

平成 12 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

生活環境中内分泌かく乱化学物質の分析精度の向上とヒト暴露に関する研究及び生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学
分担研究者 畑山善行 長野県衛生公害研究所

研究要旨

内分泌かく乱物質のヒト暴露調査に関する基礎的研究：内分泌かく乱物質のヒト暴露量調査に関して、ヒト尿中の残存量に関する分析法の構築を目的に実施した。本検討に関する内分泌かく乱物質として、ビスフェノールA、ノニルフェノール及びオクチルフェノールをターゲット物質とし、グルクロン酸抱合体を含めた分析法を NCI-GC/MS を用いて構築した。

内分泌かく乱物質の微量分析法及び分析精度向上の基礎的検討：内分泌かく乱物質の測定は主に GC/MS が使用されている。しかし、その極微量分析にはブランクや再現性等の面で問題点が多い。そこで、極微量分析時の注意点、ブランク等の扱い方について検討した。また、フェノール類等の微極性物質については LC/MS による検討を行い、LC/MS の有効性を実証した。

生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解析及び生体影響評価：酵母 Two-Hybrid 法を用いてビスフェノールA誘導体（ビスフェノールAジグリシルエーテル類）、臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエーテル、ベンゾフェノン誘導体等の S-9 代謝産物のエストロゲン様作用を評価した。また、甲状腺ホルモン受容体を導入した酵母を用いた酵母 Two-Hybrid 法によって、フタル酸エステル類及びアルキルフェノールをはじめとする生活関連製品に由来する化学物質の甲状腺ホルモン様作用を評価した。

研究協力者

内分泌かく乱物質のヒト暴露量調査に関する基礎的検討（NCI-GC/MS による尿中のオクチルフェノール、ノニルフェノール及び BPA の定量）月岡 忠、寺澤潤一（長野県衛生公害研究所）、John Brock, Sam Graiser（CDC, USA）

内分泌かく乱物質の微量分析法及び分析精度向上の基礎的検討（GC/MS 分析のノウハウ（ブランクの扱いなど）及び LC/MS 分析（フェノール類など）について）松岡宏和、佐久井徳広、滝埜昌彦（横川アナリティカルシステム株式会社）

生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質に

関する作用機構の解明及び生体影響評価（酵母 Two-Hybrid 法を用いた高分子素材等の生活関連由来化学物質の内分泌かく乱作用の評価）織田 肇、堀伸二郎、高取 聡（大阪府公衆衛生研究所）

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質のヒト暴露調査に関する基礎的検討：採取が簡単で採取の際に汚染の最も少ないと考えられる尿を用いて内分泌かく乱物質（ノニルフェノール、オクチルフェノール及び BPA）の暴露量調査を実施するため、これら物質のグルクロン酸抱合体も含めた

NCI-GC/MS による微量分析法の構築を行う。

内分泌かく乱物質の微量分析及び分析精度向上の基礎的検討：内分泌かく乱物質の測定では極微量分析が要求される。そこで、フタル酸エステル類、ビスフェノールAについて GC/MS 分析する際の、注意点やブランク等の扱いについて検討する。また、極性物質を低濃度まで精度良く測定する方法を確立するため、LC/MS によるフェノール類の分析法について検討する。

生活製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価：エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体又は甲状腺ホルモン受容体を各々導入した酵母を用いて Two-Hybrid 法を用いて化学物質及びその代謝物について内分泌かく乱作用を多面的に評価する。

B. 研究方法

内分泌かく乱化学物質のヒト暴露調査に関する基礎的検討：尿中のフェノール類は直接分析すると感度面で劣るため、PFB 化し最も高感度が期待される NCI 法による分析方法を検討した。また、生体内にとりこまれた物質は体内で代謝されてグルクロン酸抱合体等に変化していると考えられたため、分析操作に酵素分解も加え、固相抽出、PFB 化、クリンアップ、NCI 測定について検討した。

内分泌かく乱物質の微量分析及び分析精度向上の基礎的検討：フタル酸エステル類のブランク値を低減するため、GC/MS 装置ブランク、注入ブランク、溶媒ブランク、操作ブランク等について検討した。また、ビスフェノールAのブランクを低減化するため、吸着、TMS 化、分析カラムについて検討した。更に、アルキルフェノールの高感度分析法を構築するため、LC/MS を用いて ESI 法と APCI 法で測定し、最適な測定方法、測定条件を検討した。

生活製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価：酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の

検出方法は ER-GAL4DBD 及び TIFII-GAL4AD を発現させた酵母を常法により前培養した。これに DMSO で溶解した被検化学物質を添加し、常法によりインキュベーションを行い、冷 Z-buffer で洗浄し、OD₅₉₅ を測定し、ザイモリエースを加え、37℃で 15 分間インキュベーションを行った。これに、o-ニトロフェニルガラクトピラノイド溶液を加え、30℃で 30 分間インキュベーションを行い、生成したβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。また、甲状腺ホルモン様作用の検出は TR-GAL4DBD 及び TIFII-GAL4DNA を発現させた酵母を前培養し、OD₅₉₅=0.01 前後に SD 培地で希釈し、酵母懸濁液とした。これに DMSO に溶解した被検化学物質を添加し、30℃で 24 時間インキュベーションを行い前述の方法でβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

C. 研究結果及び考察

内分泌かく乱化学物質のヒト暴露調査に関する基礎的検討：尿中のノニルフェノール、オクチルフェノール及び BPA を酵素分解し、固相抽出後、PFB 化し、フロリジルカラムによるクリンアップを行い、NCI-GC/MS での同時分析法を構築した。本法は高感度で選択性に優れている。BPA は体内に取り込まれるとグルクロン酸抱合体に代謝されて排出されるが、ノニルフェノールとオクチルフェノールはグルクロン酸抱合体として排出されているかどうか確認出来なかった。また、本法は、クロロフェノール類の同時定量も可能であり、尿中のフェノール類の濃度測定を行うことにより、日本人の平均的な暴露量を推定することも可能である。

内分泌かく乱物質の微量分析及び分析精度向上の基礎的検討：GC 分析におけるフタル酸エステル類のブランク低減化について検討した。その結果、ブランクの発生源はスプリットベントライン、セプタム、ライナー、ゴールドシール等からであった。ブランクの低減対策として、スプリットベントラインの場合は大量のキャリ

アガスでパージする、ゴールドシールの交換、セプタムは使用前に必ず 320 °C で焼きだして使用し、固体の試薬は焼いてもなかなか低減できないので添加量を減らす等の対策が考えられた。ビスフェノール A については反応試薬 (BSTFA) に 0.1 ~ 0.2ppb 含まれているため、ゼロにすることは不可能であったが、ガラスライナーの交換、カラム先端を切る、エイジングを十分に行う事などで低減化がある程度可能だった。BPA 及びアルキルフェノール類の LC/MS による測定は ESI 法よりも APCI 法が高感度であった。LC/MS 法では全てのアルキルフェノール及び BPA が 1ppb まで測定可能であった。

生活製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価: BADGE, BADGE · 2HCl, BADGE · 2H₂O, スチレントリマー及びその異性体は S-9mix による代謝過程の有無によらず、エストロゲン作用は認められなかった。しかし、ピフェニル、4-臭素化ピフェニル、2,4,5-三臭素化ピフェニル、2,2',4',5',5'-五臭素化ピフェニル、ジフェニルエーテル、4-臭素化ジフェニルエーテル、ベンゾフェノン誘導体のオキシベンゾン及び、サリチル酸 4-t-ブチルフェノールエステルの S-9mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。また、臭素化ピフェニル又は臭素化ジフェニルエーテルの 4,4'-臭素化体の S-9mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められないことから、4 位に水酸化を受ける事が作用を發揮する上で重要であると考えられた。

甲状腺ホルモンを導入した酵母 Two-Hybrid 法のインキュベーション時間を 4 時間から 24 時間に延長する事により T3 に対する EC₅₀ は、 $4.0 \times 10^{-8} \text{M}$ から $2.1 \times 10^{-8} \text{M}$ になった。フェノール残基を有するアルキルフェノールに重点を置いて甲状腺ホルモン様作用を評価した結果、o-イソプロピルフェノール及び o-t-ブチルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められた。一方、p-及び m-アルキルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められなかったことから、o-

位にアルキル基を有することが作用を示す条件の一つと考えられた。また、o-アルキルフェノールのアルキル鎖長を変えて検討したところ、イソプロピル基と t-ブチル基のみに作用が認められた。ビスフェノール A 誘導体、フタル酸エステル類、アジピン酸エステル、パラベン類及びベンゼン誘導体に甲状腺ホルモン様作用は認められなかった。

D. 結論

内分泌かく乱化学物質のヒト暴露調査に関する基礎的検討: オクチルフェノール、ノニルフェノール及び BPA の暴露量を尿から推定する目的で、尿中のこれら物質の極微量分析法を構築した。この方法で尿試料を分析した結果、ノニルフェノールと BPA が検出された。

内分泌かく乱物質の微量分析及び分析精度向上の基礎的検討: 極微量分析時のブランク値の低減化について検討した。また、従来の GC/MS 法に加え、LC/MS によるフェノール類の極微量分析についても検討した。

生活製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価: 酵母 Two-Hybrid 法を用いてビスフェノール A 誘導体、臭素化ピフェニル等のエストロゲン様作用を調査した。また、甲状腺ホルモン受容体を導入した酵母を用いた酵母 Two-Hybrid 法によって、フタル酸エステル類、アルキルフェノール類等の甲状腺ホルモン様作用を評価した。

E. 研究発表

学会発表

1. SPME によるプラスチック製品からの揮発性物質の分析: 月岡 忠、寺澤 潤一、吉田徹也、佐藤守俊、藤島 弘 道、第 9 回日本環境化学討論会 (2000 年 6 月、札幌)
2. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた代謝活性 化エストロゲン様作用物質の検出: 高取聡、北川陽子、織田 肇、西川淳 一、西原力、中澤裕之、堀 伸二郎、日本食品衛生学

会第 79 回学術講演会 (2000 年 5 月、東京)

3. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた

proestrogen 候補物質の検出：高取 聡、北川
陽子、織田 肇、西川淳一、西原 力、
中澤裕之、堀 伸二郎、環境 ホルモン学会
第 3 回研究発表会 (2000 年 12 月、横浜)

論文発表

1. Detection of proestrogenic activities of
chemicals using a Yeast Two-Hybrid Assay:
Takatori S., Kitagawa Y., Nishikawa J.,
Nishihara T., Oda H., Nakazawa H., Hori S.,
Toxicol. Appl. Pharmacol. (投稿 中)

F. 知的所有権の取得状況

なし

平成 12 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

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び
動態研究

NCI-GC/MSによる尿中のオクチルフェノール、ノニルフェノール及び
BPAの定量

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学

分担研究者 畑山善行 長野県衛生公害研究所

月岡 忠 長野県衛生公害研究所

寺澤潤一 長野県衛生公害研究所

研究要旨

内分泌かく乱化学物質は、多くの生活用品に幅広く使用されており、各高分子素材ごとに異なった暴露形態を示すことから暴露経路を把握するとともに、生体におけるターゲットとした化学物質におけるトータルな暴露量の把握が重要となっている。そこで、内分泌かく乱作用が確認されているオクチルフェノール、ノニルフェノール及びビスフェノールA（BPA）の尿中の濃度を測定し尿からの排泄量を把握することを目的とし、尿中の上記フェノール類を酵素分解した後、ODSカラムで抽出、PFB化、フロリジルカラムによるクリンアップ後、NCI-GC/MSで定量する分法を開発した。

A. 研究目的

BPA、ノニルフェノール等はプラスチック素材等に使用され、幅広い経路から生体内に取り込まれている。特にBPAは、缶飲料等に含まれていることが知られているが、近年はBPAの溶出防止対策をした製品が普及するなど対策が進んでいるといわれている。しかしながら、ヒトが一日あたりどの程度のBPAを摂取しているかなど、基本的に不明な要素が多く、血液中濃度もいろいろな測定例が報告されるがはっきりした測定例が示されていない

の

のが現状である。BPAについては生体内での代謝が不明であったことから、代謝物も含めた分析法の開発を行った。

B. 研究方法

B・1 試薬・試液

研究には次の試薬を用いた。

水酸化ナトリウム (Mallinckrodt)、テトラブチルアンモニウムヒドロゲンサルフェート (Kodak)、ジクロロメタン (Caledon)、酢酸エチル (Caledon)、2,2,2-trimethylpentane (Caledon)、Methanol (Caledon)、ペンタフルオロ

ベンジルブロマイド (スペルコ)、*ter*-
オクチルフェノール (アルドリッチ)、
4-オクチルフェノール (アルドリッチ)、
ノニルフェノール (アルドリッチ)、
ビスフェノールA (アルドリッチ)、13C-
ノニルフェノール (ケンブリッジアイ
ソトープ)、13C-BPA (ケンブリッジ
アイソトープ)、C18カートリッジ
(J.T.Baker)、フロリジルカートリッジ
(J.T.Baker)、C-カートリッジ
(Superuco)、精製水 (Caledon)、酢
酸アンモニウム (シグマ特級)、 β -
glucuronidase (E.coli K12)、

B. 2 装置

超音波洗浄器、GC/MS

B. 3 操作方法

試料 2 ml を 15 ml の試験管に採り、こ
れにサロゲート化合物として 13C-ノ
ニルフェノール 0.1 ppm 溶液 20 μ l、
13C-BPA 0.076 ppm 20 μ l を加え、1 %
 β -グルクロニダーゼ含有酢酸アンモニ
ウム溶液 200 μ l を加え、37°C で 90 分間
酵素分解を行い、これに 32% 蟻酸 1 ml
を加え、超音波洗浄器で 5 分間、照射
する。これを、予めメタノール 10 ml、
精製水 5 ml で洗浄した C18 カラムに負
荷する。10% メタノール溶液 5 ml で洗浄
後、メタノール 3 ml で 15 ml の遠心管に
溶出させ、0.2 M 水酸化ナトリウム溶液
0.5 ml を加え、窒素ガスを吹き付けて、
0.2 ml 程度まで濃縮する。これに、ジク
ロロメタン 2 ml、0.2 M 水酸化ナトリウ
ム溶液 0.5 ml、0.1 M テトラブチルアン
モニウムヒドロゲンサルフェート溶
液 0.5 ml、PFBBr 20 μ l を加え、アル

ミ栓をして、超音波洗浄器で 20 分間超
音波を照射する。照射後、3000 回転/分
で 5 分間遠心分離し、下層をピペット
で 10 ml の遠心分離管に採り、窒素ガス
を吹き付けてジクロロメタンを蒸発さ
せる。残渣を 0.5 ml のイソオクタンに溶
解し、予めイソオクタン 10 ml で洗浄し
たフロリジルカートリッジに負荷し、
最初イソオクタン 5 ml で洗浄した後、
1% 酢酸エチル含有イソオクタン 10 ml
で溶出させる (オクチルフェノール、
ノニルフェノール)。更に、10% 酢酸エ
チル含有イソオクタン 5 ml で溶出させ
る (BPA)。これを窒素ガスで濃縮乾固
し、0.5 ml のイソオクタンに溶解しこれ
を GC/MS で測定する。

B. 4 GC/MS 条件

GC : Agilent 6890

カラム : HP-5MS 30m \times 0.25mm \times 0.25
 μ m

カラム温度 : 60°C - 15°C/min - 215°C
(7min) - 20°C/min - 300°C (5min)

注入口温度 : 245°C

MS : Agilent 5973

反応ガス : メタン

イオン源温度 : 230°C

モニターイオン : m/z = 205 (オクチルフェ
ノール), 219 (ノニルフェノール),
225 (13C ノニルフェノール),
407 (BPA), 419 (13C BPA)

C. 結果及び考察

C. 1 グルクロン酸抱合体の分解に ついて

人体に取り込まれた難溶性化合物は

代謝の過程で、水溶性の高いグルクロン酸抱合体に変化して、体外へ排泄される。オクチルフェノール、ノニルフェノールは水溶性が高いため、そのまま排泄されると考えられたが、BPAは水に難溶であるため、グルクロン酸抱合体として尿中に排泄されている可能性が高いと考えられた。そこで、 β -グルクロニダーゼを用いて、その必要量と、反応時間等について検討した。図1は実際の尿に β -グルクロニダーゼを1~5 μ l添加し、37°Cで90分間酵素分解した時の、BPAの測定値を示した。4-オクチルフェノールはグルクロン酸抱合体になっていないため、酵素量を多くしても濃度が増加しなかった。しかし、*ter*-オクチルフェノールとノニルフェノールは酵素中に不純物として存在したため、酵素添加量と比例して増加した(図2)。BPAは尿2mlに対して、1 μ l添加する事により、ほぼ100%分解されると考えられた。本法では余裕を考慮して2 μ l添加する事にした。また、図3に分解時間の検討結果を示した。分解時間は60分程度でほぼ終了したが、90分間酵素分解することにした。

C. 2 C18による抽出、洗浄及び溶出

ODSカートリッジによるフェノール類の抽出は、一般にpH3.5以下にして抽出されている。本法では、尿中のタンパク質を変性させるため、32%蟻酸を1ml加えてあり、pHは3以下になっているため、pHについて検討する必要はなかった。尿中には様々な物質が存在す

るため、できるだけ目的物質以外を洗浄で除去し、誘導体化する必要がある。本法では、10%メタノール溶液を用いて洗浄を検討した結果、10mlを用いて洗浄しても、目的物質はほとんど溶出しなかった。溶出溶媒としては一般に用いられている、メタノールを用いて検討した結果、3mlを用いることによりほぼ100%溶出した。図4に溶出状況を示す。

C. 3 窒素ガスによる濃縮

メタノールによる溶出溶液はまだ蟻酸が残っているため、酸性を示し、窒素ガスを吹き付けることにより気散することが確認されたため、キーパーとして0.2M水酸化ナトリウム溶液0.5mlを加え、気散を押さえることにした。また、窒素ガスの吹きつけ圧力もできるだけ低くし5 PSI以下で、濃縮した。

C. 4 PFBBrによる反応

NCI-GC/MSで測定する場合にPFB化物として測定する方法が感度的に最も優れていると考えられたため、これを用いた誘導体化について検討した。ジョン・ブロックらの方法は回転円盤法を用いているが、この方法は栓からの漏れなどでデータが得られない場合があるため、超音波による方法を採用した。この方法でも20分間超音波を照射する事により、回転円盤法と同等の生成率が得られた。図5, 6, 7, 8にNCIマススペクトルを示す。NCIでは、フラグメントピークが少ないため、EIのようなフラグメントが生成されず、

確認フラグメントが得られにくい欠点がある。スペクトルから、定量用のフラグメントイオンにオクチルフェノールは $m/z=205$ 、ノニルフェノールは $m/z=219$ 、 ^{13}C ノニルフェノールは $m/z=225$ を用いることにし、BPAは $m/z=407$ 、 ^{13}C -BPAは $m/z=419$ を用いることにした。

C. 5 フロリジルカートリッジによるクリンアップ

NCI法は妨害ピークが少ないと言われているが、実際にはクリンアップを行わないと妨害成分とピークが重なり、誤差の原因となる。本法ではフロリジルとシリカゲルカートリッジを用いて検討した。その結果、フロリジルカートリッジのほうがクリンアップ効化が大きかったためこれを採用した。オクチルフェノールとノニルフェノールのPFB化物は比較的低極性の溶出溶媒で溶出したが、BPAのPFB化物は極性を高めないと溶出しなかったため、溶出溶媒を別々にした。即ち、オクチルフェノールとノニルフェノールはイソオクタン5mlで洗浄した後、1%酢酸エチル含有イソオクタン10mlで溶出させ、その後10%酢酸エチル含有イソオクタン5mlでBPAを溶出させることにした。オクチルフェノールとノニルフェノールは1%酢酸エチル含有イソオクタン10mlでほぼ100%溶出した。また、酢酸エチルの濃度を2%に上昇するとサンプルによっては ^{13}C -ノニルフェノールのピークと重なる物質が溶出したため、1%溶液を用いることにした。BAPの場合

も酢酸エチルの濃度を20%以上にすると妨害物質が溶出したため、10%溶液を採用した。

C. 6 検量線の作成と添加回収実験

検量線はそれぞれ0.05ppmから1ppmまでの標準溶液を段階的に作りこれを20 μ lづつ試験管に採り、サロゲート化合物を加えB・3の標準操作法の反応から操作し、サロゲート化合物との面積比から検量線を作成した($n=4$)。ノニルフェノールは混合物であるため、代表的な3本のピークを用いて検量線を作成した。図9に検量線例を示す。ノニルフェノールはブランク値が高く、簡単には低減できなかった。また検量線の直線範囲は、GC/MS注入濃度で2 μ g/mlまで直線を示した。回収率はサロゲート化合物を用いているため、多少低くても分析精度に影響しないが、尿への添加回収実験は80%程度は回収されていた。

C. 7 実試料への応用

本法の応用例として、実際の尿に応用した。その結果、*ter*-オクチルフェノール、4-オクチルフェノールは検出されなかったが、ノニルフェノール(N. D. \sim 74ppb)とBPA(0.2 \sim 3.8ppb)が検出された。図10に標準物質、図11に測定例を示す。

D. 結論

ヒトの尿試料中の内分泌かく乱化学物質を測定するため、グルクロン酸抱合体を酵素で分解し高感度で測定する

方法を開発した。

この方法を用いてヒトの尿試料を分析した結果、ノニルフェノールとBPAが検出された。

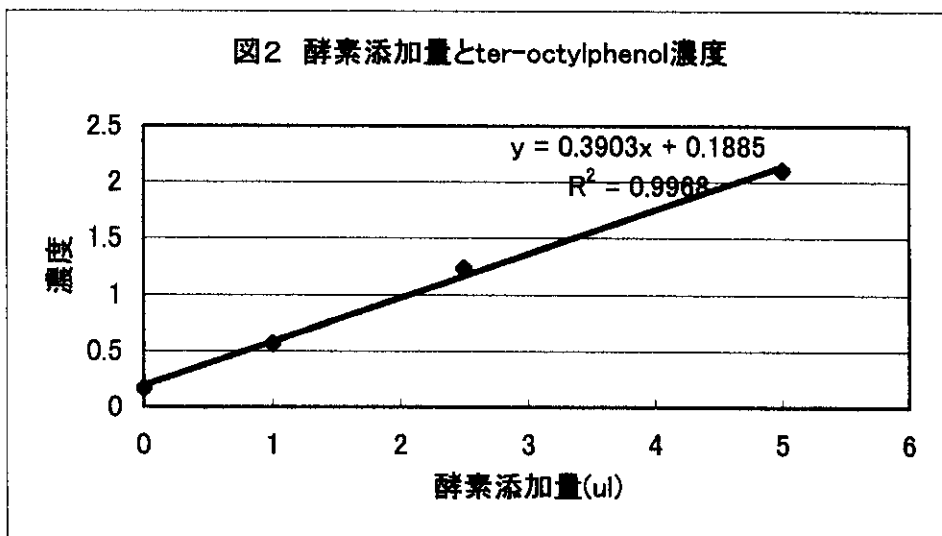
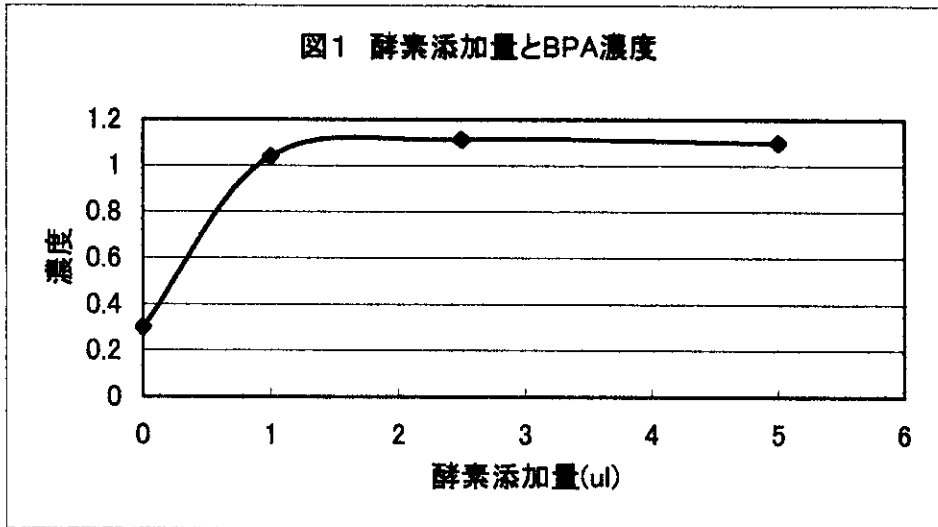
Tzing, J. of Chromatogr., 824, 79(1998)

14) Benjamin C. Blount et al., Anal. Chem., 72, 4127(2000)

参考文献

- 1) 化学工業日報社、13599の化学商品 (1999)
- 2) 林純薬工業(株)、生活関連化学物質データブック(1999年度)(1999)
- 3) EED国際ワークショップ横浜実行委員会、内分泌かく乱物質の生体影響に関する国際ワークショップ‘横浜99(2000)
- 4) 日本環境化学会、第24回日本環境化学会講演会資料集(1998)
- 5) P. Lee Ferguston et al., Anal. Chem., 2000(72), 4322(2000)
- 6) Lynn H. Pottenger et al., Toxicological Sciences, 54, 3(2000)
- 7) Euripides Stephanou, Chemosphere, 13(1), 43(1984)
- 8) Genki Matsumoto et al., Water Research, 11, 693(1977)
- 9) Nicolas Olea et al., Environmental Health Perspectives, 104(3), 298(1996)
- 10) Euripides Stephanou, Organic Mass Spectrometry, 19(10), 510(1984)
- 11) M. del Olmo et al., Analytical Chimica Acta, 346, 87(1997)
- 12) Kimmo Peltonen and Jari Pukkila, J. of Chromatogr., 439, 375(1988)
- 13) Wang-Hsien Ding and Shin-Haw

添加量ul	BPA	ter-octylph
0	0.300167	0.164481
1	1.040227	0.564195
2.5	1.113997	1.235599
5	1.098711	2.107332



分解時間の検討

時間(min)	BPA	ter-octylph	nonylph
0	0.275297	1.160771	8.40595
30	0.835666	1.730871	11.52818
60	1.916757	1.933728	13.42425
90	2.118886	1.72671	11.58249
120	2.073661	1.371878	10.34212

図3.1 分解時間とBPA濃度

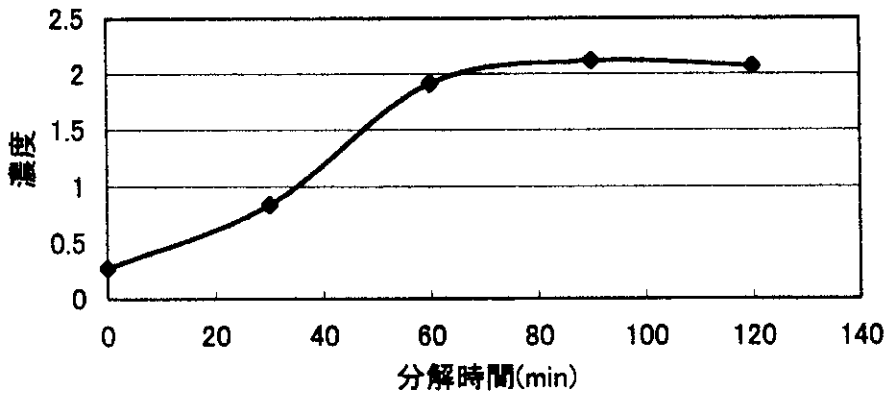


図3.2 分解時間とter-octylphenol濃度

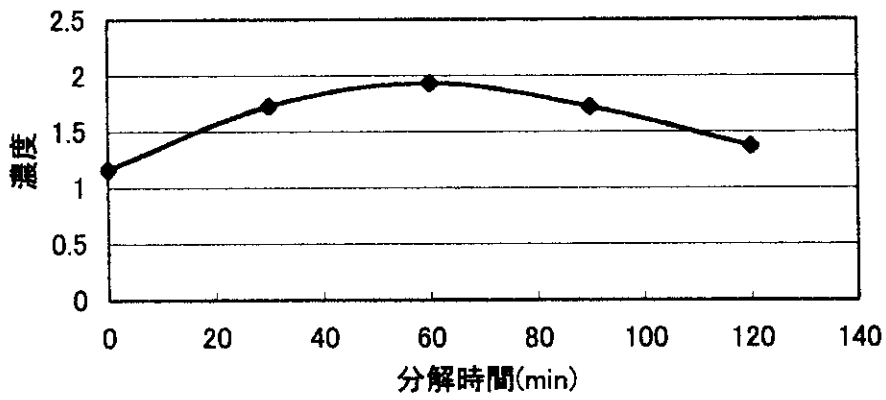


図3.3 分解時間とnonylphenol濃度

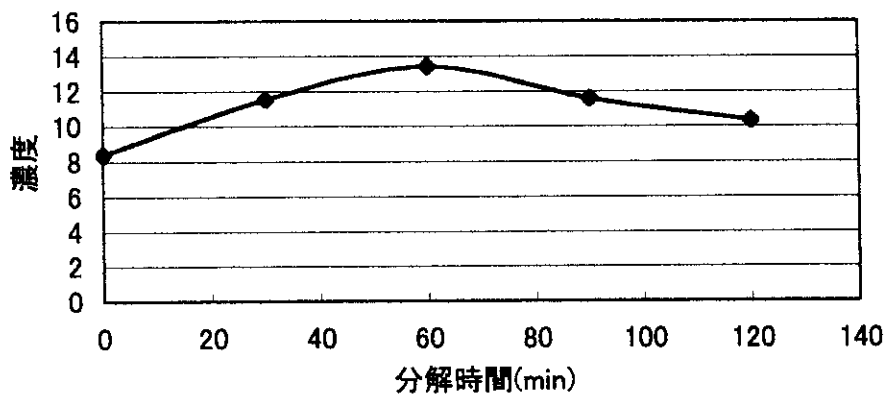
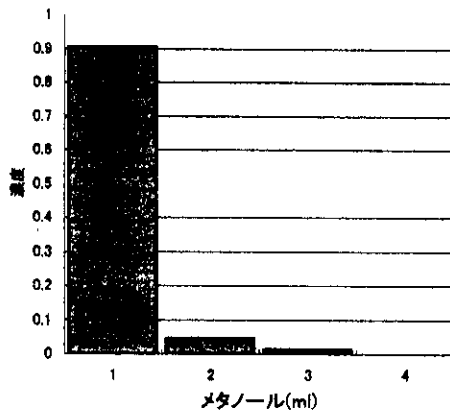
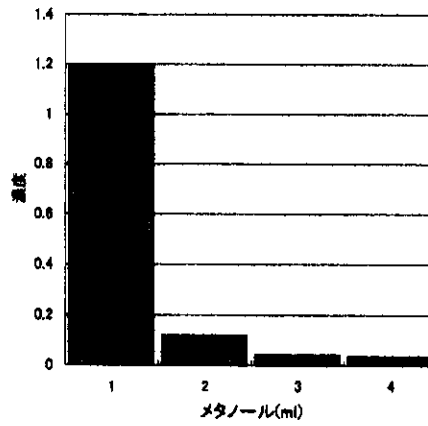


図4 ODSカラムからの溶出

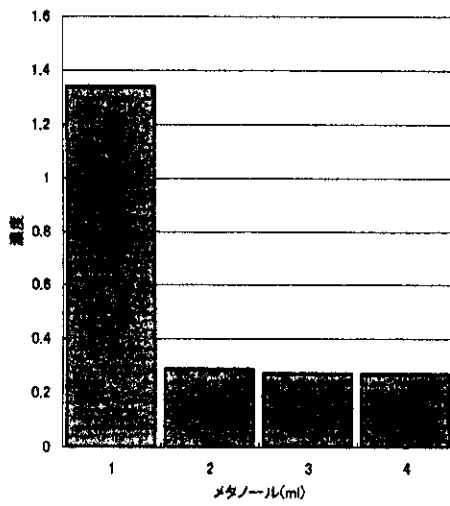
ter-octylphのメタノールによる溶出



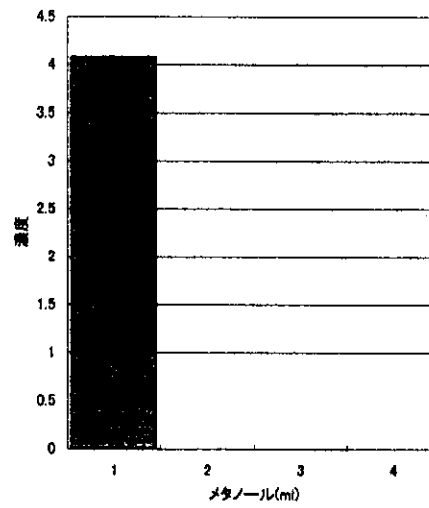
4-octylphのメタノールによる溶出

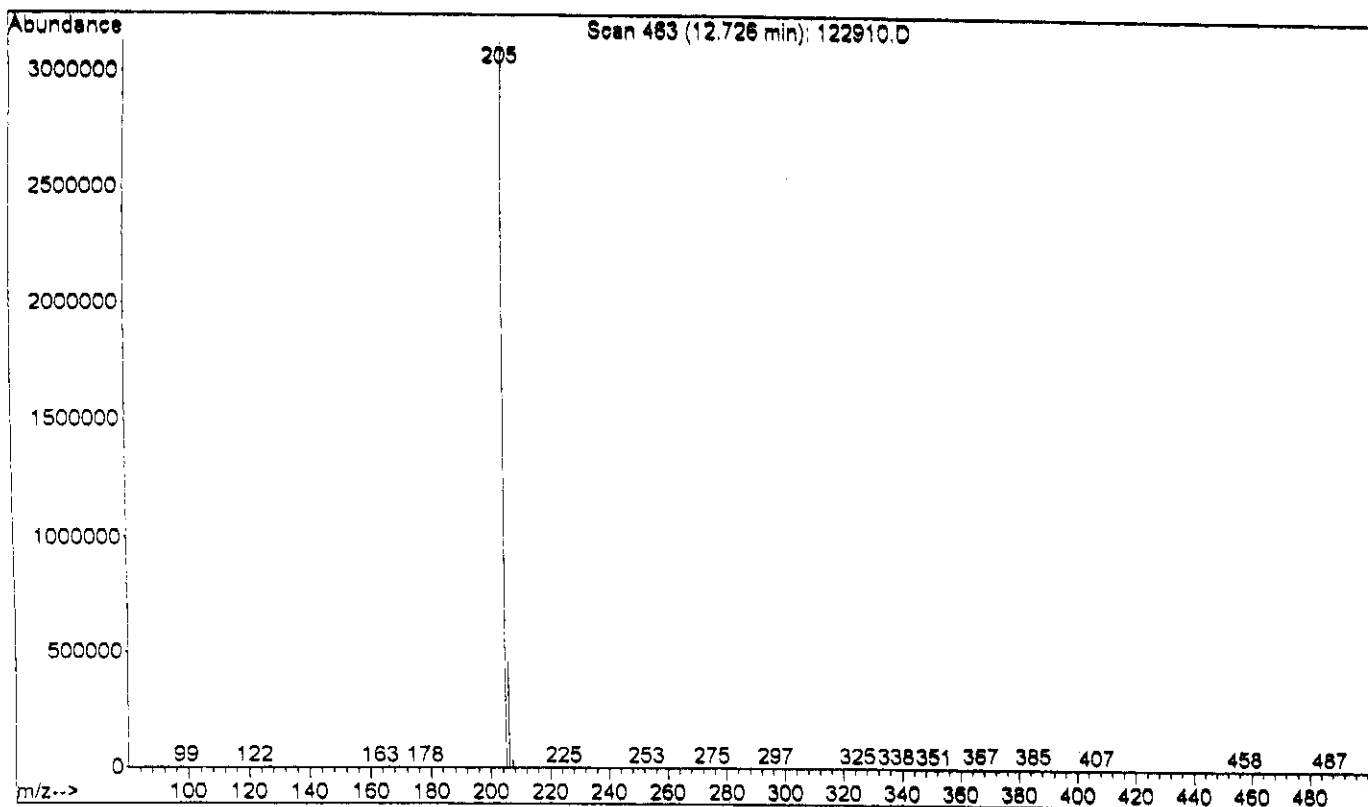


nonylphのメタノールによる溶出

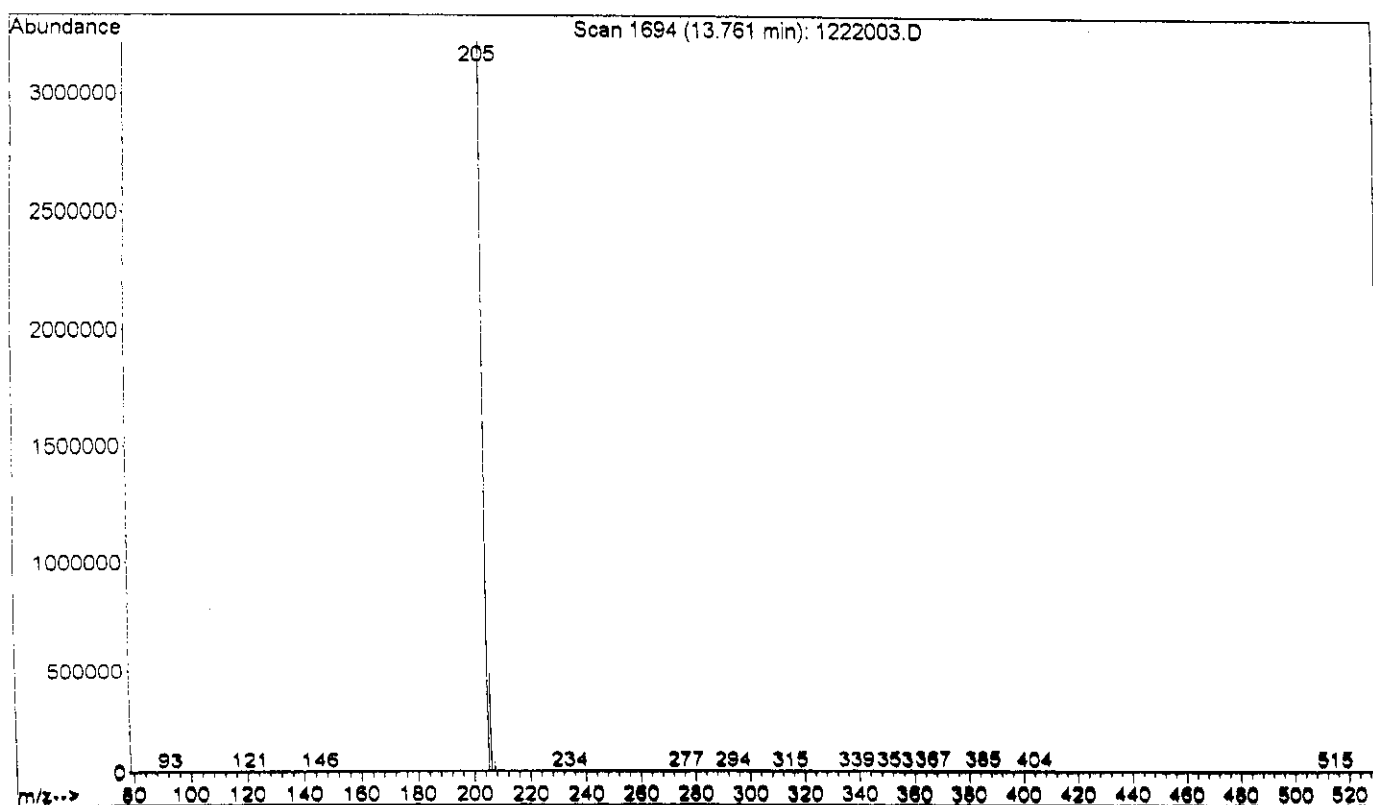


BPAのメタノールによる溶出

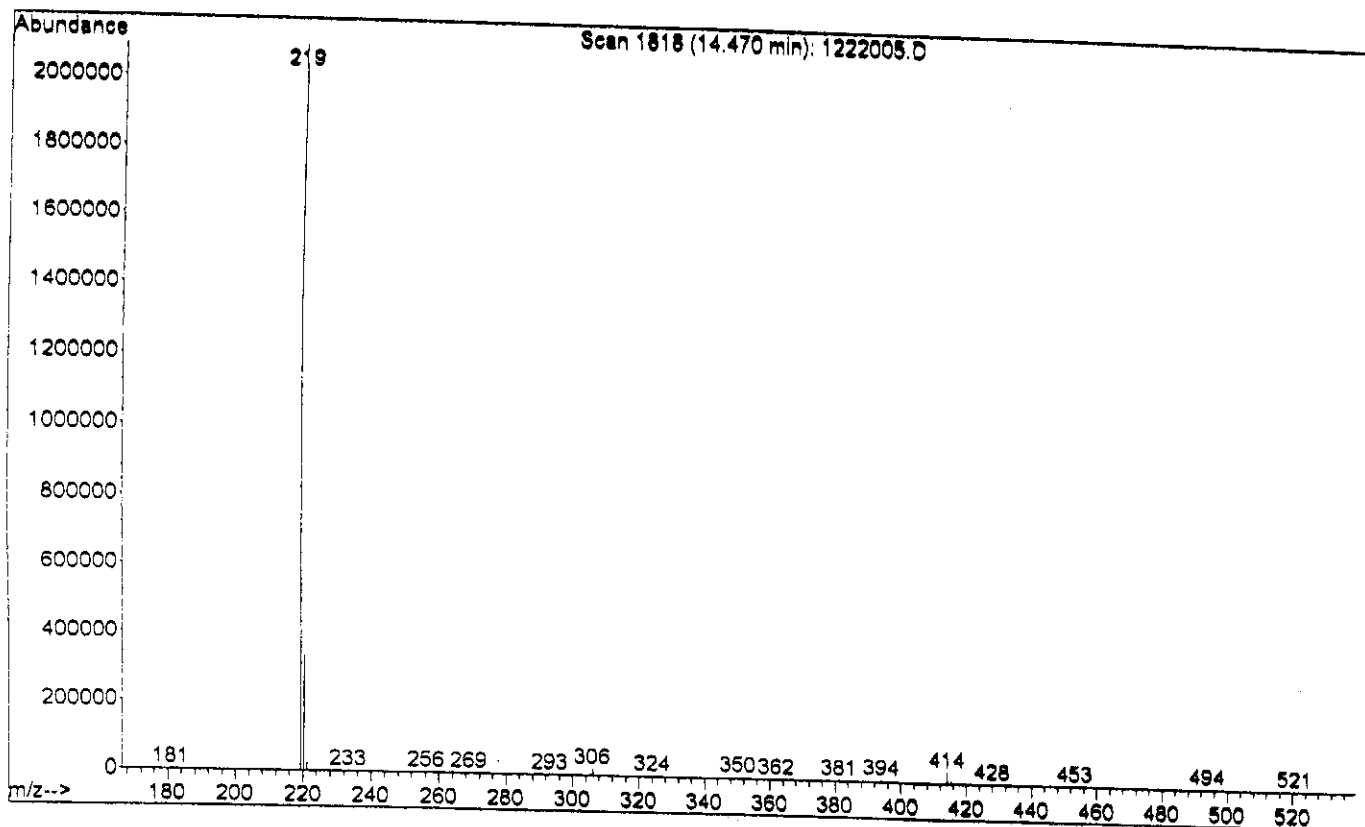




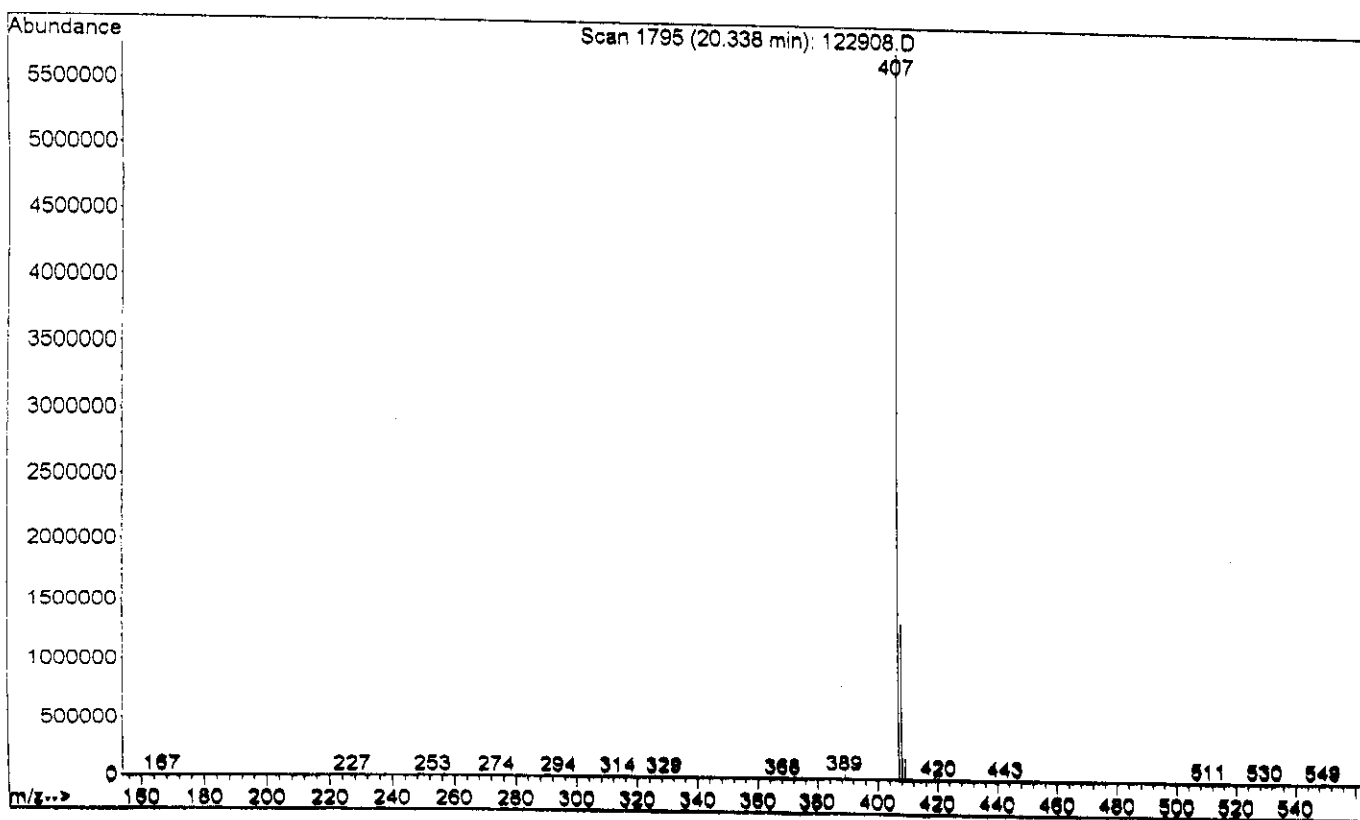
☒ 5 Ter-octylphenol-PFB 化物の NCI マススペクトル



☒ 6 4-octylphenol-BPA 化物の NCI マススペクトル



☒ 7 Nonylphenol-PFB 化物の NCI マススペクトル



☒ 8 BPA - PFB 化物の NCI マススペクトル

濃度	ter-octylph	4-octylph	nonylph	BPA
0	0	0	0.981938	0
0.5	0.862128	0.576279	1.447165	1.153939
1	1.70115	1.19212	1.807803	1.840967
2	3.355956	2.37199	2.510702	3.633603
5	8.330066	6.101173	4.481679	8.730503
10	16.3356	12.4891	7.794199	15.56365

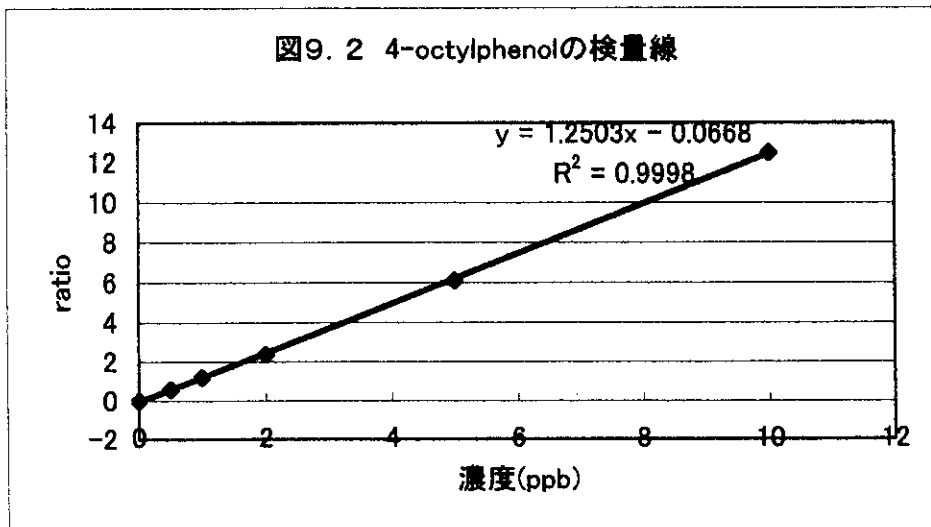
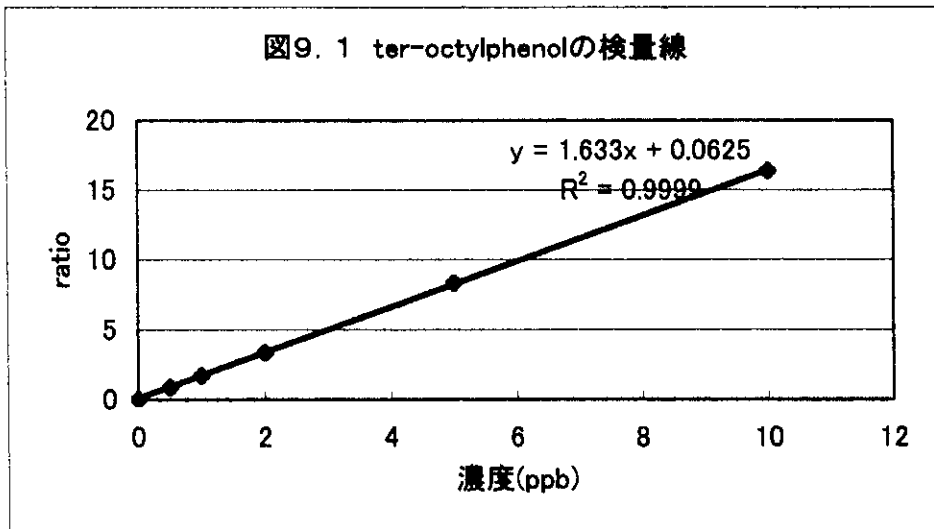


図9.3 nonylphenolの検量線

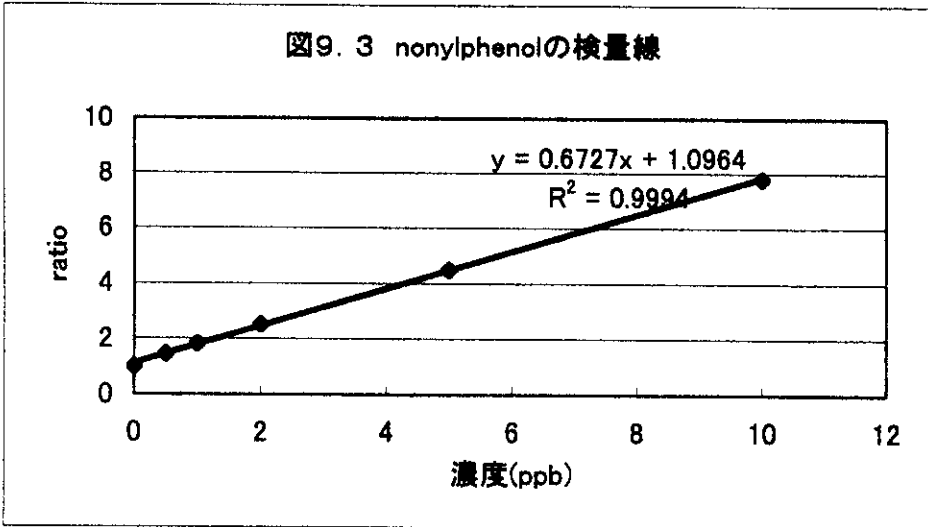
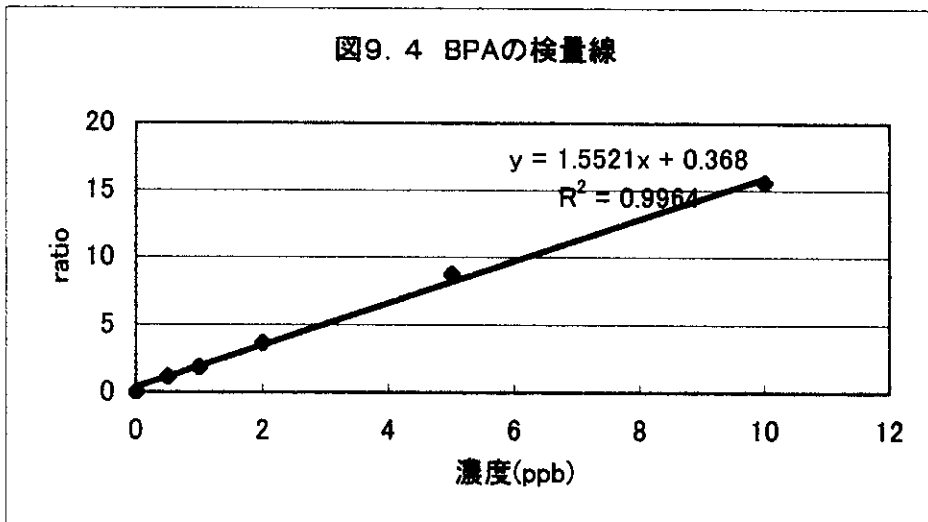


図9.4 BPAの検量線



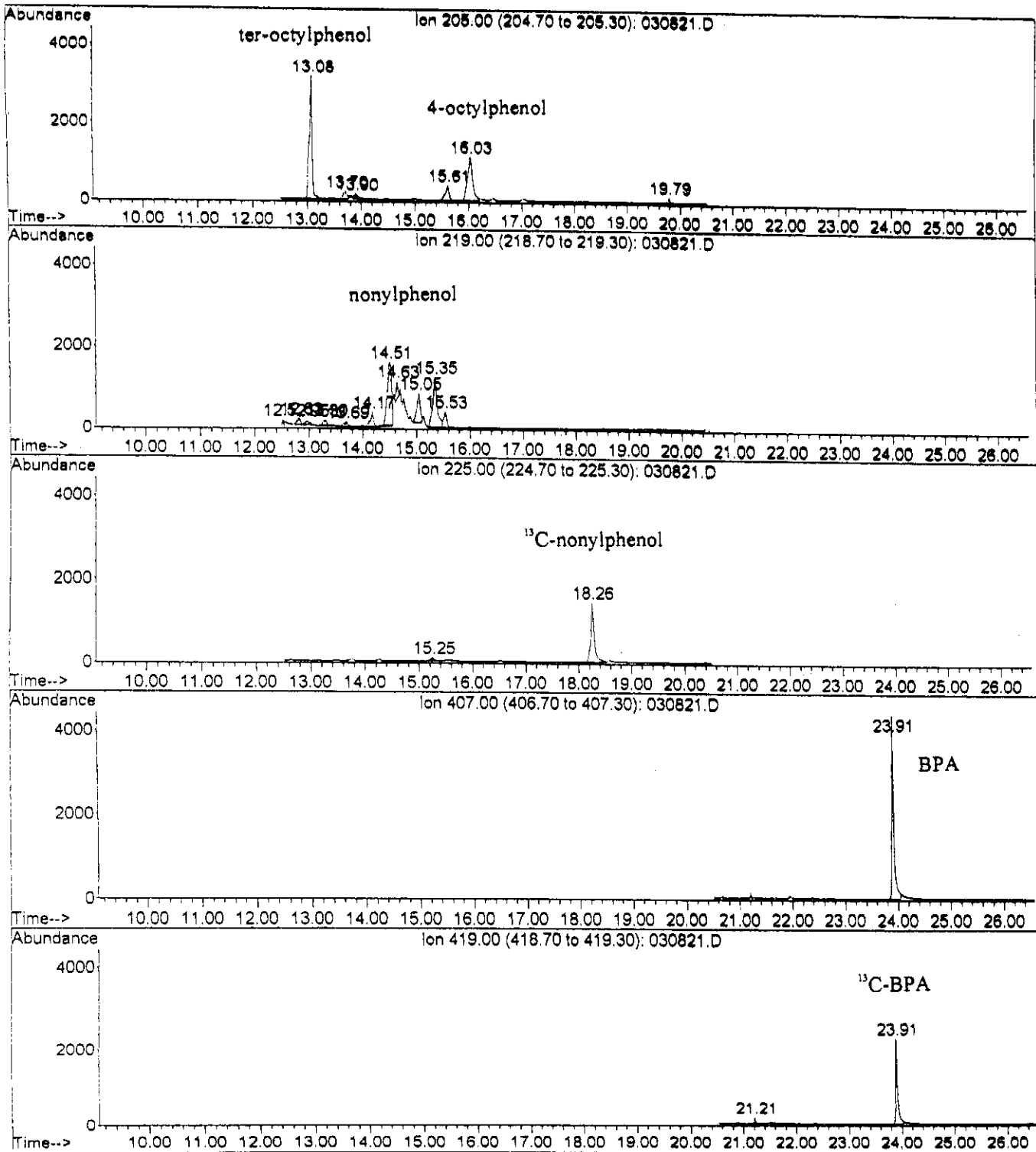


図 10 標準物質の SIM クロマトグラム

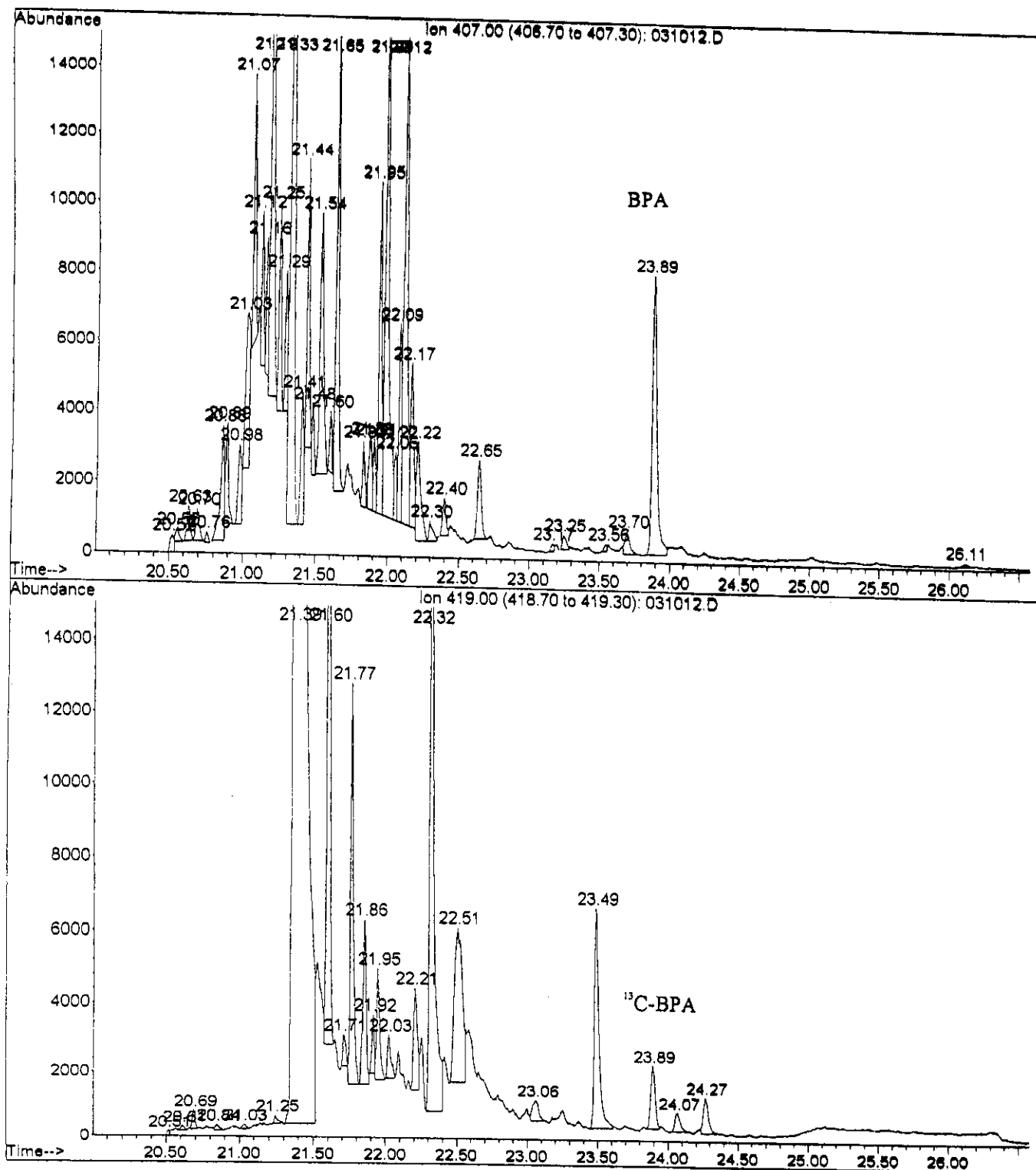


図 1 1 実試料の SIM クロマトグラム

平成 12 年度厚生科学研究補助金(生活安全総合研究事業)

分担研究報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解明
環境大気(室内、屋外)におけるフタル酸エステル等の実態調査

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学教授
研究協力者 今井俊介 奈良県衛生研究所所長
北田善三 奈良県衛生研究所大気課長
松浦洋文 奈良県衛生研究所副主幹
植田直隆 奈良県衛生研究所主任研究員
阿井敏通 奈良県衛生研究所主任研究員

研究要旨

住宅や自動車には内分泌かく乱作用を有する疑いのある化学物質や、有害大気汚染物質(HAPs)にリストアップされた化学物質が使用されており、その実態を把握する必要がある。そこで、プラスチック可塑剤であるフタル酸エステル 10 物質(うち HAPs 4 物質)及びアジピン酸エステル 1 物質、並びに揮発性有機化合物 40 物質(うち HAPs 28 物質)について、住宅 14 戸及び自動車 3 台における実態調査を行った。

A. 研究目的

環境庁の調査でリストアップされた内分泌かく乱作用を有する疑いのある化学物質¹⁾のうち、生産量が比較的多く、我々の生活環境で最もありふれたものとしてフタル酸エステル等のプラスチック可塑剤がある。さらに、我々の身の回りにはその他にも様々な化学物質が使用されており、環境基本法では平成 9 年 2 月に大気汚染に関する環境基準物質として新たにベンゼン、トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンが追加された。また、平成 9 年 2 月に大気汚染防止法の一部が改正され、継続的に摂取される場合には人の健康を損なうおそれのある大気汚染物質として、新たに HAPs が追加され、その中でも健康被害が生ずるおそれがある程度高い物質としてアクリロニトリル、塩化ビニルモノマー、クロロホルム等の揮発性有機化合物(VOCs)を含む 22 物質を優先取組物質に指定した。

このような様々な化学物質について、その実態を調査するために今年度は昨年度のプラス

チック可塑剤に加えて、ベンゼン等の VOCs について、室内、屋外大気中や特殊環境としての自動車内空気中の濃度測定を行った。

B. 研究方法

B・1 測定期間

平成 12 年 4 月～平成 12 年 12 月

B・2 測定対象

(1)住宅

奈良県内の新築住宅(竣工後 6 ヶ月未満のもの)10 戸、及び中古住宅(竣工後 6 ヶ月以上のもの)4 戸を対象とした。表 1 に様式、構造等を示した。

(2)自動車

測定対象とした自動車 3 台の仕様等を表 2 に示した。

B・3 試薬、試料

(1)プラスチック可塑剤

標準試薬:フタル酸エステル及び内標準物質 Fluoranthene d₁₀は Chem Servic 社製を、ジ-(2-エチルヘキシル)-アジピン酸は関東化学製を

用いた。また、関東化学製プラスチック可塑剤7種混合標準液も併用した。なお、調査の対象としたプラスチック可塑剤を表3に示した。

標準液:標準試薬をアセトンで溶解または希釈し、各標準物質が5,000ng/mlの濃度となるように調製し、使用時にさらに希釈した。

内部標準液:Fluoranthene d_{10} をアセトンで希釈して2,000ng/mlとし、検量線用の標準液及びGC/MS測定時の試料液には、それぞれ200ng/mlとなるように添加した。

溶媒:アセトン、ヘキサンは関東化学製のフタル酸エステル測定用を、ジクロロメタンは和光純薬残留農薬・PCB試験用ジクロロメタン1000を用いた。

捕集ろ紙:石英繊維ろ紙(QF)はWhatman社製QM-Aφ47mmを、炭素繊維ろ紙(CF)は東洋紡製KFペーパーP-175Aを用いた。各ろ紙はソックスレー抽出器を用い、アセトンで24時間洗浄した後、80℃で乾燥し、ガラス製デシケーター内に保管した。

(2) VOCs

標準ガス:Scott Specialty Gases社製VOC43成分混合標準ガス(100ppb)を用いた。

ゼロガス:大阪酸素工業製99.99999%窒素ガスを用いた。

内標準ガス:Aldrich社製Toluene d_8 を気化させて濃度が1700pptになるよう調製した。

B・4 装置及び器具

(1) プラスチック可塑剤

温度・湿度計:佐藤計量器製作所製SK-L200THを用いた。

超音波洗浄装置:BRANSON社製5210型を用いた。

遠心分離器:クボタ製KC-70型を用いた。

エバポレーター:Zymark社製Tarbo Bap LVを用いた。

GC/MS:Hewlett Packard社製HP-5890 II、Automass150を用いた。

ガラス器具:すべて使用前にアセトンで洗浄した。

(2) VOCs

濃縮装置:Entech社製7000型を用いた。

GC/MS:Hewlett Packard社製HP-5890/5972を用いた。

試料採取容器(キャニスター):Entech社製6l容シリコカンキャニスターを用いた。

B・5 測定方法

(1) プラスチック可塑剤

測定方法は昨年度と同様であり、分析フローを図1に示した。まず、テフロン製のろ紙ホルダーにQFとCFを重ねて装着し、10l/minで室内の場合は24時間、自動車の場合は日中6時間空気を捕集した(図2)。捕集ろ紙を鋏で約2mm幅に裁断し、10ml容ガラス製遠心分離管に入れ、ジクロロメタン10mlを正確に加え、超音波で20分間抽出した。次に、遠心分離器にかけ(3000rpm×10min)、上澄液5mlを正確に分取し、内部標準液を加え、エバポレーターを用いて窒素ガス吹き付けにより溶媒を留去した後、アセトン0.5mlまたは1.0mlに転溶し、GC/MS分析試料とした。

(2) VOCs

平成9年2月に環境庁が示した「有害大気汚染物質測定マニュアル」²⁾中の容器採取-GC/MS法を用いた(図3)。なお、空気の捕集は室内の場合24時間、自動車の場合車内温度が十分高くなる午後2時~3時の間に瞬間的に行った。試料前処理条件は次の通りである。

Trap1:Glass Beas Trap -150℃、Desorb 20℃

Trap2:Tenax Trap -10℃、Desorb 180℃

Forcuser:Trap -160℃、Desorb 100℃

B・6 GC/MS分析条件

(1) プラスチック可塑剤

Column:HP-5、30m×0.25mmi.d.、0.1μm film
Oven: 60℃(3min)→(20℃/min)→200℃→(8℃/min)→280℃→(15℃/min)→300℃ hold(0.1min)

Inject:2μl, split:5:1, purge on time:1.5min、280℃

Carrier:He、1.0ml/min

Interface Temp.:210℃