

研究課題：試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

(H14-食品・化学-012)

主任研究者名：所属機関 東海大学

氏名 牧野 恒久

1. 研究目的

本研究では、分析法の信頼性確保のための検討を行い、ヒト生体暴露量モニタリングを実施する一方、化学物質の代謝や、遺伝子多型といったレベルまで掘り下げて作用機構を検討し、これら総合的な研究成果をもって、いわゆる内分泌かく乱化学物質が生体内に実際に存在する暴露量の範囲で、どのような作用を発現するかを解明することを目的とし、大きく以下の5つの研究を行う。

- ① 生体試料中の化学物質の分析に関するガイドラインの作成
- ② 化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング
- ③ 動物実験の信頼性確保
- ④ 環境中の化学物質の胎盤機能と胎児発生における影響
- ⑤ 化学物質に対する感受性に関与する遺伝子の解明

2. 研究計画の進捗状況及び得られている成果

① 生体試料中の化学物質の分析に関するガイドラインの作成

平成15年度は、平成14年度に構築した「生体試料分析に関するガイドライン(案)」の信頼性を検証した。すなわち、複数の試験機関にビスフェノールA (BPA)、ノニルフェノール及びフタル酸エステル類を添加した同一試料を配布し、「生体試料分析に関するガイドライン(案)」にそって各機関で分析して得られた結果を評価した。その結果、分析法として優れたものであることが検証された。

② 化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング

BPA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) やアルキルフェノール類に関しては、生体試料のサンプリングに利用される医療器材にも含有されている可能性も示唆されるため、BPA、DEHP やアルキルフェノール類フリーの器具の使用による汚染排除を十分考慮する必要性ある。平成15年度は、平成11～13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」のプロジェクトで確立したコンタミネーションのない生体試料のサンプリング法を用いて採取され、提供される20症例以上の生体試料(血液・尿)について、平成14年度に構築した分析法を用いて、暴露調査を実施した。その結果、BPA及びアルキルフェノール類の生体暴露量は極めて微量(1ppbレベル以下)であることが示唆された。

③ 動物実験の信頼性確保

平成 15 年度は、実験動物飼育環境中の内分泌かく乱化学物質（ビスフェノール A、ノニルフェノール、フタル酸エステル類）の分析に関するガイドラインの基本骨格の構築は終了し、予備的に餌、給水瓶、床じきの分析を行った。その結果一部の飼料、床じき等から BPA 及びノニルフェノールが検出されている。

④ 環境中の化学物質の胎盤機能と胎児発生における影響

平成 15 年度はまず、ラット胎盤を用いた灌流実験システムの確立を試み、胎盤動脈（母親側）に挿入したカニューレからの人工血液の注入に成功している。エバンズブルーを注入した予備実験では、胎盤のバリアー機能が維持されていることが確認された。このシステムを用いて、胎盤での化学物質のバリアー機能解析が可能となった。また、これまでの研究を進展させ、反転腸管と胃灌流実験により消化管での BPA の吸収代謝を解析した。胃灌流実験では、小腸大腸には見られなかった素早い BPA の吸収が観察された。胃粘膜上皮細胞にグルクロン酸抱合酵素（UGT）が発現している事も判明した。

また、マウス栄養膜幹細胞（TS 細胞）に対するフタル酸モノ 2-エチルヘキシル（MEHP）の作用を検討した。50 μ M 以下の MEHP 存在下では、TS 細胞の未分化マーカー遺伝子および、分化マーカー遺伝子双方の発現亢進が観察された。その一方で、500 μ M の MEHP 存在下では、細胞は生存しているものの双方のマーカー遺伝子の発現は抑制されていた。これは予想外の結果で、MEHP はゲノム DNA 全体に何らかの修飾をもたらすような作用を示唆している。

⑤ 化学物質に対する感受性に関与する遺伝子の解明

子宮内膜症に関わる化学物質として、BPA、ノニルフェノール、フタル酸エステル類を対象とし、その暴露量を完成した①のガイドライン（案）に沿って測定条件を設定中である。

平成 14 年度にそれらの物質に対する疾患感受性遺伝子として aromatic hydrocarbon receptor、estrogen receptor、あるいはチトクロム、グルクロン酸抱合酵素の遺伝子を想定しそれらの遺伝子多型を明らかにし、その解析方法を確立し、平成 15 年度は、健常人での遺伝子多型分布を解析し、感受性対立遺伝子（アレル）の解析に使用しうる遺伝子多型部分を選定した。

3. 今後の予定

① 生体試料中の化学物質の分析に関するガイドラインの作成

平成15年度に検討された「生体試料分析に関するガイドライン(案)」を完成させる。

② 化学物質のヒト生体暴露量のモニタリング

①で構築した「生体試料分析に関するガイドライン」に則り、BPA、DEHP、ノニルフェノール及びオクチルフェノールのヒト生体暴露量のモニタリング調査数を増やし、これらの物質が生体内に実際に存在する暴露量の範囲を明らかにする。

③ 動物実験の信頼性確保

実験動物飼育環境中のBPA、ノニルフェノール、フタル酸エステル類の分析に関するガイドラインを完成すると共に、提案した分析法を用いて、餌、給水瓶、床じきの分析を行う計画である。

④ 環境中の化学物質の胎盤機能と胎児発生における影響

確立したラット胎盤を用いた灌流実験システムを用いて、胎盤での化学物質のバリアー機能解析を行う。また、胃灌流実験で明らかとなった素早いBPAの吸収の本態と共に胃粘膜上皮細胞に発現している事が判明したUGTの役割について検討する。

また、TS細胞のゲノムDNAメチル化状態に対するMEHPの作用を検討し、MEHPによってメチル化状態に異常を呈するゲノム領域近傍の遺伝子同定、および、それらの発現解析を行う。

⑤ 化学物質に対する感受性に関与する遺伝子の解明

子宮内膜症患者およびその家族などを対象に上で決定した遺伝子多型部分の解析を行い、子宮内膜症感受性のアレルを分子遺伝学的、統計遺伝学的に求めると共に、暴露経路を尋ね、さらに、BPA、ノニルフェノール、フタル酸エステル類の暴露量を測定してその相関を求める。

(内分泌かく乱化学物質の)試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

☆これまでの本研究班における研究成果 (ビスフェノールA、フタル酸エステル類、ノニルフェノール)

