

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料(臍帯血等)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

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

主任研究者: 牧野 恒久 (東海大学)

分担研究者: 中澤 裕之 (星薬科大学)

協力研究者: 早川 和一 (金沢大学)

要旨

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、健常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。

A. 研究目的

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、最近著者らは、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β-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(CYP1A1)で処理液及び、ヒト尿中のOH-BaPの同定に適用した。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

12種の OH-BaP は、NCI Chemical Carcinogen Repositories から購入したものを、BaP は Sigma 社製を用いた。ヒト CYP1A1 は Gentest 社製、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(30 U/mL)/アリルスルファターゼ(60 U/mL)は Merk 社製の試薬を用いた。その他の試薬は、HPLC 用または特級を用いた。

### 2) 装置

HPLC ポンプは、LC-10AD (Shimadzu) 2台、880U (Jasco) 2台を用い、カラムオープンは CTO-2A (Shimadzu)、スイッチングバルブユニットは 892-01 (Jasco) 2台 (V1, 2)、データ処理装置は C-R7A (Shimadzu)を用いた。カラムは分離用カラム 3本、C1 カラム ; Discovery RP-Amide-C16 (250×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, SUPELCO)、C2 カラム ; COSMOSIL 5C18AR (250×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, Nacalaitesque)、C4 カラム ; LiChroCart 250-4 Chiradex (250×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, Merk)及び、濃縮用カラム 1本、C3 カラム ; BROWNLEE Spheri-5RP-18 (30×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, PERKIN ELMER)を用いた。またガードカラムとして Discovery RP-Amide-C16 (20×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, SUPELCO)を用いた。検出器は、吸光度を測定する場合には SPD-10AV (Shimadzu)を、蛍光を測定する場合には RF-10AXL (Shimadzu)を 3台(D1-3)使用した。

### 3) HPLC 条件

OH-BaP 標準溶液または、試料溶液をガードカラムを接続した C1 カラム(40 °C)に注入した。溶離液はアセトニトリル/

10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0) (55/45, v/v)を用いた。12種の OH-BaP のうち分離が完全な成分については検出器(D1)で同定・定量した。分離の不十分な成分については、C1 カラムからの溶出時間に合わせてカラムスイッチング(V1)により流路を切り替えることによって C2 カラム(40 °C)へ導入した。溶離液はメタノール/0.1%酢酸水溶液 (75/25, v/v)を用いた。ここで分離できた成分は検出器(D2)で検出した。分離が不十分な成分は、さらに C2 カラムからの溶出液に別のポンプから送液された水を加えて有機溶媒の含量を低下させ、カラムスイッチング(V2)により C3 カラムの先端に吸着させた。その後、バックフラッシュ溶出法により C4 カラムの溶離液で C3 カラムから溶出させ、C4 カラムに導入して分離し、検出器(D3)で検出した。C4 カラムの溶離液としてメタノール/水 (57/43, v/v)を用いた。検出は、CYP1A1 処理液の分析には吸光度 254 nm、尿分析には蛍光、すなわち 3-OH-BaP の極大励起波長(265 nm)、蛍光波長(432 nm)で行った。

### 4) BaP の CYP1A1 処理

反応液は、リン酸カリウム水溶液(pH 7.4)中に 0.3 mM CYP1A1、75  $\mu$ M BaP、0.25 mM NADP<sup>+</sup>、2.5 mM グルコース-6-リン酸、0.25 U/mL グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの濃度になるように調製し、全量 100  $\mu$ L とした。この反応液を 37°C、2 時間インキュベートした後、90°C、10 分間加熱して反応を停止させ、放冷後酢酸エチル(200 $\mu$ L)で 2 回抽出した。有機層を分取し窒素ガスで完全に乾固させた。メタノール(45  $\mu$ L)に再溶解させ、3000 回転

で 10 分間遠心した後、上清の 20  $\mu$ L を HPLC に導入した。

#### 5) 尿試料の前処理

ヒトの尿 (健常人、男、26 歳、非喫煙者) 70 mL に 1 M 塩酸を加えて pH 5.0 とし、酢酸緩衝液 (pH 5.0) 140 mL を加えた後、 $\beta$ -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼを 100  $\mu$ L 加え、37°C、16 時間インキュベートした。反応液を Sep-pak C18 にロードし、水 10 mL で洗浄した後、保持されていた代謝物及びその加水分解物をメタノールで溶出させた。メタノールを完全に乾固させた後、メタノール 700  $\mu$ L に再溶解して 5000 回転 6 分間遠心した溶液の上清 30  $\mu$ L を HPLC に導入した。

### C. 研究結果及び考察

フェノール性水酸基を有する化合物を強く保持するアルキルアミド型逆相カラム (C1) を用いることによって、通常の ODS カラムでは達成できなかった 1-, 3-, 7-, 12-OH-BaP を除く 8 種類の OH-BaP の分離が可能となった。次いで、分離が不十分な 1-, 3-, 7-, 12-OH-BaP をさらにカラムスイッチングにより ODS カラム (C2) に導入して 7-及び 12-OH-BaP の同定が可能となった。さらに分離が不十分な 1-及び 3-OH-BaP を C3 カラムの先端に吸着させた後、 $\beta$ -シクロデキストリン固定化カラムに導入することで 12 種すべての分離が可能となった。6-OH-BaP は、溶液中で極めて分解しやすく、定量が困難であったため、吸光度検出の際にはその分解物のピークで同定することとしたが、蛍光性がないため蛍光検出の際には分析対象か

ら除外することとした。検出限界は、蛍光検出の場合 1~30 fmol/injection (S/N=3) であった。これまでに 12 種すべての OH-BaP を分離した例はなく、はじめての報告であると考えられる。さらに分離条件の改良を検討したところ、C1 カラムから C3 カラムを経て C4 カラムへの 1 回のカラムスイッチングによる 12 種 OH-BaP の分離が可能となり、検出下限の改善の見通しがたった。

BaP の CYP1A1 処理液にこの分析システムを適用したところ、C1 カラム溶出液から 9-OH-BaP を同定することができ、1-, 3-, 7-, 12-OH-BaP に相当するピークも確認された。そこで、1-, 3-, 7-, 12-OH-BaP に相当するピークをカラムスイッチングにより C2 カラムに導入したところ、7-, 12-OH-BaP ではなく 1-, 3-OH-BaP であることが分かった。さらにこの 1-, 3-OH-BaP に相当するピークを C4 カラムに導入したところ、1-及び 3-OH-BaP の両方が確認できた。最終的に、BaP の CYP1A1 処理によって 1-, 3-, 9-OH-BaP が生成したことが分かった。BaP は大気粉塵を介して肺を経由して吸収されることが考えられ、肺で発現している CYP1A1 により水酸化を受け、特にエストロゲンレセプターに対する結合能の強い 3-OH-BaP が生成している可能性が示唆された。

酵素処理をすることでグルクロン酸または硫酸抱合体を加水分解したヒト尿試料をこの分析システムに適用したところ、検出される OH-BaP のほとんどが 3-OH-BaP (3~5 ng/L) であり、わずかに 1-OH-BaP も含まれていることが分かった。酵素処理をしない場合にはこれらの

ピークはまったく検出されなかったことから、尿中にはグルクロン酸または硫酸抱合体として排泄されていると考えられる。以上の検討結果より、ヒトの尿 200 mL を試料として用いれば、1-OH-BaP も含めた BaP の代謝物の定量分析が確実に進めることが分かった。

#### D. 結論

- HPLC-カラムスイッチング法を用いることにより、BaP 水酸化体の一斉分析が可能となった。
- CYP1A1 処理によって生成した BaP 水酸化体(1-, 3-, 9-OH-BaP)を同定できた。
- 健常人(男、26歳、非喫煙者)の尿中から BaP 水酸化体(1-, 3-OH-BaP)を同定し、生体内でも BaP 水酸化体が代謝物として生成することを明らかにした。
- ヒト尿 200 mL を用いれば、BaP 水酸化体の定量が可能である。

今後、内部標準物質の検討等を行って定量性を確立した後、生活習慣(特に喫煙)、環境(交通量の多少)の違い、すなわち BaP の暴露量の異なると考えられるヒト尿中の BaP 水酸化体を分析すると同時に、血液や母乳にこの分析法を適用するためにそれら試料の前処理法の検討を行っていく予定である。

#### E. 研究業績

学会発表

1. 野村 麻貴、鳥羽 陽、木津 良一、久保田 明子、輪島 志帆子、正宗 行人、早川 和一：ディーゼル排気粉

塵及び尿中のベンゾ[a]ピレンとピレンの水酸化体の検出；日本薬学会第120年会、30[PF]12-08, 2000, 岐阜。