

①細胞表面マーカー(CD3, CD4, CD8, CD19, CD3- α / β TCR, CD3- γ / δ TCR, CD4-DR, CD8-DR, CD8-CD11b, CD56-CD16 の 10 項目)

②リンパ球幼弱反応 (PHA, LAK)

③ CRP,

④④免疫グロブリン

⑤ RAST(ダニ、卵、牛乳)

II。甲状腺機能(TSH, T3, T4, FT4)、

III。血液濾紙(TSH, FT4, 甲状腺抗体)

IV。先天性代謝異常等(マススクリーニング)検査:生後5日目と1歳時の甲状腺機能を比較するために、保護者の同意を得て、生後5日目のマススクリーニング濾紙甲状腺機能の結果を関係機関より取得する。結果をダイオキシン類の負荷量との関係を明らかにする。

2 平成10年から新たに開始された研究(新規調査研究)

上記研究に引き続き、対象を19地区に拡大して同様の検討を行う。検査項目は新たに農薬5項目を加えた。また、第2子を生んだ母親の出産後30日の母乳内容の調査を行い第1子との比較検討を行う。

特に、対照となる人工栄養児の採血については、北里大学医学部倫理委員会の承認を取って行った(B倫98-05号)。採血に際しては両親に採血の目的、意義、児への負担などを説明しインフォームドコンセントを取って行った。

C。結果

1. 乳汁中のダイオキシン類濃度

1回目から4回目までの母乳中ダイオキシン類の濃度を表1に示した。分娩後、日齢と共に乳汁中の脂肪濃度は低下しないのに関わらず、ダイオキシン類、即ちPCDDs+PCDFs、Co-PCB/pg/gfatは低下してきている。故に、データは示していないが、母乳100gあたりのダイオキシン類濃度は低下してくる。乳汁分泌量、哺乳量も日齢と共に低下してくるので、乳児に負荷されるダイオキシン量は日齢と共に低下することが明らかになった。各乳児毎の哺乳量、ダイオキシン負荷量は計算され、後に示す甲状腺機能、免疫機能との相関関係を検討中である。

2. 栄養法別の甲状腺機能

血清甲状腺機能、濾紙血甲状腺機能の結果を表2に示した。血清中のTSH、T3、T4、FT4共に、母乳栄養群、人工栄養群で有意な差は認められなかった。濾紙血甲状腺機能は母乳群(n=58)、人工栄養群(n=15)で比較検討したが、両群には差は認められなかった。甲状腺抗体(サイロイドテスト、マイクロソームテスト)共に全て陰性であった。

3 栄養法別の免疫機能

現在、各乳児のダイオキシン負荷量について集計中であり、また各乳児の免疫機能について解析が進められている。免疫グロブリン、RAST、の中にはIgAの低値、1つないし複数のRAST陽性児が見られるが、どちらかの栄養法に偏っていることはなく、これとは関係の無い要因によって起こっている変化と考える。今後詳細な検討を加える予定である。

D。考案

ダイオキシンの汚染と乳児の免疫、甲状腺機能に対する影響の報告がある。Koopman-Esseboomらは105例の母児の甲状腺機能と母親血漿及び母乳及び臍帯血PCB濃度を検討した。その結果、PCB、PCDDs、PCDFs濃度とT3、T4は逆相関し、TSH濃度とは相関したと報告した¹⁾。Nagayamaらは分娩後2-3カ月の母乳中のダイオキシン類濃度を測定し、12カ月の乳児の末梢リンパ球CD4/CD8比、並びに甲状腺機能を検討し共に母乳からのダ

表1. 母乳中のダイオキシン類の濃度

	採乳日	脂肪濃度	TEQ(PCDDs+PCDFs)	TEQ(C0-PCB)	TEQ(total)pg/gfat
第1回目 (n=80)	5.2 ± 2.0	3.0 ± 1.4	17.3 ± 7.7	11.1 ± 7.3	28.4 ± 12.7
第2回目 (n=72)	31.1 ± 3.8	3.8 ± 1.2	14.8 ± 5.1	9.9 ± 5.2	24.8 ± 9.5
第3回目 (n=45)	151.4 ± 3.6	3.8 ± 1.9	14.0 ± 4.2	7.0 ± 3.9	21.0 ± 7.4
第4回目 (n=25)	303.0 ± 6.9	3.7 ± 1.5	11.9 ± 4.3	6.2 ± 3.6	18.1 ± 7.4
					Mean ± S.D.

表2. 生後12-14ヵ月の甲状腺機能

	血清				濾紙血	
	TSH(uU/ml)	T3(ng/ml)	T4(ug/dl)	FT4(ng/ml)	TSH(uU/ml)	FT4(ng/ml)
母乳栄養群(n=44)	2.3 ± 1.1	1.58 ± 0.21	10.5 ± 1.8	1.41 ± 0.29	2.7 ± 1.2	1.50 ± 0.26
人工栄養群(n=9)	1.7 ± 1.0	1.59 ± 0.30	10.9 ± 2.4	1.36 ± 0.19	2.1 ± 1.1	1.53 ± 0.28
全ての検査項目で両群に有意の差は認められない。						Mean ± S.D.

イオキシン負荷量と免疫、甲状腺機能の間に相関を認めたとの報告をしている2)。甲状腺ホルモンとダイオキシン類の構造が類似するところから、TBGとの競合、甲状腺ホルモン受容体への結合における競合などで甲状腺機能に影響を及ぼす可能性はラットなどの研究で明らかにされている。また、免疫系に対する影響についても多くの動物を用いた研究報告がヒトにおいて、特に母乳栄養を受けた乳児についての報告は少ない。先に述べた研究以外の新しい報告は否定的論文である3-5)。最近、オランダにおけるダイオキシン汚染地区、非汚染地区に居住している婦人から生まれた児の3歳半における認識機能についての研究が報告された。汚染地区の母親から生まれた児の認識機能は有意に低下していたが、母乳、人工栄養の差は見られなかった。故に、母親の妊娠期間中の汚染は避けるべきであるが、母乳栄養をやめなければならない理由はないと結論している。いずれにしても、ダイオキシン類の汚染と母乳の問題は今後十分に解析する必要があると考える。

E. 結論

4都府県80名の母親の母乳中のダイオキシン類濃度を検討した。日齢が進むにつれ、母乳中のダイオキシン類濃度は低下し、哺乳量を考えると、日齢と共にダイオキシン類の負荷は低減するものと考えられた。12-14ヵ月児の母乳栄養児と人工栄養児の甲状腺機能並びに免疫機能について検討した。全体で見たところ、両群に明らかな差は認められなかった。今後、個々の乳児のダイオキシン類負荷量と甲状腺、免疫機能を検討する予定である。

F. 文献

1. Koopman-Esseboom C, Morse D, Weisglas-Kuperus N, et al: Effects of Dioxins and Polychlorinated Biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants. *Pediatr Res* 36:468-473,1994
2. Nagayama J, Iida T, Hirakawa H, et al: Effects of lactational exposure to Chlorinated Dioxins and related chemicals on lymphocyte subpopulations and thyroid functions in Japanese babies. *Organohalogen Compounds* 302:28-233,1996
3. Weisglas-Kuperus N, Sas TJ, Koopman-Esseboom C, et al: Immunologic effects of background prenatal and postnatal exposure to Dioxins and Polychlorinated Biphenyls in Dutch infants. *Rediar Res* 38: 404 - 410,1995
4. Patandin S, Lanting CL, Mulder PG, et al: Effects of environmental exposure to Polychlorinated Biphenyls and Dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J Pediatr* 134: 33-41,1999

6. 研究結果の概要

1) 乳汁中のダイオキシン類濃度

4都府県、80名の妊婦の協力を得て、1回目(日齢6-7日)、2回目(日齢30日)、3回目(日齢150日)、4回目(日齢300日)までの母乳中ダイオキシン類の濃度を測定した。分娩後、日齢と共に乳汁中の脂肪濃度は低下しないのに関わらず、ダイオキシン類、即ちPCDDs+PCDFs、Co-PCB/pg/gfat濃度は低下していた。故に、データは示していないが、母乳100gあたりのダイオキシン類濃度は低下してくる。乳汁分泌量、哺乳量も日齢と共に低下してくるので、乳児に負荷されるダイオキシン量は日齢と共に低下することが明らかになった。各乳児毎の哺乳量、ダイオキシン負荷量は計算され、後に示す甲状腺機能、免疫機能との相関関係を検討中である。

2) 栄養法別の甲状腺機能

ダイオキシンを含む母乳栄養群と人工栄養群の血清甲状腺機能、濾紙血甲状腺機能を測定した。血清中のTSH、T3、T4、FT4共に、母乳栄養群、人工栄養群で有意な差は認められなかった。濾紙血甲状腺機能は母乳群(n=58)、人工栄養群(n=15)で比較検討したが、両群には差は認められなかった。甲状腺抗体(サイロイドテスト、マイクロソームテスト)共に全て陰性であった。

3) 栄養法別の免疫機能

両群間に明らかな異常、差異は認められなかった。

7 研究より得られた成果の活用・提供

現在、個々の乳児におけるダイオキシン類の負荷量と甲状腺機能、免疫機能について解析を進めている。少なくともダイオキシン類を多く負荷された母乳栄養群とその負荷が非常に少ない人工栄養群の間には明らかな甲状腺機能に差違は見られなかった。また、免疫系は更に詳細な検査であり、今後解析が必要であるが、異常所見を示す乳児は見られなかった。以上のことは、現時点で母乳栄養の利点を考えると、ダイオキシンのために母乳栄養を禁止しなければならない理由はないものと考えられ、広く公表すべきと考える。

8 研究の実施経過

1 平成9年から継続して行われている研究

東京都、大阪府、埼玉県、石川県の特定な2地域から協力の得られた各々10名の妊婦合計80名を対象とした。妊婦の年齢、居住地の条件、乳汁中のダイオキシン類の測定等は昨年の研究報告に示した通りである。分娩後、生後5-6日目、30日目、150日目、300日目に採乳を行った。各々の乳汁を第1回、2回、3回、4回目乳汁とした。生後12-14か月の時点で成長、発達を評価すると共に採血し、甲状腺機能、免疫機能を測定した。対照として、同じ年齢の人工栄養児の成長、発達を評価すると共に採血し、同様な検討を行った。

2. 平成10年から新たに開始された研究(新規調査研究)

上記研究に引き続き、対象を19地区に拡大して同様の検討を行う。検査項目は新たに農業5項目を加えた。また、第2子を生んだ母親の出産後30日の母乳内容の調査を行い第1子との比較検討を行う。現在、各市町村の協力を得て研究は順調に進行している。

平成 10 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する調査（指定研究）

ヒト母乳及び血清中の有機塩素系化合物の分析法開発と生体試料の分析

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学教授

分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所副所長

研究協力者 堀 伸二郎、北川 幹也 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨：1973 年から 1996 年の府下在住の授乳婦（25～29 歳の初産者のみ；各年 19～33 名）より採取した母乳中の有機塩素系化合物およびダイオキシン類の残留実態を明らかにした。また、血清中の有機塩素系化合物の高感度迅速分析法を確立し、本方法を用いて成人ヒト血清中の有機塩素系化合物の汚染濃度を明らかにした。

1996 年の母乳中の PCB(0.33 $\mu\text{g/g}$)、HCH(0.23 $\mu\text{g/g}$)および DDT 類(0.30 $\mu\text{g/g}$)濃度は、1973 年の PCB(1.43 $\mu\text{g/g}$)、HCH(3.79 $\mu\text{g/g}$)および DDT 類(3.35 $\mu\text{g/g}$)濃度対して、それぞれ、23%、6%、9%に減少した。

1996 年の母乳脂肪中ダイオキシン類およびコプラナ PCB 濃度は、1975 年のダイオキシン類およびコプラナ PCB 濃度に対して、46%および 28%に減少した。

1996 年の母乳脂肪中ダイオキシン類（16.3pg-TEQ/g）およびコプラナ PCB（7.8pg-TEQ/g）濃度は、1975 年のダイオキシン類（30.2pg-TEQ/g）およびコプラナ PCB（28.0pg-TEQ/g）濃度に対して、46%および 28%に減少した。

成人血清 34 検体のうち、全検体より PCB 類、HCB、p,p'-DDE を検出し、また 25 検体から β -HCH を検出した。総 PCB 濃度は 4.63～20.78ppb（平均：11.92ppb）、HCB 濃度は 0.07ppb～0.62ppb（平均：0.228ppb）、p,p'-DDE 濃度は 0.4ppb～14.9ppb（平均：3.68ppb）であった。 β -HCH 濃度は ND～8.1ppb（検出限界：0.1ppb 検出したものの平均：1.76ppb）であった。

A. 研究目的

現在、内分泌かく乱化学物質が社会的に問題になっている。これらの化学物質のヒトへの影響を評価する場合、これら化学物質によるヒトの汚染（蓄積）レベルを正確に把握することが重要である。また、従来とは異なる新たな問題ということもあり、可能なかぎり低濃度の分析が必要である。しかしながら、最近のこれら化学物質の汚染データはほとんど明らかにされていない。

また、内分泌かく乱化学物質の血液等の生体試

料についての微量分析法は必ずしも確立されていない。そこで本研究では、血液中の有機塩素系化合物を迅速に分析する方法を確立するとともにヒト血液中の有機塩素系化合物の汚染濃度を明らかにする。さらに、1973 年～1996 年にわたる大阪府在住者の保存母乳について、有機塩素系化合物の汚染濃度を明らかにした。

B. 研究方法

保存母乳〔1973 年から 1996 年の府下在住の授

乳婦（25～29歳の初産者のみ；各年19～33名）より採取した母乳）については、脂肪抽出後、フロリジルドライカラムで脂肪を除去した。つぎに、フロリジルカラムでクリーンアップをおこなった後、ECD-GC及びGC/MSで測定した（図1）。

血液中のPCB、DDT類、HCH等の有機塩素系化合物の迅速分析法を確立した。すなわち、ヒト血清（2ml）をヘキサン・ジエチルエーテル混液で抽出した後、抽出液をゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）でクリーンアップを行い、GC/MSで有機塩素系化合物を測定した（図2）。試料中の検出限界をPCBでは異性体ごとに、4～6塩化：25ppt、7～8塩化：5ppt、9～10塩化：1pptとし、HCH類・ヘプタクロール類・ディルドリン等およびDDT類：100ppt、HCB：10pptとした。PCBのSIMクロマトグラムを図3、4に示した。

C. 研究結果

ヒト母乳中の有機塩素系化合物およびダイオキシン類

(1) 母乳中の有機塩素系化合物濃度

1973年から1996年の府下在住の授乳婦（25～29歳の初産者のみ；各年19～33名）より採取した母乳についての有機塩素系化合物濃度を表1に示した。

1996年の母乳脂肪中のPCB(0.33 μ g/g)、HCH(0.23 μ g/g)およびDDT類(0.30 μ g/g)濃度は、1973年のPCB(1.43 μ g/g)、HCH(3.79 μ g/g)およびDDT類(3.35 μ g/g)濃度に対して、それぞれ、23%、6%、9%に減少した。また、1986年の母乳脂肪中のHCB（ヘキサクロロベンゼン）、HCE（ヘプタクロルエポキシサイド）およびクロルデン（CLD）濃度は、1986年のそれらに対して、それぞれ、25%、20%および55%に減少した。しかしながら、クロルデン防除家屋に居住していた人のCLD濃度では、依然母乳脂肪当たり0.1 μ

g/g以上の汚染母乳も認められた。

(2) 母乳中のダイオキシン(PCDD)、ベンゾフラン(PCDF)、コプラナPCB(Co-PCB)濃度

我々は1973年から1996年の大阪府在住者の母乳中のダイオキシン類の測定を行い、その経年変化を明らかにした（表1）。1996年の母乳中ダイオキシン類(16.3pg-TEQ/g)およびCo-PCB(7.8pg-TEQ/g)濃度は、1975年のダイオキシン類(30.2pg-TEQ/g)およびCo-PCB(28.0pg-TEQ/g)濃度に対して、46%および28%に減少した。

ヒト成人血清中有機塩素系化合物

当所に勤務する職員の一部（24～60歳、男性30名、女性4名）について分析を行った。全検体よりPCB、HCB、p,p'-DDEを検出し、また25検体から β -HCHを検出した（表2）。

PCB濃度は、それぞれ4塩化PCB(0.70～4.65ppb)、5塩化PCB(1.95～5.36ppb)、6塩化PCB(0.66～6.14ppb)、7塩化PCB(0.114～1.596ppb)、8塩化PCB(0.412～5.402ppb)、9塩化PCB(0.002～0.026ppb)、10塩化PCB(0.001～0.009ppb)、総PCB(4.63～20.78ppb)で、総PCBの平均値は11.92ppbであった（表2、図5）。

HCBは0.07ppb～0.62ppb（平均：0.228ppb）、p,p'-DDEは0.4ppb～14.9ppb（平均：3.6ppb）であった。 β -HCHはND～8.1ppb（検出限界：0.1ppb 検出したものの平均：1.76ppb）であった（表2、図5）。その他の塩素系化合物は検出しなかった。

D. 考察

PCBをはじめとする難分解性の有機塩素系化合物は、人体に取り込まれると体外に排泄されにくい。授乳婦のみ、母乳とともに多量に排泄することができる。したがって、母乳汚染の程度は、

初産婦では経産婦にくらべてかなり高濃度である。1992年度の初産婦60名の有機塩素系化合物（HCH、HCB、DDE、PCB）濃度を例にとると、有機塩素系化合物濃度は年齢に伴い上昇する傾向が認められた。これらの化合物は魚介類摂取等による食物連鎖によって、人体に蓄積されるため、年齢が高くなるほど人体に多く蓄積される。一方、CLD濃度は年齢との相関を示さなかった。その理由は、クロルデン防除家屋に居住していた人の家屋汚染が原因と考えられる。

平成6年度及び7年度報告（厚生省）によれば、日本における母乳中のダイオキシン類の脂肪中濃度は平均26.6pg-TEQ/g fatである。また、諸外国における母乳中のダイオキシン類濃度は、イギリス29～37pg-TEQ/g fat、ドイツ28～37pg-TEQ/g fat、カナダ16～23pg-TEQ/g fatであり、日本を含めた先進国での母乳中のダイオキシン類濃度は同程度と考えられる。

このようにダイオキシン類濃度が約20年間で半減した理由は、①環境汚染の減少に伴う食品汚染レベルの減少、②食事内容の変化、特に食材の多様化及び広域化（輸入食品の増加）等が考えられるが、現時点では分からない。

ヒト血清中のPCB濃度は4～6塩化PCBが主成分であるが、PCB濃度と年齢との間には、特に高塩素化PCBにおいて有意の正の相関がみられた。しかしながら、食事との間には相関は認められなかった。（表3、図6）また、 β -HCH、HCB、 p,p' -DDEについても同様の傾向が見られた。ただし、年齢が高くなるほどそれぞれの濃度の分散が大きくなること、肉または魚をまったく摂取しない極端な群が見られなかったことを考慮する必要があると思われる。また、PCBは、パックドGC-ECDを用いる従来の分析法に対し、今回は各異性体をキャピラリーGC/MSで測定したため、従来法による結果とは単純には比較できない。し

かしながら、暴露実態を調査するためにはできるだけ多くの情報を得ることが望ましいと考えられるため、異性体ごとのデータを収集した上で、従来法との比較・補正法を検討する必要がある。

有機塩素系化合物やダイオキシン類の内分泌かく乱作用等のヒトへの影響を考える場合、現時点での暴露だけではなく、胎児期及び乳幼児期の暴露を含めた長期的な視野で解析することが重要である。そのためには長期的な展望のもとに継続したモニタリング調査が不可欠である。

母乳 (約100 g) 500 ml分液ロート

シユウ酸カリウム 1 g (水4 mlに溶解)
エタノール 100 ml (母乳と同量)
エーテル 50 ml (母乳の半量)
ヘキサン 120 ml, shake for 10 min

ヘキサン層

2% NaCl 30 ml, shake for 5 min
水層を50 ml tubeにとり、遠心分離し、
上層をヘキサン層に加える
2% NaCl 100 mlで洗浄 (2回) 後、亡硝脱水
K.D濃縮 (20 ml 試験管) 後、さらに濃縮

乳脂肪 (正確に秤量してFat%を算出)

フロリジルドライカラム 20 g 22×300 mm

(活性化、130°C, over night)
乳脂肪 (約1.0 g) をヘキサン約3mlに溶解しのせる
N₂ガスで乾燥 (約1時間)

溶出

70% アセトニトリル/水 100 ml 1秒/1滴
受け 1 L分液ロート --- 200 ml 2% Na₂Cl
--- 120 ml ヘキサン
500 ml 2% NaCl, shake for 10 min
2% NaCl 100 mlで洗浄 (2回) 後、亡硝脱水
K.D濃縮 (5 ml 試験管)

フロリジルウェットカラム 15 g 18×300 mm

130°Cでover night 活性化
約1 cmの亡硝をのせる
10% エーテル/ヘキサン 60 mlで前洗浄

溶出

10% エーテル/ヘキサン 80 ml 1秒/2滴
受け --- 3 ml 試験管付き K.D

約0.5 mlに濃縮

δ-HCH 2 ppmを0.1 ml加える (内部標準、200 ppb)

1.0 mlにメスアップ (GC-MSでクロルデン、農薬測定)

3.0 mlにメスアップ後、2 N KOH 2 mlでアルカリ処理
水1 mlで水洗2回

フロリジルミニカラム 1 g 130°C, over night 活性化

亡硝 少々 ヘキサン 5 mlで前洗浄
2.6 mlをのせ ヘキサン 6 mlで溶出 (1 ml試験管)

1 mlに濃縮、メスアップ後、PCB測定

図1 母乳中有機塩素系化合物の分析方法

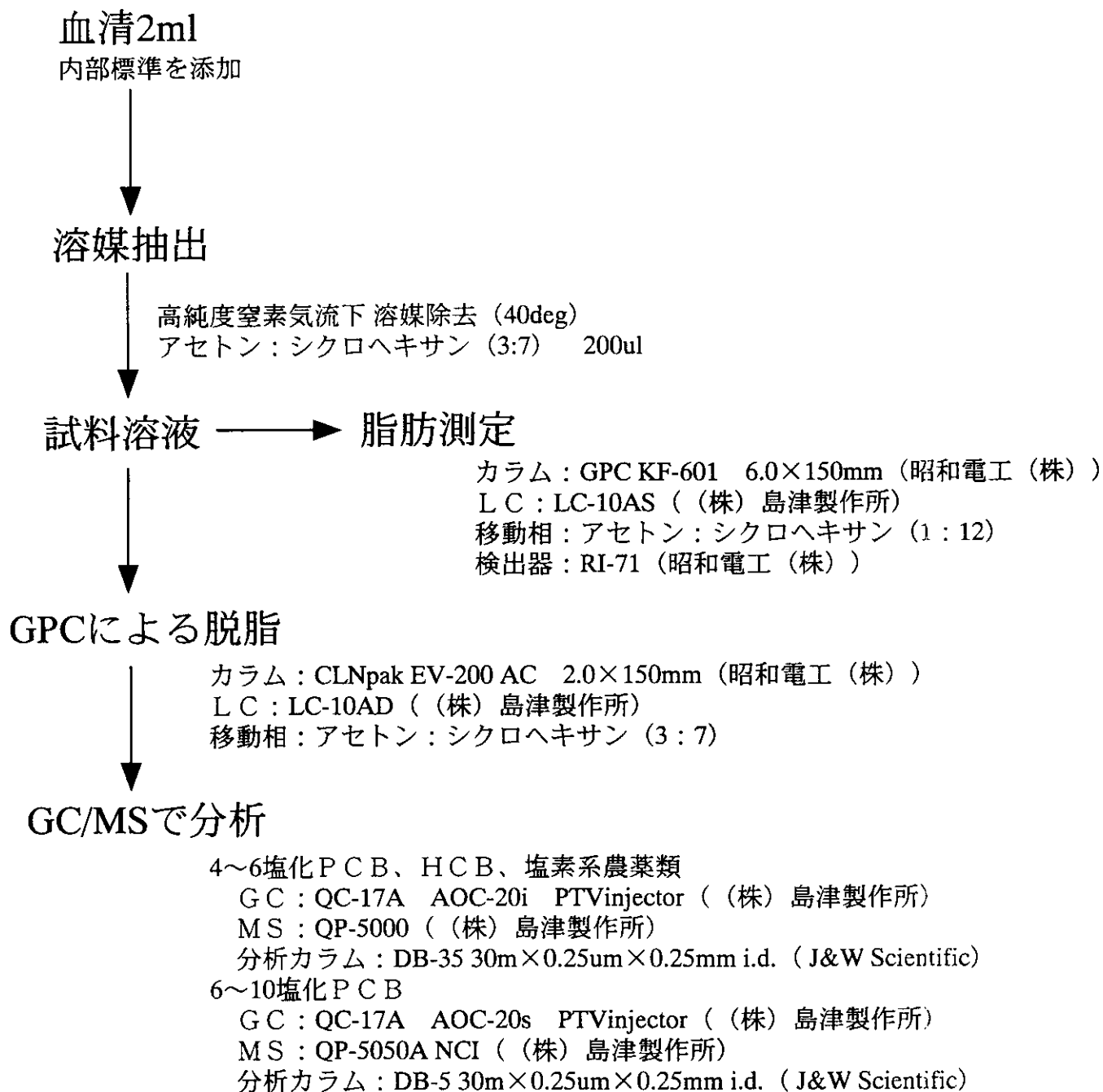


図2 血清中PCB分析法 フローチャート

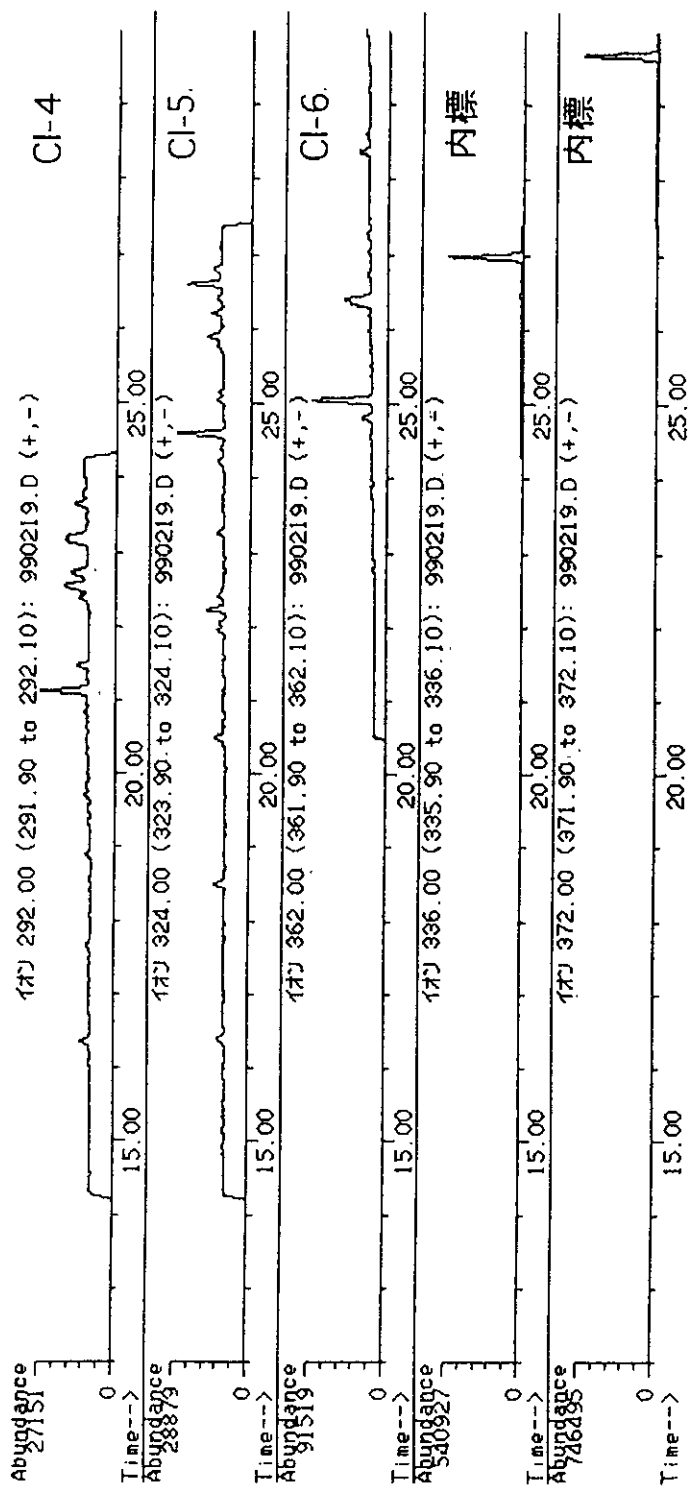


図3 試料中の4~6塩化P C B (EIによる)

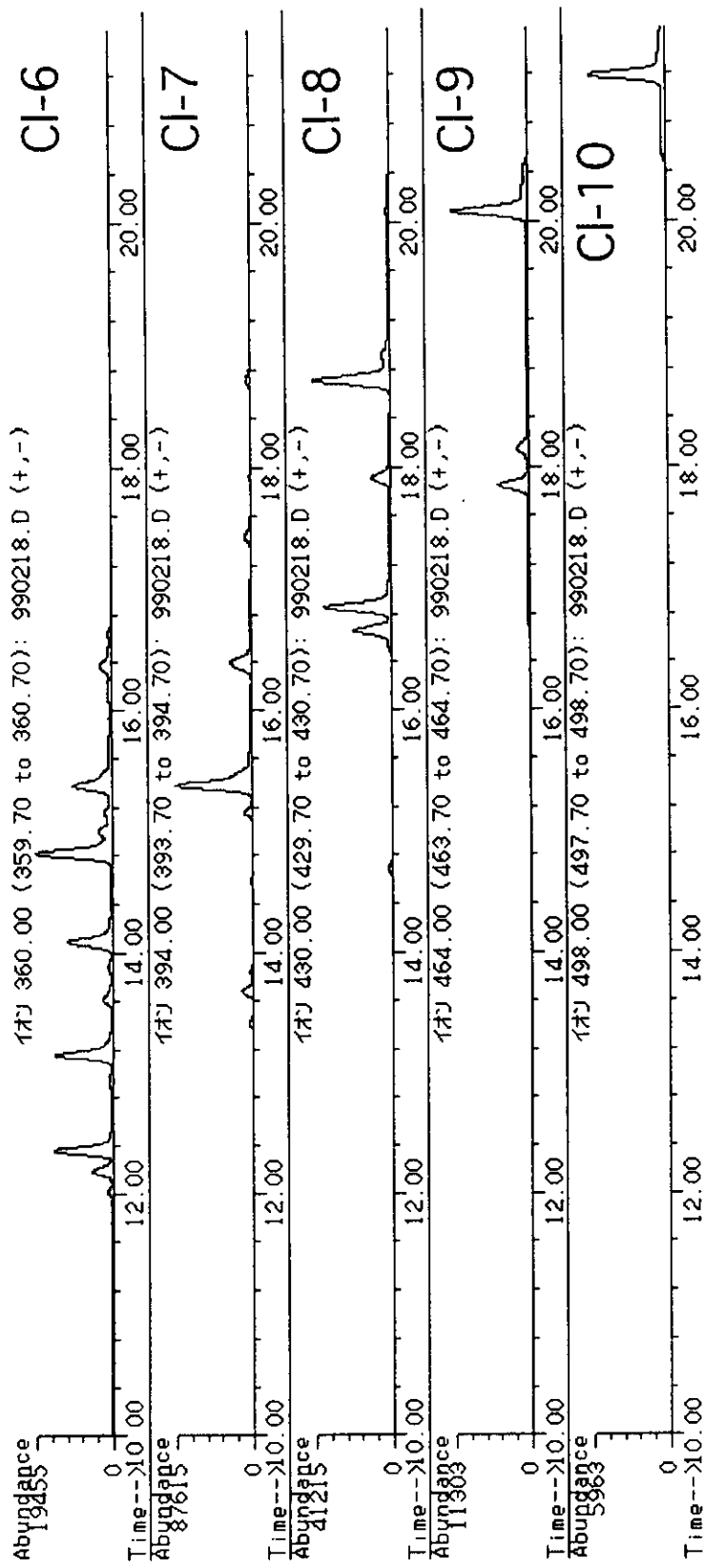


図4 試料中の6~10塩化P C B (NCI)

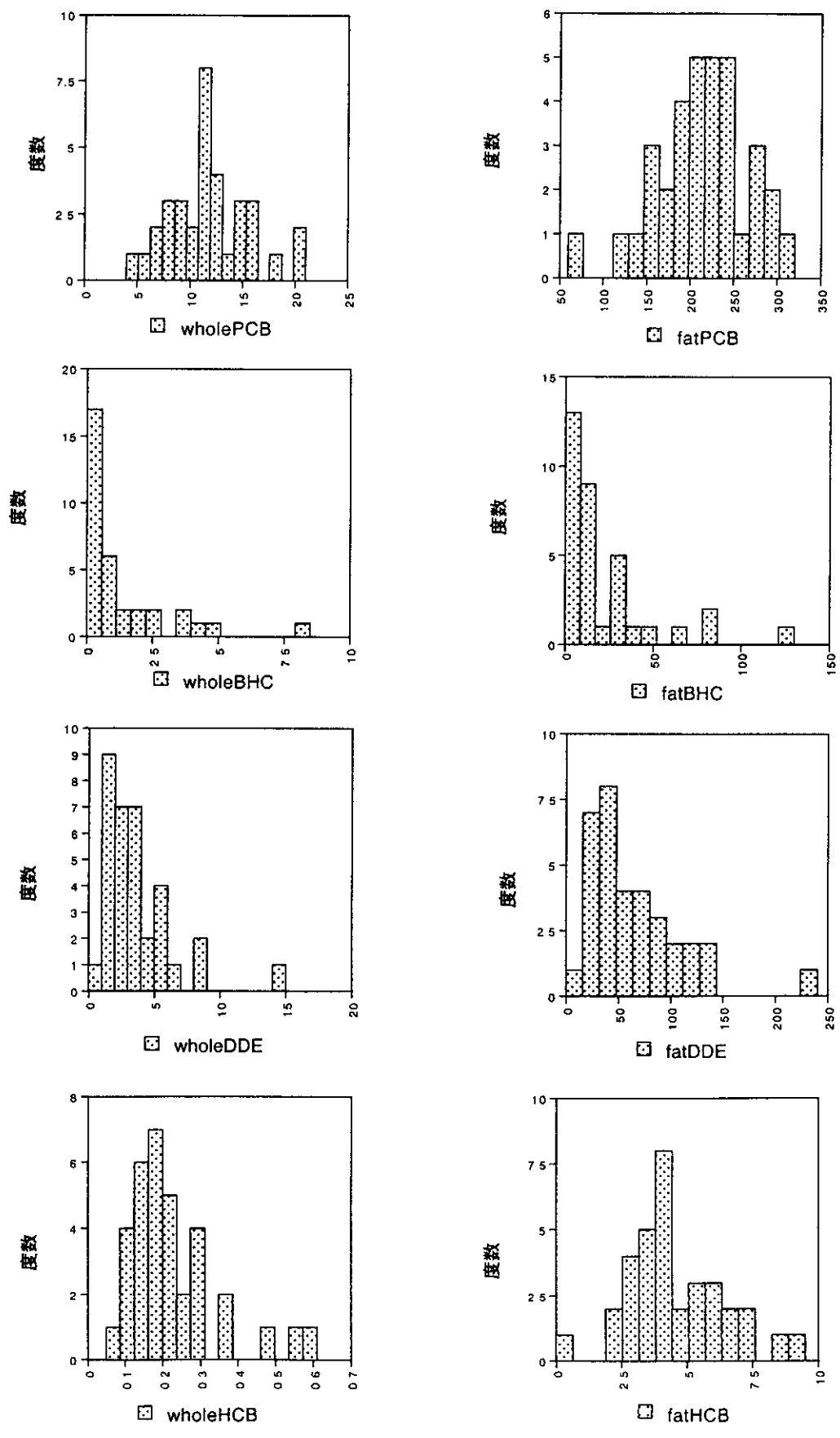


図5 血清中濃度のヒストグラム

横軸：濃度(ppb)

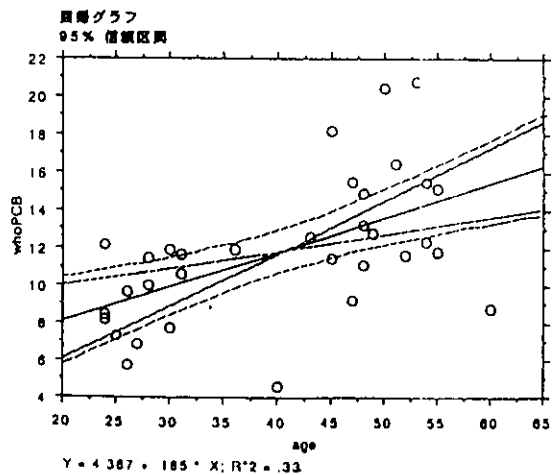
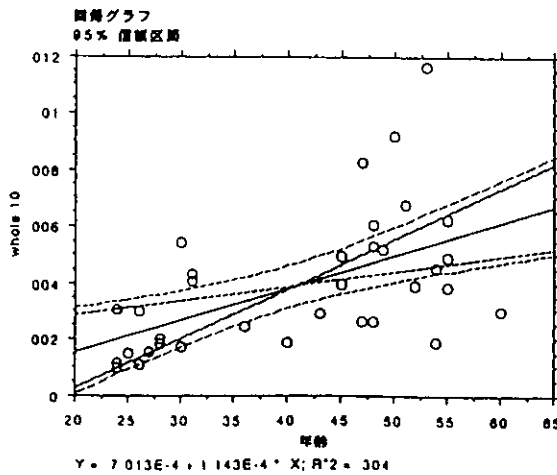
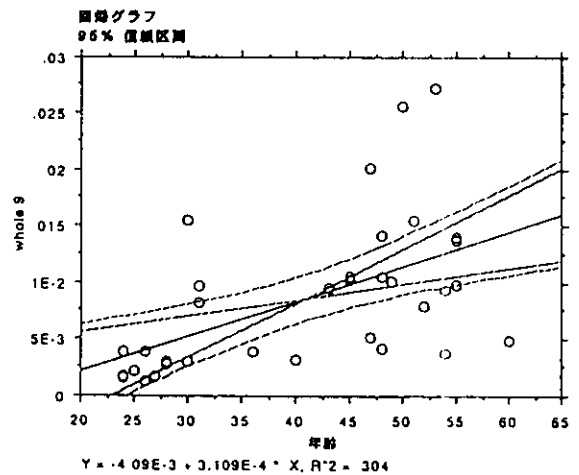
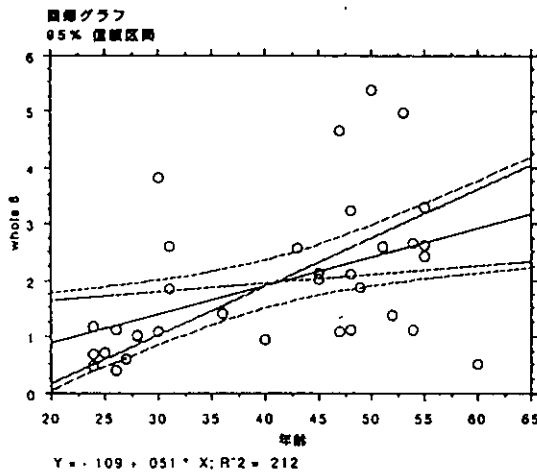
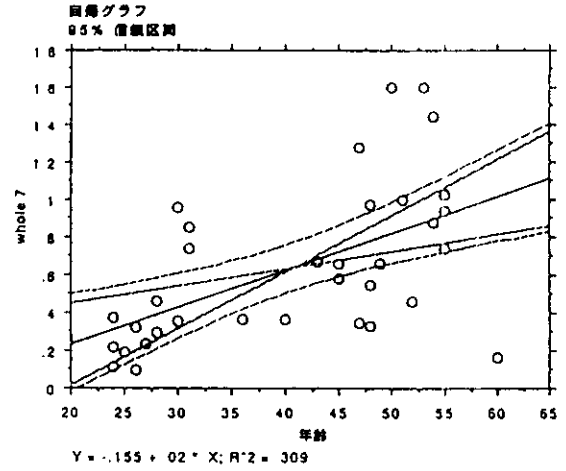
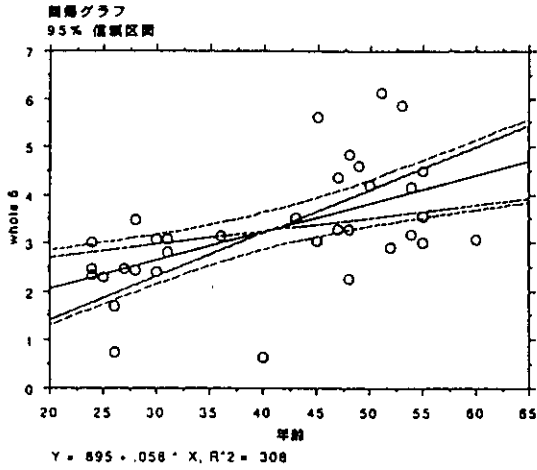
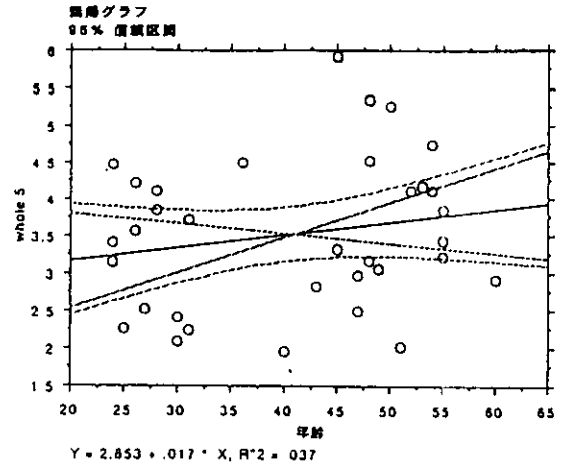
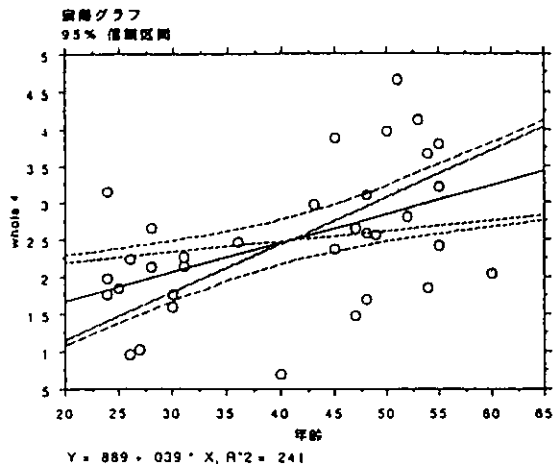


図6 血清中のPCBと年齢との関係

Table 1. Average levels (fat basis) of organochlorine compounds in human milk samples

year	PCDD pg-TEQ/g	PCDF pg-TEQ/g	PCDD+PCDF pg-TEQ/g	Co-PCB pg-TEQ/g	PCB μg/g	HCB μg/g	β-HCH μg/g	T-DDT μg/g	HCE μg/g	T-CLD μg/g
1973	14.3	11.4	25.6	31.4	1.43		3.79	3.35		
1974	14.6	17.5	32.1	31.4	1.58		7.66	2.54		
1975	15.9	14.3	30.2	28.0	1.24		3.78	2.48		
1976	13.6	12.3	25.9	23.0	1.13		4.26	5.51		
1977	12.8	13.7	26.5	22.2	1.15		2.47	2.19		
1978	13.6	13.0	26.6	25.3	1.34		2.87	2.52		
1979	13.0	13.5	26.4	20.1	1.11		3.05	2.37		
1980	11.6	11.8	23.4	16.6	1		2.87	2.3		
1981	12.7	9.8	22.5	15.6	1.04		2.27	2.14		
1982	13.3	10.3	23.7	15.0	1.04		2.27	2.99		
1983	14.1	10.1	24.2	16.4	1.17					
1984	14.4	10.2	24.6	12.7	0.89					
1985	12.2	9.1	21.3	11.1	0.74					
1986	11.4	8.2	19.6	10.9	0.67	0.04	1.52	1.21	0.038	0.11
1987										
1988	13.4	8.3	21.7	12.7	0.52	0.04	1.86	1.16	0.020	0.1
1989	14.1	7.4	21.5	11.5	0.53	0.03	1.46	0.89	0.011	0.08
1990	12.3	8.8	21.1	10.8	0.48	0.03	1.17	0.60	0.014	0.07
1991	11.1	7.4	18.5	10.7	0.36	0.04	0.88	0.75	0.006	0.07
1992	10.9	6.7	17.5	8.6	0.31	0.02	0.71	0.53	0.009	0.05
1993	11.0	6.7	17.7	8.8	0.28	0.02	0.43	0.59	0.012	0.09
1994	11.8	7.0	18.8	8.3	0.32	0.02	0.57	0.50	0.013	0.09
1995	9.3	6.3	15.6	7.9	0.28	0.02	0.31	0.34	0.014	0.07
1996	9.5	6.8	16.3	7.8	0.33	0.01	0.23	0.30	0.007	0.06

表2 血清中 P C B 濃度 (Whole Basis : ppb)

No	脂肪量 (%)	年齡	性別	食草	4塩化	5塩化	6塩化	7塩化	8塩化	9塩化	10塩化	總PCB	β-HCH	HCB	p,p'-DDE
1	0.581	48	男	肉	3.10	5.36	3.29	0.333	1.129	0.004	0.003	13.22	1.9	0.17	5.1
2	0.705	55	男	魚	3.22	3.85	4.49	0.942	2.633	0.014	0.006	15.16	0.3	0.27	3.5
3	0.545	52	男	肉魚	2.80	4.12	2.91	0.460	1.379	0.008	0.004	11.67	ND	0.20	1.3
4	0.574	49	男	肉魚	2.57	3.06	4.59	0.657	1.870	0.010	0.005	12.76	ND	0.23	3.7
5	0.511	36	男	魚	2.47	4.50	3.14	0.367	1.406	0.004	0.003	11.89	1.7	0.23	4.8
6	0.585	48	男	魚	2.59	3.18	4.85	0.972	3.243	0.014	0.006	14.84	0.8	0.18	2.6
7	0.407	24	男	魚	1.97	3.16	2.48	0.114	0.488	0.002	0.001	8.21	0.5	0.14	2.3
8	0.407	26	男	魚	0.96	3.56	0.75	0.092	0.412	0.001	0.001	5.78	ND	0.07	1.1
9	0.621	25	男	魚	1.84	2.26	2.29	0.189	0.734	0.002	0.002	7.32	ND	0.16	2.6
10	0.515	24	女	肉	3.15	4.48	3.02	0.375	1.183	0.004	0.003	12.22	0.9	0.31	6.0
11	0.662	53	男	肉魚	4.13	4.18	5.84	1.599	4.993	0.027	0.012	20.78	4.3	0.60	5.0
12	0.489	47	男	肉魚	1.48	2.97	3.28	0.345	1.098	0.005	0.003	9.18	0.8	0.15	2.4
13	0.797	51	男	魚	4.65	2.02	6.14	1.002	2.605	0.015	0.007	16.43	3.5	0.56	6.2
14	0.423	54	男	肉魚	1.85	4.73	3.17	1.444	1.139	0.004	0.002	12.34	0.7	0.12	1.4
15	0.632	48	男	肉魚	1.70	4.51	2.26	0.546	2.105	0.011	0.005	11.14	0.4	0.19	3.5
16	0.477	26	女	魚	2.25	4.22	1.68	0.324	1.129	0.004	0.003	9.61	0.3	0.25	2.0
17	0.587	45	女	肉魚	2.37	3.34	3.03	0.584	2.133	0.011	0.004	11.47	4.8	0.22	1.4
18	0.759	50	男	魚	3.97	5.26	4.20	1.596	5.402	0.026	0.009	20.47	2.4	0.29	3.6
19	0.420	28	男	魚	2.14	4.11	2.43	0.298	1.021	0.003	0.002	10.00	0.6	0.18	2.7
20	0.678	31	男	肉	2.26	3.71	3.08	0.743	1.855	0.008	0.004	11.65	0.3	0.16	1.2
21	0.445	27	男	肉魚	1.03	2.53	2.48	0.232	0.617	0.002	0.002	6.89	ND	0.11	1.2
22	0.731	28	女	肉魚	2.65	3.84	3.48	0.465	1.031	0.003	0.002	11.47	0.7	0.21	2.0
23	0.611	30	男	肉	1.59	2.41	3.09	0.956	3.832	0.016	0.006	11.89	ND	0.12	2.5
24	0.654	40	男	肉	0.70	1.95	0.66	0.369	0.958	0.003	0.002	4.63	ND	0.18	0.4
25	0.563	60	男	肉魚	2.04	2.92	3.08	0.168	0.534	0.005	0.003	8.74	ND	0.16	1.7
26	0.758	45	男	魚	3.90	5.91	5.63	0.657	2.038	0.010	0.005	18.15	2.5	0.36	8.5
27	0.572	47	男	肉魚	2.66	2.50	4.36	1.275	4.664	0.020	0.008	15.48	0.8	0.36	3.5
28	0.454	24	男	魚	1.76	3.41	2.34	0.217	0.705	0.002	0.001	8.44	ND	0.11	1.6
29	0.627	54	男	魚	3.67	4.10	4.16	0.877	2.664	0.010	0.005	15.48	1.7	0.46	8.5
30	0.375	31	男	魚	2.14	2.25	2.80	0.853	2.599	0.010	0.004	10.65	0.3	0.16	3.3
31	0.659	55	男	肉魚	3.80	3.43	3.55	1.022	3.314	0.014	0.005	15.14	8.1	0.28	14.9
32	0.312	30	男	肉魚	1.75	2.08	2.40	0.352	1.115	0.003	0.002	7.70	0.4	0.16	3.6
33	0.508	55	男	肉魚	2.41	3.21	3.01	0.737	2.441	0.010	0.004	11.83	1.8	0.15	5.4
34	0.432	43	男	肉	2.98	2.83	3.52	0.666	2.580	0.010	0.003	12.58	3.5	0.24	5.7
平均	0.562	40.9			2.49	3.53	3.28	0.642	1.972	0.009	0.004	11.92	1.8	0.23	3.7
SD	0.122	11.8			0.94	1.01	1.24	0.416	1.312	0.007	0.003	3.81	1.9	0.12	2.8

表3 2群の検定 (P値)

	4塩化	5塩化	6塩化	7塩化	8塩化	9塩化	10塩化
年齢40歳以上/未満	0.005	0.310	0.001	0.001	0.006	0.001	0.001
食事(魚/肉)	0.451	0.698	0.327	0.834	0.985	0.759	0.594

	HCB	β -HCH	p,p'-DDE
年齢40歳以上/未満	0.004	0.005	0.044
食事(魚/肉)	0.405	0.921	0.802

(n=34)

(肉中心:6 魚中心:14)

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する調査（指定研究）

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼンの分析法の開発と人由来の生体
試料の分析に関する研究

主任研究者	中澤裕之 星薬科大学
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 岡 尚男 伊藤裕子 愛知県衛生研究所

要旨

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン（HCB）の人体暴露量の調査を目的として、これらの分析法の検討を行ったところ、GC/MS を用いた高感度で選択性の高い人血清及び母乳中分析法の開発を行うことができた。人血清 36 試料、母乳 1 試料を分析したところ、血清からオキシクロルデン（ND～0.29ppb）、*trans*-クロルデン（ND～0.04ppb）、*trans*-ノナクロル（ND～0.73ppb）、*cis*-ノナクロル（ND～0.11ppb）及び HCB（ND～0.19ppb）が検出され、母乳からは、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル及び HCB が、それぞれ 0.01、0.004、0.10、0.09ppb 検出された。検出された人血清中のクロルデン関連物質及び HCB について、食事との関連を調査したところ、検出頻度及び濃度ともに食事嗜好に依存する傾向が示唆された。

A. 研究目的

クロルデン（図-1）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、最近の調査でも環境中にクロルデン、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の残留が認められている。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、図-2）は、我が国では農薬登録はなされていないが、環境中に存在し、塩素系化合物の製造原料中あるいは塩素系農薬中の不純物に由来すると推測されている。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及びHCBは、このように環境中に存在していることが明らかとなっており、さらに、内分泌かく乱作用を有することも疑われている。従って、これらの化合物の人体暴露量の調査を早急に実施する必要があると思われる。

これらの化合物の分析は一般に電子捕獲型のガスクロマトグラフィーを用いて行われているが、極微量にしか含まれない生体成分中のこれらの物質を精度よく分析するためには、高感度で選択性の高い分析法が必要となる。そこで、本研究ではガスクロマトグラフィー／質量分析法（GC/MS）を用いて高感度で選択性の高い分析法の開発を行った後、実際に人血清及び母乳に含まれるこれらの物質を分析し、人体暴露量の調

査を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

標準品として用いた *trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、オキシクロルデン、ヘプタクロルエポキシサイド及びヘキサクロロベンゼンは、林純薬工業製を用いた。その他の試薬はすべて和光純薬製残留農薬分析用を用いた。

2. GC/MS 操作条件

装置：JMS AX-505W（日本電子）

カラム：クロムパック CP-Sil 5CB-MS

(0.25 mmx30 m、0.1 µm、GL サイエンス)

カラム温度：80°Cで2分間保持し、230°Cまで毎分 15°Cで昇温する。その後、

300°Cまで毎分 20°Cで昇温の後、300°Cで10分間保持する。

注入口温度：210°C イオン源温度：210°C イオン化：EI イオン化電圧：

70 eV 試料注入量：2µL 検出方法：選択イオン検出法（SIM）

モニターイオン

クロルデン関連物質：[M-Cl]⁺

m/z 353（ヘプタクロルエポキシサイド）、m/z 387（オキシクロルデン）

m/z 373 (trans-および cis-クロルデン)

m/z 409 (trans-および cis-ノナクロル)

HCB: $M^{+\cdot}$ m/z 284

1-クロロテトラデカン: $C_{14}H_{27}Cl^+$
m/z 91

1. 試験溶液調製法

1) 人血清

スキーム 1 に示した。

2) 母乳

スキーム 2 に示した。

GPC 操作条件

カラム: Shodex CLN Pack EV2000 (2.0 cmx30cm、昭和電工)

カラム温度: 40°C

移動相: 20%アセトン-シクロヘキサン 流速: 4mL/min

分取: 試料注入後、60 から 100mL の画分を分取する。

C. 結果と考察

1. GC/MS 条件の検討

キャピラリーカラムとして、J&W DB-1、J&W DB-5、J&W DB-17 及びクロムパック CP-Sil 5CB-MS を用いて、クロルデン関連物質及び HCB の分離条件の最適化を試みた。種々の分離条件下で分離を実施したが、J&W DB-1 については HCB と内標準物質として用いた 1-クロロテトラデカンのピークがテーリングを示し

た。DB-5 については trans-クロルデンと cis-ノナクロルの分離が、J&W DB-17 ではヘプタクロルエポキシドとオキシクロルデンの分離が不十分であった。これに対し、クロムパック CP-Sil 5CB-MS を実験方法に示した昇温条件下で用いたところ、図-3 に示すように 6 種類のクロルデン関連物質及び HCB が、テーリングを示すこともなく完全に分離した。そこで、以下の実験ではキャピラリーカラムとしてクロムパック CP-Sil 5CB-MS を用いることとした。

EI 条件下でクロルデン関連物質のマスペクトルを測定すると、分子イオン ($M^{+\cdot}$) はほとんど認められず、 $[M-Cl]^+$ がベースピークあるいはそれに準ずる強度のイオンとして観察された。選択イオン検出法 (SIM) においては、イオン強度の強い目的化合物特有のイオンをモニターすることが、分析精度を向上させるために不可欠であるので、 $[M-Cl]^+$ をモニターイオンとして選択することとした。一方、HCB 及び内標準物質として用いた 1-クロロテトラデカンでは $M^{+\cdot}$ がベースピークとして認められたので、これをモニターイオンとして選択した。

実験方法に示したモニターイオンを用いて SIM により、検量線を作成したところ、ヘプタクロルエポキサ

イド及びオキシクロルデンは 1 から 100ppb の間で、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロルは 0.2 から 100ppb の間で、HCB は 0.1 から 100ppb の間で良好な直線性を示した。

以上のように、実験方法に示した GC/MS 操作条件を用いることにより、クロルデン関連物質及び HCB の分析は精度良く実施可能であった。

2. 添加回収実験

1) 人血清

血清中の濃度がそれぞれ 10ppb になるようにクロルデン関連物質及び HCB を添加した後に、実験方法に従って試験溶液を調製し、添加回収率を求めた。添加回収率を表-1 に、添加血清及びブランク血清の SIM プロファイルをそれぞれ図-4、図-5 に示した。平均回収率は 79%以上、変動係数は 4.5%以下と良好な結果が得られた。また、定量限界はヘプタクロルエポキサイド及びオキシクロルデンが 0.2ppb、*trans*、*cis*-クロルデン及び *trans*、*cis*-ノナクロルが 0.03ppb、HCB が 0.02ppb であった。これらの値は血清を精度良く分析するためには十分な回収率、精度及び定量限界と考えられる。また、ブランク血清からは、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル及び HCB が、それぞれ 0.49、0.10、0.28ppb 検出されたが、これ

らは後述する同位体存在比により該当する化合物であると同定された。

2) 母乳

本研究は人由来の生体試料の分析を目的としているので、本来は母乳を用いて添加回収実験を行う必要がある。しかしながら、今回母乳の入手には非常な困難を伴い、また、入手できた貴重な母乳試料を添加回収実験に用いることは躊躇されたので、成分の類似している牛乳を用いて添加回収実験を行った。

牛乳中濃度がそれぞれ 10 または 1.75 ppb になるようにクロルデン関連物質及び HCB を添加した後に、実験方法に従って試験溶液を調製し、添加回収率を求めた。添加回収率は表-2 に、添加牛乳及びブランク牛乳の SIM プロファイルをそれぞれ図-6、図-7 に示した。10ppb の濃度に添加した場合の平均回収率は 74%以上、変動係数は 4.7%以下と良好な結果が得られたが、1.75 ppb の場合には HCB の平均回収率が 65%と 10ppb の場合と比較して、若干低い結果であった。しかしながら、1.75 ppb という極微量の添加量を考慮すると妥当な値と考えられる。また、定量限界は脂肪中濃度としてヘプタクロルエポキサイド及びオキシクロルデンが 1ppb、*trans*、*cis*-クロルデン及び *trans*、*cis*-ノナクロルが 0.3ppb、HCB

が 0.1ppb であった。これらの数値は、実際に母乳中のクロルデン関連物質及び HCB を分析するためにも満足すべき回収率、精度及び定量限界と考えられる。

2. 生体試料の分析

1) 人血清

24 才から 60 才までの男性ボランティアの血清 31 試料、及び 24 才から 45 才までの女性ボランティアの血清 5 試料を実験方法に従って分析した。表-3 にその結果を年齢、性別、食事嗜好とともに示し、また、SIM プロファイルの代表例として図-8 に No. 13 の男性血清の例を示した。ヘプタクロルエポキサイド及び *cis*-クロルデンは全試料から全く検出されなかった。オキシクロルデンは、男性血清 2 試料からそれぞれ 0.24 及び 0.29ppb、また、*trans*-クロルデンも別の男性血清 2 試料よりともに 0.04ppb 検出された。

一方、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、HCB は多数の試料から検出された。*trans*-ノナクロルについては、男性血清 31 試料すべてから 0.05 から 0.73ppb の濃度で検出され、平均値は 0.22ppb であった。女性血清 5 試料のうち 4 試料から検出され、濃度は 0.09 から 0.15ppb の範囲であり、平均値は 0.12ppb であった。*trans*-ノナクロルが検出された全試料 (36

試料のうち 35 試料) の平均値は 0.20ppb であった。

cis-ノナクロルは、男性血清 31 試料のうち 22 試料から 0.03 から 0.11ppb の濃度で検出され、その平均値は 0.06ppb であった。女性血清からは 5 試料のうち 2 試料よりいずれも 0.04ppb 検出された。*cis*-ノナクロルが検出された全試料 (36 試料のうち 24 試料) の平均値は 0.05ppb であった。

HCB は男性血清 31 試料のうち 25 試料に、0.03 から 0.19ppb の濃度で検出され、平均値は 0.09ppb であった。女性血清については 4 試料から 0.07 から 0.14ppb 検出され、平均値は 0.10ppb であった。また、HCB が検出された全試料 (36 試料のうち 29 試料) の平均値は 0.09ppb であった。

次に、年齢あるいは食事の嗜好とこれら物質の検出頻度及び平均濃度を比較した。その結果、年齢についてはいずれの化合物との相関性は見いだせなかったが、食事嗜好に関してはつぎに示すような知見を得ることができた。即ち、*cis*-ノナクロルについては、フィッシャーのカイ二乗検定の結果、5%未満の危険率で魚を好む人 (検出頻度：78.6%) と肉を好む人 (検出頻度：16.6%) の間に有意な差が認められた ($p=0.018$)。また、*trans*-ノナクロルの平均濃度が