

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。

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. 検出限界値、定量限界値及び検量線について：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-d₅ : 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。

2. 精油定量装置を用いた抽出法の検討

2.1 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 NP 及び m-OP-d₅ 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。NP 及び m-OP-d₅ は 15 分間蒸留することで、約 80%、30 分間ではほぼ 100% の回収が得られた。NP の内標準物質として市販されている m-OP-d₅ 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。

2.2 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 ng/mL 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。

2.3 遠心エバポレータによる NP 及び m-OP-d₅ 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 NP 及び m-OP-d₅ 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 NP 及び m-OP-d₅ 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。

2.4 添加回収実験：水及び飼料に NP 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 NP が 18.7 ng/g 検出された飼料に添加した。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 NP が含有されており、飼料のばらつきが考えられる。本法を用いて動物飼料 35 検体 (29 種)、床敷 14 検体 (10 種) 及び給水及び給水瓶中の水 12 検体を分析した。

3. 動物飼料の分析：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。

4. 床敷の分析：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。床敷からの暴露量推定は困難であるため高濃度に汚染が認められる床敷の使用は避けることが望ましい。

5. 給水の分析：神奈川県衛生研究所動物舎給水栓から得た 1 検体については、不検出であった (定量限界値は 0.02ng/mL)。給水瓶に入れた水については、4 社の給水瓶本体とキャップの組み合わせ (11 検体) について検討を行った。給水瓶の使用方法を考慮して、分析条件は超純水 200mL を入れた後、室温で 24 時間放置後、100mL を分析に供した場合と給水瓶に入れた超純水とともに給水瓶を 121°C、20 分間加熱放冷後、100mL を分析した場合について検討した。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。加熱放冷後では 1 検体を除くすべての検体から NP が 0.03-0.63ng/mL の範囲で認められた。給水瓶中の超

純水への NP 溶出は、室温 24 時間放置した場合よりも 121°C、20 分間加熱放冷した場合の方が多いたことが判明した。従って 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、キャップについてシリコンゴム（本体ポリサルホン樹脂 1 検体、ポリカーボネート樹脂 2 検体、ポリエチルイミド樹脂 1 検体）の場合、室温 24 時間放置で 4 検体中 1 検体から 0.04ng/mL、121°C で 20 分間放置で 4 検体中 3 検体から 0.03-0.05ng/mL の NP を検出した。ブチルゴム（本体ポリサルホン樹脂 2 検体、ポリカーボネート樹脂 2 検体、ポリエチルイミド樹脂 1 検体）の場合、室温 24 時間放置で 5 検体中 2 検体から 0.03-0.06ng/mL、121°C で 20 分間放置で 5 検体中 5 検体から 0.08-0.35ng/mL の NP を検出した。天然ゴム（本体ポリカーボネート樹脂 1 検体、ポリエチルイミド樹脂 1 検体）の場合、室温 24 時間放置で 2 検体中 2 検体から 0.06-0.11ng/mL、121°C で 20 分間放置で 2 検体中 2 検体から 0.53-0.63ng/mL の NP を検出した。以上のことから 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ビ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。

1-⑤ 実験動物用飼料中の 17β-エストラジオールの分析：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 E₂ は、内部標準法により定量した。すなわち、E₂-d₃ に対する E₂ のピーク面積比から検量線を作成し、定量値を求めた。E₂ が検出されなかった飼料（F-10, 11, 14, 及び 15）に E₂ 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。E₂-d₃ で補正することによって、F-10, 11, 14, 及び 15 での E₂ 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 E₂ 含有量を測定した。F-20 に 0.52 ± 0.03 ppb の E₂ 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 E₂ 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：分析した全試料の中には、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。生体試料のパ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、さらに今後モニターを続ける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いた。本研究では、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。胃灌流実験には、小腸や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、吸収されたビスフェノール A 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判明した。胃粘膜上皮細胞における UGT の発現も確認された。

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の確立に成功した。この灌流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。また、UGT1A6 でグルクロン酸抱合される 1-ナフトールも同様の結果が得られた。さらに、性周期でのビスフェノール A の解毒能の変化を調べたところ、発情前期が休止期に比べおよそ 2 倍高い活性を示した。なおその場合も、抱合体は母体側に排泄された。

3. ラット子宮での代謝解毒酵素活性の解析：子宮でビスフェノール A などのグルクロン酸抱合を担う酵素分子種の検索をおこなった。免疫組織染色の結果、UGT はラット子宮内膜上皮細

胞・子宮腺および卵管上皮細胞に発現していた。この分子種の一つは UGT1A6 であったが、肝臓でビスフェノール A の抱合を担っている UGT2B1 は発現していなかった。分子種特異的抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行ったところ、ラット子宮には UGT1A6 の他に、肝臓では発現していない 2B ファミリー分子種も発現しており、発情周期によって発現量が異なると予測された。UGT2B1 は子宮内では発現していないので、ビスフェノール A をグルクロン酸抱合する分子種はこの中に存在すると思われる。

4. ラット子宮内膜上皮細胞を用いた代謝解毒酵素活性の解析：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。

5. ラット子宮間質細胞を用いた代謝解毒酵素活性の解析：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。これにより、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。

6. 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。上述の結果とあわせると、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 によってグルクロン酸抱合（解毒）され、妊娠期にはやはり胎児を取り巻く間質細胞によってグルクロン酸抱合される事により解毒される、すなわち、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。一方、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。ラットおよびモルモットにおいて、ビスフェノール A が胎児に移行するのは妊娠

後期でありそれ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。

7. DEHP の胎盤形成および胎児発生への影響の解析：これまで、妊娠雌マウスへの投与実験や TS 細胞培養系への添加実験により、ベンツピレンは直接は胎盤細胞の分化にほとんど影響を及ぼさないが、母体細胞でのレチノイン酸合成を増加させることにより、二次的な効果を及ぼす可能性があることを明らかにしてきた。これらの解析法にならない、DEHP の妊娠マウスへの投与実験を行った。その結果、低用量 (0.2 mg/kg) 投与群の一部で栄養膜巨細胞の過形成が確認されたが、他の濃度における栄養膜巨細胞の明確な過形成は見られていない。これは、胎盤形成に影響を及ぼす DEHP 濃度に上下の閾値が存在する可能性を示唆し興味深い。胎児の成長（サイズ、発生ステージ）には、DEHP 投与群と対照群との間で明確な差は見られなかった。

8. DEHP の TS 細胞への作用の解析：未分化 TS 細胞への DEHP の添加実験では、細胞の増殖能や形態に明確な影響は見られなかった。生体内に取り込まれた DEHP は血中ですみやかに代謝されて MEHP になり、実際に内分泌かく乱作用を示すのは MEHP であると考えられている。DEHP が TS 細胞に対して明らかな作用を示さなかったことは、TS 細胞の培養系では DEHP が MEHP に転換されないことによるものと考えられる。

9. MEHP の TS 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。

10. 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。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 ヶ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 ヶ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 ヶ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年目)

1. 遺伝的多型箇所の検索：現在までに報告されている文献等によって子宮内膜症候補遺伝子を *ESRI* 遺伝子、*CYP11A1* 遺伝子、*AHR* 遺伝子の3遺伝子に選定した。さらに、上記3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、イントロン1において3個、エクソン4において1個のSNPsを選定し、子宮内膜症患者2名および健常者8名を用いて、対立遺伝子のタイピングを行った。その結果、イントロン1における1個のSNPを除く3個のSNPsについて多型を確認した。また、*CYP11A1* 遺伝子については、エクソン7において1個、3' flanking 領域において1個のSNPsを選定し、同様にタイピングを行った。その結果、2個のSNPsともに多型を確認した。さらに、*AHR* 遺伝子についてはエクソン10に存在する3個のSNPsを選定し、同様にタイピングを行った。その結果、1個のSNPにおいて多型を確認した。

(2年目)

2. 遺伝的多型マーカーの設定：子宮内膜症と各候補遺伝子の関係を詳細に調べるために、さらに遺伝マーカーの設定を行った。患者群5名、対照群11名を用いて、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、*ESRI* 遺伝子についてはSNPs45箇所中34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SNPsを20箇所で確認した。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SNP11箇所中5箇所において多型性が確認され、この5箇所のSNPはMinor allele frequencyが0.2以上を満たしていた。

(3年目)

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箇所で確認した。同様に、*CYP11A1* 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。

3. 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、*CYP11A1* 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, $\chi^2=4.67$ 。*CYP11A1* 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, $\chi^2=5.40$ 。

4. マイクロサテライトマーカー解析：さらに、*ESRI* 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, $\chi^2=5.90$

D. 考察

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。

また、相関解析において統計学的有意差を示した各対立遺伝子については、その対立遺伝子自身あるいはその近傍に存在する多型が子宮内膜症に何らかの影響を与えている可能性が高いと考えられる。

今回、相関解析に用いた患者集団および対象者集団はそれぞれ 43 名、58 名であり、昨年度に比べてその人数を増やしているが、さらに検体数を増加させることにより、比較的弱い遺伝的効果を検出できる可能性がある。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ている。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的要因を明らかにすることができると期待される。

このような高密度な遺伝的多型マーカーを用いるゲノム多様性研究のために、米国では SNPs (Single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型) の検出が盛んに行われている。SNPs はヒトゲノム中におよそ 1000 塩基に一つと期待される一塩基置換である。これらは、マイクロサテライトのような他のマーカーよりもゲノム中に豊富に存在しており、遺伝子内にも存在するという利点をもっている。このことから、遺伝子のコード領域および調節領域における全ての塩基置換をカタログ化しようとする試みが考えられた。これにより、疾患感受性に影響を与える多型を包括することでき、さらに患者集団と健常者集団においてこれらの多型頻度を比べることによって疾患に影響を及ぼすような多型が患者集団において見出すことができるであろうと期待されていた。

しかしながら、原理的には大変単純のように見えるが、現実的にはいくつかの問題が生じることが報告された。これは、遺伝子のコード領域内に存在する SNPs である cSNPs (coding SNP; コード SNP) を収集する直接法と呼ばれるものであるが、このアプローチは、タンパク質の構造を変えるような SNPs のほとんどを取り逃している可能性があり、おそらくまだ疾患に直接的に影響を与える SNPs が存在していることを指摘された。また、ほとんどの SNPs は、タンパク質産物に直接的に影響を与えるものではなく、ヒトゲノムの約 95% と見積もられている非コード領域に含まれるかあるいは同義語的 (静的) 置換として作用していると予想した。そして、cSNPs が非同義語的置換であることはヒト遺伝子プールで大変まれであることが報告された。これは、タンパク質構造におけるいかなる変化に対しても強い選択が存在し、これ

らの変化のほとんどが進化の過程で取り除かれたと予想している。この2つの報告により、疾患に関与する非同義語的 cSNP を見出すことは大変困難であり、これらを見出すためにはできる限り大きくさらにさまざまなサンプル集団が必要とされることが指摘された。先に述べた通り上記の方法は、疾患に直接的に関与する遺伝子のコード領域内および調節領域内の変異を収集することから、直接法と呼ばれているが、遺伝子のコード領域以外の、たとえば調節領域やイントロン多型などによる遺伝子機能に影響を与える遺伝的変異を見出すことは大変困難である。

これに対して、疾患感受性遺伝子座とその近傍の多型との間の連鎖不平衡により相関が示される間接法がある。この方法は、遺伝子のコード領域以外の SNPs すなわち gSNPs (genomic SNPs:ゲノム SNPs)を用いることによってすべての変異を包括する必要性を避けることができる。一見直接法に比べてかなり有用であるように思われるが、この間接法にも現在問題点が指摘されている。それは、疾患感受性変異を調べるうえで十分な遺伝的マーカー数がどの程度必要であるかということである。この答えは、人類集団における連鎖不平衡の程度に依存する。これは複雑で、実際連鎖不平衡が染色体領域のどの程度の範囲におよぶかは不明で、多くの人類集団におけるさまざまなゲノム領域のデータが必要とされる。しかしながら、現時点において人類集団の歴史および遺伝的変異、染色体組み換えを簡素化した情報をもとにした試算により、連鎖不平衡の有用な範囲は一般人類集団において平均約3kbの距離を越えないであろうということが推測されている。つまり、SNPs を遺伝的マーカーとした場合、数多くのマーカー数が必要とされる。これは、SNPs マーカーがその対立遺伝子数が通常2個と少ないために染色体組換えによる連鎖不平衡の減衰を受けやすいことが考えられている。一方、2-5塩基の繰り返し単位からなるマイクロサテライトはヒトゲノム中に約30kbに1個の密度で均一に存在し、一般に対立遺伝子数も繰り返し数の増加に比例して増加することが知られている。これにより、マイクロサテライトは SNPs マーカーに比べ広範囲に連鎖不平衡を示し、疾患感受性遺伝子のマッピングに有用であると考えられている。このことより、疾患感受性遺伝子マッピングにおいて、SNPs マーカ

一は遺伝的多様度が不十分であり、その近傍に存在する標的遺伝子について有意な相関を取り逃し易いと考えられる。これに対して、広範囲に連鎖不平衡を有するマイクロサテライトマーカーは大変効率的な手段であると考えられる。

以上、今回用いられた患者集団はすべて、臨床的検査によって子宮内膜症の病巣を確認された患者であるが、対象者集団中には婦人科外来を受診し、筋腫などの病巣が確認されたが子宮内膜症の病巣が確認されなかった患者も含まれている。最近の報告では、子宮内膜症が子宮ガンの発症過程に含まれる可能性が示唆されたため、対象者集団の基準についても十分注意する必要があると考えられる。

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. 分析操作過程における汚染を低減化し、生体試料（血清）中のフタル酸エステル類を高い精度で分析する方法を開発した。さらに、外部機関を含めた3機関でクロスチェックを実施した結果、概ね良好な回収率と相対標準偏差が得られた。以上の結果を基に、生体試料中のフタル酸エステル類分析ガイドラインを作成した。
2. 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、市販の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。
3. 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 生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発：

1. 生体試料中のBPA分析法ガイドラインの構築：LC/MS 及び GC/MS を用いたビスフェノール A (BPA) の信頼性の高い高感度分析法を構築し、血清（母体血、さい帯血）、腹水及び尿中の BPA 濃度を測定した。

・血清（さい帯血、母体血）及び腹水中の遊離

体BPA濃度は操作ブランクレベル(0.2ng/mL)であった。一方、抱合体も含めた総BPA濃度は、一部の試料からは1-2ng/mLレベルで検出された。

・尿中では、遊離体BPA濃度は平均で0.1ng/mL程度、抱合体も含めた総BPAは、平均で0.6ng/mL程度であった。

2. BPAの体内動態:低用量(50 μ g)及び高用量(1mg)のBPAを経口的に単回摂取し、摂取後の体内動態を調べた。

・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の曝露量を評価することが可能と考える。

・尿中への移行量に比べ、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BPA濃度は約0.3ng/mLであった(1mg経口摂取時)。

3. BPA分析法ガイドラインの検証:構築した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(RSD7%)

4. 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 μ g/dayレベルであり、2002年5月に示されたEUの暫定TDI(500 μ g/day)に比べ問題のないレベルと思われた。

5. 飼料、床敷中のBPA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曝露量を評価する分析法を構築した。本法を用いて飼料等を分析した結果、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17.4ng/日(一日の飼料摂取量を6gとした時)、ラットでは72.5ng/日(一日の飼料摂取量を25g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。

6. 飼料中の植物エストロゲン分析法の構築: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 μ 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 μ g/日(一日の飼料摂取量を6gとした時)、ラットでは14,225 μ g/日(一日の飼料摂取量を25g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曝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 μ g/g)されなかった。

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: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機関の結果を一覧で示す。その結果、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。内標準法を採択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-d₈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。

1-④ 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。

1-⑤ 実験動物用飼料中の17β-エストラジオール分析:

1: 実験動物用飼料に含まれるE₂の定量法を開発した。

2: 実験動物用飼料20点(15品目)についてE₂含有量を測定したところ1点に0.52±0.03ppbのE₂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: ガイドラインに則した生体試料ぶんせきをしたが、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。

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: 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。また、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の発現の役割が環境ホルモンの代謝動態にとって重要であることが分かった。さらに、新たに確立した胎盤灌流システムにより、従来通過すると考えられていた脂溶性で低分子の化学物質でもグルクロン酸抱合されると母親側に戻されることを明らかにした。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。この結果は、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与する遺伝子の解明: 主な成果は下記の通りである。

1. 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. Brock, S. Graiser, J. Nguyen, H. Nakazawa and T. Makino. Determination of trace amounts of Bisphenol A in Urine by Negative-Ion Chemical-Ionization-Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Analytical Science*, 19, 151(2003)

3) T. Tsukioka, J. Terasawa, S. Sato, Y. Hanaoka, T. Makino and 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)
- 4) M. Horie, H. Takegami, S. Tanno, K. Inoue, H. Nakazawa, S. Izumi, T. Makino. Determination of nonylphenol and octylphenol in serum and urine by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry" *in submission*
- 5) K. Inoue, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa. Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection" *Analyst* 125, 1959-1961 (2000)
- 6) K. Inoue, S. Kondo, Y. Yoshie, K. Kato, Y. Yoshimura, M. Horie, H. Nakazawa. Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for food-wrapping into food simulants and foods." *Food Additives & Contaminants* 18, 157-164 (2001)
- 7) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, N. Takai, Y. Yoshimura, M. Horie, S. Izumi, T. Makino and H. Nakazawa. Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry" *Analytica Chimica Acta* 486, 41-50 (2003)
- 8) Matsumoto, J., Yokota, H., and Yuasa, A. Developmental Increase in Rat Hepatic Microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward Xenoestrogens and Decrease during Pregnancy. *Environ Health Perspect* 110(2), 193-196 (2002)
- 9) Yokota, H., Miyashita, N. and Yuasa, A. High Glucuronidation Activity of Environmental Estrogens in the Carp, *Cyprinus carpio* Intestine. *Life Science* 71(8), 887-898 (2002)
- 10) Yamashiki, N., Yokota, H., Sakamoto, M. and Yuasa, A. Presence of Phenol UDP-glucuronosyltransferase in Bovine Alveolar Macrophages and Bronchial Epithelial Cells. *Toxicology* 176(3), 221-227 (2002)
- 11) Yokota, H., Kunimasa, Y., Shimoyama, Y., Kobayashi, T., Matsumoto, J. and Yuasa, A. Tissue Specific Effects on UDP-glucuronosyltransferase in Hypophysectomized Rat. *J. Biochem* 132(2), 265-270 (2002)
- 12) Sakamoto, H., Yokota, H., Kibe, R., Sayama, Y. and Yuasa, A. Excretion of Bisphenol A-glucuronide into the Small Intestine and Deconjugation in the Cecum of the Rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1573, 171-176 (2002)
- 13) Shibata, N., Matsumoto, J., Nakada, K., Yuasa, A. and Yokota, H. Male Specific Suppression of Hepatic Microsomal UDP-glucuronosyltransferase Activities toward Sex Hormones in the Adult Male Rat Administered Bisphenol A. *Biochem. J.* 368, 783-788 (2002)
- 14) Daidoji T, Inoue H, Kato S, and Yokota H. Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metab Dispos.* 31, 993-998 (2003)
- 15) Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H. and Kato S. Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine. *Drug Metab. Dispos.* 31, 140-144 (2003)
- 16) Narukawa J., Inoue H., Kato S., Yokota H. Glucuronidation of 1-naphthol and excretion into the vein in perfused rat kidney. *Drug Metab. Dispos.* 32, 758-761 (2004)
- 17) Kibe R, Sakamoto M, Hayashi H, Yokota H, Benno Y. 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)
- 18) Ito, H., Yokota, H., Wang, R., Yamanoshita, O., Ichihara, G., Wang, H., Kurata, Y., Takagi, K. and Nakajima, T. 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) 堀江正一, 吉田栄充, 中澤裕之, 牧野恒久, LC-MS による魚肉中ノニルフェノール, オクチルフェノールの分析, 第 83 回日本食品衛生学会 (東京) 平成 14 年 5 月

4) 堀江正一, 戸谷和男, 竹上晴美, 食品中ノニルフェノール, オクチルフェノールの分析法と実態調査, 第 39 回全国衛生化学技術協議会 (山形) 平成 14 年 10 月

5) 月岡 忠, John Brock, Sam Graiser, Johnny Nguen, 中澤裕之, 牧野恒久, NCI-GC/MS-SIM による生体試料中のオクチルフェノール, ノニルフェノール及び BPA の定量, 第 10 回環境化学討論会, 平成 13 年 5 月

6) 日本薬学会第 124 年会；「動物実験環境下における各種試料中のノニルフェノール分析法」(2004)；藤巻照久, 平山クニ (神奈川衛研), 瀬下文恵, 伊藤里恵, 井之上浩一, 中澤裕之 (星薬大), 牧野恒久 (東海大医学部)

7) 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)

8) 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)

9) Tomikawa, J., Yan, J., Ohgane, J., Hattori, J., Makino, T., Tanaka, S. and Shiota, K. Effect of benzo(a)pyrene on placentation. Society for the Study of Reproduction 35th Annual Meeting (2002 年 7 月)

10) 松本順也, 井上博紀, 山舗直子, 湯浅亮, 横田博「ラット子宮に存在する内分泌攪乱化学物質抱合 UDP-glucuronosyltransferase の役割について」第 5 回環境ホルモン学会 (2002 年 11 月)

11) 井上博紀, 福島裕介, 工藤聡子, 横田博, 翁長武紀, 加藤精雄「雌ラット肝におけるビスフェノール A 動態の解明」第 5 回環境ホルモン学会 (2002 年 11 月)

12) 佐々木聖史, 結城豪, 井上博紀, 横田博, 翁長武紀, 加藤精雄「ラット肝および町に置け

るビスフェノール A 動態の系統差」第 5 回環境ホルモン学会 (2002 年 11 月)

13) 大江洋正, 大道寺智, 井上博紀, 横田博, 成川淳一, 翁長武紀, 加藤精雄「ラット精巣灌流法を用いた内分泌攪乱化学物質および植物エストロジェンの動態評価」第 5 回環境ホルモン学会 (2002 年 11 月)

14) 大道寺智・中出圭介・牛頭圭介・横田博；UDP - glucuronosyltransferase isoforms (UGT1A6 and UGT2B1) glucuronidation alkylphenols；第 76 回日本生化学会 (2003 年 10 月)

15) 大道寺智・中出圭介・野村幸子・横田博；ビスフェノール A ・DES ・ノニルフェノール・オクチルフェノール・PCBs 水酸化体の代謝動態とグルクロン酸抱合酵素分子種；第 6 回日本環境ホルモン学会 (2003 年 12 月)

16) 宮庄拓・渡辺剛幸・芝崎道広・横田博海産魚類の肝臓における薬物代謝酵素 (CYP, UGT, GST) 活性および Co-PCBs 暴露による影響；第 6 回日本環境ホルモン学会 (2003 年 12 月)

17) 松本順也・井上博紀・山舗直子・横田博；ビスフェノール A グルクロン酸抱合酵素ラット子宮上皮細胞内発現と役割；第 6 回日本環境ホルモン学会 (2003 年 12 月)

18) 大道寺智・牛頭圭介・横田博；ラットにおける PCB 水酸化体グルクロン酸抱合活性の臓器特異性と酵素分子種について；第 6 回日本環境ホルモン学会 (2003 年 12 月)

19) 五島朋子・富川順子・服部中・田中智・塩田邦郎 (東京大学)；「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

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
	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 誉友	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

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/m³、DBPが261-357 ng/m³ 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」に記載予定である。

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^{1, 2)}。

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、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」に記載予定である。

B. 研究方法

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 $4 \mu\text{g/mL}$ 、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°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°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

試験溶液の調製法の概要を、図1に示した。血清1g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 μ 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

試験溶液の調製法の概要を、図2に示した。乳鉢中で粉末状にした動物飼料5g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 μ 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

試験溶液の調製法の概要を、図3に示した。床敷き2.5g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 μ 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 μ 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 μ 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 μ m)

カラム温度:80°C (3分) →20°C/分→240°C→10°C/分→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℃
試料注入法：パルスドスプリットレス
四重極温度：150℃
イオン源温度：230℃
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. 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℃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

試験溶液の調製は、図 1 に従い行った。すなわち、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。

空試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表 2 に示した。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を表 3 に示した。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。

添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率を表 4 に示した。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、別添 1 に示す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

試験溶液の調製は、図 2 に従い行った。使用した試料量 (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。空試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表 5 に示した。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。ブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表 6 に示した。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。

添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率を表 7 に示した。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結果を表 8 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。

以上の結果を基に、別添 2 に示す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

試験溶液の調製は、図 3 に従い行った。すなわち、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。空試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表 9 に示した。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。ブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量を表 10 に示した。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。

添加試験におけるフタル酸エステル類の回収率を表 11 に示した。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 (表 1)。

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結果を表 12 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。

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結果を表 13 に示した。空气中 (n=4) からは、DBP (平均値 316 ng/m³、範囲 261-357 ng/m³) 及び DEHP (平均値 30.8 ng/m³、範囲 27.6-32.1 ng/m³) が検出された。総量の平均値は 347 ng/m³ で、範囲は 293-388 ng/m³ 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、文献調査を行った結果を表 14 に示した⁴⁻¹⁹⁾。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⁵⁾ 及び Silva ら⁸⁾ の方法を図 4 に示した。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、図 5 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、ガイドライン案の提案は見送ることとした。

D. 考察

フタル酸エステル類、ビスフェノール A、アルキルフェノール類は、高分子素材由来の化学物質として暴露量も多いと想定され、社会的にも注目される化学物質である。そのリスク評価を実施するには、生体影響評価に加えて、ヒト暴露量の評価が必要である。

この目的のためには、ヒト生体試料の信頼性の高い高感度測定法の構築や、サンプリング及び保存方法の基礎的検討が要求されている。しかし、これら化学物質の微量分析を実施するにあたっての共通の課題は、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 (コンタミネーション) が懸念され、分析値に影響を及ぼすことが危惧されることである。

そこで今回我々は、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するとともに、分析ガイドラインを作成した。本研究班の分担研究機関である東海大学医学部産婦人科で母体血等を採取し、外部機関において本ガイドラインに従い分析した結果、汚染による異常値は認められないことが報告されている（平成 16 年度厚生労働科学研究「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」第 2 回班会議資料）。従って、本ガイドラインに従って測定され得られるデータは信頼性が高く、子宮内膜症等の婦人科領域における疾患発症に関する疫学的検討に使用可能と考えられた。

一方、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）における化学物質曝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曝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曝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、基礎曝露量を正確に把握することが必要と考えられた。

なお、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. 分析操作過程における汚染を低減化し、生

体試料（血清）中のフタル酸エステル類を高い精度で分析する方法を開発した。さらに、外部機関を含めた 3 機関でクロスチェックを実施した結果、概ね良好な回収率と相対標準偏差が得られた。以上の結果を基に、生体試料中のフタル酸エステル類分析ガイドラインを作成した。

2. 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、市販の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曝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曝露影響を考慮する必要があると考えられた。

3. 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, 猪飼啓友, 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, G. W. Lucier, R. J. Jackson, J. W. Brock, Environmental Health Perspectives, 108, 972-982, 2000.
- (5) B. C. Blount, K. E. Milgram, M. J. Silva, N. A. Malek, J. A. Reidy, L. L. Needham, J. W. Brock, Anal. Chem., 72, 4127-4134, 2000.
- (6) J. A. Hoppin, J. W. Brock, B. J. Davis, D. D. Baird, Environmental Health Perspectives, 110, 515-518, 2002.
- (7) K. Kato, M. J. Silva, J. W. Brock, J. A.

- Reidy, N. A. Malek, C. C. Hodge, H. Nakazawa, L. L. Needham, D. B. Barr, *Journal of Analytical Toxicology*, 27, 284-289, 2003.
- (8) M. J. Silva, N. A. Malek, C. C. Hodge, J. A. Reidy, K. Kato, D. B. Barr, L. L. Needham, J. W. Brock, *Journal of Chromatography B*, 789, 393-404, 2003.
- (9) M. J. Silva, D. B. Barr, J. A. Reidy, K. Kato, N. A. Malek, C. C. Hodge, D. Hurtz III, A. M. Calafat, L. L. Needham, J. W. Brock, *Arch. Toxicol.*, 77, 561-567, 2003.
- (10) M. J. Silva, D. B. Barr, J. A. Reidy, N. A. Malek, C. C. Hodge, S. P. Caudill, J. W. Brock, L. L. Needham, A. M. Calafat, *Environmental Health Perspectives*, 112, 331-338, 2004.
- (11) K. Kato, M. J. Silva, J. A. Reidy, D. Hurtz III, N. A. Malek, L. L. Needham, H. Nakazawa, D. B. Barr, A. M. Calafat, *Environmental Health Perspectives*, 112, 327-330, 2004.
- (12) H. A. A. M. Dirven, P. H. H. van den Broek, F. J. Jongeneelen, *Occupational and Environmental Health*, 64, 555-560, 1993.
- (13) I. Colon. J.-M. D. Dimandja, *Anal. Bioanal. Chem.*, 380, 275-283, 2004.
- (14) W. A. C. Anderson, K. A. Barnes, L. Castle, A. P. Damant, M. J. Scotter, *Analyst*, 127, 1193-1197, 2002.
- (15) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, 527-533, 2003.
- (16) I. Paris, F. Ruggieri, P. Mazzeo, G. Carlucci, *ANALYTICAL LETTERS*, 36, 2649-2658, 2003.
- (17) G. Latini, C. D. Felice, G. Presta, A. D. Vecchio, I. Paris, F. Ruggieri, P. Mazzeo, *Environmental Health Perspectives*, 111, 1783-1785, 2003.
- (18) H. M. Koch, L. M. G. -R, J. Angerer, *Journal of Chromatography B*, 784, 169-182, 2003.
- (19) H. M. Koch, B. Rossbach, H. Drexler, J. Angerer, *Environmental Research*, 93, 177-185, 2003.

G. 健康危険情報

なし

H. 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. 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）

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

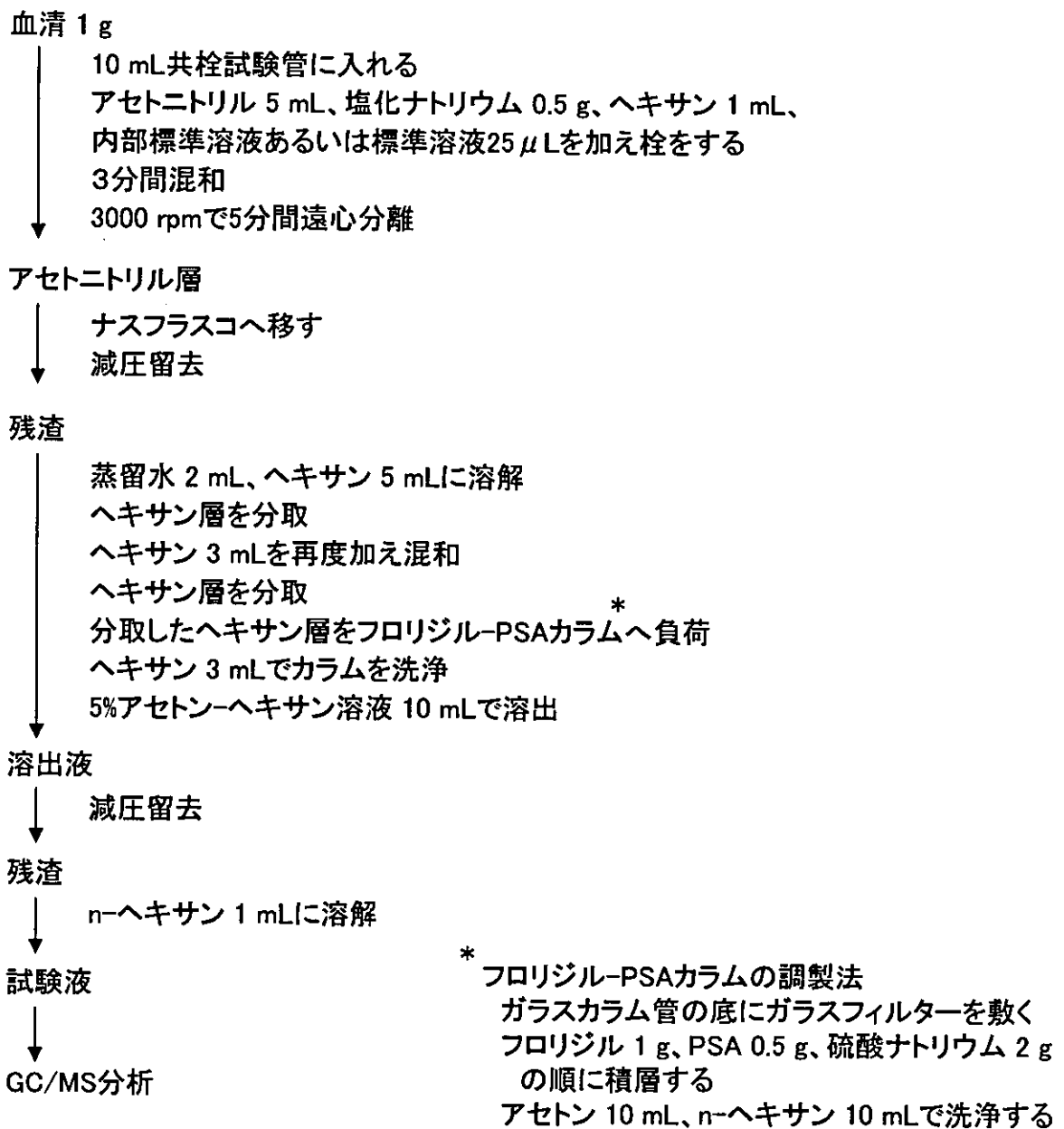


図1 血清中のフタル酸エステル類の分析法