

内分泌攪乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する調査研究

（血清及び缶飲料中のビスフェノールAの分析）

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）
研究協力者 小林 進 （埼玉県衛生研究所長）

研究要旨

分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)を用いた血清及び缶飲料中のビスフェノールA(BPA)の分析法を検討した。インターフェースにはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を採用し、イオン化モードはネガティブモードとした。検出にはBPAの擬分子イオン[M-H]⁻ m/z 227を用いた。試料の前処理は固相抽出法を採用し、カートリッジにはマルチモードタイプのISOLUTE Multimodeを用いた。本法における血清及び缶飲料に対する添加回収率は5あるいは10 ng/mlの添加で概ね80%以上、検出限界は血清で0.1 ng/mlであった。本法を用いて血清中のBPA濃度を調べた結果、BPAは検出限界以下であった。一方、缶飲料では、加熱・滅菌処理されるコーヒーや紅茶缶からBPAが200 ng/ml以上検出されるものも見られた。

【研究目的】

ビスフェノールA(BPA)は、内分泌攪乱化学物質として環境庁よりリストアップされた67物質の一つであり、ポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として多用されている。その国内生産量は平成8年度で約25万トンであり、リストアップされた67物質の中で第3位を占めている。

化学物質によるヒトへの影響は、個々の化学物質がどの程度毒性を有しているか、また、その化学物質にどの程度暴露

されているかによって決定される。そこで、今回ヒトへの暴露状況を把握する目的で選択性及び検出感度に優れている高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)を用いた血清中のBPAの分析法の開発を試みた。併せて、開発した分析法を用いて、血液中及びヒトへの主要な暴露源と考えられる缶飲料中のBPAの含有量調査も実施した。

【研究方法】

1. 試料及び試薬

血清は埼玉県衛生研究所職員7名から採血して調製した。また、日赤製分画用血漿(凝固因子用:c)3検体も用いた。

缶飲料は埼玉県内で市販されているコーヒー、紅茶、日本茶、果実飲料、炭酸飲料缶などを用いた。

標準品:ビスフェノールA(BPA)は関東化学(株)製の環境分析用試薬を用いた。

標準溶液:標準品100mg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HPLC移動相で希釈して標準溶液とした。

ISOLUTE Multimode カートリッジ(500 mg): International Sorbent Technology Ltd.製、カートリッジは予めメタノール10ml、水5ml、メタノール10ml及び水5mlの順で洗浄した後使用した。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

高速液体クロマトグラフ-質量分析計(LC/MS): Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。測定条件は表1に示した。

3. 検量線の作成

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 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、モニターイオンm/z 227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、絶対検量線法により検量線を作成した。

4. 試験溶液の調製

血清, 血漿: 試料2mlを採り,

ISOLUTE Multimode カートリッジに負荷する。水10mlで洗浄した後メタノール5mlで溶出し、減圧乾固後40%アセトニトリル1mlに溶解して試験溶液とした。

缶飲料: 試料10mlを採り、ISOLUTE Multimode カートリッジに負荷し、水20mlで洗浄した後40%アセトニトリル5mlで溶出して試験溶液とした。

【結果及び考察】

1. LC/MS 測定条件の検討

一般に、河川水や底質などの環境試料中のBPAの分析は、トリメチルシリル(TMS)化後、ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC/MS)で測定されている。一方、高速液体クロマトグラフ(HPLC)法は、誘導体化せずにそのまま測定できることから、uv検出器や蛍光検出器を用いた方法が汎用されている。しかし、BPAの極大吸収波長は227nmと短波長領域にあり、血清や缶飲料中のBPAを高感度分析するには夾雑成分の影響を受け、困難であった。また、蛍光検出法は一般に選択性、検出感度に優れているが、BPAの蛍光性は乏しく、蛍光検出法も缶飲料中のBPAの高感度分析法には適切でなかった。

最近、新たな分離分析法として、HPLCの検出器に豊富な定性情報を提供する質量分析計(MS)を直結したLC/MSが生体試料や食品の分析にも汎用されてきている。そこで、血清及び缶飲料中のBPAの分析にLC/MSを用い、その適用性を検討した。

1.1 移動相の影響

BPAは2個のフェノール基を有する極めて弱い酸性を示す化合物である。そ

ここで、インターフェースには操作性に優れ、且つ微極性化合物のイオン化にも適したエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を選択し、イオン化モードはネガティブモードとした。本条件により BPA の擬分子イオン $[M-H]^-$ (m/z 227) が高感度で観測された。なお、移動相に微量の酢酸を加えることにより、BPA はより感度良く検出された (図 1)。

1.2 フラグメンター電圧の影響

ESI はマイルドなイオン化法であり、化合物の分子量情報は得やすいが、構造情報には乏しい面がある。そこで、衝突誘起解離 (Collision Induced Dissociation, CID) を起こして構造情報 (フラグメントイオン) を得る方法が利用されている。キャピラリー出口の電圧 (フラグメンター電圧) を上げることにより、フラグメントイオンが生成し、逆に擬分子イオン強度は低下した。そこで、フラグメンター電圧の設定であるが、BPA の検出・定量には擬分子イオンを効率良く生成する 80V に、BPA の確認にはフラグメントイオンを生成する 160V に設定した (図 2)。

更に、他のパラメーターの最適測定条件を検討し、表 1 に示す条件を設定した。本条件によって得られた BPA の検出限界は、SIM モードでモニターイオンを BPA の擬分子イオンとした場合 0.2ng/ml (絶対量として 2pg) であった。

2. 前処理法の検討

最近環境庁より示された暫定マニュアルでは²⁾、ジクロロメタンを用いた液-液分配抽出後、シリカゲルカラムでクリーンアップを行う方法が採用されてい

る。しかし、ジクロロメタンの使用は環境汚染及び労働衛生上好ましくない。そこで、現在試料の前処理に多用されている固相抽出法を用いて、より簡易な方法を検討した。検討したカートリッジの中では、無極性の ODS (C18) と強陽イオン (benzenesulphonic acid) 及び強陰イオン (quaternary amine) 交換樹脂の 3 種類がミックスして充填されている ISOLUTE Multimode がクリーンアップ効果に最も優れていた。本試料調製法によって得られた血清及び缶飲料の LC-MS-SIM クロマトグラムを図 3, 4 に示す。

当研究所にはイオン交換水と超純水製造装置があり、当初カートリッジのコンディショニング及び洗浄にイオン交換水を用いた。しかし、イオン交換水を用いたブランク試験において BPA とと思われるピークが観測された。そこで、ジクロロメタンを用いてイオン交換水中の疎水性成分を液-液抽出し、LC/MS に供した結果、イオン交換水中に BPA が微量 (0.2 ~ 1 ng/ml) 含まれていることが判った。BPA はエポキシ樹脂やポリカーボネートの原料が主な用途であるが、この他にポリマー製品の酸化防止剤や安定剤としても使用されている。従って、ポリマー製品を使用しているイオン交換水製造装置や前処理用器材の使用に当たっては、当該ポリマー製品からの BPA の溶出に特に注意を要すると考える。

3. 添加回収実験

血清及び缶飲料に BPA を添加 (血清: 5ng/ml, 缶飲料, 10ng/ml) し、回収率を求めた結果、血清及び缶飲料とも概ね 80% 以上であった (表 2)。本法に

よる検出限界は、血清で 0.1ng/ml、缶飲料で 0.2ng/ml(コーヒー類は 2ng/ml)であった。

4. 血清及び血漿中の BPA 濃度

血清及び血漿中の BPA 濃度を表 3 に示す。当研究所職員の血清中の BPA 濃度はいずれも検出限界以下(0.1ng/ml)であったが(図 3)、日赤製の血漿試料から微量の BPA とと思われるピークが観測された。日赤製の血漿については、保存容器からの汚染等も考えられる。そこで、保存バッグの材質試験を行ったところ、保存バッグからは BPA は検出(10ng/ml)されなかった。

5. 市販缶飲料中の BPA 濃度

缶飲料中の BPA の含有量を表 4 ~ 6 に示す。コーヒー、紅茶などの缶飲料は加圧・加熱殺菌されると言われている。今回得られた分析結果からも、コーヒー類や茶類は、他の加圧・加熱殺菌工程がないと思われる飲料缶に比べて高い濃度で BPA が検出された。代表的な缶飲料の LC-MS-SIM クロマトグラムを図 4 に示す。

数年前からスチールの両面にプラスチックフィルム(主にポリエステル系フィルム)をラミネートしたエポキシ塗料を用いない新しいタイプの缶が開発製造されている。表 4,5 に示すとおり、従来タイプに比べ、新タイプ缶を用いたコーヒー及び茶類飲料からは BPA は殆ど検出されなかった。一方、加圧・加熱殺菌処理のない果実飲料、炭酸飲料等では両者とも BPA はほとんど検出されず、缶のタイプによる有為さは見られなかった(表 6)。

6. 市販空缶からの BPA の溶出試験

加圧・加熱殺菌処理されていない果実飲料や炭酸飲料缶からは BPA はほとんど検出されなかった。そこで、上蓋を取り除いた後、95℃の熱水を缶に満たし、BPA が溶出されるか調べた。表 4 ~ 6 に示す通り、コーヒー及び茶類飲料では、従来タイプの缶からは微量溶出されたが、新タイプ缶からの溶出はいずれも検出限界以下(0.05ng/ml; 注入量 50 μ l)であった。一方、果実飲料、炭酸飲料缶からは 1ng/ml 以上溶出された缶が 3 例とコーヒー及び茶類飲料缶より高い溶出量であった。

更に、空缶に蒸留水を満たし、オートクレーブで 121℃、15 分間加熱処理して溶出量を調べた(表 4 ~ 6)。コーヒー及び茶類飲料では、従来タイプの缶からは 10ng/ml 以上溶出されたものも見られたが、新タイプ缶からはいずれも検出限界以下であった。前述した様に缶からの BPA の溶出は、加圧・加熱殺菌工程時に缶コーティング剤から飲料中に移行するものと推察される。

7. 缶飲料からの BPA の摂取量

米国環境保護庁(EPA)は、BPA の RfD(ADI に相当)を 0.05mg/kg/day としている³⁾。動物実験により求めた BPA の最小毒性影響量(LOAEL) 50mg/kg/day に不確実係数 1/1,000 を乗じてものである。日本では、EPA によるリスク評価を踏まえて、食品衛生法によりポリカーボネート製食品容器からの BPA の溶出基準を 2.5ppm に設定している。しかし、現在のところ金属缶からの BPA の溶出に関する基準は設定されていない。

今回調査した缶飲料の中で BPA が最も高く含まれていたものはコーヒー缶で 1 缶当たり約 $40 \mu\text{g}$, 紅茶缶で約 $44 \mu\text{g}$ であった。最も BPA が含まれていた缶飲料を成人が一日当たり 1 缶摂取したとすると, 対 ADI 比は 1.8% ($44/2,500$) となる。従来のリスク評価では問題とされないレベルであるが, vom Saal ら⁴⁾ は, 最小毒性量 $50\text{mg}/\text{kg}$ より低い量の BPA(体重当たり 2 及び $20 \mu\text{g}$) を妊娠マウスに摂取させたところ, 生まれた雄マウスの生殖能力に影響が見られたと報告している。なお, vom Saal らの報告に対する信憑性については賛否両論があり, 現在追試が幾つかの研究機関においてなされている。

【結 論】

分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)を用いた血清及び缶飲料中のビスフェノール A(BPA)の分析法を検討した。インターフェースにはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を採用し, イオン化モードはネガティブモードとした。検出には BPA の擬分子イオン $[M-H]^-$ m/z 227 を用いた。試料の前処理は固相抽出法を採用し, カートリッジにはマルチモードタイプの ISOLUTE Multimode を用いた。本法における血清及び缶飲料に対する添加回収率は 5 あるいは $10 \text{ ng}/\text{ml}$ の添加で概ね 80%以上, 検出限界は血清で $0.1 \text{ ng}/\text{ml}$ であった。本法を用いて当研究所職員 7 名の血清中の BPA 濃度を調べた結果, BPA は検出限界以下であった。一方, 缶飲料では, 加熱・滅菌処理されるコーヒーや紅茶缶から BPA が $200 \text{ ng}/\text{ml}$ 以上検出されるものも見られた。

【参考文献】

- 1) 環境庁：外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書 (1997)
- 2) 環境庁水質管理課編：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル (1998)
- 3) L.H.Keith: "Environmental Endocrine Disruptors" p.256(1997)(J.Wiley & Sons, New York)
- 4) S.C.Nagel, F.S.vom Saal et al.: Environ. Health Perspect., 105, 70 (1997)

【研究発表】

1. 論文発表

堀江正一, 石井里枝, 小林 進, 中澤裕之：分析化学, "LC/MSによる缶飲料中のビスフェノール A の定量" (印刷中)