

の分析

栄養ドリンク中のパラベン類の測定は試料1mlをSEP-PAK tC18に試料を通水し、蒸留水5ml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。また、栄養ドリンク中のパラヒドロキシ安息香酸、安息香酸の分析は資料を1ml分取し、血液試料と同じ手法(extr elut NT3を使用)を用いた。

B10-③血液中のクロルベンゼン類(パラジクロロベンゼン、HCB)の測定方法

血液5mlを22mlヘッドスペース瓶に採りプロテナーゼK 200ユニット、HCB-13C6 5ngを加え栓をして60℃にて3時間加熱し蛋白の分解を行う。次にSPMEファイバーをヘッドスペース瓶に差し込み80℃にて30分ヘッドスペースSPMEを行い定量はGC/MSにより行った。

B10-④食品中のHCB、p、p'-DDEの分析

1Lの丸底フラスコに試料10-20gを採り、5%NaOH 100ml、沸石とシリコンオイル1ml、ヘキサン5mlを加え改良型循環蒸留装置にて90分間蒸留を行いHCB、p、p'-DDEを捕集した。その後ヘキサン層を濃硫酸5mlで洗浄、シリカゲルによるクリンアップ後、定容してGC/ECDにて定量した。

B10-⑤室内空気中のパラジクロロベンゼンの分析

市販の活性炭充填チューブ(柴田化学器械工業製パッシブガスチューブ)を使

用して活性炭に捕集した揮発性化学物質を二硫化炭素で溶出しGC/MSによりパラジクロロベンゼンを定量し、[濃度(ppm)=試料ガス量/サンプリングレート/サンプリング時間(min)]の式にて室内濃度を算出した。

C. 研究結果および考察

C1. 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

今回の条件のクロマトグラムでは、DCHPとDEHP及びそのサロゲートは、ベースライン分離しなかったが、定量には十分な分離だった。その他の化合物は、完全にベースライン分離した。さらにマススペクトルにより、エステル類とそのサロゲート物質及び内標準物質を測定し、モニターイオンをこれらのスペクトルに基づいて決定した。エステル類及びそれらのサロゲートの検量線は、少なくとも200ng/mlまでの良好な直線性を示した。サロゲート物質100ng/mlを加えて作成した、エステル類の検量線も良好な直線性を示し、寄与率 $\gamma=0.9992$ から $\gamma=0.9999$ と良好であった。検出限界(S/N=3)は、1ng/mlのエステル類を用いて得たクロマトグラムより算出した。

本法をヒト体液(腹水、血清、さい帯血)に応用するため、ウサギ標準血清をモデルとして使い、諸条件を検討した。操作法に従って血清を処理して得られたクロマトグラムでは、DBP及びDEHPが、1.4及び1.3ng/ml検出され、それぞれの参照イオンとの強度比は(100:2、100:29:7)、標準物質の強

度比 (100 : 3、100 : 31 : 6) とほぼ同じであることを確認した。このときの操作ブランクの DBP 及び DEHP は、0.7 及び 0.4ng/ml であった。一方、その他のエステル類は全く検出されなかった。また、生体試料由来の妨害ピークは観測されなかった。

抽出条件設定のための予備実験により、血清に対する抽出溶媒の量を少なくしても、エマルジョンが全く起こらなかった、アセトニトリル：ヘキサン = 2 : 1.5 を用いて抽出した。

本法の操作ブランクは 7 回測定した結果、DBP 及び DEHP は、それぞれ 0.8 及び 1.0 ng/ml であった。それ以外の測定対象のピークは全く観測されなかった。ウサギ血清にエステル類を各 50ng/ml の濃度添加した溶液を 5 回ずつ測定し、回収率を算出したところ、DEP が 14%、と極端に低い他は、60 から 90% と比較的良好であった。検出限界をそれぞれの回収率を加味し、試料あたりに換算した結果、回収率が低い DEP、BBP 以外は 1ng/ml 以下と良好な値を示した。しかし、DBP と DEHP は、操作ブランクが検出されたため [定量限界 = 平均値 + 1.943 × 標準偏差] の式から定量限界を算出し、それぞれ 1.0 及び 1.5 ng/ml とした。

本法を用いてボランティアのヒト血清を測定した結果、汚染の可能性が考えられる DBP が、定量限界をわずかに超える程度検出された。これは、プラスチック製品が多数存在する P-2 実験室内のさらなる汚染防止と、サンプリングの操作ブランクを測定し、考察する必要性を示唆する。

C2. ビスフェノール A (BPA) の健康影響に関する調査研究

C2-①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

母乳、さい帯血、血清及び腹水を、本法に従って処理して得たクロマトグラムからいずれにおいても、0.2 ng/ml の BPA が検出され、その他の生体試料由来の妨害ピークは観測されなかった。これらの測定値はいずれも検出限界以下で、このときの操作ブランクは 0.2ng/ml で、操作ブランクによる物と考えられる。また、本条件下で、BPA、BPA-d₁₆、並びにフルオランテン-d₁₀ の化合物は、完全にベースライン分離した。また、試薬由来の妨害ピークは、全く存在しなかった。

BPA-d₁₆ 100 ng/ml を加えて作成した、BPA の検量線も良好な直線性を示し、寄与率 $\gamma = 0.9993$ と良好であった。検出限界 (S/N=3) は、0.5 ng/ml の BPA を用いて得たクロマトグラムより、0.6 ng/ml とした。検出限界以下の測定値は、ND とした。

BPA の毎測定ごとに同時に測定した操作ブランクは、検出限界以下で良好な結果であった。操作ブランクの測定値の推移を検討すると、測定実施期間のうちごく短い期間だけに高い値が局在していた。この原因は、現在のところ 2 つ可能性が考えられる。(1) 測定の時期に、測定場所の近くで塗装が行われ、エポキシ系の塗料が用いられた。この塗装由来の BPA により、操作ブ

ンクが増加した可能性がある。(2) 途中から逆相系前処理カラムは、200℃で加熱乾燥処理し BPA 除去した物を使用した。全く除去操作をしなかった場合、0.4 ng/ml 程度の操作ブランクであったものが、加熱乾燥処理によって充填剤の BPA 汚染の除去が可能となった。しかし初期の製品は、処理時間が不十分であったことが追跡調査でわかっており、製品のロット間並びにロット内で汚染除去効率が異なっていた可能性がある。この原因のため、操作ブランク値が 0.1 から 0.4 ng/ml と変動し、それに伴い測定値が真の値と異なってくる可能性がある。これらの対策として、(1) 塗装の問題は、徹底的な器具の洗浄、実験室のクリーンナップの実施を行った。(2) 前処理カラムに関しては、充填剤だけを加熱乾燥処理して、ロット間及びロット内の均一化をはかった。これらの対策の後には、一定した操作ブランク値となった。また、全測定の回収率は、平均で 82% と良好であった。

住宅環境、食生活、病歴を含む生化学データなど、結果解析に必要なデータが入手可能なボランティアを、婦人科及び産科の 2 つのグループに分け BPA の測定した。婦人科グループは、母乳、さい帯血及び母体血を、婦人科グループでは、腹水及び血液を測定対象とした。

婦人科グループでは、1 例腹水中に 1.7 ng/ml (1.9 及び 1.6 ng/ml の平均値) の BPA が検出された。まず、測定の根拠となるピークが BPA に基づくかどうかを検討するために、本法で用いたモニターイオンの他に複数のモニターイオン

で同時に測定し、標準物質から得られたものとピーク強度比を比較した。この腹水の試料 No. 1 及び No. 2 は、どちらも標準物質のピーク強度比とほぼ等しいことから、BPA の存在する可能性が考えられる。しかしながら、本測定は、先に述べた操作ブランクの値が、0.1-0.4 ng/ml と変動していた時期に相当し、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ある。n = 2 で測定した測定値が、1.9 と 1.6 と大きく異なることから、このことを示唆する。従ってこれら測定値が試料由来であることを証明するためには、まず再測定、しかる後に他測定機関によるクロスチェックが必要である。しかし、本試料はもともと 4ml しかなく、これ以上の検討は不可能であった。その他の腹水及び血液では、BPA の測定値は全て ND であった。

産科グループでは、母乳、さい帯血、母体血中の BPA を本法で測定しいずれも ND という結果を得た。

C2-②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

PFBBBr 試薬による BPA の PFB 化を試み、10ng/mL BPA 標準溶液を用いて GC/MS により測定した。反応生成物のピークが 26.59 分にみられ、マススペクトルを確認したところ、m/z:407 に M⁻の分子イオンピークが認められたことから、本反応による生成物は、OH 基の 1 つがアルキル化して PFB-BPA (MW:407) を生じたことが確認された。その結果、他

の物質との妨害の影響なく分離が可能であった。

50ng/mL BPA 標準溶液にジクロロメタン、硫酸水素テトラブチルアンモニウム、水酸化ナトリウム及びPFBBr（以上4種をPFB化試薬）を加えて反応させた。その反応溶液に各種有機溶媒を添加したPFB-BPAの生成量について、さらに蒸発乾固後に添加した有機溶媒によるPFB-BPAの抽出効果の差について検討した。その結果、イソオクタン/イソオクタンの抽出溶媒の組み合わせが最もよかった。これはBPAが水相のアルカリ条件下でテトラブチルアンモニウムとイオン対を生成してイオンペア反応生成物を生成する。この生成物はメタノールよりもイソオクタンに抽出されやすいものと考えられる。さらに、この反応生成物が有機相へ移行してPFBBrと反応してPFB-BPAを生じる。このPFB-BPAはジクロロメタンやヘキサンよりもイソオクタンに抽出されやすいと考えられる。また、PFB化試薬と同時にイソオクタン1mLを加えて反応させた場合と反応後にイソオクタンを加えた場合を比較した結果、反応後イソオクタン加えた方が9.4倍増加した。

50ng/mL BPA 標準溶液にPFB化試薬を加えて反応後、イソオクタン添加量について検討した。その結果、イソオクタン1mLの添加が最もよい結果が得られた。イソオクタンを全く添加しない場合に比べて430倍の差が認められた。これは、水相と有機相の界面での平衡状態において、BPAとテトラブチルアンモニウムとのイオンペア生成物がイソ

オクタン1mLの添加で最も有機相へ移動しやすくなったものと考えられる。

PFB化試薬として使用している0.1M硫酸水素テトラブチルアンモニウム及び0.2M水酸化ナトリウムの調製には水溶媒を用いている。今回、その水溶媒として、市販のHPLC用水とイオン交換水及び予めC₁₈カートリッジ処理した水（SPE処理水）をそれぞれ試薬調製に用いてPFB-BPAの分析法を検討した。その結果、SPE処理水は市販の水及びイオン交換水と比較して約18倍の差がみられた。これは、市販の水、及びイオン交換水は処理過程で高分子フィルターを使用しているため、BPAがコンタミネーションしたものと考えられる。従って、以後使用する水は全てSPE処理した水を用いることとした。

BPA標準溶液を0.01~100ng/mLに調製して、PFB化試薬を加えて生成したPFB-BPAについて検量線を作成した。その結果、0.01~100ng/mLに対して良好な相関性($r^2=0.998$)が認められ、またそのダイナミックレンジも広範囲であった。また本法の検出限界は5pg/mL(絶対量として10fg)であった。1ng/mL及び0.1ng/mL PBA標準溶液を用いた再現性の検討では、それぞれ4.76、5.42% (n=5)と良好の結果が得られた。

生体試料として、ヒト血清を使用し、血清1mLに32%ギ酸溶液1mLを加え、5分間超音波処理を行った後、C₁₈カートリッジ(500mg)及びフロリジルの固相抽出法(SPE)で試料のクリーンアップを検討した。C₁₈固相カートリッジは予め、エタノール15mL及び水3mLで処理し、フロリジルは15%のエチルエーテル

／石油エーテル 5mL、メタノール 10mL で処理した。その結果、C₁₈ カートリッジによる SPE 処理後、C₁₈ カラムでろ過したもので最もよい回収率が得られた。次に、SPE 処理での BPA のメタノールによる溶出効果について検討し、メタノール量の増加に伴い、BPA の溶出量も増加し 8mL 以上では変化がみられなかった。

ヒト血清及びコントロール血清に 10ng/mL の BPA 標準溶液を添加した結果、BPA のピークは他の成分とよい分離が得られた。また 10ng/mL BPA 添加の回収率を求めた結果、ヒト血清では 98.5% (n=5)、コントロール血清では 100.9% (n=5)、1ng/mL BPA 添加では 101.0% とそれぞれ良好な結果が得られた。なお、ヒト血清及びコントロールの BPA 含量はそれぞれ、0.79、4.46ng/mL であった。

本法をヒト血清試料に応用し、その回収率を測定した結果、良好な回収率が得られ、種々の生体試料中の BPA 分析に有効であると考えられる。

C2-③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

HPLC-蛍光定量法：標準溶液を用いて得られたクロマトグラム上で、DIB-BPA ピークの保持時間は約 16 min であり、試薬の妨害ピークの影響は見られなかった。検量線を作成したところ、0.1～50 ppb の濃度範囲で良好な直線関係 ($r \geq 0.999$) が得られた。検出下限は 0.05 ppb (S/N=3) と非常に高感度であった。

実試料への適用性を調べる目的でウ

サギ血漿に添加した BPA の測定を試みた。血漿 1 mL を除タンパク後、固相抽出 (Waters Oasis HLB) により BPA を抽出する clean-up を行い、バックグラウンドの減少を図った。抽出液は窒素気流下、乾固し、アセトニトリルに再溶解して蛍光ラベル化に付した。過剰量の未反応試薬は Sep-pak C18 カートリッジを通じて除去し、ろ液を HPLC に注入した。BPA を 1 および 10 ppb、ウサギ血漿に添加した場合の回収率はいずれも 4 回の測定で平均 95% 前後であり (RSD<5%)、検出下限も 1 ppb と良好な結果を得た。

HPLC-化学発光定量法：標準溶液を用いて得られたクロマトグラムで、DIB-BPA のピーク保持時間は約 48 min であった。過シュウ酸エステル化学発光反応により得られる試薬ブランク由来のピークが DIB-BPA の分離を妨害したため、固相抽出による未反応試薬の除去を検討した。その結果、ODS カートリッジを用いた場合、先の操作法に記載した条件で抽出すると、最も効果的に試薬を除去することができた。ここでの、clean-up 操作を行った場合の DIB-BPA の回収率は約 60% であった。

標準溶液を用いて検量線を作成したところ、0.56～22.7 ppb の範囲で良好な直線性 ($r=0.996$) が得られ、S/N=3 における検出下限は 0.38 ppb であった。

本法を市販のポリカーボネート製ほ乳びんから溶出する BPA の定量に適用した。ほ乳びんに 95℃のお湯 100・L を加え、同温度で 30 min 恒温室に放置後、溶出した BPA を定量した。検討した 2 種類のほ乳びんから、0.53 および

0.74 ppb の BPA が検出された。なお、2 度目の溶出操作では検出されたものの、検出下限値以下であった。

C3. 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

C3-①核内受容体について

(1) RA 存在下では DNA 含量の高い細胞がより多くをしめることが明らかになった。海綿栄養膜細胞特異的遺伝子である 4311 および Cea4 の発現は RA 添加により減少していた。(2) RA の腹腔内投与により、PL-1 陽性細胞の数が明らかに増加した。一方 4311 陽性細胞の数は RA 処理群で減少していた。(3) AhR の発現は、TS 細胞の分化に伴い一過的に上昇するパターンを示した。(4) マウス AhR 遺伝子には C57BL/6 タイプと DBA タイプの 2 種類が報告されているが、今回 ICR 系統由来 TS 細胞から単離された AhR 遺伝子は、これら両タイプの特徴的配列を合わせ持つ、第 3 のタイプであった。

C3-② 解毒酵素について

(1) ラット肝門脈に注入したビスフェノール A は、ほとんどが胆汁中にグルクロン酸抱合体として排泄され、他の代謝物は検出されなかった。一方静脈中にも、グルクロン酸抱合体として排泄されたが、投与量が多い場合にはわずかに未反応のビスフェノール A が検出された。(2) ヒト肝ミクロゾームにも、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および各

種植物由来エストロゲンのグルクロン酸抱合体活性が検出された(3) ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素の分子種 UGT2B4、UGT2B7、UGT2B10 の cDNA をクローニングできた。現在、UGT2B10 のみ発現できているが、かすかにビスフェノール A のグルクロン酸抱合体活性が検出された。

C4. 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

C4-①副腎由来の培養細胞を用いた研究

H295R 細胞の産生するステロイドホルモンについては、産生量の多いコルチゾールを測定することとし、生合成を誘導する cAMP の処理時間と濃度について検討を加えた。予備実験より、コルチゾール生合成の誘導を行うための cAMP 濃度は 1mM とし、処理時間は 48 時間に設定した。

農薬 DDT とその代謝物等による影響: 検体として、*p, p'*-DDT、*p, p'*-DDD、*p, p'*-DDE、*o, p'*-DDT、その代謝物である *o, p'*-DDD、ジコホール、トランス・クロルデン、シス・クロルデン、およびヘキサクロルベンゼンを用いた。その結果、*p, p'*-DDT、*p, p'*-DDD、*p, p'*-DDE、*o, p'*-DDT、*o, p'*-DDD、およびジコホールが 1 μg/mL 以上の高濃度で (Bu)₂cAMP で誘導した H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制することが判明した。これらの検体の細胞に与える傷害の指標として測定した培養上清中の LDH 活性はいずれの濃度において

も影響が認められなかったが、ジコホールは細胞に対する毒性が高く、 $10\mu\text{g/mL}$ の濃度において培養上清中のLDH活性が増加傾向した。トランス・クロルデン、シス・クロルデン及びヘキサクロルベンゼンのコルチゾール産生に及ぼす影響は軽微かあるいはほとんど認められない程度であった。

各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類の影響：パラオキシ安息香酸、そのメチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステル、イソプロピルエステル、イソブチルエステル、およびパラジクロルベンゼンを検体として用いた。その結果、パラオキシ安息香酸では全く影響が認められないが、そのエステル部分が長くなるにつれて、 $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ で誘導したH295R細胞のコルチゾールの産生は抑制され、パラオキシ安息香酸ブチルおよびパラオキシ安息香酸イソブチルはコントロールと比較してコルチゾールの産生が40%に抑制された。しかしこれらの検体は細胞に障害を与え、培養上清中のLDH活性が増加傾向にあった。そのLDH活性は細胞の総LDH活性の10%であった。またジクロルベンゼンはコルチゾール産生に対して全く影響を及ぼさなかった。

植物エストロゲンおよびジエチルステロイド(DES)等の影響：植物エストロゲンの検体としてダイゼインとゲニステインおよびそれらの7-グリコシドである配糖体、ダイジンとゲニステインを用いた。また合成エストロゲンとしてDESおよび天然のエストロゲンとしてエストラジオール- 17β を検

体として用いた。その結果アグリコンに相当するダイゼインとゲニステインは $2.6\mu\text{g/mL}$ を越える高濃度になるとLDH活性を指標とした細胞障害なしにH295R細胞のコルチゾールの産生を抑制することが判明した。それに対して、配糖体であるダイジンとゲニステインでは全く影響が認められなかった。DESにおいてもコルチゾール産生に及ぼす影響が高濃度($10\mu\text{g/mL}$)において認められるが、ダイゼインやゲニステインと比較して軽微であった。それに対してエストラジオール- 17β は $1\mu\text{g/mL}$ 前後の低濃度においてコルチゾール産生を抑制し、濃度が上昇するにつれ抑制効果は増加するが、高濃度の $10\mu\text{g/mL}$ の濃度においても35%に抑制される程度でその用量反応曲線は緩やかであった。

C4-② 乳癌培養細胞を用いた研究

本研究において、本アッセイで通常用いられるチャコールデキストラン処理血清に代えて市販の低蛋白溶液を用いたところ、エストラジオールでは $10^{-11}\sim 10^{-6}\text{M}$ で増殖促進作用がみられ、同様にアッセイが行えることを確認した。低蛋白溶液を用いることにより、ホルモン以外の血清成分による結果のばらつきを抑えられたと考える。本法によるアッセイの結果、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシルにエストロゲン作用が検出された。フタル酸ジシクロヘキシルについては、E-

スクリーンアッセイでエストロジェン様活性がなかったという報告もあるが、我々のアッセイではエストロジェン様活性が検出された。ところで、MCF-7細胞によるアッセイはMCF-7細胞のエストロジェンに対する反応性の維持に技術を要し、常に同様の条件下でアッセイを行うことが容易ではないと思われたので、MCF-7細胞にかえて、同じくヒト乳癌細胞であるT47Dを用い、同様にアッセイを行ったところ、エストラジオールではMCF-7と同様に 10^{-11} ~ 10^{-6} Mで1.5~2.2倍の増殖促進作用がみられた。T47Dを用いた場合は細胞の増殖性がよく、ばらつきの少ない安定した結果が得られた。ノニルフェノールでは、 10^{-11} M~ 10^{-6} Mで1.5~1.7倍、ビスフェノールAでは 10^{-11} M~ 10^{-6} Mで1.2~1.5倍、フタル酸ジブチルでは 10^{-11} M~ 10^{-4} Mで1.1~1.4倍、フタル酸ブチルベンジルでは 10^{-8} ~ 10^{-5} Mで1.1倍、フタル酸ジエチルでは 10^{-11} ~ 10^{-4} Mで1.1~1.2倍、フタル酸ジシクロヘキシルでは 10^{-11} ~ 10^{-4} Mで1.1~1.7倍、フタル酸ジエチルヘキシルでは 10^{-11} ~ 10^{-5} Mで1.1~1.2倍の増殖促進作用がみられた。これらの増殖促進作用はエストロジェンレセプターのアンタゴニストであるICI182,780で阻害され、これらの作用がエストロジェンレセプターを介した系によるものであることを確認した。

C5. 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

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、 α -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であることが分かつ

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できることが分かった。

C6. 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

これまでに報告されている生物試料中 PBDE 分析法には、分液漏斗を用いる煩雑な濃硫酸処理や有害性の高いジクロロメタンを使用する行程が前処理操作に含まれており、ルーチン分析法としては問題点が多かった。今回、自動化が容易なゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) およびディスパーザブルミニカラムを用いる簡便・迅速な前処理法

の開発を試みた。まず前処理法により、GC 分析の妨害となる脂肪成分を効率的に除去することができた。また、4ng/g の濃度で脂肪に PBDE を添加したときの回収率は概ね 70・120% (RSD<10%) の範囲内であった (n=4)。

開発した前処理法を用いて、GC/四重極型 MS (GC/QMS、EI) で食用魚のスクリーニング分析を行った。その結果、全ての検体から湿重量あたり < 0.2-1.5ng/g の BDE-47 が検出された。また、その他幾つかの PBDE 同族体が数試料から定量限界レベルで検出された。反応型の臭素系難燃剤であるテトラブプロモビスフェノール A についても併せて測定を行ったが、これらの魚試料からは検出されなかった (検出限界 0.05ng/g)。

上述の検討により、現在の魚介類の概ねの PBDE 汚染レベルが明らかとなったが、各試料間の汚染プロファイルを定量的に比較・解析するには感度が不十分であった。そこで試料の濃縮率を高めるとともに、測定機器面からも高感度化を図ることにした。まず、近年幾つか PBDE 分析への応用例が報告されている負化学イオン化法 (NCI) について GC/QMS を用いて検討を行った。その結果、SIM 分析において EI-GC/QMS より約 1 桁高感度であること、実試料分析時においても特に定量の妨害となる夾雑ピークは認められないことが分かった。一方、GC/二重収束型高分解能 MS (GC/HRMS、EI モード) についても予備的な検討を行ったところ、高感度検出が可能であったが、GC/HRMS はコストおよび装置の維持管理の面から (特に生

物試料の) 簡易分析には不向きな装置と考えられた。また、マトリックスが異なる種々の実試料の分析において GC/HRMS とほぼ一致した結果が得られたことから、NCI-GC/QMS は十分な選択性を有すると考えられた。以上の結果から、今後の分析には NCI-GC/QMS を使用することにした。

C7. 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

C7-① 一般成人血液を用いた分析

154 人の成人血清試料を分析した。多数の試料から検出されたものは *trans*-ノナクロル、HCB、それに *cis*-ノナクロルであった。このうち最も高頻度に検出されたものは *trans*-ノナクロルで、154 人のうち 144 人 (93.5%) で検出され、濃度は 0.03 から 1.65 ppb であった (平均値は 0.20 ppb)。次いで高頻度に検出されたものは HCB で、138 人 (89.6%) から検出され、濃度は 0.02 から 2.20 ppb であった (平均値は 0.23 ppb)。また、*cis*-ノナクロルも 68 人 (44.2%) の人から検出され、その濃度は 0.03 から 0.44 ppb であった (平均値は 0.07 ppb)。一方、*cis*-クロルデン及びヘプタクロルエポキサイドはいずれの人からも全く検出されなかった。オキシクロルデンは男性 2 人 (0.24、0.56 ppb) からのみ、*trans*-クロルデンは別の男性 1 人 (0.04 ppb) からのみ検出された。(検出限界; ヘプタクロルエポキサイド、オキシクロルデン: 0.2 ppb、*trans*-クロルデン、*cis*-クロ

ルデン、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル: 0.03 ppb、HCB: 0.02 ppb)。

年齢を 30 才未満、30 才代、40 才代、50 才以上の 4 階層に分けて、血清中に含まれていたこれら 5 種の化学物質のうち統計的解析に耐え得る件数が得られた *trans*-ノナクロル、HCB、それに *cis*-ノナクロルの濃度を比較したところ、*trans*-ノナクロルと、HCB が各年齢階層間に有意差が認められ、年代の上昇とともにその濃度が有意に上昇していた ($p < 0.01$)。これらの結果は、CLDs と HCB がともに蓄積性を有することから、暴露期間の長さが血中濃度上昇の一因として深く関与していることを示唆するものと考えられた。

CLDs はシロアリ駆除剤として昭和 61 年まで使用されていたことによる残留、また、HCB は塩素系農薬を始めとした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。このことから、住環境におけるシロアリ駆除剤の使用歴及び使用年についてアンケートで調査し、血清中に検出されたこれらの化学物質の濃度との関係を検討した。

その結果、ごく少数の人からのみ検出されたオキシクロルデン (2 人) や *trans*-クロルデン (1 人) が検出された人では、全員がシロアリ駆除を昭和 61 年以前に実施していたことが判明した。しかし、高頻度に検出された他の 3 種の化学物質についてカイ二乗検定を用いて比較すると、シロアリ駆除剤の使用歴および使用年と血清中 CLDs 濃度との間には有意差は認められなかった。

魚介類、肉類、野菜・果物について、一週間に食べる日数を2日以内、3～4日、5日以上に3階層に分けて、血清中のCLDs及びHCB濃度との関連について検討した。その結果、*trans*-ノナクロル濃度 ($p=0.003<0.01$) と魚介類の摂取頻度階層間に有意差が認められた。さらに30才未満の年齢階層において、摂取日数5日以上に階層のヒトでは、血中 *trans*-ノナクロル濃度の高いヒトの割合が有意に多かった ($p=0.022$)。これは、30才未満の年齢階層では化学物質の蓄積期間が短く他の因子の影響が少ないため、それ以上の年齢階層におけるよりも食事嗜好の影響が顕著に現れたと考えられる。

血清中のHCB濃度は、喫煙者では非喫煙者に比べ有意 ($p=0.003<0.01$) に低いとの結果が出た。しかしながら全体としての喫煙者と非喫煙者間における血中HCB濃度の有意差は、年齢による影響が強く関与した結果であることが示唆された。

C7-② 母体末梢血、腹水、及びさい帯血を用いた分析

母体末梢血9試料、腹水5試料、さい帯血10試料を分析した結果を、最も高頻度に検出されたものは *trans*-ノナクロルで、腹水からの1試料を除く全検体から検出され、全体としての検出率は95.8% (23/24) であった。次いで高頻度に検出されたものはHCBで、全体としては83.3% (20/24) の検出率で、母体末梢血では9試料のうち5試料が

ら検出されただけであったが、腹水及びさい帯血試料からは全検体から検出された。次いで *cis*-ノナクロルが4試料 (4/24) から検出された (検出率16.7%)。母体末梢血9試料のうち3、腹水5試料のうち1試料から検出 (0.02 ppb) されたが、さい帯血試料10検体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シサイド、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。

今回CLDs及びHCBの測定に用いた母体末梢血、腹水及びさい帯血は、すべて異なる人から採取されたものであったため、特定の人における異なる試料に含まれるこれらの化学物質の濃度関係を解析することは不可能であった。また、試料の数も非常に少なかったことから、試料間の濃度関係を比較、解析することも残念ながら実施することが出来なかった。しかしながら、今回の調査により母体末梢血、腹水、さい帯血のすべてから、何らかのCLDsまたはHCBが検出されることが確認された意義は大きいと考えられる。

C8. 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

LC/MS測定条件の検討にあたっては、分析対象として、Daidzein、Genistein、Glycitein、その配糖体であるDaidzin、Genistin、Glycitin及び各Malonyl体、Acetyl体、Succinyl体、計15成分を、イオン化モードを検討した結果、いずれもフェノール性水酸基を有して

いることから Negative mode が適していた。また、移動相に微量の酢酸を加えることにより、各成分ともより高感度に検出された。

次にイオン強度に及ぼすフラグメンター電圧の影響を検討し、120V に設定した。更に、他のパラメーターの最適測定条件を検討した。各イソフラボンの検出限界は、SIM モードでモニターイオンを各イソフラボンの擬分子イオンあるいは糖脱離イオンとした場合、概ね 10ng/ml (絶対量として 50 pg) であった。

各イソフラボンの擬分子イオン [M-H]⁻ あるいは糖脱離イオン [M-glucose-H]⁻ を選んだ SIM により各イソフラボンの検量線を作成し、0.25 ~ 10 ng の範囲で良好な直線性 (r=0.998) を示した。また、変動係数 5% 以内の分析精度を得ることができた。

食品からの抽出には、アグリコン (Daidzein、Genistein、Glycitein) 及び配糖体 (Daidzin、Genistin、Glycitin) とともに良好に回収される 80% MeOH を用いた。LC/MS は選択性に優れており、クリーンアップ操作なしに食品分析への応用が可能であった。

食事から摂取されたイソフラボン配糖体、Acetyl 体、Malonyl 体は、腸管内において加水分解を受けてフリーのアグリコンとして体内に吸収されることが知られている。また、イソフラボン配糖体、Acetyl 体、Malonyl 体にはエストロゲン作用が認められないとされている。そこで、尿及び血清に関してはアグリコン (Daidzein、Genistein、Glycitein) のみを分析対

象とした。尿、血清中のこれら化合物のレベルは微量であることから、簡便で再現性に優れている固相抽出法を前処理に採用することとした。Daidzein、Genistein、Glycitein は疎水性が高いこと、及び尿・血清は殆どが水分であることから、抽出用カートリッジには逆相系を中心に検討した。検討したカートリッジの中では、無極性の ODS (C18) と強陽イオン (benzenesulphonic acid) 及び強陰イオン (quaternary amine) 交換樹脂の 3 種類がミックスして充填されている ISOLUTE Multimode がクリーンアップ効果に最も優れていた。

大豆及び大豆加工品中の含有量調査：市販されている乾燥大豆、大豆加工食品を中心にイソフラボン含有量調査を行った。大豆及び大豆加工食品のいずれからもイソフラボン化合物が検出されたが、今回分析を行った他の豆類 (小豆、金時豆、とら豆、うずら豆、大福豆、えんどう豆、赤えんどう豆、ヒヨコ豆) からはイソフラボン化合物は検出されなかった。本調査と平成 9 年国民栄養調査を組み合わせると日本人のイソフラボン類の一日摂取量を推定すると 34.7mg (アグリコンとして) となる。

大豆及び大豆加工品中のイソフラボンの成分組成をみると、乾燥大豆では Malonyl 体が最も多く含まれていた。しかし、乾燥大豆を加熱加工処理した黄粉では、Malonyl 体は全く含まれておらず、その代わりに Acetyl 体の含量が多くなっている。味噌、醤油などの発酵食品はアグリコンの割合が高く、醤油

ではアグリコンのみであった。今回調査した大豆加工食品の中で納豆からのみ Succinyl 体が検出された。同じ発酵食品でも納豆の発酵期間は約 1 日と短く、且つ発酵菌種が味噌・醤油と異なっており、これらのことが要因と考えられるが、今後詳細に検討したい。なお、Succinyl 体については、標準品が市販されていないことから、ピーク成分のマスマスペクトル及びUVスペクトルで確認し、定量は、イソフラボン化合物の分子吸光係数はほぼ同等と考えられることから、UV 吸収を利用して行った。

トータルダイエット方式により調製した 4 ヶ年(1996、1997、1998、1999 年)試料を本法を用いて分析し、日本人が摂取するイソフラボン化合物の一日量を求めた。イソフラボン化合物の 95% 以上が第 5 群、豆類由来であった。トータルダイエット(マーケットバスケット)方式による日本人(埼玉県: 関東・地域の栄養摂取量による)のイソフラボンの一日摂取量は 35mg (アグリコンとして)と推定された。

さらに、尿及び血清中の Daidzein、Genistein、Glycitein 濃度を分析した。尿中から遊離 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 例から遊離の Daidzein 及び Genistein が極微量検出(1ppb 以下)された。ラット等を用いた動物実験において、Daidzein、Genistein は腸管から速やかに吸収され、肝臓でその多くはグルクロン酸抱合体あるいは硫酸抱合体に代謝されることが知られている。今回

は、アグリコンのみ分析対象としたが、今後の課題として抱合体も含めた分析法を構築し、イソフラボンの体内動態を把握して行くことが重要と考える。

C-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

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。検量線は、安定同位体標識標準品を用いた内標準法によった。TBT、DBT及びMBTの各濃度10、50、100、500ng/mLでほぼ原点を通る直線性($r \geq 0.999$)が得られた。検出限界は、10ng/mL(S/N=3)であった。

添加回収実験には48才の男性の毛髪及び血液を用いた。試薬ブランク、毛髪及び血液を分析した(n=4)ところTBTは、いずれも不検出であった。試料量0.2gに対して100ngの添加回収実験(n=6)の結果、TBTは毛髪、血液でそれぞれ回収率97.8%(CV値1.9%)、104.8%(CV値10.4%)と良好な結果が得られた。一方、DBT及びMBTについては反応試薬に由来すると思われるブランク値(n=4)がそれぞれ72ng/mL(CV値4.2%)、236ng/mL(CV値10.2%)認められた。毛髪ではDBT、MBTがそれぞれ141ng/mL(CV値13.5%)、775ng/mL(CV値3.1%)認められ、血液ではDBT、MBTがそれぞれ63ng/mL(CV値10.0%)、332ng/mL(CV値11.7%)が認められた(n=4)。TBTと同様にDBT、MBTの添加回収実験(n=6)の結果は、毛髪が69.2%(CV値14.7%)、133.8%(CV値9.4%)であり、血液が84.0%(CV値6.6%)、90.6%(CV値9.8%)であった。

DBT及びMBTの試薬ブランク値はテト

ラエチルホウ素ナトリウムを5%水溶液とした後、0.20 μ mのフィルターでろ過し、n-ヘキサンで3回、洗浄することにより約10~20%低減できるため、反応試薬に由来するものと考えられる。DBT及びMBTは、反応試薬に由来するものと思われるブランク値が認められたが、毛髪 (n=4) からはブランク値 (n=4) より約3倍、高いMBTが検出された。

C10. 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

C10-①パラベン類

(1)パラベン類のヒトにおける摂取実験で、被験者2名で80mg相当のパラベン類(パラベンブチル)含有飲料を飲み、直後より血液濃度及び尿排泄濃度を調査した。その結果、パラベンを摂取後、20分以内に血液よりパラベン類及びp-ヒドロキシ安息香酸濃度の上昇という形でパラベン摂取の影響を確認した。パラベン及びp-ヒドロキシ安息香酸は8時間後にはほぼ初期の状態に戻った。尿試料の場合でも、試料からパラベンが検出され、また、パラヒドロキシ安息香酸濃度は、試飲後20時間近く影響が残った。

日本人の食品由来のパラベン類摂取量は厚生省のマーケットバスケット調査のデータを引用すると0.2-0.3mg/日程度である。しかし、生活形態の変化により食品以外からもパラベン類を摂取する機会が多いと考えられる。特に、近年コンビニ等で販売され、販売量が増加している栄養ドリンク剤(医薬品及び医薬部外品の分類となり食品としては

扱われない)について実態調査を行った。市販品で19種ほどの栄養ドリンク剤類のうち保存料にパラベンの添加表示のあるものについて購入し、パラベン類の濃度を調査した。その結果、保存料にパラベンの表示のある栄養ドリンクに添加されているパラベンは、ブチルパラベンの使用頻度が一番高く、続いて、エチル、プロピルの順であった。添加量は平均で50ppm程度(清涼飲料水中のパラベンの基準値が0.1g/kg以内でありこの値に配慮したものと思われる)で、ドリンク剤1本(50-100ml)あたりパラベンは4.7mgが添加されていた。この値から先の試飲試験と比較して、栄養ドリンクを数本以上常用するヒトの場合、血液からパラベンを検出する可能性が高いと考えられる。

C10-② HCB

昨年からの当所の調査で成人60人の血液を調査した結果、調査した全員の血液からHCB(0.07-0.40ppb)が検出された。HCBのヒトへの暴露要因として大気や食事を經由して体内に取り込まれていると考えられた。そこで、HCBの暴露量を評価する手法として、トータルダイエツトスタディ法を用いて食品分類ごとに分析を行い、食品群別のHCB摂取量及びHCBの一日摂取量を算出した。また、陰膳方式による調査も平行して行い、食事経由からのHCB摂取量を検討した。

トータルダイエツト法による調査を行うため長野市内で約300品目の食品を購入し、13群類に分類し、群別に標準的な調理を行った上で混合して試料とし

た。群毎に指定した分析法により試料中 HCB 濃度を測定した。その値と厚生省国民栄養調査から算出した各群毎の一日あたり摂取量を掛けあわせ各群毎の HCB 摂取量を求めた。その結果、群毎の HCB 摂取量を合計した成人一日あたり HCB 摂取量は 65 n g / 日で、このうち半分にあたる 33 n g が 10 群に属する魚介類からの HCB 摂取量であった。また、摂取量の 1/6 である 10 n g は 11 群の卵・肉製品から、また同じく 10 n g を 12 群の乳製品から摂取していた。食事の重量換算では 2 割にしかならない 10 群、11 群、12 群が全体の 8 割以上を占めていた。HCB に併せて、p、p'-DDE も同時に定量した結果、p、p'-DDE の一日摂取量は 237 n g / 日となった。ここで得られた p、p'-DDE 濃度はアルカリ分解後の結果であり t-DDT として評価できる。HCB の摂取量と p、p'-DDE 摂取量を比較すると HCB は過去に大量に使用され現在でも環境ホルモン作用が心配される DDT に比べ 1/4 程度の汚染レベルにあると評価された。

昨年度血液中 HCB 測定を行った職員を中心に 9 名で陰膳方式での HCB 摂取量調査を行った。調査は 3 日間の食事をメニュー、メニュー毎の摂取量を記載した上で採取しミキサーでホモジナイズして試料とした。この試料を用いて算出した HCB の一日摂取量は 9 人の平均で 113 n g / 日となった。トータルダイエツト法と比べて 2 倍程度の開きであったが概ね類似した値となった。ヒト血中 HCB 濃度と陰膳方式による被験者 HCB 一日摂取量の相対関係を調べたが HCB 摂取量の多い人が血中 HCB 濃度

が高いといった著しい相関は見られなかった。

C10-③ p-ジクロロベンゼン

当所の職員及びその家族 (n=60) を対象として血液中の調査を行い、クロロベンゼン類のうち p-ジクロロベンゼンが測定者から検出され、平均値で 14.9 p p b (0.4~211 p p b)、一部の人に高濃度の結果が得られた。また、一部の高濃度のパラジクロロベンゼンの検出された被験者の血液ではパラジクロロベンゼンの代謝物である 2、5-ジクロロフェノールも同時に検出された。このため、血液濃度で、5 p p b 以上のパラジクロロベンゼンを検出した対象者を中心に 21 名に市販活性炭入りパッシブチューブを 2 日間胸元に携帯してもらい個人の平均暴露濃度 (調査期間中の平均室内濃度に換算)、対象者の寝室及び居間におけるパラジクロロベンゼンの室内濃度を算出した。血液濃度と個人暴露濃度を比較した結果を図に示す。概ね、室内濃度と血中濃度レベルはともに数十 p p b オーダーであり 1:1.4 程度の相対関係にあることが確認された。

聞き取り調査の結果、5 p p b 以上の血液濃度を検出した対象者の家庭ではもれなくパラジクロロベンゼンを使用しており、タンスを置いてある寝室等の部屋の濃度が高くなっていた。また、被験者のうち室内で生活する時間の長い主婦の場合、外での勤務時間のある男性に比べてより高い暴露を受ける傾向が示された。

D. 結論

D1. 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

GC-MS を用いる、ヒト体液中のフタル酸エステル及びアジピン酸エステルの一斉分析法を開発した。本法は、試料をヘキサン：アセトニトリルと振とうするだけで、抽出・精製が可能で、前処理操作が極めて簡便かつ迅速である。それ故、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、比較的高感度で 1 ng/ml (生体試料) のエステル類の測定が可能である。

本法はヒト体液中のフタル酸エステル及びアジピン酸エステルを、高感度で、アーティファクトの可能性が極めて低い状態で測定可能である。また、迅速かつ簡便であるなど、スクリーニング法として優れた特徴を有する。それ故、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。

D2. ビスフェノール A (BPA) の健康影響に関する調査研究

D2-①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

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 グループに分け、各々 30 および 15 検体について、調査を実施し

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。

D2-②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 の検出方法として、BPA を PFBBR によりアルキル化して、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 NCI モードで検出を行った。本法による PFB-BPA の保持時間は 26.6 分であった。その定量範囲は 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 ($r^2=0.998$) と良好であった。また、検出限界は 0.005ng/mL (s/n=3) で、繰り返し分析精度は 1 及び 0.1ng/mL で 4.76、5.42% と良好であった。10ng/mL の BPA 標準溶液を添加して、その添加回収率を求めた。

その結果、ヒト血清では 98.5% (n=5)、コントロール血清では 100.9% (n=5) と良好な結果が得られた。

D2-③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

BPA の高感度 HPLC-蛍光および化学発光検出定量法を開発した。それぞれ、0.05、0.38 ppb の BPA が検出可能であ

り、基礎検討の結果、ヒト血漿など生体試料中の微量 BPA の定量に適用できる可能性が示された。現在、clean-up 法の再検討や、カラムスイッチング法の導入、マイクロカラムの使用などの検討を行っているが、良好な結果が得られており、実試料への適用を十分図ることができるものと考えられる。

D3. 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

D3-① 核内受容体について

(1) レチノイン酸は、in vivo および in vitro の両方において栄養膜細胞の分化に大きな影響を及ぼした。これは、環境物質が胎盤の形成と機能に異常を及ぼす可能性を示唆する。(2) AhR の発現、栄養膜細胞の分化に伴って変化した。したがって、AhR も栄養膜細胞の分化過程に何らかの役割を果たしている可能性がある。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同定発見した。

D3-② 解毒酵素について

ビスフェノール A はラット生体に侵入後、肝臓でその大半がグルクロン酸抱合される。ヒトも多種類の内分泌かく乱化学物質のグルクロン酸抱合（解毒）活性を有するが、動物種によってその活性値は大きな差があった。内分泌かく乱化学物質は食品に含まれ、腸

管で吸収された後、必ず肝臓を通過し、そこで、UGT2B1 によってほとんどがグルクロン酸抱合され、その大半が胆汁中に排泄される。吸収量が 0、01mM を越えるときにはわずかながら未反応のビスフェノール A が静脈中に漏れだし、これが各臓器に分配され、精巣・卵巣・胎児に暴露されることが予測された。ここで示したように、肝臓での解毒能力はその生物の生殖器官および胎児が暴露される化学物質量を決定するので、個々での代謝解毒能力を把握しておくことは、その種への影響を予測・評価する上で重要なファクターになる。

D4. 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

D4-① 副腎由来の培養細胞を用いた研究

ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす環境由来の化学物質の影響を解明する目的で、ヒト副腎皮質由来の H295R 細胞を用いて、アッセイ法の基礎的検討を行い、方法を確率した。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、高濃度ではあるが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することができた。

D4-② 乳癌培養細胞を用いた研究

E-スクリーンアッセイで通常用いられるチャコールデキストラン処理血清に代えて市販の低蛋白溶液を用いたところ、エストラジオールでは $10^{-11} \sim 10^{-6} \text{M}$ で増殖促進作用がみられ、同様にアッセイが行えることを確認した。低蛋白溶液を用いることにより、ホルモン以外の血清成分による結果のばらつきを抑えられたと考える。また、MCF-7細胞にかえてT47D細胞を用いたところ、結果にばらつきが少なく安定した結果が得られ、T47D細胞はエストロゲン活性の検出に有用であることが確認された。MCF-7細胞及びT47D細胞を用いてアッセイを行った結果、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシルにエストロゲン作用が検出された。フタル酸ジシクロヘキシルについては、E-スクリーンアッセイでエストロゲン様活性がなかったという報告もあるが、我々のアッセイではエストロゲン様活性が検出された。さらに、これらの増殖促進作用はエストロゲンレセプターを介した系によるものであることを確認した。

D5. 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

(1) 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。(2) 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。(3) 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。(4) ヒト尿200 mLを用いれば、BaP水酸化体の定量が可能であることが判明した。

D6. 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

生物試料のPBDE汚染実態の解明を目的として、GPCおよび負化学イオン化GC/MSを用いる簡便・迅速なルーチン分析法を開発した。本法を用いて大阪府下で採取した食用魚および母乳脂肪を予備的に分析したところ、BDE-47(2, 2', 4, 4'-TeBDE)をはじめとする幾つかのPBDE同族体が検出された。

D7. 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

1. 一般成人154人からの血清試料を分析したところ、144人(93.5%)から*trans*-ノナクロル(0.03~1.65 ppb)が、138人(89.6%)からHCB(0.02~2.20 ppb)が、68人(44.2%)から*cis*-ノナクロル(0.03~0.44 ppb)が検出された。また、2人からはオキシクロルデン(0.24, 0.56 ppb)、別の1人からは*trans*-クロルデン(0.04 ppb)も検出された。

2. *trans*-ノナクロル濃度を30才未満、30才代、40才代、50才以上の4つの年齢階層に分けて比較したところ、各年齢階層間に有意差が認められ、年齢階層の上昇とともに血中*trans*-ノナ

クロル濃度も上昇していた ($p=0.000<0.01$)。また、30才未満の年齢階層においては、魚介類の摂取頻度の高い(週5日以上)階層のヒトでは低い(週5日未満)階層のヒトに比べ、血中 *trans*-ノナクロル濃度の高いヒトの割合が有意に高かった ($p=0.022<0.05$)。

3. 検出された HCB について、年齢を同様に4階層に分けて比較したところ、血中 HCB 濃度と各年齢階層間に有意差が認められ、年代の上昇とともに血中濃度も上昇していた ($p=0.000<0.01$)。

4. 母体末梢血、腹水、さい帯血からも CLDs、HCB が検出され、*trans*-ノナクロル (0.03~0.39 ppb) は腹水一試料を除く全検体 (95.8%、23/24) から、HCB (0.05~0.18 ppb) は 83.3% (20/24) からと高頻度に検出され、また、*cis*-ノナクロル (0.03~0.09 ppb) も主として母体末梢血 (3/9) を含む4試料から (16.7%) から検出された。

D8. 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 35mg 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。

D9. 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

ブチルスズ化合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。TBT については内標準物質として安定同位体標識標準品を使用し、GC/MSを用いた精度の高い分析法の開発を行うことができた。現在、テトラエチルホウ素ナトリウムの精製法について検討中であるが、TBTの分解・代謝物であるDBT及びMBTは、試薬ブランク値との差を取るにより実試料の分析は可能と思われる。

D10. 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

生体試料中のクロロベンゼン類及びパラベン類の分析には、SPMEを用いることは溶媒の使用の削減をする上でも非常に有効な手段であった。また、ケイソウ土カラムの使用は感染性の試料に直接接触する機会を少なくする意味で有効と考えられた。また、サロゲート化合物として *p*-ジクロロベンゼン-d4、HCB-13C6、3-ヒドロキシ安息香酸等を加えて分析する手法をとることで精度の高い測定を行うことができた。昨年度パラベン類代謝物の測定に全血を用いてジアゾメタンによるメチル化を行っていたが、血漿成分の分析にすること及びメチル化の代わりにシリル化に変更することで感度が上がった。

パラベン類は保存料として幅広く使用されており、食品の他、医薬品、その他

一般商品等多用途に使用されていることからヒトが摂取する機会が多い。パラベン類は、比較的早い生体内での代謝経路があるものの、パラベンを摂取直後では血液中から検出される可能性が高い。内分泌かく乱作用を考えると、摂取したパラベン類は、胎盤や母乳を通じて胎児に供給される可能性が高いことから、さらに検討を要すると考える

トータルダイエットの手法によりHCBの摂取起源が魚介製品等であることがはっきりした。HCBの生成起源は燃焼により生成したり農薬の製造に伴い不純物として生成するなど発生の段階を含めてダイオキシンの汚染分布とよく類似している。ある意味で、ダイオキシン汚染の指標ともなりうると考えられる。また、HCBの一日摂取量は過去に大量に使用され現在使用禁止となっているDDTの1/4程度であることが確認された。HCBのように非意図的に生成した化学物質がDDTと同じの濃度レベルにあることは注目すべきで、新たにHCBの発生源があるか否かについても調査が必要となっている。

また、HCBは臍帯血及び母体血液、母乳の調査から、臍帯において胎児移行を妨げる機能を持っていることが明らかになったが、その代わりに、母乳を通じ新生児に移行していくことも明らかになっている。このことは母体中のHCBの蓄積濃度を下げないかぎり胎児、新生児への供給負荷を下げる方法がないことを意味しており今後母体における低減対策が必要となっている。

パラジクロロベンゼンは従来、室内で大量に使われてはいても生体内での

代謝等があるため血液中濃度がはっきりしていなかった。しかし今回、室内環境と血液濃度の相関関係をはっきりさせることができた。この結果はパラジクロロベンゼンの生体中での影響を評価するための貴重な資料となると考えられる。パラジクロロベンゼンについてはヒトへの毒性等が問題となっており、現在でも大量に使用している住宅に対してヒトへの暴露実態を明らかにしていく時期に来ていると考える

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S. and Yuasa, A.: Glucuronidation of the Environmental Estrogen Bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the Rat Liver *Biochem. Journal* (1999) 340, 405-409

(2) 堀江正一、石井里枝、小林進、中澤裕之：液体カラムグラフイー/質量分析法による缶飲料中のビスフェノールAの定量、分析化学(1999) 48, 579-587

2. 学会発表

1. Yoshihiro Yoshimura, Kayoko Kato, Koichi Inoue, Isao Yajima, Hiroyuki Nakazawa: Analysis of endocrine disruptors derives from the polymer materials in the biological specimen, PITTCON 2000, March, 2000, New Orleans, USA

2. 中澤裕之、山本博史、井之上浩一、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、黒