

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 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 秦 順一

平成 13 年（2001 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、インフォームドコンセントのもとに、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）を平成11年度に引き続き測定した。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。さらに人工栄養のみで栄養されていた脳性小児麻痺では、ダイオキシン類が低かったこと、膵癌症例で平均値の10倍以上のダイオキシン蓄積例が1例見いだされた。

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、農業やプラスチック、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、ことを目的とする。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) インフォームドコンセントのもとに、剖検症例の主要臓器（腹部脂肪組織（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、197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、インフォームドコンセントを得て、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（52検体）および腸間膜脂肪（54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8.9、20.0pg/gであり、肝は脂肪組織の1/2以下であった。また脂肪重量あたりのdi-ortho PCB平均値はTEQ表記で、それぞれ2.4、5.2pg/gであり、肝は脂肪組織の約1/2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-ortho3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。今回、測定した剖検例で興味深い例が2例みられたが、その概要は以下のとおりである。第1例は、脳性小児麻痺患者（21歳にて死亡）で、生後1歳から21歳で亡くなるまで、人工栄養（クリニミール）のみで成長した方であり、この患者においてはダイオキシン類が血液、肝臓とも平均値の5～7分の1であることが明らかとなった。年齢を考慮しても、ダイオキシンが経口摂取されていることを推測させるとともに、少ないながらも暴露していたことはダイオキシンは、一部は経気道的あるいは経皮的に暴露する可能性を示唆するものと考えられた。第2例は、59歳男性で、膵癌の術後再発で亡くなった方であり、有機塩素系化合物、ダイオキシン、PCBいずれも高い蓄積を示しており、平均値の2-12倍に達していた。これまでも有機塩素系化合物とがんの関係は、報告されているが、特にDDT、DDE、PCBの血清濃度が高い膵癌症例では、K-rasのコドン12の変異が高頻度であるとの報告が1999年にLancetにある。本症例についても現在、K-ras変異を検討している。

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、高濃度の蓄積を認めた膵臓癌症例が見いだされた。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。

E. 研究発表

- 1) Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and non-ortho, mono-ortho substituted chlorinated biphenyls in Japanese human liver and adipose tissue. Takenaka S, Todaka T, Nakamura M, Hori S, Iida T, Yamada T, Hata J J Anal Toxicol (submitted)
- 2) Dioxins in bile in relation to those in the liver and blood of humans. Kitamura K, Sunaga M, Yamada T, Hata J, Watanabe S, Nagao M J Toxicol Soc (submitted)

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:ダイオキシン類の各同族体ごとのヒトでの吸収、排泄に関する報告はほとんどない。そこで健常被験者3名の協力を得て同一の献立による食事の摂取を一定期間行い、陰膳、糞便、皮脂、及び血液中ダイオキシン類量を測定して、ダイオキシン類の摂取量および排泄量を検討した。食事由来と胆汁中に排泄されるダイオキシン類量から糞便中に排泄された量を引くと約80%のダイオキシン類が吸収されていた。糞便へ排泄されたダイオキシン類総量は 300.6 ± 72.6 pg/dayであり、Total-TEQは 18.3 ± 5.9 pgTEQ/dayであった。OCDDが最も多く1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, PeCB, 1,2,3,4,6,7,8-HxCDFが続き、これらで総量の約70%を占めていた。TEQが最も高かった同族体は1,2,3,7,8-PeCDDで2,3,4,7,8PeCDF, PeCBが続き、これらでTotal-TEQの約70%を占めていた。皮脂への排泄総量は $4,186.4 \pm 1,054.5$ pg/day, Total-TEQが 23.8 ± 5.6 pgTEQ/dayであった。最大濃度はOCDDで総量の80%を超えており、TEQでは2,3,4,7,8PeCDF, PeCB, 1,2,3,7,8-PeCDDがTotal-TEQの約60%を占めていた。胆汁経由の排泄に比し、低塩素の排泄は皮脂の方が多かった。排泄経路が同族体によって異なることは、体内蓄積ダイオキシン類の排出を考える際に重要と考えられる。

A. 研究目的

平成12年度は11年度に続き、20例の病理解剖例のダイオキシン類濃度を測定した。これまでに解剖例27例の測定結果で、胆汁中のダイオキシン類濃度はほぼ血液中濃度に等しいこと、肝には塩素数の高いダイオキシン同族体が血中の10倍近く蓄積していることがわかった。平成12年度はダイオキシン類の異性体ごとの吸収と排泄経路を知るために、出納実験をおこなった。ヒト生体内のダイオキシンの半減期は、少量の14C-2,3,7,8-TCDDを低投与した実験から5.8~9.7年と非常に長いことが報告されているが、ヒトにおけるほかの同族体の代謝に関する実験のデータは無い。ダイオキシン類は通常の日常生活においては大半が食品からの摂取であり、その推定量は 2.4 pgTEQ/dayと発表されている。また排泄に関しては、母乳、皮脂におけるデータがあり、糞便に関しては、飯田らによる油症患者の報告があるのみである。本研究では、健常被験者3名の協力を得て同一の献立による食事の摂取を一定期間行い、陰膳、糞便、皮脂および血液中ダイオキシン類量を測定して、ダイオキシン類の摂取量および排泄量を検討した

B. 研究方法

同意を得て協力を得た被験者3名は同一の食事を9日間摂取した。その期間内に以下の要領で、陰膳と上記の被験者から血液、糞便および皮脂を摂取した。陰膳はフードミキサーで均一化したものに13C-TCDD/F~HpCDD/Fを各30pg, 13C-OCDDを各60pg, 13C-TCB~HxCBを各100pg添加した。3~9日目までに排泄された全糞便(約200g)を採取した。皮脂は3から9日目まで、トルエン、ヘキサン、アセトンおよびエタノールで十分に洗浄した50%含超純水エタノール綿で毎朝顔面を拭くことにより採取した。血液は4-5日目にヘパリン入りベネジエクト真空採血管(テルモ社製)に約50ml採取した。

C. 結果

陰膳中のダイオキシン類では、OCDDが最も多かった。同じ塩素系の同族体では塩素数の増加に伴って量が増加する傾向がPCDDおよびPCDFにおいて見られた。逆にCo-PCBsでは高塩素になるに従って減少する傾向があった。糞便中のダイオキシン排泄量においては、3名の被験者のダイオキシン類量に有意差はなかったため、3名の20検体の平均値で検討した。PCDDsとPCDFsの量は陰膳と同様な傾向があったが、Co-PCBsは3,3',4,4',5-PeCBが最も多かった。ダイオキシン類総量は 300.6 ± 72.6 pg/dayであり、Total-TEQは 18.3 ± 5.9 pgTEQ/dayであった。最大量の同族体はOCDDで、1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, PeCB,

1,2,3,4,6,7,8-HxCDFが続き、これらで総量の約70%を占めていた。TEQが最も高かった同族体は1,2,3,7,8-PeCDDで2,3,4,7,8-PeCDF, PeCBが続き、これらでTotal-TEQの約70%を占めていた。また、PCDDsがTotal-TEQの約50%を占め、同族体群で最も高いTEQであった。皮脂中のダイオキシン類排泄量は、ヒト皮脂排泄量を 1 g/dayとして試算した。ダイオキシン類の排泄総量は $4,186.4 \pm 1,054.5$ pg/day, Total-TEQが 23.8 ± 5.6 pgTEQ/dayであった。最大濃度の同族体はOCDDで総量の80%を超えていた。TEQで最も高かったのは2,3,4,7,8-PeCDFで、PeCB, 1,2,3,7,8-PeCDDが続きこれらでTotal-TEQの約60%を占めていた。また、PCDFsがTotal-TEQの40%以上を占め、同族体群で最もTEQが高かった。今回の研究で血液中のダイオキシン濃度では、最大濃度の同族体はOCDDであった。TEQではPeCB, 1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,4,7,8-PeCDFがほぼ同じ位で最も高く、Total-TEQの約70%を占めていた。

D. 考察

1日あたりのダイオキシン類同族体の排泄率は糞便で摂取量の2.4~29%、皮脂で6.4~227%であった。Total-TEQで見た糞便と皮脂の合計の排泄率は51%で、同族体群のTEQでは49.1~68.3%でCo-PCBsが最も高い排泄率だった。皮脂からのOCDD, 2,3,7,8-TCDF, TCBの排泄が観察されたが、これらの同族体は腸内でよく吸収され、皮脂からよく排泄されやすいといえる。逆に1,2,3,4,7,8-HxCDDと1,2,3,7,8,9-HxCDFは腸内でよく吸収されるが、皮脂からは排泄されにくく、糞便と皮脂の合計でも排泄率は20%に満たなかった。腸内を通過する消化物中のダイオキシン類に胆汁由来のダイオキシン類を考慮する必要がある。血液と胆汁のダイオキシン類濃度はほぼ等しいので血液中濃度から1日当たりの胆汁中に分泌される量を算出すると、 15.6 ± 4.7 pgTEQ/dayとなり、これと陰膳中における1日摂取量の総和を100%として糞便からの排泄率を求めると、糞便へはTotal-TEQ、各同族体群のTEQいずれも20%未満しか排泄されず、80%以上が吸収されると試算された。

E. 研究発表

論文発表

1) Dioxins in bile in relation to those in the liver and blood of humans. Kitamura K, Sunaga M, Yamada T, Hata J, Watanabe S, Nagao M J Toxicol Soc (submitted)

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。肝臓中の総Mono-及びDi-ortho-PCBsは脂肪組織中の約1/15であったが、脂肪重量あたりではほぼ同じであった。脂肪組織中の総Mono-及びDi-ortho-PCBsのTEQ換算値は肝臓中の約17倍で、脂肪重量あたりでは約1.2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10,11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

病理解剖により採取された肝臓及び腸間膜脂肪組織（20件）を分析対象とした。（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、インフォームドコンセントを得て、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。

2) 試薬

10種類のPCBs標準品はAccuStandard社製を、内部標準物質には¹³C¹²標識PCBs（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、ポリトロロン（キネマティカ社製）で撹拌抽出した後、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、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。容出したヘキサンを1mLに濃縮し、GC-MSを用いて分析した。

C. 研究結果

2000年は肝臓（20件）及び腸間膜脂肪組織（20件）を測定した。その結果をTable 1に示す。1998、1999年と同様、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1/15であったが、脂肪重量あたりではほぼ同じであった。TEQに換算したデータをTable 2に示す。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17倍で、脂肪重量あたりでは約1.2倍であった。Table 3に肝臓および腸間膜脂肪組織中の各Mono-及びDi-ortho PCBsの構成比を示す。数値に若干の差がみられるほかは1998および1999年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

1998年、1999および2000年に分析を行った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Coplanar PCBs）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。

論文発表

Takenaka S, Todaka T, Nakamura M, Hori S, Iida T, Yamada T, Hata J Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and non-ortho, mono-ortho substituted chlorinated biphenyls in Japanese human liver and adipose tissue. J Anal Toxicol (submitted)

研究要旨：新たな環境汚染物質 tris (4-chlorophenyl) methane (TCPMe) および tris (4-chlorophenyl) methanol (TCPMOH) と、他の有機塩素化合物 (PCB、DDTs、HCHs、HCB、クロルデン化合物 [CHLs]) について日本人の汚染実態とその蓄積および排泄特性を理解するため、脂肪組織、肝臓、そして胆汁中に残留するこれら化学物質の濃度を測定した。日本人の脂肪組織からは TCPMe と TCPMOH が検出され、ヒトに対する継続的な曝露が示唆された。PCBs と DDTs も、脂肪組織と肝臓での残留を認めた。胆汁中の濃度は、脂肪組織および肝臓中の濃度と強い相関関係を示し、脂肪組織 - 胆汁と肝臓 - 胆汁間で平衡状態にあり、胆汁経路で排泄されていることが示唆された。また加齢による蓄積傾向は認められたが、性差はみられなかった。有機塩素化合物の胆汁排泄率を推算したところ、p,p'-DDE と TCPMe は相対的に低値を示し、これら物質の排泄には、オクタノール/水分配係数が関与しているものと考えられた。排泄率とオクタノール/水分配係数との間で得られた相関関係は、ダイオキシン類など他の脂肪親和性有機塩素化合物の胆汁排泄予測に適用可能と思われる。

A. 研究目的

PCBs、DDTs、そして HCHs などの有機塩素化合物は高い生物蓄積性を有し、ヒトや野生生物の健康に影響を及ぼすため、その汚染や毒性影響に関する研究が必須である。これら有機塩素化合物は、ヒト体内でエストロゲンやアンドロゲン様に作用して内分泌機能を攪乱するため、様々な生殖障害を引き起こすことが懸念されている。tris (4-chlorophenyl) methane (TCPMe) および tris (4-chlorophenyl) methanol (TCPMOH) は、最近になって検出された環境汚染物質である。これら化学物質は、DDT に構造が類似しており、エストロゲンおよびアンドロゲンレセプターの両方に強い結合能をもつことが指摘されている。In vivo でこれら化合物の内分泌攪乱作用は明らかにされていないが、上記の報告は TCPMe と TCPMOH が比較的低濃度でエストロゲン様に作用することを示唆している。しかし、これら2つの化学物質の環境動態、とくにヒトへの曝露に関する研究例は極めて少ない。そこで他の有機塩素化合物 (PCB、DDTs、HCHs、HCB、クロルデン化合物 [CHLs]) とともに TCPMe と TCPMOH について日本人の汚染実態とその蓄積および排泄特性を理解するため、脂肪組織、肝臓、そして胆汁中に残留するこれら化学物質の濃度を測定した。また、胆汁中の残留レベルから、これら化学物質の胆汁経路での排泄率を推算し、その物理化学的特性を基に他の有機塩素化合物の排泄特性を推定した。

B. 研究方法

病理解剖にて採取された脂肪、肝臓、胆汁 22 検体について、TCPMe と TCPMOH を含む有機塩素化合物を分析した。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に抽出、フロリシー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。(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、インフォームドコンセントを得て、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. 結果と考察

脂肪組織の残留パターンは、DDTs > PCBs > HCHs > CHLs > HCB > TCPMe > TCPMOH の順であった。脂肪組織中の TCPMe と TCPMOH 濃度は、脂肪重当りでそれぞれ 2.7 ~ 44 (平均 18) ng/g と 0.28 ~ 31 (平均 12) ng/g であり、DDTs 濃度よりほぼ 2 桁低値であった。肝臓と胆汁中の TCPMe、TCPMOH そして他の有機塩素化合物の湿重量当りの濃度は、脂肪重当りに換算すると、ほぼ同レベルであった。肝臓の TCPMe と TCPMOH 濃度は、1.1 ~ 20 (平

均 7.0) と < 4.0 ~ 38 (平均 19) ng/g lipid wt. であった。胆汁中の TCPMe 濃度は、< 5.0 ~ 62 (平均 17) ng/g lipid wt. であり、肝臓よりいくぶん高値を示したが、TCPMOH 濃度は検出限界以下であった。胆汁から TCPMe が検出されたことは、この物質が胆汁経路で排泄されることを暗示している。また脂肪組織の PCBs 濃度は 230 ~ 6600 (平均 2100) ng/g lipid wt. であり、日本人体内の PCBs 濃度が依然として高いことは、その影響が長期化することを懸念させる。また脂肪中 DDTs 濃度は 160 ~ 8100 (平均 2300) ng/g lipid wt. であり、分析した有機塩素化合物の中で最も高いレベルであった。また TCPMe、TCPMOH、そして他の有機塩素化合物濃度は、男女とも加齢により増加傾向を示したが、性差は認められなかった。有機塩素化合物は脂肪親和性が高く、難分解性のため脂肪組織に強く残存する傾向がある。そこで、脂肪組織と胆汁中の濃度を用いて排泄率を推定した。その結果、有機塩素化合物の排泄率は、0.046 から 0.25% の範囲であった。p,p'-DDE は最も低い排泄率を示し、次いで β -HCH、TCPMe、クロルデン化合物、そして PCBs の順であり、HCB は分析した有機塩素化合物の中で最も高い排泄率を示した。有機塩素化合物の排泄率は、体内におけるこれら物質の残留性と強く関係している。そこで、胆汁排泄率とオクタノール/水分配係数 (Kow) との関係性を調べたところ、TCPMe は、最も高い Kow を有する脂肪親和性の物質であり、低い排泄率を示した。本研究でみられた排泄率と Kow との相関関係は、ダイオキシン類など他の有機塩素化合物の胆汁排泄の予測に適用できると考えられた。

D. 研究発表

学会発表

1) Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J, Watanabe S. Contamination, specific accumulation and elimination kinetics of tris(4-chlorophenyl)methane, tris(4-chlorophenyl)methanol and other persistent chlorinated endocrine disruptors in human from Japan. 日本内分泌かく乱化学物質学会 (横浜), 2000 年 12 月 論文発表

1) Watanabe M, Kannan K, Takahashi A, Loganathan BG, Odell DK, Tanabe S, Giesy JP. Polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, tris(4-chlorophenyl)methane, tris(4-chlorophenyl)methanol in livers of small cetaceans stranded along Florida coastal waters, USA. Environ Toxicol Chem 19:1566-1574 (2000).

2) Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J, Watanabe S. Occurrence of tris(4-chlorophenyl)methane, tris(4-chlorophenyl)methanol and other persistent organochlorines in Japanese human adipose tissue. Environ Health Perspec 108:599-603 (2000).

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
Kitamura K, Sunaga M, Yamada T, Hata J, Watanabe S, Nagao M	Dioxins in bile in relation to those in the liver and blood of humans.	J Toxicol Soc	submitted		
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	108	599-603	2000

DIOXINS IN BILE IN RELATION TO THOSE IN THE LIVER AND BLOOD OF HUMANS

Kimiyoshi Kitamura^{1,*}, Masahiro Sunaga¹, Taketo Yamada², Jun-ichi Hata², Shaw Watanabe¹ and Minako Nagao¹

¹*Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka 1-1-1, Setagayaku, Tokyo 156-8502,*

²*Department of Pathology, School of Medicine, Keio University, Shinanomachi 35, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan*

ABSTRACT

The levels of 20 dioxin congeners, 7 polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), 10 polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and three coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs), in bile were examined in comparison with those in the blood and liver, in 27 autopsy cases. Total-TEQ values were the same in the bile (43.2 ± 30.9 pg/g lipid) and blood (43.1 ± 24.2 pg/g lipid), and three times higher in the liver (127.8 ± 57.4 pg/g lipid). Highly chlorinated PCDDs and PCDFs have a tendency to accumulate in the liver, and their levels in bile and blood were relatively low compared with those in the liver, with 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzofuran having the highest tendency among the 20 congeners. Daily excretion in bile was calculated to be 54 pg TEQ at age 65, by assuming that the daily bile secretion is 750 ml and is concentrated 7.5-fold in the gallbladder. The correlation between bile and blood total-TEQ was high, with a correlation coefficient of 0.89 among the 27 autopsy cases. Thus, the regression equation of $y = 1.14x - 6.02$ will provide us levels in bile (TEQ per g lipid), knowing the blood total-TEQ level, where x is total-TEQ per g lipid of the blood. Further, accumulation of dioxins were estimated to be 0.99, 0.70 and 1.91 pg/g lipid /year in bile, blood and liver, respectively.

Keywords : PCDD, PCDF, Co-PCB, Bile, Blood, Liver

Running title: Dioxins in bile of humans

INTRODUCTION

These days in our environment, dioxins, including polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (Co-PCBs), are mainly produced by heating waste in incinerators, and then are emitted in the exhaust gas and fly ash. Dioxins are chemically stable and lipophilic compounds, and they accumulate in fish, meat and dairy products (Schechter *et al.*, 1996, Toyoda *et al.*, 1999). Humans are exposed to dioxins mainly through foods in daily life and the data of human exposure to dioxins based on blood levels are accumulating (International Agency for Research on Cancer 1997, US Department of Health and Human Services, 1998).

However, studies of the distribution of dioxins in the human body and excretion from the body are very limited. We have recently clarified that gastrointestinal absorption of dioxins is not directly associated with the number of chlorine atoms of the congeners, and each compound has its own characteristic features of metabolism (Kitamura *et al.*, 2001). 1,2,3,7,8,9-hexachlorodibenzofuran (1,2,3,7,8,9-HxCDF), 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran (1,2,3,7,8-PeCDF), 1,2,3,4,7,8,9-heptachlorodibenzofuran (1,2,3,4,7,8,9-HpCDF), 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (2,3,7,8-TCDF), octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD)

and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin(1,2,3,4,7,8-HxCDD) were well absorbed from gastrointestinal tract after ingestion, and OCDD, 2,3,7,8-TCDF and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (3,3',4,4'-TCB) were efficiently excreted from sebum but 1,2,3,4,7,8-HxCDD was scarcely excreted. In total-TEQ, about 22% were excreted from feces and 29% from sebum, while the fate of the other 50% is not clear at present (Kitamura *et al.*, 2001). Since the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) in humans has been estimated to be 5.8~9.5 years (Michalek *et al.*, 1996, Ott and Zober, 1996), and 33 years for 2,3,4,7,8-PeCDF (Rohde *et al.*, 1999), these dioxins might be subjected to enterohepatic circulation. Thus, prevention of absorption of dioxins from intestine would be helpful for reduction of body burden of dioxins after accidental exposure. For this purpose, we first need to clarify levels of dioxins in bile. In this study, we clarified dioxin levels in the bile of 27 autopsy patients, in relation to blood levels, for estimation of dioxin in bile from blood levels.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Authentic PCDDs, PCDFs and Co-PCBs, and ¹³C₁₂-PCDDs, ¹³C₁₂-PCDFs and ¹³C₁₂-Co-PCBs were purchased from Wellington Laboratories (Ontario, Canada). All

solvents used were of dioxin-analysis grade (Kanto Chemicals, Tokyo, Japan).

Sample preparation

Gallbladder bile, cardiac blood and liver tissue were obtained from 27 cadavers at autopsy with the permission of the bereaved families, and were stored at -80 °C until use. About 50 g of bile, more than 50 g of blood and about 5 g of liver tissue were stored from each cadaver. The ages and diagnoses of dead subjects were summarized in Table 1.

Preparation of samples for dioxin analysis:

Bile: Forty g of bile was transferred to a 250 ml centrifuge-tube, 30 pg of $^{13}\text{C}_{12}$ -TCDD/F ~ HpCDD/F, 60 pg of $^{13}\text{C}_{12}$ -OCDD, 100 pg of $^{13}\text{C}_{12}$ -TCB~HxCB were added and then a lipid fraction containing dioxins was obtained by extracting with 160 ml of acetone/*n*-hexane (2:1), and then *n*-hexane three times. The extracts were washed with ultra-pure water and the hexane fractions were pooled and dried by passing through a column containing 10 g Na_2SO_4 , concentrated to about 1 ml by a rotary evaporator, and then spontaneously dried by standing at room temperature. The lipid fraction was then weighed.

Blood: Fifty g of blood were transferred to a 250 ml centrifuge-tube, and to this $^{13}\text{C}_{12}$ isomers were added as described above, and then dioxin extraction was performed

within the same day. A lipid fraction that contained dioxins was extracted by the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ethanol/hexane method (Miyata *et al.*, 1998).

Liver: The method reported by Iida *et al.* (1999) was applied with a minor modification. Briefly, 1.5 g of the liver tissue was homogenized in a mortar in the presence of the same amount of Na_2SO_4 (Beck *et al.* 1990) and transferred to a 100 ml tube. Then, $^{13}\text{C}_{12}$ -isomers were added. A lipid fraction was obtained by extracting with 50 ml acetone/*n*-hexane (2:1), and then *n*-hexane three times.

Clean-up

The lipid fraction was dissolved in 2-3 ml *n*-hexane and subjected to a clean-up process. Clean-up was achieved by passing through a multi-layer column composed of Na_2SO_4 , 10% (w/w) AgNO_3 -silica gel, silica gel, 22% (w/w) H_2SO_4 -silica gel, silica gel, 44% (w/w) H_2SO_4 -silica gel, silica gel, 2% (w/w) KOH -silica gel and silica gel (Miyata *et al.*, 1989). After elution with 150 ml of *n*-hexane the specimen was evaporated to a small volume. The concentrate was applied to an active carbon-impregnated silica gel column (Masuzaki *et al.*, 1999), washed with 200 ml of 25% (v/v) dichloromethane/*n*-hexane, and then eluted with 200 ml of toluene. Five μl of *n*-nonane containing $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4-TCDD and $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDD spiking substances was added to this vessel (Safe, 1991). Samples dissolved in *n*-nonane were subjected to GC/MS

analysis.

GC/MS

PCDDs, PCDFs and Co-PCBs were analyzed by GC-MS, according to the method by the Environmental Protection Agency, U.S. (EPA, USA, Office of Water, 1994). The analytical conditions were as follows: gas chromatography was performed with an HP 6890 series unit (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipped with a Finnigan MAT-95S (Finnigan MAT GmbH, Bremen, Germany). The column used was a DB5MS fused silica capillary column, 0.25 mm i.d. x 60 m, with 0.25 μm film thickness (J&W Scientific, Folsom, CA). The column temperature was maintained at 140 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, heated to 220 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 17 $^{\circ}\text{C}$ / min, heated to 310 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 3 $^{\circ}\text{C}$ / min, and maintained at 310 $^{\circ}\text{C}$ for 4 min. The injection temperature was 260 $^{\circ}\text{C}$, ion source temperature was maintained at 250 $^{\circ}\text{C}$ and the carrier gas (helium) flow rate was 1.2 ml/min. The ionizing current, ionizing energy and accelerating voltage were 1 mA, 60 eV and 5 kV, respectively. The resolution of the mass spectrometer was maintained at about 10,000 throughout the work, and the analysis was carried out according to a selected ion monitoring (SIM) using 50 selected ions. A standard curve for quantification of each chemical was obtained using authentic congeners.

RESULTS

Levels of dioxins in the bile, blood and liver

Dioxin levels in amount and TEQ in the bile, blood and liver are summarized in Table 2. OCDD is the most abundant among 20 congeners in all of these organs, followed by Co-PCBs.

The TEQ values per g lipid were almost the same in bile and blood, being 43.2 ± 30.9 and 43.1 ± 24.2 , respectively (Table 2). On the other hand, it is three times higher in the liver, being 127.8 ± 57.4 . The lipid weights in bile, blood and liver were 1.24 ± 0.75 , 0.4 ± 0.04 and $5.09 \pm 2.50\%$, respectively, and TEQ per unit tissue-weight was 3 times higher in bile than in blood, 38 times higher in liver than in blood, and 12 times higher in liver than in bile. Table 2 also shows the TEQ values of the congener groups. The contribution of each group was the same in blood and bile, however, the contribution of PCDDs was relatively small, and that of PCDFs was relatively large in the liver compared with the bile and blood. Among 20 congeners, the contribution of 3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (3,3',4,4'-PeCB), 2,3,4,7,8-PeCDF and 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (1,2,3,7,8-PeCDD) were the most, more than 70% of the total-TEQ in all these three organs. 1,2,3,4,7,8-HxCDD and 2,3,7,8-TCDD followed them and accounted for more than 10% of the total TEQ in the three organs.

The characteristics of organ distribution of each compound were examined (Table 3). Ratios of the values per g lipid in the bile to the blood were between 0.5 and 1.5, indicating that distribution in these body fluids was almost the same, except for OCDF that was one-tenth in bile of that in blood. It was also revealed that highly chlorinated congeners of PCDDs and PCDFs were lower in bile than in blood, although the levels of all PCB congeners were almost the same in the bile and blood.

The ratio of the liver TEQ to the blood revealed that 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF has the highest tendency to accumulate in the liver, distribution to the blood was low, and to the bile was lower. Highly chlorinated congeners of PCDDs and PCDFs showed a similar tendency, although the extent was lower in the other congeners. Among the three Co-PCBs, the tendency was opposite to the number of chlorine atoms, and the ratio of the liver TEQ to the bile TEQ was the highest with 3,3',4,4'-TCB.

Daily secretion of dioxins into the bile

Daily secretion of bile from the liver is known to be about 500 ~1000 ml, and it is concentrated 5~10 fold in the gallbladder. Thus, the daily amount of gallbladder bile can be calculated as 100 ml, assuming that the daily bile secreted from the liver is 750 ml and concentrated 7.5-fold. Based on this value, the daily secretion into bile of the total-TEQ, and of each congener group are indicated in Table 4. Daily secretion was

calculated to be 53.9 ± 52.5 pg TEQ at age 65, from an average of 27 cases.

Relationship among bile, blood and liver TEQ

Correlation between blood TEQ and bile TEQ is demonstrated in Fig. 1. The correlation coefficient r was 0.89, and the regression equation was $y = 1.14x - 6.02$, where y indicates total-TEQ of bile per g lipid, and x is total-TEQ per g lipid of the blood. We also examined the relationship between blood total-TEQ and liver total-TEQ. As demonstrated in Fig.1, it also showed good correlation, with a correlation coefficient of 0.73, and the relationship between blood total-TEQ can be expressed as $y = 1.74x + 52.9$, where y is total-TEQ in terms of per g lipid of liver and x is total-TEQ per g lipid of blood.

Accumulation rate of dioxins in bile, blood and liver

Although the number of samples was not large, the ages of the subjects were distributed relatively well between 21 and 85. Therefore, we examined by age accumulation rates of dioxins in the bile, blood and liver, for total-TEQ and each of five congeners contributing largely to the total-TEQ. Regression analysis between total-TEQ and age revealed that there is relatively good correlation in these organs, with correlation coefficients of 0.52 ($p < 0.01$), 0.47 ($p < 0.05$) and 0.54 ($p < 0.01$) in bile, blood and liver, respectively (Table 5). Further it was estimated that dioxins appeared in bile after

about age 20, in contrast to the blood in which dioxins appeared from age 0 (Fig. 2.).

In bile, all of the major five congeners also showed a positive correlation between age and levels, although there are some exceptional cases in blood and liver. Regression lines indicated that all of the major five congeners appeared after about age 20 in bile, although appearance patterns are different by congener in blood and liver (Fig. 2).

Relationship between dioxin levels and disease at death

Eight of 12 cases of women and 10 of 15 cases of men were associated with malignant changes: three lung cancer, three malignant lymphomas, two urothelial cancer, two pancreatic cancer, two hepatomas, two acute myelocytic leukemia, one cancer in spinal cord, ovary, brain, stomach, colon, bladder and prostate. Three cases in men were associated with double cancers. Total-TEQ ranged from 17.1 to 287.3 pg TEQ per g lipid in the liver. However, there was no correlation between cancer diagnosis and the level of dioxins.

DISCUSSION

This study first demonstrated that the dioxin level in bile is almost the same as the level in blood in terms of TEQ per g lipid. The same level as in blood was observed not only as the mean, but also in 27 cases, with a correlation coefficient of 0.89. The bile and blood levels were one third of that in the liver in terms of TEQ per g lipid. Iida et al. (1999) also reported a similar trend in the ratio between blood and liver, although the ratio was 4.6 in their cases. It is noteworthy that the dioxin burden in liver is 38 times higher than that in blood in terms of per organ weight. These dioxins in liver would be distributed to various organs including bile and blood. However, there was a tendency that congeners with higher numbers of chlorine atoms were less efficiently distributed to bile when compared with blood, and OCDF was hardly distributed to bile.

It has been reported that 2,3,7,8-TCDD is not detected in the bile of guinea pigs and it was suggested that the fecal excretion of 2,3,7,8-TCDD in this animal resulted from direct intestinal elimination (Olson, 1986). However, in this study it was demonstrated that the level of 2,3,7,8-TCDD in human bile was higher than that in blood, in terms of per g lipid.

Regression analysis of 27 cases revealed that bile dioxin levels can be deduced based on blood total-TEQ level with an equation of $y = 1.14x - 6.02$, where $x =$