

## 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、 $N_2$  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  $20 \mu\text{l}$  を加え、その  $2 \mu\text{l}$  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、 $200 \mu\text{g/ml}$  の濃度にヘキサンで調製し、さらにヘキサンで希釈して、 $2 \mu\text{g/ml}$  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、 $100 \mu\text{g/ml}$  の濃度にヘキサンで調製し、さらにヘキサンで希釈して、 $4 \mu\text{g/ml}$  溶液とした。また、内標準溶液としてフェナンスレン- $d_{10}$ 、フルオランテン  $d_{10}$  及びクリセン- $d_{12}$  を  $200 \mu\text{g/ml}$  の濃度にヘキサンで調製し、さらにヘキサンで希釈して  $20 \mu\text{g/ml}$  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  $-30^\circ\text{C}$  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、 $200 \text{ng/ml}$  の溶液に、サロゲート及び内標準物質をそれぞれ  $100 \text{ng/ml}$ 、 $200 \text{ng/ml}$  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 ( $C_s$ ) 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 法の開発とエチル誘導体化 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<sup>13</sup>C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C<sub>18</sub>固相抽出カラムのBaker Bond SPE C<sub>18</sub>(J. T. Baker)で処理して用いた。PFB化剤として用いたPentafluorobenzyl bromide (PFBBBr)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 30 m thickness:0.25 μm)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 C<sub>18</sub>(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PFBBBr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PFBBBr試薬20 μL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、15 mM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30 min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/H<sub>2</sub>O/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340 nm、蛍光波長470 nm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10 mM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20 min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-HNO<sub>3</sub> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sup>+</sup>(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)<sub>2</sub>cAMP 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

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) MgCl<sub>2</sub> (0.5 mM)、MnCl<sub>2</sub> (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、 $37^\circ\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 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)、スウィ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 ( $40^\circ\text{C}$ ) 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 ( $40^\circ\text{C}$ ) 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、カラムスウィッチング (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<sup>+</sup>、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、 $\beta$ -グルクロニダーゼ/アリ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 10 mL 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  $\phi$ ) および CLN pak EV-2000 (300 mm x 20 mm  $\phi$ ) 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 5 mL/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  $\mu\text{L}$ 、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

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<sup>+</sup>、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、 $\beta$ -グルクロニダーゼ/アリ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 10 mL 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  $\phi$ ) および CLN pak EV-2000 (300 mm x 20 mm  $\phi$ ) 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 5 mL/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  $\mu\text{L}$ 、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、子供の人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け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ット試料を用いた。トータルダイエット試料は、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・海藻類、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ット試料は、 $-20^{\circ}\text{C}$ 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  $45^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu$ 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てベンゼン溶液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 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $[M-C_2H_5]^+$  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5ml (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 $\mu$ g及び0.1mlの濃塩酸を加え、精製水5mlで希釈した後Extrelut NT20に負荷し、酢エチ120mlで溶出させた。エバポレーターで濃縮後、アセトニトリル0.5mlに溶解後BSTFAを0.2ml添加し、シリル化を行い、その試料をGC/MSで定量した。

##### B10-②栄養ドリンク剤中のパラベン類



## 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アニソール、安息香酸の分析は資料を1ml分取し、血液試料と同じ手法(extraction NT3を使用)を用いた。

## B10-③血液中のクロロベンゼン類(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(柴田化学機械工業製パッシングガスチューブ)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-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-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用い、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-d<sub>16</sub>、並びにフルオランテン-d<sub>10</sub> 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-d<sub>16</sub> 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、操作ブラ