

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（臍帯血等）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

主任研究者 東海大学 牧野 恒久

分担研究者 大阪府立公衆衛生研究所 織田 肇

協力研究者 大阪府立公衆衛生研究所 阿久津 和彦 北川 幹也
堀 伸二郎

ポリ臭素化ジフェニルエーテルのルーチン分析法開発と生物試料の分析

要旨

GC/MS によるポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDE）の高感度迅速分析法を確立し、本分析法を用いて 1998 年に瀬戸内海で採取した食用魚の PBDE 汚染実態を明らかにした。また、ヒト母乳抽出脂肪（1980, 84, 86, 90 年の保存試料）の予備的分析を行い、1g 以下の試料量で PBDE の分析が可能であること、すなわち量が限られている貴重な保存試料を大量に使用することなく、過去に遡って母乳中 PBDE 濃度の経年変化を追跡できることを明らかにした。

A. 研究目的

ポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDE）は、合成樹脂の難燃剤として電子機器の筐体等に広く使用されている。一方、PBDE は環境汚染物質として指摘されており、さらに、その化学構造（図 1）および生物実験等から、内分泌かく乱作用を有するのではないかと疑われている。特に近年、北欧地方においてヒト母乳中の PBDE 濃度が上昇傾向にあることが報告され、乳幼児への悪影響が懸念されている。

我が国においても 1980 年代から累積して数万吨の PBDE が消費されているが、環境・生物中 PBDE 濃度に関する研究報告はわずかであり、その汚染実態は明らかではない。従って、PBDE のリスク評価に先立ち、まず早急に国内の汚染状況を明らかにする必要がある。そこで本研究では 1) 生物試料中 PBDE のルーチン分析法の開発、2) 食用魚の PBDE 汚染レベルの解明、および 3) 乳幼児期の暴露の観点から重要であるヒト母乳の汚染実態の解明を目的とした。

B. 研究方法

B.1. 試料

魚試料は、1998 年 10-12 月に瀬戸内海で採取したアジ、アナゴ、スズキ、ハマチ、ヒラメ、ボラおよびマダイを使用した。母乳脂肪は、大阪府下で採取された 1980 年（74 件混合）、1984 年（67 件混合）、1986 年（55 件混合）および 1990 年（58 件混合）の保存試料を使用した。

B.2. 試薬

3,4,4'-トリブロモジフェニルエーテル（BDE-37）、2,2',4,4'-、2,3',4,4'-、2,3',4',6-、2,4,4',6-、3,3',4,4'-テトラブロモジフェニルエーテル（BDE-47, 66, 71, 75, 77）、2,2',3,4,4'-、2,2',4,4',5-、2,3',4,4',6-ペンタブロモジフェニルエーテル（BDE-85, 99, 119）、2,2',4,4',5,5'-ヘキサブロモジフェニルエーテル（BDE-153）および 2,3,3',4,4',5,6-ヘプタブロモジフェニルエーテル（BDE-190）は Cambridge Isotope Laboratories 製、2,4,4'-トリブロモジフェニルエーテル（BDE-28）、2,2',4,4',6-ペンタブロモジフェニルエーテル（BDE-100）および

2,2',3,4,4',5'-, 2,2',4,4',5,6'-ヘキサブロモジフェニルエーテル (BDE-138, 154) は Wellington Laboratories 製のものを使用した。4,4'-ジブロモジフェニルエーテル (BDE-28) は東京化成工業 (株) 製, デカブロモジフェニルエーテル (BDE-209) は和光純薬工業 (株) 製のものを使用した。

B. 3. 機器条件

B. 3. 1. GPC 条件

GPC 装置には abc laboratories 製の AS-2000 を用いた。プレカラム および GPC カラムは、各々 Shodex 製 CLN pak EV-G (100 mm x 20 mm ϕ) および CLN pak EV-2000 (300 mm x 20 mm ϕ) を使用した。GPC 移動相にはアセトン/シクロヘキサン (3 : 7) を使用した (流速 5mL/min)。なお、タイムプログラムは dump 15min, collect 13min, wash 12min (total 40min) とした。

B. 3. 2. GC/MS 条件 (NCI)

ガスクロマトグラフは Hewlett Packard 製の HP5890 series II を使用した。分離カラムは J & W Scientific 製の DB-1 (15m x 0.25mm ϕ , 膜厚 0.25 μ m) を使用した。キャリアガスは He (カラムヘッド圧 6psi 定圧) を用い、昇温条件は 140°C (2min) \rightarrow 10°C/min \rightarrow 180°C \rightarrow 3°C/min \rightarrow 220°C \rightarrow 10°C/min \rightarrow 325°C (5min) とした。試料注入はスプリットレス方式 (注入量 2 μ L, パージオフ時間 0-1.5min, 注入口温度 275°C) により行った。

四重極型質量分析計は日本電子 (株) 製のオートマス 120M を使用した。イオン源温度およびトランスファーライン温度は各々 180°C, 250°C とした。反応ガスはイソブタンを使用し、イオン化エネルギーは 70eV とした。

C. 研究結果

これまでに報告されている生物試料中 PBDE 分析法には、分液漏斗を用いる煩雑な濃硫酸処理や有害性の高いジクロロメタンを使用する行程が前処理操作に含まれており、ルーチ

ン分析法としては問題点が多かった。そこで今回、自動化が容易なゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) およびディスポーザブルミニカラムを用いる簡便・迅速な前処理法の開発を試みた。その結果、図 2 に示した前処理法により、GC 分析の妨害となる脂肪成分を効率的に除去することができた。また、4ng/g の濃度で脂肪に PBDE を添加したときの回収率は概ね 70 \cdot 120% (RSD < 10%) の範囲内であった (n=4)。

開発した前処理法を用いて、GC/四重極型 MS (GC/QMS, EI) で食用魚のスクリーニング分析を行った。その結果、全ての検体から湿重量あたり < 0.2-1.5ng/g の BDE-47 が検出された。また、その他幾つかの PBDE 同族体が数試料から定量限界レベルで検出された (表 1)。反応型の臭素系難燃剤であるテトラブロモビスフェノール A についても併せて測定を行ったが、これらの魚試料からは検出されなかった (検出限界 0.05ng/g)。

上述の検討により、現在の魚介類の概ねの PBDE 汚染レベルが明らかとなったが、各試料間の汚染プロファイルを定量的に比較・解析するには感度が不十分であった。そこで試料の濃縮率を高めるとともに、測定機器面からも高感度化を図ることにした。まず、近年幾つか PBDE 分析への応用例が報告されている負化学イオン化法 (NCI) について GC/QMS を用いて検討を行った。その結果、SIM 分析において EI-GC/QMS より約 1 桁高感度であること、実試料分析時においても特に定量の妨害となる夾雑ピークは認められないことが分かった。一方、GC/二重収束型高分解能 MS (GC/HRMS, EI モード) についても予備的な検討を行ったところ、高感度検出が可能であったが、GC/HRMS はコストおよび装置の維持管理の面から (特に生物試料の) 簡易分析には不向きな装置と考えられた。また、マトリックスが異なる種々の実試料の分析において GC/HRMS とほぼ一致した結果が得られたことから、NCI-GC/QMS は十分な選択性を有すると考えられた。以上の結果か

ら、今後の分析には NCI-GC/QMS を使用することにした。

NCI-GC/QMS を用いて食用魚および母乳脂肪について予備的な分析を行った結果を表 2 に、実試料のクロマトグラム例を図 3 に示した。

D. 考察

化学工業日報社の調査データによれば、日本では 1991 年以降、業界の自主規制により TeBDE は使用されていない。しかし今回、1998 年に採取した食用魚から BDE-47 (2,2',4,4'-TeBDE) が相対的に高い濃度で検出された。これらの汚染が、単に過去に環境流出した TeBDE による残留汚染なのか、あるいは現在も進行中の汚染（埋め立て処分された古い樹脂製品からの流出、高臭素化ジフェニルエーテルの脱ブロム化等）なのかは未解明であり、今後、引き続き汚染状況をモニタリングしていく必要がある。

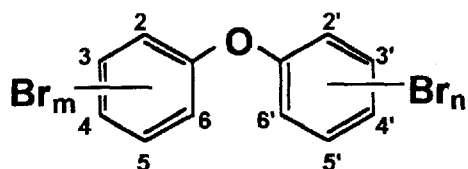
E. 結論

生物試料の PBDE 汚染実態の解明を目的として、GPC および負化学イオン化 GC/MS を用いる簡便・迅速なルーチン分析法を開発した。本法を用いて大阪府下で採取した食用魚および母乳脂肪を予備的に分析したところ、BDE-47 (2,2',4,4'-TeBDE) をはじめとする幾つかの PBDE 同族体が検出された。

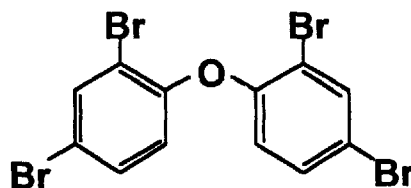
F. 研究業績

学会発表：阿久津和彦，尾花裕孝，起橋雅浩，柿本幸子，堀 伸二郎，「GC/MS によるポリ臭素化ジフェニルエーテルの分析」，日本食品衛生学会第 78 回学術講演会（長野），1999 年 10 月

ポリ臭素化ジフェニルエーテル

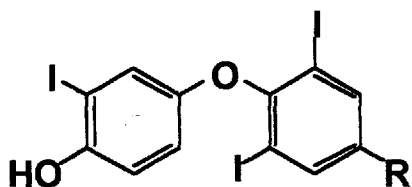


Polybrominated diphenyl ethers (PBDE)
MW: 249.1-959.2 (m+n=1-10)

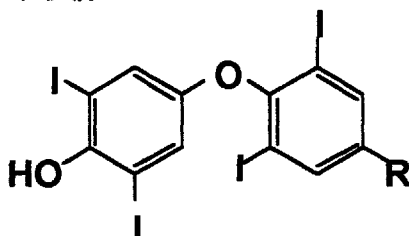


BDE-47 (2,2',4,4'-TeBDE)

甲状腺ホルモン



T3 (L-トリヨードチロニン)



T4 (L-チロキシン)

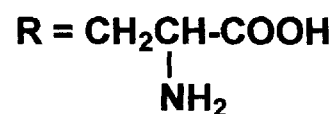


図1 PBDEおよび甲状腺ホルモンの構造式

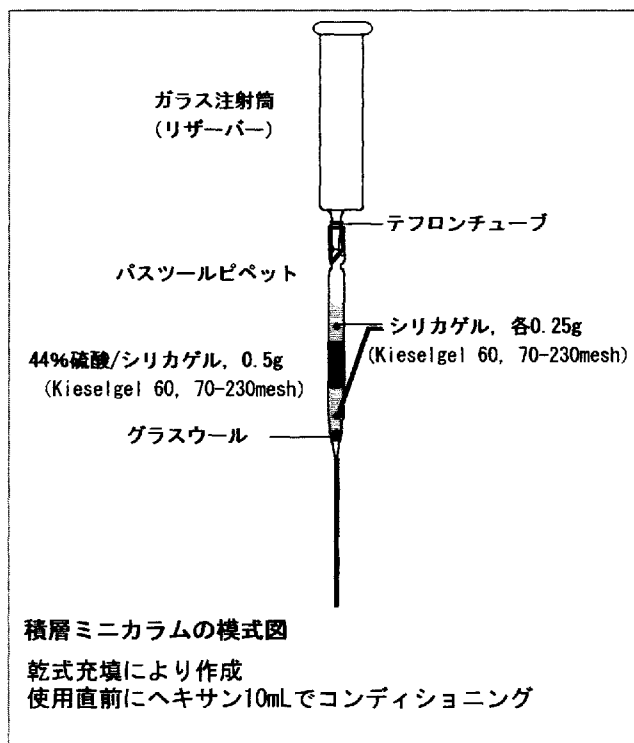
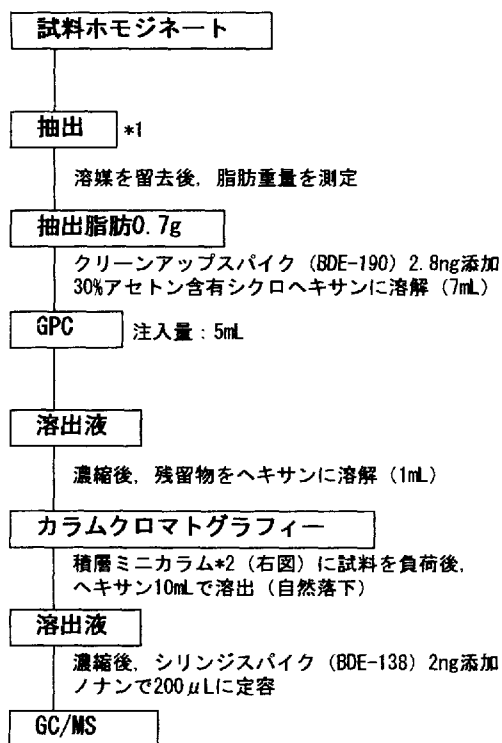


図2 PBDE分析フロー

*1: エーテル/ヘキサン系混合溶媒による振とう抽出等, 脂肪含量の測定が可能な抽出法を用いる。
*2: 高濃度汚染試料の分析等, 用いる脂肪量が少量の場合は市販のシリカカートリッジカラム (メガボンドエリート等) で代用可能。

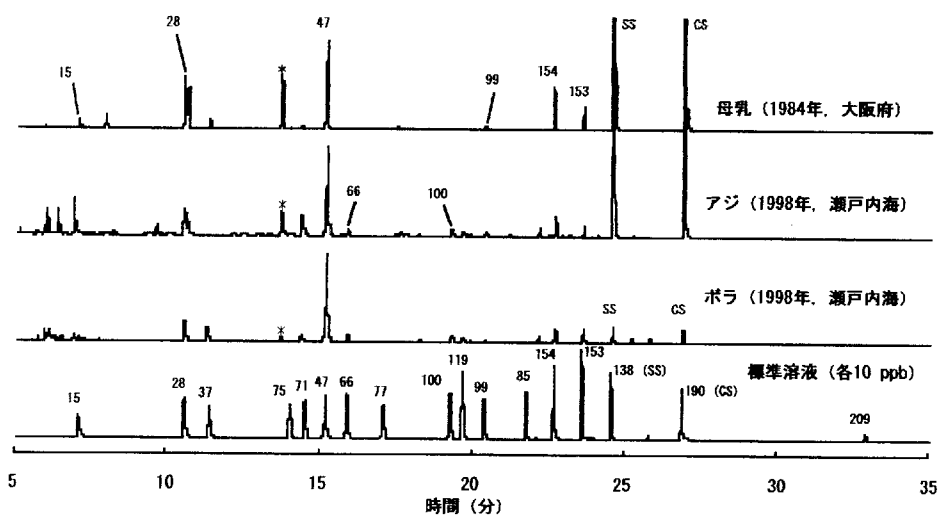


図3 母乳、食用魚およびPBDE標準溶液のSIMクロマトグラム (NCI, m/z=81)

*GPCで使用了シクロヘキサン (和光, HPLC用) に含まれる不純物のピーク

SS: シリンジスパイク, CS: クリーンアップスパイク

表1 魚試料の分析結果 (EI-GC/QMS)

魚種	検体数	濃度 (ng/g, 湿重量あたり)		
		BDE-47	BDE-66	BDE-99
アジ (天然)	3	<0.2-0.26	ND	ND
アナゴ (天然)	3	<0.2-0.22	ND	ND
スズキ (天然)	3	<0.2-0.25	ND	ND
ハマチ (養殖)	3	0.63-1.5	<0.2	ND-0.53
ヒラメ (天然)	1	0.29	ND	ND
ヒラメ (養殖)	3	≤0.20	ND	ND
ボラ (天然)	1	1.4	<0.2	ND
マダイ (天然)	2	<0.2-0.33	ND	ND
マダイ (養殖)	3	0.28-0.29	ND	ND

その他の化合物は検出されず

検出下限値 (ng/g) : BDE-37, 75, 71, 47, 66, 77 (0.05), BDE-119, 99, 85, 153, 190 (0.2), BDE-209 (ECD, 0.05), TBBPA (0.05)

表2 食用魚および母乳の分析結果 (NCI-GC/QMS)

化合物	濃度 (ng/g, 脂肪重量あたり)							
	アジ	スズキ	ハマチ	ボラ	母乳80	母乳84	母乳86	母乳90
BDE-15	ND	ND	ND	1.0	<0.08	<0.08	0.15	0.15
BDE-28	0.17	1.9	ND	8.5	<0.08	0.14	0.18	0.17
BDE-37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-47	1.4	6.0	8.6	38	<0.08	0.32	0.46	0.26
BDE-66	<0.08	0.53	1.3	1.8	ND	ND	<0.08	ND
BDE-77	ND	<0.08	<0.08	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-100	<0.08	0.55	1.6	2.1	ND	ND	ND	<0.08
BDE-119	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-99	<0.08	0.47	3.4	0.61	ND	<0.08	<0.08	<0.08
BDE-85	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-154	0.15	0.65	1.2	2.2	0.082	0.086	0.18	0.18
BDE-153	0.062	0.32	0.55	2.5	<0.04	<0.04	0.061	<0.04
BDE-209	ND	ND	<0.8	ND	ND	ND	ND	ND

ND : BDE-15, 28, 37, 75, 71, 66, 77, 100, 119, 99, 85 (<0.02ng/g), BDE-209 (<0.2ng/g)