

<その4> ラミネートフィルムに含まれる残留有機溶剤の分析

研究協力者 尾崎麻子、岸 映里 大阪市立環境科学研究所

A. 研究目的

性質の異なる2種類以上のプラスチックや紙、アルミ箔を貼り合わせ、短所を補い長所を高めたラミネートフィルムは、食品用の容器包装材として多く使用されている。各層を貼り合わせる手法としては、接着剤を有機溶剤などで希釈してフィルムに塗布するドライラミネート法、フィルムの片面に溶解したポリエチレン (PE) をコーティングしたり、フィルム間に溶解した PE を流し込む押し出しラミネート法、PE やポリプロピレン (PP) などヒートシール性のあるフィルム同士に熱をかけて圧着するサーマルラミネート法などがある¹⁾。このうち、ドライラミネート法は他の方法に比べて接着強度が非常に強く、耐熱性、耐水性、耐油性に優れ、あらゆる材質のフィルムの貼り合わせが可能であることから、主流の方法の一つとなっている²⁾。その有機溶剤として、アルコール類、ケトン類、酢酸エステル類など様々な有機溶剤が使用される²⁾。有機溶剤は、接着剤をフィルムに塗布したのちに乾燥除去されるが、除ききれなかった場合は最終製品に残留する可能性がある。しかしながら、これまでラミネートフィルムに残留する有機溶剤について報告した例は非常に少ない。Eiceman ら³⁾の調査では、食品用ラミネートフィルムからメタノール、1-エトキシ-2-プロパノール、1-プロパノール、2-(2-ヒドロキシプロピル)-1-プロパノール、酢酸プロピル、2-メチル-2-プロパノール、*tert*-ブタノールが検出されたと報告しているが、定性試験のみで定量結果が示されていない。一方、国内で流通する製品について調査した報告はみられない。

また、分析法については、オレイン酸を溶媒として用いたヘッドスペース - ガスクロマトグラフィー (GC) 法が衛生試験法・注解2015⁴⁾に掲載されているが、ヘッドスペースの加熱条件や溶媒の設定根拠、定量下限値や検量線範囲といった詳細情報は示されていない。

そこで本研究では、ラミネートフィルム製の容器包装に残留する可能性がある30種類の有機溶剤について一斉分析法を確立した。さらに、確立した一斉分析法を用いて、市販されているラミネートフィルム製の食品包装袋42試料について残留有機溶剤を定量したので報告する。

B. 研究方法

1. 試料

市販のラミネートフィルム製の食品包装袋42試料(合成樹脂製品35試料、合成樹脂・アルミニウム製品4試料、合成樹脂・紙製品3試料)。このうち、合成樹脂製品2試料には表面に印刷が施されており、残りの試料には印刷面はなかった。

2. 試薬および標準溶液

N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ヘプタン：高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業(株)製

メタノール、エタノール、アセトン、ヘキサン、シクロヘキサン、酢酸エチル：残留農薬試験・PCB試験用、関東化学(株)製

2-プロパノール：高速液体クロマトグラフ用、ナカライテスク(株)製

酢酸メチル：GC用標準物質、東京化成工

業(株)製

1-プロパノール、2-ブタノール、2-ブタノン (MEK)、2-メチル-1-プロパノール、酢酸イソプロピル、1-ブタノール、1-メトキシ-2-プロパノール、酢酸プロピル、4-メチル-2-ペンタノン (MIBK)、トルエン、酢酸ブチル、2-メトキシエチル酢酸、2-エトキシエチル酢酸、シクロヘキサノン、3-メチル-3-メトキシブタノール：東京化成工業(株)製

テトラヒドロフラン、*o*-キシレン、*m*-キシレン、*p*-キシレン：特級、和光純薬工業(株)製

ベンゼン：インフィニティピュア、和光純薬工業(株)製

酢酸イソブチル：特級、関東化学(株)製

フルオロベンゼン (FB)、トルエン- d_8 ：大気汚染物質測定用、和光純薬工業(株)製

酢酸エチル- d_8 ：CDN Isotopes 製

内標準溶液：10 mL 容の各メスフラスコに約 9 mL の DMF を入れたのち、FB、酢酸エチル- d_8 またはトルエン- d_8 をそれぞれ 100 mg 加え混和したのち DMF で 10 mL とし、各内標準原液とした (濃度各 10,000 $\mu\text{g/mL}$)。この液を DMF で混合・希釈し、10 および 200 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を調製した。

標準原液：10 mL 容の各メスフラスコに約 9 mL の DMF を入れたのち、メタノール、エタノール、2-プロパノール、1-プロパノール、2-ブタノール、2-メチル-1-プロパノール、1-ブタノール、1-メトキシ-2-プロパノール、2-メトキシエチル酢酸、2-エトキシエチル酢酸、3-メチル-3-メトキシブタノール、シクロヘキサノン、アセトン、酢酸メチル、ヘキサン、MEK、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、シクロヘキサノン、酢酸イソプロピル、ヘプタン、ベンゼン、酢酸プロピル、MIBK、イソブチル酢酸、トルエン、酢酸ブチルまたは *o*-キシレンをそれぞれ 100 mg 加え混和したのち

DMF を加え 10 mL とし、各標準原液とした (濃度各 10,000 $\mu\text{g/mL}$)。また、*m*-および *p*-キシレンはそれぞれ 50 mg ずつとり混合したのち、DMF を加え 10 mL とし、標準原液とした (*m*-および *p*-キシレン合わせて濃度 10,000 $\mu\text{g/mL}$)。

標準溶液 A：表 1 の A に示した 12 化合物について、各標準原液を 1.0 mL ずつとり混合したのち、200 $\mu\text{g/mL}$ の内標準溶液を 1.0 mL 加えて DMF で 20 mL とした (各標準物質 500 $\mu\text{g/mL}$ および内標準物質 10 $\mu\text{g/mL}$)。さらにこの液を 10 $\mu\text{g/mL}$ 内標準溶液で希釈し、0.1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ (内標準 10 $\mu\text{g/mL}$ を含有) の標準溶液を調製した。

標準溶液 B：表 1 の B に示した 18 化合物について、各標準原液を 1.0 mL ずつとり混合したのち、200 $\mu\text{g/mL}$ の内標準溶液を 1.0 mL 加えて DMF で 20 mL とした (各標準物質 500 $\mu\text{g/mL}$ および内標準物質 10 $\mu\text{g/mL}$)。さらにこの液を 10 $\mu\text{g/mL}$ 内標準溶液で希釈し、各標準物質 0.01 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ (内標準 10 $\mu\text{g/mL}$ を含有) の標準溶液を調製した。

3. 器具および装置

ヘッドスペースサンプラー (HS)：7694、Agilent Technologies 社製

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)：GC 6890、MS 5973、Agilent Technologies 社製

ヘッドスペース用バイアル：容量 20 mL のアルミキャップ式バイアル、Agilent Technologies 社製

バイアル用セプタム：PTFE/シリコーンラバーセプタム、Agilent Technologies 社製

4. HS-GC/MS 測定条件

特に記載している場合を除き、以下の条件で測定した。

表1 測定対象化合物

グループ	化合物	モニターイオン (<i>m/z</i>)		定量下限値 ($\mu\text{g/g}$)	検量線範囲 ($\mu\text{g/mL}$)	
		定量 イオン	定性 イオン			
A	methanol	31	32	5.0	0.5	100
	ethanol	45	46	1.0	0.1	100
	2-propanol	45	59	1.0	0.1	100
	1-propanol	59	60	5.0	0.5	100
	2-butanol	45	59	5.0	0.5	100
	2-methyl-1-propanol	43	74	5.0	0.5	100
	1-butanol	56	41	5.0	0.5	100
	1-methoxy-2-propanol	45	47	5.0	0.5	100
	2-methoxyethyl acetate	43	58	5.0	0.5	100
	2-ethoxyethyl acetate	43	59	5.0	0.5	100
	3-methyl-3-methoxybutanol	73	103	50	5.0	100
	cyclohexanone	55	98	5.0	0.5	100
	B	acetone	43	58	0.5	0.05
methyl acetate		43	74	0.5	0.05	10
hexane		57	86	0.5	0.05	10
2-butanone (MEK)		43	72	0.5	0.05	10
ethyl acetate		43	61	1.0	0.1	10
tetrahydrofuran		42	72	0.5	0.05	10
cyclohexane		84	56	0.5	0.05	10
isopropyl acetate		61	43	1.0	0.1	10
heptane		71	100	0.5	0.05	10
benzene		78	77	0.5	0.05	10
propyl acetate		43	61	0.5	0.05	10
4-methyl-2-pentanone (MIBK)		43	58	0.5	0.05	10
isobutyl acetate		43	56	1.0	0.1	10
toluene		91	92	0.1	0.01	10
butyl acetate	43	56	1.0	0.1	10	
<i>m, p</i> -xylene	91	106	0.5	0.05	10	
<i>o</i> -xylene	91	106	0.5	0.05	10	
internal standard	fluorobenzene	96	70	-	-	-
	ethyl acetate- <i>d</i> ₈	46	66	-	-	-
	toluene- <i>d</i> ₈	98	100	-	-	-

1) ヘッドスペースサンプラー

オープン温度：80℃、サンプルループ温度：150℃、トランスファーライン温度：180℃、加熱時間：30 min、注入時間：0.5 min、ヘッドスペース導入量：1 mL

2) GC/MS

GC カラム：VOCOL（内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 1.5 μm 、Sigma-Aldrich 社製）、カラム温度：35℃ (4 min) -4℃/min-260℃、注入口温度：200℃、トランスファーライン温度：250℃、イオン源温度：250℃、四重極温度：

180℃、キャリアーガス：He、1.4 mL/min（定流量モード）、スプリット比：1：20、イオン化電圧：70 eV (EI モード)、測定モード：SIM、モニターイオン：表 1 を参照

5. 検量線の作成

各濃度の標準溶液 1.0 mL をヘッドスペース用バイアルに入れてただちに密封した後、HS-GC/MS 分析を行い、得られた定量用イオンのピーク面積を用いて絶対検量線法および内標準法により検量線を作成したものを標準

表2 ラミネートフィルム試料一覧および検出された化合物

No	材質*	化合物*** (μg/g)					耐熱性に関する記載	耐冷性に関する記載	販売元	製造国
		2-propanol	ethyl acetate	heptane	propyl acetate	toluene				
1	PET12/AL7/PE80	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
2	NY15/PE80	ND	ND	ND	ND	ND	85℃30分	-40℃		
3	PP30/PP50	ND	ND	ND	ND	ND	—	—	①	日本製
4	KPP20/PE15/PP40	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
5	PET12/PE20/PP40	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
6	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	水:85℃、サラダ油:70℃	—		
7	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	水:90℃、サラダ油:90℃	—	②	日本製
8	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	水:100℃、サラダ油:100℃	—		
9	KNY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	水:65℃、サラダ油:70℃	—		
10	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	95℃30分	-40℃		タイ製
11	NY18/PE67	ND	ND	ND	ND	ND	95℃30分	-40℃	③	中国
12	NY15/PE70	ND	ND	ND	ND	ND	95℃30分	-40℃		—
13	NY/NY/PE/PE/PE	ND	ND	ND	ND	ND	100℃30分	-40℃	④	日本製
14	NY/EVOH/NY/PE/PE	ND	ND	ND	ND	ND	100℃30分	-40℃		
15	NY15/PE20/PE40	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
16	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	100℃30分	—		
17	KPP20/PP40	ND	ND	ND	ND	0.20 (0.006)	—	—		
18	PET12/AL9/NY15/PP60	ND	3.4 (0.21)	ND	ND	0.10 (0.006)	130℃30分	—		
19	KNY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	90℃30分	-40℃		
20	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	85℃30分	-40℃		
21	NY15/PE50	ND	ND	ND	ND	ND	95℃30分	—	⑤	—
22	PP20/PE40	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
23	KPP20/PE40	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
24	PET12/PP40	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
25	レーヨン紙18/PE15/KPP20/PE15/PE20	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
26	レーヨン紙18/PE15	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
27	NY15/PE15/PE30	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
28	NY15/PE15/PE40	ND	ND	ND	ND	ND	95℃30分	-30℃		
29	NY15/PE15/PE40	ND	ND	ND	ND	ND	ボイル殺菌不可	-30℃	⑥	—
30	NY15/PE15/PE40	ND	ND	ND	ND	ND	95℃30分	—		
31	—**	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
32	PET12/AL9/NY15/PP60	ND	2.6 (0.16)	ND	ND	ND	130℃30分	—	⑦	—
33	PP40/PP30	ND	ND	ND	ND	ND	加熱殺菌不可	—		
34	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	95℃30分	-40℃	⑧	—
35	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	105℃30分	-40℃		
36	PET12/PE20/PET12/PE25/PE40	2.5 (0.14)	1.9 (0.11)	14 (0.81)	0.70 (0.040)	ND	—	—		
37	PET12/PE15/PP50	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
38	PET12/PE15/NY15/PE15/PE50	ND	ND	7.3 (0.42)	ND	ND	—	—	⑨	—
39	PET12/PE15/PE50	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
40	和紙9g/PE15/PET12/PE15/PE50	ND	ND	ND	ND	ND	—	—		
41	PET12/PE15/AL6.5/PE15/NY15/PE15/PE40	ND	ND	3.9 (0.26)	ND	ND	—	—		
42	NY15/PE60	ND	ND	ND	ND	ND	95℃30分	-40℃	⑩	—

—:記載なし、ND:定量下限値未満

AL:アルミニウム、PE:ポリエチレン、PP:ポリプロピレン、PET:ポリエチレンテレフタレート、NY:ナイロン、EVOH:エチレンビニルアルコール共重合樹脂、K:ポリ塩化ビニリデンコート

*材質の後の数字はフィルムの厚さ(μm)(単位の記載があるものは除く)、**合成樹脂のみから成る

***検出された化合物は括弧内に1m²あたりの測定値(mg)を示した。また、ここに示した化合物以外は検出されなかった。内標準物質はFBを用いた。

ND: 2-propanol, ethyl acetate < 1 μg/g; heptane, propyl acetate < 0.5 μg/g; toluene < 0.1 μg/g

検量線とした。マトリックス検量線は、約 1 mm×5 mm に細切した試料 0.1 g をヘッドスペース用バイアルにはかりとり、各濃度の標準溶液 1.0 mL をヘッドスペース用バイアルに入れてただちに密封した後、HS-GC/MS 分析を行い、絶対検量線法および内標準法により作成した。いずれの検量線においても、内標準法では全ての化合物について FB を内標準物質として用いた。さらに、酢酸エチルとトルエンについてはそれぞれの安定同位体（サロゲート物質）を内標準物質として用いた検量線も作成した。

6. 試料の調製と測定

約 1 mm×5 mm に細切した試料 0.1 g をヘッドスペース用バイアルにはかりとり、10 µg/mL 内標準溶液 1.0 mL を加えてただちに密栓した。このバイアルを室温で一晩放置した後、HS-GC/MS 分析を行った。

C. 研究結果および考察

1. 測定対象化合物の選定

衛生試験法・注解の有機溶剤試験法⁴⁾では 20 化合物を対象としている。また、ドライラミネート法では、アルコール類、アセトン、2-ブタノン、シクロヘキサノンなどのケトン類、酢酸エチルや酢酸ブチルなどの酢酸エステル類、その他にトルエンやヘキサンなどの有機溶剤が使用される²⁾。そこで、衛生試験法・注解の有機溶剤試験法⁴⁾で対象となっている 20 化合物に、使用される可能性のあるアルコール類、酢酸エステル類、ヘキサンなど 10 化合物を加え、合計 30 化合物を測定対象とした。

2. 試料溶液調製法の検討

ヘッドスペース法は、バイアルを密封した状態で一定条件に保ち、測定物質が液相と気

相において平衡状態を保った状態で気相を GC に注入し、試験溶液中の測定物質を分析する方法である。したがって、試料が溶解した状態であることが望ましいが、今回試料としたラミネートフィルムには表 2 に示したように、PE、PP、ポリエチレンテレフタレート (PET)、ナイロン (NY)、エチレンビニルアルコール共重合樹脂 (EVOH)、ポリ塩化ビニリデンコート (K)、紙およびアルミニウム (AL) が使用されており、これら全ての材質を溶解することのでき、HS-GC/MS に使用可能な適切な溶媒はなかった。そこで今回は、接着剤部分を溶解することにより残留する有機溶剤を分析することとした。試料の製造に使用された接着剤の種類については記載されていなかったため、ラミネートフィルムの接着剤として汎用されているポリウレタン、エポキシ樹脂およびアクリル樹脂を溶解可能であり、沸点が 153°C と比較的高くヘッドスペース用の溶媒として適当な DMF を用いて検討した。様々な材質からなる 8 試料についてそれぞれ約 1 mm 幅に細切し、DMF に室温で一晩放置した結果、表 3 に示すように 6 試料ではラミネートフィルムの接着剤部分は溶解し、全て層ごとに分離した。分離しなかった No.6 と No.34 はいずれも NY と PE のラミネートフィルムであり、熱圧着されているものと推測された。よって、ヘッドスペースバイアルに試料と DMF を加えて室温で一晩放置した後、HS-GC/MS 分析を行うことにした。

表3 DMFに常温で一晩放置した後の各層の分離

No	材質	各層の分離
1	PET/AL/PE	○
6	NY/PE	×
18	PET/AL/NY/PP	○
23	KPP/PE	○
24	PET/PP	○
26	レーヨン紙/PE	○
33	PP/PP	○
34	NY/PE	×

3. HS-GC/MS による測定

分析用カラムとして、VOCOL (内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 1.5 μm) および ENV-624MS (内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 1.4 μm 、関東化学(株)製) を用いて対象化合物のマスクロマトグラムを比較したところ、膜厚がより厚い VOCOL カラムにおいてピーク分離がより良好であったため、本カラムを用いることにした (図 1)。

30 種類すべての対象化合物が分離可能な条件を検討したが、1-ブタノールとヘプタンは保持時間が近く、昇温条件を変更しても分離することができなかった。さらに、1-ブタノールのモニターイオンをヘプタンが小さい

ながらも有していたことからこれらの分別定量は困難であった。また、30 種類の化合物はそれぞれ感度が異なっていた。そのため、比較的感度の低い A グループ (1-ブタノールを含む) および感度の高い B グループ (ヘプタンを含む) に分類し、それぞれ調製した標準溶液を用いて検量線を作成することにした。なお、試料から 1-ブタノールおよびヘプタンが検出された場合は、SCAN モードで測定を行い、マススペクトルを確認することにより同定は可能と考えられた。また、*m*-および *p*-キシレンはピークが分離せず、感度もほぼ同じであったため、合算して定量することにした。

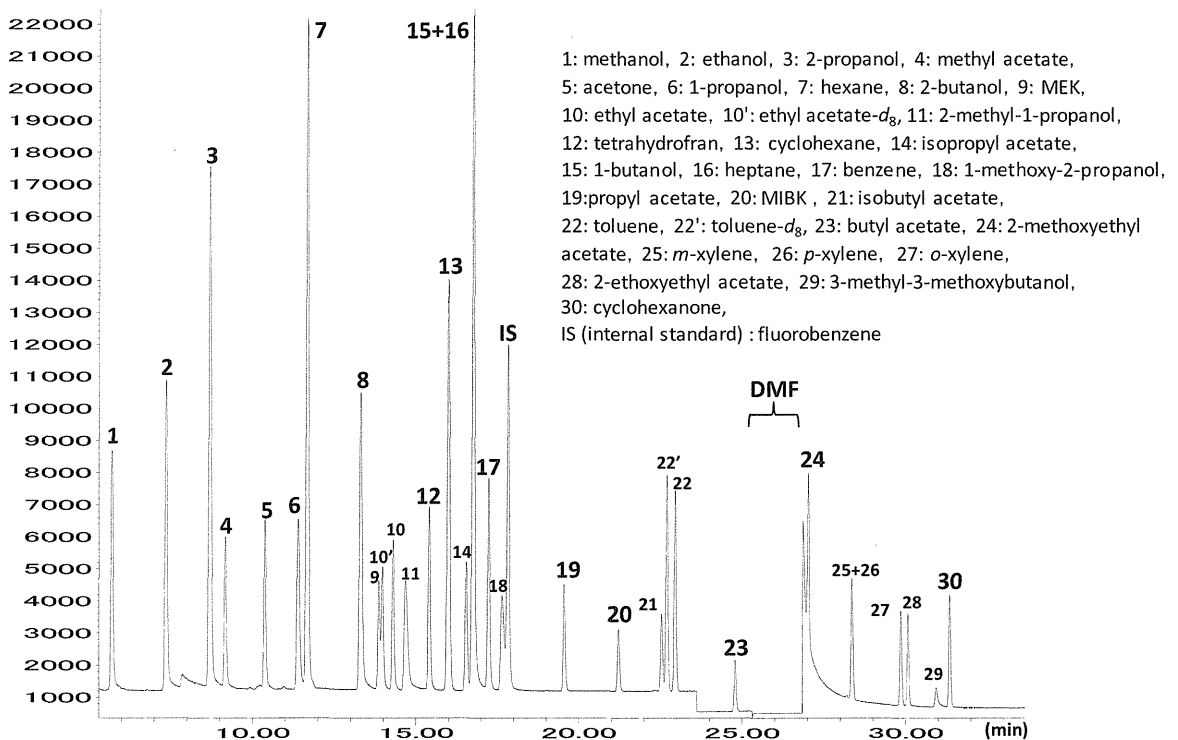


図1 標準溶液のトータルイオンクロマトグラム

ヘッドスペースサンプラーオープン温度: 80°C、サンプルループ温度: 150°C、トランスファーライン温度: 180°C、加熱時間: 30 min、注入時間: 0.5 min、ヘッドスペース導入量: 1 mL
GCカラム: VOCOL (内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 1.5 μm)、カラム温度: 35°C (4 min) $-4^\circ\text{C}/\text{min}$ -260°C 、注入口温度: 200°C、トランスファーライン温度: 250°C、イオン源温度: 250°C、四重極温度: 180°C、キャリアーガス: He、1.4 mL/min (定流量モード)、スプリット比: 1:20、イオン化電圧: 70 eV (EIモード)、測定モード: SIM
Aグループの化合物: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Bグループ: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (グループの詳細は表1に示した)

表4 30化合物の各加熱温度におけるピーク面積値の相対標準偏差(RSD)の最小値および最大値(%)

	60℃		80℃		100℃	
	内標準補正なし	内標準補正あり	内標準補正なし	内標準補正あり	内標準補正なし	内標準補正あり
最小値	2.5	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2
最大値	9.9	9.5	4.0	3.5	2.0	3.0

n=3

内標準物質:FBおよびサロゲート物質

4. HS法の検討

バイアルの加熱温度および加熱時間を検討した。まず、標準溶液 A (50 µg/mL) または標準溶液 B (5 µg/mL) をそれぞれ添加したバイアルを用い、60℃、80℃、100℃で30分間加熱した場合のピーク面積値を比較した。図2に10化合物およびFBの面積値を、表4に30化合物のピーク面積値の相対標準偏差(RSD, %)のうち最小値および最大値を示した。いずれの化合物も温度の上昇に伴ってピーク面積値が増加し、RSDは温度が高いほど小さくなった。内標準補正の有無による差は見られなかった。今回はヘッドスペースサンプラーを用いて気相をGC/MSに導入したが、手動注入の場合では加熱温度が高いとシリンジの扱いが難しくなり、注入時の誤差などにより正確に注入することが困難であると推測されることから、加熱温度はRSDが4.0%以下を示した80℃とした。

80℃で3~90分間加熱した際の10化合物およびFBのピーク面積値を図3に示した。シクロヘキサンやヘプタンなど加熱7分後に既に平衡に達した化合物も見られたが、いずれの化合物も加熱30分後には平衡に達していたことより、加熱時間は30分間とした。

5. 検量線の作成

絶対検量線法および内標準法で検量線を作成した。内標準法で用いる内標準物質は気液

平衡下で測定化合物と同様の挙動を示すこと、すなわち、化学構造が似た化合物であることが望ましい。しかし、今回測定対象とした30化合物は化学構造や物理化学的性質が様々である。そこで、GC/MS分析において保持時間が測定対象化合物の中間程度であり、定量の妨害にならないFBを内標準物質として用いることにした。さらに、酢酸エチルおよびトルエンについては気液平衡下で同じ挙動を示すそれぞれのサロゲート物質を用いた補正も行い、検量線の作成、添加回収試験および試料の測定を行い、FBを用いた内標準法による結果と比較した。

それぞれの化合物の定量下限値および検量線範囲を表1に示した。相関係数は絶対検量線法では0.996以上、FBを用いた内標準法では0.997以上、サロゲート物質を用いた内標準法では0.999以上であり、いずれにおいても良好な直線性を示した。絶対検量線においても良好な結果であったが、GC/MSは注入口や検出器の汚れなどにより感度の変動しやすく、また、手動注入した場合は注入量の誤差の補正に内標準補正が有効であることから、以後は内標準法を用いて検討を行った。

6. マトリックスによる影響の確認

HS法はマトリックスの影響を受けやすいため、標準溶液と試料溶液のマトリックスを同一にすることが望ましい。しかしながら、

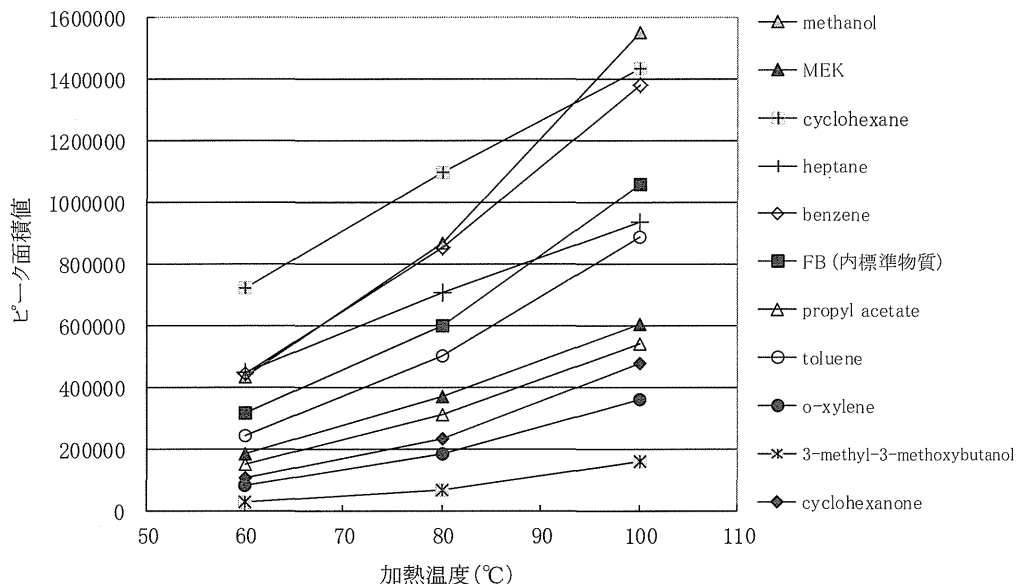


図2 バイアル加熱温度による各化合物のピーク面積値

標準溶液を60°C、80°C、100°Cで30分間加熱した際のピーク面積値の変動を検討した。測定した30化合物のうち、10化合物及び内標準物質について示した。Aグループの化合物: 50 μ g/mL, Bグループ: 5 μ g/mL (グループの詳細は表1に示した)

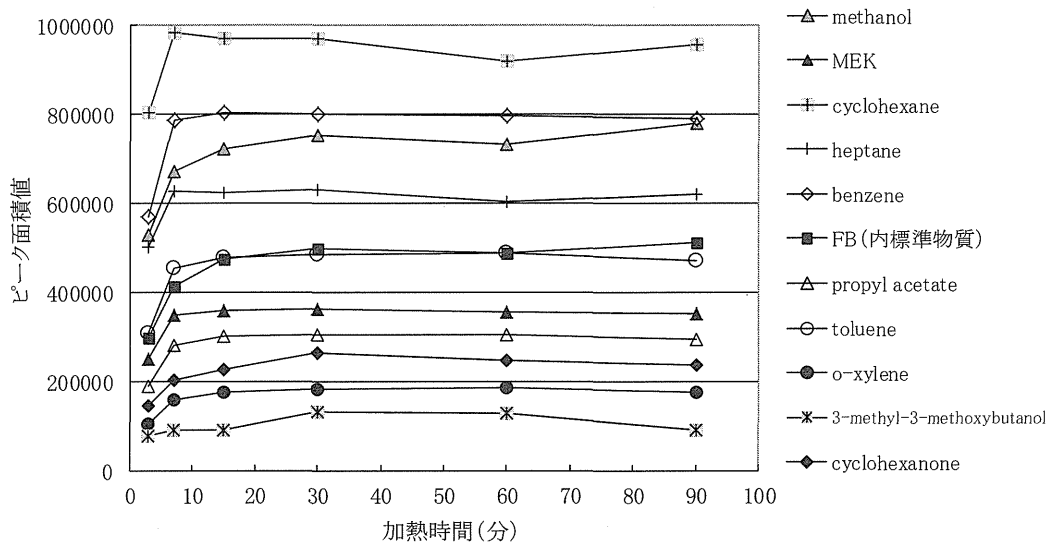


図3 バイアル加熱時間による各化合物のピーク面積値

標準溶液を80°Cで3~90分間加熱した際のピーク面積値の変動を検討した。測定した30化合物のうち、10化合物及び内標準物質について示した。Aグループの化合物: 50 μ g/mL, Bグループ: 5 μ g/mL (グループの詳細は表1に示した)

ラミネートフィルムは様々な材質から構成されており、フィルムの厚さなども製品ごとに異なる。1 試料ごとにマトリックス検量線を引いて定量すると大幅に時間を要することから、材質が異なる 5 つのラミネートフィルム (No.1 : PET/AL/PE、No.6 : NY/PE、No.19 : KNY/PE、No.26 : レーヨン紙/PE、No.33 : PP/PP) を用いてマトリックス検量線を作成し、標準検量線と比較した。図 4 に例として 6 化合物について示した。2-プロパノール、酢酸エチル、トルエンなどの約半数の化合物においては、標準検量線とマトリックス検量線は良く一致した。酢酸エチルおよびトルエンにおいてはサロゲート物質を用いた場合も同様であった。ヘプタンや 1-メトキシ-2-プロパノールなど残り約半数の化合物では、標準検量線とマトリックス検量線の傾きが若干異なっていたが、3-メチル-3-メトキシブタノールを除いてマトリックスによる大きな影響は受けないことを確認した。

3-メチル-3-メトキシブタノールは標準検量線とマトリックス検量線の傾きに大きな差が見られた。3-メチル-3-メトキシブタノールについては、図 4 に示した検量線では No.33 のマトリックス検量線の傾きが最も小さかったのに対して、別日に同じ実験を繰り返し行ったところ、No.33 の傾きが最も高くなり再現性が得られなかった。しかし、一回目の結果と同様に標準検量線とマトリックス検量線には大きな傾きの差が見られた。以上より、3-メチル-3-メトキシブタノールは試料の材質の種類によって影響を受けるのではなく、試料 (固相) が入ることにより定量結果がばらつく可能性が示唆された。その他の化合物ではマトリックスによる大きな影響がなかったことから、迅速な定量を行うことを目的として標準検量線を用いることにした。

7. 添加回収試験

マトリックス検量線を検討した同じ 5 試料を用いて添加回収試験を行った (表 5)。添加量は検量線の最低濃度の約 10 倍とした。すなわち、グループ A の化合物は材質中 50 $\mu\text{g/g}$ (3-メチル-3-メトキシブタノールのみ 500 $\mu\text{g/g}$)、グループ B は材質中 10 $\mu\text{g/g}$ となるよう添加した。その結果、3-メチル-3-メトキシブタノールを除き、回収率は 93.0~103.2%、RSD は 0.0~8.5% と非常に良好であった。酢酸エチルおよびトルエンにおいてサロゲート物質を用いた場合も同様に良好であった。一方、3-メチル-3-メトキシブタノールでは、回収率が 74.8~120.4%、RSD が 5.6~22.6% と他の化合物よりもばらつきが大きかった。これは 6. マトリックスによる影響の確認で検討したマトリックス検量線と同様の傾向であり、本化合物が試料による影響を受けやすいことが示された。

8. 試料中の残留量

本法によりラミネートフィルム製品 42 試料の残留量を測定した (表 2)。その結果、2-プロパノールが 1 試料に 2.5 $\mu\text{g/g}$ 、酢酸エチルが 3 試料に 1.9~3.4 $\mu\text{g/g}$ (サロゲート物質による定量値 : 2.0~3.4 $\mu\text{g/g}$)、ヘプタンが 3 試料に 3.9~14 $\mu\text{g/g}$ 、酢酸プロピルが 1 試料に 0.70 $\mu\text{g/g}$ 、トルエンが 2 試料に 0.10 および 0.20 $\mu\text{g/g}$ (サロゲート物質による定量値 : とともに 0.10 $\mu\text{g/g}$) 残留していた。その他の化合物は検出されなかった。表 2 には表面積あたりの測定値も併記した。FB およびサロゲート物質による酢酸エチルおよびトルエンの定量値はよく一致しており、サロゲート物質を用いなくても FB を用いることで良好に定量できることが確認された。

ラミネートフィルムの材質の違いによる有機溶剤の検出傾向の違いは見られなかった

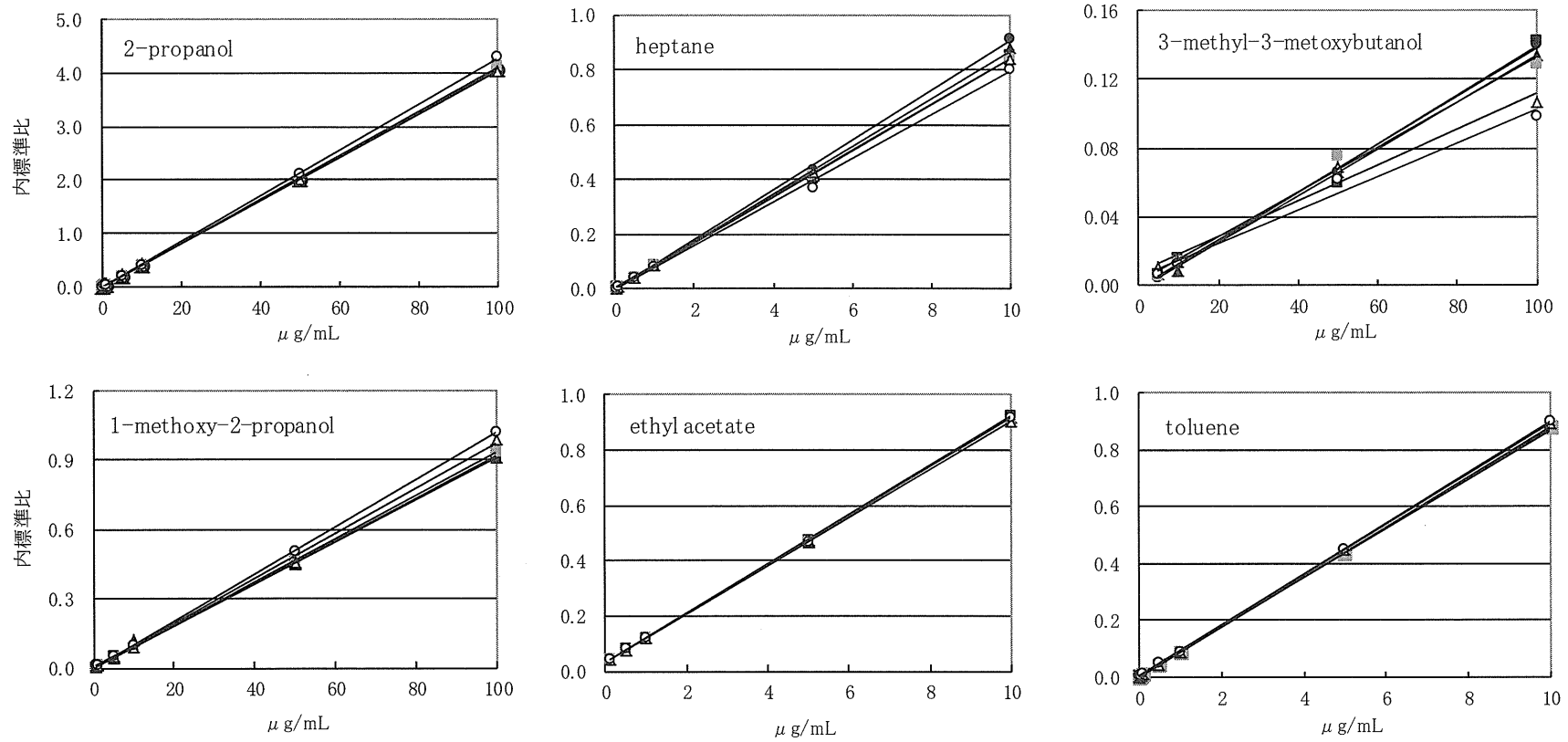


図4 標準検量線とマトリックス検量線の比較

- 標準検量線、■ マトリックス検量線 (No.1:PET/AL/PE)、▲ マトリックス検量線 (No.6:NY/PE)、
- マトリックス検量線 (No.19:KNY/PE)、△ マトリックス検量線 (No.26:レーヨン紙/PE)、○ マトリックス検量線 (No.33:PP/PP)

材質が異なる5つのラミネートフィルム各0.1 gに各濃度段階の標準溶液を1.0 mL加えてマトリックス検量線を調製し、標準検量線と比較した。測定した30化合物のうち、6化合物について示した(内標準物質:FB)。

表5 添加回収試験結果

グループ	化合物	No.1 (PET/AL/PE)		No.6 (NY/PE)		No.19 (KNY/PE)		No.26 (レーヨン紙/PE)		No.33 (PP/PP)	
		平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
A	methanol	100.8	0.9	101.3	0.7	102.2	0.3	97.3	0.7	102.9	1.0
	ethanol	99.3	0.6	99.5	0.7	100.6	0.9	98.2	0.3	101.3	1.2
	2-propanol	101.0	0.7	101.1	0.6	102.0	0.8	99.7	0.2	101.8	0.2
	1-propanol	100.9	0.8	101.1	2.2	103.2	0.2	99.0	1.0	101.3	0.2
	2-butanol	102.6	0.4	103.7	1.7	102.8	0.7	102.1	0.8	102.5	0.4
	2-methyl-1-propanol	99.0	2.8	102.1	4.4	102.8	1.3	100.1	2.6	102.3	1.3
	1-butanol	100.1	1.5	104.4	5.7	100.4	1.1	101.7	1.4	101.0	0.8
	1-methoxy-2-propanol	100.6	0.4	102.6	4.1	101.1	1.5	100.4	1.3	100.4	1.4
	2-methoxyethyl acetate	97.5	5.5	101.0	8.5	98.0	4.9	97.6	1.0	96.6	2.4
	2-ethoxyethyl acetate	100.9	3.0	101.1	7.3	101.4	1.3	98.0	4.4	98.9	3.1
	3-methyl-3-methoxybutanol	120.4	13.1	93.8	10.5	116.6	5.6	84.1	22.6	74.8	6.2
cyclohexanone	99.9	2.7	99.3	6.4	97.8	1.7	98.2	2.0	98.4	0.3	
B	acetone	101.0	0.0	100.0	1.0	100.0	1.0	98.7	0.6	101.3	1.5
	methyl acetate	99.3	0.6	101.6	2.0	100.0	1.0	98.7	0.6	100.7	1.5
	hexane	103.0	2.5	96.5	1.8	96.5	0.9	98.5	0.0	96.5	1.8
	MEK	101.6	0.5	101.3	0.5	100.3	0.5	100.0	0.9	101.9	0.9
	ethyl acetate	101.2	1.4	100.3	1.4	100.6	0.5	98.8	0.5	101.2	0.5
	ethyl acetate (サロゲート補正)	101.4	0.5	100.3	0.5	100.6	0.5	99.7	0.5	100.3	0.5
	tetrahydrofran	99.0	1.0	98.4	1.5	99.0	0.0	98.0	1.0	99.0	1.0
	cyclohexane	95.4	0.0	93.5	0.7	93.5	0.7	96.2	0.7	93.9	1.4
	isopropyl acetate	100.3	1.9	100.6	0.5	100.0	1.9	100.0	0.9	100.0	0.9
	heptane	96.3	0.7	93.0	1.4	93.4	1.2	97.4	0.7	93.0	1.8
	benzene	100.0	0.0	99.4	0.6	101.0	0.9	101.0	0.0	101.0	0.9
	propyl acetate	101.9	0.0	101.3	0.5	102.5	1.1	102.5	0.5	102.8	0.0
	MIBK	101.2	1.4	102.8	1.6	99.7	1.1	99.7	1.1	99.1	2.5
	isobutyl acetate	101.9	0.9	101.6	0.5	101.2	0.5	101.6	0.5	100.3	1.4
	toluene	101.0	0.9	100.3	1.1	100.0	1.9	100.0	0.0	98.7	1.1
	toluene (サロゲート補正)	101.0	1.0	100.7	1.5	101.3	1.5	101.0	0.0	100.3	0.6
	butyl acetate	101.9	0.9	101.9	0.9	99.7	2.1	98.5	0.5	99.7	1.4
	<i>m, p</i> -xylene	99.7	0.5	100.0	2.4	96.3	1.0	96.6	0.5	95.4	1.0
<i>o</i> -xylene	100.0	0.9	102.5	2.6	96.6	2.0	95.4	0.0	93.5	1.7	

n=3

内標準物質:FB(サロゲート補正の記載があるものは除く)

添加量:Aグループ 50 μ g/g(3-methyl-3-methoxybutanolは500 μ g/g);Bグループ 10 μ g/g

が、ヘプタンが検出された3試料は同じ販売元のものであり、トルエンが検出された2試料も同じ販売元のものであったことから、同じ溶剤が使用されたと推測された。一方、酢酸エチルが検出された3試料はいずれも別の販売元であった。

有機溶剤は接着剤だけでなく、印刷インキの使用によっても試料中に残留する場合がある。そのため、白、青および黒の印刷が表面にあった2試料(No.21 および 31)について印刷部分とそれ以外に分けて測定したが、いずれにおいても測定対象化合物は検出されなかった。

食品衛生法において器具・容器包装の残留溶剤に関する規格はない。一方、医薬品については厚生省より「医薬品中の残留溶媒ガイドライン」⁵⁾が出されており、医薬品中に残留する溶媒の一日あたりに摂取が許容される最大量(permitted daily exposure : PDE)が示されている。今回、試料から検出されたトルエン、酢酸エチル、ヘプタン、2-プロパノールおよび酢酸プロピルのPDEはトルエンが8.9 mg/day、その他の物質が50 mg/dayであった。トルエンが検出された試料について最大摂取量(ワーストケース)を求めた。すなわち、一日に摂取する食品全て(2 kg)がトルエンを0.006 mg/m²含有するラミネートフィルム(試料No.16 および 17)に包装され、材質中のトルエンが全量食品へ溶出すると仮定した。食品1 kgが600 cm²のフィルムに接触する⁶⁾として計算すると、トルエンの最大摂取量は $0.006 \times 600 \times 2/10,000=0.00072$ mgであり、PDEの1/12,000と低い値であった。同様に、酢酸エチル、ヘプタン、2-プロパノールおよび酢酸プロピルを含有していた試料No.36(残留溶剤の合計値:1.1 mg/cm²)についても算出した。その結果、

一日の最大摂取量は4種類の溶剤の合計値で0.13 mgとなり、PDEの1/380と低い値であった。この摂取量はラミネートフィルムに含有されるすべての残留溶剤が食品に移行すると仮定したものであるため、実際の摂取量はPDEと比較して極めて低いと考えられた。

D. 結論

食品用ラミネートフィルムに残留する有機溶剤30化合物の一斉分析法を確立した。本法は、試料に内標準物質を含むDMF溶液を加えて室温で一晩静置後、気相をGC/MSにより測定する方法であり、様々な材質から成るラミネートフィルムに適用が可能であった。

本法を用いて、市販の42試料について残留量を測定した結果、6試料から5種類の測定対象化合物が検出された。検出された残留溶剤は発がん性などが疑われる化合物ではなく、また、比較的濃度が低いため、ただちに問題になるものではないと考えられた。

E. 参考文献

- 1) 葛良忠彦：プラスチック包装容器の構成と製造方法，色材協会誌，80(2)，80-89(2007)。
- 2) 日本接着剤工業会：接着剤読本，株式会社桐文社(1999)。
- 3) Eiceman GA and Karasek FW: Identification of residual organic compounds in food packages, Journal of Chromatography, 210, 93-103(1981)。
- 4) 公益社団法人日本薬学会編：器具・容器包装および玩具試験法(有機溶剤)、衛生試験法・注解2015、東京、金原出版、p.635-636, 682-683(2015)

- 5) 平成 10 年 3 月 30 日、厚生省医薬安全
局審査管理課長通知、医薬審第 307 号
- 6) Commission regulation (EC) No 10/2011 of

14 January 2011 on plastic materials and
articles intended to come into contact
with food (2011)

＜その5＞ 特定芳香族アミン5種による細胞形質転換活性の検討

研究協力者 清水 碧、大森 清美 神奈川県衛生研究所

A. 研究目的

アゾ色素は全色素の60～70%を占める一般的な色素であり、種類が豊富で安価であることから、繊維製品や革製品、おもちゃ、食品等に広く使用されている。アゾ色素は、皮膚表面や腸内の細菌、肝臓等で還元分解され、アミンを生成する。そのうち、コンゴレッドやスーダンレッド等一部のアゾ色素は、発がん性またはそのおそれ指摘されている特定芳香族アミンを生成する可能性がある。アゾ色素には、溶媒に溶ける性質をもつ「アゾ染料」と、溶けずに固体の粒子として分散している「アゾ顔料」がある。欧州、中国、韓国等の諸外国では、皮膚と長時間接触する繊維製品に特定芳香族アミンを生成しうるアゾ染料の使用を規制しており、わが国においても、24種の特定芳香族アミンを容易に生成するアゾ染料が、繊維製品や革製品等の家庭用品に対する法規制¹⁾の対象として平成28年4月1日から追加されることとなった²⁾³⁾。対象の特定芳香族アミンのうち、4-aminobiphenyl、benzidine、2-naphtylamine、4,4'-methylenbis(2-chloroaniline)、*o*-toluidineの5種は、International Agency for Research on Cancer (IARC; 国際がん研究機関)による発がん性リスク評価でグループ1に分類され、ヒトに対して発がん性があるとされている。

器具・容器包装において、わが国で使用が認められるのは食品衛生法施行規則で食品添加物として指定されている着色料であり⁴⁾、特定芳香族アミンを容易に生成するアゾ色素の使用は認められていない。しかし、着色料が溶出または浸出して食品に混和するおそれのないように加工されている場合の制限はなく、アゾ色素の汎用性を考慮するとその有害性を評価

することは重要である。

化学物質の発がん性を予測する試験として、安全性評価試験の国際標準であるOECDテストガイドラインでは細菌復帰突然変異試験(Ames試験)や染色体異常試験等の遺伝毒性試験が示されているが、これらの試験法では検出できない発がん性物質(非遺伝毒性発がん物質)の存在が問題視されており、その多くは発がんプロモーターであると予測されている。当所ではこれまでにBhas 42細胞を用いた発がんプロモーション試験法を開発し⁵⁾、非遺伝毒性発がん物質を検出すべく「Bhas 42細胞形質転換試験法」を確立した⁶⁾。後に発がんイニシエーション試験法が追加され⁷⁾、当試験法は平成27年にOECDガイダンスドキュメントとして承認され、同28年に掲載された⁸⁾。

特定芳香族アミンのうち3化合物については、既にこのBhas 42細胞形質転換試験法を用いた評価がなされており、2,4-diaminotoluene (Cas No. 95-80-7) はイニシエーション活性が、2-naphtylamine (Cas No. 91-59-8) 及び*o*-toluidine (Cas No. 95-53-4) はプロモーション活性が認められている⁹⁾。本研究では、*in vitro* 発がんプロモーション試験として唯一のOECDガイダンスドキュメントであるBhas 42細胞形質転換試験法を用いて、特定芳香族アミンの発がんプロモーション活性の有無について検討するとともに、発がんイニシエーション活性の有無を既報の遺伝毒性試験結果と比較した。

B. 研究方法

1. 被験物質

発がん毒性の有無を評価する観点から、特定芳香族アミンのうち、IARCでグループ2B(ヒ

トに対して発がん性の可能性がある)に分類され、かつ IARC でグループ 1 に分類される benzidine に構造の類似する化学物質を中心に、5 種を選択し対象とした (表 1)。

No. A, C : >98.0%、東京化成工業(株)

No. B : 99.9%、シグマアルドリッチジャパン合同会社 (SUPELCO)

No. D : >95.0%、東京化成工業(株)

No. E : 一級、>98.0%、和光純薬工業(株)

2. 陽性対照物質

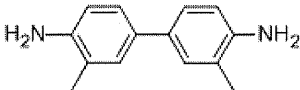
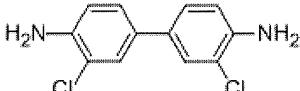
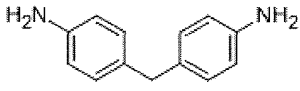
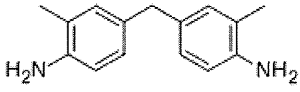
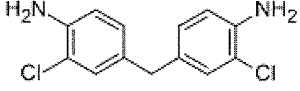
プロモーション試験の陽性対照物質として 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate (TPA ; Cas No. 16561-29-8) : 和光純薬工業(株)、20 及び 50 ng/mL を、イニシエーション試験の陽性対照物質として 3-Methylcholanthrene (MCA ; Cas No. 56-49-5) : 和光純薬工業(株)、1 µg/mL を用いた。

3. 試薬および試液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) 培地 : サーモフィッシャーサイエンティフィック(株) (Gibco)

ウシ胎児血清 (FBS) : (株)ニチレイバイオサイエンス

表 1 被験物質とした特定芳香族アミン5種

No.	化学物質名 (政令 ²⁾ における名称)	Cas No.	構造式	IARC分類
A	3,3'-dimethylbenzidine (3,3'-ジメチルベンジジン (別名オルト-トリジン))	119-93-7		2B
B	3,3'-dichlorobenzidine (3,3'-ジクロロベンジジン)	91-94-1		2B
C	4,4'-diaminodiphenylmethane (4,4'-メチレンジアニリン)	101-77-9		2B
D	3,3'-dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane (4,4'-ジアミノ-3,3'-ジメチルジフェニルメタン)	838-88-0		2B
E	4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) (3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン)	101-14-4		1

DF5F 培地 : DMEM/F12 培地に FBS を 5%と なるように加えた。

dimethyl sulfoxide (DMSO) : Bio Reagent、≧ 99.9%、シグマアルドリッチジャパン合同会社

ホルマリン : ホルムアルデヒド液 (37%)、 特級、和光純薬工業(株)

メタノール : 特級、和光純薬工業(株)

クリスタルバイオレット : 和光純薬工業(株)

0.1%クリスタルバイオレット染色液 : クリスタルバイオレット 1.0 g をエタノール 50 mL に 溶かし、水を加えて 1000 mL とした。

クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 : 特級、和光 純薬工業(株)

エタノール : 特級、和光純薬工業(株)

色素抽出液 : クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 18 g に水 600 mL を加えて溶かし、0.1 mol/L 塩 酸 100 mL 及びエタノール 1000 mL を加えた。

ギムザ染色液 : メルク(株)

5%ギムザ染色液 : ギムザ染色液 25 mL に水 を加えて 500 mL とした。

4. 器具及び装置

クリーンベンチ NS-13BS : 十慈フィールド(株)

CO₂ インキュベータ BNA-111 : エスペック(株)

コールターカウンター Z1：ベックマンコー
ルター(株)

iMark マイクロプレートリーダー：バイオ・
ラッド ラボラトリーズ(株)

実体顕微鏡 SZX9：オリンパス(株)

5. 被験物質を含む培地の調製

培地中の DMSO 濃度を 0.1%以下とするため、
被験物質を最終濃度の 1000 倍濃度となるよう
DMSO に溶解し、0.03 ~300 mg/mL (濃度は試
験及び被験物質により異なる) の溶液を調製し
た。これらを DF5F 培地に添加して 1000 倍希釈
し、最終濃度 0.03~300 µg/mL の被験物質を含
む培地を調製し、試験に用いた。また、溶媒対
照群として被験物質を含まない (DMSO のみ
0.1%含む) 培地を調製した。

6. 濃度設定試験

1) プロモーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、
DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を
経て、対数増殖期 (細胞密度 60~70%) にある
Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて 7×10^3
cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 0.5 mL ずつ
24 ウェルプレートに播種した。その播種日を 0
日目とし、4 日目に被験物質 (0.1~100 µg/mL)
を含む培地に交換 (1 濃度群あたり 3 ウェル：
n=3) し、7 日目にホルマリンで固定した。0.1%
クリスタルバイオレット染色液で染色した後、
色素を抽出し、各抽出液の波長 570 nm におけ
る吸光度を測定した。

2) 相対的細胞生存率

溶媒対照群の吸光度を 100%とし、被験物質
の各濃度群における吸光度の比率 (%) を算出
した。

3) 被験物質の濃度設定

相対的細胞生存率の算出結果から、被験物質
を、ア. 溶媒対照群と比較して相対的細胞生存
率が 120%以上に増加した物質、イ. 狭い濃度
範囲で細胞増殖を抑制する物質、ウ. その他の
物質 (弱い増殖抑制作用が認められる、または
増殖抑制・促進のいずれも認められない物質)
の 3 つに分類し、形質転換試験に用いる濃度を
設定した。

7. 細胞毒性試験

1) プロモーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、
DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を
経て、対数増殖期 (細胞密度 60~70%) にある
Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて 7×10^3
cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6
ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日
目とし、4 日目に被験物質を含む培地に交換
(n=3) し、7 日目にホルマリンで固定した。
0.1%クリスタルバイオレット染色液で染色し
た後、色素を抽出し、各抽出液の波長 570 nm
における吸光度を測定した。

2) イニシエーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、
DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を
経て、対数増殖期 (細胞密度 60~70%) にある
Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて 2×10^3
cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6
ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日
目とし、1 日目に被験物質を含む培地に交換
(n=3) し、4 日目に DF5F 培地に交換し、7 日
目にホルマリンで固定した。0.1%クリスタルバ
イオレット染色液で染色した後、色素を抽出し、
各抽出液の波長 570 nm における吸光度を測定
した。

3) 相対的細胞生存率

溶媒対照群の吸光度を 100%とし、被験物質の各濃度群における吸光度の比率 (%) を算出した。

8. 形質転換試験

1) プロモーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を経て、対数増殖期（細胞密度 60~70%）にある Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて 7×10^3 cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6 ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日目とし、4、7、11 日目に被験物質を含む培地に交換（1 濃度群あたり 6 ウェル：n=6）し、14 日目に DF5F 培地に交換し、21 日目にメタノールで固定及び 5%ギムザ染色液で染色を行った。

2) イニシエーション試験

凍結保存していた Bhas 42 細胞を解凍し、DF5F 培地を用いて播種した。7 日間の前培養を経て、対数増殖期（細胞密度 60~70%）にある Bhas 42 細胞を DF5F 培地を用いて 2×10^3 cells/mL に調製し、1 ウェルあたり 2 mL ずつ 6 ウェルプレートに播種した。その播種日を 0 日目とし、1 日目に被験物質を含む培地に交換し、4、7、11、14 日目に DF5F 培地に交換（n=6）し、21 日目にメタノールで固定及び 5%ギムザ染色液で染色を行った。

3) 形質転換フォーカス数の計数

形質転換頻度の指標として、実体顕微鏡を用いて細胞を観察し、以下の (1) ~ (6) の基準に合致するものを「形質転換フォーカス」と判断し、ウェルごとに計数した。(1) 細胞数が 100 個以上、(2) 細胞が紡錘形をなして周囲の細胞とは異なる細胞形態を示す (spindle-shaped)、(3) 細胞質がギムザ染色液により強く染まっ

ている (basophilic)、(4) 細胞がランダムな配列で互いに交差している (crisscross)、(5) 積み重なりあった細胞の増殖 (pilling-up) (6) 周囲の単層細胞への浸潤性の増殖

4) 結果の判定

1 ウェルあたりの形質転換フォーカス数 [個/ウェル] を定量単位とし、統計解析を行った。統計解析及び結果の判定は OECD テストガイドンスドキュメント⁸⁾に従った。各被験物質について、濃度群ごとに溶媒対照群に対する Dunnett 検定を行い、片側 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。Dunnett 検定により 1 濃度群のみで有意差ありと判定された場合、Jonckheere 傾向検定を行った。それにより、(1) 溶媒対照群と比較して連続する 2 濃度以上で有意に形質転換フォーカス数が増加した場合または (2) 溶媒対照群と比較して 1 濃度のみで有意に形質転換フォーカス数が増加し、傾向検定で増加傾向が認められた場合の 2 つのうちいずれかを満たす場合、その被験物質を陽性と判定した。溶媒対照群と比較していずれの濃度においても有意な形質転換フォーカス数の増加が認められない場合、その被験物質を陰性と判定し、陽性にも陰性にも含まれない場合を擬陽性とした。

陽性対照群の統計解析には F 検定による等分散性の判定に応じ、Student t 検定または Welch 検定を用い、統計的に有意差があった場合に試験が妥当に遂行されたと判断した。

C. 研究結果及び考察

1. プロモーション試験

1) 濃度設定試験

特定芳香族アミン 5 種について、プロモーション試験のための濃度設定試験を実施した。その結果、被験物質 C 及び D は、0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲において細胞増殖への影響は認め

られなかった。被験物質 A は 10 µg/mL 以下の濃度では影響が認められなかったが、100 µg/mL では相対的細胞生存率が 50%未満に低下した。被験物質 B は 1 µg/mL 以下の濃度では影響は認められなかったが、10 µg/mL で約 50%、100 µg/mL で約 40%に低下した。被験物質 E は 1 µg/mL 以下の濃度では影響が認められなかったが、10 µg/mL では約 70%、100 µg/mL では約 10%に低下した。B. 6. 3) でア (溶媒対照群と比較して相対的細胞生存率が 120%以上に増加する) に分類される被験物質はなかった。被験物質 A、B 及び E は、イ (狭い濃度範囲で細胞増殖を抑制する物質) に分類され、A 及び B は 50%抑制濃度 (inhibitory concentration ; IC) 50 と IC90 の間にある 100 µg/mL を最高濃度とし、E は IC50 と IC90 の間にあると予測される 30 µg/mL を最高濃度として形質転換試験を実施した。被験物質 C 及び D はウ (いずれにも該当しない物質) に分類され、C は 0.1% DMSO 溶液への溶解度から最高濃度を変更せず 100 µg/mL とし、D は 300 µg/mL を最高濃度として形質転換試験を実施した。

2) 細胞毒性試験及び形質転換試験

特定芳香族アミン 5 種について、はじめに濃度設定試験の結果から決定した濃度でプロモーション試験を行った。その結果、被験物質 A 及び B については最高濃度とした 100 µg/mL 濃度群で、E については 30 及び 10 µg/mL 濃度群で、濃度設定試験と同程度の細胞増殖抑制が認められ、これらの濃度群においてはいずれのウェルでも形質転換フォーカスの形成が認められなかった。被験物質 D の細胞毒性試験では、最高濃度の 300 µg/mL 濃度群でも細胞増殖抑制は認められなかった。そこで、被験物質ごとに濃度範囲を最適化し、被験物質 A は 1~3000 ng/mL、B は 0.03~3000 ng/mL、C は 1~10000 ng/mL、D は 1~30000 ng/mL、E は 0.03~100

ng/mL の濃度範囲で公比 10 または $10^{1/2}$ の 7~9 濃度群により再度細胞毒性試験及び形質転換試験を実施した (図 1)。

細胞毒性試験の結果、被験物質 A、C、D 及び E は試験した濃度域において明らかな相対的細胞生存率の増加または減少は認められなかった。被験物質 B は 1000 ng/mL 濃度群で約 80%、3000 ng/mL 濃度群で約 70%に相対的細胞生存率が低下し、細胞増殖抑制が認められた。

形質転換試験の結果、被験物質 A は 300~3000 ng/mL の連続する 3 濃度群において溶媒対照群と比較して形質転換フォーカス数が有意に増加し、プロモーション活性陽性と判定された。被験物質 B は 0.03 及び 0.1 ng/mL の連続する 2 濃度群において溶媒対照群と比較して形質転換フォーカス数が有意に増加し、さらに 1000 ng/mL 濃度群でも有意に増加した。本試験を行う前に 0.1~3000 ng/mL の濃度範囲で同試験を実施した際にも、0.1 及び 1000 ng/mL の 2 濃度において形質転換フォーカス数の有意な増加が認められ、濃度依存性はないものの、これら 2 濃度についての結果の再現性が得られた。これらのことから、被験物質 B はプロモーション活性陽性と判定した。被験物質 C、D 及び E は、いずれの濃度群においても形質転換フォーカス数の有意な増加は認められず、プロモーション活性陰性と判定した。

陽性対照試験においては、いずれの濃度においても有意な形質転換フォーカス数の増加が認められ、妥当な結果が得られた。

3. イニシエーション試験

特定芳香族アミン 5 種について、0.1~10000 ng/mL の濃度範囲で 6~8 濃度群でイニシエーション試験の細胞毒性試験及び形質転換試験を行った (図 2)。

細胞毒性試験の結果、被験物質 A の 10000 ng/mL 濃度群において相対的細胞生存率が溶媒

対照群の約 80%に減少し、被験物質 B 及び E は高濃度群で細胞毒性による相対的細胞生存率の顕著な減少が認められた。試験した濃度域における被験物質 C 及び D による相対的細胞生存率の明らかな増加または減少は認められなかった。

形質転換試験の結果、被験物質 A 及び E はいずれの濃度群においても溶媒対照群と比較して形質転換フォーカス数の有意な増加が認められず、イニシエーション活性陰性と判定した。被験物質 B は、1000 及び 3000 ng/mL の連続する 2 濃度群において形質転換フォーカス数の有意な増加が認められたことから、イニシエーション活性陽性と判定した。細胞毒性試験の結果を照合すると、細胞毒性が発現する濃度で形質転換頻度が増加していた。被験物質 C は、10 ng/mL の 1 濃度群にて溶媒対照群と比較して有意な形質転換フォーカス数の増加が認められ、また、傾向検定においても濃度依存的な増加傾向が認められた。同試験を繰り返し実施し、同様に 10 ng/mL 濃度群において形質転換フォーカス数の有意な増加が認められたことから、イニシエーション活性陽性と判定した。被験物質 D は、1 ng/mL の 1 濃度群で溶媒対照群と比較して有意な形質転換フォーカス数の増加が認められた。しかし、傾向検定による濃度依存性は認められなかったことから、擬陽性と判定した。さらに、同試験を繰り返して実施したが、判定結果は同じであった。

陽性対照試験においては、有意な形質転換フォーカス数の増加が認められ、妥当な結果が得られた。

4. 結果のまとめ

プロモーション試験及びイニシエーション試験における形質転換試験の結果を表 2 に示した。本試験において、被験物質 A (3,3'-dimethylbenzidine) にはプロモーション活性が、

被験物質 B (3,3'-dichlorobenzidine) にはプロモーション活性及びイニシエーション活性が、被験物質 C (4,4'-diaminodiphenylmethane) にはイニシエーション活性が認められた。この被験物質 C については、これまでに動物実験でラット甲状腺のプロモーションを引き起こすという報告¹⁰⁾があるが、本試験ではプロモーション活性は認められなかった。今回対象とした 5 種のうち、その他の被験物質についてのプロモーション活性に関する報告はなく、本検討により新たに被験物質 A 及び被験物質 B のプロモーション活性が示唆された。特に被験物質 B は、イニシエーション試験において有意な形質転換フォーカス形成の増加が認められた濃度よりもはるかに低濃度においてプロモーション活性が認められ、発がん性リスク評価でのプロモーション試験の重要性が示唆された。

イニシエーション試験においては、これまでも Ames 試験等の遺伝毒性試験による報告があり、被験物質 A では遺伝毒性が認められず被験物質 B では S9 による代謝活性化を経なくても遺伝毒性を示すこと¹¹⁾や、被験物質 B による遺伝毒性は S9 による代謝活性化で増強すること¹²⁾、被験物質 C が遺伝毒性を示すこと¹³⁾等が報告されている。本試験で陽性と判定された被験物質 B 及び被験物質 C の陽性判定については、Ames 試験の判定結果と概ね合致するものと考えられた。

一方、IARC のリスク評価でグループ 1 に分類される被験物質 E (4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)) は、本試験ではプロモーション活性、イニシエーション活性ともに陰性であり、異なる結果となった。被験物質 E は細胞毒性試験において高濃度域で顕著な細胞毒性が認められ、その濃度域における形質転換活性を評価することができなかったため、そのことが結果に影響した可能性がある。また、被験物質 E は S9 による代謝活性化で遺伝毒性を示すという報

告¹³⁾があるが、Bhas 42 細胞形質転換試験法では Ames 試験のような代謝活性化後の試験が現状では設定されていないため、このことが IARC のリスク分類とは結果が異なった要因である可能性も考えられた。また、被験物質 D (3,3'-dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethane) については、プロモーション活性は認められず、イニシエーション活性についても擬陽性であった。

D. 結論

特定芳香族アミン 5 種について、Bhas 42 細胞形質転換試験法により、発がんプロモーション活性及びイニシエーション活性の有無を検討した。その結果、3,3'-dimethylbenzidine にプロモーション活性、3,3'-di-chlorobenzidine にプロモーション活性及びイニシエーション活性、4,4'-diaminodiphenylmethane にイニシエーション活性が認められた。

E. 参考文献

- 1) 昭和 48 年 10 月 12 日付法律第 112 号「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」
- 2) 平成 27 年 4 月 8 日付政令第 175 号「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律第 2 条第 2 項の物質を定める政令の一部を改正する政令」；平成 28 年 4 月 1 日施行
- 3) 平成 27 年 7 月 9 日付厚生労働省令第 124 号「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則の一部を改正する省令」；平成 28 年 4 月 1 日施行
- 4) 昭和 34 年 12 月 28 日付厚生省告示第 370 号「食品、添加物等の規格基準」
- 5) Ohmori K, et al. An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells. *Mutat Res.* (2004) 557:191-202
- 6) Ohmori K, et al. An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells. *ATLA.* (2005) 33:619-639
- 7) Asada S, et al. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutat Res.* (2005) 588:7-21
- 8) Series on Testing & Assessment No. 231 GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY. ENV/JM/MONO (2016) 1
- 9) Sakai A, et al. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* (2010) 702:100-122
- 10) Hiasa Y, et al. 4,4'-Diaminodiphenylmethane: promoting effect on the development of thyroid tumors in rats treated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J Natl Cancer Inst.* (1984) 72(2):471-6
- 11) Makena P, et al. Evidence that 4-aminobiphenyl, benzidine, and benzidine congeners produce genotoxicity through reactive oxygen species. *Environ Mol Mutagen.* (2007) 48(5):404-13
- 12) Savard S, et al. Synthesis and mutagenicity of 3,3'-dihalogenated benzidines. *Carcinogenesis.* (1986) 7(7):1239-41
- 13) 高木ら ジアミノフェニルメタンおよびその関連化合物の変異原性 環境化学 (1995) 5(4):841-845