

な生体試料採取系・基礎的実験系の

構築のための方法

医療器具、実験室内にある実験器具及びそれに付随する道具の汚染調査を実施した。汚染の可能性が知られている化学物質は、フタル酸エステル類、ビスフェノール A 並びにノニルフェノールであるが、その類縁化合物もその可能性が考えられる。従って本試験は、フタル酸エステル類の代表として、ジ 2-エチルヘキシルフタレート (DEHP)、ビスフェノール A 並びにノニルフェノールを中心とした、FID-GC によるパターン分析を実施した。なお、量的な情報を得るために、DEHP のみ定量した。詳細は、添付の詳細報告書 1 を参照されたい。

B.2 生体試料中ビスフェノール A

の高感度分析法の構築のための方法

装置や分析法さらに、誘導体化操作の詳細は、添付の詳細報告書 2 および 3 を参照されたい。

B.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

討のための方法

添付の詳細報告書 1 の結果に基づき、医療器具、分析室内にある実験器具及びそれに付随する道具の汚染調査を実施した、これらの結果に基づき、使用する試料採取器具の選択、新規作製を試み、汚染が比較的無い系を作り上げた。また、分析室で日常的に使用している器具や装置を検

討し、可能な限り排除あるいは選択し汚染が少ない分析室の構築も必要であることがあきらかになった。しかし、可能な限り努力はしているが、特に医療現場では対応できない部分がある。従って試料採取及び測定の実験ブランクを毎測定ごとに調製し、これらの2種の操作ブランク値を加味して、得られたデータを解析することが、信頼性の高いデータを得る正確な測定のために必須であることも明確になった。

C. 結果と考察

C.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の研究から得られた結果

方法に基づき、医療器具、分析室内にある実験器具及びそれに付随する道具の汚染調査を実施した。これらの結果に基づき、使用する試料採取器具の選択、新規作製を試み、汚染が比較的無い系を作り上げた。また、分析室で日常的に使用している器具や装置を検討し、可能な限り排除あるいは選択し汚染が少ない分析室の構築にも成功した。しかし、可能な限り努力はしているが、特に医療現場では対応できない部分がある。従って試料採取及び測定の実験ブランクを毎測定ごとに調製し、これらの2種の操作ブランク値を加味して、得られたデータを解析することが、正確な測定のために必須であると考えた。詳細は、添付

の詳細報告書 1 を参照されたい。

製効率が期待される。

C.2 生体試料中ビスフェノール A
の高感度分析法の構築の研究から得
られた結果

本法は極めて高感度で、夾雑物が
多量に存在する試料中の BPA を精度
よく測定することが可能である。そ
れ故、内分泌攪乱物質の健康影響に
関する調査研究の実施に極めて有用

C.2.1 ジエチル硫酸を用いる、ヒ
ト体液中の BPA のエチル誘導体化

と思われる。さらに詳細は、添付の
詳細報告書 2 を参照されたい。

GC-MS 法を開発した。本法は (1)

比較的高感度で 0.25 ng/ml (生体

C.2.2 誘導体化試薬 BSTFA を用い

試料) の BPA の測定が可能で、(2)

る、ヒト体液中の BPA の TMS 誘導

また室温、1 時間放置するだけで反

体化 GC-MS 法を開発した。

応が終了し、操作が簡便である。ま

試薬ブランクの原因を詳細に検討

た、反応生成物であるフェネトール

し、過剰な試薬を N₂ パージで除去

体は、極めて安定で、本法を生体試

することにより、試薬ブランクの完

料に応用するとき、(3) 反応生成

全除去に成功した。本法は (1) 比

物を加水分解を用いて精製すること

較的高感度で 0.1ng/ml の BPA の測

が可能である。それ故極めて高い精

定が可能で、(2) また室温、1 時

間放置するだけで反応が終了し、操作が簡便である。この感度及び操作性は、エチル誘導体化法に匹敵する。

しかし、本法を血清及び母乳の生体試料に応用を検討したところ、試料最終溶液中に夾雑する多量の物質のために、回収率が 150 から 180%となり、本法の応用は不可能であった。本法は極めて高感度かつ簡便な方法である。しかし血清や母乳のように多量の夾雑物が存在する試料中の BPA を精度よく測定することは不向きであった。それ故、本法は比較的夾雑物が少ない試料中 BPA の、高感度かつ正確な測定に有用と思われる。さらに詳細は、添付の詳細報告書 3 を参照されたい。

C.3. 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

C.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高感度分析においては、医用材料に含まれる可塑剤の影響を排除するために実試料の採取に際しては細心の配慮がなされることが必要である事が明らかとなった。30 例の正期分娩の症例について内分泌かく乱物質の分析が行われているが、一施設での結果を最終分析のためのデータベースへに記録するのではなく、他施設でクロスチェックを行うこと

によりデータとしての精度を高めることは必須である。とくに、今回の結論が社会に対して与えるインパクトの大きさを考慮した場合は、当然である。現在、各地区の公衆衛生研究所にサンプルを回して、分析結果をクロスチェック中である。

C.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、近年若年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。この研究における内分泌かく乱物質の高感度分析におい

ては、腹水の採取時に使われる医用材料に含まれる可塑剤の影響が重大であることが明らかとなった。その影響を排除するために、腹水試料の採取に際しては細心の配慮がなされて改良された器具が必要である。事前にチェック済みのこれらの器具を用いて、不妊症を既往にもつ患者 30 症例の腹水と血液を生体試料として得た。内分泌かく乱物質の分析結果と、腹腔内の所見から分類された子宮内膜症の重症度、年齢、不妊期間などの各要素をデータベースへ登録して最終分析を行う予定である。内分泌かく乱物質の分析結果については、一施設での結果を他施設でクロスチェックすることによりデータとしての精度が高まることは明白

である。とくに、今回の結論が社会
に対して与えるインパクトの大きさ
を考慮した場合は、当然である。現
在、各地区の公衆衛生研究所にサン
プルを回して、分析結果をクロスチ
ェック中である。

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）

<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

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

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）からの、これら化学物質の溶出試験を実施した。それらのデータに基づき、生体試料採取法あるいは実験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。

A. 研究目的

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。しかし、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。これらの目的のために、本研究を行う前に、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。

B. 分析法

医療器具、実験室内にある実験器具及びそれに付随する道具の汚染調査を実施した。汚染の可能性が知られている化学物質は、フタル酸エステル類、ビスフェノール A 並びにノニルフェノールであるが、その類縁化合物もその可能性が考えられる。従って本試験は、フタル酸エステル類の代表として、ジ 2-エチルヘキシルフタレート (DEHP)、ビスフェノール A 並びにノニルフェノールを中心とした、FID-GC によるパターン分析を実施した。なお、量的な情報を得るために、DEHP のみ定量した。

B.1 装置

ガスクロマトグラフ、島津 GC-17 A

B.2 操作法

試料を採取し、はさみあるいはカッターで細切する。これを秤量し、10ml のヘキサンを加えて一晩放置する。このヘキサン抽出液の 1 μ l を FID-GC に付す。

B.3 GC 条件

カラムは、DB-5, 0.25 mm x 30 m, df 0.25 μ m を使用した。温度条件は、注入口を 280 $^{\circ}$ C、検出器を 280 $^{\circ}$ C、カラムの昇温条件を、200 $^{\circ}$ C \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C(5min)で行った。流量は、1ml/min(He)、スプリット比は 1:50 であった。

B.4 検量線

1000 mg/ml の DEHP の標準試料溶液を、ヘキサンで希釈して、1.0、2.1、4.1、10.3 μ g/ml の溶液を調整し、その 1 μ l を上記分析法に従って測定した。

DEHA の、ピーク面積値の比と、重量比から、検量線を作成した (Fig. 70)。

B.5 定量計算

得られた DEHP のピーク面積値から、検量線より検出量を求め、次式により試料中の DEHP 濃度 (Cs) を算出した。

$$C_s (\mu\text{g/g}) = W_d \times (V_s / V_i) \times (1 / W_s)$$

Wd : 検出量 (ng)

Ws : 試料採取量 (g)

Vs : 測定試料液量 (10ml)

Vi : 注入量 (1 μ l)

B.6 検討項目

B.6.1 生体試料採取方法の検討

I) 採血

真空採血管を用い、採血する。

検討項目：テルモベノジェクト II 採血針、真空採血管 (10 ml、自家製 ACD-A 液入り)

II) さい帯血採取

さい帯から下記注射器を用いさい

帯血を採取する。

検討項目：JMS シリンジ (100 ml)、
ニプロフローマックス採血針、抗凝
固剤 ACD-A 液

III) 腹水採取

エンドパスアクセスニードルで採
取ルートを確認し、永島製金属管を
挿入し、ニプログリーンスネークチ
ューブを通じて注射器で腹水を採取
する。

検討項目：エンドパスアクセスニード
ル、金属管、ニプログリーンスネ
ークチューブ、ニプロシリンジ GA (20
ml)

IV) 保存容器

検討項目：各種スピッツ管

B.6.2 実験室及び実験器具

Table 2 に示す実験室内にある
種々のプラスチック製の物を、スク
リーニングした。

C. 結果考察

生体試料採取器具及び実験室に存
在する物質からの汚染、日常のルー
チン操作で使用している、実験器具、
実験補助器具について汚染の実態調
査を実施した結果を、Table 1 及び 2、
Fig. 1-69 に示す。これらの結果に基
づいて、個々の対策を検討した。

C.1 生体試料採取法

I) 医療器具

溶出試験を行った結果を、Fig. 1-26、
それらをまとめた物を、Table 1 に示
す。これらの結果が示すように、腹
水採取用器具のグリーンスネークチ
ューブ、ACD-A 液の包装容器は多量
の DEHP を、さい帯血用注射器の包
装容器はビスフェノール A を、腹水
用注射器や真空採血管はノニルフェ
ノールを含むことがわかった。さら
に、ほとんどの医療器具から、多数
の溶出ピークが認められ、これらの
同定は行わなかったが、汚染のおそ
れがある物質の類縁化合物の可能性
が高く、これらの医療器具を試料採
取及び測定に使用することは、系内
を汚染する可能性が極めて高いこと
がわかった。それ故、全ての医療器
具は、可能な限りガラス製の物を使
用した。

一方、腹水採取用器具のグリーン
スネークチューブは、多量の DEHP
を含むが、ガラスに置き換えること
が不可能である。それ故 Fig. 75 に
示すテフロン製器具を作製し、これ
を用いることにした。また、注射針
も金属製の物が入手困難であった。
しかし、接液部は極めて小さいこと
と、Fig. 10 に示すようにほとんど溶
出ピークが認められないことから、
プラスチック製の注射針を使うこと
にした。

II) 血液の調製

Fig. 23-26 に示すように、抗凝固剤を入れるバック及びその包装容器から、DEHP、ノニルフェノール及び多数の溶出ピークが認められた。測定対象の安定性と操作性を考えると、血液から血漿を調製する方が優れているが、ACD-A 液からの汚染を防止するため、余分な物を全く加えずによい血清を調製することにした。

C.2 実験室及び実験器具の検討

I) 実験室

実験室のレイアウトを Fig. 76 に示す。床はコンクリート製で、フタル酸エステルの汚染の可能性が、もっとも高い、フロアのビニルタイルは使用していない部屋で行った。簡易ドラフトの配管からは、汚染物質の溶出は認められなかった。電気器具のコンセントが DEHP を含んでおり、その他にも多数の溶出ピークが認められた (Fig. 28)。したがって全てのコードをテフロンシートで覆った。

II) 実験装置

エバポレーター保護ネットはテフロンシートを、同真空ゴム管はシリコン製の物を使用した。パッキンは接液部ではないのでそのまま使用した。

III) 実験器具

使用する器具は、全てガラス、テフロン、金属製の物を用いた。すり

合わせ器具は、全て透明ずりの器具を用いた。手袋は、P-2 実験室での操作及び器具洗浄に、サニメント及びビューティーを用いた。安全ピペッターは、シリコン製の物を用いた。N₂ エバポレーターは、Fig. 77 の物を作製した。固相抽出は、接液部が全てテフロンでできたバキュームマニユールドを用いた。さらに、カートリッジからの溶出の際、汚染の可能性を最小限にするために Fig. 78 の器具を作製した。

IV) 実験補助器具

シールテープは、テフロンシールを使用した。全てのラベルはテプラを廃止し ppc ラベルを使用した。精製水の蛇口に使用していたホースもテフロン製の物を作製し、これを用いた。

D. 結論

FID-GC を用いる、ヘキサン溶出液のパターン分析を用い、試料採取法 (実験操作) のルーチンを詳細に検討した。これらの結果に基づき、使用する試料採取器具の選択、新規作製を試み、汚染が比較的無い系を作り上げた。また、実験室で日常的に使用している器具や装置を検討し、可能な限り排除あるいは選択し汚染が少ない実験室の構築に成功した。しかし、可能な限り努力はしているが、特に医療現場では対応できない部分がある。従って試料

採取及び測定の実験ブランクを毎測定ごとに調製し、これらの2種の操作ブランク値を加味して、得られたデータを解析することが、正確な測定のために必須である。

Table 1 試料採取器具の溶出試験

Fig. 名称	メーカー	試料量 (g)	DEHP濃度 (ppm)	BPA ピーク領域	NonylPhenol ピーク領域	その他
真空採血用器具						
1 真空採血管本体	テルモ	0.14	N.D.	A	A	A
2 本体ゴム部品		0.08	N.D.	A	B	B
3 採血針キャップA		0.40	N.D.	A	B	B
4 同キャップB		0.19	N.D.	A	B	B
5 同プラスチック部品		0.11	N.D.	A	A	B
6 同ゴム製部品		0.07	N.D.	A	B	C
さい帯血採取用器具						
7 注射筒本体	JMS	0.14	160	A	B	C
8 ピストンゴム部品		0.14	N.D.	A	B	C
9 包装		0.49	tr	C	C	C
10 注射針プラスチック部	ニプロ	0.05	N.D.	A	B	B
11 注射針キャップ		0.13	N.D.	A	A	B
腹水採取用器具						
エンドパスアクセスニードル						
12 プラスチック部A		0.77	N.D.	A	A	A
13 プラスチック部B		0.20	N.D.	A	B	B
14 包装		0.18	N.D.	A	B	B
15 グリーンスネークチューブ	ニプロ	0.18	31%	-	-	-
16 注射筒本体	ニプロ	0.18	N.D.	A	A	B
17 ピストンゴム部品		0.37	tr	B	C	C
18 包装		0.37	N.D.	A	A	B
保存容器						
19 プラスチック製スピッツ管	岩城硝子	0.28	N.D.	A	C	C
20 同キャップ		0.14	N.D.	A	A	B
滅菌用容器						
21 ヒートシール		0.1	ND	A	A	B
22 紙製		0.1	N.D.	A	A	A
抗凝固剤(ACD-A液)						
23 バック本体		0.15	N.D.	A	A	B
24 プラスチック部品A		0.52	N.D.	B	B	C
25 プラスチック部品B		0.89	ND	A	C	C
26 包装		0.07	1.60%	-	-	C

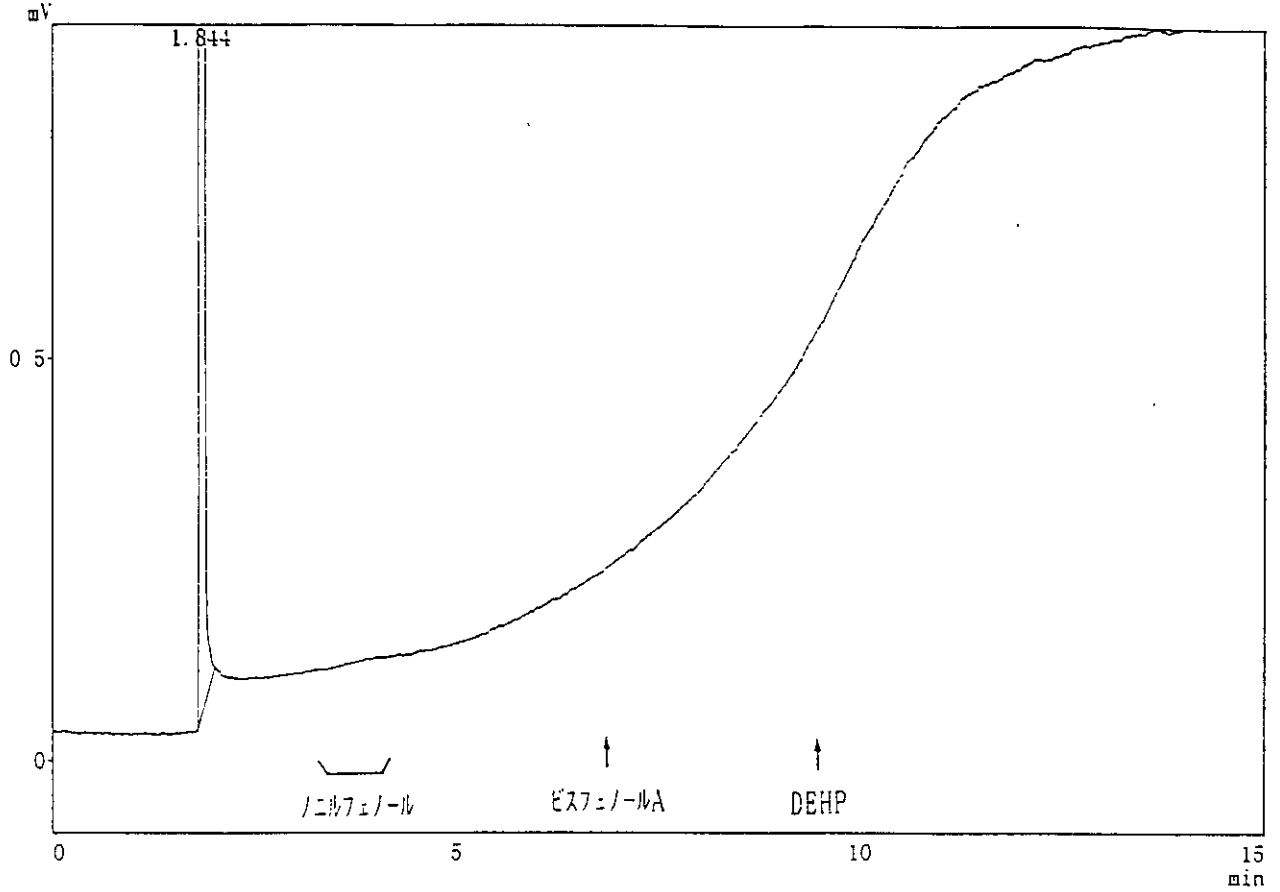
A、全くなし、B、ピーク小あるいは少数、C、ピーク大あるいは多数。

Table 2 実験室設備及び実験器具の溶出試験

Fig	名称	メーカー	試料量 (g)	DEHP濃度 (ppm)	BPA ピーク領域	NonylPhenol ピーク領域	その他
実験室							
27	排気ダクトの配管		0.06	N.D	A	A	A
28	コンセント		0.06	567	A	A	C
実験装置							
エバポレーター		柴田科学					
29	パッキンA		0.14	73	C	C	C
30	パッキンB		0.17	N.D.	A	B	C
31	真空ゴム管A		0.06	167	B	A	C
32	真空ゴム管B		0.05	N.D	A	A	C
33	保護ネット		0.98	N.D	B	B	C
34	水流ポンプ用ゴム管		0.06	N.D	B	A	C
実験器具							
安全ピペッター							
35	シリコン製		0.18	N.D.	A	C	C
36	同コネクターA		0.11	196	A	C	C
37	同コネクターB		0.10	156	A	C	C
38	ゴム製		0.08	18	A	A	B
39	ポリプロピレン製遠沈管	岩城硝子	0.99	N.D.	A	B	C
40	同キャップ		0.90	N.D.	A	B	B
41	ポリスチレン製遠沈管	岩城硝子	1.0	tr	A	C	C
42	同キャップ		0.62	N.D.	A	B	B
43	ケックジョイントクリップ	柴田科学	0.85	ND	A	A	B
44	GC-MSバイアル用セブタム	島津	0.08	N.D	A	A	C
実験補助器具							
45	洗ビン		0.05	N.D	A	A	B
46	アルミ箔	三菱化学	0.65	N.D	A	A	A
47	エプロン		0.10	N.D	A	A	B
手袋							
48	ショーワ		0.06	2.64%	-	-	C
49	トワロン	TOWA	0.08	156	C	C	C
50	サニメント	井内盛栄堂	0.08	N.D	A	B	B
51	ビューティー	TOWA	0.07	N.D	A	A	B
52	手術用		0.08	N.D	A	C	C
53	ナビフィット	井内盛栄堂	0.07	ND	A	A	B
54	みのり	三興化学	0.09	ND	B	C	C
55	防塵マスク包装	トーコー衛材	0.03	tr	A	B	C
56	クイックルワイパー		0.30	14	A	B	C
57	テフロンシール		0.70	N.D	A	B	B
58	テフロンシート		1.1	N.D	A	A	A
59	補強テフロンシート		1.0	N.D	A	B	B
60	ポリエチレンホース		0.54	N.D	A	B	B
61	遮光フィルム		0.41	N.D	C	B	C
ラベルシール							
62	カラーラベルシール	巴川製紙	0.06	25	A	A	B
63	テブラ	KingJim	0.18	tr	B	B	B
64	ppcラベル	コクヨ	0.06	ND	A	C	B
65	マジックインキ(黒)		0.0013	ND	A	B	B
66	輪ゴム	共和	0.17	ND	C	B	C
67	ガムテープ	Kikusui	0.59	ND	A	B	B
68	荷造りひも		0.60	ND	A	B	B
69	包材(エアマット)		0.19	N.D	C	C	C

A、全くなし；B、ピーク小あるいは少数；C、ピーク大あるいは多数。

*** グラフ *** ファイル名: 981125.C05

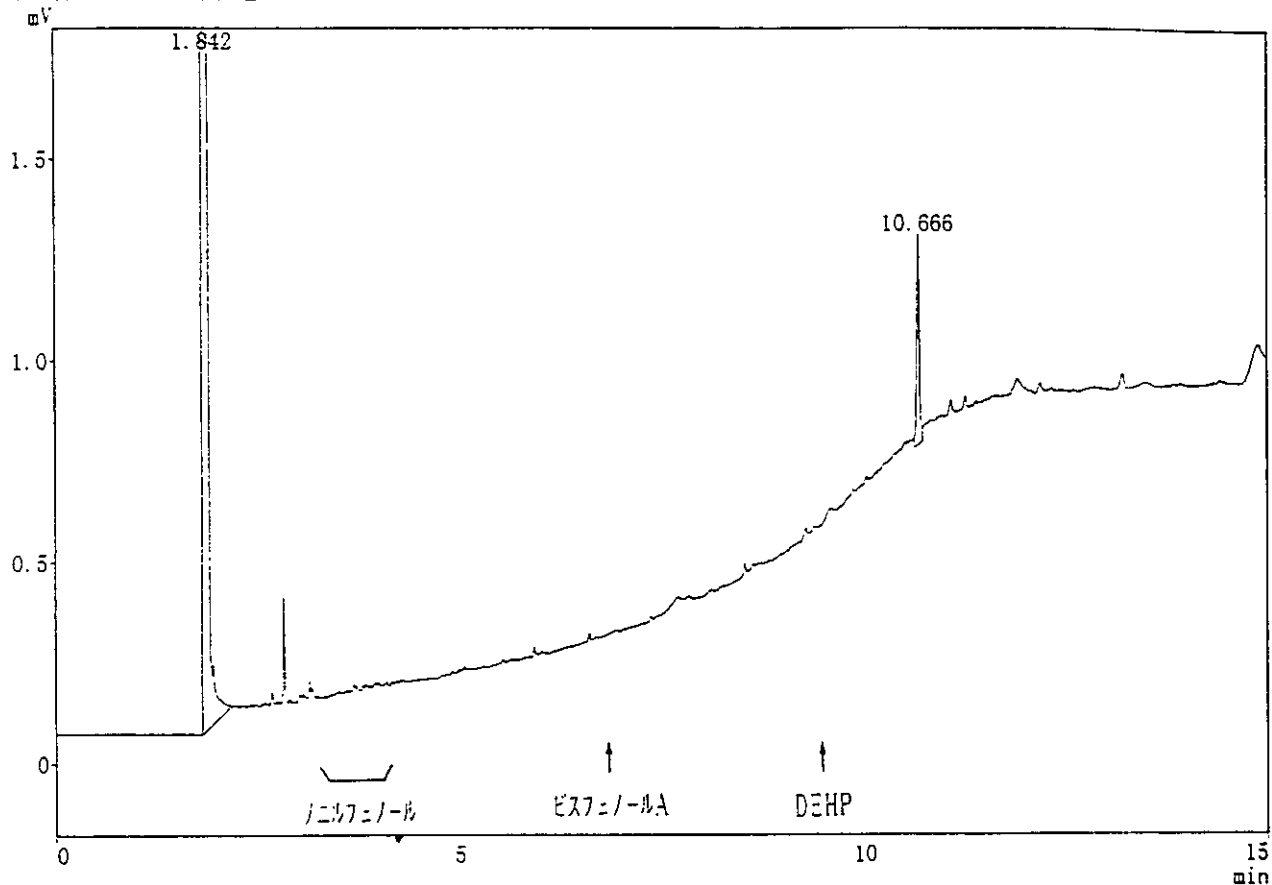


*** レポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.844	97837535	65337658			100.0000	
		97837535	65337658			100.0000	

Fig.1 真空採血用器具 真空採血管本体

*** クロマトグラム *** ファイル名: 981125.C08

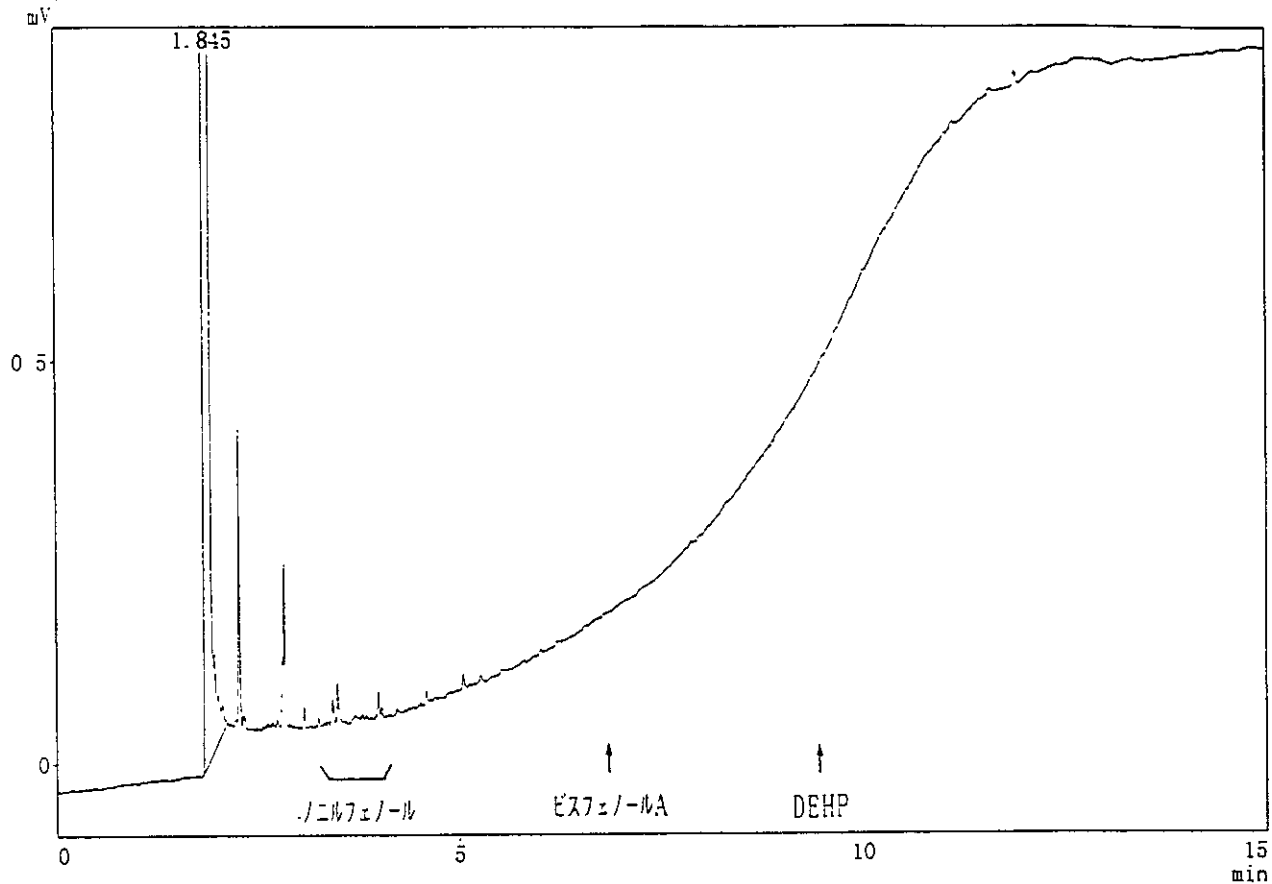


*** レポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MR	IDNO	CONC	NAME
1	1.842	103376947	69045351	S		99.9989	
2	10.666	1168	516	V		0.0011	
		103378115	69045867			100.0000	

Fig.2 真空採血用器具 本体ゴム部品

*** クロマトグラム *** ファイル名: 981125.C02

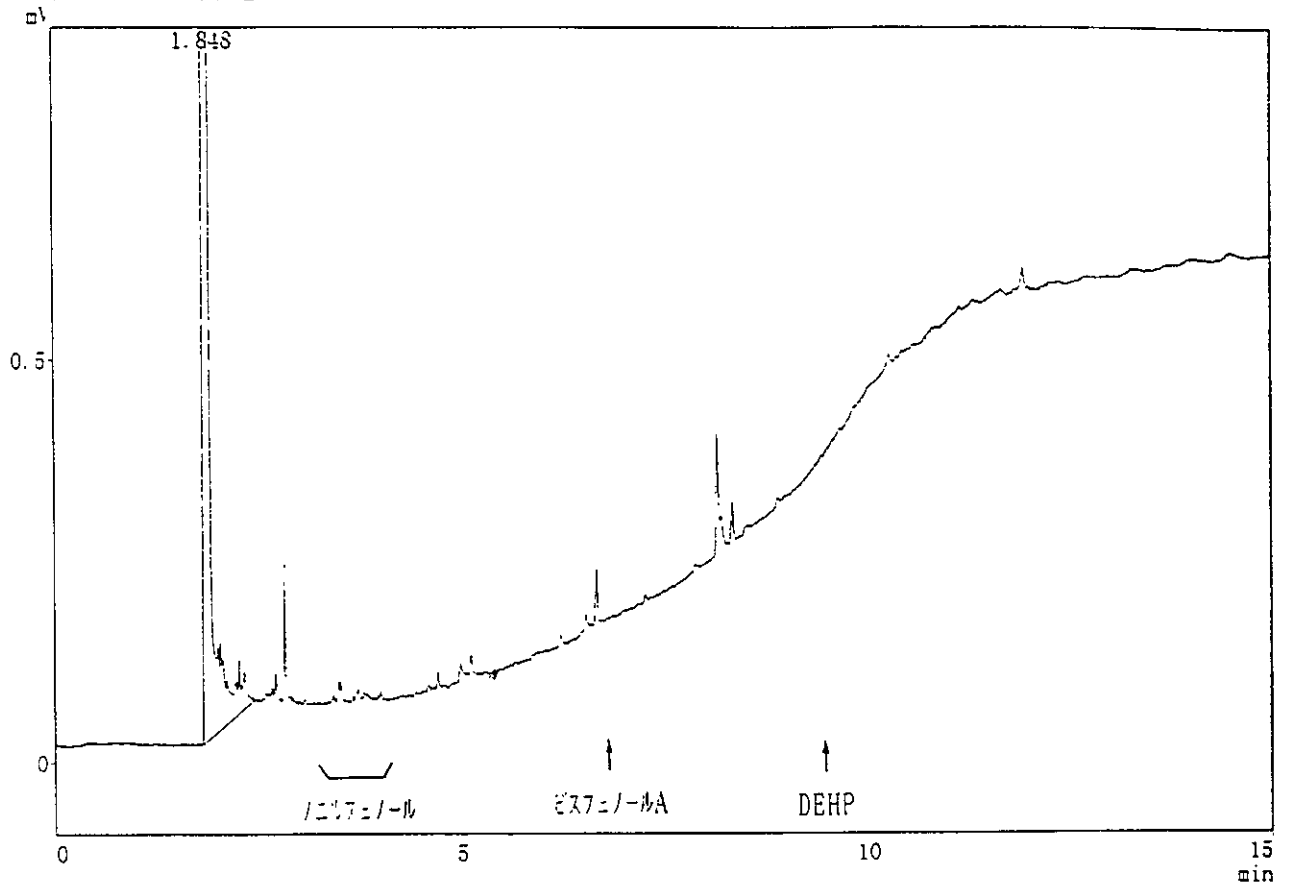


*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.845	102750749	67738165	S		100.0000	
		102750749	67738165			100.0000	

Fig.3 真空採血用器具 採血針キャップA

*** シーケンス *** ファイル名: 981120.C03

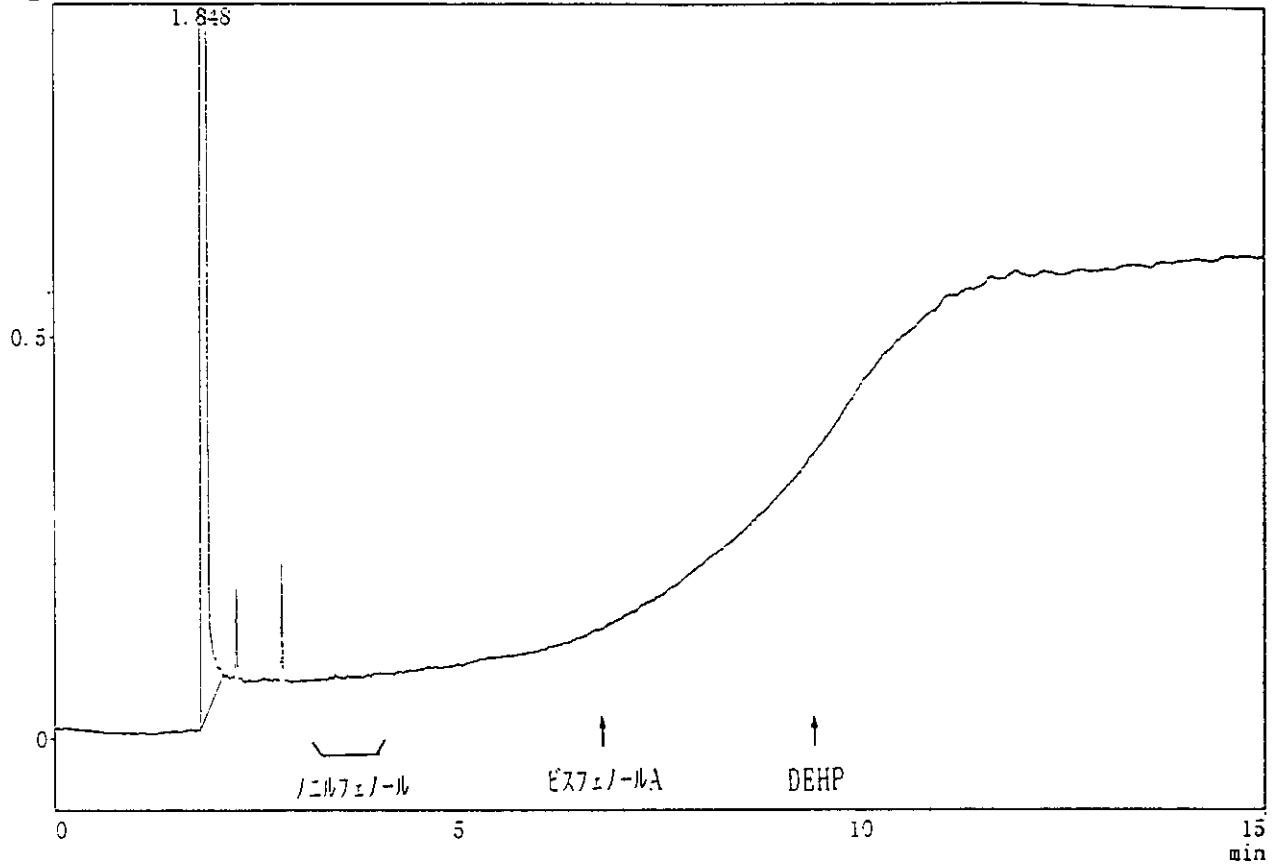


*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.848	100283195	55575640	S		100.0000	
		100283195	55575640			100.0000	

Fig.4 真空採血用器具 採血針キャップ B

*** クロマトグラム *** ファイル名: 981120.C04
mV

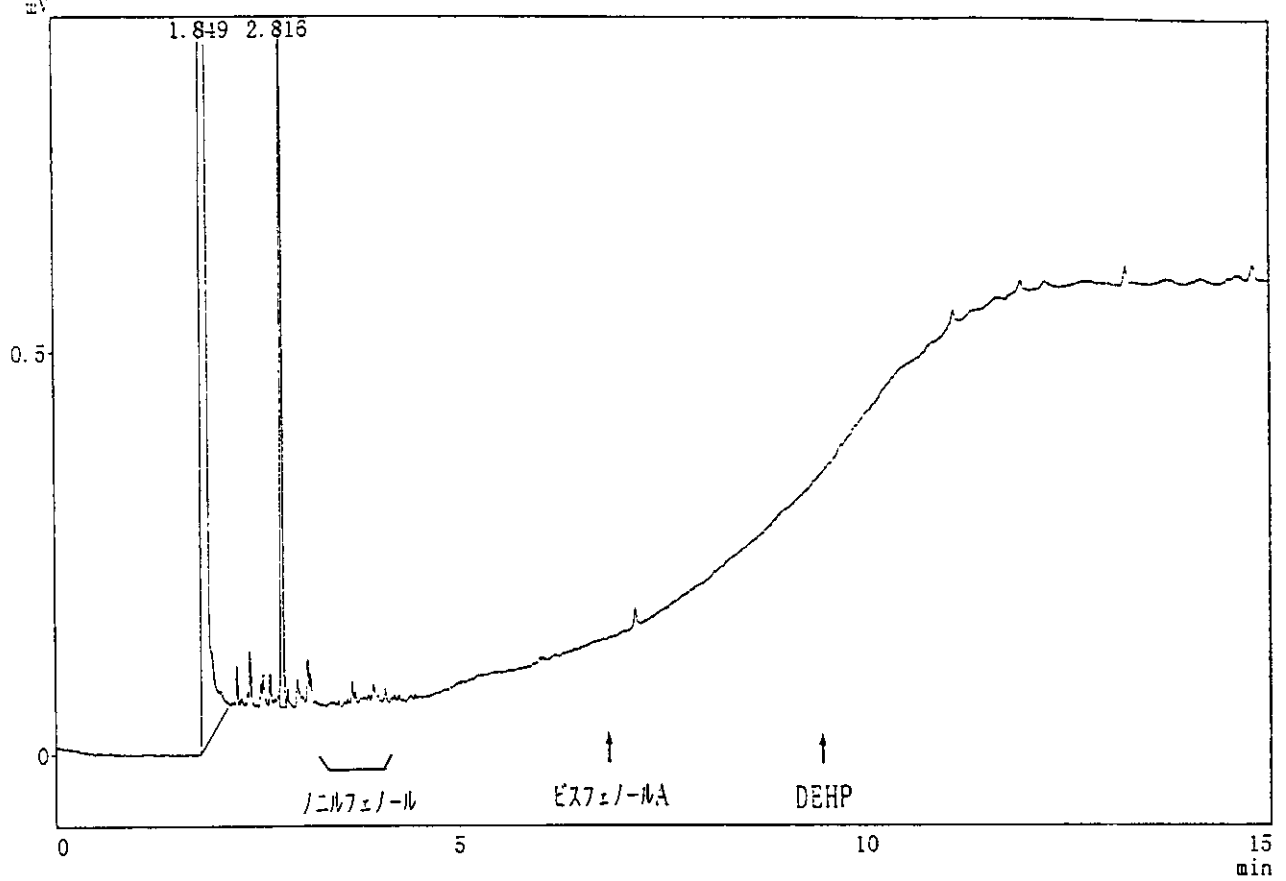


*** ヒートレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MR	IDNO	CONC	NAME
1	1.848	98357001	65339267	S		100.0000	
		98357001	65339267			100.0000	

Fig.5 真空採血用器具 採血針プラスチック部品

レポート ファイル名:981120.C05

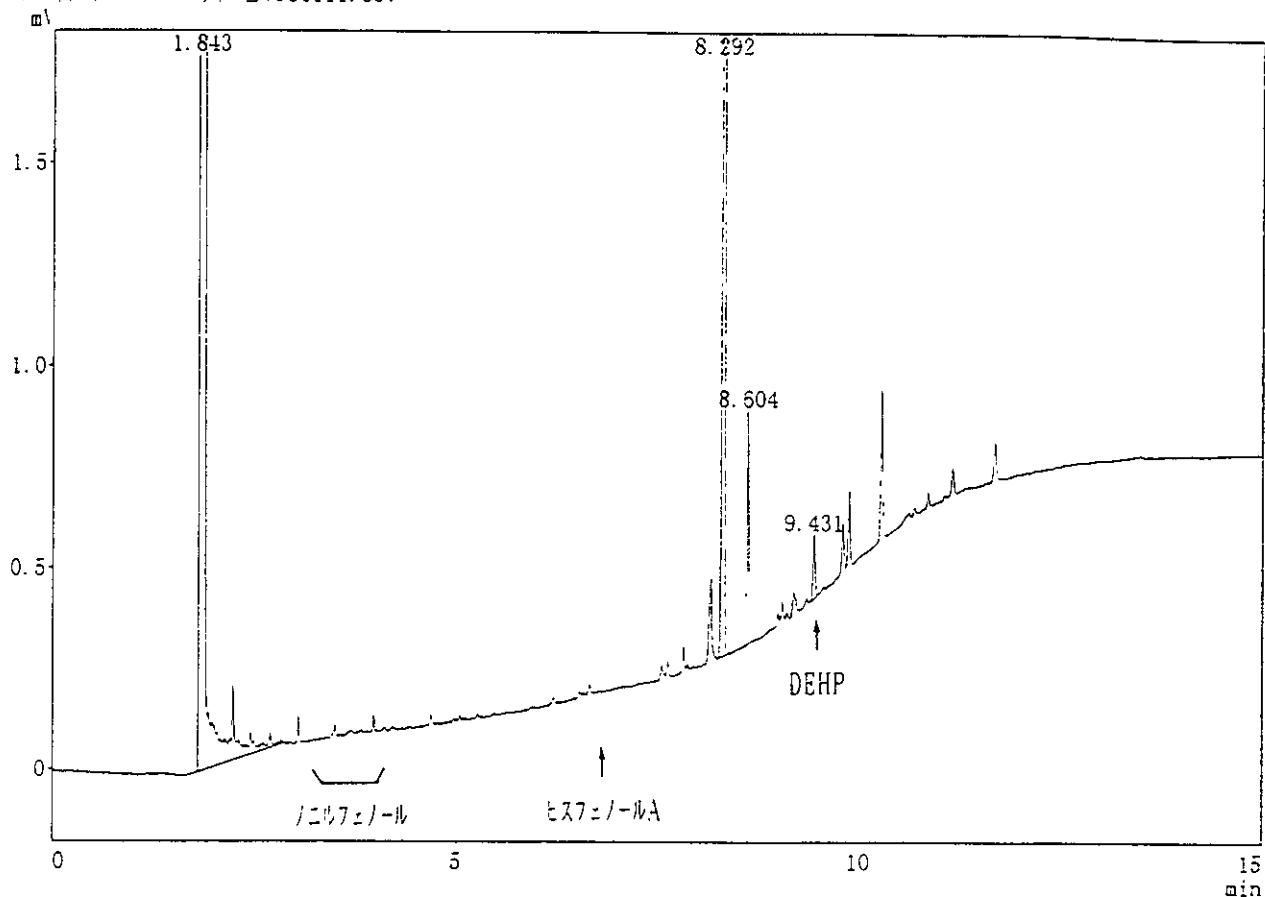


レポート

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.849	96985544	64588717	S		99.9962	
2	2.816	3722	3130	V		0.0038	
		96989265	64591847			100.0000	

Fig.6 真空採血用器具 採血針ゴム製部品

※※ カロトグラム ※※ ファイル名: 9S1111.C07



※※ ヒートマップ ※※

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.843	94169567	63522510	S		99.9866	
2	8.292	11575	6952	V		0.0123	
3	8.604	1000	591			0.0011	
	9.431	306	159				

 94182448 63530223 100.0000

Fig.7 さい帯血採取用器具 注射筒本体