

令和4年度厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書

1. ノンターゲット分析手法を用いた乳幼児用玩具に含まれる有害成分の網羅的解析

研究分担者 江口 哲史 千葉大学 予防医学センター 講師
研究代表者 戸次 加奈江 国立保健医療科学院 主任研究官

研究要旨：【目的】 プラスチック製品を多く含む乳幼児用玩具については、健康影響との関連性が指摘される可塑剤や難燃剤を初めとした成分分析が行われてきているものの、こうした成分以外にもフェノール類やビスフェノール類など様々な成分が含まれる可能性が考えられる。そこで、これまでに測定した玩具製品を対象に、さらに網羅的なノンターゲット分析を行うことで、他の化合物による潜在的リスクの可能性について調べることにした。

【方法】 ベビー用品や玩具協会等における統計データに基づき、国内市場で幅広く普及する玩具 84 製品を対象とした。これらを細かく切断し凍結粉碎機で粉碎処理したものをアセトニトリルで抽出し、固相抽出カラムでクリーンアップした後濃縮し、Sciex ExionLC AD, X500R を組み合わせた高速液体クロマトグラフ-タンデム飛行時間型質量分析計で分析した。

【結果・考察】 計測の結果、185 ピークに MSI level 2 のアノテーションが付けられた。これらのピーク強度を用いて主成分分析を実施したところ、中国製かつ製造年が 2010 年以前の製品において、特徴的な組成が認められた。この結果から、製造年、製造地域により特異的な化学物質が製品中に含まれている可能性が示唆された。この背景には各国・各年における規制の差などが関与していることが示唆される。また、乳幼児のマウシング行動を想定し、製品から口腔内の唾液中への成分の移行についても調べるため、人工唾液で溶出した試料についても同様の網羅的な解析を行ったところ、玩具試料において検出された DBP のフタル酸エステルに関しては、模擬唾液試料において検出されたフタル酸エステル類と強い相関性があることが示された。

【結論】 製造年や生産国の違いにより製品中に含まれている化学物質のパターンが異なることが示唆され、ターゲット分析の結果とも一致する傾向が見られたことは、乳幼児用玩具には、本研究でターゲットとした規制成分以外にも、様々な化合物が含まれている可能性があり、その一部には有害性が懸念されるものも含まれる可能性が示唆された

A. 研究目的

プラスチック製品を多く含む乳幼児用玩具については、健康影響との関連性が指摘される可塑剤や難燃剤を初めとした成分分析が行われてきているものの、こうした成分以外にもフ

ェノール類やビスフェノール類など様々な成分が含まれる可能性が考えられる。そこで、これまでに測定した玩具製品を対象に、さらに網羅的なノンターゲット分析を行うことで、他の化合物による潜在的リスクの可能性について

調べることにした。

B. 研究方法

B.1. 玩具試料

対象とする乳幼児用玩具については、フタル酸エステル類やリン系難燃剤と同様の製品を対象としており、厚生労働大臣が指定する「指定おもちゃ」（乳幼児が口に接触することにより健康を損なう恐れがあるおもちゃ）を初め、ベビー用品販売メーカーや一般社団法人日本玩具協会等における統計データに基づき幅広く市場に普及する玩具 84 製品である（「乳幼児用玩具に含まれる可塑剤・難燃剤に関する分析法の改良」Table 1 に記載。このとき調査した玩具は、フタル酸エステル類の規制がなされる前の製品（1991~2020 年製造のもの）にも焦点をあてており、また海外製のものを多く含んでいるものである。そのため、現在日本国内に流通している玩具全体の状況を必ずしも反映するものではない。）。これらの玩具は、凍結粉砕機（冷凍粉砕機 JFC-400、日本分析工業株式会社）にて粉砕処理を行った後、容器に保存して密閉後分析までの間 - 20℃で保存した。

B.2. 試料前処理

粉砕した試料 50 mg をアセトニトリル 5 ml で超音波抽出（40℃、40 min）し、1 ml 分取したものを固相抽出カラム（Bond Elut C18、Agilent）に流し、アセトニトリル 4 ml でカラムを洗浄した。これら全て回収し、窒素ガスで溶媒を除去し 500 µl に濃縮した。この試料から、ノンターゲット分析用に抽出液を 200 µl ずつ分取し、再度フィルター処理した後に分析に供した。

B.3. プラスチック試料のノンターゲット分析

試料の前処理は B.2. と同様である。

対象のノンターゲット分析には Sciex ExionLC AD, X500R を組み合わせた高速液体クロマトグラフ・タンデム飛行時間型質量分析計を用いた。分析条件は Table 1 に示した。ピークアノテーションは高分解能 MS を用いた MS/MS スペクトルの一致である、Metabolomics Standards Initiative (MSI) の level2 のグレードに従い実施した¹⁾。

C. 結果及び考察

本研究で対象としたプラスチック製の玩具製品からは、ターゲット分析の対象としたフタル酸エステル類の他、近年、使用量が増加傾向にある代替成分が原材料として含まれる製品も多く散見された。そこで、対象とした成分以外にも多くの添加物が含まれている可能性が予想されるため、これまでに測定した玩具製品を対象に、LC-QToFMS を用いたノンターゲットによる網羅的な分析を行うことで、さらなる潜在的リスクの可能性について調べることにした。初めに、ターゲット分析と同様の試料を対象に解析したところ、185 物質が同定され、検出された成分の中には、可塑剤や難燃剤、香料などに分類される成分が比較的多く含まれていた。これらのピーク強度を用いて、主成分分析により製造年及び生産国別に成分及びサンプルの分布を調べた。その結果、中国製とそれ以外の製造国の製品とでサンプルが分離する傾向が見られ（Fig. 1 (A)）、かつ製造年が 2010 年以前とそれ以後の製品においても分布の傾向が異なる特徴が認められた（Fig. 1 (B)）。この結果は、令和 3 年度分担研究報告書「乳幼児用玩具に含まれる可塑剤・難燃剤に関する分析法の改良」のターゲット分析の分布とも同様な傾向であった。また、ノンターゲット分析において検出された因子負荷量から、中国製の製品には、Hexadecanamide、Tetraethylene

Glycol、4-Nonylphenol や 1,3-Diphenylpropane-1,3-dione など、有害性が懸念される成分の寄与も高い傾向にあった (Fig. 2)。また、製造年が 2010 年以前の製品に特徴的な成分としては、[1,1'-Biphenyl]-3,3',4,4'-tetracarboxylic.acid, Phthalic anhydride, Tri(3-chloropropyl) phosphate, [1,1'-Biphenyl]-3,3',4,4'-tetracarboxylic.acid などの寄与が高い傾向にあった (Fig. 3)。

また、乳幼児のマウシング行動を想定し、製品から口腔内の唾液中への成分の移行についても調べるため、人工唾液で溶出した試料についても同様の網羅的な解析を行った (Fig. 4)。その結果、製品中から検出された成分と、模擬唾液の溶液から検出された成分との関連性について、正準相関分析により解析した。このとき、模擬唾液と玩具の試料中において検出された成分の中でも、特にピーク強度の高かった成分は、濃い赤色で示しており、さらに相関が強いことを意味しているが、特に、玩具試料において検出された DBP のフタル酸エステルに関しては、模擬唾液試料において検出されたフタル酸エステル類と強い相関性があることが示された。一方で、赤い四角で囲んでいるフタル酸類については、模擬唾液中のリン系難燃剤とも相関が示された。この結果から、少なくとも、フタル酸類の曝露には、玩具中の成分が寄与している可能性があると考えられ、模擬唾液中に溶出したフタル酸類については、玩具に由来するものであると考えられた。

D. 結論

以上の分析結果から、製造年や生産国の違いにより製品中に含まれている化学物質のパターンが異なることが示唆され、ターゲット分析の結果とも一致する傾向が見られたことは、乳幼児用玩具には、本研究でターゲットとした規

制成分以外にも、様々な化合物が含まれている可能性があり、その一部には有害性が懸念されるものもある。

E. 参考文献

1. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ Sci Technol* 2014; 48: 2097-8.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Analytical condition of nontarget analysis by LC-QToFMS.

Instrument: LC-QToFMS (X500R, Sciex)

Mobile phase: A) Water 0.1% formic acid, B) Acetonitrile containing 0.1% formic acid

Gradient: hold at 5% B for 1 min, 5% to 99% B in 9 min, hold for 0.5 min

Flow rate: 0.3 ml/min

Column: Ascentis Express C18,, 100 mm x 2.1 mm, 2.7 μ m (Phenomenex)

Column temperature: 40°C

MS setting: 50-800, SWATH mode, positive, negative mode

Used library: NIST20, Massbank of North America, Human metabolome database, RIKEN database

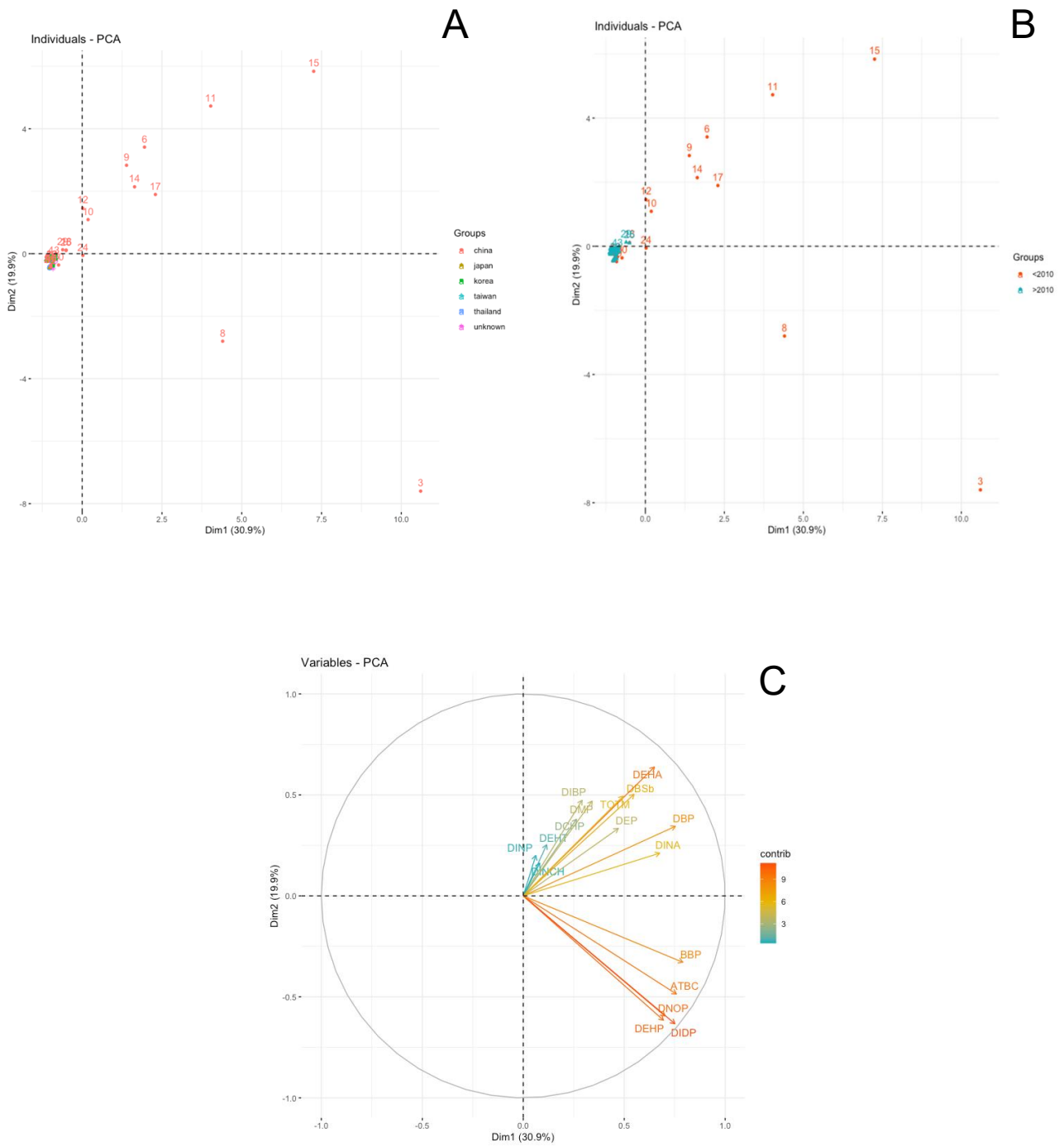


Fig. 1 PCA score plot for comparison of year of manufacture (A) and comparison of countries of manufacture (B). PCA loading plot from Comprehensive analysis of plastic toys by LC-QToFMS/LC-MS/MS (C).

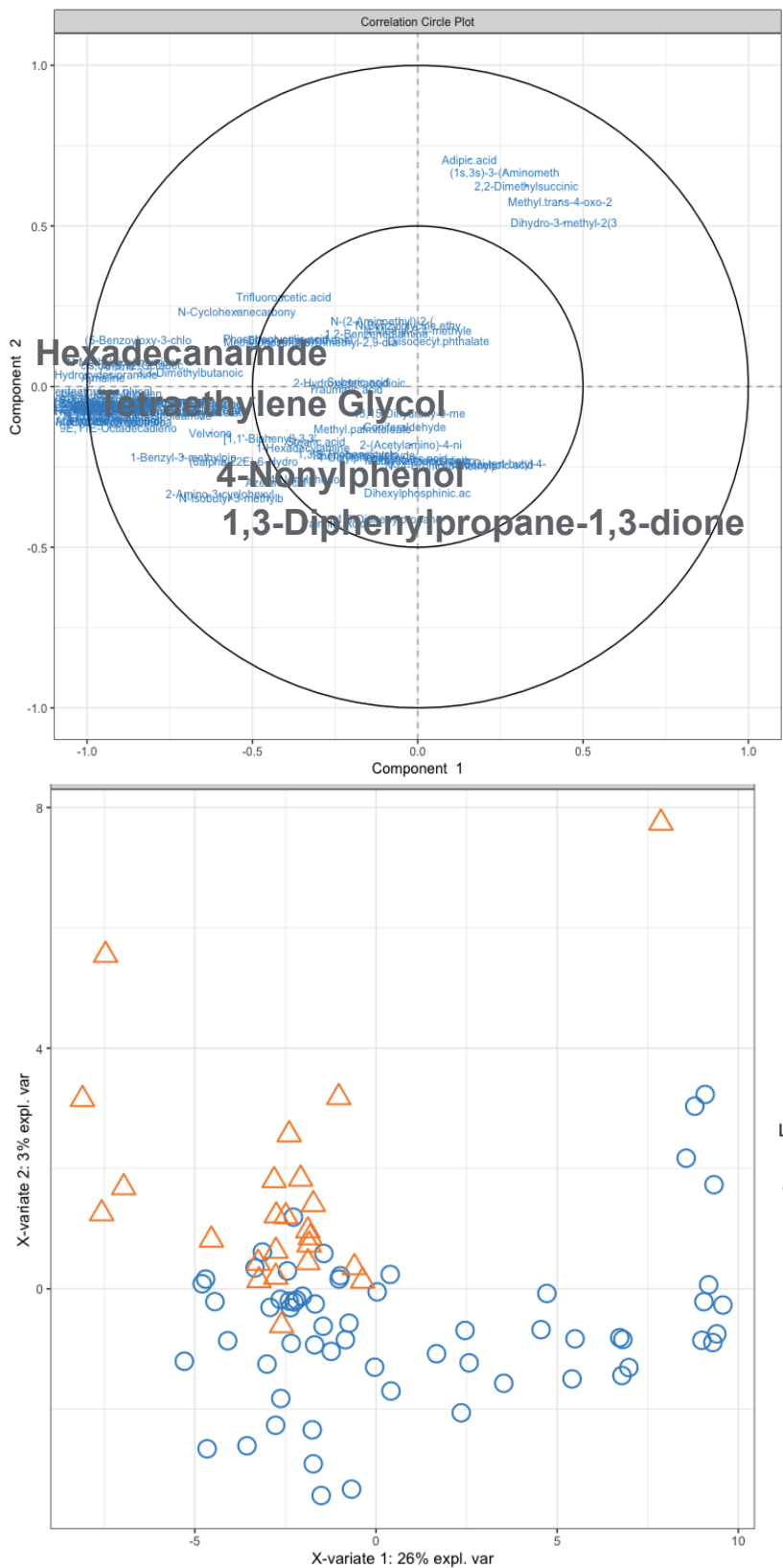


Fig. 2 Comprehensive analysis of plastic toys by non-targeted analysis and comparison of country of production.

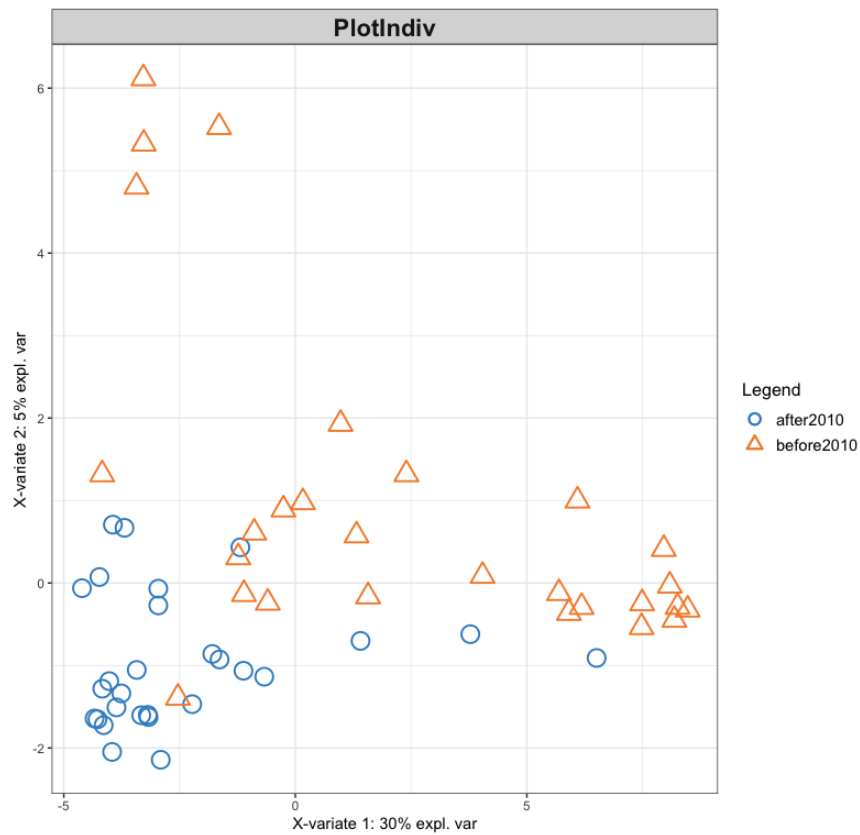
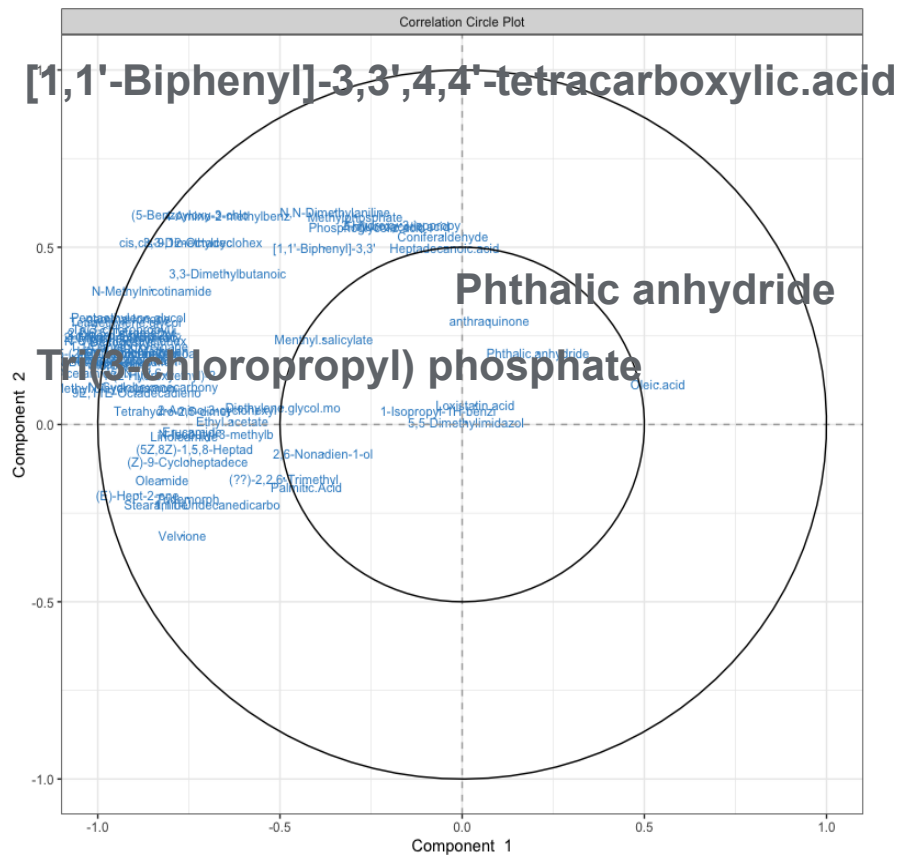


Fig. 3 Comprehensive analysis of plastic toys by non-targeted analysis and comparison of year of production.

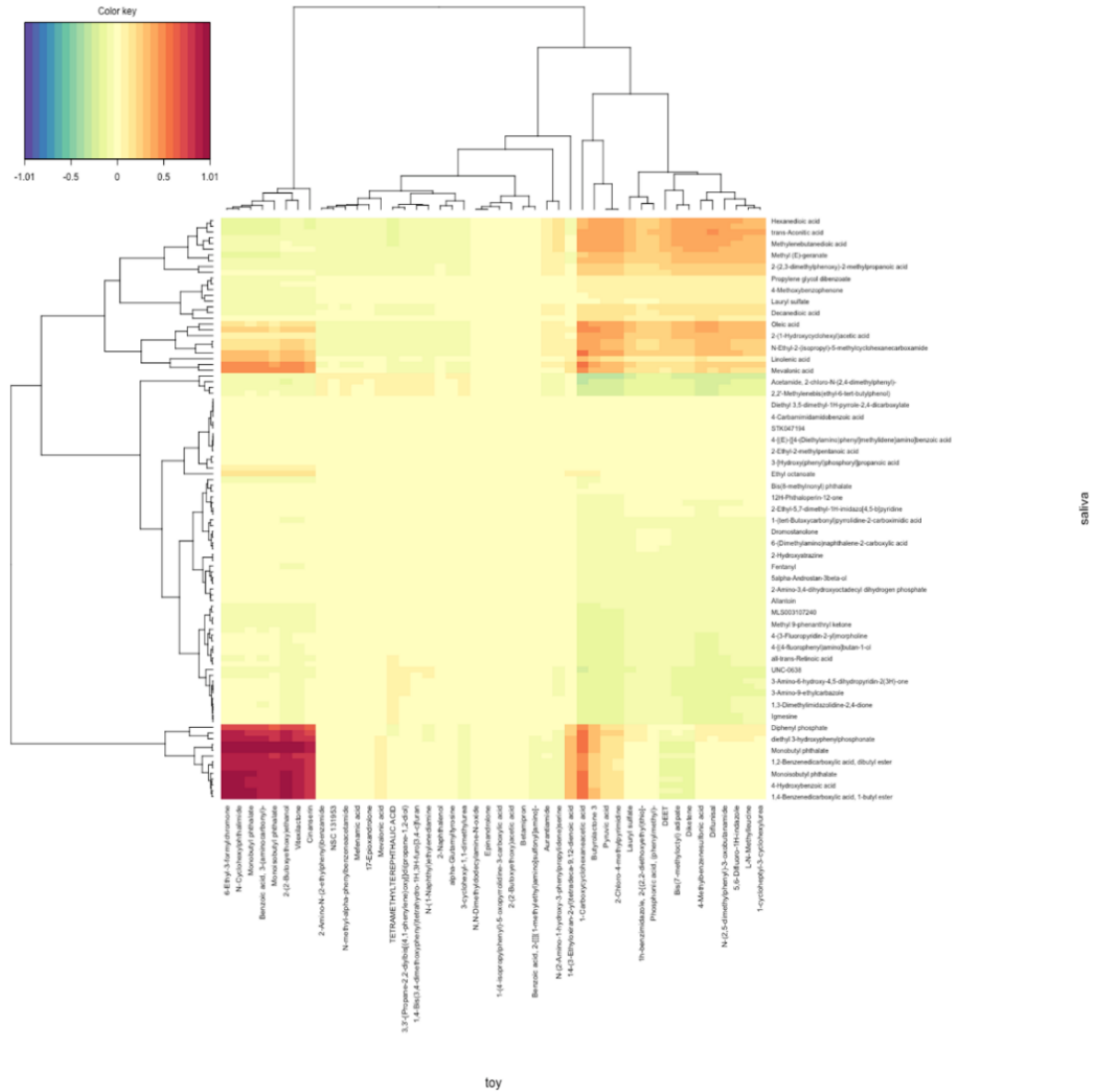


Fig. 4 Associated compounds in the sample of toy and artificial saliva by non-targeted analysis using sparse canonical correlation analysis.