

5. 分析値の信頼性確保について

Dr. W.Horwitz^{注1}が指摘するように、試料中における測定対象化学物質の濃度が低いほど測定機関間での分析値のバラツキは大きくなる。この点、生体試料あるいは動物飼育飼料中のBPA、フタル酸エステル類、ノニルフェノールの存在量がppbレベルであることから、測定値の信頼性を確保する上でも克服すべき最重要課題である。

また、これらの化学物質は、測定環境から容易に汚染（コンタミネーション）をおこし、その結果は、分析値に大きく影響するので、コンタミネーションを極力排除する必要がある。

2. 及び3. に示した分析ガイドラインは、以上のことに十分留意して作成したものである。

分析法の信頼性の確認

分析法の信頼性を確認するためには、中間報告書でも述べられているとおり、複数の試験機関で同一試料を分析した結果を評価することが不可欠である。

しかしながら、今回作成した分析ガイドラインについては、これまでのところ、微量な血液などの生体試料等における、また、先に述べたように容易にコンタミネーションをおこす化学物質の超微量測定を行うという要件のため、参加試験機関を募ることができなかったことから、分析ガイドラインを作成した機関間で一部の試料についてクロスチェックを行った。この点、今後、参加可能な複数の試験機関を得て、クロスチェックを行う必要性が残されている。

精度管理保証のための措置について

実試料の測定に際しては、実試料を分析する試験機関と参照試験機関（複数機関であれば、なお望ましい）で、事前に、同一サンプルについて分析ガイドラインに従った分析を行い、分析値を検証するクロスチェックを実施して、当該実試料を分析する試験機関が十分な感度と精度を有することを確認することが望ましい。

注1： *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1344(1980)

6. 動物の飼育・実験環境からの化学物質暴露について

飼育・実験環境の化学物質

飼料・床敷等中のビスフェノール A

飼料中(n=40)に含まれる BPA は、ND~2.9ppb で、ほとんどの飼料が検出下限値レベル(1ng/g)であった。最も高濃度で検出された BPA 濃度(2.9ng/g)より、マウス及びラットが飼料から摂取する BPA を試算すると、マウスでは 17.4 ng/日(一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 72.5 ng/日(一日の飼料摂取量を 25 g とした時)程度となる。

また、床敷中(n=14)からは最高で 704ppb 検出されたものも見られたが、給水中(n=3)からは BPA は検出(0.02ng/mL)されなかった。

飼料・床敷等中のフタル酸エステル類

飼料中(n=12)からは DEHP が 116-511 ng/g、DBP が 25.1-944 ng/g、BBP が 22.2-157ng/g 検出され、総量(測定対象とした 5 種のフタル酸エステル類の合計値)は 141-1410 ng/g であった。検出されたフタル酸エステル類の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取するフタル酸エステル類の総量を試算すると、マウスでは 846-8460 ng/日(一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 3525-35250 ng/日(一日の飼料摂取量を 25 g とした時)となる。

また、床敷(n=13)からは DEHP が 16.0-5070 ng/g、DBP が 19.6-1390 ng/g、BBP が 440-900 ng/g、DiNP が 198 ng/g、実験動物舎の室内空气中(n=4)からは DEHP が 27.6-32.1 ng/m³、DBP が 261-357 ng/m³ 検出された。給水中(n=3)からは、フタル酸エステル類は検出されなかった。

飼料・床敷等中の 4-ノニルフェノール

飼料中(n=35)の 1 検体は不検出であったが、34 検体から NP が 4.9-117.0 ng/g 検出された。検出された NP の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取する NP を試算すると、マウスでは、29.4-702ng/日(一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 122.5-2925 ng/日(一日の飼料摂取量を 25 g とした時)となる。

床敷(n=15)からはすべての検体から NP が検出された。特に古新聞再生紙を原料とする床敷きは、620-1020ng/g の範囲で検出された。その他の床敷きは 2.3-65.3ng/g の範囲で検出された。床敷きからの暴露量推定は困難であるため高濃度に汚染が認められる床敷きの使用は避けることが望ましい。

給水は、4 社の給水瓶の本体とキャップの組み合わせ(n=11)について行った。給水瓶の使用方法を考慮して、分析条件は超純水 200mL を入れた後、室温で 24hr 放置後、100mL を分析に供した場合と給水瓶に入れた超純水とともに給水瓶を 121℃、20min 加熱滅菌放冷後、100mL を分析した場合について検討した。室温放置の場合、5 検体から 0.03-0.11ng/mL の範囲で NP が認められた。加熱滅菌後では 1 検体を除くすべての検体から NP が 0.03-0.63ng/mL の範囲で認められた。検出された NP の濃度より、マウス及びラットが給水から摂取する NP を試算すると、マウスでは、0.24-5.04ng/日(一日の給

水摂取量を 8mL とした時)、ラットでは、1.35-28.35ng/日 (一日の給水摂取量を 45mL とした時) となる。なお、オートクレーブ内の汚染の有無を確認するためピーカーに超純水を入れ、蓋をせずに滅菌前と滅菌後を分析したが NP は不検出であった (定量限界値は 0.02ng/mL)。

飼料中の植物エストロゲン

測定に供したほとんどの飼料(37/40)から植物エストロゲンが検出された。最も高濃度で検出された植物エストロゲン濃度(569 μ g/g)より、マウス及びラットが飼料から摂取する植物エストロゲンを試算すると、マウスでは 3,414 μ g/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 14,225 μ g/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) 程度となる。なお、植物エストロゲンフリーとして注文販売されている飼料からは植物エストロゲンは検出(<0.2 μ g/g)されなかった。

飼料中の 17 β -エストラジオール

動物飼料中 (n = 20) に含まれる 17 β -エストラジオール (エストラジオール; E₂) は、一製品を除いて定量下限値 (0.50 ng/g) 未満であった。定量下限値を越えた一製品中の E₂ 濃度は、0.52 \pm 0.03 ng/g であった。当該飼料は、マウスまたはラットに使用される。このケースでマウスまたはラットが、飼料から摂取する E₂ を試算するとマウス (飼料摂取量 : 6 g/日) で 3.1 ng/日、ラット (飼料摂取量 : 25 g/日) で 13 ng/日程度となる。

飼育・実験環境からの化学物質暴露への対応について

実験動物が、飼育・実験環境から化学物質の暴露を受けていることが予想されることから、内分泌かく乱化学物質問題に係る動物実験の信頼性を検証することを目的に、飼料、給水や床敷、空気中の化学物質濃度を測定した。

飼料、床敷等中から BPA、フタル酸エステル類、ノニルフェノール等が検出されたことから、実験動物は、飼育・実験環境から、さまざまな化学物質の暴露を受けていることが示唆される。

この結果を踏まえると、低用量作用の有無については、まさに議論が行われているところであるが、これに係る動物実験を行う際には、用いる飼料、床敷等について、対象の化学物質等をあらかじめ測定するなど、汚染のレベルを把握すること等が必要と思われる。

すなわち、飼育・実験環境は、化学物質に汚染されていない（コンタミナント・フリーである）ことが理想的ではあるが、現実の問題として、およそ化学物質のコンタミネーションをゼロにすることは不可能であり、現実的な対応としては、用いる飼料、床敷等のロット番号、入手可能な当該化学物質の分析データを明示するとともに、必要に応じて基礎暴露量を正確に把握するために飼料、床敷等中の化学物質濃度を測定して、論文、報告書等に記載するような配慮が必要であろう。

もとより、相当に汚染されている飼料、床敷等については、使用を避けることが望ましい。

床敷、空気、ケージについては、暴露量の推定は困難であろうが、飼料、給水については、濃度と摂取量から暴露量の推定が可能と思われるので、推定暴露量を動物実験の結果の考察に加えることも必要であろう。

なお、飼料中の植物エストロゲンは、栄養素としての側面もあるが、エストロゲン活性を指標にする等の動物実験では、その影響は無視できないと思われ、動物実験に先立ち、使用する飼料の組成及び植物エストロゲン量を把握しておくことが望ましい。

7. 今後、必要な調査研究等の取組

今回作成した分析ガイドラインの測定対象であるBPA、フタル酸エステル類、ノニルフェノールは、測定環境中での汚染が懸念され、微量分析を困難にしている分析化学的には測定難度の最も高い物質群である。提案した分析ガイドラインは、最新の分析法を参考に、公的試験研究機関を中心に現時点で使用する最新の分析機器(GC/MS、LC/MS、LC/MS/MSなど)を駆使した方法である。

内分泌かく乱化学物質の生体影響を把握するにはこれらの分析ガイドラインに従って多数の生体試料を分析し、データを蓄積する必要があるが、作成した分析ガイドラインによる分析を請負う測定機関は現状では限られている。

今後、更に効率の良い分析法やより精度、感度に優れた分析法が構築される可能性もあり、引き続き情報収集に努力して分析ガイドラインの充実を図る必要がある。