

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）

<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

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

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）からの、これら化学物質の溶出試験を実施した。それらのデータに基づき、生体試料採取法あるいは実験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。

A. 研究目的

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。しかし、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。これらの目的のために、本研究を行う前に、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。

B. 分析法

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。

B.1 装置

ガスクロマトグラフ、島津 GC-17 A

B.2 操作法

試料を採取し、はさみあるいはカッターで細切する。これを秤量し、10ml のヘキサンを加えて一晩放置する。このヘキサン抽出液の 1 μ l を FID-GC に付す。

B.3 GC 条件

カラムは、DB-5, 0.25 mm x 30 m, df 0.25 μ m を使用した。温度条件は、注入口を 280 $^{\circ}$ C、検出器を 280 $^{\circ}$ C、カラムの昇温条件を、200 $^{\circ}$ C \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C(5min)で行った。流量は、1ml/min(He)、スプリット比は 1:50 であった。

B. 4 検量線

1000 mg/ml の DEHP の標準試料溶液を、ヘキサンで希釈して、1.0、2.1、4.1、10.3 μ g/ml の溶液を調整し、その 1 μ l を上記分析法に従って測定した。

DEHA の、ピーク面積値の比と、重量比から、検量線を作成した (Fig. 70)。

B. 5 定量計算

得られた DEHP のピーク面積値から、検量線より検出量を求め、次式により試料中の DEHP 濃度 (Cs) を算出した。

$$C_s (\mu\text{g/g}) = W_d \times (V_s / V_i) \times (1 / W_s)$$

Wd : 検出量 (ng)

Ws : 試料採取量 (g)

Vs : 測定試料液量 (10ml)

Vi : 注入量 (1 μ l)

B.6 検討項目

B.6.1 生体試料採取方法の検討

I) 採血

真空採血管を用い、採血する。

検討項目：テルモベノジェクト II 採血針、真空採血管 (10 ml、自家製 ACD-A 液入り)

II) さい帯血採取

さい帯から下記注射器を用いさい

帯血を採取する。

検討項目：JMS シリンジ (100 ml)、
ニプロフローマックス採血針、抗凝
固剤 ACD-A 液

III) 腹水採取

エンドパスアクセスニードルで採
取ルートを確認し、永島製金属管を
挿入し、ニプログリーンスネークチ
ューブを通じて注射器で腹水を採取
する。

検討項目：エンドパスアクセスニード
ル、金属管、ニプログリーンスネ
ークチューブ、ニプロシリンジ GA (20
ml)

IV) 保存容器

検討項目：各種スピッツ管

B.6.2 実験室及び実験器具

Table 2 に示す実験室内にある
種々のプラスチック製の物を、スク
リーニングした。

C. 結果考察

生体試料採取器具及び実験室に存
在する物質からの汚染、日常のルー
チン操作で使用している、実験器具、
実験補助器具について汚染の実態調
査を実施した結果を、Table 1 及び 2、
Fig. 1-69 に示す。これらの結果に基
づいて、個々の対策を検討した。

C.1 生体試料採取法

I) 医療器具

溶出試験を行った結果を、Fig. 1-26、
それらをまとめた物を、Table 1 に示
す。これらの結果が示すように、腹
水採取用器具のグリーンスネークチ
ューブ、ACD-A 液の包装容器は多量
の DEHP を、さい帯血用注射器の包
装容器はビスフェノール A を、腹水
用注射器や真空採血管はノニルフェ
ノールを含むことがわかった。さら
に、ほとんどの医療器具から、多数
の溶出ピークが認められ、これらの
同定は行わなかったが、汚染のおそ
れがある物質の類縁化合物の可能性
が高く、これらの医療器具を試料採
取及び測定に使用することは、系内
を汚染する可能性が極めて高いこと
がわかった。それ故、全ての医療器
具は、可能な限りガラス製の物を使
用した。

一方、腹水採取用器具のグリーン
スネークチューブは、多量の DEHP
を含むが、ガラスに置き換えること
が不可能である。それ故 Fig. 75 に
示すテフロン製器具を作製し、これ
を用いることにした。また、注射針
も金属製の物が入手困難であった。
しかし、接液部は極めて小さいこと
と、Fig. 10 に示すようにほとんど溶
出ピークが認められないことから、
プラスチック製の注射針を使うこと
にした。

II) 血液の調製

Fig. 23-26 に示すように、抗凝固剤を入れるバック及びその包装容器から、DEHP、ノニルフェノール及び多数の溶出ピークが認められた。測定対象の安定性と操作性を考えると、血液から血漿を調製する方が優れているが、ACD-A 液からの汚染を防止するため、余分な物を全く加えずによい血清を調製することにした。

C.2 実験室及び実験器具の検討

I) 実験室

実験室のレイアウトを Fig. 76 に示す。床はコンクリート製で、フタル酸エステルの汚染の可能性が、もっとも高い、フロアのビニルタイルは使用していない部屋で行った。簡易ドラフトの配管からは、汚染物質の溶出は認められなかった。電気器具のコンセントが DEHP を含んでおり、その他にも多数の溶出ピークが認められた (Fig. 28)。したがって全てのコードをテフロンシートで覆った。

II) 実験装置

エバポレーター保護ネットはテフロンシートを、同真空ゴム管はシリコン製の物を使用した。パッキンは接液部ではないのでそのまま使用した。

III) 実験器具

使用する器具は、全てガラス、テフロン、金属製の物を用いた。すり

合わせ器具は、全て透明ずりの器具を用いた。手袋は、P-2 実験室での操作及び器具洗浄に、サニメント及びビューティーを用いた。安全ピペッターは、シリコン製の物を用いた。N₂ エバポレーターは、Fig. 77 の物を作製した。固相抽出は、接液部が全てテフロンでできたバキュームマニユールドを用いた。さらに、カートリッジからの溶出の際、汚染の可能性を最小限にするために Fig. 78 の器具を作製した。

IV) 実験補助器具

シールテープは、テフロンシールを使用した。全てのラベルはテプラを廃止し ppc ラベルを使用した。精製水の蛇口に使用していたホースもテフロン製の物を作製し、これを用いた。

D. 結論

FID-GC を用いる、ヘキサン溶出液のパターン分析を用い、試料採取法 (実験操作) のルーチンを詳細に検討した。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、実験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実験室の構築に成功した。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。