

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

公 募 区 分 : 環境問題対応型研究 (一般課題)

研究予定期間 : 令和3 (2021) 年度 ~ 令和5 (2023) 年度

課 題 番 号 : 【5-2104】

体系的番号 : (JPMEERF20215004)

研 究 課 題 : 「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」

Research Title : Proposition of a Comprehensive Human Biomonitoring Method to Assess Co-exposure to Chemicals

研 究 代 表 者 : 上島 通浩

研究代表機関 : 名古屋市立大学

研究分担機関 : 東京農業大学

研 究 領 域 : 安全確保領域

キ ー ワ ー ド : 化学物質、バイオモニタリング、網羅的分析、複合曝露、尿サンプル

令和6 (2024) 年5月

目次

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書	1
I. 成果の概要	3
1. はじめに（研究背景等）	5
2. 研究開発目的	5
3. 研究目標	5
4. 研究開発内容	6
5. 研究成果	8
5-1. 成果の概要	8
5-2. 研究目標の達成状況	15
5-3. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献	16
6. 研究成果の発表状況の概要	18
6-1. 成果の件数	18
6-2. 主な査読付き論文等の主要な成果	18
7. 国際共同研究等の状況	19
8. 研究者略歴	19
II. 成果の詳細	20
II-1 サブテーマ1「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」	20
〔サブテーマ1要旨〕	20
1. サブテーマ1研究開発目的	20
2. サブテーマ1研究目標	20
3. サブテーマ1研究開発内容	21
4. サブテーマ1結果及び考察	23
5. サブテーマ1研究目標の達成状況	34
III. 研究成果の発表状況の詳細	36
(1) 成果の件数	36
(2) 誌上発表	36
(3) 口頭発表	37
(4) 知的財産権	37
(5) 「国民との科学・技術対話」の実施	38
(6) マスメディア等への公表・報道等	38
(7) 研究成果による受賞	38
(8) その他の成果発表	38

I. 成果の概要

<課題情報>

公 募 区 分 :	環境問題対応型研究（一般課題）
研 究 実 施 期 間 :	令和3（2021）年度 ～ 令和5（2023）年度
課 題 番 号 :	【5-2104】
研 究 課 題 :	「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」
研 究 代 表 者 :	上島通浩（名古屋市立大学、教授）
重点課題（主）:	【重点課題⑮】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の促進に係る研究
重点課題（副）:	
行政要請研究テーマ （行政ニーズ）:	非該当
研 究 領 域 :	安全確保領域

<キーワード>

化学物質
バイオモニタリング
網羅的分析
複合曝露
尿サンプル

<研究体制>

サブテーマ1「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」

<サブテーマ1リーダー及び研究分担者>

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	教授	上島通浩	
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	准教授	伊藤由起	
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	准教授	榎原毅	2021年度～2022年9月

名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	助教	加藤沙耶香	2022年9月～2023年度
東京農業大学	生命科学部	教授	富澤元博	

＜サブテーマ1 研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	助教	加藤沙耶香（2021年度～2022年9月）
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	助教	ハレツキスロマナス（2022年11月～2023年度）
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	大学院生	岩崎楓生（2022年度～2023年度）
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	大学院生	柴山裕希（2022年度～2023年度）
東京農業大学	生命科学部	助教	寺島健仁
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	大学院生	モハントナヤンチャンドラ（2021年度～2023年9月）
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	医学部MD-PhD前期コース生	和佐田ひと実（2022年9月～2023年5月）
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	技術職員	湊京子
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	医学部医学科3年生	豊田佳代（2021年9月～2021年12月）
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	パートタイム職員	ムスタファアーメッド（2022年7月～2023年3月）
名古屋市立大学	大学院医学研究科 環境労働衛生学分野	研究員	土山智之（2023年11月～2024年3月）

＜研究経費（間接経費を含む）＞

年度	直接経費	間接経費	経費合計
2021	27,693千円	8,307千円	36,000千円
2022	27,693千円	8,307千円	36,000千円
2023	27,693千円	8,307千円	36,000千円
合計	83,079千円	24,921千円	108,000千円

1. はじめに（研究背景等）

ヒトにおける化学物質の的確な曝露評価は、実効性のある健康リスク管理を行うための必要条件である。従来の曝露評価は、環境中への排出量や、空気、水、土壌、食品等の媒体を対象とした濃度モニタリングの結果やモデルによる推定値を用いて、平均値や予測最大曝露量等の代表値を得るアプローチを中心に行われてきた。近年はこれに加え、個人単位の曝露量の多様性が正確に反映される、生体試料を用いたヒトバイオモニタリング (human biomonitoring、以下、**HBM**) が注目され、欧米諸国を中心に導入されている。わが国でも、環境省の「化学物質の人へのばく露量モニタリング調査」や「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」でHBMが行われ、「国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ (SAICM)」国内実施計画の進捗結果としても報告されている。

しかし、これらバイオモニタリングは予め定めた対象物質を測定するターゲット分析を手法とし、多種の物質への曝露を網羅的に評価する方法論としてのHBMは、未だ確立したといえない状況にある。近年は、分析前に特定の物質を想定しないノンターゲット分析法が発展してきたが、代謝物の化学構造の確定に必須である参照ライブラリが事実上存在しない。標準物質との照合が必要になるが、これを入手可能な場合は例外的である。化学物質の包括的なリスク評価、特に複合曝露評価に欠かせない網羅的分析を、現状に鑑みて実際の曝露評価にどう位置づけるか、方法論・手法の確立が求められている。

本研究代表者らはH30-R2年度の環境研究総合推進費課題【5-1851】(JPMEERF20185051)において、有機リン系殺虫剤のノンターゲット分析に動物実験を組み合わせ、市販標準品のない殺虫剤代謝物をヒト尿中で検出する技術を開発した(Nomasa et al. 2021)。本研究課題では、この技術を環境リスク初期評価で「詳細な評価を行う候補」とされた物質及び化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）の優先評価物質、室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質に拡張適用する。尿中に排泄される化学物質を対象に、ヒト集団で包括的曝露評価を行う方法論の開発を目指した。

【引用文献】

Nomasa K, Oya N, Ito Y, et al. Development of a strategic approach for comprehensive detection of organophosphate pesticide metabolites in urine: Extrapolation of cadusafos and prothiofos metabolomics data of mice to humans. J Occup Health 63(1): e12218, 2021.

2. 研究開発目的

本研究では、ヒト尿を用いるバイオモニタリングに関し、ターゲット分析法が未確立、曝露評価の優先度が高い化学物質を対象に、対象集団の包括的曝露評価が可能な方法論を開発することを目的とする。

3. 研究目標

全体目標	ヒト尿を用いるBMに関し、ターゲット分析法が未確立かつ曝露評価の優先度が高い化学物質について、対象集団の包括的曝露評価が可能な方法論を開発する。具体的には次の2つの主要アウトプットおよび1つの付加的アウトプットを得ることを目標とする。 【主要アウトプット】 (a)～(c)の3カテゴリー（(a)環境リスク初期評価の「人に対する健康のリスク評価」により「詳細な評価を行う候補と考えられる」とされた物質、(b)化審法における優先評価化学物質のうち人健康影響の観点からリスク評価（一次）II以降に進んだ物質、(c)室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある
------	---

	物質) から合計 150 物質を選定し、このうち、物質の物理化学的性質や分析機器の特性および感度を考慮して対象物質を絞り込み、その尿中代謝物または尿中親物質の包括的曝露同定に必要な質量分析用ライブラリを構築する。 2. 構築したライブラリを、愛知県におけるエコチル調査参加妊婦(100 人)、2 日間の陰膳試料を採取済みの成人(女子大学に在籍する学生 70 人)に適用し、尿中代謝物等の検出状況を明らかにする。これにより、リスク評価が必要として設定した物質群、対象集団において、本手法による包括的曝露評価が有効であることを示す。 【付加的アウトプット】 主要アウトプット 2 において検出率または検出濃度が高かった代謝物のうち、同物質およびその親物質の標準物質が入手可能な場合に限り、陰膳試料 70 人分を分析する。食事中に親物質(または代謝物と同構造の分解物)が検出されるか、すなわち食事が曝露経路といえるかを明らかにする。
--	---

サブテーマ 1	網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案
サブテーマ 1 実施機関	名古屋市立大学、東京農業大学
サブテーマ 1 目標	全体目標と同様

4. 研究開発内容

【サブテーマ 1】網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案

以下の 1) ～ 6) について、研究を実施した。

1) 曝露評価が必要な物質の選定

本研究の対象となる有機化学物質を、下記の(a)～(c)の選定基準に従い、合計150物質を越える数で選定し、測定対象候補物質とした。

(a) 化学物質の環境リスク初期評価

「人に対する健康のリスク評価」により「詳細な評価を行う候補と考えられる」物質

(b) 化審法

優先評価化学物質のうち人健康影響の観点からリスク評価(一次)II以降に進んだ物質

(c) 室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質

(c)については、まず、(1)環境省がリストを作成している「有害大気汚染物質に該当する可能性のある物質」に相当する物質のうち、化審法の優先評価化学物質であるもの、(2)厚生労働省の職場における化学物質のリスク評価検討会の初期リスク評価や詳細リスク評価の対象物質をリストアップした。そして、(a)、(b)の物質を含め分析可能性を考慮した上で、(3)食品安全委員会により再評価優先度A、Bとされた農薬、または河川等での検出事例があるなど、環境汚染物質としての可能性が指摘されている医薬品・動物用医薬品・農薬類の中から150物質を越える数となるように選定した。

さらに、選定した物質について、物理化学的性質や分析機器の特性および感度を考慮し、本研究で対象とする物質を絞り込んだ。なお、曝露濃度が高い産業現場ではターゲット法による分析が行われていても、測定対象の尿中代謝物が生活環境の低濃度域複合曝露下では物質特異的のマーカーであると

は限らないことから、ターゲット法が確立している物質についても一部、今回の対象物質に含めた。

2) 尿中代謝物の調査および「環境化学物質代謝物ライブラリ（仮称）」への仮登録

1) で絞り込んだ化学物質について、これらの物質の代謝に関する文献を調査した。代謝マップが得られた場合は、尿中に排泄される代謝物をリストアップし、ライブラリソフト (mzVault™ (Thermo Fisher Scientific社)) 上の自作の「環境化学物質代謝物ライブラリ（仮称）」に仮登録した。代謝マップに関する文献が存在しない場合は、尿中に排泄されることが想定される代謝物候補物質を登録した。

3) マウスへの対象物質の投与

実験全体のワークフローを図0-1（図1-1）に示す。

10週齢のICR雄マウスを1～2週間環境に馴化させたのち、1) で選定した各被験物質を溶媒に溶解し、半数致死量(LD50)を目安に設定した高用量、低用量（高用量の1/2の用量に設定）を、一物質ずつ異なる個体に強制経口投与した（最大投与量はLD50の1/2）。投与後24時間に排泄された尿を代謝ケージにて採取した。投与スケジュールは図0-1（図1-1）の通り、1日目は対照として溶媒のみの投与を行い、2日目は低用量、4日目には高用量を投与し、各投与後に24時間採尿を行った。なお、本動物実験は名古屋市立大学の動物実験委員会の審査承認を得て行った。



図0-1（図1-1）．本研究のワークフロー模式図

4) 質量分析用ライブラリの作成

尿試料の分析は、高速液体クロマトグラフ高分解能質量分析計（LC-HRMS）またはガスクロマトグラフ高分解能質量分析計（GC-HRMS）により行った。まず、尿の前処理方法について検討した。食品分析などで汎用され、農薬類の代謝物の網羅的分析には最も適していることが経験的に判明しているQuick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (QuEChERS) 法とアセトニトリルを加えた除タンパクのみの方法を用い、それぞれで添加標準物質の回収率とクロマトグラムピークの検出状況を検討した。その際、尿中代謝物の標準品は入手困難であることを鑑み、尿中に未変化体として排泄されることが想定される親物質の標準品を、代謝物の代替添加標準物質として用いた。最終的に尿比重で補正をすることとし、超純水で希釈しマウス尿比重1.004、ヒト尿比重1.002に標準化し、除タンパクを行った。

その後、各被験物質を投与したマウスから得た実試料を用いた。高用量および低用量投与により得た尿におけるピーク面積が対照尿に比べ明瞭に大きくなるピークを選択した。イオン化されたピーク物質のスペクトル情報（MS¹スペクトル）を化学構造推定ソフト（Compound Discoverer 3.3（Thermo Fisher Scientific社製）、MZmine）に読み込み、同位体存在比と元素の精密質量から計算される分子の精密質量から組成式を推定した。これを仮登録した代謝物に照合し、合致すれば、ピークの保持時間と、化合物の化学結合が切れて生じるプロダクトイオンのスペクトル（MS²スペクトル）をライブラリ（マウスデータ）に登録した。用量依存的に増加したピーク物質については、仮登録した代謝物と一致しない場合においても、投与に由来して尿に排泄された外因性または内因性物質と考えられるため、フラグ付きでマウスデータに加えた。

LC-HRMSは、逆相とHILICの2種のクロマトグラフィーで、加熱エレクトロスプレーイオン化法ポジティブ、ネガティブ両方を実施した。マウスのデータは、data dependent acquisitionで、ヒトのデータはdata independent acquisitionモードで取得した。

5) ヒト尿中のピークとマウスデータとの照合

研究代表者らは、エコチル調査において全国調査の一環として収集する生体試料とは別に、愛知ユニットセンターとして独自に採尿を実施し、検体を名古屋市立大学に保管している。エコチル調査への参加妊婦の妊娠初期検体の中から、有機リン系殺虫剤代謝物濃度（以前の研究で測定済み）が比較的高かった141人（各人につき妊娠前期、妊娠中後期の2時点の計282検体：研究計画書の「研究目標」では100人に設定）を選定した。また、女子大学に在籍する学生については、環境研究総合推進費研究【5-1851】で実施した陰膳調査翌日の尿73人分（研究計画書の「研究目標」では70人に設定）を選定した。これらのサンプルの前処理は全てQuEChERS法を行い、LC-HRMSで網羅的分析を行ったクロマトデータは取得済みであったが、前述の通り前処理方法、データ取得方法を変更したため、再度網羅的分析を実施した。

この部分の研究については名古屋市立大学の医学系研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

6) 検出率または検出濃度が高かった代謝物を対象とした陰膳試料中の親物質含有状況の検索

今回対象とした物質の中で化学構造の同定レベルが高く、かつ尿中濃度の最高値がそれぞれ約3 μmol/L、0.3 μmol/Lと比較的高かった殺菌剤テブコナゾールとテトラコナゾールに着目してガスクロマトグラフィータンデム型質量分析計にて陰膳試料の分析を行った。これらは食事や飲料水、環境からの曝露の可能性が考えられる物質である。検体は、尿に検出された各物質それぞれ2人ずつを含む計10名の2日分の陰膳試料を、各食事と飲料、間食とにわけて測定した。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

1) 曝露評価が必要な物質の選定

測定対象候補としてリストアップした物質数を、表0-1（表1-1）に示す。本課題では、行政によるリスク評価制度の対象物質および室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質という観点から物質を選定した。まず、(a)、(b)、(c)1、(c)2の選定基準で160物質を候補物質としてリストアップした。次に、この中から使用する質量分析計での分析に適さない金属や無機化合物を除いた138物質に、(c)3に該当する農薬・医薬品・動物用医薬品73物質を加え、合計211物質を選定した。(c)3のカテゴリーは、食品安全委員会により再評価優先度A、Bとされた農薬を中心に選定した。近年、投薬された（服用した）ヒトから排泄された、あるいは不適切な方法で廃棄された医薬品等による下水処理水中の汚染（Kadokami et al. 2021）や河川水等の環境汚染（Wilkinson et al. 2022）が注目され始めている。検出されている環境媒体中の濃度からは、ヒトへの曝露用量が他の環境化学物質と同程度になりうるものがうかがわれ、環境経路で曝露する農薬等のヒト健康への影響に着目した疫学研究が多く行われていることを鑑みれば、同様に医薬品等についてもHBMの対象物

質に含むことが必要と考えた。

表 0-1（表 1-1）． 選定基準に該当した物質数および絞り込んだ測定対象候補物質数

選定基準	行政によるリスク評価 物質数	測定対象候補 物質数
(a) 環境リスク初期評価 「人に対する健康のリスク評価」により 「詳細な評価を行う候補と考えられる」物質	20	18 [†]
(b) 化審法 優先評価化学物質のうち人健康影響の観点 からリスク評価（一次）II以降に進んだ物質	24 (2物質は(a)と重複)	18 [†]
(c) 室内外で広く使われる広義のバイオサイド またはリスクの指摘がある物質	160	138 (重複分を 除いた数)
1. 「有害大気汚染物質に該当する可能性が ある物質」相当のうち化審法の優先評価 化学物質	98 (12物質は(a), (b)と重複)	82 [†]
2. 厚労省リスク評価 詳細・初期評価	34 (1物質は(a), (b)と, 1物質は(c)-1と重複)	23 [†]
3. 農薬・医薬品・動物用医薬品	183 [¶]	73 [#]
		211 (合計)

† 該当物質のうち、機器で測定不可能な金属類・無機化学物質を除いた物質数

¶ 食品安全委員会による再評価優先度A・Bに該当する農薬

この他に既に有機リン系殺虫剤等33物質についてはライブラリ作成済

本研究の対象物質候補としてとりあげた211物質の全体像と位置づけを図0-2（図1-2）に示した。網羅的曝露測定法の開発をめざす候補物質として表0-1（表1-1）にリストアップした物質には、曝露評価の必要度が高い物質すべてが含まれているわけではないことに留意する必要がある。また、パーソナルケアプロダクトの成分物質は、日常生活の中で一定の曝露があるため、人がライフコースの中で受ける化学物質への曝露を網羅的に捉えるエクスポソーム（Wild, 2005）評価を実装する観点からは、将来的には加えることが望ましいと思われる。

2) 尿中代謝物の調査および「環境化学物質代謝物ライブラリ（仮称）」への登録

選定した211物質から、物理化学的性質や分析機器の特性および感度、そして次項3)で述べる標準品の入手可能性を考慮して、本研究で実験を行う（マウスに投与する）物質を147物質に絞り込んだ。そして、これら物質の尿中代謝物を調査し「環境化学物質代謝物ライブラリ（仮称）」に仮登録した。

3) マウスへの対象物質の投与

1) で選択した物質について、マウスにこれらを一物質ずつ投与するため、標準品の入手可能性を

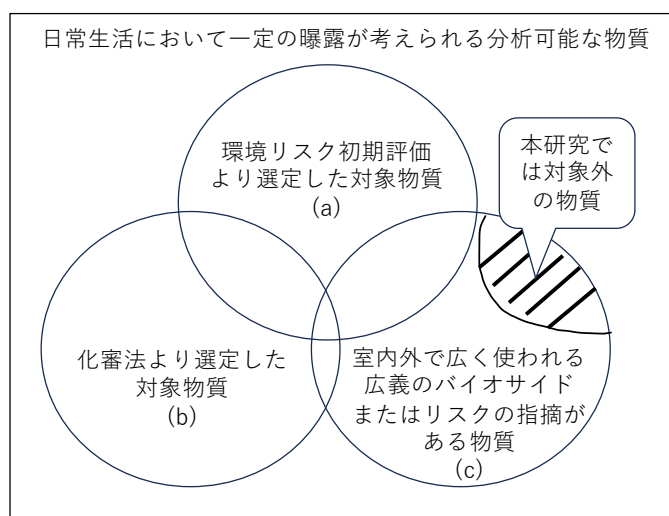


図0-2（図1-2）． 本研究のHBM対象物質．リスク評価が望まれる物質全てが含まれているわけではない。

調べた。全物質について投与可能な標準品が得られたわけではなく、標準品が市販されていないもの、市販はされているが国内輸入実績がなく、購入が困難なもの、市販品が純品の原液ではなく既にメタノール等の各種溶剤に溶かした薄い濃度の製品しか存在しないもの、純品の市販品が存在するが世界中からの注文が一定数に達しないと合成しないもの、については実質的に入手不可能と判断した。以下に述べる課題として浮かび上がった投与量や被験物質の溶解性を検討しつつ、2) で絞り込んだ物質を投与した。一部の物質は日本学術振興会科学研究費補助金22H03333から費用を補填した。

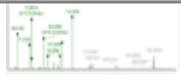
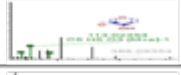
マウスへの投与においては、できる限り高用量を投与することが、体内産生量の少ない代謝物のピークを検出する上で有利である。本研究課題の特徴は、信頼性が担保された代謝物情報が登録されたライブラリにヒト実サンプルのピーク情報を参照する通常の代謝物同定法とは異なり、ライブラリがマウスの体内で産生された「みなし代謝物情報」のままで実サンプルの分析を行い、ライブラリとサンプルのピーク情報の合致確認後に「みなし代謝物」の化学構造を同定し、ライブラリを構築する発想にある。そのため、体内産生代謝物を十分な量で尿中排泄させるために、我々の先行実験 (Nomasa et al., 2021; 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書 5-1851, 2021) での経験をふまえ、当初はLD50の4分の1を低用量、2分の1を高用量として投与することを想定していた。しかし、実際に本研究を開始し、この量での投与が現実的ではないことが判明した物質については、投与量を減らした。

さらに、対象化学物質の物理化学的性質が多様なため、投与の際の溶媒 (vehicle) について、当初想定しなかった検討が必要となった。通常、毒性実験などで強制経口投与する際に用いられる滅菌水やコーン油などに不溶またはごく少量しか溶けない被験物質が多数あることがわかった。このような物質については、エタノール、メチルセルロース、ジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒として使用した。

4) 質量分析用ライブラリの作成

尿の前処理方法は最終的に除タンパク法を採用した。そして、LC-HRMSまたはGC-HRMSにより得た尿試料中の代謝物候補物質ピークの保持時間、MS²スペクトルを「マウスデータ」として順次ライブラリに登録した。LC-HRMSは電子スプレーイオン化法、GC-HRMSは電子イオン化法を用いた。

表 0-2 (表 1-4) . 選定基準 (c) 3の動物医薬品・農薬のライブラリ登録例

物質名	代謝物 ピーク	分子式	精密質量	保持 時間 (分)	MS ² スペクトラム
monoammonium glycyrrhizinate	#1	C ₆ H ₁₀ O ₇	194.043	1.697	
	#2	C ₆ H ₁₀ O ₇	194.043	1.478	
fenobucarb	#1	C ₁₂ H ₁₅ NO ₂	205.110	6.559	
	#2	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	223.120	7.419	
isoprothiolane	#1	C ₉ H ₁₂ O ₄ S ₂	248.017	17.867	
	#2	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆ S ₃	411.084	8.798	
	#3	C ₁₄ H ₂₃ NO ₆ S ₃	397.068	9.149	
spinosad	#1	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	731.45914	1.303	
azoxystrobin	#1	C ₂₇ H ₂₃ N ₃ O ₁₁	565.133	7.944	
tebuconazole	#1	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₃ Cl	337.119	6.303	

LC-HRMSに用いた移動相は0.1% ギ酸水と0.1% ギ酸入りアセトニトリル、カラムはHypersil Gold C18 column (100 × 2.1 mm, 1.9 μm particles, Thermo Fisher Scientific製)である。

表0-2（表1-4）には動物用医薬品・農薬でライブラリ登録した結果の一部を示す。最終的に、5種類以上の代謝物の化学構造推定ができた120物質の5915のMS2スペクトル（うち2976スペクトルはその物質のみに特異的な代謝物）と、殺菌剤由来と想定される7098のMS2スペクトルを、「マウスデータ」（総合スペクトルライブラリ）としてオープンライブラリ(MassBank)に登録した（成果番号16, 17）。公的機関が公開する、あるいは質量分析計メーカーが提供するライブラリ上で、環境化学物質の代謝物の登録数はごく少ない。まして、環境中での検出の報告あるいは検出される可能性がある動物用医薬品、農薬類を広く含む、リスク評価が必要な化学物質の包括的曝露同定に必要な、尿中代謝物の質量分析用ライブラリは存在しない。登録したライブラリ情報は、他の質量分析装置で得たピークデータについても、データ収集閾値やマッチングパラメータの調整により基本的に適用可能であり、環境化学物質のHBMにおいて非常に重要なライブラリとなる。ただし、図0-2（図1-2）に示したように、収載物質に含まれない物質については、今後、情報の補完が望まれる。

5) ヒト尿中のピークとマウスデータとの照合

女子大学に在籍する学生(n=73)とエコチル調査参加妊婦(n=141, それぞれ妊娠前期・中後期の2時点)を対象に、尿中物質の網羅的な質量分析後にマウスデータ（MS2ライブラリ）との照合を行った。その結果、学生からは15群の尿中物質クラスターが、エコチル調査参加妊婦からは12群の尿中物質クラスターが、検出された。

個人ごとの各物質の検出状況を図0-3（図1-3）に示す。学生では採尿前日および当日の服薬の有無について調査を行っているが、個人単位で見たとき、医薬品代謝物の検出と服薬は必ずしも一致しなかった。これらの医薬品の尿中から検出された代謝物濃度は、同じピーク面積が示す濃度が物質間ではほぼ同等であると仮定すると、平均値でみたときほとんどの薬剤でトルエン（または塩化ビニル、酢酸エチル）の代謝物の約2/3～1/100程度であった。検出が服薬状況調査対象日より前の時点での内服の反映であるのか、あるいは、内服者の排泄物が下水、河川水、上水を経由した結果、非服薬者が超低用量で曝露していることを示しているのかについては、今後の課題である。

特筆すべきは、本研究で開発したマウスデータ（MS2ライブラリ）を利用した網羅的照合法により、報告されている代謝物に加え、ヒトにおいて過去に報告のない代謝物が検出されたことである。

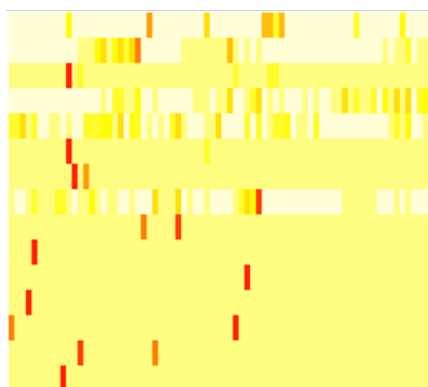
例えば、女子大学に在籍する学生、妊婦ともに一部の対象者で殺菌剤テブコナゾールの代謝物が検出されたが、既報のある代謝物だけでなく、ヒト尿での報告例がない代謝物5種類が本研究で初めて検出された（図0-4（図1-4））（論文投稿中）。これは、テブコナゾールを対象としたHBM研究の数がもとより少ないことに加え、標準試薬の有無に左右されない本研究のユニークなアプローチによって言うて良いであろう。ライブラリ内の化合物については2976種類の代謝物について構造推定を行うことができ、そのうちの83.4%（2482種類）は硫酸、グルクロン酸等との抱合体であった。代謝物の硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体の化学物質標準試薬は、ほとんどの場合、市販品がなく容易に入手できない。本研究で作成したライブラリは、環境化学物質のHBMの実用化に新たな可能性をもたらすものといえる。



成人女子大生 (n=73),



(n=73)



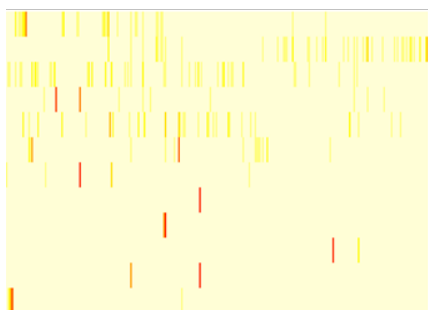
1. Trimethylbenzene (TMB) +20, C -glucuronide (1,2,3-, 1,2,4-TMB)
 2. Hydroxyethylbenzene-glucuronide (ethyl-benzene, cumene, 1,2,3-, 1,2,4-TMB)
 3. Naphthol (naphthalene, ethylbenzene, 1,2,3-TMB)
 4. Cresol-glucuronide (toluene, ethyl-acetate, benzyl-chloride, cumene, 1,2,3-, 1,2,4-TMB)
 5. Octanol-glucuronide (octanol)
 6. $C_{10}H_{14}O_2$ -sulfate (isoprene)
 7. Hydroxycamphor-glucuronide (camphor, isoprene)
 8. Triethanolamine (triethanolamine)
 9. Tebuconazole +30, 4H (tebuconazole)
 10. Tetraconazole (tetraconazole)
 11. Fexofenadine (fexofenadine)
 12. Levocetirizine (levocetirizine)
 13. Olopatidine (olopatidine)
 14. Hydroxyibuprofen-glucuronide (Ibuprofen)
 15. Acetaminophen-sulfate (acetaminophen, aniline, diphenylmethane diisocyanate, chloroaniline, toluidine, chloronitrobenzene, phenylenediamine, sulpiride, vinylcyclohexene)
- } 殺菌剤
- } 医薬品



エコチル調査参加妊婦 (n=141), T1とT2

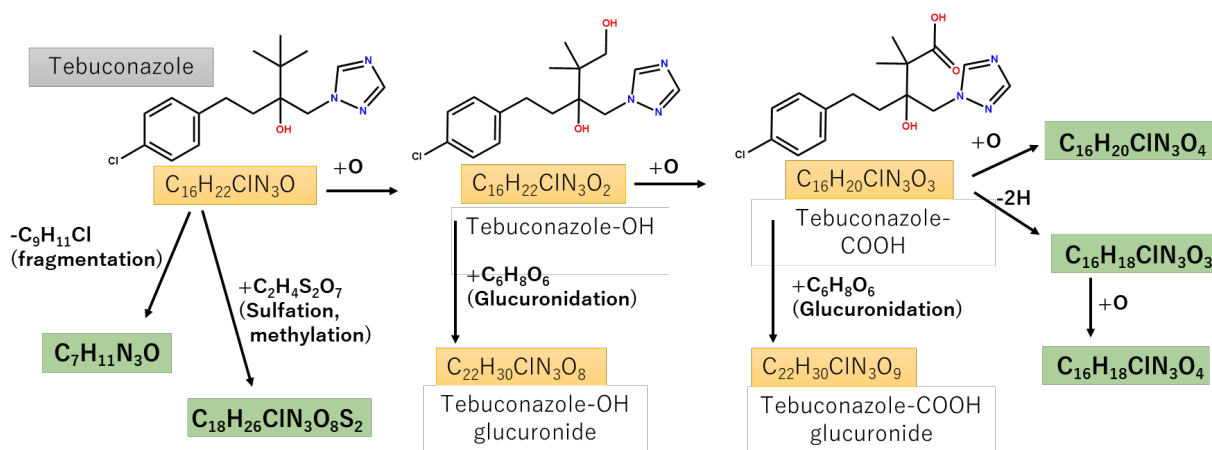


(n=282)



1. Hydroxyethylbenzene-glucuronide (ethyl-benzene, toluene, cumene, 1,2,4-TMB)
 2. Cresol-glucuronide (toluene, benzylchloride, ethyl-acetate, 1-bromopropane)
 3. Octanol-glucuronide (octanol)
 4. $C_{10}H_{14}O_2$ -sulfate (isoprene)
 5. Hydroxycamphor-glucuronide (camphor, isoprene)
 6. Triethanolamine (triethanolamine)
 7. Tebuconazole +30, 4H (tebuconazole)
 8. Hydroxysimeconazole (simeconazole)
 9. Levocetirizine (levocetirizine)
 10. Propylthiouracil-glucuronide (propylthiouracil)
 11. Fexofenadine (fexofenadine)
 12. Acetaminophen-sulfate (acetaminophen, aniline, diphenylmethane diisocyanate, chloroaniline, toluidine, chloronitrobenzene, phenylenediamine)
- } 殺菌剤
- } 医薬品

図0-3 (図1-3) . 対象者ごとのマウスデータとの照合による尿中物質クラスターの検出状況. 上図は女子大学に在籍する学生、下図は妊婦尿(T1, 妊娠前期; T2, 妊娠中後期の2時点). 列が対象者、行は検出された物質クラスター. 各クラスターに属する尿中物質の代表例について物質ごとに各対象者のピーク面積をZスコア化し、濃赤色→淡赤色→濃黄色→淡黄色の順に高濃度→低濃度であることを示す. 括弧内は代表的な親物質の例.



以前に検出の報告があり、本研究でも検出されたヒトの尿中代謝物 (5種類)

以前に検出の報告がない、本研究で初めて検出されたヒト尿中代謝物 (5種類)

図 0-4 (図 1-4) . ヒト尿で検出されたテブコナゾール代謝物

マウスデータを用いてヒト尿で存在が示されたナフタレン代謝物である水酸化ナフタレン誘導体 (図 0-5 (図 1-5)) のうち、ヒドロキシナフチル硫酸については、核磁気共鳴 (NMR) 装置により硫酸抱合体の構造同定を試みた。抱合をうける水酸基の位置が不明であるため、投与したマウスの尿から高速液体クロマトグラフを用いて保持時間をもとに該当画分を分取し、シグナル測定結果を 1-ナフトール、2-ナフトールの標準品の場合と比較した (図 0-6 (図 1-6))。その結果、1, 2 位が水酸基置換され、1 位で硫酸抱合されていることが推定された。ナフトール誘導体については、グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の両方が検出されたが、質量分析における標準品の保持時間が 1-ナフトール、2-ナフトールともにほぼ同じで、2-ナフトールの抱合体であることが推定されたが決定には至らなかった。今回の検討では試料の量の制約により官能基の位置の同定で不確実さが残ったが、今後は反復投与して得られる大量のマウスの尿を用いるなどして解析試料の量を増やすことや、画分精製方法の更なる検討により、正確な官能基の位置同定が可能と考えられる。マウスデータの MS2 スペクトルからは置換基の位置決定ができない場合における、NMR 解析による代謝物の構造同定の道筋が確認できた。

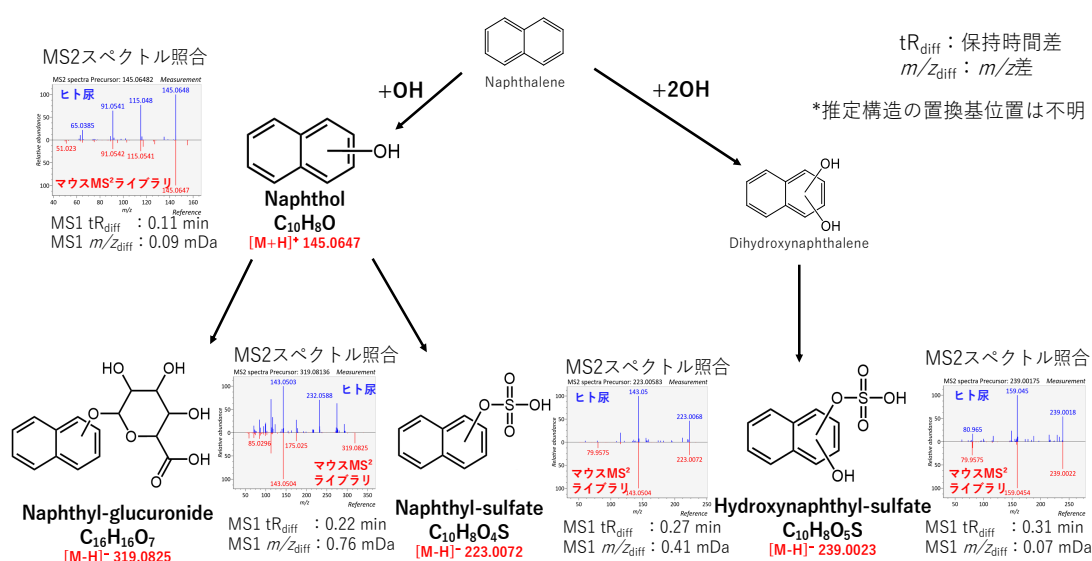


図 0-5 (図 1-5) . ヒト尿で検出されたナフタレン代謝物

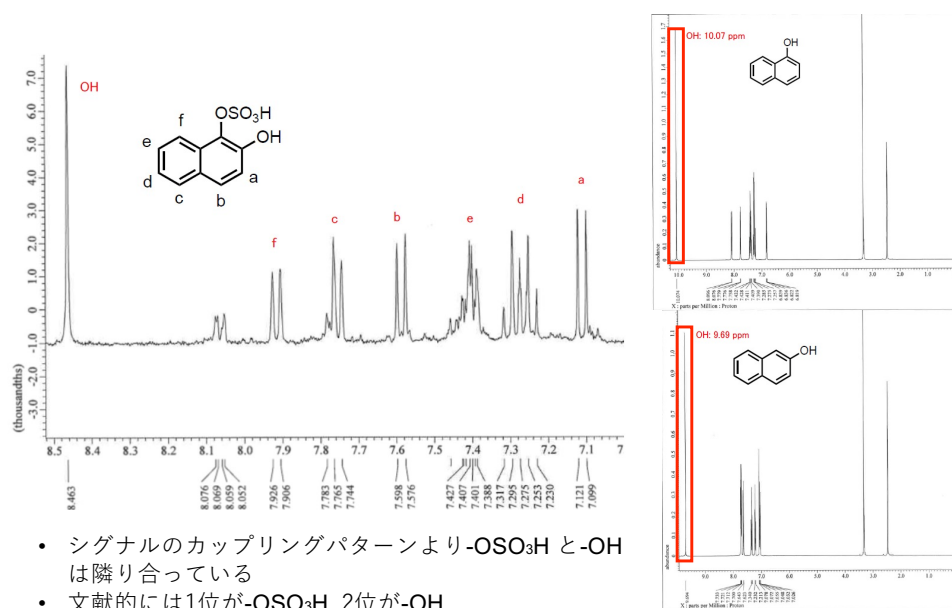


図 0-6 (図 1-6) . NMRによるナフタレン代謝物の構造推定

上記のように構造推定ができた一方で、代謝物によるHBMにおける共通の限界は本研究にも存在することに留意する必要がある。異なる親化合物から同じ代謝物が生成される場合、現状では当該代謝物によるHBMでは曝露した親化合物が明らかにならない。例えば、クレゾールまたはベンジルアルコール (MS2スペクトルではフラグメントイオンが同パターンなので区別できない) のグルクロン酸抱合体が女子大学に在籍する学生、妊婦ともに検出されている。この代謝物は、マウスではトルエン、塩化ビニル、酢酸エチルの投与により、それぞれ量依存的なピークとして検出された。したがって、曝露した親物質がこのうちのどれであるのか、複合曝露の可能性とともに現時点では絞り込むことができない。これらの親物質の毒性およびその強さは必ずしも同一とはいえないので、化学物質管理の観点からは、どの曝露源におけるどの物質への曝露が健康リスクという点で着目すべきかを絞り込むことが求められる。

6) 検出率または検出濃度が高かった代謝物を対象とした陰膳試料中の親物質含有状況の検索

ヒト尿中で検出された代謝物のうち一部の親物質について、食事あるいは飲料水経路の曝露を想定し、陰膳試料10人分2日分を分析して食事中にその物質が検出されるかを調べた。農薬として環境中で使用される殺菌剤テブコナゾール、テトラコナゾールについて検討を行った。その結果、陰膳試料中で親物質が検出されたが (1日の食事延べ20人分 (82検体)、検出率テブコナゾール20/20、テトラコナゾール13/20、検出限界値0.03 ng/mL)、検出された半定量的尿中濃度との関連は見られなかった。このことに関連して、意図的に服薬する医薬品に関しても、尿中物質の検出状況と服薬歴との照合を行った。解熱鎮痛薬アセトアミノフェン、イブプロフェンの代謝物が一部の対象者の尿中に比較的高濃度で検出されたが、同時に調査した服薬状況とは必ずしも一致しなかった。また、抗アレルギー薬フェキソフェナジン、レボセチリジン、オルパタジンの親物質そのものが一部の対象者の尿中に検出されたが、やはり服薬状況とは一致しなかった。マウスデータに収載したMS2スペクトルが投与物質由来であるという前提の下で、以下の可能性が推論される。

第一に、化学物質の環境経路の低用量曝露状況での毒物動態(toxicokinetics)においては、高用量曝露時で見られるα相、β相より半減期の長いγ相以下の消失相が尿中濃度の決定要因であるため

に、陰膳試料採取日より前の経口曝露が尿中濃度に寄与している可能性である。

第二に、低用量曝露状況では、循環血液量を含む毒物動態の個人差により、摂取量と尿中排泄量との間の関連が認められにくくなっている可能性である。一般生活環境での曝露レベルに比べ格段に多い職域曝露においてさえ、個人曝露量としての気中濃度とHBMの結果との間には有意な関連があっても相当程度の個人差が認められる。経口曝露による化学物質の消化管吸収量においては、腸管内容物（例えば線維成分）の多少による腸管吸収率の個人差や、遺伝的背景や生活習慣によって変わらうる腸内細菌叢による代謝の個人差の影響を受ける可能性もあると考えられる。

【引用文献】

Kadokami K, Miyawaki T, Iwabuchi K, et al. Inflow and outflow loads of 484 daily-use chemicals in wastewater treatment plants across Japan. Environ Monit Contam Res. 1: 1-16, 2021.

Wild CP. Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14(8):1847-50, 2005.

Wilkinson JL, Boxall ABA, Kolpin DW, et al. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. Proc Natl Acad Sci U S A. 119(8):e2113947119, 2022.

Nomasa K, Oya N, Ito Y, et al. Development of a strategic approach for comprehensive detection of organophosphate pesticide metabolites in urine: Extrapolation of cadusafos and prothiofos metabolomics data of mice to humans. J Occup Health 63(1): e12218, 2021.

5－2． 研究目標の達成状況

<全体の達成状況>・・・・・・・・・・・・・・・・ 2. 目標を上回る成果をあげた

「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」

全体目標	全体の達成状況
ヒト尿を用いるBMに関し、ターゲット分析法が未確立かつ曝露評価の優先度が高い化学物質について、対象集団の包括的曝露評価が可能な方法論を開発する。具体的には次の2つの主要アウトプットおよび1つの付加的アウトプットを得ることを目標とする。 【主要アウトプット】 1. (a)～(c)の3カテゴリー（(a)環境リスク初期評価の「人に対する健康のリスク評価」により「詳細な評価を行う候補と考えられる」とされた物質、(b)化審法における優先評価化学物質のうち人健康影響の観点からリスク評価（一次）II以降に進んだ物質、(c)室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質）から合計150物質を選定し、このうち、物質の物理化学的性質や分析機器の特性および感度を考慮し	下記の2つの主要アウトプットを目標を上回る数で達成したことにより、ターゲット分析法が未確立かつ曝露評価の優先度が高い化学物質について、対象集団の包括的曝露評価が可能なHBMの方法論を開発した。 主要アウトプット1については、(a)～(c)の3カテゴリーから研究計画書で掲げた目標の150物質を上回る211物質を選定し（表0-1（表1-1））、このうち120物質の質量分析用ライブラリ（マウスデータ）を構築した。なお、可能な限り多くの物質のスペクトルデータをライブラリに登録するために、投与実験に必要な費用のうち、高額な標準品購入費の一部は他の研究資金を充当する努力を行った。ライブラリ情報は、オープンライブラリ(MassBank)に登録（成果番号16, 17）

て対象物質を絞り込み、その尿中代謝物または尿中親物質の包括的曝露同定に必要な質量分析用ライブラリを構築する。 2. 構築したライブラリを、愛知県におけるエコチル調査参加妊婦（100人）、2日間の陰膳試料を採取済みの成人（女子大学に在籍する学生70人）に適用し、尿中代謝物等の検出状況を明らかにする。これにより、リスク評価が必要として設定した物質群、対象集団において、本手法による包括的曝露評価が有効であることを示す。 【付加的アウトプット】 主要アウトプット2において検出率または検出濃度が高かった代謝物のうち、同物質およびその親物質の標準物質が入手可能な場合に限り、陰膳試料70人分を分析する。食事中に親物質（または代謝物と同構造の分解物）が検出されるか、すなわち食事が曝露経路といえるかを明らかにする。	するとともに代表者の研究室のホームページ上にもURLリンクを掲載した。 主要アウトプット2については、目標を上回る妊婦141人、女子大学に在籍する学生73人の尿中代謝物等の検出状況を明らかにした（図0-4（図1-4）および図0-5（図1-5））。なお、妊婦については化学物質に対する胎児の感受性が時期により異なる可能性を考慮し、妊娠前期及び中後期の2時点の尿を測定した。 付加的アウトプットについても検討を行い、尿中代謝物濃度の存在と食事媒体中の親化合物の存在とは一致しないことを明らかにした。
---	--

<【サブテーマ1】達成状況>・・・・・・・・・・ 2. 目標を上回る成果をあげた

「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」

サブテーマ1 目標	サブテーマ1 の達成状況
全体目標と同様	全体目標と同様

5-3. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

<得られた研究成果の学術的意義>

本研究で開発したマウスデータにより、対象物質のHBMが可能になった。これを愛知県の女子大学に在籍する学生、同県に住む妊婦の尿に適用した結果、行政によるリスク評価制度の対象物質および室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質の一部が、集団内で検出された。検出された物質は、室内外の空气中にひろく存在するが、樟脳のように主に室内空気由来である蓋然性が高い物質も含まれる。また、農業用殺菌剤や医薬品由来物質も検出された。本推進費課題の期間中に、HBMによる網羅的な農薬曝露のサスペクトスクリーニング法が欧州共同体(EU)の研究者から報告されたが(Huber et al, 2022)、曝露源が異なる広汎な物質への曝露を網羅的に測定した研究は、これまでにほとんどない。本手法を用いることにより、対象物質への曝露が比較的高い生活者の存在をスクリーニング可能であることが強く示唆され、開発した手法の有効性が示された。作成した総合スペクトルライブラリはオープンライブラリ(MassBank)に登録した(成果番号16, 17)。HBMは、リスク評価の優先度が高い物質の曝露量や健康へのリスクを個人単位で評価可能なゴールドスタンダードであり、開発・登録したライブラリは今後、研究者、各国の行政、民間の測定・分析機関等の環境産業により広く利用されることが期待される。本研究で登録したライブラリの利用に関し、標準試薬またはNMRによる最終構造決定がなされていない物質についてのHBMはサスペクトスクリーニングであ

り、ターゲット分析法による定量同定すべき物質を決めるための利用法が想定される。なお、図0-2（図1-2）に示したように、HBMによるリスク評価のためのスクリーニングが必要でも本ライブラリには含まない物質がある。これらの物質については、今後、データを追加的に得てライブラリを補完していくことが望ましい。パーソナルケアプロダクトをはじめ日常生活で一定の曝露がある物質についても、今後対象として追加することが考えられる。

<行政等に既に貢献した成果>

研究代表者は、自身が委員を務める環境省の「化学物質の人へのばく露量モニタリング調査」検討会および国立環境研究所エコチル調査運営委員会において、本研究を通して理解を深めた複合曝露評価の見識を基に、HBMの実施に関する検討に貢献した。研究分担者（伊藤）は、エコチル調査曝露評価専門委員会委員、同委員会精度管理分科会委員として、本研究で得た見識をもとにエコチル調査のHBMの精度管理に貢献した。

<行政等に貢献することが見込まれる成果>

本研究では、化学物質の環境リスク初期評価で「人に対する健康のリスク評価」により「詳細な評価を行う候補と考えられる」18物質、化審法の優先評価化学物質のうち人健康影響の観点からリスク評価（一次）II以降に進んだ18物質、「有害大気汚染物質に該当する可能性がある物質」相当のうち化審法の優先評価化学物質82物質、厚労省のリスク評価 詳細・初期評価23物質（一部各カテゴリー間で重複あり）の138物質のうち、120物質の網羅的なサスペクトスクリーニングに必要なMS2ライブラリ情報を構築・公開登録し、HBMによる網羅的分析の導入手法のひとつとしての可能性を実証した。実際に適用したトライアル例として、愛知県的女子大学に在籍する学生および同県に住む妊婦の試料を用いたスクリーニングを行い、平均的な都市生活住民における、複合曝露実態に関する半定量的データを得ることができた。環境省の「化学物質の人へのばく露量モニタリング調査」やエコチル調査等のバイオモニタリングでは、対象化学物質をあらかじめ定めた定量的ターゲット分析が行われている。本網羅的分析手法は、リスク評価の観点からターゲット分析を行う対象化学物質を絞り込むためのスクリーニング手法として、現行のHBMを補完する位置づけが与えられる。行政等による調査への導入にあたっては、本研究で開発・公開したMS2ライブラリには曝露評価が望まれる物質すべてが収載されているわけではないこと、検出下限濃度は物質により異なり、多くの物質では数百nmol/L程度、最大100 μmol/L程度（農薬クロロタロニルの場合）であること、ライブラリは尿を用いたHBM目的で作成したこと、異なる親物質から共通代謝物が生じる場合にはまだ親物質の区別ができないのが現状であることの理解が前提となる。また、本格的な導入の際には、ライブラリ登録情報の拡充、標準品が入手できない場合のNMRによる構造解析フローのブラッシュアップが望まれる。

【引用文献】

Huber C, Nijssen R, Mol H, et al. A large scale multi-laboratory suspect screening of pesticide metabolites in human biomonitoring: From tentative annotations to verified occurrences. Environ Int. 168:107452, 2022.

6. 研究成果の発表状況の概要

6-1. 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	0
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	0
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	0
口頭発表（学会等・査読なし）：	9
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	6
マスコミ等への公表・報道等：	0
研究成果による受賞：	0
その他の成果発表：	2

6-2. 主な査読付き論文等の主要な成果

成果 番号	主要な成果（その他の成果、10件まで）
16	MassBank of North America (MoNA) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/downloads へのライブラリ（120 物質のマウス尿中代謝物等 5915 種類の MS2 スペクトル）の登録 CD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_HILIC_NEG (1,691 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/b231f50b-ab81-4049-8507-002356cbef3b CD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_RP_NEG (1,261 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/cde41407-5e86-4ff3-80bf-2b340af46b90 CD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_HILIC_POS (1,655 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/cb07338f-75a9-40f8-a693-906d0f39cbc9 CD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_RP_POS (1,308 spectra)

	https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/4e2e8d22-62c9-47b0-9fed-37e12b8e2af9
17	MassBank of North America (MoNA) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/downloads へのライブラリ（殺菌剤 31 物質のマウス尿中代謝物等 7098 種類の MS2 スペクトル）の登録 Fungicide_suspect_metabolites_NCU_HIL_NEG (1,603 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/6d491933-5eb0-417b-9b92-ceb0eb3be928 Fungicide_suspect_metabolites_NCU_HIL_POS (1,533 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/55416382-e11c-4012-aa14-ecea47a2b3bd Fungicide_suspect_metabolites_NCU_RP_NEG (1,705 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/77c675ba-f2e0-432a-a3fb-7ffdcdb51cf9 Fungicide_suspect_metabolites_NCU_RP_POS (2,257 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/6f55c842-800d-4c36-ae50-f915d675c350

※この欄の成果番号は「Ⅲ．研究成果の発表状況の詳細」と共通です。

7. 国際共同研究等の状況

<国際共同研究等の概要>

スウェーデン王国のカリロンスカ研究所のDr. Craig Wheelockと尿中バイオマーカーの網羅的質量分析の精緻化についての共同研究を行い、本研究課題の成果である共著の原著論文を投稿した。

<相手機関・国・地域名>

機関名	国・地域名（本部所在地等）
カリロンスカ研究所	スウェーデン王国

8. 研究者略歴

<研究代表者略歴>

代表者氏名	略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）
上島通浩	東北大学医学部医学科卒業、名古屋大学大学院医学研究科単位取得退学博士(医学) 名古屋大学准教授を経て、 現在、名古屋市立大学大学院医学研究科教授 化学物質の人へのばく露量モニタリング調査検討会座長、エコチル調査運営委員会委員長、農業資材審議会農薬分科会臨時委員 専門は衛生学、研究テーマは化学物質の健康リスク評価

Ⅱ. 成果の詳細

Ⅱ－１ サブテーマ１「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」

〔サブテーマ１要旨〕

サブテーマ１では、曝露評価の優先度が高い化学物質に関して個人単位の曝露状況を、尿を用いたヒトバイオモニタリング（HBM）により網羅的に評価可能とすることを目指した。まず、曝露評価が必要な物質を選定し、HBMに必要な尿中代謝物を調査し、「環境化学物質代謝物ライブラリ（仮称）」に仮登録した。そしてマウスに対象物質を投与して得た尿を用いて質量分析を行い、イオン化されたピーク物質のスペクトル情報（MS¹スペクトル）を化学構造推定ソフトに読み込み、推定した組成式を仮登録した代謝物に照合した。合致した物質のピークの保持時間と、化合物の化学結合が切れて生じるプロダクトイオンのスペクトル（MS²スペクトル）をライブラリ（マウスデータ）に登録し、最終的に120物質のピーク情報をオープンライブラリ（MassBank）として公開した。そして、作成したライブラリを愛知県の女子大学に在籍する学生73人と同県に住む妊婦141人の集団に適用し、前者では15物質、後者では12物質の尿中代謝物等を検出した。本手法により、これまで報告がなかった代謝物が新たに検出された。比較的高い濃度で代謝物が検出された殺菌剤テブコナゾールおよびテトラコナゾールについて、学生の陰膳試料80検体について含有量を分析したが、検出された半定量的尿中濃度との関連は見られなかった。本サブテーマの結果から、開発した手法を用いることにより、対象物質への曝露が比較的高い生活者の存在をスクリーニング可能であることが強く示唆され、開発した手法の有効性が示された。研究開始にあたって設定した主要アウトプットをいずれも目標を上回る数で達成した。

１. サブテーマ１研究開発目的

サブテーマ１では、ヒト尿を用いるバイオモニタリングに関し、ターゲット分析法が未確立、曝露評価の優先度が高い化学物質を対象に、対象集団の包括的曝露評価が可能な方法論を開発することを目的とした。

２. サブテーマ１研究目標

サブテーマ１	「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」
サブテーマ１実施機関	名古屋市立大学、東京農業大学
サブテーマ１目標	ヒト尿を用いるBMに関し、ターゲット分析法が未確立かつ曝露評価の優先度が高い化学物質について、対象集団の包括的曝露評価が可能な方法論を開発する。具体的には次の２つの主要アウトプットおよび１つの付加的アウトプットを得ることを目標とする。 【主要アウトプット】 1. (a)～(c)の３カテゴリー（(a)環境リスク初期評価の「人に対する健康のリスク評価」により「詳細な評価を行う候補と考えられる」とされた物質、(b)化審法における優先評価化学物質のうち人健康影響の観点からリスク評価（一次）II以降に進んだ物質、(c)室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質）から合計150物質を選定し、このうち、物質の物理化学的性質や分析機器の特性および感度を考慮して対象物質を絞り込み、その尿中代謝物または尿中親物質の包括的曝露同定に必要な質量分析用ライブラリを構築する。 2. 構築したライブラリを、愛知県におけるエコチル調査参加妊婦（100

	人)、2日間の陰膳試料を採取済みの成人(女子大学に在籍する学生70人)に適用し、尿中代謝物等の検出状況を明らかにする。これにより、リスク評価が必要として設定した物質群、対象集団において、本手法による包括的曝露評価が有効であることを示す。 【付加的アウトプット】 主要アウトプット2において検出率または検出濃度が高かった代謝物のうち、同物質およびその親物質の標準物質が入手可能な場合に限り、陰膳試料70人分を分析する。食事中に親物質(または代謝物と同構造の分解物)が検出されるか、すなわち食事が曝露経路といえるかを明らかにする。
--	--

3. サブテーマ1 研究開発内容

サブテーマ1では、以下の1)～6)について、研究を実施した。

1) 曝露評価が必要な物質の選定

本研究の対象となる有機化学物質を、下記の(a)～(c)の選定基準に従い、合計150物質を越える数で選定し、測定対象候補物質とした。

(a) 化学物質の環境リスク初期評価

「人に対する健康のリスク評価」により「詳細な評価を行う候補と考えられる」物質

(b) 化審法

優先評価化学物質のうち人健康影響の観点からリスク評価(一次)II以降に進んだ物質

(c) 室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質

(c)については、まず、(1)環境省がリストを作成している「有害大気汚染物質に該当する可能性がある物質」に相当する物質のうち、化審法の優先評価化学物質であるもの、(2)厚生労働省の職場における化学物質のリスク評価検討会の初期リスク評価や詳細リスク評価の対象物質をリストアップした。そして、(a)、(b)の物質を含め分析可能性を考慮した上で、(3)食品安全委員会により再評価優先度A、Bとされた農薬、または河川等での検出事例があるなど、環境汚染物質としての可能性が指摘されている医薬品・動物用医薬品・農薬類の中から150物質を越える数となるように選定した。

さらに、選定した物質について、物理化学的性質や分析機器の特性および感度を考慮し、本研究で対象とする物質を絞り込んだ。なお、曝露濃度が高い産業現場ではターゲット法による分析が行われていても、測定対象の尿中代謝物が生活環境の低濃度域複合曝露下では物質特異的マーカーであるとは限らないことから、ターゲット法が確立している物質についても一部、今回の対象物質に含めた。

2) 尿中代謝物の調査および「環境化学物質代謝物ライブラリ(仮称)」への登録

1)で絞り込んだ化学物質について、これらの物質の代謝に関する文献を調査した。代謝マップが得られた場合は、尿中に排泄される代謝物をリストアップし、ライブラリソフト(mzVault™(Thermo Fisher Scientific社))上の自作の「環境化学物質代謝物ライブラリ(仮称)」に仮登録した。代謝マップに関する文献が存在しない場合は、尿中に排泄されることが想定される代謝物候補物質を登録した。

3) マウスへの対象物質の投与

実験全体のワークフローを図1-1(図0-1)に示す。

10週齢のICR雄マウスを1週間環境に馴化させたのち、1)で選定した各被験物質を溶媒に溶解し、

半数致死量(LD50)を目安に設定した高用量、低用量（高用量の1/2の用量に設定）を、一物質ずつ異なる個体に強制経口投与した（最大投与量はLD50の1/2）。投与後24時間に排泄された尿を代謝ケージにて採取した。投与スケジュールは図1-1（図0-1）の通り、1日目は対照として溶媒のみの投与を行い、2日目は低用量、4日目には高用量を投与し、各投与後に24時間採尿を行った。なお、本動物実験は名古屋市立大学の動物実験委員会の審査承認を得て行った。



図1-1（図0-1）．本研究のワークフロー模式図

4) 質量分析用ライブラリの作成

尿試料の分析は、高速液体クロマトグラフ高分解能質量分析計（LC-HRMS）またはガスクロマトグラフ高分解能質量分析計（GC-HRMS）を用いて行った。まず、尿の前処理方法について検討した。食品分析などで汎用され、農薬類の代謝物の網羅的分析には最も適していることが経験的に判明している Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (QuEChERS) 法とアセトニトリルを加えた除タンパクのみの方法を用い、それぞれで添加標準物質の回収率とクロマトグラムピークの検出状況を検討した。その際、尿中代謝物の標準品は入手困難であることを鑑み、尿中に未変化体として排泄されることが想定される親物質の標準品を、代謝物の代替添加標準物質として用いた。その結果、一部の物質ではQuEChERS法での回収率が極めて低く、適さないことが判明したため、前処理は除タンパク法にすることにした。また、示差屈折率検出器で測定した尿比重を予め統一させ、一部尿検体を希釈することで、機械への負荷を減らすこととした。超純水で希釈しマウス尿比重1.004、ヒト尿比重1.002に標準化した。比重で標準化した尿に技術的内部標準として3.0 $\mu\text{mol/L}$ CHES、3.0 $\mu\text{mol/L}$ HEPES、6.0 $\mu\text{mol/L}$ PIPESを含むアセトニトリル水溶液を加えて除タンパクを行った。

その後、各被験物質を投与したマウスから得た実試料を用いた。高用量および低用量投与により得た尿におけるピーク面積が対照尿に比べ明瞭に大きくなるピークを選択した。イオン化されたピーク物質のスペクトル情報（MS¹スペクトル）を化学構造推定ソフト（Compound Discoverer 3.3（Thermo Fisher Scientific社製）、MZmine）に読み込み、同位体存在比と元素の精密質量から計算される分子の精密質量から組成式を推定した。これを仮登録した代謝物に照合し、合致すれば、ピークの保持時間と、化合物の化学結合が切れて生じるプロダクトイオンのスペクトル（MS²スペクトル）をライブラリ（マウスデータ）に登録した。用量依存的に増加したピーク物質については、仮登録した代謝物と一致しない場合においても、投与に由来して尿に排泄された外因性または内因性物質と考えられるため、フラグ付きでマウスデータに加えた。

LC-HRMSは、逆相とHILICの2種のクロマトグラフィーで、加熱エレクトロスプレーイオン化法ポジ

ティブ、ネガティブ両方を実施した。マウスのデータは、data dependent acquisitionで、ヒトのデータはdata independent acquisitionモードで取得した。

5) ヒト尿を用いた対象物質の代謝物等の測定

研究代表者らは、エコチル調査において全国調査の一環として収集する生体試料とは別に、愛知ユニットセンターとして独自に採尿を実施し、検体を名古屋市立大学に保管している。2012年11月～2014年10月に収集した調査参加妊婦の妊娠初期検体の中から、有機リン系殺虫剤代謝物濃度（以前の研究で測定済み）が比較的高かった141人分を選定した。また、女子大学に在籍する学生については、2018年6月～7月の間に環境研究総合推進費研究【5-1851】で実施した陰膳調査翌日の尿73人分（研究計画書の「研究目標」では70人に設定）を選定した。これらのサンプルの前処理は全てQuEChERS法を行い、LC-HRMSで網羅的分析を行ったクロマトデータは取得済みであったが、前述の通り前処理方法、データ取得方法を変更したため、再度網羅的分析を実施した。得られた分析結果をマウスデータに照合し、MS1ピーク面積が50000超のものを検出と判定した。

なお、この部分の研究は名古屋市立大学の医学系研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

6) 検出率または検出濃度が高かった代謝物を対象とした陰膳試料中の親物質含有状況の検索

今回対象とした物質の中で化学構造の同定レベルが高く、かつ尿中濃度の最高値がそれぞれ約 $3\mu\text{mol/L}$ 、 $0.3\mu\text{mol/L}$ と比較的高かった殺菌剤テブコナゾールとテトラコナゾールに着目してガスクロマトグラフィータンデム型質量分析計にて陰膳試料の分析を行った。これらは食事や飲料水、環境からの曝露の可能性が考えられる物質である。検体は、尿に検出された各物質それぞれ2人ずつを含む計10人の2日分の陰膳試料を、各食事と飲料、間食とにわけて測定した。研究計画書においては、70人分の陰膳試料を分析することとしていたが、対象物質の体内動態、特に尿中濃度の半減期を考慮し、採尿前のどの時点の食事・飲料中の含有量が尿中濃度と関連するのかの検討が可能となるよう、人数を絞った上で82検体を分析することとした。尿と陰膳の分析者は、それぞれの濃度の情報にはダブルブラインドで分析した。

4. サブテーマ1 結果及び考察

1) 曝露評価が必要な物質の選定

測定対象候補としてリストアップした物質数を、表1-1（表0-1）に示す。本課題では、行政によるリスク評価制度の対象物質および室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質という観点から物質を選定した。まず、(a)、(b)、(c)1、(c)2の選定基準で160物質を候補物質としてリストアップした。次に、この中から使用する質量分析計での分析に適さない金属や無機化合物を除いた138物質に、(c)3に該当する農薬・医薬品・動物用医薬品73物質を加え、合計211物質を選定した。(c)3のカテゴリーは、食品安全委員会により再評価優先度A、Bとされた農薬を中心に選定した。近年、投薬された（服用した）ヒトから排泄された、あるいは不適切な方法で廃棄された医薬品等による下水処理水中の汚染（Kadokami et al. 2021）や河川水等の環境汚染（Wilkinson et al. 2022）が注目され始めている。こうした化学物質のヒト健康への想定されているリスクは、現時点では環境中での抗生物質耐性菌の選択を通してのものであり（Wilkinson JL et al., 2022）、当該物質の直接的なヒトへの作用ではない。しかし、検出されている環境媒体中の濃度からは、ヒトへの曝露用量が他の環境化学物質と同程度になりうるということがわかれ、環境経路で曝露する農薬等のヒト健康への影響に着目した疫学研究が多く行われていることを鑑みれば、同様に医薬品等についてもHBMの対象物質に含むことが必要と考えた。

表 1-1 (表 0-1) . 選定基準に該当した物質数および絞り込んだ測定対象候補物質数

選定基準	行政によるリスク評価 物質数	測定対象候補 物質数
(a) 環境リスク初期評価 「人に対する健康のリスク評価」により 「詳細な評価を行う候補と考えられる」物質	20	18 [†]
(b) 化審法 優先評価化学物質のうち人健康影響の観点 からリスク評価（一次）II以降に進んだ物質	24 (2物質は(a)と重複)	18 [†]
(c) 室内外で広く使われる広義のバイオサイド またはリスクの指摘がある物質	160	138 (重複分を 除いた数)
1. 「有害大気汚染物質に該当する可能性が ある物質」相当のうち化審法の優先評価 化学物質	98 (12物質は(a), (b)と重複)	82 [†]
2. 厚労省リスク評価 詳細・初期評価	34 (1物質は(a), (b)と, 1物質は(c)-1と重複)	23 [†]
3. 農薬・医薬品・動物用医薬品	183 [¶]	73 [#]
		211 (合計)

† 該当物質のうち、機器で測定不可能な金属類・無機化学物質を除いた物質数

¶ 食品安全委員会による再評価優先度A・Bに該当する農薬

この他に既に有機リン系殺虫剤等33物質についてはライブラリ作成済

本研究の対象物質候補としてとりあげた211物質の全体像と位置づけを図1-2（図0-2）に示した。網羅的曝露測定法の開発をめざす候補物質として表1-1（表0-1）にリストアップした物質には、曝露評価の必要度が高い物質すべてが含まれているわけではないことに留意する必要がある。また、パーソナルケアプロダクトの成分物質については、選定基準からは今回の研究の対象としてリストアップされなかったが、日常生活の中で一定の曝露があることから、今後網羅的なHBMの対象に加えることも考えられる。人がライフコースの中で受ける化学物質への曝露を網羅的に捉えるエクスポソーム（Wild, 2005年）評価を実装する観点からは、将来的には加えることが望ましいと思われる。

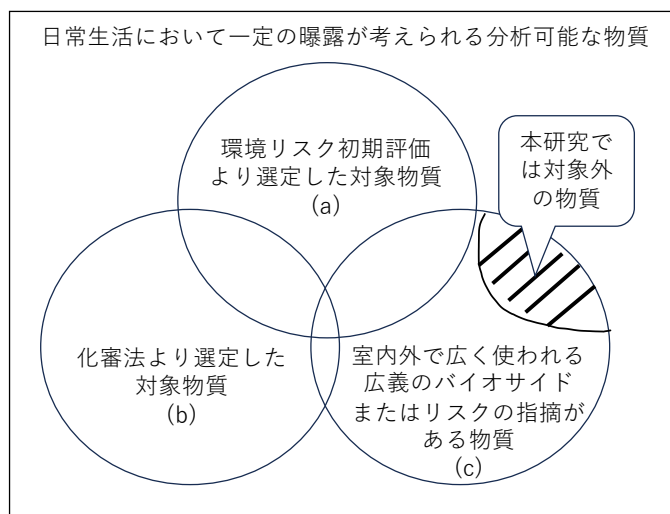


図1-2（図0-2）. 本研究のHBM対象物質. リスク評価が望まれる物質全てが含まれているわけではない。

2) 尿中代謝物の調査および「環境化学物質代謝物ライブラリ（仮称）」への登録

選定した211物質から、物理化学的性質や分析機器の特性および感度、そして次項3)で述べる標準品の入手可能性を考慮して、本研究で実験を行う（マウスに投与する）物質を147物質に絞り込んだ。そして、これら物質の尿中代謝物を調査して「環境化学物質代謝物ライブラリ（仮称）」に仮登録した。例として、「(a) 環境リスク初期評価において選定された物質」のCAS番号、リスク評価で念頭に置かれた毒性のエンドポイント、尿中に検出されることが想定される代謝物を表1-2に示す。

表 1-2. 選定基準 (a) 環境リスク初期評価において選定された物質の尿中代謝物

化学物質名	Chemicals	CAS No.	Potential endpoints	Suspected urinary metabolites
1,2,3-トリメチルベンゼン	1,2,3-trimethyl benzene	526-73-8	回転棒試験の成績低下、気管支杯細胞の増加	2,3-dimethylhippuric acid (DMHA); 2,6-DMHA; 2,3-dimethylbenzoic acid (DMBA); 2,6-DMBA
1,2,4-トリメチルベンゼン	1,2,4-trimethyl benzene	95-63-6	行動（神経系）への影響、気管支周囲の変性	3,4-DMHA; 2,4-DMHA; 2,5-DMHA; 2,4-DMBA; 2,5-DMBA; 3,4-DMBA
1,1-ジクロロエチレン	1,1-dichloroethylene	75-35-4	尿細管過形成、鼻甲介の萎縮と骨化過剰、嗅上皮の呼吸上皮化生	chloroacetic acid; N-acetyl-S-(2-carboxymethyl)cysteine; S-(2-hydroxyethyl)-N-acetyl cysteine
エチルベンゼン	ethyl benzene	100-41-4	肝細胞の合胞体変性、下垂体前葉の過形成	mandelic acid; phenylglyoxylic acid
スチレン	styrene	100-42-5	色覚異常	mandelic acid; phenylglyoxylic acid
ベンズアルデヒド	benzaldehyde	100-52-7	体重増加の抑制、低体温、肝臓重量の増加など	kippuric acid; benzylmercapturic acid; benzoyl glucuronide
酢酸エチル	ethyl acetate	141-78-6	体重増加の抑制、嗅上皮の変性	ethanol; acetic acid
過塩素酸	perchloric acid	7601-90-3	甲状腺ヨウ素摂取率の低下	perchloric acid (parent compound)
ナフタレン	naphthalene	91-20-3	鼻粘膜の変性	mercapturic acid; 1,2-naphthoquinone; 1,4-naphthoquinone
クロトンアルデヒド	crotonaldehyde	123-73-9	鼻腔の傷害、(変異肝細胞巣)	3-hydroxy-1-methyl-propylmercapturic acid; 2-carboxy-1-methyl-ethylmercapturic acid
ベンゾ[a]ピレン	benzo[a]pyrene	50-32-8	前胃の腫瘍、出生率の低下	quinons; phenol dihydrodiols; tetraols
1-ブタノール	1-butanol	71-36-3	運動協調性障害	1-butanol glucuronide
アクロレイン	acrolein	107-02-8	死亡率の増加	N-acetyl-S-carboxyethylcysteine; N-acetyl-S-hydropropylcysteine; N-acetyl-S-2-carboxy-2-hydroxyethylcysteine; 3-hydroxypropionic acid; oxalic acid
ピリジン	pyridine	110-86-1	肝臓重量の増加	3-pentenoic acid monoamide; succinic semialdehyde
アセトアルデヒド	acetaldehyde	75-07-0	肺洗浄液中の貪食細胞数の減少、嗅覚上皮の変性	N-nitroso-2-methylthiazolidine 4-carboxylic acid (cis- and trans-isomers); acetaldehyde; acetate
p-ジクロロベンゼン	p-dichlorobenzene	106-46-7	肝臓と腎臓の重量増加	2,5-dichlorophenol; 2,4-dichlorophenol; catechols, quinones
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)	di(2-ethylhexyl) phthalate	117-81-7	精巣セルトリ細胞の空胞化	MEHP; MEOHP; MEHHP; MECPP
ホルムアルデヒド	formaldehyde	50-00-0	ヒトの感覚刺激（鼻やのど）を防ぐための30分平均値	formic acid

青字で示した物質は市販標準品

表 1-2 に挙げた物質のうち、投与親物質の代謝物を網羅的に測定してもHBM対象者の曝露量を評価困難であった物質は解析を終了した。

3) マウスへの対象物質の投与

1) で選択した物質について、マウスにこれらを一物質ずつ投与するため、標準品の入手可能性について調べた。全物質について投与可能な標準品が得られたわけではなく、標準品が市販されていないもの、市販はされているが国内輸入実績がなく、購入が困難なもの、市販品が純品の原液ではなく既にメタノール等の各種溶剤に溶かした薄い濃度の製品しか存在しないもの、純品の市販品が存在するが世界中からの注文が一定数に達しないと合成しないもの、については実質的に入手不可能と判断した。以下に述べる課題として浮かび上がった投与量や被験物質の溶解性を検討しつつ、2) で絞り込んだ物質を投与した。一部の物質は日本学術振興会科学研究費補助金22H03333から費用を補填した。

マウスへの投与においては、できる限り高用量を投与することが、体内産生量の少ない代謝物のピークを検出する上で有利である。本研究課題の特徴は、信頼性が担保された代謝物情報が登録されたライブラリにヒト実サンプルのピーク情報を参照する通常の代謝物同定法とは異なり、ライブラリがマウスの体内で産生された「みなし代謝物情報」のままで実サンプルの分析を行い、ライブラリとサ

ンプルのピーク情報の合致確認後に「みなし代謝物」の化学構造を同定し、ライブラリを構築する発想にある。そのため、体内産生代謝物を十分な量で尿中排泄させるために、我々の先行実験 (Nomasa et al., 2021; 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書 5-1851, 2021) での経験をふまえ、当初はLD50の4分の1を低用量、2分の1を高用量として投与することを想定していた。しかし、実際に本研究をスタートしてみると、LD50値が大きい (急性毒性が低い) 物質については、マウスの体重1 kgあたり4 mLという投与液体量に溶かすことが困難であることが判明した。また、数十mg単位で販売されている高価な標準品が大量に必要となることから、このような物質については投与量を減らすこととした。

さらに、対象化学物質の物理化学的性質が多様なため、投与の際の溶媒 (vehicle) について、当初想定しなかった検討が必要となった。通常、強制経口投与する際には、親水性物質であれば滅菌水、生理食塩水やリン酸緩衝液、親油性であればコーン油などの植物油が用いられる。しかし、これらの溶媒に不溶またはごく少量しか溶けない被験物質が多数あることがわかった。多くの物質においてはアルコールへの溶解度の情報があること、エタノールに関しては代謝への作用についての報告が十分あることから、一部の物質についてはエタノールを溶媒として用いた。医薬品においてはメチルセルロースを用いた報告も多く、その場合は0.5%メチルセルロースを用いた。この他にジメチルスルホキシド (DMSO) も溶媒として使用した。DMSOには水や緩衝液、植物油に不溶な物質の多くがよく溶けるが、DMSO自体の急性毒性は低いもののマウスにおける他の化学物質代謝への影響は十分には明らかになっていない。しかし、DMSOの50%溶液が無毒性量である (池田ら, 第47回日本毒性学会) との報告があるので、水やエタノールなどでは投与困難であった物質においては50% DMSOを溶媒として使用した。なお、加温等しても液体溶媒への溶解が困難であった物質に関しては、マウス用のカプセルを使用した経口投与を試みた。しかし、カプセルに入れられる試薬量が非常に少ないため、マウスデータの取得が困難であった場合には、当該物質についてエタノール、DMSO等を溶媒として用いた投与実験を改めてやり直した。

4) 質量分析用ライブラリの作成

尿の前処理方法に関し、動物用医薬品についてはQuEChERS法による回収率が0~43.3%となり (表 1-3)、適さないことが判明したため、最終的に除タンパク法を採用した。

そして、LC-HRMSまたはGC-HRMSにより得た尿試料中の代謝物候補物質ピークの保持時間、MS²スペクトルを「マウスデータ」として順次ライブラリに登録した。LC-HRMSは電子スプレーイオン化法、GC-HRMSは電子イオン化法を用いた。LC-HRMSに用いた移動相は0.1% ギ酸水と0.1% ギ酸入りアセトニトリル、カラムはHypersil Gold C18 column (100 × 2.1 mm, 1.9 μm particles, Thermo Fisher Scientific製)である。

表 1-4 (表 0-2) に動物用医薬品・農薬でライブラリ登録した結果の一部を示す。最終的に、5種類以上の代謝物の化学構造推定ができた120物質の5915のMS²スペクトル (うち2976スペクトルはその物質のみに特異的な代謝物) と、殺菌剤由来と推定された7098のMS²スペクトルを、「マウスデータ」 (総合スペクトルライブラリ) としてオープンライブラリ (MassBank) に登録した (成果番号16, 17、登録した物質は表 1-5 に掲載)。公的機関が公開する、あるいは質量分析計メーカーが提供するライブラリ上で、環境化学物質の代謝物の登録数はごく少ない。ましてや、環境中での検出の報告あるいは検出される可能性がある動物用医薬品、農薬類を広く含む、リスク評価が必要な化学物質の包括的曝露同定に必要な、尿中代謝物の質量分析用ライブラリは存在しない。登録したライブラリ情報は、他の質量分析装置で得たピークデータについても、データ収集閾値やマッ

表 1-3. 動物用医薬品の QuEChERS 法における絶対回収率 (%)

物質名	回収率 (%)
fenobucarb (BPMC)	6.2
lufenuron	1.1
isoprothiolane	15.8
spinosad	43.3
etoxazole	0.0
teflubenzuron	2.8
oxolinic acid	7.0
cyromazine	1.8

チングパラメータの調整により基本的に適用可能であり、環境化学物質のHBMにおいて非常に重要なライブラリとなる。ただし、図1-2（図0-2）に示したように、収載物質でカバーされない物質については今後、情報の補完が望まれる。

表1-4（表0-2）．選定基準（c）3の動物医薬品・農薬のライブラリ登録例

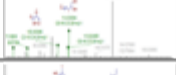
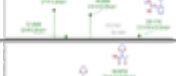
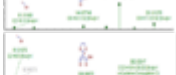
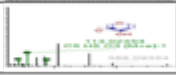
物質名	代謝物 ピーク	分子式	精密質量	保持 時間 (分)	MS ² スペクトラム
monoammonium glycyrrhizinate	#1	C ₆ H ₁₀ O ₇	194.043	1.697	
	#2	C ₆ H ₁₀ O ₇	194.043	1.478	
fenobucarb	#1	C ₁₂ H ₁₅ NO ₂	205.110	6.559	
	#2	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	223.120	7.419	
isoprothiolane	#1	C ₉ H ₁₂ O ₄ S ₂	248.017	17.867	
	#2	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆ S ₃	411.084	8.798	
	#3	C ₁₄ H ₂₃ NO ₆ S ₃	397.068	9.149	
spinosad	#1	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	731.45914	1.303	
azoxystrobin	#1	C ₂₇ H ₂₃ N ₃ O ₁₁	565.133	7.944	
tebuconazole	#1	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₃ Cl	337.119	6.303	

表 1-5 (a). ライブラリ収載の120物質の各スペクトル数

No.	選定 基準	投与物質名	InChIKey	MS2スペ	内、特異的なアノテーション
				クトル数	が付いたM2スペクトル数
1	a	1,2,3-トリメチルベンゼン	FYGHXSUNMUKGBRK-UHFFFAOYSA-N	197	91
2	a	1,1-ジクロロエチレン	LGXVIGDEPROXKC-UHFFFAOYSA-N	24	15
3	a	エチルベンゼン	YNQLUTRBYVCPMQ-UHFFFAOYSA-N	127	52
4	a	スチレン	PPBRXRYQALVMV-UHFFFAOYSA-N	51	24
5	a	酢酸エチル	XEKOWRVHYACXOJ-UHFFFAOYSA-N	50	47
6	a	ナフタレン	UFWIBTONFRDIAS-UHFFFAOYSA-N	154	64
7	a	1,2,4-トリメチルベンゼン	GWHJZXXIDMPWG-X-UHFFFAOYSA-N	212	84
8	a	ベンゾ[a]ピレン	FMMWHPNWFZXXNH-UHFFFAOYSA-N	28	18
9	a	1-ブタノール	LRHPLDYGVMQRHN-UHFFFAOYSA-N	10	7
10	a	アクロレイン	HGNCPLSRVDWNT-UHFFFAOYSA-N	10	10
11	a	ピリジン	JUJWROOIHBMZHM-G-UHFFFAOYSA-N	20	13
12	a	ホルムアルデヒド	WSFSSNUMVMOOMR-UHFFFAOYSA-N	16	12
13	b	二硫化炭素	QGJOPFRUJISHPQ-UHFFFAOYSA-N	5	5
14	b	1,3-ブタジエン	KAKZBPTYRLMSJV-UHFFFAOYSA-N	16	16
15	b	1,2-ジクロロエタン	WSLDOOZREJYCGB-UHFFFAOYSA-N	20	16
16	b	N,N-ジメチルホルムアミド	ZMXDDKWLCZADIW-UHFFFAOYSA-N	24	13
17	b	ベンゼン	UHOVQNZJYSORNB-UHFFFAOYSA-N	65	35
18	b	アクリロニトリル	NLHHLRWOUZZQLW-UHFFFAOYSA-N	14	10
19	b	トルエン	YXFVVABEGXRONW-UHFFFAOYSA-N	45	22
20	b	アニリン	PAYRUJLWNCNPSJ-UHFFFAOYSA-N	100	50
21	b	4,4'-メチレンビス(2-クロロアニリン)	IBOFVQJTBBUKMU-UHFFFAOYSA-N	53	20
22	b	酸化プロピレン	GOOHAUXETOMSMU-UHFFFAOYSA-N	18	12
23	b	o-トルイジン	RNVCVTLRINQCPJ-UHFFFAOYSA-N	74	32
24	c-1	メチルイソブチルケトン	NTIZESTWVPVYFN-L-UHFFFAOYSA-N	94	38
25	c-1	N-メチル-2-ピロリドン	SECXISVLQFMJRM-UHFFFAOYSA-N	41	27
26	c-1	2-ブトキシエタノール	POAOYUHQDCAZBD-UHFFFAOYSA-N	31	18
27	c-1	テトラヒドロフラン	WYURNTSHIVDZCO-UHFFFAOYSA-N	19	18
28	c-1	1,4-ジオキサン	RYHBNJHYFVUHQ-T-UHFFFAOYSA-N	14	9
29	c-1	1-ブロモプロパン	CYNYIHKIEHGYOZ-UHFFFAOYSA-N	58	38
30	c-1	2-メトキシエタノール	XNWFRZJHXBZDAG-UHFFFAOYSA-N	30	22
31	c-1	アクリル酸エチル	JIGUQPWFRLRLWPJ-UHFFFAOYSA-N	83	46
32	c-1	アクリル酸メチル	BAPJBEBLWBFYGM-E-UHFFFAOYSA-N	37	22
33	c-1	イソブレン	RRHGJUQNOFWUDK-UHFFFAOYSA-N	83	43
34	c-1	エビクロロヒドリン	BRLQWZUYTZBJKN-UHFFFAOYSA-N	21	13
35	c-1	カテコール	YCIMNLLNPGFGHC-UHFFFAOYSA-N	32	20
36	c-1	クメン	RWGFKTVRMDUZSP-UHFFFAOYSA-N	150	64
37	c-1	ニトロメタン	LYGJENNIWJXYER-UHFFFAOYSA-N	30	21
38	c-1	ヘキサメチレンジイソシアネート	RRAMGCGOFNQTL-D-UHFFFAOYSA-N	17	12
39	c-1	n-ヘキサン	VLKZOEYOYAKHREP-UHFFFAOYSA-N	11	8
40	c-1	塩化アリル	OSDWBNEJMKUWAV-UHFFFAOYSA-N	29	17
41	c-1	塩化ベンジル	KCXMKQUVWSEMD-UHFFFAOYSA-N	101	43
42	c-1	酢酸ビニル	XTXRWKRVRITETP-UHFFFAOYSA-N	24	20
43	c-1	メチレンビス(4-フェニルイソシアネート)	UPMLOUAZCHDJJD-UHFFFAOYSA-N	62	37
44	c-1	p-クロロニトロベンゼン	CZGCEKJOLUNIFY-UHFFFAOYSA-N	56	29
45	c-1	アクリルアミド	HRPVXLWLXDHG-H-UHFFFAOYSA-N	40	29
46	c-1	4-クロロアニリン	QSNCSYSFYORT-R-UHFFFAOYSA-N	22	15
47	c-1	クロロ酢酸	FOCAUTSVDIKZOP-UHFFFAOYSA-N	7	6
48	c-1	テレフタル酸	KKEYFWRCBNTPAC-UHFFFAOYSA-N	11	9
49	c-1	ニトリロ三酢酸及びその塩	MGFYIUFZLHCRTH-UHFFFAOYSA-N	16	9
50	c-1	フェニレンジアミン	CBCKQZAAMUWICA-UHFFFAOYSA-N	59	30
51	c-1	1-オクタノール	KBPLFHHGFOOTCA-UHFFFAOYSA-N	44	21
52	c-1	テレフタル酸ジメチル	WOZVHXUHUFLZGK-UHFFFAOYSA-N	27	12
53	c-1	フェノール	ISWSIDIOOBJBQZ-UHFFFAOYSA-N	10	9
54	c-1	モルホリン	YNAVUWVOSKDBBP-UHFFFAOYSA-N	20	17
55	c-1	2-アミノエタノール	HZAXFHJVJLSVMW-UHFFFAOYSA-N	15	12
56	c-1	イソブチルアルコール	KFZMGEQAYNKOFK-UHFFFAOYSA-N	17	11
57	c-1	クロロエタン	HRYZWHHZPQKTI-UHFFFAOYSA-N	9	8
58	c-1	メチルエチルケトン	ZWEHNKRNPQVVGH-UHFFFAOYSA-N	37	26
59	c-1	2-(2-エトキシエトキシ)エタノール	XXJWXESWEXICW-UHFFFAOYSA-N	76	38
60	c-1	エチレングリコール	LYCAIKOWRPUZTN-UHFFFAOYSA-N	17	13

表 1-5 (b). ライブラリ収載の120物質の各スペクトル数 (続き)

No.	選定 基準	投与物質名	InChIKey	MS2スペ クトル数	内、特異的なアノテーション が付いたM2スペクトル数
61	c-1	シクロヘキサノン	JHIVVAPYMSGYDF-UHFFFAOYSA-N	41	26
62	c-1	トリエタノールアミン	GSEJCLTVZPLZKY-UHFFFAOYSA-N	26	15
63	c-2	2-クロロ-1,3-ブタジエン	YACLQRRMGJLV-UHFFFAOYSA-N	9	7
64	c-2	2,4-ジニトロトルエン	RMBFBMJGBANMMK-UHFFFAOYSA-N	91	46
65	c-2	1,1-ジメチルヒドラジン	RHUYHJGZVWEHW-UHFFFAOYSA-N	30	22
66	c-2	1,3-ジクロロプロペン	UOORRWUZONOOLO-OWOJBTEDSA-N	32	15
67	c-2	4-ビニル-1-シクロヘキセン	BBDKZWKEPDTENS-UHFFFAOYSA-N	209	59
68	c-2	2-プロモプロパン	NAMYKGVNDVBCFQ-UHFFFAOYSA-N	39	32
69	c-2	o-フェニレンジアミン	GEYOCULXLDLDCMW-UHFFFAOYSA-N	70	30
70	c-2	1,2-ジクロロプロパン	KNKRKFALVUDBJE-UHFFFAOYSA-N	56	35
71	c-2	2-クロロフェノール	ISPYQTSUDJAMAB-UHFFFAOYSA-N	25	12
72	c-2	メタクリル酸メチル	VVQNEPGJFQJSBK-UHFFFAOYSA-N	55	30
73	c-2	しょう脳	DSSYKIVIOFKYAU-UHFFFAOYSA-N	124	30
74	c-2	チウラム	KUAZQDVQKLNPE-UHFFFAOYSA-N	18	30
75	c-2	メタクリル酸 2,3-エポキシプロピル	VOZRXNHFFUQHIL-UHFFFAOYSA-N	29	30
76	c-3	イブプロジオン	ONUFESLQCSAYKA-UHFFFAOYSA-N	55	30
77	c-3	チオファネートメチル	QGHREAKMXNCOA-UHFFFAOYSA-N	96	30
78	c-3	テブコナゾール	PXMNMQRDXWABCY-UHFFFAOYSA-N	80	30
79	c-3	ヒドロキシイソキサゾール	KGVPNLBXJKTABS-UHFFFAOYSA-N	26	30
80	c-3	フェリムゾン	GOWLARCWZRESHU-AQTBJWFISA-N	20	30
81	c-3	アテノロール	METKIMKYRPLGS-UHFFFAOYSA-N	45	30
82	c-3	ビソプロロール	VHYCDWMUTMEGQY-UHFFFAOYSA-N	41	30
83	c-3	イブプロフェン	HEFNNWSXXWATRW-UHFFFAOYSA-N	134	30
84	c-3	アセトアミノフェン	RZVAJINKPMORJF-UHFFFAOYSA-N	87	30
85	c-3	メフェナム酸	HYYBABOKPJLUIN-UHFFFAOYSA-N	70	30
86	c-3	ブレドニゾン	OIGNJSKKLXVSLV-UHFFFAOYSA-N	45	30
87	c-3	ベタメタゾン	UREBDLICKHUKA-DVTGEIKXSA-N	26	30
88	c-3	デキサメタゾン	UREBDLICKHUKA-CXSFGZGWSA-N	26	30
89	c-3	プロピオチオウラシル	KNAHARQHSZJURB-UHFFFAOYSA-N	111	30
90	c-3	チアマゾール	PMRYVIKBURPHAH-UHFFFAOYSA-N	66	30
91	c-3	スルピリド	BGRJTUBHPOOWDU-UHFFFAOYSA-N	65	30
92	c-3	ドンペリドン	FGXWKSZVQUSTL-UHFFFAOYSA-N	36	30
93	c-3	オランザピン	KVWDHTXUZHCGIO-UHFFFAOYSA-N	28	30
94	c-3	ジソピラミド	UVTNFZQICZKOE-UHFFFAOYSA-N	52	30
95	c-3	ソリフェナチン	RXZMMZZRUPYENV-VROPFNGYSA-N	64	30
96	c-3	フェキソフェナジン	RWTNPBWLIMQHL-UHFFFAOYSA-N	22	30
97	c-3	オロパタジン	JBIMVDZLSHOPLA-LSCVHKIXSA-N	70	30
98	c-3	レボセチリジン	ZKLPARSLTMPFCP-UHFFFAOYSA-N	45	30
99	c-3	イソプロチオラン	UFHLMYOGRXOCSL-UHFFFAOYSA-N	100	30
100	c-3	アゾキシストロビン	WFDXOXNFRHQEC-GHRIWEEISA-N	45	30
101	c-3	ボスカリド	WYEMLYFITZORAB-UHFFFAOYSA-N	12	30
102	c-3	ピラクロストロビン	HZRSNVGNWUDEFX-UHFFFAOYSA-N	26	30
103	c-3	ベンチオピラド	PFFIDZXUXFLSSR-UHFFFAOYSA-N	51	30
104	c-3	クレソキシムメチル	ZOTBXTZVPHCKPN-HTXNQAPBSA-N	39	30
105	c-3	プロシミドン	QXJKBPAAVHBAHF-UHFFFAOYSA-N	31	30
106	c-3	トリフルミゾール	HSMVPDGGQIQYSR-UHFFFAOYSA-N	38	30
107	c-3	ベンチアバリカルブイソプロピル	USRKFGIXLGMKU-ABAIWWIYSA-N	51	30
108	c-3	キャプタン	LDVVMCZRFBMZSG-UHFFFAOYSA-N	15	30
109	c-3	ダゾメット	QAYICIQNSGETAS-UHFFFAOYSA-N	22	30
110	c-3	トルクロホスメチル	OBZIQJJIKNWN-OHFFFAOYSA-N	58	30
111	c-3	ビロキロン	XRJLAOUDSILFTT-UHFFFAOYSA-N	59	30
112	c-3	フルアジナム	UZCGKGPEKUCDTF-UHFFFAOYSA-N	24	30
113	c-3	フルスルファミド	GNVDAZSPJWCQIZ-UHFFFAOYSA-N	12	30
114	c-3	プロベナゾール	WHHIPMZEDGBUCC-UHFFFAOYSA-N	98	30
115	c-3	マンゼブ	CHNQZRKUZNPOOH-UHFFFAOYSA-N	21	30
116	c-3	メタラキシル	ZQEIXNIJLIKNTD-UHFFFAOYSA-N	77	30
117	c-3	シメコナゾール	YABFPHSQTSFWQB-UHFFFAOYSA-N	60	30
118	c-3	ジフェノコナゾール	BQYJATMQXGBDHF-UHFFFAOYSA-N	10	30
119	c-3	テトラコナゾール	LQDARGUHUSPFLN-UHFFFAOYSA-N	51	30
120	c-3	プロピコナゾール	STJLVHVMYQXCPB-UHFFFAOYSA-N	60	30

5) ヒト尿中のピークとマウスデータとの照合

女子大学に在籍する学生(n=73)とエコチル調査参加妊婦(n=141, それぞれ妊娠初期と妊娠中後期の2時点)を対象に、尿中物質の網羅的な質量分析を行った後にマウスデータ(MS2ライブラリ)との照合を行った。その結果、学生からは15群の尿中物質クラスターが、エコチル調査参加妊婦からは12群の尿中物質クラスターが、代謝物または親物質として検出された。

個人ごとの各物質の検出状況を図1-3(図0-3)に示す。女子大学に在籍する学生では採尿前日および当日の服薬の有無について調査を行っているが、個人単位で見たとき、医薬品代謝物の検出と服薬は必ずしも一致しなかった。これらの医薬品の尿中から検出された代謝物濃度は、同じピーク面積が示す濃度が物質間でほぼ同等であると仮定すると、トルエン(または塩化ビニル、酢酸エチル)代謝物の約2/3~1/100程度であった。検出が服薬状況調査対象日より前の時点での内服の反映であるのか、あるいは、内服者の排泄物が下水、河川水、上水を経由した結果、非服薬者が超低用量で曝露していることを示しているのかについては、今後の課題である。

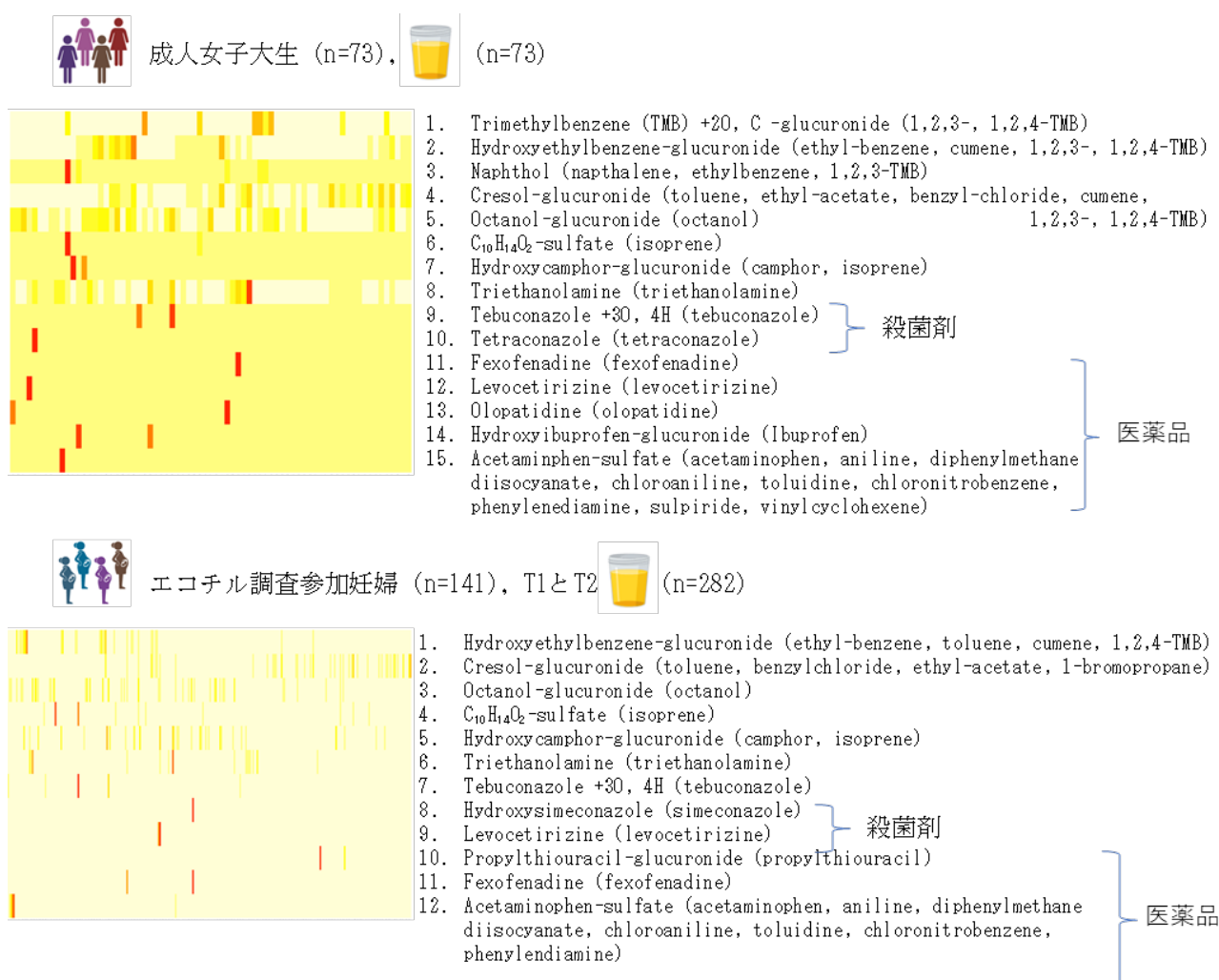


図1-3(図0-3). 対象者ごとのマウスデータとの照合による尿中物質クラスターの検出状況。列が各対象者、行は検出された物質クラスター。各クラスターに属する尿中物質の代表例について各対象者のピーク面積をZスコア化し、濃赤色→淡赤色→濃黄色→淡黄色の順に高濃度→低濃度であることを示す。括弧内は代表的な親物質の例。

特筆すべきは、本研究で開発したマウスデータ(MS2ライブラリ)を利用した網羅的照合法により、報告されている代謝物に加え、ヒトにおいて過去に報告のない代謝物が検出されたことである。例えば、女子大学に在籍する学生、妊婦ともに一部の対象者で殺菌剤テブコナゾールの代謝物が検出されたが、既報のある代謝物だけでなく、ヒト尿での報告例がない代謝物5種類が本研究で初めて検出さ

れた（図1-4（図0-4））（論文投稿中）。これは、テブコナゾールを対象としたHBM研究の数よりもより少ないことに加え、標準試薬の有無に左右されない本研究のユニークなアプローチによって良いであろう。

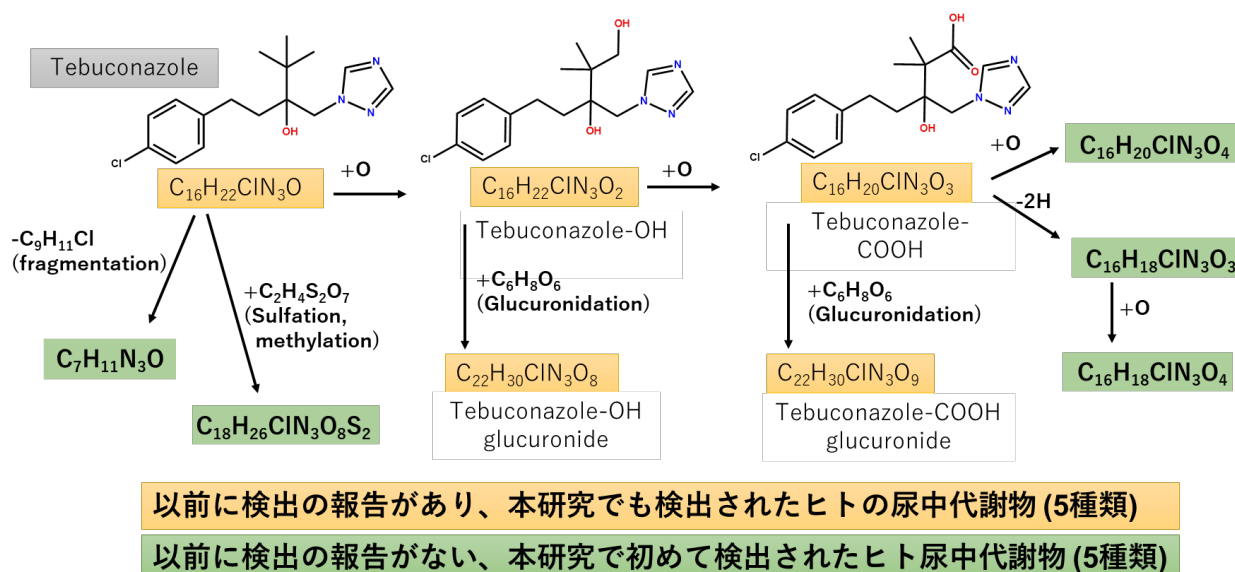


図1-4（図0-4）．ヒト尿で検出されたテブコナゾール代謝物

マウスデータを用いてヒト尿で存在が示された、ナフタレン代謝物である水酸化ナフタレン誘導体（図1-5（図0-5））のうち、ヒドロキシナフチル硫酸については、核磁気共鳴(NMR)装置により硫酸抱合体の構造同定を試みた。抱合をうける水酸基の位置が不明であるため、投与したマウスの尿から高速液体クロマトグラフを用いて保持時間をもとに該当画分を分取し、シグナル測定結果を1-ナフトール、2-ナフトールの標準品の場合と比較した（図1-6（図0-6））。その結果、1,2位が水酸基置換され、1位で硫酸抱合されていることが推定された。試料はDMSO-d6に溶解したものとCD3OD（重メタノール）に溶解したものの両方を測定したが、両者のシグナルの出方は同じであった。ナフトール誘導体については、グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の両方が検出されたが、質量分析における標準品の保持時間が1-ナフトール、2-ナフトールともにほぼ同じで、2-ナフトールの抱合体であることが推定されるものの決定には至らなかった。今回の検討では試料の量の制約により官能基の位置の同定で不確実さが残ったが、今後はマウス反復投与して得られる大量の尿を用いるなどして解析試料の量を増やすことや、画分精製方法の更なる検討により、正確な官能基の位置同定が可能と考えられる。マウスデータのMS2スペクトルからは置換基の位置決定ができない場合における、NMR解析による代謝物の構造同定の道筋が確認できた。

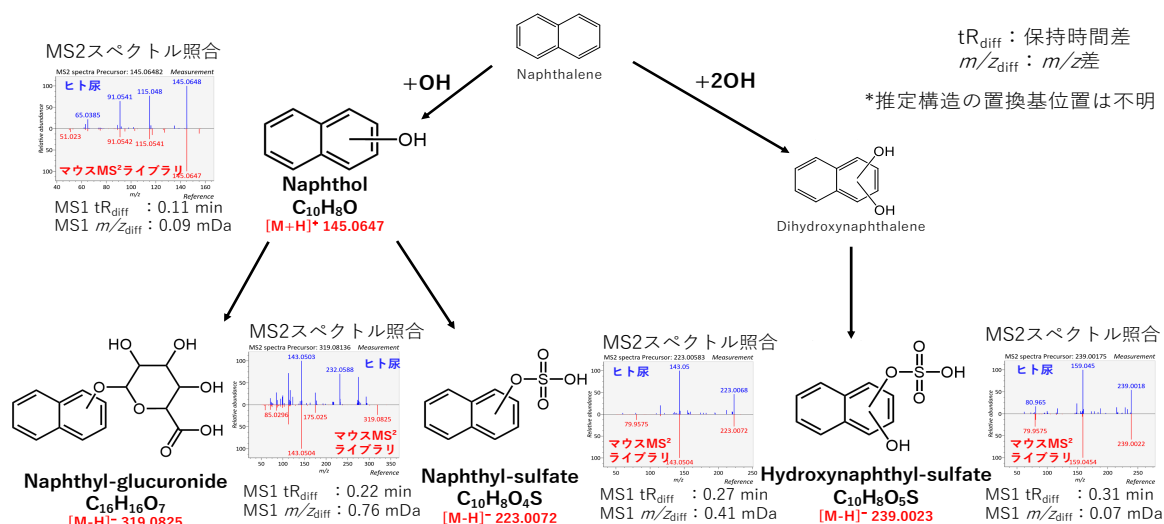


図 1-5 (図 0-5) . ヒト尿で検出されたナフタレン代謝物

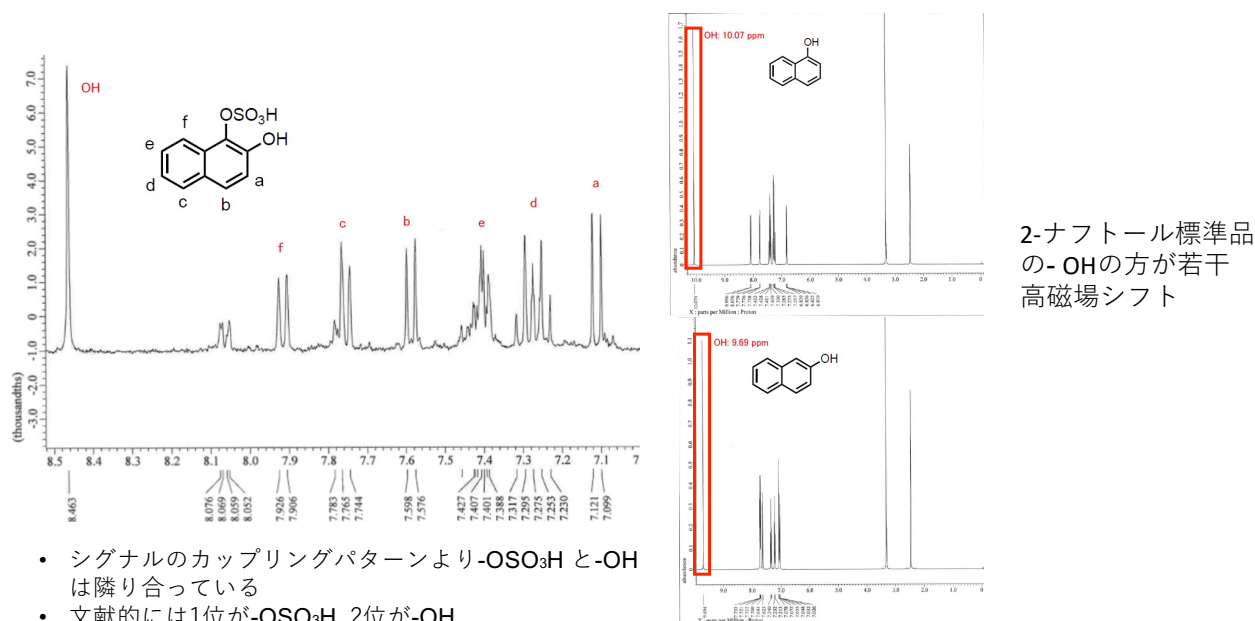


図 1-6 (図 0-6) . NMRによるナフタレン代謝物の構造推定

このように構造推定ができた一方で、代謝物によるHBMに共通する研究の限界は本研究にも存在することに留意する必要がある。異なる親化合物から同じ代謝物が生成される場合、当該代謝物によるHBMでは曝露した親化合物が明らかにならない。例として、図 1-7 の左側および中央パネルにクレゾールまたはベンジルアルコール (MS2スペクトルではフラグメントイオンが同パターンなので区別できない) のグルクロン酸抱合体の検出状況を示す。マウスへのトルエン、塩化ビニル、酢酸エチルの投与により、量依存的な相互に区別不能なピークとして検出された。ちなみに、このグルクロン酸抱合体は、対象物質を投与していないコントロールマウスにおいても検出され、その尿中濃度には約10倍のばらつきが見られた (図 1-7 左パネルの右下クロマトピーク)。このことは、マウスの飼育環境において親物質への微量のバックグラウンド曝露があり、飼育環境が同様であっても個体差が現れる可能性を示唆する結果である。女子大学に在籍する学生および妊婦 (図 1-7 中央パネル) においても、上記代謝物の尿中濃度に約1000倍の個体差が見られ、これらの代謝物濃度が他の対象者に比べて非常に

低い数人の存在も明らかになった。この違いが何によるのかは興味を持たれる。

図1-7の右側パネルには、キャプタンとチウラムの共通代謝物がヒト尿で検出されたことを示す。曝露した親物質がこのうちのどれであるのか、複合曝露の可能性とともに現時点では絞り込むことができない。これらの親物質の毒性およびその強さは必ずしも同一とはいえないので、化学物質管理の観点からは、どの曝露源におけるどの物質への曝露が健康リスクという点で着目すべきかを絞り込むことが求められる。この点は今後の課題である。

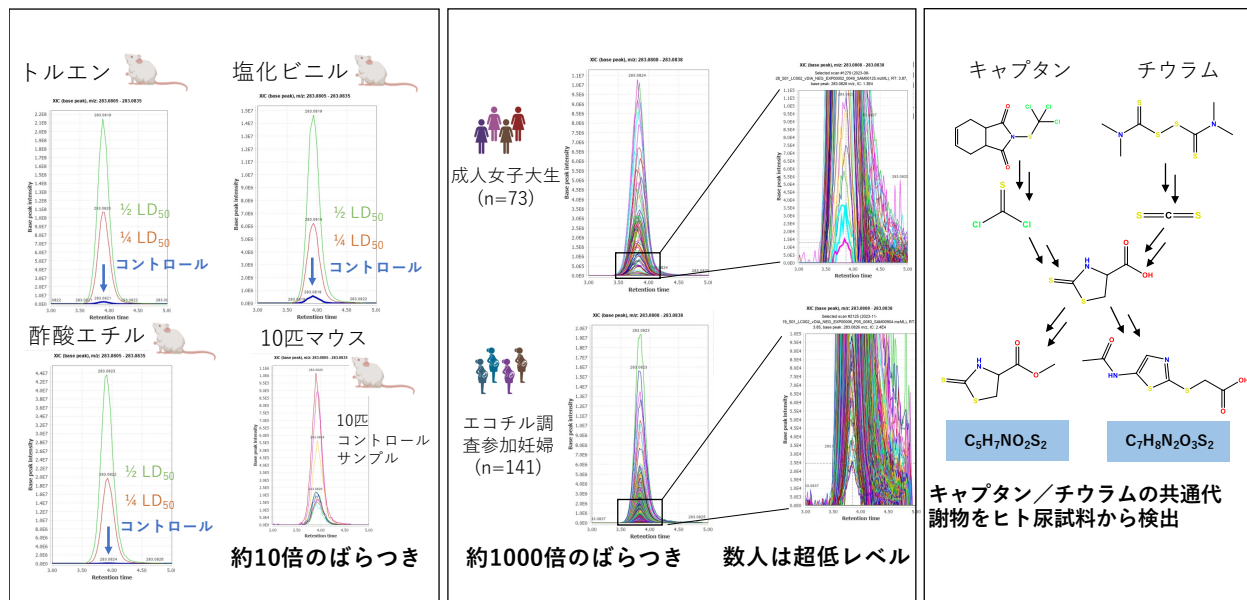


図1-7. クレゾールまたはベンジルアルコールのグルクロン酸抱合体（左・中央パネル）およびキャプタンとチウラムの共通代謝物（右パネル）の検出。左パネルはマウス、中央及び右パネルはヒト対象者。クレゾールまたはベンジルアルコールのグルクロン酸抱合体は非投与マウスにおいてもピークが検出され、尿中濃度には約10倍のばらつきがある。

6) 検出率または検出濃度が高かった代謝物を対象とした陰膳試料中の親物質含有状況の検索

ヒト尿中で検出された代謝物のうち一部の親物質について、食事あるいは飲料水経路の曝露を想定し、陰膳試料10人分2日分を分析して食事中にその物質が検出されるかを調べた。農薬として環境中で使用される殺菌剤テブコナゾール、テトラコナゾールについて検討を行った。その結果、陰膳試料中で親物質が検出されたが（1日の食事延べ20人分（82検体）、検出率テブコナゾール20/20、テトラコナゾール13/20、検出限界値0.03 ng/mL）、検出された半定量的尿中濃度との関連は見られなかった。尿中代謝物濃度と陰膳試料中の親物質濃度との関係については、同じ成人集団を対象に以前に実施した推進費研究【5-1851】でも他の環境化学物質で同様の検討を行っている。起床後最初の尿中の一部のジアルキルリン酸（有機リン系殺虫剤の尿中代謝物であるとともに環境中での分解生成物）濃度とその前日の陰膳試料中に含まれる同物質濃度との間に、相関係数0.4以上の有意な関連が見られた一方で、尿中代謝物から推定された親化合物は、陰膳中に検出された親化合物と一致しなかった。すなわち、本研究での対象物質と同様の結果であった。これらの事実より、マウスデータに収載したMS2スペクトル（投与量の増加に伴い増加したピークのうち、一定のフィルタリング条件に適合し、かつ、親物質由来のものとして構造的に矛盾がないものを選抜）が投与物質由来であるという前提の下で、以下の可能性が推論される。

第一に、化学物質の環境経路の低用量曝露状況での毒物動態(toxicokinetics)においては、高用量曝露時で見られるα相、β相より半減期の長いγ相以下の消失相が尿中濃度の決定要因であるため

に、陰膳試料採取日より前の経口曝露が尿中濃度に寄与している可能性である。

第二に、低用量曝露状況では、循環血液量を含む毒物動態の個人差により、摂取量と尿中排泄量との間の関連が認められにくくなっている可能性である。一般生活環境での曝露レベルに比べ格段に多い職域曝露においてさえ、個人曝露量としての気中濃度とHBMの結果との間には有意な関連があっても相当程度の個人差が認められる。経口曝露による化学物質の消化管吸収量においては、腸管内容物（例えば線維成分）の多少による腸管吸収率の個人差や、遺伝的背景や生活習慣によって変わりうる腸内細菌叢による代謝の個人差の影響を受ける可能性もあると考えられる。

【引用文献】

Kadokami K, Miyawaki T, Iwabuchi K, et al. Inflow and outflow loads of 484 daily-use chemicals in wastewater treatment plants across Japan. Environ Monit Contam Res. 1: 1-16, 2021.

Wild CP. Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14(8):1847-50, 2005.

Wilkinson JL, Boxall ABA, Kolpin DW, et al. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. Proc Natl Acad Sci U S A. 119(8):e2113947119, 2022.

Nomasa K, Oya N, Ito Y, et al. Development of a strategic approach for comprehensive detection of organophosphate pesticide metabolites in urine: Extrapolation of cadusafos and prothiofos metabolomics data of mice to humans. J Occup Health 63(1): e12218, 2021.

池田恵吾、佐々木靖弘、岡田久美代ら。ラット経口投与毒性試験で難溶性化合物を評価するための経口投与用媒体の検討。第47回日本毒性学会 P-170、2020。

5. サブテーマ1 研究目標の達成状況

<【サブテーマ1】達成状況>・・・・・・・・・・ 2. 目標を上回る成果をあげた

「網羅的なヒトバイオモニタリングによる化学物質の複合曝露評価手法の提案」

サブテーマ1 目標	サブテーマ1 の達成状況
ヒト尿を用いるBMに関し、ターゲット分析法が未確立かつ曝露評価の優先度が高い化学物質について、対象集団の包括的曝露評価が可能な方法論を開発する。具体的には次の2つの主要アウトプットおよび1つの付加的アウトプットを得ることを目標とする。	目標とした2つの主要アウトプットについて目標を上回る数で達成した。これにより、ターゲット分析法が未確立かつ曝露評価の優先度が高い化学物質について、対象集団の包括的曝露評価が可能なHBMの方法論を開発した。 本研究で開発・公開したMS2ライブラリは曝露評価が望まれる物質すべてが収載されているわけではないが、実際に女子大学に在籍する学生および妊婦の尿に適用し、ライブラリ収載物質への曝露が比較的高い生活者の存在をスクリーニング可能であることを示した。曝露源が異なる広汎な物質への曝露をHBMにより網羅的に測定した研究は、これまでにほとんどないこと、代謝物である硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体の化学物質標準試薬は、一般に入手困難であることより、本研究

【主要アウトプット】 1. (a)～(c)の3カテゴリー((a)環境リスク初期評価の「人に対する健康のリスク評価」により「詳細な評価を行う候補と考えられる」とされた物質、(b)化審法における優先評価化学物質のうち人健康影響の観点からリスク評価(一次)II以降に進んだ物質、(c)室内外で広く使われる広義のバイオサイドまたはリスクの指摘がある物質)から合計150物質を選定し、このうち、物質の物理化学的性質や分析機器の特性および感度を考慮して対象物質を絞り込み、その尿中代謝物または尿中親物質の包括的曝露同定に必要な質量分析用ライブラリを構築する。 2. 構築したライブラリを、愛知県におけるエコチル調査参加妊婦(100人)、2日間の陰膳試料を採取済みの成人(女子大学に在籍する学生70人)に適用し、尿中代謝物等の検出状況を明らかにする。これにより、リスク評価が必要として設定した物質群、対象集団において、本手法による包括的曝露評価が有効であることを示す。 【付加的アウトプット】 主要アウトプット2において検出率または検出濃度が高かった代謝物のうち、同物質およびその親物質の標準物質が入手可能な場合に限り、陰膳試料70人分を分析する。食事中に親物質(または代謝物と同構造の分解物)が検出されるか、すなわち食事が曝露経路といえるかを明らかにする。	で作成したライブラリは、環境化学物質のHBMの実用化に新たな可能性をもたらすものといえる。 主要アウトプット1については、(a)～(c)の3カテゴリーから研究計画書で掲げた目標の150物質を上回る211物質を選定し(表1-1(表0-1))、このうち120物質の質量分析用ライブラリ(マウスデータ)を構築した。なお、可能な限り多くの物質のスペクトルデータをライブラリに登録するために、投与実験に必要な費用のうち、高額な標準品購入費の一部は他の研究資金を充当する努力を行った。ライブラリ情報は、オープンライブラリ(MassBank)に登録(成果番号16, 17)するとともに代表者の研究室のホームページ上にもURLリンクを掲載した。 主要アウトプット2については、目標を上回る妊婦141人、女子大学に在籍する学生73人の尿中代謝物等の検出状況を明らかにした(図1-4(図0-4)および図1-5(図0-5))。なお、妊婦については化学物質に対する胎児の感受性が時期により異なる可能性を考慮し、器官形成期を含む妊娠前期及び胎盤機能の完成後に化学物質が胎盤を経て胎児に移行し、胎児毒性を生じうる妊娠中後期の2時点の尿を測定した。 付加的アウトプットについても検討を行い、尿中代謝物濃度の存在と食事媒体中の親化合物の存在とは一致しないことを明らかにした。
--	---

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

※この項目の成果番号は通し番号です。

(1) 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	0
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	0
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	0
口頭発表（学会等・査読なし）：	9
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	6
マスコミ等への公表・報道等：	0
研究成果による受賞：	0
その他の成果発表：	2

(2) 誌上発表

< 査読付き論文 >

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文
	特に記載すべき事項はない。

< 査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野） >

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）
	特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ1】のその他誌上発表（査読なし）
	特に記載すべき事項はない。

(3) 口頭発表

<口頭発表（国際学会等・査読付き）>

成果 番号	【サブテーマ1】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
	特に記載すべき事項はない。

<口頭発表（学会等・査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ1】の口頭発表（学会等・査読なし）
1	伊藤由起, 上島通浩. シンポジウム4「環境化学物質の健康影響研究の知見と今後の展望」環境化学物質の曝露の低減に向けて：食事調査から分かってきたこと. 第92回日本衛生学会学術総会 2022/3/23 オンライン
2	伊藤由起, 上島通浩. シンポジウム11「最新の研究成果から考える化学物質健康リスク評価の新たな展開」化学物質の網羅的分析による曝露評価の試み. 第95回日本産業衛生学会 2022/5/26 高知
3	上島通浩. シンポジウム4「隣接領域（環境保健）から学ぶ化学物質のリスク評価」環境保健領域におけるヒトバイオモニタリング. 第97回日本産業衛生学会 2024/5/23 広島
4	和佐田ひと実, 伊藤由起, Nayan Chandra Mohanto, 加藤沙耶香, 上島通浩. LC-HR/MSを用いた殺菌剤の尿中代謝物の網羅的分析. 第49回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 2022/10/22 熊本
5	伊藤由起, 加藤沙耶香, 和佐田ひと実, 豊田佳代, 能美侑芽, 上島通浩. 尿中代謝物の網羅的分析のためのデータリスト作成. 第93回日本衛生学会学術総会 2023/3/4 蒲田
6	伊藤由起, ハレツキスロマナス, 岩崎楓生, 柴山裕希, 加藤沙耶香, 富澤元博, 上島通浩. 尿を用いた産業化学物質代謝物の網羅的分析の検討. 2023年度日本産業衛生学会東海地方会学会. 2023/11/11 東海
7	ハレツキスロマナス, 和佐田ひと実, 伊藤由起, 加藤沙耶香, 富澤元博, 上島通浩. ヒト生物学的モニタリングのためのマウス尿を用いた殺菌剤代謝物MS2スペクトルライブラリーの作成. 第50回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2023/11/18 神田
8	岩崎楓生, ハレツキスロマナス, 伊藤由起, 柴山裕希, 加藤沙耶香, 富澤元博, 上島通浩. マウス尿を用いた産業化学物質の網羅的分析法の開発と一般集団における曝露評価. 第50回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2023/11/18 神田
9	ハレツキスロマナス, 伊藤由起, 岩崎楓生, 柴山裕希, 和佐田ひと実, 加藤沙耶香, 富澤元博, 上島通浩. Urinary Non-Targeted Analyses for comprehensive chemical exposure screening. 第9回日本医用マススペクトル学会西部会. 2024/7/20 名古屋

(4) 知的財産権

成果 番号	発明者	出願者	名称	出願以降 の番号	出願 年月日
----------	-----	-----	----	-------------	-----------

	特に記載すべき事項はない。				
--	---------------	--	--	--	--

(5) 「国民との科学・技術対話」の実施

成果番号	実施年度	【サブテーマ1】の実施状況
10	2021	名古屋市立の高校生対象「大学丸ごと研究室体験」（名古屋市立大学主催、2021年8月20日、名古屋市立大学、高校生4名+高校教員1名）
11	2022	文教大学付属高校における特別授業「化学物質は本当にカラダに悪いのか？」（文教大学付属高校主催、2022年6月11日、文教大学付属高校、高校生50名）
12	2022	名古屋市立大学オープンキャンパス（主催：名古屋市立大学、2022年8月6日、名古屋市立大学、高校生486名）
13	2022	名古屋市立の高校生対象「大学丸ごと研究室体験」（主催：名古屋市立大学、2022年8月12日、名古屋市立大学、高校生3名+高校教員1名）
14	2022	名古屋市立名東高校出前講座「健康リスクって何？」（名東高校主催、2022年10月26日、名東高校、高校3年生150名+高校教員5名）
15	2023	名古屋市立の高校生対象「大学丸ごと研究室体験」（主催：名古屋市立大学、2023年7月28日、名古屋市立大学、高校生4名+高校教員1名）

(6) マスメディア等への公表・報道等

成果番号	【サブテーマ1】のメディア報道等
	特に記載すべき事項はない。

(7) 研究成果による受賞

成果番号	【サブテーマ1】の研究成果による受賞
	特に記載すべき事項はない。

(8) その他の成果発表

成果番号	【サブテーマ1】のその他の成果発表
16	MassBank of North America (MoNA) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/downloads へのライブラリ（120 物質のマウス尿中代謝物等 5915 種類の アノテーション付き MS2 スペクトル）の登録

	CD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_HILIC_NEG (1,691 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/b231f50b-ab81-4049-8507-002356cbef3b CD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_RP_NEG (1,261 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/cde41407-5e86-4ff3-80bf-2b340af46b90 CD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_HILIC_POS (1,655 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/cb07338f-75a9-40f8-a693-906d0f39cbc9 CD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_RP_POS (1,308 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/4e2e8d22-62c9-47b0-9fed-37e12b8e2af9
17	MassBank of North America (MoNA) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/downloads へのライブラリ（殺菌剤 31 物質のマウス尿中代謝物等 7098 種類の MS2 スペクトル）の登録 Fungicide_suspect_metabolites_NCU_HIL_NEG (1,603 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/6d491933-5eb0-417b-9b92-ceb0eb3be928 Fungicide_suspect_metabolites_NCU_HIL_POS (1,533 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/55416382-e11c-4012-aa14-ecea47a2b3bd Fungicide_suspect_metabolites_NCU_RP_NEG (1,705 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/77c675ba-f2e0-432a-a3fb-7ffdcdb51cf9 Fungicide_suspect_metabolites_NCU_RP_POS (2,257 spectra) https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/6f55c842-800d-4c36-ae50-f915d675c350

Abstract

[Research Title]

Proposition of a comprehensive human biomonitoring method to assess co-exposure to chemicals

Project Period (FY) :	2021-2023
Principal Investigator :	Kamijima Michihiro
(PI ORCID) :	ORCID0000-0003-0670-8790
Principal Institution :	Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, JAPAN Tel: +81-52-853-8171 Fax: +81-52-859-1228 E-mail: kamijima@med.nagoya-cu.ac.jp
Cooperated by :	Tokyo University of Agriculture
Keywords :	Chemicals, Biomonitoring, Comprehensive analysis, Combined exposure, Urine samples

[Abstract]

Exposure characterization is an indispensable component of chemical risk assessment. To facilitate exposure characterization, a technique that measures metabolites or parent chemicals directly in human urine and blood has been introduced into the risk assessment process in environmental and occupational health settings to evaluate chemical exposure at the individual level. This technique, human biomonitoring (HBM), originally involved targeted analyses of parent compounds of concern or their metabolites, but non targeted or comprehensive analyses are theoretically desirable to elucidate combined exposure to multiple chemicals, which remain to be developed. One primary bottleneck is the absence of chemical libraries that provide accurate information on mass, retention time and MS2 spectra of chemical metabolites. The absence of such libraries makes it difficult to annotate chemical metabolite candidates detected in biospecimens. For most relevant metabolites, their standard reagents are not commercially available. In this project, we chose chemicals that have been highly prioritized by ministries, listed under the following categories: (a) Initial Environmental Risk Assessment of Chemicals, (b) Priority Assessment Chemical Substances designated by Japan's Chemical Substance Control Law, and (c) biocides or other chemicals in prevalent outdoor/ indoor use to which attention has been paid in a risk assessment context. We administered parent standards to mice, collected urine containing the metabolites, and constructed a suspected metabolite MS2 spectral library. A total of 5915 accurate masses and retention times of urinary metabolites/parent compounds derived from 120 chemicals were exported and registered in MSP format in the MassBank public domain (MassBank of North America (MoNA) <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu>). The library was applied to urine samples from pregnant women and adult female students in Japan. This screen revealed exposure to 12 and 15 of the represented parent compounds/candidate chemicals in these respective populations. Our approach, using our constructed library, is useful for suspect screening in HBM. It may be applied to various ongoing HBM projects as a screening tool to select chemicals to be measured by quantitative targeted analyses with an understanding of the limitations of the developed

approach.

This research was funded by the Environment Research and Technology Development Fund (ERTDF).