

母乳試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)濃度

化合物	母乳中濃度 (ng/g 脂肪)									母乳中濃度 (ng/g 脂肪)		
	東海大20	東海大21	東海大22	東海大25	東海大27	東海大30	東海大38	東海大43	東海大45	東海大39	計	
3臭素化体	#28	0.093	0.298	0.278	0.031	0.136	0.176	0.046	0.232	0.121	#28	37.680
4臭素化体	#37	ND	0.042	0.016	0.005	0.017	0.021	0.007	0.033	ND	#37	1.100
	#75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#75	0.490
	#71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#71	ND
	#47	0.568	0.366	2.152	0.298	0.518	0.816	0.204	2.247	0.578	#47	186.49
5臭素化体	#66	0.016	ND	0.016	0.009	0.011	0.056	0.010	0.040	ND	#66	3.240
	#77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#77	0.110
	#100	0.174	0.106	0.281	0.080	0.100	0.205	0.047	0.377	0.098	#100	27.230
	#119	0.009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#119	ND
6臭素化体	#99	0.158	0.118	0.390	0.137	0.111	0.235	0.056	0.447	0.113	#99	21.130
	#85	0.013	ND	0.025	0.008	ND	ND	ND	0.046	ND	#85	2.050
	#154	0.032	0.024	0.035	0.020	0.019	0.059	0.011	0.056	0.017	#154	1.330
	#153	0.432	0.308	0.273	0.174	0.355	0.257	0.160	0.396	0.140	#153	10.220
7臭素化体	#138	0.006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#138	0.220
	#183	0.090	0.086	0.042	0.040	0.059	0.078	0.031	0.076	0.033	#183	0.080
	#190	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#190	ND
計	1.59	1.35	3.51	0.80	1.33	1.90	0.57	3.95	1.10	291.37		

母乳中 PBDEs濃度 (ng/g 脂肪, 東海大39を除いた9検体について)

平均 1.79

最大 3.95

最小 0.57

\*東海大39のPBDEs濃度 (ng/g 脂肪): 291.37

他の9検体と比較して「東海大39」のPBDEs濃度は約2桁高い

◎質問事項

職歴

家電・OA製品, 自動車, プラスチック, 廃棄物等と関連がある職業か?

食事の嗜好等

魚介類(クジラ等を含む)の摂取量は多いか?

妊娠期間中に何か健康食品(肝油, 魚油等)や薬剤を摂取したか?

居住地近辺の環境条件等

樹脂工場, 自動車工場, 家電工場, 廃棄物処理場等が近隣にあるか?

母体および子供の病歴, 医学的所見

喫煙歴, その他

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

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）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

内分泌かく乱化学物質の胎児及び母体における汚染状況の分析と  
その細胞障害等の解析

分担研究者 鈴木 薫 名古屋市立大学  
研究協力者 杉浦真弓 名古屋市立大学  
孫田信一 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

**研究要旨**

内分泌かく乱化学物質の母体を介した胎児等への影響を明らかにするために、絨毛、羊水、さい帯血等の試料収集とこれら試料における内分泌かく乱化学物質（PCB、BPA 等）汚染状況の調査を開始した。これらの調査をとおして同一母体及び胎児における内分泌かく乱化学物質の経時的な汚染状態、及び母体と胎児との比較により化学物質の母体から胎児への伝達に関する基礎的情報を得ることができる。また、内分泌かく乱化学物質として疑われている重金属類の母体及び胎児への蓄積状況と重金属等に対する *in vivo* 細胞反応を調査し、内分泌かく乱化学物質がヒト健康に及ぼす影響の作用機序の一つと考えられる遺伝子（DNA）への障害として、8-ヒドロキシ-デオキシグアノシンの検出法を検討した。

**A. 研究目的**

環境中に存在する数多くの内分泌かく乱化学物質がヒト健康へ重大な影響を及ぼしていると予測されている。この中の化学物質のいくつかは調査が行われていて、その実態や作用機序についてある程度わかっているものがある。しかし、他のほとんどの内分泌かく乱化学物質は生体への汚染状況に関する調査はまだ不十分であり、そのヒト健康への影響についての情報は極めて限られている。特に、母

体を介して伝達される胎児への汚染とその影響の実態はほとんど分かっていない。そこで、本研究班において我々は内分泌かく乱化学物質の母体を介した胎児への汚染の実態把握と、これら内分泌かく乱化学物質のヒト健康影響の機序を検討することを目的として、本年度から調査解析を開始した。まず、当グループでは生体試料（羊水、さい帯血、臍帯、母体血等）の系統的集積を図り、主要な内分泌かく乱化学物質であるポリ塩化ビフ

ェニール (PCB)、ビスフェノール A (BPA) 等の母体と胎児試料における測定によって、母体と胎児の汚染濃度の相関及び汚染濃度の経時的変化について検討するための基礎的資料を得ることに着手した。さらに、内分泌かく乱化学物質の汚染濃度とそれらに対する *in vivo* の細胞反応の測定、及び 内分泌かく乱化学物質によるヒト健康影響の作用機序の一つとしてこれら化学物質による遺伝子への障害の可能性を測定する方法について検討を加えた。

## B. 研究方法

### B-1 生体試料の系統的収集と採取容器の検討

内分泌かく乱化学物質はヒト健康に種々の影響を及ぼしている可能性が指摘され、多くの化学物質がその候補として上げられている。これらの化学物質は成人はもとより母親を介して胎児への影響が危惧されているところであるが、しかしその実態は特定の化学物質を除いてまだ十分に把握されていない。本研究班において我々は胎児等における実態を可能な限り明らかにして、母体との関連、その汚染状況と経時的な変化を明らかにすることを旨として以下の生体試料について収集を図り、内分泌かく乱化学物質の影響調査に着手した。

#### 1) 収集試料

- a. 羊水 (出生前診断等で採取した検体の細胞分離後の試料)
- b. 流産絨毛 (散発性及び習慣性流

産絨毛)

- c. さい帯血 (出生時)
- d. 臍帯
- e. 母体血 (上記 a~d の羊水、流産絨毛採取時、及びさい帯血等の採取時において、それぞれ母体血を採取する。羊水を採取した胎児においては出生時にもさい帯血、母体血を採取する。)
- f. 母乳

#### 2) 生体試料採取容器の検討

微量の内分泌かく乱化学物質の測定にはディスポーザブル容器に種々の物質の溶出性が問題にされ、これまで主にガラス容器が用いられてきた。しかし、最近のディスポーザブル製品は改良が加えられ、化学物質の溶出性についてかなり厳密に管理されてきているものが含まれる。我々は複数のディスポーザブル容器 (FALCON、CORNING、IWAKI) 及び洗浄方法の異なるガラス容器 (各種洗剤、濃硫酸による洗浄後、メタノール又はエタノールによる洗浄) に関して、フタル酸ジエチルヘキシルを含む内分泌かく乱化学物質の溶出濃度を測定して、比較調査した。また、市販の分析用精製水 (住友精密工業、和光純薬ほか) 及び自家製超純水 (Milli-Q、Millipore; NanomureII, Barnstead) に関して内分泌かく乱化学物質の混入等に関して調査を実施した。

B-2 内分泌かく乱化学物質の胎児等の生体試料における測定、及び母体への汚染濃度との相関解析

我々は内分泌かく乱化学物質と認定されている物質の中でも重大な影響を及ぼしているものの一つであるポリ塩化ビフェニール (PCB)、樹脂の原料として用いられその影響が懸念されているビスフェノール A (BPA) 等について分析を行うことにした。

ポリ塩化ビフェニール (PCB) の測定法：省略

ビスフェノール A (BPA) の測定法：省略

これらの内分泌かく乱化学物質について、我々は特に同一母体における出生前診断時、出生時及び母乳について汚染濃度の変化を調査し、一方では同一胎児における汚染濃度との相関に着目して分析を進める。

### B-3 内分泌かく乱化学物質の汚染とそれらに対する *in vivo* 細胞反応測定、及び内分泌かく乱化学物質による遺伝的障害検出法の検討

1) 内分泌かく乱作用が疑われる重金属類 (Sn, Cd, Hg, Pb 等) の母体血及びさい帯血における汚染濃度を原子吸光光度計により測定し、これらの汚染濃度と、その *in vivo* 細胞反応として細胞内 peroxide 量を HPLC により調査する。また、メタロチオネイン量を Western blot 等の方法で測定し、重金属濃度との相関について検討する。

2) 内分泌かく乱化学物質によるヒト健康影響の作用機序の検討

内分泌かく乱化学物質が実際に細胞内で種々の影響を及ぼすと考えら

れるが、そのうちの一つの機序として遺伝子構造 (DNA) に直接障害を及ぼす可能性が考えられる。このような影響をみる指標として、DNA 中の 8-OH-dG (8-ヒドロオキシ-デオキシグアノシン) 分析法がある。これは HPLC を用いて微量の DNA で 100 万ヌクレオチド当たり 1 塩基程度の変異について判定できるとされている。これらの試料解析に適した高感度検出方法の開発を図り、この検出法の有用性を検討する。そして、8-ヒドロオキシ-デオキシグアノシンの検出量と重金属及び他の内分泌かく乱化学物質の蓄積濃度との相関を調べ、ヒト健康に及ぼす影響の機序について検討していく。

### C. 研究結果と考察

内分泌かく乱化学物質は母親を介して胎児への影響が危惧されているが、しかしその実態は多くの化学物質についてはまだほとんど分かっていない。本研究班において我々は胎児情報を可能な限り明らかにして、母体との関連や胎児における蓄積状況、また経時的な汚染状況を少しでも明らかにすることを目指している。そのため、我々はまず以下の生体試料について収集を図った。

#### C-1 胎児及び母体由来の生体試料の系統的収集と生体試料採取容器の検討

出生前診断等で採取した羊水、流産絨毛、さい帯血、臍帯、母体血、母乳等についてできるだけ同一母体、胎児

について経時的にセットとして採取、保存することに努めてきた。母体血とさい帯血を含む生体試料の 50 セットについては既に各分析に供されてきた。これらのいくつかに関しては種々の化学物質の解析には十分な量に至らないものもあるので、微量な試料で高感度に検出できる方法の開発が必要であり、他の分析方法開発グループとの連携が不可欠である。

試料の採取と並行して、内分泌かく乱化学物質測定に適した試料採取容器について検討した。FALCON、及び CORNING のディスポーザブル容器についてフタル酸ジエチルヘキシルを含む 3 種類の内分泌かく乱化学物質の溶出について測定を実施したが、いずれも検出限界以下であった。また我々の異なる洗浄方法によって準備されたガラス容器についてもいくつかの化学物質溶出濃度を測定して比較したが、いずれも検出限度以下であった。多量のサンプルを複数の施設で採取保存されたものから均一な品質の生体試料を得るためには、従来用いられてきたガラス容器に比べてハンドリングが容易であり、統一された容器の選定が早急に必要であると考え。さらに、生体試料または試薬の希釈調整等に用いる精製水の成分について検討を加えた。これまで市販の各種分析用精製水（住友精密工業、和光純薬など）と自家製超純水（Milli-Q、Millipore; NanomureII, Barnstead）について測定したところ、測定した 3 種類の内分泌かく乱化学物質の混入

はいずれも検出限界以下であり、希釈調整等に用いる精製水としての使用には特に問題はないと考えられた。さらに継続して調査を進めている。

**倫理面への配慮** ① 試料等の提供者及びその家族に対しては、研究内容と目的等を事前に十分に説明し自由意思に基づく文書によるインフォームドコンセントを受けて、試料等の提供を受ける。② 生体試料の収集とその解析研究等に関しては、厚生省等から出されている遺伝子解析研究に関する倫理指針等に沿い、個人識別情報の符号化等を徹底して個人情報を保護し、試料等の提供者及びその家族の人権及び利益を保護する。

## C-2 内分泌かく乱化学物質の胎児等の生体試料における測定、及び母体への汚染濃度との相関の解析

内分泌かく乱化学物質の代表例の一つであるポリ塩化ビフェニール（PCB）、及びビスフェノール A（BPA）等について分析を進めた。

これらの内分泌かく乱化学物質については、出生前診断時、出生時及び母乳について同一母体に関して継続して検体を収集し、汚染濃度の経時変化について調査してきた。また、同一胎児の出生前診断時における羊水と出生時のさい帯血についてそれぞれ調査を実施し、内分泌かく乱化学物質の胎児と母体への影響の相関について検討を進めているが、これらの結果については次年度にまとめて報告

をする予定である。

### C-3 内分泌かく乱化学物質の汚染濃度とそれらに対する *in vivo* の細胞反応の測定、及びこれらの化学物質による障害検出法の検討

1) 母体及び胎児に於ける内分泌かく乱作用が疑われる重金属類（スズ、鉛など）及び他の重金属（銅など）の母体末梢血と出生児さい帯血における汚染濃度を原子吸光光度計により測定した。これまで 30 セットの生体試料に関して原液〜100 倍希釈試料を用いて測定した。母体血における測定値（これまで報告された数値の例）は以下のとおりである。鉛：母体血中の平均値、16.7 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 400-700 ppb、NHANES III では 5-560 ppb）、スズ：母体血中の平均値、15.3 ppb、カドミウム：母体血中の平均値、1.60 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 3-5 ppb）、銅：母体血中の平均値、1212 ppb（生化学データハンドブックでは成人全血中 690-1500 ppb）。いずれも成人におけるこれまでの報告値に比べ、同範囲内かあるいはそれよりも低い数値を示した。そして、いずれの重金属においても、さい帯血における濃度は母体血に比べて（数例の例外を除いて）同程度かむしろ低い値を示した。さい帯血中の濃度平均値は、鉛 12.2 ppb、スズ 14.7 ppb、カドミウム 0.79 ppb、銅 501.9 ppb であった。また、調査した重金属に関して個体間でばらつきがあり、さい帯血の濃

度は母体血の濃度に強く関係しているように見える。さらに、*in vivo* 細胞反応として、細胞内 peroxide 量とメタロチオネイン量を HPLC 及び Western Blot 法で測定し、重金属濃度との相関について解析を開始した。

### 2) 内分泌かく乱化学物質によるヒト健康影響の作用機序の検討

内分泌かく乱化学物質が細胞に及ぼす機序の一つとして、遺伝子構造に直接障害を及ぼすことが考えられ、遺伝子、DNA への障害を DNA 中の 8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン（8-OH-dG）の増加値として検出できるかを検討した。これまで微量の 8-OH-dG の検出方法の改良を試みた。今後さらに高感度の検出方法の開発を図り、実際にこの方法で重金属及び他の内分泌かく乱化学物質の汚染濃度との相関を明らかにして、ヒト健康に及ぼす影響の機序について検討していく。

有機スズは内分泌かく乱化学物質としてリストに上がっているが、他のいくつか（鉛、カドミウム、水銀）も内分泌かく乱化学物質として疑われている（平成 12 年度環境庁報告リスト）。これらのうち、カドミウムや水銀は公害病の原因物質として過去に調査されてきたが、国内における最近の生体内における蓄積状況についての情報は十分ではないし、また内分泌かく乱作用に視点を置いた調査は少ない。重金属は胎児や胎盤等を含む特定器官への蓄積とその影響の危険性が考えられる。すなわち、重金属類は直接的影響ばかりでなく、間接的影響

及び重金属類あるいは他の内分泌かく乱化学物質との相加相乗作用が考えられる。最近の報告では、重金属の過剰な存在によるフェントン反応によって活性酸素の障害の相乗作用が起こり種々の障害が生じることが知られている。したがって、これらの作用機序による DNA・遺伝子への障害が生殖腺の発生、分化等に影響を及ぼし、結果的に内分泌かく乱作用を発現する可能性も考えられる。

我々は本研究をとおして、内分泌かく乱作用を有すると考えられる化学物質について、母体及び胎児等への蓄積の実態とその蓄積に対する *in vivo* 細胞反応との関係を明らかにするとともに、内分泌かく乱作用の機序の一つとして遺伝子等への障害を予測してその検出系の検討を進める。内分泌かく乱化学物質に対する *in vivo* 細胞反応や、その障害の一つと考えられる遺伝子への影響を DNA 変異を指標にして検出し、その実態について明らかにすることができるならば、その意義は大きいと考える。

#### C-4 妊婦の残留ポリ塩化ビフェニール成分の測定について

一時期注目を浴び測定されたポリ塩化ビフェニール (PCB) も最近、妊婦や胎児血中に残留している可能性が示唆され社会的な話題になっている。PCB そのものが胎児や新生児発育にいかなる影響や長期予後が関連するかは定かではないが環境汚染物質としてみのがすことはできない。

我々は GC/MS 法で測定する手技を確立し、母胎血、羊水、臍帯血にどのような割合で汚染がすすんでいるかを明らかにすべく試験的な検討を進めている。しかし、データの蓄積は十分ではなく次年度の成績に是非、他の環境汚染物質とともに明らかにする予定である。

#### D. 研究業績

発表準備中

#### E. 知的所有権の取得状況

該当事項なし

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

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

不妊症患者の血液等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	伊藤裕子	愛知県衛生研究所
	猪飼誉友	愛知県衛生研究所
	近藤文雄	愛知県衛生研究所
	岡 尚男	愛知県衛生研究所
	松本 浩	愛知県衛生研究所

要旨

不妊症患者等を対象として、クロルデンとその関連物質（CLDs）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、同一患者の末梢血液と腹水（ $n=12$ ）、それに母体末梢血とさい帯血（ $n=8$ ）中における濃度の相関について検討を加えた。検出を試みた 7 種の化学物質のうち、HCB の検出率が 98%（患者末梢血、腹水、母体末梢血：100%、さい帯血：88%）と最も高く、次いで *trans*-ノナクロルが 63%（患者末梢血、母体末梢血：100%、腹水：31%、さい帯血：25%）、*cis*-ノナクロルが 17%（患者末梢血：42%、母体末梢血：25%、腹水、さい帯血：0%）で、それ以外の物質は検出されなかった。また、検出された物質の中央値は、ヘキサクロロベンゼンが 0.05 ppb（患者末梢血：0.11 ppb、腹水：0.03 ppb、母体末梢血：0.08 ppb、さい帯血：0.03 ppb）、*trans*-ノナクロルが 0.10 ppb（患者末梢血：0.12 ppb、腹水：0.04 ppb、母体末梢血：0.12 ppb、さい帯血：0.04 ppb）、*cis*-ノナクロルが 0.04 ppb（患者末梢血：0.04 ppb、母体末梢血：0.03 ppb、腹水及びさい帯血：ND）であった。同一患者から採取した試料中の HCB 濃度についてみると、患者末梢血と腹水には有意な正の相関関係（順位相関係数=0.722、 $n=12$ 、 $p=0.017$ ）が認められたが、母体末梢血とさい帯血には有意な相関関係は認められなかった（順位相関係数=0.605、 $n=7$ 、 $p=0.139$ ）。



## 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、腹水、母体末梢血及びさい帯血の計 24 検体について、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 の測定を実施した結果、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル及びヘキサクロロベンゼンの 3 物質がサブ ppb のオーダーで検出された。そこで、本年度の研究ではより多くの試料を分析し、昨年度の調査結果の確認を試みるために、不妊症患者及び母体末梢血、腹水、それに帯血中のこれら化学物質の濃度を測定した。さらに、患者末梢血と腹水、及び母体末梢血とさい帯血における濃度の相関についても検討を加えた。

## B. 研究方法

### B. 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。

### B. 2. 試料

東海大学病院を受診した不妊症患者及び分娩予定者 21 名からインフォームドコンセントを得た後、血液試料等の提供を受けた。患者末梢血と腹水は 13 名、母体末梢血とさい帯血は 8 名から採取した。

### B. 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-C1]<sup>+</sup> 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:  $M^+$  m/z 284

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

### 3. 試験溶液調製法

試料を遠心分離後、上清についてスキーム1に従って操作を行ない調製した。

### B. 4. 統計的解析

測定値は中央値及び( )内に示した 25-75 パーセントイル値で表した。調査及び測定結果に対し、パソコン用統計解析ソフト StatView を用いて統計解析を行なった。統計解析は、ノンパラメトリック (Spearman の順位相関) 法を用いた。

### C. 結果と考察

患者末梢血 (血清) 12 試料 (2. 試料では 13 名と記述してあるが、1 名分の血清が搬送中に破損したため、実際に分析したのは 12 試料となる) 腹水 13 試料、母体末梢血 (血清) 8 試料、さい帯血 (血清) 8 試料を分析した結果を表-1 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 HCB で、さい帯血からの 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 98% (40/41) であった。その濃度は中央値として、患者末梢血中で 0.11ppb (0.07-0.13 ppb)、腹水中で 0.03 ppb (0.03-0.03 ppb)、母体末梢血中で 0.08 ppb (0.06-0.011 ppb)、さい帯血中で 0.03 ppb (0.02-0.04 ppb) であった。次いで高頻度に検出されたものは *trans*-ノナクロルで、全体としては 63% (26/41) の検出率で、患者末梢血及び母体末梢血試料では

全検体から検出されたが、腹水では 13 試料のうち 4 試料 (検出率 31%)、さい帯血では 8 試料のうち 2 試料 (検出率 25%) から検出されたのみであった。検出された濃度の中央値は、患者末梢血は 0.12 ppb (0.08-0.22 ppb)、腹水中は 0.04 ppb (0.04-0.07 ppb)、母体末梢血中は 0.12 ppb (0.09-0.18 ppb)、さい帯血中は 0.04 ppb (0.03-0.04 ppb) であった。次いで高頻度に検出されたものは *cis*-ノナクロル (7/41、検出率 17%) で、患者末梢血 12 試料のうち 5 試料 (42%) から検出され、その濃度の中央値は 0.04 ppb (0.04-0.06 ppb)、母体末梢血 8 試料のうち 2 試料 (25%) から検出され、その中央値は 0.03 ppb (0.03-0.03 ppb) であった。しかし、腹水及びさい帯血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シサイド、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。

以上の結果は、検出率及び濃度範囲ともに、昨年度実施した子宮内膜症患者、妊娠母体、及び、さい帯を試料とした調査結果 (n=24) とほぼ同様な値であった。したがって、これらの測定値が子宮内膜症患者及び不妊症患者の末梢血、腹水、それに母体末梢血及びさい帯血中の平均的な CLDs 及び HCB の検出率及び濃度範囲と結論付けられた。

今回 CLDs 及び HCB の測定に用いた試料のうち、患者末梢血及び腹水の 12 組、母体末梢血及びさい帯血の 8 組の

試料がいずれも同一のヒトから採取されたものであったことから試料間の濃度関係を比較、解析することが可能であった。その結果、図-1 に示すように、不妊症患者末梢血中の HCB 濃度と腹水中の濃度には有意な正の相関（順位相関係数：0.722、 $p=0.017$ ）が存在することが明らかとなった。一方、母体末梢血中とさい帯血中の濃度には有意な相関は認められなかった（順位相関係数：0.0605、 $p=0.139$ ）。また、CLDs に関しては、検出された試料数が少なく、統計解析処理を行うことはできなかった。

#### D. 結論

D. 1. 不妊症患者末梢血と腹水、母体末梢血とさい帯血から HCB、CLDs が検出され、HCB（中央値 0.05 ppb；25-75% 値 0.03-0.10 ppb）は腹水 1 試料を除く全検体（98%、40/41）から、*trans*-ノナクロル（0.10 ppb；0.06-0.17 ppb）は患者及び母体末梢血の全検体を含む 63%（26/41）からと高頻度に検出され、また、*cis*-ノナクロル（0.04ppb；0.03-0.05 ppb）も患者（5/12）及び母体の末梢血（2/8）から検出され、全体としての検出率は 17%であった。

D. 2. ヘプタクロルエポキシサイド、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。

D. 3. 以上の結果は、検出率及び濃度範囲ともに、昨年度実施した調査結果とほぼ同様な数値であった。

D. 4. 同一患者から採取した試料中の HCB 濃度には、患者末梢血と腹水では有意な正の相関関係（順位相関係数=0.722、 $n=12$ 、 $p=0.017$ ）が認められたが、母体末梢血とさい帯血には有意な相関関係は認められなかった（順位相関係数=0.605、 $n=7$ 、 $p=0.139$ ）。

#### E. 研究業績

学会発表：岡 尚男、伊藤裕子、猪飼 誉友、近藤文雄、松本 浩、GH I、中澤裕之、牧野恒久、「GC/MS による人血清中のクロルデン及びその関連物質の分析」、第 25 回日本医用マススペクトル学会年会（広島）、2000 年 9 月

血清 (50ml 共栓付き遠沈管)	約 3 g
エタノール	5 ml
エーテル	2.5 ml
ヘキサン	10 ml
振とう (10分)	
遠心分離 (3000 rpm、10分)	
ヘキサン層	
脱水	
濃縮乾固 (30 ml ナス型フラスコ)	
セップパックプラス フロリジル (15%エーテル/ヘキサン 10 ml 予洗)	
アプライ 15%エーテル/ヘキサン	1 ml
洗浄 15%エーテル/ヘキサン	10 ml
溶出液 (25 ml ナス型フラスコ)	
濃縮乾固	
内標準液 *	0.5 ml
試験溶液	

\* : 1-クロロテトラデカン 25 ppbヘキサン溶液

## スキーム 1. 人血清の分析法

表-1 不妊症患者の末梢血と腹水、及び母体末梢血とさい帯血の分析結果

(単位: ppb)

試料種別 測定項目	患者末梢血		患者腹水		母体末梢血		さい帯血		計	
	検出率% (検出数)	中央値 (25-75%)	検出率% (検出数)	中央値 (25-75%)	検出率% (検出数)	中央値 (25-75%)	検出率% (検出数)	中央値 (25-75%)	検出率% (検出数)	中央値 (25-75%)
ヘキサクロロ ベンゼン	100 (12/12)	0.11 0.07-0.13	100 (13/13)	0.03 0.03-0.03	100 (8/8)	0.08 0.06-0.11	88 (7/8)	0.03 0.02-0.04	98 (40/41)	0.05 0.03-0.10
<i>trans</i> -ノナクロル	100 (12/12)	0.12 0.08-0.22	31 (4/13)	0.04 0.04-0.07	100 (8/8)	0.12 0.09-0.18	25 (2/8)	0.04 0.03-0.04	63 (26/41)	0.10 0.06-0.17
<i>cis</i> -ノナクロル	42 (5/12)	0.04 0.04-0.06	0 (0/13)	-	25 (2/8)	0.03 0.03-0.03	0 (0/8)	-	17 (7/41)	0.04 0.03-0.05
ヘプタクロル エポキシド	0 (0/12)	-	0 (0/13)	-	0 (0/8)	-	0 (0/8)	-	0 (0/41)	-
オキシクロルデン	0 (0/12)	-	0 (0/13)	-	0 (0/8)	-	0 (0/8)	-	0 (0/41)	-
<i>trans</i> -クロルデン	0 (0/12)	-	0 (0/13)	-	0 (0/8)	-	0 (0/8)	-	0 (0/41)	-
<i>cis</i> -クロルデン	0 (0/12)	-	0 (0/13)	-	0 (0/8)	-	0 (0/8)	-	0 (0/41)	-

中央値及び25-75% 値は検出された検体についてのみの値

検出限界: ヘプタクロルエポキシド、オキシクロルデン: 0.2 ppb  
*trans*-、*cis*-クロルデン、*trans*-、*cis*-ノナクロル: 0.03 ppb  
 ヘキサクロロベンゼン: 0.02 ppb

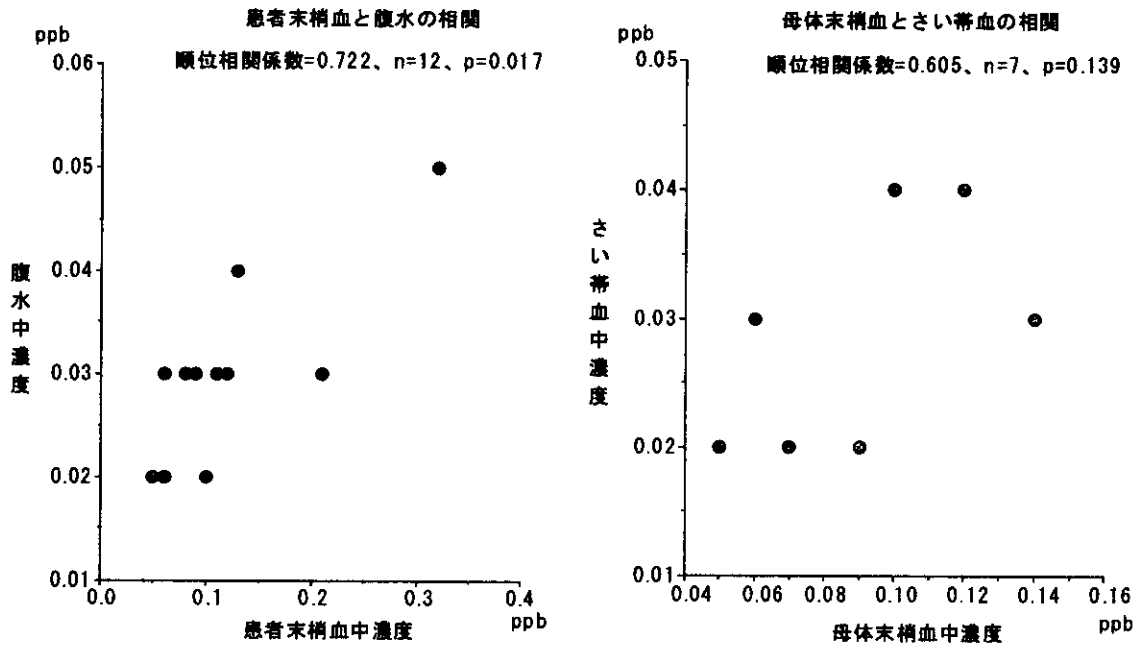


図-1 同一患者から採取した試料(患者末梢血と腹水、母体末梢血とさい帯血)中のヘキサクロロベンゼン濃度の相関

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

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

不妊症患者の血清及び腹水中の揮発性有機化合物の分析

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	愛知県衛生研究所
	近藤文雄	愛知県衛生研究所
	猪飼誉友	愛知県衛生研究所
	伊藤裕子	愛知県衛生研究所
	岡 尚男	愛知県衛生研究所
	松本 浩	愛知県衛生研究所

要旨

不妊症患者の生体内における揮発性有機化合物の存在実態を明らかにすることを目的に、18名の患者（平成11年度5名、平成12年度13名）の末梢血及び腹水36検体を採取し分析を実施した。その結果、これら生体試料の80%からトルエンが検出され（中央値1.2ppb）、次いでp-ジクロロベンゼンが49%（4.0ppb）、m,p-キシレンが43%（1.8ppb）と比較的高頻度に検出された。また、エチルベンゼンが37%（1.2ppb）、o-キシレンが29%（0.7ppb）、スチレンが26%（0.6ppb）、ベンゼンも11%（0.6ppb）の試料から検出されたが、ナフタレンは全く検出されなかった。以上の結果より、今回測定を行なった不妊症患者の体内には、トルエンなどの揮発性有機化合物がppbからサブppbのオーダーで存在することが示唆された。また、採血方式及び場所の違いによる血中揮発性有機化合物濃度の違いについて調べるため、愛知県衛生研究所（愛知衛研）職員4名について、愛知衛研で愛知衛研方式で、また東海大学病院で愛知衛研と東海大の2方式で末梢血を採取して、その揮発性有機化合物濃度を測定したところ、愛知衛研方式で採血した場合の検出率及び濃度が、東海大方式のそれらよりも低い傾向が認められた。

その理由の一つとして、愛知衛研方式は、周囲の環境中からの汚染を防止するために、血清保存用試験管内の空気を窒素で置換するなどの対策を講じていたことが考えられた。今後、不妊症患者等の生体内における揮発性有機化合物のより詳細な存在実態を明らかにするために、周囲の環境等からの汚染防止対策を施した採血方式及び測定法の確立が重要な課題であると考えられた。

## A. 研究目的

高分子系接着剤や塗料等の溶剤には、ベンゼン、トルエン、キシレン等が使われており、空気中に揮散したこれらの化合物に人体が曝されることが問題となっている。これら溶剤由来の化合物以外にも、食品の容器包装や輸送用の梱包資材等に汎用される発泡スチロールから漏出するスチレンモノマー、あるいは、衣類の防虫等に使われる p-ジクロロベンゼンやナフタレンなど、主に空気を介して人体に取り込まれ、内分泌かく乱作用などの生体影響が疑われている揮発性有機化合物はかなりの数にのぼる。

今回、不妊症患者の生体内における揮発性有機化合物の存在実態を明らかにすることを目的に、その血液及び腹水中の濃度を測定した。また、サンプリング方法及び場所の違いによる血中揮発性有機化合物濃度の違いについても検討を加えた。

## B. 研究方法

### B.1. 試薬及び材料

「水中の揮発性有機化合物分析用

標準溶液」(54 種混合メタノール溶液、各成分 1 mg/mL) は東京化成製、「VOCs 混合標準液(45 種混合)」(二硫化炭素溶液、各 1 mg/mL) は関東化学製、内部標準物質として使用したベンゼン-d6、トルエン-d8、エチルベンゼン-d8、o, m, p-キシレン-d8、スチレン-d8、p-ジクロロベンゼン-d4、ナフタレン-d8 は CDN Isotopes 社製(ケベック、カナダ)、二硫化炭素は和光純薬製作業環境測定用、メタノールは和光純薬製残留農薬分析用、ブランク水はエビアン(輸入元:伊藤忠商事, 販売者:カルピス)をそれぞれ使用し、その他については、和光純薬製の特級試薬を使用した。

血液及び腹水中の揮発性有機化合物濃度の測定には、「水中の揮発性有機化合物分析用標準溶液」を標準溶液として用い、その濃度が 0.5、1、2、5、10 µg/ml となるようにメタノールで段階的に希釈した。

揮発性有機化合物に対する個人暴露濃度の測定には、「VOCs 混合標準液(45 種混合)」を標準溶液として用い、その濃度が 0.1、0.2、0.4、1、2、5 µg/mL

となるように二硫化炭素で段階的に希釈した。

病院内空気中等の揮発性有機化合物濃度測定用試料の捕集には、柴田科学機器工業製「有機ガスサンプラー用活性炭チューブ」を使用した。

## B. 2. 試料採取

### 1) 不妊症患者の末梢血及び腹水

東海大学病院で受診した不妊症患者 18 名（平成 11 年度 5 名、平成 12 年度 13 名）からインフォームドコンセントを得た後、末梢血と腹水の提供を受けた。末梢血は腹腔鏡検査前、腹水は検査中に採取した。

なお、平成 11 年度は東海大方式（後述）で試料採取、血清・腹水の分離を行なったのに対し、平成 12 年度は、採血を東海大方式（東海大で洗浄した注射筒）で行ない、その後の血清・腹水分離を愛知県衛生研究所（愛知衛研）方式（後述）で行なった。

### 2) 愛知衛研職員の末梢血

4 名の職員について異なる 3 方法（①愛知衛研で愛知衛研方式、②東海大学病院で東海大方式、及び③東海大学病院で愛知衛研方式）にて採血及び血清分離を行なった。

採血は 2 日連続で行ない、1 日目は①、2 日目は②及び、③にて実施した。

### 3) 試料採取方式

#### a) 東海大方式

#### 注射筒（ガラス製）の洗浄及び保管

#### 方法

超音波洗浄器用洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。乾熱滅菌器で乾燥（200℃、2 時間）後、紙製（HOGI 製）の袋に入れ、オートクレーブで滅菌（180℃、30 分）。乾熱滅菌器で乾燥（200℃、2 時間）後、クリーンベンチ内で 1 日紫外線照射を行ない、使用時まで実験室内の引き出しに保管した。

#### 血清保存用共栓試験管の洗浄及び保管方法

超音波洗浄器用洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。200℃で 2 時間加熱処理後、アルミ箔で包み、再度 200℃で 2 時間加熱し、使用時まで実験室内の引き出しに保管した。

#### 試料採取及び保存

上述の洗浄及び処理を施したガラス製注射筒で採取した末梢血及び腹水を共栓透明摺試験管に入れ、遠心分離（2000 rpm、10 分）した。上層に分離された血清及び腹水を処理済みガラス製注射筒で採取し、処理済みの共栓透明摺試験管に入れた後、冷凍保存した。

#### b) 愛知衛研方式

#### 注射筒（ガラス製）の洗浄及び保管方法

中性洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。自然乾燥後アルミ箔で包み、オートクレーブで滅菌（120℃、



20分)。37℃で乾燥後、使用時までそのまま保管した。

#### 血清保存用スクリーキャップ試験管の洗浄及び保管方法

中性洗剤を用いて洗浄後、水道水及び蒸留水で水洗。自然乾燥後、残留農薬試験用メタノールで洗浄し、180℃で5時間加熱処理後、試験管内の空気を窒素ガスで置換し、キャップをして使用時まで実験室内で保管した。なお、キャップ部分は洗剤およびメタノールによる洗浄後、窒素を吹き付けて使用した。

#### 血清分注用パスツールピペットの洗浄及び保管方法

血清保存用スクリーキャップ試験管と同様に洗浄し、使用時まで実験室内で保管した。

#### 試料採取及び保存

上述の処理を行なったガラス製注射筒で採取した末梢血を処理済みスクリーキャップ試験管に入れ、遠心分離(2000 rpm、10分)した。上層に分離された血清をパスツールピペットで採取し、処理済みスクリーキャップ試験管に入れた後、冷凍保存した。

#### 2) 病院内空気等の捕集

空気の捕集は、両端を切断した捕集管をポンプ(柴田科学機器工業製 MP-Σ30 及び PAS-500S 型)にセットし、毎分 100~130 mL の流量で 24 時間行なった。ポンプは、東海大学病院内の

手術室(5ヶ所)及び研究室(6ヶ所)、愛知衛研と東海大学病院の往復に使用した自家用車内(1ヶ所)、それに愛知衛研職員の自宅の居間(1ヶ所)に設置し、空气中揮発性有機化合物の捕集を行なった。また、愛知衛研職員1名について、PAS-500S型ポンプを胸元(1ヶ所)に着け試料の採取を行なった。

#### B.3. 測定項目

##### 1) 血清及び腹水

血清及び腹水中の揮発性有機化合物濃度は、内部標準物質(安定同位体)が入手できた p-ジクロロベンゼン、トルエン、m、p-キシレン、o-キシレン、ベンゼン、エチルベンゼン、スチレン、ナフタレンの8物質について測定を行なった。

##### 2) 病院内空気等

以下に示す 41 物質を測定対象とした。

##### 脂肪族炭化水素類(13物質)

ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン、ドデカン、トリデカン、テトラデカン、ペンタデカン、ヘキサデカン、2,4-ジメチルペンタン、2,2,4-トリメチルペンタン

##### 芳香族炭化水素類(10物質)

ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、m、p-キシレン、o-キシレン、スチレン、

1,3,5-トリメチルベンゼン、  
1,2,4-トリメチルベンゼン、  
1,2,3-トリメチルベンゼン、  
1,2,4,5-テトラメチルベンゼン  
テルペン類 (2物質)

α-ピネン、リモネン

ハロゲン類 (9物質)

トリクロロエチレン、テトラ  
クロロエチレン、クロロホルム、  
1,1,1-トリクロロエタン、1,2-  
ジクロロエタン、1,2-ジクロロ  
プロパン、p-ジクロロベンゼン、  
四塩化炭素、クロロジプロモ  
メタン

エステル類 (2物質)

酢酸エチル、酢酸ブチル

アルコール類 (1物質)

n-ブタノール

アルデヒド・ケトン類 (4物質)

メチルエチルケトン、メチル  
イソブチルケトン、ノナナール、  
デカナール

#### B. 4. 分析方法

1) 血清及び腹水中の揮発性有機化合物濃度

試料 1 mL 及び飽和食塩水 14 mL を  
ヘッドスペースバイアル (容量 22 mL)  
に採り、内部標準溶液 3 μL を加えた  
後、テフロン張りのシリコンゴムセプ  
タムおよびアルミシールで密封した。  
このバイアルをヘッドスペースオー  
トサンプラーにセットし、ヘッドスペ

ース-ガスクロマトグラフィー/質量  
分析法 (GC/MS) により測定を行なっ  
た。

2) 病院内空気中等の揮発性有機化合物濃度

空気中の揮発性有機化合物濃度の  
測定は、厚生省通知 (平成 12 年 6 月  
30 日付け生衛発第 1093 号「室内空気  
中化学物質の室内濃度指針値及び標  
準的測定方法について」) に従って、  
以下に示す方法で行なった。

試料を採取した捕集管から捕集剤  
(活性炭) を取り出し試験管に入れた  
後、二硫化炭素 1 mL と内部標準溶液  
(d8-トルエン 100 μg/mL) 1 μL を加  
えて栓をした。時々軽く振とうしなが  
ら 2 時間放置し、この上清を試験液と  
した。測定は GC/MS により行なった。

各揮発性有機化合物の濃度は、次式  
を用いて算出した。

$$C = \frac{(As - At) \times 1000}{V \times 293 / (273 + t) \times P / 101.3}$$

C : 20 °C における空気中の各測定  
対象物質濃度 (μg/m<sup>3</sup>)

As : GC に注入した試験液中の各測  
定対象物質の重量 (ng)

At : ブランク値 (ng)

V : ガスメーターで測定した捕集量  
(l)

t : 試料採取時の平均気温 (°C)

P : 試料採取時の平均大気圧 (kPa)

検量線は、各濃度の混合標準溶液を GC/MS で測定し、検出された測定対象物質の保持時間におけるクロマトグラムのピーク面積値と内部標準物質のピーク面積値との比から作成した。

#### B. 5. 分析条件

1) ヘッドスペース-GC/MS 条件 (血清及び腹水中の揮発性有機化合物濃度)  
ヘッドスペース条件

装置 : Tekmer 7000 (Tekmer)

バイアル容量 : 22 mL

(CV-22, Chromacol)

バイアル加熱条件 : 60 °C (20 分)

バイアル振とう装置 : 使用

(Power 5, 3 分)

サンプルループ容量 : 1 mL

サンプルループ温度 : 150 °C

トランスファーライン温度 : 160 °C

#### GC/MS 条件

装置 : AUTO MASS SYSTEM II

(日本電子)

カラム : Vocol (0.25 mm x 60 m,  
1.5 µm、

SUPELCO)

カラム温度 : 40 °C で 4 分間保持し、  
230 °C まで毎分 10 °C で昇温後、230 °C  
で 5 分間保持

イオン源温度 : 210 °C

イオン化 : EI

イオン化電圧 : 70 eV

検出方法 : スキャン法

(m/z 46-260)

2) GC/MS 条件 (病院内空気中等の揮発性有機化合物濃度)

装置 : AUTO MASS SYSTEM II

(日本電子)

カラム : DB-1 (0.25 mm x 60 m、1.0  
µm、J&W)

カラム温度 : 40 °C で 5 分間保持し、  
300 °C まで毎分 10 °C で昇温後、300 °C  
で 3 分間保持

イオン源温度 : 210 °C

イオン化 : EI

イオン化電圧 : 70 eV

検出方法 : スキャン法

(m/z 46-260)

#### B. 6. 測定結果の解析

測定値は中央値、25 及び 75 パーセント  
ンタイル値で表した。調査及び測定結果  
に対し、パソコン用統計解析ソフト  
StatView を用いて統計解析を行なっ  
た。統計解析は、ノンパラメトリック  
(Spearman の順位相関) 法を用いた。

#### C. 結果及び考察

##### C. 1. 不妊症患者の血清及び腹水中の 揮発性有機化合物濃度

平成 11 年度及び 12 年度に東海大学  
病院で受診した不妊症患者 18 名 (平  
成 11 年度 5 名、平成 12 年度 13 名)  
の血清及び腹水 35 検体 (血清 1 検体  
は、保存中に容器が破損したため測定  
不能) について、揮発性有機化合物濃  
度を測定した結果を表 1 に示した。

### 1) 平成 11 年度の結果

トルエン及び m, p-キシレンがすべての血清及び腹水検体から検出され、トルエンの中央値は血清が 1.4ppb、腹水が 1.5 ppb、m, p-キシレンの中央値は血清が 1.4 ppb、腹水が 2.1 ppb であった。次いで p-ジクロロベンゼン、エチルベンゼン及び o-キシレンが、血清、腹水ともに 80%から検出され、その中央値は p-ジクロロベンゼンが 3.1 ppb (血清)、4.4 ppb (腹水)、エチルベンゼンが 1.0 ppb (血清)、1.3 ppb (腹水)、o-キシレンが 0.6 ppb (血清)、0.7 ppb (腹水) であった。スチレンは血清の 60% (中央値 0.5 ppb)、腹水の 80% (中央値 0.6 ppb) から、ベンゼンは血清の 40% (中央値 0.7 ppb)、腹水の 40% (中央値 0.5 ppb) からそれぞれ検出されたが、ナフタレンは全く検出されなかった。

### 2) 平成 12 年度の結果

トルエンが最も高頻度に血清 (67%) 及び腹水 (77%) から検出され、中央値は血清が 0.7 ppb、腹水が 1.3 ppb であった。次いで高頻度に検出されたのは p-ジクロロベンゼンで、血清の 33%、腹水の 39%から検出され、中央値は血清が 10 ppb、腹水が 4.0 ppb であった。この他、m, p-キシレン (血清：検出率 8%、中央値 4.5 ppb、腹水：検出率 31%、中央値 1.1 ppb)、エチルベンゼン (血清：検出率 8%、中央値 4.5

ppb、腹水：検出率 31%、中央値 1.0 ppb)、o-キシレン (血清：検出率 8%、中央値 1.5 ppb、腹水：検出率 8%、中央値 0.8 ppb)、スチレン (血清：検出率 8%、中央値 2.0 ppb、腹水：検出率 8%、中央値 1.5 ppb) が検出された。一方、ベンゼンとナフタレンは、いずれの血清、腹水検体からも検出されなかった。

### 3) 全体の結果

この 2 年間の研究の結果、測定を実施した 8 種類の揮発性有機化合物では、トルエンが全試料の 80%と、最も高頻度で検出された。次いで高頻度に検出されたものは、順に p-ジクロロベンゼン 49%、m, p-キシレン 43%、エチルベンゼン 37%、o-キシレン 29%、スチレン 26%、それにベンゼン 11%であった。一方、ナフタレンは全く検出されなかった。また、検出された化学物質の濃度の中央値は、濃度の高い順に p-ジクロロベンゼン 4.0 ppb、m, p-キシレン 1.8 ppb、トルエン 1.2 ppb、エチルベンゼン 1.2 ppb、o-キシレン 0.7 ppb、スチレン 0.6 ppb、それにベンゼン 0.5 ppb であった。

以上の結果より、今回測定を行なった不妊症患者の体内には、トルエン、p-ジクロロベンゼンなどの揮発性有機化合物が ppb からサブ ppb のオーダーで存在していることが示唆された。

### C. 2. 揮発性有機化合物の血液中及び腹水中濃度の相関