

乱化学物質の影響調査に着手した。収集試料としては、a. 羊水（出生前診断等で採取した検体の細胞分離後の試料）、b. 流産絨毛（散発性及び習慣性流産絨毛）、c. さい帯血（出生時）、d. 臍帯、e. 母体血、f. 母乳の6種類を予定した。（e. 母体血については、上記 a-d の羊水、流産絨毛採取時、及びさい帯血等の採取時において、それぞれ採取する。羊水を採取した胎児においては出生時にもさい帯血、母体血を採取する。）またこれらの生体試料採取の前段階として、採取容器の検討の検討も試みられている。すなわち、微量の内分泌かく乱化学物質の測定にはディスプレイ容器に種々の物質の溶出性が問題にされ、これまで主にガラス容器が用いられてきた。しかし、最近のディスプレイ製品は改良が加えられ、化学物質の溶出性についてかなり厳密に管理されてきているものが含まれる。我々は複数のディスプレイ容器（FALCON、CORNING、IWAKI）及び洗浄方法の異なるガラス容器（各種洗剤、濃硫酸による洗浄後、メタノール又はエタノールによる洗浄）に関して、フタル酸ジエチルヘキシルを含む内分泌かく乱化学物質の溶出濃度を測定して、比較調査した。また、市販の分析用精製水（住友精密工業、和光純薬ほか）及び自家製超純水（Milli-Q、Millipore; NanomureII, Barnstead）に関して内分泌かく乱化学物質の混入等に関して調査を実施した。

⑧-2 内分泌かく乱化学物質の胎児等の生体試料における測定、及び母体へ

の汚染濃度との相関解析：我々は内分泌かく乱化学物質と認定されている物質の中でも重大な影響を及ぼしているものとして、ポリ塩化ビフェニール（PCB）と、樹脂の原料として用いられその影響が懸念されているビスフェノールA（BPA）等について分析を行うことを目指した。これらの内分泌かく乱化学物質について、我々は特に同一母体における出生前診断時、出生時及び母乳について汚染濃度の変化を調査し、一方では同一胎児における汚染濃度との相関に着目して分析を進める。

⑧-3 内分泌かく乱化学物質の汚染とそれらに対する in vivo 細胞反応測定、及び内分泌かく乱化学物質による遺伝的障害検出法の検討：

内分泌かく乱作用が疑われる重金属類（Sn、Cd、Hg、Pb等）の母体血及びさい帯血における汚染濃度を原子吸光光度計により測定し、これらの汚染濃度と、その in vivo 細胞反応として細胞内 peroxide 量を HPLC により調査する。また、メタロチオネイン量を Western blot 等の方法で測定し、重金属濃度との相関について検討する。さらに、内分泌かく乱化学物質の遺伝子構造への直接障害を検出する分析法の開発を目標とした。すなわち、内分泌かく乱化学物質が実際に細胞内で種々の影響を及ぼすと考えられるが、そのうちの一つの機序として遺伝子構造（DNA）に直接障害を及ぼす可能性が考えられる。この様な影響をみる指標として、DNA 中の 8-OH-dG（8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン）

分析法がある。これは HPLC を用いて微量の DNA で 100 万ヌクレオチド当たり 1 塩基程度の変異について判定できるとされている。これらの試料解析に適した高感度検出方法の開発を図り、この検出法の有用性を検討する。そして、8-ヒドロキシ-デオキシグアノシンの検出量と重金属及び他の内分泌かく乱化学物質の蓄積濃度との相関を調べ、ヒト健康に及ぼす影響の機序について検討していく。

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

東海大学病院を受診した不妊症患者及び分娩予定者 21 名からインフォームドコンセントを得た後、血液試料等の提供を受けた。患者末梢血と腹水は 13 名、母体末梢血とさい帯血は 8 名から採取した。測定は、昨年度と同様に操作した。測定値は中央値及び 25-75 パーセンタイル値で表した。調査及び測定結果に対し、パソコン用統計解析ソフト StatView を用いて統計解析を行なった。統計解析は、ノンパラメトリック (Spearman の順位相関) 法を用いた。

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

血液及び腹水中の揮発性有機化合物濃度の測定には、「水中の揮発性有機化合物分析用標準溶液」を標準溶液として用い、揮発性有機化合物に対する個人暴露濃度の測定には、「VOCs 混合標準液 (45 種混合)」を標準溶液として用いた。病院内空気中等の揮発性有機化合物濃度測定用試料の捕集には、

柴田科学機器工業製「有機ガスサンプラー用活性炭チューブ」を使用した。

1) 不妊症患者の末梢血及び腹水は、東海大学病院で受診した不妊症患者 18 名 (平成 11 年度 5 名、平成 12 年度 13 名) からインフォームドコンセントを得て、末梢血と腹水の提供を受けた。末梢血は腹腔鏡検査前、腹水は検査中に採取した。なお、平成 11 年度は東海大方式 (後述) で試料採取、血清・腹水の分離を行なったのに対し、平成 12 年度は、採血を東海大方式 (東海大で洗浄した注射筒) で行ない、その後の血清・腹水分離を愛知県衛生研究所 (愛知衛研) 方式 (後述) で行なった。

2) 愛知衛研職員の末梢血を 4 名の職員について異なる 3 方法 (①愛知衛研で愛知衛研方式、②東海大学病院で東海大方式、及び③東海大学病院で愛知衛研方式) にて採血及び血清分離を行なった。採血は 2 日連続で行ない、1 日目は①、2 日目は②及び、③にて実施した。

3) 試料採取方式とした、3 方法は:a) 東海大方式は、注射筒 (ガラス製) の洗浄及び保管方法として、超音波洗浄器用洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。乾熱滅菌器で乾燥 (200 °C、2 時間) 後、紙製 (HOGI 製) の袋に入れ、オートクレーブで滅菌 (180 °C、30 分)。乾熱滅菌器で乾燥 (200 °C、2 時間) 後、クリーンベンチ内で 1 日紫外線照射を行ない、使用時まで実験室内の引き出しに保管した。さらに血清保存用共栓試験管の洗浄及び保管方法として、超音波洗浄器用洗剤を用いて洗浄後、水道水及び

蒸留水で水洗。200℃で2時間加熱処理後、アルミ箔で包み、再度200℃で2時間加熱し、使用時まで実験室内の引き出しに保管した。また、試料採取及び保存として、上述の洗浄及び処理を施したガラス製注射筒で採取した末梢血及び腹水を共栓透明摺試験管に入れ、遠心分離(2000 rpm、10分)した。上層に分離された血清及び腹水を処理済みガラス製注射筒で採取し、処理済みの共栓透明摺試験管に入れた後、冷凍保存した。b) 愛知衛研方式は、注射筒(ガラス製)の洗浄及び保管方法として、中性洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。自然乾燥後アルミ箔で包み、オートクレーブで滅菌(120℃、20分)。37℃で乾燥後、使用時までそのまま保管した。さらに、血清保存用スクリーキャップ試験管の洗浄及び保管方法として、中性洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。自然乾燥後、残留農薬試験用メタノールで洗浄し、180℃で5時間加熱処理後、試験管内の空気を窒素ガスで置換し、キャップをして使用時まで実験室内で保管した。なお、キャップ部分は洗剤およびメタノールによる洗浄後、窒素を吹き付けて使用した。また、血清分注用パスツールピペットの洗浄及び保管方法として、血清保存用スクリーキャップ試験管と同様に洗浄し、使用時まで実験室内で保管した。さらに、試料採取及び保存として、上述の処理を行なったガラス製注射筒で採取した末梢血を処理済みスクリーキャップ試験管に入れ、遠心分離(2000 rpm、

10分)した。上層に分離された血清をパスツールピペットで採取し、処理済みスクリーキャップ試験管に入れた後、冷凍保存した。

病院内空気等の捕集は、両端を切断した捕集管をポンプ(柴田科学機器工業製MP-Σ30及びPAS-500S型)にセットし、毎分100~130 mLの流量で24時間行なった。ポンプは、東海大学病院内の手術室(5ヶ所)及び研究室(6ヶ所)、愛知衛研と東海大学病院の往復に使用した自家用車内(1ヶ所)、それに愛知衛研職員の自宅の居間(1ヶ所)に設置し、空气中揮発性有機化合物の捕集を行なった。また、愛知衛研職員1名について、PAS-500S型ポンプを胸元(1ヶ所)に着け試料の採取を行なった。

血清及び腹水中の揮発性有機化合物濃度は、内部標準物質(安定同位体)が入手できたp-ジクロロベンゼン、トルエン、m,p-キシレン、o-キシレン、ベンゼン、エチルベンゼン、スチレン、ナフタレンの8物質について測定を行なった。試料1 mL及び飽和食塩水14 mLをヘッドスペースバイアル(容量22 mL)に採り、内部標準溶液3 µLを加えた後、テフロン張りのシリコンゴムセプタムおよびアルミシールで密封した。このバイアルをヘッドスペースオートサンプラーにセットし、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)により測定を行なった。病院内空気等の揮発性有機化合物濃度は、以下の41物質を測定対象とした。: 脂肪族炭化水素類(13物質)、芳香族炭化水素類(10物質)、テ

ルペン類 (2 物質)、ハロゲン類 (9 物質)、エステル類 (2 物質) アルコール類 (1 物質)、アルデヒド・ケトン類 (4 物質)。空气中の揮発性有機化合物濃度の測定は、厚生省通知 (平成 12 年 6 月 30 日付け生衛発第 1093 号「室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法について」) に従って、以下に示す方法で行なった。: 試料を採取した捕集管から捕集剤 (活性炭) を取り出し試験管に入れた後、二硫化炭素 1 mL と内部標準溶液 (d8-トルエン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1 μL を加えて栓をした。時々軽く振とうしながら 2 時間放置し、この上清を試験液とした。測定は GC/MS により行なった。検量線は、各濃度の混合標準溶液を GC/MS で測定し、検出された測定対象物質の保持時間におけるクロマトグラムのピーク面積値と内部標準物質のピーク面積値との比から作成した。測定値は中央値、25 及び 75 パーセンタイル値で表した。調査及び測定結果に対し、パソコン用統計解析ソフト StatView を用いて統計解析を行なった。統計解析は、ノンパラメトリック (Spearman の順位相関) 法を用いた。

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

昨年度の研究により栄養膜幹細胞株 (TS 細胞) を用いることでレチノイン酸の胎盤栄養膜細胞の分化過程への影響を *in vitro* で再現出来ることを示した。今年度はさらに胎盤細胞の分化に対するベンツピレンの作用を解析した。解析は、1 および 10 μM ベ

ンツピレン存在下で培養した TS 細胞から RNA を調整し、各種胎盤特異遺伝子プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションにより行った。またラット消化管でのビスフェノール A の吸収を反転腸管を用いた実験で検討した。さらにラット腎動脈にビスフェノール A を混入させた灌流液 (アルブミンを含む) を注入し、腎静脈と尿中の代謝物を調べることで腎臓でのビスフェノール A の代謝・動態を解析した。ついでラット胎盤ミクロソームを用い、グルクロン酸抱合 (解毒) 活性を測定した。

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

5~7 匹のマウス (C3H/HeN メス 4 週令) に 3 日ないしは 4 日置きにジブチルスズをゾンデで経口投与し、20% カゼインを含んだ餌 (船橋農場製) あるいはカゼインを含まない普通食 (CE-2 日本クレア社製) を自由摂取させ、4 週間飼育した。化学物質はエタノール (特級; 和光純薬社製) に溶かし、生理食塩水 100 μl に対し 0.1% 添加し、調整した。投与量は 1 回あたり 1.0 μg 、10.0 μg とした。これらの濃度はマーケットバスケット法により食品経由の有機スズ摂取量調査における 2.29 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ および魚介類汚染によるジブチルスズ一日摂取量の推定値 0.45 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ を参考とし設定した。なお、FAO および WHO で設定されている許容一日摂取量 (ADI) は塩化トリブチルスズで 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ である。また、経口トレランス実験により、ト

レランスを破壊すると考えられるコレラトキシン(CT) 10.0 μ g 投与群を設け、その影響について比較した。マウスは1週間ごとに採血を行い、血清をとりカゼイン特異的総抗体価およびIgGサブクラスをELISAにより測定した。抗体価はMann Whitney 検定により、有意差検定を行った。4週間飼育した後、マウス後肢および尾底部にカゼイン 100 μ g を免疫し、10日後にリンパ節細胞を採取し、抗原特異的な増殖応答をH₃の取り込みおよびMTSアッセイ(プロメガ社製)により測定した。増殖応答はt検定により、有意差検定を行った。

③ ヒト副腎皮質由来H295R細胞のコレステロール産生に及ぼす植物エストロゲンの阻害効果

H295R細胞のステロイド産生の誘導とcortisolの分析: J. Ian Mason 博士 (University of Edinburgh, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, Scotland) より供与されたヒト副腎皮質由来H295R細胞を用いて昨年度報告と同様の方法にて、検体のステロイド産生に対する影響を検討した。

ミトコンドリアおよびマイクロソームの調製: dibutyryl cAMP (1mM) と EGF (10ng/mL) で 24 hr 処理した H295R 細胞(1.0~2.1 g wet weight)は冷却したPBSで良く洗浄後、3 mL の 0.25 M sucrose (5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.1 mM PMSF を含む) (緩衝液 A) 中で Dounce tissue grinder (Wheaton) を用いてホモゲナイズした。定法に従いミトコンドリア画分とマイクロソーム画分を得た。それ

ぞれの画分は 20% glycerol を含む緩衝液 A に懸濁した。ミトコンドリア画分は更に酵素活性測定のために超音波処理を行った。それぞれの画分は 5.0 ~ 5.6 mg/mL の蛋白質濃度に調整し、-70°C で保存した。

酵素活性の測定: P450scc

(cholesterol 側鎖切断酵素) 活性および P45011 β (11 β -ヒドロキシラーゼ) 活性は各々 [4-¹⁴C] cholesterol (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) および [4-¹⁴C] deoxycorticosterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質としてミトコンドリア, glucose-6-phosphate (25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP⁺ (0.5 mM), および adrenodoxin (2 μ M) の存在下 37°C, 2 hr インキュベーションすることにより測定した。3 β -HSD II (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II) 活性は [4-¹⁴C] dehydroepiandrosterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質として, 0.2 ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でマイクロソーム, NAD⁺ (0.5 mM) の存在下 37 °C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した。P450c17 (17 α -hydroxylase/C_{17,20}-lyase) および P450c21 (21-hydroxylase) 活性は [4-¹⁴C] progesterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質として, 0.2 mL の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でマイクロソーム, glucose-6-phosphate (25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP⁺ (0.5

mM)の存在下 37°C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した. インキュベーション終了後ステロイドを 0.6 mL の ethyl acetate / 2,2,4-trimethylpentane (1/1, v/v) で抽出して乾固し, TLC(Kieselgel 60F254, Merck)により基質と反応生成物を分離した. 展開溶媒は benzene/acetone (8/1, v/v), benzene/ethyl acetate (2/1, v/v), benzene/acetone (7/3, v/v) を使用した. ラジオオートグラフィーで放射能標識ステロイドを検出した後, それぞれのスポットの放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した. P450_{scc}, P450_{11β} および 3β-HSD II 活性は pregnenolone, corticosterone および androstenedione の生成量として, P450_{c17} 活性は 17α-hydroxyprogesterone と 11-deoxycortisol 生成量の総和として, 及び P450_{c21} 活性は 11-deoxycortisol と 11-deoxycorticosterone 生成量の総和としてそれぞれ表した. なお, 有意差の検定は Student' s の t-test を用いた.

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

被検物質として 6 種類を選択していかに検討を行った (Diethyl- hexil phthalate, Butyl- benzil phthalate, Bisphenol-A, p-Nonylphenol, Dizein, Genistein)。

E-screen / WST-1 assay assay : 96

穴プレートに細胞 (MCF-7, HHUA) 懸濁液を 5000cells/50 μl/well ずつ播種し, 37°C, 5%CO₂ で, 24 時間培養する. 前培養後, フェノールレッドフリー, 10% Charcoal-dextran 処理 FCS 含有 Medium に交換し, 濃度調整した被検物質を加えさらに 5 日間同条件で, 培養する. 培養後 WST-1 assay (Cell Counting Kit:和光純薬) にて細胞増殖を評価 (生細胞中で活性をもつミトコンドリア脱水素酵素の基質である WST-1 を各 Well に 10 μl ずつ加え 3 時間 37°C にて incubation 後 OD_{450nm} を測定) する.

E-screen / Idu assay : 細胞増殖効果を Thymidine analogue である Idu(5-Iodo-2-deoxyuridine) の取り込み (DNA · Idu Labeling and Detection Kit: TAKARA) により, 各 well の細胞増殖効果について評価した. 96 穴プレートに細胞 (MCF-7, HHUA) 懸濁液を 5000cells/50 μl/well ずつ播種し, 37°C, 5%CO₂ で, 24 時間培養する. 前培養後, フェノールレッドフリー, 10% Charcoal-dextran 処理 FCS 含有 Medium に交換し, 濃度調整した被検物質を加えさらに 24 時間 incubation する. 各 well の medium 中に Idu を加え (終濃度 10 μM), 24 時間 incubation し, 細胞中の DNA に Idu を取り込ませる. PBS 洗浄, blocking (細胞の固定と DNA の一本鎖化) 後, 抗 Idu 抗体 (5 μg/ml, 37°C, 30min), ウサギ抗マウス IgG · POD 標識抗体 (37°C, 30min) を反応させる. 発色試薬 (TMBZ) を加え, 呈色反応後

OD_{450nm}を測定する。

エストロゲン受容体 binding

assay : エストロゲン受容体(ER)の既知サブタイプ α 、 β における 17β -estradiol との competition binding assay (TOYOBO) を施行して、各化学物質のサブタイプ親和性を検討した。

receptor 蛋白溶液に、 17β -estradiol

(E_2) と濃度調整した測定サンプルを加え競合反応 (37°C、60min) させる。反応溶液を抗 E_2 抗体固相プレートに移し、HRP 標識 E_2 を加え遊離 E_2 と競合反応させる。反応後プレートを PBS にて洗浄し、発色基質を加え呈色反応後、OD_{450nm} を測定する。

⑤ ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

Genistein 及び Daidzein は DMSO に溶解して $10^{-4}M$ とし、アッセイに用いる培養液で希釈することにより、試料溶液を $10^{-10} \sim 10^{-3}M$ に調製した。Bisphenol A 及び ICI 182,780 は DMSO に溶解して $10^{-4}M$ とし、培養液で希釈することにより、それぞれ試料溶液を $10^{-9}M$, $10^{-5}M$ 及び $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ に調製した。Fujiflavone P40 は大豆抽出物であり、全体の 40%が総イソフラボン量に相当するため、Genistein・Daidzein 濃度に換算し、DMSO に溶解させ、培養液で希釈することにより、試料溶液を $10^{-10} \sim 10^{-3}M$ に調製した。各々の試料溶液は細胞増殖試験において添加する際、10 倍希釈される。また、最終 DMSO 濃度は細胞増殖に影響を及ぼさない様、0.1%以下となるように調製した。

T47D ヒト乳癌細胞は東京大学・久保田

俊一郎先生から供与を受けた。T47D 細胞はエストロゲンレセプター α 及び β を共に発現している。細胞は通常、10%牛胎児血清、1% L-glutamine を添加したダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬社製)で培養し、5% CO₂-95% Air, 37°Cの条件下で継代培養した。細胞増殖試験においては、ダルベッコ変法イーグル培地を牛胎児血清の代わりに低蛋白質溶液を添加したフェノールレッド不含のダルベッコ改変イーグル培地(SIGMA 社製)に交換して、試料溶液を添加し、96 時間培養後、細胞の増殖を産生 NADH 量を指標とする Cell counting kit (和光純薬社製)により測定する。

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

細胞増殖のアッセイとして汎用されるヒト乳癌細胞 (MCF-7) を用いた E-SCREEN アッセイの代わりに、ヒト子宮体癌細胞を用いた (E-SCREEN アッセイ変法)。使用したヒト子宮体癌細胞はセルナンバーRCB0658、 17β -エストラジオールレセプターを有する HHUA 細胞である。細胞培養はフェノールレッド添加 5%不活化 FBS 加 DMES を使用し、細胞剥離には 0.05%トリプシンに 0.53mM EDTA を使用。ただし、本アッセイをするにあたりエストロゲン様作用を考慮してフェノールレッドフリーの DMES を利用した。血清はヒト血清を 56°C、30 分で不活化後、チャコールデキストランにて内因性ステロイドホルモンを取り除き DMEM に添加した。HHUA 細胞を血球計算版に

て細胞数が 6000(±1000) cell / well となるように調整し 96 穴プレートに撒き、37°C 5%CO₂ で 24 時間培養。その後培養液を吸引し各種濃度に調製した被験化学物質を含むアッセイ用 DMEM に交換後、再び 37°C 5%CO₂ で 5 日間培養し、セルカウティングキット (Wako Pure Chemical Industries 社製) を用いて呈色反応を行い 450nm の測定波長にて吸光度分析を行った。妊娠 2.5 日から 5.5 日のマウスの皮下にビスフェノール A 0.3 mg/ kg/ day を 5 日間連続投与し (Becton Dickson 社製ガラスインジェクションを使用)、分娩直後の出生マウス体重を測定し胎児発育状態を、コントロール群 (妊娠マウス 4 匹、出生マウス 31 匹)、ビスフェノール A 投与群 (妊娠マウス 3 匹、出生マウス 23 匹) およびノックアウトマウス (+ビスフェノール A 投与) 群 (妊娠マウス 3 匹、出生マウス 26 匹) について検討した。マウスの飼育室は温度 24°C 湿度 25% で、12 時間 -12 時間・昼夜の光調節を行い、飼育ケージはプラスチック製が使用された。また生後 2 ~ 3 ヶ月経過の未妊娠雌マウスに上記と同様量でビスフェノール A を投与し子宮の発育状況や子宮内膜症所見について腹腔内を観察した。また今回は RT-PCR にてコントロール群、ビスフェノール A 投与群およびノックアウトマウス群の mdr ジーンについて検討した。プライマーは以下のように設定した。

mdr1a : Forward プライマー :

5'-GGAGAGATCCTCACCAAG -3'

Reverse プライマー :

5'-GCTCTGGGCATACATGGT -3'

mdr1b : Forward プライマー :

5'-GCTGGTTTTGATGGTGGT -3'

Reverse プライマー :

5'-GCCAAATGTGAAGCCCTG -3'

C. 研究結果と考察

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

前述の選択方法を基準に、まず候補器具類を選定した。母体血採取用は血清が必要なことから抗凝固剤の含まないタイプのテルモ社のプラスチック製真空採血管と採血針の組合せを、さい帯血採取はテルモ社注射針とシリンジの組合せを選択した。保存容器は、凍結保存と遠心分離ができるということでポリエチレン製の Becton Dickinson 社 FALCON ブランドを選択した。カタログにより、最大遠心強度と使用温度範囲 (-196°C ~ 121°C) を調査し、通常条件で使用できることを確認した。また、選択した器具類の構成原料を確認し、テルモ社製は製造工程を調査し、FALCON のものは各材料を熱プレス法で薄い試料片を作製して透過の赤外吸収スペクトル法 (FT-IR) で同定した。腹水採取器具は唯一体内に挿入する医療用具となり、品質確認や、薬事法上あるいは倫理上問題のない形で設定するため、本年度中には設定することができなかった。前述の測定試料調製方法にそって、DEHP を本年は検討した。なお、定量下限は試薬ブランクを 5 回繰り返して

測定し、10ppb とした。

さい帯、さい帯血、母体血、母乳、腹水の各保存容器に選定した Becton Dickinson 社製 FALCON のコニカルチューブは、各サイズとも本体がポリプロピレン製、蓋が高密度ポリエチレン製であり、DEHPの溶出はヘキサン接触室温 24 時間でも定量下限の 10ppb 以下であった。このヘキサン接触室温 24 時間という過酷な条件を考えると、実際に生体試料を保存する低温条件の場合にも 10ppb のバックグラウンド値を越える DEHP は溶出しないと考えられる。さい帯血採取器具には、テルモ社の注射針とシリンジの組合せを選択した。実際の採血は 5 分程度と考えられるが、ヘキサン接触抽出 1 時間で定量下限に近い 12ppb であったことから、採取時に混入する DEHP の影響はほとんど無いと判断した。母体血採取器具はテルモ社の採血針と真空採血管の組合せを選択した。採血は 1 分以内に終了するが、実使用の方法でのヘキサン抽出で定量下限の 10ppb 以下だったことから、採血時の DEHP の混入の影響はないと考える。また、真空採血管をそのまま保存容器をした場合も、室温 24 時間ヘキサン抽出で定量下限の 10ppb 以下なので影響ないと判断した。

今年度は特に混入の心配の高い DEHP について測定を行い、バックグラウンド値 10ppb に影響のない生体試料採取器具および保存容器を設定できたが、その他の内分泌かく乱作用の疑いのある物質の影響度については次年度検討する必要がある。また、腹水

採取器具についても次年度に設定、確認する必要がある。

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

先に構築した測定条件を再検討し、移動相中のアセトニトリル含量を増す一方酢酸濃度を低くし、流速を 0.2mL/min から 0.16mL/min に変更した。検出感度は以前に比べ 20% 程度向上した。本法による検出限界は、0.2ng/mL (絶対量として 2pg) であった。血液試料中の BPA 分析では超微量レベルの定量が求められており、試料調製法の構築に当たってはサンプリング時と同様に実験器材や試薬からのコンタミネーションを極力避けることが求められる。その点、ISOLUTE Multimode は、最も夾雑成分の除去効果に優れ、且つ BPA 溶出量が少なかったが、本カートリッジを用いても操作ブランクにおいて極微量の BPA が検出された。本分析法の検出限界は、カートリッジのロットを変えて行った (5 ロット)、ブランク試験の結果、操作ブランクの標準偏差の 3 倍、0.3 ng/mL とした。血清及び缶飲料に BPA を添加し、回収率を求めた結果、血清及び缶飲料とも概ね 80% 以上であった。本法による検出限界は、血清で 0.3ng/mL、缶飲料で 0.5ng/mL であった。本法により、東海大学病院で採取されたさい帯血、母体血、腹水、計 58 検体を分析した結果は、本分析法の検出限界 0.3ng/mL 以下であった。2 年前に我々は、市販缶飲料中の BPA 濃度を調査し、比較的高濃度で BPA が検出される缶飲料があることを報

告した。今回は BPA 含有量の高かった同一ブランドのものを購入し、BPA 含有量の実態調査を実施した。その結果缶飲料から BPA は殆ど検出されなかった。更に、先の調査において果実飲料や炭酸飲料缶を空にして蒸留水を満たし、オートクレーブで 121 °C、15 分間加熱処理すると比較的高濃度で BPA が溶出される飲料缶についても、同一ブランドの果実飲料や炭酸飲料缶を購入し、空缶からの溶出を調べた。その結果、BPA の溶出量は大きく減少しており、製缶メーカーにより BPA 溶出量を低減化した改良缶の開発が進められていることが示唆された。

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

健康人血清に既知濃度の BPA (0.1~7.0ppb) を添加し、検量線を作成した。その結果、検討した濃度範囲でピーク高さとの間に良好な直線性 ($r=0.998$) が得られ、シグナル/ノイズ比 (S/N) を 3 とした場合の検出下限は 0.04 ppb と高感度であった。健康人血清に 3.0 ppb の BPA を添加し、繰返し測定の実験性を調べた。その結果、日内 ($n=6$) 及び日間 ($n=3$) の精度は相対標準偏差 (RSD) でそれぞれ 4.2% 及び 8.0% と良好であった。また、BPA の標準水溶液と 3.0 ppb の BPA 添加血清及び無添加の血清を分析操作に従って処理し、得られたピーク高さから算出した BPA の添加回収率は 78.6% であった。開発した分析法を用いて、同一個人より得られた母体血及びさ

い帯血由来血清セット (9 組) 及び非妊婦の血清及び腹水のセット (21 組) における BPA 濃度を測定した。母体血の定量結果は 0.21~0.79 ppb の範囲であり、その平均値±標準偏差は 0.46 ± 0.20 ppb となった。一方、同一個人より得られたさい帯血中の BPA 濃度の範囲及び平均値はそれぞれ、0.45~0.76 ppb 及び 0.62 ± 0.13 ppb であり、さい帯血の方が有意に高い濃度を示した。また、不妊症患者の血清及び腹水のセットに関して、それぞれの BPA 濃度の範囲及び平均値は 0.24~0.64 ppb, 0.44 ± 0.12 ppb 及び 0.38~0.73 ppb, 0.55 ± 0.13 ppb となった。両者の平均値を比較した場合、腹水腹水の方が有意に高い BPA 濃度を示すことが明らかとなった。母体血とさい帯血血清中 BPA 濃度間、不妊症患者の血清及び腹水中 BPA 濃度の間に相関が見られた。

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

(1) パラベン類の胎児移行: 長野市内の産院で出産した妊産婦を協力者として提供されたさい帯血、母体血、母乳の3種の生体試料に含まれるパラベン類の測定を行った。さい帯血は出産当日に、母体血、及び母乳は出産後5日目に採取した。母体血ではパラベンの代謝物であるp-ヒドロキシ安息香酸が全員の血液から検出されたほか、メチルパラベン、エチルパラベン、イソプロピルパラベンが検出された。また、母乳からは代謝物のp-ヒドロキシ安息香酸が検出されたほかメチルパラベンが検出された。さい帯血からは代

謝物のp-ヒドロキシ安息香酸のほかメチルパラベン、プロピルパラベンが検出された。検出されたパラベン類をみると、母体血からメチルパラベン以外のパラベン類が検出された被験者では、さい帯血、母乳から該当するパラベン類が検出されていない。また、さい帯血にプロピルパラベンが検出された2人の被験者では母体血からプロピルパラベンは検出されなかった。メチルパラベンの濃度を比較するとさい帯血の方が母体血より高濃度である事例が多かったが著しい特徴は無かった。このほか、東海大学病院で採取したさい帯血及び母体血(血清)中のパラベン類の濃度測定を行った。被験者62人の試料を分析した結果、母体血からメチルパラベンが検出されたほか、プロピルパラベンが4人から検出された。さい帯血ではメチルパラベンのみが検出された。このうち母体血、さい帯血のセットで採取されている31人分の試料中のメチルパラベン濃度を比較したが相関は見られなかった。

(2)化粧品からのパラベン類の暴露：市販の化粧品(化粧水、乳液、ファンデーション)には保存料としてパラベン類が添加されており、日常的に皮膚を通じて体内に吸収されるパラベン類の暴露量の推定を行った。パラベンを保存料として使用しているものは概ね1000ppm程度が添加されていた。使用されるパラベン類の種類は、化粧水では、メチルパラベンがほとんどであり、また、ファンデーションや薬用クリーム用ではエチルパラベンやブチ

ルパラベンを含むものもあった。1回の化粧で使用する量を2mlとするとパラベン類の皮膚塗布量は1回あたり2mg程度となる。一般成人の化粧品からのパラベン類の皮膚吸収の実態を把握するため、濃度の明らかな市販化粧水(メチルパラベンを1200ppm含む)を2ml塗布して1時間後に採血を行った。なお、化粧水の塗布は朝の洗顔後に行い、朝食を取らない条件で採血を行った。その結果、化粧水塗布後の血液では、ほとんどは不検出(定量限界2ppb)であった。また、模擬化粧品でのマウス塗布実験では、塗布したブチルパラベンのマウス血中濃度は塗布後1時間で一部上昇するものの、著しい増加は見られずむしろ代謝物のp-ヒドロキシ安息香酸濃度の経時的な増加が確認された。模擬化粧水のマウス塗布実験ではメチルパラベンについて同様な傾向が現れたが、代謝物のpHBA濃度も1時間以降低下していた。なお、プロピルパラベンは検出されなかった。

3) 血液中の有機塩素化合物(HCB、クロルデン類、p, p'-DDE)：東海大学病院から提供を受けたさい帯血、母体血について、ヘッドスペース-SPME-GC/MS法を用いて、内分泌かく乱作用が疑われているクロロベンゼン類(HCB)と有機塩素化合物であるクロルデン類、p, p'-DDEを併せて測定した。その結果、クロルデン類ではtrans-ノナクロルが高頻度で検出された。また、HCB、p, p'-DDEも、すべての試料から検出された。また、3種の化学物質濃度には概ね相関が見られた。また、同一提供者

からのさい帯血及び母体血中の各物質の濃度を比べた結果、各物質のさい帯血中濃度は母体血中濃度に比べておよそ半分程度であった。

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

LC/MS 測定条件を最適化したのち、ヒト血清における添加回収の検討を行った結果、各種フタル酸エステル類が高濃度で検出され、通常の標準試料溶液添加による前処理検討は、困難と考えられた。そこで、フタル酸モノエステル類の重水素化体を用いて添加回収試験を実施した。陰イオン交換モードタイプ (OASIS MAX) と逆相モードタイプ (OASIS HLB) において回収率と再現性に関して、検討した結果、いずれも良好な結果が得られた。一方、クリーンアップ効果に関しては、PDA クロマトグラムで比較した場合、イオン交換モード用固相充填による処理では、夾雑ピークが少なく、より MS のイオン化効率をあげられることが判明し、前処理においては、イオン交換モードタイプを用いることにした。さらに、ヒト血清酵素による影響についても検討した。：血清中にはリパーゼやエステラーゼ等の酵素が存在するため、血液試料採取時に混入したフタル酸ジエステル類が、モノエステル体へと代謝変換される可能性が考えられる。そこで、血清中にジエステル体を添加し、種々の条件でその代謝変換を検討した。その結果より、ヒト血清内に含まれる酵素により、ジエステル体が代謝分解され、モノエステル体へ変換される可能が示唆された。つい

で、本法を腹水と血清の測定に応用した。2種5サンプルにおいてMBP, MBzP は認められなかった。また、MEHP は N. D. ~28.8ng/mL であった。

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

昨年報告における12種のOH-BaP分析HPLCシステムは、2台のスイッチングバルブ、4本のカラム、及び3台の検出器からなる複雑なシステムであった。今回これに改良を加え、1台のスイッチングバルブ、3本のカラム、及び2台の検出器からなるより簡便なシステムを構築した。まず、フェノール性水酸基を有する化合物を強く保持するアルキルアミド型逆相カラム (C1) を用いることで、通常のODSカラムでは達成できなかった1-, 3-, 12-OH-BaP を除く8種のOH-BaPの分離が可能になった。残る分離が不十分な1-, 3-, 12-OH-BaP 画分のみをカラムスイッチングによりODSカラム (C2) に濃縮後、バックフラッシュ溶出で β -シクロデキストリン固定化カラム (C3) に導入し11種のOH-BaP全ての分離が可能となった。6-OH-BaP は溶液中で極めて不安定なため分析対象外とした。検出限界は1~30 f mol/injection (S/N=3) であった。また検量範囲は3-OH-BaPで12 f mol-0.6 p mol / injectionであった。さらに抱合体の加水分解率の検討は、 β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼを用いて、1-OH-Pyr-G、及び3-OH-BaP-Gの加水分解率の経時的変化を観察したところ、37°C、8時間で完結した。この結果は他の研究グルー

プの報告ともほぼ一致しており、尿試料における分解時間は37°C、8時間とした。また添加回収試験は、3環以上の芳香環を持つ多環芳香族炭化水素類を選択的に吸着する性質を有するレーヨン繊維を用いて検討した。抽出溶媒としてメタノールを用いたときに3-OH-BaP、1-OH-Pyrの添加回収率は、共にほぼ100%を達成し、固相抽出法の回収率（50%前後）と比較して高い回収率を示した。

健常人（男、28歳、非喫煙者）の尿試料200 mLを酵素処理し、グルクロン酸または硫酸抱合体を加水分解した後、ブルーレーヨンによる濃縮操作を経て、この分析システムに適用した。定量値は尿中クレアチニン濃度で補正した。その結果、3-OH-BaP（0.27 ng/g creatinine）が検出された。しかしながら、カラムスイッチング後に検出すべき1-OH-BaP及び12-OH-BaPに関しては、夾雑ピークと重なって同定をすることができなかった。また、1-OH-Pyr（600 ng/g creatinine）は、これまでの報告と同様の濃度であった。酵素処理をしない場合にはこれらのピークが検出されなかったことから、これらの代謝物は、尿中にグルクロン酸または硫酸抱合体として排泄されていると考えられた。

⑦ 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

分析法の検討：硫酸処理により低塩素のPCB類について回収率の低下が見られたため、2塩化以下については検討対象外とした。また、妨害による影響

のため、リテンションタイムがHCBより遅いものを測定対象とした。GPCについて、もっとも良好な回収が得られる条件として、注入後3.2-5.2分のフラクションを分取、測定することにした。さらに分析精度の向上とコンタミネーションの低減を目的としてオンラインGPC-GC/MSを用い、負化学イオン化法（NCI）による分析を行った。NCI法ではEI法と異なり、各アイソマー間のイオン化に差があることから、出来る限り定性できたアイソマー毎の検量線を作成した。また、内部標準に3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl、3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl、HCB、p,p'-DDE、の¹³C同位体を用い、近似した内部標準との相対検量線により定量を行った。検出限界は各アイソマーについて検液中濃度0.2ppbとした。PCB濃度の算出においては、PCBの全異性体209種類をキャピラリーカラムで分離し、各異性体を定量し、各異性体濃度の総和を総PCB濃度とした。暴露評価：PCB濃度は母乳（平均値：95ng/g、最小値：42ng/gー最大値：192ng/g）、母体血（平均値：99ng/g、最小値：34ng/gー最大値：222ng/g）、臍帯血（平均値：61ng/g、最小値：15ng/gー最大値：126ng/g）であった。有機塩素系農薬についてはDDE、β-HCHで高い濃度で検出された。同一人の母乳、母体血、臍帯血中PCB、有機塩素系農薬濃度を比較すると、脂肪中濃度では3試料間で同程度か、臍帯血で若干低い濃度が認められた。Whole basisで母体血と臍帯血を比較すると

臍帯血の脂肪含量は母体血の約1/4である。従って、臍帯血のPCB、有機塩素系農薬の濃度は母体血の1/4かそれ以下である。各組織共に6及び7塩素PCBが高濃度で蓄積されていた。各異性体組成においては母体血及び臍帯血の間で顕著な差は認められなかった。母乳中のダイオキシン類の濃度は、PCDDs/PCDFs (166.7pg/g fat, 14.6pg TEQ/g fat)、Non-ortho PCB (76.1pg/g fat, 3.2pg TEQ/g fat)、Mono-ortho PCB (13215pg/g fat, 3.0pg TEQ/g fat)、総ダイオキシン類 (20.8pg TEQ/g fat)であった。PCB及び有機塩素系農薬の母乳経路による乳児への暴露評価をから、有機塩素系農薬は各化合物のADIに対し7.7%~33.7%で、問題はない。一方、ダイオキシン類に関してはPCDDs/PCDFsではTDIに対し1643%、Co-PCB (Non/Mono-ortho)では698%、総ダイオキシン類では2340%であった。今回新たに開発した分析法を用いて測定した結果と、アルカリ分解-高分解能GC/MSを用いた従来法の分析結果とを比較したところ mono-ortho PCBについてよく一致した結果が得られたことから本法が従来法に対する簡便法として使用できると考えられる。脂肪中濃度において、総PCB、農薬類は母体血中と比較して、さい帯血中では同等か低くなる傾向が見られた。PCBを塩素数別で比較したところ、7塩化PCBの低下が認められる。この要因を明らかにするため、母体血と母乳、さい帯血間の各塩素ごとに含まれる組成比についてt検定を行った結果、母体血に比べ臍帯血では低いことが

明らかになった。これは胎盤により移行が阻害されたためか、胎児の肝臓等の組織に蓄積された可能性も考えられる。今後胎児由来の試料を分析することが必要と考えられる。一方、毒性の評価から、胎児の組織に蓄積されていない限り、母体から胎児への曝露は低減されていると考えられる。

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：

出生前診断等で採取した羊水、流産絨毛、さい帯血、臍帯、母体血、母乳等について、可能な限り同一母体、胎児についての経時的なセットとして採取、保存してきた。これらの母体血とさい帯血を含む生体試料の50セットについては既に各分析に供されている。これらのいくつかに関しては種々の化学物質の解析には十分な量に至らないものもあるので、微量な試料で高感度に検出できる方法の開発が必要であり、他の分析方法開発グループとの連携が不可欠である。試料の採取と並行して、内分泌かく乱化学物質測定に適した試料採取容器について検討した。FALCON、及びCORNINGのディスポーザブル容器についてフタル酸ジエチルヘキシルを含む3種類の内分泌かく乱化学物質の溶出について測定を実施したが、いずれも検出限界以下であった。また我々の異なる洗浄方法によって準備されたガラス容器に関してもいくつかの化学物質溶出濃度を測定して比較したが、いずれも検出限度以下であ

った。多量のサンプルを複数の施設で採取保存されたものから均一な品質の生体試料を得るためには、従来用いられてきたガラス容器に比べてハンドリングが容易であり、統一された容器の選定が早急に必要であると考ええる。さらに、生体試料または試薬の希釈調整等に用いる精製水の成分について検討を加えた。これまで市販の各種分析用精製水（住友精密工業、和光純薬など）と自家製超純水（Milli-Q、Millipore; NanomureII, Barnstead）について測定したところ、測定した3種類の内分泌かく乱化学物質の混入はいずれも検出限界以下であり、希釈調整等に用いる精製水としての使用には特に問題はないと考えられた。さらに継続して調査を進めている。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内分泌かく乱化学物質の混入等に関して調査を実施した。

⑧-2 内分泌かく乱化学物質の胎児等の生体試料における測定、及び母体への汚染濃度との相関解析：我々は内分泌かく乱化学物質と認定されている物質の中でも重大な影響を及ぼしているものとして、ポリ塩化ビフェニール（PCB）と、樹脂の原料として用いられその影響が懸念されているビスフェノール A（BPA）等について、特に同一母体における出生前診断時、出生時及び母乳について汚染濃度の変化を調査し、一方では同一胎児における汚染濃度との相関に着目して分析を進めている。これらの結果については

次年度にまとめて報告をする予定である。

⑧-3 内分泌かく乱化学物質の汚染とそれらに対する in vivo 細胞反応測定、及び内分泌かく乱化学物質による遺伝的障害検出法の検討：母体及び胎児に於ける内分泌かく乱作用が疑われる重金属類（スズ、鉛など）及び他の重金属（銅など）の母体末梢血と出生児さい帯血における汚染濃度を原子吸光光度計により測定した。これまで30セットの生体試料に関して原液→100倍希釈試料を用いて測定した。母体血における測定値は以下のとおりである。

鉛：母体血中の平均値、16.7 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 400-700 ppb、NHANES III では 5-560 ppb）、スズ：母体血中の平均値、15.3 ppb、カドミウム：母体血中の平均値、1.60 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 3-5 ppb）、銅：母体血中の平均値、1212 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 690-1500 ppb）。

いずれも成人におけるこれまでの報告値に比べ、同範囲内かあるいはそれよりも低い数値を示した。いずれの重金属においても、さい帯血における濃度は母体血に比べて、同程度かむしろ低い値を示した。さい帯血中の濃度平均値は、鉛 12.2 ppb、スズ 14.7 ppb、カドミウム 0.79 ppb、銅 501.9 ppbであった。また、調査した重金属に関して個体間でばらつきがあり、さい帯血の濃度は母体血の濃度に強く関係しているように見える。さらに、in vivo

細胞反応として、細胞内 peroxide 量とメタロチオネイン量を HPLC 及び Western Blot 法で測定し、重金属濃度との相関について解析を開始した。内分泌かく乱化学物質が細胞に及ぼす機序の一つとして、遺伝子構造に直接障害を及ぼすことが考えられ、遺伝子、DNA への障害を DNA 中の 8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン (8-OH-dG) の増加値として検出できるかを検討した。これまで微量の 8-OH-dG の検出方法の改良を試みた。今後さらに高感度の検出方法の開発を図り、実際にこの方法で重金属及び他の内分泌かく乱化学物質の汚染濃度との相関を明らかにして、ヒト健康に及ぼす影響の機序について検討していく。

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

患者末梢血（血清）12 試料、腹水 13 試料、母体末梢血（血清）8 試料、さい帯血（血清）8 試料を分析した。これらの試料から最も高頻度に検出されたものは HCB で、全体としての検出率は 98% であった。その濃度は中央値として、患者末梢血中で 0.11ppb、腹水中で 0.03 ppb、母体末梢血中で 0.08 ppb、さい帯血中で 0.03 ppb であった。次いで高頻度に検出されたものは *trans*-ノナクロルで、全体としては 63% の検出率で、検出された濃度の中央値は、患者末梢血は 0.12 ppb、腹水中は 0.04 ppb、母体末梢血中は 0.12 ppb、さい帯血中は 0.04 ppb であった。次いで高頻度に検出されたものは *cis*-ノナクロル（検出率 17%）で、その濃度の中央値は 0.04 ppb であった。

しかし、腹水及びさい帯血からは全く検出されなかった。一方、検出を試みた 7 種の化学物質のうち、ヘプタクロルエポキシサイド、オキシクロルデン、*trans*-クロルデン及び *cis*-クロルデンは、いずれの試料からも全く検出されなかった。以上の結果は、検出率及び濃度範囲ともに、昨年度実施した子宮内膜症患者、妊娠母体、及び、さい帯を試料とした調査結果 (n=24) とほぼ同様な値であった。したがって、これらの測定値が子宮内膜症患者及び不妊症患者の末梢血、腹水、それに母体末梢血及びさい帯血中の平均的な CLDs 及び HCB の検出率及び濃度範囲と結論付けられた。不妊症患者末梢血中の HCB 濃度と腹水中の濃度には有意な正の相関が存在するが、母体末梢血中とさい帯血中の濃度には有意な相関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

平成 11 年度及び 12 年度に東海大学病院で受診した不妊症患者 18 名（平成 11 年度 5 名、平成 12 年度 13 名）の血清及び腹水 35 検体について、揮発性有機化合物濃度を測定した結果、測定を実施した 8 種類の揮発性有機化合物では、トルエンが全試料の 80% と、最も高頻度で検出された。次いで高頻度に検出されたものは、順に *p*-ジクロロベンゼン 49%、*m, p*-キシレン 43%、エチルベンゼン 37%、*o*-キシレン 29%、スチレン 26%、それにベンゼン 11% であった。一方、ナフタレンは全く検出されなかった。また、検出された化学物質の濃度の中央値は、濃度の高い順に *p*-ジクロロベンゼン 4.0 ppb、*m, p*-

キシレン 1.8 ppb、トルエン 1.2 ppb、エチルベンゼン 1.2 ppb、*o*-キシレン 0.7 ppb、スチレン 0.6 ppb、それにベンゼン 0.5 ppb であった。以上の結果より、今回測定を行なった不妊症患者の体内には、トルエン、*p*-ジクロロベンゼンなどの揮発性有機化合物が ppb からサブ ppb のオーダーで存在していることが示唆された。同一患者から採取した血液と腹水中の揮発性有機化合物濃度の関係について、検出頻度及びその測定濃度より統計解析が可能であったトルエン及び *p*-ジクロロベンゼン濃度について検討を加えた。その結果、*p*-ジクロロベンゼン濃度には有意な正の相関関係（順位相関係数 = 0.893、 $n=7$ 、 $p=0.029$ ）が認められたが、トルエン濃度には有意な相関関係は認められなかった（順位相関係数 = -0.270、 $n=12$ 、 $p=0.370$ ）。

揮発性有機化合物は環境中に普遍的に存在していることから、試料の採取時及びその保存期間中に汚染を受ける可能性が高い。事実、周囲の環境等からの汚染を防止するために、血清保存用試験管内の空気を窒素で置換するなどの対策を講じる愛知衛研方式を用いて採取した平成 12 年度の検出率が、そうではない平成 11 年度の検出率よりも低い傾向を示していた。そこで、採血方式及び場所の違い（東海大方式 vs 愛知衛研方式）による血中揮発性有機化合物濃度の差異を調べるため、愛知衛研職員 4 名について、以下の異なる 3 方法にて採血及び血清分離を行なった。：①愛知衛研で愛知衛研方式、②東海大学病院で愛知衛研

方式、③東海大学病院で東海大方式。採血は 2 日連続で行ない、1 日目は①で、2 日目は②及び③にて実施した。各方式で採血及び分離した血清中の揮発性有機化合物濃度を表 2 に示した。まず、東海大学病院において同じ日に愛知衛研と東海大の両方式で血液を採取し、同一被験者 4 名の血中揮発性有機化合物濃度を測定した。その結果、全検体から同程度の濃度が検出された *p*-ジクロロベンゼン及び全く検出されなかったナフタレンを除き、愛知衛研方式で採血した場合の検出率及び濃度が、東海大方式のそれらよりも低い傾向が認められた。この結果は、上述の不妊症患者における平成 11 年度と 12 年度の相違（11 年度は東海大方式、12 年度は愛知衛研方式による採血・血清分離）と同様の傾向を示すものであった。

また、東海大学病院での採血の前日に①（愛知衛研で愛知衛研方式）で採取した血中の揮発性有機化合物濃度は、東海大学病院にて両方式（②及び③）で採取した場合と比べて、検出率及び濃度が低い傾向を示していた。この結果については、採血日が異なること、愛知衛研から東海大学病院への移動によるトラベルブランクの影響が考えられること、それに検体数が非常に少ないこと等から、今回の結果のみから採血場所（東海大学病院）の汚染を第一義的な原因と断定的に考えることはできない。

なお、環境汚染の状況を調べる目的で、東海大学病院で採血を実施した手術室、研究室等の空気中の揮発性有機

化合物濃度を測定した。その結果、総揮発性有機化合物濃度として手術室が $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (中央値、 $n=5$)、研究室 1 が $17 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (中央値、 $n=3$)、研究室 2 が $37 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (中央値、 $n=3$) であった。一方、愛知衛研の職員 4 名のうち、1 名の自宅の室内空气中揮発性有機化合物濃度は $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。従って、東海大学病院内の空气中揮発性有機化合物濃度の方がかなり低い値であることが判明した。

以上のことから、その具体的汚染源、汚染様式は不明ではあるが、生体内の揮発性有機化合物濃度を測定する際には、採血方式及び場所によって汚染が発生する可能性が高いことが明らかとなった。今後、不妊症患者等の生体内における揮発性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、周囲の環境等からの汚染防止を万全にした状態での検体採取・保存及び測定が重要な課題であることが明らかとなった。

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

TS 細胞の分化に対する影響の検討では、 $10 \mu\text{M}$ ベンツピレン存在下でも、大きな変化は見られなかった。我々は、ベンツピレンの細胞内受容体と考えられている AhR が TS 細胞で発現していることをすでに昨年度報告しており、この結果を踏まえた今年度の研究であったが、ベンツピレンによる栄養膜細胞分化への大きな影響がないことは、予想外の結果であった。今後さらに詳細な解析が必要であるが、胎盤

形成の初期段階にはベンツピレンは無害であるのかもしれない。腸の管腔側に添加されたビスフェノール A (BPA) は粘膜上皮細胞に吸収され、そのほとんどがグルクロン酸抱合された。抱合体の一部は漿膜側に吸収されたが、多くが管腔側(粘膜側)に戻された。漿膜側へのグルクロン酸抱合の取込みは結腸で最も高かった。また、腎動脈中に添加した BPA は、直ちに腎静脈中に検出され、尿中にはほとんど検出されなかった。さらに、胎盤マイクロソームを用いた実験では、一般的薬物のグルクロン酸抱合活性が母親側胎盤に存在したが、BPA のグルクロン酸抱合活性は検出されなかった。免疫組織染色により、UGT1A6 に相当する分子種が胎盤脱落膜層に発現していることが分かった。グルクロン酸抱合体を分解してもとの薬物に戻す酵素 (β -グルクロニダーゼ) の活性がラット胎盤母親側に存在していることを見出した。

ラット臓器を用いた研究からは、まず、消化管に入った BPA はそのほとんどがグルクロン酸抱合されてから吸収されることがわかった。また、腎では他の薬物は様々な代謝を受けるが、BPA は濾過も代謝もされないと考えられる。今後グルクロン酸抱合体の尿中への移行についてさらに調べる。最近の報告にあったように、グルクロン酸抱合体を分解してもとの薬物に戻す酵素 (β -グルクロニダーゼ) の活性がラット胎盤母親側にも存在していた。このことから血液中に存在する BPA のグルクロン酸抱合体が胎盤で

もとのフリーの状態に戻され、胎児側に移行する可能性が示唆される。

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

マウスにカゼイン食を与えた場合、血中カゼイン特異的総抗体価は普通食に比べ有意に増加し、投与開始2から3週間後に最高値となり、以後ほぼ横ばいとなった。カゼイン食とともにDBTを28日間経口投与した後の抗原特異的総抗体価は有意に増強した ($p < 0.01$)。また、この時のIgGサブクラス (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}) をみると、IgG₁が有意に増強した ($p < 0.01$)。カゼイン経口投与による免疫応答は、IgG₁およびIgG_{2a}産生を誘導するが、ジブチルスズはヘルパーT細胞におけるTh₂型が誘導するIgG₁産生を有意に増強した。ゆえに、ジブチルスズは抗原とともに経口感作され、抗原特異的免疫応答を修飾することが明らかとなった。動物をアジュバントとともに抗原で免疫すると、抗原特異的なT細胞や抗体の応答を誘導できるが、動物にこの抗原をあらかじめ経口投与しておくとも免疫応答は低下し、実験的に経口トレランスを誘導することが出来る。この系を用いて、経口トレランスにおけるT細胞増殖応答へのDBTの影響を検討した。カゼインを経口投与しないDBT単独での抗原に対するT細胞増殖応答への影響を検討したところ、DBTは、MTSアッセイが示すミトコンドリアにおける代謝活性を有意に増強した。経口寛容におけるT細胞増殖応答へのDBTの影響を検討したところ、抗

体産生を増強したDBTは、H₃取り込みおよびMTSアッセイいずれにおいても増殖応答を有意に増強した。MTSアッセイにおいて、DBTはCTでは影響がみられなかったカゼイン低濃度刺激においても代謝活性を有意に増強した。抗原とともに経口感作されたジブチルスズは、免疫応答を増強するアジュバント様の影響を示すことが明らかとなった。これまでの実態調査において、養殖ハマチでDBT 13.6ppmの濃度事例もみられ、本研究におけるDBT影響濃度は、閉鎖系水域での汚染レベルとして考えうると思われた。また、高濃度投与では、細胞応答を抑制する毒性発現の影響を示すことから、濃度により異なる影響を示すと考えられた。さらに、本実験系において、自己トレランスの実験系モデルである経口トレランスを破綻することが明らかとなっているコレラトキシンと同等あるいはそれ以上に経口抗原特異的な抗体産生およびT細胞応答に影響を及ぼすことが明らかとなった。これにより、ジブチルスズは過剰な免疫応答を引き起こし、経口トレランスの誘導を破綻することが考えられた。現代病といわれ患者数が増加している自己免疫疾患は自己トレランスの破綻により引き起こされると考えられている。このことから、ジブチルスズのように経口トレランスの誘導を破綻すると考えられる化学物質の存在は非常に興味深い。ゆえにDBTのアジュバント様の影響および経口トレランスへの影響について、細胞応答および伝達、ターゲット細胞等の細胞レベルでの

解析をすすめることが必要と考えられる。

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

H295R細胞のcortisol産生に及ぼす植物エストロゲンである各種フラボン及びイソフラボン曝露の影響を種々濃度で検討した。12.5 μM の濃度の曝露において6-hydroxyflavone (6-HF), apigenin, daidzein, genistein, biochanin A 及び formononetin 等が有意なcortisol産生の阻害を示した。しかし他のフラボノイドには阻害効果は認められなかった。さらに、25.0 μM の曝露ではこれらのフラボノイドに加えbiochanin Aも有意なcortisol産生の阻害を示した各種濃度における6-HF, apigenin, daidzein, genistein, 及びformononetinの阻害効果、は曝露濃度に依存していた。しかし、daidzein及びgenisteinの7-グルコシドであるdaidzin及びgenistinはH295Rのcortisol産生を阻害しなかった。

H295R細胞のcortisol産生阻害が認められた植物エストロゲンの作用機序を明らかにする一端として、この阻害作用がエストロゲンレセプターを介して引き起こされるかどうかを、daidzeinを用いて検討した結果、daidzeinの曝露(5 $\mu\text{g/mL}$)により引き起こされるcortisol産生の阻害はエストロゲンレセプターアンタゴニストであるICI 182,780の添加により解除されなかった。

H295R細胞のcortisol産生を阻害した6-HF, apigenin, daidzein, genistein, biochanin A 及び formononetinの作用機序を明らかにするためP450scc, 3 β -HSD, P450c17, P450c21 およびP45011 β 等のステロイド合成に関与する酵素に対する阻害作用を検討した。これらのフラボノイドは3 β -HSD β のみならず12.5 および25 μM の濃度でP450c21活性も阻害した。さらに6-FHは25 μM の濃度でP45011 β 活性も阻害した。一方、H295R細胞のcortisol産生の阻害に影響を及ぼさなかったdaidzinはいずれのステロイド合成酵素も阻害しなかった。

daidzeinを用いて、3 β -HSD β およびP450c21活性の阻害について反応速度論的解析を行った。その結果、3 β -HSD β 活性はdaidzeinにより競合的に阻害され、その K_i は2.9 μM であった。なお、基質のandrostendioneに対する K_m は6.6 μM , V_{max} は328 pmol/min/mg proteinであった。一方、daidzeinによるP450c21活性阻害は、競合的に阻害され、その K_i は33.3 μM であった。なお、基質のprogesteroneに対する K_m は2.8 μM , V_{max} は28.93 pmol/min/mg proteinであった。

3 β -HSDは Δ^5 -3 β -ヒドロキシステロイド(pregnenoloneあるいはDHEA)を対応する Δ^4 -3 β -ケトステロイド(progesteroneあるいはandrostenedione)に変換させる酵素である。見かけ上異なる反応である酸化と異性化反応を触媒する。ヒトにおいては胎盤や皮膚に発現している