

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750140

研究課題名（和文）

水圏における医薬・化粧品殺菌防腐剤の汚染実態と生態毒性の変化

研究課題名（英文）Contamination and ecotoxicological variation by preservative originating from pharmaceutical and cosmetic products in aquatic environment

研究代表者

寺崎 正紀（TERASAKI MASANORI）

静岡県立大学・環境科学研究所・助教

研究者番号：10363904

研究成果の概要（和文）：殺菌防腐剤パラベンとその二次的生成物による水質汚染の解明に取り組んだ。まずパラベン関連 23 物質の一斉分析法を確立した。河川中では、塩素化体として懸濁相に分布することがわかった。塩素化体は、親パラベン（塩素をもたない）が水道水と接触した際、生成することを突き止めた。また、紫外線照射により含塩素カテコールとなり、難分解性が高まった。複数の毒性試験から、製品への使用頻度が高いプロピルパラベンは、塩素化されると催奇形性を示した。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to examine the contaminant levels of parabens and their secondary products, whose presence in the aquatic environment has not yet been investigated. First, we have developed a method for the simultaneous analysis of 23 parabens and related compounds. The analysis results indicate that chlorinated derivatives preferentially partition to the suspended-solid phase in river water. With regard to the sources of chlorinated derivatives, chlorination tests with tap water revealed that the paraben was immediately chlorinated to yield the dichlorinated paraben. When an aqueous solution of the chlorinated paraben was irradiated with an ultraviolet light, chlorinated catechol was indentified and revealed to be rather resistant to photochemical decomposition. In the toxicity assessment with several hormone receptor mediated reporter assays, the activity of the retinoic acid receptor of a chlorinated propyl paraben is considerably higher than that of the corresponding parent paraben.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：環境分析化学、環境毒性化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：水環境、環境動態、発生源、塩素化副生成物、光変換生成物、構造決定、受容体原性毒性

1. 研究開始当初の背景

医薬・化粧品には、優れた効能効果や製品の品質維持に不可欠な化学物質が含まれている。反面、こうした生理活性物質は、暴露が想定されていない野生生物に対する有害性が問題視されている。

ヒドロキシ安息香酸のエステルである「パラベン」は、幅広い pH 領域で抗菌作用や安定性を有することから、医薬品およびパーソナルケア製品の防腐剤として広く用いられている。この種の化学物質は塩素消毒により、容易に塩素化副生成物を与える。実際、塩素化パラベンの存在に関して、申請者らは典型的な塩素消毒水であるプール水からパラベンの塩素誘導体を同定した。塩素化パラベンの生態毒性に関して、申請者らはミジンコに対する影響を評価し、親化合物（塩素を有さないパラベン）よりも、急性毒性が高まることを明らかにしている。

国内外で使用実績のあるパラベンおよびその塩素化副生成物は 23 物質にのぼる。現在、簡便・迅速な環境分析法は確立されておらず、水圏における汚染実態や太陽光などの環境因子による影響は知られていない。また生じる塩素化パラベンの生態毒性は、申請者らによるミジンコ毒性のみで、知見が限られている。

2. 研究の目的

本研究では、はじめにパラベン、塩素化パラベン、それらの分解生成物の計 23 物質について、水環境中での種類や濃度を明らかにする環境分析法の確立を目指した(図 1)。

続いて、確立した手法に基づき、下水処理水や河川水などの環境水中濃度のモニタリングを実施した。実試料中では、フミン酸などの自然界由来の懸濁物質による影響が、定量情報に大きな影響を及ぼす。これを解明するため、パラベン関連物質の懸濁物質相への分配についても調査した。塩素化パラベンの発生源を推定するため、パラベンと水道水との反応を実施した。河川に拡散後の動態に関する情報を得るため、模擬太陽光による変換物質の構造決定に取り組んだ。

さらに、生態毒性としてエストロゲン活性および脊椎動物の催奇形作用に関与するレチノイン酸受容体活性をインビトロ試験で実施した。塩素化に伴う毒性能評価と、そのク因子となる化学物質を推定した。

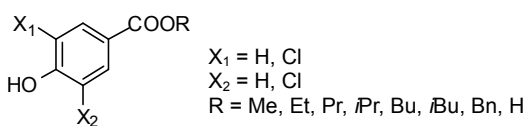


図 1 パラベンとその塩素誘導体の分子構造

3. 研究の方法

(1) 環境分析法の確立

異なる固定相を用いた固相抽出、抽出後のシリル化およびガスクロマトグラフ質量分析計を組み合わせた一斉分析法を検討した。分析法は添加回収実験で得られた回収率により決定した。

(2) 河川水の分析

静岡市内の下水流入域にある 4 河川について、異なる時期の同時刻に採水した試料を調査した。水試料はフィルター（粒子保持能 1.6 μm ）でろ過した残渣（懸濁相）中濃度と、通水された溶存水中濃度を計測した。

(3) パラベンと水道水との反応実験

モデル物質としてプロピルパラベンと水道水とを混合し、20 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。なお、公定法（ジエチルパラフェニレンジアミン指示薬、吸光度測定）による水道水中の残留塩素濃度は、反応時間 0 分で 0.20 mg/L、40 分で 0.05 mg/L であった。

(4) 紫外線照射による水溶液中での塩素化パラベンの挙動と変換生成物

微量のメタノールに溶解させた二塩素化プロピルパラベン水溶液を照射試料とした。光源は太陽光の紫外線波長に近い蛍光灯（TRUE-LITE: Duro-Test Lighting, PA）を使用し、室温下（25 $^{\circ}\text{C}$ ）で照射を実施した。照射試料は酢酸エチルで抽出し、必要に応じてトリメチルシリル誘導化後、ガスクロマトグラフ質量分析計および液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析計に供した。標準物質が市販されていない光変換生成物は、その合成法を検討した。

(5) 受容体原性毒性評価

ヒト・エストロゲン受容体 α 、メダカ・エストロゲン受容体 α またはヒト・レチノイン酸受容体 γ を導入した酵母 two-hybrid アッセイ法を用いて、活性指標である EC \times 10 により評価した。

4. 研究成果

(1) 固相抽出の最適化

検量線の決定係数は、0.996 以上と良好な線形関係にあることが判明した。23 物質の回収率を比較すると、逆相系固定相に関しては、溶出溶媒にメタノールを用いると高い回収率（55%-134%）が得られた。ポリマー系固定相（RP-1）に関しては、溶出溶媒にアセトニトリルを用いると高い回収率（89-104%）が得られた。また、相対標準偏差（11%以内）、検出下限値（0.80-4.2 ng/L）、定量下限値（2.8-14 ng/L）のいずれの指標も、環境分析法に適用できることが判明した。

(2) パラベン関連物質の河川水中での分布

3 つの河川水（R1-R3）の懸濁相および溶存相中のパラベン関連物質の分布を図 2 に示す。塩素化パラベン（50-92%）および分解生成物の塩素化ヒドロキシ安息香酸（81-93%）は主

に懸濁相中に存在する一方、パラベン(45-80%)はその傾向が幾分弱くなった。対象物質の総濃度は、懸濁相中で 54-130 ng/kg、溶存水中で 2.2-130 ng/l となった。この結果は、パラベンの塩素誘導体が河川水中で懸濁相へ分配されることを示している。

個々の物質濃度について、パラベン 4 物質、塩素化パラベン 6 物質、塩素化ヒドロキシ安息香酸 2 物質を同定した。このうち 8 物質は河川水から検出した初めての事例である。製品への使用頻度の高いメチルパラベン(最大 5.4 ng/l)とプロピルパラベン(最大 22 ng/l)ならびに塩素化ヒドロキシ安息香酸(最大 150 ng/l)が、すべての河川から検出された。一方、未処理の下水からはパラベン 4 物質(最大 4500 ng/l)および塩素化パラベン 2 物質(最大 2300 ng/l)が検出される一方、塩素化ヒドロキシ安息香酸は 1 物質(13 ng/l)のみが検出された。これは下水処理過程において、パラベンとその塩素誘導体が除去されるものの、一部はエステル基の加水分解で生じる塩素化ヒドロキシ安息香酸に変換されることを示している。

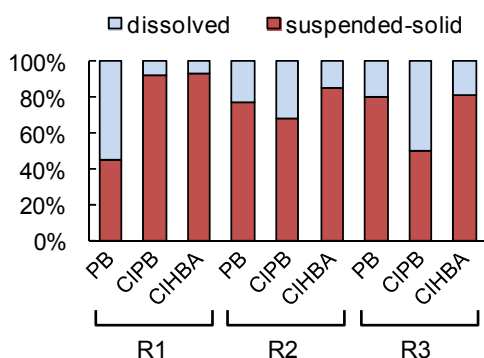


図2 パラベン関連物質の懸濁相および溶存相中の濃度分布 PB=パラベン、CIPB=塩素化パラベン、CIHBA=塩素化ヒドロキシ安息香酸

(3) パラベンと水道水との反応

モデル物質のプロピルパラベン、一および二塩素化プロピルパラベン濃度の経時変化を図3に示す。プロピルパラベンは反応開始5分で消失する一方、その一塩素置換体および二塩素置換体が逐次的に生成した。パラベンの塩素化を一次反応と仮定すると、速度定数は 0.22、半減期は 2.2 min と見積もられ、既報(Canosa et al., 2006)の約 2 倍の速さで進行した。これは本試験の水道水(pH=8.0)が、①フェノール類の塩素化に有利な条件(pH=8-9)に近いこと、②水道水中の不純物による影響(臭素による反応性の低下)がないこと、と推測される。河川から検出される塩素化パラベンの発生経路の 1 つとして、パラベンを含む製品が水道水との接触で直ちに塩素化され、水圏に拡散していることを裏付けた。

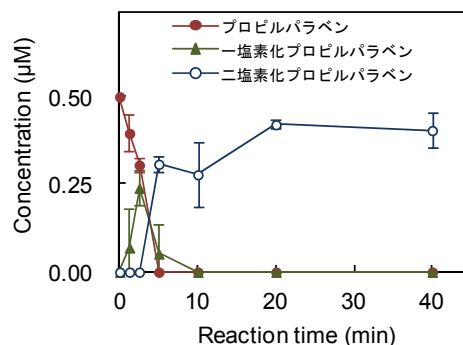


図3 水道水中のパラベンとその塩素誘導体濃度の経時変化(n=3)

(4) 塩素化パラベンの光変換生成物の同定

照射 33 日後において、二塩素化プロピルパラベン濃度は 14%にまで減少した(図4)。遮光下では、分解反応は進行しなかった(データは示さない)。従って、塩素化パラベンの濃度減少は紫外線に起因することが示された。本条件下での分解速度を一次反応と仮定したとき、速度定数は 0.0822、半減期は 201.6 h と見積もられた。また、水溶液の pH が酸性側にシフトするにつれて、その分解速度は低下した。ガスクロマトグラフ質量分析計による分析から主要な変換生成物として、3 物質を検出した。標準物質に基づき、1 つの塩素が脱離するとともにエステルが加水分解した 3-クロロ-4-ヒドロキシ安息香酸(1)と 1 つの塩素が脱離した一塩素化プロピルパラベン(2)を同定した。

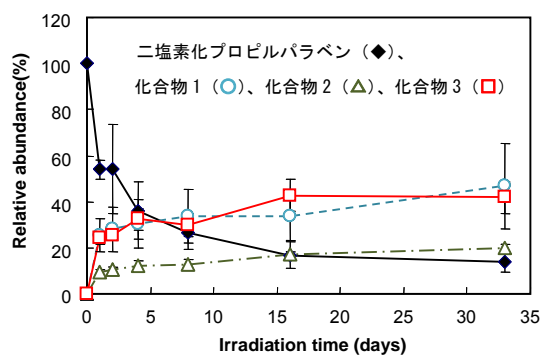
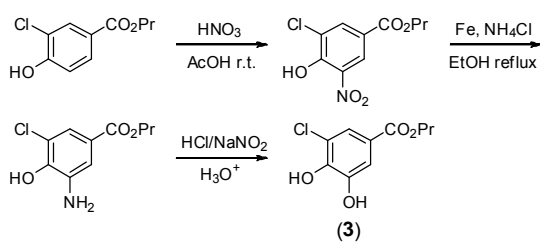


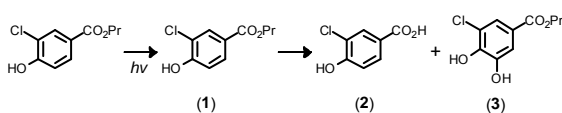
図4 紫外線照射による塩素化パラベンとその光変換生成物濃度の経時変化(n=3)

残りの 1 物質は液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析計による精密質量分析およびガスクロマトグラフ質量分析計によるマススペクトル解析から、(1)の芳香環上に水酸基が置換した含塩素カテコール誘導体(3)を推定した。この物質は化合物(2)を出発物質とした 3 段階の反応操作によりその合成に成功した(Scheme 1)。光照射試料および合成標準物質(3)に対するクロマトグラフ上での保持時間とマススペクトルが一致したことから、化合物(3)を同定するとともに、文献調査より新規化合物であることが判明した。



Scheme 1

光変換生成物(1)–(3)は、いずれも照射1日後には生成が確認され、33日後における各生成物の増加率は、(1)が21%、(2)が11%、(3)が18%であった。また、照射33日後における濃度は(1)≧(3)>(2)となり、化合物(2)および(3)は、化合物(1)を経由して生成することが推測される(Scheme 2)。これらの経時変化はまた、本条件下における化合物(3)の光安定性を示唆している。



Scheme 2

(5) 塩素化パラベンの受容体原性毒性評価 (表1)

エストロゲン活性は、ヒト受容体試験系では8物質が活性を示し、リガンドであるエストラジオールに対して 10^{-5} – 10^{-4} の相対活性を示した。同様に、メダカ受容体試験系では12物質が活性を示し、エストラジオールに対して 10^{-5} – 10^{-2} の相対活性を示した。エステル部の鎖長増加に伴い活性は強くなるが、塩素置換体の活性は親パラベンよりも減少した。このような塩素化に伴う活性低下はノニルフェノールとその塩素置換体、エストロンとその塩素置換体の活性挙動と同様の傾向であった。一方、レチノイン酸受容体活性は6物質が活性を示し、リガンドであるトランスレチノイン酸に対して 10^{-5} – 10^{-4} の相対活性を示した。炭素数3以上の側鎖を有するパラベンで活性が認められた。使用頻度の高いパラベンについて、メチルパラベンはその塩素誘導体を含め、いずれの受容体に対しても活性は認められなかった。プロピルパラベンは、エストロゲン活性はヒト・メダカ両試験系で活性が示された。またレチノイン酸受容体試験系に置いて、親パラベンは活性を有さないが、塩素化されると活性が発現することが判明した。

(6) まとめ

パラベンとその塩素誘導体について、固相抽出法とガスクロマトグラフ質量分析計を組み合わせた一斉分析法を確立した。本手法により、下水処理水が流入する河川水を計測した結果、塩素化パラベンおよび塩素化ヒドロキシ安息香酸を初めて検出するとともに、

これらが懸濁相中に分配していることを突き止めた。使用頻度の高いメチルパラベン、プロピルパラベンはすべての河川から検出された。また塩素化パラベンの発生源の一つとして、水道水との反応を提示した。模擬太陽光により生成した新規光変換生成物の合成法を確立し、その光安定性を明らかにした。受容体原性毒性について、メチルパラベンは塩素誘導体も含めて、いずれも不活性であった。一方、プロピルパラベンは、ヒト・メダカエストロゲン活性を示すとともに、その塩素誘導体がレチノイン酸受容体活性を有することが判明した。

表1 パラベン関連物質の受容体原性毒性 (EC \times 10 \pm SD^a, n=3)

Compound ^b	RAR ^c		ER ^d	
	R	X ₂	hER α	medER α
Me	H	H	Not active	Not active
	Cl	H	Not active	Not active
	Cl	Cl	Not active	Not active
Et	H	H	Not active	6.5 \pm 2.3
	Cl	H	Not active	17 \pm 0.16
	Cl	Cl	Not active	Not active
Pr	H	H	Not active	4.1 \pm 0.27
	Cl	H	10 \pm 0.40	1.6 \pm 0.30
	Cl	Cl	Not active	Not active
iPr	H	H	Not active	2.2 \pm 0.35
	Cl	H	Not active	6.6 \pm 1.0
	Cl	Cl	Not active	Not active
Bu	H	H	13 \pm 1.7	2.3 \pm 0.34
	Cl	H	Not active	Not active
	Cl	Cl	Not active	Not active
iBu	H	H	10 \pm 0.59	0.68 \pm 0.16
	Cl	H	9.8 \pm 1.7	1.4 \pm 0.23
	Cl	Cl	Not active	Not active
Bn	H	H	3.5 \pm 0.55	1.2 \pm 0.20
	Cl	H	21 \pm 2.2	Not active
	Cl	Cl	Not active	Not active

^a unit = μ M, ^b See Figure 1, ^c RAR = retinoic acid receptor, ^d hER α /medER α = human/medaka estrogen receptor α

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① M. Terasaki, Y Takemura, M Makino. Occurrence and distribution of chlorinated derivatives of parabens in river waters. *Environ Chem Lett*, peer-reviewed journal, in press. DOI:10.1007/s10311-012-0367-1

[学会発表] (計6件)

- ① 寺崎正紀・竹村義治・長嶋慧・牧野正和. 防腐剤パラベンおよびその塩素化副生成物の水環境中での分布と挙動. 第14回環境ホルモン学会研究発表会. 2011年12月1日. 東京
- ② M. Terasaki, Y Takemura, S Nagashima,

M Makino. Environmental occurrence, fate, and risk assessment of micropollutant in water: A case study of paraben as pharmaceuticals and personal care products. 37th Congress on Science and Technology of Thailand. Oct. 11, 2011. Bangkok

- ③ 寺崎正紀・竹村義治・長嶋慧・牧野正和. 生活関連物質とその塩素化体の水環境中での分布と挙動: 防腐剤パラベンによる事例研究. 第45回日本水環境学会年会. 2011年3月. 札幌
- ④ M Terasaki, Y Takemura, S Nagashima, M Makino. Occurrence and behavior of parabens and their chlorinated by-products in the aquatic environments. The 2nd Korea-Japan Symposium on Environmental Chemistry. Nov. 4, 2010. Seoul
- ⑤ 竹村義治・寺崎正紀・牧野正和. 水環境中に存在する塩素化パラベンの同定に関する研究. 第19回環境化学討論会. 2010年6月21-23日. 春日井
- ⑥ 長嶋慧・寺崎正紀・牧野正和. 紫外線照射による塩素化パラベンの光変換生成物の同定. 第19回環境化学討論会. 2010年6月21-23日. 春日井

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺崎 正紀 (TERASAKI MASANORI)

静岡県立大学・環境科学研究所・助教

研究者番号: 10363904