

20020933

厚生労働科学研究研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

内分泌かく乱物質・ダイオキシン類の小児、成人の汚染実態および暴露に関する調査研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山田健人

平成15年(2003年)4月1日

目 次

I. 総括研究報告	
内分泌かく乱物質・ダイオキシン類の小児、成人の 汚染実態および暴露に関する調査研究	1
山田健人	
II. 分担研究報告	
1. 内分泌かく乱物質・ダイオキシン類の小児、成人の 汚染実態および暴露に関する調査研究	
特に膵癌・悪性リンパ腫患者における内分泌かく乱物質の暴露調査	5
秦 順一	
2. ダイオキシン、コプラナ PCB、農薬等の暴露調査・汗腺による 排出経路の解明	
特にヒト血液及び臓器・組織中の臭素系ダイオキシン類の暴露状況	8
渡辺 昌	
3. ヒト剖検試料中のダイオキシン類 (PCDD/DFs、Non-ortho-PCBs) 調査 ヒト血液及び臓器・組織中 Mono-ortho-PCB 迅速分析法の検討	10
飯田隆雄	
資料：表 1～4	
4. TBT、重金属、有機塩素等の暴露調査	
特に残留性有機汚染物質 (POPs) による愛媛県在住初産婦の 母乳汚染について	17
田辺信介	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV. 研究成果の刊行物・別冊	21

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

総括研究報告書

内分泌かく乱物質・ダイオキシン類の小児、成人の汚染実態および暴露に関する調査研究

主任研究者 山田健人 慶應義塾大学医学部病理学教室 専任講師

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、内分泌攪乱物質（PCB、ダイオキシン類、有機塩素系化合物）を測定してきた。これまでにのべ70例の測定が終了し、同一症例における血液、肝、胆汁中の濃度の測定から、血液と胆汁での濃度がよく相関すること、肝では脂肪重量あたりの濃度が血液、胆汁よりも高いこと、が明らかとなった。また構造が類似していても分子構造により、胆汁からの排泄に差異が認められた。これらの知見はヒトにおける内分泌かく乱物質の代謝・排泄経路について重要な示唆を与えるものである。また PCB や一部の塩素系化合物の体内蓄積量は、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、人体への複合的な毒性を考慮する必要性が明らかとなった。一方、多くの症例を迅速に測定しうる方法の確立が急務であることから、臓器・組織からの抽出の簡便化・迅速化を図るため、既に環境試料で使用実績のある高速溶媒抽出（ASE）法による臓器からの脂肪およびダイオキシン類の迅速な抽出方法を検討したところ、これまでの測定法と遜色ない良好な結果を得た。また今回測定した症例のなかで、平均値の数倍～10倍以上の内分泌攪乱物質の蓄積症例（膵癌および悪性リンパ腫症例それぞれ1例）が見いだされた。特に膵癌症例については、癌遺伝子 H-ras, K-ras 変異を検索した結果、H-ras には変異は見られない一方、K-ras において、コドン 12, 61 に新たな変異を見出した。

分担研究者

秦 順一 国立成育医療センター研究所 所長
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 保健科学部長
田辺 信介 愛媛大学沿岸環境科学研究センター 教授

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。また肪組組織、肝、血液、胆汁の測定結果から、内分泌かく乱物質の代謝経路についても研究・考察した。また平成14年度は、多くの症例を迅速に分析しうる方法の確立が急務であることから、特に臓器・組織からの抽出の簡便化・迅速化を図るため、既に環境試料で使用実績のある高速溶媒抽出(ASE)法による臓器からの脂肪およびダイオキシン類の迅速な抽出方法を検討した。一方、現在、ファイリングが進行中の臓器・組織は東京近郊在住の患者さんの剖検症例であることから、食習慣の異なる魚類の摂取量が多い地方との比較を進める目的で、まずは準備段階として愛媛県に着目し、同地における初妊婦の母乳における内分泌攪乱物質の測定を行った。

材料及び方法

方法：1) 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、胆汁を採取した。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、TCP、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、性別に得た。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で行った。また迅速なASE法の検討のためには、アセトン：ヘキサン比を(1:2)、(1:1)及び(2:1)にて100℃、1500psiで抽出後、さらに150℃、2000psi、アセトン・ヘキサン(1:3)で抽出した。母乳試料は、愛媛県内に15年以上在住している21-41歳の初産婦30人から1999年に採取した。また比較として、2001年に福岡県在住初産婦の母乳試料も採取した。

(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た。母乳に関しては提供者には事前に研究の主旨を説明し、文書にて同意を得たのち採取した。

結果及び考察

ヒト血清および全血からのASE抽出法と従来法(大塚アッセイ研究所およびドイツERGO社)を比較検討した。その結果、両方法での分析値はいずれもよく一致した。また

全血中の Mono-ortho-PCBs 抽出条件の検討の結果、ASE の温度 100°C、圧力 1500psi の条件ではアセトンの割合を 2:1 まで増やしても、ASE の温度 150°C、圧力 2000psi の条件で再抽出するとなお 10%程度の Mono-ortho-PCBs が検出された。このことから、環境試料のダイオキシン類分析に汎用されている ASE の条件（温度 150°C、圧力 2000psi）が生体試料の Mono-ortho-PCBs 抽出でも適していることが明らかとなった。実際にヒト臓器組織中の Mono-ortho-PCBs 分析を行ったところ、血液やいずれの臓器でも lipid basis では同程度（2 倍の範囲内）の Mono-ortho-PCBs が検出された。また、8 種類の Mono-ortho-PCBs の異性体相対比は同一であった。また同一症例における血液、肝、胆汁中のダイオキシン類濃度の測定から、血液と胆汁中の濃度がよく相関し、肝では脂肪重量あたりの濃度が血液、胆汁よりも高いことが明らかとなった。またダイオキシンの異性体種類により、胆汁からの排泄量に差異が認められた。また農薬を含む有機塩素化合物では、脂肪組織中の残留パターンは、DDTs > PCBs > HCHs > CHLs > HCB > TCPMe > TCPMOH の順であり、人体（脂肪組織、胆汁）から初めて TCP が検出され、さらに TCP の胆汁からの排泄が明らかとなった。また PCB や一部の農薬の体内蓄積量は、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。さらに国際比較の結果、日本人の PCB 濃度は途上国の一般人より明らかに高く、先進国の中でも高いレ

ベルにあることが判明した。年齢とダイオキシン・PCB・有機塩素化合物の蓄積に相関があるかどうか検討したところ、年齢に伴ってダイオキシン・PCB の蓄積が増加することが明らかとなったが、性差は認められなかった。愛媛県在住者の母乳においては、これまでの日本人における調査結果よりも、内分泌攪乱物質の濃度は高く、地域による臓器・組織レベルにおける調査を進める必要性が明らかとなった。最後に本研究過程で、膵癌および悪性リンパ腫で平均値の数倍～10 倍以上の内分泌攪乱物質蓄積例がそれぞれ 1 例見いだされた。特にダイオキシン類の高濃度暴露が明らかとなった膵癌症例（59 歳、男性、腺扁平上皮癌）について、H-ras、K-ras 変異を検索した結果、H-ras には変異はない一方、K-ras において、コドン 12, 61 に新たな変異を見出した。

考察

同一剖検症例における血液、肝、胆汁における内分泌かく乱物質の濃度を測定することで、ヒトにおける内分泌かく乱物質の代謝経路の一端が明らかにしうることを示した。またダイオキシン類、PCB、有機塩素系化合物、有機スズ化合物が、高濃度の蓄積を認めた悪性腫瘍症例が見いだされ、新たな癌遺伝子 K-Ras の点突然変異を発見したことは、内分泌攪乱物質が関与する悪性腫瘍の存在の可能性を十分に考慮しながら今後、検討する必要があることを認識させた。今後とも日本人における内分泌攪乱物質暴露状況をモニターする必要性があると考えられた。

研究発表

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 chlorine substituted biphenyls in Japanese human liver and adipose tissue. *Chemosphere* 49:161-172, 2002

Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Shirasaki Y, Kondo K, Yamada T Various amplification of direct PCR using Blood Samples. *Clinical Laboratory* 48: 377-384, 2002

Shibata R, Hashiguchi A, sakamoto J, Yamada T, Umezawa A, Hata J Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumor. *J Med Genetics* 39 (12): E83, 2002

Zhao C, Hashiguchi A, Kondoh K, Du W, Hata J, Yamada T Exogenous expression of heat shock protein 90kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response. *Experimental Cellular Research* 275: 200-214, 2002

Kitamura K, Nagao M, Yamada T, Sunaga M, Hata J, Watanabe S Dioxins in bile in relation to those in the human liver and blood. *J Toxicological Sciences* 26(5): 327-336, 2001

学会発表

Hirai T, Furutani H, Myouren M, Fujimine Y, Kodaira T, Hata J, Watanabe S Concentration of polybrominated diphenyl ethers (PBDES) in the human bile in relation to those in the liver and blood. *Organohalogen Compounds* 58: 277-280, 2002 (Dioxin 2002, Barcelona, Spain)

國末達也・染矢 雅之・渡部 真文・豊田 卓枝・黒田 優子・長山 淳哉・田辺 信介 (2002): 残留性有機汚染物質(POPs)による愛媛県在住初産婦の母乳汚染 -未調査地域における汚染実態解明の必要性-, 環境ホルモン学会第5回研究発表会, 11月, 広島市, 講演要旨集, 59.

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録

なし

分担研究報告書

内分泌かく乱物質・ダイオキシン類の小児、成人の汚染実態および暴露に関する調査研究
特に膵癌・悪性リンパ腫患者における内分泌かく乱物質の暴露調査

分担研究者 秦 順一 国立成育医療センター研究所 所長

研究要旨 剖検症例の主要臓器、血液、胆汁を採取し、内分泌攪乱物質（PCB、ダイオキシン類、有機塩素系化合物）を測定してきた。これまでにのべ 70 例の測定が終了し、同一症例における血液、肝、胆汁中の濃度の測定から、血液と胆汁での暴露がよく相関すること、肝では脂肪重量あたりの濃度が血液、胆汁よりも高いこと、が明らかとなった。また構造が類似していても分子構造により、胆汁からの排泄に差異が認められた。これらの知見はヒトにおける内分泌かく乱物質の代謝・排泄経路について重要な示唆を与えるものである。これらの症例中、膵癌および悪性リンパ腫症例で平均値の数倍～10 倍以上の内分泌攪乱物質蓄積症例がそれぞれ 1 例見いだされた。膵癌症例については、H-ras, K-ras 変異を検索した結果、腺扁平上皮癌の中において腺癌と扁平上皮癌いずれの組織型の部分において、H-ras には変異はない一方、K-ras において、同一のコドン 12, 61 の新たな変異を見出した。

目的

人体において、内分泌攪乱物質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。さらにこれまでの測定から高濃度暴露の見られた膵癌、悪性リンパ腫症例を見出したが、

これらの悪性腫瘍で癌遺伝子の特異的な変異の有無について調査した。

材料及び方法

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（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、210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、TCP、重金属、微量元素) を測定し、標準的なバックグランド暴露値を年齢、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 で行った。癌遺伝子 Ras の変異については、パラフィン切片から DNA を抽出し、PCR にて増幅後、クローニングして塩基配列の決定を行った。(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。

結果及び考察

同一剖検症例の肝、腸間膜脂肪、胆汁、血液におけ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、TCP、重金属、微量元素) を測定した。その結果、まずダイオキシン類は、血液中の濃度はこれまでの報告と同様の平均 24-45 pgTEQ/g 脂肪であった。本研究において、胆汁中のダイオキシン濃度を測定したところ、胆汁中のダイオキシン濃度は、脂肪ベースではその絶対値も血液とよく相関しており、異性体のパターンもほぼ同じであった。一方、肝臓では、ダイオ

キシン濃度は血液、胆汁と比べて高く、約 3 倍であった。さらに胆汁、血液、肝臓のダイオキシンの蓄積には、高い相関が見られた。また膵癌の術後再発症例において、有機塩素系化合物、ダイオキシン、PCB いずれも高い蓄積を認め、平均値の 2-12 倍に達していた。また悪性リンパ腫症例において、一部の有機塩素化合物の蓄積が平均値の数倍に達していた。これまでも有機塩素系化合物と膵癌、乳癌、悪性リンパ腫の関係が報告されており、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。そこで、これらの症例についても K-ras 遺伝子変異を検討したところ、腺癌および扁平上皮癌いずれの部分においても H-ras には変異はない一方、K-ras において、コドン 12, 61 に同一の新たな変異を見出した。

研究発表

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 chlorine substituted biphenyls in Japanese human liver and adipose tissue. Chemosphere 49:161-172, 2002

学会発表

Hirai T, Furutani H, Myouren M, Fujimine Y, Kodaira T, Hata J, Watanabe S Concentration of polybrominated diphenyl ethers (PBDES) in the human bile in

relation to those in the liver and blood.

Organohalogen Compounds 58: 277-280, 2002

(Dioxin 2002, Barcelona, Spain)

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録

なし

分担研究報告書

ダイオキシン、コプラナPCB、農薬等の暴露調査・汗腺による排出経路の解明

特にヒト血液及び臓器・組織中の臭素系ダイオキシン類の暴露状況

分担研究者 渡辺 昌 東京農業大学応用生物科学部 教授

研究要旨 日本人における内分泌攪乱物質の体内蓄積量と特定の疾患や病態と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、これまでに210例の剖検例について各種臓器、組織が採取された。これをもとに、近年、ダイオキシン類と同様な生体作用と毒性をもつことが推測されている臭素系ダイオキシン類 (Polybrominated Diphenyl Ether; P B D E) について、日本人におけるその暴露状況を明らかにするために、このP B D Eの測定法の開発を試み、実際に解剖例を用いて脂肪、血液、肝臓、胆汁中の濃度を測定異性体ごとに比較した。その結果、いずれの臓器からもP B D Eが検出され、血液濃度と胆汁における濃度の相関が明らかとなり、胆汁からのP B D E排泄が確認された。

目的

近年、臭素系難燃剤を含む廃棄物の焼却に伴って、ダイオキシン類と同様な生体作用と毒性をもつ臭素系ダイオキシン類が発生していることが明らかにされ、その人体汚染が注目されている。環境省がこれまでの実施した環境汚染調査結果を考慮すると、臭素系ダイオキシン類の人体汚染濃度は、塩素系ダイオキシン類の1/10以下になるものと推測される。臭素系ダイオキシン類のうち、Polybrominated Diphenyl Ether (P B D E) は内分泌攪乱物質としての作用の他、中枢神経系への作用、免疫系への作用なども報告されている。PBDEによる汚染実態を明らかに

するため、本年度はPCBと同程度の毒性を有するとされるP B D Eの測定法の開発を試み、解剖例を用いて脂肪、血液、肝臓、胆汁中の濃度を測定異性体ごとに比較した。

材料及び方法

臭素系ダイオキシン類には約5,000もの膨大な種類の同族体およびその異性体が存在するが、市販品の種類は極めて少ない。今年度はP B D Eに絞って検討した。内部標準は ^{13}C P B D Eをケンブリッジリサーチラボラトリーより得て使用した。10例の解剖例から肝臓、脂肪、心血、胆汁を得て検討材料とした。回収率およびGCMS

の定量のため40 pgの¹³C PBDEを検体に加え、血液は約30 gに飽和硫酸12 ml、エタノール6 ml、n-ヘキサン18 mlで脂肪を抽出し、3回繰り返した。肝臓は約2 gの肝臓組織に5倍の硫酸を加え、アセトンヘキサン(2:1)溶液で抽出した。胆汁も同様にアセトンヘキサン2:1溶液で抽出した。各脱水乾燥した脂肪を少量のn-ヘキサンで再溶解し、クリーアップ[®]をおこなった。クリーアップ[®]はNa₂SO₄、シリカ、硝酸銀多層カラムと活性炭カラムを用い、n-ヘキサンで洗浄後、10%塩化メチレン・n-ヘキサン溶液で溶出させた。濃縮後GCMSで測定した。シリンジスパイクとして20 pgの¹³C₁₂-3,3',4,4'-tetraBDEをもちいた。

結果及び考察

心血中のPBDE濃度は4,087±4,428 pg/g脂肪、肝臓中は4,001±3,191 pg/g脂肪、胆汁中は2,953±2,916 pg/g脂肪であった。測定した27の異性体のうち、2,2',4,4'-tetraBDE(#47)、2,2',4,4',5,5'-hexaBDEの濃度が高く全体の70%を占めた。心血中の濃度と胆汁中の濃度の相関は相関係数0.64と良く、ダイオキシンと同じように胆汁からの排泄のあることが示唆された。

本研究によりPBDEの蓄積はPCBに匹敵する程度はあるという可能性がしめされた。

現在PBDEの毒性についてはよくわからずPCBとほぼ同じとかがえられていて、Toxicity Equivalent Factorも数1,000分の1から数万分の1に設定されている。しかし、

複合効果についてはまったく不明なので症例をたして蓄積状態を解明する必要がしめされた。

結論

解剖例の脂肪、血液、肝臓、胆汁中から臭素系ダイオキシン類PBDEが検出された。さらに血液濃度と胆汁における濃度の相関が明らかとなり、胆汁からのPBDE排泄が確認された。

健康危険情報

なし

研究発表

学会発表

Hirai T, Furutani H, Myouren M, Fujimine Y, Kodaira T, Hata J, Watanabe S
Concentration of polybrominated diphenyl ethers (PBDES) in the human bile in relation to those in the liver and blood. Organohalogen Compounds 58: 277-280, 2002 (Dioxin 2002, Barcelona, Spain)

知的財産権の出願・登録

なし

分担研究報告書

ヒト剖検試料中のダイオキシン類（PCDD/DFs、Non-ortho-PCBs）調査

ヒト血液及び臓器・組織中 Mono-ortho-PCB 迅速分析法の検討

分担研究者 飯田隆雄 福岡県保健環境研究所 保健科学部長

研究要旨 日本人における内分泌攪乱物質の体内蓄積量と特定の疾患や病態と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、平成 11 年度より 3 年間で 210 例の剖検例について各種臓器、組織が採取された。このうち現在までに血液(18 件)、胆汁(15 件)、脂肪組織(20 件)、肝臓(20 件)中のダイオキシン類の一つである Mono-ortho-PCBs を測定した。しかし、ファイリングされている未測定の剖検例の検体は膨大であるので、効率的かつ正確な迅速分析法が必要である。この目的を達成するため Mono-ortho-PCBs を試料からの抽出方法として高速溶媒抽出（ASE）法を検討した結果、迅速な抽出法を確立した。

目的

我々は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-ortho-PCBs を対象として剖検例の臓器中濃度を測定してきた。現在まで既に 210 例がファイリングされ今後とも剖検例は蒐集され続けている。臓器中 Mono-ortho-PCBs 濃度と疾患・病態との相関関係を明らかにするためのデータベースを構築するためには迅速な分析法が必要である。特に、臓器からの抽出の簡便化・迅速化が緊急の課題となっている。この問題を解決するため、既に環境試料で使用実績のある高速溶媒抽出（ASE）法による臓器中脂肪・Mono-ortho-PCBs の迅速な抽出方法を検討し

た。

材料及び方法

1) 材料

ヒト血液（血清・全血）、及び臓器。

2) 試薬

10 種類の PCBs 標準品は AccuStandard 社製を、内部標準物質には $^{13}\text{C}_{12}$ 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 回洗浄したものを使用した。

3) 方法

a) 脂肪の抽出

血液（全血・血清）は 5g 血液試料：アイ

ソリュートをつめた円筒濾紙を 33mL 抽出管に入れアセトン・ヘキサン (2:1) 40ml を用い 150°C、2000psi で 3 回洗浄した。これに血液 5mL を秤取し、凍結乾燥した。サンプリングスパイク内標準添加後アセトン・ヘキサン (1:3) で抽出した。抽出溶液をナスフラスコに移し、2ml まで濃縮した。秤量瓶に移し、室温で放置し、恒量後、脂肪重量を測定し、脂肪重量とした。ASE 抽出条件を検討するためアセトンとヘキサンの比率を (1:2)、(1:1) 及び (2:1) に変えて 100°C、1500psi で抽出した。さらに抽出残さにサンプリングスパイク内標準を添加し 150°C、2000psi、アセトン・ヘキサン (1:3) で抽出した。臓器は 1-5g を細切して秤取し、上記の方法で洗浄したアイソリュートに混合し、円筒濾紙を入れた抽出管に詰め、サンプリングスパイク内標準添加後、血液と同じ条件で抽出した。抽出液はロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。少量のヘキサンで秤量瓶に移し、室温で放置し乾固した。恒量後、重量を測定し、脂肪量とした。

b) クリーンアップ

抽出した脂肪に少量のヘキサンを加えて溶解し、濃硫酸 3ml を加え一夜放置した。上清硝酸銀/シリカゲル (1/10、0.5 g) を乾式充填したクロマトカラムに負荷した。その後、ヘキサン 15mL で溶出させ、その溶出液を活性炭 (活性炭/無水硫酸ナトリウム (1/1000)、0.5 g) を乾式充填したクロマトカラムに負荷し、その後、10%ジクロロメタン・ヘキサン 10mL で溶出させた。その溶出液を濃縮し、活性炭分散シリカゲル (関東化学製) 1g を

乾式充填したクロマトカラムに負荷し、ヘキサン 50mL で洗浄し、25%(w/w)ジクロロメタン/ヘキサン 50mL で溶出した。その溶出液を濃縮し、シリンジスパイクを添加し、室温で溶媒を留去後、n-ノナンを 500 μ L 加えて残留物を溶解し、Mono-ortho-PCBs 分析用試料液とし、HRGC/HRMS を用いて分析した。

使用した機器及びその条件は以下のとおりである。

ガスクロマトグラフ：HP6890 (Hewlett Packard)、オートインジェクター付き。

質量分析計：Autospec-Ultima E (Micromass)

カラム：HT-8PCB、長さ 60m、内径 0.25mm、膜厚 0.25 μ m (SGE 社製)

カラム温度：150°C (一分間保持)、20°C/分で 220°Cまで昇温、3°C/分で 320°Cまで昇温、320°C (3.2 分間保持)

キャリアーガス (ヘリウム)：1.3mL/分

注入量：1 μ l

注入口温度：280°C

注入方法：スプリットレス (60 秒)

インターフェイス温度：320°C

加速電圧：8KV

分解能：10000

イオン化電圧：38EV

イオン源温度：250°C

トラップ電流：750 μ A

マルチプライヤー電圧：410V

結果及び考察

表 1 にヒト血清 3 件の ASE 抽出法と従来法との比較を示す。この表からわかるように両方法での分析値はいずれもよく一致した。

(従来法は大塚アッセイ研究所で行った) 表 2 にヒト全血 3 件の ASE 抽出法と従来法の比較を示す。この結果からも両者の値はほぼ一致することがわかる。(従来法はドイツ ERGO 社のデータを示した) 表 3 に全血中の Mono-ortho-PCBs 抽出条件の検討結果を示す。この表からわかるように、ASE の温度 100°C、圧力 1500psi の条件ではアセトンの割合を 2:1 まで増やしても、ASE の温度 150°C、圧力 2000psi の条件で再抽出するとなお 10%程度の Mono-ortho-PCBs が検出された。この結果、環境試料のダイオキシン類分析に汎用されている ASE の条件 (温度 150°C、圧力 2000psi) が生体試料の Mono-ortho-PCBs 抽出でも適していることがわかった。表 4 にヒト臓器中の Mono-ortho-PCBs 分析例を示す。いずれの血液や臓器・組織でも lipid basis では同程度 (2 倍の範囲内) の Mono-ortho-PCBs が検出された。また、8 種類の Mono-ortho-PCBs の相対比 (パターン) はほぼ一同じであった。これは今までの臓器・組織中 Mono-ortho-PCBs の分析結果と一致するものである。

結論

環境試料のダイオキシン類分析に汎用されている ASE 法が人体試料の Mono-ortho-PCBs 抽出でも通用することが明らかとなり、測定の迅速化に寄与しうることが期待される。

健康危険情報

なし

研究発表

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 chlorine substituted biphenyls in Japanese human liver and adipose tissue. Chemosphere 49:161-172, 2002

知的財産権の出願・登録

なし

表1. ASE抽出法と従来法の比較 (血清中ダイオキシン類濃度: Whole Basis)

Congener	血清試料1						血清試料2						血清試料3						ND	TEF
	ASE抽出法 (箱回保羅研)		従来法 (大塚アッセイ研)		ASE抽出法 (箱回保羅研)		従来法 (大塚アッセイ研)		ASE抽出法 (箱回保羅研)		従来法 (大塚アッセイ研)									
	実測濃度	TEQ濃度	実測濃度	TEQ濃度	実測濃度	TEQ濃度	実測濃度	TEQ濃度	実測濃度	TEQ濃度	実測濃度	TEQ濃度								
1 2,3,3',4,4'-PencB(#105)	21	0.0021	14	0.0014	12	0.0012	14	0.0014	25	0.0025	19	0.0019	0.3	0.0001						
2 2,3,4,4',5-PencB(#114)	4.9	0.0025	4.5	0.0022	3.5	0.0018	4.1	0.0020	5.8	0.0029	6.4	0.0032	0.3	0.0005						
3 2,3',4,4',5-PencB(#118)	78	0.0078	77	0.0077	45	0.0045	50	0.0050	90	0.0090	93	0.0093	0.3	0.0001						
4 2',3,4,4',5-PencB(#123)	1.1	0.0001	1.8	0.0002	0.67	0.0001	0.82	0.0001	1.2	0.0001	1.3	0.0001	0.3	0.0001						
5 2,3',4,4',5,5'-HexCB(#167)	10	0.0001	11	0.0001	6.6	0.0001	8.6	0.0001	11	0.0001	7.5	0.0001	0.3	1E-05						
6 2,3,3',4,4',5-HexCB(#156)	37	0.0185	47	0.0233	25	0.0125	29	0.0145	40	0.0200	37	0.0185	0.3	0.0005						
7 2,3,3',4,4',5'-HexCB(#157)	8.7	0.0044	8.5	0.0043	5.9	0.0030	7.2	0.0036	9.4	0.0047	7.4	0.0037	0.3	0.0005						
8 2,3,3',4,4',5,5'-HxCB(#189)	4.6	0.0005	4.0	0.0004	3.1	0.0003	3.5	0.0003	4.4	0.0004	2.8	0.0003	0.3	0.0001						
Total mono-ortho-PCBs	165	0.036	167	0.040	102	0.023	117	0.027	187	0.040	175	0.037								

表 2. ASE抽出法と従来法の比較 (全血中Momo-ortho-PCB分析 : Lipid basis)

Congener	全血試料 1		全血試料 2		全血試料 3	
	ASE法	従来法	ASE法	従来法	ASE法	従来法
2,3,3',4,4'-Penta-CB (#105)	1034	820	1317	1100	772	380
2,3,4,4',5-Penta-CB (#114)	456	290	418	400	357	220
2,3',4,4',5-Penta-CB (#118)	5257	4000	5916	4200	3534	2100
2',3,4,4',5-Penta-CB (#123)	190	n.d.(200)	146	n.d.(90)	192	n.a.
2,3,3',4,4',5-Hexa-CB (#156)	3497	2200	1995	2500	1804	1400
2,3,3',4,4',5'-Hexa-CB (#157)	778	630	795	640	469	510
2,3',4,4',5,5'-Hexa-CB (#167)	919	860	769	860	616	540
2,3,3',4,4',5,5'-Hepta-CB (#189)	531	330	320	330	284	240

ASE抽出・SCLV注入法は全血 5 g 使用
従来法全血 5 0 g 使用

表3. ASEによる全血中ダイオキシン類抽出条件検討 (Whole Basis)

Congener	試料 1 (ppb/g)		合計	試料 2 (ppb/g)		合計	試料 3 (ppb/g)		合計	ND	TEF
	1回目 (1:2)	2回目 (2:1)		1回目 (1:1)	2回目 (2:1)		1回目 (2:1)	2回目 (2:1)			
1 2,3,3',4,4'-PencB(#105)	13.9	2.35	16.25	13.4	1.81	15.21	13.1	2.02	15.12	0.03	0.0001
2 2,3,4,4',5-PencB(#114)	5.75	1.11	6.86	5.54	0.768	6.308	5.75	0.757	6.507	0.03	0.0005
3 2,3',4,4',5-PencB(#118)	69.2	12.4	81.6	65.	8.4	73.4	66.4	8.76	75.16	0.03	0.0001
4 2',3,4,4',5-PencB(#123)	1.22	0.227	1.447	1.18	0.219	1.399	1.2	0.166	1.366	0.03	0.0001
5 2,3',4,4',5,5'-HexCB(#167)	7.89	1.76	9.65	8.51	1.15	9.66	7.97	1.19	9.16	0.03	0.00001
6 2,3,3',4,4',5-HexCB(#156)	25.7	5.32	31.02	25.3	3.72	29.02	24.7	3.06	27.76	0.03	0.0005
7 2,3,3',4,4',5'-HexCB(#157)	5.61	1.23	6.84	5.71	0.867	6.577	6.	0.922	6.922	0.03	0.0005
8 2,3,3',4,4',5,5'-HxCB(#189)	2.4	0.771	3.17	2.69	0.511	3.201	2.58	0.375	2.955	0.03	0.0001
Total mono-ortho-PCBs	132.	25.	157.	127.	17.	145.	128.	17.	145.		
Total mono-ortho-PCBs TEQ	0.0273	0.0054	0.0327	0.0266	0.0038	0.0304	0.0266	0.0035	0.0301	0.03	0.0001

1 回目の抽出はASEの温度 100℃、圧力 1500psiの条件で行い、抽出溶媒として試料1はアセトン/ヘキサン (1:2) を、試料2はアセトン/ヘキサン (1:1) を、試料3はアセトン/ヘキサン (2:1) を用いた。
 2 回目の抽出は試料1 からの抽出液さらに内標準を加えASEの温度 150℃、圧力 2000psiの条件で抽出溶媒としてアセトン/ヘキサン (1:3) を用いて再抽出した。

5

表4. ヒト臓器・組織中Mono-ortho-PCBの分析例 (pg/g lipid)

Congener	胃癌部	胃正常部	腎癌部	腎正常部	右腎臓周囲 部脂肪	血液
1 233'44'-PencB(#105)	3076	2226	5729	8984	5155	5329
2 2344'5'-PencB(#114)	2975	2672	4556	5610	4296	3564
3 23'44'5'-PencB(#118)	13959	20434	23414	33239	21430	26069
4 2'344'5'-PencB(#123)	242	217	342	473	324	381
5 23'44'5'5'-HexCB(#167)	2553	3794	4785	6388	3879	4450
6 233'44'5'-HexCB(#156)	19877	15718	33883	36850	25289	30981
7 233'44'5'-HexCB(#157)	3953	4948	8409	10875	7150	7637
8 233'44'5'5'-HpCB(#189)	2510	1259	3821	3934	3563	3438
Total mono-ortho-PCBs	49144	51267	84940	106353	71087	81848
Total Co-PCBs-TEQ	15	14	27	31	21	25
lipid (%)	0.75	28	1.7	0.34	64	0.43

分担研究報告書

TBT、重金属、有機塩素等の暴露調査

特に残留性有機汚染物質(POPs)による愛媛県在住初産婦の母乳汚染について

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 日本人における内分泌攪乱物質の蓄積状況について、これまでに東京近郊在住の患者さんの剖検症例において解析してきたが、食習慣や環境の異なる地域との比較を行うための予備調査の意味で、今回は本研究において、母乳汚染の未知地域である愛媛県を対象に、POPsによる初産婦母乳汚染の実態解明を試みた。その結果、1998年の調査結果と比較したところ、愛媛県在住者の母乳中ダイオキシン類 TEQs 濃度と DDTs 濃度は、比較した府県の中で最も高い値を示した。この結果から東京以外ではまず愛媛県在住住民における臓器・組織における内分泌攪乱物質の蓄積状況を調査することが今後の内分泌攪乱物質暴露の地域差などを知るうえでも有用と思われた。

目的

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs)、dibenzofurans (PCDFs)、biphenyls (PCBs)、そして dichlorodiphenyltrichloroethane 及びその代謝物 (DDTs) などの残留性有機汚染物質 (POPs) は、毒性が強く、脂溶性で難分解性のため、環境中での動態や生物への蓄積および毒性影響等について大きな学術的・社会的関心を集めてきた。ヒトの POPs 曝露調査として、厚生省は平成 10 年に 1 府 18 県の初産婦から母乳を採取してダイオキシン類等有機塩素化合物による汚染の実態調査を実施し、翌年その結果を公表した。しかしながら、この

調査では、愛媛県は対象地域とされなかったため、現在もその汚染実態は不明のままである。また日本人における内分泌攪乱物質の蓄積状況について、これまでに東京近郊在住の患者さんの剖検症例において解析してきたが、食習慣や環境の異なる地域との比較を行うための予備調査の意味で、今回は本研究において、母乳汚染の未知地域である愛媛県を対象に、POPs による初産婦母乳汚染の実態解明を試みた。

材料及び方法

母乳試料は、愛媛県内に 15 年以上在住している 21-41 歳の初産婦 30 人（南予 8 人、中

予 12 人、東予 10 人) から 1999 年に採取した。提供者には事前に研究の主旨を説明し、同意を得たのち母乳を採取した。なお、愛媛県は東予、中予、南予に地域区分されており、それぞれ工業、都市圏、農漁業中心の産業構造を有している。また比較として、2001 年に福岡県在住初産婦の母乳試料も採取した。本研究では、PCDDs、PCDFs、PCBs、DDTs、hexachlorocyclohexane 異性体 (HCHs)、そしてクロルダン化合物 (CHLs) と hexachlorobenzene (HCB) などの POPs を分析した。これら POPs の分析は既法に従った。毒性等量 (TEQs) の算出には、WHO が設定したヒト/哺乳動物の毒性等価係数 (TEF) を用いた。母乳中の POPs 濃度は全て、脂肪重当りで表記した。

結果及び考察

分析したすべての母乳試料から POPs が検出された。愛媛県の母乳中ダイオキシン類濃度は、mono-ortho PCBs (平均 27000 pg/g、範囲 8500-63000 pg/g) > non-ortho PCBs (平均 160 pg/g、範囲 55-460 pg/g) ≥ PCDDs (平均 140 pg/g、範囲 68-270 pg/g) > PCDFs (平均 28 pg/g、範囲 11-67 pg/g) の順であり、TEQs レベル (平均 36 pg/g、範囲 13-92 pg/g) は、福岡県の母乳 (平均 24 pg/g、範囲 15-36 pg/g) と比べ高値を示した。また、ダイオキシン類を除くその他の有機塩素化合物の濃度は、DDTs (平均 430 ng/g、範囲 130-2500 ng/g) > PCBs (平均 240 ng/g、範囲 81-870 ng/g) > HCHs (平均 180 ng/g、範囲 52-990 ng/g) > CHLs (平均 110 ng/g、範囲 26-870 ng/g)

> HCB (平均 18 ng/g、範囲 10-37 ng/g) の順であり、これら POPs の濃度も福岡県の母乳より高値を示した。このことから、愛媛県内には比較的大きな POPs 汚染源が存在し、その曝露が在住者に及んでいることが示唆された。また、愛媛県内を南予、中予、東予に分けデータを比較した結果、東予在住者に non-ortho PCBs、mono-ortho PCBs および PCDFs 濃度の高い母乳が存在した。このことから、東予に工業活動に由来するこれらダイオキシン類の局所的な汚染源が存在し、東予在住者がその曝露を受けていることが示唆された。

本研究の結果と 1998 年に厚生省が実施した調査結果を比較したところ、愛媛県在住者の母乳中ダイオキシン類 TEQs 濃度と DDTs 濃度は、比較した府県の中で最も高い値を示した。とくに、ダイオキシン類が高い濃度を示したことは注視すべき結果であり、愛媛県内におけるダイオキシン類汚染実態解明のための徹底調査に加え、排出インベントリーの整備等早急な対策が必要であると考えられた。また、DDTs についても、愛媛県内に過去、あるいは今なお大きな汚染源が存在することが示唆されたことから、DDT 埋設場所の管理体制の強化に加え、流出調査、さらには、その他ストックパイルの存在確認等の対策が必要であると考えられた。

結論

本研究の結果は、未調査地域の中に愛媛県在住者よりさらに濃度が高い POPs 被汚染者が存在する可能性を示しているとともに、臓