

コルチゾール産生を抑制することが考えられる化合物である。各種パラヒドロキシ安息香酸エステルは防腐剤として食品や化粧品中に含まれており、ヒトが暴露される可能性が十分にある化合物である。これらの化合物は  $10 \mu\text{g/mL}$  の高濃度ではあるが本アッセイ系においてコルチゾール産生を抑制することを認め、エステル部分が長くなるにつれてその傾向は大きかった。植物エストロゲンと呼ばれるダイゼインやゲニステインまたはそれらの配糖体であるダイジンやゲニスチンは大豆製品に多量に含まれることから、これらもヒトにおける暴露が十分考えられる化合物である。本アッセイ系においてダイゼインやゲニステインがコルチゾール産生を抑制することを認めた。しかし、それらの配糖体であるダイジンやゲニスチンは何ら作用を及ぼさなかった。また天然のエストロゲンであるエストラジオール  $17\beta$  が比較的高濃度で H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制することおよびその作用機序として受容体を介した作用では無いことが報告されている。本実験で得られたダイゼインやゲニステインが H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制することに関する作用機序は現在不明である。近年になりステロイドホルモン生合成に関与する酵素群がクローニングされそれらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細が分子レベルで明らかにされつつある。本研究を発展させることにより、ステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を細胞レベル、分子レベルで解明することが可能となる。

#### E. 結論

ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす環境由来の化学物質の影響を解明する目的で、ヒト副腎皮質由来の H295R 細胞を用いて、アッセイ法の基礎的検討を行い、方法を確率した。このアッセイ法を用い農薬 DDT とその代謝物、ジコホル、クロルデンおよびヘキサクロルベンゼンの影響、各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類の影響、および植物エストロゲンであるダイゼイン、ゲニステインおよびそれらの配糖体であるダイジン、ゲニスチンの影響を検討し、高濃度ではあ

るがコルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定することができた。

#### F. 研究業績

学会発表

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす DDT とその代謝物の影響：中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之 (星薬大・薬)、牧野恒久 (東海大・医)、日本内分泌攪乱化学物質学会第 2 回研究発表会、12、1999、神戸

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（臍帯血等）分析法の開発とその実試料分析結果  
に基づくヒト健康影響についての研究

ヒト由来乳癌細胞を用いた内分泌かく乱物質の簡便で高精度のアッセイ系の確立の研究

主任研究者： 牧野 恒久  
東海大学医学部教授

分担研究者： 中澤 裕之  
星薬科大学教授

研究協力者： 山崎 聖美  
国立公衆衛生院

研究要旨

近年、生活環境中の化学物質の安全性について内分泌かく乱作用という新しい観点で評価する必要性が生じている。スクリーニングの一つにヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法である E-SCREEN Assay がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的として研究を行った。そして、高分子素材由来の化学物質について評価を行った。

A. 研究目的

近年、生活環境中の化学物質が、微量で生物に作用し、生殖機能等に影響していると指摘されている。殺虫剤等の農薬、プラスチック等の高分子素材に関連する化学物質の安全性について内分泌攪乱作用という新しい観点で評価する必要性が生じている。既に内分泌攪乱化学物質のスクリーニングには、*in vitro*、*in vivo* で様々な方法が報告されているが、その一つにヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法である E-SCREEN Assay がある。従来法では、チャコールデキストラン処理したヒト血清をメディウム中に添加するが、乳癌細胞の増殖に関わるホルモン以外の物質も影響を及ぼし、測定施設間で異なる結果をもたらす可能性がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現している

ヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. E-SCREEN Assay

- ①サブコンフルエントの細胞（MCF-7, T47D）を、トリプシン-EDTA で剥離する。
- ②遠心分離し、細胞を回収する。
- ③細胞数を血球計算版で測定する。
- ④細胞数を、以下の数になるように DMEM-10%FCS で希釈する。  
MCF-7:  $5 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$   
T47D:  $3 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$
- ⑤96穴プレートに  $100 \mu\text{l}$  ずつ④の細胞懸濁液をまいていく。
- ⑥37°C、5%CO<sub>2</sub> 中で24時間インキュベーションする。
- ⑦フェノールレッド入りの DMEM を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  $\mu$ l) にかえる。

- ⑧ 10  $\mu$ l の被験物質を加える。被験物質は、DMSO に 10<sup>-2</sup>M になるようにして作ったものを DMEM で希釈していき、10<sup>-3</sup>M ~ 10<sup>-10</sup>M になるような溶液を作り、それを 10  $\mu$ l ずつ加えていく。最終的な濃度は 10<sup>-4</sup>M ~ 10<sup>-11</sup>M になる。

- ⑨ 37°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ディングキット (和光純薬) 中の試薬溶液を 10  $\mu$ 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。

(倫理面への配慮)

本研究において使用している細胞株は細胞バンク等において人手できるものであり、倫理面の問題はないと判断する。

### C. 研究結果

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<sup>-11</sup> ~ 10<sup>-6</sup>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ゲ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ゲ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 細胞のエストロゲ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 を使い、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<sup>-11</sup> ~ 10<sup>-6</sup>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<sup>-11</sup>M ~ 10<sup>-5</sup>M で 1.5~1.7 倍、ビスフェノール A では 10<sup>-11</sup>M ~ 10<sup>-5</sup>M で 1.2~1.5 倍、フタル酸ジブチルでは 10<sup>-11</sup>M ~ 10<sup>-4</sup>M で 1.1~1.4 倍、フタル酸ブチルベンジルでは 10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-5</sup>M で 1.1 倍、フタル酸ジエチルでは 10<sup>-11</sup> ~ 10<sup>-4</sup>M で 1.1~1.2 倍、フタル酸ジシクロヘキシルでは 10<sup>-11</sup> ~ 10<sup>-4</sup>M で 1.1~1.7 倍、フタル酸ジエチルヘキシルでは 10<sup>-11</sup> ~ 10<sup>-5</sup>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ゲ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ゲ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。

### D. 考察

MCF-7 細胞と T47D 細胞でどちらか一方にのみ細胞増殖性を示すようなことはなく、T47D 細胞はエストロゲン活性の検出に有用であることが確認された。T47D 細胞を用いた場合、結果にばらつきが少なく安定した結果が得られたが、MCF-7 細胞と T47D 細胞で反応性の度合いが異なる場合も見受けられた。これは、前者にはエストロゲンレセプターの  $\alpha$  が、後者にはエストロゲンレセプターの  $\beta$  が多く発現しているとの報告があるので、その影響が考えられる。今後、用いた細胞株においてエストロゲンレセプターの発現について確認を行う必要がある。さらに、細胞増殖を示した条件における細胞内での各分子の挙動を調べるために、ディファレンシャルディスプレイ法を用いて発現に差異のある遺伝子を検索する。

### E. 結論

E-スクリーン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<sup>-11</sup> ~ 10<sup>-6</sup>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。また、MCF-7 細胞にかえて T47D 細胞を用いたところ、結果にばらつきが少なく安定した結

果が得られ、T47D 細胞はエストロゲン活性の検出に有用であることが確認された。MCF-7 細胞及び T47D 細胞を用いてアッセイを行った結果、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ゲ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ゲン様活性が検出された。さらに、これらの増殖促進作用はエストロゲ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。

## F. 研究業績

学会発表

1. 内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について：山崎聖美、岡田由美子、久松由東、第72回日本生化学大会、横浜、1999年 p 897.
2. 内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応

性に及ぼす影響について：山崎聖美、岡田由美子、久松由東、香山不二雄、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、神戸、1999年、p157.

3. 生活関連物質の E-Screen Assay による評価：山口晃子、山崎聖美、坂部 貢、中澤裕之、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、p69、1999年、神戸
4. Effects of endocrine disruptors on lymphocyte functions, Endocrine Disruptors : Yamazaki. T., Okada. Y., and Hisamatsu. Y., Keystone Symposia, California, 1999; p48.

平成11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に関する生体試料（臍帯血等）分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

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

主任研究者：牧野 恒久（東海大学）

分担研究者：中澤 裕之（星薬科大学）

協力研究者：早川 和一（金沢大学）

要旨

ベンゾ[a]ピレン(BaP)の代謝物として知られ、内分泌攪乱作用の疑われるモノヒドロキシベンゾ[a]ピレン(OH-BaP)の1,2異性体の分離・分析法を開発した。アルキルアミド型逆相カラム(Discovery RP-Amide-C16)により1-, 3-, 7-, 12-OH-BaPを除く8種類のOH-BaPを分離し、分離が不十分な1-, 3-, 7-, 12-OH-BaPをカラムスイッチングによりODSカラム(COSMOSIL 5C18AR)に導入して7-及び12-OH-BaPを同定した。さらに分離が不十分な1-及び3-OH-BaPをβ-シクロデキストリン固定化カラム(LiChroCart 250-4 Chiradex)に導入することで1,2種すべてを分離できた。この分析システムをBaPのCYP1A1処理液に適用したところ、1-, 3-, 9-OH-BaPの生成が確認された。また、健康人の尿中から代謝物として1-, 3-OH-BaPを同定し、尿中に排泄されるOH-BaPは主としてエストロゲンレセプターに対してビスフェノールAに匹敵する結合能を有する3-OH-BaPであることが明らかとなった。

A. 研究目的

化石燃料などの有機物の不完全燃焼によって生成する多環芳香族炭化水素(PAH)は、癌や喘息などの原因となることが知られているが、最近著者らは、ベンゾ[a]ピレン(BaP)をはじめとする数種類のPAHが、抗エストロゲンまたは抗アンドロゲン作用を有することを明らかにした。一方、水酸基の位置の異なるモノヒドロキシベンゾ[a]ピレン(OH-BaP)のエストロゲンレセプターに対する結合能について、ヒトエストロゲンレセプターに対する競合実験及び、酵母のエストロゲンレセプター依存β-ガラクトシダーゼの発現系を用いた実験を行い、

3-OH-BaPがビスフェノールAに匹敵する強さを有することを見いだした。このことは、BaPの内分泌攪乱作用の全容を明らかにするためには、代謝物をも視野にいれた暴露量に対する血液や尿中の濃度レベルの調査が不可欠であることを示唆する。

そこで本研究では、OH-BaPの生体内挙動を検討するにあたって、カラムスイッチング法を用いた1,2異性体の分離・分析法を開発した。また、開発した分析法をBaPのチトクロームP-450(CYP1A1)で処理液及び、ヒト尿中のOH-BaPの同定に適用した。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

1 2 種の OH-BaP は、NCI Chemical Carcinogen Repositories から購入したものを、BaP は Sigma 社製を用いた。ヒト CYP1A1 は Gentest 社製、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(30 U/mL)/アリスルファターゼ(60 U/mL)は Merck 社製の試薬を用いた。その他の試薬は、HPLC 用または特級を用いた。

### 2) 装置

HPLC ポンプは、LC-10AD (Shimadzu) 2 台、880U (Jasco) 2 台を用い、カラムオーブンは CTO-2A (Shimadzu)、スイッチングバルブユニットは 892-01 (Jasco) 2 台 (V1, 2)、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 カラム ; Discovery RP-Amide-C16 (250×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, SUPELCO)、C2 カラム ; COSMOSIL 5C18AR (250×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, Nacalaitesque)、C4 カラム ; LiChroCart 250-4 Chiradex (250×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, Merck)及び、濃縮用カラム 1 本、C3 カラム ; BROWNLEE Spheri-5RP-18 (30×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, PERKIN ELMER)を用いた。またガードカラムとして Discovery RP-Amide-C16 (20×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m, SUPELCO)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 3 台(D1-3)使用した。

### 3) 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 °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。1 2 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、C1 カラムからの溶出時間に合わせてカラムスイッチング(V1)により流路を切り替えることによって C2 カラム(40 °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、カラムスイッチング(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。

### 4) 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ L)に再溶解させ、3000 回転

で 10 分間遠心した後、上清の 20  $\mu$ L を HPLC に導入した。

#### 5) 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/アシルスルファターゼを 100  $\mu$ 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  $\mu$ L に再溶解して 5000 回転 6 分間遠心した溶液の上清 30  $\mu$ L を HPLC に導入した。

#### C. 研究結果及び考察

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、 $\beta$ -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行えることが分かった。

塵及び尿中のベンゾ[a]ピレンとピレンの水酸化体の検索；日本薬学会第 120 年会、30[PF]12-08, 2000, 岐阜。

#### D. 結論

- ・ HPLC-カラムスイッチング法を用いることにより、BaP 水酸化体の一斉分析が可能となった。
- ・ CYP1A1 処理によって生成した BaP 水酸化体(1-, 3-, 9-OH-BaP)を同定できた。
- ・ 健常人 (男、26 歳、非喫煙者) の尿中から BaP 水酸化体 (1-, 3-OH-BaP) を同定し、生体内でも BaP 水酸化体が代謝物として生成することを明らかにした。
- ・ ヒト尿 200 mL を用いれば、BaP 水酸化体の定量が可能である。

今後、内部標準物質の検討等を行って定量性を確立した後、生活習慣 (特に喫煙)、環境 (交通量の多少) の違い、すなわち BaP の暴露量の異なると考えられるヒト尿中の BaP 水酸化体を分析すると同時に、血液や母乳にこの分析法を適用するためにそれら試料の前処理法の検討を行っていく予定である。

#### E. 研究業績

学会発表

1. 野村 麻貴、鳥羽 陽、木津 良一、久保田 明子、輪島 志帆子、正宗 行人、早川 和一：ディーゼル排気粉



平成 11 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に関する生体試料（臍帯血等）分析法の開発とその実試料分析結果  
に基づくヒト健康影響についての研究

主任研究者 東海大学 牧野 恒久

分担研究者 大阪府立公衆衛生研究所 織田 肇

協力研究者 大阪府立公衆衛生研究所 阿久津 和彦 北川 幹也  
堀 伸二郎

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

要旨

GC/MS によるポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDE）の高感度迅速分析法を確立し、本分析法を用いて 1998 年に瀬戸内海で採取した食用魚の PBDE 汚染実態を明らかにした。また、ヒト母乳抽出脂肪（1980, 84, 86, 90 年の保存試料）の予備的分析を行い、1g 以下の試料量で PBDE の分析が可能であること、すなわち量が限られている貴重な保存試料を大量に使用することなく、過去に遡って母乳中 PBDE 濃度の経年変化を追跡できることを明らかにした。

A. 研究目的

ポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDE）は、合成樹脂の難燃剤として電子機器の筐体等に広く使用されている。一方、PBDE は環境汚染物質として指摘されており、さらに、その化学構造（図 1）および生物実験等から、内分泌かく乱作用を有するのではないかと疑われている。特に近年、北欧地方においてヒト母乳中の PBDE 濃度が上昇傾向にあることが報告され、乳幼児への悪影響が懸念されている。

我が国においても 1980 年代から累積して数万トンの PBDE が消費されているが、環境・生物中 PBDE 濃度に関する研究報告はわずかであり、その汚染実態は明らかではない。従って、PBDE のリスク評価に先立ち、まず早急に国内の汚染状況を明らかにする必要がある。そこで本研究では 1) 生物試料中 PBDE のルーチン分析法の開発、2) 食用魚の PBDE 汚染レベルの解明、および 3) 乳幼児期の暴露の観点から重要であるヒト母乳の汚染実態の解明を目的とした。

B. 研究方法

B. 1. 試料

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。

B. 2. 試薬

3,4,4'-トリブロモジフェニルエーテル（BDE-37）、2,2',4,4'-、2,3',4,4'-、2,3',4',6-、2,4,4',6-、3,3',4,4'-テトラブロモジフェニルエーテル（BDE-47, 66, 71, 75, 77）、2,2',3,4,4'-、2,2',4,4',5-、2,3',4,4',6-ペンタブロモジフェニルエーテル（BDE-85, 99, 119）、2,2',4,4',5,5'-ヘキサブロモジフェニルエーテル（BDE-153）および 2,3,3',4,4',5,6-ヘプタブロモジフェニルエーテル（BDE-190）は Cambridge Isotope Laboratories 製、2,4,4'-トリブロモジフェニルエーテル（BDE-28）、2,2',4,4',6-ペンタブロモジフェニルエーテル（BDE-100）および

2,2',3,4,4',5'-, 2,2',4,4',5,6'-ヘキサブ  
ロモジフェニルエーテル (BDE-138, 154) は  
Wellington Laboratories 製のものを使用した。  
4,4'-ジブロモジフェニルエーテル (BDE-28)  
は東京化成工業 (株) 製, デカブロモジフェニ  
ルエーテル (BDE-209) は和光純薬工業 (株)  
製のものを使用した。

### B. 3. 機器条件

#### B. 3. 1. GPC 条件

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  
φ) および CLN pak EV-2000 (300 mm x 20 mm  
φ) 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  
5mL/min)。なお、タイムプログラムは dump  
15min, collect 13min, wash 12min (total  
40min) とした。

#### B. 3. 2. GC/MS 条件 (NCI)

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 (15m x 0.25mm φ, 膜  
厚 0.25 μm) 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°C/min ↑ -180°C -3°C/min  
↑ -220°C -10°C/min ↑ -325°C (5min) とした。  
試料注入はスプリットレス方式 (注入量 2 μL,  
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。

### C. 研究結果

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。そこで  
今回、自動化が容易なゲル浸透クロマトグラ  
フィー (GPC) およびディスパーザブルミニカ  
ラムを用いる簡便・迅速な前処理法の開発を  
試みた。その結果、図 2 に示した前処理法によ  
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 < 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 (表 1)。反応  
型の臭素系難燃剤であるテトラブロモビスフ  
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。

NCI-GC/QMS を用いて食用魚および母乳脂肪について予備的な分析を行った結果を表 2 に、実試料のクロマトグラム例を図 3 に示した。

#### D. 考察

化学工業日報社の調査データによれば、日本では 1991 年以降、業界の自主規制により TeBDE は使用されていない。しかし今回、1998 年に採取した食用魚から BDE-47 (2,2',4,4'-TeBDE) が相対的に高い濃度で検出された。これらの汚染が、単に過去に環境流出した TeBDE による残留汚染なのか、あるいは現在も進行中の汚染（埋め立て処分された古い樹脂製品からの流出、高臭素化ジフェニルエーテルの脱ブロム化等）なのかは未解明であり、今後、引き続き汚染状況をモニタリングしていく必要がある。

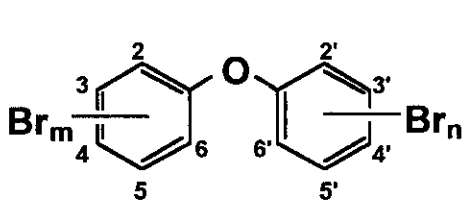
#### E. 結論

生物試料の PBDE 汚染実態の解明を目的として、GPC および負化学イオン化 GC/MS を用いる簡便・迅速なルーチン分析法を開発した。本法を用いて大阪府下で採取した食用魚および母乳脂肪を予備的に分析したところ、BDE-47 (2,2',4,4'-TeBDE) をはじめとする幾つかの PBDE 同族体が検出された。

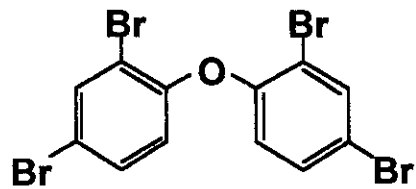
#### F. 研究業績

学会発表：阿久津和彦，尾花裕孝，起橋雅浩，柿本幸子，堀 伸二郎，「GC/MS によるポリ臭素化ジフェニルエーテルの分析」，日本食品衛生学会第 78 回学術講演会（長野），1999 年 10 月

ポリ臭素化ジフェニルエーテル

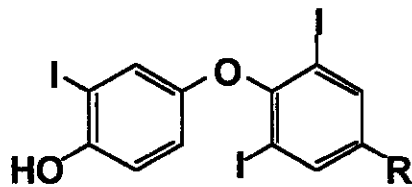


Polybrominated diphenyl ethers (PBDE)  
MW: 249.1-959.2 (m+n=1-10)

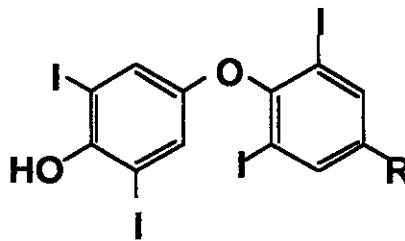


BDE-47 (2,2',4,4'-TeBDE)

甲状腺ホルモン



T3 (L-トリヨードチロニン)



T4 (L-チロキシン)

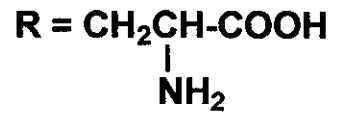


図1 PBDEおよび甲状腺ホルモンの構造式

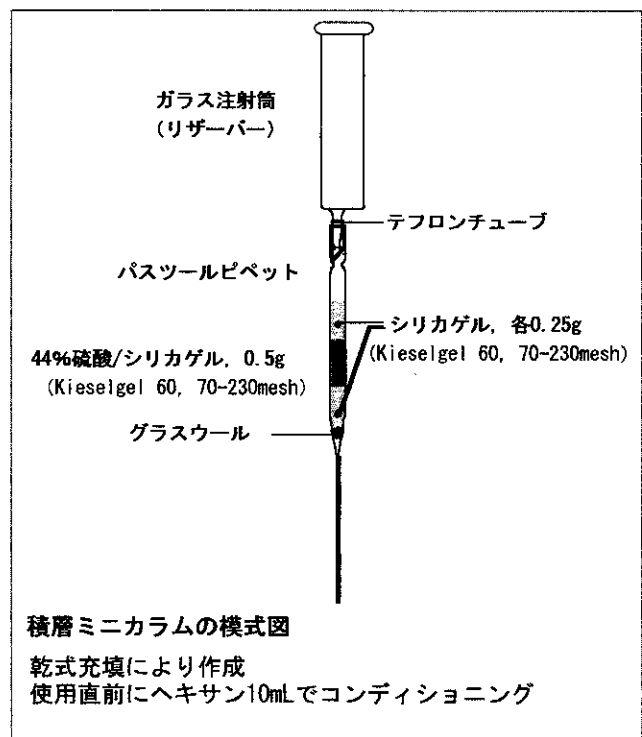
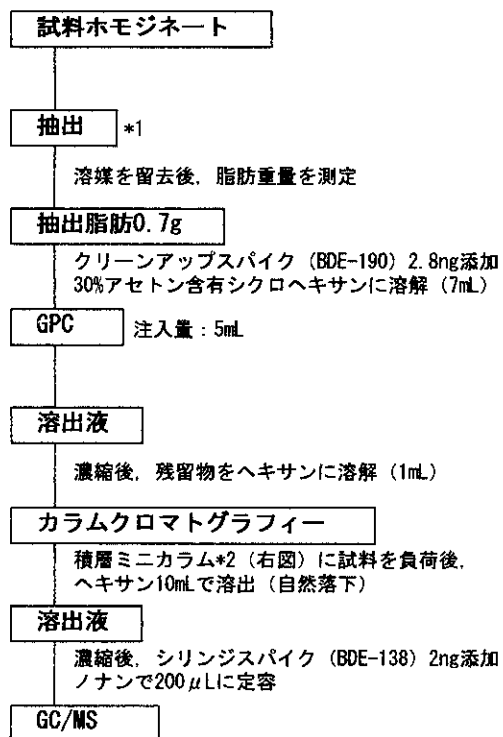


図2 PBDE分析フロー

\*1: エーテル/ヘキサン系混合溶媒による振とう抽出等、脂肪含量の測定が可能な抽出法を用いる。

\*2: 高濃度汚染試料の分析等、用いる脂肪量が少量の場合は市販のシリカカートリッジカラム (メガボンドエリート等) で代用可能。

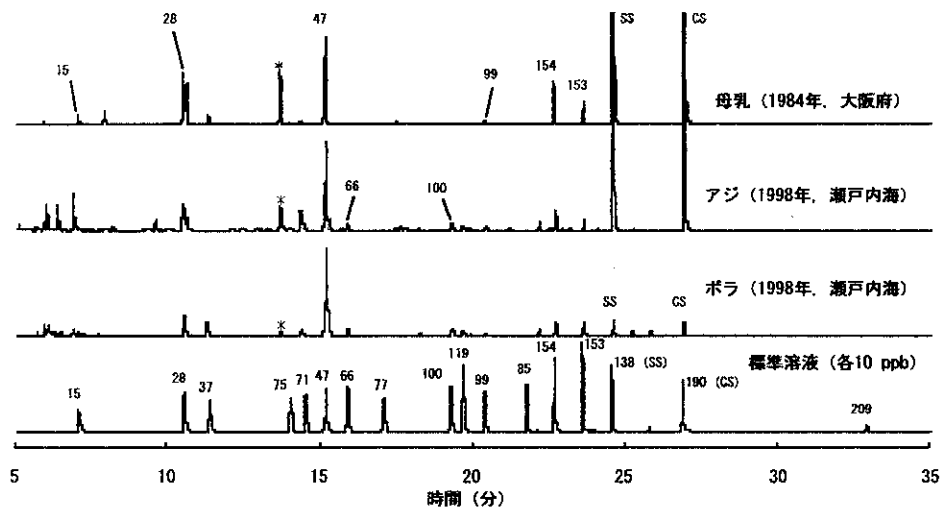


図3 母乳、食用魚およびPBDE標準溶液のSIMクロマトグラム (NCI,  $m/z=81$ )

\*GPCで使用了したシクロヘキサン (和光, HPLC用) に含まれる不純物のピーク

SS: シリンジスパイク, CS: クリーンアップスパイク

表1 魚試料の分析結果 (EI-GC/QMS)

魚種	検体数	濃度 (ng/g, 湿重量あたり)		
		BDE-47	BDE-66	BDE-99
アジ (天然)	3	<0.2-0.26	ND	ND
アナゴ (天然)	3	<0.2-0.22	ND	ND
スズキ (天然)	3	<0.2-0.25	ND	ND
ハマチ (養殖)	3	0.63-1.5	<0.2	ND-0.53
ヒラメ (天然)	1	0.29	ND	ND
ヒラメ (養殖)	3	≤0.20	ND	ND
ボラ (天然)	1	1.4	<0.2	ND
マダイ (天然)	2	<0.2-0.33	ND	ND
マダイ (養殖)	3	0.28-0.29	ND	ND

その他の化合物は検出されず

検出下限値 (ng/g) : BDE-37, 75, 71, 47, 66, 77 (0.05), BDE-119, 99, 85, 153, 190 (0.2), BDE-209 (ECD, 0.05), TBBPA (0.05)

表2 食用魚および母乳の分析結果 (NCI-GC/QMS)

化合物	濃度 (ng/g, 脂肪重量あたり)							
	アジ	スズキ	ハマチ	ボラ	母乳80	母乳84	母乳86	母乳90
BDE-15	ND	ND	ND	1.0	<0.08	<0.08	0.15	0.15
BDE-28	0.17	1.9	ND	8.5	<0.08	0.14	0.18	0.17
BDE-37	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-47	1.4	6.0	8.6	38	<0.08	0.32	0.46	0.26
BDE-66	<0.08	0.53	1.3	1.8	ND	ND	<0.08	ND
BDE-77	ND	<0.08	<0.08	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-100	<0.08	0.55	1.6	2.1	ND	ND	ND	<0.08
BDE-119	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-99	<0.08	0.47	3.4	0.61	ND	<0.08	<0.08	<0.08
BDE-85	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BDE-154	0.15	0.65	1.2	2.2	0.082	0.086	0.18	0.18
BDE-153	0.062	0.32	0.55	2.5	<0.04	<0.04	0.061	<0.04
BDE-209	ND	ND	<0.8	ND	ND	ND	ND	ND

ND : BDE-15, 28, 37, 75, 71, 66, 77, 100, 119, 99, 85 (<0.02ng/g), BDE-209 (<0.2ng/g)

平成11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に関する生体試料（さい帯血等）の分析法の開発とその  
実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

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

主任研究者	牧野恒久 東海大学
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 伊藤裕子 猪飼誉友 近藤文雄 岡 尚男 松本 浩 愛知県衛生研究所

要旨

一般の成人を対象としてクロルデンとその関連物質及びヘキサクロロベンゼン（HCB）に対する人体暴露量調査を実施する目的で、これらの物質の血中濃度を測定すると共に、血液提供者に対するアンケート調査により食事の嗜好性、住環境等の情報を得、これらの化学物質の生体内濃度との関連性について検討を加えた。154人の血清試料を分析したところ、93.5%の人から *trans*-ノナクロル（0.03～1.65 ppb）が、89.6%の人から HCB（0.02～2.20 ppb）が、また、44.2%の人からは *cis*-ノナクロル（0.03～0.44 ppb）検出された。さらに、ごく少数の人からはオキシクロルデン（2人、0.24、0.56 ppb）や *trans*-クロルデン（1人、0.04 ppb）も検出された。検出された5種の化学物質のうち *trans*-ノナクロル濃度は、年齢及び魚介類の摂取頻度と関連することが示唆された。また、HCB濃度については年齢との関連性が示唆された。また、母体末梢血（9検体）、腹水（5検体）、及びさい帯（10検体）を用いて同様に CLDs 及び HCB への暴露量調査を実施した。その結果、*trans*-ノナクロル（0.03～0.39 ppb）は腹水1検体を除く23検体（95.8%）から、HCB（0.05～0.18 ppb）は腹水、さい帯血の全検体を含む20検体（83.3%）から検出された。また、*cis*-ノナクロル（0.03～0.09 ppb）も4検体（16.7%、うち母体末梢血3検体）から検出された。

A. 研究目的

クロルデンは、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、最近の調査でもクロルデンや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が環境中に残留していることが確認されている。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) は、我が国では農薬として登録はなされていないが、環境中に存在することは確認されており、塩素系農薬を始めとする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。昨年度の本研究では、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 (CLDs) と HCB に対する人体暴露量の予備的調査を実施し、その結果、血清中の CLDs 濃度と食事嗜好性との間に関連性があると示唆される結果を得た。そこで本年度の研究では、より多くの一般成人の血液に含まれる CLDs や HCB 濃度を測定すると共に、更に詳細な食事の嗜好性や住環境などの生活因子に関する調査を行なうことにより、これらの因子の血中 CLDs 及び HCB 濃度に及ぼす影響について検討を加えた。また、母体末梢血及び腹水、それに、さい帯血中におけるこれら化学物質の濃度についても測定を実施した。

## 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. 試料

#### 2-1. 一般成人血液を用いた分析

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。

#### 2-2. 母体末梢血、腹水及びさい帯血を用いた分析

昨年度、三菱安全化学研究所においてビスフェノール A 等の調査に用いられたこれらの試料 (東海大学医学部付属病院で採取されたもの) の保存品 24 検体を用いた。

### 3. 操作方法

昨年度と同様に操作した。すなわち、GC/MS 操作条件と試験溶液調製法は、以下のとおりである。

#### 3-1. 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  $\mu$ m, 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 : 2  $\mu$ L

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]<sup>+</sup> m/z 353 (ヘプタクロルエポキサイド)、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 :  $M^{+}$  *m/z* 284

1-クロロテトラデカン :  $C_{14}H_{28}Cl^{+}$   
*m/z* 91

### 3-2. 試験溶液調製法

#### 1) 人血清

スキーム 1 に示した。

#### 2) 母体末梢血、腹水及びさい帯血

試料を遠心分離後、上清について人血清と同様に操作し調製した。

### 4. 統計的解析

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げ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。

## C. 結果と考察

### 1. 一般成人血液を用いた分析

#### 1-1. 分析結果

154 人の成人血清試料を分析した結果を年齢、性別とともに表-1 に示した。

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%) と、ほとんどの人から検出された。検出された試料における濃度は 0.03 から 1.65 ppb で、その濃度の平均値は 0.20 ppb であった。次いで高頻度に検出されたものは HCB で、138 人 (89.6%) から検出された。検出された濃度は 0.02 から 2.20 ppb で、その平均値は 0.23 ppb であった。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、平均値は 0.07 ppb であった。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)。

#### 1-2. 年齢の影響

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 ( $p=0.000 < 0.01$ ) は各年齢階層間に有意差が認められ、年代の上昇とともに血中 *trans*-ノナクロル濃度も上昇していた (表-2)。また、血中 HCB 濃度については、平均値を用いた階層化では有意差は認められなかった。しかしながら、HCB 濃度が極端に高い検体が複数存在することでその平均値が中央値と大きく乖離していたので、統計的解析にあたり平均値ではなく中央値を用いて中央値以下と中央値超の二階層に分化し、年齢階層と血中濃度との関連を検討した。その結果、血中 HCB 濃度も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 ( $p=0.000<0.01$ 、表-3)。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。

血中の CLDs と HCB 濃度が年齢階層の影響を受けることが明らかとなったことから、他のアンケート調査項目で年齢階層の影響を受けている項目では、これらの項目と CLDs や HCB 濃度との関係が年齢階層の影響を強く受けると考えられる。そこで予めその他のアンケート調査項目（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、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）と年齢階層間をカイ二乗検定により比較し、年齢の影響を受けるか否かを検討した。アンケート調査項目のうち摂食嗜好に関しては、一週間に食べる日数を 2 日以内、3～4 日、5 日以上の 3 階層に分けて解析した。その結果、性別 ( $p=0.049<0.05$ 、表-4) において各年齢階層間に有意な差が認められた。すなわち、男性は年代の高い層が多く、女性は年代の低い層が多かった。また、魚介類の摂取頻度、喫煙、そして子供の人数との関係については、一部が期待値 5 を満たさないためカイ二乗検定によっては、正確な結果を得ることができなかった。このうち子供の人数については、相関分析

により年齢階層間に正の相関が認められた ( $r=0.638$ 、 $p=0.000<0.01$ )。すなわち、子供の人数は年齢階層が上昇するとともにその数が増加していた。年齢階層との間に有意差及び相関関係が認められたこれらの項目については、血清中の CLDs 及び HCB 濃度との関係に年齢階層による影響が関与することから、以下の検討からは除外した。しかしながら、今後はさらに試料数を増やすことにより、このような項目も含めた詳細な検討が必要であると考えられる。また、今回の検討では、解析可能な例数の不足から年齢階層による影響が不明であった魚介類の摂食頻度と喫煙に関しては、各年齢階層ごとの検討も加えて実施した。

### 1-3. シロアリ駆除歴の影響

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。

#### 1-4. 食事嗜好の影響

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日以上の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。(表-5)。血中 *trans*-ノナクロルの濃度は、一週間当たりの魚介類の摂取日数が増加するのに伴い有意に高くなっていった。

次に、*trans*-ノナクロルの血中濃度と魚介類の摂取日数の関係について年齢階層の影響を完全に除くため、年齢階層ごとその関係を検討した。魚介類の摂取日数を一週間に4日以内と5日以上の2階層に分け、先の年齢4階層ごとに *trans*-ノナクロルの濃度を比較した。その結果、30才未満の年齢階層において、摂取日数5日以上の階層のヒトでは、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 ( $p=0.022<0.05$ 、表-6)。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。

#### 1-5. 喫煙の影響

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。しかしながら上に述べた様に喫煙が年齢の影響を受けているか否かの検定が確定できなかったことから、この結果が年齢による影響を受けていることも考えられた。そこで、年齢階層ごとに喫煙と HCB 濃度との関係について解析を加えた。その結果、何れの階層においても有意差は認められなかった。したがって、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。

#### 1-6. その他

摂取している米の産地や飲用している水、居住環境地域や飲酒、それに病歴についても調査を実施したが、血清中の CLDs 及び HCB 濃度との間にいずれも有意差は認められなかった。

#### 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(血清) 9試料、腹水5試料、さい帯血(血清) 10試料を分析した結果を表-7に示した。これらの試料から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。その濃度は母体末梢血中で0.04から0.39 ppb (平均値0.17 ppb)、腹水中では0.03から0.07 ppb (検出4試料の平均値0.04 ppb)、さい帯血中で

は0.04から0.18 ppb (平均値 0.09 ppb) の範囲であった。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。母体末梢血試料から検出された濃度は0.06から0.18 ppb (検出された5試料の平均値 0.13 ppb)、腹水中濃度は0.08から0.15 ppb (平均値 0.09 ppb)、また、さい帯血中濃度は0.07から0.18 ppb (平均値 0.10 ppb) であった。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試料から検出され、その濃度は0.05から0.09 ppb (検出された3試料の平均値 0.07 ppb) の範囲であり、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。したがって今後は、母体の末梢血及び腹水と、さい帯血中のCLDs及びHCB濃度との関係を明確にするために、同一人物に由来する異なる組織からの試料を含めて、より多くの検体について同様な測定を実施する等の継続的な研究が必要であると考えられた。

#### D. 結論

1. 一般成人 154 人からの血清試料を分析したところ、144 人 (93.5%) から *trans*-ノナクロル (0.03~1.65 ppb) が、138 人 (89.6%) から HCB (0.02~2.20 ppb) が、68 人 (44.2%) から *cis*-ノナクロル (0.03~0.44 ppb) が検出された。また、2 人からはオキシクロルデン (0.24、0.56 ppb)、別の 1 人からは *trans*-クロルデン (0.04 ppb) も検出された。

2. *trans*-ノナクロル濃度を 30 才未満、30 才代、40 才代、50 才以上の4つの年齢階層に分けて比較したところ、各年齢階層間に有意差が認められ、年齢階層の上昇とともに血中 *trans*-ノナクロル濃度も上昇していた ( $p=0.000 < 0.01$ )。また、30 才未満の年齢階層においては、魚介類の摂取頻度の高い(週5日以上)階層のヒトでは低い(週5日未満)階層のヒトに比べ、血中 *trans*-ノナクロル濃度の高いヒトの割合が有意に高かった ( $p=0.022 < 0.05$ )。

3. 検出された HCB について、年齢を同様に4階層に分けて比較したところ、血中 HCB 濃度と各年齢階層間に有意差が認められ、年代の上昇とともに血中濃度も上昇していた ( $p=0.000$ )。