

19990733

平成11年度厚生科学研究費補助金研究報告書

(医薬安全総合研究事業)

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究

(H10-医薬-016)

平成12年3月

は し が き

近年医療材料、化粧品、医薬部外品に含まれる化学物質の内分泌攪乱作用による人体への影響が注目されている。1996年に歯科用フィッシャーシーラントで処置された患者の唾液中に多量のビスフェノールAが溶出していることが報告されたことに端を発し、ビスフェノールAを出発物質とするBisGMAを含む歯科用レジン等や、ポリカーボネイト、ポリスルホンを含む血液透析器、歯科材料等の人体に対する影響が懸念されるに至った。

医療材料、化粧品、医薬部外品にはビスフェノールA、フタル酸エステル類、ベンゾフェノン、ノニルフェノール、オクチルフェノールなどのエンドクリン阻害物質（内分泌攪乱物質）が含まれている可能性があるが、その実体は十分明らかにされていない。またエンドクリン阻害物質の分析法について標準化した方法がないため計測値について不一致がある。

本研究は医療材料等の中のエンドクリン阻害物質の量を正確に把握し、その体液中への溶出量、経皮吸収量、曝露レベルにおける生体影響を明確にすることが医療材料のリスク評価に不可欠であるとの観点に立ち、医療材料等に含まれると想定されるエンドクリン阻害物質に関して、特にフタル酸エステルの発生毒性、歯科材料や血液透析器中のビスフェノールA等の含量と溶出量、化粧品中に含まれていると想定されるビスフェノールA、フタル酸エステルの経皮吸収、さらに分析法の予備的バリデーションを含めて総合的な研究を実施したものである。

本研究は平成10年から2年間の期間で実施し、既に平成10年度研究報告書を刊行したが、ここに平成11年度研究の成果についての総括研究報告書と分担研究者による分担研究報告書ならびに2年間の研究の総合研究報告書を刊行し、この分野の研究者にご高覧いただき、医療材料等におけるエンドクリン阻害物質の溶出規準やリスク評価の基礎の確立に資することを願うものである。

平成12年3月

東京医科歯科大学名誉教授
昭和大学歯学部客員教授
佐藤 温 重

目 次

研究報告概要	1	
総括研究報告	5	
		佐藤温重
フタル酸エステル等の発生毒性	13	
		江馬 眞
歯科材料中の分析	21	
		本郷敏雄
歯科材料中の分析	55	
		佐藤温重
プラスチック製医療用具中の分析	65	
		配島由二
化粧品、医薬部外品中の分析	75	
		徳永裕司
総合研究報告書概要	81	
		佐藤温重
総合研究報告書	85	
		佐藤温重
刊行した研究成果の別刷		
Further evaluation of developmental toxicity of di- <i>n</i> -butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats.	99	
		M. Ema, et al.
Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats.	107	
		M. Ema, et al.
Developmental effects of plasticizer butyl benzyl phthalate after a single administration in rats.	113	
		M. Ema, et al.
Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di- <i>n</i> -butyl phthalate during late pregnancy.	123	
		M. Ema, et al.
Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats.	131	
		M. Ema, et al.

別添 1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要

別添1 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名=医薬安全総合研究事業

研究課題名=医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究

国庫補助金精算所要額（円）=7,000,000

研究期間（西暦）=1998-1999

研究年度（西暦）=1999

主任研究者名=佐藤 温重（昭和大学）

分担研究者名(所属施設名)=江馬 眞(国立医薬品食品衛生研究所大阪支所), 本郷敏雄(東京医科歯科大学), 配島由二(国立医薬品食品衛生研究所), 徳永裕司(国立医薬品食品衛生研究所)

研究目的=医療材料等に含まれると想定されるエンドクリン阻害物質のビスフェノールA (BA)、フタル酸エステル類 (PAES) の含有量を把握し、その使用の際の溶出量、吸収量、曝露レベルにおける生体に対する作用を明確にすることは、医療材料などのリスク評価のために不可欠であるが、未だ明らかにされていない。そこで平成10年度の研究を進展させ、1) ジブチルフタレート (DBP) の発生毒性の感受期、2) 歯科材料中の BA の体液への溶出量の計測及び PAE の含有量の計測、3) プラスチック医療用具の血液透析器の BA 溶出量計測のための血清擬似溶媒の開発、4) 化粧品、医薬部外品中の分析として PAE の経皮吸収と界面活性剤の影響について検討し、医療材料などによるエンドクリン阻害物質の溶出試験基準及びリスク評価の基礎を確立する。

研究方法=1) フタル酸エステルの発生毒性: Wistar ラットの妊娠 12-14 日、妊娠 15-17 日または妊娠 18-20 日に DBP を 500, 1000, または 1500mg/kg を強制経口投与して、妊娠 21 日に開腹し、着床数、生存及び死亡胎仔数、胎仔体重、肛門-生殖突起間距離 (AGD)、AGD /胎仔体重比を測定した。生存胎仔の精巣下降不全の有無を調べた。2) 歯科材料中の分析: 新ロットの歯科用レジン (フィッシャーシーラント 4 種、コンポジットレジン 3 種、ボンディング材 3 種) の光重合試料 (径 5mm 厚さ 1mm)、及びポリカーボネイト (PC) 製矯正用ブラケット 2 種の試料をメタノールで抽出し、BA 含有量の計測、及び各試料を無菌の人工唾液、唾液中に 37 °C、1-32 週間浸漬し、経週の BA 溶出量を計測した。BA の定性定量は分光蛍光光度計を装着した HPLC 及び LC/MS で行った。また市販の裏装材 10 種の液および粉末中の PAES を定量した。液試料はヘキサンに溶解

し GC/MS で、また粉末試料はヘキサンにて溶出して GC/MS にて測定を行った。3) 市販プラスチック医療用具中の分析：牛血清浸漬時と同じ溶出量を与える擬似溶媒組成を検索するため 0, 5, 10, 15, 20 %エタノール/無蛍光水 (250ml) を PC 及びポリスルホン (PS) 製血液透析器の中空糸内外を 10ml/min の流速で 16 時間循環させた。循環溶媒 25ml を分取し減圧下で乾固させた後アセトニトリル/無蛍光水に溶解したのち HPLC で BA の分析を行った。4) 化粧品、医薬部外品中の分析：フタル酸ジエチル (DEP) の経皮吸収試験を行った。ハートレー系雄性モルモットの腹部皮膚を剥離し、無処置または界面活性剤で 2 時間処理した後 Franz 型拡散セルに装着、donor 側に水、10 mM ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液、10mM 塩化ベンザルコニウム (BK) 溶液あるいは 0.5%ポリオキシエチレン 10 オレイエーテル (POE・OE) 溶液を加え、receptor 側に 20 %プロピレングリコール溶液を加え 32 °C で 2 時間放置後、doner 側の溶媒を除去、DEP 溶液 (0.05%DEP20%エタノール溶液) を単独または界面活性剤と共に加え、16-24 時間後に receptor 側の溶液を 0.2ml 採取した。この液を用いて HPLC にて DEP の測定を行い、Flux を求めた。

結果と考察=1) フタル酸エステルの発生毒性：妊娠 12-14 日 DBP 投与ではオス胎仔の精巣下降不全、AGD の短縮が認められたが AGD /胎仔体重比には変化がなかった。妊娠 18-20 日投与では精巣下降不全は認められなかった。妊娠 15-17 日投与では精巣下降不全、AGD の短縮及び AGD /胎仔体重比の低下が認められた。オス胎仔における AGD の短縮及び精巣下降不全の発現の感受期は妊娠 15-17 日であることが明らかとなった (江馬分担)。2) 歯科材料中の分析：フィッシャーシーラント、コンポジットレジン、ボンディング材の旧ロットの硬化体には BA が微量含まれていたが、新ロットでは検出限界 (0.5ng/g) 以下であり、製品の安全化がメーカーによりなされていることが明らかとなった。PC 製品の矯正用ブラケットには BA が微量含まれており、唾液または人工唾液 1-32 週間浸漬により BA が持続的に溶出した。12 週間の人工唾液中への総溶出量は製品 K 及び L で $1.7 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ レジン及び $12.6 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$ レジンで製品により差があった。唾液中の BA 溶出量は人工唾液中のそれより 2 - 5 倍多かった。今後唾液と同じ溶出量を示す疑似溶媒の開発が必要である。人工唾液への溶出量の経時的計測により 1 週間浸漬では、K で $202.7 \pm 26.4\text{ng/g}$ レジン、L で $239.0 \pm 10.3\text{ng/g}$ レジンであったが、12 週間後にはそれぞれ $1067.9 \pm 46.0\text{ng/g}$ レジン、及び $11331.9 \pm 608.6\text{ng/g}$ レジンとなり、溶出量の著しい増加があった。このことは PC が水溶液中で加水分解することを示唆するものである。溶出量から推定される最大 32 歯装着時 (560mg の PC) の BA 溶出量は 12 週間で $7.3 \mu\text{g}$ であり、全量吸収されたと仮定して体重当たりの摂取量は 4ng/kg/日 であり vom Saal らの報告している生殖異常惹起濃度 $2 \mu\text{g/kg}$ に比して低値である。裏装材の液試料にはフタル酸ジ-n-ブチルが $120 \sim 8500 \mu\text{g/g}$ 、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルが微量検出された。その他ブチルカルボトキシメチルフタレートと考えられる成分、詳細構造不明のフタル酸エステルが検出された。PAES はエンドクリン阻害作用のほか発ガン作用を有する物質であり今後対応が必要である (佐藤分担) 3) プラスチック製医療用具の分析：市販の PS 及び PC 製血液透析器を無蛍光水または牛血清で循環すると BA が溶出する。BA の溶出量は循環溶媒で異なり牛血清循環で多い。牛血清と同じ溶出量を与える溶媒について検索

し 17.2 %エタノールが擬似溶媒となることが明かとなった。17.2 %エタノールによる血液透析器からの BA 溶出量の定量分析は、前処理が不必要でありまた低コストであり、PC および PS 製血液透析器の BA 溶出試験に有効である。4) 化粧品、医薬部外品中の分析：化粧品などの溶剤として用いられる DEP の経皮吸収について調べた。モルモット剥離皮膚を装着した Franz 型拡散セルでの検討の結果 DEP は 9.35 ~ 14.28 時間の lag time の後、皮膚を透過し、Flux は 1.04 ~ 3.15 μ g/cm²/hr であった。界面活性剤 SDS、BK、POE・OE で剥離皮膚を 2 時間処理した後の DEP の皮膚透過 Flux は無処理皮膚の 190 %、174 % 及び 110 % と増加した。また、DEP の Flux は界面活性剤 SDS、BK、POE・OE が共存していた場合、それぞれ 81.9 %、105.7 %、99 % となり、SDS 共存で DEP 透過が低下することが明らかとなった。化粧品、医薬部外品によるエンドクリン阻害物質のリスクが示唆された。

結論=妊娠ラットにおける DBA のオス胎仔の生殖器発生異常惹起作用の感受期は、妊娠 15-17 日である。Bis-GMA を含有する歯科用フィッシャーシーラント、コンポジットレジン、ボンディング材の旧ロットには BA が微量含まれ、人工唾液浸漬により微量溶出していたが、新ロットの市販歯科材料では BA が検出感度以下である。PC 製矯正用ブラケットには BA が微量含まれており、唾液及び人工唾液中に溶出する。BA 溶出量は人工唾液中に長期間浸漬すると著しく増加し PC の水溶液中での加水分解が示唆される。裏装材の液成分には PAES が比較的少量含まれている。PC 及び PS 製血液透析器の BA 溶出試験の循環溶媒として 17.2%エタノールは牛血清と同じ溶出量を与える擬似溶媒となる。前処置なしに BA の定性分析が可能であり、血液透析器の BA 溶出試験溶媒として適用できる。PDB は、モルモット剥離皮膚を用いた透過試験で皮膚を透過する。皮膚を表面活性剤処理すると、透過量は増加する。

以上の総合的研究の結果、医療材料、歯科材料、化粧品などには BA、PAE が含まれており、体液中に溶出し、また生体に吸収される可能性が示唆されたが、含有量、溶出量は微量であり、BA に関しては、現在このレベルでは生体に対して毒性を示すという知見はない。PAES は、エンドクリン阻害作用の他、発ガン作用が知られており、今後の検討が必要である。医療材料などには複数のエンドクリン阻害物質が含まれており、それらの累積作用についても注目する必要がある。

別添2

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究

主任研究者 佐藤温重 昭和大学歯学部歯科理工学教室教授

研究要旨

医療材料などに含まれると想定されるエンドクリン阻害物質のリスク評価、溶出基準の基礎を確立するためジブチルフタレート（DBP）の生殖毒性ならびにビスフェノールA（BA）、フタル酸エステル類（PAES）の医療材料中の含有量、溶出量、経皮吸収動態について研究した。PAESの一つであるフタル酸ジブチル（DBP）は、妊娠ラットに投与することにより、オス胎仔の生殖器発生に異常を惹起する作用がある。その作用発現時期には感受期があり、ラット妊娠15-17日が高感受期である。

Bis-GMAを含有する歯科用コンポジットレジン、フィッシャーシーラント、ボンディング材の旧ロット製品はBAを微量含有し、人工唾液に浸漬したとき浸漬液中にBAが微量溶出するが、新ロットでは1-4週間の浸漬中のBA溶出量は検出限界（0.5ng/ml）以下であった。PC製矯正用ブラケットはBAを微量含有し、人工唾液及び唾液中に浸漬すると微量のBAが溶出していた。BA溶出量は唾液浸漬で多かった。また溶出量は浸漬12及び32週で著しく増加しPCの加水分解の存在が示唆された。裏装材の液体成分にはPAESが120-8500 µg/g含まれていた。

PC及びPS製血液透析器を水及び血清で循環すると、BAが循環溶媒中に溶出する。血清循環で溶出量が多い。17.2%エタノールは牛血清と同じ溶出量をあたえる疑似溶媒として使用できる。BA及びフタル酸ジエチル（DEP）は、モルモット剥離皮膚を用いた透過試験で皮膚を透過する。皮膚を界面活性剤処理すると、透過量は増加する。界面活性剤共存ではBA、DEPの透過性は増大または減少する。

医療材料などにはBA、PAEが含まれており、体液中に溶出し、また、生体に経皮吸収される可能性が示唆されたが、BAに関しては、溶出量は微量であり、現在このレベルでは生体に対して毒性を示すという知見はない。PAEに関しては、含有量が比較的多く、またエンドクリン阻害作用の他、発ガン作用が知られており、今後の検討が必要である。BA、DEPは経皮吸収されるので、化粧品などによるエンドクリン阻害物質の曝露について注目すべきである。

分担研究者

江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部室長

本郷敏雄 東京医科歯科大学歯学部歯科理工学第2講座助教授教室

配島由二 国立医薬品食品衛生研究所療薬部室長

徳永裕司 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部室長

A. 研究目的

医療材料、化粧品、および医薬部外品の中に含まれると想定されるエンドクリン阻害物質にはビスフェノールA、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジエチル、ベンゾフェノンなどがあり¹⁾

、それらが溶出し生体に吸収されることによる生体影響が懸念されている。医療材料などに含まれるエンドクリン阻害物質の量を把握し、その溶出量、吸収量、および曝露レベルにおける生体に対する作用を明確にすることは、医療材料などのリスク評価のために不可欠であるが、未だ明らかにされていない^{2)~6)}。平成10年度の研究においてラットの妊娠後半期にフタル酸ジブチル (DBP) を投与したときオス胎仔の精巣下降不全、肛門-生殖突起間距離 (AGD) の短縮などの発生毒性があること、Bis-GMAを含む歯科材料の人工唾液浸漬によりビスフェノールA (BA) の溶出があること、プラスチック医療用具のポリカーボネイト (PC)、ポリスルホン (PS) 製血液透析器の原材料中にはBAが含まれており、血液透析器を水及び血清で循環すると、BAが循環溶媒中に溶出することを明らかにした。さらにBAの経皮吸収をモルモット剥離皮膚を装着したFranz型拡散セルでの検討し、BAが皮膚を透過することを報告した。

そこで、平成11年度の研究においては、

1) フタル酸エステルの発生毒性についてDBPの発生毒性発現の感受期、2) 歯科材料中

の分析については新ロットの歯科用レジンからのBAの溶出量の計測、及び旧ロットおよび新ロットの裏層材中のPAESの含有量、3) プラスチック製医療用具の分析については、血液透析器からのBA溶出試験のための血清擬似溶媒の開発、4) 化粧品、医薬部外品中の分析については、DEPの経皮吸収と吸収に及ぼす界面活性剤の影響について総合的に検討することにより、医療材料などのエンドクリン阻害物質のリスク評価および溶出試験基準作成の基礎の確立を試みた。

B. 研究方法

1) フタル酸エステルの発生毒性：Wistarラットの妊娠12-14日、妊娠15-17日または妊娠18-20日にDBPを500, 1000, または1500mg/kgを強制経口投与して、妊娠21日に開腹し、着床数、生存及び死亡胎仔数、胎仔体重、肛門-生殖突起間距離 (AGD) を測定した。生存胎仔の精巣下降不全の有無を調べた。

2) 歯科材料中の分析：光重合型フィッシャーシラント4種A~D [Teethmate F-1(Kuraray Co Ltd), Concise light cure white sealant resin(3M Dental Products), Heliobond al(Vivadent), Palfique light sealant(Tokuyama Corp.)]、コンポジットレジン3種E~G [Z-100(3M Dental Products), Clearfil AP-X(Kuraray Co Ltd), Charisma(Heraeus Kulzer GmbH)]、ボンディング材3種H~J [Clearfil Liner Bond II Σ Bond A(Kuraray Co Ltd), Tokuso MAC II (Tokuyama Corp.), Single Bond(3M Dental Products)]、PC製矯正用ブラケット2種K、L [Clear Bracket (Sunkin Kogyo), Plastic Bracket(Tomy International)] を材料とした。A~Lはテフロン製リング (内径5mm、厚さ1mm) 中に材料を挿入し、光照射 (ラクソールで40,000ルクス) を2分間行い重合させた。

溶出試験はA~Lの各試料を1mlの人工唾液に37°C遮光下にて1-4週間浸漬した。ブラケットを同様に人工唾液または唾液に1-3

2週間浸漬した。浸漬中のBAは分光蛍光光度計を装置したHPLC及びLC/MSにより定性定量した。

市販の裏装材10種〔Soft Reverse旧ロット(Nissin), Soft Reverse新ロット(Nissin), Soft Liner新ロット(GC Corporation), Soft-Liner旧ロット(GC Corporation), Soften旧ロット(Kamemizu Chem Ind Co Ltd), Soften新ロット(Kamemizu Chem Ind Co Ltd), Fit Softer新ロット(Sankin Ind Co Ltd), Tissue Tender旧ロット(Kamemizu Chem Ind Co Ltd), Tissue Tender新ロット(Kamemizu Chem Ind Co Ltd), Tissue Conditioner新ロット(Shofu Inc)〕の液および粉末中のフタル酸エステル類(PAES)を定量した。液試料はヘキサンに溶解しGC/MSで、また粉末試料はヘキサンにて溶出してGC/MSにて測定を行った。

3) 市販プラスチック医療用具中の分析：牛血清循環時と同じ溶出量を与える擬似溶媒組成を検索するため市販のPSまたはPC製ホローファイバー型血液透析器(A社製Ⅱ型)の中空糸内外を、0, 5, 10, 15, 20%エタノール/無蛍光水(250ml)で10ml/minの流速で16時間循環させた。循環溶媒25mlを分取し減圧下で乾固させた後アセトニトリル/無蛍光水に溶解したのちHPLCでBAの分析を行った。牛血清と同じBA溶出量を与える擬似溶媒を選択した。擬似溶媒の溶出量を確認するためA社製セルロース/PC製血液透析器Ⅰ型、B社製PS/PC製血液透析器、C社製PS/ポリスチレン製血液透析器に擬似溶媒を循環させBAの回収量を牛血清のそれと比較した。

4) 化粧品、医薬部外品中の分析：DEPの経皮吸収試験を行った。ハートレー系雄性モットモットの腹部皮膚を剥離し、無処置または界面活性剤処理後Franz型拡散セルに装着、donor側に水、10mMドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液、10mM塩化ベンザルコニウム(BK)溶液あるいは0.5%ポリオキシエチレン10オレイルエーテル(POE・OE)溶液を加え、receptor側に20%プロピレングリコール溶液を加え32

°Cで2時間放置後、doner側の溶媒を除去、DEP溶液を単独または界面活性剤とともに加え、16-24時間後にreceptor側の溶液を0.2ml採取し、HPLCにてDEPの測定を行った。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物倫理規定に従った。

C. 研究結果

1) フタル酸エステルの発生毒性：

妊娠12-14日にDBPを投与すると母体体重増加及び摂取飼料は対照群に比べ有意に低かった。1500mg/kg投与群における胎仔の精巣下降不全発現頻度が有意に高かった。オス胎仔のAGDはわずかに短かかったが、AGD/胎仔体重比は変化しなかった。妊娠15-17日にDBPを投与したとき、DBP投与群で精巣下降不全の発現頻度は有意に高かった。1000及び1500mg/kg投与群におけるオス胎仔のAGDはメス胎仔のそれと同程度であり、外見上メス胎仔との識別が困難であった。AGD/胎仔体重比は有意に低かった。メス胎仔のAGDは投与群と対照群との間に差はなかった。妊娠18-20日にDBPを投与したとき、精巣下降不全を有する胎仔は観察されなかった。DBP投与群のオス胎仔のAGDは有意に短かかったが、AGD/胎仔体重比は変化しなかった。オス胎仔におけるAGDの短縮及び精巣下降不全の発現の感受期は妊娠15-17日であることが明らかとなった。(江馬分担)

2) 歯科材料中の分析：

HPLCの分析条件について検討し、唾液浸漬中のBAの分析では移動相の成分比を58%蒸留水とするとBAのピークと唾液夾雑物のピークの分離ができた。Bis-GMA含有歯科用レジンの新ロット製品硬化体の人工唾液4週間浸漬液中の溶出BAはフィッシャーシーラントA、B、C、Dで11.0、10.6、10.5、7.7ng/gレジン未満であった。コンポジットレジジンE、F、Gではいずれも5.7ng/gレジン未満、ボンディング材H、I、Jでは10.5、15.8、10.8ng/gレジン未満であった。

PC製ブラケットの人工唾液1週間浸漬においてはBAの溶出があり、K、Lで 202.7 ± 26.4 、 $239.0 \pm 10.3 \text{ ng/g}$ レジンであった。KにおけるBA溶出量は2、3週と経過的に減少したが、Lでは増加していた。12週間浸漬ではBA量はK、Lでそれぞれ 1067.9 ± 46.0 、 $11331.9 \pm 608.6 \text{ ng/g}$ レジンといずれも顕著に増加した。

PC製ブラケットを唾液に浸漬した場合、1週間浸漬でKでは 207.1 ± 9.3 、Lでは $2101.6 \pm 84.9 \text{ ng/g}$ レジンで人工唾液浸漬と比較してKでは差がないが、Lでは9倍高い値を示した。唾液浸漬では人工唾液浸漬に比べBAが溶出しやすいことが示唆された。(本郷分担)

裏装材A～Jの液試料にはフタル酸-n-ブチルが120、0.1以下、240、240、4500、5100、230、180、180、 $8500 \mu\text{g/g}$ 検出された。この他フタル酸ジ-2-エチルヘキシルが微量検出された。その他ブチルカルボトキシメチルフタレートと考えられる成分、詳細構造不明のフタル酸エステルが検出された。粉末ではPAESは検出されなかった。(佐藤分担)

3) プラスチック製医療用具の分析：

市販のPS及びPC製血液透析器を0、5、10、15、および20%エタノール溶液で循環したとき、エタノールの濃度の上昇にともないBA溶出量は増加する傾向が認められ、それぞれ141.8、479.7、866.4、1423.4および 3060.9 ng ／個回収された。牛血清と同じ溶出量を与える擬似溶媒は17.2%エタノールであることが判明した。17.2%エタノールにより血液透析器からのBA溶出量の定量分析では、前処理が不必要であった。また他の血液透析器に適用した場合B社製PS/PC製血液透析器から 986.4 ng ／個回収され、牛血清循環と疑似溶媒循環の間に良好な相関関係が認められた。中空糸またはハウジングが異なる材質から構成されているA社製セルロース/PC製血液透析器I型、およびC社製PS/ポリスチレン製血液透析器からそれぞれ173.8個及び153.3

ng／個のBAが回収され、この擬似溶媒が他の材質の血液透析器にも適用できることが明らかとなった。(配島分担)

4) 化粧品、医薬部外品中の分析：

化粧品などの溶剤として用いられるフタル酸ジエチル (DEP) の経皮吸収について調べた。モルモット剥離皮膚を装着したFranz型拡散セルでの検討の結果DEPは9.35～14.28時間のlag timeの後、皮膚を透過し、Fluxは $1.04 \sim 3.15 \mu\text{g/cm}^2/\text{hr}$ であった。界面活性剤SDS、BK、POE・OEで剥離皮膚を2時間処理した後のDEPの皮膚透過Fluxは無処理皮膚の190%、174%及び110%と増加した。また、DEPのFluxは界面活性剤SDS、BK、POE・OEが共存していた場合、それぞれ81.9%、105.7%、99%となり、SDS共存ではDEP透過が低下することが明らかとなった。(徳永分担)

D. 考察

DBPのオス胎仔への発生毒性の検索において、感受期を明らかにすることが重要である。既にMylchreestら⁷⁾はDBPのsensitive windowは妊娠12-21日と報告しているが詳細は不明である。本研究においては、オス生殖器官に対する影響を明確にするため比較的高い投与量のDBPを妊娠各期のラットに投与した。妊娠12-14日及び18-20日におけるDBP投与ではオス胎仔のAGDの短縮はわずかであり外見上メス胎仔との識別が可能であったが、妊娠15-17日におけるDBP投与ではAGDの短縮は著しく、外見上メス胎仔との識別が困難であった。AGDは体重によって変化すると考えられるので、AGD/胎仔体重比から検討した。AGD/胎仔体重比は妊娠12-14日及び18-20日の投与では低下は認められなかったことから妊娠12-14日及び18-20日でのDBP投与ではオス胎仔のAGDに影響しないものと考えられた。これに対し妊娠15-17日におけるDBP500mg/kg以上の投与ではAGDの有意の低下が認められ、また精巣下降不全が高頻度で観察され、妊娠15-17日が臨界期であることが示された。オスの表

現型の決定要因はテストステロン及びジヒドロテストステロンなどアンドロゲンである。出生前の精巣下降はテストステロンに調節され、外部生殖器の男性化はジヒドロテストステロンに依存している。これらの過程が妊娠15-17日のDBP投与により強く影響を受けるものと考えられる。DBPの作用機序については、DBPはアンドロゲンレセプターを介した作用ではなく、アンドロゲンシグナルパスウェイを間接的に障害することによって起こると考えられている。アンドロゲンがオス表現型の決定要因であり、外部生殖器の男性化はジヒドロテストステロンに依存する現象で妊娠15-17日がもっとも影響を受けることを示している。

Bis-GMAを含む歯科用レジン10製品の新ロットの硬化物では人工唾液浸漬によるBAの溶出は検出限界以下であり、歯科用レジンの安全性が向上したといえる。PC製矯正用ブラケットの人工唾液、唾液浸漬でBAの溶出が認められた。BA溶出量の経週の計測で持続的に溶出が認められたが、特に12及び32週に溶出量が著しく増加することが見出されたことは、PCが生体内環境で加水分解する可能性を示唆するものとして注目される。しかし、12週間のBA総溶出量は製品により異なるが、 $1.7\mu\text{g}/\text{gレジン}$ あるいは $12.6\mu\text{g}/\text{gレジン}$ であり、微量である。全歯にブラケットを装着(PC 560 mg 相当)し、溶出BAがすべて吸収されたと仮定しても小児体重当たりの摂取量は $4\text{ng}/10\text{g}/\text{日}$ であり vom Saalら⁹⁾の報告している生殖異常をきたす量 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ と比して低値である。しかし低用量のBAの生殖毒性についての研究は不十分であり、ブラケットによる生体為害性の有無については現時点で断定できない。裏層材中に比較的多量のPAESが検出された。PAESはエンドクリン阻害作用のほか発ガン作用⁹⁾を有する物質であり対応が必要である。

血液透析器のBA溶出試験において、使用する溶媒によりBA回収量が異なる。血清を使用

することが使用条件に最も近似しているが、血清からのBAの回収は操作が煩雑であり、また血清自身高価である。血清疑似溶媒の開発が必要である。開発された17.2%エタノール無蛍光水系は低コストでありPCおよびPS製血液透析器のBA溶出試験に有用である。

モルモット皮膚を用いたDEP経皮吸収実験においてDEPが皮膚を透過し、透過量は界面活性剤処理皮膚で促進され、DEPと界面活性剤共存では透過性が無影響または抑制されることが明らかとなった。化粧品、歯科用裏層材から溶出するPAESの経皮または経粘膜吸収の可能性を示唆するもので、化粧品などの安全対策上注目する必要がある。医療材料にはBA、PAESなど複数のエンドクリン阻害物質が含まれており、それらの累積的作用及びそれらを検出できる試験系の開発が今後必要となるであろう。

E. 結論

PAESの一つのDBAは、妊娠ラットに投与することにより、オス胎仔の生殖器発生に異常を惹起する作用がある。その作用発現時期には感受期があり、ラット妊娠15～17日が高感受期である。

Bio-GMAを含有する歯科用コンポジットレジン、フィッシャーシーラント、ボンディング材10製品の新ロットで作成した硬化体の人工唾液浸漬でBAの溶出量は検出限界($0.5\text{ng}/\text{ml}$)以下であった。PC製矯正用ブラケット2種にはBAが微量含まれており、人工唾液中に溶出する。12週間浸漬時の総溶出量は 1.7 ± 0.4 、 $12.6\pm 0.7\mu\text{g}/\text{gレジン}$ であった。市販製品の裏装材10製品には1製品を除いて $120\text{--}8500\mu\text{g}/\text{g}$ のPAESが含まれている。

PC及びPS製血液透析器を水及び血清で循環すると、BAが循環溶媒中に溶出する。溶出量は血清で多い。溶出試験で血清と同じBA溶出量が得られる疑似溶媒として17.2%エタノール無蛍光水系が開発された。本法により前処理なしにBAの計測が可能となった。

BA 及びDEPは、モルモット剥離皮膚を用いた透過試験で皮膚を透過する。皮膚を界面活性剤処理すると、透過量は増加する。

医療材料などにはBA, PAE が含まれており、体液中に溶出し、また生体に吸収される可能性が示唆されたが、含有量、溶出量は微量であり、BA に関しては、現在このレベルでは生体に対して毒性を示すという知見はない。PAE は、エンドクリン阻害作用の他、発ガン作用が知られており、今後の検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

長谷川隆一, 広瀬明雄, 紅林秀雄, 江馬眞, 黒川雄二 : ジクロロ酢酸の毒性評価と経口摂取による耐用1日摂取量の算定. 水環境学会誌, 22, 821-826 1999.

Ema, M., Miyawaki, E. Kawashima, K. : Developmental effects of plasticizer butyl benzyl phthalate after a single administration in rats. J. Appl. Toxicol., 19, 357-365 1999.

Ema, M., Miyawaki, E. Kawashima, K. : Adverse effects of diphenyltin dichloride on initiation and maintenance of pregnancy in rats. Toxicol. Lett., 108, 17-25, 1999.

Ema, M., Miyawaki, E. Kawashima, K. : Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. Arch. Toxicol., 73, 175-179, 1999.

Ema, M., Miyawaki, E., Kawashima, K. : Developmental toxicity of triphenyltin chloride after administration on three consecu-

tive days during organogenesis in rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62, 363-370, 1999.

Ema, M., Miyawaki, E. Kawashima, K. : Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. Toxicol. Lett., 111, 271-278, 2000.

Ema, M., Miyawaki, E. Kawashima, K. : Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. Reprod. Toxicol. (in press).

徳永裕司, 鄭然孫, 内野正, 安藤正典 : ビスフェノールAのin vitro経皮吸収に関する研究. 粧技誌, 投稿中

2. 学会発表

本郷敏雄ら : 歯科用レジンの高感度分析法. 歯科材料器械, 18 (S. I, 34) 1999.

矢島功ら : 歯科用ポリカーボネイト中のビスフェノールA. 日本内分泌攪乱化学物質学会, 第2回研究発表会要旨集, P, 27, 1999.

配島由二, 矢上健, 林譲, 松田りえ子, 中村晃忠 : ポリカーボネイトおよびポリスルホン製血液透析器からのビスフェノールAの溶出. 日本薬学会第119年会1999. 6

参考文献

1) Illinois Environment Protection Agency (1997). Illinois EPA Endocrine Disruptors Strategie.

2) Olea N., et al. (1996). Environ. Health Perspect., 104, 298.

3) Nathanson D., et al. (1997). JADA,

128, 1517.

4) Hamid A. and Hume W.R. (1997). Dent. Master., 13, 98.

5) Spahl W., et al. (1998). J.Dentistry, 26, 137.

6) 歯科器材調査研究委員会(1999). 歯科材料・器械、18(4)、302.

7) Mylchreest, E., et al. (1998). Toxicologist, 42, 176.

8) vom Saal, F.S., et al. (1998). Toxicol. Ind. Health, 14, 239.

9) Kleinsasser, NH, et al. (2000). Mutat. Res., 467(1), 21.

別添 3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

フタル酸エステル等の発生毒性

国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所

江馬 眞

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究（H11-医薬-016）
分担研究：フタル酸エステル等の発生毒性

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
生物試験部第二室長

研究要旨

ラットの妊娠 12-14 日、妊娠 15-17 日または妊娠 18-20 日に 500, 1000, または 1500 mg/kg の dibutyl phthalate (DBP) を経口投与して胎児の性分化に対する影響を調べた。妊娠 12-14 日の 1500 mg/kg 及び妊娠 15-17 日の全投与群で精巣下降不全の発現頻度が有意に上昇した。オス胎児における肛門生殖突起間距離 (AGD) の短縮が DBP 投与群で観察され、妊娠 15-17 日の投与で特に著しかった。AGD/体重比の有意の低下は妊娠 15-17 日に DBP を投与したときにだけ認められた。これらの結果から、DBP によるオス胎児における精巣下降不全及び AGD 短縮の発現の感受期は妊娠 15-17 日であることが明らかになった。

A. 研究目的

可塑剤として使われているフタル酸エステル類 (PAEs) は地球規模の環境汚染物質である。PAEs の一つである dibutyl phthalate (DBP) は安全ガラス、印刷用インク、紙のコーティング剤、接着剤等に使われており、また、各種化粧品にも使われている。

最近、DBP や butyl benzyl phthalate (BBP) などの PAEs が組み替え酵母やヒト乳癌細胞を用いた *in vitro* の実験においてエストロゲン作用を示すことが報告され、DBP 及び BBP 等の PAEs は内分泌攪乱化学物質として注目されている。このようなことから、PAEs の生殖発生毒性を研究することの重要性は益々高まっている。

DBP はラット及びマウスにおいて発生毒性を示すことが知られている。我々

は先に、ラット胎児の器官形成期に DBP を投与したとき、胚致死作用と催奇形作用を示すことを明らかにした。更に、ラットの妊娠 7-9 日または妊娠 13-15 日に DBP を投与したときに催奇形作用を示し、妊娠前半に DBP を投与したとき強い胚致死作用を示すことを報告した。

昨年度においては、ラットの妊娠後半に DBP を与えたときオス胎児において精巣下降不全の発現頻度が上昇し、肛門生殖突起間距離 (AGD) が短縮することを報告した。

本年度においては、DBP による精巣下降不全及び肛門生殖突起間距離 (AGD) 短縮の発現の感受期について検討した。

B. 研究方法

Wistar ラットを使用した。ラットは、

室温 24 ± 1 °C、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12:12 時間 明/暗の動物室にて、水道水と飼料を自由に与えて飼育した。メスラットを同系統のオスラットと同居させ、翌朝膈垢内に精子を認めたメスを妊娠とし、この日を妊娠0日として、以後個別ケージにて飼育した。

ラットの妊娠12日から14日または妊娠18日から20日まで1000 または 1500 mg/kg、妊娠15日から17日まで500, 1000 または 1500 mg/kg のDBPを経口投与した。DBPはオリーブ油に溶解し、投与日の体重に基づいて5 ml/kg 与えた。対照群のラットにはオリーブ油だけを経口投与した。

ラットは妊娠21日に開腹し、着床数、吸収胚数、生存及び死亡胎児数を記録した。生存胎児については、体重を測定し、肛門生殖突起間距離 (AGD: Anogenital distance) をノギスで測定した。生存胎児はブアン液に浸して固定した後、生殖腺により雌雄を判別し、精巣下降不全の有無を調べた。

胎児に関する成績は一腹を単位として統計処理を行った。

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

1. 妊娠12-14日にDBPを投与したときの影響

DBP投与群における母体体重増加及び摂餌量は対照群に比べて有意に低かった (Table 1)。1500 mg/kg投与群において、38%の頻度で全胚吸収がみられ、吸収胚数が有意に増加し、生存胎児数が有意に減少した。DBP投与群の雌雄の胎児体重は対照群に比べて有意に低かった。1500 mg/kg投与群における精巣下降不全を有する胎児の発現頻度は有意に高かった。

妊娠12-14日のDBP投与群のオス胎

児のAGDは有意に短かった。メス胎児のAGDにはDBP投与群と対照群との間の差はみられなかった (Fig. 1)。

AGD/体重比にはDBP投与による影響は認められなかった (Fig. 2)。

2. 妊娠15-17日にDBPを投与したときの影響

1000及び1500 mg/kg投与群における母体体重増加及び摂餌量は対照群に比べて有意に低かった (Table 1)。1500 mg/kg投与群において20%の頻度で全胚吸収がみられ、吸収胚数が有意に増加し、生存胎児数が有意に減少した。1500 mg/kg投与群の雌雄の胎児体重は対照群に比べて有意に低かった。DBP投与群における精巣下降不全の発現頻度は有意に高かった。

妊娠15-17日のDBP投与群のオス胎児のAGDが有意に短くなった。1000及び1500 mg/kg投与群におけるオス胎児のAGDはメス胎児のAGD程度の長さであった。メス胎児のAGDにはDBP投与群と対照群との間の差はみられなかった (Fig. 1)。

DBP投与群におけるAGD/体重比は有意に低かった (Fig. 2)。

3. 妊娠18-20日にDBPを投与したときの影響

1000及び1500 mg/kg投与群の母体体重増加及び1500 mg/kg投与群の摂餌量は対照群に比べて有意に低かった。吸収胚数、死亡及び生存胎児数、生存胎児の性比にはDBP投与群と対照群との間に差はなかった。DBP投与群の雌雄の胎児体重は対照群に比べて有意に低かった。DBP投与群において精巣下降不全を有する胎児は観察されなかった。

妊娠18-20日のDBP投与群のオス胎児のAGDは有意に短かった。メス胎児のAGDにはDBP投与群と対照群との

間の差はみられなかった (Fig. 1)。

AGD/体重比には DBP 投与による影響は認められなかった (Fig. 2)。

D. 考察

本実験では DBP のオス生殖器官に対する影響をより明確にするために、比較的高投与量の DBP を妊娠ラットに投与した。その結果、母体体重増加抑制及び摂餌量減少が観察された。また、着床後の胚死亡率の上昇が妊娠 12-14 日投与群及び妊娠 15-17 日投与群でみられた。これらの結果は、妊娠 12-16 日間の DBP の 1 回投与で着床後胚死亡率が有意に上昇した我々の先の実験結果とよく一致し、妊娠後期の胚は DBP の致死作用に対して感受性が低いことを示唆している。

妊娠後半の 3 日間に DBP を投与したところ、投与日に関わらずオス胎児の AGD の有意の短縮が認められた。妊娠 12-14 日及び妊娠 18-20 日における投与では AGD の短縮はわずかであり、外見上メス胎児と識別は可能であった。しかしながら、妊娠 15-17 日の投与では AGD の短縮は著しく、メス様の外見を呈しており、メス胎児と識別することは困難であった。AGD は身体のサイズによって変化すると考えられ、また、DBP 投与により胎児体重が低下していたため、AGD/体重比を算出して、DBP の影響について検討した。その結果、AGD/体重比には妊娠 12-14 日及び妊娠 18-20 日の DBP 投与による低下はみられなかったが、妊娠 15-17 日に 500 mg/kg 以上の DBP を投与したとき有意の低下が認められた。これらのことから、妊娠 12-14 日及び妊娠 17-20 日の DBP 投与ではオス胎児の AGD に影響を与えないものと考えられた。更に、妊娠 15-17 日の DBP 500 mg/kg 以上の投与により高頻度で精巣下降不全が観察さ

れた。妊娠 7-15 日に DBP を経口投与したとき 630 mg/kg 以上で着床後胚死亡率が有意に上昇し、750 mg/kg で奇形胎児の発現頻度が有意に上昇することを我々は先に報告している。これらのことは、Mylchreest らの報告でも示されており、オスの生殖器官は出世前に投与された DBP に対して他の器官よりも感受性が高いことを示唆している。妊娠中及び授乳中を通じて投与した DBP により AGD 短縮、尿道下裂、陰囊欠損精巣、小精巣、精巣状態の低形成または欠損、精囊及び前立腺重量低下が生後のラットのオス児に認められることが Mylchreest らによって報告されている。更に、彼らは、ラットの妊娠 12-21 日に DBP を投与したとき同様な変化が惹起されることを見出し、この 10 日間は DBP による生殖器奇形の sensitive window であると述べている。今回の実験では、妊娠 15-17 日の DBP 投与により AGD、すなわちオス外部生殖器の発生指標の短縮及び精巣下降不全が惹起された。テストステロン及びジヒドロテストステロン等のアンドロゲンはオス表現型の決定要因である。出生前の精巣下降はテストステロンによりコントロールされており、外部生殖器の男性化はテストステロンの代謝物であるジヒドロテストステロンに依存した現象である。これらの現象が妊娠 15-17 日の DBP 投与により最も強く影響を受けたことを本実験成績が示している。生殖器官の発生障害を惹起する DBP の作用機序について、Gray らは、*in vivo* における DBP の抗アンドロゲン作用はアンドロゲン・レセプターを介した作用ではないことを示唆している。また、Mylchreest らは、DBP が性分化期間中のアンドロゲン・シグナリング・パスウェイを間接的に障害することによって、恐らく直接胎児の精巣に作用すること

によって、その抗アンドロゲン作用を発現することを示唆している。

ラットに経口投与された DBP は急速に消化管で吸収され monobutyl phthalate (MBuP) に代謝される。我々は、MBuP の催奇形作用が親化合物の DBP の催奇形作用とよく類似していることを明かにし、DBP の催奇形作用は MBuP を介して発現することを示唆した。この仮説は、妊娠ラットに DBP を投与したとき胚組織には MBuP の移行は認められたが、DBP の移行はごくわずかであったと云う Sallenfait らの実験成績により支持されている。また、MBuP は精巣毒性、精巣下降不全の原因物質であると報告されている。経口投与された BBP もまた急速に吸収され、MBuP と monobenzyl phthalate に代謝される。BBP 及びその代謝物のオス児における生殖器官に対する発生毒性を検討することは興味ある研究課題である。

E. 結論

ラットの妊娠 12-14 日、妊娠 15-17 日または妊娠 18-20 日に DBP を与えて妊娠 21 日の胎児を調べた。妊娠 15-17 日の DBP 投与によりオス胎児の AGD が有意に短縮し、精巣下降不全を有する胎児の発現頻度が有意に上昇した。これらの結果から、DBP のオス児の生殖器官の発生に及ぼす影響の感受期は妊娠 15-17 日であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (in press). *Reprod. Toxicol.*
Critical period for adverse effects on

development of reproductive system in male offspring of rats given di-*n*-butyl phthalate during late pregnancy. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (2000).

Toxicol. Lett., 111, 271-278

ジクロロ酢酸の毒性評価と経口摂取による耐用 1 日摂取量の算定、長谷川隆一、広瀬明雄、紅林秀雄、江馬 眞、黒川雄二 (1999) *水環境学会誌*, 22, 821-826.

Developmental effects of plasticizer butyl benzyl phthalate after a single administration in rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K.

(1999). *J. Appl. Toxicol.*, 19, 357-365.

Adverse effects of diphenyltin dichloride on initiation and maintenance of pregnancy in rats.

Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999). *Toxicol. Lett.*, 108, 17-25.

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

(1999). *Arch. Toxicol.*, 73, 175-179.

Developmental toxicity of triphenyltin chloride after administration on three consecutive days during organogenesis in rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 363-370.

2. 学会発表

Early embryonic loss induced by dibutyltin dichloride (DBTCD) in rats. Ema, M., Harazono, A. and Kawashima, K. 39th Annual Meeting, Society of Toxicology

トリブチルスズによるラットにおける