

着床害作用 原園 景、江馬 眞、川島邦夫 第64回関西実験動物研究会
妊娠初期に投与した diphenyltin dichloride による胚致死作用 江馬眞、宮脇英美子、川島邦夫 第26回日本トキシコロジー学会
可塑剤 dibutyl phthalate の妊娠及び偽妊娠ラットにおける生殖障害 江馬眞、宮脇英美子、川島邦夫 第39回日本先天異常学会
Triphenyltin chloride のラットにおける発生毒性 江馬 眞、宮脇英美子、川島邦夫 第39回日本先天異常学会
有機スズ化合物のラット生殖発生毒性 江馬 眞 第39回日本先天異常学会
CASA-System を用いた Nitrobenzene 関連化合物の精子試験 I. Nitrobenzene 宮脇英美子、前田秀子、原園 景、江馬 眞、川島邦夫 第

4回 Testes Workshop 精子形成・精巣毒性研究会

CASA-System を用いた Nitrobenzene 関連化合物の精子試験 II. 1, 4-dichloro-2-nitrobenzene 前田秀子、宮脇英美子、原園 景、江馬 眞、川島邦夫 第4回 Testes Workshop 精子形成・精巣毒性研究会
CASA-System を用いた Nitrobenzene 関連化合物の精子試験 III. Nitrobenzene 及び 1, 4-dichloro-2-nitrobenzene の相対効力検定 原園 景、前田秀子、宮脇英美子、前田秀子、江馬 眞、川島邦夫 第4回 Testes Workshop 精子形成・精巣毒性研究会

【共同研究者】

宮脇英美子 (国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 生物試験部)

Table 1. Maternal, reproductive and fetal findings in rats given dibutyl phthalate (DBP) on days 12-14, 15-17 or 18-20 of pregnancy

Days of treatment	Days 12-14			Days 15-17			Days 18-20			
	0 (control)	1000	1500	0 (control)	500	1000	1500	0 (control)	1000	1500
No. of pregnant rats	10	10	13	10	10	10	10	10	10	10
No. of dead pregnant rats	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	231 ± 15	230 ± 10	228 ± 7	226 ± 7	223 ± 7	225 ± 6	230 ± 8	227 ± 5	235 ± 14	227 ± 6
Body weight gain (g) ^{a,b}	13 ± 3	4 ± 5*	5 ± 6*	32 ± 5	27 ± 6	19 ± 6*	10 ± 11*	39 ± 5	30 ± 7*	27 ± 11*
Food consumption (g) ^{a,b}	45 ± 5	32 ± 7*	39 ± 5*	49 ± 6	41 ± 7	34 ± 8*	33 ± 8*	48 ± 12	40 ± 3	36 ± 10*
No. of implantations per litter ^a	14.5 ± 1.1	15.3 ± 1.1	14.8 ± 1.6	15.0 ± 1.3	15.3 ± 1.1	14.9 ± 1.5	14.9 ± 1.0	15.8 ± 1.8	15.6 ± 1.3	15.2 ± 1.8
No. of litters totally resorbed	0	0	5*	0	0	0	2	0	0	0
No. of resorptions per litter ^a	0.8 ± 1.1	4.8 ± 5.0	10.5 ± 4.6*	0.4 ± 0.7	1.2 ± 1.0	3.1 ± 2.3	4.2 ± 4.7*	1.1 ± 1.0	1.6 ± 1.3	1.0 ± 1.2
No. of dead fetuses per litter ^a	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.6	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.7	2.4 ± 5.0	0	0	0.1 ± 0.3
No. of live fetuses per litter ^a	13.6 ± 1.4	10.3 ± 4.7	3.8 ± 4.0*	14.4 ± 1.1	13.9 ± 1.4	11.5 ± 2.3	8.3 ± 4.9*	14.7 ± 2.1	14.0 ± 1.9	14.1 ± 2.4
Sex ratio of fetuses (male/female)	84 / 52	47 / 56*	30 / 20	69 / 75	75 / 64	67 / 48	47 / 36	87 / 60	78 / 62	77 / 64
Fetal weight (g) ^a										
Male	4.81 ± 0.13	4.35 ± 0.38*	3.97 ± 0.50*	4.76 ± 0.20	4.86 ± 0.15	4.34 ± 0.77	3.57 ± 0.40*	4.79 ± 0.20	4.07 ± 0.20*	3.45 ± 0.40*
Female	4.58 ± 0.07	4.07 ± 0.35*	3.84 ± 0.30*	4.47 ± 0.20	4.58 ± 0.18	4.13 ± 0.60	3.46 ± 0.47*	4.41 ± 0.20	3.87 ± 0.10*	3.38 ± 0.40*
No. of male fetuses (litters) with undescended testes	0(0)	1(1)	10(4)*	0(0)	12(8)*	65(10)*	47(8)*	0(0)	0(0)	0(0)

^a Values are given as mean ± SD. ^b Values are given as body weight gain and food consumption on days 12-15, days 15-18 or days 18-21 of pregnancy.

^c (No. of resorptions and dead fetuses/no. of implantations) x 100. * Significantly different from control, P < 0.05.

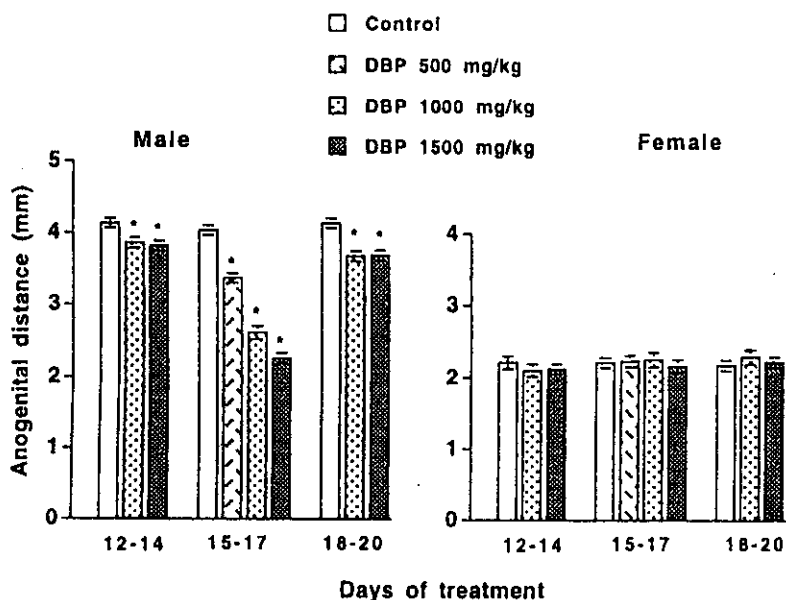


Fig. 1. Anogenital distance in male and female fetuses of rats given dibutyl phthalate (DBP) on days 12-14, days 15-17 or days 18-20 of pregnancy. Values are given as mean \pm S. E. M. * Significantly different from control, $P < 0.05$.

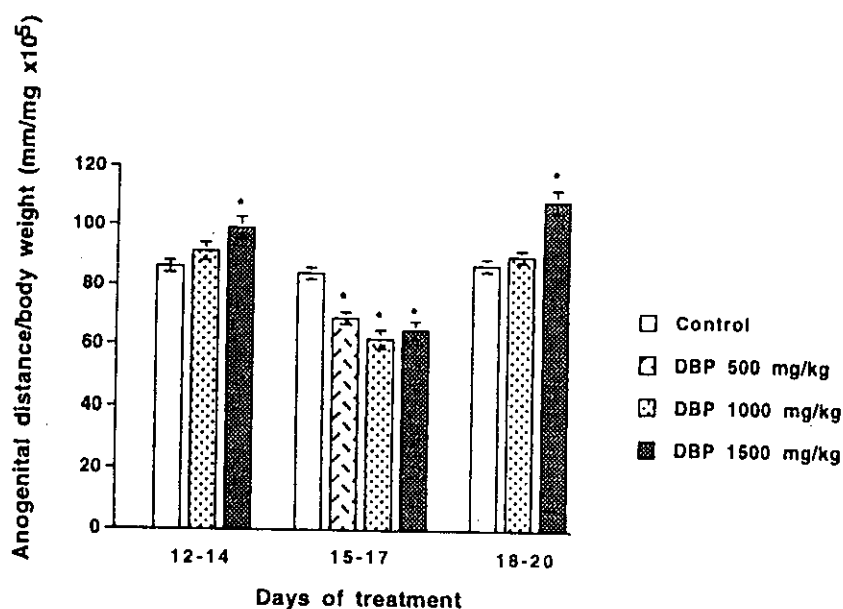


Fig. 2. Anogenital distance/body weight ratio of male fetuses in rats given dibutyl phthalate (DBP) on days 12-14, days 15-17 or days 18-20 of pregnancy. Values are given as mean \pm S. E. M. * Significantly different from control, $P < 0.05$.

別添 3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

歯科材料中の分析

東京医科歯科大学歯学部

本郷 敏雄

歯科材料中の分析

分担研究者	本郷 敏雄	東京医科歯科大学歯学部歯科理工学第二講座	助教授
共同研究者	日景 盛	北海道医療大学歯学部歯科補綴学第二講座	助教授
	大槻 昌幸	東京医科歯科大学歯学部歯科保存学第一講座	助教授
	田上 順次	東京医科歯科大学歯学部歯科保存学第一講座	教授
	佐藤 温重	昭和大学歯学部歯科理工学教室	教授

研究要旨

歯科治療で修復材料として使用されている歯科用レジンのレジン主成分の一つとして 2-propenoic acid, 2-methyl-(1-methylethylidene)bis(4,1-phenyleneoxy(2-hydroxy-3,1-propanediyl))ester(Bis-GMA; CAS Number : 1565-94-2)に夾雑物として存在している合成前駆体であるビスフェノール A(BPA)が歯科用レジンの硬化体にも微量残留している可能性が高い。加えて、歯科領域において BPA が不純物として残留している可能性のある歯科材料としてテンポラリークラウン、レジン歯、矯正用ブラケット、義歯床などのポリカーボネート(PC)製材料並びにポリスルホン製の義歯床などがある。従って、本研究は歯科用レジン硬化体並びに矯正用ブラケットを人工唾液中に浸漬し、溶出される BPA 量を分光蛍光光度計を装着した高速液体クロマトグラフ(HPLC)で定量することを目的とした。平成 10 年度の報告では旧ロットの市販歯科用レジン硬化体を人工唾液に浸漬したところ、微量の BPA を検出したので、同じ市販歯科用レジン硬化体で新ロットについて検討すること並びに PC 製矯正用ブラケットについては人工唾液並びに唾液に浸漬した場合について同様に検討を加えた。更に PC 製矯正用ブラケットの人工唾液浸漬液については、溶出された BPA の紫外部スペクトル、蛍光スペクトル並びにマススペクトルについて解析した。人工唾液に浸漬した各種 Bis-GMA 含有歯科用レジン硬化体浸漬液を分析したところ、現在市販されている新ロットの Bis-GMA 含有歯科用レジン硬化体からは BPA に相当するピークは検出されず、検出限界以下(0.5ng/ml, 絶対量として 10pg)であった。人工唾液に浸漬した歯科用レジン硬化体浸漬液からは Bis-GMA 及び Bis-GMA 類似誘導体は検出されなかった。PC 製と考えられる矯正用ブラケットからは微量の BPA が人工唾液並びに

唾液中に溶出していることが認められた。この浸漬液を液体クロマトグラフ／質量分析計（LC/MS）で確認をしたところ、BPA のモニターイオン（M/Z：227）が得られ、そのマススペクトルも BPA 標準品とほぼ一致したことから、人工唾液中に浸漬した PC 製矯正用ブラケットから BPA が溶出していることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、PC 製プラスチック容器の原材料である BPA や可塑剤であるフタル酸エステル類、紫外線吸収剤であるベンゾフェノン、有機塩素系農薬や界面活性剤として使用されている合成化学物質などに生体の内分泌機能を攪乱し、動物界のみならずヒトの健康に影響を及ぼす懸念が指摘されている¹⁾。

歯科領域においては代表的な齲蝕処置法として修復治療に歯科用レジンが汎用されているのが現状である。このように歯科材料としてレジンは不可欠な材料の一つであり、修復用レジンのレジン主成分の一つとなっている物質は Bis-GMA である。1996 年にスペインのグラダナ大学とアメリカのタフツ大学の共同研究でシーラント処理後、唾液中に BPA が多量に溶出していることが報告され²⁾、構成成分である Bis-GMA などの夾雑物と考えられる BPA による内分泌攪乱作用の懸念が指摘されている。BPA による内分泌攪乱作用に関しては未解明な点が多く、またその影響は多岐に渡ることなどから現時点でも明確な結

論³⁻⁸⁾が得られていない。

BPA の微量定量分析法は現時点でさえ、確立した分析法はない。この BPA 微量定量分析法として、機器による分析と酵素免疫定量法による定量法があるが、現時点においては検出感度の点から BPA の微量定量分析法は機器による分析が主流を占めている。この分析に用いられる代表的な機器として、ガスクロマトグラフ（GC）、HPLC、ガスクロマトグラフ／質量分析計（GC/MS）、LC/MS などがある。GC、GC/MS で分析する場合の最大の欠点は試料を極力クリーンアップしなければならないことである。歯科用レジン構成成分が多く、また、その構成成分が不明なことが多いので試料のクリーンアップは困難を極める等の欠点がある。一方、HPLC は非常に簡便な測定機器であり、試料をそのまま分析に供することができるメリットがある。その検出方法として BPA の紫外外部吸収（UV-VIS 検出器）、蛍光（分光蛍光検出器）、電気化学的特性（電気化学検出器）を利用して分析しているが、感度と検出特異性から微量定量には分光蛍光検出器若しくは電気化学

検出器を用いた分析法が一般的である。

フィッシャーシーラントやコンポジットレジン硬化体からの BPA の溶出に関する報告は断片的なデータのみで広範囲の研究はなされていないのが現状である。その多くは分析装置として HPLC を用い、同定には BPA の紫外部吸収を指標としているが、BPA の紫外部吸収ではその検出感度が低いため、極微量の BPA は検出できない。そこで本研究は昨年度と同一で新ロットの市販光重合型フィッシャーシーラント、コンポジットレジン、ボンディング材の硬化体を人工唾液中に浸漬し、並びに PC 製矯正用ブラケットを人工唾液及び唾液中に浸漬し、溶出される BPA 量を分光蛍光光度計を装着した HPLC で定量することを目的とし、人工唾液に浸漬した矯正用ブラケットについて LC/MS でも定性分析した。

B. 研究方法

光重合型フィッシャーシーラントである Teethmate®F-1 (Kuraray Co.Ltd.;Lot.:0031AC)、Concise™ Light Cure White Sealant Resin (1930W, 3M Dental Products; Lot.:19991201)、Helioseal (Vivadent; Lot.:B25947)、Palfique Light Sealant (Tokuyama Corp., Lot.:11588 と、コンポジットレジンである Z-100™ (3M Dental Products; Lot.:19981105)、Clearfil AP-X (Kuraray Co.Ltd.;

Lot.:057987)、Charisma (Heraeus Kulzer GmbH; Lot.:20011081)、ボンディング材である Clearfil Liner Bond II Σ Bond A (Kuraray Co. Ltd.; Lot.:00089AA)、Tokuso-MAC II (Tokuyama Corp., Lot.:016)、Single Bond (3M Dental Products; Lot.:19991213)、PC 製矯正用ブラケットである Clear Bracket (Sankin Kogyo, Lot.:C9020038、C9120119) と Plastic Bracket (Tomy Internatinal, Lot.:B349、B4X9) を材料として用いた。検体名はフィッシャーシーラントでは A、B、C、D とし、コンポジットレジンでは E、F、G とし、ボンディング材は H、I、J とし、PC 製矯正用ブラケットは K、L とした。重合方法はテフロン製リング (内径 5mm、厚さ 1mm) 中に材料を填入し、リングをスライドガラスで圧接しながら光照射 (ラクソール、Model:4000) を 2 分間行い、重合させた。光の強度は約 40000 ルックスとした。浸漬条件はそれぞれの硬化体を 1ml 人工唾液 (17.5mM KCl、2.5mM KH₂PO₄、2.4mM Na₂HPO₄、10mM NaCl、0.15mM MgCl₂、0.5mM CaCl₂、1.5mM NaHCO₃ で Arvidson and Johansson の変法⁹⁾⁾ 中に 37℃ で遮光下にて浸漬し、溶出物の同定・定量の試料とした。PC 製矯正用ブラケットはレジン硬化体浸漬条件と同様にしてそのまま人工唾液並びに唾液中に浸漬した。尚、採取した唾液は唾液中に含まれている細胞や食物残渣を除去するた

めに4℃で3000rpm、10分間の遠心した。遠心後、無菌的にするためにボトルトップフィルター(0.22 μm、旭テクノグラス)で濾過滅菌し、得られた溶液を滅菌した容器に保存し、その後の操作は極力無菌的に実施した。

HPLCの分析条件はガードカラムとしてCAPCELL C₁₈ UG120(2.0x10mm、資生堂製)、分離カラムとしてCAPCELL PAK C₁₈ UG120(2.0x250mm、5 μm、資生堂製)を用い、移動相は蒸留水/アセトニトリル混合液(混合比は56:44若しくは58:42)、カラム温度は40℃、流量は0.2ml/minとし、検出波長は217nmで定量した。用いたHPLCシステムはHP1100シリーズ(Hewlett Packard製)を用い、同時に同定にはHP1100シリーズ・ダイオードアレイ検出器(Hewlett Packard製)を用い、検出波長を190nmから400nmとして測定し、HPケミステーション LC 3Dシステム(Hewlett Packard製)にて解析した。この検出法と同時に励起波長273nm、蛍光波長313nmとしてBPA量を定量し、蛍光波長解析には蛍光波長を300~500nmとした。溶出物の定量には絶対検量線法を用い、その検量線の相関係数は0.999以上の場合のみを用いた。

LC/MSによる定性分析に使用した装置はLCとしてHP1000シリーズ(Hewlett Packard製)、MSとしてHP1100MSD(Hewlett Packard製)を使用した。LCの

条件としてカラムはZorbax XDB-C₁₈(2.1x150mm、5 μm、Hewlett Packard製)、移動相は0.02%酢酸/アセトニトリル混合液(混合比は60:40)、流量0.2ml/min、カラム温度は40℃とし、MSの条件としてイオン化はESI、モードはnegative、モニターイオンはM/Z:227とした。

唾液中に溶出されたBPAを抽出するために、有機溶媒による抽出操作を実施した。唾液中に存在する蛋白質を除去するために、0.5ml唾液に1mlメタノールを添加し、十分攪拌後、3000rpmで10分間の遠心し、上清を採取した。その上清に50 μlの1N HClを添加・攪拌後、4.5mlのジクロロメタンを添加して十分攪拌した。得られたジクロロメタン分画を濃縮乾固し、0.5mlの蒸留水/アセトニトリル混合液(混合比50:50)を添加し、濃縮乾固物を溶解させ、HPLCの試料とした。この抽出による回収率を求めるために、唾液に5ng/ml BPAを添加し、前述と同様にして添加回収実験を実施した。

PC製プラケットに残留しているBPAの抽出法は食品衛生試験法¹⁰⁾に準じて実施した。

得られた値はレジンのグラムあたりのBPA溶出量として表した。使用したガラス器具類はすべてアセトンで3回洗浄後、実験に使用した。

C. 研究結果

HPLC 分析条件で、使用する移動相の成分は BPA 分析で重要なファクターとなるので移動相成分比を 50、52、53、54、56、58、60 % 蒸留水と変化させて、BPA の検出限界を検討したところ 56%、58% 蒸留水で BPA の検出限界として 0.5 ~ 1ng/ml を確保できた。更に歯科用レジン硬化体浸漬液を用いて、移動相の成分比を変化させて成分分離状態を確認したところ、53 ~ 56 % 蒸留水まではその分離状態にあまり変化は認められなかったが、58 % 以上では BPA ピークと他の成分のピークが重なり合い、BPA 定量が出来なかった。しかしながら、唾液浸漬液の場合にはレジン硬化体とは異なり、BPA 溶出ピークに夾雑物ピークが認められたので、移動相の成分比を 58% 蒸留水とした。この条件で蛍光による BPA の定量再現性を確認するために 2ng/ml BPA を用いて、HPLC 装置の再現性を確認したところ、10 回注入した平均値は 2.06ng/ml BPA でその標準偏差は 0.07 であった。これから、検出下限値は計算上、0.2ng/ml (絶対量として 4pg) であり、定量下限値は 0.7ng/ml (絶対量として 14pg) となったが、実測値から検出下限値を 0.5ng/ml とした。注入量が 20 μ l なので、その定量下限絶対値は 10pg であることが明らかとなった。また、UV-VIS では 30ppb BPA でその絶対量は 600pg となり、蛍光

による定量法の方が約 60 倍ほど感度が高かった。

この HPLC の蛍光による分析条件を用いて、人工唾液に浸漬した新ロットの各種光重合型 Bis-GMA 含有歯科用レジン硬化体浸漬液を分析したところ、それら硬化体からの溶出物の分離状態は紫外吸収法と同様に極めて良好であったが、BPA ピークに相当するピークは試料 A ~ J まで何れも 4 週間までの浸漬条件では検出されなかった(図 1-10)。これら光重合型 Bis-GMA 含有歯科用レジン硬化体の重量は平均値 \pm 標準誤差で表すとフィッシャーシーラントの A では 45.4 \pm 0.3mg、B では 47.2 \pm 0.6mg、C では 47.7 \pm 0.6mg、D では 65.1 \pm 0.4mg であり、コンポジットレジンの E では 87.2 \pm 0.6mg、F では 87.0 \pm 1.6mg、G では 87.0 \pm 1.6mg であり、ボンディング材の H では 47.7 \pm 0.7mg、I では 31.7 \pm 0.3mg、J では 46.1 \pm 0.4mg となり、形状は同じでも、用いた材料によりその重量はかなり異なっていた。これは恐らく材料に含まれているフィラー含有量が異なるためであると考えられる。この重量とこの HPLC 条件から求めた検出下限値(0.5ng/ml BPA)から、人工唾液に 1 ~ 4 週間浸漬した光重合型 Bis-GMA 含有歯科用レジン硬化体の浸漬液に、もし BPA が存在していたとしても、表 1 に示すように 4 週間人工唾液に浸漬した硬化体からの溶出量はフィッシャーシー

ラントの A では 11.0ng/g レジン未満、B では 10.6ng/g レジン未満、C では 10.5ng/g レジン未満、D では 7.7ng/g レジン未満であり、コンポジットレジンの E、F、G では何れも 5.7ng/g レジン未満であり、ボンディング材の H では 10.5ng/g レジン未満、I では 15.8ng/g レジン未満、J では 10.8ng/g レジン未満であった。

一方、人工唾液に浸漬した PC 製ブラケットからは微量ながら BPA が溶出された (図 11,12)。図 13 に示すように人工唾液浸漬 1 週間で溶出された BPA 量は K では 202.7 ± 26.4 ng/g レジン、メタルスロット除去した K(K')では 98.4 ± 2.2 ng/g レジンであったが、L では 239.0 ± 10.3 ng/g レジンであった。人工唾液浸漬 2 週間では K で 76.3 ± 6.5 ng/g レジン、K'で 60.1 ± 4.6 ng/g レジンと人工唾液浸漬 1 週間で溶出された BPA 量よりも減少したが、L では 410.3 ± 30.4 ng/g レジンと増加した。人工唾液浸漬 3 週間では K で 67.0 ± 8.1 ng/g レジンと経過的に減少していたが、K'と L ではそれぞれ 182.6 ± 8.4 ng/g レジン、 570.3 ± 35.1 ng/g レジンと増加した。人工唾液に 12 週間浸漬すると K と L では溶出された BPA 量はそれぞれ 1067.9 ± 46.0 ng/g レジンと 11331.9 ± 608.6 ng/g レジンと顕著に増加した。人工唾液に 32 週間浸漬した K'では溶出された BPA 量は 7841.1 ± 87.1 ng/g レジンとなり、メタルスロットを除去した場合の方が BPA 溶出量が多かった。BPA の 12

週間の BPA 総溶出量は K と L でそれぞれ $1.7 \pm 0.4 \mu$ g/g レジンと $12.6 \pm 0.7 \mu$ g/g レジンと 12 週間の BPA 総溶出量は L が K に比べて約 7 倍高かった。更にメタルスロット除去した K'では 32 週間人工唾液に浸漬すると $8.2 \pm 0.1 \mu$ g/g レジンと 12 週間人工唾液に浸漬した K よりも BPA 総溶出量は高かった。

このように人工唾液に PC 製ブラケットを浸漬すると BPA 量が増加することから、PC 製ブラケット中にどの程度の残留 BPA が存在しているかを検討した。図 14 に示されているように BPA 以外に恐らく保持時間 6 分ぐらいのピークはフェノールであり、25 分ぐらいのピークは抗酸化剤である p-t-butylphenol などの物質がブラケット中に残留している。図 15 に示すように室温に放置した K と L の BPA 残留量はそれぞれ $37.9 \pm 4.4 \mu$ g/g レジンと $12.7 \pm 0.5 \mu$ g/g レジンとなり、残留 BPA 量は L の場合で少なかった。これらブラケットを 37 °C で試験管中に 12 週間放置した場合の残留 BPA は K と L でそれぞれ $35.2 \pm 1.8 \mu$ g/g レジンと $12.3 \pm 0.2 \mu$ g/g レジンと室温放置した場合と値に変化は認められなかった。ところが一方、37 °C で人工唾液に浸漬した場合では残留 BPA 量は K では $74.7 \pm 3.1 \mu$ g/g レジン、L では $52.8 \pm 1.6 \mu$ g/g レジンとなり室温放置と試験管中に 12 週間放置した場合に比べてそれぞれ約 2 倍と約 4 倍と顕著に増加し、その増加比は L で高

かったが、残留 BPA 量は K で多かった。また、メタルスロットを除去した K で人工唾液に 32 週間浸漬した場合の残留 BPA 量は $82.7 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$ レジンであった。

人工唾液に浸漬した PC 製ブラケットで BPA が溶出されていたので、唾液に浸漬した場合について検討した。唾液に溶出した BPA を定量する場合、唾液中に含まれる不必要なマトリックスを極力除去することが不可欠である。不要なマトリックスを除去する方法として液-液抽出法若しくは固相法があり、微量の目的物質の抽出には固相法が簡便なので、昨年度は唾液に BPA を添加した試料を固相法により、クリーンアップすることを目的として 2 種類のカートリッジを用いて検討したところ、OASIS HLB と ED カートリッジ SDB-RPS では、それぞれの回収率は 85.3 ± 10.6 、 80.2 ± 7.3 % で添加回収率が悪かったので、本年度は液-液抽出を試みた。添加回収には 5ng/ml の BPA を唾液に添加し、その回収率を求めたところ、 92.6 ± 2.2 % (CV:2.4) と固相法より回収率が高かったので、この液-液抽出法を用いて、唾液に浸漬した PC 製ブラケットの浸漬液から BPA を抽出した。この抽出液には唾液由来と考えられるピークが BPA ピーク近傍にあったので、それを分離するために HPLC の移動相成分を 58% 蒸留水と 42% アセトニトリル混合液を用いた。また、定量された BPA 量は添加回収で求めた回収率で換算せずに、実測値

とした。図 16,17 に示すように唾液浸漬 1 週間で溶出された BPA 量は K では $207.1 \pm 9.3\text{ng/g}$ レジンであり、L では $2101.6 \pm 84.9\text{ng/g}$ レジンと人工唾液浸漬 1 週間と比較すると K では殆ど差はないが L では約 9 倍ほど高く、唾液に浸漬した K と比較すると約 10 倍も高い値を示した。唾液浸漬 2 週間では K で $312.1 \pm 39.3\text{ng/g}$ レジン、L で $2063.9 \pm 84.9\text{ng/g}$ レジンと何れの製品も人工唾液浸漬 2 週間と比べて BPA 溶出量は増加していた。唾液浸漬 3 週間では K で $189.6 \pm 4.3\text{ng/g}$ レジン、L で $2472.1 \pm 135.3\text{ng/g}$ レジンとなり、この場合でも人工唾液浸漬 3 週間に比べて BPA 溶出量は増加していた。唾液浸漬 3 週間の総溶出量は K では $0.73 \pm 0.05 \mu\text{g/g}$ レジン、L では $6.41 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$ レジンとなり、特に L では人工唾液浸漬 3 週間の BPA 溶出量と比較して約 5 倍ほど増加していたが、K では約 2 倍程度であった。いずれにしても唾液浸漬では人工唾液浸漬に比べると BPA は溶出しやすいことが示唆された。

このように溶出された BPA が標準品である BPA と同一成分であることを確認するために、得られた BPA ピークの紫外部吸収波長パターン並びに蛍光波長パターンと BPA 標準品とを比較したところ、ほぼ一致した (図 18,19) ことに加えて、LC/MS によるマススペクトルを溶出された BPA と BPA 標準品とを比較したところ、紫外部吸収波長パターンと同じようにマススペ

クトル（図 20,21）もほぼ一致したことから、同定された物質はほぼ BPA であることが示された。

D. 考察

歯科用レジン材料は合成化学物質であり、それらは 100 % 純粋な物質であることは殆ど存在しない。また、歯科用レジンの多くは口腔内で化学反応させることが多いが、化学反応で至適な条件でさえ、100 % 完全に反応することは少ないことから、口腔内の条件ではその化学反応率は低いと考えられる。従って、未反応の化学物質、反応中間体、触媒などが必ず残留していることになるが、口腔内環境下のポリマーではそれらの物質の除去は不可能である。従って、それらの物質がポリマー中に残留し、そこから溶出する可能性は非常に高いと考えられるが、現時点では溶出物に関する体系的な研究はなされていない。特に内分泌攪乱作用があると言われている BPA が Bis-GMA（及びその類似体）含有歯科用レジン材料に存在しているか、否かについても測定感度、測定機器などにより、異なっている。更に歯科用レジン硬化体からの溶出物の同定・定量は歯科用レジンの構成成分が多いこと、その構成成分の化学的、物理化学的性質が非常に類似していること並びに多くの構成成分がどのような化学物質であるか不明なことなどから非常に困難を

極める。現在までにコンポジットレジンやフィッシャーシーラントなどからの溶出物の同定に関する報告^{2,12,20)}は数多くあるが、微量構成成分に関する報告は GC/MS¹¹⁾、LC/MS¹²⁾と HPLC¹³⁾を用いた研究から 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール (BHT)¹²⁾のような抗酸化剤、チヌビン P¹¹⁾やベンゾフェノン誘導体¹²⁾などの紫外線吸収剤、更にフタル酸エステル類^{11,13)}などの可塑剤、重合開始剤であるトリフェニルホスフィン¹²⁾などがある。フィッシャーシーラントやコンポジットレジン硬化体からの BPA の溶出に関する報告は断片的なデータのみで広範囲の研究はなされていないのが現状である。その多くは分析装置として HPLC を用い、同定には BPA の紫外外部吸収を指標としているが、BPA の紫外外部吸収ではその検出感度が低いため、極微量の BPA は検出できない。逆の見方をすれば、もし BPA が存在していたとしても紫外外部吸収で検出できないほど微量の BPA しか存在しない。しかしながら、宮崎らは¹³⁾BPA が HPLC（紫外外部吸収）でコンポジットレジン硬化体の蒸留水浸漬により溶出すること、GC でコンポジットレジン未硬化体中に 0.015% の BPA が存在する¹⁸⁾こと、更に Olea ら²⁾によると HPLC（紫外外部吸収）でコンポジットレジン未硬化体中に最大、約 0.068% の BPA が存在すること並びに Pulgar ら¹⁹⁾も BPA が最大 1.8 μ g/mg も検

出していることを報告している。フィッシャーシーラント処理直後の唾液中に 5.8-105.6ppb の BPA が HPLC で検出される²⁰⁾など合成原材料として BPA を使用している歯科用レジンから BPA 溶出の可能性が指摘されている。著者らも HPLC で BPA の紫外吸収を指標としてその感度を検討したところ、検出限界は 20 ~ 30ng/ml であった。ところがこの検出限界ではフィッシャーシーラント硬化体を人工唾液に浸漬しても BPA は検出できなく、宮崎らの報告¹⁹⁾などを確認できなかったため、更に検出感度を高めるため、分光蛍光検出器を用いて人工唾液に浸漬した歯科用レジン硬化体からの溶出物を測定したところ、極微量ではあるが構成成分として Bis-GMA を含有する材料の全てから BPA が検出されたことを報告した²¹⁾が、新しいロットを用いて、同様な研究を実施したところ、検出下限値が 0.5ng/ml (絶対値として 10pg) でも調べた何れの 10 種類の Bis-GMA 及びその類似体含有歯科用レジン硬化体から人工唾液浸漬液中には BPA は検出されなかった。

一方、PC 製ブラケットを人工唾液並びに唾液中に浸漬すると BPA が微量ながら検出された。その溶出量は人工唾液に比べると唾液中に浸漬した場合で高い値が得られた。また、溶出された BPA 量と残留 BPA 量は製品によりかなり異なっていることが明らかとなった。PC 製ブラケットは射出成形するため、PC を溶解させる必要性が

あり、一例として約 330 °C で数分で溶解させるなど射出成形機により、その溶解温度が異なる。この温度では PC は熱分解を起し、フェノール類 (例えばフェノール、メチルフェノール、4-イソプロピルフェノールなど) が生成され、その処理時間が長いと BPA などにも分解されること²²⁾が知られているので、その成型時の温度が異なると製品中の残留 BPA も異なる²³⁾こと、更に原材料の PC をどの程度精製したかによっても残留 BPA 量は異なることが知られているので、この製品による残留 BPA 量の相違はこのためと考えられる。

矯正用ブラケットはメタルスロットを装着しているため、人工唾液並びに唾液中に浸漬するとメタルスロットの金属が微量ながら溶出する可能性があり、溶出した金属イオンにより、溶出 BPA 量及び人工唾液や唾液中に浸漬した PC 製ブラケットに残留している BPA 量が増加していると考えられる。これは PC の熱分解反応に、ある種の金属が関与し、PC の加水分解を促進していること²⁴⁾が知られているので、人工唾液でも同様な反応が生じていることが類推される。メタルスロット除去製品で 32 週間、人工唾液浸漬した場合には BPA 総溶出量がメタルスロット装着したまま、12 週間人工唾液に浸漬した場合の BPA 総溶出量よりも多かったことはメタルスロット除去時の物理的因子により、マイクロクラックが生じたこと並びに人工唾液浸漬期間が長

いことなどによるものと考えられる。K と L はメタルスロットを装着したまま浸漬したので、この BPA 溶出量並びに残留量の相違は前述のようなブラケット成型時に生じる変化のみならずこのメタルスロットの金属成分が PC の加水分解反応に何らかの形で関与している可能性があるためメタルスロットの金属組成の相違による可能性も否定できない。また、口腔内では各種酵素が存在しているので、それら酵素（特にエステラーゼ）による加水分解も現時点では否定できない。しかしながら、これら BPA 残留量増加の可能性の中で最も大きい比重を占めている条件は原材料である PC の純度と射出成形時の温度による PC の熱分解による低分子化と考えられる。そのために K では L に比べて残留 BPA が室温放置若しくは 37℃ 放置で残留 BPA 量が多かったが、12 週間人工唾液に浸漬すると残留 BPA 量の増加比が顕著に L で高くなったことから、L での水溶液中での PC の加水分解反応が K よりも大きいことが推測される。しかしながら、このようにブラケットに残留している BPA 量は食品衛生法に基づく材質試験の規格基準値は 500ppm なので、現時点の規格基準から判断すると特に問題があるとは考えられない。

一方、唾液に浸漬すると K と L で何れも BPA 溶出量が顕著に増加していることから、前述のような唾液中の酵素による PC の加水分解促進作用の可能性のみならず、

唾液中の脂質などによる PC からの BPA の抽出促進によることも考えられる。従って、歯科材料などからの BPA 溶出実験を実施するには人工唾液では溶出量の傾向は分かるが、正確な溶出量を求めるためには、溶出試験法として唾液による溶出試験を実施することが望ましいと考えられる。但し、唾液の成分は日時変動が大きいので、極力採取する時間を決めることとある程度、まとめた母集団にするれば、その成分が平均化され、抽出効果なども一定となりうることでデータのばらつきも少なくなると考えられる。このようなことから、他の PC 製医療用具が長期間体内で直接接触する場合にはブラケットと同じように BPA 溶出の可能性並びに材質中の残留 BPA 量が増加する可能性も否定できないので、PC 製医療用具の許認可の際には報告実施項目としてその医療用具の使用期間を考慮して、血清や唾液などを用いた溶出動態並びに溶出後の材質試験などを実施することが必要であると考えられる。

この PC 製ブラケットの L を人工唾液に浸漬すると 12 週間で約 13 μ g/g レジンの BPA が溶出されるが、最大 32 歯に PC 製ブラケットを装着させると約 560mg の PC が装着されたことになる。従って、約 7.3 μ g の BPA が 12 週間で PC から溶出したことになる。ここで唾液の全てが体内に摂取されたと仮定すると 1 日当たり約 87ng の BPA を摂取したことになる。小児の体

重を 20kg とすると体重当たりの摂取量は約 4ng/kg/日となる。この値は少なくとも vom Saal らの報告²³⁾で生殖異常をきたすと言われている用量である 2 μg/kg に比べて低値であるが、これをもって安全であるとも生体為害性があるとも現時点では断定できず、更に今後の BPA による生殖異常に関する詳細な報告がなされることを待たねばならない。また、この全てが摂取・吸収されたとして体重 20kg では血液量は約 1500ml なので血中濃度は約 0.06ng/ml となる。しかしながら、これらの値は人工唾液浸漬から換算した値なので、実際の唾液ではこの値よりも高いことが推測される。特に矯正用ブラケットは長期間装着するので、長期間唾液浸漬後の溶出量並びに残留量などを詳細に検討すること及び人工唾液では光重合型 Bis-GMA 含有歯科用レジンからの溶出は測定機器の検出限界未満であったが、唾液中での浸漬実験などを、今後検討する必要性があると考えられる。

D. 結 論

4 週間人工唾液に浸漬した新しいロットの光重合型 Bis-GMA (及びその類似体) 含有歯科用レジン硬化体からの BPA は検出限界未満であった (0.5ng/ml) が、人工唾液並びに唾液中に浸漬した PC 製矯正用ブラケットから BPA ピークに相当する物質が極微量溶出していることが明らかとなっ

た。その溶出量は短期浸漬条件では唾液浸漬した場合で高い値が得られた。更に PC 製ブラケットでは人工唾液中に浸漬した場合の残留 BPA 量が顕著に増加していることが明らかとなった。

E. 研究発表

学会発表

- 1) 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) : 171, 1999.
- 2) 矢島 功ら：歯科用ポリカーボネート中のビスフェノール A の分析. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第二回研究発表会要旨集、p.27、1999.

F. 文 献

- 1) 厚生省, 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書, 1998.
- 2) Olea, N., et al.: Environ. Health Perspect., 104: 298, 1996.
- 3) Mariotti, A., et al.: Eur. J. Oral Sci., 106: 1022, 1998.
- 4) Farabollini, F., et al.: Pharmacol. Biochem. Behav., 64: 687, 1999.
- 5) Nagao, T., et al.: Reprod. Toxicol., 13: 303, 1999.
- 6) Cagen, S.Z., et al.: Toxicol. Sci., 50: 36, 1999.
- 7) Cagen, S.Z., et al.: Regu. Toxicol.

- Pharmacol., 30: 130, 1999.
- 8) Howdeshell, K., et al.: Nature, 401:763, 1999.
- 9) Arvidson, K. & Johansson, E.G.: Scand. J. Dent. Res., 93: 467, 1985.
- 10) 衛生試験法・注解、日本薬学会編、金原出版(株)、pp1702, 1995.
- 11) Lee, S. -Y., et al.: J. Oral. Rehabil., 25: 575, 1998.
- 12) Spahl, W., et. al.: J. Dent., 26: 137, 1998.
- 13) 宮崎光治ら: 歯科材料・器械, 2: 8, 1983.
- 14) Nathanson, D., et al.: JADA, 128: 1517, 1977.
- 15) Hamid, A. and Hume, W.R.: Dent. Mater., 13: 98, 1997.
- 16) Siew, C., et al.: J. Dent. Res., 77(SI A): 239, 1998.
- 17) Inoue, K. and Hayashi, I.: J. Oral. Rehabil., 9: 493, 1982.
- 18) Jolanki, R., et al.: Contact Dermatitis, 33: 94, 1995.
- 19) Fung, E.Y.K., et al.: JADA, 131: 51, 2000.
- 20) Arenholt-Bindslev, D., et al.: J. Dent. Res., 77(SI B): 692, 1988.
- 21) 本郷敏雄ら: 平成 10 年度厚生科学研究補助金研究報告書「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」p.22, 1999.
- 22) Davis, A. and Golden, J.H.: J. Gasschro., 5: 81, 1967.
- 23) Kovarskaya, B.M., et al.: Polymer Sci. USSR, 4: 1346, 1963.
- 24) 鈴木健一: プラスチック, 15: 46, 1964.
- 25) vom Saal, F.S., et al.: Toxicol. Ind. Health, 14: 239, 1998.

G. 謝 辞

本研究を遂行する際にあたり、HPLC の解析条件などを快くご指導下さいました横河アナリティカルシステムズ(株)アプリケーションセンターの下位典子殿並びに LC/MS の分析を実施して下さいました埼玉県衛生研究所の堀江正一博士に厚く御礼申し上げます。

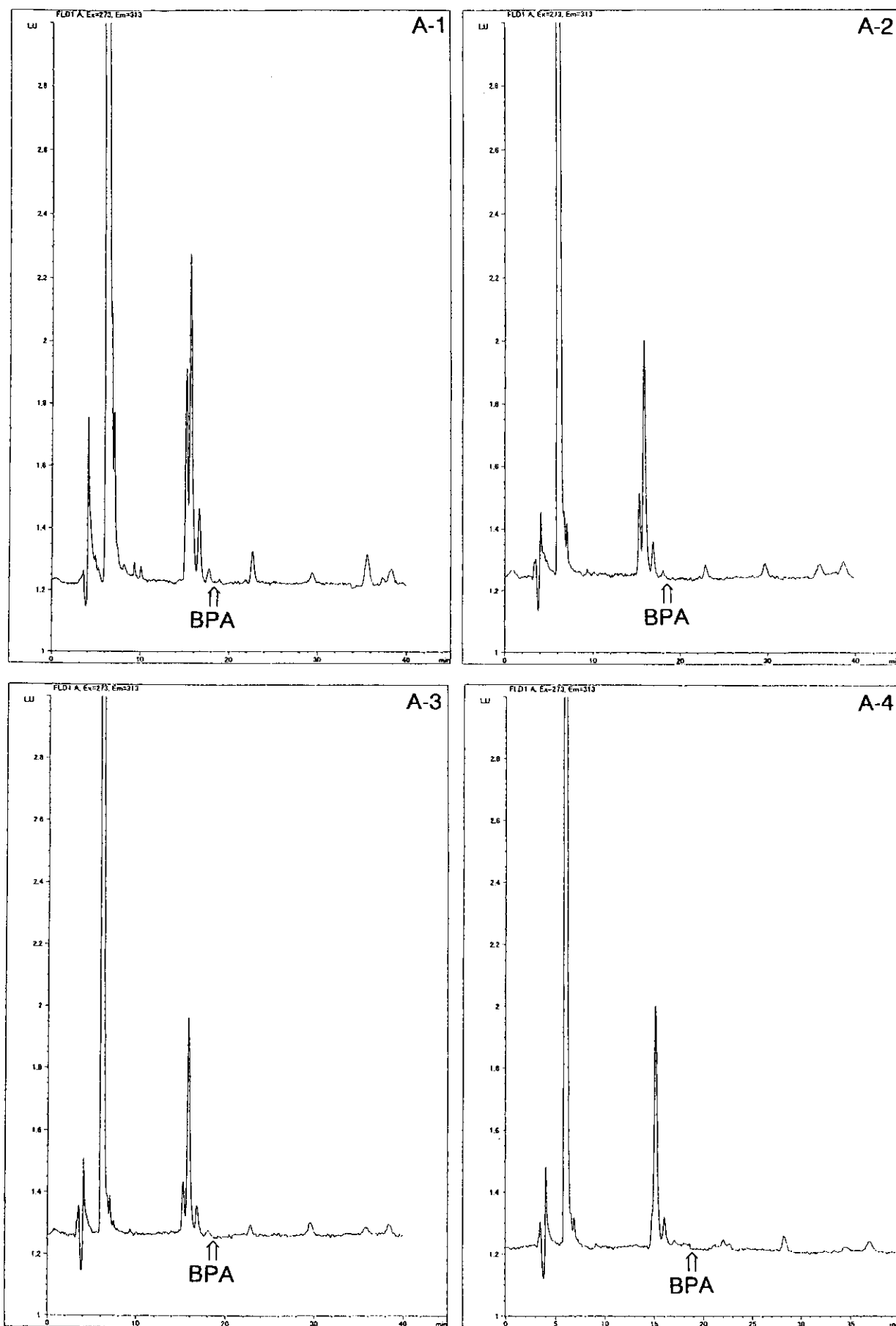


図1. フィッシャーシーラント(A)硬化体を人工唾液に1週間(A-1)、2週間(A-2)、3週間(A-3)、4週間(A-4) 浸漬して溶出された物質の典型的なHPLCクロマトグラム

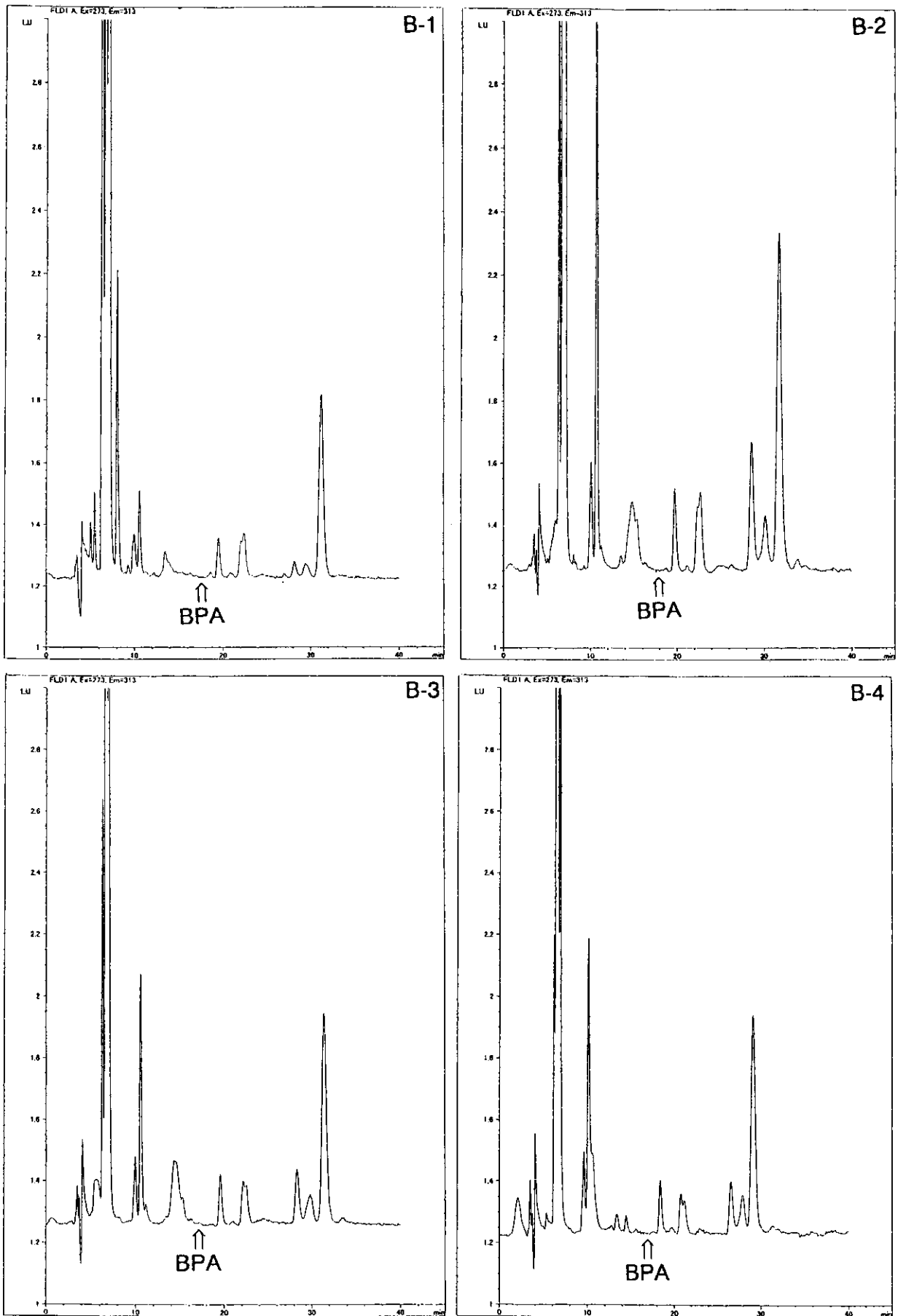


図2. フィッシャーシーラント(B)硬化体を人工唾液に1週間(B-1)、2週間(B-2)、3週間(B-3)、4週間(B-4) 浸漬して溶出された物質の典型的なHPLCクロマトグラム

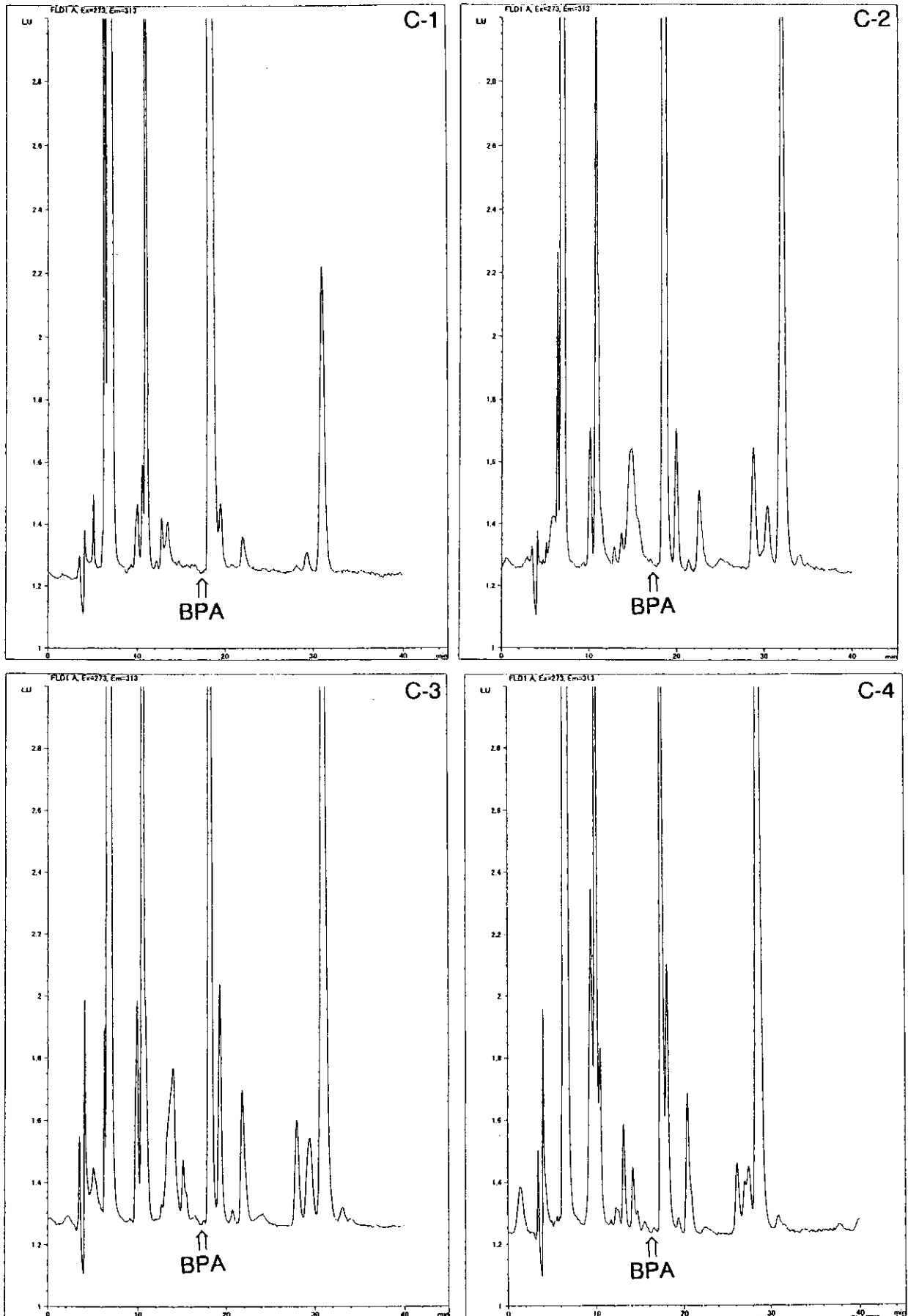


図3. フィッシャーシーラント(C)硬化体を人工唾液に1週間(C-1)、2週間(C-2)、3週間(C-3)、4週間(C-4) 浸漬して溶出された物質の典型的なHPLCクロマトグラム

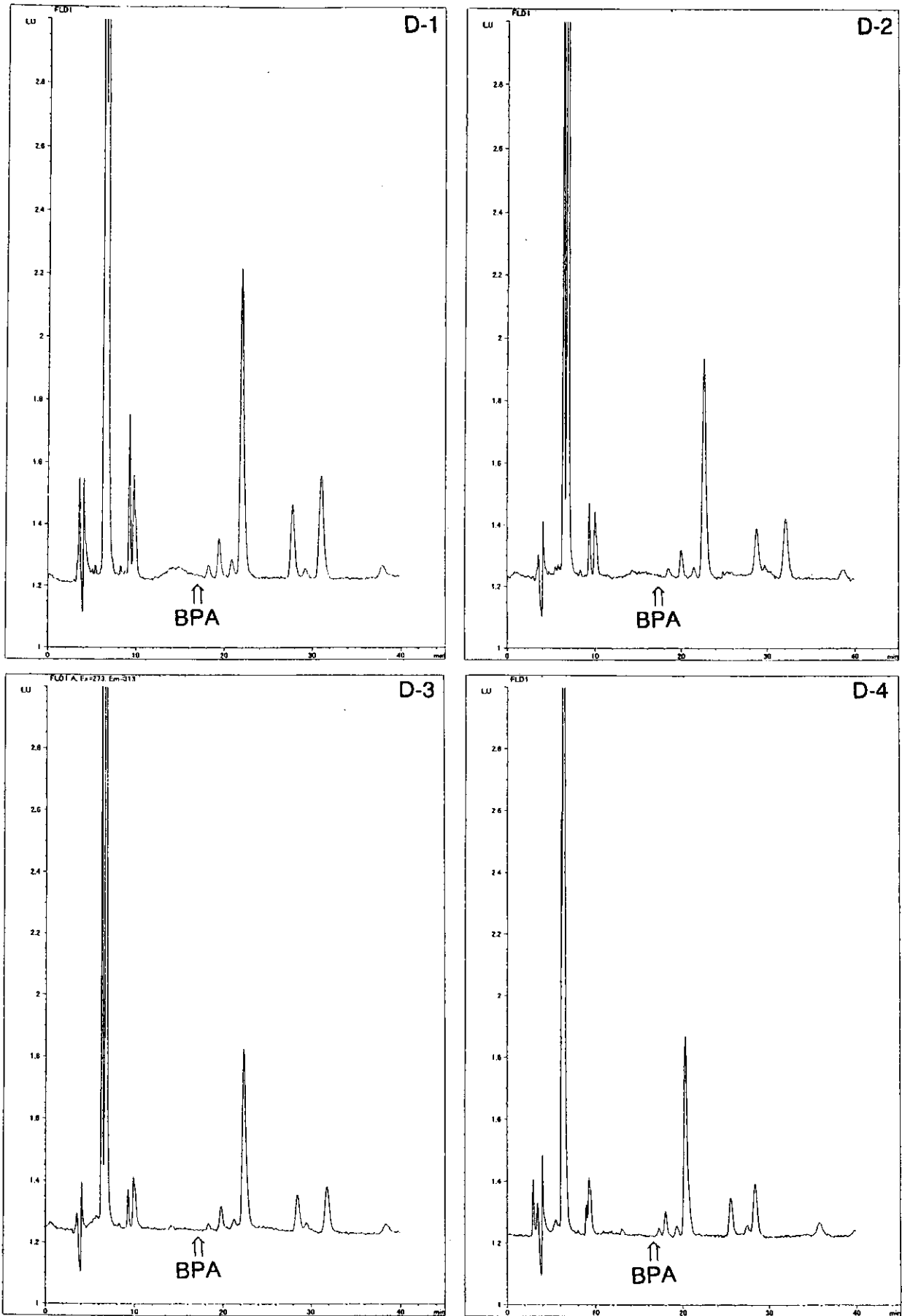


図4. フィッシャーシーラント(D)硬化体を人工唾液に1週間(D-1)、2週間(D-2)、3週間(D-3)、4週間(D-4) 浸漬して溶出された物質の典型的なHPLCクロマトグラム