

平成12年度 厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）  
協力研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）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

LC-MSによる生体試料及び缶飲料中のビスフェノールA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  
協力研究者 小林 進 埼玉県衛生研究所  
堀江正一 埼玉県衛生研究所  
吉田栄充 埼玉県衛生研究所

研究要旨

分離分析法として優れている高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS）を用いたさい帯血，母体血，腹水及び缶飲料中のビスフェノールA(BPA)の分析法を検討した。分析に供したさい帯血，母体血及び腹水，計58検体中のBPA濃度はほぼ検出限界(0.3ng/mL)以下であった。また，市販缶飲料中のBPA濃度調査から，製缶メーカーによるBPA溶出の低減化が進められていることが示唆された。血液試料中のBPAの分析では，超微量レベルの定量が求められている。しかし，現段階では①サンプリング時，及び②分析操作時のコンタミネーションを「ゼロ」にすることは極めて困難であり，信頼性の高い分析値を得るためにバリデーションされたサンプリング・分析法の確立が必要と考えられる。

A. 研究目的

ビスフェノールA(BPA)は，内分泌かく乱作用が疑われる物質として環境庁よりリストアップされた67物質の中でも注目の高い物質である。その国内生産量は平成8年度，約25万トンであったものが平成11年度には約35万トンと増産されており，リストアップされた67物質の中で第3位を占めている。

先に著者らは高速液体クロマトグ

ラフ-質量分析計(LC-MS)を用いたBPAの高感度分析法を構築し，予備調査としてボランティア7名の血液（血清）を調べた結果，いずれも検出レベル以下であった。一方，現在までELISA法やGC-MSを駆使して血液や卵胞液中のBPAを測定した報告が幾つかなされており，報告の多くは，血液中から平均で数ng/mL(ppb)のBPAが検出されたと言うものである。そこで今回，先に構築した方法を一部改良し，さい帯血，

母体血、腹水等計58検体について分析を試みた。更に、前回の調査で比較的高濃度でBPAが検出された缶飲料（同一ブランド）中の実態調査も実施した。

## B. 研究方法

### B.1 試料及び試薬

さい帯血、母体血及び腹水は東海大学牧野教室から提供されたものを用いた。さい帯血及び母体血は産科グループのボランティアから、腹水及び血液は婦人科グループのボランティアから採取した。採取した血液試料は、常法に従って血清を調製し、15分以内に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。腹水も同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。

缶飲料は埼玉県内で市販されているコーヒー、紅茶、日本茶、果実飲料、炭酸飲料缶などを用いた。

標準品：ビスフェノールA (BPA) 及びビスフェノールA-d<sub>16</sub> (BPA-d<sub>16</sub>) は関東化学(株)製の環境分析用試薬を用いた。

標準溶液：各標準品20mgを精秤し、メタノール100mLに溶解して標準原液を調製し、適宜HPLC移動相で希釈して標準溶液とした。

ISOLUTE Multimode カートリッジ (500 mg)：International Sorbent Technology Ltd. 製、カートリッジは予めメタノール10mL、水3mL、メタノール3mL及び水3mLの順で洗浄した後使用した。その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

### B.2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS)：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC-MSD を使用した。測定条件は表1に示した。

### B.3 検量線の作成

BPA 及びBPA-d<sub>16</sub>の0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10及び100ng/mLの溶液を調製し、その10μLをLC-MSに注入する。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM)法を採用し、それぞれモニターイオン  $m/z$  227,  $m/z$  241により得られたSIMクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

### B.4 試験溶液の調製

血清、腹水、缶飲料：生体試料は1mLを、缶飲料は5mLを採り、ISOLUTE Multimode カートリッジに負荷する。水3mL及び20%メタノール3mLで洗浄した後メタノール3mLで溶出し、減圧乾固後10%メタノール1mLに溶解して試験溶液とした。

## C. 結果及び考察

### C.1 LC-MS測定条件の検討

先に構築した測定条件について、更にBPAの検出感度を高めるため検討した結果、移動相中のアセトニトリル含量を増す一方酢酸濃度を低くし、流速を0.2mL/minから0.16mL/minに変更し、表1に示す条件を設定した。本条件によって得られたBPAの検出感度は、先

に構築した条件に比べ20%程度向上した。本法による検出限界は、SIM モードでモニターイオンをBPA の擬分子イオンとした場合0.2ng/mL(絶対量として2pg)であった。

### C.2 前処理法の検討

血液試料中のBPA分析では超微量レベルの定量が求められており、試料調製法の構築に当たってはサンプリング時と同様に実験器材や試薬からのコンタミネーションを極力避けることが求められる。先に著者らは、イオン交換水やカートリッジ中に微量のBPAが含まれていることを報告した。そこで、より信頼性の高い前処理法を構築するため、BPAの溶出量が少なく且つクリーンアップ効果に優れたカートリッジを検討した。その結果、先に報告したISOLUTE Multimodeが最も夾雑成分の除去効果に優れ、且つBPA溶出量が少なかった。しかし、本カートリッジを用いても操作ブランクにおいて極微量のBPAが検出された。

本前処理法の信頼性ある検出限界を得るため、カートリッジのロットを変え(5ロット)、各ロットにつき6回、計30回ブランク試験を行った。その結果、操作ブランクの標準偏差0.083の3倍、0.3 ng/mLを本分析法の検出限界とした。

### C.3 添加回収実験

血清及び缶飲料にBPAを添加(血清:5ng/mL, 缶飲料, 10ng/mL)し、回

収率を求めた結果、血清及び缶飲料とも概ね80%以上(血清 82.3±5.7, 缶紅茶89.2±4.3 (%))であった。本法による検出限界は、血清で0.3ng/mL, 缶飲料で0.5ng/mL(コーヒー類は2ng/mL)であった。

### C.4 血液試料中のBPA 濃度

本法により、東海大学病院で採取されたさい帯血、母体血、腹水、計58検体を分析した(表2)。殆どの試料は、先に示した本分析法の検出限界0.3ng/mL以下であり、0.3ng/mLを僅かに超えた試料も2検体見られたが、検出限界レベルの量であった。従って、今回分析した試料中のBPA濃度は、ほぼ検出限界以下であったと言える。

標準溶液及び試験溶液の代表的なLC-MSクロマトグラムを図1に示す。なお、分析結果をより確かなものとするためにBPA-d<sub>16</sub>をサロゲートとして利用し、良好に回収されていることを確認した。

### C.5 市販缶飲料中のBPA 濃度

先に(2年前)著者らは、市販缶飲料中のBPA濃度を調査し、比較的高濃度でBPAが検出される缶飲料があることを報告した。そこでBPA含有量の高かった缶飲料について、同一ブランドのものを購入し、BPA含有量の実態調査を実施した。その結果、2年前の調査で比較的高濃度で検出された缶飲料からBPAは殆ど検出されなかった(表3)。

更に、先の調査において加圧・加熱殺菌処理されていない果実飲料や炭酸飲料缶からはBPAはほとんど検出されないが、缶を空にして蒸留水を満たし、オートクレーブで121℃、15分間加熱処理すると比較的高濃度でBPAが溶出される飲料缶があることも報告した。そこで、比較的高濃度でBPAが溶出された同一ブランドの果実飲料や炭酸飲料缶を購入し、空缶からの溶出を調べた。その結果、BPAの溶出量は大きく減少しており、製缶メーカーによりBPA溶出量を低減化した改良缶の開発が進められていることが示唆された。

#### D. 結論

これまでの多くの報告では血液試料等から平均で数ppbのBPAが検出されている。しかし、今回の調査においては、さい帯血、母体血及び腹水中のBPA濃度はほぼ検出限界(0.3ppb)以下であった。

血液試料中のBPAの分析では、超微量レベルの定量が求められている。しかし、現段階では①サンプリング時、及び②分析操作時のコンタミネーションを完全に「ゼロ」にすることは極めて困難であり、信頼性の高い分析値を得るためにバリデーションされたサンプリング・分析法の確立が必要と考えられる。

なお、市販缶飲料中のBPA濃度調査から、製缶メーカーによりBPA溶出量を低減化した改良缶の開発が進められていることが示唆された。

#### E. 研究業績

##### E.1 学会発表

- 1) 「LC-MSによる生体試料及び缶飲料中のビスフェノールAの分析」：第4回分析化学東京シンポジウム（幕張）  
2000.8.30-9.1

表 1 LC/MS測定条件

Apparatus: HP1100 Series LC/MSD (Hewlett Packard)

MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization Mode	ESI, Negative Mode	Column	Zorbax XDB-C18 (150 x 2.1 mm)
Fragmentor	90V	Eluent	0.005% acetic acid-MeCN (55:45)
Nebulizer	N2 (35 psi)	Flow rate	0.16 ml/min
Drying gas	N2 (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500V	Injection size	10 µl
SIM ion	m/z 227, 241		

表2 さい帯血, 母体血, 腹水中のBPAの分析

試料	BPA濃度(ng/mL)		試料	BPA濃度(ng/mL)	
	さい帯血	母体血		血液	腹水
IW-16	0.18	0.10	IZ-36	0.15	0.25
IW-17	0.28	0.29	IZ-37	0.13	0.29
IW-23	0.26	0.13	IZ-38	0.20	0.11
IW-24	0.14	0.17	IZ-40	0.15	0.07
IW-28	0.27	0.10	IZ-41	0.16	0.27
IW-29	0.24	0.17	IZ-42	0.09	0.14
IW-31	0.26	0.18	IZ-43	0.09	0.10
IW-35	0.19	0.32	IZ-44	0.09	0.10
			IZ-45	0.09	0.14
			IZ-51	0.10	0.09
			IZ-52	0.17	0.17
			IZ-53	0.19	0.16
			IZ-54	0.25	0.28
			IZ-64	0.16	0.09
			IZ-66	0.09	0.28
			IZ-70	0.13	0.23
			IZ-73	0.09	0.27
			IZ-74	0.11	0.11
			IZ-81	0.18	0.20
			IZ-82	0.14	0.35
			IZ-83	0.18	0.10

表3 市販缶飲料中のビスフェノールAの分析

試料	1998.11検査		2001.1検査	
	濃度(ppb)	溶出(ppb)	濃度(ppb)	溶出(ppb)
コーヒ (A)	212	14.0	<2.0	<1.0
コーヒ (B)	170	20.0	4.0	<1.0
コーヒ (C)	152	10.7	3.1	<1.0
紅茶 (A)	129	14.5	<0.5	<1.0
紅茶 (B)	70	14.5	<0.5	<1.0
日本茶(A)	11	1.1	<0.5	<1.0
日本茶(B)	—	—	3.3	<1.0
炭酸飲料	<0.5	60.5	<0.5	1.7
フルーツリッパ(A)	<0.5	27.5	<0.5	<1.0
フルーツリッパ(B)	<0.5	17.1	<0.5	<1.0
ジュース(A)	<0.5	62.5	<0.5	1.1
ジュース(B)	<0.5	88.3	<0.5	<1.0

溶出試験：空缶 + 蒸留水→121℃、15分

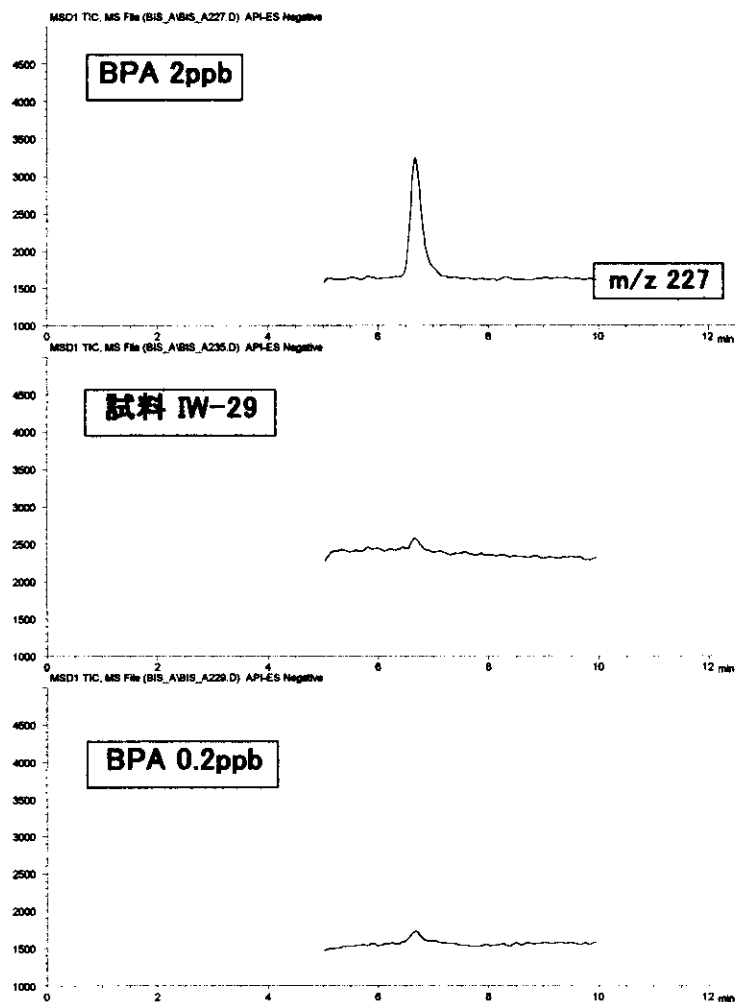


図1 代表的なLC-ESI-SIMクロマトグラム

平成12年度 厚生科学研究（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（さい帯血等）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

生体試料中ビスフェノール A 及びその類似化合物のカラムスイッチング  
HPLC-蛍光定量

主任研究者	牧野恒久	東海大学
分担研究者	中澤裕之	星薬科大学
研究協力者	黒田直敬	長崎大学
	中島憲一郎	長崎大学
	岩崎克彦	東海大学
	和泉俊一郎	東海大学

研究要旨

内分泌かく乱化学物質のヒト（胎児，乳児，成人等）における暴露量を正確に把握するためには，生体試料中のこれらの高感度かつ高選択的な分析法の開発が不可欠である．そこで，環境中に多く見い出され，かつ社会的関心の高いビスフェノール A (BPA) を対象として，生体試料中 BPA の高感度 HPLC 分析法の開発を行った．この方法を母体血，さい帯血及び腹水等の試料に適用し，その濃度レベルを明らかにした．

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質は，一般に極微量で作用し，しかも世代を超えて生体に影響を及ぼすことから，生体試料中の高感度かつ選択的な分析法の開発が不可欠である．研究協力者らは，これまでにフェノール性水酸基を有する化合物と選択的に反応し，蛍光誘導体を与える 4-(4,5-ジフェニル-1*H*-イミダゾル-2-イル)ベンゾイルクロリド (DIB-C1) を開発し，ヒト尿中フェノールやクレゾール類の蛍光定量に適用してきた．さらに，環境庁によりリストアップされた内分泌かく乱作用が疑われる 67 種類の化学物質の

うち、ビスフェノール A (BPA) に注目し，この高感度定量のための HPLC-蛍光検出及び過シュウ酸エステル化学発光検出法の開発を行い，ほ乳びんから溶出される BPA の定量等を行ってきた．本研究の目的は，これをさらに発展させ，生体試料への適用が可能な超高感度かつ高選択的な分析法を開発することである．このための手段としてカラムスイッチング技術の導入を検討した．開発した HPLC-蛍光定量法を用いて，母体血，さい帯血由来血清及び腹水中の BPA 濃度の測定を実施した．

## B. 研究方法

### B・1 分析操作

血清 100  $\mu$ l を塩酸酸性としたのちクロロホルム 1.0 ml を用いて BPA を抽出した。このクロロホルム層 0.85 ml を蒸発乾固後、5 mM DIB-C1 のアセトニトリル懸濁液 100  $\mu$ l 及び 1.5M トリエチルアミンのアセトニトリル溶液 5  $\mu$ l を用いて蛍光標識 (35 $^{\circ}$ C, 20 分間) を行った。この反応溶液に 12.5% アンモニアのアセトニトリル溶液 10  $\mu$ l を添加し、さらに室温下、10 分間放置した。5% 酢酸溶液 10  $\mu$ l を加えて反応を停止したのち、メンブランフィルターでろ過し、5  $\mu$ l を HPLC システムに注入した。

### B・2 HPLC 装置

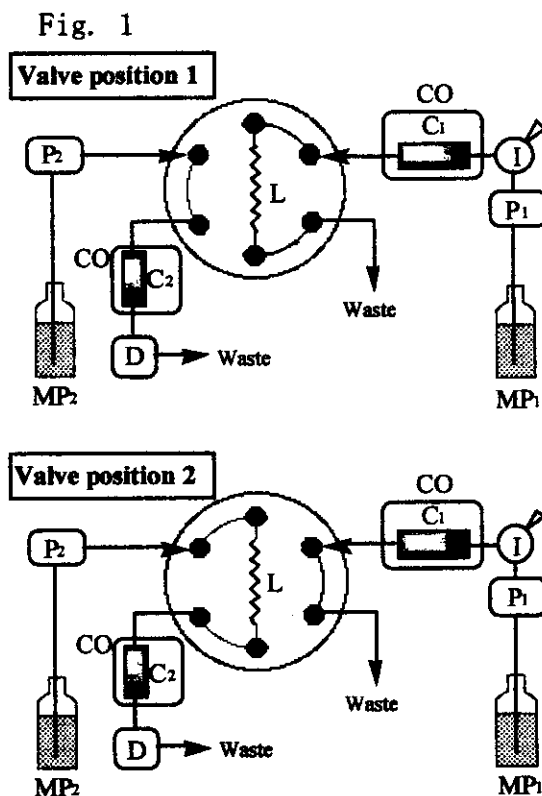
カラムスイッチング HPLC-蛍光定量装置を構築した (Fig. 1)。すなわち、注入された試料は第一の分離カラムで粗分離された後、DIB-BPA を含む分画がカラムスイッチングによりさらに第二の分離カラムに導入され、蛍光検出される装置である。以下にその概要を示す。

ポンプ 2 台 (LC-10AS, Shimadzu) ; 第一カラム (Wakosil-II 5C18 RS,  $\phi$  1.0x150mm, Wako) ; 第二カラム (Vydac Protein & Peptide C18,  $\phi$  4.6x150mm, Vydac) ; 恒温槽 (E5C3, Omron) ; スイッチングバルブ (SPV-N-6, 200  $\mu$ l ループ, GL Sciences) ; 試料注入装置 (7125 型, 5  $\mu$ l ループ, Rheodyne) ; 蛍光検出器 (RF-10AXL, Shimadzu) ; 記録計 (FBR-1, Tosoh)

### B・3 HPLC 条件

第一溶離液にはアセトニトリル/メタノール/水の 72:15:13 (v/v/v) 混液を、第二溶離液にはアセトニトリル/メタノール/0.1 M 酢酸ナトリウム緩

衝液 (pH 5.5) の 55:33:12 (v/v/v) 混液を使用した。また、それぞれの流速は 0.1 及び 0.3 ml/min. に設定した。両分離カラムによる分離は 35 $^{\circ}$ C にて行い、カラムスイッチングのタイミングは試料注入後 10.75 min. とした。蛍光検出は  $\lambda_{ex}$ : 350 nm,  $\lambda_{em}$ : 475 nm で行った。



### B・3 試料

試料として同一個人より得られた母体血及びさい帯血由来の血清セット (9 組) 及び不妊症患者の血清及び腹水のセット (21 組) を用いた。これはいずれも東海大学医学部において採取された試料である。

## C. 研究結果

### C・1 検量線

健康人血清に既知濃度の BPA (0.1



〜7.0 ppb) を添加し、検量線を作成した。その結果、検討した濃度範囲でピーク高さとの間に良好な直線性 ( $r=0.998$ ) が得られ、シグナル/ノイズ比 (S/N) を3とした場合の検出下限は 0.04 ppb と高感度であった。

### C・2 測定精度及び回収率

健常人血清に 3.0 ppb の BPA を添加し、繰返し測定 of 再現性を調べた。その結果、日内 ( $n=6$ ) 及び日間 ( $n=3$ ) の精度は相対標準偏差 (RSD) でそれぞれ 4.2% 及び 8.0% と良好であった。また、BPA の標準水溶液と 3.0 ppb の BPA 添加血清及び無添加の血清を分析操作に従って処理し、得られたピーク高さから算出した BPA の添加回収率は 78.6% であった。

### C・3 生体試料中 BPA の定量

開発した分析法を用いて、同一個人より得られた母体血及びさい帯血由来の血清セット (9組) 及び非妊婦の血清及び腹水のセット (21組) における BPA 濃度を測定した。

母体血の定量結果 (Table 1) は 0.21〜0.79 ppb の範囲であり、その平均値±標準偏差は  $0.46 \pm 0.20$  ppb となった。一方、同一個人より得られたさい帯血中の BPA 濃度の範囲及び平均値はそれぞれ、0.45〜0.76 ppb

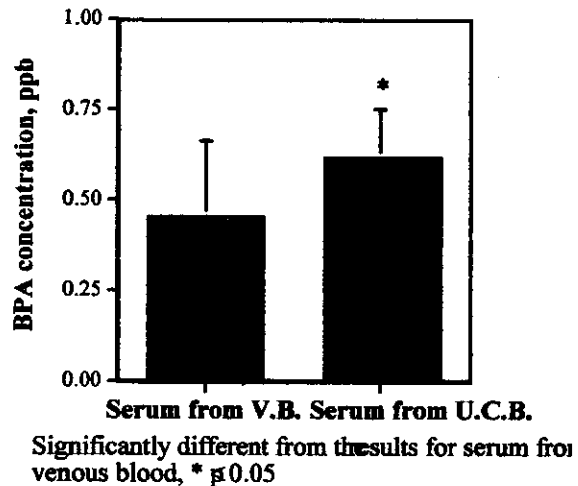
Table 1

No.	Sample	Concentration of BPA in serum (ppb)	
		Venous blood	Umbilical cord blood
1	IW 16	0.43	0.61
2	IW 17	0.23	0.45
3	IW 23	0.63	0.69
4	IW 24	0.65	0.76
5	IW 28	0.45	0.45
6	IW 29	0.43	0.74
7	IW 31	0.34	0.49
8	IW 35	0.79	0.73
9	IW 36	0.21	0.64
<b>Mean ± SD</b>		$0.46 \pm 0.20$	$0.62 \pm 0.13$
<b>Median</b>		0.43	0.64
<b>Range</b>		0.21-0.79	0.45-0.76

及び  $0.62 \pm 0.13$  ppb であり、さい帯

血の方が有意に高い濃度を示した (Fig. 2)。

Fig. 2



また、不妊症患者の血清及び腹水のセットに関して、それぞれの BPA 濃度の範囲及び平均値は 0.24〜0.64 ppb,  $0.44 \pm 0.12$  ppb 及び 0.38〜0.73 ppb,  $0.55 \pm 0.13$  ppb となった (Table 2)。

Table 2

No.	Sample	Concentration of BPA (ppb)	
		Serum	Ascites
1	IZ 36	0.30	0.75
2	IZ 40	0.81	0.88
3	IZ 41	0.23	0.35
4	IZ 42	0.87	0.78
5	IZ 43	0.36	0.55
6	IZ 47	0.46	0.63
7	IZ 48	0.49	0.61
8	IZ 51	0.31	0.62
9	IZ 52	0.44	0.50
10	IZ 53	0.22	0.22
11	IZ 54	0.24	0.15
12	IZ 55	0.85	0.85
13	IZ 64	0.24	0.43
14	IZ 66	0.47	0.73
15	IZ 69	0.64	0.64
16	IZ 70	0.46	0.56
17	IZ 71	0.40	0.49
18	IZ 72	0.38	0.42
19	IZ 74	0.51	0.56
20	IZ 81	0.56	0.71
21	IZ 94	0.33	0.38
<b>Mean ± SD</b>		$0.44 \pm 0.12$	$0.55 \pm 0.13$
<b>Median</b>		0.46	0.56
<b>Range</b>		0.24-0.64	0.38-0.73

両者の平均値を比較した場合、腹水

の方が有意に高い BPA 濃度を示すことが明らかとなった (Fig. 3). Fig. 4 に母体血とさい帯血由来の血清中 BPA 濃度間の相関図を示す. また, Fig. 5 には不妊症患者の血清及び腹水中 BPA 濃度間の相関を示す. さらに, 不妊症患者の血清及び腹水より得られたクロマトグラムを Fig. 6 に示す.

Fig. 3

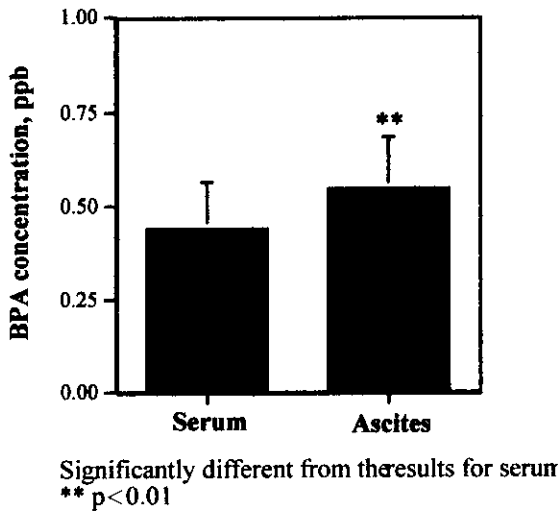
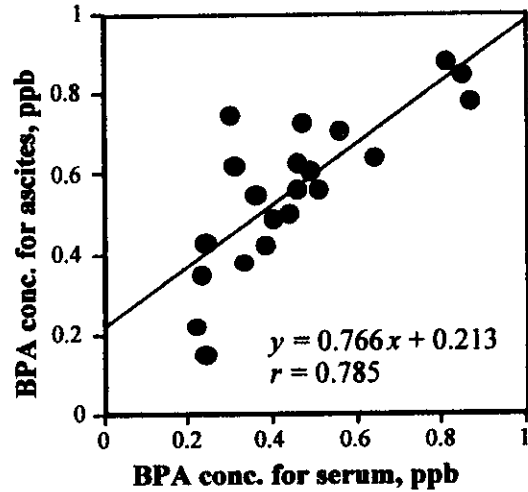


Fig. 4

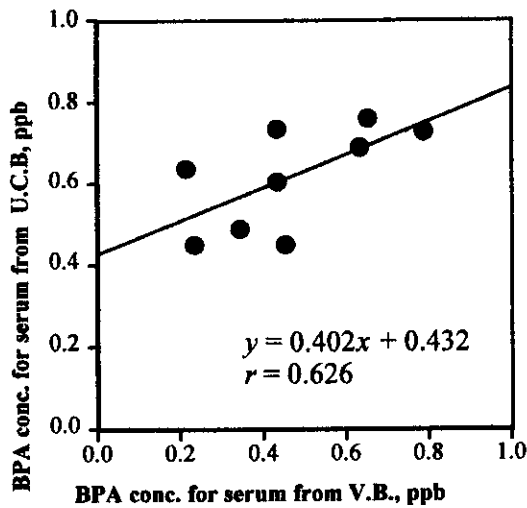
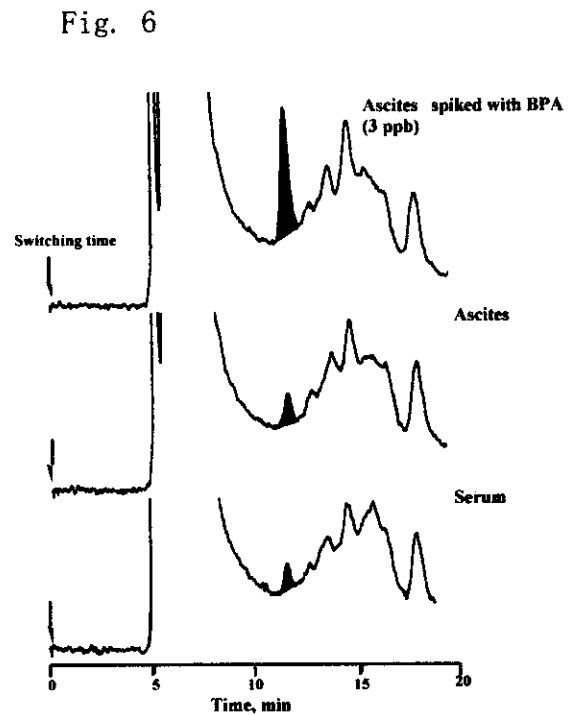


Fig. 5



#### D. 考察

一般に, さい帯血は母体血に比べ, より多くの脂質及びリポタンパクを含むことが知られている. 今回の検討により, さい帯血中により高濃度の BPA が見いだされたことから, 今後, BPA の脂肪組織等への移行性や蓄積性等に関する詳細な調査が望まれる. 一方, 本測定法により腹水中の BPA 濃度が血清よりも高いことも明らかとなった. この原因は現在までのところ

明らかではなく、今後、この解明が待たれる。

#### E. 結論

今回開発したカラムスイッチング HPLC 法が血清や腹水などに含まれる BPA の高感度定量に有用であることが明らかとなった。本法を用いてこれらの試料中に含まれる BPA 濃度レベルを明らかにすることができた。今後、分析対象試料を母乳等まで拡大し、各種生体試料中 BPA 濃度の総合的な把握を試みる予定である。また、胎児及び乳児の暴露量を明らかにすることにより、BPA 摂取の健康影響に関する考察に役立てたい。

#### 学会発表

第 10 回日本臨床化学会九州支部総会：「生体試料中のビスフェノール A の高感度分析法の開発に関する基礎研究」；中島憲一郎，孫 艶，オサマ・アルデハシ，和田光弘，黒田直敬（長崎大），中澤裕之（星薬大），高橋正克（長崎大），牧野恒久（東海大）

日本薬学会第 120 年会：「カラムスイッチングを利用するビスフェノール A のセミマイクロ HPLC 蛍光計測」（2000）；孫 艶，オサマ・アルデハシ，和田光弘，黒田直敬，中島憲一郎（長崎大），中澤裕之（星薬大），牧野恒久（東海大）

#### 発表論文

Y. Sun, M. Wada, O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, and K. Nakashima, "High-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated

from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride as a label." J. Chromatogr. B, 749, 49-56 (2000).

平成12年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）  
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（さい帯血等）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 畑山善行 長野県衛生公害研究所  
月岡 忠 長野県衛生公害研究所  
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。特にパラベン類はフタル酸エステル類同様に精巣機能に対する影響が報告されており近年その生体への影響が注目されている。さい帯血、および母体血、母乳等の生体試料中のパラベン類の測定を行うため、少量の試料で高感度な測定のできる分析法を構築し、化学物質の胎盤通過性や、暴露経路等について検討を行った。

さい帯血からはメチルパラベンとプロピルパラベンが検出され、とくにメチルパラベンは比較的高濃度に検出された検体があった。母乳でもメチルパラベンが検出されており、妊婦が暴露を受けたパラベン類が血液を経由して母乳やさい帯血に移行したものと推定された。パラベン類は化粧品や医薬品等の保存料に使用されている。化粧品からの皮膚吸収がパラベン類の暴露にどの程度影響するかの検討を行った。

また、簡易分析法により、さい帯血と母体血中のクロロベンゼン類等の濃度比較を行った。

A. 研究目的

平成10年度厚生科学研究（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（母体

血、さい帯血、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p-ヒドロキシ安息香酸が検出された。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った。

## 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): 関東化学工業製を用いた。

p-ヒドロキシ安息香酸、3-ヒドロキシ安息香酸: 和光純薬製を用いた。

TMS化剤(BSTFA): 東京化成製を用いた。

ケイソウ土カラム: メルク製

extrelut-NT3を用いた。

HCB-13C6はケンブリッジアイソトープラボ製を用いた。

コスモール168AR(ジペンタエリトリット脂肪酸エステル): 日清オイルミルズを用いた。

その他、有機溶媒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

SPMEファイバー: supelco製65 $\mu$

mPDMS-DVBコーティング

固相樹脂: waters製SEP-PAK tC18

### 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p-ヒドロキシ安息香酸の定量

#### a) 血液試料

試料1ml(血液は、遠心分離を行い血清画分を試料とすることとし、採取後速やかに冷凍保存し、分析直前に解凍

し使用した)にサロゲート化合物として3-ヒドロキシ安息香酸50ng及び25 $\mu$ lの塩酸を加え、精製水1mlで希釈し、ケイソウ土カラムに負荷した。溶出は酢酸エチル30mlで行った。エバポレーターで濃縮後、酢酸エチル0.5mlに溶解後、BSTFAを100 $\mu$ l添加し、シリル化を行い、その試料をGC/MSで定量した。

(フロ-1) 参照

#### b) 母乳中のパラベン類の測定

試料(母乳はポリプロピレン製の容器に産院で直接採取し、採取後は速やかに冷凍保存し測定直前に解凍し一部を使用した)4mlを10mlスクリーキャップ付き遠心管に分取し、サロゲートとして3-ヒドロキシ安息香酸200ngを添加後、10%炭酸ナトリウム溶液0.5mlを加えアルカリ性(pH10程度)にしたのち、n-ヘキサン4mlを加え振とう後遠心分離しヘキサン層を除去して脂肪分を除去し、その後、遠心管の下層にある水層をパスツールピペットで1ml分取し、濃塩酸50 $\mu$ lを加え、後は血液試料と同様な処理を行った。(フロ-1) 参照

#### 2) 化粧品中のパラベン類の分析

化粧品中のパラベン類の測定は、化粧品では試料1mlを、乳液、ファンデーションについて0.1g~0.5gを分取後、メタノール1mlに溶解し、その後、蒸留水で10mlになるよう希釈し、うち試料2ml~5ml分をメタノール、水でコンデューションしたSEP-PAK tC18に通水し、蒸留水10mlで洗浄し、メタノール10mlで溶出させた。

定量はHPLC(UV270nm)により行った。

(フロ-2) 参照

### 3) 化粧品塗布実験

パラベン類の皮膚吸収による暴露実態を把握するため、マウスを用いたパラベン含有模擬化粧品による塗布実験を行った。

a) 模擬化粧品としてブチルパラベンをジペンタエリトリット脂肪酸エステルに2%濃度になるように溶解し、Wistar系ラット（雄）1匹あたり0.5gを塗布した。

b) 模擬化粧水として、メチルパラベン、プロピルパラベンを含む精製水（10%のエタノールを含む）をWistar系ラット（雄）に塗布した。血液中のパラベン濃度は、塗布直前及び一定時間経過後（1時間、2時間、3時間）のマウスから血液を採取し遠心分離処理した血清中のパラベン類濃度を測定した。

### 3) 血液中の有機塩素化合物（HCB、クロルデン類、p, p'-DDE）の簡易測定

血液1ml（血清試料）を12mlヘッドスペース瓶に採り、サロゲートとしてHCB-13C6 2ngを加え、血清が凝固しないように蒸留水4mlを加えてバイアルキャップをした。測定は、SPMEファイバー：supelco製65  $\mu$  mPDMS-DVBコーティングをヘッドスペース瓶に差し込み90℃にて30分ヘッドスペースSPMEによる捕集を行い、分析はGC/MSにより行った。

（フロ-3）参照

## C. 研究結果

### C. 1 パラベン類

#### (1) パラベン類の胎児移行

長野市内の産院で出産した妊産婦を協力者として提供されたさい帯血、母体血、母乳の3種の生体試料に含まれるパラベン類の測定を行った。その結果を表1及び表2に示す。なお、さい帯血は出産当日に、母体血、及び母乳は出産後5日目に採取した。母体血ではパラベンの代謝物であるp-ヒドロキシ安息香酸が全員の血液から検出されたほか、メチルパラベン、エチルパラベン、イソプロピルパラベンが検出された。また、母乳からは代謝物のp-ヒドロキシ安息香酸が検出されたほかメチルパラベンが検出された。さい帯血からは代謝物のp-ヒドロキシ安息香酸のほかメチルパラベン、プロピルパラベンが検出された。検出されたパラベン類をみると、母体血からメチルパラベン以外のパラベン類が検出された被験者では、さい帯血、母乳から該当するパラベン類が検出されていない。また、さい帯血にプロピルパラベンが検出された2人の被験者では母体血からプロピルパラベンは検出されなかった。メチルパラベンの濃度を比較するとさい帯血の方が母体血より高濃度である事例が多かったが著しい特徴は無かった。

このほか、東海大学病院で採取したさい帯血及び母体血（血清）中のパラベン類の濃度測定を行った。被験者62人の試料を分析した結果、母体血からメチルパラベンが検出されたほか、プロピルパラベンが4人から検出された。さい帯血ではメチルパラベンのみが検出された。このうち母体血、さい帯血のセットで採取されている31人分の試料

中のメチルパラベン濃度を比較したが相関は見られなかった。(図1)

#### (2)化粧品からのパラベン類の暴露

a)市販の化粧品(化粧水、乳液、ファンデーション)には保存料としてパラベン類が添加されており、日常的に皮膚を通じて体内に吸収されるパラベン類の暴露量の推定を行った。化粧品に含まれるパラベン類を測定した結果を表3に示す。パラベンを保存料に使用していない化粧品もあったが、使用しているものは概ね1000ppm程度のパラベンが添加されていた。使用されるパラベン類の種類は、化粧水では、メチルパラベンがほとんどであり、また、ファンデーションや薬用クリーム用ではエチルパラベンやブチルパラベンを含むものもあった。1回の化粧で使用する量を2mlとするとパラベン類の皮膚塗布量は1回あたり2mg程度となる。(表3)

一般成人の化粧品からのパラベン類の皮膚吸収の実態を把握するため、濃度の明らかな市販化粧水(メチルパラベンを1200ppm含む)を2ml塗布して1時間後に採血を行った。なお、化粧水の塗布は朝の洗顔後に行い、朝食を取らない条件で採血を行った。その結果、化粧水塗布後の血液では、ほとんどは不検出(定量限界2ppb)であった。

また、模擬化粧品でのマウス塗布実験では、塗布したブチルパラベンのマウス血中濃度は塗布後1時間で一部上昇するものの、著しい増加は見られずむしろ代謝物のp-ヒドロキシ安息香酸濃度の経時的な増加が確認された(図2)。模擬化粧水のマウス塗布実験では

メチルパラベンについて同様な傾向が現れたが、代謝物のpHBA濃度も1時間以降低下していた。なお、プロピルパラベンは検出されなかった。(図3)

#### C. 2 血液中の有機塩素化合物(HCB、クロルデン類、p, p'-DDE)

東海大学病院から提供を受けたさい帯血、母体血について、ヘッドスペース-SPME-GC/MS法を用いて、内分泌かく乱作用が疑われているクロロベンゼン類(HCB)と有機塩素化合物であるクロルデン類、p, p'-DDEを併せて測定した。その結果、クロルデン類ではtrans-ノナクロルが高頻度で検出された。また、HCB、p, p'-DDEも、すべての試料から検出された。また、3種の化学物質濃度には概ね相関が見られた。また、同一提供者からのさい帯血及び母体血中の各物質の濃度を比べた結果を図に示す。各物質のさい帯血中濃度は母体血中濃度に比べておよそ半分程度であった。

(図4)

#### D. 考察

平成11年度厚生科学研究「内分泌かく乱化学物質に関する生体試料(さい帯血等)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」においてヒトが経口から摂取したパラベン類が比較的速やかに吸収され、また、代謝を受けて数時間以内に尿に排泄されるほか、p-ヒドロキシ安息香酸に代謝されることが確認されている。今回、さい帯血と母体血(母乳を含む)中のパラベン類の測定を行った

が、検出されたパラベン類の種類は一致しなかった。これは、血液採取時期に数日というタイムラグがあったためと考えられる。しかし、さい帯血からメチルパラベンほかのパラベン類が検出されたことは水溶性の高いパラベン類は比較的容易に胎盤を通過するものと考えられた。

化粧品によるパラベン類の皮膚吸収では、化粧品の使用量が1回あたり2～3ml程度で、含まれるパラベン量は2～3mgと推定される。パラベン類は数時間以内に血液に吸収されると推定されるが代謝も同時に進むことからヒト血液中では化粧品由来のパラベン類濃度は、高い値になりにくいと推定された。

なお、パラベン類を摂取する経路として、平成11年度の報告書で栄養ドリンク等食品以外からの暴露があることを示したが、妊娠、出産という事象では医療用具、医薬品等による母体へ寄与も大きいと考えられる。今後、出産における医療現場で使用される薬剤や用具等におけるパラベン類使用情報を収集する必要があると考えられる。

内分泌かく乱物質であるクロロベンゼン類代表のHCBに加え、生体中で同様な挙動をされると思われる有機塩素化合物のクロルデン類及びDDEに加え、母体血とさい帯血の比較を行った。測定法として、血清中脂肪分の抽出等の前処理をすることなく、ヘッドスペース-SPME-GC/MS法により測定した。本法は簡便に生体試料(血液中)中の化学物質濃度を把握できる特色がある。ただし、脂質等のマトリックス等の影響を受け

ることが知られているため、測定物質毎に対応したサロゲート(13C体や重水素体など)を加えて測定することが望ましい。

今回、さい帯血と母体血中のHCB、クロルデン類、DDEの比較を行った結果、HCBなど脂溶性物質は、さい帯における脂質の透過性の違いにより、さい帯血濃度は母体血液中の濃度の半分近くになったと考えられる。

HCB、クロルデン類、DDEなど有機塩素化合物のヒト暴露経路は食品、特に近海魚を摂取することが大きな要因となっているといわれ、食習慣が個人の血液中内分泌かく乱化学物質濃度に影響している。そのため、個人の健康管理の面で、簡易分析法の普及は重要であり、食生活の健康管理に有効な手段となると考えられる。

#### E. 学会発表

p-ヒドロキシ安息香酸の摂取と生体中濃度, 日本環境化学会9回環境化学討論会, 257(2000):

寺澤, 月岡, 吉田, 佐藤, 藤島(長野衛公研), 中澤(星薬科大)



表1 集計結果 さい帯血、母体血、母乳中のパラベン類分析結果 (単位:ppb)

さい帯血	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	S-11	S-12	S-13	S-14	S-15	S-16	S-17	S-18	S-19	S-20	
メチルパラベン	3.0	174	24.0	nd	1.9	13.8	5.7	11.8	6.1	15.1	20.5	7.1	18.5	nd	3.4	3.2	65.7	11.7	14.1	
エチルパラベン																				
イソプロピルパラベン																				
ブチルパラベン		14.8															4.4			
イソブチルパラベン																				
フェニルパラベン																				
p-ヒドロキシ安息香酸	6.6	21.4	10.7	6.5	6.6	6.8	6.4	10.3	6.8	18.1	11.5	9.0	9.6	21.7	6.5	2.1	11.3	9.7	5.6	
母体血	ho-1	ho-2	ho-3	ho-4	ho-5	ho-6	ho-7	ho-8	ho-9	ho-10	ho-11	ho-12	ho-13	ho-14	ho-15	ho-16	ho-17	ho-18	ho-19	ho-20
メチルパラベン	3.8	8.0	2.3	3.1	2.2	2.7	6.6	nd	3.4	1.7	3.4	2.6	5.2	3.9	6.6	3.3	nd	3.2	1.5	
エチルパラベン		3.4								2.0										
イソプロピルパラベン								2.0												
ブチルパラベン																				
イソブチルパラベン																				
フェニルパラベン																				
p-ヒドロキシ安息香酸	16.6	7.2	6.7	8.4	13.1	8.1	12.3	6.6	6.0	4.7	6.0	13.5	12.9	10.2	10.9	10.5	10.9	2.2	6.8	2.4
母乳	mi-1	mi-2	mi-3	mi-4	mi-5	mi-6	mi-7	mi-8	mi-9	mi-10	mi-11	mi-12	mi-13	mi-14	mi-15	mi-16	mi-17	mi-18	mi-19	欠測
メチルパラベン	6.2	nd	7.4	6.3	nd	6.7	6.5	nd	7.4	nd	3.6	1.6	nd	3.7	nd	nd	nd	nd	1.5	
エチルパラベン																				
イソプロピルパラベン																				
ブチルパラベン																				
イソブチルパラベン																				
フェニルパラベン																				
p-ヒドロキシ安息香酸	5.4	7.1	5.3	6.6	6.7	8.7	4.9	8.5	10.5	13.9	7.0	4.9	2.7	6.8	8.6	6.6		4.8	7.4	

**表2 さい帯血、母体血、母乳の集計結果**

(単位:ppb)

さい帯血	検出率	最大	最小	平均
メチルパラベン	17/19	174.0	1.9	24.1
エチルパラベン	0/19			
イソプロピルパラベン	0/19			
プロピルパラベン	2/19	14.8	4.4	9.6
イソブチルパラベン	0/19			
ブチルパラベン	0/19			
p-ヒドロキシ安息香酸	19/19	21.7	2.1	10.1
母体血	検出率	最大	最小	平均
メチルパラベン	18/20	8.0	1.7	3.8
エチルパラベン	2/20	3.4	2.0	2.7
イソプロピルパラベン	1/20	2.0	2.0	2.0
プロピルパラベン	0/20			
イソブチルパラベン	0/20			
ブチルパラベン	0/20			
p-ヒドロキシ安息香酸	20/20	16.6	2.2	9.1
母乳	検出率	最大	最小	平均
メチルパラベン	8/18	7.4	1.5	5.1
エチルパラベン	0/18			
イソプロピルパラベン	0/18			
プロピルパラベン	0/18			
イソブチルパラベン	0/18			
ブチルパラベン	0/18			
p-ヒドロキシ安息香酸	18/18	13.9	2.7	7.0

表3 化粧品中のパラベン類濃度の測定結果

分類	メチルパラベン	エチルパラベン	イソプロピルパラベン	ブチルパラベン	ラウリルパラベン	ステアロイルパラベン	ベンゾイルパラベン	フェニルパラベン	平均塗布量(仮定)	1回の塗布量(mg)
化粧水	1248	0	0	0	0	0	0	0	2ml	2.5
化粧水	936	0	0	0	0	0	0	0	2ml	1.9
化粧水	839	0	0	0	0	0	0	0	2ml	1.7
化粧水	1229	0	0	0	0	0	0	0	2ml	2.5
化粧水	0	0	0	0	0	0	0	0	2ml	0.0
乳液	3021	0	0	0	0	0	0	0	1ml	3.0
乳液	11	0	0	0	0	0	0	0	1ml	0.0
美容液	0	0	0	0	0	0	0	0	2ml	0.0
乳液	771	0	0	0	0	0	0	0	1ml	0.8
乳液	0	0	0	0	0	0	0	0	1ml	0.0
薬用クリーム	1269	0	0	0	0	0	0	382	1ml	1.7
ファンデーション	12	0	0	0	0	0	0	0	0.3g	0.0
ファンデーション	0	594	0	0	0	0	0	0	0.3g	0.2
ファンデーション	0	692	0	0	0	0	0	0	0.3g	0.2

使用量の推定にあたって

化粧水は1回あたり2ml程度、乳液は1mlを使用すると仮定した。  
 化粧水では概ね1000ppm程度であり、パラベン類の塗布量は2ml \* 1000ug/ml = 2mg / 回になる。  
 乳液ではパラベンを用以いていないものもあるが、化粧水と同程度の濃度が標準的であった。  
 化粧品は複数の種類を使用する事からパラベンの使用量は加算される。

(70-1) 生体試料(血清、尿、母乳等)中のパラベン類及びパラヒドロキシ安息香酸の分析フロ

母乳等脂肪分の多い試料

