

令和3年度～5年度 環境研究総合推進費

1

5-2104 (JPMEERF20215004)

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



【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

代表研究機関：名古屋市立大学

研究分担機関：東京農業大学

研究代表者：上島通浩

研究分担者：伊藤由起、加藤沙耶香、冨澤元博



ヒトにおける化学物質の的確な曝露評価は健康リスク管理の必要条件

- 近年、尿・血液等の生体試料を用いて個人単位の曝露評価を行うバイオモニタリング(BM)が導入されている
 - ・環境省「化学物質の人へのばく露量モニタリング調査」「エコチル調査」
 - ・「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

多種の物質への曝露を網羅的に評価するBMは未確立

- BMは予め定めた対象物質を測定するターゲット分析が基本手法
 - ・近年、分析前に特定の物質を想定しないノンターゲット分析が発展中
 - ・しかし代謝物の化学構造決定に必須な参照ライブラリが事実上存在しない
 - ・標準物質を入手可能な場合は例外的

複合曝露評価に今後不可欠な網羅的分析の方法論・手法を確立し、
曝露評価に位置づけられるようにすることが望まれる

ヒト尿を用いるBM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について、
集団の包括的曝露評価が可能な方法論を開発

研究目標及び研究計画

4

主要アウトプット1

- リスク評価の必要性の高い150物質を選定し、その中から絞り込んだ物質について尿中代謝物または尿中親物質の質量分析用ライブラリを構築

- (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」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

主要アウトプット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女子大学に在学する学生（70人）に適用し、尿中代謝物等の検出状況を解明

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、アウトプット2の対象者に紐付けられた陰膳試料70人分を分析
- 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解明

1) 曝露評価が必要な物質の選定

- (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

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

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物質を絞り込み、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「環境化学物質代謝物ライブラリ（仮称）」に仮登録

3) マウスへの対象物質の投与

ICR雄マウスに2段階の用量を強制経口投与し、投与後24時間に排泄された尿を代謝ケージにて採取

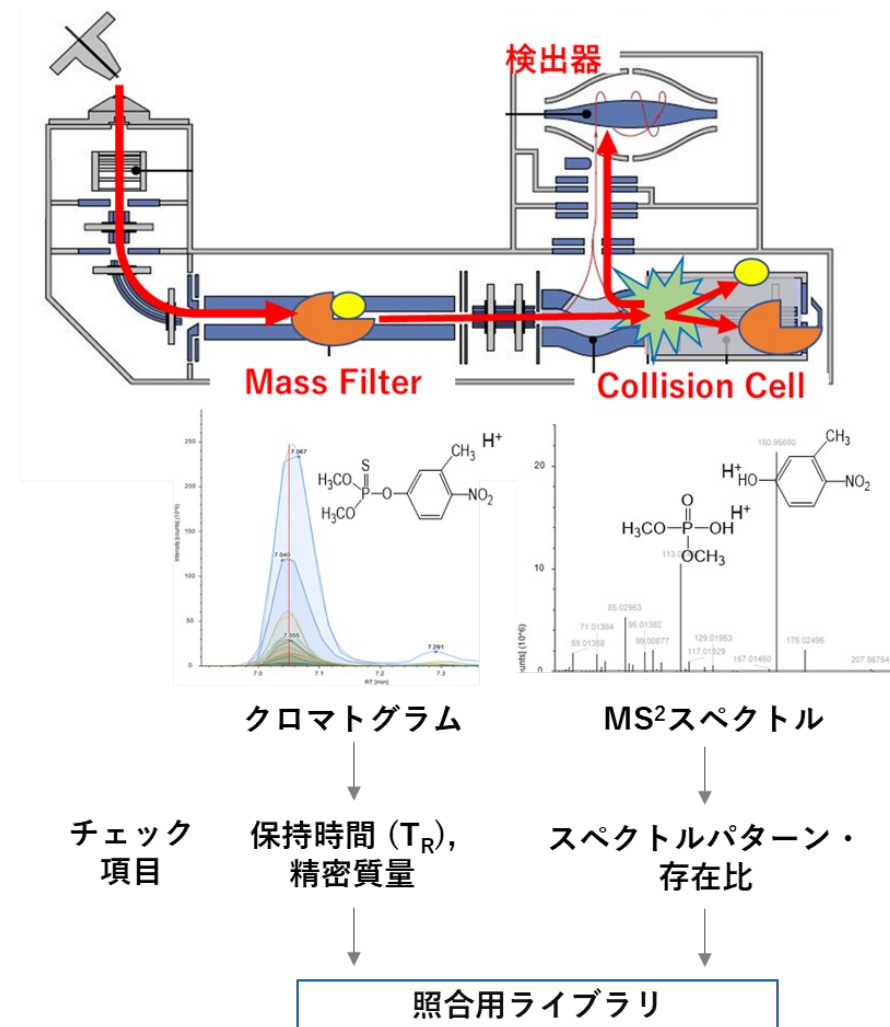
4) 質量分析用ライブラリの作成

マウス尿の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) での尿試料の分析

精密質量から計算される分子式、ピークの保持時間、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) をライブラリに登録 (マウスデータ)

5) ヒト尿中のピークとマウスデータとの照合

エコチル調査愛知ユニットセンター妊婦100人分と女子大学に在籍する学生70人分の尿を選定



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) <u>環境リスク初期評価</u> 「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) <u>化審法</u> 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) <u>室内外で広く使われる広義のバイオサイド</u> <u>またはリスクの指摘がある物質</u>	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) ※一部は科研費 22H03333から 費用を補填

[†]該当物質のうち、機器での測定ができる可能性のある金属類・無機物質以外の物質

[¶]食品安全委員会農薬の再評価優先度A・Bに該当する物質

[#]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

選定物質の尿中代謝物の登録例

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	hippuric acid; benzylmercapturic acid; benzoyl glucuronide
1-ブタノール	1-butanol	71-36-3	運動協調性障害	1-butanol glucuronide
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)

Name	Structure	Name	Formula	Molecular Weight	RT (min)	Description
28		DL-Atenolol	C14 H22 N2 O3	266.1604		CSD: 2162
29		Bisoprolol	C18 H31 N O4	325.2251		CSD: 2312
30		Diclofenac	C14 H11 Cl2 N O2	295.0166		CSD: 2825
31		Loxoprofen	C15 H18 O3	246.1259		CSD: 3828
32		Mefenamic acid	C15 H15 N O2	241.1103		CSD: 3904
33		prednisolone	C21 H28 O5	360.1907		CSD: 5552
34		Betamethasone	C22 H29 F O5	392.1990		CSD: 9399
35		Dexamethasone	C22 H29 F O5	392.1990		CSD: 5541

より検出漏れがないように
予めライブラリ登録

動物実験を組み合わせた実験フロー確立

9

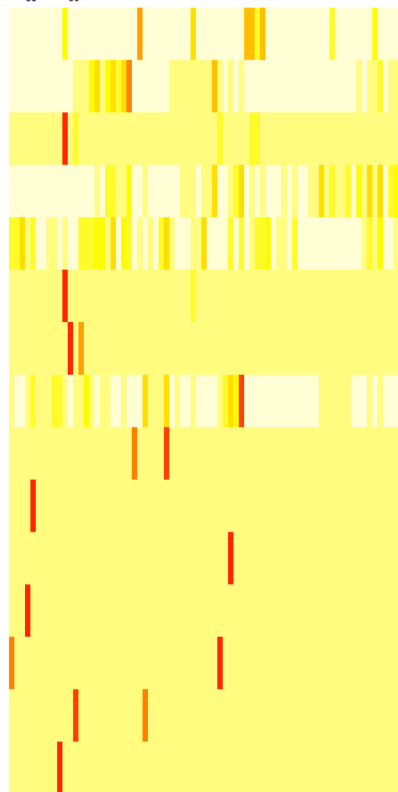


成人女性と妊婦各個人の複合曝露状況

10



成人女子大生 (n=73),  (n=73)



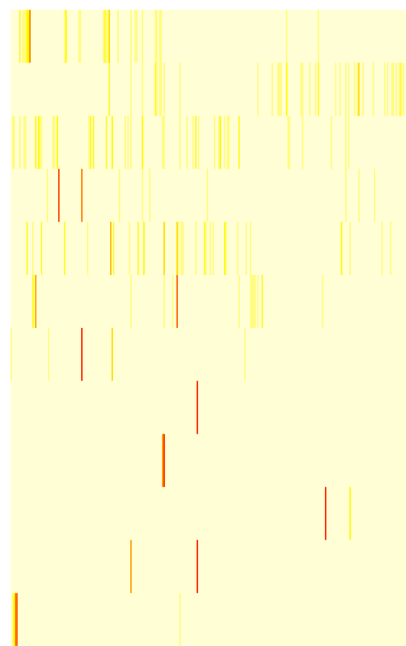
1. Trimethylbenzene +2O, C -glucuronide (1,2,3-, 1,2,4-trimethylbenzenes)
2. Hydroxyethylbenzene-glucuronide (ethyl-benzene, cumene, 1,2,3-, 1,2,4-trimethylbenzenes)
3. Naphthol (naphthalene, ethylbenzene, 1,2,3-trimethylbenzene)
4. Cresol-glucuronide (toluene, ethyl-acetate, benzyl-chloride, cumene, 1,2,3-, 1,2,4-trimethylbenzenes)
5. Octanol-glucuronide (octanol)
6. C₁₀H₁₄O₂-sulfate (isoprene)
7. Hydroxycamphor-glucuronide (camphor, isoprene)
8. Triethanolamine (triethanolamine)
9. Tebuconazole +3O, 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-trimethylbenzene)
2. Cresol-glucuronide (toluene, benzylchloride, ethyl-acetate, 1-bromopropane)
3. Octanol-glucuronide (octanol)
4. C₁₀H₁₄O₂-sulfate (isoprene)
5. Hydroxycamphor-glucuronide (camphor, isoprene)
6. Triethanolamine (triethanolamine)
7. Tebuconazole +3O, 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)

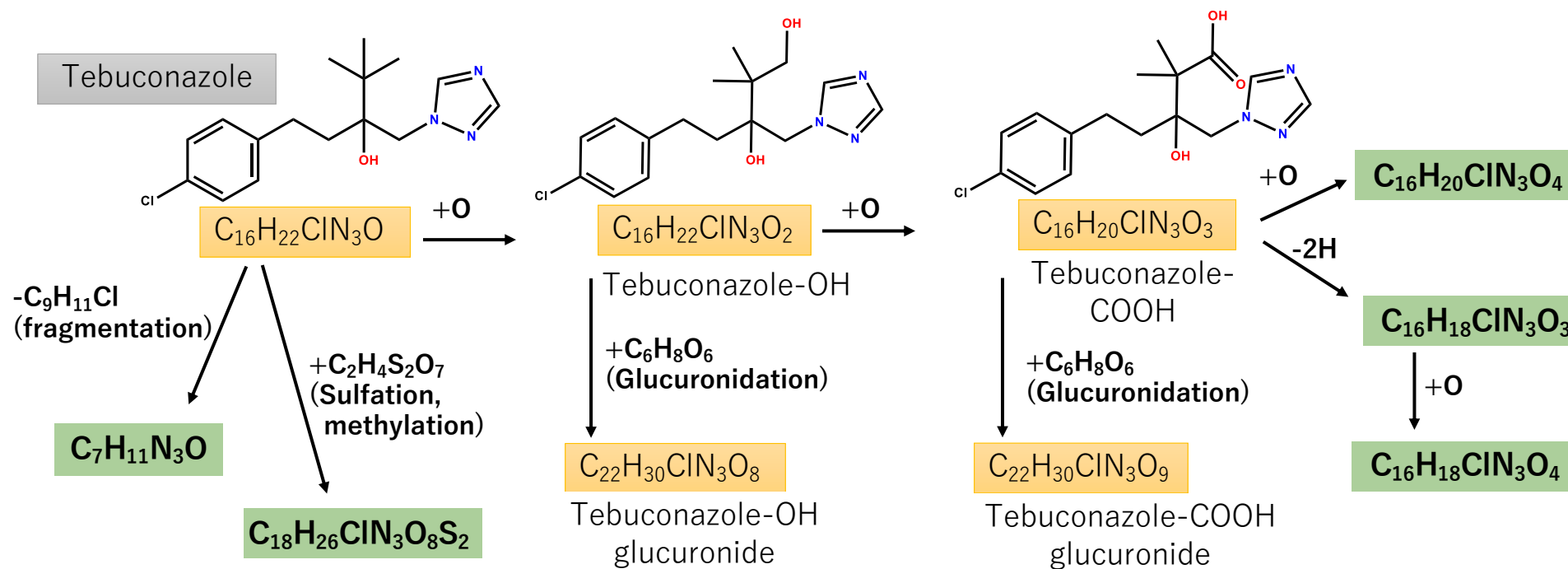
殺菌剤

医薬品

[†] T1, 妊娠前期; T2, 妊娠中後期

列が各対象者、行が対象者のうち最低1名で検出された物質群。物質ごとに各対象者のピーク面積をZスコア化。

→ → → の順に高濃度→低濃度。

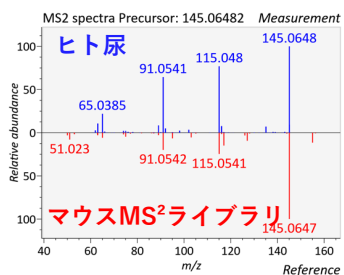


以前に検出の報告があり、本研究でも検出されたヒトの尿中代謝物 (5種類)

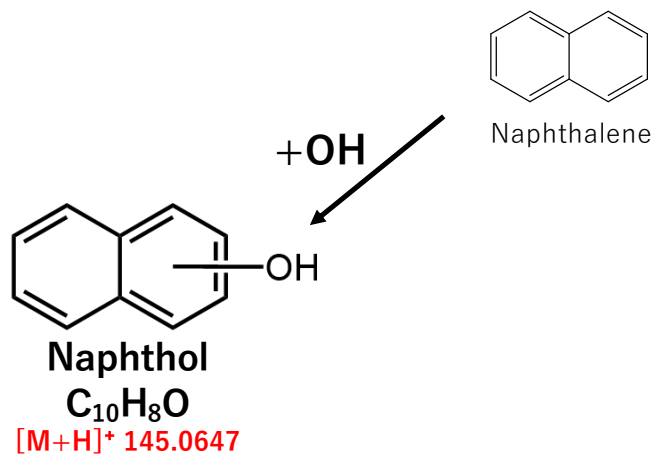
以前に検出の報告がない、本研究で初めて検出されたヒト尿中代謝物 (5種類)

ナフタレン代謝物の構造推定

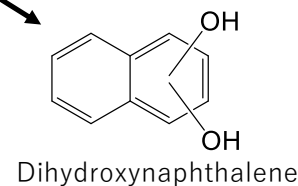
MS2スペクトル照合



MS1 tR_{diff} : 0.11 min
MS1 m/z_{diff} : 0.09 mDa

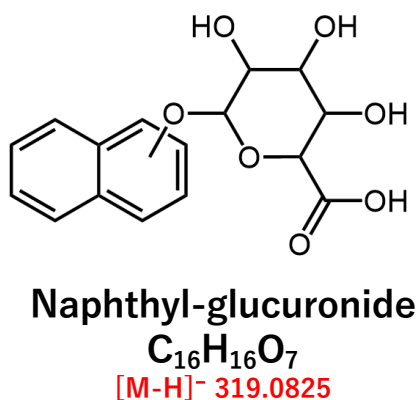


+2OH

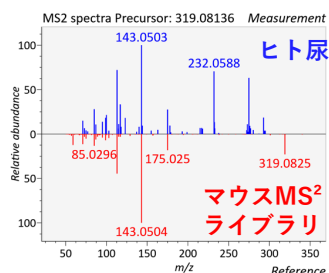


tR_{diff} : 保持時間差
m/z_{diff} : m/z差

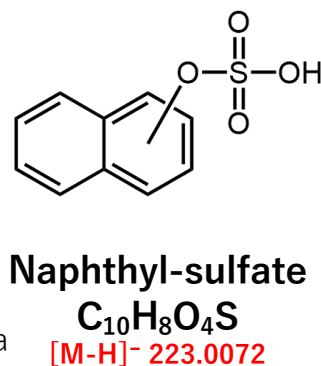
*推定構造の置換基位置は不明



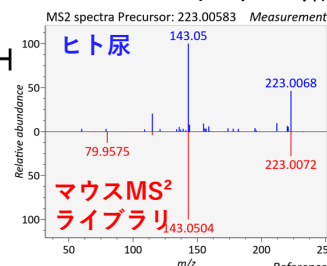
MS2スペクトル照合



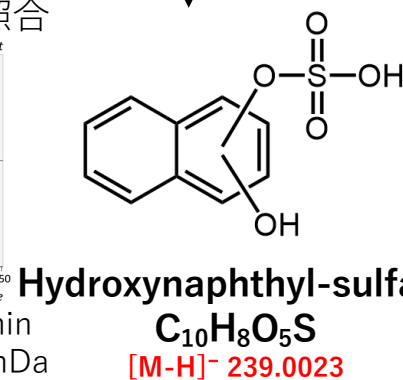
MS1 tR_{diff} : 0.22 min
MS1 m/z_{diff} : 0.76 mDa



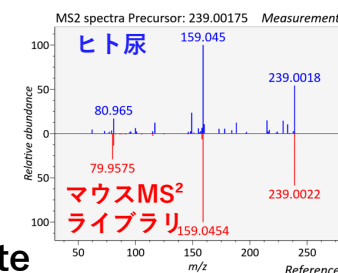
MS2スペクトル照合



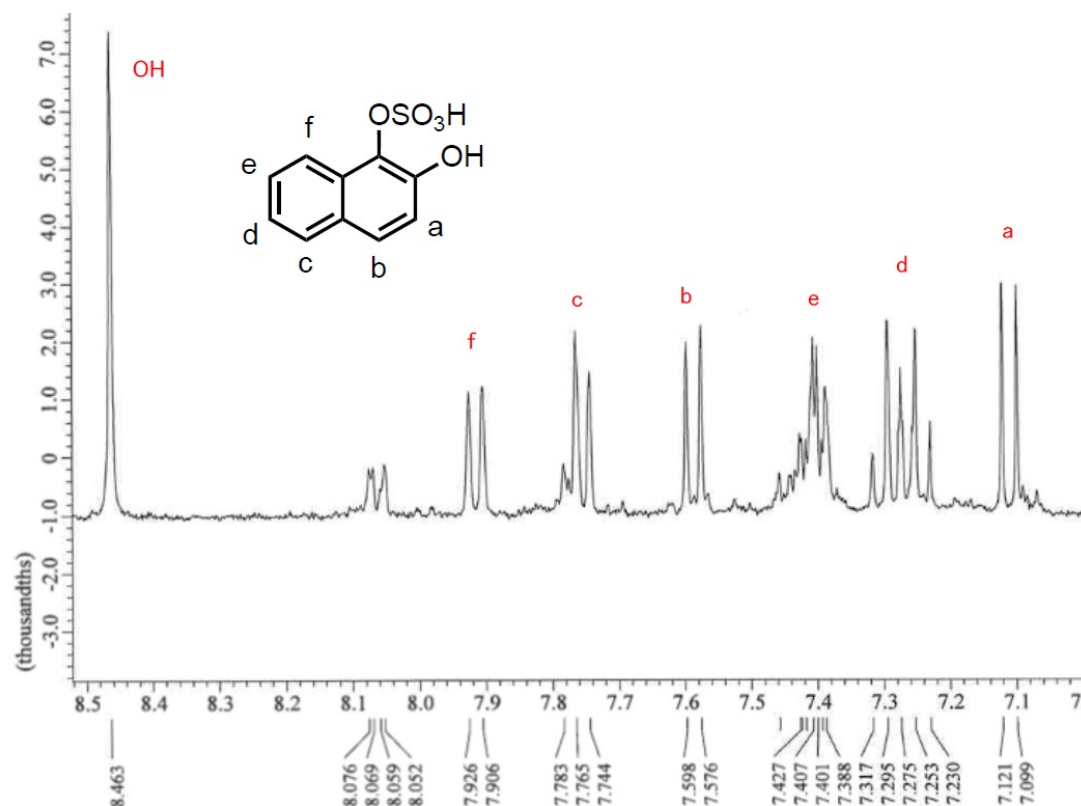
MS1 tR_{diff} : 0.27 min
MS1 m/z_{diff} : 0.41 mDa



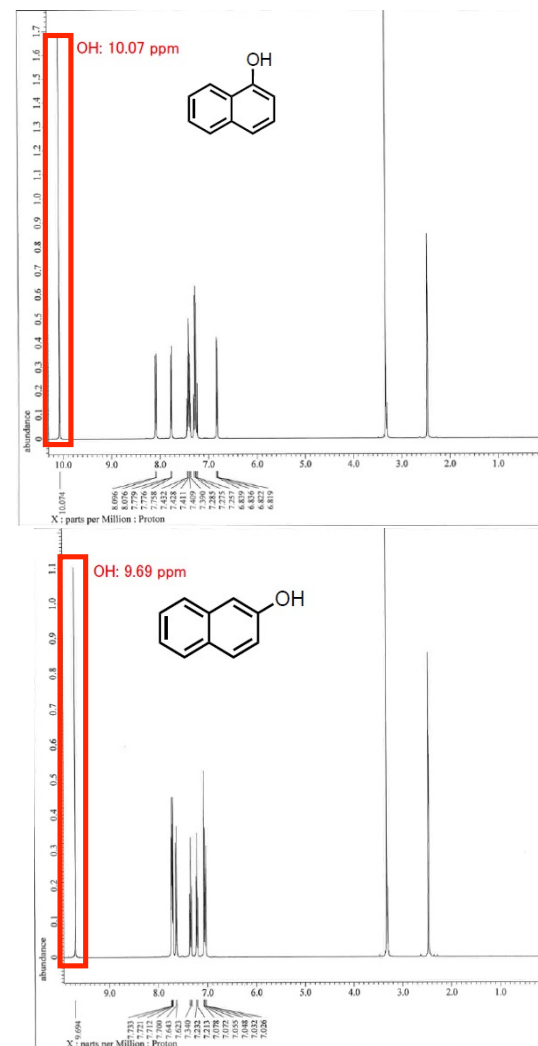
MS2スペクトル照合



MS1 tR_{diff} : 0.31 min
MS1 m/z_{diff} : 0.07 mDa



- シグナルのカップリングパターンより-OSO₃H と-OH は隣り合っている
- 文献的には1位が-OSO₃H, 2位が-OH



2-ナフトール標準品の
-OHの方が若干
高磁場シフト

NIST MSP format (plain text) MS2 libraries



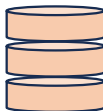
**120化合物*のアノテーション付き
対象物質の代謝物の
MS2スペクトルライブラリー**

>5,900 MS2スペクトル



Compound Discoverer 3.3
(Thermo Scientific)

	ESI-	ESI+
逆相	1261	1308
HILIC	1691	1655
合計	2952	2963



Compound 1 (Desaturation)
Compound 1 (Oxidation, Glucuronide conjugation)
Compound 1 (Oxidation, Sulfation)

メリット: アノテーション付きの代謝物、化学式に厳選
デメリット: 予測/予想される代謝物のみ



**120化合物*の
対象物質の代謝物の
MS2スペクトルライブラリー**

>23,000 MS2スペクトル



MZmine

	ESI-	ESI+
逆相	4537	6158
HILIC	6766	6210
合計	11303	12368



Compound 1 suspect metabolite 1
Compound 1 suspect metabolite 2
Compound 1 suspect metabolite 3

メリット: 予期せぬ代謝物やフラグメントを含む
デメリット: 化学式やアノテーションはない

全データ

殺菌剤のデータ

*5スペクトル以上のものに限定

データ共有

- オープンライブラリー (MassBank) への登録、ライブラリーをダウンロード可能
- 研究室ホームページにダウンロードリンク

MassBank

<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/downloads>

- ☐ [QCD_annotated_EnvCpd_suspect_metabolites_NCU_HILIC_NEG](#) (1,691 spectra)
- ☐ [QFungicide_suspect_metabolites_NCU_RP_NEG](#) (1,705 spectra)
- ☐ [QEMBL-MCF_2.0_HRMS_Library](#) (533 spectra)

[Download](#)

- 📄 JSON (Internal MoNA Format) (533)
- 📄 MSP (NIST compatible) (478.8 kB)
- 📄 SDF (NIST compatible) (491.2 kB)

他のLC-MS装置データにも原則使用可能

研究目標に対する達成状況（2. 目標を上回る成果をあげた）

15

主要アウトプット1

- リスク評価の必要性の高い**150物質**を選定し、その中から絞り込んだ物質について尿中代謝物または尿中親物質の**質量分析用ライブラリを構築**

報告書p.9, 18-19, 28-29, 他

目標を上回る
211物質を選定

120物質の
ライブラリ情報を
オープンライブラリ(MassBank)に
登録・公開

1. 目標を大きく上回る
成果をあげた

主要アウトプット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解明

報告書p.11-12, 他

目標を上回る
妊婦**141人**（2時点の尿）、
女子大学に在籍する学生
73人に適用し、
前者で**12群**の物質クラ
スター、後者で**15群**の
物質クラスターへの曝露
を検出

1. 目標を大きく上回る
成果をあげた

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、アウトプット2の対象者に紐付けられた陰膳試料70人分を分析
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解明

分析を実施

4. 目標にはやや及ばないが
一定の成果をあげた

- 曝露評価における網羅的分析の導入モデルの提示
 - ターゲット分析法の前段階のスクリーニング法としての活用
- 曝露評価の必要性が高い物質について代謝物等の分析用参照ライブラリの構築
 - 120物質からなるライブラリを構築し、オープンアクセス化
- 本課題でライブラリを構築する物質の曝露実態に関する予備的データ取得
 - 愛知県のエコチル調査参加妊婦(n=141、2時点)と女子大学に在籍する学生(n=73)
- エコチル調査への貢献
 - 曝露評価専門委員、精度管理分科会委員としての識見の向上
- 化学物質の人へのばく露モニタリング調査への貢献
 - 同検討会委員としての識見の向上

【論文】

- Chaleckis et al. Fungicide metabolite MS2 spectral libraries for comprehensive human biomonitoring, J Agric Food Chem 投稿中

その他、2本欧文論文作成中

【シンポジウム発表】

- 伊藤由起, 上島通浩：第92回日本衛生学会学術総会 2022年3月 23日（オンライン）
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.
- 伊藤由起, 上島通浩：第95回日本産業衛生学会 2022年5月26日（高知）
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.
- 上島通浩：第97回日本産業衛生学会 2024/5/23 広島
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.

- 和佐田ひと実, 伊藤由起, Nayan Chandra Mohanto, 加藤沙耶香, 上島通浩 :
第49回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2022年10月22日 (熊本)
LC-HR/MSを用いた殺菌剤の尿中代謝物の網羅的分析.
- 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 :
第93回日本衛生学会学術総会. 2023年3月4日 (蒲田)
尿中代謝物の網羅的分析のためのデータリスト作成.
- 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 :
2023年度日本産業衛生学会東海地方会学会. 2023年11月11日 (東海)
尿を用いた産業化学物質代謝物の網羅的分析の検討
- 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 :
第50回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2023年11月18日 (神田)
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.

- 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 :
第50回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2023年11月18日 (神田)
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
- 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 :
第9回日本医用マススペクトル学会西部会. 2024年7月20日 (名古屋)
Urinary Non-Targeted Analyses for comprehensive chemical exposure screening

【ライブラリ公開】

- 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>
- 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-7ffdcdbd51cf9>
- Fungicide_suspect_metabolites_NCU_RP_POS (2,257 spectra)
<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/rest/downloads/retrieve/6f55c842-800d-4c36-ae50-f915d675c350>

1) 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)

(名古屋市立大学主催, 2022年8月12日, 名古屋市立大学, 高校生3名+高校教員1名)

(名古屋市立大学主催, 2023年7月28日, 名古屋市立大学, 高校生4名+高校教員1名)

2) 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)

3) 名古屋市立大学オープンキャンパス

(名古屋市立大学主催, 2022年8月6日, 名古屋市立大学, 高校生486名)

4) 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, 高校生3年生150名+高校教員5名)