

「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

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。トータルダイエッ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 m g 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両分のみ試料とした)にサロゲート化合物として 3-ヒドロキシ安息香酸 0.2  $\mu$  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 E x t r e l u t N T 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 n m) 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 (e x t r e l u t N T 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 ℃ 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 ℃ 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  
柴田パッシブガスタンブ (code:8015-066)  
:活性炭 20-40 メッシュ 200 mg 入り  
溶出溶媒:二硫化炭素  
サンプリングレート: 0.29l ( $\mu\text{g}/(\text{ppm} \times \text{min})$ ) を用いた。

試料濃度の算出式:  
濃度 (ppm) = 試料ガス量 / サンプリングレート / サンプリング時間 (min)  
測定機器:GC/MS

### 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 mg 相当のパラベン類(パラベンプチル)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 mg/日程度である。しかし、生活形態の変化により食品以外に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 ppm 程度(清涼飲料水中のパラベンの基準値が 0.1 g/kg 以内でありこの値に配慮したものと思われる)で、ドリンク剤 1 本(50-100 ml)あたりパラベンは 4.7 mg 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 HCB

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 HCB (0.07-0.40 ppb) が検出された。HCB 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、HCB 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 HCB 摂取量及び HCB 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、食事経由からの HCB 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 HCB 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合わせ各群毎の HCB 摂取量を求めた。その結果、群毎の HCB 摂取量を合計した成人一日あたり HCB 摂取量は 65 ng/日で、このうち半分にあたる 33 ng が 10 群に属する魚介類からの HCB 摂取量であった。また、摂取量の 1/6 である 10 ng は 11 群の卵・肉製品から、また同じく 10 ng 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。HCB に併せて、p,p'-DDE も同時に定量した結果、p,p'-DDE の一日摂取量は 237 ng/日となった。ここで得られた p,p'-DDE 濃度はアルカリ分解後の結果であり t-D

DT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1日摂取量は9人の平均で113 ng/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HCB1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14.9 ppb(0.4~211 ppb)、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、5 ppb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、5 ppb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、ケイソウ土カラムの使用は感染性の試料に直接触れ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-d 4、HCB-13 C 6、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考えられる。また、HCBの1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