

平成 10 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の胎児、成人等の暴露に関する調査（指定研究）

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼンの分析法の開発と人由来の生体
試料の分析に関する研究

主任研究者	中澤裕之 星薬科大学
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 岡 尚男 伊藤裕子 愛知県衛生研究所

要旨

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン（HCB）の人体暴露量の調査を目的として、これらの分析法の検討を行ったところ、GC/MS を用いた高感度で選択性の高い人血清及び母乳中分析法の開発を行うことができた。人血清 36 試料、母乳 1 試料を分析したところ、血清からオキシクロルデン（ND～0.29ppb）、*trans*-クロルデン（ND～0.04ppb）、*trans*-ノナクロル（ND～0.73ppb）、*cis*-ノナクロル（ND～0.11ppb）及び HCB（ND～0.19ppb）が検出され、母乳からは、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル及び HCB が、それぞれ 0.01、0.004、0.10、0.09ppb 検出された。検出された人血清中のクロルデン関連物質及び HCB について、食事との関連を調査したところ、検出頻度及び濃度ともに食事嗜好に依存する傾向が示唆された。

A. 研究目的

クロルデン（図-1）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、最近の調査でも環境中にクロルデン、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の残留が認められている。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、図-2）は、我が国では農薬登録はなされていないが、環境中に存在し、塩素系化合物の製造原料中あるいは塩素系農薬中の不純物に由来すると推測されている。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及びHCBは、このように環境中に存在していることが明らかとなっており、さらに、内分泌かく乱作用を有することも疑われている。従って、これらの化合物の人体暴露量の調査を早急に実施する必要があると思われる。

これらの化合物の分析は一般に電子捕獲型のガスクロマトグラフィーを用いて行われているが、極微量にしか含まれない生体成分中のこれらの物質を精度よく分析するためには、高感度で選択性の高い分析法が必要となる。そこで、本研究ではガスクロマトグラフィー／質量分析法（GC/MS）を用いて高感度で選択性の高い分析法の開発を行った後、実際に人血清及び母乳に含まれるこれらの物質を分析し、人体暴露量の調

査を行った。

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。

2. 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 µm、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：2µL 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]⁺

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: $M^{+\cdot}$ m/z 284

1-クロロテトラデカン: $C_{14}H_{27}Cl^+$
m/z 91

1. 試験溶液調製法

1) 人血清

スキーム 1 に示した。

2) 母乳

スキーム 2 に示した。

GPC 操作条件

カラム: Shodex CLN Pack
EV2000 (2.0 cmx30cm、昭和電工)

カラム温度: 40°C

移動相: 20%アセトン-シクロヘキサ
ン 流速: 4mL/min

分取: 試料注入後、60 から 100mL
の画分を分取する。

C. 結果と考察

1. GC/MS 条件の検討

キャピラリーカラムとして、J&W DB-1、J&W DB-5、J&W DB-17 及びクロムパック CP-Sil 5CB-MS を用いて、クロルデン関連物質及び HCB の分離条件の最適化を試みた。種々の分離条件下で分離を実施したが、J&W DB-1 については HCB と内標準物質として用いた 1-クロロテトラデカンのピークがテーリングを示し

た。DB-5 については trans-クロルデンと cis-ノナクロルの分離が、J&W DB-17 ではヘプタクロルエポキサイドとオキシクロルデンの分離が不十分であった。これに対し、クロムパック CP-Sil 5CB-MS を実験方法に示した昇温条件下で用いたところ、図-3 に示すように 6 種類のクロルデン関連物質及び HCB が、テーリングを示すこともなく完全に分離した。そこで、以下の実験ではキャピラリーカラムとしてクロムパック CP-Sil 5CB-MS を用いることとした。

EI 条件下でクロルデン関連物質のマスペクトルを測定すると、分子イオン ($M^{+\cdot}$) はほとんど認められず、 $[M-Cl]^+$ がベースピークあるいはそれに準ずる強度のイオンとして観察された。選択イオン検出法 (SIM) においては、イオン強度の強い目的化合物特有のイオンをモニターすることが、分析精度を向上させるために不可欠であるので、 $[M-Cl]^+$ をモニターイオンとして選択することとした。一方、HCB 及び内標準物質として用いた 1-クロロテトラデカンでは $M^{+\cdot}$ がベースピークとして認められたので、これをモニターイオンとして選択した。

実験方法に示したモニターイオンを用いて SIM により、検量線を作成したところ、ヘプタクロルエポキサ

イド及びオキシクロルデンは 1 から 100ppb の間で、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロルは 0.2 から 100ppb の間で、HCB は 0.1 から 100ppb の間で良好な直線性を示した。

以上のように、実験方法に示した GC/MS 操作条件を用いることにより、クロルデン関連物質及び HCB の分析は精度良く実施可能であった。

2. 添加回収実験

1) 人血清

血清中の濃度がそれぞれ 10ppb になるようにクロルデン関連物質及び HCB を添加した後に、実験方法に従って試験溶液を調製し、添加回収率を求めた。添加回収率を表-1 に、添加血清及びブランク血清の SIM プロファイルをそれぞれ図-4、図-5 に示した。平均回収率は 79%以上、変動係数は 4.5%以下と良好な結果が得られた。また、定量限界はヘプタクロルエポキサイド及びオキシクロルデンが 0.2ppb、*trans*、*cis*-クロルデン及び *trans*、*cis*-ノナクロルが 0.03ppb、HCB が 0.02ppb であった。これらの値は血清を精度良く分析するためには十分な回収率、精度及び定量限界と考えられる。また、ブランク血清からは、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル及び HCB が、それぞれ 0.49、0.10、0.28ppb 検出されたが、これ

らは後述する同位体存在比により該当する化合物であると同定された。

2) 母乳

本研究は人由来の生体試料の分析を目的としているので、本来は母乳を用いて添加回収実験を行う必要がある。しかしながら、今回母乳の入手には非常な困難を伴い、また、入手できた貴重な母乳試料を添加回収実験に用いることは躊躇されたので、成分の類似している牛乳を用いて添加回収実験を行った。

牛乳中濃度がそれぞれ 10 または 1.75 ppb になるようにクロルデン関連物質及び HCB を添加した後に、実験方法に従って試験溶液を調製し、添加回収率を求めた。添加回収率は表-2 に、添加牛乳及びブランク牛乳の SIM プロファイルをそれぞれ図-6、図-7 に示した。10ppb の濃度に添加した場合の平均回収率は 74%以上、変動係数は 4.7%以下と良好な結果が得られたが、1.75 ppb の場合には HCB の平均回収率が 65%と 10ppb の場合と比較して、若干低い結果であった。しかしながら、1.75 ppb という極微量の添加量を考慮すると妥当な値と考えられる。また、定量限界は脂肪中濃度としてヘプタクロルエポキサイド及びオキシクロルデンが 1ppb、*trans*、*cis*-クロルデン及び *trans*、*cis*-ノナクロルが 0.3ppb、HCB

が 0.1ppb であった。これらの数値は、実際に母乳中のクロルデン関連物質及び HCB を分析するためにも満足すべき回収率、精度及び定量限界と考えられる。

2. 生体試料の分析

1) 人血清

24 才から 60 才までの男性ボランティアの血清 31 試料、及び 24 才から 45 才までの女性ボランティアの血清 5 試料を実験方法に従って分析した。表-3 にその結果を年齢、性別、食事嗜好とともに示し、また、SIM プロファイルの代表例として図-8 に No. 13 の男性血清の例を示した。ヘプタクロルエポキサイド及び *cis*-クロルデンは全試料から全く検出されなかった。オキシクロルデンは、男性血清 2 試料からそれぞれ 0.24 及び 0.29ppb、また、*trans*-クロルデンも別の男性血清 2 試料よりともに 0.04ppb 検出された。

一方、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、HCB は多数の試料から検出された。*trans*-ノナクロルについては、男性血清 31 試料すべてから 0.05 から 0.73ppb の濃度で検出され、平均値は 0.22ppb であった。女性血清 5 試料のうち 4 試料から検出され、濃度は 0.09 から 0.15ppb の範囲であり、平均値は 0.12ppb であった。*trans*-ノナクロルが検出された全試料 (36

試料のうち 35 試料) の平均値は 0.20ppb であった。

cis-ノナクロルは、男性血清 31 試料のうち 22 試料から 0.03 から 0.11ppb の濃度で検出され、その平均値は 0.06ppb であった。女性血清からは 5 試料のうち 2 試料よりいずれも 0.04ppb 検出された。*cis*-ノナクロルが検出された全試料 (36 試料のうち 24 試料) の平均値は 0.05ppb であった。

HCB は男性血清 31 試料のうち 25 試料に、0.03 から 0.19ppb の濃度で検出され、平均値は 0.09ppb であった。女性血清については 4 試料から 0.07 から 0.14ppb 検出され、平均値は 0.10ppb であった。また、HCB が検出された全試料 (36 試料のうち 29 試料) の平均値は 0.09ppb であった。

次に、年齢あるいは食事の嗜好とこれら物質の検出頻度及び平均濃度を比較した。その結果、年齢についてはいずれの化合物との相関性は見いだせなかったが、食事嗜好に関してはつぎに示すような知見を得ることができた。即ち、*cis*-ノナクロルについては、フィッシャーのカイ二乗検定の結果、5%未満の危険率で魚を好む人 (検出頻度：78.6%) と肉を好む人 (検出頻度：16.6%) の間に有意な差が認められた ($p=0.018$)。また、*trans*-ノナクロルの平均濃度が

ウエルチ検定によって、5%未満の危険率で魚を好む人の平均検出濃度（0.283ppb）の方が、肉を好む人のそれ（0.110ppb）よりも有意に高いことが判明した（ $p=0.012$ ）。これに対し、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、オキシクロルデン、ヘプタクロルエポキサイド及び HCB については、食事嗜好と分析結果には有意な相関は認められなかった。これらの食事の嗜好との関連結果については、母数が少ないこともあり即座に断定することはできないが、今回の調査から少なくともその傾向が認められた、ということ是可以する。したがって今後、さらに継続的な、より詳細な調査が必要と思われる。

2) 母乳

今回、母乳試料の入手に非常に苦勞し、平成 10 年 9 月に出産した 36 才の女性の母乳 1 試料のみを入手することができたので、その分析を実施した。その結果は表-3 に示すように *trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル及び HCB が、それぞれ 0.01、0.004、0.10、0.09ppb 検出（母乳脂肪中の濃度としてはそれぞれ 0.88、0.33、8.05、7.07ppb）されたが、ヘプタクロルエポキサイド、オキシクロルデン、*cis*-ノナクロルは検出されなかった。なお、母乳の SIM プロファイルは図-9 に示した。

3) 同位体存在比による同定

SIM を用いて同定を行うためには、通常、分子イオンあるいは目的化合物に特徴的なフラグメントイオンの中から 3 種類のイオンを選択して、SIM を実施した後、得られたクロマトグラムからそれぞれのイオンの強度比を算出し、標準品のそれと比較して同定される。しかし、選択する 3 種類のイオン強度が十分でなければ、極微量の化合物の同定は不可能である。今回同定を試みた物質については、上述の $[M-Cl]^+$ 以外には強度の強いイオンは観測されておらず、この手法を用いることはできない。そこで、クロルデン関連物質及び HCB に 6 から 9 個含まれる塩素原子の同位体存在比 ($^{37}Cl/^{35}Cl=1/3$) に着目して同定を試みた。例えば、分子量 282 の HCB の場合には一分子内に 6 個の塩素原子を含むので、その同位体存在比が影響して、分子量の存在比は、 $282:284:286:288:290:292=18:36:30:13:3:0.4$ となり、この比は常に一定である。一方、分子量の存在比は、マススペクトル上のイオン強度に比例するので、容易に算出することができる。そこで、比較的存在比が大きく、感度よく測定が可能な m/z 282、284、286 をモニターイオンとして選択して、SIM を実施し、そのイオン強度から存在比を求

め、標準品のそれと比較することにより、感度よく同定を行うことが可能と考えられる。

図-10 に実際にこの方法を用いて、人血清中の HCB の同位体存在比による同定の例を示した。図に示したように、この物質のイオンの強度比は標準品のそれと完全に一致し、クロマトグラムグラム上の保持時間も一致しているので、HCB と同定された。

同様にして、図-11、12、13、14 に人血清中の *trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、オキシクロルデン及び母乳中の *trans*-クロルデンの同定の例を示した。いずれも標準品の保持時間及び同位体存在比と完全に一致しており、該当する化合物であると同定された。

D. 結論

1. クロルデン関連物質及び HCB の人体暴露量の調査を目的として、これらの物質の分析法の検討を行い、GC/MS を用いた高感度で選択性の高い人血清及び母乳中分析法の開発を行うことができた。この分析法における平均回収率は 74%以上、変動係数は 4.7%以下と良好な結果が得られ、定量限界は人血清で 0.02 から 0.2ppb、母乳脂肪で 0.1 から 1ppb であった。

2. 開発した分析法を用いて、人血清 36 試料、母乳 1 試料を分析したところ、人血清からオキシクロルデン (ND~0.29ppb)、*trans*-クロルデン (ND~0.04ppb)、*trans*-ノナクロル (ND~0.73ppb)、*cis*-ノナクロル (ND~0.11ppb) 及び HCB (ND~0.19ppb) が検出された。母乳からは、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル及び HCB が、それぞれ 0.01、0.004、0.10、0.09ppb 検出された。
3. 検出された血清中のクロルデン関連物質及び HCB と食事の嗜好による検出頻度及び平均濃度を比較したところ、*cis*-ノナクロルについては、5%未満の危険率で、魚を好む人の方 (検出頻度：78.6%) が肉を好む人 (検出頻度：16.6%) よりも有意に高頻度に検出された ($p=0.018$)。また、*trans*-ノナクロルの平均濃度を比較したところ、5%未満の危険率で魚を好む人での平均検出濃度 (0.283ppb) の方が、肉を好む人のそれ (0.110ppb) よりも有意に高いことが判明した ($p=0.012$)。
4. 人血清及び母乳中に検出され

たクロルデン関連物質及び HCB について、同位体存在比による同定を試みたところ、これらの化合物を良好に同定することができた。