

表-6 被験者のchewingによるPVC製玩具から唾液へのDINP溶出量

歯がため(36%含有)				おしゃぶり(58%含有)				ガラガラ(32%含有)				
被験者	1回目		2回目		被験者	1回目		2回目		被験者	溶出量 [唾液量]	
	溶出量	[唾液量]	溶出量	[唾液量]		溶出量	[唾液量]	溶出量	[唾液量]		溶出量	[唾液量]
	$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]	$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]		$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]	$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]		$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]
AA	35.8	[45.5]	28.7	[50.5]	BA	141	[35.5]	105	[21.0]	CA	86.6	[55.0]
AB	68.9	[45.5]	73.7	[56.5]	BB	65.6	[46.0]	86.9	[40.5]	CB	74.0	[35.0]
AC	65.5	[56.5]	93.8	[72.5]	BC	115	[43.5]	142	[40.0]	CC	98.1	[36.0]
AD	108	[16.0]	58.4	[24.0]	BD	95.5	[60.0]	68.6	[65.0]	CD	57.7	[59.0]
AE	47.9	[31.0]	44.8	[32.5]	BE	72.8	[51.0]	52.8	[40.0]	CE	65.4	[46.0]
AF	41.0	[24.0]	40.3	[36.0]	BF	74.0	[45.0]	42.6	[37.5]	CF	15.7	[27.0]
AG	53.5	[35.5]	39.5	[30.0]	BG	125	[86.0]	121	[69.0]	CG	129	[79.5]
AH	38.0	[39.0]	54.3	[47.0]	BH	112	[87.5]	141	[69.0]	CH	22.6	[48.5]
AJ	19.8	[18.0]	35.4	[38.0]	BJ	56.6	[44.0]	149	[56.0]	CJ	29.9	[66.5]
平均	53.2±25.6		52.1±20.7		平均	95.3±29.5		101±40.2		平均	64.3±37.5	
H10年度報告	188±27.8				H10年度報告	300±89.4				H10年度報告	328±39.3	
唾液量	16.0~56.5mL/hr		24.0~72.5mL/hr		唾液量	35.5~87.5mL/hr		21.0~69.0mL/hr		唾液量	27.0~79.5mL/hr	
唾液pH	6.9~7.4		7.0~7.4		唾液pH	7.0~7.5		7.2~7.5		唾液pH	6.8~7.4	

PVC製玩具:各玩具を表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。
 1回目溶出量:試験片を1時間chewingし、得られたDINP溶出量
 2回目溶出量:1回目と同種類の試験片を1時間chewingし、得られたDINP溶出量
 DINP:フタル酸ジイソニル

計9人、同種の試験片でのchewingを2回実施した。ガラガラは男性5人(22~23歳)、女性4人(22~25歳)計9人でchewingを1回、ソフト人形Aは男性3人(22~23歳)、女性2人(24と25歳)計5人、ソフト人形Bは男性3人(22~23歳)、女性1人(22歳)計4人で、それぞれchewingを1回実施した。そして、それぞれの試験片から唾液へのフタル酸エステル溶出-移行量を求めた。その結果は以下の通りである。

ヒトのchewingによる口腔内唾液へのDINP溶出-移行量

DINPを含有するPVC製玩具、おしゃぶり、歯がため、ガラガラそれぞれのchewingにより得られた唾液量とそのpHおよびDINP溶出-移行量、さあに平成10年度の予備試験結果をそれぞれ表-6に示した。

歯がため(DINP36%含有)の場合、1回目のchewingによるDINP溶出-移行量は9人平均で53.2 $\mu\text{g/hr}$ ±25.6であった。その1週間後に同一被験者による2回目のchewingを行った結果、その溶出-移行量は52.1 $\mu\text{g/hr}$ ±20.7であ

り、1回目と2回目がほぼ同じ溶出-移行量であり、標準偏差もほぼ同じであった。これを平成10年度の予備試験での結果と比較すると、本年度の結果は1/2.8量に減少していることがわかった。これは、平成10年度のchewing試験は被験者が本研究に携わっており、すなわち、注意深くchewingし、DINPが唾液へ良好に溶出-移行するように行ったため、結果として本年度の結果との間に差が開いたものと考えられる。さらに前報IIにおける回転式振とうによる人工唾液への溶出試験の検討において、振とう数200rpm/分でのDINP溶出量は79 $\mu\text{g/hr}$ 、300rpm/分では204 $\mu\text{g/hr}$ 、および400rpm/分では291 $\mu\text{g/hr}$ であり、DINP溶出量が振とう数に依存する結果がえられている(表-2)。このことからより注意深くchewingを行ない、口腔内で試験片をよく転がしたことが、溶出-移行量が多くなった原因であると推察される。

また、1回目および2回目の実験結果から、唾液量とDINP溶出-移行量との間には平成10

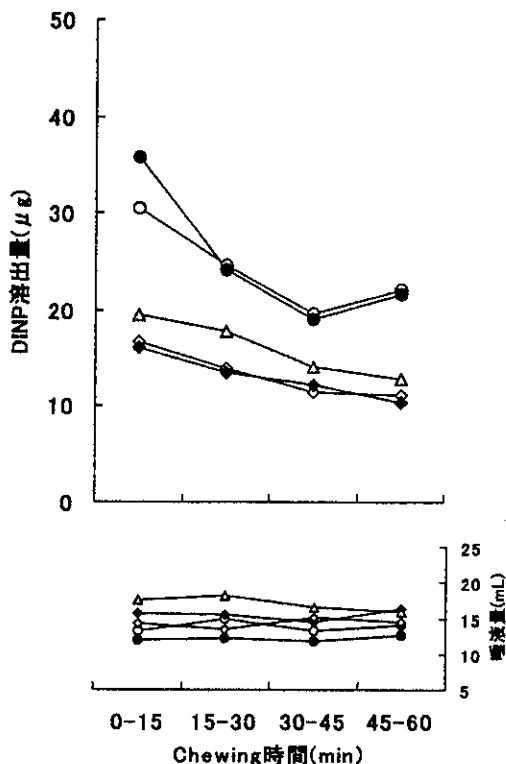


図-7 被験者のchewingによるPVC製玩具から唾液へのDNP溶出及び唾液分泌量とchewing時間の関係

PVC製玩具: 表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。15分間あたりの溶出量及び唾液量○: おしゃぶり(1回目), ●: おしゃぶり(2回目), ◇: 歯がため(1回目), ◆: 歯がため(2回目), △: ガラガラ
DNP溶出量: 被験者9人の平均値

年度と同様、直接関係するデータが得られていない。また、唾液のpHは6.9~7.4とほぼ中性であり、DNP溶出-移行量とは直接関係していないと考えられる。

おしゃぶり(DNP58%含有)試験片でも、1回目の溶出量が95.3μg/hr±29.8、2回目の溶出量が101μg/hr±40.2であり、歯がための結果と同様、1回目と2回目の溶出-移行量が近似し、平成10年度の結果と比較すると1/3.1量に減少した。また唾液量とDNP溶出-移行量を比較しても直接相関関係が見られなかった。ガラガラ(DNP32%含有)の場合、DNPの含有量は歯がためのそれに近似し、被験者9人の平均DNP溶出-移行量は64.3μg/hr±37.5であり、歯がためでの溶出-移行量と近似した。さらに、

DNPを58%含有するおしゃぶりの溶出量と比較すると、ヒト唾液への溶出-移行量は試験片に含まれるDNP含有量に関係するものと考えられる。

つぎに、おしゃぶり、歯がため、ガラガラそれぞれの試験片における15分間ずつの区分間での溶出量(図-7)を検討すると、DNPの溶出量は第1区分が多く、移行第2, 3, 4区分と減少する傾向がみられ、前報Ⅱでの回転振とう方式による人工唾液への溶出傾向と良く一致することがわかった。

ヒトのchewingによる口腔内唾液へのフタル酸エステル溶出-移行量

PVC製玩具のDEHP31%を含有するソフト人形Aと、DHP25%含有するソフト人形の2種類についてchewingによる唾液への溶出-移行試験を行った。被験者数はソフト人形Aが5人、ソフト人形Bが4人である。得られた結果を表-7と図-8にそれぞれ示した。

ソフト人形Aとソフト人形Bとも被験者の唾液量は、歯がため、おしゃぶり、がらがらでの実験で得られた唾液量とほぼ同じであった。

また、ソフト人形AのDEHP含有量(31%)はガラガラのDNP含有量(32%)とほぼ同じであるが、DEHP溶出-移行量は5人の平均で32.6μg/hr±11.5であり、ガラガラからのDNP溶出-移行量と比較し1/2量に減少していた。さ

表-7 被験者のchewingによるPVC製玩具から唾液へのDEHPまたはDHP溶出量

ソフト人形A(31%DEHP含有)		ソフト人形B(25%DHP含有)	
被験者	DEHP 溶出量 [唾液量] μg/hr [mL/hr]	被験者	DHP 溶出量 [唾液量] μg/hr [mL/hr]
DA	33.4 [38.0]	EA	4.76 [28.0]
DB	50.2 [17.5]	EB	6.72 [78.0]
DC	31.2 [25.0]	EC	10.7 [44.0]
DD	18.0 [44.5]	ED	5.60 [91.5]
DE	30.0 [45.0]		
平均	32.6±11.5	平均	6.95±2.83
唾液量	17.5~45.0mL/hr	唾液量	28.0~91.5mL/hr
唾液pH	7.3~7.5	唾液pH	7.1~7.3

PVC製玩具: 各玩具を表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。
DEHP: フタル酸ジ-エチルヘキシル
DHP: フタル酸ジヘプチル

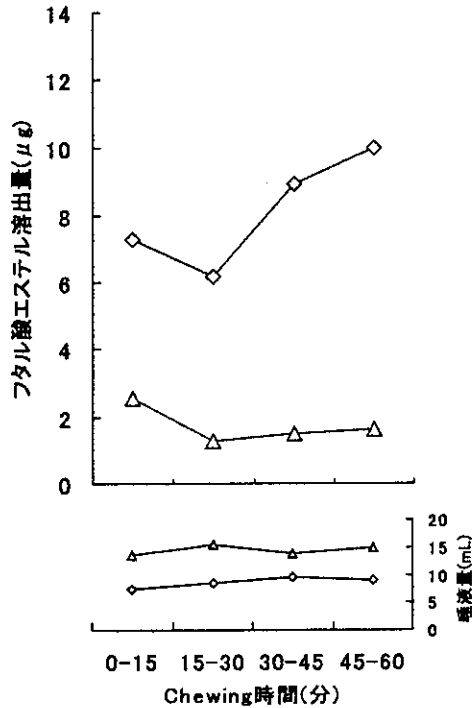


図-8 被験者のchewingによるPVC製玩具から唾液へのDEHPとDhP溶出及び唾液分泌量とchewing時間の関係
 PVC製玩具: 表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。15分間あたりの溶出量及び唾液分泌量◇:ソフト人形A (DEHP32%含有), △:ソフト人形B (DhP25%含有)
 フタル酸エステル溶出量: 被験者4~5人の平均値

らに、ソフト人形BのDhPにおいては、その唾液への溶出-移行量は4人の平均で6.95 μg/hr ± 2.63であった。

ソフト人形AからのDEHPと、ソフト人形BからのDhPの15分間での区分間溶出-移行量(図-8)をみると、DEHPは第1, 2区分が第3, 4区分と比較し、若干ではあるが少なく、またDhPは第1, 2, 3, 4区分間に差が生じていない。前報IIで報告した回転振とう方式による人工唾液への溶出試験において、ソフト人形AからのDEHPとソフト人形BからのDhPの人工唾液への溶出は、それぞれ第1区分で溶出量が多く、以降第2, 3, 4区分と減少する溶出傾向が見られた。このことより、口腔内の唾液へ溶出-移行したDEHPおよびDhPが、脱エステル化され、フタル酸モノエステルに変化していると考え、以下の予備的な実験を行った。

10%のDBPおよび18%のDEHPそれぞれを含

有するボールを被験者5人が60分(15分×4区分)間chewing試験を行った。得られた唾液にアセトニトリルを加え、DBPおよびDEHP溶出-移行量を測定したところ、5人の平均でDBPが29.8 μg/hr ± 30.2 およびDEHPが75.9 μg/hr ± 22.5であった。さらに、唾液中のモノエステル体の存在を確認するため、各被験者の4区分間の調整唾液を合わせ、フタル酸モノエステルを20%ジクロロメタン含有n-ヘキサン抽出し、その抽出液をTMSDにてメチルエステル化し、GC-MSのSIMモードにてフラグメントイオンm/e163を測定した。その結果、MBPおよびMEHPの存在を確認した。また、推定量ではあるが、MBPが14 μg/hr およびMEHPが3.12 μg/hrであり、DBP溶出-移行量の約50%およびDEHPの約3%の量であった。このことより、ボールより溶出-移行したDBPおよびDEHPが唾液の中で脱エステル化され、MBPおよびMEHPに変化した可能性が示唆された。現在これらのフタル酸ジエステルからモノエステル体の生成機構について検討中である。

4. まとめ

平成10年度、ヒト口腔内におけるPVC製玩具へのDINP溶出-移行試験を予備的に行った。本年度は平成10年度の結果に基づき、被験者の人数を30人(のべ54人)に増やし、実験を行った。得られた結果は以下のものである。

- 1) おしゃぶり(DINP58%含有)または歯がため(DINP36%含有)試験片を同一被験者が同種試験片を2回chewing実験し、その溶出-移行量は95.8 μg/hr ± 29.8と101 μg/hr ± 40.2 または53.2 μg/hr ± 25.6と52.1 μg/hr ± 20.7であった。また、ガラガラ(DINP32%含有)試験片からは64.3 μg/hr ± 37.5溶出-移行した。
- 2) おしゃぶり、歯がため、ガラガラからのDINP溶出-移行量は平成10年度の結果と比較すると3試験片ともに大幅に減少してい

たが、これは口腔内での試験片の転がし方に前回と差が生じたためと考えられる。

- 3) ソフト人形 A(DEHP31%含有)試験片からは $32.6 \mu\text{g/hr} \pm 11.5$, ソフト人形 B(DHP25%含有)試験片からは $6.95 \mu\text{g} \pm 2.6$ それぞれ溶出-移行した。
- 4) DINP を含有する 3 試験片は 15 分間の区分間での溶出量が第 1 区分で多く以降第 2, 3, 4 区分と減少する傾向が得られた。一方, DEHP または DHP 含有試験片では第 1~4 区分で溶出量にあまり差が見られなかった。
- 5) ボール(DBP10%および DEHP18%含有)試験片を chewing し, 得られた唾液中に DBP および DEHP の脱エステル体である MBP および MEHP の存在を確認した。

5. 結論

平成 11 年度における玩具からのフタル酸エステルの溶出に関する調査研究は, 平成 10 年度の厚生科学研究での結果に基づいて, とくにフタル酸エステルの分析法においては, フタル酸ジエステルの脱エステル化物質, フタル酸モノエステルの HPLC 分析法とその GC-MS による確認法を主な検討事項とした。

また, 玩具からのフタル酸エステルの溶出に関する調査研究に関して, 人工唾液による溶出試験では, 振とう方式を平成 10 年度の上下振とう方式から回転振とう方式に代え, さらに, 本年度は新たに溶出液温度を制御した溶出条件の検討を行った。

成人の chewing による唾液への溶出-移行試験では, 平成 10 年度の被験者(本実験従事者)3 人における予備実験の結果に基づき, 本年度は被験者(学生)数を 30 人, のべ 54 人と大幅に増やし, chewing 実験を実施した。以下, ここに平成 10 年度と 11 年度の試験研究を比較し, 総括する。

I. HPLC 分析

フタル酸ジエステルとモノエステルの HPLC 分析は逆相系カラムで同一条件での一斉分析は困難である。ジエステル体は移動相をアセトニトリル・水をリニアグラジエント法にてアセトニトリル 100%とすることで, 一斉分析が可能であった。

また, モノエステル体は分子中に遊離のカルボキシル基を持っているため, 移動相を酸性にする必要がある。種々検討した結果, アセトニトリル・2%酢酸水溶液(8:2)で, モノエステルのうち MBP および MEHP を分析し, 分離良好なクロマトグラムを得ることができた。また, 確認にはカルボキシル基をメチルエステル化し, GC-MS にて行う方法が可能であった。

II. 回転振とうによる人工唾液への溶出試験

振とう方式を回転式に代え, “おしゃぶり”, “歯がため” および “ガラガラ” に含有する DINP, さらに “ソフト人形” に含有する DEHP あるいは DHP それぞれについて人工唾液への溶出試験を行い, 溶出条件を設定した。その条件は, 溶出液量はパラツキが小さい 30mL とした。これは食品衛生法で定められている容器包装の溶出試験での条件 1cm^2 あたり 2mL と同様である。また振とう数は 300rpm/分, 溶出温度は $35 \pm 5^\circ\text{C}$ とし, 60 分内の溶出時間でパラツキの小さい良好な条件が得られた。平成 10 年度の結果と直接比較はできないが, 回転式がパラツキなどの点で優れていると考えられる。

また, 溶出時間 60 分間を 15 分ずつ区分し, その区分間での DINP, DEHP および DHP の溶出量をみると, 第 1 区分が多く, 以降第 2, 3, 4 区分と徐々に減少する傾向が見られた。これは平成 10 年度の試験結果と同じであり, 玩具の人工唾液による溶出法における溶出時間は, 最初の 10 分あるいは 15 分の溶出で十分準備できるものと考えられる。

III. 成人の chewing による溶出-以降試験

試験片は人工唾液への溶出試験に用いた

ものと同様のものを用いた。

今年度の実験結果は、60 分間の chewing 時間で、DINP 含有の“おしゃぶり”が 9 人平均で 1 回目 95.3 μ g, 2 回目 101 μ g, “歯がため”では 1 回目 53.2 μ g, 2 回目 52.1 μ g であり、2 試験片ともに 1 回目、2 回目ともほぼ同じ溶出-移行量であった。“ガラガラでは”9 人の平均で 64.3 μ g であった。

同様の試験片について、平成 10 年度でも同様の試験を行っているが、そのときの 60 分間の溶出-移行量は“おしゃぶり”で 3 人の平均 300 μ g, “歯がため”で 188 μ g および“ガラガラ”で 328 μ g であり、今年度のそれと比べると、それぞれ約 3 倍、3.5 倍および 5 倍大きいことがわかった。これは、平成 10 年度の chewing 試験は被験者が本研究に携わっており、すなわち、注意深く chewing し、DINP が唾液へ良好に溶出-移行するように行ったため、結果として本年度の結果との間に差が開いたものと考えられる。さらに前報 II における回転式振とうによる人工唾液への溶出試験の検討において DINP 溶出量が振とう数に依存する結果がえられている。このことからより注意深く chewing を行ない、口腔内で試験片をよく転がしたことが、溶出-移行量が多くなった原因であると推察される。

また、60 分間の溶出-移行量の傾向は、1 区分 15 分×4 区分の chewing から、第 1 区分の溶出-移行量は第 2, 3, 4 区分に比べ、多く、以降、除々に減少する傾向が得られた。この傾向は、人工唾液のそれに同様なものであった。

他のフタル酸エステル DEHP と DHPp では、DINP の溶出-移行と異なる結果であった。60 分間の溶出-移行量は“ソフト人形 A”の DEHP 32.6 μ g, “ソフト人形 B”の DHPp 6.95 μ g であった。また、溶出-移行区分では、第 1 区分、第 2, 3, 4 区分間の溶出量にそれぞれ、あまり差がなく、ほぼ一定の溶出量であった。

この現象はフタル酸ジエステルが唾液中

で脱エステルされ、フタル酸モノエステルに変化したものと考え、予備的実験として、DBP および DEHP を含有する“ボール”を 1 時間 chewing した結果、MBP および MEHP の存在を確認した。

今後の研究として、このフタル酸ジエステルからモノエステルの生成機構について検討を行う予定である。

6. 参考文献

- 1) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7, 17-34. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France (1987)
- 2) 中村好志他, 衛生化学, 33. 71 (1987)
- 3) EPA, Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis, *ibid.*, 106, 11 (1998)
- 4) Chris F.W., James C.L. IV, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 30, 140-155 (1999)
- 5) M. Sharman *et al.*, *ibid.*, 113. 375 (1994)
- 6) 食衛誌, Vol. 37, No. 2 85- (1997)

7. 研究発表

学会発表

- 1) 第 78 回日本食品衛生学会学術講演会(長野)
- 2) 日本薬学会第 120 年会(岐阜)

（総括・分担）研究報告書

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）

協力研究者 松木容彦、平林尚之 （財）食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨

生活環境が豊かになる一方、様々な化学物質による人体への影響が報告され、なかでもホルモン様作用を有する（外因性）内分泌かく乱物質に社会的関心が持たれている。とりわけ、生活関連用品由来の内分泌かく乱物質は、直接および間接的に体内に取り込まれ影響を及ぼすことから、様々な調査研究が進められてきた。

昨年度、我々は、乳幼児が種々のプラスチック製おもちゃをおしゃぶりしたときに溶出する可塑剤の曝露量を推定するための *in vitro* 試験法を確立することを目的に、フタル酸ジイソノニル（DINP）を指標として、縦（上下）振盪による *in vitro* 溶出法の溶出条件の基礎的検討を行った。

そこで本年度は、*in vitro* 試験法を確立するに当り、予め、成人被験者による Mouthing 実験を行い、唾液中 DINP の溶出レベルを調べた。その結果、試料として用いた歯がためからの DINP の溶出量はおよそ 1～数 $\mu\text{g}/\text{min}$ 、単位面積当り、 $0.1\sim 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ と推定された。

次に *in vitro* 溶出条件の追加検討として、歯がためを用い、試料の大きさ（表面積）と溶出液量の関係が DINP の溶出に及ぼす影響について調べたところ、一定範囲の表面積を有する試料に対し定容量の溶出液で溶出することにより、試料の単位面積当り一定レベルの DINP が溶出すると推測された。そこで、昨年度実施した歯がため（3 cmφ 円形ディスク、表面積約 17.4 cm^2 ）の溶出試験結果を調べたところ、単位面積当りの DINP 溶出量は約 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ と、先の Mouthing 実験での DINP 溶出量とほぼ同程度の溶出レベルを示すことから、縦振盪による *in vitro* 溶出法では試料の表面積を約 15 cm^2 、溶出液量を 30 mL に設定した。

一般におもちゃは様々な大きさや形をしており、定形の試験試料を得ることは困難である。そこで *in vitro* 溶出試験で用いる試料の形状と DINP 溶出量の関係について、3 cmφ 円形ディスクを基に形状の違いによる DINP 溶出量を調べた。すなわち、表面積約 15 cm^2 の異なる形状の試料をそれぞれ同一条件で溶出したところ、各試料の単位面積当りの DINP の溶出量はおよそ $0.7\sim 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ と、ほぼ近似した溶出結果が得られ、形状によりやや高い値を示すものの、いずれも成人の Mouthing に近い溶出レベルを示した。

以上、歯がためを用いて DINP の *in vitro* 溶出条件を検討した結果、溶出容器に 50 mL の遠心管を用い、表面積が約 $8\sim 25 \text{ cm}^2$ 試料を 30 mL の溶出液中で縦（上下）振盪により 10～30 分間溶出するとき、試料の形状の違いによる影響が少なく成人の Mouthing に近似した DINP の溶出レベルを示すことが明らかとなった。

A. 研究目的

先に我々は、フタル酸エステル等の暴露に関する調査研究班においてポリ塩化ビニル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（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）の一環として、乳幼児のフタル酸エステル類の暴露量を推定するための *in vitro* 溶出法を確立すべく溶出条件の基礎的検討を行った。

本年度は、その継続研究としてより詳細な溶出条件の検討を行い *in vitro* 溶出法を確立した。また、ヒトでの Mouthing 時におけるフタル酸エステル類の溶出を推定する外挿法としての本法の妥当性について考察した。

B. 研究方法

本研究では、社団法人日本玩具協会より供与されたおもちゃの中からから“歯がため”（DINP 約30%含有）を試料として用いた。

1. Mouthing による唾液中への DINP の溶出 (Mouthing 実験)

1) 歯がため全形 (おもちゃそのもの) による Mouthing 実験

試料：歯がため全形 (Mouthing 面積は約 10~20 cm²)

被験者：成人男性 (5名、27~55歳)

Mouthing 条件：被験者 (5名) に5分間、試料を Mouthing させ、分泌される唾液をガラス製の遠心管に採取した。唾液分泌量を計った後、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により DINP 溶出量を測定した。

DINP の測定：唾液に等量のアセトニトリルを加えて混和した後、その 1 mL をヘキサン 4 mL で抽出した。このヘキサン層 2 mL を室温、窒素気流下濃縮

乾固し、残渣をアセトニトリル 0.5 mL に溶解して HPLC 試料とした。

HPLC 条件：“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1. フタル酸エステル等の暴露に関する調査研究（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））参照。

測定項目：唾液分泌量および DINP 溶出量。

2) 円形試料 (試験片) による Mouthing 実験

試料：2 cmφ 円形ディスクに打ち抜いた歯がため (表面積約 8.48 cm²)

被験者：成人男性 (25名、21~55歳)

Mouthing 条件：被験者 (25名) に15分間試料を Mouthing させ、分泌される唾液をガラス製の遠心管に採取した。唾液分泌量および pH を計った後、HPLC 法により DINP 溶出量を測定した。また、一部の被験者については、同一試料を用いて繰り返し Mouthing 実験を行った。

DINP の測定：1.1) の歯がため全形による Mouthing 実験と同様。

HPLC 条件：1.1) の歯がため全形による Mouthing 実験と同様。

測定項目：唾液分泌量、pH および DINP 溶出量。

3) 唾液からの DINP の回収実験

ブランク唾液に DINP の標準溶液を加えた添加試料 (4 および 20 μg/mL、各濃度 n=3) について、上述の Mouthing 実験と同様に HPLC 法により DINP 量を測定し、添加量に対する回収率とそのバラツキを調べた。また、1.2) の円形試料による Mouthing 実験で得られた唾液 (3名、n=3) の DINP 量

を測定し、測定操作のバラツキを求めた。

2. *in vitro* 溶出条件の検討

以下に本研究で用いた基本的な *in vitro* 溶出条件を示した。なお、詳細については“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、1. フタル酸エステル等の曝露に関する調査研究（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））を参照。

試料 : 歯がため
 溶出方法 : 縦（上下）振盪（室温、300 stroke/min、10 分間）
 溶出液 : 人工唾液（pH 6.8～7）
 DINP の測定 : HPLC 法による。

1) 試料の大きさ（表面積）と溶出液量の関係が DINP の溶出に及ぼす影響

① 表面積の異なる試料を上記条件下 30 mL の溶出液で溶出し、HPLC 法により DINP 溶出量を測定した。

形状	表面積	溶出液量
2 cmφ円形ディスク (1個)	約 8.48 cm ²	30 mL
2 cmφ円形ディスク (2個)	約 17.0 cm ²	30 mL
2 cmφ円形ディスク (3個)	約 25.4 cm ²	30 mL

② 表面積の異なる試料を上記条件下単位面積当り等量（約 2 mL/cm²）の溶出液で溶出し、HPLC 法により DINP 溶出量を測定した。

形状	表面積	溶出液量
2 cmφ円形ディスク (1個)	約 8.48 cm ²	15 mL
3 cmφ円形ディスク (1個)	約 17.4 cm ²	30 mL

2) 試料の形状と DINP 溶出量の関係

表面積約 15 cm² の形状の異なる試料を上記条件下で溶出し、HPLC 法により DINP 溶出量を測定した。

形状	表面積	溶出液量
3 cmφ円形ディスク (1個)	約 17.4 cm ²	30 mL
2 cmφ円形ディスク (2個)	約 17.0 cm ²	30 mL
半径 1 cm の扇型 (6個)	約 16.9 cm ²	30 mL
2×3 cm 角型プレート (1個)	約 15.5 cm ²	30 mL
2×3 cm 三角プレート (2個)	約 18.0 cm ²	30 mL

C. 研究結果

1. Mouthing による唾液中への DINP の溶出量の比較 (Mouthing 実験)

歯がため全形および 2 cmφ 円形ディスクを Mouthing した被験者の唾液中 DINP 溶出量の測定結果を Table 1 および Table 2 に、同一被験者が同一試料を繰り返し Mouthing したときの唾液中 DINP 溶出量の測定結果を Table 3 に示した。以下にその結果を要約した。

成人被験者が歯がため全形および 2 cmφ 円形ディスクを Mouthing したときの唾液分泌量は、それぞれ 3～14 mL（平均 8.4 mL ±48.1%）および 7～43 mL（平均 18.0 mL ±47.6%）であり、分泌量の差は被験者間で最大約 6 倍あった。また、分泌された唾液の pH は pH 6～8 であった (Table 1, 2)。

Mouthing による DINP の総溶出量は、歯がため全形では 3.22～65.4 μg（平均 33.2 μg ±80.3%）、2 cmφ 円形ディスクでは 2.92～51.1 μg（平均 23.2 μg ±50.9%）であり、いずれの実験においても被験者間におよそ 20 倍の違いがあった。また、両者を単位時間当りの溶出量で比較すると、それぞれ 0.644～13.1 μg/min、平均 6.64 μg/min および 0.195～3.41 μg/min、平均 1.55 μg/min であり、歯がため全形からの溶出がおよそ 4 倍高かった (Table 1, 2)。

同一被験者が同一試料を繰り返し Mouthing したときの DINP 総溶出量の変動（歯がため全形：1名、3回、2 cmφ 円形デ

ディスク：3名、各3回)は、それぞれ約14%および26~35%であり、各験者間の総溶出量の変動のほぼ1/2であった (Table 3)。

ブランク唾液中に DINP 標準液を加えた添加試料 (4 および 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、各濃度 $n=3$) を用いて唾液中からの回収率を調べた結果、DINP の添加量に対する回収率はそれぞれ 99.9% および 102.9%、バラツキはそれぞれ 4.1% および 1.0% であった。また、円形ディスクの Mouthing 実験で得られた唾液 (被験者 3 名、DINP 濃度約 0.7~2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をそれぞれ 3 回処理して唾液中 DINP 量を算出し、唾液中 DINP の測定操作の再現性を調べたところ、各被験者の唾液中 DINP 量の変動は 0.3~8.8% と良好であった (Table 4)。

2. *in vitro* 溶出法の検討

歯がためを用い、試料の大きさ (表面積) と溶出液量との関係が DINP の溶出に及ぼす影響について調べた。以下にその結果を示す。

まず、表面積と溶出液量との関係が DINP の溶出に及ぼす影響を調べるために 2 cm ϕ 円形ディスク (約 8.48 cm^2) 1、2 および 3 個をそれぞれ液量 30 mL の定容量の溶出液で溶出したときの DINP の溶出量を比較した。その結果、DINP の総溶出量の平均値は円形ディスク 1 個 (総表面積約 8.48 cm^2) では 80.9 $\mu\text{g} \pm 27.7\%$ 、2 個 (総表面積約 17.0 cm^2) では 158 $\mu\text{g} \pm 18.9\%$ 、3 個 (総表面積約 25.4 cm^2) では 214 $\mu\text{g} \pm 12.5\%$ と、表面積の大きさに比例して DINP の溶出量が増加した。また、この DINP の溶出を単位面積当りの溶出量で比較すると、いずれも約 0.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ であり、単位面積当りの溶出量はほぼ同程度であった (Table 5)。

次に、2 cm ϕ 円形ディスク (約 8.48 cm^2) と 3 cm ϕ 円形ディスク (約 17.4 cm^2) をそれぞれ 1 個用い、15 および 30 mL と試料の表面積に応じて液量を変え、単位面積当り約 2 mL/cm^2 の等量の溶出液で溶出したときの DINP の溶出量を比較した。その結果、DINP の総溶出量の平均値は 2 cm ϕ 円形ディスクでは 566 $\mu\text{g} \pm 40.3\%$ 、3 cm ϕ 円形ディスクでは 157 $\mu\text{g} \pm 35.5\%$ と、表面積が小さい 2 cm ϕ 円形ディスクの方がより多くの DINP を溶出した。なお、両者の単位面積当りの溶出量はそれぞれ 6.67 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 、0.902 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ であり、約 7 倍の差があった (Table 6)。

試料の形状と DINP 溶出量との関係を調べるために、表面積がほぼ同じ (平均表面積 17.0 $\text{cm}^2 \pm 5.4\%$) で形状の異なる 5 つの試料 (各 $n=3$) を同一条件下で溶出して溶出する DINP 量を比較した。その結果、各形状毎の DINP の総溶出量の平均値は、3 cm ϕ 円形ディスク (1 個、約 17.4 cm^2) では 109~156 μg 、平均 126 μg 、2 cm ϕ 円形ディスク (2 個、約 17.0 cm^2) では 141~172 μg 、平均 158 μg 、2 \times 3 cm 角型プレート (1 個、約 15.5 cm^2) では 178~297 μg 、平均 249 μg 、2 \times 3 cm 三角プレート (2 個、約 18.0 cm^2) では 292~420 μg 、平均 362 μg 、半径 1 cm の扇型 (6 個、約 16.9 cm^2) では 207~233 μg 、平均 222 μg であり、各形状毎の溶出量のバラツキはそれぞれ約 19~30% であった。また、この DINP の溶出を単位面積当りの溶出量で比較するとそれぞれ 0.726~2.01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ であり、最も溶出量の多い 2 \times 3 cm 三角プレートと最も少ない 3 cm ϕ 円形ディスクではおよそ 3 倍の差が見られた (Table 7)。

D. 考 察

1. Mouthing による唾液中への DINP の溶出 (Mouthing 実験)

被験者延べ 30 名の Mouthing 実験における唾液分泌量はおよそ 0.5~3 mL/min と被験者間の差は約 6 倍であり、一方、同一被験者延べ 4 名が繰り返し 3 回の Mouthing 実験を行ったときの同一被験者での唾液分泌量の差は 1.4~1.6 倍と、各被験者間の唾液分泌量の差のおよそ 1/4 と小さいことから、Mouthing 時の唾液分泌量には個人差があるものの、各人の唾液分泌量は毎回ほぼ一定に分泌される傾向が見られた (Table 1~3)。なお、オランダコンセンサスグループによる延べ 40 名の成人被験者の調査結果 (RIVM report 613320 002, Konemann, W.H., ed., 1998) においても、我々と同様に被験者間の唾液分泌量には大きな差が見られている。

被験者に実際のおもちゃの使用状態を想定して歯がため全形を Mouthing させたとき、歯がためから試験的に調製した円形ディスクを Mouthing させたときの唾液分泌量を比較したところ、唾液分泌量は同等、もしくは歯がため全形を Mouthing したときの方が多く分泌される傾向が見られた (Table 1 および 2)。一方、オランダコンセンサスグループの報告では、試験的に調製した円形ディスクを Mouthing したときの方が実際の使用状態を想定したおもちゃ全形の Mouthing に比し、唾液分泌量が多かったことから、試料すなわち、おもちゃの形状等により Mouthing 時の唾液分泌量が変化すると考えられる。

歯がため全形とその円形ディスク、状態の異なる試料を用いた Mouthing 実験において単位時間当りの唾液分泌量と DINP の総溶出量を比較したところ、共に唾液分泌量と DINP の溶出量に関連性は見られなかった

(Fig 1)。

また、これら 2 つの Mouthing 実験における DINP の溶出を比較するために、単位面積、単位時間当りの溶出量を調べたところ、歯がため全形 (推定 Mouthing 面積 10~20 cm²) では 0.0429~0.873 μg/cm²/min、2 cmφ 円形ディスク (Mouthing 面積約 8.48 cm²) では 0.0230~0.402 μg/cm²/min であり、実際の使用状態を想定して歯がため全形を Mouthing したときの方が約 2 倍高い溶出を示し、このような傾向はオランダコンセンサスグループでも同様に報告されている。

以上の結果、Mouthing 実験において実際の使用状態を想定しておもちゃ全形を Mouthing するときと試験的に調製したおもちゃ片を Mouthing する場合には、唾液分泌量との関連性は見られないが Mouthing の方法や強さ等により、溶出する DINP 量に若干の差が生じる可能性が示唆された。

2. Mouthing 実験と *in vitro* 溶出法の関係

今回実施した歯がため全形および円形ディスクによる Mouthing 実験の結果、成人被験者が歯がためを Mouthing したときに溶出する DINP 量は、およそ 0.1~1 μg/cm²/min と推定された。一方、昨年度我々が報告した縦 (上下) 振盪による *in vitro* 溶出法では歯がため (3 cmφ 円形ディスク) からおよそ 0.5 μg/cm²/min の DINP が溶出しており、先の成人での Mouthing と同程度の溶出傾向を示した。そこで本年度は、*in vitro* 試験法を確立するに当たり、これらの結果を踏まえ、*in vitro* 溶出条件を吟味すると共に、試料の大きさ (表面積) と溶出液量が DINP 溶出に及ぼす影響ならびに試料の形状と DINP 溶出量の関係について検討を行った。

円形ディスクによる Mouthing 実験の結果、Mouthing 時の唾液の pH は pH 6~8 であった。従って、*in vitro* 溶出法に用いる溶出液には pH 7 付近に調整した人工唾液が妥当と考えられた。また、昨年度行った *in vitro* 溶出条件の検討の結果、生理的 pH の範囲 (pH 6~8.5) では溶出液の pH と DINP の溶出に関連性は見られず、Mouthing 時の唾液 pH の違いは DINP の溶出にほとんど影響を与えないと考えられた。

同一被験者が同一試料を繰り返し Mouthing したところ、毎回ほぼ同レベルの DINP が溶出したことから、DINP の溶出量は Mouthing の時間にほぼ比例して増えると推測される。従って、*in vitro* 溶出法における溶出 (振盪) 時間の設定においても、振盪時間に比例して DINP の溶出量が増加する時間帯、すなわち、昨年度の検討の結果、振盪時間 10~30 分間に設定するのが妥当と思われる。

溶出容器 50 mL の遠心管としたときの試料の大きさ (表面積) と溶出液量を設定するために、昨年度の溶出試験条件を基に、試料の表面積と溶出液量の関係が DINP の溶出に及ぼす影響について調べた。まず、2 cm φ 円形ディスクを 1、2 および 3 個 (表面積約 8.48~25.4 cm²) 用い、それぞれ液量 30 mL の定容量の溶出液で溶出を行い DINP 溶出量を比較して表面積との関係を調べたところ、DINP の総溶出量は 80.9~214 μg とほぼ表面積に比例して増加した ($r = 0.99584$)。さらに、このときの単位面積当りの溶出量はいずれの場合においてもほぼ 0.9 μg/cm²/min と同レベル溶出であり、これらの結果、試料の大きさ (表面積) が多少異なる場合であっても同一溶出条件で溶出試験を行うことにより、試料間の DINP 溶出量を比較することが可能であると考えられた

(Table 5)。

次に、2 cm φ 円形ディスク 1 個 (表面積約 8.48 cm²) と 3 cm φ 円形ディスク 1 個 (表面積約 17.4 cm²) を用い、15 および 30 mL と試料の表面積に応じて液量え、単位面積当り等量 (約 2 mL/cm²) の溶出液で溶出し、溶出する DINP の量を比較して溶出液量との関係を調べた。その結果、表面積が小さい 2 cm φ 円形ディスクの方が総溶出量で約 3.6 倍、単位面積当りの溶出量では約 7.4 倍高い溶出を示した。この原因としては溶出容器中での試料と溶出液の動きが相互に関連していると考えられるが明確な理由については判らなかつた (Table 6)。

また、これら 2 つの検討において、溶出液量を 30 mL として試料の溶出を行った場合、表面積約 8.48~25.4 cm² の試料からの DINP の溶出量はおよそ 0.9 μg/cm²/min であり、成人が歯がためを Mouthing したときの溶出 (0.1~1 μg/cm²/min) と同程度の溶出傾向を示した。従って、*in vitro* 溶出法によりヒトでの Mouthing を推定するためには試料の大きさ (表面積) としては 15 cm² 付近、溶出液量は 30 mL 程度に設定するのが妥当と考えられた。

実際のおもちゃは大きさや形状が多種多様であり、種々のおもちゃについて溶出試験を行うには必ずしも 3 cm φ 円形ディスク試料を得がたい場合もある。そこで試料の形状の違いが DINP の溶出に及ぼす影響を調べるために、歯がためから表面積がほぼ同程度 (平均表面積 17.0 ± 5.4%) で形状の異なる 5 つの試料を採取し、同一条件下で溶出した時の DINP 溶出量を比較して形状違いによる影響を確認した。その結果、形状の異なる各試料の単位面積当りの DINP 溶出量の平均値は 0.7~2 μg/cm²/min であり、角型プレートと三角プレートでやや高い値を

示したものの、成人での Mouthing に近似した溶出レベルであることから、形状の異なる試料に対しても同様の溶出条件により DINP の溶出量を推定できると考えられる (Table 7)。

E. 結論

昨年度および本年度の検討結果より、以下のような結論を得た。

DINP (30~40%) を含有するおもちゃについて、下記条件下で溶出試験を行うことにより採取する各試料の形状の違いにより溶出量がやや高値を示す場合があるものの、比較の変動が少なく、かつ、ヒトでの Mouthing に近似した DINP の溶出レベルを推定する外挿法になると思われる。

in vitro 溶出条件

溶出容器：50 mL ガラス製遠心管

試料：表面積約 8~25 cm²

溶出方法：縦（上下）振盪（室温、300 stroke/min、10~30 分間）

溶出液：人工唾液（pH 6.8~7、2 mL/cm²、約 30 mL）

DINP の測定：試料および溶出液を 50 mL の遠心管に入れ、縦振盪法により溶出する。得られる溶出液と等量のアセトニトリルを加え混和した後、その 100 μL を HPLC に注入し DINP 量を測定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表（平成 10 年度分）

○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（長野）

G. 知的所有権の取得状況

なし

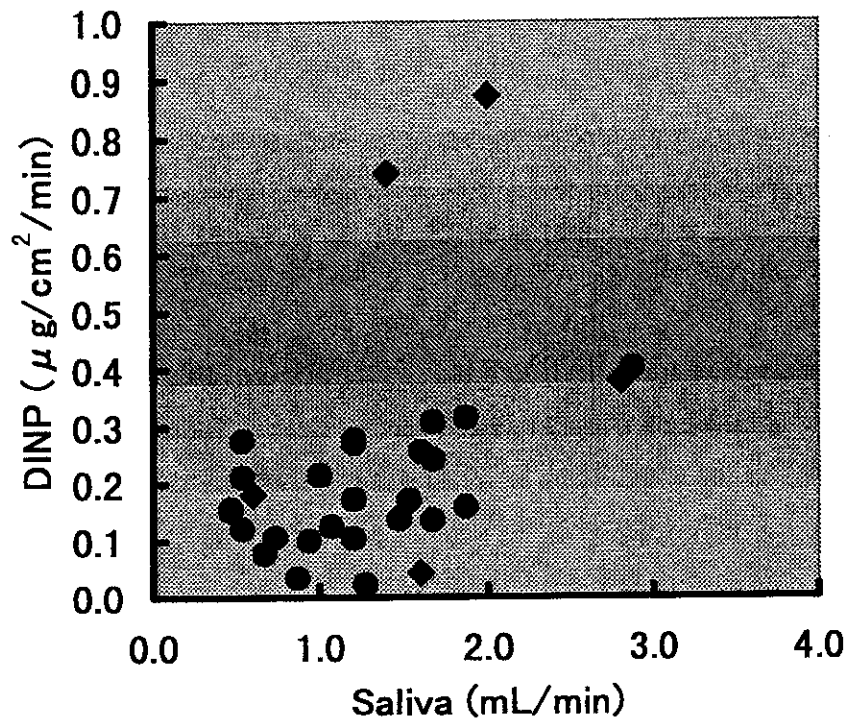


Fig. 1 唾液分泌量と DINP 溶出量の関係

◆ 歯がため全形 (被験者5名)

● 2 cm φ 円形ディスク (被験者25名)

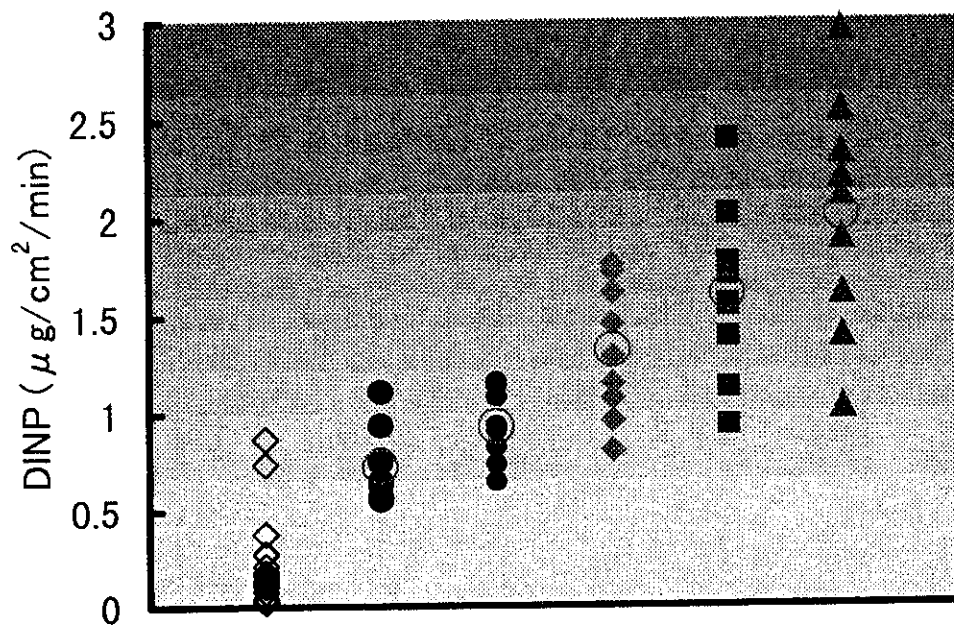


Fig. 2 試料の形状と DINP 溶出量の関係

◇ Mouthing 実験 (延べ30名) ● 3 cm φ 円形ディスク

● 2 cm φ 円形ディスク

◆ 扇形

■ 角型ディスク

▲ 三角プレート

○ 各試料形状毎の平均値

Table 1 Mouthing による歯がため全形からの DINP の
DINP の溶出

Volunteer		Saliva	Extract of DINP		
		mL	μg	$\mu\text{g}/\text{min}$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$
1	E	7	55.4	11.1	0.739
2	F	8	3.22	0.644	0.0429
3	Q	14	28.4	5.68	0.379
4	R	10	65.4	13.1	0.872
5	U	3	13.5	2.70	0.180
Mean		8.4	33.2	6.64	0.443
CV%		48.1	80.3	80.4	80.2

被験者に歯がため全形を5分間 Mouthing させた。

Table 2 Mouthing による円形ディスクからの DINP の
DINP の溶出

Volunteer		Saliva	Extract of DINP		
		mL	μg	$\mu\text{g}/\text{min}$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$
1	A	18	13.4	0.893	0.105
2	B	22	17.6	1.17	0.138
3	C	16	16.0	1.07	0.126
4	D	10	9.92	0.661	0.0780
5	E	18	34.3	2.29	0.270
6	F	28	20.2	1.35	0.159
7	G	13	4.42	0.295	0.0347
8	H	18	35.2	2.35	0.277
9	I	8	27.0	1.80	0.212
10	J	8	15.5	1.03	0.122
11	K	19	2.92	0.195	0.0230
12	L	7	20.0	1.33	0.157
13	M	25	39.1	2.61	0.307
14	N	43	51.1	3.41	0.402
15	O	14	12.8	0.853	0.101
16	P	15	27.3	1.82	0.215
17	Q	25	30.7	2.05	0.241
18	R	11	13.6	0.907	0.107
19	S	18	22.0	1.47	0.173
20	T	7	19.7	1.31	0.155
21	U	8	34.9	2.33	0.274
22	V	23	21.7	1.45	0.171
23	W	25	17.2	1.15	0.135
24	X	28	40.0	2.67	0.314
25	Y	24	32.5	2.17	0.256
Mean		18.0	23.2	1.55	0.182
CV%		47.6	50.9	50.8	51.0

被験者に 2 cm ϕ 円形ディスクを15分間 Mouthing させた。

Table 3 繰り返し Mouthing による DINP の溶出

Volunteer	Saliva mL	DINP (μg)	
		Mean	CV%
歯がため全形			
	13	30.0	
Q	12	31.3	28.4
	18	23.9	(14) (22.5)
2 cm ϕ 円形ディスク			
	28	21.3	
F	18	15.2	20.9
	22	26.2	(23) (21.7)
	25	28.1	
Q	25	14.6	23.1
	34	26.7	(28) (18.6)
	11	12.5	
R	15	9.33	9.27
	13	5.98	(13) (15.4)

(): Saliva

歯がため全形: 5分間 Mouthing

2 cm ϕ 円形ディスク: 15分間 Mouthing

Table 4 唾液からの DINP の回収および唾液中 DINP 測定操作の再現性

Added DINP (μg)	Found μg	Recovery %
	4.27	104.7
4.08	3.98	97.5
	3.98	97.5
Mean	4.08	99.9
CV (%)	4.1	
	21.0	103.9
20.4	20.8	102.0
	21.2	103.9
Mean	21.0	102.9
CV (%)	1.0	

Saliva : 1 mL

	Volunteer		
	A	Q	T
DINP (μg)	13.6	28.1	19.6
	13.5	33.5	19.7
	13.1	30.6	19.7
Mean	13.4	30.7	19.7
CV%	2.0	8.8	0.3

Saliva : 1 mL

Table 5 試料の大きさの違いと DINP の溶出

Sample*	Extract of DINP		
	μg	$\mu\text{g}/\text{min}$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$
2cm ϕ \times 1 (8.48 cm ²)	47.2	4.72	0.534
	72.6	7.26	0.821
	69.0	6.90	0.781
	96.0	9.60	1.09
	119	11.9	1.35
	108	10.8	1.22
	67.8	6.78	0.767
	76.2	7.62	0.862
	72.6	7.26	0.821
Mean	80.9	8.09	0.916
CV(%)	27.7		27.8
2cm ϕ \times 2 (17.0 cm ²)	155	15.5	0.911
	194	19.4	1.14
	155	15.5	0.914
	159	15.9	0.935
	197	19.7	1.16
	183	18.3	1.08
	110	11.0	0.646
	125	12.5	0.734
	141	14.1	0.829
Mean	158	15.8	0.928
CV(%)	18.9		19.0
2cm ϕ \times 3 (25.4 cm ²)	194	19.4	0.764
	247	24.7	0.972
	209	20.9	0.823
	194	19.4	0.764
	251	25.1	0.988
	235	23.5	0.925
	170	17.0	0.669
	218	21.8	0.858
	211	21.1	0.831
Mean	214	21.4	0.844
CV(%)	12.5		12.4

* : 歯がため円形ディスク

溶出条件 : 縦振盪法 (人工唾液 30 mL、室温、300 stroke/min、10分間)

Table 6 溶出液量の違いと DINP 溶出

Sample*	Solvent mL	Extract of DINP		
		μg	$\mu\text{g}/\text{min}$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$
3cm ϕ (17.4cm ²)	30	216	21.6	1.24
		150	15.0	0.862
		105	10.5	0.603
		Mean	157	15.7
CV(%)		35.5	35.5	
2cm ϕ (8.48cm ²)	15	822	82.2	9.69
		490	49.0	5.78
		386	38.6	4.55
		Mean	566	56.6
CV(%)		40.3	40.2	

* : 歯がため円形ディスク

溶出条件 : 縦振盪法 (室温、300 stroke/min、10分間)

Table 7 試料形状の違いによる DINP 溶出

Sample	Extract of DINP			
	μg	$\mu\text{g}/\text{min}$	$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$	
3cm ϕ (17.4cm ²)	1	114*	11.4*	0.656*
		14.8**		15.2**
	2	156	15.6	0.899
		25.9		25.9
	3	109	10.9	0.647
		17.8		23.0
Mean(n=9)	126	12.6	0.726	
CV(%)	26.1		26.2	
2cm ϕ 2piece (17.0cm ²)	1	141	14.1	0.831
		19.3		19.3
	2	172	17.2	1.01
		23.7		23.8
	3	160	16.0	0.941
		13.4		13.6
Mean(n=9)	158	15.8	0.928	
CV(%)	18.9		19.1	
2cm ϕ \times 1/4 6piece (16.9cm ²)	1	207	20.7	1.23
		38.1		38.0
	2	226	22.6	1.34
		30.3		30.1
	3	233	23.3	1.38
		20.3		20.5
Mean(n=9)	222	22.2	1.32	
CV(%)	26.4		26.2	
2 \times 3cm (15.5cm ²)	1	178	17.8	1.15
		19.7		19.7
	2	297	29.7	1.91
		23.1		23.0
	3	273	27.3	1.76
		13.3		13.4
Mean(n=9)	249	24.9	1.61	
CV(%)	27.7		27.5	
Triangle 2 \times 3cm 2piece (18.0cm ²)	1	292	29.2	1.62
		36.6		36.4
	2	375	35.7	2.09
		38.1		38.1
	3	420	42.0	2.34
		9.2		9.2
Mean(n=9)	362	36.2	2.01	
CV(%)	29.6		29.7	

* : Mean (n=3)

** : CV(%) (n=3)

溶出条件

試料 : 歯がため (DINP 約 30%含有)

溶出容器 : 50 mL 遠心管

溶出液 : 人工唾液 (約 pH 7)、30 mL

溶出方法 : 縦振盪 (室温、300 stroke/min、10分間)

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

分担研究者 河村 葉子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 缶コーティングから飲料へのビスフェノールA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、缶入飲料の調査でビスフェノールA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ビスフェノールA含有量を測定したところ、コーヒーAではサイドシーム、コーヒーBと紅茶Bでは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。一方、改良缶では、側面及び底部はほぼ定量限界以下であり、サイドシームも大きく減少していた。

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、水60℃及び95℃30分間、20%エタノール60℃30分間、*n*-ヘプタン25℃60分間のいずれの条件においてもビスフェノールAの溶出はみられなかった。しかし、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、缶入飲料におけるビスフェノールAにほぼ近い値であった。また、溶出時間の増加とともに溶出量の増加がみられた。これらのことから、ビスフェノールAの溶出には、エポキシ樹脂のガラス転移温度である104℃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、改良缶では溶出量は3~6 ng/mLと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、ビスフェノールAの溶出量低減に極めて有効であったと判断された。

次に、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(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。ビスフェノールAは、紅茶、緑茶等の茶飲料から検出されたが清涼飲料及び酒類では検出されず、前回の調査と比べて高い含有量のものがなくなり、検出頻度、含有量ともに減少していた。一方、BADGE関連化合物については、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、残存量もビスフェノールA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。BADGE関連化合物については、EUの暫定基準値1 ppmを超える試料はみられなかったが、今後注視していく必要があると考える。

A. 研究目的

食品用の缶は、その内面をエポキシ樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂などでコーティングされている。エポキシ樹脂は原料がビスフェノールAであり、ポリ塩化ビニル樹脂は安定剤としてビスフェノールAを添加することから、コーティング中に遊離のビスフェノールAが存在しており、それらが缶内容物に移行することが知られている。我々はこれまで、コーヒー、紅茶、茶等の缶入飲料にビスフェノールAが多く残存することを明らかにしてきた。これらの加圧加熱殺菌処理が行われている缶入飲料は我が国で開発されたものであり、我が国における消費量は極めて高いが、欧米ではあまり普及していない。そのため、我が国におけるビスフェノールA摂取量においては、他の国々と比較して特異的に、缶入飲料からの摂取の寄与率が高いことが予想される。しかし、缶コーティングからのビスフェノールA溶出のメカニズムや各種ファクターの影響等については、まだ十分に明らかにされておらず、低減化にむけての方策を検討しておく必要があると考えられる。

また、ビスフェノールA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攪乱が疑われるものがあり、缶入飲料への溶出が懸念されるが、それらに関する報告はほとんどみられない。

そこで、缶コーティングから飲料へのビスフェノールA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の解明を行い、さらに缶入飲料中のビスフェノールA及び関連化合物の分析法を開発し、市販缶入飲料中のこれらの化合物の残存量を調査することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

1) 試料

① モデル缶：缶入飲料の調査においてビスフェノールA含有量が高かったコーヒーA及びB、紅茶A及びBに相当する未使用缶、及びその改良缶

② 市販缶入飲料：紅茶19検体、緑茶12検体、健康茶5検体、玄米茶4検体、ウーロン茶3検体、スポーツ飲料6検体、果汁飲料6検体、炭酸飲料2検体、ビール8検体、リカー類7検体の合計72検体、1999年10～11月に都内の小売店または自動販売機で購入した。

2) 試薬

標準品：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(BADGE)以上東京化成工業製、

ビスフェノールAビス(2,3-ヒドロキシプロピル)エーテル(ビスフェノールA四水酸化体、BADGE-40H)、ビスフェノールAビス-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピル)-エーテル(ビスフェノールA二塩素体、BADGE-2Cl)以上Fluka社製

水：MILLI-Q SP(Millipore社製)により製造した超純水

ポリスチレン固相カートリッジ：GL-Pak PLS-2、ジーエルサイエンス製

フィルター：サンプレップLCRI3-LH(直径13 mm, 孔径 0.5 μm) Millipore社製

3) 装置

フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)：JIR-3505 日本電子データム社製

高感度反射測定装置：IR-RSC 110 日本電子データム社製

高速液体クロマトグラフ(HPLC)：ポンプ LC-10AD、紫外可視分光検出器 SPD-10AVvp、蛍光検出器 RF-10Ax1、オートインジェクタ SIL-10Ax1、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

作所製

高速液体クロマトグラフ-質量分析計(LC/MS) : HP-1100 series LC/MSD Hewlett Packard製

4) 測定条件

① FT-IR(高感度反射測定装置付)

入射角及び反射角 : 30°

分解能 : 4 cm⁻¹

積算回数 : 100回

波数領域 : 250~4200 cm⁻¹

② HPLC/UV/FL

カラム : TSKgel ODS-80Ts (内径4.6 mm、長さ25 cm、粒径5 μm) 東ソー製

ガードカラム : ステンレスカラム (内径1.0 mm、長さ4.5 cm) にWhatman社製ODSゲルを充填したもの

カラム温度 : 50°C、流量 : 1.0 mL/min

移動相 : アセトニトリル-水 (6:4) から、リニアグラジエント10分間でアセトニトリル100%とし、20分間保持。

UV検出器 検出波長 : 217 nm

蛍光検出器 励起波長 : 275 nm

蛍光波長 : 300 nm

注入量 : 10 μL

③ LC/MS

カラム、ガードカラム及びカラム温度 : HPLC/UV/FLに同じ

流量 : 0.4 mL/min、注入量 : 30 μL

移動相 : 50 mM酢酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル (6:4) から、リニアグラジエント10分間で (5:95) とし、15分間保持。

イオン化法 : エレクトロスプレー (ESI)、ネガティブ (Nega) またはポジティブ (Posi)

ネブライザー : N₂ (Nega 30, Posi 50 psi)

乾燥ガス : N₂ (10 L/min, 350°C)

フラグメンター電圧 : Nega 100 V, Posi 50 V

測定モード : SIM (Nega m/z 227, Posi

m/z 358, 399, 435)

但し化合物の確認には以下の条件を用いた。

フラグメンター電圧 : Nega 140 V, Posi 80 Vまたは100 V

測定モード : SIM (Nega m/z 211, Posi m/z 191, 209, 227)

5) 材質判別

缶の天蓋部、側面部、底蓋部、サイドシームの4つの部位から試験片を切り取り、高感度反射測定装置付FT-IRに装着した。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材質を判別した。

6) 材質試験

缶を天蓋部、側面部、底蓋部、サイドシームの4部位にわけ、それぞれの内面の2×2 cm(サイドシームは1×4 cm)の範囲のコーティングをナイフで削り取った。ジクロロメタン5 mLを加えて、30分間超音波をかけ、1000 rpmで10分間遠心分離後、上清を減圧濃縮した。アセトニトリルに溶解してフィルターでろ過し、HPLC/UV/FLによりビスフェノールAを測定した。

7) 溶出試験

天蓋、底蓋ともに巻き締めた空缶を、サイドシームが下にくるように横に倒して置き、上方に穴を開けて内容量の溶出溶媒を注入した後、アルミホイルで上部を覆い、溶出試験を行った。溶出溶媒として水を用いた場合には、60°C及び95°C30分間、120°C10、30、60分間、20%エタノールを用いた場合には60°C30分間溶出試験を行った。溶出液は液量を缶の内容量に調整し試験溶液とした。n-ヘプタンを用いた場合には、25°C1時間溶出試験を行った後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、アセトニトリルに溶解して試験溶液とした。試験溶液はHPLC/UV/FLによりビスフェノールAを測定した。