

表3. 血液透析器充填水中のビスフェノールA濃度

血液透析器名	充填水量	ビスフェノールA濃度 ^{A)}
A社製血液透析器I	138 ml	1.61 ng/個 (11.7 ppt)
A社製血液透析器II	152 ml	定量不可 ^{B)}
B社製血液透析器	175 ml	5.44 ng/個 (31.1 ppt)
C社製血液透析器	87 ml	検出限界以下 ^{C)}

A) 血液透析器一個あたりの含量 (充填水中濃度)。B) ポリカーボネートオリゴマー混入のためと思われる。C) 100～200倍程度濃縮しているため、実際の検出限界は1～2ppt程度。

表4. 水循環による血液透析器からのビスフェノールAの溶出

血液透析器名	ビスフェノールA濃度 ^{A)}
A社製血液透析器I	34.3 ng/個 (137.2 ppt)
A社製血液透析器II	141.8 ng/個 (567.1 ppt)
B社製血液透析器	31.0 ng/個 (124.0 ppt)
C社製血液透析器	3.78 ng/個 (15.2 ppt)

A) 血液透析器一個あたりの溶出量 (循環水 250 ml 中濃度)

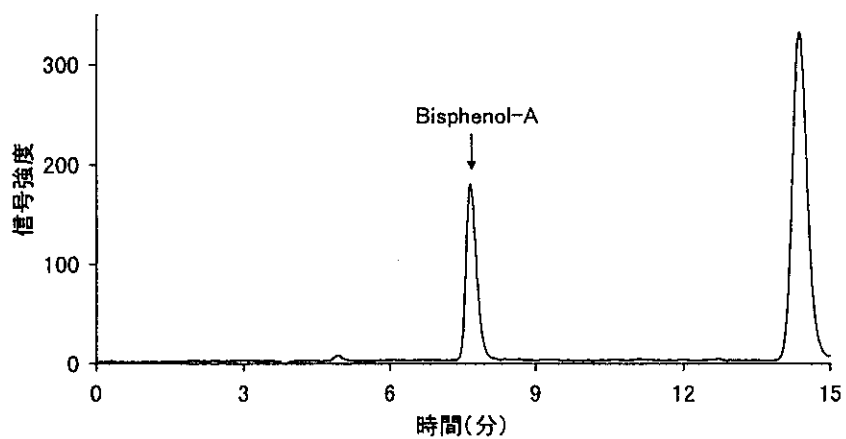
表5. 血清循環による血液透析器からのビスフェノールAの溶出

血液透析器名	ビスフェノールA濃度 ^{A)}
A社製血液透析器I	196.1 ng/個 (784.2 ppt)
A社製血液透析器II	2.09 µg/個 (8.35 ppb)
B社製血液透析器	1.01 µg/個 (4.04 ppb)
C社製血液透析器	140.7 ng/個 (562.7 ppt)

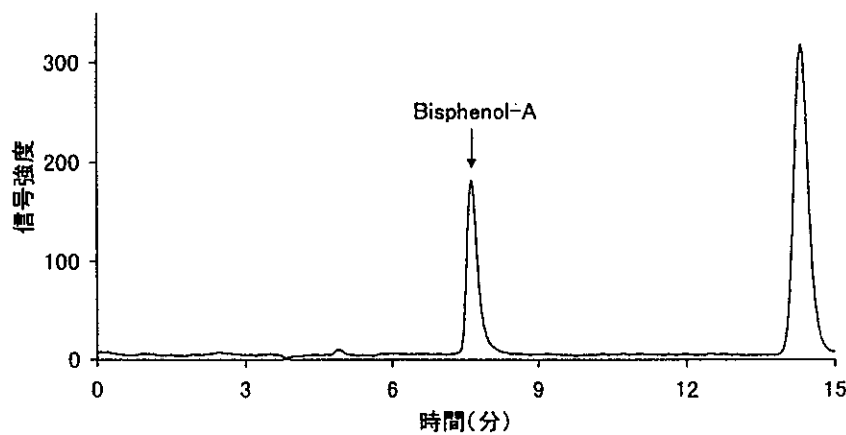
A) 血液透析器一個あたりの溶出量 (循環血清 250 ml 中濃度)

図1. 原材料ペレットのビスフェノールA分析

A) A社製PCペレット



B) B社製PCペレット



C) C社製PSペレット

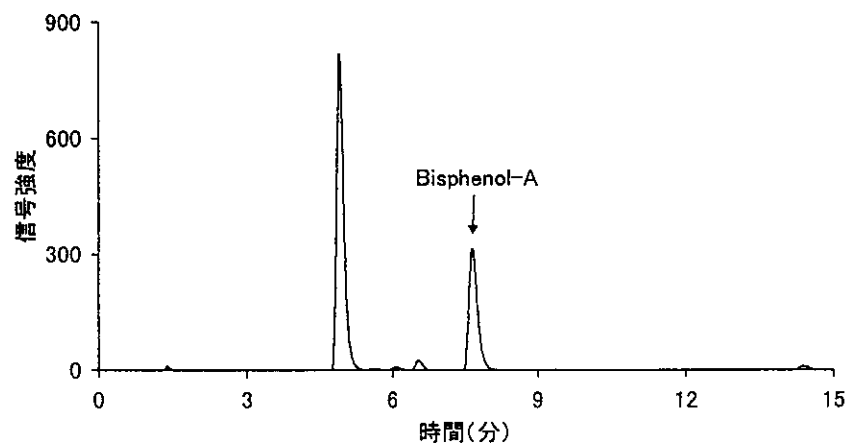
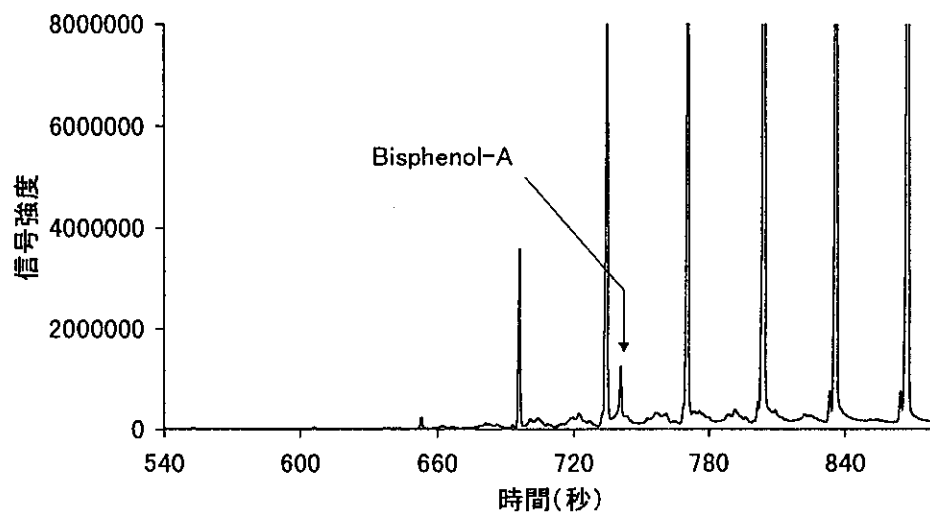


図2. PC 製ハウジングからのビスフェノールA溶出

A) A 社製 PC ハウジング



B) B 社製 PC ハウジング

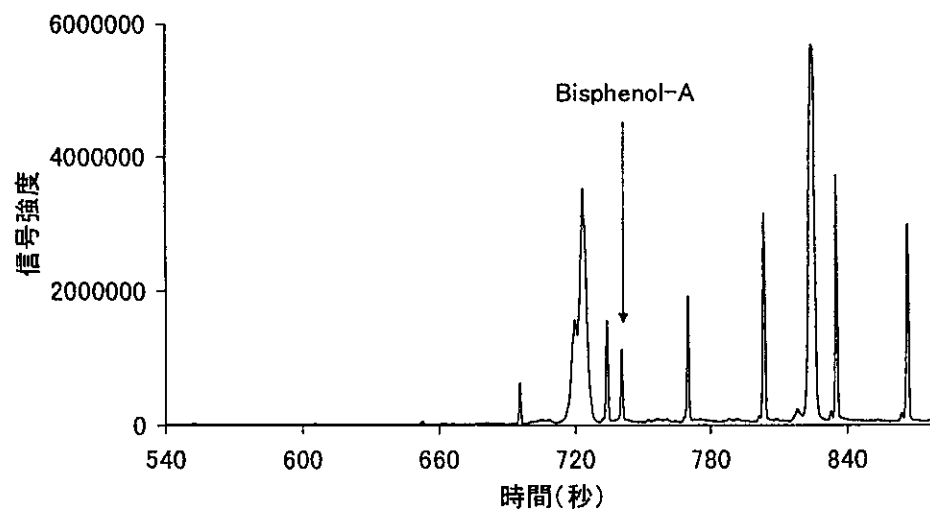


図3. 水循環による血液透析からのビスフェノールA溶出

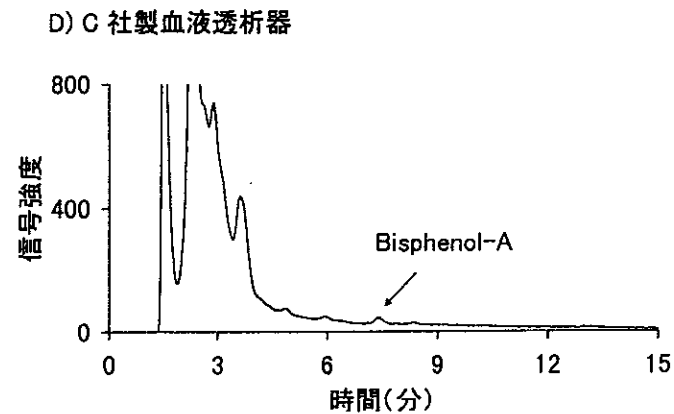
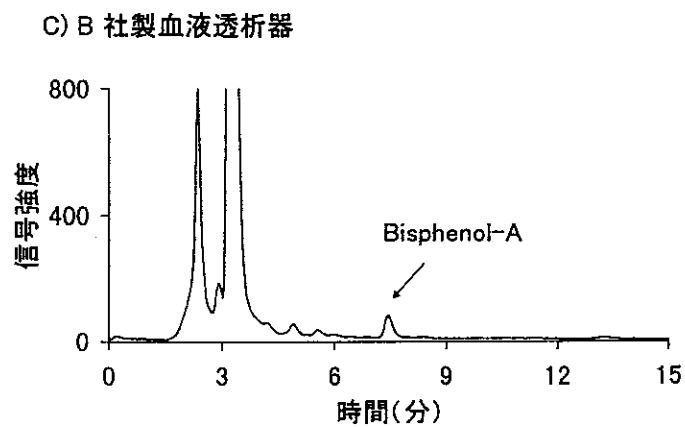
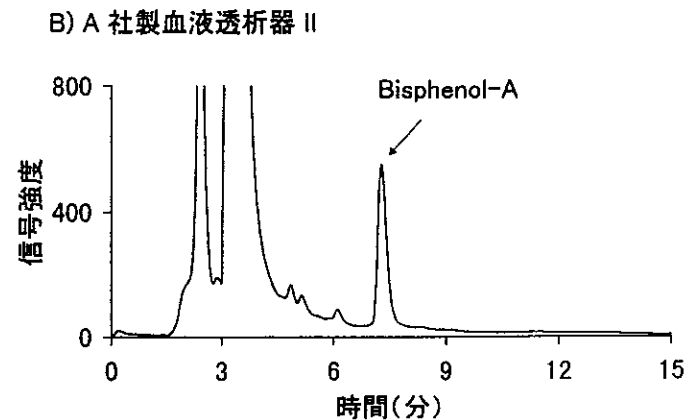
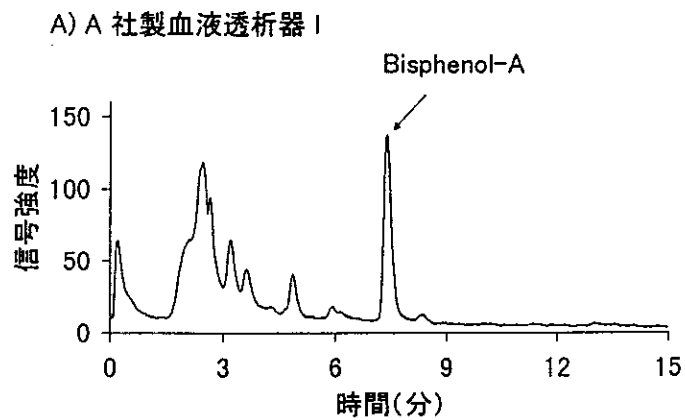


図4. 牛血清からのビスフェノールAの回収

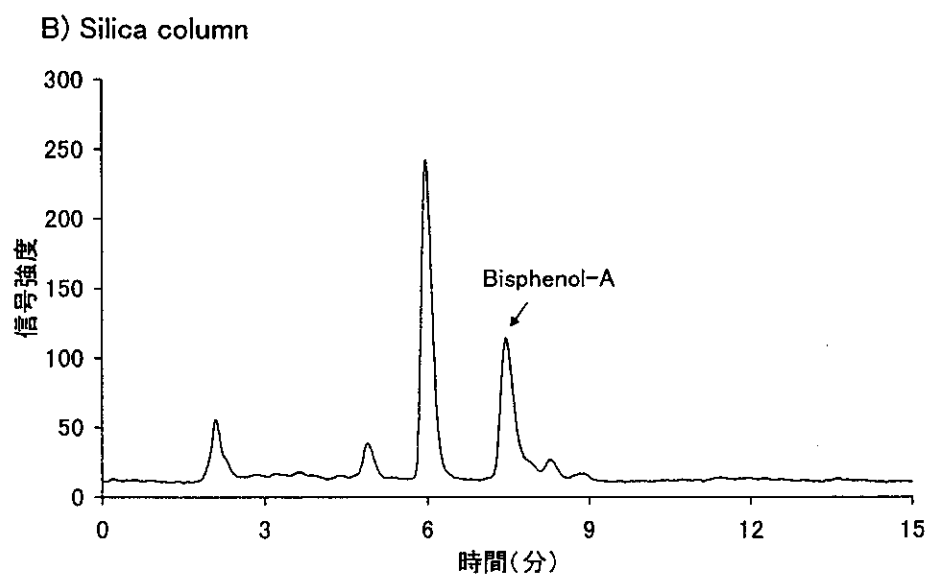
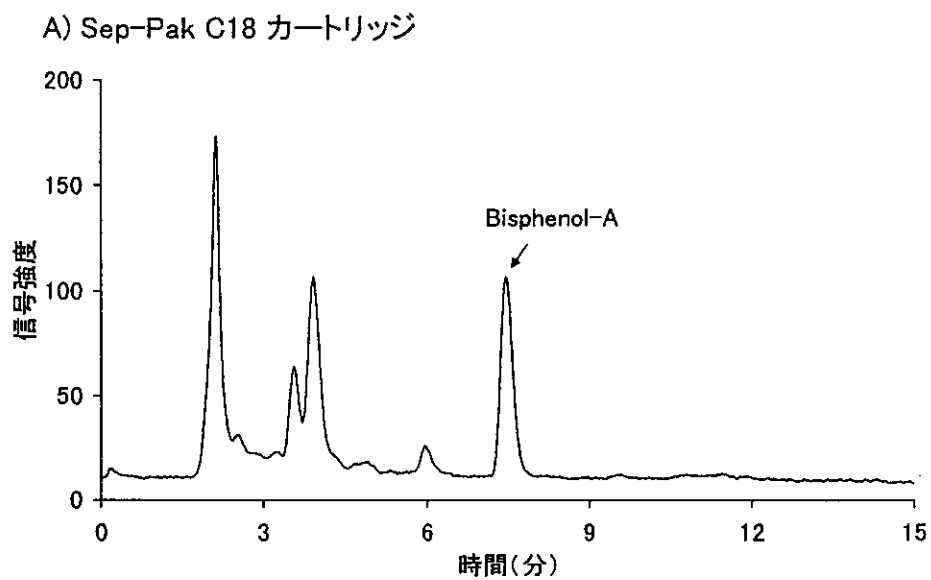


図5. 血清循環による血液透析からのビスフェノールA溶出

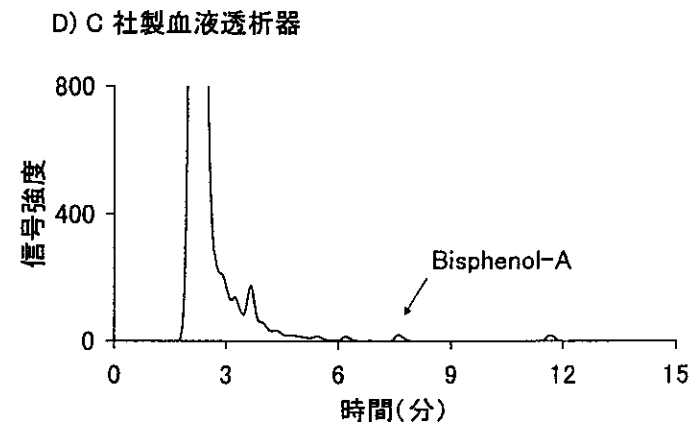
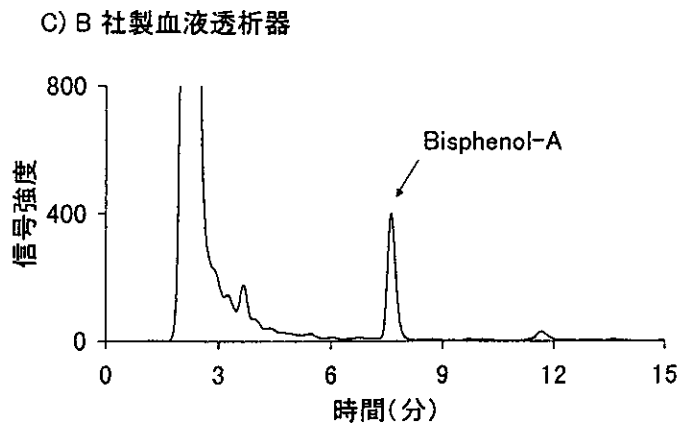
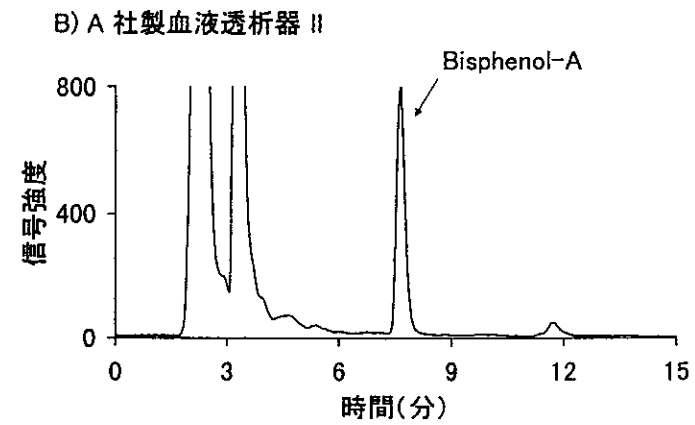
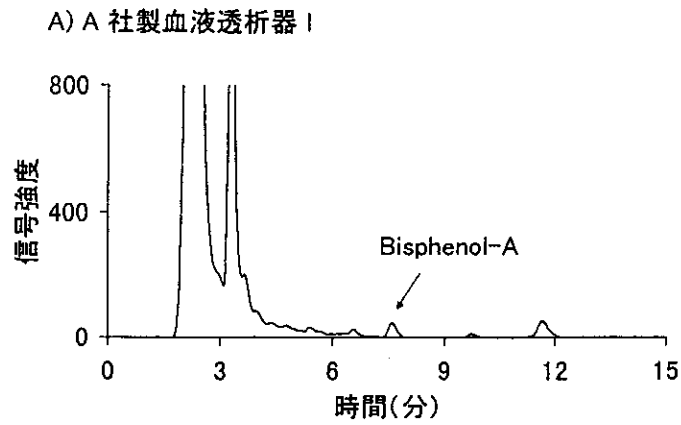


図6. TMS 誘導体化ビスフェノールAの GC-MS スペクトル

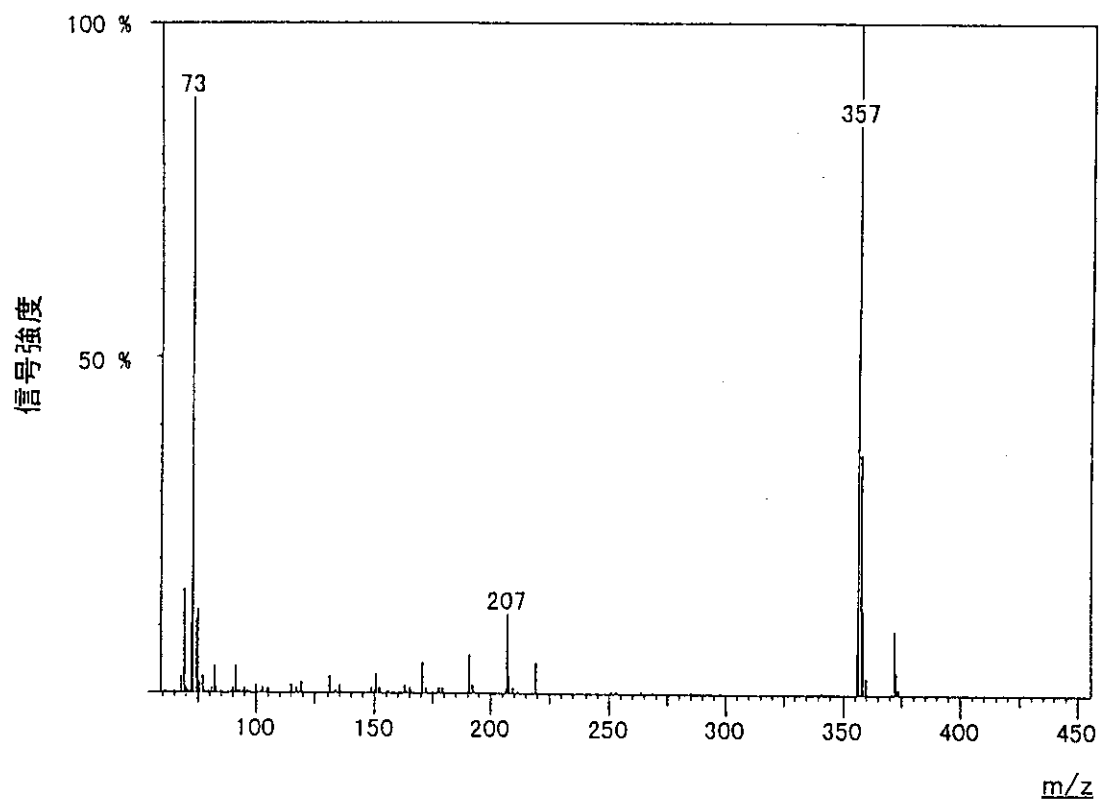


図7. ビスフェノールAのLC-MS スペクトル

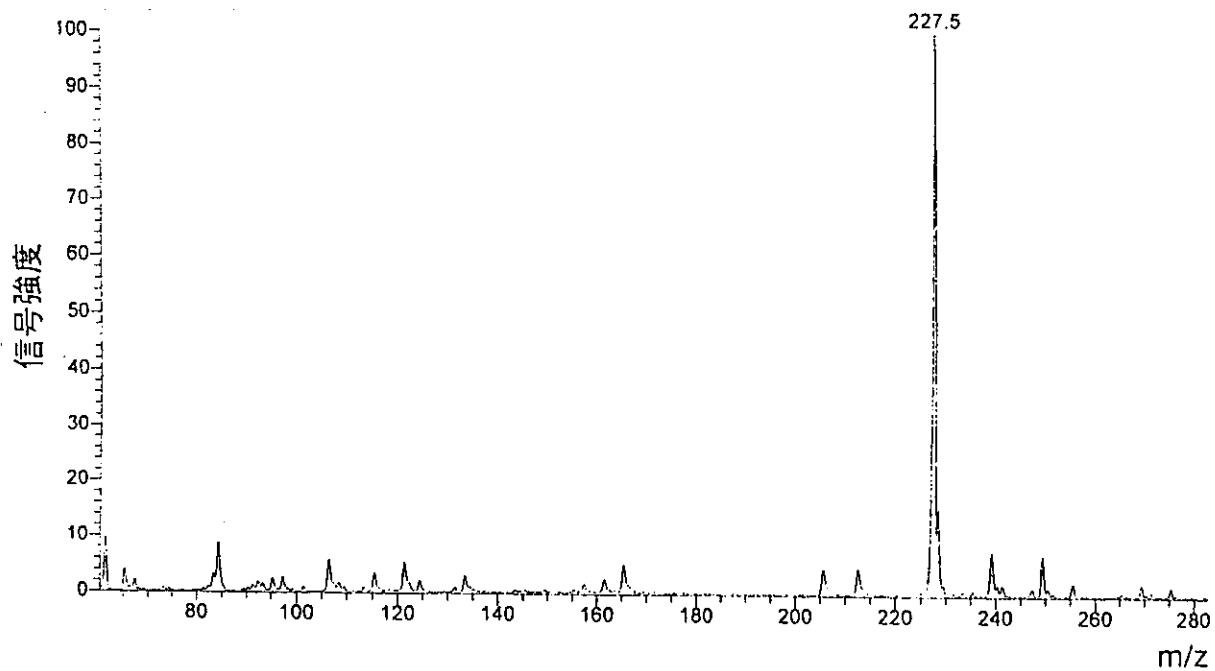


図8. ビスフェノールAの¹H-NMR スペクトル

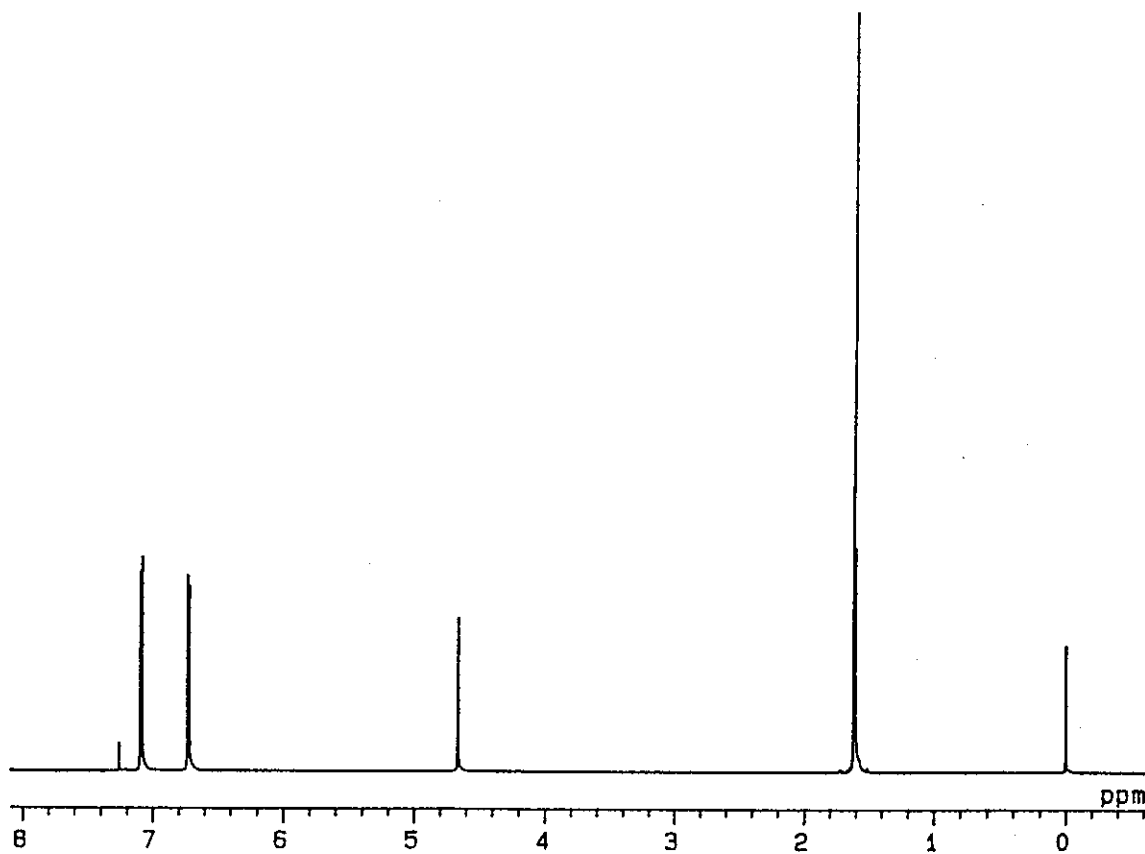


図 9. 検量線と 95%信頼区間

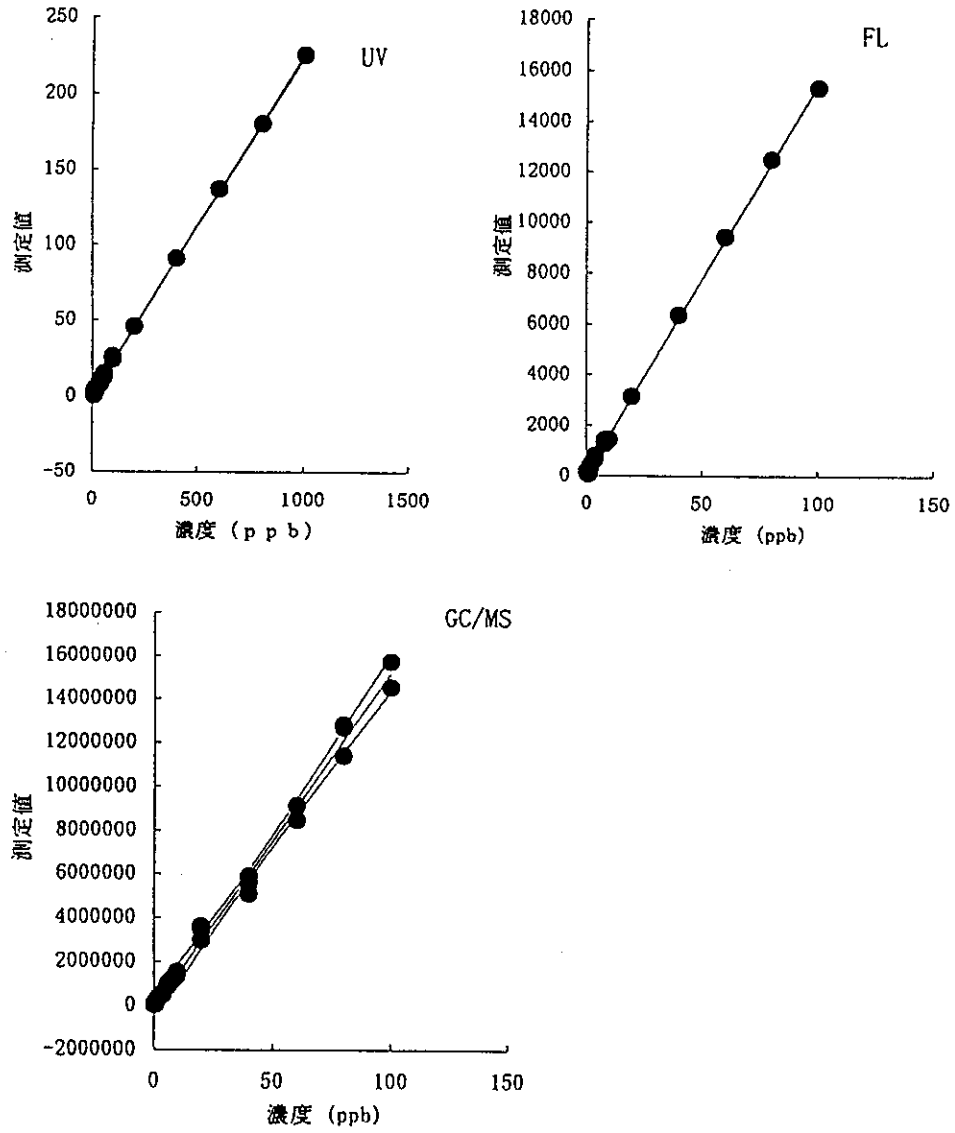


図 10. 精度プロット

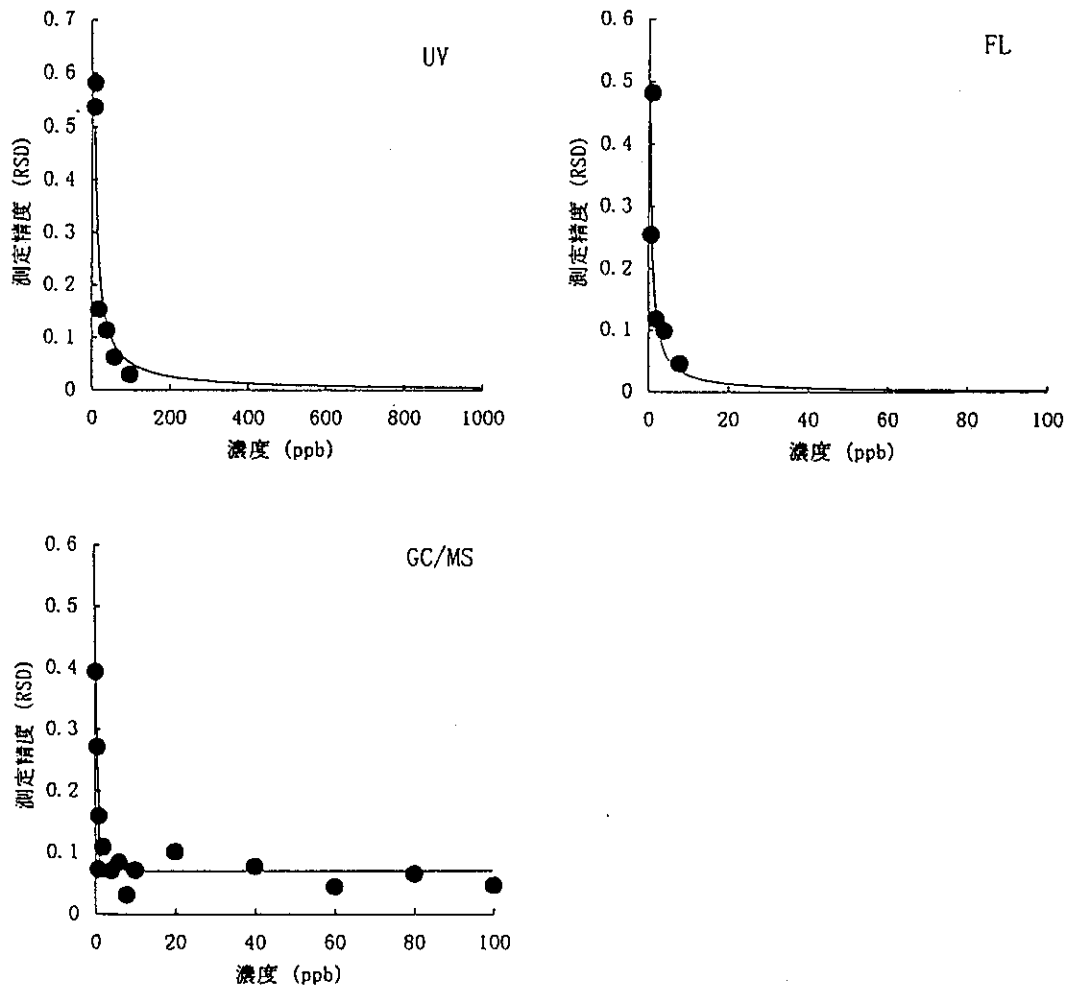
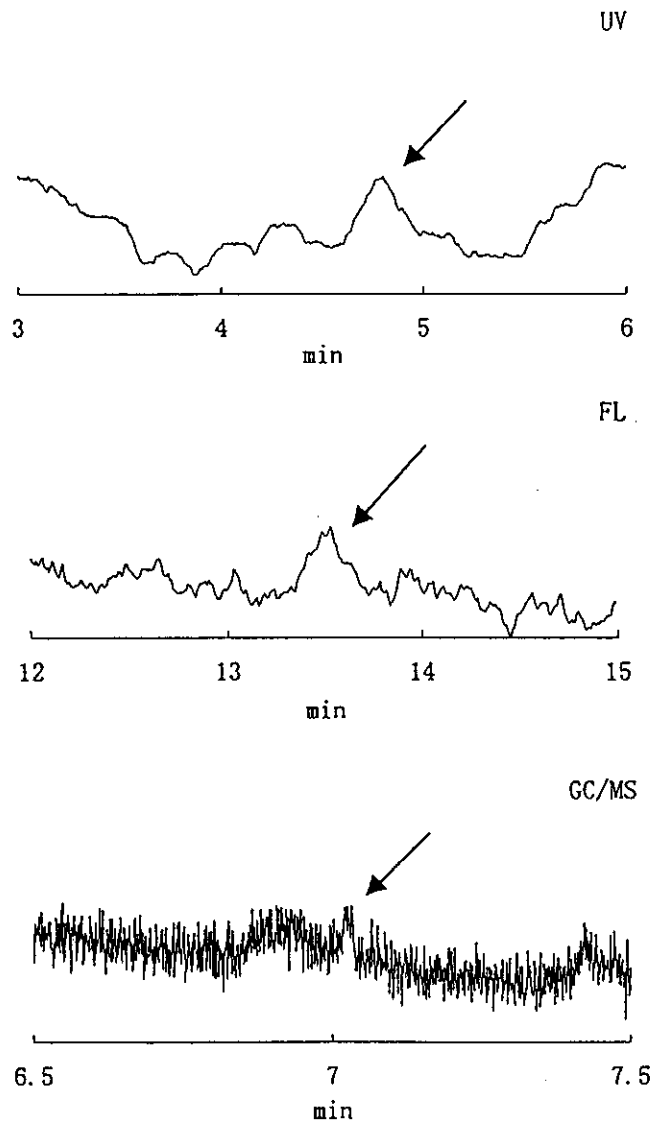


図 11. ベースライン上の検出限界シグナル



別添 3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書
化粧品、医薬部外品中の分析

国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部療品部
徳永 裕司

分担研究報告書

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究
化粧品、医薬部外品中の分析

分担研究者

徳永裕司、国立衛研、環境衛生化学部

要約

化粧品および医薬部外品に含まれると想定されるエンドクリン障害物質の経皮吸収的な試験をモルモットの剥離皮膚を用いて実施すると共に化粧品および医薬部外品の可溶化剤として多用され、皮膚角質層への影響が懸念される界面活性剤の存在下でのエンドクリン障害物質の経皮吸収に関する影響を、ポリカーボネートの出発原料として用いられるビスフェノールAについて検討した。6匹のモルモットの腹部剥離皮膚を装着した Franz 型拡散セルでの検討の結果、ビスフェノールAは約7～12時間（平均値10.1時間）のLag timeの後、Franz 型拡散セルの receptor 側に現れ、Flux は1.9～6.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ （平均値3.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ ）であった。24時間後のビスフェノールAの累積透過量は30～102 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ （平均値51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）であった。ビスフェノールAが塩化ベンザルコニウム、ポリオキシエチレン（10）オレイルエーテルと共存して存在した場合、ビスフェノールAの Flux は著しく低下し、donor 側でのビスフェノールAの溶解性が皮膚透過に大きく関与していることが示唆された。

キーワード：エンドクリン障害性物質、ビスフェノールA、Franz 型拡散セル、剥離皮膚、皮膚透過

A. 研究目的

いわゆるエンドクリン障害性化学物質（endocrine disruptor）による生態系の破壊への影響が問題視され、そのリストには多様な化学物質が挙げられている。しかし、実際の製品中にどの程度の量のどんな種類の物質が存在し、それが使用の際にど

れだけ体内に取り込まれるか分かっていない。そこで、化粧品および医薬部外品に含まれると想定されるエンドクリン障害物質（ビスフェノールA、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジエチル、ノニルフェノール、オクチルフェノール、ベンゾフェノンなど）の経皮吸収的な試験をモルモットの

剥離皮膚を用いて実施すると共に化粧品および医薬部外品の可溶化剤として多用され、皮膚角質層への影響が懸念される界面活性剤の存在下でのエンドクリン障害物質の経皮吸収に関する影響を検討し、化粧品および医薬部外品に含まれると想定されるエンドクリン障害物質の経皮吸収的な暴露評価を行う。本年度は爪化粧品の賦形剤として許可されているポリカーボネートの出発原料として用いられるビスフェノールAについて検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬および試液

ビスフェノールA (BA) は三井化学株式会社から Table 1 に示した規格品の提供を受けた。液体クロマトグラフ (HPLC) 用アセトニトリルおよびHPLC用メタノールは和光純薬工業株式会社より購入した。HPLC用カラムは Unisil Q C₁₈ カラム (粒径 5 μm、内径 4.6mm、長さ 15cm) をジューエルサイエンス社から購入した。塩化ベンザルコニウム (BK)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ポリオキシエチレン (10) オレイルエーテル (POE・OE) は和光純薬工業株式会社より購入した。その他の試薬は、試薬特級品を用いた。

Table 1 Certification for Bisphenol A

1. Solidifying point	156.7 °C
2. Water content	0.04 ppm
3. Loss on ignition	less than 0.002%
4. Free phenol	less than 0.005%
5. Assay	99.9%

5%プロピレングリコール試液：プロピレングリコール5 mLに水を加え、100 mLとする。

BA原液：BA約0.05 gを精密に量り、5%プロピレングリコール試液に溶かし、正確に100 mLとした (0.05 W/V%)。

10 mM-BK溶液：BK約36.7 mgを精密に量り、水10.0 mLに溶解する。

10 mM-SDS溶液：SDS約28.8 mgを精密に量り、水10.0 mLに溶解する。

0.5% POE・OE溶液：POE・OE約50 mgを精密に量り、水10.0 mLに溶解する。

生理食塩液：塩化ナトリウム9.5 gを水に溶かし、1 Lとする。

2) 剥離皮膚の調製法

モルモット (ハートレー系、オス、250-300 g) をエーテル麻酔後、エーテルでの深麻酔および呼吸停止により処理した。腹部の毛を電気バリカンで除いた後、腹部の皮膚を剥離した。皮下脂肪を除き、凍結保存し、必要なときに解凍して用いた。

3) BAの皮膚透過実験 (1)

モルモット剥離皮膚を縦型の Franz 型拡散セル (有効透過面積 0.246 cm²) に表皮を donor 側に向けて装着した。donor 側に水、10 mM-SDS 溶液、10 mM-BK 溶液あるいは0.5% POE・OE 溶液 1.0 mL を加え、receptor 側に生理食塩液 1.9 mL を加えた。32 °C で 2 時間放置後、donor 側の溶媒を除き、水で数回 donor 側を洗う。BA 原液 1.0 mL を donor 側に加え、32 °C で 14 ~ 24 時間後に receptor 側の溶液 0.2 mL を分取した。この液 20 μL を用いて HPLC 法にて測定を行い、あらかじめ作成した検量線を用いて透過した BA 量を求めた。なお、receptor 側に生理食塩液 0.2 mL を加え、receptor 側の容量を一定とした。

(HPLC条件)

検出器：蛍光検出器（励起波長：280 nm、
蛍光波長：305 nm）

カラム：Unisil Q C₁₈ カラムを用いた。

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル混液（3：2）

流量：1 mL/min

4) BAの皮膚透過実験(2)

モルモット剥離皮膚を縦型の Franz 型拡散セル（有効透過面積 0.246cm²）に表皮を donor 側に向けて装着した。donor 側に BA 原液 1.0 mL あるいは 0.05% BA を溶解した 10 mM-SDS 溶液、10 mM-BK 溶液および 0.5% POE・OE 溶液を加え、receptor 側に生理食塩液 1.9 mL を加えた。32℃で 14～24 時間後の receptor 側の溶液 0.2 mL を分取した。以下、3) BA の皮膚透過実験(1)と同様に操作した。

C. 研究結果

BA 原液を 5% プロピレングリコール試液で正確に希釈し、1 mL 当たり 1 μg を含む液を調製し、以後の実験に使用した。

1) 移動相について

龍野らは魚体中の BA の分析に、Wakosil sC₁₈ カラム (4.6 × 150mm) 及び水／メタノール混液 (60：40) を移動相として用いている。そこで、移動相として、メタノール／水混液 (60：40) ～ (50：50) あるいは水／アセトニトリル混液 (70：30) ～ (60：40) を用いて検討し、その結果を Fig.1 に示した。

メタノールを移動相に加えた場合、カラム圧力が大きくなるため、アセトニトリルを移動相に用いることにした。移動相として、水／アセトニトリル混液 (60：40) を用いたとき、t_R が 8.6 分を示した。この結果より、水／アセトニトリル混液 (60：40) を用いることにした。

ル混液 (60：40) を用いることにした。

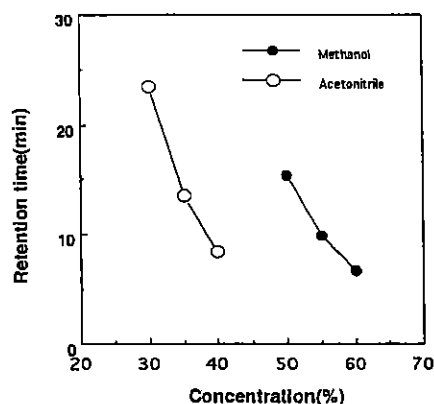


Fig.1 Effect of Methanol and Acetonitrile on Retention Time of Bisphenol A

2) カラム温度について

移動相に水／アセトニトリル混液 (3：2) を用い、カラム温度を 25～45℃に変更したときの結果を Fig.2 に示した。

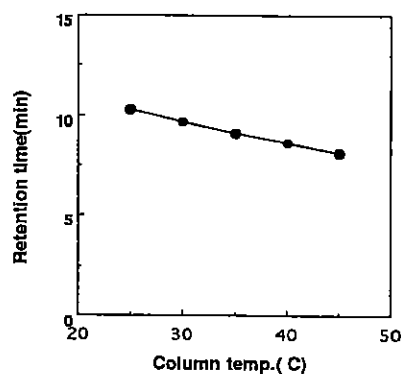


Fig.2 Effect of Column Temperature of Retention Time of Bisphenol A

カラム温度の上昇により、徐々に BA の保持時間 (t_R) が小さくなることが分かった。この結果より、カラム温度を 40℃とすることにした。

3) 検量線及び再現性について

BA 0.2～1.2 μg/mL の溶液 20 μL を用いて HPLC 条件にて検量線の作成を行った。その結果を Fig.3 に示した。

濃度と Peak area の間には原点を通る良好な直線関係を示した。また、BA 0.2 μg/mL および 1.0 μg/mL の 20 μL を用いたときの再

現性は、それぞれ、 $90489 \mu V \times sec$ (相対標準偏差 6.18%) と $501764 \mu V \times sec$ (相対標準偏差 1.38%) であった。

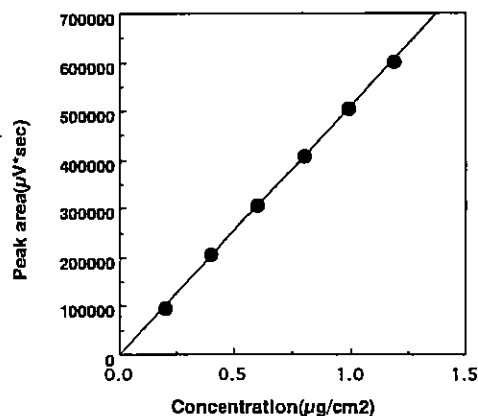


Fig.3 Working Curves for Bisphenol A

4) BAの剥離皮膚透過について

BA原液及び0.05% BAに溶解した10 mM SDS溶液1.0 mLを Franz 型拡散セルの donor 側に入れ、14~24時間後に receptor 側に透過するBA量を測定した。その結果を Fig.4 に示した。

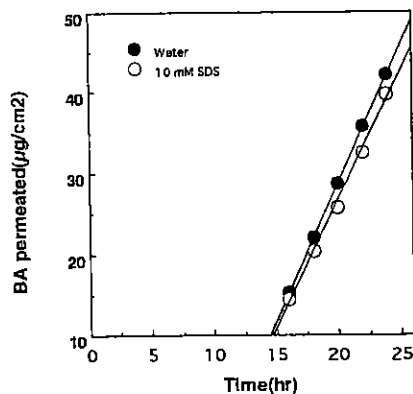


Fig.4 Permeation of Bisphenol A through the Skin after Treating 10 mM Sodium Dodecyl Sulfate

BAは11.5時間後から receptor 側に現れ、時間の経過と共に直線的に増加することが明らかになった。同一のモルモットの腹部剥離皮膚の6カ所から得られた皮膚を Franz 型拡散セルの6個に装着し、水で2時間処理した後、BAを作用させたもの2個及び10 mMあるいは0.5%の界

面活性剤で2時間処理した後、BAを作用させたもの4個から得られたそれぞれの Flux 及び Lag time を Table 2 に示した。

Table 2 Lag time and Flux of Bisphenol A after treating surfactants for 2 hours

	Lag time (hr)	Flux ($\mu g/cm^2/hr$)
Water	11.44	3.36
SDS(10mM)	11.54	3.14
Water	7.57	1.85
BK(10mM)	10.34	3.06
Water	11.97	2.56
POE.OE(0.5%)	11.91	3.10

また同様に、同一のモルモットの腹部剥離皮膚の6カ所から得られた皮膚を Franz 型拡散セルの6個に装着し、BA原液2個及びBAを含む10 mMあるいは0.5%の界面活性剤を donor 側に添加した4個から得られたそれぞれの Flux 及び Lag time を Table 3 に示した。

Table 3 Lag time and Flux of Bisphenol A with the Mixture of Surfactants

	Lag time (hr)	Flux ($\mu g/cm^2/hr$)
Water	10.14	4.05
SDS(10mM)	10.16	5.02
Water	9.25	6.93
BK(10mM)	9.53	0.75
Water	10.38	3.25
POE.OE(0.5%)	12.21	0.73

D. 考察

モルモットの剥離皮膚を装着した Franz 型拡散セルにBAの5%プロピレングリコール溶液1 mLを donor 側に添加したとき、使用したモルモットの個体差によるが、約7~12時間(平均値10.1時間)の Lag time の後、BAが receptor 側に透過することが明らかになった。著者らは、既

に、防腐剤の一種であるメチルパラベン、サリチル酸及びエチルパラベンを用いて同様の実験を行っており、それらの Lag time は1～2時間と報告している。メチルパラベン、サリチル酸及びエチルパラベンの log P (Pはn-オクタノール/水への分配係数)は、それぞれ、1.945, 0.988及び2.465である。BAの log Pは3.32であることから、分配係数の違いがLag timeの違いとして現れていることが示唆された。皮膚透過には、polar pathwayとnon-polar pathwayの二種類があると説明されている。Table 2から得られた各種界面活性剤で処理した後のBAのFluxを用いて考察してみた。BAは疎水性が高いため、non-polar pathwayの透過が仮定される。SDS溶液での2時間処理した後のBAのFluxはSDSで処理しなかったもののFluxと変わらないため、SDSは皮膚角質層のnon-polar pathwayに大きな影響を与えないものと考えられる。しかし、BKでは1.6倍、POE. OEでは1.2倍とFluxが大きくなっており、皮膚角質層のnon-polar pathwayへの影響が示唆された。次に、Table 3に示した各種界面活性剤とBAを共存させた場合、BAの経皮吸収に与える界面活性剤の影響を見てみた。Lag timeで比較した場合、界面活性剤の有無により、大きな変化は観察されなかった。Fluxについて見た場合、SDSの共存下では、FluxはBA単独の場合に比べて1.25倍の増加を示しているが、BK及びPOE. OEの共存下ではFluxは大きく低下し、それぞれ、0.1倍及び0.22倍となっている。BK及びPOE. OEの共存下では、界面活性剤の皮膚角質層の影響より、donor側の溶液へのBAの溶解性が増加し、それ結果としてBAの皮膚透過性が低下したものと考えられた。こ

を検討したとき、BAのFluxが、それぞれ、1.6倍及び1.2倍に増加したことから指示されることは、Table 2で示したBAあるいはPOE. OEで2時間剥離皮膚を処理した後、BAの透過の結果である。Table 2及びTable 3のBA原液を用いた実験から、6匹のモルモットの腹部剥離皮膚から得られたFluxは1.9～6.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ (平均値3.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)であり、24時間後のBAの累積透過量は30～102 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (平均値51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)であった。

E. 結論

今年度の研究の結果、以下のことが明らかになった。

1. BAの剥離皮膚を用いた経皮透過的な実験にODSカラム及び蛍光検出器を用いる液体クロマトグラフ法を確立することができた。

2. 6匹のモルモットの腹部剥離皮膚を用いたBAの経皮透過実験ではLag timeの平均値は10.1時間であり、Fluxの平均値は3.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であり、24時間後の累積透過量は51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

3. 界面活性剤のBK及びPOE. OEで処理された剥離皮膚でのBAのFluxは増加し、皮膚角質層のno-polar pathwayへのBKあるいはPOE. OEの影響が示唆された。

4. BAを界面活性剤のBKあるいはPOE. OEと共存させてBAの皮膚透過実験を行った場合、Fluxの著しい低下が観察され、BAのdonor側の溶液への溶解性がBKあるいはPOE. OEの添加により増加し、BAの皮膚透過が減少したことが示唆された。

別刷

刊行した研究成果の別刷

199800626A

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧」

Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats.

Ema M, Miyawaki E, Kawashima K.

Reprod Toxicol. 1998 Mar-Apr;12(2):127-32.

Further evaluation of developmental toxicity of di-n-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats.

Ema M, Miyawaki E, Kawashima K.

Toxicol Lett. 1998 Sep 1;98(1-2):87-93.