

## 2. ヒト生体試料中の内分泌攪乱化学物質等の測定

研究代表者 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】

昨年度の本研究において実施した有機フッ素系化合物FOCsの血液濃度と精液所見等の臨床データとの関連について解析を実施した。精液所見に大きく影響する因子である禁欲期間の分布が大きく外れた男性1名を除いた49名を対象に解析を実施した結果、検討した全ての項目との間に有意な関連は認められなかった。

高分子素材由来のフタル酸エステル類およびその代謝物を対象物質とし、LC/MS/MSおよびGC/MS法による精度の高い分析法を構築し、その方法により日本人若年男性の血清45検体の測定を実施した。その結果、フタル酸モノ-2-エチルヘキシルがすべての検体から検出され、中央値が1.9 ppb、検出濃度範囲が1.2~3.5 ppbであった。トラベルブランクを差し引いた実質濃度は、1.6 ppb (中央値) であった。一方、ジエステル体 (フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジイソオクチル、フタル酸ジイソニル) の検出率は0-33 %と低く、また、全検体での中央値は定量下限値未満であった。

血清中フタル酸モノ-2-エチルヘキシル濃度と、身体所見ならびに精液所見に関する各種パラメータとの関連について解析を実施した結果、有意な関連を示す項目は認められなかった。一方、検出率の低かったジエステル体において、検出された男性群と定量下限値未満だった男性群間で身体所見ならびに精液所見パラメータを比較したところ、フタル酸ジブチルが検出された群(7例)の精子濃度が定量下限値未満だった群(38例)に比して有意に低いという結果を得た(精子濃度平均値:  $29.1 \times 10^6/\text{ml}$  vs  $64.4 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $P=0.004$ )。統計解析上はDBP曝露の精巣機能への影響を示唆する結果であったが、この結果の検証には、例数を増やしての測定・分析、DBPの代謝物であるMBPの測定、精液所見以外の生殖機能パラメータを用いての分析などを含め、さらに詳細な検討が必要である。

血清中のポリ臭化ジフェニルエーテル類 (PBDEs) の分析法として、Patterson法により脂肪を抽出後、44 %硫酸含浸シリカゲルカラムで精製し、GC/MSで測定する方法を確立した。

血清および尿中のパラジクロロベンゼン、およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの分解物である2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナールの同時分析法を検討し、安定同位体を内部標準に用いたヘッドスペース-GC/MS法を確立した。しかし、添加回収実験の結果より、本法には2-エチル-1-ヘキサノールおよび2-エチル-1-ヘキサナールの定量性に若干の問題があり、今後さらに検討する必要があることが示唆された。

### 【研究協力者】

中澤 裕之 (星薬科大学薬品分析化学教授)

近藤 文雄 (愛知県衛生研究所主任研究員)

猪飼 誉友 (愛知県衛生研究所主任研究員)

高取 聡（大阪府立公衆衛生研究所研究員）  
阿久津 和彦（大阪府立公衆衛生研究所研究員）  
野澤資亜利（聖マリアンナ医科大学泌尿器科助手）  
田中 紀子（東京大学大学院医学系研究科助手）

## A. 研究目的

我々はおびただしい種類と量の化学物質に囲まれて生活しており、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。しかし、いわゆる内分泌攪乱化学物質や単独では安全でも複合的な曝露あるいは体内に蓄積されて初めて生体影響が表れるような化学物質は、その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曝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。

本研究では、日常的に広く利用されている化学物質に対する日本人男性の曝露状況を明らかにすること、および、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。具体的には、生体試料中の内分泌攪乱化学物質等を高感度かつ高精度に測定できる分析手法を開発し、その方法で日本人健常男性の血液・精漿等における曝露状況を明らかにする。得られた測定結果は、曝露に関するその他の情報とともにデータベース化し、既にデータベース化されている背景データ（生活習慣および健康状態等に関する情報、理学的所見、精液所見、血清中の各種ホルモン値等）との関連を解析する。測定対象とする化学物質は、日常的に広く利用または摂取する可能性があり、生殖系への影響およびヒトへの健康影響が強く懸念されているものを選択した。

本年度は、昨年度の本研究において実施した有機フッ素系化合物（FOCs）の血液濃度と精液所見等の臨床データとの関連について、交絡因子による補正を行った上で解析を実施する。また、新たに高分子素材由来のフタル酸エステル類およびその代謝物を対象物質とし、精度の高い分析法を構築し、その方法により日本人男性の試料（血清または尿）約50検体を目処に測定を実施する。さらに、生体試料中の臭素系難燃剤ポリ臭化ジフェニルエーテル類（PBDEs）、ハロゲン系化合物類で防虫剤のパラジクロロベンゼン、およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの分解物である2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナールの分析法を検討する。

## B. 研究方法

### 1. 有機フッ素系化合物（FOCs）の血液濃度と精液所見等の臨床データの解析

健康な日本人若年男性（大学生、年齢：18-24歳）より、聖マリアンナ医大泌尿器科で2000年3-5月に採取・分離・保存されていた血清および精漿ペアの中で、背景データ（アンケートによる生活習慣や出生前後の状況ならびに病歴等の情報）および臨床データ（身体所見、精液所見、血清ホルモン値）の揃った50検体を使用し、LC/MS法またはLC/MS/MS法により検体中のFOCs濃度を測定した（平成15年度報告書参照）。今回、検出率の高かったPFOS（血清中：100%、

精漿中：82%)について、臨床データとの関連を解析した。

## 2. 血清中のフタル酸モノ-2-エチルヘキシルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの分析 (LC/MS/MS法)

### (1) 試料

健康な日本人若年男性（大学生、年齢：18-22歳）より、聖マリアンナ医大泌尿器科で2003年2月に採取・分離された血清の中で、背景データ（アンケートによる生活習慣や出生前後の状況ならびに病歴等の情報）および臨床データ（身体所見および精液所見）の揃った45検体を使用した。

### (2) 試薬

フタル酸モノ-2-エチルヘキシル (MEHP、99.3%)、MEHP-d<sub>4</sub> (99.8%) およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d<sub>4</sub> (DEHP-d<sub>4</sub>、99.0%) は、林純薬工業（株）製を用いた。DEHP (>99.0%) は、関東化学（株）製を用いた。アセトン（環境分析用）、ヘキサン（環境分析用）、アセトニトリル（環境分析用）、アセトニトリル (LC/MS 用)、酢酸 (HPLC 用) およびフタル酸エステル類測定用水は、和光純薬工業（株）製を用いた。

### (3) 標準溶液

メスフラスコ中に精密に採取した MEHP または DEHP をアセトニトリルに溶解して標準原液とした。メスフラスコ中に精密に採取した DEHP-d<sub>4</sub> または MEHP-d<sub>4</sub> をアセトニトリルに溶解し、内標準原液とした。検量線作成に用いる標準溶液は、希釈各段階の標準溶液中に内標準物質を 20 ppb 含むように調製した。

### (4) 使用器具の前処理

ガラス製およびステンレス製の器具を用いた。これらの器具は、アセトンおよびヘキサンで洗浄後、ステンレス製の容器に入れて200℃で2時間以上加熱した後、清浄な条件下で冷却後に使用した。

### (5) 試験溶液の調製法

血清 0.5 g を試験管に採取し、10 ng の MEHP-d<sub>4</sub> および DEHP-d<sub>4</sub> を添加し、アセトン 4 mL を加えて 5 分間攪拌した。遠心後、上清を回収し、沈殿にアセトン 1 mL を加えて 5 分間攪拌した。遠心後、上清を回収して先の上清と合わせて窒素気流下で乾固した。精製水 0.5 mL および酢酸 4 μL を加えて溶解した。1 mL のヘキサンを加えて5分間攪拌した。30分間静置後、遠心してヘキサン相を回収した。以後、この抽出を2回繰り返す、回収したヘキサン相を合わせて窒素気流下で乾固した。アセトニトリル 0.5 mL に再溶解して LC/MS/MS で分析した。また、MEHP および DEHP 双方の化学物質は、実験環境中に広く存在し、試験溶液中への混入が危惧される。このことから、実験毎に操作ブランクを併せて測定した。

## (6) LC/MS/MS条件

LC/MS/MS の条件は、下記の通りである。

LC 条件：

機器；Agilent 1100 series；カラム，Wakosil-II 3C18，2.0 x 150 mm；溶出液，5 x 10<sup>-4</sup>% 酢酸水溶液 (A)，アセトニトリル (B)；溶出条件，(A)/(B):2/8，イソクラティック；流速，0.2 mL/min；カラム温度；50°C；インジェクト量，5 μL

MS/MS 条件：

機器；API 3000 (Applied Biosystems)；インターフェイス；ターボイオン Sprey™ (electrospray ionization；ESI)；イオン化電圧，±4000 V；温度，500°C；モニターイオン (Mode, Precursor ion/Daughter ion)；MEHP (negative, 277/134)，MEHP-d<sub>4</sub> (negative, 281/138)，DEHP (positive, 391/149)，DEHP-d<sub>4</sub> (positive, 395/153)

図1に 各物質のMS/MSスペクトラムを示した。

## (7) 定量法

安定同位体希釈法を用いて定量した。すなわち、試料に一定量の安定同位体（内標準物質；MEHP-d<sub>4</sub> および DEHP-d<sub>4</sub>）を添加して抽出操作を行い、試験溶液を調製した。LC/MS/MS では、測定対象物質（MEHP および DEHP）およびその内標準物質の双方を測定し、試料への添加量に相当する内標準物質を含む標準溶液を用いて相対検量線を作成した。試験溶液中に認められる測定対象物質と内標準物質の比から試料中に含まれる測定対象物質量を求めた。

## 3. 血清中フタル酸エステル類の分析 (GC/MS法)

### (1) 試料

「1. 血清中のフタル酸モノ-2-エチルヘキシルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの分析(LC/MS/MS法)」に示した。

### (2) 試薬および標準溶液

ヘキサン、アセトニトリル、アセトン、硫酸ナトリウムは関東化学（株）製フタル酸エステル測定用を用いた。フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジイソオクチル (DiOP)、フタル酸ジイソノニル (DiNP) は、関東化学（株）製環境分析用を用いた。また、内部標準物質として用いたDBP-d<sub>4</sub>、BBP-d<sub>4</sub>、DEHP-d<sub>4</sub>、DiOP-d<sub>4</sub>、DiNP-d<sub>4</sub>は、林純薬工業（株）製環境分析用を用いた。フロリジルは和光純薬工業（株）製、ボンデシルPSAはバリアン（株）製を使用した。フタル酸エステル類の標準溶液は、DBP、BBP、DEHPの濃度が4 μg/mL、DiOP、DiNPの濃度が20 μg/mLになるようにヘキサンの希釈した。内部標準溶液は、それぞれの濃度が4 μg/mL になるようにヘキサンで希釈した。

### (3) 器具・試薬の前処理

ホールピペット、メスフラスコ以外の器具は、200 °Cで2時間加熱し、使用直前にヘキサンで洗浄した。

塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200 °Cで2時間加熱した。

### (4) 試験溶液の調製法

血清1 mLを共栓付遠心管（10 mL、ガラス製）にとり、アセトニトリル5 mL、塩化ナトリウム0.5 g、ヘキサン1 mLおよび内部標準溶液（あるいは標準溶液）25  $\mu$ Lを加えた後、3分間混和した。3000 rpmで5分間遠心分離後、アセトニトリル相を分取し、減圧留去した。残渣を蒸留水2 mL、ヘキサン5 mLに溶解後、ヘキサン相を分取した。残った水相に再度ヘキサン3 mLを加えて混和後、ヘキサン相を分取した。分取したヘキサン相をフロリジル-PSAカラムに負荷し、ヘキサン3 mLでカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン10 mLで溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン1 mLに溶解して試験溶液とした。

なお、フロリジル-PSAカラムは、内径15 mm、長さ110 mmのガラス製カラムの底にガラス繊維濾紙を敷き、フロリジル1 g、PSA 0.5 g、無水硫酸ナトリウム2 gを積層して調製し、使用直前にアセトン10 mL、ヘキサン10 mLで洗浄した。

### (5) GC/MS条件

装置：Agilent 6890N GC/5973N MSD

イオン源：EI

カラム：HP-5MS SV（30 m x 0.25 mm ID、膜厚0.5  $\mu$ m）

カラム温度：80 °C（3分）→20 °C/分→240 °C→10 °C/分→300 °C（5分）

キャリアガス：He（カラム流量1.2 mL/分）

注入口温度：250 °C

試料注入法：パルスドスプリットレス

四重極温度：150 °C

イオン源温度：230 °C

検出法：選択イオン検出（SIM）

モニターイオン：表1に示した。

### (6) 定量法

試験溶液2  $\mu$ LをGC/MSに注入し、各フタル酸エステル類のピーク面積を内部標準のピーク面積で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。DiOPは主要な2本のピークを、DiNPは主要な5本のピーク面積をそれぞれ合計して定量対象とした。

#### 4. 生体試料中のPBDEsの分析法の確立

##### (1) 試料

市販のプール血清試料（日水製薬製L-コンセーラNまたはL-スイトロールI）を予備実験および添加回収試験に用いた。また、聖マリアンナ医大泌尿器科で2003年1月から12月の各月毎に採取・冷凍保存された健康な10人の日本人男性（18～22歳）の血清から、6 gの代表的プール血清試料（同一提供者の血清試料を各月0.5 gずつ12ヶ月分混合）を10検体調製して本実験に使用した（表2）。

##### (2) 試薬および標準溶液

PBDEs標準原液はAccuStandard社製BDE-AAP-A-15Xを用い、3～7臭素化PBDEs29異性体を測定対象とした。測定対象PBDEsの構造式と対応するIUPACナンバーおよび略号を表3に示した。クリーンアップスパイクおよびシリンジスパイクには炭素安定同位体（ $^{13}\text{C}$ ）で標識化された $^{13}\text{C}$ -PBDEs混合溶液（Wellington Laboratories社製MBDE-MXC）および $^{13}\text{C}$ -PeBDE-126溶液（CIL社製E0-4930）を用いた。ヘキサン、エタノール、アセトニトリル（以上、残留農薬・PCB試験用5000倍濃縮保証品）、ノナン（ダイオキシン類分析用）、44 %硫酸シリカゲル（ダイオキシン類分析用）、アセトン（試薬特級、器具の一次洗浄に使用）および硫酸アンモニウム（試薬特級）、無水硫酸ナトリウム（PCB・フタル酸エステル試験用）は和光純薬社製を用いた。水は超純水（Milli-Q水）をヘキサンの洗浄したものを使用した。

##### (3) 使用器具・試薬の前処理

ガラス製およびステンレス製の器具を用いた。これらの器具はアセトンおよびヘキサンで順次洗浄してから使用した。ロータリーエバポレーターの使用開始時には、まずヘキサンを数回減圧濃縮してクリーニング運転を行った。また、トラップ球（共用）は1試料毎にヘキサンで再洗浄して使用し、溶媒蒸気の還流に伴うコンタミネーションの低減化を図った。

##### (4) 試験溶液の調製法（図2）

###### 1) 脂肪抽出（血清10 g使用の場合）

Patterson法<sup>1)</sup>を用いて血清脂肪を抽出した。解凍した血清試料10 gを50 mL容の共栓付試験管に精密に秤量後、クリーンアップスパイクおよび飽和硫酸アンモニウム6 mL、25 %エタノール／ヘキサンを24 mL添加し、30分間振とう抽出を行った。ヘキサン相を採取後、水相にヘキサン20 mLを添加し更に30分間振とう抽出を行った。この操作をもう一度繰り返し、計3回の抽出により採取・混合したヘキサン相を精製水20 mLで洗浄（手振り30回）した。無水硫酸ナトリウムで脱水後、ガラス製フィルター漏斗でろ過し、ロータリーエバポレーターを用いてろ液を1 mL程度まで濃縮した。あらかじめ秤量済みの試験管に濃縮液と洗液（ヘキサン0.5 mLで数回）を移し、窒素ガス吹き付けで乾燥した。試験管にアルミホイルで蓋をして一晩室温下で放置後、重量をセミマイクロ天秤（Sartorius RC210P）で測定し、脂肪重量を算出した。

血清1 g, 2 g, 5 g, 6 g使用の場合についても同様の操作を行い、脂肪重量を算出した。

なお、予備検討の結果、Patterson法では抽出溶媒量と血清重量の比率が重要なファクターであることが分かったので、最終的に抽出溶媒量と血清重量の比率を一定（血清10 g使用時と同じ比率）にして脂肪抽出を行った。

## 2) PBDEsの分析（血清1-10 g共通）

抽出脂肪をヘキサンに溶解し、予めヘキサン30 mLで洗浄した44%硫酸シリカゲルカラム（充填量3 g、カラム内径15 mm、上部に無水硫酸ナトリウムを約2 cm積層）に負荷した。ヘキサン30 mLでPBDEsを溶出し、溶出液を1 mL程度まで濃縮した。少量のヘキサンで洗い込みながら濃縮液を10 mL容の共栓・目盛付試験管に移し、2 mLの目盛に合わせた。ヘキサン飽和アセトニトリル4 mLを加え、10分間振とう後、遠心処理（3000 rpm、10 min）した。アセトニトリル相を採取後、同様の操作を2回繰り返した（アセトニトリル4 mL×2）。合わせたアセトニトリル相を濃縮乾固し、残留物を少量のヘキサンで再溶解し、共栓付濃縮試験管に移した。窒素ガス吹き付けで溶液を1 mL以下に濃縮後、シリンジスパイクおよびn-ノナン10  $\mu$  Lを添加して最終的に10  $\mu$  Lに濃縮し、GC/MS測定に供した。

## （5）GC/MS条件

装置：JEOL JMS-GCmateII GC/MS system

注入口温度：250  $^{\circ}$ C

注入法：パルスドスプリットレス、1  $\mu$  L

パルス圧：20 psi（0～1.6 min）

キャリアガス：He（カラム流量1 mL/min）

カラム：Restek社製Rtx-1ms（15 m×0.25 mm ID、膜厚0.1  $\mu$  m）

昇温条件：100  $^{\circ}$ C（2 min）-10  $^{\circ}$ C/min-310  $^{\circ}$ C（3 min）

トランスファーライン温度：310  $^{\circ}$ C

イオン源温度：280  $^{\circ}$ C

イオン化電流：300  $\mu$  A

イオン化エネルギー：35 eV

加速電圧：2500 V

マルチプライヤー電圧：500 V

分解能：1000

イオン化モード：EI

検出法：SIM

モニターイオン：表3に示した。

## （6）定量法

6～8点の段階濃度になるように調製した標準溶液のGC/MSクロマトグラムから分析対象PBDE異性体と $^{13}$ C-PBDE異性体の面積比を算出し、濃度と面積比の相対検量線を作成して直線回帰式

を得た。同様に試験溶液中から検出された各PBDE異性体と<sup>13</sup>C-PBDE異性体の面積比を算出し、対応する回帰式に代入して試験液中濃度を定量した。

操作ブランクまたは検量線作成に使用した最も低濃度の標準溶液を5回以上繰り返し測定した時の仮想定量値の標準偏差を比較し、その大きい方の値の3倍および10倍の値を検出下限値 (LOD) および定量下限値 (LOQ) とした (表4)。

## 5. 生体試料中のパラジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノールの分析法の確立

### (1) 試料

豚血清およびヒトの尿を用いた。

### (2) 試薬等

パラジクロロベンゼンおよび2-エチル-1-ヘキサノール標準品には和光純薬工業(株)製を、2-エチル-1-ヘキサノール標準品にはアルドリッチ(株)製を、内部標準物質のパラジクロロベンゼン-d<sub>4</sub>および2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>17</sub>にはCDN Isotopes(株)製(ケベック, カナダ)を、2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>16</sub>については、上記2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>17</sub>を原料にDess-Martin酸化により合成したものを使用した。試薬調整等に用いた水には全てMilli-Q水を、塩化ナトリウムおよびメタノールには関東化学(株)製残留農薬・PCB測定用を用いた。試料希釈用飽和食塩水は、調製後にバリアン(株)製メガボンドエリートC18カートリッジ(5g)で処理したものを使用した。

### (3) 試料の前処理、定量方法等

希釈用飽和食塩水10 mLが入った22 mLヘッドスペースバイアル(Chromacol, CV-22)に、試料として血清の場合は0.5 mL、尿は2.0 mLを加え、さらに、安定同位体内部標準混合溶液(各1.0 mg/L メタノール溶液)を2 μLおよび各化合物の混合標準メタノール溶液を添加した後、テフロン-シリコンゴム製セプタムおよびアルミシールで密封し、測定に供した。各化合物の濃度は、飽和食塩水に内部標準および標準を添加した溶液を試料と同様に測定して得られた検量線を基に算出した。

### (4) 測定

ヘッドスペースオートサンプリング付GC/MSを用いて実施した。詳細な条件を以下に示した。

#### 1) ヘッドスペース条件

装置: Tekmer 7000 (Tekmer)、バイアル加熱条件: 85 °C (10分)、バイアル振とう機能: 使用 (Power 5: 10分)、サンプルループ容量: 1 mL、サンプルループ温度: 150 °C、トランスファーライン温度: 160 °C。

#### 2) GC/MS条件

装置: AUTO MASS SYSTEM II (日本電子) カラム: Inert Cap 5MS/Sil (0.25 mm i. d. x 30

m、膜厚：0.25  $\mu$ m、GLサイエンス) カラム温度：45  $^{\circ}$ Cで2分間保持し、300  $^{\circ}$ Cまで毎分15  $^{\circ}$ Cで昇温。イオン源温度：210  $^{\circ}$ C イオン化：EI、イオン化電圧：70 eV、検出方法：SIM法、モニターイオン：パラジクロロベンゼン (m/z 111)、パラジクロロベンゼン-d<sub>4</sub> (m/z 115)、2-エチル-1-ヘキサノール (m/z 70)、2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>17</sub> (m/z 80)、2-エチル-1-ヘキサノール (m/z 72)、2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>16</sub> (m/z 80、79)

## 6. データ解析

データの解析には StatView 5.0 for Windows または SPSS 11.0J for Windows を使用した。血清中の化学物質の濃度と臨床データとの関連は Pearson の相関係数を求めて分析した。層分けした群間での各パラメータの平均値の比較は、f 検定により等分散性を検定したのち、Student の t 検定または Welch の t 検定によった。今回の臨床データの解析では、年齢、身長、体重、左および右精巣容量、禁欲期間、精液量、精子濃度、総精子数、精子運動率の項目について検討した。

## C. 結果

### 1. 有機フッ素系化合物 (FOCs) の血液濃度と精液所見等の臨床データの解析

昨年度に実施した日本人若年男性(年齢18-24歳の大学生)50名の血清および精漿中のFOCs濃度測定で100%の検出率であったPFOS (Perfluorooctane sulfonate)について、臨床データ(身体所見、精液所見、血清ホルモン値)との関連を解析したところ、精漿中のPFOS濃度と、精子濃度および総精子数との間にのみ有意な弱い正の相関(精子濃度：r=0.37、P=0.007、総精子数：r=0.27、P=0.05)が認められた。しかしながら、対象者50名の中に精液検査の禁欲期間が359時間(50例の平均：73.3時間、5~95パーセンタイル：48~108時間)で精子濃度が $447 \times 10^6$ /mlと分布から大きく外れた男性が1名含まれており、長い禁欲期間の影響で精子濃度が高くなっていることが示唆されたため、この男性のデータを棄却して49例で再分析することとした。対象者49名の身体所見、精液所見、血清ホルモン値を表5に、血清中および精漿中のPFOS濃度と各種パラメータとの相関係数とP値を表6に示した。49例での再分析では、PFOS濃度と検討した全ての項目との間に有意な関連は認められなかった。なお、PFOS濃度の5-95パーセンタイルの集団を対象とした分析でも49例の再分析と同様な結果が得られた。

### 2. 血清中フタル酸エステル類の分析

#### (1) 予備検討

今回測定に用いた血清の採取および保存法を図3に示した。試料採取時および保存中のコンタミネーション防止には十分配慮しているが、フタル酸エステル類の測定用に特化した対策は行っていない。そこで、実試料を測定するための予備検討として、試験操作に由来するブランク値とトラベルブランク値の測定、および実試料数検体の予備測定を行った(表7)。

我々はすでに、分析操作過程におけるコンタミネーションを低減化した前処理法を開発している<sup>2)</sup>。その方法に従い、試験操作に由来するブランク試験を行った結果、DEHPとDBPの検

出濃度の平均値±標準偏差 (n=3) は、それぞれ $5.0 \pm 0.9$ 、 $4.0 \pm 0.9$  ppbと低い値を示し、BBP、DiOPおよびDiNPについては検出されなかった。従って、本法は、血清中のフタル酸エステル類を分析するのに十分な性能を有すると考えられた。なお、実試料の測定の際には、定期的にブランク試験を行い、ブランク値をモニターすることとした。

次に、トラベルブランク値の測定を行った。試料は、血清を採取した際に、血清の代わりにフタル酸エステル類測定用水をチューブに入れ、血清と同様に保存したものをを用いた。その結果、検出濃度（平均値±標準偏差；n=3）はDEHPが $6.8 \pm 3.7$  ppb、DBPが $5.8 \pm 1.1$  ppbで、BBP、DiOPおよびDiNPは検出されなかった。これらの値は、ブランク試験とほぼ同じレベルであり、保存中および輸送に伴うコンタミネーションはないと考えられた。

さらに、今回測定を行う血清と同じ方法で採取、保存されている血清について測定を行った。図4にフタル酸エステル類標準溶液および血清のGC/MS-SIMクロマトグラムを示した。検出濃度（平均値±標準偏差；n=3）はDEHPが $5.5 \pm 3.1$  ppb、DBPが $4.2 \pm 0.6$  ppbで、BBP、DiOPおよびDiNPは検出されなかった。これらの値は、ブランク試験、トラベルブランク試験とほぼ同じレベルであり、試料採取、保存中および輸送に伴うコンタミネーションはないと考えられた。

以上の結果より、今回測定に用いた血清には、フタル酸エステル類のコンタミネーションは認められないと考えられた。また、MEHPの予備検討は行っていないが、DEHPに由来するコンタミネーションの心配がないことから、MEHPのコンタミネーションはないと考えられた。

## (2) LC/MS/MS法を用いた日本人男性の血清中DEHPおよびMEHP濃度の測定

本実験に先立って行った血清に対して MEHP (20 ppb) および DEHP (20 ppb) を添加した際の回収試験の成績は、それぞれ、96.4% (RSD、6.8; n=6) および 99.5% (RSD、4.2; n=6) であった。図5に操作ブランクおよび血清の multiple reaction monitoring (MRM) クロマトグラムを示した。図6に相対検量線を示した。本研究を通じた MEHP および DEHP 操作ブランク値の平均値±標準偏差は、それぞれ、 $0.29 \pm 0.02$  および  $3.7 \pm 0.6$  ppb であった。試料中の MEHP および DEHP の定量下限値 (LOQ) は、操作ブランク値の標準偏差の 10 倍に相当する、それぞれ、0.20 および 6.0 ppbとした。また、MEHP のトラベルブランク値が 0.40 ppb であったことから、試料の輸送過程において MEHP のコンタミネーションがないことが示された。

日本人男性45名から採取、分離した血清中（検体数：45）の MEHP を測定した結果、全ての検体からMEHP が検出され、中央値は1.9 ppb であった（表8）。試料中に含まれる MEHP の実質量（測定値から操作ブランク値を差し引いた量）は、中央値で 1.6 ppb と概算された。

DEHP については、トラベルブランク値が 4.6 ppbであったことから、検体の輸送過程において DEHP のコンタミネーションがないことが示された。上記の 45 検体中15検体から LOQ (6.0 ppb) を越える DEHP が検出された。この LOQ を超えた上位 15検体の検出濃度範囲は、6.0~11.3 ppbであり、その中央値は、7.1 ppb であった。ただし、大部分の検体からは、LOQ 未満の DEHP しか検出されず、45検体全体での中央値は、LOQ 未満となった。LOQ を超えた

上位 15 検体中に含まれる DEHP の実質濃度（測定値から操作ブランク値を差し引いた濃度）は、中央値で 2～3 ppb と概算された。また、45 検体全体の実質濃度は、中央値で 2 ppb 未満と推測された。

### （3）GC/MS法を用いた日本人男性の血清中フタル酸エステル類の分析

実試料の測定に先立ち、トラベルブランク値の測定を行った。その結果、DEHPが6.4 ppb、DBPが3.0 ppbであったことから、試料の輸送過程におけるコンタミネーションがないことが示された。また、実試料と並行して測定を行った操作ブランク値の平均値±標準偏差は、DEHPが $4.3 \pm 1.0$  ppb、DBPが $3.6 \pm 0.6$  ppbで、BBP、DiOP、DiNPは検出されなかった。なお、LOQは、ブランクの標準偏差の10倍あるいは、検量線に使用した最も低濃度の標準溶液を5回繰り返し測定した時の標準偏差の10倍とした。DBP、BBP、DEHPは10 ppb、DiOP、DiNPは50 ppbであった。

日本人男性45名から採取、分離した血清の測定結果を表9に示した。DEHPは45検体中8検体から検出され、中央値は13.4 ppb、検出濃度範囲は10.3～76.1 ppbであった。DBPは45検体中7検体から検出され、中央値は25.2 ppb、検出濃度範囲は11.5～48.9 ppbであった。ただし、LOQ未満の検体を含む全試料の中央値は、両物質ともにLOQ未満となった。BBP、DiOP、DiNPは、すべての検体でLOQ未満であった。LOQを超えて検出された試料中に含まれるDEHP、DBPの実質濃度（測定値からブランク値を差し引いた値）は、中央値で8～20 ppbと概算された。

また、全試料中に含まれるDEHP、DBPの実質濃度は2 ppb未満と推測された。

## 3. 日本人男性の血清フタル酸エステル類およびその代謝物の濃度と臨床データとの関連

### （1）対象男性集団における身体所見ならびに精液所見データ

表10に今回フタル酸エステル類を測定した日本人男性45名の身体所見ならびに精液所見の各パラメータの平均値、標準偏差、最小値、中央値、最大値を示した。

### （2）血清中MEHP濃度と身体所見ならびに精液所見パラメータとの関連

LC/MS/MS法により45検体全例から検出されたMEHPについては、血清中の濃度と身体所見ならびに精液所見との関連をみた結果、全てのパラメータに対して有意な相関関係を認めなかった（表11）。さらに、MEHP濃度を中央値1.9 ppbで2群（1.9 ppb 未満と1.9 ppb以上）に分けて各パラメータの平均値を比較したが、検討した全ての項目において有意差は認められなかった（表12）。

### （3）血清中フタル酸ジエステル体 (DEHPおよびDBP) 濃度と身体所見ならびに精液所見パラメータとの関連

検出率の低かったDEHP (LC/MS/MS)、DEHP (GC/MS) およびDBPについては、検出された男性群と定量下限値未満だった男性群間で身体所見ならびに精液所見の各パラメータの平均値を比較したところ、DEHP (LC/MS/MS) 検出群 (15例) では精液量が有意に低く (表13、2.1ml vs 3.2ml、

P=0.028)、DEHP(GC/MS)検出群(8例)では身長が有意に高く(表14、176.4cm vs 172.1 cm、P=0.04)、DBP検出群(7例)では精子濃度( $29.1 \times 10^6/\text{ml}$  vs  $64.4 \times 10^6/\text{ml}$ 、P=0.004)と総精子数( $89.6 \times 10^6$  vs  $168.3 \times 10^6$ 、P=0.023)が有意に低かった(表15)。DBPと精子濃度の散布図を見ると、検出群7例全例で精子濃度が低い特徴的なパターンを示していた(図7)。DBPを検出した7例の各パラメータ平均値を表16に示した。平均値の比較(表15)では有意差は認められなかったが、精巣容量が左右ともに小さい傾向が認められた(表16)。

#### 4. 生体試料中のPBDEsの分析法の確立

##### (1) 脂肪抽出法の選択

血清中のPBDEs濃度の評価を行う際には、脂肪重量あたり濃度も併せて算出する方が望ましい。一方、不正確な脂肪抽出結果は大きな定量誤差要因となる。Patterson法は血液(血漿・血清)中ダイオキシン類の分析における標準的な脂肪抽出法であり、本研究においても原理的に適用可能と考えられるが、Patterson法を1 g程度の少量血清試料に適用した例は報告されていない。そこで、本実験に先立って、Patterson法の少量血清試料への適用性について基礎的な検討を行った。その結果、図8の通り、1、2、5、6、10 gのいずれの血清使用量においても同様の脂肪抽出結果が得られた。すなわち、L-コンセーランまたはL-スイトロールIの各プール血清について、血清1 gあたり約4 mgの脂肪が抽出された。この値は、製品の成分参考値から推測される脂肪量(約3~4 mg)とほぼ一致しており、満足できる結果であった。なお、Patterson法における操作ブランク重量は0.2 mg以下と小さく、脂肪重量測定の大きな障害とはならなかった。以上、Patterson法を用いて少量血清中の脂肪を精度良く抽出することが可能であることが明らかとなった。

1、2、5、6、10 gの血清を使用した場合のPBDEs定量結果を図9~10(L-コンセーラン)および図11~12(L-スイトロールI)に示した。血清ベース、脂肪ベースいずれの場合についても血清使用量の違いによるPBDEs定量値の大きな違いは認められなかった。今回のプール血清と同程度の汚染レベルであれば、1 gの少量血清によるPBDEsの定量は十分可能であることが分かった。L-スイトロールIを1 g使用して得られたクロマトグラムを図13に示した。一方、報告されている日本人の平均的なPBDEs汚染レベルは主要異性体のTeBDE-47で約0.5~2 ng/g-lipidであり、これは今回使用したプール血清(L-コンセーラン、L-スイトロールI)の汚染レベルの約1/60~1/15に相当する。仮に1 gの血清を本実験に使用すると仮定した場合、最終検液中では約0.2~0.8 ng/mLとなる。装置の検出感度は十分であるが、予備検討における操作ブランク最終検液中から2,2',4,4'-TetraBDEが平均0.1 ng/mL検出されているので、LOD・LOQの設定レベル次第では大半の試料でNDもしくはTrace(<LOQ)になり、試料間の汚染レベルの比較が困難となることが予想された。そこで、今回、疫学的評価が可能な定量データ(ブランク値の10倍以上)を出すために、6 gの血清を用いて本実験を行った。

なお、Patterson法以外の脂肪抽出法として、荻原らが報告しているアセトン/ヘキサン(1:1)を抽出溶媒に使用した高速溶媒抽出法(ASE法)<sup>3)</sup>についても検討を行った。しかし、ASE法はステンレス金属製部品9点、消耗部品3点からなる抽出セル(各試料毎に必要な)の組み

立て・分解・洗浄に時間を要し、また、脂溶性成分以外にも、担体に保持させた血清中の水分および水溶性成分も抽出液に混入してくるため、別途抽出液の水洗・脱水操作が必要であるなど、当初期待したほど簡便・迅速な手法ではなかった。さらに、無水硫酸ナトリウムを血清試料の保持担体として用いた場合、抽出脂肪量が予想値（血清1 gあたり3~4 mg）より低い傾向が認められた。これは、セル内部において血清由来の水分による硫酸ナトリウムの固着が起こったためと推測された。保持担体にけい藻土を用いれば固着の問題は解消できるが、予備検討においてけい藻土のブランク抽出液から微量のPBDEsが検出され、血清試料の抽出に適用するためには、けい藻土の洗浄あるいは焼き出し処理が必要と考えられた。以上、血清試料の抽出にASE法を用いる利点は少なく、さらに担体の種類や抽出条件の最適化等、本実験までに検討すべき課題が多いことが示唆された。よって、本研究では、脂肪抽出法としてPatterson法を採用することにした。

## （2）添加回収試験

市販のプール血清（L-スイトロールI）にPBDEsを添加した際の回収率は、表17の通り良好であった。また、予備実験および本実験におけるクリーンアップスパイクの回収率は概ね50~100 %の範囲内であり、満足できるものであった。

## （3）実試料の測定

標準溶液および血清試料（YE100204005）、トラベルブランクのクロマトグラム例を図14~16に、血清およびトラベルブランク（血清の代わりに超純水をチューブに入れ、血清と同様に保存した試料）の定量結果を表18~19および図17~18に示した。トラベルブランクからPBDEsは検出されず、保存容器および輸送に伴う汚染はないことが明らかとなった。今回分析した血清試料10検体すべてからLOQ以上の濃度で検出された主要な異性体はTeBDE-47、HxBDE-153、PeBDE-99、PeBDE-100、であり、その濃度範囲（および中央値）は血清あたり濃度で各々、3.0~26 pg/g (8.2 pg/g)、2.0~7.1 pg/g (4.0 pg/g)、0.53~4.9 pg/g (1.3 pg/g)、0.72~3.0 pg/g (1.3 pg/g)、脂肪あたり濃度で各々、0.54~5.9 ng/g (1.4 ng/g)、0.37~1.1 ng/g (0.72 ng/g)、0.10~1.1 ng/g (0.21 ng/g)、0.13~0.67 ng/g (0.24 ng/g)であった。

## 5. 生体試料中のパラジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノールの分析法の確立

### （1）測定条件の検討

血清および尿中の、パラジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノールおよび2-エチル-1-ヘキサノールを定量するための方法としてヘッドスペース-GC/MS法を選択し、試料処理や測定条件を検討した。その結果、試料の処理方法として、血清は0.5 mL、尿は2 mLをそれぞれ飽和食塩水10 mLで希釈し、内部標準物質を一定量添加した後に、ヘッドスペース分析に供するという方法を採用した。試料の希釈に用いた飽和食塩水は、実験室内での汚染と考えられ

るが、2-エチル-1-ヘキサノールの濃度が1 ppb以上と高かったため、逆相系の固相カートリッジで処理し0.1 ppb以下に低減させたものを使用した。内部標準には、それぞれの安定同位体を用いたが、2-エチル-1-ヘキサノールの安定同位体は入手できなかったため、市販の2-エチル-1-ヘキサノール- $d_{17}$ から2-エチル-1-ヘキサノール- $d_{16}$ を自家合成して使用した。ヘッドスペース処理におけるバイアル加熱温度は、2-エチル-1-ヘキサノールの検出感度に大きく影響を及ぼしたため、水系の試料としては上限に近い85 °Cを用いた。

図19に標準溶液のSIMクロマトグラムを、図20および図21に豚血清およびヒトの尿にそれぞれ20 ppbおよび5 ppbレベルで標準添加して得られたクロマトグラムを示した。3種類の測定対象化合物および内部標準として添加した安定同位体は良好に分離・検出され、いずれの試料からも、定量の障害となるような妨害ピークは認められなかった。しかしながら、図19および図20に示したように、血清を測定したクロマトグラムにおいてのみ2-エチル-1-ヘキサノール- $d_{16}$ のモニターイオンである $m/z$  80のピーク面積値が、標準溶液のそれに比べて極端に低くなり、代わりに $m/z$  79が高くなるという現象が認められた。これは、血清に含まれる何らかの成分の作用により、内部標準として加えた2-エチル-1-ヘキサノール- $d_{16}$ のアルデヒド基に結合している重水素 (D) が水素 (H) に置換され、2-エチル-1-ヘキサノール- $d_{15}$ が生成した結果であると考えられた。そこで、血清中の2-エチル-1-ヘキサノールの定量に関してのみ、2-エチル-1-ヘキサノール- $d_{16}$ に由来する $m/z$  80のピーク面積に、2-エチル-1-ヘキサノール- $d_{15}$ に由来すると考えられる $m/z$  79のそれを加えて定量することとした。

## (2) 添加回収実験

豚血清に2および20 ppbの標準物質を添加した試料、および、ヒトの尿に0.5および5 ppbを標準添加した試料を分析し、その結果として得られた回収率などのデータを表20および表21に示した。パラジクロロベンゼンの豚血清およびヒトの尿からの回収率および再現性は、いずれの添加レベルにおいてもほぼ良好であった。しかしながら、2-エチル-1-ヘキサノールおよび2-エチル-1-ヘキサノールにおいては、再現性は問題ないものの、回収率が100%を大きく超過したことから、本測定方法の実用にはさらに検討が必要であることが示唆された。この原因を調査した結果、測定対象化合物と内部標準のピーク面積比が標準溶液と試料溶液間で大きく異なる、すなわち、回収率を補正するために内部標準として加えた安定同位体が十分に機能していないためであることが明らかとなった。定量下限値については、パラジクロロベンゼンが血清中で0.5 ppb、尿中で0.1 ppb、2-エチル-1-ヘキサノールは血清中で2 ppb、尿中で0.5 ppb、2-エチル-1-ヘキサノールは血清中で1 ppb、尿中で0.2 ppb程度であった。

## D. 考察

### 1. 有機フッ素系化合物 (FOCs) の血液濃度と精液所見等の臨床データの解析

100%の検出率であったPFOSについて、身体所見、精液所見、血清ホルモン値との関連を解析したところ、50例全例を対象とした解析では、精漿中のPFOS濃度と、精子濃度および総精子数との間に有意な弱い正の相関が認められた。しかしながら、禁欲期間と精子濃度が分布

から大きく外れた男性1名を除いての解析では、PFOS濃度と検討した全ての項目との間に有意な関連は認められなかった。棄却した1例の男性は精子濃度が最も高く、かつPFOS濃度が最高値であったため、その1例の影響で、正の相関を示す結果が導かれたものと推察された。したがって、49例で再分析した結果と、昨年度の本研究で測定した日本人若年男性集団における精漿中のPFOSの曝露レベルが非常に低かったことから、PFOSの男性生殖機能への曝露影響も認められなかったと考える。

## 2. 血清中フタル酸エステル類の分析

MEHPは、全ての試料から 1.2~3.5 ppb の範囲で検出された。Katoらは、特記すべき DEHPの曝露がないヒトの血清中の MEHP を測定し、その幾何平均値を 2.5 ppbと報告している<sup>4)</sup>。また、井之上らも健康なヒトの血清中の MEHP を測定し、5 ppb 未満であったと報告している<sup>5)</sup>。同じく筆者らも以前に健康な日本人から提供された血清を測定した結果、最大値で MEHP を 5.7 ppb 検出した以外、5 ppb 未満であると報告している<sup>6)</sup>。今回の値は、それらの結果と近似した値となった。Katoらは、血清中のエステラーゼ活性によって血清採取後に混入した DEHP から MEHP が生成し、MEHP の値が本来の数値よりも高く検出する危険性を指摘しており、リン酸を添加することで防ぐことができることを報告している<sup>7)</sup>。そのため、Katoらは、上記に引用した MEHP の測定結果について、過剰評価の危険性を注記している<sup>4)</sup>。従って、本研究結果についてもその危険性を含んでいると考えられる。しかしながら、同時に DEHP を測定した結果、DEHP を高濃度に含む試料がほとんど存在しなかったことから、MEHP の濃度を過剰評価している危険性は、低いと考えられる。また、測定した 45 試料中の MEHP の濃度について、過去の健康なヒトの血清中の濃度と近似することから、試料提供者は、特記すべき DEHP の曝露がないと推察される。

DEHP についても、健康なヒトの血清からは微量 (5 ppb 未満) しか検出されてない<sup>5, 6)</sup>。DEHP を含む医療器具を用いた医療行為 (透析等) を受けた患者は、一過性に比較的多量の DEHP に曝露を受けることがあり、その血清中では、数百 ppb 以上の DEHP が検出されることがある<sup>8, 9)</sup>。今回、このような DEHP の多量の曝露が疑われる試料は認められなかった。同様に、DBP等他のフタル酸エステル類についても、特記すべき曝露はないと推測された。従って、試料提供者のフタル酸エステル類に対する曝露量は、通常レベルと推測される。また、本研究においては、血液採取、血清分離、分析機関への検体の輸送等の過程において、フタル酸エステル類のコンタミネーション防止対策が、適切に管理されていたことが結論づけられる。

## 3. 日本人男性の血清フタル酸エステル類およびその代謝物の濃度と臨床データとの関連

今回、45検体全例から微量のMEHPが検出されたが、血清中の濃度と身体所見ならびに精液所見との間に相関関係は認められず、中央値で2群に分けての平均値の比較においても、検討した全ての項目において有意な差は認められなかった。DEHPの測定では、DEHP(GC/MS)検出群で精液量が有意に低く、DEHP(GC/MS)検出群で身長が有意に高いという結果が得られたが、相

関分析および散布図のパターンからDEHP濃度との間に関連は認められず、2群間での精液量あるいは身長分布の違いが影響したとするのが妥当であった。したがって、今回の測定結果を分析した限りでは、MEHP およびDEHPの男性生殖機能へ曝露影響は認められなかった。

一方、DBP検出群では精子の数に関わるパラメータ（精子濃度と総精子数）の値が有意に低く、検出群7例全例で精子濃度が $50 \times 10^6/\text{ml}$ 以下であった。WHO基準で乏精子症（精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満）と分類される男性は1例であったが、それ以外の4例が妊孕性の低下が疑われる $40 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の数値であった。さらに精巣容量についても、有意差は認められなかったが、7例中5例で14~18mlと、やや低めの値であった。統計解析上はDBPと精巣機能との関連を示唆する結果であったが、これらの結果がDBPの男性生殖機能への影響によるものなのか否かについては、分析対象の中で最もコンタミネーションの影響が少なく比較的曝露量の反映がされやすい MEHP で差異が認められなかった点を踏まえ、客観的な解釈が望まれる。検出群の検体数が7例と少ないので、さらに例数を増やしての測定と分析が必要であり、また再現性を確認するために別の時期に採取した血清での測定が必要である。今後はDBPの代謝物であるMBPについて検討していくことが重要であると考えられる。

男性生殖機能に関連した指標として今回は精巣容量と精液所見のデータを用いたが、次は血清中の各種ホルモン値データについても、血清中フタル酸類およびその代謝物濃度との関連を解析する計画である。

#### 4. 生体試料中のPBDEsの分析法の確立

TeBDE-47およびHxBDE-153の脂肪あたり濃度について、今回の結果を国内外の報告値と比較すると表22の通りとなる<sup>10-15)</sup>。今回の値は、ほぼ日本人の平均的な汚染レベルの範囲内であり、スウェーデン人の一般的なレベルと同程度、アメリカ人と比べると1オーダー低い値であった。蓄積性の高い工業原体（ペンタ-BDE）の使用を1990年代前半から関連業界が自主規制してきた日本や欧州と異なり、アメリカでは最近までペンタ-BDEの使用が継続されてきたために人体のPBDEs汚染がより深刻化したものと推定される。

同一人物におけるPBDEs濃度の年内変動の解明は、曝露モニタリングを実施する上で重要である。今回の分析には6gの血清試料を用いたが、今回最も汚染レベルが高かったYE100204005の血清試料であれば、理論上1g程度でPBDEsの主要異性体の測定が可能である。保存血清（各月約0.5g）を2~3ヶ月毎に混合して分析することにより、PBDEs濃度の年内変動に関する有用な知見が得られると期待される。また、今回分析に使用した最終検液の残りをを用いて予備的な定性分析を行ったところ、図22-23の通り、代表的な残留性有機汚染物質（POPs）である有機塩素系農薬（ $\beta$ -HCH、HCB、クロルデン関連成分、DDT関連成分）、PCBsについて妨害の少ない明瞭なクロマトグラムが得られ、今回開発した分析法がPBDEs以外のPOPsの分析にも適用できることが示唆された。各汚染物質について適切な内標準物質を使用することにより、少量血清中POPsの包括的高精度微量分析が可能と期待される。

## 5. 生体試料中のパラジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノールの分析法の確立

今回検討したヘッドスペース-GC/MS法による血清および尿中の分析法は、2-エチル-1-ヘキサノールおよび2-エチル-1-ヘキサノールの2種類の化合物において、添加回収率が100%を大きく超過するという問題があり、実用には未だ検討の余地を残している。その原因として考えられたのが、測定対象化合物と内部標準物質の挙動の差、即ち、試料に含まれるマトリックスの影響が測定対象化合物と内部標準の間で異なることである。内部標準物質は測定対象化合物と物理的性質が近似し、試料中での挙動がほぼ同一であることが求められることから、安定同位体が最も理想に近いとされている。しかしながら、今回用いたパラジクロロベンゼン以外の安定同位体は $-d_{17}$ あるいは $-d_{16}$ 体であり、測定対象化合物とは沸点や極性などの物理的性質だけでなく、タンパク質や脂肪など試料中に存在するマトリックスとの相互作用など化学的な性質にもある程度差があり、それが原因で前述したような回収率の誤差をもたらしたものと考えられる。以上より、本法を改良し、良好な回収率を得るためには、新たな内部標準の検討・開発が不可欠であると考えられる。

その一方で、本法は回収率の面では不十分ながらも、再現性は十分であるため、血清や尿中に存在するこれら化合物の存在濃度レベルを評価する方法としては、現在のままでも十分利用価値があるものと考えられる。今後は、実際の試料を分析すると同時に、分析法の改良に取り組む予定である。

## E. 結論

1. PFOSの血液濃度と精液所見等の臨床データとの関連について、精液所見に大きく影響する因子である禁欲期間の分布が大きく外れた男性が1名を除いた49名を対象に解析を実施した結果、検討した全ての項目との間に有意な関連は認められなかった。

2. 日本人男性45名から採取、分離した血清中のフタル酸エステル類濃度を測定した結果、MEHPについては、すべての検体から検出され、中央値は1.9 ppb、検出濃度範囲は1.2~3.5 ppbであった。トラベルブランクを差し引いた実質濃度は、1.6 ppb（中央値）程度と推測された。DEHP、DBP、BBP、DiOP、DiNPについては、大部分の検体でLOQ未満となり、45検体全体での中央値はLOQ未満であった。

3. 日本人男性45名の血清中のMEHP濃度と、精液所見等の臨床データとの関連について解析を実施した結果、身体所見ならびに精液所見に関する各種パラメータにおいて有意な関連を示す項目は認められなかった。一方、検出率の低かったジエステル体において、検出された男性群と定量下限値未満だった男性群間で身体所見ならびに精液所見パラメータを比較したところ、DBPが検出された7例の精子濃度が定量下限値未満だった38例に比して有意に低いという結果を得た(精子濃度平均値:  $29.1 \times 10^6/\text{ml}$  vs  $64.4 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $P=0.004$ )。

4. 血清中のポリ臭化ジフェニルエーテル類の分析法として、Patterson法により脂肪を抽出後、44%硫酸含浸シリカゲルカラムで精製し、GC/MSで測定する方法を確立した。さらに、実試料10検体を測定した結果、主要な残留成分としてTeBDE-47、HxBDE-153、PeBDE-99、PeBDE-100が全ての試料から検出され、その中央値は各々8.2 ppt、4.0 ppt、1.3 ppt、1.3 pptであった。その他、TrBDE-28/33、TeBDE-49、TeBDE-66、PeBDE-85、PeBDE-118、HxBDE-154、HxBDE-155、HpBDE-183についても、幾つかの試料から検出された。これらのPBDEs濃度は、これまでに報告されている日本人の平均的な汚染レベルの範囲内であった。

5. 血清および尿中のパラジクロロベンゼン、およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの分解物である2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノールの同時分析法として、安定同位体を内部標準に用いたヘッドスペース-GC/MS法を検討した。その結果、パラジクロロベンゼンに関しては良好な定量性が得られたが、それ以外の化合物については、内部標準が十分に機能していないことが原因で、回収率が100%を大きく超過するという問題があり、現在改良法を検討中である。

#### F. 参考文献

- 1) Patterson, D. G. Jr., Furst, P., Alexander, L. R., Isaacs, S. G., Turner, W. E., Needham, L. L., *Chemosphere*, 19, 89-96 (1989).
- 2) 生体試料、動物飼料等中のフタル酸エステル類の分析法の開発、厚生労働科学研究（化学物質リスク研究事業）「試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究」総合研究報告書：29-54、2005
- 3) 荻原正義，鷹屋光俊，神山宣彦，第13回環境化学討論会講演要旨集，pp334-335（2004）.
- 4) Kato, K., Silva, M. J., Reidy, J. A., Hurtz III, D., Maleck, N. A., Needham, L. L., Nakazawa, H., Barr, D. B. and Calafat, A. M., *Environ. Health Perspect.*, 112, 327-330 (2004).
- 5) Inoue, K., Kawaguchi, M., Okada, F., Yoshimura, Y. and Nakazawa, H., *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, 527-533 (2003).
- 6) Takatori, S., Kitagawa, Y., Kitagawa, M., Nakazawa, H., and Hori, S., *J. Chrom., B.*, 804, 397-401 (2004).
- 7) Kato, K., Silva, M. J., Brock, J. W., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hodge, C. C., Nakazawa, H., Needham, L. L. and Barr, D. B., *J. Anal. Toxicol.*, 27, 284-289 (2003).
- 8) Dine, T., Luyckx, M., Gressier, B., Brunet, C., Souhait, J., Nogarede, S., Vanpouke, J., Courbon, F., Plusquellec, Y. and Houin, G., *Medical Engineering Physics*, 22, 157-165 (2000).
- 9) Flaminoio, L. M., Bergia, R., Angelis, L. D., Ferazza, M., Marinovich, M., Galli, G. and Galli, C. L., *Int. J. Art. Org.*, 11, 428-435 (1988).
- 10) Takasuga, T., Senthilkumar, K., Takemori, H., Ohi, E., Tsuji, H., Nagayama, J.,

Chemosphere, 57, 795-811 (2004).

11) 平井哲也, 藤峰慶徳, 小平 司, 渡邊 昌, 第11回環境化学討論会講演要旨集, pp168-169 (2002).

12) Guvenius, D.M., Aronsson, A., Ekman-Ordeberg, G., Bergman, A., Noren, K., Environ. Health Perspect., 111, 1235-1241 (2003).

13) Sjodin, A., Hagmar, L., Klasson-Wehler, E., Kronholm-Diab, K., Jakobsson, E., Bergman, A., Environ. Health Perspect., 107, 643-648 (1999).

14) Sjodin, A., Jones, R.S., Focant, J.F., Lapeza, C., Wang, R.Y., McGahee, E.E. 3rd, Zhang, Y., Turner, W.E., Slazyk, B., Needham, L.L., Patterson, D.G. Jr., Environ. Health Perspect., 112, 654-658 (2004).

15) Mazdai, A, Dodder, N.G., Abernathy, M.P., Hites, R.A., Bigsby, R.M., Environ. Health Perspect., 111, 1249-1252 (2003).

#### 謝辞

2-エチル-1-ヘキサナール-d<sub>16</sub>を合成していただいた、岐阜薬科大学薬品化学教室の廣田耕作教授および佐治木弘尚助教授に深謝いたします。