

平成12年度厚生科学研究費補助金
(生活安全総合研究事業)
研究成果報告書

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
(H11 - 生活 - 023)

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学
分担研究者	宮崎 豊	愛知県衛生研究所
	畑山 善行	長野県衛生公害研究所
	石綿 肇	国立医薬品食品衛生研究所

目 次

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	1
総括研究報告書	
主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学 薬品分析化学教室 教授	
ポリ塩化ビニル製手袋中のフタル酸ジ2-エチルヘキシルの食品中への移行に関する研究	25
主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授	
研究協力者 吉村 吉博 星薬科大学	
加藤喜代子 星薬科大学	
井之上浩一 星薬科大学	
堀江 正一 埼玉県衛生研究所	
石井 里枝 埼玉県衛生研究所	
吉田 栄充 埼玉県衛生研究所	
平山 クニ 神奈川県衛生研究所	
藤巻 照久 神奈川県衛生研究所	
月岡 忠 長野県衛生公害研究所	
寺沢 潤一 長野県衛生公害研究所	
岡 尚男 愛知県衛生研究所	
伊藤 裕子 愛知県衛生研究所	
食品用ポリ塩化ビニル製手袋中のジエチルヘキシルフタレートの分析及びその動態解明	45
主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授	
研究協力者 荻野 純一 東レリサーチセンター	
生活関連製品中の内分泌かく乱化学物質と溶出物の変化に関する研究	61
分担研究者 石綿 肇 国立医薬品食品衛生研究所	
軟質ポリ塩化ビニル製玩具からのフタル酸エステル曝露量の算定及び 平成12年度購入玩具中の可塑剤の分析	65
分担研究者 石綿 肇 国立医薬品食品衛生研究所	
協力研究者 杉田たき子、阿部有希子	

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	
－フタル酸ジエステル類の唾液中での化学変化－	91
主任研究者	中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者	石綿 肇 国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	石橋 亨 東京顕微鏡院
	新野 竜大 東京顕微鏡院
食品用ラップフィルム中における4-ノニルフェノールの分析及びその動態解明	101
主任研究者	中澤 裕之 星薬科大学教授
研究協力者	吉村 吉博 星薬科大学
	井之上浩一 星薬科大学
	加藤喜代子 星薬科大学
	牧野 恒久 東海大学
	岩崎 克彦 東海大学
	和泉俊一郎 東海大学
缶ビール中のビスフェノールAに関する研究	
－LC/MS/MS法による分析法開発と缶ビール・缶体・塗料試料の分析－	115
主任研究者	中澤 裕之 星薬科大学教授
研究協力者	池田 満雄 アサヒビール(株)総合評価センター
	渋谷 一郎 アサヒビール(株)総合評価センター
	奈良部 雄 アサヒビール(株)総合評価センター
	表 雅之 アサヒビール(株)総合評価センター
	林 優子 アサヒビール(株)総合評価センター
缶詰食品中のビスフェノールAおよび	
ビスフェノールAジグリシジルエーテル関連物質の分析	125
主任研究者	中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者	宮崎 豊 愛知県衛生研究所
協力研究者	小林 進 埼玉県衛生研究所
	堀江 正一 埼玉県衛生研究所
	吉田 栄充 埼玉県衛生研究所
容器包装素材等からの内分泌かく乱化学物質の動態	139
主任研究者	中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者	宮崎 豊 愛知県衛生研究所

容器包装素材等からの内分泌かく乱化学物質の動態

血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析 145

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所
研究協力者 猪飼 誉友 愛知県衛生研究所
近藤 文雄 愛知県衛生研究所
伊藤 裕子 愛知県衛生研究所
岡 尚男 愛知県衛生研究所
松本 浩 愛知県衛生研究所

医療用ディスプレイ製品における内分泌かく乱化学物質の動態に関する研究 157

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
研究協力者 牧野 恒久 東海大学教授
岩崎 克彦 東海大学助教授
和泉俊一郎 東海大学講師
畑山 善行 長野県衛生公害研究所所長
月岡 忠 長野県衛生公害研究所
寺沢 潤一 長野県衛生公害研究所
石川 健次 テルモ(株)
中橋 敬輔 テルモ(株)

医療用具を含む高分子素材中の重金属類の分析 167

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所
研究協力者 益川 邦彦 神奈川県衛生研究所
藤巻 照久 神奈川県衛生研究所
平山 クニ 神奈川県衛生研究所

歯科・医用高分子素材由来の内分泌かく乱化学物質

ポリカーボネート製矯正用ブラケット中のビスフェノールAと

p-t-ブチルフェノールの分析 171

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
研究協力者 本郷 敏雄 東京医科歯科大学

生活環境中内分泌かく乱化学物質の分析精度の向上とヒト暴露に関する研究

及び生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価 183

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者 畑山 善行 長野県衛生公害研究所

NCI-GC/MSによる尿中のオクチルフェノール、ノニルフェノール及びBPAの定量……………187

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者 畑山 善行 長野県衛生公害研究所
月岡 忠 長野県衛生公害研究所
寺澤 潤一 長野県衛生公害研究所

環境大気（室内、屋外）におけるフタル酸エステル等の実態調査……………201

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
研究協力者 今井 俊介 奈良県衛生研究所所長
北田 善三 奈良県衛生研究所大気課長
松浦 洋文 奈良県衛生研究所副主幹
植田 直隆 奈良県衛生研究所主任研究員
阿井 敏道 奈良県衛生研究所主任研究員

GC/MS分析のノウハウ（ブランクの扱いなど）及び

LC/MS分析（フェノール類など）について……………223

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者 松岡 広和 横河アナリティカルシステムズ株式会社
佐久井徳広 横河アナリティカルシステムズ株式会社
滝埜 昌彦 横河アナリティカルシステムズ株式会社

酵母Two-Hybrid法を用いた高分子素材等の

生活関連製品由来化学物質の内分泌かく乱作用の評価……………231

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
分担研究者 畑山 善行 長野県衛生公害研究所
研究協力者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所
堀 伸二郎 大阪府立公衆衛生研究所
高取 聡 大阪府立公衆衛生研究所

ヒト副腎皮質由来H295R細胞のコルチゾール産生に及ぼすスチレンモノマー、

ダイマー、トリマー、フタル酸エステル、及びアルキルフェノールの阻害効果……………245

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
研究協力者 中陳 静男 星薬科大学

エポキシ樹脂関連化学物質の妊娠期及び授乳期暴露による次世代への影響……………259

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授
研究協力者 山崎 聖美 国立公衆衛生院

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

主任研究者 中澤裕之（星薬科大学 薬品分析化学教室 教授）

研究要旨

1. ポリ塩化ビニル製玩具及び食品用手袋に残存するフタル酸エステル類の分析及びその動態解明

①ポリ塩化ビニル製手袋に残存するフタル酸 2-ジエチルヘキシルの分析精度管理及びその動態に関する研究

塩化ビニル樹脂 (PVC) は、食品用容器・包装材やプラスチック製医療用具の材質に広く使用されている。PVC の可塑剤として内分泌かく乱作用が危惧されているフタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP) が多く利用されている。近年、食品用 PVC 製手袋から DEHP が多量に残存し、食品等へその多くが移行している可能性が指摘された。そこで、PVC 製手袋中に残存する DEHP の分析に関して精度高い方法を構築し、本法を用いて、実際の食品への移行実験を実施した。PVC 製手袋中 DEHP の分析精度管理を行った結果、5 研究機関による DEHP 室間再現精度等の検討を実施した。

②PVC 手袋に残存する DEHP の溶出挙動及び残存状態の解明

食品用 PVC 製手袋に多くの DEHP が残存し、食品へ移行していることを確認した。そこで、DEHP の溶出挙動及び残存状態を解明する目的でその存在状態、分布及び、エチルアルコール消毒時の変化などの評価を、透過型電子顕微鏡観察、固体 NMR 分析、角度変化 ATR による深さ方向分布シミュレーション、熱重量測定および熱脱着 GC/MS 法などにより実施した。

③PVC 製玩具からのフタル酸エステル類の溶出及びその挙動に関する研究

1) 玩具中のフタル酸エステルの唾液での動態解析

乳幼児の mouthing 時間と、ボランティアによるフタル酸エステル含有玩具試験片を chewing した時の溶出濃度とから、我が国の乳幼児におけるフタル酸エステルの一日摂取量を試算した。また、平成 13 年 1 月に購入した 29 検体の玩具では、平成 10 年度に入手した玩具と比べてフタル酸エステル類の検出率等に関して調査研究を実施した。

2) 唾液中フタル酸モノエステルの HPLC/UV 及び GC/MS 分析

唾液中のフタル酸ジエステルおよびそのモノエステル体の抽出は、唾液量と等量のアセトニトリルを加え良く混和した後、遠心分離し、沈殿物を取り除き、アセトニトリルが 10% (v/v) になるように 0.1% 酢酸水溶液を加え、良く混和した。次に、固相抽出法により、精製及び濃縮処理を行い、UV 検出器付 HPLC にてフタル酸モノエステルの分析を行った。その結果、良好な分離能及び測定法を確立した。また、GC/MS 分析において、カルボキシル基を TMSD にてメチルエステル化し、asymmetric なフタル酸ジエステルとした後、GC/MS-SIM

にて行った。測定用フラグメントイオンは m/z 163、149 および 91 とした。

3) ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルのモノエステル体の生成

5種類 of フタル酸ジエステルを、ヒト唾液中にそれぞれ 100nmol 加え、37℃、30 分間 Incubate し、それぞれのフタル酸ジエステルに相当するモノエステル体を HPLC 分析および GC/MS-SIM 分析した。その結果、フタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジ-n-ヘキシル (DHXP)、およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) 5種類それぞれのフタル酸ジエステルの唾液中での化学変化により、ジエステル体に相当するモノエステル体がそれぞれフタル酸モノエチル (MEP) 21.2%、フタル酸モノブチル (MBP) 81.6%、フタル酸モノベンジル (MBenzP) 24.6%、フタル酸モノ-n-ヘキシル (MHXP) 18.8%、およびフタル酸モノ-2-エチルヘキシル (MEHP) 1.8% 生成された。

2. 食品用器具・容器包装に関する内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

① 食品用ラップフィルム中の 4-ノニルフェノールの分析及び動態解析

食品用ラップフィルムに内分泌系をかく乱することが示唆される化学物質の残存に関して注目され、その安全性を評価する必要がある。特に内分泌かく乱作用が指摘されている 4-ノニルフェノール (NP) が残存している報告があり、早急に調査研究を実施しなければならない。そこで食品用ラップフィルム中に残存する NP に関する分析法の開発、溶出挙動の解明、改良型ラップフィルムの評価及びそのエストロゲン活性評価を実施した。

② 食品用飲料缶中ビスフェノール A の分析及びその食品移行に関する研究

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた新規ビスフェノール A (BPA) の高感度分析の開発を実施した。本法により各種製品ビールについて、BPA の含有量を調査した。また、缶容器からの BPA 溶出挙動と食品移行に関する詳細な検討も実施した。

③ 缶詰食品中の BPA およびその関連物質の分析に関する研究

缶詰の内面コーティング剤から食品に移行した BPA およびビスフェノール A ジグリシジルエーテル (BADGE) 関連物質の一斉分析法を高速液体クロマトグラフ (HPLC) - 蛍光検出器を用いて検討し、構築した分析法により、市販缶詰食品 (主としてプルトップ型) のモニタリング調査を実施した。

3. 医療用高分子素材及び製品に残存する内分泌かく乱化学物質の動態解析

① 血液バッグ保存血液に存在する揮発性有機化合物の分析に関する研究

輸血用血液バッグから溶出するテトラヒドロフラン (THF) および 2-エチル-1-ヘキサノールの溶出挙動、および、これらの物質がバッグから溶出する原因の調査を行なうとともに、実際の医療に用いられる輸血用血液に含まれる揮発性有機化合物の実態について調査を行った。さらに、人工透析用の透析膜およびそれに付随して使われる血液回路から溶出する物質の予備調査を実施した。

② 高分子素材からなる医療用プラスチック製品の内分泌かく乱化学物質等に関する動態解

析

医療用具は直接生体との関わりの多い生活関連製品であり、その安全性には常に注意をしておかねばならないものである。今回は特に内分泌かく乱化学作用の疑いのある化学物質として挙げられている可塑剤等に注目して、輸液を通常行う条件下でのそれらの溶出挙動を測定する。また、その測定結果を基にそのリスクについて検討した。

③医療用高分子素材中重金属類の分析及びその残存量調査

医療用具及び食品の容器包装材料などの高分子素材中に内分泌かく乱化学物質として疑いのあるCd、Pbなどの金属の有無について検討した。測定には高周波プラズマ発光分析装置を用い、Cd、Pbを含む22金属について53検体の高分子素材を分析した。

④歯科用ポリカーボネート中内分泌かく乱化学物質に関する分析及び動態解明

歯科用材料ではポリカーボネートは、テンポラリークラウン、レジン歯矯正用ブラケットなどに用いられ、人工唾液にこれら材料を浸漬するとBPAなどが溶出され、特に矯正用ブラケットからのBPA溶出量が多かったため、模擬口腔内環境を想定して12週間唾液に浸漬した矯正用ブラケットからのBPA溶出量などについて検討したところ、人工唾液浸漬に比べて唾液浸漬ではBPA溶出量が高く、また、微量ではあるがp-t-ブチルフェノール(t-BuP)が溶出していることも明らかとなった。

4. 生活環境中内分泌かく乱化学物質の分析精度の向上とヒト暴露に関する研究

①内分泌かく乱化学物質のヒト暴露調査に関する基礎的検討

内分泌かく乱化学物質のヒト暴露調査に関して、ヒト尿中の存在量に関する分析法の構築を目的に実施した。本検討に関する内分泌かく乱化学物質として、BPA、NP、オクチルフェノール等のフェノール性内分泌かく乱化学物質をターゲットとし、グルクロン酸抱合体を含めた測定法をGC/MS-NCIにより構築した。

②環境大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

住宅や自動車には内分泌かく乱作用を有する疑いのある化学物質や、有害大気汚染物質(HAPs)にリストアップされた化学物質が使用されており、その実態を把握する必要がある。そこで、プラスチック可塑剤であるフタル酸エステル10物質(うちHAPs4物質)及びアジピン酸エステル1物質、並びに揮発性有機化合物40物質(うちHAPs28物質)について、住宅14戸及び自動車3台における実態調査を行った。

③内分泌かく乱化学物質の微量分析及び分析精度向上の基礎的検討

内分泌かく乱化学物質の微量測定には、主にGC/MSが利用される。しかし、その微量分析や精度の高い測定法には、難点が多い。そこで、本報では分析の注意点やブランクの扱い等測定上のノウハウに関する知見を報告する。また、内分泌かく乱化学物質の疑いのあるフェノール性化学物質の微量分析において、LC/MSを用いる高感度分析法の知見を報告する。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価

①酵母 Two-Hybrid 法を用いた高分子素材由来化学物質の内分泌かく乱作用評価

酵母 Two-Hybrid 法を用いて BPA 誘導体 (BADGE 類)、臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエーテル、ベンゾフェノン誘導体等の S-9 代謝産物のエストロゲン様作用を評価した。また、甲状腺ホルモン受容体を導入した酵母を用いた酵母 Two-Hybrid 法によって、フタル酸エステル類及びアルキルフェノールをはじめとする生活関連製品に由来する化学物質の甲状腺ホルモン様作用を評価した。

②ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

環境由来の化学物質の内在性ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす影響を解明する目的で、ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いてコルチゾール産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法を確立した。このアッセイ系を用いて高分子を素材とした生活関連製品から溶出が疑われており、内分泌かく乱化学物質としてリストアップされているスチレンモノマー、ダイマー、トリマー、フタル酸エステル、及びアルキルフェノール類の影響を検討した。さらにステロイド産生を阻害することが認められたフタル酸ジシクロヘキシル、NP および 4-*t*-オクチルフェノール等についてその作用機序の検討を行った。

③BADGE 関連化学物質の妊娠期及び授乳期暴露による次世代への影響

エポキシ樹脂は高分子素材由来製品に多く応用されており、食品用缶の内面コーティングや接着剤等に用いられる。BADGE はエポキシ樹脂主原料であり、水系食品の缶に用いられた場合、BADGE 加水分解体としての食品移行が報告されている。この物質に関する内分泌かく乱作用という視点での毒性評価はなされていない。日常、食品を介して摂取する可能性のあるこの物質に関して、生体影響についての研究が必要とされる。従って、BADGE-40H の次世代影響を検討した。

分担研究者

宮崎 豊 愛知県衛生研究所 所長
畑山 善行 長野県衛生公害研究所 所長
石綿 肇 国立医薬品食品衛生研究所
室長

A. 研究目的

1. PVC 製玩具及び食品用手袋に残存するフタル酸エステル類の分析及びその動態解明

①PVC 製手袋に残存する DEHP の分析精度管理及びその動態に関する研究

DEHP は、食品用ポリ塩化ビニル製手袋に多く残存し、その使用により食品に移行し、ヒトに暴露されていると近年危惧されている。そこで、調理用手袋から食品調理時ほどの程度 DEHP が移行するか、実際の食品を用いて検討した。先ず材質試験として、塩化ビニル製手袋中 DEHP の含量を従来から使用されている液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー (GC) 及びガスクロマトグラフ/質量分析 (GC/MS) 法により測定した。次に食品への移行試験として、切り干し大根、コロケ及びおにぎりの調理時に PVC 製手袋を使用し、DEHP の食品への移行について検討した。

② VC 製手袋に残存する DEHP の溶出挙動及び残存状態の解明

DEHP は内分泌系をかく乱する化学物質であることが示唆されており、特に手袋用途のような特に柔らかい材料の場合、使用量が数 10% から 50% 以上になることから、手袋表面から食器や食品への移行が懸念される。これまでに PVC 製品からの DEHP の溶出挙動などについて調査が進められてきているのに対し、ここでは PVC 製品残存 DEHP の

存在状態や相互作用等、高分子素材の解析という観点から、複数の高分子分析の手法を適用して分析・評価を実施する。

③PVC 製玩具からのフタル酸エステル類の溶出及びその挙動に関する研究

EU では 6 種類のフタル酸エステルについて TDI が設定され、わが国も 2000 年 6 月に DEHP について $40\sim 140\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の TDI が設定された。これを踏まえ、①我が国の乳幼児における PVC 玩具由来のフタル酸エステル類暴露量を推定すること、②使用されている可塑剤に変更があるか否か、③溶出したフタル酸エステルの唾液中での変化、以上 3 点について明らかにすることを目的とした。

平成 11 年度の本研究では、ヒトの chewing による乳幼児用玩具からのフタル酸ジエステルの口腔内への溶出実験を行った。その結果、一部の玩具からの溶出量が他の玩具からの溶出量と比較し、著しく低いことが分かった。その理由を検討したところ、フタル酸ジエステルが唾液中で化学変化していることが判明した。

そこで本年度における研究は、唾液中のフタル酸モノエステルの分析法、およびフタル酸ジエステルの唾液中での化学変化によるフタル酸モノエステルの生成について検討した。

2. 食品用器具・容器包装に関する内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

①食品用ラップフィルム中の NP の分析及び動態解析

NP は、酸化防止剤や界面活性剤等の分解物として、プラスチック製品に残存する可

能性が示唆される。近年、その用途よりスーパーや一般家庭等で広く利用されている食品用ラップフィルムもその一つとして挙げられる。内分泌かく乱化学物質として、代表的な化学物質である NP に関して、食品用ラップフィルム中残存や食品移行等調査しなければならない。そこで、NP に関しての新規分析法の開発及び食品用ラップフィルムを用

いて、材質試験及び溶出試験を実施した。近年、開発された改良型ラップフィルムに関してもその調査研究を実施し、エストロゲン活性評価も行った。

②食品用飲料缶中 BPA の分析及びその食品移行に関する研究

飲料用缶内面塗装には、エポキシ樹脂塗料等が使用されており、ビスフェノール A (BPA) が中身飲料に移行する可能性が指摘されている。本研究では液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いて、信頼性の高い BPA 分析法を開発することを目的とした。さらに、この方法を用いて全国各地でサンプリングした市販缶ビールについて試験を実施し BPA 含有量を調べた。また、主要な製缶メーカー 4 社の製造した飲料用缶容器について、一定条件 (120℃、30 分間) で溶出試験を行い、BPA 溶出量と使用された缶内面塗料の関係について調査した。

③缶詰食品中の BPA およびその関連物質の分析に関する研究

缶詰においては、エポキシ樹脂が缶壁から金属等の溶出を防ぐための内面コーティング剤として使用されており、エポキシ樹脂のスターティングモノマーである BPA および BPA を構造中に有する BADGE 等が缶詰

食品中に移行している可能性がある。

平成 11 年度本研究課題において、缶詰食品に残存する BPA 及び一部の BADGE 関連物質の移行を明らかにしたが、今年度は HPLC-蛍光検出器を用いた BPA および加水分解体を含めた BADGE 関連物質の一斉分析法について検討した。構築した方法を用いて、市販缶詰食品のモニタリング調査を実施した。

3. 医療用高分子素材及び製品に残存する内分泌かく乱化学物質の動態解析

①血液バッグ保存血液に存在する揮発性有機化合物の分析に関する研究

前年度の研究において、輸血用血液バッグに詰めて冷蔵保存した豚血液を分析した結果、その血液中にはバッグからの溶出などによりトルエンやキシレン、さらには、現在内分泌かく乱作用が疑われているスチレンモノマーなどの芳香族系有機溶剤が数十 ppb のレベルで存在するだけでなく、テトラヒドロフラン (THF) および 2-エチル-1-ヘキサノールが ppm レベルで大量に存在することを報告している。そこで今年度の研究では、大量に溶出する考えられるこれら有機化合物の溶出挙動及び、その溶出原因についても検討を加えることとした。また、血液バッグに入れて冷蔵保存されていた濃厚赤血球液を分析することにより、実際の医療現場で使用されている輸血用の血液に含まれている揮発性有機化合物の実態について予備的調査を実施した。さらに、人工透析用の透析膜・血液回路から溶出する揮発性有機化合物についても予備調査を併せて実施した。

②高分子素材からなる医療用プラスチック

製品の内分泌かく乱化学物質等に関する動態解析

高分子素材からなる生活関連製品の中でディスプレイ医療用具はヒトへの直接的な影響が心配され、その安全性には常に注意が必要である。PVC の可塑剤として使用される DEHP は内分泌かく乱化学作用の疑いが指摘されている物質の一つであり、医療用具にも汎用的に使われている。本研究は、通常の輸液に使用されている医療用具を集め、それらの溶出測定結果を基にそのリスクを検討し、ヒトへの影響度を考察した。

③医療用高分子素材中重金属類の分析及びその残存量調査

医療用具及び食品の容器包装材料等の高分子素材中に内分泌かく乱化学物質として疑いのある Cd、Pb などの金属の有無について検討した。

④歯科用ポリカーボネート中内分泌かく乱化学物質に関する分析及び動態解明

ポリカーボネート(PC)はガラスフィラーなどを添加することによりその機械的性質が更に向上することから歯科用材料として矯正用ブラケット、テンポラリークラウン(暫間被覆冠)、レジン歯、義歯床などに用いられている。

PC は合成前駆体である BPA や重合調節材である p-t-ブチルフェノール(t-BuP)、紫外線安定剤などが添加されている。従って、口腔内環境下では PC からこれらの物質が溶出される可能性が推測される。本研究はヒト唾液に浸漬した矯正用ブラケットからの BPA、t-BuP 溶出量並びに唾液に浸漬した矯正用ブラケットに残留しているそれら物質の量を HPLC-蛍光検出器で検討した。

4. 生活環境中内分泌かく乱化学物質の分析精度の向上とヒト暴露に関する研究

①内分泌かく乱化学物質のヒト暴露調査に関する基礎的検討

内分泌かく乱化学物質のヒト暴露調査として、近年様々な生体試料を利用してその実態解明を行っている。そこで、ヒト生体試料として最も採取しやすい、尿を用いて内分泌かく乱化学物質の暴露調査を実施する。本検討に関する内分泌かく乱化学物質として、BPA、NP、オクチルフェノール等のフェノール性内分泌かく乱化学物質をターゲットとし、グルクロン酸抱合体を含めた測定法を GC/MS-NCI により構築した。

②環境大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

内分泌かく乱作用を有する疑いのある化学物質のうち、生産量が比較的多く、我々の生活環境で最もありふれたものとしてフタル酸エステル等のプラスチック可塑剤がある。環境基本法では平成 9 年 2 月に大気汚染に関する環境基準物質として新たにベンゼン、トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンが追加された。また、平成 9 年 2 月に大気汚染防止法の一部が改正され、継続的に摂取される場合には人の健康を損なうおそれのある大気汚染物質として、新たに HAPs が追加され、その中でも健康被害が生ずるおそれがある程度高い物質としてアクリロニトリル、塩化ビニルモノマー、クロロホルム等の揮発性有機化合物(VOCs)を含む 22 物質を優先取組物質に指定した。

このような様々な化学物質について、その実態を調査するために今年度は昨年度のプラスチック可塑剤に加えて、ベンゼン等

の VOCs について、室内、屋外大気中や特殊環境としての自動車内空気中の濃度測定を行った。

③内分泌かく乱化学物質の微量分析及び分析精度向上の基礎的検討

内分泌かく乱化学物質の分析では、極低濃度までの測定が要求される。そのため、これまでの通常分析においてはそれほど注意を払う必要のなかった部分がクローズアップされてきている。内分泌かく乱化学物質の中でも特に注目度の高いフタル酸エステル類、BPA について、分析の注意点やブランクの扱いなど GC/MS 分析上のノウハウに関する知見を報告する。

また、内分泌かく乱化学物質の測定では、通常 GC/MS を用いる手法が多く使用されている。しかし、極性物質の測定においては、誘導体化が不要で再現性も優れている LC/MS を用いる手法が注目されてきた。そこで、大気圧イオン化法 (API) を使用した LC/MS 法の高感度化についての知見を報告する。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価

① 酵母 Two-Hybrid 法を用いた高分子素材由来化学物質の内分泌かく乱作用評価

本研究では、エストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR) または甲状腺ホルモン受容体 (TR) を各々導入した酵母を用いた Two-Hybrid 法を行い、化学物質及びその代謝産物について内分泌かく乱作用を多面的に評価する。

②ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱

学物質の影響

生活環境由来の内分泌かく乱化学物質の曝露により内在性ホルモンの合成や分泌が阻害された場合、正常な内分泌系がかく乱される可能性が考えられる。特にこれらの化学物質が胎生期から新生仔期の限られた時期に曝露されることで、ステロイドホルモン合成が阻害された場合、生物における発生や生殖において深刻な影響が表れることが懸念される。

本研究では、昨年度これら化学物質の生体内ステロイドホルモン合成に及ぼす影響を解明することに視点をおき、ヒト副腎由来の H295R細胞を用いて *in vitro* で、ステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を確立した。そこで本研究では、ステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を用いて、スチレンモノマー、ダイマー、トリマー、フタル酸エステル、及びアルキルフェノール類のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を検討することとした。

③BADGE 関連化学物質の妊娠期及び授乳期曝露による次世代への影響

エポキシ樹脂である BADGE は、缶の内面コーティング、接着剤等に用いられており、食品用缶に用いられた場合は食品へ移行することが報告されている。また、BADGE は水系食品や溶媒条件下において、BADGE 加水分解体として存在することが示唆されている。昨年度、乳癌細胞増殖試験法により、BADGE 加水分解体のエストロゲン活性を測定したところ、乳癌細胞増殖促進作用が認められた。しかし十分な毒性評価がなされておらず、エストロゲン作用が観察された BADGE 加水分解体の生体影響を調査することは重要である。従って近年問題視さ

れている低用量暴露による次世代への影響を、経口摂取させた妊娠マウスを用いて評価した。

B. 研究方法

1. PVC 製玩具及び食品用手袋に残存するフタル酸エステル類の分析及びその動態解明

①PVC 製手袋に残存する DEHP の分析精度管理及びその動態に関する研究

手袋試料に残存する DEHP の材質試験には n-ヘキサンで抽出し、HPLC-UV 及び GC を用いて、5 機関による測定を実施した。また、食品移行に関しては、各種条件下、切り干しダイコン、コロケ及びおにぎり試料への DEHP 測定を GC/MS により実施した。

②PVC 製手袋に残存するフタル酸 2-ジエチルヘキシルの溶出挙動及び残存状態の解明

PVC と DEHP の存在状態を可視化して直接観察する目的で、透過型顕微鏡観察を実施した。また、固体状態での運動性や相互作用について情報を得る目的で、固体 NMR 分析を実施した。

手袋表面部分の DEHP の濃度分布を調べる目的で角度変化 ATR 測定とスペクトルシミュレーションを実施した。IR 分光計には一回反射 ATR 用アタッチメント付属を用いた。手袋からの DEHP の熱脱着挙動を調べる目的で、熱重量測定法により加熱減量挙動を調べると共に、熱脱着 GC/MS 分析により、発生する化合物の内容を調べた。

③PVC 製玩具からのフタル酸エステル類の溶出及びその挙動に関する研究

平成 10、11 年度の厚生科学研究報告書による結果より、一人一日当たりの推定摂取量は、mouthing 時間と chewing 時の溶出

濃度それぞれの平均値及び変動係数から試算した。chewing は、2 機関（機関 A: 25 名、機関 B: 12 名）で行った。これらの結果を基に、(1) 点推定法、(2) 積の誤差法による 95 パーセンタイル、(3) Monte Carlo 法により一日推定摂取量を算出した。材質中の含有量は GC/MS により行った。

唾液中フタル酸エステル類の挙動に関しては、固相抽出法及び、UV 検出器付き HPLC 及び誘導体化-GC/MS にてフタル酸モノエステルの分析を行った。

2. 食品用器具・容器包装に関する内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

①食品用ラップフィルム中の NP の分析及び動態解析

ラップフィルムに残存する NP に関して、調査する目的で材質試験及び各種衛生試験法に準じた溶媒で溶出試験を実施した。また、食品移行試験として、おむすびをラップくるみ、室温及び電子レンジ条件下による移行量の想定試験を行った。本研究では、改良型ラップフィルムも対象として、検討を行った。

ラップフィルム残存添加剤の内分泌かく乱作用を総合的に評価する目的で材質試験用試験溶液を用いて、エストロゲン活性評価（エストロゲンレセプターバインディングアッセイ）も実施した。

②食品用飲料缶中 BPA の分析及びその食品移行に関する研究

試料ビール中 BPA 分析においては、固相抽出法及び LC/MS/MS を用いて定性・定量を行った。

塗料の BPA 含量測定では、缶内面塗料を量りとり、内標準溶液 (BPA-d₁₀) を加えた後、

ヘキサンによる抽出を行った。その後、上記の方法を利用して測定を実施した。

缶体の溶出試験に関しては、5%アルコール溶液により、インキュベータ 120℃(または 100, 80, 60, 40℃の各温度)で 30 分間加温した。その後、同様の方法を用いて測定を実施した。

③缶詰食品中の BPA およびその関連物質の分析に関する研究

各缶詰食品は、固形試料、液状試料及び油試料に分類し、各種前処理条件を検討し、精製及び濃縮を行った。得られた試料溶液を GC/MS や HPLC により、定性及び定量確認を実施した。

3. 医療用高分子素材及び製品に残存する内分泌かく乱化学物質の動態解析

①血液バッグ保存血液に存在する揮発性有機化合物の分析に関する研究

血液バッグからの各種化学物質の溶出に関しては、と殺された豚から血液を利用して、血液バッグに充填した後、チューブを 2カ所結さくしてバッグを密封したものをを用いた。試料を解凍し、精製飽和食塩水および内部標準液が入ったヘッドスペースバイアルに加えた後、ヘッドスペース-GC/MS 分析に供した。濃厚赤血球液については、その 0.5mL を上述の操作と同じようにヘッドスペースバイアルに封入した後、分析に供した。

透析膜洗浄液試料における測定は、医療機関の透析膜洗浄現場において行なわれる透析膜および血液回路の洗浄操作の過程で得られた洗浄廃液、すなわち、血液回路(動脈側)から流入し、透析膜ユニットを通過して、血液回路(静脈側)より流出した生

理食塩水を用いて測定を行った。方法は、内部標準液とともにヘッドスペースバイアルに入れ、ヘリウムでパージ後密封し、ヘッドスペース-GC/MS 分析に供した。

(3)採血針においては、メタノールで浸せき抽出し、その抽出液を飽和食塩水で希釈した溶液をヘッドスペースバイアルに採り、同様の処理後、ヘッドスペース-GC/MS にて分析した。

高分子素材からなる医療用プラスチック製品の内分泌かく乱化学物質等に関する動態解析

測定検体に含まれる測定対象物質の分析法は、検体の特性に合わせて 2 群(生理食塩水試料及び界面活性剤含有試料)に分けて測定した。

フタル酸エステル類は、生理食塩水試料ではヘッドスペース-SPME 抽出し、GC/MS で測定し、サロゲート化合物との面積比で定量した。界面活性剤含有試料では、サロゲート添加後、アセトンで希釈し、直接 GC/MS に注入し、サロゲートとの面積比で定量した。

NP、DEHA は、生理食塩水検体では、固相抽出法による精製及び濃縮後、誘導体化-GC/MS で定量した。

③医療用高分子素材中重金属類の分析及びその残存量調査

測定対象試料は、手術用縫合糸、ドレーンチューブ、カテーテル、静脈留置針、エクステンションチューブ、手術用手袋等である。細切した試料を磁製のつぼに入れ、硫酸を加え、徐々に加熱し、100~150℃で大部分の硫酸分を蒸発させた後、直火上で乾固した。さらに電気炉で 500℃、24時間加熱し、灰化した。この残留物に 1N硝酸を加

えた後、加温して溶解させた。これをろ過し、ろ液に水を加えて試験用溶液とした。測定には、高周波プラズマ発光分析装置を用いた。

④歯科用ポリカーボネート中内分泌かく乱化学物質に関する分析及び動態解明

材質試験は食品衛生試験法に準じたが、矯正用ブラケットは小さいためブラケット重量に対しての試薬量として使用した。また、溶出試験及び添加回収においては、矯正用ブラケットを無菌的に唾液中に浸漬させ、37℃の恒温槽で遮光下静置した。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。

4. 生活環境中内分泌かく乱化学物質の分析精度の向上とヒト曝露に関する研究

①内分泌かく乱化学物質のヒト曝露調査に関する基礎的検討

ヒト尿中に関するフェノール性内分泌かく乱化学物質の測定には、NCI のイオン化による誘導體化 (PFBB_r) -GC/MS により行った。また、前処理にはグルクロニダーゼによる酵素処理後、固相抽出法により、精製・濃縮を行い、試験溶液とした。

②環境大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

大気中可塑剤測定に関しては、テフロン製のろ紙ホルダーにQFとCFを重ねて装着し、10l/minで室内の場合は24時間、自動車の場合は日中6時間空気を捕集した。捕集ろ紙をジクロロメタンで超音波抽出した。その後、内部標準液を加え、エバポレーターを用いて窒素ガス吹き付けにより溶媒を除去した後、アセトンに転溶し、GC/MS分析試料とした。

大気中VOCs測定においては、平成9年2月に環境庁が示した「有害大気汚染物質測定マニュアル」中の容器採取-GC/MS法を用いた。なお、空気の捕集は室内の場合24時間、自動車の場合車内温度が十分高くなる午後2時～3時の間に瞬間的に行った。

③内分泌かく乱化学物質の微量分析及び分析精度向上の基礎的検討

今回、内分泌かく乱化学物質の微量分析に関する精度向上及びその技術に関して、使用する装置は通常の四重極タイプGC/MS及び大気圧イオン化法(APCI)によるLC/MSを用いて、様々な検討を実施する。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質に関する作用機構の解明及び生体影響評価

①酵母Two-Hybrid法を用いた高分子素材由来化学物質の内分泌かく乱作用評価

酵母Two-Hybrid法によるエストロゲン様作用の検出方法は、ER-GAL4DBD及びTIFII-GAL4ADを発現させた酵母を常法に従い、前培養した。また、これと前述のS-9 mix処理溶液とを容量比1:1で混和し、30℃で4時間のインキュベーションを行った。以下、前述の方法によって酵母内のβ-ガラクトシダーゼ活性を調べた。

酵母Two-Hybrid法による甲状腺ホルモン様作用の検出方法は、TR-GAL4DBD (Thyroid hormone receptor α - GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及びTIFII-GAL4AD (TIFII-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母を前培養した。DMSOに溶解した被検化学物質を添加し、30℃で24時間のインキュベーションを行った。以下、B-1 (エストロジ

エン様作用の検出)に記した方法に従って、産生されたβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

②ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

測定対象試料は、スチレン類、フタル酸エステル類、アルキルフェノール類等である。本試験系に利用した培養細胞は、ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞である。試験項目として、H295R 細胞のステロイド誘導、ミトコンドリア及びミクロソーム酵素活性等である。

③BADGE 関連化学物質の妊娠期及び授乳期暴露による次世代への影響

BADGE 加水分解体の投与方法は、粉末飼料中に 3.3mg/kg/day 及び 50 × 10³µg/kg/day になるように与えた。試験投与期間は、妊娠 3.5 日目から仔の離乳(生後 21 日目)までとした。試験項目は、胎仔生殖分化の影響、胎仔骨形成に対する影響、仔の体重及び各種臓器重量である。

C. 研究結果及び考察

1. PVC 製玩具及び食品用手袋に残存するフタル酸エステル類の分析及びその動態解明

①PVC 手袋に残存する DEHP の分析精度管理及びその動態に関する研究

DEHP の測定方法に関するバリデーションを行った。5 研究機関による DEHP 測定法の室間再現精度について検討した結果、2 種類の手袋中ではいずれも 5%以内と良好であった。従って、DEHP の食品中への移行実験について本測定法の適用は可能であると判断した。

切り干し大根を使用した移行実験の結果から、PVC 製手袋から食品へ移行する DEHP 量は、手袋の DEHP 含有率及び手袋の接触時間に比例してその移行量が増加することが分かった。また脂溶性の液体である媒体を経由して極めて短時間のうちに移行が起こることが判明した。

切り干し大根は油を使用して調理され、また PVC 製手袋との接触面積が大きいため、瞬時に食材への DEHP の移行が認められ、コロッケやおにぎりの場合と比較して大きな移行量が認められた。コロッケの場合は油で揚げてあり、食品自身が油性であるが接触面積や接触時間が短いため、切り干し大根よりも移行量が少なかった。おにぎりの移行実験では消毒用アルコールを手袋に噴霧後使用した場合、アルコールを噴霧しない場合と比較して大きな DEHP の移行が確認できた。おにぎりは水溶性であるため、DEHP の移行量は少ないが、アルコール噴霧した手袋から DEHP が溶出して、それがおにぎりに接触することにより移行したものと考えられる。従って、手袋にアルコールを噴霧後、アルコールを揮散させた場合は、DEHP の移行量が大きく減少することが分かった。

また、手袋中の DEHP は油に溶解しやすいため、一度コロッケを握った手袋を、再度使用してコロッケを握ると、コロッケ中の DEHP の移行量が飛躍的に増加した。従って、PVC 製手袋からの食材への DEHP の移行は、脂溶性の媒体を経由して極めて短時間のうちに起こることが判明した。

②PVC 製手袋に残存する DEHP の溶出挙動及び残存状態の解明

PVC と DEHP の存在状態を観察する方法と

して、電子顕微鏡観察の有効性を確認した。特に PVC の 1 次粒子を観察する目的では PMMA 包埋超薄切片法による断面 TEM 観察が有効であり、今回の試料では大きさ 0.1~3.3 μm の PVC 一次粒子が、表面と内部で同様に分布していると考えられた。また DEHP を観察する目的ではエポキシ包埋 RuO₄ 染色超薄切片法による断面 TEM 観察が有効であり、今回の試料では大きさ 5~10nm の DEHP が PVC の 1 次粒子の内部に分散していると推定された。

PVC と DEHP の相互作用については固体 NMR 分析により情報が得られることがわかった。今回の試料では PVC と DEHP が比較的強く相互作用している部分と、比較的自由な状態の部分の存在が示唆された。

PVC 表面付近の DEHP の深さ方向濃度分布測定に、角度変化 ATR 測定とスペクトルシミュレーションが有効であることがわかり、今回の試料では最表面での DEHP 濃度が内部に比べてかなり高くなっていることが示された。また 10 秒間程度のエタノール消毒でも表面から少なくとも 2 μm 程度までの DEHP が溶出する様子が確認された。

また、DEHP の空気中への揮散に関する評価として熱脱着挙動に注目したが、TG-DTG 分析も熱脱着 GC/MS 測定もエタノール処理前後で説明可能な明確な差を検出できず、有効な情報を引き出すには、今後測定条件の最適化などが必要と考えられた。PVC と DEHP の存在状態を観察する方法として、電子顕微鏡観察の有効性を確認した。特に PVC の 1 次粒子を観察する目的では PMMA 包埋超薄切片法による断面 TEM 観察が有効であり、今回の試料では大きさ 0.1~3.3 μm の PVC 一次粒子が、表面と内部で同様に分布して

いると考えられた。

③PVC 製玩具からのフタル酸エステル類の溶出及びその挙動に関する研究

玩具からのフタル酸エステル類の溶出量と推定摂取量に関しては、前年度報告による mouthing 時間の検討及び chewing 試験により、mouthing 時間の平均値とフタル酸エステル溶出量の平均値から一日の推定摂取量を算出すると、機関 A の 25 名による平均値及び両機関を合わせた 37 名による平均値は、それぞれ 16.9 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 及び 14.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ であった。積の誤差法による 95 パーセンタイルでは、39.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 及び 36.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ であった。また、Monte Carlo 法による平均値は 14.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 及び 17.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 、95 パーセンタイル値は 35.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 及び 38.6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ であった。また、Monte Carlo 法で DEHP の TDI (40~140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) の下限値である 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 以上を摂取する乳幼児は 3.1% と推定された。

玩具中残存可塑剤の分析に関しては、平成 13 年 1 月に購入した 28 検体の玩具から、フタル酸エステル類は DINP、DEHP 及び DBP が検出された。フタル酸エステル以外の可塑剤では、クエン酸アセチルトリブチル等が検出された。平成 10 年度に入手した玩具と比べフタル酸エステルの検出率は低下した。特に DINP の検出率が低下し、クエン酸アセチルトリブチル等への変更が認められたが、DEHP の検出率及び含有量には変化がなかった。

フタル酸ジエステル類の唾液中での変化に関しては、ヒト唾液にフタル酸ジエステル類を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートしたところ、対応するモノエステル体を確認した。モノエステル体の生成反応はアルキル基の種類に影響され、直鎖のアルキル

基、特にブチルエステルに特異的に反応した。フタル酸ジブチルのモノエステル体の生成反応は唾液の pH が7で生成量が最大となった。フタル酸モノエステル生成におよぼすフタル酸ジエステルのアルキル基の影響は、アルキル基の異なる DEP、DBP、BBP、DHXP および DEHP をそれぞれ 50nmol を唾液に加え、37℃、30 分間 Incubation し、生成したそれぞれのモノエステル体量を測定した。Symmetric なフタル酸ジエステルである DEP、DBP、DHXP および DEHP は唾液中で1つのアルキル基が脱離し、MEP、MBP、MHXP および MEHP をそれぞれ 10.6、40.8、9.4 および 0.9nmol 生成し、その生成率は 21.2%、81.6%、18.8% および 1.8% であった。本実験でのフタル酸ジエステルの唾液中でのモノエステル体生成反応は直鎖のアルキル基を有す DBP が最も変化し易く、アルキル基に側鎖を有する DEHP ではその生成が悪かった。また asymmetric なフタル酸ジエステルである BBP のモノエステル体生成は、MBenzP が 12.3nmol 生成したが、MBP の生成は認められなかった。

その他検討項目より、本実験からフタル酸ジエステルが口腔内の唾液中でモノエステル体を生成することが分かった。また、唾液中でのモノエステル体生成反応には酵素による加水分解が深く関与していることが推察される。

2. 食品用器具・容器包装に関する内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

①食品用ラップフィルム中の NP の分析及び動態解析

食品用ラップフィルム材質試験の結果、試料中の残存量が 2000 $\mu\text{g/g}$ 以上であったの

が 1 検体、1900~1500 $\mu\text{g/g}$ の範囲であったのが 1 検体、1400~1000 $\mu\text{g/g}$ の範囲であったのが 6 検体、900~500 $\mu\text{g/g}$ の範囲であったのが 3 検体の検出であった。材質による違いは、ポリ塩化ビニル製のみから NP の残存が確認された。

n-ヘプタンでの溶出試験では、1.6~ND(<0.1) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の溶出量であった(11/30)。また、水の溶出試験では、37.5~ND(<1.0) ng/cm^2 の溶出量であった (10/30)。

NP の残存が確認されたラップフィルムの新規改良型が開発され、そのラップフィルム中に残存する NP を材質試験により、調査した。その結果、改良型では NP の残存は確認されなかった。

食品用ラップフィルムには、多くの添加剤が残存している可能性が示唆される。そこで、NP を含めた総合的エストロゲン活性に関する評価 (Estrogen-R (α) Competitor Screening) を実施した。本法を用いて、標準化学物質 (NP 及びエストラジオール) を評価した際、活性が確認され、標識エストラジオールとの競合が確認された。つまり、本法を用いることにより、エストロゲン受容体 (α) との結合能が確認できる。食品用ラップフィルム中残存物質がエストロゲン受容体との結合性を有するかの確認を実施した。その結果、NP の残存量との関連性が確認された。

②食品用飲料缶中 BPA の分析及びその食品移行に関する研究

BPA 標準試料及び夾雑成分の最も多いと考えられる飲料試料等を用いて、MRM 測定条件及び移動相組成、グラジエント条件に関して検討した。コーン電圧及び衝突エネルギーの最適化及び MRM イオンの選択を行

った。その結果、BPA 測定には m/z 227→212 のイオンが最も感度良く測定が可能であり、この場合のコーン電圧及び衝突エネルギーはそれぞれ、60 V、20 eV であった。次に MS/MS 部を上記条件として、ビール試料を用いて移動相組成に関して検討した結果、アセトニトリル含量が 10~40% の範囲であれば、BPA は他成分と良好に分離することが明らかとなった。また、溶出試験試料並びに塗料試料では、BPA の妨害となる成分が認められないことから、本条件をそのまま適用して分析を行うこととした。

9 都市でサンプリングした主要 4 社製缶ビール(350 mL 缶)計 36 試料及び東京都並びに茨城県内でサンプリングした缶ビール(500 mL 缶等)10 試料を試験に供した。その結果、試験した全ての試料缶ビールから、BPA は検出されなかった。

缶内面塗装からの BPA の溶出は、塗料中に残留する未反応の原料モノマーが原因と考えられている。各塗料試料から BPA を検出し、その量は約 0.1~0.9 $\mu\text{g/mL}$ 程度であった。新旧処方での塗料で BPA 含量を比較すると、イ社品では旧処方が約 0.4 $\mu\text{g/mL}$ であるのに対し、新処方では約 0.1 $\mu\text{g/mL}$ と低減した。BPA 量が 1/2~1/4 程度に減少することが確認された。

一定組成(5 %エタノール溶液)の試験液を封入し、40~120℃の温度下に一定時間保持した後、BPA 溶出量を測定することで、BPA 溶出の観点から缶内面塗装の評価を試みた。その結果、特に温度条件に依存して液中に溶出する BPA 量は異なり、80℃未満の温度では BPA が認められないが、これ以上の温度条件下では微量の溶出が認められることが明らかとなった。

③缶詰食品中の BPA およびその関連物質の分析に関する研究

食品缶詰中の BPA 濃度測定の結果、試料 30 検体中 22 検体(果実缶 0/2、野菜缶 13/17、魚介缶 9/11) から BPA を検出した。缶詰食品中の濃度は、1 缶当たり 0.3~12.8 μg (HPLC - 蛍光検出器) であった。今回調査した缶詰食品については、まだ少数であるが飲料缶同様 BPA の溶出の低減化が図られた缶詰が見られ、改良缶詰の切り替えの過渡期と思われた。

BADGE 加水分解体に関する挙動は、水系の缶詰中では、缶内面コーティング剤から溶出した BADGE は、BADGE として存在できずそのほとんどが最終加水分解体の BADGE 加水分解体として存在することが容易に推察される。実際、今回調査したすべての缶詰(ビスフェノール F ジグリシジルエーテル型エポキシ樹脂によるコーティング缶を除く、後述)から、BADGE 加水分解体(1 缶当たり、1.0~27.4 μg) を検出した。特に果実缶では、19.2~24.5 $\mu\text{g/缶}$ と胴体部が未塗装にもかかわらず高く、単位グラム(mL) 当りの移行量はやや液相に多い傾向があった。野菜缶では固形分に液相の約 2~6 倍移行していた。また油相からは検出されなかった。

BADGE 塩化水素付加体の濃度においては、BADGE 塩化水素付加体は 30 検体中 7 検体から検出された(0.7~4.8 $\mu\text{g/缶}$)。今回、BADGE 塩化水素付加体が検出された缶詰は、すべて野菜缶詰の固形分からで、プルトップの内面コーティング剤に塩化ビニル樹脂が配合されたものもしくは 3 ピース缶であった。

BADGE 塩化水素付加体は 30 検体中 21 検