

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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)

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書

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 .....29

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)

伊藤 裕子 (愛知県衛生研究所)

猪飼 啓友 (愛知県衛生研究所)

斉藤 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)

2. 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発 .....55

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. 生体試料中化学物質 (ノニルフェノール) 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 .....65

分担研究者 中澤 裕之 (星薬科大学)

研究協力者 斉藤 貢一 (星薬科大学)

井之上浩一 (星薬科大学)

伊藤 里恵 (星薬科大学)

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)

4. 動物飼料、床敷及び給水中の4-ノニルフェノールの分析 .....79

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)

斉藤 貢一 (星薬科大学)

伊藤 里恵 (星薬科大学)

5. 実験動物用飼料中の $17\beta$ -エストラジオールの分析 .....	89
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)
6. 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.....	95
1) 生殖年齢婦人を対象とした生体試料に対する分析	
2) 周産期試料に関する分析	
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.....	107
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.....	113
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.....	129
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	133

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：分析操作過程における汚染を低減化した前処理法を含む、精度の高い生体試料（血清）中のフタル酸エステル類の分析法を開発した。さらに、本法の信頼性を検証するために、外部機関を含めた3機関で同一血清を分析し、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、相対標準偏差も42.8%であった。しかし、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、本法により精度の高い測定値が得られると考えられた。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、実試料の分析を行った。その結果、動物飼料（n=12）からは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。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。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。本研究で開発した生体試料及び動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法を基に、分析ガイドラインを作成した。本ガイドラインは、「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補その2」に収載予定である。

1-② 生体試料等中のビスフェノールAの分析法の開発：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。そこで、本研究では「生体試料中のビスフェノールA分析法ガイドライン」を構築し、構築した試験法を用いて、生体試料中のビスフェノールA(BPA)の分析を行った。また、動物実験の信頼性を確保するため、「動物飼料、床敷中のビスフェノールA分析法ガイドライン」及び「飼料中の植物エストロゲン（イソフラボン）の分析法」の作成を試みた。血清（さい帯血、母体血）及び腹水中のBPA濃度を測定した結果、抱合体も含めた総BPA濃度は操作ブランクレベル（0.2ng/mL）であった。経口的に摂取したBPAは消化管から速やかに吸収され、投与量の殆どが24時間以内に尿中（主としてグルクロン酸抱合体）へ排泄された。従って、一日尿中のBPAを測定することによりBPAの曝露量を推定することが可能と考える。そこで、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と思われた。飼料中に含まれる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。一方、床敷の中には最高で704ng/g 検出されたも

のも見られたが、給水中からはBPAは検出(0.02ng/mL)されなかった。更に、飼料中の植物エストロゲンを測定した結果、殆どの飼料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 $\mu$ g/日程度となった。

**1-③ 生体試料中化学物質(ノニルフェノール)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**：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。

**1-④ 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。給水については、神奈川県衛生研究所動物舎給水栓から得た1検体は、不検出であった(定量限界値は0.02ng/mL)。給水瓶に入れた水は、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°Cで20分間放置の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。

**1-⑤ 実験動物用飼料中の17 $\beta$ -エストラジオールの分析**：実験動物用飼料に含まれる17 $\beta$ -エストラジオール(E<sub>2</sub>)の定量法を開発した。市販の実験動物用飼料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 $\pm$ 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**：ラット、モルモ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解析した。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アーとして機能しているが、胎盤ではグルクロン酸抱合されないと胎児側に移行す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を明らかにし、一過性の暴露でもその後の遺伝子発現に長期にわたる影響を及ぼし得ることを示唆する結果を得た。

**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。そこで、本疾患の遺伝的要因を遺伝学的相関解析によって明らかにすることを目的とした。

平成14年度 1年目：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 (*ESR1*)、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素 (*CYP1A1*)、アリルヒドロカーボン受容体 (*AHR*) の各遺伝子については、各遺伝子内に存在する多型を明らかにし、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するために、子宮内膜症患者 2 名および健常者 8 名を用いて、合計 9 遺伝子座について対立遺伝子のタイピングを行い、解析方法を確立した。

平成 15 年度 2 年目：子宮内膜症候補遺伝子である *ESR1* 遺伝子、*CYP1A1* 遺伝子、*AHR* 遺伝子の各遺伝子について、子宮内膜症との関連を詳細に解析するために、さらに遺伝的多型マーカーの設定を行った。子宮内膜症患者 5 名および健常者 11 名を用いて、各候補遺伝子の対立遺伝子のタイピングを行い、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 の SNP マーカーを選定した。*ESR1* 遺伝子については、27 箇所中 13 箇所について Minor allele frequency > 0.2 の SNP マーカーが確認された。同様に、*CYP1A1* 遺伝子および *AHR* 遺伝子については、それぞれ 4 箇所および 1 箇所が確認された。

平成 16 年度 3 年目：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。*CYP1A1* 遺伝子および *AHR* 遺伝子については、統計学的有意差を示す対立遺伝子が各々 1 個の遺伝子座で見出された。また、*ESR1* 遺伝子については統計学的有意差を示す対立遺伝子は見出されなかったが、1 個の SNP マーカーにおいて遺伝子型頻度において統計学的有意差が示された。さらに、*ESR1* 遺伝子のイントロン 5 に存在するマクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行い、5 個の対立遺伝子を同定した。また、子宮内膜症患者 32 名、一般健常者 42 名の日本人試料において、各対立遺伝子頻度に関する相関解析を行った結果、1 個の対立遺伝子において統計学的有意差が示された。

#### 分担研究者

中澤裕之 星薬科大学 薬品分析化学  
岡 尚男 愛知県衛生研究所  
堀江正一 埼玉県衛生研究所  
塩田邦雄 東京大学大学院 農学生命科学  
研究科細胞生化学  
木村 穰 東海大学 医学部 分子生命科学

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、床敷等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。研究最終年度には、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、実試料の分析を行った。さらに、本研究で開発した生体試料及び動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法を基に、分析ガイドラインを作成した。本ガイドラインは、「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補その 2」に収載予定である。

#### 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、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。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、精度の高い生体試料 (血清) 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。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、

**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。そこで、本研究では「生体試料中のビスフェノール A 分析法ガイドライン」を構築し、構築した試験法の信頼性を検証することを目的とした。次に、構築した試験法を用いて、生体試料中のビスフェノ

ール A(BPA)の分析と一日尿中の BPA の分析から、BPA の一日暴露量を推定した。また BPA の問題に関しては、妊娠期投与により影響が出るという von Saal らを中心とする報告と、それに対し再現性は確認されないとする報告があり、議論が繰り返されている。その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、「動物飼料、床敷、給水中のビスフェノール A 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検証するため、飼料中に含まれる植物エストロゲン (イソフラボン) の信頼性の高い分析法の策定を目的とした。

1-③ 生体試料中化学物質 (ノニルフェノール) 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: アルキルフェノール類は、様々な工業製品、界面活性剤、樹脂モノマー、プラスチック添加剤等の原料として利用されてきた。1991 年、A. M. Soto らにより改良型ポリスチレン製実験器具から溶出する 4-ノニルフェノール (NP) にヒト乳がん細胞 (MCF-7) 増殖能 (エストロゲン活性) を有することが報告された。そして、近年では、*in vitro* や *in vivo* 系での多くの研究が報告され、エストロゲン活性のみではなく、代謝阻害への影響、ヒト神経 Nicotinic acetylcholine receptor/channels への抑制、コルチゾール産生能に対する阻害などのヒト由来の細胞等を用いた検討でも、様々な活性が確認されている。その NP が、環境を汚染し、生体への暴露を進行させているとして、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、ELISA 法、GC/MS 法、LC/MS 法など、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。また、ノニルフェノールによる環境汚染は広範囲に進行していると予想される。今後は全国各地の測定施設におけるノニルフェノール測定の必要性が示唆される。その分析法としては、高精度かつ再現性に優れた分析法でなければならない。そこで、本研究においては、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。これまでに構築した方

法は、環境中からのコンタミネーションを低減するために、前処理をカラムスイッチング法によるオンライン固相抽出法を利用した LC/MS による分析法であり、3 機関による添加回収試験のクロスチェックもカラムスイッチング LC/MS 法により行った。また、高精度な分析法とするために、内標準法を選択した。

1-④ 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の評価については、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、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。

1-⑤ 実験動物用飼料中の 17 $\beta$ -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。このため内分泌かく乱作用に関する動物実験者は、飼料に含まれる化学物質量を把握することが求められている。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や、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 17 $\beta$ -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。本研究は、動物実験の信頼性の確保に役立つ情報を提供すると期待される。

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うと共に、各種臓器の灌流システムを確立して、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)、およびその代謝産物 Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) を例にとり、主にマウス胎盤の幹細胞を用いた解析により、それらの妊娠母体への曝露が胎盤形成あるいはその機能におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

**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。極端な例としては、単一遺伝性疾患のレッシュナイハン症候群などの場合は遺伝要因が大きく寄与し、また、交通事故による骨折や脳挫傷などは物理的な外力つまり環境要因がその主たる原因である。現在までに進められてきた疾患の遺伝要因の解析の多くは、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

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的要因を明らかにすることができる可能性がある。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。しかし一方で、同一の環境条件下でもその反応性に個人差があることは良く経験されることである。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方法、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 (*ESR1*)、チトクロム・グルクロン酸抱合酵素 (*CYP1A1*)、アリルヒドロカーボン受容体 (*AHR*) の各遺伝子である。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、高密度な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、さらに、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、遺伝学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：**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

1) 血清：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ーキャップ試験管(10 mL)に分注後、冷凍状態で各分析機関(株式会社東レリサーチセンター、株式会社エスアールエル、愛知県衛生研究所)へ送付した。

2) 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

3) 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

4) 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 $\mu$ g/mL、

DiOP、DiNPの濃度が20 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 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. 試料採取及び試験溶液の調製法

5.1 血清分析用：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：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 $\mu$ 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。

5.3 床敷: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  $\mu$ 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。

5.4 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。

5.5 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 $^{\circ}$ C (3 分)  $\rightarrow$  20 $^{\circ}$ C/分  $\rightarrow$  240 $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  10 $^{\circ}$ C/分  $\rightarrow$  300 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C

試料注入法:パルスドスプリットレス

四重極温度:150 $^{\circ}$ C

イオン源温度:230 $^{\circ}$ C

検出法:選択イオン検出 (SIM)

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。

## 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:さい帯血、母体血及び腹水は東海大学病院から提供されたものを用いた。さい帯血及び母体血は産科グループのボランティアから、腹水及び血液は婦人科グループのボランティアから採取した。採取した血液試料は、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-30 $^{\circ}$ C で保存した。腹水も同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30 $^{\circ}$ C で保存した。尿は、埼玉県衛生研究所及び長野県衛生公害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-30 $^{\circ}$ C で保存した。なお、さい帯血、母体血、腹水及び尿の採取と使用に関しては、いずれもインフォームドコンセントを十分行い、理解が得られたボランティアから採取するなど、倫理面への配慮を行った。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 $^{\circ}$ C で保存した。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。

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。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 10 mg (Malonyl 体及び Acetyl 体は 1mg) を精秤し、メタノール 10 mL 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。フロリジルカートリッジ：スペルコ製、スペルクリン ENVI フロリジル(0.5g)を用いた。カートリッジは予め *n*-ヘキサン 5mL で洗浄して使用した。Oasis HLB カートリッジ：Waters 社製、充填量 60 mg を用いた。カートリッジは予めメタノール 5mL、精製水 5mL で洗浄して使用した。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 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/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/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×0.25 μm

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

注入口温度：250°C

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°C

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/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 (LC/MS 法)：安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub> を 10ng 含んだ BPA の 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 50ng/mL の溶液を調製し、その 20 μL 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。

4.2 尿中の BPA の分析 (GC/MS 法)：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 200 μL 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製した。

4.3 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 2 μg/mL となる標準溶液を調製し、その 5 μL 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 血清、尿中の BPA 試験溶液の調製 (LC/MS 測定用)

5.1.1 遊離体 BPA 測定用試験溶液：血清、腹水は 1mL を、尿は 2mL を採り、内部標準物質である BPA-d<sub>16</sub> を 5ng 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。

5.1.2 総 BPA 測定用試験溶液：血清、腹水は 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。

## 5.2 尿中の BPA 試験溶液の調製 (GC/MS 測定用)

5.2.1 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。

5.2.2 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。

5.3 飼料、床敷中の BPA 試験溶液の調製：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 (LC/MS/MS) 用試験溶液とした。

5.4 給水中の BPA 試験溶液の調製：給水瓶に BPA フリーの精製水 200mL を入れ、実験動物に給水する状態で 48 時間放置後、給水瓶中の精製水を実験に供した。給水瓶中の精製水 100mL

を Oasis HLB カートリッジに負荷し、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。

5.5 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 20mL 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 生体試料中化学物質 (ノニルフェノール) 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：

### 1. 試薬・装置

【試薬】すべての試薬類は、クロマトグラム上で NP の分析に支障のないことを確認した後、用いた。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 μm)
- ・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 °C
- ・注入量：30 μl

### 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 °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°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 μg/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°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 μg/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。

#### 1-④ 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

- ・ 4-ノニルフェノール (NP): 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> (m-OP-d<sub>5</sub>): 林純薬社製 1000 μg/mL 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: NP 標準溶液: NP 100 mg を精秤し、ヘキサン 100 mL に溶解して 1000 μg/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 μg/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。

3. 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。給水については神奈川県衛生研究所動物舎給水栓から得た 1 検体及び給水瓶 (高分子製) について 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る 11 検体の合計 12 検体を分析した。

##### 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°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: Agilent 社製 Agilent1100

##### HPLC 測定条件

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

カラム温度: 40 °C

移動相: 0.5M 酢酸アンモニウム含有 90%メタノール

流速: 0.2 mL/min

注入量: 10 μL

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

Monitor ion(Precursor ion/Product ion): NP(m/z=219/m/z=133);  
m-OP-d<sub>5</sub>(m/z=224/m/z=123)

4.1 検量線の作成: NP の 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100ng/mL メタノール溶液を調製して、低濃度用検量線を作成し、10, 100, 500, 1000, 2000ng/mL メタノール溶液を調製して、高濃度用検量線を作成した。なお、内部標準物質 (m-OP-d<sub>5</sub>) の濃度は 50ng/mL とした。

5. 試験溶液の調製: 精油定量装置に水 100mL

と試料 2 g を入れ、ヘキサン 3 mL 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。給水及び給水瓶中の水の場合は試料水 100 mL とヘキサン 3 mL を用いて同様な操作を行った。

6. 倫理面への配慮：実験に用いた試薬及び有機溶媒等が環境中に排出されないよう、それらの回収を徹底した。

#### 1-⑤ 実験動物用飼料中の 17β-エストラジオールの分析：

1. 試薬及び器具：E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> (16, 16, 17-d<sub>3</sub>), メタノール (環境分析用) 及びジクロロメタン (環境分析用) は、和光純薬社製を用いた。グラフアイトカーボン/アミノプロピルシリカゲル固層抽出カラムは、スペルクリン ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500mg/500mg; SPELCO) を用いた。カラムは、実験に際して予め 20 mL のジクロロメタン/メタノール (50 : 50) 及び 20 mL のメタノールの順で洗浄して用いる。実験に用いる器具は、E<sub>2</sub> の分析に支障のないよう、十分に水洗したガラス器具を分析直前にアセトンで洗浄したものを使用した。

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：

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: API 3000 (アプライドバイオシステムズ)

4. 試験液の調製：粉碎した飼料 10 g に E<sub>2</sub>-d<sub>3</sub> を 100 ng 添加した。メタノールを 50 mL 加えて室温で 1 時間静置した後、ホモジナイズ (2 分間) した。超音波照射 (10 分間) 後、遠心分離し、上清を回収した。残渣にメタノール 10 mL を加えて洗浄し、遠心分離後、上清を回収し、先の上清と併せて 50 mL に定容した。この抽出液 2.0 mL をグラフアイトカーボン/アミノプロピルシリカゲル固層抽出カラムに負荷し、メタノール 20 mL で洗浄後、ジクロロメタン/メタノール (50 : 50) 10 mL で溶出させた。窒素気流下で乾固させ、LC の溶出開始液 0.20 mL に溶解して試験溶液とした (スキーム 1)。LC/MS/MS の条件は、以下の通り。

LC 条件：

カラム; Cadenza CD-C18, 2.0 x 50 mm; カラム温度; 50°C; 分析用移動相; (A) 0.02% アンモニア水; (B) アセトニトリル; グラジエント条件; (B), 20 → 60% (10 min), リニア; 分析用移動相の流速; 0.2 mL/min; 注入量; 5.0 μL; イオン化法; エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法; ネガティブモード; モニターイオン (プレカーサーイオン/プロダクトイオン): E<sub>2</sub>, (m/z= 271/m/z= 145); E<sub>2</sub>-d<sub>3</sub>, (m/z= 274/m/z= 145)。

5. 倫理面への配慮：実験に用いた試薬及び有機溶媒等が環境中に排出されないよう、それらの回収を徹底した。

#### 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 20 mL、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を採用した。主な測定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. 実験動物、倫理面への配慮：本研究に用いた実験動物は、購入後速やかに、あるいは、専用の動物飼育室内で自由な給餌と給水をあたえて任意の期間飼育した後に、頸椎脱臼あるいは断頭により屠殺した。飼育・屠殺は、各大学の動物実験実施規則を遵守して行った。

2. 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、ラット子宮およびモルモット胎盤の灌流システムを確立し用いた。ラット子宮はその一部を切除し、両端を結紮後、灌流液に浸した。1-ナフトールまたはビスフェノール A を子宮血管側 (漿膜側) および子宮粘膜側から暴露

し、経時的に灌流液中の代謝物を HPLC で分析した。

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

4. DEHP の胎盤形成および胎児発生への影響の解析: 妊娠雌マウス (ICR 系統) の腹腔に、妊娠 6.5 日目および 7.5 日目の 2 度、体重 1 kg 当たり 0、0.2、20 および 200 mg の DEHP を尾静脈注射した。その後、妊娠 8.5 日目に胎児を含む子宮脱落膜組織を採取し、組織学的解析に供した。

5. DEHP の胎盤細胞分化への作用の解析: 0、0.2、20 および 200  $\mu$ g/ml の DEHP 存在下でマウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を培養し、増殖能および形態への影響の有無を検討した。

6. 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 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トリング法により解析した。

7. MEHP の DNA メチル化への作用の解析: FGF4 存在下で未分化のまま維持された TS 細胞、および、FGF4 非存在下で分化誘導条件におかれた TS 細胞それぞれの培地に、DMSO に溶解した MEHP を加えて (終濃度 1  $\mu$ M MEHP、0.1% DMSO) 4 日間培養し、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。RLGS 法は、メチル化感受性制限酵素である NotI による切断の有無を指標に DNA メチル化状態を解析する手法で、多くのゲノム領域を網羅的に解析することができる。

#### 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. 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、約 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は、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、GenBankDNA database (<http://www.ebi.ac.uk/emb/>), <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), 遺伝子間のスパーサー領域に存在する 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 の箇所ごとに設計した。このソフトウェアは PCR に適した条件の必要事項である T<sub>m</sub> 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り、この点は精査した。

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 断片が検出できなかつたり、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変化させることによって特異的な DNA 増幅を検討した。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、SNP 検出においては、PCR 増幅条件を十分に検討することが重要である。

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。

6. 統計解析：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 検定によって調べた。このとき、 $P < 0.05$  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。採取する試料は、臨床診断にも利用する血液の一部、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承認したが、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、承認を得ている。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、動物飼料等中のフタル酸エステル類の分析法の開発：

1. 生体試料中のフタル酸エステル類分析法の開発：

(1) 操作ブランクの低減化：操作ブランクの低減化に関して、分担研究者及び研究協力者の研究室で個々に検討を行った結果、以下に示す 10 項目対策を講じることにより、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。

1) ホールピペット及びメスフラスコ以外の全ての実験器具（エバポレーターのトラップも含む）は、200°C で 2 時間加熱後放冷し、使用する直前にフタル酸エステル分析用の n-ヘキサンで洗浄する。なお、n-ヘキサン洗浄は手が器具に直接触れないように、ピンセットを用いて実施する。

2) 実験操作開始直前には必ず両手を石けんでよく洗い、その後は、極力実験器具以外には触れないようする。特に、ドアノブに触れた場合には必ず両手を洗浄する。

3) 使用する実験台はアルミホイールで覆い、毎日交換する。

4) エバポレーターは、使用する直前にフタル酸エステル分析用アセトンを濃縮乾固する。

5) 標準品を扱う際は、作業する実験台とは異なる実験台で行う。

6) ピペットの先端が実験室内の器具装置等に触れないようにする。

7) ホールピペットは、必ず基本操作どおり扱い、決して口で吹いたりして溶液を排出しない。

8) 腕時計は外しておく。

9) 髪の毛は小さくまとめる。

10) 爪は短く切る。

これらの項目に注意を払わない場合には、操作ブランクの SIM プロファイル上に 100 ppb レベルの DBP 及び DEHP が出現するのに対して、これらの実施すると、操作ブランク値が、それぞれ 10 ppb 以下に低減されたので、以下に実験ではこれらの点に留意して実験を行うこととした。検出限界値は、DBP、BBP、DEHP は 10 ng/g、DiOP、DiNP は 50 ng/g に設定した。

(2) 試験溶液の調製法：血清中の脂質をヘキサン/アセトニトリル分配により除去した後、フロリジル-PSA カラムで精製した。

(3) 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）を用いて分析法のクロスチェックを実施した。試験操作としては、空試験、ブランク試験及び添加試験を行った。空試験は、ブタ血清の代わりに蒸留水を試料として用いて試験を行い、試験操作に由来するバックグラウンド値を求めることを目的としている。ブランク試験は、ブタ血清を試料として用いて試験を行い、試料及び試験操作に由来するバックグラウンド値を求めることを目的としている。添加試験は、ブタ血清に標準物質を添加して試験を行い、標準物質の回収率を求めるこ



とにより、本試験法の信頼性を検討することを目的としている。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。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、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 10 ng/g を超えていた。機関 C で高い 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、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。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。

以上の結果を基に、分析ガイドラインを作成した。本ガイドラインは、「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補その 2」に記載予定である。

2. 動物飼料中のフタル酸エステル類分析法の開発：試料量 (5 g) と同量 (5 mL) の水を加えた後、アセトニトリル抽出を行った。得られた抽出液は、血清と同様にヘキサン/アセトニトリル分配により脂質を除去した後、フロリジル-PSA カラムで精製した。なお、動物飼料中の脂肪含量は粗脂肪として 4~5% と、血清の約 10 倍と多いため、PSA の使用量を血清の場合の 2 倍 (1 g) とした。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。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。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。フタル酸エステル類の回収率の平均値は、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：前項で開発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、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 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。

以上の結果を基に、分析ガイドラインを作成した。本ガイドラインは、「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補その 2」に記載予定である。

4. 床敷中のフタル酸エステル類の分析法の開発：床敷 2.5 g からアセトンでフタル酸エステル類を抽出し、その後フロリジル-PSA カラムで精製を行った。試験操作としては、血清及び動物飼料と同様に、空試験、ブランク試験及び添加試験を行った。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。フタル酸エステル類の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。添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率の平均値は、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。

6. 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。

7. 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。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切と考えられた。尿をβ-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、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、ガイドライン案の提案は見送ることとした。

#### 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. LC/MSによる生体試料中のBPAの分析：BPAの総曝露量を評価するため、遊離体BPAと抱合体も含めた評価法を検討した。

1.1 前処理法の検討：血清及び尿中の遊離体BPAの前処理には先に報告した方法(平成12年度研究成果報告書)を採用した。総BPAの前処理、即ち抱合体の加水分解条件は、血清1mLに抱合体を含む尿50μL添加して検討した。β-グルクロニダーゼ量を5、10、20及び30μLと変えて加水分解率に及ぼす影響を調べた結果、いずれの量においても37℃、1時間インキュベートすることによりほぼ完全に加水分解された。そこで、本法では酵素量は5μLとした。なお、5μLのβ-グルクロニダーゼを再現良く分取することは困難であったので、0.2M酢酸緩衝液でβ-グルクロニダーゼを10倍希釈し、その50μLを採ることとした。

1.2 添加回収実験：血清及び尿にBPA及び安定同位体標識内部標準物質BPA-d<sub>16</sub>を添加(5ng/mL)し、回収率を求めた結果、血清及び尿とも概ね70%以上であった(BPA-d<sub>16</sub>による補正なしの回収率)。本法による検出限界は、血清で0.2ng/mLであった。

1.3 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10ppbになるよう添加したものを配付)。

○分析法：構築したガイドライン(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(榊原レリサーチセンター、榊原エスアールエル、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、構築した「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。

1.4 血清、腹水、尿中の BPA 濃度：本法により、東海大学病院で採取された母体血、さい帯血、腹水等計 27 検体を分析した結果、遊離体 BPA はいずれも操作ブランクレベル (0.2~0.3ng/mL) であった。一方、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理した一部の試料からは 1-2 ng/mL レベルで BPA が検出された。また、健康なボランティア 5 名から採取した一時尿を分析した結果、血液サンプルと同様、遊離体 BPA はいずれも操作ブランクレベル (0.2~0.3ng/mL) であったが、抱合体を含めた総量では一部試料から 1-2ng/mL レベルで BPA が検出された。

1.5 BPA の体内動態：米国 EPA による BPA の参照用量 RfD (0.05mg/kg) 及び昨年出された EU の暫定 TDI (0.01mg/kg) 値を参考にして、BPA の安全摂取量を算出した。それを基に BPA を低用量 (50  $\mu$ g) 及び高用量 (1mg) を経口的に単回投与し、摂取後の体内動態を GC/MS (低用量ケース) 及び LC/MS (高用量ケース) を用いて調べた。低用量及び高用量のケースとも、BPA は消化管から速やかに吸収され、投与量の大半が尿中 (クレアチニン補正：尿中クレアチニン濃度を 1mg/mL とし算出、高用量ケースでは約 80% が 24 時間以内に主としてグルクロン酸抱合体として) へ排泄された。しかし、血中への移行量は少なく、その殆どが抱合体 (最高濃度：43ng/mL：経口摂取後 0.5 時間) で、その時の遊離体レベルは 0.3ng/mL 程度であった。

2. GC/MS による生体試料中の BPA の分析

2.1 健康成人尿中の BPA 濃度：成人尿 (n=11) を採取し、GC/MS 法により総 BPA と遊離体 BPA について分析した結果、総 BPA 濃度は、0.19~1.38ng/mL (平均 0.56ng/mL)、遊離体 BPA 濃度は、0.01~0.27ng/mL (平均 0.08ng/mL) であり、遊離体 BPA の割合は 2.6~29% (平均 12%) であった。

2.2 BPA の尿中への排泄：ボランティア 25 人に BPA-d<sub>16</sub> 50  $\mu$ g を含む清涼飲料水を投与し、摂取後 5 時間の尿を採取して分析した。その結果、総 BPA 濃度は、27~80ng/mL (平均 57.2ng/mL)、遊離体 BPA 濃度は、0.13~5.5ng/mL (平均 1.13ng/mL)、排泄量は 17.6~48.6  $\mu$ g (平均 38  $\mu$ g：投与量の 76%) であり、遊離体 BPA の割合は 0.34~8.1% (平均 1.9%) であった。更に、

BPA-d<sub>16</sub> の排泄をみるため、BPA-d<sub>16</sub> 100  $\mu$ g を含む清涼飲料水 100ml を投与し、一定時間間隔で 26.5 時間採尿し、分析した。その結果、摂取後 30 分後にグルクロン酸抱合体として尿中最高値の 90ng/mL、60 分後には 26ng/mL に減少し、5 時間後にはほぼ元の濃度付近にまで低下した。BPA は消化管から速やかに吸収され、尿中へグルクロン酸抱合体として排泄され、低用量暴露では 24 時間で約 97% が排泄された。

3. BPA の推定曝露量について：経口摂取された BPA は消化管から速やかに吸収され、投与量の殆どが 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、1 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、1  $\mu$ g/day レベルであった。2002 年 5 月に示された EU の BPA 暫定 TDI は、500  $\mu$ g/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。長野と埼玉では異なった分析法を採用したが、問題はないと考えられる。

4. 飼料、床敷、給水中の BPA の分析

4.1 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 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。測定には先に構築した生体試料中の BPA 分析法

(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。

4.2 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 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。

## 5. 飼料中の植物エストロゲン分析

5.1. 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  $[M\text{-glucose-H}]^-$  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 50 pg)であった。

5.2. 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。

5.3 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( $<0.2 \mu\text{g/g}$ )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( $569 \mu\text{g/g}$ )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  $3,414 \mu\text{g/日}$ 、ラットでは  $14,225 \mu\text{g/日}$ (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 生体試料中化学物質(ノニルフェノール)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:

1. 実験環境等の汚染状況:下記の試薬・実験器具より、汚染が確認された。

- セプタム:メタノールのブランク分析をした際、9.7 ppb の NP が検出された。そのため、NP の残留していない Agilent 社製 Screw cap septa(5182-0729)を使用することにした。
- 精製水:NP が 0.2ppb 程度検出されるものがあつた。そのため、NP の測定には、検出限界以下となるものを用いることとした。
- 固相抽出用カートリッジ:メタノールで洗浄した溶液を測定した場合、3.5ppb 程度の NP が検出された。そこで、オンライン固相抽出法を採用し、環境からの汚染をできるかぎり除外した。

採取器具:一部の血液採取器具より、NP が残留することが報告されている。そこで、実際の採血や保存器具に関して、NP などの含まないものを使用するようにした。

2. オンライン抽出-LC/MS 法による分析法の検討:本研究に使用可能な分析装置の現状を考慮し、再度、移動相の条件検討を行った。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、 $119.6\sim 126.0\%$  ( $RSD < 2.7\%$ ,  $n=3$ )であった。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。

2. 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