

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

成人血及びさい帯血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	宮崎 豊 伊藤裕子 猪飼誉友 近藤文雄 岡 尚男 松本 浩 愛知県衛生研究所

要旨

一般の成人を対象としてクロルデンとその関連物質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、血液提供者に対するアンケート調査により食事の嗜好性、住環境等の情報を得、これらの化学物質の生体内濃度との関連性について検討を加えた。154人の血清試料を分析したところ、93.5%の人から *trans*-ノナクロル（0.03～1.65 ppb）が、89.6%の人から HCB（0.02～2.20 ppb）が、また、44.2%の人からは *cis*-ノナクロル（0.03～0.44 ppb）検出された。さらに、ごく少数の人からはオキシクロルデン（2人、0.24、0.56 ppb）や *trans*-クロルデン（1人、0.04 ppb）も検出された。検出された5種の化学物質のうち *trans*-ノナクロル濃度は、年齢及び魚介類の摂取頻度と関連することが示唆された。また、HCB 濃度については年齢との関連性が示唆された。また、母体末梢血（9検体）、腹水（5検体）、及びさい帯（10検体）を用いて同様に CLDs 及び HCB への暴露量調査を実施した。その結果、*trans*-ノナクロル（0.03～0.39 ppb）は腹水1検体を除く23検体（95.8%）から、HCB（0.05～0.18 ppb）は腹水、さい帯血の全検体を含む20検体（83.3%）から検出された。また、*cis*-ノナクロル（0.03～0.09 ppb）も4検体（16.7%、うち母体末梢血3検体）から検出された。

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、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 に対する人体暴露量の予備的調査を実施し、その結果、血清中の CLDs 濃度と食事嗜好性との間に関連性があると示唆される結果を得た。そこで本年度の研究では、より多くの一般成人の血液に含まれる CLDs や HCB 濃度を測定すると共に、更に詳細な食事の嗜好性や住環境などの生活因子に関する調査を行なうことにより、これらの因子の血中 CLDs 及び HCB 濃度に及ぼす影響について検討を加えた。また、母体末梢血及び腹水、それに、さい帯血中におけるこれら化学物質の濃度についても測定を実施した。

## 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. 試料

#### 2-1. 一般成人血液を用いた分析

18 才から 64 才までの成人 154 名からインフォームドコンセントを得た後、血液試料の提供を受けた。血液採取時に、年齢、性別、摂取している米の産地、飲用している水、居住環境地域、住居のシロアリ駆除歴、それに米飯・魚介類・肉類・野菜・果実を摂取する頻度、喫煙、飲酒、病歴、子供の人数についてのアンケート調査を実施した。

#### 2-2. 母体末梢血、腹水及びさい帯血を用いた分析

昨年度、三菱安全化学研究所においてビスフェノール A 等の調査に用いられたこれらの試料 (東海大学医学部付属病院で採取されたもの) の保存品 24 検体を用いた。

### 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-Cl]<sup>+</sup> m/z 353 (ヘプタクロルエポキサイド)、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*-ノナクロール)

HCB :  $M^+$  *m/z* 284

1-クロロテトラデカン :  $C_4H_8Cl^+$   
*m/z* 91

### 3-2. 試験溶液調製法

#### 1) 人血清

スキーム 1 に示した。

#### 2) 母体末梢血、腹水及びさい帯血

試料を遠心分離後、上清について人血清と同様に操作し調製した。

### 4. 統計的解析

検出された試料の平均値で結果を平均値以下と平均値超の 2 階層に分け、これらの化学物質の血中濃度とアンケート調査の項目との関連について統計的解析 (カイ二乗検定) を実施した。なお、HCB については他の検体とは非常にかげ離れた高濃度を示す検体が複数存在し、平均値が中央値と大きく乖離していたことから、中央値を用いて 2 階層に分けた後の統計的解析 (カイ二乗検定) をも実施した。

## C. 結果と考察

### 1. 一般成人血液を用いた分析

#### 1-1. 分析結果

154 人の成人血清試料を分析した結果を年齢、性別とともに表-1 に示した。

多数の試料から検出されたものは *trans*-ノナクロール、HCB、それに *cis*-ノナクロールであった。このうち最も高頻度に検出されたものは *trans*-ノナクロールで、154 人のうち 144 人 (93.5%) と、ほとんどの人から検出された。検出された試料における濃度は 0.03 から 1.65 ppb で、その濃度の平均値は 0.20 ppb であった。次いで高頻度に検出されたものは HCB で、138 人 (89.6%) から検出された。検出された濃度は 0.02 から 2.20 ppb で、その平均値は 0.23 ppb であった。また、*cis*-

ノナクロールも 68 人 (44.2%) の人から検出され、その濃度は 0.03 から 0.44 ppb、平均値は 0.07 ppb であった。一方、*cis*-クロルデン及びヘプタクロルエポキサイドはいずれの人からも全く検出されなかった。オキシクロルデンは男性 2 人 (0.24、0.56 ppb) からのみ、*trans*-クロルデンは別の男性 1 人 (0.04 ppb) からのみ検出された。

(検出限界; ヘプタクロルエポキサイド、オキシクロルデン : 0.2 ppb、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロール、*cis*-ノナクロール : 0.03 ppb、HCB : 0.02 ppb)。

#### 1-2. 年齢の影響

年齢を 30 才未満、30 才代、40 才代、50 才以上の 4 階層に分けて、血清中に含まれていたこれら 5 種の化学物質のうち統計的解析に耐え得る件数が得られた *trans*-ノナクロール、HCB、それに *cis*-ノナクロールの濃度を比較したところ、*trans*-ノナクロール ( $p=0.000 < 0.01$ ) は各年齢階層間に有意差が認められ、年代の上昇とともに血中 *trans*-ノナクロール濃度も上昇していた (表-2)。また、血中 HCB 濃度については、平均値を用いた階層化では有意差は認められなかった。しかしながら、HCB 濃度が極端に高い検体が複数存在することでその平均値が中央値と大きく乖離していたので、統計的解析にあたり平均値ではなく中央値を用いて中央値以下と中央値超の二階層に分化し、年齢階層と血中濃度との関連を検討した。その結果、血中 HCB 濃度も各年齢階層間に有意差が認められ、年代の上昇とともにその濃度が有意

に上昇していた ( $p=0.000<0.01$ 、表-3)。これらの結果は、CLDs と HCB がともに蓄積性を有することから、暴露期間の長さが血中濃度上昇の一因として深く関与していることを示唆するものと考えられた。

血中の CLDs と HCB 濃度が年齢階層の影響を受けることが明らかとなったことから、他のアンケート調査項目で年齢階層の影響を受けている項目では、これらの項目と CLDs や HCB 濃度との関係が年齢階層の影響を強く受けると考えられる。そこで予めその他のアンケート調査項目（性別、摂取している米の産地、飲用している水、居住環境地域、住居のシロアリ駆除歴、米飯・魚介類・肉類・野菜・果実を摂取する頻度、喫煙、飲酒、病歴、子供の人数）と年齢階層間をカイ二乗検定により比較し、年齢の影響を受けるか否かを検討した。アンケート調査項目のうち摂食嗜好に関しては、一週間に食べる日数を 2 日以内、3～4 日、5 日以上の 3 階層に分けて解析した。その結果、性別 ( $p=0.049<0.05$ 、表-4) において各年齢階層間に有意な差が認められた。すなわち、男性は年代の高い層が多く、女性は年代の低い層が多かった。また、魚介類の摂取頻度、喫煙、そして子供の人数との関係については、一部が期待値 5 を満たさないためカイ二乗検定によっては、正確な結果を得ることができなかった。このうち子供の人数については、相関分析

により年齢階層間に正の相関が認められた ( $r=0.638$ 、 $p=0.000<0.01$ )。すなわち、子供の人数は年齢階層が上昇するとともにその数が増加していた。年齢階層との間に有意差及び相関関係が認められたこれらの項目については、血清中の CLDs 及び HCB 濃度との関係に年齢階層による影響が関与することから、以下の検討からは除外した。しかしながら、今後はさらに試料数を増やすことにより、このような項目も含めた詳細な検討が必要であると考えられる。また、今回の検討では、解析可能な例数の不足から年齢階層による影響が不明であった魚介類の摂食頻度と喫煙に関しては、各年齢階層ごとの検討も加えて実施した。

### 1-3. シロアリ駆除歴の影響

CLDs はシロアリ駆除剤として昭和 61 年まで使用されていたことによる残留、また、HCB は塩素系農薬を始めとした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。このことから、住環境におけるシロアリ駆除剤の使用歴及び使用年についてアンケートで調査し、血清中に検出されたこれらの化学物質の濃度との関係を検討した。その結果、ごく少数の人からのみ検出されたオキシクロルデン (2 人) や *trans*-クロルデン (1 人) が検出された人では、全員がシロアリ駆除を昭和 61 年以前に実施していたことが判明した。しかし、高頻度に検出された他の 3 種の化学物質に

ついてカイ二乗検定を用いて比較すると、シロアリ駆除剤の使用歴および使用年と血清中 CLDs 濃度との間には有意差は認められなかった。

#### 1-4. 食事嗜好の影響

魚介類、肉類、野菜・果物について、一週間に食べる日数を2日以内、3～4日、5日以上との3階層に分けて、血清中のCLDs及びHCB濃度との関連について検討した。その結果、*trans*-ノナクロル濃度 ( $p=0.003<0.01$ ) と魚介類の摂取頻度階層間に有意差が認められた。(表-5)。血中 *trans*-ノナクロルの濃度は、一週間当たりの魚介類の摂取日数が増加するのに伴い有意に高くなっていた。

次に、*trans*-ノナクロルの血中濃度と魚介類の摂取日数の関係について年齢階層の影響を完全に除くため、年齢階層ごとその関係を検討した。魚介類の摂取日数を一週間に4日以内と5日以上の2階層に分け、先の年齢4階層ごとに *trans*-ノナクロルの濃度を比較した。その結果、30才未満の年齢階層において、摂取日数5日以上の階層のヒトでは、血中 *trans*-ノナクロル濃度の高いヒトの割合が有意に多かった ( $p=0.022<0.05$ 、表-6)。これは、30才未満の年齢階層では化学物質の蓄積期間が短く他の因子の影響が少ないため、それ以上の年齢階層におけるよりも食事嗜好の影響が顕著に現れたと考えられる。

#### 1-5. 喫煙の影響

血清中の HCB 濃度は、喫煙者では非喫煙者に比べ有意 ( $p=0.003<0.01$ ) に低いとの結果が出た。しかしながら上に述べた様に喫煙が年齢の影響を受けているか否かの検定が確定できなかったことから、この結果が年齢による影響を受けていることも考えられた。そこで、年齢階層ごとに喫煙と HCB 濃度との関係について解析を加えた。その結果、何れの階層においても有意差は認められなかった。したがって、全体としての喫煙者と非喫煙者間における血中 HCB 濃度の有意差は、年齢による影響が強く関与した結果であることが示唆された。

#### 1-6. その他

摂取している米の産地や飲用している水、居住環境地域や飲酒、それに病歴についても調査を実施したが、血清中の CLDs 及び HCB 濃度との間にいずれも有意差は認められなかった。

#### 2. 母体末梢血、腹水、及びさい帯血を用いた分析

母体末梢血 (血清) 9 試料、腹水 5 試料、さい帯血 (血清) 10 試料を分析した結果を表-7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 *trans*-ノナクロルで、腹水からの 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 95.8% (23/24) であった。その濃度は母体末梢血中で 0.04 から 0.39 ppb (平均値 0.17 ppb)、腹水中では 0.03 から 0.07 ppb (検出 4 試料の平均値 0.04 ppb)、さい帯血中で

は0.04から0.18 ppb (平均値0.09 ppb)の範囲であった。次いで高頻度に検出されたものは HCB で、全体としては83.3% (20/24) の検出率で、母体末梢血では9試料のうち5試料から検出されただけであったが、腹水及びさい帯血試料からは全検体から検出された。母体末梢血試料から検出された濃度は0.06から0.18 ppb (検出された5試料の平均値0.13 ppb)、腹水中濃度は0.08から0.15 ppb (平均値0.09 ppb)、また、さい帯血中濃度は0.07から0.18 ppb (平均値0.10 ppb)であった。次いで *cis*-ノナクロルが4試料(4/24)から検出された(検出率16.7%)。母体末梢血9試料のうち3試料から検出され、その濃度は0.05から0.09 ppb (検出された3試料の平均値0.07 ppb)の範囲であり、腹水5試料のうち1試料から検出(0.02 ppb)されたが、さい帯血試料10検体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。

今回CLDs及びHCBの測定に用いた母体末梢血、腹水及びさい帯血は、すべて異なる人から採取されたものであったため、特定の人における異なる試料に含まれるこれらの化学物質の濃度関係を解析することは不可能であった。また、試料の数も非常に少なかったことから、試料間の濃度関係を比較、解析することも残念ながら実施することが出来なかった。しかしなが

ら、今回の調査により母体末梢血、腹水、さい帯血のすべてから、何らかのCLDsまたはHCBが検出されることが確認された意義は大きいと考えられる。したがって今後は、母体の末梢血及び腹水と、さい帯血中のCLDs及びHCB濃度との関係を明確にするために、同一人物に由来する異なる組織からの試料を含めて、より多くの検体について同様な測定を実施する等の継続的な研究が必要であると考えられた。

#### D. 結論

1. 一般成人154人からの血清試料を分析したところ、144人(93.5%)から *trans*-ノナクロル(0.03~1.65 ppb)が、138人(89.6%)から HCB(0.02~2.20 ppb)が、68人(44.2%)から *cis*-ノナクロル(0.03~0.44 ppb)が検出された。また、2人からはオキシクロルデン(0.24、0.56 ppb)、別の1人からは *trans*-クロルデン(0.04 ppb)も検出された。
2. *trans*-ノナクロル濃度を30才未満、30才代、40才代、50才以上の4つの年齢階層に分けて比較したところ、各年齢階層間に有意差が認められ、年齢階層の上昇とともに血中 *trans*-ノナクロル濃度も上昇していた( $p=0.000<0.01$ )。また、30才未満の年齢階層においては、魚介類の摂取頻度の高い(週5日以上)階層のヒトでは低い(週5日未満)階層のヒトに比べ、血中 *trans*-ノナクロル濃度の高いヒトの割合が有意に高かった( $p=0.022<0.05$ )。
3. 検出された HCB について、年齢を同様に4階層に分けて比較したところ、血中 HCB 濃度と各年齢階層間に有意差が認められ、年代の上昇とともに血中濃度も上昇していた( $p=0.000$ )。

<0.01)。

4. 母体末梢血、腹水、さい帯血からも CLDs、HCB が検出され、*trans*-ノナクロル (0.03~0.39 ppb) は腹水一試料を除く全検体 (95.8%、23/24) から、HCB (0.05~0.18 ppb) は 83.3% (20/24) からと高頻度に検出され、また、*cis*-ノナクロル (0.03~0.09 ppb) も主として母体末梢血 (3/9) を含む 4 試料から (16.7%) から検出された。

#### 謝辞

本研究にあたり、統計的解析法についてご指導頂いた愛知県衛生研究所企画情報部の加藤恵一主任研究員に深謝致します。