

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）の分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

主任研究者 牧野恒久（東海大学 医学部産婦人科学教室 教授）

研究要旨

1. 生体試料中のフタル酸及びアジピン酸エステル類測定法の開発と測定

フタル酸エステル類及びアジピン酸エステルは、プラスチック製品の可塑剤として汎用されており、内分泌かく乱化学物質の一つとして健康影響に関する調査研究の実施が急務とされている。この目的のために、ヒト体液中での、これらエステル類の高感度かつ迅速な一斉分析法を開発した。本法は、前処理操作が極めて簡便かつ迅速で、定量操作過程へのエステル類の混入が、極めて少ないという利点がある。また、1 ng/ml（生体試料）の高感度でエステル類の測定が可能であり、内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査研究の実施に極めて有用である。

2. ビスフェノール A (BPA) の健康影響に関する調査研究

内分泌系をかく乱する可能性があるとして指摘されている BPA は、ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂等を用いた食品用容器や金属缶からの溶出することが報告されている。従って、食品や生活環境などから BPA がヒトへ暴露される可能性も十分に考えられ、BPA の健康影響に関する調査研究の実施が急務とされている。しかし BPA は、生体内では極めて微量で存在する。そのため、本年度は、昨年度開発したエチル誘導化 GC-MS 法を用いてパイロット調査研究を実施するとともに、さらに高感度かつ迅速な分析法の開発を、前処理に固相抽出法を用いた GC-MS 法と HPLC-蛍光および化学発光定量法について検討した。

①ビスフェノール A の調査研究：エチル誘導体化 GC-MS 法を用いた高感度分析

先に我々が開発した「ジエチル硫酸を誘導体化試薬として用いる GC-MS 法」により、ヒト母乳、さい帯血、血液、腹水中の BPA の測定を、食生活や居住環境などの生活環境と病歴を含む生化学データなどが入手可能なボランティアを対象として実施した。このパイロット調査研究では、血液、腹水を測定する婦人科グループと、母乳、さい帯血、母体血を測定する産科グループの 2 グループが対象で、各々 30 および 15 検体について調査した。その結果、産科グループでの母乳、さい帯血、母体血中の BPA は、本法で測定したところいずれも ND であった。いっぽう、婦人科グループでは、30 例中の 1 例においてその腹水中 BPA が 1.7 ng/ml で検出されたが、操作ブランクが真の値よりも小さく、それに伴い測定値が真の値よりも大きく算出された可能性が示唆された。その他の腹水及び血液での BPA の測定値は、全て ND

であった。

②前処理に固相抽出法を用いた GC-MS 法による BPA の高感度分析法の開発と生体への応用に関する研究

BPA のさらに高感度分析法を開発するため、前処理に固相抽出法、検出にはガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) を用いた高感度分析法を開発し、ヒト血清等の生体試料への応用を検討した。BPA の検出方法として、BPA を臭化ペンタフロロベンジル (PFBBBr) によりアルキル化して、ペンタフロロベンジルービスフェノール A (PFB-BPA) に誘導體化した。これを生体成分に対して影響が少ない GC/MS のネガティブモードで検出を行った。本法により、PFB-BPA は、その定量範囲が 0.01 ~ 100ng/mL までの広範囲なダイナミックレンジで測定でき、相関係数は 0.998 と良好であった (検出限界 S/N=30.005ng/mL)。10ng/mL の BPA 標準溶液を添加して、その添加回収試験を実施したところ、ヒト血清では 98.5%、コントロール血清では 100.9% と良好な結果が得られた。今後の生体試料への応用が期待できる。

③ビスフェノール A の高感度 HPLC-蛍光および化学発光定量法の開発

血液中のビスフェノール A (BPA) の高感度で高精度な測定法を開発を目的として、フェノール類やアミン類の選択的な蛍光ラベル化試薬である、4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride (DIB-C1) を用いた、HPLC-蛍光および化学発光検出定量法を検討した。その結果、検出下限が HPLC-蛍光法では 0.05 ppb (S/N=3)、過シュウ酸エステル化学発光法では 0.38 ppb (S/N=3) の感度を有する計測法を開発することができた。ウサギの添加血漿を用いて HPLC-蛍光法を検討したところ、回収率 95% 前後、定量下限 1 ppb であり、生体試料への適用が可能であることが分かった。

3. 環境中の内分泌かく乱化学物質の胎児・胎盤における遺伝子発現調節と酵素的修飾についての研究

① 妊娠中に母体に取り込まれた物質は、まず胎盤を構成する胎児由来細胞である栄養膜細胞に作用すると考えられる。環境中の内分泌かく乱化学物質の胎児にたいする作用を解明する第 1 段階として、この栄養膜細胞における内分泌かく乱化学物質に応答する核内受容体の発現様式とその機能を解析した。まず、すでにその核内受容体が胎盤で発現していることが報告されているレチノイン酸 (RA) の、*in vivo* および *in vitro* での影響を解析した。RA 投与によって栄養膜巨細胞の分化は促進される一方で、海綿状栄養膜細胞の分化阻害も確認された。つまり、RA 受容体を活性化あるいは不活性化する環境物質が、妊娠母体に取り込まれた場合に、胎盤形成に異常が現れる可能性が示唆された。さらに、ベンゾピレンやダイオキシンの生体内受容体であるとされる AhR の、培養栄養膜幹細胞における発現を、RT-PCR により解析すると同時に、その cDNA のクローニングを行い、新規の AhR アイソフォームを同定発見した。

② 母体に取り込まれた物質は、胎盤を通過して胎児に到達するが、この間に胎

盤によって解毒される可能性も考えられる。ビスフェノールAについては、ラット肝臓において、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT2B1) によりグルクロン酸抱合(解毒)される事実を我々すでに報告している。胎盤を含めた生体の解毒機構の解明のために、今回は、ノニルフェノール・オクチルフェノール・植物由来のエストロジェンについて、ヒトおよび各種動物肝におけるグルクロン酸抱合能について検討した。市販のヒト肝マイクロゾーム及び各種動物肝マイクロゾームを用いて、グルクロン酸抱合反応を行い、逆相 HPLC により反応産物の同定・定量を行った。また、ラット肝灌流法を用いてビスフェノールAの臓機内での代謝を測定した。

以上の結果より、ヒトをはじめ、多くの動物肝に於いて、ビスフェノールA・ノニルフェノール・オクチルフェノール・植物由来エストロジェンはグルクロン酸抱合されること。ビスフェノールAは大部分グルクロン酸抱合で胆汁中に排泄されることが判明した。

4. 内分泌かく乱化学物質の培養細胞レベルでの作用とそれを応用した簡便で高精度のアッセイ系確立についての研究

① 環境由来の化学物質が、内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、ヒト副腎皮質由来の培養細胞 (H295R) を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、方法を確立した。このアッセイ法を用い農薬 DDT とその代謝物、ジコホル、クロルデンおよびヘキサクロルベンゼンの影響、各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類の影響、および植物エストロゲンであるダイゼイン、ゲニステインおよびそれらの配糖体であるダイジン、ゲニスチンの影響を検討し、コルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定した。この方法によって、環境由来の化学物質のヒトにおけるリスクを評価できる可能性が示された。

② 生活環境中の化学物質の安全性については、内分泌かく乱作用という新しい観点で評価する必要性が生じている。しかし、多数の候補物質からその作用の強弱を評価スクリーニングする必要がある、迅速で簡便な方法が求められる。従来は、ヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法の E-SCREEN Assay がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的として研究を行い、高分子素材由来の化学物質について評価を行った。

5. ヒト尿・血液中のベンゾ[a]ピレン及びその代謝物の分析法開発

ベンゾ[a]ピレン (BaP) の代謝物として知られ、内分泌攪乱作用の疑われるモノヒドロキシベンゾ[a]ピレン (OH-BaP) の 12 異性体の分離・分析法を開発した。アルキルアミド型逆相カラム (Discovery RP-Amide-C16) により 1-, 3-, 7-, 12-OH-BaP を除く 8 種類の OH-BaP を分離し、分離が不十分な 1-, 3-, 7-, 12-OH-BaP をカ

ラムスイッチングにより ODS カラム (COSMOSIL 5C18AR) に導入して 7-及び 12-OH-BaP を同定した。さらに分離が不十分な 1-及び 3-OH-BaP を β -シクロデキストリン固定化カラム (LiChroCart 250-4 Chiradex) に導入することで 12 種すべてを分離できた。この分析システムを BaP の CYP1A1 処理液に適用したところ、1-、3-、9-OH-BaP の生成が確認された。また、健康人の尿中から代謝物として 1-、3-OH-BaP を同定し、尿中に排泄される OH-BaP は主としてエストロゲンレセプターに対してビスフェノール A に匹敵する結合能を有する 3-OH-BaP であることが明らかとなった。

6. ポリ臭素化ジフェニルエーテルのルーチン分析法開発と生物試料の分析

GC/MS によるポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDE) の高感度迅速分析法を確立し、本分析法を用いて 1998 年に瀬戸内海で採取した食用魚の PBDE 汚染実態を明らかにした。また、ヒト母乳抽出脂肪 (1980、84、86、90 年の保存試料) の予備的分析を行い、1g 以下の試料量で PBDE の分析が可能であること、すなわち量が限られている貴重な保存試料を大量に使用することなく、過去に遡って母乳中 PBDE 濃度の経年変化を追跡できることを明らかにした。

7. 成人血及びさい帯血中のクロルデン関連物質およびヘキサクロロベンゼンの分析

一般の成人を対象としてクロルデンとその関連物質及びヘキサクロロベンゼン (HCB) に対する人体暴露量調査を実施する目的で、これらの物質の血中濃度を測定すると共に、血液提供者に対するアンケート調査により食事の嗜好性、住環境等の情報を得、これらの化学物質の生体内濃度との関連性について検討を加えた。154 人の血清試料を分析したところ、93.5% の人から *trans*-ノナクロル (0.03~1.65 ppb) が、89.6% の人から HCB (0.02~2.20 ppb) が、また、44.2% の人からは *cis*-ノナクロル (0.03~0.44 ppb) 検出された。さらに、ごく少数の人からはオキシクロルデン (2 人、0.24、0.56 ppb) や *trans*-クロルデン (1 人、0.04 ppb) も検出された。検出された 5 種の化学物質のうち *trans*-ノナクロル濃度は、年齢及び魚類の摂取頻度と関連することが示唆された。また、HCB 濃度については年齢との関連性が示唆された。また、母体末梢血 (9 検体)、腹水 (5 検体)、及びさい帯 (10 検体) を用いて同様に CLDs 及び HCB への暴露量調査を実施した。その結果、*trans*-ノナクロル (0.03~0.39 ppb) は腹水 1 検体を除く 23 検体 (95.8%) から、HCB (0.05~0.18 ppb) は腹水、さい帯血の全検体を含む 20 検体 (83.3%) から検出された。また、*cis*-ノナクロル (0.03~0.09 ppb) も 4 検体 (16.7%、うち母体末梢血 3 検体) から検出された。

8. LC/MS による食品及び生体試料中の植物エストロゲンの分析

大豆中に多く含まれる Daidzein、Genistein、Glycitein 等のイソフラボンのヒトへの影響を解明するために、LC/MS を用いた高感度且つ特異的な分析法の開発を検討した。構築した方法を用いて日本人が摂取する上記イソフラボンの一日量を求めた結果、約 35 mg と推定された。更に、イソフラボンの体内動態を把握するた

めに尿及び血清中の分析を試みた結果、尿中から Daidzein、Genistein、Glycitein が比較的高い濃度で検出された。一方、血清中からは10例中3例から Daidzein 及び Genistein が極微量検出 (1ppb 以下) された。

9. 毛髪及び血液中のトリチルスズ化合物の分析法に関する研究

トリチルスズ化合物及びその分解、代謝物の人体暴露量の調査を目的として、毛髪及び血液を対象とした分析法の検討を行った。内標準物質として安定同位体標識標準品を使用し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) による選択イオン検出法 (SIM) で測定したところ毛髪及び血液におけるトリチルスズ化合物 (TBT) の添加回収実験 (n=6) は、それぞれ97.8% (CV値1.9%)、104.8% (CV値10.4%) と良好な結果が得られた。その分解、代謝物であるジブチルスズ化合物 (DBT) 及びモノブチルスズ化合物 (MBT) は、反応試薬に由来すると思われるブランク値が認められた。毛髪 (n=4) からは試薬ブランク値 (n=4) より約3倍、高いMBTが検出された。ブランク値との差を取るにより分解、代謝物の検出も可能と思われた。

10. クロロベンゼン類及びパラベン類の分析法開発と実試料の分析

クロロベンゼン類およびパラベン類は内分泌かく乱作用を持つ可能性があることが指摘されている。このうちパラジクロロベンゼンは防虫剤として、パラベン類は保存料として一般の環境で広範囲に使用されている。これらの物質はヒト体内で代謝する経路があることが知られているが、環境中での大量消費に伴いヒト体内に常時供給がある場合、体内中(血液等)で検出される可能性が高く代謝物を含めての内分泌かく乱作用の可能性についての検討が必要である。そのため、ヒトがこれらの物質を摂取する経路の解明、摂取してからの体内中での挙動、代謝、排泄等について調査を行うための迅速で高感度な分析方法の開発を行い、併せて実試料の分析によるヒト健康への影響について研究を行った。

① パラベン類を模擬飲料として摂取し生体内での挙動を確認したところ摂取直後20分以内に血液中にパラベンが検出されるとともに代謝物であるパラヒドロキシ安息香酸 (PHBA) 濃度の急増が確認された。PHBAの血中濃度はその後急速に低下し8時間後ではほぼ初期濃度にまで回復した。同時に行った尿試料の測定の結果、尿からもパラベンが検出された。また、PHBA濃度は、試飲後20時間近く影響が残ることが判明した。さらに、パラベン類の摂取経路として食品に分類されない栄養ドリンク剤について調査した結果、パラベン類を含むドリンク剤の場合、平均で50ppm程度添加されており、比較的大きなパラベンの摂取源であることが確認された。

② 内分泌かく乱作用の確認されているHCBは食事由来で摂取する可能性が大きいことから、暴露量の推定を行った。トータルダイエット法による一日摂取量は65ng/日であった。陰膳法での平均一日摂取量では113ng/日であった。概ね魚介製品がHCBの摂取源であることが確認された。

③ パラジクロロベンゼンは防虫剤として使用されているが室内空気経由であることが明らかである。ヒト体内での代謝はあるものの、常時高濃度暴露される条件

下では血液中に高濃度で存在することが明らかになり、室内濃度と血液濃度の濃度レベルの比較を行った結果、 $y=1.4X$ の回帰式が得られた。この結果、室内濃度から血液濃度を推定できることになった。

分担研究者

中澤 裕之

星薬科大学薬品分析化学教授

塩田 邦郎

東京大学農学生命科学大学院教授

織田 肇

大阪公衆衛生研究所所長

A. 研究目的

A1. 生体試料中のフタル酸及びアジピン酸エステル類測定法の開発と測定

内分泌かく乱化学物質の一つと考えられているフタル酸エステル類及びアジピン酸エステルは、プラスチック製品の可塑剤として汎用されており、健康影響に関する調査研究の実施が急務とされている。この目的のために、ヒト体液中での、高感度かつ迅速な一斉分析法を開発を企画した。開発した分析法の最適化は、ウサギ標準血清を生体試料のモデルとして用いて行った。

A2. ビスフェノール A (BPA) の健康影響に関する調査研究

A2-① エチル誘導体化 GC-MS 法を用いたビスフェノール A の調査研究

ビスフェノール A (BPA) は内分泌かく乱化学物質の一つと考えられており、健康影響に関する調査研究の実施が急

務とされている。この目的のため、先に開発し、平成 10 年 厚生科学研究補助金 (生活安全総合研究事業) : 内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する研究に関する調査研究 (指定研究) に報告した「ジエチル硫酸を誘導体化試薬として用いる GC-MS 法」により、ヒト母乳、さい帯血、血液、腹水中の BPA の測定を実施した。食生活、居住環境などの生活環境や、病歴を含む生化学データなどが入手可能なボランティアを測定対象とし、血液、腹水を測定する婦人科グループと、母乳、さい帯血、母体血を測定する産科グループの 2 つのグループに分け、各々 30 および 15 検体について、本調査を実施した。

A2-② 前処理に固相抽出法を用いた GC-MS 法による BPA の高感度分析法の開発と生体への応用に関する研究

BPA はポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原材料として広く用いられており、我々の身の回りの容器を含めた、高分子素材として需要も増えている。このように使用量の多い BPA の環境中での動態、生態系への影響についてはまだよく知られておらず、環境中や食品中における存在量が問題となり、モニタリングが要求されている。

しかし、プラスチック原料に由来する内分泌かく乱化学物質を測定する際、実験系自体から汚染される可能性があり、微量測定には慎重な操作が必要で

ある。BPAは、器具の洗浄、試薬調製などに利用される精製水への混入や実験器具からの汚染等も考えられ、バックグラウンドが重要な要因となる。

BPAの微量分析法として多くの分析法が検討されており、BPAを直接ガスクロマトグラフィーにより測定する方法、TMS誘導体化後ガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)で測定する方法がある。また、液体クロマトグラフ(HPLC)法では吸光度検出器、蛍光検出器、電気化学検出器及び質量分析などの報告がある。しかし、これらの方法では生体中の微量のBPAを測定するには、バックグラウンドや検出感度において問題がある。またBPAは生体内で一部代謝されており、その代謝物の分析することは重要である。そこで、BPAをPFBBBrによりアルキル化して、ペンタフロロベンジルービスフェノールA(PFB-BPA)に誘導体化した。これを生体成分に対して影響が少ないGC/MSのネガティブモードで測定する方法を検討した。

A2-③ ビスフェノールAの高感度HPLC-蛍光および化学発光定量法の開発

上述の如く、生体試料中のBPAを高感度に測定する方法が不可欠である。本研究では、研究協力者らが開発した、フェノール類やアミン類に選択的な蛍光ラベル化試薬、DIB-Clを用いてBPAを蛍光ラベル化後、HPLC-蛍光あるいは化学発光検出する方法を検討した。また、プラスチックなどに由来するBPAなどの微量の化学物質が生活環境中に

も多く存在し、高いバックグラウンド値に反映するため、これらのバックグラウンドを排除するための検討を行う必要がある。そこで、固相抽出によるクリーンアップを試みた。

A3. 環境中の内分泌かく乱化学物質の胎児・胎盤における遺伝子発現調節と酵素的修飾についての研究

環境物質は核内受容体と呼ばれる一群の分子を介して作用している可能性が示唆されている。環境物質によって引き起こされる核内受容体およびオーファン受容体の異常な活性化・不活性化が、発生途上の胎児・胎盤に重大な影響を及ぼすことが容易に予想される。

胎盤の大部分を構成する栄養膜細胞は、妊娠期間を通じて、母体側体液に直接さらされる唯一の胎児由来細胞である。したがって、その意味では、環境物質が胎児・胎盤機能へ及ぼす影響を解析するためには、まず栄養膜細胞における核内受容体およびオーファン受容体の発現様式、およびその機能を詳しく知る必要がある。また、胎盤(栄養膜細胞)における環境物質の代謝機能についてもほとんど知見が無く、研究の必要性が唱えられている。本研究の第一の目的は、核内受容体およびオーファン受容体の、胎盤における発現様式とその機能を解析し、これら受容体を介した環境中ホルモン様物質の内分泌かく乱作用機序を解析する基礎を確立すること(①)にある。第二に、ビスフェノールAおよびノニルフェノールの代謝酵素を特定し、これらの環境中ホルモン様物質を解毒する能力が

どの程度存在しているかを評価すること(②)を目的とする。

A4. 内分泌かく乱化学物質の培養細胞レベルでの作用とそれを応用した簡便で高精度のアッセイ系確立についての研究

A4-① ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

ステロイドホルモンは個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっており、生体の恒常性を保つためには必須の作用分子である。

本研究では、環境ホルモンといわれる環境由来の化学物質が生体のステロイドホルモン産生(steroidogenesis)にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、ヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞(H295R細胞)を用いて、*in vitro*でその直接的な影響を検討するものである。このH295R細胞はヒト由来であり、かつ広範囲にわたるステロイドホルモンの産生能力を保持しており、これを用いて環境由来の化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ系を確立する。次に確立したアッセイ系を利用して内分泌かく乱化学物質として知られている農薬DDTとその関連代謝物質、各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類、植物エストロゲンおよび合成エストロゲン等の影響を検討する。

A4-② ヒト由来乳癌細胞を用いた内分泌かく乱化学物質の簡便で高精度のアッセイ系の確立の研究

既に内分泌攪乱化学物質のスクリー

ニングには、*in vitro*、*in vivo*で様々な方法が報告されているが、その一つにヒト由来乳癌細胞であるMCF-7のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした*in vitro*試験法であるE-SCREEN Assayがある。従来法では、チャコールデキストラン処理したヒト血清をメディウム中に添加するが、乳癌細胞の増殖に関わるホルモン以外の物質も影響を及ぼし、測定施設間で異なる結果をもたらす可能性がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞であるT47Dを使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的として研究を行う。

A5. ヒト尿・血液中のベンゾ[a]ピレン及びその代謝物の分析法開発

化石燃料などの有機物の不完全燃焼によって生成する多環芳香族炭化水素(PAH)は、癌や喘息などの原因となることが知られているが、最近我々は、ベンゾ[a]ピレン(BaP)をはじめとする数種類のPAHが、抗エストロゲンまたは抗アンドロゲン作用を有することを明らかにした。一方、水酸基の位置の異なるモノヒドロキシベンゾ[a]ピレン(OH-BaP)のエストロゲンレセプターに対する結合能について、ヒトエストロゲンレセプターに対する競合実験及び、酵母のエストロゲンレセプター依存・-ガラクトシダーゼの発現系を用いた実験を行い、3-OH-BaPがビスフェノールAに匹敵する強さを有することを

見いだした。このことは、BaP の内分泌攪乱作用の全容を明らかにするためには、代謝物をも視野にいたした暴露量に対する血液や尿中の濃度レベルの調査が不可欠であることを示唆する。

そこで本研究では、OH-BaP の生体内挙動を検討するにあたって、カラムスイッチング法を用いた 12 異性体の分離・分析法を開発した。また、開発した分析法を BaP のチトクローム P-450 (CYP 1A1) で処理液及び、ヒト尿中の OH-BaP の同定に適用した。

A6. ポリ臭素化ジフェニルエーテルのルーチン分析法開発と生物試料の分析

ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDE) は、合成樹脂の難燃剤として電子機器の筐体等に広く使用されている。一方、PBDE は環境汚染物質として指摘されており、さらに、その化学構造および生物実験等から、内分泌かく乱作用を有するのではないかと疑われている。特に近年、北欧地方においてヒト母乳中の PBDE 濃度が上昇傾向にあることが報告され、乳幼児への悪影響が懸念されている。

我が国においても 1980 年代から累積して数万トンの PBDE が消費されているが、環境・生物中 PBDE 濃度に関する研究報告はわずかであり、その汚染実態は明らかではない。従って、PBDE のリスク評価に先立ち、まず早急に国内の汚染状況を明らかにする必要がある。そこで本研究では 1) 生物試料中 PBDE のルーチン分析法の開発、2) 食用魚の PBDE 汚染レベルの解明、および 3) 乳幼児期の暴露の観点から重要であるヒ

ト母乳の汚染実態の解明を目的とした。

A7. 成人血及びさい帯血中のクロルデン関連物質およびヘキサクロロベンゼンの分析

クロルデンは、シロアリ、ヒラタキクイムシの駆除剤及び防除剤として広く使用されていたが、肝臓障害などの慢性毒性が認められたことから、わが国では昭和 61 年に使用禁止となった。しかし、遅効性殺虫剤であるクロルデンの残留性は極めて強く、最近の調査でもクロルデンやその製剤中の不純物であるノナクロル、さらには代謝物であるオキシクロルデンが環境中に残留していることが確認されている。一方、海外で殺菌剤として使用されているヘキサクロロベンゼン (HCB) は、我が国では農薬として登録はなされていないが、環境中に存在することは確認されており、塩素系農薬を始めとする塩素系化合物の製造原料中の不純物に由来すると推測されている。昨年度の本研究では、クロルデン、ノナクロル、及びオキシクロルデンを含むクロルデン関連物質 (CLDs) と HCB に対する人体暴露量の予備的調査を実施し、その結果、血清中の CLDs 濃度と食事嗜好性との間に関連性があると示唆される結果を得た。そこで本年度の研究では、より多くの一般成人の血液に含まれる CLDs や HCB 濃度を測定すると共に、更に詳細な食事の嗜好性や住環境などの生活因子に関する調査を行なうことにより、これらの因子の血中 CLDs 及び HCB 濃度に及ぼす影響について検討を加えた。また、母体末梢血及び腹水、

それに、さい帯血中におけるこれら化学物質の濃度についても測定する。

A8. LC/MS による食品及び生体試料中の植物エストロゲンの分析

大豆中に多く含まれる Daidzein、Genistein、Glycitein 等のイソフラボンは、*in vitro* において女性ホルモン様作用を示す植物エストロゲンとして、その作用が注目されている。一方、日本人の乳癌、前立腺癌の発生率は欧米人に比較して低く、逆に大豆中のこれらの成分がこれらの発癌に対して予防的に作用していると考えられている。

更に最近の研究では、骨粗鬆症についても上記のイソフラボンが有効に働いていることが示唆されている。そこで、上記イソフラボンのヒトへの影響を解明するために、高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)を用いた高感度且つ特異的な分析法を構築し、構築した方法を用いて日本人が摂取する上記イソフラボンの一日量を調査した。更に、これらイソフラボンの体内動態を把握するために尿及び血液中の分析を試みた。

A9. 毛髪及び血液中のブチルスズ化合物の分析法に関する研究

内分泌かく乱化学物質として注目されているトリブチルスズ化合物(TBT)は船底防汚塗料や漁網汚魚剤として長年使用されてきた。近年、法的規制などによって日本近海的环境レベルは横ばいまたは減少傾向にある。しかし、水生生物への毒性が強く、メスの巻き貝の不妊化を引き起こすことがわかっており、

海産魚介類をタンパク質源として多く摂取している我が国としてはその人体曝露量の評価が求められている。そこで本研究では、ヒト毛髪及び血液を対象とし、ヒトの体内に残留するトリブチルスズ化合物及びその分解、代謝物の分析法について検討した。

分析法は昨年度、選択性が高いGC-FPDにて分析する方法を用い、確認法としてSIMによるイオン強度比から金属スズ(Sn)の天然同位体存在比を基に毛髪中の有機スズ化合物の確認を行った。今年度はトリブチルスズ化合物及びその分解、代謝物を対象にテトラエチルホウ素ナトリウムによる簡便なアルキル誘導体化法を用い、内標準物質として安定同位体標識標準品を用いた分析法について検討した。

A10. クロロベンゼン類及びパラベン類の分析法開発と実試料の分析

クロロベンゼン類のうち昨年度の厚生科学研究(内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する研究)により内分泌かく乱作用が心配されるヘキサクロロベンゼン及びジクロロベンゼンが生体試料(血液、臍帯血、母乳)から検出された。また、同様に内分泌かく乱作用が懸念されるパラベン類については代謝物であるパラヒドロキシ安息香酸が検出されている。これらの化学物質が生体に取り込まれる過程について経路を検討し、また、生体中での挙動について調査を行う。

B. 研究方法