

平成11年度厚生科学研究費補助金

(生活安全総合研究事業)

研究成果報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい
帯血等）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

(H11 - 生活 - 027)

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

織田 肇 大阪公衆衛生研究所

塩田 邦郎 東京大学農学生命科学大学院

目 次

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	1
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）	
生体試料中のフタル酸及びアジピン酸エステル類の高感度一斉分析測定法の開発	41
分担研究者 牧野 恒久（東海大学）	
研究協力者 岩崎 克彦 和泉 俊一郎	
エチル誘導体化GC-MS法を用いた、ヒト母乳、さい帯血、血液、腹水中のビスフェノールAの高感度測定	61
分担研究者 牧野 恒久（東海大学）	
研究協力者 岩崎 克彦 和泉 俊一郎	
ビスフェノールAの高感度分析法の開発と生体への応用に関する研究	79
分担研究者 中澤 裕之（星薬科大学）	
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	83
分担研究者 中澤 裕之（星薬科大学）	
研究協力者 中島 憲一郎（長崎大学） 黒田 直敬	
環境中ホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響に関する研究	87
分担研究者 塩田 邦郎（東京大学）	
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 内分泌かく乱物質を解毒するヒトUGT分子種の特定と母胎・胎盤・胎児での機能	93
分担研究者 塩田 邦郎（東京大学）	
研究協力者 横田 博（酪農学園大学）	
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	99
分担研究者 中澤 裕之（星薬科大学）	
研究協力者 中陳 静男	
ヒト由来乳癌細胞を用いた内分泌かく乱物質の簡便で高精度のアッセイ系の確立の研究	103
分担研究者 中澤 裕之（星薬科大学）	
研究協力者 山崎 聖美（国立公衆衛生院）	

ヒト尿・血液中のベンゾ [α] ピレン及びその代謝物の分析法開発	107
分担研究者 中澤 裕之 (星薬科大学)	
研究協力者 早川 和一 (金沢大学)	
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	111
分担研究者 織田 肇 (大阪府立公衆衛生研究所)	
研究協力者 阿久津和彦	
北川 幹也	
堀 伸二郎	
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	117
分担研究者 織田 肇 (大阪府立公衆衛生研究所)	
研究協力者 宮崎 豊 (愛知県衛生研究所)	
伊藤 裕子	
猪飼 誉友	
近藤 文雄	
岡 尚男	
松本 浩	
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	131
分担研究者 織田 肇 (大阪府立公衆衛生研究所)	
研究協力者 小林 進 (埼玉県衛生研究所)	
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	145
分担研究者 織田 肇 (大阪府立公衆衛生研究所)	
研究協力者 益川 邦彦 (神奈川県衛生研究所)	
藤巻 照久	
渡邊 裕子	
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	151
分担研究者 織田 肇 (大阪府立公衆衛生研究所)	
研究協力者 藤島 弘道 (長野県衛生公害研究所)	
月岡 忠	
寺澤 潤一	

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の開発を目的として、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-Cl) 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。市販のヒト肝ミクロゾーム及び各種動物肝ミ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。

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、年齢及び魚介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. 毛髪及び血液中のブチルスズ化合物の分析法に関する研究

トリブ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ブチルスズ化合物 (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ことで分解、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。トータルダイエツ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-C1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性がある。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・ 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 (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の環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

B1. 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

まず定量操作として、10 ml の共栓付き試験管に、試料溶液 2ml を加える。これに、サロゲート化合物溶液を 50・1 添加し、混和後 5 分間放置する。アセトニトリル 2ml、ヘキサン 1.8ml を添加し、N₂ でヘッドスペースを置換して、ボルテックスミキサーを用い、1 分間抽出する。1000g で 5 分間、遠心分離し、ヘキサン層を分取し、内標準溶液 20 μl を加え、その 2 μl を GC-MS (島津製、QP-5050A 型) に付した。なお、標準試料溶液として、各エステル類を、200 μg/ml の濃度にヘキサンの調製し、さらにヘキサンで希釈して、2 μg/ml 溶液とした。また、サロゲート溶液として、各エステル類対応のサロゲート物質を、100 μg/ml の濃度にヘキサンで調製し、さらにヘキサンで希釈して、4 μg/ml 溶液とした。また、内標準溶液としてフェナンスレン-d₁₀、フルオランテン d₁₀ 及びクリセン-d₁₂ を 200 μg/ml の濃度にヘキサンで調製し、さらにヘキサンで希釈して 20 μg/ml 溶液とした。

また、ヒト血清は、7 人のボランティアから得た。血清試料は、常法に従って調製し、15 分以内に凍結し、測定するまで -30°C で保存した。

測定法には、GS-MS 法を採用した。検量線は、標準試料溶液をヘキサンで希釈して、1、5、10、50、100、200ng/ml の溶液に、サロゲート及び内標準物質をそれぞれ 100 ng/ml、200 ng/ml となるように添加した溶液を、上記分析条件で測定し、エステル類と対応するサロゲート物質の、ピーク面積値の比と、

重量比から作成した。得られたエステル類と、対応するサロゲート物質とのピーク面積値の比から、検量線より検出量を求め、次式により生体試料中の濃度 (Cs) を算出した。また、測定ごとに一定量添加したサロゲート物質により、それぞれの測定対象の回収率を算出した。サロゲートの定量は感度計数 (RF) 法で行った。

B2. ビスフェノール A (BPA) の健康影響に関する調査研究

B2-①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) 研究報告書において報告した (内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する生体試料採取による調査：詳細報告書 2；生体試料中のビスフェノール A の高感度分析法の開発 I- エチル誘導体化 GC-MS 法と、同詳細報告書 3；生体試料中のビスフェノール A の高感度分析法の開発 II- トリメチリシリル誘導体化 GC-MS 法との比較検討)、生体試料中のビスフェノール A 濃度を測定した。

産科グループのボランティアからは、母乳、さい帯血、母体血を、婦人科グループからは、腹水、血液を採取した。採取した血液試料は、常法に従って血清に調製し、15 分以内に凍結し、測定

するまで-30°Cで保存した。母乳、腹水も同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30°Cで保存した。

B2-②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の標準試薬及び内標準として用いた¹³Cラベル化BPAはCambridge Isotope Laboratories Inc製を使用した。抽出、洗浄に用いた有機溶媒であるアセトンはJT Baker、ヘキサン及びメタノールはB&J Brand、イソオクタンはMallinckrodt Chemical、ジクロロメタンはCaledon Laboratories製をそれぞれ用いた。水は市販の精製水

(Caledon Laboratories製)をC₁₈固相抽出カラムのBaker Bond SPE C₁₈(J. T. Baker)で処理して用いた。PFB化剤として用いたPentafluorobenzyl bromide (PFBBr)はSUPELCOのものを用いた。BPA標準液はメタノールに溶解して調製し、実験に供した。

ガスクロマトグラフ/質量分析装置(GC/MS)はヒューレットパッカード社製HP5973型、オートサンプラーはHP7683を用いた。分離カラムはDB-5(J&W scientific 0.25mm i. d. x 30m thickness:0.25μm)を用いた。固相抽出用のカートリッジは、J. T. Baker製のBaker Bond SPE C₁₈(wide-mouth、500mg)を用いた。固相処理操作には、SUPELCO製Extractor:Visiprepを用いた。濃縮装置はZymark製のTurbo Vap LV evaporatorを用いた。また、実験に用いるガラス器具はすべてアセトン及びヘキサン洗浄して用いた。BPAのペ

ンタフロロベンジル化(PFB化)はPFBBrを用いて行った。BPA標準溶液0.5mLにジクロロメタン0.5mL、0.1M硫酸水素テトラブチルアンモニウム0.5mL、0.2M水酸化ナトリウム0.5mL及びPFBBr試薬20μLを加え、室温で攪拌しながら20分間反応させる。この溶液にイソオクタン1mLを加えて攪拌後、窒素気流下で蒸発乾固させる。さらにイソオクタン0.5mLを加えてGC/MSのNCIモードで分析を行った。

B2-③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

定量方法として、今回はDIB-BPA誘導体の定量には蛍光検出と化学発光検出の2つのシステムを検討した。

HPLC-蛍光定量法として、BPAのアセトニトリル溶液200・Lに1.5%トリエチルアミンを含む、15mMのDIB-C1アセトニトリル溶液200・Lを加え、室温、10分間反応させた。これに、溶離液400・Lを加え、室温30min放置後、HPLCに注入した。分離カラムにYMC製YMC-Pack Pro C18、溶離液はアセトニトリル/H₂O/MeOH=60:6:34、v/v/v)を用い、島津LC10Advポンプで1.0・L/minの速度で送液した。試料は5・Lを注入し、島津RF-10AXL検出器により、励起波長340nm、蛍光波長470nmで検出した。

HPLC-過シュウ酸エステル化学発光検出法として、BPAのアセトニトリル溶液100・Lに10mMのDIB-C1アセトニトリル溶液10・Lおよび30%トリエチルアミンのアセトニトリル溶液5・Lを加え、室温20min反応させた。

得られた溶液を ODS カートリッジに負荷し、70%アセトニトリル水溶液 5 mL で洗浄後、300・Lのアセトニトリルで溶出し、得られた溶液を HPLC に注入した。分離カラムはダイソー製の Daisopack-SP-120-5-ODS、溶離液にはアセトニトリル/40 mM Imidazole-HNO₃ buffer (pH 7.0)=83:17(v/v)を使用し、島津 LC10Adv ポンプにより、1 mL/min で送液した。試料は 5・L を注入した。ポストカラム化学発光試薬は 0.6 mM TDPO と 25 mM 過酸化水素のアセトニトリル混合溶液を使用し、LC10Adv ポンプを用いて、1.0・L の速度で送液した。

B3. 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

B3-① 核内受容体について

(1) 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、株化栄養膜幹細胞 (TS 細胞) の分化に及ぼす影響を見る目的で、TS 細胞を 1 μ M の RA 存在下で培養し、FACS 解析および Northern hybridization 解析を行う。(2) in vivo での栄養膜細胞の分化に対する RA の影響を解析する目的で、25 μ g/g body weight の RA を、妊娠雌マウスに妊娠 6.5 日および 7.5 日に腹腔内注射し、8.5 日に栄養膜細胞の分化マーカーである、PL-1 および 4311 遺伝子をプローブとして用いた in situ hybridization 解析を行った。(3) 核内受容体の一つで、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、TS

細胞における発現を、RT-PCR により解析した。(4) さらに (3) で得られた PCR 産物を精製し、ICR 系統由来 AhRcDNA のクローニングを行った。

B3-② 解毒酵素について

(1) ラット肝臓門脈ヘビスフェノール A を灌流し、肝臓から胆管や静脈に排泄されるビスフェノール A の代謝物を分析する。(2) 市販ヒト肝臓ミクロソームを用い、各種内分泌かく乱化学物質のグルクロン酸抱合活性を HPLC 等で測定する。(3) ヒト cDNA から、UGT2B 分子種を複数クローニングする。

B4. 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

B4-① 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

H295R 細胞は英国エジンバラ大学の J. I. Mason 教授から供与を受けた。細胞を実験に使用するに当たり、細胞をトリプシンで処理後、24 well のプレートにサブカルチャーし、コンフルエント後、ITS⁺(1.0%)、牛血清アルブミン (0.01%) および抗生物質含有の D-MEM-F12 メジウムに交換した。24 時間後さらにメジウムを交換し、種々の検体のエタノール溶液を添加し (エタノール濃度は 1%以下)、同時にステロイド合成を誘導するため (Bu)₂cAMP を添加した。一定時間後にメジウム中に分泌されたステロイドをラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。サンプ

ルの細胞毒性を考慮してメジウム中に放出される LDH を測定した。さらに well 中の細胞を洗浄後溶解し、全タンパク質量を測定して、細胞数の指標とした。なお、コルチゾールの測定にはコルチゾール測定 RIA キット (DPC 社製) を用いた。LDH の測定は細胞障害試験用の CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega 社製) を用いた。well 中の細胞は SDS (1%) NaCl (150mM)、EGTA (5mM) MgCl₂ (0.5 mM)、MnCl₂ (0.5mM)、および PMSF (0.2mM) 含有の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用い溶解した後、BCA Protein assay reagent (Pierce 社製) を用いて測定した。

B4-②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

まず E-SCREEN Assay は、サブコンフルエントの細胞 (MCF-7、T47D の 2 種類の乳癌細胞) を、DMEM-10%FCS で希釈し、MCF-7 は、 $5 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$ に、T47D は、 $3 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$ の濃度で、96 穴プレートに $100 \mu\text{l}$ ずつ培養する。フェノールレッドフリーで市販低蛋白質溶液を加えた DMEM ($90 \mu\text{l}$) にて、 $10 \mu\text{l}$ の被験物質を加える。被験物質は、DMSO に 10^{-2} M になるようにして作ったものを DMEM で希釈していき、 10^{-3} M ~ 10^{-10} M になるような溶液を作り、それを $10 \mu\text{l}$ ずつ加えていく。最終的な濃度は 10^{-4} M ~ 10^{-11} M で、 37°C 、5%CO₂ 中で 3 日間インキュベートした後、各ウェルにセルカウンディングキット

(和光純薬) 中の試薬溶液を $10 \mu\text{l}$ ずつ加え、3 時間後にプレートリーダーで測定波長 450nm、参照波長 600nm にて測定する。

B5. 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

分析装置 : HPLC ポンプは、LC-10AD (Shimadzu)、880U (Jasco) を用い、カラムオーブンは CT0-2A (Shimadzu)、スイッチングバルブユニットは 892-01 (Jasco)、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、C2、C4) 及び、濃縮用カラム 1 本 (C3) を用いた。またガードカラムとして Discovery RP-Amide-C16 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) を使用した。

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、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。

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 · M BaP、0.25 mM NADP⁺、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 · 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 · 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 · L) に再溶解させ、3000 回転で 10 分間遠心した後、上清の 20 · L を HPLC に導入した。

尿試料の前処理：ヒトの尿 (健康人、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、 β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼを 100 · 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 10mL 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 · L に再溶解して 5000 回転 6 分間遠心した溶液の上清 30 · L を HPLC

に導入した。

B6. 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

魚試料は、1998 年 10-12 月に瀬戸内海で採取したアジ、アナゴ、スズキ、ハマチ、ヒラメ、ボラおよびマダイを使用した。母乳脂肪は、大阪府下で採取された 1980 年 (74 件混合)、1984 年 (67 件混合)、1986 年 (55 件混合) および 1990 年 (58 件混合) の保存試料を使用した。

GPC 装置には abc laboratories 製の AS-2000 を用いた。プレカラム および GPC カラムは、各々 Shodex 製 CLN pak EV-G (100 mm x 20 mm ϕ) および CLN pak EV-2000 (300 mm x 20 mm ϕ) を使用した。GPC 移動相にはアセトン/シクロヘキサン (3:7) を使用した (流速 5mL/min)。なお、タイムプログラムは dump 15min、collect 13min、wash 12min (total 40min) とした。

ガスクロマトグラフは Hewlett Packard 製の HP5890 series II を使用した。分離カラムは J&W Scientific 製の DB-1 を使用した。キャリアーガスは He (カラムヘッド圧 6psi 定圧) を用い、昇温条件は 140°C (2min) $-10^{\circ}\text{C}/\text{min} \uparrow -180^{\circ}\text{C}-3^{\circ}\text{C}/\text{min} \uparrow -220^{\circ}\text{C}-10^{\circ}\text{C}/\text{min} \uparrow -325^{\circ}\text{C}$ (5min) とした。試料注入はスプリットレス方式 (注入量 2 μL 、パージオフ時間 0-1.5min、注入口温度 275°C) により行った。

四重極型質量分析計は日本電子 (株) 製のオートマス 120M を使用した。イオン源温度およびトランスファーライン温度は各々 180°C、250°C とした。反応ガスはイソブタンを使用し、イオン化

エネルギーは70eVとした。

B7. 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

18才から64才までの成人154名からインフォームドコンセントを得た後、血液試料の提供を受けた。血液採取時に、年齢、性別、摂取している米の産地、飲用している水、居住環境地域、住居のシロアリ駆除歴、それに米飯・魚介類・肉類・野菜・果実を摂取する頻度、喫煙、飲酒、病歴、子供の数についてのアンケート調査を実施した。また、昨年度、ビスフェノール A 等の調査に用いられた母体末梢血、腹水及びさい帯血試料の保存品24検体も用いた。

操作方法は、昨年度と同様である(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)研究報告書において報告済)。検出された試料の平均値で結果を平均値以下と平均値超の2階層に分け、これらの化学物質の血中濃度とアンケート調査の項目との関連について統計的解析(カイ二乗検定)を実施した。なお、HCBについては他の検体とは非常にかげ離れた高濃度を示す検体が複数存在し、平均値が中央値と大きく乖離していたことから、中央値を用いて2階層に分けた後の統計的解析(カイ二乗検定)をも実施した。

B8. 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

試料には、市販の大豆類、黄粉・豆腐等の大豆加工品、その他の豆類及びトータルダイエツト試料を用いた。トータルダイエツト試料は、厚生省国民栄養調査による食品群別摂取量表を基にして、小売店から購入した約150品目の食料品を、実際の食事形態に従い、そのままあるいは調理した後、13群(1群:米・米加工品、2群:米以外の穀類・種実類・芋類、3群:砂糖類・菓子類、4群:油脂類、5群:豆類、6群:果実類、7群:緑黄色野菜、8群:その他野菜類・きのこ類・海草類、9群:調味・嗜好飲料、10群:魚介類、11群:肉類・卵類、12群:乳・乳製品、13群:その他の食品)に大別し、十分混合して調製した。なお、平成8、9及び10年度トータルダイエツト試料は、-20℃で冷凍保存されていたものを使用した。また食品については、試料0.5・2gを採り、80%メタノールを加えてホモジナイズ抽出後、遠心分離してその上清を試験溶液とした。さらに生体試料については、尿は5mlを、血清は2mlをIsolute Multimodeカートリッジに負荷し、蒸留水10mlで洗浄後、メタノール10mlで溶出した。溶出液を45℃の水浴中で減圧乾固後、80%メタノール1mlに溶解して試験溶液とした。これらを高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)を用いて測定した。各イソフラボン標準の濃度が0.05、0.1、0.2、0.5、1及び2・g/mlとなる標準溶液を調製し、その10・1をLC/MSに注入した。検出には選択イオン検出(selected ion monitoring、SIM)法を採用し、得られ

た SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

B9. 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

毛髪約3gをエタノールで1分間超音波で3回洗浄後、イオン交換水で3回、超音波で洗浄した。洗浄した毛髪は、乾燥後3~5mmに細切し、さらに15時間乾燥後、秤量し、試験試料とした。血液は、採血後ヘパリンを2%添加し、凍結保存した。分析時に解凍し、均一化した試料を秤量し、試験試料とした。この試料0.2gに内標準物質として安定同位体標識標準品を0.1 μ g添加し、25%テトラメチルアンモニウムヒドロキシド水溶液5mlでアルカリ分解後、酢酸1.5ml及び塩酸2.0mlを加え酸性とした。これに10%塩化ナトリウム水溶液40mlを加え、0.01%トロポロン-ベンゼン溶液20mlを加えた後、振り混ぜ上層を分取し、この操作を繰り返しベンゼン溶液40mlを減圧濃縮した。濃縮液をイソオクタン5mlに溶解後、0.5M酢酸緩衝液10ml及び1.0%テトラエチルホウ素ナトリウム水溶液0.5mlを加えて激しく振とうし、エチル化後上層を分取した。塩化ナトリウム3gを加え、イソオクタンで2回抽出した。これを減圧濃縮して1mlのn-ヘキサンに溶解し、Sep-Pak Plusフロリジルカラムに負荷し、n-ヘキサン10mlで溶出した。減圧濃縮後n-ヘキサンにて試験溶液0.2mlとした。これらの試料溶液を以下の装置及び条件で分析した。

装置：Auto Mass 20（日本電子）

カラム：DB-5 30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m

注入口：スプリットレス、温度 220 $^{\circ}$ C
昇温プログラム：50 $^{\circ}$ C(1min)-20 $^{\circ}$ C/min-280 $^{\circ}$ C(10min)

イオン源温度：200 $^{\circ}$ C

GC/MSインターフェイス部温度：250 $^{\circ}$ C

サンプル注入量：2 μ L

イオン化：EI

イオン化電圧：70eV

検出方法：選択イオン検出法 (SIM)

モニターイオン：トリブチルエチルスズ

(TBT-Et) の [M-C₂H₅]⁺ である291を定量イオンとし、スズの同位体由来する289を参照イオンに用いた。同様にジブチルジエチルスズ (DBT-Et) は263を定量イオンとし、261を参照イオンに用い、ブチルトリエチルスズは235を定量イオンとし、233を参照イオンに用いた。

B10. 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

B10-①生体試料中におけるパラベン類及びパラヒドロキシ安息香酸の定量

試料5m l (尿の場合はそのまま、血液の場合、遠心分離を行い血清画分のみ試料とした) にサロゲート化合物として3-ヒドロキシ安息香酸0.2 μ g 及び0.1m l の濃塩酸を加え、精製水5m l で希釈した後 E x t r e l u t N T 20 に負荷し、酢エチ120m l で溶出させた。エバポレーターで濃縮後、アセトニトリル0.5m l に溶解後 B S T F A を0.2m l 添加し、シリル化を行い、その試料を G C / M S で定量した。

B10-②栄養ドリンク剤中のパラベン類