

Drug Administration (Web at <http://www.fda.gov/cdrh/newpg.html>.) September (2001)

2) Health Canada Expert Advisory Panel on DEHP in Medical Devices (Web at <http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut/htmleng/whatsnew.html>) January (2002)

3) 厚生労働省 (Web at http://www1.mhlw.go.jp/shingi/s0006/txt/s0614-1_13.txt)

G. 発表

1. 発表論文

特になし

2. 学会発表

特になし

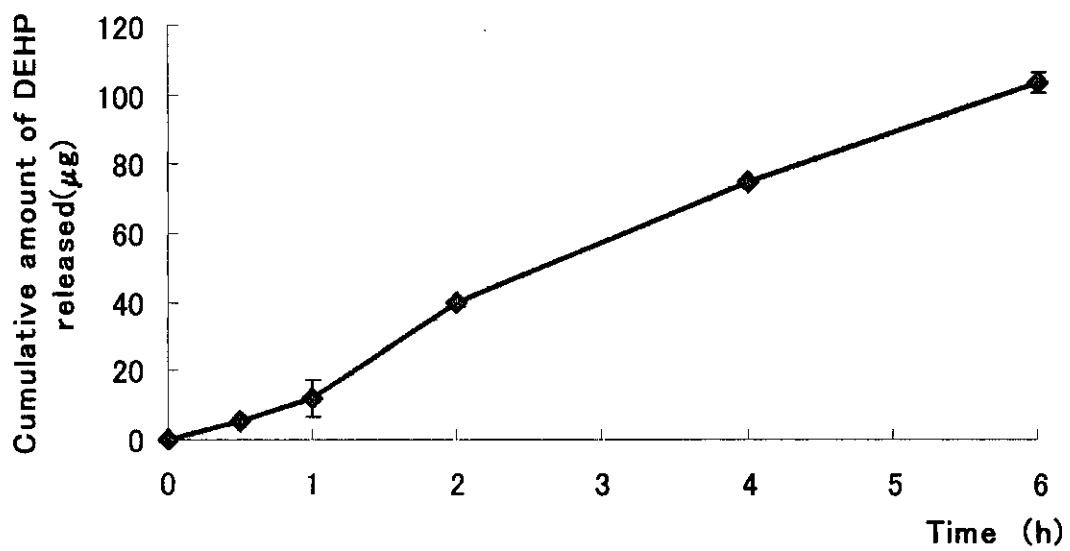


Fig. 1 Release profile of DEHP from medical feeding tube for infant.

厚生科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

プラスチック製医療用具に係る溶出物質の曝露量の評価に関する研究

平成13年度 分担研究報告書

4. 義歯裏装材等からのフタル酸エステルの溶出量

分担研究者 宮崎 隆

平成14（2002）年4月

義歯裏装材等からのフタル酸エステルの溶出

分担研究者 宮崎 隆（昭和大学歯学部歯科理工学教室）
研究協力者 玉置幸道（昭和大学歯学部歯科理工学講座）
堀田康弘（昭和大学歯学部歯科理工学講座）
丸谷善彦（昭和大学歯学部有床義歯学講座）
井口詔雄（東レリサーチセンター）

研究要旨：義歯維持・安定を図るために裏装材がしばしば用いられる。しかし、その本体には可塑剤(フタル酸ジエチルブチル、DBP)が大量に使われている。本研究では市販 4 製品の硬化体試料を人工唾液中に浸漬し DBP の溶出量を測定し、臨床使用の際の曝露量評価を行った。その結果、DBP が 13.1～179.1 $\mu\text{g/g}$ 材料の溶出が認められた。成人(体重 50kg)が 1 回 6g 使用した場合の DBP 曝露量は 21.5 $\mu\text{g/kg/day}$ で、厚生労働省の耐容 1 日摂取量 66 $\mu\text{g/kg/day}$ の約 1/2 であることが分かり、少なくとも通常の使用で DBP の溶出に関しては安全性が確認された。

A.研究目的

近年、環境ホルモンによる生殖器異常を引き起こすという、いわゆるエストロゲン作用が多数報告され^{1,4)}、それが微量でも作用を起こることから社会的な問題となっている。この多くはプラスチック製品の可塑剤として含有され、歯科治療分野では充填修復用レジン系材料や矯正治療用レジン系ブラケット、義歯裏装材、粘膜調整材などに含有されている^{5,6)}。

環境ホルモンの主体は材料によって異なり、充填修復用レジン系材料ではビスフェノール A (BPA) がモノマー合成に直接関わっているために、その未重合部分や分解などによる溶出が懸念されている。一方、粘膜調整材にはフタル酸エステルが、これも原材料としてアルコール

とともに含まれ、そこからの溶出が問題となる^{7,8)}。これらはいずれもダイオキシンや PCB などと比べると毒性は低いとされ、しかもあらゆるプラスチック用品に含有されているものであるが、微量でも作用が発現するものだけに体液や唾液、あるいは血液などに取り込まれる可能性が高い生体使用での影響は懸念されるところである。

以前の厚生科学の報告ではフタル酸エステルの中でとくにフタル酸ジエチルブチル（以下 DBP と略記する）について、市販の義歯裏装材中からの溶出量を人工唾液中で測定した。本研究では臨床現場での実態に合った使用時の裏装材、調整剤からのフタル酸エステル溶出挙動を調べることを目的とした。

B.材料と方法

実験には市販の義歯裏装材と粘膜調整剤を用いた。これは以前の厚生科学研究の報告でモノマー中に含まれている割合の多いもの2種類、と比較的少ないもの2種類を選んだ。表1に分類と含有データを示す。なお、ここでのデータはDBPを表している。

表1 実験に用いた歯科用裏装材

製品名 (略号)	分類	モノマー含有DBP量
ソフテン (ST)	裏装	4100-5200 ($\mu\text{g/g}$)
ティッシュコンディショナー (TC)	粘膜	8100
ソフトラハース (SR)	裏装	120
ソフトライター (SL)	粘膜	240

使用するガラス器具の洗浄にはできるだけフタル酸エステルのコタミを抑えるために以下のような洗浄を行った。器具を一旦水洗いした後に超純水で再度洗浄を行い、さらに滅菌済みビーカー内でアセトン 2000 を用いて超音波洗浄を2度繰り返し、最後に200℃で4時間乾熱滅菌を行った。なお、商品付属の練和用スパチュラはプラスチック製であるため今回は金属製のセメントスパチュラで練和した。実験は以下のように行った。なお、GC/MSなど同定・計測方法については以前の報告に従い同様に行ったので割愛する。

1. 静的試験法

各材料の指示に沿って粉末と液を混和し、用意した金型内に填入後15-20分間放置してから試料を取り出した。試料形状は厚さ3mm、縦と横が約24-25mmの

板状である。取り出された試料は直ちに15cc人工唾液(KCl: 17.50mM, KH_2PO_4 : 2.50mM, Na_2HPO_4 : 2.40mM, NaCl: 10.00mM, MgCl_2 : 0.15mM, CaCl_2 : 0.50mM, NaHCO_3 : 1.50mM)中に全浸漬し37℃の恒温槽内で1時間、2時間、24時間保管した。その後試料を取り出し浸漬液を分析して溶出量を測定した。各材料で各浸漬時間ごとに5試料ずつ行った。

2. 動的試験法

一般に歯科臨床では義歯裏装は粘性を持つ状態で行う。そこで試料が完全に硬化するまで待たずに、流動性がある状態から人工唾液中に浸漬して溶出量を測る実験についても行った。これは粉末1g、液1ccをとり30秒練和後に人工唾液中にゼリー状の混和物を流し込み、1分後、2分後、3分後に液を取り出して溶出量を測定した。さらに浸漬後に遠心分離を5分間行い、人工唾液が流動している動的な状態下での溶出についても測定を行った。

C.研究成果

静的試験下での溶出試験の結果、予備実験で定量された液(モノマー)に含まれているDBP含有量の大小と今回の実験で検出された溶液中へのDBP量の大小は完全に符合していた。DBPの溶出は浸漬初期の1時間以内で急速でありその後は緩慢になった。24時間経過後の加算溶出量で比較するとSLが 0.77 ± 0.02 、TCが 8.95 ± 1.00 、SRが 0.40 ± 0.03 、STが $10.41 \pm 0.60 \mu\text{g/ml}$ であった。一般に義歯裏装材はPEMAが主体となり、ま

た粘膜調整材はエタノールとフタル酸エステルが主成分であるとされ、前者を硬質系裏装材、後者を軟質系裏装材と呼ぶ場合もある。しかし、その成分は必ずしも同じではなく、製品によっては体内への溶出に留意する必要があることが示唆された。

得られたデータを 1cc 当りではなく 15cc 容量中に溶出した量として計算し、さらには試験片重量 (0.88g) で除したデータを図 1 に示す。これをもとに 24 時間のデータを 1 日当りの溶出量とした。それによると TC からは 1 日平均で 154.3 ± 43.4 、ST からは 179.1 ± 27.6 ($\mu\text{g/g}$) が溶出することになる。

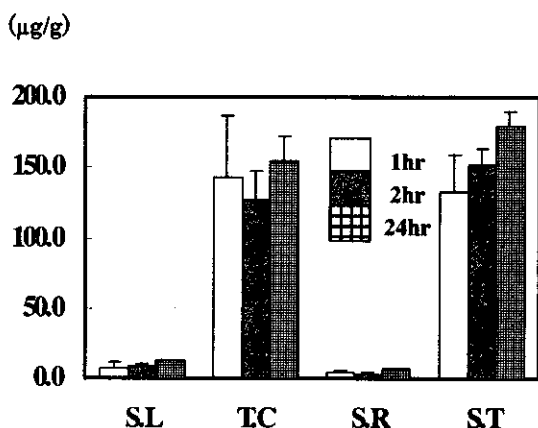


図1 完全硬化体からの溶出量

一方、静的試験で溶出が大きく現れていた 2 種類の裏装材を用いて動的試験を行った。静的試験と同様に裏装材 1g 当りで分析した結果を図 2 に示す。静的試験では大きな差が認められなかった 2 種類の裏装材も、混和直後のモノマー・リッチな状態での比較では大きな差が認められ、例えば 1 分後の値で比較すると ST の

DBP 溶出量は $58.00 \pm 7.21\mu\text{g/g}$ と高く、TC の $10.53 \pm 0.70\mu\text{g/g}$ に比べると約 5-6 倍の値を示していた。

TC、ST とともに浸漬時間に従って溶出が増える傾向であるが、増加率はいずれもそれほど大きくなく、3 分間浸漬後の値は ST が 62.67 ± 4.16 で TC が 13.20 ± 0.92 ($\mu\text{g/g}$) であった。しかし、遠心分離を行った結果を見ると、溶出する DBP 量は ST では $150 \pm 5 \mu\text{g/g}$ と変化がなく、TC では $20.5 \pm 0.87 \mu\text{g/g}$ と、むしろ減少していた。これは遠心分離を行うまでの試料作成に問題があるのか、それとも遠心分離の条件設定が不具合であったのかなどの詳細については明らかではない。

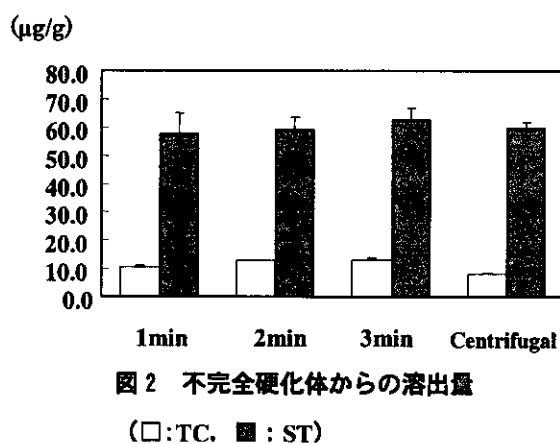


図2 不完全硬化体からの溶出量 (□:TC, ■:ST)

D.考察

図 1 の結果において通常の義歯裏装材の臨床現場での使用を考える。ケースにもよるが最も面積が広い総義歯を想定して粉末と液をマニュアルにしたがい、粉末と液を合わせて約 6g 用いた仮定すると、24 時間後の値を利用した単純計算では裏装材から外部への DBP 溶出量は約 0.9-1.1mg となる。

仮に体重が 50kg の患者に使用したと

すると、1日当りのDBP曝露量は約0.02mg/kg/dayとなる。この値はフタル酸エステルの中で、特にDBPに対するエストロゲン作用発現のNOAEL（最大無毒作用量）およびLOAEL（最小毒作用発現量）といわれている値に比べて格段に低いことがわかる。

江馬らの報告⁹⁾では妊娠ラットに500mg/kg/day以上投与すると催奇性が生じるとし、またMylchreestら¹⁰⁾はNOAELで50mg/kg/dayと指摘している。日本歯科理工学会の歯科器材調査研究委員会の報告¹¹⁾でも50mg/kg/dayと同様であった。

一方、EUではtolerable daily intake (TDI) について規定があり、100µg/kg/dayと定めている。このほか、カナダでは63µg/kg/day、オランダでは52µg/kg/dayと発表され、また厚生労働省のシックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会の中間報告によるとDBPのTDI値については66µg/kg/dayとの記載がある。

しかし、今回測定した値は完全硬化後で成人(体重50kg)における1回6g使用時のDBPの曝露量は20.5µg/kg/dayであり、これに硬化前の状態を加味しても硬化までの時間的ファクターと溶出データから多く見積もっても約50µg/kg/day程度であり、TDI以下であると推定される。

加えて、このシミュレーションでは体内に取りこまれても体外への排泄が一切ないことを前提としているので、裏装材からの溶出量により幾多の生体障害が起こる可能性は限りなく低いと思われる。

また、静的試験の結果を受け、溶出量

の多い材料の初期溶出挙動を調べる目的で行った結果が図2である。グラフは本実験が10cc人工唾液中での試験であること、さらにはマニュアルよりも少量で行ったことを考慮して通常使用の値に換算してある。

この実験は図1で行った完全に硬化してから溶出量評価の前段階、つまり臨床使用を考慮して裏装材が口腔粘膜の形状を再現しうほどの粘性がある状態での溶出量も評価しようと試みたものである。

図2の結果からは、図1と比べてSTとTCに明らかな差が生じ、STの溶出量が多く認められる。これはSTでは粉末1g、液1gの割合で混和すると混和物は粘性が低く、液状の良好な流れを示したのに対し、TCでは混和中から餅状を呈し粘性が高い。この初期混和時の物性の差が溶出量に反映したものと考えられる。

この動的試験はあくまでも完全硬化前の溶出挙動を知る目的で行ったものであり、溶出量を1日当りに換算してもあまり意味がない。硬化するまでの時間は商品によっても差があるが約10-20分間である。しかし、1-3分の溶出結果からも明らかのように溶出挙動は経時的に増加していくというよりも浸漬直後に大きく、後は安定する傾向にも見受けられる。これは以前行った硬化体からの溶出試験¹²⁾でも明らかであった(図3)。

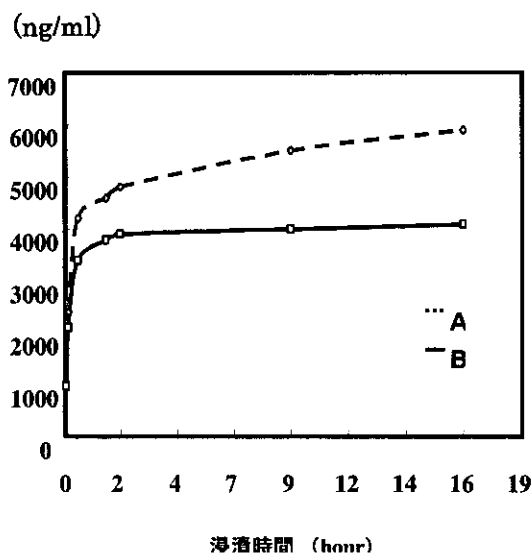


図3 裏装材からのDBP溶出量の経時的变化

無論、裏装材が硬くなるまで溶出は続くのだろうが、急激に増大するとは考えにくい。硬化まで30分間かかると仮定しても、3分浸漬後の溶出量である $62.67 \pm 4.16 \mu\text{g/g}$ (ST) を基準にすると、上記のような理由から、図1での1日浸漬後の溶出量である約 $180 \mu\text{g/g}$ を大幅に超えるほどの溶出量を予想するのは非現実的といえよう。

確かに動的試験では混和直後から浸漬しているため浸漬時間が極めて短く、それに伴い硬化体から溶出してくる量を全く考慮していない不測のデータではある。しかし、前述したように仮に硬化体からの持続的な溶出を見込んでだとしても、TDIレベルには達しないことが容易に推察され、少なくとも裏装材関連から溶出するDBPに関しては問題が無いものと結論付けられる。

しかし、ここで問題視されるのはDBPの口腔内溶出後の安定性である。リスク評価では影響が無いと出ているが、これ

はあくまでもDBPの溶出に限った評価である。川口らの報告¹²⁾を始めとしてDBPは唾液中で容易に分解しジ体からモノ体へと変化するということが定説となっている。つまり水よりも人工唾液中へのDBPの溶出が多いことから、無機イオン存在下では溶けこみが促進されるが、ヒト唾液中にはタンパクや酵素が含まれているのでモノ体へと分解される可能性が高いということである。事実ヒト唾液中ではDBPの溶出量は水に浸漬した場合よりも低いとの報告もある¹³⁾。それゆえ、実際の計測で大きな溶出が確認できなかっただけであるのかも知れず、今後はモノ体の溶出とその毒性についても詳細な検討が必要であろう。

また、歯科界でも義歯裏装材に関してフタル酸エステルを用いない素材を開発しようという研究も芽生える^{14,15)}などこれから注目すべきテーマであることは間違いない。

E. 結論

1. 裏装材モノマー中に多量のフタル酸エステルが含まれている材料からの人工唾液中へのDBP溶出量は高く、TCからは1日平均で 154.3 ± 43.4 、STからは $179.1 \pm 27.6 (\mu\text{g/g})$ であった。
2. 混和直後に人工唾液中へ浸漬した溶出試験結果では、1分後のDBP溶出量はSTで $58.00 \pm 7.21 \mu\text{g/g}$ と高く、TCは $10.53 \pm 0.70 \mu\text{g/g}$ であった。しかし3分間浸漬後の値はSTが 62.67 ± 4.16 、TCが $13.20 \pm 0.92 (\mu\text{g/g})$ と大幅な変化は認められなかった。
3. 遠心により動的な試験を試みたが、溶

- 2) 佐藤温重：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，平成11年度厚生科学研究費補助金研究報告書、56-59、1998
 3) 本郷敏雄：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，平成10年度厚生科学研究費補助金研究報告書、22-29、1998
 4) 歯科器材調査委員会：内分泌攪乱作用が疑われるビスフェノールAを主とする化学物質と歯科材料とのかかわりについて、歯材器18(4)、302-331、1999
 5) JDMAガイドブック：短期弾性裏装材，日本歯科材料協同組合，1997,pp484-489
 6) Harsanyi BB, Foong WC, Howell RE, Hidi P, Jones DW: Hamster cheek-pouch testing of dental soft polymers, JDR,70(6),991-996,1991
 7) 川口 稔、高橋 裕、宮崎光治、羽生哲也：化学重合型直接リライニング材からの残留モノマーの溶出、歯材器、17(5)、304-308、1998
 8) 川口 稔、高橋 裕、宮崎光治、羽生哲也：ティッシュコンディショナーからの可塑剤成分の溶出性、補綴誌45(4)、504-511、2001
 9) 江馬 眞：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 - フタル酸エステルの発生毒性，成果報告会講演要旨集、3-6、2000
 10) Eve Mylchreest, Madhabananda Sar, Russel C Cattley, & M.D.Foster: Disruption of androgen-regulated male reproductive development by
- 1) 本実験では義歯裏装材から溶出するDBP量を調べた結果、臨床使用における患者のDBP曝露量は各報告で示されているTDI値には達しないことが認められた。
 2) 出力はSTが 60.00 ± 2.00 、TCが 8.20 ± 0.35 ($\mu\text{g/g}$)であり、結果的に人工唾液浸漬試験とほぼ変わらない値を示した。
 3) ジ体(DBP)からモノ体への分解については不明であるが、ヒト唾液中では分解が促進されるためにジ体の溶出量が低くなるので、今後はモノ体の為害性についても検討が必要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

なし。

1. 論文発表

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H 知的財産権の出願・登録状況

なし。

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

[参考文献]

- 1) 江馬 眞：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 - フタル酸の発生毒性，平成11年度厚生科学研究費補助金研究報告書、86-96、1998
 2) 佐藤温重：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，平成11年度厚生科学研究費補助金研究報告書、56-59、1998
 3) 本郷敏雄：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，平成10年度厚生科学研究費補助金研究報告書、22-29、1998
 4) 歯科器材調査委員会：内分泌攪乱作用が疑われるビスフェノールAを主とする化学物質と歯科材料とのかかわりについて、歯材器18(4)、302-331、1999
 5) JDMAガイドブック：短期弾性裏装材，日本歯科材料協同組合，1997,pp484-489
 6) Harsanyi BB, Foong WC, Howell RE, Hidi P, Jones DW: Hamster cheek-pouch testing of dental soft polymers, JDR,70(6),991-996,1991
 7) 川口 稔、高橋 裕、宮崎光治、羽生哲也：化学重合型直接リライニング材からの残留モノマーの溶出、歯材器、17(5)、304-308、1998
 8) 川口 稔、高橋 裕、宮崎光治、羽生哲也：ティッシュコンディショナーからの可塑剤成分の溶出性、補綴誌45(4)、504-511、2001
 9) 江馬 眞：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 - フタル酸エステルの発生毒性，成果報告会講演要旨集、3-6、2000
 10) Eve Mylchreest, Madhabananda Sar, Russel C Cattley, & M.D.Foster: Disruption of androgen-regulated male reproductive development by

di(n-Butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. Toxicology and Applied Pharmacology 156, 81-95, 1999

- 11) 歯科器材調査委員会：内分泌攪乱作用が疑われるビスフェノールAを主とする化学物質と歯科材料とのかかわりについて、歯材器 21 (特 39) ,21, 1999
- 12) 玉置幸道：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 - フタル酸エステルの発生毒性，成果報告会講演要旨集、11・12、2000
- 13) 川口 稔、高橋 裕、宮崎光治、羽生哲也：ティッシュコンディショナー用可塑剤成分のヒト唾液への溶出性
歯材器 21 (特 39) ,85, 2002
- 14) 橋本典也、出口幹人、中村正明：フタル酸エステル類フリーの新しい粘膜調整材の理工学的性質と開発、歯材器 20 (特 38) ,138, 2001
- 15) 西島真人、橋本典也、中村正明：フタル酸エステル類フリーの新しい粘膜調整材が細胞に及ぼす影響について、歯材器 20 (特 38) ,137, 2001

厚生科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

プラスチック製医療用具に係る溶出物質の曝露量の評価に関する研究

平成13年度 分担研究報告書

5. 唾液に浸漬した歯科用有機材料の分析

分担研究者 本郷敏雄

平成14（2002）年4月

平成 13 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)

分担研究報告書

プラスチック製医療用具に係わる溶出物質の曝露量の評価に関する研究

—唾液に浸漬した歯科用有機材料の分析—

主任研究者	佐藤温重	昭和大学・歯学部
分担研究者	本郷敏雄	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科
研究協力者	日景 盛	北海道医療大学・歯学部
	田中文夫	昭和薬品化工 (株)・開発研究部
	浦部素直	(株)トクヤマデンタル
	井口詔雄	(株)東レリサーチセンター

研究要旨

歯科用充填材料から溶出する物質で、特にビスフェノール A(BPA)溶出量に関して社会的な関心は高いが、それに対応すべく正確な報告が少ないこと、同様にポリカーボネート (PC) 製矯正用ブラケットからの BPA 溶出に関しても、その報告は極めて少ないことに加えて、使用されている溶出溶媒が実態環境下とは懸け離れている等の問題点がある。術者と患者間の感染防止策として歯科治療ではグローブの使用が推奨されているが、多くの PVC 製グローブではジ (2-エチルヘキシル) フタル酸エステル (DEHP) が可塑剤として含有されている。この DEHP による胎児、小児や子供に対する生殖毒性の懸念が指摘されているので、歯科治療の際に使用される可能性が考えられる PVC 製グローブから唾液への移行量を明らかにすることは社会的な要請でもある。従って、本研究は唾液に 1, 6 週間浸漬した 2 種類の歯科用コンポジットレジン硬化体から溶出する BPA, 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン(BP-3)などを定量すること更に唾液に 24 週間浸漬した PC 製矯正用ブラケットから溶出する物質の定量を HPLC で分析すること及び PVC 製グローブに唾液を片面接触させ、唾液に移行する DEHP 及びその代謝物であるモノエチルヘキシルフタル酸エステル (MEHP) を GC/MS で分析すること並びにそれら溶出量からこれら歯科用材料からの溶出物の曝露量を評価することを目的とした

唾液に 1, 6 週間浸漬した Bis-GMA 系コンポジットレジン硬化体溶出液を分析したところ、BPA, トリエチレングリコールジメタクリレートと BP-3 は何れも検出限界以下であった。

24 週間唾液に浸漬した PC 製矯正用ブラケットでは BPA 溶出量は 5.4 ~ 30.2µg/g resin, *p-t*-ブチルフェノール溶出量は 0.1 ~ 0.6µg/g resin, *p*-クミルフェノール溶出量は 0 ~ 1.6µg/g resin であった。残留量は唾液浸漬により何れの物質

も増加した。

PVC 製グローブを片面唾液に接触させ、唾液中への DEHP 移行量及びその代謝物について検討したところ、その検出量は 24 時間唾液接触で約 37ng/cm² と昨年度に比べて検出量は低値であった。昨年度検出されていた MEHP は本年度では検出限界以下 (10ng/mL) であった。他の 1 製品では DEHP 及び MEHP は検出されなかった。

A. 研究目的

内分泌攪乱作用が懸念されているビスフェノール A(BPA, CAS No: 80-05-7)は多くの歯科用有機材料の合成原材料としても使用されている。現時点においては BPA それ自体を歯科用有機材料の構成成分としては使用されていない。しかし、現在でも歯科充填用材料、フィッシャーシーラントなど並びにポリカーボネート(PC)製歯科材料からの BPA 溶出が懸念されている。これに対応すべく日本歯科理工学会の歯科器材調査研究委員会で平成 12 年 3 月に「内分泌攪乱作用が疑われる、ビスフェノール A を主とする化学物質と歯科材料との関わりについて」と題する報告書を作成した(1)。この報告書作成以後も歯科充填用材料からの BPA などの溶出に関する報告がなされている(2-14, 表 1)。

この BPA の物性は表 2 の Log Pow が 3.32 であることから極性が高い物質と考えられる。また、その一般毒性に関しては National Toxicology Program(NTP)の NTP Chemical Repository(15)で詳細に記載されている。その一般毒性からは非常に安全な物質であると考えられていたが、内分泌攪乱作用の疑いが懸念されてからは特に低用量による生殖毒性が大きな問

題となっており、その懸念は現時点でも扶植されていない。この問題に関しては NTP(16)で詳細に BPA の低用量作用について言及されているが、明確な結論については記載されていない。同様に各国でも BPA の毒性評価を報告している(17-19)が、何れも明確な結論が現時点でもなされていない。

この BPA の耐容 1 日摂取量(TDI)については EU 及び US EPA の RfD から 50µg/kg 体重/日と考えられていたが、現在の EU では仮の TDI(a temporary TDI(t-TDI))を求めるために、種差を 10, 個体差を 10, 不確実性(uncertainties)を 5 とした不確実係数(uncertainty factor, UF)である 500 を採用することにより、BPA の仮の TDI を 10µg/kg 体重/日とし、以前の TDI に比べて 5 倍ほど基準値は低下している。歯科充填用材料から溶出している化合物は充填材料の未反応のレジンモノマー、触媒(重合開始剤、重合調節(停止)剤など)、退色防止剤、可塑剤などが知られているが(20, 21)、特に退色防止剤として使用されている 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン(BP-3, CAS No: 131-57-7)がコンポジットレジンから多量に溶出するという報告(22)により、社会的な関心を引き起こした。

歯科材料として PC を用いて、暫間ク

ラウン(テンポラリークラウン), 人工歯, 義歯床, 矯正用ブラケットなどが製造されている。これら医療用具で長期間治療に使用される材料として義歯床, 人工歯と矯正用ブラケットがあり, 内分泌攪乱作用が懸念されている BPA の毒性を考慮すると実態に近い環境下での PC 製矯正用ブラケットからの BPA 曝露量を明らかにする必要がある。PC 製矯正用ブラケットを人工唾液及び唾液に 12 週間浸漬すると材料に残留している BPA や *p-t*-ブチルフェノール(*t*-BuP, CAS No: 98-54-4)量が増加していることを既に報告している(23)。この矯正用ブラケットで使用されている PC の重合調節剤(停止剤)としては代表的な *t*-BuP とは異なる物質である *p*-クミルフェノール(*p*-CP, CAS No: 599-64-4)も使用されている。これら物質の物性は表 1 に記してあるように, BPA と同等若しくはそれ以上に極性の高い物質であり, 水性溶媒には溶解しにくいと考えられる。しかし, *t*-BuP(24)は *in vitro* で弱いエストロゲン様作用のあること及び *p*-CP は *in vitro*(25, 26)並びに *uterotrophic assay* (子宮肥大試験)(25)でエストロゲン様作用のあることが知られているが *p*-CP の一般毒性についての情報は皆無である(27)。

ジ(2-エチルヘキシル)フタル酸エステル(DEHP, CAS No: 117-81-7)は可塑剤として, 種々のポリ塩化ビニール(PVC)で使用され(28-33), 各種 PVC 製医療用具でも汎用されている(34-38)。この PVC 製医療用具中には約 20 ~ 40%の DEHP が可塑剤として添加されている。従来から一部の医療用具を用いた治療中に曝露され

る DEHP 量が多いことなどが指摘され, それによる生体為害性の懸念も指摘されていた。発癌性に関する報告よりも近年, 内分泌攪乱化学物質としての毒性に関心が高まっている中で, DEHP 曝露による新生児, 小児及び子供の生殖毒性の懸念が指摘されている(28-33, 35-38)。可塑剤としての DEHP は食品包装材, プラスチック製医療用具, PVC 製グローブなどでも使用され, 特に食品関連では O-157 対策として用いられた PVC 製グローブを消毒用アルコールで殺菌してから食材などに接触すると多量の DEHP が食材に移行する(39, 40)ことが報告されている。歯科治療で各種感染症予防のためにグローブが使用されているが, ラテックスアレルギー患者の場合にはラテックス製グローブが使用できないのでその代替グローブとして多くの場合, PVC 製グローブが使用されているのが現状である。加えて DEHP は小児や子供に対する生殖毒性の懸念が指摘されているので, 歯科治療の際に使用される可能性が考えられる PVC 製グローブから唾液への移行量を明らかにすることは社会的な要請でもある。昨年度では検出された DEHP 量は約 0.8 ~ 2.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, DEHP の代謝物であるモノエチルヘキシルフタル酸エステル(MEHP, CAS No: 4376-20-9)量は約 0.04 ~ 0.47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった(41)。平成 12 年に厚生労働省から「塩化ビニル製手袋の食品への使用について」(42)中で「緊急措置として可塑剤として DEHP を含有する PVC 製手袋の食品への使用を避ける」旨の通達がなされているので, 本年度も唾液に接触させた PVC 製グローブから溶出

される DEHP 量について検討する必要性がある。

従って、本研究は唾液に 1, 6 週間浸漬した 2 種類の歯科用コンポジットレジン硬化体から溶出する BPA, BP-3 などを定量すること更に唾液に 24 週間浸漬した PC 製矯正用ブラケットから溶出する物質の定量を HPLC で分析すること並びに PVC 製グローブに唾液を片面接触させ、唾液に移行する DEHP 及び MEHP を GC/MS で分析することを目的とした。

B. 研究方法

光重合型 Bis-GMA (ビスフェノール A グリシジールメタクリレート, CAS No: 1565-94-2) 系コンポジットレジンは国内で代表的な歯科充填用コンポジットレジンであるクリアフィル® AP-X ((株) クラレ, Lot: 0783A), パルフィークエステライトペースト ((株) トクヤマデンタル, Lot: J237) を材料として用いた。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唾液中に 37℃で遮光下にて 1, 6 週間浸漬した。コンポジットレジン硬化体を浸漬した唾液を溶出物の同定・定量の試料とした。

PC 製矯正用ブラケットは国内メーカーで製造されているクリアブラケット (三金工業 (株), Lot: C0100110), プラスチック Br.スタンダード ((株) トミーインターナショナル, Lot: A3X0) と輸入品で

ある PLASTIC EDGEWISE CENTRAL BRKT(ORTHO ORGANIZERS, INC., Lot: 610200), TM SPIRIT mb(Ormco Corporation, Lot: 00K43K)を材料として用いた。4 種類の矯正用ブラケットはメタルスロットを撤去せずにそのまま, 唾液に 37℃で遮光下にて 24 週間浸漬し, 溶出物の同定・定量の試料とした。

唾液中の BPA をクリーンアップするために固相抽出や溶媒抽出法などがあるが, 本研究では BPA 以外の物質の分析をも目的としているので, これらの方法では操作が煩雑になること並びにその操作に伴うコンタミンを避けるため, 酸性下有機溶媒による除蛋白した試料を HPLC の試料とした。唾液に浸漬した PC 製矯正用ブラケット中に残留する物質の抽出法は衛生試験法 (器具・容器包装および玩具試験法の材質試験法) (43)に準じて試料を調製した。

HPLC の分析条件はガードカラムとして CAPCELL C₁₈ UG120 (2x10 mm, 資生堂), 分離カラムとして CAPCELL PAK C₁₈ MG120 (2x250 mm, 資生堂)を用い, 移動相は蒸留水/アセトニトリル混合液 (移動相の組成比は本文中に記載), カラム温度は 40℃, 流量は 0.2mL/min とした。主に BPA 分析のために紫外部の検出波長は 217nm とし蛍光では励起波長 273nm, 蛍光波長 313nm とした。同時に波長スペクトルを測定するため紫外部吸収 (UV) では 190nm ~ 400nm, 蛍光発光では 300 ~ 500nm とした。HPLC 装置は HEWLETT PACKARD Series 1100 (Hewlett Packard) を用いた。定量は絶対検量線法を用い, 検量線の相関係数が 0.999 以上の場合のみ

採用した。コンポジットレジン硬化体及びブラケットの例数は何れも 5 とした。

PVC 製グローブとしてエチレンオキサイドガス滅菌済のトップメディカルグローブ ((株) トップ, Lot: 01G01K), 歯科用手袋として医療用具許可をとっているトクヤマデンタルプラスチックグローブ ((株) トクヤマデンタル, Lot: 5X1176NP) を材料として用いた。これらグローブを内径 1.32cm の円板状試料 (面積は 5.43cm^2) として作製した。この円板状試料を褐色のねじ口瓶 SV-50 (日電理化ガラス(株)) の蓋にテフロン内蓋を敷いた上に置き, 5mL 唾液が入った瓶を装着して, しっかりと蓋をし, 瓶を逆さまにして, テフロン内蓋の上に置いた円板状試料と唾液が接触するようにした。溶出方法は唾液と円板状試料が接触してから, 100rpm で水平に回転し, 温度は 37°C とした。唾液との接触時間は 1, 2, 6, 24 時間した。例数は 4 とし, これら試料は溶出物の測定まで -30°C 以下で保存した。

分析条件は昨年度とほぼ同じ条件とした(41)。使用した GC/MS はプレカラムとして, Non-Polar Fused Silica 15m \times 0.53mm I.D. (SUPELCO), 分析カラムとして, BPX-5 25m \times 0.22mm I.D. \times 0.25 μm Film (SGE 社), オートサンプラーとして ThermoQuest AS 2000, ガスクロマトグラフとして ThermoQuest Trace2000 SERIES, 質量分析計として ThermoQuest Voyager, データ処理として ThermoQuest Xcalibur を使用した。DEHP 及び MEHP 測定時の GC/MS 測定条件をそれぞれ表 3 および表 4 に示した。また, DEHP 及び MEHP の前処理法は図 1 と図

2 に示した。

唾液採取中は氷冷し, その後, 食物残渣や細胞などを除去するために 3000rpm で 15 分間遠心した。得られた上清を滅菌するためにボトルトップフィルター (旭テクノグラス, $0.22\mu\text{m}$) で濾過滅菌した。得られた唾液を滅菌したガラス容器に保存し, 操作は極力無菌的に行った。

唾液提供に関して, 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。

本実験で用いたガラス器具類は全てアセトンで 3 回洗浄したものを用いた。

C. 研究結果

C-1. 唾液に浸漬した Bis-GMA 系歯科充填用コンポジットレジン硬化体からの溶出物の分析

Bis-GMA 系コンポジットレジン硬化体を人工唾液などに浸漬すると主にトリエチレングリコールジメタクリレート (TEGDMA, CAS No:109-16-0) や Bis-GMA の加水分解体などが溶出していたが, BPA は検出限界以下で検出されていないことを既に報告した(44)。しかしこの溶出条件は口腔内環境下とはかなり異なる条件であるため, より口腔内環境下に近い条件下で Bis-GMA 系コンポジットレジン硬化体から BPA が溶出するかについて, 溶出溶媒としてヒト唾液を用いて, BPA, TEGDMA 並びに退色防止剤 (紫外線防止剤) である BP-3 などの分析を検討した。一般的な HPLC で使用される紫外外部吸収

に比べ、本研究で用いた蛍光法(FL)による BPA の定量法は UV 法に比べて感度が非常に高かった。TEGDMA と BP-3 は UV 法により測定した。また、用いたコンポジットレジジン A と B の重量はそれぞれ $98.2 \pm 1.5 \text{ mg}$, $81.7 \pm 0.6 \text{ mg}$ であった。本研究で使用した 40%アセトニトリル/蒸留水から 90%アセトニトリル/蒸留水までの linear gradient の実験条件(移動相 A, 図 3A)を用いて, 12.5ng/mL BPA, 250ng/mL の TEGDMA と BP-3 の混合標準液で検討したところ, 実測値は BPA で $12.3 \pm 0.1 \text{ ng/mL}$, TEGDMA で $249.7 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$, BP-3 で $250.6 \pm 0.2 \text{ ng/mL}$ となり, それぞれの回収率は 98.4%, 99.9%, 100.2% であった。検出下限値と定量下限値をこの添加回収実測値から求めたところ, FL による BPA の検出下限値は 0.3 ng/mL , 定量下限値は 0.9 ng/mL (絶対量は 18 pg), UV による TEGDMA ではそれぞれ 1.8 ng/mL と 6.1 ng/mL (絶対量は 122 pg), UV による BP-3 ではそれぞれ 0.5 ng/mL と 1.7 ng/mL (絶対量は 34 pg) であった。この HPLC の分析条件を用いて, 唾液に 1, 6 週間浸漬した Bis-GMA 系コンポジットレジジン硬化体溶出液を分析した。コンポジットレジジン硬化体 A を唾液に 1 週間浸漬したクロマトグラムを図 4 に示してある。図 4 の A は 25 ng/mL BPA, 500 ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液のクロマトグラムである。図 4 の B は 1 週間浸漬した唾液のクロマトグラムであり, BPA ピークは確認できなかった。そこでこの標準混合液と 1 週間浸漬した唾液を等量混合して得られたクロマトグラムを図 4 の C に示してある。図 5 の C は 6 週間唾

液に浸漬したコンポジットレジジン硬化体 A のクロマトグラムである。図 5 の A は唾液のみのクロマトグラムであり, 用いた唾液中の BPA は検出限界以下であった。図 5 の B はこの唾液に 50 ng/mL BPA, 1000 ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液とを等量加えた試料のクロマトグラムである。これらのことから 6 週間唾液中に浸漬してもコンポジットレジジン硬化体 A からは BPA が溶出していたとしても検出限界以下であると考えられた。

コンポジットレジジン硬化体 B を唾液に 1 週間浸漬したクロマトグラムを図 6 に示してある。図 6 の A は 25 ng/mL BPA, 500 ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液のクロマトグラムである。図 6 の B は 1 週間浸漬した唾液のクロマトグラムであり, コンポジットレジジン硬化体 A と同様に BPA ピークは確認できなかった。そこでこの標準混合液と 1 週間浸漬した唾液とを等量混合して得られたクロマトグラムを図 6 の C に示してある。図 7 の C は 6 週間唾液中に浸漬したコンポジットレジジン硬化体 A のクロマトグラムである。図 7 の A は唾液のみのクロマトグラムであり, BPA は検出限界以下であった。図 7 の B はこの唾液に 50 ng/mL BPA, 1000 ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液を等量加えた試料のクロマトグラムである。これらのことから 6 週間唾液中に浸漬してもコンポジットレジジン硬化体 B からは BPA は検出限界以下であると考えられた。

UV 検出による TEGDMA と BP-3 はコンポジットレジジン硬化体 A (図 8, 9) と B (図 10, 11) で前述の蛍光検出と同じ試

料を同時に測定した。図 8 の B と C, 図 9 の B と C, 図 10 の B と C, 図 11 の B と C で明らかなように, TEGDMA と BP-3 のピークの分離が良くないこと並びにピークの重なりがあったためにこの条件下では TEGDMA と BP-3 は検出不可能であった。従って, HPLC の移動相を 50%アセトニトリル/蒸留水から 90%アセトニトリル/蒸留水までの linear gradient (移動相 B, 図 3B) に変えて検討した。

この移動相条件で 6.25ng/mL BPA, 125ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液を用いて検討したところ, 実測値は BPA で 6.26 ± 0.04 ng/mL, TEGDMA で 125.94 ± 0.28 ng/mL, BP-3 で 124.43 ± 0.32 ng/mL となり, それぞれの回収率は 100.2%, 100.8%, 99.5%であった。検出下限値と定量下限値をこの添加回収実測値から求めたところ, 蛍光法による BPA の検出下限値は 0.1ng/mL, 定量下限値は 0.4ng/mL (絶対量は 8pg), UV による TEGDMA ではそれぞれ 0.8ng/mL と 2.8ng/mL (絶対量は 56pg), UV による BP-3 ではそれぞれ 1.0ng/mL と 3.2ng/mL (絶対量は 64pg) であった。BPA の感度は非常に良く、唾液と標準混合液のクロマトグラム (図 12 の B) 及び唾液のみのクロマトグラム (図 12 の A) でも見かけ上, 問題ない分離状態が得られた。しかしながら, 1 週間唾液に浸漬したコンポジットレジン硬化体 A (図 12 の C), B (図 12 の D) のクロマトグラムを比較すると BPA に相当するピークが検出された。図 13 の A は 12.5ng/mL BPA, 250ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液のクロマトグラムであり, 図 13 の B は

唾液中に添加した標準混合液のクロマトグラムを示している。図 13 の C はコンポジットレジン A 硬化体を 6 週間浸漬した唾液のクロマトグラムであり, 見かけ上, 保持時間が BPA と一致するピークが検出された。コンポジットレジン A 硬化体を 6 週間浸漬した唾液と BPA 終濃度が 12.5ng/mL になるように混合した場合のクロマトグラムが図 13 の D であり, 保持時間が BPA と一致するピークに重複した。しかし, 移動相 A からこれらのピークが BPA ではないことが明かであるため, この移動相 B では BPA の検出はこれらの試料では不可能であると判断した。

移動相 A では TEGDMA と BP-3 の分離状態が良くなかったので, 移動相 B で検討した。図 14 の A は唾液のみのクロマトグラムであり, この唾液に終濃度 5ng/mL BPA, 100ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液を添加した場合のクロマトグラムが図 14 の B である。TEGDMA と BP-3 の分離状態は悪くなかった。そこでコンポジットレジン硬化体 A 若しくは B を 1 週間浸漬した唾液のクロマトグラムをそれぞれ図 14 の C と D に示してある。TEGDMA と BP-3 はコンポジットレジン硬化体 A では検出されなかったが, コンポジットレジン硬化体 B では TEGDMA の保持時間に一致するピークが検出されたが, BP-3 は検出されなかった。6 週間浸漬した唾液のクロマトグラムを図 15 と 16 に示した。図 15 の A は唾液のみのクロマトグラムで, B は 12.5ng/mL BPA, 250ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液と唾液の混合液のクロマトグラムである。図 15 の C はコンポジットレジン硬

化体 A を 6 週間浸漬した唾液のクロマトグラムであり、TEGDMA と BP-3 は検出されなかった。これは終濃度 12.5ng/mL BPA, 250ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液とコンポジットレジン硬化体 A を 6 週間浸漬した唾液とを混合した場合のクロマトグラムから確認された (図 15 の D)。同様に図 16 にコンポジットレジン硬化体 B の場合について示してある。唾液のみのクロマトグラムは図 16 の A であり、B は 12.5ng/mL BPA, 250ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液のクロマトグラムである。コンポジットレジン硬化体 B を 6 週間浸漬した唾液のクロマトグラムが図 16 の C である。このレジン硬化体の場合には TEGDMA の保持時間に該当するピークが検出されたが、BP-3 は検出されなかった。これは 12.5ng/mL BPA, 250ng/mL TEGDMA と BP-3 の標準混合液とコンポジットレジン硬化体 B を 6 週間浸漬した唾液とを混合した場合のクロマトグラム (図 16 の D) から、明らかであった。しかし、このコンポジットレジン硬化体 B で TEGDMA に該当するピークが検出されているが、コンポジットレジン A では検出されていない。コンポジットレジン硬化体 B で TEGDMA に該当するピークが TEGDMA であれば、コンポジットレジン硬化体 A と同じように検出されない若しくは検出されても微量であると考えられる。コンポジットレジン硬化体を唾液に浸漬すると唾液中のリパーゼやエステラーゼなどのエステル加水分解酵素により、TEGDMA は加水分解され、トリエチレングリコール (TEG) とメタクリル酸になる可能性が考えられ

る。この条件下では TEG はボイドポリウーームに溶出されるので検出不可能であった。また、メタクリル酸も唾液由来ピークと重複するため検出不可能であった。このようにコンポジットレジン硬化体 A では TEGDMA が検出されないにも拘わらず、コンポジットレジン硬化体 B では TEGDMA に該当するピークが検出されたことはこのピークが TEGDMA とは異なる物質である可能性が高いと考えられる。これらの結果から、コンポジットレジン硬化体 A と B を唾液に浸漬した場合には BPA と BP-3 はこれらの分析条件下では検出限界以下であった。同様にコンポジットレジン硬化体 A では TEGDMA も検出限界以下であった。

C-2. 唾液に浸漬した PC 製矯正用ブラケットからの溶出物の分析

PC 製矯正用ブラケットを人工唾液、唾液に 12 週間浸漬すると BPA, t-BuP と p-CP が溶出することと唾液に浸漬したブラケットに残留しているそれらは唾液浸漬前に比べると残留量が増加している (23) ことを明らかにしているが、歯列矯正に用いられるブラケットの装着期間は 1 ~ 2 年位であるため、PC 製矯正用ブラケットからの BPA 溶出量及び唾液に浸漬したブラケットに残留している BPA 量の変化を 24 週間唾液に浸漬した場合について検討した。

溶出物の分析には移動相組成は 50%アセトニトリル/50%蒸留水、残留物の分析には 53%アセトニトリル/47%蒸留水を用い、FL による検出法を採用した。溶出物の分析に用いた条件では終濃度 4.55ng/mL

の混合標準液(BPA+t-BuP+p-CP)を唾液に添加し、標準物質の添加回収を実施し、検出下限値と定量下限値を求めた。BPAの回収率は $101.1\pm 2.5\%$ 、CVは2.5%、検出下限値は 0.3ng/mL 、定量下限値は 0.5ng/mL であった。同様にt-BuPとp-CPの回収率はそれぞれ $94.7\pm 5.9\%$ と $98.6\pm 2.3\%$ 、CVはそれぞれ6.2%と2.3%、検出下限値はそれぞれ0.8と 0.3ng/mL 、定量下限値はそれぞれ1.2と 0.5ng/mL であった。24週間唾液浸漬により、溶出された物質の典型的なクロマトグラムを図17に示した。それぞれのブラケットを浸漬した唾液の分離状態は良かった。図18に示すように、BPA溶出量は $5.4\sim 30.2\mu\text{g/g resin}$ 、t-BuP溶出量は $0.1\sim 0.6\mu\text{g/g resin}$ 、p-CP溶出量は $0.0\sim 1.6\mu\text{g/g resin}$ であり、製品により、溶出される物質の溶出量はかなり異なっていた。用いたブラケットの重量はブラケットA, B, C, Dでそれぞれ $36.2\pm 0.1\text{mg}$ 、 $45.5\pm 0.0\text{mg}$ 、 $47.6\pm 0.1\text{mg}$ 、 $35.9\pm 0.2\text{mg}$ であった。

残留物の分析に用いた条件では終濃度 12.5ng/mL の混合標準液(BPA+t-BuP+p-CP)を唾液に添加し、標準物質の添加回収を実施し、検出下限値と定量下限値を求めた。BPAの回収率は $100.1\pm 1.4\%$ 、CVは1.4%、検出下限値は 0.5ng/mL 、定量下限値は 1.7ng/mL であった。同様にt-BuPとp-CPの回収率はそれぞれ $100.1\pm 0.8\%$ と $100.0\pm 2.0\%$ 、CVはそれぞれ0.8%と2.0%、検出下限値はそれぞれ0.3と 0.7ng/mL 、定量下限値はそれぞれ1.0と 2.5ng/mL であった。図19と20に唾液浸漬前のブラケットをジクロロメタンに溶解し、調製した試料(A)と唾液浸漬後(B)の典型的な

クロマトグラムを示した。何れの試料も分離状態には問題がなかった。唾液浸漬前のブラケットの重量はブラケットA, B, C, Dでそれぞれ $36.1\pm 0.2\text{mg}$ 、 $45.5\pm 0.0\text{mg}$ 、 $47.4\pm 0.2\text{mg}$ 、 $36.1\pm 0.0\text{mg}$ であり、唾液浸漬ブラケットの重量との差は認められなかった。図21に示すように、唾液浸漬前のブラケットに残留しているBPA(図21-A)、t-BuP(図21-B)とp-CP(図21-C)量はそれぞれ $7.0\sim 13.9\mu\text{g/g resin}$ 、 $0.1\sim 48.8\mu\text{g/g resin}$ 、 $0\sim 133.1\mu\text{g/g resin}$ であったが、一方、唾液浸漬後のブラケットに残留しているBPA、t-BuPとp-CP量はそれぞれ $31.1\sim 522.2\mu\text{g/g resin}$ 、 $0.0\sim 61.1\mu\text{g/g resin}$ 、 $0\sim 204.0\mu\text{g/g resin}$ と増加していた。特にその最大増加率はBPAでは約46倍、t-BuPで約1.3倍、p-CPで約1.5倍でBPAの増加率が顕著であった。

C-3. PVC製グローブから唾液への移行量

可塑剤であるDEHPを含有していると考えられるPVC製グローブを片面唾液に接触させ、唾液中へのDEHP及びその加水分解物であるMEHPを分析した。昨年度では検出されたDEHP量は約 $0.8\sim 2.3\mu\text{g/cm}^2$ 、MEHP量は約 $0.04\sim 0.47\mu\text{g/cm}^2$ であった(41)が、新たに本年度入手したPVC製グローブから唾液へのDEHP移行がどの程度変化しているかについて検討した。GC/MS分析条件では操作ブランクから $3.8\pm 0.5\text{ng/mL}$ のDEHPが検出されたが、MEHPではクロマトグラム上ではピークが検出されなかった。また、 10ng のDEHPを添加して、その添加回収を実施したところ、 $13.0\pm 0.2\text{ng/mL}$ でCVは1.6%