

<研究報告書>

1. 厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）：（総括）研究報告書

課題：組換え酵母を用いるプラスチック溶出物中の内分泌攪乱物質の検索

主任研究者 片瀬隆雄 日本大学生物資源科学部・教授

2. 厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）：（分担）研究報告書

課題： 組換え酵母を用いる環境中の内分泌攪乱物質の検索

分担研究者： 井上 正 （日本大学生物資源科学部）

3. 厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）：（分担）研究報告書

課題：組換え酵母レセプターに感応するプラスチック溶出化合物の同定および定量
～内分泌攪乱物質検索のためのプラスチック溶出化合物の簡易分析法の開発～

分担研究者 片瀬隆雄・水谷 広 （日本大学生物資源科学部）

1999年3月

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

（総括）研究報告書

組換え酵母を用いるプラスチック溶出物中の内分泌攪乱物質の検索

主任研究者 片瀬隆雄 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨：ヒトエストロゲンレセプター遺伝子および大腸菌lacZ遺伝子を組み込んだ酵母の、エストロゲン様活性定量系としての有効性を検証し、日常生活で使用されるプラスチック製品などのエストロゲン様活性を定量することを試みた。陽性対照として β - エストラジオールを用いたところ、この測定系は、反応液中の 5×10^{-11} Mのエストラジオールを再現性よく検出定量できることが分かった。この感度は、同じレセプターを試験管内細胞系で用いるものよりも数倍高感度で、さらに簡便さを勘案すれば、内分泌攪乱物質の第一次スクリーニングに本法は極めて有効であると結論できる。本法をプラスチック製品のn-ヘプタン抽出液に適用したところ、食品包装用ラップフィルム、学校給食用手袋、オモチャの一部に明らかなエストロゲン様活性が検出された。さらに、このn-ヘプタン抽出液中の化合物をガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を用いて分析した結果、フタル酸ジエチル、フタル酸ベンジルブチル、フタル酸ジエチルヘキシルの3種類のフタル酸エステルおよびアジピン酸ジエチルヘキシル、アジピン酸ジn-オクチルなど6種のアジピン酸エステルが同定された。プラスチック製品のなかで、最も強い活性を示した給食用手袋3点から溶出したn-ヘプタン溶液中に同定された共通の化合物とその平均濃度は、フタル酸ベンジルブチル(BBP)(2500ppm)及びフタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)(7500 ppm)であった。さらに、この活性を有した手袋2点から、共通にアジピン酸ジ2-エチルヘキシル(DEHA)(2500ppm)が検出された。

片瀬隆雄 日本大学生物資源科学部・教授
水谷 広 日本大学生物資源科学部・教授
井上 正 日本大学生物資源科学部・教授

A. 研究目的

現在、日本で使用されている食品用合成樹脂器具及び容器包装に添加されている合成化合物は、500種類以上あると予想される¹⁾。最近、合成化合物の内分泌攪乱作用に関心が寄せられている。この作用を持つ合成化合物の、4-ノニルフェノール²⁾及びビスフェノールA (bis-2,2'-hydroxyphe-

nyl propane)³⁾がプラスチックに添加されまたは本体に残留し、使用中に容易に溶出することが明らかとなって以来、日常生活における化合物の安全性の関心がさらに高まっている。これらのプラスチックから溶出する内分泌攪乱物質はエストロゲン作用をもつ。合成化合物のこの作用はすでに、1930年代の後半にDoddsらにより約40種類の合成化合物の作用強度が測定され、最大効果の250万単位/gから最少効果の10単位/gまで、その間に25万倍の強度の差異があることが明らかとなった⁴⁾。すでに活性が

明らかとなっているこれらのプラスチック溶出化合物は最少効果のエストロゲン作用を有する化合物群に属し、単独で強度の影響を与えることは考え難い。従って、重要な課題はプラスチックをはじめ日常生活で使用されている多数の合成化合物の個々の作用強度を測定することにある。

環境中の内分泌攪乱物質の動態を解析するために、多数の試料を迅速簡便に分析する必要がある。エストロゲン様活性を高感度でかつ再現性高く検出できる系として組換え酵母を用いる検出系が考案されている⁵⁾。この検出系は、ゲノムにヒトエストロゲンレセプター遺伝子上に、このレセプターの結合部位 (estrogen response element:ERS)とそれに支配されるレポーターとして大腸菌*lacZ*遺伝子を組み込んだ酵母を用いるものである。この酵母がエストロゲンないしエストロゲン様活性を有すると思われる物質に暴露されると、それらはレセプター分子に結合し、これを活性化する。活性化されたレセプター分子はERSに結合して、その結果、レポーターである*lacZ*遺伝子から β -ガラクトシダーゼの活性は容易に検出できるので、試料が有するエストロゲン様活性を定量することができる。

この方法はヒトのエストロゲンレセプターを用いるので、原理的にヒトの細胞を用いる実験系と同様の特異性を有しているはずであるが、培養ヒト細胞でなく、微生物である酵母を用いるので、より簡便迅速に定量することが可能であると予想され、特に多数の試料を発揮することが期待される。そこで、本研究では、この方法の感度や特性あるいは再現性を検討し、分析条件の最適化を計ると同時に、日常生活で使われているいくつかのプラスチック製品のn-ヘプタン抽出物中のエストロゲン様活性の有無を調査した。さらに、ガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を

用いて、n-ヘプタン抽出物中の化合物を同定し、エストロゲン様活性との関連を考察した。

B. 研究方法

<測定法>

ヒトエストロゲンレセプター遺伝子及び大腸菌*lacZ*遺伝子を組み込んだ酵母は Dr. Sumpter (Brunel University, UK) より分与された。エストロゲン様物質によって誘導された β -ガラクトシダーゼの活性は、chlorophenyl red - β -galactopyranoside (CPRG)の呈色を測定することによって行った。分析は以下のようにして行った。dimethyl sulfoxide (DMSO)で希釈した試料を96-wellのマイクロタイタープレートのwellに分注し、これにCPRGを含む酵母培養液を添加した。28°C 4日間の培養の後にマイクロプレートリーダーを用いて、540nmと620nmの吸光度を測定し、その差を誘導された β -ガラクトシダーゼの活性とした。活性度測定に際しては、溶媒(DMSO)のみから得られた値を差し引いた。また、陽性対照として17 β -エストラジオールを用いた。

プラスチック製品からの溶出物の分析は既報⁶⁾に基づいて行った。すなわち、水洗し、風乾後のプラスチック製品を約2g(ラップフィルムの場合、約9cmx9cm)を切り取り、共栓付試験管に詰め、4mlのn-ヘプタンを加え、オープン加熱後、室温で放置し、n-ヘプタン溶液をガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計で同定および定量した。

<試料>

標準試料は特級試薬を用いた。また、プラスチック製品の試料は、市販品をn-ヘプタン抽出したものを一定濃度に希釈した。その濃度は、ガスクロマトグラム上のピーク

面積を既知量のdi-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)のそれと比較して、相対値として規格化した。

C. 研究結果

<測定条件の至適化>

本法の有効性を検証するために、陽性対照である17β- エストラジオールを用いて、様々な条件下でエストロゲン活性を測定し、測定条件の至適化を図った。培養液量、培養温度、培養時間、振盪時間、振盪の有無などについて検討を加えた結果、全量200 μlの反応系を用いて、28°C 4日間、密閉系で培養することにより、5x10⁻¹¹Mの17β- エストラジオールを再現性高く検出できる条件を設定することができた。

<標準試料の分析>

17β- エストラジオールに加えて、既に強いエストロゲン様活性を有することが知られている、estron、estriol、sopia A、norethindrone について、本法を用いてその活性を測定した。予想通りこれらの化合物のいずれもが、エストロゲン様活性を呈し、本法の有効性が支持された。

<活性未知の試料の分析>

化学構造式から推定して、エストロゲン様活性を保有することが予想される数種の化合物について、本法を適用して活性の検出を試みた。供試した試料は、4-hydroxycinnamic acid(HCA)、4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid: FRA)、sinapic acid (SNA)、4-hydroxybenzoic acid (HBA)、vanillic acid (VNA)、resveratrol, genistein などである。また、DEHP、アジピン酸エステル混合物(C₆~C₁₀)やpropylphenolを試供した。genistein は1x10⁻⁶M で、resveratrol は1x10⁻⁵で明らかな活性が検出された。また、HBA と

SNA には全く活性が認められなかった。その他の化合物は、最高濃度の実験区においてわずかの活性が認められたが、これらについては今後の検討が必要である。

<市販プラスチック製品試料の分析>

市販のプラスチック製品から、食品包装用ラップ・フィルム3点、学校給食用等手袋4点、おもちゃ2点、テーブルクロス1点およびスリッパ1点を選び、そのn-ヘプタン抽出物について検討した。手袋については3点が明らかな活性を示した。その他のラップ、おもちゃ、テーブルクロス、スリッパにもわずかな活性が認められた。

<プラスチック製品溶出物の同定と定量>

プラスチック製品のなかで、最も強い活性を示した給食用手袋3点から溶出したn-ヘプタン溶液中に同定された共通の化合物とその平均濃度は、フタル酸ベンジルブチル(BBP) (2500ppm)及びフタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)(7500 ppm)であった。さらに、この活性を有した手袋2点から、共通にアジピン酸ジ2-エチルヘキシル(DEHA) (2500ppm) が検出された。おもちゃ、テーブルクロスおよびスリッパにもわずかな活性が認められたが、これらのプラスチック製品3点に共通してDEHPが同定され、平均濃度は18000ppmであった。また、同様にわずかな活性を示したラップ3点から、共通してDEHPまたはアジピン酸ジn-オクチル(DnOA) が平均濃度で6900ppm 検出された。活性分析に使用したn-ヘプタン抽出液は、それぞれ調製し、2.5mM(ラップなど) および28~64mM (手袋など) で適用した。

D. 考察

日常生活では、非常に多数のプラスチック製品が存在しており、それらに含まれる内分泌攪乱物質の定量・定性は火急の問題

である。これらの多数の試料を能率良く検定するには、簡便でコストが低く、かつ定量性と再現性に富んだ測定系が必要である。本研究で検討対象とした組換え酵母を用いるエストロゲン様活性検出系は、陽性対照である 17β -エストラジオールの活性を $5 \times 10^{-11} \text{M}$ という低能度で再現性よく検出することができ、さらに調査した既知のエストロゲン様活性物質の殆どに対して、陽性の結果を与えた。この事実は、本法にかかる費用が比較的安くまた特殊な装置を必要としないこととあいまって、内分泌攪乱物質の第一次スクリーニングにおいて、本法が極めて有効であることを示している。

本法を、活性未知の数種の化合物、あるいはプラスチック抽出物に適用したところ、genistein やresveratrol あるいは、プラスチック製品の手袋の一部に明らかな活性が見出された。これらの陽性物質に関して

は、試料の純度や部分分解物の含有量などを検討した後に、さらに高次の検定系を用いて、内分泌攪乱作用を定量する必要がある。

文献

- 1) 厚生省食品化学課編：食品用プラスチック衛生学，297-307pp，1980.
- 2) A.M.Soto et al.：Unviron. Health Perspect. 92:167-173,1991.
- 3) A.V.Krishnan et al.：Endocrinology 132:2279-2288,1993.
- 4) 片瀬隆雄：化学工業49:913-921,1998.
- 5) E.J.Routledge,J.P.Sumpter：Environ. Toxicol. Chem. 15:241-248,1996.
- 6) 片瀬隆雄：神奈川県立衛生短期大学紀要 15:13-19,1982.

厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業)
(分担) 研究報告書

組換え酵母を用いる環境中の内分泌攪乱物質の検索

分担研究者 井上 正 日本大学生物資源科学部 教授

研究要旨: ヒトエストロゲンリセプター遺伝子および大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母の、エストロゲン様活性定量系としての有効性を検証し、我々の身近に存在するプラスチック製品のエストロゲン様活性を定量することを試みた。陽性対象として β -エストラジオールを用いたところ、この測定系は、反応液中の 5×10^{-11} M のエストラジオールを再現性よく検出定量できることが分かった。この感度は、同じレセプターを試験管内無細胞系で用いるものよりも数倍高感度で、さらに簡便さを勘案すれば、内分泌攪乱物質の第一次スクリーニングに本法は極めて有効であると結論できる。本法を身近にあるプラスチック製品の *n*-ヘプタン抽出物に適用したところ、手術用手袋やオモチャの一部に明らかなエストロゲン様活性が検出された。

1 目的

環境中の内分泌攪乱物質の動態を解析するためには、多数の試料に関して、迅速簡便に分析を行う必要がある。内分泌攪乱物質のうちでいわゆるエストロゲン様活性を示す化合物は既に数多く知られているが、それらの活性を高感度でかつ再現性高く検出できる系として、組換え酵母を用いる検出系が考案されている (Routledge and Sumpter, 1996)。この検出系は、ゲノムにヒトエストロゲンリセプター遺伝子を組み込み、さらに核外遺伝子上に、このレセプターの結合部位 (ERS: estrogen response element) とそれに支配されるレポーターとして大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母を用いるものである。この酵母がエストロゲンないしはエストロゲン様活性を有すると思われる物質

に暴露されると、それらはレセプター分子に結合し、これを活性化する。活性化されたレセプター分子は ERS に結合して、その結果、レポーターである *lacZ* 遺伝子から β -ガラクトシダーゼが生産され培地中に放出される。 β -ガラクトシダーゼの活性は容易に検出できるので、試料が有するエストロゲン様活性を定量することができる。

この方法はヒトのエストロゲンレセプターを用いるので、原理的にヒトの細胞を用いる実験系と同様の特異性を有しているはずであるが、培養ヒト細胞ではなく、微生物である酵母を用いるので、より簡便迅速に定量することが可能であると予想され、特に多数の試料の第一次スクリーニングには有効性を発揮することが期待される。そこで、本研究では、この方法の感度や特性あるいは再現性を検討し、分析条件

の最適化を計ると同時に、我々の周囲に存在するいくつかのプラスチック製品の n-ヘプタン抽出物中のエストロゲン様活性の有無を調査した。

2 方法

2.1 測定系

ヒトエストロゲンリセプター遺伝子および大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母は Dr. Sampter (Brunel University, UK) より分与された。

エストロゲン用物質によって誘導された β -ガラクトシダーゼの活性は、Chlorophenyl red- β -D-galactopyranoside (CPRG) の呈色を測定することによって行った。

分析は以下のようにして行った。dimethyl sulfoxide (DMSO) で希釈した試料を 96-well のマイクロタイタープレート の well に分注し、これに CPRG を含む酵母培養液を添加した。28°C 4 日間の培養の後にマイクロプレートリーダーを用いて、540 nm と 620 nm の吸光度を測定し、その差を誘導された β -ガラクトシダーゼの活性とした。

活性測定に際しては、溶媒 (DMSO) のみのから得られた値を差し引いた。また陽性対照として 17 β -エストラジオールを用いた。

2.2 試料

標準試料は特級試薬を用いた。またプラスチック製品の試料は、市販品を n-ヘプタン抽出したものを濃縮し、その濃度は、ガスクロマトグラムのピーク

面積を既知量の di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) のそれと比較して、相対値として表した。なお抽出、濃度測定は研究総括者の片瀬が行った。

3 結果

3.1 測定条件の最適化

本法の有効性を検証するために、陽性対照である 17 β -エストラジオールを用いて、様々な条件下にエストロゲン活性を測定し、測定条件の最適化を図った。培養液量、培養温度、培養時間、振盪の有無などについて検討を加えた結果、全量 200 μ l の反応系を用いて、28°C で 4 日間、密閉系で培養することにより、 5×10^{-11} M の 17 β -エストラジオールを再現性高く検出できる条件を設定することができた。

3.2 標準試料の分析

17 β -エストラジオールに加えて、既に強いエストロゲン様活性を有することが知られている、estriol, estron, Sopia A, norethindrone について、本法を用いてその活性を測定した。予想通りこれらの化合物のいずれもが、エストロゲン様活性を呈し、本法の有効性が支持された (Fig. A)。しかし、弱いながらも、活性を有していることが知られている NPH に関しては、現在までのところそれを検出するには至っていない (Fig. B)。

3.3 活性未知の試料の分析

構造から推定して、エストロゲン様活性を保有することが疑われる数種の化合物について、本法を適用して活性の検出を試みた。供試した試料は、sinapic acid (SNA), 4-hydroxybenzoic acid (HBA), vanillic acid (VNA), ferulic acid (FRA), DEHP, 4-hydroxycinnamic acid (HCA), resveratrol, genistein, propylphenol, o-allylphenol, である (Figs. B, C, D)。これらのうち、genistein は 1×10^{-6} M (Fig. B) で、resveratrol は 1×10^{-5} M (Fig. D) で明らかな活性が検出された。また、HBA と SNA には全く活性が認められなかった (Fig. C)。その他の化合物は、最高濃度の実験区においてわずかの活性が認められたが、これらについては今後の検討が必要である。

3.4 市販プラスチック製品試料の分析

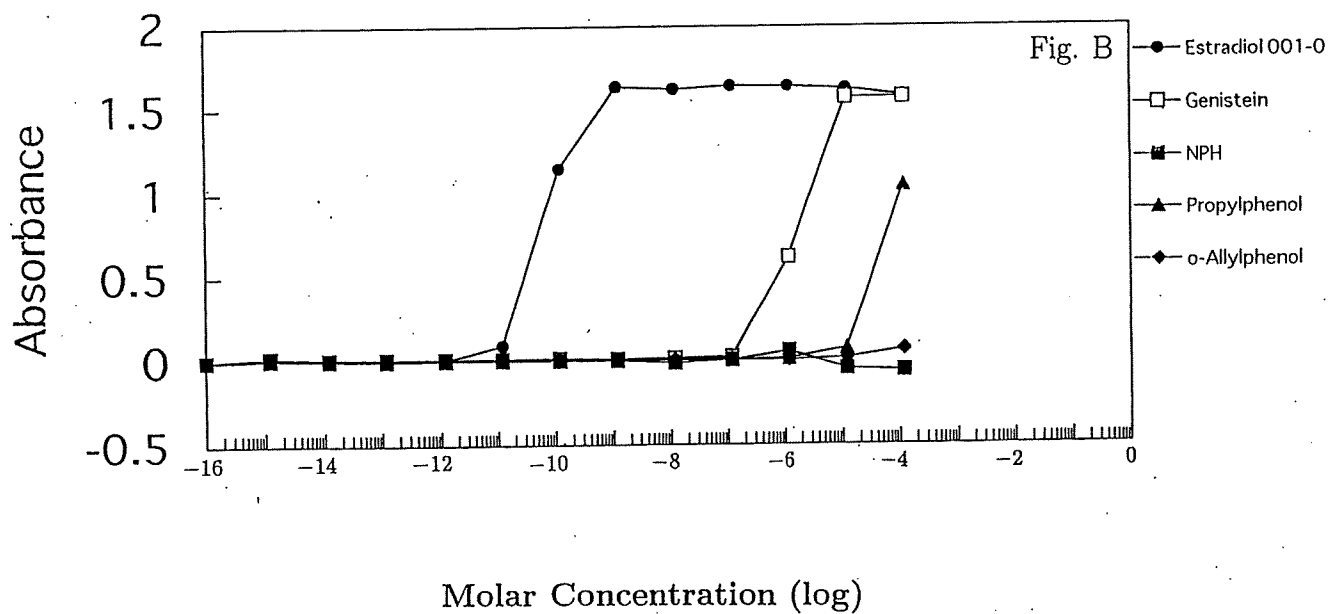
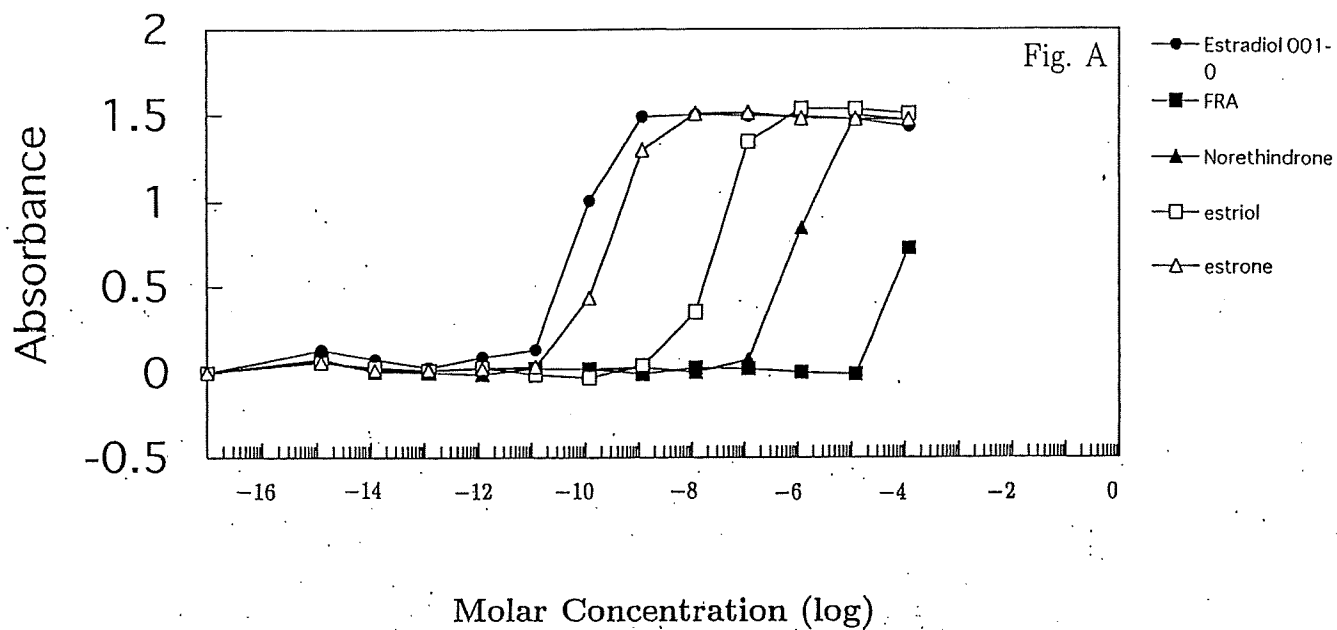
市販のプラスチック製品から、オモチャ 2 点、スリッパ 1 点、テーブルクロス 1 点、手術用手袋 4 点を選び、その n-ヘプタン抽出物について検討した。手袋については 3 点が明らかな活性を示し (Fig. E)、スリッパやテーブルクロスおよびオモチャ (まり、豚のオモチャ) にもわずかの活性が認められた

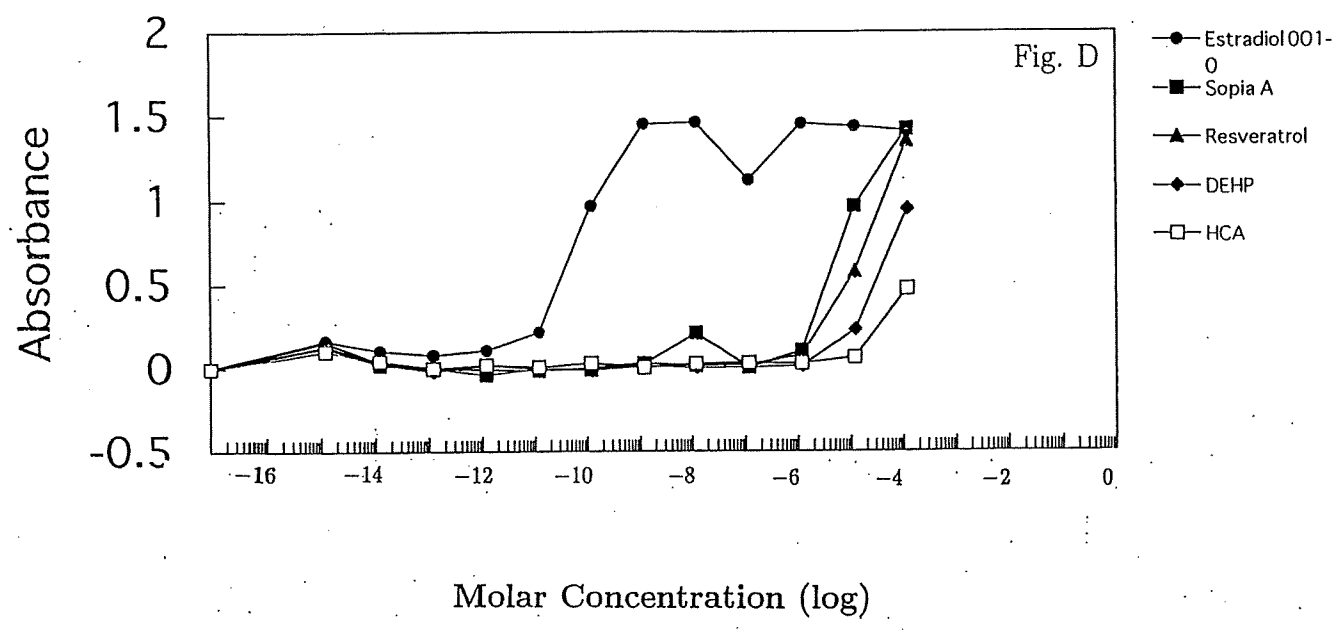
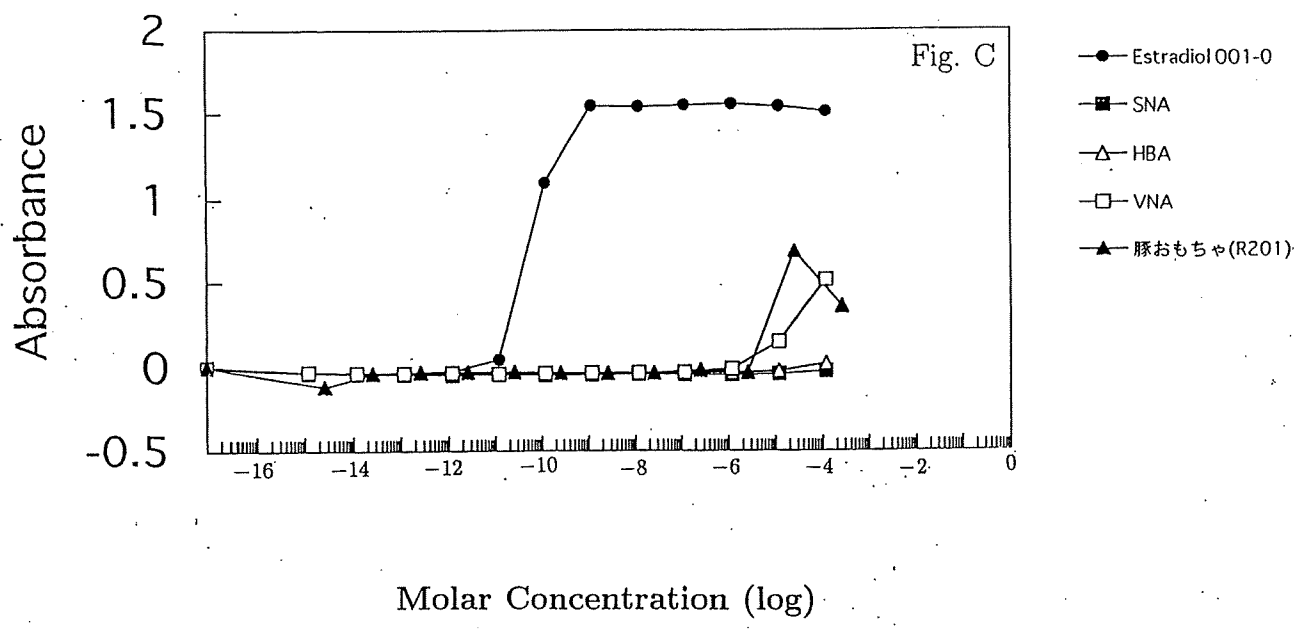
(Figs. C, F)。

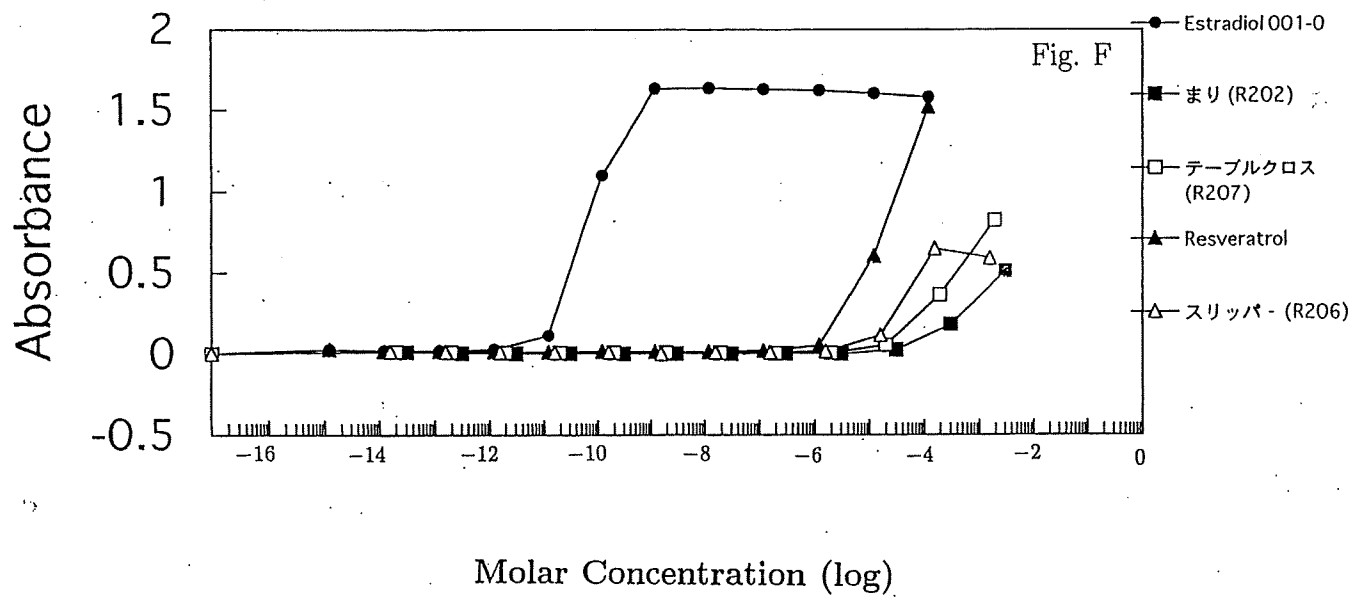
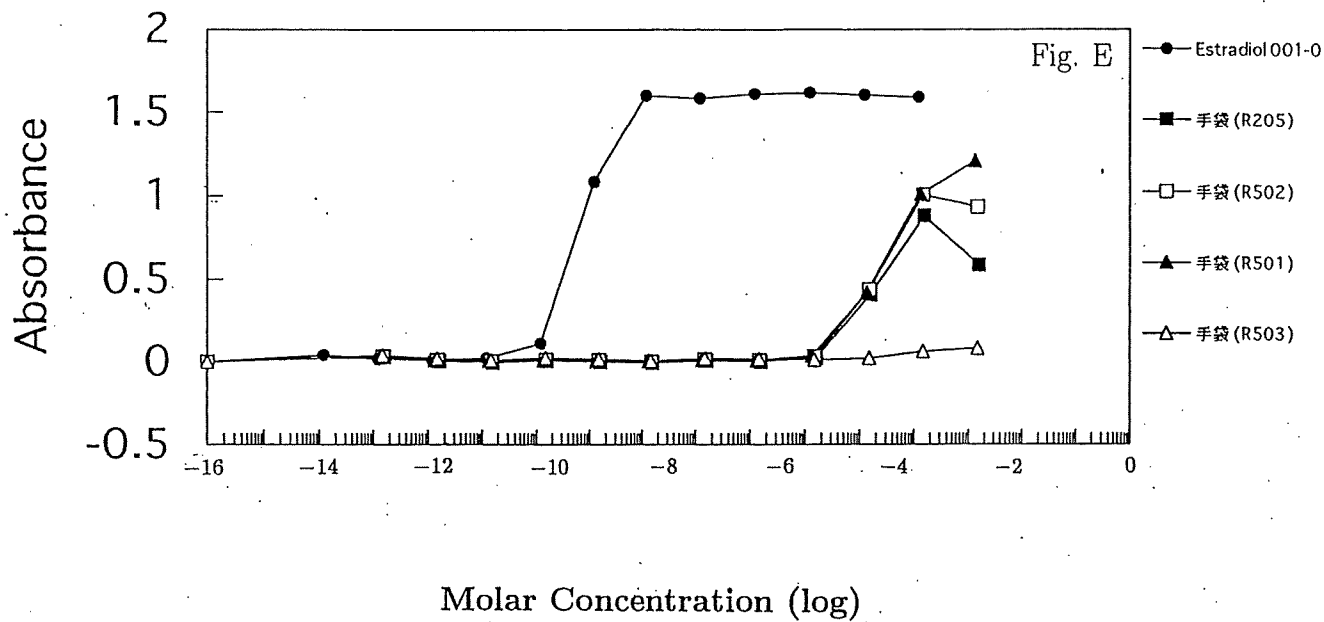
4 考察

我々の環境中には非常に多数のプラスチック製品が存在しており、それらに含まれる内分泌攪乱物質の定量・定性は火急の問題である。これらの多数の試料を能率良く検定するには、簡便でコストが低く、かつ定量性と再現性に富んだ測定系が必要である。本研究で検討対象とした組換え酵母を用いるエストロゲン様活性検出系は、陽性対照である 17β -エストラジオールの活性を 5×10^{-11} M という低濃度で再現性よく検出することができ、さらに調査した既知のエストロゲン用活性物質の殆どに対して、陽性の結果を与えた。この事実は、本法にかかる費用が比較的安くまた特殊な装置を必要としないこととあいまって、内分泌物質の第一次スクリーニングにおいて、本法が極めて有効であることを示す。

本法を、活性未知の数種の化合物、あるいはプラスチック抽出物に適用したところ、genistein や resveratrol あるいは、手術用手袋の一部に明らかな活性が見出された。これらの陽性物質に関しては、試料の純度や部分分解物の含有量などを検討した後に、さらに高次の検定系を用いて、内分泌攪乱作用を定量する必要がある。







厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担）研究報告書

組換え酵母レセプターに感応するプラスチック溶出化合物の同定および定量
～内分泌攪乱物質検索のためのプラスチック溶出化合物の簡易分析法の開発～

分担研究者 片瀬隆雄・水谷 広 日本大学生物資源科学部

研究要旨：組換え酵母を用いて内分泌攪乱物質を検索したところ、プラスチック製品の食品包装用ラップフィルム、学校給食用手袋、おもちゃの一部に明らかなエストロゲン様活性が検出された。そこで、n-ヘプタン抽出液中の化合物をガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を用いて分析した結果、フタル酸ジエチル、フタル酸ベンジルブチル、フタル酸ジエチルヘキシルの3種類のフタル酸エステルおよびアジピン酸ジエチルヘキシル、アジピン酸ジn-オクチルなど6種のアジピン酸エステルが同定された。プラスチック製品のなかで、最も強い活性を示した給食用手袋3点から溶出したn-ヘプタン溶液中に同定された共通の化合物とその平均濃度は、フタル酸ベンジルブチル(BBP) (2500ppm)及びフタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)(7500 ppm)であった。さらに、この活性を有した手袋2点から、共通にアジピン酸ジ2-エチルヘキシル(DEHA)(2500ppm)が検出された。おもちゃ、テーブルクロスおよびスリッパにもわずかな活性が認められたが、これらのプラスチック製品3点に共通してDEHPが同定され、平均濃度は18000ppmであった。また、同様にわずかな活性を示したラップ3点から、共通してDEHPまたはアジピン酸ジn-オクチル(DnOA)が平均濃度で6900ppm 検出された。

A. 研究目的

現在、日本で使用されている食品用合成樹脂器具及び容器包装に添加されている合成化合物は、500種類以上あると予想される¹⁾。最近、合成化合物の内分泌攪乱作用に関心が寄せられている。この作用を持つ合成化合物の、4-ノニルフェノール²⁾及びビスフェノールA (bis-2,2'-hydroxyphenyl propane)³⁾がプラスチックに添加されまたは本体に残留し、使用中に容易に溶出することが明らかとなって以来、日常生活における化合物の安全性の関心がさらに高

まっている。これらのプラスチックから溶出する内分泌攪乱物質はエストロゲン作用をもつ。合成化合物のこの作用はすでに、1930年代の後半にDoddsらにより約40種類の合成化合物の作用強度が測定され、最大効果の250万単位/gから最少効果の10単位/gまで、その間に25万倍の強度の差異があることが明らかとなった⁴⁾。すでに明らかとなったこれらのプラスチック溶出物は最少効果のエストロゲン作用を有する化合物群に属し、単独で強度の影響を与えることは考え難い。従って、重要な課題はプラスチックをはじめ日常生活で使用されている

多数の合成化合物の個々の作用強度を測定することにある。そのために、迅速簡便なプラスチック試料の調製法の開発が必要である。今回は、試みに既報の簡便な抽出法⁵⁾で調製したプラスチック製品のn-ヘプタン抽出物を組換え酵母レセプターを用いた内分泌攪乱物質検索法でスクリーニングしたところ、明らかなエストロゲン活性が検出された。そこで、まず、ガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を用いて、n-ヘプタン抽出物中の化合物の同定および定量を行った。

B. 研究方法

1 n-ヘプタン抽出液の調製

プラスチック製品からの溶出物の分析は既報⁵⁾に基づいて行った。すなわち、水洗し、風乾後のプラスチック製品を約2g (ラップフィルムの場合、約9cm×9cm)を切り取り、共栓付試験管に詰め、4mlのn-ヘプタンを加え、オーブン加熱後、室温で放置し、n-ヘプタン溶液をガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計で同定および定量した。定量値は、4mlのn-ヘプタン溶液中の濃度で示した。

2 活性調査用DMSO溶液の調製

内分泌攪乱作用の調査のために、エストロゲン様活性分析に使用したn-ヘプタン抽出物の適用濃度は、以下のようにして調製した。すなわち、同定された化合物の濃度を和した総濃度を、フタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)のモル濃度に換算して、2.5mM (ラップなど) および28~64mM (手袋など)に規格化した。規格化した各濃度の溶液の溶媒n-ヘプタンを留去して、あらたにdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解した溶液を活性調査に適用した。活性調査は分担研究者の井上が行った。

3 市販プラスチック製品試料

国内外の食品包装用ラップフィルム、おもちゃ、学校給食用器具およびペットボトルなど156点(表1)を2.1の方法でn-ヘプタン抽出溶液を調製し、溶液中の化合物の同定および定量分析に供した。

これらのプラスチック製品n-ヘプタン抽出液の中から、食品包装用ラップ・フィルム3点、学校給食用等手袋4点、おもちゃ2点、テーブルクロス1点およびスリッパ1点を選び、活性調査に供した。

C. 結果

市販プラスチック製品のなかで、手袋については3点が明らかな活性を示した。その他の手袋、ラップ、おもちゃ、テーブルクロス、スリッパにもわずかな活性が認められた。

プラスチック製品のなかで、最も強い活性を示した給食用手袋3点から溶出したn-ヘプタン溶液中に同定された共通の化合物とその平均濃度は、フタル酸ベンジルブチル(BBP) (2500ppm)及びフタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)(7500ppm)であった。さらに、この活性を有した手袋2点から、共通にアジピン酸ジ2-エチルヘキシル(DEHA) (2500ppm)が検出された。おもちゃ、テーブルクロスおよびスリッパにもわずかな活性が認められたが、これらのプラスチック製品3点に共通してDEHPが同定され、平均濃度は18000ppmであった。また、同様にわずかな活性を示したラップ3点から、共通してDEHPまたはアジピン酸ジn-オクチル(DnOA)が平均濃度で6900ppm検出された(表3)。活性分析に使用したn-ヘプタン抽出液は、それぞれ調製し、2.5mM(ラップなど)および28~64mM(手袋など)で適用した(表2)。

D. 考察

既に開発したプラスチック製品の簡便抽出法で溶出させたn-ヘプタン溶液のエストロゲン活性を調査したところ、明らかな陽性を示す物質の存在が示された。従って、本法の簡便性は多数の試料中の内分泌攪乱物質検索に極めて有効であると考えられる。

今回のエストロゲン様活性調査に用いた試料は、2.5mM~64mMと異なる濃度で調製された。今後は、量的な面からの検討が必要である。

文献

- 1) 厚生省食品化学課編：食品用プラスチック衛生学，297-307pp，1980.
- 2) A.M.Soto et al.: Unviron. Helth Perspect. 92:167-173,1991.
- 3) A.V.Krishnan et al.:Endocrinology 132: 2279-2288,1993.
- 4) 片瀬隆雄：化学工業49:913-921,1998.
- 5) 片瀬隆雄：神奈川県立衛生短期大学紀要, 15:13-19,1982.

表1 化学分析に供した市販プラスチック製品一覧

市販プラスチック	I D 番号			合計
	業務用	市販用	小計	
1. 食品包装用 ラップフィルム				
日本	49枚 (R01-R50)	16枚 (R51-R66)	65 枚	132 枚
韓国	16枚 (R101-R116)	6枚 (R141-R146)	22 枚	
中国	34枚 (R151-R184)	11枚 (R190-R200)	45 枚	
小計	99枚	33枚		
2. おもちゃ等	7点 (R201-R207)			7点
3. 学校給食用器具	5点 (R501-R505)			5点
4. ペットボトル	12点 (R211-R222)			12点
合計				156 点

表2 エストロゲン様活性調査に供した試料一覧

		換算濃度	活性判定	同定された化合物
024-0	おもちゃ (豚) (R201)	5.4mM	++	DEP
025-0	おもちゃ (鞠) (R202)	64 mM	++	DEHP
026-0	スリッパ (R206)	33 mM	++	DEHP
027-0	テーブルクロス (R207)	41 mM	++	DEHP
028-1	手術用手袋 (R205)	33 mM	+++	BBP, DEHP
-2	学校給食手袋 (R501)	28 mM	+++	BBP, DEHP
-3	学校給食手袋 (R502)	31 mM	+++	BBP, DEHP, DEHA
-4	学校給食手袋 (R503)	31 mM	+	DEHP
010-1	ラップ(A型) (R 09)	2.5mM	+	DnOA
-2	ラップ(B型) (R 40)	2.5mM	+	AAE(C ₆ ~C ₁₀)
-3	ラップ(韓国) (R101)	2.5mM		DEHP, DEHA
011-0	DEHP -	2.5mM	++	—————
010-0	AAE(C ₆ ~C ₁₀) -	2.5mM	+	—————

化合物の略号は表3の脚注参照：

表3 エストロゲン活性を示した試料のプラスチック製品中で同定された化合物と濃度

プラスチック製品 (ID)	同定された化合物 (濃度: ppm)							エストロゲン 活性 mM 濃度 (ID)
	DEP	BBP	DEHP	DEHA	DnOA	AAE	総濃度	
おもちゃ (豚) (R201)	1,200						1,200	5.4 ++ (024-0)
おもちゃ (鞠) (R202)			25,000				25,000	64 ++ (025-0)
スリッパ (R206)			13,000				13,000	33 ++ (026-0)
テーブルクロス (R207)			16,000				16,000	41 ++ (027-0)
手術用手袋 (R205)		5,400	7,300				13,000	33 +++ (028-1)
学校給食手袋 (R501)		1,800	7,200	2,300			11,000	28 +++ (-2)
学校給食手袋 (R502)		1,900	7,900	2,600			12,000	31 +++ (-3)
学校給食手袋 (R503)			12,000				12,000	31 + (-4)
ラップ(A型) (R 09)					7,600		7,600	2.5 + (010-1)
ラップ(B型) (R 40)						6,200	6,200	2.5 + (-2)
ラップ(韓国) (R101)			24	7,300			7,300	2.5 + (-3)

化合物の略号;

DEP: diethyl phthalate	フタル酸ジエチル
BBP: benzylbutyl phthale	フタル酸ベンジルブチル
DEHP: di-2-ethylhexyl phthalate	フタル酸ジエチルヘキシル
DEHA: di-2-ethylhexyl adipate	アジピン酸ジエチルヘキシル
DnOA: di-n-octyl adipate	アジピン酸ジn-オクチル
AAE: adipic acid ester (C ₆ -C ₁₀)	アジピン酸エステル(C ₆ -C ₁₀ 混合物)
AAE-C ₆ : di-n-hexyl adipate	アジピン酸ジn-ヘキシル
AAE-C ₇ : di-n-heptyl adipate	アジピン酸ジn-ヘプチル
AAE-C ₈ : not-yet-identified	未同定アジピン酸エステル
AAE-C ₉ : di-n-nonyl adipate	アジピン酸ジn-ノニル
AAE-C ₁₀ : di-n-decyl adipate	アジピン酸ジn-デシル

エストロジェンによる内分泌攪乱作用
プラスチック溶出物等の弱いエストロゲン効果物質の微量摂取

片瀬隆雄

日本大学生物資源科学部

Endocrine Disruption by Estrogen :
Plastics and Natural Substances as Estrogenic Molecules in our Daily Lives
by Takao Katase,
College of Bioresource Sciences, Nihon University

March, 1999

平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

研究課題：内分泌かく乱物質等，生活環境中の化学物質による健康影響及び
安全性の確保等に関する研究（課題番号：H10－生活－022）

研究代表： 片瀬隆雄

日本大学 生物資源科学部

目次

1. 環境ホルモン：日常生活の安全性に関する解決すべき21世紀当初の課題：
～合成化合物のホルモン作用攪乱効果の解明～ ----- (1)
(*Green Campus*, 47: 10-16, 1999)
2. プラスチックと「ホルモン作用攪乱効果」仮説：
～「エストロジェン様合成化合物」の微量被曝をどう考えるか～ ----- (9)
(*化学と生物*, 36: 768-770, 1998)
3. Dodds による合成エストラス効果化合物の内分泌攪乱作用の定量化
～化学構造との関連性の意義～ ----- (13)
(*化学工業*, 49: 913-921, 1998)
4. 可塑剤フタル酸エステルの影響 ----- (23)
(別冊化学11月号「環境ホルモンとダイオキシン」70-78, 1998 , 化学同人)
5. 包装材にみる新たな「環境ホルモン様物質」
～攪乱能の微量摂取をどう考えるか～ ----- (33)
(*Eco Industry*, 4: 5-15, 1999)
6. プラスチック食器・哺乳瓶・おもちゃ等と「環境ホルモン」 ----- (59)
(*食べもの文化*, No.252, 46-54, 1998)
7. 「内分泌かく乱化学物質」研究・調査の現在
～プラスチック等からの微量被曝をどのように考えるか～ ----- (66)
(*食生活*, 93: 87-93, 1999)

<学会発表要旨等>

1. 食品包装材ラップフィルムの潜在溶出化合物の挙動 (1) アジピン酸エステル等の同定
(*日本分析化学会第47年会講演要旨集* 3G22, 164, 1998) ----- (45)
2. 食品包装のラップから溶けだすものを探る
(*日本分析化学会第47年会, 展望とトピックス*, 12, 1998) ----- (46)
3. 食品包装材プラスチック・フィルムから移行するアジピン酸エステル ----- (47)
Adipic acid esters migrated from plastic films for food-wrapping ----- (48)
(*日本内分泌攪乱化学物質学会第一回研究発表会要旨集*, B17, 45, 1998)

19980579

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので前ページの「目次」をご参照ください。