

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）

ヒト母乳及び血清中の有機塩素系化合物の分析法開発と生体試料の分析

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学教授

分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所副所長

研究協力者 堀 伸二郎、北川 幹也 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨：1973 年から 1996 年の府下在住の授乳婦（25～29 歳の初産者のみ；各年 19～33 名）より採取した母乳中の有機塩素系化合物およびダイオキシン類の残留実態を明らかにした。また、血清中の有機塩素系化合物の高感度迅速分析法を確立し、本方法を用いて成人ヒト血清中の有機塩素系化合物の汚染濃度を明らかにした。

1996 年の母乳中の PCB(0.33  $\mu\text{g/g}$ )、HCH(0.23  $\mu\text{g/g}$ )および DDT 類(0.30  $\mu\text{g/g}$ )濃度は、1973 年の PCB(1.43  $\mu\text{g/g}$ )、HCH(3.79  $\mu\text{g/g}$ )および DDT 類(3.35  $\mu\text{g/g}$ )濃度対して、それぞれ、23%、6%、9%に減少した。

1996 年の母乳脂肪中ダイオキシン類およびコプラナ PCB 濃度は、1975 年のダイオキシン類およびコプラナ PCB 濃度に対して、46%および 28%に減少した。

1996 年の母乳脂肪中ダイオキシン類（16.3pg-TEQ/g）およびコプラナ PCB（7.8pg-TEQ/g）濃度は、1975 年のダイオキシン類（30.2pg-TEQ/g）およびコプラナ PCB（28.0pg-TEQ/g）濃度に対して、46%および 28%に減少した。

成人血清 34 検体のうち、全検体より PCB 類、HCB、p,p'-DDE を検出し、また 25 検体から  $\beta$ -HCH を検出した。総 PCB 濃度は 4.63～20.78ppb（平均：11.92ppb）、HCB 濃度は 0.07ppb～0.62ppb（平均：0.228ppb）、p,p'-DDE 濃度は 0.4ppb～14.9ppb（平均：3.68ppb）であった。 $\beta$ -HCH 濃度は ND～8.1ppb（検出限界：0.1ppb 検出したものの平均：1.76ppb）であった。

#### A. 研究目的

現在、内分泌かく乱化学物質が社会的に問題になっている。これらの化学物質のヒトへの影響を評価する場合、これら化学物質によるヒトの汚染（蓄積）レベルを正確に把握することが重要である。また、従来とは異なる新たな問題ということもあり、可能なかぎり低濃度の分析が必要である。しかしながら、最近のこれら化学物質の汚染データはほとんど明らかにされていない。

また、内分泌かく乱化学物質の血液等の生体試

料についての微量分析法は必ずしも確立されていない。そこで本研究では、血液中の有機塩素系化合物を迅速に分析する方法を確立するとともにヒト血液中の有機塩素系化合物の汚染濃度を明らかにする。さらに、1973 年～1996 年にわたる大阪府在住者の保存母乳について、有機塩素系化合物の汚染濃度を明らかにした。

#### B. 研究方法

保存母乳〔1973 年から 1996 年の府下在住の授

乳婦（25～29歳の初産者のみ；各年19～33名）より採取した母乳）については、脂肪抽出後、フロリジルドライカラムで脂肪を除去した。つぎに、フロリジルカラムでクリーンアップをおこなった後、ECD-GC及びGC/MSで測定した（図1）。

血液中のPCB、DDT類、HCH等の有機塩素系化合物の迅速分析法を確立した。すなわち、ヒト血清（2ml）をヘキサン・ジエチルエーテル混液で抽出した後、抽出液をゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）でクリーンアップを行い、GC/MSで有機塩素系化合物を測定した（図2）。試料中の検出限界をPCBでは異性体ごとに、4～6塩化：25ppt、7～8塩化：5ppt、9～10塩化：1pptとし、HCH類・ヘプタクロール類・ディルドリン等およびDDT類：100ppt、HCB：10pptとした。PCBのSIMクロマトグラムを図3、4に示した。

### C. 研究結果

ヒト母乳中の有機塩素系化合物およびダイオキシン類

#### (1) 母乳中の有機塩素系化合物濃度

1973年から1996年の府下在住の授乳婦（25～29歳の初産者のみ；各年19～33名）より採取した母乳についての有機塩素系化合物濃度を表1に示した。

1996年の母乳脂肪中のPCB(0.33 $\mu$ g/g)、HCH(0.23 $\mu$ g/g)およびDDT類(0.30 $\mu$ g/g)濃度は、1973年のPCB(1.43 $\mu$ g/g)、HCH(3.79 $\mu$ g/g)およびDDT類(3.35 $\mu$ g/g)濃度に対して、それぞれ、23%、6%、9%に減少した。また、1986年の母乳脂肪中のHCB（ヘキサクロロベンゼン）、HCE（ヘプタクロルエポキシイド）およびクロルデン（CLD）濃度は、1986年のそれらに対して、それぞれ、25%、20%および55%に減少した。しかしながら、クロルデン防除家屋に居住していた人のCLD濃度では、依然母乳脂肪当たり0.1 $\mu$

g/g以上の汚染母乳も認められた。

(2) 母乳中のダイオキシン(PCDD)、ベンゾフラン(PCDF)、コプラナPCB(Co-PCB)濃度

我々は1973年から1996年の大阪府在住者の母乳中のダイオキシン類の測定を行い、その経年変化を明らかにした（表1）。1996年の母乳中ダイオキシン類(16.3pg-TEQ/g)およびCo-PCB(7.8pg-TEQ/g)濃度は、1975年のダイオキシン類(30.2pg-TEQ/g)およびCo-PCB(28.0pg-TEQ/g)濃度に対して、46%および28%に減少した。

ヒト成人血清中有機塩素系化合物

当所に勤務する職員の一部（24～60歳、男性30名、女性4名）について分析を行った。全検体よりPCB、HCB、p,p'-DDEを検出し、また25検体から $\beta$ -HCHを検出した（表2）。

PCB濃度は、それぞれ4塩化PCB(0.70～4.65ppb)、5塩化PCB(1.95～5.36ppb)、6塩化PCB(0.66～6.14ppb)、7塩化PCB(0.114～1.596ppb)、8塩化PCB(0.412～5.402ppb)、9塩化PCB(0.002～0.026ppb)、10塩化PCB(0.001～0.009ppb)、総PCB(4.63～20.78ppb)で、総PCBの平均値は11.92ppbであった（表2、図5）。

HCBは0.07ppb～0.62ppb（平均：0.228ppb）、p,p'-DDEは0.4ppb～14.9ppb（平均：3.6ppb）であった。 $\beta$ -HCHはND～8.1ppb（検出限界：0.1ppb 検出したものの平均：1.76ppb）であった（表2、図5）。その他の塩素系化合物は検出しなかった。

### D. 考察

PCBをはじめとする難分解性の有機塩素系化合物は、人体に取り込まれると体外に排泄されにくい。授乳婦のみ、母乳とともに多量に排泄することができる。したがって、母乳汚染の程度は、

初産婦では経産婦にくらべてかなり高濃度である。1992年度の初産婦60名の有機塩素系化合物（HCH、HCB、DDE、PCB）濃度を例にとると、有機塩素系化合物濃度は年齢に伴い上昇する傾向が認められた。これらの化合物は魚介類摂取等による食物連鎖によって、人体に蓄積されるため、年齢が高くなるほど人体に多く蓄積される。一方、CLD濃度は年齢との相関を示さなかった。その理由は、クロルデン防除家屋に居住していた人の家屋汚染が原因と考えられる。

平成6年度及び7年度報告（厚生省）によれば、日本における母乳中のダイオキシン類の脂肪中濃度は平均26.6pg-TEQ/g fatである。また、諸外国における母乳中のダイオキシン類濃度は、イギリス29~37pg-TEQ/g fat、ドイツ28~37pg-TEQ/g fat、カナダ16~23pg-TEQ/g fatであり、日本を含めた先進国での母乳中のダイオキシン類濃度は同程度と考えられる。

このようにダイオキシン類濃度が約20年間で半減した理由は、①環境汚染の減少に伴う食品汚染レベルの減少、②食事内容の変化、特に食材の多様化及び広域化（輸入食品の増加）等が考えられるが、現時点では分からない。

ヒト血清中のPCB濃度は4~6塩化PCBが主成分であるが、PCB濃度と年齢との間には、特に高塩素化PCBにおいて有意の正の相関がみられた。しかしながら、食事との間には相関は認められなかった。（表3、図6）また、 $\beta$ -HCH、HCB、p,p'-DDEについても同様の傾向が見られた。ただし、年齢が高くなるほどそれぞれの濃度の分散が大きくなること、肉または魚をまったく摂取しない極端な群が見られなかったことを考慮する必要があると思われる。また、PCBは、バックドGC-ECDを用いる従来の分析法に対し、今回は各異性体をキャピラリーGC/MSで測定したため、従来法による結果とは単純には比較できない。し

かしながら、暴露実態を調査するためにはできるだけ多くの情報を得ることが望ましいと考えられるため、異性体ごとのデータを収集した上で、従来法との比較・補正法を検討する必要がある。

有機塩素系化合物やダイオキシン類の内分泌かく乱作用等のヒトへの影響を考える場合、現時点での暴露だけではなく、胎児期及び乳幼児期の暴露を含めた長期的な視野で解析することが重要である。そのためには長期的な展望のもとに継続したモニタリング調査が不可欠である。

母乳 (約100 g) 500 ml分液ロート

シュウ酸カリウム 1 g (水4 mlに溶解)  
エタノール 100 ml (母乳と同量)  
エーテル 50 ml (母乳の半量)  
ヘキサン 120 ml, shake for 10 min

ヘキサン層

2% NaCl 30 ml, shake for 5 min  
水層を50 ml tubeにとり、遠心分離し、  
上層をヘキサン層に加える  
2% NaCl 100 mlで洗浄 (2回) 後、亡硝脱水  
K.D濃縮 (20 ml 試験管) 後、さらに濃縮

乳脂肪 (正確に秤量してFat%を算出)

フロリジルドライカラム 20 g 22×300 mm

(活性化、130°C, over night)

乳脂肪 (約1.0 g) をヘキサン約3mlに溶解しのせる  
N<sub>2</sub>ガスで乾燥 (約1時間)

溶出

70% アセトニトリル/水 100 ml 1秒/1滴  
受け 1 L分液ロート --- 200 ml 2% Na<sub>2</sub>Cl  
--- 120 ml ヘキサン

500 ml 2% NaCl, shake for 10 min  
2% NaCl 100 mlで洗浄 (2回) 後、亡硝脱水  
K.D濃縮 (5 ml 試験管)

フロリジルウェットカラム 15 g 18×300 mm

130°Cでover night 活性化

約1 cmの亡硝をのせる

10% エーテル/ヘキサン 60 mlで前洗浄

溶出

10% エーテル/ヘキサン 80 ml 1秒/2滴  
受け --- 3 ml 試験管付き K.D

約0.5 mlに濃縮

δ-HCH 2 ppmを0.1 ml加える (内部標準、200 ppb)

1.0 mlにメスアップ (GC-MSでクロルデン、農薬測定)

3.0 mlにメスアップ後、2 N KOH 2 mlでアルカリ処理  
水1 mlで水洗2回

フロリジルミニカラム 1 g 130°C, over night 活性化

亡硝 少々

ヘキサン 5 mlで前洗浄

2.6 mlをのせ ヘキサン 6 mlで溶出 (1 ml試験管)

1 mlに濃縮、メスアップ後、PCB測定

図1 母乳中有機塩素系化合物の分析方法

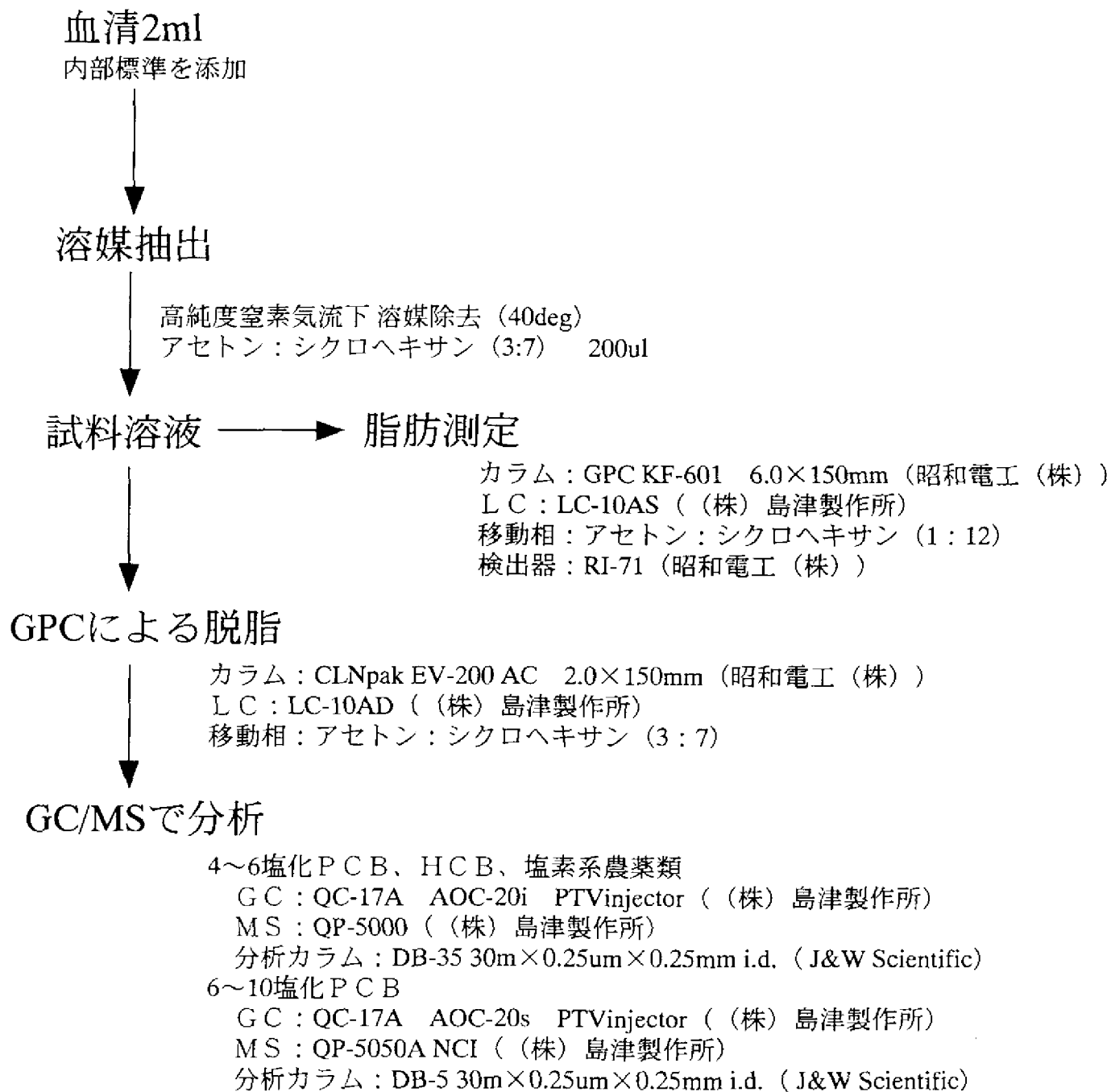


図2 血清中PCB分析法 フローチャート

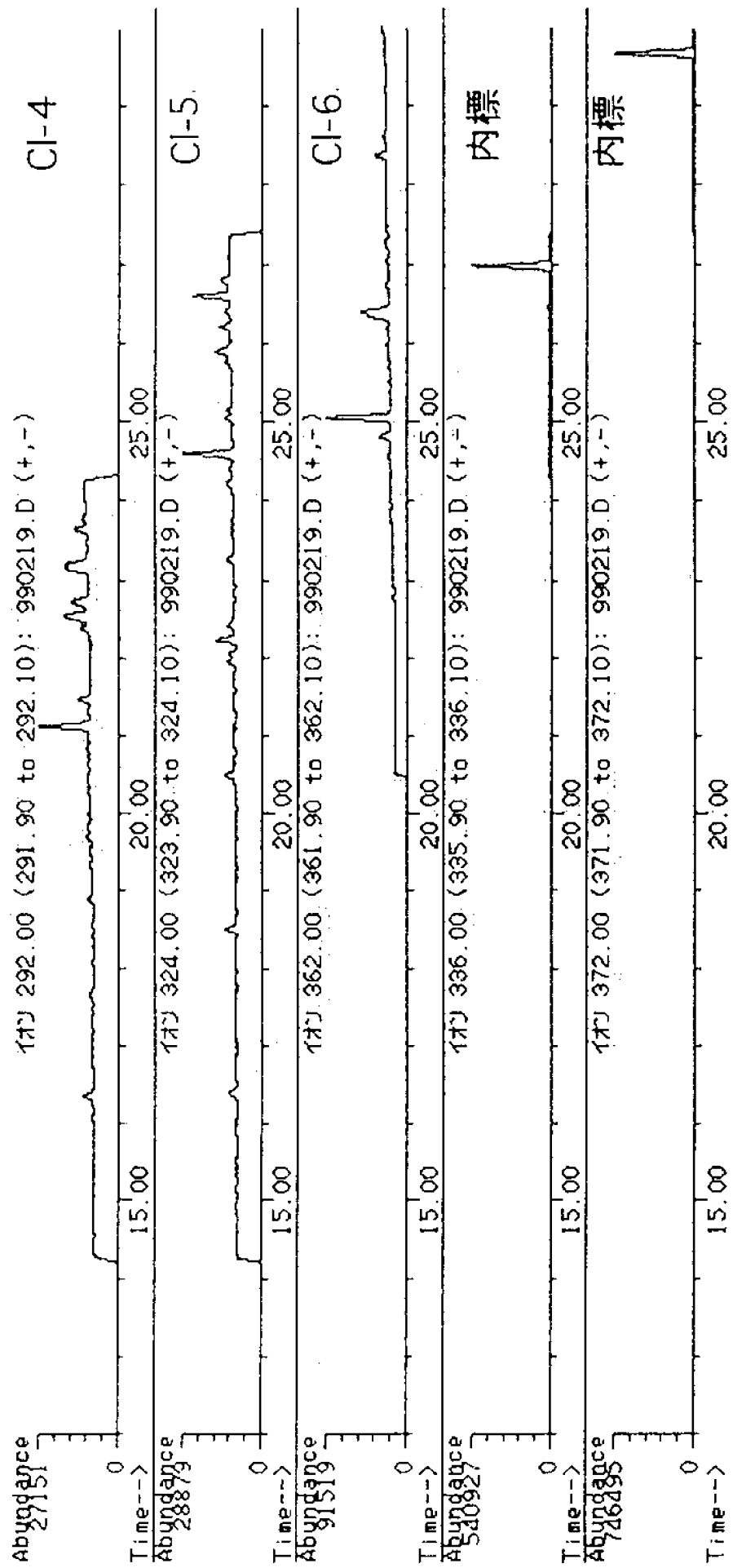


図3 試料中の4~6塩化PCB (EIによる)

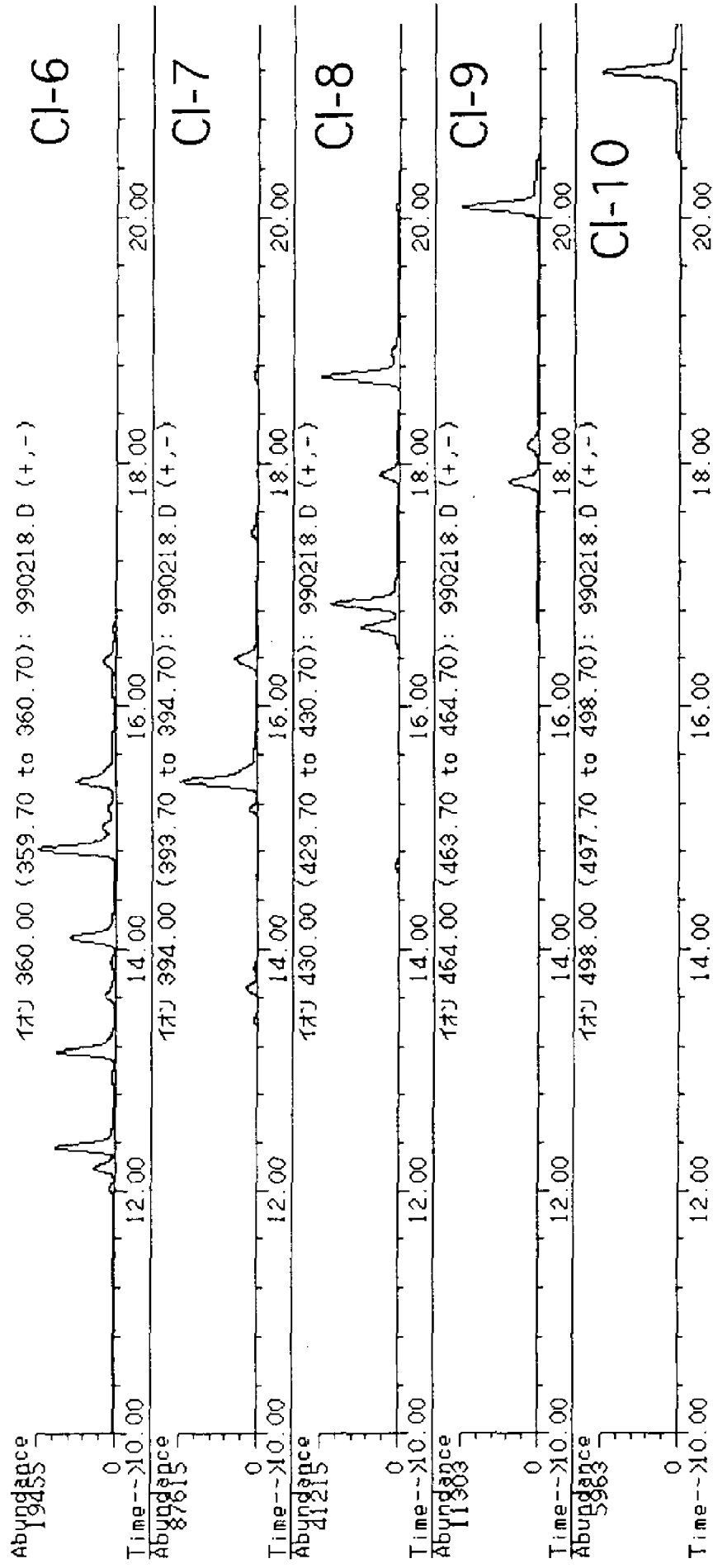


図4 試料中の6~10塩化PCB (NCI)

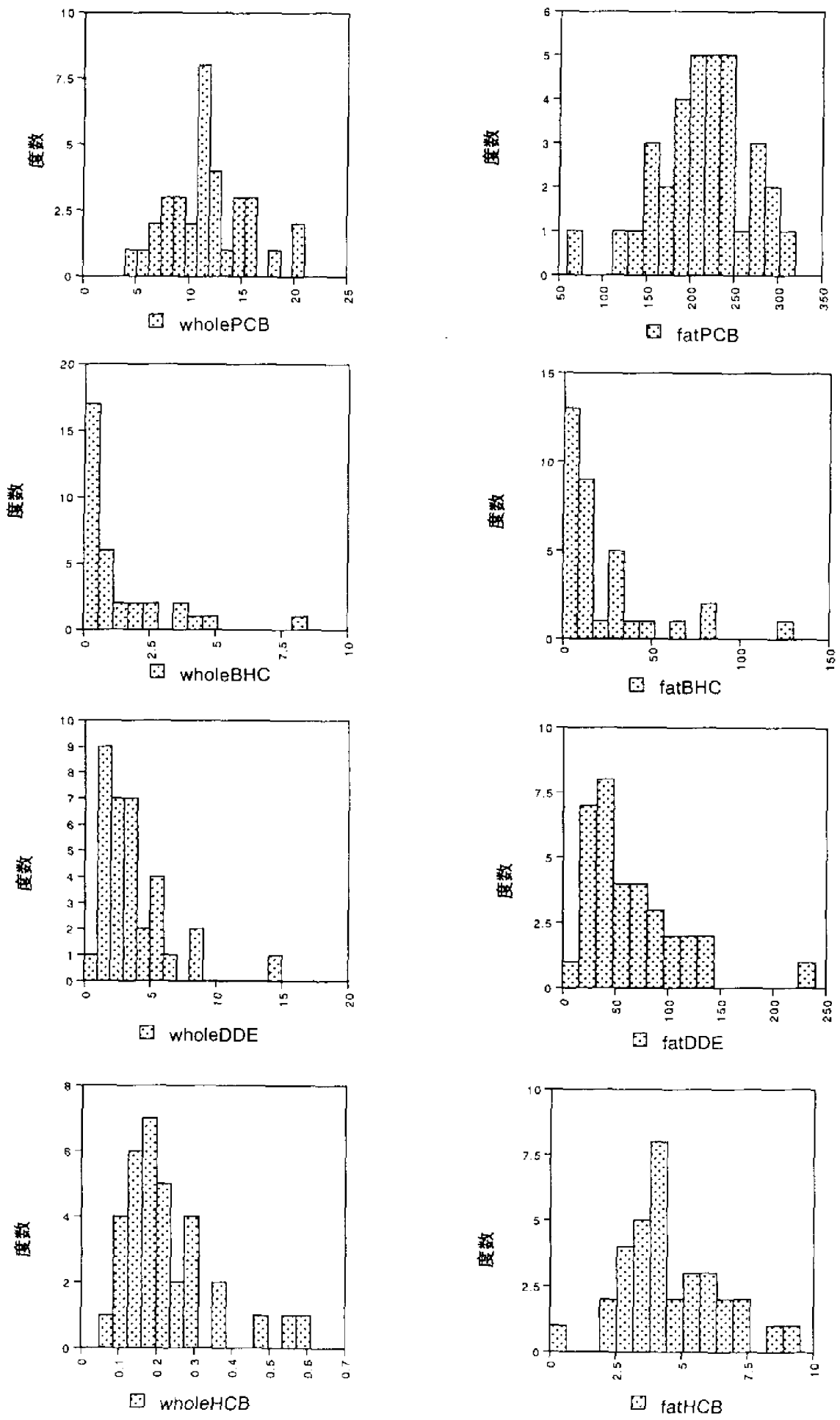


図5 血清中濃度のヒストグラム

横軸：濃度(ppb)



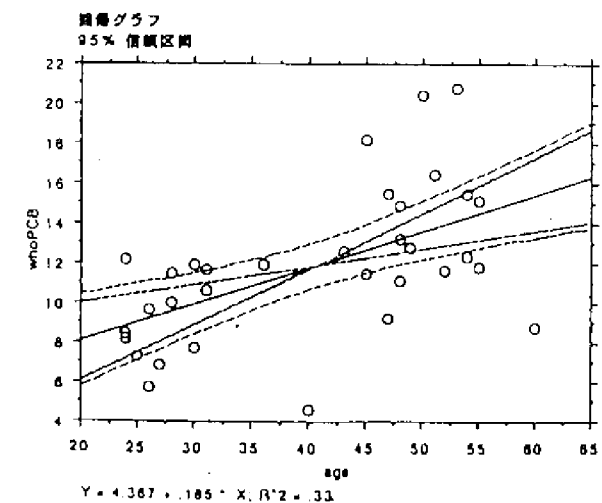
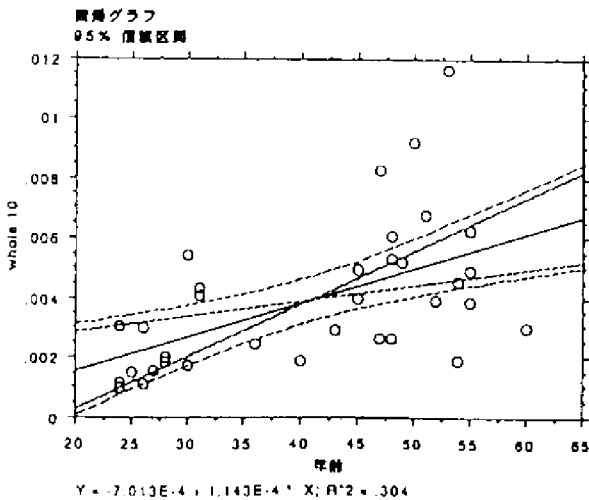
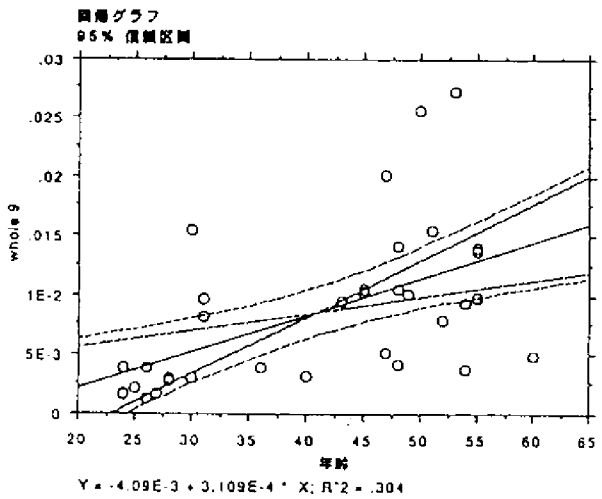
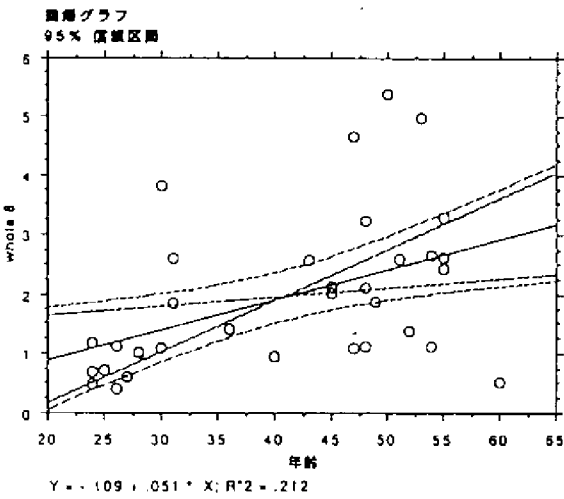
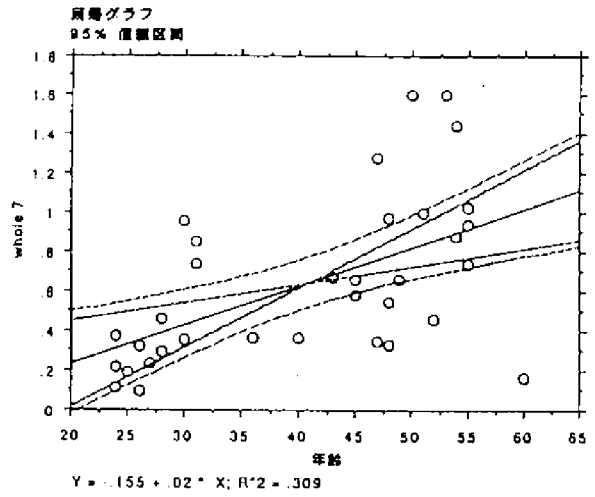
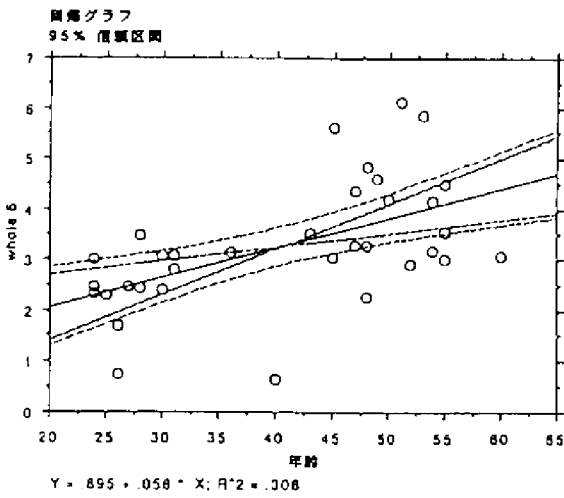
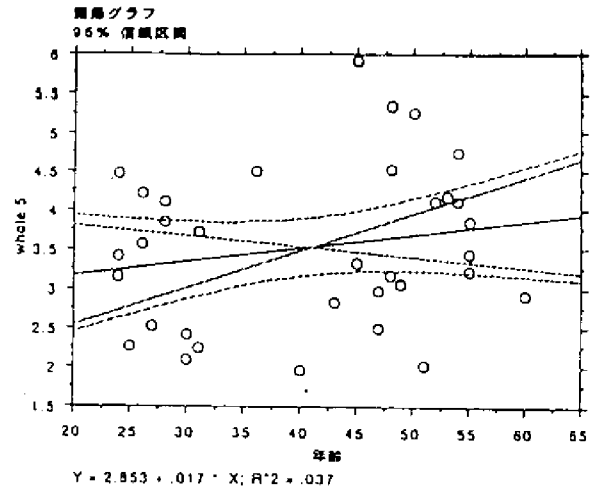
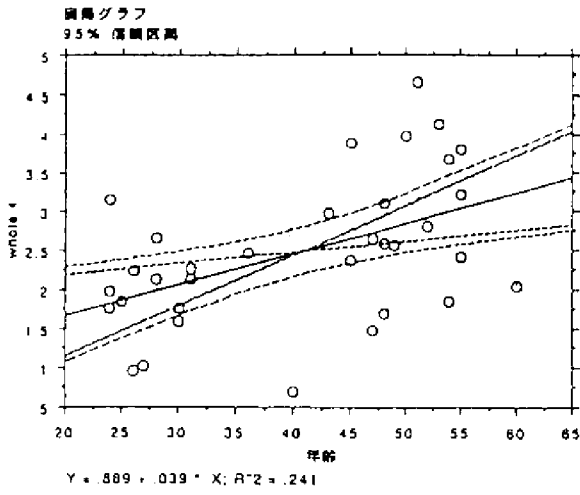


図6 血清中のPCBと年齢との関係

Table 1. Average levels (fat basis) of organochlorine compounds in human milk samples

year	PCDD pg-TEQ/g	PCDF pg-TEQ/g	PCDD+PCDF pg-TEQ/g	Co-PCB pg-TEQ/g	PCB μg/g	HCB μg/g	β-HCH μg/g	T-DDT μg/g	HCE μg/g	T-CLD μg/g
1973	14.3	11.4	25.6	31.4	1.43		3.79	3.35		
1974	14.6	17.5	32.1	31.4	1.58		7.66	2.54		
1975	15.9	14.3	30.2	28.0	1.24		3.78	2.48		
1976	13.6	12.3	25.9	23.0	1.13		4.26	5.51		
1977	12.8	13.7	26.5	22.2	1.15		2.47	2.19		
1978	13.6	13.0	26.6	25.3	1.34		2.87	2.52		
1979	13.0	13.5	26.4	20.1	1.11		3.05	2.37		
1980	11.6	11.8	23.4	16.6	1		2.87	2.3		
1981	12.7	9.8	22.5	15.6	1.04		2.27	2.14		
1982	13.3	10.3	23.7	15.0	1.04		2.27	2.99		
1983	14.1	10.1	24.2	16.4	1.17					
1984	14.4	10.2	24.6	12.7	0.89					
1985	12.2	9.1	21.3	11.1	0.74					
1986	11.4	8.2	19.6	10.9	0.67	0.04	1.52	1.21	0.038	0.11
1987										
1988	13.4	8.3	21.7	12.7	0.52	0.04	1.86	1.16	0.020	0.1
1989	14.1	7.4	21.5	11.5	0.53	0.03	1.46	0.89	0.011	0.08
1990	12.3	8.8	21.1	10.8	0.48	0.03	1.17	0.60	0.014	0.07
1991	11.1	7.4	18.5	10.7	0.36	0.04	0.88	0.75	0.006	0.07
1992	10.9	6.7	17.5	8.6	0.31	0.02	0.71	0.53	0.009	0.05
1993	11.0	6.7	17.7	8.8	0.28	0.02	0.43	0.59	0.012	0.09
1994	11.8	7.0	18.8	8.3	0.32	0.02	0.57	0.50	0.013	0.09
1995	9.3	6.3	15.6	7.9	0.28	0.02	0.31	0.34	0.014	0.07
1996	9.5	6.8	16.3	7.8	0.33	0.01	0.23	0.30	0.007	0.06

表2 血清中P C B濃度 (Whole Basis : ppb)

No	脂肪量 (%)	年齢	性別	食草	4塩化	5塩化	6塩化	7塩化	8塩化	9塩化	10塩化	総PCB	β-HCH	HCB	p,p'-DDE
1	0.581	48	男	肉	3.10	5.36	3.29	0.333	1.129	0.004	0.003	13.22	1.9	0.17	5.1
2	0.705	55	男	魚	3.22	3.85	4.49	0.942	2.633	0.014	0.006	15.16	0.3	0.27	3.5
3	0.545	52	男	肉魚	2.80	4.12	2.91	0.460	1.379	0.008	0.004	11.67	ND	0.20	1.3
4	0.574	49	男	肉魚	2.57	3.06	4.59	0.657	1.870	0.010	0.005	12.76	ND	0.23	3.7
5	0.511	36	男	魚	2.47	4.50	3.14	0.367	1.406	0.004	0.003	11.89	1.7	0.23	4.8
6	0.585	48	男	魚	2.59	3.18	4.85	0.972	3.243	0.014	0.006	14.84	0.8	0.18	2.6
7	0.407	24	男	魚	1.97	3.16	2.48	0.114	0.488	0.002	0.001	8.21	0.5	0.14	2.3
8	0.407	26	男	魚	0.96	3.56	0.75	0.092	0.412	0.001	0.001	5.78	ND	0.07	1.1
9	0.621	25	男	魚	1.84	2.26	2.29	0.189	0.734	0.002	0.002	7.32	ND	0.16	2.6
10	0.515	24	女	肉	3.15	4.48	3.02	0.375	1.183	0.004	0.003	12.22	0.9	0.31	6.0
11	0.662	53	男	肉魚	4.13	4.18	5.84	1.599	4.993	0.027	0.012	20.78	4.3	0.60	5.0
12	0.489	47	男	肉魚	1.48	2.97	3.28	0.345	1.098	0.005	0.003	9.18	0.8	0.15	2.4
13	0.797	51	男	魚	4.65	2.02	6.14	1.002	2.605	0.015	0.007	16.43	3.5	0.56	6.2
14	0.423	54	男	肉魚	1.85	4.73	3.17	1.444	1.139	0.004	0.002	12.34	0.7	0.12	1.4
15	0.632	48	男	肉魚	1.70	4.51	2.26	0.546	2.105	0.011	0.005	11.14	0.4	0.19	3.5
16	0.477	26	女	魚	2.25	4.22	1.68	0.324	1.129	0.004	0.003	9.61	0.3	0.25	2.0
17	0.587	45	女	肉魚	2.37	3.34	3.03	0.584	2.133	0.011	0.004	11.47	4.8	0.22	1.4
18	0.759	50	男	魚	3.97	5.26	4.20	1.596	5.402	0.026	0.009	20.47	2.4	0.29	3.6
19	0.420	28	男	魚	2.14	4.11	2.43	0.298	1.021	0.003	0.002	10.00	0.6	0.18	2.7
20	0.678	31	男	肉	2.26	3.71	3.08	0.743	1.855	0.008	0.004	11.65	0.3	0.16	1.2
21	0.445	27	男	肉魚	1.03	2.53	2.48	0.232	0.617	0.002	0.002	6.89	ND	0.11	1.2
22	0.731	28	女	肉魚	2.65	3.84	3.48	0.465	1.031	0.003	0.002	11.47	0.7	0.21	2.0
23	0.611	30	男	肉	1.59	2.41	3.09	0.956	3.832	0.016	0.006	11.89	ND	0.12	2.5
24	0.654	40	男	肉	0.70	1.95	0.66	0.369	0.958	0.003	0.002	4.63	ND	0.18	0.4
25	0.583	60	男	肉魚	2.04	2.92	3.08	0.168	0.534	0.005	0.003	8.74	ND	0.16	1.7
26	0.758	45	男	魚	3.90	5.91	5.63	0.657	2.038	0.010	0.005	18.15	2.5	0.36	8.5
27	0.572	47	男	肉魚	2.66	2.50	4.36	1.275	4.664	0.020	0.008	15.48	0.8	0.36	3.5
28	0.454	24	男	魚	1.76	3.41	2.34	0.217	0.705	0.002	0.001	8.44	ND	0.11	1.6
29	0.627	54	男	魚	3.67	4.10	4.16	0.877	2.664	0.010	0.005	15.48	1.7	0.46	8.5
30	0.375	31	男	魚	2.14	2.25	2.80	0.853	2.599	0.010	0.004	10.65	0.3	0.16	3.3
31	0.659	55	男	肉魚	3.80	3.43	3.55	1.022	3.314	0.014	0.005	15.14	8.1	0.28	14.9
32	0.312	30	男	肉魚	1.75	2.08	2.40	0.352	1.115	0.003	0.002	7.70	0.4	0.16	3.6
33	0.508	55	男	肉魚	2.41	3.21	3.01	0.737	2.441	0.010	0.004	11.83	1.8	0.15	5.4
34	0.432	43	男	肉	2.98	2.83	3.52	0.666	2.580	0.010	0.003	12.58	3.5	0.24	5.7
平均	0.562	40.9			2.49	3.53	3.28	0.642	1.972	0.009	0.004	11.92	1.8	0.23	3.7
SD	0.122	11.8			0.94	1.01	1.24	0.416	1.312	0.007	0.003	3.81	1.9	0.12	2.8

表3 2群の検定 (P値)

	4塩化	5塩化	6塩化	7塩化	8塩化	9塩化	10塩化
年齢 40歳以上/未滿	0.005	0.310	0.001	0.001	0.006	0.001	0.001
食事 (魚/肉)	0.451	0.698	0.327	0.834	0.985	0.759	0.594

	HCB	$\beta$ -HCH	p,p'-DDE
年齢 40歳以上/未滿	0.004	0.005	0.044
食事 (魚/肉)	0.405	0.921	0.802

(n=34)

(肉中心 : 6 魚中心 : 14)