

平成14年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業)
研究成果報告書

適用する医薬品の脂溶性等とプラスチック
製医療用具に使用される可塑剤の溶出度の
相関性に関する研究
(H14- 医薬 -005)

| | | |
|-------|-------|--------------|
| 主任研究者 | 中澤 裕之 | 星薬科大学 |
| 分担研究者 | 薮島 由二 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| | 佐藤 温重 | 昭和大学歯学部 |
| | 掘 伸二郎 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| | 牧野 恒久 | 東海大学医学部 |

目 次

I. 総括研究報告書概要

II. 総括研究報告書

適用する医薬品の脂溶性等とプラスチック製医療器具に使用される
可塑剤の溶出度の相関性に関する研究

中澤裕之

III. 分担研究報告書

1. 高分子医療器具からの可塑剤溶出量の評価に関する研究

—DEHP 溶出量の予測—

中澤 裕之

薮島 由二

2. DEHP の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす 影響について

牧野 恒久

3. LC/MS/MS を用いたプラスチック製医療器具に使用される可塑剤の 動態解析

堀 伸二郎

4. 可塑剤の溶出動態に影響する要因の解析

佐藤 温重

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告書概要

研究費名称 = 厚生労働科学研究費補助金

研究事業名 = 医薬安全総合研究事業

研究課題名 = 適用する医薬品の脂溶性等とプラスチック製医療用具に使用される可塑剤の
溶出度の相関性に関する研究

国庫補助金精算所要額 (円) = 20,000,000 円

研究期間 (西暦) = 2002

研究年度 (西暦) = 2002

主任研究者 = 中澤 裕之 (星薬科大学)

分担研究者 = 佐藤 温重 (昭和大学)、牧野 恒久 (東海大学医学部)、
藪島 由二 (国立医薬品食品衛生研究所)、堀 伸二郎 (大阪府立公衆衛生研究所)

研究目的：プラスチック製医療用具には、種々の機能を付与させるために様々な添加剤が用いられ、可塑剤はその利便性から、プラスチック添加剤として最も多く利用されている。この様な可塑剤には、フタル酸エステル類が広く使用されており、中でもフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)は、全可塑剤生産量の約 50%以上を占めている。平成 13 年度厚生科学研究 (主任研究者:佐藤温重【分担研究者:中澤裕之】「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」において、現在医療機関で多く使用されているプラスチック製医療用具の代表的な可塑剤 DEHP に焦点を当て、溶出量について測定してきた。本研究においては、これらの成果を踏まえて DEHP だけでなく、この代謝分解産物等にも対象を広げ、併用される医薬品による DEHP 等の可塑剤の溶出力を医薬品の脂溶性を機軸に一元的な評価手法を開発するために、ガスクロマトグラフ/質量分析法、液体クロマトグラフ/質量分析法等のハイブリッドな最新機器を駆使した分析法を構築し、プラスチック製医療用具からの溶出挙動や脂溶性医薬品の影響等を究明する。

研究方法

- ①プラスチック製医療用具からの可塑剤溶出量の評価に関する研究：血液バッグ用 PVC シート (テルモ社製) を使用し、医薬品や界面活性剤との関連性を検討した。可溶化力：脂溶性色素として、スダン III, メチルイエローおよび 1,4-ジアミノアントラキノンを用いた。その後、各吸収極大における吸光度を測定した。静的接触角：種々の濃度の薬剤を PVC シート上に滴下し、同液滴の高さと幅を ERMA 接触角測定器により測定し、接触角を求めた。電気伝導度：種々の濃度の薬剤溶液を調製し、各溶液の電気伝導度を COS 伝導率メーターにより測定した。
- ②プラスチック製医療用具に使用される可塑剤の動態解析：分析利用した装置は、LC: Agilent 1100 及び MS/MS: API 3000 である。また、測定条件とは、逆相系 LC 条件で行い、MS/MS 条件として、インターフェイス (electrospray ionization; ESI) とした。対象試料としては、血液製剤を用いた。
- ③可塑剤の溶出動態に影響する要因の解析：粘膜調整材であるティッシュコンディショナーと軟質リライニング材であるソフテンを実験材料として用い、レジ系仮封材としては汎用されている DuraSeal、プラストシール、フィットシールを用いた。溶出検討として、ヒト唾液に浸漬した後、HPLC 測定を実施した。
- ④可塑剤の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響：インフォームドコンセントにより承諾を得た臍帯血造血幹細胞について、PCR などを用いて、ER の cDNA を増幅させ、2%アガロ

ースゲルを用いた電気泳動法により確認した。それに加え、DEHP の影響についても同様検討を重ねた。

結果と考察

(1) 脂溶性色素溶解力の測定においては、薬剤濃度の上昇に伴う吸光度変化率は、メチルイエローが最も高く、スダンⅢが最も低いことが確認された。本結果から、3種類の色素中では、メチルイエローが薬剤の可溶化力の相違を最も顕著に反映することが明らかになった。静的接触角の測定では、Tween® 80を除く薬剤は濃度上昇に従ってPVCシートに対する親和性が向上し、濃度依存的に接触角が小さくなる傾向がみられた。続いて、電気伝導度の測定を行った結果、サンディミュン®注射液、HCO-60、Tween® 80およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は、濃度上昇に伴い、導電率が上昇することが確認された。

(2) 血清ではフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)(MEHP)及びDEHPの濃度は操作ブランク値に近似した値となった。定量限界値以下であるが、標準用プール血清からは、MEHP及びDEHPが、それぞれ、 2154 ± 64 及び 2200 ± 46 ppbの濃度で検出された。従って、実際のMEHP及びDEHPの濃度は、共に22000 ppbとなる結果が得られた。

(3) 代表的なフタル酸エステルを含有する歯科材料の液成分を調べたところ、調べた製品の全てが可塑剤としてジ-n-ブチルフタル酸エステル(DBP)を使用していた。その含有量は液組成の38~85%であった。分析した一例として、1g用いた場合には3日間で約2.1 mgのDBPが溶出したことになる。よって一日当たりでは平均0.7 mgを摂取したことになる。体重が60 kgとすると推定一日摂取量は12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日である。小児に使用した場合を考え、小児の体重を20 kgとすると推定一日摂取量は35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日となる。何れも各国のTDI値よりも低値であった。

(4) 臍帯血造血幹細胞からRT-PCR法によりcDNAを合成し、制限酵素により、エストロゲンの核内レセプター(ER)発現の存在を確認した。その結果、電気泳動により、mRNAレベルでERが存在することが確認された。各化学物質を暴露させた後にERの発現に対してははっきりした影響がみられたため、コントロールと比較した結果、 10^{-6} mol/LのDEHPでは、エストラジオールと同様にER α (サブクラス)の発現を増加させる傾向がみられたが、 10^{-5} mol/LのDEHPでは、ER α の発現を減少させる傾向がみられ、また、両濃度のDEHPにおいて、ER β の発現を、エストラジオールとは逆に減少させる傾向がみられた。

結論

PVC製医療用具を対象としたDEHPの高精度な分析法を構築し、輸液バッグ等のPVC製医療用具の安全性評価を目的に、点滴等の医療行為からDEHPが溶出することを想定し、輸液を構成する医薬品の物性(脂溶性など)と溶出挙動との関連を検討し、溶出評価法の確立やリスク評価に活用できるデータの取得を行った。また、類似の様々な可塑剤について、活性評価の異なるバイオアッセイを駆使して生体影響や医療用具とした際の溶出挙動を調べ、現在用いられている物質の代替となるような可塑剤の探索を検討した。このアプローチにより安全性の高い医療用具の開発に活用しうるデータを取得するが達成できた。平成12年6月、厚生労働省は、DEHPを含む調理用PVC製手袋の使用を自粛するよう指導し、平成13年7月にはPVC製玩具へのDEHP及びフタル酸ジイソノニル(DINP)の使用を禁止した。食品衛生分野におけるDEHPの規制は、医療分野においても、DEHP含有当該製品を使用するにあたり、その安全性に対する再評価が必要である。PVC製医療用具の安全性に関しては現在、社会的な関心も高く、その安全性を評価するに不可欠な信頼おけるデータの集積が必要とされている。平成14年度10月、厚生労働省は『医薬品・医療用具等安全性情報 No.182』において、PVC製医療用具の使用について公表した。本研究事業の研究成果が、行政的処置に反映されたものであり、本プロジェクトが評価されたものである。それに加え、国際的にも行政発表としては、アメリカFDA及びカナダHealth CANADAに続く、迅速な行政的対応と考えられる。その上、更なる検討が必要であると思われる。

II. 総括研究報告書

主任研究者 中澤 裕之

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

適用する医薬品の脂溶性等とプラスチック製医療用具に使用される可塑剤の
溶出度の相関性に関する研究

| | | |
|-------|-------|-------------------|
| 主任研究者 | 中澤 裕之 | 星薬科大学 薬品分析化学教室 教授 |
| 分担研究者 | 牧野 恒久 | 東海大学医学部 教授 |
| 分担研究者 | 堀 伸二郎 | 大阪府立公衆衛生研究所 課長 |
| 分担研究者 | 佐藤 温重 | 昭和大学歯学部 客員教授 |
| 分担研究者 | 配島 由二 | 国立医薬品食品衛生研究所 室長 |

研究要旨

プラスチック製医療用具にはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) の可塑剤が多く使用されているが、血液や輸液等への溶出が懸念されている。本研究では、医薬品の脂溶性等と可塑剤の溶出液との相関性について解明し、より安全性の高い高度医療提供への貢献を目的とする。

①プラスチック製医療用具からの可塑剤溶出量の評価に関する研究

ポリ塩化ビニル (PVC) 製医療用具から溶出する可塑剤 (DEHP) 量について同用具に適用する医薬品の物性を指標として予測する簡易評価法の開発を検討した。2種類の脂溶性医薬品および3種類の界面活性剤に関して脂溶性色素溶解力、電気伝導度およびPVCシートに対する静的接触角を測定し、各種薬剤が示すDEHP溶出力と比較検討した。その結果、これら3種類の物性はDEHP溶出力と密接な関連性を有することが確認された。またPVC製医療用具からのDEHP溶出量は煩雑な溶出実験を行うことなく、薬剤の物性を測定することにより容易に予測できる可能性が示唆され、医療現場における安全対策の一助として期待される。

②プラスチック製医療用具に使用される可塑剤の動態解析

DEHPは、測定環境中に広く存在するため、コンタミネーションによって測定値の信頼性が損なわれる可能性がある。そこで抽出およびクリーンアップを簡略化し、高度な選択性を有するLC/MS/MSを活用して血漿または血清中のDEHPおよびフタル酸モノ(2-エチルヘキシル) (MEHP)の分析方法を開発した。DEHPおよびMEHPのコンタミネーションを排除した条件下で調製した血清中のDEHPおよびMEHPの濃度は、定量限界以下 (DEHP, 10 ppb; MEHP, 5 ppb)であった。一方、輸血バッグ中に保存されていた血漿からは、DEHPおよびMEHPがそれぞれ、14000および770 ppbの濃度で検出された。

③歯科材料中の可塑剤の溶出動態に影響する要因の解析

歯科材料に使用されているフタル酸エステル等の可塑剤の溶出挙動に及ぼす併用医薬品の影響を検討した。難溶性医薬品に添加されている溶解補助剤を加えた唾液に、市販のレジン系仮封材硬化体を浸漬し、ジ-n-ブチルフタル酸エステル (DBP) とモノブチルフタル酸エステル (MBP) をHPLCにて分析した。唾液に浸漬した粘膜調整材やレジン系仮封材硬化体溶出液を分析したところ、DBPとMBPが検出された。レジン系仮封材硬化体についてポリソルベート80を0.01~0.5%(w/v)含有する唾液に浸漬すると、その濃度に依存して総DBP溶出量は増加したが、MBP検出量は減少した。検討した歯科材料を難溶性医薬品と併用して子供の治療に使用した場合のDBPの推定一日摂取量は、TDIよりも低値であり、こ

れら歯科材料からの溶出物による重篤な健康障害を来すとは考えにくい。また、DBP の摂取を極力少なくすることが望ましい患者に対しては、レジン系仮封材には代替製品があることから、DBP 含有レジン系仮封材の使用は回避すべきであると考えられる。

④可塑剤の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響

近年、造血幹細胞移植に応用の試みられている臍帯血造血幹細胞は、その採取から移植に使用されるまでの一部の過程において血液バッグが使用される。一方、臍帯血造血幹細胞は、保存血として用いられる分化の完了した血球細胞とは異なりその機能は未熟で未知なものである。したがって、臍帯血造血幹細胞が PVC 製血液バッグ処理時に DEHP から何らかの影響を及ぼされることが危惧される。そこで、DEHP の「弱いエストロゲン様作用を持つ」という点に着目し、エストロゲン (E) の核内レセプター (ER) を臍帯血造血幹細胞で同定し、その発現調節への影響を検討した。臍帯血造血幹細胞には、RT-PCR と制限酵素切断法により、ER として2種のサブタイプ (ER α と ER β) がともに発現していることが確認された。その2種の ER のサブタイプに対する経時的な作用を、MCF-7 ヒト乳癌細胞を用いて検討したところ、DEHP は E とビスフェノール A (BPA) と同様に ER α を up-regulation するが、ER β に対する up-regulation 作用は DEHP のみにおいて認められなかった。

A. 研究目的

①プラスチック製医療用具からの可塑剤溶出量の評価に関する研究

ポリ塩化ビニル (PVC) 製医療用具は、耐久性や血液適合性などに優れていることから医療の場で広く用いられている。しかし、PVC 樹脂に柔軟性を与えるために添加される代表的な可塑剤であるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) は、齧歯類に対して精巢毒性や発生毒性を示すことが確認されている。PVC 製医療用具に含まれる DEHP は PVC 分子と化学的に結合されていないため、血液、脂溶性医薬品、経口・経腸栄養剤などを介して容易に体内に取り込まれる。このように、医学的治療において患者は比較的多量の DEHP に暴露される可能性があることが指摘されており、現在、DEHP に対する感受性が高いと考えられているリスク患者グループ (胎児、新生児、小児、妊婦) を中心とした健康被害が危惧されている。

PVC 製医療用具からの DEHP 溶出量を評価した報告は比較的多い。例えば、PVC 製医療用チューブおよび点滴セットを用いて脂溶性注射剤を患者に投与する際、可塑剤として含有されている DEHP が医薬品溶液中

に溶出し、患者体内に取り込まれることが知られている。また、米国 FDA (Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration) および Health CANADA は、現在までに報告された様々な知見に基づいて、PVC 製医療用具を用いた治療における DEHP 暴露に関するリスク評価を詳細に行っている。

厚生労働省は、日本において使用されている代表的な PVC 製医療用具からの DEHP 溶出量、同用具の必要性、緊急性、適用期間、リスク患者グループへの適用の有無や代替用具の存在の有無などを総合的に考慮して PVC 製品の再リスク評価を行った。その結果、平成 14 年 10 月、厚生労働省は、より良い医療行為を患者に提供するための重要な参考情報として、リスク患者グループへの PVC 製医療用具の適用に関する注意喚起や推奨事項を関係団体に通知するに至った⁶⁾。また、製薬業界に対しては PVC 製医療用具を介して脂溶性医薬品や栄養剤を適用する際の DEHP 溶出量を自主的に点検するよう要請している⁷⁾。

医学的治療に伴う患者の DEHP 暴露量を把握するためには、溶出実験を行う必要があ

る。しかし、同実験には高価な装置と高い分析精度が要求されるとともに、DEHPは試薬や環境中にも存在するため、分析試料の調製にも細心の注意を要する⁸⁾。そこで、このような煩雑な溶出試験を行うことなく、医療現場において容易且つ迅速にDEHP溶出量を評価することが可能となれば、より安全性の高い高度医療の提供が可能となる。

D. R. Jenkeの報告(pHや有機溶媒含量の異なる溶液、並びに数種の界面活性剤溶液によるPVC製容器からのDEHP溶出量を測定)に示されているように、PVC製医療用具からのDEHP溶出は、適用する医薬品溶液の性質に大きく影響される。

そこで本研究では、PVC製品に適用する医薬品の脂溶性色素溶解力、電気伝導度およびPVCシートに対する静的接触角を指標としてDEHP溶出量を予測する簡易評価法を確立することを目的とし、医療現場における安全性確認の一手法としての適用性を検討した。

②プラスチック製医療用具に使用される可塑剤の動態解析

塩化ビニル製樹脂を用いた医療器具から溶出したDEHPに輸液や透析を介してDEHPに暴露されるケースなどが危惧されている。新生児が体外循環酸化装置の回路から高濃度のDEHPの暴露を受けたことが原因と思われる壊死性の小児結腸炎⁴⁾や肺障害⁵⁾の発症の例の報告がある。また、透析によって血中のDEHPの濃度が上昇するとの指摘⁶⁾ならびに透析と嚢胞腎との関連性が疑われる⁷⁾との報告もある。正しく評価を行うためには、DEHPの医療用具からの溶出挙動および分解等の動態を高い精度で把握する必要がある。しかし、DEHPは測定環境中に広く存在し、コンタミネーションによって測定値の信頼性が損なわれる可能性がある。すなわち、分析対象試料から測定試料に到るまでの抽出およびクリーアップに用いる器具、溶媒、固相抽出カートリッジおよび誘導体化試薬等中に混在

するDEHPのコンタミネーションによって、測定値が歪められる。このコンタミネーションは、器具の完璧な洗浄と試薬を厳選することによって軽減させることは可能であるが、限界がある。さらにDEHPのコンタミネーションを低減化するためには、抽出およびクリーアップを簡略化することが有効であると考えられる。しかしながら、クリーアップの簡略化は、測定試料中のマトリックスの増加を意味する。そのため、分析機器に測定対象物質に対する高度な選択性を有することが要求される。タンデム型質量分析計を装着した液体クロマトグラフ(LC/MS/MS)は、測定対象物質に由来するイオン(precursor ion)を選別した後、さらに窒素分子等との衝撃を与えて得たイオン(daughter ion)をさらに選別してモニタリングするという高い選択性を有している。このLC/MS/MSの特性をDEHPの測定に応用し、高い精度を保った測定値を得ることを目指した。また、DEHPは、生体試料中に存在するエステラーゼ/リパーゼ活性によってフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)(MEHP)に分解される(図1)。このため、DEHPの動態解析においては、DEHPとともにMEHPも測定する必要がある。MEHPは、極性が高いためGC/MSの分析では誘導体化が必要となり、コンタミネーションの機会が増える。一方、LCでは誘導体化の必要がなく、この点においてLC/MS/MSは、GC/MSよりも有利である。

③歯科材料中の溶出動態に影響する要因の解析

DEHP, CAS No: 117-81-7)に関して生殖・発生毒性の懸念が指摘されている。2002年の米国NTP-CERHRのジ-n-ブチルフタル酸エステル(DBP, CAS No: 84-74-2)に関する報告案で発生・生殖毒性に関して「Some evidence of adverse effects」、同様に胎児発生毒性に関しても「Some concern for adverse effects」と記載され、2000年度のNTP-CERHR報告の「minimal concern」に比

べ、DBP 毒性の懸念が高まってきている。

DBP の多くは可塑剤、溶媒、接着剤などで使用されている。日本においては食品関連で添加物としては現時点では使用禁止となっているが、米国などではアイスクリームやシャーベットなどに食品添加物として使用されている。ポリマー製の医療用具では可塑剤として DBP の使用例は少ないが、歯科領域ではこの DBP 以外のフタル酸エステル類としてブチルフタルイルブチルグリコレート(BPBG, CAS No: 85-70-1)などが使用されている。これらフタル酸エステル類の使用されている歯科材料は軟質裏層材、粘膜調整材、レジン系仮封材などでそれら液成分中に含有されている。これらの歯科材料に加えて微量成分として歯科用有機材料に使用されている場合もある。

歯科治療で使用される材料で発生・生殖毒性に着目すると、レジン系仮封材の毒性が懸念される。従って、本研究の目的の1つは口腔内模擬環境下としてヒト唾液を溶出溶媒として用い、レジン系仮封材および粘膜調整材からのフタル酸エステル類の溶出量を測定し、実態に則した暴露量を求めることである。更に口腔カンジダ症や食道カンジダ症などで使用されている医薬品の添加物としてポリソルベート 80(Tween 80, CAS No: 9005-65-6)が使用されているので、ポリソルベート 80 存在下におけるレジン系仮封材からのフタル酸エステル類溶出量についても検討を加えた。

④可塑剤の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響

厚生労働省は、食品用塩化ビニル手袋や新生児を対象とした玩具等の可塑剤として使用されている DEHP 等について TDI を設定し、これらの製品に対して使用を規制した。輸液バッグや血液バッグ等の医療用具においても、当該可塑剤の濃度は高く、血液や輸液等を介して体内に取り込まれる可能性が危惧される。従って、様々な医療行為を通して、直接ヒト生体内にこれら化

学物質が取り込まれる可能性が懸念されることから、そのリスク評価が必須であると考へて本研究プロジェクトに参画した。

DEHP は PVC 製血液バッグの可塑剤であり、保存血の採取・保存において、その簡便さから汎用されている。そこで、PVC 製血液バッグの血球細胞に対する影響を、臍帯血造血幹細胞を用いて検討した。

臍帯血造血幹細胞は、近年造血幹細胞移植に応用する試みがなされており、その採取から移植までの一部の過程において血液バッグが使用される。臍帯血造血幹細胞は、保存血に用いられる分化の完了した血球細胞とは異なり、その機能は未熟で未知なものである。したがって、臍帯血造血幹細胞が PVC 製血液バッグ保存時に DEHP により何らかの影響を及ぼされることが危惧される。特に、DEHP の「弱いエストロゲン様作用を持つ」という点に着目し、エストロゲンの核内レセプター (ER) を臍帯血造血幹細胞で同定し、その2種のサブタイプ (ER α と ER β) についての発現変化を mRNA レベルでの探究を目的した。

また、現在、エストロゲン自身のその作用発現機構について、ER を介してから作用を発現するまでの間には未解明の部分が多い。エストロゲンは女性ホルモンの一種であり、女性の生殖器への作用が主であるが、脳、心血管、骨、皮膚等にも作用を示すことが報告されており、骨粗鬆症、心筋梗塞、高血圧症などとの関連も懸念されている。エストロゲンの作用発現機構における未解明な部分を解明することは、多くの疾患の解明、治療につながると考えられている。また、ビスフェノール A (BPA) のようにエストロゲン様作用を示すと報告されている物質の作用発現機構を解明することも必要である。本研究では、「DEHP のエストロゲン様作用についての遺伝子レベルでの基礎的検討」とともに、E2, BPA を用いて、「ER を介するエストロゲン作用の発現機構解明に対する基礎的検討」を同時に行った。

B. 研究方法

①プラスチック製医療用具からの可塑剤溶出量の評価に関する研究

1. 材料および試薬

血液バッグ用 PVC シート (テルモ社製) は、縦 1 cm, 横 3 cm, 厚さ 0.4 mm に型抜いて使用した。医薬品としては、サンディミュン®注射液 (シクロスポリン: ノバルティスファーマ社製), プログラフ®注射液 (タクロリムス水和物: 藤沢薬品工業社製) を用いた。これらの医薬品は両社より研究用試料として提供された。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 (HCO-60), ポリソルベート 80 (Tween® 80) およびラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を用いた。DEHP および DEHP-d₄ 標準品は、関東化学から購入した。ヘキサソルブおよびメタノールはフタル酸エステル分析用グレード (関東化学), ジエチルエーテルはダイオキシン類分析用グレード (和光純薬), また抽出溶液希釈用の蒸留水として, HPLC グレード (和光純薬) を使用した。塩析にはフタル酸分析用塩化ナトリウムを使用し, 脱水用試薬としては, PCB・フタル酸試験用無水硫酸ナトリウム (和光純薬) を用いた。実験に用いた全てのテフロン製, ガラス製, 金属製器具類は, 250°C で 10 時間以上加熱した後使用した。

2. 可溶化力の測定

脂溶性色素としては, スダンⅢ (純度 95%: シグマ・アルドリッチ), メチルイエロー (特級: 和光純薬) および 1,4-ジアミノアントラキノン (純度 98%: 東京化成工業) を用いた。各色素 5 mg に種々の濃度の医薬品および界面活性剤を 1 ml 添加し, 10 分間超音波処理を行った後, 遠心分離 (3,000 rpm x 10 min) した。上清をメンブランフィルター (ポアサイズ 0.2 μm) により濾過した後, その 0.1 ml を 96 穴プレートに分注し, μQuant (BIO-TEK INSTRUMENTS 社製) を用いて 530 nm (スダンⅢ), 450 nm (メ

チルイエロー) および 590 nm (1,4-ジアミノアントラキノン) における吸光度を測定した。

3. 静的接触角の測定

種々の濃度の薬剤 (10 μl) を PVC シート上に滴下し, 90 秒後に同液滴の高さと幅を ERMA 接触角測定器 (G-1-1000) により測定した。接触角 (δ) は以下の計算式から求めた。

$$L^2 = (w/2)^2 + (1-h)^2$$

$$\sin \delta = (w/2)/L$$

L: 液滴の半径 (mm)

w: 液滴の幅 (mm)

h: 液滴の高さ (mm)

δ: 接触角

3. 電気伝導度の測定

種々の濃度の薬剤溶液を調製し, 各溶液の電気伝導度 COS 伝導率メーター (CEH-12) を用いて測定した。

4. DEHP 溶出試験

種々の濃度の試験液 (医薬品および界面活性剤溶液) 5 ml に PVC シートを浸析し, 室温下, 2 時間振とう抽出した。抽出液 0.1 ml をサンプリングし, 最終容量 2 ml になるように蒸留水を加え, 食塩および 50 ppb の DEHP-d₄ ジエチルエーテル溶液 5 ml を添加した後, 30 分間振とう抽出した。遠心分離 (3,000 rpm x 10 min) 後, 有機層を採取し, 無水硫酸ナトリウムで脱水した後, GC-MS 用試料とした。本抽出法による DEHP 回収率は, DEHP-d₄ 絶対検量線 (0.1 - 50 ppb) を用いて計算した。DEHP の定量は, DEHP / DEHP-d₄ 相対検量線 (0.1 - 200 ppb / 50 ppb) を用いて行った。また, バックグラウンド解析を行い, 検量線の補正を行った。

5. GC-MS 分析条件

質量分析装置は, 磁場型高分解能質量分

析計 JEOL JMS700 を使用し、分解能 3,000 で測定した。得られた SIM クロマトグラムはテキスト変換後、FUMI (Function of Mutual Information) 理論を実践するプログラム TOCO (Total Optimization of Chemical Operations) を使用して解析した。

6. 倫理面への配慮

ヒトおよび動物由来の組織、臓器、細胞および血液などを使用していないため、特段、倫理面に配慮していない。有機溶媒の取り扱いと廃棄は国立医薬品食品衛生研究所・有害物質等取扱規定に従って行った。

②プラスチック製医療器具に使用される可塑剤の動態解析

1. 試薬等

試薬：アセトン、ヘキサンおよびアセトニトリルは、和光純薬製（環境分析用）を用いた。DEHP（関東化学製）、d₄-DEHP（ケンブリッジアイソトープラボラトリー社製）、MEHP（林純薬製）および d₄-MEHP（ケンブリッジアイソトープラボラトリー社製）を購入した。ガラスおよびステンレス製の器具は、溶媒で洗浄後、200℃で 2 時間以上加熱し、清浄な場所で冷却して用いた。血清は、清浄なガラス器具およびステンレス製採血針を用いて研究所内ボランティア（男性、20 歳代）から得た。輸血バッグ中に保存した血漿は、使用期限が越えたものを日本赤十字社から得た。臨床検査標準用プール血清（コンセーラ N）は、日水製薬から購入した。ヘキサン洗浄水は、Milli Q 水をヘキサンの洗浄することによって調製した。その中に含まれる MEHP および DEHP の濃度は、それぞれ、1 ppb 未満および 1 ppb であった。

2. 機器

LC:は Agilent 1100 シリーズ; バイナリポンプ (G1312A); ウェルプレートオートサンプリング (G1367A); カラム恒温槽 (G1316A);

デガッサー (G1379A) を、MS/MS は API 3000 (アプライドバイオシステムズ) を用いた。

3. 測定試料の調製

血清（血漿）0.5 g にサロゲート (50 ng) を 10℃以下で添加攪拌後、アセトン 4 ml を加えて 5 分間振とう攪拌し、遠心分離により上清を得た。沈殿物に対してアセトン 1 ml を加えて超音波を 2 分間照射後 5 分間振とう攪拌し、遠心分離により上清を得た。この上清と先の上清を併せて窒素気流下で乾固させた。次にヘキサン洗浄水 0.5 ml および酢酸 4 μl を加えて、超音波を 2 分間照射した。ヘキサン 1 ml を加えて 5 分間振とう攪拌し、遠心分離後、ヘキサン層を回収した。同様にヘキサン抽出を 3 回繰り返した。ヘキサン抽出物を窒素気流下、乾燥させ、アセトニトリル 0.5 ml に再溶解して測定試料とした。

4. 分析条件

LC 条件：カラム：Wakosil-II 3C18, 2.0 x 150 mm; 溶出液：0.05% 酢酸水溶液 (A) およびアセトニトリル (B); 溶出条件：A/B (2/8), イソクラティック; 流速：2 μl/min; カラム温度：50℃; インジェクト量：5 μl

モニターイオンの選択は、1000 ppb の MEHP または DEHP を MS/MS に直接導入し、Analyst Software (v. 1.2) を用いて条件を最適化した。

MS/MS 条件：インターフェイス：ターボイオンスプレー™ (electrospray ionization; ESI); イオン化電圧：±4000 V; 温度：500℃; モニターイオン (Mode, Precursor ion/Daughter ion)：DEHP (Positive, 391/149), MEHP (Negative, 277/134), d₄-DEHP (Positive, 395/153), d₄-MEHP (Negative, 281/138) 定は絶対検量線法で行った。

5. 倫理面への配慮

分析方法の開発には、臨床検査用標準プール血清および使用期限が切れた輸血用血漿を用いた。また、対照とした血清は、倫

理規定に則って文書および口頭で研究の主旨を説明し、同意を得た大阪府立公衆衛生研究所内のボランティアから提供された。また、研究に使用した試薬等は環境中に排出されないよう回収を徹底した。

③歯科材料中の溶出動態に影響する要因の解析

粘膜調整材であるティッシュコンディショナーと軟質ライニング材であるソフトンを実験材料として用い、レジン系仮封材として汎用されている DuraSeal, プラストシール, フィットシールを用いた。液成分中のフタル酸エステル量を測定するためそれぞれ材料の液をアセトニトリルに適量希釈し、試料とした。

硬化体からの溶出にはティッシュコンディショナー, DuraSeal, プラストシールを用いた。硬化体試料作製はティッシュコンディショナーでは粉液比を 1.2 とし, DuraSeal とプラストシールでは粉液比を 2 とした。液と粉をテフロン製ビーカー中で混合後、速やかに練和物をテフロン製の型（内径 5mm, 深さ 3mm）に填入した。填入後、テフロン板で圧接し、1 時間後に重量を秤量し、ヒト唾液に浸漬した。浸漬条件は 37℃ で 100 回転の水平振盪とした。HPLC の分析条件はガードカラムとして CAPCELL C₁₈ UG120 (2x10mm, 資生堂), 分離カラムとして Inertsil C8-3(2.1x250mm, GL サイエンス) を用い、移動相は蒸留水/アセトニトリル混合液、カラム温度は 40℃, 流量は 0.2 l/min とした。主にフタル酸エステル分析のために紫外部の検出波長は 217nm と 254nm 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。試料数は 5 例とした。

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 3000 rpm で 15 分間遠心した。得られた上清を滅菌するためにボルトトップフィルター（旭テクノグラス, 0.22μm）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。試薬等に用いた蒸留水はフタル酸エステル不含有を使用した。

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洗浄後、230℃で 10 時間以上乾熱したものをを用いた。

④可塑剤の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響

1. 実験用造血幹細胞

実験に使用した臍帯血造血幹細胞は、インフォームドコンセントにより承諾を得た妊婦の臍帯から出産後に採取し、東海大学の臍帯血バンクに集められたもののうち、移植に使用するためには採取量が過少なため、研究用に提供されたものである。研究用に提供を受ける臍帯血は、臍帯血を用いる研究者による週一回の定例会議で申請が検討され、割り当てられる。血幹細胞の表面には CD34 と呼ばれる糖タンパク質が選択的に発現している。この CD34 をマーカーとして、臍帯血から造血幹細胞を分離する。実際には、臍帯血から Ficoll-Paque PLUS を用いて抽出した単核細胞に CD34 に対する磁気ビーズつき抗体を反応させ、細胞分離システム (MACS) を用いて、造血幹細胞を分離する。

2. 造血幹細胞の ER の存在の有無

臍帯血から分離した造血幹細胞から強力なタンパク変性作用を有する Isogen により Total RNA を抽出し、DNase 処理し、

逆転写して cDNA を作製する。これを PCR により ER α 、ER β の cDNA を増幅させ、2%アガロースゲルを用いた電気泳動法により確認した。さらに、電気泳動法により得られたバンドが目的とする ER α 、ER β であることを確認するためにバンド部分のゲルを切り出し、制限酵素である Sau96I により、ER α では 151bp のバンドが 99bp、52bp に、ER β では 201bp のバンドが 92bp、74bp、35bp に切断されることを確認した。

3. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System による遺伝子レベルでの解析

175 cm² 組織培養フラスコ 1 枚にサブコンフルエントになった、MCF-7 ヒト乳癌細胞を Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; in phenol red, high glucose) を用いて 10 cm dish に均等になるように播き、24 時間後に DMEM (without phenol red, high glucose) を用いて Medium 交換を行い、同時に被検物質 (E2: 終濃度 10⁻⁸~10⁻¹⁰mol/l, DEHP, BPA: 終濃度 10⁻⁵~10⁻⁶mol/l) を dish 4 枚ずつに添加した。これは、各被検物質添加後、6 時間、10 時間、24 時間後の Estrogen receptor の発現の変化を見るためである。また、この際、無添加の dish 4 枚を control として用意した。被検物質添加時を 0 時間として、6、10、24 時間後に Isogen を用いて各 dish から細胞を剥離して、抽出した mRNA から AGPC 法により cDNA を作製し、試料とした。

被検物質が MCF-7 ヒト乳癌細胞の ER α 、ER β の発現量に及ぼす影響を検討するために、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems 社製) を用い、定量的リアルタイム RT-PCR 法により検討した。この測定の際、サンプルを β -actin により補正して用いた。

4. 倫理面への配慮

医療行為によるプラスチック製医療用具由来化学物質の暴露は、社会的に関心の高い検討課題であるため、事前に充分その意

義を説明し、同意が得られた症例のみ実施する。得られた結果の公表についても社会的反響を考慮し、慎重を期す。各業界および臨床現場の混乱を生じないためにも十分な配慮が必要である。

ヒト臍帯血造血幹細胞の採取は東海大学血液バンクで実施され、各当該機関における倫理委員会等の承認を得て実施した。当該機関においては、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する利益・不利益等の説明を行い、理解 (インフォームドコンセント)、同意 (署名) を得ている。また、個人の氏名、情報等が漏出しないよう万全の配慮をされている。

分析担当の当該機関においては、有害化学物質を研究施設から環境中へ排出しないために、廃液等はすべて回収し、専門処理業者に委託廃棄されている。

C. 研究成果

①プラスチック製医療用具からの可塑剤溶出量の評価に関する研究

1. 分析精度と DEHP 回収率

DEHP-d₄ 絶対検量線および DEHP/DEHP-d₄ 相対検量線の相関係数は 0.9941 であった。同検量線を利用して検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) を TOCO により解析した結果、LOD は 0.05 ppb、LOQ は 0.16 ppb であった。50 ppb の DEHP-d₄ を内標準物質として使用した際のバックグラウンド解析を行った結果、1.9 \pm 0.2 ppb の DEHP が検出されたことから、DEHP の実質的な LOD と LOQ は、2.5 ppb および 4.0 ppb であることが判明した。バックグラウンド値に基づきブランク補正を行って作成した DEHP/DEHP-d₄ 相対検量線の相関係数は、0.9999 であり、精度の高い分析を行うことが可能であることが確認された。また、内標準物質として添加した DEHP-d₄ (50 ppb) の回収率を DEHP-d₄ 絶対検量線から計算した結果、本実験で使用した抽出法における DEHP 回収率は 98.5 \pm 8.0 であることが明らかになった。

2. DEHP 溶出力の測定

薬剤の濃度と DEHP 溶出量には明確な相関性が認められ、薬剤濃度の上昇に伴い、濃度依存的に DEHP 溶出力も増大されることが判明した。

3. 脂溶性色素溶解力の測定

3 種類の色素は、いずれも医薬品濃度に依存して吸光度が顕著に上昇する傾向が見られた。また、界面活性剤溶液においても同様な結果が得られた。薬剤濃度の上昇に伴う吸光度変化率は、メチルイエローが最も高く、スダンⅢが最も低いことが確認された。本結果から 3 種類の色素中では、メチルイエローが薬剤の可溶化力の相違を最も顕著に反映することが明らかになった。

4. 静的接触角の測定

PVC シートに対する各種薬剤の静的接触角を測定した。Tween® 80 を除く薬剤は濃度上昇に従って PVC シートに対する親和性が向上し、濃度依存的に接触角が小さくなる傾向がみられた。一方、Tween® 80 の場合、指数近似曲線は他の薬剤と同様の形状を示したが、濃度上昇に伴い接触角が一度上昇し、その後、再び低下する現象が見られた。

5. 電気伝導度の測定

各種薬剤の電気伝導度を測定した。サンディミュン®注射液、HCO-60、Tween® 80 および SDS は、濃度上昇に伴い、導電率が上昇することが確認された。中でもイオン性界面活性剤である SDS は、濃度依存的に最も顕著に電気伝導度に変動した。一方、プログラフ®注射液の場合、電気伝導度が非常に低く、薬剤濃度と導電率間に顕著な関連性は認められなかった。

②プラスチック製医療器具に使用される可塑剤の動態解析

1. モニターイオンおよび検出限界値

MEHP および DEHP のマススペクトラムからそれぞれ、 m/z 277 および 391 に $[M-H]$ および $[M+H]^+$ イオンピークが認められた。これらを precursor ion として得られる、それぞれ、 m/z 134 および 149 を daughter ion としてモニタリングした。

MEHP および DEHP の検出限界値を MRM (Multiple Reaction Monitoring) において S/N 比が 3 以上となる 1 ppb とした。

2. 添加回収試験

コンタミネーションを極力排除した条件下で調製したヒト血清に d_4 -MEHP および d_4 -DEHP を 100 または 20 ppb 添加して回収率を評価した結果、 d_4 -MEHP および d_4 -DEHP とともに 93~103% の範囲になった。

3. 操作ブランク値

ヘキサン洗浄水 (MEHP, 1 ppb 未満; DEHP, 1 ppb 含有) に対して前記の方法に従って測定試料を調製した。MEHP および DEHP の測定値は、それぞれ、1 ppb 未満および 4.8 ± 0.9 ppb であった。この値は、ヘキサン洗浄水中の濃度を含んでいる。よって、本法の MEHP および DEHP の操作ブランク値を、それぞれ 1 ppb 未満および 5 ppb とした。

4. 検量線および定量限界値

MEHP および DEHP の検量線はそれぞれ、5~1000 ppb の範囲で直線性を示した。MEHP および DEHP の定量限界値は、それぞれの検量線が直線性を示し、かつ前記の操作ブランク値の 2 倍の濃度以上となる、5 および 10 ppb とした。

5. 血清、プール血清 (臨床検査標準用) および血漿 (輸血バッグ中保存) の分析

予備実験から臨床検査標準用プール血清 (以下、標準用プール血清) および輸血バッグ中に保存した血漿 (以下、輸血バッグ中保存血漿) 中に高濃度で MEHP および DEHP が存在していることが認められた。

従って、これら試料については、ヘキサン洗淨水で 10 倍に希釈して測定した MEHP および DEHP のコンタミネーションがない条件で採取および調製した血清には、MEHP および DEHP が認められなかった。一方、輸血バッグ中保存血漿からは、DEHP のピークが認められた。また、標準用プール血清からは、MEHP および DEHP の存在が認められた。

血清では MEHP および DEHP の濃度は操作ブランク値に近似した値となった。これは定量限界値以下であるが、検量線を外挿して算出した結果、それぞれ、 3.7 ± 1.5 および 7.0 ± 2.6 ppb であった。これらの数値には操作ブランク値を含んでおり、実際の血清中の濃度は 5 ppb 未満となる。ヘキサン洗淨水で 10 倍に希釈した輸血バッグ中保存血漿からは、MEHP および DEHP が、それぞれ、 76.6 ± 1.5 および 1410 ± 10 ppb の濃度で検出された。従って、実際の MEHP および DEHP の濃度は、770 および 14000 ppb となる。また、同様にヘキサン洗淨水で 10 倍に希釈した標準用プール血清からは、MEHP および DEHP が、それぞれ、 2154 ± 64 および 2200 ± 46 ppb の濃度で検出された。従って、実際の MEHP および DEHP の濃度は 22000 ppb となる。

6. MEHP の代謝物の探索

MEHP (2×10^{-3} mol/l) をラット S-9 で 37°C で 1 h 処理し、酢酸エチルで抽出したものをネガティブスキャンモードで分析した結果、代謝物 (Metabolite 1) のピークが認められた。マススペクトラムを調べた結果、 m/z 293 にベースピークが認められた。

③歯科材料中の溶出動態に影響する要因の解析

1. 歯科材料液成分の分析

粘膜調整材・軟質ライニング材およびレジン系仮封材の試料名をそれぞれ A, B, C, D, E とした。それぞれ試料の液をアセトニトリルで希釈後、50%アセトニトリル

–50%蒸留水で希釈して HPLC の試料とした。A~E の液では検出されたフタル酸エステルは DBP のみであった。それぞれの液成分中の DBP 含有量は A では 84.8%, B では 49.1%, C では 37.9%, D では 44.6%, E では 38.7% であった。そこで唾液浸漬に用いる材料として、DBP 含有量、治療で使用されている汎用性を考慮して A, C, D を採用した。

2. 唾液に浸漬した硬化体試料からの DBP 溶出動態

人工唾液などの塩類溶液で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硬化体から DBP 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、DBP およびその代謝物であるモノブチルフタル酸エステル (MBP, CAS No: 131-70-4) の分析を検討した。MBP, BPBG, DBP の検出には 217 nm の紫外部吸収を用いると、検出・定量限界値は小さくなるが、217 nm では唾液由来成分との分離が不可能なため 254 nm を用いた。

500 ng/ml の標準溶液を用いて装置の再現性について検討したところ、MBP は 495.6 ± 1.2 ng/ml ($99.1 \pm 0.24\%$)、BPBG は 502.6 ± 1.8 ng/ml ($100.5 \pm 0.36\%$)、DBP は 501.9 ± 1.9 ng/ml ($100.4 \pm 0.38\%$) であった。これから検出限界値は MBP, BPBG と DBP はそれぞれ 3.6 ng/ml, 5.4 ng/ml, 5.7 ng/ml であり、定量限界値は何れも 50 ng/ml であった。

唾液に 100 ng/ml の MBP-BPBG-DBP 標準混合液を添加して、添加回収を検討した。MBP では 101.5 ± 4.6 ng/ml, BPBG では 102.1 ± 4.7 ng/ml, DBP では 102.5 ± 3.1 ng/ml となり、検出限界値はそれぞれ 14 ng/ml, 14 ng/ml, 10 ng/ml であり、定量限界値はそれぞれ 46 ng/ml, 47 ng/ml, 31 ng/ml であった。用いた唾液中には MBP, BPBG, DBP は検出されなかったことから、もし唾液中に存在していたとしても検出限界値以下で

あると考えられる。

硬化体を唾液に浸漬し、1, 2 時間、1, 3, 7 日に唾液を全量交換した。用いた A の重量は 131.3 ± 0.5 mg で、唾液浸漬後 1 時間で DBP 溶出量は 60.7 ± 0.7 $\mu\text{g/g}$ レジン、MBP 検出量は 29.8 ± 0.9 $\mu\text{g/g}$ レジンであった。DBP はエステル結合があり、唾液のエステルを加水分解する酵素により、MBP に代謝されたため、実際の DBP 溶出量は DBP と MBP の和になる。従って、実際の DBP 総溶出量は 98.0 ± 7.8 $\mu\text{g/g}$ レジンであった。DBP 検出量は経時的に減少しているが、一方、MBP は増加した。唾液浸漬 2 時間では DBP と MBP 検出量が 1 時間唾液浸漬に比べて見かけ上減少しているのは、硬化体試料表面に存在する DBP が唾液浸漬 1 時間で唾液に移行しているためと考えられる。3 日間の DBP 総溶出量は約 2.1 mg/g レジン、7 日間では 5.4 mg/g レジンであった。

同様に C の用いた重量は 141.4 ± 0.9 mg であり、唾液浸漬 1 時間後では DBP 検出量は 26.8 ± 7.2 $\mu\text{g/g}$ レジン、MBP 検出量は 16.7 ± 1.7 $\mu\text{g/g}$ レジンであったことから、DBP 溶出量は 47.6 ± 9.3 $\mu\text{g/g}$ レジンであった。A と同様に DBP 検出量は経時的に減少しているが、MBP は DBP とは異なり経時的に増加していた。唾液浸漬 2 時間では DBP と MBP 検出量は、唾液浸漬 1 時間と比べて検出量が低下していた。7 日間の DBP 総溶出量は 1.6 mg/g レジンであった。D の重量は 139.1 ± 0.8 mg であり、唾液浸漬 1 時間の DBP 検出量は 40.8 ± 5.8 $\mu\text{g/g}$ レジンで、MBP 検出量は 18.2 ± 0.9 $\mu\text{g/g}$ レジンであった。DBP 検出量は経時的に減少しているが、MBP は DBP とは逆に経時的に増加した。7 日間の DBP 総溶出量は 4.5 mg/g レジンであった。

3. ポリソルベート 80 含有唾液に浸漬した C 硬化体試料からの DBP 溶出動態

7 日間の DBP 総溶出量は $A > D > C$ となった。難溶性医薬品溶解補助剤であるポリソルベート 80 含有唾液を用いての DBP 溶出動態を検討するに当たり、C 硬化体を選択

した根拠は、(1)レジン系仮封材であり、適応年齢に制限がないこと、(2)液成分が単純組成であることである。また用いたポリソルベート 80 の濃度は、その CMC および難溶性医薬品の溶出試験などで使用されている濃度、および食品に添加されている濃度などを考慮して、0.01, 0.05, 0.1, 0.5% (w/v) を採用した。ポリソルベート 80 含有唾液浸漬に用いた C の重量は 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5% でそれぞれ 141.7 ± 2.2 , 143.7 ± 1.0 , 145.4 ± 1.3 , 145.4 ± 1.3 mg であり、用いた材料の重量には重量変動差は認められなかった。

浸漬 1 時間の DBP 検出量は 26.7 ± 1.8 $\mu\text{g/g}$ レジン、MBP 検出量は 15.1 ± 0.6 $\mu\text{g/g}$ レジンと前述の実験結果とほぼ同じ値が得られた。24 時間の総 DBP 溶出量は約 367 $\mu\text{g/g}$ レジンであった。0.01% ポリソルベート 80 含有唾液では浸漬 1 時間の DBP 検出量は 37.1 ± 4.3 $\mu\text{g/g}$ レジン、MBP 検出量は 13.0 ± 0.7 $\mu\text{g/g}$ レジンで MBP 検出量が対照群に比べて減少していた。24 時間の DBP 総溶出量は約 373 $\mu\text{g/g}$ レジンであった。0.05% ポリソルベート 80 含有唾液では浸漬 1 時間の DBP 検出量は 52.2 ± 4.8 $\mu\text{g/g}$ レジン、MBP 検出量は 9.5 ± 0.6 $\mu\text{g/g}$ レジンと対照群に比べて MBP 検出量は顕著に減少していた。24 時間の DBP 総溶出量は約 473 $\mu\text{g/g}$ レジンと対照群に比べて顕著に増加していた。0.1% ポリソルベート 80 含有唾液では浸漬 1 時間の DBP 検出量は 68.3 ± 9.2 $\mu\text{g/g}$ レジン、MBP 検出量は 8.5 ± 0.6 $\mu\text{g/g}$ レジンと対照群に比べて MBP 検出量は顕著に減少していた。24 時間の DBP 総溶出量は約 600 $\mu\text{g/g}$ レジンと対照群に比べて顕著に増加していた。0.5% ポリソルベート 80 含有唾液では浸漬 1 時間の DBP 検出量は 337.3 ± 16.3 $\mu\text{g/g}$ レジン、MBP 検出量は、 7.5 ± 0.6 $\mu\text{g/g}$ レジンと対照群に比べて MBP 検出量は顕著に減少していた。浸漬 2 時間では DBP が検出されたが、MBP は検出限界以下であった。このことはポリソルベート 80 によって唾液中の加水分解酵素が大きく失活し、活性のある酵素

が少なくなっているためと考えられる。24時間のDBP総溶出量は約1444 µg/gレジンと対照群に比べて約4倍増加していた。

④可塑剤の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響

1. ER α , ER β の存在の有無

臍帯血造血幹細胞からRT-PCR法によりcDNAを合成し、2%アガロースゲルを用いた電気泳動のバンドを切り出して制限酵素により、ER α , ER β の存在を確認した。その結果、電気泳動により、ER α の長さ201bp, ER β の長さ196bpのバンドが見られた。また、そのバンドを制限酵素Sau96Iで処理をした。ER α では151bpのバンドが99bpと52bpに切断され、ER β では201bpのバンドが92bp, 74bp, 35bpに切断されることが確認できた。そのため、そのバンドがER α , ER β のものであることが推定でき、臍帯血造血幹細胞には、mRNAレベルでER α , ER β が存在することが確認された。

2. ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemによる遺伝子レベルでの解析

DEHP, E2, BPAがMCF-7ヒト乳癌細胞のER α , ER β の発現に及ぼす影響をコントロール6時間に対する相対発現量として表した。以下の結果の数値は、コントロール6時間のThreshold Cycle(Ct)値を1とし各試料のCt値より換算したものである。

2-1. DEHP, E2, BPAのコントロール6時間値に対する相対発現量

・ER α の発現について

コントロールについては、10時間値が0.462, 24時間値が29.897という結果が得られた。E2については、10⁻¹⁰ mol/lでは、6時間値が0.548, 10時間値が2.039, 24時間値が37.696という結果が得られた。また、DEHPについては、10⁻⁶ mol/lでは6時間値が2.483, 10時間値が0.944, 24時間値が37.696, また、BPAについては、10⁻⁶

mol/lでは、6時間値が0.007, 10時間値が2.612, 24時間値が37.581であった。また10⁻⁵ mol/lでは、6時間値が0.004, 10時間値が0.001, 24時間値が37.581という結果が得られた。

・ER β 発現について

コントロールについては、10時間値が0.027, 24時間値が13.581という結果が得られた。E2については、10⁻¹⁰ mol/lでは、6時間値が0.013, 10時間値が0.009, 24時間値が172.055であった。また、DEHPについては、10⁻⁶ mol/lでは、6時間値が0.069, 10時間値が0.317, 24時間値が0.001であった。BPAについては、10⁻⁶ mol/lでは、6時間値が0.010, 10時間値が0.305, 24時間値が76.899であった。

2-2. E2の結果に対するDEHP, BPAの動向

ER α の発現について、DEHPは10⁻⁶ mol/lにおいてE2と類似の動向がみられた。また、BPAでは、10⁻⁵ mol/l, 10⁻⁶ mol/lの両濃度において、E2と類似の動向がみられた。ER β の発現について、DEHPでは、10⁻⁵ mol/l, 10⁻⁶ mol/lの両濃度において、E2と逆の動向がみられた。

2-3. コントロールの結果に対するDEHP, E2, BPAの発現量

コントロールの24時間値の結果をそれぞれの化学物質の結果と比較すると、E2, BPAでは、ER α , ER β の両レセプターの発現を増加させる傾向がみられた。10⁻⁶ mol/lのDEHPでは、E2, BPAと同様にER α の発現が増加する傾向がみられたが、10⁻⁵ mol/lのDEHPでは、ER α の発現を減少させる傾向がみられ、また、両濃度のDEHPにおいて、ER β の発現はE2, BPAとは逆に減少させる傾向がみられた。

D. 考察

①プラスチック製医療用具からの可塑剤溶出量の評価に関する研究

本研究では、煩雑な溶出実験を行うこと

なく、PVC 製医療用具に適用する医薬品の物理化学的性質から DEHP 溶出量を予測する簡易評価法の開発を試みた。各種薬剤の濃度変化に伴う脂溶性色素溶解力、電気伝導度および PVC シートに対する静的接触角の変動は、PVC シートからの DEHP 溶出力と密接に関連していることが明らかとなった。中でも、薬剤の脂溶性色素溶解力の変動は、DEHP 溶出力と最も高い関連性を有し、PVC 製医療用具からの DEHP 溶出量を予測する上で非常に有益な指標となることが示された。医薬品の中には主薬自体が着色している製剤も存在するが、薬剤の色調に応じて 3 種類の色素を使い分けることにより、全ての医薬品に適用できるものと思われる。PVC シートに対する静的接触角も DEHP 溶出量を予測する指標として利用可能であるが、欠点としては比較的高価で測定データに多少のバラツキがあることである。電気伝導度の測定は、コスト的に安価で容易に測定できるが、プログラム注射液のように伝導率が非常に低い試料には適用できない。また、薬剤濃度の上昇に伴う静的接触角および電気伝導度の変動は、DEHP 溶出力の変動と比較して多少遅れることも確認された。今後、様々な医薬品の脂溶性色素溶解力、電気伝導度および PVC シートに対する静的接触角を測定し、これら 3 つの指標と DEHP 溶出力の関連性を統計的に評価する予定である。最終的には、PVC 製医療用具からの DEHP 溶出量を予測するマップを作製し、患者への DEHP 暴露に関する安全性評価の一助として利用することを目指す。

②プラスチック製医療用具に使用される可塑剤の動態解析

輸液または透析等の医療行為からの DEHP の暴露リスク評価においては、直接的に患者の体内に導入されることから DEHP のみならず、その分解物である MEHP も併せて測定する必要がある。GC/MS では、MEHP は誘導体化する必要がある。この誘導体化の過程で DEHP が分

解する可能性があるため、予め DEHP と MEHP とを分画した後、誘導体化しなくてはならない。このため、操作が煩雑で測定環境からのコンタミネーションによって測定値の信頼性が損なわれることが指摘されていた。今回、LC/MS/MS を活用して、DEHP および MEHP を同時に定量できる方法を開発した。分離に LC を用いるため、MEHP を誘導体化する必要がなく、また、高度な選択性を有する MS/MS を検出に用いることによって抽出およびクリーンアップを簡略化することが可能となった。従って、LC/MS/MS は、DEHP および MEHP の分析に有用であるといえる。

MEHP および DEHP のコンタミネーションを排除した条件下で採取および調製された血清からは、それぞれ、5 ppb 未満の濃度でしか検出されなかった。一方、輸液バッグ中に保存されていた血漿中からは、それぞれ、770 および 14000 ppb 濃度で検出された。これらの差異から、採血から血漿の調製過程、保存液の添加および保存の過程において使用された樹脂製品から血漿に DEHP および MEHP が溶出した可能性も考えられる。仮にこの血漿 200~400 ml が用法に従って患者に輸液されると、MEHP および DEHP は、それぞれ、150~300 および 2800~5600 μg の暴露を経血管的に受けることとなる。

DEHP は、生体内で MEHP を経て ω または $\omega-1$ 酸化を受けて mono(2-ethyl-6-hydroxy)phthalate または mono(2-ethyl-5-hydroxy)phthalate に代謝される。後者の物質は、精巣毒性を有することが明らかにされている。従って、輸液や透析によって DEHP および MEHP に暴露を受けた患者の体内における代謝物を含めて DEHP および MEHP の消長を把握することは、リスク評価をするうえで重要である。MEHP を S-9 で処理した結果、m/z が 293 にベースピークを持つ代謝物の生成が認められた。MEHP が ω または $\omega-1$ 酸化を受けて生成する代謝物の分子量は

294 であり、同様の代謝物が S-9 処理によって生成される可能性がある。また、 m/z が 145 および 121 のフラグメントは、ベンゼン環でなく、側鎖の水酸化を示唆しており、上記の推測に矛盾しない。今回、開発した方法を改良することによって DEHP および MEHP に暴露されたヒトの血中の代謝物もモニタリングすることも可能になることが期待される。

③ 歯科材料中の溶出動態に影響する要因の解析

歯科材料で使用されている主なフタル酸エステルは DBP と BPPG である。このフタル酸エステルが液構成成分の 90% も添加されている製品についても、その製品の MSDS などに記載されている場合もある。しかしながら、国内で使用されている多くの製品にはそれらの含有量、更にはその可塑剤名の記載はほとんどない。歯科材料でフタル酸エステルを多量に含有する製品は軟質裏層材や粘膜調整材などである。しかし、これら製品を治療目的で使用する患者の対象年齢は、DBP の毒性に関する懸念が低い患者である。レジン系仮封材は齶蝕歯の窩洞形成後、インレーなどが作製されるまでの封鎖材として使用される材料である。従って、適度の可塑性が必要であることなどからレジン系仮封材の多くは、フタル酸エステルを可塑剤として使用している。レジン系仮封材を治療上、使用する場合の対象年齢は小学生から高齢者まで考えられる。従って、口腔内模擬環境下として、ヒト唾液に浸漬した DBP を含有する歯科材料からの DBP 溶出量を把握し、暴露量を推定した。

代表的なフタル酸エステルを含有する歯科材料の液成分を分析したところ、全てに製品が可塑剤として DBP を使用していた。その含有量は液組成の 38%~85% であった。それら歯科材料の粉液比は多くの場合 1~2 程度である。特にレジン系仮封材は筆積法を採用しているため、術者の好みにより粉

液比がかなり異なると考えられる。本研究では粉液比を 2 とした。硬化体からの DBP 溶出パターンは、唾液浸漬 2 時間よりも唾液浸漬 1 時間の場合で総 DBP 溶出量が増加しているが、その後の総 DBP 溶出量は何れも増加していた。これは唾液浸漬 1 時間では硬化体表面に存在する DBP が速やかに溶出するため、見かけ上総 DBP 溶出量が増加していると考えられる。更に何れの硬化体も唾液浸漬 2 時間以外は MBP 溶出量が経時的に増加した。これは唾液中の酵素（エステラーゼやリパーゼなどのエステル加水分解酵素）により、DBP が加水分解され、MBP に代謝された結果を示唆している。従って、DBP 溶出量は検出された DBP 量と検出された MBP との和である。

A はその使用目的から通常、口腔内に適用される期間は数日なので、その期間は唾液浸漬 72 時間に相当する。その場合の総 DBP 溶出量は、約 2.1 mg/g レジンであった。硬化体からの溶出速度は硬化体の表面積および体積に依存しているので、単純には比較できないがこの溶出条件は最悪の場合と考えて問題ないと考えられる。従って、この A を 1g 用いた場合には 3 日間で約 2.1 mg の DBP が溶出したことになる。すなわち一日あたりでは平均 0.7 mg を摂取したことになり、体重が 60 kg とすると推定一日摂取量は 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日である。小児の場合を考え、小児の体重を 20 kg とすると推定一日摂取量は 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日となる。何れも各国の TDI 値よりも低値であった。

一方、C と D の歯科材料は子供から成人までその適応年齢に制限はない。この製品は長くとも 1 ヶ月も使用されることもあるが、多くの場合には約 1 週間位の適応期間である。また、適応表面は実験で使用した表面積よりも実際には小さいと考えられる。C の 1 週間の DBP 総溶出量は約 1.6 mg/g レジンであるので、1g を治療に使用したとすると体 60 kg 成人の推定一日摂取量は 3.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日、体重 20 kg の子供では推定一日摂取量は 11.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日となった。同