

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 16 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  
(H 1 4 - 食品・化学 - 0 1 2)

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. 分担研究報告書

1. 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 .....13

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)

齊藤 勲 (愛知県衛生研究所)

猪飼 誉友 (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)

高取 聡 (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)

石井 里枝 (埼玉県衛生研究所)

竹上 晴美 (埼玉県衛生研究所)

3. 動物飼料、床敷及び給水中の 4-ノニルフェノールの分析 .....39

分担研究者 中澤 裕之 (星薬科大学)

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)

齊藤 貢一 (星薬科大学)

伊藤 里恵 (星薬科大学)

4. 実験動物用飼料中の 17 $\beta$ -エストラジオールの分析 .....45

分担研究者 岡 尚男 (愛知県衛生研究所)

研究協力者 堀 伸二郎 (大阪府立公衆衛生研究所)

高取 聡 (大阪府立公衆衛生研究所)

近藤 文雄 (愛知県衛生研究所)

5. 生殖年齢婦人を対象とした生体試料に対する分析.....	51
主任研究者    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. 周産期試料に関する分析.....	59
主任研究者    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)	
7. 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.....	67
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)	
8. 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.....	71
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.....	83
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	85

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 専門診療学系 産婦人科 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実験動物飼育環境中の分析法のガイドライン」

策定作業

1-① 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：昨年度の本研究において開発した、動物飼料及び床敷中のフタル酸エステル類の分析法の検証を行うとともに、本法を用いて市販の動物飼料及び床敷を分析した。その結果、動物飼料（n=12）からはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）が 111-511 ng/g、フタル酸ジブチル（DBP）が 25.1-944 ng/g、フタル酸ブチルベンジル（BBP）が 22.2-157 ng/g 検出され、総量（測定対象とした 5 種のフタル酸エステル類の合計値）は 141-1410 ng/g であった。検出されたフタル酸エステル類の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取するフタル酸エステル類の総量を試算すると、マウスでは 846-8460 ng/日（一日の飼料摂取量を 6 g とした時）、ラットでは 3525-35250 ng/日（一日の飼料摂取量を 25 g とした時）であった。床敷（n=13）からは DEHP が 16.0-5070 ng/g、DBP が 19.6-1390 ng/g、BBP が 440-900 ng/g、フタル酸ジイソノニルが 198 ng/g 検出された。検出された 4 物質の最高値は、いずれも再生紙を原材料とした床敷から検出されたものであった。実験動物舎の室内空気（n=4）からは、DEHP が 27.6-32.1 ng/m<sup>3</sup>、DBP が 261-357 ng/m<sup>3</sup> 検出された。給水（n=3）からは、フタル酸エステル類は検出されなかった。以上の結果より、*in vivo* 低用量影響試験の信頼性確保には、動物実験環境からの暴露影響を考慮する必要があると考えられた。生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析法について文献調査を行った結果、米国疾病管理・予防センターの研究グループが開発した尿中の分析法の信頼性が高く、その方法をガイドライン案として提案した。

1-② 実験動物飼育環境中のビスフェノール A 及び植物エストロゲンの分析法の開発：1). 実験動物飼育環境中のビスフェノール A の分析法ガイドラインの構築；動物実験の信頼性確保するため、動物実験環境（飼料、床敷、給水）からのビスフェノール A (BPA) 暴露量を評価する分析法（試料を、アルミナ-A カートリッジ及びポリマーゲル充填カートリッジを用いてクリーンアップし、高速液体クロマトグラフ/質量分析計（LC/MS）で定性・定量）を構築した。2). 飼料、床敷、給水中のビスフェノール A；飼料中（n=40）に含まれる BPA は、ND~2.9ng/g で、ほとんどの飼料が検出下限値レベル（1ng/g）であった。最も高濃度で検出された BPA 濃度（2.9ng/g）より、マウス及びラットが飼料から摂取する BPA を試算すると、マウスでは 17.4 ng/日（一日の飼料摂取量を 6 g とした時）、ラットでは 72.5 ng/日（一日の飼料摂取量を 25 g とした時）程度となる。また、床敷中（n=14）からは最高で 704ng/g 検出されたものも見られたが、給水中（n=3）からは BPA は検出（0.02ng/mL）されなかった。3). 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、飼料に含まれる植物エストロゲン（イソフラボン）の分析法を構築した。本法を用いて飼料中のイソフラボンを測定した結果、ほとんどの飼料（37/40）から植物エストロゲンが検出された。最も高濃度で検出された植物エストロゲン濃度（569 μg/g）より、マウスが飼料から摂取する植物エストロゲンを試算すると、3,414 μg/日（一日の飼料摂取量を 6 g とした時）程度となる。なお、植物エストロゲンフリーとして注文販売されている飼料からは植物エストロゲンは検出（<0.2 μg/g）されなかった。

1-③ 動物飼料、床敷及び給水中の 4-ノニルフェノールの分析：動物飼料等からの 4-ノニルフェ

ノール(NP)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、市販の動物飼料、床敷及び給水の分析を行った。その結果、動物飼料35検体中34検体から4.9-117.0ng/gの範囲で、また床敷14検体すべてからNPを認めた。特に古新聞再生紙を原料とする床敷から620-1020ng/g、そのほかの試料から2.3-65.3ng/gの範囲でNPを検出した。給水瓶については4社の材質の異なる給水瓶本体とキャップの組合せによって11検体を分析した。その結果、室温24時間放置で11検体中5検体から0.03-0.11ng/mL、121℃で20分間放置で11検体中10検体から0.03-0.63ng/mLの範囲でNPを検出した。NPの溶出は給水瓶本体樹脂の材質によるものではなく、キャップ素材の影響が示唆された。

**1-④ 実験動物飼料中の17β-エストラジオールの分析**：実験動物飼料に含まれる17β-エストラジオール(E<sub>2</sub>)の定量法を開発した。市販の実験動物飼料20点(15品目)についてE<sub>2</sub>含有量を測定したところ、1点に0.52±0.03ppbのE<sub>2</sub>を検出した。その他は、0.50ppb未満であった。

**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。結果として特に問題となる濃度の検体は存在しなかった。

**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**：妊娠期における内分泌かく乱物質の作用を知る目的で、母体・胎盤・胎児における化学物質の代謝解毒反応、および、胎盤細胞に対する影響を解析した。その結果、子宮環境が化学物質に対するバリアー機能を果たす一方、胎盤はビスフェノールAを通過させることが示された。また、フタル酸エステルが胎盤細胞のゲノムDNAメチル化状態を乱すことが分かり、エピジェネティック異常といった側面からの内分泌かく乱作用の研究が必要であることが明らかになった。

**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**：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ているが、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に対する遺伝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、アリルヒドロカーボン受容体の各遺伝子については、昨年度までに遺伝子多型を明らかにし、その解析方法を確立した。さらに遺伝的多型マーカーとして有用な高度な多型性を示す遺伝マーカーを設定した。本年度は、有用性の検討が行われた遺伝的多型マーカーを用いて子宮内膜症患者43名、一般健常者59名の日本人試料における、各一塩基多型(SNP)の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度について遺伝的相関解析を行った。

#### 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 穰 東海大学 医学部 分子生命科学

#### A. 研究目的

**1-① 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**：フタル酸エステル類は、分析の様々な操作過程で混入してしまう恐れがある。研究初年度では、分析操作過程のコンタミネーション低減化前処理法を開発した。2年目の研究では、開発した分析法の信頼性を確保するために、クロスチェックを実施し、概

ね良好な回収率と相対標準偏差が得られた。また、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、以下に示す3つの課題を実施する。

(1) 昨年度開発した動物飼料及び床敷中の分析法の検証と実試料の分析。(2) 実験動物舎の室内空気及び給水中の分析。(3) 生体試料中の分析法について文献調査を行い、その結果を基にして分析ガイドライン案の提案。

**1-② 実験動物飼育環境中のビスフェノールA及び植物エストロゲンの分析法の開発:** 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及び開発した方法によるヒト生体暴露量モニタリングの実施が必要とされている。昨年度までに「生体試料中のビスフェノールA(BPA)分析法ガイドライン(案)」を策定し信頼性検証と同時に一日尿中のBPA分析から、BPAの一日暴露量を推定した。またBPAに関して議論が繰り返されている一因として動物実験環境下におけるコンタミネーション等が考えられる。そこで、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、給水)からのBPA暴露量を評価する分析法を高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)を用いて検討し、分析法ガイドラインの作成を試みた。更に、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 動物飼料、床敷及び給水中の4-ノニルフェノールの分析:** 内分泌かく乱化学物質の生体影響、特に低用量域における評価を困難としている要因として、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、動物飼料、床敷及び給水に含まれる4-ノニルフェノール(NP)の微量分析法を構築し、市販の動物飼料、床敷及び給水の分析を行った。

**1-④ 実験動物飼料中の17β-エストラジオールの分析:** 動物実験環境中に内分泌かく乱作用が疑われる化学物質(以下、化学物質)が広く存在することが指摘されている。飼料は、実験動物が摂取することから最も影響が大きいと考えられるため、内分泌かく乱作用の評価に

関する動物実験に用いるため、植物エストロゲンを低減化した製品が開発されている。しかしながら、その飼料にも魚粉が使用されることがあり、原料の魚粉にエストロゲン活性が検出された報告がある。我々は、飼料中の17β-エストラジオール(E<sub>2</sub>)の分析方法を開発し、市販飼料中のE<sub>2</sub>含有量を測定した。

**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:** 胎児期の内分泌かく乱化学物質の作用を評価するにあたって、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。本研究は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、ラット、マウスおよびモルモットの臓器、細胞を用いた研究を行った。

**4. 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:** 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。近年、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、複合性遺伝疾患であると考えられ、この手法を応用できる

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報告されており、内分泌かく乱化学物質がその発症および病態に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。遺伝的相関解析には、全ゲノム領域を対象として位置的情報のみを手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法と、現在までにその遺伝子の機能が解明されており疾患との関連性を考慮して候補遺伝子を選定する、すなわち機能的情報を手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法があるが、本研究では後者の方法によって子宮内膜症の遺伝的要因に関する情報を蓄積することを目指した。

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に対応する遺伝子を選定した。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рилハイドロカーボン受容体の各遺伝子である。昨年度はこれらの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、遺伝マーカーの設定およびその遺伝的多型の解析法を確立した。今年度は、内子宮内膜症患者集団および健常者集団を用いて、各遺伝マーカーの対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度について、遺伝的相関解析によって子宮内膜症感受性対立遺伝子を同定することを目指した。

## B. 研究方法

### 1-① 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：

#### 1. 試料

(1) 動物飼料：埼玉県衛生研究所及び星薬科大学で一括購入し、各機関に配布された5種12検体を用いた。品名等は報告書に示した。

(2) 床敷：星薬科大学及び愛知県衛生研究所で購入した11種13検体を用いた。品名等は報告書に示した。

(3) 実験動物舎の室内空気及び給水：愛知県衛生研究所の実験動物舎内で採取した。空気は平成16年11月29日から12月3日にかけて、給水は同年12月6日にそれぞれ採取した。

#### 2. 試薬および器具・試薬の前処理

内部標準物質は、林純薬工業製環境分析用をそれぞれの濃度が4 $\mu$ g/mLになるようにヘキサソで希釈した。他の試薬及び前処理、フロリジル-PSA カラムの調製についての詳細は報告書参照。

#### 3. 試料採取及び試験溶液の調製法

3.1 動物飼料：乳鉢中で粉末状にした動物飼料5gから始める試験溶液の調製法の概要は、分担報告書の図1に示した。

3.2 床敷：床敷き2.5gから始まる試験溶液の調製法の概要は、分担報告書の図2に示した。

3.3 実験動物舎室内空気：厚生労働省通知；平成13年7月25日付け医薬発第828号「室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について」に従って、試験溶液を調整した。

3.4 給水：厚生労働省通知；平成15年10月10日付け健水発第1010001号「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について」に示された方法に準じて試料を作成した。

#### 4. 文献調査

米国立医学図書館の医学文献データベースPubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>)及びAnalytical Abstractを用いて、“phthalate AND monoester AND determination”のキーワードで文献を検索した。候補文献の中から、生体試料中の分析法に関する原著論文を選択した。さらに、これらの原著論文に言及されている論文を選択した。

### 1-② 実験動物飼育環境中のビスフェノールA及び植物エストロゲンの分析法の開発：

1. 試料と試薬：飼料40検体（日本クレア、日本農産工業、オリエンタル酵母、日本SLC）、床敷14検体（日本チャールズリバー、オリエンタル酵母、日本クレア、日本SLC、天然素材探索研究所、原商店、中部科学）、給水瓶3検体（日本クレア）は市販品を購入した。

標準品等の詳細は分担報告書を参照：

#### 2. 装置及び測定条件

2.1 飼料、床敷及び給水中のBPAの分析：高速液体クロマトグラフ/質量分析計（シングルタイプ、LC/MS）：Hewlett Packard製HP1100 series LC/MSDと、高速液体クロマトグラフ/質量分析計（タンデムタイプ、LC/MS/MS）：Waters社製Quattro micro API Mass Analyzerを使用した。測定条件は分担報告書の通りである。

2.2 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/質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。

### 1-③ 動物飼料、床敷及び給水中の 4-ノニルフェノールの分析：

1. 試薬・標準溶液：NP 標準溶液：NP 100 mg を精秤し、ヘキサン 100 mL に溶解して 1000  $\mu$ g/mL 標準原液を調製し、適宜メタノールで希釈した。

m-OP-d<sub>5</sub> 溶液：市販の 1000  $\mu$ g/mL ヘキサン溶液を適宜メタノールで希釈し、内部標準溶液として使用した。

2. 試料：動物飼料は 4 社、29 種、35 検体について、また床敷は 6 社、10 種、14 検体について分析した。給水瓶（高分子製）については 4 社の材質の異なる給水瓶本体とキャップの組合せによって 11 検体を分析した。

3. 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℃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 装置は Agilent 社製 Agilent1100 を、MS/MS 装置は Applied Biosystems 社製 API-3000 を用い、測定条件は分担報告書に記述した。

4. 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、還流蒸留抽出を行った。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。給水瓶中の水の場合は試料水 100 mL とヘキサン 3 mL のみを用いて同様な操作を行った。

### 1-④ 実験動物飼料中の 17 $\beta$ -エストラジオールの分析：

1. 試薬及び器具：分担報告書に記述した。

2. 飼料について：実験に用いた飼料は、本研究班から分与された。また、表記中のナンバリングは、本報告書における統一様式に従った。

3. 機器及び試験液の調製

LC：Agilent 1100 シリーズ；バイナリポンプ、G1321A；ウェルプレートオートサンプラ、G1367A；カラム恒温槽、G1316A；デガッサ、G1379A。

MS/MS：API3000（アプライドバイオシステムズ）。粉砕した飼料 10g から始め、LC の溶出開始液 0.20 mL に溶解して試験溶液とするまでは、分担報告書に記述した。

2. 生体試料分析と生体暴露量のモニタリング：東海大学医学部付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℃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℃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別分類もおこない、化学物質の濃度と病気の関連についても検討した。検査法については策定したガイドラインの方法にしたがい、対象物質は、フタル酸エステル類、ビスフェノール A、ノニルフェノールを主とした。

### 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：

1. ラット臓器灌流システム：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に加え、モルモットの胎盤灌流システムを確立し用いた。臓器にビスフェノール 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. MEHP の DNA メチル化への作用の解析：1  $\mu$ M の Mono-2-dthylhexyl phthalate (MEHP) 存在下でマウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を未分化条件および分化条件で培養し、ゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA のメチル化状態は Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法により解析した。

3. 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、モルモット（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。採血管はクエン酸主体のものを使用し、約 10mL 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の配列情報は、GenBankDNA database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) より入手した。現在までにヒトゲノム上で見いだされた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. プライマーの設計とPCR増幅:PCRプライマーの設計とその後のPCR反応については、分担報告書に記述した。

4. 塩基配列の決定と統計解析:増幅DNA断片を精製後、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。対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度は、各対立遺伝子および遺伝子型を直接カウントすることによって算出した。患者および健常者集団の間で対立遺伝子の分布に関する偏りは、FisherのP検定で、 $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。オッズ比および95%信頼区間は全てのマーカーで解析された。各集団において、遺伝子型頻度がハーディ・ワインベルグの平衡状態にあることも解析した。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。

## C&D. 結果と考察

### 1-① 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:

1. 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法の検証:昨年度開発した動物飼料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、以下の項目について検証を行った。

(1) 試験溶液の調製法について検証を行い方法を変更し、ヘキサン層と水層の分離が明瞭になり、ヘキサン層の分取が容易になった。また、続くヘキサンによる再抽出においても、遠心分離操作を追加した。

(2) 操作ブランクの低減化のために、10項目の留意事項を実施した。その検証によって測定

環境における汚染を常に低レベルに抑えることができると考えられた。

(3) 本法は、飼料中の夾雑物を確実に除去できる事が検証された。

2. 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析:市販の動物飼料12検体の分析を行った。DEHPとDBPは全ての検体から、BBPは4検体から検出され、DiOP、DiNPは検出限界値未満であった。DEHPの濃度が246 ng/g(平均値)と最も高く、その範囲は116-511 ng/gであった。次いで濃度が高かったDBPの平均値は215 ng/gで、範囲は25.1-944 ng/gであった。BBPの濃度(平均値)は57.8 ng/gで、範囲は18.4-157 ng/gであった。総量(測定対象とした5種のフタル酸エステル類の合計値)の平均値は507 ng/gで、範囲は141-1410 ng/gであった。検出されたフタル酸エステル類の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取するフタル酸エステル類の総量を試算すると、マウスでは924-8460 ng/日(一日の飼料摂取量を6gとした時)、ラットでは3850-35250 ng/日(一日の飼料摂取量を25gとした時)であった。

3. 床敷中のフタル酸エステル類の分析法の検証:動物飼料と同様に、昨年度開発した床敷中のフタル酸エステル類の分析法の検証を行った。まず、試験操作手順について検証を行った結果、昨年度開発した方法を変更する必要はなかった。また、空試験による操作ブランク値はすべて10 ng/g以下と、測定環境からの汚染を抑制できると考えられた。さらに、床敷中の夾雑物の除去効果について検証を行った結果、床敷中に含まれるDBP、BBP、DEHPのピーク及び添加した内部標準物質のピークが良好に検出され、妨害となるピークも観察されなかった。

4. 床敷中のフタル酸エステル類の分析:市販の床敷13検体の分析を行った。DEHPは全ての検体から、DBPは12検体から、BBPは2検体から、DiNPは1検体からそれぞれ検出され、DiOPはすべて検出限界値未満であった。DEHPの濃度が642 ng/g(平均値)と最も高く、その範囲は16.0-5070 ng/gであった。次いで濃度が高かったBBPの平均値は670 ng/gで、範囲は440-900 ng/gであった。DBPの濃度(平均値)は470 ng/gで、範囲は19.6-1390 ng/gであった。総量の平均値は1190 ng/gで、範囲は20.5-7560 ng/gであった。検出された4物質の最高値は、いずれも再生紙を原材料とした床敷から検出されたものであった。

5. 実験動物舎室内空気及び給水中のフタル酸エステル類の分析：実験動物舎の室内空気の分析を行った。空气中 (n=4) からは、DBP (平均値 316 ng/m<sup>3</sup>、範囲 261-357 ng/m<sup>3</sup>) 及び DEHP (平均値 30.8 ng/m<sup>3</sup>、範囲 27.6-32.1 ng/m<sup>3</sup>) が検出された。総量の平均値は 347 ng/m<sup>3</sup> で、範囲は 293-388 ng/m<sup>3</sup> であった。マウス及びラットの 1 日当たりの呼吸量をそれぞれ 43 L、290 L として暴露量を試算すると、マウスでは 14.9 ng/日、ラットでは 101 ng/日となり、動物飼料の約 1/204 及び約 1/125 と非常に少ないことが明らかとなった。給水中 (n=3) からは、フタル酸エステル類は検出されなかった。

6. 生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析ガイドライン案：生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析法に関し、文献調査を行った。フタル酸モノエステル類は、フタル酸エステル類の代謝物であり、生体暴露評価法のバイオマーカーとして分析されている。米国疾病管理・予防センター (CDC) の研究グループから出されたものは、分析法の開発・改良とともに、実試料への応用例も多く報告されている。尿を分析試料として、固相抽出カートリッジによるクリーンアップ後、LC/MS/MS で分析する方法が主に用いられている。現段階ではその方法が信頼性が高く、分析ガイドライン案とするのが適当と考えられた。血清中の分析法に関しては、情報が少ないため、ガイドラインの提案は見送ることとした。

#### 1-② 実験動物飼育環境中のビスフェノール A 及び植物エストロゲンの分析法の開発：

##### 1. 飼料、床敷及び給水中の BPA の分析

1.1 飼料、床敷及び給水中の BPA の分析法の検討：動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境 (飼料、床敷及び給水) からの BPA 暴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、昨年度本事業で構築した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、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。測定には先に構築した分離分析法として優れている LC/MS 法を用いることにした。なお、より選択的な分析結果を得る目的で、タンデム型高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS/MS) も採用した。

1.2 飼料、床敷、給水中のビスフェノール A：本法を用いて飼料 40 検体、床敷 14 検体、給水 3 検体中の BPA を測定した。飼料中 (n=40) に含まれる BPA は、ND~2.9ng/g (表 4) で、ほとんどの飼料が検出下限値レベル (1ng/g) であった。最も高濃度で検出された BPA 濃度 (2.9ng/g) より、マウス及びラットが飼料から摂取する BPA を試算すると、マウスでは 17.4 ng/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 72.5 ng/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) 程度となる。また、床敷中 (n=14) からは最高で 704ppb 検出されたものも見られたが、給水中 (n=3) からは BPA は検出 (0.02ng/mL) されなかった。

##### 2. 飼料中の植物エストロゲン分析法の検討

2.1. 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、Negative mode を採用した。また、移動相に 0.003% 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。次にイオン強度に及ぼす影響を検討しフラグメンター電圧を 120V に設定した。詳細は分担報告書を参照。

2.2 飼料中の植物エストロゲン：市販されている飼料 40 検体を購入し、測定に供した結果、ほとんどの飼料から植物エストロゲンが検出された。なお、植物エストロゲンフリーとして注文生産されている飼料からは植物エストロゲンは検出 (<0.2 μg/g) されなかった。市販されている多くの実験動物飼料中に植物エストロゲンが含まれていた。そこで、最も高濃度で植物エストロゲン (569 μg/g) が含まれていた飼料から、マウス及びラットが摂取する植物エストロゲン量の試算を試みた。マウスの一日の飼料摂取量を 6 g とした時、植物エストロゲンの推定摂取量は 3,414 μg/日、ラットでは 14,225 μg/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) 程度となった。以上の結果から、マウス等の実験動物が飼育環境から植物エストロゲンの暴露を受けていることが示唆された。

1-③ 動物飼料、床敷及び給水中の 4-ノニルフェノールの分析：定量下限値 (LOQ) は、検量線に使用した最も低濃度の標準溶液 (NP: 0.5 ng/mL, m-OP-d<sub>5</sub>: 50 ng/mL) を用いて 5 回の繰り返し測定を行い、標準偏差の 10 倍のシグナルを検出できる 2ng/mL に設定した。なお、NP

の検出下限値 (LOD) は標準偏差の 3 倍のシグナルを検出できる 0.5ng/mL に設定した。これによって定量下限値は、動物飼料中及び床敷中で 1ng/mL とされ、給水中で 0.02ng/mL とされる。定量分析はいずれも内部標準法によった。低濃度用及び高濃度用検量線は共に原点を通る直線性を示した。本法を用いて動物飼料 35 検体 (29 種)、床敷 14 検体 (10 種) 及び給水 11 検体を分析した。動物飼料中 (n=35) の 1 検体は不検出であったが、34 検体から NP が 4.9-117.0 ng/g 検出された。検出された NP の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取する NP を試算すると、マウスでは、29.4-702ng/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 122.5-2925 ng/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) となる。床敷 (n=14) についてはすべての検体から NP が検出された。特に古新聞再生紙を原料とする床敷は、620-1020ng/g の範囲で検出された。その他の床敷きは 2.3-65.3ng/g の範囲で検出された。給水の分析は、4 社の給水瓶の本体とキャップの組み合わせ (n=11) について行った。室温放置の場合、5 検体から 0.03-0.11ng/mL の範囲で NP が認められた。NP 溶出は、放置時間よりも加熱による影響が示唆された。また、キャップについての検討から、NP 溶出は、給水瓶本体樹脂の材質ではなく、キャップ素材の影響が示唆された。検出された NP の濃度より、マウス及びラットが給水から摂取する NP を試算すると、マウスでは、0.24-5.04ng/日 (一日の給水摂取量を 8mL とした時)、ラットでは、1.35-28.35ng/日 (一日の給水摂取量を 45mL とした時) となる。なお、オートクレーブ内の汚染の有無を確認するためピーカーに超純水を入れ、蓋をせずに加熱滅菌前と加熱滅菌後を分析したが、NP は不検出であった (定量限界値は 0.02ng/mL)。

**1-④ 実験動物飼料中の 17β-エストロジオールの分析:** 定量下限値は、クロマトグラフ上で操作ブランク値の標準偏差の 10 倍のシグナルを検出できる 1.0 ppb に設定した。これによって飼料中の定量下限値は、0.50 ppb とされる。飼料中の E<sub>2</sub> は、内部標準法により定量した。すなわち、E<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> に対する E<sub>2</sub> のピーク面積比から検量線を作成し、定量値を求めた。E<sub>2</sub> が検出されなかった飼料 (F-10, 11, 14, 及び 15) に E<sub>2</sub> 5.0 ppb を添加し、その回収率を求めた結果、回収率は、78~95% であった。E<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> で補正することによって、F-10, 11, 14, 及び

15 での E<sub>2</sub> の回収率 (RSD) は、それぞれ、103(0.3), 107(4.8), 101(1.4), 97.9(2.9)% になった。本法を用いて飼料 20 点 (15 種類) について E<sub>2</sub> 含有量を測定した。代表的なクロマトグラフを図 2 に示した。F-20 に 0.52±0.03 ppb の E<sub>2</sub> を検出した。その他は、0.50 ppb 未満であった。F-20 は、マウスまたはラットに使用される。このケースでマウスまたはラットが、飼料から摂取する E<sub>2</sub> を試算するとマウス (飼料摂取量: 6 g/日) で 3.1 ng/日、ラット (飼料摂取量: 25 g/日) で 13 ng/日程度となる。

**2. 生体試料分析と生体暴露量のモニタリング:** 今回検討の試料分析では、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、今後引き続きモニターを行う場合の目安としたい。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。

**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. ラット胃での代謝解毒酵素活性の解析: 昨年度から継続して行った胃灌流実験により、胃ではビスフェノール A が素早く吸収され、その大半がグルクロン酸抱合されて粘膜側に戻されることが分かった。

2. ラット子宮におけるビスフェノール A の代謝動態の解析: ラット子宮での灌流実験系を用いてビスフェノール A の代謝を調べたところ、ビスフェノール A 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。今回は、妊娠ラット子宮から間質細胞を単離培養し、酵素活性を測定する系を構築した。その結果、妊娠ラット子宮間質細胞に低い値ながらビスフェノール A のグルクロン酸抱合能が存在していることを確認できた。この結果は、免疫組織染色によるグルクロン酸抱合酵素の局在の結果と一致した。

3. モルモット胎盤におけるビスフェノール A の代謝動態の解析: モルモットの胎盤灌流実験系を確立し、1-ナフトールの胎盤での代謝を解析すると、その多くがグルクロン酸抱合され母体側に戻っていた。次にビスフェノール A を灌

流したところ、1-ナフトールと異なり、その多くが胎盤を通過した。さらに、移行したビスフェノールAは胎児の様々な臓器にグルクロン酸抱合されていないFree体のまま蓄積していた。

4. MEHPのTS細胞ゲノムDNAメチル化への影響の解析：未分化維持条件下、および、分化誘導条件下のどちらにおいても、MEHP添加による細胞形態の明瞭な変化は観察されなかった。しかし、RLGSによるゲノムDNAのメチル化解析では、未分化維持条件下では20カ所のメチル化の変化が(亢進12/阻害8)、分化誘導条件下では22カ所のメチル化の変化が(亢進16/阻害6)認められた。また、これらのうち、メチル化の亢進した2カ所は両条件で共通していた。

#### 4. 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：

1. 遺伝的多型箇所の検索：子宮内膜症候補遺伝子である*ESRI*遺伝子、*CYP1A1*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。*ESRI*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8個のマイクロサテライトが存在する。また、*CYP1A1*遺伝子および*AHR*遺伝子については、それぞれ約6kbと49.5kbのゲノム領域とともに24個のSNPが存在する。また、*AHR*遺伝子については4個のマイクロサテライトが存在していたが、*CYP1A1*遺伝子について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際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した。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(デオキシヌクレオチド三リン酸)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SNPを選択して、塩基配列の決定を行った。その結果、*ESRI*遺伝子についてはSNP43箇所中31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26箇所を確認した。同様に、*CYP1A1*遺伝子についてはSNP32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SNP11箇所中5箇所において多型性が確認され、このSNPはすべてMinor allele frequencyが0.2以上を満たしていた。

4. 遺伝的相関解析：子宮内膜症患者集団において特異的な対立遺伝子が存在するかを調べるために、上記のようにして設定されたSNPマーカーを用いて、日本人対象者集団59人と子宮内膜症患者43人における相関解析を子宮内膜症候補遺伝子である*ESRI*遺伝子、*CYP1A1*遺伝子、*AHR*遺伝子の各遺伝子について行った。*ESRI*遺伝子については、17個のSNPsマーカー(プロモーター領域1個、翻訳領域2個、非翻訳領域2個、イントロン領域12個)を用いた。その結果、統計学的な有意差を示す対立遺伝子は見い出されなかった。しかしながら、遺伝子型頻度については1個のSNPsマーカーにおいて統計学的な有意差を示した(rs2228480, P=0.031, Odds Ratio=8.06,  $\chi^2=4.67$ )。 *CYP1A1*遺伝子については、4個のSNPsマーカー(プロモーター領域1個、翻訳領域1個、イントロン

領域 1 個、3' flanking 領域 1 個) を用いた。その結果、プロモーター領域における SNP マーカーにおいて統計学的な有意差を示す対立遺伝子が見い出された (rs3826041,  $P=0.007$ , Odds Ratio=2.16,  $\chi^2=7.34$ )。AHR 遺伝子については、5 個の SNPs マーカー (翻訳領域 1 個、イントロン領域 4 個) を用いた。その結果、統計学的な有意差を示す対立遺伝子が 1 個の SNP マーカーにおいて見い出された (rs2106728,  $P=0.038$ , Odds Ratio=2.16,  $\chi^2=4.32$ )。さらに、遺伝子型頻度についても上記の SNPs マーカーにおいて統計学的な有意差を示した。AHR-intron 10 T/T (rs2106728)  $P=0.020$  (Odds Ratio=2.71,  $\chi^2=5.40$ )。

5. マイクロサテライトマーカー解析: さらに、ESR1 遺伝子のイントロン 5 に存在するマイクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行った。このマイクロサテライトは、塩基配列 (AAAT) の繰り返し配列であり、日本人対象者集団 42 人と子宮内膜症患者 32 人におけるタイピングの結果、5 個の対立遺伝子が存在していた。このうち 1 個の対立遺伝子において統計学的な有意差を示した。ESR1-intron 5 MS-aaat (262)  $P=0.015$  (Odds Ratio=5.86,  $\chi^2=5.90$ )

## E. 結論

### 1-① 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:

1. 市販の動物飼料 12 検体についてフタル酸エステル類の分析を行った結果、DEHP が 111-511 ng/g、DBP が 25.1-944 ng/g、BBP が 22.2-157 ng/g 検出され、総量 (測定対象とした 5 種のフタル酸エステル類の合計値) は 141-1410 ng/g であった。検出されたフタル酸エステル類の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取するフタル酸エステル類の総量を試算すると、マウスでは 846-8460 ng/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 3525-35250 ng/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) であった。

2. 市販の床敷 13 検体についてフタル酸エステル類の分析を行った結果、DEHP が 16.0-5070 ng/g、DBP が 19.6-1390 ng/g、BBP が 440-900 ng/g、DiNP が 198 ng/g 検出された。検出された 4 物質の最高値は、いずれも再生紙を原材料とした床敷から検出されたものであった。

3. 実験動物舎の室内空気 ( $n=4$ ) からは、DEHP が 27.6-32.1 ng/m<sup>3</sup>、DBP が 261-357 ng/m<sup>3</sup> 検出された。給水 ( $n=3$ ) からは、フタル酸エステ

ル類は検出されなかった。

4. *in vivo* 低用量影響試験の信頼性確保には、動物実験環境からの暴露影響を考慮する必要があると考えられた。

5. 文献調査の結果を基に、生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析ガイドライン案を提案した。

### 1-② 実験動物飼育環境中のビスフェノール A 及び植物エストロゲンの分析法の開発:

1. 動物飼料中の BPA の分析法ガイドラインの構築: 動物実験の信頼性確保するため、動物実験環境 (飼料、床敷、給水) からの BPA 暴露量を評価する分析法 (試料を、アルミナ-A カートリッジ及びポリマーゲル充填カートリッジを用いてクリーンアップし、高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) で定性・定量) を構築した。

2. 飼料、床敷、給水中のビスフェノール A の分析: 飼料中 ( $n=40$ ) に含まれる BPA は、ND~2.9 ng/g で、ほとんどの飼料が検出下限値レベル (1 ng/g) であった。最も高濃度で検出された BPA 濃度 (2.9 ng/g) より、マウス及びラットが飼料から摂取する BPA を試算すると、マウスでは 17.4 ng/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 72.5 ng/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) 程度となる。また、床敷中 ( $n=14$ ) からは最高で 704 ng/g 検出されたものも見られたが、給水中 ( $n=3$ ) からは BPA は検出 (0.02 ng/mL) されなかった。

3. 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。測定に供したほとんどの飼料 (37/40) から植物エストロゲンが検出された。最も高濃度で検出された植物エストロゲン濃度 (569  $\mu$ g/g) より、マウス及びラットが飼料から摂取する植物エストロゲンを試算すると、マウスでは 3,414  $\mu$ g/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 14,225  $\mu$ g/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) 程度となる。以上の結果から、マウス等の実験動物が飼育環境から植物エストロゲンの暴露を受けていることが示唆された。なお、植物エストロゲンフリーとして注文販売されている飼料からは植物エストロゲンは検出 (<0.2  $\mu$ g/g) されなかった。

1-③ 動物飼料、床敷及び給水中の 4-ノニルフェノールの分析: 動物飼料等からの NP 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、市販の動物飼料、床敷及び給水の分析を行った。その結果、動物飼料 35 検体中 34 検体から 4.9-117.0ng/g の範囲で、また床敷 14 検体すべてから NP を認めた。特に古新聞再生紙を原料とする床敷から 620-1020ng/g、そのほかの試料から 2.3-65.3ng/g の範囲で NP を検出した。給水については 4 社の材質の異なる給水瓶本体とキャップの組合せによって 11 検体を分析した。その結果、室温 24 時間放置で 11 検体中 5 検体から 0.03-0.11 ng/mL、121°C で 20 分間放置で 11 検体中 10 検体から 0.03-0.63ng/mL の範囲で NP を検出した。NP の溶出は給水瓶本体樹脂の材質によるものではなく、キャップ素材の影響が示唆された。

#### 1-④ 実験動物飼料中の 17β-エストラジオールの分析:

- 1: 実験動物飼料に含まれる E<sub>2</sub> の定量法を開発した。
- 2: 実験動物飼料 20 点 (15 品目) について E<sub>2</sub> 含有量を測定したところ 1 点に 0.52 ± 0.03 ppb の E<sub>2</sub> を検出した。その他は、0.50 ppb 未満であった。

2. 生体試料分析と生体暴露量のモニタリング: 生体試料の分析により、予測に比べ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。

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: ビスフェノール A は、非妊娠期には子宮上皮細胞に存在する UGT によって、また、妊娠期にもやはり胎児を取り巻く母体の間質細胞によってグルクロン酸抱合 (解毒) される事がわかった、これらは、母体子宮環境が薬物のバリエーとして機能していることを示している。しかし、妊娠後期のモルモット胎盤はそのまま通過することが分かった。妊娠後期のビスフェノール A の胎児への移行は、胎盤にグルクロン酸抱合酵素が発現していないことに起因すると考えられる。MEHP 添加によりゲノム DNA のメチル化異常が検出されたことの意義は大きい。DNA メチル化は細胞分裂後も維持されるので、MEHP の前駆体である DEHP への一過的な暴露が、DNA メチル化の異常を介して慢性的な遺伝子発現異常を引き起こす可能

性がある。これは、内分泌かく乱作用の研究に“エピジェネティック毒性”という新たなパラダイムを提示するものである。

4. 内分泌かく乱化学物質に対する感受性に関する遺伝子の解明: 今年度の主な成果は下記の通りである。

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、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 > 0.2 以上の SNP マーカーを *ESR1* 遺伝子については 26 個、*AHR* 遺伝子については 5 個、*CYP1A1* 遺伝子については 4 個設定し得た。
2. 上記のように設定された SNPs マーカーのうち、*ESR1* 遺伝子については 17 個、*AHR* 遺伝子については 5 個、*CYP1A1* 遺伝子については 4 個の SNPs マーカーを用いて、一般対象者集団 59 名、子宮内膜症患者集団 43 名について、タイピングを行い、対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度についての遺伝学的相関解析を行った。*ESR1* 遺伝子については、1 つの遺伝子型 (rs2228480, A/A) において統計学的有意差を示した (P=0.031)。*AHR* 遺伝子については 1 つの遺伝マーカー (rs2106728) において、統計学的有意差を示した (P=0.038)。*CYP1A1* 遺伝子についても 1 つの遺伝マーカー (rs3826041) において、統計学的有意差を示した (P=0.007)。
3. *ESR1* 遺伝子のイントロン 5 に存在するマイクロサテライト繰り返し配列について、タイピングを行ったところ、5 個の対立遺伝子を同定した。日本人対象者集団 42 人と子宮内膜症患者 32 人におけるタイピングの結果、1 つの対立遺伝子 (*ESR1*-intron 5 MS-aaat-262) において統計学的有意差を示した。

F. 健康危険情報  
特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 岡 尚男、伊藤裕子、後藤智美、猪飼誉友、近藤文雄、松本 浩、牧野恒久、中澤裕之: GC 及び GC/MS による文具、化粧品、家庭用品等に含まれる可塑剤フタル酸及びアジピン酸エステル類の分析、日本食品化学学会誌、11(2)、

106-110、2004.

2) T. Tsukioka, J. Terasawa, S. Sato, Y. Hanaoka, T. Makino, H. 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, 57 (2004)

3) J. Narukawa, H. Inoue, S. Kato, H. Yokota. Glucuronidation of 1-naphthol and excretion into the vein in perfused rat kidney *Drug Metab. Dispos.* 32:758-761, 2004.

4) R. Kibe, M. Sakamoto, H. Hayashi, H. Yokota, Y. Benno. Maturation of the murine cecal microbiota as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism and 16S rRNA gene clone libraries. *FEMS Microbiology Letters* 235:139-146, 2004.

5) H. Ito, H. Yokota, R. Wang, O. Yamanoshita, G. Ichihara, H. Wang, Y. Kurata, K. Takagi, T. Nakajima. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Archives of Toxicology* 1432-0738 (Online), 2004.

## 2. 学会発表

1) 近藤文雄、猪飼誉友、後藤智美、伊藤裕子、岡 尚男、中澤裕之、牧野恒久；血清中のフタル酸エステル類分析法の開発；日本薬学会第125年会（2005）

2) 岡 尚男、近藤文雄、中澤裕之、牧野恒久；実験動物飼料及び床敷き中のフタル酸エステル類分析法の開発；日本薬学会第125年会（2005）

3) 日本薬学会第125年会；「動物実験環境下における飼料、床敷等中のノニルフェノールの分析（1）」（2005）；藤巻照久、平山クニ（神奈川衛研）、山崎晴子、紺野浩平、伊藤里恵（星薬大）、和泉俊一郎、牧野恒久（東海大医学部）、斉藤貢一、中澤裕之（星薬大）

4) 日本薬学会第125年会；「動物実験環境下における飼料、床敷き等中のノニルフェノールの分析（2）」（2005）；山崎晴子、紺野浩平、伊藤里恵（星薬大）、藤巻照久、平山クニ（神奈川衛研）、和泉俊一郎、牧野恒久（東海大医学部）、斉藤貢一、中澤裕之（星薬大）

5) 五島朋子・富川順子・服部中・田中智・塩田邦郎；フタル酸エステルによるゲノムワイドなDNAメチル化状態への影響、第138回日本

獣医学会学術集会（2004年9月）

## 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

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
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  
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

主任研究者	牧野 恒久	東海大学
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
	斎藤 勲	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
	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

昨年度の本研究において開発した、動物飼料及び床敷中のフタル酸エステル類の分析法の検証を行うとともに、本法を用いて市販の動物飼料及び床敷を分析した。その結果、動物飼料 (n=12) からはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) が 111-511 ng/g、フタル酸ジブチル (DBP) が 25.1-944 ng/g、フタル酸ブチルベンジル (BBP) が 22.2-157 ng/g 検出され、総量 (測定対象とした 5 種のフタル酸エステル類の合計値) は 141-1410 ng/g であった。検出されたフタル酸エステル類の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取するフタル酸エステル類の総量を試算すると、マウスでは 846-8460 ng/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 3525-35250 ng/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) であった。

床敷 (n=13) からは DEHP が 16.0-5070 ng/g、DBP が 19.6-1390 ng/g、BBP が 440-900 ng/g、フタル酸ジイソノニルが 198 ng/g 検出された。検出された 4 物質の最高値は、いずれも再生紙を原材料とした床敷から検出されたものであった。実験動物舎の室内空気 (n=4) からは、DEHP が 27.6-32.1 ng/m<sup>3</sup>、DBP が 261-357 ng/m<sup>3</sup> 検出された。給水 (n=3) からは、フタル酸エステル類は検出されなかった。以上の結果より、*in vivo* 低用量影響試験の信頼性確保には、動物実験環境からの暴露影響を考慮する必要があると考えられた。

生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析法について文献調査を行った結果、米国疾病管理・予防センターの研究グループが開発した尿中の分析法の信頼性が高く、その方法をガイドライン案として提案した。

A. 研究目的

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、分析の様々な操作過程で混入し、分析値のバックグラウンドが上昇することにより、過剰評価をしてしまう恐れがある<sup>1, 2)</sup>。研究初年度では、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、精度の高い血清中のフタル酸エステル類の分析法を開発した。

2年目の研究では、研究初年度に開発した生体試料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、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した。その結果、概ね良好な回収率と相対標

準偏差が得られた。また、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、床敷中のフタル酸エステル類の分析法を開発し、数種の実試料の分析を行った。

本年度の研究では、以下に示す3つの課題について実施する。

(1) 昨年度開発した動物飼料及び床敷中のフタル酸エステル類の分析法の検証を行うとともに、実試料の分析を行う。

(2) 実験動物舎の室内空気及び給水中のフタル酸エステル類の分析を行う。

(3) 生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析法について文献調査を行い、その結果を基にして分析ガイドライン案を提案する。



## B. 研究方法

### 1. 試料

#### (1) 動物飼料

埼玉県衛生研究所及び星薬科大学で一括購入し、各機関に配布された5種12検体を用いた。品名等を以下に示した。

日本クレア CE-2: Lot. No. 2054-PE、2054-PU、E2104-00、不明1件

日本農産工業 ラボ MR ストック: Lot. No. 0405 76-4、0404-72-2、不明1件

オリエンタル酵母 粉末 MF: Lot. No. 41102、不明1件

オリエンタル酵母 MF: Lot. No. 040506 A1

オリエンタル酵母 NIH-07PLD: Lot. No. 40732、sample 1件

#### (2) 床敷

星薬科大学及び愛知県衛生研究所で購入した11種13検体を用いた。品名等を以下に示した。

日本チャールズリバー: ホワイトフレーク2件、サンフレーク1件、ベータチップ1件

オリエンタル酵母: パルソフト2件

日本クレア: 再生紙床敷 PC1 件、クリーンチップ1件

日本 SLC: ソフトチップ1件、ペパークリーン1件

中部科学: ソフトチップ1件

天然素材探索研究所: パルマス 3000 1件

原商店: Q プラチップ1件

#### (3) 実験動物舎の室内空気及び給水

愛知県衛生研究所の実験動物舎内で採取した。空気は平成16年11月29日から12月3日にかけて、給水は同年12月6日にそれぞれ採取した。

### 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  $4 \mu\text{g/mL}$ 、DiOP、DiNP

の濃度が  $20 \mu\text{g/mL}$  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  $4 \mu\text{g/mL}$  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、 $200^\circ\text{C}$  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、 $200^\circ\text{C}$  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 1 g (床敷では 0.5 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. 試料採取及び試験溶液の調製法

#### 5.1 動物飼料

試験溶液の調製法の概要を、図1に示した。乳鉢中で粉末状にした動物飼料 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)  $125 \mu\text{L}$  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、残渣を蒸留水 2 mL、ヘキサン 5 mL に溶解した。3000 rpm で5分間遠心分離後、ヘキサン層を分取した。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。

#### 5.2 床敷

試験溶液の調製法の概要を、図2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  $65 \mu\text{L}$  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。

### 5.3 実験動物舎室内空気

厚生労働省通知:平成 13 年 7 月 25 日付け医薬発第 828 号「室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について」に従って、以下に示す方法で行った。

ポンプ (ジーエルサイエンス製 SP208-10L) に接続した捕集管 (AERO Cartridge、ジーエルサイエンス製) を床から高さ 1.2~1.5 m の位置に取り付け、流速 5 L/分で 24 時間採取した。採取後の AERO Cartridge から捕集剤を取り出し、共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) に入れ、アセトン 10 mL 及び内部標準溶液 25  $\mu$ L を加えた。10 分間超音波抽出後、3000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を減圧留去後、アセトン 1 mL に溶解して試験溶液とした。

### 5.4 給水

厚生労働省通知:平成 15 年 10 月 10 日付け健水発第 1010001 号「水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について」に示された方法を一部変更し、以下に示す方法で行った。

実験動物舎内の蛇口水 30 mL を共栓付遠心管 (50 mL、ガラス製) にとり、ヘキサン 2 mL 及び内部標準溶液 50  $\mu$ L を加え、5 分間激しく振り混ぜた。静置後、ヘキサン層 1 mL を分取し、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: 表 1 に示した。

### 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。

### 8. 文献調査

米国立医学図書館の医学文献データベース PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) 及び Analytical Abstract を用いて、“phthalate AND monoester AND determination” のキーワードで文献を検索した。候補文献の中から、生体試料中の分析法に関する原著論文を選択した。さらに、これらの原著論文に言及されている論文を選択した。

## C. 結果

### 1. 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法の検証

昨年度開発した動物飼料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、以下の項目について検証を行った。

(1) 試験溶液の調製法

(2) 試験操作に由来する汚染の低減化

(3) 飼料中の夾雑物の除去効果

まず、試験溶液の調製法について検証を行った結果、図 1 に示す方法に変更した。従来は、アセトニトリル層を減圧留去後の残渣をヘキサン 5 mL のみで溶解していたが、蒸留水 2 mL を追加し、さらに、遠心分離操作 (3000 rpm、5 分間) を加えることとした。このことにより、ヘキサン層と水層の分離が明瞭になり、ヘキサン層の分取が容易になった。また、続くヘキサンによる再抽出においても、遠心分離操作を追加した。

続いて、試験操作に由来する汚染の低減化について検証を行った。フタル酸エステル類の分析で最も問題となるのが、試料採取から分析に供するまでの測定環境における汚染である。我々は、これまでに血清、動物飼料及び床敷中の分析法を開発した際、操作ブランクの低減化のために、10 項目の留意事項を実施した。その結果、ブランク値を 10 ng/g 以下にまで低減化することができた。

そこで、この低減化法の再現性を検証するために、ヘキサンで洗浄した蒸留水を試料として空試験を実施した。その結果、4 回の試験の平

均値は、DBP が 2.7 ng/g、DEHP が 8.2 ng/g、他の 3 物質はいずれも 1 ng/g 以下であった。これらの値は、昨年度 (DBP : 1.8 ng/g、DEHP : 8.1 ng/g、他の 3 物質 : いずれも 1 ng/g 以下、n=3) とほぼ同程度であった。従って、操作ブランク低減化のための 10 項目の留意事項を実施することにより、測定環境における汚染を常に低レベルに抑えることができると考えられた。

最後に、飼料中の夾雑物の除去効果について検証を行った。実試料を GC/MS 分析して得られた、SIM クロマトグラムの一例を図 3 に示した。飼料中に含まれる DBP、BBP、DEHP のピーク及び添加した内部標準物質のピークが良好に検出され、妨害となるピークも観察されなかった。今回分析を行った他の飼料についても、定量の妨害となるピークは観察されなかった。従って、本法は、飼料中の夾雑物を確実に除去できると考えられた。

## 2. 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析

市販の動物飼料 12 検体の分析を行った結果を表 2 に示した。DEHP と DBP は全ての検体から、BBP は 4 検体から検出され、DiOP、DiNP は検出限界値未満であった。DEHP の濃度が 246 ng/g (平均値) と最も高く、その範囲は 116-511 ng/g であった。次いで濃度が高かった DBP の平均値は 215 ng/g で、範囲は 25.1-944 ng/g であった。BBP の濃度 (平均値) は 57.8 ng/g で、範囲は 18.4-157 ng/g であった。総量 (測定対象とした 5 種のフタル酸エステル類の合計値) の平均値は 507 ng/g で、範囲は 141-1410 ng/g であった。

検出されたフタル酸エステル類の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取するフタル酸エステル類の総量を試算すると、マウスでは 924-8460 ng/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 3850-35250 ng/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) であった。

## 3. 床敷中のフタル酸エステル類の分析法の検証

動物飼料と同様に、昨年度開発した床敷中のフタル酸エステル類の分析法の検証を行った。まず、試験操作手順について検証を行った結果、昨年度開発した方法 (図 2) を変更する必要はなかった。また、空試験による操作ブランク値はすべて 10 ng/g 以下と、測定環境からの汚染を抑制できると考えられた。さらに、床敷中の夾雑物の除去効果について検証を行った結果、

床敷中に含まれる DBP、BBP、DEHP のピーク及び添加した内部標準物質のピークが良好に検出され、妨害となるピークも観察されなかった (図 4)。

## 4. 床敷中のフタル酸エステル類の分析

市販の床敷 13 検体の分析を行った結果を表 3 に示した。DEHP は全ての検体から、DBP は 12 検体から、BBP は 2 検体から、DiNP は 1 検体からそれぞれ検出され、DiOP はすべて検出限界値未満であった。DEHP の濃度が 642 ng/g (平均値) と最も高く、その範囲は 16.0-5070 ng/g であった。次いで濃度が高かった BBP の平均値は 670 ng/g で、範囲は 440-900 ng/g であった。DBP の濃度 (平均値) は 470 ng/g で、範囲は 19.6-1390 ng/g であった。総量の平均値は 1190 ng/g で、範囲は 20.5-7560 ng/g であった。検出された 4 物質の最高値は、いずれも再生紙を原材料とした床敷から検出されたものであった。

## 5. 実験動物舎室内空気及び給水中のフタル酸エステル類の分析

実験動物舎の室内空気の分析を行った結果を表 4 に示した。空気中 (n=4) からは、DBP (平均値 316 ng/m<sup>3</sup>、範囲 261-357 ng/m<sup>3</sup>) 及び DEHP (平均値 30.8 ng/m<sup>3</sup>、範囲 27.6-32.1 ng/m<sup>3</sup>) が検出された。総量の平均値は 347 ng/m<sup>3</sup> で、範囲は 293-388 ng/m<sup>3</sup> であった。マウス及びラットの 1 日当たりの呼吸量<sup>3)</sup> をそれぞれ 43 L、290 L として暴露量を試算すると、マウスでは 14.9 ng/日、ラットでは 101 ng/日となり、動物飼料の約 1/204 及び約 1/125 と非常に少ないことが明らかとなった。給水中 (n=3) からは、フタル酸エステル類は検出されなかった。

## 6. 生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析ガイドライン案

生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析法に関し、文献調査を行った結果を表 5 に示した<sup>4-19)</sup>。フタル酸モノエステル類は、フタル酸エステル類の代謝物であり、生体暴露評価法のバイオマーカーとして分析されている。表中の参考文献番号 4 から 11 の論文は、米国疾病管理・予防センター (CDC) の研究グループから出されたもので、分析法の開発・改良とともに、実試料への応用例も多く報告されている。尿を分析試料として、固相抽出カートリッジによるクリーンアップ後、LC/MS/MS で分析する方法が主に用いられている。論文の内容及び報告数などから判断して、彼らの研究グループの

方法の信頼性が高いと考えられ、現段階ではその方法を分析ガイドライン案とするのが適当と考えられた。

Blount ら<sup>5)</sup> 及び Silva ら<sup>8)</sup> の方法を図 5 に示した。尿を  $\beta$ -グルクロニダーゼで加水分解後、塩基性条件下で固相抽出カートリッジ (Nexus SPE、バリアン製) によるクリーンアップを行い、酸性条件下で再度固相抽出カートリッジ (Nexus SPE) によるクリーンアップを行う。その後、図 6 に示す HPLC-APCI-MS/MS 条件で分析を行う。血清中の分析法に関しては、情報が少ないため、ガイドラインの提案は見送ることとした。

#### D. 考察

フタル酸エステル類を始め、本研究班で検討対象としているビスフェノール A やノニルフェノールに関しては、低用量作用の有無が大きな問題となっている。内分泌かく乱化学物質の生体影響評価を実施する際、実験動物を利用した *in vivo* 系試験が広く行われている。しかし、低用量域における生体影響を評価するための動物実験の信頼性を確保するためには、飼育・実験環境 (飼料、床敷、給水瓶、空気等) における化学物質暴露の影響を明らかにする必要性が指摘されている。

そこで今回我々は、動物飼料及び床敷中のフタル酸エステル類の分析法を開発するとともに、分析ガイドラインを作成した。本ガイドラインに従い、動物飼料及び床敷中のフタル酸エステル類濃度を測定した結果、フタル酸エステル類が高頻度に検出された。従って、実験動物は、飼育及び実験環境から日常的にフタル酸エステル類の暴露を受けていることが明らかとなり、*in vivo* 低用量影響試験の信頼性確保には、飼育及び実験環境からの暴露影響を考慮する必要があると考えられた。

しかし、飼育及び実験環境からフタル酸エステル類を完全に排除することは不可能である。従って、動物飼料等中のフタル酸エステル類濃度を測定し、基礎暴露量を正確に把握することが必要と考えられた。

今回、生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析ガイドラインとして、CDC の研究グループの方法を提案した。フタル酸モノエステル類の生体内での挙動に関しては、現在もなお CDC のグループが継続して研究を実施していることから明らかなように、その情報が不足して

いる。従って、今後分析法の構築だけでなく、生体内の挙動についても、さらに詳細な検討及び情報収集が必要と考えられた。

#### E. 結論

1. 市販の動物飼料 12 検体についてフタル酸エステル類の分析を行った結果、DEHP が 111-511 ng/g、DBP が 25.1-944 ng/g、BBP が 22.2-157 ng/g 検出され、総量 (測定対象とした 5 種のフタル酸エステル類の合計値) は 141-1410 ng/g であった。検出されたフタル酸エステル類の濃度より、マウス及びラットが飼料から摂取するフタル酸エステル類の総量を試算すると、マウスでは 846-8460 ng/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 3525-35250 ng/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) であった。

2. 市販の床敷 13 検体についてフタル酸エステル類の分析を行った結果、DEHP が 16.0-5070 ng/g、DBP が 19.6-1390 ng/g、BBP が 440-900 ng/g、DiNP が 198 ng/g 検出された。検出された 4 物質の最高値は、いずれも再生紙を原材料とした床敷から検出されたものであった。

3. 実験動物舎の室内空気 (n=4) からは、DEHP が 27.6-32.1 ng/m<sup>3</sup>、DBP が 261-357 ng/m<sup>3</sup> 検出された。給水 (n=3) からは、フタル酸エステル類は検出されなかった。

4. *in vivo* 低用量影響試験の信頼性確保には、動物実験環境からの暴露影響を考慮する必要があると考えられた。

5. 文献調査の結果を基に、生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析ガイドライン案を提案した。

#### F. 参考文献

- (1) K. Kato, Y. Yoshimura, Y. Ito, H. Oka, H. Nakazawa, J AOAC Int., 85, 712-716, 2002.
- (2) 中澤裕之, 宮崎 豊, 伊藤裕子, 後藤智美, 岡 尚男, 猪飼誉友, 近藤文雄, 松本 浩, 厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業) 「高分子素材からなる生活関連製品由来の内内分泌かく乱化学物質の分析および動態解明」平成 13 年度分担研究報告書: 95-104, 2001.
- (3) 厚生省通知, 平成 10 年 3 月 30 日付け医薬審第 307 号「医薬品の残留溶媒ガイドラインについて」.
- (4) B. C. Blount, M. J. Silva, S. P. Caudill, L. L. Needham, J. L. Pirkle, E. J. Sampson,