

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業  
平成15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 医学部 専門診療学系
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室
	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 医学部 基礎医学系

# 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

(東海大学医学部専門診療学系産婦人科 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及び動物実験の信頼性確保

生体試料、動物飼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 近藤 文雄 (愛知県衛生研究所)

後藤 智美 (愛知県衛生研究所)

斎藤 勲 (愛知県衛生研究所)

猪飼 誉友 (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 ..... 31

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. 生体試料中化学物質の分析に関するガイドラインの作成及び分析法のクロスチェック ..... 39

分担研究者 中澤 裕之 (星薬科大学)

研究協力者 和泉俊一郎 (東海大学専門診療学系)

吉村 吉博 (星薬科大学)

井之上浩一 (星薬科大学)

伊藤 里恵 (星薬科大学)

川口 研 (星薬科大学)

瀬下 文恵 (星薬科大学)

山崎 晴子 (星薬科大学)

太刀野寿志 (株式会社エスアールエル)

宮川 秀則 (株式会社エスアールエル)

中島 信行 (株式会社東レリサーチセンター)

大久保賢治 (株式会社東レリサーチセンター)

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)

4 . 飼料, 床敷き等中の 4-ノニルフェノールの分析 .....	53
分担研究者 中澤 裕之 (星薬科大学教授)	
研究協力者 藤巻 照久 (神奈川県衛生研究所)	
平山 クニ (神奈川県衛生研究所)	
吉村 吉博 (星薬科大学)	
井之上浩一 (星薬科大学)	
伊藤 里恵 (星薬科大学)	
川口 研 (星薬科大学)	
瀬下 文恵 (星薬科大学)	
5 . 生体飼料に関する報告 .....	61
分担研究者 牧野 恒久 (東海大学医学部専門診療学系)	
研究協力者 和泉俊一郎 (東海大学医学部専門診療学系)	
6 . 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 .....	71
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)	
7 . 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 .....	75
分担研究者 木村 穰 (東海大学医学部基礎医学系)	
研究協力者 松坂 恭成 (東海大学医学部基礎医学系)	
牧野 恒久 (東海大学医学部専門診療学系)	
和泉俊一郎 (東海大学医学部専門診療学系)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	91
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	93

**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及び動物試料等の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**：昨年度の本研究において、血清中フタル酸エステル類の精度の高い分析法を開発するとともに、分析法ガイドラインを作成した。本年度は、作成した分析法ガイドラインの信頼性を確保するために、外部機関を含めた3機関で同一の試料（ブタ血清）を分析し、クロスチェックを実施した。5種のフタル酸エステル類標準物質を添加して行った試験では、フタル酸ジ2-エチルヘキシル（DEHP）を除く4物質の回収率の平均値が98.5～111%、相対標準偏差が1.4～10.3%と良好な結果であった。DEHPについては、1機関で高いバックグラウンドが検出されたため、回収率は128%とやや高い値を示し、また、相対標準偏差は42.8%であった。このDEHPのバックグラウンドは、GC/MSの注入口からの汚染であることが判明しており、この問題が解決されれば、本試験法により精度の高い測定値が得られると考えられた。さらに、動物実験環境からのフタル酸エステル類の暴露量を評価するために必要となる、動物飼料及び床敷き中のフタル酸エステル類の分析法を確立するとともに、実試料の分析を行った。3種の動物飼料について分析を行った結果、すべての動物飼料からフタル酸ジブチル（DBP）及びDEHPが検出された（検出濃度：DBP 23.0～184 ng/g、DEHP 112～168 ng/g）。また、2種の床敷きについて分析を行った結果、両者からDBP及びDEHPが検出された（検出濃度：DBP 630～1420 ng/g、DEHP 16.5～467 ng/g）。

**1-② 生体試料等中のビスフェノールAの分析法の開発**：本年度は下記の4項目について検討した。その概要は次のとおりである。1. BPA分析法ガイドラインのクロスチェック：先に提案したBPA分析法ガイドラインについて、3機関でクロスチェックを実施したところ、良好な結果が得られた（RSD 7%）。2. BPAの推定曝露量調査：1日尿を用いてBPAの推定曝露量を求めた結果、1μg/dayレベルであり、2002年5月に示されたEUの暫定TDI（500μg/day）に比べ問題のないレベルであった。3. 実験動物飼育環境中のBPAの分析法ガイドラインの検討：動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境（飼料、床敷等）からのBPA暴露量を評価する分析法を構築した。本法を用いて飼料、床敷中のBPAを測定した結果、多くは数ppb前後であったが、数百ppbレベルで検出された床敷も見られた。4. 飼料中の植物エストロゲン分析法の検討：動物実験の信頼性を確保するため、飼料中に含まれる植物エストロゲン（イソフラボン）の分析法を検討した。本法を用いて飼料中のイソフラボンを測定した結果、数ppm～数百ppmのイソフラボンが検出された。

**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**：内分泌かく乱化学物質として疑われるノニルフェノールの環境及び生体への汚染は広く進行している。ヒト生体試料中のガイドライン作成を目指し、前年度までに構築したノニルフェノールの分析法のバリデーションを外部委託機関に依頼してクロスチェックを行った。試料にはブタ血清を用い、添加回収試験を行った。その検討には、内標準物質として、4-(1-メチル)オクチルフェノール-d<sub>5</sub>を使用した内標準法を用いた。その結果、同様の測定条件で分析を行った2機関における平均回収率が133.2%（RSD<10.1%）と良好な結果が得られた。

動物飼料等からの4-ノニルフェノールの分析法として、精油定量装置を用い、LC/MS/MSで測定する方法を検討した。精油定量装置により前処理操作を簡素化することで、試験操作による汚染を低減化することが可能となった。本分析法を用い、市販のラット・マウス飼育用飼料及び床敷の分析を行った。その結果、飼料3検体から10.5~18.7 ppb、床敷2検体から65.3 ppb, 32.2 ppbの4NPが検出され、給水からは検出されなかった。

**2. 生体試料分析と生体暴露量のモニタリング：**生体試料採取にあたっては、周産期試料と生殖年齢婦人の試料の2種を対象とした。周産期試料としては母子関係を重視し、母体側試料と、その母体より出生した新生児側試料を関連づけて採取した。母体側からは、母体血、母乳を、新生児側からは臍帯血を基準試料としたが、各研究機関の要望により、母体側毛髪、臍帯、胎脂等を追加採取し、一部検討した。生殖年齢婦人の試料は腹水、血液を中心として採取した。同時に生体試料提供協力者の身体的、社会的、環境的背景を記録し、疫学的分析の資料とした。

### **3. 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**

胎児期の内分泌かく乱化学物質の作用を評価するに当たって、母体における化学物質の代謝解毒反応、胎盤を介した母体から胎児への移行、および、細胞に対する化学物質の作用機序に関する知見が必要とされる。我々はラットおよびマウスの臓器、細胞を用い、妊娠母体における解毒・代謝機能、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、母体内における化学物質代謝の概要を明らかにし、特に、子宮組織が薬物のバリエーとして機能していることを明らかにした。また、フタル酸エステルがゲノムのDNAメチル化状態を変えることで広範にわたる遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性が示された。

**4. 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：**疾患の発症は、一般に環境要因と遺伝的要因の組み合わせによって決定されると考えられている。本研究では、内分泌かく乱化学物質の生体への影響として子宮内膜症を取り上げるが、この疾患については内分泌かく乱化学物質が環境要因として深く関与していることが状況証拠として集積しつつあることは周知の事実となってきた。しかしながら、それでも同一の環境におかれてもやはり本疾患のなりやすさ（疾患感受性）は個人で異なっていると考えられる。

本疾患の発症には、代謝酵素調節を含む種々の細胞表面および細胞内分子が重要であると考え、内分泌かく乱物質の毒性発現に関与する細胞内シグナル伝達経路の構成分子を本疾患の候補遺伝子として選定した。特に、エストロゲン受容体、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素、アリルハイドロカーボン受容体の各遺伝子については、遺伝子多型を明らかにすると共に、子宮内膜症に特異的な対立遺伝子を分子遺伝学および統計遺伝学的に解析し、本疾患との関連性を明らかにすることを目的とした。

本年度は、遺伝学的相関解析に用いる遺伝的多型マーカーの有用性を検討するために子宮内膜症患者5名、一般健常者11名の日本人試料を用いて、各一塩基多型（SNP）の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度を解析し、子宮内膜症候補遺伝子内に高度な多型を示す遺伝マーカーの設定を行った。

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 穂 東海大学医学部分子生命科学

### **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、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。昨年度の研究では、コンタミネーションを低減化した前処理法の開発により、精度の高いフタル酸エステル類分析法を確立し、分析法ガイドラインを作成した。本年度は、この分析法ガイドラインの信頼性を確保するために、外部機関を含めた3機関で同一の試料を分析し、クロスチェックを実施する。

また、実験動物を利用した in vivo 系試験の信頼性確保のために。動物飼料、床敷き等動物実験環境からのフタル酸エステル類の暴露量を評価するために必要となる分析法を確立し、分析法ガイドラインを作成する。

**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。昨年度、血清及び尿中のビスフェノール A (BPA) の分析について、操作中のコンタミネーションを低減化した、精度の高い分析法を開発し、分析法ガイドラインとして提案した。そこで、本年度はこのガイドラインの信頼性を確保するために、外部機関に依頼し、クロスチェックを行った。また、動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境（飼料、床敷等）からの BPA 暴露量を評価する分析法を検討し、分析法ガイドラインの作成を試みた。更に、飼料中に含まれる植物エストロゲン（イソフラボン）の測定についても信頼性の高い分析法を構築する目的で基礎的検討を行った。

**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：**4-ノニルフェノール (NP) は、環境を汚染し、生体への暴露を進行させているとして、近年その汚染実態や生体暴露が注目され、NP の分析法が数多く報告されている。その分析対象とする試料は、環境試料から生体試料まで幅広く、分析法についても、種々の方法が報告されている。今後、全国的な汚染実態及び暴露調査を行う上でも、その分析法のバリデーション、精度管理が必要不可欠になっている。本研究においては、前年度までに構築した血清中のノニルフェノールの分析法

のバリデーションの一つとして、外部委託機関によるクロスチェックを行った。

内分泌かく乱化学物質の生体評価については、低用量域において再現性のある結果を得るのが困難な状況にあるのが現状である。その要因として、動物実験及び実験動物の飼育環境下による当該化学物質の暴露が問題点として指摘されている。

本研究では、実験動物の飼育環境下による暴露量を把握するため、飼料、床敷等に含まれる 4-ノニルフェノール (4NP) の微量分析法を構築し、市販の飼育用飼料及び床敷の分析を行った。

**2. 生体試料分析と生体暴露量のモニタリング：**次世代への内分泌かく乱化学物質の影響を考える場合、生殖年齢の婦人における暴露状況の把握と母児間の移行の実態の理解は必須である。

まず内分泌かく乱物質の妊婦および胎児・新生児への影響は、単独試料による分析だけでは不十分であり、母子の一連の試料のもとに、母体側暴露状態と、妊娠中の胎児への移行を分析する必要がある。そこで、本研究に使用する試料の採取にあたっては、母体側試料と、その母体より出生した新生児の試料を採取し、母子両者の分析結果比較が可能になるよう条件を設けた。

次に、母体側環境、例えば妊娠経過、その間の食生活、嗜好、また、住居付近の生活環境等にも配慮し、疫学的分析の資料とした。

生殖年齢婦人の暴露状況調査としては、内視鏡検査を施行する婦人に十分なインフォームドコンセントの上で同意を得て腹水と血液を採取し分析することとした。

**3 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懸念されている。胎児への内分泌かく乱物質の作用を評価する上で、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。本研究では、母体臓器、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) の代謝産物 Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) を例にとり、その妊娠胎盤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、マウス胎盤の幹細胞を用いた解析を行った。

#### **4. 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**

一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって規定されると考えられる。現在までに進められてきた疾患の遺伝要因の解析は、単純なメンデル遺伝を示す単一遺伝子の支配によるものに限定されていた。しかしながら、複数の遺伝的要因が関与する複合性遺伝疾患あるいは、人類集団中において高頻度で見出される通常疾患の原因遺伝子についても、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた遺伝的相関解析を行うことによって、その疾患感受性遺伝子を同定できる可能性が示された。子宮内膜症についても、複数の遺伝的効果が複雑に作用している複合性遺伝疾患であると考えられ、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた相関解析によってその遺伝要因を明らかにすることができる可能性がある。この子宮内膜症は、内因性のエストロゲンとの関係が以前から報告されており、内分泌かく乱化学物質が子宮内膜症の発症および病態に何らかの影響を与えることも予想される。

以上より、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、その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。

疾患候補遺伝子として、内分泌かく乱物質の毒性発現に関与する細胞内シグナル伝達経路の構成分子を選定した。今回、対象とした子宮内膜症候補遺伝子は、エストロゲン受容体、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素、アリルヒドロキラーソン受容体の各遺伝子である。昨年度はこれらの遺伝子について遺伝的多型位置を明らかにし、その遺伝的多型の解析法を確立した。今年度は、候補遺伝子領域を遺伝的多型の連鎖

不平衡によって網羅的に解析するためにさらに遺伝マーカーの設定を継続して行い、子宮内膜症感受性対立遺伝子を同定することを最終目的とした。

## **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**

用いた試薬、機器は各機関で若干異なるが、機関 A の例を以下に示した。

#### **1. 試料**

血清中のフタル酸エステル類分析法ガイドラインのクロスチェックは、と畜検査場から豚血液を入手し、遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) して得られた血清を用いた。また、血清は、「2. 器具・試薬の前処理」に示す方法で洗浄したスクリュウキャップ試験管 (10 mL) に分注後、冷凍状態で各分析機関へ送付した。

動物飼料 3 種 (F-1, F-2, F-3)、床敷き 2 種 (M-1, M-2) は、分担研究機関である星薬科大学で一括購入し、各機関に配布されたものを用いた。

#### **2. 試薬および標準溶液**

ヘキサン、アセトニトリル、アセトン、硫酸ナトリウムは関東化学製フタル酸エステル測定用を用いた。フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジイソオクチル (DiOP)、フタル酸ジイソノニル (DiNP) は、関東化学製環境分析用を用いた。また、内部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、DBP, BBP, DEHP の濃度が 4 μg/mL、DiOP, DiNP の濃度が 20 μg/mL になるようにヘキサンで希釈した。内部標準溶液は、それぞれの濃度が 4 μg/mL になるようにヘキサンで希釈した。

#### **3. 器具・試薬の前処理**

ホールピペット、メスフラスコ以外の器具は、200℃で 2 時間加熱し、使用直前にヘキサンで洗浄した。

塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200℃で 2 時間加熱した。

#### **4. フロリジル-PSA カラムの調製**

内径 15 mm、長さ 110 mm のガラス製カラムの底に、ガラス繊維濾紙を敷き、フロリジル 1 g、

PSA 0.5 g (動物飼料では 1 g)、無水硫酸ナトリウム 2 g を積層した。使用直前にアセトン 10 mL、ヘキサン 10 mL で洗浄した。

## 5. 試験溶液の調製法

### 5.1 血清分析用

試験溶液の調製法の概要を、スキーム 1 に示した。血清 1 g を共栓付遠心管 (10 mL、ガラス製) にとり、アセトニトリル 5 mL、塩化ナトリウム 0.5 g、ヘキサン 1 mL 及び内部標準溶液 (あるいは標準溶液) 25  $\mu$ L を加えた後、3 分間混和した。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を分取し、減圧留去した。残渣を蒸留水 2 mL、ヘキサン 5 mL に溶解後、ヘキサン層を分取した。残った水層に再度ヘキサン 3 mL を加えて混和後、ヘキサン層を分取した。分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラムに負荷し、ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

### 5.2 動物飼料分析用

試験溶液の調製法の概要を、スキーム 2 に示した。動物飼料 5 g を共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) にとり、蒸留水 5 mL、アセトニトリル 20 mL 及び内部標準溶液 (あるいは標準溶液) 125  $\mu$ L を加えた後、1 分間ホモジナイズした。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を分取した。残った水層に蒸留水 5 mL、アセトニトリル 15 mL を加え、再度抽出を行った。分取したアセトニトリル層を共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) に入れ、塩化ナトリウム 1.5 g を加えた後 5 分間機械振とうした。アセトニトリル層を分取して共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) に入れ、アセトニトリル飽和ヘキサン 4 mL を加えた後 5 分間機械振とうした。アセトニトリル層を分取後減圧留去し、残渣をヘキサン 5 mL に溶解した。ヘキサン層を分取し、残った水層にヘキサン 5 mL を加えて混和後、ヘキサン層を再度分取した。分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラムに負荷し、ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

### 5.3 床敷き分析用

試験溶液の調製法の概要を、スキーム 3 に示した。床敷き 2.5 g を共栓付遠心管 (50 mL、ガ

ラス製) にとり、アセトン 40 mL 及び内部標準溶液 (あるいは標準溶液) 65  $\mu$ L を加えて 1 時間放置後、10 分間機械振とうした。アセトン溶液を減圧留去後、残渣を蒸留水 2 mL、ヘキサン 5 mL に溶解した。ヘキサン層を分取し、残った水層にヘキサン 3 mL を加えて混和後、ヘキサン層を再度分取した。分取したヘキサン層をフロリジル-PSA カラムに負荷し、ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を減圧留去後、ヘキサン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

## 6. GC/MS 条件

装置: Agilent 6890N GC/5973N MSD

イオン源: EI

カラム: HP-5MS SV (30 m x 0.25 mm ID、膜厚 0.5  $\mu$ m)

カラム温度: 80°C (3 分)  $\rightarrow$  20°C/分  $\rightarrow$  240°C  $\rightarrow$  10°C/分  $\rightarrow$  300°C (5 分)

キャリアガス: He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度: 250°C

試料注入法: パルスドスプリットレス

四重極温度: 150°C

イオン源温度: 230°C

検出法: 選択イオン検出 (SIM)

モニターイオン

## 7. 定量法

試料液を GC/MS に注入し、各フタル酸エステル類のピーク面積を内部標準のピーク面積で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。DiOP は主要な 2 本のピークを、DiNP は主要な 5 本のピーク面積をそれぞれ合計して定量対象とした。

## 1-② 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発

1. 試料  
豚血清は、埼玉県内にある食肉処理場から入手した豚血液から調製した。採取した豚血液試料は、常法に従って血清を調製し、15 分以内に凍結し、測定するまで -20°C で保存した。尿は、長野県衛生公害研究所及び埼玉県衛生研究所職員のボランティアから採取した。採取した尿は速やかに分析に供するか、血液試料と同様に採取後即座に凍結し、測定するまで -20°C で保存した。

なお、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。

飼料及び床敷は市販品を購入した。

## 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-d<sub>16</sub> (BPA-d<sub>16</sub>) は関東化学(株)製の環境分析用試薬を、<sup>13</sup>C-BPA はケンブリッジアイソトープ製を用いた。標準溶液は、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。

Daidzein, Genistein, Glycitein 及びイソフラボン配糖体、Malonyl 体、Acetyl 体は和光純薬工業(株)あるいはナカライ化学(株)製の生化学用試薬を用いた。標準溶液は、各標準品10mg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80%メタノールに溶解して標準溶液とした。

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。

アルミナ-A カートリッジ：Waters 社製、Sep-Pak アルミナ-A カートリッジ(1.7g)を用いた。カートリッジは予めアセトン5mL、精製水5mL、アセトン5mLの順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。

## 3. 装置及び測定条件

### 3.1 血清、尿及び飼料等中のBPAの分析

3.1.1 高速液体クロマトグラフィー質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。

3.1.2 ガスクロマトグラフィー質量分析計：日本電子(株)製 GC-mate を用いた。

測定条件は次のとおりとした。

GC：HP-5890 シリーズII

カラム：DB-5MS 0.32mm×30m×0.25μm

カラム温度：70℃(2min)－20℃/min－150℃－10℃/min－300℃(5min)

注入口温度：250℃

キャリアーガス：He, 1mL/min

注入方法：スプリットレス パージオフ  
1min

MS：Jeol GC-mate

イオン源温度：230℃

イオン化電圧：70V

モニターイオン(m/z)：BPA(357, 372), BPA-d<sub>16</sub>  
(368, 386), <sup>13</sup>C-BPA(369)

### 3.2 飼料中の植物エストロゲンの分析

高速液体クロマトグラフィー質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。

## 4. 検量線の作成

### 4.1 血清、尿及び飼料等中のBPAの分析

#### 4.1.1 LC/MS 測定

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub> を10 ng 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10μL 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-d<sub>16</sub> の面積比により検量線を作成した。

#### 4.1.2 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<sup>13</sup>C-BPA を100ng 添加し、BSTFA 200μL を加え、アセトンで1mL に定容した。これを一夜放置し、GC/MS-SIM で測定し、<sup>13</sup>C-BPA との面積比で検量線を作成した。

### 4.2 飼料中の植物エストロゲンの分析

各イソフラボン標準の濃度が0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 及び2μg/mL となる標準溶液を調製し、その10μL を LC/MS に注入した。検出には SIM 法を採用し、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。

## 5. 試験溶液の調製

### 5.1 BPA 試験溶液の調製(血清、尿)

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)「試料分析の信頼性確保と生体曝露量のモニタリングに関する研究」報告書に準拠して次のとおり調製した。

#### 5.1.1 LC/MS 測定用試験溶液の調製

○遊離体 BPA 測定用試験溶液

豚血清は 1mL を、尿は 2mL を採り、内部標準物質である BPA-d<sub>16</sub> を 5~10 ng 加えた後 Isolute Multimode カートリッジに負荷した。水 3mL 及び 20%メタノール 3mL で洗浄した後メタノール 3mL で溶出し、減圧乾固後 10%メタノール 1mL に溶解して試験溶液とした。

#### ○総 BPA 測定用試験溶液

豚血清は 1mL を、尿は 2mL を採り、0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) 1mL、β-グルクロニダーゼ 6,500units/mL (試薬 β-グルクロニダーゼを 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) で 10 倍希釈) を 50 μL 加えた後、37°C で 1 時間インキュベートした。その後の操作は遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

#### 5.1.2 GC/MS 測定用試験溶液の調製

##### ○遊離体 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100 mL を共栓付き三角フラスコに採り、<sup>13</sup>C-BPA 0.1 μg を加え、これに (1+1) リン酸 1mL を加え、pH 3 以下にした。これを、予めメタノール 5mL、精製水 10mL で活性化した C18 カートリッジに負荷し BPA を抽出した。カートリッジを 10%メタノール 10mL で洗浄後、3mL のメタノールで BPA を溶出させ、100mL のナス型フラスコに受け、酢酸エチル 20mL を加え、ロータリーエバポレータで濃縮乾固した。フラスコに BSTFA 200 μL とアセトン 2mL を加え一夜放置し TMS 化し、ロータリーエバポレータでアセトンを留去した。これに n-ヘキサン 2mL を加え、超音波洗浄機で溶解させ、予め n-ヘキサン 5mL で洗浄したフロリジルカートリッジに負荷し、流出液を試験管に採取した。更に、n-ヘキサン 2mL ずつでフラスコを 2 回洗浄し、カートリッジに負荷し、先の流出液と合わせた。流出液に窒素ガスを吹き付け、1mL に濃縮し、これを GC/MS-SIM で定量した。

##### ○総 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100mL を共栓付き三角フラスコに採り、β-グルクロニダーゼ溶液 100 μL と <sup>13</sup>C-BPA 0.1 μg を加え、37°C で 90 分間酵素処理した。その後の操作は遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

#### 5.2 BPA 試験溶液の調製 (飼料、床敷)

飼料、床敷 1~2g を採り、内部標準物質である BPA-d<sub>16</sub> を 10~20ng 加えた後アセトニトリル 25mL (床敷は 50mL) で 2 分間ホモジナイズ抽出した。抽出液を 3000rpm で 5 分間遠心分

離後、上清を分取し、減圧乾固した。残留物をアセトン 5mL に溶解し、Sep-Pak Alumina-A に負荷した。カートリッジをアセトン 5mL で洗浄後、水 5mL で溶出した。溶出液を Oasis HLB に負荷し、20%メタノール 3mL で洗浄後、メタノール 3mL で溶出した。溶出液を減圧乾固し、40%メタノール 1mL に溶解して LC/MS 用試験溶液とした。一方、GC/MS 用試験溶液は、Oasis HLB への負荷までは LC/MS 法と同様に操作し、メタノール溶出液を減圧乾固後 BSTFA で TMS 化した。TMS 化法は前記の血清、尿試料と同様に行った。

5.3 植物エストロゲン用試験溶液の調製  
飼料、床敷 1~2g を採り、80%メタノール 15mL を加えて 2 分間ホモジナイズ抽出した。抽出液を 3000rpm で遠心分離後、上清を分取した。精製水を加えて 20mL に定容した後、必要に応じて Whatman シリンジフィルター (0.45 μm) でろ過し、試験溶液とした。

### 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:

#### 1. 試薬・装置

【試薬】ノニルフェノール (NP) は、環境分析用試薬 (関東化学社製) を使用した。内標準物質として用いた 4-(1-メチル)オクチルフェノール-d<sub>5</sub> (NP-d<sub>5</sub>) は、環境分析用試薬 (林純薬社製) を用いた。

#### 【溶媒】

LC/MS の移動相に使用したアセトニトリルは和光純薬社製 HPLC 用を、酢酸アンモニウムは和光純薬社製特級を選択した。また、前処理に利用した溶媒は、全て和光純薬社製残留農薬用を使用した。精製水は日本ミリポア社製 Milli-Q (EDS ポリッシャー付き) で精製した水を使用した。

#### 【実験用器具】

ガラス製の実験器具は、すべて 200°C 以上で加熱後使用した。

#### 【LC/MS 装置及び測定条件】

LC/MS 装置 (機種: Agilent 1100 LC/MSD-SL)  
LC 条件

- ・分析用カラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2.1 x 100 mm, 5 μm)
- ・ガードカラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2 x 5 mm, 5 μm)

- ・ 前処理用カラム：TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5  $\mu$ m)
- ・ 移動相：アセトニトリル+0.02%酢酸アンモニウム/0.02%酢酸アンモニウム溶液 (70:30 (8 min)→95:5 (10 min) (V/V))
- ・ 流速：0.2 ml/min (分析カラム)  
0.5 ml/min (前処理カラム)
- ・ カラム温度：40  $^{\circ}$ C
- ・ 注入量：30  $\mu$ l

#### MS 条件

- ・ イオン化法：Electrospray (ESI) , Negative
- ・ Nebulizer gas：N<sub>2</sub> (35 psi)
- ・ Drying gas：N<sub>2</sub> (12 l/min, 350  $^{\circ}$ C)
- ・ フラグメンター電圧：130 V (NP, NP-d<sub>5</sub>)
- ・ モニタリングイオン (*m/z*)：219 (NP), 224 (NP-d<sub>5</sub>)

#### 2. オンライン前処理-LC/MS 法の測定概要

血清試料(ブタ)に同量のアセトニトリルを加え、遠心分離を行った。その後、上清を取り、暫定濃度になるように内標準物質を添加し、測定用試料とした。抽出精製・濃縮は、オンライン前処理固相カラムを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質を分離部及び検出部(LC/MS)に導入する。検出には、ESI-MS による SIM モードネガティブで測定を実施した。

#### 測定試料の調製法

測定対象としたブタ血清は神奈川県食肉衛生検査所にてした屠殺したブタ血液を用い、神奈川県衛生研究所で遠心分離(3000 rpm, 10 分間)を行い、使用に供するまで -80 $^{\circ}$ C にて凍結保存した。測定時には室温解凍し、転倒混和を行った後に、ピペッターで正確に 1 ml を量り取り、試験管に移した。この試験管は、あらかじめ洗浄後に精製水、アセトンを通液したものを使用した。血清が入った試験管に標準溶液を血清中 50  $\mu$ g/ml となるように添加した。次に、血清と同量のアセトニトリルを加え混和後、遠心分離(3000 rpm, 30 min, 4 $^{\circ}$ C)を行った。その後、上清 1 ml をバイアル瓶に正確に量り取り、暫定濃度になるように内標準物質である、NP-d<sub>5</sub> を加え、測定に供した。

#### 標準試料の調製法

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、標準原液としてアセトニ

トリルで 1.0 mg/ml とする。その後、0.2~100  $\mu$ g/ml の濃度範囲になるようにアセトニトリル/水=1/1 (V/V) 溶液を加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう希釈する。

その後、LC/MS-SIM 法により標準試料溶液を測定し、内標準法を用いて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。

#### 1 試薬

4-ノニルフェノール(4NP)：関東化学社製(環境分析用)

4-(1-メチル)オクチルフェノール-d<sub>5</sub>(NP-d<sub>5</sub>)：林純薬社製 1000 ppm ヘキサン溶液(水質試験用)

ヘキサン、メタノール：関東化学社製(フタル酸エステル測定用)

超純水：日本ミリポア社製純水/超純水製造システム EQS-5L で精製した。

#### 2 標準溶液

4NP 標準溶液：4NP 100 mg を精秤し、ヘキサン 100 mL に溶解して 1000 ppm 標準原液を調製し、適宜メタノールで希釈した。

NP-d<sub>5</sub> 溶液：市販の 1000ppm ヘキサン溶液を適宜メタノールで希釈し、内標準溶液として使用した。

#### 3 試料

床敷 2 検体(日本チャールス・リバー社製ホワイトフレック、オリエンタル酵母社製パルソフト)、飼料 3 検体(日本クレア社製 CE-2 E2083-ZY、日本農産工社製ラボ MR ストック、オリエンタル酵母社製粉末 MF) は、市販品を購入した。給水 1 検体は、神奈川県衛生研究所の動物舎給水栓から得たものである。

#### 4 装置及び測定条件

##### 精油定量装置：

実験に用いるガラス器具はすべて洗浄後、180 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱した。次いで放冷し、アセトンで洗浄後使用した。

HPLC 装置：Agilen 社製 Agilent1100

HPLC 測定条件

分析カラム：ODS-3(2.1 mmx150 mm) (ジーエルサイエンス社製)

カラム温度：40  $^{\circ}$ C

移動相：95%メタノール

Flow rate：0.2 mL/min

注入量：10  $\mu$ L

MS/MS 装置：Applied Biosystems 社製 API-3000

MS/MS 測定条件

Ion source : Turbo ion Spray (ESI)

Mode : MRM

Turbo gas temp. : 550°C

Polarity : Negative

Spray voltage : -4500V

#### 4.1 検量線の作成

4NP の 0.5, 1, 10, 50, 100 ppb メタノール溶液を調製して、検量線を作成した。なお、内標準物質 (NP-d<sub>5</sub>) の濃度は 50ppb とした。

#### 5 試験溶液の調製

精油定量装置に水 100mL と試料 2g を入れ、ヘキサン 3mL を用いて 1 時間、還流蒸留を行った。得られたヘキサン層を減圧下で遠心濃縮後、メタノール 1 mL を入れ、超音波で溶解した後、試験溶液とした。給水の場合は試料水 100 mL とヘキサン 3 mL のみを用いて同様な操作を行った。

#### 6 オンライン抽出-LC/MS 法による分析法の検討

前年度までに構築した分析法による最適分析条件で、ブタ血清試料に標準溶液を添加後、その回収率を求めた結果、119.6~126.0% (RSD < 2.7%, n=3) であった。また、本法による検出限界 (S/N > 3) 及び定量限界 (S/N > 10) は、それぞれ 0.2, 1 ng/ml であった。

#### 7 外部委託機関による分析法の構築及びバリデーション

試料調製後にサンプルバイアル瓶に入れた標準溶液及び血清を外部委託 (株式会社エスアールエル及び株式会社東レリサーチセンター) 2 機関に送付し、施設間誤差を検討した。できる限り同様の条件で行うために、分析シーケンスや測定モードを統一して行った。LC における移動相のグラジエントプロフィール及び移動相に添加する酢酸アンモニウムの濃度等は分析する装置の最適化に大きな影響を及ぼすため、各装置における最適化を行った。

#### 2. 生体試料分析と生体暴露量のモニタリング

**グ:** 東海大学医学部附属病院産婦人科外来において、研究目的の十分なインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた患者より、全例同意書を得た。周産期試料としては、分娩時、母体血 20ml、臍帯血全量を採取し、すぐに遠沈し、血清をマイナス 4°C で保存した。

採取にあたっては、採取器具からのコンタミネーションを防止するために、本研究開始時の基礎実験の結果に基づいて施行した。母乳採取は分娩 4 日目と 5 日目に可能な限りの量を採取し、マイナス 4°C にて保存した。また、分析対象の補充を試みるべく、各研究機関からの依頼を受けて、必要に応じて母体毛髪、臍帯、胎脂等の採取を行った。生殖年齢の婦人については腹腔鏡下に内視鏡の期列分離もおこない、化学物質の濃度と病気の関連についても検討した。

検査法については現在策定中のガイドラインに近い方法を採用したが、対象物質がその他の関連のものも測定できる場合は検討対象とした。

#### 主な測定物質と測定方法

1. ビスフェノール A
  - 1) GC-MS 法
  - 2) 高感度 HPLC-蛍光定量法
  - 3) LC-MS 変法
2. 有機塩素系化学物質 (PCB、農薬、ダイオキシン類)
  - GPC-GC/MS 法
3. ブチルスズ化合物
  - ICP-MS/GC 法

#### 3-① 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:

##### (1) 臓器灌流システム

これまでの研究で確立したラット腸管、胃、子宮の灌流システムを用い、ビスフェノール A を暴露し、経時的に灌流液中の代謝物を HPLC で分析した。

##### (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ミクロソームを調整し、UGT 分子種特異抗体を用いたウエ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。

##### (3) MEHP の胎盤細胞分化への作用の解析

0, 0.5, 50, および 500  $\mu$ M の MEHP 存在下でマウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を培養し、各種幹細胞マーカー遺伝子、および、分化マーカー遺伝子の発現をノーザンブロッティング法により解析した。

(4) MEHP の DNA メチル化への作用の解析

1  $\mu$ M の MEHP 存在下で TS 細胞を培養し、ゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA のメチル化状態を Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法により解析した。

(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。

#### **4. 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:**

##### **1. DNA の抽出**

インフォームドコンセントの得られたボランティアより末梢血の採取を行った。採血管はヘパリンがその後の酵素反応に影響を与えるためクエン酸主体のものを使用し、10ml を採血した。このうち 0.4ml を用いて、カートリッジ (キアゲン社) による DNA の抽出を行った。得られたゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA の定性的判断を行った。さらに、吸光度を測定して DNA 濃度を算出した。

##### **2. DNA 配列情報および一塩基置換 (SNP) の検索**

上記 3 遺伝子 (*ESR1*, *CYP1A1*, *AHR*) のゲノム領域内において SNPs の検出を行うために、これらの遺伝子領域を含むゲノム DNA の配列情報が必要となる。ヒトゲノム配列は、Gen Bank DNA data base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) より入手した。得られたゲノム配列について、上記 3 遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター領域を明らかにした。SNP のなかには、調節領域に存在する rSNP (regulatory SNP) やコーディング領域に存在する cSNP (coding SNP)、イントロン領域に存在する iSNP (intron SNP)、遺伝子間の介在領域に存在する gSNP (genomic SNP) がある。これらのうち、直接的に表現型に影響を与える SNPs は、rSNP、cSNP、iSNP であり予めこれらの情報を整理しておくことは、疾患感受性遺伝子のマッピングするうえで大変重要である。

現在までにヒトゲノム上で見い出された SNP についてはデータベースに登録されており、上記 3 遺伝子領域に存在する SNP についてもこのデータベースを検索することによって SNP の位置を

明らかにした

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)。

##### **3. プライマーの設計**

PCR プライマーの設計は、PCR に適した条件を考慮するソフトウェアである「Primer Express」を用いて、SNP を挟み込むようにフォワードプライマーとリバースプライマーの 2 種類のプライマーを各 SNP ごとに設計した。このソフトウェアは PCR の適した条件の必要事項である Tm 値、GC 含量、プライマー配列の 2 次構造等を考慮してプライマー配列を選定できるが、反復領域やゲノム上に類似した配列がある場合あるいはプライマー配列内に多型がある場合には PCR 増幅が阻害されるため、できる限り配列情報の検索を行っておくことが重要である。

##### **4 PCR 増幅**

ゲノム DNA 10ng を鋳型としてサーマルサイクラー 9700 (ABI 社) を用いて PCR 反応を行い、SNP を含むゲノム領域の増幅を行った。増幅断片を 2.0% アガロースゲル電気泳動等によって確認した。このとき、予想されるサイズの DNA 断片が検出されなかったり、非特異的 DNA 断片が検出された場合は、PCR 増幅サイクルのうち、アニーリング温度あるいは伸長反応の時間を検討することによって特異的な DNA 増幅の検出を確認した。SNP 検出は、最終段階の塩基配列の決定において偽陽性あるいは偽陰性が検出される場合があるため、PCR 増幅条件を十分に検討することは重要である。

##### **5 塩基配列の決定**

増幅 DNA 断片をエクソヌクレアーゼ I および Shrimp アルカリホスファターゼによって精製後、PCR 増幅に用いたプライマーを用いてシーケンシングサイクルを行う。反応後、シーケンシング産物を精製して ABI3100 シーケンサーによって塩基配列の決定を行った。明確な波形データが得られない場合は、入れ子 (nested) プライマーを用いて再度シーケンシングサイクルを行った。

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。

当初、血液だけを暴露量測定材料と考えた「子宮内膜症に関する遺伝要因の解明」と題する申請については伊医倫 02-037 号の承認を 2002 年 10 月 17 日に得たが、その後、本研究班の班会議において、人体の暴露量測定には尿や毛髪、または子宮内膜症の検査に必須の腹水も有効な試料となる可能性が示されたことから、再度変更申請を行い、伊医倫 02-053 号の承認を 2002 年 11 月 27 日に得ている。

一方この研究について、本大学医学部では情報管理、遺伝カウンセリングの体制も十分備えて万全を期している。

## C&D. 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：

#### 1. 血清中のフタル酸エステル類分析法ガイドラインのクロスチェック

外部機関を含めた 3 機関で、同一試料（ブタ血清）を用いて分析法ガイドラインのクロスチェックを実施した。

空試験におけるフタル酸エステル類の検出量では、3 機関ともに DBP 及び DEHP が検出され、BBP、DiOP 及び DiNP は検出されなかった。検出濃度の平均値は、DBP が 9.4 ng/g、DEHP が 12.6 ng/g であった。ブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量については、空試験と同様に、3 機関ともに DBP 及び DEHP が検出され、BBP、DiOP 及び DiNP は検出されなかった。検出濃度の平均値は、DBP が 8.6 ng/g、DEHP が 23.6 ng/g であった。

機関 A と機関 B では、空試験及びブランク試験ともに、検出された DBP 及び DEHP の濃度は、ガイドラインで定めた検出限界値（10 ng/g）未満であった。一方、機関 C では、空試験及びブランク試験ともに、検出された DBP 及び DEHP の濃度は検出限界値を超えていた。機関 C で検出限界値を超える DBP、DEHP が検出された原因は、GC/MS の注入口からの汚染であることが判明している。従って、この問題が解決されれば、すべての機関でバックグラウンド値を検出限界値未満に抑えることが可能と考えられた。

添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率については、3 機関の回収率の平均値は、DBP が 98.5 %、BBP が 101 %、DEHP が 128 %、DiOP が 108 %、DiNP が 111 % であった。機関 C にお

ける GC/MS に由来するバックグラウンドの影響で、DEHP の回収率がやや高い値を示したが、それ以外は良好な結果であった。相対標準偏差は、DEHP の 42.7 % を除き 1.4 ~ 10.3 % と良好な結果であった。

以上のクロスチェックの結果、1 機関で GC/MS の注入口に由来するバックグラウンド値が認められたものの、この問題が解決されれば、本試験法により精度の高い測定値が得られると考えられた。

#### 2. 動物飼料中のフタル酸エステル類分析法の確立

動物飼料中のフタル酸エステル類分析法の検討は、星薬科大学から配布された 3 種の動物飼料の中から、「F-1」を選択して実施した。

試験操作としては、血清と同様に、空試験、ブランク試験及び添加試験を行った。空試験におけるフタル酸エステル類の検出量については、検出濃度の平均値は、DBP が 1.8 ng/g、DEHP が 8.1 ng/g で、他の 3 物質はいずれも 1 ng/g 未満であった。ブランク試験では、検出濃度の平均値は、DBP が 173 ng/g、DEHP が 113 ng/g、他の 3 物質はいずれも 10 ng/g 未満であった。添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率は、その平均値が、DBP が 123 %、BBP が 98.8 %、DEHP が 148 %、DiOP が 109 %、DiNP が 113 % であった。DBP と DEHP の回収率がやや高い傾向を示したが、試料中に含まれている両物質の濃度が高いことが要因の一つと考えられた。相対標準偏差は、0.4 ~ 7.9 % と良好な結果であった。なお、本法による検出限界値は、DBP、BBP、DEHP は 10 ng/g、DiOP、DiNP は 50 ng/g に設定した。

3. 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析前項で確立した動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法を用いて、動物飼料中のフタル酸エステル類の濃度を測定した。測定に用いた試料は、星薬科大学から配布された 3 種の動物飼料で、同一の試料を 2 機関で分析した。その結果、全ての試料から DBP と DEHP が検出され、BBP、DiOP、DiNP は検出限界値未満であった。検出濃度は、DBP が 23.0 ~ 184 ng/g、DEHP が 112 ~ 168 ng/g であった。2 機関間でほぼ同程度の結果が得られており、本試験法は、動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法として、十分な性能を有する方法と考えられた。

#### 4. 床敷き中のフタル酸エステル類分析法の確

立

床敷き中のフタル酸エステル類分析法の検討は、星薬科大学から配布された2種の床敷きの中から、「M-1」を選択して実施した。空試験におけるフタル酸エステル類の検出濃度の平均値は、DBPが3.1 ng/g、DEHPが6.6 ng/gで、他の3物質はいずれも1 ng/g未満であった。検出濃度の平均値は、DBPが1140 ng/g、DEHPが441 ng/gであった。この他、DiNPが19.0 ng/g検出され、BBP及びDiOPは10 ng/g未満であった。

添加試験における回収率の平均値は、DBPが132%、BBPが102%、DEHPが146%、DiOPが119%、DiNPが94.7%であった。DBPとDEHPの回収率がやや高い傾向を示したが、試料中に含まれている両物質の濃度が高いことが要因の一つと考えられた。相対標準偏差は、1.3~5.0%と良好な結果であった。なお、本法による検出限界値は、DBP、BBP、DEHPは10 ng/g、DiOP、DiNPは50 ng/gに設定した。

なお、床敷き中に含まれる夾雑物由来と考えられる妨害ピークが、SIMクロマトグラム(m/z 149)上のBBP及びDiOP付近に出現するため、定量イオンを、BBPではm/z 206(BBP-d4ではm/z 210)、DiOPではm/z 279(BBP-d4ではm/z 283)に設定した。

5. 床敷き中のフタル酸エステル類の分析  
前項で確立した床敷き中のフタル酸エステル類の分析法を用いて、床敷き中のフタル酸エステル類の濃度を測定した。測定に用いた試料は、星薬科大学から配布された2種(M-1、M-2)の床敷きで、同一の試料を2機関で分析した。その結果、両方の試料からDBPとDEHPが検出された。BBP、DiOP及びDiNPは検出限界値未満であった。検出濃度は、DBPが630~1420 ng/g、DEHPが16.5~467 ng/gであった。2機関間でほぼ同程度の結果が得られており、本試験法は、動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法として、十分な性能

を有する方法と考えられた。

### 1-② 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発：

#### 1. BPA分析法ガイドラインのクロスチェック

○配付試料：埼玉県内にある食肉処理場から豚血液を入手し、遠心分離して得られた豚血清を用いた（ブランク豚血清、及びビスフェ

ノール A を 10 ppb になるよう添加したものを配付）。

○分析法：検討会に提出したガイドライン(LC/MS法)に準拠して行った。

○数値の算出方法：分析方法に従い、ppb等の濃度で算出した。配付試料について3機関(株)東レリサーチセンター、(株)エスアールエル、長野県衛生公害研究所)でクロスチェックを実施した。無添加及び10ppb添加試料中のBPA濃度は、いずれの機関の分析値も良く一致し、室間再現性に優れていた、以上の結果から、昨年提案した「BPA分析法ガイドライン」は、血清中のBPA分析法として有効であると考えられる。

#### 2. BPAの推定曝露量について

昨年度の調査において、経口摂取された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)へ排泄されることが解った。従って、一日尿中のBPAを測定することによりBPAの曝露量を推定することが可能と考える。そこで、一日尿を採取し、BPAの推定曝露量を求めた。37例の一日尿を測定した結果、1例を除いた尿中BPA濃度は2ppb以下であった(長野30例はGC/MS法、埼玉7例はLC/MS法により測定)。尿中BPA濃度及び尿量からBPAの平均排泄量を求めた結果、1µg/dayレベルであった。2002年5月に示されたEUのBPA暫定TDIは、500µg/dayであり、今回推定された平均曝露量は問題のないレベルであると思われる。

なお、一日尿10試料について、GC/MS法による測定値とLC/MS法による測定値を比較した結果、高い相関が得られた。今回は、前述したとおり「BPA分析法ガイドラインのクロスチェック」として、検討会に提出したガイドラインの中のLC/MS法を検討したが、LC/MS法とGC/MS法による相関が高いことから、ガイドラインとして提出したGC/MS法も精度に優れたBPAの分析法であると思われる。

#### 3. 実験動物飼育環境中のBPAの分析法ガイドラインの検討

動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境(飼料、床敷等)からのBPA曝露量を評価する分析法を検討した。飼料は魚粉、大豆等を主原料としており、かなりの脂質成分を含んでいた。このことから、血清や尿を分析

試料とした試験溶液調製法は適用困難であった。そこで、脂質成分を除去する目的で活性アルミナ、フロリジル、シリカゲル等を用いて検討した。フロリジル及びシリカゲルでは、脂質成分を完全に除去できなかった。一方、塩基性、中性及び酸性のいずれの活性アルミナを用いても脂質成分を除去することが可能であった。しかし、塩基性及び中性の活性アルミナでは、BPAの回収率が30-40%であった（酸性アルミナでは60-80%）。以上の結果から、脂質の除去には酸性の活性アルミナを用いることにした。本法を用いて飼料、床敷中のBPAを測定した結果、多くは数ppbレベルであったが、数百ppbレベルで検出された床敷も見られた。

#### 4. 飼料中の植物エストロゲン分析法の検討

##### 4.1. LC/MS測定条件の検討

分析対象として、Daidzein, Genistein, Glycitein, その配糖体である Daidzin, Genistin, Glycitin 及び各 Malonyl 体, Acetyl 体、計12成分を選んだ。イオン化モードは、いずれもフェノール性水酸基を有していることから Negative mode を採用した。また、移動相に微量の酢酸を加えることにより、各成分ともより高感度に検出された。しかし、酢酸の濃度が高くなるに従い検出感度は逆に低下することから、酢酸濃度は0.003%とした。次にイオン強度に及ぼすフラグメンター電圧の影響を検討した。各成分の脱プロトン化分子  $[M-H]^-$ 、あるいは糖脱離イオン  $[M-glucose-H]^-$  を効率良く生成する120Vに設定した。更に、他のパラメーターの最適測定条件を検討し、設定した。本条件によって得られた各イソフラボンの検出限界は、SIMモードでモニターイオンを各イソフラボンの脱プロトン化分子あるいは糖脱離イオンとした場合、概ね10ng/mL(絶対量として50pg)であった。

##### 4.2. 前処理法の検討

飼料からの抽出には、アグリコン (Daidzein, Genistein, Glycitein) 及び配糖体 (Daidzin, Genistin, Glycitin) とも良好に回収される80%メタノールを用いた。LC/MSは選択性に優れており、クリーンアップ操作なしに飼料分析への応用が可能であった。

予試験的に本法を用いて市販されている飼料中のイソフラボン含有量調査を行った結果、数ppm~数百ppmのイソフラボンが含まれていた。

#### 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:

オンライン前処理-LC/MS法で、統一シーケンスにより測定した3機関の結果からB、C機関ではほぼ同様の結果が得られた。A機関においては前処理カラムに除タンパク機能を持たないカラムを使用したために、他機関と異なる結果が得られたものと考えられる。B、C機関の添加回収試験の結果を比べてみると、平均回収率が133.2%, RSD<10.1%であった。内標準法を採用しているにもかかわらず、回収率が100%を超える原因としては、前年度に報告したように、ノニルフェノールの内標準物質として、4-(1-メチル)オクチルフェノール-d<sub>5</sub>を使用しているために、イオン化効率や挙動がノニルフェノールと異なることが考えられた。

以上の結果より、感度及び精度がほぼ同等の複数施設間による施設間差としてのクロスチェックにより、本法の精度管理が可能であった。今後は各施設での測定においては、本法を用いることで、正確な測定ができると思われる。

##### 1 LC/MS/MSの測定条件について

4NP及びNP-d<sub>5</sub>のメタノール溶液を用い、自動最適化を行った。4NPのPrecursor ion及びProduct ionは、それぞれ219,133であり、NP-d<sub>5</sub>は224,123であった。

##### 2 検量線について

B・4・1で作成した標準溶液について検量線を作成したところ、相関係数 $r^2=0.9998$ と良好な結果が得られた。

##### 3 検出下限値(LOD)及び定量下限値(LOQ)について

検量線に使用した最も低濃度の標準溶液(4NP:0.5ppb, NP-d<sub>5</sub>:50ppb)を用いて5回の繰り返し測定を行った。

その結果、平均値と標準偏差( $\sigma$ )は以下のとおりとなった。

0.4504±0.1687 ppb

また、LODは0.5ppb(3 $\sigma$ )、LOQは2ppb(10 $\sigma$ )であった。

##### 4 精油定量装置を用いた抽出法の検討



#### 4.1 蒸留時間による回収率について

精油抽出装置に水 100 mL を入れ、これに 4NP 及び NP-d<sub>5</sub> をそれぞれ 1 μg 添加し、ヘキサンを抽出溶媒として 15 分から 90 分間蒸留を行った。4NP 及び NP-d<sub>5</sub> は 15 分間蒸留することで、約 80%、30 分間でほぼ 100% の回収が得られた。4NP の内標準物質として市販されている NP-d<sub>5</sub> は蒸留法においても内標準物質として使用することが可能であった。

#### 4.2 装置内洗浄によるブランク値の低減下について

微量分析においては、操作ブランク値が問題となるため、ブランク値の低減下を目的に試験前の装置内の洗浄効果を検討した。

水とヘキサンで 30 分間、4 回洗浄し、それぞれの洗浄段階でブランク値を測定した。3 回洗浄することでブランク値を 1~2 ppb の範囲に抑えることができたことから、3 回洗浄後試料を測定することとした。

#### 4.3 遠心エバポレータによる 4NP 及び NP-d<sub>5</sub> の揮散についての検討

ヘキサン溶液 (A) 及びヘキサン溶液に水を入れ、ヘキサン層を再度分取したもの (B) を遠心エバポレータにかけ、25 分後及び 50 分後、ヘキサンに再溶解し、測定を行った。完全にヘキサンが除去できる 25 分間では 4NP 及び NP-d<sub>5</sub> は、ともに 90% 以上の回収率が得られ、ヘキサン除去後さらに 25 分間遠心エバポレータにかけた場合においても 90% 以上の回収率が得られた。

この結果から 4NP 及び NP-d<sub>5</sub> は、50 分後においても (A) と (B) の回収率にほとんど差がないことが確認できた。

従って、精油定量装置から分取したヘキサン層の無水硫酸ナトリウムによる脱水操作を省略した。

なお、測定値は 4NP、NP-d<sub>5</sub> 各々の 50 ppb 標準溶液を用いて絶対検量線で測定した。

#### 4.4 添加回収実験

水及び飼料に 4NP を 100 ng 添加し、添加回収実験を行った。なお、飼料については 4NP が 18.7 ppb 検出された飼料に添加し、サンプル量を補正した。その結果、蒸留水については 105%、飼料は 71.7% であった。飼料からの回収率がやや低い値を示した要因として、添加した飼料に 4NP が含有されており、飼料のばらつきが考え

られる。

#### 4.5 試料中の分析結果

飼料 3 検体から 10.5~18.7 ppb、床敷 2 検体から 65.3 ppb、32.2 ppb の 4NP が検出された。給水からは検出されなかった。

### 2. 生体試料分析と生体暴露量のモニタリング:

各試料は要望のあった研究機関に発送し、分析が行われたが、現時点では高濃度の暴露を疑わせる症例は存在しなかった。妊婦が研究に協力的であったことは、テレビ、ラジオ、雑誌等のマスコミの影響と、妊婦自身の関心の高さによるものと考えられた。

生体試料のバラツキの多さが認められたが、このことはある一定数の試料を準備するにあたっては、その 1.5~2 倍数の症例数が必要であることを意味し、今後の目安としたい。

現時点では、内膜症の病気と関連する物質は特に検出されなかった。さらに疫学的検討を追加して報告したい。

### 3. 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:

(1) ラット消化管での代謝解毒酵素活性の解析

これまでの研究により、ビスフェノール A 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、消化管でのビスフェノール A の吸収代謝を知るために、反転腸管と胃灌流実験を行った。胃灌流実験により、小腸大腸には見られなかった素早いビスフェノール A の吸収が観察された。また、胃粘膜上皮細胞における UGT の発現が確認された。

(2) ラット子宮環境での代謝解毒酵素活性の解析

ラット着床初期の脱落膜細胞と胎盤内上皮細胞に UGT の陽性像が見られた。

ラット子宮内膜上皮細胞の単離・培養に成功し、プレート上で 1-ナフトールを添加したところグルクロン酸抱合活性が検出された。この細胞を用いて発現している UGT を特定し、どのような化学物質をグルクロン酸縫合し解毒する能力があるかを明らかにすることができる。さらに、薬物投与により上皮細胞での UGT の誘導現象を明らかにする。

胎盤での内分泌かく乱物質のバリエーション機能解析のために、ラット胎盤を用いた灌流実験システムの確立を試み、胎盤動脈（母親側）に挿入したカニューレからの人工血液の注入に成功した。エバンスブルーを注入した予備実験では、胎盤のバリエーション機能が維持されていることが確認された。このシステムを用いることで、ラット胎盤が内分泌かく乱物質のバリエーションとしてどの程度機能しているか、もし通過しやすい物質があるとしたらどのような化学構造のものか、などを詳細に検討することが可能である。

#### (3) MEHP の胎盤細胞の分化への影響の解析

MEHP 存在下で培養した TS 細胞では、2つの未分化マーカー遺伝子のうち片方だけに発現の上昇が認められた。一方、分化誘導後は分化マーカー遺伝子の発現が MEHP によって促進されていた。これらの MEHP の作用は、従来知られてきた分化の概念では説明できない。MEHP の作用機序の可能性として、細胞のエピジェネティックな状態（DNA メチル化など）を変化させることで分化に影響を及ぼすことが考えられる。

#### (4) MEHP による TS 細胞の DNA メチル化への作用の解析

未分化 TS 細胞に MEHP を添加した結果、複数のゲノム領域での DNA メチル化異常がおこる事が明らかになった。またその異常は、メチル化の亢進と阻害の両方があった。

### **4. 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：**

#### 1. 遺伝的多型箇所を検索

子宮内膜症候補遺伝子である *ESR1* 遺伝子、*CYP11A1* 遺伝子、*AHR* 遺伝子の各遺伝子について、遺伝的多型箇所をデータベースおよび文献検索によって調べた。*ESR1* 遺伝子については、280Kb の比較的広大なゲノム領域にわたり、現在までのところ 340 個の SNP と 7 個のマイクロサテライトが存在する。また、*CYP11A1* 遺伝子および *AHR* 遺伝子については、それぞれ約 6kb と 49.5kb のゲノム領域に 24 個および 8 個の SNP が存在するが、両遺伝子ともにマイクロサテライトは存在していなかった。SNP に関しては、その対立遺伝子頻度の情報が全ての SNP について明らかにされていないため、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency の高い遺伝マーカーを実験的に調べる必要がある。そこで、上記

の検索によって検出された SNP についてランダムにいくつかの SNP について対立遺伝子頻度を求めることとした。

#### 2. PCR プライマーおよび PCR 条件の設定

遺伝的多型の解析方法を確立するために、a) DNA 抽出方法、b) PCR プライマーの設定と PCR 条件の決定、c) PCR 産物の抽出方法、d) Sequencing 方法の決定を行った。DNA の抽出方法については、0.4ml の末梢血試料をカートリッジ（キアゲン社）を使用して DNA の調製を行った。このようにして抽出されたゲノム DNA は次ぎの PCR 反応条件に適切な DNA 濃度および品質を保っていた。PCR プライマーは、SNP 箇所を挟み込む形で設定してその増幅 DNA 断片が 1.5kb 以下になるように設計された。PCR 反応条件は、94° C 30sec、56-60° C 40sec、72° C 1min のサイクルを 30 回繰り返すことで標的 DNA 断片の増幅を確認できた。また、近接する SNP 箇所については 1つの PCR 断片の中に複数の SNP が含まれるように PCR プライマーを設定し、多型解析の効率化を図った。PCR 増幅断片を含む PCR 産物には、PCR プライマーおよび dNTPs（デオキシ 3 リン酸）が含まれているため、これらを Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって除去し、1/100 量を Sequencing 反応に使用した。

#### 3. DNA 多型解析

DNA 多型の解析方法が確立された SNP について、その対立遺伝子頻度を求め遺伝的多型マーカーとしての有用性を検討した。患者群 5 名、対照群 11 名について、子宮内膜症候補遺伝子内に検出された遺伝的多型箇所のうちランダムにいくつかの SNP を選択して、塩基配列の決定を行った。その結果、*ESR1* 遺伝子については SNP27 箇所中 18 箇所において多型性が確認された。さらに、多型が確認されたこれらの SNP について Minor allele frequency を算出したところ、多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP を 13 箇所確認した。同様に、*CYP11A1* 遺伝子については SNP33 箇所中 8 箇所において多型性が確認され、Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP は 4 箇所存在していた。また、*AHR* 遺伝子については SNP7 箇所中 1 箇所において多型性が確認され、この SNP は Minor allele frequency が 0.2 以上を満たしていた。

さらに、上記 3 遺伝子について各 SNP の対立遺伝子頻度から遺伝子型頻度を求めた。その結果、allele frequency > 0.2 を満たしていたほとんどの SNP について、ヘテロ接合性が 0.2 以上であった。

現在までのところ、内分泌かく乱化学物質が関与する疾患の遺伝的要因については不明な部分が多く、各疾患の発症および病態を捕らえるまでには至っていない。本研究は、このような疾患に関与する遺伝子を科学的根拠に基づき選定し、その遺伝的関与を詳細に解析するという点で独創的な研究であると考えられる。現在までに行われてきた疾患感受性遺伝子の解析は、その遺伝子の翻訳領域を中心とした解析が中心であった。これはそれまで、ヒトのゲノム情報の不完全さが原因であり、そのため大変低い対立遺伝子頻度を対象とした解析により実際にはその疾患に重要な遺伝子多型を見逃してしまう可能性があった。

しかしながら、現在ではヒトのゲノム情報を簡単迅速に入手することが可能となり、疾患感受性遺伝子の遺伝的解析においてもその遺伝子領域全体を高密度な遺伝的多型マーカーを用いて網羅的に解析することが可能となった。このようなことから、高度な多型性を示す遺伝マーカーを高密度に設定し、疾患との感受性を解析することにより、より信頼性の高い解析結果と評価が可能であると予想される。本研究において、見出された高度な多型性を示す遺伝マーカーは本疾患との関係を詳細に解析するだけでなく、今後の疾患感受性遺伝子の遺伝的解析においても重要な知見をもたらすことは間違いないと期待される。

しかしながら、ヒトゲノム上には約 3 万から 3 万 5000 個の遺伝子が存在すると予想されており、未だその機能が明らかにされている遺伝子は半数もない。このようなことから、本研究において選定した 3 個の候補遺伝子以外にも多くの遺伝子が内分泌かく乱化学物質や感受性に関与している可能性も考えられ、さらに候補遺伝子の選定を行うことが必要であろう。

## 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. 同一の試料（ブタ血清）を用いて、外部機関を含めた 3 機関で血清中フタル酸エステル類の分析法ガイドラインのクロスチェックを実施した。その結果、1 機関で GC/MS の注入口に由来するバックグラウンド値が認められたものの、この問題が解決されれば、本試験法により精度の高い測定値が得られると考えられた。

2. 動物飼料中のフタル酸エステル類分析法を確立するとともに、3 種類の動物飼料中のフタル酸エステル類濃度を測定した。その結果、DBP が 23.0~184 ng/g、DEHP が 112~168 ng/g 検出された。

3. 床敷き中のフタル酸エステル類分析法を確立するとともに、2 種類の床敷き中のフタル酸エステル類濃度を測定した。その結果、DBP が 630~1420 ng/g、DEHP が 16.5~467 ng/g 検出された。

4. 確立した動物飼料及び床敷き中のフタル酸エステル類の分析法の信頼性を確保するために、今後、クロスチェックを実施する必要があると考えられた。

5. in vivo 系試験の信頼性確保には、動物飼料、床敷き以外にも、給水瓶、ケージ、実験室内空気等の動物実験環境中の分析法を確立し、それらからの暴露量を総合的に把握する必要があると考えられた。

### 1-② 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発：

1. BPA 分析法ガイドラインのクロスチェックについて

先に提案した BPA 分析法ガイドラインについて、3 機関でクロスチェックを実施したところ、良好な結果が得られた（RSD 7 %）

2. BPA の推定曝露量について

1 日尿を用いて BPA の推定曝露量を求めた結果、1 µg/day レベルであり、2002 年 5 月に示された EU の暫定 TDI (500 µg/day) に比べ問題のないレベルと思われた。

3. 実験動物飼育環境中の BPA の分析法ガイドラインの検討

動物実験の信頼性確保するため、動物実験環境（飼料、床敷等）からの BPA 曝露量を評価する分析法を検討した。本法を用いて飼料、床敷中の BPA を測定した結果、多くは数 ppb 前後であったが、数百 ppb レベルで検出された床敷も見られた。

4. 飼料中の植物エストロゲン分析法の検討  
動物実験の信頼性を確保するため、飼料中に含まれる植物エストロゲン（イソフラボン）の分析法を検討した。本法を用いて飼料中のイソフラボンを測定した結果、数 ppm～数百 ppm のイソフラボンが検出された。

#### 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：

動物飼料等からの 4NP の分析法として、精油定量装置を用い、前処理操作を簡素化することで、試験操作による汚染を低減化することが可能となった。

本試験法の検討には、LC/MS/MS を用いて 4NP の測定を行った。4NP は異性体の混合物があることから、今後、さらに LC-MS との比較を行う予定である。

#### 2. 生体試料分析と生体暴露量のモニタリング：

生体試料採取の実際を試みた。予測に比べ特に母乳採取と胎脂採取に個人差が大きいことが判明したが現時点で採取した生体試料において危惧された高濃度暴露を疑わせる値は存在しなかった。さらに例数を蓄積しガイドラインに則った方法で分析して検討したい。

#### 3 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：

これまでの研究の成果により、母体に取り込まれた内分泌かく乱物質の大部分が腸および肝臓で解毒され、さらに子宮でも解毒代謝されることが明らかになった。今後、胃における素早いビスフェノール A の吸収、および、胃粘膜上皮細胞における UGT の発現の役割について検討する必要がある。胎盤灌流システムの確立は、胎児への化学物質の移行に関する知見を得る上で非常に重要である。

TS 細胞に対する MEHP の作用は予想外の結果であった。これは MEHP がゲノム DNA 全体に何らかの修飾をもたらすような作用を有する可能性を示唆していたが、実際にゲノム DNA のメチル化異常が検出されたことの意義は大きい。これまで、内分泌かく乱物質の作用に関するエピジェネティックな側面からの解析はほとんど無く、この結果は、内分泌かく乱作用の研究に一石を投じるものである。

#### 4. 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：

1. 昨年度までに見い出された遺伝的多型箇所に加えて、さらに高密度な多型マーカーを候補遺伝子領域に設定するために、多型情報の検索を行い、子宮内膜症候補遺伝子領域に新たに多型箇所を見出した。また、*ESR1*、*AHR* 遺伝子については遺伝的多型マーカーとして高度な多型性を示すことが予想されるマイクロサテライトについてもそのゲノム上の位置を明らかにした。

2. *ESR1*、*CYP1A1*、*AHR* 遺伝子について、多型箇所を増幅する PCR 系とそれに続く塩基配列の決定システムをそれぞれ 8、2、5 遺伝子座について確立した。

3. 上記 3 遺伝子について、患者群 5 名、対照群 11 名を用いた DNA 多型解析の結果、Minor allele frequency が 0.2 以上の多型性を示す多型箇所を *ESR1*、*CYP1A1*、*AHR* 遺伝子について、それぞれ 13、4、1 箇所見出した。これらの多型箇所は、今後の相関解析において有用な遺伝マーカーとして期待される。

#### **F. 健康危険情報**

該当無し

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

- 1) Tadashi Tsukioka, Jun-ichi Terasawa, Shouichiro Sato, Yoshiyuki Hanaoka, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa, "Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA," *Journal of Environmental Chemistry*, 14(1), (2004)
- 2) Masakazu Horie, Harumi Takegami, Sakiko Tanno, Kouichi Inoue, Hiroyuki Nakazawa, Shun-ichiro Izumi, Tsunehisa Makino, "Determination of nonylphenol and octylphenol in serum and urine by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry" *in submission*
- 3) Koichi Inoue, Yoshihiro Yoshimura, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa, "Determination of 4-nonylphenol and