

G. W. Lucier, R. J. Jackson, J. W. Brock, Environmental Health Perspectives, 108, 972-982, 2000.

(5) B. C. Blount, K. E. Milgram, M. J. Silva, N. A. Malek, J. A. Reidy, L. L. Needham, J. W. Brock, Anal. Chem., 72, 4127-4134, 2000.

(6) J. A. Hoppin, J. W. Brock, B. J. Davis, D. D. Baird, Environmental Health Perspectives, 110, 515-518, 2002.

(7) K. Kato, M. J. Silva, J. W. Brock, J. A. Reidy, N. A. Malek, C. C. Hodge, H. Nakazawa, L. L. Needham, D. B. Barr, Journal of Analytical Toxicology, 27, 284-289, 2003.

(8) M. J. Silva, N. A. Malek, C. C. Hodge, J. A. Reidy, K. Kato, D. B. Barr, L. L. Needham, J. W. Brock, Journal of Chromatography B, 789, 393-404, 2003.

(9) M. J. Silva, D. B. Barr, J. A. Reidy, K. Kato, N. A. Malek, C. C. Hodge, D. Hertz III, A. M. Calafat, L. L. Needham, J. W. Brock, Arch. Toxicol., 77, 561-567, 2003.

(10) M. J. Silva, D. B. Barr, J. A. Reidy, N. A. Malek, C. C. Hodge, S. P. Caudill, J. W. Brock, L. L. Needham, A. M. Calafat, Environmental Health Perspectives, 112, 331-338, 2004.

(11) K. Kato, M. J. Silva, J. A. Reidy, D. Hertz III, N. A. Malek, L. L. Needham, H. Nakazawa, D. B. Barr, A. M. Calafat, Environmental Health Perspectives, 112, 327-330, 2004.

(12) H. A. A. M. Dirven, P. H. H. van den Broek, F. J. Jongeneelen, Occupational and Environmental Health, 64, 555-560, 1993.

(13) I. Colon. J.-M. D. Dimandja, Anal. Bioanal. Chem., 380, 275-283, 2004.

(14) W. A. C. Anderson, K. A. Barnes, L. Castle, A. P. Damant, M. J. Scotter, Analyst, 127, 1193-1197, 2002.

(15) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, Anal. Bioanal. Chem., 375, 527-533, 2003.

(16) I. Paris, F. Ruggieri, P. Mazzeo, G. Carlucci, ANALYTICAL LETTERS, 36, 2649-2658, 2003.

(17) G. Latini, C. D. Felice, G. Presta, A. D. Vecchio, I. Paris, F. Ruggieri, P. Mazzeo,

Environmental Health Perspectives, 111, 1783-1785, 2003.

(18) H. M. Koch, L. M. G.-R., J. Angerer, Journal of Chromatography B, 784, 169-182, 2003.

(19) H. M. Koch, B. Rossbach, H. Drexler, J. Angerer, Environmental Research, 93, 177-185, 2003.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

1) 岡 尚男、伊藤裕子、後藤智美、猪飼誉友、近藤文雄、松本 浩、牧野恒久、中澤裕之：GC及びGC/MSによる文具、化粧品、家庭用品等に含まれる可塑剤フタル酸及びアジピン酸エステル類の分析、日本食品化学学会誌、11(2)、106-110、2004.

2. 学会発表

1) 近藤文雄、猪飼誉友、後藤智美、伊藤裕子、岡 尚男、中澤裕之、牧野恒久；血清中のフタル酸エステル類分析法の開発；日本薬学会第125年会（2005）

2) 岡 尚男、近藤文雄、中澤裕之、牧野恒久；実験動物飼料及び床敷き中のフタル酸エステル類分析法の開発；日本薬学会第125年会（2005）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

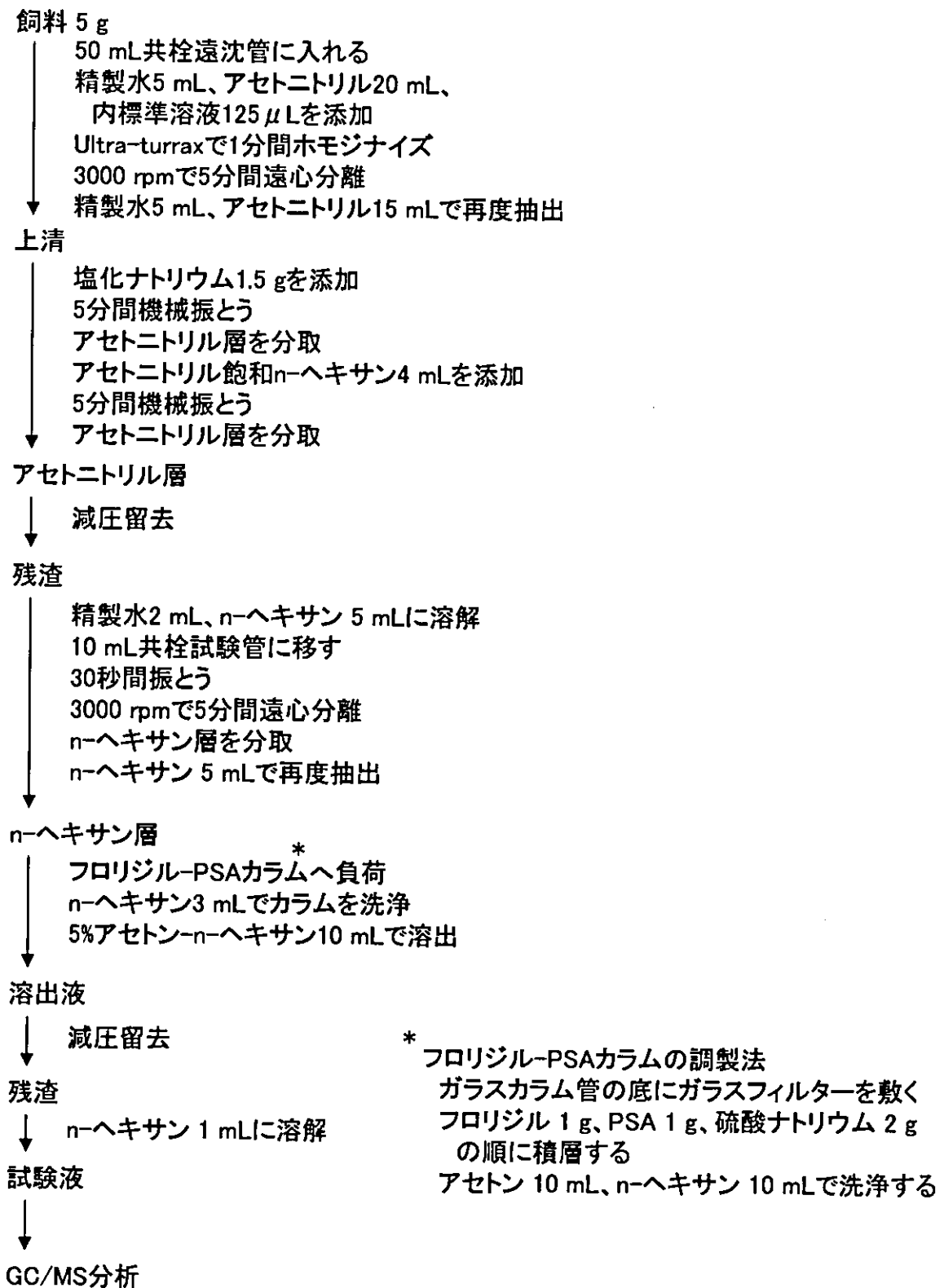


図1 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法

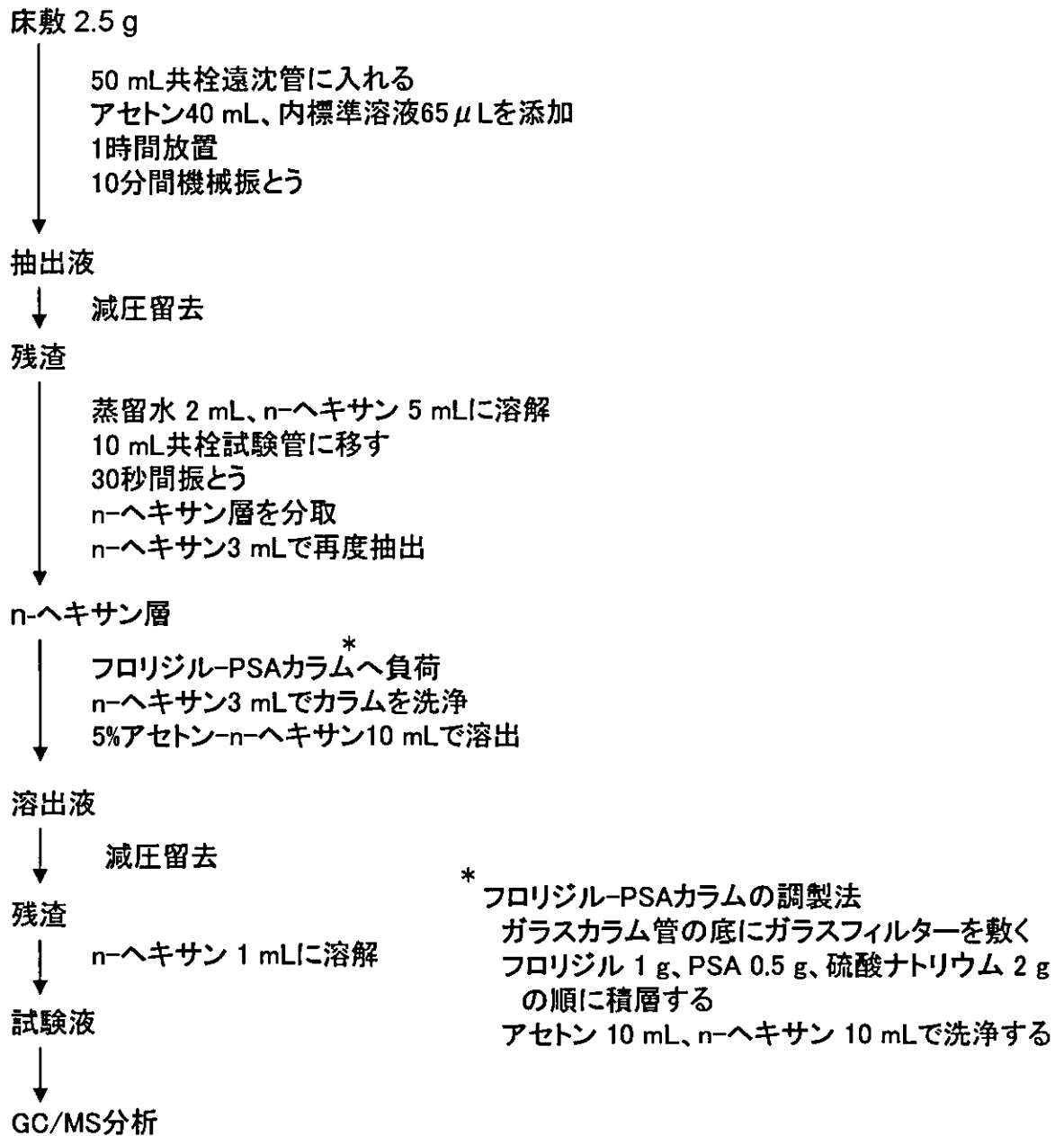
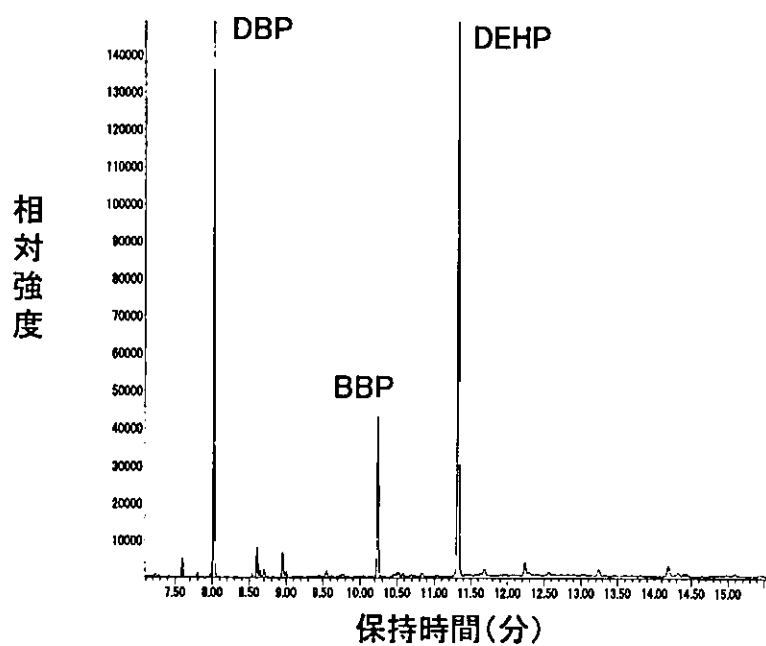


図2 床敷中のフタル酸エステル類の分析法

m/z 149



m/z 153

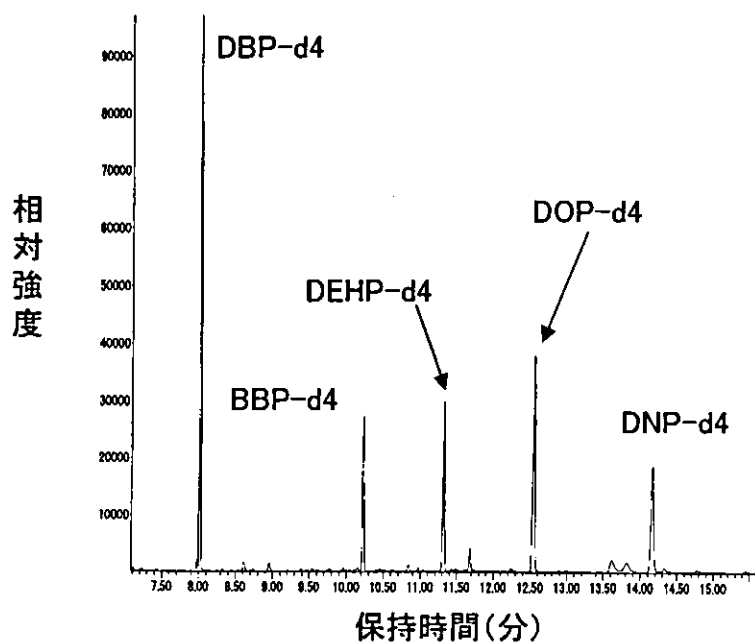
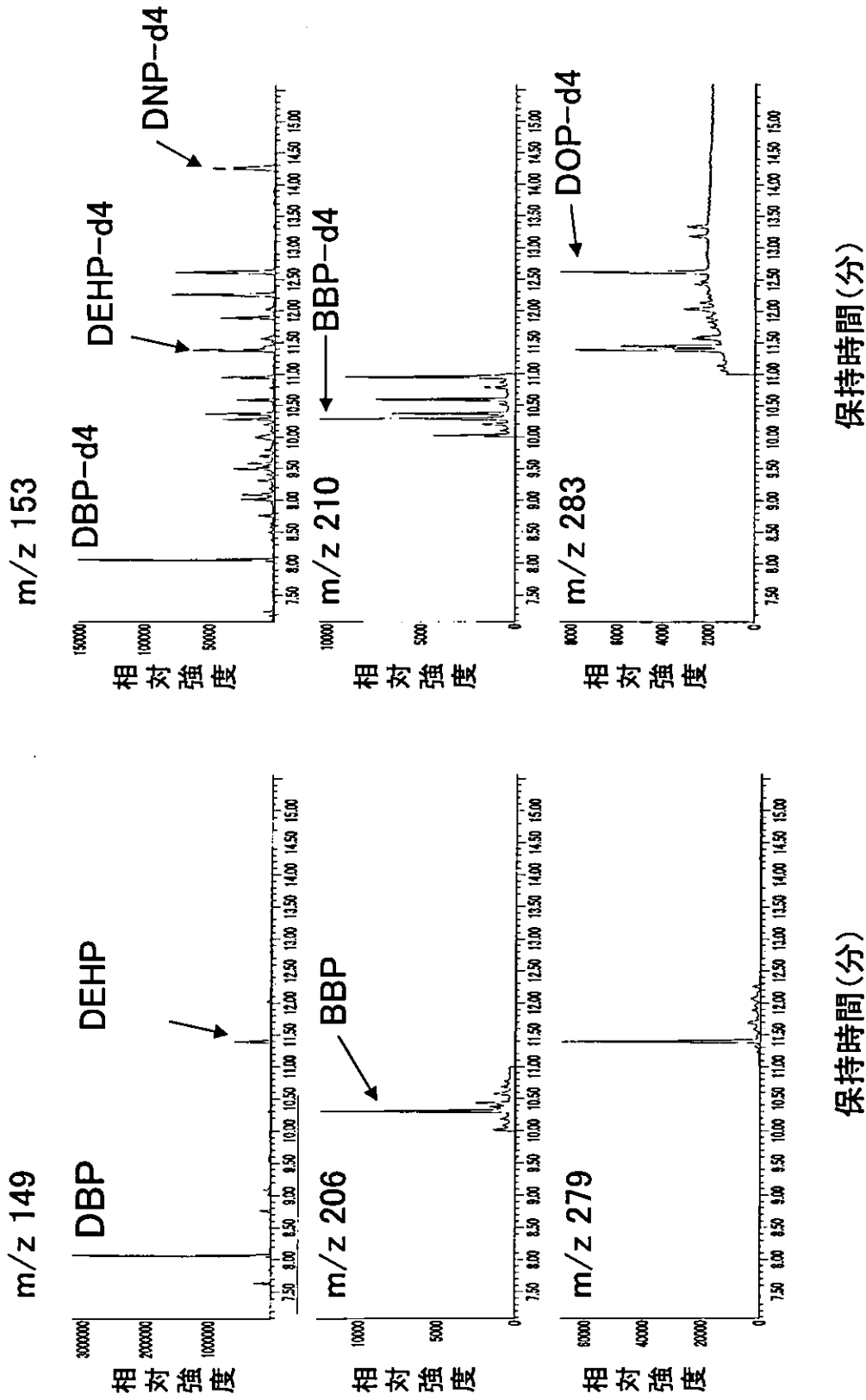


図3 動物飼料抽出物のGC/MS-SIMクロマトグラム



保持時間(分)

保持時間(分)

図4 床敷抽出物のGC/MS-SIMクロマトグラム

尿 1 mL

1M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.5) 250 μ L、
内標準溶液 50 μ L、 β -グルクロニダーゼ 5 μ L
(200単位/mL)を添加

穏やかに攪拌

37°Cで90分インキュベート

塩基性緩衝液^{*} 1 mLを添加後攪拌

Nexus SPEカートリッジ(60mg)へ負荷

(アセトニトリル1 mL、塩基性緩衝液2 mLで
あらかじめコンディショニング)

塩基性緩衝液1 mLをカラムへ負荷

(流速はいずれも<2 mL/分)

溶出液

**

酸性緩衝液 3 mLを添加後攪拌

Nexus SPEカートリッジ(200mg)へ負荷

(アセトニトリル1 mL、水1 mL、酸性緩衝液2 mLで
あらかじめコンディショニング)

酸性緩衝液3 mL、水9 mLでカラムを洗浄

アセトニトリル2 mL、酢酸エチル2 mLで溶出

溶出液

55°C加温、窒素気流下で蒸発乾固

残渣

水 200 μ Lに溶解

試験液

HPLC-MS/MS分析

* 塩基性緩衝液
50:50アセトニトリル/水200 mLと
30%アンモニア水 1 mLを混合

** 酸性緩衝液 (pH 2.0)
0.14M Na₂HPO₄にリン酸を1%添加

図5 尿中のフタル酸モノエステル類の分析法

HPLC conditions

Column: Betasil phenyl column, 50 mm x 2 mm, 5 mm

Mobile phase:

Mobile phase A: 0.1% acetic acid in water

Mobile phase B: 0.1% acetic acid in acetonitrile

Gradient program:

Time (min)	0	1.0	10.0	11.0	11.2	11.5	12.0
%A	100	85	55	0	0	100	100
%B	0	15	45	100	100	0	0

Flow rate: 0.6 mL/min

MS/MS conditions

Interface, mode: APCI, negative

Nitrogen sheath gas: 40 psi

API vaporizer temperature: 500°C

Heated capillary temperature: 250°C

Corona needle discharge: 9 mA

Tube lens voltage: 182 V

Electron multiplier: 1800 V

Collision-induced dissociation gas pressure: 2.0 mTorr

(M.J. Silva *et al.*, J. Chromatogr. B, 2003, 789, 393-404)

Phthalate metabolites	Parent mass	Daughter mass
mMP	179	107
mEP	193	121
mBP	221	77
mCHP	247	77
mBzP	255	183
mEHP	277	134
mEOHP	293	121
mEHHP	291	121
mOP	277	125
mNP	291	245
mDP	305	155

表1 モニターイオン

物質名	略称	血清、動物飼料、空気、水		床敷	
		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
フタル酸ジオクチル-d4	DOP-d4	153	283	283	153
フタル酸ジノニル-d4	DNP-d4	153	297	153	297

表2 動物飼料中のフタル酸エステル類濃度

単位: ng/g

試料番号*	DEHP	DBP	BBP	DiOP	DiNP	総量
F-1	143	179	ND	ND	ND	322
F-2	160	46.3	ND	ND	ND	206
F-3	116	25.1	ND	ND	ND	141
F-10	511	146	157	ND	ND	814
F-11	156	41.4	ND	ND	ND	197
F-12	146	134	ND	ND	ND	280
F-13	118	36.1	ND	ND	ND	154
F-14	205	80.4	ND	ND	ND	285
F-15	281	205	22.2	ND	ND	508
F-16	422	403	18.4	ND	ND	843
F-17	257	344	ND	ND	ND	601
F-18	431	944	33.4	ND	ND	1410
検出数	12	12	4	0	0	12
平均値	246	215	57.8	—	—	507
中央値	183	140	27.8	—	—	397
最大値	511	944	157	—	—	1410
最小値	116	25.1	18.4	—	—	141

* 試料番号は、他の測定対象物質と統一した。

表3 床敷中のフタル酸エステル類濃度

単位:ng/g

試料番号*	DEHP	DBP	BBP	DiNP	DiOP	総量
M-1	449	1380	ND	ND	ND	1830
M-2	23.8	757	ND	ND	ND	781
M-4	280	19.6	ND	ND	ND	300
M-5	498	765	ND	ND	ND	1260
M-6	20.5	ND	ND	ND	ND	20.5
M-7	187	128	ND	ND	ND	315
M-8	262	130	440	ND	ND	832
M-9	420	66.4	ND	ND	ND	486
M-10	132	538	ND	ND	ND	670
M-11	5070	1390	900	198	ND	7560
M-12	547	381	ND	ND	ND	928
M-13	443	55.5	ND	ND	ND	499
M-14	16.0	30.5	ND	ND	ND	46.5
検出数	13	12	2	1	0	12
平均値	642	470	670	-	-	1190
中央値	280	256	670	-	-	670
最大値	5070	1390	900	-	-	7560
最小値	16.0	19.6	440	-	-	20.5

*試料番号は、他の測定対象物質と統一した。

表4 実験動物舎の室内空気中のフタル酸エステル類濃度 (ng/m³)

採取日	DBP	DEHP	BBP	DiOP	DiNP	総量
04/11/29-30	357	31.4	ND	ND	ND	388
04/11/30-12/1	320	27.6	ND	ND	ND	348
04/12/1-2	261	31.9	ND	ND	ND	293
04/12/2-3	325	32.1	ND	ND	ND	357
検出数	4	4	0	0	0	4
平均値	316	30.8	-	-	-	347
中央値	323	31.7	-	-	-	353
最大値	357	32.1	-	-	-	388
最小値	261	27.6	-	-	-	293

表5 生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析法

試料	測定対象物質	抽出、精製法	分析手段	著者	発表年	参考文献番号
尿	MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MNP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Blount B.C. et al	2000	4
尿	MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MINP, MDP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Blount B.C. et al	2000	5
尿	MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MINP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Hoppin B.C. et al	2002	6
尿	MMP, MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MNP, MDP	オンライン固相抽出	HPLC-ESI-MS/MS	Kato K. et al	2003	7
尿	MMP, MEP, MBR, MCHP, MBzP, MEHP, MEOHP, MEHHP, MOP, MNP, MDP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Silva M.J. et al	2003	8
尿	MEP, MBP, MBzP, MEHP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Silva M.J. et al	2003	9
尿	MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MINP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Silva M.J. et al	2004	10
尿	MEHP, MEOHP, MEHHP	固相抽出	HPLC-APCI (or ESI)-MS/MS	Kato K. et al	2004	11
血清(牛)	MEHP, MEOHP, MEHHP, MECPP	液-液抽出	GC-MS	Dirven et al	1993	12
血清	DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, MEHP	液-液抽出	GC-MS	Colon I. et al	2000	13
尿	MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MIDP	液-液抽出	HPLC-APCI-MS	Warwick A.C. et al	2002	14
血清	DEHP, MEHP	カラムスイッチング	HPLC-ESI-MS/MS	Inoue K. et al	2003	15
血清	DEHP, MEHP	液-液抽出	HPLC	Paris, I. et al	2003	16
臍帯血	DEHP, MEHP	不明	HPLC	Giuseppe L. et al	2003	17
尿	MEHHP, MEOHP, MEHP, MEP, MBP, MBzP, MOP	カラムスイッチング	HPLC-ESI-MS/MS	Koch H.M. et al	2003	18
尿	MEHHP, MEOHP, MEHP, MEP, MBP, MBzP, MOP	カラムスイッチング	HPLC-ESI-MS/MS	Koch H.M. et al	2003	19

MEP: フタル酸モノエチル, MBP: フタル酸モノブチル, MCHP: フタル酸モノシクロヘキシル, MBzP: フタル酸モノベンジル, MEHP: フタル酸モノ-2-エチルヘキシル, MOP: フタル酸モノオクチル, MNP: フタル酸モノノニル, MIDP: フタル酸モノイソデシル, MEOHP: フタル酸モノ-2-エチル-5-オキソヘキシル, MEHHP: フタル酸モノ-2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル, MECPP: フタル酸モノ-5-カルボキシ-2-エチルペンチル

DMP: フタル酸ジメチル, DEP: フタル酸ジエチル, DBP: フタル酸ジブチル, BBP: フタル酸ジブチルベンジル, DEHP: フタル酸ジ-2-エチルヘキシル

平成 16 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）
石井里枝（埼玉県衛生研究所）
竹上晴美（埼玉県衛生研究所）

研究要旨

1. 実験動物飼育環境中のビスフェノールAの分析法ガイドラインの構築
動物実験の信頼性確保するため、動物実験環境（飼料、床敷、給水）からのビスフェノールA(BPA)暴露量を評価する分析法（試料を、アルミナ-Aカートリッジ及びポリマーゲル充填カートリッジを用いてクリーンアップし、高速液体クロマトグラフ/質量分析計（LC/MS）で定性・定量）を構築した。
2. 飼料、床敷、給水中のビスフェノールA
飼料中(n=40)に含まれる BPAは、ND~2.9ng/gで、ほとんどの飼料が検出下限値レベル(1ng/g)であった。最も高濃度で検出されたBPA濃度(2.9ng/g)より、マウス及びラットが飼料から摂取するBPAを試算すると、マウスでは17.4 ng/日（一日の飼料摂取量を6 gとした時）、ラットでは72.5 ng/日（一日の飼料摂取量を25 gとした時）程度となる。また、床敷中(n=14)からは最高で704ng/g検出されたものも見られたが、給水中(n=3)からはBPAは検出(0.02ng/mL)されなかった。
3. 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、飼料に含まれる植物エストロゲン（イソフラボン）の分析法を構築した。本法を用いて飼料中のイソフラボンを測定した結果、ほとんどの飼料(37/40)から植物エストロゲンが検出された。最も高濃度で検出された植物エストロゲン濃度(569 μg/g)より、マウスが飼料から摂取する植物エストロゲンを試算すると、3,414 μg/日（一日の飼料摂取量を6 gとした時）程度となる。なお、植物エストロゲンフリーとして注文販売されている飼料からは植物エストロゲンは検出(<0.2 μg/g)されなかった。

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及び開発した方法によるヒト生体曝露量モニタリングの実施が必要とされている。平成 15 年度は、平成 14 年度に構築した「生体試料中のビスフェノール A 分析法ガイドライン（案）」の信頼性を検証すると同時に一日尿中のビスフェノール A(BPA)の分析から、BPA の一日曝露量を推定した。また BPA の問題に関しては、妊娠期投与により影響が出るという von Saal らを中心とする報告と、それに対し再現性は確認されないとする報告があり、議論が繰り返されている。その一因

として動物実験環境下におけるコンタミネーション等が考えられる。そこで、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、給水）からの BPA 暴露量を評価する分析法を高速液体クロマトグラフ/質量分析計（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

飼料 40 検体（日本クレア、日本農産工業、

オリエンタル酵母、日本 SLC)、床敷 14 検体 (日本チャールズリバー、オリエンタル酵母、日本クレア、日本 SLC、天然素材探索研究所、原商店、中部科学)、給水瓶 3 検体 (日本クレア) は市販品を購入した (附表)。

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_{16} (BPA- d_{16}) は関東化学(株)製の環境分析用試薬を用いた。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 (図 1) 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 10 mg (Malonyl 体及び Acetyl 体は 1mg) を精秤し、メタノール 10 mL 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。

Oasis HLB カートリッジ: Waters 社製、充填量 60 mg を用いた。カートリッジは予めメタノール 5mL、精製水 5mL で洗浄して使用した。

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 で洗浄して使用した。

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 飼料、床敷及び給水中の BPA の分析

3.1.1 高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (シングルタイプ、LC/MS): 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 高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (タンデムタイプ、LC/MS/MS): Waters 社製 Quattro micro API Mass Analyzer を使用した。測定条件は表 2 のとおりとした。

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 3 のとおりとした。

4. 検量線の作成

4.1 飼料、床敷及び給水中の 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- d_{16} を 10 ng 含んだ BPA の 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 50

ng/mL の溶液を調製し、その 20 μ 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、それぞれモニタリーオン 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。

4.1.2 LC/MS/MS 測定

安定同位体標識内部標準物質 BPA- d_{16} を 10 ng 含んだ BPA の 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 50 ng/mL の溶液を調製し、その 10 μ L を LC/MS/MS に注入する。検出には MRM (Multiple Reaction Monitoring) モードを採用し、それぞれプリカーサーイオン及びプロダクトイオン、 m/z 226.8 \rightarrow 211.9, m/z 226.8 \rightarrow 132.7, m/z 241.0 \rightarrow 222.8, m/z 241.0 \rightarrow 141.8 により得られた MRM 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 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 μ g/mL となる標準溶液を調製し、その 5 μ L 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 飼料、床敷中の BPA 試験溶液の調製

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 (LC/MS/MS) 用試験溶液とした (図 2)。

5.2 給水中の BPA 試験溶液の調製

給水瓶に BPA フリーの精製水 200mL を入れ、実験動物に給水する状態で 48 時間放置後、給水瓶中の精製水を実験に供した。給水瓶中の精製水 100mL を Oasis HLB カートリッジに負荷し、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。

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 20mL 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 μ m)でろ過し、試験溶液とした。

C. 結果及び考察

1. 飼料、床敷及び給水中の BPA の分析

1.1 飼料、床敷及び給水中の BPA の分析法の検討

動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境(飼料、床敷及び給水)からの BPA 暴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、昨年度本事業で構築した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。

測定には先に構築した生体試料中の BPA 分析法(分離分析法として優れている LC/MS 法)を用いることにした。なお、より選択的な分析結果を得る目的で、タンデム型高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS/MS)も採用した。

1.2 飼料、床敷、給水中のビスフェノール A

本法を用いて飼料 40 検体、床敷 14 検体、給水 3 検体中の BPA を測定した。飼料中(n=40)に含まれる BPA は、ND~2.9ng/g(表 4)で、ほとんどの飼料が検出下限値レベル(1ng/g)であった。最も高濃度で検出された BPA 濃度(2.9ng/g)より、マウス及びラットが飼料から摂取する BPA を試算すると、マウスでは 17.4 ng/日(一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 72.5 ng/日(一日の飼料摂取量を 25 g とした時)程度となる。

また、床敷中(n=14)からは最高で 704ppb 検出されたものも見られたが、給水中(n=3)か

らは BPA は検出(0.02ng/mL)されなかった。

2. 飼料中の植物エストロゲン分析法の検討

2.1. 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 3 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。

2.2. 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)とも良好に回収される 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。

2.3 飼料中の植物エストロゲン

市販されている飼料 40 検体を購入し、測定に供した結果、ほとんどの飼料から植物エストロゲンが検出された(図 3、表 5)。なお、植物エストロゲンフリーとして注文生産されている飼料からは植物エストロゲンは検出(<0.2 μ g/g)されなかった。

市販されている多くの実験動物飼料中に植物エストロゲンが含まれていた。そこで、最も高濃度で植物エストロゲン(569 μ g/g)が含まれていた飼料から、マウス及びラットが摂取する植物エストロゲン量の試算を試みた。マウスの一日の飼料摂取量を 6 g とした時、植物エストロゲンの推定摂取量は 3,414 μ g/日、ラットでは 14,225 μ g/日(一日の飼料摂取量を 25 g とした時)程度となった。

以上の結果から、マウス等の実験動物が飼育環境から植物エストロゲンの暴露を受けていることが示唆された。

D 結論

1. 動物飼料中の BPA の分析法ガイドラインの構築

動物実験の信頼性確保するため、動物実験環境（飼料、床敷、給水）からの BPA 暴露量を評価する分析法（試料を、アルミナ-A カートリッジ及びポリマーゲル充填カートリッジを用いてクリーンアップし、高速液体クロマトグラフ/質量分析計（LC/MS）で定性・定量）を構築した。

2. 飼料、床敷、給水中のビスフェノール A の分析

飼料中 (n=40) に含まれる BPA は、ND～2.9ng/g で、ほとんどの飼料が検出下限値レベル(1ng/g)であった。最も高濃度で検出された BPA 濃度(2.9ng/g)より、マウス及びラットが飼料から摂取する BPA を試算すると、マウスでは 17.4 ng/日（一日の飼料摂取量を 6 g とした時）、ラットでは 72.5 ng/日（一日の飼料摂取量を 25 g とした時）程度となる。

また、床敷中 (n=14) からは最高で 704ng/g 検出されたものも見られたが、給水中 (n=3) からは BPA は検出 (0.02ng/mL) されなかった。

3. 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。

測定に供したほとんどの飼料(37/40)から植物エストロゲンが検出された。最も高濃度で検出された植物エストロゲン濃度(569 μg/g)より、マウス及びラットが飼料から摂取する植物エストロゲンを試算すると、マウスでは 3,414 μg/日（一日の飼料摂取量を 6 g とした時）、ラットでは 14,225 μg/日（一日の飼料摂取量を 25 g とした時）程度となる。以上の結果から、マウス等の実験動物が飼育環境から植物エストロゲンの暴露を受けていることが示唆された。なお、植物エストロゲンフリーとして注文販売されている飼料からは植物エストロゲンは検出 (<0.2 μg/g) されなかった。

E. 研究業績

1. 論文発表

1) Tadashi sukioka, 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, 57 (2004)

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

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		

column No. 1223

0 min A:B=30 A=0.01% AcOH
 15 min A:B=60 B=MeCN

表2 LC/MS/MS 測定条件

分析カラム : Cadenza CD-C18 (10cm x 2 mm) カラム温度 : 40°C
 移動相 : 0.005%酢酸 - アセトニトリル (60:40) 流速 : 0.2 mL/min
 注入量 : 10 µL イオン化モード : ESI+

MRM	モニターイオン	Cone電圧	Collision電圧
BPA	m/z 226.8 → m/z 211.9	40	20
	m/z 226.8 → m/z 132.7	40	20
BPA-d16	m/z 241.0 → m/z 222.8	40	20
	m/z 241.0 → m/z 141.8	40	20

表3 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

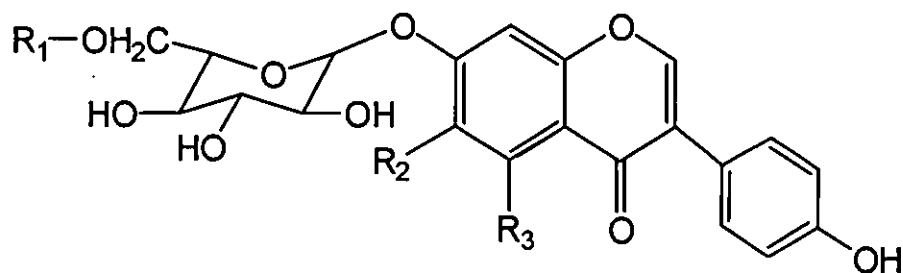
表4 飼料・床敷・給水中のBPAの分析

Sample	BPA (ppb)	Sample	BPA (ppb)	Sample	BPA (ppb)
F-1	<1.0	F-21	<1.0	M-1	1.9
F-2	<1.0	F-22	<1.0	M-2	1.8
F-3	<1.0	F-23	<1.0	M-3	704
F-4	1.3	F-24	<1.0	M-4	<1.0
F-5	1.2	F-25	2.9	M-5	<1.0
F-6	1.1	F-26	<1.0	M-6	<1.0
F-7	<1.0	F-27	<1.0	M-7	9.3
F-8	<1.0	F-28	<1.0	M-8	-
F-9	<1.0	F-29	<1.0	M-9	-
F-10	<1.0	F-30	<1.0	M-10	1.8
F-11	<1.0	F-31	2.2	M-11	559
F-12	<1.0	F-32	<1.0	M-12	-
F-13	<1.0	F-33	<1.0	M-13	-
F-14	<1.0	F-34	<1.0	M-14	1.7
F-15	<1.0	F-35	1.7		
F-16	<1.0	F-36	1.2	B-1	<0.02
F-17	<1.0	F-37	<1.0	B-2	<0.02
F-18	<1.0	F-38	1.5	B-3	<0.02
F-19	<1.0	F-39	<1.0		
F-20	<1.0	F-40	2.5		

表5 飼料中の植物イストゲソ

Sample	植物イストゲソ(ppm)	Sample	植物イストゲソ(ppm)
F-1	68	F-21	26
F-2	36	F-22	4.4
F-3	220	F-23	278
F-4	14	F-24	81
F-5	14	F-25	211
F-6	52	F-26	134
F-7	5	F-27	34
F-8	24	F-28	34
F-9	2.4	F-29	346
F-10	405	F-30	312
F-11	204	F-31	410
F-12	276	F-32	569
F-13	218	F-33	427
F-14	173	F-34	54
F-15	ND	F-35	3.4
F-16	105	F-36	135
F-17	180	F-37	262
F-18	ND	F-38	224
F-19	35	F-39	118
F-20	23	F-40	80

◎ : イストゲソフリー飼料



化合物	R ₁	R ₂	R ₃	糖	mol. Wt
Daidzein	H	H	H	—	254.24
Daidzin	H	H	H	+	416.38
6''-O-Acetyldaidzin	COCH ₃	H	H	+	458.42
6''-O-Malonyldaidzin	COCH ₂ COOH	H	H	+	502.43
Genistein	H	H	OH	—	270.24
Genistin	H	H	OH	+	432.38
6''-O-Acetylgenistin	COCH ₃	H	OH	+	474.42
6''-O-Malonylgenistin	COCH ₂ COOH	H	OH	+	518.43
Glycitein	H	OCH ₃	H	—	284.26
Glycitin	H	OCH ₃	H	+	446.40
6''-O-Acetylglycitin	COCH ₃	OCH ₃	H	+	488.45
6''-O-Malonylglycitin	COCH ₂ COOH	OCH ₃	H	+	532.46

図1 代表的植物エストロゲン，イソフラボン類の化学構造

図2 飼料，床敷中のビスフェノールA分析法

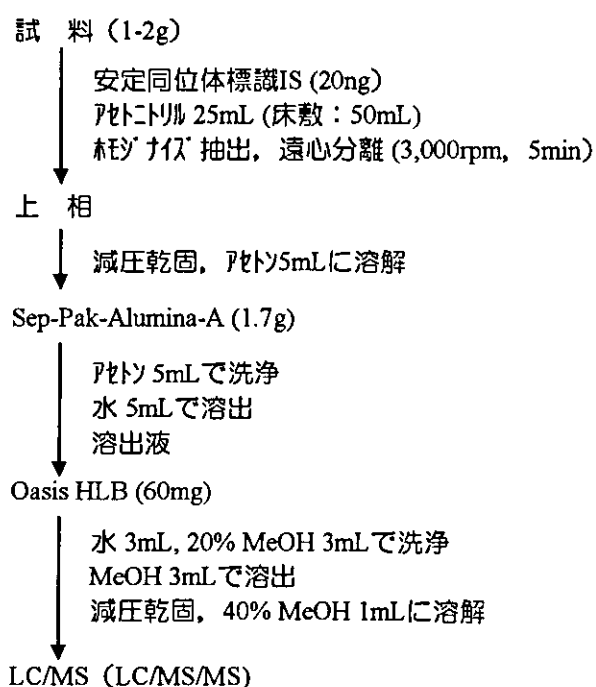
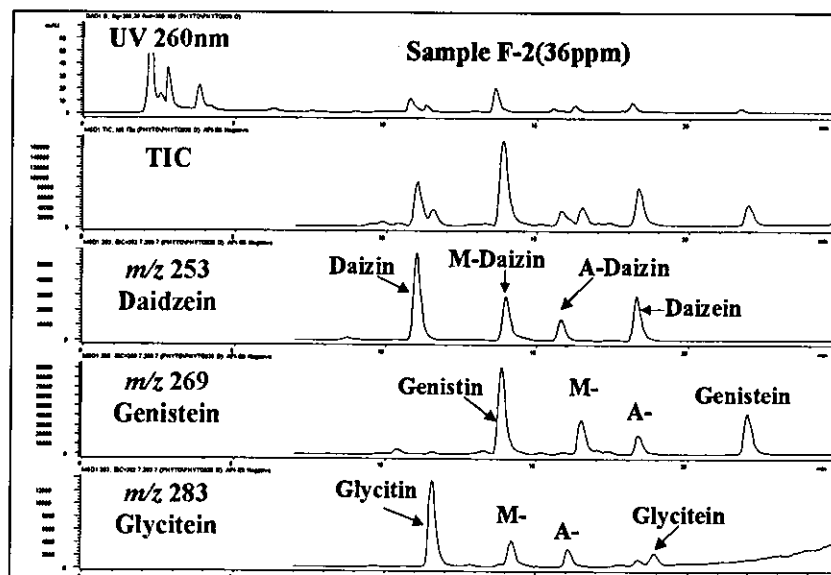


図3 飼料中の植物エストロゲンの分析



付表 実験に供した飼料, 床敷, 給水瓶

No.	試料	供給先	備考
F-1	飼料	A社	
F-2	飼料	B社	
F-3	飼料	C社	
F-4	飼料	A社	
F-5	飼料	A社	
F-6	飼料	A社	
F-7	飼料	A社	
F-8	飼料	A社	
F-9	飼料	A社	
F-10	飼料	C社	
F-11	飼料	B社	
F-12	飼料	B社	
F-13	飼料	A社	
F-14	飼料	A社	
F-15	飼料	C社	イストゲ ソリ-
F-16	飼料	C社	
F-17	飼料	A社	
F-18	飼料	C社	イストゲ ソリ-
F-19	飼料	A社	
F-20	飼料	A社	
F-21	飼料	A社	
F-22	飼料	A社	
F-23	飼料	A社	
F-24	飼料	A社	加用
F-25	飼料	A社	加用
F-26	飼料	A社	ウギ用
F-27	飼料	A社	イストゲ ソリ-
F-28	飼料	A社	
F-29	飼料	D社	
F-30	飼料	D社	
F-31	飼料	D社	
F-32	飼料	D社	
F-33	飼料	D社	
F-34	飼料	D社	加用
F-35	飼料	D社	加用
F-36	飼料	D社	加用
F-37	飼料	D社	加用
F-38	飼料	B社	
F-39	飼料	B社	
F-40	飼料	B社	加用
M-1	床敷	E社	
M-2	床敷	C社	
M-3	床敷	A社	
M-4	床敷	E社	トビ
M-5	床敷	E社	ミ
M-6	床敷	E社	ブナ, 加ナ, 加デ, ホ, プラ
M-7	床敷	D社	ミ
M-8	床敷	A社	ミ
M-9	床敷	F社	赤松
M-10	床敷	D社	
M-11	床敷	A社	
M-12	床敷	G社	松ノ再生品
M-13	床敷	H社	
M-14	床敷	C社	ハルブ
B-1	給水瓶	A社	PC製
B-2	給水瓶	A社	PC製
B-3	給水瓶	I社	PC製