

## パラベン類— パーソナルケア製品からの経皮吸収と妊娠期曝露による男児生殖影響

東京大学 大学院新領域創成科学研究科 環境システム学専攻  
環境健康システム学分野研究室 47096668 白井 さやか (2011年3月修了)  
指導教員 吉永 淳 准教授

キーワード: エストロゲン様化学物質、パラベン類、妊娠期曝露、皮膚吸収率、  
エストロゲン等量、肛門性器間距離

### 1. 緒言

我々の生活環境中にはあらゆる化学物質が存在しているが、近年では環境中エストロゲン様化学物質曝露による性ホルモンレベルの変動や性ホルモン関連疾患の罹患率増加が懸念されている。とりわけ、生殖系発達を決定づける重要な時期である胎児期の、特に元来女性ホルモンレベルが低い男児への影響が懸念されるようになった<sup>1)</sup>。

パラヒドロキシ安息香酸エステル類 (パラベン類) は、最近になってそのエストロゲン様作用が懸念されるようになった化学物質である。多くの *in vitro* 試験でエストロゲン受容体 (ER) への結合能をもつことが示されたほか、*in vivo* 試験では胎児期曝露による出生オスの精子数の低下やテストステロンの減少が報告されている<sup>2)3)</sup>。

パラベン類は食品や薬品のほか、我々が日常的に使用している化粧品や石鹸、日焼け止め、整髪料など、いわゆる「パーソナルケア製品」(以下 PCPs) に保存料として用いられている。さらに、PCPs 使用等によってパラベン類に経皮曝露した場合、グルクロン酸・硫酸抱合体や *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA) といった化合物に代謝される前の free 体が尿中に検出されることから<sup>4)</sup>、よりエストロゲン活性が強い可能性がある free 体が血中を循環するものと考えられる。この点が、吸収後、解毒器官である肝臓を経てから体内を循環する経口曝露と異なる経皮曝露の特徴である。これらの事実から PCPs がパラベン類の重要な曝露源と考えられるが、PCPs を使用することによってパラベン類がどの程度体内に取り込まれるのか、パラベン類の経皮吸収について、これまで明確となっていない。

そこで本研究では、実験的にパラベン類を含有する PCPs を使用し、尿中パラベン類及びその代謝産物濃度を測定することで、パラベン類の皮膚吸収率を検討した。その結果、PCPs 使用に伴うパラベン類の経皮吸収により、内因性女性ホルモンである 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) と比較して無視しえないレベルのエストロゲン活性の追加となることが判明したため、化学物質の影響に対して脆弱な胎児に影響を及ぼすかどうかを検討するために、妊娠中の母親のパラベン類曝露評価を行うとともに、妊婦尿中パラベン類濃度と出生男児への影響との関連評価を行った。パラベン類胎児期曝露に関するこれまでの動物実験等の結果からは生殖毒性があることが示唆されているが、それがヒトへのリスクにつながるかを定量的に評価した点で、本研究はパラベン類のリスク評価の第一歩を踏み出したと考える。

### 2. 尿中パラベン類分析方法

本研究では、パラベン類曝露量の指標として尿中排泄濃度を用いた。我々の身近に存在するメチル (MP)、エチル (EP)、プロピル (PP)、ブチルパラベン (BP) 及びパラベン類の主な代謝産物である PHBA を対象とし、それぞれの尿中 total 体パラベン類 (抱合体+free 体) 及び free 体パラベン類の計 10 種を分析するため、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (HPLC/MS/MS) の最適条件及び感度確認、尿前処理方法 (添加回収試験、脱抱合操作) を検討した。その結果、尿試料 1 mL に内標物質を添加し、 $\beta$ -glucuronidase /sulfatase とともに 4 時間インキュベーションして脱抱合したのち固相抽出、濃縮、乾固、メタノールに再溶解して検液とする前処理方法を定めた。尿中 free 体パラベン類濃度測定の際には

脱抱合操作は省いた。

### 3. パラベン類経皮吸収率に関する調査

#### 3-1. 対象者及び方法

成人女性3名を対象とし、6日間の調査期間中毎日24時間尿を採取した。調査3日目の夜、その日最後の排尿後に、所定量の試験クリーム（市販ボディクリーム; 20 g、市販日焼け止め; 2 g）を対象者が自ら腕や足に塗布した。塗布方法については、所要量をまんべんなく塗布すること以外に、塗布部位などについては特に指示しなかった。その後3日間、24時間尿を採取した。対象者から採取した24時間尿中 total 体及び free 体パラベン類濃度を HPLC/MS/MS により測定し、その値と一日尿排泄量から各パラベン類の皮膚吸収率を推定するとともに、尿中パラベン類排泄量の変動を検討した。皮膚吸収率は、（塗布翌日から3日間の合計尿中 total パラベン類排泄量[mg]） / （パラベン類塗布量[mg]）により、試験クリームを塗布することによるパラベン類過剰排泄量を算出し、更に PHBA 排泄分を考慮した上で推定した。なお、必要に応じ、吸光度法で測定したクレアチニン濃度あるいはリフラクトメーターで測定した比重値によって尿中パラベン類濃度の補正を行った。

#### 3-2. 結果及び考察

##### 3-2-1. 24時間尿中 total 体及び free 体パラベン類排泄量の変動調査

24時間尿中 total 体及び free 体パラベン類濃度測定結果から排泄量を推定した結果、試験クリーム塗布後1日目（調査4日目）に、尿中 total 体及び free 体パラベン類排泄量の顕著な増加を確認した（Fig. 1）。また、1名の対象者のみであるが、試験クリーム塗布翌日の排尿ごとのパラベン類排泄量を測定したところ、試験クリーム塗布後15時間程度、尿中 free 体パラベン類排泄量の増加が続くことを確認した。

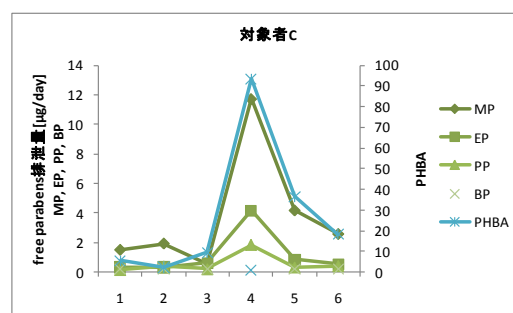


Fig.1 尿中 free 体パラベン類排泄量[µg]

##### 3-2-2. パラベン類皮膚吸収率推定結果

パラベン類の皮膚吸収率を

Table 1. 皮膚吸収率推定結果

Table 1 に示す。吸収率は個人内でも個人間でも変動があるが、平均的には1~10%と推定された。対象者内のパラベン類皮膚吸収率のばらつきは既往研究でも報告されており、化学物質が皮膚へ浸

|        | 皮膚吸収率(%) |      |     |      |
|--------|----------|------|-----|------|
|        | MP       | EP   | PP  | BP   |
| 対象者A_1 | 4.2      | 1.2  | 10  | 2.2  |
| 対象者B   | 1.6      | 0.55 | 3.8 | 1.6  |
| 対象者C   | 1.1      | 1.1  | 1.1 | 0.57 |
| 対象者A_2 | 10       | 2.0  | 4.8 | 3.9  |

透する吸収速度を決定づける部位である角質層内の脂肪含有量及び皮脂腺の状態がばらつきの要因と考えられている<sup>5)</sup>。また、皮膚の表面温度の上昇により、化学物質の皮膚透過が一般的には増大することが報告されており<sup>6)</sup>、本調査において試験クリーム塗布部位の状態が調査日時によって異なっていたことが、対象者内で吸収率がばらついた原因と考えられる。一方、対象者間の皮膚吸収率のばらつきについては、上記に加え、試験クリームの塗布部位が対象者間で異なっていたことや、パラベン類の代謝に関わる酵素活性が個人間で異なっていた可能性が考えられる。一般に、化学物質の皮膚浸透性は、腕や足と比較して胴体が3~4倍高いことや、パラベン類の代謝に関与する酵素のひとつであるカルボキシエステラーゼの活性が対象者間で異なることが既往研究で報告されている<sup>6)</sup>。

### 3-2-3. エストロゲン等量の推定

試験クリーム使用によって体内に吸収されたパラベン類が、一般女性の血清中に通常存在する E2 のもつエストロゲン活性と比較してどの程度に相当するか、を検討するため、他研究でも用いられているエストロゲン等量の考え方をを用いて評価することとした。エストロゲン等量は既往報告<sup>7)8)9)</sup>をもとに、試験クリーム塗布による尿中パラベン類排泄量増加分を血清中量に換算し、パラベン類の ER 結合能 (E2 の ER 結合性に対する相対値) をかけ合わせ、100% free 体として暫定的に推定した。その結果、試験クリームを塗布することによって体内に吸収されるパラベン類のエストロゲン等量は、健康な成人女性の血清中 E2 のエストロゲン等量の 0.4~156%に相当すると推定された。既往報告においては、血清中 E2 レベルが通常の 10%程度増加するだけでも、様々な健康影響が現れる可能性が示唆されていることから、PCPs 使用に伴うパラベン類の経皮吸収によるエストロゲン活性の増加によって、特に化学物質に対して脆弱である胎児への健康影響が懸念される。

## 4. 胎児期パラベン類曝露・影響評価

### 4-1. 対象者及び方法

2007 年~2010 年に東京都某病院で定期検診を受診した妊婦のうち、化学物質の胎児期曝露による出生児の生殖影響研究に関するインフォームドコンセントが得られた 111 名を対象に、採尿及び年齢や喫煙等の生活習慣に関する質問調査が行われた。サンプリングされた尿中の total 体及び free 体パラベン類濃度を HPLC/MS/MS によって分析した。尿試料はスポット尿であったため、対象者ごとの水分摂取量や発汗量による尿中パラベン類濃度の変動を補正するため、1 日の排泄量がほぼ一定であるクレアチニンを用い補正した。統計解析には、Excel 2007 及び 2003、SPSS for Windows ver. 12.0 J を用いた。

### 4-2. 結果及び考察

#### 4-2-1. 妊婦尿中パラベン類濃度分析結果

111 名の対象者の尿中パラベン類濃度レベルは幅広い分布を示し、パラベンによって、そして対象者毎でみても、尿中濃度幅が大きい結果となった (Table 2)。エストロゲン活性が total 体に比べ強い可能性のある free 体についても尿中に検出され、妊娠中に free 体パラベン類が体内を循環している可能性が示唆された。また、3.において、試験クリーム塗布によって増加した尿中パラベン類濃度と同レベルあるいはそれ以上の濃度であった妊婦は、111 名中 40 名 (MP; 20 人、EP; 14 人、PP; 6 人、BP; 5 人) であった。なお、尿中パラベン類濃度分布は対数正規分布を示したため、以下の統計解析には対数変換した値を用いた。

Table 2. 妊産婦尿中パラベン類濃度測定結果[ $\mu\text{g/g-cre}$ , n=111]

|        | total parabens |        |        |        |       | free parabens |        |        |    |       |
|--------|----------------|--------|--------|--------|-------|---------------|--------|--------|----|-------|
|        | MP             | EP     | PP     | BP     | PHBA  | MP            | EP     | PP     | BP | PHBA  |
| Mean   | 180            | 52.5   | 169    | 5.12   | 727   | 37.8          | 2.19   | 2.21   | -  | 138   |
| SD     | 205            | 191    | 659    | 13.5   | 1018  | 73.0          | 4.51   | 4.38   | -  | 239   |
| Min    | <0.566         | <0.465 | <0.475 | <0.463 | 1.13  | <0.566        | <0.465 | <0.475 | -  | 0.703 |
| Max    | 1025           | 1879   | 6728   | 122    | 5868  | 447           | 36.4   | 29.3   | -  | 1292  |
| Median | 109            | 8.00   | 33.5   | 0.743  | 318   | 10.9          | 0.317  | 0.321  | -  | 52.0  |
| GM     | 71.9           | 6.78   | 22.9   | 1.17   | 286   | 9.45          | 0.769  | 0.802  | -  | 51.4  |
| GSD    | 6.30           | 8.51   | 9.77   | 5.17   | 4.80  | 6.50          | 3.77   | 3.74   | -  | 4.50  |
| 検出率(%) | 95             | 83     | 89     | 57     | 100   | 89            | 54     | 52     | 1  | 100   |
| LOD    | 0.566          | 0.465  | 0.475  | 0.463  | 0.497 | total体と同値     |        |        |    |       |

\*free BP は 1 名のみの検出(0.654  $\mu\text{g/g-cre}$ ), \*LOD; 検出下限値

#### 4-2-2. エストロゲン等量の推定

妊婦の尿中に排泄されたパラベン類から推定されるエストロゲン等量を 3-2-3.と同様に

計算した。その結果、平均的に妊婦の血液中に存在する E2 の 0.2~2.4%に相当すると推定され、高曝露群については最大で 60%に相当すると推定された。

### 4-2-3. 胎児期パラベン類と男児生殖影響

#### 4-2-3-1. 男児生殖影響指標

4-2-2.では、尿中パラベン類濃度から妊婦血清中パラベン類に由来するエストロゲン等量を推定したが、母体血清中 E2 は直接胎児へ移行するわけではなく、エストロゲン等量を用いた方法では胎児への影響を評価することはできない。本研究では、出生男児の肛門性器間距離 (Anogenital Distance; AGD) を指標として用いた評価を試みた。AGD は胎児期男性ホルモンレベルに対し敏感な指標と考えられており、動物実験で広く用いられているほか、近年ではヒト調査においても用いられている<sup>10)</sup>。AGD は出生体重と正の相関があることが知られていることから、本研究では体重で補正した Anogenital Index (AGI) を統計解析に用いた。

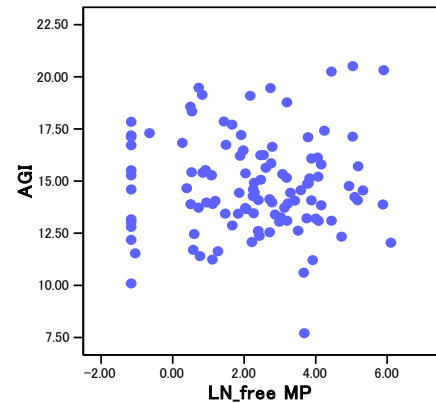


Fig.2 尿中 free MP と AGI の関連  
(ピアソン相関分析:  $r=0.023$ ,  $p=0.811$ )

#### 4-2-3-2. 妊婦尿中パラベン類濃度と AGI の関連

母体尿中パラベン類濃度と AGI との関連を単相関分析によって解析したところ、有意な関連はみられなかった (Fig. 2)。また、妊婦尿中パラベン類濃度を四分位にカテゴリー化し、AGI との関連を一元配置分散分析により検証したが、パラベン類高曝露群においても AGI との関連はなかった。以上のことから、対象とした妊婦のパラベン類曝露レベルであれば出生男児の AGI に影響を及ぼすレベルではないことが示唆された。

## 5. 結言

パラベン類経皮吸収率に関する調査から、パラベン類の皮膚吸収率は平均的に 1~10% と推定され、試験クリーム塗布によって体内に吸収されたパラベン類をエストロゲン等量として比較すると、健康な一般女性の血清中に存在する E2 に対し 0.4~156%相当となり得ることが推定された。よって、パラベン類含有 PCPs を日常量使用することによる内分泌系への影響を考慮するべきと考え、特に化学物質の毒性に対して脆弱である胎児に着目し、本研究では妊娠期パラベン類曝露・影響評価を行った。その結果、妊婦尿中にパラベン類が高頻度で検出され、妊婦が日常的にパラベン類へ曝露していることが示唆された。しかしながら、妊婦尿中パラベン類濃度と出生男児の肛門性器間距離との間に関連はなかったことから、対象とした妊婦のパラベン類曝露レベルは男児の男性ホルモンレベルに影響を与えるほどの曝露レベルではない、と推測される。

## 参考文献

- 1) Sharpe et al., 2004, *B. M. J.*, **328**:447-51, 2) Nishihara et al., 2000, *J. Health Sci.*, **46**:282-298, 3) Taxvig et al., 2008, *Toxicol. Sci.*, **106**:206-213, 4) Soni et al., 2005, *Food Chem. Toxicol.*, **43**:985-1015, 5) Akomeah et al., 2007, *J. Pharm. Sci.*, **96**:824-834, 6) WHO, 2006, *E. H. C.*, 7) Janjua et al., 2007, *Environ. Sci. Technol.*, **41**:5564-5570, 8) Janjua et al., 2008, *Int. J. Androl.*, **31**:118-130, 9) Boberg et al., 2010, *Reprod. Toxicol.*, **30**:301-312, 10) Swan et al., 2005, *Environ. Health Perspect.*, **113**:1056-1061