

しかし、実際には、環境化学物質や薬物感受性を決定付ける遺伝子要素の数はあまりに膨大である。P450 はもちろん、GST（グルタチオン抱合酵素）や UGT（グルクロン酸抱合酵素）、硫酸抱合酵素などの数々の第 2 相抱合酵素群、MDR（P 糖タンパク）をはじめとする種々のトランスポーター、それらの発現を調節する転写因子群、そして転写因子の結合サイト等々、薬物代謝に関与する遺伝子群の多型は、膨大な数に上っている。実際、これまでに日本人で既に 4000 以上の薬物代謝関連遺伝子の SNPs が報告されている。アンブリチップ CYP450 のような既存のマイクロアレイ遺伝子解析ツールでは、「薬物動態」の多型をカバーしきれず、他の遺伝子解析ツールと同様に、単なる 1-2 遺伝子の SNP アレル解析しか行えない。

一方、Affimetrix 社が網羅的解析用に販売する SNP chip は Human Genome のマッピングを可能にしており、SNP コンソーシアムのデータベース上の 11500 個の SNP の解析を可能にしている。しかし、この chip の目的はあくまでマッピングであり、実際に特定の SNP 解析を行うことはできず、高額なスキャナーを必要とするほか、chip1 枚 6 万円と高価格で、実際の臨床場で使用することは難しい。

そこで、本研究では、P450 を始めとする薬物代謝酵素群とその制御機構に存在する遺伝多形について、安価かつ簡便な新規 SNPs 解析方法の開発を試みた。

B. 研究方法

SNP 解析のためには、現在ゲノムプロジェクトにも用いられている Invader 法（CFLP：Cleavase Fragment Length Polymorphism の応用）の他、LC-MS やシーケンス解析、電気的に SNPs を検出する Electrochemical DNA array（ECA chip）、SSCP（single-strand conformational polymorphism）、DGGE（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis）、TGGE（Temperature Gradient Gel

Electrophoresis）、Restriction fragment length polymorphism（RFLP）、Taqman assay、Protein truncation test（PTT）、Ribonuclease S1 nuclease、MutY や MutS を用いた方法、ALBUM（Aldehyde-Linker-Based-Ulttrasensitive-Mismatch Scanning）法などが行われている。開発中の方法としては、アフィニティーキャピラリー電気泳動マイクロチップや金コロイドなどナノ粒子の凝集を用いた方法が挙げられる。また、既に、一昨年よりイムノクロマトグラフィーを利用した SNPs 解析方法も開発された。

我々は、膨大な遺伝情報が必要な SNP 解析には、一度に多くの情報を得ることを特徴とするマイクロアレイ法が最も適していると考えた。ピオチンラベル化した PCR product をアビジン-HRP（horseradish peroxidase）で検出することで、サーマルサイクラー以外の特殊な機械を必要とせず、TMB（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine）発色によって変異アレルを検出することを目的とした。また、マイクロアレイ法の利点である「一度に多数」の遺伝子について調べることができる。Multiplex 法を用いた PCR の簡略化によって、PCR-RFLP 法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができる可能性がある。

そこで、我々は、試験版として P450 を中心とした薬物代謝関連遺伝子の SNP グラスアレイを開発した。膨大な SNP の中でも、(1) cSNP（coding SNP）や rSNP（regulatory SNP）のように function に実際に関わっている SNP であること、(2) 日本人に多い多型であること、(3) 特に変異原物質などを代謝する酵素群に焦点を絞ること、を条件に薬物代謝酵素関連遺伝子のアレルから数十種の遺伝子の選定を行った。P450 は CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調節因子として、GSTM1、GSTP1、NAT2（N アセチルトランスフェラーゼ）、AhR（arylhydrocarbon receptor）、PPAR

(peroxisome proliferators activated receptors) の 11 遺伝子、の 32 アレルをリストアップした。

（倫理面への配慮）

動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。また、遺伝子解析に関する本研究は、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。

C. 研究成果

マイクロアレイ法による判定では、PCR の正確性やハイブリダイゼーション上の都合から、極端に大きな PCR 産物（数 10kbp など）を用いた実験は難しいことがわかった。また、CYP2D6 deletion、GST null などの deletion は、数イントロン、エクソンにまたがる繰り返し配列が原因で起こっていると考えられる為、各アレルに特異的な PCR 産物の作成が難しかった。そこで、これらのアレルを除いた遺伝子について wild、変異アレルの DNA を合成してスライドガラスにスポットティングし、マイクロアレイを作成した。

Primer は PCR 産物が数 100bp 以内になるように設計し、multiplex PCR を 3 回に分けて行った。得られた PCR 産物は、混合してスライドガラス上のオリゴ DNA にハイブリダイズし、ペルオキシダーゼによって発色させ、アレルの判定を行った。変異検出には、ゲノム PCR 産物のハイブリ後の発色で、スキャナーなどの光学機器を必要とせず、目視判定が可能であった。

ヒト血液 20-50ul より各々 genomeDNA を抽

出し、SNPs を検出することができた。約 50 名の genome を用いて再現性や検出感度を確認したところ、CYP1B1*3、CYP2C19*3、GSTP1、AhR については、確実な多型の検出が可能であった。CYP1A2、NAT2 は非常に弱いシグナルが得られた。CYP2D6、PPAR、CYP2A6 については、安定した結果が得られなかった。

さらに、血液よりも非浸襲的なサンプルである毛髪や眉毛、爪からのゲノム抽出を行ったところ、それらの PCR 産物が chip を用いた遺伝多型の判定に利用できる可能性が考えられた。DNA の増幅は 1 本の毛髪あるいは眉毛でも十分可能であった。

D. 考 察

現在、人薬物代謝関連遺伝子の SNPs は日本人で 4000 ほど報告されている。これらを簡便な方法で全て検出することは難しく、また肉眼判定可能なツールでは少数の遺伝子アレルに関する解析に限定される。従って、今後、chip による SNPs 解析ツールは、high density と low density の二極化が必要であると考えられる。

今回、ピオチンラベルした PCR 産物のアレイ上オリゴへのハイブリダイゼーションによって SNPs を検出する方法をとった。しかし、一塩基の違いではハイブリダイゼーションの効率を変えることは難しいとも言われており、本研究でも、疑陽性のスポットが検出された。従って、今後は、chip 上での DNA extension 法を利用するなど、より SNPs 配列に特異性の高い方法の開発が必要と思われる。

現在、国内 SNPs 解析の major な手法となっている Invader 法を chip 上で行う方法が理化学研究所を中心に開発されつつある。また、chip 法の中で major になりつつあるのは Arrayed primer extension (APEX) 法である。この方法では、chip 上のオリゴ DNA primer にハイブリした DNA サンプルの 1 塩基 extension を検出するため、蛍光や発光など感度の高い検出方法が要求される。このため、ポリメラーゼによる伸長反応

で生成されるピロリン酸を ATP に変換し、luciferase を用いることで、ルシフェリンなどの高感度検出を実現しているが、スキャンには特殊な機器が必要である。一方、on chip で塩基を extension させる Sifted termination assay (STA)法に、今回用いた検出方法である HRP 発色法を組み合わせることで、APEX 法よりも感受性を高め、特殊なスキャナー機器を必要としない方法が開発可能であると考えられた。

また、今回の結果から、血液採取よりもより非侵襲的で安全なサンプルである毛髪を用いた chip による判定方法も可能であると考えられた。

E. 結 論

ヒト CYP の SNPs 解析において、マイクロアレイ解析法は、従来の方法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができた。しかし、より特異性を高めるために、on chip の塩基の extension など、今後新たな方法との組み合わせが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Muzandu, K., Shaban, Z., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Possible involvement of peroxynitrite in estrogen-induced oxidative stress. *Free Radical Research*. (In press)

Shaban, Z., Soliman, M., El-shazly, S., El-bohi, K., Abdelazeez, A., Kehelo, K., Kim, H., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. AhR and PPAR α Antagonistic effects on CYP2B and CYP3A and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica*. (In press)

Nikaidou, S., Ishizuka, M., Maeda, Y., Hara, T.,

Kazusaka, A., Fujita, S. Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens. *J Vet Med Sci*. (In press)

Shaban, Z., El-Shazly, S., Abdelhady, S., Fattouh, I., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kimura, K., Kazusaka, A., Fujita, S. Down regulation of hepatic PPAR α function by AhR ligand. *J Vet Med Sci*. 66(11):1377-86 (2004)

Sakamoto, K.Q., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Iodine intake as a possible cause of discontinuous decline in sperm counts: a re-evaluation of historical and geographic variation in semen quality. *Jpn J Vet Res*. 52(2):85-94. (2004).

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci*. 66(9):1119-24 (2004).

Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats. *Drug Metab Dispos*. 32(9):959-65 (2004).

Shaban Z, El-Shazly S, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S. PPAR α -dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibric acid in rats. *Arch Toxicol*. 78(9):496-507 (2004).

Saito K, Kim HS, Sakai N, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rats. *J Pharm Sci.* 93(5):1271-8 (2004)

PERSISTENT ORGANOCHLORINE POLLUTANTS AND POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER AND THEIR EFFECT. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

2. 学会発表

Shaban, Z, El-Shazly, S, 石塚真由美, 数坂昭夫, 藤田正一, Ah 受容体リガンドによる PPAR α 機能の抑制, 環境ホルモン学会(2004)

石塚真由美, 高菅卓三, 谷川力, 数坂昭夫, 藤田正一, 野生ドブネズミに蓄積する環境汚染物質と生体影響の genomics 解析, 環境ホルモン学会(2004)

藤田正一, 石塚真由美, 高菅卓三, 谷川力, 千葉一成, 佐治尚介, 坂本健太郎, 数坂昭夫, 日本の野生生物における内分泌攪乱と環境汚染, 環境ホルモン学会(2004)

K.M. Muzandu, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PEROXYNITRITE IN ESTROGEN-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND PROTECTIVE ROLE OF CAROTENOIDS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

H-S. Kim, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE SUPPRESSES TAMOXIFEN-INDUCED APOPTOSIS IN PITUITARY GH3 CELLS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

M. Ishizuka, T. Takasuga, T. Tanikwa, S. Fujita. SUPPRESSION OF TESTOSTERONE SYNTHESIS IN TESTES OF WILD NORWAY RATS IN JAPAN: ACCUMULATION OF

内分泌かく乱化学物質のヒト暴露評価 —新規高感度分析手法の構築—

主任研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野
分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 吉村 吉博、井之上浩一、川口 研 星薬科大学薬品分析化学教室

研究要旨

前向きコホート研究に関するヒト生体影響評価を行う際、生体試料からの分析を前提とした採取法や測定法を構築する上での基礎的検討を実施した。具体的な分析手法としては、液体クロマトグラフ/質量分析法及びガスクロマトグラフ/質量分析法を駆使し、前処理の簡略化による高感度分析手法の基礎的な検討を実施した。また、採取器具からの汚染を確認するため、血液採取管からの溶出試験も実施した。

A. 研究目的

前向きコホート研究による先天性異常と内分泌かく乱化学物質などの環境汚染物質との関わりについては、多くの関心が寄せられている。その一方で、有機塩素系化学物質に関しては、様々な報告があるが、近年問題視される内分泌かく乱化学物質の関連性に関しては、詳細な報告は少ない。

前向きコホート研究においては、要因ばく露群と要因非ばく露群（対照群）を分け、寄与危険度や相対危険度などを算出することが可能となる。その算出には、要因一対象研究にある発症疾患の追求と要因ばく露群を求めなければならない。

本分担研究では、後者とされる要因暴露の算出することを目的とする。ここで言う要因とは、内分泌かく乱化学物質に代表される環境汚染物質のヒト汚染状況を把握することである。

従来までの環境汚染化学物質の分析としては、ppm (parts per million)でのレベルによる精度が要求されていた。しかし、内分泌かく乱化学物質では低用量作用が危惧されており、ppb(parts per billion)レベル以下での分析が要求され、従来の分析手法では困難であった。そこで、高感度かつ高精度な分析手法が望まれるようになり、多くの手法が検討されるようになった。

生体試料を対象とした分析では、サンプル量が少ないため、前処理での工夫が必要とされ、様々

な検討が実施されている。本分担研究では、少量の生体試料から可能な限り多くの化学物質を同時分析して出来る限り多くの情報を取得することを目的に液体クロマトグラフ/質量分析法（LC/MS）及びガスクロマトグラフ/質量分析法（GC/MS）を応用して、新規分析手法の構築を目的とした。

B. 研究方法

B.1. LC/MS 法による分析手法の構築 測定用装置

液体クロマトグラフ/質量分析法 装置 (LC/MS) [Agilent Technologies 社製 Agilent LC/MSD Superior Line], HPLC 用ポンプ: 島津社製 LC-10ADvp

LC 用カラム: 関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (L) (150 x 2.0 mm, 5 μ m)

LC 用ガードカラム: 関東化学社製 Mightysil RP-18 GP (5 x 2.0 mm, 5 μ m)

前処理用カラム: Waters 社製 OASIS-HLB extraction column (20 x 2.1 mm, 25 μ m),

GL Sciences 社製 Bioptic AV-2 extraction column (50 x 4.6 mm, 5 μ m), TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S. (4.6 x 10 mm)

試薬

アセトニトリル：和光純薬社製 HPLC 用

メタノール：和光純薬社製 HPLC 用

酢酸：和光純薬社製 特級

精製水：Millipore 社製 EDS polisher 付 Milli-Q gradient A 10 で精製

アセトン：溶解液及び洗浄液として，関東化学社製（フタル酸エステル試験用）を使用した。

ヘキサン：洗浄液として，関東化学社製（フタル酸エステル試験用）を使用した。

B. 2. GC/MS 法による分析手法の構築

測定用装置・条件

ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS)

【Agilent Technologies 社製 Agilent 6890N GC/5973N】加熱脱着システム【Gerstel 社製 TDS2 thermodesorption system/TDS-A autosampler/CIS 4 PTV】

TDS conditions

Flow Mode: Splitless

Initial Temp.: 20 °C

Initial Time: 0.5 min

Transfer Temp.: 300 °C

Ramp Rate: 60 °C/min

Final Temp.: 200 °C

Final Time: 5.0 min

CIS conditions

Initial Temp.: -150°C

Initial Time: 0.5 min

Ramp Rate: 12.0 °C/s

Final Temp.: 300 °C

Final Time: 10.0 min

GC/MS conditions

Flow gas: Helium

Flow rate: 1.2 ml/min

Column: HP-5ms (0.25 mm X 30 m, 0.25 µm)

Oven Temp.: 60 °C - 10 °C/min - 280°C(5

min)

Ionization: EI (70eV)

SCAN (m/z): 40 ~ 700

試薬

アセトニトリル：和光純薬社製 残留農薬用

メタノール：和光純薬社製 残留農薬用

精製水：Millipore 社製 EDS polisher 付 Milli-Q gradient A 10 で精製

アセトン：溶解液及び洗浄液として，関東化学社製（フタル酸エステル試験用）を使用した。

n-ヘキサン：洗浄液として，関東化学社製（フタル酸エステル試験用）を使用した。

B. 3. 定量法

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，標準原液としてメタノールで 1.0 mg/ml とする。その後，各種濃度にメタノールを加え調製する。又，内標準物質を暫定濃度になるよう精製水で希釈する。

LC/MS-SIM もしくは GC/MS-SIM 法により，標準・試料溶液を測定し，内標準法により，ピーク面積を利用して，各濃度範囲内において，検量線を作成し，定量分析に用いた。

C. 研究結果

C. 1. LC/MS 法による分析条件の検討

環境省等における化学物質の環境汚染実態調査において，様々な残留状況を GC/MS 法を用いて測定・把握してきている。GC/MS 法は，多種類の化学物質を同時に高感度の測定ができ，微量の化学物質分析に優れている。しかしながら，GC/MS 法は難揮発性物質，熱不安定物質等の分析は困難とされ，誘導体化などの煩雑な操作が必要とされてきた。内分泌かく乱化学物質の代表されるフェノール性化学物質やイソフラボン類などもその代表的なものである。そこで，本研究では，そのように GC/MS 法では困難とされる化学物質を LC/MS 法により，迅速・簡便な測定を試みることにした。本年度は，方法論の構築を検討するため，基礎的なデータ取得に着手した。

LC/MS 法における問題点として、各種インターフェイスにおけるイオン化が達成できなければ測定が不可能ということにある。また、内標準法における補正を実施するため、ターゲット化合物の内標準物質の有無について、表 1 にまとめた。いずれもエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) において、イオン化が可能であった。つまり、LC の分離条件が達成できれば、測定できることが伺える¹³⁾。

また、本研究での化学物質暴露モニタリングに関しては、代謝を考慮しながら分析を実施する。具体的には、BPANP,OP では、グルクロン酸抱合体の存在を考慮する¹³⁾。また、可塑剤であるフタル酸エステル類のいずれもモノ体みのモニタリングを実施することとする⁵⁾。

少量の生体試料を対象とした場合、オンラインで直接前処理を実施し、ダイレクトに測定できることが望まれる。そこで、本研究において、カラムスイッチング-LC/MS法を応用することとした。具体的な概略図を図 1 に示す。その一例として、ヒト血液試料 (10 μ l) を用いて DEHP 及び MEHP の分析を試みた。その際のクロマトグラムを図 2 に示す⁴⁾。また、ヒト尿中の NP 及び OP の分析にも応用し、良好な結果を得ることができた (図 3)³⁾。本方法を用いて、難揮発性の内分泌かく乱化学物質の一斉分析を実施する。

C. 2. GC/MS 法による分析条件の検討

GC/MS 法は、従来から環境汚染物質のモニタリング評価に応用され、様々な報告がされている。分離能が高いため、一斉分析が容易であり、高感度検出も可能である。その一方で、環境試料のような多量得られる場合には、固相抽出法や液-液抽出法を利用して、濃縮後分析を行えるが、少量の生体試料では、本操作が困難であり、効率の良い抽出・濃縮法が望まれる。本研究では、液-液分配の理論を応用した Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)法を利用して、簡単な操作で、高感度、広範囲の化合物を分析することを目指し、基礎的検討を実施した。

具体的な操作過程としては、生体試料溶液 (希釈もしくは直接) 中に Twister を入れ、一定時間攪拌した後、TDS 加熱脱着システム/ GC/MSD システムで分析を行う。TDS システムは、バルブレス構造、不活性、高脱着流量 (>50 ml/min 以上) といった特徴をもった加熱脱着装置である。この TDS システムと Twister の特長を活用することによって、特異的な高感度測定を行うことができる。Gerstel 社製 Twister は、100%ポリジメチルシロキサン(PDMS)をコーティングさせた攪拌子 (1.5 cm) である。磁石をガラスでコーティングし、さらにこの表面を不活性化処理した後、厚さ 500 μ m、体積にして約 24 μ l の 100% PDMS をコーティングしてある。これは、SPME での液相量、0.5 μ l と比べると、約 50 倍に相当する。

実試料の測定として、ヒト血液中の NP 及び OP の添加回収実験を実施した。その結果を表 2 に示す。いずれも良好な結果を得ることができた。また、本方法を利用して、採血用器具【ベノジェット II 採血針 S(21G)、ベノジェット II ホルダー-S、ベノジェット II 真空採血管(VP-P100)] について、血液検体保存を行い、汚染状況の確認を実施した。GC/MS-SCAN のクロマトグラムを図 4 に示す。その結果、BHT の汚染が確認された。

D. 結 論

微量の生体試料から多種類の内分泌かく乱化学物質を一斉分析する際、最新の理化学的手法に加え、工夫を加えた前処理方法を組み合わせることにより、達成できる可能性を示唆することができた。本方法の精度管理を行うことにより、微量の試料から多くの内分泌かく乱化学物質の暴露状況を把握することができる。ヒト暴露評価を実施する際、代謝を十分に考慮する必要があるため、代謝酵素によるフリー体の測定などを行い、補正を行うことも考慮する。

E. 参考文献

- 1) K. Inoue, A. Yamaguchi, M. Wada, Y. Yoshimura, T. Makino and H. Nakazawa: Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma using liquid chromatography - electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 765, 121-126 (2001)
- 2) K. Inoue, M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura and H. Nakazawa: Application of liquid chromatography - mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *J. Chromatogr. B* 773, 97-102 (2002)
- 3) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, N. Takai, Y. Yoshimura, M. Horie, S. Izumi, T. Makino and H. Nakazawa: Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching LC/MS coupled with on-line extraction. *Anal. Chim. Acta* submitted
- 4) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura and H. Nakazawa: Column-switching high-performance liquid chromatography - electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 527-533 (2003)

F. 発表

特になし

表1 エレクトロスプレーイオン化法による各種イオン検出及び内標準補正物質

化合物名	略語	分子量	イオン化モード	検出イオン(m/z)	内標準物質
ビスフェノールA	BPA	228	Negative	$[M-H]^-$, 227	BPA- $^{13}C_{12}$
ノニルフェノール(mix)	NP	220	Negative	$[M-H]^-$, 219	4-(1-methyl) octylphenol- d_5
4-tert-オクチルフェノール	OP	206	Negative	$[M-H]^-$, 205	4-(1-methyl) octylphenol- d_5
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	DEHP	390	Positive	$[M+H]^+$, 391	DEHP- d_4
フタル酸モノ-2-エチルヘキシル	MEHP	278	Negative	$[M-H]^-$, 277	MEHP- d_4
フタル酸モノベンジル	MBzP	256	Negative	$[M-H]^-$, 255	MBzP- d_4
フタル酸モノブチル	MBP	222	Negative	$[M-H]^-$, 221	MBP- d_4
フタル酸モノエチル	MEP	194	Negative	$[M-H]^-$, 193	MEP- d_4

表2 SBSE-TDS-GC/MS 法による生体試料中の NP 及び OP の添加回収

Urine

	0.5 ng/ml (RSD %)	10 ng/ml (RSD %)
NP	98.5 (1.6 %)	99.8 (2.6 %)
OP	98.1 (1.5 %)	99.1 (3.9 %)

Serum

	0.5 ng/ml (RSD %)	10 ng/ml (RSD %)
NP	98.1 (2.5 %)	99.2 (3.2 %)
OP	95.8 (3.0 %)	96.5 (2.9 %)

(n=6)

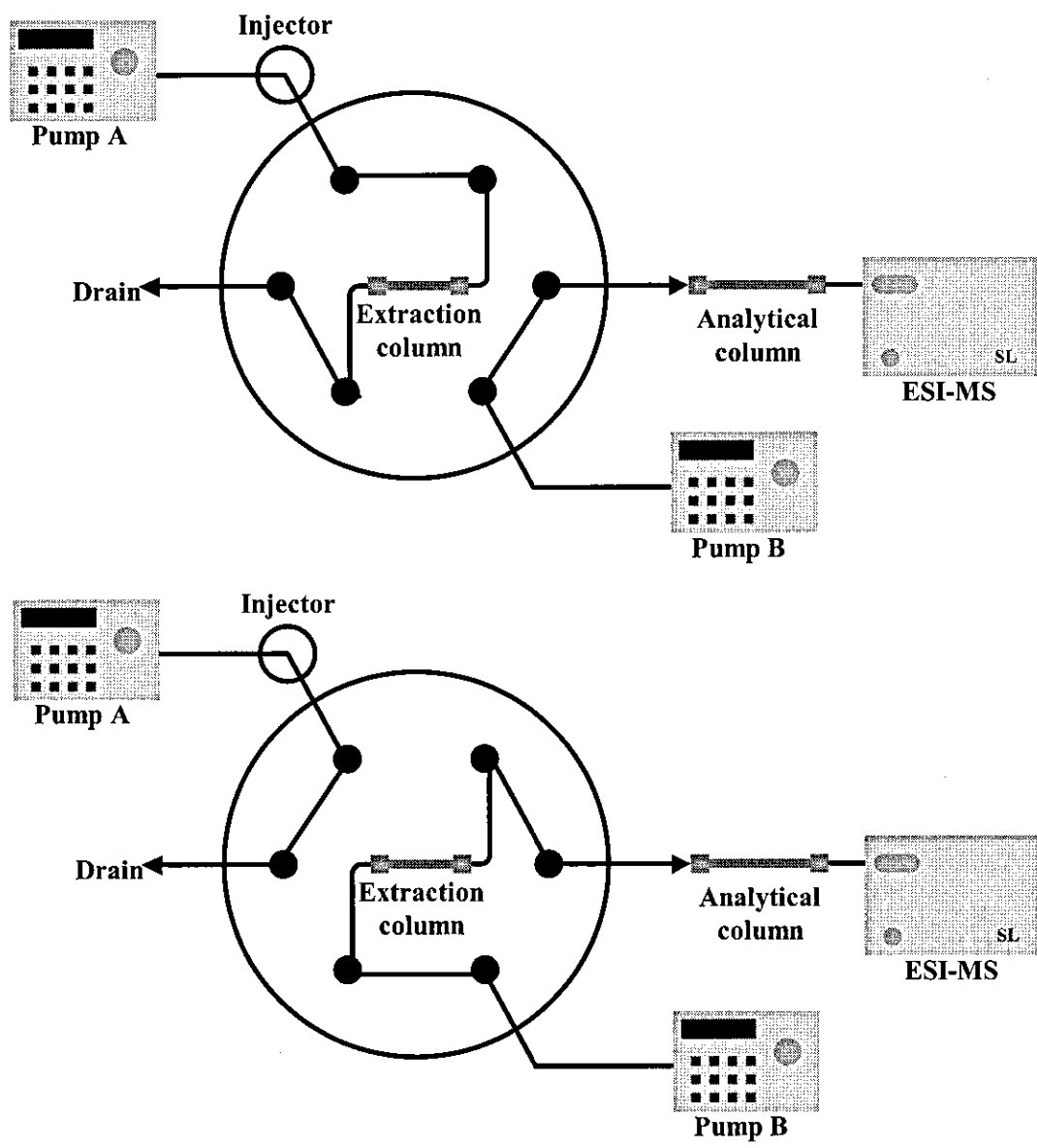


図1 カラムスイッチング-液体クロマトグラム/質量分析法の概略図

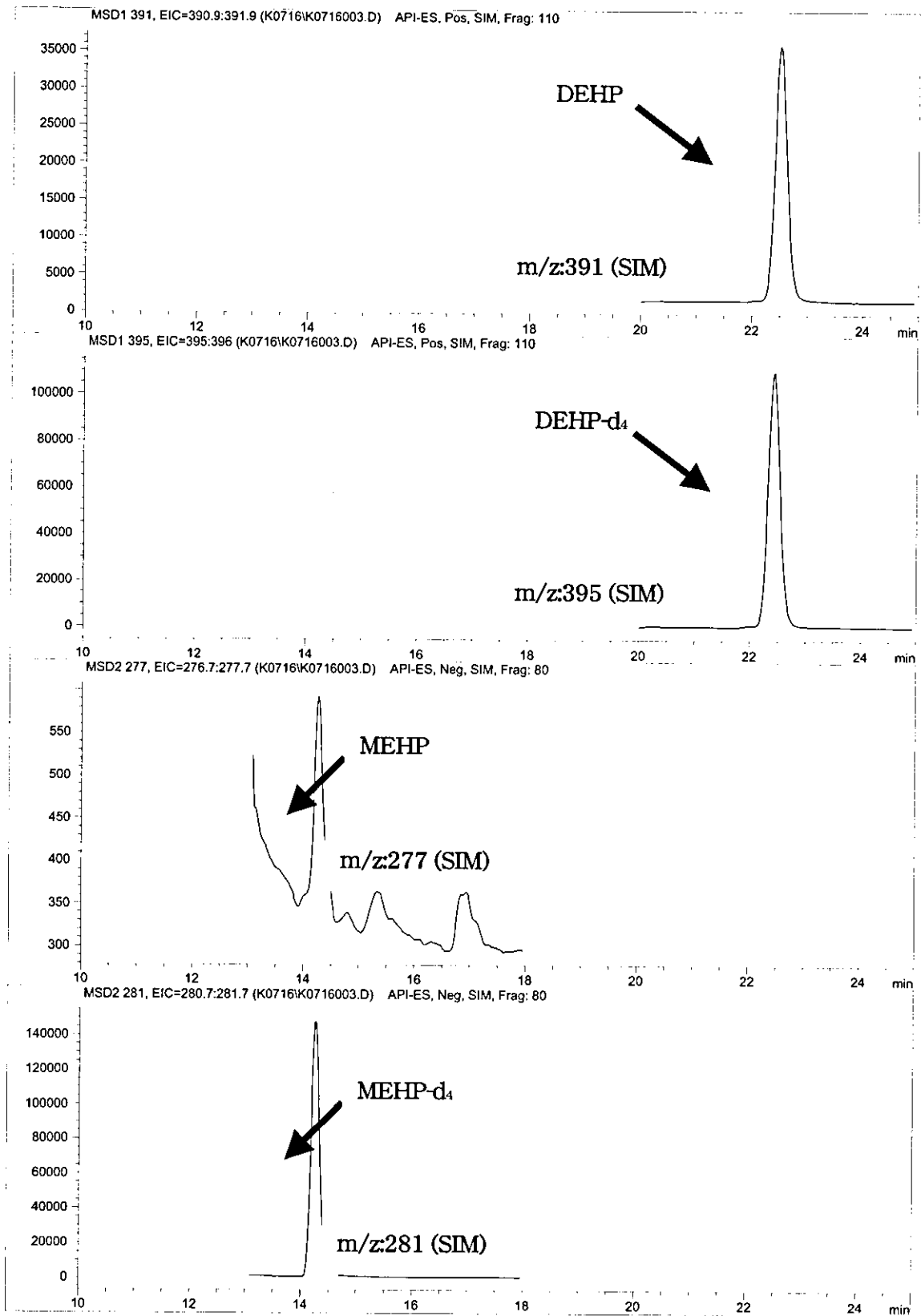


図2 カラムスイッチング-LC/MS 分析による DEHP 及び MEHP のクロマトグラム

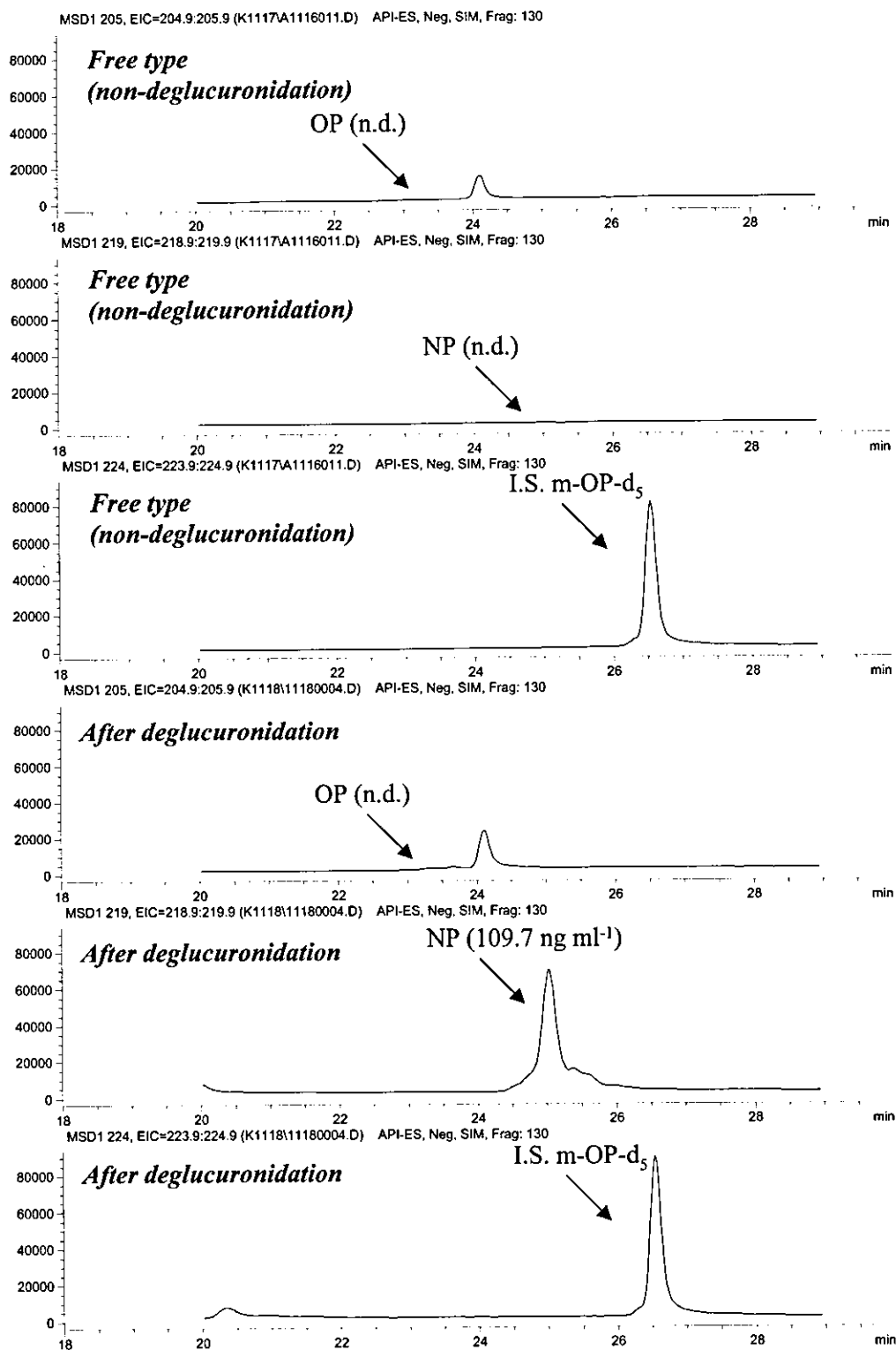


図3 カラムスイッチング-LC/MS分析によるNP及びOPのクロマトグラム

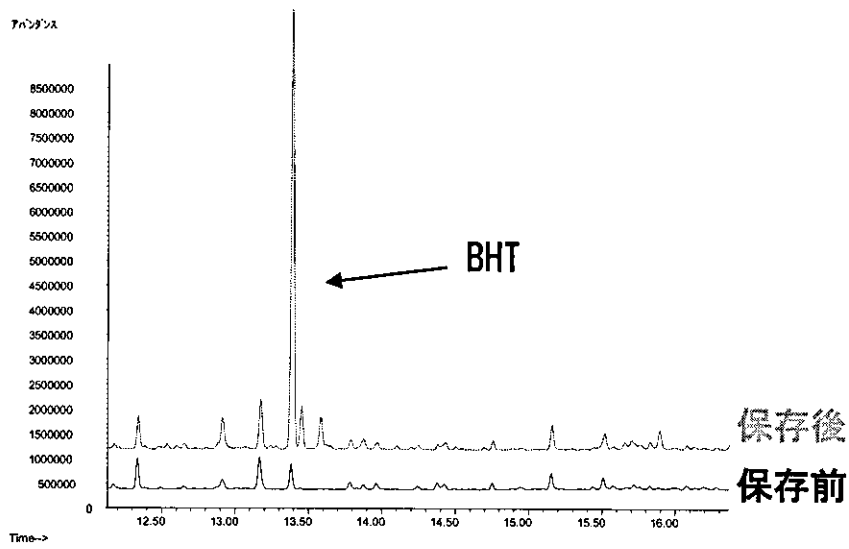


図4 SBSE-TDS-GC/MS-SCANによる採血用器具保存時の血液試料のクロマトグラム

ヒト生体試料からの内分泌かく乱化学物質の微量分析法の確立

主任研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室

研究協力者 斉藤 貢一、井之上浩一、伊藤 里恵、岡田 文雄、仲田 尚生

星薬科大学薬品分析化学教室

研究要旨

内分泌かく乱化学物質（ED）のヒト暴露モニタリング手法の基礎的検討を基盤として、有機フッ素系化合物に関する新たな分析法および暴露評価の構築を目指した。LC-MS法を用いるフッ素系化合物の微量分析法を構築し、ヒト母体血-臍帯血濃度分布を測定した結果、決定係数 $r^2=0.875$ を得ることができた。その結果、母体暴露推移と胎児への影響が懸念される。また、母体血における分析結果のみにおいて、胎児への影響も想定できることとなった。そこで、妊婦ボランティアより提供を受けた検体において、有機フッ素系化合物の分析を実施することとした。その結果、PFOSに関しては、すべての検体より検出され、今後疫学研究への発展に期待される。

A. 研究目的

近年、有機フッ素系化合物における世界的汚染の広がりにより、その環境モニタリングが精力的に実施されている。また、実験動物を用いた研究においても催奇形性や生理学的影響が報告されている。一方、ヒトに対する暴露モニタリングに関しても多くの発表がなされ、特に血液試料による分析結果が世界中で報告されるようになってきた。

現在、有機フッ素系化合物の製造販売は、一部の企業において全面的撤退を行うなどされているが、日本国内でのそのような対応は現在不明である。また、生体内での蓄積性も高く、早急な暴露モニタリングの必要性も謳われている。そこで、本研究では、次世代影響（特に先天異常）に主眼を置き、分析法の検討および評価法の確立を実施したので、報告する。

B. 研究方法

B.1. LC-MSによる分析法

試薬

PFOS (Perfluorooctane sulfonate) : 和光純薬社製

PFOA (Perfluorooctanoic acid) : Fluka 社製

PFOSA (Perfluorooctane sulfonamide) :
ABCR GmbH & Co.KG 社製

Internal Standard for PFOS, PFOA and
PFOSA (IS) Perfluorodecanoic acid :
Lancaster 社製

アセトニトリル : 和光純薬社製 HPLC用及び残留農薬用 300

メタノール : 和光純薬社製 HPLC用及び残留農薬用 300

酢酸アンモニウム : 和光純薬社製 特級

精製水 : Millipore 社製 EDS Polisher 付 Milli-Q
gradient A10 で精製

オンライン前処理 LC/MS法の測定概要

血液試料（血清・血漿）は内標準物質を添加したアセトニトリルで除タンパクし、遠心分離した上清をメンブランフィルターを通し、測定用試料とする。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する。

・モニタリングイオン (m/z): 499 (PFOS), 369 (PFOA), 498 (PFOSA), 469 (PFDA)

測定試料の調製法

-80 °Cで凍結保存してある血液試料を常温で解凍し、転倒混和を行った後、ピペッターで正確に300 μ lを量り取り、アシストチューブ(2 ml)に移す。同様に内標準物質(Prefluorodecanoic acid: PFDA)を添加したアセトニトリル溶液を300 μ l量り取り、ゆっくりと添加する。溶液をよく混ぜタンパク質を十分変性させた後、遠心分離(3000 rpm, 10分)で除タンパクを行う。遠心後の上清をパスツールピペットで取り、45 μ mのフィルターを通したものを測定試料とする。

標準試料の調製法

各標準品をメタノールに溶解させ、1.0 mg/mlの溶液を調製し、0.1~400 μ g/mlの範囲で標準溶液を水で適宜希釈して測定用試料を調製した。

測定条件

LC/MS条件 (機種: Agilent 1100 LC/MSD SL)

LC条件

- ・分析用カラム: GLサイエンス社製 Inertsil C₈ (2.1×100 mm, 5 μ m)
- ・前処理用カラム: OASIS-HLB (2.1×20 mm, 25 μ m)
- ・移動相: アセトニトリル+1.0 mM 酢酸アンモニウム/1.0 mM 酢酸アンモニウム溶液 (65:35→85:15 v/v, 5-15分)
- ・流速: 0.2 ml/min
- ・カラム温度: 40 °C
- ・注入量: 30 μ l

MS条件

- ・イオン化法: Electrospray (ESI), Negative
- ・Nebulizer gas: N₂ (35 psi)
- ・Drying gas: N₂ (12 L/min, 350 °C)
- ・フラグメンター電圧: 220 V (PFOS), 130 V (PFOA), 170 V (PFOSA), 130 V (PFDA)

【カラムスイッチングのプログラム】

min	
0-5	洗浄
5-15	負荷
15-20	測定
20-30	安定化

B. 2. LC-MS/MS法の測定条件の検討

試薬

PFOS (Perfluorooctane sulfonate): 和光純薬工業社製

PFOSA (Perfluorooctane sulfonamide): ABCR GmbH & Co.KG社製

PFOA (Perfluorooctanoic acid), PFNA (Perfluorononanoic acid): Fluka社製

PFDA (Perfluorodecanoic acid): Lancaster社製

Internal Standard(IS) PFHpA (Perfluoroheptanoic acid): Aldrich社製

アセトニトリル: 和光純薬工業社製 HPLC用及び残留農薬用300

メタノール: 和光純薬工業社製 HPLC用

酢酸アンモニウム: 和光純薬工業社製 特級

精製水: Millipore社製 EDS Polisher付 Milli-Q gradient A10で精製

B. 2. オンライン固相抽出LC-MS/MS法の測定概要

測定試料の調製法は、血液試料(血漿・血清)に内標準物質を含むアセトニトリル溶液を加えて除タンパクを行い、遠心分離(3000 rpm 10 min)した後、上清をメンブランフィルターに通した。抽出・精製・濃縮は、前報と同様にオンライン固相抽出用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LC分離部及び検出部(MS/MS)に導入する。検出には、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)のネガティブモードを採用した。

測定試料の調製法

-80℃で凍結保存してある血液試料を常温で解凍し、転倒混和を行った後、ピペッターで正確に100 μlを量り取り、アシストチューブ(2 ml)に移す。同様に内標準物質(Prefluoroheptanoic acid: PFHpA)を添加したアセトニトリル溶液を200 μl量り取りゆっくりと添加する。溶液をよく混ぜタンパク質を十分変性させた後、遠心分離(3000 rpm, 10分)で除タンパクを行う。遠心後の上清をパスツールピペットで取り、0.20 μmのメンブランフィルターを通したものを測定試料とする。

標準試料の調製法

各標準品をアセトニトリルに溶解させ、1.0 mg/mlの溶液を調製し、0.5~100 μg/mlの範囲で標準溶液を水で適宜希釈して測定用試料を調製した。

測定条件

MS/MS装置：Waters社製 Quattro micro API システム

LC装置：Waters社製アライアンス HPLC2795 システム

LC条件

- ・分析用カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-3 (2.1×50 mm, 5 μm)
- ・前処理用カラム：OASIS HLB (2.1×20 mm, 25 μm)
- ・移動相：アセトニトリル+1.0 mM 酢酸アンモニウム/1.0 mM 酢酸アンモニウム溶液 (45:55→85:15 v/v, 5-12分)
- ・流速：0.2 ml/min
- ・カラム温度：40℃
- ・注入量：30 μl

MS条件

- ・イオン化法：Electrospray (ESI), Negative
- ・Nebulizer gas：N₂ (35 psi)
- ・Drying gas：N₂ (12 L/min, 350℃)
- ・キャピラリー電圧：0.6 V
- ・モニタリングイオン (*m/z*)：499→80 (PFOS),

498→78 (PFOSA), 369→169 (PFOA), 419→169 (PFNA), 469→169 (PFDA), 319→169 (PFHpA)

【カラムスイッチングのプログラム】

min	
0-5	洗浄
5-10	負荷
10-14.5	測定

MS/MS装置：Waters社製 Quattro micro API システム

LC装置：Waters社製アライアンス HPLC2795 システム

カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-3 (2.1 x 50 mm, 5 μm)

測定条件：

移動相：0.1mM 酢酸アンモニウム水溶液/アセトニトリル

流速：0.2 ml/min

MS：ESI, Negative mode

C. 研究結果

C.1. 分析法の開発

従来法における有機フッ素系化合物の前処理には、イオンペアー(Tetrabutylammonium ion)を用いた抽出である¹⁾。しかし、多検体への応用は、困難であり、更なるスクリーニング分析が要求される。そこで、オンライン固相抽出法を採用することとした。その結果、LC-MS および LC-MS/MS に対して、良好なバリデーションが得られた (Table 1, 2)。

本法を応用して、母体血-臍帯血の分析を実施した。

C.2. 妊婦ボランティアの血液試料（母体血-臍帯血）中の有機フッ素化合物

15名の妊婦についてペアで採血された母体血と臍帯血について分析した結果、PFOSとの相関

性を検討したところ、 $r^2 = 0.8759$ となった。その他、新生児の性別、体重、甲状腺機能などとの関連性は見出せなかった。

C. 3. 妊婦ボランティア中の母体血中の有機フッ素系化合物

北海道大学医学部の倫理規定に基づいてサンプリングされた母体血、207 検体を構築した LC/MS/MS で分析した。有機フッ素系化合物 5 種類を測定した結果、母体血より、PFOS 及び PFOA が高頻度で検出された。それぞれの化合物の検出率は、100%(PFOS)、88%(PFOA)であり、検出濃度範囲は 2.8~16.2ppb(PFOS)、N.D~4.8ppb(PFOA)であった。

D. 結 論

近年における PFOS のヒト血液中濃度としては、米国で 30 ppb 前後、Poland では 30-50 ppb と報告され、日本では 10 ppb 前後と比較的低いレベルと考えられている²⁾。また、地域によるヒト暴露濃度もあることが報告されている³⁾。また、食事との関連性についても発表され、暴露要因からのアプローチも議論されるようになってきた⁴⁾。

そこで、次世代影響の観点から、母体血および臍帯血の分析を実施した。その結果、胎盤への通過率は、約 10%弱となった。また、その相関性も $r^2=0.87$ となり、母体との暴露と胎児への影響の関連性が示唆された。更に大規模な母体血の分析を実施した結果、Table 3 のようになり、今後更なる疫学研究へ貢献できることを期待できる。

E. 参考文献

- 1) Hansen, K. J., Clemen, L. A., Ellefson, M. E., Johnson, H. O. Environ. Sci. Technol. 2001, 35, 766-770.
- 2) Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillman, G., Kumar, K. S., Loganathan, B. G., Mohd, M. A., Olivero, J., van Wouwe, N., Yang, J. H., Aldous, K. M. Environ. Sci. Technol. 2004, 38,

4489-4495.

- 3) Harada K, Saito N, Inoue K, Yoshinaga T, Watanabe T, Sasaki S, Kamiyama S, Koizumi A., J. Occup. Health. 2004, 46, 141-147.
- 4) Tomy GT, Budakowski W, Halldorson T, Helm PA, Stern GA, Friesen K, Pepper K, Tittlemier SA, Fisk AT., Fluorinated organic compounds in an eastern Arctic marine food web. Environ Sci Technol. 2004, 38, 6475-6481.

F. 発 表

学会発表

フォーラム 2003：衛生薬学・環境トキシコロジー（仙台：2003年10月）「カラムスイッチング-LC/MS を用いたヒト血液中有機フッ素系化合物の分析」岡田文雄，伊藤里恵，井之上浩一，吉村吉博，中澤裕之

第6回環境ホルモン学会（仙台：2003年12月）「有機フッ素系化合物のヒトへの暴露状況—オンライン前処理-LC/MS法を用いた血液試料の分析法開発」岡田文雄，伊藤里恵，井之上浩一，中澤裕之

「有機フッ素系化合物のヒトへの暴露状況—日本人の地域・食事摂取と血液濃度の分析」井之上浩一，花岡知之，岡田文雄，伊藤里恵，小林実夏，月野浩昌，津金昌一郎，中澤裕之

「有機フッ素系化合物のヒトへの曝露状況—健康男性における血液及び精漿中濃度」伊藤里恵，井之上浩一，野澤資亜利，岡田文雄，吉池美紀，岩本晃明，中澤裕之

第125回薬学会（東京：2005年3月）

「日本人における有機フッ素系化合物の暴露状況」岡田文雄，中田彩子，井之上浩一，伊藤里恵，

齊藤貢一, 花岡知之, 小林実夏, 月野浩昌, 津金昌
一郎, 中澤裕之

発表論文

Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, Uno A, Saijo Y, Sata F, Yoshimura Y, Kishi R, Nakazawa H, Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ. Health Perspect.*, 2004, 112, 1204-1207.

Inoue K, Okada F, Ito R, Kawaguchi M, Okanouchi N, Nakazawa H, Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonylamide in human plasma by column-switching liquid chromatography-electrospray mass spectrometry coupled with solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B*, 2004, 810, 49-56.

Table 1 Recovery levels of PFOS, PFOA and PFOSA in human plasma sample spiked with the analytes and the I.S. by LC-MS

	Spike amount (ng ml ⁻¹ : plasma samples)	Recovery average (%)	RSD (n=6) (%)
PFOS*	100	95.3	3.3
	10	97.7	4.6
PFOA**	100	87.2	4.0
	10	82.2	2.3
PFOSA**	100	95.8	5.2
	10	98.7	2.0

*: Background PFOS levels in the unspiked human plasma were subtracted out of the spiked sample levels to allow easier comparison.

** : Background PFOA and PFOSA levels in the unspiked human plasma can be neglected.

Table 2 Recovery levels of fluorinated organic compounds in human plasma sample spiked with the analytes and the I.S. by LC-MS/MS

	Spike amount (ppb:plasma sample)	Recovery average(%)	RSD (n=6) (%)
PFOS	5, 50	99.3, 97.5	3.0, 6.3
PFOSA	1, 10	98.3, 105	4.2, 4.2
PFOA	1, 10	100, 97.3	8.9, 4.8
PFNA	1, 10	96.7, 94.7	8.4, 3.1
PFDA	1, 10	93.3, 102	8.7, 4.7

Table 3 Concentration range and detection rate of fluorinated organic compounds in human blood samples (n=207) from Japan

	Sample number	Detected range (ppb)	Detection rate (%)
PFOS	207/207	2.8~16.2	100
PFOSA	8/207	N.D~0.7	3.9
PFOA	182/207	N.D~4.8	88.0
PFNA	87/207	N.D~2.0	42.0
PFDA	25/207	N.D~1.6	12.0

N.D < 0.5 ppb