

19980615

平成10年度 厚生科学研究補助金 (生活安全総合研究事業)

内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の 暴露に関する研究に関する調査研究

研究報告書

主任研究者

星薬科大学 薬品分析化学教室

中澤 裕之

分担研究者

東海大学医学部産婦人科学教室

牧野 恒久

北里大学医学部小児科学教室

松浦 信夫

大阪府立公衆衛生研究所

織田 肇

慶応大学医学部病理学教室

泰 順一

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する研究に関する調査研究

主任研究者 中澤裕之（星薬科大学 薬品分析化学教室 教授）

研究要旨

本研究は、外因性内分泌かく乱化学物質がヒトの健康に影響を及ぼしているかを究明するのを最終目標に、補正予算に基づく指定研究として内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に視点をおいて実施された。単年度研究であるために、先ず環境庁がリストアップした内分泌かく乱作用が疑われている代表的かつ社会的に問題になっている化学物質を取り上げ、生体試料として血液、母乳、毛髪を対象に分析法の開発に取り組んだ。

具体的には下記に示す内容に対して多数の機関が参画し、総合的に本研究プロジェクトを推進し、衛生行政の施策に供するデータの取得を試みた。

(1) 内分泌かく乱化学物質の胎児・乳児暴露等に関する調査研究

母乳、臍帯血、妊婦血液を対象とした内分泌かく乱物質の超高感度分析の確立を目標に試料調製法を含む測定法を構築した。

(2) 母乳中の内分泌かく乱化学物質と乳児の健康影響に関する調査研究

従来のダイオキシン類解析に関する研究手法を参考に、母乳中に含まれるダイオキシン類の濃度と乳児の甲状腺機能の低下等、母乳等の乳児への影響について考察した。

(3) 内分泌かく乱物質の成人暴露等に関する調査研究

①子宮内膜症患者の腹水中における内分泌かく乱化学物質に関する調査研究。

この研究には子宮内膜症患者の腹水の採取方法と内分泌かく乱物質の超高感度な分析法の構築が必要であり、基礎的測定条件を検討した。

②成人の血液、毛髪中の内分泌かく乱物質と食生活要因等に関する調査研究。

成人への内分泌かく乱物質の暴露量を知るために、血液についてはヘキサクロロベンゼン(HCB)、2,4-D、2,4,5-T等について高感度分析法を開発、また毛髪に関しては有機スズの高感度分析法を検討した。

③ヒト解剖検体の肝臓、脂肪、血液等各種臓器、部位への内分泌かく乱化学物質の分布等に関する調査研究。

我が国における人体への内分泌かく乱物質暴露量の実態を明らかにし、組織内蓄積分布を計測し、将来の対策の基礎データを取得した。

分担研究者

牧野恒久 東海大学医学部
産婦人科学教室 教授

松浦信夫 北里大学医学部
小児科学教室 教授

織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所
副所長

秦 順一 慶応大学医学部
病理学教室 教授

るかを明らかにすることを主目的に実施された。この目的のためにはガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) や高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) 等の最新分析機器を駆使して、現時点で我々がどのような内分泌かく乱化学物質を取り込んで、生体試料 (血液、母乳、腹水、臓器など) から実際に検出されるのかを試み、暴露及び汚染状況の経時変化を解析する上での貴重なデータの取得を最終目的にする。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

血液は各試験研究機関職員、その家族あるいは一般人から採血して調製した。また、日赤製分画用血漿 (凝固因子用)、東海大学において採取した検体も用いた。

多くの試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いたが、一部BPAやフタル酸エステル類の分析では精製して実験に供した。

2. 装置及び測定条件

ヒトへの暴露状況を把握する目的で選択性及び検出感度に優れているGC/MS、LC/MSを主に用いた高感度分析法の開発を試みた。検討項目にはカラムや移動相の選択、測定イオン、誘導体化等について検出感度、共存物質の影響等を考慮に入れてそれぞれ最適条件を検討した。

3. 試験溶液の調製

血液、母乳等の生体試料は複雑なマトリックスからなり、微量に存在する内分泌かく乱化学物質の高感度分析には測定対象物質の抽出、クリーンアップ、濃縮といった一連の試料前処理法が重要なボ

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質は長期にわたって体内に蓄積されるが、その生体影響を知るためには、先ず人体暴露量を知ることが不可欠である。実験動物でなく、ヒトの母乳、血液、毛髪、臍帯血などの生体試料中の存在量を測定することにより、日常の暴露量とともに長期影響および後世代影響を評価することが可能となる。

母乳中のダイオキシン類、PCB、HCB等ダイオキシン類が乳児にどのような影響を及ぼしているかということについて、調査・検討を進め、多方面からの考察を行う必要性は高いと思われる。特に社会的に関心の高いダイオキシン類に関しては人体の各種臓器の暴露状態を把握し、人体にどの程度の影響を及ぼしているかについて基礎的研究を行う。最新分析機器等を駆使した本実態調査は世界的にもなされておらず、内分泌かく乱化学物質の暴露量に対するバックグラウンドの把握はこれら化学物質のリスク評価をする上でも重要である。

本研究では内分泌かく乱化学物質にヒト (胎児、乳児、成人等) がどの程度暴露されてい

イントになる。回収率、妨害物質の影響、検出感度、分析精度等を考慮しながら、最適条件を設定した。

C. 研究結果

1. 内分泌かく乱化学物質の胎児・乳児暴露等に関する調査研究

(1)内分泌かく乱化学物質の胎児・乳児暴露等に関する調査研究として、妊婦血液、臍帯血及び母乳等の分析法を構築し、実試料に適用した。

産院で出産した16人の妊婦の臍帯血（出産直後）、及び妊婦本人の血液及び母乳（概ね出産5日後）を採取して分析した結果、臍帯血ではp-ジクロロベンゼンがn.d.~2.0ppb、HCBがn.d.~0.10ppb、p-ヒドロキシ安息香酸が45~293ppb、妊婦血液でp-ジクロロベンゼンがn.d.~2.7ppb、HCBが0.02~0.19ppb、p-ヒドロキシ安息香酸が36~211ppb、母乳でp-ジクロロベンゼンがn.d.~9.4ppb、HCBがn.d.~1.2ppb、p-ヒドロキシ安息香酸が27~278ppb検出された。

ヘキサクロロベンゼンについては妊婦血液平均は成人血平均値(0.17ppb)に比べ約半分の値と低い値を示しており、臍帯血の平均値はその妊婦血液に比べさらに半分の値を示した。一方、母乳は平均0.42ppbと妊婦血液に対して2.5倍程度高い値を示した。p-ジクロロベンゼンについては妊婦血液平均で0.63ppb(nd~2.7ppb)、臍帯血は平均で0.68ppb(nd~2.0ppb)、母乳で平均1.98ppb(nd~9.4ppb)という結果となった。妊婦血液の平均は成人

血と比べ1/23以下と低い値を示した。

(2)母乳中の内分泌かく乱化学物質と乳児の健康影響に関する調査研究として、従来のダイオキシン類解析に関する研究手法を参考に、母乳に含まれるダイオキシン類の濃度と乳児の甲状腺機能の低下等、母乳等の乳児への影響について考察した。4都府県、80名の妊婦の協力を得て乳汁中のダイオキシン類濃度を測定した結果、分娩後、日齢と共に乳汁中の脂肪濃度は低下しないのにも関わらず、ダイオキシン類、即ちPCDDs+PCDFs、Co-PCB/pg/gfat濃度は低下した。乳汁分泌量、哺乳量も日齢とともに低下しており、乳児に負荷されるダイオキシン量は日齢と共に低下することが明らかになった。

また、ダイオキシンを含む母乳栄養群と人工栄養群の栄養法別の血清甲状腺機能、ろ紙血甲状腺機能を測定したところ、血清中のTSH、T3、T4、FT4共に、母乳栄養群、人工栄養群で有意な差は認められなかった。濾紙血甲状腺機能は母乳群、人工栄養群で比較検討したが、両群には差は認められなかった。甲状腺抗体（サイロイドテスト、マイクロソームテスト）ともに全て陰性であった。さらに、栄養法別の免疫機能に関しては両群間に明らかな異常、差異は認められなかった。

2. 内分泌かく乱化学物質の成人暴露等に関する調査研究

①妊婦及び子宮内膜症患者の母乳、臍帯血、腹水中における内分泌かく乱化学物質に関する調査研究

妊婦の母乳、臍帯血、血液及び子宮

内膜症患者の腹水を対象とした内分泌かく乱物質の超高感度分析を目的に試料調製法を含む測定法を検討した。測定対象化学物質によっては採取の際に用いる医療器具（注射筒、採血管、試験管、グリースネークチューブ等）からのコンタミネーションの可能性が示唆され、採取装置や採取方法及び測定実験室のレイアウトに格段の注意が必要であると思われる。また、内分泌かく乱物質の超高感度な分析法の構築が必要であり、GC/MSやLC/MS等の機器分析を用いた基礎的測定条件を検討した。構築した試験法を用いて、出産した妊婦の血液、臍帯血、母乳を分析した結果、2、4-D、2、4、5-Tは検出されなかったが、HCBは成人血液から微量検出された。

②成人の母乳、血液、毛髪中の内分泌かく乱化学物質と食生活要因等に関する調査研究

成人への内分泌かく乱化学物質の暴露量を知るために、LC/MS（移動相組成、フラグメンター電圧、モニターイオン等）及びGC/MS（モニターイオン、誘導体化等）を用いた分析法の測定条件や試料前処理法、さらに添加回収試験、検出限界等のバリデーション項目を検討した。

(2) 1973年～1996年の大阪府下在住の授乳婦（25～29歳の初産者のみ；各年19～33名）より採取した母乳中の有機塩素系化合物およびダイオキシン類の残留実態を明らかにした。

1996年の母乳中のPCB(0.33 μ g/g)、HCH(0.23 μ g/g)およびDDT類(0.30 μ g/g)濃度は、1973年のPCB(1.43 μ g/g)、HCH(3.79 μ g/g)およびDDT類(3.35 μ g/g)

濃度に対して、それぞれ、23%、6%、9%に減少した。

1996年の母乳脂肪中ダイオキシン類およびコプラナPCB濃度は、1975年のダイオキシン類およびコプラナPCB濃度に対して、46%および28%に減少した。また、1996年の母乳脂肪中ダイオキシン類(16.3pg-TEQ/g)およびコプラナPCB(7.8pg-TEQ/g)濃度は、1975年のダイオキシン類(30.2pg-TEQ/g)およびコプラナPCB(28.0pg-TEQ/g)濃度に対して、46%および28%に減少した。

さらに、血清中のGC/MSによる有機塩素系化合物の高感度迅速分析法を確立し、本方法を用いて成人ヒト血清中の有機塩素系化合物の汚染濃度を明らかにした。成人血清34検体のうち、全検体よりPCB類、HCB、p、p'-DDEを検出し、また25検体から β -HCHを検出した。総PCB濃度は4.63～20.78ppb(平均：11.92ppb)、HCB濃度は0.07ppb～0.62ppb(平均：0.228ppb)、p、p'-DDE濃度は0.4ppb～14.9ppb(平均：3.68ppb)であった。 β -HCH濃度はND～8.1ppb(検出限界：0.1ppb 検出したものの平均：1.76ppb)であった。

(2) LC/MSを用いたBPAの検出限界は血清で0.1ng/mlで、成人7名の血清中のBPA濃度を調べた結果、検出限界以下であった。血漿試料(日赤製)から微量のBPAと思われるピークが観測されたが、保存容器からの汚染等も考えられ、保存バッグの材質試験を行ったところ、保存バッグからBPAは検出(検出限界10ng/ml)されなかった。

また、クーロメトリック型多重電極電気化学検出器を用いた高速液体

クロマトグラフィー及び固相抽出法による分析法を検討した結果、検出限界 (0.01ng/mL) の高感度分析法を開発した。本法によりヒト血清から微量BPAを検出したが、保存用血液バッグからの汚染も考えられ、今後更に検討する必要がある。

また、ジエチル硫酸を用いたエチル誘導体化GC/MS法を開発したが、(検出限界は0.25ng/ml)、夾雑物が多量に存在する生体試料への応用が期待される。

BPAの分析においては試料採取、試料溶液の調製段階において採取器具や理化学器具からのコンタミネーションがみられ、バッググランド値や分析精度に影響を及ぼすことが明らかになった。

(3)クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン(HCB)の人体暴露量の調査を目的として、これらの分析法の検討を行ったところ、GC/MSを用いた高感度で選択性の高いヒト血清及び母乳中分析法を構築した。ヒト血清36試料、母乳1試料を分析したところ、血清からオキシクロルデン(ND~0.29ppb)、*trans*-クロルデン(ND~0.04ppb)、*trans*-ノナクロル(ND~0.73ppb)、*cis*-ノナクロル(ND~0.11ppb)及びHCB(ND~0.19ppb)が検出され、母乳からは、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル及びHCBが、それぞれ0.01、0.004、0.10、0.09ppb検出された。検出されたヒト血清中のクロルデン関連物質及びHCBについて、食事との関連を調査したところ、検出頻度及び濃度ともに食事嗜好に依存する傾向が示唆された。

(4)新たに内分泌かく乱作用が疑われ、厚生省より測定要請のあったパラオキシ安息香酸エステル類(パラベン)の分析法を構築した。成人血液、臍帯血、母乳を分析した結果、パラベン類はいずれの試料からも検出されなかったが、その代謝物である

-ヒドロキシ安息香酸が成人血で平均値44.0ppb(18~72ppb)検出された。

(5)クロロベンゼン類のうち、HCBは成人血液(長野県在住)60人のうち全員から検出され、平均値は0.17ppb(0.07~0.40ppb)で、平均値を中心とした比較的正規分布に近いヒストグラムが得られた。*p*-ジクロロベンゼンもほぼ全員から検出され、平均値は14.9ppb(0.36~211ppb)で一部の成人に高濃度の結果が得られた。

(6)有機スズ化合物の人体暴露量の調査を目的として、毛髪及び血液を対象とした分析法を蛍光光度検出器付きガスクロマトグラフ(GC-FPD)及びGC/MSを用い、選択性の高い分析法を構築した。本分析法を用いたヒト毛髪中有機スズ化合物の分析結果は、トリブチルスズ化合物が24検体中5検体から0.010~0.028ppm(検出限界0.010ppm)の範囲で検出された。さらに、検出された5検体中4検体についてはGC/MSの選択イオン検出法(SIM)により、金属スズ(Sn)の天然同位体存在比を基に主要なマスフラグメントのイオン強度比を標準品と比較した。その結果においても、ヒト毛髪中には有機スズ化合物の存在が示された。なお、血液については混合血液(全血)1検体からトリブチルスズ化合物0.014ppmが検出されたが、血漿3検体についてはいずれも不検出であった。

(7)プラスチック可塑剤として使用されるフ

タル酸及びアジピン酸エステルの GC/MS による生体試料を対象とした微量分析法の基礎的検討を行った。試薬、室内空気等からの汚染を抑制するために、精油定量器を用いた閉鎖系で実施できる蒸留前処理法を検討し、その有用性を明らかにできたことで、実試料への応用が期待される。

③ヒト解剖検体の肝臓、脂肪、血液等各種臓器、部位への内分泌かく乱化学物質の分布等に関する調査研究。

我が国における人体への内分泌かく乱化学物質暴露量の実態を明らかにし、組織内蓄積分布を計測し、将来講ずべき対策の基礎データを取得した。

(1)PCB 類

剖検症例の肝 (10 検体)、腸間膜脂肪 (12 検体) および腹壁脂肪 (9 検体) における mono-ortho PCB (8 種類) と di-ortho PCB (2 種類) を測定した結果、肝、腸間膜脂肪および腹壁脂肪の脂肪重量あたりの mono-ortho PCB 平均値は TEQ 表記で、それぞれ 8.95、19.16 および 20.59pg/g であり、肝は脂肪組織の約 1/2 であった。絶対値では、肝、腸間膜脂肪および腹壁脂肪の脂肪重量あたりの mono-ortho PCB は、478-3366、17357-171919 および 20022-186417ppt と予想外の大量の蓄積があった。di-ortho PCB も同様に TEQ 表記で、11.36、24.79 および 20.59 であり、mono-orthoPCB と同じように肝は脂肪組織の約 1/2 であった。測定した 12 種類 PCB のそれぞれの相対比は、肝、腸間膜脂肪および腹壁脂肪いずれも同じ傾向を示した。

(2)ダイオキシン、フラン、ジベンゾフラン類
剖検症例 (4 症例) の肝、胆汁および血液におけるダイオキシン、フラン、ジベンゾフラン類と di-ortho PCB を測定した結果、

TEQ 表記でみると、胆汁におけるダイオキシン、フラン、ジベンゾフラン類の蓄積は、血液における蓄積と相関する傾向がうかがわれた。Total TEQ 値でみると、胆汁では 1.11-27.27、肝では 3.77-16.21、血液では 3.7-16.44 であった。胆汁中の濃度が意外に高いことがわかり、ダイオキシン類の体内循環に示唆をあたえる所見を得た。

(3)有機スズ化合物、重金属類

剖検症例 (14 症例) の肝および腸間膜脂肪組織について、有機スズ化合物 (トリブチルスズ TBT、ジブチルスズ DBT、モノブチルスズ MBT)、重金属 (水銀、鉛、カドミウム等) を測定している。モノブチルスズ MBT およびジブチルスズ DBT は、肝臓湿重量あたりそれぞれ 6 以下より 60、8.3 から 81ng cation/g であり、トリブチルスズ TBT はいずれも検出限界以下であった。また水銀は 0.08 以下から 1.49mg/g 乾燥重量まで、鉛は 0.095-1.38mg/g 乾燥重量、カドミウムは 1.05-22.6mg/g 乾燥重量であった。

有機塩素化合物の分析は未完であるが、これまでに終了した 5 検体の濃度範囲 (ng/g 湿重量) は、PCBs (320-2100)、DDTs (94-820)、CHLs (53-480)、HCHs (52-370)、HCBs (19-45) であった。

D. 考察

ヒトへの内分泌かく乱化学物質の暴露量を把握する上で、血液、毛髪等の生体試料中での分析を行い、存在量を把握することはダイレクトにかつ重要な情報を提供するものと期待され、限られた期間内での研究として先ず基礎的な分析法の検討と周辺の問題点の洗い出しを行った。

(1)測定対象化合物の選定に関して

当初、測定対象化合物の選定アプロ

一チとしてこれまでのモニタリングにおいて環境中に検出されていて、生産量が多く、有害性、残留性が高い上、内分泌かく乱作用の疑われている化学物質を重点測定対象物質として選定した。生体試料を対象とした高感度分析法の構築に本研究の相当な精力をつぎ込んだと言える。

(2)人体暴露量評価について

- ①今後、実試料の分析を行い、被験者の食生活等との関連性を明らかにし、内分泌かく乱化学物質の成人への人体暴露量を評価することが次の課題の一つとして残された。代謝物の内分泌かく乱作用等に関する生体影響についても担当する専門家グループとの有機的かつ総合的な評価が必要である。
- ②ダイオキシン類を多く負荷された母乳栄養群とその負荷が非常に少ない人工栄養群の間には明らかな甲状腺機能に差違は見られなかった。また、免疫系は更に詳細な検査であり、今後解析が必要であるが、異常所見を示す乳児は見られなかった。以上のことは、現時点で母乳栄養の利点を考えると、ダイオキシンのために母乳栄養を禁止しなければならない理由はないものと考えられ、広く公表すべきと考える。
- ③剖検症例での PCB の体内蓄積量は、ダイオキシン類より数桁多いことが明らかとなった。このことはダイオキシン類等他の内分泌かく乱物質の人体への複合的な毒性を考える際に PCB 自体の直接的な人体への毒性だけでなく、生物学的に相加・相乗作用をもつ可能性も無視できない。これらの内分泌かく乱化学物質は、

生体内での代謝産物がより強力な生物活性をもつ場合があり、体内での代謝経路の解明や代謝中間物質の測定も重要である。

剖検症例の肝から、有機スズ化合物として主にジブチルスズ DBT が検出され、トリブチルスズ TBT は検出限界以下であった。このことはトリブチルスズ TBT として海産物等から摂取し、それが DBT へ代謝されたものと、日用品に含まれる DBT からきた可能性も考えられる。

一方、重金属類では、1 症例の肝で高い銀濃度が検出された以外、通常のレベル内であった。特に毒性元素として知られる水銀、鉛、カドミウムも、影響が懸念されるレベルではなかった。有機塩素化合物は、5 検体のみのデータであるが、PCBs>>DDTs>CHLs>HCHs>HCB の順であった。

(3)分析法の構築と精度管理

微量でホルモン様作用を発揮する恐れが危惧されている以上、血液、母乳等に含まれる内分泌かく乱化学物質の精度の高い高感度分析法の構築が不可欠である。

- ①パラベン類は食品添加物等として現在も使用されているが、食品以外の化粧品等にも使用されており様々な経路で体内に取り込まれる可能性がある。しかし、パラベン類は、肝臓で速やかに加水分解され、p-ヒドロキシ安息香酸に代謝されると言われており、代謝物が血液中に存在すると考えられる。パラベン類の分析でも明らかにされたように、親化合物ばかりでなく、代謝物について分析法を開発する必要性が存在することも考慮すべきであろう。

② *p*-ジクロロベンゼンの分析結果のようにヒト血液等から比較的高濃度かつ高頻度で検出される化学物質に関しては、まだ構造等が特定されていない化学物質も存在しており、今後の大きな課題である。

③ 得られた数値が社会的に一人歩きする現状を勘案すると、少なくとも異常値に対しては異なる試験研究機関において同一試料を分析するようなクロスチェックが必要である。

E. 結論

ヒトの健康の中でも、生殖機能は次世代への生命の継承という立場から重要な機能であるが、内分泌かく乱化学物質と雌性の生殖機能の研究は妊婦を通じた母子暴露を新たな暴露経路として考慮せざるを得ない点もあり、焦眉の急の状況である。

一方、新たな化学物質が世の中に導入される現状を考慮すれば、現時点における人体暴露量を評価することは、たとえ測定対象物質の濃度が検出限界以下の実測値であっても、次世紀における比較対象のバックグラウンド値として重要であり、今後も、地道なモニタリングを続けていく必要があるものと判断される。また、日本における一般成人に対する内分泌かく乱化学物質の暴露量は明らかでなく、一般住民を対象とした暴露量調査は未だ十分にはなされておらず、大規模な実態調査も必要であろう。

ヒトの健康に内分泌かく乱化学物質が影響を及ぼしているのか否かという本研究プロジェクトの最終目標を達成するには、医学的見地から、妊娠成立後の胎児、胎盤へのこれら

の物質の影響、さらに妊娠が成立しない不妊症等の疾患、あるいは反復する自然流産との因果関係を解析する必要がある。さらにこれら生殖機能異常の際の生体内に蓄積された外因性内分泌かく乱化学物質の濃度分布など、臨床所見やヒト生殖機能の変遷の実態を把握しながら比較する総合的な解析が不可欠であり、今後はこのような視点で研究を継続、推進する必要があるものと結論される。

F. 研究発表

1. 論文発表

堀江正一、石井里枝、小林 進、中澤裕之：分析化学、“LC/MSによる缶飲料中のビスフェノールAの定量”（印刷中）

2. 学会発表

(1) 井之上浩一、佐々木春美、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、中澤裕之、本郷敏雄、堀江正一：電気化学検出高速液体クロマトグラフィー、日本薬学会第119年会（徳島）、1999年3月

(2) 藤巻照久、佐藤修二、谷 孝之、益川邦彦、渡辺卓穂、吉村吉博、中澤裕之：GC-FPD及びGC-MSによるヒト毛髪中の有機スズ化合物の分析、日本薬学会第119年会（徳島）、1999年3月

2. その他

(1) 中澤裕之、斉藤貢一、堀江正一、内分泌かく乱化学作用物質の最新動向と分析法、食品と開発、34(4)、4-7 (1999)

(2) 中澤裕之、外因性内分泌かく乱化学物質と分析科学、薬科機器、146、2-10(1999)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案
なし

3. その他
なし

平成 10 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書
内分泌かく乱化学物質の胎児，成人等の暴露に関する調査（指定研究）

血中のビスフェノール A 高感度分析
法に関する研究

主任研究者 中澤裕之
星薬科大学教授

研究要旨

ビスフェノール A(BPA)には，内分泌系をかく乱する可能性があるとして指摘されており，ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂等を用いた食品用容器や金属缶からの溶出が報告されている。そのため，食品や環境などから BPA がヒトへ暴露される可能性も十分に考えられる。この暴露量を至急解明しなければならない。そこで，極めて微量である BPA の高感度かつ簡単迅速な分析法の開発が要求されている。前処理に固相抽出法，検出に電気化学検出高速液体クロマトグラフィー（HPLC/ECD）を用いた高感度分析法の開発を目的に基礎的な検討を行った。

A. 研究目的

ビスフェノール A(BPA)は，Krishnan らによりポリカーボネート製実験器具より溶出し，ヒト乳がん細胞（MCF-7）を増殖させることが報告された¹⁾。その後，妊娠マウスに BPA を投与し，産まれてきたマウスに前立腺肥大や精子減少などの影響も報告されている²⁾。

このように内分泌かく乱作用が指摘される一方，BPA は我々の身の回りにおいて給食用食器や歯科治療用充填材の高分子素材³⁾などに利用されている。そのため，環境中や食品中に

おける存在量が問題となり，モニタリングが要求されている。

しかし，プラスチック原料に由来する内分泌かく乱化学物質を測定する際，実験系自体から汚染される可能性があり，微量測定には慎重な操作が必要である⁴⁾。BPA はポリカーボネート，エポキシ樹脂などの原料に使用されており，器具の洗浄，試薬調製などに利用される精製水への混入や実験器具からの汚染等が考えられる。BPA の分析法を構築するにあたってバックグラウンド値に対する影響

を及ぼすような要因について明らかにすることは分析値の信頼性を確保する上で重要である。

BPA 微量分析として、TMS 誘導体化後、GC/MS^{5,6)}で測定する方法がある。また、TMS 誘導体化の操作が必要ない液体クロマトグラフ (HPLC) 法では UV 検出器⁷⁾や蛍光検出器⁸⁾などの報告がある。しかし、これらの方法では操作性や検出感度に問題を抱えている。そこで、我々はフェノール性化合物を選択的かつ高感度に検出できる電気化学検出高速液体クロマトグラフ (HPLC/ECD)^{9,10)}を利用することにより、高感度な BPA 分析を試みた。また、アンペロメトリック型電気化学検出器¹¹⁾のように保持時間のみでは化合物の同定に不十分であることから、クーロメトリック型多電極電気化学検出器を用い、そのピーク高さ比により同定することを検討した。

B. 研究方法

B・1 試薬

BPA は環境分析用試薬 (和光純薬工業社製) を使用した。抽出、洗浄に用いた有機溶媒は残留農薬試験用アセトニトリル 300, アセトン 300, メタノール 300, ジクロロメタン 300 (いずれも和光純薬製) を、精製水には日本ミリポア社製 Milli-Q で製したものをを用いた。移動相のアセトニトリル、リン酸はいずれも和光純薬製、試薬特級を使用した。

BPA はアセトニトリル/水 (1/1 : V/V) に溶解して 1.0 mg/mL の標準液

を調製し、標準液を更にアセトニトリル/水 (1/1) で各種濃度に調製し、実験に供した。

B・2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフとしてポンプ、恒温槽には島津製作所製 LC10AD, CTO-2A, 電気化学検出器 (ECD) は ESA 社製 Coul Array MODEL 6210, データ処理は CoulArray System ver.1.0 を用いた。試料注入には Kontron Instruments 社製 Autosampler460 を用いた。分離カラムには資生堂製 CAPCELL PAK UG 120 C₁₈ (4.6 × 150 mm) を使用した。

固相抽出用のカートリッジは、Waters 社製 OASIS HLB (充填量:130mg/カートリッジ容量:2.8mL) 及び Varian 社製 Bond Elut Certify (60mg/3mL) を用いた。またディスクは、3M 製 Empore SDB-RPS (直径 13mm, 膜厚 0.5mm) を用いた。固相処理操作には、Waters 社製 エキストラクションマニホールドを用いた。実験に用いるガラス器具はすべてアセトン洗浄後、200°C, 4 時間加熱して使用した。

B・3 測定条件

カラム温度を 30°C とし、移動相にアセトニトリル/0.3%リン酸水溶液 (40/60) を 1.0mL/min で送液した。また、ECD の設定電圧 (Ch₁~Ch₄) は Tabel 1 に示した分析条件に合わせて用いた。試料注入量を 50 μL とした。各試料の HPLC 測定毎にアセトニトリルを注入してブランクのモニタリングを行っ

た。

C. 研究結果

C・1 HPLC/ECD 測定条件の検討

C・1・1 移動相の検討

移動相には、アセトニトリル/リン酸水溶液を用い、リン酸濃度における検出感度の影響を検討した。BPA のピーク面積と印加電圧をプロットしてヒドロダイナミックボルタモグラムを作成した (Fig.1) 。その結果、高い感度を得られ、S/N 比も低い 0.3% リン酸水溶液を用いて以下の実験を行うことにした。

C・1・2 多電極による BPA の同定

クーロメトリック型多電極電気化学検出器では、保持時間及び二つの電極間のピーク高さ比によって同定可能である¹²⁾。Ch₁~Ch₄ の印加電圧を変え、BPA 特有のピーク高さ比 (h_1/h_2) を Fig.2 より求めた。

C・1・3 検量線の作成

BPA をそれぞれ 0.01~100ng/mL に調製し、その 50 μ L を注入して、得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。その結果、検出限界は 0.01ng/mL (絶対量として 0.5pg, S/N=3) であった。検量線は 0.1~100ng/mL (5pg~5ng) の範囲で良好な直線性 (相関係数=0.999) が得られ、5.0, 50ng/mL 標準液の 9 回繰り返し測定では保持時間 10.40 分 (RSD=0.05%), 10.44 分 (0.07%) であり、

ピーク高さ比 0.35(4.86%), 0.37(0.77%) と良好な結果を得た。

C・2 前処理法の検討

C・2・1 試験用水の BPA 測定

前処理などの分析に用いる水は、さまざまな要因から BPA に汚染されている可能性が考えられる。そこで通常の実験に利用している精製水及び水道水中の BPA を測定した。また、分析に用いるすべての水は、精製水を Empore SDB-RPS (直径 47mm, 膜厚 0.5mm) に通過させることにより、BPA をディスク上に捕集させた。捕集能力は BPA 1.0ng/mL 添加水を用い、ディスクに通過させて求めた。その結果、2L まで 100% の捕集率があった (Fig.3)。

それぞれの水に対する BPA 測定法は、操作過程の BPA 汚染を考慮してガラス製器具のみを利用した液-液抽出法で行った (Fig.4) 。その結果、水道水及び精製水では 0.01ng/mL, 0.02ng/mL の検出値を得た。また Empore 処理後の水に関しては、6.5pg/mL の検出値が得られた。

C・2・2 固相抽出法

環境水中 BPA の前処理法として、ジクロロメタンを用いた液-液抽出法が利用されている¹³⁾。しかし、簡便迅速な手段ではなく、多量の有機溶媒を用いるため、本実験では固相抽出法を採用した。しかし、この固相抽出用カートリッジやディスクも高分子素材であり、一般にその素材が不

明であるケースが多い。これらカートリッジ等を使用した場合、抽出過程において BPA の汚染が考えられる。そこで実験に用いるカートリッジ及びディスクの溶出試験を行った。固相抽出法に用いるカートリッジ及びディスクの溶出試験方法は室温条件下、本実験で溶出液として利用したメタノール 100mL に浸漬した後、溶出液 10mL を濃縮乾固させ、アセトニトリル/水(1/1)100 μ L に溶解させた。カートリッジに関しては、内部を分解しそれぞれの部位に分け、溶出試験を行った。その結果、それぞれのカートリッジ、ディスクの部位より 0.006~0.013ng/mL の溶出が確認された (Fig.5)。

また、固相の洗浄による BPA の溶出検討した。検討方法は、メタノール 3 mL を 5 回固相に通し、その溶出液を濃縮し、アセトニトリル/水(1/1)100 μ L に溶解させた後、測定を行った。その結果、メタノール 15mL の洗浄により、BPA の混入がないことを確認した。よって固相抽出過程において 15mL 以上の洗浄が必要と思われる (Fig.6)。

固相抽出の水添加回収の結果、各固相に対する 0.5, 0.05ng/mL 添加回収率は平均 83.8~98.2%、標準偏差はいずれも 6.5%以内であり、BPA 分析として有用である (Fig.7)。

また、ウサギ血清の添加回収では水における添加回収率の最も良かった OASIS HLB を用いて、0.1, 1.0 ng/mL 添加回収率を求めた。その結果、

87.3%及び 79.0%であり、標準偏差は 13.5%及び 5.1%であった (Fig.8)。

C・3 ヒト血清中の BPA 濃度

血清は日赤製分画用血清 (凝固因子用) 検体を用いた。

平成 11 年 2 月 4 日に採取後、保存バックに入れ、冷凍保存を行ったものを用いた。

血清中の BPA 濃度を測定した結果、0.32ng/mL の濃度を検出した (Fig.9)。

D. 考察

以上の結果から、電気化学検出器を利用した測定法は、選択性及び再現性にも良好な結果を得ることができた。検出限界 (0.01ng/mL) 及び検量線の直線性 (相関係数 $R=0.999$) においても良好な結果を得ることができた。

固相抽出においては、洗浄、前処理に利用される水やカートリッジ及びディスクからの BPA 溶出が確認された。しかし、抽出過程におけるメタノール洗浄を通常よりも多く行うことにより、0.01ng/mL 以上の BPA 汚染を防ぐことができた。

以上より本方法を用いることにより 0.1ng/mL の定量限界は十分に可能であると考察される。

E. 結論

生体などの微量な BPA を分析する時に、今までの手段では前処理での汚染、検出感度の問題があり、実際に応用することが難しいと思われる。

本実験では HPLC/ECD での高感度な分析法及び前処理過程での汚染の軽減を試みた。これにより、今まで以上に高感度かつ正確な分析を行うことが可能となった。

また、本結果においてヒト血清から、0.32ng/mL 濃度が検出された。しかし、保存用バックからの BPA 溶出や血液採取時における汚染等も考えられるため、今後はこれらの検討も必要である。

文献

- 1) A.V.Krishnan, P.Stathis, S.F.Petmuth, L.Tokes, D.Feldman : *Endocrin.*, 132, 2279 (1993)
- 2) S.C.Nagel, F.S.vom Saal, K.A.Thayer, M.Dhar : *Environ.Health Persp.*, 105, 70 (1997)
- 3) 本郷敏雄:東京都歯科医師会雑誌, 46, 12 (1998)
- 4) 高田秀重:現代化学, 1999, 38
- 5) 神浦俊一, 田島裕子, 中原武利:環境化学, 7, 275 (1997)
- 6) M.D.Olmo, A.G.Casado, N.A.Navas, J.L.Vilchez : *Anal.Chim.Acta*, 346, 87 (1997)
- 7) 河村葉子, 小谷野有希, 武田由比子, 山田隆:食衛誌., 39, 206 (1998)
- 8) C.Lambert, M.Larroque : *J.Chromatogr.Sci.*, 35, 57 (1997)
- 9) J.Ruana, I.Urbe, F.Borrull : *J.Chromatogr.A*, 655, 217 (1993)
- 10) G.Achilli, G.P.Cellerino, G.V.M.d'Eril, F.Tagliaro : *J.Chromatogr.A*, 729, 273 (1996)
- 11) K.Peltonen, J.Pukkila : *J.Chromatogr.*, 439, 375 (1988)
- 12) H.Takeda, T.Matsumiya, T.Shibuya : *J.Chromatogr.*, 515, 265 (1990)
- 13) 環境庁水質管理課編:外因性内分泌かく乱化学物質調査暫定マニュアル, III-8 (1998)

PUMP	SHIMADZU LC-10AD
Column	SHISEIDO CAPCELL PAKC ₁₈ (4.6 × 150 mm)
Column temperature	30°C
Detector	ESA Coul Array MODEL 6210
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	0.3% H ₃ PO ₄ /CH ₃ CN (60:40)
Apply voltage	Ch ₁ (+350 mV) , Ch ₂ (+430 mV) , Ch ₃ (+570mV) Ch ₄ (+650mV) [H ⁺ /H ⁺ Pd]
Injection volume	50 μ L

Table 1 Analytical conditions for HPLC / Multi-electrode ECD

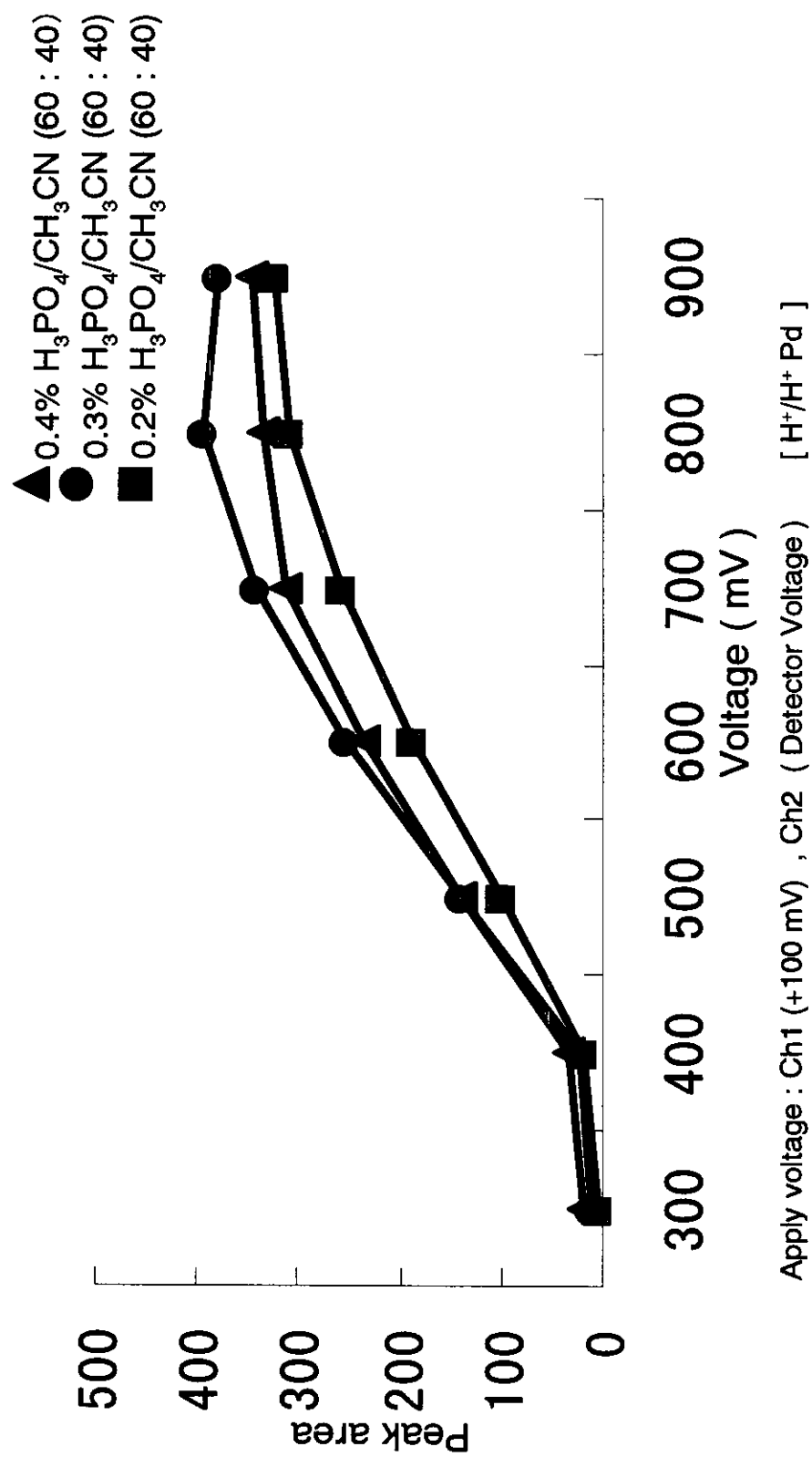


Fig.1 Effect of HPLC/ECD condition

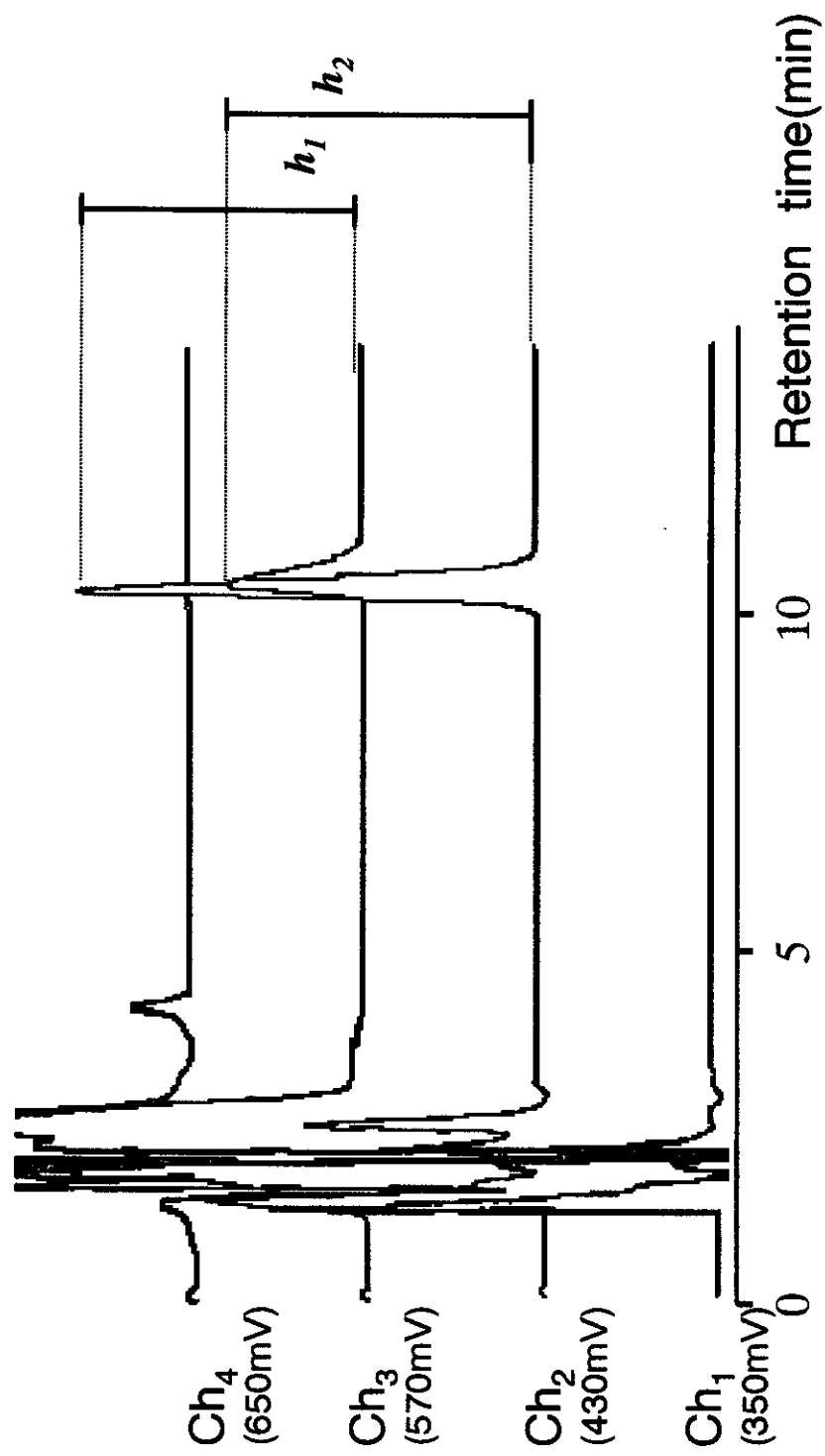
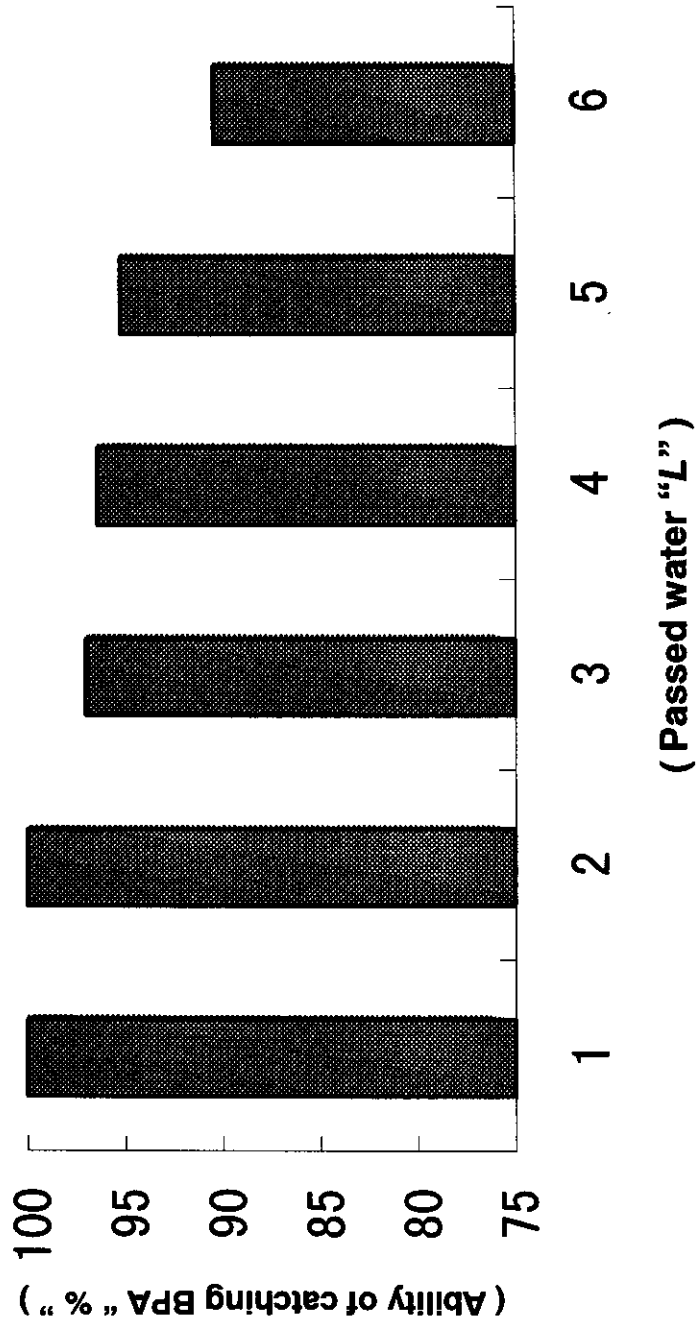


Fig.2 Peak ratio of BPA standard



「 Milliq Water containing 0.1 ng/mL BPA was passed through “Empore SDB-RBS” for trapping BPA 」

Fig.3 Preparation of water for trapping BPA

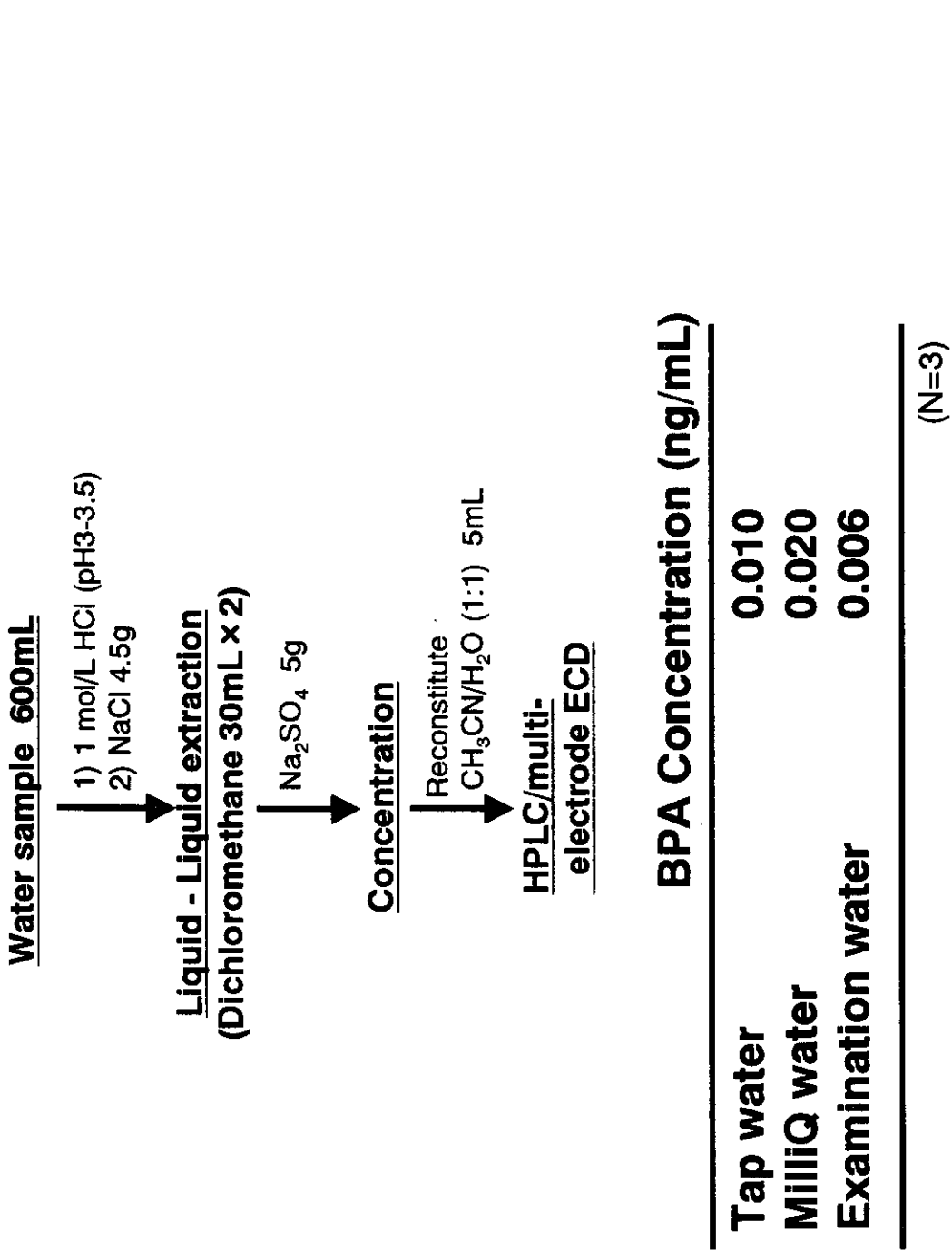


Fig.4 Determination of BPA in sample of laboratory waters