

類、アジピン酸エステル：2 種類）の定量を行なったところ、検量線は 50ppm から 2000ppm の間で良好な直線性を示し、文具等を分析するための十分な定量性が認められた。

2. 検出された可塑剤の同定を研究方法に示した GC/MS 条件下で実施したところ、すべてのマススペクトルからモノエステル体（DHpP：m/z 265、DBP：m/z 223、DEHP：m/z 279、DINP：m/z 293、DEHA：m/z 241）に由来するイオンと、無水体（DHpP、DBP、DEHP、DINP：m/z 149、DEHA：m/z 129）に由来するイオンが観察され、良好に同定することができた。

3. 市販の文具、化粧品、家庭用品の計 64 検体について 14 種類の可塑剤を分析した結果、30 検体からフタル酸エステル及びアジピン酸エステルが検出された（消しゴム：20 検体、サインペ

ンの透明ケース等：4 検体、クッションフロア：5 検体、ビータイル：1 検体）。うち、15 検体からは同時に 2 種類の、3 検体からは同時に 3 種類の可塑剤が検出された。また、消しゴム中には高頻度（95%、20/21）かつ高濃度（20～60%）に可塑剤が含有されていることが判明した。透明ケース類（4/5、濃度 15%前後）及びクッションフロア（5/5、濃度 25%前後）からも高頻度に可塑剤が検出された。

E. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 フタル酸及びアジピン酸エステル類の保持時間

フタル酸及びアジピン酸エステル類	保持時間
フタル酸ジエチル (DEP)	1.27
フタル酸ジプロピル (DPrP)	2.24
フタル酸ジイソブチル (DIBP)	2.83
フタル酸ジブチル (DBP)	3.41
フタル酸ジペンチル (DPeP)	5.27
フタル酸ブチルベンジル (BBP)	7.41
フタル酸ジヘキシル (DHxP)	7.41
フタル酸ジヘプチル (DHpP) (4 ピーク)	7.90-9.19
アジピン酸 2-エチルヘキシル (DEHA)	8.00
フタル酸 2-エチルヘキシル (DEHP)	9.88
フタル酸ジシクロヘキシル (DcHP)	9.68
アジピン酸ジイソノニル (DINA)	10.96
フタル酸ジイソノニル (DINP) (8 ピーク)	12.00-14.42
フタル酸ジオクチル (DOcP)	12.15

表2 文具等中のフタル酸エステル及びアジピン酸エステルの濃度

			単位：％				
番号	分	類	DBP	DEHA	DHP	DEHP	DINP
1	消しゴム	1	11.1	ND	ND	30.5	ND
2	消しゴム	2	18.3	ND	ND	33.0	ND
3	消しゴム	3	12.4	ND	ND	29.4	ND
4	消しゴム	4	16.1	ND	ND	27.9	ND
5	消しゴム	5	17.3	ND	ND	27.1	ND
6	消しゴム	6	ND	ND	ND	ND	ND
7	消しゴム	7	ND	ND	35.2	ND	ND
8	消しゴム	8	4.1	ND	9.3	23.7	ND
9	消しゴム	9	ND	ND	33.7	ND	ND
10	消しゴム	10	15.8	ND	ND	29.0	ND
11	消しゴム	11	ND	ND	2.4	30.7	ND
12	消しゴム	12	17.9	ND	ND	33.1	ND
13	消しゴム	13	7.0	ND	ND	27.4	6.9
14	消しゴム	14	12.7	ND	ND	29.3	ND
15	消しゴム	15	12.5	ND	ND	29.6	ND
16	消しゴム	16	6.5	ND	5.9	23.9	ND
17	消しゴム	17	5.1	ND	14.0	16.0	ND
18	ねり消しゴム	1	ND	ND	ND	19.1	ND
19	ねり消しゴム	2	ND	ND	ND	18.9	ND
20	ねり消しゴム	3	ND	ND	ND	18.9	ND
21	粘土消しゴム		19.1	ND	ND	23.7	ND
22	紙粘土		ND	ND	ND	ND	ND
23	粘土	1	ND	ND	ND	ND	ND
24	粘土	2	ND	ND	ND	ND	ND
25	クレヨン	1	ND	ND	ND	ND	ND
26	クレヨン	2	ND	ND	ND	ND	ND
27	クレパス	1	ND	ND	ND	ND	ND
28	クレパス	2	ND	ND	ND	ND	ND
29の1	水性ボールペン	(本体)	ND	ND	ND	ND	ND
29の2		(インク)	ND	ND	ND	ND	ND
30	水性ボールペン	(インク)	ND	ND	ND	ND	ND
31の1	水性サインペン	1 (ケース)	ND	4.4	ND	12.4	ND
31の2		(本体)	ND	ND	ND	ND	ND
31の3		(インク)	ND	ND	ND	ND	ND
32の1	水性サインペン	2 (ケース)	ND	ND	ND	ND	ND
32の2		(本体)	ND	ND	ND	ND	ND

32の3	(インク)	ND	ND	ND	ND	ND
33の1	水性ぬりえペン (ケース)	ND	ND	ND	13.1	ND
33の2	(本体)	ND	ND	ND	ND	ND
33の3	(インク)	ND	ND	ND	ND	ND
34の1	水性スケッチペン (ケース)	ND	ND	ND	14.2	ND
34の2	(本体)	ND	ND	ND	ND	ND
34の3	(インク)	ND	ND	ND	ND	ND
35	マーカー	ND	ND	ND	ND	ND
36	絵の具	ND	ND	ND	ND	ND
37	色鉛筆	ND	ND	ND	ND	ND
38	鉛筆キャップ	ND	ND	ND	ND	ND
39の1	筆箱 (ふた-外側)	ND	ND	ND	18.0	ND
39の2	(ふた-内側)	ND	ND	ND	16.1	ND
39の3	(カードホルダ)	ND	ND	ND	10.8	ND
39の4	(鉛筆ホルダ)	ND	ND	ND	ND	ND
39の5	(本体)	ND	ND	ND	ND	ND
40	でんぶんのり	ND	ND	ND	ND	ND
41	ステックのり	ND	ND	ND	ND	ND
42	はさみ	ND	ND	ND	ND	ND
43	セロハンテープ	ND	ND	ND	ND	ND
44	定規	ND	ND	ND	ND	ND
45	下敷き 1	ND	ND	ND	ND	ND
46	下敷き 2	ND	ND	ND	ND	ND
47	下敷き 3	ND	ND	ND	ND	ND
48	下敷き 4	ND	ND	ND	ND	ND
49	下敷き 5	ND	ND	ND	ND	ND
50	口紅	ND	ND	ND	ND	ND
51	リップクリーム	ND	ND	ND	ND	ND
52	リップグロス	ND	ND	ND	ND	ND
53	マニキュア 1	ND	ND	ND	ND	ND
54	マニキュア 2	ND	ND	ND	ND	ND
55	水性マニキュア 1	ND	ND	ND	ND	ND
56	水性マニキュア 2	ND	ND	ND	ND	ND
57	メイク用化粧品	ND	ND	ND	ND	ND
58	マスカラ	ND	ND	ND	ND	ND
59	クッションフロア 1	ND	ND	ND	27.0	ND
60	クッションフロア 2	ND	ND	ND	26.2	ND
61	クッションフロア 3	ND	ND	ND	23.8	ND
62	クッションフロア 4	ND	ND	ND	26.8	ND
63	クッションフロア 5	ND	ND	ND	27.0	ND
64	Pタイル	ND	ND	2.0	3.6	ND

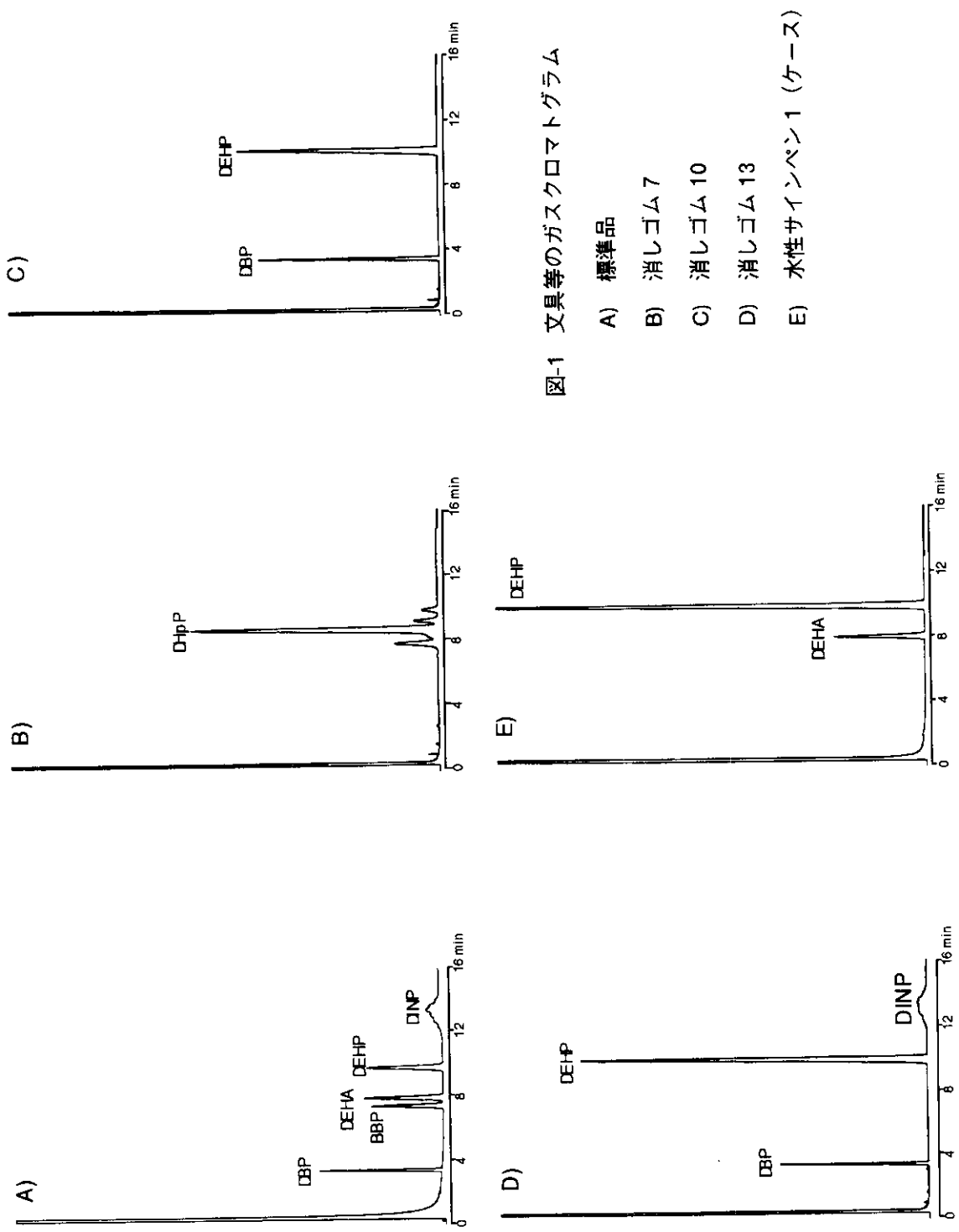


図-1 文具等のガスクロマトグラム

- A) 標準品
- B) 消しゴム 7
- C) 消しゴム 10
- D) 消しゴム 13
- E) 水性サインペン 1 (ケース)

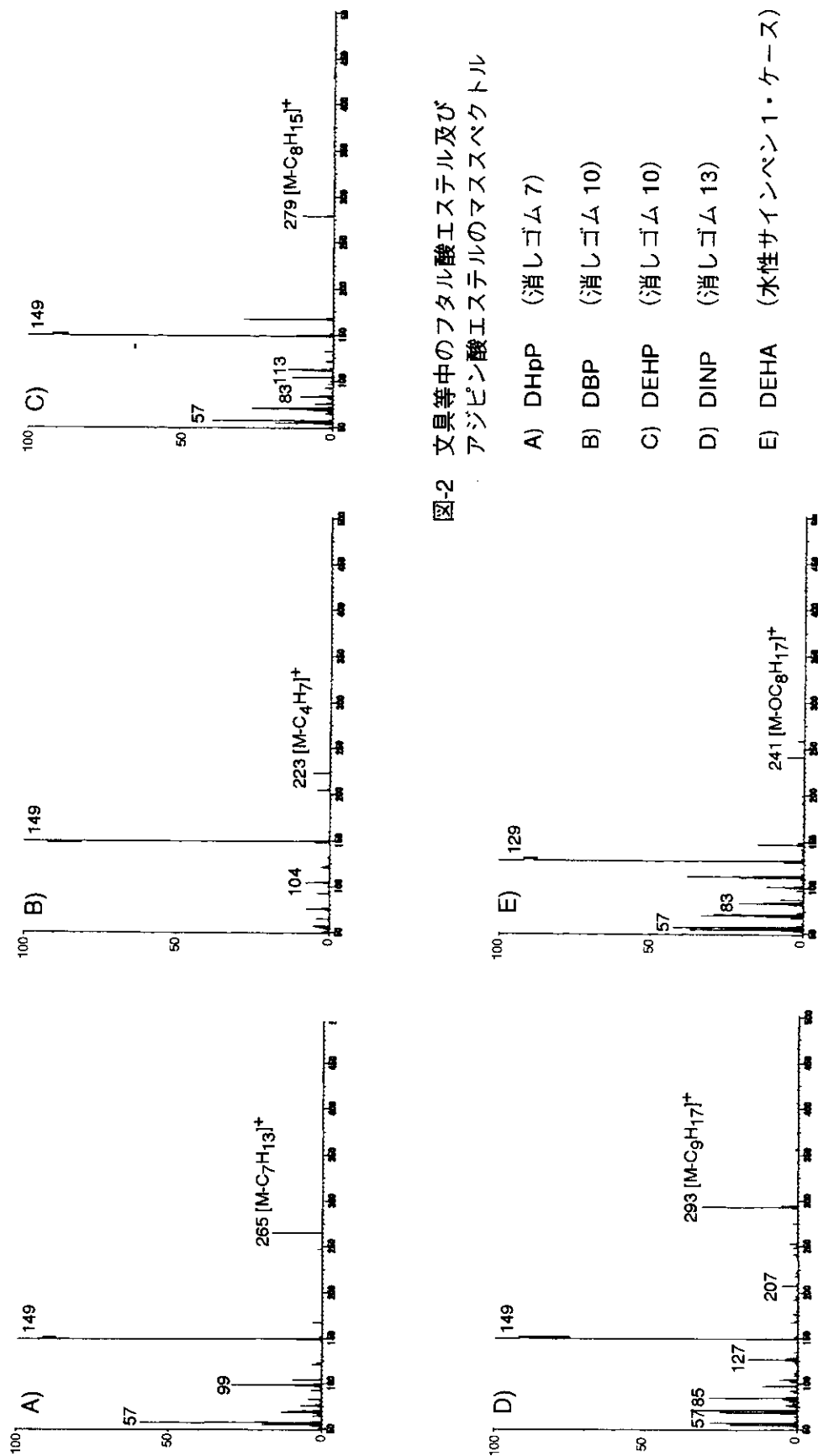


図-2 文具等中のフタル酸エステル及び
アジピン酸エステルのマススペクトル

- A) DHpP (消しゴム 7)
 B) DBP (消しゴム 10)
 C) DEHP (消しゴム 10)
 D) DINP (消しゴム 13)
 E) DEHA (水性サイレンペン 1・ケース)

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）
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

実験動物飼料中のビスフェノール A の分析

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 星薬科大学助教授

研究要旨

ビスフェノール A (BPA) の実験動物を用いて、検討は様々な報告が発表されている。しかし、その統一した見解は、現在もまだ不明である。その一方で、実験動物環境下からの汚染状況についての報告は全くなく、その究明が急務である。そこで、LC/MS を用いて、各種飼料と飲水に関して、微量分析を実施した。その結果、飼料中の BPA 濃度は検出限界以下であった。又、ポリカーボネイト製給水ビンに 1 週間放置の飲水では、14.3 ng/ml が検出された。

A. 研究目的

化学物質の生体影響を検討する方法には、大きく分けて *in vitro* assay と *in vivo* assay があり、後者は、実験動物に化学物質を投与し、その生体影響を評価するものである。しかし、既に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、給水瓶に残留する内分泌かく乱化学物質（ビスフェノール A : 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。

BPA の分析に対しては、様々な報告がされている。我々は、BPA の分析を

実施する際の汚染源の追及や高感度・精度の分析を構築・応用してきた^{1,2)}。本研究においても、その知見を生かして、固相抽出法及び LC/MS による方法を応用した。

B. 研究方法

B・1 試薬・試料

BPA に関しては、関東化学社製環境分析用を使用し、重水素化体ビスフェノール A (BPA- d_{16}) においては、和光純薬社製を用いた。また、前処理に使用したメタノールは、残留農薬用であり、移動相に使用したアセトニトリルは HPLC 用を用いた。本試験に用いた精製水は、BPA 不検出 (> 0.01 ng/mL) であったミリポア社製 Milli Q gradient A10 システムで精製したも

の($>18.0\text{M}\Omega$)を用いた³⁾.

B-2 装置及び条件

LC/MS 装置: Agilent 1100 LC/MSD SL system (Agilent Technologies) LC カラム: Senshu PakPEGASIL ODS (150 $\times$ 2 ϕ mm) 移動相: アセトニトリル/0.01%酢酸水溶液 (40/60[0-10 min] $\rightarrow$ 100/0[10-20 min]) 流速: 0.2 mL/min MS 条件: エレクトロスプレーイオン化法, ネガティブモード, モニタリングイオン $m/z = 227$ (BPA) $m/z = 241$ (BPA- d_{16})

B-3 前処理法 (固相抽出法)

飼料 に BPA- d_{16} 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、固相抽出法を実施した。本検討に用いて、固相充填カラムカートリッジは、GL-Pak PLS2 を用いた。詳細な検討のフローチャートを Fig. 1 に示す。

B-4 飲水の分析法

実験動物用給水ビンを用いて、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。分析法は、BPA- d_{16} 内標準物質を添加し、直接分析を行った。

C. 研究結果

C-1 LC/MS による BPA 分析

C-1 LC/MS の測定検討

上記の LC/MS 測定条件において、

標準溶液を分析した際、保持時間、検量線の直線性及び検出限界は、以下のように良好な結果となった (Table 1).

検量線: 1.0 - 500 ng/mL

($R=0.999$)

検出限界: 0.1 ng/mL ($S/N=3$)

定量に関しては、重水素化体による内標準法により実施した。

C-2 測定結果 (飼料)

Fig. 2 に分析結果のクロマトグラムを示す。いずれの検体も検出限界 (<50 ng/g) 以下であった。

本検討に使用した飼料は、オリエンタル酵母工業社製 MF (マウス・ラット・ハムスター) 飼育用 固形 12 mm、日本クレア社製 CLEA Rodent Diet CA-1 (マウス・ラット・ハムスター) 繁殖用 粉末状、日本農産工業社製ラボ MR ストック (マウス・ラット・ハムスター) 維持用 固形 12 mm (γ 線滅菌済) であり、いずれも平成 13 年度末に入手したものである。

C-3 測定結果 (飲水)

ポリカーボネイト製給水ビンに一週間保存した蒸留水の結果・クロマトグラムを Fig. 3 に示す。0 日コントロールと比較して、有意に BPA が検出された。本検出値は、14.3 ng/ml であった。

D. 考察

今回検討を行った飼料からは、いずれも検出限界以下 (<50 ng/g) であつ

た。しかし、微量であるが飲水からは、BPA が検出された。今回は、検体数も少なく今後更なる検討が必要であると思われる。又、その他のエストロゲン活性様化学物質として、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、植物性ホルモン様化学物質等の分析も必要と思われる。

又、実験動物環境の因子として、餌、飲水以外にゲージ、床敷等も考慮に加えないといけない。

E. 結論

今回の測定法では、いずれも実験動物に影響の与えるレベルでのBPA検出はなかった。

参考文献

- 1) K. Inoue, A. Yamaguchi, M. Wada, Y. Yoshimura, T. Makino and H. Nakazawa “Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma using liquid chromatography - electrospray mass spectrometry” *J. Chromatogr. B* 765, 121-126 (2001)
- 2) K. Inoue, M. Wada, T. Higuchi, S. Oshio, T. Umeda, Y. Yoshimura and H. Nakazawa “Application of liquid chromatography - mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen” *J. Chromatogr. B* in press
- 3) K. Inoue, Y. Yoshie, S. Kondo, Y. Yoshimura and H. Nakazawa

“ Determination of phenolic xenoestrogens in water by liquid chromatography with coulometric-array detection”
J. Chromatogr. A 946, 291-294 (2002)

飼料 1 g + BPA-d₁₆
 ↓ + 抽出: アセトニトリル 10 mL (×3)
 濃縮乾固
 ↓ + メタノール 1 mL
 ↓ + 水 20 mL
 固相抽出(GL-Pak PLS-2)
 ↓ + 洗浄: 水
 ↓ + 溶出: メタノール 5 mL
 濃縮乾固
 ↓ メタノール 1 mL
 ↓ + フィルターろ過 (0.45 μm)
 LC/MS

Fig.1 実験動物用飼料中のBPAの試験法

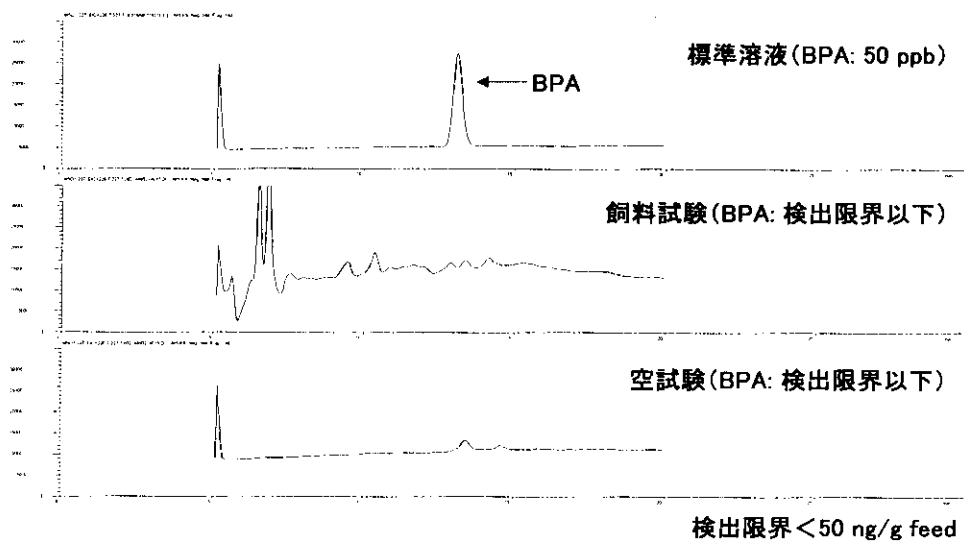


Fig. 2 飼料中のBPA分析に関するクロマトグラム

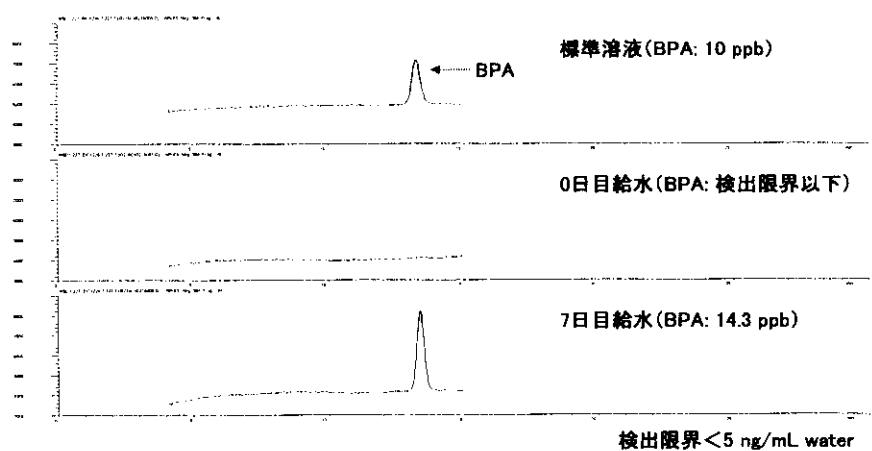


Fig. 3 給水瓶中の水のBPA分析に関するクロマトグラム

Table 1 LC-MS analytical conditions for determination of BPA

Instrument	Agilent 1100 MSD-SL system
【 LC】	
Column	SENSHU PAK C18 (2.0 ϕ $\times$ 150 mm)
Column temperature	40°C
Flow rate	200 μ L min⁻¹
Mobile phase	A: Water B: Acetonitrile 0-30 min; B 35%
Injection volume	5.0 μ L
【 MS】	
Ionization	Electrospray
Fragmentor	140 V
Nebulizer	N₂
Drying gas	N₂ (12 L/ min 350°C)
Mode	Negative

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）
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および動態解明

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

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
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
藤巻照久 神奈川県衛生研究所

ポリ塩化ビニル(PVC)製品中の BPA の残存量と水への溶出挙動を検討した。

1998 年に入手した 38 検体中 30 検体に BPA (約 80 %) が検出され、検出したレベルは 1.4-500 μ g/g であった。BPA が検出されたホース類の一部および手袋を用い、BPA の水への溶出挙動を検討した結果、BPA の水への溶出は材質中の濃度に依存した。また、ホースの溶出試験から、BPA は常に樹脂の表面へと移行することが推察された。手袋からの溶出については一時間ごと、数回溶出させることで材質中の BPA はほとんど溶出するものがあつた。いずれの試料においても BPA は非常に水へ溶出しやすことが明らかになった。2001 年に入手した PVC 製品では、BPA が検出される比率は低く、添加剤が替わりつつあることが推察された。

A. 研究目的

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネート、エポキシ樹脂等の原料、さらにポリ塩化ビニル樹脂の安定剤として使用されている。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する製品からの溶出等について多くの報告がある。しかし、ポリ塩化ビニル樹脂中の 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。そこで今回、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した。

B. 実験方法

B.1 試料

1998 年に入手したラップフィルム 5 検体、手袋 6 検体、ホース類 8 検体、ランチ

ヨンマット 4 検体、蛇口フィルター 4 検体、フック 2 検体、テーブルクロス 2 検体、急須口 1 検体、レインコート 4 検体、その他 5 検体、2001 年に入手したホース類 1 検体、手袋 1 検体、ラップフィルム 2 検体、急須口 1 検体、その他 1 検体について調査した。

B.2 試薬

ビスフェノール A : 関東化学 (株) 環境分析用

酢酸エチル : 和光純薬工業 (株) 残留農薬・PCB 試験用 2000

ヘキサン : 関東化学 (株) フタル酸エステル測定用

アセトニトリル : 和光純薬工業 (株) 残留農薬・PCB 試験用 300 および液体クロマトグラフ用

フロリジルカートリッジ : ウォーターズ社製 Sep-Pak Plus フロリジル

水：日本ミリポア社製 MILLIPORE
simpli-Lab-UV で精製した純水
機器

高速液体クロマトグラフィー：Hewlett
Packard 社製 HP1100 シリーズ

B.3 分析方法

B.3.1 材質中の BPA

試料を細切し、その 200mg を三角フラスコに採り、酢酸エチル 20ml を入れ、時々振りながら 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 10ml を入れ、超音波で溶解させた。このとき生じた沈殿物は遠心分離で除去した。この溶液 5ml をヘキサン 10mL 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/ヘキサン溶液を 10ml 流し、ついで 50%酢酸エチル/ヘキサン 6mL を流した。50%酢酸エチル/ヘキサン層を濃縮乾固し、HPLC 移動相で 2ml とした後、0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、HPLC で分析した。

B.3.2 材質から水への BPA の溶出試験

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 $^{\circ}$ C にした蒸留水を入れ、25 $^{\circ}$ C 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、25 cm^2 に切り取り、蒸留水 100mL を入れ、25 $^{\circ}$ C の水浴で 1 時間放置後、試料を取り出し、試験溶液とした。この溶液を 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、HPLC で分析した。

B.3.3 HPLC の測定条件

カラム：ODS-80Ts, 4.6mmID x25 cm L, カラム温度：40 $^{\circ}$ C, 移動相：アセトニトリル：水 (1:1), 流速：1mL/min, 検出波長：217nm, 蛍光 (Ex231nm, Em322nm), 注入量：100 μ L

C. 結果および考察

C.1 HPLC による BPA の分析について

検出された BPA はダイオードアレーで吸収曲線を確認した。また、蛍光検出器は UV と比較して約 10 倍の感度を得られることから、検出される濃度が低い場合には蛍光検出器による値と比較して BPA の存在を確認した。

C.2 各種 PVC 製品中の BPA

各種 PVC 製品の材質中の BPA 測定結果を表 1 に示した。

ホース類および手袋については 3 回の平均値を示した。その他の製品は 1 回の測定値である。

1998 年に入手した約 80 % の製品に 1.4-500 μ g/g の範囲で BPA が検出された。しかし、2001 年に入手した試料では急須そそぎ口には BPA が検出されたが、それ以外の製品には検出されなかった。

内分泌かく乱化学物質が注目されてから、添加剤の切り替えが行われつつあることが推察された。

C.3 ホースから水への溶出試験について

ホースに水を入れ、1 時間毎に水を入れ替え、それぞれの BPA の溶出量を測定した結果を図 1 に示した。試料としては材質中に 80 μ g/g (A)、270 μ g/g (B) 含有したものをを用いた。BPA の水への溶出量は材質量に比例した。さらに 1 時間毎に水を入れ替え、連続で BPA の溶出量を測定したところ、溶出回数とともに溶出量は減少した。しかし、ホースを 24 時間放置後、同様な操作を繰り返したところ、1 時間後の溶出量ははじめの溶出量のレベルにほとんど戻っていた。同様の実験を数回繰り返したところほぼ同じ傾向を示した。このことは添加剤は比較的短時間の内に表面へと集まる傾向にあり、次々と溶出される事が推察された。

C.3 手袋から水への溶出試験について

手袋を25cm²に切り取り、水を100mL入れ、25℃で1時間ごとに水を入れ替えた溶出液のBPAの測定結果を表2に示した。溶出を5回繰り返すことによってNo.1、2、4については材質中の約60%のBPAが水へ溶出された。No.3については溶出量は材質中のBPAを上回る値となった。この理由については現在検討中である。なお、試料25cm²中のBPA量は材質中の濃度から換算した値である。

以上、ホースおよび手袋におけるBPA溶出試験の結果から、BPAは水へ非常に溶出しやすいことが明らかになった。これまで環境から検出された微量のBPAはPVC製品からの溶出も要因の一つと考えられる。

D. 結論

1998年に入手したポリ塩化ビニル製品の80%に1.4-500μg/gの範囲でBPAが検出された。材質中のBPAは樹脂の表面に集まる傾向が見られ、容易に水へ溶出することを確認した。

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推察された。

E. 研究業績

学会発表

1) ポリ塩化ビニル製品中のBPAの分析および溶出挙動

平山クニ、土屋久世、藤巻照久、中澤裕
日本薬学会第122年会(2002.3)

表1 PVC製品中のBPA実態調査

	試料入手年度					
	1998			2001		
品名	検体数	検出数	検出量($\mu\text{g/g}$)	検体数	検出数	検出量($\mu\text{g/g}$)
ラップフィルム	4	2	77-80	2	0	
手袋	5	4	38-110	1	0	
ホース	8	7	29-270	1	0	
蛇口フィルター	4	2	1.4-2.0			
ランチョンマット	4	3	11-250			
レインコート	4	4	20-500			
テーブルクロス	2	2	140-150			
急須そそぎ口	1	1	420	1	1	450
その他	6	4	46-490	1	0	

表2 手袋におけるBPAの溶出試験

試料	No.1	No.2	No.3	No.4
材質中のBPA($\mu\text{g/g}$)	48	110	38	103
25cm ² 材質中のBPA(μg)	35.7	97.8	14.9	132
溶出試験*				
溶出回数	溶出量(μg)			
1	6.2	17.7	5.5	11.4
2	4.1	13.9	5.4	8.9
3	4.1	13.2	5.1	8.8
4	3.7	11.3	3	7.7
5	3.6		3	9
計 (%)	21.7(60.8)	56.1(57.4)	22.0(147.6)	80.5(61.0)

溶出条件: 材質を25cm²に切り取り水100mLを入れ、25℃ 1時間放置、1時間ごとに水を入れかえ、5回繰り返す。

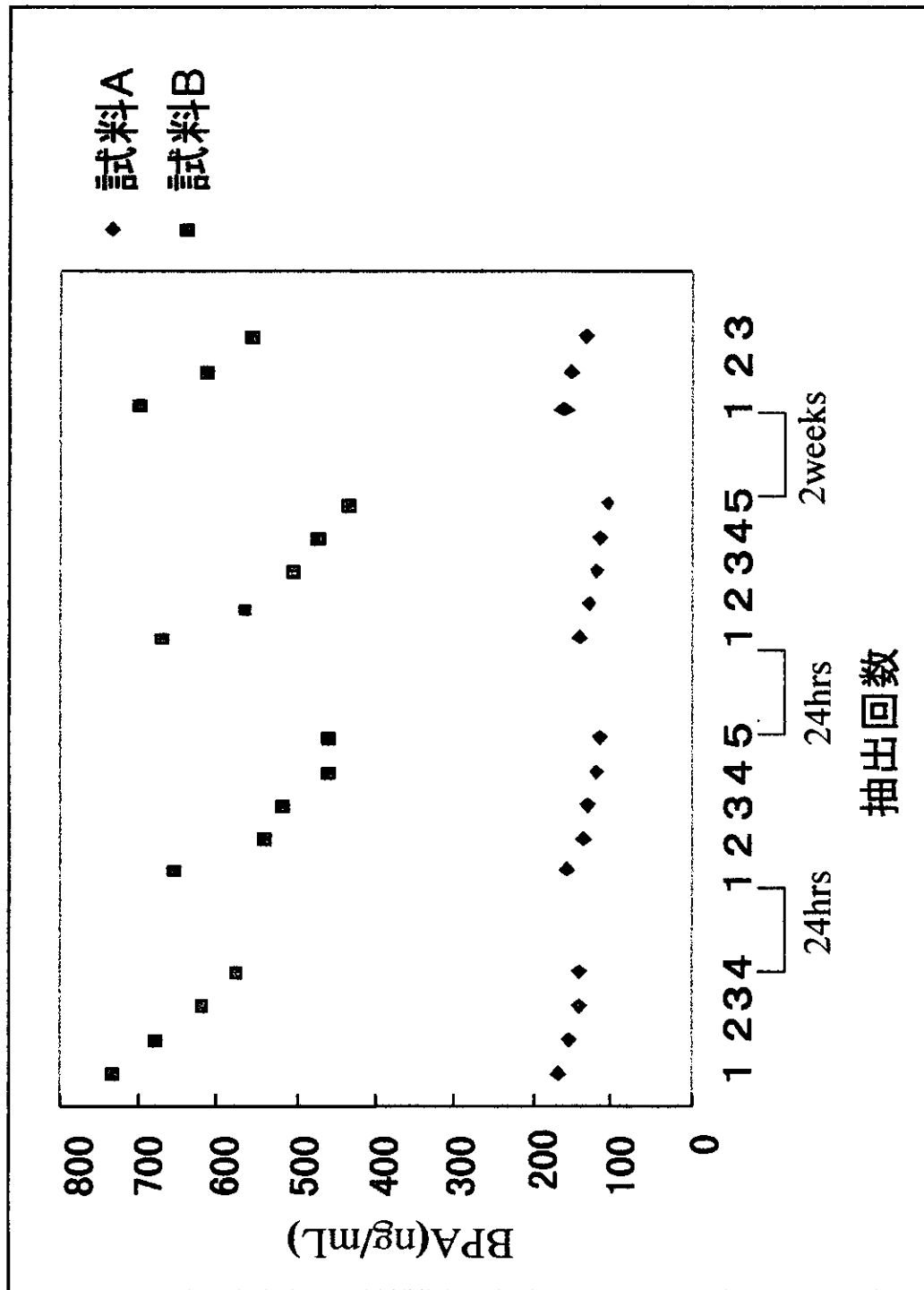


図1 BPAのPVC製ホースからの溶出

材質中の濃度(試料A: 80 μ g/g, 試料B: 270 μ g/g)

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）

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

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—

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学

研究協力者 本郷 敏雄 東京医科歯科大学

研究要旨

昨年度、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2社製品からのBPA溶出量について検討し、人工唾液浸漬に比べて唾液浸漬ではBPA溶出量が高く、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及びブラケットに残留しているBPA、t-BuPも唾液浸漬で残留量が増加していたことから、口腔内環境下ではPC製矯正用ブラケットは加水分解され可能性のあることを報告した。本年度はブラケット4製品で同様な検討を行い、昨年度のロット番号並びに製品番号の異なるブラケットについても検討を加えた。更に唾液由来のエステラーゼ類やリパーゼ類によるポリカーボネート（PC）の加水分解の可能性が考えられるため、熱変成した唾液を用いても検討を加えた。12週間のBPA溶出量はロットの異なる製品については殆ど同じ値が得られたが、製品番号の異なる製品ではBPA溶出量が減少し、また重合調節剤として使用されていたt-BuPは殆ど検出されず、PCの重合調節剤であるp-クミルフェノール（p-CP）が使用されていた。他の2製品も重合調節剤としてp-CPが使用されていた。BPA溶出量に関しては12週間唾液浸漬では昨年度の溶出量を越えるブラケットは認められなかった。また、変性唾液浸漬により、BPA溶出量及びBPA残留量が正常唾液に比べて、増加していた。これらのことから、唾液浸漬によるPCの加水分解は唾液中に存在する酵素による可能性は低いと考えられる。

A. 研究目的

歯列矯正治療で汎用されているポリカーボネート（PC）製矯正用ブラケットは、ビスフェノール A（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, CAS:599-64-4）、p-

オクチルフェノール（CAS:140-66-9）及び 2,6-ジ-t-ブチル-p-クレゾール（CAS:128-37-0）などを用いて合成されている。BPA は内分泌かく乱化学物質の一つとして注目され、t-BuP も弱いエストロゲン活性のあることが報告されている¹⁾ 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が必要である。そこで電気化学検出器 (ECD) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を用い、矯正用 PC 製ブラケットで BPA, t-BuP の残留、溶出動態について 4 製品で検討した。唾液浸漬したブラケットから、BPA 溶出量が増加することを昨年度の報告でしているが、BPA 溶出量増加の可能性として唾液中のエステラーゼやリパーゼの関与が考えられるので、熱変性することにより酵素を失活させた唾液にブラケットを浸漬した場合についても 2 製品で検討を加えた。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

PC 製矯正用ブラケットとして、ロット番号の異なるクリアーブラケット (三金工業) 2 製品、製品番号の異なるプラスチックブラケット (トミーインターナショナル) 2 製品、TM スピリット mb (オルムコ)、プラスチックエッジワイズセントラルブラケット (オルソ) を材料として用いた (表 1)。用いた試薬は全て残留農薬試験用若しくは HPLC グレードのものを、標準試薬として BPA, t-BuP, p-CP は和光純薬製のものを使用した。

採取したヒト唾液は唾液中に含まれている細胞や食物残渣などを除去するために 4℃で 3000rpm, 15 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 μ m, 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。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。

唾液採取に関して、唾液提供者に対して口頭でこの研究の趣旨を説明し、プライバシーに関してはそれを守秘し、提供された唾液を本研究以外の目的に使用しないことを説明した。

B-2. HPLC 分析条件

HPLC の分析条件は分離カラムとして CAPCELLPACK C₁₈ UG 120 (2.0x150 mm, 5 μ m, 資生堂製)を用い、移動相は 40mM リン酸塩緩衝液 (pH:6.0) / アセトニトリル混合液 (混合比 6:4), カラム温度は 40℃, 流量は 0.2mL/min, 試料注入量は 20 μ L, 印加電圧は +800 mV vs AgCl, 作用電極はグラッシカーボンを用いて定量した。用いた HPLC システムは SHISEIDO 社製 NANOSPACE SI-1 シリーズ (電気化学検出器 SI-1-2005, 表 2)。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。

B-3. 材質試験

材質試験は食品衛生試験法²⁾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。図 1 に示すように適量のジクロロメタンに溶解させ、スターラーで攪拌しながらアセトンをゆっくり滴下し、高分子化合物