

平成 11 年度厚生化学研究費補助金

(生活安全総合研究事業)

研究成果報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱

化学物質の分析及び動態解析

(H11-生活-023)

主任研究者

分担研究者

中澤 裕之 星薬科大学

山田 隆 国立医薬品食品衛生研究所

宮崎 豊 愛知県衛生研究所

藤島 弘道 長野県衛生公害研究所

河村 葉子 国立医薬品食品衛生研究所

目 次

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析	1
主任研究者 中澤 裕之 (星薬科大学 薬品分析化学教室 教授)	
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	23
分担研究者 山田 隆 (国立医薬品食品衛生研究所)	
ポリ塩化ビニル製おもちゃからのフタル酸ジイソノニル (DINP) の溶出に関する調査研究	29
分担研究者 山田 隆 (国立医薬品食品衛生研究所)	
協力研究者 杉田たき子	
阿部有希子	
乳児のMOUTHING行動の実態	43
研究協力者 谷村 雅子 (国立小児医療研究センター小児生態研究部長)	
ポリ塩化ビニル製玩具からのフタル酸エステルの溶出に関する研究	51
ーヒトのchewingによる玩具から唾液へのフタル酸エステルの溶出-移行 および回転振とう方式による人工唾液への溶出-	
分担研究者 山田 隆 (国立医薬品食品衛生研究所)	
協力研究者 石橋 亨 ((財)東京顕微鏡院)	
共同研究者 新野 竜大 ((財)東京顕微鏡院)	
小野寺祐夫 (東京理科大学薬学部)	
玩具類からの内分泌かく乱化学物質の分析 「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 (その2)」	67
協力研究者 松木 容彦 ((財)食品薬品安全センター 奏野研究所)	
平林 尚之 ((財)食品薬品安全センター 奏野研究所)	
缶コーティングからのビスフェノールA及び関連化合物の溶出に関する研究	79
分担研究者 河村 葉子 (国立医薬品食品衛生研究所)	
瓶詰め食品のキャップシーリング材の内分泌かく乱化学物質に関する研究	93
主任研究者 中澤 裕之 (星薬科大学)	
分担研究者 宮崎 豊 (愛知衛生研究所)	
協力研究者 益川 邦彦 (神奈川県衛生研究所)	
平山 クニ (神奈川県衛生研究所)	
藤巻 照久 (神奈川県衛生研究所)	
HPLCを用いた缶詰食品中のビスフェノールAおよびビスフェノールA関連物質の分析	99
主任研究者 中澤 裕之 (星薬科大学 薬品分析化学教室 教授)	
分担研究者 宮崎 豊 (愛知県衛生研究所)	
協力研究者 小林 進 (埼玉県衛生研究所)	
缶ビール中のビスフェノールAに関する研究	111
主任研究者 中澤 裕之 (星薬科大学 教授)	
研究協力者 池田 満雄 (アサヒビール(株)総合評価センター)	
望月 直樹 (アサヒビール(株)総合評価センター)	
奈良部 雄 (アサヒビール(株)総合評価センター)	

高分子素材からなる生活関連製品からの内分泌かく乱化学物質の溶出と揮散	117
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学 薬品分析化学教室)
分担研究者	藤島 弘道 (長野県衛生公害研究所)
血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析	137
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学)
研究協力者	宮崎 豊 (愛知県衛生研究所)
	猪飼 蒼友 (愛知県衛生研究所)
	近藤 文雄 (愛知県衛生研究所)
	伊藤 裕子 (愛知県衛生研究所)
	岡 尚男 (愛知県衛生研究所)
	松本 浩 (愛知県衛生研究所)
歯科用ポリカーボネート中のBPAの分析	147
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学)
研究協力者	本郷 敏雄 (東京医科歯科大学)
大気中のプラスチック可塑剤の実態調査	157
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学 教授)
研究協力者	今井 俊介 (奈良県衛生研究所 所長)
フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析と動態	169
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学 教授)
研究協力者	牧野 恒久 (東海大学 教授)
分析注意点及びブランクの扱いについて	179
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学 教授)
研究協力者	松岡 広和 (横河アナリティカルシステムズ株式会社)
	佐久井徳広 (横河アナリティカルシステムズ株式会社)
酵母Two-Hybrid法を用いた高分子素材等の生活関連製品由来化学物質の内分泌かく乱作用の評価 ...	189
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学 薬品分析化学教室)
分担研究者	藤島 弘道 (長野県衛生公害研究所)
研究協力者	織田 肇 (大阪府立公衆衛生研究所)
	堀 伸二郎 (大阪府立公衆衛生研究所)
	高取 聡 (大阪府立公衆衛生研究所)
ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響 ...	203
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学)
研究協力者	中陳 静男 (星薬科大学)
エストロゲン活性検出系の確立	207
主任研究者	中澤 裕之 (星薬科大学)
研究協力者	山崎 聖美 (国立公衆衛生院)

平成 11 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

主任研究者 中澤裕之（星薬科大学 薬品分析化学教室 教授）

研究要旨

1. 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

6～10ヶ月乳児の MOUTHING 行動を観察した結果、1日の MOUTHING 時間は、平均 105.3 ± 72.1 分で、フタル酸エステルを溶出する可能性の無いおしゃぶりを口に行っている時間を除くと、平均 73.9 ± 32.9 分（最大値 136.5 分、最小値 11.4 分）であった。ヒトが、フタル酸ジイソノニル(DINP)58%を含む玩具の片を口に含んだ際、 10 cm^2 あたり平均 $63.7 \mu\text{g/hr}$ の DINP が唾液中に溶出した。この値と、MOUTHING 行動の平均時間を用いて、乳幼児が、この玩具を口に入れた場合に摂取する DINP の量は $78.4 \mu\text{g}$ と試算された。渦巻き振とう機を用い 15 cm^2 の玩具片に 30 ml の人工唾液を加えて 300 回転/分で 10 分間振とうを行うと、ヒトが chewing したときの最大溶出量に近似した値が得られた。この方法により、乳幼児が、ある玩具を口に入れた場合、どの程度のフタル酸エステルを摂取する可能性があるかを推測できる。

2. 食品容器包装材等からの内分泌かく乱化学物質の動態

①缶コーティングからのビスフェノールA及び関連化合物の溶出に関する研究

缶コーティングから飲料へのビスフェノールA（BPA）の溶出に関連する各種ファクターの影響及び溶出原因の解明を行うため、缶入飲料の調査で BPA 含有量が高かったコーヒー及び紅茶各 2 銘柄の相当缶及びその改良缶を試験した。缶各部位のコーティング中の BPA 含有量に違いが見られた。これらの缶について食品擬似溶媒を用いた溶出試験を行ったところ、溶出時間の増加とともに溶出量の増加がみられ、BPA の溶出には、エポキシ樹脂のガラス転移温度である 104°C 以上の加熱が必要であり、飲料を缶に封入後の加圧加熱滅菌における温度と時間が、溶出に大きく影響することが示唆された。一方、改良缶での溶出量は大幅に減少しており、缶コーティング中の残存量を減少させた今回の改良は、BPA の溶出量低減に極めて有効であったと判断された。次に、BPA、ビスフェノールAジグリシジルエーテル(BADGE)、その四水酸化体(BADGE-4OH)及び二塩素体(BADGE-2Cl)について、LC/MS による飲料中の分析法を開発し、市販缶入飲料 72 検体中の含有量を分析した。BADGE-4OH は、紅茶、緑茶など茶飲料を中心に、スポーツ飲料、果汁飲料、リカー類からも検出され、残存量も BPA より数倍～数十倍高かった。さらに、塩化水素付加体の BADGE-2Cl もポリ塩化ビニル樹脂塗装缶の一部飲料から検出された。

②瓶詰め食品のキャップシーリング材の内分泌かく乱化学物質

瓶詰食品（輸入品 35、国産品 15 検体）のキャップシーリング材について、内分泌かく乱

作用が疑われているフタル酸エステル等の可塑剤および BPA の使用動向を調査した。可塑剤は約 50%から検出され、国産品と輸入品では検出された可塑剤が異なっていた。全体的にはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)の使用が自粛されつつあること、また、材質自体もポリ塩化ビニル製から可塑剤を必要としないものになりつつあることが窺えた。BPA は輸入品の 5 検体から 1.0-620ppm の範囲で検出された。さらに、シーリング材から食品への可塑剤の移行について調べたところ、脂質の多い食品に高い濃度で溶出されているものがあった。

③缶詰食品中のビスフェノール A およびビスフェノール A 関連物質の分析

缶内面コーティング剤から缶詰食品中に移行した BPA について高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器-蛍光検出器を用いた分析法を検討し、缶詰食品中 72 検体の BPA の分析を行った。その結果、72 検体中 47 検体から BPA が約 1-22 μ g/缶検出された。加熱処理条件の厳しい野菜缶および肉・魚介缶であり、10 μ g/缶以上検出された缶詰 (9 検体) はすべてプルトップ型の缶詰であり、缶詰食品は、BPA のヒトへの暴露経路の一つとして考えられる。さらに、BADGE および 2 種類の塩化水素付加体 (HCl 型, 2HCl 型) について 20 検体分析したところ、BADGE が 3 検体(0.6-4 μ g/缶)、BADGE・2HCl 型が 9 検体 (0.1-47 μ g/缶)、BADGE・HCl 型が 3 検体 (0.1-2 μ g/缶) から検出された。

④缶ビール中のビスフェノール A に関する研究

缶ビール等の缶飲料に用いられるアルミ缶は、内面にエポキシ樹脂による塗装が施されており、BPA が内容物に溶出する可能性がある。そこで、ビール中の BPA について GC/MS による試験法を検討し、市販缶ビール製品中の BPA 含有量を調査した。国内の主要製品から BPA は検出されなかったが、輸入品の一部製品で、ビール中から BPA が検出された。

3. 医療用高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解明

①高分子素材からなる医療用プラスチック製品

医療用プラスチック製品に由来する揮発性物質をヘッドスペース瓶にとり、50℃で気化する物質を SPME ファイバーに吸着させ、GC/MS で測定した。その結果、飽和炭化水素で C₁₇以下の沸点を持つような化合物 (PTRI で 1700 以下) として、アニリン、トルエン、THF、フェノール、アセトフェノン、ベンゾチアゾール、ジクロロベンゼン、スチレン、BHT 等が検出された。また、溶出により人体に取り込まれる可能性のある物質を同定するため、生理食塩水でカテーテルから溶出してきた物質を SPME ファイバーで抽出し、GC/MS で測定した。この結果、ベンゾチアゾール、ベンゾフェノン、BPA、ノニルフェノール、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) 等約 120 物質を推定できた。

②血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

輸血用血液バッグに豚の血液を詰めて冷蔵保存した後、揮発性有機化合物をヘッドスペース-GC/MS で分析したところ、その血液中にはベンゼン、トルエン、スチレンモノマーなどの芳香族系有機化合物が経時的に増加し、20 日間の保存期間でこれらは数十 ppb の濃

度に達することが確認された。これらの化合物は、バッグ中に残存していたものが血中に溶出したもののみではなく、空気中に存在していたものがバッグを通過し、バッグ中の血液に移行した可能性も示唆された。また、これら芳香族系化合物の他に、血液バッグからはテトラヒドロフラン (THF) および 2-エチル-1-ヘキサノールが大量に溶出することも判明した。一方、母乳バッグに牛乳を詰めて 30 日間凍結保存した後、分析を行ったところ、調査した 2 種類のバッグのうち 1 種類からはトルエンの溶出が認められた。

③歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

BPA を原材料としたポリカーボネート(PC)は歯科領域においては、テンポラリークラウン、レジン歯、矯正用ブラケット、義歯床などに用いられている。BPA の簡便かつ高感度測定方法として、電気化学検出高速液体クロマトグラフ法による分析法を検討した。構築した分析法を用いて、PC 中に残留している BPA と人工唾液中に溶出する BPA を分析したところ、歯科材料中には残留 BPA が数 $\mu\text{g/g}$ ～数百 $\mu\text{g/g}$ 確認され、材料からの溶出において多いものでは数 $\mu\text{g/g}$ 単位であり、浸漬することにより PC 中に残留している BPA の増加が確認された。

4. 生活空間中の可塑剤の分析と分析精度の向上について

①大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

大気中のプラスチック可塑剤（フタル酸エステル 10 種、アジピン酸エステル 1 種）を同時に測定する方法を検討し、その屋外、屋内及び特殊環境として駐車中の自動車内空気の濃度の実態を調査した。屋外で多く検出されたのは DnBP、DEHP であった。屋内では、検出する濃度、種類は部屋によって少し異なっていた。55℃以上となる夏季の駐車中の車内では、検出する可塑剤の種類も多く、特に DnBP、DEHP は数千 ng/m^3 オーダーで検出された。しかし、車内最高温度 30℃程度の冬季では、濃度は高くなかった

②フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析におけるバックグランド低減化

食品中のフタル酸エステル類等の濃度を把握することは、リスク評価を行う上で重要であるが、使用量が多く、常に実験室を含む測定環境中に多く存在するため、精度の高い微量分析を困難としている。本研究では、試料の抽出、クリーンアップに精油定量装置を応用した閉鎖系の蒸留システムにより、操作ブランク値の低減化と再現性について検討した。超純水を製造した後、8 時間以上、精油定量装置で加熱還流を行い、フタル酸エステル類を含む共存物質をトルエンで捕集・除去することで、操作ブランクを低減することが可能となった。本法を氷菓の分析に応用したところ、内標準法を採用することで良好な回収率が得られた。

③分析注意点及びブランクの扱いについて

アルキルフェノール類、芳香族炭化水素類、フタル酸エステル類及び BPA 等について、GC/MS 上でのマトリックスの妨害、異性体ピークパターンの扱い、測定環境からの汚染（セプタム等の部品の表面汚染、装置ブランク、室内空気、試薬ブランク）、混合物スタンダードの使用等の留意点を明らかにし、対策を検討した。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法

酵母 Two-Hybrid 法を運用し、化学物質のエストロジェン様作用について評価した。さらにその代謝産物を含めた化学物質のエストロジェン様作用の評価を実施するために、酵母 Two-Hybrid 法の操作過程に S9 mix 処理過程を組み込み、その有用性を検討した。本法は化学物質自体のみならずその代謝産物の内分泌かく乱作用を検討する上で有用であることが判った。また、化学物質のエストロジェン様作用の評価は、化学物質自体を評価したのみでは不十分であり、代謝産物も含めて評価する必要性があることが示唆された。

②ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

化学物質が内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、H295R 細胞を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行った。このアッセイ法を用いて、プラスチック可塑剤として用いられているフタル酸エステル類の影響、プラスチック関連物質として BPA、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールの影響、および食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出物低分子画分・メタノール可溶部分の影響を検討し、コルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定した。

③エストロジェン活性検出系の確立

MCF-7 を用いた内分泌かく乱作用の *in vitro* スクリーニング試験法である E-SCREEN Assay の、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に、諸条件の基礎的検討を行った。さらに、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的とし、高分子素材由来の化学物質について評価を行った。

分担研究者

山田 隆	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長
宮崎 豊	愛知県衛生研究所 所長
藤島 弘道	長野県衛生公害研究所 所長
河村 葉子	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

A. 研究目的

1. 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
乳幼児は、内分泌かく乱物質の影響を受

けやすい可能性もあることから、玩具を口に入れてしゃぶり、あるいは噛んだとき、どの程度のフタル酸エステル類が溶出し、体内に入る可能性について検討した。次に、ヒトによる実験を代替しうる、*in vitro* での溶出試験法の開発を行うことを目的とし、溶出試験法の検討を行った。

2. 食品容器包装材料等からの内分泌かく乱化学物質の動態

- ①缶コーティングからのビスフェノールA 及び関連化合物の溶出

缶コーティングからの BPA 溶出のメカ

ニズムや各種影響因子等については、十分に解明されていない。また、BPAのエポキシ化体で、エポキシ樹脂の原料であり、塩化ビニル樹脂の安定剤であるビスフェノールAジグリシジルエーテル(BADGE)、及びその分解物等の関連化合物の中にも内分泌かく乱作用が疑われるものがある。そこで、缶コーティングから飲料へのBPAの溶出及びそれに影響を与えるファクター及び移行原因を究明し、缶入飲料中のBPA及び関連化合物の分析法を開発して、市販缶入飲料中のこれら化合物の残存量を調査することを本研究の目的とした。

②瓶詰め食品のキャップシーリング材の内分泌かく乱化学物質

フタル酸エステル(PAE)、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)等の可塑剤は現在、国産の食品用容器包装材にはほとんど使用されていないが、ポリ塩化ビニル製(PVC)のものが多いといわれている瓶詰め食品のキャップシーリング材にはこれら可塑剤を検出されることが多かった。あらためて国産及び輸入瓶詰め食品におけるこれら可塑剤の最近の動向とシーリング材から可塑剤の食品への移行を調査した。また、BPAはPVCの安定剤として、使用される可能性があり、内分泌かく乱化学物質が注目されている現況から、BPAの使用状況を明らかにすることを目的とする。

③缶詰食品中のビスフェノールA及びビスフェノールA関連物質の分析

缶詰において、エポキシ樹脂は、缶壁から金属等の溶出を防ぐための内面コーティング剤として使用されており、BPAが缶詰食品中に移行している可能性がある。そこで、BPAのヒトに対する暴露量を把握する

ために、高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器-蛍光検出器を用いた缶詰食品中の分析法について検討し、缶詰食品中のBPAの分析を行った。また、エポキシ樹脂のモノマーであるBADGEについても、脂溶性の高い塩化水素付加体(以下BADGE・HCl, BADGE・2HCl)との同時分析を目的とした。

④缶ビール中のビスフェノールAの動態

食品用金属缶の内面塗装には、エポキシ樹脂塗料が多く使用されており、BPAが飲料缶に移行する可能性が指摘されている。そこで、本研究では缶ビール中のBPA試験法を検討し、市販缶ビール製品中のBPAの動態を明らかにするため、含有量を調査した。

3. 医療用高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解明

①高分子素材からなる医療用プラスチック製品

輸液バック、カテーテル、血液透析ファイバー、注射器等は直接人体に接触して使用されるため、様々な化学物質が溶出し、血液系全体に取り込まれる可能性がある。これらプラスチック製品からどのような化学物質が溶出してくるか、また、どのような化合物が気化してくるかを明らかにすることを目的とする。

②血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

輸血用の血液は通常プラスチック製バッグ中に採血、保存されるが、予備調査において、血液バッグに保存された血液は、ベンゼンやトルエン、スチレンモノマーなどの濃度が非保存血液に比べて、異常に高い値を示すことを見いだした。しかしながら、

このような調査には、汚染の少ない血液が大量に必要であり、人血を用いて行うことは困難である。そこでと畜場で簡単に入手できる豚血液を用いて、血液バッグから血中に溶出する揮発性有機化合物の溶出挙動等について検討を行う。さらに、母乳を凍結保存する母乳バッグについても、血液バッグと同様にバッグから溶出する有機化合物による汚染が懸念されたことから、母乳の代わりに牛乳を用いて究明することを目的とする

③歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

ポリカーボネート(PC)は BPA とジフェニルカーボネート又は塩化カルボニルとの縮合ポリマーで、透明で耐熱性、耐衝撃性に優れており、色素などを加えることにより、歯と類似色調が得られ、またフィラーを加えることにより PC の強化を得られることから、歯科領域では矯正用ブラケット、テンポラリークラウン、レジン歯、義歯床などに用いられている。本研究では特異性が高く、高感度の分析が期待される電気化学検出高速液体クロマトグラフィーを用いた分析法を構築し、PC 製歯科材料について材質中に残留する BPA 量と人工唾液に浸漬することによる BPA 溶出量を把握する。

4. 生活空間中の可塑剤の分析と分析精度の向上

①大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

化学物質の中でも比較的生産量も多く、我々の生活環境中にはありふれた物質とされているプラスチック可塑剤について、大気中の汚染状況を把握する測定方法を確立し、その濃度が測定地点、気象条件や室内環境等でどのように変化するかを究明し、

実態調査を通じて人体暴露影響を評価し、発生を防止するための基礎資料とすることを目的とする。

②フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析におけるバックグランド低減化

食品中のフタル酸エステル、アジピン酸エステル類について精度の高い分析法を構築することが要求されている。しかし、これらの可塑剤は生活環境中に多く存在するため、その暴露経路は空気、水、試薬等多岐にわたり、その結果として高いバックグランド値として現れ、精度の高い分析を困難にしている。そこで、分析上の障害となるバックグランドを極力排除し、高感度定量法を確立するために、抽出・クリーンアップが閉鎖系で行われる精油定量器を用いた蒸留法を検討する。

③分析上の注意点及びブランクの扱いについて

内分泌かく乱化学物質の分析では低濃度での測定を要求されるため、通常の分析では注意を払う必要の少ない部分がクローズアップされ、分析結果に影響を及ぼす。分析機器装置や部品を含めた機器分析上の留意点やブランクの扱い等について、アルキルフェノール類、芳香族炭化水素類、フタル酸エステル類及び BPA を中心に分析技法上の情報を取得する。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

化学物質について内分泌かく乱作用という新たな観点からの安全性評価が求められており、高分子素材に由来する化学物質や溶出物を中心に様々な視点から生体に及ぼす影響を解析するため、アッセイ系の構築を目標とした。

① 酵母 Two-Hybrid 法

酵母 Two-Hybrid 法を運用し、化学物質のエストロジェン様作用の評価を実施し、さらにその代謝産物を含めた化学物質のエストロジェン様作用の評価を実施するために、酵母 Two-Hybrid 法の操作過程に S9 mix 処理過程を組み込み、その有用性を明らかにする。

② エストロジェン活性検出系の確立

内分泌攪乱化学物質のスクリーニングには、*in vitro*、*in vivo* で様々な方法が報告されているが、その一つにヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法である E-SCREEN Assay がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性検出系を検討し、高分子素材由来の化学物質について評価を行った。

③ ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

環境由来の化学物質が生体のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、ヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞 (H295R 細胞) を用いて、*in vitro* でその直接的な影響を検討する。まず環境由来の化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ系を構築し、フタル酸エステル類、BPA、4-ノニルフェノール及び 4-*t*-オクチルフェノールの影響、及び食品包装用ラップ類のジクロロメタン

抽出物低分子画分・メタノール可溶部分の影響を検討する。

B. 研究方法

1. 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

① 乳児 MOUTHING 行動の実態調査：6～10ヶ月の各月齢児5名、計25名の親に、1回15分ずつ10回、計150分ビデオカメラで児の様子を記録し、被験児の MOUTHING 時間を秒単位で測定し、1日の活動時間中の MOUTHING 時間を推計した。

② ヒトの chewing による玩具から唾液へのフタル酸エステルの溶出：使用頻度のもっとも高い、フタル酸ジイソノニル (DINP) を含む玩具片を作製、そのまま、口に含み、軽く噛んだり、舌で口中を転がした。この間、唾液は飲み込まない。一定時間 (主として15分間) 後、唾液を高速液体クロマトグラフィーにより、フタル酸エステル量を測定した。

③ *In vitro* 溶出試験：溶出方法として玩具に直接手で触れないように手袋を用い、表面積 15 cm² に切断し、50 ml の遠心管に入れ、人工唾液 30 ml を加え、渦巻き振とう機一定時間振とう抽出し、アセトニトリルで希釈後、高速液体クロマトグラフィーにより分離定量した。

2. 食品容器包装材等からの内分泌かく乱化学物質の動態

① 缶コーティングからのビスフェノール A 及び関連化合物の溶出

試料にはモデル缶、市販缶入飲料を使用した。材質判別は FT-IR で内表面の赤外吸収スペクトルを測定した後、標準品スペク

トルとの比較により実施した。材質試験は内面コーティングの一部を削り取り、ジクロロメタンで超音波抽出し、アセトニトリルに再溶解して HPLC/UV/FL により BPA を測定した。溶出試験は溶出溶媒として水を用いた場合には、60℃及び95℃30分間、120℃10、30、60分間、20%エタノールを用いた場合には60℃30分間、*n*-ヘプタンを用いた場合には、25℃1時間溶出試験を行って試験溶液を調製し、BPA を測定した。缶入飲料はポリスチレン固相抽出用カートリッジでクリーンアップし、LC/MS により BPA、BADGE、BADGE-4OH、BADGE-2Cl を測定した。

②瓶詰め食品のキャップシーリング材の内分泌かく乱化学物質

1999年に購入した市販瓶詰食品(国産品15検体及び輸入品35検体)のキャップシーリング材50検体を用いた。シーリング材中の可塑剤は金属製キャップ内側のシーリング材をはがして細切し、ヘキサンを加え、時々振り混ぜながら3日間放置した抽出液を適宜希釈し、GC及びGC/MSにて分析を行った。BPAについては酢酸エチルで抽出したものを、フロリジルカートリッジでクリーンアップ、蛍光検出HPLCで分析した。食品中のDEHPの分析はアセトンで抽出、ヘキサン洗浄、フロリジルカートリッジでクリーンアップし、GC及びGC/MSで測定した。

③缶詰食品中のビスフェノールA及びビスフェノールA関連物質の分析

市販の缶詰72種類果実缶17検体、野菜缶34検体、肉・魚介缶21検体)について分析した。缶詰食品は、固形分、液汁、油に分離し、それぞれについて試験溶液を調

製した。液汁試料(スープ類を含む)はOASIS HLBカートリッジさらにフロリジルカラムでクリーンアップを行った。油試料はヘキサンに溶解後、アセトニトリル分配、フロリジルカラムでクリーンアップを行った。分析は蛍光検出-HPLCで実施した。

④缶ビール中のビスフェノールAの動態

ビール中のBPAについてGC/MS(SIM)による試験方法を確立するために、既存のBSTFAを用いたTMS誘導体化法を検討し、本法を用いて、缶ビール製品に関して試験を行った。一部缶ビール製品に関して25℃及び50℃にて一定期間保存した後、同様に試験を行った。さらにジエチル硫酸を用いてジエチル誘導体化法及びエチル誘導体化法を検討し、GC/MS(SIM)により測定した。本法を特定のホップエキスを原料として使用した缶ビールに関して試験を行った。

3. 医療用高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解明

①高分子素材からなる医療用プラスチック製品

医療用に用いられているプラスチック製品25種類及び関連企業から12種類の医療用プラスチック製品の提供を受けた。揮発性物質の測定は試料をはさみ等で細切し、ヘッドスペース瓶に採り、密栓し50℃で30分間、Polydimethylsiloxane/divinylbenzeneのSPMEファイバーで抽出し、GC/MSで測定した。また、同定の精度を高めるためにGC-FPDとGC-NPDでも測定した。更に細切した試料に生理食塩水を加え、10分間超音波・攪拌しながらSPMEファイバーで30分間抽出し、GC/MSで生理食塩水によ

る溶出物質の測定を行った。

②血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

血液バッグについては 6℃の冷蔵庫中に保存し、一部は発泡スチロール製の小型容器に入れ、ふたを装着して、その他のバッグとは異なる冷蔵庫内で保存した。母乳バッグに牛乳を規定量詰めて密封し、-30℃で 30 日間凍結保存した後、即日開封とともに解凍し、試料とした。分析はヘッドスペース-GC/MS で行った。

③歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

PC 製ブラケット、テンポラリークラウン、レジン歯は臨床で用いられている市販品を購入した。材質試験は適量のジクロロメタンに溶解させ、スターラーで攪拌しながらアセトンをゆっくり滴下し、高分子化合物を析出させた。3000rpm で 10 分間遠心分離後、上清液を約 2mL まで減圧濃縮(40℃以下)し、アセトニトリルに溶解後、適量をメンブランフィルターでろ過した。溶出試験は材料を人工唾液中に浸漬させ、37℃の恒温槽で遮光下静置した。BPA の測定は電気化学検出 HPLC で行った。

4. 生活空間中の可塑剤の分析と分析精度の向上について

①大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

試料捕集はテフロン製のろ紙ホルダーに GF(QF)、CF を重ねて装着し、10 l/min で 24hr (約 14.4m³) 2 段捕集し、ろ紙一部ジクロロメタンを用い、超音波抽出した。内部標準物質を添加して、GC/MS で分析した。

②フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析におけるバックグラウンド低減化

使用した水はいずれも、精油定量装置を用い、8 時間以上加熱還流して、揮発性成分を除去し、GC/MS に対して妨害ピークを認めないもの、本法で用いるガラス器具類はすべてアセトン洗浄後、200℃の乾燥器内で 4 時間以上加熱したものをを用いた。精油定量器にトルエンを 1mL 正確に加え、ジムロート冷却器を取り付け、マントルヒーターで加熱蒸留した。蒸留後、トルエン抽出層を小試験管に取り、少量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、GC/MS 検液とした。

③分析注意点及びブランクの扱いについて

使用した分析機器及び測定条件はそれぞれ研究協力書に記載した通り。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法

エストロジェンアッセイは酵母を前培養し、DMSO に溶解した被検化学物質を添加して実施した。生成したβ-ガラクトシダーゼの酵素活性を被検化学物質のエストロジェン様作用の指標とした。S9 mix 処理は Cofactor I 溶液ラット S9 を添加し、被検化学物質の DMSO 溶液を加え、37℃、4 時間のインキュベーションを行った。S9 mix 処理後、エストロジェンアッセイを実施した。

②エストロジェン活性検出系の確立

MCF-7, T47D を用いて E-スクリーンアッセイを実施した。被験物質を加えて、37℃、5%CO₂ 中で 3 日間インキュベートした後、各ウェルにセルカウディングキット (和光純薬) 中の試薬溶液を加えて、3 時間後にプレートリーダーで測定波長 450nm、参照波長 600nm にて測定する。

③ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロ

イドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

細胞は ITS+(1.0%)、Ultrosor G (2.0%) 及び抗生物質を含有する D-MEM-F12 メジウムを用い、5% CO₂-95% Air の気相中、37 °C の条件下で継代培養した。サブカルチャーしコンフルエント後、メジウムを交換し、種々の検体のエタノール溶液を添加し、同時にステロイド合成を誘導するため (Bu)₂cAMP を添加した。メジウム中に分泌されたステロイドをラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。サンプルの細胞毒性を考慮してメジウム中に放出される LDH を測定し、全タンパク質量を測定して、細胞数の指標とした。なお、コルチゾールの測定にはコルチゾール測定 RIA キットを用いた。

C. 研究結果及び考察

1. 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

①乳児 MOUTHING 行動の実態調査

6~10 ヶ月児 25 名の 1 日の活動時間は、平均 615.0±100.5 分であった。1 日あたりの MOUTHING 推計時間は、平均 105.3±72.1 分であった。MOUTHING 時間の長さは、おしゃぶり使用時間に依存していた。おしゃぶりを口に入れているときの行動は、他のものを口に入れる場合と大きく異なるため、おしゃぶりをしゃぶっている時間は、本観察が目的としている MOUTHING 時間から省くのが適切と考えられる。

②ヒトの chewing による玩具から唾液へのフタル酸エステルの溶出

おしゃぶり (DINP 含量 58%) 片を入れたときの唾液への DINP の溶出は、95.5±

40.4 μg/hr であった。ガラガラ (DINP 含量 32%) では、64.3±37.5 μg/hr、歯固め (DINP 含量 36%) では 49.2±20.8 μg/hr であった。同一人物が一週間の間隔を空けて同じ実験を行ったとき、溶出量はほとんど同じ値であった。

③In vitro 溶出試験

In vitro 溶出試験は、温度の影響を受けることが分かったため、恒温槽中で振とう試験ができる、渦巻き振とう機を使用した。おしゃぶりとガラガラの場合、ヒトの chewing の結果と in vitro 溶出試験の結果でほぼ近い値が得られた。玩具の形状によっては、試験片を同じ形に切ることが不可能であり、バラツキは大きくなった。

2. 食品容器包装材等からの内分泌かく乱化学物質の動態

①缶コーティングからのビスフェノールA及び関連化合物の溶出

1) 飲料へのビスフェノールAの移行要因

缶各部位のコーティング中のBPA含有量を測定したところ、サイドシームや底部で極めて高い含有量を示した。また、紅茶Aでは突出した部位はみられなかったが、面積が広い側面の含有量がやや高いため、缶全体では高い値を示した。水120℃30分間で溶出を行うと、相当缶では35~124 ng/mLの溶出がみられ、缶入飲料におけるBPAにほぼ近い値であった。

飲料への溶出は缶コーティングに残存していたBPA量に依存しており、加圧加熱等によりエポキシ樹脂が分解して新たにBPAが生成しているとは考え難い。

2) 市販缶入飲料中のBPA、BADGE及び関連化合物の含有量

BPA、ビスフェノールAジグリシジルエ

ーテル(BADGE)はいずれの試料からも検出されなかったが、その加水分解物であるBADGE-4OHは、紅茶、緑茶、スポーツ飲料、果汁飲料、リカー類から検出され、残存量もBPAより数倍～数十倍高かった。さらに、塩化水素付加体のBADGE-2Clもポリ塩化ビニル樹脂塗装缶の一部飲料から検出された。また、BADGE-2Clが一部検出されたが、飲料缶は天蓋部または側面がポリ塩化ビニルで塗装されており、塗装加熱時にポリ塩化ビニルから遊離した塩素とBADGEが反応してBADGE-2Clが生成し、飲料中に移行したものと推定された。

②瓶詰め食品のキャップシーリング材の内分泌かく乱化学物質に関する研究

瓶詰め食品におけるキャップシーリング材中の可塑剤 (DEP、DPP、DBP、DPEP、DHP、BBP、DEHP、DEHAの8種類及びDIDP、DINP、DALG) を分析したところ、約50%にPAEが使用されていた。国産品については15検体中6検体からDEHPが検出され、含有量は19.6～31.2%であった。

試料50検体について材質中のBPAを測定した結果、輸入品の5検体から1.0-620ppmの範囲で検出された。DEHPが検出された試料について食品中のDEHPを分析したところ、8検体中6検体からDEHPが検出された。

③缶内面コーティング剤から缶詰食品中に移行したビスフェノールAの分析

HPLCによるBPAの分析法を検討し、缶詰72検体について分析した。その結果、72検体中47検体からBPAが約1～22 μ g/缶検出され、20検体について、BADGE及び2種類の塩化水素付加体を分析したところ、一部検体にBADGE、BADGE・2HCl型、BADGE・HCl型が検出された。

今回調査した缶詰食品においては、すでに報告されている飲料缶中のBPA濃度(コーヒー缶で約40 μ g/缶)を越すような缶詰はなかったものの、加熱殺菌の温度、時間が相対的に長い野菜缶や肉・魚介缶のほとんどの缶詰からBPAが検出された。

④缶ビール中のビスフェノールA

同一会社における各製缶メーカー及びビール製造工場の異なる製品ビール10種、及びこれらを25℃6ヶ月、50℃で1週間保存した各試料を分析した結果、全ての試料からBPAは検出されなかった。海外で生産され国内に輸入された一部の製品で、最高0.5ppb程度のBPAが検出された。

3. 医療用高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解明

①高分子素材からなる医療用プラスチック製品

1)揮発性物質の同定

プラスチック製品は新品の時、比較的強い臭気を発生するものが多いが、揮発性物質の測定結果では、飽和炭化水素でC₁₇以下の沸点を持つような化合物(PTRIで1700以下)が検出された。これらの化合物の中には有害と思われるアニリン、トルエン、THF、フェノール、アセトフェノン、ベンゾチアゾール、ジクロロベンゼン、スチレン、BHT等が含まれる。

2)生理食塩水による溶出物質の同定

カテーテルについて溶出試験の溶媒として、生理食塩水を採用したところ、極性が高く、水溶性の高い、フェノール類、アルコール類、脂肪酸、アミド等が多く検出された。血液バックからの溶出物質は少なく、溶出濃度も低く、僅かにエチルヘキサノール、DEHP、BPAが検出された程度であっ

た。

②血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

輸血用血液バッグに豚の血液を詰めて冷蔵保存した後、揮発性有機化合物を分析したところ、その血液中にはベンゼン、トルエン、スチレンモノマーなどの芳香族系有機化合物等が経時的に増加し、20日間の保存期間でこれらは数十ppbの濃度に達することが確認された。これらの化合物は、バッグ中に残存していたものが血中に溶出したもののみではなく、空気中に存在していたものがバッグを通過し、バッグ中の血液に移行した可能性も示唆された。また、これら芳香族系化合物の他に、血液バッグからはテトラヒドロフラン (THF) 及び 2-エチル-1-ヘキサノールが大量に溶出することも判明した。今回検出されたものも、血液バッグに使われた樹脂に残存していたものであると推察できる。一方、母乳バッグに牛乳を詰めて30日間凍結保存後、分析したところ、1種類からはトルエンの溶出が認められた。

③歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

BPA の簡便かつ高感度な測定方法として、電気化学検出高速液体クロマトグラフ法を用いた分析法を検討した。この分析法を用いて、PC 中に残留している BPA と人工唾液中に溶出する BPA の定量を行ったところ、歯科材料中には残留 BPA が数 $\mu\text{g/g}$ ~ 数百 $\mu\text{g/g}$ 確認され、材料からの溶出において多いものでは数 $\mu\text{g/g}$ 単位であった。さらに、浸漬することにより PC 中に残留している BPA の増加が確認された。人工唾液に浸漬することにより材質中の残留 BPA

量が増加していたが、人工唾液によるポリカーボネートの劣化が原因でないかと考えられる。

4. 生活空間中の可塑剤の分析と分析精度の向上について

①大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

環境空気の実態調査として屋外大気を測定した結果、DEHP、DnBP が比較的高濃度で検出された。冬季の測定結果は、夏季に比べ低い傾向が見られた。また、屋内空気の調査として研究所の部屋を測定したところ、屋外濃度より高く、DEHP 濃度で約 300ng/m^3 であった。また検出した可塑剤の種類が部屋により若干異なっていた。密室として駐車中の自動車内空気を測定したところ、冬季は車内最高気温が 30°C 程度で、夏季に比べてかなり測定当該物質は低い値であったが、夏季の車内温度は、 55°C 以上で、DEP、DnBP、DEHP は数千 ng/m^3 の高濃度で検出され、DMP、DnPP、DEHA も比較的高い濃度で検出された。

②フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析と動態

精製水をさらに8時間以上、精油定量装置で加熱還流を行い、フタル酸エステル類を含む共存物質をトルエンで捕集・除去することで、操作ブランクを低減することが可能であった。氷菓に、可塑剤の各標準を 25ppb、100ppb 濃度で添加し、回収試験を行ったところ、絶対検量線法では 45.6~179.0%と大きくばらついたが、内標準法を用いることで 90.2~118.3%と良好な結果を得た。

③GC/MS の分析注意点及びブランクの扱いについて

アルキルフェノール類、芳香族炭化水素

類、フタル酸エステル類及びBPAについてGC/MSによる試料調製段階、分析装置上の留意点、マススペクトル上での夾雑成分の判別などの問題点を実測データで明らかにした。信頼性の高い分析結果を得るには分析機器、試薬等の保守管理、測定室の維持管理が重要であり、精度管理のようなGLP対策も信頼性ある測定データを取得するには必要不可欠である。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法

1)エストロジェン様作用

アルキルフェノール類にエストロジェン様作用が認められた。また、アルキル基の主鎖長とエストロジェン様作用の強度との間に関連性が認められ、アルキル基の主鎖長が5のとき最も強い作用を発揮した。また、フタル酸ジブチル及びフタル酸ベンジルブチルにエストラジオールの10⁶分の1未満と弱い活性が認められたが、他のフタル酸エステル類には、エストロジェン様作用は認められなかった。アジピン酸エステル類は、エストロジェン受容体のリガンドとしての結合能力及びコンフォメーションの変換能力を持たないと考えられた。

最も強いエストロジェン様作用を示した *p-br*-ノニルフェノールについての組成は不明であるが、4-(1,1,3,3-テトラメチル)ブチルフェノール (*p-tert*-オクチルフェノール) に類似した枝鎖を持つ置換基を有する化学物質が主成分と推察される。

フタル酸エステル類は、分子内にフェノール性水酸基がないことによってリガンドとしての結合能力とコンフォメーションの変換能力が弱いため、エストロジェン様作

用が弱いと考えられる。アジピン酸エステル類については、分子内にベンゼン環を持たず、その構造にエストラジオールとの類似性がないため、エストロジェン受容体のリガンドとしての結合能力及びコンフォメーションの変換能力を持たないと考えられた。

2)化学物質の代謝産物の内分泌かく乱作用

スチレンダイマー (1,2-*trans*-ジフェニルシクロブタン、1,2-*cis*-ジフェニルシクロブタン、1,3-ジフェニルプロパン及び2,4-ジフェニル-1-ブテン)、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、ベンゾフェノン及びビフェニルのS9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用が認められた。S9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用が認められたスチレンダイマー及び2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセンはベンゼン環に水酸基が導入され、フェノール残基が生成したと考えられる。ベンゾフェノン及びビフェニルのS9 mix 代謝産物についてもベンゼン環に水酸基が導入され、フェノール残基が生成したと考えられる。

②ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

H295R 細胞を使用してステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、アッセイ法を確立した。本法により、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、アジピン酸ジエチルヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ヘキシル、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジブチル、及びフタル酸を測定した結果、フタル酸ジ

ジクロヘキシルが H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制することを明らかにした。その他のフタル酸エステル類及びフタル酸は何ら影響を及ぼさなかった。更に、業務用あるいは一般用食品包装用ラップフィルムのジクロロメタン抽出低分子画分・メタノール可溶部分についてその影響を検討した結果、一部品目からの抽出物が H295R 細胞のコルチゾールの産生を有意に抑制した。なお、この試料中のノニルフェノール含有量とコルチゾール産生の抑制との間の相関関係を調べたところ、相関関係は認められなかったことから、ノニルフェノール以外の成分がコルチゾールの産生を抑制している可能性が考えられる。

③エストロジェン活性測定系の確立

本アッセイ系で通常用いられるチャコールデキストラン処理血清に代えて市販の低蛋白溶液を用いたところ、エストラジオールでは 10^{-11} ~ 10^{-6} M で増殖促進作用がみられ、同様にアッセイが行えることを確認した。このアッセイ系を用いた結果、p-ジクロロベンゼンでは 10^{-11} ~ 10^{-4} M で 1.1 倍以下の弱いエストロジェン活性が、p-ヒドロキシ安息香酸では 10^{-11} ~ 10^{-5} M で 1.1~1.3 倍のエストロジェン活性が検出された。本研究により BPA ジグリシジルエーテルの 2HCl 付加体及び 4OH 付加体に、BPA と同等のエストロジェン活性が検出され、これら化学物質に対しても慎重に検討する必要がある。

D. 結論

1. 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 乳児 MOUTHING 行動の実態調査結果

と、ヒトの chewing による玩具から唾液への DINP の溶出結果より、乳幼児が、今回試験に供したおしゃぶりと同量の DINP を含む玩具を口に入れた際の、一日に口の中に入る DINP の量を試算した。オランダの報告では、幼児の口に入れる大きさを 10 cm^2 としており、今回の検討は、表面積 15 cm^2 の片で行ったため、今回得た溶出量を $2/3$ 倍した。平均では、今年度の chewing の平均溶出量である $95.5 \mu\text{g/hr}$ の $2/3$ とおしゃぶり以外のものの MOUTHING 行動の平均時間 73.9 分とを乗じた $78.4 \mu\text{g}$ 、最大で、昨年度の chewing の最大溶出量である $401 \mu\text{g/hr}$ の $2/3$ と MOUTHING 行動の最大時間 136.5 分を乗じた $608.2 \mu\text{g/hr}$ となった。

ヒト(成人)が玩具片を口に入れたとき、唾液中に溶出するフタル酸エステルの量は、玩具片を人工唾液中に入れ、渦巻き振とう器を用いて 300 回転/分で振とうすることにより類推できることがわかった。

2. 高分子製食品容器包装材料等からの内分かく乱化学物質の溶出

① 缶コーティングからのビスフェノール A 及び関連化合物の溶出に関する研究

缶入飲料中の BPA 含有量は、缶のサイドシーム、底蓋部、側面のコーティング中のビスフェノール A 残存量、及び飲料の滅菌温度や時間に大きく依存しており、材質中の残存量を低減することで溶出量は大きく低減されることが示された。また、市販缶入飲料中の BPA 含有量は減少傾向にあるが、BADGE 関連化合物については、BADGE-4OH が BPA の数倍~数十倍の含有量で広範囲に検出され、また、BADGE-2Cl も天蓋部または側面がポリ塩

化ビニル塗装の試料から検出された。これらの BADGE 関連化合物は、EUにおいて合計の溶出量が暫定的に 1 ppm 以下と定められており、今回の調査では基準値を超えるものはみられなかったが、数分の一程度の試料もあり、今後注視していく必要がある。

② 瓶詰め食品のキャップシーリング材の内分泌かく乱化学物質

瓶詰食品のキャップシーリング材は国産品、輸入品ともに材質が PVC から可塑剤の必要としない素材に変わりつつあることが窺えた。しかし、約 50%のキャップに可塑剤が検出され、脂質の多い食品に可塑剤が高濃度で溶出された例があることから、脂質を多く含んだ食品への使用については何らかの対策が必要である。BPA については材質中に高濃度で検出された試料があったが、その後食品に接触しないような工夫が施されたり、BPA を使用しないシーリング材に替えたりの対処がなされていた。材質中に微量に検出されたシーリング材から、食品へ移行する可能性については今後の課題である。

③ 缶詰食品中のビスフェノール A およびビスフェノール A 関連物質の分析

缶内面コーティング剤から缶詰食品中に移行した BPA の分析法を構築し、缶詰 72 検体について分析したところ、検体から BPA が約 1-22 μ g/缶検出され、缶詰食品は、BPA のヒトへの暴露経路の一つとして考えられた。また、検出された缶詰のほとんどは、加熱処理条件の厳しい野菜缶および肉・魚介缶であり、10 μ g/缶以上検出された缶詰はすべてプルトップ型の缶詰であった。

さらに、20 検体について、BADGE および 2 種類の塩化水素付加体 (HCl 型, 2HCl 型) について分析したところ、複数の検体から BADGE、BADGE・2HCl 型、BADGE・HCl 型が検出された。

④ 缶ビール中のビスフェノール A

国内の缶体製造メーカーでは、BPA の低減化のための対策として、アルミ缶の塗剤であるエポキシ樹脂製造工程 (BPA とエピクロロヒドリンの縮合反応) において、低温で長時間反応させることにより、未反応の BPA を低減化すること、缶コーティング工程において、高速回転させた缶胴にエポキシ樹脂をスプレーガンを用いて、均一に薄く塗布後、高温高速で樹脂が分解することなく乾燥させる等の工夫が行われているおり、今回の試験結果から、国産製品から BPA は検出されておらず、効果が現れていると考える。外国製品については缶内面塗装由来の BPA に対しては国内度問題視されておらず、BPA 溶出に関する対策が十分に実施されていないことが示唆され、食品監視業務における取り組みを検討すべきと思われる。

3. 医療用高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解明

① 高分子素材からなる医療用プラスチック製品

今年度は、主に医療用プラスチック製品からどのような物質が揮発して人の肺から取り込まれるか、またカテーテルのように人の体内に挿入して使用される場合にどのような物質が溶出して人体に取り込まれる可能性があるのかを GC/MS を用いて検討した。揮発性物質の測定結果では、飽和炭化水素で C₁₇ 以下の沸点を持つような化合

物 (PTRI で 1700 以下) が検出され、その中にはアニリン、トルエン、THF、フェノール、アセトフェノン、ベンゾチアゾール、ジクロロベンゼン、スチレン、BHT 等が含まれる。生理食塩水による溶出試験では、GC で直接測定できる物質に限定したため、蒸気圧が低く測定できなかった物質がかなりあったものと考えられ、不揮発性物質をどう扱うかは今後の課題である。今回の実験結果では体内に挿入して使用されるカテーテル等の製造原料はメーカー側でできるだけ有害物質を抑えているように推測されるが、極性が高く、水溶性の高いフェノール類、アルコール類、脂肪酸類、アミド等が多く検出されている。またヘッドスペース法では検出されなかったフタル酸エステル、ベンゾフェノン、リン酸エステル等比較的沸点の高い化合物が多く検出されている。

③ 血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

血液バッグに詰めて冷蔵保存した豚血液中の揮発性有機化合物を分析したところ、ベンゼン、トルエン、スチレンモノマーなどの芳香族系有機化合物が検出され、それらは保存期間が長くなるに従い増加する傾向が認められた。また、発泡スチロール容器中に保存した血液バッグからは、発泡スチロールから放出されるスチレンモノマーが非常に高濃度に検出されたことから、空气中に存在する芳香族系有機化合物が、バッグを通過し、保存血液バッグ中の血液に移行する可能性が示唆された。さらに、血液バッグからは 3 種類の揮発性有機化合物が大量に溶出することが認められ、それらのうちの 2 種類は、テトラヒドロフラン

(THF) および 2-エチル-1-ヘキサノールであることが同定された。

母乳バッグに牛乳を詰めて冷凍保存した検体からは、調査した 2 種類のバッグのうち 1 種類のみからトルエンの溶出が認められた。その原因は製造時におけるトルエンの混入と思われたが、その詳細については不明であった。

③ 歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

電気化学検出 HPLC を用いてポリカーボネート中に残留している BPA 量及び人工唾液へ溶出した BPA 量を測定した。ポリカーボネート製歯科材料中に BPA が残留し、材料から BPA が溶出してくることが確認され、ヒト唾液中への溶出の可能性が示唆された。

4. 生活空間中の可塑剤の分析と分析精度の向上

① 大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

大気中のプラスチック可塑剤 (フタル酸エステル 10 種及びジ (2-エチルヘキシル) アジピン酸) の分析法を検討したところ、回収率に多少の高低はあったものの、ほとんどの物質について良好な結果が得られた。捕集ろ紙による違いについては、比較的低分子量の DMP、DEP 等は CF に多く捕捉され、分子量の大きな DEHP、DnOP 等は GF(QF) に捕捉される傾向が見られた。大気中の実試料について、屋外、屋内及び特殊環境として、駐車中の自動車内の各空気について測定を行った結果、DMP、DEP、DnBP、DEHA、DEHP が夏季に高濃度で検出された。濃度は温度に影響され、夏季の車内気温は高温になり、可塑剤も多種高濃度に検出されたのに対し、冬季はかなり

低い値であった。

②フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析におけるバックグラウンド低減化

精油定量装置を用いた蒸留前処理法を構築した。その結果、精製水を8時間以上、本システムで加熱還流を行い、フタル酸エステル類を含む共存物質をトルエンで捕集・除去することで、操作ブランクを低減することが可能であった。本システムは操作が閉鎖系で行われることで外部からの汚染を極力抑えた微量分析が可能であり、氷菓、清涼飲料水など、共存物質が少ないと思われる試料の分析に十分適用できることが期待される。

③分析精度の向上と信頼性確保について

内分泌かく乱化学物質の分析化学的視野から見た特徴は微量化学物質の測定を実施するにあたり、実験に用いる蒸留水、イオン交換水、試薬に加えて、使用する高分子製理化学器具に由来するコンタミネーションがバックグラウンド値の上昇、ばらつき等に反映されることである。分析化学担当者にとっても内分泌かく乱化学物質の測定においては盲点をつかれる問題が山積している。その要因がサンプリング時点の採取容器に始まって測定最終段階の分析装置に至るまで、多岐にわたっていることを認識し、その対応策を模索する必要がある。さらに、微量分析になるほど、データの施設間のばらつきは大きくなる。本研究においても同一サンプルについて必要に応じて複数機関でのクロスチェックを実施して、データの信頼性を確保しているが、分析値の信頼性を確保する上でも精度管理の実施が不可欠と言えよう。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学

物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法

生活関連高分子製品由来の内分泌かく乱化学物質のエストロジェン様作用について酵母 Two-Hybrid 法及び S9mix を加えた系で評価した。本研究を通じて酵母 Two-Hybrid 法は化学物質自体のみならず、その代謝産物の内分泌かく乱作用を短時間で検討する上で有用であることが示唆された。ベンゼン環を有する化学物質においては代謝過程で水酸基が導入され、フェノール残基が生成される可能性があり、代謝によって新たにエストロジェン様作用を発揮する化学物質が生成されるものと考えられる。化学物質の内分泌かく乱作用を検討するに際してその代謝産物の内分泌かく乱作用も検討することは不可欠である。

②エストロジェン活性測定系の確立

E-スクリーンアッセイで通常用いられるチャコールデキストラン処理血清に代えて市販の低蛋白溶液を用いたところ、エストラジオールでは 10^{-11} ~ 10^{-6} M で増殖促進作用がみられ、同様にアッセイが行えることを確認した。低蛋白溶液を用いることにより、ホルモン以外の血清成分による結果のばらつきを抑えられたと考えられ。また、MCF-7細胞にかえてT47D細胞を用いたところ、結果にばらつきが少なく安定した結果が得られ、T47D細胞はエストロジェン活性の検出に有用であることが確認された。このアッセイ系を用いた結果、p-ジクロロベンゼン及びp-ヒドロキシ安息香酸では弱いエストロジェン活性が検出された。また、エポキシ樹脂のモノマーであるビスフェノール A ジグリシジルエーテルの 2HCl 付加体及び 4OH 付加体には BPA と同等のエス