

環境ホルモンについて ヒト体内の環境ホルモンの存在量と評価

香山不二雄¹⁾⁵⁾, 堀口 兵剛¹⁾⁵⁾, 小熊 悦子¹⁾⁵⁾, 大塚 広子¹⁾
池田 陽子¹⁾, 宮本佳代子¹⁾, 荒尾 行知¹⁾⁵⁾, 野本 聡¹⁾⁵⁾
佐々木 敏²⁾, 古賀 実³⁾⁵⁾, 藪下 尚智⁴⁾, 中村 昌文⁴⁾

¹⁾ 自治医科大学, ²⁾ 国立健康栄養研究所, ³⁾ 熊本県立大学, ⁴⁾ 株式会社日吉, ⁵⁾ CREST-JST

(平成15年1月31日受付)

要約: 環境ホルモンには, 人工の化学物質と植物由来のイソフラボンなどの植物エストロゲンがある。今回, 全国5カ所の農家女性の大規模疫学調査を行い, 血中のダイオキシン類, 残留有機塩素系農薬を測定した。さらに血中のイソフラボン濃度も測定した。血清中残留有機塩素系農薬は使用禁止後30年後にも拘わらずppbレベルで存在し, 南の地域の方が高い傾向があった。血中ダイオキシン濃度は, 地域差があり北の地域Aにて高い集団があった。また, すなわち, 有機塩素系農薬の不純物としてダイオキシン類の職業曝露を受けていたと考えられる集団の農家女性でも, 特に有機塩素系農薬の残留量とダイオキシン類濃度と相関は見られず, 過去の純度の低い農薬散布によるダイオキシン汚染は今回の調査から否定できた。また, イソフラボン類の摂取量に地域格差はほとんど無かった。また, ダイゼインの腸内細菌叢による代謝産物であるイクオールは, 摂取量に関係なく高い集団と低い集団があった。血中イソフラボン濃度は $\mu\text{g/ml}$ レベル, すなわちppmレベルで存在し, 残留有機塩素系農薬の千倍以上の濃度で存在していることが明らかとなった。有機塩素系農薬の影響に対して, 千倍以上の濃度のあるイソフラボン類が影響を修飾する可能性は高い。明らかに有機塩素系農薬の方が残留性は高く, イソフラボン類は急速に体外に排出されるが, 常にイソフラボン類を摂取している東洋人にとって, 環境ホルモンの影響を評価する場合, 常に総合的に評価しなければならないと考えられる。現在, 測定結果の解析の途上であるが, 今後, 多種類の環境ホルモンが体内でどのような相互作用をする可能性があるのか検討を加えていく予定である。

(日職災医誌, 51: 166—171, 2003)

—キーワード—

植物エストロゲン, ダイオキシン, 有機塩素系農薬

はじめに

環境ホルモンには, 化学構造や作用が生体内の性ホルモンや甲状腺ホルモンに類似しているために, 内分泌系の発達や正常な機能に攪乱を起し, 内分泌系, 神経系, 免疫系など他の生理機能にも影響をあたえる可能性のある化学物質である。環境ホルモンの中には, 人工の化学物質である農薬や化学工業で, 特にプラスチックなど多く使用されているフタル酸エステル類やビスフェノールA, 界面活性剤として広く使用されているアルキルフェ

ノール類などがある。また, 有機錫化合物は貝類の生殖器異常を惹起することが報告されている。これは性分化に重要なホルモンの代謝に影響していると考えられている。このように性ホルモンとの構造類似性のために, 発生影響をもたらしているだけでなく, 種々の作用機序が存在することが近年の研究で明らかとなってきた。一方, 我々が日常的に摂取している食品の中には植物や微生物由来の化学物質で内分泌系に影響を与える化学物質がある。その代表的な化学物質に, ライ麦など穀類に多いリグナン類や大豆に多いイソフラボン類などがある。この体内存在量は他の環境汚染物質の環境ホルモンに比べ, 100倍から1,000倍高く, 人工の環境ホルモンと共に, 植物由来の環境ホルモンの影響評価は非常に重要であ

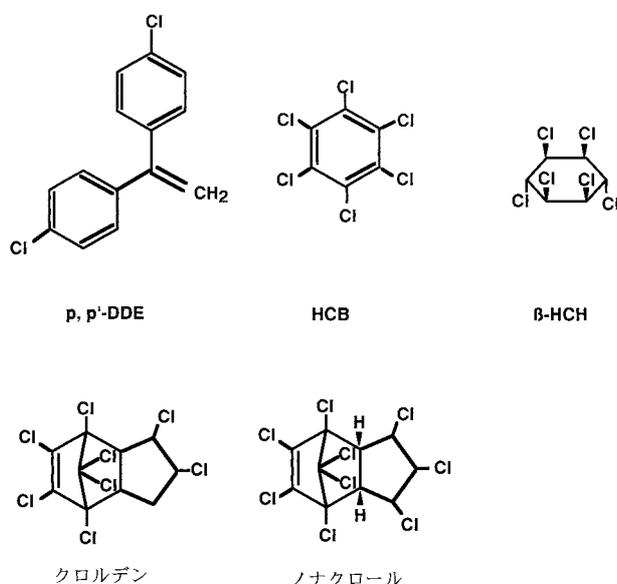


図 1

る。ここでは、疫学調査で得られたダイオキシン類および有機塩素系の農薬の体内残留量と、イソフラボン濃度に関して論じる。

ヒト体内の残留有機塩素系農薬

今回、農家女性の体内有機塩素系残留量に関して測定を行った。調査した農薬は、約30年前に使用禁止となった残留性の高い有機塩素系農薬である。

DDTはかつて非常に広範に大量に使用された。しかし分解されにくく、残留性の高さから30年前に使用が禁止された。商品名は、DDTで、用途としては稲のニカメイチュウ、ウンカ、ゾウム等に殺虫剤として使用された。1971年以降は農薬として使用されていない。DDTは体内で代謝され大部分がDDEとなって存在している。また、トランス・ノナクロールは、シロアリ駆除剤として使用されたクロルデンなどに含まれる殺虫剤である。1986年に使用が禁止された。ヘキサクロールベンゼンは、農薬の不純物として含まれている。種々の工業製品中にも不純物として含まれ、焼却でも発生する。化学物質として1979年に製造、使用が禁止されている。

ガンマーBHCは、商品名 ガンマー、ヘキサチン、リンデン、BHCなどとして流通していた。用途としては、稲のウンカ、ハモグリバエ、カメムシ等に殺虫剤として使用されていたが、1971年に農薬として使用が禁止された。ベータBHC、アルファBHC、HCBなどの不純物を含んだ純度の低い農薬ガンマーBHCが、かつて日本で多量に使用された。これらの農薬の構造式を図1に示す。

以上、調査した有機塩素系農薬は約30年前に禁止されたものであるが、残留性が高いため今でも人体や食品

中、環境中に見出される。しかし、年月が経つにつれ徐々に濃度は減少してきている。

疫学調査の対象集団は、東北地方から九州地方の5カ所で北からA地域565名、B地域203名、C地域203名、D地域205名、E地域200名、全体で1,406名の農家女性である。年齢は30～79歳である。血清中農薬は、ヘキササン抽出、Sefpack（フロリジル）により精製し、GC-ECDを用いて測定した。hexachlorbenzene (HCB、定量下限；0.1ng/ml)、β-hexachlorhexane (HCH；0.3 ng/ml)、γ-HCH（；0.5ng/ml）、trans-nonaclor (0.2 ng/ml)、p, p'-DDE (0.25ng/ml) を定量を行った。確認のためにGC/MS-SIMにて同定した。

表1に、それぞれの地域の血清中農薬濃度を示す。それぞれに地域の被験者血清の幾何平均値 (GM) を比較すると、地域Aが一番低く、地域B、地域Dが次ぎに高く、地域Eが最も高い。(因みに地域Cの血清は測定中) β-HCHでは、地域Aと地域Eが最も高い傾向にあったが、それ以外は同じ傾向を示していた。すなわち、北の地域がヒト血中残留農薬は低く、南に行くほど高くなる傾向が見られた。

また、HCBとγ-HCH、HCBとβ-HCH、γ-HCHとβ-HCHとは強い相関を示した(図2)。それぞれは、農薬の不純物として共存しており、そのために体内に残存している量でも強い相関を示している。このことは、それらの異性体や不純物の体内動態もあまり差がないことを示唆している。

ダイオキシン類

ダイオキシン類特別措置法施行の結果、一般集団のダイオキシン曝露に関しては、環境省や厚生労働省の矢張り早の対策がなされた。焼却炉のダイオキシン発生量の低減のために、廃棄物の収集法や処理法も現在大きく変化している。また、食品から摂取するダイオキシンの耐用一日摂取量 Tolerable Daily Intake (TDI) も4 pgTEQ/kg bw/dayと定められた。しかし、2001年のThe 57th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additivesで、ダイオキシン類の暫定耐用一月摂取量 Provisional Tolerable Monthly Intake (PTMI) を70 pgTEQ/kg bwと提案された。これを一日に換算すると2.3pgTEQ/kg bw/dayとなり、現在の約半分ということになる。

一方、産業保健分野においても、清掃工場、産業廃棄物工場、溶接作業や鋳工業作業でダイオキシン曝露の高いと考えられる職業集団が存在する。このような高濃度曝露集団の産業現場での作業管理、作業環境管理、健康管理の重要性は誰もが危惧している状況であるが、測定費用が高価であるため、非常に情報量が少ないという現状がある。

ダイオキシン類は、正確には、ポリ塩化ベンゾーパラ

表1 全国5地域の農家女性の血清中残留有機塩素系農薬

	Districts	A	B	D	E	
P, P'-DDE	GM	1.2	1.72	2.09	2.12	ppb
	Median	2.28	2.24	2.37	2.18	
	Max	24.1	15	25.07	24.5	
	Min	0.125	0.125	0.125	0.125	
HCB	GM	0.41	0.88	0.8	1.02	
	Median	0.63	0.94	0.87	0.98	
	Max	8.11	1.89	6.51	9.95	
	Min	0.05	0.05	0.05	0.05	
β -HCH	GM	0.86	0.22	0.29	1.18	
	Median	1.5	0.15	0.15	1.86	
	Max	15.67	9.22	4.56	12.47	
	Min	0.15	0.15	0.15	0.15	

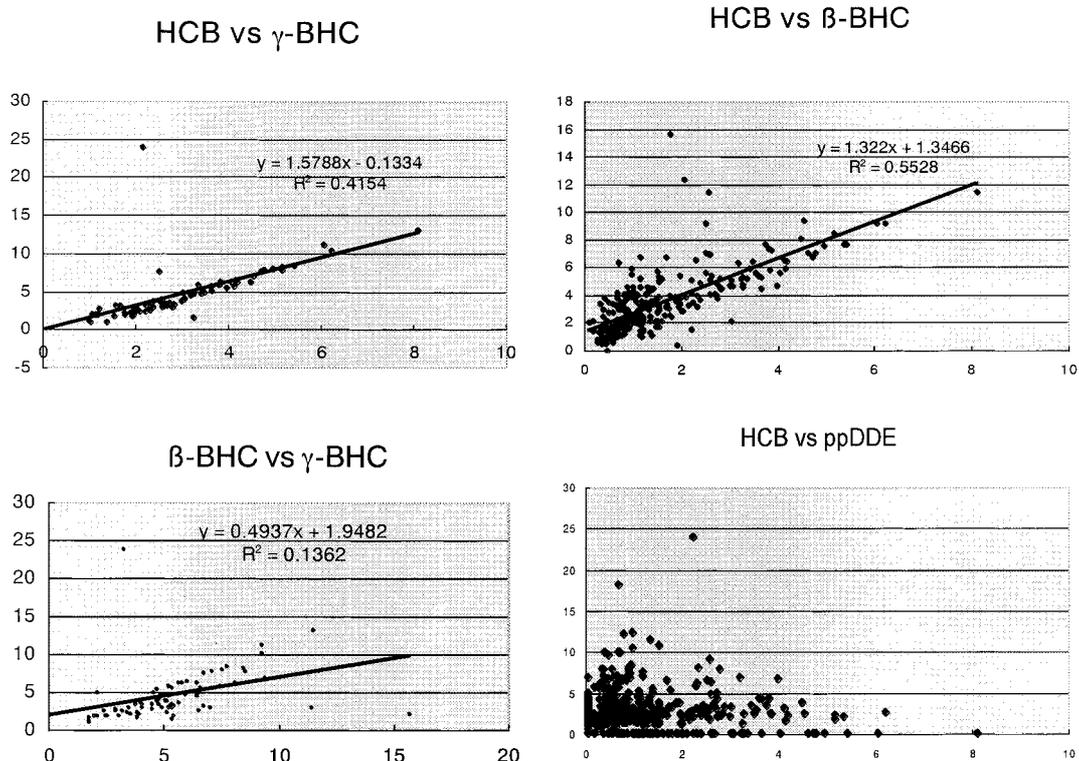


図 2

ージオキシン (PCDD) とポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) とコープラナーPCBとして分類されている (図3)。PCDDには、8個の塩素分子が付くことができ、理論上、異性体が75種類考えられ、PCDFには135種類の異性体があることになるが、環境問題として最も重要なものは、2, 3, 7, 8-TCDDであり、これが最も毒性が強いことが知られている。現在、ダイオキシン類測定の公定法は、High Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry (HRGC/MS) を用いる方法と定めている。1997年International Program on Chemical Safety (IPCS) で定められたToxic Equivalent Factor (TEF) が定められているPCDD 7種類、PCDF 10種類、co-

PCB 12種類の異性体をそれぞれHRGC/MSを用いて定量して、それぞれのTEFを乗じ、毒性当量Toxic Equivalents (TEQ)を算出する。検出されなかった異性体をゼロとして測定値と、検出限界以下の異性体の存在量を過小評価しないように、検出下限の1/2は存在するとして、測定値に加算した値も併記して、総合的に評価している。

血中ダイオキシン類の測定では、最低50ml、一般的には100mlの採血が必要であり、費用は20万円以上である。このようなダイオキシン類測定の現状は、現実的な作業管理、作業環境管理および健康管理の実現を阻んでいる。

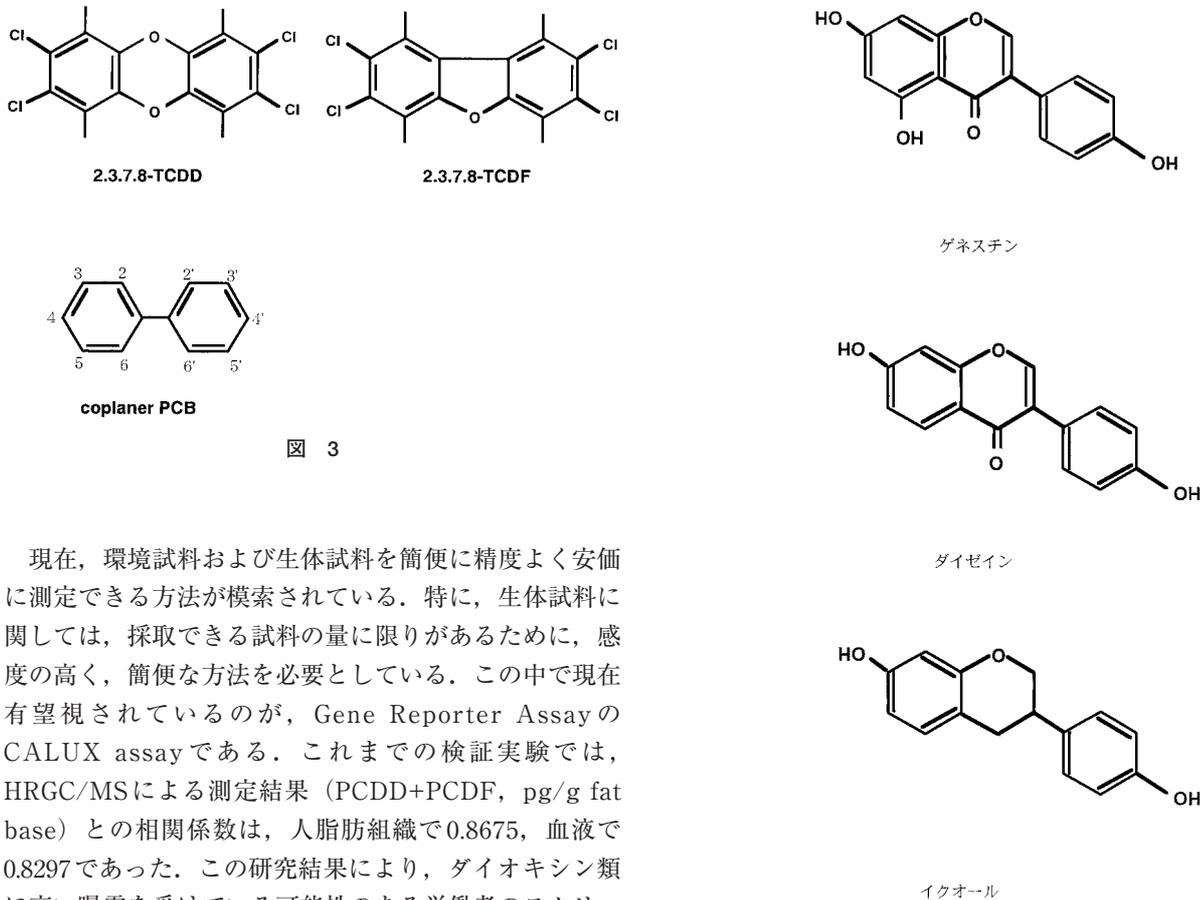


図 3

現在、環境試料および生体試料を簡便に精度よく安価に測定できる方法が模索されている。特に、生体試料に関しては、採取できる試料の量に限りがあるために、感度の高く、簡便な方法を必要としている。この中で現在有望視されているのが、Gene Reporter AssayのCALUX assayである。これまでの検証実験では、HRGC/MSによる測定結果(PCDD+PCDF, pg/g fat base)との相関係数は、人脂肪組織で0.8675、血液で0.8297であった。この研究結果により、ダイオキシン類に高い曝露を受けている可能性のある労働者のスクリーニング法として応用が可能であると考えられた。

今回の疫学調査では、1,160検体の全血試料中ダイオキシン濃度をCALUX cell assayを用いて測定し、一部HRGC/MSにても測定してCALUX cell assayとの両方の定量法の相関を確かめた。今回のCALUX assayによるダイオキシン濃度の定量下限20pgTEQ/g fatでスクリーニングを行ったところ、地域A, B, C, D, Eの被験者の70%, 25%, 26%, 24%, 20%が20pgTEQ/g fat下限以上であった。地域Aが他の地域より高く、曝露源がある可能性が考えられた。

A地域について、年齢、有機塩素系農薬とダイオキシン類の濃度および授乳期間、出産回数などとピアソンの相関係数を求めると、年齢のみが両汚染物質と関係があり、出産回数、授乳期間とは相関は見られなかった。また、血中ダイオキシン濃度とピアソンの相関係数は年齢と魚介類の摂取量と相関が見られたが、重回帰分析を行うと年齢のみが相関が残り、魚介類摂取とは相関が無くなった。10歳ごとの年齢階層で分けてSpearmanの順位相関の解析をおこなっても魚介類との相関は無くなった。年齢と正の相関があるのは血中ダイオキシン濃度と血清中p, p'-DDEのみであった。

血中イソフラボン

被験者の自記式食事栄養調査を行った結果、豆類、大豆類の摂取に地域間に大きな差は見られなかった。大豆

イソフラボン類は、大部分が配当体(グルコシド)として存在しており、ヒトが摂取すると腸管上皮や肝臓のグルコシダーゼの働きで、分解されアグリコンとして遊離の形になる。その分子構造式を図4に示す。しかし、肝臓でグルクロン酸抱合を受け、イソフラボンの95%以上は血中でグルクロン酸抱合体して存在している。さらにイソフラボンは腸内細菌により分解され中間代謝産物としてイクオールとなる。血中濃度の測定は、グルクロニダーゼで抱合体を分解後に、ダイゼイン、ゲネスタイン、イクオールについてアグリコン総量として、HPLC-CouloArrayを用いて定量を行った。構造的にも、女性ホルモンと似ており、更年期不定愁訴の改善効果や骨粗鬆症の予防、乳癌の予防などの効果が考えられている。

血清中ゲネスタイン、ダイゼイン、イクオールは、半定量式の栄養調査大豆摂取量とほとんど相関は見られなかった。イクオール濃度は高い人と非常に低い人が存在し、腸内細菌叢の違いによるものと考えられた。骨密度は年齢と共に減少して行くが、特に地域Bおよび地域Eの閉経後前期で他地域と比べて骨密度が低い傾向が見られた。骨塩量、骨密度、若年者比較骨密度%は大豆蛋白摂取量、ゲネスタイン摂取量、ダイゼイン摂取量と相関は、年齢調整をすると相関が見られなかった。

図 4

まとめ

血中イソフラボン濃度は $\mu\text{g/ml}$ レベル, すなわちppbレベルで存在し, 残留有機塩素系農薬の千倍の濃度で存在していることが明らかとなった. 有機塩素系農薬の影響に対して, 千倍以上の濃度のあるイソフラボン類が影響を修飾する可能性は高い. 明らかに有機塩素系農薬の方が残留性は高く, イソフラボン類は急速に体外に排出されるが, 常にイソフラボン類を摂取している東洋人にとって, 環境ホルモンの影響を評価する場合, 常に総合的に評価しなければならないと考えられる. 現在, 測定結果の解析の途上であるが, 今後, 多種類の環境ホルモンが体内でどのような相互作用をする可能性があるのか検討を加えていく予定である.

謝辞: 第50回日本職業・災害医学会学術大会に講演の機会を賜りました, 重松大会長並びに大会事務局に謝意を表します. また, この研究は, 厚生科学研究費特別研究, 文部科学省科学技術振興調整費, 科学技術振興事業団戦略基礎研究の研究費によって, 実施が可能になりましたことを報告いたします.

文献

- 1) Kayama F, Hamamatsu A, Sagisaka K, et al : The 3rd Annual Meeting of Japan Society of Endocrine Disruptors Research, 2000.
- 2) Kayama F, Hamamatsu A, Sagisaka K, et al : Organohalogen Compounds 54 : 48—50, 2001.
- 3) Kayama F, Hamamatsu A, Sagisaka K, et al : Vietnam-United States Scientific Conference on Human Health and Environmental Effects of Agent Orange/Dioxin p-114, March 2002, Hanoi Vietnam.
- 4) Kayama F, Horiguchi H, Oguma E, et al : Organohalogen Compound 55 : 275—278, 2002.

(原稿受付 平成15. 1. 31)

別刷請求先 〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺
3311-1
自治医科大学保健科学講座環境免疫学毒性学部門

香山不二雄

Reprint request:

Fujio Kayama
Jichi Medical School

REGIONAL DIFFERENCES OF BLOOD ENDOCRINE DISRUPTOR CONCENTRATIONS AND ITS EVALUATION

Fujio KAYAMA¹⁾, Hyogo HORIGUCHI¹⁾, Etsuko OGUMA¹⁾, Hiroko OTSUKA¹⁾,
Yoko IKEDA¹⁾, Kayoko MIYAMOTO¹⁾, Yukitomo ARAO¹⁾, Satoshi NOMOTO¹⁾,
Satoshi SASAKI²⁾, Minoru KOGA³⁾, Hisatoshi YABUSHITA⁴⁾ and Masafumi NAKAMURA⁴⁾

¹⁾Jichi Medical School and CREST/JST, ²⁾National Institute of Health, and Nutrition

³⁾Kumamoto Prefectural University, ⁴⁾Hiyoshi Corporation, Omihachiman, Shiga 523-8555 JAPAN

Farmers who used pesticides and herbicides frequently may have higher dioxin body burden as well as ample intake of phytoestrogens or soy isoflavons in their traditional diet. To elucidate body burden of dioxins, organochlorine pesticides, and isoflavon intake, and relationships between health status of female farmers and environmental contaminants including dioxins, we designed epidemiological studies in 5 distant districts in Japan. In this paper, we demonstrate that CALUX assay for dioxin is applicable in epidemiology and a useful dioxins screening method for identifying higher exposure groups. In addition, the current analysis of dioxin contamination among female farmers in Japan revealed a distinct difference of distribution of blood dioxin concentration in the studied districts in Japan.

Female farmers in five districts scattered in the Japan Archipelago were asked through regional agricultural organizations to cooperate in a nation-wide health survey studying relationships among health, nutrition and contaminants. Health examinations included serum chemistry and urinalysis, bone metabolic markers, and wrist bone density measured by Dual Energy X-ray Absorption (DEXA) scanner as well as life, medical and diet history questionnaires double-checked by nurses and nutritionists at interview.

We previously reported a validation study of the CALUX assay in biological samples. We collected 70 ml blood samples from volunteers in the medical school. Ten-ml and 50-ml whole blood samples were used for CALUX assay and HRGC-MS measurement, respectively. Results for test samples measure by CALUX bioassay for dioxins at Hiyoshi Corporation were compared in a double blind study to HRGC/MS results in blood measured at Shimazu Techno-Research (Kyoto, Japan). when we started to apply CALUX assay for human biological samples, correlation coefficient (R-values) for PCDD + PCDF + coPCB per gram fat was 0.4758. As the test blood samples were taken from young volunteers with lower dioxin body burden, most of the samples had low dioxin concentrations. In addition, as CALUX assay is slightly less sensitive to coPCB, we excluded coPCB fractions for measurement. The R-values on PCDD+PCDF per gram wet weight and per gram fat were 0.7445 and 0.6417, respectively. When we limit applications of CALUX assay for blood specimens to evaluate PCDD + PCDF fraction and set detection limit of 20 pg/g fat, the R-values of PCDD + PCDF per gram wet weight and per gram fat is 0.9161 and 0.8297 respectively. This showed that CALUX assay is practically sensitive enough for screening moderately high exposure groups for dioxins.

In the current study we measured blood dioxin (PCDD + PCDF) concentrations in 1,160 female farmers out of 1,407 volunteers in five districts. The average (\pm SD) of examinees' age was 55.5 ± 10.3 . The average (\pm SD) blood dioxin concentration was 32.3 ± 12.1 pg TEQ/g fat. When results for these five districts were compared, the average dioxin concentration in District A was distinctively high. Seventy percent of samples were higher than the detection limit (20 pg TEQ/g fat) in District A, while in the other districts approximately 25% were higher. This indicates that there may be some dioxin contamination in district A.

Organochlorine pesticides, such as hexachlorbenzen, β -, and γ -hexachlorohexane, p, p'-dichlorodiphenyldichlorethylene (p, p'-DDE), were found in almost all the serum samples at ppb levels, even though thirty years has passed since the cessation of their agricultural application. Their concentrations were higher in southern district when compared to northern Japan, while the level of the serum dioxin concentrations were higher in district A, located in the north of Japan. The data revealed that dioxin contaminations among the female farmers were not correlated to dioxin contamination of organochlorine pesticide due to impurity of the chemicals. Isoflavons intake calculated from dietary history questionnaire showed no regional differences. In conclusion, blood dioxins and serum persistent organochlorine pesticides were widely distributed in the female farmers in 5 districts in Japan, and there were regional differences of the contamination. Further study is required to elucidate the origin of these differences.