

平成 12 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

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 母子生育学系産婦人科学部門教授）

研究要旨

1. 分析法の開発と実試料分析

内分泌かく乱化学物質測定用ディスプレイ器具の開発に関する研究

生体試料中の内分泌かく乱化学物質の暴露量測定を行う当班の研究内容に鑑みて、それらの生体試料を採取、保存する際には測定物質等のコンタミを極力低減させる必要がある。これまでのガラス製に代わり、煩わしい準備の必要もなく、破損やコンタミの心配ないプラスチック製ディスプレイ器具および保存容器の開発を行った。

LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析

分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS）を用いたさい帯血，母体血，腹水及び缶飲料中のビスフェノール A(BPA)の分析法を検討した。分析に供したさい帯血，母体血及び腹水，計 58 検体中の BPA 濃度はほぼ検出限界(0.3ng/mL)以下であった。また，市販缶飲料中の BPA 濃度調査から，製缶メーカーによる BPA 溶出の低減化が進められていることが示唆された。血液試料中の BPA の分析では，超微量レベルの定量が求められるが，現段階ではサンプリング時，と分析操作時のコンタミネーションを「ゼロ」にすることは極めて困難であり，信頼性の高い分析値を得るためにバリデーションされたサンプリング・分析法の確立が必要と考えられる。

生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング HPLC-蛍光定量

我々は、フェノール性水酸基を有する化合物と選択的に反応し，蛍光誘導体を与える 4-(4,5-ジフェニル-1H-イミダゾル-2-イル)ベンゾイルクロリド（DIB-Cl）を開発し，ヒト尿中フェノールやクレゾール類の蛍光定量に成功したが、これを応用して、ビスフェノール A (BPA) の高感度定量のための HPLC-蛍光検出及び過シュウ酸エステル化学発光検出法を、生体試料へ適用可能な超高感度かつ高選択的な分析法に発展させることを目的とした。その結果、カラムスイッチング技術をさらに導入することにより、HPLC-蛍光定量法を確立し、

母体血、さい帯血及び腹水中の BPA 濃度レベルを明らかにした。

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。特にパラベン類はフタル酸エステル類同様に精巣機能に対する影響が報告されており近年その生体への影響が注目されている。生体試料中のパラベン類の測定を行うため、少量の試料で高感度な測定のできる分析法を構築し、化学物質の胎盤通過性や、暴露経路等について検討を行った。パラベン類は化粧品や医薬品等の保存料に使用されており、化粧品からの皮膚吸収がパラベン類の暴露にどの程度影響するかの検討を行った。

フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明

プラスチックの可塑剤として汎用されているフタル酸ジエステル類の代謝物であるフタル酸モノエステル類に関する、高感度かつ再現性の良い生体試料分析法を開発した。本法を用いて、実試料（血清及び腹水）に応用した結果、フタル酸モノブチル及びフタル酸モノベンジルに関してはいずれも検出限界以下であったが、フタル酸モノ-2-エチルヘキシルに関しては、最高 28.8ng/mL が検出された。生体中での代謝過程に関する動態解明に関して、ヒト血清へのジエステル体添加による代謝変換に関する検討を実施した際、種々の酵素により、フタル酸ジエステル類が分解され、モノエステル体へと代謝することを確認した。生体試料中フタル酸エステル類の分析には、様々な要因により、微量分析の詳細な検討が必要と推測される。

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、内分泌かく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 1 2 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により、不安定な 6-OH-BaP を除く 8 種類の OH-BaP を分離し、分離が不十分な 1-, 3-, 12-OH-BaP をカラムスイッチングによりβ-シクロデキストリン固定化カラムに導入することで 11 種全てを分離し、蛍光検出できる。この分析システムを尿試料に適用するための前処理法を検討し、銅-フタロシアニン誘導体を結合させた繊維を用いて濃縮することで回収率をほぼ 100%にした。健常人の尿中代謝物を同定し、ビスフェノール A に匹敵するエストロゲンレセプター結合能を有する 3-OH-BaP が主であることを明らかにした。

生体試料（母乳、母体血、さい帯血等）中の有機塩系化学物質の分析法開発とその暴露評価

生体試料を対象とした、内分泌かく乱作用をもつ有機塩素系化学物質（PCB、農薬、ダイオキシン類）の迅速・精密分析法を開発し、母体および胎児、乳児暴露評価を行った。本分析法により、さい帯血などの低脂肪組織における分析が可能となり、PCB については、母乳、母体血、さい帯血から 35 種類の異性体か

検出され、平均総 PCB 濃度 (fat basis) は 95ng/g (母乳)、99ng/g (母体血)、61ng/g (臍帯血) であった。PCB 及び有機塩素系農薬の臍帯血中濃度は (Whole basis) 母体血の約 1/4 であった。また、これら化合物の母体から胎児への暴露量は臍帯血流量が明らかになれば推定が可能になった。母乳をかいした乳児暴露評価は、有機塩素系農薬はそれぞれの ADI の 33% ~ 8% であった。一方、ダイオキシン類においては TDI を大幅に上回った。

内分泌かく乱化学物質の胎児及び母体における汚染状況の分析とその細胞障害等の解析

内分泌かく乱化学物質の母体を介した胎児等への影響を明らかにするために、絨毛、羊水、さい帯血等の試料収集とこれら試料における内分泌かく乱化学物質 (PCB、BPA 等) 汚染状況の調査を開始した。これらの調査をとおして同一母体及び胎児における内分泌かく乱化学物質の経時的な汚染状態、及び母体と胎児との比較により化学物質の母体から胎児への伝達に関する基礎的情報を得ることができる。また、内分泌かく乱化学物質として疑われている重金属類の母体及び胎児への蓄積状況と重金属等に対する *in vivo* 細胞反応を調査し、内分泌かく乱化学物質がヒト健康に及ぼす影響の作用機序の一つと考えられる遺伝子 (DNA) への障害として、8-ヒドロキシ-デオキシグアノシンの検出法を検討した。

不妊症患者の血液等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

不妊症患者および母体 (さい帯血) を対象として、クロルデンとその関連物質 (CLDs) 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した。検出を試みた 7 種の化学物質のうち、HCB の検出率が 98% と最も高く、次いで *trans*-ノナクロルが 63%、*cis*-ノナクロルが 17% で、それ以外の物質は検出されなかった。また、検出された物質の中央値は、ヘキサクロロベンゼンが 0.05 ppb、*trans*-ノナクロルが 0.10 ppb、*cis*-ノナクロルが 0.04 ppb であった。同一患者から採取した試料中の HCB 濃度については、患者末梢血と腹水には有意な正の相関関係が認められたが、母体末梢血とさい帯血には有意な相関関係は認められなかった。

不妊症患者の血清及び腹水中の揮発性有機化合物の分析

不妊症患者の生体内における揮発性有機化合物の存在実態を明らかにすることを目的に、18 名の患者 (平成 11 年度 5 名、平成 12 年度 13 名) の末梢血及び腹水を分析した。その結果、今回測定を行なった不妊症患者の体内には、トルエンなどの揮発性有機化合物が ppb からサブ ppb のオーダーで存在することが示唆されたが、ナフタレンは全く検出されなかった。また、採血方式及び場所の違いによる血中揮発性有機化合物濃度の違いについても検討した結果、生体内における揮発性有機化合物のより詳細な存在実態を明らかにするためには、周

困りの環境等からの汚染防止対策を施した採血方式及び測定法の確立が重要な課題であると考えられた。

2. 生体への影響と作用機序

環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

内分泌かく乱物質は細胞分化及び生殖器管形成期すなわち胎児期に暴露されると、成長後およびその子孫への不可逆的影響が心配されている。胎生期の内分泌かく乱化学物質の作用を解析するためには、母体・胎盤・胎児における化学物質の代謝解毒反応を詳細に明らかにすることが求められており、我々は、化学物質解毒酵素の妊娠期での機能を明らかにする事を目的として、臓器・細胞レベルおよび酵素レベルでの研究をおこなった。

経口免疫寛容へのジブチルスズの影響 抗原特異的な T 細胞応答への影響

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体機能へのリスク評価を行うことを目的として、食品抗原の経口感作によって誘導される免疫応答への影響を検討した。内分泌かく乱作用が疑われる物質のうち、胸腺萎縮などの免疫機能への影響がすでに知られている DBT(塩化ジブチルスズ)について、末梢リンパ節細胞の抗原特異的な応答への影響を検討した。

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす植物エストロゲンの阻害効果

環境由来の化学物質の内在性ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす影響を解明する目的で、ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いてコルチゾール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を確立した。このアッセイ系を用いて食餌として多量に摂取する可能性がある植物エストロゲンであるフラボン及びイソフラボンの影響を検討した結果、7 物質がコルチゾール産生を阻害した。この阻害作用は、エストロゲンレセプターを介する作用ではなく、コルチゾール合成を触媒する酵素の阻害を介する作用で、特にヒドロキシステロイド脱水素の 3 β -HSD タイプ 及びモノオキシゲナーゼの P450c21 を阻害することが明らかになった。

エストロゲン受容体、 を介した内分泌かく乱化学物質の作用機序についての研究

近年、化学物質の持つ内分泌攪乱作用が問題となっており、その内分泌攪乱作用については、様々な評価法が確立しつつある。しかし作用機序の解明は充分になされていない。今回は、代表的な評価法として、エストロゲンレセプター 発現細胞を用いた E-screen assay (エストロゲン依存性細胞増殖効果の評価) 及び、エストロゲンレセプター、 における Binding assay を行い、内分泌攪乱物質のエストロゲンレセプターを介した作用機序について検討した。その結果、全ての被検物質にエストロゲン様細胞増殖効果が認められた。またエスト

ロゲン受容体 における 17 β -estradiol との Competition binding assay では、各々の物質特有の競合結合を認め、それぞれのエストロゲン様作用の発現においては、介するレセプターが必ずしも均一ではないことが明らかとなった。

ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

植物エストロゲンは大豆やもやし、ホップ等に存在する天然由来物質であり、構造がエストラジオールに類似していることから、エストロゲン様物質であるとして注目されている。一方、大豆食品を多く摂取しているアジア人には、乳癌や前立腺癌等のホルモン依存性癌発生率が低いことから、抗エストロゲン様物質であるとも言われているが、詳細な研究はなされていない。そこで、エストロゲン様作用を検出する目的で、ヒト乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により、植物エストロゲン及び植物エストロゲンがその他のエストロゲン様物質と共存した条件下での乳癌細胞に対する影響について検討した。

内分泌かく乱化学物質の生体影響における子宮内膜症の発生と増殖のメカニズムに関する研究

内分泌かく乱化学物質と考えられているフタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ノニルフェノールおよびビスフェノール A (BPA) を用いてヒト子宮体癌細胞 (HHUA 細胞) の増殖性を *in vitro* で検討した。ついで *in vitro* の BPA の濃度を考慮して、妊娠マウスの皮下に BPA を投与し胎児発育を検討した。また種々の化学物質や薬物類を細胞外にトランスポートする P - 糖タンパクを欠損させたノックアウトマウスを用いて同様の胎児発育を検討した。さらに出生 2 ~ 3 ヶ月の未妊娠の雌マウスに BPA を投与した後に腹腔内所見を観察したが、明らかな子宮の肥大や子宮内膜症の所見は得られなかった。

分担研究者

中澤裕之 星薬科大学 教授

織田 肇 大阪公衆衛生研究所

所長

塩田邦郎 東京大学農学生命科学

大学院 教授

鈴森 薫 名古屋市立大学 教授

A. 研究目的

1. 分析法の開発と実試料分析

内分泌かく乱化学物質測定用ディスプレイザブル器具の開発に関する研究

生体試料中の内分泌かく乱作用の疑いがある物質の暴露量測定を行うこと場合、それらの試料採取の際に測定物質等の混入を極力低減させなければ、高感度分析の意味が無くなってしまふ。これまでは、洗剤洗浄、アセトン洗浄、200 加熱、清浄域で徐冷等、繁雑な作業が可能な、ガラス製の採取器具や保存容器を用いて、測定物質の混入を低減させてきた。本研究では、ガラス製に代わり、煩わしい準備の必要もなく、破損の心配ないプラスチック製ディスプレイザブル生体試料採取器具および保存容器を開発を目的とした。特に本年は、混入の可能性の高い DEHP (Di-2-ethylhexyl phthalate) に焦点を当て、設定した採取器具での採取操作や設定した保存容器での保存中の DEHP の混入量を測定し、その影響度を検討した。

LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析

ビスフェノール A (BPA) は、内分泌かく乱作用が疑われる物質として環境庁よりリストアップされた 67 物質の中でも注目の高い物質で、その国内生産量は第 3 位を占めている。これまで ELISA 法や GC-MS を使った他の幾つかの報告では、血液中から平均で数 ng/mL (ppb) の BPA が検出されたともあるが、我々の構築した高感度な高速液体クロマトグラフ-質量分析計

(LC-MS) を用いた予備調査では、ボランティア 7 名の血液 (血清) 中の濃度は検出レベル以下であった。今回は、先に構築した方法を一部改良し、さい帯血、母体血、腹水等計 58 検体について分析し、更に前回の調査で比較的高濃度で BPA が検出された缶飲料 (同一ブランド) 中の実態調査も実施した。

生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング HPLC-蛍光定量

我々は、これまでにフェノール性水酸基を有する化合物と選択的に反応し、蛍光誘導体を与える 4-(4,5-ジフェニル-1*H*-イミダゾル-2-イル)ベンゾイルクロリド (DIB-Cl) を開発し、ヒト尿中フェノールやクレゾール類の蛍光定量に適用してきた。さらに、ビスフェノール A (BPA) の高感度定量のための HPLC-蛍光検出及び過シュウ酸エステル化学発光検出法を開発を行い、ほ乳びんから溶出される BPA の定量等を行ってきた。本研究は、さらにカラムスイッチング技術の導入し、生体試料へ適用可能な超高感度かつ高選択的な分析法を開発すると同時に、この HPLC-蛍光定量法を用いて、母体血、さい帯血由来血清及び腹水中の BPA 濃度の測定を実施、その濃度レベルを明らかにすることを目的とした。

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

平成 10 年度厚生科学研究 (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 (母体

血、さい帯血、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p-ヒドロキシ安息香酸が検出された。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ことを目的とした。

フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明

フタル酸エステル類は機能性、加工性、経済性等に優れたプラスチックの可塑剤であり、幅広い用途で使用されているが、内分泌かく乱化学物質として疑われている。ヒトへの内分泌かく乱作用を検証する上で、生体試料からの微量測定法の開発は必要不可欠であるが、フタル酸エステル類は生活環境中に多く存在するため、その暴露経路は空気、水等幅広く、その結果として高いバックグラウンド値として現れ、微量測定を困難としている。そこで、平成10年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「内分泌かく乱化学物質の胎児、成人などの暴露に関する研究(指定研究)」において、高感度分析上の妨害となるバックグラウンドを極力排除した血中フタル酸エステル類の精度高い微量分析法を開発した。しかしながら、フタル酸ジエステル類は生体内に取り込まれると速やかに代謝を受け、血中にフタル酸モノエステル類として、また尿中にはフタル酸モノエステル類のグルクロン酸抱合体として存在することが報告されており、暴露量の評価にはモノエステル体を分析することが適当で

あると考えられる。動物実験における毒性評価は、di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)はげっ歯類でペルオキシソーム(peroxisome)増殖による肝癌が報告されている。また、DEHP、dibutyl phthalate (DBP)、butylbenzyl phthalate (BzBP)は動物で催奇形性が認められている。DBPはその代謝物である monobutyl phthalate (MBP)により毒性を示し、monobenzyl phthalate (MBzP) mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP)はセルトリ細胞への毒性と催奇形性が報告されている。そこで、これらの報告より、測定対象物を MBP、MEHP、MBzP とし、ヒト血清中のこれらフタル酸モノエステル類分析法を検討した。

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(PAHs)は、癌や喘息などの原因となることが知られている。我々は、ベンゾ[a]ピレン(BaP)をはじめとする数種類の PAHs が抗エストロゲン、抗アンドロゲン作用を有することを明らかにした。またヒトエストロゲンレセプター (hER) に対する競合実験及び酵母の hER に応答した β -ガラクトシダーゼの発現系を用いた実験では、BaP の代謝物として知られているモノヒドロキシベンゾ[a]ピレン(OH-BaP)の水酸基の位置の異なる異性体12種のうち、3-OH-BaPがビスフェノール A (BisA)に匹敵する強さの結合能を有することを見いだした。こ

ことから、ヒトの BaP 暴露量を把握し、その内分泌かく乱作用の全容を明らかにするためには、BaP のみならず、その代謝物も視野に入れた尿や血液中のモニタリングが不可欠であると考えられた。そこで、昨年度の厚生科学研究においては、カラムスイッチング HPLC による OH-BaP の異性体の分離分析法を開発した。本年度は更に実用性を高めるためにこれを改良し、より簡便な分析システムを構築した。また、本分析システムをヒト尿試料に適用するにあたり、試料の前処理法として、グルクロン酸抱合体の加水分解、及び銅フタロシアニンレーヨンを用いた被検体の濃縮法について検討した。さらに健常人尿中 OH-BaP の同定、及び定量を実施した。

生体試料(母乳、母体血、さい帯血等)中の有機塩系化学物質の分析法開発とその暴露評価

PCB などの有機塩素系化学物質による内分泌かく乱作用とその健康への影響が問題となっている。これら化学物質は体内への蓄積性が高く、継続的な曝露の要因となっている。内分泌かく乱作用は胎児期から成長期における曝露による影響が問題となっており、母体から血液あるいは母乳を通しての曝露状況を知ることが最も重要な課題である。そこで、胎児および出生後の汚染実態を明らかにすることを目的とした迅速・精密分析法の開発を行うと共に母体血・さい帯血・母乳のこれら化学物質による汚染レベルについて詳細な検討を行った。

内分泌かく乱化学物質の胎児及

び母体における汚染状況の分析とその細胞障害等の解析

環境中に存在する数多くの内分泌かく乱化学物質がヒト健康へ重大な影響を及ぼしていると予測されている。この中の化学物質のいくつかは調査が行われており、その実態や作用機序については、ある程度判明しているものがある。しかし、他のほとんどの内分泌かく乱化学物質についての、生体への汚染状況に関する調査は、いまだ不十分であり、そのヒト健康への影響についての情報は極めて限られている。特に、母体を介した胎児への汚染とその影響の実態はほとんど分かっていない。そこで、本研究班において我々は内分泌かく乱化学物質の母体を介した胎児への汚染の実態把握と、これら内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響の機序を検討することを目的として、本年度から調査解析を開始した。まず、当グループでは生体試料(羊水、さい帯血、臍帯、母体血等)の系統的集積を図り、主要な内分泌かく乱化学物質であるポリ塩化ビフェニール(PCB)、ビスフェノール A(BPA)等の母体と胎児試料における測定によって、母体と胎児の汚染濃度の相関及び汚染濃度の経時的変化について検討するための基礎的資料を得ることに着手した。さらに、内分泌かく乱化学物質の汚染濃度とそれらに対する *in vivo* の細胞反応の測定、及び内分泌かく乱化学物質によるヒト健康影響の作用機序の一つとしてこれら化学物質による遺伝子への障害の可能性を測定する方法について検討を加えた。

不妊症患者の血液等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、腹水、母体末梢血及びさい帯血の計24検体について、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の測定を実施した結果、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル及びヘキサクロロベンゼンの3物質がサブppbのオーダーで検出された。そこで、本年度の研究ではより多くの試料を分析し、昨年度の調査結果の確認を試みるために、不妊症患者及び母体末梢血、腹水、それに帯血中のこれら化学物質の濃度を測定した。さらに、患者末梢血と腹水、及び母体末梢血とさい帯血における濃度の相関についても検討を加えた。

不妊症患者の血清及び腹水中の揮発性有機化合物の分析

高分子系接着剤や塗料等の溶剤には、ベンゼン、トルエン、キシレン等

が使われており、空気中に揮散したこれらの化合物に人体が曝されることが問題となっている。これら溶剤由来の化合物以外にも、食品の容器包装や輸送用の梱包資材等に汎用される発泡スチロールから漏出するスチレンモノマー、あるいは、衣類の防虫等に使われる *p*-ジクロロベンゼンやナフタレンなど、主に空気を介して人体に取り込まれ、内分泌かく乱作用などの生体影響が疑われている揮発性有機化合物はかなりの数にのぼる。今回、不妊症患者の生体内における揮発性有機化合物の存在実態を明らかにすることを目的に、その血液及び腹水中の濃度を測定した。また、サンプリング方法及び場所の違いによる血中揮発性有機化合物濃度の違いについても検討を加えた。

2. 生体への影響と作用機序

環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

薬物は体内に取り込まれた後、肝臓で様々な代謝を経て排泄される。内分泌かく乱物質の作用機序の解明や毒性を評価するために、母胎から胎盤を通して胎児に到達するまでの各臓器での代謝反応および内分泌かく乱物質による細胞分化への影響を明らかにしてゆくことを目的とする。特に、内分泌かく乱物質が吸収される消化管と排泄される腎、化学物質のバリアーである胎盤での代謝と動態について、肝臓の場合と比較して、その特徴を調べる。また、上記臓器で働いている酵素の機能を試験管レベルで測定し、どのような機能がどのような臓器でど

のような時期にどの程度発現するのかを明らかにすることを目的とした。

経口免疫寛容へのジブチルスズの影響 抗原特異的な T 細胞応答への影響

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体への影響は、内分泌系だけでなく免疫系や神経系などの他の生体機能も含めた検討を行うことの必要性が認識されている。一方、免疫担当細胞である T 細胞や B 細胞の応答は様々な細胞応答や物質により増強・阻害され修飾されることが知られている。このことから、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質が免疫担当細胞の応答に影響を及ぼし、正常な応答を変化させることが考えられる。特に T 細胞は外来抗原の認識に重要な役割を果たし、その分化過程で暴露される物質の影響は大きい。

船底塗料や食品の包装材料等に幅広く用いられていたトリブチルスズ化合物 (TBT) は、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明らかとなっている。その代謝物のうちジブチルスズ (DBT) は、依然プラスチックの安定剤として用いられ、環境中の残留性も高い。また、ラットにおいて胸腺萎縮を引き起こすことが明らかとなっている。そこで、マウスを用いて、より実態に近い暴露モデルを想定し、ジブチルスズの経口免疫寛容への影響を検討することを目的とし、経口感作抗原に対する T 細胞応答についての影響を検討した。

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコ

ルチゾール産生に及ぼす植物エストロゲンの阻害効果

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。近年になりステロイドホルモン生合成に關与する酵素群がクローニングされ、それらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細、およびステロイドホルモンの核内受容体が明らかにされたことからステロイドホルモンの作用発現機構が分子レベルで明らかにされつつある。内分泌かく乱化学物質の曝露により内在性ホルモンの合成や分泌が阻害された場合、正常な内分泌系がかく乱されると考えられるが、特にこれらの化学物質が胎生期から新生仔期の限られた時期に曝露されることで、ステロイドホルモン合成が阻害された場合、生物における発生や生殖において深刻な影響が表れることが懸念される。内分泌かく乱化学物質のうち植物由来のエストロゲン活性物質は植物エストロゲンとも呼ばれており、特に大豆や大豆関連製品には植物エストロゲンの一種、フラボンやイソフラボンが多く含まれている。従来植物エストロゲンはヒトの健康に良い影響を与えられられており、特に疫学調査等により、大豆製品を多く摂取する日本

やアジアでホルモン依存性の癌である乳癌や前立腺癌発生率が低いと言われている。しかし、これら植物エストロゲンのステロイドホルモン産生に及ぼす阻害効果については検討されていない。我々は昨年度、内分泌かく乱化学物質の生体内ステロイドホルモン合成に及ぼす影響を解明することに視点をおき、ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いて *in vitro* で、ステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を確立した。本研究ではステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を用いて、代表的な植物エストロゲンとして知られるフラボン及びイソフラボンのステロイドホルモン産生に及ぼす阻害効果を検討することとした。

エストロゲン受容体、 を介した内分泌かく乱化学物質の作用機序についての研究

近年、内分泌攪乱作用を持つ化学物質が多数報告されているが、それら内分泌攪乱物質の作用機序についてはまだ十分な解明がなされていない。代表的な内分泌攪乱作用のスクリーニングの一つにエストロゲンレセプター発現細胞を用いた E-screen assay があるが、これまでのヒト乳腺細胞由来の MCF-7 に加え、今回は、子宮内膜由来細胞である、HHUA を用い同様の検討を行い、組織間における内分泌攪乱物質のエストロゲン作用の違いについて検討した。2 種の細胞間におけるエストロゲン様細胞増殖作用

の違いに関して、今回はエストロゲンレセプター、 、それぞれにおける Binding assay を行い、レセプターサブタイプの関与について検討した。さらにこれらの検討から、現在報告されている代表的な内分泌攪乱物質について、それらレセプターを介した作用から作用機序別に分類することも今回の目的とした。

ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

植物エストロゲンは大豆やもやし、ホップ等天然に存在し、内分泌かく乱作用が疑われている物質の 1 つである。構造がエストラジオールに類似していることより、エストロゲン様作用があると言われている。実際、内分泌かく乱作用スクリーニング法の 1 つである受容体結合試験において、植物エストロゲンである Genistein, Daidzein はエストロゲンレセプター 及び に結合能を有する。また、1940 年代にオーストラリアで起きたクローバー病は、植物エストロゲンであるクメストロールを含むクローバーを多量に摂取した羊に死産や奇形が発生したというものであり植物エストロゲンのエストロゲン様作用による結果であると考えられている。一方、大豆食品を多く摂取するアジア人の血中植物エストロゲン濃度は Genistein: 158.6ng/mL, Daidzein: 82.5ng/mL と、欧米人に比べ約 10 倍高い。このことがアジア人において乳癌や前立腺癌等、ホルモン依存性癌発生率が低い要因であると指摘されている。

よって、植物エストロゲンにおける抗エストロゲン様作用の可能性も示唆されているが、詳細な研究はなされていない。そこで、植物エストロゲンのエストロゲン・抗エストロゲン様作用を検出する目的で、乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により、植物エストロゲン単独及び植物エストロゲンがその他のエストロゲン様物質と共存した条件下での乳癌細胞に対する影響について検討した。

内分泌かく乱化学物質の生体影響における子宮内膜症の発生と増殖のメカニズムに関する研究

近年、さまざまな化学物質によりヒト体内の内分泌環境がかく乱されていることが懸念されている。特に妊娠初期の女性がこれらの化学物質に暴露された場合の胎児の発育に関する胎児健康影響や、若年女性における子宮内膜症や子宮内膜増殖症の増加傾向が、実は内分泌かく乱化学物質による生殖器の早熟化に起因する可能性が考えられつつある。今回われわれは、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ノニルフェノールおよびビスフェノール A (BPA) などの化学物質を用いてエストロゲンレセプターを有するヒト子宮体癌細胞 (RINKEN GENE BANK :HHUA 細胞) における細胞増殖性を *in vitro* で検討した。ついで *in vitro* の結果を踏まえ、BPA の濃度を設定し、妊娠初期のマウスに皮下投与し胎児発育への影響について、出生マウスの体重をコントロール群と比較検討した。次に出生後 2~3 ヶ月経過の未妊娠の雌

マウスに同様に BPA を皮下投与し、子宮の発育状況や腹腔内の子宮内膜症所見の有無について検討した。胎盤の合胞体栄養細胞層、絨毛上皮に多く存在する P - 糖タンパクは主に化学物質や他の薬物を細胞外へ排出する働きを有する。この P - 糖タンパクをコードする multidrug resistance (mdr1a/1b) ジーンを欠損させたノックアウトマウスについても同様に BPA を投与し、さらに RT-PCR による解析を行った。

B.研究方法

1. 分析法の開発と実試料分析

内分泌かく乱化学物質測定用ディスプレイ器具の開発に関する研究

生体試料採取器具および保存容器について、使用する際の要求特性を検討し、全てに共通する点として、1. 包装から取り出して直ぐ使えること、2. 滅菌済みであること、3. 通常使用条件下で破損しないプラスチック製であること、4. 測定物質の混入が少ないこととした。内分泌かく乱作用の疑いのある物質の混入を低減することを目的とした場合、その中でもフタル酸エステル類、ノニルフェノール類、アジピン酸エステル類、ビスフェノール A を特に注意すべき物質とした。以上の目的のため、原料に意図的に使用されていないことと、通常の製造過程で残留、生成、混入しないことを考慮し、更に、無意識の汚染防止対策の一つとして、ヒトの手で触れずに大量生産されていることも条件として、選定をすすめ

た。テルモ社製の器具は製造工程の調査によりその構成原料を明らかにし、製造工程の不明な他社品は、構成部品を熱プレス法で薄い試料片に加工して、透過の赤外吸収スペクトル法 (FT-IR) で同定した。本年のターゲットとした DEHP 測定は、GC/MS (SIM: Selected Ion Monitoring) により行った。測定試料調製はヘキサン抽出により次の 2 段階の方法で行った: 初めは、24 時間室温でヘキサンと接触、抽出させて測定試料調製した。さらに、DEHP が検出されたものについて、生体試料採取方法等を考慮に入れて、ヘキサン抽出時間を決めて試料調製を行った。

LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析

生体試料は東海大学病院から提供されたものを用いた。缶飲料は埼玉県内で市販されているコーヒー、紅茶、日本茶、果実飲料、炭酸飲料缶などを用いた。測定は、高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS): Hewlett Packard 製 HP1100 series LC-MSD を使用した。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 法を採用し、それぞれモニターイオン m/z 227, m/z 241 により得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め、BPA 及び BPA- d_{16} の標準溶液のデータから絶対検量線法により検量線を作成した。血清、腹水、缶飲料: 生体試料は 1mL を、缶飲料は 5mL を採り、ISOLUTE Multimode カートリッジに負荷する。水 3mL 及び 20% メタノール 3mL で洗浄した後メタ

ノール 3mL で溶出し、減圧乾固後 10%メタノール 1mL に溶解して試験溶液とした。

生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング HPLC-蛍光定量

分析操作: 血清 100 μ l を塩酸酸性としたのちクロロホルム 1.0 ml を用いて BPA を抽出した。このクロロホルム層 0.85 ml を蒸発乾固後、5 mM DIB-Cl のアセトニトリル懸濁液 100 μ l 及び 1.5M トリエチルアミンのアセトニトリル溶液 5 μ l を用いて蛍光標識 (35 , 20 分間) を行った。この反応溶液に 12.5% アンモニアのアセトニトリル溶液 10 μ l を添加し、さらに室温下、10 分間放置した。5% 酢酸溶液 10 μ l を加えて反応を停止したのち、メンブランフィルターでろ過し、5 μ l を HPLC システムに注入した。

測定のために、カラムスイッチング HPLC-蛍光定量装置を構築した。: 注入された試料は第一の分離カラムで粗分離された後、DIB-BPA を含む分画がカラムスイッチングによりさらに第二の分離カラムに導入され、蛍光検出される装置である。

HPLC 条件: 第一溶離液にはアセトニトリル/メタノール/水の 72:15:13 (v/v/v) 混液を、第二溶離液にはアセトニトリル/メタノール/0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) の 55:33:12 (v/v/v) 混液を使用した。また、それぞれの流速は 0.1 及び 0.3 ml/min. に設定した。両分離カラムによる分離は 35 にて行い、カラムス

イッチングのタイミングは試料注入後 10.75 min. とした。蛍光検出は ex: 350 nm, em: 475 nm で行った。

試料として同一個人より得られた母体血及びさい帯血由来の血清セット(9組)及び不妊症患者の血清及び腹水のセット(21組)を用いた。これはいずれも東海大学医学部において採取された試料である。

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

装置器具 (GC/MS装置: 日本電子 GC/mate、SPMEファイバー: supelco製 65 µmPDMS-DVBコーティング、固相樹脂: waters製SEP-PAK tC18)を用いた。

1) 生体試料中におけるパラベン類及びp-ヒドロキシ安息香酸の定量: 血液試料は、試料1mlにサロゲート化合物として3-ヒドロキシ安息香酸50ng及び25 µlの塩酸を加え、精製水1mlで希釈し、ケイソウ土カラムに負荷した。溶出は酢酸エチル30mlで行った。エバポレーターで濃縮後、酢酸エチル0.5mlに溶解後、BSTFAを100 µl添加し、シリル化を行い、その試料をGC/MSで定量した。また、母乳では、試料4mlを10mlスクリーキャップ付き遠心管に分取し、サロゲートとして3-ヒドロキシ安息香酸200ngを添加後、10%炭酸ナトリウム溶液0.5mlを加えアルカリ性(pH10程度)にしたのち、n-ヘキサン4mlを加え振とう後遠心分離しヘキサン層を除去して脂肪分を除去し、その後、遠心管の下層にある水層をパスツールピペットで1ml分取し、濃塩酸50 µlを加え、後は血液試料と同様な処

理を行った。

2) 化粧品中のパラベン類の分析: 化粧品中のパラベン類の測定は、化粧水では試料1mlを、乳液、ファンデーションについて0.1g~0.5gを分取後、メタノール1mlに溶解し、その後、蒸留水で10mlになるよう希釈し、うち試料2ml~5ml分をメタノール、水でコンディショニングしたSEP-PAK tC18に通水し、蒸留水10mlで洗浄し、メタノール10mlで溶出させた。定量はHPLC(UV270nm)により行った。

3) 化粧品の塗布実験: パラベン類の皮膚吸収による暴露実態を把握するため、マウスを用いたパラベン含有模擬化粧品による塗布実験を行った。模擬化粧品としてブチルパラベンをジペンタエリトリット脂肪酸エステルに2%濃度になるように溶解し、Wistar系ラット(雄)1匹あたり0.5gを塗布した。また、模擬化粧水として、メチルパラベン、プロピルパラベンを含む精製水(10%のエタノールを含む)をWistar系ラット(雄)に塗布した。血液中のパラベン濃度は、塗布直前及び一定時間経過後のマウスから血液を採取し遠心分離処理した血清中のパラベン類濃度を測定した。

4) 血液中の有機塩素化合物(HCB、クロルデン類、p,p'-DDE)の簡易測定: 血液1ml(血清試料)を12mlヘッドスペース瓶に採り、サロゲートとしてHCB-13C6 2ngを加え、血清が凝固しないように蒸留水4mlを加えてバイアルキャップをした。測定は、SPMEファイバー: supelco製65 µmPDMS-DVBコーティングをヘッドスペース瓶に差し込み

90にて30分ヘッドスペースSPMEによる捕集を行い、分析はGC/MSにより行った。

フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明

測定に用いた液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC/MS)は、島津社製 LCMS-2001 システムを用いた。データ処理に関しては、LCMSsolution for Win.により、行った。ヒトプール血清を用いて前処理法を検討した。血清3mLに各標準の重水素化体を100、50、10ng/mL濃度で加え、逆相モード、陰イオン交換の二種のカートリッジを用いて固相抽出法を行った。Waters社製 OASIS HLB (1mL/30mg)は、メタノール(1mL)、水(3mL)でコンディショニングし、血清(1mL)負荷後、10%メタノール(1mL)で洗浄後、メタノール(2mL)で溶出し、窒素気流下で濃縮後200・LとしてLC/MSで分析した。OASIS MAX (1mL/30mg)は、0.1%ギ酸/メタノール(1mL)、水(3mL)でコンディショニングし、血清(1mL)負荷後、10%メタノール(1mL)で洗浄後、0.1%ギ酸/メタノール(3mL)で溶出し、窒素気流下で濃縮後200・LとしてLC/MSで分析した。

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

HPLCポンプとその条件は昨年度の報告内容を検討して再構築した。

1-OH-Pyr 及び 3-OH-BaP のグルクロン酸抱合体(-G)の合成：ガラス遠心管(50 mL)に、UDP-グルクロン酸三ナトリウム(1.5 mM)、塩化マグネシウム(5.0 mM)、及び 1-ヒドロキシピレン

(1-OH-Pyr) 又は 3-OH-BaP (5.0 μ M)の濃度となるように、それらの試薬を50 mM トリス緩衝液(pH 7.5) 20 mL中に溶解した。活性化済み UDP-グルクロン酸転移酵素(0.1 mg protein)を加え、37、2時間インキュベーションした。予めコンディショニングした固相抽出カートリッジ(OASIS, HLB 6cc 500 mg)に反応液を導入した。カートリッジを水10 mLで洗浄した後、それぞれのグルクロン酸抱合体をアセトニトリル/水=30/70 (v/v)溶液(40 mL)で溶出させた。溶出液を減圧乾固後、残渣をエタノール1 mLに溶解させた。各抱合体の同定は、LC-MS (ESI)で行った。1-OH-Pyr-G: m/z 393 $[M-H]^-$, m/z 412 $[M+NH_4]^+$; 3-OH-BaP-G: m/z 443 $[M-H]^-$, m/z 462 $[M+NH_4]^+$ 。また、調製した各抱合体溶液の濃度は、 β -グルクロニダーゼにより加水分解することで得られた脱抱合体の濃度から、6.3 μ M (1-OH-Pyr-G)、0.65 μ M (3-OH-BaP-G)と概算された。

ヒト尿試料の前処理：被験者尿200 mLに1 M塩酸を加えてpH 5.0とし、100 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)400 mLで希釈した後、 β -グルクロニダーゼ(170 U/mL尿)/アリルスルファターゼ(6 U/mL尿)を添加し、37、8時間インキュベートした。その後、ブルーレーヨン0.6 gを添加し24時間攪拌した。レーヨンを取り出し水で洗浄後、ペーパータオルで乾燥させた後、メタノール100 mLに浸し30分間超音波抽出する。これを2回繰り返した後、抽出溶媒を減圧乾固し残渣をメタノール200 μ Lに再溶解させ、遠心後上澄みを試料とした。

以上の操作について、酵素を添加せず
に同様に行った場合をブランク試料
とした。

抱合体の加水分解率の検討：水 100 mL
に 1-OH-Pyr-G が 400 ng/L、3-OH-BaP-G
が 20 ng/L の濃度となるように添加し、
酢酸緩衝液 (pH 5.0) 200 mL で希釈し、
 β -グルクロニダーゼ / アリルスルフ
ァターゼを加え、37、0.5、1、8、
16 時間インキュベートした。反応後、
銅フタロシアニンレーヨン 0.30 g を
添加し 24 時間攪拌した。以下、尿試
料と同一操作を行い、残渣をエタノー
ル 1 mL に溶解させ、HPLC に導入した。

ブルーレーヨンによる尿中 1-OH-Pyr
及び 3-OH-BaP の添加回収試験：
1-OH-Pyr 1 μ g/L、及び 3-OH-BaP 15
ng/L の濃度となるように、ヒト尿試料
200 mL に添加し、ブルーレーヨンを
用いて尿試料の前処理の項と同様の
操作を行った後、抽出溶媒としてメタ
ノール、メタノール / アンモニア水
=50/1 (v/v)、ジオキサンの 3 種を用い
て抽出した。最終的に 1 mL とした検
液を HPLC に導入した。

**生体試料 (母乳、母体血、さい帯
血等) 中の有機塩系化学物質の分析法
開発とその暴露評価**

平成 11 年度に東海大学により採取さ
れた 10 人分の母体血、さい帯血、母
乳、計 30 試料を用いた。分析に用い
た GPC-GC/MS は、前年度の同研究によ
り開発した装置である。各試料からの
脂肪抽出は Paterson の方法に基づい
て行った。本法により抽出された平均
脂肪量は、さい帯血 0.197%、母体血
0.895%、母乳 3.04% であった。分析

法を均一化するため、ほぼ同量の脂肪
すなわち、さい帯血 (4ml) 由来：全
量、母体血由来：約 20mg、母乳由来：
約 40mg を精秤し用いた。脂肪分解は、
PCB と農薬の同時分析を目的とし硫酸
分解による方法を選択した。また硫酸
分解で残った極性成分の除去と脱水
を目的とし、無水硫酸ナトリウムとフ
ロリジルの積層カラムを、低分子の除
去を目的として GPC を用いてクリーン
アップを行った。母乳中ダイオキシ
ン類分析は、10 名分の母乳由来の脂肪
を均等に混和し、2.0g を精秤したもの
について、従来法に従いアルカリ分解、
積層カラム、アルミナカラム等による
クリーンアップを行ったのち、高分解
能 GC-MS により分析を行った。

**内分泌かく乱化学物質の胎児及
び母体における汚染状況の分析とそ
の細胞障害等の解析**

-1 生体試料の系統的収集と採取容
器の検討：内分泌かく乱化学物質はヒ
ト健康に種々の影響を及ぼしている
可能性が指摘され、多くの化学物質が
その候補として上げられている。これ
らの化学物質は成人はもとより母親
を介して胎児への影響が危惧されて
いるところであるが、しかしその実態
は特定の化学物質を除いてまだ十分
に把握されていない。本研究班にお
いて我々は胎児等における実態を可
能な限り明らかにして、母体との関連、
その汚染状況と経時的な変化を明ら
かにすることを目指して以下の生体
試料について収集を図り、内分泌かく
乱化学物質の影響調査に着手した。収
集試料としては、a. 羊水 (出生前診

断等で採取した検体の細胞分離後の試料) b. 流産絨毛(散発性及び習慣性流産絨毛) c. さい帯血(出生時) d. 臍帯、e. 母体血、f. 母乳の6種類を予定した。(e. 母体血については、上記 a~d の羊水、流産絨毛採取時、及びさい帯血等の採取時において、それぞれ採取する。羊水を採取した胎児においては出生時にもさい帯血、母体血を採取する。) またこれらの生体試料採取の前段階として、採取容器の検討の検討も試みられている。すなわち、微量の内分泌かく乱化学物質の測定にはディスプレイ容器に種々の物質の溶出性が問題にされ、これまで主にガラス容器が用いられてきた。しかし、最近のディスプレイ製品は改良が加えられ、化学物質の溶出性についてかなり厳密に管理されてきているものが含まれる。我々は複数のディスプレイ容器(FALCON、CORNING、IWAKI)及び洗浄方法の異なるガラス容器(各種洗剤、濃硫酸による洗浄後、メタノール又はエタノールによる洗浄)に関して、フタル酸ジエチルヘキシルを含む内分泌かく乱化学物質の溶出濃度を測定して、比較調査した。また、市販の分析用精製水(住友精密工業、和光純薬ほか)及び自家製超純水(Milli-Q、Millipore; Nanomurell, Barnstead)に関して内分泌かく乱化学物質の混入等に関して調査を実施した。

-2 内分泌かく乱化学物質の胎児等の生体試料における測定、及び母体への汚染濃度との相関解析：我々は内分泌かく乱化学物質と認定されている

物質の中でも重大な影響を及ぼしているものとして、ポリ塩化ビフェニール(PCB)と、樹脂の原料として用いられその影響が懸念されているビスフェノールA(BPA)等について分析を行うことを目指した。これらの内分泌かく乱化学物質について、我々は特に同一母体における出生前診断時、出生時及び母乳について汚染濃度の変化を調査し、一方では同一胎児における汚染濃度との相関に着目して分析を進める。

-3 内分泌かく乱化学物質の汚染とそれらに対する in vivo 細胞反応測定、及び内分泌かく乱化学物質による遺伝的障害検出法の検討：

内分泌かく乱作用が疑われる重金属類(Sn、Cd、Hg、Pb等)の母体血及びさい帯血における汚染濃度を原子吸光光度計により測定し、これらの汚染濃度と、その in vivo 細胞反応として細胞内 peroxide 量を HPLC により調査する。また、メタロチオネイン量を Western blot 等の方法で測定し、重金属濃度との相関について検討する。さらに、内分泌かく乱化学物質の遺伝子構造への直接障害を検出する分析法の開発を目標とした。すなわち、内分泌かく乱化学物質が実際に細胞内で種々の影響を及ぼすと考えられるが、そのうちの一つの機序として遺伝子構造(DNA)に直接障害を及ぼす可能性が考えられる。このような影響をみる指標として、DNA 中の8-OH-dG(8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン)分析法がある。これは HPLC を用いて微量の DNA で 100 万ヌクレオチド当たり1塩基程度の変異について判定できるとされて

いる。これらの試料解析に適した高感度検出方法の開発を図り、この検出法の有用性を検討する。そして、8-ヒドロキシ-デオキシグアノシンの検出量と重金属及び他の内分泌かく乱化学物質の蓄積濃度との相関を調べ、ヒト健康に及ぼす影響の機序について検討していく。

不妊症患者の血液等中のクロロデン関連物質およびヘキサクロロベンゼンの分析

東海大学病院を受診した不妊症患者及び分娩予定者 21 名からインフォームドコンセントを得た後、血液試料等の提供を受けた。患者末梢血と腹水は 13 名、母体末梢血とさい帯血は 8 名から採取した。測定は、昨年度と同様に操作した。測定値は中央値及び 25-75 パーセンタイル値で表した。調査及び測定結果に対し、パソコン用統計解析ソフト StatView を用いて統計解析を行なった。統計解析は、ノンパラメトリック (Spearman の順位相関) 法を用いた。

不妊症患者の血清及び腹水中の揮発性有機化合物の分析

血液及び腹水中の揮発性有機化合物濃度の測定には、「水中の揮発性有機化合物分析用標準溶液」を標準溶液として使い、揮発性有機化合物に対する個人暴露濃度の測定には、「VOCs 混合標準液 (45 種混合)」を標準溶液として用いた。病院内空気中等の揮発性有機化合物濃度測定用試料の捕集には、柴田科学機器工業製「有機ガスサンプラー用活性炭チューブ」を使用した。1) 不妊症患者の末梢血及び腹水は、東海大学病院で受診した不妊症患者

18 名 (平成 11 年度 5 名、平成 12 年度 13 名) からインフォームドコンセントを得て、末梢血と腹水の提供を受けた。末梢血は腹腔鏡検査前、腹水は検査中に採取した。なお、平成 11 年度は東海大方式 (後述) で試料採取、血清・腹水の分離を行なったのに対し、平成 12 年度は、採血を東海大方式 (東海大で洗浄した注射筒) で行ない、その後の血清・腹水分離を愛知県衛生研究所 (愛知衛研) 方式 (後述) で行なった。

2) 愛知衛研職員の末梢血を 4 名の職員について異なる 3 方法 (愛知衛研で愛知衛研方式、東海大学病院で東海大方式、及び東海大学病院で愛知衛研方式) にて採血及び血清分離を行なった。採血は 2 日連続で行ない、1 日目は、2 日目は 及び、にて実施した。

3) 試料採取方式とした、3 方法は : a) 東海大方式は、注射筒 (ガラス製) の洗浄及び保管方法として、超音波洗浄器用洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。乾熱滅菌器で乾燥 (200、2 時間) 後、紙製 (HOGI 製) の袋に入れ、オートクレーブで滅菌 (180、30 分)。乾熱滅菌器で乾燥 (200、2 時間) 後、クリーンベンチ内で 1 日紫外線照射を行ない、使用時まで実験室内の引き出しに保管した。さらに血清保存用共栓試験管の洗浄及び保管方法として、超音波洗浄器用洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。200 で 2 時間加熱処理後、アルミ箔で包み、再度 200 で 2 時間加熱し、使用時まで実験室内の引き出しに保管した。また、試料採

取及び保存として、上述の洗浄及び処理を施したガラス製注射筒で採取した末梢血及び腹水を共栓透明摺試験管に入れ、遠心分離（2000 rpm、10分）した。上層に分離された血清及び腹水を処理済みガラス製注射筒で採取し、処理済みの共栓透明摺試験管に入れた後、冷凍保存した。 b) 愛知衛研方式は、注射筒（ガラス製）の洗浄及び保管方法として、中性洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。自然乾燥後アルミ箔で包み、オートクレーブで滅菌（120℃、20分）、37℃で乾燥後、使用時までそのまま保管した。さらに、血清保存用スクリューキャップ試験管の洗浄及び保管方法として、中性洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。自然乾燥後、残留農薬試験用メタノールで洗浄し、180℃で5時間加熱処理後、試験管内の空気を窒素ガスで置換し、キャップをして使用時まで実験室内で保管した。なお、キャップ部分は洗剤およびメタノールによる洗浄後、窒素を吹き付けて使用した。また、血清分注用パスツールピペットの洗浄及び保管方法として、血清保存用スクリューキャップ試験管と同様に洗浄し、使用時まで実験室内で保管した。さらに、試料採取及び保存として、上述の処理を行なったガラス製注射筒で採取した末梢血を処理済みスクリューキャップ試験管に入れ、遠心分離（2000 rpm、10分）した。上層に分離された血清をパスツールピペットで採取し、処理済みスクリューキャップ試験管に入れた後、冷凍保存した。

病院内空気等の捕集は、両端を切断した捕集管をポンプ（柴田科学機器工業製 MP-30 及び PAS-500S 型）にセットし、毎分 100～130 mL の流量で 24 時間行なった。ポンプは、東海大学病院内の手術室（5ヶ所）及び研究室（6ヶ所）、愛知衛研と東海大学病院の往復に使用した自家用車内（1ヶ所）、それに愛知衛研職員の自宅の居間（1ヶ所）に設置し、空气中揮発性有機化合物の捕集を行なった。また、愛知衛研職員 1 名について、PAS-500S 型ポンプを胸元（1ヶ所）に着け試料の採取を行なった。

血清及び腹水中の揮発性有機化合物濃度は、内部標準物質（安定同位体）が入手できた p-ジクロロベンゼン、トルエン、m,p-キシレン、o-キシレン、ベンゼン、エチルベンゼン、スチレン、ナフタレンの 8 物質について測定を行なった。試料 1 mL 及び飽和食塩水 14 mL をヘッドスペースバイアル（容量 22 mL）に採り、内部標準溶液 3 µL を加えた後、テフロン張りのシリコンゴムセプタムおよびアルミシールで密封した。このバイアルをヘッドスペースオートサンプラーにセットし、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフィー/質量分析法（GC/MS）により測定を行なった。病院内空気等の揮発性有機化合物濃度は、以下の 41 物質を測定対象とした。：脂肪族炭化水素類（13 物質）、芳香族炭化水素類（10 物質）、テルペン類（2 物質）、ハロゲン類（9 物質）、エステル類（2 物質）、アルコール類（1 物質）、アルデヒド・ケトン類（4 物質）、空气中の揮発性有機化合物濃

度の測定は、厚生省通知(平成12年6月30日付け生衛発第1093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について」)に従って、以下に示す方法で行なった。: 試料を採取した捕集管から捕集剤(活性炭)を取り出し試験管に入れた後、二硫化炭素1 mLと内部標準溶液(d8-トルエン100 µg/mL)1 µLを加えて栓をした。時々軽く振とうしながら2時間放置し、この上清を試験液とした。測定はGC/MSにより行なった。検量線は、各濃度の混合標準溶液をGC/MSで測定し、検出された測定対象物質の保持時間におけるクロマトグラムのピーク面積値と内部標準物質のピーク面積値との比から作成した。測定値は中央値、25及び75パーセンタイル値で表した。調査及び測定結果に対し、パソコン用統計解析ソフト StatView を用いて統計解析を行なった。統計解析は、ノンパラメトリック(Spearmanの順位相関)法を用いた。

2. 生体への影響と作用機序

環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

昨年度の研究により栄養膜幹細胞株(TS細胞)を用いることでレチノイン酸の胎盤栄養膜細胞の分化過程への影響を *in vitro* で再現出来ることを示した。今年度はさらに胎盤細胞の分化に対するベンツピレンの作用を解析した。解析は、1および10 µMベンツピレン存在下で培養したTS細胞からRNAを調整し、各種胎盤特異遺伝子プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションにより行った。また

ラット消化管でのビスフェノールAの吸収を反転腸管を用いた実験で検討した。さらにラット腎動脈にビスフェノールAを混入させた灌流液(アルブミンを含む)を注入し、腎静脈と尿中の代謝物を調べることで腎臓でのビスフェノールAの代謝・動態を解析した。ついでラット胎盤ミクロソームを用い、グルクロン酸抱合(解毒)活性を測定した。

経口免疫寛容へのジブチルスズの影響 抗原特異的なT細胞応答への影響

5~7匹のマウス(C3H/HeNメス4週令)に3日ないしは4日置きにジブチルスズをゾンデで経口投与し、20%カゼインを含んだ餌(船橋農場製)あるいはカゼインを含まない普通食(CE-2日本クレア社製)を自由摂取させ、4週間飼育した。化学物質はエタノール(特級;和光純薬社製)に溶かし、生理食塩水100 µlに対し0.1%添加し、調整した。投与量は1回あたり1.0 µg, 10.0 µgとした。これらの濃度はマーケットバスケット法により食品経由の有機スズ摂取量調査における2.29 µg/人/日および魚介類汚染によるジブチルスズ一日摂取量の推定値0.45 µg/人/日を参考とし設定した。なお、FAOおよびWHOで設定されている許容一日摂取量(ADI)は塩化トリブチルスズで1.6 µg/kg/日である。また、経口トレランス実験により、トレランスを破綻すると考えられるコレラトキシン(CT)10.0 µg投与群を設け、その影響について比較した。マウスは1週間ごとに採血を行い、血清をとり

カゼイン特異的総抗体価および IgG サブクラスを ELISA により測定した。抗体価は Mann Whitney 検定により、有意差検定を行った。4 週間飼育した後、マウス後肢および尾底部にカゼイン 100 μ g を免疫し、10 日後にリンパ節細胞を採取し、抗原特異的な増殖応答を H₃ の取り込みおよび MTS アッセイ (プロメガ社製) により測定した。増殖応答は t 検定により、有意差検定を行った。

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコレステロール産生に及ぼす植物エストロゲンの阻害効果

H295R 細胞のステロイド産生の誘導と cortisol の分析: J. Ian Mason 博士 (University of Edinburgh, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, Scotland) より供与されたヒト副腎皮質由来 H295R 細胞を用いて昨年度報告と同様の方法にて、検体のステロイド産生に対する影響を検討した。

ミトコンドリアおよびミクロソームの調製: dibutyryl cAMP (1mM) と EGF (10ng/mL) で 24 hr 処理した H295R 細胞 (1.0 ~ 2.1 g wet weight) は冷却した PBS で良く洗浄後、3 mL の 0.25 M sucrose (5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.1 mM PMSF を含む) (緩衝液 A) 中で Dounce tissue grinder (Wheaton) を用いてホモゲナイズした。定法に従いミトコンドリア画分とミクロソーム画分を得た。それぞれの画分は 20% glycerol を含む緩衝液 A に懸濁した。ミトコンドリア画分は更に酵素活性測定のために超音波処理を行った。それぞれの画分は

5.0 ~ 5.6 mg/mL の蛋白質濃度に調整し、-70 °C で保存した。

酵素活性の測定: P450scc

(cholesterol 側鎖切断酵素) 活性および P45011 (11 β -ヒドロキシラーゼ) 活性は各々 [4-¹⁴C] cholesterol (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) および [4-¹⁴C] deoxycorticosterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質としてミトコンドリア、

glucose-6-phosphate (25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP⁺ (0.5 mM), および adrenodoxin (2 μ M) の存在下 37°C, 2 hr インキュベーションすることにより測定した。3 β -HSD II (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II) 活性は [4-¹⁴C] dehydroepiandrosterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質として、0.2 mL の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でミクロソーム, NADP⁺ (0.5 mM) の存在下 37 °C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した。

P450c17 (17 α -hydroxylase/C_{17,20}-lyase) および P450c21 (21-hydroxylase) 活性は [4-¹⁴C] progesterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質として、0.2 mL の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でミクロソーム, glucose-6-phosphate (25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP⁺ (0.5 mM) の存在下 37°C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した。インキュベーション終了後ステロイドを 0.6 mL の ethyl acetate /

2,2,4-trimethylpentane (1/1, v/v) で抽出して乾固し, TLC(Kieselgel 60F254, Merck)により基質と反応生成物を分離した. 展開溶媒は benzene/acetone (8/1, v/v), benzene/ethyl acetate (2/1, v/v), benzene/acetone (7/3, v/v) を使用した. ラジオオートグラフィーで放射能標識ステロイドを検出した後, それぞれのスポットの放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した. P450sc, P45011 および 3 β -HSD II 活性は pregnenolone, corticosterone および androstenedione の生成量として, P450c17 活性は 17 α -hydroxyprogesterone と 11-deoxycortisol 生成量の総和として, 及び P450c21 活性は 11-deoxycortisol と 11-deoxycorticosterone 生成量の総和としてそれぞれ表した. なお, 有意差の検定は Student's *t*-test を用いた.

エストロゲン受容体、 $\text{ER}\alpha$ を介した内分泌かく乱化学物質の作用機序についての研究

被検物質として6種類を選択していかに検討を行った (Diethyl-hexyl phthalate, Butyl-benzil phthalate, Bisphenol-A, p-Nonylphenol, Dizein, Genistein).

E-screen / WST-1 assay : 96 穴プレートに細胞 (MCF-7, HHUA) 懸濁液を 5000cells/50 μ l/well ずつ播種し, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で, 24 時間培養する. 前培養後、フェノールレッドフ

リー、10% Charcoal-dextran 処理 FCS 含有 Medium に交換し、濃度調整した被検物質を加えさらに5日間同条件で、培養する. 培養後 WST-1 assay (Cell Counting Kit:和光純薬) にて細胞増殖を評価 (生細胞中で活性をもつミトコンドリア脱水素酵素の基質である WST-1 を各 Well に 10 μ l ずつ加え 3 時間 37 $^{\circ}$ C にて incubation 後 OD_{450nm} を測定) する.

E-screen / Idu assay : 細胞増殖効果を Thymidine analogue である Idu(5-Iodo-2-deoxyuridine) の取り込み (DNA \cdot Idu Labeling and Detection Kit: TAKARA) により、各 well の細胞増殖効果について評価した. 96 穴プレートに細胞 (MCF-7, HHUA) 懸濁液を 5000cells/50 μ l/well ずつ播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で、24 時間培養する. 前培養後、フェノールレッドフリー、10% Charcoal-dextran 処理 FCS 含有 Medium に交換し、濃度調整した被検物質を加えさらに 24 時間 incubation する. 各 well の medium 中に Idu を加え (終濃度 10 μ M)、24 時間 incubation し、細胞中の DNA に Idu を取り込ませる. PBS 洗浄、blocking (細胞の固定と DNA の一本鎖化) 後、抗 Idu 抗体 (5 μ g/ml、37 $^{\circ}$ C、30min) ウサギ抗マウス IgG \cdot POD 標識抗体 (37 $^{\circ}$ C、30min) を反応させる. 発色試薬 (TMBZ) を加え、呈色反応後 OD_{450nm} を測定する.

エストロゲン受容体 binding assay : エストロゲン受容体(ER)の既知サブタイプ、 $\text{ER}\alpha$ 、 $\text{ER}\beta$ における 17

-estradiol との competition binding assay (TOYOBIO) を施行して、各化学物質のサブタイプ親和性を検討した。

receptor 蛋白溶液に、 17β -estradiol (E_2) と濃度調整した測定サンプルを加え競合反応(37℃、60min)させる。反応溶液を抗 E_2 抗体固相プレートに移し、HRP 標識 E_2 を加え遊離 E_2 と競合反応させる。反応後プレートを PBS にて洗浄し、発色基質を加え呈色反応後、OD450nm を測定する。

ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

Genistein 及び Daidzein は DMSO に溶解して $10^{-1}M$ とし、アッセイに用いる培養液で希釈することにより、試料溶液を $10^{-10} \sim 10^{-3}M$ に調製した。Bisphenol A 及び ICI 182,780 は DMSO に溶解して $10^{-1}M$ とし、培養液で希釈することにより、それぞれ試料溶液を $10^{-9}M, 10^{-5}M$ 及び $10^{-5}M, 10^{-4}M$ に調製した。Fujiflavone P40 は大豆抽出物であり、全体の 40% が総イソフラボン量に相当するため、Genistein・Daidzein 濃度に換算し、DMSO に溶解させ、培養液で希釈することにより、試料溶液を $10^{-10} \sim 10^{-3}M$ に調製した。各々の試料溶液は細胞増殖試験において添加する際、10 倍希釈される。また、最終 DMSO 濃度は細胞増殖に影響を及ぼさない様、0.1% 以下となるように調製した。T47D ヒト乳癌細胞は東京大学・久保田俊一郎先生から供与を受けた。T47D 細胞はエストロゲンレセプター 及び ERα を共に発現している。細胞は通常、10% 牛胎児血清、1% L-glutamine

を添加したダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬社製)で培養し、5% CO_2 -95% Air, 37℃ の条件下で継代培養した。細胞増殖試験においては、ダルベッコ変法イーグル培地を牛胎児血清の代わりに低蛋白質溶液を添加したフェノールレッド不含のダルベッコ改変イーグル培地(SIGMA 社製)に交換して、試料溶液を添加し、96 時間培養後、細胞の増殖を産生 NADH 量を指標とする Cell counting kit(和光純薬社製)により測定する。

内分泌かく乱化学物質の生体影響における子宮内膜症の発生と増殖のメカニズムに関する研究

細胞増殖のアッセイとして汎用されるヒト乳癌細胞 (MCF-7) を用いた E-SCREEN アッセイの代わりに、ヒト子宮体癌細胞を用いた(E-SCREEN アッセイ変法)。使用したヒト子宮体癌細胞はセルナンバーRCB0658、 17β -エストラジオールレセプターを有する HHUA 細胞である。細胞培養はフェノールレッド添加 5% 不活化 FBS 加 DMES を使用し、細胞剥離には 0.05% トリプシンに 0.53mM EDTA を使用。ただし、本アッセイをするにあたりエストロゲン様作用を考慮してフェノールレッドフリーの DMES を利用した。血清はヒト血清を 56℃、30 分で不活化後、チャコールデキストランにて内因性ステロイドホルモンを取り除き DMEM に添加した。HHUA 細胞を血球計算版にて細胞数が 6000 (± 1000) cell / well となるように調整し 96 穴プレートに撒き、37℃ 5% CO_2 で 24 時間培養。その後培養液を吸引し各種濃度に調製

した被験化学物質を含むアッセイ用 DMEM に交換後、再び 37 °C、5%CO₂ で 5 日間培養し、セルカウンティングキット (Wako Pure Chemical Industries 社製) を用いて呈色反応を行い 450nm の測定波長にて吸光度分析を行った。妊娠 2.5 日から 5.5 日のマウスの皮下にビスフェノール A 0.3 mg/ kg/ day を 5 日間連続投与し (Becton Dickson 社製ガラスインジェクションを使用)、分娩直後の出生マウス体重を測定し胎児発育状態を、コントロール群 (妊娠マウス 4 匹、出生マウス 31 匹)、ビスフェノール A 投与群 (妊娠マウス 3 匹、出生マウス 23 匹) およびノックアウトマウス (+ビスフェノール A 投与) 群 (妊娠マウス 3 匹、出生マウス 26 匹) について検討した。マウスの飼育室は温度 24 °C 湿度 25% で、12 時間 -12 時間・昼夜の光調節を行い、飼育ケージはプラスチック製が使用された。また生後 2 ~ 3 ヶ月経過の未妊娠雌マウスに上記と同様量でビスフェノール A を投与し子宮の発育状況や子宮内膜症所見について腹腔内を観察した。また今回は RT-PCR にてコントロール群、ビスフェノール A 投与群およびノックアウトマウス群の mdr ジーンについて検討した。プライマーは以下のように設定した。

mdr1a : Forward プライマー :

5'-GGAGAGATCCTCACCAAG -3'

Reverse プライマー :

5'-GCTCTGGGCATACATGGT -3'

mdr1b : Forward プライマー :

5'-GCTGGTTTTGATGGTGGT -3'

Reverse プライマー :

5'-GCCAAATGTGAAGCCCTG -3'

C. 研究結果と考察

1. 分析法の開発と実試料分析

内分泌かく乱化学物質測定用ディスプレイザブル器具の開発に関する研究

前述の選択方法を基準に、まず候補器具類を選定した。母体血採取用は血清が必要なことから抗凝固剤の含まないタイプのテルモ社のプラスチック製真空採血管と採血針の組合せを、さい帯血採取はテルモ社注射針とシリンジの組合せを選択した。保存容器は、凍結保存と遠心分離ができるということでポリエチレン製の Becton Dickinson 社 FALCON ブランドを選択した。カタログにより、最大遠心強度と使用温度範囲 (-196 ~ 121 °C) を調査し、通常条件で使用できることを確認した。また、選択した器具類の構成原料を確認し、テルモ社製は製造工程を調査し、FALCON のものは各材料を熱プレス法で薄い試料片を作製して透過の赤外吸収スペクトル法 (FT-IR) で同定した。腹水採取器具は唯一体内に挿入する医療用具となり、品質確認や、薬事法上あるいは倫理上問題のない形で設定するため、本年度中には設定することができなかった。前述の測定試料調製方法にそって、DEHP を本年は検討した。なお、定量下限は試薬ブランクを 5 回繰り返して測定し、10ppb とした。

さい帯、さい帯血、母体血、母乳、腹水の各保存容器に選定した Becton Dickinson 社製 FALCON のコニカルチ

ューブは、各サイズとも本体がポリプロピレン製、蓋が高密度ポリエチレン製であり、DEHPの溶出はヘキサン接触室温 24 時間でも定量下限の 10ppb 以下であった。このヘキサン接触室温 24 時間という過酷な条件を考えると、実際に生体試料を保存する低温条件の場合にも 10ppb のバックグラウンド値を越える DEHP は溶出しないと考えられる。さい帯血採取器具には、テルモ社の注射針とシリンジの組合せを選択した。実際の採血は 5 分程度と考えられるが、ヘキサン接触抽出 1 時間で定量下限に近い 12ppb であったことから、採取時に混入する DEHP の影響はほとんど無いと判断した。母体血採取器具はテルモ社の採血針と真空採血管の組合せを選択した。採血は 1 分以内に終了するが、実使用の方法でのヘキサン抽出で定量下限の 10ppb 以下だったことから、採血時の DEHP の混入の影響はないと考える。また、真空採血管をそのまま保存容器をした場合も、室温 24 時間ヘキサン抽出で定量下限の 10ppb 以下なので影響ないと判断した。

今年度は特に混入の心配の高い DEHP について測定を行い、バックグラウンド値 10ppb に影響のない生体試料採取器具および保存容器を設定できたが、その他の内分泌かく乱作用の疑いのある物質の影響度については次年度検討する必要がある。また、腹水採取器具についても次年度に設定、確認する必要がある。

LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析

先に構築した測定条件を再検討し、移動相中のアセトニトリル含量を増す一方酢酸濃度を低くし、流速を 0.2mL/min から 0.16mL/min に変更した。検出感度は以前に比べ 20%程度向上した。本法による検出限界は、0.2ng/mL(絶対量として 2pg)であった。血液試料中の BPA 分析では超微量レベルの定量が求められており、試料調製法の構築に当たってはサンプリング時と同様に実験器材や試薬からのコンタミネーションを極力避けることが求められる。その点、ISOLUTE Multimode は、最も夾雑成分の除去効果に優れ、且つ BPA 溶出量が少なかったが、本カートリッジを用いても操作ブランクにおいて極微量の BPA が検出された。本分析法の検出限界は、カートリッジのロットを変えて行った(5 ロット)、ブランク試験の結果、操作ブランクの標準偏差の 3 倍、0.3 ng/mL とした。血清及び缶飲料に BPA を添加し、回収率を求めた結果、血清及び缶飲料とも概ね 80% 以上であった。本法による検出限界は、血清で 0.3ng/mL、缶飲料で 0.5ng/mL であった。本法により、東海大学病院で採取されたさい帯血、母体血、腹水、計 58 検体を分析した結果は、本分析法の検出限界 0.3ng/mL 以下であった。2 年前に我々は、市販缶飲料中の BPA 濃度を調査し、比較的高濃度で BPA が検出される缶飲料があることを報告した。今回は BPA 含有量の高かった同一ブランドのものを購入し、BPA 含有量の実態調査を実施した。その結果缶飲料から BPA は殆ど検出されな

かった。更に、先の調査において果実飲料や炭酸飲料缶を空にして蒸留水を満たし、オートクレーブで 121℃、15 分間加熱処理すると比較的高濃度で BPA が溶出される飲料缶についても、同一ブランドの果実飲料や炭酸飲料缶を購入し、空缶からの溶出を調べた。その結果、BPA の溶出量は大きく減少しており、製缶メーカーにより BPA 溶出量を低減化した改良缶の開発が進められていることが示唆された。

生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング HPLC-蛍光定量

健常人血清に既知濃度の BPA (0.1 ~ 7.0ppb) を添加し、検量線を作成した。その結果、検討した濃度範囲でピーク高さとの間に良好な直線性 ($r=0.998$) が得られ、シグナル/ノイズ比 (S/N) を 3 とした場合の検出下限は 0.04 ppb と高感度であった。健常人血清に 3.0 ppb の BPA を添加し、繰返し測定の実験性を調べた。その結果、日内 ($n=6$) 及び日間 ($n=3$) の精度は相対標準偏差 (RSD) でそれぞれ 4.2% 及び 8.0% と良好であった。また、BPA の標準水溶液と 3.0 ppb の BPA 添加血清及び無添加の血清を分析操作に従って処理し、得られたピーク高さから算出した BPA の添加回収率は 78.6% であった。開発した分析法を用いて、同一個人より得られた母体血及びさい帯血由来血清セット (9 組) 及び非妊婦の血清及び腹水のセット (21 組) における BPA 濃度を測定した。母体血の定量結果は 0.21 ~ 0.79 ppb の範

囲であり、その平均値 \pm 標準偏差は 0.46 ± 0.20 ppb となった。一方、同一個人より得られたさい帯血中の BPA 濃度の範囲及び平均値はそれぞれ、0.45 ~ 0.76 ppb 及び 0.62 ± 0.13 ppb であり、さい帯血の方が有意に高い濃度を示した。また、不妊症患者の血清及び腹水のセットに関して、それぞれの BPA 濃度の範囲及び平均値は 0.24 ~ 0.64 ppb、 0.44 ± 0.12 ppb 及び 0.38 ~ 0.73 ppb、 0.55 ± 0.13 ppb となった。両者の平均値を比較した場合、腹水腹水の方が有意に高い BPA 濃度を示すことが明らかとなった。母体血とさい帯血血清中 BPA 濃度間、不妊症患者の血清及び腹水中 BPA 濃度間に相関が見られた。

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

(1) パラベン類の胎児移行：長野市内の産院で出産した妊産婦を協力者として提供されたさい帯血、母体血、母乳の3種の生体試料に含まれるパラベン類の測定を行った。さい帯血は出産当日に、母体血、及び母乳は出産後5日目に採取した。母体血ではパラベンの代謝物であるp-ヒドロキシ安息香酸が全員の血液から検出されたほか、メチルパラベン、エチルパラベン、イソプロピルパラベンが検出された。また、母乳からは代謝物のp-ヒドロキシ安息香酸が検出されたほかメチルパラベンが検出された。さい帯血からは代謝物のp-ヒドロキシ安息香酸のほかメチルパラベン、プロピルパラベンが検出された。検出されたパラベン類をみると、母体血からメチルパラベン以

外のパラベン類が検出された被験者では、さい帯血、母乳から該当するパラベン類が検出されていない。また、さい帯血にプロピルパラベンが検出された2人の被験者では母体血からプロピルパラベンは検出されなかった。メチルパラベンの濃度を比較するとさい帯血の方が母体血より高濃度である事例が多かったが著しい特徴は無かった。このほか、東海大学病院で採取したさい帯血及び母体血(血清)中のパラベン類の濃度測定を行った。被験者62人の試料を分析した結果、母体血からメチルパラベンが検出されたほか、プロピルパラベンが4人から検出された。さい帯血ではメチルパラベンのみが検出された。このうち母体血、さい帯血のセットで採取されている31人分の試料中のメチルパラベン濃度を比較したが相関は見られなかった。

(2)化粧品からのパラベン類の暴露：市販の化粧品(化粧水、乳液、ファンデーション)には保存料としてパラベン類が添加されており、日常的に皮膚を通じて体内に吸収されるパラベン類の暴露量の推定を行った。パラベンを保存料として使用しているものは概ね1000ppm程度が添加されていた。使用されるパラベン類の種類は、化粧水では、メチルパラベンがほとんどであり、また、ファンデーションや薬用クリーム用ではエチルパラベンやブチルパラベンを含むものもあった。1回の化粧で使用する量を2mlとするとパラベン類の皮膚塗布量は1回あたり2mg程度となる。一般成人の化粧品か

らのパラベン類の皮膚吸収の実態を把握するため、濃度の明らかな市販化粧水(メチルパラベンを1200ppm含む)を2ml塗布して1時間後に採血を行った。なお、化粧水の塗布は朝の洗顔後に行い、朝食を取らない条件で採血を行った。その結果、化粧水塗布後の血液では、ほとんどは不検出(定量限界2ppb)であった。また、模擬化粧品でのマウス塗布実験では、塗布したブチルパラベンのマウス血中濃度は塗布後1時間で一部上昇するものの、著しい増加は見られずむしろ代謝物のp-ヒドロキシ安息香酸濃度の経時的な増加が確認された。模擬化粧水のマウス塗布実験ではメチルパラベンについて同様な傾向が現れたが、代謝物のpHBA濃度も1時間以降低下していた。なお、プロピルパラベンは検出されなかった。

3) 血液中の有機塩素化合物(HCB、クロルデン類、p,p'-DDE)：東海大学病院から提供を受けたさい帯血、母体血について、ヘッドスペース-SPME-GC/MS法を用いて、内分泌かく乱作用が疑われているクロロベンゼン類(HCB)と有機塩素化合物であるクロルデン類、p,p'-DDEを併せて測定した。その結果、クロルデン類ではtrans-ノナクロルが高頻度で検出された。また、HCB、p,p'-DDEも、すべての試料から検出された。また、3種の化学物質濃度には概ね相関が見られた。また、同一提供者からのさい帯血及び母体血中の各物質の濃度を比べた結果、各物質のさい帯血中濃度は母体血中濃度に比べておよそ半分程度であった。

フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明

LC/MS 測定条件を最適化したのち、ヒト血清における添加回収の検討を行った結果、各種フタル酸エステル類が高濃度で検出され、通常の標準試料溶液添加による前処理検討は、困難と考えられた。そこで、フタル酸モノエステル類の重水素化体を用いて添加回収試験を実施した。陰イオン交換モードタイプ (OASIS MAX) と逆相モードタイプ (OASIS HLB) において回収率と再現性に関して、検討した結果、いずれも良好な結果が得られた。一方、クリーンアップ効果に関しては、PDA クロマトグラムで比較した場合、イオン交換モード用固相充填による処理では、夾雑ピークが少なく、より MS のイオン化効率をあげられることが判明し、前処理においては、イオン交換モードタイプを用いることにした。さらに、ヒト血清酵素による影響についても検討した。：血清中にはリパーゼやエステラーゼ等の酵素が存在するため、血液試料採取時に混入したフタル酸ジエステル類が、モノエステル体へと代謝変換される可能性が考えられる。そこで、血清中にジエステル体を添加し、種々の条件でその代謝変換を検討した。その結果より、ヒト血清内に含まれる酵素により、ジエステル体が代謝分解され、モノエステル体へ変換される可能が示唆された。ついで、本法を腹水と血清の測定に応用した。2種5サンプルにおいて MBP MBzP は認められなかった。また、MEHP は N.D. ~ 28.8ng/mL であった。

ヒト尿・血液中のペンゾ[a]ピレン及びその代謝物の分析法開発

昨年の報告における 12 種の OH-BaP 分析 HPLC システムは、2 台のスイッチングバルブ、4 本のカラム、及び 3 台の検出器からなる複雑なシステムであった。今回これに改良を加え、1 台のスイッチングバルブ、3 本のカラム、及び 2 台の検出器からなるより簡便なシステムを構築した。まず、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) を用いることで、通常の ODS カラムでは達成できなかった 1-, 3-, 12-OH-BaP を除く 8 種の OH-BaP の分離が可能になった。残る分離が不十分な 1-, 3-, 12-OH-BaP 画分のみをカラムスイッチングにより ODS カラム (C2) に濃縮後、バックフラッシュ溶出でシクロデキストリン固定化カラム (C3) に導入し 11 種の OH-BaP 全ての分離が可能となった。6-OH-BaP は溶液中で極めて不安定なため分析対象外とした。検出限界は 1 ~ 30 f mol / injection (S/N = 3) であった。また検量範囲は 3-OH-BaP で 12 f mol - 0.6 p mol / injection であった。さらに抱合体の加水分解率の検討は、 β -グルクロニダーゼ / アリルスルファターゼを用いて、1-OH-Pyr-G、及び 3-OH-BaP-G の加水分解率の経時的变化を観察したところ、37、8 時間で完結した。この結果は他の研究グループの報告ともほぼ一致しており、尿試料における分解時間は 37、8 時間とした。また添加回収試験は、3 環以上の芳香環を持つ多環芳香族炭化水素

類を選択的に吸着する性質を有するレーヨン繊維を用いて検討した。抽出溶媒としてメタノールを用いたときに3-OH-BaP、1-OH-Pyrの添加回収率は、共にほぼ100%を達成し、固相抽出法の回収率（50%前後）と比較して高い回収率を示した。

健常人（男、28歳、非喫煙者）の尿試料200 mLを酵素処理し、グルクロン酸または硫酸抱合体を加水分解した後、ブルーレーヨンによる濃縮操作を経て、この分析システムに適用した。定量値は尿中クレアチニン濃度で補正した。その結果、3-OH-BaP（0.27 ng/g creatinine）が検出された。しかしながら、カラムスイッチング後に検出すべき1-OH-BaP及び12-OH-BaPに関しては、夾雑ピークと重なって同定をすることができなかった。また、1-OH-Pyr（600 ng/g creatinine）は、これまでの報告と同様の濃度であった。酵素処理をしない場合にはこれらのピークが検出されなかったことから、これらの代謝物は、尿中に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た。

生体試料（母乳、母体血、さい帯血等）中の有機塩系化学物質の分析法開発とその暴露評価

分析法の検討：硫酸処理により低塩素のPCB類について回収率の低下が見られたため、2塩化以下については検討対象外とした。また、妨害による影響のため、リテンションタイムがHCBより遅いものを測定対象とした。GPCについて、もっとも良好な回収が得られる条件として、注入後3.2-5.2分のフ

ラクシオンを分取、測定することにした。さらに分析精度の向上とコンタミネーションの低減を目的としてオンライン GPC-GC/MS を用い、負化学イオン化法（NCI）による分析を行った。NCI法ではEI法と異なり、各アイソマー間のイオン化に差があることから、出来る限り定性できたアイソマー毎の検量線を作成した。また、内部標準に3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl、3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl、3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl、HCB、p,p'-DDE、の¹³C同位体を用い、近似した内部標準との相対検量線により定量を行った。検出限界は各アイソマーについて検液中濃度0.2ppbとした。PCB濃度の算出においては、PCBの全異性体209種類をキャピラリーカラムで分離し、各異性体を定量し、各異性体濃度の総和を総PCB濃度とした。暴露評価：PCB濃度は母乳（平均値：95ng/g、最小値：42ng/g～最大値：192ng/g）、母体血（平均値：99ng/g、最小値：34ng/g～最大値：222ng/g）、臍帯血（平均値：61ng/g、最小値：15ng/g～最大値：126ng/g）であった。有機塩素系農薬についてはDDE、-HCHで高い濃度で検出された。同一人の母乳、母体血、臍帯血中PCB、有機塩素系農薬濃度を比較すると、脂肪中濃度では3試料間で同程度か、臍帯血で若干低い濃度が認められた。Whole basisで母体血と臍帯血を比較すると臍帯血の脂肪含量は母体血の約1/4である。従って、臍帯血のPCB、有機塩素系農薬の濃度は母体血の1/4かそれ以下である。各組織共に6及び7塩素

PCB が高濃度で蓄積されていた。各異性体組成においては母体血及び臍帯血の間で顕著な差は認められなかった。母乳中のダイオキシン類の濃度は、PCDDs/PCDFs (166.7pg/g fat, 14.6pg TEQ/g fat)、Non-ortho PCB (76.1pg/g fat, 3.2pg TEQ/g fat)、Mono-ortho PCB(13215pg/g fat, 3.0pg TEQ/g fat)、総ダイオキシン類 (20.8pg TEQ/g fat)であった。PCB 及び有機塩素系農薬の母乳経路による乳児への暴露評価をから、有機塩素系農薬は各化合物の ADI に対し 7.7%~33.7%で、問題はない。一方、ダイオキシン類に関しては PCDDs/PCDFs では TDI に対し 1643%、Co-PCB (Non/Mono-ortho) では 698%、総ダイオキシン類では 2340%であった。今回新たに開発した分析法を用いて測定した結果と、アルカリ分解-高分解能 GC/MS を用いた従来法の分析結果とを比較したところ mono-ortho PCB についてよく一致した結果が得られたことから本法が従来法に対する簡便法として使用できると考えられる。脂肪中濃度において、総 PCB、農薬類は母体血中と比較して、さい帯血中では同等か低くなる傾向が見られた。PCB を塩素数別で比較したところ、7 塩化 PCB の低下が認められる。この要因を明らかにするため、母体血と母乳、さい帯血間の各塩素ごとに含まれる組成比について t 検定を行った結果、母体血に比べ臍帯血では低いことが明らかになった。これは胎盤により移行が阻害されたためか、胎児の肝臓等の組織に蓄積された可能性も考えられる。今後胎児由来の試料を分析する

ことが必要と考えられる。一方、毒性の評価から、胎児の組織に蓄積されていない限り、母体から胎児への曝露は低減されていると考えられる。

内分泌かく乱化学物質の胎児及び母体における汚染状況の分析とその細胞障害等の解析

-1 生体試料の系統的収集と採取容器の検討： 出生前診断等で採取した羊水、流産絨毛、さい帯血、臍帯、母体血、母乳等について、可能な限り同一母体、胎児についての経時的なセットとして採取、保存してきた。これらの母体血とさい帯血を含む生体試料の 50 セットについては既に各分析に供されている。これらのいくつかに関しては種々の化学物質の解析には十分な量に至らないものもあるので、微量な試料で高感度に検出できる方法の開発が必要であり、他の分析方法開発グループとの連携が不可欠である。試料の採取と並行して、内分泌かく乱化学物質測定に適した試料採取容器について検討した。FALCON、及び CORNING のディスポーザブル容器についてフタル酸ジエチルヘキシルを含む 3 種類の内分泌かく乱化学物質の溶出について測定を実施したが、いずれも検出限界以下であった。また我々の異なる洗浄方法によって準備されたガラス容器に関してもいくつかの化学物質溶出濃度を測定して比較したが、いずれも検出限度以下であった。多量のサンプルを複数の施設で採取保存されたものから均一な品質の生体試料を得るためには、従来用いられてきたガラス容器に比べてハン

ドリングが容易であり、統一された容器の選定が早急に必要であると考えられる。さらに、生体試料または試薬の希釈調整等に用いる精製水の成分について検討を加えた。これまで市販の各種分析用精製水（住友精密工業、和光純薬など）と自家製超純水（Milli-Q、Millipore; NanomureII, Barnstead）について測定したところ、測定した3種類の内分泌かく乱化学物質の混入はいずれも検出限界以下であり、希釈調整等に用いる精製水としての使用には特に問題はないと考えられた。さらに継続して調査を進めている。内分泌かく乱化学物質はヒト健康に種々の影響を及ぼしている可能性が指摘され、多くの化学物質がその候補として内分泌かく乱化学物質の混入等に関して調査を実施した。

-2 内分泌かく乱化学物質の胎児等の生体試料における測定、及び母体への汚染濃度との相関解析：我々は内分泌かく乱化学物質と認定されている物質の中でも重大な影響を及ぼしているものとして、ポリ塩化ビフェニール（PCB）と、樹脂の原料として用いられその影響が懸念されているビスフェノールA（BPA）等について、特に同一母体における出生前診断時、出生時及び母乳について汚染濃度の変化を調査し、一方では同一胎児における汚染濃度との相関に着目して分析を進めている。これらの結果については次年度にまとめて報告をする予定である。

-3 内分泌かく乱化学物質の汚染とそれらに対する in vivo 細胞反応測定、

及び内分泌かく乱化学物質による遺伝的障害検出法の検討：母体及び胎児に於ける内分泌かく乱作用が疑われる重金属類（スズ、鉛など）及び他の重金属（銅など）の母体末梢血と出生児さい帯血における汚染濃度を原子吸光光度計により測定した。これまで30セットの生体試料に関して原液～100倍希釈試料を用いて測定した。母体血における測定値は以下のとおりである。

鉛：母体血中の平均値、16.7 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 400-700 ppb、NHANES III では 5-560 ppb）、スズ：母体血中の平均値、15.3 ppb、カドミウム：母体血中の平均値、1.60 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 3-5 ppb）、銅：母体血中の平均値、1212 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 690-1500 ppb）。

いずれも成人におけるこれまでの報告値に比べ、同範囲内かあるいはそれよりも低い数値を示した。いずれの重金属においても、さい帯血における濃度は母体血に比べて、同程度かむしろ低い値を示した。さい帯血中の濃度平均値は、鉛 12.2 ppb、スズ 14.7 ppb、カドミウム 0.79 ppb、銅 501.9 ppbであった。また、調査した重金属に関して個体間でばらつきがあり、さい帯血の濃度は母体血の濃度に強く関係しているように見える。さらに、in vivo 細胞反応として、細胞内 peroxide 量とメタロチオネイン量を HPLC 及び Western Blot 法で測定し、重金属濃度との相関について解析を開始した。

内分泌かく乱化学物質が細胞に及ぼす機序の一つとして、遺伝子構造に直接障害を及ぼすことが考えられ、遺伝子、DNA への障害を DNA 中の δ -ヒドロオキシ-デオキシグアノシン(δ -OH-dG)の増加値として検出できるかを検討した。これまで微量の δ -OH-dG の検出方法の改良を試みた。今後さらに高感度の検出方法の開発を図り、実際にこの方法で重金属及び他の内分泌かく乱化学物質の汚染濃度との相関を明らかにして、ヒト健康に及ぼす影響の機序について検討していく。

不妊症患者の血液等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

患者末梢血（血清）12 試料、腹水 13 試料、母体末梢血（血清）8 試料、さい帯血（血清）8 試料を分析した。これらの試料から最も高頻度に検出されたものは HCB で、全体としての検出率は 98%であった。その濃度は中央値として、患者末梢血中で 0.11ppb、腹水中で 0.03 ppb、母体末梢血中で 0.08 ppb、さい帯血中で 0.03 ppb であった。次いで高頻度に検出されたものは *trans*-ノナクロルで、全体としては 63%の検出率で、検出された濃度の中央値は、患者末梢血は 0.12 ppb、腹水中は 0.04 ppb、母体末梢血中は 0.12 ppb、さい帯血中は 0.04 ppb であった。次いで高頻度に検出されたものは *cis*-ノナクロル（検出率 17%）で、その濃度の中央値は 0.04 ppb であった。しかし、腹水及びさい帯血からは全く検出されなかった。一方、検出を試みた 7 種の化学物質のうち、ヘプタクロルエポキサイド、オキシクロルデン、

trans-クロルデン及び *cis*-クロルデンは、いずれの試料からも全く検出されなかった。以上の結果は、検出率及び濃度範囲ともに、昨年度実施した子宮内膜症患者、妊娠母体、及び、さい帯を試料とした調査結果（ $n = 24$ ）とほぼ同様な値であった。したがって、これらの測定値が子宮内膜症患者及び不妊症患者の末梢血、腹水、それに母体末梢血及びさい帯血中の平均的な CLDs 及び HCB の検出率及び濃度範囲と結論付けられた。不妊症患者末梢血中の HCB 濃度と腹水中の濃度には有意な正の相関が存在するが、母体末梢血中とさい帯血中の濃度には有意な相関は認められなかった。

不妊症患者の血清及び腹水中の揮発性有機化合物の分析

平成 11 年度及び 12 年度に東海大学病院で受診した不妊症患者 18 名（平成 11 年度 5 名、平成 12 年度 13 名）の血清及び腹水 35 検体について、揮発性有機化合物濃度を測定した結果、測定を実施した 8 種類の揮発性有機化合物では、トルエンが全試料の 80%と、最も高頻度で検出された。次いで高頻度に検出されたものは、順に *p*-ジクロロベンゼン 49%、*m,p*-キシレン 43%、エチルベンゼン 37%、*o*-キシレン 29%、スチレン 26%、それにベンゼン 11%であった。一方、ナフタレンは全く検出されなかった。また、検出された化学物質の濃度の中央値は、濃度の高い順に *p*-ジクロロベンゼン 4.0 ppb、*m,p*-キシレン 1.8 ppb、トルエン 1.2 ppb、エチルベンゼン 1.2 ppb、*o*-キシレン 0.7 ppb、スチレン 0.6 ppb、それにベ

ンゼン 0.5 ppb であった。以上の結果より、今回測定を行なった不妊症患者の体内には、トルエン、p-ジクロロベンゼンなどの揮発性有機化合物が ppb からサブ ppb のオーダーで存在していることが示唆された。同一患者から採取した血液と腹水中の揮発性有機化合物濃度の関係について、検出頻度及びその測定濃度より統計解析が可能であったトルエン及び p-ジクロロベンゼン濃度について検討を加えた。その結果、p-ジクロロベンゼン濃度には有意な正の相関関係（順位相関係数 = 0.893、n=7、p=0.029）が認められたが、トルエン濃度には有意な相関関係は認められなかった（順位相関係数 = -0.270、n=12、p=0.370）。

揮発性有機化合物は環境中に普遍的に存在していることから、試料の採取時及びその保存期間中に汚染を受ける可能性が高い。事実、周囲の環境等からの汚染を防止するために、血清保存用試験管内の空気を窒素で置換するなどの対策を講じる愛知衛研方式を用いて採取した平成 12 年度の検出率が、そうではない平成 11 年度の検出率よりも低い傾向を示していた。そこで、採血方式及び場所の違い（東海大方式 vs 愛知衛研方式）による血中揮発性有機化合物濃度の差異を調べるため、愛知衛研職員 4 名について、以下の異なる 3 方法にて採血及び血清分離を行なった。： 愛知衛研で愛知衛研方式、東海大学病院で愛知衛研方式、東海大学病院で東海大方式。採血は 2 日連続で行ない、1 日目は、2 日目は 及び にて実施した。

各方式で採血及び分離した血清中の揮発性有機化合物濃度を表 2 に示した。まず、東海大学病院において同じ日に愛知衛研と東海大の両方式で血液を採取し、同一被験者 4 名の血中揮発性有機化合物濃度を測定した。その結果、全検体から同程度の濃度が検出された p-ジクロロベンゼン及び全く検出されなかったナフタレンを除き、愛知衛研方式で採血した場合の検出率及び濃度が、東海大方式のそれらよりも低い傾向が認められた。この結果は、上述の不妊症患者における平成 11 年度と 12 年度の相違（11 年度は東海大方式、12 年度は愛知衛研方式による採血・血清分離）と同様の傾向を示すものであった。

また、東海大学病院での採血の前日に（愛知衛研で愛知衛研方式）で採取した血中の揮発性有機化合物濃度は、東海大学病院にて両方式（及び）で採取した場合と比べて、検出率及び濃度が低い傾向を示していた。この結果については、採血日が異なること、愛知衛研から東海大学病院への移動によるトラベルブランクの影響が考えられること、それに検体数が非常に少ないこと等から、今回の結果のみから採血場所（東海大学病院）の汚染を第一義的な原因と断定的に考えることはできない。

なお、環境汚染の状況を調べる目的で、東海大学病院で採血を実施した手術室、研究室等の空気中の揮発性有機化合物濃度を測定した。その結果、総揮発性有機化合物濃度として手術室が $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$ （中央値、n=5）研究室 1

が $17 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (中央値、 $n=3$)、研究室 2 が $37 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (中央値、 $n=3$) であった。一方、愛知衛研の職員 4 名のうち、1 名の自宅の室内空气中揮発性有機化合物濃度は $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。従って、東海大学病院内の空气中揮発性有機化合物濃度の方がかなり低い値であることが判明した。

以上のことから、その具体的汚染源、汚染様式は不明ではあるが、生体内の揮発性有機化合物濃度を測定する際には、採血方式及び場所によって汚染が発生する可能性が高いことが明らかとなった。今後、不妊症患者等の生体内における揮発性揮発性有機化合物のより詳細な存在実態を明らかにするためには、周囲の環境等からの汚染防止を万全にした状態での検体採取・保存及び測定が重要な課題であることが明らかとなった。

2. 生体への影響と作用機序

環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

TS 細胞の分化に対する影響の検討では、 $10 \mu\text{M}$ ベンツピレン存在下でも、大きな変化は見られなかった。我々は、ベンツピレンの細胞内受容体と考えられている AhR が TS 細胞で発現していることをすでに昨年度報告しており、この結果を踏まえた今年度の研究であったが、ベンツピレンによる栄養膜細胞分化への大きな影響がないことは、予想外の結果であった。今後さらに詳細な解析が必要であるが、胎盤形成の初期段階にはベンツピレンは無害であるのかもしれない。腸の管腔側に添加されたビスフェノール A

(BPA) は粘膜上皮細胞に吸収され、そのほとんどがグルクロン酸抱合された。抱合体の一部は漿膜側に吸収されたが、多くが管腔側(粘膜側)に戻された。漿膜側へのグルクロン酸抱合の取込みは結腸で最も高かった。また、腎動脈中に添加した BPA は、直ちに腎静脈中に検出され、尿中にはほとんど検出されなかった。さらに、胎盤マイクロソームを用いた実験では、一般的薬物のグルクロン酸抱合活性が母親側胎盤に存在したが、BPA のグルクロン酸抱合活性は検出されなかった。免疫組織染色により、UGT1A6 に相当する分子種が胎盤脱落膜層に発現していることが分かった。グルクロン酸抱合体を分解してもとの薬物に戻す酵素(β-グルクロニダーゼ)の活性がラット胎盤母親側に存在していることを見出した。

ラット臓器を用いた研究からは、まず、消化管に入った BPA はそのほとんどがグルクロン酸抱合されてから吸収されることがわかった。また、腎では他の薬物は様々な代謝を受けるが、BPA は濾過も代謝もされないと考えられる。今後グルクロン酸抱合体の尿中への移行についてさらに調べる。最近の報告にあったように、グルクロン酸抱合体を分解してもとの薬物に戻す酵素(β-グルクロニダーゼ)の活性がラット胎盤母親側にも存在していた。このことから血液中に存在する BPA のグルクロン酸抱合体が胎盤でもとのフリーの状態に戻され、胎児側に移行する可能性が示唆される。

経口免疫寛容へのジブチルスズ

の影響 抗原特異的な T 細胞応答への影響

マウスにカゼイン食を与えた場合、血中カゼイン特異的総抗体価は普通食に比べ有意に増加し、投与開始 2 から 3 週間後に最高値となり、以後ほぼ横ばいとなった。カゼイン食とともに DBT を 28 日間経口投与した後の抗原特異的総抗体価は有意に増強した ($p < 0.01$)。また、この時の IgG サブクラス (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}) をみると、IgG₁ が有意に増強した ($p < 0.01$)。カゼイン経口投与による免疫応答は、IgG₁ および IgG_{2a} 産生を誘導するが、ジブチルスズはヘルパー T 細胞における Th₂ 型が誘導する IgG₁ 産生を有意に増強した。ゆえに、ジブチルスズは抗原とともに経口感作され、抗原特異的免疫応答を修飾することが明らかとなった。動物をアジュバントとともに抗原で免疫すると、抗原特異的な T 細胞や抗体の応答を誘導できるが、動物にこの抗原をあらかじめ経口投与しておくとも免疫応答は低下し、実験的に経口トレランスを誘導することが出来る。この系を用いて、経口トレランスにおける T 細胞増殖応答への DBT の影響を検討した。カゼインを経口投与しない DBT 単独での抗原に対する T 細胞増殖応答への影響を検討したところ、DBT は、MTS アッセイが示すミトコンドリアにおける代謝活性を有意に増強した。経口寛容における T 細胞増殖応答への DBT の影響を検討したところ、抗体産生を増強した DBT は、H₃ 取り込みおよび MTS アッセイいずれにおいても増殖応答を有意に増強

した。MTS アッセイにおいて、DBT は CT では影響がみられなかったカゼイン低濃度刺激においても代謝活性を有意に増強した。

抗原とともに経口感作されたジブチルスズは、免疫応答を増強するアジュバント様の影響を示すことが明らかとなった。これまでの実態調査において、養殖ハマチで DBT 13.6ppm の濃度事例もみられ、本研究における DBT 影響濃度は、閉鎖系水域での汚染レベルとして考えうると思われた。また、高濃度投与では、細胞応答を抑制する毒性発現の影響を示すことから、濃度により異なる影響を示すと考えられた。さらに、本実験系において、自己トレランスの実験系モデルである経口トレランスを破錠することが明らかとなっているコレラトキシンと同等あるいはそれ以上に経口抗原特異的な抗体産生および T 細胞応答に影響を及ぼすことが明らかとなった。これにより、ジブチルスズは過剰な免疫応答を引き起こし、経口トレランスの誘導を破錠することが考えられた。現代病といわれ患者数が増加している自己免疫疾患は自己トレランスの破錠により引き起こされると考えられている。このことから、ジブチルスズのように経口トレランスの誘導を破錠すると考えられる化学物質の存在は非常に興味深い。ゆえに DBT のアジュバント様の影響および経口トレランスへの影響について、細胞応答および伝達、ターゲット細胞等の細胞レベルでの解析をすすめることが必要と考えられる。

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞の コルチゾール産生に及ぼす植物エスト ロゲンの阻害効果

H295R 細胞の cortisol 産生に及ぼす植物エストロゲンである各種フラボン及びイソフラボン曝露の影響を種々濃度で検討した。12.5 μM の濃度の曝露において 6-hydroxyflavone (6-HF), apigenin, daidzein, genistein, biochanin A 及び formononetin 等が有意な cortisol 産生の阻害を示した。しかし他のフラボノイドには阻害効果は認められなかった。さらに、25.0 μM の曝露ではこれらのフラボノイドに加え biochanin A も有意な cortisol 産生の阻害を示した各種濃度における 6-HF, apigenin, daidzein, genistein, 及び formononetin の阻害効果、は曝露濃度に依存していた。しかし、daidzein 及び genistein の 7-グルコシドである daidzin 及び genistin は H295R の cortisol 産生を阻害しなかった。

H295R 細胞の cortisol 産生阻害が認められた植物エストロゲンの作用機序を明らかにする一端として、この阻害作用がエストロゲンレセプターを介して引き起こされるかどうかを、daidzein を用いて検討した結果、daidzein の曝露(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)により引き起こされる cortisol 産生の阻害はエストロゲンレセプターアンタゴニストである ICI 182,780 の添加により解除されなかった。

H295R 細胞の cortisol 産生を阻害した 6-HF, apigenin, daidzein,

genistein, biochanin A 及び formononetin の作用機序を明らかにするため P450scc, 3β -HSD, P450c17, P450c21 および P45011 β 等のステロイド合成に關与する酵素に対する阻害作用を検討した。これらのフラボノイドは 3β -HSD のみならず 12.5 および 25 μM の濃度で P450c21 活性も阻害した。さらに 6-FH は 25 μM の濃度で P45011 β 活性も阻害した。一方、H295R 細胞の cortisol 産生の阻害に影響を及ぼさなかった daidzin はいずれのステロイド合成酵素も阻害しなかった。

daidzein を用いて、 3β -HSD および P450c21 活性の阻害について反応速度論的解析を行った。その結果、 3β -HSD 活性は daidzein により競合的に阻害され、その K_i は 2.9 μM であった。なお、基質の androstendione に対する K_m は 6.6 μM , V_{max} は 328 pmol/min/mg protein であった。一方、daidzein による P450c21 活性阻害は、競合的に阻害され、その K_i は 33.3 μM であった。なお、基質の progesterone に対する K_m は 2.8 μM , V_{max} は 28.93 pmol/min/mg protein であった。

3β -HSD は 5 - 3β -ヒドロキシステロイド (pregnenolone あるいは DHEA) を対応する 4 - 3β -ケトステロイド (progesterone あるいは androsten-dione) に変換させる酵素である。見かけ上異なる反応である酸化と異性化反応を触媒する。ヒトにおいては胎盤や皮膚に発現している type I と副腎、精巣及び卵巣に特異的に発現している type が存在するこ

とが知られており、 3β -HSD はコルチコイドのみならずミネラルコルチコイド、ゲスタゲン、アンドロゲン及びエストロゲンの生合成における重要な酵素でもある。従って、植物エストロゲンの内在性のステロイド産生に及ぼす影響とヒトへの健康影響との関連は、さらに詳細に検討されることが必要である。

エストロゲン受容体、 を介した内分泌かく乱化学物質の作用機序についての研究

MCF-7 は、 E_2 の添加により、 10^{-9} ~ 10^{-8} mol/l で、濃度依存性の細胞増殖能の亢進が認められた。一方子宮内膜由来細胞である HHUA でも 10^{-7} ~ 10^{-11} mol/l で同様の細胞増殖が認められた。今回の被検物質は MCF-7 ではすでにエストロゲン様の細胞増殖効果が認められていたが、今回 HHUA 細胞でも同様のアッセイを行ったところ MCF-7 と同様の効果が認められた。一方エストロゲン受容体との Binding assay では、E-screen assay で反応がみられた全ての物質で程度の差はあるものの、エストロゲン受容体との競合結合が認められた。しかし物質によっては、エストロゲン受容体、 間で、Binding に差が見られた。今回 E_2 の添加により、子宮内膜由来 HHUA 細胞でも、MCF-7 同様の細胞増殖効果を認め、内分泌攪乱物質の子宮内膜への作用として、HHUA 細胞を用いた評価が可能であることが明らかとなった。E-screen assay では、MCF-7 と HHUA との間に、反応の程度や濃度において、若干の相違を認め

たが、今後は、両細胞のエストロゲン受容体 サブタイプの発現量の違いについても定量的な評価が必要であると考ええる。またエストロゲン受容体との Binding assay では、レセプターとの反応を認めた濃度と E-screen assay で細胞増殖効果を認めた濃度との間で、差が認められる物質が存在し、今後はエストロゲン受容体、 それぞれに対し、レセプター結合の下流での転写活性の有無についても、検討する必要があるものと考えられる。今後はこれらの検討を通し、それぞれのエストロゲン受容体、 に対する作用 (agonist、 antagonist) を明らかにし、現在多数存在する内分泌攪乱物質について作用機序別による分類を行っていく予定である

ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

内分泌かく乱作用の疑われている Bisphenol A は 10^{-10} M 及び 10^{-6} M の濃度において、T47D 細胞の増殖を促進した。この細胞増殖促進作用はエストロゲンレセプターアンタゴニストである ICI 182,780 の 10^{-6} M の濃度で阻害された。また、 10^{-11} ~ 10^{-5} M の Genistein、 10^{-11} ~ 10^{-4} M の Daidzein は T47D 細胞の増殖を促進した。この細胞増殖促進作用は Genistein は 10^{-5} M の ICI 182,780 により、Daidzein は 10^{-6} M の ICI 182,780 により阻害された。我々が食品より植物エストロゲンを摂取することを想定し、大豆抽出物であり、Genistein、 Daidzein、 Glycitein 混合物である Fujiflavone P40 の T47D 細胞に対する影響を検討

したところ、 10^{-5}M 、 10^{-4}M と高濃度では T47D 細胞の増殖を促進する作用が見られたが、 $10^{-11} \sim 10^{-6}\text{M}$ の濃度において T47D 細胞の増殖を促進する作用は見られなかった。我々の日常における複合暴露を想定し、Bisphenol A 共存下における植物エストロゲンの T47D 細胞に対する影響を検討した。 10^{-6}M の Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を 100%とし、 $10^{-11} \sim 10^{-4}\text{M}$ の Genistein 及び Daidzein を共存させたところ、 $10^{-11} \sim 10^{-8}\text{M}$ と低濃度の Genistein、Daidzein においては T47D 細胞の増殖を促進する傾向が見られたが、 $10^{-7} \sim 10^{-4}\text{M}$ と高濃度においては T47D 細胞の増殖を抑制した。加えて、Bisphenol A 共存下での T47D 細胞に対する Fujiflavone P40 の影響を検討した。 10^{-10}M 及び 10^{-6}M の Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を 100%とし、 $10^{-11} \sim 10^{-4}\text{M}$ の Fujiflavone P40 を共存させたところ、Fujiflavone P40 は Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を抑制する傾向が観察された。植物エストロゲンである Genistein、Daidzein は単独で、T47D ヒト乳癌細胞の増殖を促進した。また、この増殖促進作用はエストロゲンレセプターアンタゴニストである ICI 182,780 により阻害され、エストロゲンレセプターを介した反応であることが示唆された。我々の食品からの摂取に近い、大豆抽出物である Fujiflavone P40 (Genistein + Daidzein + Glycitein の混合系) は T47D 細胞の増殖作用を促進せず、Genistein あるいは Daidzein のみで見られた T47D 細胞増殖促進作用

の相加あるいは相乗作用はないことが示唆された。また、我々の日常における複合暴露を想定した Bisphenol A 共存下における Genistein、Daidzein は、濃度によって Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を促進も抑制も示し、植物エストロゲンが濃度によってエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン様作用と異なった挙動を示すことが示唆された。Bisphenol A 共存下における Fujiflavone P40 は Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を抑制する傾向が見られ、Bisphenol A 共存下で植物エストロゲンの混合物は抗エストロゲン様作用を示すことが示唆された。

内分泌かく乱化学物質の生体影響における子宮内膜症の発生と増殖のメカニズムに関する研究

本研究に用いたヒト子宮体癌細胞 (HHUA 細胞) で、 17β -エストラジオールの各濃度における細胞増殖をまず顕微鏡下で確認。well 内のコロニー形成が十分で均一である事を確認し分析を開始した。コントロールと比較して $10^{-12} \sim 10^{-7}\text{M}$ で細胞増殖は著明となり増殖性は 1.1~1.2 倍であった。つぎに被験物質として用いたフタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル、ノニルフェノールおよびビスフェノール A (BPA) におけるそれぞれの細胞増殖性は、フタル酸ジブチルでは $10^{-12} \sim 10^{-7}\text{M}$ の濃度で 1.1 ~ 1.2 倍、フタル酸ジシクロヘキシルでは $10^{-13} \sim 10^{-5}\text{M}$ の濃度で 1.2 ~ 1.4 倍、フタル酸ジエチルヘキシルでは $10^{-13} \sim 10^{-5}\text{M}$ の濃度

で 1.1~1.3 倍、ノニルフェノールでは $10^{-12} \sim 10^{-5}$ M の濃度で 1.1 ~ 1.3 倍および BPA では $10^{-13} \sim 10^{-6}$ M の濃度で 1.1 ~ 1.5 倍の細胞増殖性を認めた。また BPA については 10^{-6} M で急峻な細胞の増殖を認め、以後ゆっくり下降し再度 10^{-10} M で細胞増殖がみられる二峰性のパターンを示した。

次に、BPA の妊娠初期マウスへの皮下投与における出生マウス体重の検討では、コントロール群の出生マウス計 31 匹の体重は、1.2 ~ 1.4 g (1.29 ± 0.06 g) の結果であった。BPA 投与群では、出生マウス計 23 匹の体重は、1.2 ~ 1.4 g (1.29 ± 0.06 g)。ノックアウトマウスでの BPA 投与群では、出生マウス計 26 匹の体重は、1.2 ~ 1.4 g (1.28 ± 0.06 g) の結果で、3 群間での出生マウスの体重に明らかな差は見られなかった。出生 2 ~ 3 ヶ月経過の未妊娠雌マウスに BPA を同様に投与した結果は子宮長 10 ~ 12 mm で、BPA 未投与群の雌マウスと比較しても明らかな子宮の肥大を認めなかった。また腹腔内に明らかな子宮内膜症の所見を認めることはできなかった。

mdr1a / 1b m-RNA のプライマーを用いてコントロール群、BPA 投与群およびノックアウトマウス群について RT-PCR を行った結果、コントロール群と BPA 投与群では、mdr1a で 428bp に mdr1b で 537bp に明らかなバンドの出現を認めたが、ノックアウトマウスではバンドの出現はなかった。

今回の検討では、ヒト子宮体癌細胞と乳がん細胞では異なった感受性を示すことが示唆された。また BPA の *in*

vivo での実験では、胎児の発育状態には有意差を認めなかった。一方、未妊娠マウスへの投与しでも、子宮肥大や子宮内膜症の所見を得る事は出来なかった。

また今回我々は、薬物や他の化学物質をトランスポートするジーンを欠損させたノックアウトマウスも使用したが、コントロール群と比べて薬剤感受性が強く出現することが考えられ、BPA 投与の影響を受けやすい事が予想されたにもかかわらず、出生マウスの体重に明らかな違いはなかった。今後さらに詳細な検討が必要と思われた。

D. 結論

我々は、平成 11 年度厚生科学研究(主任研究者：牧野恒久)「内分泌かく乱化学物質に関する生体試料(さい帯血等)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」の研究成果を通じて興味ある知見を得ると共に、検討すべき問題点もいくつかあることが明らかになった。生体試料の分析にあたっては、採取や保存の際の汚染もみのがせないことが、明らかになった。そのため、内分泌かく乱化学物質測定に適した試料採取容器についても検討した。特にフタル酸ジエチルヘキシルについては、本年の検討でシステムの確立をみており、実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての検討がようやく可能である段階に達したと思われる。他のいくつかの化学物質についても、それぞれ検出限界を低く設定できるように分析法の開発をすすめており、母体及び胎

児をふくめたヒトにおける蓄積の実態をあきらかにしつつある。また、暴露状況の調査と同時に、内分泌かく乱作用の作用機序を明らかにすることも必要である。in vivo 細胞反応を明らかにするとともに、その障害の一つと考えられる遺伝子への影響を DNA 変異を指標にして検出し、その実態について明らかにするなどの in vitro での細胞反応系も重要である。in vitro の細胞反応系については、現在検討中である数種の系に加えて、さらに開発中でもあり、本研究の平成 12 年度の報告は、その意義は大きいと考える。

各論は前項に詳述したが、ポリ塩化ビフェニール (PCB) も、妊婦や胎児血中に残留している可能性が示唆された。PCB そのものが胎児や新生児発育にいかなる影響や長期予後が関連するかは定かではないが、環境汚染物質としてみのがすことはできない。我々は母胎血、羊水、臍帯血にどのような割合で汚染がすすんでいるかを明らかにしつつある。さらに、他の環境汚染物質とともにデータの蓄積を行い、次年度に明らかにする予定である。また、内分泌かく乱作用の機序の一つとして遺伝子等への障害を予測してその検出系の検討も進められており、生体内での代謝もについても、解毒の意味も含めて明らかになり、さらに代謝系での新規の遺伝子、分子種の発見にも本研究は貢献した。本研究において今年度まとめられた各報告は、内分泌かく乱化学物質にして有益な情報として活用されることが期待される。

E. 研究業績

1. 論文発表

1) Y. Sun, M. Wada, O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, and K. Nakashima, "High-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated from polycarbonate baby bottles using

4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride as a label." J. Chromatogr. B, 749, 49-56 (2000).

2) Akutsu, K., Obana, H., Okihashi, M., Kitagawa, M., Nakazawa, H., Matsuki, Y., Makino, T., Oda, H., Hori, S.: GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan: Chemosphere (in press)

3) J. Yan, S. Tanaka, M. Oda, T. Makino, J. Ohgane and K. Shiota. "Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate" Developmental Biology (投稿中)

4) Tomomi Yamazaki, Yumiko Okada, Yoshiharu Hisamatsu, Shunichiro Kubota and Fujio Kayama
EFFECT OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS ON LYMPHOCYTE RESPONSES
DIOXIN 2000, Vol.49 p394-396, August 2000, Monterey, California, USA

5) Nao Kobayashi, Akiko Yamaguchi, Tomomi Yamazaki and Hiroyuki Nakazawa

Effect of Xenoestrogens and Phytoestrogens on Breast Cancer Cells

第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学会, p320, December 2000, 横浜

2. 研究発表

1) 「LC-MS による生体試料及び缶飲料中のビスフェノール A の分析」: 第 4 回分析化学東京シンポジウム(幕張) 2000.8.30-9.1

2) 中島憲一郎, 孫 艶, オサマ・アルデハシ, 和田光弘, 黒田直敬(長崎大), 中澤裕之(星薬大), 高橋正克(長崎大), 牧野恒久(東海大): 「生体試料中のビスフェノール A の高感度分析法の開発に関する基礎研究」; 「カラムスイッチングを利用する」第 10 回日本臨床化学会九州支部総会

孫 艶, オサマ・アルデハシ, 和田光弘, 黒田直敬, 中島憲一郎(長崎大), 中澤裕之(星薬大), 牧野恒久(東海大); 日本薬学会第 120 年会スフェノール A のセミマイクロ HPLC 蛍光計測」(2000)

3) 寺澤, 月岡, 吉田, 佐藤, 藤島(長野衛公研), 中澤(星薬科大): p-ヒドロキシ安息香酸の摂取と生体中濃度, 日本環境化学会 9 回環境化学討論会, 257(2000)

4) 加藤嘉代子, 荘田 祥子, 吉村吉博, 中澤裕之(星薬大), 伊藤 裕子, 岡 尚男(愛知衛研): “HPLC/PDA による生体内フタル酸モノエステル類

の分析” : 日本薬学会第 121 年回

5) Kayoko Kato, Yoshihiro Yoshimura, Yuko Ito, Hisao Oka, Hiroyuki Nakazawa “Determination of metabolites of the plasticizer (di(2-ethylhexyl) phthalate, dibutyl phthalate and butylbenzyl phthalate) in human plasma.” , PITTCON 2001, New Orleans, USA

6) 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索; 日本薬学会第 120 年会、30[PF]12-08, 2000, 岐阜.

7) 鳥羽陽、野村麻貴、木津良一、早川和一: カラムスイッチング HPLC を用いたヒト尿中モノヒドロキシベンゾ[a]ピレンの分析; 第 7 回クロマトグラフィシンポジウム、4, 2000, 徳島.

8) 中村浩彰、鳥羽陽、木津良一、早川和一、中澤裕之、牧野恒久: カラムスイッチング HPLC を用いたヒト尿中モノヒドロキシベンゾ[a]ピレンの分析; フォーラム 2000: 衛生薬学・環境トキシコロジー、P-229, 2000, 東京.

9) 中村浩彰、蔵前弥生、鳥羽陽、木津良一、早川和一、中澤裕之、牧野恒久: カラムスイッチング HPLC を用いたヒト尿中モノヒドロキシベンゾ[a]ピレンの分析; 日本薬学会第 121 年会、28[PF]III-054, 2001, 札幌

10) Shinjiro Horii, Kazuhiko Akutsu, Mikiya Kitagawa, Hajime Oda, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki, Tsunehisa Makino, Development of

Analysis for Polybrominated Diphenyl Ether in Seafood and Actual Contamination of Seafood、20Th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds(DIOXIN 2000)2000,8,13-17(Monterey,CA,U.S.A.)

11) 岡 尚男、伊藤裕子、猪飼誉友、近藤文雄、松本 浩、GH I、中澤裕之、牧野恒久、「GC/MSによる人血清中のクロルデン及びその関連物質の分析」第25回日本医用マススペクトル学会年会(広島)、2000年9月

12) 巖 軍麗・田中 智・大鐘 潤・塩田 邦郎
「栄養膜細胞の分化におよぼすレチノイン酸の影響の解析」
第130回日本獣医学会学術集会(平成12年10月)

13) 巖 軍麗・田中 智・大鐘 潤・塩田 邦郎
「Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast cells into giant cell」米国細胞生物学会(ASCB)第40回年会(平成12年12月)

14) 横田 博、井上博紀、松本順也、柴田憲明、加藤清雄、湯浅 亮
「内分泌かく乱化学物質のラット肝におけるグルクロン酸抱合」
第3回環境ホルモン学会
15) 柴田憲明、横田 博、松本順也、

湯浅 亮

「ビスフェノール A 投与ラット肝における性ホルモンのグルクロン酸抱合能低下とクミルフェノール及びタモキシフェン投与の影響」

第3回環境ホルモン学会

16) 大道寺智、横田 博、井上博紀、加藤清雄、湯浅 亮

「ラット肝灌流法によるノニルフェノール及びアルキルフェノールのグルクロン酸抱合体の胆汁排泄」

第3回環境ホルモン学会

17) 井上博紀、横田 博、秋山毅一郎、伊藤隆志、翁長武紀、田村守、加藤清雄

「ラット脳灌流モデルを用いたビスフェノール A の脳組織への残留」

第3回環境ホルモン学会

18) 渡邊裕子、八村敏志、藤巻照久、中澤裕之、上野川修一、牧野恒久: 抗原特異的なT細胞応答に対するジブチルスズの影響, 日本農芸化学会 2001年度大会 講演要旨集, 75, 262, 京都.

19) 中陳静男, 篠田 聡, 豊島 聡, 中澤裕之(星薬大・薬), 大野修司(日大・薬), 牧野恒久(東海大・医): ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす内分泌攪乱化学物の影響, 第73回日本生化学大会, 2000年, 10月, 横浜

20) 中陳静男, 篠田 聡, 豊島 聡, 中澤裕之(星薬大・薬), 大野修司(日大・薬), 牧野恒久(東海大・医): ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼすフタル酸エステル, アルキルフェノール及び植物エストロゲンの阻害効果, 第3回日本内分泌学会

研究発表会，2000年，12月，横浜

21) 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、松林秀彦、新井正、Shanta F Haque、牧野恒久（東海大学医学部）：内分泌かく乱物質の細胞増殖におけるエストロゲン受容体の関与についての検討、第52回日本産科婦人科学会、4、2000、徳島

22) 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、奥脇伸二、内田能安、牧野恒久（東海大学医学部）：内分泌かく乱物質の作用について、cell line システムと酵母系アッセイシステムでの比較検討、第73回日本内分泌学会、6、2000、京都

23) T Murano, S Izumi, K Sakabe, S F Haque, T Suzuki, H Matsubayasi, S Okuwaki, T Makino

Environmental Endocrine Disruptors in an E-Screen Assay and a Yeast-Based Transcriptional Assay

11th International Congress of Endocrinology (Sydney, Australia. Oct 29- Nov 2, 2000)

24) T. Murano, S-I. Izumi, H. k. Sakabe, S. F. Haque, M. Onoe, T. Makino.

Effect of Environmental Endocrine Disruptors on Cell Proliferation and Estrogen Receptor-Mediated Transcription.

8th World Congress of Gynecological Endocrinology.

(Florence, Italy. Dec 6-9, 2000, Italy. Dec 6-9, 2000)