

を析出させた。3000rpm で 10 分間遠心分離後、上清液を約 2mL まで減圧濃縮(40℃以下)した。アセトニトリル 8mL を用いてメスフラスコに洗い込み、精製水で 20mL とした。そして適量をメンブランフィルターでろ過後、分析試料とした。

B-4. 溶出試験および添加回収

矯正用ブラケットを無菌的に 12 週間、唾液中に浸漬させ、37℃の恒温槽で遮光下静置した。図 1 に示すように、唾液中に溶出された BPA、t-BuP を抽出するために、有機溶媒による抽出操作を実施した。唾液中に存在する蛋白質を除去するために、0.5mL 唾液に 1mL メタノールを添加し、十分攪拌後、3000rpm で 10 分間の遠心をし、上清を採取した。沈渣に 0.5mL 67%メタノールを添加し、十分攪拌後、3000rpm で 10 分間の遠心した上清を上記の上清に加えた。この上清に適量の 1M HCl を添加・攪拌後、6mL のジクロロメタンを添加して十分攪拌した。得られたジクロロメタン分画を濃縮乾固して、0.5mL の蒸留水／アセトニトリル混合液（混合比 50:50）を添加し、濃縮乾固物を溶解させ、HPLC の試料とした。この抽出による回収率を求めるために、唾液に 10ng/mL BPA と t-BuP の混合液を添加し、前述と同様にして添加回収実験を実施した。得られた値はレジンのグラムあたりの BPA 及び t-BuP 量として表した。使用したガラス器具類はすべてアセトンで 3 回洗浄後、実験に使用した。

C. 研究結果

C-1. HPLC 分析条件

HPLC 分析条件で、検出器に ECD を用いているので、至適移動相を求めるため、リン酸塩緩衝液の pH と印加電圧の検討を行った（図 2）。この検討からリン酸塩緩衝液の pH は 6.0 で印加電圧 +800 mV を ECD の最適条件とした。この条件で ECD の検量線を作成したところ、検量線は 0～100ng/mL の範囲で 5 点とり、BPA の相関係数は 1.0000、t-BuP の相関係数は 0.9998 と良好であり、BPA、t-BuP と p-CP の検出限界はそれぞれ 0.2ng/mL、0.3ng/mL、0.5ng/mL であり（図 3）、定量限界はそれぞれ 0.8ng/mL、1.0ng/mL、1.5ng/mL であった。CV はそれぞれ 1.6%、2.1%、3.2%であった。

唾液に 10ng/mL BPA と t-BuP の混合液を添加して、液-液抽出による添加回収の結果は BPA では $103.1 \pm 3.7\%$ （CV は 3.6%）、t-BuP では $99.3 \pm 1.9\%$ （CV は 1.9%）と非常に回収率が良好なので、唾液浸漬液中の BPA と t-BuP 量は特に回収率を換算せずに実測値とした。

C-2. 矯正用ブラケット中の残留 BPA、t-BuP 量

ブラケットに残留している物質はこの条件ではブラケットの種類により異なっていた（図 4）。ブラケット A では BPA と t-BuP が検出されたが、ブラケット B～D では BPA、p-CP と微量の p-BuP であった。

唾液に浸漬したブラケット中の

BPA 量は、唾液浸漬前と比べると $14.1 \pm 2.2 \mu\text{g/g}$ から $59.4 \pm 6.4 \mu\text{g/g}$ (約 4 倍), $13.2 \pm 2.9 \mu\text{g/g}$ から $30.1 \pm 1.2 \mu\text{g/g}$ (約 2 倍), $17.8 \pm 3.1 \mu\text{g/g}$ から $36.0 \pm 3.9 \mu\text{g/g}$ (約 2 倍), $33.5 \pm 7.0 \mu\text{g/g}$ から $230.0 \pm 23.4 \mu\text{g/g}$ (約 7 倍) と, ブラケットごとに増加率は異なっていたが, 唾液浸漬ブラケット中の BPA 量は増加していた. t-BuP 量も $38.7 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ から $54.0 \pm 3.4 \mu\text{g/g}$, $0.6 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ から $0.7 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$, $1.4 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ から $2.0 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$, $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ から $4.6 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ と, 全てのブラケットで増加していた. 唾液と変性唾液に浸漬させたブラケット中の BPA 量を比べてみると, 変性唾液に浸漬させたブラケットで 1.4 倍, 1.7 倍ほど増加していた (図 5, 6) .

C-3. 唾液への BPA, t-BuP 溶出量

ブラケットを浸漬した唾液から抽出した物質の典型的なクロマトグラムを図 7 に示した. 顕著なピークは BPA であり, それ以外に検出されたピークは t-BuP であった.

ブラケットから唾液に溶出した BPA 量は $4.8 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$, $11.5 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$, $14.5 \pm 4.2 \mu\text{g/g}$, $2.6 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ であり, t-BuP 量は $0.6 \pm 0.0 \mu\text{g/g}$, $0.4 \pm 0.0 \mu\text{g/g}$, $0.5 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$, $0.3 \pm 0.0 \mu\text{g/g}$ であった (図 8) .

変性唾液にブラケットすると BPA 量は約 2 倍から 3 倍増加し, t-BuP 量は殆ど変化がなかった (図 8) .

BPA, t-BuP 溶出量は, 製品によりその値は異っていた, ブラケッ

ト中の残留 BPA, t-BuP 量と唾液に溶出した BPA, t-BuP 量には相関性はなかった.

D. 考察

今回, 4 製品用いて材質試験, 溶出試験を行い, BPA, t-BuP 量を測定したが, 製品の違いにより溶出及び残留 BPA, t-BuP 量が異なり, 昨年度報告したデータと比較する (図 9) とロットが異なっても溶出量, 残留量に大きな相違は認められなかったが, 某メーカーのブラケットは昨年度の報告で使用した製品番号を製造中止とし, 新たな製品番号として発売している. このブラケットに残留している物質は主に BPA と p-CP であった. p-BuP 量は微量であった. また, 残留 BPA 量及び溶出 BPA 量共に昨年度の製品番号と比べると減少していた.

本年度で使用したブラケットでは重合調節剤として p-BuP の代わりに p-CP を使用しているブラケットが 3 種類あった. この p-CP には報告例は少なく *in vitro* で弱いエストロゲン活性のあることが報告されている^{3,4)}が, *in vivo* の毒性に関する報告は皆無である. 今後, この p-CP に関する毒性について, 検討すべき課題ではないかと考えられる.

唾液と変性唾液に浸漬したブラケットを比較すると, 変性唾液に浸漬したブラケットの溶出 BPA 量のほうが多かった. 唾液より変性唾液に浸漬させた場合では, PC の残留 BPA 量と溶出 BPA 量が共に増加した. この変性唾液から

の BPA 溶出量の増加は唾液中の脂質が熱変性により，加水分解されて変性唾液の脂溶性が変化し（脂溶性の増加），PC から変性唾液への移行量の増加並びにそれに伴って PC からの BPA 分解が促進された結果ではないかと考えられる．この変性唾液の結果から，唾液中のエステラーゼやリパーゼなどの酵素による PC の炭酸エステル分解により，BPA 量が増えるという可能性は少ないことが示唆された．

これらの結果から，唾液に浸漬した PC 製矯正用ブラケットはいずれも唾液浸漬により残留 BPA が増加すること並びに残留 BPA の溶出のみならず唾液浸漬により PC が加水分解され，唾液に移行することが明らかとなった（図 10）．

更に現時点においては唾液への BPA 移行量は微量であり，重篤な健康障害を惹起するとは考えられにくい（表 3）が，矯正用ブラケットには他の材質の製品があるので，極力異物の摂取を回避すべき患者である妊婦，子供などへの使用は避けることが望ましいのではないかと考えられる．

E. 結論

電気化学検出器を用い，高感度に BPA，t-BuP の定量を行うことが可能となった．唾液より，変性唾液にブラケットを浸漬させた場合で，ブラケット中に残留している BPA 量及び溶出 BPA 量が増加していた結果から，唾液中エステラーゼやリパーゼなどの酵素による PC の炭酸エステル分解により，BPA 量が

増えるという可能性は少ないことが示唆された．これらのことから，医療用具などの溶出試験法は単純な塩類，有機溶媒では代替できない可能性が高いので，より実態に則した溶出試験法の開発が急務である．望ましくは医療用具が接触する体液が望ましいが，それらにも個体差があり一般的に用いることにも問題がある．

F. 参考文献

1. Milligan, S.R., et.al., Gen Comp Endocrinol, 112, 89-95(1998)
2. 食品衛生試験法 1009-1010 (1998)
3. Y. Hashimoto, et.al., Toxicology in vitro, 15, 421-425(2001)
4. K. Yamasaki, et.al., Toxicology, 170, 21-30(2002)

G. 研究業績

学会発表

1. 並木達也、中澤裕之、吉村吉博、本郷敏雄：ポリカーボネート製プラスチックブラケットからのビスフェノール A のヒト唾液への移行日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会集、p149 (2001)
2. HONGO, T., NAMIKI, T., HIKAGE, S., OTSUKI, M., TAGAMI, J., NAKAZAWA, H. and SATO, A.: Leachability of Bisphenol A from Plastic Bracket Immersed in Human Saliva., J. Dent. Res., 81(SI), (2002) in press.

表1. 用いたポリカーボネート製矯正用ブラケット

Plastic Bracket (Tomy International, Lot:A3X0, B4X9)
 Clear Bracket (Sankin Kogyo K.K., Lot:C9120119,C9020030)
 Plastic Edgewise Central Bracket (Ortho Organizers Inc., Lot:610200)
 Bondable Plastic Light Wire Bracket (TP Orthodontics, Inc., Lot:030175)
 TM Spirit mb (Ormco Corp. Inc., Lot:00K43K)

表2. HPLC/ECD 条件

Instrument :NANOSPACE SI-1 series
 (semimicro pump, degaser, column oven, electrochemical detector, autosampler)
Column :SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (5 µm, 150×2.0 mm, I.d.)
Column temp. :40° C
Mobile phase :40 mM phosphate buffer (pH:6.0) :acetonitrile = 60 : 40
Flow rate :0.2 mL/min
Injection vol. :20 µL
Applied voltage :+800 mV vs. Ag/AgCl
Working electrode :Grassy Carbon

**表3. 12週間ヒト唾液に浸漬したブラケットから溶出した
BPAの1日当たりの摂取量**

	µg/g ¹⁾	µg ²⁾	ng/day ³⁾	ng/kg/day ⁴⁾	ng/ml ⁵⁾
Artificial Saliva	13	4.6	55	1.8	0.02
Human Saliva	35	12	143	4.8	0.06

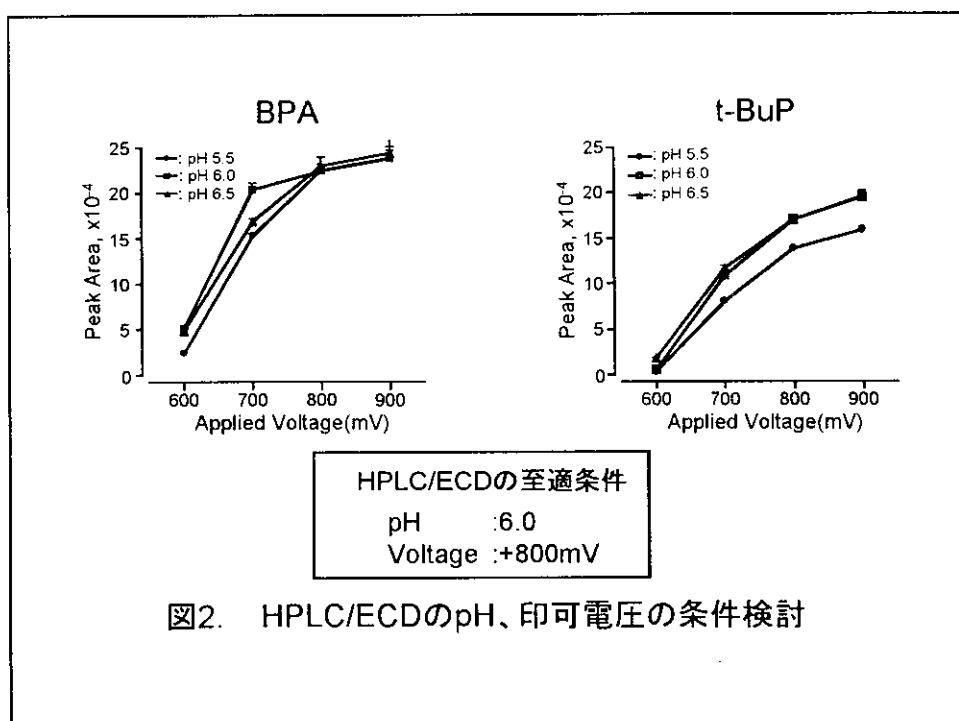
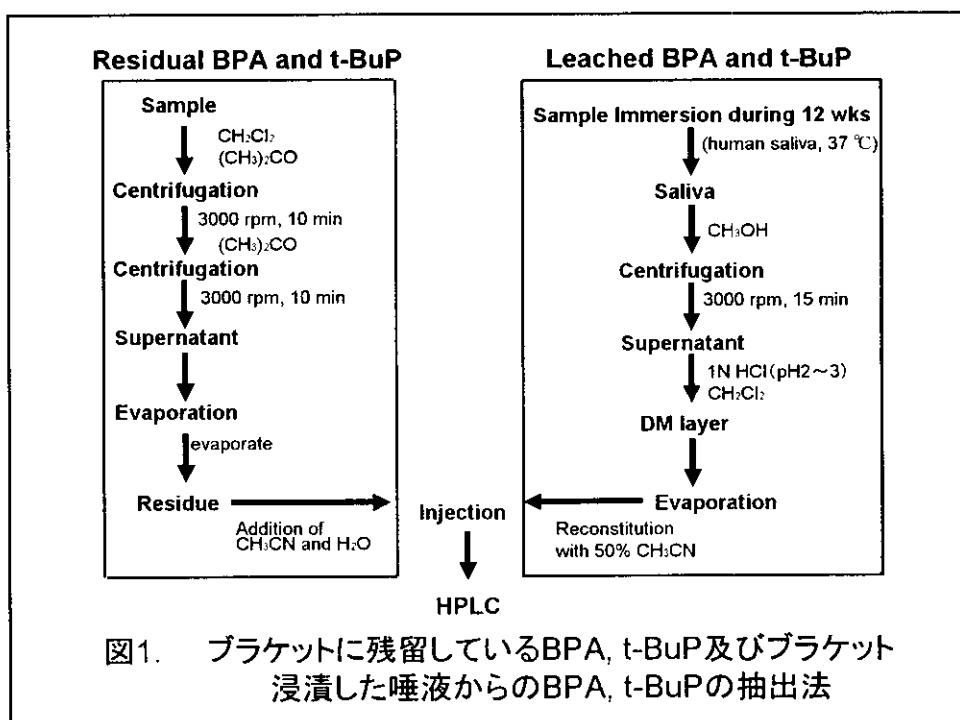
1): Total amount of leached BPA from orthodontic plastic bracket for 12 weeks

2): BPA amount In case of installing onto 20 teeth(ca 350mg PC)

3): BPA intake per day during 12 weeks(84 days)

4): In case of body weight being 30 kg

5): The amount of blood in case of body weight being 30 kg was estimated ca 2300ml



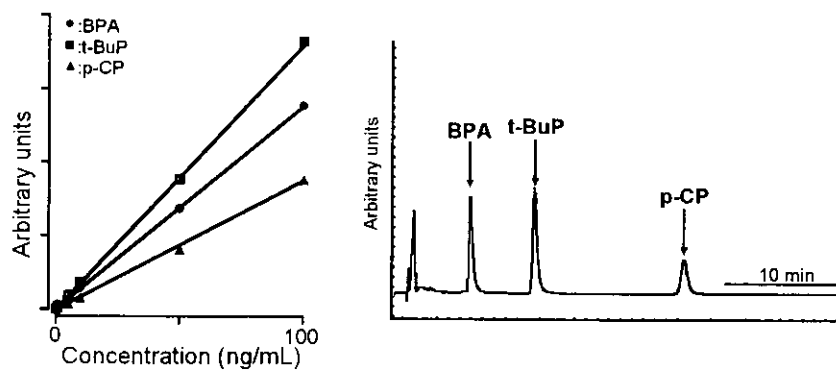


図3. 標準曲線(左図)と標準BPA, t-BuP, p-CPの典型的なクロマトグラム(右図)

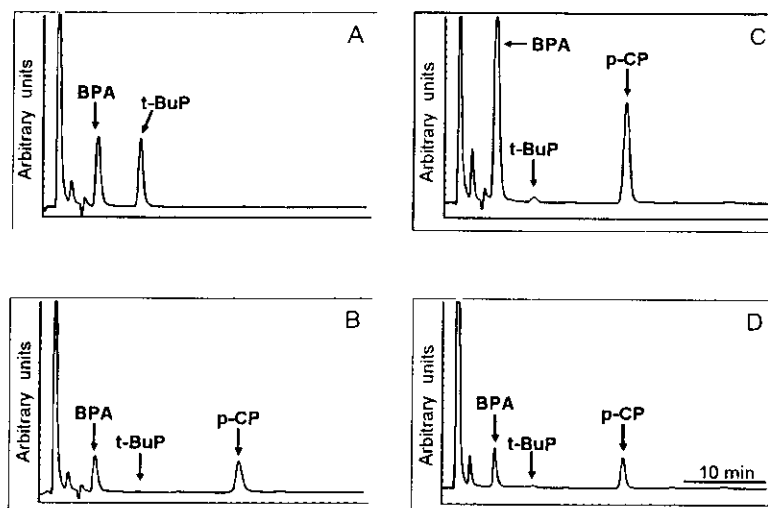
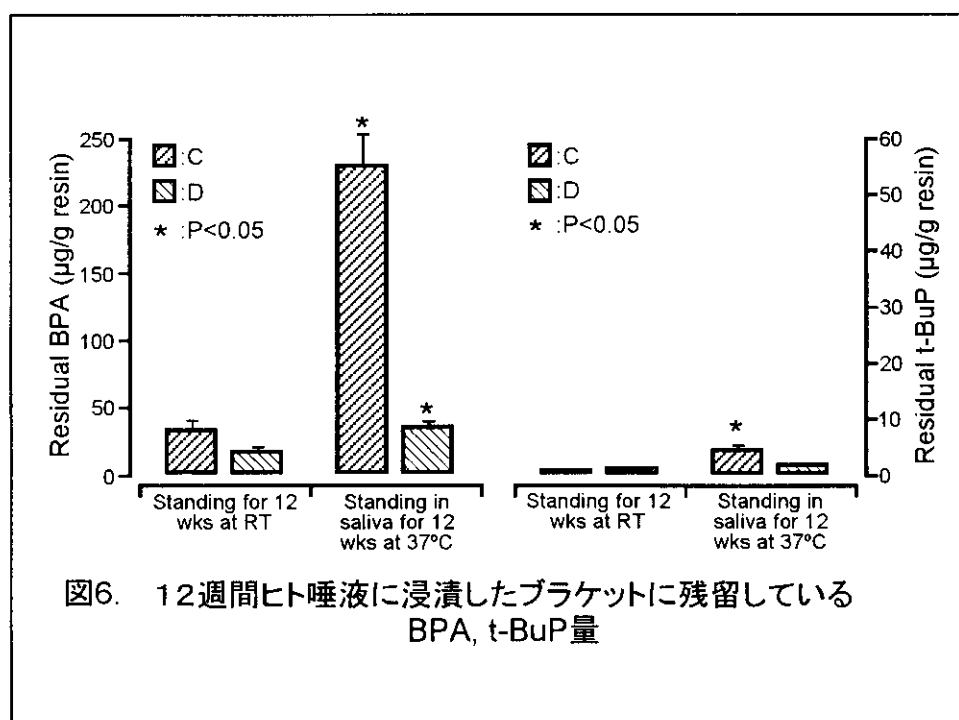
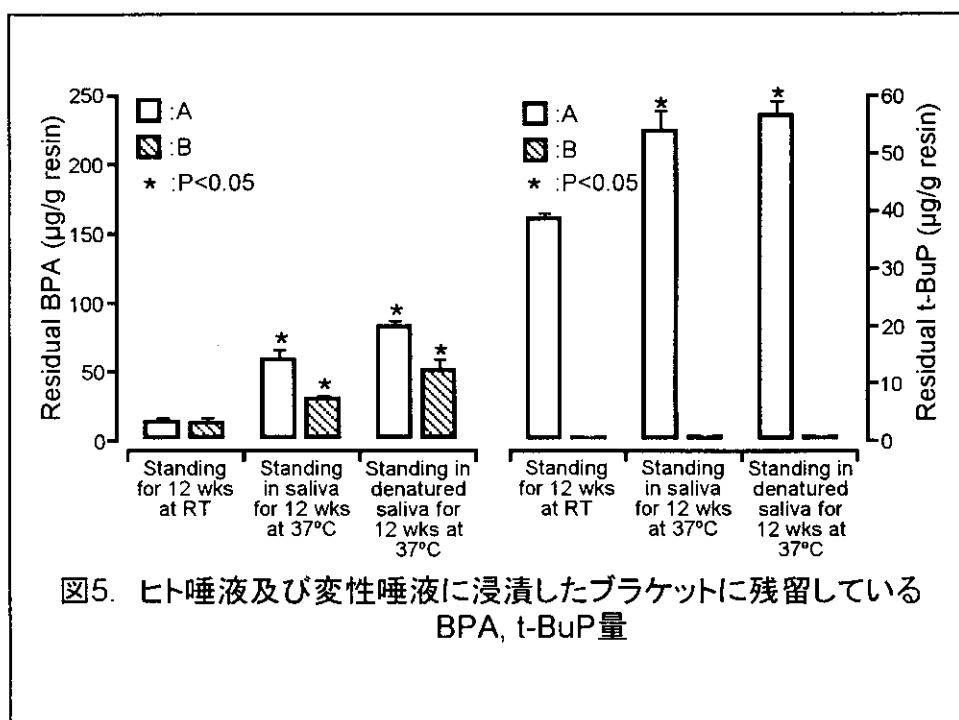


図4. ブラケットに残留しているBPA, t-BuPの典型的なクロマトグラム



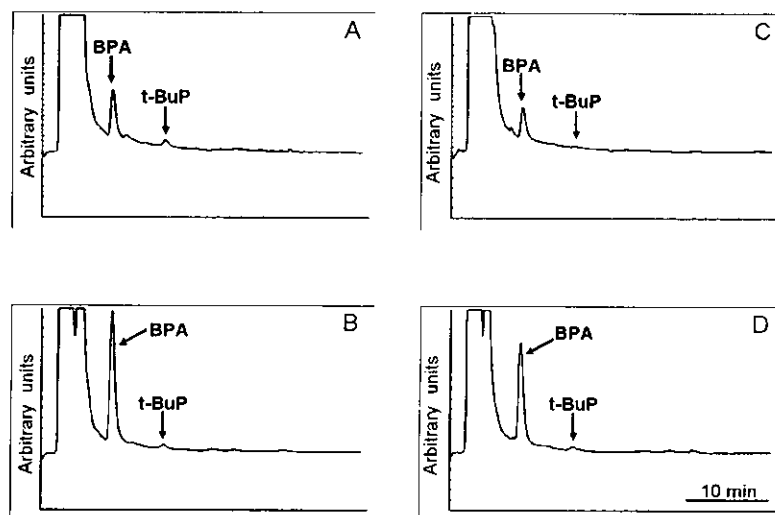


図7. ヒト唾液に浸漬したブラケットから溶出したBPA, t-BuPの典型的なクロマトグラム

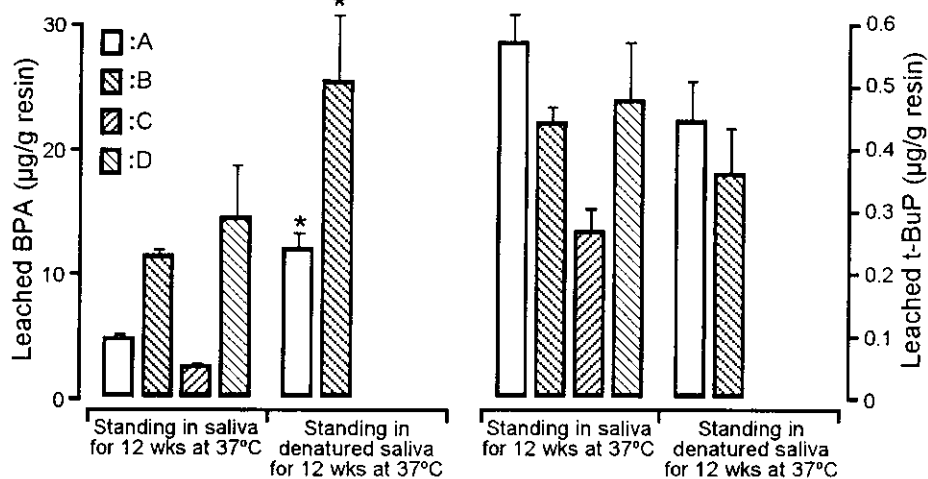


図8. 12週間ヒト唾液及び変性唾液に浸漬したブラケットから溶出したBPA, t-BuP量

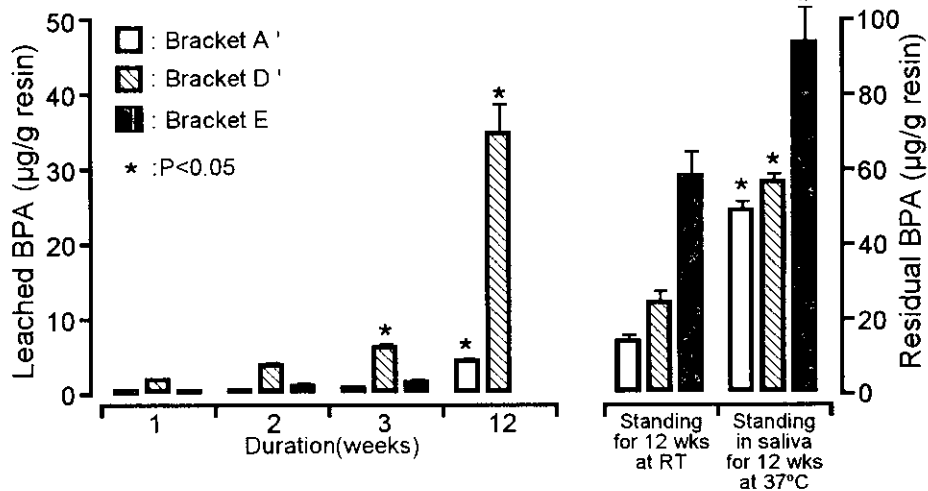


図9. ヒト唾液に浸漬した矯正用ブラケットから溶出したBPA, t-BuP量の経時的変化とブラケットに残留しているBPA, t-BuP量

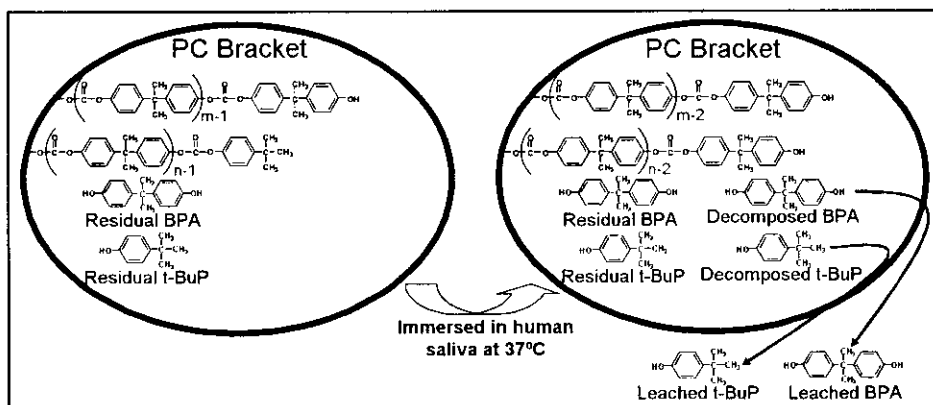


図10. ヒト唾液に浸漬したブラケットからの溶出BPA, t-BuP量増加の模式図

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱物質の分析及び動態解析

高分子素材由来の内分泌かく乱物質の分析法開発と実態調査

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

高分子素材から検出され内分泌かく乱作用が疑われている BPA、ノニルフェノール、オクチルフェノール等（C₄～C₉）の尿試料を用いた微量分析法を開発し尿中濃度の実態調査を実施した。BPA はβ-グルクロニダーゼで酵素分解した後、C₁₈ カートリッジで抽出し TMS 化物とした。これをフロリジルカートリッジでクリンアップ後、GC/MS-SIM で定量した。アルキルフェノール類は BPA と同様に酵素分解した後、ヘッドスペース瓶に採り、磷酸酸性下で SPME 法で抽出し GC/MS-SIM で定量した。これらの方法を用いて当研究所の職員等から採尿し分析した。その結果、BPA が 0.27～5.47ng/ml（平均 0.85ng/ml）検出され、一日の排泄量は平均 1.68 μg であった。ノニルフェノールが 0.2～2.5ng/ml（平均 0.55ng/ml）検出され、一日の排泄量は平均 2.0 μg であった。

A 研究目的

高分子素材から検出される BPA、ノニルフェノール、オクチルフェノール等のヒトへの暴露状況について実態を調査するため、昨年度から尿中のこれら物質の微量分析法を検討してきている。昨年度、尿中の BPA、オクチルフェノール及びノニルフェノールを PFB 化し、NCI-GC/MS による一斉分析法を検討し、実試料に応用した。しかし、この方法は BPA の測定法としては有効であったが、オクチルフェノールとノニルフェノールの測定にはブランク値が高い欠点があった。そ

こで今年度は、BPA とアルキルフェノール類を個別に分析する方法を構築し、実態調査を実施し日本人の平均的な暴露量を求めることを目的とする。

B 研究方法

B.1 尿中の BPA の分析

B.1.1 実験

B.1.1.1 試薬・試液

BPA：和光純薬㈱製を用いた。

¹³C-BPA：ケンブリッジアイソトープ製を用いた。

精製水：超純水を更に活性炭カートリッジを通して使用した。

メタノール、酢酸エチル、*n*-ヘキサン、アセトン：関東化学㈱製、残留農薬分析用を用いた。

磷酸：和光純薬㈱製、特級を用いた。

β -グルクロニダーゼ：和光純薬㈱製、生化学用を用いた。

C18カートリッジ：スペルコ製、スペルクリン ENVI-18(0.5g)を用いた。

フロリジルカートリッジ：スペルコ製、スペルクリン ENVI フロリジル(0.5g)を用いた。

BSTFA：ジールサイエンス㈱製を用いた。

B.1.1.2 装置

超音波洗浄機：シバタ製 SU-3TH型

真空ポンプ：ヤマト製 WP-25型

固相抽出装置：スペルコ製 VISIPREP DL型

超純水製造装置：ミリポア製 ミリQ-ST型

GC/MS：日本電子㈱製 GC-mate

B.1.1.3 尿試料の採取

一時尿：インフォームドコンセントを実施後、平成13年9月25日～10月22日に当研究所の職員とアルバイト（男性41人、女性17人）から2回分の尿で200～300ml採取した。

一口尿：インフォームドコンセントを実施後、平成14年1月18日～2月3日の間に職員と家族（男性11人、女性11人）から採取した。

暴露実験：平成13年11月9日に男性2人にアルキルフェノール類（C4～C9）各100 μ gをドリンク剤100mlに添加して摂取させ、10時間尿を採取した。また、平成14年1月17日に

BPA50 μ gをドリンク剤100mlに添加して摂取させ、11時間尿を採取した。

B.1.1.4 操作方法

尿試料100mlを共栓付フラスコに採り、 β -グルクロニダーゼ溶液100 μ lと ^{13}C -BPA0.1 μ gを加え、37℃で90分間酵素分解した。これに(1+1)リン酸1mlを加えpH3以下にした後、C18カートリッジカラムに負荷しBPAを抽出した。カートリッジを10%メタノール5mlで洗浄後、3mlのメタノールでBPAを溶出させ、100mlのナス型フラスコに受け、酢酸エチル20mlを加え、ロータリーエバポレータで濃縮乾固した。フラスコに、BSTFA200 μ lとアセトン2mlを加え一夜放置し、TMS化後ロータリーエバポレータでアセトンを留去した。これに*n*-ヘキサン2mlを加えて溶解し、フロリジルカートリッジに負荷し流出液を試験管に採取した。さらに*n*-ヘキサン2mlずつでフラスコを2回洗浄し、カートリッジに負荷し流出液を合わせた。流出液に窒素ガスを吹き付け、1mlに濃縮しこれをGC/MS-SIMで定量した。

B.1.1.5 GC/MS条件

GC：HP-5890 シリーズII

カラム：HP-5MS 0.32mm $\times$ 30m $\times$ 0.25 μ m

カラム温度：70℃(2min)–20℃/min–150℃–10℃/min–300℃(5min)

注入口温度：250℃

キャリアーガス：He 1ml/min

注入方法：スプリットレス パージオフ 1min

MS：Jeol GC-mate

イオン源温度：230℃

イオン化電圧：70V

モニターイオン： $m/z=357, 372, 369$ (^{13}C -BPA)

B.1.2 結果及び考察

B.1.2.1 抱合体の酵素分解について

昨年度BPAはグルクロン酸抱合体として排泄されており、 β -グルクロニダーゼで酵素分解する際の酵素添加量、分解時間について検討した。今年度の方法は尿試料100mlを使用したため、昨年度の試料量に単純比例させ β -グルクロニダーゼ100 μ lを添加し、37℃で90分間酵素分解した。

B.1.2.2 C18カートリッジによる抽出、洗浄及び溶出

今年度は昨年使用したメーカーのC18カートリッジが入手できなかったため、抽出、洗浄、溶出について再検討した。その結果、抽出と洗浄については殆ど変化なかったが、メタノールによる溶出が昨年のカートリッジよりも遅かった。しかし、3mlのメタノールを使用することで100%回収された。

B.1.2.3 BPAのTMS化

BPAのTMS化については多くの報告があり、本法では生体試料でBSTFAと反応する物質が多く含まれるため、環境省の方法と同様200 μ l添加し、一夜放置して反応させた。図1にBPAのTMS化物のEIマススペクトル、図2に ^{13}C -BPAのTMS化物のEIマススペクトルを示す。

B.1.2.4 フロリジルカートリッジによるクリンアップ

尿試料には様々な物質が含まれており、抽

出物をTMS化するとタール状の物質が生成され、クリンアップなしでは測定が困難であった。そこで、フロリジルカートリッジによるクリンアップを検討した。その結果、BPAのTMS化物は*n*-ヘキサンで簡単に溶出されたため、*n*-ヘキサンに溶解したTMS化物をカートリッジを通過させるだけでクリンアップが可能だった。

B.1.2.5 検量線の作成と回収率

試験管にBPAを10ng～200ngの範囲で段階的に採り、これにサロゲートの ^{13}C -BPAを100ng添加し、BSTFA 200 μ lを加え、アセトンで1mlに定容し、一夜放置した。これをGC/MS-SIMで測定し、 ^{13}C -BPAとの面積比で検量線を作成した。本法の検出限界は0.05ng/mlで、回収率は80%以上であった。検量線の例を図3に示した。

B.1.2.6 実試料への応用

一時尿の分析結果は、0.14～5.47ng/mlであり、平均値は0.87ng/mlであった（表1）。図4にヒストグラムを示した。一日尿の測定結果は0.27～2.03ng/mlで、平均値は0.81ng/mlで一時尿の平均値とほぼ一致した（表2）。一日尿からの排泄量を計算すると排泄量は0.48～4.53 μ g/dayで平均値は1.68 μ g/dayであった。一時尿では尿の排泄量の少ない人にBPA濃度の高い人が多く見られたが統計的な有意差は認められなかった。この供給源としては食事が大きなウエイトを占めると考えられるが、どのような食材に由来しているか、現段階では不明である。図5に標準品と実試料のSIMクロマトグラムを示した。

暴露実験結果を図6に示したが、摂取後30

分後にはすでにグルクロン酸抱合体として尿中に45ng/ml検出され、60分後には最高濃度の75ng/mlに達し、5時間後にはほぼ元の濃度近くまで低下し、11時間経過で70%程度がグルクロン酸抱合体として排泄された。

B.2 尿中のアルキルフェノール類の分析

B.2.1 実験

B.2.1.1 試薬・試液

精製水、リン酸、 β -グルクロニダーゼ、メタノール、アセトン：B.1.1.1に同じ。

^{13}C -ノニルフェノール、2,4-ジクロロフェノール- d_3 、フェノール- d_5 ：ケンブリッジアイソトープ製を用いた。

4-ノニルフェノール、4-*n*-オクチルフェノール、4-*ter*-オクチルフェノール、4-*n*-ペンチルフェノール、4-*ter*-ペンチルフェノール、4-*n*-ブチルフェノール、4-*ter*-ブチルフェノール、*o,m,p*-クレゾール、フェノール、2,5-ジクロロフェノール(2,5-DCP)：和光純薬㈱及び関東化学㈱製を用いた。

B.2.1.2 器具・装置

ヘッドスペース瓶：テクマー製
22ml容量

ヒーター：ピアース製

SPME：スペルコ製 65 μm

PDMS/DVBファイバー

GC/MS：日本電子㈱製 GC-mate

B.2.1.2 試料の採取

B.1.1.3に同じ

B.2.1.3 操作方法

尿試料30mlを共栓付試験管に採り、 β -グルクロニダーゼ溶液30 μl を加え、37℃で90

分間、酵素分解した。分解液を22ml容量のヘッドスペース瓶に採り、これに精製水5ml、 ^{13}C -ノニルフェノール、(1+1)リン酸0.5mlを加え、密栓し、80℃で30分間ヘッドスペースをPDMS/DVB系のSPMEファイバーで抽出し、GC/MS-SIMで定量した。

B.2.1.4 GC/MS条件

GC：HP-5890 シリーズII

注入口温度：250℃、

キャリアーガス：He 流速1ml/min

フェノール類($\text{C}_4\sim\text{C}_9$)

カラム：HP-5MS 0.32mm $\times$ 30m $\times$ 0.25

μm

カラム温度：70℃(1min)–20℃/min–

150℃–5℃/min–250℃(5min)

2,5-DCP, フェノール、クレゾール

カラム：DB-624 0.32mm $\times$ 30m $\times$ 1.8

μm

カラム温度：50℃ (1min) –10℃/min
–230℃(5min)

GC/MS：Jeol GC-mate

イオン源温度：230℃

イオン化電圧：70V

モニターイオン： $\text{C}_4\sim\text{C}_9$ $m/z=107$,

121, 135, 150, 164, 206, 220, 113(^{13}C -
ノニルフェノール)

2,5-DCP： $m/z=162$, 164, 165(2,4-DCP- d_3)

フェノール、クレゾール： $m/z=94$, 99(フェ
ノール- d_5), 107, 108

B.2.1.5 検量線の作成

フェノール類($\text{C}_4\sim\text{C}_9$)：ヘッドスペース瓶に精製水10mlを採り、これに混合標準溶液0.05~1.0 $\mu\text{g/ml}$ を20 μl 、 ^{13}C -ノニルフェノール溶液 (1 $\mu\text{l/ml}$)5 μl 、(1+1)リン酸0.5ml

を加え密栓し、80℃で30分間ヘッドスペースをSPMEファイバーで抽出し、GC/MS-SIMで定量し、¹³C-ノニルフェノールとの面積比で検量線を作成した。

2,5-DCP：上記と同様に精製水を採り、これに2,5-DCP標準液0.25～2.0 μg/mlを20 μl、2.0 μg/mlの2,4-DCP-d₃を10 μl、(1+1)リン酸0.5mlを加え同様に操作し、2,4-DCP-d₃との面積比で検量線を作成した。

フェノール、クレゾール：上記と同様に精製水を採り、これにフェノール25～200 μg/ml、クレゾール2.5～25 μg/ml、フェノール-d₅ 50 μg/mlの混合標準溶液を20 μlと(1+1)リン酸0.5mlを同様に操作し、フェノール-d₅との面積比で検量線を作成した。

B.2.2 結果及び考察

B.2.2.1 抱合体の酵素分解について

昨年度の段階では、ノニルフェノール、オクチルフェノール等のアルキルフェノール類がグルクロン酸抱合体として排泄されているか不明確だったため、100 μgのこれらアルキルフェノール類を摂取させ、尿中成分を分析した結果、これらのアルキルフェノール類はグルクロン酸抱合体として排泄されていることがわかった。酵素添加量、分解時間についてはB.1.2.1と同様である。

B.2.2.1 SPME条件

ヘッドスペース中の目的物質を効率良く抽出するファイバーを選定するため、PDMS, PMMS/DVB, Carboxen/PDMS, Carbowax/PDMS, Polyacrylateについて検討したが、PDMS/DVBとCarbowax/DVBが感度面で優れていた。本法では65 μm膜厚のPDMS/DVBを用いた。また、80℃で30分間

抽出することにより効率良く抽出された。

B.2.2.2 アルキルフェノール類の測定結果

表1に一時尿、表2に一日尿の測定結果を示した。ブチルフェノール、オクチルフェノールは検出されなかったが、ノニルフェノールが0.2～2.5 ng/ml (平均0.55 ng/ml) 検出され、一日排泄量は0.6～4.5 μg (平均2.0 μg) になった。一時尿のヒストグラムを図7に示した。ノニルフェノールはフタル酸エステルと同様、バックグラウンドが高いため、本研究ではSPME法による直接抽出法を採用したが0.1～0.2 ng/ml程度のバックグラウンドは避けられなかった。図8に標準物質と尿試料のSIMクロマトグラムを示す。

フェノールは一時尿で0.6～29.4 μg/ml (平均6.4 μg/ml)、一日尿で1.3～30.5 μg/ml (平均6.4 μg/ml) で一日排泄量は3.0～78.8 mg/day (平均14.4 mg/day)であった。

p-クレゾールは一時尿0.06～165 μg/ml (平均20.4 μg/ml)、一日尿で0.61～87.3 μg/ml (平均25 μg/ml) で一日排泄量は1.2～78 mg/day (平均43.1 mg/day)であった。図9にフェノールとクレゾールの標準物質と尿試料のSIMクロマトグラムを示す。

パラジクロロベンゼンの代謝物である2,5-DCPは一時尿5.4～4650 ng/ml (平均208 ng/ml)、一日尿で5.8～265 ng/ml (平均63.3 ng/ml) で一日排泄量は10.5～705 μg/day (平均150 μg/day)であった。2,5-DCPは家庭でパラゾールを使用していない人からも検出された。図10に標準物質と尿試料のSIMクロマトグラムを示す。また、図11に酵素分解する前のフリーの2,5-DCPとトータルの2,5-DCPの関係を示したが、2,5-DCPの場合も約9割がグルクロン酸抱合体として排泄

されていた。

B.2.2.3 暴露実験

暴露実験結果を図12、13に示した。アルキル基の短いブチルとペンチルフェノールは排泄が早く、摂取後30分で排泄が始まり、1時間後に最高濃度に達し、5時間ではほぼ排泄された。しかし、オクチルやノニルフェノールになると4-*ter*オクチルフェノールでははっきりした濃度上昇が見られたが、ノニルフェノールでは他に比べ濃度上昇が低く、4-*tr*オクチルフェノールでは明確な濃度上昇曲線は得られず、10時間経過しても明確な濃度低下が認められなかった。全体の排泄量は4-*ter*オクチルフェノールで55%、ノニルフェノール30%、4-*tr*オクチルフェノールで10%程度の排泄しか認められなかった。このことは、長鎖のアルキルフェノール類による暴露を受けた場合、体内に長く残留し、排泄されにくいことを示していると考えられた。

C 結論

高分子素材から検出されるBPAやアルキルフェノール類の尿中の微量分析法を確立し、成人尿を分析し、以下の結果を得た。

1. BPAは一時尿 (n=58) から0.14~5.47ng/ml (平均0.87ng/ml) 検出された。一日尿 (n=22)は0.23~2.03ng/ml (平均0.81ng/ml)で一日排泄量は0.48~4.53 μ g (平均1.68 μ g)であった。BPAの供給源は食事由来と考えられるが、どのような食材に由来するか、現段階では不明である。

2. ノニルフェノールは一時尿から0.2~2.0ng/ml (平均0.37ng/ml)検出され、一日尿からは0.29~2.5ng/ml(平均1.0ng/ml)で一日排泄量は0.6~4.5 μ g (平均2.0 μ g)になった。

3. オクチルフェノール、ペンチルフェノール及びブチルフェノールは検出されなかった。

4. フェノールが一時尿から0.6~29.4 μ g/ml (平均6.4 μ g/ml)、一日尿から1.4~30.5 μ g/ml (平均6.4 μ g/ml) 検出され、一日排泄量は3.0~78.8mg (平均14.4mg)であった。

5. *p*-クレゾールが一日尿から0.06~165 μ g/ml (平均20.4 μ g/ml)、一日尿から0.61~87.3 μ g/ml (平均25.0 μ g/ml)検出され、一日排泄量は1.2~78mg (平均43.1mg)であった。クレゾールはフェノールの約3倍排泄され、*p*-体のみの排泄であり、どのような物質の代謝物であるのか興味のあるところである。

6. 2,5-DCPは一時尿から5.4~4650ng/ml (平均208ng/ml)、一日尿から5.8~265ng/ml (平均63.3ng/ml)検出され、一日排泄量は10.5~705 μ g (平均150 μ g)であった。

7. BPA50 μ gをドリンク剤に添加して摂取した結果、BPAはグルクロン酸抱合体として排泄され、5時間程度で大部分が排泄された。

8. C4~C9のアルキルフェノールの暴露実験では、ブチルとペンチルフェノールは排泄が早く、5時間程度ではほぼグルクロン酸抱合体として排泄された。しかし、アルキル鎖が長くなると排泄が遅く、ノニルフェノールでは10時間で30%、4-*tr*オクチルフェノールでは10%程度が尿から排泄されただけだった。

D 研究発表

D.1 発表論文

1)Tadashi TSUKIOKA, Jun-ichi TERASAWA, Tetsuya YOSHIDA, Moritoshi SATO, Hiromichi FUJISHIMA,

Hiroyuki NAKAZAWA and Tsunehisa MAKINO., Analysis of Chlorobenzenes in blood by Head Space SPME-GC/MS, *Journal of Environmental Chemistry*, **11**(3), 517-523(2001)

2) 山川晋、浦野まちな、熊谷昭彦、月岡忠、佐藤守俊、学校給食用ビン牛乳で発生した異臭事故の原因究明に関する一考察、食品衛生研究、**51**(1)、13-20(2001)

D.2 学会発表

1) SPMEによる生体試料中の有機塩素系化合物の微量分析、月岡忠、寺澤潤一、吉田徹也、佐藤守俊、藤島弘道、中澤裕之、第8回環境化学討論会、平成11年7月（北九州市）

2) 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回環境化学討論会、平成12年6月（札幌市）

3) NCI-GC/MS-SIMによる生体試料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、Jhon BROCK、Sam GRAISER、Johnny NGUYEN、中澤裕之、牧野恒久、第10回環境化学討論会、平成13年5月（松山市）

4) 学校給食用ビン牛乳で発生した異臭事故の原因究明に関する一考察、山川晋、浦野まちな、熊谷昭彦、月岡忠、佐藤守俊、全国食品衛生監視員研修会発表等抄録、平成11年11月

E 知的所有権の取得状況

E.1 特許取得 なし

E.2 実用新案登録 なし

E.3 その他 なし

F. 健康危険情報

1. ビスフェノールA

歯科治療に使用されているビスフェノールAジグリシジルエーテルメタクリル酸をベースとする密封剤50mgで治療1時間後、ビスフェノールAが唾液から90-931 μ g検出された。(Olean, N., et al., *Environ. Health Perspect.*, **104**, 298, 1996)

ラット子宮細胞質画分のERへの結合親和性はE2のそれを100とすると0.012である。

（同上）

2. ノニルフェノール

幼若雌ラットにノニルフェノール1,2,4mg/mlを単回腹腔内投与し、24時間後に子宮重量を測定した結果、すべての投与群で子宮重量の増加が認められた。(Lee, P. C., Lee W., *Bull. Environ., Contam., Toxicol.*, **57**, 341, 1996)

3. オクチルフェノール

幼若雌ラットにオクチルフェノール約166mg/kg/dayを3日間皮下投与することによって、子宮量の増加を観察している。(Bicknell, R. J., et al., *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **19**, 367, 1999)

4. ベンゾフェノン

接触性皮膚炎及び光過敏性皮膚炎の原因として指摘されている。(Schauder, S., et al., *Contact Dermatitis*, **37**, 221, 1997)

Scan: 368 (172-183)

R.T.: 13:04

Base: m/z 357; 54.1%FS TIC: 2139951

#Ions: 214

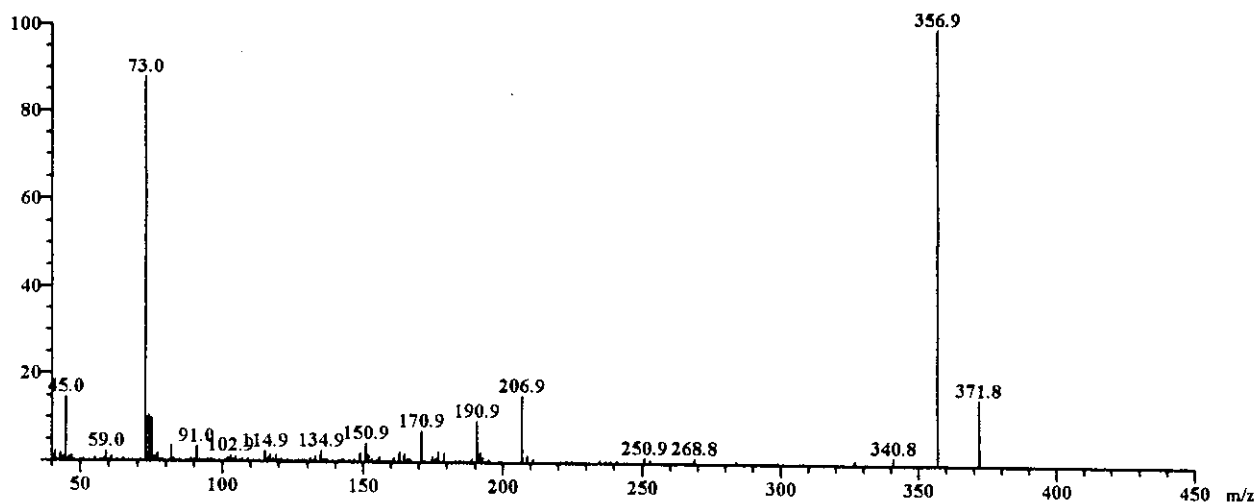


図1 BPA-TMS 化物の EI スペクトル

Scan: 368 (168-179)

R.T.: 13:04

Base: m/z 73; 29.6%FS TIC: 864669

#Ions: 195

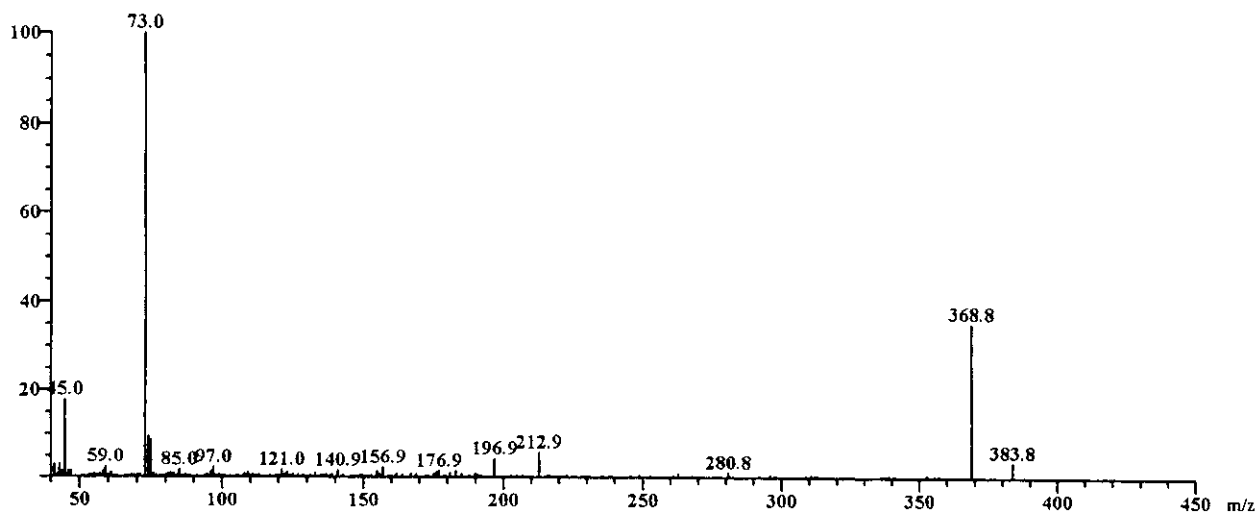


図2 ¹³C-BPA-TMS 化物の EI スペクトル

図3 BPAの検量線

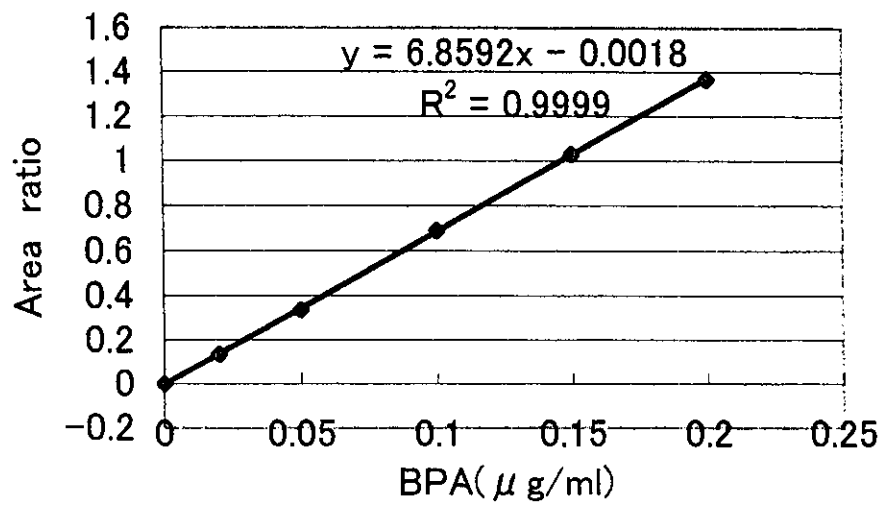
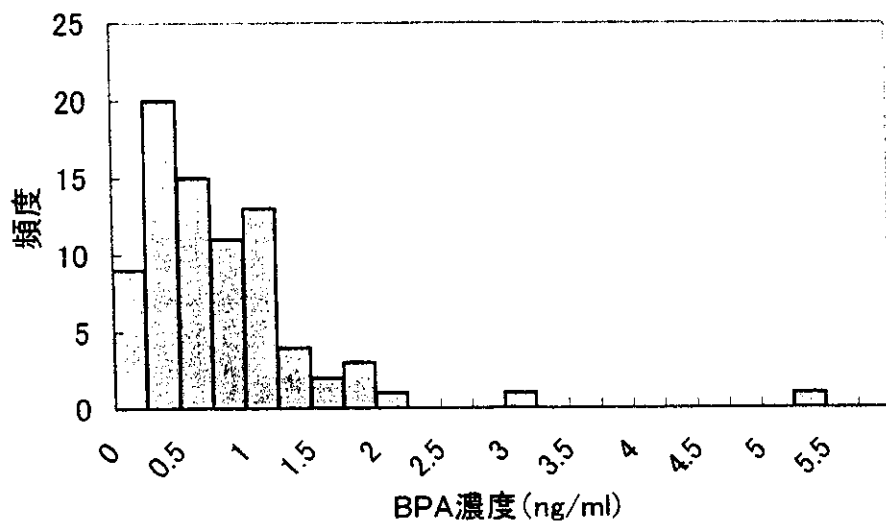


図4 尿中のBPAヒストグラム



File: BPA247

Date Run: 02-06-2002

Time Run: 10:46:08

Sample: St-150,150ng

Instrument: JEOL GCmate

Run By: T.Tukioka

Inlet: GC/MS

Ionization mode: EI+Printed by: NAGANO EISEI KOGAI

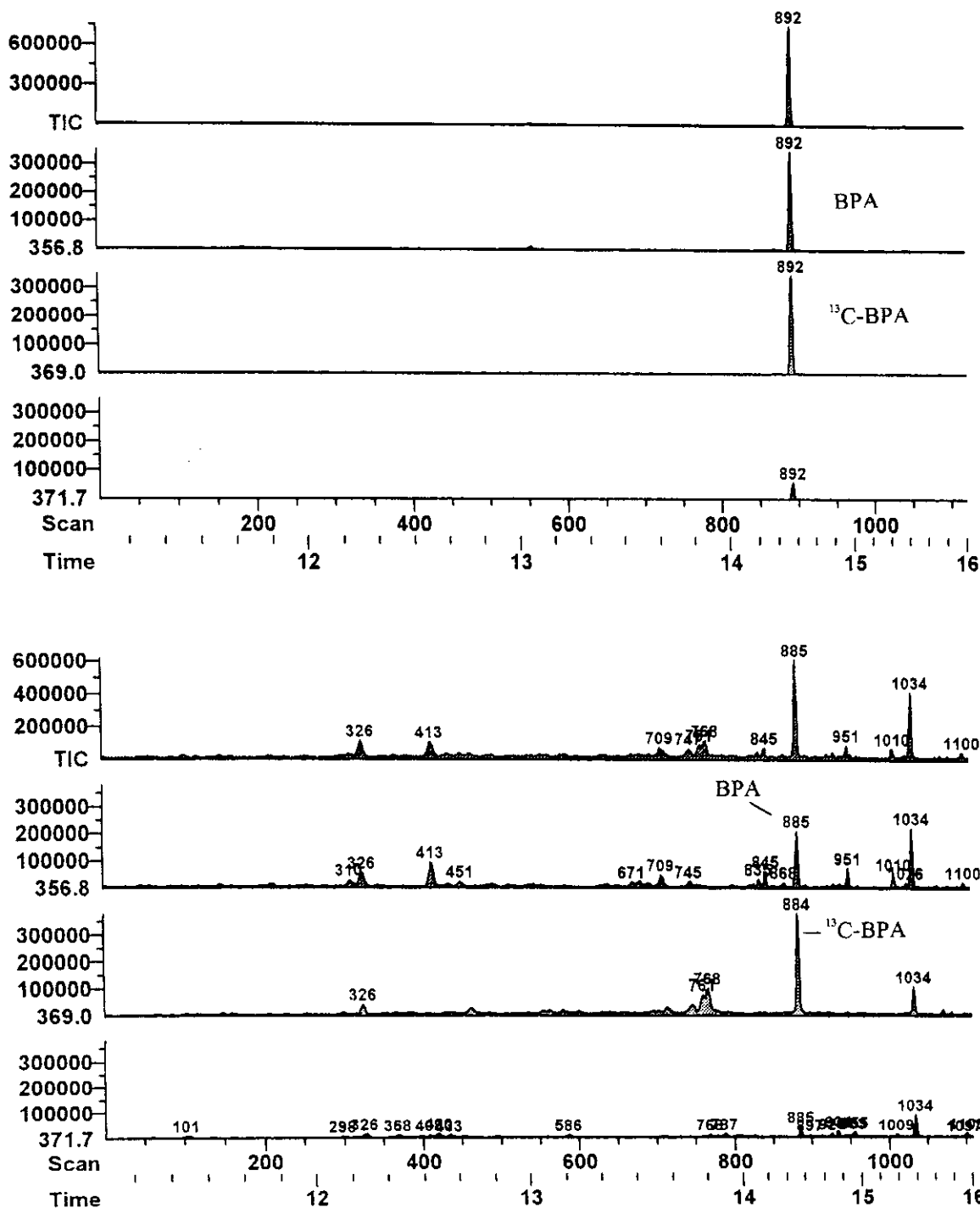


図5 BPA-TMS の SIM クロマトグラム(上段 標準、下段 尿試料)

図6 BPAの尿への排泄

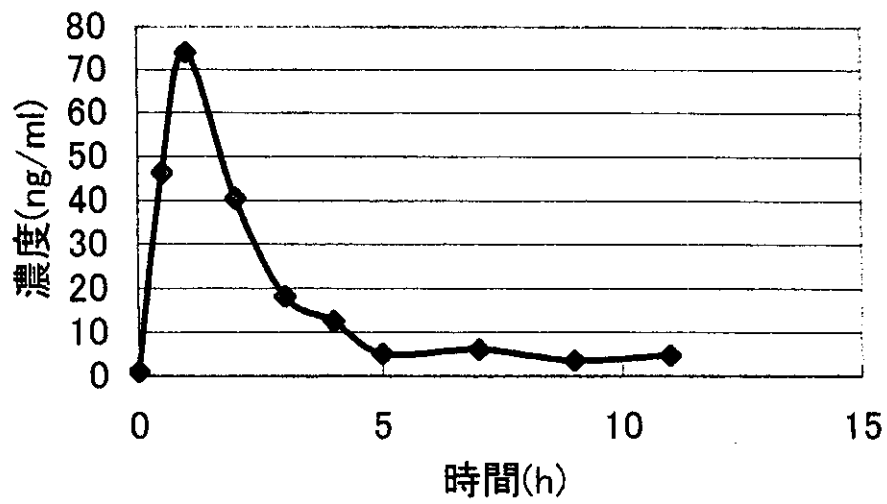


図7 ノニルフェノールのヒストグラム

