

表2. 観察時間中における各被験児の MOUTHING 時間の比率

ID	月齢	指しゃぶり (月)	玩具			その他		MOUTHING 合計時間 (%)
			おしゃぶり (%)	歯固め (%)	他の玩具 (%)	合成樹脂製 (%)	その他 (%)	
A01	3	10.0	36.7	0.0	0.0	0.0	4.7	51.3
A02	3	19.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	19.6
A03	3	7.0	0.0	0.0	6.0	0.0	1.7	14.7
A04	3	15.7	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	18.7
A05	3	21.3	31.6	0.0	0.0	0.0	7.7	60.6
A06	4	12.4	0.0	0.0	12.4	0.0	11.0	37.9
A07	4	22.7	0.0	0.0	2.7	0.0	6.0	31.3
A08	4	22.0	0.0	0.0	5.3	0.0	0.0	27.3
A09	4	9.0	24.7	0.0	0.0	0.0	6.0	39.7
A10	4	10.0	0.0	1.3	0.0	0.0	17.0	28.3
A11	5	21.3	1.7	0.3	5.3	0.0	1.2	29.9
A12	5	3.7	0.0	0.0	4.7	0.0	5.7	14.0
A13	5	2.3	4.0	0.0	7.9	0.0	3.6	17.9
A14	5	6.0	0.0	0.0	2.0	0.0	14.7	22.7
A15	5	9.0	0.0	6.7	0.7	0.0	5.7	22.0
A16	6	1.4	10.4	3.5	0.7	8.0	25.0	49.0
A17	6	4.0	0.0	3.3	2.7	0.0	4.7	14.7
A18	6	2.0	0.0	0.0	6.0	4.0	2.7	14.7
A19	6	14.6	0.0	2.0	0.0	11.3	8.6	29.8
A20	6	8.7	0.0	2.0	33.3	5.3	6.7	56.0
A21	7	24.5	0.0	0.0	5.2	10.4	2.1	42.2
A22	7	0.7	0.0	1.3	7.2	5.9	15.0	30.1
A23	7	7.3	3.6	0.0	7.3	0.0	13.3	31.5
A24	7	2.7	0.0	6.3	2.7	20.3	8.0	40.0
A25	7	3.4	0.0	1.0	5.7	5.9	31.0	47.0
A26	8	0.0	0.0	1.3	4.7	5.3	5.7	17.0
A27	8	2.0	0.0	0.0	6.0	5.3	8.0	21.3
A28	8	10.0	0.0	0.0	9.3	9.3	7.0	35.7
A29	8	0.0	0.0	0.0	6.4	4.4	9.7	20.5
A30	8	2.0	0.0	0.0	3.3	16.7	16.7	38.7
A31	9	1.0	1.3	0.0	4.7	0.7	3.3	11.0
A32	9	0.0	0.0	0.0	26.2	6.3	4.6	37.1
A33	9	16.7	1.3	0.0	8.0	7.3	19.3	52.7
A34	9	0.5	0.0	0.0	20.1	0.0	17.6	38.2
A35	9	0.0	0.0	0.0	13.9	13.9	15.7	43.5
A36	10	10.3	0.0	2.1	4.1	15.2	9.7	41.4
A37	10	16.8	0.0	0.0	25.4	1.1	4.5	47.8
A38	10	2.7	0.0	0.0	13.3	12.7	22.7	51.3
A39	10	11.4	0.0	0.0	7.0	19.0	0.0	37.3
A40	10	0.7	0.3	0.0	15.0	8.7	3.3	28.0
A41	11	31.7	0.0	0.0	0.3	18.6	0.0	50.6
A42	11	0.7	0.0	0.0	0.7	18.3	1.3	21.0
A43	11	4.0	0.0	0.0	14.7	4.0	5.3	28.0
A44	11	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	7.3
A45	11	0.5	0.0	0.0	1.5	2.1	2.7	6.7
A46	12	0.0	0.0	0.0	9.0	6.7	6.0	21.7
A47	12	1.6	0.5	0.0	4.2	10.7	9.9	27.0
A48	12	0.0	23.7	0.0	2.7	7.5	5.8	39.7
A49	12	6.0	0.0	0.0	7.3	2.7	13.3	29.3
A50	12	6.7	3.3	0.0	10.7	8.7	1.3	30.7

表3. 1日の活動時間における各被験児の MOUTHING 時間の推定値 (分)

ID	月齢	活動時間	指しゃぶり	玩具			その他		MOUTHIN 合計時間
				おしゃぶり	歯固め	他の玩具	合成樹脂製	その他	
A01	3	570	57.0	209.0	0.0	0.0	0.0	26.6	292.6
A02	3	553	106.9	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	108.6
A03	3	468	32.8	0.0	0.0	28.1	0.0	7.8	68.6
A04	3	605	94.8	0.0	0.0	0.0	0.0	18.2	112.9
A05	3	641	136.5	202.6	0.0	0.0	0.0	49.6	388.7
A06	4	460	57.1	0.0	0.0	57.1	0.0	50.8	174.5
A07	4	270	61.2	0.0	0.0	7.2	0.0	16.2	84.6
A08	4	445	97.9	0.0	0.0	23.7	0.0	0.0	121.6
A09	4	565	50.9	139.4	0.0	0.0	0.0	33.9	224.1
A10	4	537	53.7	0.0	7.2	0.0	0.0	91.3	152.2
A11	5	553	118.0	9.2	1.8	29.5	0.0	6.6	165.2
A12	5	686	25.2	0.0	0.0	32.0	0.0	38.9	96.0
A13	5	421	9.8	16.7	0.0	33.5	0.0	15.3	75.3
A14	5	660	39.6	0.0	0.0	13.2	0.0	96.8	149.6
A15	5	502	45.2	0.0	33.5	3.3	0.0	28.4	110.4
A16	6	584	8.1	60.8	20.3	4.1	46.6	146.0	285.9
A17	6	528	21.1	0.0	17.6	14.1	0.0	24.6	77.4
A18	6	632	12.6	0.0	0.0	37.9	25.3	16.9	92.7
A19	6	585	85.2	0.0	11.6	0.0	65.9	50.4	174.3
A20	6	624	54.1	0.0	12.5	208.0	33.3	41.6	349.4
A21	7	710	173.7	0.0	0.0	36.8	74.0	15.1	299.6
A22	7	580	3.8	0.0	7.6	41.7	34.1	87.2	174.4
A23	7	430	31.3	15.6	0.0	31.3	0.0	57.3	135.5
A24	7	651	17.4	0.0	41.2	17.4	132.4	52.1	260.4
A25	7	480	16.1	0.0	4.8	27.4	28.3	148.8	225.5
A26	8	510	0.0	0.0	6.8	23.8	27.2	28.9	86.7
A27	8	622	12.4	0.0	0.0	37.3	33.2	49.8	132.7
A28	8	515	51.5	0.0	0.0	48.1	48.1	36.1	183.7
A29	8	690	0.0	0.0	0.0	44.2	30.1	67.2	141.5
A30	8	660	13.2	0.0	0.0	22.0	110.0	110.0	255.2
A31	9	525	5.3	7.0	0.0	24.5	3.5	17.5	57.8
A32	9	647	0.0	0.0	0.0	169.2	40.7	30.0	239.9
A33	9	574	95.7	7.7	0.0	45.9	42.1	111.0	302.3
A34	9	645	3.5	0.0	0.0	129.4	0.0	113.4	246.3
A35	9	526	0.0	0.0	0.0	73.2	73.2	82.3	228.7
A36	10	882	91.2	0.0	18.2	36.5	133.8	85.2	365.0
A37	10	612	102.6	0.0	0.0	155.6	6.8	27.4	292.3
A38	10	460	12.3	0.0	0.0	61.3	58.3	104.3	236.1
A39	10	528	60.2	0.0	0.0	36.8	100.3	0.0	197.2
A40	10	562	3.7	1.9	0.0	84.3	48.7	18.7	157.4
A41	11	575	182.3	0.0	0.0	1.8	106.9	0.0	291.0
A42	11	635	4.2	0.0	0.0	4.2	116.4	8.5	133.4
A43	11	590	23.6	0.0	0.0	86.5	23.6	31.5	165.2
A44	11	682	13.6	0.0	0.0	0.0	0.0	36.4	50.0
A45	11	417	2.0	0.0	0.0	6.1	8.7	11.3	28.1
A46	12	682	0.0	0.0	0.0	61.4	45.5	40.9	147.8
A47	12	545	8.6	2.9	0.0	22.8	58.5	54.2	147.0
A48	12	543	0.0	128.8	0.0	14.7	40.5	31.3	215.4
A49	12	500	30.0	0.0	0.0	36.7	13.3	66.7	146.7
A50	12	465	31.0	15.5	0.0	49.6	40.3	6.2	142.6

表4. 月齢群別、対象別、一日あたりの MOUTHING時間
①月齢群別、対象別 MOUTHING 時間 (分)

	おしゃぶり	他の玩具	玩具以外 合成樹脂製	玩具以外 他の材質	指	総計
3-5ヶ月	平均値 38.5±76.7	18.0±17.9	0.0±0.0	32.1±29.7	65.7±36.7	155.0±87.9
15例	中央値 0.0	13.2	0.0	26.6	57.0	121.6
	幅 0.0~209.0	0.0~57.1	0.0~0.0	0.0~96.8	9.8~136.5	68.6~388.7
6-12ヶ月	平均値 6.9±23.8	52.4±48.7	47.1±38.3	51.7±40.3	33.4±46.7	190.4±85.5
	中央値 0.0	37.3	40.5	40.9	13.2	174.4
	幅 0.0~128.8	0.0~220.5	0.0~133.8	0.0~148.8	0.0~182.3	28.1~365.0
全被験児	平均値 16.3±47.8	42.1±44.6	33.0±38.6	45.8±38.2	43.1±46.1	179.8±86.9
	中央値 0.0	32.1	26.3	35.0	27.6	161.3
	幅 0.0~209.0	0.0~220.5	0.0~133.8	0.0~148.8	0.0~182.3	28.1~388.7

②オランダ調査との比較

	おしゃぶりを除くすべての MOUTHING 時間 (分)		MOUTHING 総計時間 (分)	
	日本	オランダ [#]	日本	オランダ [#]
3-5ヶ月	例数 15例	5例	15例	5例
	平均値 115.9 ± 38.2	36.9 ± 19.1	154.9 ± 87.9	
	中央値 110.4	約35*	121.6	約135*
	幅 58.6 ~ 186.1	14.5 ~ 67.0	68.6 ~ 388.7	
6-12ヶ月	例数 35例	14例	35例	14例
	平均値 184.7 ± 86.5	44.0 ± 44.7	190.4 ± 85.5	
	中央値 174.4	約35*	174.4	約50*
	幅 28.1 ~ 364.9	2.4 ~ 171.5	28.1 ~ 365.0	
全被験児	例数 50例	19例	50例	
	平均値 164.1 ± 81.4	42.1 ±	179.8 ± 86.9	
	中央値 148.7	約35*	161.3	
	幅 28.1 ~ 364.9	2.4 ~ 171.5	28.1 ~ 388.7	

: Groot et al. 1998

* : 同上 図から読み取り

図1. 1日の活動時間の分布

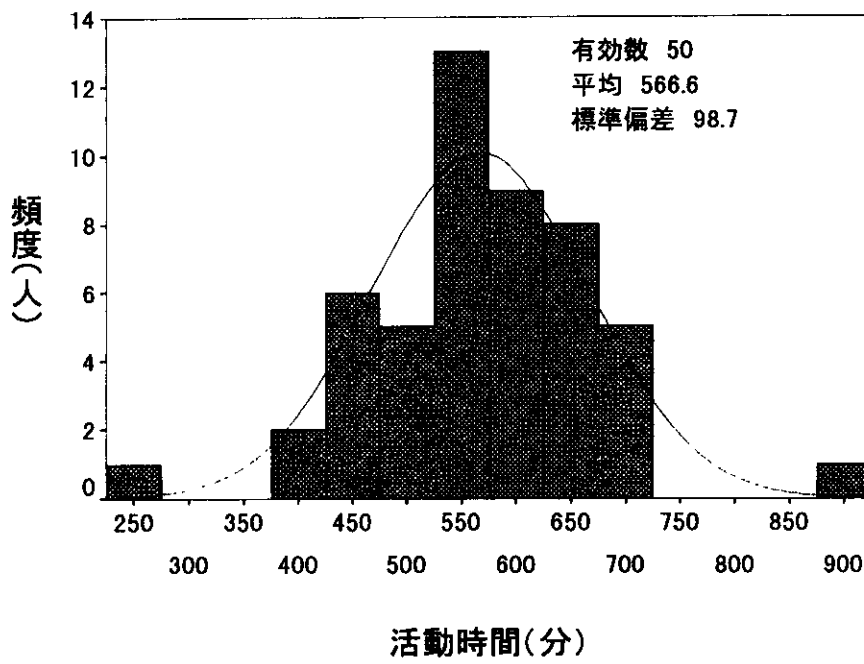


図2. 1日のMOUTHING時間の分布

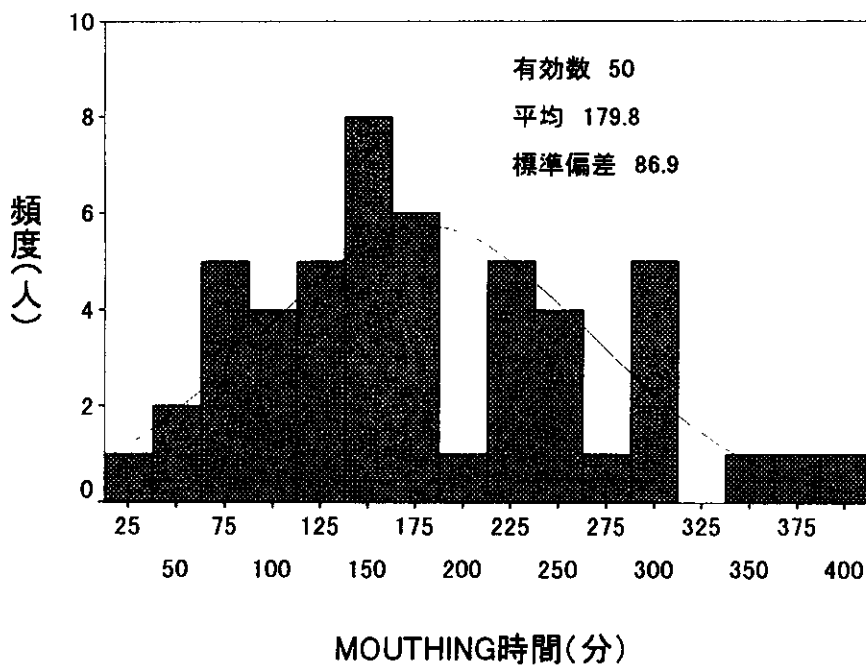


図3. 月齢別MOUTHING時間

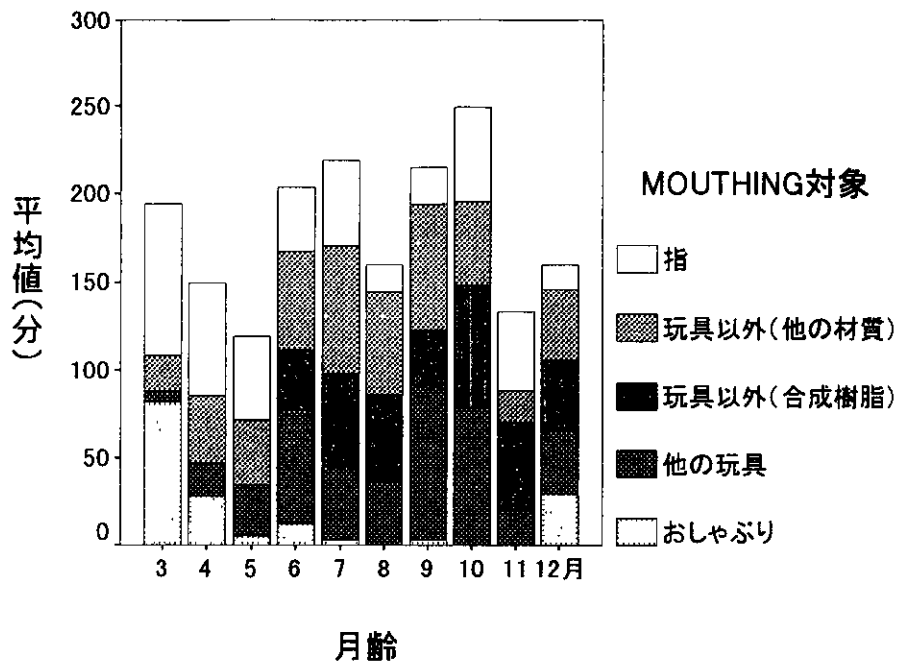
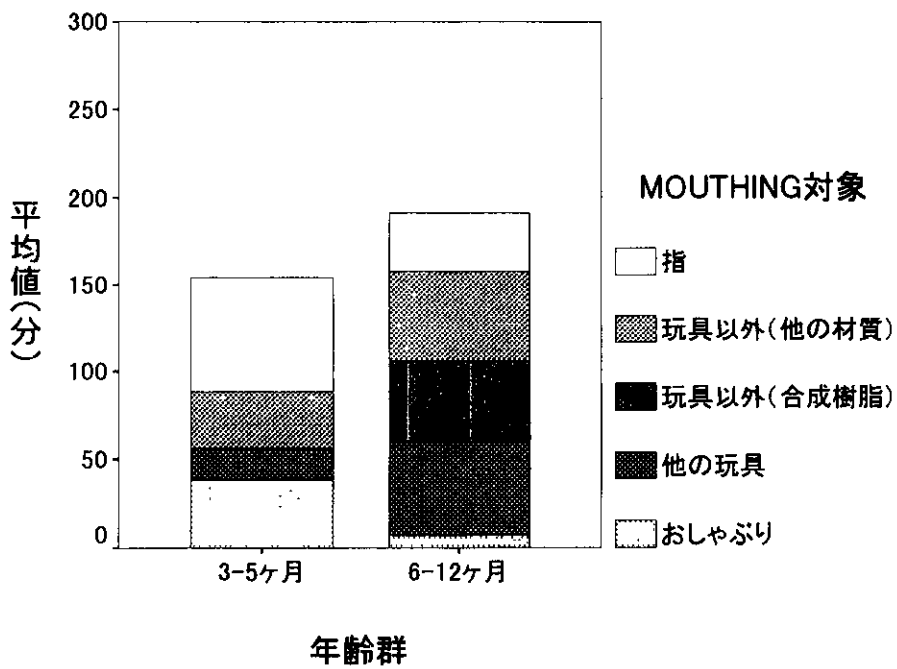


図4. 年齢群別MOUTHING時間



ポリ塩化ビニル製おもちゃからのフタル酸エステル
の溶出に関する調査研究

協力研究者 杉田 たき子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ポリ塩化ビニル製おもちゃに可塑剤として用いられるフタル酸エステル類が内分泌攪乱物質の一つであることが指摘されたことから、世界各国で乳児用おもちゃからのフタル酸エステル類の溶出に対する関心が高まり、大きな社会問題となり、我が国でもこれらに関する調査研究事業が進められた。本研究はその事業の一環として、乳幼児が口に含んだときのフタル酸エステル類の移行量の推定及び実験室でのシミュレーション試験法の開発のための基礎的研究を実施した。その結果①分析法ではおもちゃ中のフタル酸エステル類の残存量の測定にはGC法が、溶出試験溶液の定量にはHPLC法が適した。②おもちゃからはフタル酸ジイソノニル(DINP)が多く検出され、DINPは製造メーカーにより形状の異なるピークとなることが明らかとなった。材質中のDINPの定量は、総ピーク面積で、また、溶出試験液中の定量は主ピークの高さを基準にした。③DINP58%を含有するおしゃぶりをを用いて、各種振とう用機器を用いて8の字振とう、往復振とう、上下振とう及び超音波振とうによる溶出試験を行ったところ、8の字振とう(毎分90回)ではDINPの溶出量は $10.9\mu\text{g/mL}$ 、往復振とう(毎分160回)では $20.4\mu\text{g/mL}$ 及び上下振とう(毎分300回)では $35.8\mu\text{g/mL}$ であり、上下振とうで多く溶出した。DINPの溶出量は溶出用器具の中でのおもちゃ試験片の動きが大きいほど溶出量は多く、ビー玉を加えると、試験片の動きが阻害されDINPの溶出量は減少した。④4種類の振とう方法を数種類のおもちゃ試験片に応用したところ、DINPの溶出量は試験片の重量や形状にも左右され、今回検討した振とう方法では、300回/分の上下振とう法が溶出量のバラツキが小さく最も有効な方法であると考えられた。⑤ヒトによる15分間4回のチューイング試験結果で、DINPの総移行量及び濃度はおしゃぶりで $231\sim 401\mu\text{g}$ 及び $4.4\sim 11.6\mu\text{g/mL}$ 、ガラガラでは $308, 373\mu\text{g}$ 及び $8.4, 11.6\mu\text{g/mL}$ 、歯がためでは $156, 207\mu\text{g}$ 及び $4.4, 6.6\mu\text{g/mL}$ であった。今回実施した上下振とう試験(300回/分、15分間)における溶出量は、おしゃぶりで $297\mu\text{g}$ 及び $9.9\mu\text{g/mL}$ 、ガラガラでは $246\mu\text{g}$ 及び $8.2\mu\text{g/mL}$ 、また、歯がためでは $186\mu\text{g}$ 及び $6.2\mu\text{g/mL}$ であり、ヒトによるチューイング試験の移行量と良く一致した。

I. フタル酸エステル類の分析法 に関する検討

A. 研究目的

ポリ塩化ビニルは可塑剤の添加量を調整することによって柔軟性と加工性を高め、性質の異なる製品ができる。しかも安価のため従来から農業用ビニルシート、水道管等の他、食品用容器包装に大量に使用されて来た。しかし、塩化ビニルモノマーの発ガン性が指摘されてからは食品用の用途は少なくなったものの、子供用おもちゃは代替品が導入されず、依然として塩化ビニルは主原料となっている。特に、ソフト塩ビと称されるおもちゃには20~60%の可塑剤が添加されている。可塑剤は原料の塩化ビニルと化学的結合をしていないため有機溶媒には簡単に溶け出すと考えられている。近年、フタル酸エステルが内分泌攪乱物質の一つと発表され、世界各国で子供用おもちゃからのフタル酸エステルの溶出に関する関心が高まり、大きな社会問題となっている。

塩化ビニル製のおもちゃや食品用容器包装材に用いられる可塑剤の内、主なものはフタル酸エステルである。フタル酸エステルはC1からC13のアルキル鎖を持つo-フタル酸のジエステルである。今回、フタル酸エステル15種類及び2種類のアジピン酸エステルを入手しガスクロマトグラフィー(GC)及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析条件を検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

フタル酸エステル：フタル酸ジメチル(DMP)、フタル酸ジエチル(DEP)、フタル酸ジイソプロピル(DIPP)、フタル酸ジ-n-プロピル(DNPP)、フタル酸ジイソブチル(DIBP)、フタル酸ジブチル(DIBP)、フタル酸ジ-n-ペンチル(DPeP)、フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)、フタル酸ジヘプチル(DHP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ジ-n-オクチル(DNOP)、フタル酸ジノニル(DNP)、フタル酸ジイソオクチル(DIOP)、フタル酸ジイソノニル(DINP)、フタル酸ジイソデシル(DIDP)、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)及びアジピン酸ジイソノニル(DINA)は和光純薬工業、関東化学、東京化成及びアルドリッチの試薬

アセトン及びアセトニトリル：HPLC用、片山化学工業製

2. 標準溶液

試薬のフタル酸エステル50.0mgをアセトンで溶解して50mLとし、1,000 μ g/mLの標準原液を調製した後、それぞれについてGCに注入し保持時間を確認した。GCで単一のピークとして検出された13種類は一定量を混合し、また複数のピークとして検出されたDIOP、DINP、DIDP及びDINAはそれぞれの一定量をアセトンあるいはアセトニトリルで適宜希釈した。

3. 装置

ガスクロマトグラフ：HP-5890 SERIES II Plus, FID検出器

高速液体クロマトグラフ：ポンプ LC-10A, 紫外可視分光検出器 SPD-10

AVvp, システムコントローラ SCL-10
A, データ処理装置 CR-7A plus 以上
(株) 島津製作所

4. GC測定条件

カラム: DB-1 (内径0.25 mm, 長さ30 m, 膜厚0.25 μ m), J&W Scientific社製

注入口温度: 250°C, 検出器温度:
300°C

カラム温度: ①100°C(1 min)-40°C
/min-220°C(0min)-10°C/min-280°C
(15min)

②200°C(1min)-10°C/min-300°C(10
min)

注入量: 1 μ l, スプリット (25:1)

5. HPLC測定条件

カラム: TSKgel ODS-80Ts QA (内径
4.6 mm, 長さ25 cm, 粒径5 μ m), 東
ソー(株)製

ガードカラム: TSKgurdgel ODS-80
Ts (3.2 mm I.D., 1.5cm), 東ソー製

カラム温度: 40°C, 流量: 1.0 ml/
min

移動相: ①フタル酸エステル類の測
定: アセトニトリル-水 (7:3) から,
リニアグラジエント15分でアセト
ニトリル100%とし, 10分間保持した。

②DINPの測定: アセトニトリル-水
(9:1) から, リニアグラジエント
5分でアセトニトリル100%とし, 15分
間保持した。

検出波長: 225 nm

注入量: 10 μ lあるいは50 μ l

C. 実験結果

1. フタル酸エステル類標準溶液の分 析条件の検討

フタル酸エステルの分析法としては

HPLC法及びGC法が報告されてい
る。今回は市販の玩具を測定対象とし
たため, できるだけ多くの試薬を入手
し, 分離分析条件を検討することとし
た。入手できたフタル酸エステル類は
15種類, アジピン酸エステル2種類で
あった。これら17種類についてGC法
及びHPLC法による分離分析を検討
した。

(1) GC法

対象としたフタル酸エステル及びア
ジピン酸エステルのCAS番号, 分子量及
びGC, HPLCにおける保持時間を
表1に示した。No1~13のフタル酸エ
ステル(DMP, DEP, DIPP, DNPP, DIBP,
DBP, DPEP, BBP, DCHP, DEHP, DNP, DNOP
及びDEHAは単一のピークとして検出さ
れたが, DHPは2本のピークであった。
これらは混合して標準溶液を調製した。
カラム条件①により, 13種類のフタル
酸エステル及びDEHAが良好に分離でき
た。しかし, DINP, DIOP, DIDP及びDI
NAは十数本からなるピークであったた
め, それぞれについて標準溶液を調製
した。また, DINPは多数の異性体混合
物であることから, 製造メーカーによ
ってピークの形状が異なることが明ら
かとなった。今回入手できたDINPは和
光純薬工業製及び関東化学製であつた
が, これらの試薬は保持時間は一致す
るもののピーク形状は著しく異なつた
(図1)。GC法では入手した可塑剤の
全てを測定する事ができた。また, 関
東化学製のDINPは①のカラム温度条
件ではブロードなピークとなり(図1-
B), インテグレータでカウントされ
ないことがあつたため, 標準原液(1,0
00 μ g/mL)をカラム温度条件②で測定し

た。保持時間は前者が12.2～14.6分、後者は11.9～14.8分で一致し、ピーク面積の和は前者が737,990、後者は721,106で、ピーク形状は異なるものの、各ピーク面積の総量は一致した。従って、DINPの定量は検出されたピーク面積のトータル量で行うこととした。

(2) H P L C 法

検出波長225 nm で測定した場合、フタル酸エステル類の感度はG C法に比べて著しく良好であった。G C法と同様にそれぞれのフタル酸エステル標準溶液(50 μ /mL)を測定したところ、12種類のフタル酸エステルは単一ピークとして検出されたもののアジピン酸エステルは2種類共検出されなかった。また、DNOPとDNPは保持時間が一致し、分離条件を検討したが、これらのピークを分離することは困難であった。DINPはG C法と同様、和光純薬工業製及び関東化学製のピーク形状は異なった。前者が14.9分を主ピークとする1グループのピークに対し、後者は14.4分が主ピークであるが、15.9分にも分離したピークがあり、2つのグループからなるピークであった(図2)。

以上のようにG C法及びH P L C法を検討したところ、材質試験溶液の測定にはすべてのフタル酸エステル及びアジピン酸エステルが同時に測定できるG C法が良好であること、溶出試験溶液の測定には感度の点で優れるH P L C法が適することが明らかとなった。

II. ポリ塩化ビニル製おもちゃ中のフタル酸エステルの溶出に関する研究

A. 研究目的

内分泌攪乱物質の環境汚染問題は我が国のみならず、諸外国でも大きな社会問題となり、それぞれの立場での研究結果が求められている。特に、内分泌攪乱物質が妊産婦及び乳幼児に与える影響は大きいものと考えられていることから、我々は、内分泌攪乱物質としてリストアップされ、しかも乳幼児が使用のおもちゃ類に多量に使用されているフタル酸エステルについて検討することにした。乳幼児用のソフト塩ビ製おもちゃ類には、フタル酸エステル類が30から40%程度含まれている。特に、フタル酸ジイソノニル(DINP)がかなりの頻度で使用されていることがグリーンピース、オランダの報告で明らかになっている。

今回、我が国で市販されているおもちゃを入手し、おもちゃ中のフタル酸エステルの残存量を明らかにすること、さらに、乳幼児が口にした場合のフタル酸エステルの移行量の推定及び移行量を推定するための溶出試験法の開発を目的とした。本年度は乳幼児が口に入れることを目的としたおもちゃのおしゃぶり及び歯がため、口にできる可能性が高いガラガラ等のおもちゃを用いて種々の条件で溶出試験を実施し、おもちゃから人工唾液に移行するDINPを定量した。

B. 実験方法

1. 試料

平成10年10月に玩具協会を通じて入手したおもちゃの一部を試料に供した。

口に入れることを目的としたもの：
おしゃぶり，歯がため

口に入れる可能性が極めて高いもの
(1年未満の乳児を対象)：ガラガラ，
トマト，ストロー

口に入れる可能性があるもの：ソフ
トドール(3種類)，ままごと道具，
リンゴ

2. 試薬

DINP：和光純薬工業製，関東化学製
試薬

アセトン及びアセトニトリル：H P
L C用，片山化学工業製

3. 装置

TAIYO CIRCLE SHAKER：太陽科学工業
(株)

RECIPRO SHAKER SR-2w：タイトック
(株)

ソニケータ：BRANSON B2200 超音波
120 W ヤマト科学(株)

4. GCおよびHPLC測定条件

I B 4 及び 5 に記載

5. 試験溶液の調製

(1) 材質試験溶液

試料0.5gにアセトン50 mlを加え，マ
グネチックスターラーで1時間攪拌後，
室温で約1時間放置後，東洋ろ紙5 A
でろ過した液をGC用試験液とした。

(2) 溶出試験溶液

人工唾液を用いて行った溶出試験液
0.5 mlを取り，アセトニトリルを加え
て1.0 mlとし，HPLC用試験液とした。

7. 各種振とう機器による溶出試験

(1) 試験片

これらのおもちゃは表面積が15cm²
になるようにカットし，溶出試験用試
験片を作成した。各試験片10枚の平均
重量はおしゃぶり1.12±0.16 g，ガラ

ガラ1.56±0.20 g 及び歯がため2.83±
0.29 gであった。

(2) 人工唾液

BS 6684 British Standard Specific
ation for Safety Harnesses 1987

塩化ナトリウム	4.5g
塩化カリウム	0.3g
塩化アンモニウム	0.4g
硫酸ナトリウム	0.3g
尿素	0.2g
乳酸	3.0g.

ミリQ水1,000 mLに溶解した。

(5 M 水酸化ナトリウムでpH 4.5あ
るいは6.8に調整)

(3) 振とう機器による溶出条件

50ml容量の蓋つきガラス製遠心管あ
るいは100 mL容量の三角フラスコ3個
を用い，それぞれに15 cm²の試験片を
入れ，人工唾液30mLを加え，下記の振
とう器にセットし，一定時間振とうし
た。

a. 上下振とう：RECIPRO SHAKER SR-
2w 蓋つき遠心管を用い，室温(20°C)，
振幅4.0 cm，毎分300回で15分間ある
いは1時間。溶出液は振とう終了後に別
の容器に移し，溶出試験液とした。15
分間振とうの場合はこの操作を4回繰
り返した。

b. 8の字振とう：TAIYO CIRCLE SHA
KER 三角フラスコ(平底直径60mm)を用
い，水温37°Cの恒温槽で，振幅(15x24
cm)の8字振とう(毎分70,80及び90
回)1時間。

c. 往復振とう：8の字振とうと同様
の機器で振幅2.4 cmの往復振とう(毎
分160及び120回)1時間

d. 超音波による振とう：水温25°Cか
ら35°C，8の字振とうと同様に試料を

セットし、超音波で15分間の振とうを4回繰り返した。

C. 研究結果及び考察

1. 材質中のフタル酸エステル残存量

材質試験用溶媒として、アセトン、アセトニトリル及びヘキサンを用いて、1～4時間スターラーで攪拌し、一定時間ごとに抽出液をGCに注入した。これらの溶媒はいずれも1時間目から4時間目で材質中のフタル酸エステルの量に差は認められず、1時間で抽出されているものと考えられた。そこで、材質からのフタル酸エステル類の抽出は細切した試料0.5gをアセトン50mlを用いてマグネチックスターラーで1時間攪拌後、室温で約1時間放置し、東洋ろ紙5Aでろ過する方法とした。12試料中のフタル酸エステル類の残存量はDINPが9試料から検出され、その量は16～58%であった。DINPは数多くの異性体からなる混合物であるが、今回2種類の形状の異なるピークが検出された。これらは関東化学製及び和光純薬工業製試薬の試薬と一致した。おもちゃからの検出頻度はほぼ同じであった。ボール2種類からはDBP及びDEHPが20～27%、やや固めのストローからはDBPが7.9%検出された(表2)。

2. 溶出液中のDINPの定量

標準溶液：和光純薬工業製及び関東化学製試薬の標準原液をさらに50%アセトニトリルを用いて0.05～10.0 μ g/mlを調製し、検量線を作成した。

主ピークの面積、高さ及びピーク面

積の総量について検量線を作成したところいずれも $R = 0.999$ と良好であった。定量は主ピークのピーク高さで行った。

溶出試験液はDINPの溶出量が多いと白濁した。また、溶出試験液が澄明な場合でも、そのままHPLCのオートサンプラーにセットした場合、測定時間が遅くなるとピーク高さが約20%減少した。これはDINPの人工唾液への溶解性に原因するものと推定し、溶出試験液にアセトニトリルを加えDINPの溶解性を高めたところ改善された。従って、HPLC用試験溶液は、溶出試験液0.5mlにアセトニトリルを加え1mlとした。

3. ヒトのチューイングによるおもちゃ試験片からのDINPの移行量

協力研究者石橋らの「ヒトのチューイングによるDINPの移行量」について行った3名のボランティアによる実験結果から、おしゃぶり、ガラガラ及び歯がための各試験片をチューイングしたときの唾液量が25.0～39.9mlであり、15分間ずつ4回チューイングしたときのDINPの移行量は、おしゃぶりで5.8、10.7及び11.2 μ g/ml、ガラガラでは8.4及び11.6 μ g/ml、また、歯がためでは4.4及び6.6 μ g/mlであることが解った。そこで、各種振とうによる負荷溶出試験を実施し、in vivoにおけるDINPの移行量により近い振とう試験法を検討した。

4. おしゃぶりからのDINPの溶出

各種振とう方法によるおしゃぶり試験片からのDINPの溶出量の結果を表3

に示した。溶出用人工唾液の液量を30 mLとしたが、ヒトによるチューイング試験の結果からも唾液量が25~40 mLであることが確認されたことから、溶出試験の設定条件として、試験片15cm²に対し溶出液を30 mLとすることはシミュレーション試験法として妥当であると考えられる。振とうは8の字振とう、往復振とう、上下振とう及び超音波による振とうの4種類の方法で行った。さらにビー玉を加えることによる溶出促進効果についても検討した。①DINPはすべての条件でビー玉を加えない方が多く溶出した。特に上下振とう300回ではビー玉無しで35.8 μ g/mL、ビー玉有りでは11.1 μ g/mLとその差が大きく、ビー玉があると溶出用器具の中での試験片の動きが妨げられると思われる。②8の字振とう(90回/分)、往復振とう(160回/分)及び上下振とう(300回/分)で、最も溶出量が多かったのは上下振とうであった。③DINPの溶出に及ぼす振とう回数の影響を調べたところ、8の字振とうでは90、80回/分ではそれぞれ10.9及び8.4 μ g/mLであったが、70回/分では0.7 μ g/mLと著しく減少した。往復振とう及び上下振とうでも同様に振とう回数が少ないほど溶出量は減少した。④各振とう方法における変動係数は、8の字振とう(80及び90回)、往復振とう(160回)及び上下振とうのビー玉無しの場合は10~24%であり良好と考えた。しかし、ビー玉を加えた場合あるいは振とう回数が少ないと変動係数は大きくバラツキが大きくなることが解った。⑤超音波による振とうは、15分間ずつ4回繰り返しの試験を行ったところ、変動係数が52~143%と大き

く溶出試験法としては不相当と考えた。⑥8の字振とう(80回/分)60分と上下振とう(300回/分)15分間のDINPの溶出量は前者が8.4 μ g/mL、後者が9.9 μ g/mLと同程度であった(表4)。それぞれの操作を3回あるいは4回繰り返した場合、双方共3回目で50%まで減少した。⑦以上4種類の異なる振とう法を検討したところ、振とうの効果が最も高かったのは毎分300回の上下振とうであった。ボランティアのチューイングによるDINPの移行量と比較すると、超音波以外の8の字振とう、往復振とう及び上下振とうはさらに振とう時間等を検討することによりシミュレーション試験法として有効であると考えられた。

5. 8の字振とう、往復振とう及び上下振とうによる他の試料への応用

試験片は表面積を15cm²と一定にしたが、溶出試験は市販品のおもちゃを対象とするため試験片は形状、重量等が異なることになる。シミュレーション試験に採用する振とう法はこれらの影響が小さくなければならない。そこで、おしゃぶり以外にガラガラ、歯がためについて同様の振とう試験を実施した。これら試験片の重量及び材質中のDINPはガラガラが1.56g及び42%、歯がためは2.83g及び38%であった。

①ガラガラは8の字振とう(90回/分)、往復振とう及び上下振とうのいずれにおいても、おしゃぶりと同程度の溶出量であった(表5)。しかし、おしゃぶりは90及び80回/分でDINPの溶出量は同程度であったが、ガラガラでは

80回/分で溶出量は少なく、変動係数も大きくなった。②往復振とうではビー玉の有無に関わらず、変動係数が大きくなった。これは $n = 3$ で行った時、1試料からの溶出量が極端に少ないためである。③試験片から人工唾液へのDINPの溶出は、振とうの際のフラスコあるいは遠心管中での試験片の動きの多少に関係あるものと推察され、ガラガラ試験片を形状の異なる2種類に分類して、往復振とう(160回/分)及び上下振とう(300回/分)を行ったところ、往復振とうでは平板部に比べて湾曲部で溶出量が多かったが、上下振とうでは平板部が多かった(表6)。④試験片を形状別にしたことでバラツキは小さくなった。しかし、溶出量が極端に少なくなる原因は解明できなかった。⑤上下振とうは形状による差が小さく、溶出量のバラツキも小さかった(表5、6)。

⑥歯がためについても同様の振とう溶出試験を実施したところ、8の字振とう(90回/分)及び往復振とう(160回/分)のビー玉無しでは1.7及び0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と溶出量は少なく、ビー玉を加えたほうが多かった(表7)。これは歯がため試験片の重量が2.83gと他の試験片(おしゃぶり1.12g、ガラガラ1.56g)に比べて重たいために、動きが低下するのではないかと考えられた。上下振とうでは15分間で6.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、おしゃぶり、ガラガラとの差は小さかった。

6. 上下振とうによるおしゃぶり、ガラガラ及び歯がためからのDINPの溶出

検討した振とう法のうち、試験片の形状あるいは重量等の影響が最も少なく、溶出量のバラツキの小さい振とう法は上下振とうであった。上下振とうによる各試験片からのDINPの溶出量を表8にまとめた。おしゃぶり及びガラガラの変動係数に比べて歯がための変動係数が大きかった。これは前二者に対して歯がためでは均一の試験片を得ることが困難であったため、試験片の形状及び重量の差によるものと考えられる。DINPの溶出量は15分間の振とう1回でおしゃぶり、ガラガラ及び歯がためからそれぞれ9.9、8.2及び6.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、この量は3名のボランティアが15分間ずつ4回チューイングしたときのDINPの移行量、(おしゃぶり 5.8、10.7及び11.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ガラガラ 8.4及び11.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、歯がため 4.4及び6.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と一致した。

上下振とうの1時間連続及び15分間ずつ4回の総溶出量を比較すると、溶出量はほぼ一致した(表9)。

7. 人工唾液pHのDINP溶出に及ぼす影響

溶出試験に用いた人工唾液は5M水酸化ナトリウムでpHを調製することになっているが、無調整のpH 2.5あるいは4.5及び6.8に調製してその影響を調べた。おしゃぶりの8の字振とうでは、それぞれ8.4、29.8及び13.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とpHによる影響が見られた。しかし、上下振とうのおしゃぶりでは9.9、11.3及び9.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ガラガラでは8.2、5.9及び6.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とpHによる影響はなかった(表10)。

8. その他のおもちゃ試料への応用

トマト，リンゴ，ままごと道具及びソフトドール3試料について，人工唾液(pH 6.8)を用い，上下振とう(300回/分)及び8の字振とうによる溶出試験を行った結果を表11に示した．DINPの材質中残存量が16%と最も少ないソフトドールCからは上下振とう15分間で $3.2\mu\text{g/mL}$ と溶出量も少なかった．溶出量が多かったのは材質中残存量が34%のトマトの $13.7\mu\text{g/mL}$ であった．

9. DINPの材質中残存量と溶出量

測定したおもちゃ試料のうちDINPが検出された9試料について，材質中残存量と人工唾液への溶出量をプロットしたところ，相関性は極めて低かった(図3)．すなわち，おもちゃからのDINPの溶出量は材質中残存量と関係せず，溶出試験用器具中での試験片の動きに影響され，試験片の重量，形状等に左右された．

D. まとめ

①フタル酸エステル類の定量法

材質試験はGC法が，溶質試験液の定量にはHPLC法が適した．

②材質中にDINPが58%残存するおしゃぶりをを用いて各種振とう法を検討したところ，毎分300回での上下振とうで溶出量が最も多く，ビー玉を加えると試験片の動きが阻害され，むしろ溶出量が少なくなった．

③各種振とう法を他の試験片に応用したところ，試験片の形状や重量等の影響が少なく，バラツキが小さい振とう法は毎分300回の上下振とうであった．

④上下振とう法による溶出試験結果はボランティアが行ったチューイング試験の結果と良く一致し，乳幼児がおもちゃを口に含んだときのDINPの移行量を推定するための，溶出試験法として有効な方法と考える．

⑤本年度に検討した振とう法では毎分300回の上下振とうが適当であると考えられるが，さらに，ボランティアによるin vivoの移行試験の件数を多くすること，試験片の重量や形状等に左右されないより均一な振とう法を検討する必要があると考える．

表1. フタル酸エステル及びアジピン酸エステル

	Chemical name		CAS	M. W.	保持時間	
					GC ①	HPLC
1	Dimethyl Phthalate	DMP	131-11-3	194.18	6.1	4.4
2	Diethyl Phthalate	DEP	84-66-2	222.24	6.8	5.8
3	Di-iso-propyl Phthalate	DIPP	605-45-8	250.29	7.2	8.2
4	Di-n-propyl Phthalate	DNPP	131-16-8	250.29	7.8	8.5
5	Di-iso-butyl Phthalate	DIBP	84-69-5	278.34	8.3	11.7
6	Dibutyl Phthalate	DBP	84-74-2	278.35	8.9	11.8
7	Butyl benzyl Phthalate	BBP	85-68-7	312.36	11.8	11.1
8	Di-2-ethylhexyl Adipate	DEHA	103-23-1	370.57	12.3	—
9	Diheptyl Phthalate (mix)	DHP	3648-21-3	362.51	12.7	20.3
10	Dicyclohexyl Phthalate	DCHP	84-61-7	330.42	13.6	15.9
11	Di-2-ethylhexyl Phthalate	DEHP	117-81-7	390.56	13.8	22.6
12	Di-n-octyl Phthalate	DNOP	117-84-0	390.56	16.3	23.4
13	Dinonyl Phthalate	DNP	103-23-1	418.61	15.4	23.4
14	Di-iso-octyl Phthalate	DIOP	27554-26-3	390.56	14.4~ 16.5	20.3~ 23.4
15	Di-iso-nonyl Phthalate(Wako)	DINP	68515-48-0	418.62	16.5~ 19.5	23.8~ 26.4
	Di-iso-nonyl Phthalate(Cica)	DINP	68515-48-0	418.62	15.4~ 19.7	23.0~ 27.6
16	Diisodecyl Phthalate	DIDP	26761-40-0	446.66	17.4~ 20.5	24.9~ 29.9
17	Diisononyl Adipate	DINA	33703-08-1	398.63	15.1~ 17.5	—

M. W. : 分子量

GC① : カラム ; DB-1

注入口温度 : 250℃, 検出器温度 : 300℃

カラム温度 : 100℃ (1min) - 40℃/min - 220℃ (0min) - 10℃/min - 280℃ (15min)

HPLC : カラム ; TSKgel ODS80TS QA (250 x 4.6 mm)

移動相 : アセトニトリル・水 (7:3) からリニアグラジエント15分で

アセトニトリル100%とし, 10分間保持

検出波長 : 225 nm

カラム温度 : 40℃

表 2 . 玩具中のフタル酸エステル残存量

試	料	DINP(%)	DBP(%)	DEHP(%)
おしゃぶり		58 (関東)		
ガラガラ		42 (関東)		
歯がため		38 (和光)		
トマト		34 (関東)		
リンゴ		33 (和光)		
ままごと道具	J	37 (和光)		
ソフトドール	C	16 (和光)		
	E	26 (関東)		
	O	29 (和光)		
ボール	C		20	27
	F		20	25
ストロー	E		7.9	

DBP : フタル酸ジブチル, DEHP : フタル酸ジ-2-エチルヘキシル, DINP : フタル酸ジイソノニル

表3. 各種振とう条件におけるおしゃぶり試験片からのDINPの溶出

振とう方法	振とう回数 (回/分)	DINP ($\mu\text{g/mL}$)			
		ビー玉無し		ビー玉3個	
		mean \pm S.D.	C.V.(%)	mean \pm S.D.	C.V.(%)
8の字振とう 振幅 15x24 mm 1時間, 37°C	90	10.9 \pm 1.1	10	8.1 \pm 2.7	33
	80	8.4 \pm 2.0	24	6.2 \pm 0.9	15
	70	0.7 \pm 0.9	129	0.4 \pm 0.2	50
往復振とう 振幅 24 mm 1時間, 37°C	160	20.4 \pm 2.6	13	16.0 \pm 6.9	43
	120	2.7 \pm 2.4	89	0.1 \pm 0.0	
上下振とう 振幅 40 mm 1時間, 20°C	300	35.8 \pm 4.0	11	11.1 \pm 5.3	48
	275	13.2 \pm 2.8	21		
	250	1.4 \pm 0.2	14		
超音波 15分間, 25~35°C	1	2.3 \pm 1.2	52		
	2	3.7 \pm 5.3	143		
	3	2.9 \pm 3.8	131		
	4	0.4 \pm 0.3	75		

試料：おしゃぶり試験片（表面積15cm²，重量1.12 \pm 0.16g）

溶出条件：人工唾液30 mLで溶出

8の字振とう，往復振とう及び超音波振とうは100 mL容の三角フラスコ（底辺66 mm），上下振とうは50 mL容のガラス製蓋付き遠心管を用いた。

表4. おしゃぶり試験片の8の字振とう及び上下振とうによる繰り返し溶出試験

振とう方法	振とう条件 (回/分)	DINP ($\mu\text{g/mL}$)	
		ビー玉無し	ビー玉3個
8の字振とう 振幅 15x24 mm (37°C)	80, 1時間-1	8.4 \pm 2.0	6.2 \pm 0.9
	-2	6.6 \pm 2.1	5.0 \pm 0.4
	-3	4.2 \pm 1.2	4.3 \pm 0.6
上下振とう 振幅 40 mm (20°C)	300, 15分間-1	9.9 \pm 0.4	4.6 \pm 1.9
	-2	8.1 \pm 0.5	3.4 \pm 1.8
	-3	5.0 \pm 0.4	2.3 \pm 1.1
	-4	4.6 \pm 0.7	0.8 \pm 0.7
	合計(1時間)	27.6 \pm 1.1	11.1 \pm 5.3

平均 \pm S.D. (n=3)

試料：おしゃぶり試験片（表面積15cm²，重量1.12 \pm 0.16g）

溶出条件：人工唾液30 mLで溶出

8の字振とうは100 mL容の三角フラスコ(底辺66 mm)，上下振とうは50 mL容のガラス製蓋付き遠心管を用いた。

繰り返し試験：同一試験片を用い，溶出液を取り替えた。

上下振とうの1時間当たりの合計値は，試料A，B，Cの各4回分の溶出量を和して求めた。

表5. 8の字振とう及び往復振とうにおけるガラガラ試験片からの
DINPの溶出

振とう方法	振とう回数 (回/分)	DINP ($\mu\text{g/mL}$)								
		ビー玉無し			ビー玉3個					
		mean	S.D.	C.V.(%)	mean	S.D.	C.V.(%)			
8の字振とう 振幅 15x24 mm 1時間, 37°C	90	A	6.6			17.6				
		B	9.4	7.3	±1.8	25	21.2	17.7	±3.4	19
		C	6.0				14.4			
	80	A	0.4				0.2			
		B	2.6	1.1	±1.3	118	14.2	7.2	±7.0	97
		C	0.4				7.2			
往復振とう 振幅 24 mm 1時間, 37°C	160	A	14.0			1.4				
		B	14.3	9.5	±8.1	85	9.6	5.9	±4.2	71
		C	0.1				6.8			
上下振とう 振幅 40 mm 15分間, 20°C	300	A	7.9							
		B	8.8	8.2	±0.5	6.0				
		C	8.0							

試料：ガラガラ試験片（表面積 15cm^2 ，重量 $1.56 \pm 0.20\text{g}$ ）

溶出条件：人工唾液30 mLで溶出

8の字振とう及び往復振とうは100 mL容の三角フラスコ（底辺66 mm），上下振とうは50 mL容のガラス製蓋付き遠心管を用いた。

表 6 . ガラガラ試験片の形状の違いによるDINPの溶出量

振とう方法	振とう回数	DINP ($\mu\text{g/mL}$)				
		平板部		湾曲部		
往復振とう 振幅 24 mm 1時間, 37°C	90	A	14.8		18.4	
		B	15.0	12.8 \pm 3.6	17.8	19.5 \pm 2.5
		C	8.6	(C.V. 28%)	22.4	(C.V. 13%)
上下振とう 振幅 40 mm 15分間, 20°C	300 1 -	A	8.5		5.6	
		B	10.3	9.2 \pm 1.0	6.9	6.6 \pm 0.9
	C	7.6	(C.V. 11%)	7.4	(C.V. 14%)	
	2 -	A	9.4		5.1	
		B	10.3	9.1 \pm 1.4	6.1	6.0 \pm 0.8
		C	7.6	(C.V. 15%)	6.7	(C.V. 13%)

ビー玉なし

溶出条件：人工唾液 30 mLで溶出

往復振とうは100 mL容の三角フラスコ(底辺66 mm), 上下振とうは50 mL容のガラス製蓋付き遠心管を用いた。