

組換え酵母レセプターに感応するプラスチック溶出化合物の同定および定量  
～内分泌攪乱物質検索のためのプラスチック溶出化合物の簡易分析法の開発～

分担研究者 片瀬隆雄・水谷 広 日本大学生物資源科学部

研究要旨：組換え酵母を用いて内分泌攪乱物質を検索したところ、プラスチック製品の食品包装用ラップフィルム、学校給食用手袋、おもちゃの一部に明らかなエストロゲン様活性が検出された。そこで、n-ヘプタン抽出液中の化合物をガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を用いて分析した結果、フタル酸ジエチル、フタル酸ベンジルブチル、フタル酸ジエチルヘキシルの3種類のフタル酸エステルおよびアジピン酸ジエチルヘキシル、アジピン酸ジn-オクチルなど6種のアジピン酸エステルが同定された。プラスチック製品のなかで、最も強い活性を示した給食用手袋3点から溶出したn-ヘプタン溶液中に同定された共通の化合物とその平均濃度は、フタル酸ベンジルブチル(BBP) (2500ppm)及びフタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)(7500 ppm)であった。さらに、この活性を有した手袋2点から、共通にアジピン酸ジ2-エチルヘキシル(DEHA)(2500ppm)が検出された。おもちゃ、テーブルクロスおよびスリッパにもわずかな活性が認められたが、これらのプラスチック製品3点に共通してDEHPが同定され、平均濃度は18000ppmであった。また、同様にわずかな活性を示したラップ3点から、共通してDEHPまたはアジピン酸ジn-オクチル(DnOA)が平均濃度で6900ppm 検出された。

## A. 研究目的

現在、日本で使用されている食品用合成樹脂器具及び容器包装に添加されている合成化合物は、500種類以上あると予想される<sup>1)</sup>。最近、合成化合物の内分泌攪乱作用に関心が寄せられている。この作用を持つ合成化合物の、4-ノニルフェノール<sup>2)</sup>及びビスフェノールA (bis-2,2'-hydroxyphe-nyl propane)<sup>3)</sup>がプラスチックに添加されまたは本体に残留し、使用中に容易に溶出することが明らかとなって以来、日常生活における化合物の安全性の関心がさらに高

まっている。これらのプラスチックから溶出する内分泌攪乱物質はエストロゲン作用をもつ。合成化合物のこの作用はすでに、1930年代の後半にDoddsらにより約40種類の合成化合物の作用強度が測定され、最大効果の250万単位/gから最少効果の10単位/gまで、その間に25万倍の強度の差異があることが明らかとなった<sup>4)</sup>。すでに明らかとなったこれらのプラスチック溶出物は最少効果のエストロゲン作用を有する化合物群に属し、単独で強度の影響を与えることは考え難い。従って、重要な課題はプラスチックをはじめ日常生活で使用されている

多数の合成化合物の個々の作用強度を測定することにある。そのために、迅速簡便なプラスチック試料の調製法の開発が必要である。今回は、試みに既報の簡便な抽出法<sup>5)</sup>で調製したプラスチック製品のn-ヘプタン抽出物を組換え酵母レセプターを用いた内分泌攪乱物質検索法でスクリーニングしたところ、明らかなエストロゲン活性が検出された。そこで、まず、ガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を用いて、n-ヘプタン抽出物中の化合物の同定および定量を行った。

## B. 研究方法

### 1 n-ヘプタン抽出液の調製

プラスチック製品からの溶出物の分析は既報<sup>5)</sup>に基づいて行った。すなわち、水洗し、風乾後のプラスチック製品を約2g (ラップフィルムの場合、約9cm×9cm)を切り取り、共栓付試験管に詰め、4mlのn-ヘプタンを加え、オープン加熱後、室温で放置し、n-ヘプタン溶液をガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計で同定および定量した。定量値は、4mlのn-ヘプタン溶液中の濃度で示した。

### 2 活性調査用DMSO溶液の調製

内分泌攪乱作用の調査のために、エストロゲン様活性分析に使用したn-ヘプタン抽出物の適用濃度は、以下のようにして調製した。すなわち、同定された化合物の濃度を和した総濃度を、フタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)のモル濃度に換算して、2.5mM (ラップなど) および28~64mM (手袋など) に規格化した。規格化した各濃度の溶液の溶媒n-ヘプタンを留去して、あらたにdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した溶液を活性調査に適用した。活性調査は分担研究者の井上が行った。

## 3 市販プラスチック製品試料

国内外の食品包装用ラップフィルム、おもちゃ、学校給食用器具およびペットボトルなど156点(表1)を2.1の方法でn-ヘプタン抽出溶液を調製し、溶液中の化合物の同定および定量分析に供した。

これらのプラスチック製品n-ヘプタン抽出液の中から、食品包装用ラップ・フィルム3点、学校給食用等手袋4点、おもちゃ2点、テーブルクロス1点およびスリッパ1点を選び、活性調査に供した。

## C. 結果

市販プラスチック製品のなかで、手袋については3点が明らかな活性を示した。その他の手袋、ラップ、おもちゃ、テーブルクロス、スリッパにもわずかな活性が認められた。

プラスチック製品のなかで、最も強い活性を示した給食用手袋3点から溶出したn-ヘプタン溶液中に同定された共通の化合物とその平均濃度は、フタル酸ベンジルブチル(BBP) (2500ppm)及びフタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)(7500ppm)であった。さらに、この活性を有した手袋2点から、共通にアジピン酸ジ2-エチルヘキシル(DEHA) (2500ppm) が検出された。おもちゃ、テーブルクロスおよびスリッパにもわずかな活性が認められたが、これらのプラスチック製品3点に共通してDEHPが同定され、平均濃度は18000ppmであった。また、同様にわずかな活性を示したラップ3点から、共通してDEHPまたはアジピン酸ジn-オクチル(DnOA) が平均濃度で6900ppm 検出された(表3)。活性分析に使用したn-ヘプタン抽出液は、それぞれ調製し、2.5mM(ラップなど) および28~64mM (手袋など) で適用した(表2)。

## D. 考察

既に開発したプラスチック製品の簡便抽出法で溶出させたn-ヘプタン溶液のエストロゲン活性を調査したところ、明らかな陽性を示す物質の存在が示された。従って、本法の簡便性は多数の試料中の内分泌攪乱物質検索に極めて有効であると考えられる。

今回のエストロゲン様活性調査に用いた試料は、2.5mM~64mMと異なる濃度で調製された。今後は、量的な面からの検討が必要である。

## 文献

- 1) 厚生省食品化学課編：食品用プラスチック衛生学，297-307pp，1980.
- 2) A.M.Soto et al.: Unviron. Helth Perspect. 92:167-173,1991.
- 3) A.V.Krishnan et al.:Endocrinology 132: 2279-2288,1993.
- 4) 片瀬隆雄：化学工業49:913-921,1998.
- 5) 片瀬隆雄：神奈川県立衛生短期大学紀要, 15:13-19,1982.

表1 化学分析に供した市販プラスチック製品一覧

市販プラスチック	I D 番号			合計	
1. 食品包装用 ラップフィルム	業務用	市販用	小計	132 枚	
	日本	49枚 (R01-R50)	16枚 (R51-R66)		65 枚
	韓国	16枚 (R101-R116)	6枚 (R141-R146)		22 枚
	中国	34枚 (R151-R184)	11枚 (R190-R200)		45 枚
	小計	99枚	33枚		
2. おもちゃ等	7点 (R201-R207)			7点	
3. 学校給食用器具	5点 (R501-R505)			5点	
4. ペットボトル	12点 (R211-R222)			12点	
合計				156 点	

表2 エストロゲン様活性調査に供した試料一覧

		換算濃度	活性判定	同定された化合物
024-0	おもちゃ (豚) (R201)	5.4mM	++	DEP
025-0	おもちゃ (鞠) (R202)	64 mM	++	DEHP
026-0	スリッパ (R206)	33 mM	++	DEHP
027-0	テーブルクロス (R207)	41 mM	++	DEHP
028-1	手術用手袋 (R205)	33 mM	+++	BBP, DEHP
-2	学校給食手袋 (R501)	28 mM	+++	BBP, DEHP
-3	学校給食手袋 (R502)	31 mM	+++	BBP, DEHP, DEHA
-4	学校給食手袋 (R503)	31 mM	+	DEHP
010-1	ラップ(A型) (R 09)	2.5mM	+	DnOA
-2	ラップ(B型) (R 40)	2.5mM	+	AAE(C <sub>6</sub> ~C <sub>10</sub> )
-3	ラップ(韓国) (R101)	2.5mM		DEHP, DEHA
011-0	DEHP -	2.5mM	++	—————
010-0	AAE(C <sub>6</sub> ~C <sub>10</sub> ) -	2.5mM	+	—————

化合物の略号は表3の脚注参照：

表3 エストロゲン活性を示した試料のプラスチック製品中で同定された化合物と濃度

プラスチック製品 (ID)	同定された化合物 (濃度: ppm)							エストロゲン 活性	
	DEP	BBP	DEHP	DEHA	DnOA	AAE	総濃度	mM 濃性	(ID)
おもちゃ (豚) (R201)	1,200						1,200	5.4 ++	(024-0)
おもちゃ (鞠) (R202)			25,000				25,000	64 ++	(025-0)
スリッパ (R206)			13,000				13,000	33 ++	(026-0)
テーブルクロス (R207)			16,000				16,000	41 ++	(027-0)
手術用手袋 (R205)	5,400	7,300					13,000	33 +++	(028-1)
学校給食手袋 (R501)	1,800	7,200	2,300				11,000	28 +++	( -2)
学校給食手袋 (R502)	1,900	7,900	2,600				12,000	31 +++	( -3)
学校給食手袋 (R503)		12,000					12,000	31 +	( -4)
ラップ(A型) (R 09)					7,600		7,600	2.5 +	(010-1)
ラップ(B型) (R 40)					6,200		6,200	2.5 +	( -2)
ラップ(鞆) (R101)			24	7,300			7,300	2.5 +	( -3)

化合物の略号 ;

- DEP : diethyl phthalate                      フタル酸ジエチル
- BBP : benzylbutyl phthale                  フタル酸ベンジルブチル
- DEHP: di-2-ethylhexyl phthalate          フタル酸ジエチルヘキシル
- DEHA: di-2-ethylhexyl adipate            アジピン酸ジエチルヘキシル
- DnOA: di-n-octyl adipate                  アジピン酸ジn-オクチル
- AAE : adipic acid ester (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)        アジピン酸エステル(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 混合物)
- AAE-C<sub>6</sub>: di-n-hexyl adipate                アジピン酸ジn-ヘキシル
- AAE-C<sub>7</sub>: di-n-heptyl adipate                アジピン酸ジn-ヘプチル
- AAE-C<sub>8</sub>: not-yet-identified                未同定アジピン酸エステル
- AAE-C<sub>9</sub>: di-n-nonyl adipate                アジピン酸ジn-ノニル
- AAE-C<sub>10</sub>: di-n-decyl adipate                アジピン酸ジn-デシル