

type I と副腎、精巣及び卵巣に特異的に発現している type II が存在することが知られており、 $3\beta$ -HSD II はコルチコイドのみならずミネラルコルチコイド、ゲスタゲン、アンドロゲン及びエストロゲンの生合成における重要な酵素でもある。従って、植物エストロゲンの内在性のステロイド産生に及ぼす影響とヒトへの健康影響との関連は、さらに詳細に検討されることが必要である。

#### ④ エストロゲン受容体 $\alpha$ 、 $\beta$ 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

MCF-7 は、 $E_2$  の添加により、 $10^{-9}$ ~ $10^{-8}$ mol/l で、濃度依存性の細胞増殖能の亢進が認められた。一方子宮内膜由来細胞である HHUA でも  $10^{-7}$ ~ $10^{-11}$ mol/l で同様の細胞増殖が認められた。今回の被検物質は MCF-7 ではすでにエストロゲン様の細胞増殖効果が認められていたが、今回 HHUA 細胞でも同様のアッセイを行ったところ MCF-7 と同様の効果が認められた。一方エストロゲン受容体との Binding assay では、E-screen assay で反応がみられた全ての物質で程度の差はあるものの、エストロゲン受容体との競合結合が認められた。しかし物質によっては、エストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  間で、Binding に差が見られた。今回  $E_2$  の添加により、子宮内膜由来 HHUA 細胞でも、MCF-7 同様の細胞増殖効果を認め、内分泌攪乱物質の子宮内膜への作用として、HHUA 細胞を用いた評価が可能であることが明らかとなった。E-screen assay では、

MCF-7 と HHUA との間に、反応の程度や濃度において、若干の相違を認めしたが、今後は、両細胞のエストロゲン受容体 サブタイプの発現量の違いについても定量的な評価が必要であると考えられる。またエストロゲン受容体との Binding assay では、レセプターとの反応を認めた濃度と E-screen assay で細胞増殖効果を認めた濃度との間で、差が認められる物質が存在し、今後はエストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  それぞれに対し、レセプター結合の下流での転写活性の有無についても、検討する必要があるものと考えられる。今後はこれらの検討を通し、それぞれの、エストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  に対する作用 (agonist、antagonist) を明らかにし、現在多数存在する内分泌攪乱物質について作用機序別による分類を行っていく予定である

#### ⑤ ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

内分泌かく乱作用の疑われている Bisphenol A は  $10^{-10}$ M 及び  $10^{-6}$ M の濃度において、T47D 細胞の増殖を促進した。この細胞増殖促進作用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  $10^{-6}$ M の濃度で阻害された。また、 $10^{-11}$  ~  $10^{-5}$ M の Genistein,  $10^{-11}$ ~ $10^{-4}$ M の Daidzein は T47D 細胞の増殖を促進した。この細胞増殖促進作用は Genistein は  $10^{-5}$ M の ICI 182,780 により、Daidzein は  $10^{-6}$ M の ICI 182,780 により阻害された。我々が食品より植物エストロゲンを摂取することを想定し、大豆抽出物であり、Genistein, Daidzein,

Glycitein 混合物である Fujiflavone P40 の T47D 細胞に対する影響を検討したところ、 $10^{-5}\text{M}$ 、 $10^{-4}\text{M}$  と高濃度では T47D 細胞の増殖を促進する作用が見られたが、 $10^{-11}\sim 10^{-6}\text{M}$  の濃度において T47D 細胞の増殖を促進する作用は見られなかった。我々の日常における複合暴露を想定し、Bisphenol A 共存下における植物エストロゲンの T47D 細胞に対する影響を検討した。 $10^{-6}\text{M}$  の Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を 100%とし、 $10^{-11}\sim 10^{-4}\text{M}$  の Genistein 及び Daidzein を共存させたところ、 $10^{-11}\sim 10^{-8}\text{M}$  と低濃度の Genistein, Daidzein においては T47D 細胞の増殖を促進する傾向が見られたが、 $10^{-7}\sim 10^{-4}\text{M}$  と高濃度においては T47D 細胞の増殖を抑制した。加えて、Bisphenol A 共存下での T47D 細胞に対する Fujiflavone P40 の影響を検討した。 $10^{-10}\text{M}$  及び  $10^{-6}\text{M}$  の Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を 100%とし、 $10^{-11}\sim 10^{-4}\text{M}$  の Fujiflavone P40 を共存させたところ、Fujiflavone P40 は Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を抑制する傾向が観察された。植物エストロゲンである Genistein, Daidzein は単独で、T47D ヒト乳癌細胞の増殖を促進した。また、この増殖促進作用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 により阻害され、エストロゲンレセプターを介した反応であることが示唆された。我々の食品からの摂取に近い、大豆抽出物である Fujiflavone P40 (Genistein + Daidzein + Glycitein の混合系) は T47D 細胞の増殖作用を促進

せず、Genistein あるいは Daidzein のみで見られた T47D 細胞増殖促進作用の相加あるいは相乗作用はないことが示唆された。また、我々の日常における複合暴露を想定した Bisphenol A 共存下における Genistein, Daidzein は、濃度によって Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を促進も抑制も示し、植物エストロゲンが濃度によってエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン様作用と異なった挙動を示すことが示唆された。Bisphenol A 共存下における Fujiflavone P40 は Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を抑制する傾向が見られ、Bisphenol A 共存下で植物エストロゲンの混合物は抗エストロゲン様作用を示すことが示唆された。

#### 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

本研究に用いたヒト子宮体癌細胞 (HHUA 細胞) で、 $17\beta$ -エストラジオールの各濃度における細胞増殖をまず顕微鏡下で確認。well 内のコロニー形成が十分で均一である事を確認し分析を開始した。コントロールと比較して  $10^{-12}\sim 10^{-7}\text{M}$  で細胞増殖は著明となり増殖性は 1.1~1.2 倍であった。つぎに被験物質として用いたフタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル、ノニルフェノールおよびビスフェノール A (BPA) におけるそれぞれの細胞増殖性は、フタル酸ジブチルでは  $10^{-12}\sim 10^{-7}\text{M}$  の濃度で 1.1~1.2 倍、フタル酸ジシクロヘキシルでは  $10^{-13}\sim 10^{-5}\text{M}$

の濃度で1.2 ~ 1.4倍、フタル酸ジエチルヘキシルでは $10^{-13}$  ~  $10^{-5}$  Mの濃度で1.1 ~ 1.3倍、ノニルフェノールでは $10^{-12}$  ~  $10^{-5}$  Mの濃度で1.1 ~ 1.3倍およびBPAでは $10^{-13}$  ~  $10^{-6}$  Mの濃度で1.1 ~ 1.5倍の細胞増殖性を認めた。またBPAについては $10^{-6}$  Mで急峻な細胞の増殖を認め、以後ゆっくり下降し再度 $10^{-10}$  Mで細胞増殖がみられる二峰性のパターンを示した。

次に、BPAの妊娠初期マウスへの皮下投与における出生マウス体重の検討では、コントロール群の出生マウス計31匹の体重は、1.2 ~ 1.4 g (1.29 ± 0.06 g)の結果であった。BPA投与群では、出生マウス計23匹の体重は、1.2 ~ 1.4 g (1.29 ± 0.06 g)。ノックアウトマウスでのBPA投与群では、出生マウス計26匹の体重は、1.2 ~ 1.4 g (1.28 ± 0.06 g)の結果で、3群間での出生マウスの体重に明らかな差は見られなかった。出生2 ~ 3ヶ月経過の未妊娠雌マウスにBPAを同様に投与した結果は子宮長10 ~ 12 mmで、BPA未投与群の雌マウスと比較しても明らかな子宮の肥大を認めなかった。また腹腔内に明らかな子宮内膜症の所見を認めることはできなかった。

mdr1a / 1b m-RNAのプライマーを用いてコントロール群、BPA投与群およびノックアウトマウス群についてRT-PCRを行った結果、コントロール群とBPA投与群では、mdr1aで428bpにmdr1bで537bpに明らかなバンドの出現を認めたが、ノックアウトマウスではバンドの出現はなかった。

今回の検討では、ヒト子宮体癌細胞と

乳がん細胞では異なった感受性を示すことが示唆された。またBPAの*in vivo*での実験では、胎児の発育状態には有意差を認めなかった。一方、未妊娠マウスへの投与しでも、子宮肥大や子宮内膜症の所見を得る事は出来なかった。

また今回我々は、薬物や他の化学物質をトランスポートするジーンを欠損させたノックアウトマウスも使用したが、コントロール群と比べて薬剤感受性が強く出現することが考えられ、BPA投与の影響を受けやすい事が予想されたにもかかわらず、出生マウスの体重に明らかな違いはなかった。今後さらに詳細な検討が必要と思われた。

#### D. 結論

我々は、平成11年度厚生科学研究(主任研究者:牧野恒久)「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」の研究成果を通じて興味ある知見を得ると共に、検討すべき問題点もいくつかあることが明らかになった。生体試料の分析にあたっては、採取や保存の際の汚染もみのがせないことが、明らかになった。そのため、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も検討した。特にフタル酸ジエチルヘキシルについては、本年の検討でシステムの確立をみており、実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての検討がようやく可能である段階に達したと思われる。他のいくつかの化学物質について

も、それぞれ検出限界を低く設定できるように分析法の開発をすすめており、母体及び胎児をふくめたヒトにおける蓄積の実態をあきらかにしつつある。また、暴露状況の調査と同時に、内分泌かく乱作用の作用機序を明らかにすることも必要である。in vivo 細胞反応を明らかにするとともに、その障害の一つと考えられる遺伝子への影響をDNA変異を指標にして検出し、その実態について明らかにするなどの in vitro での細胞反応系も重要である。in vitro の細胞反応系については、現在検討中である数種の系に加えて、さらに開発中でもあり、本研究の平成12年度の報告は、その意義は大きいと考える。

各論は前項に詳述したが、ポリ塩化ビフェニール（PCB）も、妊婦や胎児血中に残留している可能性が示唆された。PCBそのものが胎児や新生児発育にいかなる影響や長期予後が関連するかは定かではないが、環境汚染物質としてみのがすことはできない。我々は母胎血、羊水、臍帯血にどのような割合で汚染がすすんでいるかを明らかにしつつある。さらに、他の環境汚染物質とともにデータの蓄積を行い、次年度に明らかにする予定である。また、内分泌かく乱作用の機序の一つとして遺伝子等への障害を予測してその検出系の検討も進められており、生体内での代謝もについても、解毒の意味も含めて明らかになり、さらに代謝系での新規の遺伝子、分子種の発見にも本研究は貢献した。本研究において今年度まとめられた各報告は、内分

泌かく乱化学物質にして有益な情報として活用されることが期待される。

## E. 研究業績

### 1. 論文発表

- 1) Y. Sun, M. Wada, O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, and K. Nakashima, "High-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride as a label." J. Chromatogr. B, 749, 49-56 (2000).
- 2) Akutsu, K., Obana, H., Okihashi, M., Kitagawa, M., Nakazawa, H., Matsuki, Y., Makino, T., Oda, H., Hori, S. : GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan : Chemosphere (in press)
- 3) J. Yan, S. Tanaka, M. Oda, T. Makino, J. Ohgane and K. Shiota. "Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate" Developmental Biology (投稿中)
- 4) Tomomi Yamazaki, Yumiko Okada, Yoshiharu Hisamatsu, Shunichiro Kubota and Fujio Kayama  
EFFECT OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS ON LYMPHOCYTE RESPONSES

DIOXIN 2000, Vol. 49 p394-396,  
August 2000, Monterey, California,  
USA

5) Nao Kobayashi, Akiko Yamaguchi,  
Tomomi Yamazaki and Hiroyuki  
Nakazawa

Effect of Xenoestrogens and  
Phytoestrogens on Breast Cancer  
Cells

第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学  
会, p320, December 2000, 横浜

## 2. 研究発表

1) 「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」: 第  
4 回分析化学東京シンポジウム(幕張)  
2000.8.30-9.1

2) 中島憲一郎, 孫 艶, オサマ・ア  
ルデハシ, 和田光弘, 黒田直敬(長崎  
大), 中澤裕之(星薬大), 高橋正克(長  
崎大), 牧野恒久(東海大): 「生体試  
料中のビスフェノール A の高感度分析  
法の開発に関する基礎研究」; 「カラム  
スイッチングを利用する」第 10 回日  
本臨床化学会九州支部総会

孫 艶, オサマ・アルデハシ, 和田光  
弘, 黒田直敬, 中島憲一郎(長崎大),  
中澤裕之(星薬大), 牧野恒久(東海  
大); 日本薬学会第 120 年会スフェ  
ノール A のセミマイクロ HPLC 蛍光計測  
(2000)

3) 寺澤, 月岡, 吉田, 佐藤, 藤島(長野衛  
公研), 中澤(星薬科大): p-ヒドロキ  
シ安息香酸の摂取と生体中濃度, 日本  
環境化学会 9 回環境化学討論  
会, 257(2000)

4) 加藤嘉代子, 荘田 祥子, 吉村吉  
博, 中澤裕之(星薬大), 伊藤 裕子,  
岡 尚男(愛知衛研): “HPLC/PDA に  
よる生体内フタル酸モノエステル類  
の分析”: 日本薬学会第 121 年回

5) Kayoko Kato, Yoshihiro Yoshimura,  
Yuko Ito, Hisao Oka, Hiroyuki  
Nakazawa “Determination of  
metabolites of the plasticizer  
(di(2-ethylhexyl) phthalate,  
dibutyl phthalate and butylbenzyl  
phthalate) in human plasma.”,  
PITTCON 2001, New Orleans, USA

6) 野村麻貴, 鳥羽陽, 木津良一, 久  
保田明子, 輪島志帆子, 正宗行人, 早  
川 和一: ディーゼル排気粉塵及び尿  
中のベンゾ[a]ピレンとピレンの水酸  
化体の検索; 日本薬学会第 120 年会,  
30[PF]12-08, 2000, 岐阜.

7) 鳥羽陽, 野村麻貴, 木津良一, 早  
川和一: カラムスイッチング HPLC を  
用いたヒト尿中モノヒドロキシベン  
ゾ[a]ピレンの分析; 第 7 回クロマト  
グラフィーシンポジウム, 4, 2000, 徳  
島.

8) 中村浩彰, 鳥羽陽, 木津良一, 早  
川和一, 中澤裕之, 牧野恒久: カラム  
スイッチング HPLC を用いたヒト尿中  
モノヒドロキシベンゾ[a]ピレンの分  
析; フォーラム 2000: 衛生薬学・環境  
トキシコロジー, P-229, 2000, 東京.

9) 中村浩彰, 蔵前弥生, 鳥羽陽, 木  
津良一, 早川和一, 中澤裕之, 牧野  
恒久: カラムスイッチング HPLC を  
用いたヒト尿中モノヒドロキシベン  
ゾ[a]ピレンの分析; 日本薬学会第 121  
年会, 28[PF]III-054, 2001, 札幌

- 10) Shinjiro Hori, Kazuhiko Akutsu, Mikiya Kitagawa, Hajime Oda, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, Tsunehisa Makino, Development of Analysis for Polybrominated Diphenyl Ether in Seafood and Actual Contamination of Seafood、20Th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds (DIOXIN 2000) 2000, 8, 13-17 (Monterey, CA, U.S.A.)
- 11) 岡 尚男、伊藤裕子、猪飼蒼友、近藤文雄、松本 浩、GH I、中澤裕之、牧野恒久、「GC/MSによる人血清中のクロルデン及びその関連物質の分析」、第25回日本医用マスペクトル学会年会(広島)、2000年9月
- 12) 巖 軍麗・田中 智・大鐘 潤・塩田 邦郎  
「栄養膜細胞の分化におよぼすレチノイン酸の影響の解析」  
第130回日本獣医学会学術集会(平成12年10月)
- 13) 巖 軍麗・田中 智・大鐘 潤・塩田 邦郎  
「Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast cells into giant cell」米国細胞生物学会(ASCB)第40回年会(平成12年12月)
- 14) 横田 博、井上博紀、松本順也、柴田憲明、加藤清雄、湯浅 亮  
「内分泌かく乱化学物質のラット肝におけるグルクロン酸抱合」  
第3回環境ホルモン学会
- 15) 柴田憲明、横田 博、松本順也、湯浅 亮  
「ビスフェノール A 投与ラット肝における性ホルモンのグルクロン酸抱合能低下とクミルフェノール及びタモキシフェン投与の影響」  
第3回環境ホルモン学会
- 16) 大道寺智、横田 博、井上博紀、加藤清雄、湯浅 亮  
「ラット肝灌流法によるノニルフェノール及びアルキルフェノールのグルクロン酸抱合体の胆汁排泄」  
第3回環境ホルモン学会
- 17) 井上博紀、横田 博、秋山毅一郎、伊藤隆志、翁長武紀、田村守、加藤清雄  
「ラット脳灌流モデルを用いたビスフェノール A の脳組織への残留」  
第3回環境ホルモン学会
- 18) 渡邊裕子、八村敏志、藤巻照久、中澤裕之、上野川修一、牧野恒久：抗原特異的なT細胞応答に対するジブチルスズの影響、日本農芸化学会2001年度大会 講演要旨集, 75, 262, 京都。
- 19) 中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之(星薬大・薬)、大野修司(日大・薬)、牧野恒久(東海大・医)：ヒト副腎由来H295R細胞のコルチゾール分泌に及ぼす内分泌攪乱化学物の影響、第73回日本生化学大会、2000年、10月、横浜
- 20) 中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之(星薬大・薬)、大野修司(日大・薬)、牧野恒久(東海大・医)：ヒ

ト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼすフタル酸エステル、アルキルフェノール及び植物エストロゲンの阻害効果, 第 3 回日本内分泌学会研究発表会, 2000 年, 12 月, 横浜

Gynecological Endocrinology.  
(Florence, Italy. Dec 6-9, 2000, Italy.  
Dec 6-9, 2000

21) 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、松林秀彦、新井正、Shanta F Haque、牧野恒久 (東海大学医学部) : 内分泌かく乱物質の細胞増殖におけるエストロゲン受容体の関与についての検討、第 52 回日本産科婦人科学会、4、2000、徳島

22) 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、奥脇伸二、内田能安、牧野恒久 (東海大学医学部) : 内分泌かく乱物質の作用について、cell line システムと酵母系アッセイシステムでの比較検討、第 73 回日本内分泌学会、6、2000、京都

23) T Murano, S Izumi, K Sakabe, S F Haque, T Suzuki, H Matsubayasi, S Okuwaki, T Makino

Environmental Endocrine Disruptors in an E-Screen Assay and a Yeast-Based Transcriptional Assay

11th International Congress of Endocrinology (Sydney, Australia. Oct 29- Nov 2, 2000)

24) T. Murano, S-I. Izumi, H. k. Sakabe, S. F. Haque, M. Onoe, T. Makino.

Effect of Environmental Endocrine Disruptors on Cell Proliferation and Estrogen Receptor-Mediated Transcription.

8th World Congress of

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）  
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）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

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

主任研究者	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）

研究要旨

さい帯や腹水などの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、保存する際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。その結果、腹水採取器具を除いてDEHPのコンタミの心配ない生体試料採取器具および保存容器の設定ができた。

A. 研究目的

本研究班はさい帯や腹水などの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を目的としている。その研究内容に鑑みて、それらの生体試料を採取する際には測定物質等のコンタミ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う。これまではガラス製の採取器具や保存容器は、表 1 に示すように洗剤洗浄、アセトン洗浄、200℃加熱、

清浄域で徐冷等、非常に繁雑な作業でコンタミを低減させて研究に供していた。さらに各共同研究先に貴重な生体試料を送付する際に、保存容器の破損事故もあり、当研究班の研究に支障が出ることも心配されていた。そこで、それらのガラス製の生体試料採取器具や保存容器に代わり、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を開発



することが本研究の目的である。

具体的な生体試料採取器具および保存容器として、表2に示すものを検討した。特に本年は、コンタミの可能性の高いDEHP (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DEHPのコンタミ量を測定し、その影響度を考察した。

## B. 研究方法

### B・1 器具および保存容器の選定方法

#### B・1・1 要求特性

表2に示した生体試料採取器具および保存容器について、それぞれの器具への要求特性を表3に示した。全てのものに共通する要求として、包装から取り出して直ぐ使えること、滅菌済みであること、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、測定物質のコンタミが少ないことが挙げられる。

#### B・1・2 選択方法

内分泌かく乱作用の疑いのある物質のコンタミを低減することが大きな目的であるが、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。また、それらのコンタミを低減するため、原料に意図的に使用されていない、通常の製造過程で残留、生成、混入しないことを考慮した。更に、無意識のコンタミ対策の一つとして、ヒトの手で触れずに大量生産されているものを条件として、使用材料および器具類を選定し

た。

### B・1・3 構成原料の同定方法

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た。製造工程のわからない他社品は、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。測定条件等を表4に示した。

## B・2 DEHP汚染度測定

### B・2・1 測定条件

DEHP測定は、GC/MS (SIM: Selected Ion Monitoring) により行った。測定装置、測定条件等を表5に示した。

### B・2・2 試料調製法

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、生体試料採取方法や保存期間などを考慮せずに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。そこで、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。なお、抽出用のヘキサンは関東化学社製フタル酸エステル試験用 (18041-79) を用いた。

## C. 研究結果

### C・1 設定した器具および保存容器

先に述べた選択方法を基に、表2に示した生体試料採取器具および保存容器の候補器具類を設定し、表6に示した。血液などの採取は、既に臨床使用実績があり、大量生産している既存の医療用具類から選択した。母体血は血

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の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ものの中からコンタミの少ない工程と考えられる Becton Dickinson 社の FALCON ブランドのものを選択した。カタログにより、最大遠心強度は 15mL 品で 3500RCF、50mL 品で 9400RCF であり、通常条件で使用できることを確認した。また、 $-196^{\circ}\text{C}$  ~  $121^{\circ}\text{C}$  の使用温度範囲も確認した。

選択した器具類の構成原料を表 7 に示した。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。結果を図 1 ~ 6 に Sadtler (Bio-Rad 社) の標準スペクトラムと合わせて示した。

腹水採取器具は唯一体内に挿入する器具であり、医療用具となる。医療用具としての製造承認が取得された市販の適当なものが無いため、新たに材料や形状の設定を行った。医療用具としての品質確認や、薬事法上あるいは倫理上問題のない形で設定するための時間が掛かり、本年度中には設定することができなかった。この腹水採取器具については来年度に設定することにした。

#### C・2 DEHP 溶出量測定結果

測定試料調製方法と 2 段階による測定結果を表 8、表 9 に示した。

FALCON はいずれも定量下限の 10ppb 以下であった。注射針とシリンジを接続して実使用と同様にヘキサンを吸引する方法では、1 時間接触で 12ppb、24 時間接触で 32ppb を検出した。採血針も真空採血管にセットし、実採血と同様の方法でヘキサンを吸引し 24 時間室温静置すると定量下限の 10ppb 以下となった。また、注射針と採血針を材質試験の様に全体をヘキサンで 24 時間室温接触抽出すると 23ppb、51ppb が検出され、シリンジ内部にヘキサンを吸引し 24 時間室温放置すると 57ppb が検出された。

なお、定量下限は試薬ブランクを 5 回繰り返して測定し、平均値及び標準偏差を求め、標準偏差  $\sigma$  の 10 倍を定量下限とした<sup>1)</sup>。測定値の  $10\sigma$  が 9.7ppb であったので本研究の定量下限を 10ppb とした。

#### D. 考察

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、採取時にコンタミする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のコンタミ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。

今年度は特にコンタミの心配の高い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。

#### E. 結論

さい帯など生体試料中の内分泌かく乱作用の疑いのある物質の暴露量測定をする当研究班の研究内容に対応する生体試料採取器具と保存容器の設定を行った。その結果、腹水採取器具を除いて要求事項を満たし、DEHPのコンタミ影響のないことが確認できた。

次年度は、設定した生体試料採取器具および保存容器が、DEHP以外の

内分泌かく乱化学作用の疑いのある物質の影響度を検討することが、腹水採取器具の設定と同時に必要である。

#### F. 文献

1) 日本工業標準調査会：排ガス中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定法、JIS K0311、p. 39 (1999)

表1 ガラス製器具類の洗浄方法

手順	方 法
1	洗剤 (Extran MA 01*5%溶液) に一晚以上漬け置き、そのまま超音波洗浄
2	脱塩水で洗浄および超音波洗浄
3	アセトン洗浄
4	超純水で置換、乾燥後アルミホイルで巻く
5	200℃2時間加熱
6	清浄域で放冷後、蓋をする

\* Merck 社製

表2 生体試料採取器具および保存容器

NO	用具・容器
1	さい帯保存容器
2	さい帯血採取器具
3	さい帯血保存容器
4	母体血採取器具
5	母体血保存容器
6	母乳保存器具
7	腹水採取器具
8	腹水保存容器

表3 生体試料採取器具および保存容器

用具・容器	要 求 事 項
さい帯保存容器	凍結保存、遠心分離可能なこと
さい帯血採取器具	市販の針付シリンジと同等機能を有すること
さい帯血保存容器	凍結保存、遠心分離可能なこと
母体血採取器具	市販の採血器具同等機能を有すること
母体血保存容器	凍結保存、遠心分離可能なこと
母乳保存器具	広口で、凍結保存できること
腹水採取器具	φ2.5mm×30cmの採取中空棒とシリンジを組み合わせる
腹水保存容器	凍結保存、遠心分離可能なこと

表4 赤外吸収スペクトル (FT-IR) 法の測定条件

項目	測定条件
測定装置	日本分光製 顕微専用装置 Janssen
分解能	4cm <sup>-1</sup>
測定法	透過法
積算回数	16回
標準スペクトラム	Bio-Rad社 Sadtler スペクトラム集

表5 GC/MS(SIM)法によるDEHP測定条件

項目	測定条件
測定装置 MS	日本電子製 Automass20
検出方法	選択イオン検出法(SIM)
イオン源及びインターフェイス温度	200°C、250°C
イオン化及びイオン化電圧	EI、70eV
モニターイオン	149
測定装置 GC	HP製 HP5890 SERIES II
カラム	J&W製 DB-5MS (0.25mm×30m, df0.25um)
カラム温度	50°C(1min)-20°C/min-280°C(10min)
注入口温度	220°C
注入法	スプリットレス
注入量	2μL
キャリアガス	ヘリウム 1.2mL/min

表6 生体試料採取器具および保存容器の候補用具

用具類	候補用具	品番
さい帯保存容器	FALCON 225mL ジャンボコニカルチューブ	2075
さい帯血採取器具	テルモ注射針 18G	NN-1838R
	テルモシリンジ 50mL	SS-50ESZ
さい帯血保存容器	FALCON 50mL コニカルチューブ	2070
母体血採取器具	テルモ採血針 21G	MN-2138MS
	ベノジェクトII 真空採血管(プレイン)	VP-P070
母体血保存容器	FALCON 15mL コニカルチューブ	2196
母乳保存器具	FALCON 225mL ジャンボコニカルチューブ	2075
	FALCON 50mL コニカルチューブ	2070
腹水採取器具	設定中	—
腹水保存容器	FALCON 225mL ジャンボコニカルチューブ	2075

表7 候補用具の構成原料

用具名	原料名
FALCON 225mL ジャンボコニカルチューブ	蓋：高密度ポリエチレン 本体：ポリプロピレン
FALCON 50mL コニカルチューブ	
FALCON 15mL コニカルチューブ	
テルモ注射針 18G	針：ステンレス+シリコーンコート 針基：ポリプロピレン
テルモシリンジ 50mL	外筒：ポリプロピレン ガasket：エラストマー 内表面シリコーンコート
テルモ採血針 21G	針：ステンレス+シリコーンコート
ベノジェクトII 真空採血管(プレイン)	本体：PET樹脂 蓋フィルム：ポリエチレン

表8 医療用具単独からのDEHP溶出測定結果

医療用具名	抽出条件	結果
テルモ注射針 18G	1個/10mL ヘキサン 24h 室温抽出	23ppb
テルモシリンジ 50mL	内部を30mL ヘキサン 24h 室温抽出	57ppb
テルモ採血針 21G	1個/10mL ヘキサン 24h 室温抽出	51ppb
真空採血管	内部をヘキサンで満たし 24h 室温抽出	<10ppb

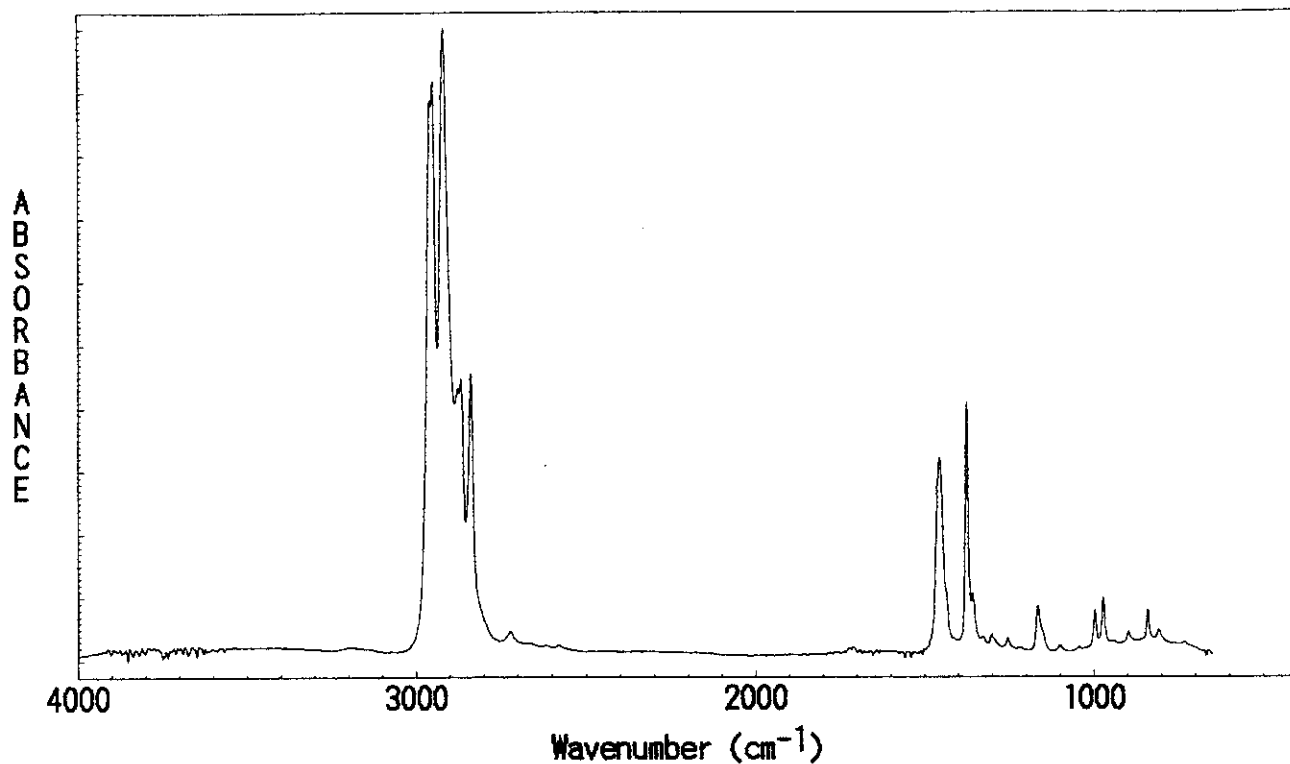
測定：神奈川県衛生研究所、測定方法：GC/MS(SIM)、定量下限：10ppb

表9 候補用具からの実使用条件下でのDEHP溶出測定結果

用具名	抽出条件	結果
FALCON 225mL 本体	内部をヘキサンで満たし 24h 室温抽出	<10ppb
FALCON 225mL 蓋	内部をヘキサンで満たし 24h 室温抽出	<10ppb
FALCON 15mL 本体	内部をヘキサンで満たし 24h 室温抽出	<10ppb
18G テルモ注射針 +50mL テルモシリンジ	ヘキサンを規定量吸い込み 1h 室温抽出	12ppb
18G テルモ注射針 +50mL テルモシリンジ	ヘキサンを規定量吸い込み 24h 室温抽出	32ppb
21G テルモ採血針 +真空採血管	採血と同様手技で採血管内部にヘキサンを 満たし 24h 室温抽出	<10ppb

測定：神奈川県衛生研究所、測定方法：GC/MS(SIM)、定量下限：10ppb

図1 FALCON 15mL 容器本体のFT-IR スペクトラム



BP133

POLY(PROPYLENE), ISOTACTIC

Copyright © 1980, 1981-1993 Bio-Rad, Sadtler Division. All Rights Reserved.

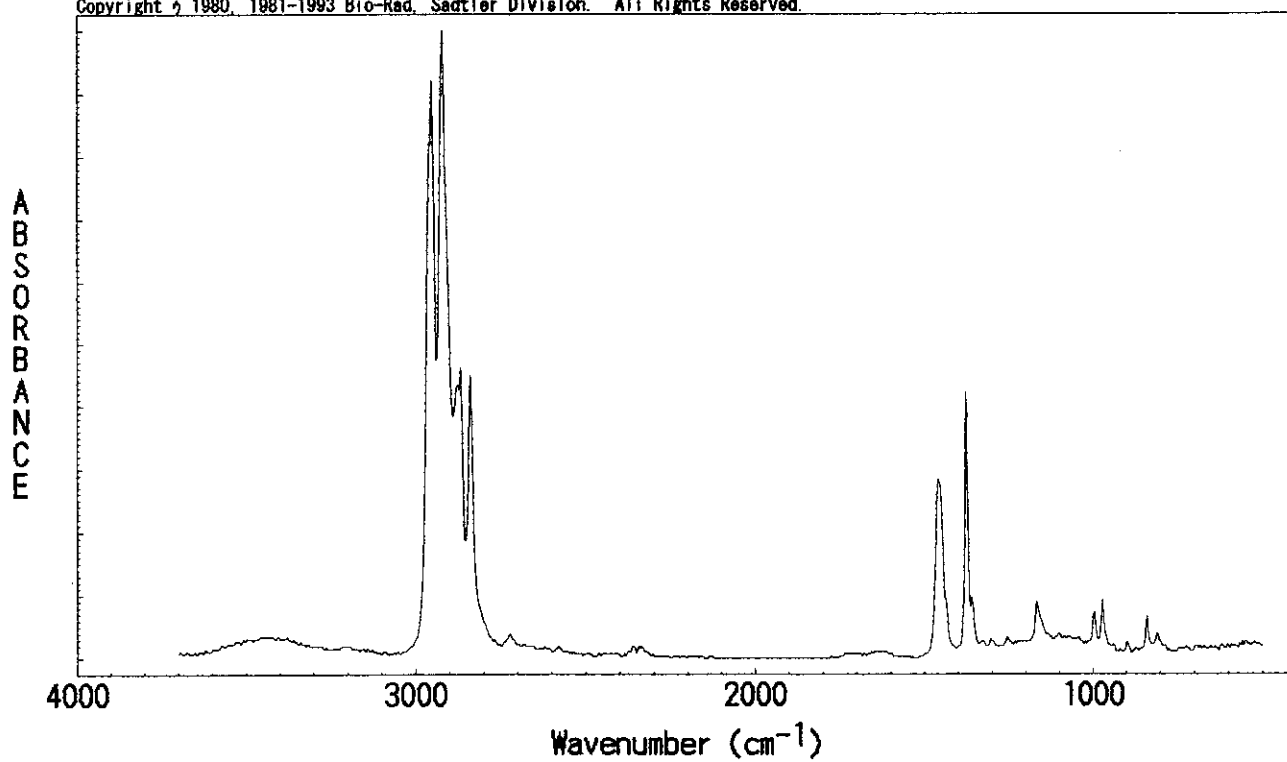
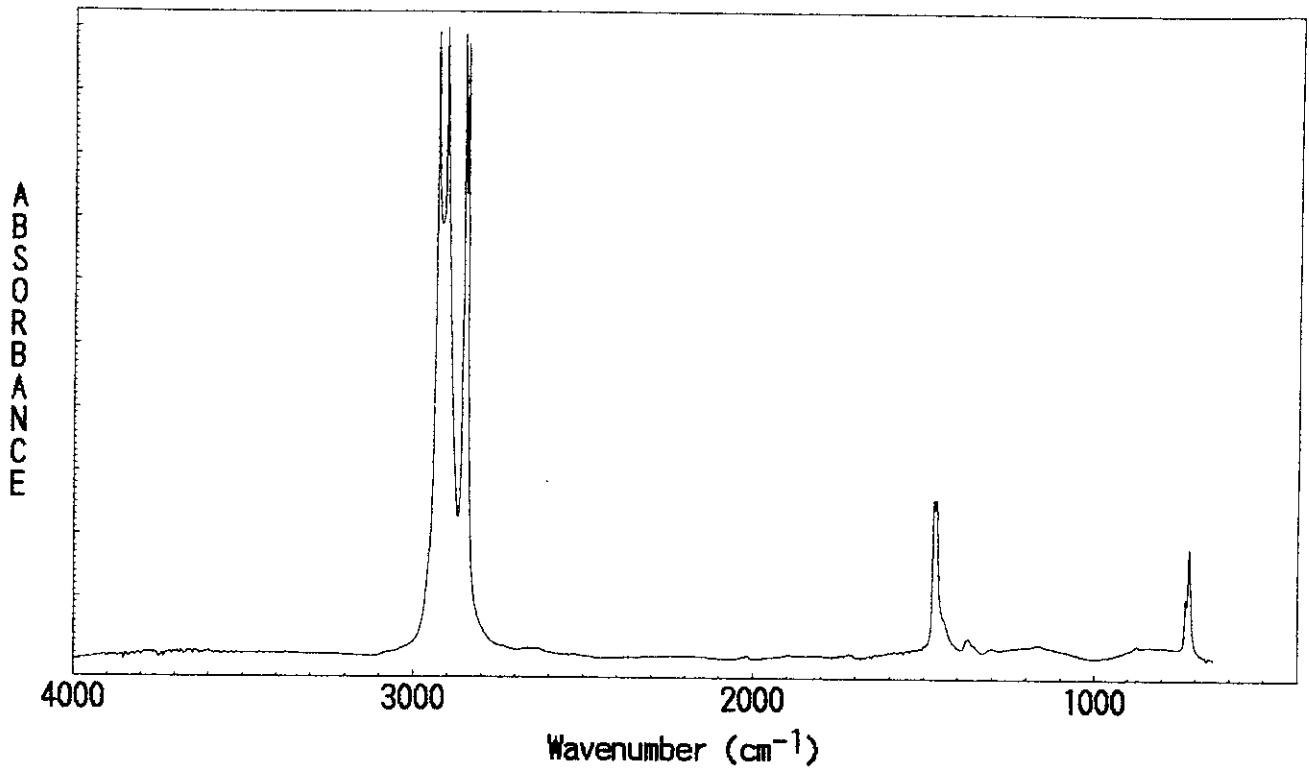


図2 FALCON 15mL 容器蓋のFT-IR スペクトラム



BP95

POLY(ETHYLENE)\*HIGH DENSITY

Copyright © 1980, 1981-1993 Bio-Rad, Sadtler Division. All Rights Reserved.

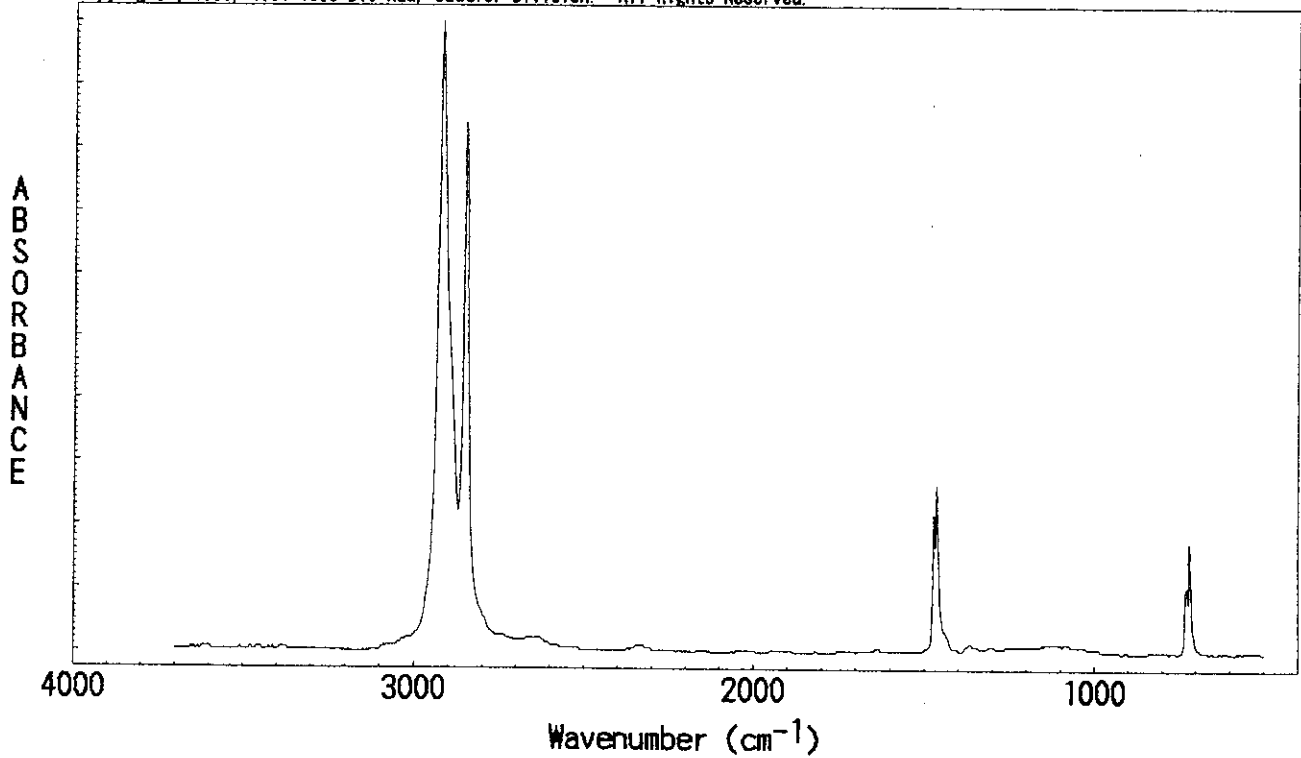
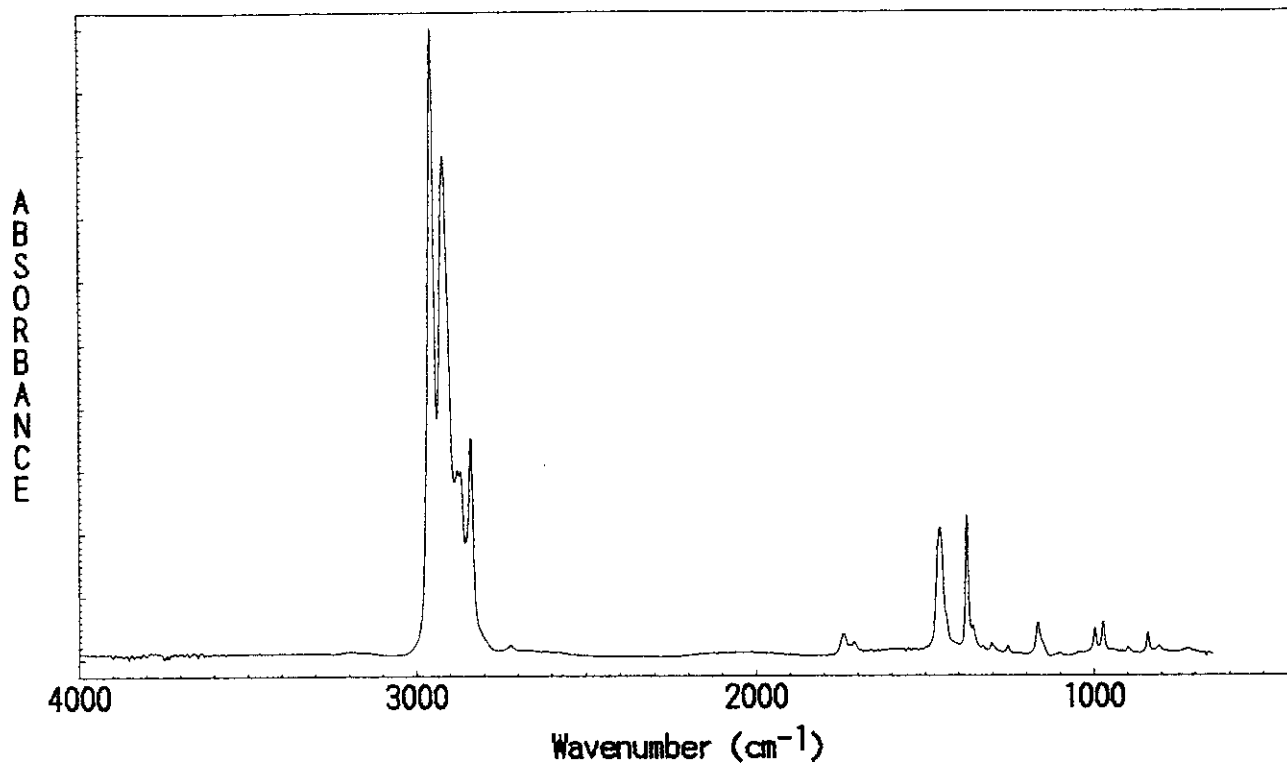




図3 FALCON 50mL 容器本体のFT-IR スペクトラム



BP133

POLY(PROPYLENE), ISOTACTIC

Copyright © 1980, 1981-1993 Bio-Rad, Sadtler Division. All Rights Reserved.

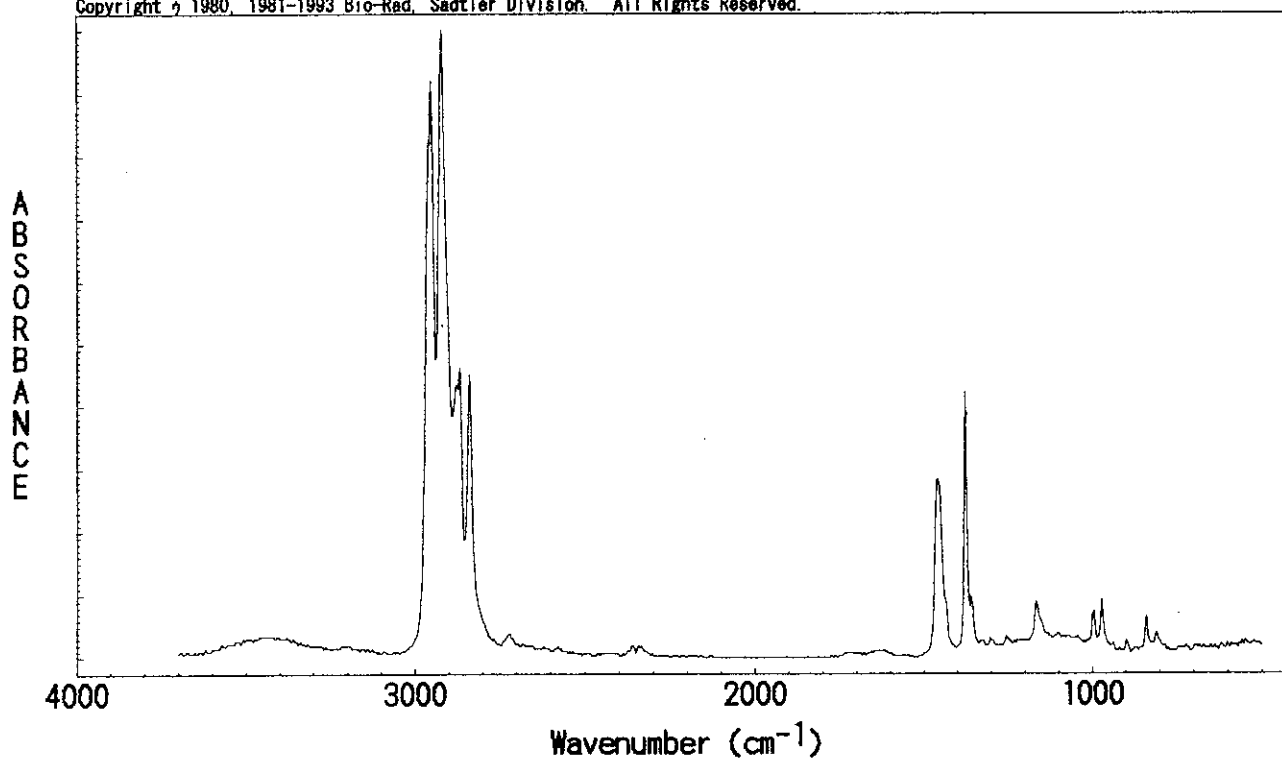
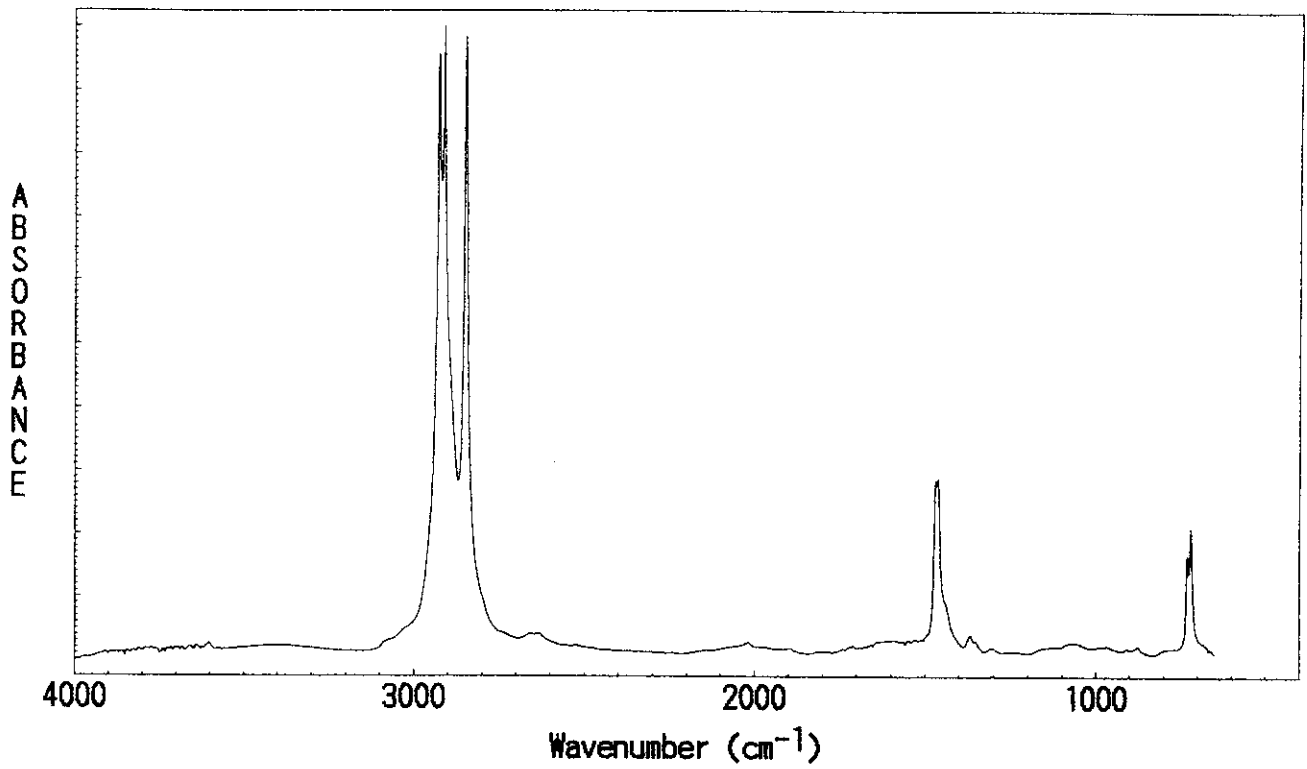


図4 FALCON 50mL 容器蓋のFT-IR スペクトラム



BP95

POLY(ETHYLENE)\*HIGH DENSITY

Copyright © 1980, 1981-1993 Bio-Rad, Sadtler Division. All Rights Reserved.

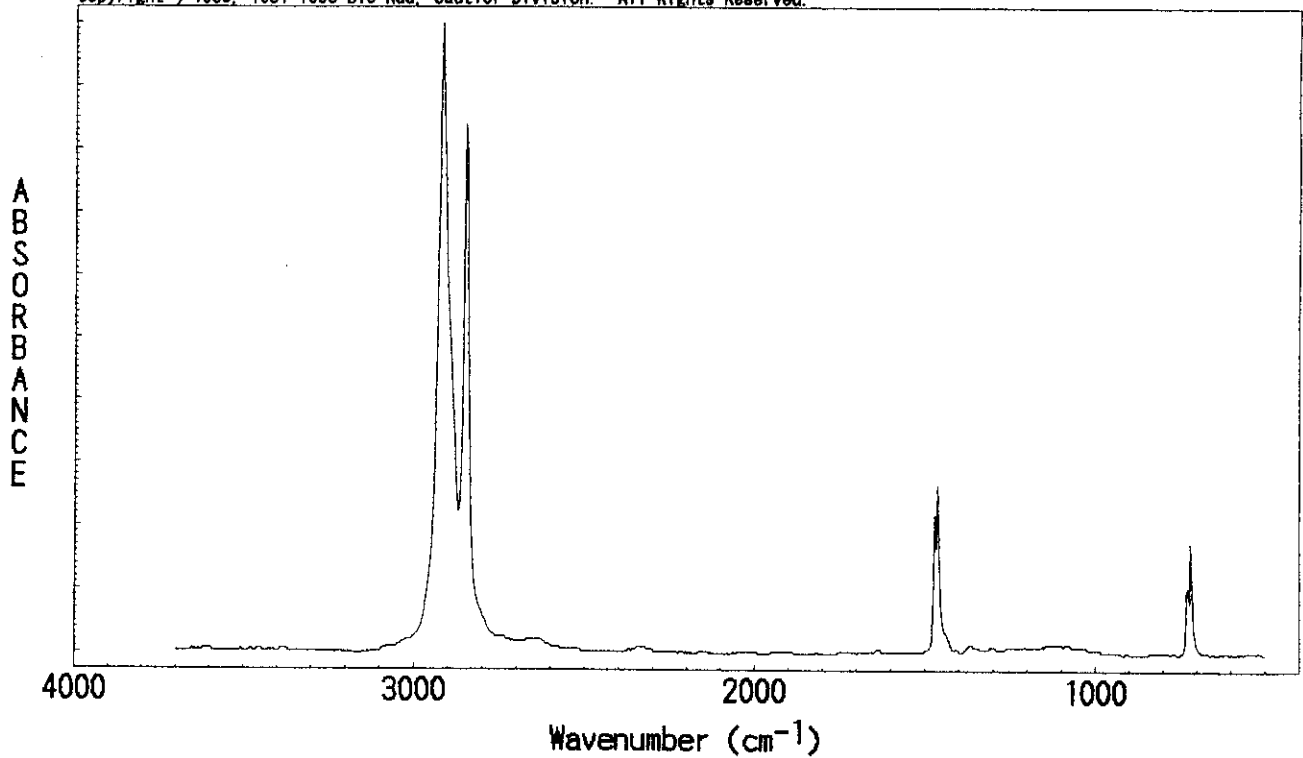
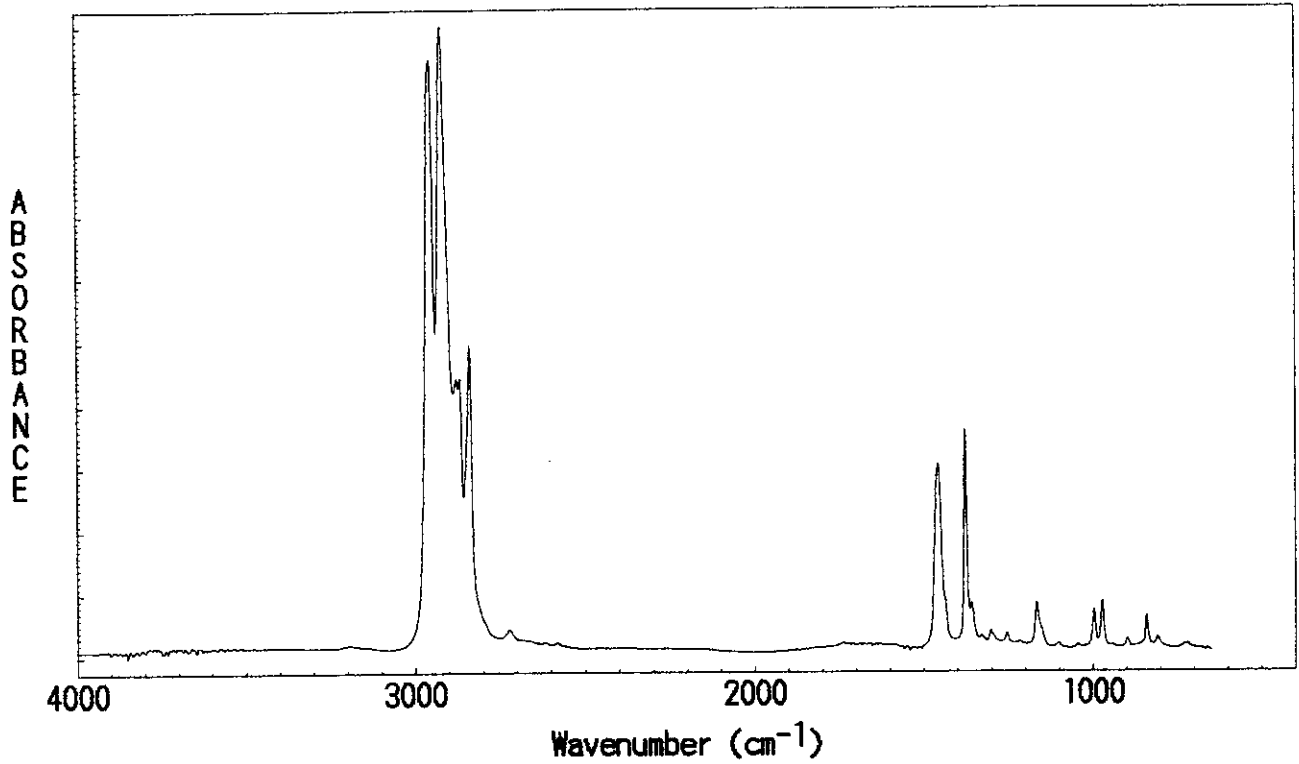


図5 FALCON 225mL 容器本体のFT-IR スペクトラム



BP133

POLY(PROPYLENE), ISOTACTIC

Copyright © 1980, 1981-1993 Bio-Rad, Sadtler Division. All Rights Reserved.

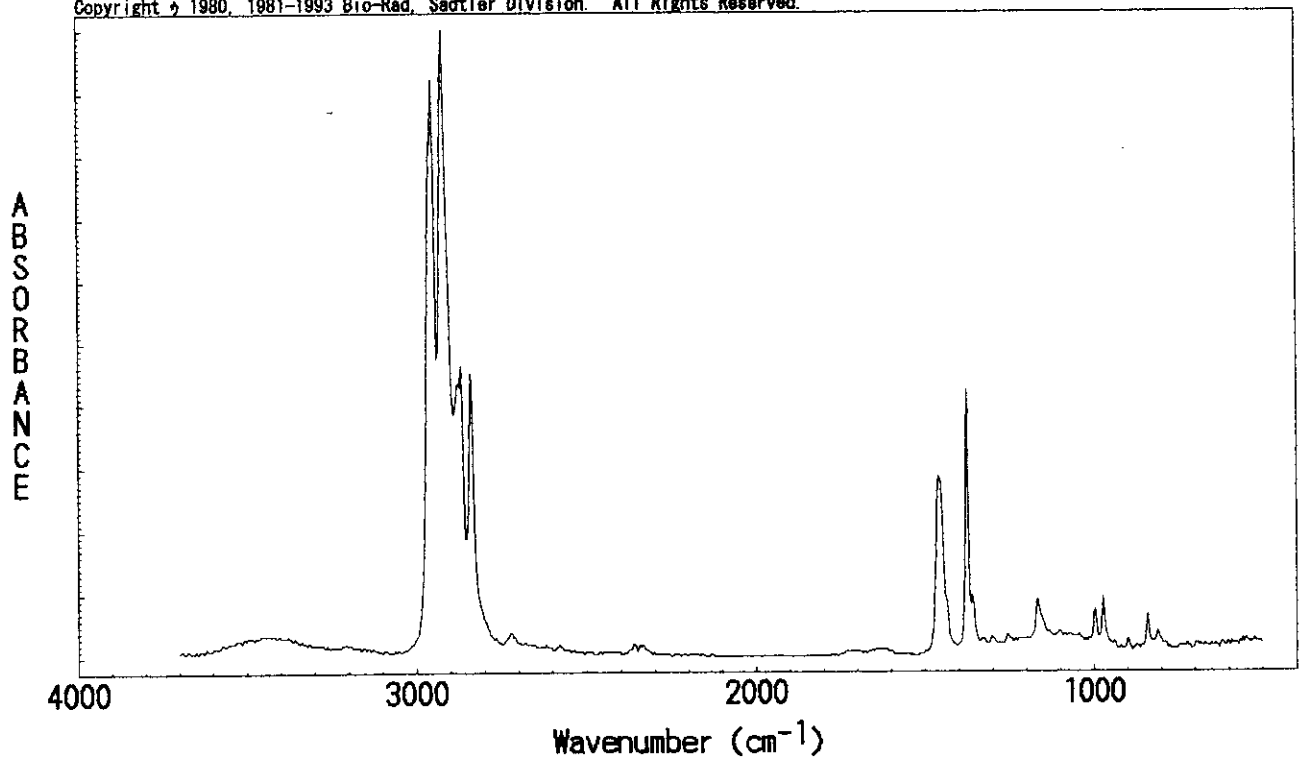
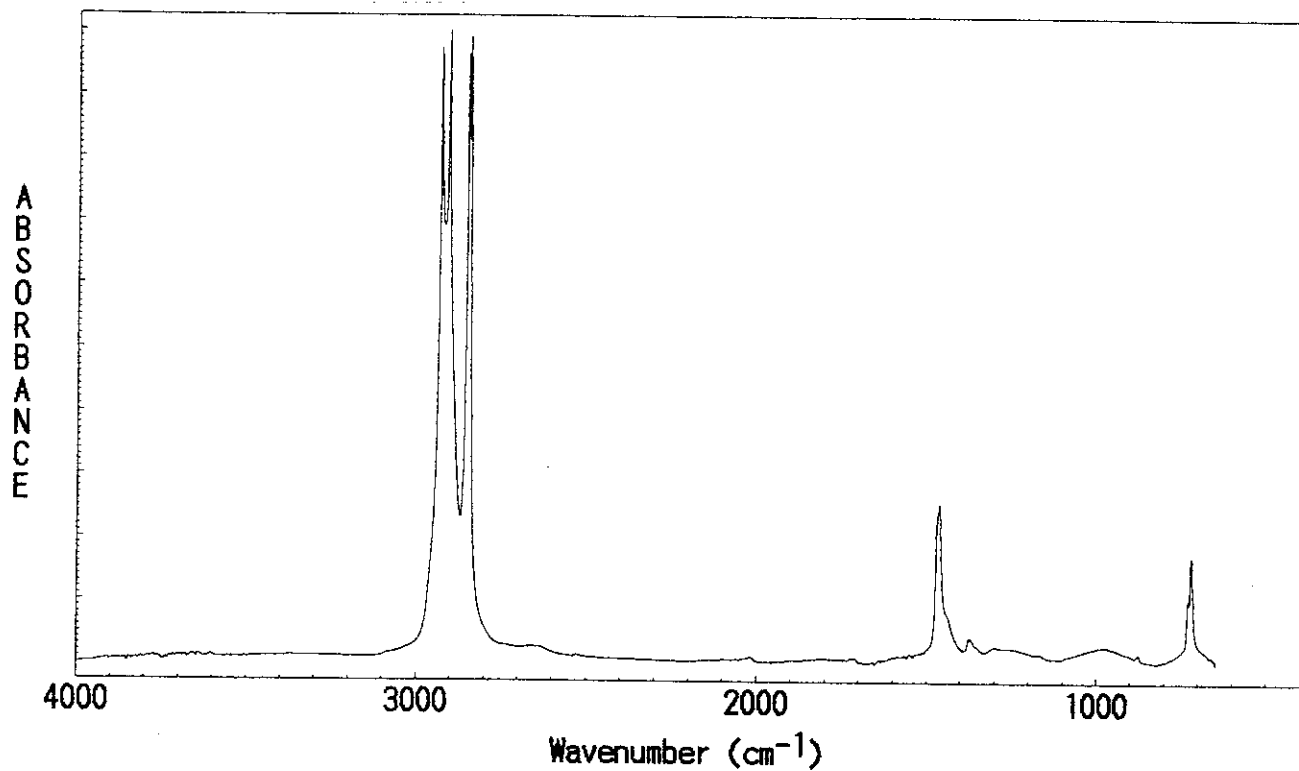


図6 FALCON 225mL 容器蓋のFT-IR スペクトラム



BP95

POLY(ETHYLENE)\*HIGH DENSITY

Copyright © 1980, 1981-1993 Bio-Rad, Sadtler Division. All Rights Reserved.

