

平成10年度厚生科学研究費補助金研究報告書

(医薬安全総合研究事業)

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究

(H10-医薬-016)

平成11年3月

は し が き

近年化学物質の内分泌攪乱作用による人体への影響や生態系への影響が注目されている。医療材料に関しては 1996 年歯科用フィッシャーシーラントからビスフェノール A の溶出が報告されたことに端を発し、ビスフェノール A を出発物質とする BisGMA を含むコンポジットレジン等や、ポリカーボネイト、ポリスルホンを含む血液透析器等の人体、とくに胎児に対する影響が懸念されている。医療材料、化粧品、医薬部外品にはエンドクリン阻害物質（内分泌攪乱物質）が含まれている可能性があるが、その実体は十分明らかにされていない。

本研究は医療材料等の中のエンドクリン阻害物質の量を正確に把握し、その溶出量、経皮吸収量、曝露レベルにおける生体影響を明確にすることが医療材料のリスク評価に不可欠であるとの観点に立ち、医療材料等に含まれると想定されるエンドクリン阻害物質に関して、特にフタル酸エステルの発生毒性、歯科材料や血液透析器中のビスフェノール A の含量と溶出量、ビスフェノール A の経皮吸収という面からの研究を実施したものである。

ここに平成 10 年度研究の成果である総括研究報告書ならびに分担研究者による研究報告書を刊行し、この分野の研究者にご高覧いただき、医療材料等におけるエンドクリン阻害物質の溶出規準やリスク評価の基礎の確立に資することを願うものである。

平成 11 年 3 月

東京医科歯科大学名誉教授
昭和大学歯学部客員教授

佐藤 温 重

目 次

研究報告概要	-----	1
総括研究報告	-----	5
	佐藤温重	
フタル酸エステル等の発生毒性	-----	13
	江馬 眞	
歯科材料中の分析	-----	21
	本郷敏雄	
プラスチック製医療用具中の分析 —— ポリカーボネイト およびポリスルホン製血液透析器からのビスフェノールA溶出に 関する研究	-----	33
	薮島由二	
化粧品、医薬部外品中の分析	-----	53
	徳永裕司	
刊行した研究成果の別刷		
Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats. -----		61
	M.Ema, E.Miyawaki and K.Kawashima	
Further evaluation of developmental toxicity of di-n-butylphthalate following administration during late pregnancy in rats. -----		67
	M.Ema, E.Miyawaki and K.Kawashima	

1. 厚生省科学学術研究費補助金総括研究報告書概要

- (1) 研究費名称=厚生科学研究費
- (2) 研究業者名=医療安全総合研究事業
- (3) 研究課題名=医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究
- (4) 国庫補助金精算所要額=7,000,000 円
- (5) 研究期間=1998～1999
- (6) 主任研究者名(所属施設名)=佐藤温重(昭和大学)
- (7) 分担研究者名(所属施設名)=江馬 眞(国立医薬品食品衛生研究所大阪支所)、本郷敏雄(東京医科歯科大学)、薮島由二(国立医薬品食品衛生研究所)、徳永裕司(国立医薬品食品衛生研究所)
- (8) 研究目的=医療材料等の中のエンドクリン阻害物質の量を把握し、その溶出量、経皮吸収量、曝露レベルにおける生体に対する作用を明確にすることは、医療材料等のリスク評価のために不可欠であるが、未だ明らかにされていない。そこで、1)エンドクリン阻害物質の1つフタル酸エステルの発生毒性 2)歯科材料中のエンドクリン阻害物質の1つと考えられるビスフェノール A (BA)の総含有量の計測、体液等への溶出量の計測 3)プラスチック製医療用具中の BA の分析と血清ほか溶媒への溶出量の計測 4)化粧品、医薬部外品中の分析として BA の経皮吸収について検討し、医療材料等によるエンドクリン阻害物質の溶出規準作成やリスク評価の基礎を確立する。
- (9) 研究方法=1)フタル酸エステルのジブチルフタレート(DBP)を 0、0.5、1.0、2.0% 添加した飼料で妊娠 11 日 Wistar ラットを飼育し、妊娠 21 日に胎子の体重、外形および内臓奇形、生殖器—肛門間距離を調べた。2)市販歯科材料 12 種(フィッシャーシーラント、コンポジットレジン、ボンディング材の未重合体及び矯正用ブラケット)試料をメタノールで抽出し BA 含有量を、また硬化体試料(径 5mm、厚さ 1mm)を 7～169 日間人工唾液中に浸漬し、BA の経時的溶出量を蛍光光度計装着高速液体クロマトグラフィー(HPLC)または LS-MS で定量した。3)市販ポリカーボネートおよびポリスルホン製血液透析器 4 種の原材料、ハウジング単体、血液透析器 RO 充

填水、血液透析器を無蛍光水 250ml で 16 時間循環した水、前述と同様に 16 時間循環した血清の各試料中の BA を HPLC、GC-MS、LC-MS、NMR により計測し、各種溶媒中への溶出量を求めた。また、用いた 5 種の分析法のバリデーションを FUMI 理論によって行った。4)ハートレー系モルモットからの剥離皮膚を Franz 型拡散セルに装着し、Flux を計測し、BA 経皮吸収及び吸収に及ぼす可溶化剤の 10mM ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10mM 塩化ベンザルコニウム(BK)、0.5%ポリオキシエチレンオレイルエーテル (POE・OE) の影響を調べた。

- (10) 結果と考察=1)DBP は、0.5%添加飼料の反覆投与では胎仔に異常を認めなかったが、2.0%飼料投与群でオス、メス胎仔の口蓋裂などの奇形発現頻度の上昇、また 1.0%及び 2.0%飼料群 (平均摂取量 555 及び 661mg/kg/day) でオス胎仔の精巣下降不全率の上昇、生殖器-肛門間距離の短縮が認められた。DBP はアンドロゲンにより調節される性分化を攪乱するか、または DBP がアンドロゲンレセプターの拮抗剤として作用する可能性がある。フタル酸エステルは共通の作用機序で作用することが示唆されており、両物質の共通の代謝産物モノブチルフタレート(MbuP)が発生毒性の原因物質であることが示唆された。2)市販の Bis-GMA 含有歯科用フィッシャーシーラント、コンポジットレジン、ボンディング材の中には BA が $3.39 \pm 0.35 \sim 12.82 \pm 2.18$ ng/mg レジン検出された。またこれらの硬化体及びポリカーボネート製ブラケットを人工唾液中浸漬すると BA が微量溶出した溶出量は、フィッシャーシーラント 14 日浸漬で 0.19 ± 0.05 ng/mg レジン、コンポジットレジン、ボンディング材 21 日浸漬で $8.3 \pm 0.8 \sim 24.3 \pm 2.8$ pg/mg レジン、ブラケットでは 7 日浸漬で 0.12 ± 0.01 ng/mg レジンであった。これら試料中の BA の含有量、溶出量は製品より異なるが、いずれも極めて微量であり、Bis-GMA 中の夾雑物に由来するものと考えられた。3)ポリカーボネート製血液透析器の原材料の BA 含有量は $4.2\text{-}7.2 \mu\text{g/g}$ 、ポリスルホン製血液透析器の原材料の BA 含有量は、 $34.5 \mu\text{g/g}$ であった。牛血清、無蛍光水等を溶媒とした血液透析器循環において、いずれの透析器からも BA が溶出した。溶出量は血清循環において水循環より多量であった。250ml 血清 16 時間循環における BA 溶出量は $140.7\text{ng}/\text{個}(567.2\text{ppt}) \sim 2.09 \mu\text{g}/\text{個}(8.35\text{ppb})$ で製品によって異なっていた。溶出試験の基準化にあたっては使用する溶媒の選定が重要である。血液透析器からの BA 溶出量のレベルでヒトの健康に重大な影響を与えるという報告はなく、また米国環境保護庁の BA の一日摂取許容量相当値は $0.05\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ と設定されており、現段階では血液透析器の使用を中止する必要はないと考えられる。4) BA のモルモット剥離皮膚を用いた経皮透過実験で Flux は平均 $3.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ である。BK 及び POE・OE 処理した皮膚では BA の Flux はそれぞれ 1.6 倍、1.2 倍に増加した。BA は疎水性であり non polar pathway 透過仮定されるが、BK、POE・OE はこの pathway に影響することが示唆された。BA と可溶化剤とを共存させると BA

の透過性は低下した。BA の生体作用に対し可溶化剤が作用する可能性があることは注目すべきである。

- (11) 結論=DBP はラットの母体に 1.0%~2.0%添加飼料 (555、661mg/kg 投与に相当) を投与するとオス胎子の生殖器発生に有害な作用を示す。BA を出発物質とする歯科材料、血清透析器にはBA が微量存在し、血清、人工唾液浸漬時微量溶出する。含有量、溶出量は製品によって異なる。BA はモルモット剥離皮膚を透過する。透過量は界面活性剤の共存によって増減する。これらの知見は、医療材料などにはエンドクリン阻害物質の BA が含まれており、体液中に溶出し、また、生体に吸収される可能性があることを示唆しているが、含有量、溶出量は微量である。現在このレベルでは生体に対して毒性を示すという知見はなく、また1日摂取許容量以下である。エンドクリン阻害物質については微量であっても作用がある可能性があり、曝露レベルでの毒性について今後検討し結論を得ることが必要となる。

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究

主任研究者 佐藤温重 昭和大学歯学部

研究要旨

医療材料などに含まれると想定されるエンドクリン阻害物質のリスク評価、溶出規準の基礎を確立するために、ジブチルフタレート（DBP）の生殖毒性ならびにビスフェノールA（BA）について医療材料中の含有量、溶出量、経皮吸収動態について調べた。DBPは妊娠11日ラットに0.5～2.0%添加飼料を10日間投与すると、0.5%添加飼料群では胎仔に異常を認めなかったが、2.0%添加飼料群では、オスおよびメス胎仔の口蓋裂、胸骨核癒合などの奇形が認められた。また、1.0%、2.0%添加飼料群（平均DBP摂取量555、661mg/kg/day）では、オス胎仔に対しては精巣下降不全、生殖器-肛門間距離短縮などが認められ、DBPはオスの生殖器発生に有害な作用を示す。BAを出発物質とするBis-GMAを含む市販歯科材料中にはBAが微量含まれており人工唾液に7～169日間の浸漬において持続的に溶出する。また、ポリカーボネイト製またはポリスルホン製の市販血液透析器にはBAが微量存在し、無蛍光水、ウシ4倍希釈血清で循環したとき微量溶出する。溶出量は水に比較し血清で多い。歯科材料および血液透析器中のBA含有量および体液などへの溶出量は製品により異なる。BAはモルモット剥離皮膚を透過する。透過量は界面活性剤共存で減少し、また界面活性剤処理した皮膚で増加する。これらの知見は、医療材料などにはエンドクリン阻害物質のBAが含まれており、体液中に溶出し、また、生体に経皮的吸収される可能性があることを示すが、含有量、溶出量共に極めて微量である。現在このレベルでは生体に対して毒性を示すという知見はない。しかし、エンドクリン阻害物質については微量であっても胎仔に対し作用があるとする報告もあり、曝露レベルでの毒性について今後検討が必要となる。

分担研究者

江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所生物試験部室長
本郷敏雄 東京医科歯科大学歯学部歯
科理工学第二講座助教授
薮島由二 国立医薬品食品衛生研究所
療品部室長
徳永裕司 国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部室長

となるポリカーボネイト、ポリスルホン、Bis-GMA などにはビスフェノールA（BA）や可塑剤のフタル酸エステルなどが、また化粧品および医療部外品の中にもBA、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジエチル、ノニルフェノール、オクチルフェノール、ベンゾフェノンなどのエンドクリン阻害物質が含まれていると想定されている。歯科材料に関しては、Bis-GMA を含む18種の市販フィッシャーシーラント50mg充填した患者の唾液中にBAが溶出しており、充填1時間後採取した唾液中にはBA 89.8～931.0 μg (3.3～30 μg/ml)

A. 研究目的

エンドクリン阻害物質（内分泌攪乱物質、endocrine disruptor）には多様な化学物質がある¹⁾。医療材料の原材料

存在することが報告されている²⁾。一方 Bis-GMA を含むコンポジットレジンや、フィッシャーシーラントから BA はほとんど溶出しないという報告もあり^{3) 4) 5)}、一致した見解に達していない。ポリカーボネイト (PC) 製の血液透析器からの BA の溶出については報告がない。一方エンドクリン阻害物質の選別を米国環境防護庁 (EPA) は Endocrine Disruptors Screening & Testing Advisory Committee で実施している。内分泌攪乱作用物質の評価法について経済開発協力機構 (OECD) が総説を公表している。わが国においては厚生省生活衛生局が健康影響検討会を発足させた他、多くの研究グループによって検討が行われている^{6) 7) 8)}。代表的試験法には *in vivo* 試験として 2 世代哺乳動物生殖毒性試験、齧歯類 3 日間子宮増殖アッセイ、齧歯類 14 日間非去勢成熟雄性アッセイなど、*in vitro* 試験としてホルモン受容体結合試験、レポーター遺伝子アッセイ、MCF-1 細胞を用いる方法などがある。OECD はエンドクリン阻害物質を検出するためには *in vivo* 試験が必須であると考えている。世界的規模の研究によって化学物質のエンドクリン阻害作用が明らかになりつつある。しかし医療材料、化粧品、医薬部外品などにどのようなエンドクリン阻害化学物質がどの程度の量含まれているか、またこれら物質が医療材料等の使用条件のもとでどの位溶出し吸収され、生殖に重大な影響を与えるかについて体系的な研究がない。またリスク評価の基本となる医療材料等を対象とするエンドクリン阻害物質の定量試験法、溶出試験法についての規準がない。

本研究班は初年度において 1) エンドクリン阻害物質の 1 つで、可塑性として広く使用され、また化粧品等にも使用されているフタル酸エステル

発生毒性 2) 歯科材料中のエンドクリン阻害物質の 1 つと考えられるビスフェノール A (BA) の総含有量の計測、ならびに体液等への溶出量の計測

3) プラスチック製医療用具中の BA の分析ならびに血清ほか溶媒への溶出量の計測 4) 化粧品、医薬部外品中の分析として BA の経皮吸収について検討し、医療材料のエンドクリン阻害物質の溶出規準ならびにリスク評価の基礎を確立することを試みた。

B. 研究方法

1. フタル酸エステルなどの発生毒性：各群 11 匹の確定妊娠 11 日 Wistar 系ラットに 0.5、1.0 または 2.0% のジブチルフタレート (DBP) を含む飼料を、対照群には DBP 無添加飼料を与えた。妊娠 21 日目に開腹し、着床数、生存および死亡胎仔数、吸収胚数、胎仔体重、外表奇形発生頻度、骨奇形頻度、生殖器-肛門間距離 (AGD) を調べた。

2. 歯科材料中の分析：Bis-GMA を含む市販光重合性フィッシャーシーラント 3 種、コンポジットレジン 3 種、ボンディング材 5 種の各未重合体およびポリカーボネイト製矯正用ブラケット中の BA の含有量の定量および硬化体試料 (径 5 mm、厚さ 1 mm)、ブラケット各 1 個を人工唾液 1 ml 中に 7、14、21、169 日間浸漬した時の溶出する BA を蛍光分光高度計を装着した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析した。一部については LC-MS で分析を行った。HPLC の分析条件はガードカラムとして CAPCELL C18SG120 (資生堂)、分離カラムとして CAPCELL PAKC18SG120 (資生堂) を、移動相は蒸留水/アセトニトリル (混合比 53:47) とし、235nm で定量した。同定は SPD-M10AVP (島津) を用い、200 ~ 300nm で測定し、

CLA25 - M10A 解析ソフトで解析した。LC-MSによる定性分析はLCとしてHP1006 (Hewlett-Packard)、MSとしてHP1100MSD (Hewlett-Packard)を使用した。

3. プラスチック製医療用具の分析：市販PCおよびPS製血液透析器の原材料ペレット、ハウジング単体、血液透析器の充填RO水、血液透析器を250ml無蛍光水またはウシ血清(4倍希釈)で16時間循環後の無蛍光水または血清中のBAをHPLC(日立)、GC-MS(JEOL Automass)、LC-MS(Finigan MatLCQ)、MNR(JEOL α 600)で分析した。HPLCの分析条件はLuna 3 μ C18(2)カラムを使用し、アセトニトリル/無蛍光水(1:1)を溶離液とした。GC-MS分析はDB-5MSカラムを用い、イオン化法はE1とした。LC-MS分析はLuna 3 μ C18(2)カラムを用い、アセトニトリル/無蛍光水(1:1)を溶離液とし、イオン化法はAPC1とした。NMRは測定核 ^1H 、共鳴周波数600MHz、溶媒は重クロロホルムとして解析した。なお血清中のBAの回収は塩酸酸性下ジエチルエーテルで抽出後乾固し、一定量のエタノール/水(1:1)に溶解し分析に供した。用いた各分析法のバリデーションでは各分析法の検出限界(LOD)と定量限界(LOQ)を調べた。FUMIは理論に基づいて測定系の信頼性を検討した。

4. 化粧品、医薬部外品中の分析：BAの経皮吸収試験を実施した。ハートレー系雄性モルモットの腹部剥離皮膚をFranz型拡散セルに装着し、donor側に水、BA溶液(0.05w/v%5%プロピレングリコール溶液)単独または表面活性剤の10mMドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10mM塩酸ベンザルコニウム(BK)、または0.5%ポリオキシエチレンオレイルエーテル(POE

・OE)を混合して加え32°Cで14-24時間にreceptor側(生理食塩水)の溶液に透過したBAをHPLCにて測定した。皮膚は無処置または表面活性剤2時間処理したものをを用いた。

C. 研究結果

1. フタル酸エステル類の発生毒性

妊娠11日ラットに10日間、0.5、1.0、2.0%DBP添加飼料を投与すると、1.0%、2.0%投与群で母体重の増加が低下し、飼料摂取量も有意に低下した。0.5、1.0、2.0%投与群におけるDBP平均摂取量は331、555、661mg/kg/dayであった。DBP投与群の吸収胚数および死亡胎仔数、胚死亡率は対照群と差がなかった。オス胎仔のAGDおよびAGD/体重は1.0%および2.0%投与群で対照群に比し有意に短縮していた。メス胎仔のAGDにはDBP投与群と対照群との間に差がなかった。胎仔の外形奇形は対照群では認められなかったが、2.0%投与群では152胎仔中6例(主として口蓋裂)観察された。骨格奇形は2.0%投与群で101例中56胎仔に胸骨核癒合が観察された。外部奇形および骨格奇形はメス、オス胎仔に認められた。内部器官奇形としてオス胎仔の精巣下降不全が1.0%投与群で46胎仔中7例、2.0%投与群で51胎仔中27例観察された。DBPは妊娠後期ラットに10日間継続飼料中に混合して投与するとオス、メス胎仔の口蓋裂、胸骨核癒合発症率を上昇させ、オス胎仔に対し精巣下降不全、生殖器-肛門間距離短縮を惹起する。

2. 歯科材料中の分析

市販3種のフィッシャーシーラントA、B、Cの未硬化体中のメタノール抽出によるBA量はB、Cで4.18 \pm 0.38、5.78 \pm 0.09ng/mgレジンであった。Aに関してはBAが検出されなかった。

6種ボンディング材F、G、H、I、

J、K未重合体からのBAは 4.40 ± 0.86 、 11.20 ± 0.15 、 3.39 ± 0.35 、 1.15 ± 0.21 ng/mg レジンおよび 3.58 ± 0.28 ng/ μ l レジン検出された。BisGMA を含まないKからは検出されなかった。フィッシャーシーラントの硬化体試料を人工唾液中に1～169日浸漬したとき溶出したBA量は、1日、3日浸漬では検出限界以下であったが、7日ではB、CでBAの溶出が認められた。Cでは7日間浸漬で 0.11 ± 0.02 ng/mg レジン、169日浸漬でも 0.73 ± 0.16 ng/mg レジン溶出していた。

2種のコンポジットレジンの未硬化体試料中のBAは計測は終了していないが、硬化体から人工唾液中へのBAの溶出が認められた。溶出量はE試料の21日浸漬で 14.5 ± 0.4 pg/mg レジンであった。

ボンディング材F、G試料の21日浸漬で 14.5 ± 0.9 、 24.3 ± 2.8 pg/mg レジンの溶出を認めた。

ポリカーボネイト製の矯正用ブラケットLからも人工唾液中7日、14日間浸漬において 0.12 ± 0.01 、 0.10 ± 0.01 ng BA/mg レジン溶出していた。HPLC分析におけるBA相当ピークの確認のため一部試料についてLC-MSで定性分析した結果HPLC・蛍光で検出されるピークはBAであると考えられた。

3. 市販プラスチック医療用具中の分析

PC製およびPS製血液透析器4種の原材料となるPCペレット2種には、 4.0μ g/g および 7.2μ g/g BAが、PSペレットには 34.5μ g/gのBAが含まれていた。血液透析器から中空糸とポリウレタン製サポート部分を除いたハウジング単体の無蛍光水100ml、16時間抽出において 11.7 ng/個（抽出液中濃度 117.4 ppt）、 13.7 ng/個（抽出液中濃度 137.2 ppt）、メタノール抽出にお

いて 296 ng/個（抽出液中濃度 2.96 ppb）、 345 ng/個（抽出液中濃度 3.45 ppb）であった。A社製とB社製血液透析器に充填されているRO水中にBAがA社製I型に 11.7 ppt、B社製に 31.1 ppt 検出された。C社製の充填水中のBAは検出限界以下であった。

血液透析器の水循環水（250ml、16時間）中にはA社製I型、II型、B社製およびC社製でそれぞれ 137.2 ppt（ 34.3 ng/個）、 567.1 ppt（ 141.8 ng/個）、 124.0 ppt（ 31.0 ng/個）および 15.2 ppt（ 3.78 ng/個）検出された。また血液透析器の循環血清（250ml、16時間）中には 784.2 ppt（ 196.1 ng/個）、 8.35 ppb（ 2.09μ g/個）、 4.04 ppb（ 1.01μ g/個）および 562.7 ppt（ 140.7 ng/個）のBAが検出された。

分析法のバリデーションをFUMI理論により行った。HPLCにおけるUV検出と蛍光検出は95%信頼区間が狭く、信頼度の高い分析が可能である。GC-MS法では注入誤差にのため95%信頼区間が広い。くり返し測定値から求めた実験値のRSDとFUMI理論から求めたRSDとの比較によりUV検出、蛍光検出、GC-MSのいずれの方法においても理論値と実験値とはよく一致している。測定精度が33% RSDとなる濃度を検出限界とするとUV検出 16.0 ppb、蛍光検出 0.65 ppb、GC-MS 0.16 ppbとなる。このことは検出限界付近における検出ではGC-MSの分析精度が最も高いことを示している。定量下限を10% RSDとすると、UV検出、蛍光検出、GC-MSの各定量限界はそれぞれ 48.0 ppb、 2.0 ppb、 1.9 ppbとなる。なお、この計算には注入誤差は入っていない。サンプル濃度が $20 - 100$ ppbではGC-MS法より蛍光法の方が精度がよい。これは注入誤差があるためである。UV検出の精度はGC-MSと同等かある

いはそれ以下である。しかし、1 ppb 以下（限界付近）ではGC-MSの方が蛍光検出より高い精度である。この濃度ではUV検出では検出不可能である。

各分析法の定性分析におけるBAの同定はLS-MS、GC-MSにより行い、いずれもBA標準品と同様のマススペクトルが得られた。PCペレットから回収したBAの¹H-NMR解析によりBA標準品と同様のBAプロトン由来のシグナルが観測された。

4. 化粧品、医薬部外品中の分析

化粧品、医薬部外品に含まれるBAの経皮吸収と吸収に及ぼす化粧品、医薬部外品の可溶化剤の影響についてFranz型拡散セルでの検討の結果、donor側に加えた0.05w/v%BAは約7-12時間のLag timeの後、拡散セルのreceptor側に移行し、BAのFluxは1.9-6.9 μg/cm²/hr（平均3.7 μg/cm²/hr）であった。24時間後の累積透過量は30-102 μg/cm²（平均51 μg/cm²）であった。可溶化剤が共存して存在するとLag timeには変化はみられなかったが、BAのFluxは変化し10 mM SDS共存では5.02 μg/cm²/hr（対照群4.05 μg/cm²/hr）増大したが、10 mM BK共存では0.75 μg/cm²/hr（対照群6.93 μg/cm²/hr）、0.5% POE・OE共存では0.73 μg/cm²/hr（対照群3.25 μg/cm²/hr）とFluxが著しく抑制された。皮膚を可溶化剤で2時間処理した後のBAのFluxは変化した。SDS 2時間処理皮膚では3.14 μg/cm²/hr（対照群3.36 μg/cm²/hr）、BK処理皮膚では3.06 μg/cm²/hr（対照-水処理皮膚1.85 μg/cm²/hr）、POE・OE処理皮膚では3.10 μg/cm²/hr（対照-水処理皮膚2.56 μg/cm²/hr）であった。BAはモルモット皮膚を透過する。可溶化剤のBKおよびPOE・OEが共存するとBAのFluxは抑制される。表面活

性剤SDS、BK、POE・OE処理された皮膚ではBAのFluxは増大し、BAの透過性に可溶化剤が影響することが明らかとなった。

D. 考察

DBPは、0.5%添加飼料の反覆投与では生殖毒性を認めなかったが、2.0%飼料投与群でメス、オス胎仔における口蓋裂などの奇形発現頻度の上昇、また1.0%及び2.0%飼料群（555及び661mg/kg）でオス胎児の精巣下降不全率の上昇、生殖器-肛門間距離の短縮が認められた。

DBPのエストロゲン活性は酵母法によると17βエストラジオールを100としたとき、DBPは0である。また、マウス子宮重量法によると5 ng17βエストラジオール投与後4日の子宮重量/体重は0.172であるのに対し、DBP 5 mg投与では0.091であり、投与前と同一である。一方ニジマスのエストロゲンレセプターへの17βエストラジオール結合に対してDBPは10⁻⁶~10⁻³ Mという濃度で抑制し、DBPはエストロゲンレセプターと結合する。DBPはアンドロゲンにより調節される性分化を攪乱するか、またはDBPがアンドロゲンレセプターの拮抗剤として作用する可能性がある。フタル酸エステルは共通の作用機序で作用することが示唆されており、両物質の共通の代謝産物モノブチルフタレート(MbuP)が発生毒性の原因物質であることが示唆された。

市販のBis-GMA含有歯科用フィッシャーシーラント、コンポジットレジン、ボンディング材の中にはBAが3.39 ± 0.35 ~ 12.82 ± 2.18ng/mg レジン検出された。またこれらの硬化体及びポリカーボネート製ブラケットを人工唾液中浸漬するとBAが微量溶出した溶出量は、フィッシャーシーラント14日浸漬で0.19 ± 0.05、コンポジットレジン

21日浸漬で $0.02 \pm 0.00 \sim 0.18 \pm 0.01$ 、
ブラケットでは7日浸漬で 0.12 ± 0.01 ng/g
レジンであった。これら試料中のBAの含有量、
溶出量は製品より異なるが、いずれも極めて
微量であり、Bis-GMA中の夾雑物に由来する
ものと考えられた。

市販の各種歯科材料中のBAの含有量および
人工唾液中での溶出試験により溶出量と溶出
動態が調査されたが、定量は現在も進行中
であり、最終的結論は次年度の研究で明らか
となる予定である。

ポリカーボネート製血液透析器の原材料の
BA含有量は $4.2\text{--}7.2 \mu\text{g/g}$ 、ポリスルホン製
血液透析器の原材料のBA含有量は $34.5 \mu\text{g/g}$
であった。牛血清、無蛍光水等を溶媒とした
血液透析器循環において、いずれの透析器
からもBAが溶出した。しかし溶出量は極
めて微量で、250ml血清16時間循環にお
けるBA溶出量は $140.7\text{ng}/\text{個}$
(567.2ppt) $\sim 2.09 \mu\text{g}/\text{個}$ (8.35ppb)で
製品によって異なっていた。

血清循環時に溶出する量は無蛍光水循環
時に溶出する量に比較して多い。溶出試験
において溶媒の選択が重要であることを示
している。溶出溶媒として血液透析器の
場合血清が理想的であるが分析に困難を
伴うので、血清と同等の溶出を示す血清
模擬溶媒の開発が今後必要である。

BAのモルモット剥離皮膚を用いた経皮透
過実験においてBAは経皮吸収され、吸収
量が皮膚を界面活性剤処理あるいはBAと
界面活性剤と混合した条件で変化したこ
とは、エンドクリン阻害物質の生体作用
を検討する上で化粧品等に含まれる界
面活性剤に注目する必要があることを示
唆するものである。

BAの溶出規準、リスク評価には曝露量
に関連する医療材料等における含有量、
溶出量、吸収量、代謝排泄量、体内蓄積

量、乳汁中分泌量経胎盤性ならびに生体
の感受性(性差、年齢差、個体差など)
を考慮した総合的判断が必要である。

本研究で明らかにされた歯科材料、血液
透析器に含まれるBA量および体液等への
溶出量は微量であり、 ^{14}C BAを用いた体内
動態研究で 800mg/kg をオスラットに投与
したとき、投与1日後で投与した ^{14}C の
28%が尿中に、56%が糞中に排泄され、
投与8日後に体内に ^{14}C の残留を認めない¹⁰⁾。
BAのエストロゲン受容体への結合能は
 17β エストラジオールの $10^{-3}\sim 10^{-4}$ 倍
である。ラット母親を妊娠2日から21日
まで $0.005\sim 50\text{mg/L}$ 飲料水中に投与した
とき $5\sim 50\text{mg/L}$ 群でBAの母乳への分泌
を認めたが、母ラットにエストロゲン作
用、メス出生仔の性成熟、性周期、下垂
体-視床下部による制御に影響がない⁹⁾¹⁰⁾。
以上のように本研究で明らかとなった医
療材料等に含まれるBA量によってヒトに
重大な障害を与えるという知見はない。
しかし微量であっても作用を引き起こす
という指摘があり、詳細な検討が必要で
ある。

E. 結論

BAを出発物質とするBis-GMA、ポリ
カーボネート、ポリスルホンを用いた医
療用具にはBAが含まれており、*in vitro*
試験でBAが血清、人工唾液中に溶出
している。BA含有量および溶出量は製
品により異なっているが、いずれも微
量である。BAの胎仔毒性、体内動態研
究の結果や、米国環境保護庁が設定した
BAの一日摂取許容量相当値 0.05mg/kg/day
を考慮すると、現段階ではBis-GMA含
有歯科材料、およびポリカーボネート
またはポリスルホン製の血液透析器の
使用による重大な障害はないと考えら
れる。しかし微量であっても作用を引
き起こすという指摘があり、詳細な検
討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

M.Ema, E.Miyawaki and K.Kawashima : Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, 12, 127-132,1998

M.Ema, E.Miyawaki and K.Kawashima : Further evaluation of developmental toxicity of di-n-butylphthalate following administration during late pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*, 98, 87-93,1998

2. 学会発表

江馬 眞、宮脇英美子、川島邦夫：可塑剤 butyl benzyl phthalate の妊娠及び偽妊娠ラットにおける生殖障害。第25回日本トキシコロジー学会

江馬 眞、宮脇英美子、川島邦夫：ラットの妊娠後半に投与した dibutyl phthalate の発生毒性。第38回日本先天異常学会

本郷敏雄 他：蛍光による歯科用レジンの高感度分析法。歯材器、17、1998

本郷敏雄 他：プライマー、ボンディング材成分のHPLCによる同定。日歯保誌、41、1998

参考文献

- 1) Illinoi Environment Protection Agency (1997) : Illinoi EPA Endocrine Disruptors Stratege.
- 2) Olea N., et al. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, *Environ. Health Perspect.*, 104, 298-305.
- 3) Nathanson D., et al. (1997). In vitro elution of leachable components from dental sealants, *JADA*, 128, 1517-1523.
- 4) Hamid A. and Hume W.R. (1997). A study of component release from resin pit and

fissure sealants in vitro, *Dent. Mater.*, 13, 98-102.

5) Spahl W., et al. (1998). Determinatin of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry, *J.Dentistry*, 26, 137-145.

6) OECD Environment Dirctorate : Draft detaitel reviewpaper appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals. OECD Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, Paris 1997.

7) 山田智也、駒井浩一郎、稲若邦文、奥野泰由、松尾昌幸：Endocrine disrupters と毒性学—内分泌系攪乱作用の検出・評価のための試験法—、*The Journal Toxicological Science*, 23(2), App. 69-75, 1998.

8) 井上達、Kyung-Sun Kaug : 内分泌攪乱化学物質—作用の特徴と試験法、*The Journal Toxicological Science*, 23(5), App.191-199, 1998.

9) Gould J.C., et al. (1998). Maternal effects and secretion into milk of low doses of biophenol A given to rats via dringing water, *SOT Annual Meeting*, No.866.

10) Liaw I.J., et al. (1998). Reproductive development on female rats prenatally and lactationally exposed to bisphenol A, *SOT Annual Meeting*, No.867.

11) Knaak J.B. and Sullivan L.J. (1966). Metabolism of bisphenol A in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 8, 175-184.

別添3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書
フタル酸エステル等の発生毒性

国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所
江馬 眞

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究（H10-医薬-106）
分担研究 フタル酸エステル等の発生毒性

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
生物試験部第二室長

研究要旨

ラットの妊娠 11-21 日に 0.5, 1.0 または 2.0%の dibutyl phthalate (DBP)を含む飼料を与え、妊娠 21 日に母体を開腹し胎児に対する影響を調べた。DBP の 1 日当たりの平均摂取量は 0.5, 1.0 及び 2.0%投与群でそれぞれ 331, 555 及び 661 mg/kg であった。着床後胚死亡率に投与の影響は認められなかった。2.0%投与群における生存胎児の体重が有意に低下した。2.0%投与群における口蓋裂及び胸骨核癒合、1.0 及び 2.0%投与群における精巣下降不全の発現頻度が有意に上昇した。1.0 及び 2.0%投与群のオス胎児における生殖器—肛門間距離 (AGD: Anogenital distance) の有意の短縮が認められた。これらのことから、妊娠後半に与えた DBP はオス胎児の生殖器の発生に有害な作用を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

可塑剤として使われているフタル酸エステル類 (PAEs) は地球規模の環境汚染物質である。PAEs の一つである dibutyl phthalate (DBP)は安全ガラス、印刷用インク、紙のコーティング剤、接着剤等に使用されており、また、各種化粧品にも使われている。最近、DBP 及び butyl benzyl phthalate (BBP) などの PAEsが組み替え酵母やヒト乳癌細胞を用いた *in vitro* の実験においてエストロゲン作用を示すことが明らかになり、DBP 及び BBP 等の PAEs は内分泌攪乱化学物質として注目されている。このようなことから、PAEs の生殖発生毒性を研究することの重要性は益々高まっている。

我々は先に、ラット胎児の器官形成期

に DBP を投与したとき、胚致死作用と催奇形性を示すことを明らかにした。さらに、ラットの妊娠 7-9 日または妊娠 13-15 日に DBP を投与したときに胎児奇形が発現し、妊娠前半に DBP を投与したとき胚致死作用が強く発現することを示した。

本年度においては、DBP をラットの妊娠後半に与えたときの影響について検討した。

B. 研究方法

Wistar ラットを使用した。ラットは、室温 24 ± 1 °C、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12: 12 時間 明/暗の動物室にて、水道水と飼料を自由に与えて飼育した。メスラットを同系統のオスラットと同居させ、翌朝臍垢内に精子を認めたメスを妊娠とし、こ

の日を妊娠0日として、以後個別ケージにて飼育した。

ラットの妊娠11日から妊娠21日まで0.5, 1.0または2.0%のDBPを含む飼料を与えた。対照群のラットにはDBP無添加の飼料を与えた。

ラットは妊娠21日に開腹し、着床数、生存及び死亡胎児数、吸収胚数を記録した。生存胎児については、体重測定を行い、外表奇形を調べ、生殖器一肛門間距離 (AGD: Anogenital distance) をノギスで測定した。無作為に選んだ約2/3の胎児はアルコールに浸し、アリザリンレッドSにて染色して骨格検査に供した。残りの1/3の胎児はブアン液に浸し、剃刀切片法による内部器官奇形の検査に供した。

胎児に関する成績は一腹を単位として統計処理を行った。

C. 研究結果

妊娠ラットの所見をTable 1に示した。いずれの群にも死亡ラットはみられず、毒性徴候を示すラットも認められなかった。妊娠11-21日の母体体重及び妊娠子宮を除く母体体重増加が1.0及び2.0%投与群において有意に低下した。また、1.0及び2.0%投与群における妊娠11-21日の飼料摂取量も有意に低下した。0.5, 1.0及び2.0%投与群における1日当たりのDBP平均摂取量は、それぞれ331, 555及び661 mg/kgであった。

生殖に関する所見をTable 2に示した。黄体数、着床数、吸収胚及び死亡胎児数、生存胎児数、着床後胚死亡率及び生存胎児の性比にはDBP投与群と対照群との間の差は認められなかった。2.0%投与群の生存胎児体重は対照群に比べて軽かった。

胎児のAGDをFig. 1に示した。1.0及び2.0%投与群のオス胎児のAGDは対照群に比べて有意に短くなった。メス

胎児のAGDにはDBP投与群と対照群との間の差はみられなかった。

オス胎児におけるAGD/体重比をFig. 2に示した。1.0及び2.0%投与群のAGD/体重比は対照群に比べて有意に低かった。

胎児の形態検査の結果をTable 3に示した。2.0%投与群で152例中6例の胎児(11例中4腹)に外表奇形が観察され、発現頻度は対照群に比べて有意に高かった。これらの胎児は全て口蓋裂を有していた。骨格奇形の発現頻度は2.0%投与群において有意に高かった。全ての腹の101例中56胎児に胸骨核癒合が観察された。外表及び骨格奇形はオス及びメスの胎児に認められた。1.0及び2.0%投与群において有意に高い頻度で内部器官の奇形が観察された。1.0%投与群では46例中7胎児(11例中7腹)、2.0%投与群では51例中27胎児(11腹全て)に精巣下降不全が認められた。

D. 考察

投与期間中の母体体重増加及び飼料摂取量には投与量に依存したDBPの影響が認められ、母体体重の低下度は飼料摂取量の低下度とよく一致していた。1.0及び2.0%投与群ではこのような変化がみられたが、0.5%投与群においては母体へのDBPの影響は認められなかった。これらのことから、飼料中濃度1.0%以上のDBPを妊娠後半のラットに与えたとき母体毒性が発現することが示唆された。

ラットの妊娠前半にDBPを与えたとき胚死亡率が著しく上昇するが、妊娠後半のDBP投与では胚死亡率が上昇しないことが本実験により明らかになった。このことは、妊娠後半の胚/胎児は妊娠前半よりもDBPの致死作用に対して感受性が弱いことを示している。

本実験により、妊娠後半に投与した

DBP は特異的な奇形を発現させることが明らかになった。口蓋裂及び胸骨核癒合は両性の胎児に観察され、オス胎児に精巣下降不全と AGD の短縮が認められた。口蓋裂と胸骨核癒合はラット胎児の器官形成期に DBP を与えたときに発現することを、我々の先の研究で明らかにした。本実験では、妊娠の後半に DBP を投与したときにオス胎児に生殖器の異常を発現させることを明らかにした。

DBP を妊娠期間中及び授乳中を通じて母ラットに投与したときの生後 3 日のオス出生児に AGD の短縮がみられることが報告されている。また、DBP を妊娠 12-21 日に与えた母ラットの出生児に残存乳首、AGD 短縮、精巣下降不全が観察されている。さらに、DBP 500 mg/kg の DBP を妊娠 16-19 日に与えたラットの出生児において AGD 短縮と残存乳首が観察されている。我々の今回の実験では、オス胎児における AGD はメス胎児の AGD 程度にまで短縮していた。このような現象の発現は、DBP の子宮内暴露がアンドロゲンにより調節されている性分化を攪乱したか、または、DBP がアンドロゲンレセプターの拮抗剤として作用したことにより発現した可能性がある。

我々は先に、胎児の器官形成期に DBP あるいは BBP を投与したとき、よく類似した催奇形性の発現様式がみられることから、DBP 及び BBP の発生毒性発現には共通の作用機序が作用していることを示唆した。これらの両 PAEs ともラットに投与したとき主要な代謝物として monobutyl phthalate (MBuP) が生成されることが知られており、MBuP が発生毒性発現に関与していることが推定された。そこで、MBuP のラットにおける発生毒性を調べたところ、MBuP は DBP 及び BBP の発生毒性とよく類似した発生毒性を示すことを明らかにし

た。これらのことから、我々は MBuP が DBP 及び BBP の発生毒性の原因物質であることを示唆した。

BBP や代謝物 MBuP による AGD 短縮等のオス胎児/出生児におけるメス化(脱オス化)現象について検討することは興味あるところであり、今後、これらについて検討を行う予定である。

E. 結論

ラットの妊娠後半に DBP を与え、胎児に対する影響を調べたところ、口蓋裂及び胸骨核癒合を有する胎児の発現頻度が上昇し、オス胎児においては精巣下降不全の発現頻度が上昇した。さらに、オス胎児における生殖器一肛門間距離の短縮が認められた。これらのことから、妊娠後半に与えた DBP はオス胎児の生殖器の発生に有害な作用を示すことが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Ema, E. Miyawaki and K. Kawashima. Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, 12, 127-132 (1998)

M. Ema, E. Miyawaki and K. Kawashima. Further evaluation of developmental toxicity of di-n-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*, 98, 87-93 (1998)

A. Harazono, M. Ema and K. Kawashima. Evaluation of malnutrition as a cause of tributyltin-induced pregnancy failure in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 224-230 (1998)

M. Ema, E. Miyawaki and K. Kawashima. Developmental toxicity of triphenyltin chloride after

administration on three consecutive days during organogenesis in rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62, 363-370 (1999)

M. Ema, E. Miyawaki and K. Kawashima. Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. Arch. Toxicol. in press

2. 学会発表

江馬 眞 トリフェニルスズの着床阻害作用 第17回 In vitro 発生毒性研究会

江馬 眞、宮脇英美子、川島邦夫 可塑剤 butyl benzyl phthalate の妊娠及び偽妊娠ラットにおける生殖障害 第25回日本トキシコロジー学会

原園 景、江馬 眞、川島邦夫 ラットにおける着床前期間に投与したトリブ

チルスズの着床阻害作用—脱落膜反応に与える影響— 第25回日本トキシコロジー学会

江馬 眞、宮脇英美子、川島邦夫 ラットの妊娠後半に投与した dibutyl phthalate の発生毒性 第38回日本先天異常学会

宮脇英美子、江馬 眞、川島邦夫 トリフェニルスズの着床阻害作用：偽妊娠ラット子宮における脱落膜反応の抑制 第38回日本先天異常学会

江馬 眞 トリフェニルスズのラットにおける生殖毒性 第59回関西実験動物研究会

M. Ema, E. Miyawaki and K. Kawashima. Early embryonic loss induced by diphenyltin dichloride (DPTCl) in rats. Society of Toxicology 38th Annual Meeting

Table 1
Maternal findings in rats given dietary DBP on days 11–21 of pregnancy

	DBP (%)			
	0 (control)	0.5	1.0	2.0
No. of pregnant rats	11	11	11	11
No. of dead pregnant rats	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	235 ± 7	233 ± 9	234 ± 13	234 ± 8
Body weight gain during pregnancy (g) ^a				
Days 0–11	32 ± 8	30 ± 4	29 ± 7	35 ± 5
Days 11–21	91 ± 8	85 ± 15	72 ± 6*	32 ± 10*
Adjusted weight gain ^b	32 ± 11	34 ± 8	22 ± 8*	-6 ± 8*
Food consumption during pregnancy (g) ^a				
Days 0–11	182 ± 18	183 ± 19	179 ± 16	186 ± 10
Days 11–21	174 ± 13	175 ± 11	146 ± 13*	88 ± 16*
Daily intake of DPB (mg/kg) ^{a,c}	0	331 ± 17	555 ± 50	661 ± 130

^a Values are given as mean ± S.D.

^b Adjusted weight gain refers to maternal weight gain excluding the gravid uterus.

^c [(Food consumption on days 11–21 + 10) × %DBP]/body weight on day 11.

* Significantly different from control, $P < 0.05$.

Table 2
Reproductive findings in rats given dietary DBP on days 11–21 of pregnancy

	DBP (%)			
	0 (control)	0.5	1.0	2.0
No. of litters	11	11	11	11
No. of corpora lutea per litter ^a	16.3 ± 1.0	15.6 ± 1.3	15.4 ± 1.3	16.0 ± 1.5
No. of implantations per litter ^a	15.6 ± 1.0	15.0 ± 1.1	14.2 ± 1.5	15.3 ± 1.3
No. of litters totally resorbed	0	0	0	0
No. of resorptions and dead fetuses per litter ^a	1.0 ± 0.6	2.1 ± 2.8	0.8 ± 0.8	1.5 ± 1.0
% Postimplantation loss per litter ^b	6.4	14.3	8.0	9.5
No. of live steuses per litter ^a	14.6 ± 1.1	12.9 ± 3.2	13.0 ± 1.3	13.8 ± 1.6
Sex ratio of live fetuses (male/female)	94/67	72/70	74/69	81/71
Body weight of live steuses (g) ^a				
Male	4.49 ± 0.30	4.47 ± 0.65	4.48 ± 0.22	3.50 ± 0.31*
Female	4.23 ± 0.22	4.55 ± 0.24*	4.26 ± 0.26	3.26 ± 0.31*

^a Values are given as mean ± S.D.

^b (No. of resorptions and dead fetuses/no. of implantations) × 100.

* Significantly different from control, $P < 0.05$.

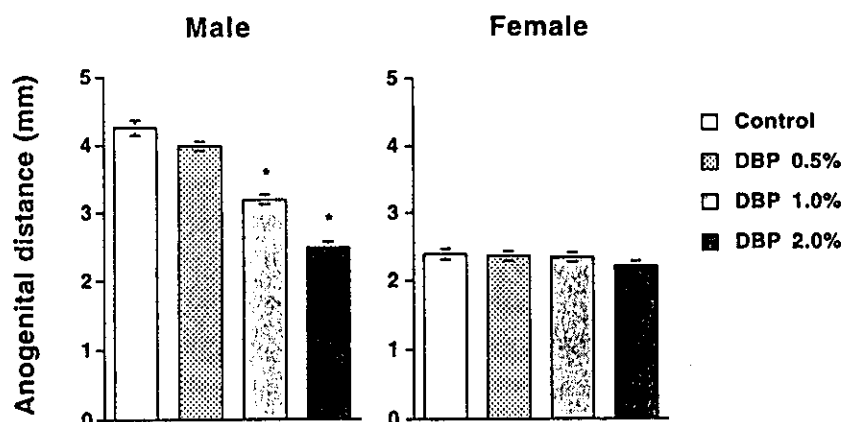


Fig. 1. Anogenital distance of male and female fetuses of rats given dietary DBP on days 11–21 of pregnancy. Values are given as mean ± S.E.M. * Significantly different from control, $P < 0.05$.

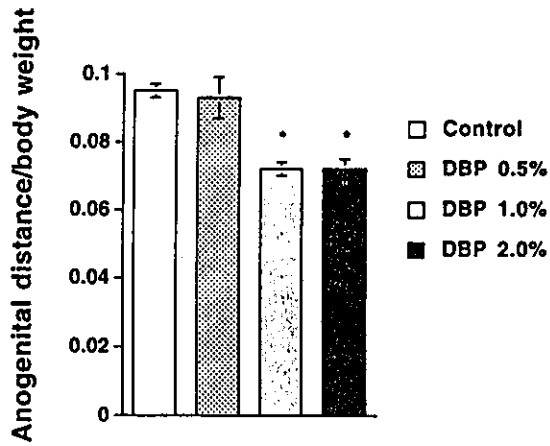


Fig. 2. Anogenital distance/body weight ratio in male fetuses of rats given dietary DBP on days 11-21 of pregnancy. Values are given as mean \pm S.E.M. * Significantly different from control, $P < 0.05$.

Table 3
Malformations in fetuses of rats given dietary DBP on days 11-21 of pregnancy

	DBP (%)			
	0 (control)	0.5	1.0	2.0
External examination				
No. of fetuses (litters) examined	161 (11)	142 (11)	143 (11)	152 (11)
No. of fetuses (litters) with malformations	0	0	0	6 (4)*
No. of fetuses (litters) with cleft palate	0	0	0	6 (4)*
Skeletal examination				
No. of fetuses (litters) examined	107 (11)	95 (11)	97 (11)	101 (11)
No. of fetuses (litters) with malformations	0	0	0	56 (11)*
No. of fetuses (litters) with fusion of sternebrae	0	0	0	56 (11)*
No. of fetuses (litters) with fusion of ribs	0	0	0	1 (1)
Internal examination				
No. of fetuses (litters) examined	54 (11)	47 (11)	46 (11)	51 (11)
No. of fetuses (litters) with malformations	0	0	7 (7)*	27 (11)*
No. of fetuses (litters) with undescended testes	0	0	7 (7)*	27 (11)*

* Values are mean \pm S.D.

* Significantly different from control, $P < 0.05$.