

平成 14 年度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）
分担研究報告書

妊娠期における母体側の遺伝的感受性—不育症例における遺伝子多型解析

分担研究者

佐田 文宏（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師）
水上 尚典（北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座周産期医学分野教授）

主任研究者

岸 玲子（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授）

研究要旨

北海道大学附属病院産婦人科を受診した不育症の症例対照研究により、不育症例では IL6 遺伝子のプロモーター領域の BsrBI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低く（オッズ比 0.5, 95%信頼区間 0.2-0.9）、CYP17 遺伝子のプロモーター領域の MspAI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型（A2）を持つ頻度が有意に高く（オッズ比 1.8, 95%信頼区間 1.1-3.2）、IL1 β 遺伝子のプロモーター領域の AvaI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低かった（オッズ比 0.8, 95%信頼区間 0.3-1.0）。また、CYP1A2 遺伝子 DdeI 多型の変異型ホモ接合の頻度が不育症例で低かったが、統計学的にはボーダーラインであった（オッズ比 0.2, 95%信頼区間 0.0-1.0）。現在、質問紙調査により環境的要因との関連を検討している。今後、先天異常に対する母体側の遺伝的感受性の検討も行う予定である。

研究協力者

山田 秀人

（北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座周産期医学分野助教授）

西條 泰明、近藤 朋子、玉置 淳子

貢 英彦、山田 彩子、櫻町 円香

鳴神 雅史、原口 貴史、田中 和美

（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）

平山 恵美、片山 宙門

（北海道大学医学部附属病院産科婦人科）

近年、免疫学的異常や凝固能異常がその発症機構に関与していることを示唆する研究報告が散見できるが、根本的な原因解明は未だなされていない。内分泌かく乱物質や遺伝的素因が不育症の発症機構に関与している可能性も存在する。

したがって、難治性不育症に対して内分泌かく乱物質の関与の有無を調べることは斬新な手法であり、有用な解析結果が得られる可能性が極めて高いと考えられる。

内分泌かく乱物質の代謝に関与する異物代謝酵素、ステロイド代謝酵素及びサイトカインの遺伝子多型とヒト生殖機能との関連を明らかにすることを目的として本研究を行った。

A. 研究目的

難治性不育症（習慣流産）においては、精査を実施しても約半数はその原因が不明である。原因不明の習慣流産においては、

B. 研究方法

北海道大学医学部附属病院を受診した不育症の患者および少なくとも1度正常分娩を経験した流産の既往のない性、年齢、居住地を合わせた健常女性を対象とした。対象者の末梢血から通常の方法でDNAを抽出した。Ah受容体、シトクロムP450のアイソザイムであるCYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP17、グルタチオン転移酵素のアイソザイムであるGSTM1、GSTT1、GSTP1、およびサイトカインのインターロイキンの1種のIL1 β とIL6の遺伝子多型を解析した。PCR-RFLP法またはReal-time PCR法により、各遺伝子の遺伝子型を判定し、ロジスティック回帰分析により、オッズ比と95%信頼区間を求めた。同時に、質問紙調査を実施し、生活習慣、食事、居住地、職業等の環境要因の検討も行った。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学大学院医学研究科医学倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。以上のように、本研究は、倫理面の十分な配慮のうえを行った。

C. 研究結果

不育症例および対照となる健常女性のGSTM1、GSTT1、GSTP1、AhR、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP17、IL1 β 、IL6遺伝子多型における遺伝子型の頻度を表1に示した。GSTM1遺伝子欠損型の頻度は不育症例で高く、不育症のリスクを高めることが示唆された(オッズ比2.2、95%信頼区間1.4-3.7)。

表1 不育症例における各遺伝子型の頻度

	症例 人数(割合)	対照 人数(割合)	オッズ比 (95%信頼区間)
GSTM1	115	160	
present	40 (35%)	87 (54%)	1.0
null	75 (65%)	73 (46%)	2.2 (1.4-3.7)
GSTT1	115	160	
present	61 (53%)	81 (51%)	1.0
null	54 (47%)	79 (49%)	1.0 (0.6-1.6)
GSTP1 (Ile105Val)	116	182	
Ile/Ile	90 (78%)	141 (78%)	1.0
Ile/Val	26 (22%)	41 (22%)	1.0 (0.6-1.7)
AhR (Arg554Lys)	116	162	
Arg/Arg	24 (21%)	32 (20%)	1.0
Arg/Lys	55 (47%)	84 (52%)	0.9 (0.5-1.7)
Lys/Lys	37 (32%)	46 (28%)	1.1 (0.5-2.2)
CYP1A1 (MspI)	118	162	
m1/m1	46 (39%)	56 (35%)	1.0
m1/m2	50 (42%)	78 (48%)	0.8 (0.4-1.3)
m2/m2	22 (19%)	26 (17%)	0.9 (0.5-1.8)
CYP1A2 (DdeI)	107	165	
G/G	68 (64%)	100 (61%)	1.0
G/A	37 (34%)	52 (31%)	1.0 (0.6-1.7)
A/A	2 (2%)	13 (8%)	0.2 (0.0-1.0)
CYP1B1 (L432V)	118	188	
Leu/Leu	87 (74%)	152 (81%)	1.0
Leu/Val	27 (23%)	33 (18%)	1.4 (0.6-2.8)
Val/Val	4 (3%)	3 (1%)	2.3 (0.5-10)
CYP17 (MspAI)	117	165	
A1/A1	24 (20%)	53 (32%)	1.0
A1/A2	64 (55%)	84 (51%)	1.7 (0.9-3.0)
A2/A2	29 (25%)	28 (17%)	2.3 (1.1-3.2)
A1/A2 + A2/A2	93 (80%)	112 (68%)	1.8 (1.1-3.2)
IL1 β (-511C/G)	97	169	
C/C	29 (30%)	33 (20%)	1.0
C/G	42 (43%)	61 (36%)	0.8 (0.4-1.4)
G/G	26 (27%)	75 (44%)	0.4 (0.2-0.7)
C/G + G/G	68 (70%)	136 (80%)	0.8 (0.3-1.0)
IL6 (-634C/G)	76	93	
C/C	58 (76%)	56 (64%)	1.0
C/G+G/G	18 (24%)	37 (36%)	0.5 (0.2-0.9)
IL6 (-174G/C)	76	93	
G/G	76 (100%)	93 (100%)	-

今回新たに、不育症例では IL6 遺伝子のプロモーター領域の BsrBI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低いこと (オッズ比 0.5, 95%信頼区間 0.2-0.9)、CYP17 遺伝子のプロモーター領域の MspAI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型 (A2) を持つ頻度が有意に高いこと (オッズ比 1.8, 95%信頼区間 1.1-3.2)、IL1 β 遺伝子のプロモーター領域の AvaI 多型で少なくとも 1 本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低いこと (オッズ比 0.8, 95%信頼区間 0.3-1.0) から、これらの遺伝子多型と不育症との関連が示唆された。また、CYP1A2 遺伝子 DdeI 多型の変異型ホモ接合の頻度が不育症例で低かったが、統計学的にはボーダーラインであった (オッズ比 0.2, 95%信頼区間 0.0-1.0)。現在、質問紙調査により環境的要因との関連および遺伝子同士の関連を検討している。

D. 考察

不育症は妊娠女性の 2~3%に発生すると推定され、子宮奇形や染色体異常などの基礎疾患がなく原因不明のものも半数近くをしめる。そのなかで、妊娠中の Th1/Th2 バランスの影響が想定され、インターロイキン-6 (IL-6) は IL-10 等とともに妊娠時に増加し、妊娠の維持に重要な働きをしていると考えられる¹。これまでのサイトカイン関連の遺伝子多型と不育症についての報告では IL-10 や TNF- α や IFN- γ の関連はみられていない²。今回検討した IL-634G carrier は野生型に比べ IL-6 濃度が上昇しやすいことが想定される (特に妊娠時などの免疫学的に刺激を受けたとき)。不育症例で IL-6-634G carrier の頻度が低く、-634G 型は妊娠の継続に保護的な影響を及ぼすことが示唆された。今後、妊娠時の IL-6 濃度と遺伝子多型の検討が必要である。

これまでに CYP17 遺伝子多型と不育症との関連を示した報告はないが、CYP17 遺伝子の A2 アリルが乳がん、卵巣がん、多嚢胞性卵巣症候群などのリスクを高めるという報告があり、エストロゲン代謝の何らかの変化がヒト生殖器系疾患のリスク要因となる可能性が考えられる³。変異型の A2 アリルは Sp-1 型配列 CCACC を持つが、in vitro 実験では、従来考えられていた転写活性の上昇は認められず、A2 アリルがリスク要因となる機序は明らかでない⁴。A2 アリルを持つ人の血清エストロゲンレベルが、持たない人よりも高値であるという報告もあるが、そうでないという報告もあり、一致した結果は得られていない^{4,5}。不育症との関連を明らかにするには、全身や血清レベルだけでなく、子宮脱落膜内などの局所的なエストロゲン濃度を調べることも必要であると考えられる。A2 アリルのホルモン合成系での働きを解明することにより、将来 A2 アリル保持者への介入研究や化学予防などの対策が可能になるかもしれない。

先天異常の場合も、母親または児の遺伝素因に環境的な要因が加わり、児が発症する可能性が考えられている。これまでに食事、喫煙などの環境的要因と代謝酵素の遺伝子多型などの遺伝的要因に関して研究されてきた。特に、神経管欠損、口蓋裂、口唇裂などの先天異常に関して、葉酸やビタミン摂取と葉酸、メチオニン、ホモシステインの代謝酵素の遺伝子多型との関連が数多く報告されている。Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) には遺伝子多型 (677C/T) があり、T アレルは MTHFR の稼働効率が悪いために、ホモシステインの血中濃度が高くなる。とくに葉酸の濃度が低いとさらにこの傾向が強くなり、先天異常の原因になると考えられている。尿道下裂、停留精巣に関しては、ステロイド代謝酵素、受容体など、口蓋裂、

口唇裂に関しては、母親の喫煙と関連して異物(薬物)代謝酵素の遺伝子多型も検討されているが、低出生体重もこのような異物代謝酵素の遺伝子多型と関連があるという報告が最近出された(表2)。来年度には、このような代謝酵素の遺伝子多型と産科異常、先天異常との関連を詳細に解析したいと考えている。

E. 結論

不育症例では IL6 遺伝子のプロモーター領域の BsrBI 多型で少なくとも1本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低く(オッズ比 0.5, 95%信頼区間 0.2-0.9)、CYP17 遺伝子のプロモーター領域の MspAI 多型で少なくとも1本のアリルに変異型(A2)を持つ頻度が有意に高く(オッズ比 1.8, 95%信頼区間 1.1-3.2)、IL1 β 遺伝子のプロモーター領域の AvaI 多型で少なくとも1本のアリルに変異型を持つ頻度が有意に低かった(オッズ比 0.8, 95%信頼区間 0.3-1.0)。また、CYP1A2 遺伝子 DdeI 多型の変異型ホモ接合の頻度が不育症例で低かったが、統計学的にはボーダーラインであった(オッズ比 0.2, 95%信頼区間 0.0-1.0)。環境要因との交互作用を検討するとともに、今後、先天異常に対する母体側の遺伝的感受性の検討も行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y, Tozaki S, Kobashi G, Kato EH, Fujimoto S, Kishi R: Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 9: 165-169, 2003

2. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kataoka S, Furuta I, Minakami H, Kishi R: Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the interleukin-6 gene and the risk of recurrent pregnancy loss, submitted.
3. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH, Kataoka S, Saijo Y, Kondo T, Tamaki J, Minakami H, Kishi R. A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss, submitted.

2) 学会発表

1. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong YY, Kobashi G, Kato EH, Fujimoto S, Kishi R. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes and risk of recurrent spontaneous abortion. XVI IEA World Congress of Epidemiology, Montreal, August 18-22, 2002.
2. Sata F, Kondo T, Gong YY, Saijo Y, Sasaki S, Yamagishi H, Tsuge M, Nagase S, Kato EH, Mikuni M, Yamada H, Fujimoto S, Kishi R. Genetic Polymorphisms and human female reproductive toxicity. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Sapporo, July 22-26, 2002.
3. 西條泰明, 佐田文宏, 山田秀人, 近藤朋子, 平山恵美, 古田伊都子, 片岡宙門, 水上尚典, 岸 玲子: インターロイキン α 6 遺伝子多型と不育症、第13回日本疫学会、福岡、2003年1月24-25日。
4. 佐田文宏、山田秀人、山田彩子、平山恵美、片岡宙門、西條泰明、近藤朋子、玉置淳子、水上尚典、岸 玲子: CYP17 遺伝子多型と不育症リスク、第73回日本衛生学会、大分、2003年3月26-29日。

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

1. Clark DA, Arck PC, Chaouat G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol* 41:5-22, 1999.
2. Babbage SJ, Arkwright PD, Vince GS, Perrey C, Pravica V, Quenby S, Bates M, Hutchinson IV. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 51:21-27, 2001.
3. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:843-54, 1999.
4. Kristensen VN, Haraldsen EK, Anderson KB, Lonning PE, Erikstein B, Karesen R, Gabrielsen OS, Borresen-Dale, AL. CYP17 and breast cancer risk: the polymorphism in the 5'-flanking area of the gene does not influence binding to Sp-1. *Cancer Res* 59: 2825-2828, 1999.
5. Feigelson HS, Shames LS, Pike MC, Coetzee GA, Stanczyk FZ, Henderson BE. Cytochrome P450c17 α gene (*CYP17*) polymorphism is associated with serum oestrogen and progesterone concentration. *Cancer Res* 58: 585-587, 1998.

表2 最近報告された主な産科異常、先天異常と遺伝子多型との関連

Anomaly	Gene	Mutation/polymorphism	Finding	First author
Low birthweight	IGF-1	Allele 191, 198 Promoter polymorphism	215g lower interaction interaction	Arends N (2002) Vaessen N (2002)
	CYP1A1 GSTT1	MspI (maternal smoking) null (maternal smoking)		Wang X (2002) Wang X (2002)
Hypospadias	AR	CAG repeats	negative	Muroya K (2001)
	SRD5A2	A49T, L113V, H231R	isolated	Silver RI (1999)
Cryptorchidism	SRD5A2		negative	Suzuki Y (2002)
NTDs	MTHFR	C677T, A1298C	OR 6.1 negative OR 5.8 negative OR 2.9, 4.1	De Marco P (2001)
		C677T (mother, child)		Al-Gazali LI (2001)
		C677T (mother)		Martinez de VLE (2001)
		677CT/1298AC		Richter B (2001)
		C677T		Johanning GL (2000)
		C677T (parent)		Davalos IP (2000)
		C677T (mother)		Lucock M (2000)
		677CT/1298CC, 677TT/1298CC		Isotalo PA (2000)
		C677T		Mutchinick OM (1999)
		C677T		Johnson WG (1999)
	C677T (combined MTRR variant)	OR 2.9, 4.1	Wilson A (2000)	
A1298C		Trembath D (1999)		
MTRR	A66G (low cobalamin)	OR 2.5, 4.8	Wilson A (2000)	
RFC-1	A80G		De Marco P (2001)	
CBS	MS	844ins68	interaction	Richter B (2001)
		844ins68	interaction	Speer MC (1999)
		A2756G		GL (2000)
		A2756G (mother)		Lucock M (2000)
	NAP1L2	SNPs in the CpG island		Rogner UC (2002)
	PDGFRA	promoter haplotypes		Joosten PH (2001)
Cleft lip and palate	MTHFR	maternal genotype	negative	Blanton SH (2002)
		C677T		Prescott NJ (2002)
		C677T	OR 3.2	Gaspar DA (1999)
	GSTM1	null (maternal smoking)	negative	Mills JL (1999)
	GSTT1	null (maternal smoking)	OR 3.2	Hartsfield JK (2001)
	CYP1A1	Ile/Val (maternal smoking)	negative	van Rooij IA (2001)
	EPHX1	Tyr113His (maternal smoking)	negative	van Rooij IA (2001)
Down syndrome	MTHFR	C677T (mother)	p=0.74	Hartsfield JK (2001)
		C677T (mother, child)		O'Leary VB (2002)
		C677T (mother)	OR 1.9	Al-Gazali LI (2001)
		C677T (mother)	OR 2.6	Hobbs CA (2000)
	MTRR	A66G (mother)	p=0.0028	James SJ (1999)
	A66G (mother)	OR 2.6	O'Leary VB (2002)	
				Hobbs CA (2000)

厚生科学研究費補助金 (研究事業)
(分担) 研究報告書

cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価

(分担) 研究者 藤田正一 (北海道大学・大学院獣医学研究科 教授)

研究要旨

シトクロム P450 (P450、CYP) は広範な生物種に存在し、生理活性物質の生合成や、医薬品・環境汚染物質などの代謝排泄に関与する、生体のホメオスタシス維持の為に重要な酵素である。P450 には様々な分子種が存在するが、P450 の遺伝多形によって、薬物を中心とした外来異物のクリアランス、毒性発現が異なることが報告されている。そこで、本研究では、異物代謝酵素群及びその調節因子の遺伝的多形を一度に解析するために、新規マイクロアレイの開発を試みた。

また、フタル酸エステルは、胎児期曝露によって尿道下裂など、生殖器の形成異常を引き起こすことが実験動物で報告されている。しかし、フタル酸エステルがどのような経路で精巣毒性を引き起こすのかについては不明な点も多い。そこで、実験動物にフタル酸エステルを投与し、精巣毒性発現のメカニズムについて調べた。ジブチルフタル酸 (DBP) の毒性発現機序を明らかにするため、マイクロアレイ法を用いて、精巣で変動する遺伝子群のスクリーニングを行った。DBP 曝露では、精巣において、CYP4 ファミリーを中心として、約 110 遺伝子の発現が上昇することが明かとなった。一方、ジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) に関しては、PPAR α を介して毒性を発現することが PPAR α ノックアウトマウスなどの報告から分かっている。そこで、DEHP が精巣のホメオスタシス、特に、テストステロン生合成および代謝にどのような影響を与えるのかについて調べた。DEHP 曝露ラットについて、テストステロン生合成に関与する 17 β HSD 活性に変動は見られなかったが、テストステロン水酸化を行う P450 や、テストステロン活性型であるデヒドロテストステロンを産生するステロイド 5 α 還元酵素の発現及び活性が上昇することが分かった。また、精子形成・維持など精巣のホメオスタシスに不可欠なエストロゲン産生するアロマターゼに関しては、DEHP 曝露で mRNA レベルが減少することが明かとなった。

研究協力者

数坂昭夫 (北海道大学・大学院獣医学研究科・助教授)、石塚真由美 (北海道大学・大学院獣医学研究科・助手)

A. 研究目的

P450 は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイドホルモン

やビタミン、エイコサノイドなどの生理活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの外来異物代謝も担っている一酸素添加酵素である。P450 には様々な分子種が存在し、哺乳類では数百に及ぶ分子種が報告されている。一方で、P450 に存在する遺伝的多形は、薬物の薬効・毒性を決定することが知られている。例えば、CYP2D6 はヒトにおいて、

肝臓における総 P450 発現量の 2-10% を占めているに過ぎないが、ヒト臨床に用いられる薬物の 3 割以上に関与するため、薬物の薬効を決定する重要な酵素である。同時に、CYP2D6 依存の薬物代謝活性は日本人や中国人において白人よりも低く、その低活性の原因が遺伝的多形（主に CYP2D6*10）に起因することも報告されている。

また、P450 そのものではなく、その発現調節機構が原因で、P450 発現レベルに差が現れることもある。DA ラットは、ヒト CYP2D サブファミリー-poor metabolizer (PM) モデル動物であるが、近年の我々の研究から、CYP2D1mRNA だけではなく、肝臓において薬物代謝活性の主体となっている CYP2D2mRNA 発現レベルも顕著に抑制されていることが明らかとなった。実際、CYP2D2 低発現によって、DA ラットでは、デブリソキンやブニトロロール、ブフラロールなど、多くの薬物代謝に関して低活性であることが分かっている。

このように、P450 及びその制御機構に存在する遺伝的多形は、外来異物のクリアランスを決定する重要な要素となっている。P450 は薬物だけではなく、喫煙物質や食物由来の外来異物も代謝するため、CYP1A1 遺伝多形と肺癌、CYP1B1 遺伝多形と大腸癌発生率との関係も報告されている。P450 の中でも、CYP1、CYP2、CYP3、CYP4 ファミリーは様々な外来異物代謝に関与することが知られており、ダイオキシン類や多環芳香族、PCB、農薬などを代謝する。外来異物代謝 P450 分子種の調節因子として、AhR (aryl hydrocarbon receptor) や PXR (pregnane X receptor)、CAR (constitutive androstane receptor)、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) が知られているが、これらの受容体群は、ダイオキシン類や

PCB、フタル酸エステルなどのリガンド受容体にもなっている。しかし、これまで、外来異物の中でも、環境汚染物質の感受性に対して、P450 及びそのレギュレーター遺伝多形がどの様に関与するのかについての報告は少ない。環境汚染物質は、フタル酸エステルのように、胎児期・新生児期のあるクリティカルな期間の短期曝露によって、尿道下裂などの先天異常を引き起こすことが動物実験で示されている。尿道下裂や精巣停留は比較的発生率の多い生殖器先天異常であるが、胎児期におけるテストステロン生合成、テストステロンからデヒドロテストステロン (DHT) への変換活性、アンドロゲン受容体の標的遺伝子転写活性機構になんらかの障害が起こることで発生する。動物実験や細胞実験では、ダイオキシン類やビスフェノール A による P450 テストステロン代謝異常、アンドロゲン受容体活性化阻害が報告されている。そこで、本研究では、P450 の発現変動や遺伝多形が環境汚染物質を含む様々な外来異物の毒性発現にどの様に関与しているのかを明らかにする。

本年度は、外来異物を代謝する P450 をはじめとする代謝酵素群とその調節因子の遺伝多形を解析するために、マイクロアレイの開発を行う。また、先天異常の尿道下裂や精巣停留の原因となる精巣におけるテストステロン生合成や代謝・毒性発現に、環境汚染物質、特に内分泌攪乱化学物質であるフタル酸エステルがどのような影響を及ぼすのかについて、動物実験から明らかにした。フタル酸エステルとして、一般的に使われるフタル酸ジブチル (DBP) とジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) を用いた。これらのフタル酸エステルは、細胞実験や動物実験から、曝露によって精子細胞の脱落、セルトリー細胞の空胞化、精巣萎縮を特徴とする精巣障害が認められ、妊娠ラッ

トへの曝露では尿道下裂なども報告されている。

DBP を投与したラット肝臓において P450 分子種の一つ CYP4A の発現が増加することから、フタル酸ジブチルもしくはその代謝物は PPAR に結合して生体に作用することが考えられるが同定はされていない。昨年度までの我々の研究で、フタル酸ジブチルが PPAR α 及び β の signal pathway を経由している可能性が考えられた。そこで、PPAR α 、 β に選択性の高いリガンドをラットに投与して、精巣を用いてマイクロアレイによる解析を行い、DBP による精巣毒性発現メカニズムの解明を試みた。

一方で、同じフタル酸エステルである DEHP に関しては、既に PPAR α に結合して毒性を発現することが知られている。しかし、DEHP がどのようにして精巣毒性を引き起こすのか、そのメカニズムについては不明な点が多い。特に、精巣の重要な機能のひとつであるテストステロン産生・代謝機構に DEHP が及ぼす影響についてはこれまで報告がない。そこで、精巣未発達の実験動物に DEHP を投与し、DEHP がテストステロン代謝・生合成にどのような影響を及ぼすのかを明らかにした。

B. 研究方法

1. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

薬物代謝酵素に存在する遺伝的多形を簡便に調べる為に、マイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。マイクロアレイ法ではサーマルサイクラー以外の特殊な機械を必要とせず、発色によって変異アレルを検出することができ、また、一度に多数の遺伝子について調べることができる。また、PCR 簡略化によって、PCR-RFLP 法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができる可能性がある。

そこで、P450、GST (グルタチオン抱合酵素) などの薬物代謝酵素から、日本人に多形が多い変異アレルを選定し、マイクロアレイの作成を行う。

2. フタル酸エステルが精巣に及ぼす影響

2-1) DBP による精巣毒性のメカニズム解明

フタル酸ジブチル (DBP: 500mg/kg)、コントロールとしてコーンオイル、そして、PPAR α のリガンドとして clofibrate (30mg/kg)、PPAR β のリガンドとして 2-bromohexadecanoic acid (2BR16C: 10mg/kg) を 7 週齢オスおよびメスラット (Wistar 系) 4 匹ずつ、計 10 群 (オス、メス 5 群ずつ) に 1 週間、連続経口投与した。1 週間後、精巣において、フタル酸ジブチルおよび PPAR β リガンド 2BR16C 投与群の mRNA 発現プロファイルや発現レベルがどのように変動するか、その作用機構を比較検討する為 cDNA マイクロアレイを用いて調べた。

2-2) DEHP テストステロン代謝に及ぼす影響

Wistar ラットオス 3 週齢にフタル酸エステルであるジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) を 0、100mg、1000mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣におけるテストステロン代謝活性にどのような影響を及ぼすかを調べた。テストステロン生合成に関与する 17 β HSD、活性型テストステロン DHT 生合成に関与するステロイド 5 α 還元酵素、また、テストステロンを水酸化し、テストステロンのクリアランスに関与する CYP3A 及び CYP2C11、テストステロンをエストロゲンに変換する CYP19 (アロマターゼ) などについて発現や代謝活性を HPLC-UV やウエスタンブロッティング法、RT-PCR 法を

用いて測定した。血中テストステロン濃度は ELISA 法により解析した。

C. 研究成果

1. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

P450 は CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調節因子として、GSTM1、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR の 11 遺伝子、の 32 アレルをリストアップした (Table1)。

変異場所の増幅に PCR を用いるため、現在、多数 primer を用いた PCR 法の条件設定を行っている。現在、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C19、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR に関しては、primer の作成と、PCR・ハイブリ条件の設定が終了している。

2. フタル酸エステルが精巣に及ぼす影響

2-1) DBP による精巣毒性経路の同定

DBP 曝露によって、精巣では、ホスホリパーゼや G 蛋白、hormone receptors、VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1) や TGF β (transforming growth factor beta) 受容体など growth factor 関連分子あるいは oncogene、proto-oncogene、tumor suppressor、また、カリウムチャネルを始めとする ion channels など、約 110 遺伝子の発現レベルが上昇することが分かった (Table 2)。DBP 投与によって、肝臓で発現が誘導されることが知られているシトクロム P450 分子種の一つ、CYP4A3、CYP4A8 など CYP4A サブファミリー mRNA は、精巣においても発現レベルが 3.0-3.6 倍に増加していた。COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) と PPAR は相互的に転写活性化することが報告されているが、今回の結果でも、DBP 投与群では COUP-TFI

の発現量が増加していることが明らかとなった。また、今回のマイクロアレイ解析から、DBP 曝露がホスホリパーゼ C isoform である δ 、 γ 、 β のいずれの発現レベルも上昇させることが明らかとなった。また DBP 投与によって、数種のカルシウム結合蛋白の発現量が増加しており、DBP がこの系の活性化に影響する可能性が示唆された。

一方、2BR16C 投与群では約 180 遺伝子の発現レベルが上昇した。DBP と 2BR16C 投与群の両群のラット精巣に発現する mRNA の発現頻度を比較すると、両群において発現量が増加する共通遺伝子は約 20 種であった。

2-2) DEHP が精巣テストステロン代謝に及ぼす影響

DEHP 曝露によって血中テストステロン濃度は減少した (Figure 1)。そこで、精巣においてテストステロン生合成に関与する 17 β HSD 活性を測定した (Figure 2)。これまで 17 β HSD 発現が減少するとの報告があったが、今回の結果では、17 β HSD 活性に大きな変化は認められなかった。

テストステロン水酸化酵素である CYP3A 及び CYP2C11 はそれぞれ肝臓において 6 β 位水酸化、16 α 位水酸化を行う。今回の結果から、テストステロンの精巣における主要な水酸化代謝物は、肝臓と同様に 6 β 位水酸化体および 16 α 位水酸化体であることが分かった。DEHP 投与によって、精巣の CYP3A2 および CYP2C11 は蛋白レベルで発現が上昇し、それに伴ってテストステロン水酸化活性も増加することが明らかとなった (Figure3-4)。また、CYP3A2 および CYP2C11 依存の活性であることが分かっているジアゼパム 3 位水酸化、N 脱メチル化活性についても、同様に測定を行った (Figure 5)。ジアゼパム代謝活性は、それぞれ、CYP3A2、CYP2C11 蛋白発現レベル、

および、テストステロン代謝活性レベルに一致していた。

5 α 還元酵素はテストステロンをよりアンドロゲン受容体への結合性が強い DHT に変換する。DHT 感受性は精巣よりも前立腺で顕著とされている。また、肝臓においても 5 α 還元酵素が発現することが報告されている。今回の結果から、精巣における 5 α 還元酵素活性は、DEHP 曝露によって上昇することが明らかとなった (Figure 6-B)。しかし、肝臓における 5 α 還元酵素活性は DEHP によって変動を受けなかった (Figure 6-A)。

CYP19 (アロマターゼ) は P450 分子種のひとつで、アンドロゲンをエストロゲンに変換する。CYP19 ノックアウトマウスは性行動に不可欠であり、また、精巣のエストロゲンは精子形成・維持に重要であることが最近の研究で報告されている。今回の結果では、DEHP 曝露は精巣の CYP19mRNA 発現レベルを減少させることが明らかとなった (Figure 7)。

D. 考察

1. フタル酸エステルによる精巣毒性発現機序の解明

1-1) DBP 曝露による精巣 mRNA 発現変動のスクリーニング

DBP 投与によって、肝臓で発現が誘導されることが知られている CYP4A サブファミリー mRNA は、精巣においても発現レベルが増加していた。CYP4 ファミリーは PPAR α によって主にその発現が調節されていることが報告されている。フタル酸エステルの一つ DEHP は PPAR α に結合し、受容体を活性化することが報告されているが、DBP も同様に PPAR α を活性化することが考えられた。また、DEHP は PPAR α 結合するが、代謝されると MEHP となり、PPAR γ を活性化することが既に報告されている。

DBP は DEHP 同様、代謝されてモノブチルフタル酸 (MBP) に変換される。今回の実験において、マイクロアレイ解析では、発現レベルの変動する遺伝子群は、DBP 投与群と PPAR β リガンド投与群の精巣において一部重なり、一部異なっていた。特に、マイクロアレイ解析から、DBP あるいは PPAR β リガンド投与によって、精巣で変動する共通 mRNA が 20 遺伝子同定された。従って、DBP が精巣において PPAR α を活性化するだけでなく、DBP 代謝物が他の PPAR アイソフォームを活性化する可能性も考えられた。

1-2) DEHP 曝露による精巣テストステロン代謝への影響

DEHP 曝露によって、精巣におけるテストステロンの代謝活性が変動することが明らかとなった。

一方で、今回の DEHP 曝露結果によって、精巣でエストロゲン産生酵素である CYP19mRNA 発現レベルが減少することが分かった。PPAR γ リガンド thiazolidinediones の一種 troglitazone はエストロゲン産生酵素・アロマターゼ (CYP19) のプロモーター領域において、PPAR γ を介して、アロマターゼの転写活性を阻害することが報告されている。一方、ゼブラフィッシュでは、CYP19 の 5' 領域に PPAR α 結合サイトが存在し、実験動物に対する PPAR α リガンド WY-14643 の投与は CYP19 発現レベルを上昇させることが分かっている。DEHP は PPAR α のリガンドであるが、その代謝物 MEHP (モノエチルヘキシルフタル酸) はアロマターゼ発現レベルを転写レベルで抑制することが報告された。従って、PPAR α リガンドが代謝を受け、代謝物が PPAR γ など他の PPAR isoform に結合し、その機能を活性化・あるいは阻害してステロイド生合成あるいは

その代謝に影響を及ぼす可能性が考えられる。

E. 結論

精巣におけるフタル酸エステル曝露は、DBP、DEHP ともに、PPAR α を活性化させ、同時に、その代謝物が他の毒性発現経路を活性化させることが考えられた。また、DEHP 曝露によって、精巣のステロイド代謝活性が変動することが示された。

F. 健康危険情報

DBP の精巣における毒性発現には、PPAR α と同時にその代謝物が異なるパスウェイで影響を及ぼす可能性が考えられた。DEHP 曝露は、肝臓および精巣において、ステロイド代謝酵素に及ぼす影響が異なることが分かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats. Arch Toxicol. (in press)

Sakamoto QK, Naki K, Aoto T, Yokoyama A., Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. Chemosphere. (in press)

Sakamoto KQ, Kunisue T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F,

Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and white-tailed sea eagles, threatened species, in Hokkaido, Japan. Environ Toxicol Chem. 2002 Apr;21(4):842-7.

Chiba I, Sakakibara A, Iwata TH, Ishizuka M, Tanabe S, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. Hepatic microsomal cytochrome p450s and chlorinated hydrocarbons in largha and ribbon seals from Hokkaido, Japan: differential response of seal species to Ah receptor agonist exposure. Environ Toxicol Chem. 2002 Apr;21(4):794-806.

Tilley RE, Kemp GD, Teramitsu I, Hall AJ. Isolation of two cytochrome P450 cDNAs, CYP1A1 and CYP1A2, from harp seal (*Phoca groenlandica*) and grey seal (*Halichoerus grypus*). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2002 Jun;132(2):181-91.

2. 学会発表

1) 第 133 回日本獣医学会 (平成 14 年春)

① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝酵素の誘導

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響

2) 北海道薬物作用談話会

雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響

3) 環境ホルモン学会 第5回研究発表会
Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats

4) 野生動物と交通
ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価

5) 14th International symposium on microsomes and drug oxidations
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes

6) 第135回日本獣医学会
①マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

②ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価

③Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

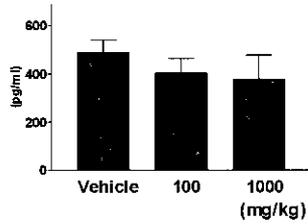
Table 1. 多形アレイ遺伝子リスト

gene	ACC No.	allele	position	DNA	Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee
CYP1A1	X02612	wild	6819	A	
		2C	6819	G	2455A>G(I462V)
CYP1A2	dbSNP ID rs2069514	wild	-3860	G	
		1C	-3860	A	-3858G>A
CYP1B1	U56438	wild	4160	G	
		2	4160	T	355G>T(A119S)
		wild	8131	C	
		3	8131	G	4326C>G(L432V)
CYP2A6	U22027	wild	6867-	ttgt...	
		4	6867-	-	allele deletion
		wild	6416	T	
		7	6416	C	1412T>C(I471T)
CYP2C19	gi22051774(NT_030059)	wild	180546	G	
		3	180546	A	636G>A(stop codon)
		wild	1806252	G	
		2A	1806252	A	681G>A(splicing defect)
CYP2D6	M33189	wild			
		5	deletion		allele deletion
		wild	913	C	
		10	913	T	100C>T
GSTM1	gi22042153(NT_029860)	wild			
		0	deletion		allele deletion
GSTP1	M24485	wild	2627	A	
		1b	2627	G	I105V
NAT2	X14672	wild	1311	G	
		6	1311	A	590G>A(R197Q)
		wild	1578	G	
		7	1578	A	857G>A(G286E)
AhR	dbSNP ID rs2066853	wild		A	
		R554K		G	R554K
PPAR gamma	AB005520	wild	892	C	
		Pro12Ala	892	G	Pro12Ala

Table 2. DBP 曝露によって精巣で発現が増加する遺伝子群

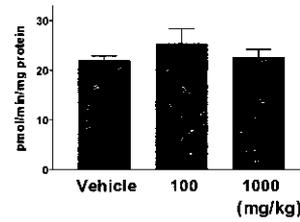
発現増加が同定された遺伝子の機能	同定された遺伝子数
Amino- & Carboxypeptidases	1
Aspartic Proteases	1
Calcium-Binding Proteins	3
Cell Cycle-Regulating Kinases	1
Cell Surface Antigens	3
Complex Lipid Metabolism	3
Energy Metabolism	3
Extracellular Transporters & Carrier Proteins	1
Facilitated Diffusion Proteins	2
Functionally Unclassified Proteins	2
G Protein-Coupled Receptors	3
G Proteins	6
Growth Factor & Chemokine Receptors	6
Growth Factors, Cytokines & Chemokines	3
GTP/GDP Exchangers & GTPase Activity Modulators	1
Hormone Receptors	11
Hormones	4
Interleukins & Interferons	1
Intracellular Kinase Network Members	7
Intracellular Protein Phosphatases	2
Kinase Activators & Inhibitors	1
Ligand-Gated Ion Channels	3
Neurotransmitter Receptors	1
Nuclear Receptors	1
Nucleotide Metabolism	1
Oncogenes & Tumor Suppressors	6
Other Cytoskeleton & Motility Proteins	3
Other Extracellular Communication Proteins	1
Other Intracellular Transducers, Effectors & Modulators	6
Other Membrane Channels & Transporters	2
Other Receptors (by Ligands)	3
Other Trafficking & Targeting Proteins	2
Phospholipases & Phosphoinositol Kinases	3
Protease Inhibitors	1
Proteosomal Proteins	1
Serine Proteases	1
Simple Carbohydrate Metabolism	1
Symporters & Antiporters	2
Voltage-Gated Ion Channels	5

Fig. 1. Serum testosterone level in rat treated with DEHP



Serum testosterone levels were measured using Testosterone EIA Kit. The standard curves ranged from 7.8 to 500 pg/ml.

Fig. 2. Activities of androstenedione 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat testis treated with DEHP



The enzyme activity of testis microsomes from DEHP-treated rats were assayed. Results are expressed as mean \pm SD (n=6).

Fig. 3. T 6 β -hydroxylation activity and Western blot for CYP3A2 in testis microsomes treated with DEHP

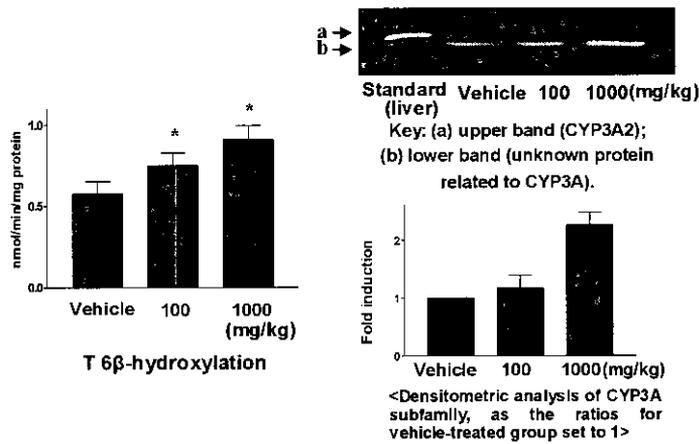


Fig. 4. T16 α -hydroxylation activity and Western blot for CYP2C11 in testis microsomes treated with DEHP

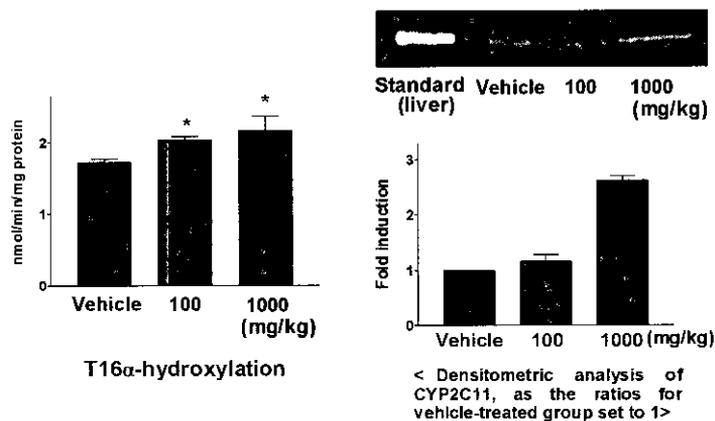


Fig. 5. Diazepam (DZ) metabolism assay in rat testis treated with DEHP

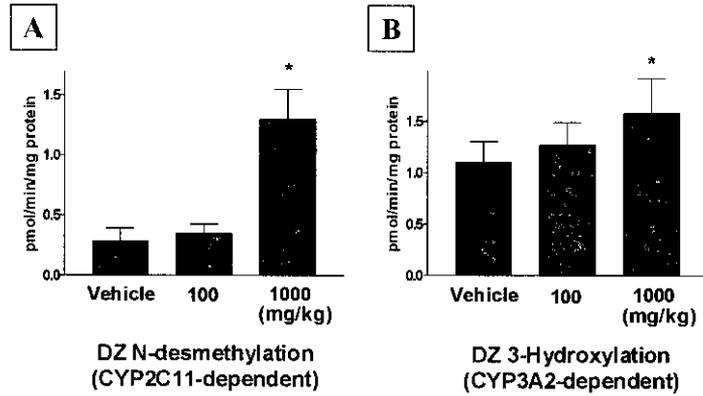


Fig. 6. Activities of testosterone 5 α -reductase in rat liver (A) and testis (B) treated with DEHP

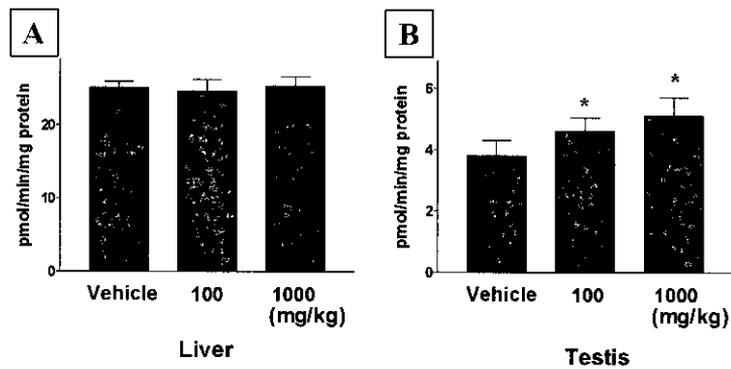
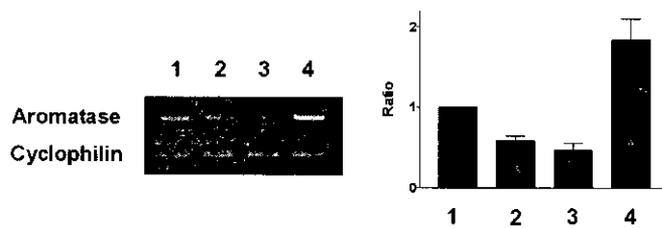


Fig. 7. RT-PCR analysis of Aromatase (CYP19) mRNA expression in rat testis treated with DEHP



Lane 1, vehicle control; Lane 2, DEHP-treated (100 mg/kg); Lane 3, DEHP-treated (1000 mg/kg); Lane 4, positive control (ovary).

平成 14 年度厚生労働科学研究（生活安全研究事業）
前向きコホート研究による先天性異常モニタリング，特に尿道下裂，停留精巣の
リスク要因と内分泌かく乱化学物質に対する感受性の解明

内分泌かく乱化学物質のヒト暴露評価
－新規高感度分析手法の構築－

主任研究者 北海道大学大学院医学研究科
予防医学講座公衆衛生学分野
岸 玲子
分担研究者 星薬科大学
薬品分析化学教室
中澤 裕之
研究協力者 星薬科大学
薬品分析化学教室
吉村 吉博
井之上 浩一
川口 研

研究要旨

前向きコホート研究に関するヒト生体影響評価を行う際，生体試料からの分析を前提とした採取法や測定法を構築する上での基礎的検討を実施した．具体的な分析手法としては，液体クロマトグラフ／質量分析法及びガスクロマトグラフ／質量分析法を駆使し，前処理の簡略化による高感度分析手法の基礎的な検討を実施した．また，採取器具からの汚染を確認するため，血液採取管からの溶出試験も実施した．

A. 研究目的

前向きコホート研究による先天性異常と内分泌かく乱化学物質などの環境汚染物質との関わりについては，多くの関心が寄せられている．その一方で，有機塩素系化学物質に関しては，様々な報告があるが，近年問題視される内分泌かく乱化学物質の関連性に関しては，詳細な報告は少ない．

前向きコホート研究においては，要

因ばく露群と要因非ばく露群（対照群）を分け，寄与危険度や相対危険度などを算出することが可能となる．その算出には，要因－対象研究にある発症疾患の追求と要因ばく露群を求めなければならない．

本分担研究では，後者とされる要因暴露の算出することを目的とする．ここで言う要因とは，内分泌かく乱化学物質に代表される環境汚染物質のヒ

ト汚染状況を把握することである。

従来までの環境汚染化学物質の分析としては、ppm (parts per million) でのレベルによる精度が要求されていた。しかし、内分泌かく乱化学物質では低用量作用が危惧されており、ppb (parts per billion) レベル以下での分析が要求され、従来の分析手法では困難であった。そこで、高感度かつ高精度な分析手法が望まれるようになり、多くの手法が検討されるようになった。

生体試料を対象とした分析では、サンプル量が少ないため、前処理での工夫が必要とされ、様々な検討が実施されている。本分担研究では、少量の生体試料から可能な限り多くの化学物質を同時分析して出来る限り多くの情報を取得することを目的に液体クロマトグラフ/質量分析法 (LC/MS) 及びガスクロマトグラフ/質量分析法 (GC/MS) を応用して、新規分析手法の構築を目的とした。

B. 研究方法

B. 1. LC/MS 法による分析手法の構築 測定用装置

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 (L) (150 x 2.0 mm, 5 μ m)
LC 用ガードカラム：関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (5 x 2.0 mm, 5 μ m)

前処理用カラム：Waters 社製 OASIS-HLB extraction column (20 x 2.1 mm, 25 μ m)、GL Sciences 社製 Bioptic AV-2 extraction column (50 x 4.6 mm, 5 μ m)、TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm)

試薬

アセトニトリル：和光純薬社製 HPLC 用

メタノール：和光純薬社製 HPLC 用

酢酸：和光純薬社製 特級

精製水：Millipore 社製 EDS polisher 付 Milli-Q gradient A 10 で精製

アセトン：溶解液及び洗浄液として、関東化学社製 (フタル酸エステル試験用) を使用した。

ヘキサン：洗浄液として、関東化学社製 (フタル酸エステル試験用) を使用した。

B. 2. GC/MS 法による分析手法の構築 測定用装置・条件

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】

TDS conditions

Flow Mode : Splitless

Initial Temp. : 20 $^{\circ}$ C

Initial Time : 0.5 min

Transfer Temp. : 300 $^{\circ}$ C

Ramp Rate : 60 $^{\circ}$ C/min

Final Temp. : 200 °C
Final Time : 5.0 min

CIS conditions

Initial Temp. : -150°C
Initial Time : 0.5 min
Ramp Rate : 12.0 °C/s
Final Temp. : 300 °C
Final Time : 10.0 min

GC/MS conditions

Flow gas : Helium
Flow rate : 1.2 ml/min
Column : HP-5ms (0.25 mm X 30 m, 0.25
μm)
Oven Temp. : 60 °C - 10 °C/min - 280°C
(5 min)
Ionization : EI (70eV)
SCAN (m/z) : 40 ~ 700

試薬

アセトニトリル : 和光純薬社製 残留
農薬用

メタノール : 和光純薬社製 残留農薬
用

精製水 : Millipore 社製 EDS polisher
付 Milli-Q gradient A 10 で精製

アセトン : 溶解液及び洗浄液として、
関東化学社製 (フタル酸エステル試験
用) を使用した。

n-ヘキサン : 洗浄液として、関東化学
社製 (フタル酸エステル試験用) を使
用した。

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
定濃度になるよう精製水で希釈する。

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
準法により、ピーク面積を利用して、
各濃度範囲内において、検量線を作成
し、定量分析に用いた。

C. 研究結果

C. 1. LC/MS 法による分析条件の検討

環境省等における化学物質の環境
汚染実態調査において、様々な残留状
況を GC/MS 法を用いて測定・把握して
きている。GC/MS 法は、多種類の化学
物質を同時に高感度の測定ができ、微
量の化学物質分析に優れている。しか
しながら、GC/MS 法は難揮発性物質、
熱不安定物質等の分析は困難とされ、
誘導体化などの煩雑な操作が必要と
されてきた。内分泌かく乱化学物質の
代表されるフェノール性化学物質や
イソフラボン類などもその代表的な
ものである。そこで、本研究では、そ
のように GC/MS 法では困難とされる化
学物質を LC/MS 法により、迅速・簡便
な測定を試みることにした。本年度は、
方法論の構築を検討するため、基礎的
なデータ取得に着手した。

LC/MS 法における問題点として、各
種インターフェイスにおけるイオン
化が達成できなければ測定が不可能
ということにある。また、内標準法に
おける補正を実施するため、ターゲッ
ト化合物の内標準物質の有無につい