

P-99

ラット幼若子宮の抗PCNA抗体を用いる内分泌攪乱化学物質の検出

○馬場恒夫、出原賢治、山崎朱美 (ダイセル化学工業株式会社・総合研究所)

PCNA as a tool to detect endocrine disrupting chemicals in immature rat uterus
Tsuneo BABA, Kenji IDEHARA, Akemi YAMAZAKI (Daicel Chem. Ind., Research Center)

【目的】内分泌攪乱化学物質 (EDC) の検出法として、ラット子宮湿重量法があるが、卵巣摘出の有無、子宮液、内因性ホルモンの影響など検討すべき課題が多い。そこで、EDCに対する感受性が高いと考えられるラットの幼若子宮を用いてPCNA免疫染色法により、子宮組織の各部位におけるPCNA陽性細胞を指標に検討した。

【方法】19日齢のラットにノニルフェノール (NP) を3日間連続投与 (1, 10, 100 mg/kg) した翌日に子宮を摘出、中性ホルマリンで固定、パラフィン包埋、薄切後、PCNA染色した (PC10, DAKO)。対照として、エストラジオール (ED) を同時に投与した (1, 10, 100 μ g/kg)。子宮組織を子宮角中央部 (UH)、子宮頸部 (CU) 及び子宮腔部 (VU) に分け、それぞれの部位における子宮腺上皮細胞 (GE) 及び子宮内腔上皮細胞 (LE) のPCNA陽性細胞を数え、細胞増殖指数 (PI) を算出した。

【結果】UH、CU及びVUのいずれの部位でも、PCNA陽性細胞は増加傾向を示し、UH及びCUにおけるGE及びLEが顕著なPCNA陽性細胞の増加傾向を示した。即ち、UHにおけるPIを求めコントロールとの比をとると、GEでは、24 (ED: 100 μ g/kg) 及び28 (NP: 100 mg/kg) 及びLEでは、13 (ED: 10 μ g/kg) 及び11 (NP: 100 mg/kg) であった。一方、CUの場合、GEでは、20 (ED: 10 μ g/kg) 及び23 (NP: 100 mg/kg) 及びLEでは、11 (ED: 10 μ g/kg) 及び8 (NP: 100 mg/kg) であった。しかし、VUにおいては、子宮腺は認められず、LEでは、7 (ED: 100 μ g/kg) 及び4 (NP: 100 mg/kg) であった。

【結論】ラット幼若子宮に対するNPのEDC作用を、PCNA陽性細胞を指標とすると、細胞レベルにおける顕著なPI増加として確認することができた。また、子宮組織のPCNA観察部位として、UH及びCUは、ほぼ同等に有効であることが分かった。

P-100

In-tube SPME/LC/MS法による変異原性ヘテロサイクリックアミンの分析

○片岡洋行¹、山本重雄¹、成松鎮雄¹、H.L. Lord²、J. Pawliszyn²、(¹岡山大・薬、²University of Waterloo)

Analysis of mutagenic heterocyclic amines by in-tube SPME/LC/MS

Hiroyuki KATAOKA¹, Shigeo YAMAMOTO¹, Shizuo NARIMATSU¹, H.L. LORD², J. PAWLISZYN², (¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama Univ., ² Department of Chemistry, University of Waterloo)

【目的】固相マイクロ抽出 (SPME) 法は、目的成分の抽出、濃縮、クロマトグラフィーへの導入が簡便迅速に行える新しい試料調製法である。本研究では、SPMEデバイスとしてキャピラリーカラムを用いる In-tube SPMEを考案し、オートサンプラー及びLC/MSとの結合による変異原性ヘテロサイクリックアミン (HCA) の自動分析法を開発した。

【方法】試料を2 mLのバイアルに取り、パフアーと水を加えて1 mLとしオートサンプラーにセットする。インジェクションプログラムによりキャピラリーカラムへの試料の吸入/吐出を繰り返し、カラム内固定相へHCAを吸着させる。さらに6-ポートバルブを切り替えMeOHをキャピラリー内へ流してHCAを脱離させ、移動相でLCカラムへ移送して分離した後、ESI-MS (SIMモード) で分析する。

【結果・考察】SPMEデバイスとしてOmegawaxを用い、試料pH 8.5、吸入/吐出は30 μ Lの試料を100 μ L/minの速度で10回以上繰り返す時、抽出量はほぼ平衡に達した。HCAの脱離はキャピラリーにMeOHを流すことにより容易に行え、キャリーオーバーは認められなかった。SIMモード検出 In-tube SPME/LC/MS法による検量線は5~200 ng/mLで良好な直線性を示し、検出限界は0.2~3.1 ng/mLであった。本法はビーフステーキのブルーレヨン抽出液に適用でき、MeIQx, IQ, PhIPが検出された。本法は試料前処理からLC分離、MSD検出、データ解析までを連続して自動的に行え、食品や環境試料分析に広く利用できると期待される。