

試料の調製及び測定は、各2ロットずつ行った。

C. 研究結果

牛肉の生肉、加熱肉及び加熱時流出油中のダイオキシン類

牛肉の生肉、加熱肉及び加熱時流出油中の PCDD 及び PCDF 含有量を表 1 に示した。それぞれ、調理前の生肉 100 g 当たりの値で示してあり、得られた各測定値の内、定量下限値以下を N.D. とした。毒性等量 (TEQ) は、定量下限以上の値をそのまま毒性等価係数 (TEF) と掛け合わせて算出し、2,3,7,8-T4CDD の毒性に換算したものと示した。

加熱肉と加熱時流出油中の PCDD 及び PCDF (TEF 値を有するもの) の濃度は N.D. ~ 440 pg 及び 0.41 ~ 160 pg であった。これらの総 TEQ 値はそれぞれ 35 pg-TEQ、11 pg-TEQ と算出され、生肉のその 74% 及び 23% であり、両者を合わせると生肉の 97% であった。ダイオキシン類の各組成ごとに加熱肉と加熱時流出油中の濃度 (操作ブランク値を引いたもの) を足して生肉のそれと比較すると、加熱により O8CDF が減少する事が分かり、また 2,3,7,8-

T4CDF 及び O8CDD は微量ではあるものの増加していたことから、加熱調理により生成する可能性が示唆された。コプラナー PCB についても、現在解析を進めている。

D. 考察

牛肉の結果で、生肉より加熱肉のダイオキシン類濃度が低く、加熱肉と加熱時流出油中のダイオキシン類濃度を合わせると生肉のそれに近い値を示した。このことから、加熱調理によるダイナミックなダイオキシン類の生成は行われず、むしろ牛生肉中のダイオキシン類が加熱肉と加熱時流出油に分配されることが示唆された。しかしながら、牛生肉、加熱肉、加熱時流出油でダイオキシンの組成が一部異なることから、ダイオキシン類の中には、加熱調理後も肉に残留しやすいものや油に溶けて流出しやすいものがあるか、又は加熱により生成しやすいものや減少しやすいものがあることが示唆された。

特に、加熱牛肉と加熱時流出油中の O8CDF の濃度を足しても生肉中の濃度より著しく低い値を示したことから、O8CDF が加熱過程で分解した可

能性が考えられた。一方、2,3,7,8-T4CDF 及び O8CDD は加熱牛肉と加熱時流出油を合わせた濃度が、生肉のそれより増加しており、これらは加熱により新たに生成したか、または他のダイオキシンが変換し精製された可能性が示唆された。この点については、今後さらに詳細な検討を行う必要がある。

生肉には、元々検出に十分な量のダイオキシンが含まれていることが分かった。これは、使用する餌やその他の畜産環境に由来するか、あるいは肉の流通過程で混入したものと考えられる。

E. 結論

肉の加熱調理により、生肉に存在していたダイオキシン類の 65~80% は加熱肉中に残り、残りは油に溶け出して流出することが示唆された。今後、煙中への流出についても調べ、加熱時のダイオキシン類生成に関する総合的な検討を行う必要があると考えられた。また、加熱肉や加熱時流出油において、一部のダイオキシンの組成の変化が認められたが、この変化がどのような機構によるのかを明らかにす

る事が、今後の課題と考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1

加熱調理前後の牛肉中のPCDD及びPCDF分析結果

		実測濃度(pg/調理前の肉100g)				
		牛肉				
異性体	PCDD	TEF(1998)	操作ブランク	加熱調理前(生肉)	加熱調理後(焼肉)	加熱調理時流出油
	2,3,7,8-T4CDD	1	0.28	4.4	3.2	0.95
	1,2,3,7,8-P5CDD	1	N.D.	18	14	3.7
	1,2,3,4,7,8-H6CDD	0.1	0.065	13	23	2.7
	1,2,3,6,7,8-H6CDD	0.1	0.045	32	29	6.6
	1,2,3,7,8,9-H6CDD	0.1	0.28	12	5.8	3.8
	1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	0.01	1.2	99	110	38
	O8CDD	0.0001	5.4	540	440	160
PCDF						
	2,3,7,8-T4CDF	0.1	1.3	1.9	3.9	2.5
	1,2,3,7,8-P5CDF	0.05	0.67	1	0.47	0.71
	2,3,4,7,8-P5CDF	0.5	0.36	19	9	3.4
	1,2,3,4,7,8-H6CDF	0.1	0.91	27	20	7.9
	1,2,3,6,7,8-H6CDF	0.1	0.39	25	16	5.6
	1,2,3,7,8,9-H6CDF	0.1	0.14	N.D.	N.D.	0.8
	2,3,4,6,7,8-H6CDF	0.1	1.34	30	21	6.8
	1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	0.01	2.3	51	40	13
	1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	0.01	0.5	1.2	1.4	0.41
	O8CDF	0.0001	3.1	21	12	4.7
同族体 PCDD						
	T4CDDs		15	88	82	36
	P5CDDs		2.2	29	24	10
	H6CDDs		2	60	48	16
	H7CDDs		1.2	120	110	42
	O8CDD		5.4	540	440	160
Total PCDDs			25	830	710	260
PCDF						
	T4CDFs		20	25	67	45
	P5CDFs		4	28	18	12
	H6CDFs		3.9	98	68	26
	H7CDFs		3.7	51	29	12
	O8CDF		3.1	21	12	4.7
Total PCDFs			35	220	190	98
Total (PCDDs + PCDFs)			60	1000	900	360
毒性評価値 TEQ(1998) (pg-TEQ)			0.87	47	35	11

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

「環境中のダイオキシン様作用物質の検索」

分担研究者 多田敦子 国立がんセンター研究所 がん予防研究部研究員

研究要旨

環境中には様々ながん原物質が存在している。ある種の物質は発がん性を示すのみでなく、内分泌攪乱作用も示すことが指摘されており、乳がんや精巣がん等の発生に影響を与えることが示唆されている。前回、河川水の変異原活性の強いことが指摘されている和歌川に注目し、この河川水中の変異原物質として 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl を同定した。また、同化合物はヒトアリルヒドロカーボンレセプター (AhR) を発現させた酵母を用いた系において AhR と結合し、その活性は β -naphthoflavone とほぼ同じであることがわかった。この化合物は親化合物である 3,3'-dichlorobenzidine から生成している可能性が高いため、構造が類似している他の 3,3'-dichlorobenzidine 誘導体も河川水中に存在している可能性がある。そこで、3,3'-dichlorobenzidine の構造類似体 3,3'-dichloro-4,4'-dinitrobiphenyl、4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl の河川水中の濃度の定量を行った結果、前者は 3640 ng/L、後者は 2120 ng/L の濃度で和歌川河川水中に存在していることが明らかとなった。両者はいずれも AhR に高い結合能を持っており、さらに 3,3'-dichlorobenzidine から 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl が生成する際の間接体であると考えられた。

A. 研究目的

環境中にはダイオキシンを始めとする様々ながん原物質が存在してい

る。ある種の物質は発がん性を示すのみでなく、内分泌攪乱作用も示すことが指摘されており、乳がんや精

巢がん等の発生に影響を与えることが示唆されている。そのため、環境中のがん原物質及び内分泌攪乱物質を同定し、それらのヒトがん発生に対する影響を正しく評価することが重要である。

和歌山市内を流れる和歌川の河川水は変異原活性の強いことが指摘されており（図1）、前回までの研究で、その活性本体は 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl であることが分かった。この化合物はヒト AhR に低濃度で強く結合することが示されたため、生体内に吸収された場合、いわゆる coplanar PCB と同様の作用を示す可能性がある。

一方、同化合物の別途合成を行った際の出発原料である 3,3'-dichlorobenzidine は工業的に和歌川周変域で生産されているため 3,3'-dichlorobenzidine 由来の他の AhR 結合性の化合物が和歌川河川水中に存在している可能性がある。そこで、前回の研究で合成中間体として得られた 3,3'-dichloro-4,4'-dinitrobiphenyl、4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl の河川水の濃度について調べた。

B. 研究方法

1) 標準化合物の合成

標準化合物は前回 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl を合成したスキームにより調整した。

（図2）

2) 化合物の定量

和歌川の試料採集地点 A（図1）から水 1L を採取し、それらをクロマトグラフィーを用いて下記の条件により分離し、化合物の単離を行った。

2-1)

Column; Cosmosil ODS (2.5 X 40 cm), Eluent; 60% acetonitrile/water, flow rate; 5 ml/min,

2-2)

Column; TSK-GEL ODS-120A column (7.8 x 300mm, TOSOH, Co. Ltd. Tokyo), eluent; 65% acetonitrile, flow rate; 2.5 ml/min,

2-3)

Column; Phenomenex LUNA 5_ Phenyl-Hexyl column (4.6 x 250 mm Phenomenex, Co. Ltd. USA), eluent; 65% acetonitrile, flow rate; 0.7 ml/min,

2-4)
Column; Cosmosil ODS column
(4.6 x 250 mm Nacalai, Co.
Ltd. Jpn), eluent; 60%
acetonitrile, flow rate; 0.7
ml,

C. 研究結果

和歌川は和歌山市内を南北に流れる小規模河川であり、中域に工場廃水が流れ込んでいる。同河川水の変異原性モニタリングでは、S9 mix 非存在下で、サルモネラ菌株 YG1024 を用いたとき、工場排水流入口（採水地点 A）の blue rayon 抽出物の変異原性が最も高かった（図 1）。前回までの研究で排水流入口の変異原物質は新規化合物 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl であることが明らかになった。

そこで、合成中間体である 3,3'-dichloro-4,4'-dinitrobiphenyl 1、4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl 3 並びに 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl 4 について、その河川水中の濃度について定量を行った。その結果、化合物 1 は河川水中に 3640 ng/L 化

合物 2 は 2120 ng/L、化合物 4 は 230ng/L の濃度で、採水地点 A に存在することが明らかになった（図 3）。これらの化合物はいずれも変異原性を有し、更に同程度の強さで AhR に結合することがわかった。

（図 4、5）。全体としてみると 1 L 辺り約 6000ng の coplanar PCB が存在することになり、生態への影響が懸念される。

C. 考察

和歌川中には変異原性が強く、なおかつ低濃度で AhR と結合する能力を持つ化合物 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl が存在するだけでなく、AhR に対し低濃度で強く結合する直接変異原性物質、3,3'-dichloro-4,4'-dinitrobiphenyl、4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl が存在することが明らかになった。後 2 者は和歌川河川水中に 2000~4000 ng/l の濃度で存在することから、高濃度の coplanar PCB が河川水中に存在していることになる。これらの化合物はいずれも親化合物である 3,3'-dichlorobenzidine から生成した可能性が高い。

これら coplanar PCB 誘導体の生体影響については、未だ不明の点が多いため、in vivo 実験を行う必要がある。

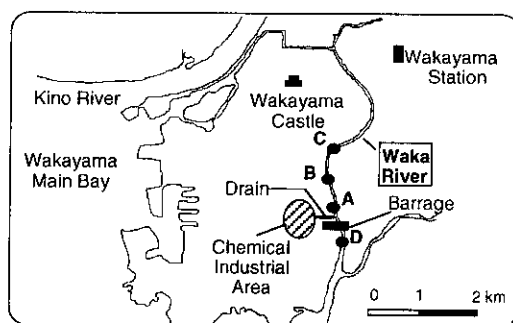
D. 結論

和歌川河川水中の AhR 結合物質として 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl のほかに、その生成中間体と考えられる 3,3'-dichloro-4,4'-dinitrobiphenyl 、 4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl の存在が明らかになった。

E. 研究発表

F. 学会発表

Identification of mutagens in the Waka River in Wakayama, Japan. Takeji Enya-Takamura, Atsuko Tada, Takashi Sugimura, Keiji Wakabayashi, Tetsushi Watanabe, Teruhisa Hirayama,
2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, December, 2000



Sampling date	Sampling point	YG1024 (Rev. / g BR)	
		-S9 mix	+S9 mix
98.7.30-31	A	167,000	72,900
	B	28,000	45,200
	C	7,310	109,000
	D	270	3,400

図1 和歌川河川水の採水地点とその変異原性

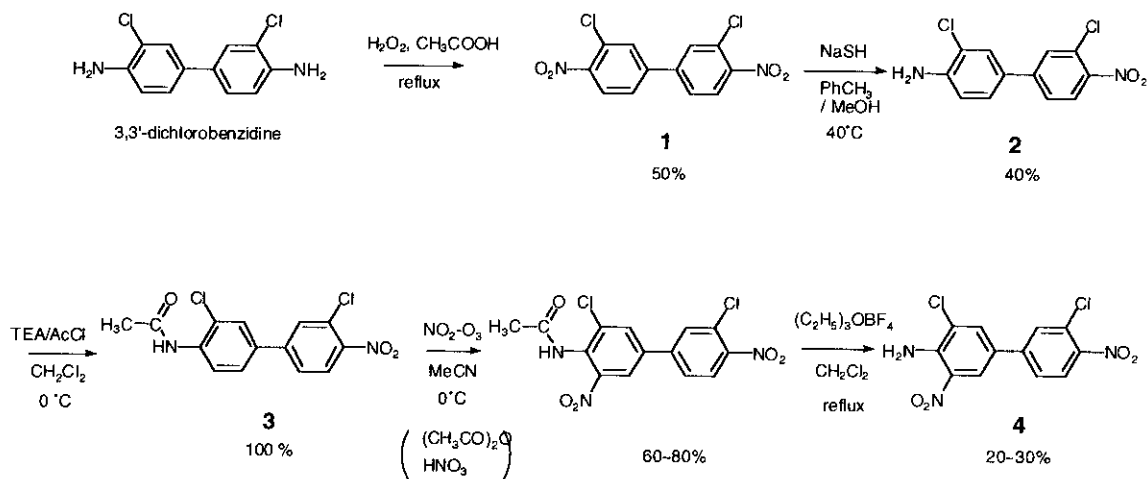
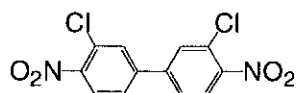
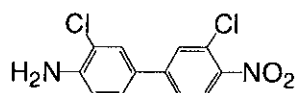


図2 新規変異原物質 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitrobiphenyl の合成方法とその合成中間体である 3,3'-dichloro-4,4'-dinitrobiphenyl (1)、4-amino-3,3'-dichloro-4'-nitrobiphenyl (3)



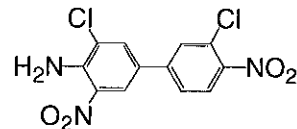
1

3640 ng/L



2

2120 ng/L



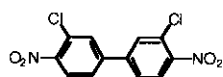
4

230 ng/L

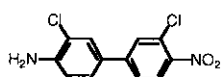
(Sampling date; 00/04/21)

図3 河川水中の各化合物の濃度

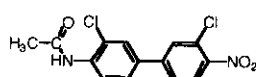
Compound	Mutagenicity (Revertants / nmol)							
	TA98		TA100		YG1021		YG1024	
	-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix
1	89	12	2	3	97	51	640	83
2	80	40	4	30	80	40	410	130
3	160	50	20	30	170	100	3400	360
4	66,000	1,700	880	91	7,700	3,000	140,000	2,900



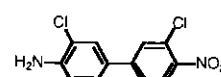
1



2



3



4

図4 各合成中間体の変異原性

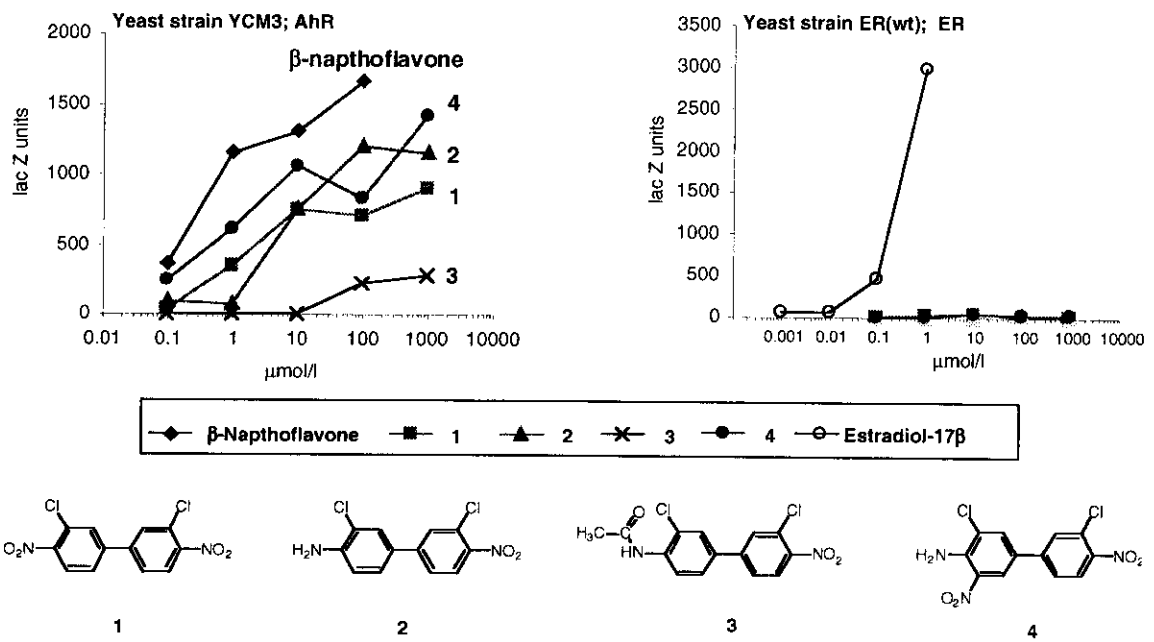


図5 各化合物のヒト AhR に対する結合能

平成 12 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

「ダイオキシン類の毒性評価に関する研究」

分担研究者 川森 俊人 国立がんセンター研究所 がん予防研究部室長

研究要旨

ダイオキシン様物質は環境中に広く存在していると考えられる。本年度は、新規ヘテロサイクリックアミンであるアミノフェニールノルハルマン（APNH）のエストロゲン様作用の有無を、昨年度報告した卵巣摘出したラットを用いた系で検討した。APNH は卵巣摘出ラットの体重増加を抑制し、子宮液増加による子宮重量の増加をきたした。しかし、BrdUrd 陽性細胞を指標にした細胞増殖能に変化を及ぼさなかった。この結果から APNH は、エストロゲン様作用を示さないと考えられた。現在、APNH のラットに対する長期毒性試験が進行中である。

A. 研究目的

近年、内分泌攪乱物質の曝露とヒトの健康との係わりについて感心が高まりつつあり、環境中に存在する内分泌攪乱物質を検出する試験系を開発することは急務である。本年度は、昨年度報告した卵巣摘出ラットを用いて、新規ヘテロサイクリックアミンであるアミノフェニールノルハル

マン（APNH）のエストロゲン様作用の有無を検討した。

B. 研究方法

5 週齢時に卵巣摘出を行なった雌 Sprague Dawley (SD)ラットを 2 週間経過観察し、各群 6 匹に分けた。試験物質は、positive control として 17 β -estradiol (E2) を 50 μ g/kg 体重、APNH、

9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole を 50 mg/kg 体重の濃度で動物に腹腔内投与した（1回／1日、計3回）。最終投与翌日に全動物を屠殺剖検し、子宮重量測定、病理組織学的検査、子宮内膜及び上皮細胞の高さの測定、BrdU を用いた子宮の細胞増殖率を検討した。

C. 研究結果 (Figs. 1&2)

17 β -estradiol 投与群では、子宮重量、子宮内膜及び上皮細胞の高さは、コントロール群に比し増加した。細胞増殖率も有意に増加していた。APNH 投与群では、APNH の全身に対する毒性のためか、体重増加抑制を認めた ($P<0.001$)。子宮重量及びその体重に対する比率も有意に増加した ($P<0.05$ 及び $P<0.01$)。しかし、組織学的には、子宮間質部及び上皮部の高さは、コントロールに比べて変化なく、もっとも鋭敏である BrdUrd 陽性細胞数でも、コントロールとほぼ同程度で非常に少なく、APNH 投与により、子宮内での細胞増殖が亢進している様子は認めなかった。これらの結果は、APNH による子宮重量増加は子宮そのものが大きくなった訳ではなく、子宮液の増加によると考えられた。

D. 考察及び結論

卵巣摘出ラットを用いた実験系から、APNH には、子宮内の細胞増殖には変化を及ぼさないが、体重抑制によるホルモンバランスの変化をもたらし、子宮液の増加をおこしたと考えられた。現在、APNH のラット長期毒性試験を実施中である。

今後この物質の雄性ラット生殖臓器への影響も短期、長期実験を用いて検討する予定である。

E. 研究発表

論文発表

Kawamori T, Uchiya N, Watanabe K, Ohta T, Sugimura T, Wakabayashi K: Effects of heterocyclic amines with mammary gland carcinogenic potential on estrogenic response of uterus in ovariectomized rats. *Cancer Letter* 162: 31-37 (2001).

F. 图凡例

Figure 1: A: body weight, B: uterine weight, and C: ratio (% uterine/body weight) in rats treated with 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ E2, APNH and saline. D: Macroscopic view of uterus.

Figure 2: A: uterine stromal cell height, B: uterine epithelial cell height, and C: BrdU positive cell count in rats treated with 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ E2, APNH and saline. D: View of uterus with H&E staining. E: Immunostaining for BrdUrd in uterus.

Figure 1: Macroscopic Findings of Uterus

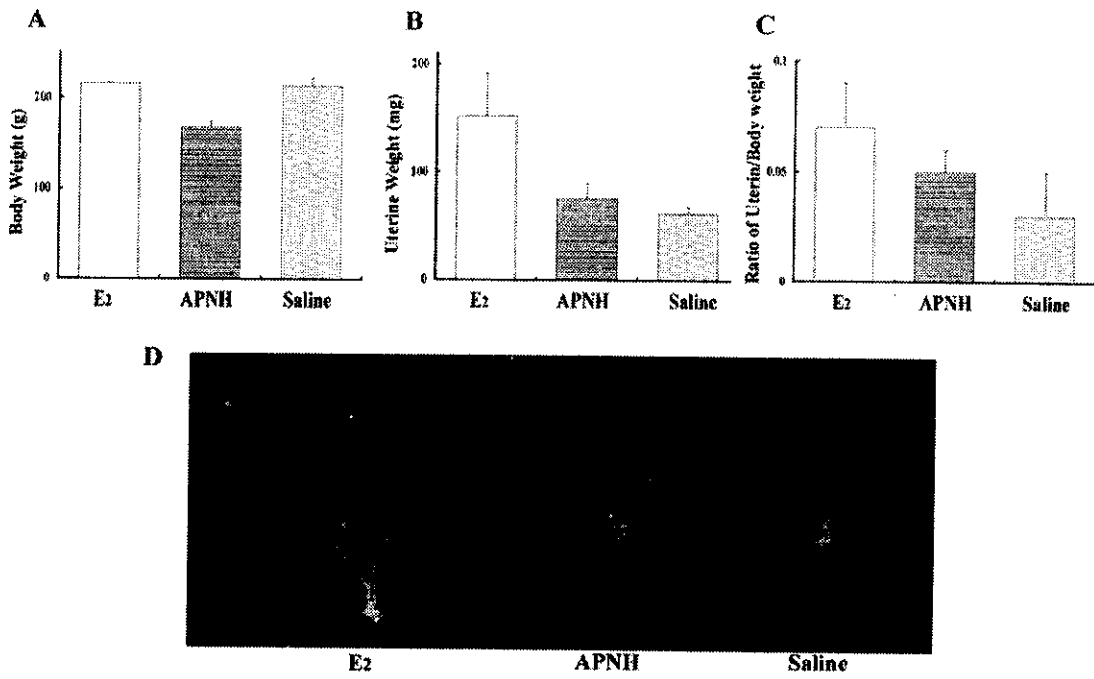


Figure 2: Microscopic Findings of Uterus

