

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）

GC/MSによるヒト生体試料中のクロロベンゼン類、パラオキシ安息香酸エステル類及びホルモン系除草剤（2,4-D、2,4,5-T等）の高感度分析法の開発と実試料の分析

主任研究者 中澤 裕之

星薬科大学

分担研究者 織田 肇

大阪府公衆衛生研究所

研究協力者 藤島 弘道

月岡 忠

寺澤 潤一

長野県衛生公害研究所

要旨

ヘキサクロロベンゼン（HCB）、パラオキシ安息香酸エステル（パラベン）類、2,4-D、及び2,4,5-T等は内分泌系をかく乱する可能性があるとして指摘されている。そのため、これら化合物の高感度分析法を開発し、生体試料の測定を行い、実態を把握する必要がある。そこで、まずヘッドスペースSPME-GC/MS等による分析法を検討し、実試料に応用できる高感度分析法を確立した。次に、この方法を用いて、成人血（n=60）と、出産した妊婦（n=16）の血液、臍帯血、母乳についてこれら化合物の測定を行った。その結果、成人血からp-ジクロロベンゼン（0.3~210ppb）、HCB（0.07~0.40ppb）が検出された。2,4-D、2,4,5-T及びパラベン類は検出されなかったがパラベン類の代謝物であるp-ヒドロキシ安息香酸（18~72ppb）が検出された。また、出産した婦人の血液、臍帯血及び母乳については、臍帯血でp-ジクロロベンゼン（n.d.~2.0ppb）、HCB（n.d.~0.1ppb）p-ヒドロキシ安息香酸（45~293ppb）が検出された。妊婦血液からはp-ジクロロベンゼン（n.d.~2.7ppb）、HCB（n.d.~0.19ppb）p-ヒドロキシ安息香酸（36~211ppb）、母乳からはp-ジクロロベンゼン（n.d.~9.40ppb）、HCB（n.d.~1.2ppb）p-ヒドロキシ安息香酸（27~278ppb）が検出された。

A. 研究目的

クロロベンゼン類はモノクロル体からヘキサクロル体まで12種類の異性体があり、有機合成の中間体、殺虫剤、殺菌剤等として広く使用されている。環境庁の調査によるとp-ジクロロベンゼン、1,2,3-, 1,2,4-トリクロロベンゼン、HCBが生物や底泥から検出されている。HCBは海外では殺菌剤として使用されているが、我が国では一度も農薬登録されたことがないた

め、HCBの発生源はPCNB、PCP等の農薬の不純物と言われている。母乳中のHCBの報告は比較的多く、H. Basri Ustunbasら¹⁾の調査によれば母乳中のHCBの平均濃度はドイツ人826、イギリス人140、カナダ人54、アメリカ人31ppb (fat base) 等という報告がある。一方、血液中濃度の論文は少なく、Jos Mes²⁾のカナダ人の平均濃度の報告（0.11~0.34ppb）のみであった。2,4-Dは山林用の除草剤やレモン、

ナス、リンゴ等の蒂落ち防止剤として用いられ
ており、輸入レモンからは比較的検出されやす
い農薬である。2,4,5-Tは我が国では農薬登録
されていないが、農産物の残留基準値が設定さ
れている。これら農薬の生体試料を対象とした
報告は代謝関係の論文のみで、実態調査を行っ
た報告は見られなかった。パラベン類は食品の
保存料としての使用は最近減少傾向にあるが、
化粧品には多く使用されている。

これらの物質は日常の食事や、呼吸や皮膚か
ら取り込まれている考えられるため、我々がど
の程度これらの内分泌かく乱物質に汚染されて
いるか正確に把握する必要がある。

生体試料中のこれら化学物質の微量分析法は
クロロベンゼン類以外は報告されていない。そ
こで、これら化合物の検出限界目標を100ppt以
下とし、サロゲート化合物を用い、主にヘッド
スペースSPME-GC/MSで測定すること
により、実試料の測定が可能な方法を開発した。
また、この方法を実際の血液及び母乳に応用し
人体暴露量の調査を行った。

B. 研究方法

B・1 試薬

クロロベンゼン類は全て和光純薬工業（株）
を用いた。

パラベン類は全て関東化学工業（株）を用い
た。

2,4-D、2,4,5-Tは和光純薬（株）、残留農薬
標準品を用いた。

プロテイナーゼKは和光純薬（株）、生化学
用を用いた。

p-トルエンスルホニル-N-メチル-N-ニトロソ
アミドは東京化成工業（株）、特級を用いた。

ギ酸は和光純薬工業（株）、特級を用いた。

2,4-ジクロロフェノール-d₃、2,4-ジクロロフ
ェノキシ酢酸-d₃、ヘキサクロロベンゼン

-¹³C₆、p-ジクロロベンゼン-d₄はケンブリッ
ジアイソトープラボを用いた。

その他は全て和光純薬工業（株）、残留農薬

分析用を用いた。

Extrelut-NT20カラムはメルク製を用いた。

B・2 装置及び器具

GC/MS条件

装置：日本電子（株）製 JEOL GC-mate

カラム：HP-5, 0.32mm x 30m x 0.52 μm
(HP製)

カラム温度：50°C(2min) - 8°C/min - 250°C
(5min) クロロベンゼン類、

パラベン類

60°C(2min) - 30°C/min - 180°C - 4°C/min -
250°C - 10°C/min - 300°C(3min) 2,4-D、

2,4,5-T, p-ヒドロキシ安息香酸

注入口温度, イオン源温度：250°C

イオン化法：EI イオン化電圧：70V

モニターイオン

クロロベンゼン類 m/z =

112,114,146,148,180,182,214,216,248,250,284,286,
(152), (292)

パラベン類 m/z = 121,138,152,166, (290)

p-ヒドロキシ安息香酸, 2,4-D, 2,4,5-T m/z
= 135,166,199,233,234,268, (237), (135)

SPMEファイバーはスペルコ製 (65 μm
Polydimethylsiloxane-Divinylbenzene) を用いた。

ヘッドスペース瓶はテクマー製を用いた。

採血管はテルモ（株）製ベノジェクトII 10ml
を用いた。

B・3 試験溶液及び試験固相の調製

クロロベンゼン類：血液5mlを22mlのヘッド
スペース用バイアル瓶に採り、プロテナーゼK
200ユニット、HCB¹³C₆。5ngを加え、栓をし、
60°Cで3時間以上加熱する。次にSPMEファ
イバーをヘッドスペース瓶に差し込み、80°Cで
30分間ヘッドスペースSPMEを行う。

パラベン類：血液5mlに2,4-D d₃ 50ng及び3-
OH安息香酸200ngを添加後、精製水7mlを加え
溶血させる。これを、Extrelut-NT20カラムに負
荷し、15分程度放置後、酢酸エチル100mlでパ

ラベン類を溶出させる。溶出液をロータリーエバポレータで濃縮し内部標準物質としてHCB¹³C₆を25ng添加し、0.25mlまで濃縮する。

p-ヒドロキシ安息香酸、2,4-D、2,4,5-T：パラベン類を溶出させた後のExtrelut-NT20カラムに3%ギ酸含有酢酸エチル120mlを流し、これをナス型フラスコに採り、ロータリーエバポレータで濃縮乾固する。濃縮残留物にジアゾメタンのエーテル溶液5mlを加え、30分程度放置しメチル化する。これを22mlのバイアル瓶に移し、室温で溶媒を除去し、精製水5mlを加え、栓をする。これにSPMEファイバーを差し込み、100℃で30分間ヘッドスペースSPMEを行う。

B・4 検量線の作成

クロロベンゼン類：牛血5mlを22mlのヘッドスペース用バイアルに採り、クロロベンゼン類を0.5~25ngになるように添加し、以後B・3と同様に操作し、GC/MS-SIM測定を行い、サロゲート化合物との面積比で検量線を作成した。

パラベン類：内部標準物質としてHCB¹³C₆。0.1μg/mlを含むパラベン類の混合標準溶液0.05~0.5μg/mlをGC/MSに注入しピーク面積法により内部標準物質との比により検量線を作成した。

p-ヒドロキシ安息香酸、2,4-D、2,4,5-T：牛血にそれぞれの標準物質を5~200ngになるように添加し試験溶液の調製と同様に操作し、サロゲート化合物との比で検量線を作成した。

なお、母乳を測定する場合は牛血の代わりに牛乳を用いた。

C. 研究結果

C・1 試料の保存について

採取血液を凝固させないため抗凝固剤としてなにが適当か、牛血を用いヘパリンとEDTAを用いて検討した。その結果、両者に差が認められなかったため、ヘパリンを用いることにし

た。分析法検討用血液として牛血にヘパリンを加え、100mlずつ小分けして-20℃の冷凍庫に保存し、必要量を解凍して用いた。成人血は市販のヘパリン入りの採血真空管を用い、臍帯血はガラス製の瓶に採取し冷蔵庫に保存した。

C・2 蛋白質分解酵素について

ヘッドスペース-SPMEで血液温度を80℃まで上昇させると蛋白質が凝固し、SPMEの効率が低下した。これを防止するため、血液中の蛋白質を酵素で分解し低分子化することにより凝固を防止する方法を検討した。即ち、牛血5mlにプロテナーゼKを段階的に加え、60℃で30分間分解し、80℃にした時に凝固するかどうかを検討した。その結果、牛血5mlにプロテナーゼK100ユニット添加することにより、ほぼ凝固は防止できたが、安全率を考慮し、200ユニット添加することにした。

C・3 Extrelutカラムによる抽出について

試料に全血を用いているため溶媒抽出を行うと、エマルジョンを作り分離が困難になった。そこで、Extrelutカラムを用いてパラベン類、2,4-D、2,4,5-T、p-ヒドロキシ安息香酸の溶出条件の検討を行った。これらの化合物は血球に取り込まれている可能性があるため、血液をExtrelutカラムに負荷する直前に精製水を加え、溶血させた。パラベン類は一般の疎水性溶媒で溶出が可能であり、今回は酢酸エチル100mlで溶出させた。2,4-D等のカルボン酸基をもった化合物は珪藻土に強く吸着されるため、溶媒中に酸やアルカリを添加させないと溶出できなかった。今回は酢酸エチルに酸を添加し溶出条件の検討を行った。添加する酸としては酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸を用いて検討した。酢酸は酸として弱いため、回収率が低かった。トリフルオロ酢酸はギ酸よりも強い酸であるが、溶出液を濃縮すると不揮発成分が残留し、以後の操作を妨害した。このため、今回はギ酸を用いることとし、ギ酸を3%含有した酢酸エチル120mlを用いることによりこれらの物質は100%回収された。

C・4 SPMEのファイバーについて

ヘッドスペース中の目的物質を効率よく抽出できるファイバーを選定するため、100 μm のPolydimethylsiloxane (PDMS), 65 μm のPolydimethylsiloxane/
Divinylbenzene (PDMS/DVB), 75 μm のCarboxen/Polydimethylsiloxane (Carboxen/PDMS), 65 μm のCarbowax/Divinylbenzene (CW/DVB)について検討した。その結果、PDMS/DVBとCW/DVBが感度面で良好な結果が得られた。Carboxen/PDMSは低沸点化合物に高感度であったが、脱離があまり良くなくピークがブロードになる傾向があったため、今回は使用しなかった。

C・5 2,4-D, 2,4,5-T, パラベン代謝物の誘導体化について

ペンタフルオロベンジル化とメチル化について検討した。誘導体化された物質自体をGC/MS測定する場合はペンタフルオロベンジル化合物が高感度であったが、ヘッドスペース-SPMEを用いた場合はメチル化合物が有利であった。このため、今回はメチル化を採用した。

C・6 GC/MS条件の検討

GC用カラムとして微極性のHP-5を用いて分離条件の検討を行った結果、クロロベンゼン類で1,2,3,5-テトラクロロベンゼンと1,2,4,5-テトラクロロベンゼンが分離しなかったが他の化合物の分離が可能であったのでこのカラムを用いた。モニターイオンはクロロベンゼン類はそれぞれの分子イオン $m/z = M^+$ が生成されやすかったため、ベースピークその付近のフラグメントイオンを用いた。またサロゲートとして用いたHCB¹³C₆はベースピーク $m/z = 290$ が試料のHCB濃度が高いとき若干影響を受ける可能性があるため、 $m/z = 292$ を用いた。パラベン類は分子イオンの生成が悪いため、 $m/z = 121, 138, 152, 166$ を用いた。2,4-D, 2,4,5-Tはメチル化合物の分子イオン $m/z = 234, 268$ とその他に強いフラグメント $m/z = 199, 233$ を用いた。サロゲートとして用いた2,4-D

d₃のメチル化合物は $m/z = 237$ を用いた。p-ヒドロキシ安息香酸のメチル化合物は分子イオンの生成が悪く、選択性に欠けたが $m/z = 135, 166$ を用いた。

検出限界は使用する機種によってかなり異なるが、今回用いた日本電子(株)のGC-mateでは表1に示す結果となった。

C・7 生体試料の分析

1) 成人血調査:

当研究所の職員及びその家族(n=60)を対象に抗凝固剤としてヘパリン入り真空採血管を用いて採血しB・3法により分析した。図1にクロロベンゼン類のSIMクロマトグラム、図2にパラベン類のSIMクロマトグラム、図3に2,4-D, 2,4,5-T, p-ヒドロキシ安息香酸メチル化合物のSIMクロマトグラムを示す。また、結果を表2及び図4にヒストグラムとして示す。成人血からはクロロベンゼン類ではp-ジクロロベンゼン(0.3~210ppb)、HCB(0.07~0.40ppb)が検出された。また、クロロフェノール類のうち2,5-ジクロロフェノールが検出された。2,4-D, 2,4,5-T及びパラベン類は検出されなかったがパラベン類の代謝物であるp-ヒドロキシ安息香酸(18~72ppb)が検出された。

2) 胎児暴露に関する調査:

長野市内の産院で出産した16人の妊婦の臍帯血(出産直後)、及び妊婦本人の血液及び母乳(概ね出産5日後)を採取した。

それらを分析した結果を表3に示す。臍帯血ではp-ジクロロベンゼンがn.d.~2.0ppb、HCBがn.d.~0.10ppb、p-ヒドロキシ安息香酸が45~293ppb、妊婦血液でp-ジクロロベンゼンがn.d.~2.7ppb、HCBが0.02~0.19ppb、p-ヒドロキシ安息香酸が36~211ppb、母乳でp-ジクロロベンゼンn.d.~9.4ppb、HCBがn.d.~1.2ppb、p-ヒドロキシ安息香酸が27~278ppb検出された。

D. 考察

D. 1 分析法について

クロロベンゼン類：サロゲートとしてHCB¹³C₆、p-ジクロロベンゼンd₄を加え、プロテナーゼKを用いて蛋白質を分解し、ヘッドスペースSPME後、GC/MS-SIMで定量する方法を確立した。この方法は溶媒抽出法等の従来法に比べ、高感度で操作性にすぐれ、精度も高い。また、操作が簡便なためB型肝炎等の感染の危険も少なく、実試料のルーチン分析法として有用である。

パラベン類：Extrelutカラムで抽出することにより、エマルジョンの生成を防止し、直接血液と触れる機会を少なくしたため感染の危険性が少なく、ルーチン分析法として有用である。

2,4-D, 2,4,5-T, p-ヒドロキシ安息香酸：Extrelutカラムを用いて、パラベン類と系統分析ができるように組み立てた。この方法は、フェノキシ系の除草剤の同時分析が可能であり、サロゲートとして、2,4-Dのd体を添加することにより、精度を高めている。また、溶媒を除去した後、ヘッドスペース瓶をそのまま加熱するのではなく、精製水を加えて加熱することにより、高感度が得られた。

D・2 測定結果の評価について

1) 成人血液の調査結果

クロロベンゼン類のうちHCBは成人血液60人のうち全員から検出され、平均値は0.17ppb(0.07~0.40ppb)で、平均値を中心とした比較的正規分布に近いヒストグラムが得られた。今回のHCBの測定値は全血をみつかったカナダでのHCBの報告例(0.11~0.34ppb)とほぼ同じレベルであった。HCBは食べ物経路で人体に取り込まれていると考えられる。

クロロベンゼン類のうちp-ジクロロベンゼンも測定者ほぼ全員から検出され、平均値は14.9ppb(0.4~211ppb)で一部の人に高濃度の結果が得られた。p-ジクロロベンゼンは衣類の防虫剤やトイレの消臭剤に広く使用されているため、室内の空気を經由して肺から取り込まれたと考えられる。従って、家族で協力した被験者のうち、家庭にいる時間の長い主婦が外で

働いている夫に比べて高濃度になった事例も見られた。また、被験者の中には健康影響が懸念される濃度の人も見られた。ジクロロベンゼン対策として、タンスに使用する防虫剤を他の種類のものに切り替え、頻りに室内空気を入れ替えて室内濃度を低下させる手段が有効と考えられる。

調査項目のうちパラベン類そのものは検出されなかったがp-ヒドロキシ安息香酸が測定者全員から検出され、平均値は44ppb(18~72ppb)であった。ヒストグラムではHCBと類似した正規分布型を示した。パラベン類は食品添加物等として現在も使用されており、また食品以外では化粧品等にも使用されていることから様々な経路で体内に取り込まれる可能性がある。パラベン類は、肝臓で速やかに加水分解され、p-ヒドロキシ安息香酸に代謝されると言われており代謝物が血液中に存在すると考えられる。

2) 胎児暴露に関する調査：

市内産院で出産した16名の妊婦における試料のうちHCBは妊婦血液平均で0.096ppb(0.02~0.19ppb)、臍帯血平均で0.04ppb(nd~0.1ppb)、母乳平均で0.42ppb(nd~1.2ppb)という結果となった。本人血液濃度に対する臍帯血、母乳中HCB濃度の相関関係を図5に示す。妊婦血液平均は成人血平均値(0.17ppb)に比べ約半分の値と低い値を示しており、臍帯血の平均値はその妊婦血液に比べさらに半分の値を示した。一方、母乳は平均0.42ppbと妊婦血液に対して5倍程度の値を示した。この結果からHCBの胎児への移行は、胎盤でのフィルター効果(有害物遮断機能)が働いていると考えられる。しかし、その分、母乳を通じて胎児に移行することがわかった。調査例数が少なく、はっきりしてはいないが、妊婦血液のHCB濃度が成人血に比べて低い理由として、妊婦血液採取が出産5日後であり、血液中の脂溶性成分が母乳に移行することも原因の一つとして考えられる。p-ジクロロベンゼンについては妊婦血液平均で0.63ppb(nd~2.7ppb)、臍帯血は平均で

0.68ppb(nd~2.0ppb)、母乳で平均2.0ppb(nd~9.4ppb)という結果となった。本人血液濃度に対する臍帯血、母乳中p-ジクロロベンゼン濃度の相関関係を図6に示す。妊婦血液の平均は成人血平均14.9ppbと比べ1/10以下と低い値を示した。しかし、調査数が少ないためp-ジクロロベンゼンを使用していない被験者のみとなったのか、出産に伴い、血液中での組成に何らかの変化があったかははっきりしなかった。p-ジクロロベンゼンは母乳中濃度と血液中濃度との差に明らかな傾向が見られず、また、胎盤におけるフィルター効果の有無については考察は今後の課題となっている。

p-ヒドロキシ安息香酸(パラベン代謝物)について妊婦血液は平均で73ppb(36~211ppb)、臍帯血は平均で96ppb(45~293ppb)、母乳で平均108ppb(27~278ppb)という結果となった。本人血液濃度に対する臍帯血、母乳中p-ヒドロキシ安息香酸濃度の相関関係を図7に示す。臍帯血と妊婦血液の平均値を比べた結果、臍帯

血が妊婦血液に比べてやや高くなる傾向を示したが、はっきりした傾向は確認できなかった。なお、p-ヒドロキシ安息香酸はHCBやp-ジクロロベンゼンなど脂溶性物質と比べ水溶性が高く、異なった挙動をすることが考えられる。被験者数が少ないことからはっきりした傾向がつかめていないが、さらに検体数を増やすことで、胎児への移行についての影響が明らかになると考えられる。

今回検出が明らかになったHCB、p-ジクロロベンゼン、パラベン(代謝物)については胎児への移行が明らかであることから、早急にエストロゲン作用をもつかどうかバイオアッセイ等で確認する必要があると思われる。

文献

- 1) H. Basri Ustunbas et al.: Human and Experimental Toxicology, 13, 299-302 (1994)
- 2) Jos Mes: Bull. Environ. Contam. Toxicol., 48, 815-820 (1992)