

体（野菜缶 13/17、魚介缶 8/11）から検出された。その量は 1 缶あたり野菜缶で 1.7～22.0  $\mu\text{g}$ 、魚介缶で 0.6～3.6  $\mu\text{g}$  であり、有意に野菜缶が多かった。概ね 80ppb 以上検出した 7 検体はすべて BADGE 塩化水素付加体を同時に検出した。

BADGE の食品缶詰について魚介油漬缶の油相からの検出報告がなされているが、今回の検体から BADGE は検出されなかった。前年度 BADGE を検出した缶詰は、今回の分析の結果、BPA の低減化が図られた改良缶であり、同時に BADGE 関連物質も低減化されていた。

### 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

THF および 2-エチル-1-ヘキサノールの血液中への溶出挙動について調査を実施した。THF および 2-エチル-1-ヘキサノールが、調査対象として用いたいずれのメーカーの製品に保存された血液の分析においても主要なピークとして認められており、保存開始後 1～2 日間は急速に上昇し、その後、THF はほぼ一定のレベルを維持し、2-エチル-1-ヘキサノールは緩やかに上昇する傾向が認められた。保存開始 2 日目から 20 日目までの 6 試料の測定値平均濃度および最高濃度は、THF ではカワスミ製バッグに保存されていた血液がそれぞれ 25.5ppm および 36.3ppm と最も高く、次いでテルモ製（平均 4.5ppm、最高 4.9ppm）、JMS 製（平均 2.3ppm、最高 3.2ppm）のバッグに保存されていた血液の順であった。DEHP 原体の分析は、水抽出液、および、試料を水とともにオートク

レーブ処理した後に水抽出した溶液を用いて実施した。その結果、いずれの抽出液からも 2-エチル-1-ヘキサノールが検出され、その濃度は、前者が 126ppb、後者では 189ppb であった。この結果から、これらの血液バッグには、その製造に可塑剤として用いられている DEHP の不純物として 2-エチル-1-ヘキサノール（未反応原料）が含まれていることが明らかとなった。

日本赤十字社より、血液保管庫にテルモ製の血液バッグに 21 日間冷蔵保存された濃厚赤血球液（4 試料）の提供を受け、これらの試料に含まれる揮発性有機化合物を分析した。その結果、トルエンが平均濃度で 4.6ppb、スチレンモノマーが 1.7ppb、エチルベンゼンが 1.3ppb、キシレンが 1.0ppb、p-ジクロロベンゼンが 1.0ppb、また、THF が 3.7ppm、2-エチル-1-ヘキサノールが 11.3ppm 検出された。濃厚赤血球液から検出された芳香族系化合物（p-ジクロロベンゼン以外）の濃度とガラス容器に保存した人血液の濃度を比較したところ、前者の方が明らかに後者よりも高かった。この結果は、濃厚赤血球液の保存容器として用いられた血液バッグからの上述化合物の溶出を示唆するものと考えられる。

人工透析に用いられる透析膜ユニット、および、それに付随して使われる血液回路は、使用前に洗浄を行なう必要があり、洗浄液としては生理食塩水を 1L 程度用いるのが一般的である。そこで今回、透析膜および血液回路から溶出する物質の予備調査として、医療機関で透析膜を洗浄する際に得られる洗浄廃液を採取し、そこに含まれる揮発性物質の分析を行った。その結果、今回調査した膜ユニットおよび血液回路か

らは、膜の材質や型式により違いはあるが、ジクロロメタン、メチルエチルケトン、THF、シクロヘキサン、エチルベンゼン、キシレンなどの溶出（10ppb 以上）が認められ、なかには ppm オーダーにまで達する物質もあった。

## 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

DEHP の溶出量に関して、薬剤に生理食塩水のみで塩化ビニル樹脂製の輸液セットを組んだ系では、J 社製の輸液セット使用時で 4 ppb を示したが、その他 8 つの実験系では 1 ppb 前後を示した。塩化ビニル樹脂製製品を組み合わせない系ではほとんど検出限界付近であった。一方、模擬界面活性剤薬剤（生理食塩水に界面活性剤を混合した系）と塩化ビニル樹脂製の輸液セットを組んだ系では、1370ppb～2460ppb という高濃度の検出された。

DBP の溶出量は薬剤に生理食塩水のみで 0.2～0.8ppb、界面活性剤を含む系で 4～30ppb であり、界面活性剤を含む系で若干溶出する傾向が見られた。

NP の溶出量は全般に検出限界以下であった。しかし、薬剤に界面活性剤を含み、ニッショー社と JMS 社の塩化ビニル樹脂製の輸液セットを組んだ系では 112ppb～140ppb と溶出が認められた。

DEHA の溶出量はいずれも検出限界以下であった。

## 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

Pb は経皮胆道カテーテル 1 検体から 24.6ppm 検出された。静脈留置針（カテーテル部分）すべてから Ba が検出された。特

に X 線不透過型静脈留置針 4 検体から Ba が 873～32200ppm 検出された。X 線透過型静脈留置針は 18.6ppm であった。Ba が高濃度、検出された X 線不透過型静脈留置針のすべてから Sr が 38.3～754ppm 検出された。また、4 検体中 3 検体から Al、Cu、Mg、K、Ca、Mn、Fe、Na が検出されており、Al は 4550～28400ppm と高濃度であった。4 検体中 2 検体から Cr（1.66～2.47ppm）も検出された。ドレーンチューブ・カテーテル類の 6 検体中 3 検体からは Ba が 373～873ppm 検出された。検出された 3 検体は、いずれも X 線不透過のチューブであった。同一検体から Sr も 25.6～54.9ppm 検出されている。縫合糸は 10 検体中 4 検体から Cr（1.18～68.5ppm）を検出した。また、10 検体中 2 検体から Sn（3.6～4.4ppm）、Sr（4.55～12.2ppm）を検出した。

## 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

残留BPAとt-BuP量は矯正用ブラケットAより、矯正用ブラケットBで顕著に高かった。また、保存条件では残留BPAとt-BuPに関しては室温で12週間保存と37℃、12週間保存で、顕著な差は認められなかった。しかし、12週間唾液に浸漬した試料は何れのブラケットでも残留BPA量が顕著に増加し、残留t-BuP量も若干増加していた。唾液浸漬矯正用ブラケットAとBでは室温保存と比較すると残留BPA量はそれぞれ3.5倍と2.3倍増加していた。

## 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

フェノール性内分泌かく乱化学物質の代表としてBPA、NP、オクチルフェノールの一括分析法を誘導体化GC/MS-NCIにより、基礎的検討を実施した。その結果、いずれの化合物も高感度かつ選択的な微量分析法を構築することができた。

フェノール性内分泌かく乱化学物質は、一般にグルクロン酸抱合による代謝で排出されると考えられている。そのため、酵素分解による処理と固相抽出法による精製により、前処理法を検討した。

## ②環境大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

今回測定した住宅14戸、延べ20件で測定した。室内と屋外の中央値を比較したI/O値では、ベンゼンを除く芳香族炭化水素、アクリロニトリル、1,3-ブタジエン、塩化エチル及び塩化ビニルモノマーが高い値を示し、発生源が住宅にある可能性が示唆された。中でも芳香族炭化水素のm,p-キシレン、o-キシレン及びスチレンではI/O値が9を越え、発生源が住宅にあることが明らかであった。I/O値が高く発生源が住宅にあることが示唆された物質の中で、室内の最大値が平均値の10倍を越えた物質はトルエン、1,3,5-トリメチルベンゼン、1,2,4-トリメチルベンゼン、4-エチルトルエン、p-ジクロロベンゼン、1,2-ジクロロエタン及びフロン11の7物質であった。

車内濃度及び屋外とのI/O値が1より大きければ車内に発生源のある可能性が考えられるが、中でもI/O値が10を越えたものはエチルベンゼン、m,p-キシレン、o-キシレン、スチレン、1,3,5-トリメチルベンゼン、1,2,4-トリメチルベンゼン、4-エチルトルエン、p-ジクロロベンゼン、アクリロ

ニトリル及び1,2-ジクロロエタンの10物質であり、Acではこれら10物質すべてがI/O値10以上であった。これに対しBcでは1,3,5-トリメチルベンゼン、1,2,4-トリメチルベンゼン及び1,2-ジクロロエタンの3物質が、Ccではアクリロニトリル及び1,2-ジクロロエタンの2物質がそれぞれI/O値が10を越えていた。特にAcで検出されたアクリロニトリルは、室内で検出された最高値のさらに約9倍の濃度であった。

## 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

これまでの内分泌かく乱化学物質の分析に関する研究において、分析の注意点やブランクの扱い等に関する詳細な検討はなされてきていない。ブランクの問題点を抱えての極低濃度における分析では、分析者の注意力や熟練の差が測定結果の信頼性に大きな影響を与えることは事実である。様々な分析上のノウハウや新しい知見については、存在する。今回GC/MS法によるフタル酸エステル類に関して、スプリットベントラインの汚染やセプタム、ライナー、ゴールドシール、カラム等の汚染に注意が必要である。その対処法として、大量のキャリアガス(200ml/分)でパージすることやゴールドシール及びセプタムの交換等詳細な情報を提供する。

HPLC法は検出器の感度、選択性に問題があった。ところが、近年LC/MS法が普及し、LC/MS法による内分泌かく乱化学物質の分析が注目を集めている中、詳細な基礎的検討を実施した。

ビスフェノール類及びアルキル類は、弱酸性の化合物であるイオンモードでの測定が有効である。しかし、水酸基解離は弱く、

ESI 法では感度が低いので、APCI 法が有効である。特にアルキルフェノール類の感度は、APCI 法が 3~10 程度高い。この要因は、APCI では移動相溶媒がイオン化され、そのイオンが分子/イオン反応を起こしてアルキルフェノール類の水酸基からプロトン(H)を強制的に引抜くためである。従って、アルキルフェノールの様な溶液中で解離が少ない化合物は、APCI が有効である。

## 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

BADGE、BADGE 塩化水素付加体及び BADGE 加水分解体は、S-9 mix による代謝過程を与えてもエストロゲン様作用を示さなかったことから、S-9 mix による O-脱アルキル化反応を受けてビスフェノール A に変換されている可能性は低いと思われる。オキシベンゾン、ジオキシベンゾン及びサリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルは、S-9 mix による代謝を受けることによってエストロゲン様作用を示した。フタル酸エステル類は、S-9 mix による代謝を受けてもエストロゲン様作用を示さなかった。イソプロピルベンゼン及びプロピルベンゼンは、S-9 mix による代謝を受けてもエストロゲン様作用を示さなかった。スチレントリマーに分類される 1*a*-フェニル-4*e*-(1-フェニルエチル)1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン及びその異性体の S-9 mix 代謝産物についてエストロゲン様作用を評価した。これら化学物質の S-9 mix 代謝産物は、エストロゲン様作用を示さなかった。ピ

フェニルについて臭素化が高度になるにつれてエストロゲン様作用の低下が認められた。この理由については臭素化によって薬物代謝酵素によるフェニル基の 4 位の水酸化が阻害されている、もしくは、代謝産物のエストロゲン様作用が弱化されている。

TR を導入した酵母 Two-Hybrid 法のインキュベーション時間を 4 時間から 24 時間に延長することにより T3 に対する EC<sub>10</sub> は、 $4.0 \times 10^{-8}$  M から  $2.1 \times 10^{-8}$  M になった。フェノール残基を有するアルキルフェノールに重点を置いての甲状腺ホルモン様作用を評価した。その結果、*o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められた。一方、*p*-アルキルフェノール及び *m*-アルキルフェノールに甲状腺ホルモン様作用は認められなかったことから、*o* 位にアルキル基を有することが作用を示す条件の一つと考えられた。また、*o*-アルキルフェノールのアルキル鎖長を変えて検討したところ、イソプロピル基及び *t*-ブチル基にのみ作用が認められた。フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類、パラベン類、ビスフェノール A 誘導体及び臭素化ジフェニルエーテル等の多岐にわたる化学物質の甲状腺ホルモン様作用を評価したが、作用を有する化学物質は見い出せなかった。

### 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

食品容器として多用されているポリスチレン製品中に各種スチレンダイマーおよびスチレントリマーが存在することが報告されており、それらは内分泌かく乱化学物質

としてリストアップされている。これらステレンダイマー及びスチレントリマーのH295R細胞のcortisol産生に及ぼす影響を検討したが、有意な影響は認められなかった。

我々は $\mu\text{M}$ のオーダーあるいはppmという高濃度ではあるがDCHP, 4-*t*-PP, 4-*t*-OPおよび4-NPが副腎由来のH295R細胞の産生するcortisol分泌を阻害することを初めて見だし、更にその作用機序を検討したところ、DCHPはcortisol産生に関与する酵素であるP450c21を、4-*t*-PP, 4-*t*-OPおよび4-NPはP450scc, P450c17およびP450c21を阻害することを明らかにした。特にP450sccはステロイドホルモン産生の最初のステップである、コレステロールの側鎖切断に関与しており、副腎のみならず精巣及び卵巣におけるステロイドホルモン産生に重要な酵素である。またP450c17はアンドロゲン産生に重要な酵素であり、P450c21はコルチコイド産生に欠くことの出来ない酵素でもある。

### 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

high dose BADGE 加水分解体投与群仔マウスは11匹(雄5匹、雌6匹)であったが、この時点での死産及び外皮の奇形は観察されなかった。実体顕微鏡により生殖腺の観察を行ったところ、構造上の異常は認められなかった。コントロール群の胎仔12匹、BADGE加水分解体low dose投与群の胎仔11匹、BADGE加水分解体high dose投与群の胎仔16匹を観察したが、母親の胎内から取り出した時点での死産や外皮奇形は、いずれの群においても見られなかった。また、骨標本についても、いずれの群においても

奇形は認められなかった。出生時及び離乳時における体重変化に関しても各群間で有意な差は認められなかった。

妊娠期及び授乳期に母親を通してBADGE加水分解体に暴露された仔マウスの胸腺、脾臓、子宮及び左右精巣の重量を、離乳時(生後21日目)に測定した。雌に関しては、胸腺、脾臓及び子宮重量は、コントロールとほぼ同様であった。しかし雄に関しては、胸腺及び左右精巣においてlow dose及びhigh dose投与群ともにコントロールと比較し有意な重量の減少が観察された。

### D. 結論

我々は平成11年度厚生科学研究(主任研究者:中澤裕之)「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」の研究成果を通じて興味ある知見を得るとともに、検討すべき問題点も浮かび上がってきた。一部の内分泌かく乱作用が疑われる化学物質が分析操作過程において試料の採取や保存に使用されている実験用器具類の高分子素材から溶出していると考えられる可塑剤、モノマー等の原材料のコンタミネーションが分析値のバックグラウンドを高めたり、再現性のあるデータの取得を困難にしていることが判明した。中でも内分泌かく乱化学物質として社会的関心の高い、フタル酸エステル類やBPA等の化学物質は、試料調製の段階で混入して分析結果のバックグラウンド値を高め、分析精度に影響を与えることが明らかにされた。

本研究では身近な高分子素材を中心にした生活関連製品(玩具、食品用容器包装材料、理化学器材、化粧品、医療用具等)に

由来する内分泌かく乱化学物質（フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類、BPA等のフェノール性化合物、重金属類、その他未解明の物質）について、初段階として精度及び感度の高い分析法を構築する。この目的のためにはGC/MSやLC/MS、ICP等のハイブリッドな最新機器分析装置を駆使した分析法を構築し、高分子素材を中心に生活関連製品からの溶出挙動を究明する。素材からの溶出が認められる化学物質については血液中等での存在量を明らかにする。また、人体暴露が判明した化学物質に関しては優先的に、細胞や実験動物を用い、細胞・分子レベルで生体にどのような影響を与えているかを明らかにすることを目的としている。本各研究項目に関しても内分泌かく乱化学物質に関する有用な基礎的情報として利用されるであろう。

## E. 研究業績

### 1. 発表論文

- 1) 堀江正一、吉田栄充、石井里枝、小林進、中澤裕之 液体クロマトグラフィー/質量分析法による缶飲料中のビスフェノールAの定量 分析化学, 48, 579-587(1999)
- 2) M.Horie, H.Nakazawa, et al. Determination of trenbolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. J.Chromatogr. A 882, 53-62(2000)
- 3) K. Inoue, Y. Yoshimura, H. Nakazawa et al. Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with

- multi-electrode electrochemical coulometric-array detection. Analyst, 125, 1959-1961(2000)
- 4) K. Inoue, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa et al. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. J. Chromatogr. B, 749, 17-23(2000)
- 5) Y. Sun, M. Wada, O. A. Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, K. Nakashima et al. High-performance liquid chromatography with peroxyrate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride as a label. J. Chromatogr. B, 749, 49-56 (2000)
- 6) T. Yoshida, M. Horie, Y. Hoshino, H. Nakazawa et al. Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. Food Addit. Contam., 18, 69-75. (2001)
- 7) K. Inoue, K. Kato, Y. Yoshimura, M. Horie, H. Nakazawa et al. Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for food-wrapping into food simulants and foods. Food Addit. Contam. 18, 157-164 (2001)
- 8) K. Hirayama, H. Tanaka, K. Kawana, T. Tani, H. Nakazawa et al. Analysis of plasticizers of cap sealing

resins for bottled foods. Food addit. Contam. (in press, 2001)

## 2. 研究発表

- 1) HPLC/PDAによる生体内フタル酸モノエステル類の分析 加藤嘉代子、荘田祥子、吉村吉博、中澤裕之、伊藤 裕子、岡 尚男、日本薬学会第121年会、北海道、2001、3
- 2) GC/MS analysis of phthalic and adipic acid esters in beverage using distillation clean up, Kayoko KATO, Yoshihiro YOSHIMURA, Hiroyuki NAKAZAWA, Yuko ITO, Hisao OKA ILSI EUROPE 2nd International Symposium Food Packaging: Ensuring the safety and quality of foods, Vienna, Austria, Nov. 2000
- 3) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす内分泌攪乱化学物の影響：中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之（星薬大・薬）、大野修司（日大・薬）、牧野恒久（東海大・医）、第73回日本生化学大会、2000年、10月、横浜
- 4) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼすフタル酸エステル、アルキルフェノール及び植物エストロゲンの阻害効果：中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之（星薬大・薬）、大野修司（日大・薬）、牧野恒久（東海大・医）、第3回日本内分泌学会研究発表会、2000年、12月、横浜
- 5) 酵母 Two-Hybrid 法を用いた代謝活性化エストロゲン様作用物質の検出：高取 聡、北川陽子、織田 肇、西川 淳一、西原 力、中澤裕之、堀 伸二郎、日本食品衛生学会第79回学術講演会、2000年5月、東京
- 6) 酵母 Two-Hybrid 法を用いた proestrogen 候補物質の検出：高取 聡、北川陽子、織田 肇、西川 淳一、西原 力、中澤裕之、堀 伸二郎、環境ホルモン学会第3回研究発表会、2000年12月、横浜
- 7) EFFECT OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS ON LYMPHOCYTE RESPONSES: Tomomi Yamazaki, Yumiko Okada, Yoshiharu Hisamatsu, Shunichiro Kubota and Fujio Kayama, DIOXIN 2000, Vol.49 p394-396, August 2000, Monterey, California, USA
- 8) 日本食品化学学会第六回総会・学術大会（2000）「食品衛生関連化学物質の E-SCREEN Assay による評価」；山口晃子、中澤裕之（星薬科大学）、山崎聖美（国立公衆衛生院）
- 9) 日本食品衛生学会第八十回学術講演会（2000）「容器・包装関連物質のエストロゲン作用かく乱の生化学的分析」；山口晃子、中澤裕之（星薬科大学）、山崎聖美（国立公衆衛生院）
- 10) 矢島 功、中澤裕之、大槻昌幸、田上順次、西村文夫、本郷敏雄、一條秀憲：歯科材料・器械：19 (SI35)、36 (2000)
- 11) 矢島 功、中澤裕之、日景 盛、大槻昌幸、田上順次、西村文夫、本郷敏雄：歯科材料・器械：19 (SI36)、38 (2000)
- 12) K.Inoue, Y.Yoshimura, H.Nakazawa, Determination of 4-NP and 4-OP in human blood samples by HPLC with multi-electrode electrochemical

- detection. (1649P) PITTCON 2001,  
New Orleans, LA. March (2001)
- 13) Y.Yamaguchi, K.Inoue, Y.Yoshimura,  
H.Nakazawa, Determination of  
epoxy resins bisphenol A diglycidyl  
ether types in food and biological  
samples by LC-MS. (2022P)  
PITTCON 2001, New Orleans, LA.  
March (2001)
- 14) 井之上浩一、吉江友理子、吉村吉博、  
中澤裕之「多電極型電気化学検出高速  
液体クロマトグラフィーによる水試料  
中フェノール性内分泌かく乱化学物質  
の一括分析」第 121 年会日本薬学会  
(I-0055)
- 15) 加藤嘉代子、荘田祥子、吉村吉博、中  
澤裕之、伊藤裕子、岡尚男「HPLC/PDA  
による生体内モノフタル酸エステルの  
分析」第 121 年会日本薬学会 (II-0056)



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）

分担研究報告書

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研究

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

主任研究者	中澤裕之	星薬科大学
研究協力者	吉村吉博	星薬科大学
	加藤嘉代子	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

研究要旨

塩化ビニル樹脂（PVC）を中心としたプラスチック製品は、工業用としての他に、食品用や、医療用として広く使用されている。この 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）などが使用されている。これらの物質は、食品製造の際にプラスチック製手袋などから食品へ移行し、人が摂取していると危惧されている。そこで、PVC 製手袋中の DEHP の分析と実際の食品への移行実験を実施した。PVC 製手袋中の DEHP の分析の精度管理を行った結果、5 研究機関による DEHP 室間再現精度は 5%以内と良好であった。PVC 製手袋中 DEHP の食品への移行量は DEHP 含有率及び手袋の接触時間の増加に伴い増加した。切り干し大根への DEHP の移行量は、コロッケやおにぎりの場合と比較して大きく、DEHP の脂溶性が多く関与していた。おにぎりへの DEHP の移行量は少なかったが、アルコール噴霧した手袋から DEHP が溶出し、それがおにぎりに移行した。PVC 製手袋中の DEHP のコロッケへ移行は、短時間でかつ油を介していることが分かった。

A. 研究目的

フタル酸エステル、アジピン酸エステル類は機能性、加工性、経済性等に優れたプラスチック可塑剤として広くかつ大量に使用されている。塩化ビニル樹脂（PVC）を中心としたプラスチック製品は、生活用品のみならず、人工腎臓の血液回路、輸血用セット（チューブやバッグ）、カテーテルなど医療器材としても広く使用されている。このように幅広い用途で 사용되는可塑剤に、内分泌かく乱化学物質としての作用が疑われている<sup>1),2)</sup>。これらの物質は、

プラスチック製手袋などから食品に移行し、人に摂取されていると危惧されている。そこで、調理用手袋から食品調理時にどの程度 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のフタル酸ジ 2-エチルヘキシル（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<sup>3)-5)</sup>。次に食品への移行試験として、切り干し大根、コロッケ及びおにぎ

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。

## B 研究方法

### B1 試料

塩化ビニル製手袋は2種類の市販の異なるメーカーのものを用いた。

#### B-1 試薬

アセトン、ヘキサン、無水硫酸ナトリウム、酢酸エチルは関東化学社製又は和光純薬製フタル酸エステル試験用を用い、アセトニトリル、塩化ナトリウムは和光純薬製残留農薬試験用を用いた。フロリジルはフロリジン社製フロリジル PR を用いた。消毒用アルコールは食品添加物アルコール製剤(エタノール 67.9%、乳酸 0.1%、リゾチーム 0.04%)を用いた(オーヤラックス製)。精製水には日本ミリポア社製 Milli-Q (EDS ポリッシャー付き)で製したものをを用いた。

#### B-2 標準品

内部標準物質として、DEHP-d4 は関東化学社製環境分析用を用いた。

#### B-3 移行試験対象資料

切り干し大根は長野市内のストアで購入したものを用いた。コロケはスーパーマーケットで生を購入し、実験室で揚げたものを用いた。おにぎりに用いたお米は新潟県産こしひかり(平成11年産)を用いた。

#### B-3 装置及び測定条件

##### 研究機関(A)

材質試験: GC-FID 装置は島津製 GC-17A を用い以下の条件で行った。カラム: HP-5、0.53mm×30m×1μm、カラム温度は: 80℃(2min)-10℃/min-300℃(5min)、キャリアーガス: N<sub>2</sub> 3ml/min

移行試験: GC/MS 装置は日本電子製 GC-mate、GC装置はHP-5890シリーズⅡを用い以下の条件で行った。カラム: HP-5、0.32mm×30m×0.25μm、カラム温度: 60℃(2min)-30℃/min-180℃-5℃/min-250℃-10℃/min-300℃(5min)、

キャリアーガス: He 1ml/min、イオン化電流: 300μA、イオン化電圧: 70V、注入方法: スプリットレス(パージオフ 1min)、モニターイオン: m/z=149、153、167、171、279

##### 研究機関(B)

材質試験: LC/UV の装置は HP 製 LC1050 を用い、以下の条件で行った。カラム: Wakosil 2-5C18 (15cm x 4.6mm)、移動相: 90% アセトニトリル、流速: 1.0 ml/min、検出波長: 225 及び 280nm、サンプルサイズ: 10 μl

移行試験: GC/MS 装置は HP 製の 5989 型を用い以下の条件で行った。カラム: HP-5、0.25mm×30m×0.25μm、カラム温度: 60℃(2min)-30℃/min-180℃-5℃/min-250℃-10℃/min-300℃(5min)、キャリアーガス: He 1ml/min、イオン化電流: 300μA、イオン化電圧: 70V、注入方法: スプリットレス(パージオフ 1min)、モニターイオン: m/z=149、153、167、171、279

##### 研究機関(C)

材質試験: GC/FID装置はHP製-6890シリーズを用い、以下の条件で行った。カラム: HP-5(0.32mm×30、0.25μm)、カラム温度: 150℃(1min)-20℃/min-250℃(24min)、キャリアーガス: He 2ml/min、注入方法: スプリット(20:1)、注入量: 1 μl

移行試験: GC/MS装置は日本電子製 Automass20、GCはHP5890シリーズを用い、以下の条件で行った。カラム: DB-5ms(0.25mm×30m、0.25μm)、カラム温度: 50℃(1min)-20℃/min-280℃(15min)、キャリアーガス: He 1.2ml/min、イオン化電流: 300μA、イオン化電圧: 70eV、注入方式: スプリットレス、注入量: 2μl、モニターイオン: m/z=149、153、167、171

##### 研究機関(D)

材質試験: LC/UV 装置は IRICA 製 Σ981 (PUMP)、IRICA Σ9820 (OVEN) IRICA Σ983 (UV DETECTOR)、IRICA Σ986 (AUTO LOADER) を用いた。カラムは Capcell PAK

C18(UG120, 3 $\mu$ m 4.6mm  $\phi$  150mm)、移動相はアセトニトリル/H<sub>2</sub>O=90/10 (1.0ml/min)、波長は 225nm で行った。  
移行試験：GC/MS 装置は HP の GC/MS を用いた。カラム：HP 社製 HP-30, 0.3mm  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0.25  $\mu$ m, キャリヤガス：He (0.6ml/min)、カラム温度：150 $^{\circ}$ C (2min) - 15 $^{\circ}$ C/min - 280 $^{\circ}$ C, サンプル注入量：2  $\mu$ L, イオン化：EI 法 70eV、m/z=149, d4 体：m/z=153。

#### 研究機関(E)

材質試験：LC/UV の装置は島津製作所製 LC-10Avp を用い、以下の条件で行った。カラム：Mightsil RP-18 GP 5 $\mu$ m (15cm  $\times$  4.6mm)、カラム温度：30 $^{\circ}$ C、移動相：90% アセトニトリル、流速：1.0 ml/min、検出波長：225 nm、サンプルサイズ：20  $\mu$ l

#### B・4 材質試験法

手袋試料を 5mm 角に細断して、これを 2.5g 精秤し、n-ヘキサン中にいれて 50ml にスラップした後、DEHP を溶出させた。手袋中の DEHP は 1 時間で DEHP がほぼ n-ヘキサン中に溶出されるため (Fig. 1)、1~24 時間浸漬させたものを用いた。溶出温度は 20-30 $^{\circ}$ C の室温で行った。

#### B・5 移行試験法

##### (1) 切り干しダイコン

切り干しダイコンの移行試験は Scheme 1 に示す。切り干し大根をガラス製シャーレに入れておき、これをフタル酸エステルを含有する PVC 製手袋で数秒握って、他の容器へ移し、試料とした。試料 30g を 300ml のツールピーカーに採り、これにサロゲート (DEHP-d4) を添加し、30 分放置した。アセトン：ヘキサン (1:1) 100ml を加え、超音波を 10 分間照射し、その抽出液をろ紙を用いて 500ml 分液ロートへろ過した。残渣にアセトン：ヘキサン (1:9) 50ml を加え、超音波抽出し、抽出液を合わせ、再度この操作を繰り返し、抽出液を合わせた。分液ロートに精製水 50ml を加え、3 分振り混ぜ、洗浄し、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、ロータリーエバポレータで濃縮乾固した。濃縮残留物をヘキサン

30ml で溶解し、100ml 分液ロートに移し、ヘキサン飽和アセトニトリル 30ml で 2 回アセトニトリル分配し、脂肪分を除去した。これを濃縮し、定容とし、GC/MS-SIM で定量した。

##### (2) コロツケ

コロツケの移行試験は Scheme 2 に示す。コロツケを油で揚げた後、表面温度 35-40 $^{\circ}$ C に到達したときに手袋でつかんだ。このコロツケ一個をピーカーに入れ、スパーテルで細かくした。これにサロゲート 20  $\mu$ g を入れ一時間放置した。次にアセトン 100ml を入れホモジナイズした後、遠心分離し、上清を分取した。さらに残留物にアセトンを入れ、同様に操作した後、上清を合わせ、減圧下でアセトンを除去した。これに 10% 塩化ナトリウム溶液 50ml を入れ、酢酸エチル：ヘキサン (1:2) で 2 回抽出を行った。有機層を減圧下で除去した後、ヘキサンで 20ml にした。このヘキサン溶液を 10ml とり、これにヘキサン 10ml を入れ、ヘキサン飽和アセトニトリル 20ml で 3 回抽出を行った。アセトニトリル層を減圧下で濃縮乾固し、ヘキサン 2ml に溶解した。この溶液をフロリジルカラムに入れ、ヘキサン 50ml で洗浄した後、1% アセトニトリル/ヘキサン溶液 50ml で溶出した。溶出液を濃縮乾固した後、ヘキサン 10ml を入れ試験溶液とした。この試験溶液を GC/MS で測定した。

##### (3) おにぎり

おにぎりの移行試験を Scheme 3 に示す。米飯は一般家庭で行う通常の方法で炊飯した。霧吹きはポリプロピレン製の霧吹きを用いた。また使用器具は全てアセトンで 2 回洗浄後、100 $^{\circ}$ C で 1 時間以上乾燥して使用した。アルコール噴霧 PVC 製手袋は手袋片手にはめ、消毒用アルコールを約 30cm 離れた位置から 2 回噴霧し、軽く 2 回手袋を握ったものを使用した。

炊飯後約 40~45 $^{\circ}$ C に冷却した米飯 30g をスパーテルでペトリ皿に量り取る。PVC 製手袋をはめた手で米飯を 2~3 回つまみ、軽く握ってステンレス製カップに移す。ステンレス製カップの中の米飯上にサロゲート 15  $\mu$ g 添加 (添加条件 15ppm, 1ml)

し、2~3分放置する。これに *n*-ヘキサン 50ml を加え、3分間の超音波抽出した。ヘキサン層を遠心管に移し、遠心分離 (3,000rpm、10分) 後、GC/MS で測定した。

## C 研究結果

### C-1 定量範囲

材質試験のために、標準 DEHP を用いての検量線を作成したところ、0.1-20 mg/ml の範囲で相関係数が0.999の良好な直線性が得られた。(Fig.2)

### C-2 材質試験法のクロスチェック

5研究機関による同一 PVC 製手袋中の DEHP の材質試験を行った。手袋①及び手袋②ともに DEHP が平均 40.4%、20.5%含まれていた。また5機関の測定のパラツキの指標である相対標準偏差も 2.4%、4.3%と良好であった。(Table 1)

### C-3 ダイコンへの移行

切り干し大根を PVC 製手袋でつかむ時間すなわち接触時間と DEHP 移行量との関係を検討し、その結果を Fig.3 に示す。接触時間が長いほど DEHP の移行量も大きくなり、相関性が認められた ( $r^2=0.9804$ )。

切り干し大根を3秒間 DEHP 含有 PVC 製手袋でつかみ、DEHP 移行量を測定した。40.4%の DEHP を含む手袋①を使用した場合、43.9ppm (平均) の DEHP が切り干し大根から検出された。また4機関の分析結果には、顕著な差は認められず (RSD: 2.64%)、良好な分析結果を得た。一方 20.5%の DEHP を含む PVC 製手袋②を用いて模擬実験を行った結果、切り干し大根中に 28.0ppm (平均) が認められた。またこのときのblank値は 0.367ppm (平均) であった。(Fig.4)

### C-4 コロッケへの移行

油で揚げたコロッケ1個 (63-70g) を、表面温度 35-40℃になった時点で2種類の PVC 製手袋でつかんだ。これをピーカに入れ、スパーテルで細切して試料とし、酢酸エチル:ヘキサン(1:2)及びヘキサン飽和アセトニトリルで抽出後 GC/MS により DEHP の移行量を求めた。2種類の PVC 手袋を使用した模擬実験の結果、手袋①が

0.48ppm、手袋②が 0.27ppm (平均) の DEHP が認められた。4機関ともに顕著な差は認められず (RSD: 10.1%、11.0%)、良好な分析結果を得た。

PVC 製手袋でコロッケをつかんだ後、再度コロッケをつかむ実験を実施したところ、Fig.6 に示すように、手袋①、手袋②を使用した場合、それぞれ、9ppm、4.8ppm (平均) の DEHP 含量の上昇が認められた。これは DEHP が脂溶性であるため手袋に付いた油を経由して食材へ移行したと考えられる。

### C-5 おにぎりへの移行

米を一般家庭で行う通常の方法で炊飯して試料とした。消毒用アルコールを (67.9%アルコール含) をポリプロピレン製の霧吹きに入れ、約 30cm 離れた位置から PVC 製手袋をはめて手に2回噴霧した。さらに軽く2回手袋を握ってから炊飯後の約 40-50℃に冷却した米飯を2~3回つまみ、軽く握ってステンレス製カップに移したものを試料とし、抽出操作後、GC/MS で分析した。その結果、Fig.7 に示すように、消毒用アルコールを併用しない場合、手袋①と②の DEHP の移行はblank値が 0.02ppm に対して、それぞれ 0.076ppm、0.069ppm と極僅かであった。消毒用アルコールを噴霧した場合、手袋①、手袋②の DEHP の移行量は 1.45ppm、0.55ppm (平均) と大きな移行が認められた。これは DEHP が脂溶性であり、アルコールに溶解されて、食品へ大量に移行したものと考えられる。

また、噴霧直後から30秒経過して乾燥した手袋を使用した場合の DEHP の移行量は、手袋①では 3.8ppm から 0.43ppm、手袋②では 2.3ppm から 0.37ppm と移行量が大きく減少した (Fig.8)。

## D 考察

PVC 製手袋中の DEHP の食品への移行性について検討する前に、その測定方法の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と思われるため、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られており、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分かった。

#### E 結論

PVC 製手袋中の DEHP 分析法の精度管理を行った結果、5 研究機関による DEHP 室間再現精度について 5%以内と良好であった。PVC 製手袋中 DEHP の食品への移行量は DEHP 含有率及び手袋の接触時間の増加に伴い増加した。切り干し大根への DEHP の移行量は、コロッケやおにぎりの場合と比較して大きく、DEHP の脂溶性が多く関与していた。おにぎりは 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、それがおにぎりに移行した。PVC 製手袋中の DEHP のコロッケへ移行性は、短時間でかつ油を介していることが分

かった。DEHP の TDI 基準を諸外国の基準から鑑みて 40-140  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  (2000-7000  $\mu\text{g}/50\text{kg}/\text{day}$ : 平均 4500  $\mu\text{g}/50\text{kg}/\text{day}$ ) に設定した場合、今回アルコール処理した手袋で作られたおにぎり (DEHP 含量: 1.45  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) をヒト (50kg 体重) が毎日 2 個 (100g  $\times$  2 個) 摂取すると DEHP 摂取量は 290  $\mu\text{g}/\text{day}$  となる。従って、ヒトの DEHP 摂取量は TDI (4500  $\mu\text{g}$ ) と比較すると約 0.064 倍であり、直ちに問題があるレベルには思われない。

#### F 参考文献

1. 環境庁保健調査室シリーズ No14、1993 「WHO 環境保健クライテリア 131 フタル酸ジエチルヘキシル」(1993).
2. 環境庁「外因性内分泌かく乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」(1998).
3. Giust, J.A., Seipelt, T., Anderson, B.K., Deis, D.A., Hinders, J.D., Determination of bis(2-ethylhexyl)phthalate in cow's milk and infant formula by high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 415-418 (1990).
4. Nakamura, Y., Oohata, T., Tsujii, H., Ito, Y., Tatsuno, T., Tomita, I., Application of the simultaneous analytical method for plasticizers as food contaminants to the film-packed foods and the plasticizer levels in the commercial foods., *Nippon Hoso Gakkaishi*, 2, 230-238 (1993).
5. Petersen, J.H., Survey of di(2-ethylhexyl)phthalate plasticizer contamination of retail Danish milk Food Addit. Contam., 8, 701-706 (1991).

#### G 研究発表

1. HPLC/PDA による生体内フタル酸モノエステル類の分析 加藤嘉代子、荘田祥子、吉村吉博、中澤裕之、伊藤 裕

子、岡 尚男、日本薬学会第 121 年会、  
北海道、2001、3  
2. GC/MS analysis of phthalic and  
adipic acid esters in beverage using  
distillation clean up, Kayoko KATO,  
Yoshihiro YOSHIMURA, Hiroyuki

NAKAZAWA, Yuko ITO, Hisao OKA  
ILSI EUROPE 2nd International  
Symposium Food Packaging: Ensuring  
the safety and quality of foods, Vienna,  
Austria, Nov. 2000

フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の参考資料

DEHP の TDI について

資料より、各国の TDI が以下のように出されています。

国	TDI		NOAEL (mg/kg/day)	毒性評価
	$\mu\text{g/kg/day}$	$\mu\text{g/day (50kg)}$		
EU	37	1850	3.7	精巣毒性
イギリス	50	2500	5	肝毒性
デンマーク	5	250	5	発がん性
アメリカ	100 ?	5000 ?	10	精巣毒性
日本	40-140	2000-7000	3.7-14	精巣毒性、生殖毒性

\*アメリカは TDI は示されていないが、NOAEL から推定した。

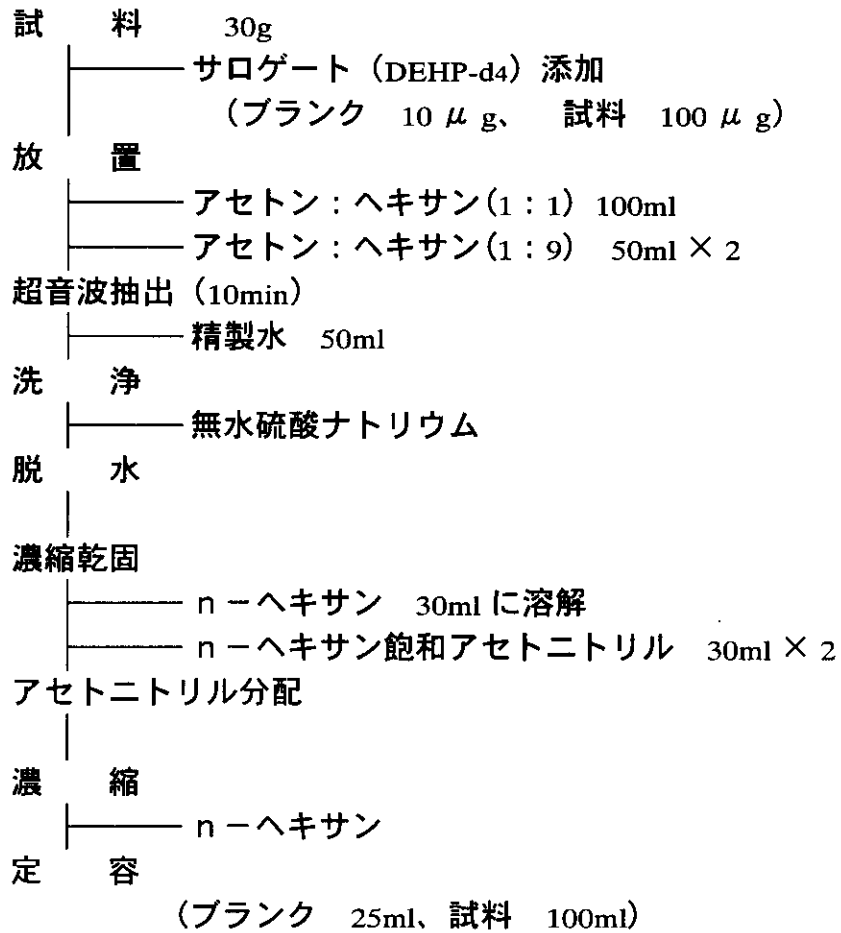
今回、EU の値を基準で報道等にて論議されているが、表のように各国により TDI の基準にばらつきが大きい。日本での TDI の基準は  $40-140 \mu\text{g/kg/day}$  と設定して、おにぎり中の DEHP 含量を検証した。

おにぎり  $1.45\text{ppm} = 1.45 \mu\text{g/g}$  おにぎり 2 個 (1 個 100g) 摂取/day とすると

$$1.45 \mu\text{g/g} \times 100\text{g} \times 2 \text{ 個} = 290 \mu\text{g/day}$$

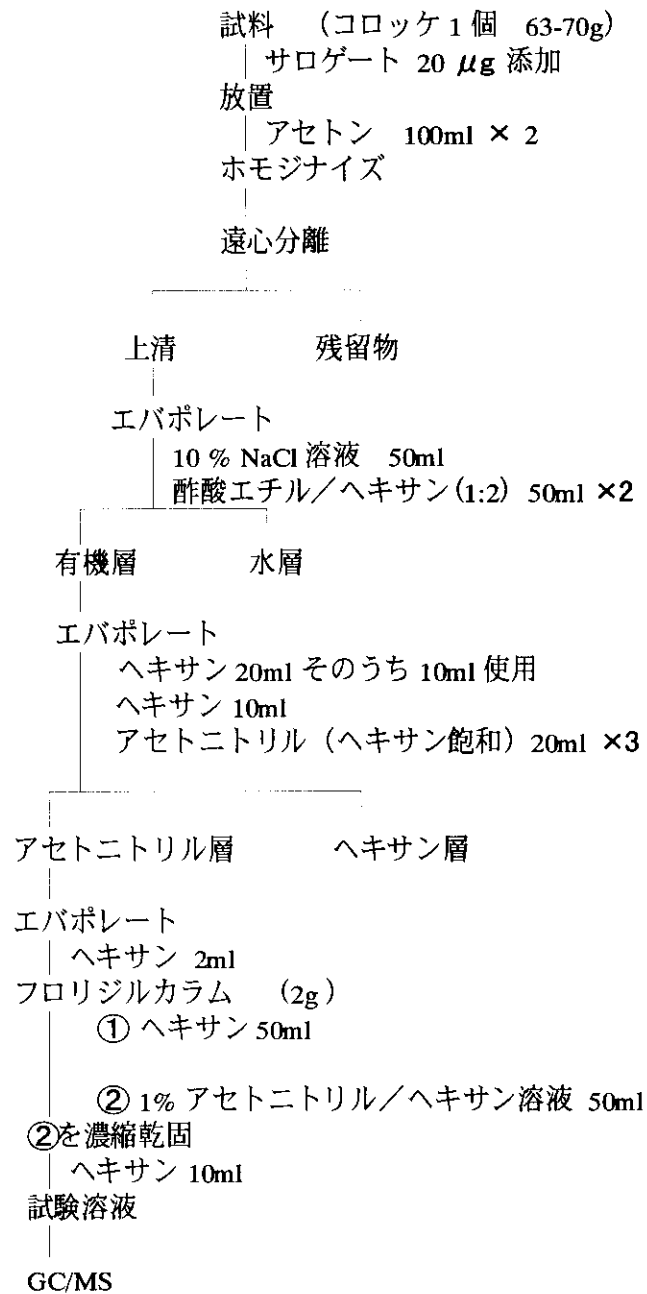
TDI が  $40-140 \mu\text{g/kg/day}$  は体重 50kg あたりに換算すると  $2000-7000 \mu\text{g/day}$  (平均 4500) となりため、おにぎり 200g を摂取した場合は TDI の 0.064 倍でありため、ほとんど問題ないと考えられる。

Scheme 1 切り干し大根の試験方法

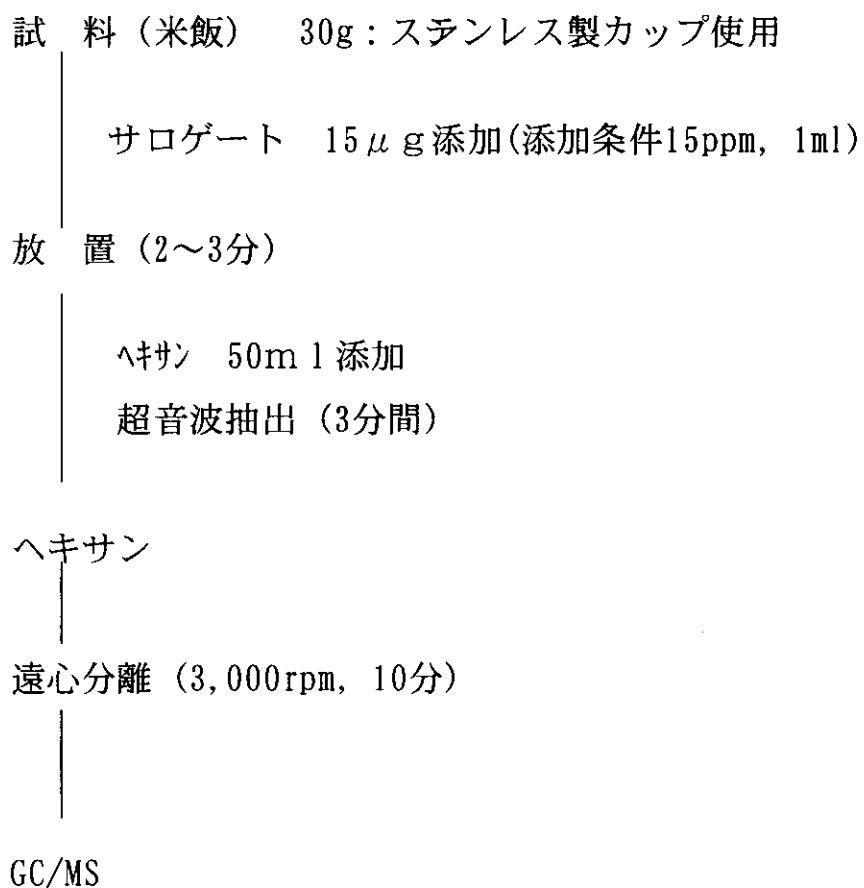




Scheme 2 コロツケ試験方法



### Scheme 3 おにぎりの試験方法



**Table 1 PVC手袋中DEHP含量**

試料	検査機関					平均	S.D	RSD
	A	B	C	D	E			
PVC手袋①	41.2	41.3	41.1	39.2	39.8	40.4	0.96	2.4
PVC手袋②	20.6	21.2	20.8	19.1	20.2	20.5	0.87	4.3
								%

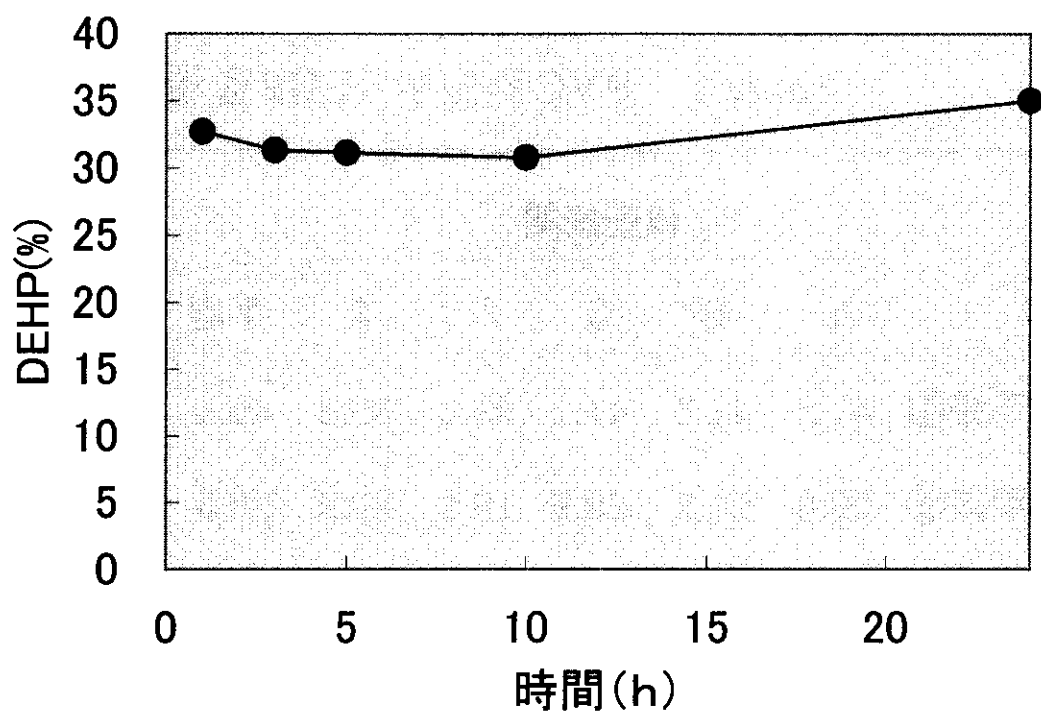


Fig.1 PVC 手袋中の DEHP の溶出挙動