

## B. 研究方法

授乳前に新生児から専用容器で胎便を採取し、厚生省医薬局「ダイオキシン類の測定暫定マニュアル」の則ったGC/MS法によって測定した。

母親から文書で同意を取得し、分娩時臍帯血（n=4）および哺乳前の新生児期胎便（n=6）を採取保存した。ガスクロマトグラフィー法により検体中のPCDDs+PCDFs, co-PCBsの濃度測定を実施した。測定結果を脂肪重量換算し、WHO-TEF（1998）による毒性等量（pg-TEQ/g-fat）として表した。妊娠初期母体血と新生児血液のTSH, FT4は濾紙血を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

インフォームドコンセントは、研究実施時点で北海道大学で通例行われている方法に則り、患者または家族が研究への参加を自発的に中止しても不利益にならないよう配慮する。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払い、対象者が研究に参加することによって不利益を被ることがないように配慮する。

## C. 結果

現在までに新生児6人から5.7-15.6（中央値10.3）gの胎便が採取可能であった。これら胎便の脂肪濃度は15.3-39.9（30.1）mg/gであった。胎便中のPCDDs+PCDFs, co-PCBsおよび総ダイオキシン類濃度は、それぞれ1.4-9.1（3.7）、0.7-5.7（3.0）、2.1-14.8（6.8）pg-TEQ/g-fatであった。このうち4人の臍帯血中PCDDs+PCDFs, co-PCBsおよび総ダイオキシン類濃度は、0.8-11（3.0）、5-13（4.5）、2.6-24（7.3）pg-TEQ/g-fatであった。胎便の総ダイオキシン類濃度は、臍帯血濃度の61.7-80.8%を示した。4組の臍帯血と胎便中総ダイオキシン類濃度の比較でも、胎便中濃度は臍帯血中に比較して低値を示した（ $p=0.068$ ）。

胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児FT4値との間にSpearman順位相関で有意差（ $p<0.05$ ）が認められ、正の相関が認められた。しかし、

母体血FT4, TSH, 新生児TSH値との間に関連を認めなかった。今後、対象例数を増やすことによって、胎児ダイオキシン曝露と内分泌学的異常、特に新生児甲状腺機能との関連を解明できる可能性があると考えられる。

## D. 考案

内分泌攪乱物質、特にダイオキシン・コプラナPCBは、近年ヒト母乳、分娩時臍帯血および母体血中に検出されることが明らかになってきた。しかしながら、胎児曝露の評価という観点からは、血液検体はダイオキシン類の胎盤での母児間クリアランスが不明なことなど問題点も多い。また、脂肪性分が少ない羊水中のダイオキシン類については、20-40ml程度の羊水量では検出不能であることを我々はすでに経験している。また、胎児曝露を臍帯血、母体血、羊水の3種を用いて評価することは極めて煩雑である。

当初、胎便中のダイオキシン・コプラナPCBの測定は、より胎内での曝露環境を反映し、羊水量変化による濃度バイアス、血液検体での胎盤クリアランスなどの問題点が少ないと思われた。これまで、脂溶性が高いダイオキシン類を早期新生児の胎便を用いて検出し測定した報告は未だなされていない。

今回の研究によって、ダイオキシン・コプラナPCBが胎便中に検出されることが初めて明らかとなった。しかしながら、胎便の総ダイオキシン類濃度は、臍帯血濃度より低値を示した。また、測定準備にあたり、胎便から脂肪を抽出する効率が良くないことを経験した。臍帯血より胎便中濃度が低いのは、採取できる胎便量が十分でないことに起因するかもしれない。

例数が少ないが、胎便中総ダイオキシン類濃度と新生児FT4値との間に正の相関が認められたことから、胎内ダイオキシン類曝露は、新生児甲状腺機能亢進と関連する可能性がある。

## E. 結論

胎便を用いることによって、ダイオキシン・コブラナPCBの胎児曝露状態を明らかにすることは可能であると考えられる。胎児ダイオキシン曝露と内分泌学的異常、特に新生児甲状腺機能との関連を解明できる可能性があると考えられる。今後、さらに新生児異常や内分泌学的、免疫学的異常との関連を明らかにする必要がある。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, Fujimoto S: Bisphenol A concentrations at early second trimester in maternal serum and amniotic fluid. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 735-9.

Sata F, Yamada H, Kondo T, Yingyan G, 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* 2003; 9: 165-9.

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J: Decreased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in spontaneous abortions with normal chromosome karyotype. *Hum Reprod* 2003; 18: 616-20.

Morikawa M, Yamada H, Okuyama K, Kato EH, Watari M, Kataoka S, Cho K, Minakami H (2003): Prenatal diagnosis and fetal therapy of congenital cystic adenomatoid malformation of the lung: a report of five cases.

Congenital Anomalies (in press)

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H (2003): Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: Increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* (in press)

Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S, Minakami H (2003): Live birth rate varies with gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (in press)

Shimada S, Iwabuchi K, Kato EH, Morikawa M, Sakuragi N, Onoe K, Minakami H, Yamada H (2003a): No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. *Am J Reprod Immunol* (in press)

Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoe K (2003b): Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I:C)-induced fetal resorption. *Am J Reprod Immunol* (in press)

森川 守, 山田秀人, 平山恵美, 小林範子, 渡利道子, 片岡宙門, 長 和俊, 奥山和彦, 水上尚典, 藤本征一郎: 胎児消化管閉塞 29 例の臨床的特徴, *周産期医学*, 32(6), 825-830, 2002

山田秀人, 藤本征一郎: 性分化異常総論 A. 早期診断と取り扱い, 121 頁-130 頁 (武谷雄二ら編: 新女性医学大系 第 17 巻 性の分化とその異常, 中山書店, 東京) 2002

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質総合研究事業）  
分担研究報告書

2. 学会発表

山田秀人：クリニカルUpdate—不育症をどう扱う—：ガンマグロブリン大量療法とNK細胞，第54回日本産科婦人科学会，生涯研修プログラム（東京，4月6-9日）2002年

片岡宙門，山田秀人，平山恵美，長 和俊，古田伊都子，水上尚典：新生児胎便中のダイオキシン類濃度測定を試み，第80回北海道産科婦人科学会，（札幌，10月2日）2002年

山田秀人：不育症—その病態解明と治療へのアプローチ—，第50回北日本連合地方部会，特別講演（富山，9月20-21日）2002年

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価

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

### 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、環境汚染物質の曝露によって、分子種特異的にその発現レベルが変動することが報告されている。従って、広範な P450 分子種の mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性を測定することにより、鋭敏に外来化学物質が引き起こす初期の生体反応を検出できるだけでなく、PCB、DDT など比較的良く知られている物質以外の、未知環境化学物質の影響も評価できる可能性がある。ヒトを対象とした場合、サンプリング及び解析の為に非侵襲的方法が必要であるが、これまで、胎盤や血液中に P450 が発現し、特に、喫煙と血液 P450 発現レベルとの間に相関が得られることが報告されている。そこで、本研究では、胎盤、母体血中の異物代謝酵素 P450 をバイオマーカーとして環境汚染のヒトへの影響を評価することを目的とする。

一方で、多くの環境汚染物質は単独ではなく、共存して環境中に存在する。そこで、本年度は、環境化学物質の複合汚染が P450 発現に与える影響について基礎的研究を行った。特に、環境中に多く存在するフタル酸エステルが結合する PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)  $\alpha$ 、ダイオキシン類や多環芳香族類が結合する AhR (aryl hydrocarbon receptor) について、それぞれのリガンドを同時に実験動物に投与し、各受容体の標的遺伝子の発現や機能にどのような影響をおよぼすのかについて調べた。AhR および PPAR 両受容体リガンド存在下では、各々の調節因子がコードする P450 分子種の発現が抑制されることが明らかとなった。

また、P450 発現レベルや活性に影響する因子として、外来環境汚染物質以外に、P450 やその調節因子の遺伝多形があげられる。そこで、調節因子の遺伝多形と P450 発現レベルとの関係、P450 遺伝多形と活性の関係、これら調節因子や P450 の遺伝多形が生体に及ぼす影響、などについて明らかにする。今年度は、多形解析の為に新規にマイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。

### 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。P450 の中でも、CYP1、CYP2、CYP3、CYP4 ファミリーは様々な外来異物によってその

発現量が変動することが知られているが、それらのレギュレーターとして、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。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と結合し、プロモーター領域に応答配列を持つ異物代謝酵素を誘導する。従って、広範な P450 分子種の mRNA 発現量、蛋白量、酵素活性を測定することにより、鋭敏に外来化学物質が引き起こす初期の生体反応を検出できるだけでなく、PCB、DDT など比較的知られている物質以外の、未知の環境化学物質の影響も評価できる可能性がある。そこで、胎盤、母体血中の異物代謝酵素 P450 をバイオマーカーとして、環境汚染のヒトへの影響を評価することを本研究の目的とする。

多くの環境汚染物質は単独ではなく、共存して環境中に存在する。これまで、外来物質による P450 発現誘導は単独の化学物質に関して多く報告されてきた。しかし、昨年度の我々の研究から、生理活性物質であるエストロゲンと AhR リガンドであるベンゾピレンの共存下では、肝由来培養細胞において、エストロゲンが AhR 標的遺伝子 CYP1 ファミリー発現の誘導を抑制することを報告した。従って、複数の受容体リガンドが存在する場合、受容体相互作用などによって P450 の発現機構に単独時とは異なる影響を及ぼすことが考えられる。前述のとおり、多くの環境汚染物質は AhR や PPAR など転写調節因子のリガンドでもある。そこで、本年度は、環境汚染物質が複数存在する場合に P450 発現にどのような影響を及ぼすについて、基礎的研究を行った。本年度は、特に、環境中に多く存

在するフタル酸エステルが結合する PPAR $\alpha$ 、ダイオキシン類や多環芳香族類が結合する AhR について、それぞれのリガンドを同時に実験動物に投与し、各受容体の標的遺伝子の発現や機能にどのような影響をおよぼすのかについて明らかにした。

一方、P450 発現レベルや活性に影響する因子として、外来環境汚染物質以外に、P450 やその調節因子の遺伝多形があげられる。そこで、調節因子の遺伝多形と P450 発現レベルとの関係、P450 遺伝多形と活性の関係、これら調節因子や P450 の遺伝多形が生体に及ぼす影響、などについて明らかにする。

## B. 研究方法

### 1. P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価

ヒト血液及び胎盤、臍帯血を採集し、P450 について mRNA 発現量を測定する。特に、ダイオキシン類などの蓄積残留濃度と P450 発現レベルとの関係について明らかにする。

### 2. 環境汚染物質複数下での P450 発現への影響

PPAR $\alpha$  リガンドとしてクロフィブレート、AhR リガンドとして SudanIII を用いた。雄性 Wistar ラット 9 週齢を、クロフィブレート（300mg/kg/day）単独投与群、SudanIII（80mg/kg/day）単独投与群、クロフィブレート+SudanIII 同時投与群、に分け、4 日間経口投与した。対象群として、コーンオイルを経口投与した。

1 群：クロフィブレート

2 群：SudanIII

3 群：クロフィブレート+SudanIII

4 群：コーン油（コントロール）

5 日目に肝臓を採取し、ミクロソーム画分を調整した。得られた肝ミクロソームにつ

いて、CYP1A1、CYP1A2、CYP4A、CYP2B のアポ蛋白発現変動をウェスタンブロッティングによって調べた。また、蛍光光度計を用いて、CYP1A1 依存の代謝活性であるエトキシレゾルフィン 0 脱エチル化活性（ethoxyresorufin 0-deethylase：EROD）、CYP1A2 依存の代謝活性であるメトキシレゾルフィン 0 脱メチル化活性（methoxyresorufin 0-demethylase：MROD）活性について明らかにした。また、肝臓より RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて、各受容体リガンド同時投与が受容体発現や標的遺伝子 mRNA の発現にどのような影響を与えるのかについて調べた。

### 3. 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。

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た。実験の手順を Figure 1 に示した。

## C. 研究成果

### 1. P450 をバイオマーカーとした曝露影響評価

現在、ヒト血液、胎盤、臍帯血について、採集を行っている。

### 2. 環境汚染物質複数下での P450 発現への影響

#### 2-1) PPAR リガンド存在下における AhR 標的遺伝子発現への影響

##### ①CYP1A1 発現への影響

CYP1A1 依存である EROD 活性は、SudanIII 投与によって上昇したが、クロフィブレードの同時投与でその活性上昇は約 60%まで抑制された（Figure 2）。AhR の標的遺伝子である CYP1A1 の蛋白発現は SudanIII 投与によって誘導されたが、クロフィブレードの同時投与によって発現誘導は抑制された（Figure 3）。しかし、SudanIII によって増加した CYP1A1 mRNA 発現は、クロフィブレードの同時投与によって、さらに増強されることが分かった（Figure 4）。

##### ②CYP1A2 発現への影響

AhR によって発現調節を受ける CYP1A2 依存 MROD 活性は、EROD 同様、SudanIII 投与で増加したが、クロフィブレードの同時投与によって、SudanIII 誘導時の 80%に減少した（Figure 5）。また、AhR の標的遺伝子である CYP1A2 の蛋白発現は SudanIII 投与によって誘導されたが、クロフィブレードの同時投与によって発現誘導は抑制された（Figure 6）。CYP1A2 は肝臓では constitutive に発現する CYP 分子種である。クロフィブレード単独投与によって、CYP1A2 アポ蛋白は対象群の約 14%まで発現が減少することが分かった。CYP1A2 mRNA は蛋白発現量と同様に、クロフィブレード単独投与によって、その発現量は減少することが明らかとなった（Figure 6）。

##### ③調節因子発現への影響

CYP1A1 および CYP1A2 の上流域に存在する XRE（xenobiotic response element）に結合する AhR および ARNT の mRNA 発現レベルを調べた。AhR リガンド SudanIII 投与によって、AhR mRNA 発現量は減少したが、クロフィブレード同時投与による顕著な影響は見られなかった

(Figure 7)。また、ARNT 発現量に対しては、SudanIII、クロフィブレートのいずれの投与も影響を及ぼさなかった (Figure 8)。

## 2-2) AhR リガンド存在下における PPAR $\alpha$ 標的遺伝子発現への影響

### ①CYP4A 発現への影響

PPAR $\alpha$  の標的遺伝子である CYP4A のアポ蛋白発現はクロフィブレート投与で増加したが、同様に SudanIII 共存によってその誘導は抑制された。また、コントロール群に比べて、SudanIII 単独投与群では、CYP4A アポ蛋白発現量が抑制されることが分かった (Figure 9)。

CYP4A1、CYP4A2 の mRNA 発現レベルを測定した。CYP4A1 はクロフィブレート投与によって mRNA 発現量が顕著に増加したが (Figure 10)、CYP4A2 ではコントロール群に比べて明らかな増加は見られなかった (Figure 11)。また、CYP4A2 ではクロフィブレートと SudanIII 同時投与によって、mRNA 発現量が減少することが明らかとなった。

## 3. 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。

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。

## D. 考察

本研究によって、AhR と PPAR $\alpha$  リガンドの同時曝露がそれぞれの調節因子がコードする CYP 分子種の発現レベルを抑制する

ことが明らかとなった。最近になって、PPAR $\alpha$  が、AhR と同様に、HSP90 (Heat Shock Protein 90) や XAP2 (hepatitis B virus X-associated protein 2) とコンプレックスを形成していることが報告された。また、既に核内受容体の転写に関与する RIP140 などの共役因子が AhR の転写にも関与することが報告されている。これまで、AhR がステロイドホルモン受容体であるエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体の標的遺伝子の転写を阻害することは報告されているが、PPAR との関係については、殆ど報告がない。今後、その原因について明らかにする。

## E. 結論

PPAR $\alpha$  及び AhR 各リガンド同時曝露によって、それぞれの受容体標的因子の発現が抑制されることが明らかとなった。多くの環境汚染物質は環境中に単独ではなく、共存して存在する。本研究において、外来化学物質の複合曝露では単独曝露とは明らかに異なる生体影響が引き起こされることがわかった。

## F. 健康危険情報

本研究において、外来化学物質の複合曝露では単独曝露とは明らかに異なる生体影響が引き起こされることがわかった。無数の環境汚染物質の複合汚染による影響のリスク評価は困難である。しかし、本研究からも、今後、実験動物や培養細胞の単独曝露だけではなく、同時曝露によるスクリーニングを行う必要があることが明らかとなった。

## 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 Hiki 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) 14<sup>th</sup> 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



厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質総合安全研究事業）  
分担研究報告書

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

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

Figure 1 マイクロアレイによる遺伝的多形解析方法の新規開発

1. 多形遺伝子のリストアップ (SNP や deletion : 下記 Table 参照)

P450 : CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C19, CYP2A6, CYP2D6

その他 : NAT2, GSTM1, GSTP1

Regulators : AhR, PPAR

2. プライマー設計や PCR 実験方法検討

3. オリゴ合成

4. スポットティング

1) PCR

1. ターゲット遺伝子配列を含むようにプライマーを設計する

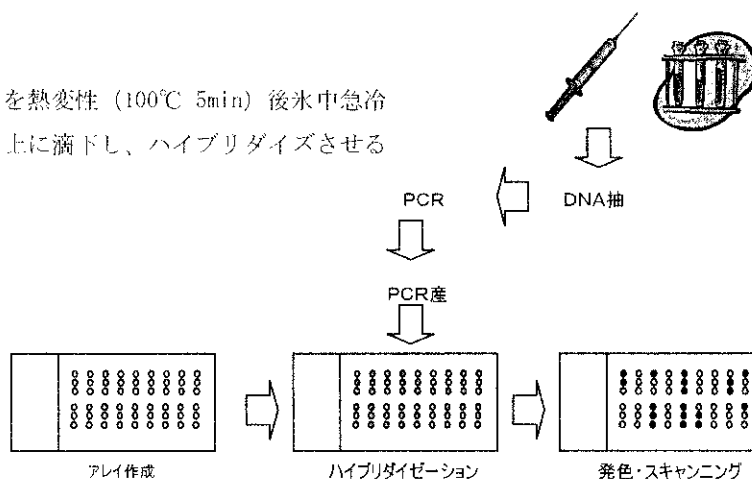
2. PCR

2) ハイブリダイゼーション

1. ターゲット DNA を熱変性 (100°C 5min) 後氷中急冷

2. マイクロアレイ上に滴下し、ハイブリダイズさせる

3. 発色させる



gene	ACC No.	allele	position	DNA
CYP1A1	X02612	2C	6819	G
CYP1A2	dbSNP ID rs2069514	1C	-3860	A
CYP1B1	U56438	2	4160	T
		3	8131	G
CYP2A6	U22027	7	6416	C
		4	6867-	-
CYP2C19	gi22051774(NT_030059)	2A	1806252	A
		3	180546	A
CYP2D6	M33189	10	913	T
		5	deletion	
GSTM1	gi22042153(NT_029860)	0	deletion	
GSTP1	M24485	1b	2627	G
NAT2	X14672	6	1311	A
		7	1578	A
AhR	dbSNP ID rs2066853	R554K		G
PPAR $\gamma$	AB005520	Pro12Ala	892	G

Effect of CFA Treatment on EROD  
 in Liver -microsomes

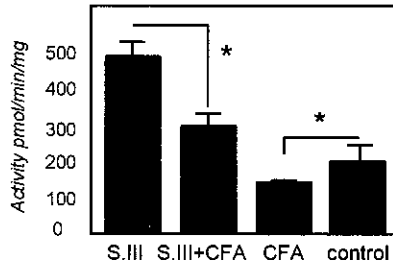


Figure 2 エトキシレゾルフィン 0 脱エチル化活性に及ぼす AhR および PPAR リガンドの影響。CFA : クロフィブレート、S. III : SudanIII

The effect of CFA treatment on  
 S.III induced CYP1A1 protein expressions

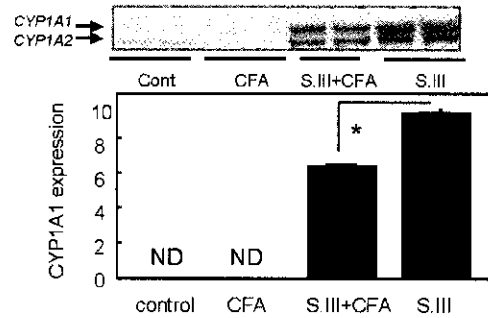
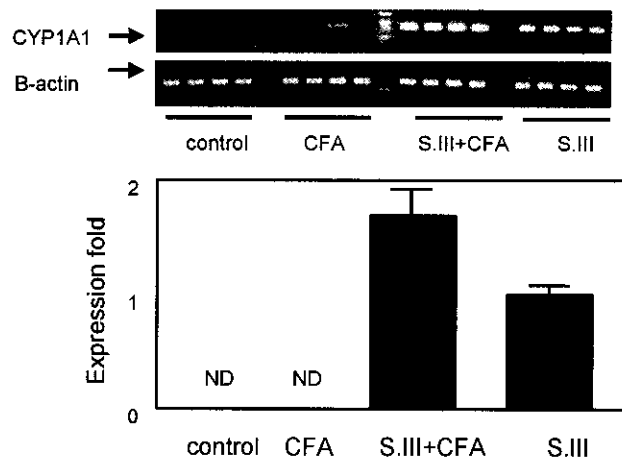


Figure 3 CYP1A1 蛋白発現に及ぼす AhR および PPAR リガンドの影響。CFA : クロフィブレート、S. III : SudanIII

Clofibric prevent CYP1A1 mRNA  
 repression by S.III



CYP1A1 normalized to B-actin and in relation to S.III induction level

Figure 4 CYP1A1mRNA 発現に及ぼす AhR および PPAR リガンドの影響。CFA : クロフィブレート、S. III : SudanIII

Effect of CFA Treatment on MROD  
in Liver -microsomes

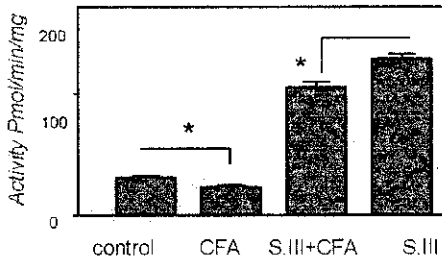
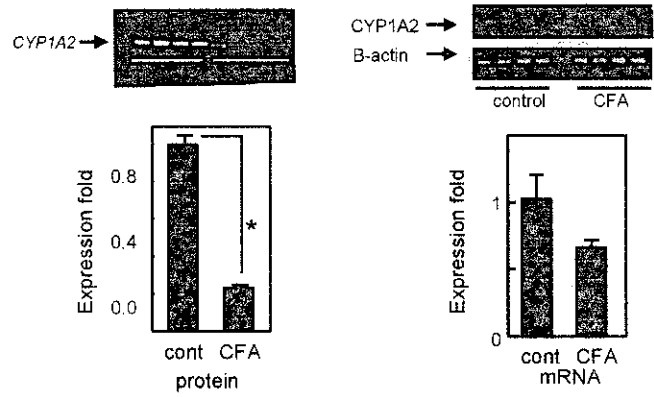


Figure 5 MROD(メトキシレゾルフィンOメチル化)活性に及ぼす AhR および PPAR リガンドの影響。CFA : クロフィブレート、S. III : SudanIII

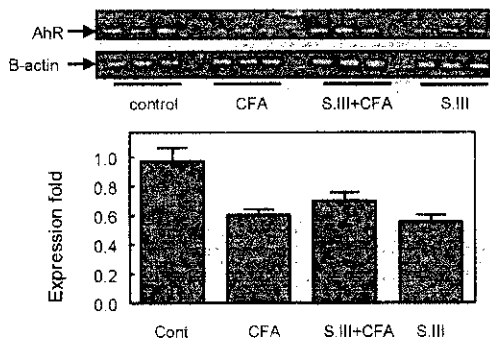
Effect of S.III and CFA on  
CYP1A2 protein and mRNA expressions



CYP1A2 mRNA, normalized with B-actin, and in relation to control

Figure 6 CYP1A2 蛋白および mRNA 発現に及ぼす AhR および PPAR リガンドの影響。CFA : クロフィブレート

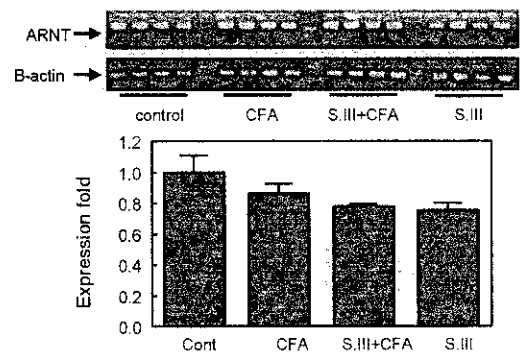
Effect of S.III and CFA treatment on  
AhR mRNA expression levels



AhR mRNA normalized with B-actin and related to control.

Figure 7 AhRmRNA 発現レベルにおよぼす AhR および PPAR リガンドの影響。CFA : クロフィブレート

Effect of S.III and CFA treatment  
on ARNT mRNA expression



ARNT mRNA normalized with B-actin and related to control.

Figure 8 ARNTmRNA 発現レベルにおよぼす AhR および PPAR リガンドの影響。CFA : クロフィブレート、S. III : SudanIII

## The Inhibition of CYP4A protein expression by S.III

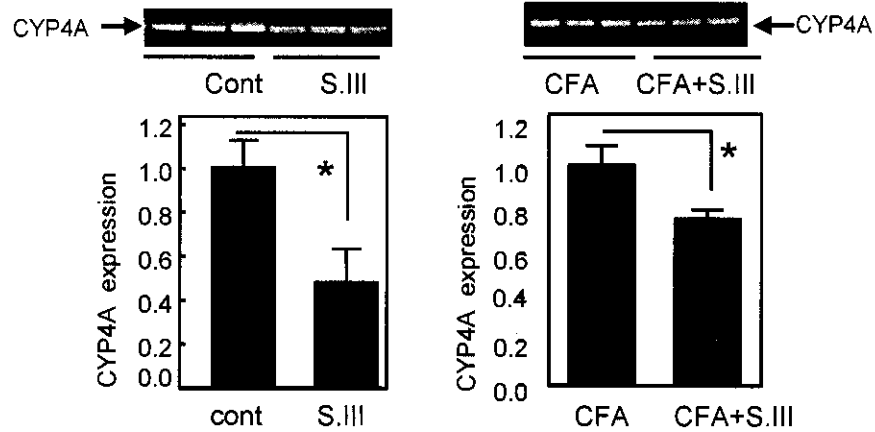
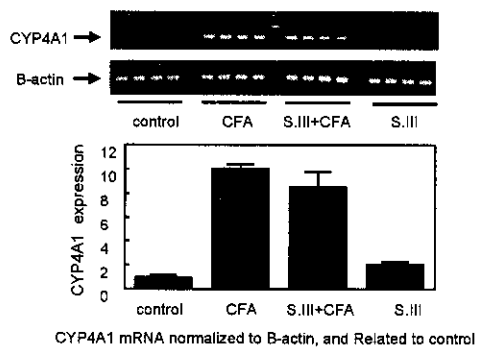


Figure 9 CYP4A 蛋白発現レベルにおよぼす AhR および PPAR リガンドの影響。  
CFA : クロフィブレート、S. III : SudanIII

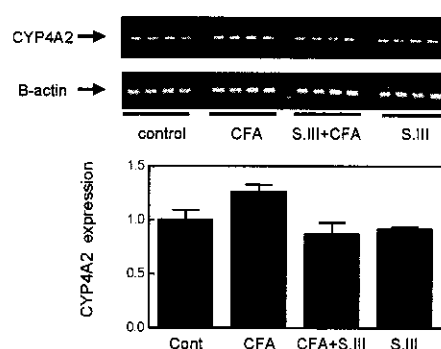
### Effect of S.III treatment on CYP4A1 mRNA induction by CFA



CYP4A1 mRNA normalized to B-actin, and Related to control.

Figure 10 CYP4A1mRNA 発現レベルにおよぼす AhR および PPAR リガンドの影響。  
CFA : クロフィブレート、S. III : SudanIII

### Effect of S.III treatment on CYP4A2 mRNA induction by CFA



CYP4A2 mRNA normalized to B-actin, and Related to control.

Figure 11 CYP4A2mRNA 発現レベルにおよぼす AhR および PPAR リガンドの影響。  
CFA : クロフィブレート、S. III : SudanIII

高分子樹脂由来環境化学物質の微量分析法の構築  
－ヒト生体試料採取器具からの汚染実態－

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 吉村 吉博 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

研究要旨

小児疾患発症のメカニズム解明に対して、環境化学物質の暴露評価を詳細に検討しなければならない。本研究では、高分子由来化学物質を対象とした微量分析法の構築を目指した。今回対象とした環境化学物質は、ビスフェノール A、ノニルフェノール、オクチルフェノール、ペンタクロロフェノールである。いずれも LC-MS による分析法を確立した。また、ヒト生体試料の採取時に使用する器材から、上記化学物質の汚染がないことも確認し、信頼性の高い分析値の取得を視野に入れた基礎的研究に着手した。

A. 研究目的

前年度に引き続き、小児疾患発症メカニズムや原因物質の追求に対する基礎的な研究課題である微量化学物質のヒト暴露モニタリングを実施する。

近年、化学物質の環境汚染に伴い、生体に対して微量で多様なホルモン類似の作用する化学物質の存在が注

目されている。この微量で作用を及ぼすという点が、分析化学の上においても考慮すべき様々な課題を惹起している。特に測定対象試料が血液等の生体試料の場合、高感度かつ精度の高い測定法が要求され、ハイブリッドな機

理化学的手法を駆使しなければならない。また、測定感度や精度に加え、ヒト生体試料採取や保存時に測定対象物質が測定環境から汚染されることにより、誤った測定値を算出する可能性を十分に留意する必要がある。

本研究では、モニタリング対象化合物として高分子樹脂由来化学物質を選択してモニタリングを実施する。対象化合物は、日常生活における使用頻度の高いビスフェノール A (BPA)、ノニルフェノール (NP)、オクチルフェノール (OP) 及びペンタクロロフェノール (PCP) とする。また、測定系に関しては、いずれの化合物もフェノール性水酸基を有するため、極性が比較的高いことから、液体クロマトグラフ

／質量分析法（LC-MS）を採用することにした。

本研究で利用する採血器材から上記化合物の汚染がないことを確認し、当該医療器材を本研究の遂行に利用できることを把握するための基礎研究の実施を目的とする。

## B. 研究方法

### B. 1. 試薬・試料

#### 試薬

BPA：関東化学社製 環境分析用

BPA-<sup>13</sup>C 安定同位体 (IS<sub>B</sub>)：Cambridge Isotope Lab. 社製

NP：関東化学社製 (mix type) 環境分析用

OP：関東化学社製 (tert-OP type) 環境分析用

Internal standard for NP and OP (IS<sub>no</sub>) [4-(1-methyl) octylphenol-d<sub>5</sub>]：林純薬社製

PCP：関東化学社製 環境分析用

PCP-<sup>13</sup>C 安定同位体 (IS<sub>P</sub>)：Cambridge Isotope Lab. 社製

アセトニトリル：和光純薬社製 HPLC 用及び残留農薬用 300

メタノール：和光純薬社製 HPLC 用及び残留農薬用 300

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。

#### 標準溶液の調製

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、IS を暫定濃度になるよう精製水で希釈する。

#### 試料

採血セット：テルモ翼状針 (SV-22CLK C タイプ 22G)、ベノジェクト II ルアーアダプタ S、ニプロネオチューブ (HE-1000)

### B. 2. 分析装置・条件

#### 測定用装置

液体クロマトグラフ/質量分析計装置 (LC/MS) 【Agilent Technologies 社製 Agilent LC/MSD Superior Line】

LC 用カラム：関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (L) (150 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)

#### 測定条件

表 1 に LC/MS の分析条件を示す。本分析条件は、引用文献<sup>1-3)</sup>を参考として新規に構築した測定対象四化合物の迅速分析方法である。

#### 定量法

LC-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。

### B. 3. 試験溶液の調製

本採血器材を用いて、IS 暫定濃度添加残留農薬用メタノールを 5.0 ml 採取し、一昼夜室温で保存した。その後、本溶液試料全量を濃縮乾固させ、HPLC 用メタノール 1 ml で再溶解させたものを LC-MS 用試験溶液とした。同様に洗浄後のガラス製スピッツ管に保存したメタノールをコントロールとした。

## C. 研究結果

### C. 1. LC-MS による分析条件の検討

各化合物の検出において、最も汎用的なエレクトロスプレーイオン化法を採用した。その結果、各化合物ともネガティブモードにおいて、 $[M-H]^-$ のイオンが検出され、良好に検出することが可能となった。図 1 にその一例として、BPA のマススペクトルを示す。

各種安定同位体の内標準物質を用いた内標準法による定量を試みた。その結果、0.5~500 ng/ml の範囲で、いずれも相関係数 0.999 以上となった。

### C. 2. 採血器具からの汚染実態

上記の条件に従い、採血器具からの微量汚染を検討した。それぞれ異なる採取器具（ロットは同一）を用いて、 $n=3$  で実施した。また、検出限界 ( $n. d.$ ) を 0.2 ng/ml とした。その結果、表 2 のように検出がされた。ガラスのスピ

ッツ管に保存した空試験では、いずれも検出限界以下であったため、採取器具からの汚染と考えられる。また、各化合物において、S. D. のばらつきが少ないため ( $<0.1$ )、操作過程おいての誤差は殆どないと思われる。

## D. 結論

内分泌かく乱化学物質の分析については、信頼性の乏しい分析法によるデータの取得や、分析データの誤った解釈及び安易な取扱いによって逆に社会を混乱させているのも事実である。血液、母乳等の生体試料を対象として発表されている分析法は、試料の採取方法、保存方法に対する配慮が欠如し、代謝物に対する検討がなされていないなど、信頼性の高い分析法はまだ十分に開発されておらず、今後の展開が要求されている。本検討においても、使用する医用器材によっては、試料採取を含む測定段階において微量の汚染が懸念された。その汚染状況を把握した上で、ヒト暴露評価を実施しなければならない。実際の生体試料では、代謝を十分に考慮する必要があるため、代謝酵素によるフリー体の測定などを行い、補正を行う必要がある。

超微量分析分野では、熟達した分析者が、特殊な高性能機器を駆使してはじめて精度の高い測定が達成されてきたが、本報告で検討した分析法を自動化したシステムでは、前処理操作の迅速化が達成されるだけでなく、誰が行っても比較的高い精度で安定したデータが出せるようになり、精度管理



の面からも将来的に望ましい手法となるであろう。更に当該化学物質が検出された試料については複数の機関により、同一試料を分析して、分析値の信頼性を確保した上で、公表すべきである。

E. 参考文献

- 1) K. Inoue, A. Yamaguchi, M. Wada, Y. Yoshimura, T. Makino and H. Nakazawa: Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma using liquid chromatography - electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 765, 121-126 (2001)
- 2) K. Inoue, M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura and H. Nakazawa: Application of liquid chromatography - mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *J. Chromatogr. B* 773, 97-102 (2002)
- 3) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, N. Takai, Y. Yoshimura, M. Horie, S. Izumi, T. Makino and H. Nakazawa: Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching LC/MS coupled with on-line extraction. *Anal. Chim. Acta* submitted

F. 発表

特になし

表1 LC/MS分析条件

LC Condition		MS Condition	
Column:	Mightysil RP-18 GP (2.0 × 150 mm)	Ionization:	Electrospray
Mobile phase:	0.01 %CH <sub>3</sub> COOH in H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> CN (70:30-12min-30:70 [35 min], V/V)	Nebulizer:	N <sub>2</sub> (35 psi)
Flow rate	0.2 ml/min	Drying gas:	N <sub>2</sub> (12 L/min, 350 °C)
Injection vol.	5 μL	Fragmentor:	140 V
Oven temp.	40 °C	Mode:	Negative
		SIM ( <i>m/z</i> ):	227 (BPA), 239 ( <sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BPA), 205 (OP), 219 (NP), 224 (m-OP-d <sub>5</sub> ), 265 (PCP), 271 ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -PCP)

表2 血液採取器具からの検出値

Sample No.	Detection levels (ng/ml)			
	BPA	NP	OP	PCP
Blank	n.d.	0.6	n.d.	n.d.
1	0.8	2.3	3.0	0.9
2	0.9	5.1	3.2	0.5
3	1.4	3.6	3.1	0.5
Av.	1.0	3.7	3.1	0.6
S.D.	0.2	1.0	0.1	0.2

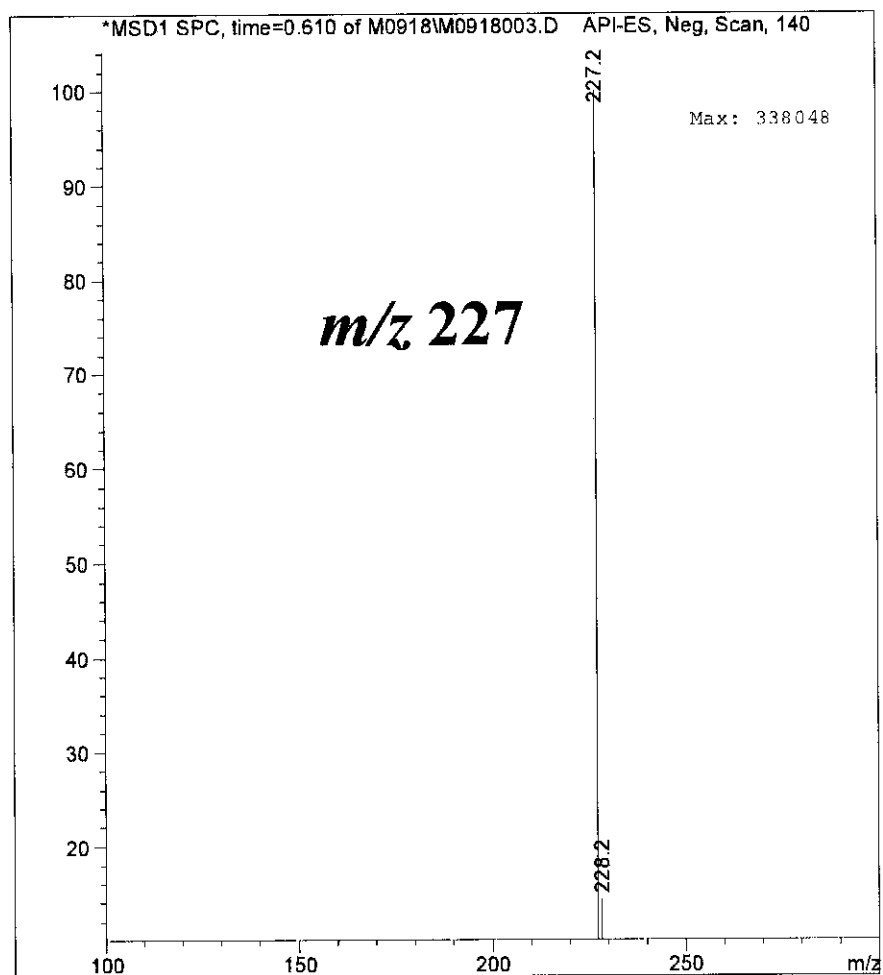


図1 ビスフェノール A のマススペクトル  
イオン化:エレクトロスプレーイオン化法