

- 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection” *Analyst* 125, 1959-1961 (2000)
- 4) Koichi Inoue, Sachiko Kondo, Yuriko Yoshie, Kayoko Kato, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie and Hiroyuki Nakazawa “ Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for food-wrapping into food simulants and foods.” *Food Additives & Contaminants* 18, 157-164 (2001)
- 5) Koichi Inoue, Migaku Kawaguchi, Fumio Okada, Natsuko Takai, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie, Shun-ichiro Izumi, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa “Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry” *Analytica Chimica Acta* 486, 41-50 (2003)
- 6) Daidoji T, Inoue H, Kato S, and Yokota H. Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metab Dispos.* (2003) 31, 993-998.
2. 学会発表
- 1) 日本薬学会第 124 年会；「動物実験環境下における各種試料中のノニルフェノール分析法」(2004)；藤巻照久、平山クニ（神奈川衛研）、瀬下文恵、伊藤里恵、井之上浩一、中澤裕之（星薬大）、牧野恒久（東海大医学部）
- 2) 大道寺智・中出圭介・野村幸子・横田博；ビスフェノール A ・DES ・ノニルフェノール・オクチルフェノール・PCBs 水酸化体の代謝動態とグルクロン酸抱合酵素分子種；第 6 日本環境ホルモン学会
- 3) 宮庄拓・渡辺剛幸・芝崎道広・横田博海産魚類の肝臓における薬物代謝酵素（CYP, UGT, GST）活性および Co-PCBs 暴露による影響；第 6 日本環境ホルモン学会
- 4) 松本順也・井上博紀・山鋪直子・横田博；ビスフェノール A グルクロン酸抱合酵素ラット子宮上皮細胞内発現と役割；第 6 日本環境ホルモン学会
- 5) 大道寺智・牛頭圭介・横田博；ラットにおける PCB 水酸化体グルクロン酸抱合活性の臓器特異性と酵素分子種について；第 6 日本環境ホルモン学会
- 6) 大道寺智・中出圭介・牛頭圭介・横田博；UDP - glucuronosyltransferase isoforms（UGT1A6 and UGT2B1）glucuronidation alkylphenols；第 76 会日本生化学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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及び動物実験の信頼性確保
生体試料、動物飼料等中のフタル酸エステル類分析法の開発

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	近藤文雄	愛知県衛生研究所
	後藤智美	愛知県衛生研究所
	斎藤 勲	愛知県衛生研究所
	猪飼誉友	愛知県衛生研究所
	松本 浩	愛知県衛生研究所
	中澤裕之	星薬科大学
	堀 伸二郎	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

昨年度の本研究において、血清中フタル酸エステル類の精度の高い分析法を開発するとともに、分析法ガイドラインを作成した。本年度は、作成した分析法ガイドラインの信頼性を確保するために、外部機関を含めた3機関で同一の試料（ブタ血清）を分析し、クロスチェックを実施した。5種のフタル酸エステル類標準物質を添加して行った試験では、フタル酸ジ2-エチルヘキシル（DEHP）を除く4物質の回収率の平均値が98.5～111%、相対標準偏差が1.4～10.3%と良好な結果であった。DEHPについては、1機関で高いバックグラウンドが検出されたため、回収率は128%とやや高い値を示し、また、相対標準偏差は42.8%であった。このDEHPのバックグラウンドは、GC/MSの注入口からの汚染であることが判明しており、この問題が解決されれば、本試験法により精度の高い測定値が得られると考えられた。

さらに、動物実験環境からのフタル酸エステル類の暴露量を評価するために必要となる、動物飼料及び床敷き中のフタル酸エステル類の分析法を確立するとともに、実試料の分析を行った。3種の動物飼料について分析を行った結果、すべての動物飼料からフタル酸ジブチル（DBP）及びDEHPが検出された（検出濃度：DBP 23.0～184 ng/g、DEHP 112～168 ng/g）。また、2種の床敷きについて分析を行った結果、両者からDBP及びDEHPが検出された（検出濃度：DBP 630～1420 ng/g、DEHP 16.5～467 ng/g）。

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^{1,2)}。昨年度の研究では、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、精度の高い血清中のフタル酸エステル類分析法を確立するとともに、分析法ガイドラインを作成した。本年度は、作成した分析法ガイドラインの信頼性を確保するために、外部機関を含めた3機関で同一の試料を分析し、クロスチェックを実施する。

また、フタル酸エステル類の生体影響評価を実施する際、実験動物を利用した *in vivo* 系試験が汎用されている。しかし、低用量域における生体影響評価は、再現性のある結果が得られておらず、動物実験環境の影響が危惧されている。そこで、本年度の研究では、動物飼料、床敷き等動物実験環境からのフタル酸エステル類の暴露量を評価するために必要となる分析法を確立するとともに、分析法ガイドラインを作成する。

B. 研究方法

用いた試薬、機器は各機関で若干異なるが、機関 A の例を以下に示した。

1. 試料

血清中のフタル酸エステル類分析法ガイドラインのクロスチェックは、と畜検査場から豚血液を入手し、遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) して得られた血清を用いた。また、血清は、「2. 器具・試薬の前処理」に示す方法で洗浄したスクリーキャップ試験管 (10 mL) に分注後、冷凍状態で各分析機関へ送付した。

動物飼料 3 種 (F-1、F-2、F-3)、床敷き 2 種 (M-1、M-2) は、分担研究機関である星薬科大学で一括購入し、各機関に配布されたも

のを用いた。

2. 試薬および標準溶液

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)、フタル酸ジ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、内部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、DBP、BBP、DEHP の濃度が 4 μ g/mL、DiOP、DiNP の濃度が 20 μ g/mL になるようにヘキサンで希釈した。内部標準溶液は、それぞれの濃度が 4 μ g/mL になるようにヘキサンで希釈した。

3. 器具・試薬の前処理

ホールピペット、メスフラスコ以外の器具は、200°C で 2 時間加熱し、使用直前にヘキサンで洗浄した。

塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200°C で 2 時間加熱した。

4. フロリジル-PSA カラムの調製

内径 15 mm、長さ 110 mm のガラス製カラムの底に、ガラス繊維濾紙を敷き、フロリジル 1 g、PSA 0.5 g (動物飼料では 1 g)、無水硫酸ナトリウム 2 g を積層した。使用直前にアセトン 10 mL、ヘキサン 10 mL で洗浄した。

5. 試験溶液の調製法

5.1 血清分析用

試験溶液の調製法の概要を、スキーム 1 に示した。血清 1 g を共栓付遠心管 (10 mL、ガラス製) にとり、アセトニトリル 5 mL、

塩化ナトリウム 0.5 g、ヘキサン 1 mL 及び内部標準溶液（あるいは標準溶液）25 μ L を加えた後、3 分間混和した。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を分取し、減圧留去した。残渣を蒸留水 2 mL、ヘキサン 5 mL に溶解後、ヘキサン層を分取した。残った水層に再度ヘキサン 3 mL を加えて混和後、ヘキサン層を分取した。分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラムに負荷し、ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

5. 2 動物飼料分析用

試験溶液の調製法の概要を、スキーム 2 に示した。動物飼料 5 g を共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) にとり、蒸留水 5 mL、アセトニトリル 20 mL 及び内部標準溶液（あるいは標準溶液）125 μ L を加えた後、1 分間ホモジナイズした。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を分取した。残った水層に蒸留水 5 mL、アセトニトリル 15 mL を加え、再度抽出を行った。分取したアセトニトリル層を共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) に入れ、塩化ナトリウム 1.5 g を加えた後 5 分間機械振とうした。アセトニトリル層を分取して共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) に入れ、アセトニトリル飽和ヘキサン 4 mL を加えた後 5 分間機械振とうした。アセトニトリル層を分取後減圧留去し、残渣をヘキサン 5 mL に溶解した。ヘキサン層を分取し、残った水層にヘキサン 5 mL を加えて混和後、ヘキサン層を再度分取した。分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラムに負荷し、ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

5. 3 床敷き分析用

試験溶液の調製法の概要を、スキーム 3 に示した。床敷き 2.5 g を共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) にとり、アセトン 40 mL 及び内部標準溶液（あるいは標準溶液）65 μ L を加えて 1 時間放置後、10 分間機械振とうした。アセトン溶液を減圧留去後、残渣を蒸留水 2 mL、ヘキサン 5 mL に溶解した。ヘキサン層を分取し、残った水層にヘキサン 3 mL を加えて混和後、ヘキサン層を再度分取した。分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラムに負荷し、ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

6. GC/MS 条件

装置 : Agilent 6890N GC/5973N MSD

イオン源 : EI

カラム : HP-5MS SV (30 m x 0.25 mm ID、膜厚 0.5 μ m)

カラム温度 : 80°C (3 分) \rightarrow 20°C/分 \rightarrow 240°C \rightarrow 10°C/分 \rightarrow 300°C (5 分)

キャリアガス : He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度 : 250°C

試料注入法 : パルスドスプリットレス

四重極温度 : 150°C

イオン源温度 : 230°C

検出法 : 選択イオン検出 (SIM)

モニターイオン : 表 1 に示した。

7. 定量法

試料液を GC/MS に注入し、各フタル酸エステル類のピーク面積を内部標準のピーク面積で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。DiOP は主要な 2 本のピークを、DiNP は主要な 5 本のピーク面積をそれぞれ合計して定量対象とした。

C. 結果と考察

1. 血清中のフタル酸エステル類分析法ガイドラインのクロスチェック

外部機関を含めた3機関で、同一試料（ブタ血清）を用いて分析法ガイドラインのクロスチェックを実施した。試験溶液の調製は、スキーム1に従って行った。試験操作としては、空試験、ブランク試験及び添加試験を行った。空試験は、ブタ血清の代わりに蒸留水を試料として用いて試験を行い、試験操作に由来するバックグラウンド値を求めることを目的としている。ブランク試験は、ブタ血清を試料として用いて試験を行い、試料及び試験操作に由来するバックグラウンド値を求めることを目的としている。添加試験は、ブタ血清に標準物質を添加して試験を行い、標準物質の回収率を求めることにより、本試験法の信頼性を検討することを目的としている。

空試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表2に示した。3機関ともにDBP及びDEHPが検出され、BBP、DiOP及びDiNPは検出されなかった。検出濃度の平均値は、DBPが9.4 ng/g、DEHPが12.6 ng/gであった。ブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表3に示した。空試験と同様に、3機関ともにDBP及びDEHPが検出され、BBP、DiOP及びDiNPは検出されなかった。検出濃度の平均値は、DBPが8.6 ng/g、DEHPが23.6 ng/gであった。

機関Aと機関Bでは、空試験及びブランク試験ともに、検出されたDBP及びDEHPの濃度は、ガイドラインで定めた検出限界値（10 ng/g）未満であった。一方、機関Cでは、空試験及びブランク試験ともに、検出されたDBP及びDEHPの濃度は検出限界値を超えていた。機関Cで検出限界値を超えるDBP、DEHPが検出された原因は、GC/MSの注入口からの

汚染であることが判明している。従って、この問題が解決されれば、すべての機関でバックグラウンド値を検出限界値未満に抑えることが可能と考えられた。

添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率を表4に示した。3機関の回収率の平均値は、DBPが98.5%、BBPが101%、DEHPが128%、DiOPが108%、DiNPが111%であった。機関CにおけるGC/MSに由来するバックグラウンドの影響で、DEHPの回収率がやや高い値を示したが、それ以外は良好な結果であった。相対標準偏差は、DEHPの42.7%を除き1.4~10.3%と良好な結果であった。

以上、同一の試料（ブタ血清）を用いて、血清中フタル酸エステル類の分析法ガイドラインのクロスチェックを実施した。その結果、1機関でGC/MSの注入口に由来するバックグラウンド値が認められたものの、この問題が解決されれば、本試験法により精度の高い測定値が得られると考えられた。

2. 動物飼料中のフタル酸エステル類分析法の確立

動物飼料中のフタル酸エステル類分析法の検討は、星薬科大学から配布された3種の動物飼料の中から、「F-1」を選択して実施した。試験溶液の調製は、スキーム2に従って行った。この飼料中には水分がほとんど含まれていないため、使用した試料量（5 g）と同量（5 mL）の水を加えた後、アセトニトリル抽出を行った。得られた抽出液は、血清と同様にヘキサン/アセトニトリル分配により脂質を除去した後、フロリジル-PSAカラムで精製した。なお、動物飼料中の脂肪含量は粗脂肪として4~5%と、血清の約10倍と多いため、PSAの使用量を血清の場合の2倍（1 g）とした。試験操作としては、血清と同様に、空試験、ブランク試験及び添加試験を行

った。空試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表5に示した。検出濃度の平均値は、DBPが1.8 ng/g、DEHPが8.1 ng/gで、他の3物質はいずれも1 ng/g未満であった。ブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表6に示した。検出濃度の平均値は、DBPが173 ng/g、DEHPが113 ng/g、他の3物質はいずれも10 ng/g未満であった。

添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率を表7に示した。回収率の平均値は、DBPが123%、BBPが98.8%、DEHPが148%、DiOPが109%、DiNPが113%であった。DBPとDEHPの回収率がやや高い傾向を示したが、試料中に含まれている両物質の濃度が高いことが要因の一つと考えられた。相対標準偏差は、0.4~7.9%と良好な結果であった。なお、本法による検出限界値は、DBP、BBP、DEHPは10 ng/g、DiOP、DiNPは50 ng/gに設定した。

3. 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析

前項で確立した動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法を用いて、動物飼料中のフタル酸エステル類の濃度を測定した。測定に用いた試料は、星薬科大学から配布された3種の動物飼料で、同一の試料を2機関で分析した。測定結果を表8に示したが、全ての試料からDBPとDEHPが検出され、BBP、DiOP、DiNPは検出限界値未満であった。検出濃度は、DBPが23.0~184 ng/g、DEHPが112~168 ng/gであった。2機関間でほぼ同程度の結果が得られており、本試験法は、動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法として、十分な性能を有する方法と考えられた。

4. 床敷き中のフタル酸エステル類分析法の確立

床敷き中のフタル酸エステル類分析法の検討は、星薬科大学から配布された2種の床

敷きの中から、「M-1」を選択して実施した。試験溶液の調製は、スキーム3に従って行った。すなわち、床敷き2.5 gからアセトンでフタル酸エステル類を抽出し、その後フロリジル-PSAカラムで精製を行った。

試験操作としては、血清及び動物飼料と同様に、空試験、ブランク試験及び添加試験を行った。空試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表9に示した。検出濃度の平均値は、DBPが3.1 ng/g、DEHPが6.6 ng/gで、他の3物質はいずれも1 ng/g未満であった。ブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表10に示した。検出濃度の平均値は、DBPが1140 ng/g、DEHPが441 ng/gであった。この他、DiNPが19.0 ng/g検出され、BBP及びDiOPは10 ng/g未満であった。

添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率を表11に示した。回収率の平均値は、DBPが132%、BBPが102%、DEHPが146%、DiOPが119%、DiNPが94.7%であった。DBPとDEHPの回収率がやや高い傾向を示したが、試料中に含まれている両物質の濃度が高いことが要因の一つと考えられた。相対標準偏差は、1.3~5.0%と良好な結果であった。なお、本法による検出限界値は、DBP、BBP、DEHPは10 ng/g、DiOP、DiNPは50 ng/gに設定した。

なお、床敷き中に含まれる夾雑物由来と考えられる妨害ピークが、SIMクロマトグラム(m/z 149)上のBBP及びDiOP付近に出現するため、定量イオンを、BBPではm/z 206(BBP-d4ではm/z 210)、DiOPではm/z 279(BBP-d4ではm/z 283)に設定した(表1)。

5. 床敷き中のフタル酸エステル類の分析

前項で確立した床敷き中のフタル酸エステル類の分析法を用いて、床敷き中のフタル

酸エステル類の濃度を測定した。測定に用いた試料は、星薬科大学から配布された2種（M-1、M-2）の床敷きで、同一の試料を2機関で分析した。その結果、両方の試料からDBPとDEHPが検出された（表12）。BBP、DiOP及びDiNPは検出限界値未満であった。検出濃度は、DBPが630～1420 ng/g、DEHPが16.5～467 ng/gであった。

2機関間でほぼ同程度の結果が得られており、本試験法は、動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法として、十分な性能を有する方法と考えられた。

D. 結論

1. 同一の試料（ブタ血清）を用いて、外部機関を含めた3機関で血清中フタル酸エステル類の分析法ガイドラインのクロスチェックを実施した。その結果、1機関でGC/MSの注入口に由来するバックグラウンド値が認められたものの、この問題が解決されれば、本試験法により精度の高い測定値が得られると考えられた。

2. 動物飼料中のフタル酸エステル類分析法を確立するとともに、3種類の動物飼料中のフタル酸エステル類濃度を測定した。その結果、DBPが23.0～184 ng/g、DEHPが112～168 ng/g 検出された。

3. 床敷き中のフタル酸エステル類分析法を確立するとともに、2種類の床敷き中のフタル酸エステル類濃度を測定した。その結果、DBPが630～1420 ng/g、DEHPが16.5～467 ng/g 検出された。

4. 確立した動物飼料及び床敷き中のフタル酸エステル類の分析法の信頼性を確保するために、今後、クロスチェックを実施する必要があると考えられた。

5. *in vivo* 系試験の信頼性確保には、動物

飼料、床敷き以外にも、給水瓶、ケージ、実験室内空気等の動物実験環境中の分析法を確立し、それらからの暴露量を総合的に把握する必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

血清 1 g

↓ 10 mL 共栓試験管に入れる
アセトニトリル 5 mL、塩化ナトリウム 0.5 g、ヘキサン 1 mL、
内部標準溶液あるいは標準溶液 25 μ L を加え栓をする
3 分間混和
↓ 3000 rpm で 5 分間遠心分離

アセトニトリル層

↓ ナスフラスコへ移す
↓ 減圧留去

残渣

↓ 蒸留水 2 mL、ヘキサン 5 mL に溶解
ヘキサン層を分取
ヘキサン 3 mL を再度加え混和
ヘキサン層を分取
分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラム^{*}へ負荷
ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄
↓ 5% アセトン-ヘキサン溶液 10 mL で溶出

溶出液

↓ 減圧留去

残渣

↓ ヘキサン 1 mL に溶解

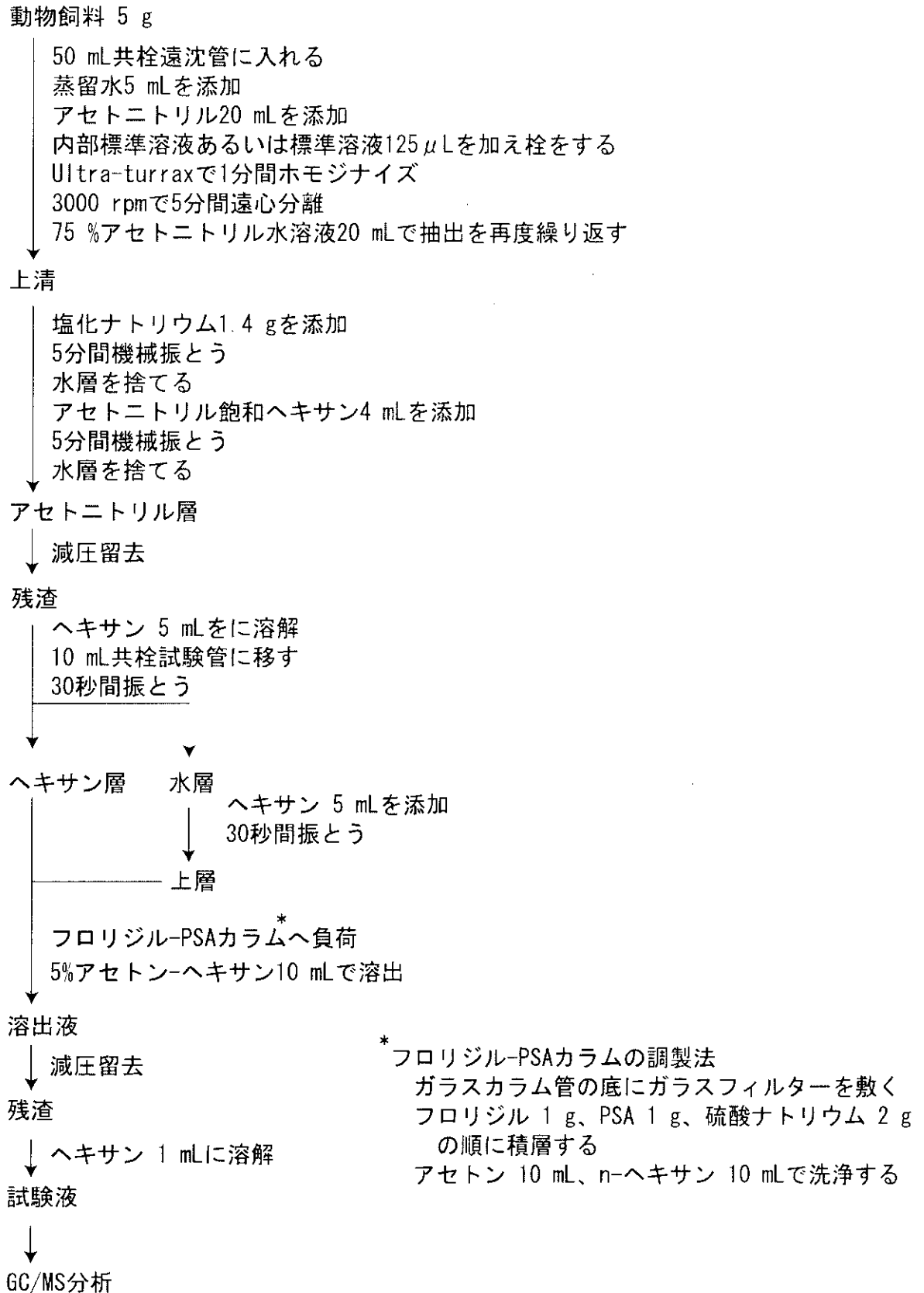
試験液

↓

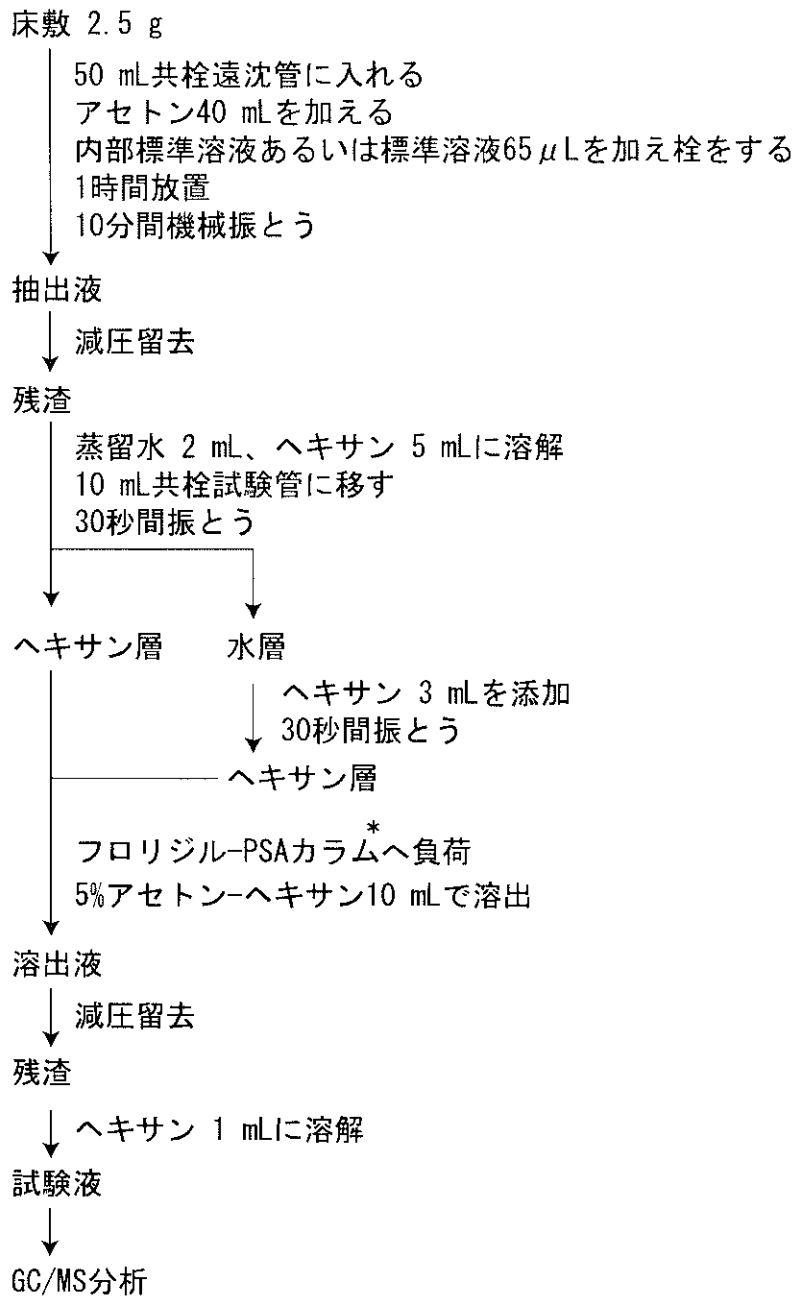
GC/MS 分析

* フロリジル-PSA カラムの調製法
ガラスカラム管の底にガラスフィルターを敷く
フロリジル 1 g、PSA 0.5 g、硫酸ナトリウム 2 g の順に積層する
アセトン 10 mL、ヘキサン 10 mL で洗浄する

スキーム 1 血清中のフタル酸エステル類分析法



スキーム2 動物飼料中のフタル酸エステル類分析法



*フロリジル-PSAカラムの調製法
 ガラスカラム管の底にガラスフィルターを敷く
 フロリジル 1 g、PSA 0.5 g、硫酸ナトリウム 2 gの順に積層する
 アセトン 10 mL、ヘキサン 10 mLで洗浄する

スキーム3 床敷き中のフタル酸エステル類分析法

表1 モニターイオン

物質名	略称	血清、動物飼料		床敷き	
		定量イオン	参照イオン	定量イオン	参照イオン
フタル酸ジ-n-ブチル	DBP	149	205, 223	149	205, 223
フタル酸ブチルベンジル	BBP	149	91, 206	206	91, 149
フタル酸ジ-2-エチル ヘキシル	DEHP	149	167, 279	149	167, 279
フタル酸ジイソオクチル	DiOP	149	279	279	149
フタル酸ジイソノニル	DiNP	149	293	149	293
フタル酸ジ-n-ブチル- d4	DBP-d4	153	227, 209	153	227, 209
フタル酸ブチルベンジル -d4	BBP-d4	153	91, 210	210	91, 153
フタル酸ジ-2-エチル ヘキシル-d4	DEHP-d4	153	171, 283	153	171, 283
フタル酸ジイソオクチル -d4	DiOP-d4	153	283	283	153
フタル酸ジイソノニル-d4	DiNP-d4	153	297	153	297

表2 血清の空試験におけるフタル酸エステル類の検出量 (ng/g)

測定機関	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
A	4.7	0.0	4.4	0.0	0.0
B	1.7	0.0	4.0	0.0	0.0
C	22.0	0.0	29.5	0.0	0.0
平均	9.4	0.0	12.6	0.0	0.0
標準偏差	11.0	0.0	14.6	0.0	0.0
相対標準偏差	116		116		

表3 血清のブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量 (ng/g)

測定機関	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
A	5.9	0.0	4.9	0.0	0.0
B	1.4	0.0	3.7	0.0	0.0
C	18.6	0.0	62.3	0.0	0.0
平均	8.6	0.0	23.6	0.0	0.0
標準偏差	8.9	0.0	33.5	0.0	0.0
相対標準偏差	104		142		

表4 血清の添加試験における標準物質の回収率(%)

測定機関	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
A	98.9	98.9	97.3	106	111
B	99.7	101	95.6	100	100
C	97.0	104	191	117	123
平均	98.5	101	128	108	111
標準偏差	1.4	2.6	54.6	8.6	11.5
相対標準偏差	1.4	2.5	42.7	8.0	10.3

表5 動物飼料の空試験におけるフタル酸エステル類の検出量(ng/g)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	1.5	0.0	10.2	0.0	0.0
試行2	1.3	0.1	3.1	0.0	0.0
試行3	2.7	0.2	11.1	0.2	0.0
平均	1.8	0.1	8.1	0.1	0.0
標準偏差	0.8	0.1	4.4	0.1	0.0
相対標準偏差	41.3	100	53.9	173	

表6 動物飼料のブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量(ng/g)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	177	2.5	106	3.5	5.8
試行2	160	0.9	115	1.9	6.0
試行3	181	2.5	117	2.3	6.4
平均	173	2.0	113	2.6	6.1
標準偏差	11.2	0.9	5.9	0.8	0.3
相対標準偏差	6.5	47.0	5.2	32.4	5.0

表7 動物飼料の添加試験における標準物質の回収率(%)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	134	98.7	150	109	113
試行2	119	99.2	149	108	112
試行3	116	98.5	145	109	115
平均	123	98.8	148	109	113
標準偏差	9.6	0.4	2.6	0.6	1.5
相対標準偏差	7.8	0.4	1.8	0.5	1.3

表8 動物飼料中のフタル酸エステル類濃度 (ng/g)

試料名	測定機関	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
F-1	1	173	ND	117	ND	ND
	2	184	ND	168	ND	ND
F-2	1	47.8	ND	166	ND	ND
	2	44.7	ND	154	ND	ND
F-3	1	27.1	ND	120	ND	ND
	2	23.0	ND	112	ND	ND

表9 床敷きの空試験におけるフタル酸エステル類の検出量 (ng/g)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	3.3	0.0	5.9	0.1	0.0
試行2	2.7	0.0	4.5	0.0	0.0
試行3	3.3	0.0	9.3	0.1	0.3
平均	3.1	0.0	6.6	0.1	0.1
標準偏差	0.3	0.0	2.5	0.1	0.2
相対標準偏差	11.2		37.6	87	173

表10 床敷きのブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量 (ng/g)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	1330	4.8	467	3.9	25.1
試行2	1120	7.0	441	5.4	15.4
試行3	974	6.2	414	4.0	16.4
平均	1140	6.0	441	4.4	19.0
標準偏差	179	1.1	26.5	0.8	5.3
相対標準偏差	15.7	18.6	6.0	18.9	28.1

表11 床敷きの添加試験における標準物質の回収率 (%)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	134	102	150	125	90.7
試行2	138	101	149	118	94.5
試行3	125	103	139	115	98.8
平均	132	102	146	119	94.7
標準偏差	6.7	1.0	6.1	5.1	4.1
相対標準偏差	5.0	1.0	4.2	4.3	4.3

表12 床敷き中のフタル酸エステル類濃度 (ng/g)

試料名	測定機関	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
M-1	1	1420	ND	430	ND	ND
	2	1330	ND	467	ND	ND
M-2	1	883	ND	31.1	ND	ND
	2	630	ND	16.5	ND	ND

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体曝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

本年度は下記の 4 項目について検討した。その概要は次のとおりである。

1. BPA 分析法ガイドラインのクロスチェック

先に提案した BPA 分析法ガイドラインについて、3 機関でクロスチェックを実施したところ、良好な結果が得られた（RSD 7%）。

2. BPA の推定曝露量調査

1 日尿を用いて BPA の推定曝露量を求めた結果、1 μ g/day レベルであり、2002 年 5 月に示された EU の暫定 TDI (500 μ g/day) に比べ問題のないレベルであった。

3. 実験動物飼育環境中の BPA の分析法ガイドラインの検討

動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境（飼料、床敷等）からの BPA 曝露量を評価する分析法を構築した。本法を用いて飼料、床敷中の BPA を測定した結果、多くは数 ppb 前後であったが、数百 ppb レベルで検出された床敷も見られた。

4. 飼料中の植物エストロゲン分析法の検討

動物実験の信頼性を確保するため、飼料中に含まれる植物エストロゲン（イソフラボン）の分析法を検討した。本法を用いて飼料中のイソフラボンを測定した結果、数 ppm ～数百 ppm のイソフラボンが検出された。

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。昨年度、血清及び尿中のビスフェノール A（BPA）の分析について、操作

中のコンタミネーションを低減化することに成功し、精度の高い分析法を開発するとともに、分析法ガイドラインとして提案した。そこで、本年度は分析法ガイドラインの信頼性を確保するために、外部機関に依託

し、クロスチェックを行った。また、動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境（飼料、床敷等）からの BPA 暴露量を評価する分析法をガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) 及び高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) を用いて検討し、分析法ガイドラインの作成を試みた。更に、動物実験の信頼性を確保するため、飼料中に含まれる植物エストロゲン（イソフラボン）の測定についても信頼性の高い分析法を構築する目的で基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料

豚血清は、埼玉県内にある食肉処理場から入手した豚血液から調製した。採取した豚血液試料は、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 -20℃ で保存した。

尿は、長野県衛生公害研究所及び埼玉県衛生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 -20℃ で保存した。

なお、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。

飼料及び床敷は市販品を購入した。

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-d₁₆ (BPA-d₁₆) は関東化学(株)製の環境分析用試薬を、¹³C-BPA はケンブリッジアイソトープ製を用いた。標準溶液は、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。

Daidzein, Genistein, Glycitein 及びイソフラボン配糖体、Malonyl 体、Acetyl 体は和光純薬工業(株)あるいはナカライ化学(株)製の生化学用試薬を用いた。標準溶液は、各標準品 10mg 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 80%メタノールに溶解して標準溶液とした。

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、スベルコ製、スベルクリン 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。

アルミナ-A カートリッジ：Waters 社製、Sep-Pak アルミナ-A カートリッジ (1.7g) を用いた。カートリッジは予めアセトン 5mL、精製水 5mL、アセトン 5mL の順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。

3. 装置及び測定条件

3.1 血清、尿及び飼料等中の BPA の分析

3.1.1 高速液体クロマトグラフ-質量分析計

Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。測定条件は表 1 のとおりとした。

3.1.2 ガスクロマトグラフ-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 × 0.25
μm
カラム温度 : 70 °C (2min) - 20 °C /min -
150 °C - 10 °C /min - 300 °C (5min)
注入口温度 : 250 °C
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
ッフ 1min
MS : Jeol GC-mate
イオン源温度 : 230 °C
イオン化電圧 : 70V
モニターイオン (m/z) : BPA (357, 372),
BPA-d₁₆ (368, 386), ¹³C-BPA (369)

3.2 飼料中の植物エストロゲンの分析
高速液体クロマトグラフ-質量分析
計 : Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD
を使用した。測定条件は表 2 のとおり
とした。

4. 検量線の作成

4.1 血清, 尿及び飼料等中の BPA の
分析

4.1.1 LC/MS 測定

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d₁₆
を 10 ng 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
μL 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-d₁₆ の面積比により検量線
を作成した。

4.1.2 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 ¹³C-BPA を 100ng 添
加し, BSTFA 200 μL を加え, アセトン

で 1mL に定容した。これを一夜放置
し, GC/MS-SIM で測定し, ¹³C-BPA との
面積比で検量線を作成した。

4.2 飼料中の植物エストロゲンの分析

各イソフラボン標準の濃度が 0.05,
0.1, 0.2, 0.5, 1 及び 2 μg/mL となる標準
溶液を調製し, その 10 μL を LC/MS に
注入した。検出には SIM 法を採用し,
得られた SIM クロマトグラムよりピー
ク面積を求め, 絶対検量線法により検
量線を作成した。

5. 試験溶液の調製

5.1 BPA 試験溶液の調製 (血清, 尿)

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) 「試料分析の信頼性確保と生体曝露量
のモニタリングに関する研究」報告書に準拠し
て次のとおり調製した。

5.1.1 LC/MS 測定用試験溶液の調製

○遊離体 BPA 測定用試験溶液

豚血清は 1mL を, 尿は 2mL を採り,
内部標準物質である BPA-d₁₆ を 5 ~ 10
ng 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。

○総 BPA 測定用試験溶液

豚血清は 1mL を, 尿は 2mL を採り,
0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) 1mL, β-グル
クロニダーゼ 6,500units/mL (試薬 β-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 μL 加えた後, 37
°C 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。

5.1.2 GC/MS 測定用試験溶液の調製

○遊離体 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100 mL を共栓付き三角フラスコに採り、 ^{13}C -BPA 0.1 μg 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 μL 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-SIM で定量した。

○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、 β -グルクロニダーゼ溶液 100 μL と ^{13}C -BPA 0.1 μg を加え、37℃ 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。

5.2 BPA 試験溶液の調製 (飼料, 床敷)

飼料, 床敷 1 ~ 2g を採り、内部標準物質である BPA- d_{16} を 10 ~ 20ng 加えた後アセトニトリル 25mL (床敷は 50mL) で 2 分間ホモジナイズ抽出した。抽出液を 3000rpm で 5 分間遠心分離後、上清を分取し、減圧乾固した。残留物をアセトン 5mL に溶解し、Sep-Pak

Alumina-A に負荷した。カートリッジをアセトン 5mL で洗浄後、水 5mL で溶出した。溶出液を Oasis HLB に負荷し、20%メタノール 3mL で洗浄後、メタノール 3mL で溶出した。溶出液を減圧乾固し、40%メタノール 1mL に溶解して LC/MS 用試験溶液とした。一方、GC/MS 用試験溶液は、Oasis HLB への負荷までは LC/MS 法と同様に操作し、メタノール溶出液を減圧乾固後 BSTFA で TMS 化した。TMS 化法は前記の血清、尿試料と同様に行った。

5.3 植物エストロゲン用試験溶液の調製

飼料, 床敷 1 ~ 2g を採り、80%メタノール 15mL を加えて 2 分間ホモジナイズ抽出した。抽出液を 3000rpm で遠心分離後、上清を分取した。精製水を加えて 20mL に定容した後、必要に応じて Whatman シリンジフィルター (0.45 μm) でろ過し、試験溶液とした。

C. 結果及び考察

1. BPA 分析法ガイドラインのクロスチェック

○配付試料：埼玉県内にある食肉処理場から豚血液を入手し、遠心分離して得られた豚血清を用いた (ブランク豚血清、及びビスフェノール A を 10 ppb になるよう添加したものを配付)。

○分析法：検討会に提出したガイドライン (LC/MS 法) に準拠して行った。

○数値の算出方法：分析方法に従い、ppb 等の濃度で算出した。

配付試料について 3 機関 (関東レリサーチセンター、(株)エスアールエル、長野県衛生公害研究所) でクロスチェックを実施した。無添加及び 10ppb

添加試料中の BPA 濃度は、いずれの機関の分析値も良く一致し、室間再現性に優れていた（表 3）、以上の結果から、昨年提案した「BPA 分析法ガイドライン」は、血清中の BPA 分析法として有効であると考えられる。

2. BPA の推定曝露量について

昨年度の調査において、経口摂取された 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）へ排泄されることが解った。従って、一日尿中の BPA を測定することにより BPA の曝露量を推定することが可能と考える。そこで、1 日尿を採取し、BPA の推定曝露量を求めた（表 4）。37 例の一日尿を測定した結果、1 例を除いた尿中 BPA 濃度は 2ppb 以下であった（長野 30 例は GC/MS 法、埼玉 7 例は LC/MS 法により測定）。尿中 BPA 濃度及び尿量から BPA の平均排泄量を求めた結果、1 μ g/day レベルであった。2002 年 5 月に示された EU の BPA 暫定 TDI は、500 μ g/day であり、今回推定された平均曝露量は問題のないレベルであると思われる。

なお、一日尿 10 試料について、GC/MS 法による測定値と LC/MS 法による測定値を比較した結果、図 1 に示す様に高い相関が得られた。今回は、前述したとおり「BPA 分析法ガイドラインのクロスチェック」として、検討会に提出したガイドラインの中の LC/MS 法を検討したが、LC/MS 法と GC/MS 法による相関が高いことから、ガイドラインとして提出した GC/MS 法も精度に優れた BPA の分析法であると思われる。

3. 実験動物飼育環境中の BPA の分析法ガイドラインの検討

動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境（飼料、床敷等）からの BPA 曝露量を評価する分析法を検討した。飼料は魚粉、大豆等を主原料としており、かなりの脂質成分を含んでいた。このことから、血清や尿を分析試料とした試験溶液調製法は適用困難であった。そこで、脂質成分を除去する目的で活性アルミナ、フロリジル、シリカゲル等を用いて検討した。フロリジル及びシリカゲルでは、脂質成分を完全に除去できなかった。一方、塩基性、中性及び酸性のいずれの活性アルミナを用いても脂質成分を除去することが可能であった。しかし、塩基性及び中性の活性アルミナでは、BPA の回収率が 30-40%であった（酸性アルミナでは 60-80%）。以上の結果から、脂質の除去には酸性の活性アルミナを用いることにした。本法を用いて飼料、床敷中の BPA を測定した結果、多くは数 ppb レベルであったが、数百 ppb レベルで検出された床敷も見られた。

4. 飼料中の植物エストロゲン分析法の検討

4.1. LC/MS 測定条件の検討

分析対象として、Daidzein, Genistein, Glycitein, その配糖体である Daidzin, Genistin, Glycitin 及び各 Malonyl 体, Acetyl 体, 計 12 成分を選んだ。イオン化モードは、いずれもフェノール性水酸基を有していることから Negative mode を採用した。また、移動相に微量の酢酸を加えることにより、各成分ともより高感度に検出された。しかし、酢酸の濃度が高くなるに従い検出感度は逆に

低下することから、酢酸濃度は 0.003% とした。

次にイオン強度に及ぼすフラグメンター電圧の影響を検討した。各成分の脱プロトン化分子 $[M-H]^-$ 、あるいは糖脱離イオン $[M\text{-glucose-H}]^-$ を効率良く生成する 120V に設定した。更に、他のパラメーターの最適測定条件を検討し、表 2 に示す条件を設定した。本条件によって得られた各イソフラボンの検出限界は、SIM モードでモニターイオンを各イソフラボンの脱プロトン化分子あるいは糖脱離イオンとした場合、概ね 10ng/mL (絶対量として 50 pg) であった。

4.2. 前処理法の検討

飼料からの抽出には、アグリコン (Daidzein, Genistein, Glycitein) 及び配糖体 (Daidzin, Genistin, Glycitin) とともに良好に回収される 80% メタノールを用いた。LC/MS は選択性に優れており、クリーンアップ操作なしに飼料分析への応用が可能であった。

予試験的に本法を用いて市販されている飼料中のイソフラボン含有量調査を行った結果、数 ppm ~ 数百 ppm のイソフラボンが含まれていた。

D 結論

1. BPA 分析法ガイドラインのクロスチェックについて

先に提案した BPA 分析法ガイドラインについて、3 機関でクロスチェックを実施したところ、良好な結果が得られた (RSD 7%)

2. BPA の推定曝露量について

1 日尿を用いて BPA の推定曝露量を求めた結果、1 μ g/day レベルであ

り、2002 年 5 月に示された EU の暫定 TDI (500 μ g/day) に比べ問題のないレベルと思われた。

3. 実験動物飼育環境中の BPA の分析法ガイドラインの検討

動物実験の信頼性確保するため、動物実験環境 (飼料、床敷等) からの BPA 曝露量を評価する分析法を検討した。本法を用いて飼料、床敷中の BPA を測定した結果、多くは数 ppb 前後であったが、数百 ppb レベルで検出された床敷も見られた。

4. 飼料中の植物エストロゲン分析法の検討

動物実験の信頼性を確保するため、飼料中に含まれる植物エストロゲン (イソフラボン) の分析法を検討した。本法を用いて飼料中のイソフラボンを測定した結果、数 ppm ~ 数百 ppm のイソフラボンが検出された。

E. 研究業績

1. 論文発表

1) Tadashi Tsukioka, Jun-ichi Terasawa, Shouichiro Sato, Yoshiyuki Hanaoka, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa, Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA, *Journal of Environmental Chemistry*, 14 (1), (2004)

2) Masakazu Horie, Harumi Takegami, Sakiko Tanno, Kouichi Inoue, Hiroyuki Nakazawa, Shun-ichiro Izumi, Tsunehisa Makino, "Determination of nonylphenol and octylphenol in serum and urine by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry" *in submission*

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 LC-MS測定条件（血清、尿中のBisphenol Aの分析）

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	0.003% NH ₄ OH - MeCN(58:42)
Nebulizer	N ₂ (30 psi)	Flow rate	0.18 ml/min
Drying gas	N ₂ (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500V	Injection size	20µl
SIM ion	m/z 227.1, 241.1		

表2 LC/MS 測定条件（飼料中のイソフラボン分析）

Apparatus: HP1100 Series LC/MSD (Hewlett Packard)			
MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization Mode	ESI, Negative Mode	Column	Zorbax XDB-C18 (150 x 2.1 mm)
Fragmentor	120V	Eluent	gradient (containing 0.003% AcOH)
Nebulizer	N ₂ (40 psi)	Flow rate	0.2 ml/min
Drying gas	N ₂ (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500V	Injection size	5µl
SIM ion	(M-H) ⁻ (M-glucose-H) ⁻		

gradient

A= 10% MeCN (containing 0.003% acetic acid)

B= 50% MeCN (containing 0.003% acetic acid)

(min)	A	B
0	100	0
20	25	75
25	0	100