

内分泌かく乱物質に関する生体試料（さい帯血等）の分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

エチル誘導体化 GC-MS 法を用いた、ヒト母乳、さい帯血、血液、腹水中のビスフェノール A の高感度測定

主任研究者 牧野恒久
東海大学
分担研究者 牧野恒久
東海大学
研究協力者 岩崎克彦
和泉俊一郎
東海大学

【要旨】

ビスフェノール A (BPA) は内分泌かく乱物質の一つと考えられており、健康影響に関する調査研究の実施が急務とされている。我々が先に開発し、平成 10 年 厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）による「内分泌かく乱物質の胎児、成人等の暴露に関する研究に関する調査研究（指定研究）」の研究報告書において報告した「ジエチル硫酸を誘導体化試薬として用いる GC-MS 法」により、ヒト母乳、さい帯血、血液、腹水中の BPA の測定を実施した。食生活、居住環境などの生活環境や、病歴を含む生化学データなどが入手可能なボランティアを測定対象とし、血液、腹水を測定する婦人科グループと、母乳、さい帯血、母体血を測定する産科グループの 2 グループに分け、各々 30 および 15 検体について、調査を実施した。その結果、産科グループでの母乳、さい帯血、母体血中の BPA は、本法で測定したところいずれも ND であった。いっぽう、婦人科グループでは、30 例中の 1 例においてその腹水中 BPA が 1.7 ng/ml で検出されたが、操作ブランクが真の値よりも小さく、それに伴い測定値が真の値よりも大きく算出された可能性が示唆された。その他の腹水及び血液での BPA の測定値は、全て ND であった。

A. 目的

ビスフェノール A (BPA) は内分泌かく乱物質の一つと考えられており、健康影

響に関する調査研究の実施が急務とされている。この目的のため、先に開発し、平成 10 年 厚生科学研究補助金（生活

安全総合研究事業)：内分泌かく乱物質の胎児、成人等の暴露に関する研究に関する調査研究(指定研究) 研究報告書収録：内分泌かく乱物質の胎児、成人等の暴露に関する生体試料採取による調査：詳細報告書2；生体試料中のビスフェノールAの高感度分析法の開発I—エチル誘導体化GC-MS法と、同詳細報告書3；生体試料中のビスフェノールAの高感度分析法の開発II—トリメチリシリル誘導体化GC-MS法の開発とエチル誘導体化GC-MS法との比較検討に報告した「ジエチル硫酸を誘導体化試薬として用いるGC-MS法」により、ヒト母乳、さい帯血、血液、腹水中のBPAの測定を実施した。食生活、居住環境などの生活環境や、病歴を含む生化学データなどが入手可能なボランティアを測定対象とし、血液、腹水を測定する婦人科グループと、母乳、さい帯血、母体血を測定する産科グループの2つのグループに分け、各々30および15検体について、本調査を実施した。

B. 研究方法

<1. 試薬>

1.1 試薬及び器具

ビスフェノールA(略号BPA)：関東化学。

ビスフェノールA-d₁₆(略号BPA-d₁₆、サロゲート)：CDN。

フルオランテン-d₁₀(内標準物質)：CDN。

ジエチル硫酸：特級、関東化学。

メタノール：フタル酸エステル分析用、関東化学。

エタノール：残留農薬試験用(1000倍濃縮)、関東化学。

ジクロロメタン：残留農薬試験用(1000倍濃縮)、関東化学。

n-ヘキサン：残留農薬試験用(1000倍濃縮)、関東化学。

ジエチルエーテル：残留農薬試験用(1000倍濃縮)、関東化学。

塩酸：精密分析用、キンダ化学。

塩化ナトリウム：残留農薬試験用、関東化学。

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用、関東化学。これを汚染除去のため、電気炉で、700℃で8時間、焼成したものをを用いた。

水酸化カリウム：特級、和光純薬。

水酸化ナトリウム：特級、和光純薬。

C₁₈カラムカートリッジ：Bond Elut Glass C₁₈(1000mg/6ml)、Varian。

フロリジルカートリッジ：Sep-pak Plus Florisil、Waters。

ディスクカートリッジ：エムポアディスクSDB-RPS(47mm)、3M。

水：イオン交換水を、超純水製造装置(Milli RO 8 Water purification system及びMilli-Q SP reagent water system)で精製した。測定に使用した水は、さらにディスクカートリッジを用いてさらに精製し、用いた。この精製では、ディスクは未洗浄の状態で使用し、11/10分の流速で通水した。ディスクは11の精製に1枚使用した。

ガラス器具：Extrane MA 01 alkaline(Merck社)5%溶液に1夜浸け置きし、超音波洗浄器を用い水、アセトン洗浄し、超純水で置換し乾燥した。さらに使用する

る直前に、ジクロロメタンで洗浄し、乾燥したものをを用いた。

固相抽出用バキューウムマンニホルド：接液部が全てテフロン製の製品（ディスボ-ザブルテフロンバルブライナーを使用可能な製品）を用いた。スペルコ製。

C₁₈カラムカートリッジ：ジクロロメタン 30ml について、メタノール 30ml で自然落下による予備洗浄を施し、ついで水 10ml で平衡化したものをを用いた。

1.2 試料溶液

BPA 標準試料溶液

BPA の 1mg/ml のジクロロメタン溶液を、ジクロロメタンで希釈して 10 μg/ml 溶液を調製した。

サロゲート BPA-d₁₆ 溶液

BPA-d₁₆、1mg/ml のジクロロメタン溶液を、アセトンで希釈して 10 μg/ml 溶液を調製した。

内標準溶液

フルオランテン-d₁₀、1mg/ml のヘキサン溶液を、ヘキサンで希釈して 10 μg/ml 溶液を調製した。測定には、さらにヘキサンで 0.5 μg/ml に希釈したものをを用いた。

1.3 試料

産科グループのボランティアからは、母乳、さい帯血、母体血を、婦人科グループからは、腹水、血液を採取した。採取した血液試料は、常法に従って血清に調製し、15 分以内に凍結し、測定する

まで-30℃で保存した。母乳、腹水も同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。

<2. 装置>

GC-MS : 島津製、QP-5050A 型

<3. 分析法>

定量操作

試料 2ml に、BPA-d₁₆ を 100ng 添加し、室温で 15 分放置した。これに Et-OH 8ml を加え、渦動攪拌機（ボルテックスミキサー）を用い 1 分間抽出した。抽出液を、水 70ml で希釈し、C₁₈カラムカートリッジに付した。水 10ml でカートリッジを洗浄後、MeOH 6ml で溶出した。MeOH 画分に、1M HCl 1ml、10% NaCl 14ml 加えた溶液を、ジクロロメタン 2ml で 2 回抽出した。ジクロロメタン層を Na₂SO₄ で脱水した後、試料溶液を N₂ 気流下乾固した。残渣に 1M KOH エタノール溶液 0.5ml 及びジエチル硫酸 0.2ml を加え良く振とうした。これを室温、1 時間反応させ、得られる反応混液に、1M KOH エタノール溶液 4.2ml 及び水 3ml を加え、70℃、1 時間加熱した。冷後、内標準溶液（0.5 μg/ml、フルオランテン-d₁₀・ヘキサン溶液）1ml を加え、激しく振とう後、遠心分離した。得られるヘキサン層を、Na₂SO₄ 脱水し、N₂ 気流下濃縮乾固し、エーテル：ヘキサン溶液（4：96、v/v）1ml に溶解した。この溶液を、あらかじめエーテル：ヘキサン溶液（4：96、v/v）10ml で洗浄しておいたフロリジルカラムカートリッジ（910mg）に付す。エーテル：ヘキサン溶液（4：96、v/v）8ml で溶出し、素通り画分と溶出画分を合わせ、

N₂気流下 1ml まで濃縮し、1 μ l を GC-MS に付す。

毎測定ごとに、カートリッジで精製した水を試料と同様に処理して、操作ブランクを測定し、測定値を補正した。

《GC-MS 条件》

GC

カラム : DB-5、0.25mm \times 30m、df 0.25 / μ m

温度 :

カラム、60 $^{\circ}$ C (1min) \rightarrow Δ 15 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (3min)

注入口、280 $^{\circ}$ C

インターフェイス、280 $^{\circ}$ C

キャリアガス : ヘリウム (1.2 ml/min)

注入 :

スプリットレス

サンプリング時間、1 min

注入量、1 μ l

MS

イオン化法、EI

モニターイオン

269.1 BPA

280.1 BPA-d₁₆

212.1 Fluoranthen-d₁₀

<4. 検量線>

1.2 項の標準試料溶液をジクロロメタンで希釈して、0.5、1、5、10、50 ng/ml の溶液を調整し、その 1ml を上記分析法に従って測定した。

BPA と BPA-d₁₆ とのフェネトール誘導体の、ピーク面積値の比と、重量比から、検量線を作成した。

<5. 定量計算>

得られた BPA のフェネトール誘導体と、BPA-d₁₆ とのピーク面積値の比から、検量線より検出量を求め、次式により生体試料中の BPA 濃度 (Cs) を算出した。

$$Cs \text{ (ng/ml)} = (Wd - Wb) \times (Vs / Vi) \times (1000 / Ws)$$

Wd : 検出量 (ng)

Wb : 空試験による測定物質質量 (操作ブランク値)

Ws : 試料採取量 (2ml)

Vs : 測定試料液量 (1ml)

Vi : 注入量 (1 μ l)

また、測定ごとに一定量添加したサロゲート物質 BPA-d₁₆ 及び内標準物質のピーク面積比から、回収率を算出した。回収率の算出は、感度計数 (RF) 法で行った。

$$RF = (As \times Cis) / (Ais \times Cs)$$

As : サロゲートの測定イオンのピーク面積

Ais : 内標準の測定イオンのピーク面積

Cis : 検量線標準液中の内標準物質質量 (ng)

Cs : 検量線標準液中のサロゲート物質質量 (ng)

C. D. 結果および考察

<1. クロマトグラム>

母乳、さい帯血、血清及び腹水を、本

法に従って処理して得たクロマトグラムを、Fig. 1-4 に示す。母乳、さい帯血、血清及び腹水のいずれも、0.2 ng/ml の BPA が検出され、その他の生体試料由来の妨害ピークは観測されなかった。これらの測定値はいずれも検出限界以下で、このときの操作ブランク (Fig. 1-4) は 0.2ng/ml で、操作ブランクによる物と考えられる。また、本条件下で、BPA、BPA-d₁₆、並びにフルオランテン-d₁₀ の化合物は、完全にベースライン分離した。また、試薬由来の妨害ピークは、全く存在しなかった。

<2. 検量線及び検出限界>

BPA-d₁₆ 100 ng/ml (0.1 ng/1 μl 注入量) を加えて作成した、BPA の検量線 (Fig. 5) も良好な直線性を示し、寄与率 $\gamma = 0.9993$ と良好であった。検出限界 (S/N=3) は、0.5 ng/ml (0.5 pg/1 μl 注入量) の BPA を用いて得たクロマトグラム (Fig. 6) より、0.6 ng/ml (0.6 pg/1 μl 注入量、0.3 ng/ml 試料) とした。検出限界以下の測定値は、ND とした。

<3. 操作ブランク及び回収率>

BPA の毎測定ごとに同時に測定した操作ブランクを、Table 1 及び 2 に示す。ほとんどの操作ブランクは、検出限界以下で良好な結果であった。操作ブランクの測定値の推移を検討すると、測定実施期間のうちごく短い期間だけに高い値が局在していた。この原因は、現在のところ 2 つ可能性が考えられる。1 つは、測定の時期に、測定場所の近くで塗装が行われ、エポキシ系の塗料が用いられた。この塗装由来の BPA により、操作ブラン

クが増加した可能性がある。2 つ目の原因として、途中から逆相系前処理カラムは、200 °C で加熱乾燥処理し BPA 除去した物を使用した。全く除去操作をしなかった場合、0.4 ng/ml 程度の操作ブランクであったものが、加熱乾燥処理のよって充填剤の BPA 汚染の除去が可能となった。しかし初期の製品は、処理時間が不十分であったことが追跡調査でわかっており、製品のロット間並びにロット内で汚染除去効率が異なっていた可能性がある。この原因のため、操作ブランク値が 0.1 から 0.4 ng/ml と変動し、それに伴い測定値が真の値と異なってくる可能性がある。これらの対策として、塗装の問題は、徹底的な器具の洗浄、実験室のクリーンナップの実施を行った。前処理カラムに関しては、充填剤だけを加熱乾燥処理して、ロット間及びロット内の均一化をはかった。これらの対策の後は、一定した操作ブランク値となった。また、全測定の回収率は、平均で 82% (標準偏差、6.3) と良好であった。

<4. BPA の測定値>

住宅環境、食生活、病歴を含む生化学データなど、結果解析に必要なデータが入手可能なボランティアを、婦人科及び産科の 2 つのグループに分け BPA の測定を実施した結果を Table 1 及び 2 に示す。婦人科グループは、母乳、さい帯血及び母体血を、婦人科グループでは、腹水及び血液を測定対象とした。

婦人科グループでは、1 例 (和泉 30) 腹水中に 1.7 ng/ml (1.9 及び 1.6 ng/ml の平均値) の BPA が検出された。まず、測定の根拠となるピークが BPA に基づく

かどうかを検討するために、本法で用いたモニターイオンの他に複数のモニターイオンで同時に測定し、標準物質から得られたもの (Fig. 7) とピーク強度比を比較した。Table-3 に示すように、和泉-30 の腹水の試料 No. 1 及び No. 2 は、どちらも標準物質のピーク強度比とほぼ等しいことから、BPA の存在する可能性が考えられる。しかしながら、本測定 (和泉-30) は、先に述べた操作ブランクの値が、0.1-0.4 ng/ml と変動していた時期に相当し、操作ブランクが真の値よりも小さく、それに伴い測定値が真の値よりも大きく算出された可能性がある。n=2 で測定した測定値が、1.9 と 1.6 と大きく異なることから、このことを示唆する。従ってこれら測定値が試料由来であることを証明するためには、まず再測定、しかる後に他測定機関によるクロスチェックが必要である。しかし、本試料はもともと 4ml しかなく、これ以上の検討は不可能であった。その他の腹水及び血液では、BPA の測定値は全て ND であった。

産科グループでは、母乳、さい帯血、母体血中の BPA を本法で測定しいずれも ND という結果を得た。

E. 結論

食生活、居住環境などの生活環境や、病歴を含む生化学データなどが入手可能なボランティアを測定対象とし、血液、腹水を測定する婦人科グループと、母乳、さい帯血、母体血を測定する産科グループの 2 グループに分け、各々 30 および 15 検体について、調査を実施した。その結

果、産科グループでの母乳、さい帯血、母体血中の BPA は、本法で測定したところいずれも ND であった。いっぽう、婦人科グループでは、30 例中の 1 例においてその腹水中 BPA が 1.7 ng/ml で検出されたが、操作ブランクが真の値よりも小さく、それに伴い測定値が真の値よりも大きく算出された可能性が示唆された。その他の腹水及び血液での BPA の測定値は、全て ND であった。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし