

図2. おもちゃ試験片からのDINPの溶出に及ぼす温度の影響  
 溶出試験 : 上下振とう(300回/分、15分間)

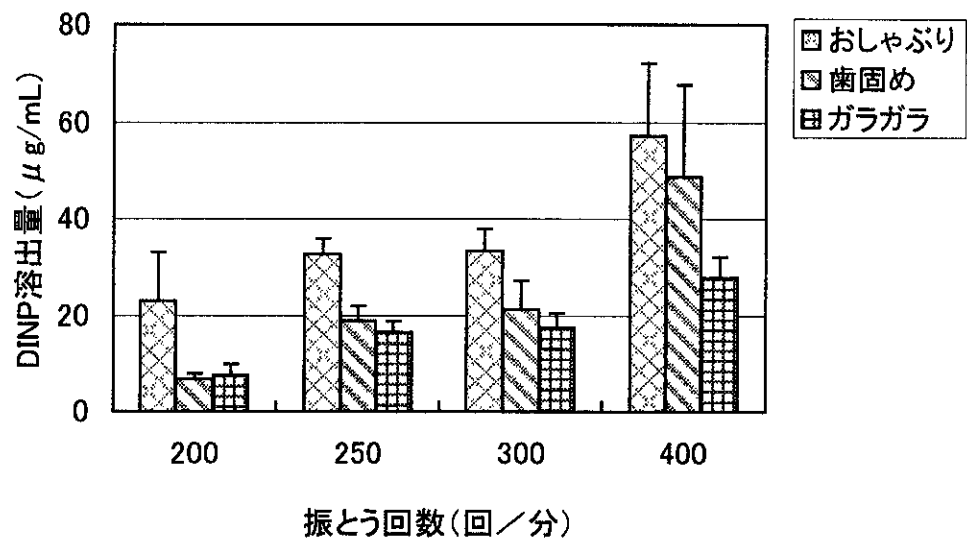


図 3. 渦巻き振とうによるDINP溶出量(30°C, 30分間)

「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」

研究報告書

乳児のMOUTHING行動の実態

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）

研究要旨 6-10カ月児25名の家庭での行動を、15分ずつ10回、ビデオ記録し、秒単位で行動解析した。1日のMOUTHING時間は平均105.3±72.1分（活動時間の17%）で、おしゃぶりを除くと平均73.9±32.9分、最小値11.4分、最大値136.5分と推計された。MOUTHING1回の持続時間は平均11.9秒と非常に短かいので親による観察記録より今回の方が信頼度が高いと考えられる。MOUTHING行動はおしゃぶりとは異なるが、玩具と玩具以外のものでは差がなく、玩具以外のもののMOUTHING時間も含めるべきと考えられる。

A. 研究目的

塩化ビニル製の玩具や食器に可塑剤として使用されているフタル酸エステルが内分泌かく乱物質の疑いがあるため、乳幼児の玩具等のMOUTHING行動を介したPVC暴露の安全性が懸念されている。MOUTHING行動は乳幼児の発達課程における生物学的特性であるが、その実態の報告は少ない。オランダのGrootらは1998年に3カ月-36カ月児42名を対象として調査を行った結果、MOUTHING時間は3-12カ月児（19名）が最も長く、うち1名は動物実験に基づく安全規定量を越える恐れのある時間であった。

わが国の乳幼児のMOUTHING行動の実態を把握するため、昨年は、オランダの結果を踏まえ、3-12カ月児について各月齢児5名ずつ計50名のMOUTHING行動を、オランダと同じ方法で、親による観察記録に基づいて調査した。オランダの結果と同様に発達と共に時間や対象物が変化し、6-10ヶ月児が最も長いことが確認されたが、1日のMOUTHING時間はオランダより顕著に長かった。

今年は、より正確に把握するため、6-10ヶ月児25名のMOUTHING行動をビデオ記録して解析した。乳児のPVC暴露に関するMOUTHING時間について検討する。

B. 研究方法

1) 6-10カ月児の各月齢児5名、計25名の乳児の親に、調査目的を説明し、下記の要領での児の生活記録とビデオ記録を依頼した。

① 2日間にわたって児の起床時刻、就寝時刻、

食事開始・終了時刻を記録する。

② 上記2日間で児が起きていて食事以外のときに、1回15分間ずつ10回、計150分、児の様子をビデオカメラで記録する。15分ずつの観察は1時間に1回を目安とする。

尚、MOUTHING行動の撮影が目的ではなく、児が口にものをいれていなくても構わないことを説明に加えた。

2) ビデオ記録に基づき、被験児の行動を秒単位で書き起こした。

3) 就寝時刻と起床時刻の記録から起きていた時間を求め、食事時間（授乳・間食時間を含む）を減じて、1日の活動時間とした。観察時間中のMOUTHING時間の割合から、1日の活動時間におけるMOUTHING時間を推計した。MOUTHING対象は、児の指・身体、おしゃぶり、他の玩具、玩具以外で合成樹脂製のもの、その他に分類した。

倫理面への配慮

親に研究目的と発表方法を説明して、ビデオ記録を依頼した。発表は集計結果のみとする。

C. 研究結果

1. MOUTHING時間の推定

表1に各被験児の観察時間中のMOUTHING時間の比率を、表2に1日のMOUTHING推計時間を示す。

6-10カ月児25名の1日の活動時間は平均615.0±100.5分で（図1）、前回の結果566.6±98.7分ともGrootらの報告501.0±71.0分とも殆ど差がなかった。1日当たりのMOUTHING推計時間は平均10

5.3±72.1分、活動時間の17.1%で、前回の平均179.8±86.9分(活動時間の31.5%)より短時間であったが、Grootらの報告57.6±62.0分よりは長かった。おしゃぶり以外のMOUTHING推計時間は73.9±32.9分で(図2)、前回の平均184.7±86.5分より短かったが、Grootらの報告44.0±44.7分よりやはり長かった。最小値11.4分、最大値136.5分、中央値73.7分で、分布型は前回と同様、Grootらの報告に比して正規分布に近い形を示した。

## 2. 月齢別、対象別 MOUTHING時間

各被験児(6-10カ月児)の1日のMOUTHING時間を図3に示す。おしゃぶり使用時間の個体差が大きく、MOUTHING時間の長さはおしゃぶり使用時間に依存しており( $r=0.90$ ,  $p<0.001$ )、MOUTHING時間が非常に長い被験児4名はいずれもおしゃぶり使用時間が長かった。

図4は月齢別のMOUTHING時間の平均値であるが、おしゃぶり使用の有無の影響がここにも現れており、おしゃぶり使用児のいる月齢の時間が長かった。おしゃぶり以外では、前回と同様の月齢変化がみられ、玩具のMOUTHINGが6-7ヶ月に長く8ヶ月以降で減少し、玩具以外の種々のものは10ヶ月まで続いていた。移動能力の発達による行動半径の広がりをよく反映しているものと推察される。

表3に、1日あたりの対象物別MOUTHING時間を示す。前回に比しておしゃぶり使用児が多かったため、おしゃぶりの平均時間は31.3±73.5分で今回の方が長かった。他のものは今回の方が短く、指22.7±22.1分、おしゃぶり以外の玩具25.1±18.2分、玩具以外の合成樹脂製品16.0±17.2分、その他10.3±9.4分であった。

## 3. MOUTHING持続時間

口に入れてから出すまでの一回の持続時間は平均11.9秒であった(表4)。おしゃぶりの一回の持続時間は非常に長く、平均98.2秒であったが、他のもの場合は指・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、おしゃぶり以外は一回の持続時間が短かった。

対象物別の持続時間の月齢変化は6-10ヶ月児においては観察されなかった。

## D. 考察

ビデオ記録に基づく詳細な解析で、一回のMOUTHING持続時間が短いこと、MOUTHING行動はおしゃぶりとは異なるが、玩具と玩具以外の

ものとは差がないことなどが示された。PVC暴露の健康影響の検討に必要なMOUTHING時間の推定方法について考察する。

## 1. 調査方法

MOUTHING行動の実態把握は被験児の月齢が人見知りの激しい時期であるため、調査方法が制限される。今回はGrootらと同じ方法で親による観察記録に基づいて解析した結果、MOUTHING時間が非常に長く推計されたため、今回はより正確な把握を期して、親にビデオ記録を依頼し、秒単位で解析した。

ビデオ記録の解析から、一回のMOUTHING持続時間は平均11.9秒と非常に短く、殆どは1分以下であることが示された。従って、MOUTHING行動は秒単位で記録する必要があるが、親が観察しながら秒単位で記録することは難しいし、分単位では不正確となるので、親に観察記録を依頼する方法は適切ではないと考えられる。親がビデオ撮影する方法の問題点としては、親にかまってもらえないために機嫌が悪くなるなど、児の状態が普段と少し異なる可能性がある。しかし、記録の精度の点から、ビデオ記録の方が観察記録よりは信頼性が高いと考えられる。今後もビデオ記録による方法で調査を続けたい。

## 2. 乳幼児のPVC暴露時間推定において選択すべきMOUTHING対象物

### ①対象物によるMOUTHING行動の相違

今回の調査で、おしゃぶりとは他のものとはMOUTHING行動が異なることが判明した。おしゃぶりのMOUTHINGの持続時間は非常に長く、総計時間も長かった。他方、他の対象物のMOUTHINGは持続時間も総計時間も短かった。

おしゃぶりは多くの場合はぐずっている時などに親が口にくわえさせ、親が口からはずすまで児はおしゃぶりをくわえたまま、手は別の動作を並行して行っていた。他方、他の対象物に対しては児が自発的に手で持って口に入れ、手で持ったまま嘗めたり噛んだり吸ったり、口から出したりしていた。周囲で音や動きの変化があるとそれに気をとられ、MOUTHING行動が中断されていた。しかし、おしゃぶり使用時は周囲の変動に対しておしゃぶりをくわえたまま視線を移すのみのことが多く、MOUTHINGの中断に至ることは少なかった。MOUTHING時間の差はこれらのMOUTHING行動の違いを反映しているものと考えられる。

## ②おしゃぶり使用児と非使用児の相違

おしゃぶり使用時間が非常に長いため、おしゃぶり使用児は一日のMOUTHING時間が当然長くなるが、おしゃぶり使用児のおしゃぶり以外のもののMOUTHING行動も非使用児と異なるのか否かを調べた。

おしゃぶり使用児がおしゃぶりを使用していない時の行動をおしゃぶり非使用児の行動と比較した結果、表4のごとく差は観察されなかった。おしゃぶり使用児もおしゃぶりを使用していない時のMOUTHING時間は非使用児と同様であることが示唆された。

## ③MOUTHING時間の推定に含めるべきMOUTHING対象

MOUTHINGを介したPVC暴露時間の把握を目的とする場合、おしゃぶりや玩具以外のもののMOUTHING時間をどのように扱うべきか。

オランダで現在市販されているおしゃぶりの殆どはPVC製ではなくフタル酸エステル類が含まれていないため、Grootらはおしゃぶり以外のものを口にした時間をMOUTHING時間とした。その他の対象物については性質を制限せずに、すなわち、おしゃぶり以外は玩具以外のものも含めて物を口に入れている時間をMOUTHING時間として推計した。

米国の消費者製品安全委員会も、乳幼児のMOUTHING時間はGrootらの調査データに基づいて、PVC暴露の健康影響を検討しているが、おしゃぶりのほか、玩具以外のものも除いたMOUTHING時間をPVC接触時間と考え、おしゃぶり以外の玩具のMOUTHING時間のみを推計した。

日本でもPVC製のおしゃぶりは製造されていないし、おしゃぶりと他のものとのMOUTHING行動は異なるので、おしゃぶりを除くことは妥当であろう。しかし、玩具以外のものについては、PVC製品が多いこと、MOUTHING時間も玩具と殆ど差がないこと、子どもにとってはMOUTHING時に両者を区別しているとは考えられないこと、暴露の危険性を検討するためには最長時間を把握する必要があることなどから、PVC製品と接触する可能

性があるMOUTHING時間の推計には、玩具以外のもののMOUTHINGも含めるべきと考えられる。

## 3. 健康影響の検討に考慮すべきMOUTHING行動特性

おしゃぶりのMOUTHINGは長時間続くが、その他のものは1回のMOUTHINGの持続時間が短かった。口に何秒以上入れると唾液中に溶出するのかが不明であるため、数秒の場合もすべて含めて計算したが、数秒なら溶出しにくいのか、それとも数秒でも反復すると溶出するのか、実験的に確認する必要がある。

## E. 結論

乳児のMOUTHING時間を前回より正確に把握するため、MOUTHING時間が最も長い月齢である6-10カ月児25名の家庭での様子の、15分ずつ10回のビデオ記録を親に依頼し、秒単位で行動解析した。

1日のMOUTHING時間は平均105±72分（活動時間の17%）、おしゃぶり以外のもののMOUTHING時間は平均74±33分、中央値74分、最小11分、最大137分と推計された。前回の結果より少ないが、オランダの報告よりは長かった。1回の持続時間が平均12秒と短いので、親の観察記録に基づくオランダや前回の調査結果より、今回のビデオ記録に基づく結果の方が信頼性が高いと考えられる。

玩具と玩具以外のものとはMOUTHING行動に差がみられないことなどから、MOUTHINGを介したPVC接触可能時間の推定には玩具以外のもののMOUTHING時間も含めるべきである。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

谷村雅子、関 美雪

乳児MOUTHING行動の実態調査。

第46回小児保健学会,札幌,10月16日,1999.

## G. 知的所有権の取得状況 なし

表1. 観察時間中における各被験児のMOUTHING時間の比率(%)

ID	月齢	指		玩具		玩具以外		合計
		おしゃぶり	他	おしゃぶり	他	合成樹脂	他	
6-a	6	3.7	0.0	6.6	2.9	1.8	14.9	
6-b	6	2.4	0.0	9.1	0.0	0.6	12.1	
6-c	6	7.4	0.0	4.9	0.0	4.4	16.7	
6-d	6	4.1	0.0	0.1	0.0	0.3	4.6	
6-e	6	4.1	0.0	7.5	0.8	1.1	13.5	
7-a	7	0.1	3.2	2.8	7.1	0.3	13.4	
7-b	7	7.7	0.0	8.7	0.7	2.1	19.2	
7-c	7	1.2	0.0	8.1	8.9	0.1	18.3	
7-d	7	7.8	0.0	2.5	0.0	1.1	11.5	
7-e	7	0.1	0.0	3.9	5.1	0.8	9.8	
8-a	8	0.5	0.0	3.3	0.1	2.7	6.6	
8-b	8	3.7	47.2	1.0	0.0	0.9	52.9	
8-c	8	0.4	23.7	3.9	4.6	0.1	32.7	
8-d	8	0.4	0.0	3.4	7.3	4.9	16.0	
8-e	8	10.5	0.1	1.8	1.7	1.0	15.0	
9-a	9	1.4	2.4	4.8	1.8	5.2	15.7	
9-b	9	1.4	0.0	1.5	3.5	2.2	8.5	
9-c	9	4.0	12.8	3.1	4.8	1.4	26.2	
9-d	9	1.2	0.0	2.7	0.0	2.7	16.6	
9-e	9	0.8	26.2	6.0	2.1	0.7	35.8	
10-a	10	9.8	0.0	1.7	6.5	5.2	23.2	
10-b	10	0.2	11.3	12.1	3.9	0.0	27.4	
10-c	10	0.6	0.0	0.3	0.0	1.0	2.0	
10-d	10	9.1	0.0	3.3	2.6	1.8	16.7	
10-e	10	0.0	0.0	0.2	1.9	0.2	2.4	

表2. 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		玩具		玩具以外		合計
			おしゃぶり	他	おしゃぶり	他	合成樹脂	他	
6-a	6	770	28.4	0.0	50.6	22.0	14.1	115.0	
6-b	6	600	14.7	0.0	54.4	0.0	3.5	72.5	
6-c	6	515	38.1	0.0	25.2	0.0	22.6	85.9	
6-d	6	736	30.5	0.0	1.0	0.0	2.4	34.0	
6-e	6	619	25.2	0.0	46.6	4.8	6.9	83.4	
7-a	7	595	0.3	19.2	16.5	42.1	1.9	80.0	
7-b	7	605	46.7	0.0	52.4	4.2	12.8	116.1	
7-c	7	745	9.3	0.0	60.4	66.2	0.7	136.5	
7-d	7	641	50.0	0.0	16.3	0.0	7.3	73.7	
7-e	7	619	0.6	0.0	24.1	31.6	4.7	60.9	
8-a	8	848	4.1	0.0	28.1	0.8	23.1	56.0	
8-b	8	665	24.5	314.1	6.9	0.1	6.2	351.8	
8-c	8	560	2.3	132.7	22.0	25.5	0.7	183.1	
8-d	8	506	2.2	0.0	17.0	36.8	25.0	80.9	
8-e	8	652	68.2	0.6	11.5	11.4	6.3	98.1	
9-a	9	640	9.2	15.5	30.7	11.8	33.2	100.4	
9-b	9	415	5.6	0.0	6.0	14.4	9.1	35.2	
9-c	9	705	28.5	90.4	21.8	34.0	10.2	184.9	
9-d	9	531	59.2	0.0	14.3	0.1	14.6	88.2	
9-e	9	625	5.0	163.9	37.6	13.1	4.3	223.9	
10a	10	555	54.2	0.0	9.7	36.0	28.8	128.7	
10b	10	415	0.7	46.7	50.0	16.1	0.1	113.6	
10c	10	567	3.6	0.0	2.0	0.0	5.8	11.4	
10d	10	614	55.7	0.0	20.0	15.9	10.8	102.4	
10e	10	635	0.2	0.0	1.3	12.3	1.1	14.9	

表3. 対象別、MOUTHING時間 (分)

		日本 (ビデオ記録)		前回調査 (親の観察記録)		オランダ <sup>#</sup> (親の観察記録)	
		6-10ヶ月児 25名		6-12ヶ月児 35名		6-12ヶ月児 14名	
指・身体	平均値	22.7 ± 22.1		33.4 ± 46.7		6.8(グラフより読みとり)	
	幅、中央値	0.2~ 68.2 14.7		0.0~182.3 13.2			
おしゃぶり	平均値	31.3 ± 73.5		6.9 ± 23.8		10.0(グラフより読みとり)	
	幅、中央値	0.0~314.1 0.0		0.0~128.8 0.0			
玩具	平均値	25.1 ± 18.2		52.4 ± 48.7		27.9	
	幅、中央値	1.0~ 60.4 21.8		0.0~220.5 37.3			
他の合成樹脂製品	平均値	16.0 ± 17.2		47.1 ± 38.3		9.3(グラフより読みとり)	
	幅、中央値	0.0~ 66.2 12.3		0.0~133.8 40.5			
その他	平均値	10.3 ± 9.4		51.7 ± 40.3			
	幅、中央値	0.1~ 33.2 6.9		0.0~148.8 40.9			
合計	平均値	105.3 ± 72.1		190.4 ± 85.5		55.0(グラフより読みとり)	
	幅、中央値	11.4~351.8 88.2		28.1~365.0 174.4			
合計		73.9 ± 32.9		184.7 ± 86.5		44.0 ± 44.7	
(おしゃぶりを除く)		11.4~136.5 73.7		28.1~364.9 174.4		2.4~171.5	

# : Groot M. E. et al. 1998

表4. MOUTHING持続時間 (秒)

対象	回数	平均値	最小値	最大値	中央値
指・身体	688	11.8 ± 22.6	1	276	5
おしゃぶり	117	98.2 ± 148.3	1	859	31
玩具	1305	7.4 ± 12.8	0	158	4
玩具以外の合成樹脂製品	747	8.5 ± 14.3	0	164	4
その他	454	8.7 ± 19.8	1	294	3
合計	3311	11.9 ± 36.3	0	859	4

表5. おしゃぶり使用児と非使用児のおしゃぶり以外のもののMOUTHING時間の比較(分)

MOUTHING 対象	おしゃぶり使用児*		おしゃぶり非使用児		有意確率
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
指・身体	27.3 ±	39.3	25.2 ±	21.8	.866
玩具	28.3 ±	14.8	25.3 ±	20.2	.708
玩具以外の合成樹脂	16.0 ±	15.6	14.4 ±	18.8	.836
その他	12.2 ±	15.7	11.4 ±	8.8	.897
合計	83.7 ±	41.1	76.2 ±	37.6	.654

\* : おしゃぶり使用児がおしゃぶりを使用していない時  
(1単位観察時間(15分)中におしゃぶりを使用しなかった観察時の結果)

図1. 1日の活動時間の分布（6-10ヶ月児）

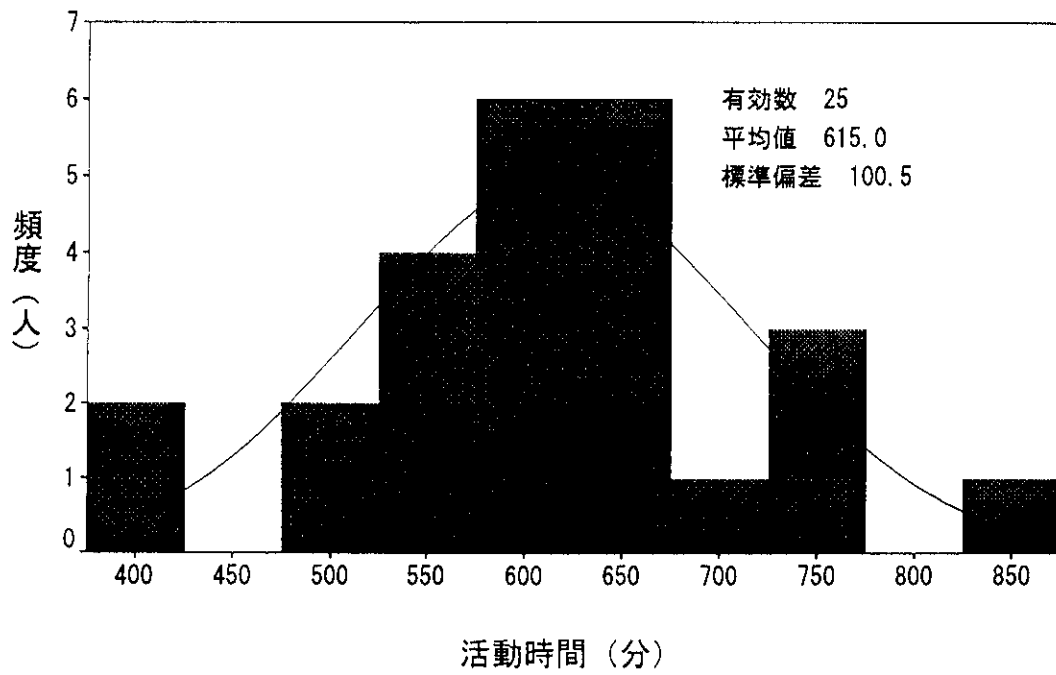


図2. 1日のおしゃぶり以外のMOUTHING時間

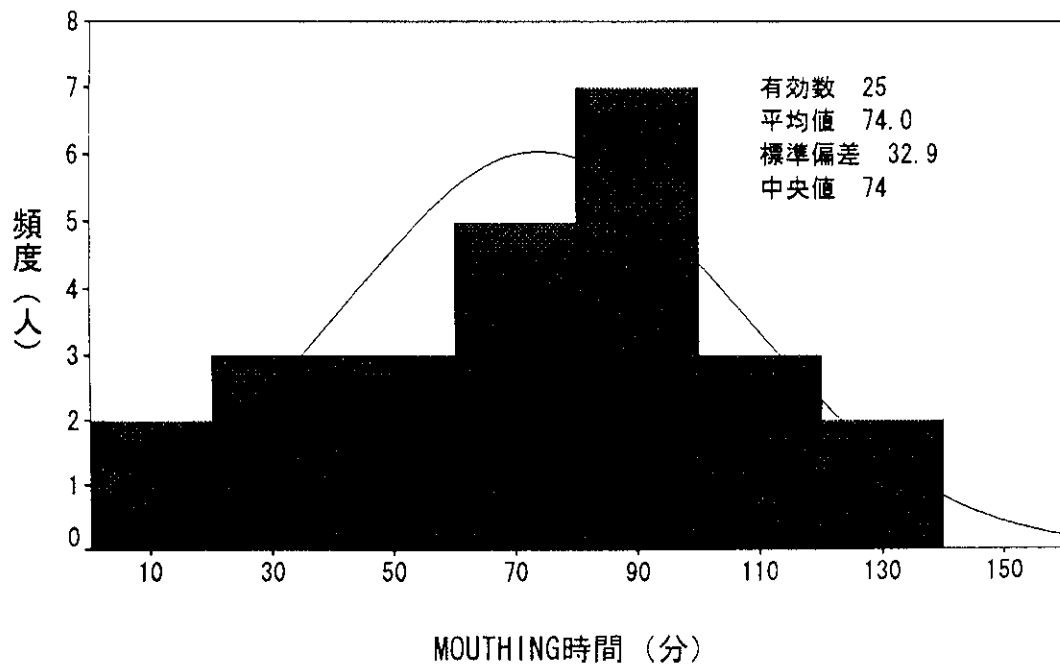




図3. 被験児別MOUTHING時間(分)

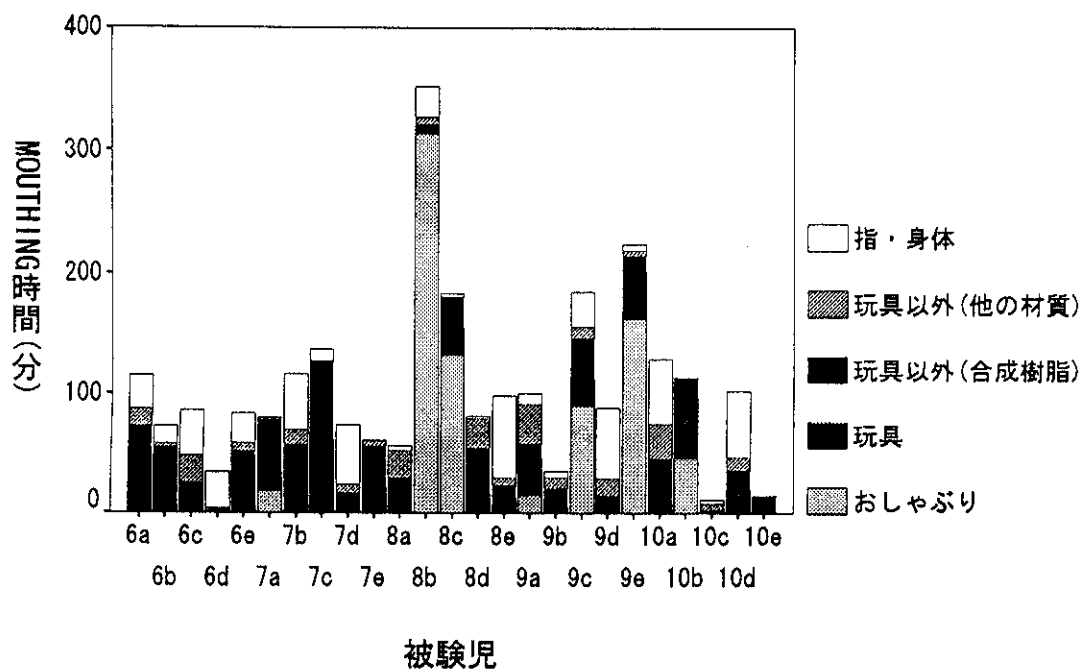
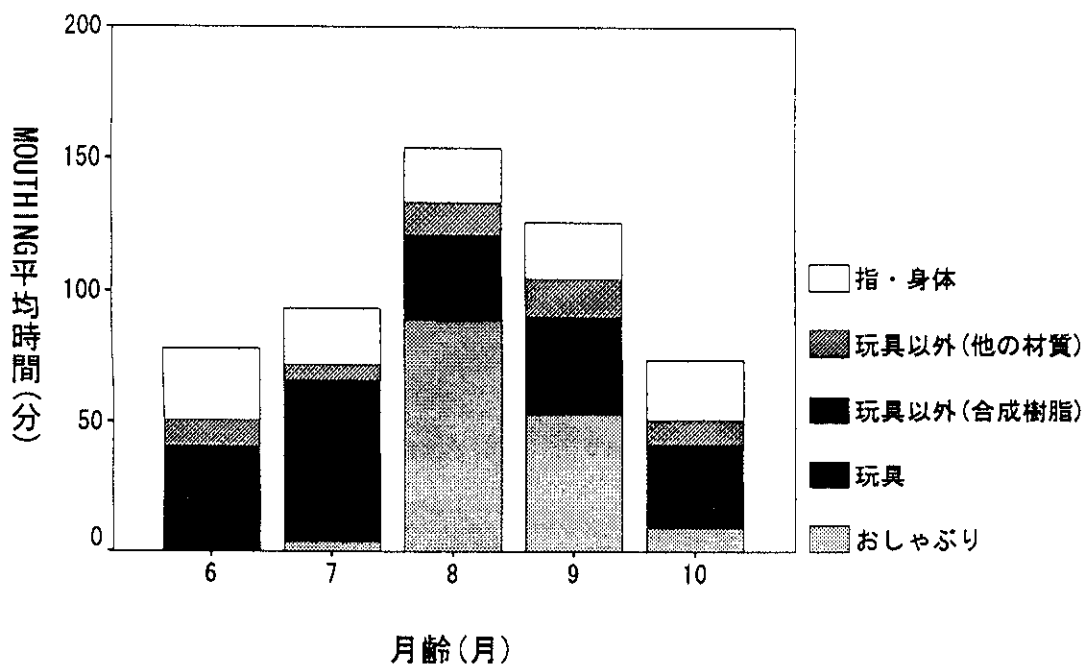


図4. 月齢別MOUTHING平均時間(分)



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

一 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 一

分担研究者 山田 隆<sup>1)</sup>

協力研究者 石橋 亨<sup>2)</sup>

新野竜大<sup>2)</sup> (共同研究者)

小野寺祐夫<sup>3)</sup> (共同研究者)

所属 <sup>1)</sup>国立医薬品食品衛生研究所, <sup>2)</sup>(財)東京顕微鏡院, <sup>3)</sup>東京理科大学薬学部

**研究要旨**

本研究は平成 10 年度の厚生科学研究の結果に基づいて人工唾液への溶出では振とう方式を代え、さらにヒト chewing 実験では被験者人数を増やし、それぞれ試験研究を行ったものである。

I. フタル酸エステルのジエステル体およびモノエステル体の HPLC 分析とその確認

フタル酸ジエステルの DBP, DEHP, DhP および DINP と、フタル酸モノエステルの MBP および MEHP の HPLC 分析は、逆相系の ODS カラムで、ジエステル体の移動相をアセトニトリル・水(80:20)をリニアグラジエントによりアセトニトリル(100)とし、またモノエステル体は移動相をアセトニトリル・2%酢酸水溶液(80:20)とし、それぞれ良好な分離能が得られた。

GC-MS による確認は SIM モードにて行った。ジエステル体の確認にはフラグメントイオン m/e149 を測定した。モノエステル体の確認にはカルボキシル基をメチルエステル化し、asymmetric なフタル酸エステルとしたのち、フラグメントイオン m/e163 にて測定した。

II. 回転振とう方式による人工唾液へのフタル酸エステルの溶出

振とう方式に回転式を採用し、人工唾液へのフタル酸エステル溶出の条件設定を行った。試験品は PVC 製のおしゃぶり (DINP58.3%含有)、歯がため (DINP35.9%含有)、ソフト人形 A (DEHP32.0%含有) およびソフト人形 B (DhP25.0%含有) の 4 試験片を用い、60 分間(15 分×4 回)における溶出条件を検討した。溶出溶媒としての人工唾液量、溶出温度および振とう回数それぞれは、30mL、35±5℃および 300rpm/分に溶出条件を設定した結果、それぞれのフタル酸エステル溶出量にバラツキが少なく、ほぼ一定の溶出量を得ることが可能となった。この条件でのそれぞれの試験片からの 1 時間あたりの溶出量は、溶出温度 30℃で、おしゃぶりの DINP が 460 μg、歯がための DINP が 395 μg、ソフト人形 A の DEHP が 547 μg そしてソフト人形 B の DhP が 75.7 μg であった。

また、設定した条件で 1 区分(15 分間)ずつの溶出量をみたとき、第 1 区分の溶出量が 4 試験片ともに多く、第 2, 3, 4 区分と減少する傾向が見られた。

III. ヒトの chewing による乳幼児製玩具から唾液へのフタル酸エステルの溶出-移行

被験者を 30 人のべ人数(54 人)で PVC 製玩具試験片の chewing 実験を行った。試験品は DINP 含有のおしゃぶり、歯がため、ガラガラ、DEHP 含有ソフト人形 A および DhP 含有ソフト人形 B の 5 種類とした。chewing 時間は 1 区分 15 分間とし、これを 4 回繰り返し、合計 60 分間とした。おしゃぶり試験片は同一被験者が同種の試験片を 2 回 chewing し、その DINP 溶出-移行量は 95.8

$\mu\text{g/hr}$  と  $101\mu\text{g/hr}$  であった。歯がため試験片も同様に 2 回行い、 $53.2\mu\text{g/hr}$  と  $52.1\mu\text{g/hr}$ 、ガラガラ試験片は 1 回で、 $64.3\mu\text{g/hr}$  溶出-移行した。ソフト人形 A 試験片は DEHP が  $32.6\mu\text{g/hr}$ 、ソフト人形 B は DHpP が  $6.95\mu\text{g}$  それぞれ溶出-移行した。

またそれぞれの区分間では、おしゃぶり、歯がためおよびガラガラの第 1 区分で溶出量が多く、第 2 区分、第 3, 4 区分と除々に減少する傾向があった。しかし、ソフト人形 A とソフト人形 B ではこの傾向が見られず、第 1 区分、第 2, 3, 4 区分間の溶出-移行量の差はあまり見られなかった。

また、DBP および DEHP 含有するボールを同様に chewing 試験を行った結果、DBP および DEHP の溶出-移行量は  $29.8\mu\text{g/hr}$  および  $75.9\mu\text{g/hr}$  であった。さらに、フタル酸ジエステルの変化物質であるフタル酸モノエステルを測定したところ、MBP および MEHP を検出した。

## はじめに

フタル酸エステルはプラスチック、特にポリ塩化ビニル(PVC)樹脂の柔軟性を増すために使用される可塑剤として広く使用されている。しかし、近年この物質の一部に内分泌攪乱化学物質「いわゆる環境ホルモン」として疑われ、内外問わず社会的に大きな関心が持たれている。とくに、これらをヒトが生体内に取り込むと生体内の正常なホルモン作用を攪乱、生殖機能の障害、あるいは発ガン発生などを引き起こす可能性が指摘されている<sup>1)</sup>。

また、この物質はその大量使用性から環境中に広く存在し<sup>2)</sup>、すでに、ヒトを含めた動物はこれらの物質に暴露されていることが報告されている<sup>3)</sup>。とくに、乳幼児が使用する玩具類には PVC 製品が多く用いられており、製品に十分な可塑性をもたせるためフタル酸エステルが高濃度で使用され、乳幼児がこれらを chewing および mouthing することによるフタル酸エステルの暴露の可能性が世界的規模で社会問題となっている。すでにフタル酸エステルは乳幼児玩具製品の可塑剤としての使用が世界各国で禁止、あるいは自主的にその使用を控えるなどの対策が講じられている<sup>4)</sup>。しかし、このフタル酸エステルを含有する PVC 製玩具は広く社会に出回っていると思われる。

このような背景から、PVC 製玩具から乳幼児へのフタル酸エステル暴露量を知るために、ヒト成人の chewing によるモデル実験を、平成

10 年度に引き続き成人ボランティアの人数を増やし行った。また、ヒト唾液へのフタル酸エステル溶出に近似した溶出条件を設定するため、振とう機を用いた人工唾液への溶出試験の設定もあわせて行ったので、平成 11 年度の厚生科学研究として、以下のように報告する。

I. フタル酸エステルのジエステル体およびモノエステル体の HPLC 分析とその確認

II. 回転振とう方式による人工唾液へのフタル酸エステル(DEHP, DHpP および DINP)の溶出

III. ヒトの chewing による乳幼児製玩具から唾液へのフタル酸エステル(DBP, DEHP, DHpP および DINP)の溶出-移行

## I. フタル酸エステルのジエステル体およびモノエステル体の HPLC 分析とその確認

### 1. まえがき

フタル酸ジエステル(DBP, DEHP, DHpP および DINP)およびそのモノエステル体の HPLC 分析、およびその確認法としての GC-MS 分析それぞれについて検討した。

また、設定した HPLC 法とその確認法を用いて、本溶出試験に用いる試験品玩具中のフタル酸エステル分析を行った。

## 2. 実験方法

### 試薬および器具

標準フタル酸エステル

- 1) フタル酸ジブチル (DBP)
- 2) フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP)
- 3) フタル酸ジヘプチル (DHpP)
- 4) フタル酸ジイソノニル (DINP)
- 5) フタル酸モノブチル (MBP)
- 6) フタル酸モノ 2-エチルヘキシル (MEHP)

上記 6 種類のうち、DINP は関東化学社製および和光純薬社製を、MBP および MEHP は東京化成社製を、その他は関東化学社製をそれぞれ使用した。

アセトニトリル (HPLC 用、関東化学社製)  
n-ヘキサン (フタル酸エステル、PCB 測定用、関東化学社製)

アセトニトリル-2%酢酸 (8:2) 溶液：酢酸 (関東化学社製) を精製水に溶かし 2%酢酸溶液を調整し、アセトニトリルと 8:2 になるよう混合した。

フタル酸ジエステル標準溶液：本実験には DINP 標準溶液、DBP、DEHP および DHpP 混合標準溶液の 2 種類を調整した。DINP または DBP、DEHP および DHpP の標準試薬をそれぞれ 100mg 正確に量り、アセトニトリル 100mL で定容したものを HPLC 用標準原液 (1mg/mL) とし、n-ヘキサン 100mL で定容したものを GC-MS 用標準原液 (1mg/mL) とした。各標準原液はアセトニトリル-精製水 (5:5) 溶液または n-ヘキサンで希釈し、各種濃度の標準溶液とした。

フタル酸モノエステル標準溶液：MBP および MEHP の標準試薬をそれぞれ 100mg 正確に量り、アセトニトリル 100mL で定容したものを HPLC 用標準原液 (1mg/mL) とし、n-ヘキサン 100mL で定容したものを GC-MS 用標準原液 (1mg/mL) とした。アセトニトリル-2%酢酸 (8:2) 溶液、または n-ヘキサンで希釈し、各種濃度の標準溶液とした。

トリメチルシリルジアゾメタン (TMSD :

Aldrich 社製)

本実験に用いた試薬はすべてフタル酸エステルが含まれないことを確認した。また、実験に使用したガラス器具は使用前に 220°C で 5 時間以上加熱処理した。

### 試験用玩具の種類

- 1) おしゃぶり
- 2) 歯がため
- 3) ガラガラ
- 4) ソフト人形 A
- 5) ソフト人形 B
- 6) ボール

### 装置

UV 検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC) : LC-10, 島津製作所社製

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) : GCMS5050, 島津製作所社製

### HPLC 用分析条件

カラム : Inertsil C8-3 (4.6×250mm)

カラム温度 : 40°C

ジエステル用移動相 : アセトニトリル・水 (8:2) からリニアグラジエントにより 8 分間でアセトニトリル (10) とした

モノエステル用移動相 : アセトニトリル・2%酢酸 (8:2) 溶液

流速 : 1.0mL/分

検出器 : UV (検出波長 254nm)

### GC-MS 測定条件

GC 部

カラム : CBP-5 (50m×0.25mm i.d., 0.25 μm)

カラム温度 : 初期温度 100°C (1 分保持) → 昇温 20°C/分 → 最終温度 280°C

注入口温度 : 290°C

インターフェース温度 : 290°C

MS 部

イオン源温度 : 290°C

イオン化電圧 : 70eV

検出モード : SIM

### フタル酸エステルの確認

フタル酸ジエステルの確認は、直接 GC-MS の SIM モードにて行った。確認に用いたフラグメントイオンは  $m/e$  149 である。

また、フタル酸モノエステルの確認は、フタル酸モノエステルのカルボキシル基をメチルエステル化し、GC-MS の SIM モードにて行った。確認に用いたフラグメントイオンは  $m/e$  163 である。

メチルエステル化：GC-MS 用フタル酸モノエステル標準溶液 1mL を窒素気流下で濃縮乾固させ、酢酸エチル、メタノールおよび TMSD をそれぞれ 500, 100 および 30  $\mu$ L 加え、室温で 30 分間メチルエステル化を行った。反応後、窒素気流により濃縮乾固させ、*n*-ヘキサンを 1mL 加え、GC-MS 分析を行った。

### 3. 結果および考察

#### フタル酸ジエステルの HPLC 分析

DBP, DEHP, DhP および DINP の HPLC 分析法について検討した。

HPLC 分析用カラムは逆相系の ODS 系カラムを用い、移動相にはアセトニトリル・水の混合溶媒を使用した。すでにフタル酸エステルの HPLC 分析条件は数多く報告され、また著者らは平成 10 年度の厚生科学報告書で、アセトニトリル・水の混合比を変化させたアセトニトリル濃度勾配法による HPLC 分析条件を設定している。この方法は 11 種類のフタル酸エステルを良好に分離するために 70%アセトニトリル水を 15 分と比較的緩やかな濃度勾配で 100%にするものである。しかし、本実験では対象としているフタル酸エステルが 4 種類と少ないため、初期のアセトニトリル濃度を 80%とし、8 分間で 100%とする濃度勾配法を利用した。このことより、短時間で分析を行うことを可能とした。

#### フタル酸モノエステルの HPLC 分析

モノエステル体の MBP または MEHP はジエステル体の DBP または DEHP から一つのエステ

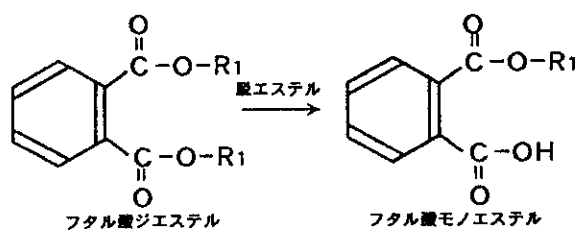


図-1 フタル酸ジエステルの脱エステル化によるフタル酸モノエステルの生成

ル結合が切断し、脱離したもので、図-1で示されるフタル酸エステルである。

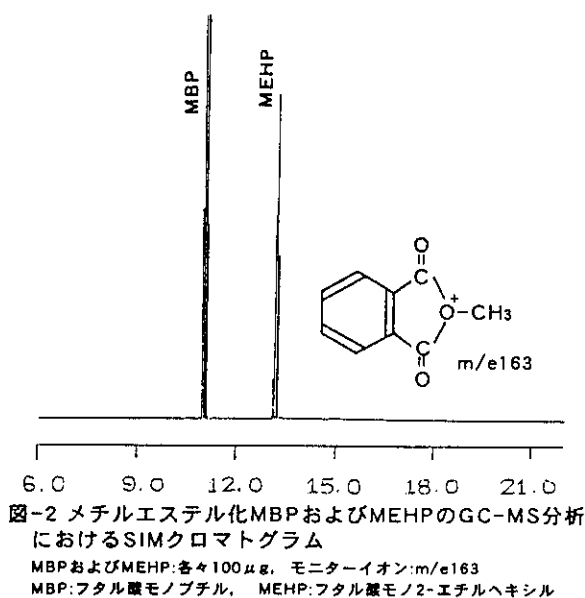
フタル酸モノエステルは、それ自身にカルボキシル基を持つ酸性物質であるため、フタル酸ジエステルを分析する移動相アセトニトリル・水(8:2)ではクロマトグラムのピーク形状がブロードになってしまい、分析することが困難であった。そこで、ジエステル体分析に使用した移動相に 2%酢酸水溶液を添加し、移動相を酸性にして分析を行った。アセトニトリル・2%酢酸水溶液(8:2)を移動相とし、MBP および MEHP を分析したところ、ピーク形状良好な MBP および MEHP のピークが得られた。

またこの HPLC 分析条件で、MBP と MEHP さらに DBP と DEHP の合計 4 種類のフタル酸エステル混合液を分析したところ、分離能良好なクロマトグラムが得られた。

#### フタル酸ジエステルとモノエステルの GC-MS による確認

フタル酸ジエステルはこの分子のまま GC-MS 分析が可能であり、SIM モードにて、フタル酸エステルのエステル部分が脱離した、無水フタル酸の基準フラグメントイオン  $m/e$  149 を測定することで DBP, DEHP, DhP および DINP の確認を行うことが可能である。

一方、モノエステルの MBP および MEHP は、分子内にカルボキシル基を有し、GC 分析を行うには十分な無極性を持っていない。そこで、そのカルボキシル基をエステル化した後、GC-MS 分析する手段について検討した。本報告で対象としているフタル酸ジエステルはその構造上 symmetric 体である。これらエステルの 1



つが脱離し、モノエステルを生成することから、著者らはカルボキシル基をメチルエステル化することにした。メチルエステル化するためのエステル化剤は種々報告されているが<sup>5)</sup>、本実験では操作性が簡易なエステル化剤テトラメチルシリルジアンゾメタン(TMSD)を用い<sup>6)</sup>、Asymmetricなフタル酸ジエステルとし、これを上記に示したフタル酸ジエステルの分析条件にてGC-MS分析を行った。その結果、MEPおよびMEHPのメチル誘導体よりm/e163のフラグメントイオンが得られ、これをSIMモードにて測定することでMBPおよびMEHPの分別確認が可能となった(図-2)。

玩具のおしゃぶり、歯がため、ガラガラ、ソフト人形およびボールそれぞれを細片し、アセトニトリルまたはn-ヘキサン抽出し、材質中のフタル酸ジエステルについてHPLCまたはGC-MS分析を行った。

その結果、おしゃぶりからDINPが58%、歯がためからDINP32%、ガラガラからDINP36%、ソフト人形AからDEHPが32%、ソフト人形BからDHPが25%、ボールからDBPおよびDEHPがそれぞれ10%および18%検出され、平成10年度報告した玩具材質中のフタル酸ジエステルとほぼ同様の結果が得られた。

さらに、ボールを細片し、テトラヒドロフ

ランで溶解し、アセトンで高分子を析出させ、20%DCM含有n-ヘキサンで抽出し、材質中のフタル酸モノエステルについてHPLCおよびGC-MS分析を行った。

その結果、DBPおよびDEHPを含有するボールより、それぞれのモノエステル体であるMBPおよびMEHPを微量ながら確認した。

#### 4. まとめ

フタル酸ジエステルDBP, DEHP, DHPおよびDINPと、モノエステルMBPおよびMEHPそれぞれのHPLC分析法および、これらの確認法としてのGC-MS分析法にちて検討し、以下のような結果が得られた。

- 1) フタル酸ジエステルのHPLC分析は、移動相をアセトニトリル・水(8:2)からアセトニトリル(10)に濃度勾配をかけることで、4種の混合溶液を一斉分析できた。
- 2) フタル酸モノエステルのHPLC分析は、移動相をアセトニトリル・2%酢酸水溶液(8:2)にすることで、MBPおよびMEHPの混合溶液を良好に分離することができ、またそれぞれのジエステルを含む4種の一斉分析が可能となった。
- 3) GC-MSによる確認法は、フタル酸ジエステルではフラグメントイオンをm/e149とし、直接SIM分析することで可能となった。また、フタル酸モノエステルでは、カルボキシル基をメチルエステル化した後、フラグメントイオンをm/e163とし、SIM分析することができた。

## II. 回転振とう方式による人工唾液へのフタル酸エステルの溶出

### 1. まえがき

振とう方式を用いたPVC製玩具から人工

唾液へのフタル酸エステルの溶出についてすでに平成10年度厚生科学研究に行っている。その結果を踏まえ、本年度(平成11年度)では上下振とう方式から、回転振とう方式に変えフタル酸エステルの溶出条件の検討を行った。

## 2. 実験方法

### 試薬および器具

ムチン：ブタ胃製，和光純薬社製

その他使用する標準試薬および一般試薬は前報Ⅰに準じた。

人工唾液：塩化ナトリウム 4.5g，塩化カリウム 3.0g，無水硫酸ナトリウム 0.3g，塩化アンモニウム 0.4g，乳酸 0.3g および尿素 0.2g それぞれを蒸留水に溶かし，0.1N 水酸化ナトリウムで pH7.0 に調整し，全量を 1000mL とした 8)。

ネジ蓋付 50mL 容遠心分離管：ガラス製

その他使用する器具は前報Ⅰに準じた。

### 装置

振とう数可変装置付回転式振とう機：VR-36，TAITEC 社製

恒温機：SANYO MIR-152，三洋電機社製

その他本実験で使用した装置は前報Ⅰに準じた。

### 試験用玩具の種類

- 1) おしゃぶり (DINP58%含有)
- 2) 歯がため (DINP32%含有)
- 3) ソフト人形 A (DEHP32%含有)
- 4) ソフト人形 B (DHP25%含有)

### 試験片の作製

それぞれの玩具を表面積が 15cm<sup>2</sup> になるように，玩具の均一部分を縦 2.5cm，横 3.0cm に切断したものを溶出用試験片とした。

### 回転振とう方式による人工唾液へのフタル酸エステルの溶出条件

試験片をネジ蓋付遠心分離管に採取し，人工唾液を 30mL 加え，蓋をし，溶出温度 35±5℃，振とう数 300rpm/分で 15 分間の振とう溶出を

行った。最初の 15 分間を第 1 区分とし，合計 4 区分 (60 分間) 溶出試験を行った。1 区分ごとに溶出溶媒を採取し，新たに人工唾液を 30mL 加え，第 2 区分の溶出試験を行った。以降同様に，3，4 区分の溶出試験を行った。

溶出条件の検討を以下に示した。

- 1) 溶出温度の検討：恒温機に振とう機をセットし，溶出温度を 20℃ (室温)，30℃，35℃ および 40℃ と変化させた。
- 2) 振とう数の検討：回転式振とう機の振とう数を 200，300 および 400rpm/分 と変化させた。
- 3) 溶出液量の検討：人工唾液量を 10，20，30 および 40mL と変化させた。
- 4) 人工唾液へのムチン添加効果：人工唾液に粘性物質ムチンを 0.16% 添加した。

### フタル酸エステルの測定

得られた各区分の溶出液 5mL を 10mL 容試験管に採取し，アセトニトリル 5mL を加え，激しく振とうし，HPLC 分析用試験液とし，これを前報Ⅰの HPLC 分析条件により測定した。

## 3. 結果および考察

人工唾液による DINP 溶出条件を設定するため，以下のような検討を行った。

### DINP 溶出量に及ぼす人工唾液量の影響

試験品玩具のおしゃぶり (DINP58.3%含有) と歯がため (DINP35.9%含有) を用い，振とう回数を 300rpm/分，溶出温度を 20℃ (室温) と一定にし，溶出溶媒としての人工唾液量を 10mL，20mL，30mL および 40mL と変化させ，第 1 区分 (0~15 分)，第 1 区分 (15~30 分)，第 3 区分 (30~45 分) および第 4 区分 (45~60 分) での DINP 溶出量を測定した。

その結果を図-3 に示した。おしゃぶり と歯がための両試験片において，第 1 区分で溶出量が最も多く，第 2 区分，第 3 区分と急激に減少した。第 1 区分と第 3 区分での溶出量を比較すると，おしゃぶりの 40mL，30mL，20mL また

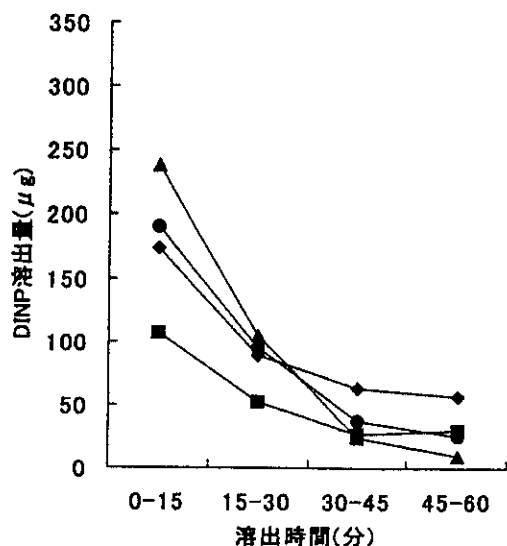


図-3-1 おしゃぶりから人工唾液へのDINP溶出に及ぼす人工唾液量の影響

おしゃぶり(DINP58.3%含有): 表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し、試験片とした。  
人工唾液量◆: 40mL, ●: 30mL, ▲: 20mL, ■: 10mL  
溶出温度: 20℃(室温) 振とう数: 300rpm/分  
DINP溶出量: 3回繰り返し実験の平均値

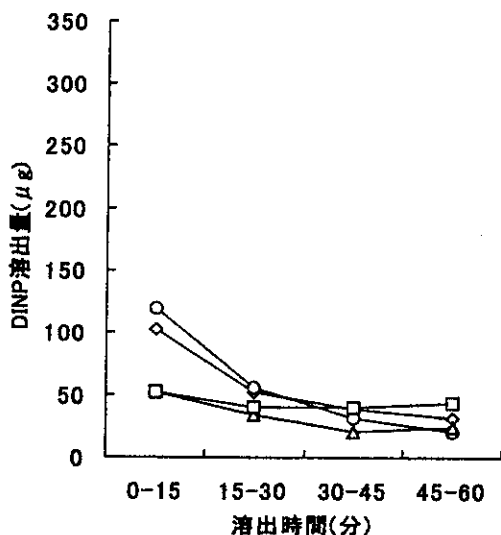


図-3-2 歯がためから人工唾液へのDINP溶出に及ぼす人工唾液量の影響

歯がため(DINP35.9%含有): 表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し、試験片とした。  
人工唾液量◇: 40mL, ○: 30mL, △: 20mL, □: 10mL  
溶出温度: 20℃(室温) 振とう数: 300rpm/分  
DINP溶出量: 3回繰り返し実験の平均値

は10mLでは約57%, 78%, 82%または76%減少し、歯がためでは約50%, 64%, 50%または11%減少なのであった。

おしゃぶりでの人工唾液量とDINP溶出量の関係は、第1区分では液量20mLで最も多くDINPが溶出し、第3区分では40mLで最多であ

表-1 人工唾液量に対するPVC製玩具から人工唾液へのDINP溶出量

PVC製玩具 溶出条件	おしゃぶり		歯がため	
	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)
40mL	383	27	226	44
30mL	349	15	228	31
20mL	377	38	133	38
10mL	217	31	177	29

DINP溶出量: 第1~4区分溶出量の合計で、3回繰り返し実験の平均値  
PVC製玩具: おしゃぶり(DINP58.3%含有)と歯がため(DINP35.9%含有)を表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し、試験片とした。  
DINP: フタル酸ジイソニル C.V.: 変動係数

った。歯がための第1区分では液量30mLで最も多くDINPが溶出し、第3区分では10mLが最も多かった。このことより、人工唾液量とDINP溶出量には相関関係が見られないことが明らかとなった。

また、各人工唾液量に対する1時間あたりのDINP溶出量とその相対標準偏差を表-1に示した。おしゃぶりでは人工唾液量40mL, 30mL, および20mLで、DINP溶出量が多く、383μg, 349μg および377μgと近似し、相対標準偏差は27%, 15%および38%であった。歯がためでは人工唾液量40mL および30mLで多く溶出し、その量は226μg および228μg, 相対標準偏差は44%および31%であった。おしゃぶり、歯がための両試験片共に、人工唾液量30mLにおいてDINP溶出量が多く、相対標準偏差が小さい値であり、良好な条件であることがわかった。

以上の結果より、本実験における溶出溶媒としての人工唾液量を30mLと設定した。これは、食品衛生法に基づく容器包装の溶出試験での溶出量の設定、試験片1cm<sup>2</sup>あたり2mLの基準と一致した。

#### DINPの溶出に及ぼす回転式振とう数の影響

おしゃぶり(DINP58.3%含有)および歯がため(DINP35.9%含有)の試験片を用い、人工唾液量30mL, 溶出温度20℃(室温)それぞれを一定にして、振とう数を1分あたり200rpm, 300rpm および400rpmにおけるDINP溶出量を測定した。振とう時間は15分ずつの区分を4回、合計60



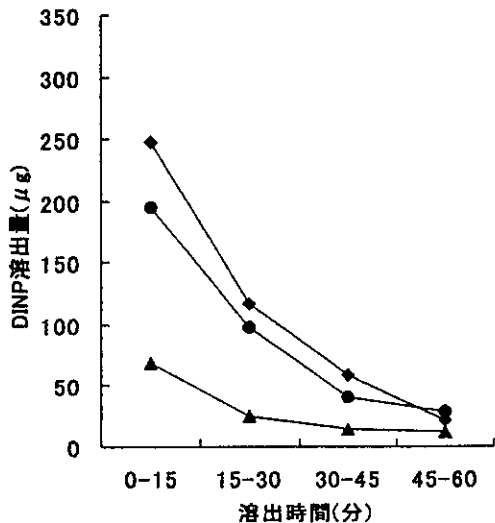


図-4-1 おしゃぶりから人工唾液へのDINP溶出に及ぼす振とう機振とう数の影響  
おしゃぶり(DINP58.3%含有): 表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し、試験片とした。  
振とう機振とう数: 400rpm/分, ●: 300rpm/分, ▲: 200rpm/分, 人工唾液量: 30mL, 溶出温度: 20℃(室温)  
DINP溶出量: 3回繰り返し実験の平均値

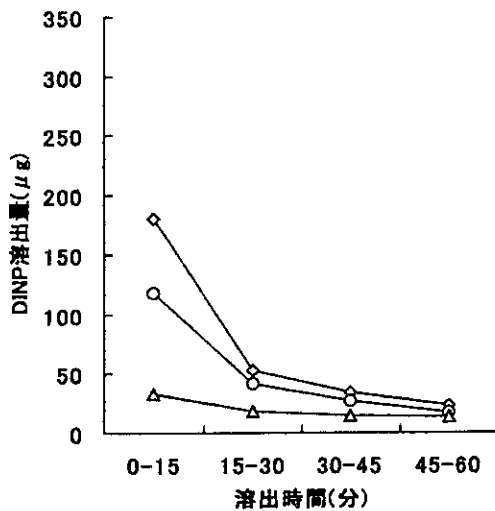


図-4-2 歯がためから人工唾液へのDINP溶出に及ぼす振とう機振とう数の影響  
歯がため試験片(DINP35.9%含有): 表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し、試験片とした。  
振とう機振とう数: 400rpm/分, ○: 300rpm/分, ▲: 200rpm/分, 人工唾液量: 30mL, 溶出温度: 20℃(室温)  
DINP溶出量: 3回繰り返し実験の平均値

分間とした。その結果を表-2と図-4に示した。

おしゃぶりの場合、60分間のDINP溶出量は振とう数200rpm/分で121μg、300rpm/分で363μgおよび400rpm/分で445μgであり、振とう数が多くなるほど、その溶出量が増加する傾向であった。また、それぞれの振とう数にお

表-2 振とう数に対するPVC製試験片から人工唾液へのDINP溶出量

溶出条件	おしゃぶり		歯がため	
	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)
400rpm/分	445	27	291	39
300rpm/分	363	17	204	32
200rpm/分	121	24	79	39

DINP溶出量: 第1~4区分溶出量の合計で、3回繰り返し実験の平均値  
PVC製玩具: おしゃぶり(DINP58.3%含有)と歯がため(DINP35.9%含有)を表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し、試験片とした。  
DINP: フタル酸ジイソニル C.V.: 変動係数

いての区分間でのDINP溶出量は、第1区分が他の区分と比較して最も多く、その後第2, 3, および4区分と減少し、その減少率は200rpm/分で第1区分は第3区分と比較し約80%, 300rpm/分では約75%, 400rpm/分では約71%であった。

歯がためでもおしゃぶりと同様の振とう数と溶出量に相関性がある結果が得られた。また、60分間のDINP溶出総量は歯がためよりおしゃぶりのほうが多かった。これは材質に含まれるDINP含有量によるものと考えられる。また、それぞれの振とう数でのDINP溶出量のバラツキをあらわす相対標準偏差は、おしゃぶりが200rpm/分と400rpm/分で24%と27%、歯がためが39%と39%と大きく、300rpm/分は両試験片ともに比較的小さい値であった。

以上の結果より、本実験の回転式振とう数は300rpm/分とした。

#### DINP溶出に及ぼす溶出温度の影響

溶出温度のDINP溶出に及ぼす影響を検討するため、試験片はおしゃぶり(DINP58.3%含有)および歯がため(DINP35.9%含有)を用い、溶出溶媒の人工唾液量を30mL、振とう数を300rpm/分と一定にし、溶出温度を20℃(室温)、30℃、35℃および40℃と変化させ、それぞれについてのDINP溶出量を測定した。その結果を表-3と図-5にそれぞれ示した。

それぞれの試験片における60分間のDINP溶出総量は溶出温度の上昇にともなって増加

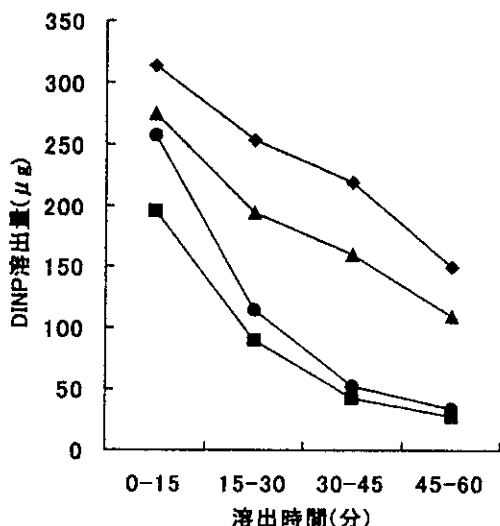


図-5-1 おしゃぶりから人工唾液へのDINP溶出に及ぼす温度の影響

おしゃぶり(DINP58.3%含有): 表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し, 試験片とした。  
 溶出温度◇: 40℃, △: 35℃, ●: 30℃, ■: 20℃(室温)  
 人工唾液量: 30mL, 振とう数: 300rpm/分  
 DINP溶出量: 3回繰り返し実験の平均値

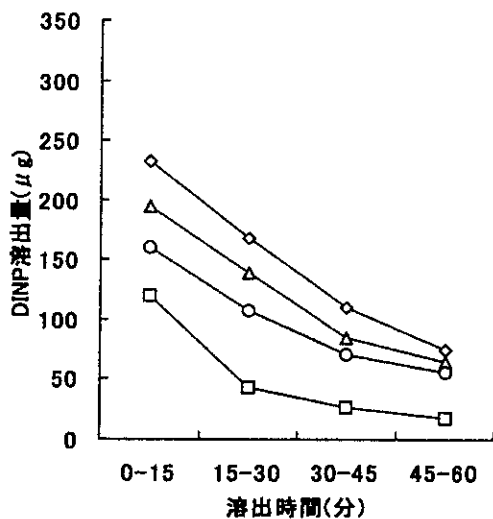


図-5-2 歯がためから人工唾液へのDINP溶出に及ぼす温度の影響

歯がため試験片(DINP35.9%含有): 表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し, 試験片とした。  
 溶出温度◇: 40℃, △: 35℃, ○: 30℃, □: 20℃(室温)  
 人工唾液量: 30mL, 振とう数: 300rpm/分  
 DINP溶出量: 3回繰り返し実験の平均値

する傾向があった。また、溶出区分間では第1区分の溶出量がどの条件においても最も多く、以降第2区分、第3区分および第4区分と減少傾向があった。この傾向はおしゃぶりと歯がため両試験片とも同じ傾向であった。一方、おし

表-3 溶出温度に対するPVC製玩具から人工唾液へのDINP溶出量

PVC製玩具 溶出条件	おしゃぶり		歯がため	
	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)
40℃	937	5.3	585	12
35℃	741	8.4	483	7.0
30℃	460	8.4	395	14
20℃(室温)	355	19	208	31

DINP溶出量: 第1~4区分溶出量の合計で, 3回繰り返しの平均値  
 PVC製玩具: おしゃぶり(DINP58.3%含有)と歯がため(DINP35.9%含有)  
 を表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し, 試験片とした。  
 DINP: フタル酸ジイソノニル C.V.: 変動係数

しゃぶりと歯がための各溶出温度に対する溶出量の相対標準偏差は、20℃(室温)で19%と31%、30℃で8.4%と14%、35℃で8.4%と7.0%および40℃で5.3%と12%であり、室温ではバラツキが多く、30℃~40℃と温度を設定すると、安定した溶出量が得られることが明らかとなった。

以上より、溶出温度を35±5℃で設定することで良好な結果が得られることがわかった。

#### 人工唾液へのDINP溶出におよぼすムチン添加効果

人工唾液に粘性をもたせ、ヒト唾液に近い性質をもたせるため、ムチンを0.16%添加した。この人工唾液を用い、試験片として歯がため、溶出液量30mL、溶出温度20℃(室温)、回転式振とう数300rpm/分、溶出時間を60分(15分×4回)とし、DINP溶出量を求めた。その結果を表-4に示した。

0.16%ムチンを含む人工唾液へのDINP溶出量は60分あたり377μgであり、同条件でのムチンを添加していない人工唾液への溶出量と比較すると54%増加した。しかし、相対標準偏差は0.16%ムチン添加人工唾液では109%でバラツキが非常に大きく、ムチンを人工唾液に添加することが今回設定している試験法において不適であることがわかった。

#### 回転式振とう溶出試験の応用

以上の結果より設定した回転式振とうによる溶出条件にて、DEHPを32%含有するソフト

人形AおよびDHpPを25%含有するソフト人形Bを用い溶出試験を行った。溶出条件は、溶出溶媒の人工唾液量を30mL、溶出温度を30℃、振とう数を300rpm/分、溶出時間を60分(15分×4)とした。その結果を図-6に示した。

各試験片からのDEHPまたはDHpP溶出量は、第1区分で最も多く、第2, 3, 4区分と減少し、DINP溶出と同じ挙動をとることがわかった。また、60分間の総溶出量および相対標準偏差は、DEHPが547μgおよび9.1%、DHpPが75.7μgおよび7.9%であり、良好な溶出結果が得られた。

以上の結果より、本実験に用いた回転振とう方式で設定した溶出条件がDINP以外のフタル酸エステルを含む玩具の溶出試験に適用できるものと考えられる

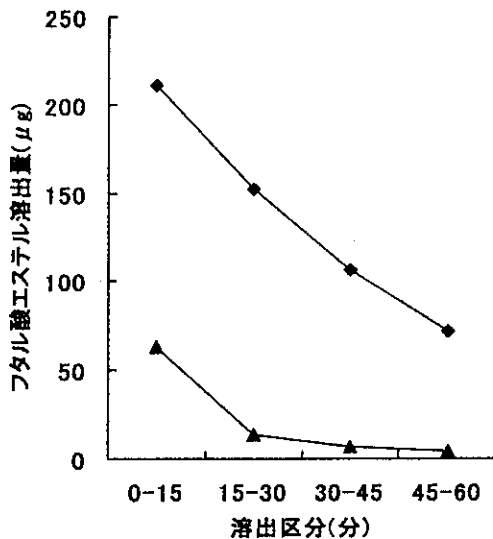


図-6 PVC製玩具から人工唾液へのDEHPおよびDHpP溶出  
 PVC製玩具◆:ソフト人形A(DEHP32%含有)▲:ソフト人形B(DHpP25%含有)を表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し、試験片とした。人工唾液量:30mL、溶出温度:30℃、振とう数:300rpm/分  
 フタル酸エステル溶出量:3回繰り返し実験平均値

#### 4. まとめ

玩具に含まれるフタル酸エステルの回転振とう方式したによる人工唾液への溶出条件を検討し、以下のような条件を設定できた。

表-4 PVC製玩具から人工唾液へのDINP溶出量に及ぼすムチンの添加効果

PVC製玩具 溶出条件	歯がため	
	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)
ムチン無添加	204	32
0.16%ムチン添加	377	109

DINP溶出量:第1~4区分溶出量の合計で、3回繰り返しの平均値  
 PVC製玩具:歯がため(DINP35.9%含有)を表面積が15cm<sup>2</sup>になるよう切断し試験片とした  
 DINP:フタル酸ジイソニル C.V.:変動係数

- 1) 振とう方式は回転式振とうが良好であり、その振とう数は300rpm/分が溶出量のバラツキが少なく、一定の値が得られた。
- 2) 出溶媒としての人工唾液量は30mL、溶出温度は35±5℃に設定することで良好な溶出量がえられた。
- 3) 人工唾液へのムチンの添加は溶出量のバラツキが非常に大きく、本溶出法には不適であった。
- 4) 玩具に含まれるDINP以外のフタル酸エステルに対しても本回転振とう方式による人工唾液への溶出試験を用いることが可能であった。

### Ⅲ. ヒトの chewing による乳幼児製玩具から唾液へのフタル酸エステルの溶出-移行

#### 1. まえがき

ヒトの chewing による口腔内でのフタル酸エステルの唾液への溶出-移行については、平成10年度厚生科学研究で予備実験を行った結果、フタル酸エステルのうちDINPを含有するPVC製玩具を成人がchewingすることにより、唾液へDINPが溶出-移行することが明らかとなった。これらの予備実験から、人工唾液によ

る in vitro での溶出条件の検討を行い、それに相当する結果を得ることができた。今年度(平成11年度)の試験研究では、ヒトの chewing 実験での被験者の数を30人(のべ54人)と増やし、得られた試験結果を平成10年度の予備実験結果と比較した。さらに、DINP 以外のフタル酸エステルについても同様の chewing による溶出実験を行った。

## 2. 実験方法

### 試薬および器具

唾液採取用のピンはネジ蓋付 50mL 容遠心分離管を用いた。

その他使用する標準試薬、一般試薬および器具は前報 I および II に準じた。

### 装置

使用した装置は前報 I および II に準じた。

### 試験用玩具の種類

- 1) おしゃぶり (DINP58%含有)
- 2) 歯がため (DINP32%含有)
- 3) ソフト人形 A (DEHP32%含有)
- 4) ソフト人形 B (DHP25%含有)
- 5) ボール (DBP10%および DHHP18%含有)

### 試験片の作製

試験片の作製は前報 II に準じた。

### 被験者の chewing による口腔内唾液へのフタル酸エステルの溶出-移行試験

PVC 製玩具試験片を被験者(表-5)の口腔

表-5 被験者の性別と年齢

おしゃぶり			歯がため			ガラガラ		
被験者	性別	年齢	被験者	性別	年齢	被験者	性別	年齢
AA	男性	25	BA	男性	22	CA	男性	23
AB	男性	24	BB	男性	24	CB	女性	25
AC	男性	23	BC	男性	22	CC	女性	24
AD	女性	25	BD	男性	22	CD	女性	24
AE	男性	23	BE	男性	22	CE	男性	23
AF	男性	23	BF	男性	23	CF	女性	22
AG	女性	24	BG	男性	23	CG	男性	23
AH	女性	23	BH	女性	22	CH	男性	22
AJ	女性	22	BJ	男性	25	CJ	男性	23
ソフト人形A			ソフト人形B					
被験者	性別	年齢	被験者	性別	年齢			
DA	男性	23	EA	女性	22			
DB	女性	25	EB	男性	23			
DC	女性	24	EC	男性	22			
DD	男性	23	ED	男性	23			
DE	男性	22						

内に入れ、mouthing(口腔内で試験片を転がす)および軽い chewing(試験片を吸う)を行った。以下この動作を“chewing”とする。この chewing を 15 分間行い、口腔内に溜まった唾液全てを 50mL 容ネジ蓋付遠心分離管に吐出し採取した。そして試験片を口腔より取り出し、少量の蒸留水で良く口腔内をすすいだ後、5 分間の休憩を行った(第 1 区分)。休憩後、先の試験片を再び口腔内に入れ、15 分間同様の chewing を行い、溜まった唾液を別の 50mL 容ネジ蓋付遠心分離管に吐出し、採取した。その後、試験片を取り出し、蒸留水にて口腔内をすすぎ、5 分間休憩した(第 2 区分)。以後同様にこの操作を 2 回繰り返した(第 3, 4 区分)。

15 分間隔でそれぞれ得られた唾液は、容量と pH を測定後、蒸留水にて正確に 10mL(唾液量が 10mL 以上のときは 20mL)に定容し、アセトニトリル 10mL(または 20mL)を正確に加え、HPLC 用試験液とした。

### フタル酸ジエステルおよびモノエステルの HPLC 分析および GC-MS 分析条件

フタル酸ジエステルの HPLC による定量分析と GC-MS による確認は前報 I, II に準じた。

また、フタル酸モノエステルの確認を行うため、第 1~4 区分の調整した唾液を合わせ、塩化ナトリウムを 10%になるように添加し、0.001N 水酸化カリウムにて pH8~9 とし、n-ヘキサンにてフタル酸ジエステルを抽出した後、0.01N 塩酸にて pH2 に調整し、20%ジクロロメタン含有 n-ヘキサンでフタル酸モノエステルを抽出した。この抽出液を濃縮後、TMSD にてメチルエステル化し、GC-MS にて測定した。

## 3. 結果および考察

本実験の被験者は全て学生であり、表-5 に示した。おしゃぶりの chewing に男性 5 人(23~25 歳)、女性 4 人(22~25 歳)計 9 人行い、同種の試験片での chewing を 2 回実施した。歯がためは男性 8 人(22~25 歳)、女性 1 人(22 歳)