

平成 1 5 年 度
内分泌攪乱化学物質のヒトへの健康影響調査
研 究 報 告 書

平成 1 6 年 3 月

財団法人日本公衆衛生協会

目 次

目 的	(1)
研究班名簿	(1)
1．内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)のヒト妊孕性ならびに ヒト胎児，先天異常に及ぼす影響に関する研究	1
研究要旨	1
研究者協力者	1
A．研究目的	1
B．研究方法	2
C．結果	2
D．考察	4
2．ヒト生体試料中の内分泌かく乱化学物質等の測定	7
研究要旨	7
研究協力者	7
A．研究目的	7
B．研究方法	8
C．研究結果	10
D．考察	11
E．結論	12
F．引用文献	12

目 的

本研究は、内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）が内分泌機構を攪乱することにより、ヒトの生殖影響、先天異常発生、疾病の誘因などに関与している可能性が指摘されていることから、環境中の化学物質との関連性を明らかにすることを目的とする。

研究班名簿

ヒト先天異常発生等調査

検討委員

（１）内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）のヒト生殖・妊孕性ならびに母児に及ぼす影響に関する研究

住吉 好雄	神奈川県労働衛生福祉協会理事、産婦人科部長、 横浜市立大学先天異常モニタリングセンター客員教授
平原 史樹	横浜市立大学医学部産婦人科学教授
森 千里	千葉大学大学院医学研究院教授
中館 俊夫	昭和大学医学部衛生学教授

（２）ヒト生体試料中の内分泌攪乱化学物質等の測定

岩本 晃明	聖マリアンナ医科大学泌尿器科学教授
中澤 裕之	星薬科大学教授

研究協力者

（１）内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）のヒト生殖・妊孕性ならびに母児に及ぼす影響に関する研究

高橋 恒男	横浜市大市民総合医療センター母子医療センター部長 横浜市立大学医学部産婦人科学助教授
山中美智子	神奈川県立こども医療センター周産期科部長 横浜市立大学医学部産婦人科学講師（非常勤）
遠藤 方哉	横浜市立大学医学部産婦人科学講師
石川 浩史	横浜市大市民総合医療センター 横浜市立大学医学部産婦人科学講師
森 千里	千葉大学大学院医学研究院教授

（２）ヒト生体試料中の内分泌攪乱化学物質等の測定

中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教授
野澤資亜利	聖マリアンナ医科大学泌尿器科学教授助手
井之上浩一	星薬科大学薬品分析化学助手
伊藤 里恵	星薬科大学薬品分析化学教室助手

1. 内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）のヒト妊孕性ならびにヒト胎児，先天異常に及ぼす影響に関する研究

研究班主任 住吉好雄（横浜市立大学医学部客員教授）
研究担当者 平原史樹（横浜市立大学産婦人科教授）

【研究要旨】

本邦の女性、妊娠女性ならびに新生児における内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の存在につき検討を試みるため、妊娠女性，ならびに臍帯血の血中内分泌攪乱化学物質（ビスフェノールA）の測定をおこない，また対照として非妊娠女性の血中内分泌攪乱化学物質（ビスフェノールA）検出を試み解析してきたがいずれの臍帯血中のビスフェノールA濃度も母体ビスフェノールAに比し高値を示す一方，非妊娠女性のビスフェノールA値は，妊娠女性に比し高値を示す傾向のあることが判明した．

本研究では，これらの全標本の測定値を評価対象として標準化するために測定時期が分散して評価されたサンプル測定法のバリデーションを行うとともに，全サンプルの由来個体の個人特性の医学的，生物学的背景の調査を行うこととした．

【研究協力者】

高橋 恒男	横浜市立大学市民総合医療センター母子医療センター部長 横浜市立大学医学部産婦人科学助教授
山中美智子	神奈川県立こども医療センター周産期科科長 横浜市立大学医学部産婦人科学講師（非常勤）
遠藤 方哉	横浜市立大学産婦人科助手
石川 浩史	横浜市立大学市民総合医療センター母子医療センター助手 横浜市立大学医学部産婦人科学講師
森 千里	千葉大学大学院医学研究院教授

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）が内分泌機構を攪乱することにより、ヒトの生殖機能、先天異常発生、疾病の誘因などに関与している可能性が指摘されている．そこで本邦の女性、妊娠女性ならびに新生児における内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の存在につき検討を試みるため，妊娠女性，ならびに臍帯血の血中内分泌攪乱化学物質（ビスフェノールA）の測定をおこない．また対照として非妊娠女性の血中内分泌攪乱化学物質（ビスフェノールA）検出を試み解析してきたがいずれの臍帯血中のビスフェノールA濃度も母体ビスフェノールAに比し高値を示す一方、非妊娠女性のビスフェノールA値は、妊娠女性に比し高値を示す傾向のあることが指摘されており．本研究では、これらの全標本の測定値を評価対象として標準化するために測定時期が分散して評価されたサンプル測定法のバリデーションを行うとともに，これらの由来サンプルのうち判明し得る個人特性の医学的，生物学的背景の調査をおこなうこととした．

B. 研究方法

妊娠女性血中ビスフェノールA値が測定された検体の由来となった1女性の臨床的情報を診療録，調査票等から収集しデータベース化する．また分娩児臍帯血中ビスフェノールA値が測定された検体の由来となった児の臨床的情報を診療録，調査票等から収集し，データベース化を試みる

測定データの検討

これらの全標本の測定値を評価対象として標準化するために測定時期が分散して評価されたサンプル測定法の精度を再検討し，精度管理上の再確認のため，すでに採取された検体の一部を用いて測定の再検討を行うこととする．

日本産婦人科医会において進められている全国規模の先天異常モニタリング調査システムを用いてその推移の検討をおこない分析する．

測定症例における妊娠歴，出産状況（新生児所見を含む），病歴，生活歴，食生活歴，などと，すでに得られたビスフェノールA測定値との関連性の分析に着手する．本年度はこれらのデータの診療情報からの情報収集、入力に着手し，検討を開始する

C. 結果

妊娠女性，ならびに臍帯血の血中内分泌攪乱化学物質（ビスフェノールA）の測定をおこない，また対照として非妊娠女性の血中内分泌攪乱化学物質（ビスフェノールA）検出を試み解析してきたがいずれの臍帯血中のビスフェノールA濃度も母体ビスフェノールAに比し高値を示す一方、非妊娠女性のビスフェノールA値は，妊娠女性に比し高値を示す傾向のあることが判明した．

（1）妊娠女性，臍帯血，非妊娠女性の比較（図参照）

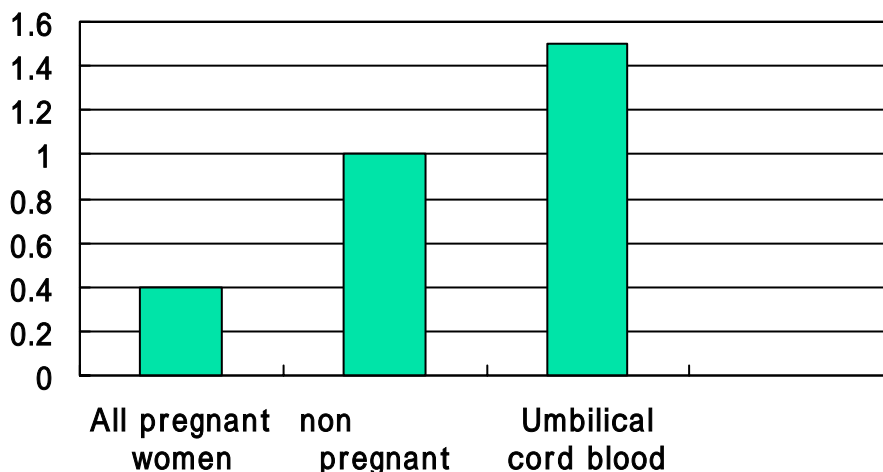
非妊娠女性のビスフェノールA測定値平均値を1.0とした場合の比較値

1. 妊娠女性血中ビスフェノールA値0.40（n=3135）

2. 分娩児臍帯血中ビスフェノールA値1.50（n=792）

妊娠女性血中ビスフェノールA値，分娩児臍帯血中ビスフェノールA値の間における有意差を認めた．（ $p < 0.0001$ ）

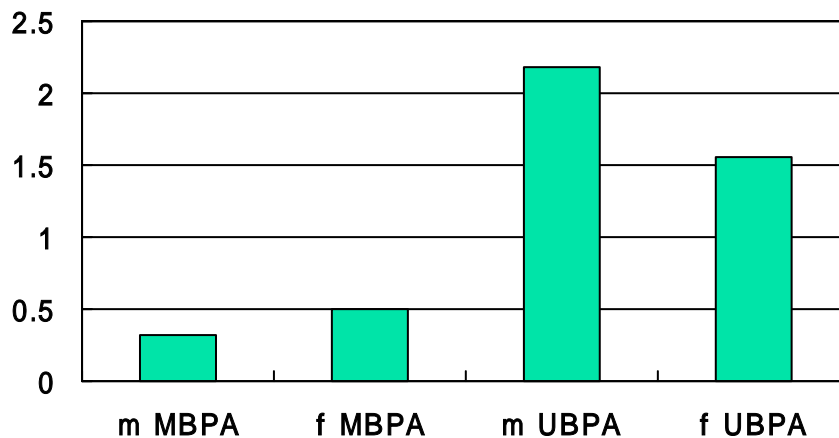
3. 対照非妊娠女性血中ビスフェノールA値1.00（n=49）



(2) 出産児別ビスフェノールA値 (図参照)

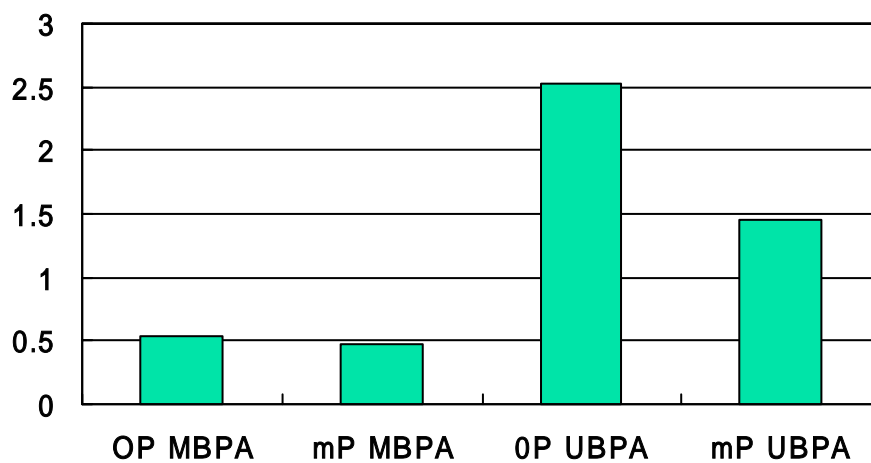
非妊娠女性のビスフェノールA測定値平均値を 1 . 0 とした場合の比較値

男児出産母体血液測定値	0 . 5 2	n =	4 4 1
女児出産母体血液測定値	0 . 5 0	n =	3 7 4
男児臍帯血液測定値	2 . 1 8	n =	1 4 2
女児臍帯血液測定値	1 . 5 6	n =	1 2 6



(3) 出産状況別ビスフェノールA (図参照)

初産母体血液測定値	0 . 5 4	n =	2 3 6
経産母体 (2-4回経産)	0 . 4 7	n =	1 0 1
初産臍帯血液測定値	2 . 5 3	n =	7 5
経産臍帯血液測定値	1 . 4 6	n =	3 5



(4) データベース化

測定対象となった3135例の由来となった女性の個々の医学的背景をデータベース化するために、妊娠歴、分娩歴・児情報、既往歴、生活歴、健康障害等の入力を行った。すでに全データの入力が完了した例は800件である。さらにデータベース測定法の標準化の後、ビスフェノールAの測定値、推移等との関連を調査するためのデータベースとした。

(5) 全検体測定値の標準化のための検討

測定された3135検体のうち、保存されていた検体のなかから約30検体をHPLC用にプーリングしてELISA法とHPLC法を対比して試行したところ、HPLCにおいて、すべて検出困難との結果が得られた。

(6) 先天異常の発生推移

2002年1月から12月までの間にモニタリングされた出産児数89,255例における調査からは、先天異常児出産頻度は1.77%であり、心室中隔欠損が最も多く、ついで口唇・口蓋裂、耳介低位、ダウン症候群、動脈管開存、水頭症、心房中隔欠損等が高頻度発生異常であった。また、2002年1年間の本邦における尿道下裂児の発生率は出産児1,0000 対 4.5と前年4.8、2000年の3.0に比し増加傾向が継続していることが判明した。

D. 考察

内外の報告から、内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)が内分泌機構を攪乱することにより、ヒトの生殖機能、先天異常発生、疾病の誘因などに関与している可能性が指摘されている。形態的・機能的異常(先天異常)は出生時点で全新生児の約5~6%に存在するといわれており、出生直後にわかる大きな形態形成異常だけをとっても約1-2%にみられる。これらの先天性の形態形成異常のうち、約1/4~1/5は遺伝的背景をもって発生するといわれ、5~10%は妊娠中の環境因子によるものとされている。

一般に、胎生(妊娠4~12週)の間は次々と各種の器官が形成されていく重要な時期があり、この時期に病原体、外的(環境)因子、薬剤などの先天異常発生要因が有意に影響すると、胎児に形態形成異常を来すとされている。

1972年より日本産婦人科医会(旧日母)が、日本では唯一の全国レベルでの先天異常モニタリング調査を開始し、現在、その集計・分析は横浜市立大学医学部産婦人科に設けられた、国際先天異常モニタリングセンターでおこなわれている。

この全国約330分娩施設(大学病院、基幹地区病院、個人病院等の各層別、地域別に選ばれた)の協力による病院ベースのモニタリング調査では、現在、対象を妊娠満22週以後、生後7日以内にみられた先天性形態形成異常としており、本邦の全出産児の約10%(毎年約10万出産児)を常時モニターし、その分析をおこなっている。日本産婦人科医会の先天異常調査からは、近年、諸外国の報告等から内分泌攪乱化学物質との関与も疑われている尿道下裂は増加し、1975年1万出産あたり1.4、1985年2.8、1998年3.5、さらには、2000年3.0、2001年4.8、2002年4.5と継続的に増加傾向を示している。

こうした、サーベイランスの研究から、我々は、本学倫理委員会承認の下、現在妊娠中の女性に同意を得、妊娠初期および、分娩時母体血、ならびに臍帯血を採取し、内分泌攪乱化学物質のなかでも生活環境のなかにも多く存在するビスフェノールAを測定する研究

を行ってきた。

測定の完了した検体の分析結果からは、ビスフェノールA臍帯血においては、母体よりも有意に高値を示していることが判明し、一方、非妊娠女性の測定値と比較すると、妊娠女性のビスフェノールA値は低値であった。妊娠中のビスフェノールA値の推移については、大きな変動はみられなかったことから、妊娠初期より低値の傾向を示すことが示唆された。今後、産褥期、産後にわたり、ビスフェノールA値のフォローを行って、その推移を観察することも重要と考えられた。また、本測定が、長期にわたりまた、多数の検体を、時期を分けて別途に測定してきたことから、これらのデータの統一性を確認し、標準化するためにもサンプル測定法のバリデーションを再度検討するとともに、全サンプルの由来個体の個人特性の医学的、生物学的背景の調査を開始した。集積されたサンプルは3000検体を超えるが、いずれも、妊娠中の女性から同意を得て、検査採血された折の余剰サンプルとして蓄積されたものであり、量的には僅少な検体である。よって、バリデーションを、約30検体をHPLC用にブリーディングして試行したものの、検出が困難であった。したがって、測定法のバリデーションに際して、これまで収集したサンプルを用いることは困難であると考えられた。今回はHPLC法についてバリデーションを行ったが、今後はELISA法について、HPLC法との比較等のバリデーションを行う必要がある。その際は、非妊娠時健常人のサンプルを用いてバリデーションを行うことが望ましい。測定法のバリデーションを実施した後、これまでの研究結果について再評価を行うべきである。

いずれにせよ、現代の環境をとりまく多種多様な因子はいつどのような形で先天異常発生要因因子として影響を与えることになるか常に万全の監視体制を整えることが重要である。先天異常モニタリング、さらにはサーベイランスを行い、常に内分泌攪乱化学物質をふくめた環境因子には注視して今後も環境疫学的視点からの厳重な監視を行うこととしたい。

業績報告

Yamanaka M, Hirahara F, Sumiyoshi Y, Suzuki K, Matsumoto H, Kogure M, Asakura H, Tanaka M, Ohmura H, Kiyokawa T, Sakamoto S: The trend of NTDs in Japan and the efficacy of folic acid campaign. *Reprod Toxcol*, **17**: 128, 2003.

Ogasawara T, Sumiyoshi Y, Yamanaka M, Haruki A, Endoh M, Ishikawa H, Andoh N, Takahashi T, Hirahara F: Fetal exposure to endocrine disruptors during pregnancy in Japan. *Journal of Perinatal Medicine*, **31**(Suppl.): 258, 2003.

Segino M, Ikeda M, Aoki S, Tokieda Y, Hirahara F, Sato K: In vitro culture of mouse GV oocytes and preantral follicles isolated from ovarian tissues cryopreserved by vitrification. *Human Cell*, **16**:109-116, 2003.

Natsume N, Sumiyoshi Y, Hirahara F, et.al: Attempt for prevention of cleft lip and palate in Japan. *Dentistry in Japan*, **39**: 194-198, 2003.

大関はるか, 石川浩史, 春木篤, 平原史樹, 安藤紀子, 高橋恒男: 周郭胎盤の5例. *日産婦神奈川会誌*, **39**: 107-112, 2003.

平原史樹: 産婦人科臨床における遺伝カウンセリング. *日産婦医会報*, **3**: 10-11, 2003.

平原史樹: サリドマイドの再登場で教えられること. *ペリネイタルケア*, **22**: 281, 2003.

平原史樹，住吉好雄，山中美智子，朝倉啓文，佐々木繁，坂元正一：先天異常モニタリング．周産期医学，**33**：1071-1076，2003．

平原史樹：先天異常と内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）．産婦人科の実際，**52**：2281-2287，2003．

2. ヒト生体試料中の内分泌かく乱化学物質等の測定

研究者 岩本 晃明 (聖マリアンナ医科大学泌尿器科学教授)

【研究要旨】

ヒト生体試料(血液、精漿、尿等)に存在する内分泌かく乱化学物質等(高分子由来合成化学物質、植物由来天然化学物質)を高感度かつ高精度に測定できる新たな理化学的分析手法を構築した。開発した方法を用いて、男性生殖機能の疫学調査で得られた、日本人正常男性の血液・精漿中の化学物質等の暴露状況を明らかにすることを最終的な目標として、本年度は信頼性あるデータを取得するための基礎的研究を実施した。共同研究者の中澤らは、これまでに液体クロマトグラフ法(LC)、ガスクロマトグラフ法(GC)、質量分析法(MS)等の機器分析法を駆使して、ヒト生体試料に対する高分子由来内分泌かく乱作用の疑われる化学物質の分析法を考案してきた。その実績を踏まえて、今年度は少量の生体試料を用いた高精度かつハイスループットな測定系を構築した。各化合物に対して、測定法として、液体クロマトグラフ質量分析法(LC-MSもしくはLC-MS/MS)による多成分一斉分析を検討した。測定対象物質のイオン化には、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)を採用し、内標準法による定量を実施することとした。また、測定環境下からのコンタミネーションも十分に考慮して、その排除やバックグラウンドモニタリングを実施し、構築した分析法のバリディーションを検討した。また、暴露指標となるバイオマーカーとしては、測定対象物質の代謝物を考慮することとした。

【研究協力者】

中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教授
野澤資亜利	聖マリアンナ医科大学泌尿器科学教授助手
井之上浩一	星薬科大学薬品分析化学助手
伊藤 里恵	星薬科大学薬品分析化学教室助手

A. 研究目的

我々は数多くの化学物質に囲まれて生活している。環境中に存在する化学物質の多くは、安全性が確認され、健康に悪影響のないものという認識で使用されているが、いわゆる内分泌かく乱化学物質や単独では安全でも複合的な暴露あるいは体内に蓄積されて初めて悪影響が表れるような化学物質は、その生体影響が容易には検出されにくいレベルで進行している可能性がある。しかしながら、一般の健康人がこれらの化学物質にどの程度暴露されているかについての確かな情報はまだ殆ど得られていない。しかも日常的に広く利用されている高分子由来合成化学物質、植物由来天然化学物質等の内分泌かく乱化学物質の高感度かつ高精度に測定できる解析法がなかったこと、そしてヒト試料は分析に供する量に限りがあり、微量で測定出来る系の開発が望まれていた。

そこで、本研究では中澤グループが解析法の開発と測定法の確立を目指し、上記化学物質について日本人正常男性生殖機能の疫学調査で得られた血液・精漿における暴露状況を明らかにすること、そして岩本グループは内分泌かく乱化学物質の濃度と精液所見等の臨床科学的データとの比較によってそれらの化学物質の男性生殖機能への健康影響の有無について検討することを目的とする。

本年度に関する検討して、下記の具体的な項目を検討した。

- (1) ヒト血液中有機フッ素系化合物の新規高感度かつ高精度な分析法の開発及びその応用
- (2) LC-MS/MS 法によるビスフェノール A (BPA) 分析の基礎的検討

B. 研究方法

(1) ヒト生体試料について

申請者らが過去に実施した健康な日本人男性生殖機能の疫学調査によって得られ、凍結保存されている試料(血清、精漿、尿等)を用いる。平成 15 年度までに、妊孕能を有する男性約 1100 名、若年男性約 1500 名および若年男性で各人年間 4-12 回採取した約 800 名、合計 3000 名以上から得られた試料が使用可能となる。本研究ではその試料の一部を用いる。

なお疫学調査は実施機関の各倫理委員会の承認を得て、疫学研究における倫理指針に基づいて実施された。疫学調査に参加するボランティアに対しては、研究の趣旨および試料の使用目的、個人情報の保護等について十分に説明し、文書による同意を得た。本研究によって得られる化学物質の測定データ等についても個人情報として厳重に管理される。

(2) ヒト血液中有機フッ素系化合物の新規高感度・高精度な分析法の開発及びその応用

試薬

PFOS (Perfluorooctane sulfonate, M.W. 538.23, 98%) : 和光純薬社製

PFOA (Perfluorooctanoate, M.W. 414.07, >90%) : Fluka 社製

PFOSA (Perfluorooctane sulfonylamide, M.W. 199.14, 97%) : ABCR GmbH & Co.KG 社製
Internal Standard for PFOS, PFOA and PFOSA (IS) Perfluorodecanoic acid : Lancaster 社製

アセトニトリル : 和光純薬社製 HPLC 用及び残留農薬用 300

メタノール : 和光純薬社製 HPLC 用及び残留農薬用 300

酢酸アンモニウム : 和光純薬社製 特級

精製水 : Millipore 社製 EDS Polisher 付 Milli-Q gradient A10 で精製

オンライン固相抽出 LC-MS 法の測定概要

血液試料(血清・血漿)は内標準物質を添加したアセトニトリルで除タンパクし、遠心分離(3000 rpm、15 min)した上清をメンブランフィルター(0.45 μm)でろ過して測定用試料とする。抽出精製及び濃縮操作は、オンライン前処理固相抽出カートリッジを用いて行い、カラムスイッチング後、分析対象物質を分離部及び検出部(LC/MS)に導入する。検出には、ESI-MS による SIM ネガティブモードで測定を実施した。

測定条件

LC-MS 条件 (Agilent 1100 LC/MSD SL)

LC 条件

- ・ 分析用カラム : GLサイエンス社製 Inertsil C₈ (2.1 x 100 mm、5 μm)
- ・ 前処理用カラム : OASIS HLB (2.1 x 20 mm、25 μm)
- ・ 移動相 : アセトニトリル + 1.0 mM 酢酸アンモニウム / 1.0 mM 酢酸アンモニウム溶液 (65 : 35 85 : 15 v/v、5 - 15 分)
- ・ 流速 : 0.2 mL/min
- ・ カラム温度 : 40

- ・ 注入量： 30 μ L

MS 条件

- ・ イオン化法： Electrospray (ESI) Negative
- ・ Nebulizer gas： N_2 (35 psi)
- ・ Drying gas： N_2 (12 L/min、350)
- ・ フラグメンター電圧： 220 V (PFOS)、 130 V (PFOA)、 170 V (PFOSA)、 130 V (PFDA)
- ・ モニタリングイオン (m/z): PFOS [M-K]⁻: 499、PFOA [M-COOH]⁻: 369、PFOSA [M-H]⁻: 498、PFDA [M-COOH]⁻: 469

(3) LC-MS/MS 法によるビスフェノール A (BPA) 分析の基礎的検討

試薬

- ビスフェノール A (BPA)： 関東化学社製環境分析用
- ビスフェノール A- $^{13}C_3$ ($^{13}C_3$ -BPA)： 林純薬社製
- アセトニトリル： 関東化学社製 LC-MS 用
- 酢酸アンモニウム： 和光純薬社製特級
- 精製水： Millipore 社製 EDS Polisher 付 Milli-Q gradient A10 で精製
 - グルクロニダーゼ： アルドリッチ社製
- サルファターゼ： アルドリッチ社製

分析概要

ヒト生体試料 (尿) について、抱合体化合物を加水分解するための最適酵素反応条件を検討し、固相抽出法により BPA の濃縮・精製を実施する。その後、LC-MS/MS による測定を行う。

測定

LC-MS/MS 条件 (Waters Alliance HT2795/Micromass Quattro micro system)

LC 条件

- 注入量： 20 μ L
- カラム： A YMC-Pack Pro C18 column (35 x 2.0 mm: particle size、 3 μ m)
- カラム温度： 40 $^{\circ}C$
- 移動相： 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 / アセトニトリル (80 : 20 5 分 15 : 85、v/v)
- 流速： 0.2 mL/min

MS/MS 条件

- イオン化： ESI Negative mode
- 窒素ガス流量： 350 L/hr (Desolvation) \ 50 L/hr (Cone)
- イオン源温度： 350 (Desolvation) \ 100 (Source)
- Cone 電圧： 40 V
- Collision 電圧： 24 V
- モニタリングイオン： BPA (m/z 227 133【定量】、 212【定性】)、 $^{13}C_3$ -BPA (m/z 230 136)

固相抽出法

- カートリッジ： OASIS MAX (1 mL/30 mg) Waters 社製
- コンディショニング： メタノール (1 mL) / 0.1%炭酸水素ナトリウム水溶液 (1 mL)
- サンプル： 尿 (3mL) 0.1%炭酸水素ナトリウム水溶液 (2 mL) 添加

洗浄：0.1%炭酸水素ナトリウム水溶液（1 mL）

溶出：メタノール（2 mL）

最終溶液：濃縮乾固 再溶解（メタノール/水，50：50（v/v）、0.3 mL）

C. 研究結果

（1）ヒト血液中有機フッ素系化合物の新規高感度・高精度な分析法の開発及びその応用分析法の検討及び最適条件

MS での検出において、最も重要なイオン化について、その最適条件検討を実施した。PFOS のイオン化について、APPI による検出報告例があるが汎用性に欠け、その他の化合物について安定なイオンを検出することが困難と予想された。そこで、様々な化学物質に応用されている ESI を用いて検討することとした。図 1 に分析対象物質のマススペクトルを示す。この結果より、SIM モニタリングイオンは、(m/z): 499 (PFOS)、369 (PFOA)、498 (PFOSA)、469 (PFDA)とした。また、移動相（図 2）及びフラグメント電圧の条件検討（図 3）を行い、最適分析条件を設定した。LC-MS の分析条件を上記のように設定した。その後、オンライン抽出法の適用を検討した。システム装置を図 4 に示す。血漿試料に標準溶液を添加後、その回収率を求めた結果、80%以上（RSD < 5.5%，n=6）と良好な結果を得た（表 1）。また、添加回収実験におけるクロマトグラフを図 5 に示す。更にブランク試験及び日内変動に関する結果を図 6 及び 7 に示す。

健常人男性における分析結果

健常人男性における血清及び精漿ペア（n=50）の分析結果を表 2 に示す。その結果、血清中 PFOS の検出率は 100%であり、濃度範囲は 9.9～40.3 ng/mL（中央値 16.2 ng/mL）であった。また、精漿においては、検出率 82%及び検出範囲は ND～0.6 ng/mL（中央値 0.18 ng/mL）であった。一方、その他の化合物については、PFOA で血清中濃度として、検出率 22%（ND～3.3 ng/mL）であったが、PFOSA はすべて検出限界以下であった。本結果をもとに各種臨床データとの関連を図 8 に示す。

また、上記の検体とは異なる健常人男性において、一年間に 4 回採血した検体を用いた分析した結果を図 9 に示す。

（2）LC-MS/MS 法によるビスフェノール A（BPA）分析の基礎的検討

ESI-MS/MS によるマススペクトルを Infusion により、検出した（図 10）。その結果、 m/z 227 133 及び m/z 227 212 を検出することができ、夫々を定量及び定性イオンとした。また、 $^{13}\text{C}_3$ -BPA に関しては、内標準物質として利用するため、定量イオン（ m/z 230 136）のみをモニタリングした。更に逆相系 ODS カラムを用いて、分離分析した結果、検出限界 0.8 ng/mL（S/N=4.9）となった。

ヒト生体試料中に存在する BPA を測定する際、濃縮及び精製過程が必要となってくる。そこで、固相抽出法を採用した。その際、LC-MS/MS 法における下記の評価を用いることとした⁹⁾。

The first set of experiments (Set 1) : evaluation of MS/MS response to the standard injected into the acetonitrile-water base (50 : 50, v/v).

The second set of experiments (Set 2) : using urine samples originating from five different lots and spiked after extraction.

The third set of experiments (Set 3) : using urine samples from the same five lots as in set 2, but the urine samples were spiked before extraction.

本実験結果より、

The matrix effect value (MEV) : Set 2/Set 1*100 (%)

The recovery value (RV) : Set 3/Set 2*100 (%)

The overall process efficiency value (PEV) : Set 3/Set 1*100 (%)

固相抽出法による尿中 BPA のバリディーション評価として、各カートリッジにおける 0.5 及び 2 ng/mL の添加レベルでの回収率を算出した (表 3 及び 4)。また、本結果に基づく最適条件 (OASIS MAX) を用いた安定同位体希釈法による添加回収実験の結果を表 5 に示す。

更に尿などの生体試料の場合、抱合体での存在が示唆されている¹⁰⁾。そこで、酵素処理による検討を実施した結果を図 11 に示す。

D. 考察

(1) ヒト血液中有機フッ素系化合物の新規高感度・高精度な分析法の開発及びその応用

現在、有機フッ素系化合物の中でも PFOS は内分泌攪乱作用 (神経系ホルモンの攪乱) の疑いが持たれ、米国を中心に最も注目される環境汚染化学物質である²⁾。ヒトでの汚染に関しては、3M 社の Olsen らの報告において、職業暴露群及び健常人群の血液検体を分析した結果、約 100% の検出率であった^{3,4)}。また、近年になり、同研究チームが米国赤十字の多検体 (n=645) を用いて、PFOS 関連物質の暴露状況について、報告した⁵⁾。その結果は、PFOS 濃度範囲として、定量限界以下 (4.1 ppb) ~ 1656 ppb (中央値 34.9 ppb) であった。一方、日本においても Harada らが地域差 (宮城、秋田、京都) における PFOS 及び PFOA の血中暴露に関する報告をしている⁶⁾。PFOS 及び PFOA に関する検出範囲は、3.5 ~ 28.1 ppb 及び 2.8 ~ 12.4 ppb であり、地域差としては近畿地方 (京都) において PFOA が高い傾向にあることを示唆している。

一方で、我々の研究では基礎となる分析法の構築及び分析法バリディーションを正確に実施し、その方法を用いて臨床データの確立したヒト生体試料を分析した結果をもとに統計的な処理を行うことにある^{7,8)}。本研究においては、聖マリアンナ医科大学泌尿器科による臨床データが確保されている保存血液及び精漿を用いた正確な評価を実施した。健常人男性の血液試料からは、既に報告されている濃度レベルとほぼ同等の値を得ることができた。その一方で、生殖能へ直接作用が懸念される精漿中濃度レベルは、非常に低く、血中濃度との関連性は見出せなかった。つまり、精漿への移行は殆どないという新たな知見を得た。それに関連して、血液濃度レベルと臨床データとの比較に関しては精液パラメーターの交絡因子による補正が必要なことから次年度の検討課題とする。

また、同一人物での 1 年間における血中 PFOS 濃度の挙動については暴露モニタリングを実施する上で最も重要な課題である。そこで、年間 4 回の採血における健常人男性の検体を測定した結果、いずれもほぼ同等の値であった。血中半減期が非常に長いのか、もしくは日常生活より常に暴露されている可能性を示唆する結果である。また、PFOS の暴露評価を実施するに際して、採血時期を選ばなくてもモニタリング評価できることも裏付ける結果となった。

(2) LC-MS/MS 法によるビスフェノール A (BPA) 分析の基礎的検討

ヒト生体試料における BPA の分析において、様々な手法が利用されている。特に近年では免疫化学的手法 (ELISA) による測定法が汎用されるようになった。ヒト暴露に関しては、堤らの研究において、BPA の検出レベルは 0.6 ~ 8.3 ng/mL 前後の検出を報告している¹¹⁾。一方、我々は実験環境からの汚染低減化¹²⁾、実験用精製水のバックグラウンドデータの取得¹³⁾、生体試料採取器具からのコンタミネーション¹⁴⁾、高感度・高精度な MS

分析手法の基礎的検討¹⁵⁻¹⁷⁾を踏まえ生体試料の様々な検体を測定した結果、検体数は少ないが殆どが 1 ng/mL 以下（抱合体代謝物を含め）となった。また、BPA の生体試料測定に関しては微量の類縁物質が生体に多く存在しており、クロマトグラフィーによる分離分析だけでは、精度の高い分析が困難である。そこで、我々は生体試料における BPA 分析の現段階において最も精度の高いと思われる LC-MS/MS 法を採用することとした。まず、精度の向上として、二つのモニタリングイオンにより、BPA を測定し、更に安定同位体希釈法による定量を実施した。その結果、最も夾雑物の多いと思われる尿試料においても 2 及び 0.5 ng/mL の添加回収実験においてほぼ 100% となり、日差変動においても RSD は 5% 未満であった。更に前処理過程におけるイオンサプレッションの低減化には逆相系及びイオン交換系混合カートリッジを用いることにより、良好な結果を得ることができた¹⁸⁾。更に第二相代謝反応（抱合体反応）も考慮し、分解酵素の最適化条件についても検討し、二つの酵素（ β -グルクロニダーゼ及びサルファターゼ）を添加し、60 分で反応は完了すると予想された。以上のように詳細な分析条件等の基礎的な検討の構築は達成できたと考えられる。本知見は、フェノール系化合物（ノニルフェノール、オクチルフェノール、イソフラボン類）における一斉分析にも有用である。

E. 結論

我々は、生活関連製品やヒト生体試料に存在する内分泌かく乱作用の疑われる環境汚染化学物質の新規分析法を開発し、様々な実試料を分析してきた。これら一連の研究を通じて興味ある知見を得るとともに、内分泌かく乱化学物質によるヒトへの健康影響を評価する上で、様々な課題が浮上してきた。特に、試料の採取、保存、クリーンアップに使用される実験用器具類の多くが高分子素材で成型されていることから、測定対象とするモノマー、可塑剤等が様々な操作過程で混入し、分析値のバックグラウンドや測定値のバラツキに影響を及ぼし、過剰評価をしてしまう恐れが判明した。しかし、今なお、内分泌かく乱化学物質による生体影響を評価するには、解決すべき多くの課題を抱えており、ヒト生体試料からの高感度かつ高精度な分析法が要求されている。

本研究では、分析操作過程における汚染原因の解明、コンタミネーションを低減化した前処理法を構築し、更に精度の高い超微量分析法の開発、健康影響の評価に応用することを目的として実施してきた。本年度の検討により、ヒト生体試料を評価する際の注意点や総合的評価の基礎的な検討が達成できたとと思われる。

F. 引用文献

- 1) M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 383-390 (2003)
- 2) M.E. Austin, B.S. Kasturi, M. Barber, K. Kannan, P.S. MohanKumar, S.M.J. MohanKumar, *Environ. Health Perspect.* 111, 1485-1489 (2003)
- 3) G.W. Olsen, K.J. Hansen, L.A. Stevenson, J.M. Burris, J.H. Mandel, *Environ. Sci. Technol.* 37, 888-891 (2003)
- 4) G.W. Olsen, J.M. Buris, M.M. Burlew, J.H. Mandel, *J. Occup. Environ. Med.* 45, 260-270 (2003)
- 5) G.W. Olsen, T.R. Church, J.P. Miller, J.M. Burris, K.J. Hansen, J.K. Lundberg, J.B. Armitage, R.M. Herron, Z. Medhdizadehkashi, J.B. Nobiletti, E.M. O'Neill, J.H. Mandel, L.R. Zobel, *Environ. Health Perspect.* 111, 1892-1901 (2003)
- 6) K. Harada, N. Saito, K. Inoue, T. Yoshinaga, T. Watanabe, S. Sasaki, S. Kamiyama, A. Koizumi, *J. Occup. Health* 46, 141-147 (2004)

- 7) K. Inoue, F. Okada, R. Ito, M. Kawaguchi, N. Okanouchi, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B*, Submitted
- 8) K. Inoue, F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, S. Nakajima, A. Uno, Y. Saijo, F. Sata, Y. Yoshimura, R. Kishi, H. Nakazawa, *Environ. Health Perspect.*, in press
- 9) B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75, 3019-3030 (2003)
- 10) Y.H. Kim, C.S. Kim, S. Park, S.Y. Han, M.Y. Pyo, M. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 441-448 (2003)
- 11) 堤 治、*現代化学* 5月号 64-68 (2004)
- 12) K. Inoue, K. Kato, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 749, 17-23 (2000)
- 13) K. Inoue, Y. Yoshie, S. Kondo, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 946, 291-294 (2002)
- 14) K. Inoue, H. Okumura, T. Higuchi, H. Oka, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *Clin. Chim. Acta* 325, 157-163 (2002)
- 15) K. Inoue, M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B*, 773, 97-102 (2002)
- 16) K. Inoue, M. Kawaguchi, Y. Funakoshi, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B*, 798, 17-23 (2003)
- 17) M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B*, 805, 41-48 (2004)
- 18) K. Inoue, T. Katsumata, Y. Funakoshi, H. Nakazawa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* Submitted

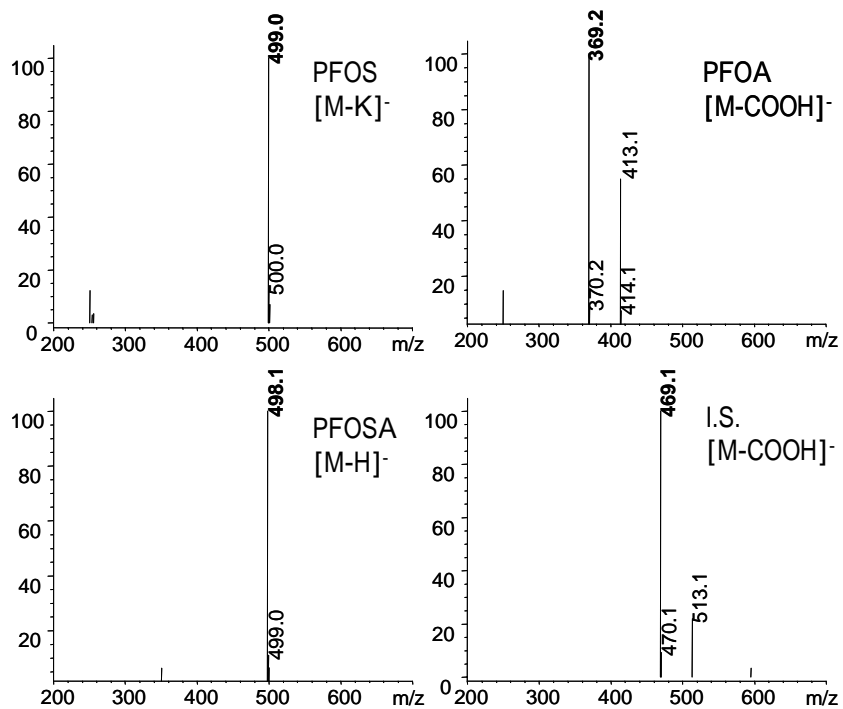


図1 有機フッ素系化合物のマススペクトル

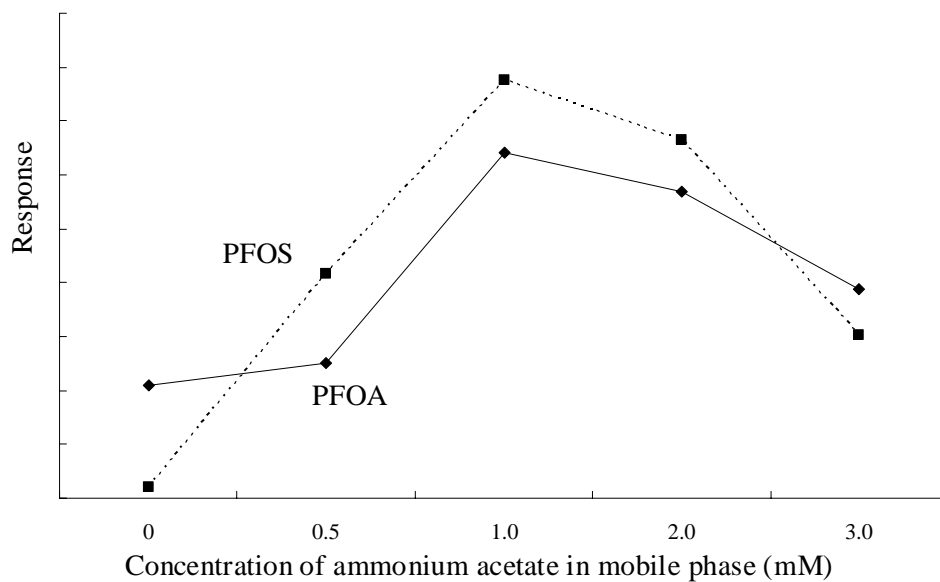


図2 移動相の条件検討 (酢酸アンモニウム濃度 mM)

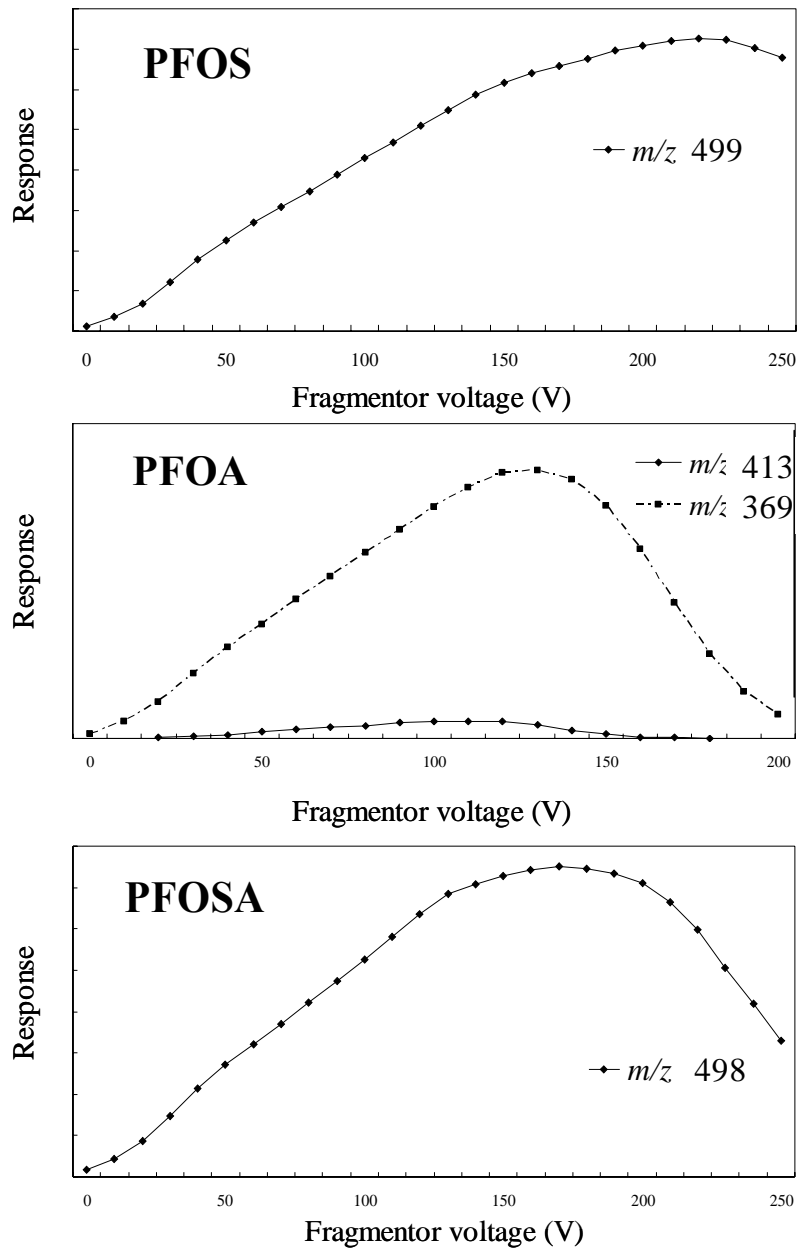


図3 フラグメント電圧の条件検討

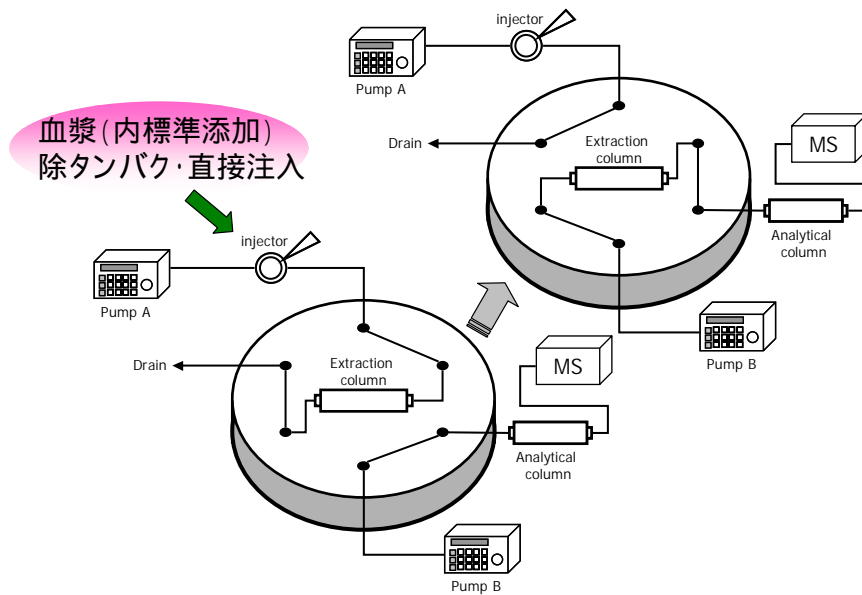
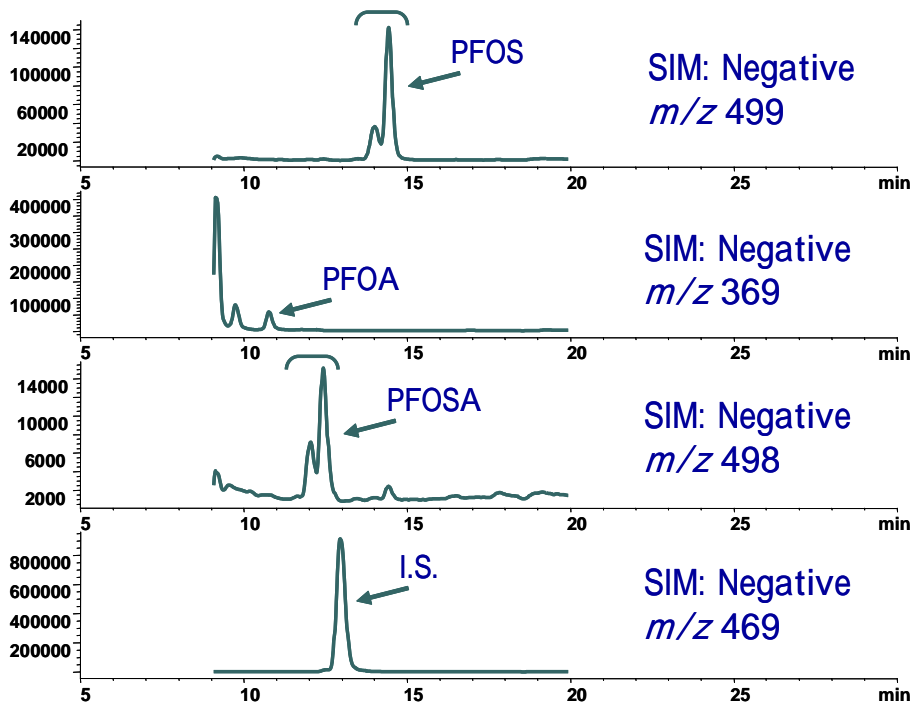


図4 オンライン抽出-LC/MS法の概略



Chromatograms of PFOS, related compounds and internal standard in human plasma (Recovery test: 10.0 ng/ml)

図5 添加回収実験における SIM Chromatograms

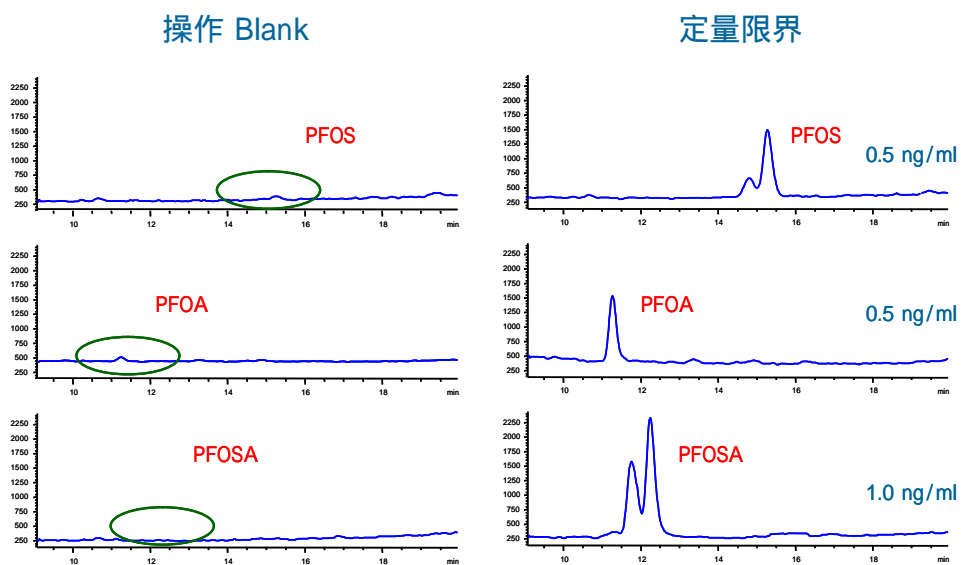


図6 標準溶液及びブランク試験におけるクロマトグラム

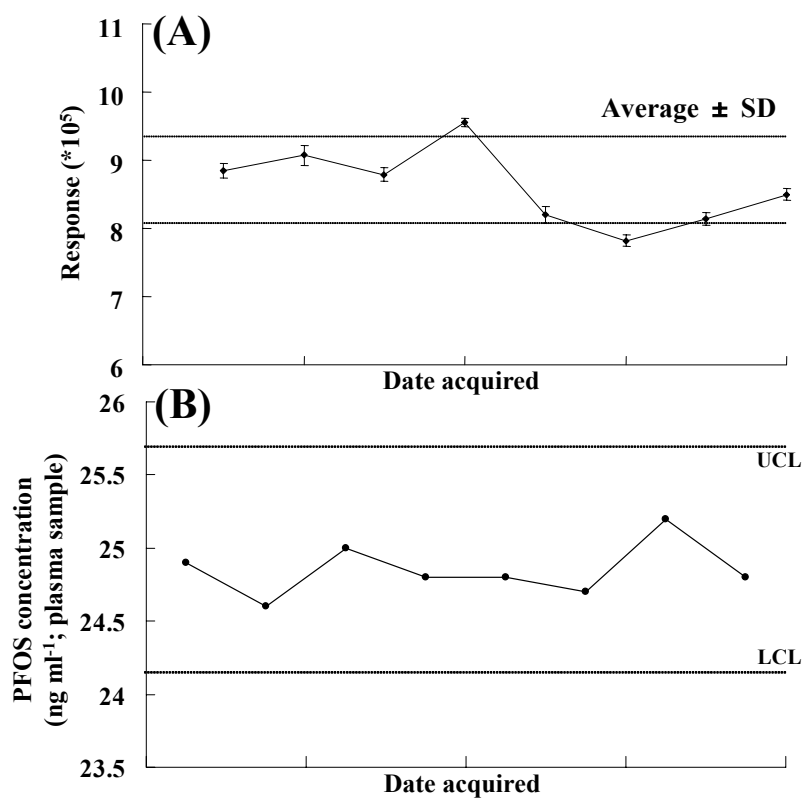
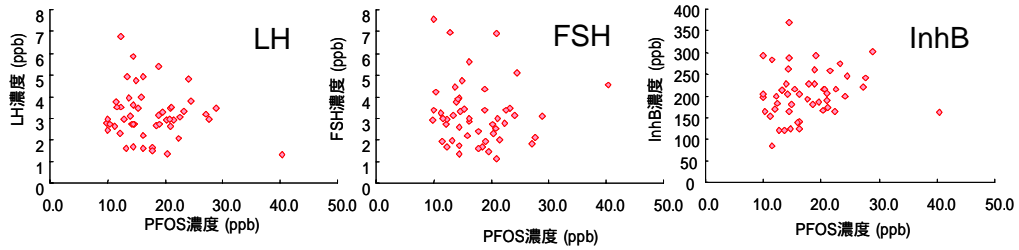


図7 血清中PFOSにおけるQCプロット(日差変動)

- (A) Analysis of internal standard (n = 64) on 8 separate days.
- (B) Analysis of PFOS (n = 8) when quality control values dose not deviated outside the 99th confidence interval (in this case < UCL = 25.53 ng/ml, > LCL = 24.17 ng/ml).

【各ホルモンとの相関性】



【精子能力との相関性】

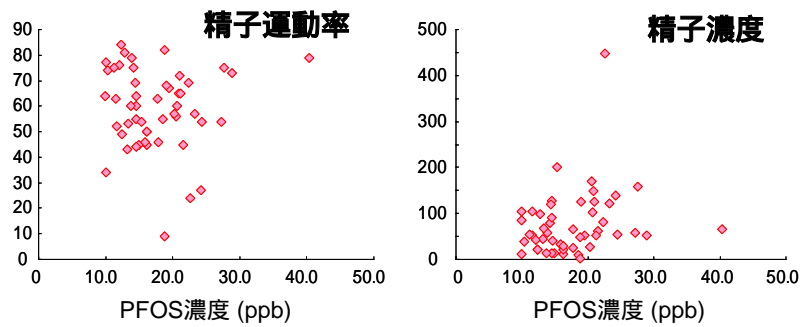


図 8 血中 PFOS 濃度及び各種臨床データとの関連性

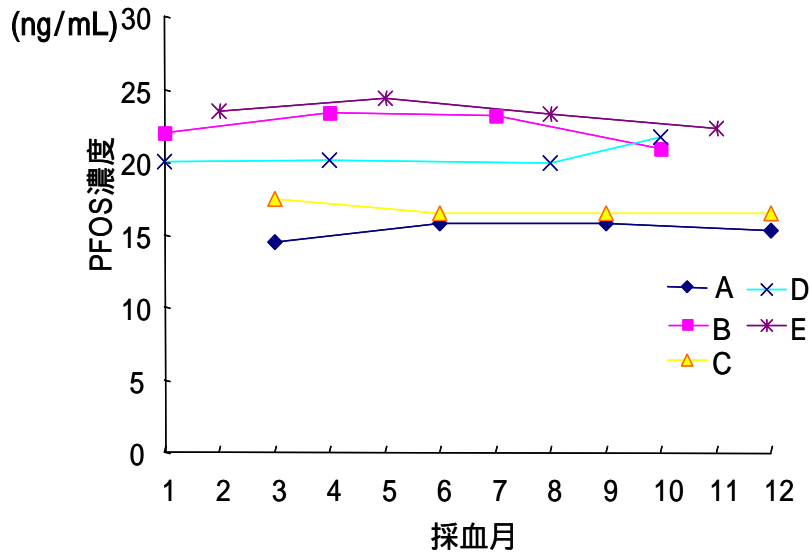


図 9 採血月の異なる検体における PFOS 血中濃度変化

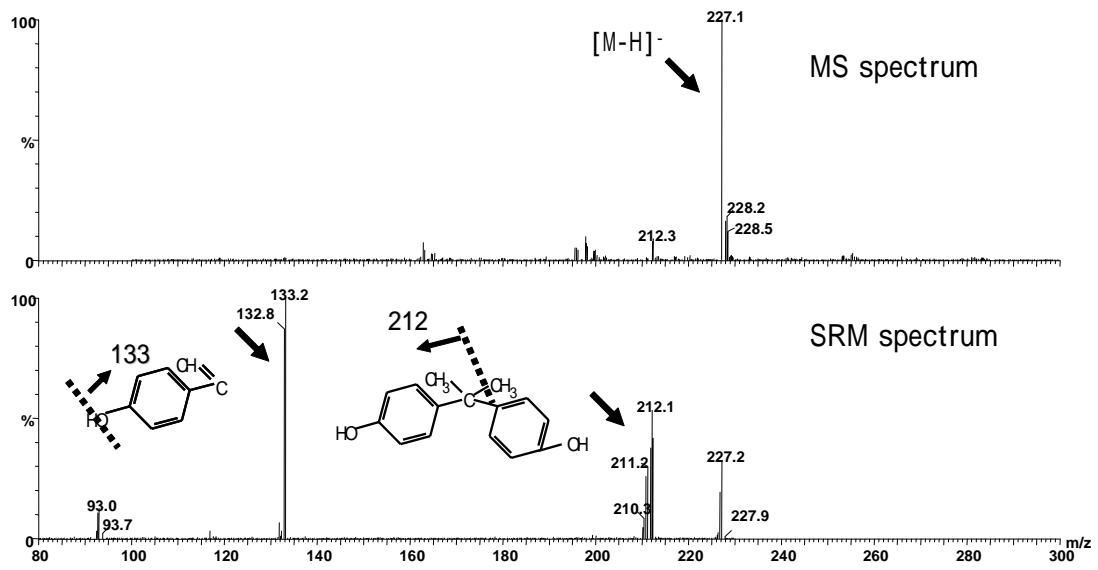


図 10 ESI-MS/MS による BPA のマススペクトル

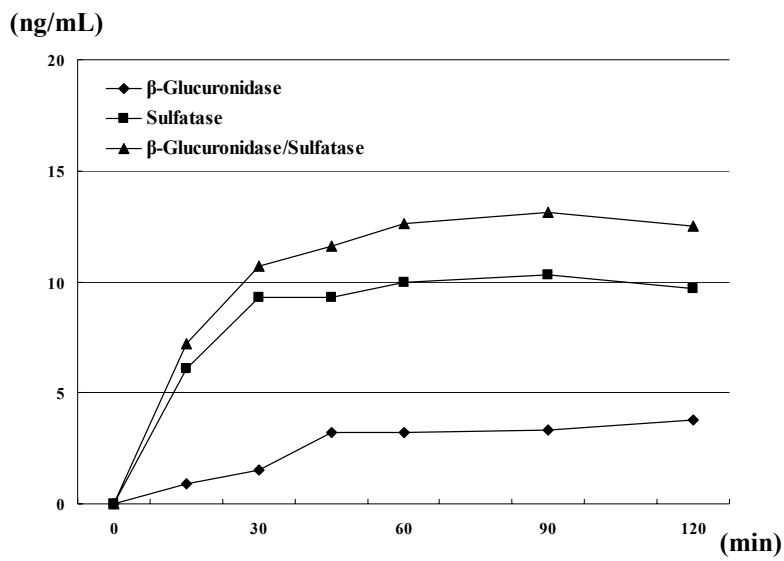


図 11 尿中 BPA による脱抱合体の経時変化

表 1 PFOS、PFOA、PFOSA における添加回収実験

	Spike amount (ng ml ⁻¹)	Recovery average (%)	RSD (%)
PFOS*	100	95.3	3.3
	10	97.7	4.6
PFOA**	100	87.2	4.0
	10	82.2	2.3
PFOSA**	100	95.8	5.2
	10	98.7	2.0

(n=6)

*: Background PFOS levels in the unspiked human plasma were subtracted out of the spiked sample levels to allow easier comparison.

** : Background PFOA and PFOSA levels in the unspiked human plasma can be neg

表 2 健康人男性の血液・精漿ペア検体 (n=50) における分析結果

		(ng/mL)		
		検出濃度範囲	Median	検出率 (%)
血液	PFOS	9.9 ~ 40.3	16.2	100.0
	PFOA	N.D. ~ 3.3	1.0	22.0
	PFOSA	N.D.	/	/
精漿	PFOS	N.D. ~ 0.6	0.18	82.0
	PFOA	N.D.	/	/
	PFOSA	N.D.	/	/

表 3 固相抽出法及び LC-MS/MS 法による尿中 BPA (2 ng/mL) におけるバリディーション結果

SPE	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	Av (%)	SD	RSD (%)
MEV (%)								
C ₁₈	56.5	58.2	58.3	46.4	60.6	56.0	5.6	9.9
EDS-1	51.1	52.5	46.0	48.1	50.1	49.5	2.6	5.2
MAX	88.1	83.0	88.0	84.8	83.8	85.5	2.4	2.8
MCX	57.3	54.1	56.9	55.5	54.0	55.6	1.5	2.8
HLB	54.2	53.6	50.2	54.1	52.7	52.9	1.7	3.1
RV (%)								
C ₁₈	97.1	91.2	97.4	99.2	88.9	94.8	4.4	4.7
EDS-1	93.9	93.8	99.5	97.9	95.2	96.1	2.5	2.6
MAX	96.1	99.3	97.6	98.5	99.1	98.1	1.3	1.3
MCX	82.8	99.9	92.5	98.0	106.8	96.0	9.0	9.3
HLB	81.8	100.9	102.6	98.1	102.2	97.1	8.7	9.0
PEV (%)								
C ₁₈	54.9	53.1	56.8	46.0	53.9	52.9	4.1	7.7
EDS-1	48.0	49.2	45.7	47.1	47.6	47.5	1.3	2.7
MAX	84.7	82.4	85.9	83.5	83.0	83.9	1.4	1.7
MCX	47.5	54.0	52.6	54.4	57.7	53.2	3.7	7.0
HLB	44.3	54.0	51.5	53.1	53.9	51.4	4.1	7.9

表 4 固相抽出法及び LC-MS/MS 法による尿中 BPA (0.5 ng/mL) におけるバリディーション結果

SPE	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	Av (%)	SD	RSD (%)
MEV (%)								
C ₁₈	50.0	61.3	57.8	61.5	60.3	58.2	4.8	8.2
EDS-1	58.8	56.6	57.1	57.2	55.3	57.0	1.3	2.2
MAX	83.2	84.4	83.4	79.4	80.1	82.1	2.2	2.7
MCX	51.5	55.2	48.9	49.3	56.1	52.2	3.3	6.3
HLB	55.4	51.8	46.5	55.8	57.7	53.5	4.4	8.3
RV (%)								
C ₁₈	95.3	92.0	94.2	80.1	93.6	91.0	6.2	6.8
EDS-1	81.1	99.2	93.7	82.2	101.2	91.5	9.4	10.3
MAX	96.9	95.3	96.3	99.0	97.9	97.1	1.4	1.5
MCX	95.1	87.1	97.0	96.8	81.8	91.6	6.8	7.4
HLB	94.4	98.3	98.9	94.1	93.3	95.8	2.6	2.7
PEV (%)								
C ₁₈	47.7	56.4	54.5	49.3	56.4	52.9	4.1	7.8
EDS-1	47.7	56.2	53.5	47.0	55.9	52.0	4.4	8.5
MAX	80.6	80.5	80.4	78.6	78.5	79.7	1.1	1.3
MCX	48.9	48.1	47.4	47.8	45.9	47.6	1.1	2.4
HLB	52.3	51.0	46.0	52.5	53.9	51.1	3.1	6.0

表 5 固相抽出法及び安定同位体希釈 LC-MS/MS 法による尿中 BPA におけるバリディーション結果

Concentration of urinary BPA	Recovery (%) [process efficiency data]						Av.	SD	RSD
	day 1	day 2	day 3	day 4	day 5	day 6			
2 ng/ml	99.5	100.7	101.3	101.1	98.7	100.1	100.2	0.98	0.98
0.5 ng/ml	103.9	102.7	100.6	98.7	99.9	98.9	100.8	2.11	2.10

Exposure and Risk Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals for Human Health

Teruaki Iwamoto¹, Hiroyuki Nakazawa²
Shiari Nozawa¹, Koichi Inoue², Rie Ito²

1: Department of Pharmacology, St Marianna University School of Medicine

2: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences Hoshi University

Key words: Endocrine disrupting chemicals, bisphenol A, PFOS, human biological sample, LC-MS

Abstract

The SPEED '98/JEA's "Strategic Programs on Environmental Endocrine Disrupters '98" from the Environmental Agency, which deal with risk assessment of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Japan, have been published. A number of studies of EDCs have been conducted in various countries. However, the potential risks to human health and reproduction from the EDCs have not been well established. It is necessary that the human exposure level and risk assessment to these chemicals be assessed as soon as possible. Analytical and medical studies of the exposure to EDCs released and originated from plastic and/or natural materials are insufficient. Therefore, analytical methods have been developed and applied for monitoring EDCs in human samples and the exposure assessment of these chemicals released from plastic materials. Therefore, in the current year, the present study reports an approach for assessing human exposure to EDCs such as fluorinated organic compounds and bisphenol A (BPA), and development of analytical method for determination of these chemicals by liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS) and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

The specific aims of the present study are:

-- to development and measurement of perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctane sulfonylamide (PFOSA) in human blood samples by column-switching LC-MS coupled with solid phase extraction (SPE) (1),

and

-- to development of LC-MS/MS for determination of urinary BPA (2).

(1) Determination of PFOS, PFOA and PFOSA in human blood samples by column-switching LC-MS coupled with SPE

The present study reports a method for determining fluorinated organic

compounds such as PFOS, PFOA and PFOSA in human blood samples by column-switching LC-MS. The sample preparation prior to SPE column (Waters Oasis HLB extraction column) involved simply mixing sample with internal standard followed by concentration and extraction. The compounds were separated by reversed-phase chromatography with a C₈ column, and detected by MS using selected ion monitoring in the negative mode. The average recoveries of PFOS, PFOA and PFOSA were above 80% with correction using the added internal standard (Perfluorodecanoic acid). The limits of quantitation of PFOS, PFOA and PFOSA in human plasma were 0.5, 0.5 and 1.0 ng/ml, respectively. The method enables the precise determination of standards and can be applied to the detection of PFOS, PFOA and PFOSA in human blood samples for monitoring human exposure.

(2) Development of LC-MS/MS and SPE for determination of trace level of BPA in human urine

The purpose of the present study was to examine whether SPE is useful for the trace analysis of urinary BPA by LC-MS/MS in the absence of the matrix effect. In previous analysis of urinary compounds with LC-MS/MS, human biological samples pretreated with only reversed-phase SPE were found to be affected by the matrix in the electrospray ionization (ESI) mode. Pre-concentration with SPE in the mixed anion-exchange mode improved sensitivity, specificity and selectivity and reduced ion suppression caused by acidic components in the matrix. Trace amounts of urinary BPA were subjected to pre-concentration with SPE in five different modes: C₁₈, EDS-1, hydrophilic-lipophilic balanced copolymers (HLB), and HLB mixed anion- and cation-exchange modes, and analyzed by LC-ESI-MS/MS. It is possible that the amount of urinary BPA is increased by tenfold by the pre-concentration with SPE in mixed anion-exchange mode. In addition, the overall process efficiency values for BPA (2 and 0.5 ng/ml in urine) were higher than 75%, and that for the internal standard was approximately 100% with low RSD (< 3%). The quantification limit in the urine samples was 0.1 ng/ml. The SPE in the reversed-phase mixed anion-exchange mode enabled precise determination and pre-concentration of urinary BPA and prevented ion suppression caused by acidic components in the matrix, and can be applied to the detection of trace amounts of neutral analytes in biological samples.