

トロジェン活性が検出された。

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

ステロイドホルモン産生に及ぼす化学物質の影響を解明する目的で、ヒト副腎皮質由来の H295R 細胞を用いて、アッセイ法の基礎的検討を行い、測定系を確立した。このアッセイ法を用いて、フタル酸エステル類、BSA、4-ノニルフェノール及び 4-*t*-オクチルフェノール、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した結果、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1)堀江正一、石井里枝、小林 進、中澤裕之：
LC/MSによる缶飲料中のビスフェノール A の定量、分析化学, 48, 579-587 (1999)
- (2)河村葉子、佐野比呂美、山田 隆：缶コーティングから飲料へのビスフェノール A の移行、食衛誌、40, 158~165 (1999)

2. 学会発表

- (1)井之上浩一、佐々木春美、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、中澤裕之、本郷敏雄、堀江正一：電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (ECD/HPLC) によるビスフェノール A の高感度分析、p77、日本薬学会第 119 年会(徳島)、1999 年 3 月
- (2)藤巻照久、佐藤修二、谷 孝之、益川邦彦、渡辺卓穂、吉村吉博、中澤裕之：GC-FPD 及び GC-MS によるヒト毛髪中の有機スズ化合物の分析、日本薬学会第

119 年会(徳島)、1999 年 3 月

- (3) 新野竜大、加藤文秋、石橋亨、伊藤武、坂井千三、杉田たき子、山田隆：ポリ塩化ビニル製おもちゃ中のフタル酸ジイソノニル(DINP)のヒト唾液への溶出・移行、日本食品衛生学会第 78 回学術講演会、1999 年 10 月、長野
- (4) 杉田たき子、山田 隆、平山クニ、長谷川康行、石橋亨：ポリ塩化ビニル製おもちゃ中のフタル酸エステル含有量及び溶出試験法の検討、日本食品衛生学会第 78 回学術講演会、1999 年 10 月、長野
- (5) 平林尚之、福原克治、鷹野祐子、遠藤和香子、安生孝子、松木容彦、杉田たき子、山田 隆、おもちゃからのフタル酸ジイソノニル(DINP)の *in vitro* 溶出の検討、日本食品衛生学会第 78 回学術講演会、1999 年 10 月、長野
- (6) 高取 聡、北川陽子、西川淳一、西原 力、堀 伸二郎：酵母 Two-Hybrid 法を用いた農薬類の内分泌かく乱作用の検討、日本食品衛生学会第 77 回学術講演会、1999 年 5 月、東京
- (7) 山川・浦野・熊谷・月岡・佐藤：学校給食用ビン牛乳で発生した異臭事故の原因究明に関する一考察、全国食品衛生監視員研修会発表等抄録、1999 年 11 月
- (8) 平山クニ、田中宏子、川名清子、谷 孝之、中澤裕之：瓶詰食品におけるキャップシーリング材の可塑剤およびビスフェノール A の分析、日本薬学会第 120 年会、p.183、2000 年
- (9) 堀江正一：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 ジグリシジルエーテルの同時分析、全国衛生化学技術協議会(福岡)、1999 年 11 月

- (10) 矢島 功、清水美希、加藤嘉代子、中澤裕之、本郷敏雄、大槻昌幸、田上順次、西村文夫、佐藤温重：日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会、p.27、1999
- (11) 矢島 功、清水美希、加藤嘉代子、中澤裕之、本郷敏雄、堀江正一、松村英生：日本薬学会第120年会、p.175、2000
- (12) Yamazaki. T. , Okada. Y. , and Hisamatsu. Y. : Effects of endocrine disruptors on lymphocyte functions, *Endocrine Disruptors, Keystone Symposia, California, 1999*; p.48.
- (13) 山崎聖美、岡田由美子、久松由東：内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第72回日本生化学大会、横浜、1999年、p.897.
- (14) 山崎聖美、岡田由美子、久松由東、香山不二雄：内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、神戸、1999年、p.157.
- (15) 山口晃子、山崎聖美、坂部 貢、中澤裕之：生活関連化学物質の E-SCREEN Assay による評価、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、神戸、1999年、p.69
- (16) 中陳静男、篠田 聡、豊島 聰、中澤裕之、牧野恒久：ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす DDT とその代謝物の影響、日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会、p.12、1999年、神戸
- (17) 井之上浩一、中澤裕之、河村葉子、山田 隆：LC/MSによる缶入水性食品中のビスフェノールA、ビスフェノールAジグリシジルエーテル及びその関連化合物の分析、日本薬学会第120年会、2000年3月
- (18) 加藤嘉代子、井之上浩一、矢島 功、吉村吉博、中澤裕之、堀江正一、吉田栄充、小林 進、岡 尚男、伊藤裕子、月岡 忠、寺沢潤一、吉田徹也、佐藤守俊、藤島弘道：高分子素材に由来する化学物質の生体試料中の分析、第13回生体成分の分析化学シンポジウム、p39、1999年8月、東京
- (19) 渡辺栄喜、岡 浩司、井之上浩一、堀内美和子、南 清和、矢島 功、秋葉奈美、平田明日美、山口晃子、渡部和恵、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、中澤裕之：内分泌かく乱化学物質の分析と動態解明、第3回分析化学東京シンポジウム、p156、1999年9月、千葉
- (20) 加藤嘉代子、植野弘子、吉村吉博、中澤裕之、岡 尚男：蒸留法による血中フタル酸エステル類測定の基礎的検討、日本分析化学会第48年会、p68、1999年9月、神戸
- (21) 井之上浩一、宮島裕子、加藤嘉代子、吉村吉博、中澤裕之、鈴木 勉：生体試料中におけるビスフェノールAの高感度分析の開発、日本分析化学会第48年会、p77、1999年9月、神戸
- (22) 加藤嘉代子、吉村吉博、中澤裕之、伊藤裕子、岡 尚男：蒸留前処理法による血中フタル酸およびアジピン酸エステル類のGC/MS分析、第24回日本医用マススペクトル学会年会、p37、1999年9月、兵庫
- (23) 中澤裕之：食品と内分泌かく乱化学物質、日本食品衛生学会

- SYMPOSIUM'99「食卓から見た食の安全と健康」、p19、1999年10月、東京
- (24) 中澤裕之：内分泌攪乱化学物質と分析化学、第43回日本薬学会関東支部大会、p28、1999年10月、東京
- (25) 中澤裕之：内分泌攪乱化学物質の分析を取り巻く課題、第25回環境トキシコロジシンポジウム・第3回衛生薬学フォーラム合同大会、p21、1999年、10月、愛知
- (26) 加藤嘉代子、吉村吉博、中澤裕之、伊藤裕子、岡尚男：食品に混入する内分泌かく乱化学物質の分析、日本食品衛生学会第78回学術講演会、p47、1999年10月、長野
- (27) 堀江正一、吉田栄充、石井里枝、星野庸二、中澤裕之：LC/MSによる牛肉、牛肝臓中の肥育用ホルモン剤トレンボロン及びゼラノールの定量、日本食品衛生学会第78回学術講演会、p30、1999年10月、長野
- (28) 矢島 功、清水美希、加藤嘉代子、中澤裕之、本郷敏雄、大槻昌幸、田上順次、西村文夫、佐藤温重：歯科用ポリカーボネイト中のビスフェノールAの分析、第2回日本内分泌攪乱化学化学物質学会、p27、1999年、神戸
- (29) 中澤裕之、山本博史、井之上浩一、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、黒田直敬、中島憲一郎、牧野恒久：蛍光誘導体化HPLCによる生体試料中ビスフェノールAの分析、第2回日本内分泌攪乱化学化学物質学会、p20、1999年、神戸、p20
- (30) 加藤嘉代子、吉村吉博、中澤裕之、伊藤裕子、岡尚男、牧野恒久：高分子素材に由来する化学物質の分析、第2回日本内分泌攪乱化学化学物質学会、p21、1999年、神戸
- (31) 山口晃子、山崎聖美、坂部 貢、中澤裕之：生活関連物質のE-Screen Assayによる評価、第2回日本内分泌攪乱化学化学物質学会、p69、1999年、神戸
- (32) 堀江正一、吉田栄充、小林 進、中澤裕之：LC/MSによる食品及び生体試料中の植物エストロジェンの分析、第2回日本内分泌攪乱化学化学物質学会、p12、1999年、神戸
- (33) 中陣静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之、牧野恒久：ヒト副腎皮質ホルモン由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす DDT とその代謝物の影響、第2回日本内分泌攪乱化学化学物質学会、p160、1999年、神戸
- (34) Yoshihiro Yoshimura, Kayoko Kato, Koichi Inoue, Isao Yajima, Hiroyuki Nakazawa, : Analysis of endocrine disruptors derives from the polymer materials in the biological specimen : PITTCON 2000, March, 2000, New Orleans, USA

3. その他

- (1) 中澤裕之、齊藤貢一、堀江正一、内分泌かく乱化学作用物質の最新動向と分析法、食品と開発、34(4)、4-7(1999)
- (2) 中澤裕之、外因性内分泌かく乱化学物質と分析科学、薬科機器、146、2-10(1999)
- (3) 井之上浩一、加藤嘉代子、吉村吉博、中澤裕之：食品用器具および容器包装由来の内分泌かく乱作用化学物質～ビスフェノール A、月刊フードケミカル 6月号、p 129-132(1999)

- (4) 中澤裕之:内分泌かく乱作用化学物質と測定法について、食品と開発、34(2), 42-44 (1999)
- (5) 堀江正一、中澤裕之:内分泌かく乱作用化学物質の概要と周辺の話、空気清浄、36(6)、27-34(1999)
- (6) 中澤裕之、辰濃 隆編集(幸書房):「内分泌かく乱化学物質と食品容器」(1999年)
- (7) 中澤裕之(監修)(林純薬工業):「生活関連化学物質データブック」(1999年)
- (8) T.Toyooka(編集)、H.Nakazawa(分担執筆)(John Wiley and Sons)「Modern derivatization methods for separation sciences」(1999年)

F. 知的所有権の取得状況

特許取得

なし

実用新案

なし

その他

なし

分担研究報告書

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

分担研究者 山田隆 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 6～10ヶ月の乳児の MOUTHING 行動の観察の結果、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 cm² あたり平均 63.7 μg/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 μg と試算された。渦巻き振とう機を用い 15 cm² 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。

協力研究者

乳児 MOUTHING 行動の実態調査

谷村雅子 (国立小児病院 小児医療研究センター)

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

石橋亨 (東京顕微鏡院 食品・環境科学センター)

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

松木容彦 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

ポリ塩化ビニル製玩具からのフタル酸エステルの溶出試験法の検討

杉田たき子 (国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

フタル酸エステル類には、内分泌かく乱作用や、発ガン性が疑われる物質もある。乳幼児は、特に、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、乳幼児が、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、体内に入る可能性があるかに関する情報を得ることを目的として検討を行った。

この目的のため、まず、乳幼児が、どの程度

玩具等を口に入れるのかに関する観察・記録を行った。ついで、玩具等を口に入れた際、唾液中に、どの程度フタル酸エステル類が溶出してくるのかを知るために、大人が、口中にポリ塩化ビニル製玩具の片を入れ、軽く噛んだり、口中で動かしたりした際に、唾液中にどの程度フタル酸エステルが溶出するのかを測定する実験を行った。

ついで、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。

これらの結果を総合し、乳幼児が、玩具を口に入れることを通じて、どの程度のフタル酸エステルを摂取する可能性があるのかを推定すること、及び、ある玩具を、乳幼児が口に入れた場合、どの程度のフタル酸エステルが溶出するかを推定する方法を見いだすことを最終目的とした。

B. 研究方法

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てもらった。記録に基づき、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

試料としては、主として、玩具に使用頻度のもっとも高い、フタル酸ジイソノニル(DINP)を含む玩具の片を使用した。一部、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ジヘプチルを含む玩具も使用した。

玩具を、表面積、約15cm²の片とし、あるいは、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、唾液を他の容器に取った。この課程を4回(合計60分間)繰り返した。唾液を希釈あるいは抽出後、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

使用機器：渦巻き振とう機(回転振幅 20 mm)

人工唾液：BS 6684 British Standard

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

を1Lの水に溶かし、5 mol/l 水酸化ナトリウムでpH 6.8に調整したもの。

溶出方法：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、一定時間振とうした。

人工唾液は、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。

C. 研究結果

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。通常、おしゃぶりはフタル酸エステルを含有しない材質で作られているので、おしゃぶり以外のものの MOUTHING 推計時間を算出すると、平均73.9 ± 32.9分(最大値136.5分、最小値11.4分)であった(表1)。MOUTHING 時間の長さは、おしゃぶり使用時間に依存していた。MOUTHING 持続時間は、おしゃぶり以外のものでは、指・身体11.8秒、玩具7.4秒、玩具以外の合成樹脂製品8.5秒、その他8.7秒であった。

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

口中にポリ塩化ビニル製玩具試験片として、DINP 含量58%のおしゃぶりの15cm²の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。昨年の予備実験では、平均300 ± 89.4 μg/hrの値を得ている。DINP 含量32%のガラガラでは、64.3 ± 37.5 μg/hr(昨年度328 ± 39.3 μg/hr)、DINP 含量36%の菌固めでは49.2 ± 20.8 μg/hr(昨年度188 ± 27.8 μg/hr)であった。

3. *In vitro* 溶出試験

昨年度は、上下振とう用振とう機を用いて検討を行ったが、*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。渦巻き振とう機を用い、30℃で毎分300回の振

とうを 10 分間行なったとき、バラツキも少なく、ほぼ昨年度行った、ヒト chewing の時の唾液への溶出量と近似した値を得ることが出来た。

D. 考察

1. 乳児 MOUTHING 行動の実態調査

ビデオ記録の解析の結果、1 回の MOUTHING 持続時間が秒単位であることが分かったため、オランダ等で行われていた人による観察を記録する方法は適当でないと考えられる。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

乳幼児が、玩具等を口に入れたとき、どの程度の強さで噛むか、また、口の中で、どの程度頻りに舌でなめたりするかに関するデータはこれまで得られていない。また、唾液への移行実験を乳幼児を使って行うことは倫理上許されないことを考えれば、口の中での試料の動かし方が乳幼児と大人で異なる可能性があることや、大人の唾液と乳幼児のそれとが異なることを考慮しても、大人がこの実験を代替することはやむを得ない。

昨年度の予備実験の結果と、今年度、人数を増やして行った結果を比較すると、DINP の溶出量は 3 - 5 倍昨年度の方が多かった。これは、昨年度は、口中でかなり頻りに試料を動かして実験を行い、今年度は、被験者の好みに任せて時々動かしたことによる差と考えられる。今年度、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。今回算出した平均値は、この 2 回の値より算出したものである。

3. *In vitro* 溶出試験

ヒト chewing によって得られた溶出量が昨年度の方が大きかったため、安全を考慮して、昨

年度の溶出量に近い値が得られる条件を検討した。表 2 に示したように、おしゃぶりとガラガラの場合は、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、そのような場合には、バラツキは大きくなった。試料が歯固めの場合はその例であり、溶出試験でのバラツキも大きかったが、chewing の結果とも大きな差が出た。

E. 結論

乳児 MOUTHING 行動の実態調査の結果と、ヒトの chewing による玩具から唾液への DINP の溶出の結果より、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、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 cm² としており、今回の検討は、表面積 15 cm² 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 μg/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 μg、最大で、昨年度の chewing の最大溶出量である 401 μg/hr の 2/3 と MOUTHING 行動の最大時間 136.5 分を乗じた 608.2 μg/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分かった。

F. 研究発表

無し。

G. 知的所有権の取得状況

無し。

きることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1. 新野竜大、加藤文秋、石橋亨、伊藤武、坂井千三、杉田たき子、山田隆：ポリ塩化ビニル製おもちゃ中のフタル酸ジイソノニル(DINP)のヒト唾液への溶出-移行. 日本食品衛生学会第78回学術講演会(1999年10月、長野)

2. 杉田たき子、山田隆、平山クニ、長谷川康行、石橋亨：ポリ塩化ビニル製おもちゃ中のフタル酸エステル含有量及び溶出試験法の検討. 日本食品衛生学会第78回学術講演会(1999年10月、長野)

3. 平林尚之、福原克治、鷹野祐子、遠藤和香子、安生孝子、松木容彦、杉田たき子、山田隆. おもちゃからのフタル酸ジイソノニル(DINP)の *in vitro* 溶出の検討
日本食品衛生学会第78回学術講演会(1999年10月、長野)

G. 知的所有権の取得状況

無し

表1 各被験児の MOUTHING 時間の推計値 (分)

	月齢	MOUTHING 対象					おしゃぶり 以外の合計
		指	おしゃぶり	他の玩具	玩具以外の合成樹脂製品	その他	
6-a	6	28.4	0.0	50.6	22.0	14.1	115.0
6-b	6	14.7	0.0	54.4	0.0	3.5	72.5
6-c	6	38.1	0.0	25.2	0.0	22.6	85.9
6-d	6	30.5	0.0	1.0	0.0	2.4	34.0
6-e	6	25.2	0.0	46.6	4.8	6.9	83.4
7-a	7	0.3	19.2	16.5	42.1	1.9	60.8
7-b	7	46.7	0.0	52.4	4.2	12.8	116.1
7-c	7	9.3	0.0	60.4	66.2	0.7	136.5
7-d	7	50.0	0.0	16.3	0.0	7.3	73.7
7-e	7	0.6	0.0	24.1	31.6	4.7	60.9
8-a	8	4.1	0.0	28.1	0.8	23.1	56.1
8-b	8	24.5	314.1	6.9	0.1	6.2	37.7
8-c	8	2.3	132.7	22.0	25.5	0.7	50.4
8-d	8	2.2	0.0	17.0	36.8	25.0	80.9
8-e	8	68.2	0.6	11.5	11.4	6.3	97.5
9-a	9	9.2	15.5	30.7	11.8	33.2	84.9
9-b	9	5.6	0.0	6.0	14.4	9.1	35.2
9-c	9	28.5	90.4	21.8	34.0	10.2	94.5
9-d	9	59.2	0.0	14.3	0.1	14.6	88.2
9-e	9	5.0	163.9	37.6	13.1	4.3	60.0
10a	10	54.2	0.0	9.7	36.0	28.8	128.7
10b	10	0.7	46.7	50.0	16.1	0.1	66.9
10c	10	3.6	0.0	2.0	0.0	5.8	11.4
10d	10	55.7	0.0	20.0	15.9	10.8	102.4
10e	10	0.2	0.0	1.3	12.3	1.1	14.9

表2 ヒト chewing による溶出量と渦巻き振とう機による溶出量

試料	DINP 含有量 (%)	Chewing	<i>in vitro</i> 試験
		μ g/hr *	μ g/hr*
おしゃぶり	58	300 ± 89.4	342 ± 16
ガラガラ	38	328 ± 39.3	252 ± 20
歯固め	39	188 ± 27.8	314 ± 38

* : 試験片 15cm² からの溶出量.

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

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

研究要旨

内分泌かく乱化学物質は人の発育初期に大きな影響を及ぼすことが懸念されている。ポリ塩化ビニル製の乳幼児用おもちゃには高濃度のフタル酸エステル類が含まれているため、口に含んだ場合のフタル酸エステルの溶出量を明らかにすること、摂取量を推定するためのシミュレーション溶出試験法を確立する必要があった。本年は昨年度提案した上下振とう溶出試験法についてさらに詳細な検討を行い以下の結果を得た。①人工唾液の組成による溶出量への影響を四種類の人工唾液を用いて調べたところ、溶出に及ぼす影響は極めて小さいものであった。②試験片を調製する際に皮脂が付着することが考えられ、付着した皮脂がDINPの溶出に何らかの影響を及ぼすか試験した。その結果、皮脂が付着した試験片では溶出量が50%と少なくなった。これは試験片の表面が皮脂でコーティングされ、DINPの溶出が妨げられるものと推察された。③溶出試験を行う場合の温度の影響を検討したところ、高温ほど溶出量が多くなり温度の影響を受けることが明らかとなった。従って上下振とう溶出試験法は温度コントロールができないため、新たな振とう方法を検討する必要が生じた。④温度コントロールが可能なVortex Shaker（渦巻き振とう、回転振幅20 mm）による振とう溶出試験法を検討したところ、250回及び300回でのバラツキは小さく、溶出条件は30℃、300回10分間が適当であった。⑤おもちゃ8試料の渦巻き振とう溶出試験（300回/分、30℃10分）の結果と昨年度実施した上下振とう溶出試験（300回/分、20℃15分間）による溶出量を比較したところ、歯固め試験片以外の7試料の溶出量はかなり良く一致した。また、上下振とうに比べてバラツキも小さくより有効な方法と考えた。⑥おしゃぶり等6試料について渦巻き振とう溶出試験を協力研究者に依頼した。3機関のおしゃぶり試験片からのDINP溶出量は $321 \pm 52 \mu\text{g}$ 、変動係数は16%と良好であったが、歯固め試験片では3倍の差がみられた。これは同一の試験片を作るのが困難なためバラツキが大きくなったと推察されるが、3倍の差があったことは、試験片の違いだけでなく、機器の振とうの強さ等に由来することも考えられる。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質はヒトの発育初期に大きな影響を及ぼすことが懸念されている。平成10年度厚生科学研究費補助金によりおもちゃ中のフタル酸エステル類の実態調査でポリ塩化ビニル（PVC）製玩具68製品の材質試験を行ったところフタル酸ジイソノニル（DINP）、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）、フタル酸ジブチル（DBP）、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHA）、フタル酸ジノニル（DNP）及びフタル酸ジヘキシル（DHP）が検出された。最も多く検出されたのはDINPで48試料で検出され、平均含有量は30.8%、含有量の最も多い試料はおしゃぶりで58%と高濃度であること等を明らかにした。

このようにPVC製の乳幼児用おもちゃには高濃度のフタル酸エステル類が含まれているため、乳幼児がこれらの玩具類をしゃぶったり、口に含んだ場合のフタル酸エステルの溶出量を明らかにすること、また、乳幼児のフタル酸エステルの摂取量を推定するためのシミュレーション溶出試験法の確立が急務とされた。

おもちゃからのフタル酸エステルのシミュレーション溶出試験法としてオランダのHead over heels method及び米国CPSCのPiston法が報告されているが、米国のPiston法は再現性が低いと評価されている。我々は平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）において、おもちゃに最も多く使用され、かつ含有量の多いDINPを含有するおしゃぶり、歯固め及びガラガラ等を用い

てシミュレーション溶出試験法を検討した。その結果、上下振とう法が溶出量のバラツキが小さく、また、上下振とう試験（300回/分、15分間）における溶出量が人によるチューイング試験の移行量とも一致したことから最も有効な方法であると考えた。本年度はおもちゃからのフタル酸エステル類の溶出試験法を確立することを目的として、上下振とう溶出試験法についてさらに詳細な検討を加えた。

B. 研究方法

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おしゃぶり、歯がため

口に入れる可能性が極めて高い（1年未満の乳児を対象）ガラガラ、ままごと道具

口に入れる可能性が考えられるソフトドール（3種類）及びままごと道具

(1) 試験片

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。

2. 試薬

フタル酸エステル：フタル酸ジイソノニル（DINP）は和光純薬工業及び関東化学の試薬

アセトン及びアセトニトリル：HPLC用、片山化学工業製

3. 標準溶液

DINP50.0mgをアセトニトリルで溶解して50mLとし、1,000 μ g/mLの標準原液を調製した後、一定量をアセトニトリルあるいは50%アセトニトリルで適宜希釈した。

4. 装置

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-10A, データ処理装置 CR-7A plus 以上 (株) 島津製作所

恒温槽：サンヨーインキュベーター-MIR-151 三洋電機 (株)

上下振とう用振とう器：Recipro Shaker (振幅40 mm) タイテック (株)

渦巻き振とう用振とう器：Vortex Shaker VR-36D(回転振幅20 mm) タイテック (株)

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 $^{\circ}$ C, 流量：1.0 ml / min

移動相：DINPの測定：アセトニトリル100%

検出波長：225 nm

注入量：50 μ l

6. 人工唾液

下記の人工唾液はミリQ水1Lに

溶解した。

(1) BS 6684 British Standard Specification 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

(5 M 水酸化ナトリウムで pH 6.8 に調整した)

(2) Arvidon and Johansson, EG

リン酸二水素カリウム	2.5mM
リン酸水素二ナトリウム	2.4mM
炭酸水素カリウム	15 mM
塩化ナトリウム	10 mM
塩化マグネシウム	0.15mM
クエン酸	0.15mM
塩化カルシウム	1.5mM

(pH 6.7)

(3) Modified Meyers artificial saliva

塩化ナトリウム	0.4g
塩化カリウム	0.4g
塩化カルシウム二水和物	0.795g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.78g
硫酸ナトリウム九水和物	0.005g
尿素	1g

(pH4.8)

(4) (2)の変法 (東京医科歯科大学本郷)

塩化カリウム	15mM
リン酸二水素カリウム	2.5mM
リン酸水素二ナトリウム	2.4mM
塩化ナトリウム	8.5mM
塩化マグネシウム	0.15mM
塩化カルシウム	0.5mM
炭酸水素ナトリウム	1.5mM

(pH 7.2)

7. 試験溶液の調製

人工唾液溶出試験液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。

8. 各種振とう機器による溶出試験

(1) 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（外径35mm, 高さ110mm）5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 室温(20℃), 振幅4.0 cm, 毎分300回で15分間振とうした。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。この操作を4回繰り返した。

b. 渦巻き振とう：VORTEX SHAKERは30℃にセットした恒温槽に入れ、回転振幅(20 mm), 回転数を300回にセットして10分間振とうした。

C. 研究結果

1. ヒトチューイング及び上下振とう試験によるDINP溶出量

ヒトチューイング試験は東京顕微鏡院のグループが担当した。結果はヒトが15分間ずつ4回(1時間)チューイングした場合のDINP移行量はおしゃぶり、ガラガラ及び歯固めでそれぞれ300±89, 328±39及び188±28 μgであった。また、上下振とう溶出試験(室温20℃, 毎分300回, 15分間)の結果はそれぞれ298±11, 247±15及び187±86 μgであった(表1)。歯固めでは標準偏差(S.D.)が86と大きく、バラツキが大きかったが、ヒトチューイングの結果とは

一致した。

2. 人工唾液成分の違いによる溶出量への影響

平成10年度の溶出試験で人工唾液はBS 6684 British Standard を基にpHを6.8に調整したものをを用いた。今回、歯科大学等で用いられている人工唾液を調整し、人工唾液の組成によって溶出量に影響があるか調べた。4種類の人工唾液を用いて、上下振とう(室温15分間)による溶出試験を行ったところ、7.7±0.4から11.1±1.5 μg/mLであり(表2)。人工唾液による差は小さいものと判断し、昨年度から使用している人工唾液を用いた。

3. 試験片に付着した皮脂のDINP溶出に及ぼす影響

試験片は市販のおもちゃをカットするため、手指で触った場合、玩具表面の可塑剤が手指に移行することや、玩具表面に皮脂が付着することが考えられ、付着した皮脂がDINPの溶出に何らかの影響を及ぼすか試験した。おしゃぶり及びガラガラは素手で触らないように手袋をしてカットしたものを皮脂なし試験片とした。これらの試験片5枚ずつを比較的皮脂量が少ない女性が手指で両面を触ったものを皮脂付き試験片Aとした。また、ガラガラ試験片については比較的皮脂量が多い男性が同様に触ったものを皮脂付き試験片Bとし、上下振とう試験を行った。その結果、おしゃぶり試験片では皮脂付き試験片Aの溶出量は皮脂なし試験片の50

%であった(図1-(1))。この溶出試験をさらに繰り返した場合も溶出量に変化は見られなかった。ガラガラ試験片でも皮脂付き試験片からの溶出量は50%と同様の結果であった。皮脂付き試験片の皮脂量は測定していないが、皮脂量の多少に関わらず溶出量は一致した(図1-(2))。すなわち、試験片に皮脂が付着した場合、試験片表面が皮脂でコーティングされ、DINPの溶出が妨げられるものと推察された。おもちゃ試料の取り扱いには手袋を使用するなどの配慮が必要であった。

4. DINPの溶出に及ぼす温度の影響

おもちゃからのDINP溶出試験法として「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)内分泌かく乱物質の食品、食器等からの曝露に関する調査研究報告書 p.22」において室温での上下振とう法を提案したが、溶出試験は通年で実施されることが前提であり、温度の影響を明らかにする必要があるが生じ、溶出試験に及ぼす温度の影響を調べた。この振とう装置は温度コントロールができないため、30及び40℃での溶出試験は人工唾液の温度を30℃及び40℃に加温したものを用い、室温(20℃)で上下振とう溶出試験を行い、比較した。おしゃぶり試験片からの溶出量は室温(20℃)、30及び40℃ではそれぞれ、14.6、24.3及び30.5 μ g/mLと高温になるほど溶出量は増加し(図2-(1))、おもちゃからのDINPの溶出に及ぼす温度の影響が大きいたことが明らかとなった。ガラガラ

及び歯固めでも室温(20℃)に比べて30及び40℃で溶出量が多くなったが(図2-(2),(3))、温度による溶出量の差はおしゃぶり試験片で大きかった。

5. 渦巻き振とうによる溶出試験

渦巻き振とう器は幅300 mm、奥行260 mm、高さ135 mm、重量5.5kgの機器で恒温槽中での使用が可能であった。30℃に設定した恒温槽に渦巻き振とう器をセットし、振とう回数を毎分200、250、300及び400回に変化させて、おしゃぶり、ガラガラ及び歯固め試験片の溶出試験を行った。毎分200回ではおしゃぶり試験片で、また400回ではおしゃぶり及び歯固め試験片でバラツキが大きくなった。250及び300回ではいずれの試験片でもバラツキは小さかった(図3)。

平成10年度に行った上下振とう試験(1時間)の結果、250及び300回でのおしゃぶり試験片からのDINP溶出量は1.4及び35.8 μ g/mLと差が大きかったのに対し、渦巻き振とうでは250及び300回での溶出量はいずれの試験片でも同程度であった(図3)。従って渦巻き振とうによる溶出試験は振とう回数によるバラツキが小さくなるものと推察された。溶出試験法の振とう回数は250及び300回が適当であったが、上下振とう法に合わせて毎分300回とした。

6. 上下振とう及び渦巻き振とうによるDINP溶出量

渦巻き振とう器の振とう回数を毎分300回とし、上下振とう(20℃、15

分間)と同程度の溶出条件を設定するために、振とう時間を検討した。表2に上下振とうによる試験結果と渦巻き振とうによる試験結果を示した。まず上下振とう(20℃,15分間)溶出試験を行い、平成10年度の結果と比較した。おしゃぶり及びガラガラ試験片の場合、若干増加しているものの、誤差範囲であると考えた。しかし、歯固め試験片の場合は2倍以上の増加となった。上下振とう(30℃,10分間)の溶出量は20℃,15分間のそれとかなり良く一致した。渦巻き振とうの振とう回数を毎分300回、温度を30℃としたことから、振とう時間10分で試験したところ、いずれの試験片でも、上下振とう20℃,15分間及び30℃10分間の結果と一致した。歯固め試験片は均一の試験片を調製できないこともあり上下振とうでは溶出量のバラツキが大きかったが、渦巻き振とうでは改善された。

7. 上下振とう及び渦巻き振とう溶出試験によるおもちゃからのDINP溶出

平成10年度に測定したおもちゃ試料について渦巻き振とうによる溶出試験を行った結果を表4に示した。なお、ソフトドール1は試料がなく溶出試験はできなかった。昨年度の上下振とう溶出試験の結果と渦巻き振とう溶出試験の結果は歯固め試験片以外はほぼ一致した。また、バラツキ(C.V.%)は上下振とうでは3試料で20%を越えたが、渦巻き振とうでは全て20%未満であり、溶出試験法としてより有効であると考えた。

8. 3研究機関による渦巻き振とう溶出試験

おもちゃ6試料について協力研究者の2研究機関に渦巻き振とう器を用いた溶出試験を依頼した。各機関の溶出量を表5に示した。依頼した2機関では6試料のうち3試料でC.V.値が20%を越えたが、30%以上はなかった。3機関全体のバラツキはおしゃぶり試験片の場合(C.V.値)は16%と良好であったが、その他の試料では20%を越えた。最もバラツキが大きかったのは歯固め試験片で溶出量に3倍の違いがあった。この試料は均一の試験片を作ることができないことが一因と考える。また、測定した試料の溶出量は当研究所の値が高く、食品薬品安全センターの値が低い結果が得られたことから、試験片の調製による差だけでなく、機器の振とうの強弱の差も考えられる。

D. 結論

平成10年度及び11年度に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を行い以下の結果を得た。

- ①人工唾液4種類を用いておしゃぶり試験片からの溶出試験を実施したところ、溶出に及ぼす影響は小さかった。
- ②試験片に付着した皮脂がDINPの溶出を妨げることが明らかとなり、試験片を調製する際に直接素手で触らないように指示する必要があることが解った。
- ③おもちゃからのDINPの溶出は温度の影響を受けた。昨年提案した上下振とう溶出試験法は温度コントロールが困難であるため、恒温槽中で使用できる

渦巻き振とう溶出試験法に変更した。

④昨年度実施したおしゃぶり試験片の上下振とう1時間の結果は振とう250回の場合 $1.4\mu\text{g/mL}$ であったが300回では $35.8\mu\text{g/mL}$ と振とう回数によって溶出量に大差があった。しかし、渦巻き振とう法では、振とう250及び300回の溶出量はほぼ同程度であり、振とう回数の影響が小さく、バラツキが小さくなるものと推察された。

⑤渦巻き振とう溶出試験法は以下の条件に設定した。

溶出用器具：50mL容量ガラス製蓋付き遠心管

試験片：表面積 15cm^2

人工唾液：30 mL

恒温槽温度： 30°C

振とう回数：毎分300回

振とう時間：10分間

以上の条件でおもちゃ8試料についてDINP溶出量を測定し、昨年度の上下振とう法による溶出量を比較した。歯固め試験片を除く7試料の測定値は良く一致した。また、変動係数もすべて20%以下と良好な結果であった。

⑥協力研究者（2機関）におもちゃ6試料の渦巻き振とう溶出試験を依頼し、溶出量を比較した。2機関ではそれぞれ3試料でC.V.値が20%を越えたが、30%以上はなかった。3機関全体でのバラツキではおしゃぶり試験片のC.V.値は16%と良好であったが、その他の試料では20%を越えた。また、歯固めでは溶出量に3倍の差が見られた。この試験片は均一の試験片を調製するのが極めて困難であったが、3倍の差は機器の振とうの強弱等に由来することも考えられる。

表1. 人チューイング及び上下振とう溶出試験によるDINP溶出量

溶出方法	DINP溶出量		
	おしゃぶり	ガラガラ	歯固め
人チューイング(15分4回)			
Mean±S.D., μ g, n=3	300±89	328±39	188±28
唾液量 (mL)	33.6±7.7	37.0±3.7	36.4±4.4
Mean±S.D., μ g/mL, n=3	9.2±3.0	9.2±2.2	5.2±0.8

上下振とう(15分1回)			
Mean±S.D., μ g, n=3	298±11	247±15	187±86
Mean±S.D., μ g/mL, n=3	9.9±0.4	8.2±0.5	6.2±2.9

人チューイング試験: 平成10年度東京顕微鏡報告書
 上下振とう溶出試験: 毎分300回、室温、15分間
 試験片表面積15cm²、人工唾液 30 mL

表2. 人工唾液成分の違いによるDINP溶出に及ぼす影響

人工唾液	DINP 溶出量 (μ g/mL)
1. BS 6684 British Standard (5 NaOH でpH 6.8)	11.1 ± 1.5
2. Arvidon and Johansson, EG	7.8 ± 2.6
3. 総山らの処方 (pH 4.8)	7.7 ± 0.4
4. 本郷らの処方 (2の変法、pH 7.2)	9.8 ± 2.0

試料: おしゃぶり試験片15cm²/人工唾液30 mL
 溶出試験: 上下振とう300 回/分、室温(20°C), 15分間

表3. 上下振とう及び渦巻き振とう溶出試験によるDINP溶出量

溶出方法	DINP溶出量(μg)			
	おしゃぶり	ガラガラ	歯固め	
上下振とう 20°C15分	①H.10 報告書	298±11	247±15	187±86
	②H.10 顕微鏡院	390	420	339
	③H.11	405±32	293±45	428±72
	④H.11	333±46		
30°C10分	①H.11	395±40	242±23	365±108

渦巻き振とう 30°C10分	①H.11	342±16	252±20	314±38

H.11 の測定結果は全てn=5
試験片表面積15cm²、人工唾液 30 mL

表4. 上下振とう及び渦巻き振とう溶出試験による DINP 溶出量

試料	含有量 (%)	上下振とう		渦巻き振とう	
		(μg)	C.V.(%)	(μg)	C.V.(%)
おしゃぶり	58	298±11	3.7	342±16	4.7
ガラガラ	38	247±15	6.0	252±20	7.9
歯固め	39	187±86	46	314±38	12
ままごと道具	1	376±31	8.2	374±36	9.6
	2	411±91	22	368±8	2.2
	3	243±53	22	180±11	6.1
ソフトドール	1	97±15	15	—	
	2	302±26	8.6	276±49	18
	3	232±22	9.5	275±32	12

上下振とう：毎分300回、室温(20°C) 15分間、n=3、H.10年度報告書
渦巻き振とう：毎分300回、30°C 10分間、n=5
試験片表面積15cm²、人工唾液 30 mL

表5. 3 研究機関による渦巻き振とう溶出試験

試料	DINP溶出量 Mean \pm S.D. (μ g), C.V.(%)							
	国立衛研		東京顕微鏡院		食品薬品安全センター			
おしゃぶり	342 \pm 16	4.7	360 \pm 86	24	262 \pm 27	10	321 \pm 52	16
ガラガラ	252 \pm 20	7.9	188 \pm 35	19	139 \pm 9	6.5	193 \pm 57	29
歯固め	314 \pm 38	12	100 \pm 26	26	139 \pm 30	22	184 \pm 114	62
ままごと道具	368 \pm 8	2.2	287 \pm 8	2.8	217 \pm 32	15	291 \pm 76	26
3	180 \pm 11	6.1	97 \pm 21	22	162 \pm 32	20	143 \pm 44	31
ソフトドール	275 \pm 32	12	176 \pm 9	5.1	123 \pm 30	24	191 \pm 77	40

渦巻き振とう：毎分300回、30°C 10分間、n=5

試験片表面積15cm²、人工唾液 30 mL

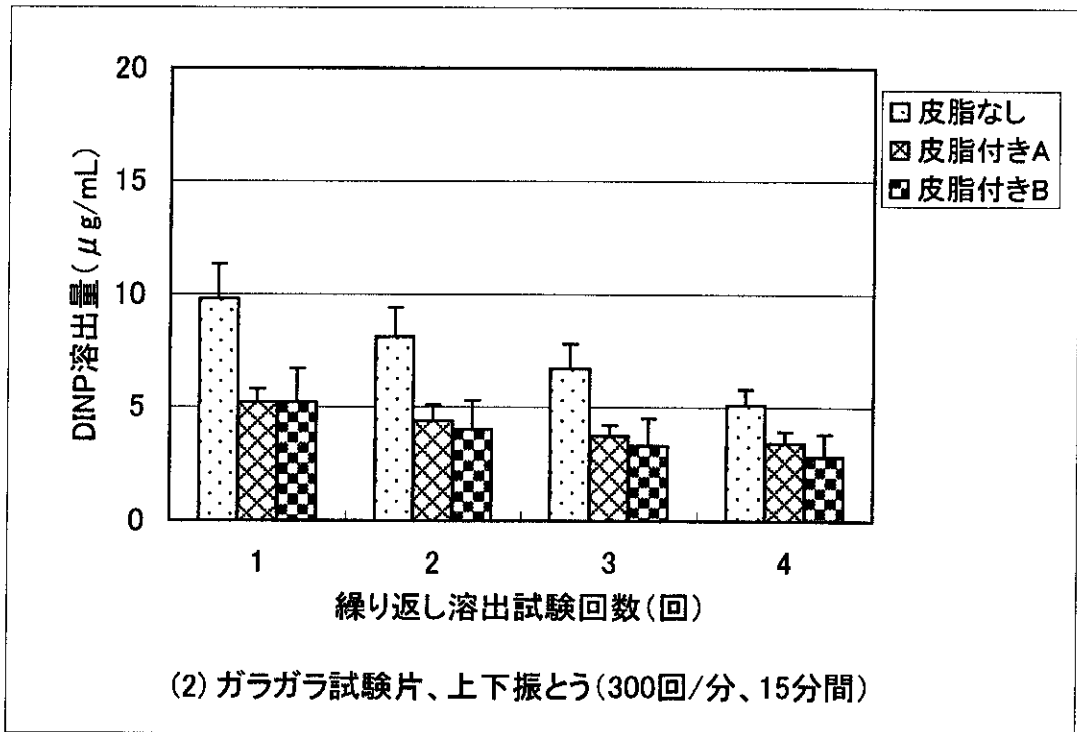
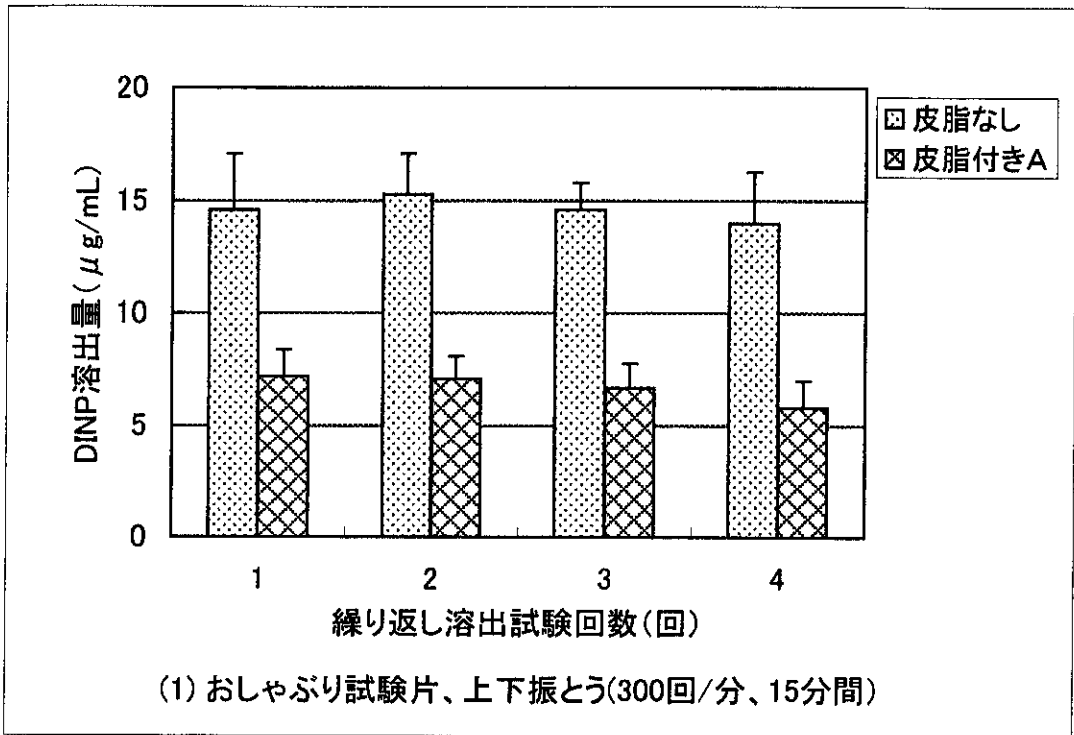


図 1. 試験片に付着した皮脂のDINP溶出に及ぼす影響