

平成 12 年度厚生科学研究費補助金
(生活安全総合研究事業)
研究成果報告書

**内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）
分析法の開発とその実試料分析結果に基づく
ヒト健康影響についての研究
(H11 - 生活 - 027)**

主任研究者	牧野 恒久	東海大学
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学
	織田 肇	大阪公衆衛生研究所
	塩田 邦郎	東京大学農学生命科学大学院
	鈴森 薫	名古屋市立大学

目 次

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）の分析法の開発と その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究	1
主任研究者 牧野 恒久 (東海大学医学部 母子生育学系産婦人科学部門 教授)	
内分泌かく乱化学物質測定用ディスプレイ器具の開発に関する研究	45
分担研究者 牧野 恒久 東海大学 研究協力者 岩崎 克彦 東海大学 和泉俊一郎 東海大学 益川 邦彦 神奈川県衛生研究所 平山 クニ 神奈川県衛生研究所 藤巻 照久 神奈川県衛生研究所 石川 健次 テルモ (株) 中橋 敬輔 テルモ (株)	
LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析	59
分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所 協力研究者 小林 進 埼玉県衛生研究所 堀江 正一 埼玉県衛生研究所 吉田 栄充 埼玉県衛生研究所	
生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング HPLC- 蛍光定量	65
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学 研究協力者 黒田 直敬 長崎大学 中島憲一郎 長崎大学 岩崎 克彦 東海大学 和泉俊一郎 東海大学	
クロロベンゼン類及びパラベン類の分析法開発と実試料の分析	71
分担研究者 織田 肇 大阪府公衆衛生研究所 研究協力者 畑山 善行 長野県衛生公害研究所 月岡 忠 長野県衛生公害研究所 寺澤 潤一 長野県衛生公害研究所	

フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明 87

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学
研究協力者 吉村 吉博 星薬科大学
加藤 嘉代子 星薬科大学
井之上 浩一 星薬科大学
岡 尚男 愛知県衛生研究所
伊藤 裕子 愛知県衛生研究所

ヒト尿・血液中のベンゾ[α]ピレン及びその代謝物の分析法開発 107

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学
協力研究者 早川 和一 金沢大学
鳥羽 陽 金沢大学

生体試料（母乳、母体血、さい帯血等）中の有機塩素系化学物質の分析法開発と
その暴露評価 113

分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者 堀 伸二郎 大阪府立公衆衛生研究所
北川 幹也 大阪府立公衆衛生研究所
阿久津和彦 大阪府立公衆衛生研究所

内分泌かく乱化学物質の胎児及び母体における汚染状況の分析とその細胞障害等の解析 123

分担研究者 鈴森 薫 名古屋市立大学
研究協力者 杉浦 真弓 名古屋市立大学
孫田 信一 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

不妊症患者の血液等中のクロルデン関連物質およびヘキサクロロベンゼンの分析 129

分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者 伊藤 裕子 愛知県衛生研究所
猪飼 誉友 愛知県衛生研究所
近藤 文雄 愛知県衛生研究所
岡 尚男 愛知県衛生研究所
松本 浩 愛知県衛生研究所

不妊症患者の血清及び腹水中の揮発性有機化合物の分析 135

分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所
近藤 文雄 愛知県衛生研究所
猪飼 誉友 愛知県衛生研究所
伊藤 裕子 愛知県衛生研究所
岡 尚男 愛知県衛生研究所
松本 浩 愛知県衛生研究所

環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響 147

分担研究者 塩田 邦郎 東京大学
研究協力者 横田 博 酪農学園大学

経口免疫寛容へのジブチルスズの影響—抗原特異的なT細胞応答への影響 151

分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者 益川 邦彦 神奈川県衛生研究所
渡邊 裕子 神奈川県衛生研究所
藤巻 照久 神奈川県衛生研究所

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす植物エストロゲンの阻害効果 159

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学
研究協力者 中陳 静男 星薬科大学

エストロゲン受容体 α 、 β を介した内分泌かく乱化学物質の作用機序についての研究 177

分担研究者 牧野 恒久 東海大学
研究協力者 和泉俊一郎 東海大学
岩崎 克彦 東海大学
村野 孝代 東海大学

ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響 189

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学
研究協力者 山崎 聖美 国立公衆衛生院

内分泌かく乱化学物質の生体影響における子宮内膜症の発生と増殖のメカニズム
に関する研究 195

分担研究者 牧野 恒久 東海大学
研究協力者 岩崎 克彦 東海大学
和泉俊一郎 東海大学
村松 俊成 東海大学

平成 12 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）の分析法の開発と
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

主任研究者 牧野恒久

（東海大学医学部 母子生育学系産婦人科学部門教授）

研究要旨

1. 分析法の開発と実試料分析

① 内分泌かく乱化学物質測定用ディスポーザブル器具の開発に関する研究
生体試料中の内分泌かく乱化学物質の暴露量測定を行う当班の研究内容に鑑みて、それらの生体試料を採取、保存するには測定物質等のコンタミを極力低減させる必要がある。これまでのガラス製に代わり、煩わしい準備の必要もなく、破損やコンタミの心配ないプラスチック製ディスポーザブル生体試料採取器具および保存容器の開発を行った。

② LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析

分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS）を用いたさい帯血，母体血，腹水及び缶飲料中のビスフェノール A (BPA) の分析法を検討した。分析に供したさい帯血，母体血及び腹水，計 58 検体中の BPA 濃度はほぼ検出限界(0.3ng/mL)以下であった。また，市販缶飲料中の BPA 濃度調査から，製缶メーカーによる BPA 溶出の低減化が進められていることが示唆された。血液試料中の BPA の分析では，超微量レベルの定量が求められるが，現段階ではサンプリング時，と分析操作時のコンタミネーションを「ゼロ」にすることは極めて困難であり，信頼性の高い分析値を得るためにバリデーションされたサンプリング・分析法の確立が必要と考えられる。

③ 生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング HPLC-蛍光定量

我々は、フェノール性水酸基を有する化合物と選択的に反応し，蛍光誘導体を与える 4-(4,5-ジフェニル-1H-イミダゾル-2-イル)ベンゾイルクロリド (DIB-Cl) を開発し，ヒト尿中フェノールやクレゾール類の蛍光定量に成功したが，これを応用して，ビスフェノール A (BPA) の高感度定量のための HPLC-蛍光検出及び過シュウ酸エステル化学発光検出法を，生体試料へ適用可能な超高感度かつ高選択的な分析法に発展させることを目的とした。その結果，カラムスイッチング技術をさらに導入することにより，HPLC-蛍光定量法を確立し，

母体血、さい帯血及び腹水中の BPA 濃度レベルを明らかにした。

④ クロロベンゼン類及びパラベン類の分析法開発と実試料の分析

クロロベンゼン類およびパラベン類は内分泌かく乱作用を持つ可能性があることが指摘されている。特にパラベン類はフタル酸エステル類同様に精巣機能に対する影響が報告されており近年その生体への影響が注目されている。生体試料中のパラベン類の測定を行うため、少量の試料で高感度な測定のできる分析法を構築し、化学物質の胎盤通過性や、暴露経路等について検討を行った。パラベン類は化粧品や医薬品等の保存料に使用されており、化粧品からの皮膚吸収がパラベン類の暴露にどの程度影響するかの検討を行った。

⑤ フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明

プラスチックの可塑剤として汎用されているフタル酸ジエステル類の代謝物であるフタル酸モノエステル類に関する、高感度かつ再現性の良い生体試料分析法を開発した。本法を用いて、実試料（血清及び腹水）に応用した結果、フタル酸モノブチル及びフタル酸モノベンジルに関してはいずれも検出限界以下であったが、フタル酸モノ-2-エチルヘキシルに関しては、最高 28.8ng/mL が検出された。生体中での代謝過程に関する動態解明に関して、ヒト血清へのジエステル体添加による代謝変換に関する検討を実施した際、種々の酵素により、フタル酸ジエステル類が分解され、モノエステル体へと代謝することを確認した。生体試料中フタル酸エステル類の分析には、様々な要因により、微量分析の詳細な検討が必要と推測される。

⑥ ヒト尿・血液中のベンゾ[a]ピレン及びその代謝物の分析法開発

ベンゾ[a]ピレン(BaP)の代謝物として知られ、内分泌かく乱作用の疑われるモノヒドロキシベンゾ[a]ピレン(OH-BaP)の12異性体の分離分析法を開発した。アルキルアミド型逆相カラムにより、不安定な6-OH-BaPを除く8種類のOH-BaPを分離し、分離が不十分な1-, 3-, 12-OH-BaPをカラムスイッチングによりβ-シクロデキストリン固定化カラムに導入することで11種全てを分離し、蛍光検出できる。この分析システムを尿試料に適用するための前処理法を検討し、銅-フタロシアニン誘導体を結合させた繊維を用いて濃縮することで回収率をほぼ100%にした。健常人の尿中代謝物を同定し、ビスフェノールAに匹敵するエストロゲンレセプター結合能を有する3-OH-BaPが主であることを明らかにした。

⑦ 生体試料（母乳、母体血、さい帯血等）中の有機塩系化学物質の分析法開発とその暴露評価

生体試料を対象とした、内分泌かく乱作用をもつ有機塩素系化学物質（PCB、農薬、ダイオキシン類）の迅速・精密分析法を開発し、母体および胎児、乳児暴露評価を行った。本分析法により、さい帯血などの低脂肪組織における分析が可能となり、PCBについては、母乳、母体血、さい帯血から35種類の異性体が

検出され、平均総 PCB 濃度 (fat basis) は 95ng/g (母乳)、99ng/g (母体血)、61ng/g (臍帯血) であった。PCB 及び有機塩素系農薬の臍帯血中濃度は (Whole basis) 母体血の約 1/4 であった。また、これら化合物の母体から胎児への暴露量は臍帯血流量が明らかになれば推定が可能になった。母乳をかいした乳児暴露評価は、有機塩素系農薬はそれぞれの ADI の 33%~8% であった。一方、ダイオキシン類においては TDI を大幅に上回った。

⑧ 内分泌かく乱化学物質の胎児及び母体における汚染状況の分析とその細胞障害等の解析

内分泌かく乱化学物質の母体を介した胎児等への影響を明らかにするために、絨毛、羊水、さい帯血等の試料収集とこれら試料における内分泌かく乱化学物質 (PCB、BPA 等) 汚染状況の調査を開始した。これらの調査をとおして同一母体及び胎児における内分泌かく乱化学物質の経時的な汚染状態、及び母体と胎児との比較により化学物質の母体から胎児への伝達に関する基礎的情報を得ることができる。また、内分泌かく乱化学物質として疑われている重金属類の母体及び胎児への蓄積状況と重金属等に対する *in vivo* 細胞反応を調査し、内分泌かく乱化学物質がヒト健康に及ぼす影響の作用機序の一つと考えられる遺伝子 (DNA) への障害として、8-ヒドロキシ-デオキシグアノシンの検出法を検討した。

⑨ 不妊症患者の血液等中のクロルデン関連物質およびヘキサクロロベンゼンの分析

不妊症患者および母体 (さい帯血) を対象として、クロルデンとその関連物質 (CLDs) 及びヘキサクロロベンゼン (HCB) に対する人体暴露量調査を実施した。検出を試みた 7 種の化学物質のうち、HCB の検出率が 98% と最も高く、次いで *trans*-ノナクロルが 63%、*cis*-ノナクロルが 17% で、それ以外の物質は検出されなかった。また、検出された物質の中央値は、ヘキサクロロベンゼンが 0.05 ppb、*trans*-ノナクロルが 0.10 ppb、*cis*-ノナクロルが 0.04 ppb であった。同一患者から採取した試料中の HCB 濃度については、患者末梢血と腹水には有意な正の相関関係が認められたが、母体末梢血とさい帯血には有意な相関関係は認められなかった。

⑩ 不妊症患者の血清及び腹水中の揮発性有機化合物の分析

不妊症患者の生体内における揮発性有機化合物の存在実態を明らかにすることを目的に、18 名の患者 (平成 11 年度 5 名、平成 12 年度 13 名) の末梢血及び腹水を分析した。その結果、今回測定を行なった不妊症患者の体内には、トルエンなどの揮発性有機化合物が ppb からサブ ppb のオーダーで存在することが示唆されたが、ナフタレンは全く検出されなかった。また、採血方式及び場所の違いによる血中揮発性有機化合物濃度の違いについても検討した結果、生体内における揮発性有機化合物のより詳細な存在実態を明らかにするためには、周

困りの環境等からの汚染防止対策を施した採血方式及び測定法の確立が重要な課題であると考えられた。

2. 生体への影響と作用機序

① 環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

内分泌かく乱物質は細胞分化及び生殖器管形成期すなわち胎児期に暴露されると、成長後およびその子孫への不可逆的影響が心配されている。胎生期の内分泌かく乱化学物質の作用を解析するためには、母体・胎盤・胎児における化学物質の代謝解毒反応を詳細に明らかにすることが求められており、我々は、化学物質解毒酵素の妊娠期での機能を明らかにする事を目的として、臓器・細胞レベルおよび酵素レベルでの研究をおこなった。

② 経口免疫寛容へのジブチルスズの影響 - 抗原特異的な T 細胞応答への影響

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体機能へのリスク評価を行うことを目的として、食品抗原の経口感作によって誘導される免疫応答への影響を検討した。内分泌かく乱作用が疑われる物質のうち、胸腺萎縮などの免疫機能への影響がすでに知られている DBT (塩化ジブチルスズ) について、末梢リンパ節細胞の抗原特異的な応答への影響を検討した。

③ ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす植物エストロゲンの阻害効果

環境由来の化学物質の内在性ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす影響を解明する目的で、ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いてコルチゾール産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法を確立した。このアッセイ系を用いて食餌として多量に摂取する可能性がある植物エストロゲンであるフラボン及びイソフラボンの影響を検討した結果、7 物質がコルチゾール産生を阻害した。この阻害作用は、エストロゲンレセプターを介する作用ではなく、コルチゾール合成を触媒する酵素の阻害を介する作用で、特にヒドロキシステロイド脱水素の 3β -HSD タイプ II 及びモノオキシゲナーゼの P450c21 を阻害することが明らかになった。

④ エストロゲン受容体 α 、 β を介した内分泌かく乱化学物質の作用機序についての研究

近年、化学物質の持つ内分泌攪乱作用が問題となっており、その内分泌攪乱作用については、様々な評価法が確立しつつある。しかし作用機序の解明は充分になされていない。今回は、代表的な評価法として、エストロゲンレセプター発現細胞を用いた E-screen assay (エストロゲン依存性細胞増殖効果の評価)、及び、エストロゲンレセプター α 、 β における Binding assay を行い、内分泌攪乱物質のエストロゲンレセプターを介した作用機序について検討した。その結果、全ての被検物質にエストロゲン様細胞増殖効果が認められた。またエスト

ロゲン受容体 における 17β -estradiol との Competition binding assay では、各々の物質特有の競合結合を認め、それぞれのエストロゲン様作用の発現においては、介するレセプターが必ずしも均一ではないことが明らかとなった。

⑤ ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

植物エストロゲンは大豆やもやし、ホップ等に存在する天然由来物質であり、構造がエストラジオールに類似していることから、エストロゲン様物質であるとして注目されている。一方、大豆食品を多く摂取しているアジア人には、乳癌や前立腺癌等のホルモン依存性癌発生率が低いことから、抗エストロゲン様物質であるとも言われているが、詳細な研究はなされていない。そこで、エストロゲン様作用を検出する目的で、ヒト乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により、植物エストロゲン及び植物エストロゲンがその他のエストロゲン様物質と共存した条件下での乳癌細胞に対する影響について検討した。

⑥ 内分泌かく乱化学物質の生体影響における子宮内膜症の発生と増殖のメカニズムに関する研究

内分泌かく乱化学物質と考えられているフタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ノニルフェノールおよびビスフェノール A (BPA) を用いてヒト子宮体癌細胞 (HHUA 細胞) の増殖性を *in vitro* で検討した。ついで *in vitro* の BPA の濃度を考慮して、妊娠マウスの皮下に BPA を投与し胎児発育を検討した。また種々の化学物質や薬物類を細胞外にトランスポートする P-糖タンパクを欠損させたノックアウトマウスを用いて同様の胎児発育を検討した。さらに出生 2~3 ヶ月の未妊娠の雌マウスに BPA を投与した後に腹腔内所見を観察したが、明らかな子宮の肥大や子宮内膜症の所見は得られなかった。

分担研究者

中澤裕之 星薬科大学 教授

織田 肇 大阪公衆衛生研究所

所長

塩田邦郎 東京大学農学生命科学

大学院 教授

鈴木 薫 名古屋市立大学 教授

A. 研究目的

1. 分析法の開発と実試料分析

① 内分泌かく乱化学物質測定用ディスプレイザブル器具の開発に関する研究

生体試料中の内分泌かく乱作用の疑いがある物質の暴露量測定を行うこと場合、それらの試料採取の際に測定物質等の混入を極力低減させなければ、高感度分析の意味が無くなってしまふ。これまでは、洗剤洗浄、アセトン洗浄、200℃加熱、清浄域で徐冷等、複雑な作業が可能な、ガラス製の採取器具や保存容器を用いて、測定物質の混入を低減させてきた。本研究では、ガラス製に代わり、煩わしい準備の必要もなく、破損の心配ないプラスチック製ディスプレイザブル生体試料採取器具および保存容器を開発を目的とした。特に本年は、混入の可能性の高い D E H P (Di-2-ethylhexyl phthalate) に焦点を当て、設定した採取器具での採取操作や設定した保存容器での保存中の D E H P の混入量を測定し、その影響度を検討した。

② LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析

ビスフェノール A (BPA) は、内分泌かく乱作用が疑われる物質として環境庁よりリストアップされた 67 物質の中でも注目の高い物質で、その国内生産量は第 3 位を占めている。これまで ELISA 法や GC-MS を使った他の幾つかの報告では、血液から平均で数 ng/mL (ppb) の BPA が検出されたこともあるが、我々の構築した高感度な高速液体クロマトグラフ・質量分析計

(LC-MS) を用いた予備調査では、ボランティア 7 名の血液 (血清) 中の濃度は検出レベル以下であった。今回は、先に構築した方法を一部改良し、さい帯血、母体血、腹水等計 58 検体について分析し、更に前回の調査で比較的高濃度で BPA が検出された缶飲料 (同一ブランド) 中の実態調査も実施した。

③ 生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング HPLC-蛍光定量

我々は、これまでにフェノール性水酸基を有する化合物と選択的に反応し、蛍光誘導体を与える 4-(4, 5-ジフェニル-1H-イミダゾル-2-イル) ベンゾイルクロリド (DIB-Cl) を開発し、ヒト尿中フェノールやクレゾール類の蛍光定量に適用してきた。さらに、ビスフェノール A (BPA) の高感度定量のための HPLC-蛍光検出及び過シュウ酸エステル化学発光検出法の開発を行い、ほ乳びんから溶出される BPA の定量等を行ってきた。本研究は、さらにカラムスイッチング技術の導入し、生体試料へ適用可能な超高感度かつ高選択的な分析法を開発すると同時に、この HPLC-蛍光定量法を用いて、母体血、さい帯血由来血清及び腹水中の BPA 濃度の測定を実施、その濃度レベルを明らかにすることを目的とした。

④ クロロベンゼン類及びパラベン類の分析法開発と実試料の分析

平成 10 年度厚生科学研究 (内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する研究) により内分泌かく乱作用が心配されるヘキサクロロベンゼン及びジクロロベンゼンが生体試料 (母体

血、さい帯血、母乳)から検出された。また、同様に内分泌かく乱作用が懸念されるパラベン類については代謝物であるp-ヒドロキシ安息香酸が検出された。これらの化学物質が生体に取り込まれる過程について経路を検討し、また、生体中での挙動について調査を行うことを目的とした。

⑤ フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明

フタル酸エステル類は機能性、加工性、経済性等に優れたプラスチックの可塑剤であり、幅広い用途で使用されているが、内分泌かく乱化学物質として疑われている。ヒトへの内分泌かく乱作用を検証する上で、生体試料からの微量測定法の開発は必要不可欠であるが、フタル酸エステル類は生活環境中に多く存在するため、その暴露経路は空気、水等幅広く、その結果として高いバックグラウンド値として現れ、微量測定を困難としている。そこで、平成10年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「内分泌かく乱化学物質の胎児、成人などの暴露に関する研究(指定研究)」において、高感度分析上の妨害となるバックグラウンドを極力排除した血中フタル酸エステル類の精度高い微量分析法を開発した。しかしながら、フタル酸ジエステル類は生体内に取り込まれると速やかに代謝をうけ、血中にフタル酸モノエステル類として、また尿中にはフタル酸モノエステル類のグルクロン酸抱合体として存在することが報告されており、暴露量の評価にはモノエステル体を分析することが適当で

あると考えられる。動物実験における毒性評価は、di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)はげっ歯類でペルオキシソーム(peroxisome)増殖による肝癌が報告されている。また、DEHP, dibutyl phthalate (DBP), butylbenzyl phthalate (BzBP)は動物で催奇形性が認められている。DBPはその代謝物である monobutyl phthalate (MBP)により毒性を示し、monobenzyl phthalate (MBzP) mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP)はセルトリ細胞への毒性と催奇形性が報告されている。そこで、これらの報告より、測定対象物を MBP, MEHP, MBzP とし、ヒト血清中のこれらフタル酸モノエステル類分析法を検討した。

⑥ ヒト尿・血液中のベンゾ[a]ピレン及びその代謝物の分析法開発

化石燃料などの有機物の不完全燃焼によって生成する多環芳香族炭化水素(PAHs)は、癌や喘息などの原因となることが知られている。我々は、ベンゾ[a]ピレン(BaP)をはじめとする数種類のPAHsが抗エストロゲン、抗アンドロゲン作用を有することを明らかにした。またヒトエストロゲンレセプター(hER)に対する競合実験及び酵母のhERに応答したβ-ガラクトシダーゼの発現系を用いた実験では、BaPの代謝物として知られているモノヒドロキシベンゾ[a]ピレン(OH-BaP)の水酸基の位置の異なる異性体12種のうち、3-OH-BaPがビスフェノールA(BisA)に匹敵する強さの結合能を有することを見いだした。こ

のことから、ヒトの BaP 暴露量を把握し、その内分泌かく乱作用の全容を明らかにするためには、BaP のみならず、その代謝物も視野に入れた尿や血液中のモニタリングが不可欠であると考えられた。そこで、昨年度の厚生科学研究においては、カラムスイッチング HPLC による OH-BaP の異性体の分離分析法を開発した。本年度は更に実用性を高めるためにこれを改良し、より簡便な分析システムを構築した。また、本分析システムをヒト尿試料に適用するにあたり、試料の前処理法として、グルクロン酸抱合体の加水分解、及び銅フタロシアニンレーヨンをを用いた被検体の濃縮法について検討した。さらに健常人尿中 OH-BaP の同定、及び定量を実施した。

⑦ 生体試料（母乳、母体血、さい帯血等）中の有機塩系化学物質の分析法開発とその暴露評価

PCB などの有機塩素系化学物質による内分泌かく乱作用とその健康への影響が問題となっている。これら化学物質は体内への蓄積性が高く、継続的な曝露の要因となっている。内分泌かく乱作用は胎児期から成長期における曝露による影響が問題となっており、母体から血液あるいは母乳を通しての曝露状況を知ることが最も重要な課題である。そこで、胎児および出生後の汚染実態を明らかにすることを目的とした迅速・精密分析法の開発を行うと共に母体血・さい帯血・母乳のこれら化学物質による汚染レベルについて詳細な検討を行った。

⑧ 内分泌かく乱化学物質の胎児及

び母体における汚染状況の分析とその細胞障害等の解析

環境中に存在する数多くの内分泌かく乱化学物質がヒト健康へ重大な影響を及ぼしていると予測されている。この中の化学物質のいくつかは調査が行われており、その実態や作用機序については、ある程度判明しているものがある。しかし、他のほとんどの内分泌かく乱化学物質についての、生体への汚染状況に関する調査は、いまだ不十分であり、そのヒト健康への影響についての情報は極めて限られている。特に、母体を介した胎児への汚染とその影響の実態はほとんど分かっていない。そこで、本研究班において我々は内分泌かく乱化学物質の母体を介した胎児への汚染の実態把握と、これら内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響の機序を検討することを目的として、本年度から調査解析を開始した。まず、当グループでは生体試料（羊水、さい帯血、臍帯、母体血等）の系統的集積を図り、主要な内分泌かく乱化学物質であるポリ塩化ビフェニール（PCB）、ビスフェノール A（BPA）等の母体と胎児試料における測定によって、母体と胎児の汚染濃度の相関及び汚染濃度の経時的変化について検討するための基礎的資料を得ることに着手した。さらに、内分泌かく乱化学物質の汚染濃度とそれらに対する *in vivo* の細胞反応の測定、及び内分泌かく乱化学物質によるヒト健康影響の作用機序の一つとしてこれら化学物質による遺伝子への障害の可能性を測定する方法について

検討を加えた。

⑨ 不妊症患者の血液等中のクロルデン関連物質およびヘキサクロロベンゼンの分析

クロルデンは、シロアリ、ヒラタキクイムシの駆除剤及び防除剤として広く使用されていたが、肝臓障害などの慢性毒性が認められたことから、わが国では昭和61年に使用禁止となった。しかし、遅効性殺虫剤であるクロルデンの残留性は極めて強く、最近の調査でもクロルデンやその製剤中の不純物であるノナクロル、さらには代謝物であるオキシクロルデンが環境中に残留していることが確認されている。一方、海外で殺菌剤として使用されているヘキサクロロベンゼン(HCB)は、我が国では農薬として登録はなされていないが、環境中に存在することは確認されており、塩素系農薬を始めとする塩素系化合物の製造原料中の不純物に由来すると推測されている。昨年度の本研究では、腹水、母体末梢血及びさい帯血の計24検体について、クロルデン、ノナクロル、及びオキシクロルデンを含むクロルデン関連物質(CLDs)とHCBの測定を実施した結果、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル及びヘキサクロロベンゼンの3物質がサブppbのオーダーで検出された。そこで、本年度の研究ではより多くの試料を分析し、昨年度の調査結果の確認を試みるために、不妊症患者及び母体末梢血、腹水、それに帯血中のこれら化学物質の濃度を測定した。さらに、患者末梢血と腹水、及び母体末梢血とさい帯血における濃度の相関についても検討を加えた。

⑩ 不妊症患者の血清及び腹水中の

揮発性有機化合物の分析

高分子系接着剤や塗料等の溶剤には、ベンゼン、トルエン、キシレン等が使われており、空気中に揮散したこれらの化合物に人体が曝されることが問題となっている。これら溶剤由来の化合物以外にも、食品の容器包装や輸送用の梱包資材等に汎用される発泡スチロールから漏出するスチレンモノマー、あるいは、衣類の防虫等に使われる *p*-ジクロロベンゼンやナフタレンなど、主に空気を介して人体に取り込まれ、内分泌かく乱作用などの生体影響が疑われている揮発性有機化合物はかなりの数にのぼる。今回、不妊症患者の生体内における揮発性有機化合物の存在実態を明らかにすることを目的に、その血液及び腹水中の濃度を測定した。また、サンプリング方法及び場所の違いによる血中揮発性有機化合物濃度の違いについても検討を加えた。

2. 生体への影響と作用機序

① 環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

薬物は体内に取り込まれた後、肝臓で様々な代謝を経て排泄される。内分泌かく乱物質の作用機序の解明や毒性を評価するために、母胎から胎盤を通して胎児に到達するまでの各臓器での代謝反応および内分泌かく乱物質による細胞分化への影響を明らかにしてゆくことを目的とする。特に、内分泌かく乱物質が吸収される消化管と排泄される腎、化学物質のバリエーである胎盤での代謝と動態について、肝臓の場合と比較して、その特徴を調

べる。また、上記臓器で働いている酵素の機能を試験管レベルで測定し、どのような機能がどのような臓器でどのような時期にどの程度発現するのかを明らかにすることを目的とした。

② 経口免疫寛容へのジブチルスズの影響 - 抗原特異的な T 細胞応答への影響

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体への影響は、内分泌系だけでなく免疫系や神経系などの他の生体機能も含めた検討を行うことの必要性が認識されている。一方、免疫担当細胞である T 細胞や B 細胞の応答は様々な細胞応答や物質により増強・阻害され修飾されることが知られている。このことから、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質が免疫担当細胞の応答に影響を及ぼし、正常な応答を変化させることが考えられる。特に T 細胞は外来抗原の認識に重要な役割を果たし、その分化過程で暴露される物質の影響は大きい。

船底塗料や食品の包装材等に幅広く用いられていたトリブチルスズ化合物 (TBT) は、水生生物への毒性が強く、メスの巻き貝の不妊化を引き起こすことが明らかとなっている。その代謝物のうちジブチルスズ (DBT) は、依然プラスチックの安定剤として用いられ、環境中の残留性も高い。また、ラットにおいて胸腺萎縮を引き起こすことが明らかとなっている。そこで、マウスを用いて、より実態に近い暴露モデルを想定し、ジブチルスズの経口免疫寛容への影響を検討することを目的とし、経口感作抗原に対する

T 細胞応答についての影響を検討した。

③ ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす植物エストロゲンの阻害効果

ステロイドホルモンは個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっており、生体の恒常性を保つためには必須の作用分子である。近年になりステロイドホルモン生合成に関与する酵素群がクローニングされ、それらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細、およびステロイドホルモンの核内受容体が明らかにされたことからステロイドホルモンの作用発現機構が分子レベルで明らかにされつつある。内分泌かく乱化学物質の曝露により内在性ホルモンの合成や分泌が阻害された場合、正常な内分泌系がかく乱されると考えられるが、特にこれらの化学物質が胎生期から新生仔期の限られた時期に曝露されることで、ステロイドホルモン合成が阻害された場合、生物における発生や生殖において深刻な影響が表れることが懸念される。内分泌かく乱化学物質のうち植物由来のエストロゲン活性物質は植物エストロゲンとも呼ばれており、特に大豆や大豆関連製品には植物エストロゲンの一種、フラボンやイソフラボンが多く含まれている。従来植物エストロゲンはヒトの

健康に良い影響を与えると考えられており、特に疫学調査等により、大豆製品を多く摂取する日本やアジアでホルモン依存性の癌である乳癌や前立腺癌発生率が低いと言われている。しかし、これら植物エストロゲンのステロイドホルモン産生に及ぼす阻害効果については検討されていない。我々は昨年度、内分泌かく乱化学物質の生体内ステロイドホルモン合成に及ぼす影響を解明することに視点をおき、ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いて *in vitro* で、ステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を確立した。本研究ではステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を用いて、代表的な植物エストロゲンとして知られるフラボン及びイソフラボンのステロイドホルモン産生に及ぼす阻害効果を検討することとした。

④ エストロゲン受容体 α 、 β を介した内分泌かく乱化学物質の作用機序についての研究

近年、内分泌攪乱作用を持つ化学物質が多数報告されているが、それら内分泌攪乱物質の作用機序についてはまだ十分な解明がなされていない。代表的な内分泌攪乱作用のスクリーニングの一つにエストロゲンレセプター発現細胞を用いた E-screen assay があるが、これまでのヒト乳腺細胞由来の MCF-7 に加え、今回は、子宮内膜由来細胞である、HHUA を用い同様の検討を行い、組織間における内分

泌攪乱物質のエストロゲン作用の違いについて検討した。2種の細胞間におけるエストロゲン様細胞増殖作用の違いに関して、今回はエストロゲンレセプター α 、 β 、それぞれにおける Binding assay を行い、レセプターサブタイプの関与について検討した。さらにこれらの検討から、現在報告されている代表的な内分泌攪乱物質について、それらレセプターを介した作用から作用機序別に分類することも今回の目的とした。

⑤ ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

植物エストロゲンは大豆やもやし、ホップ等天然に存在し、内分泌かく乱作用が疑われている物質の1つである。構造がエストラジオールに類似していることより、エストロゲン様作用があると言われている。実際、内分泌かく乱作用スクリーニング法の1つである受容体結合試験において、植物エストロゲンである Genistein, Daidzein はエストロゲンレセプター α 及び β に結合能を有する。また、1940年代にオーストラリアで起きたクローバー病は、植物エストロゲンであるクメストロールを含むクローバーを多量に摂取した羊に死産や奇形が発生したというものであり植物エストロゲンのエストロゲン様作用による結果であると考えられている。一方、大豆食品を多く摂取するアジア人の血中植物エストロゲン濃度は Genistein:158.6ng/mL, Daidzein:82.5ng/mL と、欧米人に比べ約10倍高い。

このことがアジア人において乳癌や前立腺癌等、ホルモン依存性癌発生率が低い要因であると指摘されている。よって、植物エストロゲンにおける抗エストロゲン様作用の可能性も示唆されているが、詳細な研究はなされていない。そこで、植物エストロゲンのエストロゲン・抗エストロゲン様作用を検出する目的で、乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により、植物エストロゲン単独及び植物エストロゲンがその他のエストロゲン様物質と共存した条件下での乳癌細胞に対する影響について検討した。

⑥ 内分泌かく乱化学物質の生体影響における子宮内膜症の発生と増殖のメカニズムに関する研究

近年、さまざまな化学物質によりヒト体内の内分泌環境がかく乱されていることが懸念されている。特に妊娠初期の女性がこれらの化学物質に暴露された場合の胎児の発育に関する胎児健康影響や、若年女性における子宮内膜症や子宮内膜増殖症の増加傾向が、実は内分泌かく乱化学物質による生殖器の早熟化に起因する可能性が考えられつつある。今回われわれは、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ノニルフェノールおよびビスフェノール A (BPA) などの化学物質を用いてエストロゲンレセプターを有するヒト子宮体癌細胞 (*RINKEN GENE BANK*: HHUA 細胞) における細胞増殖性を *in vitro* で検討した。ついで *in vitro* の結果を踏まえ、BPA の濃度を設定し、妊娠初期のマウスに皮下投与し胎児発育

への影響について、出生マウスの体重をコントロール群と比較検討した。次に出生後 2~3 ヶ月経過の未妊娠の雌マウスに同様に BPA を皮下投与し、子宮の発育状況や腹腔内の子宮内膜症所見の有無について検討した。胎盤の合胞体栄養細胞層、絨毛上皮に多く存在する P-糖タンパクは主に化学物質や他の薬物を細胞外へ排出する働きを有する。この P-糖タンパクをコードする multidrug resistance (*mdr1a/1b*) ジーンを欠損させたノックアウトマウスについても同様に BPA を投与し、さらに RT-PCR による解析を行った。

B. 研究方法

1. 分析法の開発と実試料分析

① 内分泌かく乱化学物質測定用ディスプレイザブル器具の開発に関する研究

生体試料採取器具および保存容器について、使用する際の要求特性を検討し、全てに共通する点として、1. 包装から取り出して直ぐ使えること、2. 滅菌済みであること、3. 通常使用条件下で破損しないプラスチック製であること、4. 測定物質の混入が少ないこととした。内分泌かく乱作用の疑いのある物質の混入を低減することを目的とした場合、その中でもフタル酸エステル類、ノニルフェノール類、アジピン酸エステル類、ビスフェノール A を特に注意すべき物質とした。以上の目的のため、原料に意図的に使用されていないことと、通常の製造過程で残留、生成、混入しないことを考慮し、更に、

無意識の汚染防止対策の一つとして、ヒトの手で触れずに大量生産されていることも条件として、選定をすすめた。テルモ社製の器具は製造工程の調査によりその構成原料を明らかにし、製造工程の不明な他社品は、構成部品を熱プレス法で薄い試料片に加工して、透過の赤外吸収スペクトル法 (FT-IR) で同定した。本年のターゲットとした DEHP 測定は、GC/MS (SIM: Selected Ion Monitoring) により行った。測定試料調製はヘキサン抽出により次の2段階の方法で行った: 初めは、24時間室温でヘキサンと接触、抽出させて測定試料調製した。さらに、DEHPが検出されたものについて、生体試料採取方法等を考慮に入れて、ヘキサン抽出時間を決めて試料調製を行った。

② LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析

生体試料は東海大学病院から提供されたものを用いた。缶飲料は埼玉県内で市販されているコーヒー、紅茶、日本茶、果実飲料、炭酸飲料缶などを用いた。測定は、高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS): Hewlett Packard 製 HP1100 series LC-MSD を使用した。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 法を採用し、それぞれモニターイオン m/z 227, m/z 241 により得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め、BPA 及び BPA- d_{16} の標準溶液のデータから絶対検量線法により検量線を作成した。血清、腹水、缶飲料: 生体試料は 1mL を、缶飲料は 5mL を

採り、ISOLUTE Multimode カートリッジに負荷する。水 3mL 及び 20% メタノール 3mL で洗浄した後メタノール 3mL で溶出し、減圧乾固後 10%メタノール 1mL に溶解して試験溶液とした。

③ 生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング HPLC-蛍光定量

分析操作: 血清 100 μ l を塩酸酸性としたのちクロロホルム 1.0 ml を用いて BPA を抽出した。このクロロホルム層 0.85 ml を蒸発乾固後、5 mM DIB-C1 のアセトニトリル懸濁液 100 μ l 及び 1.5M トリエチルアミンのアセトニトリル溶液 5 μ l を用いて蛍光標識 (35°C, 20 分間) を行った。この反応溶液に 12.5% アンモニアのアセトニトリル溶液 10 μ l を添加し、さらに室温下、10 分間放置した。5% 酢酸溶液 10 μ l を加えて反応を停止したのち、メンブランフィルターでろ過し、5 μ l を HPLC システムに注入した。

測定のために、カラムスイッチング HPLC-蛍光定量装置を構築した。: 注入された試料は第一の分離カラムで粗分離された後、DIB-BPA を含む分画がカラムスイッチングによりさらに第二の分離カラムに導入され、蛍光検出される装置である。

HPLC 条件: 第一溶離液にはアセトニトリル/メタノール/水の 72:15:13 (v/v/v) 混液を、第二溶離液にはアセトニトリル/メタノール/0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) の 55:33:12 (v/v/v) 混液を使用した。

また、それぞれの流速は 0.1 及び 0.3 ml/min. に設定した。両分離カラムによる分離は 35°Cにて行い、カラムスイッチングのタイミングは試料注入後 10.75 min. とした。蛍光検出は λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 475 nm で行った。試料として同一個人より得られた母体血及びさい帯血由来の血清セット (9組) 及び不妊症患者の血清及び腹水のセット (21組) を用いた。これはいずれも東海大学医学部において採取された試料である。

④ クロロベンゼン類及びパラベン類の分析法開発と実試料の分析

装置器具 (GC/MS装置: 日本電子 GC/mate、SPMEファイバー: supelco製 65 μ mPDMS-DVBコーティング、固相樹脂: waters製 SEP-PAK tC18) を用いた。

1) 生体試料中におけるパラベン類及びp-ヒドロキシ安息香酸の定量: 血液試料は、試料1mlにサロゲート化合物として3-ヒドロキシ安息香酸50ng及び25 μ lの塩酸を加え、精製水1mlで希釈し、ケイソウ土カラムに負荷した。溶出は酢酸エチル30mlで行った。エバポレーターで濃縮後、酢酸エチル0.5mlに溶解後、BSTFAを100 μ l添加し、シリル化を行い、その試料をGC/MSで定量した。また、母乳では、試料4mlを10mlスクリュウキャップ付き遠心管に分取し、サロゲートとして3-ヒドロキシ安息香酸200ngを添加後、10%炭酸ナトリウム溶液0.5mlを加えアルカリ性 (pH10程度) にしたのち、n-ヘキサン4mlを加え振とう後遠心分離しヘキサン層を除去して脂肪分を除去し、その後、遠心管の下層にある水層をパスツ

ールピペットで1ml分取し、濃塩酸50 μ lを加え、後は血液試料と同様な処理を行った。

2) 化粧品中のパラベン類の分析: 化粧品中のパラベン類の測定は、化粧水では試料1mlを、乳液、ファンデーションについて0.1g~0.5gを分取後、メタノール1mlに溶解し、その後、蒸留水で10mlになるよう希釈し、うち試料2ml~5ml分をメタノール、水でコンディショニングしたSEP-PAK tC18に通水し、蒸留水10mlで洗浄し、メタノール10mlで溶出させた。定量はHPLC (UV270nm) により行った。

3) 化粧品の塗布実験: パラベン類の皮膚吸収による暴露実態を把握するため、マウスを用いたパラベン含有模擬化粧品による塗布実験を行った。模擬化粧品としてブチルパラベンをジペンタエリトリット脂肪酸エステルに2%濃度になるように溶解し、Wistar系ラット (雄) 1匹あたり0.5gを塗布した。また、模擬化粧水として、メチルパラベン、プロピルパラベンを含む精製水 (10%のエタノールを含む) をWistar系ラット (雄) に塗布した。血液中のパラベン濃度は、塗布直前及び一定時間経過後のマウスから血液を採取し遠心分離処理した血清中のパラベン類濃度を測定した。

4) 血液中の有機塩素化合物 (HCB、クロルデン類、p, p'-DDE) の簡易測定: 血液1ml (血清試料) を12mlヘッドスペース瓶に採り、サロゲートとしてHCB-13C6 2ngを加え、血清が凝固ないように蒸留水4mlを加えてバイアルキャップをした。測定は、SPMEファイバ

一: supelco製65 μ mPDMS-DVBコーティングをヘッドスペース瓶に差し込み90℃にて30分ヘッドスペースSPMEによる捕集を行い、分析はGC/MSにより行った。

⑤ フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明測定に用いた液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC/MS)は、島津社製LCMS-2001システムを用いた。データ処理に関しては、LCMSsolution for Win.により、行った。ヒトプール血清を用いて前処理法を検討した。血清3mLに各標準の重水素化体を100, 50, 10ng/mL濃度で加え、逆相モード、陰イオン交換の二種のカートリッジを用いて固相抽出法を行った。Waters社製OASIS HLB (1mL/30mg)は、メタノール(1mL)、水(3mL)でコンディショニングし、血清(1mL)負荷後、10%メタノール(1mL)で洗浄後、メタノール(2mL)で溶出し、窒素気流下で濃縮後200 μ LとしてLC/MSで分析した。OASIS MAX (1mL/30mg)は、0.1%ギ酸/メタノール(1mL)、水(3mL)でコンディショニングし、血清(1mL)負荷後、10%メタノール(1mL)で洗浄後、0.1%ギ酸/メタノール(3mL)で溶出し、窒素気流下で濃縮後200 μ LとしてLC/MSで分析した。

⑥ ヒト尿・血液中のペンゾ[a]ピレン及びその代謝物の分析法開発

HPLCポンプとその条件は昨年度の報告内容を検討して再構築した。

1-OH-Pyr 及び 3-OH-BaP のグルクロン酸抱合体(-G)の合成: ガラス遠心管(50 mL)に、UDP-グルクロン酸三ナト

リウム(1.5 mM)、塩化マグネシウム(5.0 mM)、及び1-ヒドロキシピレン(1-OH-Pyr)又は3-OH-BaP(5.0 μ M)の濃度となるように、それらの試薬を50 mMトリス緩衝液(pH 7.5)20 mL中に溶解した。活性化済みUDP-グルクロン酸転移酵素(0.1 mg protein)を加え、37℃、2時間インキュベーションした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジ(OASIS, HLB 6cc 500 mg)に反応液を導入した。カートリッジを水10 mLで洗浄した後、それぞれのグルクロン酸抱合体をアセトニトリル/水=30/70 (v/v)溶液(40 mL)で溶出させた。溶出液を減圧乾固後、残渣をエタノール1 mLに溶解させた。各抱合体の同定は、LC-MS (ESI)で行った。1-OH-Pyr-G: m/z 393 [M-H]⁻, m/z 412 [M+NH₄]⁺; 3-OH-BaP-G: m/z 443 [M-H]⁻, m/z 462 [M+NH₄]⁺。また、調製した各抱合体溶液の濃度は、 β -グルクロニダーゼにより加水分解することで得られた脱抱合体の濃度から、6.3 μ M (1-OH-Pyr-G)、0.65 μ M (3-OH-BaP-G)と概算された。

ヒト尿試料の前処理: 被験者尿200 mLに1 M塩酸を加えてpH 5.0とし、100 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)400 mLで希釈した後、 β -グルクロニダーゼ(170 U/mL尿)/アリルスルファターゼ(6 U/mL尿)を添加し、37℃、8時間インキュベートした。その後、ブルーレーヨン0.6 gを添加し24時間攪拌した。レーヨンを取り出し水で洗浄後、ペーパータオルで乾燥させた後、メタノール100 mLに浸し30分間超音波抽出する。これを2回繰り返した後、抽出溶媒を減圧

乾固し残渣をメタノール 200 μ L に再溶解させ、遠心後上澄みを試料とした。以上の操作について、酵素を添加せずと同様に行った場合をブランク試料とした。

抱合体の加水分解率の検討：水 100 mL に 1-OH-Pyr-G が 400 ng/L、3-OH-BaP-G が 20 ng/L の濃度となるように添加し、酢酸緩衝液 (pH 5.0) 200 mL で希釈し、 β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼを加え、37 $^{\circ}$ C、0.5、1、8、16 時間インキュベートした。反応後、銅フタロシアニンレーヨン 0.30 g を添加し 24 時間攪拌した。以下、尿試料と同一操作を行い、残渣をエタノール 1 mL に溶解させ、HPLC に導入した。

ブルーレーヨンによる尿中 1-OH-Pyr 及び 3-OH-BaP の添加回収試験：

1-OH-Pyr 1 μ g/L、及び 3-OH-BaP 15 ng/L の濃度となるように、ヒト尿試料 200 mL に添加し、ブルーレーヨンをを用いて尿試料の前処理の項と同様の操作を行った後、抽出溶媒としてメタノール、メタノール/アンモニア水 = 50/1 (v/v)、ジオキサンの 3 種を用いて抽出した。最終的に 1 mL とした検液を HPLC に導入した。

⑦ 生体試料 (母乳、母体血、さい帯血等) 中の有機塩系化学物質の分析法開発とその暴露評価

平成 11 年度に東海大学により採取された 10 人分の母体血、さい帯血、母乳、計 30 試料を用いた。分析に用いた GPC-GC/MS は、前年度の同研究により開発した装置である。各試料からの脂肪抽出は Paterson の方法に基づいて行った。本法により抽出された平均

脂肪量は、さい帯血 0.197%、母体血 0.895%、母乳 3.04% であった。分析法を均一化するため、ほぼ同量の脂肪すなわち、さい帯血 (4ml) 由来：全量、母体血由来：約 20mg、母乳由来：約 40mg を精秤し用いた。脂肪分解は、PCB と農薬の同時分析を目的とし硫酸分解による方法を選択した。また硫酸分解で残った極性成分の除去と脱水を目的とし、無水硫酸ナトリウムとフロリジルの積層カラムを、低分子の除去を目的として GPC を用いてクリーンアップを行った。母乳中ダイオキシン類分析は、10 名分の母乳由来の脂肪を均等に混和し、2.0g を精秤したものについて、従来法に従いアルカリ分解、積層カラム、アルミナカラム等によるクリーンアップを行ったのち、高分解能 GC-MS により分析を行った。

⑧ 内分泌かく乱化学物質の胎児及び母体における汚染状況の分析とその細胞障害等の解析

⑧-1 生体試料の系統的収集と採取容器の検討

生体試料の系統的収集と採取容器の検討：内分泌かく乱化学物質はヒト健康に種々の影響を及ぼしている可能性が指摘され、多くの化学物質がその候補として上げられている。これらの化学物質は成人はもとより母親を介して胎児への影響が危惧されているところであるが、しかしその実態は特定の化学物質を除いてまだ十分に把握されていない。本研究班において我々は胎児等における実態を可能な限り明らかにして、母体との関連、その汚染状況と経時的な変化を明らかにすることを目指して以下の生体試料について収集を図り、内分泌かく