

B. 研究方法

B-1. 生体試料の採取

37週0日から41週6日までの正常単胎妊婦および子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群、前置胎盤、常位胎盤早期剥離などの異常妊娠の妊婦につき、分娩前の母体血と母体尿、分娩時の羊水、分娩後の臍帯から採取した臍帯血、出生後に児の体に着している胎脂を採取した。また、分娩後に母乳の提供をうけた。採取量は図1に示す。試料は-80度で保存した。

B-2. アンケート調査

生活習慣、住宅環境と生体内の化学物質量との関連を調べるためアンケート調査を行った（資料参照）。

（倫理面への配慮）

試料採取前に、同意説明書を対象者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、自由意思によって参加し文書による同意が得られたものを対象とした。

C. 研究結果

C-1, 2. 採取状況

・生体試料の採取は、平成20年9月の試料採取の開始から平成22年1月まで通算で、計119症例から試料採取と情報提供を得た。採取数の経過を月ごと示す（図2参照）。母体血、母体尿、母乳、羊水、臍帯血、胎脂それぞれにつき採取できた試料数を図3に示す。対象とした妊婦の概ね80%から試料を採取できているが、羊水は手技上の問題から採取率が低かった。

・母体への暴露が胎児にどの程度影響を及ぼしているかを評価するためには、母体血、臍帯血、羊水のセットでの試料採取が望ましい。母体血と臍帯血の両者が採取できた症例数は81例、母体血、臍帯血と羊水が採取できた症例数は30例、母体血、臍帯血、羊水、母乳、胎脂のすべてが採取できた症例数は26例であった。（図4）。

・異常妊娠では、子宮内胎児発育遅延が18例、前置胎盤が2例、妊娠高血圧症候群が1例につき、試料採取を行った。

D. 考察

・羊水は手技上の問題から採取率が低いため、来年度においても試料の採取を継続する必要がある。

・母体血と臍帯血の両者が採取できた症例数は81例、母体血、臍帯血と羊水が採取できた症例数は30例、母体血、臍帯血、羊水、母乳、胎脂のすべてが採取できた症例数は26例であり、母体血中から胎児環境への化学物質の移行を評価する上で重要な情報が得られるものと考えられる。

E. 結論

- ・来年度においても、正常単胎妊婦および子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群、前置胎盤、常位胎盤早期剥離などの異常妊娠の妊婦につき、試料の採取を継続する。
- ・来年度は、母体血中から胎児環境への化学物質の移行を総合的に評価する。
- ・来年度は、生活習慣、住宅環境と生体内の化学物質量との関連性を評価する。
- ・来年度は、母体血中において、どのような化学物質が存在し、胎児はこれらにどの程度暴露されているかを総括する。
- ・来年度は、暴露量と子宮内胎児発育遅延、妊娠高血圧症候群、前置胎盤、常位胎盤早期剥離などの異常妊娠との関連性の有無を評価する。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Aberrant DNA methylation status in human terine leiomyoma. *Mol Hum Reprod* 15: 259-267, 2009.

Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuo A, Tamura H, Sugino N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and

oestrogen. *Hum Reprod* 24: 1126-1132, 2009.

2. 学会発表

田村功、竹谷俊明、李理華、木塚文恵、谷口憲、前川亮、浅田裕美、松岡亜希、田村博史、杉野法広 子宮内膜間質細胞(ESC)におけるTNF α のcycoxygenase-2(COX-2), manganese superoxide dismutase(Mn-SOD)発現に及ぼす影響とprogesteroneの遺伝子特異的な影響

第60回日本産科婦人科学会学術講演会
2009年4月3日～5日 京都市
日本産科婦人科学会雑誌 第61巻 第2号 P.429 2009年

浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜間質細胞におけるIGFBP-1遺伝子とPRL遺伝子のDNAメチル化プロフィール解析

第60回日本産科婦人科学会学術講演会
2009年4月3日～5日 京都市
日本産科婦人科学会雑誌 第61巻 第2号 P.632 2009年

田村功、竹谷俊明、李理華、木塚文恵、谷口憲、前川亮、浅田裕美、松岡亜希、田村博史、杉野法広 子宮内膜間質細胞(ESC)におけるTNF α のcycoxygenase-2(COX-2), manganese superoxide dismutase(Mn-SOD)発現に及ぼす作用とprogesteroneの遺伝子特異的な影響

第82回日本内分泌学会学術総会 2009年
4月23日～25日 前橋市

日本内分泌学会雑誌 第85巻 第1号 P.
221 2009年

浅田裕美、山縣芳明、李 理華、木塚文恵、
田村 功、谷口 憲、前川 亮、竹谷俊明、
松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子
宮内膜間質細胞における IGFBP-1 遺伝子
と PRL 遺伝子の DNA メチル化プロフィー
ル解析

第82回日本内分泌学会学術総会 2009年
4月23日～25日 前橋市

日本内分泌学会雑誌 第85巻 第1号
P.221 2009年

H. Asada, Y. Yamagata, R. Maekawa, I.
Tamura, L. Lee, F. Kizuka, K.Taniguchi,
T. Taketani, A. Matsuoka, H. Tamura, N.
Sugino.

Involvement of epigenetic mechanisms in
the regulation of gene expression in the h
uman endometrium.

The 25th Annual Meeting of the Europea
n Society of Human Reproduction and E
mbryology, Amsterdam, Netherlands Jun
e 28～July 1, 2009

Human Reproduction 24; suppl. 1, p184,
2009.

I. Tamura, T. Taketani, L. Lee, F. Kizuka,
K.Taniguchi, H. Asada, A. Matsuoka, H.
Tamura, N.Sugino. Differential modificatio
n of progesterone in TNFa-induced COX-

2 and Mn- OD expression in human endo
metrial stromal cells.

The 25th Annual Meeting of the Europea
n Society of Human Reproduction and E
mbryology, Amsterdam, Netherlands June
28～July 1, 2009

Human eproduction 24; suppl. 1, p185, 2
09.

L. Lee, I. Tamura, F. Kizuka, K.Taniguchi,
N.Sugino. Invol ement of epigenetic mech
anisms in the regulation of gene expressio
n in the human endometrium.

42th Annual Meting of the Society for th
e Study on Reproduction, Pittsburgh, USA
July 18～July 22, 2009. Biology of Repro
duction suppl. p106, 2009

I. Tamura, L. Lee, F. Kizuka, K.Taniguchi,
N.Sugino. Differential modification of pro
gesterone in TNFa-induced COX-2 and M
n-SOD expression in human endometrial s
tromal cells.

42th Annual Meting of the Society for th
e Study on Reproduction, Pittsburgh, USA
July 18～July 22, 2009. Biology of Repro
duction suppl. p138, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

・このアンケートは、生活習慣・住宅環境と生体内の化学物質量との関連を調べるために、あなたの食習慣やご自宅の環境などについておたずねいたします。結果は調査目的以外に使用されることはなく、また、公表の際には個人が特定されるような形では行いません。ご理解のうえ、ご協力をお願い致します。

以下の質問にお答え下さい。 (記入日:平成____年____月____日)

住所:	県	市郡	区町	年齢	歳
氏名:					

[食 習 慣]

米飯は、1日に何回位食べますか	(1) 0~1回/日	(2) 2回/日	(3) 3回/日
魚介類は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3~5日/週	(3) 6日以上/週
肉類は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3~5日/週	(3) 6日以上/週
鶏卵は、週に何個位食べますか	(1) 2個以下/週	(2) 3~6個/週	(3) 7個以上/週
野菜・果物は、どの位食べますか	(1) ほとんど食べない	(2) できるだけ食べる	(3) たっぶり食べる
海藻(ワカメ・ヒジキ等)は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週	(2) 3~5日/週	(3) 6日以上/週
牛乳は、週に何本(200mL/本)位飲みますか	(1) 2本以下/週	(2) 3~6本/週	(3) 7本以上/週

[飲 酒]

(1) 飲まない	(2) 以前は飲んでいた(年前まで)	(3) 飲んでいる 1日 合(年前から)
※ただし、ビール1本は1合に換算		

[喫 煙]

今までに喫煙をしたことがありますか	(1)なし (2)現在も喫煙中 (3)過去にあり(年前まで)
喫煙していた時の1日の平均喫煙本数とタバコの銘柄	1日平均喫煙本数(本) タバコの銘柄()
妊娠の時点~妊娠期間中に喫煙されていましたか	(1)なし (2)あり [一日平均喫煙本数(本)]
妊娠の時点で自宅や職場での受動喫煙の可能性はありますか	(1)なし (2)あり [場所: 自宅・職場・病院・その他()]
妊娠期間中は、自宅や職場での受動喫煙の可能性はありますか	(1)なし (2)あり [場所: 自宅・職場・病院・その他()]
最後に喫煙してからどれくらい時間がたっていますか	()
妊娠中、タバコの煙に対して何か注意を心がけましたか	(1)いいえ (2)はい
タバコの煙が胎児に対して悪影響があると思いますか	(1)いいえ (2)はい

→ウラ面へ続く

【飲酒】

(1)飲まない (2)以前は飲んでいた(年前まで) (3)飲んでいる 1日 合(年前から)
※ただし、ビール1本は1合に換算

【薬】

飲んでいるサプリメント	(1)なし (2)あり () (性別、ビタミン剤等のサプリメントを記入してください)
飲んでいる薬	(1)なし (2)あり () ()サプリメント以外に、飲んでいる薬を記入してください。
経口避妊薬を使用したことがありますか	(1)なし (2)あり (年前まで)

【化粧品、香水等】

化粧品(化粧水、ファンデーション、口紅、グロス等、顔に塗布するもの)	(1)なし (2)あり (種類と使用の頻度を下欄にご記入ください) 例)ファンデーション(毎日)、口紅(毎日)、マスカラ(週に2回ぐらい)
整髪料(ヘアフォーム、ジェル、ヘアカラー等、頭髪に使用するもの)	(1)なし (2)あり (種類と使用の頻度を下欄にご記入ください) 例)ヘアフォーム(毎日)、ヘアカラー(月に2回ぐらい)
マニキュア、香水等(マニキュア、ネイルアート等、また、香水、オーデオロン等)	(1)なし (2)あり (種類と使用の頻度を下欄にご記入ください) 例)マニキュア(週に1回ぐらい)、香水(毎日)

【住環境等】

住居 (構造と築年数)	(1)一戸建て (2)マンション等の集合住宅
	(1)木造 (2)鉄骨 築年数(築 年 例、築5年)
リフォーム	(1)なし (2)あり (分かれば施工時期をご記入ください) 例)内装を交換(平成20年3月)
殺虫剤(衣類用も含む)の使用	(1)よく使う (2)時々使う (3)殆ど使わない

おつかれさまでした。ご協力ありがとうございました。

図1.採取する試料と採取量

研究グループ	測定物質	母体血清	母体尿	毛髪	母乳	羊水	臍帯血	胎脂
星薬大	PFOS, ニコチン	2ml	10ml	-	-	-	2ml	-
埼玉	殺虫剤, BPA	2ml	10ml	-	-	-	2ml	-
大阪	フタル酸エステル	2ml	20ml	-	-	5ml	2ml	1g
大阪	PBDEs	5ml	-	-	5ml	-	-	-
愛知	重金属	-	-	0.3g	-	-	-	-

図2.検体採取症例数の推移

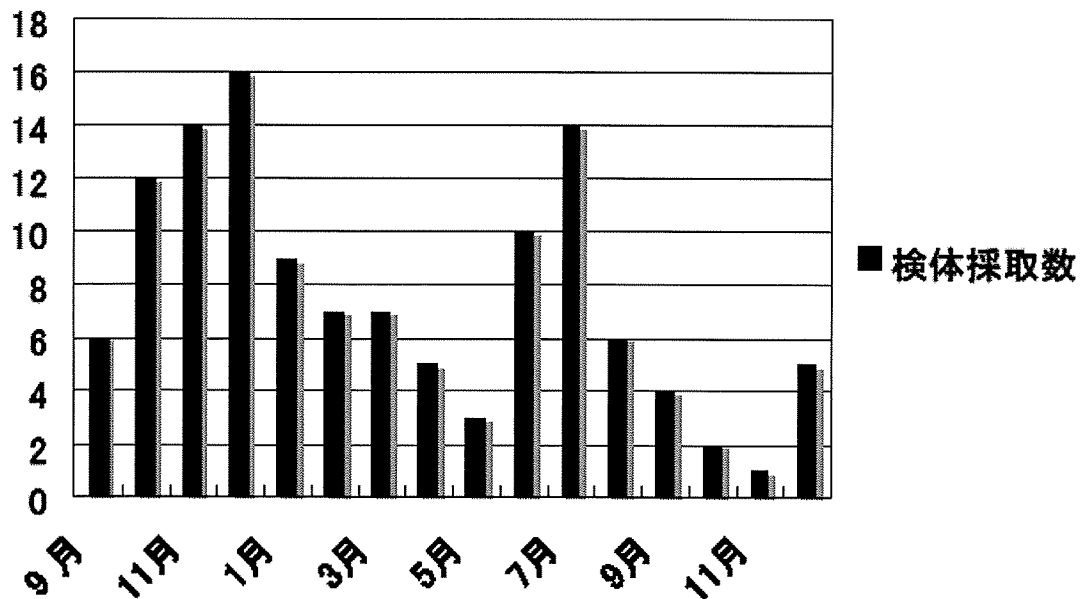


図3.実際に採取した試料
(平成21年9月から平成22年1月初旬まで119症例)

検体	母体血清	尿	母乳	羊水	臍帯血清	胎脂
採取できた検体数 (%)	102 (86%)	89 (75%)	104 (87%)	44 (37%)	106 (89%)	97 (82%)

図4.セットで試料を採取できた症例数

母体血	母体尿	臍帯血	羊水	胎脂	母乳	症例数(累計)
○	○	○	○	○	○	26
○	○	○	○	○		26
○	○	○	○			30
○	○	○				81

胎児へのエピジェネティックな影響の解析：エピミュータゲン評価法に関する研究

主任研究者	牧野 恒久	(社) 有隣厚生会東部病院
分担研究者	塩田 邦郎	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
研究協力者	大鐘 潤	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
	新井 良和	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室
	呉 嶺英	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学研究室

研究要旨

エピジェネティクスは、DNA メチル化やクロマチン構造の変化を伴う遺伝子発現情報の記憶装置である。エピジェネティクスレベルの異常は、胎児発生および出生後の発育に影響を与える可能性がある。そこで本研究は、エピジェネティック情報に影響を与える化学物質（エピミュータゲン）の検出系を構築することを目的としている。昨年度までに確立したマウス ES 細胞を用いた検出系で、25 種類のうち 5 種類の化学物質（DEP, Hg, コチニン, Se, S-421）がヘテロクロマチン形成に影響を与えることを明らかにし、今年度は DNA メチル化状況の解析から、これら 5 種類のエピミュータゲンの標的となっている遺伝子を同定し、実際に遺伝子領域のエピジェネティック状況にも影響を与えることを明らかにした。また、本年度はヒトへの影響を知ることを目的に、ヒト iPS 細胞による検出系の確立を行った。ヒト iPS 細胞系で 25 種類の化学物質（血清中濃度）を暴露し、ヘテロクロマチン形成を指標として解析した。その結果、マウス ES 細胞による検出系と異なり、PFOA ではヘテロクロマチンの変化が検出された。先にマウスで同定された 5 種類のエピミュータゲンに関しては、血清中濃度での暴露ではヘテロクロマチンの変化は検出されなかった。したがって、マウスとヒトでは化学物質への感受性が異なると考えられる。ただし、血清中濃度 10 倍量でのコチニン単独暴露、および血清中濃度での 5 種類の化学物質の混合暴露では、ヒト iPS 細胞においてもヘテロクロマチンの変化が確認された。以上、平成 21 年度の研究から、ヒト細胞についてもヘテロクロマチン形成を指標としてエピミュータゲンの検出が可能となった。

A. 研究目的

エピジェネティクスは、塩基配列の変化を伴わない、細胞分裂後も継承される遺伝子機能を研究する学問領域である。近年、発生異常や癌など多くの疾患において、様々な遺伝子のエピジェネティック異常が病態に関連していることも明らかになりつつある。これにより、発生異常や慢性疾患の原因解明や新たな治療法の確立のため、エピジェネティクスの重要性が高まっている。これまでに、人類は様々な化学物質を単離・合成することで、生活を豊かにしてきた。しかし一方では、我々がそれらの化学物質に曝されていることも確かである。一部の化学物質は母体血中と同程度で臍帯血中からも検出されており、化学物質が及ぼす胎児への影響が懸念されている。昨年度までに、マウスの初期胚モデルと考えられるES細胞を用いたエピミュータゲン検出系を確立し、解析した25種類の化学物質中、5種類がエピジェネティクスを変化させ得ることを明らかにした。今年度は、マウスES細胞系で実際にエピミュータゲンの標的となっている遺伝子を同定すると共に、実際にヒト胎児への影響を評価することを目的とし、ヒト初期胚のモデルであるiPS細胞を用いたエピミュータゲン検出系の確立を試みた(図1)。

B. 研究方法

1. 化学物質暴露ES細胞のゲノムDNA抽出
マウスES細胞をゼラチンコートディッシュ上で血清中濃度のDEP(0.1ppb)、コチニン(100ppb)、Hg(1.0ppb)、Se(100ppb)、またはS-421(0.01ppb)を添加し

たものと、コントロールとして溶媒のみを添加したものを96時間培養し(図1)、定法に従いそれらの細胞からゲノムDNAを抽出した。

2. COBRA法による遺伝子領域のDNAメチル化解析

DEP、Hg、コチニン、SeまたはS-421によりDNAメチル化状況が変化する遺伝子を探索するために、上記のゲノムDNAについてバイサルファイト反応を行い、129カ所の遺伝子領域についてCOBRA法によるDNAメチル化解析を行った。バイサルファイト反応済みゲノムDNAをPCR増幅後、HpyCH4IVによる切断を行い、切断断片をマイクロチップ電気泳動装置MCE-202(MultiNA)により解析した。これにより得られた切断断片と非切断断片の面積値よりDNAメチル化率を算出した。

3. ヒトiPS細胞でのエピミュータゲン探索系の確立

ヒトiPS細胞をフィーダー細胞上で未分化状態を維持したまま培養し、25種類の化学物質(3-PBA, TCP, DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP, DEDTP, S-421, ニコチン, コチニン, PFOA, PFOS, 2-EHA, 2EH, DCB, Sn, Se, Cd, Hg, Pb, penta BDE, deca BDE, DEHP, MEHP)(表1)をそれぞれ血清中濃度で4日間暴露した(図1)。暴露終了後、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗HP1 α 抗体を用いた免疫染色によりヘテロクロマチンを可視化して、核内のHP1 α シグナル数を指標に化学物質がヘテロクロマチン形成に及ぼす影響を検討した。さらに、先のマウスES細胞での解析においてヘテロクロマチンを変化させることが明らかとなった5種類の化学物質(DEP,

Hg, コチニン, Se, S-421) については、血中濃度 10 倍量での単独暴露、および 5 種類すべてを血清中濃度で混ぜての複合暴露についても、ヒト iPS 細胞でのヘテロクロマチン形成に及ぼす影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に使用したヒト iPS 細胞は、京都大学にて樹立された細胞株を理研筑波バイオリソースセンターより分与を受けた。ヒト iPS 細胞の使用については、東京大学におけるヒト iPS 細胞の使用に関する規定に基づいて行った。

C. 研究結果

1. 化学物質 (血清中濃度) がマウス ES 細胞の DNA メチル化状況に及ぼす影響

これまでの研究から、マウス ES 細胞での検出系により、解析した 25 種類の化学物質のうち、5 種類 (DEP, Hg, コチニン, Se, S-421) の化学物質が血清中濃度暴露でヘテロクロマチンを変化させることが明らかとなった (表 1) (平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク事業「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」より)。本研究では、それら 5 種類の化学物質が血清中濃度で遺伝子領域の DNA メチル化に及ぼす影響を COBRA 法で解析した (図 2)。その結果、解析した 5 種類のエピミュータゲンによる DNA メチル化への影響は、大きく以下の 3 つのパターンに分類されることが明らかになった。(I) Se では解析した遺伝

子について全体的な DNA メチル化レベルの低下が観察され、(II)DEP、Hg、コチニンでは ES 細胞で高メチル化状態の遺伝子での DNA メチル化レベルの変化が多く、(III)S-421 では解析した遺伝子の多くで低メチル化および高メチル化双方の変化が観察された。また、化学物質により DNA メチル化状況が変化するいくつかの遺伝子領域が明らかとなった (表 2)。その中には筋分化に関与する *Myot* 遺伝子や神経分化に関与する *Olig3* 遺伝子など、胎児の発生・分化に関わる遺伝子も含まれていた。また、*Myot* 遺伝子では Hg、コチニン、S-421 で共通して DNA のメチル化レベル低下が生じていた。*Gng2*, *Zfp64*, *Gnmt*, *Olig3* 遺伝子でも同様に、複数の化学物質で共通した DNA メチル化変化が生じていた。

2. 化学物質 (血清中濃度) がヒト iPS 細胞のエピジェネティック状況に与える影響

マウス細胞で解析した 25 種類の化学物質を血清中濃度でそれぞれヒト iPS 細胞に暴露し、ヘテロクロマチン状況を解析した。ヒト iPS 細胞ではマウス ES 細胞における検出系と異なり、マウス ES 細胞で影響の見られた 5 種類 (DEP, Hg, コチニン, Se, S-421) の化学物質は、血清中濃度での暴露ではヒト iPS 細胞のヘテロクロマチンに影響を与えなかった (図 3)。また、その他の化学物質を含め、PFOA を除く 24

種類の化学物質ではヘテロクロマチンに変化は認められなかった（表1）。

3. マウス ES 細胞による検出系によりエピミュータゲンと同定された 5 種類の化学物質の血清中濃度 10 倍量単独暴露、および血清中濃度での混合暴露によるヒト iPS 細胞への影響

昨年度までにマウス ES 細胞で同定した 5 種類の化学物質については、血清中濃度では、いずれもヒト iPS 細胞ではヘテロクロマチンの変化は観察されなかった。そこで次に、5 種類それぞれを血清中濃度 10 倍量で暴露したところ、コチニンではヘテロクロマチンの変化が観察された（図 3）。この結果から、マウスとヒトでは、化学物質の感受性が異なっていることが強く示唆された。さらに、マウス ES 細胞のエピジェネティック状況を変化させた 5 種類の化学物質（DEP, Hg, コチニン, Se, S-421）をそれぞれ血清中濃度で混ぜてヒト iPS 細胞に 4 日間暴露して、ヘテロクロマチンへの影響を検討した。各化学物質の血清中濃度での単独暴露では、ヒト iPS 細胞のヘテロクロマチンに変化は認められなかったが、5 種類の化学物質の混合暴露により、ヘテロクロマチンを示す HP1 α シグナル数が有意に低下した（図 4）。このことは、化学物質が複数混ざり合わさることで、ヘテロクロマチンに変化が生じることを示している。

D. 考察

これまでに本研究班では妊娠母体中に存在する様々な化学物質の血清中濃度を決定してきた。本研究では、決定された化学物質の血清中濃度を基に、昨年度までにマウス ES 細胞でのエピミュータゲン検出系を構築し、今年度はマウス ES 細胞でエピミュータゲンの標的となっている遺伝子を同定すると共に、ヒト胎児への影響を評価することを目的としてヒト iPS 細胞を用いた検出系を確立した。

昨年度より引き続き行ったマウス ES 細胞での解析では、DNA メチル化状態の変化を指標として、エピミュータゲンの標的遺伝子の同定および、エピミュータゲン毎のエピジェネティック変化の傾向を分析した。この解析から、5 種類の化学物質（エピミュータゲン）が遺伝子領域での DNA メチル化に与える影響は、大まかに 3 つのパターンに分類された。このうち、Se では解析した多くの遺伝子で DNA メチル化レベルの低下が観察されたことから、Se は DNA メチル化を司る DNA メチル基転移酵素群の活性を低下させることが示唆された。以上より、本研究で DNA メチル化解析を行った遺伝子セットは、エピミュータゲンにより影響を受けるエピジェネティック因子（酵素）の推定にも有効であると考えられる。また、Gng2、Zfp64、Gnmt、Olig3 などの発生に重要な遺伝子が、複数のエピミュータゲンの共通の標的になっていることが明らかになった。この結果から、エピミュータゲンによって影響を受けやすい遺伝子が存在していることが示唆された。

ヒト iPS 細胞を用いた検出系では、これ

までに解析した 25 種類の化学物質のうち、血清中濃度での暴露では、PFOA のみでヘテロクロマチンの変化が検出された。また、昨年度までにマウス ES 細胞で同定した 5 種類の化学物質については、血清中濃度では、いずれもヒト iPS 細胞ではヘテロクロマチンの変化は観察されなかった。ただし、コチニンでは血清中濃度 10 倍量での暴露により、ヘテロクロマチンの変化が観察された。この結果から、マウスとヒトでは、化学物質の感受性が異なっていることが強く示唆された。

これまでの解析から、母体は単独ではなく複数の化学物質に暴露されていると考えられる。そこで、次にマウスでエピミュータゲンであることが同定された 5 種類の化学物質について、血清中濃度での混合暴露を行ったところ、ヒト iPS 細胞の検出系でもヘテロクロマチンの変化が観察された。この結果から、化学物質の単独暴露ではエピジェネティックな変化を引き起こさないものについても、複数を混合して暴露した場合には、ヒト初期胚のモデルである iPS 細胞でエピジェネティックな変化を引き起こす可能性があることが示唆された。したがって、今後は同一血清サンプルから検出される複数の化学物質の組み合わせや、母体内で共存する可能性のある化学物質とその一連の代謝物の組み合わせについて、混合暴露によるエピジェネティクスへの影響を評価する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究では、従来の毒性学試験等と異なりヒト血清中で検出される濃度あるいは

その 10 倍程度の化学物質によって誘起されるエピジェネティック異常を検出可能な系の構築を行った。昨年度までのマウス ES 細胞での検出系に引き続き、ヒト iPS 細胞を用いたエピミュータゲン検出系の確立を終了した。これらの解析から、マウスとヒトでは化学物質への感受性が異なることが明らかとなった。さらに、血清中濃度での単独暴露ではエピジェネティックな変化を引き起こさなかった化学物質についても、複数を混合して暴露した場合には、ヘテロクロマチン形成を指標とした解析で、エピジェネティックな変化を誘起することが示唆された。以上より、ヒト iPS 細胞を用いたエピミュータゲン検出系の確立に成功し、平成 22 年度は、ヒトでのヘテロクロマチン形成を指標としたエピミュータゲン検出系を用いて、血清中濃度 10 倍量での暴露、および様々な組み合わせでの混合暴露について解析すると共に、エピミュータゲンの標的となる遺伝子領域を、DNA メチル化解析や発現解析により同定して行く予定である。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1 論文発表

- (1) Mitsuko Hirose-Takamori, Hui Wen Lim, Shiotaro Yagi and Kunio Shiota. Epigenetics for biomedical sciences. *Cornea*, 28: S7-13, 2009.

(2) Hui Wen Lim, Misa Iwatani, Naoko
Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro
Yagi and Kunio Shiota.

Resistance to 5-aza-2-deoxycytidine
in gene regions compared to non-ge
nic repetitive sequences.

J Reprod Dev, 2009 in press.

2 学会発表

(1) 塩田邦郎

胎児・胎盤評価系としてのエピジェネ
ティクスとエピジェノム、第 36 回日
本トキシコロジー学会 (2009)

(2) 塩田邦郎

エピジェネティクス-環境変異原研究
の新しい展開、第 38 回日本環境変異
原学会 (2009)

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1
化学物質の母体血清中濃度とヘテロクロマチンへの影響

略語	母体血清中濃度	細胞への暴露濃度		ヘテロクロマ	
		血中濃度 (x1)	血中濃度10倍 (x10)	マウスES	
		x1			
有機リン系農薬	3-PBA	<0.1 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	→
ピレスロイド系農薬	TCP	<0.1 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	→
	DMP	<1.0 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	→
	DEP	<1.0 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	↓
	DMTP	<1.0 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	→
	DETP	<1.0 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	→
	DMOTP	<1.0 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	→
	DEDTP	<1.0 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	→
	S-421	10.3 ng/g lipid **	0.01 ppb	0.1 ppb	↑
	タバコ	ニコチン	3.0±2.7 ppb	100 ppb	1000 ppb
コチニン		61.5±57.8 ppb	100 ppb	1000 ppb	↓
有機フッ素系化合物	PFOA	3.0±1.1 ppb	10 ppb	100 ppb	→
	PFOS	7.0±2.9 ppb	10 ppb	100 ppb	→
揮発性有機化合物	2-EHA	<1.0 ppb	1.0 ppb	10 ppb	→
	2-EH	58.3±48.3 ppb	10 ppb	100 ppb	→
	DCB	5.7±8.8 ppb	10 ppb	100 ppb	→
重金属	Sn	1.02±0.51***	1.0 ppb	10 ppb	→
	Se	110±18 ppb	100 ppb	1000 ppb	↑
	Cd	0.038±0.016 ppb	0.1 ppb	1.0 ppb	→
	Hg	0.6±0.34 ppb	1.0 ppb	10 ppb	↓
	Pb	0.3±0.12 ppb	1.0 ppb	10 ppb	→
ポリ臭素化ジフェニルエーテル	penta BDE	0.017±0.01 ppb****	0.01 ppb	0.1 ppb	→
	deca BDE	9.2 ng/g lipid*****	0.01 ppb	0.1 ppb	→
フタル酸エステル	DEHP	4.7±1.1 ppb	1.2 ppb	12 ppb	→
	MEHP	5.3±3.7 ppb	5.0 ppb	50 ppb	→

*、→: 変化なし、↑: 増加、↓: 低下、※: 化学物質暴露により細胞が死滅
、母乳中濃度、*成人尿中濃度、****成人男性血清中濃度、*****成人血清中濃度(Tak)

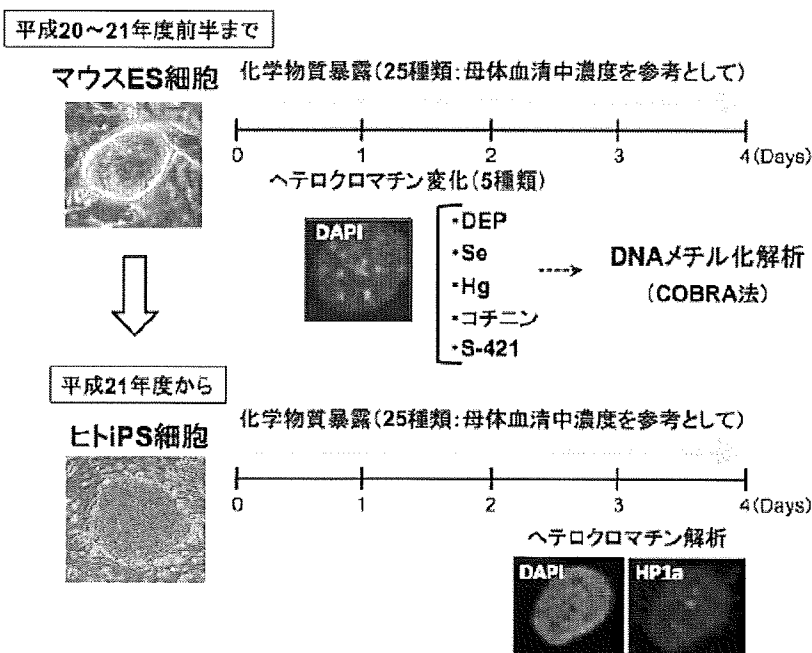


図1
マウスES細胞、およびヒトiPS細胞でのエピミュータゲン検出系

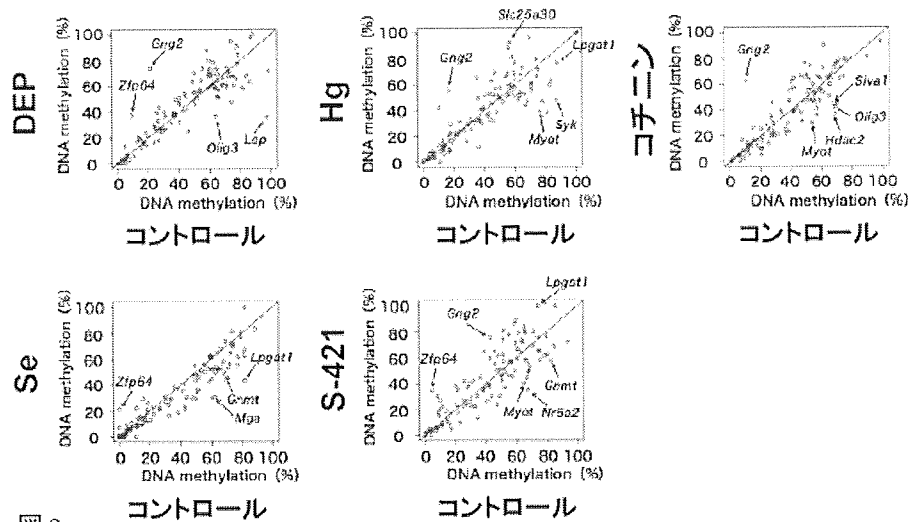


図2 マウスES細胞でのCOBRA法を用いたDNAメチル化解析

表2 マウスES細胞において化学物質によりDNAメチル化状況が変化する遺伝子群

遺伝子	DEP	Hg	コチニン	Se	S-421
<i>Slc25a30</i>	-	亢進	-	-	-
<i>Slc2a3</i>	-	亢進	-	-	-
<i>Lpgat1</i>	-	低下	-	低下	亢進
<i>Syk</i>	-	低下	-	-	-
<i>Mga</i>	-	-	-	低下	-
<i>Nr5a2</i>	-	-	-	-	低下
<i>Hdac1</i>	-	-	低下	-	-
<i>Gng2</i>	亢進	亢進	亢進	低下	亢進
<i>Zfp64</i>	亢進	-	-	亢進	亢進
<i>Myot</i>	-	低下	低下	-	低下
<i>Gnm1</i>	-	-	-	低下	低下
<i>Olfp3</i>	低下	-	低下	-	-

- , DNAメチル化変化なし
 亢進, 化学物質によりDNAメチル化レベルが亢進
 低下, 化学物質によりDNAメチル化レベルが低下

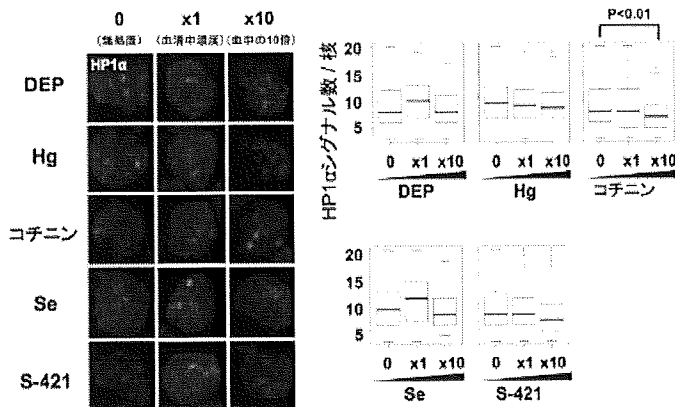


図3 ヒトiPS細胞での血清中濃度、またはその10倍量暴露によるヘテロクロマチン変化

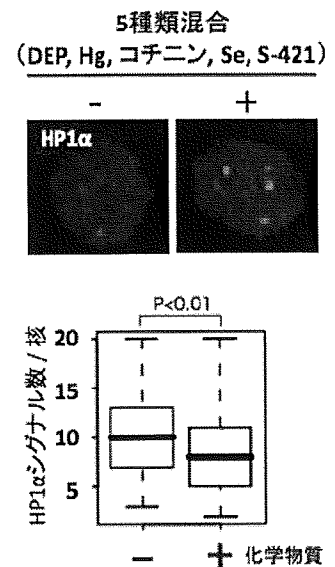


図4 ヒトiPS細胞における血清中濃度での混合暴露によるヘテロクロマチン変化

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

- (1) Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., and Iwamoto, T. Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **80**, 345-350 (2008)
- (2) Akutsu, K., Takatori, S., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Izumi, S., and Makino, T., Dietary intake estimations of polybrominated diphenyl ethers based on a total diet study in Osaka, Japan. *Food Addit. Contam. Part B*, **1** (1), 58-68 (2008).
- (3) Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Hattori N, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Potential link between estrogen receptor- α gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod* **14**: 539-545, 2008.
- (4) Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, Ohgane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Aberrant DNA methylation status in human uterine leiomyoma. *Mol Hum Reprod* in press, 2009.
- (5) Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and oestrogen. *Hum Reprod* in press, 2009.
- (6) 浅田裕美、山縣芳明、田村功、前川亮、谷口憲、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広
ヒト子宮内膜における DNA methyltransferase の発現に関する検討
第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 2008 年 4 月 12 日～15 日 横浜市
日本産科婦人科学会雑誌 第 60 巻 第 2 号 P.728 2008 年
- (7) 浅田裕美、山縣芳明、田村 功、谷口 憲、前川 亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広
子宮筋腫の Estrogen receptor- α 遺伝子の DNA メチル化情報
第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008 年 5 月 16 日～18 日 青森市
日本内分泌学会雑誌 第 84 巻 第 1 号 P.221 2008 年
- (8) Hiromi Asada, Ken Taniguchi, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino
Uterine Leiomyomas Associate with DNA Hypomethylation of Oestrogen Receptor- α Gene
The 24th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology,
Barcelona, Spain 6-9 July 2008

- (9) 第45回日本生殖医学会中国・四国支部学術講演会 2008年8月30日 徳島市
日本生殖医学会雑誌 第54巻 第1・2号 P.20 2008年 浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、
田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜におけ
る DNA methyltransferase の発現に関する検討
第53回日本生殖医学会学術講演会 2008年10月23日～24日 神戸市
日本生殖医学会雑誌 第53巻 第4号 P.155 2008年
- (10) 浅田裕美、山縣芳明、李理華、木塚文恵、田村功、谷口憲、前川亮、竹谷俊明、松岡亜希、
田村博史、杉野法広 ヒト子宮内膜間質細胞における Insulin-like growth factor binding
protein-1 (IGFBP-1) 遺伝子と Prolactin (PRL) 遺伝子の DNA メチル化プロファイル解析
第13回日本生殖内分分泌学会学術講演会 2008年11月29日 大阪市
日本内分分泌学会雑誌 第84巻 第2号 P.629 2008年
- (11) Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, Li W, Takahashi Y, Hirakawa T, Wu G, Hattori N,
Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Liu XS, Shiota K.
DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions
(T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression.
Genome Res. 18:1969-1978(2008)
- (12) 新井良和、八木慎太郎、塩田邦郎
幹細胞をエピジェネティクスで評価する、現代化学 452:52-55 (2008)
- (13) 前田千晶、塩田邦郎
再生医療のためのエピジェネティクスとエピゲノム、分子消化器病 5:13-19(2008)
- (14) 塩田邦郎
エピジェネティクスからエピゲノムへ：毒性病理学への応用、第25回 日本毒性病理学会教
育講演 (2009)

Development of Miniaturized Hollow-fiber Assisted Liquid-phase Microextraction with *in situ* Acyl Derivatization Followed by GC-MS for the Determination of Benzophenones in Human Urine Samples

Rie ITO,*† Migaku KAWAGUCHI,** Youji KOGANEI,* Hidehiro HONDA,* Noriya OKANOCHI,* Norihiro SAKUI,*** Koichi SAITO,* and Hiroyuki NAKAZAWA*

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa, Tokyo 142-8501, Japan

**Bio-Medical Standard Section, National Metrology Institute of Japan (NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba Central 3, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8563, Japan

***Agilent Technologies, Hachioji Site, 9-1 Takakura, Hachioji, Tokyo 192-0033, Japan

A simple and highly sensitive method that involves miniaturized hollow fiber assisted liquid-phase microextraction (HF-LPME) with *in situ* acyl derivatization and GC-MS was developed for the determination of benzophenone (BP) and related compounds in human urine samples. The limits of detection ($S/N = 3$) and quantification ($S/N > 10$) of BPs in human urine samples are 0.01 to 0.05 ng ml⁻¹ and 0.05 to 0.2 ng ml⁻¹, respectively. The average recoveries of BPs ($n = 5$) in human urine samples spiked with 10 and 50 ng ml⁻¹ BPs are 93.1 to 106.7% (RSD: 1.5 to 8.4%) and 96.3 to 101.5% (RSD: 3.0 to 7.7%), respectively. When the proposed method was applied to human urine samples, BPs were detected at the sub ng ml⁻¹ level.

(Received February 20, 2009; Accepted May 21, 2009; Published August 10, 2009)

Introduction

Benzophenone (diphenylmethanone; BP) and related compounds are widely used as chemical sunscreens. They absorb damaging UV rays to decrease the radiation dose, and are widely used in cosmetic products. Benzophenones (BPs) demonstrate maximum absorption at wavelengths of 288 to 290 and 325 nm, and have the property of absorbing wavelengths of 200 to 400 nm. Consequently, BPs are able to absorb UV light that is harmful to the human body in the form of UVA (320 to 400 nm) and UVB (290 to 320 nm), and have been reported to be effective in preventing skin disorders and skin cancer.¹ However, BPs are also suspected to cause pruritus and contact allergies,² and to disrupt the endocrine system by exerting estrogenic and anti-androgenic action.³⁻⁵ Recently, the migration of BPs from multilayer plastic-paper materials intended for food packaging and the contamination of food sample with BPs have been reported.^{6,7} Due to the widespread usage of BPs, healthy humans may be exposed to BPs *via* a variety of daily activities. Therefore, the assessment of human exposure to BPs is an important task.

It has been reported that when a human ingests BP, it is excreted in urine as a metabolite, such as benzhydrol (BP-OH) glucuronide.⁸ Thus, it is thought that human exposure can be evaluated by measuring these compounds in human urine samples. However, as the concentration of BPs in human urine

is low, a method with high sensitivity and high accuracy is required.

The determination of BPs in human urine samples has been accomplished with LC with diode array detection,⁹ tandem mass spectrometry (MS-MS)^{10,11} and GC-MS.¹² However, these techniques require that such pretreatment procedures as liquid-liquid extraction (LLE)^{13,14} and solid phase extraction (SPE)^{11,15} be performed prior to use, and consume considerable time and labor. As for the time and labor needed for analysis, solid-phase microextraction (SPME) has been successfully used for the determination of BPs in human urine samples.¹² However, because the limit of detection (LOD) of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3) is 5 ng ml⁻¹, the sensitivity of the above SPME method remains low. Previously, we reported on a stir bar sorptive extraction (SBSE) method that uses a stir bar coated with polydimethylsiloxane (PDMS) for the determination of BPs in water samples^{16,17} and human urine samples.¹⁸ The SBSE method required not only a PDMS-coated stir bar, but also a thermal desorption (TD)-GC-MS system. The TD system had a high running cost because liquid nitrogen was used. To improve the cost performance, liquid-phase microextraction (LPME), solvent microextraction (SME) and a single-drop microextraction (SDME) techniques have been developed.^{19,21} LPME consists of extracting and concentrating a target compound with an extremely small amount of extraction solvent using a commercially available microsyringe. Highly sensitive trace analysis is subsequently performed by injecting the extract directly into a GC-MS system using the same microsyringe as that used to collect the extract. The main advantages of these techniques are good cost performance and a wide application

* To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rie-ito@hoshi.ac.jp

range that includes polyaromatic hydrocarbons,²²⁻²⁴ polychlorinated biphenyls (PCBs),^{25,26} pesticides,^{24,26-29} and organotin compounds.³⁰ Because of the interfacial activity of urine samples, it is difficult to retain a single droplet on the microsyringe needle tip.³¹ Therefore, we have developed miniaturized hollow fiber (HF) assisted LPME for BPs analysis.³² In that study,³² five kinds of BPs (BP, BP-OH, 2OH-BP, BP-3, and BP-10) could be analyzed without derivatization. Because of their high polarity and low volatility, phenol compounds including BPs are poorly separated by GC. Derivatization has yielded sharper peaks, and hence better separation of and higher sensitivity for the phenols. However, the derivatization procedure is tedious and time consuming. In order to avoid this problem, *in situ* derivatization was developed. Moreover, with an *in situ* derivatization step, an even wider variety of BP-related compounds could be analyzed to reveal the extent of exposure to BPs.

The aim of this study was to develop an analytical method for the trace analysis of eight kinds of BPs in human urine samples, which employs miniaturized HF-LPME with *in situ* derivatization and GC-MS. The HF-LPME method was performed in conventional 2 ml vials for miniaturization. To consider a further application to valuable samples, such as serum, we performed a miniaturized HF-LPME method.

Experimental

Materials and reagents

Acetonitrile and methanol were purchased from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). BP and deuterium-labeled benzophenone- d_{10} (BP- d_{10}) as surrogate compounds were purchased from Kanto Chemical (Tokyo, Japan). 2,4-Dihydroxybenzophenone (BP-1) and BP-3 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 2-Hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenone (BP-10) was obtained from Lancaster Synthesis (Morecambe, England). Benzhydrol (BP-OH), 2-hydroxybenzophenone (2OH-BP), 3-hydroxybenzophenone (3OH-BP), and 4-hydroxybenzophenone (4OH-BP) were purchased from Wako Pure Chemical. *E. coli* β -glucuronidase (25000 U 0.4 ml⁻¹) and *H. pomatia* sulfatase (3650 U ml⁻¹) were purchased from Sigma-Aldrich. Prior to use, β -glucuronidase was added to 0.1 M ammonium acetate to make a total concentration of 10,000 U ml⁻¹. Other reagents and solvents of pesticide or analytical grade were purchased from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). The water purification system was a Milli-Q gradient A 10 with an EDS polisher (Millipore, Bedford, MA).

Concentrated solutions (1.0 mg ml⁻¹ in methanol) of BP, BP-OH, 2OH-BP, 3OH-BP, 4OH-BP, BP-1, BP-3, and BP-10 were prepared independently. Then, a mixture-standard solution (10 μ g ml⁻¹) was obtained by mixing the concentrated solutions. Urine samples were collected from fourteen healthy volunteers and sample preparation was performed immediately.

Instrumentation

A 10- μ l microsyringe for LPME was purchased from SGE Japan (Kanagawa, Japan). The microsyringe needle had a conical tip of 50 mm length and 0.63 mm OD. An accurel Q 3/2 polypropylene hollow-fiber membrane of 600 μ m i.d., 200 μ m wall thickness, and a 0.2- μ m pore size was purchased from Membrana (Wuppertal, Germany). The hollow-fiber membrane was cut manually and carefully into 1.1 cm lengths. Then, the hollow-fiber segments were cleaned in acetone prior to use. For extraction, 2 ml sample vials from Agilent

Technologies (Palo Alto, CA) were used.

GC-MS instrument and analytical conditions

GC-MS was performed with an Agilent 6890N gas chromatograph equipped with a 5973N mass-selective detector (Agilent Technologies; Palo Alto, CA). Injection was performed in a pulsed splitless mode and the injection volume was 2 μ l. The temperature of the inlet was 250°C. Separation was conducted on a DB-5MS fused silica column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness, Agilent Technologies). The oven temperature was programmed to increase from 100°C (held for 1 min) to 220°C at 5°C min⁻¹, and then increased to 280°C (held for 3 min) at 15°C min⁻¹. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. The mass spectrometer was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode with electron ionization (EI) (ionization voltage: 70 eV). The monitoring ions were as follows: m/z 182 and 105 for BP, m/z 213 and 256 for acyl-BP-1, m/z 227 and 228 for acyl-BP-3, m/z 241 and 227 for acyl-BP-10, m/z 184 and 105 for BP-OH, m/z 197 and 198 for acyl-2OH-BP, m/z 198 and 105 for acyl-3OH-BP, and m/z 121 and 198 for acyl-4OH-BP. The underlined number is the m/z of the ion used for quantification. The monitoring ion for BP- d_{10} was m/z 192 as surrogate standard, and quantitative analyses of BPs were performed with a surrogate standard.

Human urine sample preparation by LPME

A human urine sample (1 ml) spiked with surrogate standard was buffered with 1 M ammonium acetate solution (100 μ l). After adding β -glucuronidase (10 μ l; 10000 U ml⁻¹) and sulfatase (10 μ l; 3650 U ml⁻¹), the sample was sealed in a glass tube and gently mixed. Enzymatic de-conjugation to release free BPs was performed by incubating at 37°C for 3 h.³² Then, a 300- μ l aliquot of the de-conjugated sample was transferred to another vial and mixed with the same volume of acetonitrile for deproteination. After shaking sufficiently, it was centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Five hundred μ l of supernatant was transferred to another vial and 1 ml of purified water was added. Potassium carbonate (1 M K₂CO₃; 50 μ l) for a pH adjustment and acetic acid anhydride (20 μ l) as a derivatization reagent were added, and the vial was degassed. Then, the sample was agitated. Finally, the sample was subjected to HF-LPME using a 10 μ l microsyringe. Before extraction, the microsyringe was rinsed 10 times each with acetone and toluene so as to avoid carryover and air-bubble formation. The needle tip was inserted into a 1.1-cm-long hollow fiber segment. Then, the fiber assembly was immersed in toluene for about 20 s to impregnate its pores with toluene. Toluene in the syringe was injected carefully into the hollow fiber, after which the fiber assembly was completely immersed in the sample solution. LPME was performed at room temperature for 15 min while stirring at 500 rpm. After extraction, 2 μ l of the extract was carefully withdrawn into the microsyringe and injected into the GC-MS system.

Results and Discussion

Optimization of extraction solvent and time

The extraction solvent was optimized. Toluene, butyl acetate, and 1-octanol were compared. When toluene was used as the extraction solvent, relatively high responses were obtained for all acyl-BPs. Therefore, toluene was used as the extraction solvent for the HF-LPME method.

One of the most important parameters affecting not only LPME, but also HF-LPME was the extraction time. To

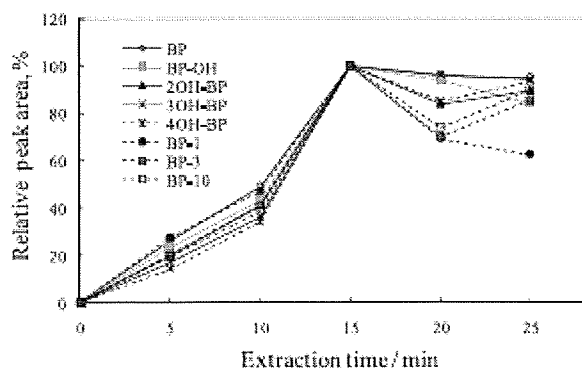


Fig. 1 Extraction time profiles of BPs. Optimum extraction time of analytes in 1 ml standard solutions (5 ng ml^{-1}) using HF-LPME with *in situ* derivatization and GC-MS.

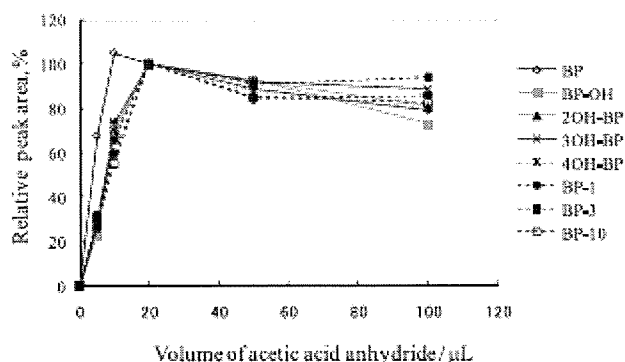


Fig. 2 Optimum volume of acetic acid anhydride for *in situ* derivatization. Optimum volume of acetic acid anhydride for *in situ* derivatization of BPs in 1 ml standard solutions (5 ng ml^{-1}) using HF-LPME with *in situ* derivatization and GC-MS.

determine the optimum extraction time, 5 ng ml^{-1} standard solutions of BPs were used. The extraction time profiles of 1 ml standard solutions of the acyl derivatives of BPs using HF-LPME with *in situ* derivatization and GC-MS are shown in Fig. 1. The highest response was obtained when the extraction time was 15 min. One possible reason for the decrease in the relative peak area was a reduction in the volume of toluene used as the extraction solvent. We thought that the extraction amounts of analytes were decreased according to the decreasing volume of the extraction solvent. This condition (15 min) was therefore used for the determination of BPs in human urine samples.

Optimization of *in situ* derivatization and GC-MS conditions

The volumes of K_2CO_3 (5 to 500 μl) and acetic acid anhydride (0 to 50 μl) in the *in situ* derivatization step were optimized. When 50 μl of K_2CO_3 was used for a pH adjustment, all BPs showed relatively high responses. As shown in Fig. 2, the highest response was obtained from BP when 10 μl of acetic acid anhydride was used. When 20 μl of acetic acid anhydride was used for the *in situ* derivatization of BPs, relatively high responses were obtained as well (Fig. 2). Therefore, 20 μl of acetic acid anhydride was used as the optimum volume. We thought that the pH changed when it was added over the 20 μl of acetic acid anhydride.

An EI-MS analysis of the standard solutions of analytes in the scan mode was conducted. Major and minor signals were used

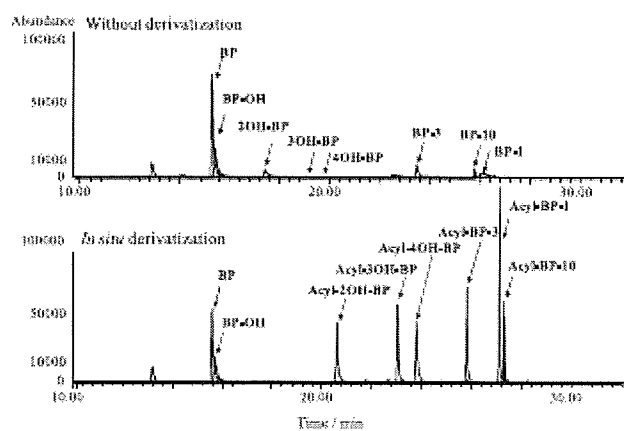


Fig. 3 Comparison of chromatograms of BPs obtained with and without derivatization. For HF-LPME with *in situ* derivatization, derivatization reagents were added to 1 ml of BP standard solution (500 ng ml^{-1}) and the extraction was commenced for 15 min at room temperature in a glass vial. Then, the extraction solvent was subjected to GC-MS analysis. For HF-LPME without *in situ* derivatization, the same procedure was performed, except that no derivatization reagents were added.

as quantification and qualifier ions, respectively. The monitoring ions were as follows: m/z 182 and 105 for BP, m/z 213 and 256 for acyl-BP-1, m/z 227 and 228 for acyl-BP-3, m/z 241 and 227 for acyl-BP-10, m/z 184 and 105 for BP-OH, m/z 197 and 198 for acyl-2OH-BP, m/z 198 and 105 for acyl-3OH-BP, and m/z 121 and 198 for acyl-4OH-BP.

The effect of *in situ* derivatization was examined. As shown in Fig. 3, peaks of 3OH-BP and 4OH-BP could be detected in the case with *in situ* derivatization. Moreover, the peaks of other acyl-BPs became sharp, since the phenolic hydroxyl group was derivatized. Therefore, *in situ* derivatization was a useful method for the determination of trace levels of BPs in human urine samples.

Analytical figures of merit

The limits of detection (LODs) (signal-noise ratio: $S/N = 3$) and the limits of quantification (LOQs) ($S/N > 10$) of BPs in human urine samples subjected to *in situ* derivatization were 0.01 to 0.05 ng ml^{-1} and 0.05 to 0.2 ng ml^{-1} , respectively. For BP determination, calibration curves were obtained by plotting the peak-area ratio versus the concentration. The calibration curves for analytes were linear with correlation coefficients >0.995 in the range of 0.05 to 100 ng ml^{-1} for BP-3, 0.2 to 100 ng ml^{-1} for BP-OH, and 0.1 to 100 ng ml^{-1} for the other BPs (Table 1). The relative recovery and precision of the method were assessed by replicate analyses ($n = 5$) of human urine samples spiked at 10 and 50 ng ml^{-1} . Non-spiked and spiked samples were subjected to HF-LPME with *in situ* derivatization and GC-MS. Typical chromatograms of spiked urine samples are shown in Fig. 4. The relative recoveries were calculated by subtracting the results for non-spiked samples from those for spiked samples. The results were obtained by using calibration curves of the standard solutions with surrogate standards. The average recoveries of analytes ($n = 5$) in human urine samples spiked with 10 and 50 ng ml^{-1} BPs were 93.1 to 106.7% (RSD: 1.5 to 8.4%) and 96.3 to 101.5% (RSD: 3.0 to 7.7%), respectively (Table 2). Therefore, this method enables precise determinations of standards, and can be applied to the determination of BPs in human urine samples.