

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、加熱乾燥処理のよって充填剤の 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、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PFBBBr (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PFBBBr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 1mL 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チルベストロール (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^{-5} Mで1.5~1.7倍、ビスフェノールAでは 10^{-11} M ~ 10^{-5} 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、 β -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であることが分かっ

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) およびディスポ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く 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、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、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試料か

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