

氏名(本籍)	川口 研	(神奈川県)
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲 第113号	
学位授与年月日	平成19年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	スターバー抽出-加熱脱着-GC/MS法を用いたフェノール性内分泌かく乱化学物質の分析	
論文審査委員	主査	教授 中澤 裕之
	副査	教授 福井 哲也
	副査	教授 上田 晴久

論文内容の要旨

我々が快適で豊かな生活を享受できるのは、化学物質の恩恵と言っても過言ではない。これまでに様々な化学物質が作られ、環境や生態系に及ぼす影響を評価するために多くの試験がなされてきた。しかし、極めて微量で生体の内分泌系をかく乱すると疑われる化学物質が報告され、大きな社会問題になった。とりわけ、フェノール性化合物の中には、弱い女性ホルモン様作用があると報告された。また、これら化学物質は高分子素材に多く用いられていることから、生活関連製品を介して暴露される可能性が高く、ヒトに対する生体影響が懸念されている。この様なことから、フェノール性内分泌かく乱化学物質のヒト生体リスク評価が要求されている。しかし、この目的のためには暴露量評価が必要であり、高感度かつ高精度な微量分析法が求められている。

近年、機器分析は目覚ましい進歩を遂げており、高感度な測定を可能にしつつあるが、実際の試料を測定する上では、多種多様なマトリックスから効率よく抽出・濃縮・精製するための試料前処理操作が重要である。分析用試料前処理技術として開発されたスターバー抽出(SBSE)法は、無極性のポリジメチルシロキサン(PDMS)相がコーティングされたガラス製攪拌子を用いて、試料中の微量分析対象物質を効率よく抽出・濃縮する方法である。また、PDMS 攪拌子に移行した成分は、加熱脱着(TD)-ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)を用いてオンラインで測定でき、分析対象物質を大量にカラムに導入できるため、高感度な測定が可能である。そのため、SBSE 法は、従来の前処理技術である固相抽出(SPE)法や固相マイクロ抽出(SPME)法よりも、操作性及び感度に優れた超微量分析法の構築が期待されている。

本研究では、SBSE 法を用いて、環境及び生体試料中フェノール性内分泌かく乱化

学物質の簡便かつ高感度な分析法の開発を試みた。はじめに、SBSE-TD-GC/MS法を用いて、単純なマトリックスである河川水を対象試料として、4-*tert*-オクチルフェノール(OP)、4-ノニルフェノール(NP)及びビスフェノール A(BPA)の分析法を検討した。次に、更なる高感度化を目指して、SBSE法の操作過程に誘導体化試薬を加えて、誘導体化と抽出を同時に行う *in situ* 誘導体化を伴う SBSE法を開発した。本法を用いて、河川水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析法を行った。最後に、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS法を用いて、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析法を構築し、当該化学物質のヒト暴露実態を調査した。

1. SBSE-TD-GC/MS法を用いた河川水中 OP、NP 及び BPA の測定

アルキルフェノール類(APs)は非イオン性界面活性剤であるアルキルフェノールポリエチルエトキシレート(APEOs)の原料として大量に使用されている。汚水中で APEOs を嫌気的条件下で活性汚泥処理すると、APs にまで分解されることが報告されているが、APEOs は通常の界面活性汚泥処理により速やかに除去されるのに対して、APs は、そのままの条件下では代謝分解除去され難い。APs の一種である OP 及び NP には、女性ホルモン様作用が報告されている。他方、BPA は、主としてポリカーボネート及びエポキシ樹脂の原料として使用され、その用途は広い。そのため、環境中に BPA が放出されることも考えられる。また、APs と同様に女性ホルモン様作用を示すことが報告されている。

河川水を対象試料として、SBSE-TD-GC/MS法を用いて、OP、NP 及び BPA の測定を検討した。GC/MS 測定条件の最適化を検討し、OP 及び NP の定量イオンを m/z 135、定性イオンを m/z 107 とした。BPA は、定量イオンを m/z 213、定性イオンを m/z 228 とした。本法の OP 及び NP の検出限界は、それぞれ 0.002 及び 0.02 ng/ml であり、定量限界は、0.01 及び 0.1 ng/ml となり、高感度分析法を構築することができた。一方、BPA の検出限界及び定量限界は、0.5 及び 2.0 ng/ml であり、期待以上の感度を得ることはできなかった。

2. *In situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS法による河川水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析

BPA は構造式中に 2 つのフェノール性水酸基を有しているため極性が高く、無極性である PDMS 相による抽出・濃縮が良好に行われなかったことや GC のキャピラリーカラム内での分離に悪影響を与えたことが考えられた。更に、BPA は揮発性に乏しいことから、加熱による PDMS 攪拌子からの脱着が不十分であることや GC の注入口やカラムへの吸着などが推察された。

本章では OP、NP 及び BPA を含むフェノール性内分泌かく乱化学物質の水酸基を誘導体化し、SBSE-TD-GC/MS法で測定することを検討した。誘導体化を行うことで、極

性の低下及び揮発性の向上を目指した。

これまでに、GC 分析におけるフェノール性化学物質の誘導体化は種々の報告がなされている。最も広く用いられている誘導体化法は、シリル化である。この方法は、様々な官能基(水酸基、アルデヒド基、カルボキシ基及びアミノ基)を誘導体化することが可能である。しかし、水が存在すると加水分解が起こり、誘導体化反応が進行できないため、シリル化は、水系試料を対象としたSBSE法に適用することは、困難である。他方、無水酢酸を用いるアシル化は、水が存在する条件下でも、フェノール性水酸基を誘導体化することが可能である。そこで、測定試料中に無水酢酸を加えて、その場で誘導体化反応を行うと同時に、SBSE法で抽出・濃縮する *in situ* 誘導体化法を検討した。

本章では、測定対象物質として、内分泌かく乱作用の疑われるフェノール性化学物質である 2,4-ジクロロフェノール(DCP)、4-*tert*-ブチルフェノール(BP)、OP、NP、ペンタクロロフェノール(PCP)及び BPA を選定し、計 6 種類のフェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析法を試みた。MS 条件、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE 条件の最適化を検討した結果、DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA の検出限界は、それぞれ 2、1、0.5、5、2 及び 2 pg/ml であり、定量限界は、10、5、2、20、10 及び 10 pg/ml となり、高感度な測定法が構築された。本法の有用性を確認するために、河川水を用いて添加回収試験を行った結果、回収率 93.9-113.0 % (RSD < 7.2 %)と良好であった。本法を用いて、多摩川から採取した河川水を測定した結果、PCP を除く 5 種の化合物を定量することができた。本法は、河川水等の環境水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の高感度かつ高精度であり、簡便な測定法として有用であった。

3. *In situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法によるヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析

ヒト生体リスク評価を行うためには、暴露量を求めることが必要である。一般に、フェノール性化学物質が経口で摂取された場合、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体として代謝され、尿中に排泄されることが知られている。これまでに、NP や BPA においても、グルクロン酸抱合体として尿中に排泄されることが報告されている。従って、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質を測定することで、当該化学物質の暴露量を推測することが可能である。

本章では、二章で開発した *in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法をヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の測定に応用し、当該化学物質の暴露実態を調査した。

In situ 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法をヒト尿試料の分析に適用した結果、ヒト尿中の夾雑成分により、OP 及び NP の誘導体化効率が低下した。そこで、アセトニトリ

ルを用いる除タンパク操作を組み込むことで、問題点を克服した。*In situ* 誘導体化を伴う SBSE 法の最適化条件を検討した結果、DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA の検出限界は、それぞれ 0.02、0.01、0.01、0.05、0.02 及び 0.02 ng/ml であり、定量限界は、0.1、0.05、0.05、0.2、0.1 及び 0.1 ng/ml となり、高感度な測定法を構築することができた。本法の有用性を確認するために、ヒト尿試料を用いて添加回収試験 (n=6) を行った結果、回収率 95.0-101.8 % (RSD < 8.6 %) と良好な結果を得ることができた。本法を用いて、健常人 5 名から提供された尿試料を測定した結果、6 種類のフェノール性内分泌かく乱化学物質を定量することができた。本法は、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の高感度、高精度かつ簡便な測定法として有用であった。また、ヒト尿試料中からフェノール性内分泌かく乱化学物質が検出されたことから、当該化学物質の恒常的な暴露が示唆された。

本研究では、フェノール性内分泌かく乱化学物質のヒト生体暴露実態を解明するために、SBSE-TD-GC/MS 法の適用を試みた。SBSE 法の操作過程に誘導体化試薬を添加する *in situ* 誘導体化法を検討した結果、簡便かつ高感度な分析法の構築が達成された。SBSE 法は、大量の PDMS 相をコーティングした攪拌子を用いることで、従来法である SPME 法よりも、高い回収率が得られ、幅広い物質に適用可能である。また、試料抽出に有機溶媒を使用しないことから、環境にやさしい分析法であり、今後、更なる発展が期待される。

論文審査の結果の要旨

我々が快適で豊かな生活を享受できるのは、化学物質の恩恵と言っても過言ではない。これまでに様々な化学物質が作られ、環境や生物に対する安全性を評価するために多くの試験がなされてきた。しかし、環境に放出された化学物質の中に、内分泌系をかく乱し、生殖、発達、神経などに影響を及ぼす化学物質が存在することが懸念されている。とりわけ、暴露量が比較的多いと予想されるフェノール性化合物の一部に、弱い女性ホルモン様作用を有することが判明し、野生生物やヒトへの影響が懸念されたため、当該化学物質の生体リスク評価が必要である。さらに、リスク評価を行うためには、ヒト暴露量を正確に把握するための微量分析法の開発が要求されている。

近年、機器分析は目覚ましい進歩を遂げており、高感度な測定が可能になりつつあるが、実試料を測定する上では、多種多様なマトリックスから効率よく測定対象物質を抽出・濃縮・精製するための試料前処理操作が重要である。分析用試料前処理技術として開発されたスターバー抽出 (SBSE) 法は、無極性のポリジメチルシロキサン (PDMS) 相がコーティングされたガラス製攪拌子を用いて、試料中の微量分析対象物質を効率よく抽出・濃縮する方法である。また、PDMS 攪拌子に移行した化学物質は、加熱脱着 (TD) - ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) を用いて、オンラインで大量の分析対象物質を測定系に導入できるため、高感度な測定が可能である。

本研究では、SBSE法を用いて、ヒト暴露量を評価するための生体試料中フェノール性内分泌かく乱化学物質を簡便かつ高感度に分析する方法の構築が試みられた。また、分析対象物質の安定同位体標識物質をサロゲートとして利用し、回収率を補正することで高精度な分析法が開発された。

第一章では、単純なマトリックスである河川水を対象試料とし、SBSE-加熱脱着 (TD) -GC/MS法を用いて4-tert-オクチルフェノール (OP) 及び4-ノニルフェノール (NP) の分析法が構築され、その有用性が検討された。

第二章では、SBSE法の操作過程に誘導体化試薬を加えて、誘導体化と抽出を同時に行う *in situ* 誘導体化を伴う SBSE法が検討された。また、測定対象物質に

は、内分泌かく乱作用が疑われている2,4-ジクロロフェノール (DCP)、4-tert-ブチルフェノール (BP)、ペンタクロロフェノール (PCP)、ビスフェノール (BPA) を加えた6種類のフェノール性内分泌かく乱化学物質が選定された。本分析法の検出感度は、sub pg/ml レベルであり、超高感度な分析法が確立された。本法を用いて、河川水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析が行われ、環境モニタリングにも有用であることが確認された。

更に、第三章では、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法を用いて、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析法が開発された。本法の検出感度は、sub ng/ml レベルであり、健常人の尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質を測定する上で、十分な感度を有しており、実際に、健常人の尿を測定することで、当該化学物質のヒト暴露実態が解明された。

本研究の成果は、平成15年3月に行われたフィジカルファーマフォーラム2003 (日本薬学会物理系薬学部会主催) において、『ベスト基盤賞』、平成17年5月に行われた第66回分析化学討論会 (日本分析化学会主催) において、『分析化学討論会新人賞』、平成17年8月に行われた FLUOROS2005 (国際会議) において、『Student Travel Award』を受賞するなど、社会的に高く評価されている。さらに、2007年1月11日における主論文3報の被引用回数の合計は、47回であり、学術的にも大きな貢献がなされている。

また、学位申請者は、博士課程在学中に、平成15年度内藤財団内藤記念若手研究者海外派遣助成金、平成16～18年度科学研究費補助金 (特別研究員奨励費)、平成16年度昭和シェル石油環境研究助成財団萌芽的研究、平成17年度星薬科大学記念大谷研究助成金を得るなど、競争的資金の獲得状況も良好である。さらに、平成16～18年度日本学術振興会特別研究員 (DC1) に採用されるなど、高い評価を得ている。

本研究で構築された分析法及び知見は、フェノール性内分泌かく乱化学物質の暴露実態を解明し、ヒトのリスク評価を実施する上で大きく寄与するものと期待される。

従って、本論文は、博士 (薬学) を授与するに十分値するものと判定した。