

## 27. 住宅内装材等から放散されるアレルギー関連物質

### テキサノールへの子どもの曝露実態調査

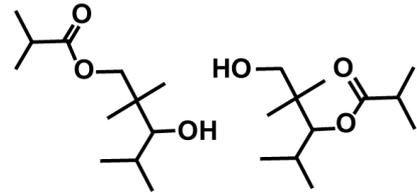
○吉田 俊明 (地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所)

#### 【研究目的】

テキサノール (化学物質名 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールモノイソブチレート、以下 TX と略記、図 1) は、建材や家庭用品への使用量が近年増加しており、最近増えている子どものアトピー性皮膚炎等アレルギー性疾患との関連性が懸念される化学物質である。本研究では、子どもにおける TX の曝露の低減化対策をはじめ、摂取による健康被害の軽減、防止のための基礎的資料を得るため、日常生活環境下の子どもにおける TX の曝露量 (様々な経路からの体内摂取総量) を把握することを目的とする。

#### 【研究の必要性】

TX は、主に水性塗料や水性接着剤の造膜助剤 (塗料や接着剤表面のコーティング促進のための添加剤) 及び可塑剤 (主に樹脂製品に柔軟性をあたえるための添加剤) として建材や家庭用品等への使用が近年増加している化学物質である。それに伴い、TX による住民の健康被害 (シックハウス症候群など) が全国で近年多発しており、



研究代表者の所属する研究所 (以下所属研究所と略記) においても複数の被害事例を経験している。また、海外でも TX とシックハウス症候群との関連性が報告されている [1]。TX による室内空気汚染の調査は国内外ともに少なく、その実態はほとんど把握されていないが、調査での住宅内空気中からの検出率は高く [2]、一般住民におけるその体内汚染 (体内摂取) は広範に及んでいる可能性が高いと推測される。TX と喘息等アレルギー症状との関連性が指摘されており [3]、近年増加している子どものアトピー性皮膚炎等アレルギー性疾患との関連性も懸念される。子どもは化学物質に対して脆弱であり、同じ環境下で過ごす成人よりもその有害作用を受けやすい。これらのことから、子どもにおける TX による健康被害の防止を目指し、彼らの TX への曝露に関する知見を得ることは非常に重要と考えられる。

#### 【研究計画】

本研究では、子どもにおける TX の曝露量を尿中に排泄されるその代謝物量から把握する。しかし、TX の体内動態 (代謝・排泄) に関する知見がほとんどない。そのため、TX の尿中代謝物の分析法も存在しない。以下の研究計画に従い、本研究目的を遂行する。

##### 1. TX の曝露の指標となり得る尿中代謝物の検索とその分析方法の確立

ラットに種々の量の TX を投与後、経時的に採尿する。尿中に排泄される各代謝物を同定し、各代謝物の定量分析方法を確立する。さらに、採取した各尿試料中の各代謝物

を定量し、TX の体内動態（各代謝物の尿中排泄率など）を解明する。各代謝物の中から、広範な TX 投与量レベルにおいて投与量とその排泄量との間に比例関係があり、排泄率が高い代謝物を指標代謝物として選定する。

## 2. 子どもにおける TX の曝露実態調査

所属研究所において、子どもの有る職員に協力を依頼し、小学生～中学生約 20 名を対象として、平日における子どもの起床時の尿を採取する。採取した尿試料中の指標代謝物を上記 1. で確立した方法により分析する。さらに、上記 1. で得た指標代謝物の尿中排泄率から、TX の一日の曝露量を推算し、その実態を明らかにする。

### 【実施内容・結果】

本研究期間内に、TX の尿中代謝物を動物実験により明らかにするとともに、これら代謝物の分析方法を確立し、さらに、子どもにおける曝露実態調査に先立ち、研究代表者の尿を継続的に採取して各代謝物濃度の朝晩の差異、濃度の代謝物間の関連性について調べ、その曝露指標としての有用性を検討した。動物実験は所属研究所の動物実験委員会に承認された動物実験計画書に沿って適切に実施した（承認番号 D-R2-1）。

#### 1. TX の尿中代謝物の同定

9 週齢の SD 系雄性ラットの腹腔内にオリーブ油に溶かした TX を投与し、代謝ケージを使用して投与後排泄される尿を採取した。得られた尿試料は、下記「2. (1) 試料の分析」に示す方法に準じて分析した（分析モードは SCAN）。尿中への排泄が推定された代謝物のうちその化合物が市販されているものを標準物質として入手し、尿試料中の TX 代謝物と推定されるピークの保持時間及びマススペクトルを標準物質のそれらと比較してそれぞれ同定した。

尿試料を分析した際保持時間 9.9 分および 11.2 分に検出されたピークのマスペクトルは、それぞれ市販の 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール（以下 TMPD と略記、図 2）および 3-ヒドロキシ-2,2,4-トリメチル吉草酸（以下 HTMV と略記、図 2）を分析した際に得られた保持時間、マスペクトル（図 3）と一致し、それぞれ同定された。尿試料中より投与物質 TX のピークも検出されたが、上記 2 種のピークに比較して明らかにその強度は小さかった。以下、これらの代謝物 TMPD および HTMV の定量方法について検討した。

#### 2. 尿中代謝物の定量法の確立

本定量法の確立のために使用する尿は全て研究代表者から採取した。

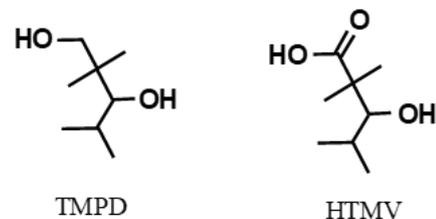


図 2. 2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール (TMPD) 及び 3-ヒドロキシ-2,2,4-トリメチル吉草酸 (HTMV) の化学構造式

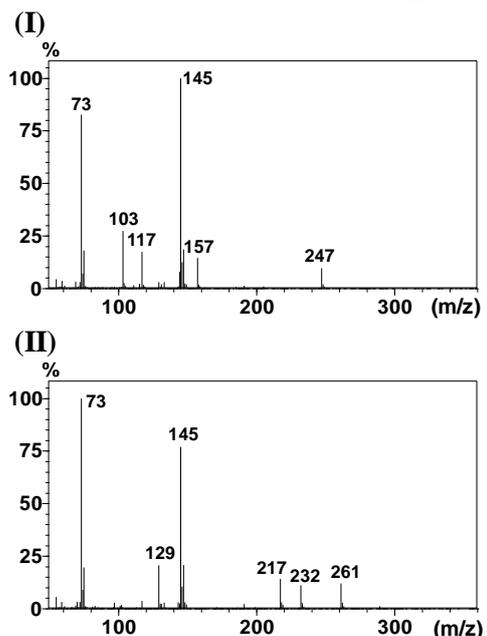


図 3. トリメチルシリル化された TMPD (I) 及び HTMV (II) のマスペクトル

### (1) 試料の分析

採取後分析までの期間 $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した尿を解凍した後、遠心分離 (3000 回転 $\times$ 10 分) し、その上清 10 mL を分取した。2M-酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.75 mL、 $\beta$ -グルクロニダーゼ含有スルファターゼ 7 mg、内部標準液 (*n*-オクチル- $\text{d}_{17}$  アルコール (以下 IS と略記) の 150  $\mu\text{g/mL}$  アセトン溶液) 3  $\mu\text{L}$  を加えて 22 時間  $37^{\circ}\text{C}$  で反応させ、抱合体を加水分解した。濃塩酸 0.5 mL および硫酸アンモニウム 9 g を加えた後トルエン 2 mL で代謝物を 2 回抽出し、無水硫酸ナトリウム 1 g を加えて脱水した。無水硫酸ナトリウムをトルエン 1 mL で洗い、抽出液に合わせた後窒素気流下  $60^{\circ}\text{C}$  にて 1 mL に濃縮した。この液にトリメチルクロロシラン、*N,O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミドおよび 1-トリメチルシリルイミダゾールを各 30  $\mu\text{L}$  添加後、 $90^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させ、各代謝物のトリメチルシリル化誘導体を形成した。水 1 mL で 2 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウム 0.5 g を加えて脱水した。 $60^{\circ}\text{C}$  で 0.15 mL に濃縮して試料溶液とした。オートサンプラーを装着した四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計を使用し、以下の条件のもと試料溶液を分析した。分析カラム：アジレント製 J&W DB-5MS (長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ )、注入量：1.0  $\mu\text{L}$ 、注入モード：スプリットレス (サンプリング 2.0 分)、キャリアーガス：ヘリウム、制御モード：圧力 (定圧)、キャリアーガス圧力：89.7 kPa、注入口温度： $260^{\circ}\text{C}$ 、カラムオープン温度： $90^{\circ}\text{C}$  (2 分保持)  $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$   $-120^{\circ}\text{C}$   $-9^{\circ}\text{C}/\text{min}$   $-280^{\circ}\text{C}$  (5 分保持)、インターフェイス温度： $260^{\circ}\text{C}$ 、イオン化方式：電子イオン化、イオン源温度： $200^{\circ}\text{C}$ 、分析モード：SIM (Selected Ion Monitoring)、定量イオン・参照イオン ( $m/z$ )：TMPD (145 $\cdot$ 247)、HTMV (145 $\cdot$ 261)、IS (204 $\cdot$ 205)。

### (2) 標準尿溶液の調製と定量

複数回採取した尿を混合してプール尿とし、 $-20^{\circ}\text{C}$  にて保存した。試料の分析に際し、プール尿を解凍し、その 10 mL ( $n = 7$ ) に混合標準原液 (TMPD および HTMV 濃度：各 100  $\mu\text{g/mL}$  アセトン溶液) の一定量を添加して、各代謝物の尿中添加濃度 0 および 1 $\sim$ 333  $\mu\text{g/L}$  の尿を調製した。上記「2. (1) 試料の分析」の方法に従って処理し、標準尿溶液とした。

試料溶液中の代謝物は内部標準法により定量した。各標準尿溶液を分析した際に得られる検量線 ([各代謝物濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )] ( $x$ ) - [各代謝物ピーク面積/IS ピーク面積] ( $y$ )) の回帰式より、試料溶液中の各代謝物濃度を算出した。

### (3) クロマトグラフィー

標準尿溶液を分析した際に得られたクロマトグラムを図 4 に示す。IS は 7.0 分、TMPD は 9.9 分、HTMV は 11.2 分にそれぞれ検出された。溶液中にはこれら 3 物質の測定に影響を及ぼす他の化学物質によるピークは検出されなかった。

### (4) 検量線

標準尿溶液を分析して検量線を作成した際、その回帰直線の傾きは TMPD 0.087、HTMV 0.047

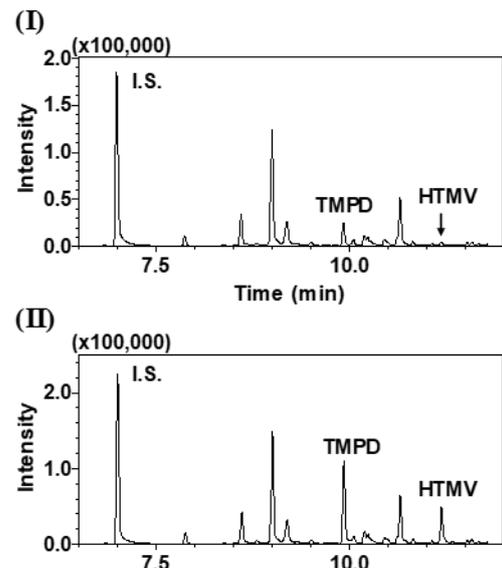


図 4. 標準尿溶液 (尿中への添加濃度：(I) 0  $\mu\text{g/L}$ 、(II) 3.3  $\mu\text{g/L}$ ) のトータルイオンクロマトグラム

であり、いずれの代謝物についても 333  $\mu$ g/L 以下の尿中濃度において良好な直線性（相関係数：0.9994 以上）を示した。

#### (5) 検出下限

検量線作成時の最低添加濃度の標準尿溶液（1  $\mu$ g/L、 $n = 5$ ）を分析して定量値の標準偏差を算出し、その値の 3 倍をそれぞれ尿中検出下限濃度とした [4]。TMPD および HTMV の検出下限濃度はそれぞれ 0.2  $\mu$ g/L、0.3  $\mu$ g/L であった。

#### (6) 定量値の正確性および再現性

一定量の TMPD および HTMV を添加したプール尿（尿中濃度として 2、20 および 200  $\mu$ g/L）を本法に従い分析した（それぞれ  $n = 5$ ）。いずれの添加量においても、各代謝物の定量値の相対誤差および変動係数はそれぞれ 9 %以下、10 %以下であった。

#### (7) 保存に対する安定性

一定量の TMPD および HTMV を添加したプール尿（尿中添加濃度として 50  $\mu$ g/L）を  $-20^{\circ}\text{C}$  にて一定期間（3、9、15、24 および 35 日）保存した後に分析し、各代謝物の残存率の経日変化を調べた。TMPD および HTMV の定量値はともに 35 日間の保存期間中ほぼ一定であり、大幅な増減は見られなかった。

### 3. 定量法の実試料への適用

研究代表者の尿を 1 週間連続的に毎日朝晩 2 回採取し、各尿中代謝物を測定した。朝は起床時に、勤務日の晩は勤務終了直後に、休日の晩は外出先から帰宅直後においてそれぞれ採尿した（ $n = 14$ ）。各代謝物の濃度は、尿の濃淡を考慮し、各尿試料について Folin-Wu 法 [5] により定量されたクレアチニン濃度により補正した。

TMPD および HTMV はともに全ての尿試料から検出された（表 1）。平均濃度は TMPD 3.9  $\mu$ g/g creatinine、HTMV 1.3  $\mu$ g/g creatinine であり、全ての試料において TMPD の濃度が HTMV の濃度よりも高かった。また、各試料中の両代謝物濃度の間に有意な相関性（ $r = 0.54$ ）が認められた。さらに、各代謝物について、朝に採取した試料中と晩に採取した試料中の濃度を比較する（ $t$ -検定）と、ともに朝に採取した試料中の濃度の方が有意（ $p < 0.05$ ）に高かった。

表 1. 尿試料中の各代謝物濃度（ $\mu$ g/g creatinine）

	月	火	水	木	金	土	日	平均	
TMPD	朝	6.12	3.44	3.64	5.02	5.28	4.38	5.49	4.77
	晩	1.73	1.73	2.51	2.44	3.08	3.61	6.71	3.12
3.94 (全平均)									
HTMV	朝	1.48	1.32	2.30	1.14	1.32	1.24	1.64	1.49
	晩	0.85	0.82	0.78	0.79	1.33	1.21	1.49	1.04
1.27 (全平均)									

本研究成果の詳細は、以下の論文に掲載している。

吉田俊明：住民における 2, 2, 4-トリメチル-1, 3-ペンタンジオールモノイソブチレートおよび 2, 2, 4-トリメチル-1, 3-ペンタンジオールジイソブチレートの尿中代謝物の分析法. 大阪健康安全基盤研究所研究年報 5（2021）（印刷中）

#### 【考察と今後の課題】

TX への曝露後尿中に排泄される代謝物を動物実験により検索したところ、TMPD および HTMV が検出された。投与した TX の尿中からの検出レベルは 2 種の代謝物に比較して低く、体内に取り込まれた TX は尿中には大部分代謝された後に排泄されることが示唆された。

TMPD および HTMV の検量線はいずれも 333  $\mu$ g/L 以下の尿中濃度において良好な直線性を示し、それぞれ 0.2 および 0.3  $\mu$ g/L 以上の尿中濃度において検出可能であった。本定量法は、これらの代謝物を正確かつ再現性よく、また、尿中の他の夾雑成分の影響を受けずに分離定量することが可能な方法であることが示唆された。さらに、採取した尿試料は一ヶ月間冷凍庫での保存が可能であると考えられた。

研究代表者から一週間連続的に採取した尿試料に本法を適用したところ、各代謝物濃度は朝に採取した試料中において高く、一般に化学物質の代謝物の尿中排泄量は採尿前数時間の曝露を反映していることから、研究代表者においては自宅での睡眠中の TX への曝露レベルが、屋外や職場での曝露レベルに比較して高いことが示唆された。両代謝物の尿中濃度間に有意な相関性が見られ、2つの代謝物の共通の源が存在することが示唆された。すなわち、これらの代謝物の一定量は体内に取り込まれた特定の同じ化学物質から生じたものと推定された。この結果は、TX の曝露量を把握するための指標として、TMPD および HTMV が妥当であることを支持するものと考えられた。

以上より、本法は TX の曝露のモニタリング手法として有用であると考えられ、今後、本法を用いて子どもにおける TX の曝露実態を把握する。

これまでに研究代表者らは、厚生労働省の提案する空気中 TX の分析法 [4] について検証し、提案された方法は室内空気中の TX の分析に十分適用できることを報告している [6]。子どもを含む住民における TX 曝露に及ぼす住宅室内空気質の影響に関する知見を集積するなど、TX による健康被害の軽減や防止を目的とした今後の調査や研究のために本研究成果の活用が期待される。

#### 【参考文献】

- [1] Sahlberg B. et al., Sci. Total Environ. 444: 433-440 (2013).
- [2] 溝内ら, 室内環境 17: 69-79 (2014).
- [3] Bonisch U. et al., PLoS One 7: e39817 (2012).
- [4] 厚生労働省医薬局長. 室内空気中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について (通知). 医薬発 828 号. 2001.
- [5] Bonsnes RW, Taussky HH, J. Biol. Chem. 158: 581-591 (1945).
- [6] 吉田ら, 大阪健康安全基盤研究所研究年報 3: 89-95 (2019).

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費	
ガラス器具類 (フラスコ、スクリー管、温度計)	37,955 円
試薬 (化学薬品、酵素)	107,187 円
高圧ガス (窒素)	5,577 円
動物 (ラット)	149,281 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円