

平成 11 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

毛髪及び血液中のトリブチルスズ化合物の分析法に関する研究

主任研究者 牧野恒久（東海大学）

分担研究者 織田 肇（大阪府立公衆衛生研究所）

研究協力者 益川邦彦，藤巻照久，渡邊裕子

（神奈川県衛生研究所）

研究要旨

トリブチルスズ化合物及びその分解代謝物の人体暴露量の調査を目的として、毛髪及び血液を対象とした分析法の検討を行った。内標準物質として安定同位体標識標準品を使用し、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）による選択イオン検出法（SIM）及びガスクロマトグラフ誘導結合プラズマ分析計（GC/ICP-MS）で測定を行った。毛髪及び血液におけるトリブチルスズ化合物（TBT）の添加回収実験（n=6）は、GC/MS の結果からそれぞれ 98%（CV 値 1.9%）、104%（CV 値 10.4%）と良好な結果が得られた。毛髪試料 9 検体（n=2）を測定したところ GC/MS は 3 検体から 0.014 ~ 0.045 μ g/g、GC/ICP-MS は 7 検体から 0.005 ~ 0.042 μ g/g の範囲で TBT を検出した。GC/MS で検出された 3 検体の分析値は GC/ICP-MS の分析値とほぼ一致した。TBT の検出限界（3 σ ）は GC/MS が 0.01 μ g/g、GC/ICP-MS が 0.005 μ g/g であった。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質として注目されているトリブチルスズ化合物（TBT）は船底防汚塗料や漁網防汚剤として長年使用されてきた。近年、法的規制などによって日本近海的环境レベルは横ばいまたは減少傾向にある。しかし、水生生物への毒性が強く、メスの巻き貝の不妊化を引き起こすことがわかっており、海産魚介類をタンパク質源として多く摂取している我が国としてはその人体曝露量の評価が求められている。そこで本研究では、ヒト毛髪及び血液を対象と

し、ヒトの体内に残留するトリブチルスズ化合物及びその分解代謝物の分析法について検討した。

B. 実験方法

B・1 試薬

標準品の塩化トリブチルスズ（TBT）、二塩化ジブチルスズ（DBT）、三塩化ブチルスズ（MBT）及び有機スズ抽出用キレート剤のトロポロンはアルドリッチ社製を用いた。安定同位体標識標準品の塩化トリブチルスズ-d27（TBT-d27）、二塩化ジブ

チルスズ-d18 (DBT-d18)、三塩化ブチルスズ-d9 (MBT-d9) は林純薬工業社製を用い、アルキル化誘導化試薬のテトラエチルホウ酸ナトリウムは Strem 社製を用いた。試料の分解に用いた 25%テトラメチルアンモニウムヒドロキシド水溶液は多摩化学工業社製超高純度分析用試薬を用いた。イソオクタンを除く溶媒は和光純薬製残留農薬用を用いた。その他の試薬は特級の和光純薬製を用いた。Sep-PakPlus フロリジルカートリッジカラム(910mg/cartridge)はウォーターズ社製を用いた。

B・2 装置及び分析条件

GC-MS

装置：Auto Mass 20、HP5890

カラム：DB-5 30m × 0.25mm × 0.25 μ m

注入口：スプリットレス、温度 220 °C

昇温プログラム：50 °C(1min)－20 °C/min－280 °C(10min)

イオン源温度：200 °C

GC/MS インターフェイス部温度：250 °C

サンプル注入量：2 μ L

イオン化：EI

イオン化電圧：70eV

検出方法：選択イオン検出法 (SIM)

モニターイオン：トリブチルエチルスズ (TBT-Et) の $[M-C_2H_5]^+$ である 291 (^{120}Sn) を定量イオンとし、スズの同位体に由来する 289 (^{118}Sn) を参照イオンに用いた。同様にジブチルジエチルスズ (DBT-Et) は 263 を定量イオンとし、261 を参照イオンに用い、ブチルトリエチルスズは 235 を定量イオンとし、233 を参照イオンに用いた。

GC/ICP-MS

装置：HP4500、HP6890

カラム：DB-1 30m × 0.32mm × 0.25 μ m

注入口：パルスドスプリットレス、温度 250 °C

昇温プログラム：55 °C－15 °C/min－100 °C－30 °C/min－300 °C(1.33min)

サンプル注入量：1 μ L

測定質量： ^{120}Sn

B・3 試験溶液調製法

B・3・1 検体試料の前処理

毛髪約 3g をエタノールで 1 分間超音波で 3 回洗浄後、イオン交換水で 3 回、超音波で洗浄した。洗浄した毛髪は、乾燥後 3～5mm に細切し、さらに 15 時間乾燥後、秤量し、試験試料とした。血液は、採血後ヘパリンを 2% 添加し、凍結保存した。分析時に解凍し、均一化した試料を秤量し、試験試料とした。

B・3・2 試験溶液の調製

試料 0.2g に内標準物質として安定同位体標識標準品を 0.1 μ g 添加し、25%テトラメチルアンモニウムヒドロキシド水溶液 5ml でアルカリ分解後、酢酸 1.5ml 及び塩酸 2.0ml を加え酸性とした。これに 10%塩化ナトリウム水溶液 40mL を加え、0.01% トロポロンーベンゼン溶液 20ml を加えた後、振り混ぜ上層を分取し、この操作を繰り返しベンゼン溶液 40mL を減圧濃縮した。濃縮液をイソオクタン 5ml に溶解後、0.5M 酢酸緩衝液 (pH5.3) 10ml 及び 1.0% テトラエチルホウ酸ナトリウム水溶液 0.5ml を加えて激しく振とうし、エチル化後上層を分取した。塩化ナトリウム 3g を加え、イソオクタンで 2 回抽出した。これを減圧濃縮して 1mL の n-ヘキサンに溶解し、Sep-Pak Plus フロリジルカラムに負荷し、n-ヘキサン 10ml で溶出した。減圧濃縮後 n-ヘキサンにて試験溶液 0.2ml

とした。

C. 研究結果

C・1 定量法及び検量線

GC/MS(SIM)及び GC/ICP-MS で測定した。検量線は、安定同位体標識標準品を用いた内標準法によった。TBT、DBT 及び MBT の各濃度 0.01、0.05、0.1、0.5 μ g/mL でほぼ原点を通る直線性($r \geq 0.999$)が得られた。GC/MS の検出限界(3σ)は、0.01 μ g/mL (TBT、DBT) 及び 0.07 μ g/mL (MBT) であった。GC/ICP-MS の検出限界(3σ)は、0.005 μ g/mL (TBT) であった。

C・2 毛髪及び血液(全血)の添加回収実験

添加回収実験には 48 才、男性の毛髪及び血液を用い、GC/MS を使用した。試薬ブランク、毛髪及び血液を分析した ($n=4$) ところ TBT は、いずれも不検出であった。試料量 0.2g に対して 0.1 μ g の添加回収実験 ($n=6$) の結果、TBT は毛髪、血液でそれぞれ回収率 98% (CV 値 1.9%)、104% (CV 値 10.4%) と良好な結果が得られた。

一方、DBT 及び MBT については反応試薬に由来すると思われるブランク値 ($n=4$) がそれぞれ 0.07 μ g/mL (CV 値 4.2%)、0.24 μ g/mL (CV 値 10.2%) 認められた。毛髪では DBT、MBT がそれぞれ 0.14 μ g/g (CV 値 13.5%)、0.78 μ g/g (CV 値 3.1%) 認められ、血液では DBT、MBT がそれぞれ 0.06 μ g/g (CV 値 10.0%)、0.33 μ g/g (CV 値 11.7%) が認められた ($n=4$)。TBT と同様に DBT、MBT の添加回収実験 ($n=6$) の結果は、毛髪が 70% (CV 値 14.7%)、132% (CV 値 9.4%) であり、血液が 84% (CV 値 6.6%)、92% (CV 値 9.8%) であった

(Table 1)。

C・3 毛髪試料中の分析結果

毛髪試料 9 検体 ($n=2$) について GC/MS (SIM) 及び GC/ICP-MS で TBT を測定した。GC/MS で 9 検体中 3 検体から 0.014 ~ 0.045 μ g/g、GC/ICP-MS で 9 検体中 7 検体から 0.005 ~ 0.042 μ g/g の範囲で TBT を検出した (Table 2)。GC-MS と GC/ICP-MS の分析値は、概ね一致した。また、分析値の高い 50 才代の男性と 20 才代の女性は家族であった。

D. 考察

試薬ブランク値については、誘導体化試薬であるテトラエチルホウ酸ナトリウムを 5%水溶液とした後、0.20 μ m のフィルターでろ過し、*n*-ヘキサンで 3 回、洗浄することにより、約 10 ~ 20%程度低減できるため、反応試薬に由来するものと考えられる。

TBT については毛髪及び血液の添加回収実験で回収率、CV 値ともに良好な結果が得られた。毛髪試料を GC/MS 及び GC/ICP-MS で測定したところ検出感度の違いにより検出率が異なっているが GC/MS で約 30%、GC/ICP-MS で約 70%の検出率が得られた。従って、生体内に取り込まれた TBT の一部は毛髪に移行するものと考えられる。

GC-MS で検出された分析値は、GC/ICP-MS とほぼ同じ結果となり、両分析装置を用いることにより精度の高い分析が可能であることがわかった。

E. 結論

ブチルスズ化合物の人体暴露量の調査を

目的として、毛髪及び血液を対象とした分析法の検討を行った。TBT については内標準物質として安定同位体標識標準品を使用し、GC/MS と GC/ICP-MS を用いた精度の高い分析法の開発を行うことができた。

TBT の分解代謝物である DBT 及び MBT の分析については今後さらに検討を要する。

F. 研究業績

藤巻照久、益川邦彦、田尾博明、本橋清乃、牧野恒久、吉村吉博、中澤裕之、GC/MS 及び GC/ICP-MS によるヒト毛髪及び血液中の有機スズ化合物の分析、日本薬学会第 120 年会、要旨集 4、p.178、2000 年

Table 1 Results of spike recovery experiments for human hair and blood

| Sample | Spiked ($\mu\text{g/g}$) | TBT | | | DBT | | | MBT | | | |
|---------------|----------------------------|---------------------------|--------------|--------|---------------------------|--------------|--------|---------------------------|--------------|--------|------|
| | | Found ($\mu\text{g/g}$) | Recovery (%) | CV (%) | Found ($\mu\text{g/g}$) | Recovery (%) | CV (%) | Found ($\mu\text{g/g}$) | Recovery (%) | CV (%) | |
| Reagent blank | — | ND | — | — | 0.07 | — | — | 4.2 | 0.24 | — | 10.2 |
| Hair | — | ND | — | — | 0.14 | — | — | 13.5 | 0.78 | — | 3.1 |
| | 0.5 | 0.49 | 98 | 1.9 | 0.49 | 70 | 14.7 | 1.44 | 132 | 9.4 | |
| Blood | — | ND | — | — | 0.06 | — | — | 10 | 0.33 | — | 11.7 |
| | 0.5 | 0.52 | 104 | 10.4 | 0.48 | 84 | 6.6 | 0.79 | 92 | 9.8 | |

Sample amount : 0.2g Spiked amount : 0.1 μg
 Reagent blank, hair, blood n=4 Spiked hair, spiked blood n=6
 TBT: Tributyltin chloride DBT: Dibutyltin dichloride MBT: Butyltin trichloride
 Method detection limits (3σ of blank values): 0.01 $\mu\text{g/g}$ (TBT,DBT), 0.07 $\mu\text{g/g}$ (MBT)

Table 2 Concentration of tributyltin compound in human hair

| No. | Sex | Age | Tributyltin compound (μ g/g) | |
|-----|-----|-----|-----------------------------------|-----------|
| | | | GC-MS | GC/ICP-MS |
| 1 | M | 10 | ND | 0.007 |
| 2 | M | 20 | ND | 0.005 |
| 3 | M | 50 | ND | ND |
| 4 | M | 50 | 0.044 | 0.041 |
| 5 | F | 20 | ND | 0.007 |
| 6 | F | 20 | 0.045 | 0.042 |
| 7 | F | 20 | 0.014 | 0.012 |
| 8 | F | 30 | ND | 0.007 |
| 9 | F | 40 | ND | ND |

Sample amount : 0.2g Injection volume GC-MS : 2 μ L , GC/ICP-MS : 1 μ L
 Number of analyses : 2 M : male F : female
 Tributyltin compound : as tributyltin chloride(TBTCl)
 GC-MS Ions measured for quantitation : TBT-Et ; 291(289), TBT-d₂₇-Et ; 318(316)
 GC/ICP-MS measured mass : ¹²⁰Sn
 Method detection limits (3 σ of blank values) : GC-MS ; 0.01 μ g/g, GC/ICP-MS ; 0.005 μ g/g