

て、表1にまとめた。いずれもエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) において、イオン化が可能であった。つまり、LCの分離条件が達成できれば、測定できることが伺える<sup>1-3)</sup>。

また、本研究での化学物質暴露モニタリングに関しては、代謝を考慮しながら分析を実施する。具体的には、BPA, NP, OP では、グルクロン酸抱合体の存在を考慮する<sup>1,3)</sup>。また、可塑剤であるフタル酸エステル類のいずれもモノ体みのモニタリングを実施することとする<sup>5)</sup>。

少量の生体試料を対象とした場合、オンラインで直接前処理を実施し、ダイレクトに測定できることが望まれる。そこで、本研究において、カラムスイッチング-LC/MS法を応用することとした。具体的な概略図を図1に示す。その一例として、ヒト血液試料(10  $\mu$ l)を用いてDEHP及びMEHPの分析を試みた。その際のクロマトグラムを図2に示す<sup>4)</sup>。また、ヒト尿中のNP及びOPの分析にも応用し、良好な結果を得ることができた(図3)<sup>3)</sup>。本方法を用いて、難揮発性の内分泌かく乱化学物質の一斉分析を実施する。

### C. 2. GC/MS法による分析条件の検討

GC/MS法は、従来から環境汚染物質のモニタリング評価に応用され、様々な報告がされている。分離能が高いため、一斉分析が容易であり、高感度検出も可能である。その一方で、環境試料のような多量得られる場合には、固相抽出法や液-液抽出法を利用して、

濃縮後分析を行えるが、少量の生体試料では、本操作が困難であり、効率の良い抽出・濃縮法が望まれる。本研究では、液-液分配の理論を応用したStir Bar Sorptive Extraction (SBSE)法を利用して、簡単な操作で、高感度、広範囲の化合物を分析することを目指し、基礎的検討を実施した。

具体的な操作過程としては、生体試料溶液(希釈もしくは直接)中にTwisterを入れ、一定時間攪拌した後、TDS加熱脱着システム/GC/MSDシステムで分析を行う。TDSシステムは、バルブレス構造、不活性、高脱着流量(> 50 ml/min以上)といった特徴をもった加熱脱着装置である。このTDSシステムとTwisterの特長を活用することによって、特異的な高感度測定を行うことができる。Gerstel社製Twisterは、100%ポリジメチルシロキサン(PDMS)をコーティングさせた攪拌子(1.5 cm)である。磁石をガラスでコーティングし、さらにこの表面を不活性化処理した後、厚さ500  $\mu$ m、体積にして約24  $\mu$ lの100% PDMSをコーティングしてある。これは、SPMEでの液相量、0.5  $\mu$ lと比べると、約50倍に相当する。

実試料の測定として、ヒト血液中のNP及びOPの添加回収実験を実施した。その結果を表2に示す。いずれも良好な結果を得ることができた。また、本方法を利用して、採血用器具【ベノジェクトII採血針S(21G)、ベノジェクトIIホルダーS、ベノジェクトII真空採血管(VP-P100)】について、血液検体

保存を行い、汚染状況の確認を実施した。GC/MS-SCAN のクロマトグラムを図 4 に示す。その結果、BHT の汚染が確認された。

#### D. 結論

微量の生体試料から多種類の内分泌かく乱化学物質を一斉分析する際、最新の理化学的手法に加え、工夫を加えた前処理方法を組み合わせることにより、達成できる可能性を示唆することができた。本方法の精度管理を行うことにより、微量の試料から多くの内分泌かく乱化学物質の暴露状況を把握することができる。ヒト暴露評価を実施する際、代謝を十分に考慮する必要があるため、代謝酵素によるフリー体の測定などを行い、補正を行うことも考慮する。

#### E. 参考文献

- 1) K. Inoue, A. Yamaguchi, M. Wada, Y. Yoshimura, T. Makino and H. Nakazawa: Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma using liquid chromatography - electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 765, 121-126 (2001)
- 2) K. Inoue, M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura and H. Nakazawa: Application of liquid chromatography - mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *J.*

*Chromatogr. B* 773, 97-102 (2002)

- 3) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, N. Takai, Y. Yoshimura, M. Horie, S. Izumi, T. Makino and H. Nakazawa: Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching LC/MS coupled with on-line extraction. *Anal. Chim. Acta* submitted
- 4) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura and H. Nakazawa: Column-switching high-performance liquid chromatography - electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 527-533 (2003)

#### F. 発表

特になし

表 1 エレクトロスプレーイオン化法による各種イオン検出及び内標準補正物質

化合物名	略語	分子量	イオン化モード	検出イオン( $m/z$ )	内標準物質
ビスフェノールA	BPA	228	Negative	$[M-H]^-$ , 227	BPA- $^{13}C_{12}$
ノニルフェノール(mix)	NP	220	Negative	$[M-H]^-$ , 219	4-(1-methyl) octylphenol- $d_5$
4-tert-オクチルフェノール	OP	206	Negative	$[M-H]^-$ , 205	4-(1-methyl) octylphenol- $d_5$
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	DEHP	390	Positive	$[M+H]^+$ , 391	DEHP- $d_4$
フタル酸モノ-2-エチルヘキシル	MEHP	278	Negative	$[M-H]^-$ , 277	MEHP- $d_4$
フタル酸モノベンジル	MBzP	256	Negative	$[M-H]^-$ , 255	MBzP- $d_4$
フタル酸モノブチル	MBP	222	Negative	$[M-H]^-$ , 221	MBP- $d_4$
フタル酸モノエチル	MEP	194	Negative	$[M-H]^-$ , 193	MEP- $d_4$

表 2 SBSE-TDS-GC/MS 法による生体試料中の NP 及び OP の添加回収

Urine

	0.5 ng/ml (RSD %)	10 ng/ml (RSD %)
NP	98.5 (1.6 %)	99.8 (2.6 %)
OP	98.1 (1.5 %)	99.1 (3.9 %)

Serum

	0.5 ng/ml (RSD %)	10 ng/ml (RSD %)
NP	98.1 (2.5 %)	99.2 (3.2 %)
OP	95.8 (3.0 %)	96.5 (2.9 %)

(n=6)

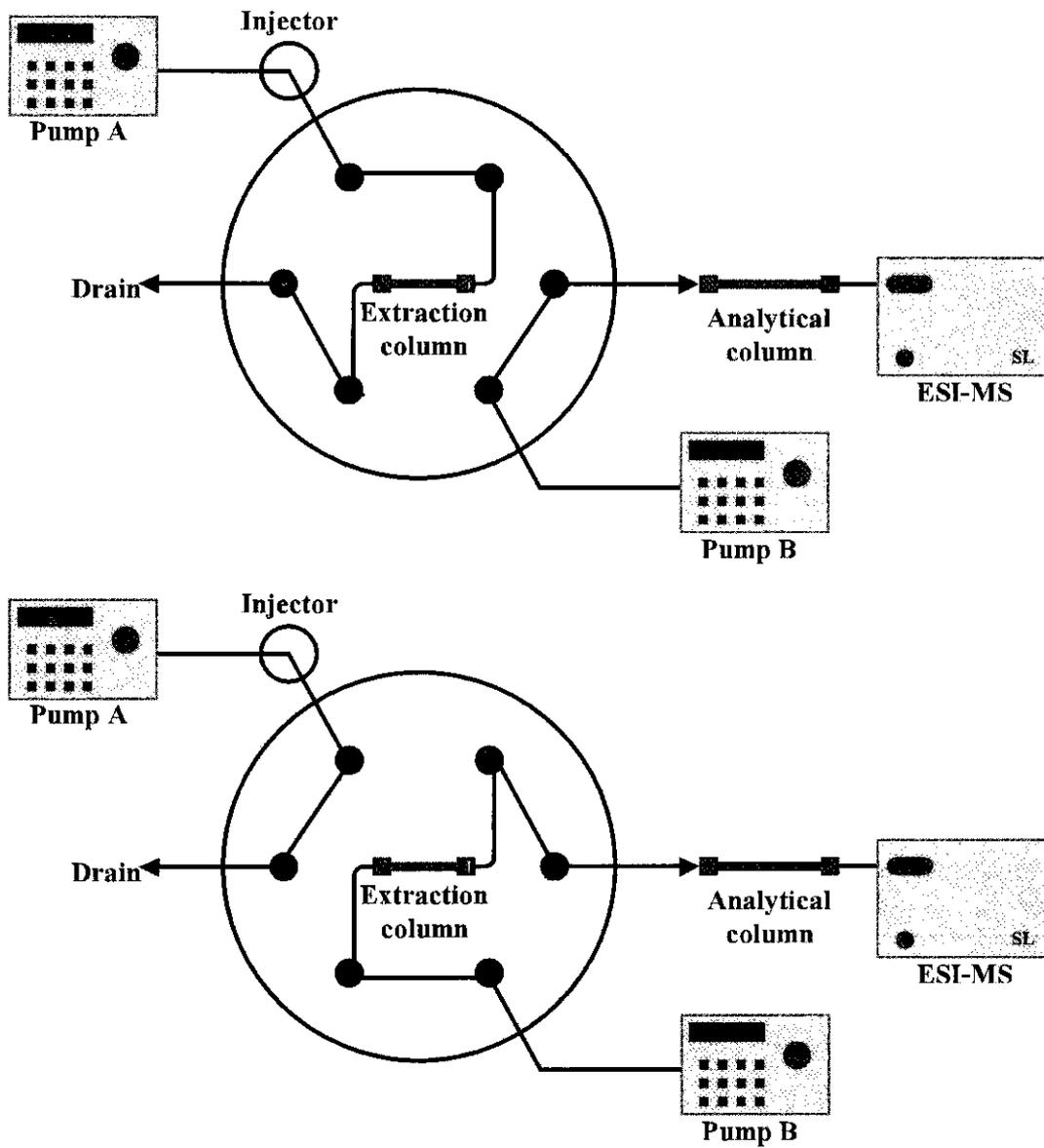


図1 カラムスイッチング-液体クロマトグラム/質量分析法の概略図

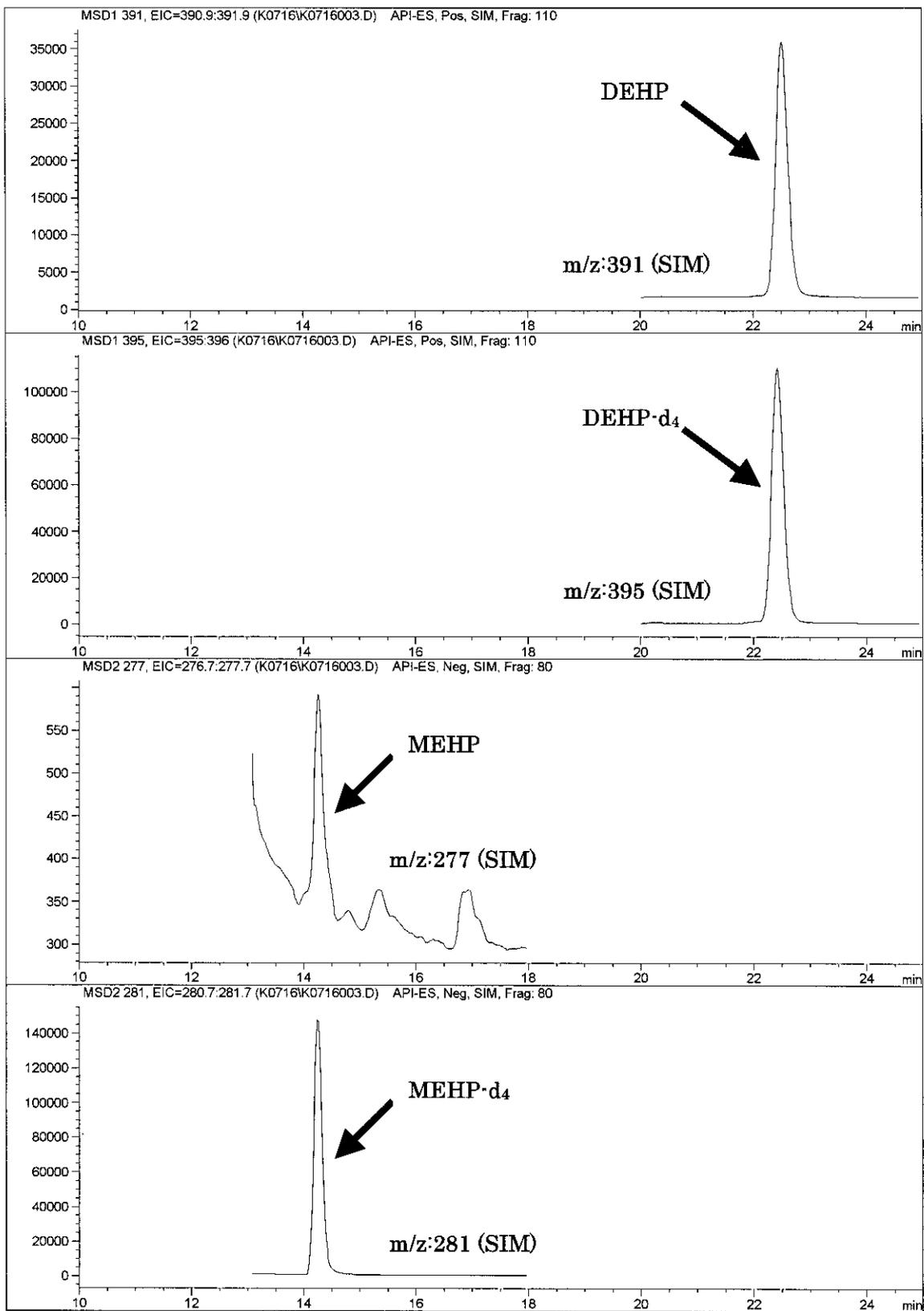


図2 カラムスイッチング-LC/MS分析によるDEHP及びMEHPのクロマトグラム

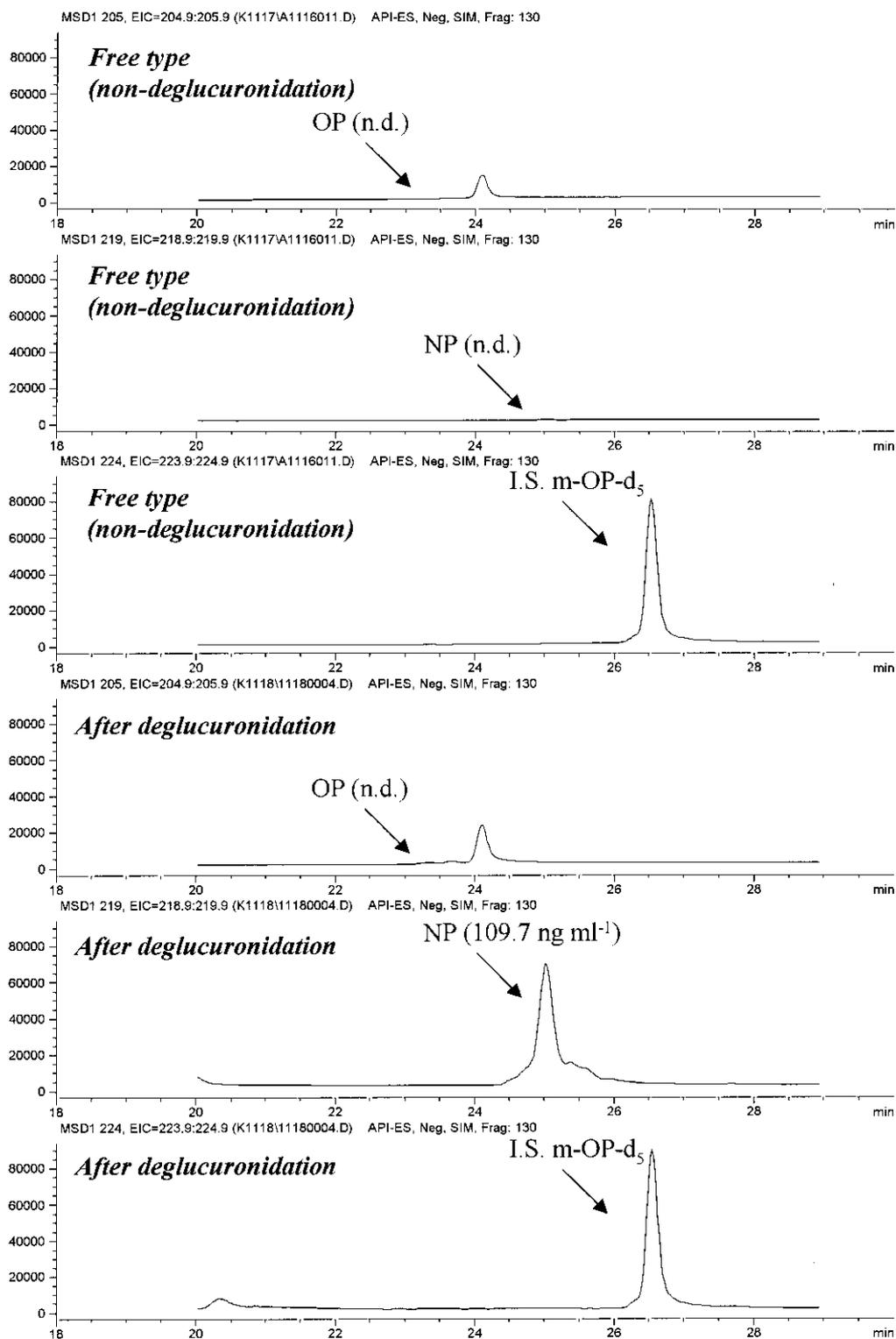


図3 カラムスイッチング-LC/MS分析によるNP及びOPのクロマトグラム

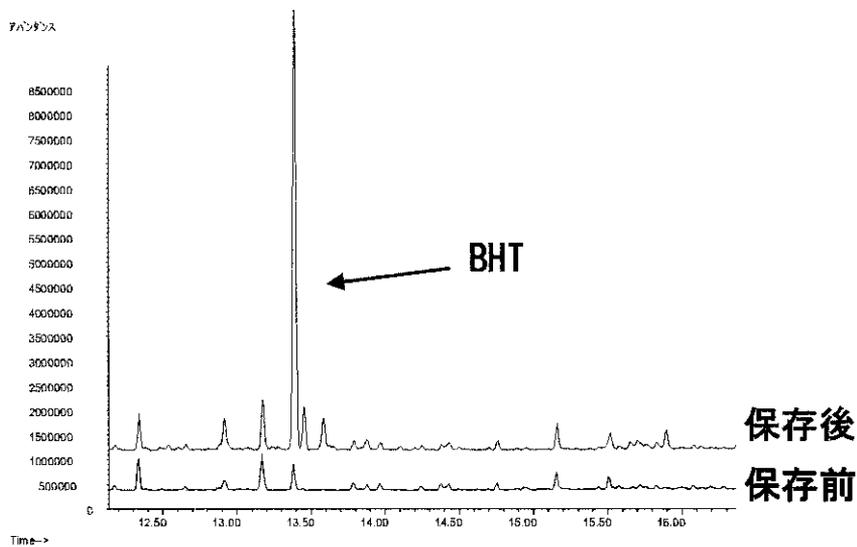


図 4 SBSE-TDS-GC/MS-SCAN による採血用器具保存時の血液試料のクロマトグラム

## 別紙5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山田秀人, 藤本征一郎	性分化異常総論 A. 早期診断と取り扱い	武谷雄二ら	新女性医学大系 第17巻 性の分化とその異常	中山書店	東京	2002	121-130

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, and Fujimoto S	Maternal serum and amniotic fluid Bisphenol A concentrations in the early second trimester	Reprod Toxicol	16(6)	735-739	2002
Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y, Tozaki S, Kobashi G, Kato EH, Fujimoto S, Kishi R	Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss	Mol Hum Reprod	9(3)	165-169	2003
岸玲子, 佐田文宏	「内分泌かく乱物質による先天異常と不妊・不育症に関する疫学的研究」	『食品衛生研究』	62(6)	44-54	2002
Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J	Decreased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in spontaneous abortions with normal chromosome karyotype	Hum Reprod	18	616-620	2003
Morikawa M, Yamada H, Okuyama K, Kato EH, Watari M, Kataoka S, Cho K, Minakami H	Prenatal diagnosis and fetal therapy of congenital cystic adenomatoid malformation of the lung: a report of five cases	Congenital Anomalies			2003
Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H	Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: Increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood	Am J Reprod Immunol			2003
Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S, Minakami H	Live birth rate varies with gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion	Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol			2003
Shimada S, Iwabuchi K, Kato EH, Morikawa M, Sakuragi N, Onoe K, Minakami H, Yamada H	No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters	Am J Reprod Immunol			2003a

Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoe K	Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I:C)-induced fetal resorption	Am J Reprod Immunol				2003b
森川 守, 山田秀人, 平山恵美, 小林範子, 渡利道子, 片岡宙門, 長和俊, 奥山和彦, 水上尚典, 藤本征一郎	胎児消化管閉塞29例の臨床的特徴	周産期医学	32(6)	825-830		2002
Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S	Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats	Arch Toxicol				
Sakamoto QK, Naki K, Aoto T, Yokoyama A., Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S	Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp ( <i>Cyprinus carpio</i> ) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan	Chemosphere				
Sakamoto KQ, Kunisue T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S	Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and white-tailed sea eagles, threatened species, in Hokkaido, Japan	Environ Toxicol Chem	21(4)	842-847		2002 Apr
Chiba I, Sakakibara A, Iwata TH, Ishizuka M, Tanabe S, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S	Hepatic microsomal cytochrome p450s and chlorinated hydrocarbons in largha and ribbon seals from Hokkaido, Japan: differential response of seal species to Ah receptor agonist exposure	Environ Toxicol Chem	21(4)	794-806		2002 Apr
Tilley RE, Kemp GD, Teramitsu I, Hall AJ	Isolation of two cytochrome P450 cDNAs, CYP1A1 and CYP1A2, from harp seal ( <i>Phoca groenlandica</i> ) and grey seal ( <i>Halichoerus grypus</i> )	Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol	132(2)	181-191		2002 Jun