

図7 LC/MSによる血清中のDaidzein, Genistein, Glycitein の分析例

平成 11 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に関する生体試料（臍帯血等）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

毛髪及び血液中のブチルスズ化合物の分析法に関する研究

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 益川邦彦，藤巻照久，渡邊裕子

（神奈川県衛生研究所）

研究要旨

トリブチルスズ化合物及びその分解代謝物の人体暴露量の調査を目的として、毛髪及び血液を対象とした分析法の検討を行った。内標準物質として安定同位体標識標準品を使用し、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）による選択イオン検出法（SIM）及びガスクロマトグラフ誘導結合プラズマ分析計（GC/ICP-MS）で測定を行った。毛髪及び血液におけるトリブチルスズ化合物（TBT）の添加回収実験（ $n=6$ ）は、GC/MS の結果からそれぞれ 98%（CV 値 1.9%）、104%（CV 値 10.4%）と良好な結果が得られた。毛髪試料 9 検体（ $n=2$ ）を測定したところ GC/MS は 3 検体から $0.014 \sim 0.045 \mu\text{g/g}$ 、GC/ICP-MS は 7 検体から $0.005 \sim 0.042 \mu\text{g/g}$ の範囲で TBT を検出した。GC/MS で検出された 3 検体の分析値は GC/ICP-MS の分析値とほぼ一致した。TBT の検出限界（ 3σ ）は GC/MS が $0.01 \mu\text{g/g}$ 、GC/ICP-MS が $0.005 \mu\text{g/g}$ であった。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質として注目されているトリブチルスズ化合物（TBT）は船底防汚塗料や漁網防汚剤として長年使用されてきた。近年、法的規制などによって日本近海的环境レベルは横ばいまたは減少傾向にある。しかし、水生生物への毒性が強く、メスの巻き貝の不妊化を引き起こすことがわかっており、海産魚介類をタンパク質源として多く摂取している我が国としてはその人体暴露量の評価が求められている。そこで本研究では、ヒト毛髪及び血液を対象と

し、ヒトの体内に残留するトリブチルスズ化合物及びその分解代謝物の分析法について検討した。

B. 実験方法

B・1 試薬

標準品の塩化トリブチルスズ（TBT）、二塩化ジブチルスズ（DBT）、三塩化ブチルスズ（MBT）及び有機スズ抽出用キレート剤のトロポロンはアルドリッチ社製を用いた。安定同位体標識標準品の塩化トリブチルスズ-d27（TBT-d27）、二塩化ジブ

チルスズ-d18 (DBT-d18)、三塩化ブチルスズ-d9 (MBT-d9) は林純薬工業社製を用い、アルキル化誘導化試薬のテトラエチルホウ酸ナトリウムは Strem 社製を用いた。試料の分解に用いた 25%テトラメチルアンモニウムヒドロキシド水溶液は多摩化学工業社製超高純度分析用試薬を用いた。イソオクタンを除く溶媒は和光純薬製残留農薬用を用いた。その他の試薬は特級の和光純薬製を用いた。Sep-PakPlus フロリジルカートリッジカラム(910mg/cartridge)はウォーターズ社製を用いた。

B・2 装置及び分析条件

GC-MS

装置：Auto Mass 20、HP5890

カラム：DB-5 30m × 0.25mm × 0.25 μ m

注入口：スプリットレス、温度 220 °C

昇温プログラム：50 °C(1min) - 20 °C/min - 280 °C(10min)

イオン源温度：200 °C

GC/MS インターフェイス部温度：250 °C

サンプル注入量：2 μ L

イオン化：EI

イオン化電圧：70eV

検出方法：選択イオン検出法 (SIM)

モニターイオン：トリブチルエチルスズ (TBT-Et) の $[M-C_2H_5]^+$ である 291 (^{120}Sn) を定量イオンとし、スズの同位体由来する 289 (^{118}Sn) を参照イオンに用いた。同様にジブチルジエチルスズ (DBT-Et) は 263 を定量イオンとし、261 を参照イオンに用い、ブチルトリエチルスズは 235 を定量イオンとし、233 を参照イオンに用いた。

GC/ICP-MS

装置：HP4500、HP6890

カラム：DB-1 30m × 0.32mm × 0.25 μ m

注入口：パルスドスプリットレス、温度 250 °C

昇温プログラム：55 °C - 15 °C/min - 100 °C - 30 °C/min - 300 °C(1.33min)

サンプル注入量：1 μ L

測定質量： ^{120}Sn

B・3 試験溶液調製法

B・3・1 検体試料の前処理

毛髪約 3g をエタノールで 1 分間超音波で 3 回洗浄後、イオン交換水で 3 回、超音波で洗浄した。洗浄した毛髪は、乾燥後 3 ~ 5mm に細切し、さらに 15 時間乾燥後、秤量し、試験試料とした。血液は、採血後へパリンを 2%添加し、凍結保存した。分析時に解凍し、均一化した試料を秤量し、試験試料とした。

B・3・2 試験溶液の調製

試料 0.2g に内標準物質として安定同位体標識標準品を 0.1 μ g 添加し、25%テトラメチルアンモニウムヒドロキシド水溶液 5ml でアルカリ分解後、酢酸 1.5ml 及び塩酸 2.0ml を加え酸性とした。これに 10%塩化ナトリウム水溶液 40mL を加え、0.01% トロポロン-ベンゼン溶液 20ml を加えた後、振り混ぜ上層を分取し、この操作を繰り返してベンゼン溶液 40mL を減圧濃縮した。濃縮液をイソオクタン 5ml に溶解後、0.5M 酢酸緩衝液 (pH5.3) 10ml 及び 1.0% テトラエチルホウ酸ナトリウム水溶液 0.5ml を加えて激しく振とうし、エチル化後上層を分取した。塩化ナトリウム 3g を加え、イソオクタンで 2 回抽出した。これを減圧濃縮して 1mL の n-ヘキサンに溶解し、Sep-Pak Plus フロリジルカラムに負荷し、n-ヘキサン 10ml で溶出した。減圧濃縮後 n-ヘキサンにて試験溶液 0.2ml

とした。

C. 研究結果

C・1 定量法及び検量線

GC/MS(SIM)及びGC/ICP-MSで測定した。検量線は、安定同位体標識標準品を用いた内標準法によった。TBT、DBT及びMBTの各濃度0.01、0.05、0.1、0.5 μ g/mLでほぼ原点を通る直線性($r \geq 0.999$)が得られた。GC/MSの検出限界(3σ)は、0.01 μ g/mL (TBT、DBT)及び0.07 μ g/mL (MBT)であった。GC/ICP-MSの検出限界(3σ)は、0.005 μ g/mL (TBT)であった。

C・2 毛髪及び血液(全血)の添加回収実験

添加回収実験には48才、男性の毛髪及び血液を用い、GC/MSを使用した。試薬ブランク、毛髪及び血液を分析した($n=4$)ところTBTは、いずれも不検出であった。試料量0.2gに対して0.1 μ gの添加回収実験($n=6$)の結果、TBTは毛髪、血液でそれぞれ回収率98%(CV値1.9%)、104%(CV値10.4%)と良好な結果が得られた。

一方、DBT及びMBTについては反応試薬に由来すると思われるブランク値($n=4$)がそれぞれ0.07 μ g/mL (CV値4.2%)、0.24 μ g/mL (CV値10.2%)認められた。毛髪ではDBT、MBTがそれぞれ0.14 μ g/g (CV値13.5%)、0.78 μ g/g (CV値3.1%)認められ、血液ではDBT、MBTがそれぞれ0.06 μ g/g (CV値10.0%)、0.33 μ g/g (CV値11.7%)が認められた($n=4$)。TBTと同様にDBT、MBTの添加回収実験($n=6$)の結果は、毛髪が70%(CV値14.7%)、132%(CV値9.4%)であり、血液が84%(CV値6.6%)、92%(CV値9.8%)であった

(Table 1)。

C・3 毛髪試料中の分析結果

毛髪試料9検体($n=2$)についてGC/MS(SIM)及びGC/ICP-MSでTBTを測定した。GC/MSで9検体中3検体から0.014～0.045 μ g/g、GC/ICP-MSで9検体中7検体から0.005～0.042 μ g/gの範囲でTBTを検出した(Table 2)。GC-MSとGC/ICP-MSの分析値は、概ね一致した。また、分析値の高い50才代の男性と20才代の女性は家族であった。

D. 考察

試薬ブランク値については、誘導体化試薬であるテトラエチルホウ酸ナトリウムを5%水溶液とした後、0.20 μ mのフィルターでろ過し、*n*-ヘキサンで3回、洗浄することにより、約10～20%程度低減できるため、反応試薬に由来するものと考えられる。

TBTについては毛髪及び血液の添加回収実験で回収率、CV値ともに良好な結果が得られた。毛髪試料をGC/MS及びGC/ICP-MSで測定したところ検出感度の違いにより検出率が異なっているがGC/MSで約30%、GC/ICP-MSで約70%の検出率が得られた。従って、生体内に取り込まれたTBTの一部は毛髪に移行するものと考えられる。

GC-MSで検出された分析値は、GC/ICP-MSとほぼ同じ結果となり、両分析装置を用いることにより精度の高い分析が可能であることがわかった。

E. 結論

ブチルスズ化合物の人体暴露量の調査を

目的として、毛髪及び血液を対象とした分析法の検討を行った。TBT については内標準物質として安定同位体標識標準品を使用し、GC/MS と GC/ICP-MS を用いた精度の高い分析法の開発を行うことができた。

TBT の分解代謝物である DBT 及び MBT の分析については今後さらに検討を要する。

F. 研究業績

藤巻照久、益川邦彦、田尾博明、本橋清乃、牧野恒久、吉村吉博、中澤裕之、GC/MS 及び GC/ICP-MS によるヒト毛髪及び血液中の有機スズ化合物の分析、日本薬学会第 120 年会、要旨集 4、p.178、2000 年

Table 1 Results of spike recovery experiments for human hair and blood

Sample	Spiked ($\mu\text{g/g}$)	TBT			DBT			MBT		
		Found ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	CV (%)	Found ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	CV (%)	Found ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	CV (%)
Reagent blank	—	ND	—	—	0.07	—	4.2	0.24	—	10.2
Hair	—	ND	—	—	0.14	—	13.5	0.78	—	3.1
	0.5	0.49	98	1.9	0.49	70	14.7	1.44	132	9.4
Blood	—	ND	—	—	0.06	—	10	0.33	—	11.7
	0.5	0.52	104	10.4	0.48	84	6.6	0.79	92	9.8

Sample amount : 0.2g Spiked amount : 0.1 μg
 Reagent blank, hair, blood n=4 Spiked hair, spiked blood n=6
 TBT: Tributyltin chloride DBT: Dibutyltin dichloride MBT: Butyltin trichloride
 Method detection limits (3σ of blank values): 0.01 $\mu\text{g/g}$ (TBT,DBT), 0.07 $\mu\text{g/g}$ (MBT)

Table 2 Concentration of tributyltin compound in human hair

No.	Sex	Age	Tributyltin compound ($\mu\text{g/g}$)	
			GC-MS	GC/ICP-MS
1	M	10	ND	0.007
2	M	20	ND	0.005
3	M	50	ND	ND
4	M	50	0.044	0.041
5	F	20	ND	0.007
6	F	20	0.045	0.042
7	F	20	0.014	0.012
8	F	30	ND	0.007
9	F	40	ND	ND

Sample amount : 0.2g Injection volume GC-MS : 2 μL , GC/ICP-MS : 1 μL
 Number of analyses : 2 M : male F : female
 Tributyltin compound : as tributyltin chloride(TBTCl)
 GC-MS ions measured for quantitation : TBT-Et ; 291(289), TBT-d₂₇-Et ; 318(316)
 GC/ICP-MS measured mass : ¹²⁰Sn
 Method detection limits (3 σ of blank values) : GC-MS ; 0.01 $\mu\text{g/g}$, GC/ICP-MS ; 0.005 $\mu\text{g/g}$

「内分泌かく乱化学物質に関する生体試料(臍帯血等)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」

クロロベンゼン類及びパラベン類の分析法開発と実試料の分析

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

研究要旨

クロロベンゼン類およびパラベン類は内分泌かく乱作用を持つ可能性があることが指摘されている。このうちパラジクロロベンゼンは防虫剤として、パラベン類は保存料として一般の環境で広範囲に使用されている。これらの物質はヒト体内で代謝する経路があることが知られているが、環境中での大量消費に伴いヒト体内に常時供給がある場合、体内中(血液等)で検出される可能性が高く代謝物を含めての内分泌かく乱作用の可能性についての検討が必要である。そのため、ヒトがこれらの物質を摂取する経路の解明、摂取してからの体内中での挙動、代謝、排泄等について調査を行うための迅速で高感度な分析方法の開発を行い、併せて実試料の分析によるヒト健康への影響について研究を行った。

1)パラベン類を模擬飲料として摂取し生体内での挙動を確認したところ摂取直後 20 分以内に血液中にパラベンが検出されるとともに代謝物であるパラヒドロキシ安息香酸(PHBA)濃度の急増が確認された。PHBAの血中濃度はその後急速に低下し 8 時間後ではほぼ初期濃度にまで回復した。同時に行った尿試料の測定の結果、尿からもパラベンが検出された。また、PHBA濃度は、試飲後 20 時間近く影響が残った。

2)パラベン類の摂取経路として食品に分類されない栄養ドリンク剤について調査した結果、パラベン類を含むドリンク剤の場合、平均で 50 ppm程度添加されており、比較的大きなパラベンの摂取源であることが確認された。

3)内分泌かく乱作用の確認されているHCBは食事由来で摂取する可能性が大きいことから、暴露量の推定を行った。トータルダイエツト法による一日摂取量は 65 ng/日であった。陰膳法での平均一日摂取量では 113 ng/日であった。概ね魚介製品がHCBの摂取源であることが確認された。

4)パラジクロロベンゼンは防虫剤として使用されているが室内空気経路であることが明らかである。ヒト体内での代謝はあるものの、常時高濃度暴露される条件下では血液中に高濃度で存在することが明らかになり、室内濃度と血液濃度の濃度レベルの比較を行った結果、 $y=1.4 X$ の回帰式が得られた。この結果、室内濃度から血液濃度を推定できることになった。

A・研究目的

クロロベンゼン類のうち昨年度の厚生科学研究(内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する研究)により内分泌かく乱作用が心配されるヘキサクロロベンゼン及びジクロロベンゼンが生体試料(血液、臍帯血、母乳)から検出された。また、同様に内分泌かく乱作用が懸念されるパラベン類については代謝物であるパラヒドロキシ安息香酸が検出されている。これらの化学物質が生体に取り込まれる過程について経路を検討し、また、生体中での挙動について調査を行う。

B・研究方法:

B・1 試薬

パラベン類(メチルパラベン、エチルパラベン、イソプロピルパラベン、プロピルパラベン、イソブチルパラベン、ブチルパラベン)は関東化学工業製を用いた。

パラヒドロキシ安息香酸、3-ヒドロキシ安息香酸は和光純薬製を用いた。

プロテナーゼKは和光純薬(生化学用)を用いた。

シリル化剤:BSTFAは東京化成製を用いた
ケイソウ土カラムはメルク製extrelut-N Tを用いた。

HCB-13 C 6、p-ジクロロベンゼン-d 4はケンブリッジアイソトープラボ製を用いた。

その他は和光純薬残留農薬分析用を用いた。

B・2 装置器具

GC/MS装置:日本電子GC/MATE及び 島津QP 2000 GF

GC-ECD装置:島津GC-17 A

循環蒸留抽出装置:杉山元改良型

パッシブサンプラー:柴田パッシブガスチューブ(c o d e :8015-066)活性炭 200 mg 入り

SPMEファイバー:スペルコ製ポリジメチルシリコンジビニルベンゼン

固相樹脂:w a t e r s 製SEP-PAK t C 18

真空採血管:テルモ製ベノジェクトII (10 m l)

B・3 試験操作及び試験試料の作成

1) 生体試料中におけるパラベン類及びパラヒド

ロキシ安息香酸の定量

試料 5 m l (尿の場合はそのまま、血液の場合、遠心分離を行い血清画分のみ試料とした)にサロゲート化合物として 3-ヒドロキシ安息香酸 0.2 μ g 及び 0.1 m l の濃塩酸を加え、精製水 5 m l で希釈した後ExtrelutNT 20 に負荷し、酢エチ 120 m l で溶出させた。エバポレーターで濃縮後、アセトニトリル 0.5 m l に溶解後BSTFAを 0.2 m l 添加し、シリル化を行い、その試料をGC/MSで定量した。

2) 栄養ドリンク剤中のパラベン類の分析

栄養ドリンク中のパラベン類の測定は試料 1 m l をSEP-PAK t C 18 に試料を通水し、蒸留水 5 m l で洗浄し、メタノール 10 m l で溶出させた。定量はHPLC(UV 270 nm)により行った。また、栄養ドリンク中のパラヒドロキシ安息香酸、安息香酸の分析は資料を 1 m l 分取し、血液試料と同じ手法(extrelutNT 3 を使用)を用いた

3) 血液中のクロロベンゼン類(パラジクロロベンゼン、HCB)の測定方法

血液 5 m l を 22 m l ヘッドスペース瓶に採りプロテナーゼK 200 ユニット、HCB-13 C 6 5 n g を加え栓をして 60 $^{\circ}$ C にて 3 時間加熱し蛋白の分解を行う。次にSPMEファイバーをヘッドスペース瓶に差し込み 80 $^{\circ}$ C にて 30 分ヘッドスペースSPMEを行い定量はGC/MSにより行った。

4) 食品中のHCB、p,p'-DDEの分析

1 L の丸底フラスコに試料 10-20 g を採り、5%NaOH 100 m l、沸石とシリコンオイル 1 m l、ヘキサン 5 m l を加え改良型循環蒸留装置にて 90 分間蒸留を行いHCB、p,p'-DDE を捕集した。その後ヘキサン層を濃硫酸 5 m l で洗浄、シリカゲルによるクリンアップ後、定容してGC/ECDにて定量した。

5) 室内空気中のパラジクロロベンゼンの分析

市販の活性炭充填チューブ(柴田化学器械工業製パッシブガスチューブ)を使用して活性炭に捕集した揮発性化学物質を二硫化炭素で溶出しGC/MSによりパラジクロロベンゼンを定量し、下式にて室内濃度を算出した。

パッシブサンプラーによる測定条件
柴田パッシブガステーブ(c o d e :8015-066)
:活性炭 20-40 メッシュ 200 m g 入り
溶出溶媒:二硫化炭素
サンプリングレート: 0.291(μ g / (p p m x
m i n))を用いた。

試料濃度の算出式:
濃度(p p m)=試料ガス量/サンプリングレート
/サンプリング時間(m i n)
測定機器:G C / M S

C. 研究結果

C・1 パラベン類

(1)パラベン類のヒトにおける摂取実験

生体試料(血液、尿等)におけるパラベン及びその代謝物であるPHBAの分析方法を確立した上で、ヒトにおける摂取及び血液中での濃度変化(パラベン類、p-ヒドロキシ安息香酸)、尿への排泄について検討した。実験は被験者 2 名で 80 m g 相当のパラベン類(パラベンブチル)含有飲料を飲み、直後より血液濃度及び尿排泄濃度を調査した。その結果、パラベンを摂取後、20 分以内に血液よりパラベン類及びp-ヒドロキシ安息香酸濃度の上昇という形でパラベン摂取の影響を確認した。パラベン及びp-ヒドロキシ安息香酸は 8 時間後にはほぼ初期の状態に戻った。尿試料の場合でも、試料からパラベンが検出され、また、パラヒドロキシ安息香酸濃度は、試飲後 20 時間近く影響が残った。

(2)食品以外からのパラベン類の摂取

日本人の食品由来のパラベン類摂取量は厚生省のマーケットバスケット調査のデータを引用すると 0.2-0.3 m g /日程度である。しかし、生活形態の変化により食品以外からもパラベン類を摂取する機会が多いと考えられる。特に、近年コンビニ等で販売され、販売量が増加している栄養ドリンク剤(医薬品及び医薬部外品の分類となり食品としては扱われない)について実態調査を行った。市販品で 19 種ほどの栄養ドリンク剤類のうち保存料にパラベンの添加表示のあるものについて購入し、パラベン類の濃度を調査した。その結果、保存料にパラベンの表示のある栄養ドリンクに添加されているパラベンは、

ブチルパラベンの使用頻度が一番高く、続いて、エチル、プロピルの順であった。添加量は平均で 50 p p m 程度(清涼飲料水中のパラベンの基準値が 0.1 g / k g 以内でありこの値に配慮したものである)で、ドリンク剤 1 本(50-100 m l)あたりパラベンは 4.7 m g が添加されていた。この値から先の試飲試験と比較して、栄養ドリンクを数本以上常用するヒトの場合、血液からパラベンを検出する可能性が高いと考えられる。

C・2 H C B

昨年からの当所の調査で成人 60 人の血液を調査した結果、調査した全員の血液からH C B (0.07-0.40 p p b)が検出された。H C B のヒトへの暴露要因として大気や食事を經由して体内に取り込まれていると考えられた。そこで、H C B の暴露量を評価する手法として、トータルダイエットスタディ法を用いて食品分類ごとに分析を行い、食品群別のH C B 摂取量及びH C B の一日摂取量を算出した。また、陰膳方式による調査も平行して行い、食事経路からのH C B 摂取量を検討した。

(1)トータルダイエット法による調査結果

トータルダイエット法による調査を行うため長野市内で約 300 品目の食品を購入し、13 群類に分類し、群別に標準的な調理を行った上で混合して試料とした。群毎に指定した分析法により試料中H C B 濃度を測定した。その値と厚生省国民栄養調査から算出した各群毎の一日あたり摂取量を掛けあわせ各群毎のH C B 摂取量を求めた。その結果、群毎のH C B 摂取量を合計した成人一日あたりH C B 摂取量は 65 n g /日、このうち半分にあたる 33 n g が 10 群に属する魚介類からのH C B 摂取量であった。また、摂取量の 1/6 である 10 n g は 11 群の卵・肉製品から、また同じく 10 n g を 12 群の乳製品から摂取していた。食事の重量換算では 2 割にしかならない 10 群、11 群、12 群が全体の 8 割以上を占めていた。H C B に併せて、p,p'-D D E も同時に定量した結果、p,p'-D D E の一日摂取量は 237 n g /日となった。ここで得られた p,p'-D D E 濃度はアルカリ分解後の結果であり t -D

DDTとして評価できる。HCBの摂取量とp,p'-DDE摂取量を比較するとHCBは過去に大量に使用され現在でも環境ホルモン作用が心配されるDDTに比べ1/4程度の汚染レベルにあると評価された。

(2) 陰膳方式による調査結果

昨年度血液中HCB測定を行った職員を中心に9名で陰膳方式でのHCB摂取量調査を行った。調査は3日間の食事をメニュー、メニュー毎の摂取量を記載した上で採取しミキサーでホモジナイズして試料とした。この試料を用いて算出したHCBの一日摂取量は9人の平均で113ng/日となった。トータルダイエツト法と比べて2倍程度の開きであったが概ね類似した値となった。ヒト血中HCB濃度と陰膳方式による被験者HCB一日摂取量の相対関係を調べたがHCB摂取量の多い人が血中HCB濃度が高いといった著しい相関は見られなかった。

C・3 p-ジクロロベンゼン

個人暴露量評価(室内濃度)と血液濃度

当所の職員及びその家族(n=60)を対象として血液中の調査を行い、クロロベンゼン類のうちp-ジクロロベンゼンが測定者から検出され、平均値で14.9ppb(0.4~211ppb)、一部のみに高濃度の結果が得られた。また、一部のみに高濃度のパラジクロロベンゼンの検出された被験者の血液ではパラジクロロベンゼンの代謝物である2,5-ジクロロフェノールも同時に検出された。このため、血液濃度で、5ppb以上のパラジクロロベンゼンを検出した対象者を中心に21名に市販活性炭入りパッシブチューブを2日間胸元に携帯してもらい個人の平均暴露濃度(調査期間中の平均室内濃度に換算)、対象者の寝室及び居間におけるパラジクロロベンゼンの室内濃度を算出した。血液濃度と個人暴露濃度を比較した結果を図に示す。概ね、室内濃度と血中濃度レベルはともに数十ppbオーダーであり1:1.4程度の相対関係にあることが確認された。

聞き取り調査の結果、5ppb以上の血液濃度を検出した対象者の家庭ではもれなくパラジクロロベンゼンを使用しており、タンスを置い

てある寝室等の部屋の濃度が高くなっていた。また、被験者のうち室内で生活する時間の長い主婦の場合、外での勤務時間のある男性に比べてより高い暴露を受ける傾向が示された。

D・考察

D・1 分析方法について

生体試料の分析にSPMEを用いることは溶媒の使用の削減をする上でも非常に有効な手段であった。また、ケイソウ上カラムの使用は感染性の試料に直接接触する機会を少なくする意味で有効と考えられる。また、サロゲート化合物としてp-ジクロロベンゼン-d₄、HCB-13C₆、3-ヒドロキシ安息香酸等を加えて分析する手法をとることで精度の高い測定を行うことができた。昨年度パラベン類代謝物の測定に全血を用いてジアゾメタンによるメチル化を行っていたが、血漿成分の分析にすること及びメチル化の代わりにシリル化に変更することで感度が上がった。

D・2 パラベン類

パラベン類は保存料として幅広く使用されており、食品の他、医薬品、その他一般商品等多用途に使用されていることからヒトが摂取する機会は多い。パラベン類は、比較的早い生体内での代謝経路があるものの、パラベンを摂取直後では血液中から検出される可能性が高い。パラベン類の摂取頻度や摂取濃度に配慮した調査を行っていく必要がある。内分泌かく乱作用を考えると、摂取したパラベン類は、胎盤や母乳を通じて胎児に供給される可能性が高いことから、さらに検討を要すると考える

D・3 HCB

トータルダイエツトの手法によりHCBの摂取起源が魚介製品等であることがはっきりした。HCBの生成起源は燃焼により生成したり農薬の製造に伴い不純物として生成するなど発生の段階を含めてダイオキシンの汚染分布とよく類似している。ある意味で、ダイオキシン汚染の指標ともなりうると思われる。また、HCBの一日摂取量は過去に大量に使用され現在使用禁止となっているDDTの1/4程度であることが確認された。HCBのように非意図的に生

成した化学物質がDDTと同じの濃度レベルにあることは注目すべきで、新たにHCBの発生源があるか否かについても調査が必要となっている。

また、HCBは臍帯血及び母体血液、母乳の調査から、臍帯において胎児移行を妨げる機能を持っていることが明らかになったが、その代わりに、母乳を通じ新生児に移行していくことも明らかになっている。このことは母体中のHCBの蓄積濃度を下げないかぎり胎児、新生児への供給負荷を下げる方法がないことを意味しており今後母体における低減対策が必要となっている。

D・4 パラジクロロベンゼン

パラジクロロベンゼンは従来、室内で大量に使われてはいても生体内での代謝等があるため血液中濃度がはっきりしていなかった。しかし今回、室内環境と血液濃度の相関関係をはっきりさせることができた。この結果はパラジクロロベンゼンの生体中での影響を評価するための貴重な資料となると考えられる。パラジクロロベンゼンについてはヒトへの毒性等が問題となっており、現在でも大量に使用している住宅に対してヒトへの暴露実態を明らかにしていく時期に来ていると考える

E・学会発表

- 1) 寺澤、月岡、吉田、佐藤:日本食品衛生学会第78回学術講演会,53(1999)、パラヒドロキシ安息香酸の血中濃度と摂取量について
- 2) 月岡、寺澤、吉田、佐藤、藤島、中澤:第8回環境化学討論会,30-31(1999)、SPMEによる生体試料中の有機塩素化合物の微量分析I-クロロベンゼン類とクロロフェノールについて
- 3) 寺澤、月岡、吉田、佐藤、藤島、中澤:第8回環境化学討論会,30-31(1999)、SPMEによる生体試料中の有機塩素化合物の微量分析II-酸系除草剤を中心に-
- 4) 月岡忠、寺澤潤一、吉田徹也、佐藤守俊、藤島弘道(長野衛公研)、中沢裕之(星薬大)、第24回医用MS学会 シンポジウム(1999.9.23)、SPME-GC/MSによる生体試料中の内分

表 栄養ドリンク中のパラベンの測定結果

	種別	添加物としての表示	他の保存料	安息香酸	pHBA	パラベン類の種類						合計		容量 (ml)	1本あたりの含量
						メチル	エチル	イソプロピル	プロピル	イソブチル	ブチル	pHBA換算			
1	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	541	0.6						13.0	9.3	50	0.46	
2	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	389	0.6						69.3	49.3	100	4.93	
3	滋養強壮保健薬	エチルパラベン、ブチルパラベン	安息香酸	403	0.5		41.1				28.9	54.7	100	5.47	
4	滋養強壮保健薬	エチルパラベン、ブチルパラベン	安息香酸	385	0.4		67.6				43.1	86.8	100	8.68	
5	整腸薬	パラベン	安息香酸	990	nd					18.1	97.8	82.4	50	4.12	
6	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	373	1.4		53.3				43.9	75.5	100	7.55	
7	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	375	0.7		57.5				42.5	78.0	100	7.80	
8	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	278	0.6						25.3	18.0	100	1.80	
9	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	505	nd						68.7	48.9	100	4.89	
10	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	336	0.1						50.8	36.1	100	3.61	
11	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	541	0.7				50.9		48.3	73.4	100	7.34	
12	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	454	nd						46.3	32.9	100	3.29	
13	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	689	nd				36.1		33.3	51.3	100	5.13	
14	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	332	nd						22.9	16.3	50	0.81	
15	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	419	nd		11.4		6.2		5.9	18.5	70	1.29	
16	滋養強壮保健薬	エチルパラベン	安息香酸	414	0.2		89.3					74.2	50	3.71	
17	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	502	nd				63.6		59.7	91.2	50	4.56	
18	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	436	0.3				51.8		49.5	74.9	100	7.49	
19	滋養強壮保健薬	パラベン	安息香酸	428	nd				54.2		10.3	48.9	100	4.89	
			平均濃度	463	0.6							53.7	85.3	4.6	
					パラベン使用頻度	0	6	0	6	1	18				

パラベン類の分析方法

サンプル(10ML)

SEPPAK tC18env(メタノール洗浄10ml)

固相吸着

SEPPAK tC18env

洗浄:蒸留水10ml

溶出

メタノール5ml

定容

HPLC

条件

カラム:L-カラム 4.6x150mm

溶離液:0.05MKH₂PO₄:アセトニトリル:メタノール

7:2:1 1ml/min

UV:270nm

20ul注入

安息香酸、PHBAの定量

試料(5ml)

↓ サロゲート: 3OHBA 200ug

↓ 塩酸 200ul

攪拌

↓

ケイソウ土カラム Extralute NT3

↓ 上記 1ml チャージ

↓ 場合によっては吸引して浸透

15分放置

↓ 酢酸エチル 25ml

溶出液

↓

濃縮-乾固

↓

アセトニトリル 0.5ml

↓ BSTFA 0.2ml

↓

↓

定容 5ml

↓

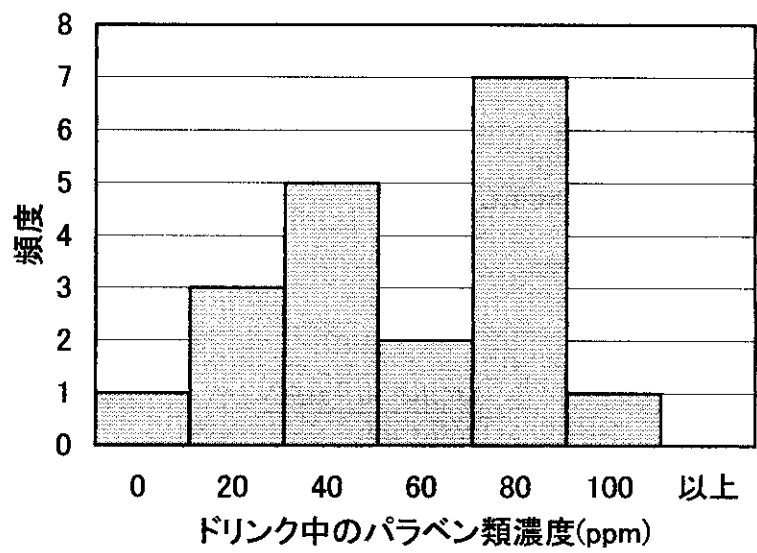
GC/MS

MONITA-MS

安息香酸	194
安息香酸	179
3-HBA	282
PHBA	282
3-HBA	267
PHBA	267
パラベンチル	266

データ区間	頻度
0	1
20	3
40	5
60	2
80	7
100	1
以上	

図 ドリンク剤のパラベン類含有量



パラベン摂取に伴う血液及び尿中のパラベン、パラベン代謝物の移行調査

パラベン添加試料の作成

模擬果汁飲料(ホカスイツを使用)

添加溶液

1. 40g/50mlのパラベンブチル(PHBAとして1.0g/50ml)溶液(エタノール溶液)作成
模擬果汁200mlに上記溶液2mlを添加(40mgのPHBAを含む)

0.2g/Kgを含む溶液

参考)食品衛生法の基準:果汁飲料で0.1g/kg(PHBAとして)

飲む量

400mlを飲む(80mgPHBAとして摂取)

血液について

試飲前
20分後
40分後
80分後
2時間後
4時間後
8時間後
24時間後
48時間後

尿について

調査を開始する前日から一日分の尿を採取

直前分採取
0-4時間分
4-12時間分
12-24時間分
24-36時間分
36-48時間分

パラベン試飲実験による血液・尿中のパラベン、パラベン代謝物濃度の経時変化

血液中経時変化

経過時間 (HR)	PHBA濃度 (ppm)		ハラベン (PHBA換算 ppm)	
	被験者A	被験者B	被験者A	被験者B
0 試飲前	0.011	0.011	0	0
0.33 20分後	0.344	0.175	0.029	0
0.66 40分後	0.224	0.123	0.038	0
1.33 80分後	0.134	0.202	0.024	0.37
2 2時間後	0.15	0.063	0.033	0.017
4 4時間後	0.063	0.022	0.005	0.006
8 8時間後	0.032	0.016	0	0
24 24時間後	0.032	0.025	0	0
48 48時間後	0.011	0.012	0	0

尿中の経時変化

経過時間 (HR)	PHBA濃度 (ppm)		ハラベン (PHBA換算 ppm)	
	被験者A	被験者B	被験者A	被験者B
0 試飲前24時間	0.53	1	0	0
2 0-4時間分	13	12.6	0.15	0.82
8 4-12時間分	2.8	3.5	0.035	0.13
18 12-24時間分	1.5	3.1	0.005	0.015
30 24-36時間分	0.45	2.3	0	0
42 36-48時間分	0.73	1.88	0	0

図1 血液中のパラベン類の変動

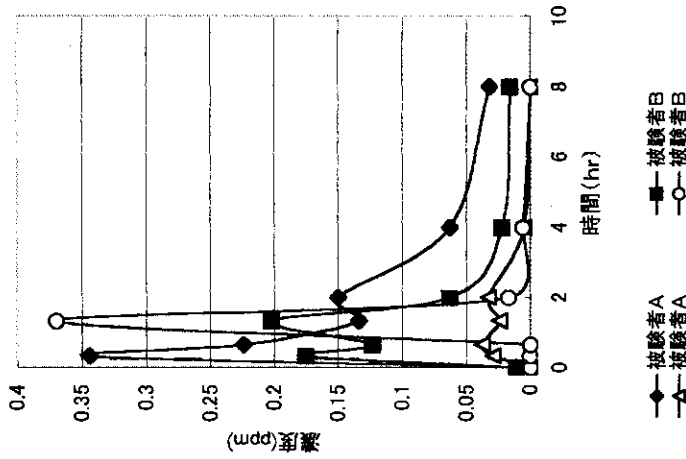
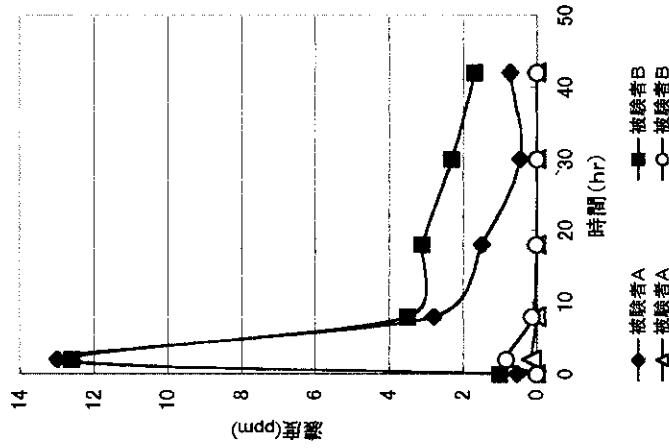
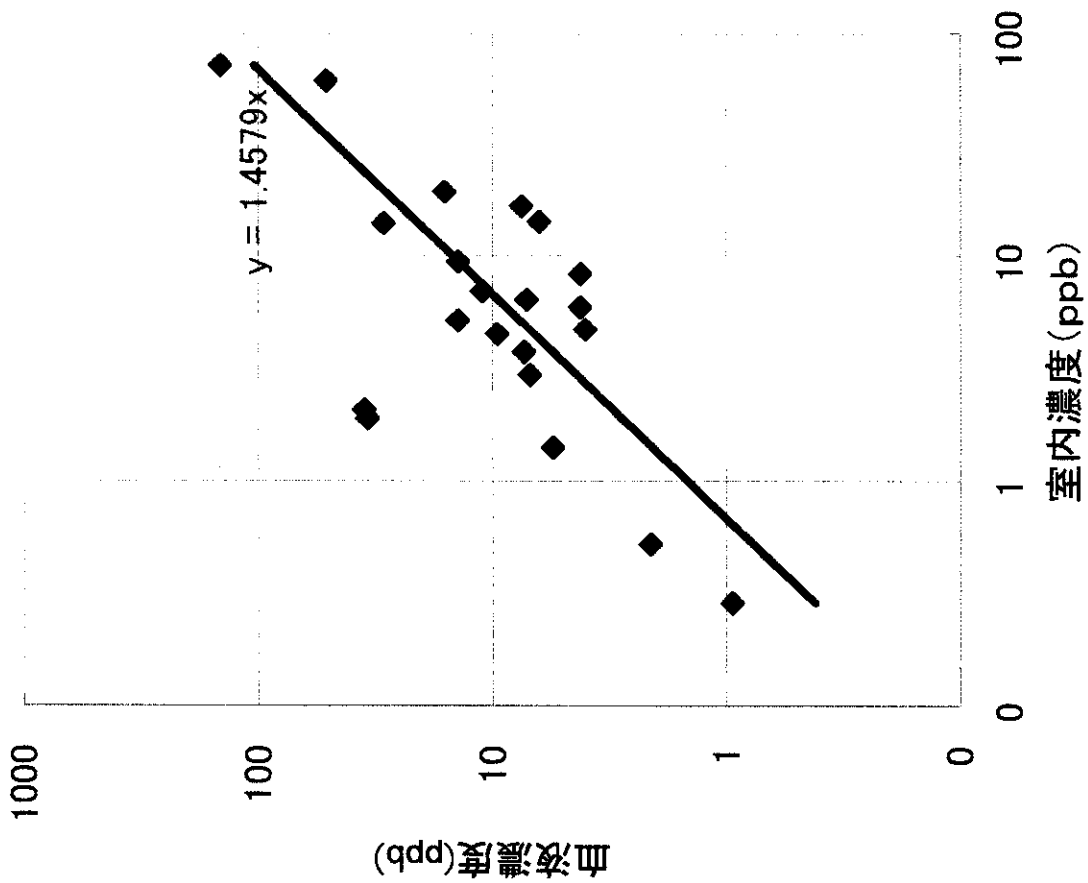


図2 尿中のパラベン類の変動



パラジクロロベンゼンの血中濃度と室内環境



	室内濃度 (ppb)	血液濃度 (ppb)
1	4.8	4.0
2	0.3	0.94
3	5.2	14
4	16.9	7.5
5	6.4	7.1
6	61.3	51
7	0.5	2.1
8	3.0	6.9
9	14.2	29
10	1.9	34
11	1.4	5.5
12	71.6	145
13	8.4	4.2
14	7.0	11
15	3.8	7.3
16	14.4	6.3
17	19.6	16
18	2.1	35
19	9.5	14
20	4.5	9.5
21	6.0	4.2