

キサノールと 1,4-ジクロロベンゼンが検出された（昨年度実施）。両物質の濃度について、子宮内膜症有症群（n=19）と子宮内膜症を認めない対照群（n=19）で比較した結果、いずれも有意な差は認められなかった。

#### E. 参考文献

- 1) 臨床検査法提要改訂第 32 版、金井正光編、金原出版、p. 1790-1806, 2005.
- 2) Rodushkin I. et al. Multi-element analysis of body fluids by double-focusing ICP-MS, Transworld Res. Network. Recent Res. Devel. Pure & Applied Chem. 2001; 5: 51-66.
- 3) 山東勤弥. セレン. 栄養—評価と治療 2002 ; 19 : 315-319.
- 4) 千葉百子. 微量元素と妊孕能. 産科と婦人科 1998 ; 37 : 871-879.
- 5) McCoy K. E.M., Weswig P. H. Some selenium responses in the rat not related to vitamin E. J. Nutr. 1969: 98: 383-389.
- 6) 篠原厚子. 内分泌・生殖機能と微量元素. 治療 2006 ; 88 ; 1970-1974.
- 7) Soltan M. H., Jenkins D. M. Plasma copper and zinc concentrations and infertility. Br. J. Obstet. Gynaecol. 1983: 90: 457-459.
- 8) Silva M. J., Barr D. B., Reidy J. A., Malek N. A., Hodge C. C., Caudill S. P., Brock J. W., Needham L. L. Urinary Levels of Seven Phthalate Metabolites in the U.S. Population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). Environ. Health Perspect. 2004; 112: 331-338.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

#### 2. 学会発表

- 1) 林留美子、近藤文雄、中澤裕之、和泉俊一郎、牧野恒久；子宮内膜症患者の血清中多元素濃度レベル；環境ホルモン学会第 10 回研究発表会（2007）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

表1 東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者の血清中  
重金属類濃度

元素	n	平均値±標準偏差	中央値	範囲
Mg <sup>*</sup>	83	19 ± 1.5	19	16 - 23
Ca <sup>*</sup>	84	93 ± 5.2	92	81 - 100
Fe <sup>*</sup>	58	1.1 ± 0.31	1.1	0.44 - 1.6
Cu <sup>*</sup>	83	0.95 ± 0.17	0.94	0.62 - 1.4
Zn <sup>*</sup>	84	0.78 ± 0.12	0.78	0.55 - 1.2
Li	84	0.58 ± 0.21	0.57	0.21 - 1.2
B	84	9.0 ± 2.4	8.4	5.2 - 16
Al	84	4.8 ± 3.3	3.9	0.19 - 13
Mn	84	0.82 ± 0.30	0.78	0.32 - 2.2
Co	84	0.17 ± 0.085	0.17	0.024 - 0.35
Ni	84	0.37 ± 0.14	0.37	0.12 - 0.74
Se	84	110 ± 18	110	75 - 150
Rb	84	160 ± 25	160	85 - 230
Sr	84	29 ± 10	28	16 - 73
Mo	84	1.2 ± 0.32	1.3	0.25 - 1.9
Cd	84	0.038 ± 0.016	0.034	0.012 - 0.096
Sb	84	0.11 ± 0.048	0.11	0.017 - 0.22
Hg	84	0.60 ± 0.34	0.49	0.20 - 2.0
Pb	84	0.30 ± 0.12	0.27	0.13 - 0.83

(濃度単位:ng/mL、ただし\*はμg/mL)

表2 東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者の血清中  
重金属類濃度(子宮内膜症有症群と対照群の比較)

元素	有症群			対照群			
	n	平均値 ± 標準偏差	標準偏差	n	平均値 ± 標準偏差	標準偏差	
Mg*	35	19 ± 1.7		48	19 ± 1.5		
Ca*	36	92 ± 5.3		48	93 ± 5.1		
Fe*	24	1.1 ± 0.26		34	1.1 ± 0.34		
Cu*	36	0.89 ± 0.16		47	0.99 ± 0.17		**
Zn*	36	0.77 ± 0.11		48	0.78 ± 0.13		
Li	36	0.59 ± 0.20		48	0.57 ± 0.22		
B	36	8.5 ± 2.0		48	9.3 ± 2.6		
Al	36	5.4 ± 3.5		48	4.4 ± 3.1		
Mn	36	0.84 ± 0.31		48	0.81 ± 0.29		
Co	36	0.15 ± 0.089		48	0.18 ± 0.080		
Ni	36	0.37 ± 0.15		48	0.37 ± 0.14		
Se	36	110 ± 16		48	120 ± 18		**
Rb	36	160 ± 25		48	150 ± 25		
Sr	36	29 ± 11		48	30 ± 8.9		
Mo	36	1.2 ± 0.40		48	1.3 ± 0.24		
Cd	36	0.037 ± 0.014		48	0.038 ± 0.018		
Sb	36	0.10 ± 0.050		48	0.11 ± 0.047		
Hg	36	0.60 ± 0.37		48	0.60 ± 0.33		
Pb	36	0.32 ± 0.11		48	0.29 ± 0.12		

\*\* : p<0.01

(濃度単位 : ng/mL、\* ; μg/mL)

表3 東海大学医学部付属病院産婦人科受診患者の血清中  
Cu、Se濃度(子宮内膜症の進行期分類による比較)

内膜症 stage	Cu ( $\mu\text{g/mL}$ )		Se (ng/mL)	
	n	平均値 $\pm$ 標準偏差	n	平均値 $\pm$ 標準偏差
0	47	0.99 $\pm$ 0.17	48	120 $\pm$ 18
I	10	0.93 $\pm$ 0.15	10	110 $\pm$ 15
II	5	0.84 $\pm$ 0.11	5	99 $\pm$ 17
III	11	0.88 $\pm$ 0.14	11	110 $\pm$ 13
IV	10	0.89 $\pm$ 0.21	10	99 $\pm$ 18

表4 東海大学付属病院産婦人科受診患者の尿中  
フタル酸モノエステル類濃度

	MBP	MEP	MBzP	MEHP
検出率 (%)	100	100	59	14
平均値	39.7	52.7	12.1	—
標準偏差	18.8	72.2	8.82	—
中央値	35.2	16.4	9.66	<LOQ
最小値	14.9	3.45	<LOQ	<LOQ
最大値	100	230	45.0	12.2

単位:  $\mu\text{g/g creatinine}$  (n=29)

LOQ(定量下限値): 実測値で5 ng/mL(MBzP、MEHP)、  
1 ng/mL(MEP、MBP、MINP)

表5 尿中のフタル酸モノエステル類濃度の比較

対象者	例数	MBP	MEP	MEHP	MBzP
東海大学病院産婦人科受診患者	29	35.2 (14.9-100)	16.4 (3.45-230)	<LOQ (<LOQ-12.2)	9.66 (<LOQ-45.0)
愛知県衛生研究所職員	36	58.7 (22.8-554)	13.7 (3.06-944)	7.73 (<LOQ-56.2)	11.4 (<LOQ-39.4)
6歳以上の米国居住者	2540	21.9 (7.74-97.5)	141 (33.0-1950)	3.08 (<LOD-18.5)	13.3 (14.0-77.4)

測定値はクレアチニン補正值 ( $\mu\text{g/g creatinine}$ ) の中央値で表した。

括弧内の値は範囲を表す。ただし、米国居住者の括弧内の値は10-90パーセンタイル値。

表6 フタル酸エステル類の推定一日摂取量

	DBP	DEP
中央値	1.08	0.46
平均値	1.20	1.29
標準偏差	0.61	1.76
最小値	0.40	0.10
最大値	3.23	5.71
TDI*	66	5000
	(厚生労働省)	(欧州連合)

n=29 (単位:  $\mu\text{g/kg/day}$ )

\* 耐容一日摂取量 tolerable daily intake



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

周産期試料および生殖婦人の生体試料を対象とした分析

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
分担研究者	和泉俊一郎	東海大学 医学部専門診療学系産婦人科
研究協力者	内田 能安	東海大学 医学部専門診療学系産婦人科
	呉屋 憲一	東海大学 医学部専門診療学系産婦人科

### 報告要旨

初期の子供への影響を検討するため、母子関係を重視し、新生児側試料をその母体側試料と関連づけて採取しペアで分析した。母体側の母体血、母乳を、新生児側は臍帯血を基準試料とし、前回の牧野班で策定したガイドラインにそって3物質を測定した。また、さらに妊娠予備時期と考えられる、生殖年齢の婦人への暴露を検討するために、生殖年齢の婦人から腹水を含む生体試料を採取した。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。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、臍帯血で最も高い濃度を示した。今回検出された水性試料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。しかし、胎脂では高濃度に検出されたものもあり、生体防御の排泄機構の一部と考えられた。また、この検討から危惧された生殖婦人の体内脂肪において、DEHPは検出されなかった。最終的には、以上の3測定物質以外の化学物質についても、共同研究班の結果を集め、一括して暴露評価ができるように測定結果一覧表を作成した。

### A. 研究目的

化学物質による子どもへの健康影響を考える場合、より幼弱な時期の暴露がより甚大な影響を及ぼすことが危惧される。そのためには、まず母児間の移行の実態の理解は必須である。また化学物質の妊婦を介した胎児・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。更にこれまで検討してきた周産期試料だけでなく、妊娠予備時期と考えられる、生殖年齢の婦人への暴露も検討することが必要と考えられるために、生殖年齢の婦人から腹水を含む生体試料を採取した。さらに、水性試料（腹水・血液・尿等）とは別に脂性試料（胎脂・臍帯・母乳・体内脂肪）にも検討項目を拡大して測定を試みた。

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、生殖年齢婦人の試料を採取した。同様に、母体側試料と新生児試料を採取し、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。更に陽性側については母体側環境、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、疫学的分析のする事も目的とした。

### B. 研究方法

試料は、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。

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、今回は分析対象を生体の脂性分画に拡大する事を試みて、各研究機関からの依頼を受けて、必要に応じて臍帯、胎脂等の採取も行った。生殖年齢の婦人からの採血、腹水採取に際しては、採取器具からのコンタミネーションを防止するために、本研究開始前の基礎実験の結果に基づいた方法に従って施行した。

検査法については厚生労働省牧野班で策定したガイドラインにしたがい、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。

① **フタル酸エステル類**（母体血、臍帯血、母乳、尿）

#### 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  $4\mu\text{g/mL}$ 、DiOP、DiNP の濃度が  $20\mu\text{g/mL}$  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  $4\mu\text{g/mL}$  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、 $200^{\circ}\text{C}$  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、 $200^{\circ}\text{C}$  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)  $25\mu\text{L}$  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  $0.5\mu\text{m}$ )

カラム温度:  $80^{\circ}\text{C}$  (3分)  $\rightarrow 20^{\circ}\text{C}/\text{分} \rightarrow 240^{\circ}\text{C} \rightarrow 10^{\circ}\text{C}/\text{分} \rightarrow 300^{\circ}\text{C}$  (5分)

キャリアガス: He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度:  $250^{\circ}\text{C}$

試料注入法: パルスドスプリットレス

四重極温度:  $150^{\circ}\text{C}$

イオン源温度:  $230^{\circ}\text{C}$

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 (母体血、臍帯血、尿)

##### 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- $d_{16}$  (BPA- $d_{16}$ ) は関東化学(株)製の環境分析用試薬を、 $^{13}\text{C}$ -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: 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。

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-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  $0.32\text{mm} \times 30\text{m} \times 0.25\mu\text{m}$

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

注入口温度:  $250^{\circ}\text{C}$

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°C

イオン化電圧: 70V

モニターイオン ( $m/z$ ): BPA(357, 372), BPA- $d_{16}$   
(368, 386),  $^{13}C$ -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- $d_{16}$  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- $d_{16}$  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  $^{13}C$ -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、 $^{13}C$ -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- $d_{16}$  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°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、 $^{13}C$ -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-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  $^{13}C$ -BPA 0.1  $\mu$ g を加え、37°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 (母体血、臍帯血、尿)

#### 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- $d_5$  (NP- $d_5$ ) 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製 Milli-Q (EDS ポリッシャー付き) で精製した水を使用した。

【実験用器具】ガラス製の実験器具は、すべて 200°C 以上で加熱後使用した。

##### 【LC/MS 装置及び測定条件】

LC/MS 装置 (機種: Agilent 1100 LC/MSD-SL)

##### LC 条件

・分析用カラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2.1 x 100 mm, 5  $\mu$ m)

・ガードカラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2 x 5 mm, 5  $\mu$ m)

・前処理用カラム: TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5  $\mu$ m)

・移動相: アセトニトリル + 0.02 % 酢酸アンモニウム / 0.02 % 酢酸アンモニウム溶液 (70 : 30 (8 min)  $\rightarrow$  95 : 5 (10 min) (V/V))

・流速: 0.2 ml/min (分析カラム)、0.5 ml/min (前処理カラム)

・カラム温度: 40 °C

・注入量: 30  $\mu$ l



## MS 条件

- ・ イオン化法: Electrospray (ESI), Negative
- ・ Nebulizer gas:  $N_2$  (35 psi)
- ・ Drying gas:  $N_2$  (12 l/min, 350 °C)
- ・ フラグメンター電圧: 130 V (NP, NP-d<sub>5</sub>)
- ・ モニタリングイオン ( $m/z$ ): 219 (NP), 224 (NP-d<sub>5</sub>)

### 2. オンライン前処理-LC/MS法の測定概要

血清試料に同量のアセトニトリルを加え、遠心分離を行った。その後、上清を取り、暫定濃度になるように内標準物質を添加し、測定用試料とした。抽出精製・濃縮は、オンライン前処理固相カラムを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質を分離部及び検出部 (LC/MS) に導入する。検出には、ESI-MSによるSIMモードネガティブで測定を実施した。

## 測定試料の調製法

測定対象とした血清は神奈川県食肉衛生検査所にてした屠殺した血液を用い、神奈川県衛生研究所で遠心分離 (3000rpm、10 分間) を行い、使用に供するまで -80°Cにて凍結保存した。測定時には室温解凍し、転倒混和を行った後に、ピペッターで正確に 1 ml を量り取り、試験管に移した。この試験管は、あらかじめ洗浄後に精製水、アセトンを通液したものを使用した。血清が入った試験管に標準溶液を血清中 50  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加した。次に、血清と同量のアセトニトリルを加え混和後、遠心分離 (3000rpm、30min、4°C) を行った。その後、上清 1 ml をバイアル瓶に正確に量り取り、暫定濃度になるように内標準物質である、NP-d<sub>5</sub>を加え、測定に供した。

## 標準試料の調製法

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、標準原液としてアセトニトリルで 1.0 mg/ml とする。その後、0.2~100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲になるようにアセトニトリル/水=1/1 (V/V) 溶液を加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう希釈する。

その後、LC/MS-SIM 法により標準試料溶液を測定し、内標準法を用いて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。

### ④ノニルフェノール及びビスフェノールA (母乳、胎脂、臍帯)

母乳、胎脂、臍帯中のノニルフェノール及びビスフェノールAについては、エチル誘導体化GC/MS法で測定を行った。

#### 1. 前処理方法

母乳、胎脂、臍帯中のノニルフェノール及びビスフェノールA測定時前処理方法は以下の通りである。

#### a) 母乳中からの抽出方法

母乳からノニルフェノール及びビスフェノールAを抽出するため、母乳 1mL を採取後、BPA-d16 を 100ng、m-OP-d5 を 100ng 添加した。ジエチルエーテル:ヘキサン (3:2) を 2mL 加え、Voltex ミキサーで攪拌した。遠心分離 (3,000rpm、5 分) を行い、有機溶媒層を回収した。水溶液層には再度ジエチルエーテル:ヘキサン (3:2) を 2mL 加え、Voltex ミキサーで攪拌後、遠心分離 (3,000rpm、5 分) を行い、有機溶媒層を回収した。回収した有機溶媒を足し合わせ、窒素気流下、40°Cで濃縮・乾固し、母乳抽出溶液を得た。

#### b) 胎脂からの抽出

胎脂からノニルフェノール及びビスフェノールAを抽出するため、胎脂を採取し、胎脂の秤量値を記録した。採取した胎脂にBPA-d16を100ng、m-OP-d5を100ng添加後、十分に攪拌し、胎脂溶液とした。

#### c) 臍帯からの抽出

臍帯からノニルフェノール及びビスフェノールAを抽出するため、臍帯をはさみで細断後、重さを量り、秤量値を記録した。細断した臍帯にBPA-d16を100ng、m-OP-d5を100ng添加した。メタノール 30mL を加え、ポリトロンホモジナイザーで更に細かくすりつぶした後、遠心分離 (3,000rpm、5 分) を行い、メタノール層を回収した。遠心分離後の沈殿物には、再度メタノール 30mL を加えた後、ポリトロンホモジナイザーで抽出を行った。その後、遠心分離 (3,000rpm、5 分) を行い、メタノール層を回収した。回収したメタノール溶液を足し合わせて、ロータリーエバポレーターで濃縮し、臍帯抽出溶液を得た。

#### d) 誘導体化及び精製処理

母乳、胎脂及び臍帯抽出溶液に 1 mol/L KOH エタノール溶液を 0.5mL、ジエチル硫酸を 0.1mL 加え、十分に攪拌した。室温で 1 時間静置し、ノニルフェノール及びビスフェノールAのフェノール性水酸基をエチルエーテル化処理した。誘導体化処理終了後、1 mol/L KOH エタノール溶液 2mL を加え、60°C で 1 時間静置し、アルカリ化水分解処理を行った。アルカリ化水分解処理終了後、蒸留水 3mL、n-ヘキサン 1mL を加え、Voltex ミキサーで攪拌し、ヘキサン層を回収した。水溶液層には再度 n-ヘキサン 1mL を加え、攪拌後、ヘキサン層を回収した。回収したヘキサン層を足し合わせ、窒素気流下、40°Cで約 0.2mL まで濃縮した。この濃縮溶液を、予め 5% ジエチルエーテル/ヘキサン溶液 10mL で洗浄したフロリジルカラムに負荷した。5%ジエチルエーテル/ヘキサン溶液 10mL で溶出させ、溶出溶液を回収した。回収溶液を窒素気流下、40 °Cで約 0.1mL まで濃縮し、GC/MS 測定溶



液とした。

## 2. 測定方法

試料溶液を GC/MS 装置にセットし、以下の条件で分析した。

### GC 条件

GC : Trace GC  
注入方法 : Splitless (1min)  
注入量 : 1  $\mu$ L  
カラム : SGE 社、BPX-35 25 m  
 $\times 0.2$  2mm I.D.  $\times 0.25$   $\mu$ m Film  
カラム温度 : 60  $^{\circ}$ C  
(1min)---10  $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 300  $^{\circ}$ C (Hold for 3 min)  
キャリアーガス : He (流速 1.4 mL/min)  
インターフェース温度 : 280  $^{\circ}$ C

### MS 条件

イオン化法 : EI  
イオン化電圧 : 70 eV  
イオン源温度 : 250  $^{\circ}$ C  
検出モード : SIM  
定量イオン  
モニターイオン  
Monoethyl-NP : m/z 177  
Monoethyl-m-OP-d5 : m/z 154  
Diethyl-BPA : m/z 269  
Diethyl-BPA-d14 : m/z 280

## 3. 検量線

NP 標準溶液を用いて、NP 濃度が 5~100ng/mL の範囲、m-OP-d5 濃度 100ng/mL の検量線溶液を調整し、エチル誘導体化処理後、GC/MS で測定を行った。

BPA 標準溶液を用いて、BPA 濃度が 0.5~10ng/mL の範囲、BPA-d16 濃度 100ng/mL の検量線溶液を調整し、エチル誘導体化処理後、GC/MS で測定を行った。

## 4. 定量

内標準法にて定量計算を行った。

NP の定量計算時には、検量線溶液の NP 濃度を横軸に、NP と m-OP-d5 の面積比 (NP/m-OP-d5) を縦軸にプロットし、最小二乗法で回帰式を算出した。試料中濃度算出時には、試料中 NP と m-OP-d5 の面積比 (NP/m-OP-d5) を、先に算出した回帰式に代入し、定量値を得た。

BPA の定量計算時には、検量線溶液の BPA 濃度を横軸に、BPA と BPA-d16 の面積比 (BPA/BPA-d16) を縦軸にプロットし、最小二乗法で回帰式を算出した。試料中濃度算出時には、試料中 BPA と BPA-d16 の面積比 (BPA/BPA-d16) を、先に算出した回帰式に代入し、定量値を得た。

### ⑤フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(胎脂、臍帯)

胎脂、臍帯中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルについては、アセトニトリル抽出 GC/MS 法で測定

を行った。

## 1. 前処理方法

胎脂、臍帯中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシル測定時前処理方法は以下の通りである。

### a) 胎脂中からの抽出方法

胎脂からフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを抽出するため、胎脂を採取し胎脂の秤量値を記録した。秤量した胎脂に DEHP-d4 を 100ng 添加後、n-ヘキサン 1mL で溶解した。この n-ヘキサン溶液に、蒸留水 1mL、塩化ナトリウム 0.5g、アセトニトリル 5mL を加え、Voltex ミキサーで攪拌後、遠心分離 (3,000rpm、5 分間) を行った。遠心分離終了後の溶液層から、アセトニトリル層を回収し、胎脂からのアセトニトリル抽出溶液を得た。

### b) 臍帯からの抽出方法

臍帯からフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを抽出するため、臍帯をはさみで細断後、全重量を測定し、秤量値を記録した。細断した臍帯に、DEHP-d4 を 100ng 添加後、蒸留水 1mL、塩化ナトリウム 0.5g、n-ヘキサン 1mL、アセトニトリル 5mL を加え、ポリトロンホモジナイザーで、攪拌を行った。攪拌終了後の溶液を遠心分離 (3,000rpm、5 分) し、アセトニトリル層を回収した。残り溶液には再度アセトニトリル 5mL を加え、ポリトロンホモジナイザーによる攪拌、遠心分離を行い、アセトニトリル層を回収した。回収したアセトニトリル層を足し合わせ、臍帯からのアセトニトリル抽出溶液を得た。

### c) 精製処理

胎脂及び臍帯からのアセトニトリル抽出溶液を窒素気流下、40  $^{\circ}$ C で濃縮、乾固した。残さを、蒸留水 2mL に溶解し、n-ヘキサン 5mL を加え、Voltex ミキサーで攪拌後、n-ヘキサン層を回収した。水溶液層には再度 n-ヘキサン 3mL を加え、Voltex ミキサーで攪拌後、n-ヘキサン層を回収した。回収した n-ヘキサン層を足し合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水処理した。この n-ヘキサン溶液を予めアセトン 10mL、n-ヘキサ 10mL で事前洗浄した無水硫酸ナトリウム (上部、1g)、PSA (0.5g、中間部)、フロリジル (1g、下部) 積層カラムに負荷した。n-ヘキサン 3mL で洗浄後、5% アセトン含有 n-ヘキサン 10mL で溶出し、溶出溶液を得た。窒素気流下、40  $^{\circ}$ C で約 1mL まで濃縮し、GC/MS 測定用試料溶液とした。

## C. 研究結果

周産期サンプルを I 群、生殖婦人サンプルを II 群として、それぞれの提供者の住居地分布を図 1 に示した。サンプル提供者の平均年齢は 31.9 才



であった。

I 群の周産期サンプルについて、前述の方法で各物質の濃度を測定し、それぞれ 0.5ng/ml をカットオフ値とした。3物質のサンプルごとの検出頻度を図2に示す。水性試料については、BAは母体血で79例中1例(1.2%)、尿中で16例中1例(6.3%)、DEHPは母体血で79例中4例(5.1%)、臍帯血で50例中1例(2.1%)、またNPは母体血で79例中6例(7.7%)、臍帯血で50例中4例(8.3%)、尿で16例中12例(75%)の検出率であった。最も高頻度に検出されたのは、尿中のNP(75%)であった。また検出濃度を図3に示す。DEHPが母体血、および臍帯血で最も高値を示した(図4)。さらに脂性試料については胎脂に100%高濃度で検出されていた。しかしその新生児での臍帯での濃度は1/1000以下であった。胎脂と臍帯に相関は認められなかった。再現性の検定のために、他の測定機関にて同一の胎脂を再度測定したが、やはり高濃度で検出され、2つの期間での結果は有意に相関していた(図4)。この検討から生殖婦人の体内脂肪においても高濃度に蓄積されていることが危惧された。そこで、同意を得たうえで手術時に提供いただいた皮下脂肪でDEHPを測定したところ高濃度(図5:n=6の06年サンプル)に検出されたが、このサンプルは操作中における紺民への配慮が不十分であったことが判明し、次年度に同意を得たうえで手術時に提供いただいた皮下脂肪で再度DEHPを測定したところ(図5:n=8の07年サンプル)、感度以下で全く検出されなかった。

II群の生殖婦人サンプルは、生殖婦人が妊娠予備時期と考えられるため、胎児暴露を検討する資料として、生殖年齢の婦人への暴露を検討することが必須であると考えられる。そのために、生殖年齢の婦人から腹水を含む生体試料を採取した。各サンプルについて、前述の方法で3物質を測定した。それぞれ0.5ng/mlがカットオフ値であった。血清および腹水のサンプル数は、おのおの127と107であった(図6)。また、サンプル提供婦人の年齢分布は図7のようであった。各物質の検出頻度は図8のとおりである。血清中においては、BAは127例中2例(1.5%)、NPは127例中34例(26.8%)、DEHPは126例中14例(11.1%)でそれぞれ検出された。腹水中ではBAが97例中1例(1.0%)、NPは101例中10例(9.9%)、DEHPは99例中25例(25.3%)で、それぞれ検出された。また検出された濃度の平均値は図9の通りである。DEHPが血清および腹水中で最も高い濃度で検出された。年齢別検出率と濃度を、図10と11にそれぞれ示した。血清ではNPで年齢差がないが、DEHPでは30代後半に高値を示した。一方腹

水では、NPで若年層ほど高値を示し、DEHPで年齢差を認めなかった。さらに合併症を検討し、疾患別のサンプリング数を図12に示した。合併症別の検出率(図13)、濃度(図14)では、明らかな差異は認めなかったが、さらに子宮内膜症での検討を試みた。子宮内膜症進行期別のサンプリング数を図15に示す。しかし、子宮内膜症進行期別の検出率(図16)、濃度(図17)でも明らかな差異は認められなかった。一方、季節変動の検討(図18)では、血清中のNPが冬に、腹水中のDEHPが春に高値を示した。

#### D. 考察

検討した3物質とも母乳からの検出はなかった。また水性試料の中で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、臍帯血で最も高い濃度を示した。またDEHPは血液中では比較的高濃度で検出されているが、尿中からの検出はなく、BAやNPとは異なり、モノ体の測定も必要であることが示唆される。また今回検出された血液・尿の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。一方、脂性試料においては胎脂で高濃度に検出されたが、同一個体(母児)の水性検体においてはまったく検出されておらず、生体防御のための排泄機構の一部として機能している可能性が示唆された。このためDEHPについては、体内の脂肪組織など他の検体における濃度についても検討が必要と考えられ、生殖婦人の体内脂肪においてもDEHPを検討したが最終結論は未検出で問題は見出せなかった。

#### E. 結論

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DEHPは血液中では比較的高濃度で検出されているが、尿中からの検出はなく、BAやNPとは異なり、モノ体の測定も必要であることが示唆される。しかし、いずれも危険値を超えるほどの濃度には至っていない。またサンプルの提供者の居住地区および疾患と、検出濃度の間には有意な差は認められなかった。化学物質の暴露は提供者の食事、喫煙、飲酒等をふくむ生活習慣によって大きく左右されることが予想される。しかし現時点での検出例数(率)は少なく、今後さらに、モニタリングを続ける必要性も含めて検



討が必要であろう。

また、以上の3測定物質以外の化学物質についても、我々の共同研究班は検討していたため、これら共同研究班の結果を集め、一括して生殖婦人・母児の暴露評価の参考のために測定結果一覧表を作成した（表1，2）。

**F. 健康危険情報**

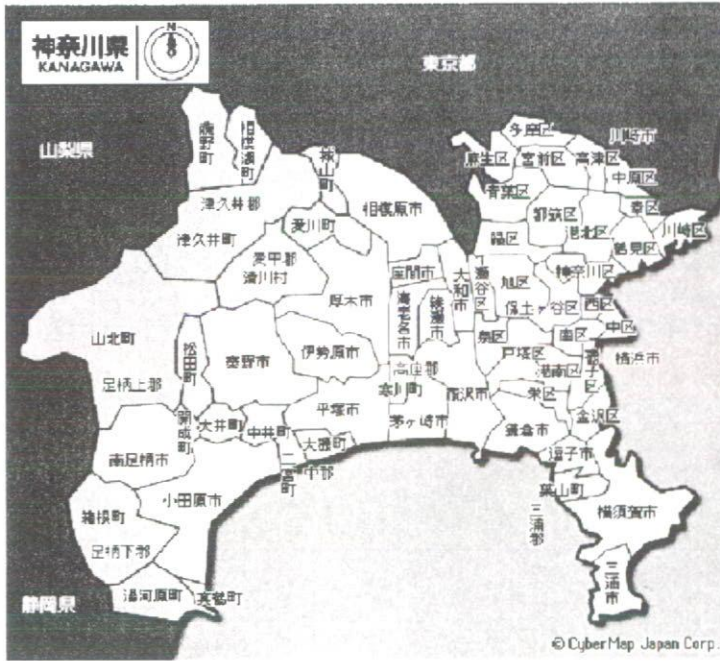
なし

**G. 研究発表**

該当なし

**H. 知的所有権の取得状況**

該当なし



	I 群	II 群		I 群	II 群
伊勢原市	17	8	静岡県	8	2
横浜市	6	10	東京都	4	3
平塚市	6	20	埼玉県	1	1
秦野市	11	13	富山県	1	0
座間市	3	2	茨城県	1	0
小田原市	3	8			
厚木市	8	17			
大磯町	1	4			
茅ヶ崎市	3	13			
海老名市	1	7			
大和市	1	0			
綾瀬市	1	2			
相模原市	1	2			
横須賀市	1	1			
藤沢市	2	3			
足柄下郡	1	6			

I 群(周産期サンプリング群) : n=79  
 II 群(婦人科サンプリング群) : n=27

図1 周産期試料と婦人科試料の住居地分布

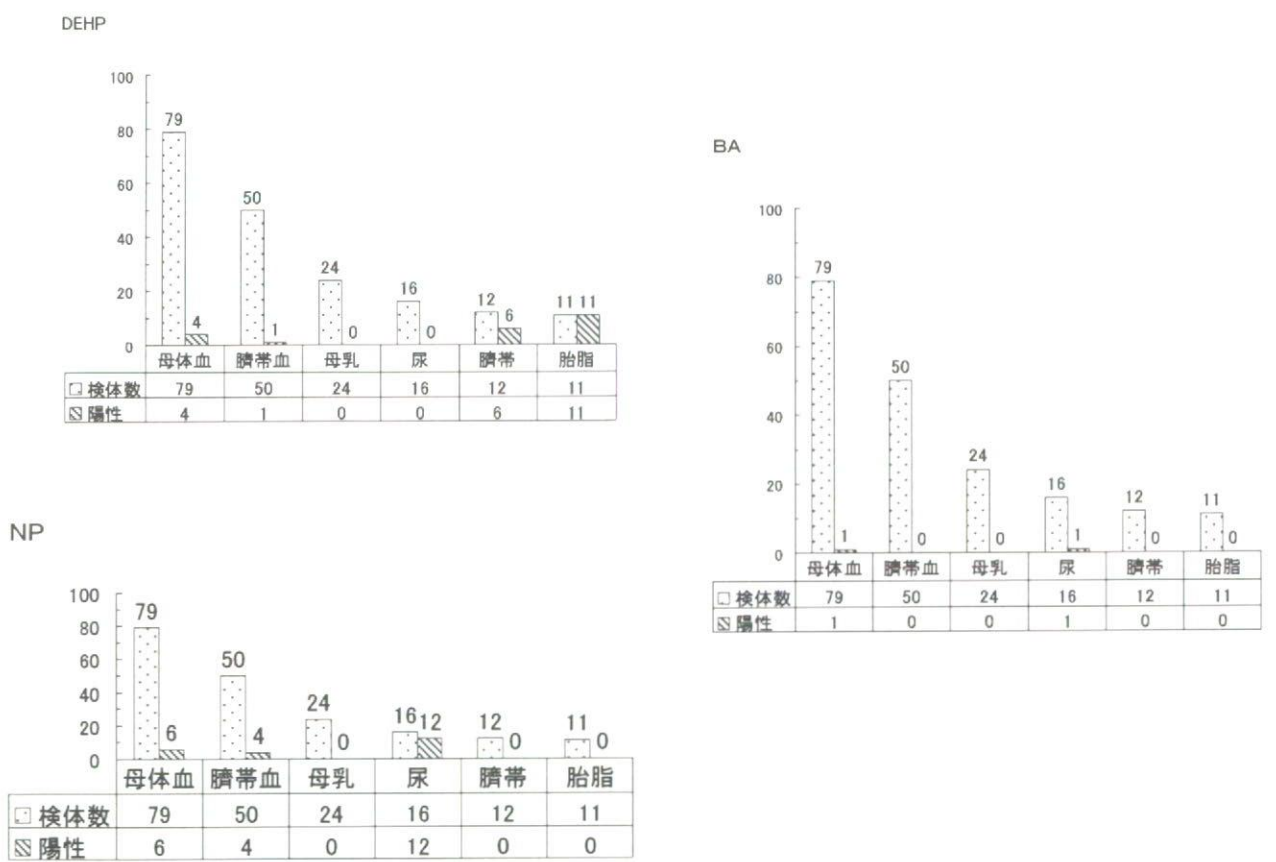


図2 I 群 周産期サンプルでの3物質検出頻度

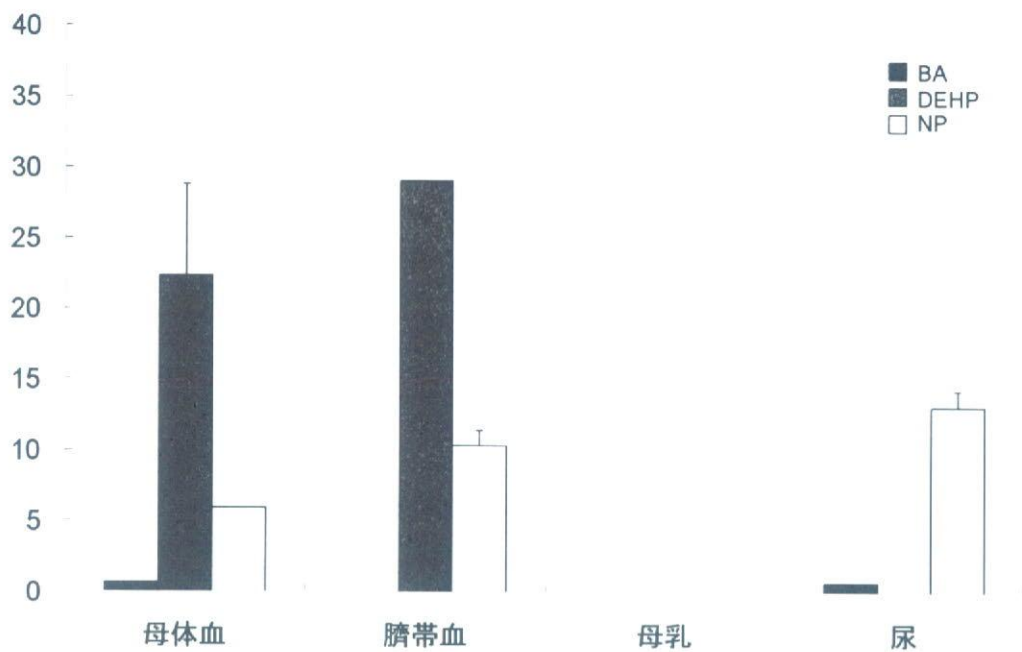


図3 検出濃度

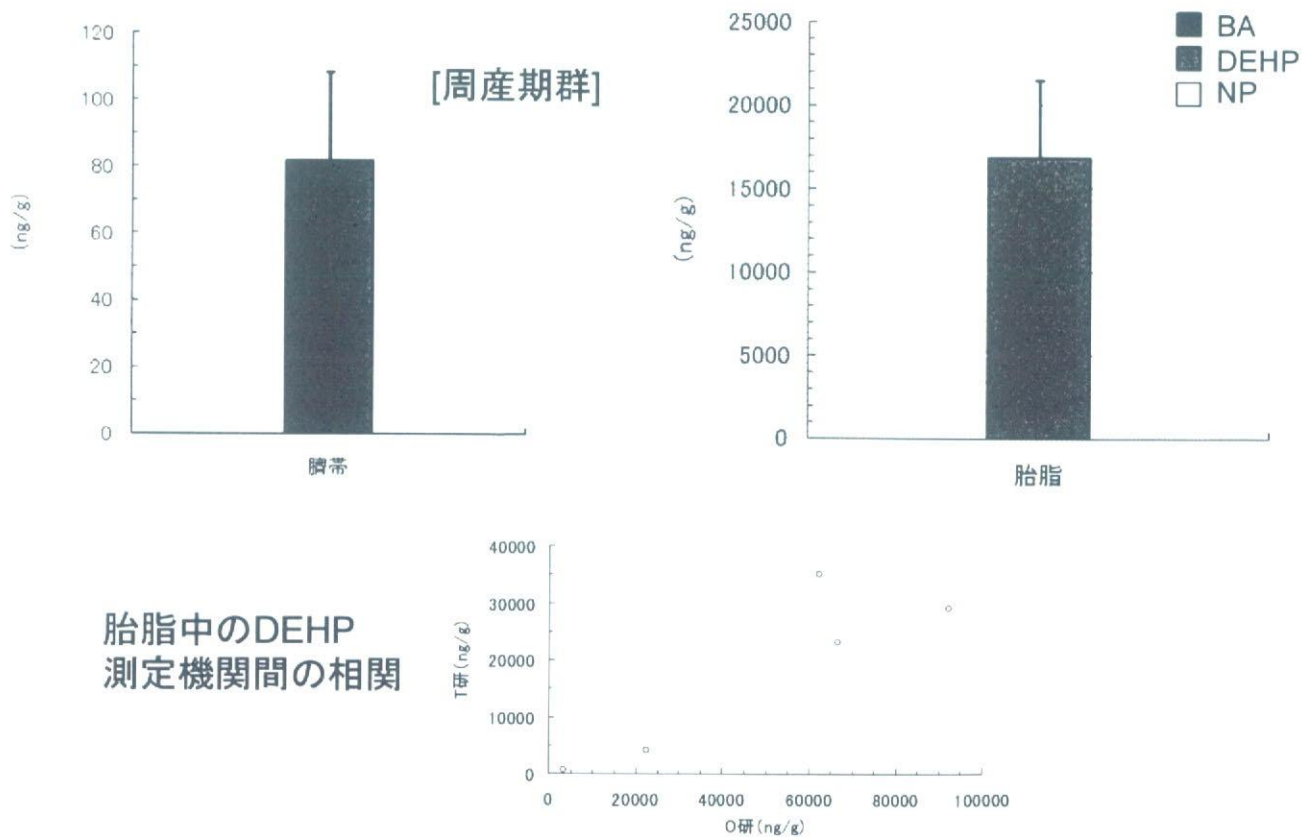
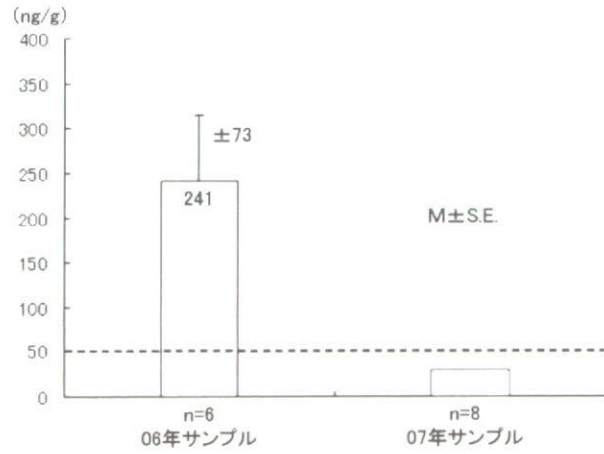


図4 脂性試料における検出濃度





注) 感度以下<50

図5 ヒト皮下脂肪中のDEHP

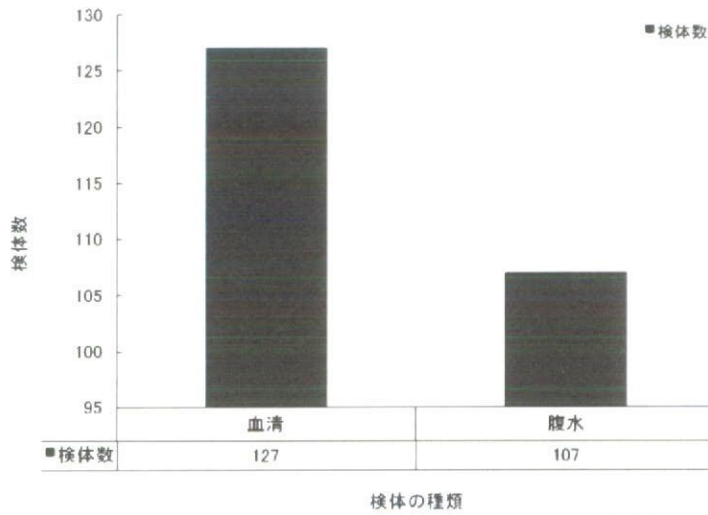


図6 婦人科サンプリグ群 (血清・腹水)

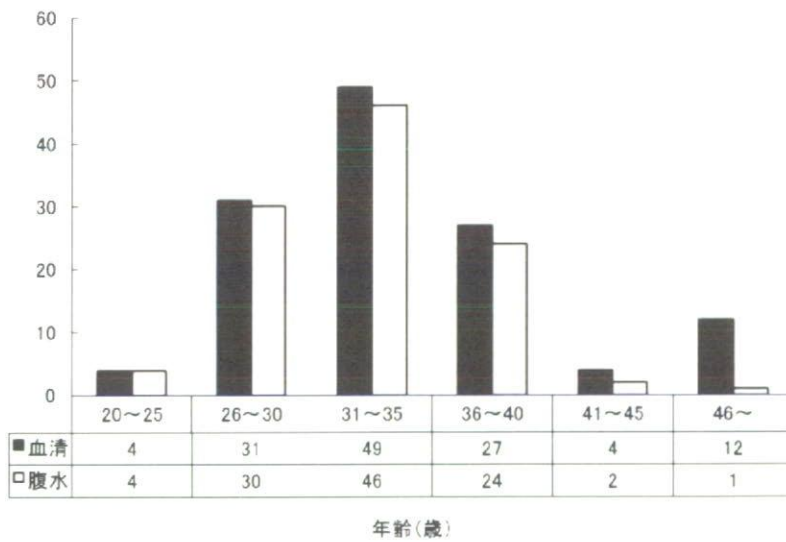


図7 婦人科サンプリグ群：年齢

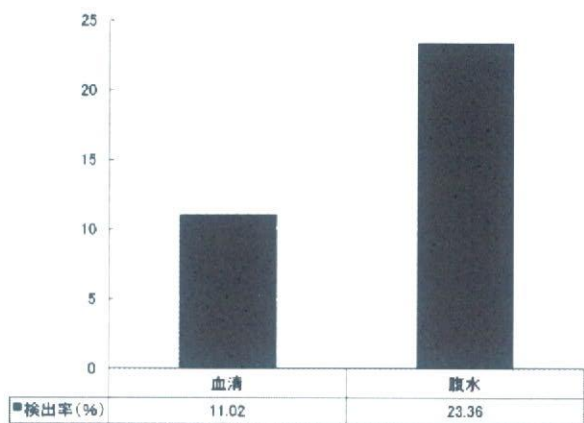


図 8a BPA と NP の検出率

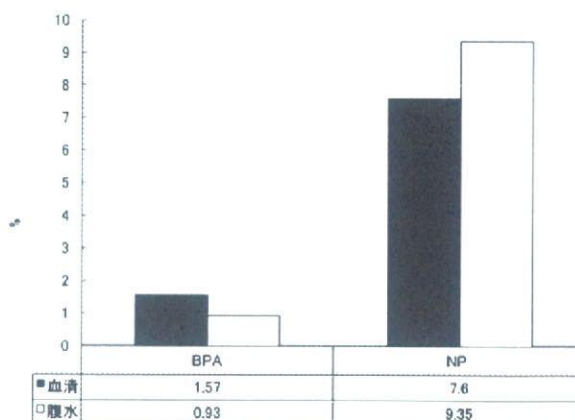


図 8b DEHP の検出率

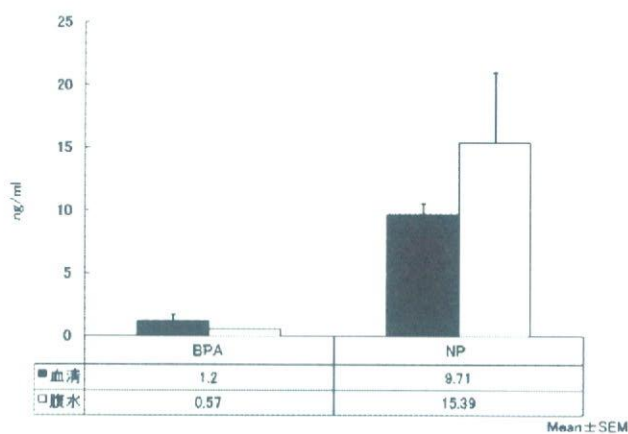


図 9a BPA と NP の検出濃度

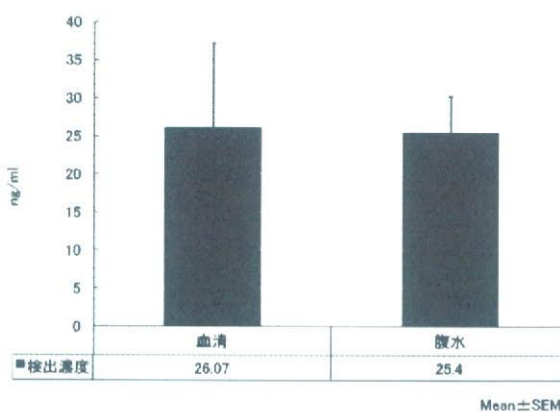


図 9b フタル酸エステル類の検出濃度

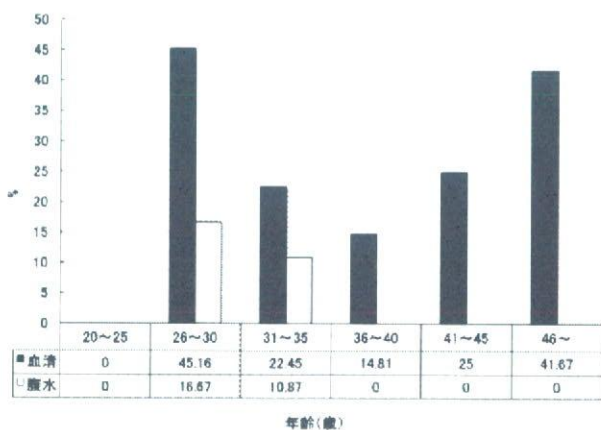


図 10a NP の年齢別検出率

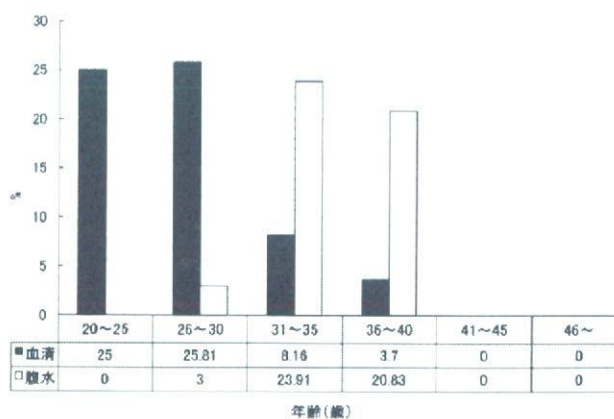


図 10b DEHP:年齢別検出率

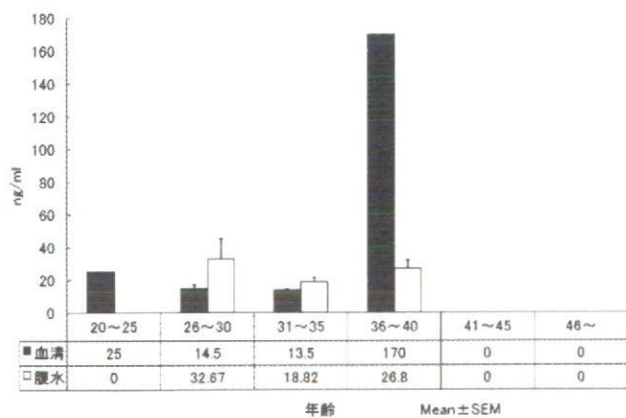


図 11a ノニルフェノールの年齢別検出濃度

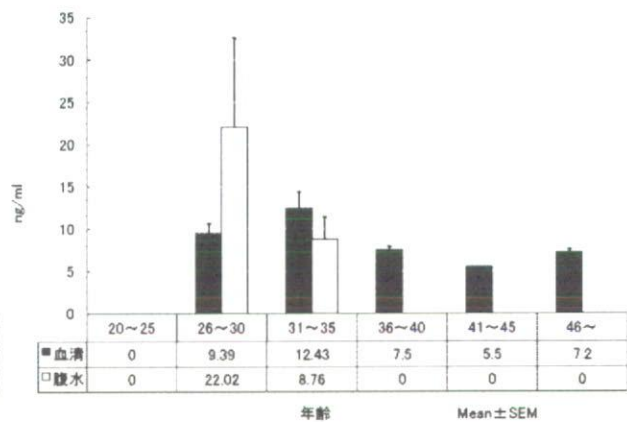


図 11b フタル酸エステル類の年齢別検出濃度

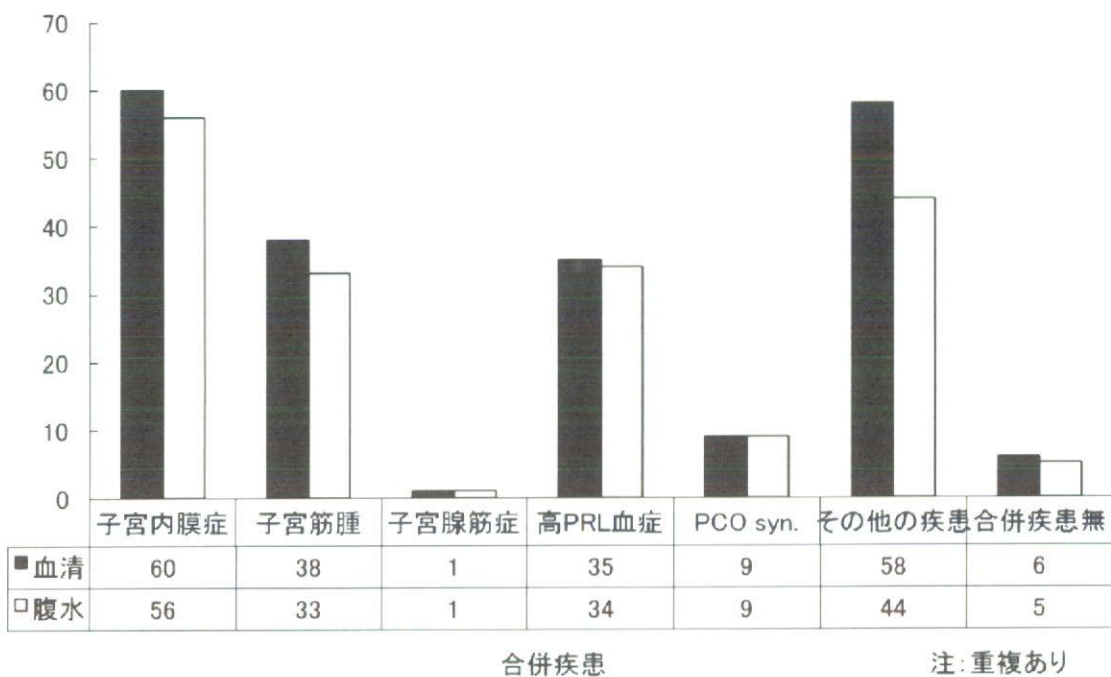


図 12 婦人科サンプリング群：合併疾患

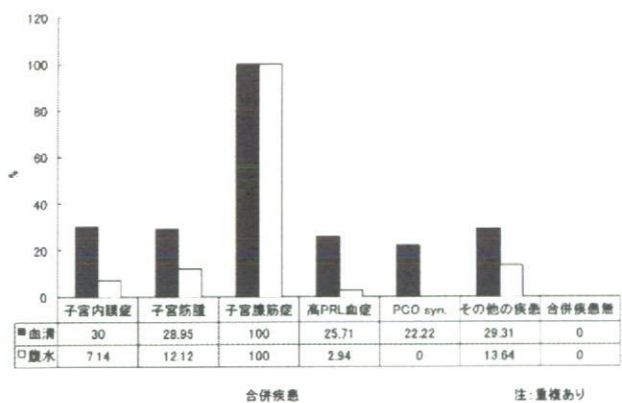


図 13a NP の合併疾患での検出率

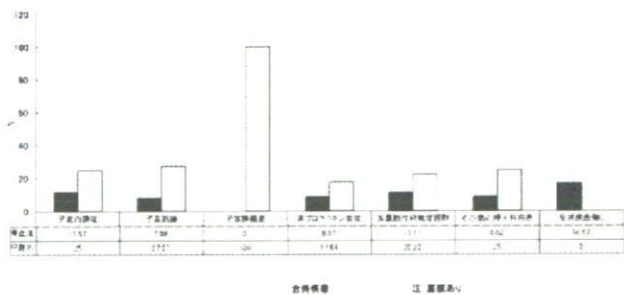


図 13b DEHP 検出率：合併疾患



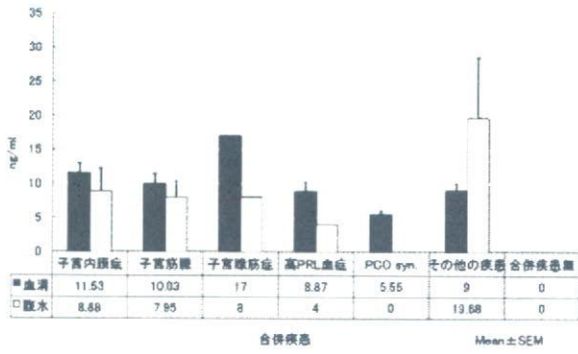


図 14a 合併疾患でのノニルフェノールの検出濃度

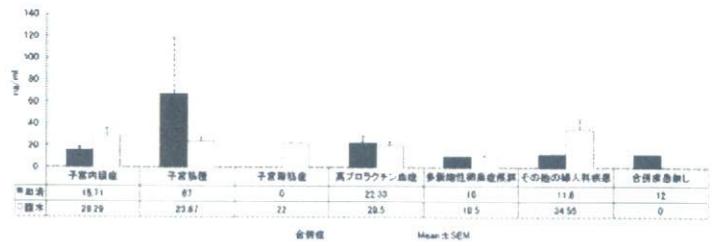


図 14b DEHP の合併症別での検出濃度

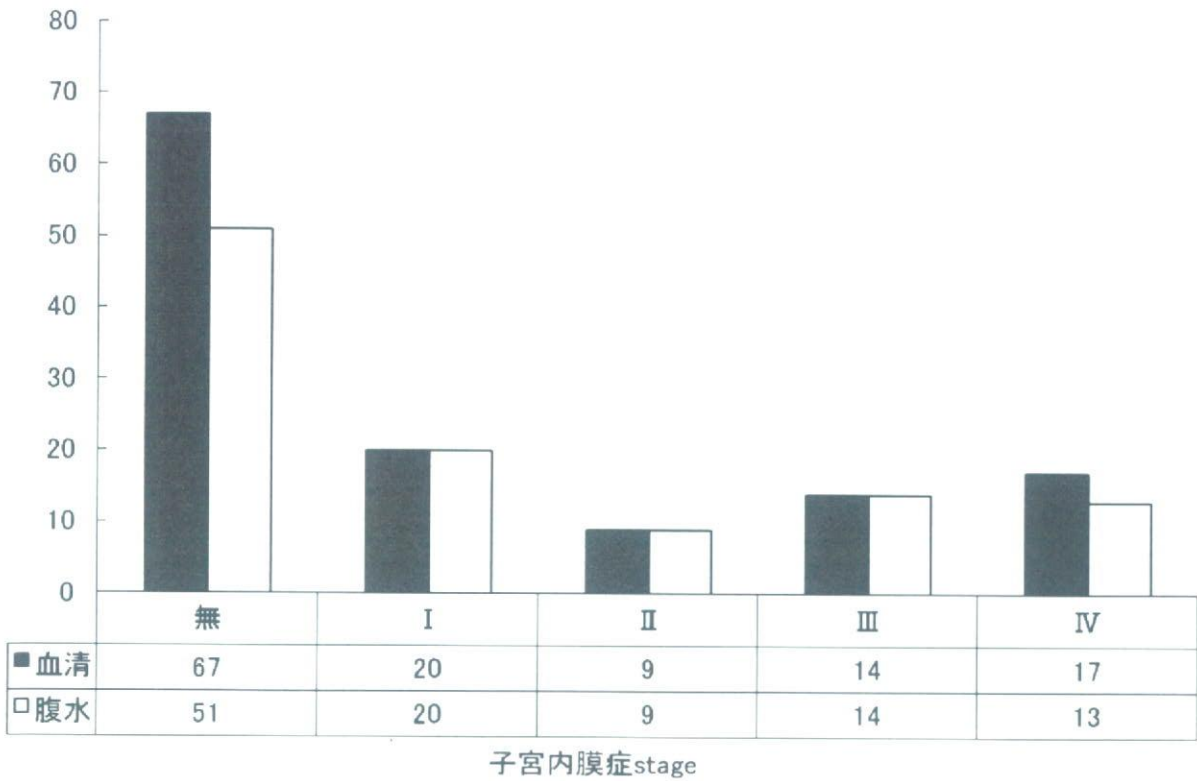


図 1 5 婦人科サンプリング群：子宮内膜症 stage

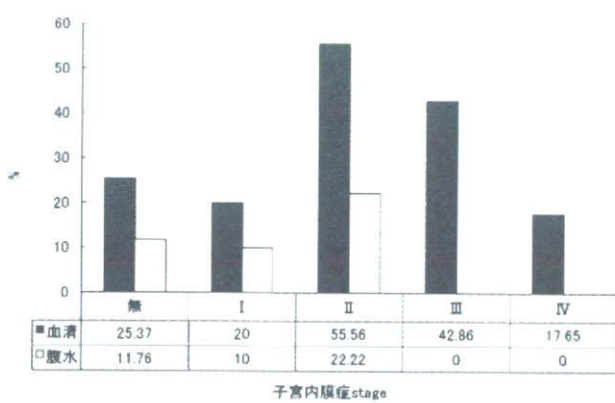


図 16a NP の子宮内膜症 stage 別での検出率

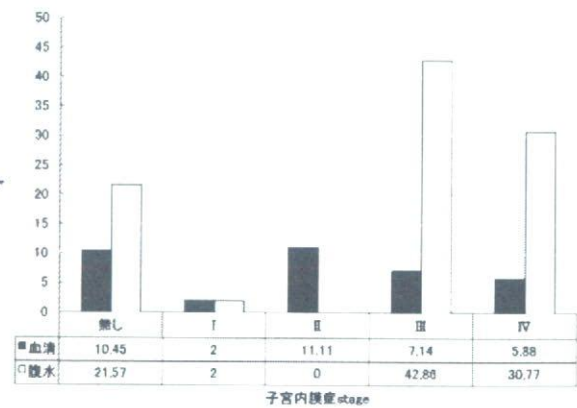


図 16b DEHP 検出率：子宮内膜症 stage 別

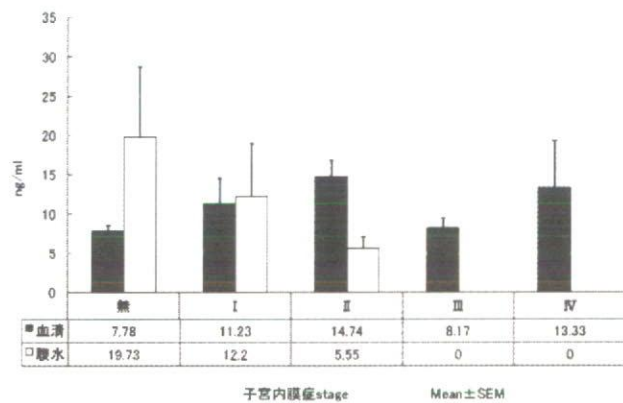


図 17a 子宮内膜症 stage 別での  
ノニルフェノールの検出濃度

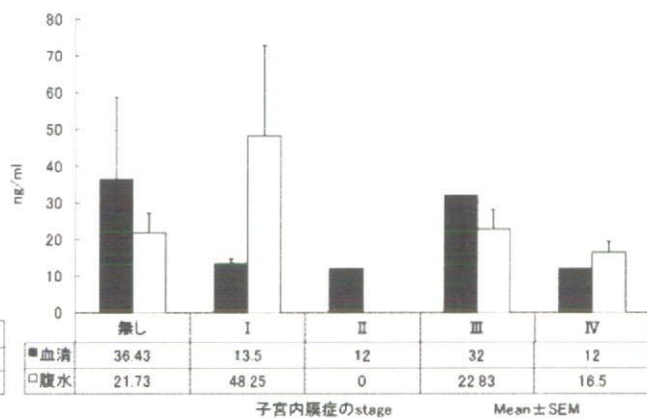


図 17b フタル酸エステル類の  
子宮内膜症 stage 別の検出濃度

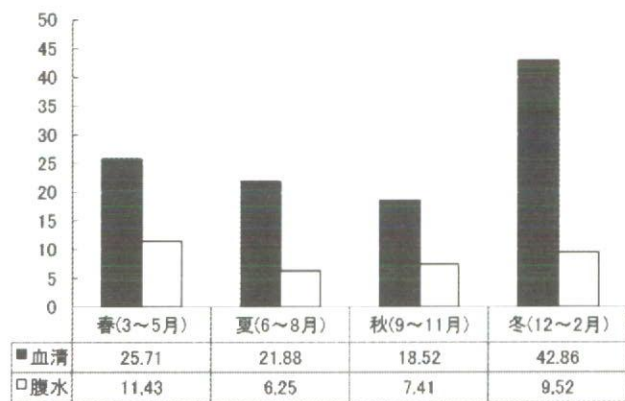


図 18a NP の検出率 (季節)

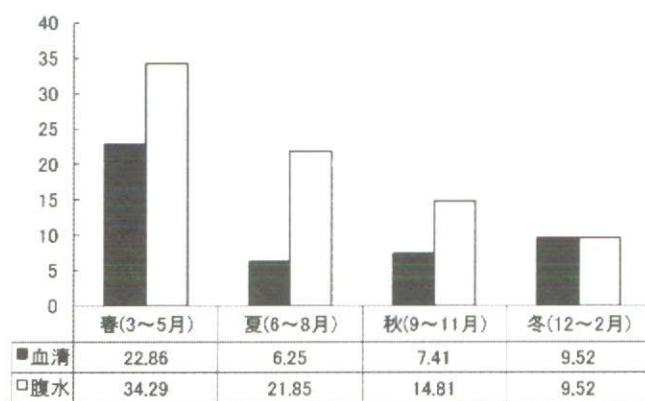


図 18b DEHP の検出率 (季節)

表1 妊婦・生殖婦人の血清中の実測値（付 臍帯血清中濃度）

物質系	略 号		検出率	検出数	濃度範囲	平均値	
ピレスロイド系農薬代謝物 (ppb)	3-PBA	母体血清	10.0%	1	0.2	0.20	
クロルピリホス代謝物 (ppb)	TCP	母体血清	0.0%	0	<0.1	<0.1	
タバコ (µg/ml)	ニコチン	母体血清	23.1%	3	1.0-1.4	1.30	
		臍帯血清	18.2%	2	1.0-1.8	1.40	
		生殖婦人血清	79%	30	1.1-12.4	3.07	
	コニチン	母体血清	7.7%	1	3.0	3.00	
		臍帯血清	9.1%	1	8.7	8.70	
フタル酸モノエステル類 (ng/mL)	MEP	母体血清	66.7%	8	0.2-0.4	0.30	
		臍帯血清	100.0%	12	0.3-0.8	0.50	
	MEHHP	母体血清	50.0%	6	0.2-0.2	0.20	
		臍帯血清	25.0%	3	0.2-0.2	0.20	
	MBP	母体血清	100.0%	12	3.6-22.9	13.30	
		臍帯血清	100.0%	12	5.3-22.7	13.80	
	MBzP	母体血清	75.0%	9	0.3-2.4	0.70	
		臍帯血清	8.3%	1	1.1	1.10	
	MEHP	母体血清	100.0%	12	2.2-5.0	3.30	
		臍帯血清	100.0%	12	1.8-11.2	3.40	
	MINP	母体血清	8.3%	1	0.7	0.70	
		臍帯血清	25.0%	3	0.3-0.4	0.30	
	フタル酸ジエステル類 (ng/mL)	DEHP(※)	母体血清	10.7%	9	4.1-41	12.86
			臍帯血清	10.9%	6	2.6-29	8.20
生殖婦人血清			11.0%	14	10-170	26.07	
MEHP		母体血清	100.0%	5	3.3-6.9	4.34	
		臍帯血清	100.0%	5	3.1-15.4	6.32	
揮発性有機化合物 (ppb)	2-EHoi	生殖婦人血清	100%	38	10-182	58.26	
	2-EHal	生殖婦人血清	18%	7	1.0-3.0	1.29	
	DCB	生殖婦人血清	100%	38	0.9-53.0	5.68	
有機フッ素系化合物 (ng/mL)	PFOS	生殖婦人血清	100%	36	5.3-19.0	10.70	
	PFOA	生殖婦人血清	100%	36	2.3-12.1	4.92	
牧野班ガイドラインによる物質(※) (ng/mL)	BPA	母体血清	1%	1	0.61	0.61	
		臍帯血清	0%	0	<0.5	<0.5	
		生殖婦人血清	2%	2	0.69-1.7	1.20	
	NP	母体血清	8%	6	5.2-8.7	6.17	
		臍帯血清	8%	4	7.7-13	10.35	
		生殖婦人血清	28%	35	5.0-25	9.71	

n=211