

## 血液中微量フッ素の分析 2

### 血液中フッ素の存在様式と定量法

木村隆英・早川史子†・安藤喬志

滋賀医科大学 化学教室  
† 滋賀県立短期大学 家政部

#### はじめに

血液中に存在するフッ素の濃度は、生体へのフッ素化合物の取り込み量を知る上で重要な指標である。しかしながら、血液中のフッ素は微量であるため、報告されたその値は時代により分析法により著しく異なり、正常値の範囲も明確ではなかった。本報文では、現在までに適用されてきた種々のフッ素分析法を集成するとともに、それらによって得られた結果について検討し、微量フッ素定量の意味を考察する。

#### 1. 血液中に存在するフッ素の分類

1968年 Taves<sup>1)</sup>、1969年 Singer と Armstrong ら<sup>2)</sup> は血清中に二種のフッ素、すなわちイオン性フッ素 (ionic または exchangeable fluoride) および非イオン性フッ素 (non-ionic または non-exchangeable fluoride) が存在することを見出した。事の発端は、Singer と Armstrong<sup>3)</sup> が、60℃、24h の拡散一吸光光度法によって得た値と、Taves<sup>4)</sup> が室温での拡散一蛍光法によって得た値が10倍も違っていて、高温による Singer らの値のほうが大きかった。なぜそのような差が生じたかが活発に議論された結果、前処理としてのフッ素イオンの分離法の違いが、測定対象としているフッ素イオン種を異ならせていると指摘された<sup>5), 6)</sup>。すなわち、血清中に異なるフッ素種が存在するということである。

その後の研究成果の蓄積をまとめると、血液中のフッ素は大別してイオン性フッ素と共有結合性フッ素に分類することができよう。命名法としては、我々や<sup>7)</sup> Venkateswarlu ら<sup>8)</sup> が明確に区別したように、無機フッ素イオンを fluoride と総称し、共有結合性フッ素を fluorine と総称する。さらにこれら全てを含む場合には総フッ素 (total fluorine) と称する。ionic (ionized)、ionizable、non-ionic (non-ionizable) という語句が多く用いられてきたが、これは測定法に依存する分類であり、分析対象フッ素種を不明確にするものである。

さらに、i) イオン性フッ素 (無機フッ素イオン : inorganic fluoride) には、(a) フリーのイオン性フッ素 (fluoride) と (b) 錯体を形成しているイオン性フッ素 (金属イオン、タンパクなどと結合しているイオン性フッ素 : complexed fluoride) があり、a、b の全てを含めて総フッ素イオン (total fluoride) と呼ぶ。ii) 共有結合性フッ素 (C-F 結合などの共有結合を有する有機化合物中のフッ素 : organic fluorine) には、(c) フッ素系生理活性物質や脂質など低分子化合物に含まれるもの (small molecule fluorine) と (d) タンパクなど高分子化合物に含まれるもの (macromolecule-bound fluorine) に分類できる。さらに c と d が結合した (e) complexed fluorine も存在し得る。

イオン性フッ素および共有結合性フッ素の定量法については次節で述べるが、a と b および c や d と

eはそれぞれ互いに平衡状態にあると考えられ、それらを別々に測定することは難しい。すなわち、採用する測定法のイオン性フッ素への特異性や感度により試料の適切な前処理が要求されるのであるが、その一連の分析操作によって、これらa、b、c、d、eのどれを測定することになるかが異なってくる。従って、採用する分析法がどのようなフッ素種を測定しているかを常に認識しておかねばならない。

まず、イオン性フッ素と共有結合性フッ素の定量法、そのための前処理法について述べ、続いてそれらが測定しているフッ素種について考察する。

## 2. フッ素の化学分析

### 2-1. イオン性フッ素の分析

フッ素は全元素中最も高い電気陰性度を持っているため、物理的にも化学的にも他のハロゲンとは異なるユニークな特徴を示す。例えば、塩素や臭素のカルシウム化合物は水によく溶けるが、フッ化カルシウムはあまり溶けない。逆に、フッ化銀は水に溶けるが、塩化銀や臭化銀は溶けない。そのため、フッ素の分析は分析化学の中でももっとも難しいものの一つである。イオン性フッ素の古典的な定量法は、金属フッ化物錯体の形成に基づくものが多い<sup>9)</sup>。

1960年代後半になって、イオン性フッ素の化学分析には二つの大きな進歩があった。一つは、イオン性フッ素をシリル化することによって、有機溶媒に可溶化かつ揮発性とし、抽出、分離を容易にしたことである<sup>10~12)</sup>。これにより、測定時における妨害物質を容易に除去することができるようになった。第二は、フッ素イオン選択性電極が開発されたことである<sup>13)</sup>。これらによって、イオン性フッ素を選択的に測定することが容易になり、また精度も飛躍的に向上した。

#### 血液中イオン性フッ素の分析における注意

あらゆる分析法に共通することであるが、i) イオン性フッ素を特異的に定量しているか、ii) 汚染、散逸が起こっていないか、には常に留意しておかねばならない。

##### i) イオン性フッ素に対する特異性

血液中には種々の物質が存在し、それらが分析結果にどのような影響をもたらすかを一つ一つ調べることは不可能に近い。従って、その分析法が存在するイオン性フッ素を定量的に分析しているかどうかの判定は難しい。定量性を上げるためには、(1) イオン性フッ素を選択的に分離するか、(2) 測定法の特異性を上げることを考えるべきである。

##### (i-1) イオン性フッ素の選択的分離

微量分析を感度良く行うには、定量前に妨害物質を除くか、あるいはイオン性フッ素を他のマトリックスから分離することが必要である。試料からイオン性フッ素を効率的、高選択的に分離する方法はいくつか報告されている。

蒸留分離法 (135 °C)<sup>14)</sup>

(微量) 拡散法 (60 °C)<sup>15~17)</sup>

Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> への吸着分離法<sup>18), 19)</sup>

シリル化拡散法および抽出法 (25 °C)<sup>10), 11), 20)</sup>

イオン交換法<sup>21)</sup>

どの方法を採用にせよ、濃度が低くなれば低くなるほど妨害物質の混入は相対的に深刻となる。妨害物質の除去とともに、ブランク値が低いこと、測定時に濃縮が可能なことも重要になる。

蒸留法は古くから用いられてきた方法であるが、希釈度が大きく、さらにガラス容器を用い、酸性条件下で高温（135℃）にするためブランク値が通常1～3  $\mu\text{gF}$ と大きくなり、微量フッ素の分析には不適当である。微量用に微量蒸留装置の工夫もされているが<sup>10)</sup>、現在ではあまり使われていない。

微量拡散法も、加温（60℃）と回収率の不確かさおよび時間がかかること（6～24 h）などが指摘されている。また60℃で拡散する有機酸はいくらかあって、それらがZr-錯体と結合し、吸光光度法に誤差を与える<sup>2), 22)</sup>。Singerら<sup>2)</sup>は未灰化試料を拡散処理したとき、電極では1.4  $\mu\text{M}$ のところ吸光光度法では5.0  $\mu\text{M}$ となり、拡散処理で得たサンプルでも電極にかからないイオン性フッ素があると報告した。しかし、これもイオン性フッ素ではない拡散物質による吸光光度法への誤差と考えられる。灰化試料については、拡散後も差はなかった。

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ への吸着法は、サンプル中に $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ を入れてイオン性フッ素を吸着させ、上澄みを除いたのち、酸性にすることによりイオン性フッ素を溶出させるものであって、これを電極法などで測定する。イオン性フッ素を吸着分離するときに酸性にしていない点の特徴となっている<sup>18)</sup>。

シリル化拡散法はTaves<sup>11)</sup>によって開発された方法で、室温で定量的にシリル化が起これ、拡散速度も十分に速く（血清中の $^{19}\text{F}$ イオンを1～2 hで98%回収）、また有機溶媒への溶解性も良いため濃縮も可能である。シリル化したフッ素を直接ガスクロマトグラフィーで測定することもできる（シリル化-GC法）。さらに、アルカリ加水分解によるイオン性フッ素への変換も迅速であるので、吸光光度法や電極法と組み合わせることもできる（reverse extraction）<sup>20)</sup>。シリル化拡散法やシリル化抽出法によれば、pH、イオン強度、他の溶質の影響を受けやすい吸光光度法や電極法でも、検量線作成試料やブランク試料と同じpHやイオン強度の試料溶液を作ることができる。

#### (i-2) イオン性フッ素の定量法

これまでに、血清および血漿中の微量フッ素の定量に適用された方法と結果を表1に示した。

表1 種々の分離一定量法による健康人血清あるいは血漿中のフッ素濃度の報告値

分離法一定量法	未灰化 (mM)	灰化 <sup>a)</sup>	文献 <sup>b)</sup>
蒸留-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)		4.6～6.3 (with MgO)	14
蒸留-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)		7.3～10.0 (fluoridated)	24
蒸留-吸光光度法 (Violet iron salicylate complex)		6.1～12.0	26
蒸留-吸光光度法 (Violet iron salicylate complex)		6.1～12.0	27
蒸留-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)		4.6～6.3	2
直接電極法 (既知量イオン性フッ素添加)	0.8～2.9		51
直接電極法	1.4～5.2		66
直接電極法	0.5		20
直接電極法	0.9～1.3		94
直接電極法	1.2～2.9		32
直接電極法 (既知量イオン性フッ素添加)	0.3～1.0		50
直接電極法	1.5		95
直接電極法		3.0 (O <sub>2</sub> -bomb)	25

表1 (続き)種々の分離一定量法による健常人血清あるいは血漿中のフッ素濃度の報告値

分離法一定量法	未灰化 (mM)	灰化 <sup>a)</sup>	文献 <sup>b)</sup>
直接電極法	0.5~2.3		57 (fluoridated)
直接電極法		4.9 (with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )	23
直接電極法	2.7~3.9	4.7~6.6 (with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )	96 (fluoridated)
直接電極法	1.1~4.0	9.5~15.3 (with $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	42
直接電極法	0.12~2.3		97
直接電極法	0.4~0.8		7
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 吸着-電極法	0.4~0.6		18
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 吸着-電極法	1.3		20(60)
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 吸着-電極法	1.3		25
イオン交換 (Dowex1X16)-拡散-吸光光度法 (La-alizarin)	3.0~3.1		21 (fluoridated)
拡散 (60°C / 22 h)-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)	4.9	3.6	3
拡散 (60°C / 22 h)-吸光光度法 (La-Alizarin)		8.3	17
拡散 (60°C / 22 h)-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)	7.3		6
拡散 (60°C / 22 h)-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)	4.9	3.6 (with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )	2
拡散 (60°C / 22 h)-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)	5.5		28
拡散 (60°C / 22 h)-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)	11.0		25
拡散 (60°C / 22 h)-吸光光度法 (Ce-alizari)	6.2		25
拡散 (60°C / 22 h)-吸光光度法 (Zr-eriochrome cyanine R)		4.7 (with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )	23
拡散 (60°C / 22 h)-蛍光法 (morin thorium)	0~1.5		4
拡散 (60°C / 22 h)-蛍光法 (morin thorium)	6~10	5.3 (with $\text{MgCl}_2$ )	1
拡散 (60°C / 22 h)-電極法	1.4	4.0	(3)
拡散 (60°C / 22 h)-電極法	1.5	5.3 (with $\text{MgCl}_2$ )	1
拡散 (60°C / 22 h)-電極法	1.4	4.0 (with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )	2

a) 特記しなければ、灰化法は熱灰化法による。b) fluoridated は水道水がフッ素化されている地域の住民の分析結果を示す。



表 1 (続き)種々の分離一定量法による健康人血清あるいは血漿中のフッ素濃度の報告値

分離法一定量法	未灰化 (mM)	灰化 <sup>a)</sup>	文献 <sup>b)</sup>
拡散 (60°C / 22 h) - 電極法	7.8		64
拡散 (60°C / 22 h) - 電極法	1.7		25
シリル化拡散 - 蛍光法 (morin thorium)	0.7~2.2	4.4	4
シリル化拡散 - 蛍光法 (morin thorium)	0.7~2.2	4.4	1
シリル化拡散 - 蛍光法 (morin thorium)	0.4~1.1	4.4	22
シリル化拡散 - 蛍光法 (morin thorium) + 電極 2.2		4.4	30
		(with MgCl <sub>2</sub> )	
シリル化拡散 - 蛍光法 (morin thorium)	0.7		29
シリル化拡散 - 電極法	0.9	4.5	11
シリル化拡散 - 電極法	0.9	4.5	1
シリル化拡散 - 電極法	0.38~1.0	1.6~2.5	59
		(with MgCl <sub>2</sub> ) (fluoridated)	
シリル化 (reverse extraction) - 電極法	1.3		20
シリル化 (reverse extraction) - 電極法	1.1	2.6	25
シリル化 (reverse extraction) - 電極法	1.3	4.1(3.9)	60
		O <sub>2</sub> -bomb(open ash)	
シリル化 (reverse extraction) - 電極法	0.8	1.8(1.2)	60
		O <sub>2</sub> -bomb(open ash)	
シリル化 - G C 法	1.2		10
シリル化 - G C 法	0.5~1.6	1.3~3.2	36
		(O <sub>2</sub> -bomb)	
シリル化 - G C 法		1.9	40
		(O <sub>2</sub> -bomb)	
シリル化 - G C 法	0.2~1.0	2.5~6.1	7
		(LOPA)	
限外濾過 - 電極法	0.8		64
限外濾過 - 電極法	1.5		20
限外濾過 - 電極法	0.9~3.2		32
限外濾過 - 灰化 - シリル化 (reverse extraction) - 電極法		0.6, 1.1	60
		(ultrafiltrate-O <sub>2</sub> -bomb)	
直接 AIF-分子吸光	6.3~11.1	8.4~14.2	42
		(with Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	
直接 AIF-分子吸光		1.1	46
熱加水分解 - AIF-分子吸光		2.3	62
エーテル抽出 - Na-ビフェニル - 電極		2.5	40

a) 特記しなければ、灰化法は熱灰化法による。b) fluoridated は水道水がフッ素化されている地域の住民の分析結果を示す。

血液中のイオン性フッ素の分析は主に次の5つの方法で定量される。

1. 吸光光度法<sup>2), 3), 6), 14), 17), 21), 23~28)</sup>
2. 蛍光法<sup>1), 4), 22), 29), 30)</sup>
3. 電極法<sup>31~34)</sup>
4. ガスクロマトグラフィー法<sup>7), 10), 23), 35), 41)</sup>
5. AIF 分子吸光法<sup>42~45)</sup>

これらの方法はそれぞれにイオン性フッ素への特異性が異なる。

#### 1. 吸光光度法

アルミニウムやジルコニウムと有機化合物で形成する錯体のイオン性フッ素による退色を測定する退色法は、古くから用いられている。逆に、赤色をしているランタンやセリウム(Ⅲ)錯体(Alizarin Complexan)はイオン性フッ素によって青に変色する。この直接法は、ベールの法則に従う最初のイオン性フッ素吸光光度法であった<sup>47), 48)</sup>。

金属イオンとイオン性フッ素との錯体形成に基づく方法であるから、錯体形成へのイオン性フッ素の特異性がよほど厳密であるか、前処理としてのフッ素の選択的分離がうまく行われないと、たとえブランク値を用いても妨害物質の影響を排除することはできない。感度はあまり高くない。より感度を上げるために、特殊なセル、すなわち長い光ファイバーセルを用いることが考案されている。これを用いると、水中の0.01 ppbF までが測定可能といわれる<sup>49)</sup>。

#### 2. 蛍光法<sup>1), 4), 22), 29), 30)</sup>

Morin-thorium complex の蛍光がイオン性フッ素によって減少するのを観測する。

La-Alizarin Complexan や Zr-Eriochrome Cyanine R を用いる吸光光度法より約2倍感度は良いが、7 nmol F 以下では直線性を示さない。前処理としてのイオン性フッ素の分離が必要である。

#### 3. 電極法<sup>13), 33), 50)</sup>

フッ化ランタン膜を用いるイオン選択性電極はもっとも多く用いられている。操作も簡便であり、汚染も少ない。フリーのイオン性フッ素であることが必要であり、難解離性フッ素塩(Mg, Al, Zr, Si など)の存在は誤差を生むことになる。イオン強度調整剤(TISAB; Total Ionic Strength Adjusting Buffer)には、このような金属イオンをマスクするための試薬が含まれている。一方、これによって希釈が起こる。また、フッ素イオン選択性電極は水酸化物イオンにも応答する。しかも濃度ではなくイオン活動度に対応して応答する。従って、pH とイオン強度とを適切に制御しなければならない。とくに、試料を電極で直接測定する直接電極法の場合、イオン性フッ素の活動度が検量線と試料とで同じという保証はない。既知濃度のイオン性フッ素添加法は、これを克服するための工夫である<sup>50), 51)</sup>。1  $\mu$ M (20 ppbF) 程度まで測定可能な感度を有する。しかし、血液中、とくに血清中のイオン性フッ素濃度は1  $\mu$ M 以下のものも多く、また、検出限界付近での検量線は直線とはならない。微量になればなるほど電極の応答には時間がかかり(0.5~1 h)、また直前に測定したイオン性フッ素濃度の影響を受ける(memory effect)。さらに、温度の影響も大きい。しかし、注意深く行えば0.5  $\mu$ M 程度までは定量可能である。それ以下の濃度の測定には濃縮が必要であるし、微量試料(5  $\mu$ l 程度)を測定できるような工夫も必要となる<sup>20), 32), 52)</sup>。

#### 4. ガスクロマトグラフィー法<sup>7), 10), 23), 35~41)</sup>

イオン性フッ素をトリアルキルクロロシランと反応させ、トリアルキルフルオロシランとしたのち(シリル化)、これをガスクロマトグラフィーで分離し、Flame Ionization detector (FID) で定量

する<sup>33)</sup>。この方法は比較的高い選択的分離と特異的測定を同時に行うことを可能にする。

Microwave Induced Plasma (MIP) によってフッ素原子を励起させ、その発光スペクトルを観測する方法もある。この方法の感度は高い。通常はガスクロマトグラフィー法の検出器 (MIP detector) として使用する<sup>53~55)</sup>。ただし MIP detector はまだ一般的ではない。

## 5. AIF 分子吸光法

イオン性フッ素を高温で (約 2,000 °C) アルミニウムイオンと反応させるとモノフッ化アルミニウム (AIF) が生成し、227.5 nm に分子吸光を示す。感度が高く、0.021 ngF (0.01 µgF) 程度まで測定できるとされている。また、試料も微量 (5~10 µl 程度) で良いこと、前処理を必要としないことなども特徴とされている。しかし、AIF 分子を in situ に生成させて観測するので、共存物質によっては定量性が妨害される場合がある<sup>46)</sup>。また、瞬間的加熱による分解反応であるため、試料によっては瞬間的に揮発散逸して回収率が悪くなることも多い<sup>56)</sup>。灰化後のサンプルを含め、無機フッ素イオンの定量にはよいが、共有結合性フッ素が含まれている場合には、それをも非定量的に含んでしまう。

## ii) 汚染、散逸

測定を可能にするために試料を分解、溶液化する方法は、採用する分離法、分析法を考慮して選択しなければならない。試料の分解には完全にして速やかな分解が望まれる。分析操作が煩雑になればなるほど、汚染、散逸の問題が深刻になることはいうまでもない。とくに、汚染はガラス器具の使用によって、あるいは高温、酸性条件下の灰化時に起こりやすい<sup>10, 15)</sup>。さらに、分析機器のまわりの気体環境からフレオンガス、あるいは酸素や窒素などからもフッ素の混入は起こりうる。たとえブランク値を定量したとしても、試料中にもともと存在して固定剤として働く物質 (Ca, Mg 塩など) や添加した固定剤が、試料とブランクに対し全く同様に働くとは限らない。とくに試料の表面積が異なる場合には大きく影響するであろう。

分析法の妥当性の指標としては、試料に少量のイオン性フッ素 (NaF あるいは Na<sup>18</sup>F) を添加したときの回収率がよく用いられてきた。しかし、これがイオン性フッ素の特異的、定量的回収を必ずしも保証しないことは指摘しておく必要がある。既知量のイオン性フッ素を添加し定量的に回収できたとしても、もともと存在したイオン性フッ素が添加した安定なフッ素と同じ挙動をするとは限らないからである。端的に言えば、添加法による場合の添加量ゼロへの補外は、たとえその直線が検量線と平行であったとしても、まだ真値より少なく見積もっている可能性が残る。

このように多くの問題点が含まれるため、それぞれの分析法についてみれば正しくみえながらも、分析法ごとに異なった値が報告される結果となってきた。

## 2-2. 共有結合性フッ素の分析

共有結合性フッ素の分析には、ガスクロマトグラフィーや <sup>19</sup>F NMR を使った特定化合物の直接的な分析の試み<sup>50, 59)</sup>を除いては、イオン性フッ素への灰化、分解によって総フッ素量を測定する以外に方法がない。共有結合性フッ素をイオン性フッ素に変換する前処理法はいくつかある。気をつけねばならない点は、i) 分解が定量的であること、ii) 変換されたイオンが煩雑な操作によって汚染、散逸することなく回収できることである。

次に主な灰化、分解法を挙げる。

### 1. 熱灰化法<sup>2), 23)</sup>

白金ボート上で (MgCl<sub>2</sub>, MgO, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> などの固定剤を加え)、除々に加熱濃縮し、最後は 500 °C 以上にして灰化する。散逸が起こりやすく、気体環境からの汚染もありうる。

2. 酸素フラスコ燃焼法<sup>36), 60)</sup>

シュンゲル燃焼フラスコと呼ばれる密閉系のフラスコ内で、酸素雰囲気下に多量でない試料を瞬間的爆発的に燃焼する。1  $\mu\text{gF}$  が測定限界といわれる。熱灰化法に比べ散逸は少ないが、試料の前処理としての(凍結)乾燥を含め、操作が煩雑となり、完全な灰化と回収に気をつけねばならない。

Venkateswarlu ら<sup>60)</sup> は、酸素フラスコ燃焼法による灰化と  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  を用いる熱灰化法<sup>2)</sup> との比較を行い、熱灰化法における散逸の可能性を指摘している。

3. Na-ビフェニル法<sup>40), 56)</sup>

Na-ビフェニル試薬により炭素-フッ素結合を還元的に切断分解する。Na-ビフェニル試薬(約 1 M) 1 ml は 10  $\mu\text{l}$  以下の水溶液にしか使えない。総フッ素量が 50  $\mu\text{M}$  以下の試料では汚染が起こりやすい。それ以下のときは、有機フッ素化合物をエーテルに抽出したのち、Na-ビフェニルで分解する。Na-ビフェニル法は微量試料を対象とするため、用いる定量法に感度と微量性が要求される。

4. 低温酸素プラズマ灰化法 (LOPA)<sup>7), 37)</sup>

低圧気体に強い電場をかけ放電を起こさせると、放電空間における電子の速度エネルギーを気体分子が吸収し、励起状態の分子、イオン、原子などの活性分子を含んだ非平衡系の低温プラズマ状態になる。気体として酸素を使用すると低温酸素プラズマが発生し、有機物質に作用させると 100  $^{\circ}\text{C}$  程度でほぼ完全に燃焼できる。LOPA 法は多量の酸素を流すことにより汚染が、減圧にすることにより散逸が起こりうる。通常の血液中には凍結乾燥によって散逸するような有機フッ素化合物はほとんど存在しないといわれている<sup>60)</sup>。

5. 熱加水分解法<sup>61), 62)</sup>

酸素雰囲気下の水蒸気を 1,100  $^{\circ}\text{C}$  に加熱した試料上に通し、灰化されて生成したイオン性フッ素を HF として水蒸気と共に留出させる。熱加水分解法は  $\text{CaF}_2$  や  $\text{MgF}_2$  をも HF に変換しうる。しかし、多量の酸素と熱による汚染と水蒸気による希釈も伴う。

6. AIF 分子吸光法<sup>42), 45), 46), 56)</sup>

開発者 Chiba ら<sup>42)</sup> は、AIF 分子吸光法によって総フッ素量を測定できると報告しているが Venkateswarlu ら<sup>56)</sup> は、イオン性フッ素量については定量性はあるものの、種々の有機フッ素化合物からの回収試験をしたところ、化合物によって 0 ~ 100 % にわたる回収率を示し、総フッ素量を測定する方法としては良くないと結論した。回収率は灰化法によって大きく異なり、例えば perfluorooctanoic acid でみると、熱灰化法では 21 ~ 71 %<sup>50), 61), 63)</sup>、酸素フラスコ燃焼法では 92 %<sup>36)</sup>、熱加水分解法では 100 %、<sup>61)</sup> AIF 分子吸光法は 8 ~ 16 %<sup>56)</sup> と報告されている。

## 7. その他

MIP<sup>53 ~ 55)</sup>

Microwave Induced Plasmaによってフッ素原子を励起させ、その発光スペクトルを観測する。感度は高いと言われるが、まだ実用段階にはない。

GC 法による有機フッ素化合物の直接定量<sup>58)</sup>

血漿中の perfluorooctanoic acid をメチルエステルとし、ガスクロマトグラフィー法によって直接定量することが試みられた。正常人血漿中の perfluorooctanoic acid はその感度以下であって、今のところ直接定量はできない。

<sup>19</sup>F NMR<sup>59</sup>

NMRによって種々の環境にあるフッ素原子を別個に分析することができる。

ただし、有機フッ素の存在を示すことは不可能ではないが、感度は高くなく、定量に使えるほど血液中のフッ素濃度は高くない。

## 3. 何を測定しているか

## [Free FluorideとComplexed Fluoride]

先に述べたように、イオン性フッ素にはフリーのイオン性フッ素 (fluoride) と錯体を形成しているイオン性フッ素 (complexed fluoride) があり、それには金属イオンなどと結合している小さな分子と、タンパクなど大きな分子に結合しているものが存在し得る。これらは生体内では、ある種の平衡状態にあるものと考えられる。従って、分離や定量のために液性を変えると、平衡は変化し始める。さらに、たとえ中性条件下であっても、フリーのイオン性フッ素を系外へ分離する操作そのものも解離を促すはずである。このような解離を起こしうる条件下でのイオン性フッ素の測定は、不完全であるかも知れないが、総イオン性フッ素量を測定していることになる。従って、酸性条件下で行なう拡散法やシリル化拡散法およびシリル化-GC法が真のフリーのイオン性フッ素量を測定しているかどうかは疑わしい。

分離法を基に、測定しうるイオン性フッ素種を表2にまとめた。それぞれの分離法によって分析可能となるイオン性フッ素種が異なるから、その差を求めれば、特定の型のイオン性フッ素種の濃度を知ることができる。△で示したものは分離が完全であるかどうかは疑わしいものである。しかしながら、研究者によって扱う試料が異なるから、様々な方法によって分析されてきた値も直接比較することはできない。

表2 分離法によって分析可能となるイオン性フッ素種

	Complexed Fluoride			
	Free Fluoride	small	large	acid labile fluorine
未処理 (存在しうるイオン性フッ素)	○	○	○	○
電極法	○	×	×	×
吸着法	○	△	△	×
拡散法	○	△	△	△
シリル化法	○	△	△	△
熱酸加水分解	○	○	○	○
限外濾過 (存在しうるイオン性フッ素)	○	○	×	○
電極法	○	×	×	×
吸着法	○	△	×	×
拡散法	○	△	×	△
シリル化法	○	△	×	△
熱酸加水分解	○	○	×	○
ゲル濾過 (存在しうるイオン性フッ素)	○	○	○	○
電極法	○	×	×	×
吸着法	○	△	△	×
拡散法	○	△	△	△
シリル化法	○	△	△	△
熱酸加水分解	○	○	○	○
陰イオン交換 (存在しうるイオン性フッ素)	○	△	△	×

真のフリーのイオン性フッ素量を測定するためには、試料に手を加えることなく、直接そのイオン性フッ素量を測定することが望ましい。直接電極法はその目的にもっとも近い。電極の選択性を上げるために緩衝液を加え、pHを7近くから5まで下げねばならないが、その変化はもっとも小さいとみなせる。

Fuchsら<sup>60)</sup>によると、既知量のイオン性フッ素を添加する直接電極法において、添加試験も希釈実験もその変化が理論式に従うから、血清や血漿のマトリックスの影響は除外できるという。すなわち、濃度変化や希釈による平衡のずれは観測可能なほど大きくなく、従って錯体を形成しているようなイオン性フッ素の存在は非常に微量か、存在しても解離は起こらないということを示している。

限外濾過後の試料 (ultrafiltrate) を測定する手法は、タンパクというマトリックスの、測定法に対する影響を除外するものであり、かつタンパクなどの高分子に結合したイオン性フッ素を取り除くことにもなる。このとき ultrafiltrate 中に残るイオン性フッ素種は、フリーのイオン性フッ素と金属イオンなど小さな分子に結合したイオン性フッ素である。Taves<sup>1)</sup> は、血清の ultrafiltrate について灰化試料と未灰化試料を拡散処理後蛍光法によって測定し、それぞれ  $1.2 \sim 1.3$  と  $1.1 \mu\text{M}$  という値を得た。大きな差のないことから、タンパクなどに結合しているイオン性フッ素はないと考えられるが、前に述べたように未灰化試料の拡散液には、測定に対する妨害物質が混入している可能性のあることを考慮しておかねばならない<sup>2), 22)</sup>。

Singerら<sup>61)</sup> は、犬血清の ultrafiltrate を電極で測定する際、pHを4.51から5.50までの10段階に変えて測定したところ、その平均は  $1.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$  であって、pH変化による影響はなかったと報告した。さらに、イオン性フッ素の定量を妨害する金属イオンのマスク剤 (TISABにも含まれている citrate など) を加えても測定値が変わらないことから、金属イオンに結合したイオン性フッ素は存在しないと結論した。一方、ultrafiltrate を  $60^\circ\text{C}$  で拡散処理すると電極に応答するイオン性フッ素が約2倍に増える。すなわち、拡散され得るような、小さな分子と錯体を形成しているイオン性フッ素が存在するというのであるが、少なくともマスク剤が効くような金属フッ化物ではない。もしこれが汚染でなければ、後で述べるような酸によって容易に分解される共有結合性フッ素と同一種なのかも知れない。

Venkateswarlu<sup>20)</sup> は、血清と血清の ultrafiltrate をシリル化抽出—電極法によって測定比較したところ、それぞれ  $1.3 \mu\text{M}$  と  $1.5 \mu\text{M}$  であった。シリル化抽出法は酸性条件で行うのでタンパクに結合したイオン性フッ素が解離してくるはずであるが、ultrafiltrate にはそのタンパクがない。それらに差がないということは、タンパクに結合しているようなイオン性フッ素は血清中に存在しないということである。

Ekstrandら<sup>62)</sup> は犬血漿中の高分子へのイオン性フッ素の結合について、ゲル濾過と電極法、 $^{18}\text{F}$ 法を用いて検討した。すなわち、血漿に  $\text{Na}^{18}\text{F}$  を加え、ゲル濾過しても、分子量3,000以上の分画には  $^{18}\text{F}$  イオンは見られず、分子量3,000以下の分画に98%の  $^{18}\text{F}$  イオンが回収された。従って、 $^{18}\text{F}$  イオンと交換可能な、血漿タンパクに結合しているイオン性フッ素はないとした。Jardillierら<sup>63)</sup> もゲル濾過 (Sephadex G-25) —拡散および限外濾過 (Amicon UM-2) によって、同様の結果を得ている。ゲル濾過中に、錯体を形成しているイオン性フッ素が、可逆的に解離するという可能性を否定できないが、溶出液に一定量のイオン性フッ素を加えておくことによって、ゲル濾過中の解離を抑えるようにしても見出しなかった。Birkelandら<sup>64)</sup> も錯体を形成しているようなイオン性フッ素を見出しなかったと報告している。

しかし、Carlsonら<sup>65)</sup> は、犬の血漿について、限外濾過法を用いると、添加した  $^{18}\text{F}$  イオンの内5%

がアルブミンに結合したと報告している。さらに、人工的に再構成した血漿中の Ca 濃度を増加させると結合も増加した。すなわち、Ca 濃度が 15 mEq/l では  $^{18}\text{F}$  イオンの約 40 % が結合し、5 mEq/l では 15 % が結合した。アルブミンがなければ、Ca 濃度によらず全て濾過された。

Singer ら、Ekstrand ら、Jardillier らの結果と Carlson らの結果は大きく異なる。しかし、人工血漿を再構成するために加えたアルブミンは恐らく精製されたアルブミンであって、その純度がイオン性フッ素のアルブミンへの結合に影響を及ぼす可能性がある。血清あるいは血漿中の共存物質を制限することがイオン性フッ素の結合平衡を変化させても不思議ではない。

試料を中性のまま処理し、フリーのイオン性フッ素のみを分離しようという試みが陰イオン交換法および  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  吸着法である。

Cox ら<sup>21)</sup> は血清中のイオン性フッ素の蛍光光度法による測定に際し、陰イオン交換樹脂 (Dowex1 X16) によってイオン性フッ素のみを取り出した。これによって拡散法における pH の変化を避けることができ、真に血清中でフリーのイオン性フッ素として存在するイオン性フッ素を測定できると考えた。しかし、彼らの得た値は 3.0 ~ 3.1  $\mu\text{M}$  と血清中のフリーのイオン性フッ素濃度としては比較的大きな値であった。

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  吸着法を中性条件下で行なうと、存在するフリーのイオン性フッ素が固体  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  上に不溶性のイオン性フッ素として捕捉されるというものである。結果はシリル化-拡散法と同様の結果 (0.35 ~ 0.55  $\mu\text{M}$ ) を与えた<sup>19)</sup>。このことは、フリーのイオン性フッ素の分離を中性条件下に行なっても、錯体を形成しているイオン性フッ素が可逆的に解離し、酸性条件下で行うのと同様の解離が起こることを示している。彼らはこれを ionic (plus ionizable) fluoride と呼んだ。

先に述べたように、(シリル化) 拡散法は酸性条件下で行うので錯体を形成しているイオン性フッ素の解離を促す可能性があるが、Taves<sup>22)</sup> はシリル化拡散法で測定するイオン性フッ素は  $^{18}\text{F}$  イオンと交換可能なイオン性フッ素であって、直接電極法と同じ値を示すという報告している。山本ら<sup>7)</sup> の測定も直接電極法とシリル化-GC 法で同じ値を示した。

いずれにせよ、総イオン性フッ素量を知るためには、錯体を形成しているイオン性フッ素を完全にフリーのイオン性フッ素に戻せる条件で測定しなければならない。山本ら<sup>7)</sup> が試料を酸性条件下に加熱し、イオン性フッ素を結合しうるようなタンパクを全て分解してしまうという苛酷な条件で血清を処理したのは、そのためである。その結果、血清中にはイオン性フッ素が 0.5  $\mu\text{M}$  存在するのに対し、総イオン性フッ素は 1.3  $\mu\text{M}$  存在することを見出した。この結果は、これまでの報告が錯体を形成しているようなイオン性フッ素はないという傾向であったのとは異なる。

酸性条件で分解されるのは錯体を形成しているイオン性フッ素だけではない。有機フッ素化合物の中には、シリル化の条件で分解されるほど酸に不安定なもの (例えば麻酔剤 methoxyflurane) もないわけではない。それらが測定の際どのような値となって、あるいはどのような誤差となって表れるかが検討された<sup>20), 31)</sup>。methoxyflurane を含むラット血漿を 3 種の分析法で測定すると、60 °C 拡散-吸光光度法、酸素フラスコ燃焼法-電極法、70 °C 酸性で 2 時間処理後-シリル化抽出-電極法で測定すると 113 ~ 121  $\mu\text{M}$  であったが、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  吸着-電極法で測定すると 14.7  $\mu\text{M}$  のみが測定された。この差が、酸に不安定な有機フッ素化合物の分解によって生じたイオン性フッ素量であると考えられた<sup>20)</sup>。

また Ikenishi らは<sup>30)</sup> シリル化-GC 法を用いる際、試料を塩酸で酸性にするかわりに SSA (Sulfosalicylate) 緩衝液で pH 2.5 にすれば、シリル化も十分速く、また酸に不安定な化合物の分解も抑え得ると報告している。この分析法によって、 $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanine、4-fluoroglutamic acid、3-difluoroalanine、



5-(trifluoromethyl) uracilなどは、唾液中での分解は遅いが、血漿中では37℃でも分解してイオン性フッ素を放出することを明らかにした。フリーのイオン性フッ素と、錯体を形成しているイオン性フッ素とを別々に定量することにどれ程の意味があるかは、試料中に共存する対陽イオン種あるいはその量がどういう意味を持ってるいかによる。いずれにせよ、血清および血漿中に、錯体を形成しているようなイオン性フッ素が存在する可能性はあるが、中性条件下で分離しても酸性条件下での分離であっても、タンパクに結合したイオン性フッ素も、金属イオンなどの小さな分子に結合したイオン性フッ素も見出されていない。フリーのイオン性フッ素として挙動しないような、錯体を形成しているイオン性フッ素は微量であるか、存在しないように思える。むしろ誤差として入ってくるのは酸に不安定な有機フッ素化合物からのものではないだろうか。

#### [Fluorine]

表3に灰化後分析可能になるフッ素種と試料処理法との対応をまとめた。

前に述べたように、Taves<sup>1)</sup>は総フッ素の80～90%が灰化することによってのみ測定可能になり、残りの10～20%は<sup>19</sup>Fイオンと交換可能であって、限外濾過されうるといふ観察から、血清中に2種のフッ素が存在すると報告した。さらに、pH 9.0で電気泳動法によって血漿を分離したとき、アルブミンと同じ分画にフッ素の大部分が存在することを認め、アルブミンと結合する低分子の成分と共有結合状態にあるのではないかと推測した<sup>70)</sup>。

Venkateswarlu<sup>60)</sup>は、2つの血清について血清および血清のultrafiltrateを酸素フラスコ燃焼法で灰化し、イオン性フッ素と総フッ素を電極法で測定している。

	ionic fluoride ( $\mu$ M)	total fluorine ( $\mu$ M)
serum	1.3	4.1
ultrafiltrate	—	1.1
serum	0.8	1.8
ultrafiltrate	—	0.6

彼らによれば、もちろん共有結合性フッ素は存在するが、限外濾過されない共有結合性フッ素が存在することを示している。また、Ophaug<sup>61)</sup>はperfluorooctanoic acidが含まれる血清を限外濾過し、分子量50,000以下の濾液にはほとんどperfluorooctanoic acidが含まれないことから、これらは血清中の何かの成分に結合していると報告した。これはTaves<sup>70)</sup>の知見と一致している。perfluorooctanoic acidと牛血清アルブミン(BSA)<sup>71), 72)</sup>およびヒト血清アルブミン<sup>73)</sup>との相互作用についての研究によれば、この酸はアルブミンと非常に強く結合すると言われている。もしこのような化合物が生体内に存在すれば、タンパクなどに結合した共有結合性フッ素として分析されるであろう。

Guy<sup>62)</sup>は、血漿から有機化合物を分離し、<sup>19</sup>F NMRによって、イオン性フッ素ではないperfluorofatty acid (C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>)誘導体の存在を明らかにした。そしてその主たるものはperfluorooctanoic acidであろうと推測している。perfluorooctanoic acid誘導体は界面活性剤に広く用いられており<sup>74)</sup>、それらが体内に蓄積されるようになってきているのではないかと推測している。その化合物は極性の高い脂質に似た性質を有し、血漿中ではアルブミンに強く結合しているのではないかと考えられている。従って、透析処理をしても、限外濾過をしても外れてこないし、電気泳動法によっても分離できない。ただし、このような脂肪酸の灰化がイオン性フッ素量を正確に与えるかどうか疑わしい。なぜなら脂肪酸の



脱炭酸によって揮発性の perfluoroalkene が生成するからである。

こうして見てみると、金属イオンやタンパクと錯体を形成しているイオン性フッ素は見い出されていないが、タンパクに結合する有機フッ素化合物は存在しそうである。

表3 灰化後分析可能となるフッ素種と試料処理法との関係

	Total Fluoride	Small molecule Fluorine	Protein bound Fluorine	complexed Fluorine
未処理	○	○	○	○
直接 AIF-分子吸光	○	△	△	△
限外濾過	○	○	×	×
ゲル濾過	○	△	△	△
電気泳動	?	?	○	○
特定化合物の 直接定量	×	○	×	○

[In Whole Blood]

血液中のフッ素の存在量および存在様式について、多くの研究がなされているが、その対象は血清と血漿に限られ、取扱いにくさから全血液に対する検討はほとんど行われていなかった。しかし、血球や血清あるいは血漿への有機フッ素化合物の溶解度や分配は、個々の化合物によって当然異なるはずであるから<sup>75), 76)</sup>、血清あるいは血漿中の総フッ素量の定量だけでは血液中に存在する有機フッ素化合物の分析としては不十分であろう。

Belisle ら<sup>36)</sup> は酸素フラスコ燃焼—シリル化 GC 法で、全血液を対象とした分析を行い、血漿中に平均 1.2  $\mu\text{M}$  の共有結合性フッ素が存在し、全血液中では平均 1.7  $\mu\text{M}$  であったとしている。

plasma		( $\mu\text{M}$ )		whole blood	
fluoride	fluorine			fluoride	fluorine
0.5 ~ 1.6	0.5 ~ 1.6			0.5 ~ 1.1	0.5 ~ 2.6
	1.3 ~ 3.2				1.1 ~ 3.4

また、山本ら<sup>7)</sup> は低温酸素プラズマ灰化 (LOPA)—シリル化 GC 法により同様の分析を行い、やはり血餅中に多量の共有結合性フッ素が存在することを示した。

serum		( $\mu\text{M}$ )		whole blood	
fluoride	fluorine			fluoride	fluorine
0.2 ~ 1.0	2.1 ~ 5.5			0.2 ~ 0.8	2.2 ~ 6.9
	2.5 ~ 6.1				2.8 ~ 7.2

彼らより以前の研究者たちは、全血液を扱うことの困難さから、直接的な定量ではなく  $^{18}\text{F}$  イオンを用いた。Hosking ら<sup>76)</sup> による  $^{18}\text{F}$  イオンの血球-血漿間への配分は 1 : 2 であり、Carlson らも人間<sup>79)</sup> (72 % が血漿中へ分布している) と犬<sup>80)</sup> (75 % が血漿へ、さらにその内 5 % が血漿中のアルブミンに結合した) を対象とした結果を報告している。これらはいずれもフリーのイオン性フッ素に関する情報であり、有機フッ素化合物、とくにフッ素化脂肪酸の存在が予想されるようになってきた現在では、これらが血球に結合する可能性も高いことから、全血液を対象とした研究がもっと行われるべきであろう。

#### 4. 共有結合性フッ素 (有機フッ素) の由来

人の血液中のフッ素量について、種々の方法で測定がなされた結果、血液中有機フッ素化合物が確かに存在し、その量はむしろイオン性フッ素より多いことが分かってきた。それが環境あるいは食物からの流入であるのか、生体内でイオン性フッ素から生成するのかは今のところ全く明らかではない。

血液に含まれる共有結合性フッ素量は灰化試料と未灰化試料の測定の差として求められる。未灰化試料中のイオン性フッ素濃度は水道水中のイオン性フッ素濃度 (0.1 ~ 5.6 ppmF) と明らかに関係しているが<sup>80), 86), 79), 80)</sup>、共有結合性フッ素濃度とは関係しておらず、骨中のイオン性フッ素とバランスを保っていると考えられる<sup>81)</sup>。Singer ら<sup>84)</sup> が提案したような、イオン性フッ素と共有結合性フッ素との間のホメオスタシスがあると考える研究者は少ないが、前報でも述べたように、我々の得ている結果は Singer らの考えを支持していると考えられる。

一方、Ubel ら<sup>82)</sup> は、フッ素系化学薬品工場の労働者の血清中のイオン性フッ素は 0.53 ~ 4.7  $\mu\text{M}$  であったのに対し、53 ~ 3,737  $\mu\text{M}$  の total fluorine を見い出した。しかもそれは、その工場で仕事に従事していた期間に依存していた。また、そのような共有結合性フッ素は、その工場をやめても除々にしか排泄されなかった。Venkateswarlu ら<sup>85)</sup> も、フッ素系化学薬品工場の労働者血清中に 260 ~ 1,200  $\mu\text{M}$  もの total fluorine を見い出している。

Guy ら<sup>83)</sup> は、血漿からフッ素を含む数種類の有機フッ素化合物を分離し、主たる化合物は perfluorooctanoic acid であることを明らかにした。この化合物は、極性を示す脂質に似た性質を有し、血漿中ではアルブミンに結合しているのではないかと考えられている。perfluorooctanoic acid を血清に加えると、加えた 99 % が血清成分に結合するといわれる<sup>83)</sup>。perfluorooctanoic acid の誘導体は界面活性剤に広く用いられており<sup>70)</sup>、それらが体内に蓄積されたのではないかと推測されている。すなわち、血漿中の有機フッ素化合物は人工的に合成されたものによっていることを示唆している。

Taves<sup>80)</sup> の研究によれば、人間以外の 12 種の動物 (犬、ラットなど) の血漿中の共有結合性フッ素は、人間の 2.0  $\mu\text{M}$  に対して 0.3  $\mu\text{M}$  以下であった。さらに、イオン性フッ素の摂取を高濃度にしても低濃度にしても、血漿中のイオン性フッ素量は変化するが共有結合性フッ素量は変化しなかった。このことから、人間だけが有機フッ素化合物の摂取源を持っているのではないかと考えられる。ただし、ラットや牛血清中にも共有結合性フッ素が存在するという報告もある<sup>82), 80), 83)</sup>。

しかし、Belisle ら<sup>84)</sup> は産業上フッ化物に接する機会の少ない空気清浄地区の住民について、酸素フラスコ燃焼法によって、血清中に 2.3 ~ 4.0  $\mu\text{M}$  のイオン性フッ素、0.42 ~ 0.89  $\mu\text{M}$  の共有結合性フッ素、2.6 ~ 4.9  $\mu\text{M}$  の total fluorine を見出し、自然由来の有機フッ素化合物もあり得るとしている。水道水はもちろん、魚、茶などの食物は血清中のイオン性フッ素濃度に寄与する。食物として毎日摂る総フッ素量は 10 ~ 25  $\mu\text{mol/day}$ <sup>85)</sup> と 85 ~ 170  $\mu\text{mol/day}$ <sup>86)</sup> と報告されている。イギリス人の

Cookらの報告によると、一杯の紅茶には $27\mu\text{mol}$ のイオン性フッ素が含まれている<sup>87)</sup>。fluoroacetateとfluorocitrateなど有機フッ素化合物が、レタス、forage crops、ダイズ、茶などを高濃度のイオン性フッ素にさらした時に生成すると報告されたが<sup>88)~92)</sup>、そのような化合物は生成しないという報告もあって明らかではない<sup>93)</sup>。

## おわりに

以上まとめたように、血液中のフッ素は種々の方法で分析されてきた。イオン性フッ素の分析に関しては、どのフッ素種を測定しているか、何が誤差となって入ってくるかをほぼ理解することができるようになった。しかし、共有結合性フッ素の分析は今もって容易ではない。

結論として、ヒト血液中に有機フッ素種が存在することは確かであり、その量はイオン性フッ素より多い。perfluorooctanoic acidの血清タンパクへの高い親和性を考えると、これ以外にも生体内組織と親和性の高い有機フッ素化合物は存在するものと考えられる。これらの化合物は、恐らく環境からの合成有機フッ素化合物の流入によるものであろうが、もしそうであれば、そのような汚染そのものも問題であろうし、その代謝、および生体機能への影響も問題となろう。一方、有機フッ素化合物の生体内における生成が否定されているわけでもない。このような意味で、生体内に存在する共有結合性フッ素の定量は、ますます重要になるものと考えられる。

# 参考文献

1. D. R. Taves, *Nature (London)*, **217**, 1050-1051 (1968).
2. L. Singer and W. D. Armstrong, *Archs. Oral Biol.*, **14**, 1343-1347 (1969).
3. L. Singer and W. D. Armstrong, *Anal. Biochem.*, **10**, 495-500 (1965).
4. D. R. Taves, *Nature*, **211**, 192-193 (1966).
5. D. R. Taves, *Nature*, **215**, 1380 (1967).
6. L. Singer and W. D. Armstrong, *Nature*, **214**, 1161-1162 (1967).
7. G. Yamamoto, K. Yoshitake, T. Kimura, and T. Ando, *Anal. Biochem.*, **182**, 371-376 (1989).
8. P. Venkateswarlu, *J. Dent. Res.*, **69**, 514-521 (1990).
9. 分析化学便覧 改定三版、日本分析化学会編、pp.187、丸善、1981.
10. J. A. Fresen, F. H. Cox, and M. J. Witter, *Pharm. Weekbl.*, **103**, 909-914 (1968).
11. D. R. Taves, *Talanta*, **15**, 969-974 (1968).
12. D. R. Taves, *Anal. Chem.*, **40**, 204-206 (1968).
13. M. S. Frant and J. W. Ross, *Science*, **154**, 1553-1555 (1966).
14. L. Singer and W. D. Armstrong, *Anal. Chem.*, **31**, 105-109 (1959).
15. L. Singer and W. D. Armstrong, *Anal. Chem.*, **26**, 904-906 (1954).
16. R. J. Hall, *Analyst*, **85**, 560-563 (1960).
17. 高江洲義矩、口腔衛生学会雑誌、**16**, 13 (1966).
18. P. Venkateswarlu, L. Singer, and W. D. Armstrong, *Anal. Biochem.*, **42**, 350-359 (1971).
19. P. Venkateswarlu and P. Sita, *Anal. Chem.*, **34**, 758-760 (1971).
20. P. Venkateswarlu, *Anal. Chem.*, **46**, 878-882 (1974).
21. F. H. Cox and O. Backer Dirks, *Caries Res.*, **2**, 69-78 (1968).
22. D. R. Taves, *Talanta*, **15**, 1015-1023 (1968).
23. L. Singer and R. H. Ophaug, *Anal. Chem.*, **49**, 38-40 (1977).
24. L. Singer and W. D. Armstrong, *J. Appl. Physiol.*, **15**, 508-510 (1960).
25. P. Venkateswarlu, *Biochem. Med.*, **14**, 368-377 (1975).
26. I. Gedalia, K. A. Rosenzweig, and A. Sadeh, *J. Dent. Res.*, **40**, 865-869 (1961).
27. I. Gedalia, A. Brzezinski, H. Zukerman, and A. Mayersdorf, *J. Dent. Res.*, **43**, 669-671 (1964).
28. W. D. Armstrong and L. Singer, in *Fluorides and Human Health* (P. Adler, ed.), Monograph Series, No.59, pp. 94-99, WHO, Geneva (1970).
29. H. J. Gitelman and F. R. Alderman, *Anal. Biochem.*, **186**, 141-144 (1990).
30. D. R. Taves, *J. Dent. Res.*, **50**, 783 (1971).
31. D. R. Taves, B. W. Fry, R. B. Freeman, and A. J. Gillies, *J. Amer. Med. Assoc.*, **214**, 91-96 (1970).
32. P. Venkateswarlu, *Clin. Chim. Acta*, **59**, 277-282 (1975).
33. F. W. Barnes and J. Runcie, *J. Clin. Path.*, **21**, 668-670 (1968).
34. B. W. Fry and D. R. Taves, *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 1020-1025 (1970).
35. R. Bock and H. J. Semmler, *Fresenius 'Z. Anal. Chem.*, **230**, 161-184 (1967).
36. J. Belisle and D. F. Hagen, *Anal. Biochem.*, **87**, 545-555 (1978).

37. Y. Bessho, M. Tomita, and Y. Kaneko, in *Fluoride Research 1985* (H. Tsunoda and M. -H. Yu, eds.) Vol. 27, pp. 73-80, Elsevier, Amsterdam, 1986.
38. Y. Zaima and S. Goto, in *Fluoride Research 1985* (H. Tsunoda and M. -HYu, eds.) Vol. 27, pp. 47-58, Elsevier, Amsterdam, 1986.
39. G. Yamamoto, K. Yoshitake, T. Kimura, and T. Ando, *Anal. Chim. Acta*, **222**, 121-126 (1989).
40. P. Venkateswarlu, *Anal. Chem.*, **54**, 1132-1137 (1982).
41. J. H. Glerum, A. van Dijk, and S. W. Klein, *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.*, **6**, 75-79 (1984).
42. K. Chiba, K. Tsunoda, H. Haraguchi, and K. Fuwa, *Anal. Chem.*, **52**, 1582-1585 (1980).
43. K. Tsunoda, H. Haraguchi, and K. Fuwa, in *Fluoride Research 1985* (H. Tsunoda and M. -H. Yu, eds.) Vol. 27, pp. 15-23, Elsevier, Amsterdam, 1986.
44. K. Itai, H. Tsunoda, and M. Ikeda, *Anal. Chim. Acta*, **171**, 293 (1985).
45. K. Tsunoda, K. Fujiwara, and K. Fuwa, *Anal. Chem.*, **49**, 2035-2039 (1977).
46. S. Fujimori, K. Itai, and H. Tsunoda, *Fluoride*, **17**, 27-35 (1984).
47. 橋谷博、工業用水、**85**, 23 (1965).
48. 上田喜一、飯塚喜一、北原栄次、医学と生物、**56**, 105 (1960).
49. W. Lei, K. fujiwara, and K. Fuwa, in *Fluoride Research 1985* (H. Tsunoda and M. -H. Yu, eds.) Vol. 27, pp. 59-71, Elsevier, Amsterdam, 1986.
50. C. Fuchs, D. Dorn, C. A. Fuchs, H-V. Henning, C. McIntosh, F. Scheler, and M. Stennert, *Clin. Chim. Acta*, **60**, 157-167 (1975).
51. L. L. Hall, F. A. Smith, O. H. De Lopez, and D. E. Gardner, *Clin. Chem.*, **18**, 1455-1458 (1972).
52. G. L. Vogel, C. M. Carey, L. C. Chow, and J. Ekstrand, *J. Dent. Res.*, **69**, 522-528 (1990).
53. H. Haraguchi, in *Fluoride Research 1985* (H. Tsunoda and M. -H. Yu, eds.), Vol. 27, pp. 31-42, Elsevier, Amsterdam, 1986.
54. D. F. Hagen, J. Belisle, and J. S. Marhevka, *Spectrochimica Acta*, **38B**, 377-385 (1983).
55. K. Chiba, K. Yoshida, K. Tanabe, M. Ozaki, H. Haraguchi, J. D. Winefordner, and K. Fuwa, *Anal. Chem.*, **54**, 761-764 (1982).
56. P. Venkateswarlu, L. D. Winter, R. A. Prokop, and D. F. Hagen, *Anal. Chem.*, **55**, 2232-2236 (1983).
57. H. Husdan, R. Vogl, D. Oreopoulos, C. Gryfe, and A. Rapoport, *Clin. Chem.*, **22**, 1884-1888 (1976).
58. J. Belisle and D. F. Hagen, *Anal. Biochem.*, **101**, 369-376 (1980).
59. W. S. Guy, D. R. Taves, and W. S. Brey, in *Biochemistry Involving Carbon-Fluorine Bond* (R. Filler, ed.), *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **28**, 117-134 (1976).
60. P. Venkateswarlu, *Anal. Biochem.*, **68**, 512-521 (1975).
61. G. J. Kakabadse, B. Manohin, J. M. Bather, E. C. Weller, and P. Woodbridge, *Nature*, **229**, 626-627 (1971).
62. K. Itai and H. Tsunoda, in *Fluoride Research 1985* (H. Tsunoda and M. -H. Yu, eds.),

- Vol. 27. pp. 25-29, Elsevier, Amsterdam, 1986.
63. R. H. Ophaug and L. Singer, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **163**, 19-23 (1980).
  64. L. Singer and W. D. Armstrong, *Biochem. Med.*, **8**, 415-422 (1973).
  65. J. Ekstrand, Y. Ericsson, and S. Rosell, *Archs. Oral Biol.*, **22**, 229-232 (1977).
  66. J. -C. Jardillier and G. Desmet, *Clin. Chim. Acta*, **47**, 357-363 (1973).
  67. J. M. Birkeland and G. Rolla, *Archs. Oral Biol.*, **17**, 455-463 (1972).
  68. C. H. Carlson, W. D. Armstrong, and L. Singer, *Am. J. Physiol.*, **199**, 187-189 (1960).
  69. R. Ikenishi and T. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 810-814 (1988).
  70. D. R. Taves, *Nature*, **220**, 582-583 (1968).
  71. H. B. Klevens and E. Ellenbogen, *Discuss. Faraday Soc.*, **18**, 277-288 (1954).
  72. E. Ellenbogen and P. H. Maurer, *Science*, **124**, 266-267 (1956).
  73. G. L. Nordby and J. M. Luck, *J. Biol. Chem.*, **219**, 399-404 (1956).
  74. H. G. Bryce, in *Fluorine Chemistry* (J. H. Simon, ed.), Vol. V, pp. 297, Academic Press, New York (1964).
  75. S. Niazi and W. L. Chiou, *J. Pharmaceutical Sci.*, **64**, 1538-1541 (1975).
  76. I. E. Hughes, L. B. Jellett, and K. F. Ilett, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **3**, 285-288 (1976).
  77. D. J. Hosking and M. J. Chamberlain, *Clin. Sci.*, **42**, 153-161 (1972).
  78. C. H. Carlson, W. D. Armstrong, and L. Singer, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 235-239 (1960).
  79. J. Inkovaara, R. Heikinheimo, K. Jarvinen, U. Kasurinen, H. Hanhijarvi, and E. Iisato, *Br. Med. J.*, **iii**, 73-74 (1975).
  80. D. Osis, E. Wiatrowski, J. Samachson, and H. Spencer, *Clin. Chim. Acta*, **51**, 211-216 (1974).
  81. F. M. Parkins, N. Tinanoff, M. Moutinho, M. B. Anstey, and M. H. Waziri, *Calcif. Tiss. Res.*, **16**, 335-338 (1974).
  82. F. A. Ubel, S. D. Sorenson, and D. E. Roach, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **41**, 584-589 (1980).
  83. R. H. Ophaug and L. Singer, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **155**, 23-26 (1977).
  84. J. Belisle, *Science*, **212**, 1509-1510 (1981).
  85. F. A. San Filippo and G. C. Battistone, *Clin. Chim. Acta*, **31**, 453-457 (1971).
  86. L. Kramer, D. Osis, E. Wiatrowski, and H. Spencer, *Am. J. Clin. Nutr.*, **27**, 590 (1974).
  87. H. A. Cook, *Lancet*, **ii**, 329 (1969).
  88. J. Y. Cheng, et al., *Environ. Sci. Technol.*, **2**, 367-370 (1968).
  89. J. Lovelace, G. W. Miller, and G. W. Welkie, *Atoms. Environ.*, **2**, 187-189 (1968).
  90. M. -H. Yu and G. W. Miller, *Environ. Sci. Technol.*, **4**, 492-495 (1970).
  91. R. H. Wade, J. M. Ross, and H. M. Benedict, *J. Chromatog.*, **14**, 37-45 (1964).
  92. R. A. Peters and M. Shorthouse, *Phytochemistry*, **11**, 1337-1338, 1339 (1972).
  93. L. H. Weinstein, D. C. McCune, J. F. Mancini, L. J. Colavito, D. H. Silberman, and P. van Leuken, *Environ. Res.*, **5**, 393-408 (1972).
  94. H. Hanhijarvi, *Pro. Finn. Dent. Soc.*, Suppl. 3., 1-67 (1974).

95. H. C. Kuo and J. W. Stamm, *Archs. Oral Biol.*, **20**, 235-238 (1975).
96. L. Singer and R. H. Ophaug, *Clin. Chem.*, **25**, 523-525 (1979).
97. D. C. Cowell and W. H. Taylor, *Ann. Clin. Biochem.*, **18**, 76-83 (1981).