

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

化粧品中の微量不純物の分析法と実態調査に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 化粧品中の微量不純物の分析法と実態調査に関する研究・・・・・・・・・・1
五十嵐良明

II. 分担研究報告

1. 化粧品中の不純物濃度の実態調査に関する研究・・・・・・・・・・7
五十嵐良明
2. 化粧品中に不純物として含まれる金属の分析に関する研究・・・・・・・・19
秋山 卓美
- 化粧品規制における国際協力に関する報告・・・・・・・・・・29
化粧品製品中の微量水銀の許容量に関する勧告（翻訳）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・41

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
総括研究報告書（平成 25 年度）

化粧品中の微量不純物の分析法と実態調査に関する研究

研究代表者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 部長

研究要旨：日米欧カナダの化粧品規制当局及び業界団体から成る化粧品規制協力国際会議（ICCR）の微量汚染物ワーキンググループ（Traces WG）では、リスクアセスメント及び品質管理の点から最終製品中の不純物の許容限度値について議論を進めており、現在、鉛、1,4-ジオキサン及び水銀が検討されている。日本においては、これまで原料の品質管理がされていたが、国際的な対応のため今後は最終製品での品質確保が求められることになり、最終製品の分析法の開発や規制設定の根拠となるデータ収集を行う必要が出てきた。本研究は、ICCR の情報収集をするとともに、そこで検討されている物質の規制を念頭に入れた分析法を開発し実態調査することとした。本年度 1,4-ジオキサンについて、ヘッドスペース - ガスクロマトグラフ/質量分析法（HS-GC/MS）を用いた定量法を開発した。内標準物質とその濃度、加熱温度及び時間について最適条件を検討した結果、検量線は良好な直線性が得られ、定量下限値 1 µg/g で分析可能であった。本試験法は、5 機関での施設間共同研究で再現性のある結果が得られ、日本薬学会・衛生試験法注解の化粧品試験法に追記されることとなった。

化粧品中の水銀に関して、情報収集した。過去 5 年間、ナイジェリア、インド、サウジアラビア、メキシコ、米国、日本などで調査が行われていた。水銀は、ほとんどの製品で検出限界以下のレベルであるが、口紅やハーブ化粧品で検出される事例が認められた。意図的に水銀化合物を配合した美白クリーム製品に 10⁴ ppm という高濃度の水銀が検出されたという例もあった。しかし、ほとんどの化粧品からの水銀曝露量は、JECFA の許容摂取量未満となることがわかった。水銀の分析法としては、ICP、冷蒸気還元気化原子吸光法、冷蒸気還元気化原子蛍光法（CVAFS）などが挙げられており、これらの検出限界は ppt レベルであった。

以上、1,4 ジオキサンに関しては、開発した方法を用いて今後日本で販売されている製品の実態把握することが可能となった。水銀については化粧品におけるリスクと規制管理の必要性を考えられることができ、実態調査に向けた検査法の適用可能性について検討を進めることとした。

研究分担者

秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 室長

A. 研究目的

日米欧カナダの化粧品規制当局及び業界団体から成る化粧品規制協力国際会議（ICCR）では、化粧品中の不純物を取り上げ、リスク

アセスメント及び品質管理の点から含有量の規制値を提案するよう議論が進められている。現在検討されている対象は鉛、1,4-ジオキサン及び水銀である。

鉛は天然に存在し、他の原料成分の不純物あるいは製品製造時に混入が避けられない。欧州では化粧品中の不純物としての鉛を 20 ppm に規制し、カナダは 10 ppm で準備している。日本は医薬部外品原料規格で、混入が考えられる成分について総重金属量を 20 ppm 未満としている。ICCR 微量汚染物ワーキンググループ (Traces WG) では、最終製品中 10 µg/g (ppm) を推奨限度値とすることで確定する段階に入っており、今後欧州委員会 (EC) 消費者安全科学委員会 (SCCS) に意見を求めることになっている。

1,4-ジオキサンは非遺伝毒性物質であるが、国際がん研究機関 (IARC) は「ヒトに対する発がん性の可能性あり (グループ 2)」と評価している。1,4-ジオキサンは揮発性物質であり、吸入及び経皮曝露が考えられるが、日本をはじめ各国とも化粧品への残存はリスク上問題にならないレベルとして、特に規制措置はとっていなかった。ICCR Traces WG では各国のリスク評価文書の評価、これまでの NGO の実態調査結果、及び製造会社での達成可能性を議論した結果、最終製品中 10 µg/g は安全と考えた。しかし、化粧品中の 1,4-ジオキサンに関する情報はわずかであり、早急に化粧品中の 1,4-ジオキサンの実態を把握し、業界及び行政とも早急な対策を講じるべきか調べる必要がある。実態調査研究は、規制値設定の根拠となるデータ収集を行うため必要であるが、精度ある試験法による正確な分析値を提出しなければならない。本年度は実態調査を行うための準備として、他の法規制を参考に、ヘッドシャンプー等の界面活性剤含有製品中の 1,4-ジオキサン分析法を策定する。

米国及びカナダは、化粧品全般について不純物としての水銀をそれぞれ 1 ppm 及び 3

ppm とする規制値を設けている。欧州と日本では意図的な水銀化合物の配合を禁止している。水銀の有害性については周知であり、化粧品への配合は考えられないとしているが、詳しい実験データはなかった。そこで、ICCR Traces WG で議論されている水銀の推奨値が実態に即した健康リスク管理に沿ったものがどうか明らかにするため、これまでの違反事例報告を精査した。また、水銀の分析法について調査し、製品の種類に応じた前処理法や適用可能性を明らかにすることにした。

B. 研究方法

1,4-ジオキサンの分析法として、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ/質量分析法 (HS-GC/MS) を用いることにした。内標準 (IS) はフルオロベンゼン (FB)、1,4-ジオキサン- d_8 (d_8) を混合し、1,4-ジオキサン標準原液を種々の濃度で添加した。精製水に 1,4-ジオキサン添加内標準溶液を加えたものを試料として、内標準の濃度、添加量、ヘッドスペースバイアルの加熱条件、定量範囲等について検討し、最適な分析条件を決定した。5 機関での施設間共同研究を実施した。確立した標準試験手順に従って同一検体を検査し、それぞれの 1,4-ジオキサンの定量結果を比較した。一部ポリオキシエチレン系界面活性剤が配合されたシャンプー、ハンドソープ、ボディソープ等を分析し、得られた定量値と製品の成分表示との関係、1,4-ジオキサンの生成機構について推測した。

ICCR Traces WG に参加し、化粧品製品中の水銀についての報告書作成に協力するとともに製品中の水銀量の調査に関する情報収集を行った。また、過去 5 年間に発表された、化粧品中の水銀量や曝露に関する学術論文を検索し、分析法開発に重点が置かれた報告と市場製品等による曝露実態調査に重点が置かれた報告に分類して内容を調査した。

C. 研究結果

1. 化粧品中の不純物濃度の実態調査に関する研究

界面活性剤配合試料については液液抽出での目的成分の分離は困難であること、化粧品には様々な添加剤が配合されていること、及び1,4-ジオキサンは揮発性物質であることから、試料からの溶媒等での抽出操作を行わず前処理のいらぬヘッドスペース-ガスクロマトグラフ/質量分析法(HS-GC/MS)を分析法として採用することにした。また、内標準法と標準添加法を組み合わせることによって、マトリックスの影響を最小限に1,4-ジオキサンを定量する試験法とした。

内標準(IS)は、他成分との分離の程度からフルオロベンゼン(FB)及び1,4-ジオキサン-d₈(d₈)を使用した。ヘッドスペースバイアルの最適な加熱温度及び時間条件を決定した。1,4-ジオキサンの検量線は良好な直線性があり、検出下限値は0.5 µg/g、定量下限値は1 µg/gであった。施設間共同試験では分析装置等に違いはあったものの、1,4-ジオキサンの定量値にほとんど差はなかった。

今回分析した試料では、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウムを含む台所用合成洗剤2製品の含量が高かった。また、ポリオキシエチレン系界面活性剤の成分表示があり、その記載順位が上位の製品ほど、1,4-ジオキサンの検出量が多い傾向があった。

2. 化粧品中に不純物として含まれる金属の分析に関する研究

ICCR Traces WGでは主に先進国における調査結果を入手することができた。Health Canadaが行った化粧品、タトゥーインク、フェイスペインティング合計171製品を対象に行った3回の調査ではほとんどが不検出であり、2製品で1471±947 ppb及び160±240 ppb検出された。ドイツBVLが行った2回の調査では製品群毎の平均値は18-50 ppb及び24-50 ppbであり、最も他含量が高かった

製品で4.4 ppmであった。

一方、文献調査では発展途上国における近年の化粧品中水銀含量や曝露実態に関する情報も得られた。タイの病院におけるアレルギー調査、ニューヨーク市における尿中水銀濃度調査、メキシコ及びサウジアラビアにおける美白クリーム中の水銀含量調査、日本も含めた各国で購入可能な化粧品に関する水銀含量調査から白降汞等の水銀化合物を10⁴ ppmを超える濃度で配合した美白クリームが、禁止されている国でも未だに使用されている実態が判明した。また、イラン女性を対象にした毛髪と爪に存在する水銀の調査では平均約1 ppmという結果が得られているが、化粧品の使用頻度と関連が見られている。インドにおけるハーブ化粧品のうち約10%に1 ppmを超える水銀が検出された。

化粧品中の水銀分析法開発に関する近年の報告として、システインを結合したセルロースファイバーを充填したミニカラムを用いて無機水銀、メチル水銀ともに濃縮と精製を行うことができ、原子蛍光分析により1 pptの検出限界を得た報告、イオン液体を用いた分散液液マイクロ抽出により無機水銀及び有機水銀を数百倍に濃縮して、1.3-5.4 pptの検出限界を得た報告、6-メルカプトニコチン酸を用いて作製したモノクローナル抗体を利用したELISA法により良好な添加回収率を示す分析法を開発した報告が挙げられた。

D. 考察

1,4-ジオキサンはポリオキシエチレン系界面活性剤の製造過程で副生成して残存し、界面活性剤を主原料とするシャンプーなどを使用することにより、消費者が経皮及び吸入曝露を受ける可能性がある。ICCR Traces WGは現状の界面活性剤含有製品は十分安全性が保たれているとしつつも、できるだけ毒性のある物質の含有量は減らすべきであること、製造会社での副生成物の除去率達成可能性が

ら最終製品中の推奨限度値を報告しようとしている。開発したヘッドスペース - GC/MS による定量法は、施設間共同試験を行うことによって、その精度と頑健性を確認することができた。試料のクロマトグラムに妨害はなく、1,4-ジオキサンを良好に分析できることがわかった。本法は、日本薬学会・衛生試験法注解の化粧品試験法として記載されることとなり、今後利用が進むことと思われる。

ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸塩の成分表示があり、その記載順位が上位のほど 1,4-ジオキサンの検出量が多い傾向が見られた。このことから、本界面活性剤が 1,4-ジオキサンの量に寄与していることが明らかになった。ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウムは、1-ドデカノールをエトキシ化し、硫酸エステル化後に炭酸ナトリウムにより中和して合成するが、硫酸エステル化の製造工程において副生成物として生成する可能性が考えられた。今後開発した方法を用いて、同様の原料やこれを含む製品について調査を進める予定である。

主に先進国における調査においては、ほとんどが WHO の基準を下回っており、JECFA などで設定されている許容摂取量を上回る可能性はないと考えられたが、主に発展途上国で流通あるいは製造される製品調査からは、数 ppm の水銀を含む製品の存在や白降汞を主成分とする美白製品の使用が確認され、それが原因と思われるヒトでの曝露が見受けられた。

一方、水銀の分析法は高感度の方法が確立されているが、近年は、より高感度で選択性の高い分析法の開発が意欲的に行われ、化粧品等に ppt オーダーで含有される水銀を分析する方法が報告されていることがわかった。これらの情報は水銀分析法の開発や日本の実態と規制の必要性の検討に役立つと考えられる。

E. 結論

国際的に化粧品中の 1,4-ジオキサンに関する議論が進められている。1,4-ジオキサンは、ポリオキシエチレン系界面活性剤の製造過程で副生成する物質であるが、これまで日本市場製品の分析例はほとんどなかった。今回、ヘッドスペース - GC/MS による界面活性剤を配合するシャンプー等製品中の 1,4-ジオキサンの分析法を開発した。施設間共同試験を行い、その精度と頑健性を確認した。1,4-ジオキサン含有量はポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸塩の配合量に関係することがわかった。今後、本試験法を用いて多くの製品及び原料について分析を進め、日本の実態と規制の必要性を明らかにする予定である。

日本では水銀に関しては原料の品質管理によって最終製品の品質が確保されるとし、最終製品に対して規制という考えがなかったが、ICCR Traces WG への参加と文献調査により諸外国での製品中濃度調査や曝露量調査に関する有用な情報を得た。分析法に関しての情報と合わせ、分析法の開発や日本の実態と規制の必要性を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tahara, M., Obama, T., and Ikarashi, Y. Development of analytical method for determination of 1,4-dioxane in cleansing products. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 35, 575–580 (2013)

2) 五十嵐良明, 原俊太郎. 化粧品の機能性と安全性を支える科学. *YAKUGAKU ZASSHI*, 134, 25-26 (2014)

2. 学会発表

1) 田原麻衣子, 小濱とも子, 五十嵐良明. 化粧品中 1,4-dioxane の分析法の開発および製

品の定量．第 38 回日本化粧品学会（2013.6）

2) 田原麻衣子，小濱とも子，五十嵐良明．界面活性剤配合製品中の 1,4-ジオキサン分析法の検討．第 50 回全国衛生化学技術協議会年会（2013.11）

3) 小濱とも子，五十嵐良明．化粧品中の微量鉛不純物の分析法設定に関する検討．第 50 回全国衛生化学技術協議会年会（2013.11）

4) 五十嵐良明，田原麻衣子，小濱とも子，林正人，安田純子，武知めぐみ，久世哲也，高野勝弘，宮澤法政，小島 尚，坂口 洋，藤井まき子．生活用品試験法 化粧品試験法 1,4

- ジオキサン．日本薬学会第 134 年会（2014.3）

H．知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
化粧品中の微量不純物の分析法と実態調査に関する研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

化粧品中の不純物濃度の実態調査に関する研究

研究分担者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 部長
研究協力者 田原麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部
小濱とも子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部

研究要旨：化粧品に混入する可能性のある不純物に対しては、最終製品中の限度値を定めるよう化粧品規制協力国際会議(ICCR)の微量汚染物ワーキンググループ(Trace WG)において国際的な議論が進められている。例えば、1,4 - ジオキサンは発がん性の可能性が知られ、ポリオキシエチレン系界面活性剤に副生成物として混入する可能性が指摘されている。ICCR Trace WG による 1,4 - ジオキサンのリスク評価では、化粧品中に一定濃度では安全性が確保されているとしているが、現状本物質に対する規制等は欧米でもなく、含有量に関する情報も極めて限られている。さらに、日本では原料の品質管理によって最終製品の品質と安全性が確保されるとしており、最終製品中の 1,4-ジオキサンの実態は不明である。本研究は、最終製品中の不純物の実態調査を行い、日本の業界及び行政として早急な対策を講じるべきか、資料として示すことを目的とした。調査研究は精度ある試験法によって正確な分析値を出ることが求められる。本年度は、界面活性剤を配合するシャンプー等製品中の 1,4-ジオキサンの分析法を開発した。ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ/質量分析法 (HS-GC/MS) による定量法確立のため、添加回収試験等により、内標準物質とその濃度、バイアル加熱温度および時間等の最適条件を検討した。1,4-ジオキサンの検量線は良好な直線性が得られ、定量下限値 1 $\mu\text{g/g}$ で分析可能であった。ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウムの合成経路を解析した結果、1,4-ジオキサンは、ポリオキシエチレンラウリルエーテルから硫酸塩に変換する工程において副生成物として生成し、製品中に残存すると考えられた。製品におけるポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸塩界面活性剤の成分表記順位と 1,4-ジオキサン濃度との関係について調べた結果、その界面活性剤の配合量、及び界面活性剤中の 1,4-ジオキサン濃度が要因となっていることを明らかにした。本試験法について 5 施設での共同研究を実施した。それぞれの施設で所有する装置や条件に差はあったが、再現性のある結果が得られた。これにより、本法は日本薬学会・衛生試験法注解の化粧品試験法として追加記載されることとなった。今後、本試験法を用いて多くの製品及び原料について分析を進め、日本の実態と規制の必要性を明らかにする予定である。

A . 研究目的

日米欧カナダの化粧品規制当局及び業界団体から成る化粧品規制協力国際会議 (ICCR) の微量汚染物ワーキンググループ (Trace WG) は、ヒトでの安全性を第一に科学的なリスクアセスメント、品質管理、達成可能性、及び適切な分析法を考慮し、製品中の微量汚染物の許容限度値の設定に向けて議論を進めている。現在検討されている物質は、鉛、1,4-ジオキサン及び水銀である。

ICCR Trace WG では鉛については最終製品中 10 µg/g (ppm) を推奨限度値とすることで確定する段階に入っており、今後欧州委員会 (EC) 消費者安全科学委員会 (SCCS) に意見を求めることになっている。化粧品のようグローバルに展開される製品は、地球規模の国際的対応が求められる。これまで日本は、鉛化合物および水銀化合物を化粧品に成分として配合することを禁止しており、医薬部外品原料規格には、混入が予想されるほとんどの原料で鉛に換算した総重金属量を 20 ppm 未満とすることとしている。このように日本は原料の品質管理をすることによって最終製品の品質が確保されるとしていたため、不純物に関して原料に対する純度試験はあっても最終製品に対してはなかった。今後は、原料の品質管理の徹底、あるいは最終製品でのチェックが必要となる。さらに、重金属といった総括的有害金属の分析から、個々の有害金属の精密分析に変化している。鉛については、自然界に比較的多く存在し、原料成分の不純物あるいは製品製造時の混入が避けられない。適切な分析法による継続的な実態調査が求められている。

化粧品において界面活性剤は、油性成分の分散、可溶化、浸透、洗浄、発砲、湿潤などの多様な作用をもたらすため、欠かせない成分である。1,4-ジオキサンは、それ自体が化粧品原料として使用されることはなく、ポリオキシエチレン系界面活性剤の製造過程で副

生成する可能性があり、原料及び製品に混入すると言われている。1,4-ジオキサンは PRTR 法 (化学物質排出把握管理促進法) の第 1 種指定化学物質にも指定されており、動物に対する急性毒性やヒトに対する眼・鼻・咽頭への刺激性、脳・腎臓・肝臓への障害が知られている。また、非遺伝毒性物質であるが、国際がん研究機関 (IARC) は「ヒトに対する発がん性の可能性あり (グループ 2)」と評価している。1,4-ジオキサンは揮発性物質であることから、吸入及び経皮曝露が考えられる。ICCR Trace WG では各国のリスク評価文書の評価、これまで報告されている実態調査結果、及び製造会社での達成可能性を議論した結果、適切な期間内に段階的にかつ最終的には 10 µg/g とすることで意見が調整されつつある。

これまで 1,4-ジオキサンの化粧品への混入量はリスク上問題にならないレベルとして、各国とも規制措置はとっていなかった。ICCR から提出される値はあくまで推奨値であり、対応については各国にまかされる。しかし、ある国でこれに基づいた規制が打ち出された場合、国際的な流通が行われている化粧品は結果的には対応が求められる。日本において 1,4-ジオキサンの化粧品への混入量に関する情報はほとんど報告されておらず、企業が 10 µg/g という数字を達成できているかどうかはわからない。早急に化粧品中の 1,4-ジオキサンの実態を把握し、業界及び行政とも早急な対策を講じるべきか調べる必要がある。

実態調査研究は、規制値設定の根拠となるデータ収集を行うことで、精度ある試験法による正確な分析値を提出することが必須である。例えば、1,4-ジオキサンの試験法は水道基準に関する省令に定められているが、化粧品等に適用するような確立した試験法はない。そこで、本年度研究は、化粧品中の 1,4-ジオキサン分析法を策定する。他の法規制を参考

に、ヘッドスペース - ガスクロマトグラフィー / 質量分析法 (GC/MS) による定量法を開発し、今後の界面活性剤含有製品の実態調査を行うための準備を行った。また試験法としての頑健性を確認するため、複数機関でのバリデーション研究を実施した。

B. 研究方法

1. 試薬

1,4-ジオキサン 0.2 g を精密にはかり、メタノールで溶かし 20 ml としたものを、1,4-ジオキサン標準原液とした。内標準 (IS) はフルオロベンゼン (fluorobenzene, FB)、1,4-ジオキサン-*d*₈ (*d*₈) 及び *p*-ブromofluorobenzene, pBF) を検討した。FB のメタノール溶液と *d*₈ のメタノール溶液を混合、それぞれが 50 µg/ml 及び 2500 µg/ml となるようメタノールで希釈したものを内標準溶液とした。この内標準溶液 1.0 ml をメスフラスコにとり、1,4-ジオキサン標準原液をそれぞれ 0、25、50、100、250 および 500 µl 加え、さらにメタノールを加えて 10 ml としたものを、1,4-ジオキサン添加内標準溶液とした。

2. 試料

界面活性剤、特にポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム (ラウレス硫酸ナトリウム) またはポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸アンモニウム (ラウレス硫酸アンモニウム) の記載のある製品を中心に、東京都及び神奈川県内の薬店及びスーパー等から購入した。

3. 装置及び器具

ヘッドスペースサンプラーは PerkinElmer 社製 TurboMatrix 40 を、ガスクロマトグラフ / 質量分析計 (GC/MS) は島津製作所製 GCMS-QP2000Plus を用いた。ヘッドスペースバイアル (20 mm・20 ml Clear Crimp Top Vial with White “P” and Writing Patch (REV.B)、テフロンコート・シリコンゴムセ

プタム、キャップ、スタースプリング (使用温度 220 °C まで) は PerkinElmer 社から購入した。

4. 試料の調製

試料約 1 g をバイアルに精密にはかり、各濃度の 1,4-ジオキサン添加内標準溶液を 20 µL ずつマイクロシリンジで加え、ただちにセプタムとアルミキャップで密栓した。各 1,4-ジオキサン添加量につき 3 本ずつ用いた。試料は用事調製を行い、調製後、直ちに測定に供した。

5. 定量

バイアルは 80 °C で 20 分間加熱し、1 分間加圧後 0.1 分間 110 °C に加熱したニードルでヘッドスペースガスを下記条件のヘッドスペース - ガスクロマトグラフ / 質量分析計に注入し、得られたそれぞれのピークの保持時間と質量スペクトルを比較して定性した。それぞれのモニターイオンにおける 1,4-ジオキサンと内標準物質のピーク面積比を求めた。バイアルに添加した 1,4-ジオキサン量を試料採取量で除したものを 1,4-ジオキサン濃度 (µg/g) として横軸に、1,4-ジオキサンと内標準物質とのピーク面積比を縦軸にして、プロットした。これらのプロットから近似式を作成し、得られた回帰式の Y 値が 0 を示すときの X 値を、試料中の 1,4-ジオキサン濃度 (µg/g) として算出した。

ガスクロマトグラフィー / 質量分析の条件

カラム : 6 % cyanopropylphenyl - 94 % methylpolysiloxane (0.25 mm i.d. × 60 m, 膜厚 1.40 µm, InertCap 624, GL Science)

カラム温度 : 40 (1 min), 40 ~ 240 (8 /min, 昇温), 240 (3 min)

注入口温度 : 200

キャリアーガス : He, 1.5 mL/min

注入方式 : スプリット / スプリットレス

イオン化法 : 電子イオン化法 (EI)

イオン化電圧 : 70 eV

イオン源温度 : 200

インターフェース温度：200

検出法：スキャン法 (m/z 40 ~ 300) / 選択イオン検出法 (SIM)

モニターイオン：1,4-ジオキサン (m/z 88), 1,4-ジオキサン- d_8 (m/z 96), フルオロベンゼン (m/z 96), *p*-プロモフルオロベンゼン (m/z 95)

6. 施設間共同試験

5 施設で実施した。1 製品、同じロットの 1,4-ジオキサン、1,4-ジオキサン- d_8 及びフルオロベンゼンを各施設に配布した。標準溶液の調製法や定量法、GC/MS 条件等の標準プロトコールを明示したのも配布したが、各施設で所有する装置とその操作条件に従って分析するようにし、異なる操作手順の部分は報告させた。検量線及び製品中の定量結果をとりまとめ、検査法としての妥当性を評価した。

C. 研究結果

1. 分析条件の検討

1-1. 試料調製法および定量方法

界面活性剤が配合されている試料は振とうすると発泡し、液液抽出ではエマルジョンを形成して目的成分をうまく分離できない。そこで、1,4-ジオキサンが揮発性物質であることを利用し、前処理の必要のないヘッドスペースガス法で分析することにした。ヘッドスペース GC/MS では、試料ごとにマトリクスや共存物質の影響があることから、標準添加法を用いた。試料の性状によっては、バイアル中の試料量が多いと、標準添加での濃度の均一化が図れなくなるため、バイアルへの採取量は約 1 g とした。

1-2. 内標準の選定および濃度

条件検討においては、精製水を試料とし、1,4-ジオキサン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と IS との混合液を作製した。1 条件について 3 回の繰り返し測定を行い、混合液中の 3 化合物のピーク面積を比較して、最適条件を決定した。内標準

(IS) の候補に挙げたフルオロベンゼン (FB)、1,4-ジオキサン- d_8 (d_8) 及び *p*-プロモフルオロベンゼン (*p*BF) の保持時間はそれぞれ、11.1, 12.0, 18.6 分であった。*p*BF は、1,4-ジオキサンとの分離は良いが保持時間が離れていること、製品の他の成分のピークは 15 分以降に多く観察され重なったことから、IS には FB および d_8 を使用した。

1-3. ヘッドスペースバイアルの加熱温度

1,4-ジオキサンの沸点は揮発性物質としては比較的高いことから、なるべく加熱温度を高く設定したい。しかし水蒸気の影響が懸念されるため、80 を最高に、以下、70、60 及び 50 を検討した。FB は 70 で、 d_8 と 1,4-ジオキサンは 80 でそれぞれ最大値となったが、FB の面積値は 70 と 80 で大きく変わらなかった (Fig. 1(a))。よって、バイアルの加熱温度は 80 を選択した。

1-4. ヘッドスペースバイアルの加熱時間

バイアルの加熱時間を 15、20、25 及び 30 分間とし、各物質の得られるピーク面積を測定したところ、20 分間以上加熱するとほぼ一定となった。FB は 25 分間、 d_8 と 1,4-ジオキサンは 30 分間で最大となった (Fig. 1(b))。多検体を分析するためには測定時間は可能なだけ短い方がよいことから、ここでは 20 分間とした。1,4-ジオキサン及び IS のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

2. 検量線および測定精度

検量線は 1,4-ジオキサン 0.5 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で良好な直線性を示した。FB および d_8 のどちらの IS を用いても相関係数は 0.999 以上であった (Fig. 3)。0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のピーク面積は標準偏差 () の 3 倍以上であることから、これを検出限界値 (LOD) とした。また、定量下限値 (LOQ) は 10 以上で検量線が直線性を満足できる範囲 ($r > 0.995$) にある濃度で算出し、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

3. 製品の分析

1,4-ジオキサン濃度は、IS の FB 及び d_8

に対する比を算出し、検量線から求めた。その結果、どちらの IS を用いても同等の結果となり、他のピークとの重なりによる妨害はみられなかった。代表的な試料のクロマトグラムを Fig.4 に示した。Table 1 には d8 を IS として用いて算出した結果を示した。LOQ 以下で検出された製品については参考値とした。台所用合成洗剤 2 製品が高かったが、今回測定した製品に 25 µg/g を超えるものはなかった。これらの製品にはアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムがそれぞれ 44%および 33%含まれていた。今回試験したシャンプーでは、ポリオキシエチレン系界面活性剤の成分表示があり、記載順位が上位のほど、1,4-ジオキサンの検出量が多い傾向がみられた (Fig. 5)。

4. 施設間共同試験

5 施設で実施した。GCMS 装置は島津製作所製が 1 施設で、他は Agilent Technologies 社製であった。ヘッドスペースオートサンプラーは PerkinElmer 社製のものを所有するのが 2 施設、Agilent 社製が 3 施設であった。バイアルの加熱温度及び時間は同一条件で行われたが、ヘッドスペースガスの GC/MS への注入方式は装置に依存して、設定するパラメータ等違いがあった。カラムは InertCap 624 の他、Agilent Technologies 社の DB-624 を 2 施設が用いた。膜厚は全ての施設で同一であったが、1 施設のみカラム長が 30 m のものを用いた。温度条件は標準プロトコールに提示したとおりに設定された。He の流量は線速度を基にしたところもあり、0.75 ~ 1.5 ml/min であった。注入方式はスプリットレス、スプリットそれぞれで、スプリット比も装置感度によって差があった。MS 条件は、すべての施設が提示した条件と同一であった。

1,4-ジオキサンの定量に当たって、検量線の直線性やクロマトグラム上で妨害となるピークが出た等の問題点は報告されなかった。定量値は、2 つのどちらの IS を用いても同等

であった。5 施設の定量値は d8 を IS としたとき、2.56 ~ 2.77 µg/g とほとんど差がなく、再現性のある結果が得られた。本法は精度の高い頑健性のある試験法と判断できた。また、日本薬学会・衛生試験法注解の化粧品試験法として追加記載されることとなった。

D. 考察

1,4-ジオキサンはポリオキシエチレン系界面活性剤の製造過程で副生成し、除去されない場合、これを主とするシャンプーなどの製品を使用することにより、消費者が経皮及び吸入曝露を受ける。IARC は 1,4-ジオキサンを「ヒトに対する発がん性の可能性あり (グループ 2)」と評価しており、これをもって配合製品の危険性を訴えることがある。ICCR Trace WG では各国のリスク評価文書とこれまで報告されている実態調査の報告結果から、現状の界面活性剤含有製品は十分安全性が保たれているとしつつも、できるだけ毒性のある物質の含有量は減らすべきであること、製造会社での副生成物の除去率達成可能度から最終製品中の限量が議論されている。

日本ではこれまで洗剤等の少数の家庭用品等の分析があるだけで、どのような化粧品にどのくらい 1,4-ジオキサンが存在するのかほとんど情報がない。化粧品分野では原料の品質管理によって製品の品質確保がされるとの考えのため、特に最終製品の実態はわからなかった。今後基準値が設定されることになれば、国際貿易に関連し、速やかに現状把握が必要となる。実態調査は、精度ある試験法によって正確な分析値を提出することが必須である。そこで、化粧品中の 1,4-ジオキサンの試験法を開発することにした。水道法等の法規制を参考に、各種分析条件を整えたヘッドスペース - GC/MS による定量法を開発した。開発した方法は 5 施設での共同試験により、その精度と頑健性を確認することができた。

限られた製品であるが、1,4-ジオキサン濃

度を求めた。試料のクロマトグラムに妨害はなく、良好に分析できた。今回の中ではアルキルエーテル硫酸エステルナトリウムを数十%含有する台所用合成洗剤 2 製品の値が高かったが、25 µg/g を超えるものはなかった。ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸塩の界面活性剤の成分表示があり、その記載順位が上位のシャンプーで、値は高かった。すなわち本界面活性剤の使用量が多いほど、1,4-ジオキサンの検出量が多い傾向が見られた。ポリオキシエチレンアルキルエーテルとポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩の原料間で 1,4-ジオキサン検出量を比較したところ、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩の方が多かった(未記載)。ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウムは、1-ドデカノールをエトキシ化し、硫酸エステル化後に炭酸ナトリウムにより中和して合成するが、硫酸エステル化の製造工程において副生成物として生成する可能性が考えられた (Fig.6)。一部メーカーで「1,4-ジオキサンの生成を低減できるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩の製造方法」に関する特許が発明されている。今後開発した方法を用いて、同様の原料やこれを含む製品について調査を進める予定である。

E . 結論

化粧品規制協力国際会議 (ICCR) の微量汚染物ワーキンググループ (Trace WG) において、製品中の 1,4-ジオキサンの許容限度値の設定に向けて議論が進められている。1,4-ジオキサンは、シャンプー等に使用されることが多いポリオキシエチレン系界面活性剤の製造過程で副生成する物質であるが、これまで日本市場の製品について分析した報告例はなかった。本研究では、こうした界面活性剤を配合するシャンプー等製品中の 1,4-ジオキサンの分析法を開発した。ヘッドスペース - GC/MS による定量法は施設間共同試験

も行い、その精度と頑健性を確認することができた。1,4-ジオキサン含有量はポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸塩の配合の有無や量と関係することが示唆された。今後、本試験法を用いて多くの製品及び原料について分析を進め、日本の実態と規制の必要性を明らかにする予定である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Tahara, M., Obama, T., and Ikarashi, Y. Development of analytical method for determination of 1,4-dioxane in cleansing products. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 35, 575–580 (2013)
- 2) 五十嵐良明, 原俊太郎 . 化粧品の機能生と安全性を支える科学 . *YAKUGAKU ZASSHI*, 134, 25-26 (2014)

2 . 学会発表

- 1) 田原麻衣子, 小濱とも子, 五十嵐良明 . 化粧品中 1,4-dioxane の分析法の開発および製品の定量 . 第 38 回日本化粧品学会 (2013.6)
- 2) 田原麻衣子, 小濱とも子, 五十嵐良明 . 界面活性剤配合製品中の 1,4-ジオキサン分析法の検討 . 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013.11)
- 3) 小濱とも子, 五十嵐良明 . 化粧品中の微量鉛不純物の分析法設定に関する検討 . 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013.11)
- 4) 五十嵐良明, 田原麻衣子, 小濱とも子, 林正人, 安田純子, 武知めぐみ, 久世哲也, 高野勝弘, 宮澤法政, 小島 尚, 坂口 洋, 藤井まき子 . 生活用品試験法 化粧品試験法 1,4-ジオキサン . 日本薬学会第 134 年会 (2014.3)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他知的所有権の取得状況

なし

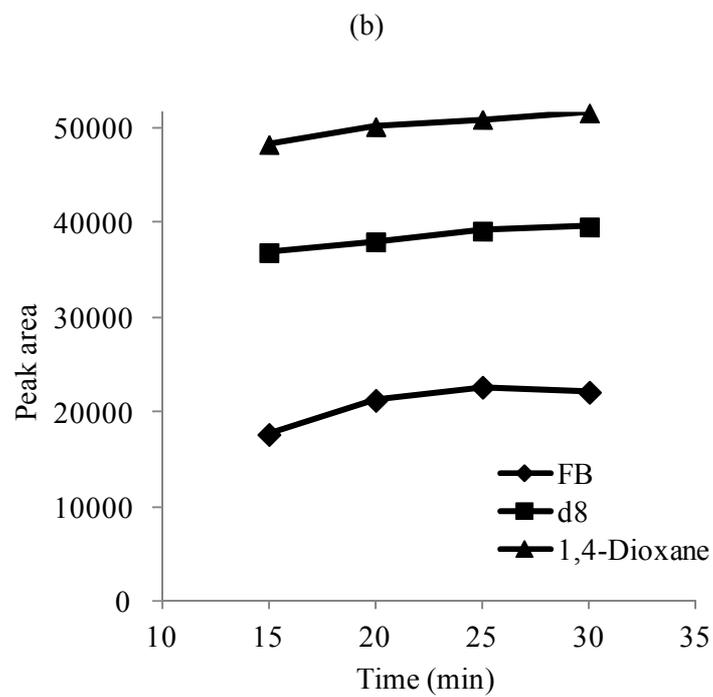
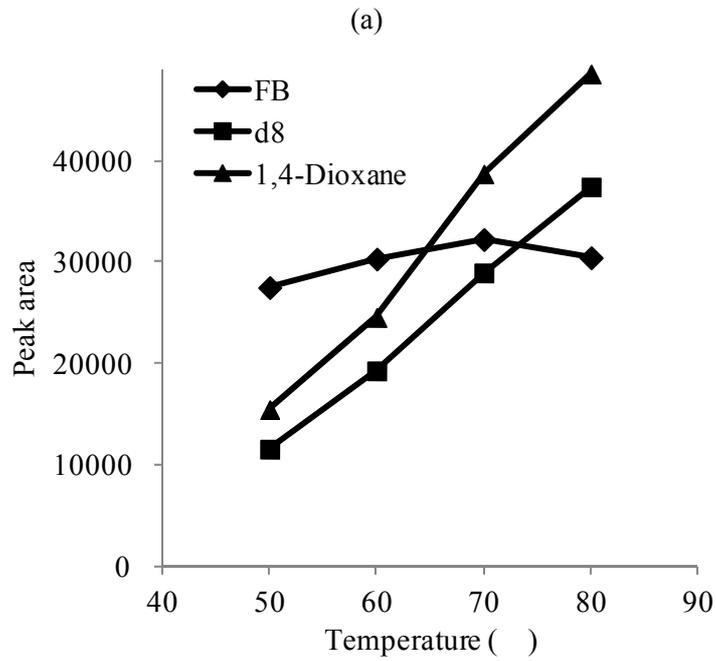


Fig.1. ヘッドスペースパイアルの加熱温度 (a) 及び加熱時間 (b) が 1,4-ジオキサン、フルオロベンゼン (FB) 及び 1,4-ジオキサン- d_8 (d8) のピーク面積に及ぼす影響

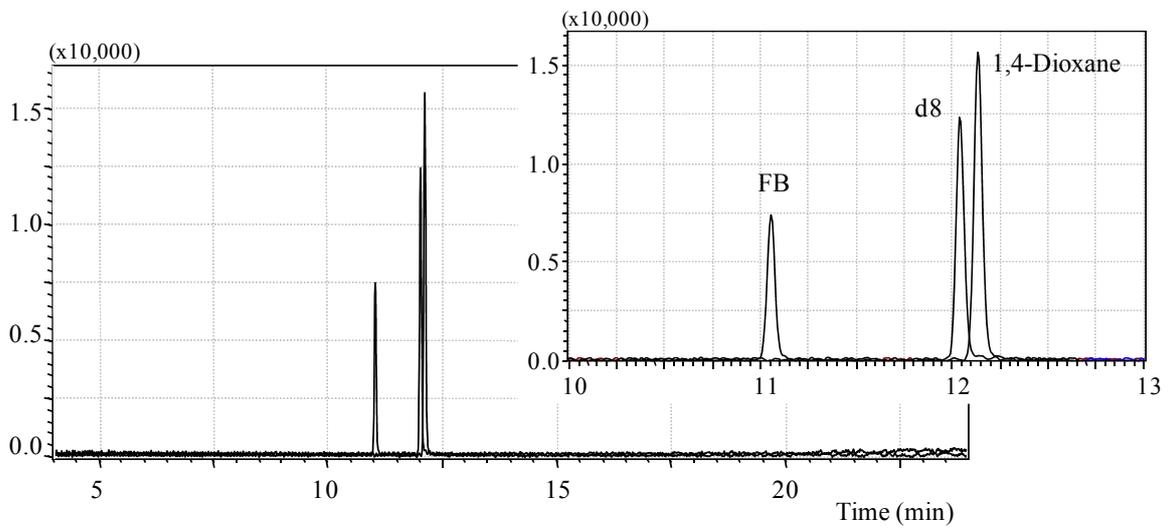


Fig. 2 最適分析条件での1,4-ジオキサンと内標準物質のクロマトグラム

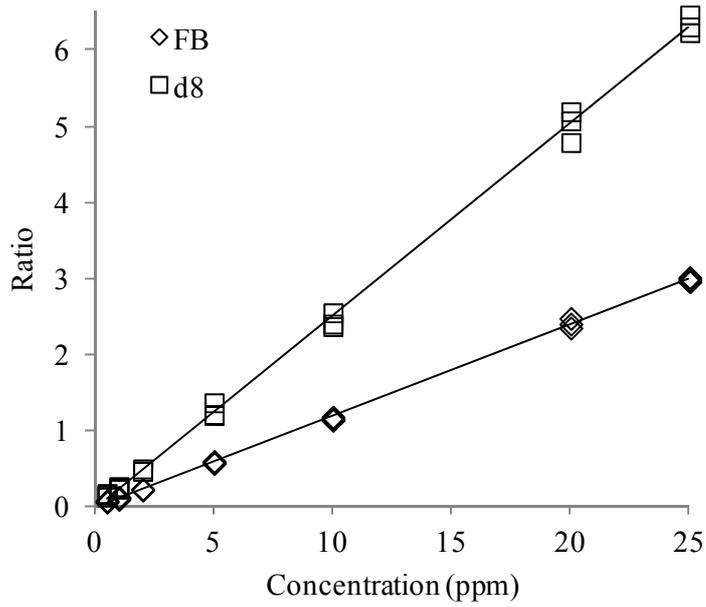


Fig. 3 精製水に添加したときの1,4-ジオキサンの検量線

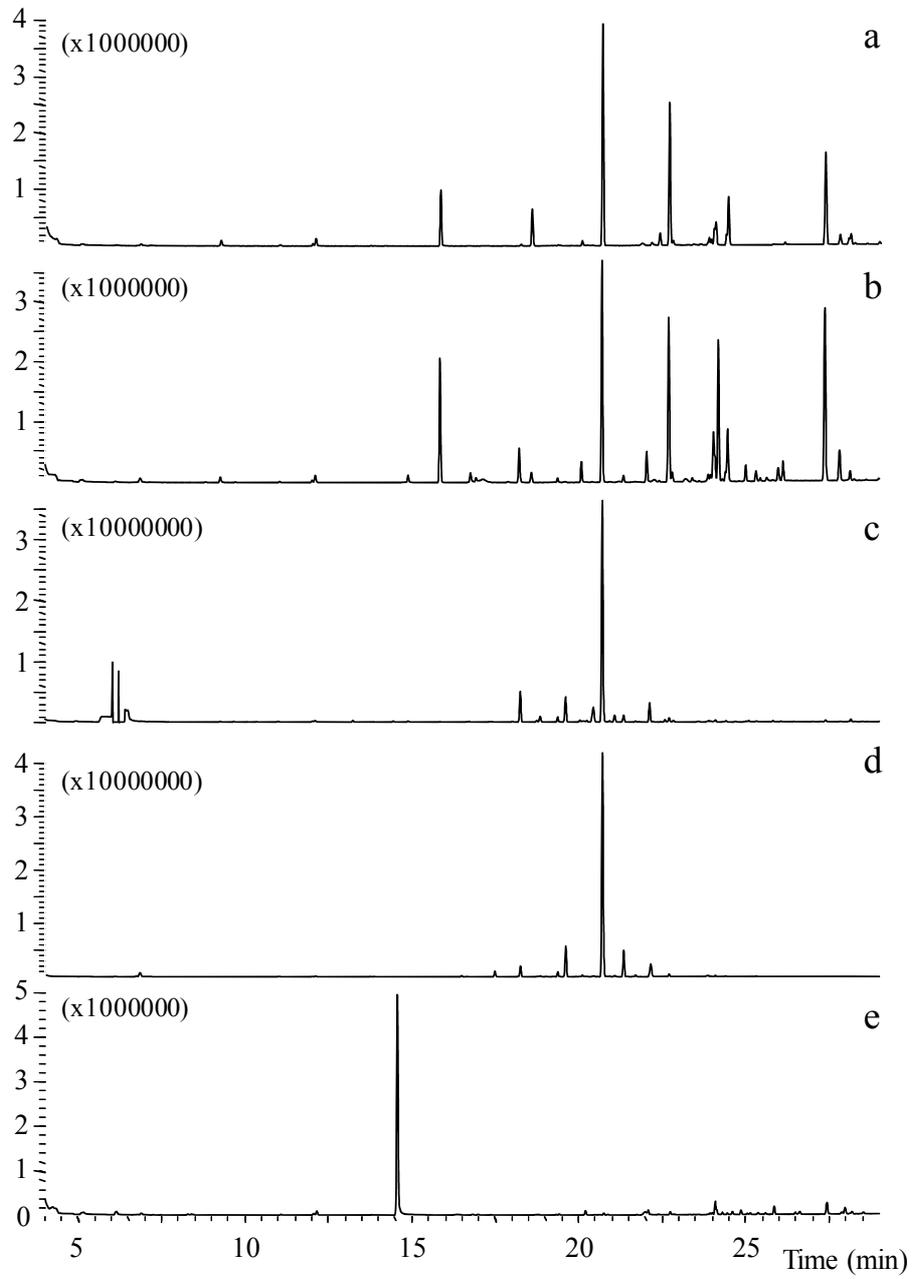


Fig.4. シャンプーD (a)、シャンプーE (b)、 台所用洗剤 (c)、 ハンドソープ (d) 及びボディソープのクロマトグラム

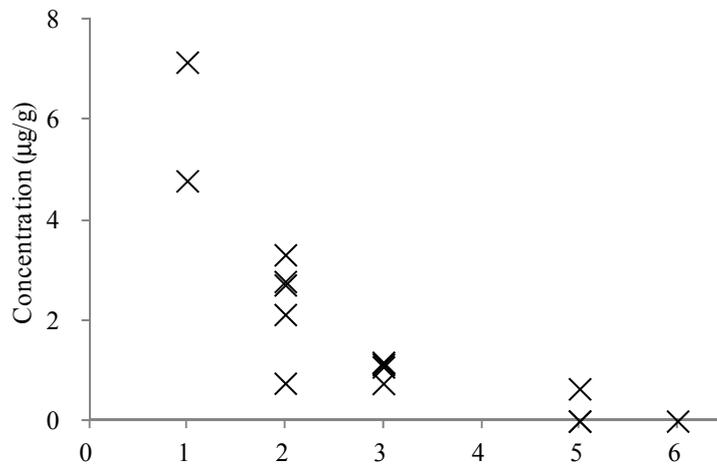
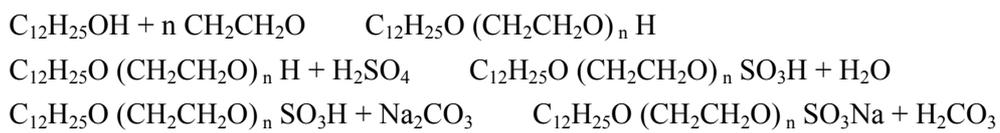


Fig. 5. ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸塩の表示記載順番と 1,4-ジオキサン濃度

(a)



(b)

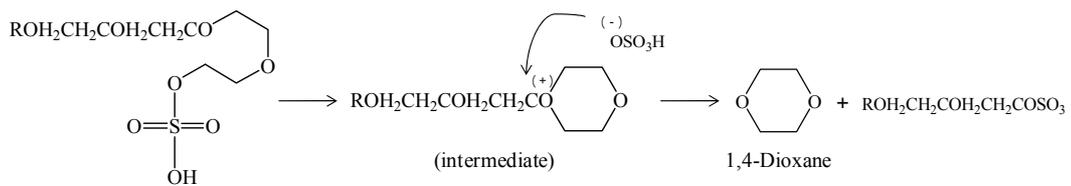


Fig.6. 1,4-ジオキサンの生成メカニズム

(a) ラウレス硫酸ナトリウム合成の主反応

(b) アルキルエーテル硫酸過程での 1,4-ジオキサンの副生成

表 1 . 各種試料の 1,4-ジオキサン濃度

記号 (Fig.4)	製品	主な界面活性剤	濃度 ($\mu\text{g/g}$)
a	シャンプーD	ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸アンモニウム液	2.78
b	シャンプーE	ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸アンモニウム液	2.71
c	台所用合成洗剤A	アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム	4.79
	台所用合成洗剤B	アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム	7.15
d	ハンドソープ	ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸アンモニウム	3.31
e	ボディ用洗剤	ラウレス硫酸ナトリウム	0.64

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
化粧品中の微量不純物の分析法と実態調査に関する研究
分担研究報告書（平成 25 年度）

化粧品中に不純物として含まれる金属の分析に関する研究

研究分担者 秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

研究要旨：化粧品に混入する可能性のある不純物に対しては、最終製品中の限度値を定めるよう化粧品規制協力国際会議 (ICCR) の微量汚染物ワーキンググループ (Trace WG) において国際的な議論が進められている。例えば、水銀は様々な化学種（元素、無機及び有機化合物）で存在するが、無機水銀は腎臓、元素水銀及び有機水銀は中枢神経に対し特に強い毒性を示す。米国とカナダでそれぞれ 1 ppm、3 ppm という規制値が色素原料及び最終製品に設けられ、欧州と日本では意図的な配合を禁止している。日本では水銀化合物を化粧品に成分として配合することが禁止、医薬部外品原料規格として総重金属量を 20 ppm 未満としており、原料の品質管理によって最終製品の品質が確保されとされていたため、水銀のみについて最終製品に対して規制という考えがなかった。今後国際的な対応のためには分析法の開発や規制値設定の根拠となるデータ収集を行う必要があり、製造事業者等が自ら試験を行えるように試験法に改良を行うことも必要である。そこで今年度は、ICCR に参加して情報収集するとともに、近年の水銀分析法や化粧品中の濃度やヒトにおける曝露に関して文献調査を行った。具体的にはまず、ICCR Traces Working Group による化粧品製品中の水銀についての報告書作成に協力した。過去 5 年間に行われた試験においてほとんどが検出限界以下であり、ごくわずかな製品で 0.16–4.4 ppm が検出されたのみであったこと、曝露量は最大でも JECFA の許容摂取量未満となることがわかった。文献調査を行い、分析法としては ICP、冷蒸気還元気化原子吸光法、冷蒸気還元気化原子蛍光法 (CVAFS) などが挙げられ、これらの検出限界は 0.1–1 ppt であった。また、Cys 修飾したセルロースを用いて前処理して CVAFS で検出した例や、ELISA 法も開発されていることがわかった。近年の化粧品中の水銀に関する報告についても調査した。ナイジェリア、インド、サウジアラビア、メキシコなどで調査が行われていた。水銀に関しては不検出が多いが、口紅やハーブ化粧品では WHO 基準を超えて含有される製品が存在した。また、美白クリーム製品で 10^4 ppm レベルの違反製品が報告されていた。今後、上記の情報を生かして分析法の開発や日本の実態と規制の必要性を検討する予定である。

A. 研究目的

日米欧カナダの化粧品規制当局及び業界団体から成る化粧品規制協力国際会議 (ICCR)

の微量汚染物ワーキンググループ (Trace WG) は、ヒトでの安全性を第一に科学的なリスクアセスメント、品質管理、達成可能性、及び適切な分析法を考慮し、製品中の微量汚

染物の許容限度値の設定に向けて議論を進めている。現在検討されている物質は、鉛、1,4-ジオキサン及び水銀である。

ICCR Trace WG では鉛については最終製品中 10 µg/g (ppm) を推奨限度値とすることで確定する段階に入っており、今後欧州委員会 (EC) 消費者安全科学委員会 (SCCS) に意見を求めることになっている。化粧品のようなグローバルに展開される製品は、地球規模の国際的対応が求められる。これまで日本は、鉛化合物および水銀化合物を化粧品に成分として配合することを禁止しており、医薬部外品原料規格には、混入が予想されるほとんどの原料で鉛に換算した総重金属量を 20 ppm 未満とすることとしている。このように日本は原料の品質管理をすることによって最終製品の品質が確保されることとしていたため、不純物に関して原料に対する純度試験はあっても最終製品に対してはなかった。今後は、原料の品質管理の徹底、あるいは最終製品でのチェックが必要となる。さらに、重金属といった総括的有害金属の分析から、個々の有害金属の精密分析に変化している。鉛については、自然界に比較的多く存在し、原料成分の不純物あるいは製品製造時の混入が避けられない。適切な分析法による継続的な実態調査が求められている。

水銀は様々な化学種 (元素、無機及び有機化合物) で存在するが、無機水銀は腎臓、元素水銀及び有機水銀は中枢神経に対し特に強い毒性を示す。米国とカナダでそれぞれ 1 ppm、3 ppm という規制値が色素原料及び最終製品に設けられ、欧州と日本では意図的な配合を禁止している。日本では水銀化合物を化粧品に成分として配合することが禁止、医薬部外品原料規格として総重金属量を 20 ppm 未満としており、原料の品質管理によって最終製品の品質が確保されることとしていたため、水銀のみについて最終製品に対して規制という考えがなかった。今後国際的な対応の

ためには分析法の開発や規制値設定の根拠となるデータ収集を行う必要があり、製造事業者等が自ら試験を行えるように試験法に改良を行うことも必要である。そこで今年度は、ICCR に参加して情報収集するとともに、近年の水銀分析法や化粧品中の濃度やヒトにおける曝露に関して文献調査を行った。

B. 研究方法

1. ICCR Traces Working Group

下記の日程で 1 時間ずつ 9 回行われた電話会議に参加した。

2013 年 4 月 24 日、5 月 8 日、5 月 22 日、6 月 5 日、8 月 7 日、11 月 27 日、2014 年 1 月 17 日、2 月 19 日、3 月 20 日

参加機関は下記の通りである。

The Canadian Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CCTFA、カナダ)、Health Canada(カナダ)、Cosmetics Europe (欧州)、EC Joint Research Centre (JRC、欧州)、Food and Drug Administration (FDA、米国)、The Personal Care Products Council (PCPC、米国)、日本化粧品工業連合会 (JCIA)、厚生労働省

2. 文献調査

過去 5 年間に発表された、化粧品中の水銀量や曝露に関する学術論文を検索し、分析法開発に重点が置かれた報告と市場製品等による曝露実態調査に重点が置かれた報告に分類して内容を調査した。

C. 研究結果

1. ICCR Traces Working Group への参加

ICCR Traces Working Group による化粧品製品中の水銀についての報告書作成に協力するとともに情報収集を行った。

過去 5 年間に行われた試験の概要は以下の通りである。

(1) Health Canada が 2008–2009 年に 114

化粧品を対象に行ったサーベイで 1 製品に 1471±947 ppb が検出された。

(2) Health Canada が 2010–2011 年にタトゥーインク 28 製品を対象に行ったサーベイで 1 試料に 160±240 ppb が検出された。

(3) Health Canada が 2012–2013 年にフェイスペインティング 29 製品を対象に行ったサーベイでは不検出であった。

(4) Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (ドイツ, BVL) が 2010 年に行った調査では、製品群毎の平均値は 18–50 ppb であり、最も含量が高かった製品で 4.4 ppm、2 番目に高かった製品で 165 ppb であった。

(5) BVL が 2011 年に行った調査では、製品群毎の平均値は 24–50 ppb であり、最も含量が高かった製品で 307 ppb であった。

以上のように、ほとんどが検出限界以下であり、ごくわずかな製品で 0.16–4.4 ppm が検出されたのみであったこと、曝露量は最大でも JECFA の許容摂取量未満となることがわかった。

報告書の和訳を本研究報告書の末尾に添付した。

2. 化粧品中の水銀量と曝露実態に関する報告の内容

2-1. 水銀の分析法開発に関する報告

(1) システインを結合したセルロースファイバーによる吸着

Chen, M.-L., Ma, H.-J., Zhang, S.-Q., Wang, J.-H., Mercury speciation with L-cysteine functionalized cellulose fibre as adsorbent by atomic fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrometry* **26**, 613–617 (2011).

この報告では、セルロースファイバーにシステイン (Cys) を結合させる (Cys ファイバー) ことにより、水銀とメチル水銀に対する吸着性が著しく向上させている。Cys ファイバーを充填したミニカラムに繰り返し試料を導入することにより水銀の濃縮と分離を同時

に行った。保持された水銀とメチル水銀は Cys の硝酸溶液により回収された。無機水銀は冷蒸気還元気化原子蛍光分析により定量した。総水銀をフレイム原子化法または加熱原子化法により定量し、差をメチル水銀量とした。1000 µL の試料溶液を用い、100 µL の溶出液を得た場合、無機水銀については検出限界が 1 ng/L で直線領域は 0.01–0.7 µg/L、メチル水銀については検出限界が 3 ng/L で直線領域が 0.03–2.0 µg/L であった。再現性は無機水銀が 0.1 µg/L において 1.5% RSD (n = 11)、メチル水銀が 1.0 µg/L において 2.6% RSD (n = 9) であった。認証標準物質 BCR176 および化粧品試料を分析することによりバリデーションを行った。水、化粧品抽出物および海藻中の水銀およびメチル水銀のスぺシエーションを行い、さらに添加回収試験では 0.3 µg/L の無機水銀を添加した化粧品において 95% の回収率を得るなど、良好な添加回収率が得られた。

この報告では、Cys による水銀の吸着を利用して 10 倍濃縮することにより、液状試料で 1 ppt という検出限界を達成している。Cys ファイバーが製品化されれば微量分析の手段として有用であるが、化粧品の場合はこれほど低い検出限界は求められるケースは多くない。

(2) イオン液体を用いた分散液液マイクロ抽出と HPLC/ICP-MS による水銀のスぺシエーション

Jia, X., Han, Y., Wei, C., Duan, T., Chen, H., Speciation of mercury in liquid cosmetic samples by ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrometry* **26**, 1380–1386 (2011).

この報告では、イオン液体を用いた分散液液マイクロ抽出と HPLC/ICP-MS を組み合わせ、液状化粧品中の水銀の定量を行っている。はじめに化粧品試料をいったん水で希釈して

得た 5.00 mL の試料溶液において無機水銀 (Hg^{2+})、メチル水銀 (MeHg^+) およびエチル水銀 (EtHg^+) をアンモニウムピロリジンチオカルバミン酸との錯体を形成させ、分散液マイクロ抽出により 1-ヘキシル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロリン酸塩中に抽出する。遠心分離により得た約 8 μL の沈殿をメタノールに溶解して HPLC/ICP-MS に導入して定量する。最適条件下では、 Hg^{2+} 、 MeHg^+ および EtHg^+ をそれぞれ濃縮係数 760、115 および 235 で得ることができた。 Hg として表した検出限界は Hg^{2+} については 1.3 ng/L、 MeHg^+ については 7.2 ng/L、 EtHg^+ については 5.4 ng/L であった。10 試行における相対標準偏差は Hg^{2+} 、 MeHg^+ および EtHg^+ についてそれぞれ 7.4%、5.2% および 2.3% であった。液状化粧品中の水銀のスペシエーションに適用することに成功し、 Hg^{2+} が主な化学形態であることが判明した。本法の正確度を検証するための添加回収試験も実施した。

この報告では、液体として存在する塩であるイオン液体で無機水銀および有機水銀を抽出することにより、高度な濃縮を実現している。化粧品試料中で 1.3 ppt という検出限界が得られている。本研究で用いられた 1-ヘキシル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロリン酸塩は安価であり、有用な分析法と考えられる。

(3) 新たなモノクローナル抗体を用いた ELISA

Wang, Y., Yang, H., Pschenitzka, M., Niessner, R., Li, Y., Knopp, D., Deng, A., Highly sensitive and specific determination of mercury(II) ion in water, food and cosmetic samples with an ELISA based on a novel monoclonal antibody. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 2519–2528 (2012).

この報告では、感度と選択性に優れたモノクローナル抗体を用いた間接競合 ELISA 法による Hg^{2+} の定量法の開発を試みている。ピリジン環にカルボキシル基とチオール基とい

う 2 つの配位子を持つ新規リガンド 6-メルカプトニコチン酸 (MNA) を用いて抗原調製を行った。マウスの免疫とハイブリドーマ作成により得られた Hg^{2+} に対するモノクローナル抗体を用いて ELISA 系を構築した。0.1–100 ng/mL で標準曲線が得られた。IC₅₀ は 1.12 ng/mL、検出限界は 0.08 ng/mL だった。交叉反応性は MNA、 CH_3Hg 、 $\text{CH}_3\text{Hg-MNA}$ に対して 2% 未満だった一方で Hg^+ と Au^{3+} に対してはそれぞれ 11.5%、4.4% であった。 Cu^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} のような陽イオンや Cl^- 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 HCO_3^- 、 F^- 、 SO_4^- のような陰イオンに対する交叉反応性は見られなかった。水、牛乳、緑色野菜、海藻、クレンジング、ナイトクリーム等の試料に Hg^{2+} を添加し、ELISA で分析した。80.0–113.0% という良好な回収率が得られ、変動係数は 1.9–18.6% であった。この ELISA 法と冷蒸気還元気化原子蛍光分析 (CVAFS) との相関を調べたところ、液状試料については 0.97、その他の試料については 0.98 であった。

この報告では、0.08 ppb という検出限界を得ている。CVAFS との相関は良好であるため、高価で設置スペースを必要とする分析装置を必要としない方法として期待される。

2.2 . 市場製品等による曝露実態に関する報告

(1) タイ国における化粧品成分による接触アレルギーの過去 10 年間の状況

Boonchai, W., Desomchoke, R., Iamtharachai, P., Trend of contact allergy to cosmetic ingredients in Thais over a period of 10 years. *Contact Dermatitis* **65**, 311–316 (2011).

この報告では、アジアでは近年行われていない化粧品成分による接触アレルギーの大規模調査を実施している。1999 年 1 月から 2008 年 12 月までバンコクの Siriraj 病院でパッチテストを受けた患者のうち少なくとも 1 つの化粧品成分に対して陽性を示した患者を対象に

した。イエイツの修正を含めたピアソンのカイ二乗検定またはフィッシャーの正確確立検定を用いて評価を行い、ボンフェローニの補正後に p 値 < 0.002 となる場合を統計学的に有意と判定した。その結果、1247 例（うち男性 239、女性 1008、平均年齢 38.5 歳）が対象となった。香料化合物と防腐剤が最も普遍的に確認されたアレルゲンであった。調査期間中に頻度が顕著に増加したアレルゲンは白降汞であり、1999–2003 年では陽性患者は 3.8% であったが、2004–2008 年では 14.9% であった ($p = 0.0008$)。

この報告は、タイにおいても禁止されている白降汞が未だに皮膚の脱色のために非合法に用いられていることを示唆している。化粧品中水銀濃度の管理の観点では考慮する必要はないが、環境曝露の要因の 1 つとして議論しても良いであろう。

(2) ニューヨーク市における無機水銀の曝露源としてのスキンケア製品

McKelvy, W., Jeffery, N., Clark, N., Kass, D., Parsons, P. J., Population-based inorganic mercury biomonitoring and the identification of skin care products as a source of exposure in New York City. *Environ. Health Perspect.* **119**, 203–209 (2011).

この報告では、ニューヨーク市 (NYC) の成人の無機水銀の曝露量を評価している。2004 年の NYC 健康栄養調査において収集された 1840 名の尿検体中の水銀濃度を測定した。20 $\mu\text{g/L}$ 以上の濃度を示したケースについて電話または面会による追加調査を行い、文化的慣習、スキンケア製品、漏出事故、天然薬物、魚などのうち曝露の可能性のあるものについて尋ねた。尿中水銀濃度の幾何平均値はカリブ海出身の黒人 (1.39 $\mu\text{g/L}$; 95%CI, 1.14–1.70) およびドミニカ人 (1.04 $\mu\text{g/L}$; 95%CI, 0.82–1.33) が、ヒスパニック以外の白人 (0.67 $\mu\text{g/L}$; 95%CI, 0.60–0.75) や他のグループより高かった。過去 30 日以内に魚料理を

20 回以上食べたグループの濃度 (1.02 $\mu\text{g/L}$; 95%CI, 0.83–1.25) が一度も食べなかったグループの濃度 (0.50 $\mu\text{g/L}$; 95%CI, 0.41–0.61) より高かった。95 パーセンタイルで最も高濃度を示したのはドミニカ人女性 (21.18 $\mu\text{g/L}$; 95%CI, 7.25–51.29) であった。最も多量に曝露したグループの曝露源は水銀を含む美白クリームであり、基準を超える水銀を含む 12 製品を特定した。クリーム 2 製品には 10^0 ppm、他のクリーム 6 製品は 10^3 – 10^4 ppm、殺菌用石けん 4 製品は 10^2 – 10^3 ppm の水銀が検出された。

この報告で述べられている環境曝露として魚由来の水銀が挙げられ、食文化による影響が無視できないことがわかる。また、白降汞を意図的に用いた製品が非合法に用いられ、 10^4 ppm の製品があることも留意すべきであろう。一方、 10^0 ppm オーダーの水銀が検出された 2 製品の場合は非意図的な混入が原因と考えられ、定期的なサーベイの必要性が示されたと言える。

(3) メキシコ国内で製造された美白クリーム中の水銀

Peregrino, C. P., Moreno, M. V., Miranda, S. V., Rubio, A., D., Leal, L. O., Mercury levels in locally manufactured Mexican skin-lightening creams. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8**, 2516–2523 (2011).

この報告では、中東、アジアおよびラテンアメリカでは水銀を含む美白クリームが製造販売されており、メキシコでも薬局や日用品店で購入できることから、これらの製品中に含まれる水銀量を冷蒸気還元気化原子吸光分析により定量している。16 製品を試料とした。いずれも水銀を含むとの表示はなかった。10 製品には水銀は検出されず、検出された 6 製品の水銀濃度は 878–36,000 ppm であった。米国 FDA のクリーム中の限度値は 1 ppm である。メキシコや多くの発展途上国では未だに水銀を含むクリームが入手でき、その含有量

はほとんど制御できていない実態が明らかになった。

この報告で述べられているように、 10^3 – 10^4 ppm オーダーで水銀を含む製品は意図的に水銀化合物を配合したものであり、しかもいずれも表示がなかったことから、環境曝露の一因として考慮しても良いと考えられる。

(4) インドのハーブ化粧品に含まれる重金属と微量元素の原子吸光分析

Sukender, K., Jaspreet, S., Sneha, D., Munish, G., AAS estimation of heavy metals and trace elements in Indian herbal cosmetic preparations. *Res. J. Chem. Sci.*, 2, 46–51 (2012).

この報告では、インド国内で販売されているハーブ化粧品 21 製品を試料とし、フレイム原子吸光度計により Pb、Cd のような重金属と Ca、Mg、Al、Cu、Zn のような微量元素を定量的に評価した。As、Hg のような重金属は、窒素をキャリアーガスに用いた水素化物発生（冷蒸気還元気化原子吸光分析）により定量した。毒性の知られている重金属については、6 製品が Pb 含量に関して WHO 許容限度値である 10 ppm を超えていたほか、2 製品の Hg 含量が WHO 許容限度値 1 ppm を超えた (1.095 ± 0.031 ppm および 2.183 ± 0.026 ppm)。As は許容限度値を超えた製品はなかったが、Cd はすべての製品で限度値を超えていた。微量元素の中では Ca と Mg が Al、Cu、Zn より多かった。微量元素の存在には利点があるが、有毒な重金属は、天然物であるという理由で安全だという印象を持っていて日常的に使用している消費者の健康に対して明らかに悪い影響を与えている。ハーブ化粧品には good analytical practices、good manufacturing practices や good agricultural and control practices を順守させることが重要と考えられた。

この報告ではハーブ化粧品 2 製品から 10^0 ppm オーダーの水銀が検出されている。非意図的な混入である可能性が高いと考えられる

が、ハーブ化粧品は原料が栽培される土壌の影響を受けると考えられることから、著者らが述べているように製造時のモニタリングを徹底すべきであろう。

(5) サウジアラビアで流通する美白クリーム中の水銀等の含量

Al-Saleh, I., Elkhatib, R., Al-Rouqi, R., Al-Enazi, S., Shinwari, N., The dangers of skin-lightening creams. *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 195–219 (2012).

この報告では、現在大量に流通している美白クリームにはさまざまな成分が配合されており、このうち水銀、ハイドロキノン、ステロイドなどは毒性が強く、特に長期間の使用で毒性が顕著であることから市場製品の調査を行っている。サウジアラビアでは水銀を含む美白クリームが以前から流通しており、そのうちいくつかは販売が禁止されているが、他の成分も含めてさらに検討を行った。流通量の多い製品を対象とし、水銀、二酸化チタン、ハイドロキノン、副腎皮質ステロイドについて検討した。33 ブランドの製品を使用し、50 製品についてチタン含量、55 製品についてハイドロキノン含量、56 製品について副腎皮質ステロイド含量を測定した。水銀については 23 ブランドの 34 製品について水素化物発生装置と原子吸光計を用いて行った。水銀量を測定した 34 製品のうち 2 製品で FDA の定めた限度値 $1 \mu\text{g/g}$ を超える水銀が検出された。いずれも同一ロットの 4 本について試験を行っている。1 製品は 2 本で $1 \mu\text{g/g}$ 未満、2 本で $10^2 \mu\text{g/g}$ であった。もう 1 製品は 4 本とも $10^4 \mu\text{g/g}$ を超えていた。二酸化チタンに関しては、EU と FDA のパーソナルケア用品に関する限度値である 25% (w/w) を超える製品はなかった一方で、7 ブランドの 8 製品が化粧品中の着色料の許容量である 1% を超えていた。最近 FDA が OTC の美白剤中のハイドロキノンに 1.5% (w/w) という限度値を提唱したが、本研究で検討した製品中では 7 ブランド

の8製品がこの値を超えるハイドロキノン含有していた。副腎皮質ステロイドとして4化合物を測定した。コルチゾンは検出限界である6 µg/gを超えた製品が13ブランドの18製品であり、最大で0.32% (w/w)が含有されていた。3製品が検出限界である9 µg/gを超えるデキサメタゾン含有していた。本研究で検出された化学物質のうちほとんどは容器に記載されていなかった。

この報告では2製品に水銀が検出され、1製品は意図的な配合、もう1製品は非意図的と考えられる。同一ロット内でのばらつきがあることから著者らの分析技術に問題がある可能性を否定できないが、今後も市場調査が必要であると考えられる。

(6) イランの美容師における水銀の業務上曝露および環境曝露

Fakour, H., Esmaili-Sari, A., Occupational and environmental exposure to mercury among Iranian hairdressers. *J. Occup. Health* (2013). DOI: 10.1539/joh.13-0008-OA.

この報告では女性美容師における、化粧品およびアマルガム充填剤に由来する水銀の業務上曝露および環境曝露を評価している。62の毛髪および爪試料を収集した。LECO製水銀分析装置AMA254を使用し、ASTM標準試験方法D-6722に従って分析を行った。水銀濃度の平均値は毛髪および爪についてそれぞれ 1.15 ± 1.03 µg/g および 1.82 ± 1.12 µg/g であり、両者の間には高い相関 ($r = 0.98$) が見られた。水銀濃度はアマルガム充填剤の数 ($P < 0.001$)、化粧品の使用頻度 ($P < 0.001$)、手袋の使用頻度 ($P = 0.02$) と顕著な関連が見られた。

この報告で述べられているように、体内に残留している水銀濃度は化粧品の使用頻度と関連していることから、化粧品中の水銀濃度の適切な管理が必要であろう。

(7) ナイジェリアでの化粧品中金属濃度の調査

Orisakwe, O. E., Otaraku, J. O., Metal concentration in cosmetics commonly used in Nigeria. *The Scientific World Journal* **2013**, article 959637 (2013).

この報告では、化粧品に意図的に配合されたり、製造原料に不純物として含まれていたりしていて毒性を顕す可能性のある微量金属に関して調査を行った。対象製品はナイジェリアで市場流通しているボディクリームおよびローション28製品、パウダー10製品、石けん3製品、アイシャドー等5製品、口紅4製品である。これらについて鉛、カドミウム、ニッケル、クロムおよび水銀の存在量を測定した。水銀については冷蒸気還元気化原子吸光分析により定量している。鉛はCosmetic Ingredient Review Expert Panelが2007年に示したレベルよりも6.1–45.9 mg/kg 高く、ドイツでの許容量より1.2–9.2 mg/kg 高かった。体に用いる化粧品、ローション、クリームのうち61%の製品は1.1–9.2 mg/kg のニッケルを含んでいた。クロムと水銀は検出されなかった。鉛とカドミウムはクリームおよびローションで高含量であった。多く用いられる乳白色の製品のほとんどが他の色の製品より金属含量が高かった。発展途上国では化粧品中の鉛とカドミウムについて施策が必要と考えられた。

この報告では調査した化粧品中に水銀は検出されていないが、他の報告では検出例があることから、今後も調査が必要であろう。

(8) 美白クリーム中水銀含量の地球規模調査

Hamann, C. R., Boonchai, W., Wen, L., Nishijima-Sakanashi, E., Chu, C.-Y., Hamann, K., Hamann, C. P., Sinniah, K., Hamann, D., Spectrometric analysis of mercury content in 549 skin-lightening products: Is mercury toxicity a hidden global health hazard? *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 282–287 (2014).

この報告では、全世界で製造される美白製品のうち、特に米国の消費者が購入できる製

品に着目して水銀含量を測定している。32ヶ国で製造される549製品を米国、台湾および日本からのネット購入または米国、中国、台湾、タイ、日本およびスリランカにおける店頭での購入により入手した。ハンドヘルド蛍光X線分析装置により水銀が200 ppm以上含有される製品をスクリーニングした。その結果、6.0%に当たる33製品に1000 ppm以上の水銀が含まれていた。その45%には10000 ppm以上含有されており、最大値は45622±322 ppmであった。米国で購入した美白製品のうち3.3%で1000 ppm以上の水銀が検出された。

この報告で示されているように、水銀化合物を主成分とし、非常に高い濃度で含有する美白製品は消費者が入手できる状況である。この報告は臨床医に対する注意喚起の目的でなされたものであるが、環境曝露の1要因としても考慮する必要があるだろう。

D. 考察

ICCR Traces WGで収集した、主に先進国における調査においては、ほとんどがWHOの基準を下回っており、JECFAなどで設定されている許容摂取量を上回る可能性はないと考えられた。しかしながら、独自の文献調査では、主に発展途上国で流通あるいは製造される製品の情報が収集でき、その結果、数 ppmの水銀を含む製品が散見される他、多くの国で禁止されている白降汞を主成分とする美白製品が現在でも使用され、それが原因と思われるヒトでの曝露が見受けられた。

一方、水銀の分析法は高感度の方法がすでに確立されているが、近年でもより高感度で選択性の高い分析法の開発が意欲的に行われ、化粧品等の試料にpptオーダーで含有される水銀を分析する方法が報告されていることがわかった。

これらの情報は分析法の開発や日本の実態と規制の必要性の検討に役立つと考えられる。

E. 結論

化粧品規制協力国際会議 (ICCR) の微量汚染物ワーキンググループ (Trace WG) においても議題となっている化粧品中の水銀について、WGへの参加および独自の文献調査によって地球規模での含有量や曝露実態、最新の分析法について情報を収集した。

ICCR Traces Working Groupによる化粧品製品中の水銀についての報告書作成に協力した。過去5年間に行われた試験においてほとんどが検出限界以下であり、ごくわずかな製品で0.16–4.4 ppmが検出されたのみであったこと、曝露量は最大でもJECFAの許容摂取量未満となることがわかった。文献調査を行い、分析法としてはICP、冷蒸気還元気化原子吸光法、冷蒸気還元気化原子蛍光法 (CVAFS) などが挙げられ、これらの検出限界は0.1–1 pptであった。また、Cys修飾したセルロースを用いて前処理してCVAFSで検出した例や、ELISA法も開発されていることがわかった。近年の化粧品中の水銀に関する報告についても調査では、ナイジェリア、インド、サウジアラビア、メキシコ、米国、日本などで調査が行われていた。水銀に関しては不検出が多いが、口紅やハーブ化粧品ではWHO基準を超えて含有される製品が存在した。また、美白クリーム製品で 10^4 ppmレベルの違反製品が報告されていた。今後、上記の情報を生かして分析法の開発や日本の実態と規制の必要性を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他知的所有権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tahara, M., Obama, T., and Ikarashi, Y.	Development of analytical method for determination of 1,4-dioxane in cleansing products	Int. J. Cosmet. Sci.	35 (6)	575-580	2013
五十嵐良明, 原俊太郎	化粧品の機能生と安 全性を支える科学	YAKUGAKU ZASSHI	134 (1)	25-26	2014