



平成 14-16 年度 厚生労働科学研究 (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  
『動物飼料, 床敷及び給水中の 4-ノニルフェノールの分析』

主任研究者	牧野 恒久	(東海大学医学部教授)
分担研究者	中澤 裕之	(星薬科大学教授)
研究協力者	藤巻 照久	(神奈川県衛生研究所)
	平山 クニ	(神奈川県衛生研究所)
	斉藤 貢一	(星薬科大学)
	伊藤 里恵	(星薬科大学)

#### 研究要旨

動物飼料等からの 4-ノニルフェノール(NP)の分析法として、精油定量装置を用い、LC/MS/MS で測定する方法を検討した。精油定量装置により前処理操作を簡素化することで、試験操作による汚染を低減化することが可能となった。

本分析法を用い、市販の動物飼料、床敷及び給水の分析を行った。その結果、動物飼料 35 検体中 34 検体から 4.9-117.0ng/g の範囲で、また床敷 14 検体すべてから NP を認めた。特に古新聞再生紙を原料とする床敷から 620-1020ng/g、そのほかの試料から 2.3-65.3ng/g の範囲で NP を検出した。給水については、神奈川県衛生研究所動物舎給水栓から得た 1 検体は、不検出であった(定量限界値は 0.02ng/mL)。給水瓶に入れた水は、4 社の材質の異なる給水瓶本体とキャップの組合せによって 11 検体を分析した。その結果、室温 24 時間放置で 11 検体中 5 検体から 0.03-0.11ng/mL、121°C で 20 分間放置の 11 検体中 10 検体から 0.03-0.63ng/mL の範囲で NP を検出した。NP の溶出は給水瓶本体樹脂の材質によるものではなく、キャップ素材の影響が示唆された。

#### A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の生体影響の評価については、低用量域において再現性のある結果を得るのが困難な状況にあるのが現状である。その要因として、動物実験及び実験動物の飼育環境下による当該化学物質の暴露が問題点として指摘されている。

本研究では、実験動物の飼育環境下による暴露量を把握するため、動物飼料、床敷及び給水に含まれる 4-ノニルフェノール(NP)の微量分析法を構築し、市販の動物飼料、床敷及び給水の分析を行った。

#### B. 研究方法

##### B・1 試薬

4-ノニルフェノール(NP): 関東化学社製(環境分析用)

4-(1-メチル)オクチルフェノール-d5 (m-OP-d<sub>5</sub>): 林純薬社製 1000 μg/mL ヘキサン溶液(水質試験用)

ヘキサン、メタノール: 関東化学社製(フタ

ル酸エステル測定用)

超純水: 日本ミリポア社製純水/超純水製造システム EQS-5L で精製した。

##### B・2 標準溶液

NP 標準溶液: NP 100 mg を精秤し、ヘキサン 100 mL に溶解して 1000 μg/mL 標準原液を調製し、適宜メタノールで希釈した。

m-OP-d<sub>5</sub> 溶液: 市販の 1000 μg/mL ヘキサン溶液を適宜メタノールで希釈し、内部標準溶液として使用した。

##### B・3 試料

動物飼料は 4 社、29 種、35 検体について、また床敷は 6 社、10 種、14 検体について分析した。給水については神奈川県衛生研究所動物舎給水栓から得た 1 検体及び給水瓶(高分子製)について 4 社の材質の異なる給水瓶本体とキャップの組合せによる 11 検体の合計 12 検体を分析した。

##### B・4 装置及び測定条件

###### 精油定量装置:

実験に用いるガラス器具はすべて洗浄後、

180℃で2時間加熱した。次いで放冷し、アセトンで洗浄後使用した。

**HPLC 装置:** Agilent 社製 Agilent1100

HPLC 測定条件

分析カラム: ODS-3(2.1 mmx150 mm) (ジールサイエンス社製)

カラム温度: 40 °C

移動相: 0.5mM 酢酸アンモニウム含有 90%メタノール

流速: 0.2 mL/min

注入量: 10 μL

**MS/MS 装置:** Applied Biosystems 社製 API-3000

MS/MS 測定条件

Ion source: Turbo ion Spray(ESI)

Mode: MRM

Turbo gas temp.: 550°C

Polarity: Negative

Spray voltage: -4500V

Monitor ion(Precursor ion/Product ion): NP( $m/z=219/m/z=133$ );  
m-OP-d<sub>5</sub>( $m/z=224/m/z=123$ )

#### B・4・1 検量線の作成

NP の 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100ng/mL メタノール溶液を調製して、低濃度用検量線を作成し、10, 100, 500, 1000, 2000ng/mL メタノール溶液を調製して、高濃度用検量線を作成した。なお、内部標準物質(m-OP-d<sub>5</sub>)の濃度は 50ng/mL とした。

#### B・5 試験溶液の調製

精油定量装置に水 100mL と試料 2g を入れ、ヘキサン 3mL を用いて 1 時間、還流蒸留抽出を行った。得られたヘキサン層を減圧下で遠心濃縮後、メタノール 1mL を入れ、超音波で溶解した後、試験溶液とした。給水及び給水瓶中の水の場合は試料水 100 mL とヘキサン 3 mL のみを用いて同様な操作を行った。

#### B・6 倫理面への配慮

実験に用いた試薬及び有機溶媒等が環境中に排出されないよう、それらの回収を徹底した。

### C. 結果及び考察

#### C・1 検出限界値、定量限界値及び検量線について

定量下限値 (LOQ) は、検量線に使用した最も低濃度の標準溶液 (NP: 0.5 ng/mL, m-OP-d<sub>5</sub>: 50 ng/mL) を用いて 5 回の繰り返し測定を行い、標準偏差の 10 倍のシグナルを検出できる

2ng/mL に設定した。なお、NP の検出下限値 (LOD) は標準偏差の 3 倍のシグナルを検出できる 0.5ng/mL に設定した<sup>1)</sup> (図 1)。

これによって定量下限値は、動物飼料中及び床敷中で 1ng/mL とされ、給水中で 0.02ng/mL とされる。定量分析はいずれも内部標準法による。低濃度用及び高濃度用検量線は共に原点を通る直線性を示した。

#### C・2 精油定量装置を用いた抽出法の検討

##### C・2・1 蒸留時間による回収率について

精油抽出装置に水 100 mL を入れ、これに NP 及び m-OP-d<sub>5</sub> をそれぞれ 1 μg 添加し、ヘキサンを抽出溶媒として 15 分から 90 分間蒸留を行った。NP 及び m-OP-d<sub>5</sub> は 15 分間蒸留することで、約 80%、30 分間でほぼ 100% の回収が得られた (図 2)。NP の内標準物質として市販されている m-OP-d<sub>5</sub> は蒸留法においても内標準物質として使用することが可能であった。

##### C・2・2 装置内洗浄によるブランク値の低減下について

微量分析においては、操作ブランク値が問題となるため、ブランク値の低減下を目的に試験前の装置内の洗浄効果を検討した。

水とヘキサンで 30 分間、4 回洗浄し、それぞれの洗浄段階でブランク値を測定した。図 3 に示すように 3 回洗浄することでブランク値を 1-2 ng/mL の範囲に抑えることができたことから、3 回洗浄後試料を測定することとした。

##### C・2・3 遠心エバポレータによる NP 及び m-OP-d<sub>5</sub> の揮散についての検討

ヘキサン溶液 (A) 及びヘキサン溶液に水を入れ、ヘキサン層を再度分取したもの (B) を遠心エバポレータにかけ、25 分後及び 50 分後、ヘキサンに再溶解し、測定を行った。表 1 に示すように

完全にヘキサンが除去できる 25 分間では NP 及び m-OP-d<sub>5</sub> は、ともに 90% 以上の回収率が得られ、ヘキサン除去後さらに 25 分間遠心エバポレータにかけた場合においても 90% 以上の回収率が得られた。

この結果から NP 及び m-OP-d<sub>5</sub> は、50 分後においても (A) と (B) の回収率にほとんど差がないことが確認できた。

従って、精油定量装置から分取したヘキサン層の無水硫酸ナトリウムによる脱水操作を省略した。

##### C・2・4 添加回収実験

水及び飼料に NP を 100 ng 添加し、添加回収実

験を行った。なお、飼料についてはNPが18.7 ng/g 検出された飼料に添加し、サンプル量を補正した結果を表2示す。その結果、蒸留水については105%、飼料は71.7%であった。測定した動物飼料及びNPを添加した飼料のクロマトグラムは図4に示す。

飼料からの回収率がやや低い値を示した要因として、添加した飼料にNPが含有されており、飼料のばらつきが考えられる。

本法を用いて動物飼料35検体(29種)、床敷14検体(10種)及び給水及び給水瓶中の水12検体を分析した。

#### C・3 動物飼料の分析

動物飼料中(n=35)の1検体は不検出であったが、34検体からNPが4.9-117.0 ng/g 検出された(表3)。検出されたNPの濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取するNPを試算すると、マウスでは、29.4-702ng/日(一日の飼料摂取量を6gとした時)<sup>2)</sup>、ラットでは122.5-2925 ng/日(一日の飼料摂取量を25gとした時)<sup>2)</sup>となる。

#### C・4 床敷の分析

床敷(n=14)についてはすべての検体からNPが検出された。特に古新聞再生紙を原料とする床敷は、620-1020ng/gの範囲で検出された。その他の床敷きは2.3-65.3ng/gの範囲で検出された(表4)。床敷からの暴露量推定は困難であるため高濃度に汚染が認められる床敷の使用は避けることが望ましい。

#### C・5 給水の分析

神奈川県衛生研究所動物舎給水栓から得た1検体については、不検出であった(定量限界値は0.02ng/mL)。

給水瓶に入れた水については、4社の給水瓶本体とキャップの組み合わせ(11検体)について検討を行った。給水瓶の使用方法を考慮して、分析条件は超純水200mLを入れた後、室温で24時間放置後、100mLを分析に供した場合と給水瓶に入れた超純水とともに給水瓶を121°C、20分間加熱放冷後、100mLを分析した場合について検討した。室温放置の場合、5検体から0.03-0.11ng/mLの範囲でNPが認められた。加熱放冷後では1検体を除くすべての検体からNPが0.03-0.63ng/mLの範囲で認められた(表5)。給水瓶中の超純水へのNP溶出は、室温24時間放置した場合よりも121°C、20分間加熱放冷した場合の方が多くことが判明した。従ってNP溶出は、放置時間よりも加熱による

影響が示唆された。

また、キャップについてシリコンゴム(本体ポリサルホン樹脂1検体、ポリカーボネート樹脂2検体、ポリエチルイミド樹脂1検体)の場合、室温24時間放置で4検体中1検体から0.04ng/mL、121°Cで20分間放置で4検体中3検体から0.03-0.05ng/mLのNPを検出した。ブチルゴム(本体ポリサルホン樹脂2検体、ポリカーボネート樹脂2検体、ポリエチルイミド樹脂1検体)の場合、室温24時間放置で5検体中2検体から0.03-0.06ng/mL、121°Cで20分間放置で5検体中5検体から0.08-0.35ng/mLのNPを検出した。天然ゴム(本体ポリカーボネート樹脂1検体、ポリエチルイミド樹脂1検体)の場合、室温24時間放置で2検体中2検体から0.06-0.11ng/mL、121°Cで20分間放置で2検体中2検体から0.53-0.63ng/mLのNPを検出した。以上のことからNP溶出は、給水瓶本体樹脂の材質ではなく、キャップ素材の影響が示唆された。

検出されたNPの濃度より、マウス及びラットが給水から摂取するNPを試算すると、マウスでは、0.24-5.04ng/日(一日の給水摂取量を8mLとした時)<sup>2)</sup>、ラットでは、1.35-28.35ng/日(一日の給水摂取量を45mLとした時)<sup>2)</sup>となる。なお、オートクレーブ内の汚染の有無を確認するためビーカーに超純水を入れ、蓋をせずに加熱滅菌前と加熱滅菌後を分析したが、NPは不検出であった。

#### D. 結論

動物飼料等からのNPの分析法として、精油定量装置を用い、LC/MS/MSで測定する方法を検討した。精油定量装置により前処理操作を簡素化することで、試験操作による汚染を低減化することが可能となった。

本分析法を用い、市販の動物飼料、床敷及び給水の分析を行った。その結果、動物飼料35検体中34検体から4.9-117.0ng/gの範囲で、また床敷14検体すべてからNPを認めた。特に古新聞再生紙を原料とする床敷から620-1020ng/g、その他の試料から2.3-65.3ng/gの範囲でNPを検出した。給水については、神奈川県衛生研究所動物舎給水栓から得た1検体は、不検出であった(定量限界値は0.02ng/mL)。給水瓶に入れた水は、4社の材質の異なる給水瓶本体とキャップの組合せによって11検体を分析した。その結果、室温24

時間放置で 11 検体中 5 検体から 0.03-0.11ng/mL、121℃で 20 分間放置で 11 検体中 10 検体から 0.03-0.63ng/mL の範囲で NP を検出した。NP の溶出は給水瓶本体樹脂の材質によるものではなく、キャップ素材の影響が示唆された。

#### E・参考文献

- 1) 環境庁水質保全局水質規制課;ダイオキシン類に係る水質調査マニュアル、p. 32(1998)
- 2) 今道知則監修：“実験動物の飼育管理と手技”、第 1 版、(1979)、(ソフトサイエンス社)。

#### F・健康危険情報

なし

#### G・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) 日本薬学会第 125 年会；「動物実験環境下における飼料、床敷等中のノニルフェノールの分析 (1)」(2005)；藤巻照久、平山クニ(神奈川衛研)、山崎晴子、紺野浩平、伊藤里恵(星薬大)、和泉俊一郎、牧野恒久(東海大医学部)、斉藤貢一、中澤裕之(星薬大)
- 3) 日本薬学会第 125 年会；「動物実験環境下における飼料、床敷き等中のノニルフェノールの分析 (2)」(2005)；山崎晴子、紺野浩平、伊藤里恵(星薬大)、藤巻照久、平山クニ(神奈川衛研)、和泉俊一郎、牧野恒久(東海大医学部)、斉藤貢一、中澤裕之(星薬大)

#### H・知的所有権の取得状況

なし

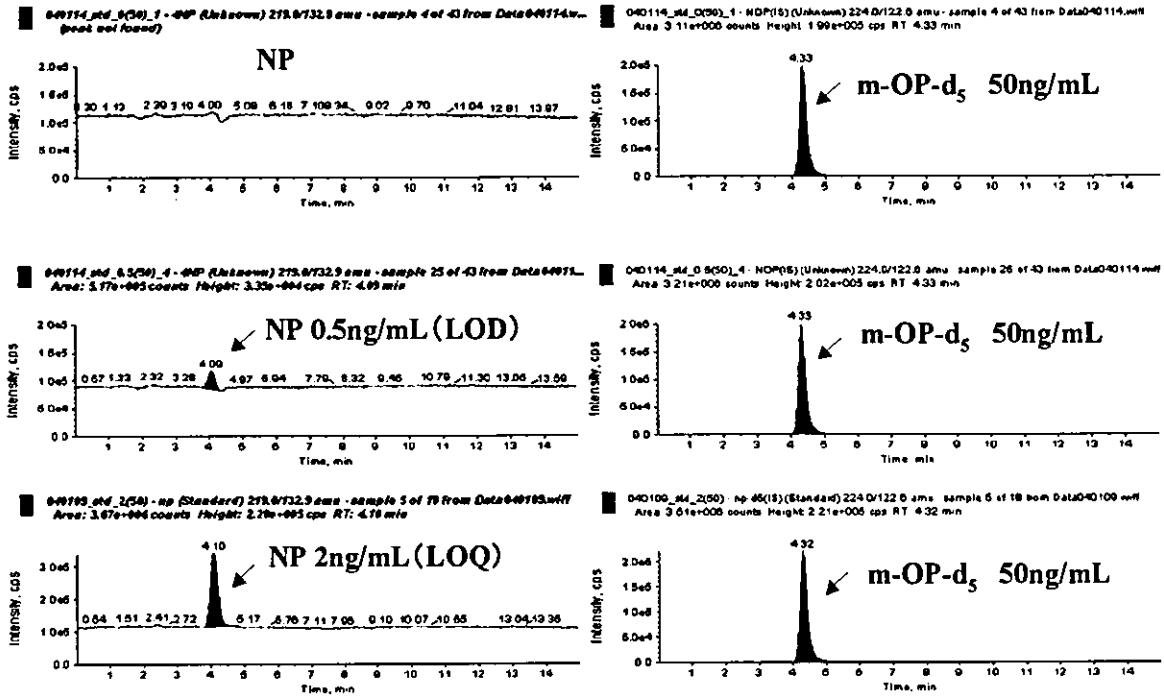


図 1 NP の検出下限値 (LOD) 及び定量下限値 (LOQ)

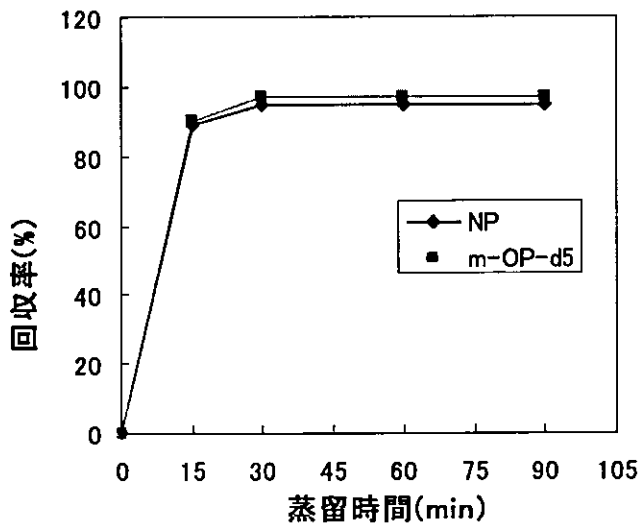


図 2 蒸留時間による NP 及び m-OP-d<sub>5</sub> の回収率

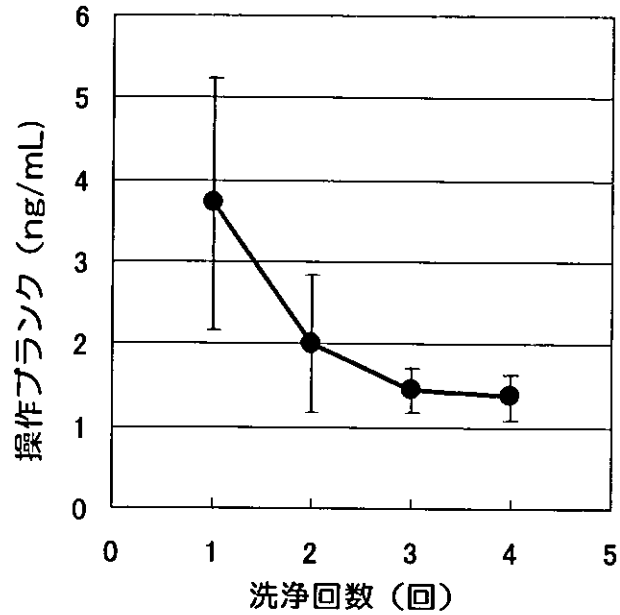


図3 装置洗浄による操作ブランクの挙動

表1 遠心エバポレータによるNP及びm-OP-d<sub>5</sub>の回収率

遠心時間(min)	%			
	NP		m-OP-d <sub>5</sub>	
	A	B	A	B
25	94.2 ± 1.1	96.1 ± 1.1	90.4 ± 1.8	92.7 ± 3.4
50	95.6 ± 3.1	94.4 ± 1.6	93.6 ± 4.5	91.1 ± 4.6

mean ± SD (n=3)

A: ヘキサン溶液(NP, m-OP-d<sub>5</sub> 50ng/mL)4mLを濃縮乾固

B: 同溶液4mLに水4mLを入れヘキサン層を濃縮乾固

表2 NPの回収率

試料	添加量	回収率(%)	RSD(%)
蒸留水	100ng/100mL	105.3 ± 0.6	0.6
飼料	100ng/2g	71.3 ± 2.5 <sup>(※)</sup>	3.5

mean ± SD (n=3)  
※: 18.7ng/gの試料を使用

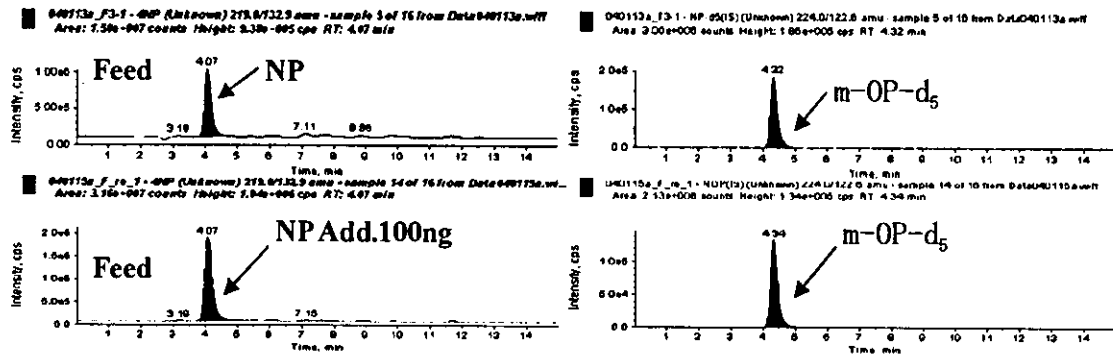


図 4 動物飼料中の NP 及び NP 添加飼料のクロマトグラム



表 3 動物飼料中の NP 測定結果

No.	分析値(ng/g)	No.	分析値(ng/g)	No.	分析値(ng/g)
F-1	17.4	F-22	7.6	F-34	55.5
F-2	10.5	F-23	5.3	F-36	6.8
F-3	18.7	F-24	16.7	F-37	4.9
F-10	11.2	F-25	13.2	F-38	22.2
F-11	10.0	F-26	7.4	F-39	nd
F-12	7.2	F-27	7.0	F-40	20.4
F-13	6.9	F-28	9.2	F-41	8.4
F-14	5.6	F-29	117.0	F-42	5.4
F-15	13.4	F-30	17.6	F-43	7.3
F-19	11.3	F-31	17.6	F-44	7.7
F-20	13.2	F-32	16.5	F-45	12.0
F-21	14.9	F-33	15.4		

nd: <1ng/g

表 4 床敷中の NP 測定結果

No.	分析値(ng/g)	No.	分析値(ng/g)
M-1	65.3	M-11	788.3 * <sup>1</sup>
M-2	32.2	M-12	4.8
M-4	18.8	M-13	8.5
M-5	20.2	M-14	3.5
M-6	2.3	M-15	33.3
M-7	9.5	M-16	681.7 * <sup>2</sup>
M-8	16.9	M-17	8.4

\* 1: 788.3±200.8 (680, 665, 1020) nd: <1ng/g

\* 2: 681.7±60.1 (685, 740, 620)

表 5

給水中の NP 測定結果

No.	メーカー名	材質		給水中の濃度 (ng/mL)	
		本体	キャップ	室温放置, 24hr	121°C, 20min
	ブランク(超純水)	ガラス(ビーカー)	なし	nd(採取直後)	nd
B-7	A社	ポリサルホン樹脂	ブチルゴム	0.03	0.08
B-8	B社	ポリカーボネート樹脂	ブチルゴム	nd	0.17
B-9	B社	ポリカーボネート樹脂	シリコンゴム	nd	nd
B-10	B社	ポリサルホン樹脂	ブチルゴム	nd	0.14
B-11	B社	ポリサルホン樹脂	シリコンゴム	nd	0.03
B-12	C社	ポリカーボネート樹脂	シリコンゴム	0.04	0.07
B-13	C社	ポリエチルイミド樹脂	シリコンゴム	nd	0.05
B-14	D社	ポリカーボネート樹脂	天然ゴム	0.11	0.63
B-15	D社	ポリカーボネート樹脂	ブチルゴム	0.06	0.35
B-16	D社	ポリエチルイミド樹脂	天然ゴム	0.06	0.53
B-17	D社	ポリエチルイミド樹脂	ブチルゴム	nd	0.15

nd: &lt;0.02ng/mL



平成 14-16 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暴露量のモニタリングに関する研究  
主任研究者：牧野恒久 東海大学医学部教授

実験動物用飼料中の 17 $\beta$ -エストラジオールの分析

分担研究者： 岡 尚男 愛知県衛生研究所  
研究協力者： 堀 伸二郎 大阪府立公衆衛生研究所  
高取 聡 大阪府立公衆衛生研究所  
近藤 文雄 愛知県衛生研究所

研究要旨

実験動物用飼料に含まれる 17 $\beta$ -エストラジオール (E<sub>2</sub>) の定量法を開発した。市販の実験動物用飼料 20 点 (15 品目) について E<sub>2</sub> 含有量を測定したところ、1 点に 0.52 $\pm$ 0.03 ppb の E<sub>2</sub> を検出した。その他は、0.50 ppb 未満であった。

A. 研究目的

動物実験環境中に内分泌かく乱作用が疑われる化学物質 (以下、化学物質) が広く存在することが指摘されている。飼料は、実験動物が摂取することから最も影響が大きいと考えられる。このため内分泌かく乱作用に関する動物実験者は、飼料中に含まれる化学物質量を把握することが求められている。内分泌かく乱作用の評価に関する動物実験に用いるため、植物エストロゲンを低減化した製品が開発されている。しかしながら、その飼料にも魚粉が使用されることがある (Kanno, J., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3883, 2002)。また、原料の魚粉にエストロゲン活性が検出された報告がある (Kato, H., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1410, 2004)。我々は、飼料中の 17 $\beta$ -エストラジオール (E<sub>2</sub>) の分析方法を開発し、市販飼料中の E<sub>2</sub> 含有量を測定した。本研究は、動物実験の信頼性の確保に役立つ情報を提供すると期待される。

B. 方法

B-1. 試薬及び器具

E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> (16, 16, 17-d<sub>3</sub>), メタノール (環境分析用) 及びジクロロメタン (環境分析用) は、和光純薬社製を用いた。グラファイトカーボン/アミノプロピルシリカゲル固層抽出カラムは、スペルクリン ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500mg/500mg; SPELCO) を用いた。カラムは、実験に際して予め 20 mL のジクロロメタン/

メタノール (50 : 50) 及び 20 mL のメタノールの順で洗浄して用いる。実験に用いる器具は、E<sub>2</sub> の分析に支障のないよう、十分に水洗したガラス器具を分析直前にアセトンで洗浄したものを使用した。

B-2. 飼料について

実験に用いた飼料は、本研究班から分与された。また、表記中のナンバリングは、本報告書における統一様式に従った。

B-3. 機器

LC: Agilent 1100 シリーズ; バイナリポンプ, G1321A; ウェルプレートオートサンプラ, G1367A; カラム恒温槽, G1316A; デガッサ, G1379A

MS/MS: API 3000 (アプライドバイオシステムズ)

B-4. 試験液の調製

粉碎した飼料 10 g に E<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> を 100 ng 添加した。メタノールを 50 mL 加えて室温で 1 時間静置した後、ホモジナイズ (2 分間) した。超音波照射 (10 分間) 後、遠心分離し、上清を回収した。残渣にメタノール 10 mL を加えて洗浄し、遠心分離後、上清を回収し、先の上清と併せて 50 mL に定容した。この抽出液 2.0 mL をグラファイトカーボン/アミノプロピルシリカゲル固層抽出カラムに負荷し、メタノール 20 mL で洗浄後、ジクロロメタン/メタノール (50 : 50) 10 mL で溶出させた。窒素気流下で乾固させ、LC の溶出開始液 0.20 mL に溶解して試験溶液とした (スキーム 1)。

LC/MS/MS の条件は、以下の通り。

LC 条件：

カラム；Cadenza CD-C18, 2.0 x 50 mm；カラム温度；50℃；分析用移動相；(A) 0.02%アンモニア水；(B) アセトニトリル；グラジエント条件；(B), 20 → 60% (10 min), リニア；分析用移動相の流速；0.2 mL/min；注入量；5.0 μL；イオン化法；エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法；ネガティブモード；モニターイオン (プレカーサーイオン/プロダクトイオン)； $E_2$ , ( $m/z=271/m/z=145$ )； $E_2-d_3$ , ( $m/z=274/m/z=145$ )。

B-5. 倫理面への配慮

実験に用いた試薬及び有機溶媒等が環境中に排出されないよう、それらの回収を徹底した。

### C. 結果及び考察

定量下限値は、クロマトグラフ上で操作ブランク値の標準偏差の 10 倍のシグナルを検出できる 1.0 ppb に設定した。これによって飼料中の定量下限値は、0.50 ppb とされる。飼料中の  $E_2$  は、内部標準法により定量した。すなわち、 $E_2-d_3$  に対する  $E_2$  のピーク面積比から検量線 (図 1) を作成し、定量値を求めた。 $E_2$  が検出されなかった飼料 (F-10, 11, 14, 及び 15) に  $E_2$  5.0 ppb を添加し、その回収率を求めた結果、回収率は、78~95% であった。 $E_2-d_3$  で補正することによって、F-10, 11, 14, 及び 15 での  $E_2$  の回収率 (RSD) は、それぞれ、103(0.3), 107(4.8), 101(1.4), 97.9(2.9)% になった。本法を用いて飼料 20 点 (15 種類) について  $E_2$  含有量を測定した。代表的なクロマトグラフを図 2 に示した。F-20 に  $0.52 \pm 0.03$  ppb の  $E_2$  を検出した (表 1)。その他は、0.50 ppb 未満であった。F-20 は、マウスまたはラットに使用される。このケースでマウスまたはラットが、飼料から摂取する  $E_2$  を試算するとマウス (飼料摂取量：6 g/日) で 3.1 ng/日、ラット (飼料摂取量：25 g/日) で 13 ng/日程度となる。

### D. 結論

- 1: 実験動物用飼料に含まれる  $E_2$  の定量法を開発した。
- 2: 実験動物用飼料 20 点 (15 品目) について  $E_2$  含有量を測定したところ 1 点に  $0.52 \pm 0.03$  ppb の  $E_2$  を検出した。その他は、0.50 ppb 未満であった。

### E. 健康危険情報

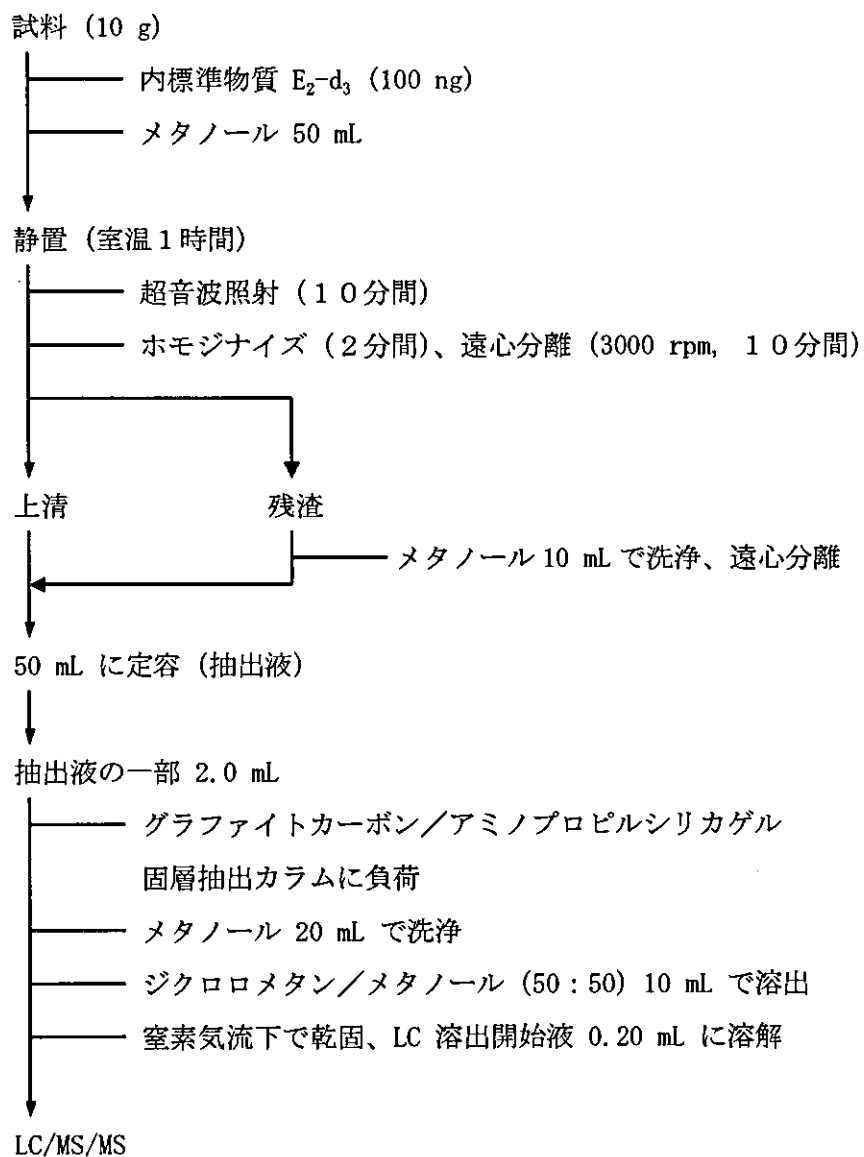
なし

### F. 研究発表

なし

### G. 知的所有権の取得状況

なし



スキーム 1 : 飼料中のエストラジオール分析法.

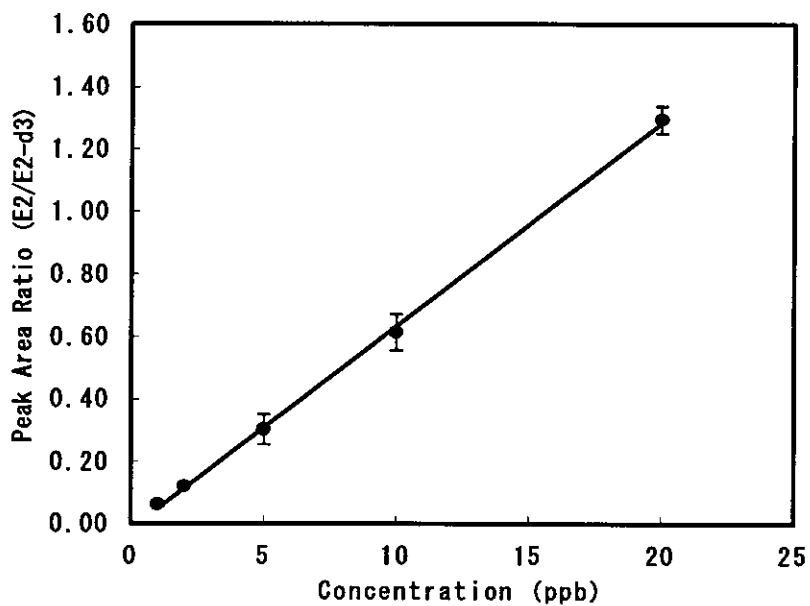
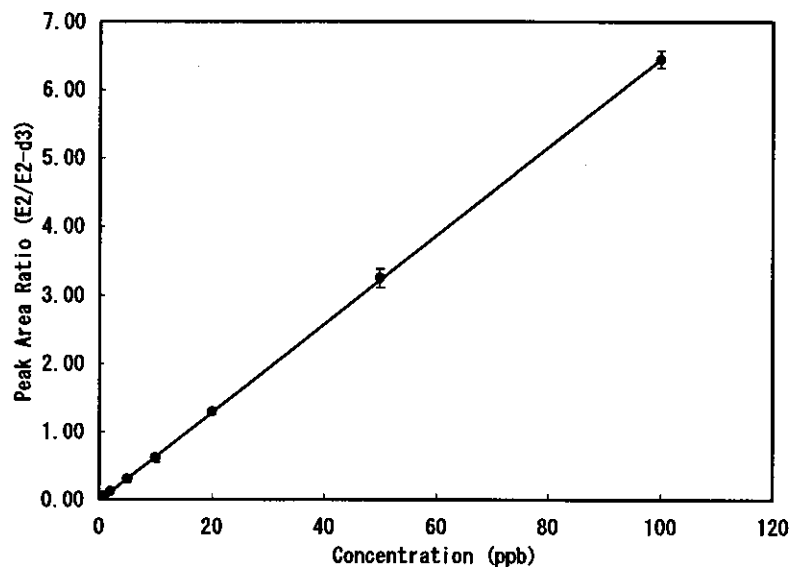


図 1 : E<sub>2</sub> の相対検量線 : 上段, (1-100 ppb),  $y = 0.065 x - 0.011$ ,  $R^2=1.00$ ;  
下段, (1- 20 ppb),  $y = 0.065 x - 0.016$ ,  $R^2=0.99$ .

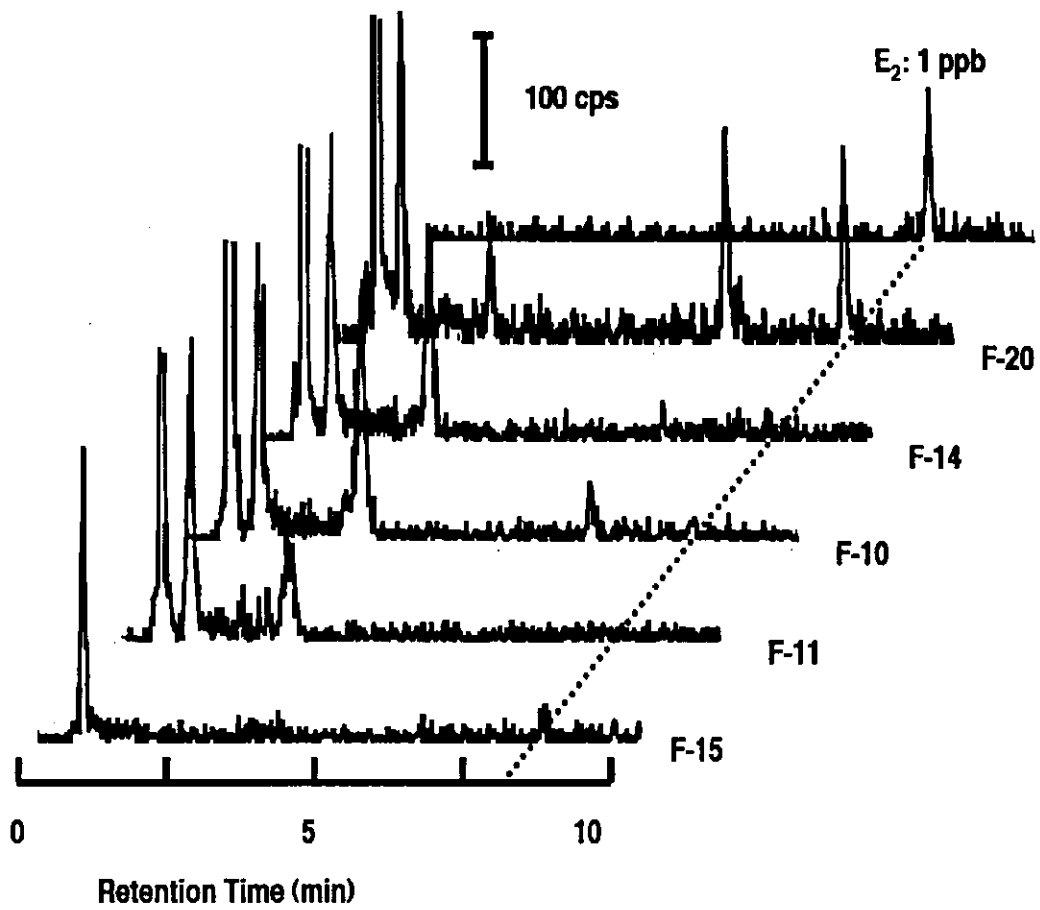


図2：試験液の MRM クロマトグラム：モニターイオン（プレカーサーイオン/プロダクトイオン）：E<sub>2</sub>, ( $m/z=271/m/z=145$ ).



No.	E <sub>2</sub> -d <sub>3</sub> 回収率 (%)	E <sub>2</sub> (ppb)	No.	E <sub>2</sub> -d <sub>3</sub> 回収率 (%)	E <sub>2</sub> (ppb)
F-10	93.4±3.4	N. D.	F-20	93.5±3.4	0.52±0.03
F-11	96.2±2.6	N. D.	F-22	73.0±6.6	N. D.
F-12	87.8±2.5	N. D.	F-24	92.0±7.6	N. D.
F-13	74.2±1.1	N. D.	F-26	73.9±5.4	N. D.
F-14	80.2±7.9	N. D.	F-27	91.1±8.9	N. D.
F-15	78.3±1.6	N. D.	F-28	70.2±3.0	N. D.
F-16	93.7±8.6	N. D.	F-30	76.4±3.7	N. D.
F-17	87.7±7.1	N. D.	F-34	87.1±1.4	N. D.
F-18	81.7±1.5	N. D.	F-36	87.5±8.0	N. D.
F-19	63.5±7.0	N. D.	F-38	82.0±5.0	N. D.

(n=3)

表 1. 飼料 20 点のエストラジオール含有量; N. D. : < 0.50 ppb.

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

- 1) 生殖年齢婦人を対象とした生体試料に対する分析
- 2) 周産期試料に関する分析

主任研究者 牧野 恒久 (東海大学医学部専門診療学系産婦人科)  
研究協力者 和泉俊一郎 (東海大学医学部専門診療学系産婦人科)

報告要旨

生体試料採取にあたっては2群を対象とした。ひとつは生殖年齢婦人で、もう一つは周産期症例である。生殖年齢婦人の試料は腹水、血液を中心として採取した。周産期試料としては母子関係を重視し、母体側試料と、その母体より出生した新生児側試料を関連づけて採取した。母体側からは、母体血、母乳を、新生児側からは臍帯血を基準試料とした。測定法は我々の班の策定したガイドラインの測定法を用いた。さらに生体試料提供協力者の身体的、社会的、環境的背景を記録し、疫学的分析の資料とした。結果として今回血清、腹水中とも最も高濃度に検出されたのはDEHPであったが、いずれも危険値を超える程の濃度には至っていない。各物質とも母乳からの検出はなかった。また最も高頻度に検出されたのは、尿中のNPであった。またDEHPは決して検出率は高くないが、検出されたサンプルでは母体血、さい帯血で最も高い濃度を示した。また今回検出された検体では危険値を超える濃度を示したものは認められなかった。

A. 研究目的

次世代への内分泌かく乱化学物質の影響を考える場合、生殖年齢の婦人における暴露状況の把握と母児間の移行の実態の理解は必須である。内分泌かく乱物質の生殖年齢婦人の暴露状況調査としては、内視鏡検査を施行する婦人に十分なインフォームドコンセントの上で同意を得て腹水と血液を採取し分析することとした。住居付近の生活環境等にも配慮し、疫学的分析の資料として分析を試みた。また、内分泌かく乱物質の妊婦および胎児・新生児への影響は、単独試料による分析だけでは不十分であり、母子の一連の試料のもとに、母体側暴露状態と、妊娠中の胎児への移行を分析する必要がある。そこで、本研究に使用する試料の採取にあたっては、十分なインフォームドコンセントの上で同意を得て母体側試料と、その母体より出生した新生児の試料を採取し、母子両者の分析結果比較が可能になるよう条件を設けた。次に、母体側環境、例えば妊娠経過、その間の食生活、嗜好、また、住居付近の生活環境等にも配慮し、疫学的分析の資料とした。

B. 試料

東海大学医学部付属病院産婦人科外来にお

いて、研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた患者より、全例同意書を得た。

生殖年齢の婦人について腹腔鏡下に内視鏡の期別分類もおこない、化学物質の濃度と病気の関連についても検討した。

周産期試料としては、分娩時、母体血 20ml、臍帯血全量を採取し、すぐに遠沈し、血清をマイナス4℃で保存した。採取にあたっては、採取器具からのコンタミネーションを防止するために、本研究開始時の基礎実験の結果に基づいて施行した。母乳採取は分娩4日目と5日目に可能な限りの量を採取し、マイナス4℃にて保存した。また、分析対象の補充を試みるべく、各研究機関からの依頼を受けて、必要に応じて母体毛髪、臍帯、胎脂等の採取を行った。

検査法については牧野班で策定したガイドラインに従い、主要3物質(フタル酸エステル類、ビスフェノールA、ノニルフェノール)を検討対象とした。

C. 測定方法

①フタル酸エステル類

1.1 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  $\mu$ g/mL、DiOP、DiNP の濃度が 20  $\mu$ 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  $\mu$ g/mL になるようにヘキサンで希釈した。

## 1.2 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。

## 1.3 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、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。

## 1.4 試験溶液の調製法

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  $\mu$ 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。

## 1.5 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  $\mu$ 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)

## 1.6 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。

## ②ビスフェノール A

### 1. 試料

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>) は関東化学製環境分析用試薬を、<sup>13</sup>C-BPA はケンブリッジアイソトープ製を用いた。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。

$\beta$ -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 : Isololute 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。

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。

## 2. 装置及び測定条件

2.1. 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。

2.2. ガスクロマトグラフィー質量分析計：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×0.25 $\mu$ m

カラム温度：70 $^{\circ}$ C(2min)–20 $^{\circ}$ C/min–150 $^{\circ}$ C–10 $^{\circ}$ C/min–300 $^{\circ}$ C(5min)

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：He, 1mL/min

注入方法：スプリットレス パージオフ 1min

MS：Jeol GC-mate

イオン源温度：230 $^{\circ}$ C

イオン化電圧：70V

モニターイオン(m/z)：BPA(357, 372), BPA-d<sub>16</sub>(368, 386), <sup>13</sup>C-BPA(369)

### 3. 検量線の作成

#### 3.1 LC/MS 測定

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub> 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 $\mu$ 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<sub>16</sub> の面積比により検量線を作成した。

#### 3.2 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 <sup>13</sup>C-BPA を 100ng 添加し、BSTFA 200 $\mu$ L 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、<sup>13</sup>C-BPA との面積比で検量線を作成した。

### 4. 試験溶液の調製

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。

#### 4.1 LC/MS 測定用試験溶液の調製

##### ○遊離体 BPA 測定用試験溶液

血清は 1mL を、尿は 2mL を採り、内部標準物質である BPA-d<sub>16</sub> 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

血清は 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 $^{\circ}$ 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。

#### 4.2 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、<sup>13</sup>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-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、 $\beta$ -グルクロニダーゼ溶液 100 $\mu$ L と <sup>13</sup>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。

### ③ノニルフェノール

#### 1. 試薬・装置

【試薬】ノニルフェノール(NP)は、環境分析用試薬(関東化学社製)を使用した。内標準物質として用いた 4-(1-メチル)オクチルフェノール-d<sub>5</sub>(NP-d<sub>5</sub>)は、環境分析用試薬(林純薬社製)を用いた。それぞれの構造式を図 1 に示す。

【溶媒】LC/MS の移動相に使用したアセトニトリルは和光純薬社製 HPLC 用を、酢酸アンモニウムは和光純薬社製特級を選択した。また、前処理に利用した溶媒は、全て和光純薬社製残留農薬用を使用した。精製水は日本ミリポア社