

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業
平成14年度 総括・分担研究報告書

**試料分析の信頼性確保と生体暴露量の
モニタリングに関する研究
(H14－食品・化学－012)**

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
	岡 尚男	愛知県衛生研究所
	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
	塩田 邦郎	東京大学
	木村 穰	東海大学

目 次

I. 総括研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究	1
主任研究者 牧野 恒久	
(東海大学医学部産婦人科学教室 教授)	

II. 分担研究報告

1. 内分泌かく乱化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング生体試料等中の フタル酸エステル類の分析法の開発	19
分担研究者 岡 尚男 (愛知県衛生研究所)	
研究協力者 後藤 智美 (愛知県衛生研究所)	
伊藤 裕子 (愛知県衛生研究所)	
斉藤 勲 (愛知県衛生研究所)	
松本 浩 (愛知県衛生研究所)	
中澤 裕之 (星薬科大学)	
堀 伸二郎 (大阪府立公衆衛生研究所)	
2. 生体試料等中のビスフェノールAの分析法の開発	29
分担研究者 堀江 正一 (埼玉県衛生研究所)	
研究協力者 月岡 忠 (長野県衛生公害研究所)	
竹上 晴美 (埼玉県衛生研究所)	
3. 生体試料等中のアルキルフェノール類 (4-ノニルフェノール及び 4-オクチルフェノール)の分析法の開発	37
分担研究者 中澤 裕之 (星薬科大学 薬品分析化学教室)	
研究協力者 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)	
吉村 吉博 (星薬科大学 薬品分析化学教室)	
加藤 嘉代子 (星薬科大学 薬品分析化学教室)	
井之上 浩一 (星薬科大学 薬品分析化学教室)	
川口 研 (星薬科大学 薬品分析化学教室)	
4. 環境中の内分泌かく乱物質の胎盤機能と胎児発生における影響	49
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)	

5. 内分泌かく乱化学物質に対する感受性に関与する遺伝子の解明	57
分担研究者 木村 穰 (東海大学)	
研究協力者 牧野 恒久 (東海大学)	
和泉 俊一郎 (東海大学)	
8. DEHPの臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響について	69
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)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	81
IV. 研究成果の刊行物・別刷	83

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

主任研究者 牧野 恒久 （東海大学医学部産婦人科学教室 教授）

研究要旨

本研究では、分析法の信頼性確保とヒト生体暴露量モニタリングを実施するうえで多角的なアプローチによる検討を行うとともに、内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響における代謝の側面を、遺伝子多型を含めた分子のレベルまで掘り下げて検討し、総合的な研究成果の達成を目標として計画されている。

1. 「内分泌かく乱化学物質に関する生体試料分析法のガイドライン」策定作業

1-① 生体試料等中のフタル酸エステル類の分析法の開発：血清中のフタル酸エステルの分析を開発する上で、操作ブランクの低減化は最も重要な事項である。この点を主として検討を行い、血清中のフタル酸エステル分析法を確立した。後述の 10 項目に注意を払うことにより、操作ブランクを 10～20 分の 1 に低減化することに成功した。また、今回提示した分析法の平均回収率は、98.7～123.7%、相対標準偏差は 0.86～.752% であり（添加濃度 DBP、BBP、DEHP：100 ppb、DiOP、DiNP：200 ppb）、検出限界は、操作ブランクを低減化できたので、DBP、BBP、DEHP は、10 ppb に、DiOP、DiNP は 50 ppb に設定した。従って、本法を用いて、上述の注意点を留意しながらフタル酸エステルの分析を実施すれば、血清中のフタル酸エステル類の濃度を過剰評価をしてしまう恐れはないと考えられる。

1-② 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発：分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) 及びガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) を用いたビスフェノール A (BPA) の信頼性の高い高感度分析法を構築し、これを用いて分析した母体血、さい帯血、腹水計 27 検体中の遊離体 BPA 濃度は、いずれも検出限界レベル (0.2ng/mL) で、抱合体も含めた総 BPA 濃度は、一部検体から 1-2ng/mL 程度検出されたが、多くの検体は検出限界レベルであった。一方、尿中の遊離体 BPA は、平均で 0.08ng/mL、総 BPA 濃度は平均で 0.56ng/mL であった。低用量 (50 μ g) 及び高用量 (1mg) の BPA を経口摂取後の体内動態を調べた。BPA は消化管から速やかに吸収され、24 時間以内に投与量の大半が尿中（主としてグルクロン酸抱合体）へ排泄された。従って、BPA の曝露量は、一日尿中の BPA を測定することにより評価することが可能と考える。一方、血中への移行量は少なく、その殆どが抱合体（最高濃度：43ng/mL：経口摂取後 0.5 時間）で、その時の遊離体 BPA レベルは約 0.3 ng/mL であった。

1-③ 生体試料等中のアルキルフェノール類（4-ノニルフェノール及び4-オクチルフェノール）の分析法の開発

アルキルフェノールの一つであるノニルフェノール及びオクチルフェノールの分析法の開発と測定ガイドライン作成に関する基礎的検討を実施した。現在までに報告されている暴露要因や残留量から推定し、ノニルフェノールの一日最大暴露量は、0.2 mg以下と算出された。そのことより、高感度な分析手法の構築が要求されるため、液体クロマトグラフィー／質量分析法及びガスクロマトグラフィー／質量分析法を駆使し、新たな測定法を検討した。構築した分析法は、十分に生体試料へ応用できることが明らかになった。

2. 環境中の内分泌かく乱物質の胎盤機能と胎児発生における影響

2-① *in vivo* および *in vitro* での動物実験：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。そこで我々はラットおよびマウスを用い、化学物質の妊娠期中での代謝、および、内分泌かく乱物質による胎盤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エーションとして機能していることが示唆されるとともに、フタル酸エステルが胎盤構成細胞の分化に影響を及ぼす可能性が示された。

2-② DEHP の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響：DEHP は軟質ポリ塩化ビニル樹脂（polyvinylchloride：PVC）製血液バッグの可塑剤であり、生殖発生毒性、精巣毒性、内分泌攪乱作用に対する疑い等の様々な問題点を持つ。DEHP の溶出報告がある PVC 製血液バッグは、保存血の採取・保存において、その簡便さから汎用されている。本分担研究において、PVC 製血液バッグの血球細胞に対する影響を、臍帯血造血幹細胞を用いて検討した。すなわち、近年造血幹細胞移植に応用の試みられている臍帯血造血幹細胞は、その採取から移植に使用されるまでの一部の過程において血液バッグが使用される。一方、臍帯血造血幹細胞は、保存血として用いられる分化の完了した血球細胞とは異なり、その機能は未熟で未知なものである。したがって、臍帯血造血幹細胞が PVC 製血液バッグ処理時に DEHP から何らかの影響を及ぼされることは危惧される。本研究は DEHP の「弱いエストロゲン様作用を持つ」という点に着目し、エストロゲン（E）の核内レセプター（ER）を臍帯血造血幹細胞で同定し、その発現調節への影響を検討した。臍帯血造血幹細胞は、RT-PCR と制限酵素切断法により、ER として2種のサブタイプ（ER α とER β ）が共に発現していることが確認された。その2種の ER のサブタイプに対する作用を、MCF-7 ヒト乳癌細胞を用いたタイムコースによる検討したところ DEHP は E とビスフェノール A (BPA) と同様に ER α を up-regulation するが、ER β に対する up-regulation 作用は DEHP のみにおいて認められなかった。

3. 内分泌かく乱化学物質に対する感受性に関する遺伝子の解明

疾患の発症は、一般に環境要因と遺伝的要因によって決定されると考えられる。本研究では子宮内膜症をとりあげるが、この疾患においては内分泌かく乱化学物質が環境要因として深く関わっている状況証拠が集積しつつある。疾患の発症に至る過程には代謝酵素調節を

含む種々の細胞表面上あるいは細胞内の分子の状態が重要であると考えられ、本研究では本疾患の疾患感受性遺伝子として Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), Estrogen Receptor (ESR) あるいはチトクロム、グルクロン酸抱合酵素の遺伝子 (CYP1A1) をとりあげ、それらの遺伝子多型を明らかにすると共に、子宮内膜症感受性のアレル (対立遺伝子) を分子遺伝学的、統計遺伝学的に求めることを最終目的として、試料解析の倫理面整備、DNA 試料解析系の確立を行った。確立した DNA 解析系をもとに、本年度は患者 2 名を含む合計 10 名の日本人の試料を分析し、日本人特有の遺伝子多型存在の可能性が示唆された。

分担研究者

中澤裕之 星薬科大学薬品分析化学

岡 尚男 愛知県衛生研究所

堀江正一 埼玉県衛生研究所

塩田邦雄 東京大学大学院農学生命科学研究科細胞生化学

木村 稔 東海大学医学部分子生命科学

採取、保存、クリーンアップに使用される実験用器具類の多くが高分子素材で成型されており、様々な操作過程で混入 (コンタミネーション) し、分析値のバックグラウンドや測定値のバラツキに影響を及ぼし、過剰評価をしてしまう恐れがある。従って、コンタミネーションを防止するため試料採取法及び高感度分析法等の確立及びその標準作業書を整備する必要がある。そこで本研究では、分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) 及びガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) を用いた BPA の信頼性の高い高感度分析法を構築し、本分析法を用いて、血清、尿試料中の BPA 濃度を測定する。更に、測定して得られた血清・尿中濃度を検証するため安全量の BPA を経口的に摂取し、体内動態を調べることを目的とする。

A. 研究目的

1-① 生体試料等中のフタル酸エステル類

の分析法の開発：フタル酸エステル類は、実験室を含めた我々の生活環境中に多く存在するため、その分析に関しては、様々な操作過程で混入し、分析値のバックグラウンドに影響を及ぼし、過剰評価をしてしまう恐れがある。そこで、分析操作過程におけるコンタミネーションを低減化した前処理法の開発を念頭に置いて、精度の高い分析法を確立し、分析法ガイドラインの作成を目的とし、まず、血清中のフタル酸エステル類の分析法を開発する。

1-② 生体試料等中のビスフェノール A の

分析法の開発：内分泌かく乱化学物質としてビスフェノール A (BPA) は、低用量においてその作用を発現することが指摘されている。このことから、適切な試料採取法及び高感度且つ選択性に優れた分析法の開発が必要とされている。しかし、試料の

1-③ 生体試料等中のアルキルフェノール

類の分析法の開発：アルキルフェノール類は、様々な工業製品、界面活性剤、樹脂モノマー、プラスチック添加剤等の原料として利用されてきた。1991年にポリスチレン製実験器具から溶出する 4-ノニルフェノール (NP) にヒト乳がん細胞 (MCF-7) 増殖能 (エストロゲン活性) を有することが報告され、1994年、4-オクチルフェノール (OP) 等にもその活性が観察され、現在では、in

vitro や *in vivo* 系での多くの研究が報告され、エストロゲン活性のみではなく、代謝阻害への影響、ヒト神経 Nicotinic acetylcholine receptor/channels への抑制、コルチゾール産生能に対する阻害などの様々な活性が確認されている。すなわち、ヒト健康影響を考慮した場合、日常製品に多く利用される NP や OP では、早急に生体暴露モニタリングの必要性が求められる。その一方で、分析値の信頼性や過剰評価などが問題とされ、早急な対策が必要と思われる。本研究では、分析操作過程における汚染原因の解明、コンタミネーションの低減化を目的とした前処理法の開発を視野において、精度の高い超微量分析法の開発、分析法ガイドラインの作成等を検討し、構築した分析法を駆使して当該化学物質の暴露状況を解明する。ヒト生体暴露量を評価する上で、健康人や病院通院者等の血液、母乳、尿等の生体試料中当該化学物質の濃度を把握するとともに、その総合的なリスク評価を目指す。更にマウス等の実験動物を用いたアルキルフェノール類に関する研究においては、実験動物の飼育環境（餌、給水瓶、ケージ、床敷、空気等）が影響を及ぼすのではないかと危惧されており、信頼性ある実験結果を追求するには、最新機器分析装置を駆使し、その実態把握と改善策を検討する。

2-① 環境中の内分泌かく乱物質の胎盤機能と胎児発生における影響：妊娠期母体の内分泌かく乱物質への暴露による、胎児への不可逆的影響が心配されている。そのため、内分泌かく乱物質の作用を解析する上で、母体・胎盤・胎児における代謝解毒反応を詳細に明らかにすることが求められて

いる。特に、子宮および胎盤は最も重要な胎児への薬物暴露バリエーションであるので、それらの器官形成・機能発現への内分泌かく乱物質の影響や、そこでの代謝解毒反応を中心とした研究が重要である。そこで本研究では、子宮、胎盤および胎児における内分泌かく乱物質の代謝を行う酵素について、その発現と機能の解析を行い、母体から胎盤・胎児への内分泌かく乱物質の移行についての知見を得ることを第一の目的とした。第二に、フタル酸エステルである Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) を例にとり、その妊娠母胎への投与が胎盤形成におよぼす影響を明らかにすることを目的に、*in vivo*、*in vitro* 両面の解析を行った。

2-② DEHP の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響：高分子化学の著しい進歩に伴い、現代医療においても様々なプラスチック製医療器具が使用されている。一方、可塑剤は、プラスチック添加剤として最も多く利用される。その作用は、樹脂の分子間に入り込み、硬い網状構造の原因である分子間結合を弱め、柔軟な性質を与えることにある。可塑剤には、フタル酸エステル類、リン酸エステル類、脂肪酸エステル類、アジピン酸エステル類等が挙げられるが、フタル酸エステル類の使用度が最も高く、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) は、全可塑剤生産量の約 50% 以上を占めている。一方、昨年、厚生労働省は、食品用塩化ビニル手袋や新生児を対象とした玩具等の可塑剤として使用されている DEHP 等について TDI を設定しこれらの製品に対して使用を規制した。この DEHP は PVC 製血液バッグの可塑剤であり、生殖発生毒性、精巣毒性、内分泌攪乱作用に対す

る疑い等の様々な問題点を持つ。PVC 製血液バッグは、DEHP の溶出報告があるが、保存血の採取・保存において、その簡便さから汎用されている。本分担研究において、PVC 製血液バッグの血球細胞に対する影響を、臍帯血造血幹細胞を用いて検討した。臍帯血造血幹細胞は、近年造血幹細胞移植に応用の試みられており、その採取から移植までの一部の過程において血液バッグが使用される。臍帯血造血幹細胞は、保存血に用いられる分化の完了した血球細胞とは異なり、その機能は未熟で未知なものである。したがって、臍帯血造血幹細胞が PVC 製血液バッグ保存時に DEHP により何らかの影響を及ぼされることは危惧される。本研究はとくに DEHP の「弱いエストロゲン様作用を持つ」という点に着目し、エストロゲンの核内レセプター (ER) を臍帯血造血幹細胞で同定し、その 2 種のサブタイプ (ER α と ER β) についての発現変化を mRNA レベルで探究を目的とした。

また、現在、エストロゲン自身のその作用発現機構について、ER を介してから作用を発現するまでの間にはブラックボックスと言われるまだ未解明の部分がたくさんある。エストロゲンは女性ホルモンの一種であり、女性の生殖器への作用が主であるが、脳、心血管、骨、皮膚等の生器外作用も示すことが報告されており、骨粗鬆症、心筋梗塞、高血圧症などとの関連も推測されている。エストロゲンの作用発現機構におけるブラックボックスを解明することは、多くの疾患の解明、治療につながると考えられている。また、ビスフェノール A (BPA) のようにエストロゲン様作用を示すと報告されている物質の作用発現機構を解明することも

必要である。本研究では、「DEHP のエストロゲン様作用についての遺伝子レベルでの基礎的検討」と共に、E2、BPA を用いて、「ER を介するエストロゲン作用の発現機構解明に対する基礎的検討」を同時に行った。

3. 内分泌かく乱化学物質に対する感受性 に關与する遺伝子の解明

：一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因によって規定されていると考えることができる。単一遺伝性疾患のレッシュナイハン症候群などの場合は遺伝要因が大きく寄与し、また、交通事故による骨折や脳挫傷などは物理的な外力つまり環境要因がその主たる原因である。子宮内膜症の場合、これまでの研究から内因性のエストロゲンで病状が進展すること、また、その量を低減させる治療が有効であることが判明しており、内分泌かく乱物質は発症や病状を左右すると考えられる。しかし一方で、同一の環境条件下でもその反応性に個人差があることは良く経験されることであり、子宮内膜症の発症と内分泌かく乱物質の関係においても、一定の遺伝的素因がそこにからんでいるものと推測される。本研究では子宮内膜症発症と内分泌かく乱物質の関係において遺伝的な背景を明らかにし、発症機構の解明と治療法の開発に役立てることを最終的な目的とした。全ゲノムレベルで追跡する事も将来的には重要であると考えが、ここでは疾患感受性候補遺伝子についての関連を明らかにし、データを集積する事を目指した。選定した遺伝子は Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)、Estrogen Receptor (ESR) あるいはチトクロム、グルクロン酸抱合酵素の遺伝子 (CYP1A1) であり、それらの遺伝子多型を明らかにすると共に、子宮内膜症感受性のア

レル（対立遺伝子）を分子遺伝学的、統計遺伝学的に求めることを最終目的として、本年度は試料解析の倫理面整備、DNA 試料解析系の確立を目指した。

B. 研究方法

1-① 生体試料等中のフタル酸エステル類の分析法の開発

各試薬は、関東化学製フタル酸エステル測定用又は、関東化学製環境分析用を用いた。また、内標準物質として用いた DBP-d4、BBP-d4、DEHP-d4、DiOP-d4、DiNP-d4 は、林純薬工業製環境分析用を用いた。フロリジル及びボンデシル PSA は、それぞれ和光純薬工業及びバリアン社製を使用した。フタル酸エステル類の標準溶液は、それぞれの濃度が1 μ g/mLになるようにn-ヘキサンで調製し、それを適宜n-ヘキサンで希釈して用いた。分析条件は、GC/MS条件；装置：島津 GCMSQP5000, イオン源：EI, カラム：DB-5MS (30 m x 0.25 mm, ID, 膜厚 0.25 μ m, J&W), カラム温度：80 $^{\circ}$ C (3分) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 300 $^{\circ}$ C (5分), キャリアガス：He (圧力 100 kPa, 全流量 50 mL/分, カラム流量 1.5 mL/分), 注入口温度：240 $^{\circ}$ C, インターフェイス温度：300 $^{\circ}$ Cでモニターイオンは分担報告内の表に示した。

1-② 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発

B. 1. 試料

さい帯血、母体血、腹水及び尿の採取と使用に関しては、いずれもインフォームドコンセントを十分行い、理解が得られたボランティアから採取するなど、倫理面への配慮を行った。

B. 2. 試薬

標準品：ビスフェノール A (BPA) 及びビスフェノール A-d₁₆ (BPA-d₁₆) は関東化学(株)製の環境分析用試薬を、¹³C-BPA はケンブリッジアイソトープ製を用いた。β-グルクロニダーゼ：シグマ社製又は、和光純薬工業(株)製、生化学用（いずれも 100,000 units/mL 以上）を用いた。精製用カートリッジ：Isolute Multimode カートリッジ (500 mg)：International Sorbent Technology Ltd. 製、又は、スペルコ製、スペルクリン ENVI-18 (0.5g) を用いた。カートリッジは予めメタノール 10mL、水 5mL の順で洗浄した後使用した。フロリジルカートリッジ：スペルコ製、スペルクリン ENVI フロリジル (0.5g) を用いた。カートリッジは予め n-ヘキサン 5mL で洗浄して使用した。BSTFA：ジーエルサイエンス(株)製を使用した。その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いた。標準溶液：各標準品 20mg を精秤し、メタノール 100mL に溶解して標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液とした。

B. 3. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ-質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC-MSD を使用した。さらにガスクロマトグラフ-質量分析計：日本電子(株)製 GC-mate を用いた。測定条件の詳細は分担報告書に示した。

B. 4. 検量線の作成

LC/MS 測定：安定同位体標識内部標準物質 BPA-d₁₆ を 5ng 含んだ BPA の 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 100ng/mL の溶液を調製し、その 10 μ L を LC-MS に注入する。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 と BPA-d₁₆ の面積比により検量線を作成した。GC/MS 測定：試験管に BPA を 10~200ng の範囲で段階的に採り、これに安定同位体標識内部標準物質として¹³C-BPA を 100ng 添加し、BSTFA 200μL を加え、アセトンで 1mL に定溶した。これを一夜放置し、GC/MS-SIM で測定し、¹³C-BPA との面積比で検量線を作製した。

B. 5. 薬物動態調査

エタノールで溶解した 1mg/mL の BPA 1mL (BPA 1mg) あるいは 0.1mg/mL の BPA-d₁₆ 1mL (BPA-d₁₆ 100μg) を含む清涼飲料水 100mL を経口的に単回投与した。摂取後一定時間経過後の尿及び血清を採取した (それぞれ男性 1 人、なお、血清採取は高用量のケースのみとした)。また、健康なボランティア 25 人 (男性 12 人、女性 13 人) に BPA-d₁₆ 50μg を含む清涼飲料水 100mL を単回投与し、摂取後 5 時間経過までの尿を全量採取した。

B. 6. 試験溶液の調製

各 LC/MS 測定用試験溶液の調製については分担報告書に詳細に記した。

1-③ 生体試料等中のアルキルフェノール類 (4-ノニルフェノール及び 4-オクチルフェノール) の分析法の開発

B. 1. 現段階でのリスクアセスメント

現在までに報告されている暴露汚染源中の濃度などを考慮して、一日摂取量や主な暴露要因を推定する。

B. 2. 試薬・分析装置

【試薬】

本検討で用いた標準品を下記に示す。

4-nonylphenol mix (NP) : 関東化学社製 (環境分析用)

4-tert-octylphenol (OP) : 関東化学社製 (環

境分析用)

4-n-nonylphenol - 2, 3, 5, 6-d₄ (NP-d₄) : 関東化学社製

4-tert-Octylphenol - 2, 3, 5, 6-d₄ (OP-d₄) : 林純薬社製

4-(1-methyl) octylphenol-d₅ (m-OP-d₅) : 林純薬社製

【溶媒】

前処理に利用する溶媒は、すべて残留農薬用とした。また、LC の移動相として用いた溶媒は、すべて和光純薬社製 HPLC 用を用いた。また、実験用水は Millipore 社製 Milli-Q gradient A 10 with an EDS polisher で精製したものなど汚染のないことを確認したものを用いた。

【実験用器具】

ガラス製の実験器具は、すべて 200℃ 以上で加熱後使用した。

【LC/MS 装置】

液体クロマトグラフ/質量分析法 装置 (LC/MS) 【Agilent Technologies 社製 Agilent LC/MSD Superior Line】、HPLC 用ポンプ：島津社製 LC-10Advp

LC 用カラム：関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (100 x 2.0 mm, 5 μm)

LC 用ガードカラム：関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (5 x 2.0 mm, 5 μm)

前処理用カラム：TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm)

【GC/MS 装置】

ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS) 【Agilent Technologies 社製 Agilent 6890N GC/5973N】加熱脱着システム【Gerstel 社製 TDS2 thermodesorption system/TDS-A autosampler/CIS 4 PTV】

カラム：HP-5ms (0.25 mm x 30 m, 0.25 μm)

B. 3. 定量法

各標準品を化学天秤で 100 ml 用メスフラスコに 100 mg 量り取り、標準原液としてメタノールで 1.0 mg/ml とする。その後、各種濃度にメタノールを加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう希釈する。LC/MS-SIM もしくは GC/MS-SIM 法により標準・試料溶液を測定し、内標準法を用い各濃度範囲内における検量線を作成し、定量分析を行った。

2-① 環境中の内分泌かく乱物質の胎盤機能と胎児発生における影響

B. 1. ラット子宮灌流系の確立：ラット子宮の一部を切除し、両端を結紮後、灌流液に浸した。1-ナフトールまたはビスフェノール A を子宮血管側（婁膜側）および子宮粘膜側から暴露し、経時的に灌流液中の代謝物を HPLC で分析した。

B. 2. ラット臓器に発現する UDP-グルクロン酸抱合酵素 (UGT) の検出：ラット肝臓および子宮からマイクロゾームを調整し、UGT 分子種特異抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、発現する分子種の同定を行った。

B. 3. DEHP の胎盤形成および胎児発生への影響の解析：妊娠雌マウス (ICR 系統) の腹腔に、妊娠 6.5 日目および 7.5 日目の二度、体重 1kg 当たり 0, 0.2, 20 および 200 mg の DEHP を尾静脈注射した。その後、妊娠 8.5 日目に胎児を含む子宮脱落膜組織を採取し、組織学的解析に供した。

B. 4. DEHP の胎盤細胞分化への作用の解析：0, 0.2, 20 および 200 μ g/ml の濃度の DEHP 存在下で栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を培養し、増殖能および形態への影響の有無を検討した。

B. 5. 倫理面への配慮

本研究に用いられたマウス (東京大学) およびラット (酪農学園大学) の飼育・と殺は、各大学の動物実験実施規則を遵守して行われた。

2-② DEHP の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響

実験に使用した臍帯血造血幹細胞はインフォームドコンセントにより承諾を得た妊婦の臍帯から出産後に採取し、東海大学の臍帯血バンクに集められたもののうち、移植に使用するためには採取量が過少なため、研究用に提供されたものである。血幹細胞の表面には CD34 と呼ばれる糖タンパク質が選択的に発現している。この CD34 をマーカーとして、臍帯血から造血幹細胞を分離する。CD34 陽性の臍帯血造血幹細胞を 35mm dish に 200 個 / dish 播種し、E2 (10^{-10} ~ 10^{-7} mol/L) 及び DEHP (10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L) を添加した培地 (Metho Cult GF H4434V) 上で、37℃、2週間インキュベートする。2週間のインキュベート後、培地上に形成されるコロニーの形態の違いから分化の方向性を特定し、物質が造血幹細胞の分化及び増殖に与える影響を顕微鏡下で観察し、カウントした。さらに、CD34 陽性の臍帯血造血幹細胞を 96 穴プレートに 500 個 / well 播種し、E2 (10^{-11} ~ 10^{-4} mol/L) 及び DEHP (10^{-11} ~ 10^{-4} mol/L) を添加した培地 (StemSpan SFEM) 上で、37℃、2週間インキュベート後、培地上の細胞数を DNA-Idu Labeling and Detection kit を用いてカウントすることにより増殖に与える影響について検討した。

3. 内分泌かく乱化学物質に対する感受性に関与する遺伝子の解明

候補の3遺伝子（AHR, ESR1, CYP1A1）の遺伝的多型箇所について、ヒトゲノムデータベースおよび多型解析データベース、また文献的な検索を行い、分析すべきDNA多型の箇所を絞り込んだ。その3遺伝子の遺伝的多型の解析法を確立するために、a)DNA抽出方法、b)PCR法のためのプライマー設定と実験的検討、また、c)PCR産物の抽出法、d)Sequencing方法の検討を行った。まず、血液試料はインフォームドコンセントを取得した試料提供者から定法により血液採取。ただし、ヘパリンは以後の酵素反応に影響があるためクエン酸主体の採血管で平均10mlの採血を行った。このうち0.4mlを用い、カートリッジ（Qiagen社）を使用してDNAを調製した。この方法が現在非常に安定して品質のよいゲノムDNAが得られる方法である。約100回分のPCRが行える回収量である。PCRのプライマーをまず設定し、なるべくPCR条件がどの遺伝子のどの箇所でも同様に行えるように配慮し、実験的に確かめた。なお、本研究は遺伝子解析を含むため、3省庁の指針に従い、東海大学医学部の医の倫理委員会での承認を得ると共に、試料提供者には十分な説明を行い、試料提供の同意書を得るように十分配慮した。採取する試料は、血液、毛髪、尿、患者腹水（検査に必須のもの）であることから、試料提供者に直接の不利益はほぼ皆無である。

C. 結果と考察

1-① 生体試料等中のフタル酸エステル類の分析法の開発

GC/MSによる定量では検量線は5ppbから500ppbの間で良好な直線性を示し、血清中

のフタル酸エステルの分析を行うための十分な結果が得られた。ただし、操作ブランクの低減化が重要であり、以下の項目が有効であることが判明した。

- 1) ホールピペット及びメスフラスコ以外の全ての実験器具（エバポレーターのトラップも含む）は、200℃、2時間加熱し、放冷した後に、使用する直前にフタル酸エステル分析用のn-ヘキサンで洗浄する。なお、n-ヘキサン洗浄は手が器具に直接触れないように、ピンセットを用いて実施する。
- 2) 実験操作開始直前には必ず両手を石けんでよく洗い、その後は、極力実験器具以外には触れないようする。特に、ドアノブに触れた場合には必ず両手を洗浄する。
- 3) 使用する実験台はアルミホイルで覆い、毎日、交換する。
- 4) エバポレーターは使用する直前に、フタル酸エステル分析用アセトンを濃縮乾固する。
- 5) 標準品を扱う際は、作業する実験台とは異なる実験台で行う。
- 6) ピペットの先端が実験室内の器具装置等に触れないようにする。
- 7) ホールピペットは必ず基本操作どおり扱い、決して口で吹いたりして溶液を排出しない。
- 8) 腕時計は外しておく。
- 9) 髪の毛は小さくまとめる。
- 10) 爪は短く切る。

本法により、血清にDBP、BBP、DEHPの濃度がそれぞれ100ppbになるように、DiOP、DiNPの濃度が200ppbになるように添加したときの平均回収率は、98.7～123.7%、相対標準偏差は0.86～7.52%であった。また、検出限界については、上述のごとく操作ブ

ランク中の DBP 及び DEHP 濃度を低減化できたので、DBP、BBP、DEHP は、10 ppb に、DiOP、DiNP は 50 ppb に設定した。以上のように、本法は血清中のフタル酸エステルを分析するのに十分な性能を有する分析である。

1-② 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発

C. 1. LC/MS による生体試料中の BPA の分析

BPA の総曝露量を評価するため、抱合体も含めた総 BPA を評価することとした。LC-MS 測定条件の検討では、先に構築した測定条件（平成 12 年度研究成果報告書）に概ね準拠して測定した。しかし、β-グルクロニダーゼ処理した生体試料、特に尿については BPA 溶出付近に夾雑物ピークが出現し、1ng/mL 前後の BPA を評価するには困難な場合が多かった。そこで、LC 分離条件を検討し、尿中の総 BPA 測定に関しては、カラムに Capcell Pak C18-AQ (15cm x 2mm) を、移動相に 0.01% 酢酸-アセトニトリル (60:40) を用いることとした。前処理法の検討の後添加回収実験を経て血清、腹水、尿中の BPA 濃度を測定した。母体血、さい帯血、腹水等計 27 検体を分析した結果、遊離体 BPA はいずれも操作ブランクレベル (0.2 ~ 0.3ng/mL) であった。一方、β-グルクロニダーゼ処理した一部の試料からは 1-2 ng/mL レベルで BPA が検出された。また、健康なボランティア 5 名から採取した一時尿を分析した結果、血液サンプルと同様、遊離体 BPA はいずれも操作ブランクレベル (0.2 ~ 0.3ng/mL) であったが、抱合体を含めた総量では一部試料から 1-2ng/mL レベルで BPA が検出された。

なお、β-グルクロニダーゼ処理した血清及び尿試料は、未処理の試料に比べ、BPA

溶出付近に夾雑物由来と思われるピークが時折出現した。従って、より信頼性の高い分析値を得るためには、タンデムタイプの LC/MS/MS による測定が好ましいと考える。BPA の体内動態を知るため、ボランティアに BPA を低用量 (50μg) 及び高用量 (1mg) を経口的に単回投与した。低用量及び高用量のケースとも、BPA は消化管から速やかに吸収され、投与量の大半は尿中 (クレアチニン補正: 尿中クレアチニン濃度を 1mg/mL として算出、高用量ケースでは約 80% が 24 時間以内に主としてグルクロン酸抱合体として) へ排泄された。しかし、血中への移行量は少なく、その殆どが抱合体 (最高濃度: 43ng/mL : 経口摂取後 0.5 時間) で、その時の遊離体レベルは 0.3ng/mL 程度であった。

C. 2. GC/MS による生体試料中の BPA の分析

成人尿 (n=11) を採取し、GC/MS 法により総 BPA と遊離体 BPA について分析した結果、総 BPA 濃度は、0.19 ~ 1.38ng/mL (平均 0.56ng/mL)、遊離体 BPA 濃度は、0.01 ~ 0.27ng/mL (平均 0.08ng/mL) であり、遊離体 BPA の割合は 2.6 ~ 29% (平均 12%) であった。昨年の一時尿の総 BPA 濃度は平均 0.87ng/mL であり、今年度は昨年に比べ、若干低い値であった。ボランティア 25 人に BPA-d₁₆ 50μg を含む清涼飲料水を投与し、摂取後 5 時間の尿を採取して分析した。総 BPA 濃度は、27 ~ 80ng/mL (平均 57.2ng/mL)、遊離体 BPA 濃度は、0.13 ~ 5.5ng/mL (平均 1.13ng/mL)、排泄量は 17.6 ~ 48.6μg (平均 38μg : 投与量の 76%) であり、遊離体 BPA の割合は 0.34 ~ 8.1% (平均 1.9%) であった。更に、BPA-d₁₆ の排泄をみるため、BPA-d₁₆ 100μg を含む清涼飲料水 100ml を投与し、

一定時間間隔で 26.5 時間採尿し、分析した。その結果、摂取後 30 分後にグルクロン酸抱合体として尿中最高値の 90ng/mL、60 分後には 26ng/mL に減少し、5 時間後にはほぼ元の濃度付近にまで低下した。BPA は消化管から速やかに吸収され、尿中へグルクロン酸抱合体として排泄され、低用量暴露では 24 時間で約 97%が排泄された。

1-③ 生体試料等中のアルキルフェノール類 (4-ノニルフェノール及び 4-オクチルフェノール) の分析法の開発

C. 1. ヒト暴露評価と汚染要因：健常人での暴露モニタリングに関する生体試料分析の報告は非常に少ない。その報告の中で、健常人の血液試料中のアルキルフェノールは 1.0-0.5 ng/ml で検出されているが、検体採取や保存時の汚染が懸念されている。非職業暴露を想定したヒト暴露量の報告で、

(Daily intake on NP < 0.16 mg/day) のように算出している。そこで、各種暴露要因となりうる報告をもとに独自に健常人暴露量の算出を実施した (詳細は分担報告書参照)。

その結果は、Daily intake on NP < 0.2 mg/day となり、上述の報告とほぼ同様の値となった。また、汚染原因の状況としては、食事要因 > 大気要因 > 飲料水となる。その一方、近年プラスチック製医療用具から NP が検出された報告がある。つまり、職業暴露以外の生活環境においても一日最大暴露量よりも高濃度に汚染される可能性がある。

C. 2. 実験環境等の汚染状況：分担報告書に列挙した如く、試薬・実験器具より、汚染が確認された。

C. 3. 新規分析手法の構築

【LC/MS 法を用いたヒト尿中 NP 及び OP の分析】

カラムスイッチング-LC/MS 法を用いて、ヒト尿中 NP 及び OP の分析を検討し、良好な結果を得ることができた。

【GC/MS 法を用いたヒト尿及び血清中 NP 及び OP の分析】

Stir Bar Sorptive Extraction-加熱脱着 GC/MS 法を用いて、ヒト尿及び血清中の NP 及び OP の分析を行った。尿及び血清における添加回収試験でも良好な結果を得ることができた。

本研究では、NP 及び OP のヒト生体試料などの分析ガイドライン作成に伴う基礎的な検討を実施した。暴露要因の追求やその汚染状況を検討した上で、高感度分析手法が要求されることが分かった。従来環境モニタリングに利用されている分析手法では、多量の試料があることが前提であり、その後、誘導体化などの煩雑な作業が必要となる。その一方で、生体試料を対象とした分析法では、可能な限り前処理などの手間をかけず、高感度な測定が求められる。そこで、新規分析手法を構築し、生体試料へ応用することが可能であった。この方法を更に追求し、マニュアル化することにより、ガイドラインとすることが達成できると思われる。

2-① 環境中の内分泌かく乱物質の胎盤機能と胎児発生における影響

C. 1. ラット子宮におけるビスフェノール A (BPA) の代謝動態の解析：ラット子宮での灌流実験系の確立に成功し、これを用いて BPA の代謝を調べたところ、BPA のグルクロン酸抱合体が生成され、漿膜側に排泄されることが分かった。また、UGT1A6 でグル

クロン酸抱合される1-ナフトールも同様の結果が得られた。この子宮灌流法を用いて、性周期でのBPAの解毒能の変化を調べたところ、発情前期が休止期に比べおよそ2倍高い活性を示した。なおその場合も、抱合体は母体側に排泄された。

C. 2. ラット子宮での代謝解毒酵素活性の解析：これまで我々は、BPAは、消化管と肝臓で大部分がグルクロン酸抱合されることを明らかにしてきた。本年度は主に子宮でグルクロン酸抱合している酵素分子種の検索をおこなった。免疫組織染色の結果、UGTはラット子宮内膜上皮細胞・子宮線および卵管上皮細胞に発現していた。この分子種の一つはUGT1A6であったが、肝臓でBPAの抱合を担っているUGT2B1は発現していなかった。分子種特異的抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行ったところ、ラット子宮にはUGT1A6の他に、肝臓では発現していない2Bファミリー分子種も発現しており、発情周期によって発現量が異なると予測された(図4)。UGT2B1は子宮内では発現していないので、BPAをグルクロン酸抱合する分子種はこの中に存在すると思われる。

C. 3. DEHPの胎盤形成および胎児発生への影響の解析：これまで、妊娠雌マウスへの投与実験やTS細胞培養系への添加実験により、ベンツピレンは直接は胎盤細胞の分化にほとんど影響を及ぼさないが、母体細胞でのレチノイン酸合成を増加させることにより、二次的な効果を及ぼす可能性があることを明らかにしてきた。これらの解析法にならば、DEHPの妊娠マウスへの投与実験を行った。その結果、低用量(0.2 mg/kg)投与群の一部で栄養膜巨細胞の過形成が確

認されたが、現時点で他の濃度における栄養膜巨細胞の明確な過形成は見られていない。これは、胎盤形成に影響を及ぼすDEHP濃度に上下の閾値が存在する可能性を示唆し興味深い。胎児の成長(サイズ、反転の有無)には、DEHP投与群と対照群との間で明確な差は見られなかった。

C. 4. DEHPの胎盤培養幹細胞への作用の解析：未分化TS細胞へのDEHPの添加実験では、細胞の増殖能や形態に明確な影響は見られていない。

2-② DEHPの臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響

Colony Assayの結果から、臍帯血造血幹細胞は、DEHP、E2存在下で増殖が有意に亢進することが分かった。また、DEHP及びE2の存在下でともにCFU-GMへの分化の促進、BFU-Eへの分化を抑制する傾向がみられた。また、Colony Assayの増殖能の結果と同様に、DNA-Idu Labeling and Detection Assayの結果でも、臍帯血造血幹細胞の増殖はDEHP、E2存在下で有意に亢進することが分かった。また、両Assayとも、 10^{-7} mol/LのDEHP及び 10^{-9} mol/LのE2存在下で最大の増殖能を示した。以上の結果より、臍帯血造血幹細胞を軟質PVC製のバッグに保存した場合、溶出したDEHPにより分化及び増殖に影響が及ぼされることが示唆された。また、そのコロニー形成能への影響では、E2及びDEHPで類似の傾向がみられたため、この影響に関して、DEHPはE2と類似の機序、つまり、エストロゲンと類似の機序により作用することが示唆された。

3. 内分泌かく乱化学物質に対する感受性に関する遺伝子の解明

C. 1. データおよび文献検索による解析箇所

の選定：AHR, ESR1, CYP1A1 の3つの遺伝子は子宮内膜症との関連が疑われる遺伝子である。これらの遺伝子の一ヌクレオチド多型箇所 (SNPs) について、ヒトゲノムデータベースおよび多型解析データベース、また文献的な検索を行い、分析すべき DNA 多型の箇所を絞り込んだ。現在、ヒトゲノムの SNPs についてはデータベースもかなり充実してきているが、逆に”suspected”と表現されている箇所も多く、実験的な証拠が怪しいものも少なくない。われわれが選定した基準は、少なくともこれまでにその SNP について、何人かの解析があつて、ひどく偏りのない場所として報告があるものである。

C. 2. プライマーおよび DNA 解析方法の決定

決定：遺伝的多型の解析法を確立するために、a)DNA 抽出方法、b)PCR 法のためのプライマー設定と実験的検討、また、c)PCR 産物の抽出法、d)Sequencing 方法の検討を行った。詳しくは研究方法に述べているが、血液試料はクエン酸主体の採血管で平均 10ml の採血を行った。このうち 0.4ml を用い、カートリッジ (Qiagen 社) を使用して DNA を調製した。この方法は非常に安定して品質のよいゲノム DNA が得られる方法である。PCR のプライマーをまず設定し、なるべく PCR 条件がどの遺伝子のどの箇所でも同様に行えるように配慮し、実験的に確かめた。その条件は 94℃30”、56℃40”、72℃1’のサイクルを30回繰り返す方法である。ESR1 のイントロンや AHR についてはそれぞれ3箇所の多型が Sequence で一挙に解析できるようにプライマーをデザインした。PCR 産物はカートリッジでプライマーを除去し、1/100 量を Sequencing に使用した。

C. 3. DNA 多型解析：上記の方法により、2名の患者と8名の健常者を用いて今の解析システムが十分うまく機能していることを示した。これだけのデータでも欧米人と日本人の SNP の分布が異なることが示唆された。今後サンプル数を増やしていくことが重要となってくるが、今回の少数例でも一部の SNP に欧米人と日本人の分布差が出てきたことは、注目に値する。これは今後の解析で、やはり患者群、対照群ともに同じ日本人の集団を解析する必要性があることを示唆していると思われる。

E. 結論

1-① 生体試料等中のフタル酸エステル類の分析法の開発

1. 研究方法に示す GC/MS 条件により、5種のフタル酸エステルの分析を行ったところ、検量線は 5ppb から 500ppb の間で良好な直線性を示し、血清中を分析するための十分な定量性が認められた。
 2. 操作ブランクの低減化に関して検討を行った結果、前述の10項目に注意を払うことにより、操作ブランクを低減化することに成功した。
 3. 血清にフタル酸エステル類を添加したときの回収率は、98.7~123.7%、相対標準偏差は0.86~7.52%であった(添加濃度 DBP、BBP、DEHP:100 ppb、DiOP、DiNP:200 ppb)。
 4. 検出限界については、DBP 及び DEHP を操作ブランクを低減化できたので、DBP、BBP、DEHP は、10 ppb に、DiOP、DiNP は 50 ppb に設定した。
- 従って、本法を用いて、上述の注意点を留意しながらフタル酸エステルの分析を実施すれば、血清中のフタル酸エステル類の濃

度を過剰評価をしてしまう恐れはないと考えられる。

1-② 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発

1. LC/MS 及び GC/MS を用いたビスフェノール A (BPA) の信頼性の高い高感度分析法を構築し、血清 (母体血、さい帯血)、腹水及び尿中の BPA 濃度を測定した。

・血清 (さい帯血、母体血) 及び腹水中の遊離体 BPA 濃度は操作ブランクレベル (0.2ng/mL) であった。一方、抱合体も含めた総 BPA 濃度は、一部の試料からは 1-2ng/mL レベルで検出された。

・尿中では、遊離体 BPA 濃度は平均で 0.08ng/mL、抱合体も含めた総 BPA では、平均で 0.56ng/mL が検出された。

2. 低用量 (50µg) 及び高用量 (1mg) の BPA を経口的に単回摂取し、摂取後の体内動態を調べた。

・BPA は消化管から速やかに吸収され、投与量の約 80-97% が 24 時間以内に尿中 (主としてグルクロン酸抱合体) へ排泄された。従って、一日尿中の BPA を測定することにより BPA の曝露量を評価することが可能と考える。

・尿中への移行量に比べ、血中への移行量は少なく、その殆どが抱合体 (最高濃度: 43ng/mL: 経口摂取後 0.5 時間) で、その時の遊離体 BPA 濃度は約 0.3ng/mL であった。

1-③ 生体試料等中のアルキルフェノール類の分析法の開発

NP 及び OP などの暴露要因は、食事由来が十分に考えられた。そこで、実際に NP 含有するラップフィルムを用いて、自由に食事に利用した後の尿を分析対象とした。その結果をまとめた。ボランティア 10 名 (A-J)

の健常人の尿は、1 人 (0.96ppb) を除き、すべて検出限界以下であった。一方、前述の食事を行った後では、100ppb と高濃度で検出された。この結果は、一時的な暴露であるが、生体内に取り込まれたことを尿を分析することで解明できると考えられる。成人では、フィードバック機構や速やかな代謝機構などにより大きな生体影響は受けられないものと思われるが、胎児や小児などでは、内分泌系などへの影響は受けるものと危惧される。結論としては、更に多数の健常人、妊婦、小児などの生体試料をモニタリングする必要性が十分にあり、来年度以降継続して、研究を推進しなければならない。また、本研究で得られた分析化学的知見を参考に、最新の分析法の発表を考慮して当該化学物質の生体試料の微量分析法ガイドラインを構築する作業を継続する必要がある。

2-① 環境中の内分泌かく乱物質の胎盤機能と胎児発生における影響

ラット子宮を用いた薬物灌流法の確立に成功し、ビスフェノール A は子宮上皮細胞に存在する UGT によってグルクロン酸抱合 (解毒) された後、母体側に排泄される事を突き止めた。すなわち、子宮において薬物曝露に対するバリアーが存在し、胚の存在する子宮内部を守る機構が存在する事が分かった。また、妊娠雌マウスへの DEHP 投与実験では、用量依存的な組織学的異常が見出された。これが直接の影響なのか、あるいは、母体細胞を介した間接的な影響なのかどうかを区別し、その作用機序を明らかにするために、分化を誘導した TS 細胞培養系に各種濃度の DEHP あるいはその代謝産物である MEHP を添加し、胎盤細胞の分化

に対する作用を検討する予定である。

2-② DEHPの臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響

本研究では、DEHPが臍帯血造血幹細胞に及ぼす影響とそのエストロゲン活性についての検討を行った。DEHPが臍帯血造血幹細胞に及ぼす影響については、臍帯血造血幹細胞が移植に使用されるまでの過程のうちいくつかの部分において、PVC製バッグが汎用されており、PVC製バッグから様々な問題点を持つDEHPが溶出するという報告があること、また、臍帯血造血幹細胞はその機能が未熟で未知なものであること、の二つを危惧要因として検討を行った。その結果、DEHPはE2添加時と同様に臍帯血造血幹細胞に対して、その増殖を促進させ、また、増殖に従いCFU-GMへの分化を促進し、BFU-Eへの分化を抑制する傾向がみられた。さらに、臍帯血造血幹細胞はmRNAレベルでの検討によりER α 、ER β を持つことを確認できた。以上のことから、DEHPが臍帯血造血幹細胞の分化及び増殖に影響を及ぼすことが分かり、その際には、ERを介した機序が一つの可能性として考えられることが示唆された。

3. 内分泌かく乱化学物質に対する感受性に関与する遺伝子の解明

今年度の主な成果は以下の4点と考える。子宮内膜症の患者や健常者の試料を暴露量の測定とDNA解析に用いるために倫理面の整備を行い、万全のものとした。

子宮内膜症の疾患感受性候補遺伝子としてアリルヒドロカーボン受容体、エストロゲン受容体、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素等の各遺伝子を対象として、多型部分を増幅するPCR系とそれに続く塩基配列

決定のシステムを確立することができた。

上記3遺伝子の遺伝的多型検討可能箇所は現在のところ9箇所中6箇所であった（患者群2名、対照群8名）。3箇所には今のところ多型が見出されていない。

例数はまだ少ないが、日本人に特有の遺伝子型の分布も検出されている。このことは欧米のデータをそのまま日本人の集団に適用して議論することの危険性を示している。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tadashi Tsukioka, John Brock, Sam Graiser, Johnny Nguyen, Hiroyuki Nakazawa and Tsunehisa Makino, Determination of trace amounts of Bisphenol A in Urine by Negative-Ion Chemical-Ionization-Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Analytical Science, 19, 151(2003)
- 2) Koichi Inoue, Yoshihiro Yoshimura, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa "Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection" The Analyst 125, 1959-1961 (2000)
- 3) Koichi Inoue, Sachiko Kondo, Yuriko Yoshie, Kayoko Kato, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie and Hiroyuki Nakazawa "Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for

food-wrapping into food simulants and foods.” *Food Additives & Contaminants* 18, 157-164 (2001)

4) Koichi Inoue, Migaku Kawaguchi, Fumio Okada, Natsuko Takai, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie, Shun-ichiro Izumi, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa “Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching LC/MS coupled with on-line extraction” *Analytica Chimica Acta*, in press

5) Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H. and Kato, S. Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine. *Drug Metab Dispos* 31: 140-144, 2003.

6) Suemizu, H., Radosavljevic, M., Kimura, M. Sadahiro, S., Yoshimura, S., Bahram, S. and Inoko, H.
A Basolateral Sorting Motif in the MICA Cytoplasmic Tail.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 2971-2976 (2002)

2. 学会発表

1) 堀江正一, 吉田栄充, 中澤裕之, 牧野恒久, LC-MS による魚肉中ノニルフェノール, オクチルフェノールの分析, 第83回日本食品衛生学会(東京)平成14年5月

2) 月岡 忠, John Brock, Sam Graiser, Johnny Nguen, 中澤裕之, 牧野恒久, NCI-GC/MS-SIM による生体試料中のオクチルフェノール, ノニルフェノール及び BPA の定量, 第10回環境化学討論会, 平成13年5月

3) 第5回内分泌かく乱化学物質学会(環境

ホルモン学会): ・ヒト尿中のノニルフェノール及びオクチルフェノールの分析 (Determination of 4-Nonylphenols and 4-Octylphenol in Human Urine by LC/MS) 井之上浩一, 川口研, 岡田文雄, 吉村吉博, 中澤裕之(星薬大), 堀江正一(埼玉衛研), 岡尚男(愛知衛研), 和泉俊一郎, 牧野恒久(東海大・医)

4) Tomikawa, J., Yan, J., Ohgane, J., Hattori, J., Makino, T., Tanaka, S. and Shiota, K. Effect of benzo(a)pyrene on placentation. Society for the Study of Reproduction 35th Annual Meeting (平成14年7月)

5) 松本順也, 井上博紀, 山舗直子, 湯浅亮, 横田博「ラット子宮に存在する内分泌攪乱化学物質抱合UDP-glucuronosyltransferase の役割について」第5回環境ホルモン学会(平成14年11月)

6) 井上博紀, 福島裕介, 工藤聡子, 横田博, 翁長武紀, 加藤精雄「雌ラット肝におけるビスフェノール A 動態の解明」第5回環境ホルモン学会(平成14年11月)

7) 佐々木聖史, 結城豪, 井上博紀, 横田博, 翁長武紀, 加藤精雄「ラット肝および町に置けるビスフェノール A 動態の系統差」第5回環境ホルモン学会(平成14年11月)

8) 大江洋正, 大道寺智, 井上博紀, 横田博, 成川淳一, 翁長武紀, 加藤精雄「ラット精巣灌流法を用いた内分泌攪乱化学物質および植物エストロジェンの動態評価」第5回環境ホルモン学会(平成14年11月)

9) ポリ塩化ビニル製医療用具の安全性評価(第3報):コロニーアッセイ法によるフタル酸エステル類の評価

堀田明子、村野孝代、和泉俊一郎、牧野恒久、吉村吉博、中澤裕之

第122年会日本薬学会（3月26～28日 幕張メッセ）

10) ヒト造血幹細胞、末梢血リンパ球の増殖とプロラクチン；血液バッグからのフタル酸エステルの効果について

堀田明子、和泉俊一郎、森恵生、村野孝代、吉村吉博、中澤裕之、牧野恒久

日本下垂体研究会第17回学術集会（8月1～3日 東京農工大学）

11) 内分泌かく乱化学物質の不妊症婦人における測定（その1）：ビスフェノールA、クロルデン関連物質の血中、腹水中分析と子宮内膜症

貴家剛、和泉俊一郎、奥脇伸二、松林秀彦、鈴木隆弘、牧野恒久

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし