The Japan Society for Analytical Chemistry

BUNSEKI KAGAKU Vol. 56, No. 12, pp. 1005–1018 (2007)
© 2007 The Japan Society for Analytical Chemistry

総合論文

内分泌撹乱化学物質の微量分析と健康リスク評価への応用

中澤　裕之®[1]，伊藤　里恵[1]，岩崎　雄介[1]，中田　彩子[1]，斉藤　貢一[1]

日常生活品として多用されているプラスチック製品には，内分泌撹乱作用があることが知られている．内分泌撹乱化学物質のヒトへの暴露に対するリスク評価を行うためには，ヒトへの暴露量を正確に測定する必要があることから，著者らは高感度かつ信頼性の高い内分泌撹乱化学物質の分析法について検討した．対象とした化学物質としては，日常生活を通じてヒトが恒常的に暴露される危害化学物質として，ビスフェノールA，フタル酸エステル類及び有機フッ素系化合物を取り上げ，血液，尿，母乳などの生体試料，更にはハウスダストやカーペットなどの環境試料などを想定して，液体クロマトグラフィー/質量分析法及び液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を主体とした機器分析による信頼性の高い微量分析法を構築した．この手法を駆使して，ヒト血液，尿などの生体試料を分析し，有機フッ素系化合物によるヒトへの暴露源を調査するとともに，医療用具等の高分子素材からのフタル酸エステル類溶出動態を調べてヒト暴露量の評価を行い，リスク評価を試みた．

1　緒　　言

1962年，Carsonは，著書“Silent Spring（沈黙の春）”の中で，ジクロロジフェニルトリクロロエタン（DDT）をはじめとする農薬などによる生態系への影響を警鐘した[1]．更に1996年，Colbornらは，微量レベルでの化学物質のヒト健康影響の評価概念として，生活環境中に放出された物質の中に，生体の恒常性維持を司る内分泌系を撹乱し，遅延や神経及び生殖系などに対する様々な影響を及ぼす化学物質の存在を警鐘した[2]．その後，これら化学物質は，endocrine disrupting chemicals（EDCs: 内分泌撹乱化学物質）として国内外で注目されるようになり，関連の研究が広範囲な領域で展開された．

2007年6月，米国環境保護局（Environmental Protection Agency, EPA）は内分泌撹乱作用を検討すべき化合物のリスト案を発表した[3]．このリスト案に網羅されているのは，ヒトへの暴露の可能性が高いと考えられる73種の農薬である．著者らは，これまでにリスト案に含まれる農薬を含め種々の残留農薬に関して報告[4)~8)]しており，総説もまとめている[9]．米国EPAは，このリスト案には内分泌撹乱化学物質及びその作用が疑われる化学物質は含まれていないと報告している．しかしながら，私達は多数の化学物質を作り出し，その恩恵に預かって，快適かつ便利な生活を享受している．とりわけ，玩具，食品用容器包装材料，化粧品，建材等の日常生活用品・資材のほかに，理化学器材，医療機器等のような専門領域で使用されている生活関連製品の中には，多くの化学物質が用いられている．これら生活関連製品から溶出する可塑剤，モノマー，重金属類等の中には内分泌撹乱作用を有する化学物質が含まれている．実際にヒトの血液を分析してみると，様々な高分子素材に由来すると推測される化学物質が検出される[10]．しかし，EDCsのような微量化学物質が多様なホルモン様作用に基づいて複雑な生体機能を微量で撹乱させ，しかも世代を越えて生体に様々な影響を及ぼすのではないかとされる化学物質はいまだに内分泌撹乱作用がどの濃度レベルで発現される（低用量問題）のか，用量-作用関係が明らかにされておらず[11)~14)]，暴露量の把握を含めて正確なリスク評価を導き出せない状況にある[15]．

著者らが様々な研究プロジェクトを通じて明らかとした知見を例に，機器を用いたビスフェノールA，フタル酸エステル類，有機フッ素系化学物質等の微量危害化学物質の分析とリスク評価について考察する．

2　ビスフェノールAの分析法

ビスフェノールA（BPA）は2つのフェノール部位を持つ芳香族化合物であり，用途としてポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として幅広く使用されている．BPAに関して，カニクイザルを用いて，経口及び静注による BPA（^{14}C-BPA放射性安定同位体）投与により，体内動態を確認した研究がなされた[16]．その結果，BPAの体内半減期が約10時間弱（経口投与）であり，そのほとんどがグルクロン酸抱合体となり，尿に24時間程度で排泄されている．しかし，ヒトでも同様の体内動態と予想されるが，Völkelらは，健常人ボランティアに5 mgのBPA（BPA-d_{16}）

[1] 星薬科大学薬品分析化学教室：142-8501　東京都品川区荏原2-4-41

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

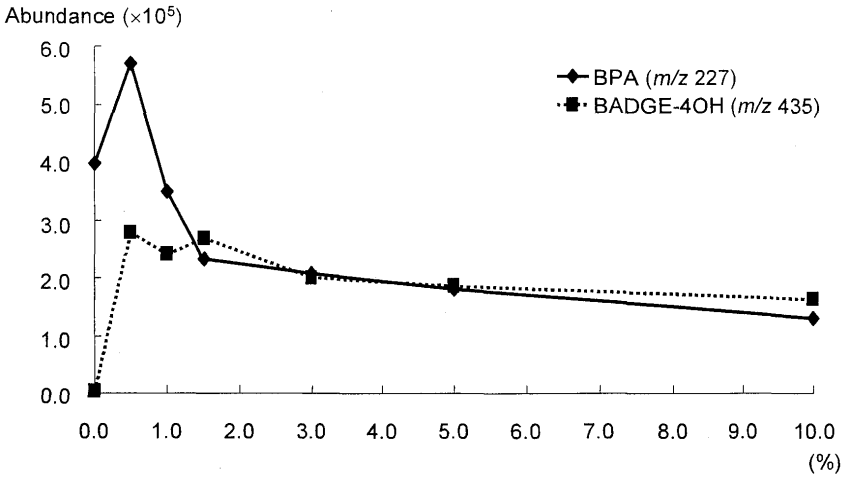


Fig. 1 Optimization of mobile phase on acetic buffer concentration

を経口投与した後，体内動態や代謝などを検討したところ，BPAの体内半減期は6時間程度であり，カニクイザルの実験同様，そのほとんどが尿にグルクロン酸抱合体として排泄されていた[17]．BPAのグルクロン酸抱合体は，既に動物実験などでも報告[18)19)]されており，モニタリングバイオマーカーとしてもグルクロン酸抱合体が有用であると推定できる[20]．しかし，ヒトによるBPAの代謝において，グルクロン酸抱合体のほかに硫酸抱合体の存在が確認されており[21]，様々な代謝プロセスを考慮する必要性が浮上している．また，ラットやマウスの肝S9を用いて代謝産物の評価をした場合，BPA以上のエストロゲン活性体や二重合体などの存在が報告[22)23)]されており，グルクロン酸抱合体などでもモノ体，ジ体も存在する可能性がある．

このように様々な影響が指摘されている一方，BPAは我々の身の回りで幅広く利用されており，缶飲料中からも検出されている[24]．そのため，環境中や食品中，生体試料中における存在量が問題となり，モニタリングが要求されている．

そこで，本節においては，著者らが実施したBPAの暴露量測定における分析例について紹介する．

2・1 ヒト血漿試料中BPAの分析

生体試料中BPAの濃度は微量であることから高感度な検出方法が求められる．更に，分析を行うに際し，夾雑成分の除去のために前処理過程が重要となってくる．そこで，BPAはフェノール水酸基を二つ有することから，その特性を生かし，フェノール性水酸基を特異的に検出することができる液体クロマトグラフィー/電気化学検出法（LC/ECD）を用い，ヒト血清中のBPA分析に応用されている[25]．しかし，多くの夾雑物が存在する生体試料中のBPAの分析については，前処理手法の検討が必須である．ヒト血漿の分析を行うに際し，固相抽出カートリッジによる精製を行い，LC/ECDで測定した結果，定量限界0.6 ng mL^{-1}（血漿）の分析法が構築できた[26]．また，ヒト精漿中BPAでも同様に固相抽出カートリッジにより前処理操作を行い，定量限界0.5 ng mL^{-1}（精漿）が達成されている[27]．前処理方法に固相抽出法，検出器にECDを使用したことで高感度な分析を行うことが可能となった．

2・2 ヒト尿試料中BPA及びBADGE-4OHの分析

上記の報告では，クロマトグラム上のピークについて保持時間のみの同定となり，分析結果の信頼性等が指摘されてきた．近年になり，質量情報の取得で同定能力を向上させた質量分析法（MS）が汎用されるようになってきた．現在では生体試料中のBPAの分析に多く利用され，クロマトグラフィーと結合した液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）及び液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（LC/MS/MS）が中核になっている．

LC/MSの移動相に適量の酸を加えることでイオン化促進効果が報告されている[28]ことから，本研究においても移動相に少量の酸を加えてイオン効率に与える影響を検討することにした．酢酸アンモニウムを加えてBPA，ビスフェノールAジグリシジルエーテル四水酸化体（BADGE-4OH）の標準品を測定し，そのmultiple reaction monitoring（MRM）レスポンス比を比べたところ，酢酸アンモニウム濃度が0.5 mMになるよう添加した際，各物質でのイオン化が良好な結果となった（Fig. 1）．

構築した分析法の信頼性を確保するために分析法バリデーションを取得した．装置の検出限界は1.0 ng mL^{-1}，検量線の相関係数は0.999となった．また，尿試料を用いた添加回収試験を行ったところ，95% 以上と良好な回収率を収めた．これら良好な結果を得ることができたことから，本分析法は尿中BPA及びBADGE-4OHの定量に有用であることを確認した．

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

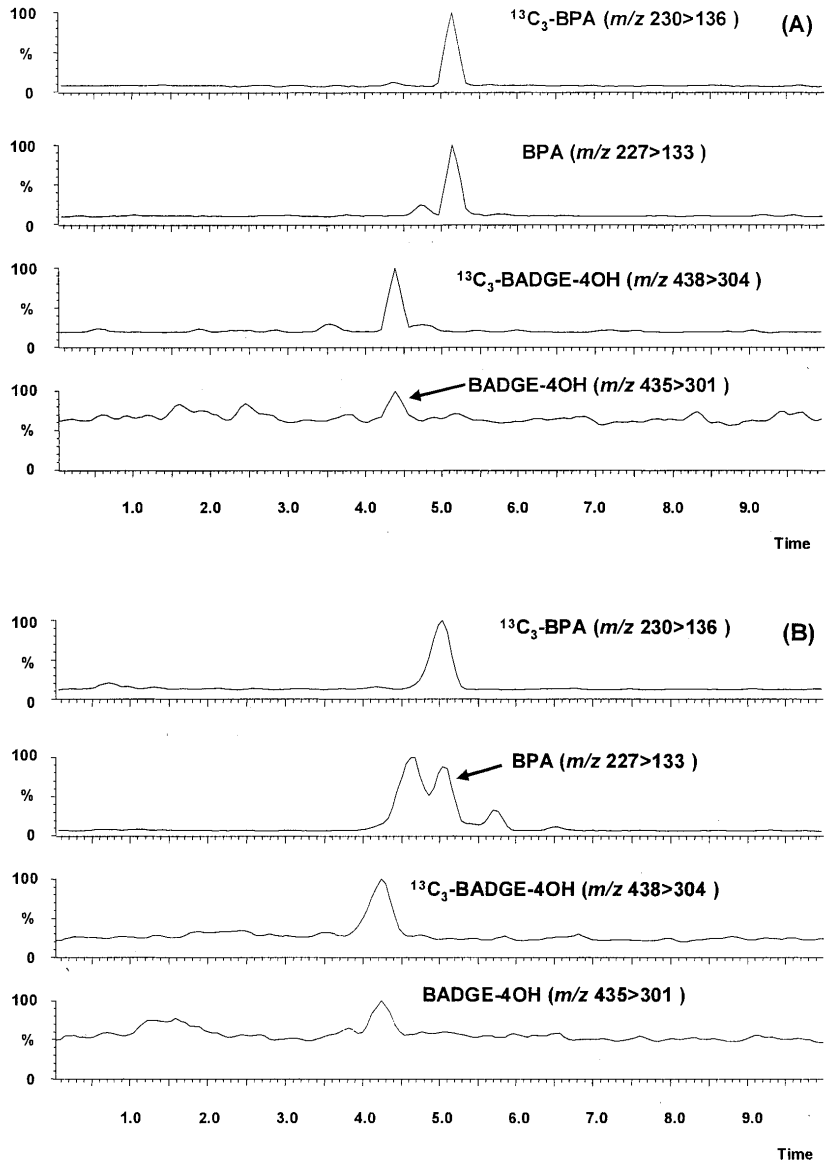


Fig. 2　MRM chromatograms of BPA and BADGE-4OH
Chromatograms of (A) and (B) were typical standard solutions and urine sample, respectively.

実際の缶飲料を摂取し，その尿中 BPA 及び BADGE-4OH を測定したところ，それぞれ検出された（Fig. 2）．これらの結果より，LC/MS/MS を用いることで高感度かつ選択的な生体試料中 BPA の分析が可能となったと考えられる．

3　フタル酸エステル類の分析

ポリ塩化ビニル（PVC）樹脂は，快適な日常生活を過ごすために広範囲に利用されており，プラスチック製医療機器など欠くことのできない存在となっている．その一方，PVC に柔軟性を付与する目的で添加される可塑剤は，PVC からの溶出によるヒトへの生体影響が懸念されている．また，建材塗料等にも使用されており，厚生労働省の室内濃度指針にも一部のフタル酸エステル類（PEs）の規制がなされている．PEs の中でも，特にフタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）は，食品用手袋[29)30)]や医療機器[31)32)]等に使用されており，ヒトへの高濃度暴露が懸念されるため，行政的な使用規制がされている．

PEs の代謝は非常に迅速であるため，ヒトへの暴露量を評価する際には，代謝物の測定を行うことが一般的である．PEs は，主にフタル酸モノエステル類に代謝され，尿中に排泄される（Fig. 3）．Albro らは，DEHP の代謝に関して 30 種以上の代謝物を報告[33)]しており，フタル酸モノ-2-エチルヘキシル（MEHP）が ω-1 酸化を受けたフタル酸モノ-2-エチル-ハイドロキシヘキシル（MEHHP）や，MEHHP の酸化物であるフタル酸モノ-2-エチル-5-オキソヘキシル（MEOHP）などを含めた暴露量評価[34)35)]もなされている．また，これら MEHHP や MEOHP などの MEHP

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

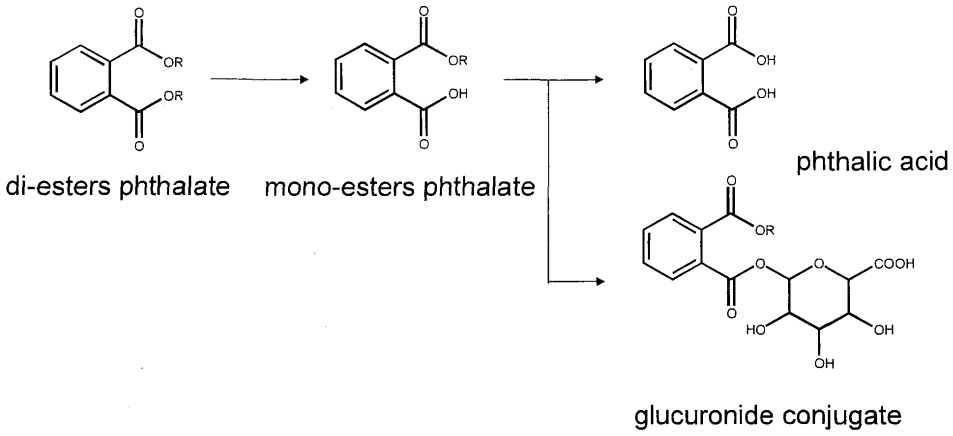


Fig. 3 Metabolic pathway of phthalate
Phthalate with the R and R groups are metabolized to be phthalate monoesters, which are found in urine as glucuronide conjugates or free acids.

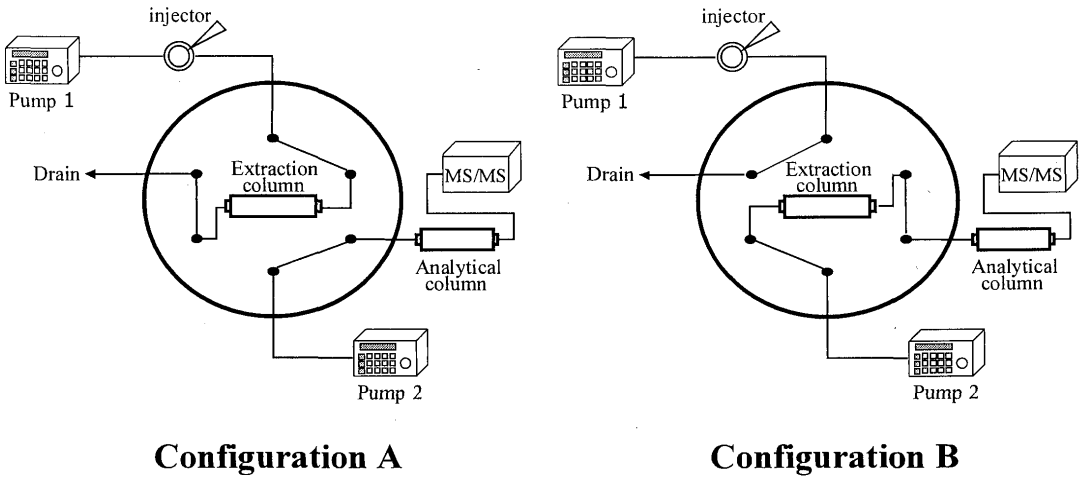


Fig. 4 Schematic representation of the column-switching system
Configration A: sample loading and washing; Configration B: sample eluting

酸化物は，DEHP を暴露後に代謝物を測定した報告[36)~38)]からも MEHP に比べて尿中排泄量割合が高く，MEHP よりも有効なバイオマーカーとなる可能性が示唆されている．DEHP 以外のフタル酸エステル類に関しても，モノ体への代謝が知られており，その代謝率は，フタル酸ジブチルからフタル酸モノブチルへ 69%，フタル酸ジブチルベンジルからフタル酸モノブチルベンジルへは 73% と報告[39)]されている．このように暴露量評価を実施するに当たり，親化合物である PEs は，測定環境からの汚染が懸念されるために，代謝物をモニタリングする例が多い．一方で，PEs の分析を実施するには，PEs の汚染を回避するために，前処理法が種々検討されている[40)41)]．Kato らは，血漿中の測定に精油定量装置を用い，汚染のない抽出精製を達成した[40)]．また，Ito らは，カラムスイッチング法（Fig. 4）を用いて閉鎖系での前処理を実施することで，測定環境からの汚染を回避している[32)41)]．

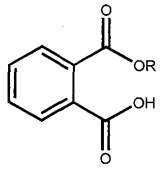
米国疾病管理・予防センター（Centers for Disease Control and Prevention, CDC）は，積極的に PEs のヒト暴露に関する研究を推進している．CDC の National Health and Nutrition Examination Survey（NHANES）プロジェクトにおいて，大規模な PEs の暴露量調査が達成されている[42)]．このプロジェクトにおいては，液体クロマトグラフィー（LC)-大気圧化学イオン化（APCI)-タンデム質量分析（MS/MS）法を用いて，フタル酸エステル類の代謝物であるフタル酸モノエステル類 8 種の分析[43)]や，更に代謝物を追加した PEs 代謝物 11 種の一斉分析法を報告している[35)]．更にエレクトロスプレーイオン化法（ESI）によるイオン化も検討されており，フタル酸（PE）や異性体を含めた LC/MS/MS による PEs 関連物質 15～16 種の一斉分析法も報告[44)45)]された．フタル酸エステル類の暴露量

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

Table 1　Chemical structures of monoester phthalates and oxidized metabolites

Analyte[a)]	Formula (-R)
MMP	$-CH_3$
MEP	$-CH_2CH_3$
MBP	$-(CH_2)_3CH_3$
MCHP	$-C_6H_{11}$
MBzP	$-CH_2C_6H_5$
MEHP	$-CH_2(C_2H_5)(CH_2)_3CH_3$
MOP	$-(CH_2)_7CH_3$
MNP	$-(CH_2)_2CH(CH_3)CH_2C(CH_3)_3$
MDP	$-(CH_2)_2CH(CH_3)CH_2(CH_2)_2CH(CH_3)_2$
MEHHP	$-CH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_2CH(OH)CH_3$
MEOHP	$-CH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_2COCH_3$
MCPP	$-(CH_2)_3COOH$
PA	-H
MECPP	$-CH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_3COOH$



a) These abbreviation is listed as follows: MMP (monomethyl phthalate), MEP (mono-ethyl phthalate), MBP (mono-butyl phthalate), MCHP (mono-cyclohexyl phthalate), MBzP (mono-benzyl phthalate), MEHP (mono-2-ethylhexyl phthalate), MOP (mono-n-octyl phthalate), MNP (mono-iso-nonyl phthalate), MDP (mono-iso-decyl phthalate, mono-3-methyl-7-methyloctyl phthalate), MEHHP (mono-2-ethyl-5-hydroxyhexyl phthalate), MEOHP (mono-2-ethyl-5-oxohexyl phthalate), MCPP (mono-3-carboxypropyl phthalate), PA (phthalic acid), MECPP (mono-2-ethyl-5-carboxypentyl phthalate)

評価にバイオマーカーとして用いられる主な化合物類をTable 1に示す．このようなCDCの暴露実態報告から健常人の暴露レベルや生体影響など疫学的な解析が実施されている[46)~49)]．しかしながら，国内における暴露レベルの解明や医療行為等による暴露評価など未解決な部分も多く，より詳細な研究が望まれている．

そこで本稿では，著者らがこれまでに行ってきたフタル酸エステル類に関する研究として，1）ヒト尿試料を用いたDEHP暴露量評価，2）ヒト血液試料中DEHP等の測定，3）PVC製医療機器から溶出するDEHP暴露量測定について紹介する．

3・1　ヒト尿試料を用いたDEHP暴露量の評価

前述のとおり，ヒト尿中のフタル酸エステル類の暴露量評価は，代謝物測定によって実施されていることが多い．尿中MEHP，MEHHP，MEOHPの3種をDEHPの代謝物としてモニタリングした例[34)]では，著者らは固相抽出法をオンラインで自動化することで簡便，迅速化を図り，更に，重水素置換したサロゲート物質を用いるLC/MS/MS測定により高感度かつ高精度な分析法を構築した[34)]．健常人ボランティア70名の尿中DEHP代謝物の測定に適用した結果，MEHHPは9.5～320.8 ng mL^{-1}，MEOHPは13.9～187.5 ng mL^{-1}，MEHPはND～13.9 ng mL^{-1}であり，MEHPに比べて他の代謝物のほうが高濃度であり，かつ検出率も100%と高かった．これにより，尿中のDEHP暴露量の測定においては，MEHPだけでなく，MEHHP，MEOHPがバイオマーカーとして有用であると考えられる．

また，健常人の暴露評価だけでなく，プラスチック工場などでPEs暴露を受けている職業暴露群についても研究を進めており，中国にあるPEsを扱う工場に従事する就労者（$n = 246$）について，尿中のMEHP及びフタル酸モノブチル（MBP）を測定した．その結果，MEHPは，検出下限値以下であった3検体を除いた243検体から検出された．クレアチニン補正した暴露濃度は，MBPが12.4～22836.9 μg g^{-1}，MEHPが1.1～9753.2 μg g^{-1}であった．平均値は，MBPが776 μg g^{-1}，MEHPが423 μg g^{-1}であり，前述の一般健常人の暴露レベルに比較すると，職業暴露群においては，健常人の暴露レベルよりも著しく高いレベルで暴露されている実態が明らかにされた[50)]．

3・2　ヒト血液試料中DEHP等の測定

ヒト血液試料中のDEHPの測定は，エステラーゼなどの血中酵素によりDEHPの代謝が進行されるために，代謝物の測定を行うことが多い．また，重水素置換したDEHPを経口投与後に，その代謝物を尿及び血清中で比較した報告[51)]から，血清中では，尿中に見られるMEHHPやMEOHPなどの代謝物よりも，MEHPが主要代謝物として存在していると言われており，血清中DEHP及びMEHPを測定することとした．健常人ボランティア4名に一部プラスチックの容器包装による食事を摂取させた後，血清中のDEHP，MEHP濃度を測定したところ，DEHPはすべての検体で定量下限値以下（トレースレベル）であった．また，MEHPも4名中3名はトレースレベルであり，残る1名も定量下限値レベルであった[52)]．

更に，ヒト血漿試料中のDEHP及びMEHPを汚染の少ない前処理法としてカラムスイッチング法を採用したLC/MS測定を試みたところ，健常人ボランティア6名の血漿中濃度もDEHP，MEHP共に定量下限値以下（DEHP＜25 ng mL^{-1}，MEHP＜5 ng mL^{-1}）であった[53)]．このことから，DEHPは代謝が迅速であるために，血中濃度が低く，通常の暴露レベルでは定量が困難であることが明らかとなった．つまり，PEs暴露評価では，血液試料よりも尿試料のほうが暴露指標として適していることが分かった．

3・3　PVC製医療機器から溶出するDEHP暴露量の測定

PVC製医療機器を用いる医療行為は，その行為によって得られるメリットが高いことから，DEHPの暴露によるリスクが軽視されがちである．そのため，暴露量を正確に把握することが重要であると考えられ，医療行為に基づくPEs暴露モデルを用いた報告も多数発表されている[54)~56)]．

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

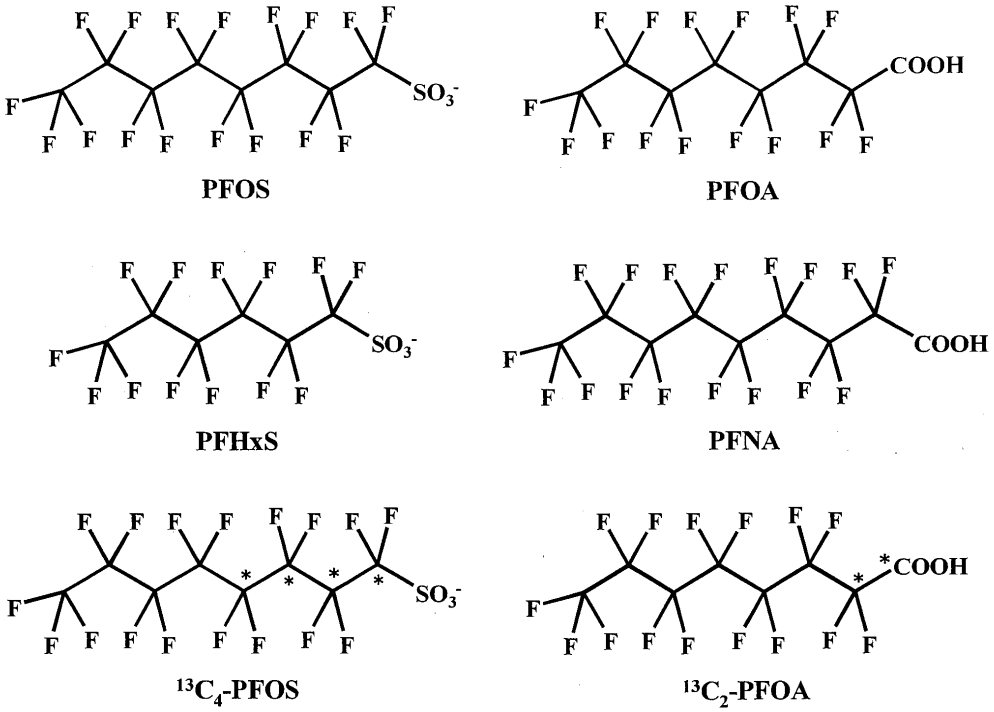


Fig. 5 Structures of PFCs and internal standards
PFOS: perfluorooctanesulfonic acid; PFOA: perfluorooctanoic acid; PFNA: perfluorononanoic acid; PFHxS: perfluorohexanesulfonic acid

PVC製医療機器からのDEHP溶出で懸念されるのは，DEHP溶出が高濃度になると考えられる，脂溶性医薬品と血液製剤である．著者らは，PVCバッグに血液製剤を保存した際に，溶出するDEHP量を測定した．赤血球製剤，全血製剤，血小板製剤，血漿製剤への溶出を比較したところ，全血製剤に溶出するDEHP量が最も多く，このことは，DEHPの溶出されやすさが試料マトリックスに影響されることを示している[57]．また，血液製剤をPVCバッグに入れて，保存する場合を検討した．その結果，保存期間の延長に伴いDEHP溶出量が増大し，血液製剤の有効期限内においても1回の輸血によって耐容一日摂取量（TDI）値を超える量に暴露されることを明らかとした[57]．更に，DEHPとMEHPの高感度・高精度な同時分析法を構築し，医薬品を用いて医療機器からの溶出試験に適用したところ，本来可塑剤として使用されていないはずのMEHPが検出され，材質試験においてもMEHPの含有が確認された[32]．DEHPは血中酵素によりMEHPへと代謝されることが知られているが，本検出系には血中酵素などの因子は存在せず，なんらかの影響によりDEHPからMEHPへ分解したことが考えられた．そこで，医療機器に不可欠である滅菌処理のエネルギーによってDEHP及びMEHPの溶出挙動に影響があるか検討することとした．未滅菌製品をコントロールとし，高圧蒸気滅菌，ガンマ線滅菌，酸化エチレンガス（EOG）滅菌を施したPVCからのDEHP及びMEHP溶出を測定したところ，ガンマ線照射したPVC製品から高濃度のMEHPが溶出した．更に材質試験の結果からもガンマ線滅菌した試料中にのみMEHPが検出され，ガンマ線照射滅菌によってDEHPからMEHPへ分解している可能性が示唆された[58]．

4 有機フッ素系化学物質

近年，新たなEDCsとして注目されている化学物質に有機フッ素系合成化学物質（PFCs）がある．PFCsは，パーフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）やパーフルオロオクタン酸（PFOA），パーフルオロオクタンスルホンアミド（PFOSA），パーフルオロノナン酸（PFNA），パーフルオロヘキサンスルホン酸（PFHxS）などを代表とし，これらは繊維類の撥水剤，界面活性剤，レベリング剤，消火剤，潤滑油及び消泡剤等，日常生活用品に広く使用されている．PFCsの構造は，直鎖状に並んだ炭素原子すべてにフッ素原子が結合しており，末端にスルホン酸基又はカルボン酸基を有している（Fig. 5）．炭素原子とフッ素原子の結合は非常に強いため，PFCsは極めて安定な化学物質であり，そのため，河川水などの環境中において比較的安定であると考えられている．他方，PFCsの生体影響としては，実験動物に対して，催奇形性や甲状腺ホルモンへの影響[59)60)]，ノルエピネフリンに対する増強作用[61)]など，内分泌撹乱作用の疑いが報告されるようになってきた[62)~64)]ことから，次世代への影響が懸念されている．

PFC汚染報告例として，Giesyらはプラスチックなどの

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

原料や添加剤として利用されるPFOS，PFHxS及びPFOSAの世界的規模での汚染を報告した[65]．また，生体内におけるPFCsの代謝や排泄は非常に遅いことから，海洋性哺乳類，魚類及び鳥類等で分解することなく，長期にわたり残留することが報告されている．更に，ヒト血漿タンパクと結合しやすい性質を有すること[66]から，血液に残留しやすいこと[67]が推察され，ヒトへの暴露評価には血中モニタリングが非常に有用と考えられている．これまでにも，ヒト血清中PFOS，PFOA，PFOSA，PFHxSの分析法が報告された[68]．それによるとPFOSは，検出率100%（65検体）で，6.7～81.5 ng mL^{-1}（血清）の範囲で検出されている[68]．この結果は，ヒトに対してPFCsの汚染が広く進行しており，生体への影響が危惧されるものであった．更に，著者らの研究においても，PFOS及びPFOAがヒト母体血を介して胎児へ移行する可能性が示された[69]．それゆえ，PFCsによる生態系及びヒト，特に子どもへのリスク評価を行うためにサーベイランスが必要となっている．PFOS関連化学物質は，国内におけるモニタリング評価も未解決であり，ヒト生体試料に対する高感度で信頼性の高い分析法が望まれている．

そこで本稿では，著者らがこれまでに行ってきたPFCsに関する研究として，1）血液中PFCsの微量分析法の開発，2）ヒトへの暴露評価と次世代影響の検討として母体血から臍帯血への移行，及びヒト精漿の分析調査，3）PFCs暴露源解明のため，室内環境媒体としてハウスダストやカーペット分析を行ってきたので，これらの研究報告について紹介する．更に，最新の研究データとして，乳児におけるPFCs暴露影響を検討するために，母乳中PFCs分析法の開発とその実態調査を行ったので，併せて報告する．

4・1　ヒト血液中PFCsの分析法の開発

初めに報告されたヒト血清中PFOS関連化合物の分析は，メチル *tert*-ブチルエーテル（MTBE）を用いて液-液抽出後，LC/MS/MSを用いて分析する手法であった[68]．本法は米国内における大規模なヒト血液試料への分析に応用されている[70]．また，同様の前処理操作後，ESIによるLC/MS分析をヒト血清へ応用したスクリーニング分析も報告されている[71]．また，CDCにおいては13種類のPFCsを自動固相抽出及びLC/MS/MSによる血液及び母乳における分析法が報告された[72]．

我が国においては，PFCsの環境モニタリングが実施されている[73]が，ヒトへの暴露調査はいまだほとんど行われていない．現在，報告されている生体試料中のPFCsの測定は，主にLC/MS及びLC/MS/MSが用いられている[69)72)74)～77]．しかし，ヒトへの暴露実態を正確に把握するためには，より精度の高いLC/MS/MSを用いるほうが望ましいとされている．また，試料前処理法には，液-液抽出法[73)～75]，固相抽出法[72)76]，カラムスイッチング法[69)77]が報告されている．液-液抽出法及び固相抽出法は，煩雑な操作を必要とし，多検体処理能に乏しい．

著者らは，生体暴露評価に応用できる迅速かつ高感度・高精度な分析法を開発するため，多検体処理を想定してカラムスイッチングを採用した固相抽出LC/MS法[77]を，更により選択性に優れたLC/MS/MS法を構築した[78]．DEHP測定において利用したカラムスイッチング法を，PFCs測定に応用した結果，オンラインの閉鎖系での前処理操作によって，前処理操作の簡便化のみならず，測定時のコンタミネーションを軽減化することが可能となった．本システムは，アセトニトリルで除タンパクした試料溶液をオートサンプラーによりLCへ注入後，5分間50 mM酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液（pH = 4.7）/メタノール（90/10，v/v）を送液することで，固相抽出カートリッジ上で測定対象物質の濃縮とクリーンアップを行った．次に六方バルブを切り替え，1 mM酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混液をバックフラッシュ法によりグラジエント溶出することで，測定対象物質を固相抽出カートリッジから溶出させ，分離部及び検出部に導入した．また，MS/MSの測定条件は，ESIのネガティブイオンモードを採用し，検量線及び実試料の測定は，MRMモードで行った．

本分析法では，前処理法にオンライン固相抽出法を用いることで，除タンパクのみという簡便な操作でPFCsの測定が可能となった．また，測定装置にMS/MSを用いることでバックグラウンドの影響を軽減することができ，検出限界は，0.08～0.14 ng mL^{-1}（$S/N = 3$），ヒト血漿試料中における定量限界は，すべての測定対象化合物において0.50 ng mL^{-1}と高感度な分析が可能となった．内標準法により検量線を作成したところ，0.5～100 ng mL^{-1}の範囲で相関係数0.999以上と良好な直線性が得られ，血漿試料を用いた添加回収試験においても，平均回収率93.3%以上（$n = 6$）と良好な結果を得ることができた．

4・2　分析法バリデーション

構築した分析法の信頼性を客観的に検証するために，内部精度管理の実施及び国際精度管理プロジェクトに参画した．内部精度管理は10 ng mL^{-1}のPFOS標準溶液を用いて，1日4サンプルを20日間測定し，管理図を作成することで測定値の再現性を評価した．その結果，すべての日において処置線の範囲内と良好な結果を得ることができた（Fig. 6）．また，外部精度管理については，2005年8月に行われた国際精度管理プロジェクト会議に参画し，本法の測定値の妥当性について評価した[79)80]．その結果，本法による測定値は，すべてz-スコアの範囲内に入っていたこと

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

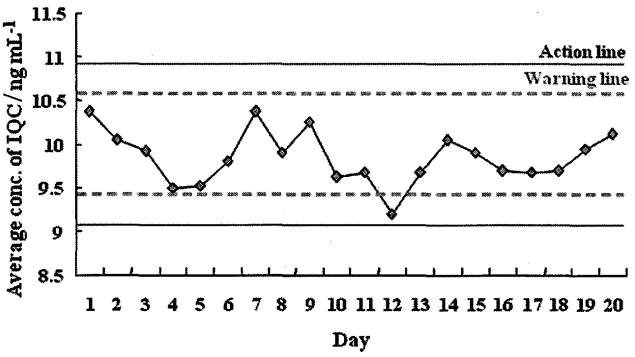


Fig. 6 Shewhart plot of average concentration of IQC

から本分析法の信頼性の高さが証明された（Fig. 7）.

4・3 ヒト暴露量評価と次世代影響の検討

4・3・1 ヒト血液の分析 北海道在住妊婦ボランティア 447 名の血液を分析した．その結果，PFOS はすべての検体から，PFOA 及び PFNA に関してはそれぞれ，93.1%，43.9% の検体から検出された．また，検出範囲は，PFOS は 1.3～16.2 ng mL^{-1}，PFOA は N.D.（<0.5 μg mL^{-1}）～5.2 ng mL^{-1}，PFNA は N.D.（<0.5 ng mL^{-1}）～1.6 ng mL^{-1} であった．次世代影響の検討として，北海道大学より提供されたカルテを用いて，血中 PFOS 及び PFOA 濃度と妊娠期間，新生児の発育及び妊娠期疾患との関連性について調査したところ，胎児仮死，微弱妊娠，軟産道強靭症の妊婦は，健常妊婦に比較して PFOS 及び PFOA 濃度が有意に高いことが明らかとなり，胎児の成長段階における PFOS 及び PFOA の影響について新たな知見を得ることができた．なお，PFOSA 及び PFDA に関してはほとんど検出されなかった．

4・3・2 母体血-臍帯血の分析 微量化学物質の影響を受けやすい胎児への移行性を検討するために，健常妊婦ボランティア 15 名の母体血-臍帯血ペアの検体を分析した[69]．その結果，PFOS は母体血，臍帯血共にすべての検体から検出され，PFOA は母体血 3 検体から検出された．母体血中 PFOSA 及び臍帯血中 PFOA，PFOSA はすべての検体で定量限界以下であった．母体血及び臍帯血中 PFOS 濃度の検出範囲は，それぞれ 4.9～17.6 ng mL^{-1}，1.6～5.3 ng mL^{-1} であった．両者の間には，高い相関性が認められ，得られた直線の傾きから移行率は約 30% と推測された（Fig. 8）．このことより，PFCs が臍帯を介して胎児に移行する可能性が示唆された．

4・3・3 ヒト精漿の分析 精漿への PFOS の移行性を検討するために，男性ボランティア 50 名（年齢 18～24 歳）の血液及び精漿ペアについて測定した結果，すべての血液から 9.9～40.3 ng mL^{-1} の範囲で PFOS を検出したが，精漿中 PFOS 濃度範囲は，<0.1 ng mL^{-1} ～ 0.6 ng mL^{-1} と非常に低く，精漿への移行は少なかった．なお，PFOSA はすべての検体において定量限界以下であった．PFOS による精子数，精子運動能への影響を調べた結果，精漿中 PFOS の検出レベルが低かったため，男性生殖能に対する影響は低いのではないかと考えられる．

4・4 暴露源の究明

PFCs の暴露源に関する研究は，いまだほとんど行われていないことから，PFCs の汚染源，暴露源，拡散経路，蓄積の形態や毒性評価などに対しては更なる研究・調査が必要である．現在，PFCs の環境汚染報告としては，汚泥[81]，環境水[82]，大気[83]などがあるが，検出されている PFCs の濃度が非常に低く，暴露源として評価するのは不十分である．そこで本研究では，室内環境における PFCs の暴露源の解明を目的として，日常生活に多く存在し，かつ，化学物質を多く含むハウスダスト[84]に着目し，ハウスダスト及びカーペットに含まれる PFCs の高感度かつ高精度な分析法について検討した[85]．

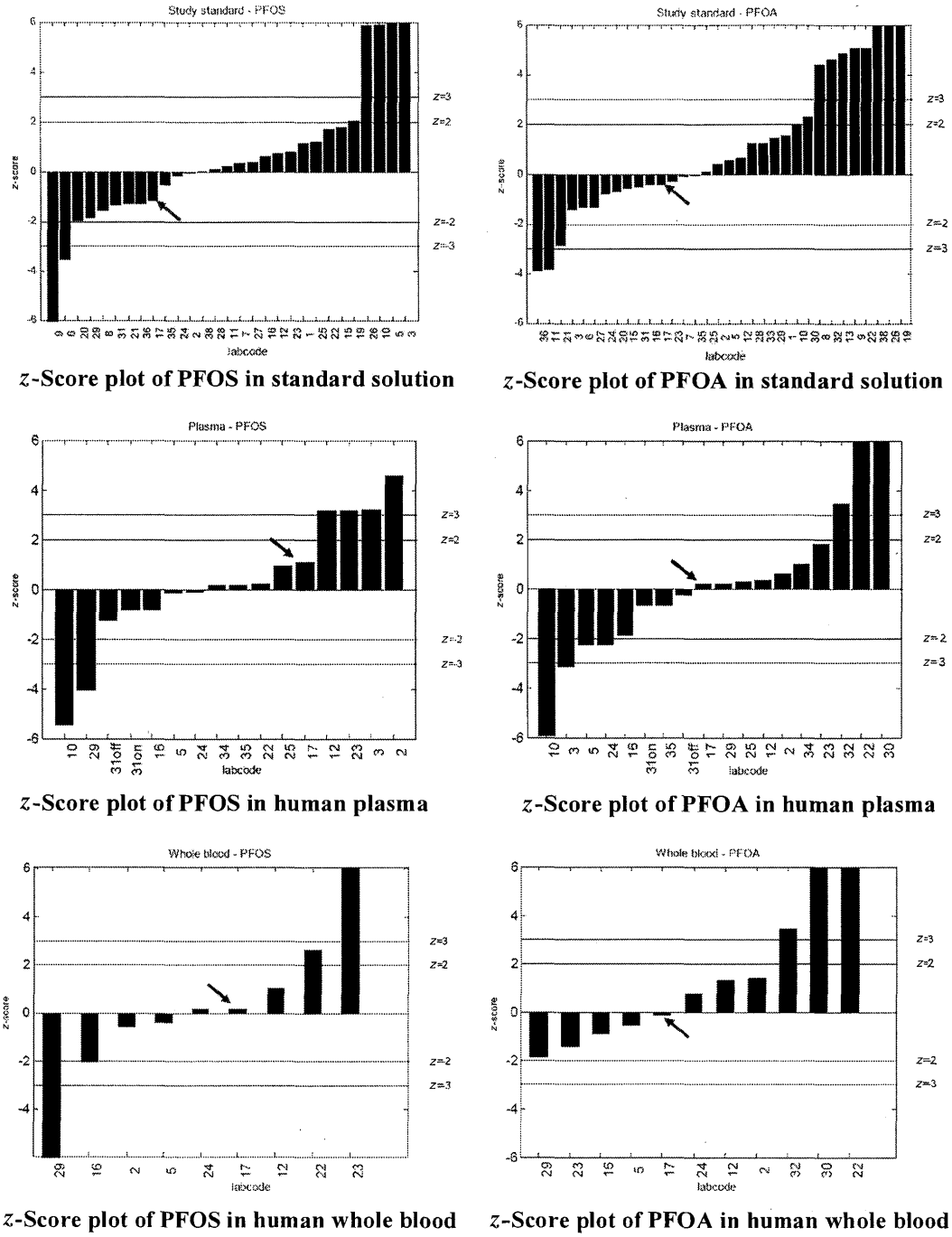
測定対象物質は，ヒト血中から高頻度に検出される PFOS，PFOA，PFNA 及び PFHxS の 4 種類とし，サロゲート物質として $^{13}C_4$PFOS と $^{13}C_2$PFOA を用いた．ハウスダストとカーペットの抽出法として超臨界状態の二酸化炭素を用いる超臨界流体抽出法を使用した．超臨界流体の特徴としては，1）高い溶媒拡散力，凝集力を有すること，2）気相と液相の中間的な流体相であることが挙げられる．その溶解力は温度や圧力によって連続的に調整することが容易である．超臨界流体の拡散係数は液体と気体の中間程度（$D = 10^{-3}$ cm^2 s^{-1}），粘度は気体と同程度（$\eta = 10^{-4}$ g cm^{-1} s^{-1}）で，密度は液体に近い（$\rho = 0.3$～1）．したがって，超臨界流体を抽出溶媒として用いた場合，液体に近い溶出力と，気体のように対象物質の隅々にまで行き渡ることができ，効率的な抽出が期待された．

測定には血液分析において構築した LC/MS/MS 法を用いた．測定の最適条件を検討したところ，検出限界は，0.58 ng mL^{-1} 以上であり，実試料中における定量限界は，すべての測定対象化合物において 2.5 ng mL^{-1} と高感度な分析が可能となった．内標準法にて添加回収試験を行った結果，平均回収率 97.9% 以上（相対標準偏差≦ 5.8%，$n = 6$）となり，本分析法はハウスダスト及びカーペット中 PFCs 濃度の定量法として有用であることが示唆された．本分析法によるハウスダスト中 PFCs の濃度は，環境水，大気及び底質といった環境試料と比較すると非常に高濃度であった．

また，研究室内の健常人ボランティア 20 名の血中 PFCs 濃度を測定し，血漿濃度及び全血濃度の比較，精度管理及びハウスダストとの比較を行った．血中 PFCs 濃度を測定

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry



z-Score plot of PFOS in standard solution　　*z*-Score plot of PFOA in standard solution

z-Score plot of PFOS in human plasma　　*z*-Score plot of PFOA in human plasma

z-Score plot of PFOS in human whole blood　　*z*-Score plot of PFOA in human whole blood

Fig. 7　*z*-Score plot of PFOS and PFOA in standard solution and biological samples

した結果，PFOS 及び PFOA はすべての検体から検出された．また，PFNA，PFHxS についても高い頻度で検出された．血漿中 PFCs 濃度とハウスダストとの比較を行ったところ，PFOA について相関性がみられた（Fig. 9）ことから，ハウスダストは PFCs のヒト暴露源の一つではないかと推察される．

4･5　ヒト母乳の分析

PFCs 暴露源究明の一環として，ヒト母乳中 PFCs の分析法を構築して，母乳栄養による乳児の PFCs 暴露評価を

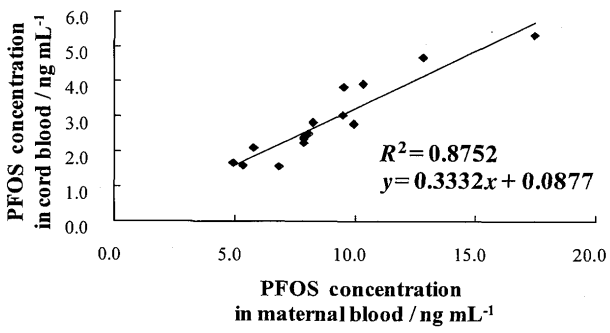


Fig. 8　Correlation of PFOS concentration between maternal and cord blood

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

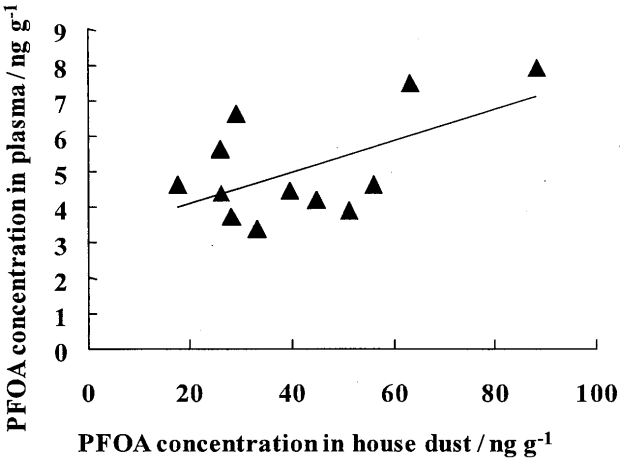


Fig. 9 Correlation of PFOA concentration between human plasma and house dust

Table 2 Concentration of PFCs in human milk sample

Analyte	Detection rate, %	Maximum/ ng mL^{-1}	Minimum/ ng mL^{-1}
PFHxS	55	0.01	N.D.
PFOS	100	0.18	0.02
PFOA	38	0.34	N.D.
PFNA	85	0.09	N.D.

行った．母乳は血液と比較してPFCsの濃度レベルが低いこと，また脂質などの夾雑物質を多く含むことから，母乳の前処理操作として試料を濃縮・精製する必要があった．そこで本研究では，測定試料の濃縮・精製を同時に行うことができる固相抽出法を採用した．固相抽出カートリッジとしてはWaters製Oasis WAX（3 cc，60 mg）を用いてクリーンアップを行った．母乳試料の調製法の概略は以下のとおりである．

母乳試料5 mLに0.1 Mギ酸溶液を15 mL及び内標準物質20 μLを添加して撹拌（かくはん）した．次に遠心分離（6000 rpm，10分）を行い，上澄みを固相抽出カートリッジ（Oasis WAX）へ導入した．Oasis WAXは，pH 4.7の酢酸緩衝液4 mL，60% メタノール溶液4 mL，メタノール4 mLで洗浄し，その後3% アンモニア/アセトン溶液3 mLでPFCsを溶出した．溶出液を窒素気流下で濃縮し，水/アセトニトリル（50/50，v/v）100 μLで再溶解し，LC/MS/MS測定に供した．

測定には血液分析において構築したLC/MS/MS法を用いた．本分析法の定量限界は，それぞれPFHxS：0.004 ng mL^{-1}，PFOS：0.004 ng mL^{-1}，PFOA：0.1 ng mL^{-1}，PFNA：0.008 ng mL^{-1}であり，検量線を作成したところ，0.2～20 ng mL^{-1}の範囲で良好な直線性（相関係数r = 0.999）が得られた．母乳試料を用いた添加回収試験（n = 6）においては，平均回収率94.3% 以上と良好な結果を得ることができ，相対標準偏差についても約10% 以下と精度良い結果を得られた．

本分析法を用いて北海道在住妊婦ボランティア41名の母乳を測定した．その結果をTable 2に示す．血液中の結果と同様に，すべての検体からPFOSが検出された．PFOAについては，他の測定対象物質と比較しても検出率が低かったが，これはPFOAが測定環境からのコンタミネーションの影響を受けることから，定量限界を0.1 ng mL^{-1}と高く設定したためと思われる．PFOAの最大値としては，PFOSよりも高い濃度で検出された．これらの結果から，母乳栄養は乳児にとって必要不可欠なものではあるが，ハウスダストと同様に，母乳がPFCs暴露源の一つになりうる可能性が示唆された．

5 リスク評価

微量危害化学物質に対する究極の探求目標の一つは，ヒトへの健康影響がどうであるのかを明らかにすることであろう．その解析のためには，水，空気，食品等の摂取媒体を通じてヒトがどれだけ当該化学物質を取り込んでいるのか（暴露量評価），各媒体中に存在する濃度を測定することが要求される．EDCsのヒト暴露量を算出する場合，二つの暴露経路が考えられる．一つは，摂取媒体からの暴露量の算出であり，もう一つのアプローチは，ヒト生体試料を分析して暴露量を推測するものである．ヒト血液，母乳を分析した結果，化学物質の存在が確認されれば，ヒトがその化学物質に暴露されている直接的な確証となる．

ヒト尿や血液を分析して検出されるPEs，PFCsは，我々が恒常的に暴露されている可能性のある化学物質である．そのリスク評価を実施するには暴露量の評価と動物実験を含む様々なアッセイによる毒性の評価が必要である．EDCsに関しては，安全性評価（毒性試験）において，低用量問題や多世代影響など多くの問題を抱え，具体的な結論には至っていない．そのため，ヒトがどの程度EDCsに暴露されているかを評価し，その値を参考に安全性試験を実施する必要性が望まれており，リスク評価が実施できる環境とは言い難い．

本稿においては，BPAやPEs，PFCs等が恒常的な暴露であるのに対し，医療機器からのPEsの溶出は不定期な暴露であること，また，その暴露レベルが高濃度であることに注目し，医療機器から溶出するPEsの暴露リスク評価を実施した．すなわち，3·3において紹介した研究について，1）血液バッグ使用時のDEHP暴露評価及び2）ガンマ線照射滅菌した医療機器からのDEHP暴露評価を実施した．

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

5・1　血液バッグ使用時の DEHP 暴露評価[57]

血液製剤中に溶出する DEHP 及び MEHP を検出したところ，人全血液である全血製剤において最も高濃度 DEHP が溶出したことから，全血製剤で最も DEHP 溶出量の高かった試料によるリスク評価を実施した．体重 50 kg のヒトが 1 回 400 mL の人全血液を輸血する際，DEHP の総暴露量は 0.7 mg kg^{-1} $time^{-1}$ となる．これを米国食品医薬品局（Food and Drug Administration, FDA）の調査[86]と比較したところ，米国 FDA では，外傷患者の輸血による DEHP 暴露は，体重 70 kg のヒトで，8.5 mg kg^{-1} day^{-1} の DEHP 暴露であると報告しており，今回の暴露レベルは非常に低いことが分かった．更に，DEHP 及び MEHP の共暴露による暴露量についても算出した．ヒトが 1 回 400 mL の人全血液を輸血する際，MEHP の暴露量は，10 μg mL^{-1} × 400 mL = 4 mg であり，患者体重を 50 kg とすると，輸血 1 回当たり，4 mg $(50\ kg)^{-1}$ $time^{-1}$ = 0.08 mg kg^{-1} $time^{-1}$ となった．また，MEHP が溶出してくることより，DEHP と MEHP の共暴露によるリスク評価を行うこととした．

米国 FDA は，DEHP に対する MEHP の相対的な精巣毒性を RPF（relative potency factor）= 10 として報告[84]している．つまり MEHP の毒性は DEHP の毒性の 10 倍に対応するということになる．また，米国 EPA は，混合物によるリスク評価を毒性等価係数（toxic equivalency factors, TEFs）としても知られている RPF を用いて行っており，次式により算出する．

$$C_{mixture} = C_{index} + \Sigma\,[RPF_i \times C_i]$$

DEHP と MEHP の共暴露によるリスク評価を実施するに当たり，指標化合物として DEHP を採用し，MEHP の暴露量に RPF を乗じ，DEHP 当たりの暴露量に換算すると，0.8 mg kg^{-1} $time^{-1}$ であった．同様に，DEHP の暴露量（体重 50 kg のヒトが 400 mL の輸血）を算出すると，DEHP の総暴露量は，0.7 mg kg^{-1} $time^{-1}$（0.66 mg kg^{-1} $time^{-1}$）となる．つまり，DEHP 及び MEHP の共暴露による暴露量は，DEHP 換算で 1.5 mg kg^{-1} $time^{-1}$ であった．非経口投与における DEHP の TDI は 600 μg kg^{-1} day^{-1} であり，1 度の輸血で TDI の 2 倍以上の DEHP に暴露されることが示唆された．

5・2　ガンマ線照射滅菌した医療機器からの DEHP 暴露評価[58]

ガンマ線照射滅菌を施した PVC シートから溶出する MEHP は約 600 ng mL^{-1} である．本分析法は，1 × 3 cm の PVC 片を用いて 5 mL の医薬品添加剤であるポリエチレン硬化ヒマシ油で浸とう抽出しており，5 mL の溶媒に溶出する MEHP 量は 3 μg となる（= 600 ng mL^{-1} × 5 mL）．抽出にかかわる PVC の表面積は，表裏合わせて 6 cm^2 であり，単位面積当たりの MEHP 溶出量は，0.5 μg/cm^2 となる．ガンマ線照射滅菌後に市販される PVC 製医療機器のうち，最大表面積を有するものは，インフュージョンセット（チューブ）であり，その表面積は 101.3 cm^2 である．この医療機器から溶出する MEHP は 50.7 μg となる（= 0.5 μg/cm^2 × 101.3 cm^2）．また，この医療機器は，臨床で 2 日間にわたり使用されるという状況より，体重 50 kg の患者が 1 回の医療行為によって暴露される MEHP の 1 日暴露量は 0.51 μg kg^{-1} day^{-1} であると算出できる．DEHP の 1 日暴露量（ガンマ線照射滅菌試料より約 35 ng mL^{-1} 溶出）も同様に計算すると，約 0.03 μg kg^{-1} day^{-1}（29.5 ng kg^{-1} day^{-1}）である．前述の暴露評価の式に代入すると，

DEHP 及び MEHP 共暴露によるリスク評価濃度
= DEHP 濃度 + [10 × MEHP 濃度]
= 0.03 + [10 × 0.51]
= 5.13 (μg kg^{-1} day^{-1})

DEHP の TDI は，経口摂取で 40 μg kg^{-1} day^{-1} であり，非経口摂取においては，600 μg kg^{-1} day^{-1} である．ガンマ線照射滅菌した PVC から溶出する DEHP 及び MEHP の共暴露によるリスク評価の結果，暴露量は DEHP として 5.13 μg kg^{-1} day^{-1} と TDI 以下であった[58]．

このように，血液製剤などによる“治療”は毎日の行為ではないこと，治療によって得られる医療的メリットが非常に大きいことから，リスクが過小に評価されていると考えられ，妊婦や新生児などの高リスク患者に適用する場合には，DEHP 暴露に十分に注意することが必要であると考えられる．

このように，ヒトがどの程度 EDCs に暴露されているかを評価し，その値を参考に安全性試験を実施することが望まれる．

6　結　　言

内分泌撹乱化学物質の問題は，分析化学領域において複雑多岐にわたる課題を提供した．微量危害化学物質が我々の健康に及ぼす危険度を多角的にしかも定量的に評価（リスクアナリシス）することがますます重要となっている．分析値の信頼性を確保し，保証するために，どのように精度管理，分析法バリデーションを実施するのか，早急に検討すべき課題の一つである．

最新機器分析装置に振り回されることなく，信頼性のあるデータの取得，実験の再現性，得られたデータの解析，保存，公表等，研究者個人の的確な判断力と解析能力が要

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

求される．

本研究にご協力，ご支援いただきました前職員である日本薬科大学漢方薬学科の吉村吉博教授，米国CDC研究員の加藤嘉代子博士，金城学院大学薬学部の井之上浩一助教授及び大阪府公衆衛生研究所の高取　聡博士，北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野の岸　玲子教授，東海大学医学部の牧野恒久教授，聖マリアンナ医科大学泌尿器科学教室の岩本晃明教授，星薬科大学薬品分析化学教室の仲田尚生，勝又常信の諸氏に深謝します．

文　献

1) R. Carson: "*Silent Spring*", (1962), (Houghton Mifflin).
2) T. Colborn, D. Dumanoski, J. Peterson: "*Our Stolen Future*", (1996), (Dutton NY).
3) U. S. Environmental Protection Agency: EPA Federal Register Notice, < http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/draft_list_frn_061807.pdf >.
4) 堀江正一，斉藤貢一，中澤裕之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 1089 (1996).
5) 山口新一，衛藤修一，江口征夫，城戸浩三，久松由東，中澤裕之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 905 (1997).
6) 中澤裕之，神崎由紀子，高橋伸之，岡　尚男: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 1295 (2004).
7) 竹上晴美，堀江正一，中澤裕之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 651 (2006).
8) 岩崎雄介，伊東　岳，北村　渉，加藤美穂子，小平　司，堀江正一，伊藤里恵，斉藤貢一，中澤裕之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 943 (2006).
9) 堀江正一，中澤裕之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 279 (1996).
10) 井之上浩一，川口　研，伊藤里恵，斉藤貢一，中澤裕之: ぶんせき (*Bunseki*), **2005**, 35.
11) A. J. M. Andrade, S. W. Grande, C. E. Talsness, K. Grote, I. Chahoud: *Toxicology*, **227**, 185 (2006).
12) H. Takano, R. Yanagisawa, K.-I. Inoue, T. Ichinose, K. Sadakano, T. Yoshikawa: *Environ. Health Perspect.*, **114**, 1266 (2006).
13) W. V. Welshons, K. A. Thayer, B. M. Judy, J. A. Taylor, E. M. Curran, F. S. vom Saal: *Environ Health Perspect*, **111**, 994 (2003).
14) Y. B. Wetherill, C. E. Petre, K. R. Monk, A. Puga, K. E. Knudsen: *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 515 (2002).
15) 厚生労働省: "内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会—中間報告書追補その2", (2005).
16) H. Kurebayashi, R. Harada, R. K. Stewart, H. Numata, Y. Ohno: *Toxicol. Sci.*, **68**, 32 (2002).
17) W. Völkel, T. Colnot, G. A. Csanády, J. G. Filser, W. Dekant: *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 1281 (2002).
18) H. Yokota, H. Iwano, M. Endo, T. Kobayashi, H. Inoue, S. Ikushiro, A. Yuasa: *Biochem. J.*, **340**, 405 (1999).
19) H. Inoue, H. Yokota, T. Makino, A. Yuasa, S. Kato: *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1084 (2001).
20) J. W. Brock, Y. Yoshimura, J. R. Barr, V. L. Maggio, S. R. Graiser, H. Nakazawa, L. L. Needham: *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, **11**, 323 (2001).
21) Y. H. Kim, C. S. Kim, S. Park, S. Y. Han, M. Y. Pyo, M. Yang: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 441 (2003).
22) S. Yoshihara, T. Mizutare, M. Makishima, N. Suzuki, N. Fujimoto, K. Igarashi, S. Ohta: *Toxicol. Sci.*, **78**, 50 (2004).
23) J. Philippejaeg, E. Perdu, L. Dolo, L. Debrauwer, J.-P. Cravedi, D. Zalko: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4935 (2004).
24) 堀江正一，吉田栄充，石井里枝，小林　進，中澤裕之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 579 (1999).
25) K. Inoue, K. Kato, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. B*, **749**, 17 (2000).
26) K. Inoue, A. Yamaguchi, M. Wada, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. B*, **765**, 121 (2001).
27) K. Inoue, M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. B*, **773**, 97 (2002).
28) Z. Wu, W. Gao, M. A. Phelps, D. Wu, D. D. Miller, J. T. Dalton: *Anal. Chem.*, **76**, 839 (2004).
29) Y. Tsumura, S. Ishimitsu, A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Nakamura, Y. Tonogai: *Food Addit. Contam.*, **15**, 569 (2001).
30) Y. Tsumura, S. Ishimitsu, I. Saito, H. Sakai, Y. Tsuchida, Y. Tonogai: *Food Addit. Contam.*, **20**, 317 (2003).
31) K. Inoue, T. Higuchi, F. Okada, H. Iguchi, Y. Yoshimura, A. Sato, H. Nakazawa: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 1145 (2003).
32) R. Ito, F. Seshimo, N. Miura, M. Kawaguchi, K. Saito, H. Nakazawa: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 1036 (2005).
33) P. W. Albro, S. R. Lavenhar: *Drug Metabolism Reviews*, **21**, 13 (1989).
34) K. Kato, T. Yamauchi, K. Higashiyama, H. Nakazawa: *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **26**, 2151 (2003).
35) M. J. Silva, N. A Malek, C. C. Hodge, J. A. Reidy, K. Kato, D. B. Barr, L. L. Needham, J. W. Brock: *J. Chromatogr. B*, **789**, 393 (2003).
36) P. W. Albro, J. T. Corbett, J. L. Schroeder, S. Jordan, H. B. Matthews: *Environ. Health Perspect.*, **45**, 19 (1982).
37) P. Schmid, C. Schlatter: *Xenobiotica*, **15**, 251 (1985).
38) C. R. Elcombe, A. M. Mitchell: *Environ. Health Perspect.*, **70**, 211 (1986).
39) W. A. C. Anderson, L. Castle, M. J. Scotter, R. C. Massey, C. Springall: *Food Addit. Contam.*, **18**, 1068 (2001).
40) K. Kato, Y. Yoshimura, Y. Ito, H. Oka, H. Nakazawa: *J. AOAC Int.*, **85**, 719 (2002).
41) R. Ito, F. Seshimo, N. Miura, M. Kawaguchi, K. Saito, H. Nakazawa: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 455 (2006).
42) R. M. David: *Environ. Health Perspect.*, **108**, A440 (2000).
43) B. C. Blout, K. E. Milgram, M. J. Silva, N. A. Malek, J. A. Reidy, L. L. Needham, J. W. Brock: *Anal. Chem.*, **72**, 4127 (2000).
44) M. J. Silva, A. R. Slakman, J. A. Reidy, J. L. Preau Jr., A. R. Herbert, E. Samandar, L. L. Needham, A. M. Calafat: *J. Chromatogr. B*, **805**, 161 (2004).
45) K. Kato, M. J. Silva, L. L. Needham, A. M. Calafat: *Anal. Chem.*, **77**, 2985 (2005).
46) M. J. Silva, D. B. Barr, J. A. Reidy, N. A. Malek, C. C. Hodge, S. P. Caudill, J. W. Brock, L. L. Needham, A. M. Calafat: *Environ. Health Perspect.*, **112**, 331 (2004).

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

47) S. M. Duty, M. J. Silva, D. B. Barr, J. W. Brock, L. Ryan, R. F. Herrick, D. C. Christiani, R. Hauser: *Epidemiology*, **14**, 269 (2003).
48) J. A. Hoppin, J. W. Brock, B. J. Davis, D. D. Baird: *Environ. Health Perstpect.*, **110**, 515 (2002).
49) B. C. Blount, M. J. Silva, S. P. Caudill, L. L. Needham, J. L. Pirkle, E. J. Sampson, G. W. Lucier, R. J. Jackson, J. W. Brock: *Environ. Health Perspect.*, **108**, 979 (2000).
50) 吉村真理子，井之上浩一，花岡知之，潘　国偉，高橋　謙，山野優子，岩崎雄介，伊藤里恵，斉藤貢一，津金昌一郎，中澤裕之：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 661 (2006).
51) H. M. Koch, H. M. Bolt, J. Angerer: *Arch. Toxicol.*, **78**, 123 (2004).
52) S. Takatori, Y. Kitagawa, M. Kitagawa, H. Nakazawa, S. Hori: *J. Chromatogr. B*, **804**, 397 (2004).
53) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura, H. Nakazawa: *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 527 (2003).
54) T. Hanawa, E. Muramatsu, K. Asakawa, M. Suzuki, M. Tanaka, K. Kawano, T. Seki, K. Juni, S. Nakajima: *Int. J. Pharm.*, **210**, 109 (2000).
55) Y. Haishima, R. Matsuda, Y. Hayashi, C. Hasegawa, T. Yagami, T. Tsuchiya: *Int. J. Pharm.*, **274**, 119 (2004).
56) R. Venkataramanan, G. J. Burckart, R. J. Ptachcinski, R. Blaha, L. W. Logue, A. Bahnson, C. S. Giam., J. E. Brady: *Am. J. Hosp. Pharm.*, **43**, 2800 (1986).
57) K. Inoue, M. Kawaguchi, R. Yamanaka, T. Higuchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa: *Clin. Chim. Acta*, **358**, 159 (2005).
58) R. Ito, F. Seshimo, N. Miura, M. Kawaguchi, K. Saito, H. Nakazawa: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 455 (2006).
59) J. R. Thibodeaux, R. G. Hanson, J. M. Rogers, B. E. Grey, B. D. Barbee, J. H. Richards, J. L. Butenhoff, L. A. Stevenson, C. Lau: *Toxicol. Sci.*, **74**, 369 (2003).
60) C. Lau, J. R. Thibodeaux, R. G. Hanson, J. M. Rogers, B. E. Grey, M. E. Stanton, J. L. Butenhoff, L. A. Stevenson: *Toxicol. Sci.*, **74**, 382 (2003).
61) M. E. Austin, B. S. Kasuri, M. Barber, K. Kannan, P. S. MohanKumar, S. M. J. MohanKumar: *Environ. Health Perspect.*, **111**, 1485 (2003).
62) R. Renner: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 154A (2001).
63) R. Renner: *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 201A (2003).
64) M. E. Austin, B. S. Kasturi, M. Barber, K. Kannan, P. S. MohanKumar, S. M. MohanKumar: *Environ. Health Perspect.*, **111**, 1485 (2003).
65) J. P. Giesy, K. Kannan: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1339 (2001).
66) X. Han, T. A. Snow, R. A. Kemper, G. W. Jepson: *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 775 (2003).
67) A. M. Seacat, P. J. Thomford, K. J. Hansen, G. W. Olsen, M. T. Case, J. L. Butenhoff: *Toxicol. Sci.*, **68**, 249 (2002).
68) K. J. Hansen, L. A. Clemen, M. E. Elefson, H. O. Johnson: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 766 (2001).
69) 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.*, **112**, 1204 (2004).
70) 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 (2003).
71) K. Harada, N. Sato, K. Inoue, T. Yoshinaga, T. Watanabe, S. Sasaki, S. Kamiyama, A. Koizumi: *J. Occup. Health*, **46**, 141 (2004).
72) Z. Kuklenyik, J. A. Reich, J. S. Tully, L. L. Needham, A. M. Calafat: *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 3698 (2004).
73) S. Taniyasu, K. Kannan, Y. Horii, N. Hanari, N. Yamashita: *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 2634 (2003).
74) G. W. Olsen, K. J. Hansen, L. A. Stevenson, J. M. Burris, J. H. Mandel: *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 888 (2003).
75) K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Fillmann, K. S. Kumar, B. G. Loganathan, M. A. Mohd, J. Olivero, J. H. Yang, K. M. Aldous: *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 4489 (2004).
76) A. Karrman, B. B. Van, U. Jarnberg, L. Hardell, G. Lindstrom: *Anal. Chem.*, **77**, 864 (2005).
77) K. Inoue, F. Okada, R. Ito, M. Kawaguchi, N. Okanouchi, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. B*, **810**, 49 (2004).
78) 仲田尚生，中田彩子，岡田文雄，伊藤里恵，井之上浩一，斉藤貢一，中澤裕之：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **54**, 877 (2005).
79) S. P. J. van Leeuwen, A. Karrman, B. van Bavel, J. de Boer, G. Lindstrom: *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 7854 (2006).
80) Rivo report C070/05 "1st worldwide interlaboratory study on perfluorinated compounds in human and environmental matrices- Final report".
81) H. F. Schroder: *J. Chromatogr. A*, **1020**, 131 (2003).
82) K. J. Hansen, H. O. Johnson, J. S. Eldridge, J. L. Butenhoff, L. A. Dick: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1681 (2002).
83) K. Sasaki, K. Harada, N. Saito, T. Tsutsui, S. Nakanishi, H. Tsuzuki, A. Koizumi: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **71**, 408 (2002).
84) K. Roinestad, J. Louis, J. Rozen: *J. AOAC Int.*, **76**, 1121 (1993).
85) 勝又常信，中田彩子，岩崎雄介，伊藤里恵，斉藤貢一，中澤裕之：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 955 (2006).
86) Center for Devices and Radiological Health, U. S. Food and Drug Administration (FDA), September 4 (2001). < http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf >.

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

Trace Analysis of Endocrine Disrupting Chemicals for Risk Assessment to Human Exposure

Hiroyuki NAKAZAWA[1], Rie ITO[1], Yusuke IWASAKI[1], Ayako NAKATA[1] and Koichi SAITO[1]

[1] Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 19 July 2007, Accepted 11 September 2007)

It is emphasized that chemicals related to daily life products, including plastic materials in wide industrial and consumer applications, may have some biological toxicity, such as endocrine-disrupting effects. An association between exposure to endocrine-disrupting chemicals and an increased incidence of human endocrine disease has led to a need for accurate analytical techniques relating the exposure of these compounds to an individual's risk of developing disease. With an understanding of the progressive processes of endocrine-disrupting effects, opportunities for the identification of human exposure of sources and biomarkers reflecting are provided. Therefore, the developments of highly sensitive and reliable analytical methods have been required to evaluate human exposure of the related chemicals for risk assessment. In order to obtain as much information as possible from the limited amount of samples, hyphenated analytical methods for the determination of endocrine-disrupting chemicals, such as bisphenol A, phthalate esters and perfluorochemicals, have been studied by the use of LC/MS and LC/MS/MS. These simple, accurate and reliable methods with high sensitivity have been successfully applied to the trace analysis of biological and environmental samples with the hope of realizing scientific risk assessment of the chemicals derived from daily life products, such as polymer plastic materials in human blood and urine.

Keywords : endocrine disruptors; bisphenol A; phthalate esters; perfluorochemicals; biological sample; LC/MS; LC/MS/MS; risk assessment.

NII-Electronic Library Service