

平成十年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書  
内分泌攪乱物質の胎児、成人等の暴露に関する調査（指定研究）

内分泌攪乱物質の胎児、成人等の暴

露に関する生体試料採取による調査

主任研究者 中澤裕之  
星薬科大学教授

分担研究者 牧野恒久  
東海大学医学部教授

添付詳細報告書リスト

詳細報告書 1 :

内分泌攪乱物質調査研究に最適な生  
体試料採取系・基礎的実験系の構築  
——試料採取系（実験系）の汚染除  
去

詳細報告書 2 :

生体試料中ビスフェノール A の高感  
度分析法の開発 I——エチル誘導体化  
GC-MS 法

詳細報告書 3 :

生体試料中ビスフェノール A の高感  
度分析法の開発 II——トリメチルシ  
リル誘導体化 GC-MS 法の開発とエ

## 手誘導体化 GC-MS 法との比較検

討

### 研究要旨

内分泌攪乱物質のうち、フタル酸エステル類、ビスフェノール A、ノニルフェノールなどの化学物質を含む製品が、医療の現場や実験室内にも多数存在する。表記研究に使用する全ての医療器具（実験器具及びそれに付随する道具）から、これら化学物質の溶出試験を実施し、それらのデータに基づいて生体試料採取法あるいは分析室でのルーチン操作を再検討し、汚染物質の排除を行った。そののち、内分泌かく乱物質の胎児・乳児暴露量の評価のために、母乳、臍帯血、妊婦血液を対象とした内分泌かく乱物質の高感度分析と、近年若年女性の間で急増していると言われる子宮内膜症患者の腹水中の内分泌かく乱物質を分析し、データベースを構築して胎児・乳児・成人暴露量の評価と疾病との関連性を明らかにする。

農薬、食品添加物、医薬品等の化学物質の安全性は実際使用される濃度レベルより高いところで、急性毒性や発ガン性等の慢性毒性実験を実施し、その体内動態を明らかにして	リスク評価がなされている。しかし、社会問題となっている外因性内分泌かく乱物質の特徴は微量でしかも世代を越えて生体、特に胎児や乳児に影響を及ぼすことが危惧されている
---	---

ことである。環境庁の実施している環境モニタリングにより、水、空気、土壌、生物試料中にその存在が明らかにされている内分泌かく乱物質もあり、食品を媒体として我々が体内に摂取する可能性のある物質も報告されている。実際、ダイオキシン、PCB等のようにヒト血液、母乳中から検出されている内分泌かく乱物質も存在する。微量で存在し、仮に微量で生体に様々な作用を及ぼすとしてもその作用機構を含めて解明すべき内容が余りにも多岐に渡っていることが内分泌かく乱物質問題を複雑化させている。この内分泌かく乱物質に対する内分泌学的基礎研究は極めて少ない上、これら物質のヒト雌性の生殖に対する基礎的研究・調

査は皆無に等しい。このような現状で特に問題となる点は、単発的な報告のデータの信頼性に疑問の点が多い事である。

内分泌かく乱物質のヒトへの健康影響の有無またはその程度に関する総合評価を正しくおこなうためには、信頼性の高いデータであることが必須である。本研究は、胎児、乳児、成人等がどの程度内分泌かく乱物質に暴露されているかを明らかにするために、まず生体試料採取法から生体試料をターゲットにした高感度かつ精度の高い分析法の構築までの基礎的な部分の確立とともに、ヒトへの健康影響に関する総合評価を正しくおこなうためのサンプリングシステムの構築を目標とした。

## A.1 内分泌攪乱物質調査研究に最適な生体試料採取系・基礎的実験系の構築——試料採取系（実験系）の汚染除去

内分泌攪乱化学物質の生体影響に関する調査研究を実施するため、母乳、さい帯血、血清、腹水中の暴露状況を検討するが、これらの測定対象のいくつか（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）は、医療の現場（実験室内）で日常的に用いられている医療器具（実験器具及びそれに付随する道具）中に含まれている可能性がある。これらの対象物質は、医療器具（実験器具及びそれに付随する道具）を通じ、採取系（測定系）内に容易に入り込

み、正確な測定（高感度な測定）を困難にすることが知られている。従って現状での試料採取（実験室内での日常的な操作）によって得られた試料及び測定データでは、得られた結果に対する保証ができない。これらの不明な点を明らかとするために、生体試料採取のためのルーチン操作を、徹底的に検討し、試料採取経路及び実験室に存在する実験器具からの汚染物質の排除及び0汚染を目指した。

## A.2 生体試料中ビスフェノール A の高感度分析法の開発

ビスフェノール A（BPA）は、内分泌攪乱物質の一つと考えられており、ヒトの健康影響に対する関心が

高まりつつある。最近、京都大学のグループにより、さい帯中の BPA の存在が報告され、次世代への影響の可能性が示唆された。それにともない現在、本化学物質のヒト、特に母体、胎児への暴露実体調査の早急な実現が、強く望まれている。

これらの調査を実施するためには、感度と選択性に優れた MS を用いた測定法の開発が必須である。しかし現在まで、生体試料（血液、さい帯血、母乳、腹水）中 BPA の、MS を用いた測定法は全く報告されていない。近年、ジエチル硫酸を用いたエチル誘導体化 GC-MS 法が開発され、環境試料へ適用されている。本 BPA 誘導体が極めて安定で、夾雑する生体由来の妨害物質を加水分解に

より精製することが可能であることに着目し、本誘導体化を用いる GC-MS 法の開発を試みた。また、ビスフェノール A の測定法としてトリメチルシリル(TMS)誘導体化 GC-MS 法も一部で汎用されている。本 TMS 化法を用いる生体試料の測定法も同時に開発し、感度、操作性、生体試料への応用性の検討を試みた。さらに、エチル誘導体化法と TMS 誘導体化法の有用性を比較検討し、生体試料（血液、さい帯血、母乳、腹水）中 BPA の、MS を用いた測定法として最適のものを開発する。

A.3 生体試料中の内分泌かく乱物質濃度とヒトの健康影響についての検討

上記 A.1 から A.2 の検討をふまえたうえで、産科および婦人科に通院中の婦人から十分なインフォームドコンセントの（大学内に常設の医の倫理委員会よりの承認をうけている書式を使用した）うえで、生体試料を採取し内分泌かく乱物質を分析する。

#### A.3.1 臍帯血及び母乳中の内分泌かく乱物質に関する研究。

内分泌かく乱物質の胎児・乳児暴露量の評価のために、母乳、臍帯血、妊婦血液を対象とした内分泌かく乱物質の試料調製法を含む超高感度分析法を開発する。特に可塑剤の分析にはその影響を排除するような実試料の採取方法が必要で、測定手法を構築する。

#### A.3.2 内分泌かく乱物質の成人暴露等に関する調査研究。

内分泌かく乱物質の生殖系に及ぼす影響の一つに、近年 20 代、30 代の女性の間で急増していると言われる子宮内膜症との関連性が指摘されている。本研究では子宮内膜症患者の腹水中の内分泌かく乱物質を分析し、関連性を明らかにする。この研究には腹水の採取方法と超高感度な分析法の構築が必要である。同時に採取した血液を対象とした内分泌かく乱物質に関する分析もおこなうが、これは上述の A.3.1 で得られた成果を利用する。

### B. 研究方法

#### B.1 内分泌攪乱物質調査研究に最適

## な生体試料採取系・基礎的実験系の 構築のための方法

医療器具、実験室内にある実験器具及びそれに付随する道具の汚染調査を実施した。汚染の可能性が知られている化学物質は、フタル酸エステル類、ビスフェノール A 並びにノニルフェノールであるが、その類縁化合物もその可能性が考えられる。従って本試験は、フタル酸エステル類の代表として、ジ 2-エチルヘキシルフタレート (DEHP)、ビスフェノール A 並びにノニルフェノールを中心とした、FID-GC によるパターン分析を実施した。なお、量的な情報を得るために、DEHP のみ定量した。詳細は、添付の詳細報告書 1 を参照されたい。

## B.2 生体試料中ビスフェノール A

### の高感度分析法の構築のための方法

装置や分析法さらに、誘導体化操作の詳細は、添付の詳細報告書 2 および 3 を参照されたい。

## B.3 生体試料中の内分泌かく乱物質

### 濃度とヒトの健康影響についての検討のための方法

添付の詳細報告書 1 の結果に基づき、医療器具、分析室内にある実験器具及びそれに付随する道具の汚染調査を実施した。これらの結果に基づき、使用する試料採取器具の選択、新規作製を試み、汚染が比較的無い系を作り上げた。また、分析室で日常的に使用している器具や装置を検

討し、可能な限り排除あるいは選択し汚染が少ない分析室の構築も必要であることがあきらかになった。しかし、可能な限り努力はしているが、特に医療現場では対応できない部分がある。従って試料採取及び測定の実験操作ブランクを毎測定ごとに調製し、これらの2種の操作ブランク値を加味して、得られたデータを解析することが、信頼性の高いデータを得る正確な測定のために必須であることも明確になった。

## C. 結果と考察

### C.1 内分泌攪乱物質調査研究に最適な生体試料採取系・基礎的実験系の構築の研究から得られた結果

方法に基づき、医療器具、分析室内にある実験器具及びそれに付随する道具の汚染調査を実施した、これらの結果に基づき、使用する試料採取器具の選択、新規作製を試み、汚染が比較的無い系を作り上げた。また、分析室で日常的に使用している器具や装置を検討し、可能な限り排除あるいは選択し汚染が少ない分析室の構築にも成功した。しかし、可能な限り努力はしているが、特に医療現場では対応できない部分がある。従って試料採取及び測定の実験操作ブランクを毎測定ごとに調製し、これらの2種の操作ブランク値を加味して、得られたデータを解析することが、正確な測定のために必須であると考えた。詳細は、添付



の詳細報告書 1 を参照されたい。

C.2 生体試料中ビスフェノール A の高感度分析法の構築の研究から得られた結果

C.2.1 ジエチル硫酸を用いる、ヒト体液中の BPA のエチル誘導体化 GC-MS 法を開発した。本法は (1) 比較的高感度で 0.25 ng/ml (生体試料) の BPA の測定が可能で、(2) また室温、1 時間放置するだけで反応が終了し、操作が簡便である。また、反応生成物であるフェネトール体は、極めて安定で、本法を生体試料に応用するとき、(3) 反応生成物を加水分解を用いて精製することが可能である。それ故極めて高い精

製効率が期待される。

本法は極めて高感度で、夾雑物が多量に存在する試料中の BPA を精度よく測定することが可能である。それ故、内分泌攪乱物質の健康影響に関する調査研究の実施に極めて有用と思われる。さらに詳細は、添付の詳細報告書 2 を参照されたい。

C.2.2 誘導体化試薬 BSTFA を用いる、ヒト体液中の BPA の TMS 誘導体化 GC-MS 法を開発した。

試薬ブランクの原因を詳細に検討し、過剰な試薬を N<sub>2</sub> パージで除去することにより、試薬ブランクの完全除去に成功した。本法は (1) 比較的高感度で 0.1ng/ml の BPA の測定が可能で、(2) また室温、1 時

間放置するだけで反応が終了し、操作が簡便である。この感度及び操作性は、エチル誘導体化法に匹敵する。

しかし、本法を血清及び母乳の生体試料に応用を検討したところ、試料最終溶液中に夾雑する多量の物質のために、回収率が 150 から 180% となり、本法の応用は不可能であった。

本法は極めて高感度かつ簡便な方法である。しかし血清や母乳のように多量の夾雑物が存在する試料中の BPA を精度よく測定することは不向きであった。それ故、本法は比較的夾雑物が少ない試料中 BPA の、高感度かつ正確な測定に有用と思われる。

さらに詳細は、添付の詳細報告書 3 を参照されたい。

C.3. 3 生体試料中の内分泌かく乱物質濃度とヒトの健康影響について

C.3.1 臍帯血及び母乳中の内分泌かく乱物質に関する研究。

内分泌かく乱物質の胎児・乳児暴露量の評価のために、母乳、臍帯血、妊婦血液を対象とした内分泌かく乱物質の高感度分析においては、医用材料に含まれる可塑剤の影響を排除するために実試料の採取に際しては細心の配慮がなされることが必要である事が明らかとなった。30 例の正期分娩の症例について内分泌かく乱物質の分析が行われているが、一施設での結果を最終分析のためのデータベースへに記録するのではなく、他施設でクロスチェックを行うこと

によりデータとしての精度を高めることは必須である。とくに、今回の結論が社会に対して与えるインパクトの大きさを考慮した場合は、当然である。現在、各地区の公衆衛生研究所にサンプルを回して、分析結果をクロスチェック中である。

### C.3.2 内分泌かく乱物質の成人暴露等に関する調査研究。

内分泌かく乱物質の生殖系に及ぼす影響の一つに、近年若年女性の間で急増していると言われる子宮内膜症との関連性が指摘されている。本研究では子宮内膜症患者の腹水中の内分泌かく乱物質を分析し、関連性を明らかにする。この研究における内分泌かく乱物質の高感度分析におい

ては、腹水の採取時に使われる医用材料に含まれる可塑剤の影響が重大であることが明らかとなった。その影響を排除するために、腹水試料の採取に際しては細心の配慮がなされて改良された器具が必要である。事前にチェック済みのこれらの器具を用いて、不妊症を既往にもつ患者 30 症例の腹水と血液を生体試料として得た。内分泌かく乱物質の分析結果と、腹腔内の所見から分類された子宮内膜症の重症度、年齢、不妊期間などの各要素をデータベースへ登録して最終分析を行う予定である。内分泌かく乱物質の分析結果については、一施設での結果を他施設でクロスチェックすることによりデータとしての精度が高まることは明白

である。とくに、今回の結論が社会  
に対して与えるインパクトの大きさ  
を考慮した場合は、当然である。現  
在、各地区の公衆衛生研究所にサン  
プルを回して、分析結果をクロスチ  
ェック中である。