

平成13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
	米谷	民雄	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ジエチルヘキシルフタレートの存在状態の研究.....	27
--	----

ーアルコール消毒時の挙動と水中への溶出量の関係ー

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室

研究協力者 萩原 純一 東レリサーチセンター

軟質ポリ塩化ビニル製玩具中の可塑剤含有量の実態調査及び

フタル酸エステル、アジピン酸エステル等の溶出について.....	39
---------------------------------	----

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室

分担研究者 米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究者 杉田たき子 国立医薬品食品衛生研究所

阿部有希子 国立医薬品食品衛生研究所

高分子樹脂製玩具からの内分泌かく乱化学物質の溶出挙動に関する研究.....	57
---------------------------------------	----

ーフタル酸ジエステルのヒト唾液中でのモノエステル体生成に関する研究ー

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室

分担研究者 米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究者 石橋 亨 財団法人東京顕微鏡院

新野 竜大 財団法人東京顕微鏡院

瓶詰食品におけるキャップシーリング材中のノニルフェノールの分析.....	67
--------------------------------------	----

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室

分担研究者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所

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

アルコール飲料中のビスフェノール A (BPA)、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル.....	73
--	----

(BADGE) 関連化合物に関する研究

ーLC/MS/MS 法による分析法開発と市販製品の分析ー

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学薬品分析化学教室

研究協力者 山下 博 アサヒビール（株）総合評価センター

望月 直樹 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

ラミネートフィルム包装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	85
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
分担研究者 宮崎 豊	愛知県衛生研究所
協力研究者 丹野嵯喜子	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
文具、化粧品、家庭用品等に含まれる内分泌かく乱化学物質の分析	95
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
分担研究者 宮崎 豊	愛知県衛生研究所
研究協力者 伊藤 裕子	愛知県衛生研究所
後藤 智美	愛知県衛生研究所
岡 尚男	愛知県衛生研究所
猪飼 啓友	愛知県衛生研究所
近藤 文雄	愛知県衛生研究所
松本 浩	愛知県衛生研究所
実験用動物飼料等中のビスフェノール A の分析	105
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 吉村 吉博	星薬科大学薬品分析化学教室
ポリ塩化ビニル製品中の BPA の分析および溶出挙動に関する研究	111
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
分担研究者 宮崎 豊	愛知県衛生研究所
協力研究者 益川 邦彦	神奈川県衛生研究所
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
歯科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－	117
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 本郷 敏雄	東京医科歯科大学
高分子素材由来の内分泌かく乱物質の分析法開発と実態調査	129
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
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

大気中のプラスチック可塑剤の実態調査	149
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 今井 俊介	奈良県衛生研究所
溝渕 膺彦	奈良県衛生研究所
松浦 洋文	奈良県衛生研究所
植田 直隆	奈良県衛生研究所
井上ゆみ子	奈良県衛生研究所
大気圧光イオン化を用いた LC/MS 法による基礎研究	163
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
分担研究者 畑山 善行	長野県衛生公害研究所
協力研究者 松岡 広和	横河アナリティカルシステムズ (株)
佐久井 徳広	横河アナリティカルシステムズ (株)
滝埜 昌彦	横河アナリティカルシステムズ (株)
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	169
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
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
北川 陽子	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
精巢ライディッヒ細胞初代培養系の構築とテストステロン産生に及ぼす	
アルキルフェノール及びフタル酸エステルリスク評価	187
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 中陳 静男	星薬科大学生化学教室
内分泌かく乱化学物質の造血幹細胞に対する影響について	199
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 牧野 恒久	東海大学医学部
岩崎 克彦	東海大学医学部
和泉俊一郎	東海大学医学部
Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) に代わる可塑剤候補となる化学物質の	
内分泌かく乱作用に関する研究	207
主任研究者 中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者 吉村 吉博	星薬科大学薬品分析化学教室

研究協力者	井之上浩一	星薬科大学薬品分析化学教室
	牧野 恒久	東海大学医学部
	岩崎 克彦	東海大学医学部
	和泉俊一郎	東海大学医学部
	村野 孝代	東海大学医学部
	山崎 聖美	国立公衆衛生院
	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
	北川 陽子	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
	中陳 静男	星薬科大学学生化学教室
	大野 修司	星薬科大学学生化学教室
	中島羊奈子	星薬科大学学生化学教室
	中橋 敬輔	テルモ（株）
	石川 健次	テルモ（株）

受容体結合試験によるフタル酸ジエチルヘキシル及びその他の可塑剤の活性評価…………… 217

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者	吉村 吉博	星薬科大学薬品分析化学教室
	石川 健次	テルモ（株）

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす

DEHP 代替可塑剤の影響評価…………… 225

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者	中陳 静男	星薬科大学学生化学教室

フタル酸ジエチルヘキシル及びその代替化学物質のエストロジェン様作用…………… 231

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者	山崎 聖美	国立公衆衛生院

E-Screen Assay によるフタル酸ジエチルヘキシル及びその他の可塑剤の活性評価…………… 239

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学薬品分析化学教室
研究協力者	牧野 恒久	東海大学医学部
	岩崎 克彦	東海大学医学部
	和泉俊一郎	東海大学医学部

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

本年度の研究では、身近な高分子素材からなる生活関連製品に由来する内分泌かく乱化学物質について、精度及び感度の高い分析法を構築する。また、内分泌かく乱作用という新たな観点で安全性評価が求められていることから、関連化学物質を中心に様々な視点から生体影響を解析するため、バイオアッセイ系評価法の構築及び本研究への応用を目的とした。さらに、フタル酸エステル類（PAE）の使用については法的規制が実施されているため、より安全性が高い代替可塑剤についてもその分析法及び生体影響の検討を目的とする。以下に研究結果の概要を示す。

1. ポリ塩化ビニル(PVC)製品中の PAE 及びその動態解析

①食品用 PVC 製手袋中のフタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP)存在状態の解析

高分子素材の解析という観点から PVC の分析を実施し、食品用 PVC 手袋からの DEHP 溶出や移行との関係を調べた。PVC 製手袋表面には高濃度の DEHP が存在し、最表面ではごく薄い皮膜を形成していることが明らかとなった。この表面付近の DEHP はアルコール消毒により一旦溶解し、手袋内部に浸み込むが、最表面では比較的短時間で元の状態に回復することが推定され、DEHP 量はアルコール噴霧に伴って手袋に残存するアルコールの影響を受けることが示唆された。

②PVC 製玩具中の可塑剤の実態調査-PAE 等の溶出-

前年度に引き続き軟質玩具製品について、実態調査、残留量の分析等を検討した。PVC 製と判明した 49 製品 56 検体の可塑剤の種類と含有量の実態調査では、PAE3 種類、アジピン酸エステル類 3 種類、その他の可塑剤 4 種類が検出されたが、PAE の検出率は 68%に減少した。複数可塑剤を含有する玩具試験片から含有量と溶出量の関係を調べたところ、フタル酸ジイソノル(DINP)と DEHP の溶出傾向は前年度の結果とほぼ同様の傾向と推察された。

③ヒト唾液中における玩具中フタル酸ジエステル体からモノエステル体への生成

ヒト唾液中の酵素がフタル酸ジエステル体の加水分解反応に及ぼす影響について検討した。モノエステル体の生成反応には、唾液酵素の関与が認められ、直鎖のアルキル基、特に炭素数 4 のブチル基に強い基質特異性を示した。また、モノエステル体の脱エステルによるフタル酸生成反応に対しては酵素活性を示さないことが明らかとなった。

2. 食品容器包装材料中の内分泌かく乱化学物質の分析に関する研究

①瓶詰食品におけるキャップシーリング材中の 4-ノニルフェノール(NP)の分析

瓶詰食品のキャップシーリング材には PVC 樹脂が使用されているため、様々な添加剤等が使用されている可能性があり、本研究では NP を分析し、市販製品の実態を調査した。その結果、1999 年に入手した製品の 20%から NP が検出されたが、最近の製品ではその添加剤の代替えが行われている傾向が観察された。

②アルコール飲料中のビスフェノール A(BPA)及びビスフェノール A ジグリシジルエーテル (BADGE)関連化合物の分析

液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法(LC-MS/MS)により、BPA 及び BADGE 関連化合物の一斉分析法を開発し、各種アルコール飲料を分析した。その結果、国産ビールでは缶及びビン製品とも BPA 及び BADGE 類は殆ど検出されなかったが、一部輸入缶ビールでは微量検出された。国産の缶入りリキュール類や果実酒、焼酎及びウイスキーなどでも一部の製品から BADGE 類が微量検出された。これらは主に、缶胴または缶蓋内面塗装として使用された塗料の種類及び品質などの要因によるものと考えられる。

③ラミネートフィルム包装食品中の BPA 及び BADGE 関連化合物の分析

包装材料からの BPA 及び BADGE 関連化合物のヒトに対する暴露量を把握するために、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出器(LC-FL)及び高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC-MS)を用いて包装食品への移行を検討した。ラミネートフィルム包装食品から BADGE 関連化合物が、一部検出されたが、BPA は検出限界以下であった。BADGE 関連化合物は、特に PET/Al/PP 型のラミネートフィルム包装食品から検出された。

3. 生活関連高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解析

①文具、化粧品、家庭用品等に含まれる内分泌かく乱化学物質の分析

文具、化粧品、家庭用品等合計 64 検体について 14 種類の可塑剤を分析した結果、30 検体から PAE 及びアジピン酸エステル類が検出された。消しゴム中には高頻度かつ高濃度に可塑剤が含有されていることが判明した。

②実験動物用飼料及び飲水中の BPA の分析

in vivo assay による内分泌かく乱化学物質の生体影響の実験結果を評価するには、実験動物の飼育環境の影響を検討する必要がある。そこで、飼料、飲水に残留する BPA を分析した結果、すべての飼料について、BPA の残留量は検出限界以下であった。一方、ポリカーボネイト製吸水瓶中の飲水からは、BPA が 14.3 ng/ml 検出されたが、実験動物飼育環境からの BPA 汚染は、少ないものと推測される。

③PVC 製生活関連製品中の BPA の分析及び溶出挙動

様々な PVC 製品（ラップフィルム、手袋、ホース、蛇口フィルター、レインコート、テーブルクロス等）に残留する BPA の動態解明と、その溶出挙動を検討した。PVC 製品の 80%に 1.4~500 $\mu\text{g/g}$ の範囲で BPA が検出され、樹脂の表面に集まる傾向が観察された。2001 年に入手した製品では BPA の検出率が減少していることが判明した。

④歯科材料由来の内分泌かく乱化学物質の分析

ポリカーボネイト(PC)重合の際の未反応 BPA, t-ブチルフェノール(t-BP)量及び射出成型に伴う熱分解などによる残留 BPA, t-BP 量および唾液浸漬による PC からの分解 BPA, t-BP 量を明らかにした。

4. 生活環境中の内分泌かく乱化学物質の実態調査と分析精度の向上に関する研究

①生活関連製品に由来する内分泌かく乱化学物質の尿中分析法の開発と実態調査

BPA とアルキルフェノール類を個別に分析する方法を構築し、暴露実験を実施して、平均的な暴露量 (BPA: 0.27~5.47 ng/ml, NP: 0.2~2.5 ng/ml) を求めた。

②環境大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

屋外大気中のプラスチック可塑剤の年間調査を行った結果、主にフタル酸ジ-n-ブチル(DnBP)と DEHP を検出した。DnBP の濃度は、夏季に高く、冬季には低くなり、気温との相関性がみられた。室内空気の調査では、DnBP は冬季に外気より 10 倍近く検出した。自動車内空気中の可塑剤の季節毎の違いを調査した結果、車内温度が 50℃を超える夏季には、DnBP, DEHP はともに 1000 ng/m³を超えた。

③LC/大気圧光イオン化(APPI)-MS 法の基礎的研究

APPI の基礎研究を行い、環境に存在する N-メチルカルバメート系農薬及びベンゾ(a)ピレンの微量分析を実施した。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法を用いた内分泌かく乱作用の評価

高分子素材由来化学物質の生体影響を評価する上で、酵母 Two-Hybrid 法を用いてホルモン活性の基礎的情報の取得を試みた。スチレン関連物質、難燃剤等の甲状腺ホルモン様作用を調べた結果、甲状腺ホルモン様作用は認められなかった。また、アルキルフェノール類、パラベン類及びベンゾフェノン誘導体では、抗アンドロゲン作用を有することが判明した。

②精巣ライディッヒ細胞初代培養系の構築とテストステロン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質のリスク評価

テストステロンを産生するライディッヒ細胞の初代培養系を構築し、そのテストステロン産生に及ぼす PAE やアルキルフェノール類の影響を検討した。その結果、副腎 H295R 細胞のコルチゾール産生を阻害した NP (mix) 及び 4-t-オクチルフェノール(OP)のみならず 4-n-ヘプチルフェノール, 4-n-NP 及び 4-n-OP の曝露によってもライディッヒ細胞のテストステロン産生が抑制されることを明らかにした。さらに、ブタ精巣からライディッヒ細胞を単離して初代培養系を構築し、テストステロン産生に及ぼす影響を検討した。

③内分泌かく乱化学物質の造血幹細胞に対する影響

DEHP が臍帯血中の造血幹細胞の分化・増殖に与える影響について、Colony Assay 法を用

いて検討した。本試験では、CD34 陽性細胞を利用することにより、新たな評価が達成できた。

6. PAE 代替可塑剤の内分泌かく乱化学物質作用の評価

①DEHP の代替可塑剤候補となる化学物質の内分泌かく乱作用

食品用器具・容器包装または玩具等には特に高い安全性が要求されることから、各種可塑剤について *in vitro* の各種内分泌かく乱作用のスクリーニング研究を行った。受容体結合能試験 (binding assay)、ヒト乳癌細胞増殖試験 (E-screen)、酵母 Two-Hybrid 法、副腎皮質細胞のコルチゾール産生への影響試験の結果、フタル酸ジ-n-デシル (DnDP：工業グレード)、トリメリット酸トリエチルヘキシル (n-TOTM：工業グレード)、トリメット酸トリ-2-エチル (EH-TOTM：工業)、クエン酸アセチルトリヘキシル (ATHC：試薬グレード) は全ての試験で活性が認められず、DEHP より内分泌かく乱作用が小さいことが示唆された。また、代謝物の活性が高くなるものがあること、工業品より試薬の方が高い活性を示す傾向があること、各種試験機関での違いがあることが分かった。

②受容体結合試験による DEHP 及びその他の可塑剤の活性評価

種々可塑剤の生殖関連受容体 (エストロゲン、アンドロゲン) への結合能を評価する目的で受容体結合試験を行った。17 β -エストラジオール及びテストステロンの IC₅₀ を 100 とし、各物質の受容体結合親和性 (RBA) を求めた。エストロゲン α 受容体結合試験 (ER(α)) において DEHP (試薬グレード)、エストロゲン β 受容体結合試験 (ER(β)) においてはトリメット酸トリ-2-エチル (EH-TOTM：試薬グレード)、アンドロゲン受容体試験 (AR) においては DEHP (試薬グレード) とクエン酸アセチルトリブチル (ATBC：工業グレード) において RBA を求められたが、その値が低いことから、他のアッセイ等での評価が必要と推測される。またその他の可塑剤については、受容体への活性は無いことが分かった。

③ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす DEHP 代替可塑剤の影響評価

DEHP の代替物質として、試薬用、工業用グレードを含む合計 11 候補物質を挙げ、ヒト副腎由来 H295R 細胞中のコルチゾール産生に及ぼす影響を種々の濃度で検討した。その結果、クエン酸ブチリルトリヘキシル (BTHC：試薬グレード) は 30 μ M の濃度においてコルチゾール産生を抑制した。またクエン酸アセチルトリブチル (ATBC) は、試薬と工業グレードとの間で多少差が見られたが、3.0 μ M–30 μ M の濃度においてコルチゾール産生を濃度依存的に抑制する傾向があった。他の可塑剤の曝露では、いずれもコルチゾール産生の抑制傾向は認められず、いずれの検体においても曝露実験に使用した濃度では細胞毒性は認められなかった。

④可塑剤及び代謝産物のエストロゲン様作用

DEHP の代替化学物質として用いられるようになったアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA) 等の化学物質について E-SCREEN Assay によりエストロゲン様作用の評価を行うとともに、生体内における化学物質の代謝を考慮し、化学物質を S-9mix で処理し、各化学物質の代謝産物のエストロゲン様作用についても E-SCREEN Assay を用いて調べた。その結

果、代謝によってもエストロゲン様作用に変化がないもの、代謝によってエストロゲン様作用がなくなるもの、代謝によってむしろエストロゲン様作用がみられるようになるものがあった。

⑤E-SCREEN Assay による DEHP 及び代替可塑剤の活性評価

MCF-7 ヒト乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により、DEHP 代替可塑剤の候補物質のエストロゲン様作用について検討した。その結果、代替物質のうち、実験用試薬 DEHP、EH-TOTM、DEHA、ATBC は MCF-7 細胞の増殖を亢進し、エストロゲン様作用があることが示唆されたが、その他の実験用試薬 ATHC、BTHC、工業用試薬 DEHP、DnDP、n-TOTM、EH-TOTM、ATBC はいずれも、MCF-7 細胞の増殖を亢進する作用はみられず、エストロゲン様作用がないことが示唆された。

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
米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所
部長

A. 研究目的

1. PVC 製品中の PAE 及びその動態解析

①アルコール消毒時による PVC 製手袋中 PAE の存在状態の解析

DEHP は、優れた可塑剤として、軟質 PVC 製品全般に使用されている。スーパーマーケットや飲食店、一般家庭等で広く利用されている手袋も、代表的な軟質 PVC 製品の一つである。一方、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、手袋表面から食器や食品への移行が懸念される。この問題に関して、これまで 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、本研究では、高分子素材の解析という観点から塩ビの分析を実施し、DEHP の溶出や移行との関係の評価することを目的とする。

②PVC製玩具中の可塑剤の実態調査及びPAE及びアジピン酸エステル等の溶

出について

これまでに玩具中のPAEが社会問題となった平成10年度の玩具及び日本玩具協会が自主規制を実施した後の平成12年度の玩具について実態調査を行ったが、本年度も引き続き軟質PVC製玩具製品について以下の項目に関する検討を行うことを研究目的とした。①軟質玩具製品の表示と素材に関する実態調査を実施する。②PVC製と確認された製品中の可塑剤の種類及び含有量の実態調査を実施する。③シミュレーション溶出試験法によるDEHP、アジピン酸ジイソノニル(DINA)及びクエン酸アセチルトリブチル(ATBC)についての溶出試験を実施する。

③ヒト唾液中における玩具中フタル酸ジエステルからモノエステル体への生成

昨年度までの本研究では、成人被験者のチューイングによるPVC製乳幼児用玩具から口腔内へのフタル酸ジエステルの溶出試験において、ヒト唾液に溶出した一部のフタル酸ジエステルが加水分解し、そのモノエステル体を生成することを明らかにした。

本年度の本研究は、ヒト唾液中の酵素がフタル酸ジエステルの加水分解反応に及ぼす影響について、その詳細を検討する。

2. 食品容器包装材料中の内分泌かく乱化学物質の分析に関する研究

①瓶詰食品におけるキャップシーリング材中のNPの分析

瓶詰食品のキャップシーリング材はPVC製であるため、様々な化学物質が使用されている可能性があり、本研究ではNPを分析し、1999年当時の製品の実態を調査することを目的とする。

②アルコール飲料中の BPA 及び BADGE 関連化合物の分析

缶飲料用のアルミ、スチール缶等の内面塗装には、エポキシ樹脂系塗料及びビニル樹脂系塗料が使用されており、これら塗料原料樹脂由来の BPA ならびに BADGE 関連化合物が中身製品に移行する可能性が指摘されている。また、アルコール濃度の高い酒類では、製造工程で設備等から混入が起ること等も懸念される。本研究では液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法(LC/MS/MS)により、BPA 並びに BADGE 関連化合物の一斉分析法を開発することを目的とする。

③ラミネートフィルム包装食品中の BPA 及び BADGE 関連化合物の分析

エポキシ樹脂の用途は広く、缶詰の内面コーティング剤に使用される他、レトルトパウチといった複合ラミネートフィルムの接着剤として使用されている可能性があり、これらエポキシ樹脂成分の食品への移行が危惧される。そこで、本研究ではこれら包装材料からの BPA および BADGE 関連物質の

ヒトに対する暴露量を把握するために、高速液体クロマトグラフ／蛍光検出器(HPLC/FL)を用いた一斉分析法(高速液体クロマトグラフ／質量分析計(LC/MS)による確認)について検討し、包装食品への移行量を調査することを目的とする。

3. 生活関連高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解析

①文具、化粧品、家庭用品等に含まれる内分泌かく乱化学物質の分析

PAE 及びアジピン酸エステル類はプラスチック製消しゴムの可塑剤として、あるいは化粧品、インク、接着剤、塗料等の成分保留剤として使用され、我々の生活環境中に氾濫している。我々は文具、化粧品、家庭用品等からこれら可塑剤の暴露を日常的に受けているものと考えられる。本研究では文具、化粧品、家庭用品等中に含まれる PAE 及びアジピン酸エステル類を分析し、これら可塑剤の含有実態の調査を目的とする。

②実験動物用飼料及び飲水中の BPA の分析

飼育環境において研究対象の化学物質に暴露されていた場合、assay による本質的な生体影響の評価は困難となり、実験結果の再現性が喪失する可能性がある。そこで、本研究では、実験動物の飼育環境の違いによる影響を評価する目的で、飼料、飲水に残留する BPA を分析し、*in vivo* assay における内分泌かく乱化学物質の生体影響評価の妥当性を検討する。

③PVC製品中のBPAの分析および溶出挙動

BPAは内分泌かく乱作用の疑いがもたれ、近年ポリカーボネート、エポキシ樹脂に関連製品からの溶出等について多くの報告があるが、

PVC樹脂中のBPAに関しては十分に把握されていない。BPAは環境中に微量に検出されていることが報告されており、分析中のブランク値が問題となる化学物質の一つである。そこで本研究では、様々なPVC製品中のBPA残存量を把握し、水への溶出挙動を検討することを目的とする。

④歯科用高分子素材由来の内分泌かく乱化学物質の分析

歯列矯正治療で汎用されているポリカーボネート製矯正用ブラケットは、BPAを合成前駆体とし、重合調節剤としてp-t-ブチルフェノール (t-BuP)、p-クミルフェノール (p-CP)、p-オクチルフェノール及び2,6-ジ-t-ブチル-p-クレゾール等を用いて合成されている。t-BuPにも弱いエストロゲン活性のあることが報告されているため、PC重合の際の未反応BPA、t-BuP量および射出成型に伴う熱分解などによる残留BPA、t-BuP量および唾液浸漬によるPCからの分解BPA、t-BuP量を明らかにすることを目的とする。

4. 生活環境中の内分泌かく乱化学物質の実態調査と分析精度の向上に関する研究

①尿中の高分子素材由来の内分泌かく乱化学物質の分析法の開発と実態調査

高分子素材から検出されるBPA、NP、オクチルフェノール等のヒトへの暴露状況について実態を調査するため、今年度は、BPAとアルキルフェノール類を個別に分析する方法を構築し、実態調査を実施して平均的な暴露量を求めることを目的とする。

②環境大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

PAE(PAE)等は、特に生産量が多く、我々の生活環境のあらゆる所で見いだされてい

る。しかし、その大気中の調査は少なく不明な点が多いことから、現状を把握するため、①一般環境屋外空気、②室内空気、③自動車内空気中のPAEとトルエン等の揮発性有機化合物(VOC)の実態調査を目的とする。

③大気圧光イオン化を用いたLC/MS法の基礎的研究

最近開発された紫外線ランプを用いたAPPIは、測定対象化合物を直接イオン化することから紫外線エネルギーよりイオン化電圧の低い移動相さえ使用しなければ、移動相組成などのLC条件の影響を受けずに測定が可能である。そこで本研究においてAPPIの基礎研究を行い、N-メチルカルバメート系農薬及びベンゾ(a)ピレンの微量分析法への応用を検討する。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法を用いた高分子素材中の内分泌かく乱作用の評価

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法により、化学物質及びその代謝物について内分泌かく乱作用を多面的に評価できる。またER、ARまたはTRを導入した酵母を利用することによってこれら受容体を介して内分泌かく乱作用を示す化学物質及び代謝物の一次スクリーニングの一翼を担うことができる。本研究を遂行することによって高分子素材からなる生活関連製品由来化学物質の生体影響を評価する上で有用な基礎的情報を得ることを目的とする。

②精巣ライディッヒ細胞初代培養系の構築とテストステロン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質のリスク評価

テストステロンは主に精巣のライディッヒ細胞で産生され、高等動物の発生初期において性分化と密接に関連しており、この産生が何らかの理由で阻害された場合、発生や性分化及び生殖の初期の段階において深刻な影響が現れることが懸念される。そこで本研究では、テストステロンを産生するライディッヒ細胞の初代培養系を構築し、そのテストステロン産生に及ぼす PAE やアルキルフェノール類の影響を検討する。さらに、ブタ精巣からライディッヒ細胞を単離して初培養系を構築し、テストステロン産生に及ぼす影響を検討することを目的とする。

③内分泌かく乱化学物質の造血幹細胞に対する影響

医療用血液バッグとして PVC 製のものが汎用されている。最近では、造血幹細胞を多く有する臍帯血が血液疾患の治療に用いられており、PVC 製の血液バッグに保存されているため、保存中の血液に DEHP 等の移行が懸念される。本研究では、DEHP が臍帯血中の造血幹細胞の分化・増殖に与える影響について、Colony Assay 法を用いて検討し、同時にその他の内分泌かく乱化学物質についても検討する。

6. PAE 代替可塑剤の内分泌かく乱化学物質作用の評価

DEHP は PVC 製品との相溶性、可塑化効率、耐揮発性、低温柔軟性をバランス良くもつことや価格の安さから最も多く使用されている。しかし、PAE の使用規制に伴い、より安全性の高い可塑剤の探索が要求されて

いる。PAE 系が可塑剤として繁用されているが、アジピン酸系、トリメット酸系、クエン酸系、セバシン酸系、リン酸系等も使用されている。これらのものについての内分泌かく乱作用については十分に検討されていない。様々な可塑剤について内分泌かく乱化学作用を多面的に検討する。

①受容体結合試験による DEHP 及びその他の可塑剤の活性評価

内分泌かく乱作用として代表的な、エストロゲン(α , β)及びアンドロゲン受容体への結合能を調べ、これらの物質の活性評価を行うことを目的とする。

③ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす DEHP 代替可塑剤の影響評価

本研究では、H295R 細胞をヒトのステロイドホルモン産生細胞モデルとし、そのコルチゾール産生に及ぼす DEHP に代わる各種 PVC 用可塑剤候補物質のヒト副腎由来の H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす影響及びこれらの可塑剤候補物質の H295R 細胞に対する細胞毒性についての評価を行う。

④DEHP 及び代替可塑剤のエストロジェン様作用

本研究では、DEHP の代替化学物質として用いられるようになったアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)等の化学物質について E-SCREEN Assay によりエストロジェン様作用の評価を行うとともに、生体内における化学物質の代謝を考慮し、化学物質を S-9mix で処理し、各化学物質の代謝産物のエストロジェン様作用についても E-SCREEN Assay を用いて調べることを目的とする。

⑤E-Screen Assay による DEHP 及び代替可塑剤の活性評価

医療用高分子製品等の可塑剤についてもより安全性の高い可塑剤が望まれている。本研究では、DEHP 代替品の候補として挙げられている物質のエストロゲン様作用について MCF-7 ヒト乳癌細胞を用いて E-SCREEN Assay により検討する。

B. 研究方法

1. PVC 製品中の PAE 及びその動態解析

①アルコール消毒時による PVC 製手袋中 PAE の存在状態の解析

食品用 PVC 製手袋中の DEHP の存在状態・分布とエチルアルコール消毒時の変化及び DEHP の水への溶出量の評価を、透過型電子顕微鏡観察、角度変化 ATR による深さ方向分布シミュレーション、切削法サンプリング熱脱着 GC/MS 法、水溶出試験により実施した。また、アルコール処理後に、DEHP の水溶出試験を実施した。水溶出試験は手袋試料に対して 100 倍量の水を用い、60℃ 30 分の条件で実施した。溶出した DEHP は GC/MS-SIM 法で定量した。

②PVC製玩具中の可塑剤の実態調査及びPAE及びアジピン酸エステル等の溶出について

平成13年10、11月に東京都内及び神奈川県内の玩具店、スーパーマーケット及びデパートで購入した軟質玩具67製品の表示について調査した。PVC製と判明した玩具49製品を可塑剤含有量調査の測定対象とした。これらは、疑似食品3製品、人形や動物などのソフトイ23製品、ボール8製品、空気注入玩具5製品、ままごと道具5製品、その他5製品である。PVC製と確認された49製品56検体についてはGC/MSにより材質試験を行い、可塑剤の種類及び含有量の調査を実施

した。

③ヒト唾液中における玩具中フタル酸ジエステルからモノエステル体への生成

フタル酸ジエステルを含まないことを確認したポリエチレン製試験片を成人被験者15人の口腔内に入れ、15分間チューイングし、口腔内に溜まった唾液をネジ蓋付50ml遠心分離管に採取した。唾液試料にトリス-HCl 緩衝液およびフタル酸ジ及びモノエステル標準溶液を加え、振とう培養器で37℃、30分間インキュベートした。インキュベーション終了後、直ちに0.1N HCl で唾液試料のpHを約2に調整し、アセトニトリルを1ml加え、生成したモノエステルを振とう抽出した。溶出液をエバポレーターで濃縮後、窒素気流下で乾固させ、アセトニトリルまたは酢酸エチル再溶解させ、それぞれHPLC用またはGC/MSにより分析した。

2. 食品容器包装材料中の内分泌かく乱化学物質の分析に関する研究

①瓶詰食品におけるキャップシーリング材中のNPの分析

瓶詰食品（輸入品35、国産品15検体）のキャップシーリング材を試料とした。試料0.2gをヘキサン50mLで抽出後、10mLを分取し、減圧下で濃縮乾固した。残渣を5%水-アセトニトリル溶液2mLに溶解した。メタノール10mL及び5%水-アセトニトリル溶液10mLでコンディショニングしたC18ミニカラムに上記の5%水-アセトニトリル溶液2mLを負荷し、5%水-アセトニトリル溶液6mLで溶出した。最初の2mLは捨て、次の4mLを分取し、ヘキサンで抽出して試験溶液として、GC/MSによりNPを分析した。

②アルコール飲料中の BPA 及び BADGE 関連化合物の分析

市販アルコール飲料として、平成 14 年 1 月上旬に東京都及び茨城県内の酒販店にてビール、リキュール類、果実酒、焼酎、ウィスキーなど主要製品約 150 点を購入し、試料とした。ビール、リキュール類などでアルコール濃度が約 5%の試料は、試料 50 mL を量りとり、内標準溶液を加え良く混合した後、固相抽出カートリッジに負荷した。水で洗浄後、吸引によりカートリッジを乾固した。次に酢酸エチルで溶離し、この液をエバポレータで濃縮し、さらに窒素ガスを用いて乾固し、メタノールを加えて、内容物を溶解し 2 mL にした。この試料溶液を LC/MS/MS で測定した。また、缶体の缶蓋及び缶胴部分などを試料から切り取り、赤外顕微鏡を用いて反射法により、表面塗膜の赤外吸収スペクトルを実施した。

③ラミネートフィルム包装食品中の BPA 及び BADGE 関連化合物の分析

市販レトルト食品・ラミネート包装食品を対象とした。レトルト食品は各々の調理法に従った後、試料の調製を行った。均一化した試料はホモジナイズ後、アセトニトリルで抽出、OASIS HLB カートリッジに負荷し、アセトニトリル/精製水で洗浄した後、BPA および BADGE 関連化合物を溶出した。溶出液は、そのまま Romer Mycosep226 カラムに通し、さらにアセトニトリル/精製水 (9 : 1, v/v) をカラムに通し、窒素気流下で乾固した。最終的にメタノール 1 mL に溶解し、HPLC/FL により測定した。

3. 生活関連高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解析

①化粧品、家庭用品等に含まれる内分泌かく乱化学物質の分析

平成 13 年 7 月から 8 月の間に名古屋市内の小売店で購入した文具 49 検体、化粧品 9 検体、家庭用品 6 検体を用いた。クッションフロアはその表面をはぎ取ったのち 5 mm 角に細切し、消しゴム等その他の固形試料はそのまま 5 mm 角に細切し、いずれもその 2.5 g をあらかじめアセトン及び n-ヘキサンで洗浄したメスフラスコに秤量した。n-ヘキサンを加え、一昼夜放置しメスアップした。インク、マニキュア等の液状試料は、あらかじめアセトン及び n-ヘキサンで洗浄した直径 125 mm のガラス製シャーレに直径 55 mm の濾紙を置き、その上に 0.5 g の試料を薄くのばした。その後、シャーレに n-ヘキサンを加え、一昼夜放置し、あらかじめアセトン及び n-ヘキサンで洗浄したメスフラスコに n-ヘキサン溶液を移し、メスアップし、GC 及び GC/MS により実施した。

②実験動物用飼料及び飲水中の BPA の分析

飼料に BPA-d₁₆ を添加後、ホモジナイズでアセトニトリル抽出を実施した。本溶液を濃縮乾固し、メタノール及び水に再溶解し、固相抽出法 (GL-Pak PLS2) を用いた。飲水はポリカーボネイト製実験動物用給水瓶を用いて、蒸留水を一週間保存した。又、コントロール試験として、本容器で保存していないものを用いた。

③PVC製品中のBPAの分析および溶出挙動

1998年及び2001年に入手したラップフィルム、手袋、ホース類、ランチョンマット、蛇口フィルター、フック、テーブルクロス、急須口、レインコートについて調査した。材質中のBPAは、試料を細切し、酢酸エチルを入れ24時間放置した。酢酸エチルを減圧下、濃縮乾固し、これに10%酢酸エチル/ヘキサンを入れ、超音波で溶解させた。この溶液をヘキサ

ンでコンディショニングしたフロリジルカートリッジに負荷し、10%酢酸エチル/ヘキサン溶液と50%酢酸エチル/ヘキサンを流した。50%酢酸エチル/ヘキサン層を濃縮乾固し、HPLC移動相に溶解して、HPLCで分析した。BPAの溶出試験は、ホースの場合はホースの先端にガラス栓をし、これにあらかじめ25℃にした蒸留水を入れ、25℃のオーブンで一時間放置した。溶出時間が過ぎた時点で試験管に移し、試験溶液とした。手袋については、25cm²に切り取り、蒸留水100mLを入れ、25℃の水浴で1時間放置後、試料を取り出し、HPLCで実施した。

④歯科用高分子素材由来の内分泌かく乱化学物質の分析

採取したヒト唾液を遠心後、ボトルトップフィルターで濾過滅菌し、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。この唾液を120℃で20分間加熱滅菌した唾液を変性唾液とする。材質試験は食品衛生試験法に準じたが、矯正用ブラケットが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。適量のジクロロメタンに溶解させ、攪拌しながらアセトンをやつくり滴下し、高分子化合物を析出させた。3000rpmで10分間遠心分離後、上清液を減圧濃縮した。適量をメンブランフィルターでろ過後、HPLCによる分析に供した。

4. 生活環境中の内分泌かく乱化学物質の実態調査と分析精度の向上に関する研究

①生活関連製品に由来する内分泌かく乱化学物質の尿中分析法の開発と実態調査

暴露実験は男性2人にアルキルフェノール類(C4～C9)各100μgをドリンク剤100mLに添加して摂取させ、10時間尿を採取した。

また、BPA 50μgをドリンク剤100mLに添加して摂取させ、11時間尿を採取した。尿中のBPAの分析は、尿試料を共栓付フラスコに採り、β-グルクロニダーゼ溶液を加え酵素分解した。これにリン酸を加えpH3以下にした後、C18カートリッジに負荷しBPAを抽出した。これに酢酸エチルを加え濃縮乾固した。TMS化後GC/MS-SIMで定量した。尿中のアルキルフェノール類の分析は、BPAと同様に尿試料をβ-グルクロニダーゼで酵素分解した。分解液をヘッドスペース瓶に採り、¹³C-NP、リン酸を加え、80℃で30分間ヘッドスペースをPDMS/DVB系のSPMEファイバーで抽出し、GC/MS-SIMで定量した。

②環境大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

屋外空気の調査は、大気汚染の常時監視局である奈良局と天理市丹波市町にある天理局について行った。室内空気は、当該研究所3Fの1室(RE)と一般居住住宅木造1戸建ての洋室(RM-1)と和室(RM-2)を対象とした。調査対象とした自動車は、すべて4ドアセダンの普通乗用車とした。可塑剤の分析法は、テフロン製ろ紙ホルダーに10L/minでポンプ吸引し、24hr(車の場合は日中6hr)空気を採取した。捕集ろ紙は、それぞれ10mLの遠心分離用試験管に入れ、ジクロロメタンを加え超音波洗浄器で抽出した。次に、遠心分離器にかけ、上澄み液5mLを正確に分取し内部標準液を加えた。溶媒を留去した後、アセトン1mLに転溶し、GC/MSで分析した。VOCの測定方法は、試料を24時間採取して行った。車の場合は、車内温度が最高になる14～15時に約5分間減圧容器が常圧になるまで実施した。

③大気圧光イオン化を用いたLC/MS法の基

基礎的研究

使用した LC/MS は Agilent Technologies 製 LC1100, MSD は APPI イオン源を用いた。イオン源で使用した紫外線ランプには synagen 製クリプトンランプ (10eV) を使用し、その他の構成は APCI 用イオン源と同様である。外因性内分泌攪乱化学物質の疑いのある N-メチルカルバメート系農薬及び多環芳香族炭化水素であるベンゾ (a) ピレンの微量分析を検討した。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法を用いた高分子素材中の内分泌かく乱作用の評価

甲状腺ホルモン様作用の評価は、GAL4DBD (t-GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び TIF2-GAL4AD (TIF2- GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母に化学物質を作用させ、酵母の OD₅₉₅ を測定した。さらに、ザイモリエースを加え、細胞壁を分解した。これに o-ニトロフェニルガラクトピラノシド溶液を加え、インキュベーションを行い、OD₄₁₀ 及び OD₅₇₀ を測定し、Miller の式に基づき、生成したガラクトシダーゼ活性を算出し、この酵素活性を化学物質の甲状腺ホルモン様作用の指標として評価した。アンドロジェン様作用の評価は、甲状腺ホルモン様作用の評価に記載した方法に従って、酵母内に産生されたガラクトシダーゼ活性を算出した。抗アンドロジェン作用の評価は、AR-GAL4DBD 及び SRC1-GAL4AD を発現させた酵母を OD₅₉₅ = 0.2 前後に SD 培地で希釈し、酵母懸濁液とした。これを DMSO に溶解した化学物質及び 5- α -ジヒドロテスト

ステロン (DHT; 2.0×10^{-8} M) を添加し、アンドロジェン様作用の検出に記載した方法に従って、産生されたガラクトシダーゼ活性を測定した。

②精巣ライディッヒ細胞初代培養系の構築とテストステロン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質のリスク評価

96-穴プレートにライディッヒ細胞を 24 時間サブカルチャーした後、培養液を交換し、検体のステロイド産生に対する影響を検討するため、検体を加えた。培養後、細胞のステロイド産生を誘導する目的で 8Br-cAM を加え一定時間培養した。この濃度では細胞のテストステロン産生には影響を及ぼさないことを確認した。検体及び 8Br-cAMP または hCG を添加した一定時間後に培養液中に分泌されたテストステロン濃度をラジオイムノアッセイで測定した。検体の細胞に対する毒性を評価するために、CytoTox96@non-radioactive cytotoxicity assay kit を用いてライディッヒ細胞から逸脱する LDH 活性を測定した。

③内分泌かく乱化学物質の造血幹細胞に対する影響

CD34/I-dU assay は、96 穴平底プレートに Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) /Nutrient Mixture F-12 (Ham) で希釈した細胞 (CD34 陽性細胞) 懸濁液を播種し、濃度調整した被検物質を加え培養した。細胞増殖効果は、Thymidine analogue である I-dU (5-Iodo-2-deoxyuridine) の取り込みにより評価した。Colony Assay は、35mm Culture Dish に Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium (IMDM) で希釈した細胞 (CD34 陽性細胞) 懸濁液を播種し、濃度調整した被検物質を加え、

MethoCult GF H4434V 培地上で培養する。その後、混合コロニー形成細胞 (CFU-Mix)、顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞 (CFU-GM)、芽球コロニー群形成細胞 (BFU-E) のコロニー数をカウントし、観察することにより、被検物質による CD34 陽性細胞の分化・増殖能への影響を調べた。

6. DEHP 代替可塑剤の内分泌かく乱化学物質作用の評価

食品用器具・容器包装用途、医療用具用途で使用実績のある可塑剤を候補可塑剤とした。試料として用いた可塑剤は、DEHP (Aldrich 社製、ジェイプラス社製；工業用、合計 2 種)、フタル酸ジ-n-デシル (DnDP、花王社製；工業用、1 種)、アジピン酸ジエチルヘキシル (DEHA、Aldrich 社製、1 種)、トリメット酸トリエチルヘキシル (EH-TOTM、東京化成社製、ジェイプラス社製；工業用、合計 2 種)、トリメリット酸トリ-n-オクチル (n-TOTM、花王社製；工業用、1 種)、クエン酸アセチルトリブチル (ATBC、東京化成社製、ジェイプラス社製；工業用、合計 2 種)、クエン酸ブチルトリエチルヘキシル (BTHC、Aldrich 社製、1 種)、クエン酸アセチルトリエチルヘキシル (ATHC、Aldrich 社製、1 種) を用いた。入手した被検物質は、アセトンで洗浄後、200℃で一晩熱処理をして環境からの汚染を防止した旭テクノグラス社 (旧岩城硝子) 製 7 mL ネジ付試験管に分注し、同社製耐熱キャップをして、各試験に供した。

①受容体結合試験による DEHP 及びその他の可塑剤の活性評価

エストロゲン α (ER α) 結合能試験は、テストチューブに、反応溶液と試料溶液を

混合して ER 固相化マイクロプレートに移した。2 時間放置後、測定溶液を添加して蛍光リーダーで測定した。エストロゲン (ER β) 結合能試験は、反応プレートにレセプター溶液、試験溶液及びリガンド (17 β -エストラジオール) 溶液を添加混和した。その後、エストラジオール HRP 標識溶液を等量加えた後、450nm の吸光度を測定した。アンドロゲン (AR) 結合試験は、反応プレートにレセプター溶液、試験溶液、リガンド (テストステロン) 溶液を添加混和した。1 時間静置後、抗テストステロン抗体固相化プレートに反応液を移し、テストステロン HRP 標識溶液を等量加え、450nm の吸光度を測定した。

③ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす DEHP 代替可塑剤の影響

24 穴プレートにサブカルチャーした H295R 細胞は、80 %コンフルエントの状態です。1 % ITS Plus、0.01 % 牛血清アルブミン及び抗生物質を含む D-MEM / F-12 培地に交換し、24 時間培養後、同様の組成からなる新しいメジウムと置換した。次にエタノールに溶解した検体を加え、同時に細胞のステロイド産生を誘導する目的で dibutyryl cAMP を加え 48 時間培養した。検体及び dibutyryl cAMP を添加した一定時間後に培養液中に分泌されたコルチゾールはラジオイムノアッセイで測定した。

④DEHP 及び代替可塑剤のエストロゲン様作用

E-SCREEN Assay は、ヒト乳癌細胞株である T47D を DMEM で細胞数 3750 cells/well となるようにプレートに播き、一晩 37℃、5%CO₂ 中でインキュベートした。その後、培養液をフェノールレッドフリー、また牛胎

児血清のかわりに低蛋白質溶液である TCH (CELOX Laboratories, Inc.)を用いた DMEM に交換し、各ウェルに被験物質を添加した。被験物質添加後、4 日間インキュベートし、WST-1 を用いたアッセイにより細胞数をカウントした。

⑤E-SCREEN Assay による DEHP 及び代替可塑剤の活性評価

E-Screen/WST-1 assay は、96 穴平底プレートに Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)で希釈した細胞 (MCF-7) 懸濁液を 5000cells/50 μ l/well ずつ播種し、37°C, 5%CO₂で、24 時間培養する。前培養後、フェノールレッド不含、10 % Charcoal-dextran 処理 FCS 含有 DMEM に交換し、濃度調整した被検物質を加え 5 日間同条件で、培養する。培養後 WST-1 assay(Cell Counting Kit)にて細胞増殖の評価を実施した。

C. 研究結果及び考察

1. PVC 製品中の PAE 及びその動態解析

①アルコール消毒時による PVC 製手袋中 PAE の存在状態の解析

電子顕微鏡観察から、PVC は 15nm 以下の粒子として存在していることが判明した。DEHP は手袋全体に約 10nm の粒子として分散しているほか、最表面に数 nm から数 10nm 程度の薄い皮膜状に存在していることが確認された。切削サンプリングによる分析の結果、未処理の PVC 製手袋試料は、内部に対し表面付近で DEHP 濃度の高いことが確認された。これに対し、アルコール噴霧後そのまま乾燥すると、表面付近の DEHP が手袋内部にしみ込むため、表面よりも手袋内部の DEHP 濃度が高くなる。また、アルコー

ルに短時間浸漬し、その後水で洗浄する処理を実施すると、表面付近の DEHP の系外への溶出と内部への浸透が同時に起こると考えられる。角度変化 ATR 測定により評価した塩ビ最表面付近の DEHP の深さ方向濃度分布は、切削法で得た結果とは一致せず、試料の深い部分までの濃度分布の変化と最表面では挙動が異なることが示唆された。最表面付近ではアルコール処理の内容に関わらず、急激に DEHP 濃度が高くなっている。このことはアルコール処理により溶解して手袋内部にしみ込んだ DEHP が、比較的短時間で、表面に再びしみ出していることを示している。

②PVC製玩具中の可塑剤の実態調査及びPAE及びアジピン酸エステル等の溶出について

平成13年度に購入した軟質玩具67製品について、①軟質玩具製品の表示と素材に関する実態調査を行ったところ、歯がため、ガラガラなど口に入れることを目的とした玩具の素材はABS樹脂、スチレン系熱可塑性エラストマー、EVA樹脂、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、合成ゴムであり、PVCから他の材料への変更が進んでいることが明らかとなった。また素材表示がされている割合は平成10年度、67製品中6製品(8.7%)であったのに対し、平成12年度は30製品中13製品(43%)、さらに平成13年度は67製品中46製品(69%)と増加した。②PVC製と確認された49製品56検体についてはGC/MSにより材質試験を行い、可塑剤の種類及び含有量を調査したところ、検出された可塑剤はPAE3種類、アジピン酸エステル3種類、その他が4種類、計10種類であった。これらの

中で、検出率が高く含有量が多かったのは、DINP、DEHP、DINA及びATBCであった。PAEの検出率は平成10年度 100%であったのに対し、平成12年度は64%に減少、平成13年度は68%であった。また、可塑剤総含有量平均値は平成10年度33.7%であったが、平成12年度は28.0%、平成13年度は22.4%と、年度ごとに減少した。③PAE以外の内分泌かく乱化学物質は、NPが56検体中19検体から検出され、検出率は34%、含有量は72~2,708 $\mu\text{g/g}$ 、平均含有量は929 $\mu\text{g/g}$ であった。

③ヒト唾液中における玩具中フタル酸ジエステルからモノエステル体への生成

フタル酸ジブチルからのフタル酸モノブチルの生成率は唾液試料濃度および唾液試料中のタンパク質濃度と相関性を示した。この反応の至適温度が 50℃、および至適 pH が 8.0 に認められた。その唾液試料はフタル酸ジエステルの直鎖のアルキル基、特に炭素数 4 のブチル基に強い基質特異性を示し、側鎖を持つ 2-エチルヘキシル基およびベンジル基にはほとんど活性を示さなかった。唾液試料中でのフタル酸モノエステルの加水分解によるフタル酸の生成は認められなかった。また、唾液試料に冷アセトンを加えることにより分離された粗酵素液にも唾液試料と同等の加水分解活性および基質特異性がそれぞれ認められた。唾液中のフタル酸ジエステルからモノエステルへの加水分解は唾液中のエステラーゼ、特にリパーゼが大きく関与し、またこれらは、モノエステルの脱エステル反応によるフタル酸生成に対するエステラーゼとしては活性を示さないことが明らかとなった。

2. 食品容器包装材料中の内分泌かく乱化学物質の分析に関する研究

①瓶詰食品におけるキャップシーリング材中のNPの分析

GC(FID)で瓶詰食品におけるキャップシーリング材中のNPの存在が疑われたものについてのみGC/MS-SIMで分析した。50検体中10検体（輸入品の4検体、国産品の6検体）にNPが56.1-1410ppmの範囲で検出された。検出レベルは既に報告されている他のPVC製品と変わらないレベルであった。NPの検出率はBPAより高かった。また、BPAは国産品からは検出されなかったが、NPは国産品からの検出率が高かった。NPが検出された試料はPAE、特に国産品の場合はDEHPが検出されるものが多かった。NPが検出された製品には脂質の多い食品が入っていたものがあり、食品への溶出も考えられた。

②アルコール飲料中の BPA 及び BADGE 関連化合物の分析

ビール及び発泡酒の国産品では全製品から BPA は検出されなかった。また、BADGE 類は 2 試料のみから、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル加水分解物である BADGE. 2H₂O または BADGE, BADGE. H₂O を微量検出した。なお、各缶製品の内面塗装について調査した結果、殆どの製品で缶胴及び缶蓋部分にエポキシ樹脂系塗料を使用していることが明らかとなった。一方、輸入品（缶）では、約半数の製品から 1.2 ppb 以下の BPA を検出した。また BADGE 類は、大部分の製品で BADGE. H₂O, BADGE. H₂O. HCl, BADGE. HCl の何れかまたは各々が検出され、最高で約 45 ppb であった。別途行った塗料の材質判別では、多くの製品で缶蓋部分にビニル樹脂系の塗料が使用されていること