%)	Min	25th	Median	75th	Max
MiBP	0.96	99.7	<LOD	7.0	12.1	27.4	463
MnBP	0.79	100	2.6	20.6	35.1	58.8	1259
MBzP	0.10	99.0	<LOD	0.7	1.5	3.5	498
MEHP	0.15	100	0.5	2.4	4.1	7.0	32
5oxo-MEHP	0.06	100	1.3	12.3	20.5	33.2	159
5OH-MEHP	0.15	100	1.8	16.5	26.8	43.8	219
5cx-MEPP	0.12	100	2.4	23.3	38.5	67.0	323
MiNP	0.10	96.9	<LOD	0.4	0.7	1.2	8
OH-MiNP	0.05	100	0.3	2.3	4.1	7.5	60
cx-MiNP	0.11	99.7	<LOD	1.4	2.5	4.7	35

LOD: limit of detection.

DiNPの尿中代謝物、MiNP、OH-MiNP、cx-MiNPの1つの異性体のみでの定量法か、異性体を含めた定量法か、定量方法の違いによる濃度の結果を表10に示す。標準品とその内標準物質 (MiNP、7cx-MMePPと7OH-MMeOP) のクロマトグラムのピークのみを定量していたMiNP、OH-MiNP、cx-MiNPのそれぞれの検出率 (中央値濃度) は18.1% (0.1ng/mL), 33.6% (0.1ng/mL), 75.8% (1.6ng/mL)であったのに対し、異性体を含む定量方法では、それぞれ96.9% (0.7ng/mL), 100% (4.1ng/mL), 99.7% (2.5ng/mL)と検出率、中央値濃度ともに増加した。

表 10 MiNP, OH-MiNP, cx-MiNP の定量方法と濃度(ng/mL)

	LOD	> LOD (%)	25th%	Median	75th%	Max
異性体を含まない (n=180)						
MiNP	0.09	18.1	<LOD	0.1	1.6	8.7
OH-MiNP	0.05	33.6	<LOD	0.1	4.1	9.9
cx-MiNP	0.11	75.8	1.6	1.6	4.1	24.7
異性体を含む (n=387)						
MiNP	0.09	96.9	0.4	0.7	1.2	8.0
OH-MiNP	0.05	100.0	2.3	4.1	7.5	60.0
cx-MiNP	0.11	99.7	1.4	2.5	4.7	35.0

LOD: limit of detection.

尿中リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類濃度の相関を図5に示す。今回検討した尿中濃度の検出率が50%以上であった化合物全ての組み合わせについて、正の相関を示した。フタル酸エステル類の代謝物間での相関は相関係数(ρ)0.38-0.88と高く、中でもDEHPの代謝物間およびDiNPの代謝物間での相関はそれぞれ、 $\rho=0.47-0.95$ および $\rho=0.77-0.88$ と非常に強い正の相関を示した。また、ビスフェノール類間については有意な正の相関はあるものの $\rho=0.21-0.32$ の弱い相関であった。リン酸トリエステル類の代謝物間ではTBOEPの代謝物であるBBOEPとBBOEHPの相関が $\rho=0.75$ と強い正の相関を示した。また、DPHPはEHDPHPの代謝物である5OH-EHDPHPおよびEHPHPとそれぞれ $\rho=0.54$ および $\rho=0.56$ の相関を示した。その他、リン酸トリエステル類のDPHPおよびEHPHPはフタル酸エステル類のDEHP代謝物およびDiNP代謝物の二次代謝物とそれぞれ $\rho=0.39-0.51$ の相関を示し、DHEPやDiNPと共通した曝露源を有している可能性が示唆された。

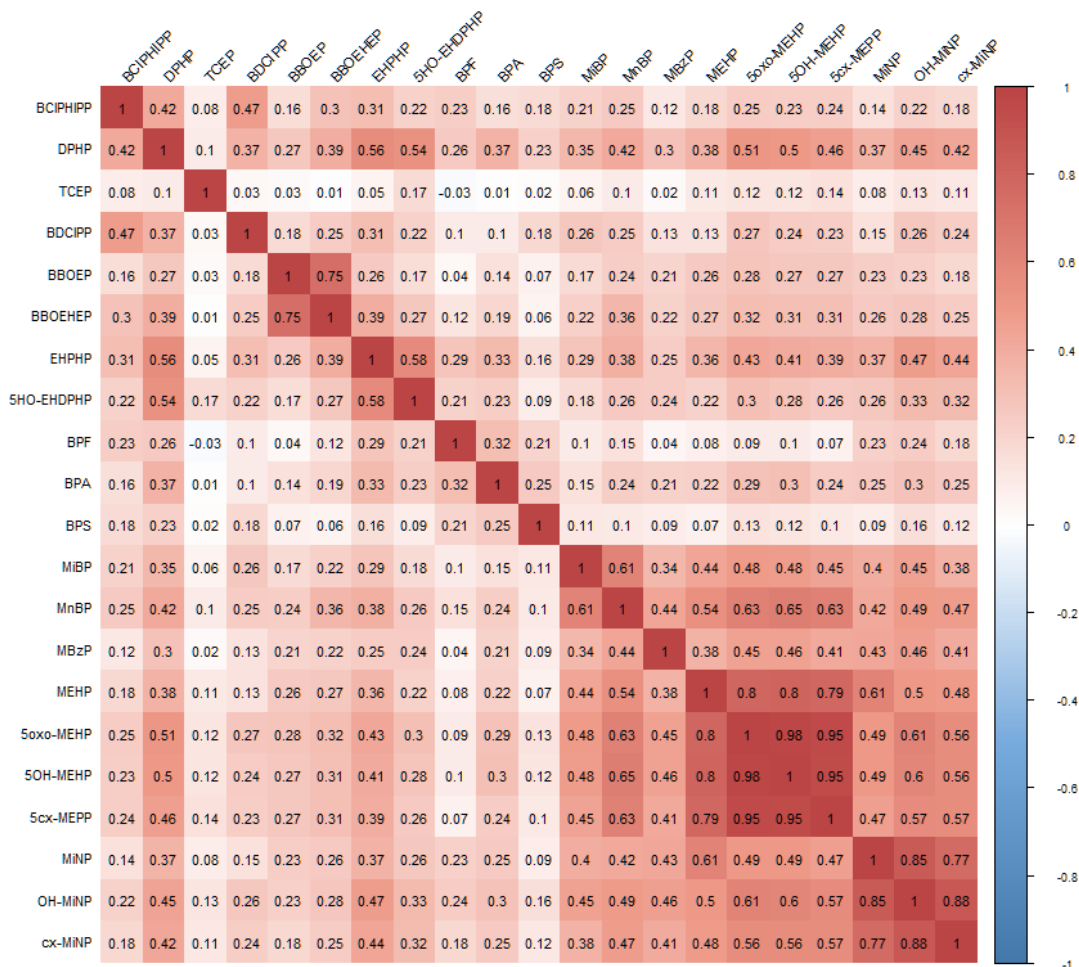


図5 尿中リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類濃度の相関セルの中の数字はSpearmanの相関係数

4.3.3. 児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、およびフタル酸エステル類の複合曝露によるアレルギーとの関連

7歳児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、およびフタル酸エステル類の単一化合物曝露とアレルギーとの関連を表11に示す。児のBDCIPP、BBOEHP濃度が高いことが喘鳴のオッズが有意に高かった。一方、児のBPS濃度が高いことが児の喘鳴のオッズが有意に低かった。その他、いずれの化合物においても鼻結膜炎、湿疹ともに有意な関連は見られなかった。

表11リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、およびフタル酸エステル類の
曝露とアレルギーとの関連

	喘鳴			鼻結膜炎			湿疹					
	OR	IQR	p-value	OR	IQR	p-value	OR	IQR	p-value			
単一化合物曝露												
ΣTCIPP	0.98	0.78	1.22	0.825	1.07	0.86	1.32	0.553	0.86	0.70	1.05	0.139
ΣTNBP	1.15	0.90	1.47	0.264	1.13	0.88	1.43	0.335	0.84	0.65	1.09	0.181
ΣTPHP	1.00	0.69	1.43	0.981	1.25	0.89	1.77	0.197	1.07	0.77	1.49	0.686
BDCIPP	1.36	1.08	1.71	0.009	0.99	0.79	1.24	0.930	0.92	0.74	1.15	0.469
ΣTBOEP	1.30	1.03	1.64	0.031	1.04	0.83	1.31	0.725	1.18	0.95	1.46	0.131
ΣEHDPHP	1.07	0.77	1.48	0.681	0.95	0.69	1.30	0.751	1.05	0.78	1.42	0.756
BPF	0.98	0.81	1.19	0.854	1.04	0.86	1.24	0.703	0.87	0.72	1.05	0.145
BPA	1.01	0.74	1.38	0.965	1.29	0.95	1.74	0.099	0.98	0.73	1.30	0.873
BPS	0.73	0.57	0.93	0.011	1.01	0.82	1.24	0.949	0.99	0.81	1.20	0.895
MiBP	1.06	0.81	1.38	0.672	1.09	0.85	1.41	0.503	0.93	0.72	1.19	0.537
MnBP	1.12	0.78	1.61	0.548	1.05	0.74	1.49	0.804	0.87	0.62	1.23	0.435
MBzP	1.03	0.85	1.24	0.773	1.10	0.93	1.31	0.274	0.95	0.80	1.13	0.541
ΣDEHP	1.11	0.74	1.65	0.620	1.26	0.86	1.86	0.235	1.13	0.79	1.63	0.505
ΣDiNP	1.31	0.93	1.85	0.126	1.05	0.75	1.47	0.781	1.12	0.82	1.54	0.487
複合曝露												
WQS index												
正の方向の												
モデル	2.12	1.38	3.30	0.001	1.62	1.03	2.58	0.039	1.30	0.89	1.91	0.169
WQS index												
負の方向の												
モデル	0.54	0.35	0.82	0.004	1.01	0.65	1.58	0.948	0.58	0.37	0.89	0.015

児の性別、BMI、室内喫煙者の有無、母のアレルギー歴で調整
曝露濃度はクレアチニン補正した濃度を自然対数に変換

児のリン酸トリエステル類、ビスフェノール類、およびフタル酸エステル類のWQSモデルによる喘鳴、鼻結膜炎、湿疹との関連を同じく表11に示した。正の方向のモデルでは、それぞれオッズ比(95%信頼区間)が喘鳴2.12 (1.38-3.30)、鼻結膜炎1.62 (1.03-2.58) で有意であったが、皮膚炎は1.30 (0.89-1.91) で有意ではなかった ($p=0.169$)。各モデルでWQSモデルによる影響が有意であった関連について、アレルギーへの寄与割合を検討した結果、各化合物のうち、喘鳴はBDCIPP(30.6%)、ΣDiNP(29.0%)、ΣTNBP(13.3%)の曝露の寄与が大きく、鼻結膜炎はDEHP(25.3%)、ΣTNBP(15.4%)、BPA(14.4%)の寄与が大きかった(図6)。一方、負の方向のモデルでは、喘鳴および湿疹のオッズ比(95%信頼区間)が0.54 (0.35-0.82)、0.58 (0.37-0.89) で有意であった。鼻結膜炎は1.01 (0.65-1.58) で有意ではなかった。負の方向のモデルが有意であった喘鳴への寄与割合はBPS(46.8%)、ついでBPF(18.0%)、MBzP(9.9%)の曝露の寄与が大きく、鼻皮膚炎はΣTNBP(29.0%)、ついでBPF(21.0%)、MiBP(12.3%)の寄与が大きかった。

次に、図6で各アレルギーのアウトカムに対する寄与が大きかった2つの化合物を3分位に分け、第1,2三分位をLow、第3三分位をHighとし、Low×LowをリファレンスとしたときのアレルギーのOR(95%CI)を図7に示す。BDCIPPとΣDiNPのどちらも低濃度曝露の組合せと比較して、どちらも高濃度曝露の組合せにおいて、喘鳴のOR(95%CI)は2.11(0.93-4.78)で統計的に有意差はないが有意傾向が認められた($p=0.074$)。鼻結膜炎については有意な関連は認められなかった。負の方向のモデルで有意であった喘鳴と皮膚炎との関連について、BPSとBPFのどちらも低濃度曝露の組合せと比較して、どちらも高濃度曝露の組合せにおいて、喘鳴のOR(95%CI)は0.29(0.11-0.80)でオッズが有意に低くなった($p=0.016$)。皮膚炎では、ΣTNBPとBPFのどちらも低濃度曝露の組合せと比較して、どちらも高濃度曝露の組合せにおいて、皮膚炎のOR(95%CI)は0.42(0.17-1.01)で有意な傾向が認められた($p=0.052$)。

4.2に示した札幌市小学生の結果では、ΣTCIPPとΣTPHPの組み合わせにおいて、どちらも高濃度曝露

群の場合にどちらも低濃度曝露群と比べて有意に鼻結膜炎リスクの上昇が認められた。しかし、北海道スタディの7歳の集団における鼻結膜炎との関連は、DEHPとTNBPの寄与割合が最も高く、この上位2位の組み合わせでは鼻結膜炎のリスク有意な増加は見られなかった。本研究では、札幌市小学生の集団で検討されたリン酸トリエステル類、フタル酸エステル類にビスフェノール類およびフタル酸エステル類のDiNP代謝物も新たに複合曝露評価として加えたため、2つの集団で曝露評価対象化合物が若干異なっており結果を一様に比較はできない。しかし、リン酸トリエステル類のうちどちらも塩素系のTCIPP、TDCIPPが鼻結膜炎や喘鳴のアレルギーのリスクに影響する可能性を示唆した。リン酸トリエステル類曝露による健康影響に関する科学的知見は動物実験、疫学研究ともに非常に限られる。しかし、過去の我々の研究においてもハウスダスト中のTDCIPPと湿疹の関連について報告しており、塩素系リン酸トリエステル類曝露は何らかのアレルギー発症メカニズムを有する可能性が示唆される。今後、塩素系のリン酸トリエステル類によるアレルギー発症メカニズムに関する更なる研究が必要である。一方、本研究ではBPFとBPSおよびTNBPとBPFの組み合わせによる喘鳴および皮膚炎のリスクの低下を示した。BPAの代替物質のBPFやBPSとアレルギーに関する科学的知見はなく、本研究結果のみではBPFおよびBPS曝露によるアレルギーへの影響は結論できない。今後も疫学研究、動物実験ともに更なる知見が必要である。

リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類の単一化合物ごとでアレルギーとの関連を検討した疫学研究はあるが、これらの複合曝露によるアレルギーの影響を検討した報告はなく、本研究が初めての報告となる。いずれの化合物も日用品に汎用される短半減期化合物であり、我々は日常的に複合的に曝露されているため本研究で検討した成果はより現実に即した曝露によるアレルギーへの影響を反映した結果であると考えられる。一方で、本研究で着目した環境化学物質以外の化合物による曝露については検討できておらず、この点は本研究の限界である。加えて、日内および日間変動がある短半減期化合物の尿中濃度測定を本研究では1回しかしておらず、この点も限界点である。しかし、全ての尿検体について朝一番尿を回収しており、日内変動についてはある程度コントロールできていると考える。

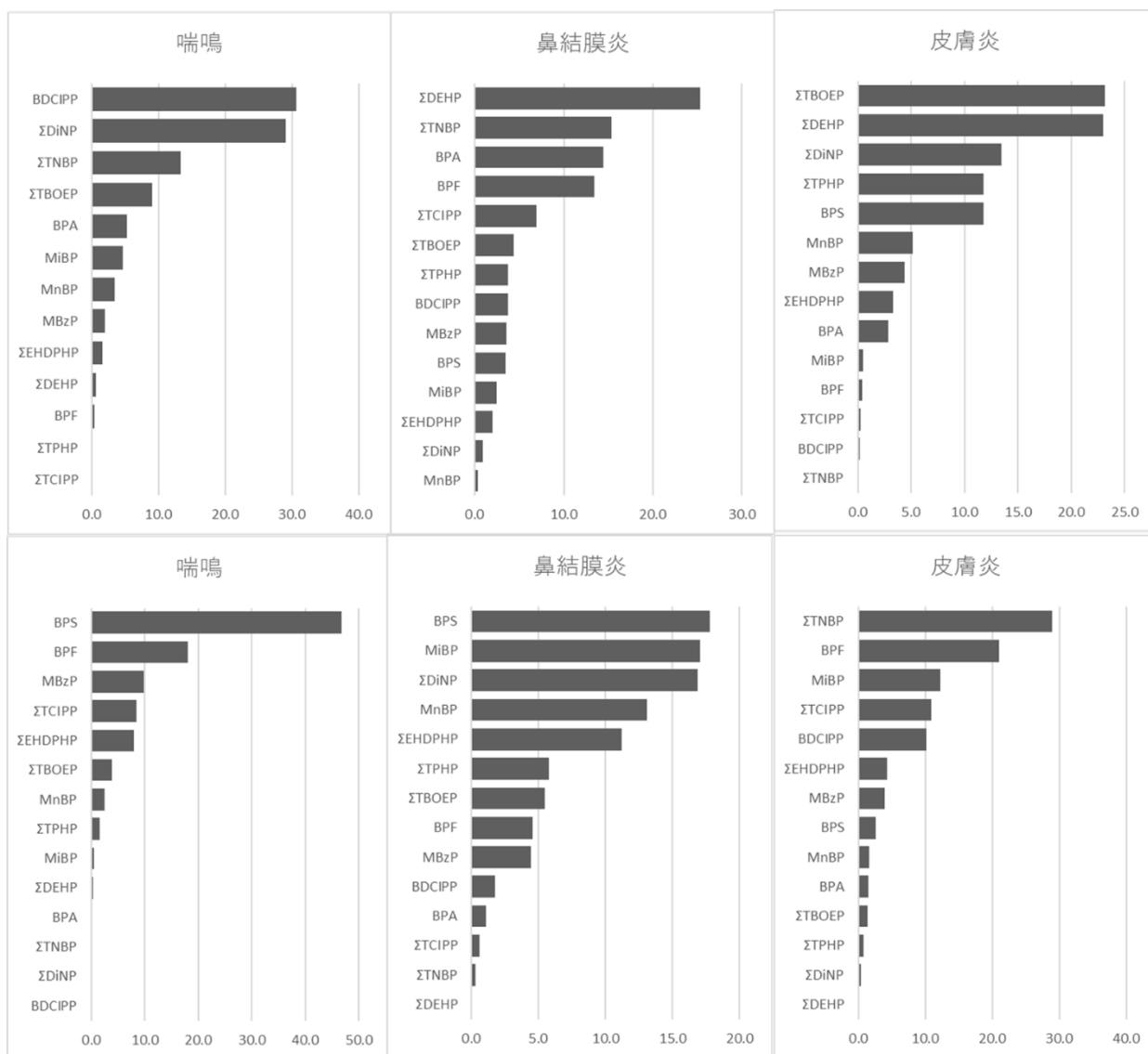


図6 児のリン酸トリエステ類、ビスフェノール類、およびフタル酸エステル類の複合曝露によるアレルギーとの関連

上段は正の方向、下段は負の方向におけるWQSモデルによる各化合物の各アウトカムへの寄与割合(%)を示す。曝露濃度をクレアチニン補正後、自然対数変換しモデルに投入。児の性別、BMI、家庭内喫煙者の有無、母のアレルギー歴で調整

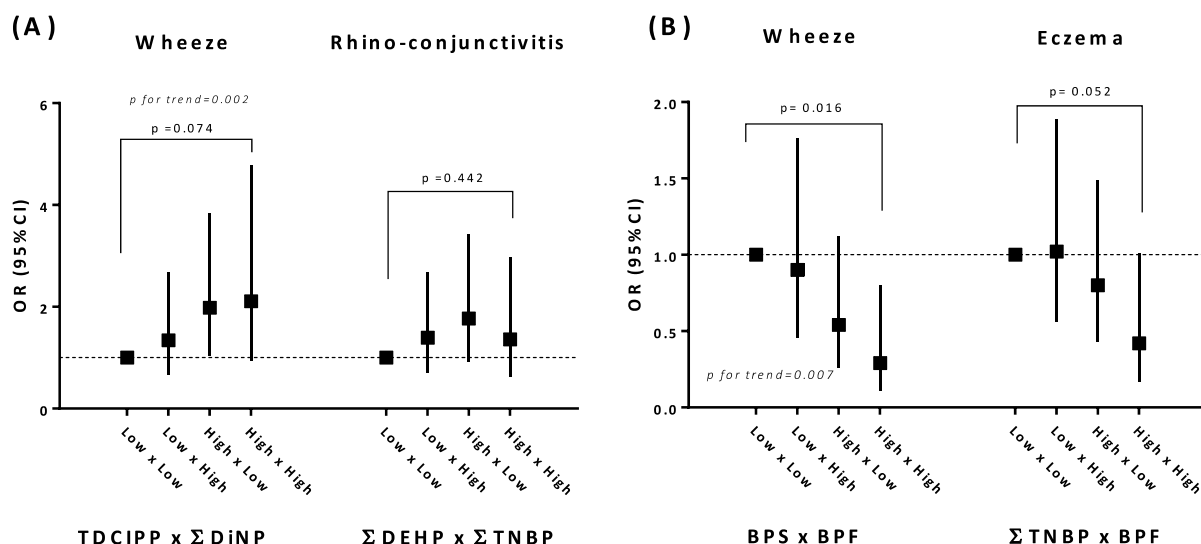


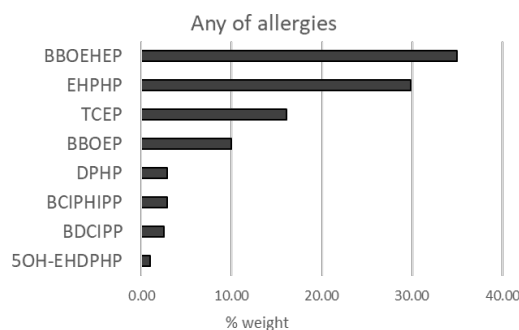
図7 リン酸トリエステル類、ビスフェノール類、フタル酸エステル類の複合曝露とアレルギーとの関連化合物濃度を3分位にし、第1,2三分位をLow、第3三分位をHighとし、Low×LowをリファレンスとしたときのアレルギーのOR(95%CI)をロジスティック回帰分析で計算。

(A) 正の方向のモデル、(B) 負の方向のモデル。ORを■、95%CIをバーで示す。性別、BMI、室内喫煙者の有無、母のアレルギー歴で調整

4.3.4. 児のリン酸トリエステル複合曝露といずれかのアレルギー、および尿中炎症マーカーとの関連

図8(左)に尿中リン酸トリエステル類代謝物の単一化合物曝露とWQSによる複合曝露といずれかのアレルギーとの関連を示す。BBOEHEP濃度が高い児でいずれかのアレルギーのオッズが有意に高かった。また、尿中リン酸トリエステル類代謝物によるアレルギーへの影響においても、WQS indexが上がるとうずれかのアレルギーのオッズが有意に高かった。図7(右)にリン酸トリエステル類代謝物のWQSモデルによるアレルギーへの影響の寄与を示す。BBOEHEPの寄与割合が35.0%と最も高く、次いでEHEPHPが29.8%、TCEPが16.2%であった。リン酸トリエステル類代謝物の単一および混合的な曝露の両方でBBOEHEP曝露によるアレルギーへの影響が懸念され、またこれは、別集団である札幌市小学生の結果⁷¹⁾とも一致していることから、この親化合物であるTBOEP曝露によるアレルギーへのリスクが示唆され、今後も注意深く検討する必要がある。

	OR (95% CI)
DPHP	1.12 (0.83, 1.51)
EHPHP	1.15 (0.88, 1.52)
5HO-EHDPHP	1.01 (0.80, 1.29)
TCEP	0.88 (0.57, 1.35)
BDCIPP	1.13 (0.93, 1.39)
BBOEP	1.21 (1.00, 1.45)
BBOEHEP	1.29 (1.07, 1.55)**
BCIPHIPP	1.01 (0.84, 1.22)
WQS index	1.58 (1.09, 2.29)*



リン酸トリエステル類を自然対数変換後、個別にモデルに投入
 児の性別、尿中クレアチニン値、室内喫煙者の有無、母のアレルギー歴、世帯年収で調整WQS indexをモデルに投入、indexが1上昇した時のOR(95% CI)

児の性別、尿中クレアチニン値、室内喫煙者の有無、母のアレルギー歴、世帯年収で調整

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.05$

図8 リン酸トリエステル類代謝物濃度といずれかのアレルギーとの関連

児のリン酸トリエステル類曝露濃度と尿中炎症マーカーとの関連を表12に示す。児の性別、BMI、アレルギーの有無で調整後、EHPHPおよびBBOEP濃度と8-OHdG値の高値、DHPH濃度とHEL値、EHPHP濃度とHNE値その間に有意な正の相関を認めた。

表 12 児のリン酸トリエステル類曝露濃度と尿中炎症マーカーとの関連

	8-OHdG			HEL			HNE					
	β	95% CI	p value	β	95% CI	p value	β	95% CI	p value			
単一化合物曝露												
DPHP	-0.017	-0.085	0.050	0.613	0.136	0.062	0.210	< 0.001	0.030	-0.070	0.131	0.551
EHPHP	0.100	0.042	0.158	0.001	0.035	-0.030	0.101	0.292	0.161	0.074	0.248	< 0.001
BBOEP	0.041	0.001	0.081	0.043	0.010	-0.034	0.055	0.652	0.044	-0.013	0.102	0.128
BCIPHIPP	-0.018	-0.060	0.023	0.389	0.024	-0.022	0.071	0.303	-0.002	-0.062	0.059	0.958
BBOEHEP	0.028	-0.010	0.067	0.152	0.018	-0.025	0.061	0.416	0.053	-0.004	0.109	0.069
BDCIPP	0.004	-0.040	0.048	0.865	0.043	-0.006	0.092	0.084	0.023	-0.040	0.086	0.473
複合曝露												
WQS index 正の方向のモデル	0.024	-0.011	0.060	0.206	0.106	0.049	0.163	< 0.001	0.140	0.062	0.217	< 0.001
WQS index 負の方向のモデル	-0.005	-0.043	0.034	0.811	did not convert			0.068	-0.007	0.142	0.077	

Single chemical models were calculated by linear regression model. All organophosphate triesters and inflammation biomarker levels were natural log-transformed and introduced into the model separately.

Adjusted for sex, BMI, ETS, and presence of allergies

Mixture chemical models were calculated by WQS regression with all chemicals introduced into the model at the same time.

表12で有意であった関連について、カテゴリカルモデルを用いて量反応関係を検討した（図9）。EHPHP濃度と8-OHdG値およびHNE値、DHPH濃度とHELとの間にそれぞれ有意な量反応関係が見られた。また、児の尿中BBOEP濃度が検出下限値未満の児と比べ、検出下限値以上の児の8-OHdG値は有意に高かった。

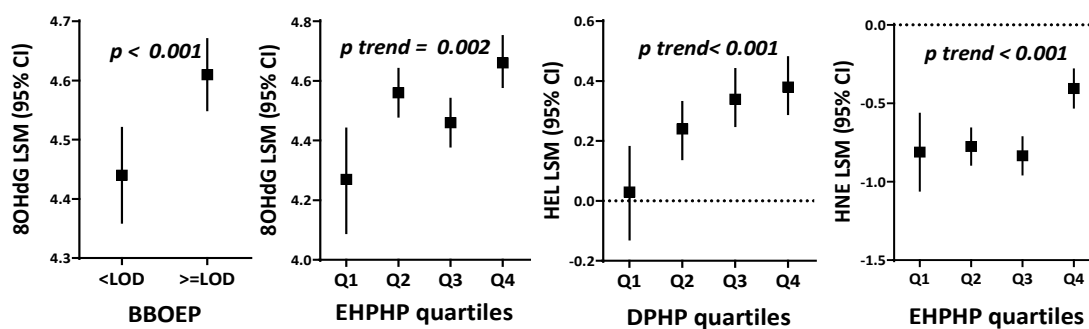


図9 児のリン酸トリエステル類曝露濃度と尿中炎症マーカーとの関連（量-反応関係）

さらに、尿中リン酸トリエステル類代謝物濃度の複合曝露による炎症マーカーとの関連について検討した（表12）。尿リン酸トリエステル類代謝物のWQSモデルとHEL、HNE影響はそれぞれ $\beta = 0.11$ および 0.14 で有意な正の相関が見られ（ $p < 0.001$ ）だが、8-OHdGは有意ではなかった。各炎症マーカーへの寄与割合は（図10）、8-OHdGはEHPHPが52.9%と最も高く、次いでBCIPHIPPが13.6%、HELへはDHPHが62.3%と最も高く、次いでBDCIPPは12.2%、HNEはEHPHPが49.7%と最も高く、次いでBDCIPPは17.7%であり、いずれの関連も最も寄与の高い代謝物が50%以上で、2番目は20%以下であった。

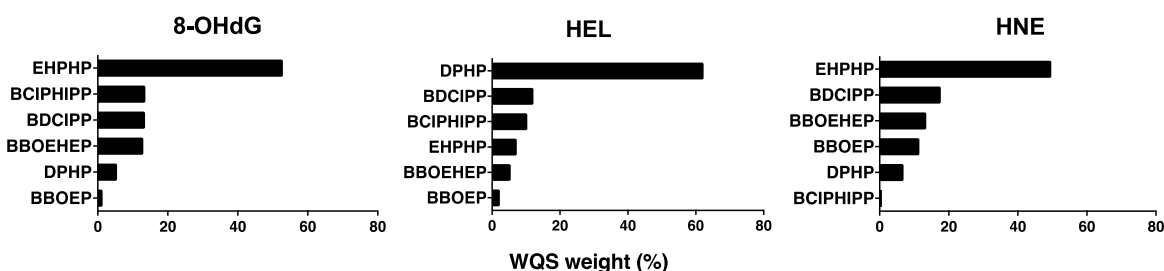


図10 尿中リン酸トリエステル類代謝物濃度の混合曝露による炎症マーカーとの関連
リン酸トリエステル類を自然対数変換し、児の性別、尿中クレアチニン値、室内喫煙者の有無、BMIで調整、Weighted Quintile Sum (WQS) indexをモデルに投入

表12で有意であったHELとHNEについて、図9で示す寄与割合の大きかった2つの代謝物の組合せモデルとの関連を検討した(図10)。HNEとの関連について、EHPHPとBDCIPPともに高濃度であった児(High × High)はともに低濃度であった児(Low × Low)と比較して有意にHNE値が高かった(P = 0.020)。

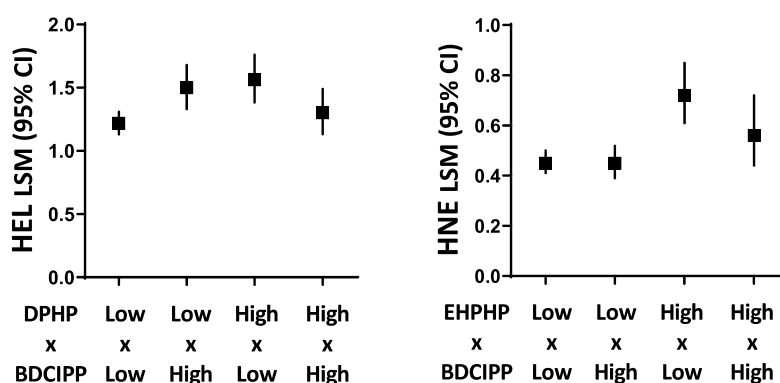


図10 DPHPとBDCIPPおよびEHPHPとBDCIPPの複合曝露と炎症関連炎症マーカーとの関連
HELおよびHNEの最小二乗平均値は児の性別、BMI、室内喫煙者の有無、アレルギーの有無で調整

本研究では、尿中リン酸トリエステル類代謝物を測定し、児のアレルギーおよび炎症関連炎症マーカーHEL、HNE、8-OHdGとの関連を検討した。HELおよびHNEは、炎症の病因や気道高感受性の中心的役割を果たす炎症マーカーであり、HELは特に過酸化脂質のオメガ6、HNEはオメガ3脂肪酸の過酸化の指標である。また8-OHdGはDNA損傷炎症マーカーであり、またこれは喘息の重症度が高いほど高値を示す(研究分担者らの未公開データ)。HEL、HNE、8-OHdGと児のISAAC調査票より評価したアレルギー有無との間に有意な関連は認められなかったが、リン酸トリエステル類代謝物とアレルギーとの間には、BBOEHEP濃度が高い児でアレルギーのオッズが有意に高く、また、リン酸トリエステル類代謝物のBBOEHEP濃度とHEL、HNE、8-OHdGとの間に有意な量反応関係が特にアレルギーのある児で認められたことから、有機リン系難燃剤の曝露、特にBBOEHEPの親化合物であるTBOEPの曝露が何らかの炎症反応としてHEL、HNE、8-OHdGの値に影響したことが示唆された。またこの関連を、リン酸トリエステル類代謝物の複合曝露による影響を検討したところ、BBOEHEPおよびEHPHPがアレルギーへの寄与割合が高く、EHPHPとBCIPHIPPが8-OHdG、DPHPとBDCIPPがHEL、EHPHP、BDCIPPがHNEへ最も寄与していることが明らかとなった。寄与割合の大きかった2つの代謝物の組合せモデルの関連については、2つの代謝物がともに高濃度の児はともに低濃度の児と比較し有意にHNE値が高かったが、1番目の寄与割合を示したEHPHPが50%程度であるのに対し、2番目のBDCIPPの寄与割合が20%程度であることから、HNEへの影響はEHPHPが大部分を占めていることが示唆された。本研究は横断研究であるため、各代謝物がどのようにアレルギー症状および炎症マーカーへ影響しているのか、また、アレルギー症状と炎症マーカーとの間のメカニズムは本研究では明らかにすることはできない。しかし、我々がこれまでに実施した、全国の戸建て

住宅の住人を対象とした研究⁷⁾、札幌市小学生を対象とした研究⁷¹⁾、そして本研究（北海道スタディの7歳児）の3つの異なる集団でリン酸トリエステル類とアレルギー症状との関連について検討した結果、TBOEPがアレルギーのオッズを上げる結果はどの集団においても一致しており、TBOEPについて今後も注意深く検討する必要があると考えられる。

（これらの結果は、Ait Bamai et al., Environm Int, 131, 105003, 2019 として論文発表済み）

4.4. アレルギーに関する対面詳細調査

4.4.1. アレルギーに関する対面詳細調査

2017年9月から2020年3月初旬までに、北海道スタディ参加者のうち札幌市およびその近郊に在住する9-11歳を迎える児1930人へ調査の案内を発送し、428人（男児230人、女児198人）の調査を実施した。参加児の特徴を表13に示す。

表13 参加児の特徴

測定項目	平均値とS.D. および25-75パーセンタイル値 または人数（割合）	
児の属性		
年齢	10歳5か月±11.5か月；9歳8か月-11歳4か月	
身長	141.1±8.5cm；135.0-146.2cm	
体重	35.8±8.8kg；29.0-41.1Kg	
世帯年収	< 300万円	25人(5.8%)
	3-500万円	101人(23.6%)
	5-800万円	182人(42.5%)
	>800万円	97人(22.7%)
	欠損	23人(5.4%)
両親のアレルギー履歴		
母親のアレルギー既往歴あり	148人(34.8%)	
父親のアレルギー既往歴あり	95人(22.1%)	

保護者記入によるISAAC調査票を用いた児のアレルギー症状を有する人数および割合を表14に示す。参加時の喘鳴、鼻結膜炎、湿疹を有する割合は、それぞれ9.2%、21.2%、22.4%であった。男女別に検討すると、喘鳴、鼻結膜炎は男児が女児よりも割合が高く、湿疹は女児の方が高かった。

表14 児のアレルギー状況(人数、%)

アレルギー症状	Total	男児	女児
喘鳴	32 (9.2)	20 (8.7)	12 (6.0)
鼻結膜炎	91 (21.2)	54 (23.4)	37 (18.6)
湿疹	96 (22.4)	48 (20.8)	48 (24.2)

本研究で実施した9-11歳でのISAAC調査に加え、これまでアレルギー症状の有無について質問した1歳、2歳、4歳、7歳の北海道スタディ調査票を用いて、喘鳴、鼻結膜炎、湿疹およびいずれかのアレルギーの有症率とその推移について検討した（図11）。9-11歳でいずれかのアレルギーを持つ児は全体の41.5%であった。各アレルギー有症率は、喘鳴は9-11歳が他の年齢と比べて最も低かった一方、鼻結膜炎は9-11歳が他の年齢と比べて最も高かった。湿疹およびいずれかのアレルギーでは、1歳から4歳までは有症率が上昇し、4歳、7歳、9-11歳ではほぼ横ばいであった。

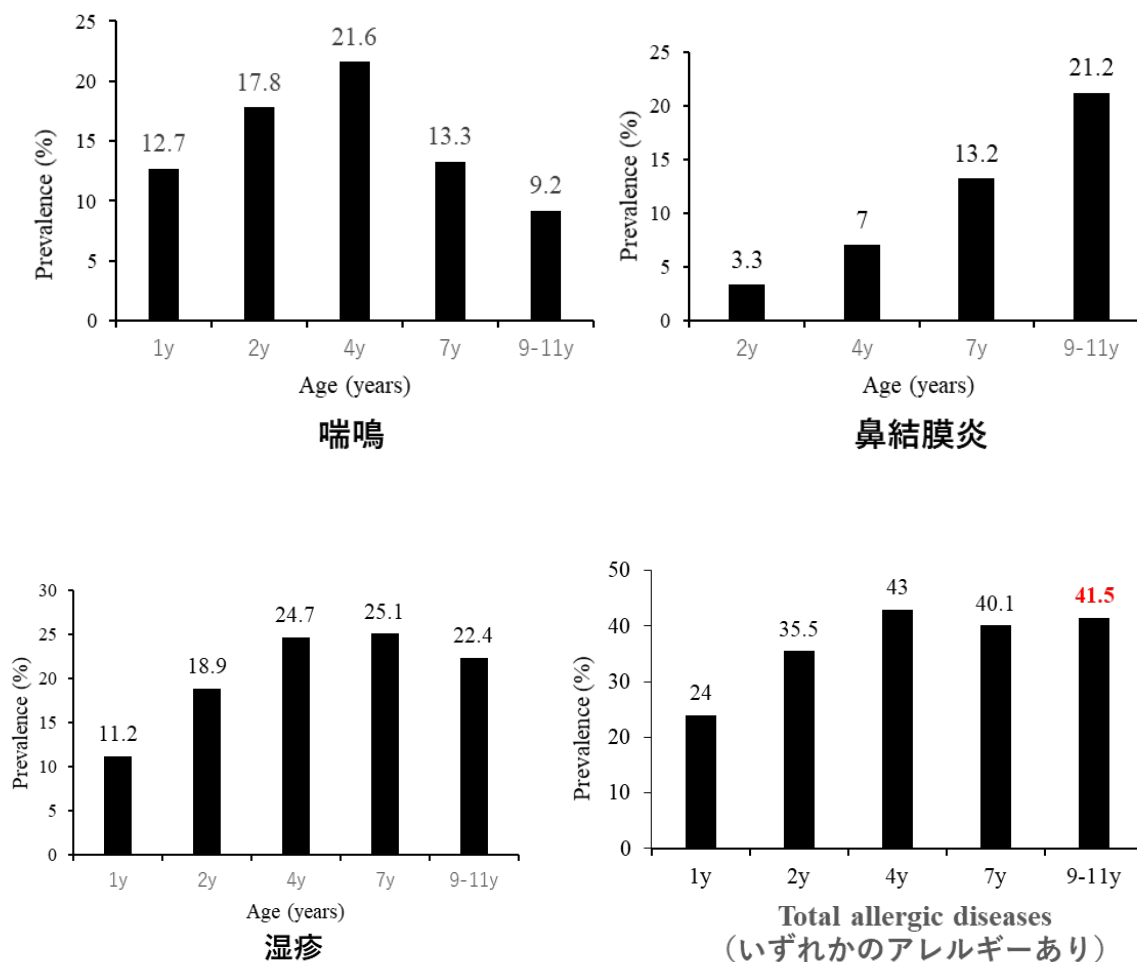


図11 年齢による児のアレルギー有症率の推移

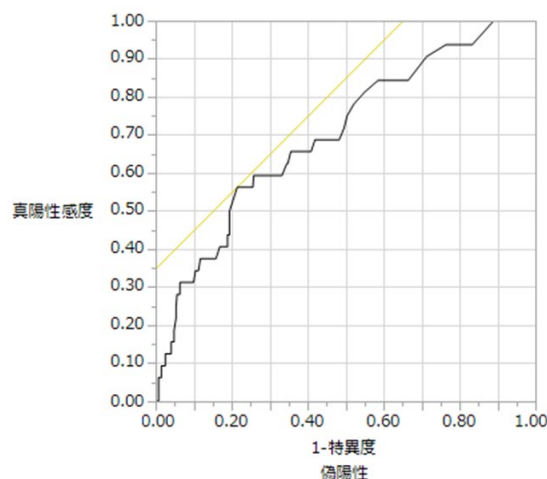
米国National Institute of Health (NIH)の提言による喘息バイオマーカー7種のうち、好酸球数、総IgE値と、FeNO値の3種の喘息バイオマーカーを測定した結果を表15に示す。中央値(25-75パーセンタイル値)はそれぞれ、全血中好酸球数が231.4(122.8-425.5)、血清中総IgE値が129(35.6-395.5) IU/mL、FeNOが17(9-37) p.p.b.であった。喘息バイオマーカーが高値であった児は、好酸球数(>300/ μ l)が420人中162人(38.5%)、総IgE(\geq 173 IU/mL)が417人中183人(43.8%)であった。FeNO(p.p.b.)については、アメリカ胸部疾患学会(American Thoracic Society; ATS)臨床ガイドラインによると⁷²⁾、20未満が低値、20-35未満が中程度、35以上が高値となっている。本研究で中等度以上(\geq 20 p.p.b)の児は423人中195人(46.0%)であり、うち20-35未満は79人(18.7%)、35以上は116人(27.4%)だった。

表15 児の喘息バイオマーカーの値

測定項目	測定人数	中央値 (25-75パーセンタイル値)
全血中好酸球数(cells/ μ L)	420人	231.4 (122.8-425.5)
血清中総IgE (IU/mL)	417人	129 (35.6-395.5)
FeNO (p.p.b)	423人	17 (9-37)

上述の表15 児のアレルギー状況で喘息であった32人を喘息有、そうでない396人を喘息無として、ROCカーブを用いてFeNOのカットオフ値を検討したところ、38.0 ppbであった(図12)。ATSにおける臨床応用に向けた呼気中一酸化窒素濃度の解釈⁷³⁾では、小児で35 ppbを超える場合は好酸球性の気道炎症が存在する可能性が高いとされる。本結果の喘息有・無間のカットオフ値38 ppbは、この解釈とほぼ一致する数値となった。日本人の成人健常者におけるFeNOカットオフ値については、37以上が高値とすでに報告されているが^{74,75)}、小児の報告はこれまでなく、本研究が日本人小児におけるFeNO値カットオフに

についての初めての報告となる。



喘鳴の有無とFeNOの値

図12 喘鳴の有無とFeNOの値に関するROCカーブ

本調査で採取した血液から測定した特異的IgE13種の値を表16に示す。ヤケヒョウダニのIgE値は275人(65.9%)が検出下限値0.1以上であったが、それ以外の2種は、半数以上の参加児においてIgE値は0.1未満であった。牛乳、卵白、小麦、ピーナッツについては、調査票で得た各食物アレルギーの診断有無情報とあわせて各IgEの値を検討したが、診断有の参加児が少なく（牛乳10人、卵白4人、小麦1人、ピーナッツ0人）、診断の有無によるIgE値に有意な差はみられなかった。

表16 特異的IgE各測定項目の値(UA/mL)

測定項目	最小値	中央値	90パーセンタイル値	最大値
カモガヤ	<0.1	<0.1	4.45	>100
ブタクサ	<0.1	<0.1	0.41	32.2
ヨモギ	<0.1	<0.1	0.57	35
アルテルナリア	<0.1	<0.1	<0.1	29.2
シラカンバ	<0.1	<0.1	23.38	>100
ネコのフケ	<0.1	<0.1	6.61	>100
ヤケヒョウダニ	<0.1	1.99	85.44	>100
牛乳	<0.1	<0.1	0.27	4.93
卵白	<0.1	<0.1	0.39	15.60
スギ	<0.1	<0.1	0.21	7.46
小麦	<0.1	<0.1	0.33	9.08
イヌのフケ	<0.1	<0.1	2.53	>100
Ara h2 (ピーナッツ由来)	<0.1	<0.1	<0.1	76.3

次に、血中および尿中の炎症バイオマーカーの濃度を表17に示す。中央値（25-75パーセンタイル値）はそれぞれ、8-OHdGが9.3(5.8-11.9)ng/mL、HELが100.1(61.5-152.2)nmol/L、HNEが24.6(13.7-41.0)μg/mL、Plasma CC16が5.5(4.3-7.0)ng/mLであった。

表17 炎症バイオマーカーの値

測定項目	測定人数	中央値 (25-75パーセンタイル値)
尿中8-OHdG (ng/mL)	413人	9.3(5.8-11.9)
尿中HEL (nmol/L)	408人	100.1(61.5-152.2)
尿中HNE (μg/mL)	365人	24.6(13.7-41.0)
血清中 CC-16 (ng/mL)	413人	5.5(4.3-7.0)

喘息バイオマーカーと炎症バイオマーカー値の相関を、Spearman's ρ で検討した結果を表18に示す。喘息バイオマーカーは、相互に中程度の正の相関がみられた。炎症バイオマーカーでは8-OHdGとHEL、HELとHNEにも正の相関がみられたが、喘息バイオマーカー3種と炎症バイオマーカー4種との間に有意な関連はみられなかった。

表18 喘息バイオマーカーと炎症バイオマーカー値の相関

測定項目	好酸球数 (cells/ μ L)	総IgE (IU/mL)	FeNO (ppb)	8-OHdG (ng/mL)	HEL (nmol/L)	HNE (μ g/mL)	CC16 (ng/mL)
好酸球数 (cells/ μ L)		0.589**	0.650**	0.013	0.054	0.075	-0.033
総IgE (IU/mL)			0.624**	0.060	0.065	0.065	0.007
FeNO (ppb)				-0.021	0.052	0.031	-0.009
8-OHdG (ng/mL)					0.151**	0.066	-0.024
HEL (nmol/L)						0.264**	-0.111
HNE (μ g/mL)							-0.057
CC16 (ng/mL)							

調査票の回答による9-11歳時の喘鳴、鼻結膜炎、湿疹の症状の有無と、喘息バイオマーカー3種（好酸球数、総IgE、FeNO）の値をt検定で検討したところ、喘鳴、鼻結膜炎、湿疹すべての症状について、症状有（Yes）と回答した群の喘息バイオマーカー値が、症状無（No）と回答した群と比較して有意に高かった（図13）。これらの結果から、喘息バイオマーカーはアレルギー症状の判定に用いるバイオマーカーに成り得る可能性が示唆された。一方、アレルギー症状の有無と尿中炎症バイオマーカー3種（8-OHdG、HNE、HEL）の値に有意な差はみとめられなかった。

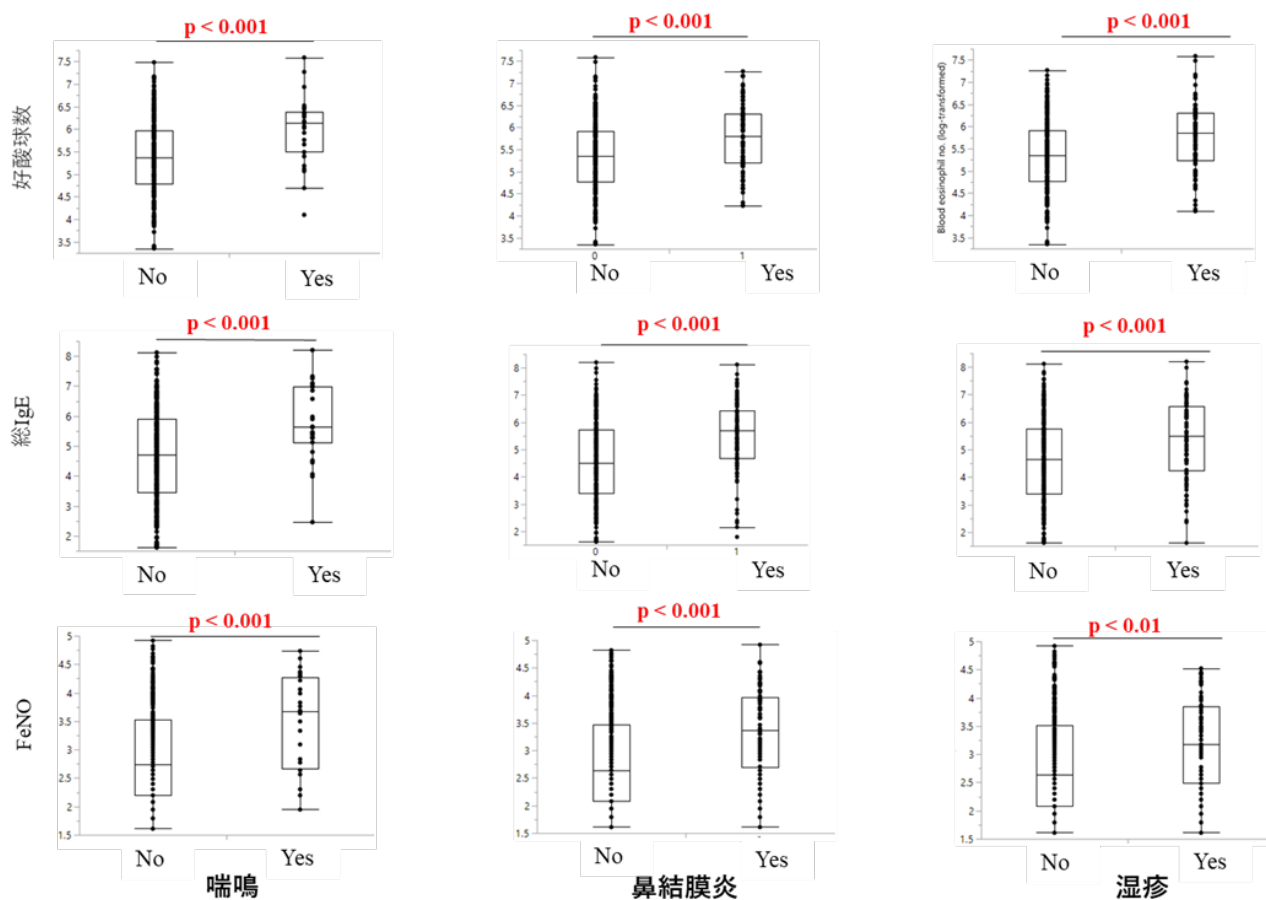


図13 アレルギー症状の有無とTh2バイオマーカーの値

CC-16 について、調査票の回答による9-11歳時の喘鳴、鼻結膜炎、湿疹の症状の有無と、血中CC-16濃度の値をt検定で検討したところ（図14）、喘鳴では症状有（Yes）と回答した群が、症状無（No）と回

答した群に比べてCC-16の値が有意に低かった一方、湿疹では症状有と回答した群が、症状無と回答した群に比べてCC-16の値が有意に高かった。鼻結膜炎の症状有無とCC-16の値に有意な差はみとめられなかった。

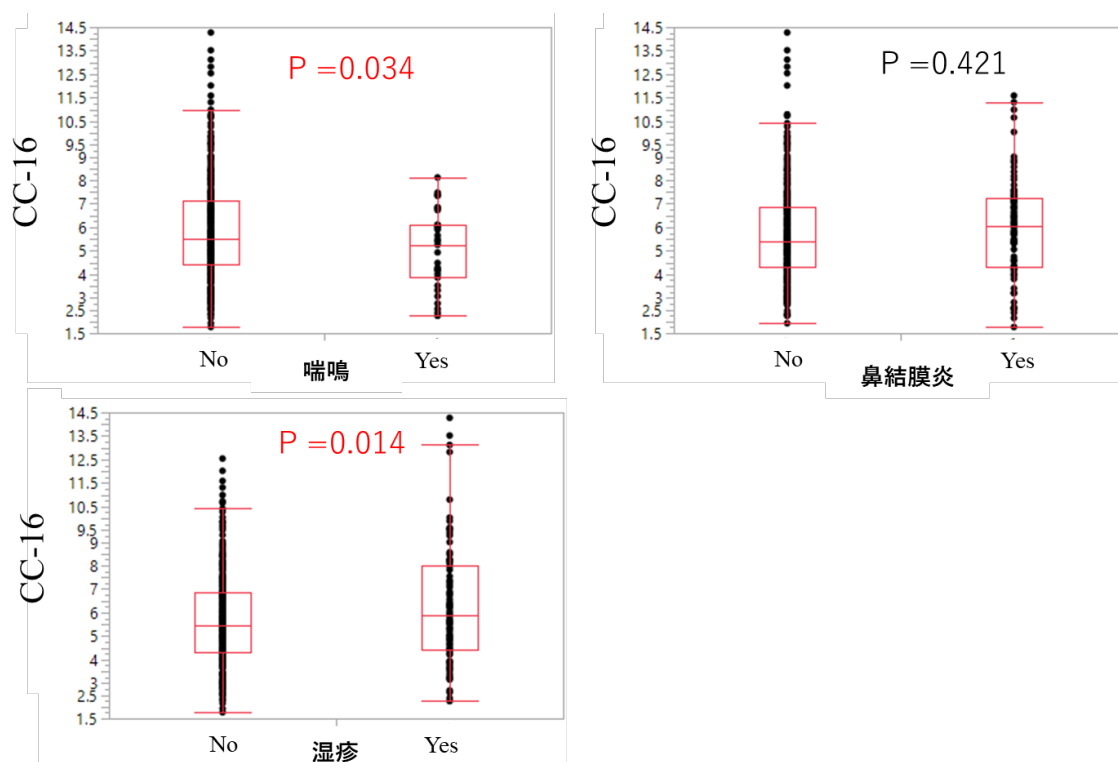


図14 アレルギー症状の有無とCC-16の値

血中ジフテリア、破傷風抗体値の結果を表19に示す。ジフテリア抗体価は、測定した282人のうち47人(16.6%)が0.1(IU/mL) < の検出下限値未満であった。また、23人が2.0(IU/mL) < の検出上限値を超えていた。

本研究の参加児428名のうち、これまでジフテリアおよび破傷風にかかった児はいなかった。出生から2歳までの間に2回以上3種混合DPT接種(第1期)を受けたのは427名であった。そのうち、第2期のboostとして10-12歳の間に2種混合DT接種を受けた59人のジフテリアおよび破傷風抗体値平均値は、該当年齢に達していない参加児も含めて2種混合DT接種を受けていない366人のジフテリアおよび破傷風抗体値より有意に高かった

表19 血中抗体値バイオマーカーの値

測定項目	測定人数	中央値 (25-75パーセンタイル値)
血清中ジフテリア抗体価 (IU/mL)	282	0.21 (0.15-0.41)
血清中破傷風抗体価 (IU/mL)	378	0.82 (0.52-1.41)

*ジフテリア抗体価は、< 0.1、2.0 < IU/mLで検出されたものは値が出ないため、平均値の算出は不可とした。

4.4.2. アレルギーに関する対面詳細調査参加児の胎児期曝露評価

児の母の妊娠中初期母体血清の保存があった314人のフタル酸エステル類濃度を表20に示す。最も高濃度かつ高頻度で検出されたのは中央値(検出率)がMnBP 23.5 ng/mL(100%)、次いでMiBP 3.40 ng/mL (99.0%) だった。DEHP代謝物はMEHP, 5OH-MEHP、5cx-MEPPがそれぞれ0.43 ng/mL (89.8%)、5cx-MMPP 0.24 ng/mL (92.4%)、50h-MEPP (5.1%)で総和はΣDEHPの中央値が1.78 ng/mLだった。DiNP代謝物はΣcx-MiNPのピークは検出率25.2%と低かった。胎児期ばくろと9-11歳児のアレルギー有病およ

びアレルギー関連バイオマーカーとの関連は引き続き解析を実施する。

表 20 初期母体血清中フタル酸代謝物濃度(n=314)

ng/mL	MDL	<MDL (n)	>MDL (%)	Min	25%	Med	75%	Max
MnBP	0.57	0	100	1.40	13.00	23.50	40.00	110.00
MiBP	0.44	3	99.0	<MDL	2.10	3.40	6.48	16.00
MBzP	0.19	294	6.4				<MDL	4.50
MEHP	0.31	32	89.8	<MDL	0.43	0.86	6.50	93.00
5OH-MEHP	0.23	298	5.1				<MDL	1.70
5cx-MEPP	0.11	24	92.4	<MDL	0.17	0.24	0.33	2.40
7cx-MMeHP	0.12	313	0.3				<MDL	0.12
Total cx-MiNP	0.12	235	25.2			<MDL	0.12	1.40
ΣDBP		0	100.0	2.03	19.48	35.01	55.42	157.81
ΣDEHP		8	97.5	<MDL	1.06	1.78	9.68	131.95

MnBP, mono-nonyl-butyl phthalate; MiBP, mono-iso-butyl phthalate; MBzP, mono butylbenzyl phthalate; MEHP, mono(2-ethylhexyl) phthalate; 5OH-MEHP, mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate; 5cx-MEPP, mono(2-Ethyl-5-carboxypentyl) phthalate; 7cx-MMeHP, mono-(4-methyl-7-carboxy-heptyl)phthalate

ΣDBP=MnBP+MiBP, ΣDEHP=MEHP+MEHHP+MECPP

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

- 2017年から2019年の3年間で、学童期（7歳児）の喘息、アレルギーに関するデータを2212人から回収（回収率約71.2%）、曝露評価に用いる児の尿を1042人から収集し、目的を達成した。これらは本研究のみならず今後環境化学物質曝露と児の健康影響を解明するためのデータ・試料となる。収集した尿400検体を持ちいて、フタル酸エステル類代謝物、リン酸トリエステル類代謝物、ビスフェノール類をそれぞれ測定し、曝露実態と経年変化を明らかにし、曝露による児の喘息・アレルギーによる複合曝露も含めた影響解明を達成した。加えて、ISAAC調査票のみでは把握できない炎症マーカー3種を測定し、リン酸トリエステル類の複合曝露による影響を明らかにした。9-11歳の学童を対象に医療機関にて対面による詳細調査を428人に実施し、目的を達成した。詳細調査での検体収集に丸3年間に要したため環境化学物質分析を行う時間を確保できず、曝露評価は達成できなかった。しかし、呼気一酸化窒素濃度、免疫に関わるバイオマーカーの測定は実施し、また尿・血液試料の保管により、今後曝露評価に利用できる。成果として、英文査読付の科学論文6報を発表した。
- 我が国で、学童の曝露実態に関するデータが少ないフタル酸エステル類については5化合物10代謝物の曝露実態に関する知見を得た。学童のリン酸トリエステル類7化合物14代謝物、およびビスフェノール類7化合物については、世界的に見ても知見は少ない。フタル酸エステル類はすべての代謝物が尿中から検出された。リン酸トリエステル類はTDCIPP、TPHP、およびBPAは米国NHANESよりも低かった。TBOEPは米国では分析しておらず、世界的にも貴重なデータである。
- リン酸トリエステル類とビスフェノール類はベルギーアントワープ大学と共同で実施しており、分析法は欧州バイオモニタリングやその他のラウンドロビン・テスト（試験所間比較）で妥当性が確認されている。また、尿中ビスフェノールについては、10 pg/mLレベルの非常に低濃度まで定量できている。フタル酸エステル類は環境健康科学研究教育センターで分析しており、本研究で用いた分析法についてもラウンドロビン・テストで妥当性が確認されている。
- フタル酸エステル類DiNPは異性体の混合物である。本研究ではDiNPの異性体の代謝物の一つとして標準品の合成が可能である7cx-MMePPおよび7OH-MMeOPをサロゲートとしてその他の異性体も

含む混合物としてのDiNP代謝物の定性・定量により曝露レベルを明らかにした。この手法は欧州のバイオモニタリングでも共通プロトコルとしている方法で、曝露レベルに関する比較の妥当性が確保できる。

5. 現実により近い複合曝露によるアレルギーとの関連について、従来から行われてきた単一化合物との関連に加えて、札幌市小学生と北海道スタディの7歳児の2つ集団で、それぞれフタル酸エステル類とリン酸トリエステル類、また7歳児の集団ではビスフェノール類も加え「WQSモデル」「上位2化合物の組合せモデル」を考慮した統計モデルを用いてアレルギーとの関連を評価した。小学生の集団ではWQSモデルが鼻結膜炎のリスクを上げ、その寄与としてはTCIPPとTPHPの組合せによる可能性を示唆した。北海道スタディ7歳児の集団では、WQSモデルが喘鳴のリスクを上げ、その寄与としてはBDCIPPとDiNPの組合せによる可能性を示唆した。また負の方向のモデルでは、喘鳴および皮膚炎のリスクを下げ、その寄与としてはそれぞれBPSとBPFおよびTNBPとBPFの組み合わせによる可能性を示唆した。リン酸トリエステル類のWQSモデルはアレルギー関連の炎症マーカーHEL、HNEとの相関を示したが、この影響はHELはDHPH、HNEにはEHPHPの曝露による寄与が大きく、複合曝露の影響は認められなかった。アレルギーへの影響を、「単一化合物曝露」、「WQSモデル」、「上位2化合物の組合せモデル」で異なるモデルを同時に考慮することで、寄与の大きい化合物を検討した初めての研究である。
6. 学童の一般集団において、世界的に用いられるアレルギーのISAAC調査票に加えて、呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO) および血液・尿中のアレルギーに関連すると考えられるバイオマーカーを測定した。以前より用いられてきた好酸球数、総IgEおよびFeNOはいずれもISAAC調査票による喘鳴、鼻結膜炎、湿疹が有りの児で無い児よりも高く、また相互に相関を示した。また、FeNOについては喘鳴のカットオフ値として38ppbを示し、米国の小児ともほぼ同じ値が得られたことは、臨床においても有益である。一方、cc16は喘息の有る児で無い児よりも低かったが湿疹の有る児は無い児よりも高かった。また、8-OHdG、HEL、HNEについてはアレルギーとの関連は認められなかった。本研究ではアレルギーとバイオマーカーとの関連を横断的に解析をしているが、コホート研究である利点を生かして今後もアレルギー症状について追跡していくことで、発症早期のバイオマーカーとなるか、検討を継続できる。

(2) 環境政策への貢献

1. わが国における学童のフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類の曝露実態を明らかにした。これらは、一般集団の学童の基礎データとして活用することができる。
2. 学童のフタル酸エステル類、リン酸トリエステル類、ビスフェノール類への複合曝露によるアレルギーとの関連を明らかにした。類縁化合物が複数存在する中で、どの化合物に注視すべきかに対する知見は、化学物質の使用・管理などの環境政策に貢献できる。
3. 上記の知見は、環境省「子どもの環境と健康に関する全国調査（エコチル調査）」において曝露評価の検討において資料となりうる。また、学童期における対面調査への応諾率、採血やFeNOの実行可能性や実施方法などの経験は、エコチル調査推進の参考になる。
4. 世界的にも懸念される、複合曝露に関するヒトでの研究成果は、我が国のみならずグローバルな環境政策にとっても有益な知見となり得る。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

1. 曝露実態のデータは、化学物質の人へのばく露量モニタリング調査において、他の集団での測定事例として活用できる。
2. DiNP代謝物の分析において異性体も含めた定量評価値として参照できる。

3. 環境省「子どもの環境と健康に関する全国調査（エコチル調査）」において暴露評価および研究及び実施計画立案時の参考資料となる。

6. 国際共同研究等の状況

ベルギーアントワープ大学毒性学センターのアドリアン・コバチ教授らとバイオモニタリングの共同研究として、尿中リン酸トリエステル類およびビスフェノール類の分析を共同で実施した。コバチ教授らのグループは欧州の30か国以上の機関が参画するバイオモニタリングプロジェクトHBM4EUのメンバーであり、リン酸トリエステル類およびビスフェノール類の分析結果の妥当性を担保している。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Araki A., Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Mesfin R. K., Covaci A., Kishi R.: *Environment International*, 119, 438-446 (2018), Associations between allergic symptoms and phosphate flame retardants in dust and their urinary metabolites among school children.
- 2) Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Araki A., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Kishi R., Covaci A.: *Environmental Research*, 172, 543-551 (2019), Biomonitoring of organophosphate flame retardants and plasticizers in children: associations with house dust and housing characteristics in Japan.
- 3) Ait Bamai Y., Bastiaensen M., Araki A., Goudarzi H., Konno S., Ito S., Miyashita C., Yao Y., Covaci A., Kishi R.: *Environment International*, 131, 105003 (2019), Multiple exposures to organophosphate flame retardants alter urinary oxidative stress biomarkers among children: The Hokkaido Study.
- 4) Araki A., Ait Bamai Y., Bastiaensen M., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Miyashita C., Itoh S., Goudarzi H., Konno S., Covaci A.: *Environmental Research*, 183, 109212 (2020), Combined exposure to phthalate esters and phosphate flame retardants and plasticizers and their associations with wheeze and allergy symptoms among school children.
- 5) Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Araki A., Goudarzi H., Konno S., Ito S., Miyashita C., Yao Y., Kishi R., Covaci A.: *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 228, 113523 (2020), Temporal trends and determinants of PFR exposure in the Hokkaido Study.

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) Chen M., Chang C., Minatoya M.,: Eds. Kishi R., Grandjean P., *Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals.*, Springer Nature, 405-437 (2020) “Chapter 16: Bisphenols and Alkylphenols”
- 2) Ait Bamai, Y.: Eds. Kishi R., Norbäck D., Araki A. : *Indoor Environmental Quality and Health Risk toward Healthier Environment for All.*, Springer Nature, 159-178 (2019) “Chapter 8: Semi-Volatile Organic Compounds (SVOCs): Phthalates and Phosphorous Flame Retardants and Health Risks”

<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) Ketema R. M., Ait Bamai Y., Araki A., Kishi R., Saito T.: The 3rd FHS International conference. Hokkaido University, Sapporo, Japan. (2017.7.7)
 “Development and validation of a reliable method for the analysis of phthalate metabolites in human urine.”
- 2) Bastiaensen M., Van den Eede N., Araki A., Ait Bamai Y., Kishi R., Covaci A.: The 37th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs DIOXIN 2017, Vancouver, Canada. (2017.8.20-25)
 “Urinary biomonitoring of organophosphate flame retardants in Japanese children and correlations with house dust concentrations.”
- 3) Araki A., Ait Bamai Y., Kawai T., Tsuboi T., Miyashita C., Kishi R.: International Society of Exposure Science 27th Annual Meeting, North Carolina, USA (2017.10.15-19)
 “Phthalates and organophosphate flame retardants in house dust and their relation to allergies and oxidative stress marker 8-OHdG: the Hokkaido Study”
- 4) Araki A., Ait Bamai Y., Miyashita C., Kishi R.: Asia-Pacific Children’s Health Symposium, Taipei, Taiwan (2017.11.8-9)
 “Indoor Air Pollution and Children’s health- focused on phthalates, PFRs and allergies”
- 5) 荒木敦子、アイツバマイゆふ、Michiel Bastiaensen、Nele Van den Eede、Rahel Ketem Mesfin、伊藤佐智子、宮下ちひろ、Adrian Covaci、岸玲子：第88回日本衛生学会学術総会，東京都大田区 (2018.03.24.-26)
 「尿中リン酸トリエステル類代謝物と児の喘息・アレルギーとの関連－札幌市学童調査－」
- 6) Ait Bamai Y., Arak A., Nomura T., Kawai T., Tsuboi T., Shimizu H., Kobayashi S., Miyashita C., Kishi R.: International Society for Environmental Epidemiology / International Society of Exposure Science Asia Chapter 2018 (ISEE/ES AC2018), Taipei, Taiwan, (2018 .6.21-25)
 “Filaggrin mutation on the association between phthalates and phosphorus flame retardants in house dust and eczema and wheeze among children : The Hokkaido Study on Environment and Children’s Health”
- 7) Araki A., Ait Bamai Y., Kawai T., Tsuboi T., Kishi R.; International Society for Environmental Epidemiology / International Society of Exposure Science Asia Chapter 2018 (ISEE/ES AC2018), Taipei, Taiwan, (2018 .6.21-25)
 “Organophosphate flame retardants in house dust and their association with school children’s asthma and allergies”
- 8) Goudarzi H, Konno S, Kimura H, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Ait Bamai Y, Kimura H, Shimizu K, Suzuki M, Ito YM, Nishimura M, Kishi R.: Japanese Society of Allergology (JSA) 67th Annual Meeting, Chiba, Japan, (2018.6.22-24)
 “Contrasting associations of maternal smoking and BMI with wheeze and eczema in children.”
- 9) Araki A., Ait Bamai Y., Bastiaensen M., Van den Eede N., Kawai T., Tsuboi T., Itoh S., Miyashita C., Covaci A., kishi R.: The Joint Annual Meeting of the International Society of Exposure Science and the International Society for Environmental Epidemiology (ISES-ISEE 2018), Ottawa, Canada, (2018.8.26-30)
 “Mixed phthalate ester and phosphate flame retardant exposure and asthma and allergies in school children”
- 10) Bastiaensen M., Ait Bamai Y., Araki A., Van den Eede N., Kishi R., Covaci A.: 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants Dioxin 2018 & 10th

International PCB Workshop, Kraków, Poland, (2018.8.26-31)

“Determinants of exposure to phosphate flame retardants for Japanese schoolchildren.”

- 11) 荒木敦子、アイツバマイゆふ、Michiel Bastiaensen、Nele van den Eede、河合俊夫、坪井樹、Rahel Ketem Mesfin、伊藤佐智子、宮下ちひろ、Adrian Covaci、岸玲子；第70回北海道公衆衛生学会。北海道科学技術大学，北海道札幌市，(2018.10.20)
「室内ダスト中リン酸トリエステル類とその尿中代謝物濃度と学童の喘鳴・アレルギー症状との関連：札幌市学童調査。」
- 12) Ketema Rahel Mesfin；第89回日本衛生学会学術総会。名古屋大学東山キャンパス、愛知県名古屋市。(2019.2.1-3)
“Urinary phthalate metabolites concentration and temporal trends in 7 years old children, 2012-2017: Hokkaido Study.”
- 13) アイツバマイゆふ；第89回日本衛生学会学術総会。名古屋大学東山キャンパス、愛知県名古屋市。(2019.2.1-3)
「学童の尿中リン酸トリエステル類代謝物濃度と尿中炎症関連マーカーとの関連」
- 14) Ketema R. M.；CHEMICAL HAZARD Symposium. Sapporo, Japan (2019.3.20)
“Secular trend of phthalate metabolites in children urine 2012-2017, Hokkaido Birth Cohort Study.”
- 15) Mesfin R. K., Ait Bamai Y., Araki A, Saito T, Kishi R.：The 4th FHS International Conference, Sapporo, Hokkaido, Japan (2019.6.5)
“Urinary phthalate metabolites and oxidative stress biomarkers in 7 years old children from Hokkaido.”
- 16) Goudarzi Houman, 荒木敦子, 伊藤 佐智子, アイツバマイゆふ, 宮下ちひろ, 木村孔一, 今野 哲, 岸 玲子；第1回日本アレルギー学会北海道支部地方会。札幌市教育文化会館、北海道札幌市。(2019.6.23)
「Contrasting associations of maternal smoking and pre-pregnancy BMI with wheeze and eczema in children.」
- 17) Gys C., Ait Bamai Y., Araki A., Caballero-Casero N., Covaci A.：ISESISIAQ2019, Kaunas, Lithuania (2019.8.18-22)
“Monitoring exposure levels to alternative bisphenols for Japanese schoolchildren.”
- 18) Araki A., Ait Bamai Y., Kishi R.：ISESISIAQ2019, Kaunas, Lithuania (2019.8.18-22)
“Exposure to organophosphate esters in Japan: associations among their concentrations in house dust, urinary metabolite levels, and allergies.”
- 19) Gys C., Ait Bamai Y., Araki A., Caballero Casero N., Kishi R., Covaci A.：11th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health., Leuven, Belgium (2019.8.28-30)
“Monitoring exposure levels to bisphenols in Japanese schoolchildren.”
- 20) Goudarzi H., Konno S., Araki A., Ito S., Ait Bamai Y., Miyashita C., Kishi R.：European Respiratory Society International Congress, Madrid, Spain, (2019.9.28-10.2)
“Childhood allergies and obesity relationship: Identification of non-invasive biomarkers.”

(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) 北海道札幌南高等学校における特別授業「環境と私たちの健康」(2017年10月26日、14:15～15:05、15:15～16:05 合計44名)
- 2) 北海道大学サステナビリティウィーク2017環境と健康に関する市民講演会「これまでの成果と今後の展望～WHO研究協力センターとしての役割～」(主催：北海道大学環境健康科学研究教育センター、2017年11月20日、北海道大学遠友学舎、観客約50名)にて講演
- 3) 市民講演会「北海道の子どもを取り巻く環境と健康 ～2万人の調査から～」(2018年2月15日、主催：北海道大学環境健康科学研究教育センター、札幌エルプラザ4階会議室、観客約35名)
- 4) 荒木敦子；身近な生活環境における化学物質と子どもたちの健康. 第6回 北大・地球研合同セミナー「グローバルとローカルの視座から地域の人々の生活と健康を考える」(2018年6月30日、第22回地球研地域連携セミナー / 2018年度第1回保健科学セミナー、北海道大学大学院保健科学研究院、約30名)
- 5) 高校特別授業「環境と私たちの健康」(2017年10月26日、北海道札幌南高等学校、合計44名、2018年10月24日、約40名； 2018年11月7日、札幌国際情報高校、約50名)
- 6) 市立札幌藻岩高校 総合的な学習の時間『ミライdesign』において講義「プラスチックに含まれる化学物質と健康」(2019年7月12日、北海道札幌市立藻岩高校、合計約80名)
- 7) 市民講演会「環境と私たちの健康とSDGs」(2019年10月2日、北海道大学学術交流会館、約50名)
- 8) 高校出前講義「環境と私たちの健康」(2019年10月24日、北海道札幌南高等学校、約50名)
- 9) 荒木敦子；私たちの身近な住まいの室内環境と健康. (令和元年 第1回「パッシブシステム・市民セミナー」、2019年11月16日、札幌市立大学サテライトキャンパス、約50名)

(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) Bekö G, Callesen M, Weschler CJ, et al. Phthalate exposure through different pathways and allergic sensitization in preschool children with asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic dermatitis. *Environ Res.* 2015;137(0):432-439.
- 2) Bornehag C, Sundell J, Weschler C, et al. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environ Health Perspect.* 2004;112:1393 - 1397.
- 3) Callesen M, Bekö G, Weschler CJ, et al. Phthalate metabolites in urine and asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic dermatitis in preschool children. *Int J Hyg Environ Health.* 2014;217(6):645-652.
- 4) Callesen M, Bekö G, Weschler CJ, et al. Associations between selected allergens, phthalates, nicotine, polycyclic aromatic hydrocarbons, and bedroom ventilation and clinically confirmed asthma, rhinoconjunctivitis, and atopic dermatitis in preschool children. *Indoor Air.* 2014;24(2):136-147.
- 5) Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, et al. Exposure to phthalates in house dust and associated allergies in children aged 6-12years. *Environ Int.* 2016;96:16-23.
- 6) Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, et al. Associations of phthalate concentrations in floor dust and multi-surface dust with the interior materials in Japanese dwellings. *Sci Total*

Environ. 2014;468-469(0):147-157.

- 7) Araki A, Saito I, Kanazawa A, et al. Phosphorus flame retardants in indoor dust and their relation to asthma and allergies of inhabitants. *Indoor Air*. 2014;24(1):3-15.
- 8) Donohue KM, Miller RL, Perzanowski MS, et al. Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and asthma development among inner-city children. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):736-742. e736.
- 9) Gascon M, Casas M, Morales E, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and childhood respiratory tract infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):370-378. e377.
- 10) Spanier AJ, Kahn RS, Kunselman AR, et al. Bisphenol a exposure and the development of wheeze and lung function in children through age 5 years. *JAMA Pediatrics*. 2014;168(12):1131-1137.
- 11) Wang IJ, Hsieh W-S, Chen C-Y, et al. The effect of prenatal perfluorinated chemicals exposures on pediatric atopy. *Environ Res*. 2011;111(6):785-791.
- 12) Dalsager L, Christensen N, Husby S, et al. Association between prenatal exposure to perfluorinated compounds and symptoms of infections at age 1-4 years among 359 children in the Odense Child Cohort. *Environ Int*. 2016;96:58-64.
- 13) Grandjean P, Andersen EW, Budtz-Jorgensen E, Nielsen F, Molbak K, Weihe P. Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *JAMA*. 2012;307.
- 14) Grandjean P, Budtz-Jorgensen E. Immunotoxicity of perfluorinated alkylates: calculation of benchmark doses based on serum concentrations in children. *Environ Health*. 2013;12.
- 15) Granum B, Haug LS, Namork E, Stolevik SB, Thomsen C, Aaberge IS. Pre-natal exposure to perfluoroalkyl substances may be associated with altered vaccine antibody levels and immune-related health outcomes in early childhood. *J Immunotoxicol*. 2013;10.
- 16) Okada E, Sasaki S, Saijo Y, et al. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and relationship with allergies and infectious diseases in infants. *Environ Res*. 2012;112(0):118-125.
- 17) Okada E, Sasaki S, Kashino I, et al. Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids and allergic diseases in early childhood. *Environ Int*. 2014;65:127-134.
- 18) Goudarzi H, Miyashita C, Okada E, et al. Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids and prevalence of infectious diseases up to 4years of age. *Environ Int*. 2017;104:132-138.
- 19) Goudarzi H, Miyashita C, Okada E, et al. Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on prevalence of allergic diseases among 4-year-old children. *Environ Int*. 2016;94:124-132.
- 20) Ait Bamai Y, Miyashita C, Araki A, Nakajima T, Sasaki S, Kishi R. Effects of prenatal di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on childhood allergies and infectious diseases: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Sci Total Environ*. 2018;618:1408-1415.
- 21) O'Brien KM, Upson K, Cook NR, Weinberg CR. Environmental Chemicals in Urine and Blood: Improving Methods for Creatinine and Lipid Adjustment. *Environ Health Perspect*. 2016;124(2):220-227.
- 22) Mage DT, Allen RH, Kodali A. Creatinine corrections for estimating children's and adult's pesticide intake doses in equilibrium with urinary pesticide and creatinine concentrations. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2008;18(4):360-368.
- 23) Carrico C, Gennings C, Wheeler DC, Factor-Litvak P. Characterization of Weighted Quantile Sum Regression for Highly Correlated Data in a Risk Analysis Setting. *Journal of*

Agricultural, Biological, and Environmental Statistics. 2015;20(1):100-120.

- 24) Gennings C, Sabo R, Carney E. Identifying subsets of complex mixtures most associated with complex diseases: polychlorinated biphenyls and endometriosis as a case study. *Epidemiology*. 2010;21 Suppl 4:S77-84.
- 25) Romano ME, Eliot MN, Zoeller RT, et al. Maternal urinary phthalate metabolites during pregnancy and thyroid hormone concentrations in maternal and cord sera: The HOME Study. *Int J Hyg Environ Health*. 2018;221(4):623-631.
- 26) Keil AP, Buckley JP, OBrien KM, Ferguson KK, Zhao S, White AJ. A quantile-based g-computation approach to addressing the effects of exposure mixtures. arXiv:190204200 [statME]. 2019.
- 27) Kishi R, Saijo Y, Kanazawa A, et al. Regional differences in residential environments and the association of dwellings and residential factors with the sick house syndrome: A nationwide cross-sectional questionnaire study in Japan. *Indoor Air*. 2009;19(3):243-254.
- 28) Saijo Y, Kishi R, Sata F, et al. Symptoms in relation to chemicals and dampness in newly built dwellings. *Int Arch Occup Environ Health*. 2004;77(7):461-470.
- 29) Antus B. Oxidative Stress Markers in Sputum. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2930434.
- 30) Minatoya M, Itoh S, Yamazaki K, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and behavioral problems in children at preschool age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health *Environ Health and Preventive Medicine*. 2018;23:43.
- 31) Bertelsen RJ, Carlsen KC, Calafat AM, et al. Urinary biomarkers for phthalates associated with asthma in Norwegian children. *Environ Health Perspect*. 2013;121(2):251-256.
- 32) Hsu NY, Lee CC, Wang JY, et al. Predicted risk of childhood allergy, asthma, and reported symptoms using measured phthalate exposure in dust and urine. *Indoor Air*. 2012;22(3):186-199.
- 33) Just AC, Whyatt RM, Miller RL, et al. Children's Urinary Phthalate Metabolites and Fractional Exhaled Nitric Oxide in an Urban Cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(9):830-837.
- 34) Araki A, Miyashita C, Mitsui T, et al. Prenatal organochlorine pesticide exposure and the disruption of steroids and reproductive hormones in cord blood: The Hokkaido study. *Environ Int*. 2018;110:1-13.
- 35) Bi C, Maestre JP, Li H, et al. Phthalates and organophosphates in settled dust and HVAC filter dust of U.S. low-income homes: Association with season, building characteristics, and childhood asthma. *Environ Int*. 2018;121:916-930.
- 36) Nishimura Y, Moriya K, Kobayashi S, et al. Association between ESR1 polymorphisms and second to fourth digit ratio in school-aged children in the Hokkaido Study. *Steroids*. 2019;141:55-62.
- 37) Tanaka M, Inoue K-i, Momoi T, Takano H. In vivo immunoamplifying effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on cytokine response. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2013;35(1):147-150.
- 38) Kuo C-H, Hsieh C-C, Kuo H-F, et al. Phthalates suppress type I interferon in human plasmacytoid dendritic cells via epigenetic regulation. *Allergy*. 2013;68(7):870-879.
- 39) Canbaz D, Logiantara A, van Ree R, van Rijt LS. Immunotoxicity of organophosphate flame retardants TPHP and TDCIPP on murine dendritic cells in vitro. *Chemosphere*. 2017;177:56-64.
- 40) Killilea DW, Chow D, Xiao SQ, Li C, Stoller ML. Flame retardant tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) toxicity is attenuated by N-acetylcysteine in human kidney cells.

Toxicol Rep. 2017;4:260-264.

- 41) Krivoshiev BV, Beemster GTS, Sprangers K, et al. Toxicogenomics of the flame retardant tris (2-butoxyethyl) phosphate in HepG2 cells using RNA-seq. *Toxicol In Vitro*. 2018;46:178-188.
- 42) Krivoshiev BV, Beemster GTS, Sprangers K, Blust R, Husson SJ. A toxicogenomics approach to screen chlorinated flame retardants tris(2-chloroethyl) phosphate and tris(2-chloroisopropyl) phosphate for potential health effects. *J Appl Toxicol*. 2018;38(4):459-470.
- 43) Liu C, Wang Q, Liang K, et al. Effects of tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate and triphenyl phosphate on receptor-associated mRNA expression in zebrafish embryos/larvae. *Aquat Toxicol*. 2013;128-129:147-157.
- 44) Ito Y, Yamanoshita O, Asaeda N, et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate Induces Hepatic Tumorigenesis through a Peroxisome Proliferator-activated Receptor α -independent Pathway. *J Occup Health*. 2007;49(3):172-182.
- 45) Ait Bamai Y, Bastiaensen M, Araki A, et al. Multiple exposures to organophosphate flame retardants alter urinary oxidative stress biomarkers among children: The Hokkaido Study. *Environ Int*. 2019;131:105003.
- 46) Lee I, Alakeel R, Kim S, et al. Urinary phthalate metabolites among children in Saudi Arabia: Occurrences, risks, and their association with oxidative stress markers. *Sci Total Environ*. 2019;654:1350-1357.
- 47) Rocha BA, Asimakopoulos AG, Barbosa F, Jr., Kannan K. Urinary concentrations of 25 phthalate metabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. *Sci Total Environ*. 2017;586:152-162.
- 48) Kojima H, Takeuchi S, Van den Eede N, Covaci A. Effects of primary metabolites of organophosphate flame retardants on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicol Lett*. 2016;245:31-39.
- 49) Greaves AK, Su G, Letcher RJ. Environmentally relevant organophosphate triesters in herring gulls: In vitro biotransformation and kinetics and diester metabolite formation using a hepatic microsomal assay. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;308:59-65.
- 50) Völkel W, Fuchs V, Wöckner M, Fromme H. Toxicokinetic of tris(2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP) in humans following single oral administration. *Arch Toxicol*. 2017.
- 51) Wang X, Liu Q, Zhong W, et al. Estimating renal and hepatic clearance rates of organophosphate esters in humans: Impacts of intrinsic metabolism and binding affinity with plasma proteins. *Environ Int*. 2019;134:105321.
- 52) Hisaka S, Kato Y, Kitamoto N, et al. Chemical and immunochemical identification of propanoyllysine derived from oxidized n-3 polyunsaturated fatty acid. *Free Radical Biol Med*. 2009;46(11):1463-1471.
- 53) Naito Y, Lee M-C-i, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. Oxidative Stress Markers. *ANTI-AGING MEDICINE*. 2010;7(5):36-44.
- 54) Bastiaensen M, Xu F, Been F, Van den Eede N, Covaci A. Simultaneous determination of 14 urinary biomarkers of exposure to organophosphate flame retardants and plasticizers by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(30):7871-7880.
- 55) He M-J, Lu J-F, Ma J-Y, Wang H, Du X-F. Organophosphate esters and phthalate esters in human hair from rural and urban areas, Chongqing, China: Concentrations, composition profiles and sources in comparison to street dust. *Environ Pollut*. 2018;237:143-153.
- 56) Araki A, Bastiaensen M, Ait Bamai Y, et al. Associations between allergic symptoms and

- phosphate flame retardants in dust and their urinary metabolites among school children. *Environ Int.* 2018;119:438-446.
- 57) Dirtu AC, Ali N, Van den Eede N, Neels H, Covaci A. Country specific comparison for profile of chlorinated, brominated and phosphate organic contaminants in indoor dust. Case study for Eastern Romania, 2010. *Environ Int.* 2012;49:1-8.
- 58) Tajima S, Araki A, Kawai T, et al. Detection and intake assessment of organophosphate flame retardants in house dust in Japanese dwellings. *Sci Total Environ.* 2014;478(0):190-199.
- 59) Chen Y, Fang J, Ren L, et al. Urinary metabolites of organophosphate esters in children in South China: Concentrations, profiles and estimated daily intake. *Environ Pollut.* 2018;235:358-364.
- 60) Fromme H, Lahrz T, Kraft M, et al. Organophosphate flame retardants and plasticizers in the air and dust in German daycare centers and human biomonitoring in visiting children (LUPE 3). *Environ Int.* 2014;71(0):158-163.
- 61) He C, English K, Baduel C, et al. Concentrations of organophosphate flame retardants and plasticizers in urine from young children in Queensland, Australia and associations with environmental and behavioural factors. *Environ Res.* 2018;164:262-270.
- 62) He C, Toms L-ML, Thai P, et al. Urinary metabolites of organophosphate esters: Concentrations and age trends in Australian children. *Environ Int.* 2018;111:124-130.
- 63) Hoffman K, Hammel SC, Phillips AL, et al. Biomarkers of exposure to SVOCs in children and their demographic associations: The TESIE Study. *Environ Int.* 2018;119:26-36.
- 64) Ospina M, Jayatilaka NK, Wong L-Y, Restrepo P, Calafat AM. Exposure to organophosphate flame retardant chemicals in the U.S. general population: Data from the 2013-2014 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Int.* 2018;110:32-41.
- 65) Bastiaensen M, Bamai YA, Araki A, et al. Biomonitoring of organophosphate flame retardants and plasticizers in children: associations with house dust and housing characteristics in Japan. *Environ Res.* 2019.
- 66) Bastiaensen M, Ait Bamai Y, Araki A, et al. Temporal trends and determinants of PFR exposure in the Hokkaido Study. *Int J Hyg Environ Health.* 2020;228:113523.
- 67) Jacobson MH, Woodward M, Bao W, Liu B, Trasande L. Urinary Bisphenols and Obesity Prevalence Among U.S. Children and Adolescents. *J Endocr Soc.* 2019;3(9):1715-1726.
- 68) 独立行政法人製品評価技術基盤機構. Summary of the Interim Report - Bisphenol A. 2003.
- 69) Liao C, Liu F, Alomirah H, et al. Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures. *Environ Sci Technol.* 2012;46(12):6860-6866.
- 70) Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, et al. Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families. *Int J Hyg Environ Health.* 2015;218(5):461-470.
- 71) Araki A, Bastiaensen M, Ait Bamai Y, et al. Associations between allergic symptoms and phosphate flame retardants in dust and their urinary metabolites among school children. *Environ Int.* 2018;119:438-446.
- 72) American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels for Clinical A. Interpreting FeNO. <https://www.niox.com/en-us/feno-asthma/interpreting-feno/>.
- 73) Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J*

Respir Crit Care Med. 2011;184(5):602-615.

- 74) Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, et al. Exhaled Nitric Oxide Cutoff Values for Asthma Diagnosis According to Rhinitis and Smoking Status in Japanese Subjects. *Allergol Int.* 2011;60(3):331-336.
- 75) Matsunaga K, Hirano T, Kawayama T, et al. Reference Ranges for Exhaled Nitric Oxide Fraction in Healthy Japanese Adult Population. *Allergol Int.* 2010;59(4):363-367.

III. 英文Abstract

Combined Exposures to Environmental Chemicals and Effects on Allergies and Immunity

Principal Investigator: Atsuko ARAKI

Institution: Hokkaido University

Kita 12, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 062-0812, JAPAN

Tel: +81-11-706-4749 / Fax: +81-11-706-4725

E-mail: AAraki@cehs.hokudai.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Environmental chemicals, Mixture exposure, Biomonitoring, Asthma, Allergies, Inflammatory biomarkers, Children, Epidemiology,

Childhood allergies have been increasing recently, and environmental chemical exposures could be potential risk factors for development of asthma and allergies. In this study, we aimed; 1) to find the exposure levels of phthalates, organophosphate triesters (OPEs), and bisphenols in school children, 2) to examine the associations of above-mentioned classes of chemical exposures with allergies (asthma, rhinoconjunctivitis, eczema) in children. Additionally, to investigate inflammatory biomarkers to examine objective measures, assessment of airway and systemic inflammations with a comprehensive approach to detect early-onset allergic conditions, 3) to conduct face to face examination related to asthma and allergies and collection of blood and urine samples for further investigation.

For preliminary analysis of single chemical, mixture chemicals, and multiple chemicals model, we used existing data of 128 school children with allergies as well as urinary phthalates and OPEs data. In a single chemical model, increased levels of TDCIPP metabolite and Σ TCIPP metabolites were significantly associated with increased prevalence of rhino-conjunctivitis. In mixture chemical models by Weighted Quintile Sum (WQS) regression, increased levels of mixture chemicals of phthalates and OPEs were positively associated with increased risk of rhino-conjunctivitis. A combined model of the two highest contributed chemicals to rhino-conjunctivitis in mixture chemical models, “high-high” Σ TCIPP and Σ TPHP was associated with an increased prevalence of rhinoconjunctivitis, (OR = 5.78, 95% CI:1.81-18.43) to the “low \times low” group, suggesting an additive and/or multiplicative interaction.

To examine exposure chemicals among children, we collected urine samples from 7-years old children participated in “Hokkaido Study on Environment and Children’s Health”. Ten metabolites of five phthalates, 14

metabolites of eight OEPs, and seven bisphenols were analyzed by LC-MSMS or GC-MSMS using 400 urine samples. Allergies were evaluated by ISAAC questionnaire and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 4-hydroxynonenal (HNE), and Hexanoyl-lysine (HEL) were measured as allergy-related biomarkers. Exposure levels of OPEs and bisphenols were slightly lower than those in the US studies. Mixture exposure to OPEs was positively associated with increasing levels of urinary HNE and HEL; however, single chemicals, such as EHPHP, and DPHP, were the factors to increase biomarkers, respectively.

For clinical examinations of allergies, 428 children at age 9-11 years agreed to visit pediatricians for physical examination, the measurement of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) and the collection of blood and urine samples. We observed higher significant levels of biomarkers including FeNO, total serum IgE, and blood eosinophils within children with asthma and other allergies assessed by questionnaires.