

厚生化学研究研究費補助金

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

平成13年度 総括・分担研究報告書

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

I. 総括研究報告

- 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)

II. 分担研究報告

1. 内分泌かく乱物質の作用様式の多様性について 27
- 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
村野 孝代 東海大学
2. 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 33
- 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)
3. LC-MS による生体試料中のノニルフェノール、オクチルフェノールの分析 37
- 分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生院研究所
研究協力者 丹野瑳喜子 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
4. ヒト生体試料中多環芳香族炭化水素類 (PAHs) 及びその代謝物に関する分析法開発 45
- 分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学
研究協力者 早川 和一 金沢大学
鳥羽 陽 金沢大学

5. ヒト生体試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテルの分析	55
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
阿久津和彦	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
6. 母乳中ビスフェノール A の高感度 HPLC- 蛍光定量法の開発とその胎児・乳児暴露量の 総合評価への適用	65
分担研究者 中澤 裕之	星薬科大学
研究協力者 中島憲一郎	長崎大学
黒田 直敬	長崎大学
7. 『子宮内膜症患者のさい帯血、腹水等における内分泌かく乱物質の実測定と その精度管理に関する研究』 －成人血中のクロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼンの分析－	69
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
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
8. パラベン類によるヒト暴露の研究	85
分担研究者 織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所
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
9. 生体試料中のブチルスズ化合物の分析法に関する研究	95
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
藤巻 照久	神奈川県衛生研究所
渡邊 裕子	神奈川県衛生研究所

10. 経口免疫寛容への有機スズ化合物の影響ー抗体産出能への影響	107
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	
藤巻 照久 神奈川県衛生研究所	
渡邊 裕子 神奈川県衛生研究所	
11. 生体試料（さい帯血等）における内分泌かく乱化学物質、内分泌かく乱作用を含む 重金属類の暴露状況の調査及びヒト健康影響に関する研究	115
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	
12. アジピン酸ジエチルヘキシルの生体影響について	119
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	
13. 医療用ポリ塩化ビニル製樹脂に含まれる可塑剤 Di(2-ethylhexyl)phthalate の 生殖系への影響	125
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学	
研究協力者 小林 直 星薬科大学	
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	
14. ステロイドホルモン産出に及ぼす有機スズ化合物のリスク評価 （副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール産出及び精巣ライディッヒ細胞の テストステロン産出に及ぼす影響）	139
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学	
研究協力者 中陳 静夫 星薬科大学	
15. 習慣流産患者における内分泌かく乱物質	155
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	

16. 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	161
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	
17. 生体試料採取に関する報告（周産期関連）	165
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	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	171
IV. 研究成果の刊行物・別刷	175

平成 13 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）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. 分析法開発と実試料分析

ディスポーザブル腹水採取器具の開発

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場合、まず採取保存の際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がない Di-2-ethylhexyl phthalate(DEHP) 測定に適したプラスチック製ディスポーザブル腹水採取器具を開発した。

ノニルフェノール(NP)及びオクチルフェノール(OP)の分析法開発と生体試料の測定

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、腹水及び尿中のノニルフェノール(NP)及びオクチルフェノール(OP)の分析法を検討した。分析に供したさい帯血、母体血、腹水及び尿、計 35 検体中の NP, OP 濃度はいずれも検出限界(0.1-1.0ng/mL)以下であった。またボランティアに 4-*t*-OP 及び 4-NP を経口負荷して体内動態を追跡したところ、4-*t*-OP 及び 4-NP は速やかに尿中に排泄され、そのほとんどが抱合体であった。

多環芳香族炭化水素類(PAHs)及びその代謝物のヒト生体試料における分析

多環芳香族炭化水素類(PAHs)の代謝物の中でエストロゲン様活性の強い 2-ヒドロキシフルオレン(2-OHF)の HPLC-蛍光検出法による分析法を開発した。また、従来から PAHs 曝露の指標として用いられてきた 1-OHP も同時に測定した。その結果、エストロゲン様活性を有する 2-OHF を健康人の尿中から検出した。また両化合物とも喫煙者で尿中濃度が有意に高く、PAH 曝露の有用な指標になる。更に、毛髪や母乳中の PAHs の測定法を開発した。毛髪中 PAHs について、喫煙との関連は認められなかったものの、長期的な曝露指標となりうる。以上から、PAHs の摂取により、抗エストロゲン、抗アンドロゲン様作用を有する PAHs が毛髪や母乳中に蓄積され、また同時に生体内でエストロゲン様活性を有する代謝物が生成され尿に排泄されていることが明らかとなった。

ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)のヒト生体試料分析

GC/HRMS を用いるヒト生体試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)の高精度分析法を開発し、母乳 13 検体を分析した。全ての試料から 2,2',4,4'-テトラブロモジフェニルエーテル(BDE-47)をはじめとする 7 種類の PBDEs(BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183)が、一部の試料から 6 種類の PBDEs(BDE-37, 66, 75, 85, 77, 138)が検出された。母乳 12 検体については脂肪あたり数 ppb レベルの PBDEs 濃度であったが、1 検体は高い PBDEs 濃度(291ppb)であった。大阪府下で採取された母乳のプール脂肪 8 検体を分析し、PBDEs 濃度が 1973-88 年度にかけて上昇(ND-1.6 ppb)し、その後は概ね 1-2ppb 程度であることが明らかになった。

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン(HCB)の人体暴露の分析

一般成人を対象としてクロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン(HCB)の人体暴露量調査を実施し、その血清中濃度と食事嗜好、住環境との関連性を調査した。一般成人 189 人からの血清分析により、93.7%の人から *trans*-ノナクロル(0.03-1.65 ppb)が、90.5%から HCB(0.02-2.20 ppb)が、また、43.4%からは *cis*-ノナクロル(0.03-0.44 ppb)が検出された。検出された化学物質のうち *trans*-ノナクロル濃度は、年齢、性別及び魚介類の摂食頻度との、HCB 濃度は、年齢との関連性が示唆された。

母乳中ビスフェノール A (BPA) の高感度 HPLC-蛍光定量法の開発

乳試料中ビスフェノール A (BPA) の高感度定量法の開発を行った。BPA の蛍光標識には DIB-Cl を使用し、カラムスイッチング HPLC-蛍光検出法による分離・検出を行った。前処理法として前年度までに確立した液液抽出法を用いて市販乳製品中 BPA を定量した。一方、母乳試料に関しては、蛍光標識反応を阻害する成分の存在が示唆されたことから、新たな前処理法を検討、確立し母乳試料中 BPA の濃度を明らかにした。

パラベン類によるヒト暴露の研究

パラベン類が臍帯血から検出された要因について医療用品を対象に検討した。その結果、数点の医薬品にパラベン類が使用されており 1 回の摂取量は 4~20mg であった。浣腸剤をラットに用いた実験ではメチルパラベンが 6 種のパラベン類の中でもっとも分解が遅いことが判明し、また、局部麻酔剤をラットに用いた実験ではメチルパラベンの半減期が 8.5 分であることが判明した。また、ヒト生体内でのパラベン類の消長をヒト尿試料を用いて検討した。

ブチルスズ化合物の生体試料分析に関する研究

トリブチルスズ化合物及びその分解代謝物（以下、ブチルスズ化合物）の人体暴露量の調査を目的として、毛髪及び妊婦生体試料を対象とした分析法の検討を行った。内標準物質としてトリブチルスズ化合物を使用し、ガスクロマトグラフ誘導結合プラズマ分析計 (GC/ICP-MS) で測定をし、毛髪分析から生体暴露が認められた。また、妊婦の生体試料分析から母体側から胎児側に胎盤を通してブチルスズ化合物移行の可能性が示唆され、母乳からの暴露の可能性も示唆された。

2. 生体への影響と作用機序

有機スズ化合物の経口免疫寛容への影響

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の環境汚染レベルにおける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経口免疫寛容における抗体産生能への影響を検討した。有機スズ化合物の、TBTC (塩化トリブチルスズ) と DBTC (二塩化ジブチルスズ) については影響が示唆された。

重金属類の母胎への暴露調査及び細胞損傷影響

絨毛、羊水、さい帯血等の試料から、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* 細胞反応を生体内高分子物質 (DNA、タンパク質) 損傷や活性酸素の影響の指標となる各種マーカー (SOD 活性、カタラーゼ活性、8-oxo-deoxyguanosine 量等) について測定を行い、これらがヒト健康に及ぼす影響の作用機序の一つと考えられた。

アジピン酸ジエチルヘキシルの生体影響について

塩化ビニル製プラスチック製品の可塑剤として用いられてきたフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) が一部規制され、その代替化学物質のひとつであるアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA) の内分泌かく乱作用など生体影響について調べた。その結果、DEHA には、*in vitro* の研究よりエストロゲン様作用が検出され、*in vivo* ではフタル酸エステル類と同様に精巣毒性さらに免疫系に影響を及ぼす可能性があると考えられた。

Di (2-ethylhexyl) phthalate の生殖系への影響

ポリ塩化ビニル製樹脂 (PVC) 製医療用具には様々の添加剤が用いられ、特に Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) は、可塑剤として汎用されてきた。本研究では PVC の安全性評価を目的に、DEHP の医療行為からの暴露を想定した生殖系への影響を検討した。投与は、DEHP 0.2 (Low-dose 群)、20 (Middle-dose 群)、200 (High-dose 群) mg/kg/day 及び 0.2% EtOH 生理食塩液 (Control 群) を成熟期及び妊娠期マウス尾静脈に投与した。DEHP は精巣の精母細胞に影響を及ぼすことより、精子形成を阻害すると推測された。この障害は Low-dose 群では一時的な影響であるが、Middle-dose 及び High-dose 群のような高濃度 DEHP は、精細管内の幹細胞にも影響し、精巣機能を障害することが推測された。妊娠中胎児の精巣器官形成期に DEHP に暴露された場合には、次世代の雄性生殖に影響を及ぼす事が観察された。この影響は性成熟する生後 9 週においても観察されたことより、生殖能に影響を与えることが推測された。

有機スズ化合物のステロイドホルモン産生に及ぼすリスクについて

内分泌かく乱化学物質として有機スズ化合物 (メチルスズ化合物、ブチルスズ化合物、オクチルスズ化合物及びフェニルスズ化合物) 15 種の副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール産生及び精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼす影響を検討した。トリブチルスズオキシド (TBT0)、

トリブチルスズ(TBT)、ジブチルスズ (DBT)及びトリフェニルスズ (TPT)は 0.3 - 1.0 μM の曝露で H295R 細胞の産生するコルチゾール産生を抑制した。このコルチゾール産生の低下は、ステロイド合成酵素である P450c21 や P45011 β の阻害が一因と考えられる。精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生も TBT、DBT 及び TPT の曝露により有意に抑制され、その濃度は更に低く 0.03 μM 程度であった。

習慣流産患者における内分泌かく乱物質

内分泌かく乱物質が生殖機能に与える影響のうち流産について調査した。ポリ塩化ビフェニール (PCB)、DDT は流産、早産をひき起こす危険性が懸念されている。これらの代謝速度は極めて長く、もし流産と関係するならば流産は反復する可能性がある。そこで 3-13 回繰り返す、習慣流産患者の血中濃度を測定し、これらの化学物質が流産の原因となるかを検討した。患者血中の PCB、ヘキサクロロベンゼン(HCB)、DDT の代謝産物 DDE の濃度は対照と比較して高濃度ではなかった。これらの化学物質が同世代において流産をひき起こす危険性は低いと考えられた。

胎児・胎盤特異的遺伝子発現への内分泌かく乱化学物質影響

胎児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る。そこで我々は、化学物質の妊娠期での代謝、および、内分泌かく乱物質による器官形成への影響を明らかにする事を目的とした研究をおこなった。その結果、子宮組織が薬物のバリアーとして機能していることが示唆されるとともに、子宮脱落膜への内分泌かく乱物質の作用が二次的に胎盤形成に影響を及ぼす可能性が示された。

正常子宮内膜間質細胞等を用いた内分泌かく乱化学物質の細胞特異的増殖促進効果

内分泌かく乱物質はエストロゲンレセプターを介し、エストロゲン様細胞増殖作用を持つが、それぞれの物質とエストロゲンレセプターとの親和性は一様ではなく、また一部ではレセプターとの直接的な作用が認められない物質も存在するなど、作用機序には多様性が見られる。エストロゲンレセプターのサブタイプ α 、 β の発現割合は臓器により異なるため、臓器により、これら物質の感受性が異なる可能性も示唆される。そこで今回は、異なる臓器由来のエストロゲンレセプター 発現細胞を用い、E-screen assay (エストロゲン依存性細胞増殖効果の評価) を行い、その効果について比較検討した。その結果、同じエストロゲン発現細胞であっても、物質に対する反応は異なる結果を示し、これら化学物質の生体内での反応の多様性が示唆された。

分担研究者

中澤 裕之	星薬科大学 教授
織田 肇	大阪府立公衆衛生研究所 所長
塩田 邦郎	東京大学農学生命科学 大学院 教授
鈴森 薫	名古屋市立大学 教授

A. 研究目的

1. 分析法開発と実試料分析

ディスポーザブル腹水採取器具の開発

内分泌かく乱化学物質の暴露量測定を行う場合、まず採取保存の際の測定物質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は、煩わしい準備が必要で破損やコンタミの心配もあった。コンタミの心配がなく安全な、Di-2-ethylhexyl phthalate(DEHP)用のプラスチック製ディスポーザブル採取器具および保存容器を開発することを目的とした。

ノニルフェノール(NP)及びオクチルフェノール(OP)の分析法開発と生体試料の測定

ノニルフェノール(NP)、オクチルフェノール(OP)等のアルキルフェノール類には内分泌かく乱作用が疑われている。NPについては平成13年8月、魚類に対して内分泌かく乱作用が認められたと環境省から報告された。河川水や下水処理水中のNP、OPの分析例は数多く報告されているが、生体試料中の分析例は少なく、さい帯血、腹水等の分析は報告されていない。今回、さい帯血、腹水、尿等について、高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC-MS)を用いたNP、OPの代謝体も含めた高感度分析法を検討した。

多環芳香族炭化水素類(PAHs)及びその代謝物のヒト生体試料における分析

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一方、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。また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)の異性体12種のうち、3-OH-BaPがビスフェノールAに匹敵する内分泌かく乱の強さを有してい

た。さらにBaPより大気中で濃度が高く気相中に存在するフルオレンの代謝物である2-ヒドロキシフルオレン(2-OHF)も3-OH-BaPと同等のエストロゲン様活性を有する。このことから、PAHsの内分泌かく乱作用の全容を明らかにするためには、代謝物を含めたホルモン活性PAHs関連化合物の生体試料中濃度のモニタリング法の検討を行った。

平成11、12年度の厚生科学研究において、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。平成13年度は、2-OHFのカラムスイッチングHPLCによる分離分析法を開発した。更に従来からPAHs曝露の指標として用いられてきた1-OHPの分析法も同時に開発し、これらをヒト尿試料に適用し、PAHsの摂取源の一つである喫煙の影響を検討した。また長期曝露及び次世代曝露の評価方法の開発を目的として、毛髪、母乳中PAHsの分析法も開発した。

ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)のヒト生体試料分析

PBDEsは、合成樹脂の難燃剤として広く使用されてきたが、内分泌かく乱作用が疑われ残留性環境汚染物質として注目されている。我国で80年代から累積して約10万トンのPBDEsが消費されてきたが、国内のPBDEs汚染に関する研究報告はわずかで、その実態は明らかではない。本年度は、乳幼児期のPBDEs暴露実態の解明を目的として、母乳中PBDEsの高精度アイソマー分析を行った。

母乳中ビスフェノールA(BPA)の高感度HPLC-蛍光定量法の開発

内分泌かく乱作用が疑われているBPAの高感度定量法としてカラムスイッチングHPLC-蛍光検出法を開発し、同一妊婦より得られた母体血液及び臍帯血中のBPA定量を行い、胎児暴露の

実態調査のためのデータの採取を行ってきた。本研究では、この分析法を用いて市販乳製品中 BPA を定量するとともに、母乳試料のための新たな前処理法を確立し、母乳中 BPA 濃度の測定を行った。

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン(HCB)の人体暴露の分析

クロルデンは、シロアリ等の駆除剤として広く使用されていたが、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、その残留性は極めて強く、さらにその製剤中の不純物であるノナクロル、代謝物であるオキシクロルデンの残留が認められている。一方、我が国では農薬登録はなされていないヘキサクロロベンゼン(HCB)は、環境中から検出されて、塩素系化合物の製造原料中あるいは塩素系農薬中の不純物に由来すると推測されている。

平成10年度及び11年度の研究において、クロルデン関連物質(CLDs)とヘキサクロロベンゼン(HCB)に対する人体暴露量の調査を実施し、その結果血液中の CLDs 濃度と食事嗜好性との間の関連性が示唆される結果を得た。そこで、本年度は更に詳細に調査し、食事嗜好や住環境などの影響について検討を加えた。

パラベン類によるヒト暴露の研究

平成12年度の研究によりパラベン類が臍帯血、妊産婦母体血、母乳等から検出された。パラベン類の代謝時間を考えて出産直前にパラベン類の暴露があったと想定し、産院で使用される医薬品を中心としたパラベン類の摂取と代謝に関する検討を行った。

ブチルスズ化合物の生体試料分析に関する研究

内分泌かく乱物質として注目されているトリブチルスズ化合物(TBT)は船底防汚塗料や漁網防汚剤として長年使用されてきたが、法的規制

によって日本近海的环境レベルは横ばいまたは減少傾向にある。しかし、水生生物への毒性が強く、海産魚介類を多く摂取している我国としてはその人体曝露量の評価が求められている。そこでヒト毛髪、臍帯、母体血、臍帯血及び母乳を対象とし、ヒトの体内に残留するトリブチルスズ化合物及びその分解代謝物(以下、ブチルスズ化合物)を分析、検討した。

2. 生体への影響と作用機序

有機スズ化合物の経口免疫寛容への影響

我々はこれまでマウスを用い、ジブチルスズが抗原の経口感作による抗体産生を増強すること、また経口免疫寛容を誘導した末梢リンパ節細胞の増殖応答を増強することを明らかにした。そこで、本研究では経口免疫寛容を誘導したマウス抗体産生能および脾臓細胞の応答へのジブチルスズおよびトリブチルスズの経口免疫寛容に対する影響を明らかにすることを目的とした。

重金属類の母胎への暴露調査及び細胞損傷影響

環境中に存在する化学物質のうち重金属類のいくつかは内分泌かく乱作用が知られている。今回、母体末梢血と胎児さい帯血の重金属類の濃度について調査するとともに、生体内高分子物質(DNA、タンパク質)の損傷や活性酸素の影響の指標となる各種マーカーを測定し、これらと重金属類の暴露状況の相関を明らかにする目的で解析を実施した。

アジピン酸ジエチルヘキシルの生体影響について

塩化ビニル製プラスチック製品の可塑剤として用いられてきた DEHP が一部規制され、その代替化学物質が色々と使用されるようになった。そこで、食品用塩ビ製手袋や塩ビ製おもちゃなどに多く用いられるようになったアジピン酸ジ

-2-エチルヘキシル (DEHA) の内分泌かく乱作用など生体影響について調べた。

DEHP の生殖系への影響

可塑剤はその利便性から、プラスチック添加剤として最も多く利用されているが、特にフタル酸エステル類の使用が最も高く、DEHP は全可塑剤生産量の約 50% 以上を占めている。しかしこのエステル類は、生殖・発生毒性を引き起こすことが明らかとされており、2000 年 6 月、厚生省は DEHP を含む調理用 PVC 製手袋の使用を自粛するよう指導し、2001 年 7 月には PVC 製玩具への DEHP 及びフタル酸ジイソノニル (DINP) の使用を禁止した。一方、医療分野では PVC は輸血セット、血液バッグ、人工心肺、人工腎臓用の血液回路等として幅広く使用されているが、PVC 製の血液バッグから溶出したフタル酸エステル類の影響が問題となる。そこで、PVC 製医療用具の安全性評価を目的に、可塑剤として多く添加されている DEHP の医療行為からの暴露を前提とした生体影響評価を行った。はじめに、輸液や成分献血等の医療行為から DEHP が暴露することを想定し、DEHP の性成熟期雄性マウス投与における精巣への影響について検討した。更に、化学物質の感受性が高いと考えられる妊娠期投与による次世代への影響についても検討した。

有機スズ化合物のステロイドホルモン産生に及ぼすリスクについて

有機スズ化合物は船底塗料や漁網の防汚剤として永年世界中で広く使用されてきたが、海洋生物に対する悪影響から、1987 年以降使用が制限された。しかし、極めて低濃度汚染にも関わらず、生物濃縮等により今なお高濃度の有機スズ化合物が海洋生物に蓄積していることが報告されている。一方、有機スズ化合物の海洋生物に及ぼす影響で良く知られているのは、沿岸に

生息する雌の巻き貝の生殖器異常（インボセックス、imposex）で、哺乳類に対してはステロイドホルモンの産生に関する異常が考えられる。本研究では、ステロイドホルモン産生に及ぼす有機スズの影響を検討する目的で、15 種の有機スズ化合物を取り上げ、ヒト副腎 H295R 細胞のコレステロール産生及びブタ精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼす影響を検討した。

習慣流産患者における内分泌かく乱物質

ポリ塩化ビフェニール (PCB) は過去にヒトの散発性流産との関係が報告され、ヘキサクロロベンゼン (HCB)、DDT の代謝産物である DDE についても 1980 年代に流産に関する報告がなされた。しかしこれらの化学物質が流産と関係するかどうかは結論が得られていない。PCB、HCB、DDE は代謝されにくいいため、もしこれらの物質が流産と関係するならば反復する可能性がある。そこで習慣流産患者におけるこれらの物質の濃度を測定して、流産の原因であり得るかを検討した。また、これらの物質は甲状腺機能低下、プロラクチン分泌促進、免疫機能異常との関係を指摘されているため、各物質のこれらの影響についても解析した。また、同一検体の母体、臍帯、羊水について PCB、HCB、DDE、BPA を測定し、妊娠中の動態についても検討した。

胎児・胎盤特異的遺伝子発現への内分泌かく乱化学物質影響

薬物は、体内に取り込まれた後、主に肝臓で様々な代謝を経て排泄される。胎児期におけ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は、母体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が必要である。本年度は、胎児への最も重要なバリエーと考えられる子宮・胎

盤組織や、生殖巣での化学物質の代謝と動態の解析に着手した。また、ベンゾ [a] ピレン (以下、BaP) を例に取り、胎盤形成におよぼす影響を in vivo、in vitro の両面の解析から検討した。

正常子宮内膜間質細胞等を用いた内分泌かく乱化学物質の細胞特異的増殖促進効果

内分泌かく乱化学物質は多数報告されているが、その作用機序については十分に解明されていない。代表的な内分泌かく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、および、正常子宮内膜間質細胞に対しても、同様の手法を用い、それぞれの物質投与時の細胞増殖促進効果について比較検討し、作用機序解明の端緒とした。

B. 研究方法

1. 分析法開発と実試料分析

ディスポーザブル腹水採取器具の開発

腹水採取器具は、婦人の腹部に設けられた検査用の孔に硬質のパイプを挿入し、それと柔軟チューブで接続したシリンジで吸引して腹水を採取する。それらの要求事項をまとめ、体内に挿入される部分は医療用具と同等の安全性が必要と考え、ガイドライン試験を参考に試験を行う。DEHP 汚染度測定は、実際の腹水採取方法を考慮した方法で測定試料を調製し、GC/MS (SIM: Selected Ion Monitoring) により測定した。

ノニルフェノール (NP) 及びオクチルフェノール (OP) の分析法開発と生体試料の測定

B. 1 試料及び試薬

さい帯血、母体血及び腹水は東海大学病院から提供されたものを用いた。採取した血液試料

は血清に調製後、腹水も測定するまで -30°C で保存した。尿は埼玉県衛生研究所職員から採取し -20°C で保存した。アルキルフェノール類の標準品は環境分析用試薬を、 β -グルクロニダーゼは SIGMA 社製 Type H-2 を用いて、メタノールに溶解して標準原液を調製した ISOLUTE Multimode カートリッジ (500 mg): International Sorbent Technology Ltd. 製、カートリッジは予めメタノール 10mL 及び水 5mL の順で洗浄した後使用した。その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を、高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC-MS): Agilent 社製 1100 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、絶対検量線法により検量線を作成した。

B. 2 試験溶液の調製

血清、腹水は試料 1mL にメタノール 3mL を加え 1 分間ミキシング後遠心分離した上清を採り、蒸留水 6mL を加えて前処理カートリッジに負荷した。50%メタノール 3mL で洗浄した後メタノール 6mL で溶出した。溶出液に 0.1M 水酸化カリウム溶液 0.1mL を加えた後、約 0.1mL まで窒素気流下で減圧濃縮し、70%メタノールを用いて 1mL に定容して試験溶液とした。尿試料は 10mL を直接カートリッジに負荷した。

抱合体の前処理法は試料 1mL、尿は試料 10mL に 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) 1mL、NP-d5 2ng、 β -グルクロニダーゼ 20 μL を加え、 37°C 10 時間インキュベートした。その後の操作は遊離体と同様に行い試験溶液を調製した。

多環芳香族炭化水素類 (PAHs) 及びその代謝物のヒト生体試料における分析

試薬、HPLC 条件：試薬は、HPLC 用または特級を使用し、カラムスイッチング HPLC による 2-OHF の分析法と PAHs は分離カラムについては、別項の報告書に詳述した。

試料の前処理：尿は、酢酸緩衝液(pH 5.0)で希釈した後、 β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼでインキュベートし、メタノールで抽出した。毛髪は 2.5M 水酸化ナトリウム水溶液で溶解させ、酢酸エチルで抽出した。母乳はシユウ酸カリウム及びエタノールを加え、ヘキサン/ジエチルエーテル(1/1, v/v)混液で 3 回抽出した。その詳細は別項の報告書に記述した。

ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)のヒト生体試料分析

1999 年度に神奈川県のある大学病院で採取された母乳 10 検体、母血清 1 検体および岡山県下で採取された母乳 3 検体を分析対象とした。母乳試料は予め全量の脂肪を抽出・秤量後、分析した。また、1973～2000 年度に大阪府下で採取・冷凍保存されていた母乳脂肪 8 検体についても分析した。測定は、Hewlett Packard 製 HP5890 series II のガスクロマトグラフと日本電子(株)製の JMS-700 二重収束型高分解能質量分析計を EI モード(分解能 10,000, 10%谷)で使用した(GC/HRMS)。

母乳中ビスフェノール A (BPA) の高感度 HPLC-蛍光定量法の開発

市販乳製品中の BPA 定量には、前年度報告までにしたクロロホルムによる液-液抽出法をそのまま適用した。一方、母乳試料の場合は、まず試料を 10 分間超音波振とう後、0.1 M ホウ酸 Na 緩衝液(pH 11)を加えて *n*-ヘキサンで非極性物質を取り除いた後、水相を市販乳製品と同様の操作でクロロホルム抽出した。以後の蛍光標識操作の詳細は報告書に記述した。BPA の分離検出は、前年度報告した方法に従い、カラムスイッチング HPLC-蛍光検出にて行った。

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン(HCB)の人体暴露の分析

試料は、18 才から 64 才までの成人 189 名(男性 93 名、女性 96 名)からインフォームドコンセントを得た血液試料で、居住環境等についてのアンケート調査を実施した。

標準品は、林純薬工業製、他の試薬は和光純薬製残留農薬分析用を用いた。測定は、昨年度と同様に GC/MS 操作した。

得られた測定結果について、SPSS を用いてカイ二乗検定(Fisher の直接法)及び T 検定(Scheffe test)で統計解析した。

パラベン類によるヒト暴露の研究

産科で一般的に使用される 27 種類の医薬品を、水溶液から直接分取するか、蒸留水溶解して分析試料とした。ワセリン等の含まれる試料はメタノールで溶解後水溶液とし、固相カートリッジに吸着させて精製し、メタノールで溶出して分析試料とした。分析試料は HPLC を用いてパラベン類濃度を測定した。

ヒト尿中にはグルクロン酸抱合体となったパラベン類の存在が考えられ、尿試料を β -グルクロニダーゼ処理後、血液試料と同様な方法で尿中パラベン類濃度を測定した。試料にサロゲート化合物として 3-ヒドロキシ安息香酸 40 ng 及び 25 μ l の塩酸を加え報告書のフローに示した方法で GC/MS で定量した。またドリンク剤 100ml (エチルパラベン 67ppm、ブチルパラベン 43ppm を含む)2 本を飲用後、一定時間おきに尿全量を採取した。経時的に採取した尿試料を用いパラベン類及びパラベン類代謝物(pHBA)濃度を測定した。また、 β -グルクロニダーゼ処理を行わない尿試料の分析を行い、フリーのパラベン類の割合を求めた。さらにブチルパラベン(200ppm)含有浣腸液 2 本(計 60ml)を使用した後、一定時間おきに尿を全量採取した。経時

的に採取した尿試料を用いパラベン類及びパラベン類代謝物(pHBA)の濃度を測定した。また、wister 系ラットを用いて、局部麻酔剤(0.5%キシロカイン:パラベン 840 μ g/ml 含有)とパラベン類6種を含む模擬浣腸液2mlによる、血中のパラベン類及びパラベン代謝物であるpHBAの濃度推移を検討した。

ブチルスズ化合物の生体試料分析に関する研究

インフォームドコンセントのうえ毛髪 57 検体、臍帯 3 検体、母体血 4 検体(全血 3、血清 1)、臍帯血 4 検体(全血 3、血清 1) 及び母乳 3 検体を得た。

標準品および分析装置、条件については、報告書に詳述した。また、検体試料の前処理や試験溶液の調製は前年度と同様である。

2. 生体への影響と作用機序

有機スズ化合物の経口免疫寛容への影響

マウス(C3H/HeN メス 4 週令)に3日間隔で二塩化ジブチルスズ(DBTC)および塩化トリブチルスズ(TBTC)をゾンデで経口(10 回)投与し、20%カゼインを含んだ餌を自由摂取させ、4 週間飼育した。1回投与量はDBTCでは0.1, 1.0, 10.0とし、TBTCは0.2, 20 μ gとした。実験的経口トレランスを破綻するコレラトキシン(CT) 10.0 μ gの影響についても比較した。スズ投与終了後およびその2週間後にカゼイン 100 μ g/匹を腹腔内に免疫した。7 日後に採血を行い、ELISA 法により抗体価を測定し、経口トレランスを誘導した抗原特異的抗体産生への影響を検討した。コントロールとしてカゼインを含まない普通食を用いた。カゼインを免疫10 日後に脾臓細胞を採取し、抗原特異的な増殖応答を H_3 の取り込みおよびMTSアッセイにより測定した。また、DBTC 投与し後のマウス血液および脾臓の、TBT, DBT および MBT の分析を行っ

た。

重金属類の母胎への暴露調査及び細胞損傷影響

母体末梢血及び胎児さい帯血を、0.1N 硝酸で希釈後、ゼーマン原子吸光法で重金属類の測定した。血液中のスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)活性は、ポリアクリルアミド・ゲル-NBT 染色法にて検出後 NIHImage 1.6I で分析した。カタラーゼ活性は、試料に 50mM 過酸化水素水を加え、240nm の吸光度の減少量から活性値(過酸化水素を1分間に1 μ mole 消費する量を1U)を求めた。遺伝子構造(DNA)への直接障害を検出する指標として、DNA中の8-OH-dG分析法を実施した。30 μ gのDNAを、DNAase 処理後ニューロケムにて分析した。タンパク質の酸化の検出は、生体試料をポリアクリルアミド・ゲルにて電気泳動後、DNP法にて分析した。

アジピン酸ジエチルヘキシルの生体影響について

ヒト乳癌細胞株であるT47Dを用いてE-SCREEN Assayを行った。培養液をフェノールレッドフリーDMEMに交換し、各ウェルに被験物質を添加後4日間インキュベートし、WST-1アッセイにより細胞数をカウントした。さらに、胎児期及び授乳期DEHA暴露仔マウスへの影響を検討した。ddYマウスを交配させ、妊娠3.5日目からLow Dose (5mg/kg/day)と、High Dose (50mg/kg/day)でDEHAをコーンオイルに混ぜて経口投与し、出産後21日目まで投与を続けた。投与終了の翌日、仔マウスの体重、生殖器、脾臓、胸腺重量を測定、脾臓と胸腺についてはFACSにてリンパ球サブセットの解析を行った。また、遅延型過敏症反応への影響も検討した：BALB/cマウス(6週齢メス)にLow Dose (10mg/kg/day)とHigh Dose (100mg/kg/day)で5週間DEHAを経口投与し、ヒツジ赤血球を腹

腔内に注射 1 週間後に後ろ足蹠の厚さを測定した後、足蹠にヒツジ赤血球を皮下注射し、24 時間後に足蹠の厚さを測定して足の腫れを算出した。さらに、脾臓、胸腺重量を測定し、FACS にてリンパ球サブセットの解析を行った。

DEHP の生殖系への影響

DEHP 0.2 (Low-dose 群)、20 (Middle-dose 群)、200 (High-dose 群) mg/kg/day 及び 0.2% EtOH 生理食塩液 (Control 群) を尾静脈内投与した。まず、ICR マウス (6 週齢・雄) に DEHP を 3 日間、尾静脈内投与し、最終投与日から 11、29、56 日目に精巣への影響について、精巣重量、精巣内精子頭部数の測定 (SHC) 及び組織切片の観察により、検討した。さらに、自由交配による妊娠マウス (ICR) に DEHP を妊娠成立 11 日目 (膣栓確認日を 0 日とする) から 4 日間、尾静脈内投与し、その後自然分娩させた。出生仔はそのまま哺育させ、仔の離乳にあたる生後 3 週目及び性成熟する生後 9 週目に精巣を摘出し、次世代への影響を検討した。

有機スズ化合物のステロイドホルモン産生に及ぼすリスクについて

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のステロイド産生を誘導する dibutyryl cAMP を加え培養し、培養液中に分泌されたコルチゾールをラジオイムノアッセイ法で測定し、細胞毒性を評価するために、CytoTox96@non-radioactive cytotoxicity assay kit を用いて細胞から逸脱する LDH 活性を測定した。細胞数を測定する簡便な方法として、well 中の付着細胞を SDS、PMSF 等を含む Tris-HCl buffer を用いて溶解し、全蛋白質量を測定した。

また、生後 2 - 3 週齢の幼若ブタより得られる精巣を collagenase / dispase を用いて処理し Percoll® gradient に積層し、ライディット細胞を単離した。得られた細胞のステロイド産生

を誘導する目的で 8Br-cAMP・hCG を加え培養し、分泌されたテストステロンや細胞毒性の評価は、H295R 細胞に準じた。一方、H295R 細胞からミトコンドリア及びミクロソームを調製し、以下の酵素活性を測定した：P450scc (cholesterol 側鎖切断酵素) 活性及び P45011β (11β-hydroxylase) 活性は、各々 [4-¹⁴C] cholesterol 及び [4-¹⁴C] deoxycorticosterone を基質として、3β-hydroxysteroid dehydrogenase type II (3β-HSD II) 活性は [4-¹⁴C] dehydroepiandrosterone を、P450c17 (17α-hydroxylase/C_{17,20}-lyase) 及び P450c21 (21-hydroxylase) 活性は [4-¹⁴C] progesterone を基質として、インキュベーション終了後ステロイドを 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、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。P450scc、P45011β 及び 3β-HSD II 活性は pregnenolone、corticosterone 及び androstenedione の生成量として、P450c17 活性は 17α-hydroxy progesterone と 11-deoxycortisol 生成量の総和として、P450c21 活性は 11-deoxycortisol と 11-deoxycorticosterone 生成量の総和としてそれぞれ表した。

習慣流産患者における内分泌かく乱物質

子宮形態異常、夫婦の染色体異常のない 3 回以上の原発性習慣流産患者 25 例 (過去の流産回数 4.2 ± 2.2、3 から 13 回) を対象とし、出産、流産の既往がなく不妊症ではない女性 30 人をコントロールとした。平均年齢はそれぞれ 31.8 ± 4.1、32.0 ± 4.8 才、BMI は 21.7 ± 3.0、20.8 ± 2.3 であり、年齢、BMI のに有意差を認めなかった。習慣流産患者については内分泌かく乱

物質測定と同時に抗リン脂質抗体、抗核抗体、Natural killer 細胞活性、TSH、freeT4、プロゲステロン、プロラクチンの測定も行った。妊娠中の動態については15例（9人の初産婦、6人の経産婦、平均年齢33.9才）について調べた。分娩時に母体血、臍帯血、羊水を採取した。PCB6種は、ガスクロマトグラフ／四重極質量分析計（島津、AOC-17、GC-17A、QP-5000）を使用して測定した。BPAは、ウサギ抗BPAポリクロナル抗体を固相化したELISAによる測定した。

胎児・胎盤特異的遺伝子発現への内分泌かく乱化学物質影響

ラット胎盤、精巣、および子宮をビスフェノールA（BPA）溶液で灌流し、回収した灌流液中の代謝物を調べることでBPAの代謝・動態を解析する化学物質灌流システムの確立を試みた。またラット臓器あるいは組織からミクロゾームを調整し、1-ナフトールを基質としたUDP-グルクロン酸抱合活性の測定、 β グルクロニダーゼ活性の測定、および、抗UDP-グルクロン酸抱合酵素（UGT）を用いたウェスタンブロッティング法により、化学物質代謝・解毒酵素の局在を解析した。さらに、BaPの胎盤形成および胎児発生への影響の解析した：妊娠雌マウス（ICR系統）の腹腔に、妊娠6.5日目および7.5日目にBaPを注射した。その後、一部は妊娠8.5日目に胎児を含む子宮脱落膜組織を採取し、in situ ハイブリダイゼーション等の解析に供した。また、一部はそのまま妊娠を継続させ、出産時の新生児体重やその後の経時的な体重変化を測定した。BaPの胎盤細胞分化への作用の解析は、BaP存在下で栄養膜幹細胞（TS細胞）を培養し、各種分化栄養膜特異遺伝子をプローブとして用いたノーザンハイブリダイゼーションにより、胎盤を構成する栄養膜細胞の分化に対するBaPの影響を検討した。

正常子宮内膜間質細胞等を用いた内分泌かく乱化学物質の細胞特異的増殖促進効果

内分泌かく乱化学物質として、Diethylhexyl phthalate、Butyl benzil phthalate、Bisphenol-A、p-Nonylphenol、Dizein、Genisteinを検討した。96穴プレートに細胞（MCF-7、子宮内膜間質細胞、HHUA）懸濁液を播種し、被検物質と数日間培養後、前2者は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を測定）で、後者は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、その細胞増殖効果を評価した。

（倫理面への配慮）

- ① 試料等の提供者及びその家族に対しては、研究内容と目的等を事前に十分に説明し自由意思に基づく文書によるインフォームドコンセントを受けて、試料等の提供を受ける。
- ② 生体試料の収集とその解析研究等に関しては、厚生省等から出されている遺伝子解析研究に関する倫理指針等に沿い、個人識別情報の符号化等を徹底して個人情報保護し、試料等の提供者及びその家族の人権及び利益を保護する。

C&D. 研究結果と考察

1. 分析法開発と実試料分析

ディスプレイザブル腹水採取器具の開発

パイプ部材は医療用具として使用実績のあるポリプロピレンを外径約2.5mm、長さ約30cmの中空材に成形した。チューブ部材は医療用具の同等の安全性のある柔軟ポリエチレンを約30cmに成形した。シリンジはテルモ社の50mLカテーテルチップタイプとした。それらをはめ

込むことで組立て、包装をして定法によるエチレンオキシドガス(EOG)滅菌をした。先に述べた方法でDEHを測定した結果、いずれも定量下限値の10ppb以下であった。安全性試験も全て適合または陰性であり、安全性に問題はないと考える。

ノニルフェノール(NP)及びオクチルフェノール(OP)の分析法開発と生体試料の測定

C.1 測定諸条件の検討

今回は試薬標準品として直鎖タイプを分析対象物質とした。イオン化モードは Negative mode が、酢酸濃度 0.005%, 酢酸アンモニウム濃度 1mM が検出感度から適していた。他のパラメーターも最適測定条件に設定し、4-NP, 4-*n*-NP, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP の検出限界は、SIM モードで 0.1ng/ml (絶対量として 2pg)であった。尿試料は直接カートリッジに負荷して良好に回収されたが、血清試料ではメタノールで徐タンパクと同時に抽出し、蒸留水で置換して負荷した。生体試料の分析では超微量レベルの定量が求められており、コンタミネーションを極力避けることが求められる。より信頼性の高い前処理法として、ISOLUTE Multimode が最も夾雑成分の除去効果に優れ、且つ 4-NP の溶出量が少なかった。また、乾固時に 0.1M 水酸化カリウム溶液 0.1mL を加えることにより減圧乾固時の揮散を抑制できた。NP, OP は、生体中ではその大部分がグルクロン酸抱合体又は硫酸抱合体として存在する。そこで、 β -グルクロニダーゼとインキュベートすることにより加水分解した。添加回収実験の結果、70%以上の回収率で、4-*n*-NP, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP の検出限界は、血清では 0.1ng/mL、尿では 0.01ng/mL であった。一方、検出限界 LOD は、血清の 4-NP が 1ng/mL、尿では 0.1ng/mL であった。

C.2 分析結果

分析した母体血、さい帯血、腹水、尿、計 35 検体において、4-NP, 4-*n*-NP, 4-*t*-OP, 4-*n*-OP は検出限界以下であった。また、1名のボランティアに 4-*t*-OP 及び 4-NP を 6mg 及び 8mg の用量で経口投与し、尿中への排泄を調べた結果はほとんどが抱合体として速やかに尿中へ排泄された。

多環芳香族炭化水素類(PAHs)及びその代謝物のヒト生体試料における分析

開発したHPLCシステムでの2-OHFの検出限界は 15 fmol/injection (S/N = 3、検量範囲は 50 - 1000 pmol/injection) であった。

喫煙者群 4 名の尿中 2-OHF 濃度は 516.4 ± 176.1 、1-OHP は 58.8 ± 23.5 (mean $\pm$ SD) nmol/mol creatinine で、非喫煙者群 9 名の、2-OHF 172.0 ± 114.2 、1-OHP 22.8 ± 22.0 nmol/mol creatinine に比較して、有意に ($P < 0.01$) 尿中濃度が高い。健常人 20 名 (喫煙群 6 名、非喫煙者群 14 名) の毛髪中 PAHs 濃度は、個人差が大きいこともあり、喫煙で有意に濃度が高い ($P < 0.05$) 化合物は Ant だけであった。尿中への PAHs 代謝物の排泄は、半減期が短く、短期的な PAHs 曝露の指標となりうるが、毛髪中の PAHs は長期的な曝露の指標となりうると考えられた。

母乳 1 例から抽出した脂肪をアルカリ分解した後ヘキサン抽出、PAHs を測定した結果 11 種類の PAHs を同定し、9 種類について定量を行った。それぞれの PAHs の定量値は、脂肪重量あたりの濃度で、Nap (245.0 ng/g fat)、Ace (306.4 pg/g)、Phe (36.5 ng/g)、Ant (187.2 pg/g)、Flu (493.6 pg/g)、Pyr (765.0 pg/g)、BaA (408.5 pg/g)、BbF (102.1 pg/g)、BaP (32.3 pg/g) であった。

ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)のヒト生体試料分析

PBDEs (ネイティブ 3-7 臭素化体 16 種類およ

び¹³C-ラベル化3〜6 臭素化体5種類)の添加実験で、回収率は概ね 80〜110%, RSD<10%の範囲内であった。各異性体の検出限界は検液中濃度 0.1ng/mL(母乳脂肪あたり濃度 0.01ppb に相当)とした。

母乳の分析を行ったところ、全ての検体から7種類のPBDEs(3〜7 臭素化体)が検出された。また、ある母乳試料から、高濃度のPBDEsが検出されたため、血清試料についても分析を行ったところ、同様に高濃度のPBDEsが検出された。

大阪府下で採取された母乳脂肪のプール試料8検体を分析し、PBDEs濃度は1973〜88年度にかけて著しく上昇(ND〜1.6ppb)し、その後は概ね 1〜2ppb 程度で推移した。大阪湾の魚類中PBDEs汚染レベルが80年代後半から減少傾向を辿っていると最近の学会で報告されている。これらの背景から、今後、我が国における母乳中PBDEsのバックグラウンド濃度が現在の数ppbレベルから著しく上昇する可能性は低いと考えられる。

なお、国内外で大量に使用されているデカ-BDE(10 臭素化物工業原体)の主成分であるBDE-209については、負化学イオン化法(NCI)四重極MSを用いた予備的な分析で、半定量的なスクリーニング分析を試みたところ、幾つかの母乳試料からBDE-209、BDE-15 および未同定の9、8 臭素化体に相当するピークが検出されたが、いずれも痕跡量程度〜脂肪あたり数ppb以下であった。

母乳中ビスフェノール A (BPA) の高感度 HPLC-蛍光定量法の開発

市販乳製品(牛乳, 加工乳, 乳飲料を含む7検体)中のBPAの濃度範囲は0.70〜1.20ppbの範囲となった。

一方、母乳試料を前年度報告した液-液抽出法の前処理では、クロマトグラム上でBPA由来の

ピークは全く観測されず、溶出に50%アセトニトリル水溶液を用い、より疎水性の高い分画を固相に保持させたまま残すことによって、誘導体化反応が良好に進行することが判明した。検量線は良好な直線性($y=0.868x+0.503$, $r=0.999$)を示し、 $S/N=3$ のときの検出下限は0.20ppbと高感度であった。母乳試料におけるBPAの添加回収率は99.0%であった。母乳試料8検体のBPA濃度範囲及び平均値±SDはそれぞれ0.46〜0.86ppb及び 0.64 ± 0.12 ppb ($n=8$)となった。同一個人より得られた妊婦血清及び母乳中BPA濃度($n=6$)の相関性は $r=0.004$ であったが、さい帯血-母乳間では $r=0.755$ という比較的高い相関が観測された。今後、BPAの脂肪組織への移行性や蓄積性に関する詳細な調査の必要性が示唆された。

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン(HCB)の人体暴露の分析

189人の成人血清試料を分析した結果、6種のCLDsとHCBのうち、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、HCBは多数の試料から検出された。*trans*-ノナクロルについては、189試料のうち177試料(93.7%)から検出され、濃度は0.03から1.65ppbの範囲であり、検出された試料での平均値は0.19ppbであった。*cis*-ノナクロルは、82試料(43.4%)から検出され、濃度は0.03から0.44ppbの範囲であり、検出された試料での平均値は0.07ppbであった。また、HCBについては171試料(90.5%)から検出され、その濃度は0.02から2.20ppbの範囲であり、検出された試料での平均値は0.10ppbであった。また、オキシクロルデンは、男性血清2試料からそれぞれ0.24及び0.56ppb、*trans*-クロルデンは別の男性血清1試料より0.04ppb検出された。一方、ヘプタクロルエポキシサイド及び*cis*-クロルデンは全試料から全く検出されなかった(検出限界;*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、*trans*-クロ

ルデン、*cis*-クロルデン:0.03 ppb、ヘプタクロルエポキシサイド、オキシクロルデン:0.2 ppb、HCB:0.02 ppb)。

血清中から検出されたこれら5種の化学物質のうち、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、HCBの濃度について年齢階層との関連を検定したところ、*trans*-ノナクロル($p=0.006$)及びHCB($p=0.000$)は、いずれも年齢階層の高い人で有意に血中濃度が高かった。一方、*cis*-ノナクロルについては、有意な差は認められなかった。これらのことから、CLDsとHCBの血中濃度は、暴露期間の影響が推測された。このようにして、血中のCLDsとHCBの濃度は、年齢階層の影響を受けることが明らかとなったことから、アンケート項目で年齢階層の影響を受けている項目を検討し、食事嗜好のうちの魚介類($p=0.023$)と肉類($p=0.041$)、それに子供の人数($p=0.000$)において年齢階層間に有意な差が認められた。

性別については、*trans*-ノナクロルの濃度は、男性の方が女性より有意に高かった($p=0.001$)。そのため、アンケート調査項目と性別の関係を検定し、喫煙において、男女間に有意差が認められた($p=0.001$)。

住環境におけるシロアリ駆除剤の使用歴及び駆除については、大きな影響を与える因子でないことが示唆された。

摂食嗜好のうち、魚介類と肉類の摂食嗜好については、年齢の影響を受けることが明らかであるが、年齢の低い階層に*trans*-ノナクロル濃度と魚介類の摂取との間に関連が認められた。これは、年齢の低い階層では化学物質の蓄積期間が短く、年齢の高い階層と比較して他の因子の影響が少ないため、食事嗜好の影響が顕著に現れたと考えた。

パラベン類によるヒト暴露の研究

1) 医薬品中のパラベン類の測定

産婦人科で使用される医療用品に含まれるパラベン類をHPLCにより測定した。その結果、浣腸液及び局部麻酔剤にパラベン類が使用されていた。医薬品1回あたりの使用量から、浣腸液(120ml使用)では20mgのパラベンが、局部麻酔剤(1回に5ml使用と仮定)では4mgのパラベン(pHBA換算)が体内に摂取されると算出された。

またパラベン類の多くはグルクロン酸抱合体として尿中に排泄され、抱合体となっていないパラベン類は1割〜2割程度であった。代謝物であるpHBAはppmオーダーで尿中に排泄されていたがグルクロン酸抱合体にはなっていなかった。

パラベン含有ドリンク剤を飲んだ後の経時的測定の結果、パラベン類は1時間後の尿で最大濃度を示した。また、パラベンが尿中に検出された時間は4時間程度で、代謝物のpHBAはパラベンと比較して30分遅い90分の尿試料で最大となった。また、ヒトに医薬品(浣腸)を行ったときの生体内挙動を調べるため経時的に採取した尿試料中のパラベン類及びpHBA濃度を調べた。その結果、30分後の尿試料が最大濃度を示し、以降は代謝物も含めて減衰した。

ラットに用いた実験では：メチルパラベン入り局部麻酔剤投与後5分で最大濃度を示し、その半減期は8.5分であった。また、代謝物のpHBAの半減期は15分程度であった。また、浣腸実験では、血中パラベン類濃度の最大値は5分〜10分で検出され、代謝物のpHBAも同様な挙動であった。血液中濃度をパラベンの種類別にみると、メチルパラベンが最大でイソプロピル、エチル、プロピル、イソブチル、ブチルの順であった。

ブチルスズ化合物の生体試料分析に関する研究

毛髪試料 57 検体についてブチルスズ化合物の測定し、MBT、DBT 及び TBT の平均値はそれぞれ $0.145 \mu\text{g/g}$ 以下、 $0.04 \mu\text{g/g}$ 以下、 $0.065 \mu\text{g/g}$ 以下であった。MBT、DBT 及び TBT の検出率についてはそれぞれ 80.7%、68.4%、14.0%となった。検出率 86%から有機スズ化合物のヒトへの暴露が大きいことが推察された。性差はなく、TBT から DBT 及び MBT へと分解、代謝が進むに従って検出率及び濃度が高くなる傾向があった。これらのことからヒトの多くは過去に環境中に存在する TBT 及び DBT の暴露を受けたものと思われる。

妊婦生体試料中の分析結果から、毛髪は 4 検体すべてから MBT ($0.971 \sim 0.110 \mu\text{g/g}$) 及び DBT ($0.41 \sim 0.01 \mu\text{g/g}$) が検出された。4 検体中 1 検体 (No. 3) から TBT ($0.084 \mu\text{g/g}$) が検出された。臍帯は 3 検体中 2 検体から MBT (0.008 、 $0.023 \mu\text{g/g}$) が検出された。全血試料では母体血及び臍帯血はともに全ての検体から MBT ($0.012 \sim 0.067 \mu\text{g/g}$) が検出され、DBT は 6 検体中 2 検体から検出 (0.01 、 $0.02 \mu\text{g/g}$) された。ブチルスズ化合物は血清成分以外の血液成分と結合している可能性が考えられた。臍帯の MBT 検出および分析結果から、母体側から胎盤を通して胎児側にブチルスズ化合物が移行している可能性が示唆された。母乳については 3 検体中 2 検体から MBT (0.073 、 $0.074 \mu\text{g/g}$) が検出され、3 検体中 1 検体から DBT ($0.06 \mu\text{g/g}$) が検出された。今後、妊婦生体試料については統計処理を行うための例数を分析する必要があると思われる。

2. 生体への影響と作用機序

有機スズ化合物の経口免疫寛容への影響

実験的経口トレランスを誘導したマウスの抗原

特異的な抗体産生へ影響:カゼインを免疫すると有意にカゼインに対する抗体が上昇するが、DBTC 投与群では抗体産生増強の傾向がみられ、TBTC では抑制の傾向がみられた。次にカゼイン食をあらかじめ投与した場合、カゼインに対する抗体産生は、有意に減少し、経口トレランスが誘導されたが、DBTC 投与群ではいずれにおいても、マウス抗体産生を有意に増強した。コレラトキシン投与群においても抗体産生増強の傾向がみられたが有意差は認められなかった。

脾臓細胞増殖応答:カゼインに対する免疫応答を誘導した脾臓細胞の増殖応答では、MTS アッセイが示すミトコンドリアにおける酵素活性への影響はみられなかったが、 H_3 取り込みによる増殖応答に対し、DBTC および TBTC 投与群では応答を有意に阻害した。

経口トレランスを誘導したマウス脾臓細胞の増殖応答:DBTC および TBTC 投与群において有意に応答を増強した。CT 投与群では影響はみられなかった。

有機スズ化合物のマウス体内濃度分析では、DBTC 投与後1ヶ月後のマウス脾臓および血液において MBT が検出され、血中濃度より脾臓の濃度が高いことが示されたが、DBT および TBT は検出限界以下であった。DBT は、マウス生体内で比較的速やかに MBT に代謝されるが、投与後1ヶ月後においても数十 ng のオーダーで生体内濃度を維持していることが明らかとなった。以上から、DBT および TBT が引き起こす過剰な免疫応答が経口トレランスを破綻することが示唆された。さらに、DBT および TBT が抗原提示能に影響を及ぼすことが考えられ、アレルギー等の発症メカニズムに対する DBT および TBT の影響をさらに検討することが必要であると考えられた。