

厚生科学研究費補助金

厚生科学特別研究事業（生活安全総合研究事業）

内分泌かく乱物質の小児、成人等の汚染実態および暴露に関する調査研究

平成11年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 秦 順一

平成12年（2000年）4月7日

目 次

I. 総括研究報告	
内分泌かく乱物質の小児、成人等の汚染実態および暴露に関する調査研究	1
秦 順一	
II. 分担研究報告	
1. ダイオキシン、コプラナ PCB、農薬等の暴露調査	2
渡辺 昌	
2. PCB, HCB 等の暴露調査	3
飯田隆雄	
3. TBT、重金属、有機塩素等の暴露調査	4
田辺信介	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	5
IV. 研究成果の刊行物・別冊	6

内分泌かく乱物質の小児、成人等の汚染実態および暴露に関する調査研究

主任研究者 秦 順一 慶応義塾大学医学部病理学教室 教授

研究要旨:日本人の各種臓器における内分泌かく乱物質の暴露状況を把握し、特定の疾患や病態と蓄積の相関関係を得るための基礎データとすることを目的とし、インフォームド Consentのもとに、剖検症例の主要臓器、血液、胆汁を採取し、内分泌かく乱物質 (PCB、ダイオキシン類、有機塩素系化合物と総スズ (有機体 + 無機体)、ブチルスズ3化合物) を測定した。同一症例における血液、肝、胆汁における内分泌かく乱物質の濃度を測定したところ、血液と胆汁での濃度がよく相関し、さらに肝では脂肪重量あたりの濃度が血液、胆汁よりも高い傾向が明らかとなった。この知見はヒトにおける内分泌かく乱物質の代謝経路について重要な示唆を与えるものである。またPCBの体内蓄積量は、ダイオキシン類より数桁多く、PCB自体の直接的な人体への毒性だけでなく、ダイオキシン類等他の内分泌かく乱物質の人体への複合的な毒性を考える必要性が明らかとなった。

分担研究者

渡辺 昌 東京農業大学応用生物科学部 教授

飯田隆雄 福岡県保健環境研究所 部長

田辺信介 愛媛大学沿岸環境科学研究センター 教授

A. 研究目的

内分泌かく乱物質は、農薬やプラスチック、PCB等の生産過程や廃棄物の処理過程等で発生すると考えられているが、人体において、その影響がどの程度起こりえているのかを評価することが必要不可欠である。本研究は、1) 成人および小児の各種臓器の暴露状況を把握し、2) 特定の疾患や病態と蓄積の相関関係を得るための基礎データとする、ことを目的としたものである。さらに我が国におけるバックグラウンド値を明らかにすることによって、人体影響データを比較するためのデータベースが構築される。

B. 研究方法

1) インフォームド Consentのもとに、剖検症例の主要臓器 (項部脂肪組織 (褐色脂肪に相当)、腋窩脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腹壁脂肪組織、下垂体、脳 (開頭症例のみ)、肝、脾、腎、膵、胃粘膜、上行結腸粘膜、乳腺、骨髄)、血液、胆汁を採取する。現在までに、135例の剖検例について、各種臓器・組織のファイリングを終了するとともに、臨床経過、臨床化学データ、病理解剖診断についてファイリングしている。

2) 臓器・組織に含有される内分泌かく乱物質 (PCB, HCB, コプラナおよびモノオルト PCB、ダイオキシン類、ブチル化スズ化合物、HCH, DDT、重金属、微量元素) を測定し、標準的なバックグラウンド暴露値を年齢、階級、性別に得る。測定は、脂質抽出、クリーンアップ後、高分解能ガスクロマトグラフ、二重収束型質量分析計あるいは GCMS で行う。

(倫理面への配慮)

剖検にあたって研究対象者に対する人権擁護上の配慮および研究方法による研究対象者に対する利益・不利益等の説明を遺族に対して行い、インフォームド Consentを得て、遺族の同意の署名を剖検承諾書へ記入していただいている。

C. 結果

剖検症例の肝 (22検体) および腸間膜脂肪 (22検体) における mono-ortho PCB (8種類) と di-ortho PCB (2種類) を測定したところ、脂肪重量あたりの mono-ortho PCB 平均値は TEQ 表記で、それぞれ 31.0、43.0 pg/g であり、肝は脂肪組織の約 2/3 であった。剖検症例の肝 (22検体) および腸間膜脂肪 (22検

体) における mono-ortho PCB (8種類) と di-ortho PCB (2種類) を測定したところ、脂肪重量あたりの mono-ortho PCB 平均値は TEQ 表記で、それぞれ 31.0、43.0 pg/g であり、肝は脂肪組織の約 2/3 であった。27 症例の肝、胆汁および血液におけるダイオキシン、フラン類とコプラナ PCB (non-ortho 3種類) を測定したところ、平均 TEQ 値でそれぞれ肝 (73.2、46.6、38.0)、胆汁 (11.5、18.0、13.7)、血液 (11.6、18.1、13.5) であった。胆汁におけるダイオキシン、フラン類、コプラナ PCB の蓄積は、血液における蓄積と相関した。胆汁についてのダイオキシン異性体パターンでは、OCDD が一番高濃度であり PePB, HxCB がそれに続き、さらに 1,2,3,6,7,8 HxCDD, TeCB, 2,3,4,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,6,7,8HpCDD が高い傾向を示し、ダイオキシン類の体内循環に示唆をあたえる所見を得た。次に肝、胆汁および腸間膜脂肪組織 (8症例) について、有機スズ化合物を測定したところ、モノブチルスズ MBT およびジブチルスズ DBT は、肝臓湿重量あたりそれぞれ 6 以下より 28、6.5 から 71 ng cation/g であり、トリブチルスズ TBT はいずれも検出限界以下から 3.4 ng cation/g であった。胆汁では 6~21、1~13、検出限界以下から 3.0 ng cation/g であった。また胆汁からは、tris(4-chlorophenyl) methane (TCPMe) が検出された (5~150 ng/fatg)。

D. 考察

同一症例における血液、肝、胆汁における内分泌かく乱物質の濃度が測定できたことから、血液と胆汁での濃度がよく相関し、さらに肝では脂肪重量あたりの濃度が血液、胆汁よりも高い傾向が明らかとなった。この知見はヒトにおける内分泌かく乱物質の代謝経路について重要な示唆を与えるものである。また PCB、有機塩素系化合物、有機スズ化合物いずれもが、平均値の 10 倍程度の高濃度の蓄積を認めた膵臓癌症例が一例見いだされた。今後、このような高濃度の蓄積が見られた症例について、臨床化学、血液データや剖検診断との関連を詳細に検討していく予定である。

D. 研究発表

1) Kitamura K, Watanabe S, Nagahashi M, Miki T, Yamada T, Hata J. (1999) Concentration of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and their related compounds in the human bile in relation to those in the liver and blood. *Organohalogen* 44: 55-59.

2) Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J and Watanabe S (2000) Occurrence of tris(4-chlorophenyl) methane, tris(4-chlorophenyl) methanol and some other persistent organochlorines in Japanese human adipose tissue. *Environ. Health Perspect.* 108 (in press).

ダイオキシン、コプラナPCB、農薬等の暴露調査

分担研究者 渡辺 昌 東京農業大学応用生物科学部・疫学、栄養学 教授

研究要旨:ダイオキシン類は異性体ごとに代謝経路が異なることが予想されるため、体内分布への違いを血液と肝臓で比較検討し、特に胆汁中への排泄状況も検討した。27検体の分析結果では血液、胆汁のダイオキシン類濃度はそれぞれ 42.6 ± 24.3 pg TEQ /gfat、 43.4 ± 30.8 pgTEQ /gfatでほぼ同様の濃度であった。肝臓中は 127.2 ± 53.4 pg TEQ /gfatで血液、胆汁に比べ約3倍の濃度であった。ダイオキシン異性体パターンでは、OCDDが一番高濃度でありPePB,HxCBがそれに続いた。またヒト胆汁中のダイオキシン類の濃度が測定できたことは、ダイオキシンの排泄・代謝を知るうえで、意義深いものである。

A. 研究目的

ダイオキシン類は、大量暴露後の追跡調査によるヒト発ガン性や動物実験等で強い毒性を有することが明らかになっている。しかし、我が国のような低濃度慢性的暴露が続いた場合のヒト生体への影響はまだ明らかにされていない。そこで、本研究では解剖例を用い人体の各種臓器の暴露状況を把握し、ダイオキシン類が人体にどのように分布しているかを研究した。異性体ごとに代謝経路が異なることが予想されるため、体内分布への違いを血液と肝臓で比較検討し、特に胆汁中への排泄状況も検討した。

B. 研究方法

血液は -80°C に凍結保存された心残血50 mlを用い、硫酸・エタノール・ヘキサン(1:3:1 v/v)溶液による抽出をおこなった。肝臓は、1~2 g、胆汁は50 mlを用い、アセトン・ヘキサン(2:1 v/v)溶液により抽出した。内標準物質は、13Cでラベルした6種のPCDDs、9種のPCDFsおよび3種のCo-PCBsの混合液各30 pg(OCDDsのみ60 pg)を前述したように抽出前に加えた。カラムクリーンアップは多層シリカゲルクロマトグラフィー(下から2%水酸化カリウムシリカゲル2 g、無水硫酸ナトリウム0.8 g、44%硫酸シリカゲル3 g、22%硫酸シリカゲル4 g、無水硫酸ナトリウム0.8 g、10%硝酸銀シリカゲル2 g、無水硫酸ナトリウム0.8 g)に、得られた脂質をヘキサンに溶解後添加し、n-ヘキサン150 mlにより溶出し精製した。溶出液は、ロータリーエバポレーターにより約1mlに濃縮し、活性炭カラム(活性炭:無水硫酸ナトリウム=1:1000)により第一分画および第二分画に分別精製した。第一分画には10%ジクロロメタン/n-ヘキサン50 mlによりPCBsを、第二分画にはトルエン150 mlによりPCDDs、PCDFおよびCo-PCBsを溶出させた。第二分画の溶出液はロータリーエバポレーターにより約1 mlに濃縮し、窒素下において蒸発乾固した。高分解能GC/MSによる測定は上記のサンプルに、内標準物質13C1,2,3,4-TCDDおよび13C121,2,3,7,8,9-HxCDDの混合液を加え、n-ノナン溶液(5ul)とした。この溶液をGC/MSを用いたSelected Ion Monitoring法により、定量分析した。

C. 結果

27検体の分析結果では血液、胆汁のダイオキシン類濃度はそれぞれ 42.6 ± 24.3 pg TEQ /gfat、 43.4 ± 30.8 pgTEQ /gfatでほぼ同様の濃度であった。肝臓中は 127.2 ± 53.4 pg TEQ /gfatで血液、胆汁に比べ約3倍の濃度であった。これまでヒト胆汁中のダイオキシン類の量が排泄されるのかは不明であったことから貴重なデータを得た。剖検時の血液も住民の血液測定結果とほぼ同じくOCDDが高濃度であり、PCB126,169が続いた。胆汁についてのダイオキシン異性体パターンでは、OCDDが一番高濃度でありPePB,HxCBがそれに続いた。

その次に1,2,3,6,7,8 HxCDD, TeCB, 2,3,4,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,6,7,8HpCDDが高い傾向を示した。各異性体パターンはほぼ血液に似ているがHxCDF, HpCDFでは血液の約2/1の濃度、HxCDDでは血液の約2/3の濃度、HpCDD, OCDDで約1/2の濃度、TeCBでは約1/2の濃度でその他の異性体はほぼ同等の濃度であった。肝臓ではPCDDs、コプラナーPCBsともに、全般的に濃度が高く OCDD, PeCB, HxCB, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, 1,2,3,6,7,8HxCDD, TeCB, 2,3,4,7,8-PeCDDと続いた。1,2,3,4,6,7,8-HpCDFは胆汁の約20倍、血液の10倍の濃度があり、1,2,3,4,7,8,9-HpCDFは胆汁の10倍、血液の8倍、OCDDに関しては血液の約5倍、胆汁の約9倍の濃度であった。全般的な濃度パターンは血液、胆汁に似ていることより胆汁、血液に比べ数倍から10倍以上の濃縮がされていることと、TEQで評価した場合のPCDFs、PCDDs、Co-PCBs、Total-TEQいずれもが血液、胆汁いずれものTEQに対して約3倍のTEQであることより、肝臓内で代謝を受けにくいと考えられた。人体試料例の年齢幅は20~90歳までと広いが、年齢による増加が明らかであった。またダイオキシン類の10年毎の肝臓での蓄積を回帰式にあてはめて概算するとPCDDが16.3pgTEQ/gfat, PCDDが9.0pgTEQ/gfat, Co-PCBが15.0pg/gfatとなった。PCDD/Fで数年から12年、PCBにいたっては50年近い半減期と言われているため、このような長期間にわたる蓄積による健康影響の有無が今後の課題である。ダイオキシン類の一部は、水酸化やグルクロン酸抱合され糞便や尿中に排泄されると考えられているため、その同定も今後検討しなければならない。異性体のうち極性が低いものほど脂質成分へ溶解しやすく、高いものほどAhレセプターやタンパク質類などへ結合し易いと考えられ、これらの事も踏まえ、脂肪サンプルや多臓器の測定を行い、検体数を増やすことにより、体内分布を明らかにする必要がある。

D. 研究発表

論文発表

- 1) Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J and Watanabe S (2000) Occurrence of tris(4-chlorophenyl) methane, tris(4-chlorophenyl) methanol and some other persistent organochlorines in Japanese human adipose tissue. Environ. Health Perspect. 108 (in press).
- 2) Watanabe S, Kitamura K, Nagahashi M (1999) Effects of dioxins on human health : A rebiew. J Epidemiology 9:1-13.

PCB, HCB等の暴露調査

分担研究者 飯田隆雄 福岡県保健環境研究所 部長

研究要旨：環境汚染問題で国内外に関心が高いダイオキシン類中のPCB類、特にWHO等でTEFが策定されているMono-及びDi-ortho-PCBsを対象とし、PCBsが比較的蓄積されやすいと考えられるヒト肝臓及び脂肪組織中のレベルを調査した。その結果、すべての検体中で2,2',3,4,4',5,5'-HpCBが最も高く次いで2,2',3,3',4,4',5-HpCB, 2,3',4,4',5-PenCB, 2,3,3',4,4',5-HexCBの順で高かった。TEQ換算値で比較すると脂肪組織中の総Mono-及びDi-ortho-PCBsのTEQ換算値は肝臓中の約15倍で、脂肪重量あたりでは約1.4倍であった。

A. 研究目的

ダイオキシン類や一部の化学物質が極微量で内分泌系を攪乱し、ヒトの健康に影響を与える危険性が指摘され、試験法の改良や基準の見直し等が国際的なレベルで進んでいる。この問題は、科学的に未解明な点が多く、未だに確定試験法は確立されていない。これらの物質の正確なリスク評価や暴露評価を行うには、早急な試験法ならびに影響評価法の確立が望まれる。我々は、平成10年度に続き、環境汚染問題で国内外に関心が高いダイオキシン類中のPCB類、特にWHO等でTEFが策定されているMono-及びDi-ortho-PCBsを対象とし、PCBsが比較的蓄積されやすいと考えられるヒト肝臓及び脂肪組織中のレベルを調査した。

B. 研究方法

1) 材料

ヒト解剖検体である、肝臓（22件）及び腸間膜脂肪組織（22件）を分析対象とした。

2) 試薬

Table1示した10種類のPCBs標準品はAccuStandard社製を、内部標準物質には¹³C¹²標識PC8s(Wellington社製)を用いた。その他の試薬はダイオキシン分析用または残留農薬

分析用を使用した。蒸留水はヘキサンで1回洗浄したものを使用した。

3) 方法

50mLの遠沈管に肝臓、脂肪組織及び内部標準物質を添加し、アセトン・ヘキサン（2：1）20mLを加え、ポリトロン（キネマティカ社製）で攪拌抽出した後、10分間遠心分離（2500rpm）した。シャフトはアセトン・ヘキサン30mLで洗い、残渣に加え、超音波抽出を5分間行い、同様に遠心分離した。アセトン・ヘキサン層は蒸留水10mLを加え、洗浄し、その操作を2回繰り返した。残渣はアセトン・ヘキサン10mLを用いて再抽出し、蒸留水10mLで再度洗浄した。洗浄されたアセトン・ヘキサン層を合わせ、濃縮した後に脂肪重量を測定した。その後、抽出した試料を5mLのヘキサンに溶解し、濃硫酸2mLで処理した。次に、10分間遠心分離（2500rpm）を行い、そのヘキサン層を10%（w/w）硝酸銀・シリカゲル2gをヘキサンで

乾式充填したカラムに流し、ヘキサン100mLで溶出した。抽出したヘキサンを1mLに濃縮し、GC-MSを用いて分析した。

C. 研究結果

ヒト肝臓（22件）及び腸間膜脂肪組織（22件）中のMono-（8種）及びDi-orthoPCBs（2種）を測定した。すべての検体中で2, 2', 3, 4, 4', 5, 5'-HpCBが最も高く・次いで・2, 2', 3, 3', 4, 4', 5-HpCB, 2, 3', 4, 4', 5-PenCB, 2, 3, 3', 4, 4', 5-HexCBの順で高かった。肝臓中の総Mono-及びDi-ortho-PCBsは脂肪組織中の約1/16であったが・脂肪重量あたりでは約2/3であった。TEQ換算値で比較した場合も濃度で比較した場合と比べ、大きな変化はみられず、脂肪組織中の総Mono-及びDi-ortho-PCBsのTEQ換算値は肝臓中の約15倍で、脂肪重量あたりでは約1.4倍であった。肝臓および腸間膜脂肪組織中の各Mono-及びDi-ortho-PCBsの構成比では、数値に若干の差がみられるほかは平成10年度の結果と比較しても大きな変化はみられなかった。それは、脂肪重量あたりに換算しても同じであった。

D. 考察

今回得られたデータは、平成10年度に比べ、肝臓および腸間膜脂肪中の各Mono-及びDi-ortho-PCBsの構成比の差はほとんどなく、おおむね、このようなPCB異性体がヒトの肝臓および脂肪中に普遍的に蓄積されているだろうと考えられる。今後、他のダイオキシン類（PCDDs, PCDFs及びCoplanarPCBs）の分析データと併せて総合的なリスク評価を行う必要性がある。

TBT、重金属、有機塩素等の暴露調査

分担研究者 田辺信介 愛媛大学沿岸環境科学研究センター 教授

研究要旨：日本人の各種臓器における内分泌かく乱物質の暴露状況を把握し、特定の疾患や病態と蓄積の相関関係を得るための基礎データとすることを目的とし、インフォームドコンセントのもとに、剖検症例の脂肪組織、肝臓、胆汁を採取し、内分泌かく乱物質（有機塩素系の環境ホルモン7化合物と総スズ（有機体+無機体）、ブチルスズ3化合物）を測定した。その結果、すべての症例の脂肪組織から DDTs \geq PCBs $>$ HCHs $>$ CHLs $>$ HCB $>$ TCPMe $>$ TCPMOH の濃度順位で有機塩素系環境ホルモンが検出された。また胆汁からも有機塩素化合物が検出され、脂肪重当りの残留濃度は体腔内脂肪と同レベルであった。ブチルスズ化合物の中では、TBT（トリブチルスズ）よりも DBT（ジブチルスズ）や MBT（モノブチルスズ）の残留濃度が高く、総量の90%以上を占めていた。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質は、農薬やプラスチック、PCB等の生産過程や廃棄物の処理過程等で発生すると考えられているが、人体において、その影響がどの程度起こりえているのかを評価することが必要不可欠である。本研究は、なかでも生活必需品から非意図的に産出される内分泌かく乱分子のなかで、特に有機塩素系の環境ホルモン7化合物と総スズ（有機体+無機体）、ブチルスズ3化合物について暴露状況を明らかにするものである。

B. 研究方法

東京および近郊に在住するヒトの体腔内脂肪8検体もしくは肝臓8検体、胆汁8検体について、有機塩素系の環境ホルモン7化合物と総スズ（有機体+無機体）、ブチルスズ3化合物を分析した。有機塩素化合物の分析は、試料をヘキサン・ジエチルエーテル混液中で抽出、フロリシルドライカラムによる脱脂、フロリシルウエットカラムによる分画の後、GC-ECDにより定量した。ブチルスズ化合物の分析は、トロポロン・アセトンによる抽出、フロリシルカラムによるクリーンアップの後、GC-FPDにより定量した。総スズの分析は硝酸で抽出後、ICP-MSで測定した。

C. 結果と考察

分析に供したすべての体腔内脂肪から有機塩素化合物が検出され、DDTs \geq PCBs $>$ HCHs $>$ CHLs $>$ HCB $>$ TCPMe $>$ TCPMOH の濃度順位であった。興味深いことに、胆汁からも有機塩素化合物が検出され、脂肪重当りの残留濃度は体腔内脂肪と同レベルであった。これらのことは、有機塩素化合物が脂肪依存性の体内分配をし、胆汁が有機塩素化合物の排泄経路として機能していることを示唆している。

総スズやブチルスズ化合物も分析に供したすべての人体試料（肝臓・胆汁）から検出され、ヒトへの暴露および蓄積が明らかとなった。ブチルスズ化合物の中では、TBT（トリブチルスズ）よりも DBT（ジブチルスズ）や MBT（モノブ

チルスズ）の残留濃度が高く、総量の90%以上を占めていた。これは、海産物から摂取したTBTが代謝されたものに加え、日用品からのDBT暴露を反映したものと考えられる。総スズ残留濃度に占めるブチルスズ化合物の割合は、0.4-30%と極めて低かった。このことは、無機スズの存在が大きい可能性も考えられるが、一方で日用品に使用されている他の有機スズ化合物、例えばオクチルスズ化合物汚染の進行を示唆している。今後、ブチルスズ化合物以外の有機スズ化合物の分析が必要であろう。

D. 研究発表

学会発表

1) 高橋 真, 四宮基彦, 村岡正義, 向井博幸, 田辺信介, 秦 順一, 山田健人, 坂山憲史, 宮崎龍彦, 升野博志: 陸棲高等動物におけるブチルスズ化合物汚染の特徴と汚染源の推定, 内分泌攪乱化学物質学会 第二回研究発表会, 神戸, 1999年12月, 要旨集 p3.

2) Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J and Watanabe S (2000) Occurrence of tris(4-chlorophenyl) methane, tris(4-chlorophenyl) methanol and some other persistent organochlorines in Japanese human adipose tissue., 内分泌攪乱化学物質学会 第二回研究発表会, 神戸, 1999年12月, 要旨集 p3.

論文発表

1) Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J and Watanabe S (2000) Occurrence of tris(4-chlorophenyl) methane, tris(4-chlorophenyl) methanol and some other persistent organochlorines in Japanese human adipose tissue. Environ. Health Perspect. 108 (in press).

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe S, Kitamura K, Nagahashi M	Effects of dioxins on human health:A review.	J Epidemiology	9	1-13	1999
Kitamura K, Watanabe S, Yamada T, Hata J	Concentration of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and their	Orphanohalogen	44	55-59	2000
Minh TB, Tanabe S, Yamada T, Hata J, Watanabe S	Occurence of Tris(4- chlorophenyl)methane, Tris(4- chlorophenyl)methanol and some other persistent Organochlorides in Japanese human adipose tissue.	Environmental Health Perspectives	in press		2000

19990694

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。