

SPE cartridge sample

CH₃OH 100mL
Room Temp. (30 min)

Elution 10mL

Concentration
Reconstitute
CH₃CN/H₂O (1:1) 100 μ L

HPLC/multi-electrode ECD

	BPA concentration (ng/mL) [RSD %]		
	A	B	C
OASIS HLB	0.013 [33.8]	0.006 [33.3]	0.011 [20.0]
Bond Elut Certify	0.013 [27.5]	0.007 [35.2]	0.010 [42.4]
Empore SDB-RPS (Disk)			
[60mg/3mL]			
[130mg/2.8mL]			
[Diameter 13mm,			
Membrane thickness 0.5mm]		0.011 [16.4]	

(N=6)

Fig.5 Migration of BPA from SPE Cartridges and Disk

- ▲ Empore SDB-RPS (Disk)
- OASIS HLB (Cartridge)
- Bond Elut Certify (Cartridge)

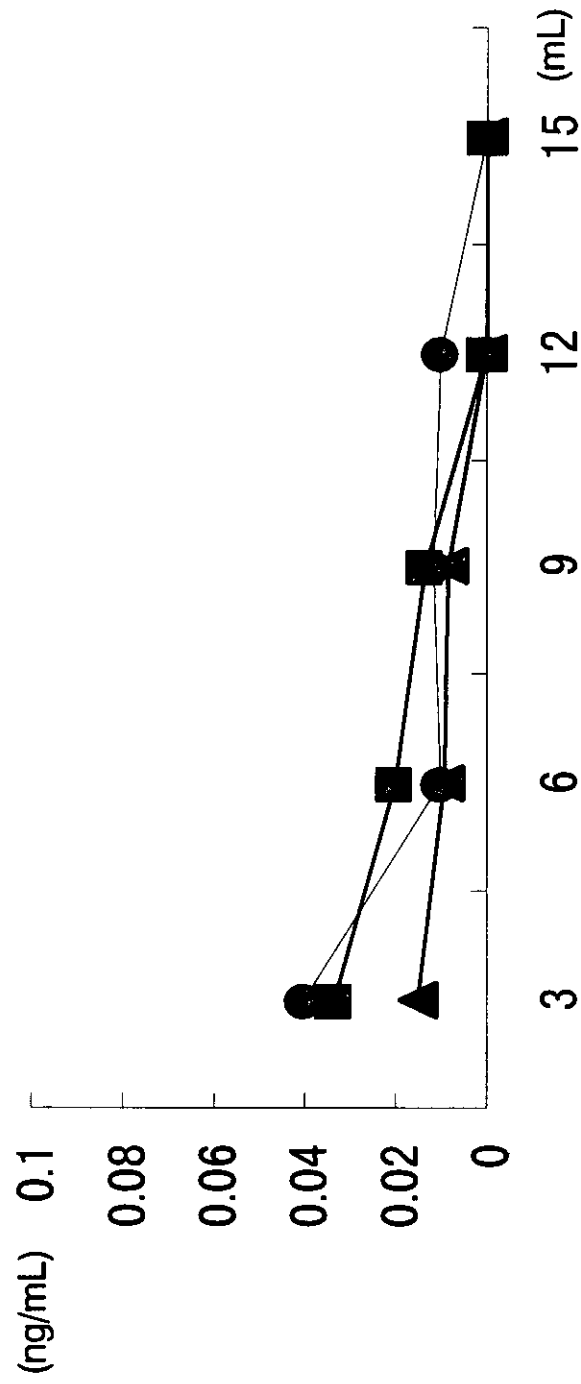


Fig.6 Remaining BPA in SPE cartridges and disk

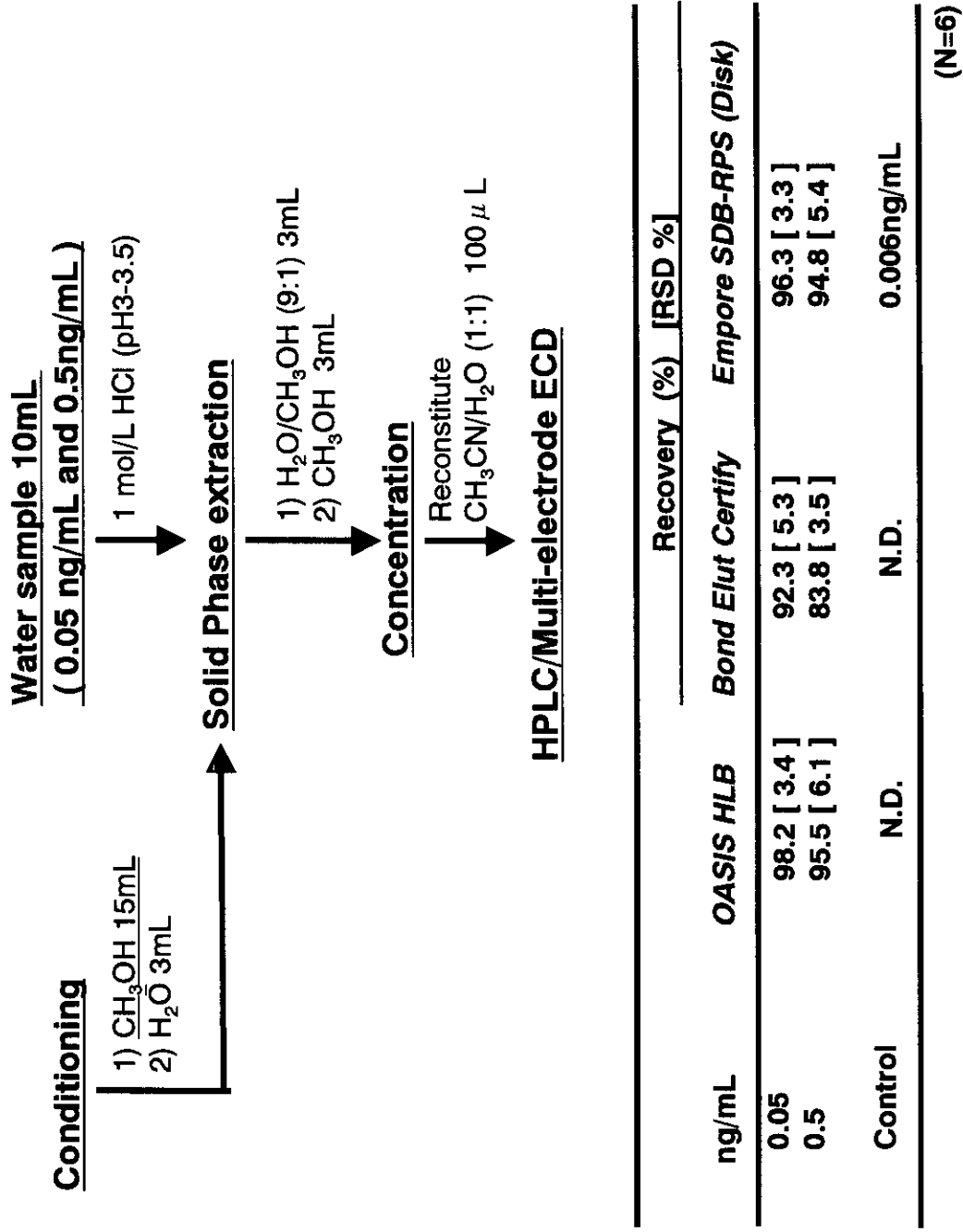


Fig.7 Recovery from water

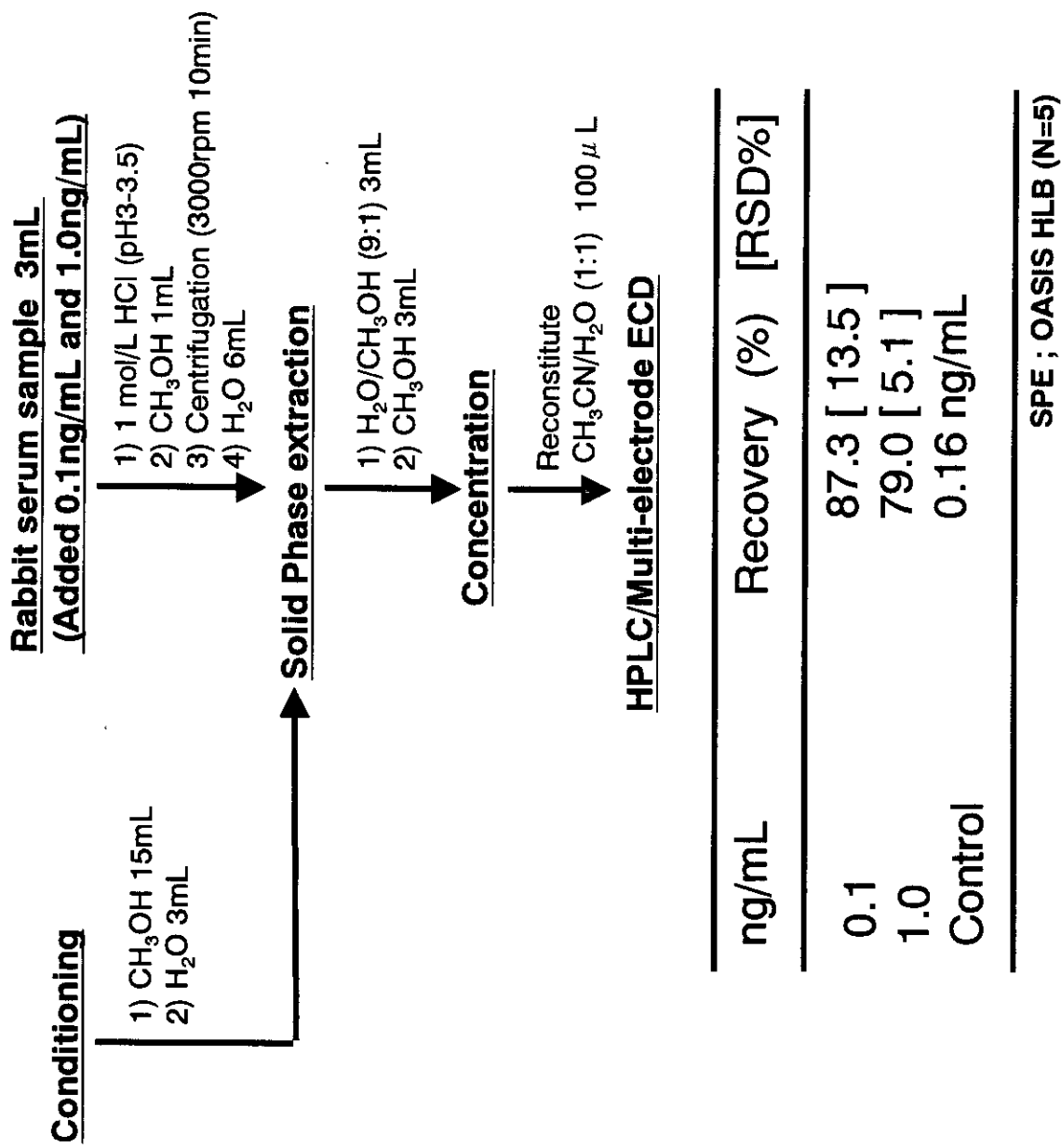


Fig.8 Recovery from Rabbit serum

**BPA Concentration (ng/mL)
[RSD %]**

Plasma sample	0.32	(N=5)
	[5.0]	

***BPA standard $Ch_4/Ch_3 = 0.46$
Plasma sample $Ch_4/Ch_3 = 0.46$**

Fig.9 Human plasma sample

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、成人などの暴露に関する研究（指定研究）

血中のプラスチック可塑剤
の分析

フタル酸エステル、アジピン
酸エステル類の測定法に関する研究
主任研究者 中澤 裕之
星薬科大学教授

研究要旨 プラスチックの可塑剤として汎用されているフタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の血中からの高感度かつ再現性のよい分析法を開発した。本法は、閉鎖系の抽出装置を用いることで外部からのこれらの物質による汚染を極力防ぐことが可能である。その結果、DEP、DBP、BBP、DEHP、DEHA の 5 物質で 50ng/mL 以上の回収率は 98.3～112.5%(RSD=0.9～5.3%)、25 ng/mL の回収率 96.2～134.4%(RSD=2.2～6.5%)、検出限界 25ng/mL であった。

A 研究目的

フタル酸エステル、アジピン酸エステル類は機能性、加工性、経済性等に優れたプラスチックの可塑剤である。塩化ビニル樹脂を中心としたプラスチック製品は生活全般のみならず、人工腎臓の血液回路、輸血用セット（チューブやバッグ）、カテーテルなど医療器材としても広く使用されている。しかし、そのように幅広い用途で使用されるプラスチックの可塑剤が内分泌かく乱化学物質としての疑いを持たれている。ヒトへの内分泌かく乱作用を検証する上で、生体成分からの微量検出法の開発は必要不可欠である。しかし、フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類は環境中に多く存在するため、その暴露経路は空気、水等幅広く、その結果として高いバックグラウンド値として現れ、微量測定を困難とする。そこで、高感度定量上の妨害となるバックグラウンドを極量

排除し、血中の高感度定量法を確立するために、抽出・クリーンアップが閉鎖系で行われる精油定量器を用いた蒸留法を検討した。

B. 研究方法

B-1 試薬及びフタル酸、アジピン酸標準液

試薬のヘキサン、アセトニトリルは関東化学のフタル酸用溶媒、トルエンは、和光純薬工業製残留農薬試験用 1000、または ∞ pure を用いた。塩化カルシウムは特級、無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用 300 を用いた。いずれの溶媒も、GC/MS により妨害ピークを認めないまたはごく少量であるものを用いた。

使用した水はいずれも、本蒸留装置を用い、8 時間以上加熱還流して、揮発性成分を除去し、GC/MS に対して妨害ピークを認めないものを用いた。

フタル酸ジ n エチル（以下 DEP）、

フタル酸ジブチル(DBP)、フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)は関東化学製環境分析用標準を用いた。内標準物質としては関東化学製環境分析用標準の DEP-d4、DBP-d4、BBP-d4、DEHP-d4、林純薬製 DEHA-d8 を用いた。フタル酸、アジピン酸を各 1000ng/mL ずつ含むように調製し、それを順次希釈して用いた。同様に内標準は各 2000ng/mL ずつ含むように調製し、それを順次希釈して用いた。検量線用標準にはフタル酸、アジピン酸の溶液に内標準を各 100ng/mL ずつ含むように調製した。

B-2 装置及び器具

検出には Hewlett Packard 社製ガスクロマトグラフ質量分析計(HP5896/HP5971)を用い、サンプル注入には Hewlett Packard 社製オートサンプラー-7673 を用いた。

蒸留装置を Fig.1 に示すように組み立て、ジムロート冷却管の冷却には東京理科機器製 Eyela Cool Ace CA-1110 を用いた。本法で用いるガラス器具類はすべてアセトン洗浄後、200℃の乾燥器内で4時間以上加熱したものをを用いた。

B-3 ヒト血清及びウサギ血漿

ヒト血清として日本製薬株式会社製、精度管理用凍結乾燥プール血清コンセーラを用いた。ウサギ血漿は 3000g 以上のウサギよりテルモ製シリンジで採血後、ガラス製遠心管で 3000rpm、20 分間遠心分離し、上清を得た。

B-4 GC/MS の分析条件

カラムは J&W 社製 DB-5MS(内径 0.25mm×30m)を用いた。キャリアガスは He を 0.9mL/min とし、カラム温度は 150℃で3分間保持し、その後毎分 10℃で 280℃まで昇温した。注入口温度は 280℃、検出器温度を 300℃とした。サンプル注入量は 4μL とした。検出のモニターイオンには DEP、DBP、BBP、DEHP は $m/z=149$ 、各 d4 体では、 $m/z=153$ 、DEHA、DEHA-d8 は $m/z=129$ 、 $m/z=137$ の SIM で行った。

B-5 蒸留法

内容量 1000mL のナス型フラスコに、8 時間以上還流した水 500mL、5%濃度で塩化カルシウムを加え、血漿 4mL 及び各内標準物質 200ng/mL のメタノール溶液を 100μL 加え、沸騰ガラス細棒を入れた。精油定量器にトルエンを 2mL 正確に加え、ジムロート冷却器を取り付け、マントルヒーターで加熱蒸留した。蒸留後トルエン抽出層を小試験管に取り、少量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、GC 検液とした。

B-6 定量操作

各濃度に調製した試料により、GC/MS にてピーク面積を得て、内標準法により検量線を作成した。

B-6 添加回収試験

ウサギ血漿 5mL に、五種混合標準メタノール液 100μL を添加してかく拌後、その 4 mL を用いた。

C. 研究結果

C-1 GC/MS による定量

本 GC/MS 分析条件での各標品の保持時間、直線性と検出限界($S/N=2$)は、それぞれ DEP で 5.2 分、5~1000ng/mL ($r=0.997$)、5ng/mL、DBP で 8.0 分、0.5

～1000ng/mL ($r=0.995$)、1ng/mL、BBP で 10.4 分、5～1000ng/mL ($r=0.998$)、2 ng/mL、DEHP で 11.4 分、5～1000ng/mL ($r=0.996$)、2ng/mL、DEHA で 10.6 分、5～1000ng/mL ($r=0.998$)、2ng/mL、であった。各標品とも保持時間の RSD は 0.1%以下であった。

C-2 水中のフタル酸類の除去

抽出・精製に用いる水中、及び本装置内のフタル酸、アジピン酸エステル類の除去を検討した (Fig.2)。抽出用水として水道水を用いた場合、還流中にカルシウム塩と思われる物質が析出して白濁したため、日本ミリポア社製 Milli-Q で製した水を用いた。4 時間還流後にトルエンを測定したところ DEP、DBP が確認されたが、さらにトルエンをかえ、合計 8 時間以上の還流で検出限界、または検出限界以下に抑えることが可能であった。このことより、本装置内のフタル酸、アジピン酸エステル類を除去することができ、また閉鎖系であるために外部からの混入も防げるものと考えられる。

C-3 血清、血漿からの添加回収

ヒト血清を用いて抽出操作を行ったところ、DEHP が 1.0～5.0 μ g/mL と高濃度に検出され (Fig.3)、その濃度に再現性はなかった。一方、ウサギから直接採血し、抽出操作を行ったところ妨害ピークは認められなかったので、ウサギ血漿に各種濃度の 5 種混合液を添加して、抽出操作を行った。内標準物質を用いない場合の回収率とその変動係数は、血漿中濃度 500ng/mL のときに 7 回測定の前平均で、DEP が 30.0% (RSD=10.5%)、DBP が 92.3% (RSD=5.9%)、BBP が 73.5% (RSD=4.8%)、DEHP が 160.0% (15.0%)、

DEHA は 45.9% (6.3%) であり、水溶性の高い DEP の回収率は特に低いものとなった。しかし内標準物質を用いることにより、回収率及び再現性が補正され、500 は Table 1、50 は Table 2、25ng/mL は Table 3 に示す通り、良好な結果を得た。また、本法による定量限界は血清中濃度で、25ng/mL であった。

D. 考察

本法の特徴は、試料からフタル酸エステル及びアジピン酸エステル類を、精油定量器を用いて抽出・精製することである。従って、抽出・精製操作は閉鎖系で行われており、外部からのこれら物質による汚染を極力防ぐことが可能であった。前述のごとく、水溶性の高い DEP の回収率は絶対検量線法では低かったものの、安定同位体を用いた内標準法を採用することにより、良好な回収率 (98.3～100.8%)、再現性 (0.9～2.2%)、定量限界 25ng/mL を得ることができた。本法は、抽出装置内のフタル酸エステル除去に若干時間がかかるが、煩雑な抽出・クリーンアップ操作が同時に行われ、非常に簡便な方法であるので、血中のフタル酸エステル及びアジピン酸エステル類を高感度に定量法するために適した手法と思われる。

E. 結論

血中の高感度定量法を確立するために、抽出・クリーンアップが閉鎖系で行われる精油定量器を用いた蒸留法を検討した。その結果、次に示す結論を得た。

1. 抽出・クリーンアップに用いる水中、及び蒸留装置内のフタル酸、アジピン酸エステル類を

8 時間蒸留する事により、ほぼ完全に除去する事ができた。

2. ヒト血清を用いて添加回収実験を行ったところ、内標準物質を用いない場合は、DEP の回収率が低かったが、内標準物質を用いることにより、回収率及び再現性が補正され、良好な結果を得た（50ng/mL 以上の回収率は 98.3～112.5%、変動係数 5.3%以下、25 ng/mL の回収率 96.2～134.4%、変動係数 6.5%以下）。
3. 本法による定量限界は血清中濃度で、25ng/mL であった。
4. 本法は、抽出・クリーンアップ操作が閉鎖系で行われており、外部からのこれら物質による汚染を極力防ぐことが可能であった。

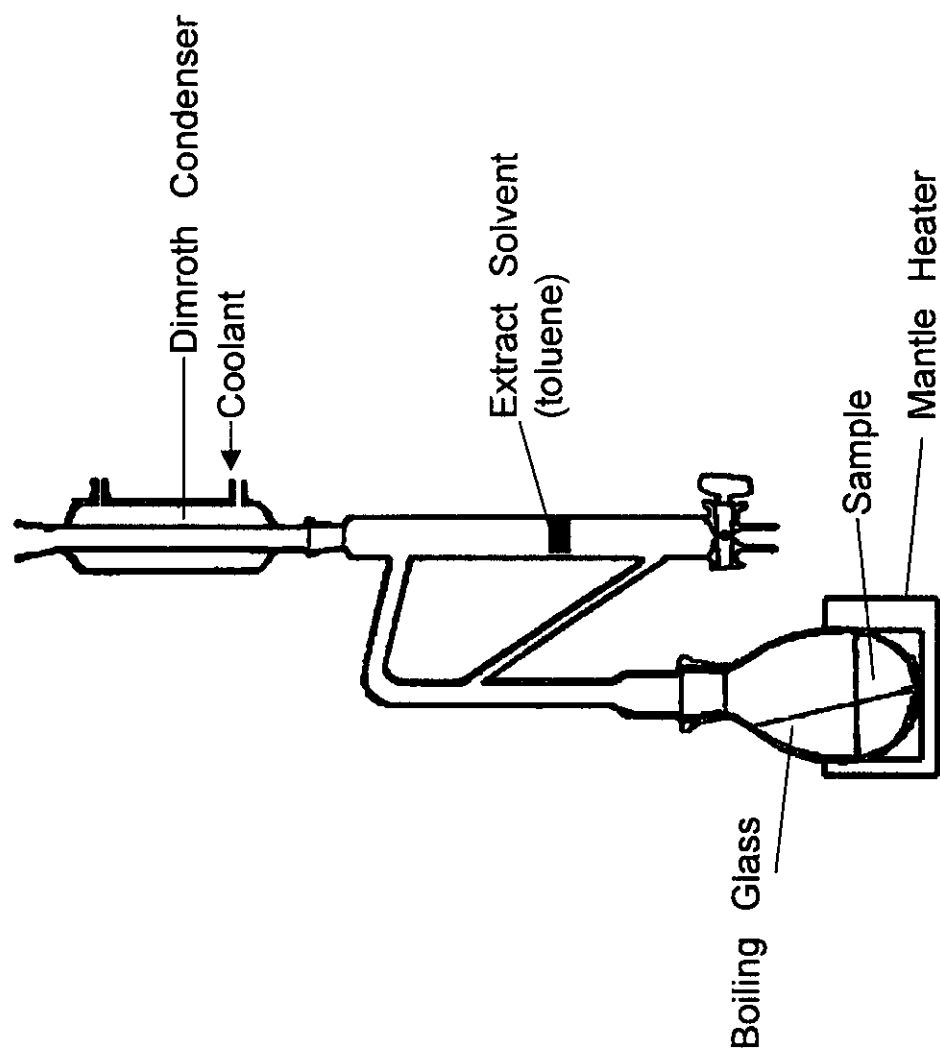


Fig.1 The apparatus of extractive distillation

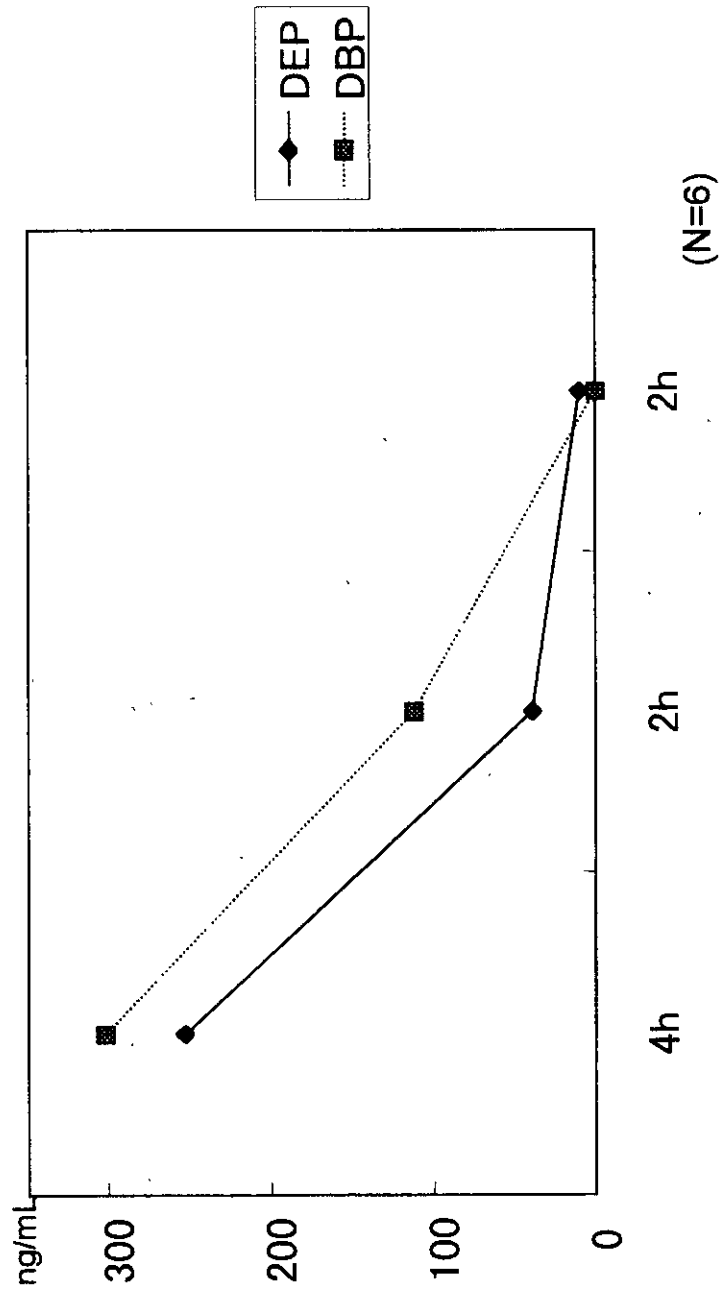


Fig.2 Remove of DEP and DBP from the apparatus

**Table 1 Recovery of standard (500ng/mL)
from the rabbit plasma**

	Recovery(%)	RSD(%)
DEP	100.8	0.9
DBP	107.4	1.8
BBP	101.2	1.0
DEHP	108.9	3.2
DEHA	102.6	1.3

(N=7)

**Table2 Recovery of standard (50ng/mL)
from the rabbit plasma**

	Recovery(%)	RSD(%)
DEP	98.3	2.2
DBP	107.4	5.3
BBP	104.2	4.2
DEHP	112.5	4.8
DEHA	103.2	4.2

(N=7)

Table3 Recovery of standard (25ng/mL)
from the rabbit plasma

	Recovery(%)	RSD(%)
DEP	99.0	2.2
DBP	103.1	6.5
BBP	103.0	4.2
DEHP	134.4	6.3
ADP	96.2	5.2

(N=7)

平成十年度 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
内分泌攪乱物質の胎児、成人等の暴露に関する調査（指定研究）

内分泌攪乱物質の胎児、成人等の暴

露に関する生体試料採取による調査

主任研究者 中澤裕之
星薬科大学教授

分担研究者 牧野恒久
東海大学医学部教授

添付詳細報告書リスト

詳細報告書 1 :

内分泌攪乱物質調査研究に最適な生
体試料採取系・基礎的実験系の構築
――試料採取系（実験系）の汚染除
去

詳細報告書 2 :

生体試料中ビスフェノール A の高感
度分析法の開発 I――エチル誘導体化
GC-MS 法

詳細報告書 3 :

生体試料中ビスフェノール A の高感
度分析法の開発 II――トリメチルシ
リル誘導体化 GC-MS 法の開発とエ

チル誘導体化 GC-MS 法との比較検

討

研究要旨

内分泌攪乱物質のうち、フタル酸エステル類、ビスフェノール A、ノニルフェノールなどの化学物質を含む製品が、医療の現場や実験室内にも多数存在する。表記研究に使用する全ての医療器具（実験器具及びそれに付随する道具）から、これら化学物質の溶出試験を実施し、それらのデータに基づいて生体試料採取法あるいは分析室でのルーチン操作を再検討し、汚染物質の排除を行った。そののち、内分泌かく乱物質の胎児・乳児暴露量の評価のために、母乳、臍帯血、妊婦血液を対象とした内分泌かく乱物質の高感度分析と、近年若年女性の間で急増していると言われる子宮内膜症患者の腹水中の内分泌かく乱物質を分析し、データベースを構築して胎児・乳児・成人暴露量の評価と疾病との関連性を明らかにする。

農薬、食品添加物、医薬品等の化学物質の安全性は実際使用される濃度レベルより高いところで、急性毒性や発ガン性等の慢性毒性実験を実施し、その体内動態を明らかにして	リスク評価がなされている。しかし、社会問題となっている外因性内分泌かく乱物質の特徴は微量でしかも世代を越えて生体、特に胎児や乳児に影響を及ぼすことが危惧されている
---	---

ことである。環境庁の実施している環境モニタリングにより、水、空気、土壌、生物試料中にその存在が明らかにされている内分泌かく乱物質もあり、食品を媒体として我々が体内に摂取する可能性のある物質も報告されている。実際、ダイオキシン、PCB等のようにヒト血液、母乳中から検出されている内分泌かく乱物質も存在する。微量で存在し、仮に微量で生体に様々な作用を及ぼすとしてもその作用機構を含めて解明すべき内容が余りにも多岐に渡っていることが内分泌かく乱物質問題を複雑化させている。この内分泌かく乱物質に対する内分泌学的基礎研究は極めて少ない上、これら物質のヒト雌性の生殖に対する基礎的研究・調

査は皆無に等しい。このような現状で特に問題となる点は、単発的な報告のデータの信頼性に疑問の点が多い事である。

内分泌かく乱物質のヒトへの健康影響の有無またはその程度に関する総合評価を正しくおこなうためには、信頼性の高いデータであることが必須である。本研究は、胎児、乳児、成人等がどの程度内分泌かく乱物質に暴露されているかを明らかにするために、まず生体試料採取法から生体試料をターゲットにした高感度かつ精度の高い分析法の構築までの基礎的な部分の確立とともに、ヒトへの健康影響に関する総合評価を正しくおこなうためのサンプリングシステムの構築を目標とした。

A.1 内分泌攪乱物質調査研究に最適な生体試料採取系・基礎的実験系の構築——試料採取系（実験系）の汚染除去

内分泌攪乱化学物質の生体影響に関する調査研究を実施するため、母乳、さい帯血、血清、腹水中の暴露状況を検討するが、これらの測定対象のいくつか（フタル酸エステル類、ビスフェノール A、ノニルフェノール）は、医療の現場（実験室内）で日常的に用いられている医療器具（実験器具及びそれに付随する道具）中に含まれている可能性がある。これらの対象物質は、医療器具（実験器具及びそれに付随する道具）を通じ、採取系（測定系）内に容易に入り込

み、正確な測定（高感度な測定）を困難にすることが知られている。従って現状での試料採取（実験室内での日常的な操作）によって得られた試料及び測定データでは、得られた結果に対する保証ができない。これらの不明な点を明らかとするために、生体試料採取のためのルーチン操作を、徹底的に検討し、試料採取経路及び実験室に存在する実験器具からの汚染物質の排除及び0汚染を目指した。

A.2 生体試料中ビスフェノール A の高感度分析法の開発

ビスフェノール A (BPA) は、内分泌攪乱物質の一つと考えられており、ヒトの健康影響に対する関心が

高まりつつある。最近、京都大学のグループにより、さい帯中の BPA の存在が報告され、次世代への影響の可能性が示唆された。それにともない現在、本化学物質のヒト、特に母体、胎児への暴露実態調査の早急な実現が、強く望まれている。

これらの調査を実施するためには、感度と選択性に優れた MS を用いた測定法の開発が必須である。しかし現在まで、生体試料（血液、さい帯血、母乳、腹水）中 BPA の、MS を用いた測定法は全く報告されていない。近年、ジエチル硫酸を用いたエチル誘導体化 GC-MS 法が開発され、環境試料へ適用されている。本 BPA 誘導体が極めて安定で、夾雑する生体由来の妨害物質を加水分解に

より精製することが可能であることに着目し、本誘導体化を用いる GC-MS 法の開発を試みた。また、ビスフェノール A の測定法としてトリメチルシリル(TMS)誘導体化 GC-MS 法も一部で汎用されている。本 TMS 化法を用いる生体試料の測定法も同時に開発し、感度、操作性、生体試料への応用性の検討を試みた。さらに、エチル誘導体化法と TMS 誘導体化法の有用性を比較検討し、生体試料（血液、さい帯血、母乳、腹水）中 BPA の、MS を用いた測定法として最適のものを開発する。

A.3 生体試料中の内分泌かく乱物質濃度とヒトの健康影響についての検討

上記 A.1 から A.2 の検討をふまえたうえで、産科および婦人科に通院中の婦人から十分なインフォームドコンセントの（大学内に常設の医の倫理委員会よりの承認をうけている書式を使用した）うえで、生体試料を採取し内分泌かく乱物質を分析する。

A.3.1 臍帯血及び母乳中の内分泌かく乱物質に関する研究。

内分泌かく乱物質の胎児・乳児暴露量の評価のために、母乳、臍帯血、妊婦血液を対象とした内分泌かく乱物質の試料調製法を含む超高感度分析法を開発する。特に可塑剤の分析にはその影響を排除するような実試料の採取方法が必要で、測定手法を構築する。

A.3.2 内分泌かく乱物質の成人暴露等に関する調査研究。

内分泌かく乱物質の生殖系に及ぼす影響の一つに、近年 20 代、30 代の女性の間で急増していると言われる子宮内膜症との関連性が指摘されている。本研究では子宮内膜症患者の腹水中の内分泌かく乱物質を分析し、関連性を明らかにする。この研究には腹水の採取方法と超高感度な分析法の構築が必要である。同時に採取した血液を対象とした内分泌かく乱物質に関する分析もおこなうが、これは上述の A.3.1 で得られた成果を利用する。

B. 研究方法

B.1 内分泌攪乱物質調査研究に最適