

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
分担研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

内分泌かく乱化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング  
生体試料等中のフタル酸エステル類の分析法の開発

主任研究者	牧野恒久	東海大学
分担研究者	岡 尚男	愛知県衛生研究所
研究協力者	後藤智美	愛知県衛生研究所
	伊藤裕子	愛知県衛生研究所
	斉藤 勲	愛知県衛生研究所
	松本 浩	愛知県衛生研究所
研究協力者	中澤裕之	星薬科大学
研究協力者	堀伸二郎	大阪府立公衆衛生研究所

要旨

血清中のフタル酸エステルの分析を開発する上で、操作ブランクの低減化は最も重要な事項である。そこで、主としてこれに関して検討を行い、血清中のフタル酸エステル分析法を確立した。後述の 10 項目に注意を払うことにより、操作ブランクを 10～20 分の 1 に低減化することに成功した。また、今回提示した分析法の平均回収率は、98.7～123.7%、相対標準偏差は 0.86～.752% であり（添加濃度 DBP、BBP、DEHP：100 ppb、DiOP、DiNP：200 ppb）、検出限界は、操作ブランクを低減化できたので、DBP、BBP、DEHP は、10 ppb に、DiOP、DiNP は 50 ppb に設定した。従って、本法を用いて、上述の注意点を留意しながらフタル酸エステルの分析を実施すれば、血清中のフタル酸エステル類の濃度を過剰評価をしてしまう恐れはないと考えられる。

A. 研究目的

フタル酸エステル類は、実験室を含めた我々の生活環境中に多く存在するため、その分析に関しては、様々な

操作過程で混入し、分析値のバックグラウンドに影響を及ぼし、過剰評価をしてしまう恐れがある<sup>1), 2)</sup>。そこで、本研究では、分析操作過程におけるコ

ンタミネーションを低減化した前処理法の開発を念頭に置いて、精度の高い分析法を確立し、分析法ガイドラインの作成をする。本年度は、血清中のフタル酸エステル類の分析法を開発した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬および標準溶液

n-ヘキサン、アセトニトリル、アセトン、硫酸ナトリウムは関東化学製フタル酸エステル測定用を用いた。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 2-エチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジイソオクチル (DiOP)、フタル酸ジイソノニル (DiNP) は、関東化学製環境分析用を用いた。また、内標準物質として用いた DBP-d4、BBP-d4、DEHP-d4、DiOP-d4、DiNP-d4 は、林純薬工業製環境分析用を用いた。フロリジル及びボンデシル PSA は、それぞれ和光純薬工業及びバリアン社製を使用した。フタル酸エステル類の標準溶液は、それぞれの濃度が  $1\mu\text{g/mL}$  になるように n-ヘキサンで調製し、それを適宜 n-ヘキサンで希釈して用いた。

### 2. 試験溶液の調製

スキーム 1 に示した。

### 3. 分析条件

#### GC/MS 条件

装置：島津 GCMSQP5000

イオン源：EI

カラム：DB-5MS (30 m x 0.25 mm, ID, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ , J&W)

カラム温度：80°C (3分) → 10°C/分 → 300°C (5分)

キャリアガス：He (圧力 100 kPa、全流量 50 mL/分、カラム流量 1.5 mL/分)

注入口温度：240°C

インターフェイス温度：300°C

モニターイオン：表 1 に示した。

## C. 結果と考察

### 1. GC/MS による定量

表 1 に掲げた 5 種のフタル酸エステルの標準品を、研究方法に示す GC/MS 条件下で分析し、その SIM プロファイルを図 1 に示した。検量線は 5ppb から 500ppb の間で良好な直線性を示し、血清中のフタル酸エステルの分析を行うための十分な定量性が得られたので、以下の研究では研究方法に示す GC/MS 条件を用いてフタル酸エステルを分析することとした。

### 2. 操作ブランクの低減化

操作ブランクの低減化に関して、分担研究者及び研究協力者の研究室で個々に検討を行った結果、以下の項目が有効であることが判明した。

1) ホールピペット及びメスフラスコ以外の全ての実験器具 (エバポレーターのトラップも含む) は、200°C、2

- 時間加熱し、放冷した後に、使用する直前にフタル酸エステル分析用の n-ヘキサンで洗浄する。なお、n-ヘキサン洗浄は手が器具に直接触れないように、ピンセットを用いて実施する。
- 2) 実験操作開始直前には必ず両手を石けんでよく洗い、その後は、極力実験器具以外には触れないようする。特に、ドアノブに触れた場合には必ず両手を洗浄する。
  - 3) 使用する実験台はアルミホイールで覆い、毎日、交換する。
  - 4) エバポレーターは使用する直前に、フタル酸エステル分析用アセトンを濃縮乾固する。
  - 5) 標準品を扱う際は、作業する実験台とは異なる実験台で行う。
  - 6) ピペットの先端が実験室内の器具装置等に触れないようにする。
  - 7) ホールピペットは必ず基本操作どおり扱い、決して口で吹いたりして溶液を排出しない。
  - 8) 腕時計は外しておく。
  - 9) 髪の毛は小さくまとめる。
  - 10) 爪は短く切る。

これらの項目に注意を払わない場合には、図 2 に示すように操作ブランクの SIM プロファイル上に 100 ppb レベルの DBP 及び DEHP が出現するのに対して、これらのことを実施すると、表 2 及び図 3 示したように操作ブランク値が、それぞれ 10 ppb 以下に低減

されたので、以下に実験ではこれらの点に留意して実験を行うこととした。

### 3. 添加回収率及び検出限界

血清に DBP、BBP、DEHP の濃度がそれぞれ 100 ppb になるように、DiOP、DiNP の濃度が 200 ppb になるように添加したときの平均回収率は、98.7～123.7%、相対標準偏差は 0.86～7.52%であった（表 3、図 4）。また、検出限界については、上述のごとく操作ブランク中の DBP 及び DEHP 濃度を低減化できたので、DBP、BBP、DEHP は、10 ppb に、DiOP、DiNP は 50 ppb に設定した。

以上のように本法の有用性が確認され、本法は血清中のフタル酸エステルを分析するのに十分な性能を有する分析である。

### D. 結論

1. 研究方法に示す GC/MS 条件により、5 種のフタル酸エステルの分析を行ったところ、検量線は 5ppb から 500ppb の間で良好な直線性を示し、血清中を分析するための十分な定量性が認められた。
2. 操作ブランクの低減化に関して検討を行った結果、前述の 10 項目に注意を払うことにより、操作ブランクを低減化することに成功した。
3. 血清にフタル酸エステル類を添加したときの回収率は、98.7～

123.7%、相対標準偏差は 0.86～7.52%であった(添加濃度 DBP、BBP、DEHP:100 ppb、DiOP、DiNP:200 ppb)。

4. 検出限界については、DBP 及び DEHP を操作ブランクを低減化できたので、DBP、BBP、DEHP は、10 ppb に、DiOP、DiNP は 50 ppb に設定した。

従って、本法を用いて、上述の注意点を留意しながらフタル酸エステルの分析を実施すれば、血清中のフタル酸エステル類の濃度を過剰評価をしてしまう恐れはないと考えられる。

#### E. 参考文献

(1) K. Kato, Y. Yoshimura, Y. Ito, H. Oka, H. Nakazawa, J. AOAC Int., 85, 719-723 2002.

(2) 中澤裕之, 宮崎 豊, 伊藤裕子, 後藤智美, 岡尚男, 猪飼誉友, 近藤文雄, 松本浩, 厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「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および動態解明」平成 13 年度分担研究報告書: 95-104, 2001.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

なし

#### 2. 論文

現在執筆中。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

Serum 1g



add CH<sub>3</sub>CN 5ml + NaCl 0.5g + hexane 1ml + internal standard

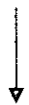
Shake for 3min and centrifuge at 3000rpm for 5min

CH<sub>3</sub>CN layer



Transfer into evaporation flask

Evaporation



Add H<sub>2</sub>O 2ml and extract with hexane ①5ml and ②3ml

Transfer hexane layer into a test tube (small amount of

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Load on the column (Florisil 1g + PSA0.5g + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2g )



Elute 5% acetone/hexane 10ml

Evaporation



Dissolve in hexane 1ml

GC/MS

スキーム 1 血清中のフタル酸エステル分析法

表-1 モニターイオン

フタル酸エステル	定量イオン	参照イオン	IS( 定量イオン)
フタル酸ジ-n-ブチル( DBP)	149	-	DBP-d4 ( 153)
フタル酸ジ 2-エチルヘキシル( DEHP)	149	167	DEHP-d4 ( 153)
フタル酸ブチルベンジル( BBP)	149	91	BBP-d4 ( 153)
フタル酸ジイソオクチル( DiOP)	149	-	DiOP-d4 ( 153)
フタル酸ジイソノニル( DiNP)	149	-	DiNP-d4 ( 153)

測定方法: SIM

注入方法: スプリット( 30: 1)

表-2 10項目の注意事項に留意して実施した操作ブランク値

	DBP	DEHP
平均値 (ppb)	6.4	2.5
標準偏差 (ppb)	0.859	1.480
R. S. D (%)	13.40	58.21
試行回数	7	7

表-3 添加回収率

	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試料 NO.	回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)	回収率(%)
1	104.5	125.5	120.5	106.3	116.4
2	97	116	118	99.7	110
3	94.5	129.5	119.5	100.4	131.4
平均値	98.7	123.7	119.3	102.1	119.3
標準偏差	4.249	5.662	1.027	2.960	8.969
R.S.D	4.31	4.58	0.86	2.90	7.52

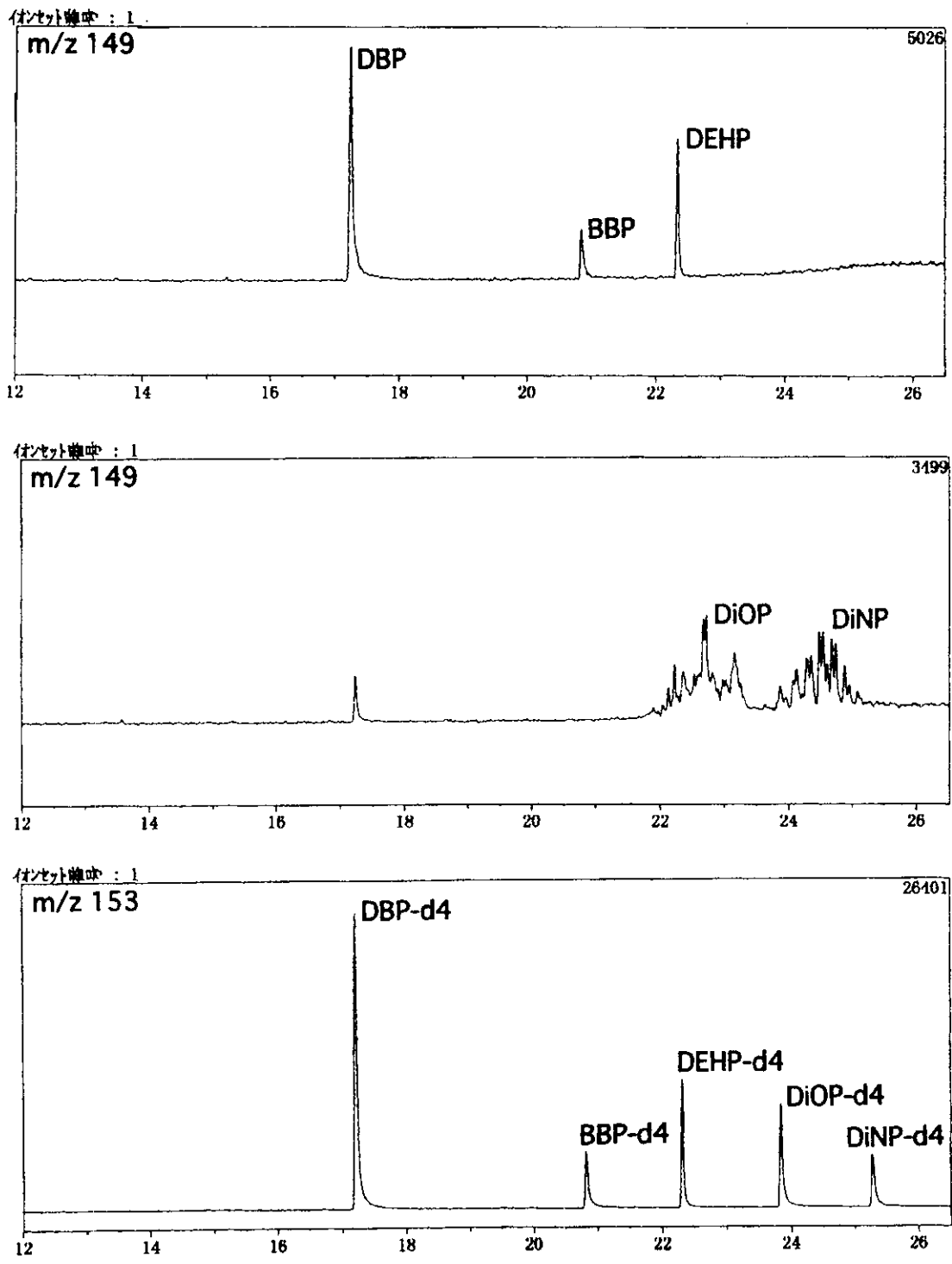


図-1 フタル酸エステル標準品のSIMプロファイル

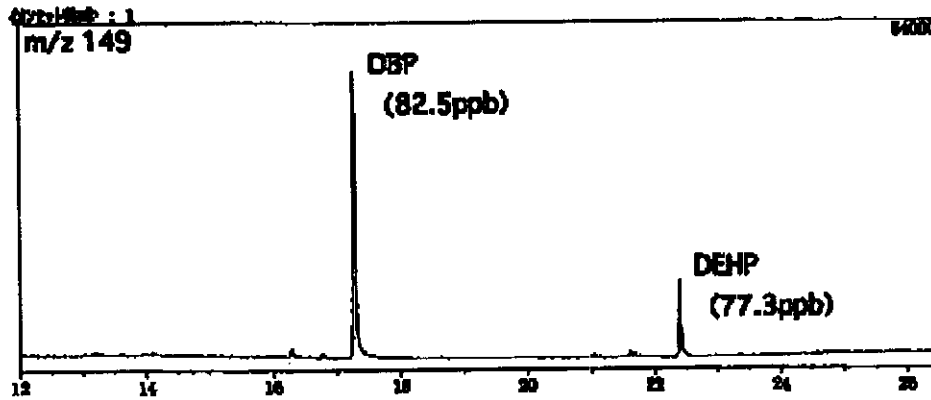


図-2 一般的な注意事項のみに留意して実施した操作ブランクのSIMプロファイル

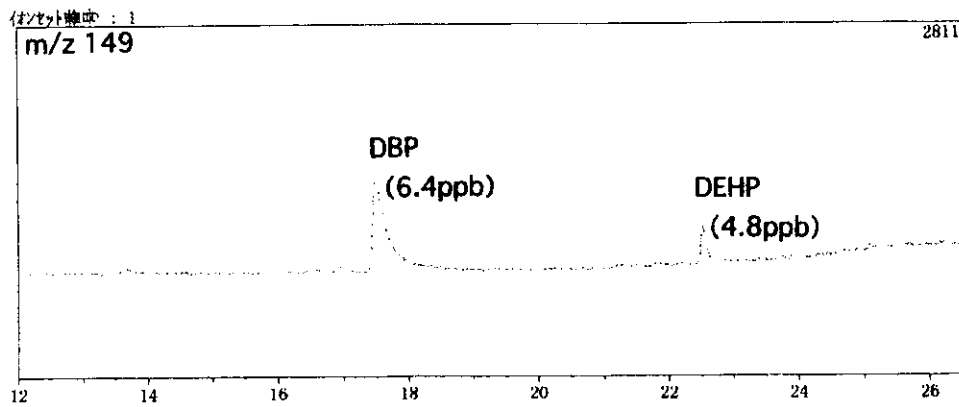


図-3 10項目の注意事項に留意して実施した操作ブランクのSIMプロファイル



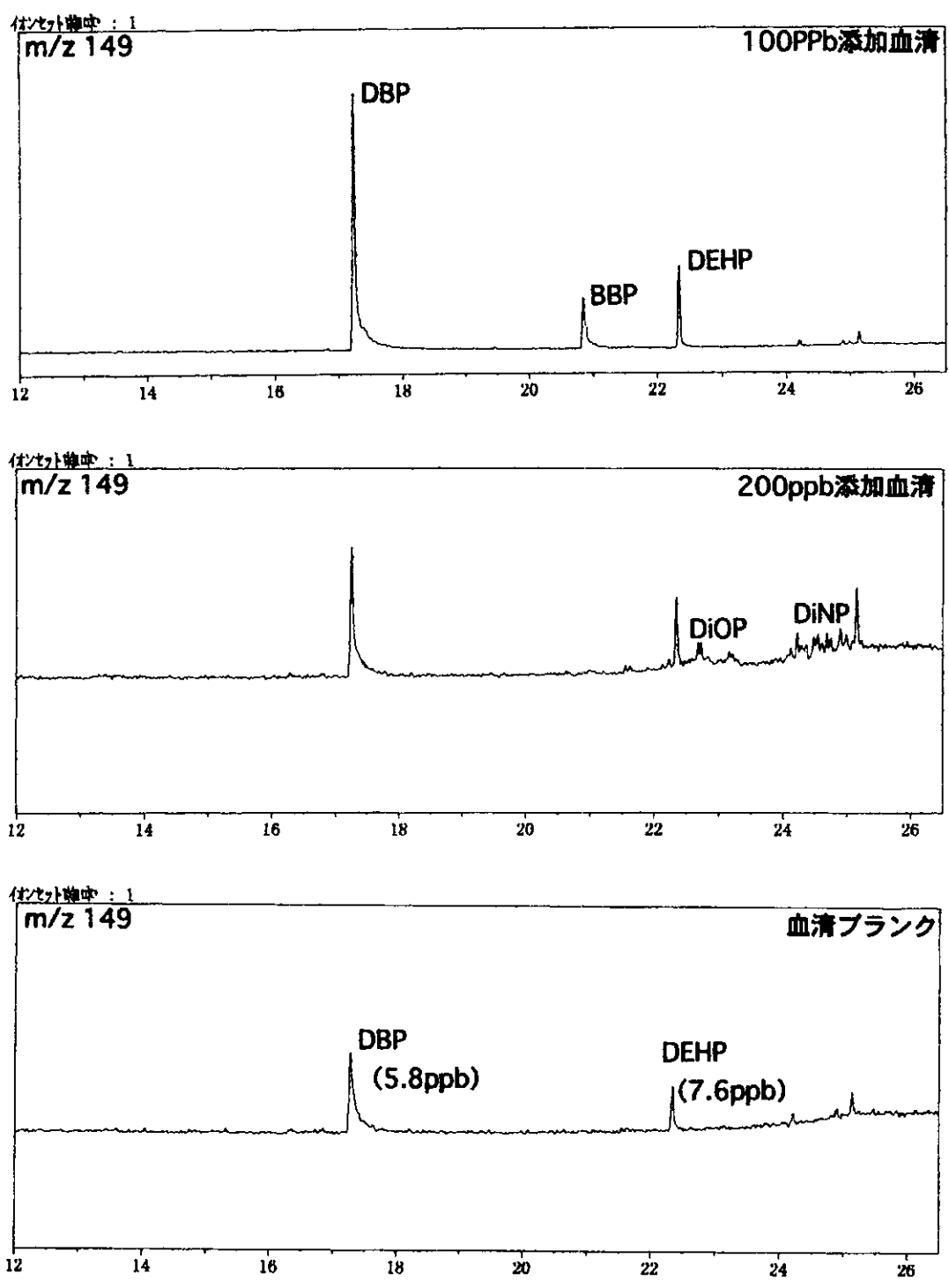


図-4 血清のSIMプロファイル

平成14年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
分担研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究  
生体試料等中のビスフェノールAの分析法の開発

主任研究者 牧野恒久（東海大学医学部教授）  
分担研究者 堀江正一（埼玉県衛生研究所）  
協力研究者 月岡 忠（長野県衛生公害研究所）  
竹上晴美（埼玉県衛生研究所）

### 研究要旨

分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)及びガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)を用いたビスフェノールA(BPA)の信頼性の高い高感度分析法を構築し、血清(母体血、さい帯血)、腹水及び尿中のBPA濃度を測定した。分析に供した母体血、さい帯血、腹水計27検体中の遊離体BPA濃度は、いずれも検出限界レベル(0.2ng/mL)、抱合体も含めた総BPA濃度は、一部検体から1-2ng/mL程度検出されたが、多くの検体は検出限界レベルであった。一方、尿中の遊離体BPAは、平均で0.08ng/mL、総BPA濃度は平均で0.56ng/mLであった。低用量(50 $\mu$ g)及び高用量(1mg)のBPAを経口摂取後の体内動態を調べた。BPAは消化管から速やかに吸収され、24時間以内に投与量の大半が尿中(主としてグルクロン酸抱合体)へ排泄された。従って、BPAの暴露量は、一日尿中のBPAを測定することにより評価することが可能と考える。一方、血中への移行量は少なく、その殆どが抱合体(最高濃度:43ng/mL:経口摂取後0.5時間)で、その時の遊離体BPAレベルは約0.3ng/mLであった。

#### A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質は、低用量においてその作用を発現することが指摘されている。このことから、適切な試料採取法及び高感度且つ選択性に優れた分析法の開発が必要とされている。しかし、試料の採取、保存、クリーンアップに使用される実験用器具類の多くが高分子素材で成型されており、様々な操作過程で混入(コンタミネーション)し、分析値のバックグラウンドや測定値のバラツキに

影響を及ぼし、過剰評価をしてしまう恐れがある。従って、コンタミネーションを防止するため試料採取法及び高感度分析法等の確立及びその標準作業書を整備する必要がある。そこで本研究では、分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)及びガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)を用いたビスフェノールA(BPA)の信頼性の高い高感度分析法を構築し、本分析法を用い

て、血清、尿試料中のBPA濃度を測定する。更に、測定して得られた血清・尿中濃度を検証するため安全量のBPAを経口的に摂取し、体内動態を調べることを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 試料

さい帯血、母体血及び腹水は東海大学病院から提供されたものを用いた。さい帯血及び母体血は産科グループのボランティアから、腹水及び血液は婦人科グループのボランティアから採取した。採取した血液試料は、常法に従って血清を調製し、15分以内に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。腹水も同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。

尿は、埼玉県衛生研究所及び長野県衛生公害研究所職員のボランティアから採取した。採取した尿は速やかに分析に供するか、血液試料と同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。

なお、さい帯血、母体血、腹水及び尿の採取と使用に関しては、いずれもインフォームドコンセントを十分行い、理解が得られたボランティアから採取するなど、倫理面への配慮を行った。

### 2. 試薬

標準品：ビスフェノールA (BPA)及びビスフェノールA-d<sub>16</sub> (BPA-d<sub>16</sub>)は関東化学(株)製の環境分析用試薬を、<sup>13</sup>C-BPAはケンブリッジアイソトープ製を用いた。

β-グルクロニダーゼ：シグマ社製又は、和光純薬工業(株)製、生化学用(いずれも100,000 units/mL以上)を用いた。

精製用カートリッジ：Isolute Multimode カートリッジ(500 mg)：International Sorbent Technology Ltd. 製、又は、スペルコ製、スペルクリンENVI-18 (0.5g)を用いた。カートリッジは予めメタノール10mL、水5mLの順で洗浄した後使用した。

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。カートリッジは予めn-ヘキサン5mLで洗浄して使用した。

BSTFA：ジーエルサイエンス(株)製を使用した。

その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

標準溶液：各標準品20mgを精秤し、メタノール100mLに溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液とした。

### 3. 装置及び測定条件

3.1 高速液体クロマトグラフー質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC-MSDを使用した。測定条件は次のとおりとした。

#### LC-MS測定条件

Apparatus: HP1100 Series LC/MSD (Hewlett Packard)

MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization Mode	ESI, Negative Mode	Column	Zorbax XDB-C18 (150 x 2.1)
Fragmentor	90V	Eluent	0.01% AcOH - MeCN(55:45)
Nebulizer	N <sub>2</sub> (30 psi)	Flow rate	0.18 mL/min
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500V	Injection size	10µl
SIM ion	m/z 227.1, 241.1		

3.2 ガスクロマトグラフー質量分析計：日本電子(株)製 GC-mateを用いた。測定条件は次のとおりとした。

GC：HP-5890 シリーズII  
カラム：DB-5MS 0.32mm×30m×0.25µm  
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 ( $m/z$ )：BPA(357, 372)、BPA- $d_{16}$  (368, 369, 386)  $^{13}C$ -BPA (369)

#### 4. 検量線の作成

##### 4.1 LC/MS測定

安定同位体標識内部標準物質BPA- $d_{16}$ を5ng含んだBPAの0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10及び100ng/mLの溶液を調製し、その10 $\mu$ LをLC-MSに注入する。検出には選択イオン検出(selected ion monitoring, SIM)法を採用し、それぞれモニターイオン  $m/z$  227,  $m/z$  241により得られたSIMクロマトグラムよりピーク面積を求め、BPAとBPA- $d_{16}$ の面積比により検量線を作成した。

##### 4.2 GC/MS測定

試験管にBPAを10~200ngの範囲で段階的に採り、これに安定同位体標識内部標準物質として $^{13}C$ -BPAを100ng添加し、BSTFA 200 $\mu$ Lを加え、アセトンで1mLに定溶した。これを一夜放置し、GC/MS-SIMで測定し、 $^{13}C$ -BPAとの面積比で検量線を作製した。

#### 5. 薬物動態調査

エタノールで溶解した1mg/mLのBPA 1mL (BPA 1mg) あるいは0.1mg/mLのBPA- $d_{16}$  1mL (BPA- $d_{16}$  100 $\mu$ g) を含む清涼飲料水100mLを経口的に単回投与した。摂取後一定時間経過後の尿及び血清を採取した(それぞれ男性1人、なお、血清採取は高用量のケースのみとし

た)。また、健康なボランティア25人(男性12人、女性13人)にBPA- $d_{16}$  50 $\mu$ gを含む清涼飲料水100mLを単回投与し、摂取後5時間経過までの尿を全量採取した。

#### 6. 試験溶液の調製

##### 6.1 LC/MS測定用試験溶液の調製

###### 6.1.1 遊離体BPA測定用試験溶液

血清、腹水は1mLを、尿は2mLを採り、内部標準物質であるBPA- $d_{16}$ を5ng加えた後Isolute Multimodeカートリッジに負荷した。水3mL及び20%メタノール3mLで洗浄した後メタノール3mLで溶出し、減圧乾固後10%メタノール1mLに溶解して試験溶液とした。

###### 6.1.2 総BPA測定用試験溶液

血清、腹水は1mLを、尿は2mLを採り、0.2M酢酸緩衝液(pH 5) 1mL、 $\beta$ -グルクロニダーゼ6,500units/mL(試薬 $\beta$ -グルクロニダーゼを0.2M酢酸緩衝液(pH 5)で10倍希釈)を50 $\mu$ L加えた後、37℃で1時間インキュベートした。その後の操作は遊離体BPA測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

##### 6.2 GC/MS測定用試験溶液の調製

###### 6.2.1 遊離体BPA測定用試験溶液

尿試料100mLを共栓付き三角フラスコに採り、 $^{13}C$ -BPA 0.1 $\mu$ gを加え、これに(1+1)リン酸1mLを加え、pH 3以下にした。これを、予めメタノール5mL、精製水10mLで活性化したC18カートリッジに負荷しBPAを抽出した。カートリッジを10%メタノール10mL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BSTFA 200 $\mu$ Lとアセトン2mLを加え一夜放

置しTMS化し、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、超音波洗浄機で溶解させ、予めn-ヘキサン5mLで洗浄した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。更に、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、先の流出液と合わせた。流出液に窒素ガスを吹き付け、1mLに濃縮し、これをGC/MS-S1Mで定量した。

#### 6.2.2 総BPA測定用試験溶液

尿試料100mLを共栓付き三角フラスコに採り、 $\beta$ -グルクロニダーゼ溶液100 $\mu$ Lと $^{13}$ C-BPA 0.1 $\mu$ gを加え、37 $^{\circ}$ Cで90分間酵素処理した。その後の操作は遊離体BPA測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

### C. 結果及び考察

#### 1. LC/MSによる生体試料中のBPAの分析

前年度までは主に遊離体BPAを中心に検討してきたが、BPAの総暴露量を評価するため、本研究では抱合体も含めた総BPAを評価することとした。

##### 1.1 LC-MS測定条件の検討

先に構築した測定条件（平成12年度研究成果報告書）に概ね準拠して測定した。しかし、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理した生体試料、特に尿についてはBPA溶出付近に夾雑物ピークが出現し、1ng/mL前後のBPAを評価するには困難な場合が多かった。そこで、LC分離条件を検討し、尿中の総BPA測定に関しては、カラムにCapcell Pak C18-AQ (15cm x 2mm)を、移動相に0.01%酢酸-アセトニトリル(60:40)を用いることとした。

##### 1.2 前処理法の検討

血清及び尿中の遊離体BPAの前処理

には先に報告した方法（平成12年度研究成果報告書）を採用した。

総BPAの前処理、即ち抱合体の加水分解条件は、血清1mLに抱合体を含む尿50 $\mu$ L添加して検討した。 $\beta$ -グルクロニダーゼ量を5、10、20及び30 $\mu$ Lと変えて加水分解率に及ぼす影響を調べた結果、いずれの量においても37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベートすることによりほぼ完全に加水分解された。そこで、本法では酵素量は5 $\mu$ Lとした。なお、5 $\mu$ Lの $\beta$ -グルクロニダーゼを再現良く分取することは困難であったので、0.2M酢酸緩衝液で $\beta$ -グルクロニダーゼを10倍希釈し、その50 $\mu$ Lを採ることとした。

##### 1.3 添加回収実験

血清及び尿にBPA及び安定同位体標識内部標準物質BPA-d<sub>16</sub>を添加（5ng/mL）し、回収率を求めた結果、血清及び尿とも概ね70%以上であった（BPA-d<sub>16</sub>による補正なしの回収率）。本法による検出限界は、血清で0.2ng/mLであった。

##### 1.4 血清、腹水、尿中のBPA濃度

本法により、東海大学病院で採取された母体血、さい帯血、腹水等計27検体を分析した結果、遊離体BPAはいずれも操作ブランクレベル（0.2~0.3ng/mL）であった。一方、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理した一部の試料からは1-2ng/mLレベルでBPAが検出された（表1）。また、健康なボランティア5名から採取した一時尿を分析した結果、血液サンプルと同様、遊離体BPAはいずれも操作ブランクレベル（0.2~0.3ng/mL）であったが、抱合体を含めた総量では一部試料から1-2ng/mLレベルでBPAが検出された。

なお、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理した血清及び尿試料は、未処理の試料に比べ、BPA溶出付近に夾雑物由来と思われるピークが時折出現した。従って、より信頼性の高い分析値を得るためには、タン

デムタイプのLC/MS/MSによる測定が好ましいと考える。

## 1.5 BPAの体内動態

米国EPAによるBPAの参照用量RfD (0.05mg/kg)及び昨年出されたEUの暫定TDI (0.01mg/kg)値を参考にして、BPAの安全摂取量を算出した。それを基にBPAを低用量(50 $\mu$ g)及び高用量(1mg)を経口的に単回投与し、摂取後の体内動態をGC/MS(低用量ケース)及びLC/MS(高用量ケース)を用いて調べた。低用量及び高用量のケースとも、BPAは消化管から速やかに吸収され、投与量の大半が図1に示すとおり尿中(クレアチニン補正:尿中クレアチニン濃度を1mg/mLとして算出、高用量ケースでは約80%が24時間以内に主としてグルクロン酸抱合体として)へ排泄された。しかし、血中への移行量は少なく、図2に示すとおり、その殆どが抱合体(最高濃度:43ng/mL:経口摂取後0.5時間)で、その時の遊離体レベルは0.3ng/mL程度であった。血清試験溶液の代表的LC/MS-SIMクロマトグラムを図3に示す。

## 2. GC/MSによる生体試料中のBPAの分析

### 2.1 健康成人尿中のBPA濃度

成人尿(n=11)を採取し、GC/MS法により総BPAと遊離体BPAについて分析した結果を図4に示す。総BPA濃度は、0.19~1.38ng/mL(平均0.56ng/mL)、遊離体BPA濃度は、0.01~0.27ng/mL(平均0.08ng/mL)であり、遊離体BPAの割合は2.6~29%(平均12%)であった。昨年の一時尿の総BPA濃度は平均0.87ng/mLであり、今年度は昨年に比べ、若干低い値であった。

### 2.2 BPAの尿中への排泄

ボランティア25人にBPA-d<sub>16</sub> 50 $\mu$ gを

含む清涼飲料水を投与し、摂取後5時間の尿を採取して分析した。その結果を図5に示す、総BPA濃度は、27~80ng/mL(平均57.2ng/mL)、遊離体BPA濃度は、0.13~5.5ng/mL(平均1.13ng/mL)、排泄量は17.6~48.6 $\mu$ g(平均38 $\mu$ g:投与量の76%)であり、遊離体BPAの割合は0.34~8.1%(平均1.9%)であった。

更に、BPA-d<sub>16</sub>の排泄をみるため、BPA-d<sub>16</sub> 100 $\mu$ gを含む清涼飲料水100mlを投与し、一定時間間隔で26.5時間採尿し、分析した。その結果、摂取後30分後にグルクロン酸抱合体として尿中最高値の90ng/mL、60分後には26ng/mLに減少し、5時間後にはほぼ元の濃度付近にまで低下した。BPAは消化管から速やかに吸収され、尿中へグルクロン酸抱合体として排泄され、低用量暴露では24時間で約97%が排泄された。

## D 結論

1. LC/MS及びGC/MSを用いたビスフェノールA(BPA)の信頼性の高い高感度分析法を構築し、血清(母体血、さい帯血)、腹水及び尿中のBPA濃度を測定した。

・血清(さい帯血、母体血)及び腹水中の遊離体BPA濃度は操作ブランクレベル(0.2ng/mL)であった。一方、抱合体も含めた総BPA濃度は、一部の試料からは1-2ng/mLレベルで検出された。

・尿中では、遊離体BPA濃度は平均で0.08ng/mL、抱合体も含めた総BPAでは、平均で0.56ng/mLが検出された。

2. 低用量(50 $\mu$ g)及び高用量(1mg)のBPAを経口的に単回摂取し、摂取後の体内動態を調べた。

・BPAは消化管から速やかに吸収され、投与量の約80-97%が24時間以内に尿中(主としてグルクロン酸抱合体)へ排

泄された。従って、一日尿中のBPAを測定することによりBPAの暴露量を評価することが可能と考える。

・尿中への移行量に比べ、血中への移行量は少なく、その殆どが抱合体（最高濃度：43ng/mL：経口摂取後0.5時間）で、その時の遊離体BPA濃度は約0.3ng/mLであった。

## E. 研究業績

### 1. 論文発表

1) Tadashi Tsukioka, John Brock, Sam Graiser, Johnny Nguyen, Hiroyuki Nakazawa and Tsunehisa Makino, Determination of trace Amounts of Bisphenol A in Urine by Negative-Ion Chemical-Ionization-Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Analytical Science, 19, 151(2003)

### 2. 学会発表

1) 堀江正一、吉田栄充、中澤裕之、牧野恒久、LC-MSによる魚肉中ノニルフェノール、オクチルフェノールの分析、第83回日本食品衛生学会（東京）平成14年5月

2) 月岡 忠、John Brock, Sam Graiser, Johnny Nguen, 中澤裕之、牧野恒久、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、第10回環境化学討論会、平成13年5月

## F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

## G. 健康危険情報

該当なし。

表1 生体試料中の総BPA（遊離体+抱合体）の分析

試料	BPA (ng/ml)		試料	BPA (ng/ml)	
	血清	腹水		母体血	臍帯血
IZ 40	<0.2	0.23	IW16	1.11	1.57
IZ 41	<0.2		IW17	1.07	1.51
IZ 42	<0.2	<0.2	IW23	<0.2	<0.2
IZ 45	<0.2	<0.2	IW28	0.51	<0.2
IZ 53	0.29	<0.2	IW29	<0.2	0.65
IZ 54	<0.2	<0.2	IW31	0.25	0.33
IZ 64	<0.2	<0.2			
IZ 66	<0.2	0.29			

検出限界=0.2ng/mL

BPA遊離体は全て検出限界レベル(0.2-0.3ng/mL)

図1 尿中のBPAレベルの推移

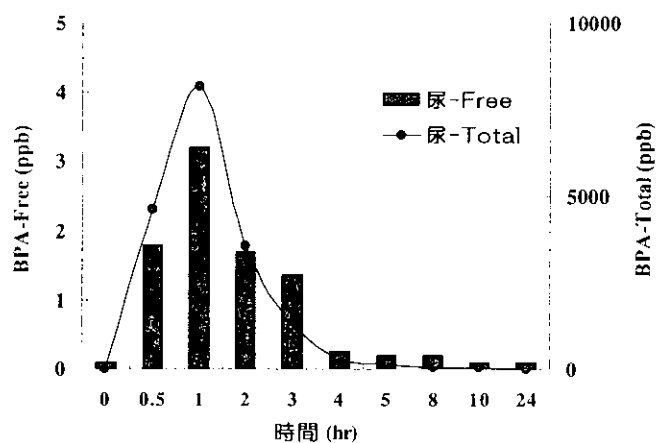
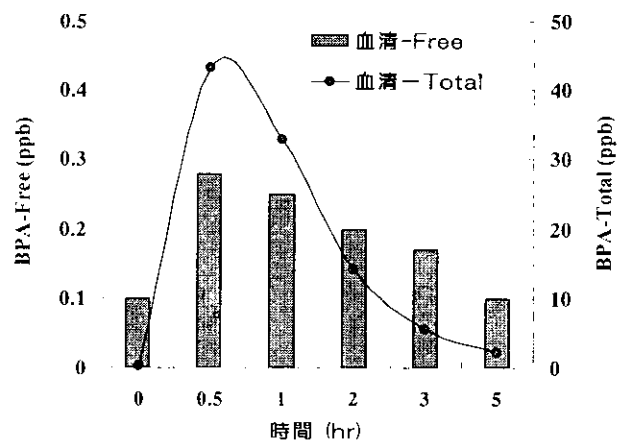


図2 血清中BPAレベルの推移





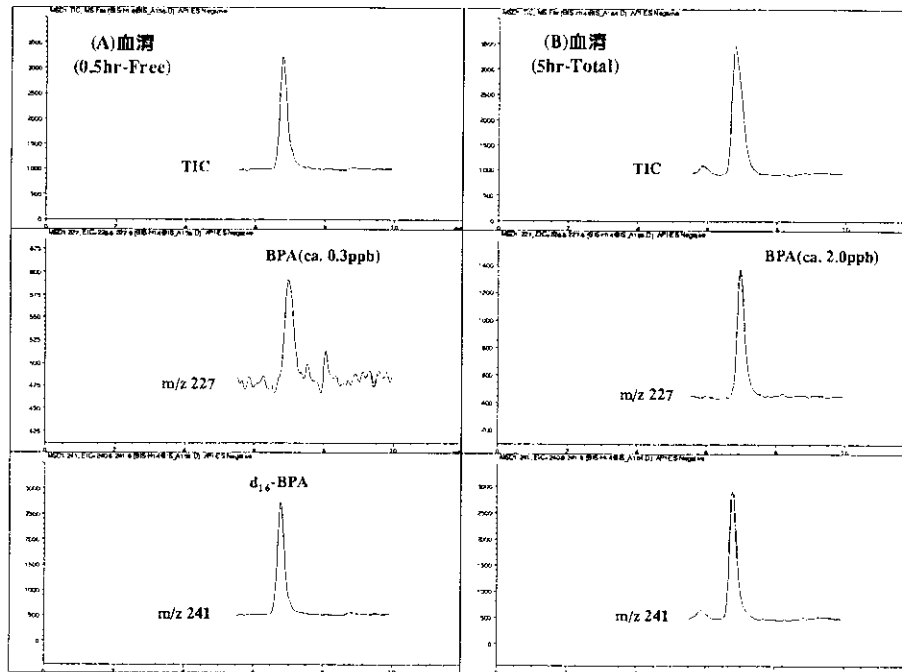


図3 BPA単回投与(1mg)後の血清試験溶液の代表的LC/MS-SIMクロマトグラム  
 (A) 0.5時間後血清中の遊離体BPA, (B) 5時間経過後血清中の総BPA

図4 尿中のBPA濃度 (n=11)

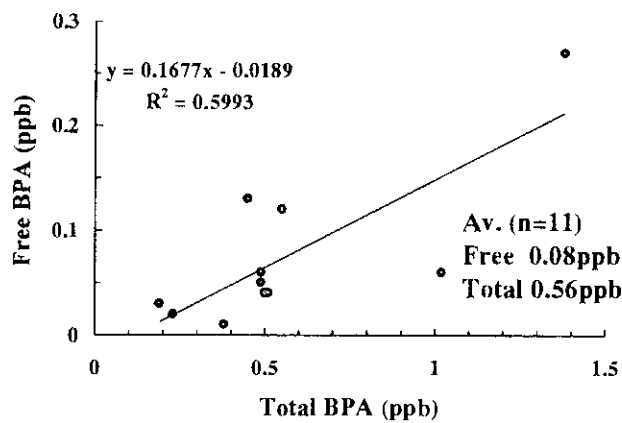
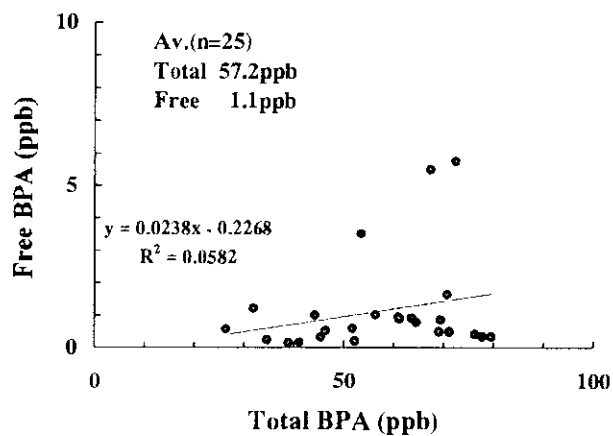


図5 BPA-d16の尿中への移行(n=25)



平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金

(食品・化学物質安全総合 研究事業)

分担研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

『生体試料等中のアルキルフェノール類 (4-ノニルフェノール及び  
4-オクチルフェノール) の分析法の開発』

主任研究者 東海大学 医学部 母子生育学系産婦人科学部門 牧野 恒久

分担研究者 星薬科大学 薬品分析化学教室 中澤 裕之

研究協力者 神奈川県衛生研究所 平山 クニ

神奈川県衛生研究所 藤巻 照久

星薬科大学 薬品分析化学教室 吉村 吉博

星薬科大学 薬品分析化学教室 加藤 嘉代子

星薬科大学 薬品分析化学教室 井之上 浩一

星薬科大学 薬品分析化学教室 川口 研

#### 研究要旨

アルキルフェノールの一つであるノニルフェノール及びオクチルフェノールの分析法の開発と測定ガイドライン作成に関する基礎的検討を実施した。現在までに報告されている暴露要因や残留量から推定し、ノニルフェノールの一日最大暴露量は、0.2 mg 以下と算出された。そのことより、高感度な分析手法の構築が要求されるため、液体クロマトグラフィー/質量分析法及びガスクロマトグラフィー/質量分析法を駆使し、新たな測定法を検討した。構築した分析法は、十分に生体試料へ応用できることが明らかになった。

#### A. 研究目的

アルキルフェノール類は、様々な工業製品、界面活性剤、樹脂モノマー、プラスチック添加剤等の原料として利用されてきた。1991年、A. M. Sotoらにより改良型ポリスチレン製実験器具から溶出する 4-ノニルフェノール (NP) にヒト乳がん細胞 (MCF-7) 増殖能 (エストロゲン活性) を有する

ことが報告された<sup>1)</sup>。また、1994年、R. Whiteらは、4-オクチルフェノール (OP) 等にもその活性が観察され、生体影響を懸念している<sup>2)</sup>。そして、現在では、*in vitro* や *in vivo* 系での多くの研究が報告され、エストロゲン活性のみではなく、代謝阻害への影響<sup>3)</sup>、ヒト神経 Nicotinic acetylcholine receptor/channels への抑制<sup>4)</sup>、コル

チゾール産生能に対する阻害<sup>5)</sup>などのヒト由来の細胞等を用いた検討でも、様々な活性が確認されている。すなわち、ヒト健康影響を考慮した場合、日常製品に多く利用されるNPやOPでは、早急に生体暴露モニタリングの必要性が求められる。その一方で、分析値の信頼性や過剰評価などが問題とされ、早急な対策が必要と思われる。

本研究では、分析操作過程における汚染原因の解明、コンタミネーションの低減化を目的とした前処理法の開発を視野において、精度の高い超微量分析法の開発、分析法ガイドラインの作成等を検討し、構築した分析法を駆使して当該化学物質の暴露状況を解明する。

ヒト生体暴露量を評価する上で、健康人や病院通院者等の血液、母乳、尿等の生体試料中当該化学物質の濃度を把握するとともに、その総合的なリスク評価を目指す。更にマウス等の実験動物を用いたアルキルフェノール類に関する研究においては、実験動物の飼育環境（餌、給水瓶、ケージ、床敷、空気等）が影響を及ぼすのではないかと危惧されており、信頼性ある実験結果を追求するには、最新機器分析装置を駆使し、その実態把握と改善策を検討する。

## B. 研究方法

### B. 1. 現段階でのリスクアセスメント

現在までに報告されている暴露汚染源中の濃度などを考慮して、一日摂取量や主な暴露要因を推定する。

### B. 2. 試薬・分析装置

#### 【試薬】

本検討で用いた標準品を下記に示す。

4-nonylphenol mix (NP) : 関東化学社製 (環境分析用)

4-*tert*-octylphenol (OP) : 関東化学社製 (環境分析用)

4-n-nonylphenol - 2, 3, 5, 6-d<sub>4</sub>  
(NP-d<sub>4</sub>) : 関東化学社製

4-*tert*-Octylphenol - 2, 3, 5, 6-d<sub>4</sub>  
(OP-d<sub>4</sub>) : 林純薬社製

4-(1-methyl) octylphenol-d<sub>5</sub>  
(m-OP-d<sub>5</sub>) : 林純薬社製

#### 【溶媒】

前処理に利用する溶媒は、すべて残留農薬用とした。また、LCの移動相として用いた溶媒は、すべて和光純薬社製 HPLC 用を用いた。また、実験用水は Millipore 社製 Milli-Q gradient A 10 with an EDS polisher で精製したものなど汚染のないことを確認したものをを用いた。

#### 【実験用器具】

ガラス製の実験器具は、すべて 200℃以上で加熱後使用した。

#### 【LC/MS 装置】

液体クロマトグラフ/質量分析法 装置 (LC/MS) 【Agilent Technologies 社製 Agilent LC/MSD Superior Line】、HPLC 用ポンプ : 島津社製 LC-10ADvp  
LC 用カラム : 関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (100 x 2.0 mm, 5 μm)  
LC 用ガードカラム : 関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (5 x 2.0 mm, 5 μm)

前処理用カラム : TOSOH 社製

TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm)

#### 【GC/MS 装置】

ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS) 【Agilent Technologies 社製 Agilent 6890N GC/5973N】加熱脱着システム 【Gerstel 社製 TDS2 thermodesorption system/TDS-A autosampler/CIS 4 PTV】

カラム:HP-5ms (0.25 mm x 30 m, 0.25  $\mu$ m)

### B. 3. 定量法

各標準品を化学天秤で 100 ml 用メスフラスコに 100 mg 量り取り、標準原液としてメタノールで 1.0 mg/ml とする。その後、各種濃度にメタノールを加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう希釈する。

LC/MS-SIM もしくは GC/MS-SIM 法により標準・試料溶液を測定し、内標準法を用い各濃度範囲内における検量線を作成し、定量分析を行った。

### C. 研究結果

#### C. 1. ヒト暴露評価と汚染要因

健常人での暴露モニタリングに関する生体試料分析の報告は非常に少ない。その報告の中で、健常人の血液試料中のアルキルフェノールは 1.0-0.5 ng/ml で検出されているが、検体採取や保存時の汚染が懸念されている<sup>6)</sup>。

また、非職業暴露を想定したヒト暴露量の報告としては、下記のように算出している<sup>7)</sup>。

Daily intake on NP < 0.16 mg/day

そこで、各種暴露要因となりうる報告をもとに独自に健常人暴露量の算出を実施した。

#### 食事經由

食用魚類<sup>8)</sup>:一日 200 g 摂取した場合、160  $\mu$ g/day

食品用包装材<sup>9)</sup>:ラップフィルム包装食品からの約一日暴露量換算値 35  $\mu$ g/day

#### 飲料水經由

飲料水<sup>10)</sup>:一日 1 L 摂取した場合、0.04  $\mu$ g/day

#### 空気經由

室内大気<sup>11)</sup>:1人1日の呼吸量 (15m<sup>3</sup>/day とする) を乗じ、吸収率を 100% と仮定した場合、0.75  $\mu$ g/day

以上の最大汚染値から考慮して、一日最大暴露量を下記のように算出した。

Daily intake on NP < 0.2 mg/day

この値は、上記に示した Müller らの報告<sup>7)</sup>とほぼ同様の値となった。また、汚染原因の状況としては、食事要因 > 大気要因 > 飲料水となる。その一方、近年プラスチック製医療用具から NP が検出された報告がある<sup>12)</sup>。つまり、職業暴露以外の生活環境においても一日最大暴露量よりも高濃度に汚染