

図 1: 妊娠及び非妊娠期における異物代謝酵素活性の変動

C: コーンオイル投与群、3MC: 3-メチルコラントレン投与群、*; 非妊娠ラットに比べて、妊娠ラットで活性に有意に差のある群 $p < 0.05$

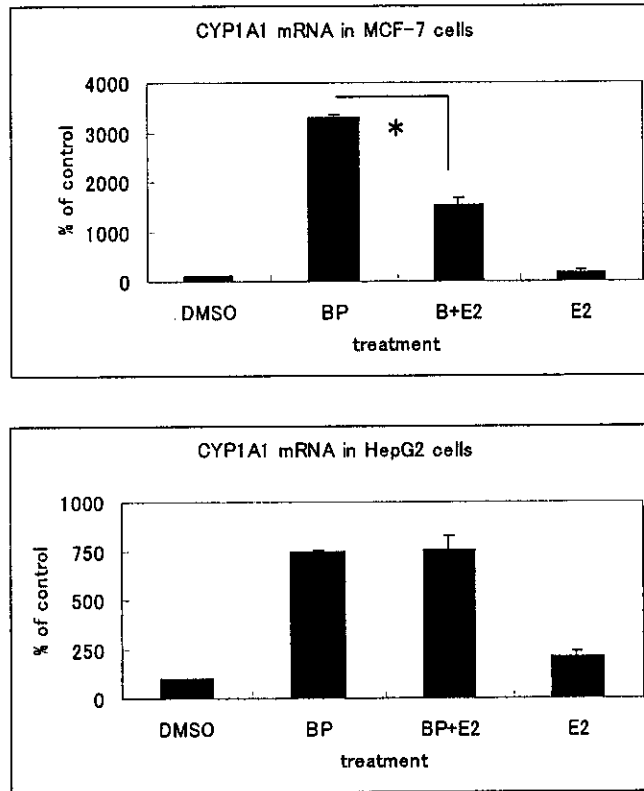


図 2: MCF-7 細胞及び HepG2 細胞において、 17β エストラジオールがベンゾピレンによる CYP1A1 mRNA 発現誘導に及ぼす影響 : HepG2 and MCF-7 cell were treated with B[a]P at the dose of 1 μ M and the expression levels of CYP1A1 mRNA were detected using Northern blotting analyses. * p<0.05

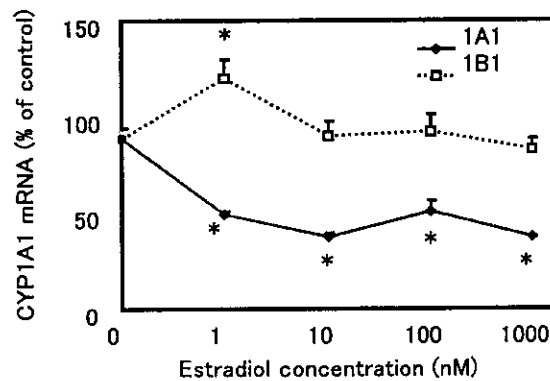


図 3: MCF-7 細胞において、 17β エストラジオールがベンゾピレンによる CYP1A1、CYP1A1 mRNA 発現誘導に及ぼす影響 : MCF-7 cell were treated with B[a]P at the dose of 1 μ M and the expression levels of CYP1 family were detected using Northern blotting analyses. * p<0.05

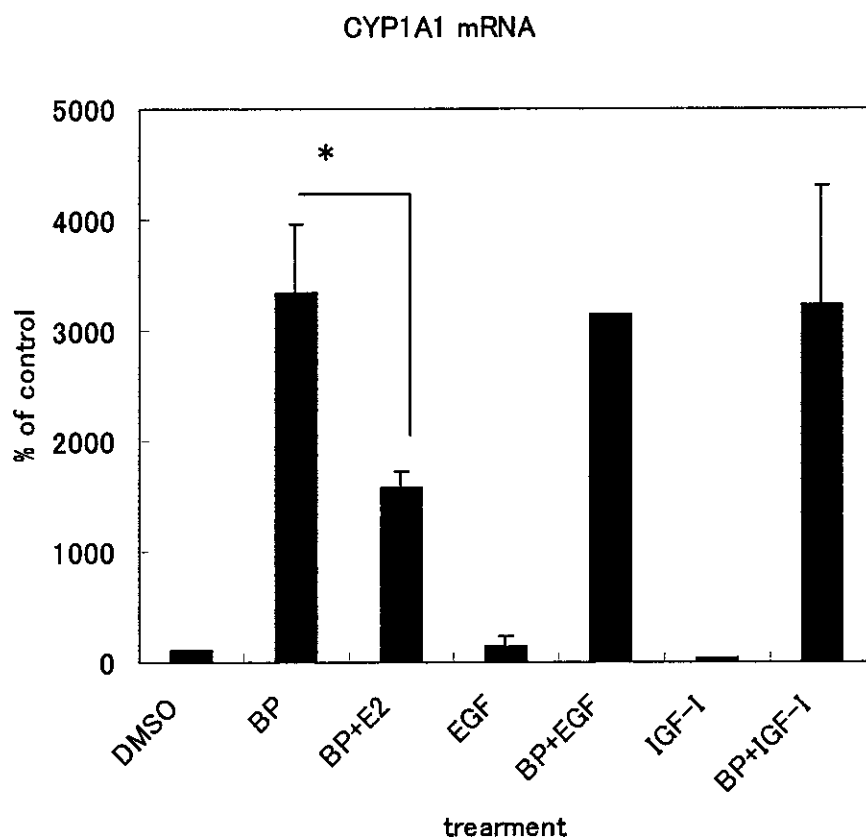


図 4: 成長因子がベンゾピレンによる CYP1A1 発現誘導に及ぼす影響: MCF-7 cell were treated with 1 μ M B[a]P, 100nM estradiol, 10ng/ml EGF and 10ng/ml IGF-I for 24 hours. The expression levels of CYP1A1 mRNA were detected using Northern blotting analyses. * p<0.05

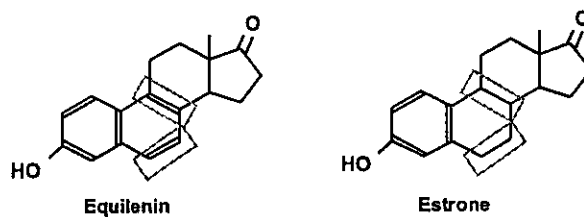


図 5: エクイレニン及びエストロンの構造

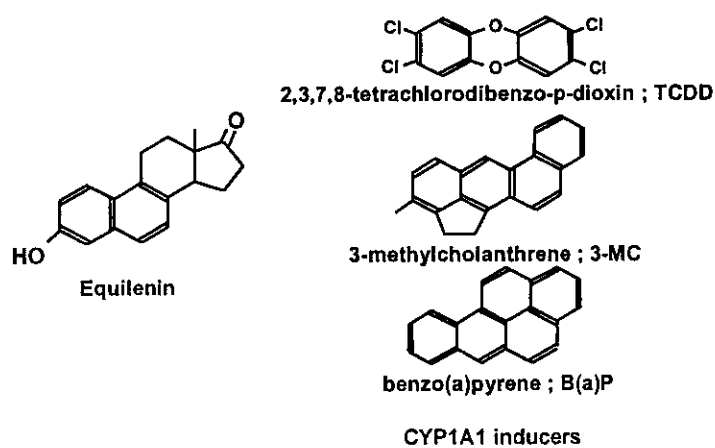


図 6: エクイレニン及び AhR リガンドの構造

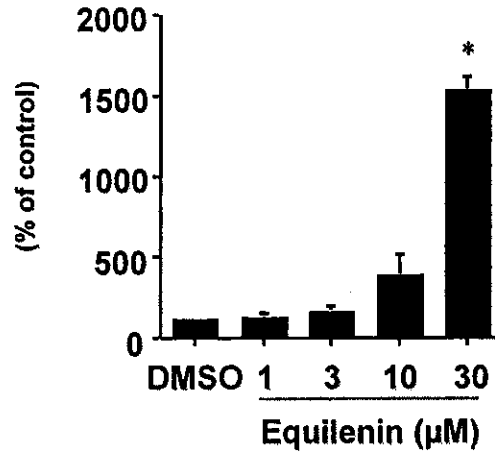


図 7: エクイレニンによる CYP1A1 mRNA 発現誘導: Cells were treated with DMSO (0.1 %), and various concentration of Equilenin (1 – 30 μM) for 24 hr. Relative amount of CYP1A1 mRNA was determined by using real-time quantitative PCR. The diagram represents the relative amount of CYP1A1 of 100 % control. The values are mean ± SD of three independent experiments.

*; Significantly different ($p < 0.05$) from DMSO controls.

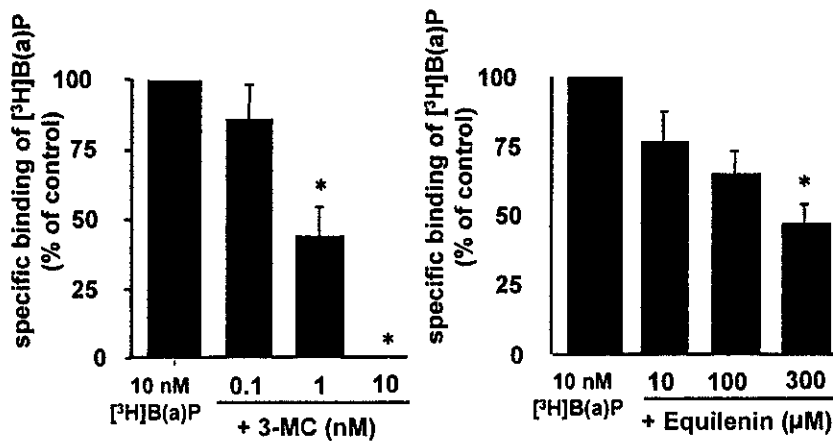


図 8: 3 メチルコラントレン及びエクイレニンの AhR への結合性: C57BL and AhR was incubated at 4 C for 1 hr in the absence or presence of the concentrations of nonradioactive 3-MC (0.1 – 10 nM) or Equilenin (10 – 300 μM). The values are mean ± SD of four independent experiments. *; Significantly different ($p < 0.05$) from 100 % of controls.

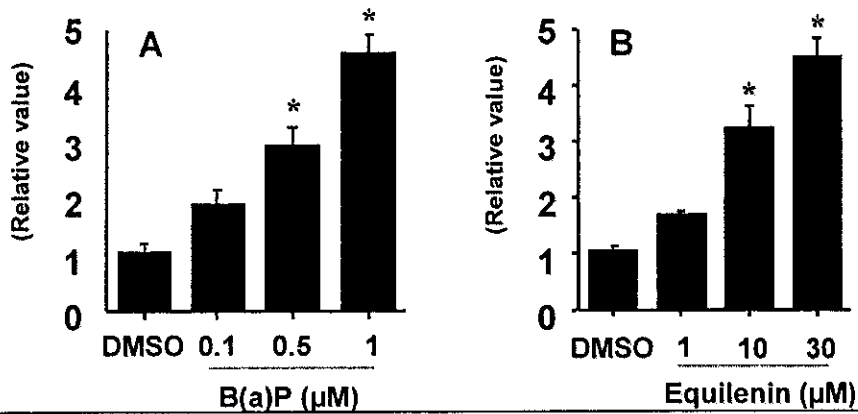


図 9: ルシフェラーゼアッセイによるベンゾピレン(A)およびエクイレニン(B)の AhR 転写活性化活性: HepG2 cell were transiently transfected with the CYP1A1 5' flanking reporter plasmids, pGL3-XRE, together with the pRL-TK control plasmid. After 12 hr from transfection, the medium was changed and the cells were treated for 24 hr with DMSO, and various concentration of B[a]P (0.1 – 1 μM), and Equilenin (1 – 30 μM). The values are mean ± SD of three independent experiments. *: Significantly different (p,0.05) from DMSO controls.

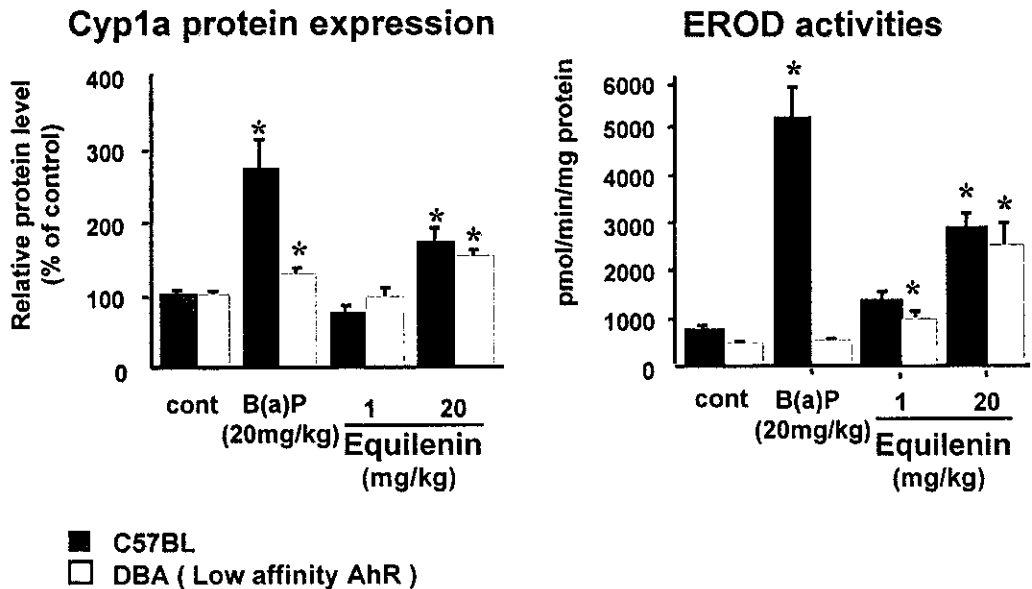


図 10: エクイレニン投与が C57BL および DBA2 マウスの肝ミクロソーム EROD 活性に及ぼす影響: C57BL and DBA2 mice (6weeks old) received either a daily ip injection of corn oil (control), B[a]P (20 mg/kg/day), and Equilenin (1, 20 mg/kg/day) for three days. Each value represents means ± SD. *: Significantly different from controls (p<0.05).

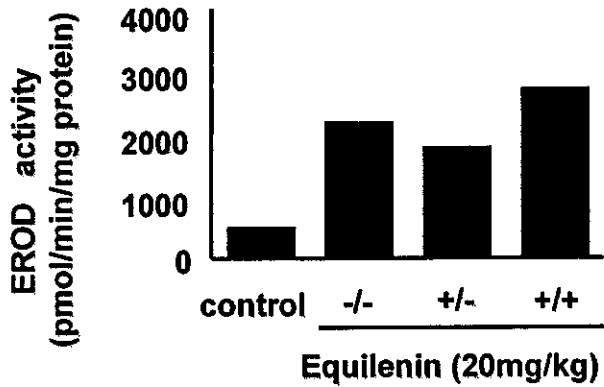
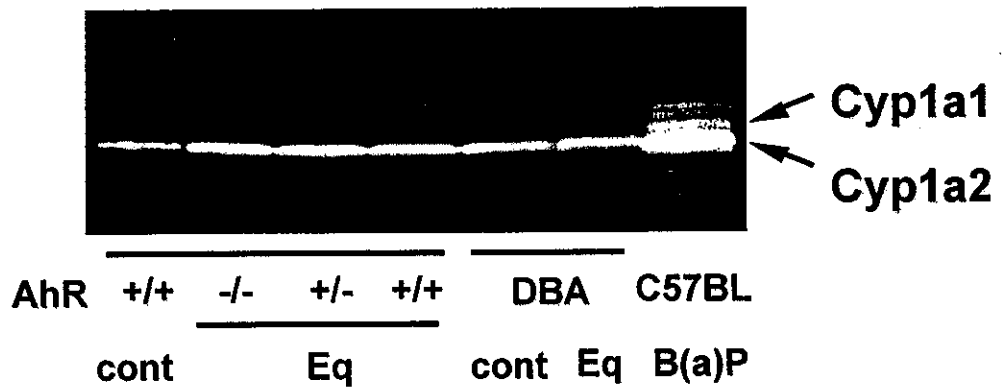


図 11: エクイレニン投与が、AhR ノックアウトマウスの肝臓における EROD 活性及び CYP1A サブファミリー発現レベルに及ぼす影響: Mouse (male) liver microsomal proteins (15ug / well) from control (corn oil-treated), Equilenin-treated mice (20 mg / kg), and B[a]P-treated mice (20 mg / kg) were separated on 7.5 % SDS-PAGE and subjected to immunoblot analyses with specific antisera against CYP1A1/2.



8. 「胎児・新生児ダイオキシン・PCB 暴露評価」

分担研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科病体制御専攻
生殖・発達医学講座周産期医学分野教授
研究協力者 山田 秀人 北海道大学医学部附属病院産婦人科学講座講師
奥山 和彦 北海道大学医学部附属病院周産母子センター助教授
長 和俊 北海道大学医学部附属病院周産母子センター講師
古田伊都子 北海道大学大学院医学研究科病体制御専攻
生殖・発達医学講座婦人科学分野助手

研究要旨

ダイオキシン・コプラナ PCB は、ヒト母乳、分娩時臍帯血、母体血で検出されることが近年明らかになってきた。この脂溶性の高いダイオキシン類を新生児胎便中に検出した報告は未だない。我々は新生児胎便中にダイオキシン類を初めて検出し、ヒト胎児における曝露状態を明らかにした。

A. 研究目的

早期新生児の胎便中のダイオキシン・コプラナ PCB を測定し、ヒト胎児の曝露状態を明らかにすることと、新生児異常（発育、神経学的所見）や内分泌学的、免疫学的所見との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

授乳前に新生児から専用容器で胎便を採取し、厚生省医薬局「ダイオキシン類の測定暫定マニュアル」の則った GC/MS 法によって測定した。過去 10 年間の妊娠 16 週時の羊水・母体血 200 組（染色体正常核型）および 48 組（染色体異常核型）についてビスフェノール A（BPA）を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

早期新生児の胎便（5-15g）および臍帯血 40ml を 7 例採取し保存した。現在までに 6 例の測定を開始し、2 例で PCDDs+PCDFs/

コプラナ PCB 濃度が判明した。胎便量 5.7 ないし 8.5g 量で PCDDs+PCDFs/コプラナ PCB 濃度が、それぞれ 3.5/4.5pg-TEQ/g-fat, 3.8/2.3pg-TEQ/g-fat 毒性等量であった。染色体正常核型および異常核型の母体血/羊水 BPA 濃度は、中央値 2.24/0.26 ng/ml および 2.97/0 ng/ml であった。羊水 BPA 濃度は母体血に比べて有意に低値であった。母体血 BPA 濃度は 5.62ng/ml（1989 年）から 0.99ng/ml（1998 年）に有意に減少した。

D. 考察

胎便中にダイオキシン・コプラナ PCB が初めて検出され、胎内曝露が明らかとなった。ヒト胎児外性器が性分化する第 2 三半期初期（妊娠 16 週）における母体・胎児の BPA 曝露状況が明らかとなった。この時期には母体血 BPA の羊水への移行は抑制されており母児間バリアが存在することが推察された。

E. 結論

胎便を用いることによって、ダイオキシ

分担研究報告書

ン・コプラナ PCB の胎児曝露状態を明らかにすることは可能である。今後、新生児異常や内分泌学的、免疫学的異常との関連を明らかにする。近年、BPAの母体曝露は減少してきている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada H, Furuta I, Kato EH, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, Fujimoto S (2002): Bisphenol A concentrations at early second trimester in maternal serum and amniotic fluid.

Biochem Biophys Res Commun (投稿中)

2. 学会発表

Yamada H, Furuta I, Kato EH, Sata F, Kishi R, Fujimoto S (2001): Bisphenol-A in maternal blood and amniotic fluid over a ten-year period.

第4回環境ホルモン学会, (つくば市, 12月14-15日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

9. 「ヒト生体試料中のダイオキシン及び環境化学物質の分析に関する概説」

分担研究者 中澤 裕之（星薬科大学・薬品分析化学教室）
研究協力者 斉藤 貢一（埼玉県衛生研究所・
生体影響担当ダイオキシン研究グループ）
井之上浩一（星薬科大学・薬品分析化学教室）

研究要旨

内分泌かく乱化学物質及びダイオキシン類の精度の高い測定を行う場合、考慮すべき様々な問題点が存在する。しかし、分析に伴う技術的注意事項等を総括し、簡潔にまとめた総説は少ない。そこで、本報告では、ヒトへの曝露量も多い内分泌かく乱化学物質として危惧されるフタル酸エステル類、ビスフェノールA、ノニルフェノール及びダイオキシン類について、その概要と測定経験に基づいて試料採取、前処理、測定法等の情報を概説した。

A. 研究目的

近年、化学物質の環境汚染に伴い、生体に対して微量で多様なホルモン類似の作用を発揮し、複雑な生体機能をかく乱させ、世代を越えて様々な影響を及ぼす危険性を指摘されている化学物質が注目されている。この微量で作用を及ぼすという点が、分析化学上においても考慮すべき様々な課題を惹起している。特に測定対象試料が血液等の生体試料の場合、高感度かつ精度の高い測定法が要求され、同時分析を実施しようとするれば、GC/MSやLC/MS等のハイブリッドな機器分析法を駆使する必要がある。機器分析の場合には、試料からの抽出、クリーンアップ、濃縮という一連の前処理操作が必須事項になる。また、内分泌かく乱化学物質に対する生体影響やヒト曝露量の評価に供するデータを取得するには、信頼性の高い分析結果を取得する必要があり、そのためには、この前処理や試料

サンプリング方法が最も重要なキーポイントとなる。

生体中に残留するプラスチック素材に由来する内分泌かく乱化学物質の微量分析においては、試料前処理操作の段階においてコンタミネーションを起こすことが大きな問題点である。例えば、プラスチック原料及び添加剤に利用されているフタル酸エステル類等のような化合物の微量分析では、実験器具、実験に利用する水、試薬や測定室内の空気から測定対象物質が分析操作中に混入し、測定値のバラツキとして影響を及ぼす。この段階で汚染されれば、正確な分析値を得ることは難しく、信頼性の高い分析とはならない。そのため、このような化学物質の測定では測定環境からのコンタミネーションをできる限り軽減させた分析法の開発が要求される。前処理操作のみならず、血液や臓器等の生体試料の採取にポリ塩化ビニル製医療用手袋、プラスチック製

注射筒が使用される可能性が高く、可塑剤や様々な添加剤が血液等に移行する恐れがある。一方、採取した試料をどのような容器（プラスチック製試験管、血液バッグ等）に保存し、搬送に使用するかも考慮すべき課題である。

ダイオキシン類は、都市ゴミや産業廃棄物の燃焼過程で副次的に発生するほか、塩素化フェノール系除草剤の副産物や、金属精錬及びパルプ漂白などの産業活動に伴って副次的に生産される、いわゆる非意図的の生産物質であり、近年最も注目されている環境汚染物質である。食物連鎖の頂点にあるヒトの血液、母乳等にもダイオキシン類汚染が進行していることが明らかにされている。ヒトへの健康影響と共に、次世代への影響も懸念されていることから、ダイオキシン類を迅速且つ高精度で測定する社会的貢献も大きい。

ダイオキシン類の分析法は、環境汚染が問題視されるようになった1980年代から今日に至る間に、測定機器の著しい進歩や数多くの研究報告により分析精度や感度の向上がもたらされてきた。しかし、ダイオキシンはその残留量が極めて微量なこと、異性体の種類が多いこと、毒性が高いこと、更に、物性が他の有機塩素系農薬やPCBなどと近いため、マトリックス中で共存するこれらの有機塩素系化合物との分離が難しいことなどから、測定難度の最も高い化学物質である。

本報告では、測定環境からの汚染が大きく極めて分析が困難とされる内分泌かく乱化学物質（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）及びダイオキシン類の測定に関する前処理方

法等を中心に、その方法論・留意点などを概説する。

B. 分析方法に関する概説

B.1 内分泌かく乱化学物質（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）に関する分析の概要

ヒト生体中に残留する内分泌かく乱化学物質の高精度かつ高感度な分析を実施するには、分離分析手法であるクロマトグラフィーと定性情報を提供しうる質量分析法を結合させたハイブリッドな分析法が要求される。この目的のために、ガスクロマトグラフィー/質量分析法（GC/MS）及び液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）が繁用されるようになった。又、これらの分析機器を駆使する上で、各種誘導体化による高感度分析法も開発されている。

ヒトが化学物質に曝露された場合、一般に生体内で代謝を受け、血液や尿中に代謝物として存在する可能性が考えられる。このような化学物質のヒト曝露量評価を実施する際には、体内動態を考慮に入れて総合的に評価することが必要となる。

内分泌かく乱化学物質の前処理法は、測定対象化学物質の物性を考慮して分離・精製モードの異なる様々な手法を単独もしくは組み合わせて方法を構築することが必要である。

フタル酸エステル類（PEs）

可塑剤として、汎用されているPEsは、様々な分野で利用されている。そのため、PEsの微量分析における前処理操作では、

実験室環境下によるコンタミネーションが重要な課題である。以下に考慮すべき内容を列記する。

a) 分析装置：前処理の汚染を排除する場合、使用する試薬、水、空気等のコンタミネーションを考慮しなければならない。特に GC/MS による分析では、有機溶媒及び測定室の空気を注入した場合、フタル酸ジエチルヘキシル、ジブチル、ジエチル等が検出される。このように測定環境からのコンタミネーションを完全に除去することは不可能に近いが、可能な限り汚染を軽減するとともに、そのバックグラウンド値を正確に把握することが重要である。

b) 使用溶媒：内分泌かく乱化学物質の前処理に利用される溶媒には、ヘキサン、アセトン、アセトニトリル等が挙げられる。フタル酸エステル用と表記された溶媒に関しても微量レベルでの汚染が認められており、バックグラウンドレベルを把握することが重要である。又、使用する溶媒は一旦開封すると、測定室内空気からの汚染を受けるため、できる限り少量の瓶の利用、使用後の密封を心掛ける等、取扱いには十分配慮する必要がある。

c) 精製水：従来の精製水製造システムでは、水道水やミネラルウォーターよりも汚染される場合が認められた。信頼性の高い前処理操作を行うにはフタル酸エステル用精製水もしくは、本試験系に利用することを保証している製造装置から精製されたものを推奨したい。いずれにしても、操作過程の簡略化、密閉系での前処理法、熟練した分析技術等が必要となる。

ビスフェノール A (BPA)

BPA は、フェノール性骨格を有し、比較的親水性に近い性質を有することから、様々な溶媒に溶解性を示すが、n-ヘキサンに対しては溶解性が低い。そのため、n-ヘキサンは、液-液分配法による脂溶性成分の抽出に使用され、試料からの抽出溶媒には主にアセトニトリル、アセトン、酢酸エチル等が繁用されている。溶媒による抽出過程において、アルカリ性試料や溶解液では、フェノール水酸基のプロトン解離が生じるため、極性が高くなり、抽出効率が低下する場合がある。可能な限り酸性条件下で前処理操作を実施する必要がある¹⁾。

生体試料については、シリカベースの C_{18} を用いた固相抽出法が繁用されている。最近ではより再現性や保持能に優れた N-ビニルピロリド（親水）及びジビニルベンゼン（疎水）をマトリックスとする固相カートリッジが BPA の前処理に有効である。しかし、共雑物の影響を受ける可能性があるため、選択性を有する測定系が望ましい²⁾。近年、クリーンケミストリーの観点から使用されている抽出法に、超臨界抽出法がある。本法を環境試料（汚泥）中の BPA 分析に応用した例³⁾もあり、今後、生体試料への応用も期待される。

固相抽出法による BPA の前処理では、固相マトリックスによる精製及び濃縮を目的に行うが、その操作過程からの汚染に注意を払う必要がある。また、モノマーである BPA を原料・添加剤として用いている理化学器具も多く、これら当該器具の使用に伴うコンタミネーションを極

力排除するとともに、バックグラウンドモニタリングを十分に実施しなければならない。その具体例として、実験用精製水への BPA 汚染があるが、その影響を排除した純水製造装置の利用を推奨したい⁴⁾。

ノニルフェノール (NP)

NP は、プロピレンの 3 重合体とフェノールから合成され、界面活性剤（ノニルフェノールエトキシレート）や抗酸化剤（トリスノニルフェニルフォスファイト）等の主原料として利用されている。標準品は、単一成分である直鎖型 NP もあるが、一般に異性体の混合物として市販されており、その存在比は明かでない。NP の分析では、この両標準品を使い分ける必要性があり、環境や生物試料等の NP を分析する際、通常検出されるものは異性体混合物であるため、定量と同定には混合物を用い、前処理の検討や補正に直鎖型を内標準物質として利用することが多い。NP は、水溶性フェノール水酸基及び疎水性アルキル鎖を有し、アルキル鎖が C_9 と長いので、疎水性が高い。この性質を利用して、試料からの抽出溶媒をアセトニトリル、アセトン、エタノール、メタノール等が利用されている。クリーンアップには、生体試料が少量のため、固相抽出法が主に利用されている。有機溶媒で抽出し、Florisil PR でクリーンアップ後、LC で測定する方法が報告されている⁵⁾。NP に関しては、疎水性が高いため、 C_{18} よりも吸着力の弱いフェニルや C_8 系充填剤を利用すると良好なクリーンアップ効果が得られる⁶⁾。

NP の前処理においても実験器具（セプタム、固相カートリッジ、精製水、ろ

過フィルター等）や有機溶媒等でのコンタミネーションとして数 ppb レベルの検出が確認される。又、前処理の濃縮操作過程でバックグラウンドが上昇する場合も見られ、NP の高感度検出に対する前処理の汚染は、完全に除去することは難しい⁷⁾。

B-2 ダイオキシン類に関する分析の概要

ダイオキシンとは、75 種類のポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン(PCDDs)と 135 種類のポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)の、それぞれの異性体の総称である。また、コプラナータイプのポリ塩化ビフェニール(Co-PCBs)については、4 種類のノンオルト Co-PCBs と 8 種類のモノオルト Co-PCBs を合わせた 12 種類の Co-PCBs がダイオキシン類として定義されている。

ダイオキシンの物理化学的性状としては、最も毒性が強く代表的な 2,3,7,8-四塩素化ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) について詳細に検討されている。2,3,7,8-TCDD は室温下では無色の結晶性固体であり、ほとんどの有機溶媒には溶けるが、水には極めて溶けにくい。水への溶解性はダイオキシン同族体の塩素化が高くなるにつれてより低くなる。同様に 2,3,7,8-TCDD の蒸気圧も低く、常温では気体になって蒸散する量は極めて少ないが、高塩素化体になるほど蒸気圧もより低くなる。溶液中での性質として酸・アルカリに対して安定であるが、熱アルカリ溶液中では高塩素化 (5 塩素化以上) ダイオキシンは容易に脱塩素化が起こる。また、光化学反応として iso-オクタンや n-オクタノール溶液中で紫外線の照射に

より、分解することが知られている。なお、水溶液中での分解は極わずかである。また、不燃性で熱に対しても比較的安定性は高いが、500℃を超えると分解が始まり、800℃では21秒以内に完全に分解する。また、ヒト体内での生物学的半減期は、6～11年程度と長い。

ダイオキシン類の毒性は、同族体または異性体によって異なるため、分析値の毒性を評価するには、最も毒性の強い2,3,7,8-TCDDの毒性を基準にした相対毒性値（毒性等価係数：TEF）を各異性体に乗じ、その総和を2,3,7,8-TCDD毒性等価量（TEQ）に換算している。1998年にWHOは再評価した新たなTEFを提案した⁹⁾。

ダイオキシン類や内分泌かく乱化学物質等を対象としたGC/MSによる超微量分析において、目的成分と物理化学的性状が殆ど等しい安定同位体（¹³Cあるいは²H等の置換体）の標準品をクリーンアップスパイクとして用いる方法が広く行われるようになってきた。この方法は内標準法の中でも、GC/MSを用いた分析法に特異的な手法であり、基本的な原理は放射化学の領域で使われている同位体希釈法と同じであることから、同位体希釈質量分析法とも呼ばれている。ここで用いられる安定同位体のことをサロゲートと称している。ダイオキシン分析では、クリーンアップスパイクの他に、更にシリンジスパイクにも別の安定同位体が添加されるが、これはクリーンアップスパイクの回収率を正確に算出するために用いられるものである。

血液中に残留するダイオキシン類の測定装置には、高分離能ガスクロマトグラ

フ（HRGC）／高分解能質量分析計（HRMS）を用いるが、この装置に試料を供する前に、数段階の抽出及びクリーンアップ操作が必要となる。血液や母乳などの生体試料ではエーテルやヘキサンなどを用いた液一液分配法によって脂質抽出が行われる。続いてクリーンアップ操作として、硫酸分解処理、シリカゲルカラムクロマトグラフィ、アルミナカラムクロマトグラフィ、活性炭カラムクロマトグラフィを用いて、ダイオキシンを分画・精製する。なお、硫酸分解処理を行う代わりに、水酸化カリウムのエタノール溶液を用いて室温下で加水分解（鹼化）する方法や、硫酸を含浸させたシリカゲルを用いてクロマトグラフィ的に行う、いわゆる多層シリカゲルカラムクロマトグラフィ、あるいはGPCにより脂質を除去する方法も実際に行われている。

又、ダイオキシン分析に伴う各前処理過程において、何度も濃縮する操作を行うが、精製段階が進むに従って、溶媒を留去する際に乾固しないように気をつけなければならない。すなわち、ロータリーエバポレーターやクデルナ・ダニッシュ濃縮器、あるいは窒素パーズによる溶媒濃縮の際に溶媒が蒸発乾固することにより、ダイオキシン類（特に低塩素化体）が損失することが危惧される¹⁰⁾。対処法としては、デカンなどの高沸点溶媒をキーパーとして添加することで蒸発乾固による損失を防ぐことができる¹¹⁾。

ダイオキシン分析に際しては、同位体質量希釈分析法という原理を利用しているため、クリーンアップスパイクとして安定同位体（サロゲート）を添加するこ

とが必須となる。問題は、サロゲートを添加するタイミングである。ダイオキシン分析でも環境試料や食品分析等、測定値を whole basis で算出する場合には、前処理に先立ってサロゲートを添加することが望ましいが、血液や母乳などのように脂質ベースで測定値を表す場合には必ずしも前処理前に添加することが良いとは限らない。これは、血液中のダイオキシン類がリポタンパク質等に結合しているため、脂質抽出に際して、native ダイオキシンと外部から添加したサロゲートが全く同じ挙動をして抽出効率も同じとは限らないからである。また、通常、サロゲートはノナン、デカンといった難揮発性溶媒に溶解しているため、脂質抽出前に添加した場合には、脂質重量測定に際して、これらの難揮発性溶媒を完全に除去しないと脂質含量の測定を誤ることになる。従って、脂質ベースでの表現を主体とするのであれば、抽出した脂質にサロゲートを添加した方が測定値としての精度は向上する。

C. ヒト生体試料の分析

C・1 生体試料中の内分泌かく乱化学物質の分析に関する注意点

ヒト生体試料中のフタル酸エステル類の分析

PEs（フタル酸ジエチル、ジブチル、ジエチルヘキシル等）は、生活環境に多く存在し、精度の高いヒト暴露評価の要求されている内分泌かく乱化学物質であるが、分析が極めて困難である。そのため、目標定量限界値も数～数十 ppb レベルに設定せざるを得ない。測定法としては、

GC/MS が主であり、その他に LC 等がある。

ヒト血液中 PEs の分析の一つとして、医療行為（輸血、透析、栄養補給等）による可塑剤の暴露を推定する場合は挙げられる。この場合は、比較的高濃度の検出を目的としているため、簡単な液-液抽出法が利用されている¹²⁾。一方、健康人による生活環境レベルでの暴露評価では、極めて低濃度の分析が要求され、前処理操作が重要となる。又、代謝物まで測定対象を広げ、分析法を構築する場合もある。コンタミネーションの恐れがあること、速やかに代謝されること等から、代謝物（フタル酸ジエチルヘキシルの場合、mono(2-ethylhexyl) phthalate, 2-ethylhexanol) を目的とした分析法が報告されている¹³⁾。

PEs の前処理に関する具体的な注意点を以下に述べる。

- a) 有機溶媒は、汚染を避けるためにフタル酸エステル分析用の小瓶を用いる。
- b) 精製水は、フタル酸エステル用もしくは、保証されている精製水製造装置を利用する。
- c) 各種ガラス器具は、200 度以上の恒温器で加熱処理して用いる。
- d) 耐熱性の試薬等は、500 度以上で加熱処理して用いる。
- e) 分析操作過程は可能な限り、短縮して迅速に実施する。

ヒト生体試料中のビスフェノールAの分析

BPA のヒト暴露量を評価するには、分析上の目標定量限界値は、0.1～0.5 ppb レベルである。又、血液試料も可能な限り

数 mL 以下で実施したい。前処理を行う場合、注意しなければならないのは BPA の分析においても各種理化学実験器具からの汚染である。そのため、器具は可能な限り有機溶媒で洗浄したガラス器具を用いる。測定に使用する精製水は、BPA 汚染フリーの純水製造装置や逆相系固相抽出用ディスク等でろ過したものを用いる。固相カートリッジは、親水性共重合体をマトリックスとした充填剤（OASIS HLB, Shodex SPEC EDC-1 等）が使用できる。代謝物（グルクロン酸抱合体）も測定対象とする場合は、固相抽出操作を行う前に、グルクロニダーゼ等の酵素で 37℃、2 時間以上処理する。MS での測定においては内標準物質として、重水素化体もしくは¹³C 体を添加する。

固相抽出法のポイントとしては、コンディショニングの際、有機溶媒での洗浄を多量に行う事により、BPA の汚染を排除することができる。又、固相抽出カートリッジから BPA 溶出後、濃縮乾固した後に再溶解が困難なため、溶解しやすい溶媒を用いて、超音波等を利用する。以上の操作に関する詳細な方法は文献を参考^{2, 14, 15)}にされたい。

ヒト生体試料中のノニルフェノールの分析

NP のヒト生体暴露評価の目標検出限界値は、0.5~1.0 ppb レベルである。NP に関しては、主に GC/MS での分析法が多く報告されているが、検出ピークが複数存在するため、その定量が困難であり、かつ感度が十分に得られない。他に、LC/MS、蛍光検出 LC 法、電気化学検出 LC 法等が報告されている¹⁶⁾。ヒト血液での前処理

は、主に固相抽出法が挙げられる。特に NP はアルキル鎖が長いため、C₈等の固相充填剤が適用できる⁶⁾。NP の前処理における注意点は、サンプリング、前処理操作過程等からの汚染である。血液試料を採取・保存する際、様々なプラスチック製医療用具が用いられている。しかし、一部に NP が原料とする添加剤を利用してある場合があり、汚染の原因となる¹⁷⁾。又、前処理で用いる各種理化学器材や溶媒等からの汚染の可能性も完全に無くすることは不可能と思われる。しかし、極力汚染を排除し、ばらつきを無くすことに心がけることが大切である。検出レベルとして、0.2 ppb 以下に設定し、ばらつきを RSD 5 %以下にし、S/N=10 を定量限界値と設定し、分析を実施した例もある。前処理に関しては、極力プラスチック製器具は使用せず、各操作過程を簡略する。代謝物（グルクロン酸抱合体）に関する分析は、酵素処理を利用する⁷⁾。

C-2 生体試料中のダイオキシン分析に関する注意点

ヒト生体試料中に残留するダイオキシン類の測定には、数段階の抽出及びクリーンアップ操作が必要となる。血液や母乳等の生体試料ではエーテルやヘキサン等を用いた液-液分配法によって脂質抽出が行われる。続いてクリーンアップ操作として、硫酸分解処理、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、アルミナカラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィーを用いて、ダイオキシンを分画・精製する。

血液中の脂質測定法としては、有機溶

媒を用いて直接脂質を抽出し、その重量を量る“重量測定法”と、血清中の脂質を生化学手法（主に酵素法）により、脂質成分ごとに測定して総脂質含量を算出する“総脂質計算法”がある。現在、米国で血液中ダイオキシン分析を行っている CDC（疾病予防管理センター）では総脂質計算法が行われている。また、我が国の公定法である血液中ダイオキシン分析暫定マニュアルでは、重量測定法が採用されている。それぞれの方法に長所・短所があるが、重量測定法では、更に抽出溶媒の種類を変えたいいくつかの方法がある。以下に代表的な3つの方法の概略を示す。

血清中脂質抽出法（重量測定法）の比較

a. Patterson 法¹⁸⁾；血清に飽和硫酸アンモニウム、エタノール、ヘキサンを加えて脂質を抽出し、ヘキサン相を分取する。水相に再度ヘキサンを加えて抽出し、ヘキサン相を合わせ、脱水後、溶媒を留去して脂質重量を測定する。この方法は、CDC の Patterson らによって開発された方法で、現在血液中の脂質抽出法として広く用いられており、我が国の血液中ダイオキシン分析暫定マニュアルもこの方法が採用されている。

b. Bligh and Dyer 法¹⁹⁾；血清にメタノール、クロロホルム、水を加えて抽出し、水相に再度クロロホルムを加えて抽出し、クロロホルム相を合わせ、水洗、脱水し、脂質重量を測定する。この方法は、Bligh および Dyer によって開発された方法で、生体試料からの脂質抽出法として古典的な方法である。

c. AOAC 法²⁰⁾；血清にシュウ酸カリウム、エタノール、エーテル、石油エーテルを順に添加し、抽出する。有機溶媒相を分離し、再度エーテル・石油エーテル混液で抽出し、有機溶媒相を合わせ、水洗、脱水、濃縮し、脂質含量を測定する。この方法は、ミルク中の脂質を測定する標準的な方法として AOAC 法を修正したものである。これらの方法は、いずれの手法を用いても同等な脂質総量、また同様なリポタンパク質が得られる¹⁸⁾。

総脂質計算法

血清 lipid 測定に際して、トータルコレステロール(TC)、遊離コレステロール(FC)、トリグリセライド(TG)、リン脂質(PL)を酵素法により自動測定し、総脂質(TL)は、 $TL=1.667 \times (TC-FC) + FC + TG + PL$ として求められる。なお、結合型コレステロール量は、TC から FC を引き算し、これに血清コレステロールエステル（平均値）とコレステロールの分子量比 ($648.25/386.67=1.677$) を乗じて算出できる。実際に総脂質計算法と重量法とがよく一致することは他の研究者の報告によっても確認されている^{21,22)}。

クリーンアップの具体例

図.1 に我々の行っている血液中ダイオキシン分析法をフローチャートで示した。この方法では、脂質抽出に際して上記の AOAC 法を基にしている。Patterson 法でもほぼ同等な脂質を得ることができるが、Patterson 法ではエマルジョンを生成することがあり、時として遠心分離操作が必要となる。また、抽出に必要な有機溶媒（ヘキサン）量が多くなるため、大型

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

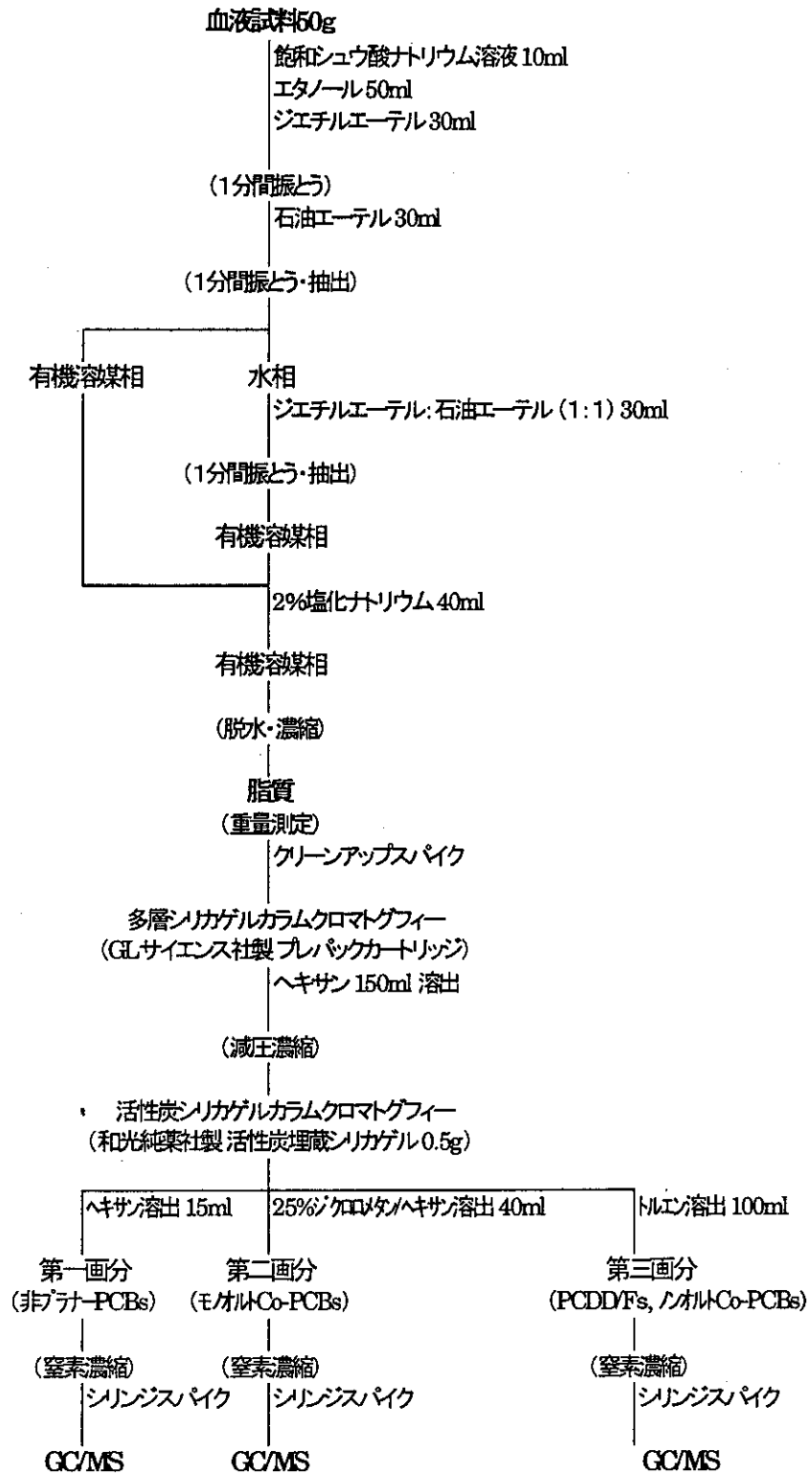


図1 血液中ダイオキシン分析前処理フローチャート

の分液ロートなどが必要になり、また、多量の有機溶媒の使用はブランク値を上昇させる原因となる。他方、AOAC法の長所としては、脂質抽出に際して、全血、血漿、血清いずれにおいてもエマルジョンを形成することがなく、更に母乳分析に際しても同様に適用できることがあげられる。

クリーンアップの第1段階として脂質の分解除去については、市販のプレパックタイプの多層シリカゲルカートリッジが用いられる。次にダイオキシン類の分画には、活性炭埋蔵シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いている。

なお、これら各種カラムからのダイオキシン類の溶出挙動については、試薬のロットによって変動する恐れもあるので、適宜、事前に溶出パターンをチェックする必要がある。

D. 最新の分析に関する報告

D・1 内分泌かく乱化学物質の最新分析法

汚染を抑え、簡単な前処理法が要求される内分泌かく乱化学物質を中心に紹介してきた。そのため、今利用されている前処理法よりも操作過程が短く、汚染され難いことを満たす方法が要求される。今後、生体試料への応用も期待される手法を含めて紹介する。

フタル酸エステル類について

PEsのヒト曝露に関する分析に関しては、様々な前処理法を利用して、代謝物を分析している。その殆どは、フタル酸モノエステル類であり、その標準品や内

標準物質も充実してきており、今後その分析法が増えていくであろう²³⁾。

ビスフェノールAについて

グルクロン酸抱合による代謝が報告されており²⁴⁾、尿や血液中の代謝物の分析法が報告されている^{14,15)}。又、河川試料中のBPA分析であるが、カラムスイッチングによるオンラインで前処理を行う方法も生体試料の分析に有用と思われる²⁵⁾。また、前処理を簡略してダイレクトにELISAで分析する方法もある²⁶⁾。

アルキルフェノールについて

アルキルフェノールのエストロゲン活性や生殖器への影響に関する報告²⁷⁾があるが、ヒトでの曝露評価に関する報告例は非常に少ない。その理由として、実験室環境からの汚染の影響が考えられる。又、アルキルフェノールエトトキシレートとの一斉分析も必要と思われる²⁸⁾が、固相抽出法、超臨界抽出法等が、注目されるであろう。

D・2 ダイオキシンの最新分析法

ダイオキシン分析法はこの問題が表面化した1980年代から今日に至るまで、精度・感度・操作法など、様々な観点から改善がなされ、進歩し続けている。本説では、その中でもクリーンアップを自動化した方法に関して紹介する。

クリーンアップの自動化

ダイオキシン分析におけるクリーンアップを自動化したシステムとしては、Power-Prep Systemという装置が市販さ

れている。このシステムは、ディスポタイプ
のシリカ、塩基性アルミナ、炭素カ
ラムを用いてクリーンアップを自動化し
たものであり、この装置を用いることで
17 種類のダイオキシン類、12 種類の
Co-PCBs、更に 7 種類のマーカーとした
PCBs の分離が行える²⁹⁾。この自動化前処
理システムでは、溶出条件を若干変更す
ることで、ダイオキシン類だけでなく、
有機塩素系農薬も含めた分画が可能とな
る³⁰⁾。この自動化前処理システムで使用
するシリカカラムは脂質 1g まで負荷す
ることが可能で、血清では 100-150ml に相
当する。また、各フラクションは、Zymark
Turbo Vap II Concentration Workstation
を用いて濃縮する。この装置は、従来の
ロータリーエバポレーターやクデルナ・
ダニッシュ型濃縮器とは異なり、窒素気
流をヘリックス状に吹き付けて溶媒を蒸
散させる装置である。これは一度に複数
の試料を濃縮できること、及びセンサー
により乾固寸前で自動的に濃縮をストッ
プさせることができるという特徴がある。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質やダイオキシン
類の分析については、信頼性の乏しい分
析法によるデータの取得や、安易な分析
データの解釈及び取扱いによって逆に社
会を混乱させているのも事実である。血
液、母乳等の生体試料を対象として発表
されている分析法は、試料の採取方法、
保存方法に対する配慮が欠如、代謝物に
対する検討がなされていないなど、信頼
性の高い分析法はまだ十分に開発されて
おらず、今後の展開が期待される。従来、

“超微量分析”，“超高感度分析”，という
特殊な分析分野では、熟達した分析者が、
特殊な機器を駆使して初めて精度の高い
測定が達成されてきたが、本報告であげ
たような分析法を自動化したシステムで
は、前処理の迅速化が達成されるだけで
なく、誰が行っても比較的高い精度で安
定したデータが出せるようになり、精度
管理の面からも将来的に望ましい手法と
なるであろう。更に当該化学物質が検出
された試料については複数の機関により、
同一試料を分析して、分析値の信頼性を
確保した上で、公表すべきである。

F. 参考文献

- 1) A. Takino, T. Tsuda, M. Kojima, H. Harada, K. Muraki and M. Wada, *J. Food Hyg. Soc. Japan* **40**, 325 (1999)
- 2) K. Inoue, K. Kato, Y. Yoshimura, T. Makino and H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* **749**, 17 (2000)
- 3) H. -B. Lee and T. E. Peart, *J. AOAC Int.* **83**, 290 (2000)
- 4) K. Inoue, Y. Yoshie, S. Kondo, Y. Yoshimura and H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* **946**, 291 (2002)
- 5) T. Tsuda, K. Suga, E. Kaneda and M. Ohsuga, *J. Chromatogr. B*, **746**, 305 (2000)
- 6) K. Inoue, Y. Yoshimura, T. Makino and H. Nakazawa, *Analyst*, **125**, 1959 (2000)
- 7) K. Inoue, N. Takai, Y. Yoshimura, H. Nakazawa and T. Makino, The 4 th Annual Meeting of Japan Society of Endocrine Disruptors Research 2001,