

Ⅲ. おもちゃからのフタル酸ジイソノニル (DINP) の人工唾液及びヒト唾液への移行-溶出条件の検討

1- まえがき

前報において、乳幼児用おしゃぶりあるいは歯がためには、フタル酸ジイソノニル (DINP) が約 30%~50%含有していることを明らかにした。

本実験では、これらのポリ塩化ビニル (PVC) 製のおしゃぶり、あるいは歯がためとして、「おしゃぶり」、「歯がため」及び「がらがら-A」を用いて人工唾液による溶出、およびヒトの口腔内における唾液への溶出について検討した。

2- 実験方法

試薬・器具

フタル酸ジイソノニル (DINP) : 和光純薬社製 (試薬特級), 関東化学社製 (環境分析用) および Aldrich 社製 (試薬特級),

アセトニトリル : 関東化学社製 (HPLC 分析用)

n-ヘキサン ; 関東化学社製 (フタル酸エステル分析用)

以上 2 種の試薬は、あらかじめフタル酸エステルが含有されていないことを確認したもの。

塩化ナトリウム : 関東化学社製 (残留農薬分析用)

無水硫酸ナトリウム : 関東化学社製 (残留農薬分析用)

これら 2 種の試薬は使用前に 150℃で一昼夜加熱した後、デシケーター内で放冷した。

人工唾液 : 塩化ナトリウム 4.5g, 塩化カリウム 3.0g, 無水硫酸ナトリウム 0.3g, 塩

化アンモニウム 0.4g, 乳酸 3.0g および尿素 0.2g をそれぞれ蒸留水 1L に溶かしたものを人工唾液として用いた。ただし、上記した蒸留水およびその他の試薬はフタル酸エステルが含まれないことを確認した。

ネジ蓋付 50mL 容遠心分離管 : ガラス製
メスフラスコ : 50mL 容と 100mL 容のガラス製

共栓付三角フラスコ : 100mL 容のガラス製
トールビーカー : 100mL 容および 200mL 容
ガラス製

上記のガラス器具およびその他本実験に使用したガラス器具は全て、あらかじめ 210℃で一昼夜以上加熱し使用した。

装置

振とう回数可変装置付振とう機 ; RECIPRO SHAKER, SR-II W, タイテック社製

振とう回数可変装置付振とう培養器 ; UNI THERMOSHAKE, NTS-2000, EYELA 社製

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) ; QP5050 型 (島津製作所社製)

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ; LC-10 型 (島津製作所製)

試験片の作製

試験品, ポリ塩化ビニル製おもちゃの「おしゃぶり (DINP 58.3%含有)」、「歯がため (DINP 35.9%含有)」および「がらがら-A (DINP 31.9%含有)」それぞれを表面積が 15cm²となるように縦 3cm, 横 2.5cm に切断したものを試験片とした。

人工唾液による DINP の溶出試験

試験片 1cm²あたり溶出溶媒 2mL となるように、人工唾液 30mL を溶出容量とした。

それぞれの試験片をネジ蓋付 50mL 容遠心分離管と共栓付 100mL 容三角フラスコにそれぞれとり、人工唾液 30mL を加えた後、蓋をし、15 分間ずつを 1 区分とし、それぞれについて振とう溶出試験を行なった。第 1 区分として溶出した人工唾液を採取し、残りは廃棄し、新たに人工唾液 30mL を加え次区分の溶出試験を行ない、第 2 区分とした。同様に 2 区分を行ない、合計 4 区分、60 分間の溶出試験を行なった。採取したそれぞれの振とう区分溶出液 5mL にアセトニトリル 5mL を加え HPLC 用試験液とし、DINP 量を測定した。

ヒトの口腔内における DINP の唾液中への移行試験

DINP 含有の 3 種の PVC 製おもちゃ試験片を上記のように作成し、それぞれについて、被験者(男性 3 人、女性 1 人の計 4 人)の口腔内に入れ、かるく chewing を 15 分間行なった。口腔内に溜まった唾液全てを 50mL 容ねじ蓋付遠心分離管に吐き出し、試験片を取り出した後、少量の蒸留水で軽く口内をすすぎ、別のビーカーにその洗液を入れ、5 分間休憩した(第 1 区分)。その後、先の試験片を口に入れ、同様に 15 分間 chewing し、別の 50mL 容ねじ蓋付遠心分離管に唾液を採取し、蒸留水で口内をすすぎ、5 分間休んだ(第 2 区分)。以後同様にこの操作を 2 回行った(第 3, 4 区分)。15 分間隔でそれぞれ得られた唾液は、容量と pH を測定後、アセトニトリルを 10mL 正確に加え、HPLC 分析用試験液とした。

DINP の HPLC および GC-MS 分析条件

DINP の定量を行なうために HPLC を、確認を行なうために GC-MS を用いた。

HPLC の分析条件と GC-MS 分析条件は前報 I に準じた。

3- 実験結果および考察

人工唾液による DINP の振とう溶出

人工唾液による溶出は、1) 振とう機による 50mL 遠心分離管での上下振とうで、室温(18°C)、振幅 40mm、振とう回数 300 回/分、2) 振とう培養器による共栓付 100mL 容三角フラスコでの左右振とうで、温度は 37°C、振幅 40mm、振とう回数 120 回/分、ビー玉を入れる場合と入れない場合、および 3) 超音波処理で超音波 28kHz、でそれぞれ行なった。

1) 上下振とうによる溶出について

得られた結果を表 III-1 に示した。試験品おもちゃの PVC 製「歯がため(DINP 35.9%含有)」の場合、第 1 区分の 0~15 分では 316 μ g、第 2 区分 349 μ g、第 3 区分 342 μ g および第 4 区分 261 μ g であり、60 分間における総溶出量は 1267 μ g であった。

おもちゃ「がらがら-A(DINP 31.9%含有)」はそれぞれの区分での溶出量は 422 μ g、480

表 III-1 上下振とう溶出による PVC 製おもちゃからの DINP 溶出量

		DINP 溶出量 (μ g)			
区分	振とう時間 (分)	試験品名	歯がため	がらがら-A	おしゃぶり
1	0 - 15		316 [11.3]	422 [14.0]	400 [13.0]
2	15 - 30		349 [12.0]	380 [13.0]	440 [15.0]
3	30 - 45		342 [11.0]	365 [12.2]	397 [13.1]
4	45 - 60		261 [9.4]	332 [11.2]	351 [12.0]
総DINP溶出量			1267 [11.1]	1498 [12.5]	1588 [13.2]

[] 内: 人工唾液 1mL あたりの DINP 溶出量 (μ g/mL)

振とう条件: 300 回/分、振幅 40mm、室温(18°C)

溶出溶媒: 人工唾液 30mL/1 区分

試験品: 歯がため(DINP 含有量 35.9%)

がらがら A(DINP 含有量 31.9%)

おしゃぶり(DINP 58.3%)

μg, 365 μg および 332 μg で、総溶出量は 1498 μg であった。また、「おしゃぶり (DINP 58.3%含有)」のそれは、それぞれの区分で 400 μg, 440 μg, 397 μg および 351 μg であり、60 分間の総溶出量は 1688 μg であった。

おもちゃ 3 種類の試験品に含まれる DINP 量はそれぞれ、35.9%, 31.9%, 58.3%であるが、人工唾液の溶出量はその含有量に比例関係にない結果となった。また、振とう時間による溶出量は、試験品 3 種ともに最初の 15 分間の第 1 区分より、第 2 区分の溶出量が増す傾向を示し、以降第 3 区分、第 4 区分とその溶出量はわずかに減少傾向が示された。

上記の実験結果から、上下振とう溶出における振とう回数 300 回/分では、3 種の試験品とも、溶出時間に関係なく、ほぼ一定の溶出量を示すことが明らかになった。

2) 左右振とうによる溶出について

左右振とう溶出には、溶出溶媒にビー玉

を加えない場合と 3 個加えた場合における 3 種類のおもちゃ試験品それぞれの DINP 溶出量を検討した。その結果を表Ⅲ-2 に示した。

ビー玉を添加しない時と添加した時の 3 種の試験品それぞれからの DINP 溶出量は、おもちゃに含有する DINP 量には影響されなかった。また、ビー玉添加なしでの振とう時間におけるそれぞれ区分間での DINP 溶出量にはバラツキがあり、一定値を示さなかった。一方、ビー玉を添加した溶出は、「おしゃぶり」と「歯がため」の第 1 区分を除いて、それぞれの区分間でほぼ一定の溶出傾向が見られた。また、60 分間における総溶出量はビー玉なしでは「歯がため」151 μg, 「ガラガラ-A」299 μg, そして「おしゃぶり」で 720 μg であり、「おしゃぶり」の溶出量は他の 2 種に比べて極めて高い溶出量であった。ビー玉添加では、「歯がため」で 223 μg, 「ガラガラ-A」で 311 μg, 「おしゃぶり」473 μg

表Ⅲ-2 左右振とう溶出によるPVC製おもちゃからのDINP溶出量

		DINP溶出量 (μg)					
振とう時間 区分 (分)	試験品名 ビー玉数	歯がため		ガラガラ-A		おしゃぶり	
		無	有	無	有	無	有
1	0 - 15	35.1 [1.2]	32.7 [1.1]	139 [4.6]	84.9 [2.8]	207 [6.9]	92.1 [3.1]
2	15 - 30	34.5 [1.2]	83.9 [2.8]	98.4 [3.3]	94.1 [3.1]	256 [8.5]	139 [4.6]
3	30 - 45	36.1 [1.2]	65.4 [2.2]	22.7 [0.8]	91.6 [3.1]	137 [4.6]	128 [4.3]
4	45 - 60	45.5 [1.5]	40.8 [1.4]	38.6 [1.3]	40.4 [1.3]	119 [4.0]	114 [3.8]
総DINP溶出量		151 [1.3]	223 [1.9]	299 [2.5]	311 [2.6]	719 [6.0]	473 [3.9]

[] 内；人工唾液1mLあたりのDINP溶出量(μg/mL)

振とう条件；左右振とう、120回/分、振幅40mm、37°C

ビー玉の数 無—0個、有—3個

溶出溶媒；人工唾液 30mL

試験品；歯がため(DINP含有量35.9%)

ガラガラ A(DINP含有量31.9%)

おしゃぶり(DINP58.3%)

であった。

以上の実験結果より、左右振とう溶出はビー玉を加えることによって、溶出用容器内の試験片と溶出溶媒の均一的な混和条件が得られることが判った。

3) 超音波処理による溶出について

上記に 1), 2) の実験方法と同じ条件で超音波処理して DINP の溶出を行なった。その結果を表Ⅲ-3 に示した。

超音波処理溶出のいおける 60 分間の総溶出量は、「歯がため」133 μg 、「ガラガラ-A」177 μg 、そして「おしゃぶり」で 372 μg であった。この溶出結果は、左右振とう溶出結果(表-Ⅲ-2)に近似していた。しかし、溶出時間の区分間での溶出量にバラツキがあった。とくに「おしゃぶり」の第 4 区分の溶出量は他の区分と比べてきわだった値となった。

超音波処理溶出は、振とう溶出と比較して振とう溶出の溶出傾向と異なった溶出傾向を示した。振とう溶出では、溶出時間が長くなるほど DINP 溶出量は若干減少傾向がみられたが、超音波処理では処理時間が長くなるほど溶出量が增大する傾向が見られた。

ヒト口腔内における DINP の唾液への移行

以上で得られた『人工唾液への溶出条件』が、『フタル酸エステルを含有する PVC 製歯がため、あるいはおしゃぶりなどを乳幼児が口の中に入れて、chewing したとき、口腔内の唾液に溶出するおそれのあるフタル酸エステル量』と近似しているかを検討するため、成人男性による口腔内での DINP 溶出-移行実験を「おしゃぶり」を用いて行なった。試験品として「おしゃぶり」について、表面積 30 cm^2 の試験片を被験者男性 2 人(A 氏:28 歳、

表Ⅲ-3 超音波処理によるPVC製おもちゃからのDINP溶出量

		DINP溶出量 (μg)		
振とう時間 区分	試験品名 (分)	歯がため	ガラガラ-A	おしゃぶり
1	0 - 15	12.4 [0.4]	21.4 [0.7]	94.4 [3.1]
2	15 - 30	29.3 [1.0]	18.9 [0.6]	47.1 [1.6]
3	30 - 45	32.4 [1.1]	49.3 [1.6]	33.3 [1.1]
4	45 - 60	59.3 [2.0]	87.8 [2.9]	198 [6.6]
総DINP溶出量		133 [1.1]	177 [1.5]	373 [3.1]

[] 内: 人工唾液1mLあたりのDINP溶出量($\mu\text{g}/\text{mL}$)

振とう条件: 超音波処理 28kHz,

溶出溶媒: 人工唾液 30mL

試験品: 歯がため(DINP含有量35.9%)

ガラガラ A(DINP含有量31.9%)

おしゃぶり(DINP58.3%)

B 氏:55 歳)の口腔内に入れ、軽く chewing を 15 分間行なった。口腔内の唾液を採取し、5 分間休憩後、同一の試験片を同様に 15 分間 chewing し、唾液を採取した。この操作を 2 回繰り返す、合計 60 分の唾液中への DINP 移行量を測定した。その結果を表Ⅲ-4 に示した。

被験者それぞれの唾液量は 25.3mL(A 氏)と 56.0mL(B 氏)であった。その唾液への DINP 溶出-移行量は 243 μg と 443 μg であり、2 人の平均溶出-移行量は 343 μg であった。これを唾液 1mL あたりの μg で表すと、それぞれ 9.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となり、ほぼ同じ溶出-移行量であった。このヒト唾液への溶

表Ⅲ-4 ポリ塩化ビニル製おもちゃからのヒト口腔内唾液へのDINP移行量

被験者	唾液量 (ml)	pH	DINP移行量 (μg)
A 氏	25.3	7.91	243 [9.6]
B 氏	56.0	7.41	443 [7.9]

DINP; フタル酸ジイソノニル

[] 内: 唾液1mLあたりのDINP溶出-移行量($\mu\text{g}/\text{mL}$)

試験品: おしゃぶり(DINP含有量58.3%)

被験者: A 氏 男性 28歳 B 氏 男性 55歳

表Ⅲ-5 ヒトの口腔内におけるDINPの唾液中への移行に及ぼすChewing時間の影響

Chewing 区分 時間(分)		DINPの移行量 (μg)							
		試験品名 おしゃぶり (DINP含有量58.3%)			歯がため (DINP含有量35.9%)		ガラガラ A (DINP含有量31.9%)		
		被験者	A氏	B氏	C氏	A氏	B氏	A氏	B氏
1	0 - 15		81.6 [13.6]	99.9 [9.6]	70.0 [6.5]	34.8 [4.4]	89.7 [10.0]	102 [11.0]	116 [12.3]
2	15 - 30		68.7 [13.7]	123 [14.5]	45.2 [4.1]	34.8 [3.8]	36.3 [4.3]	56.4 [5.8]	116 [16.1]
3	30 - 45		68.7 [8.8]	92.7 [10.3]	60.5 [6.7]	35.2 [4.0]	38.1 [4.5]	77.9 [8.4]	60.8 [8.1]
4	45 - 60		49.2 [7.9]	84.9 [10.6]	54.8 [6.0]	50.9 [5.2]	42.5 [5.2]	71.6 [9.0]	79.9 [10.0]
総DINP移行量(60分間)			268 [10.7]	401 [11.2]	231 [5.8]	156 [4.4]	207 [6.0]	308 [8.4]	373 [11.6]
唾液量			25.0ml	35.9ml	39.9ml	35.7ml	34.3ml	36.6ml	32.2ml
唾液のpH			7.11	7.39	7.43	7.27	7.65	7.09	7.53

DINP: フタル酸ジイソノニル

〔 〕内: 唾液1mLあたりのDINP溶出-移行量(μg/mL)

被験者: A氏, 男性24歳, B氏, 男性28歳, C氏, 女性27歳

出-移行量は, 上下振とうでの溶出量の約20%量, 左右振とうでビー玉添加無しで50%量であった。また, ビー玉を添加した左右振とうの場合では約77%量であり, ヒト唾液への溶出-移行量とほぼ近似した値であった。

以上の実験結果を踏まえて, PVC製おもちゃの試験品「おしゃぶり」, 「歯がため」および「ガラガラ-A」の3種について, 健常人男性2人(A氏:24歳, B氏:28歳)と健常人女性1人(C氏:27歳)計3名の被験者の口腔内におけるDINPの唾液への15分単位の移行量を測定し, 試験品間の溶出-移行量を比較した。その結果を表Ⅲ-5に示した。

「おしゃぶり」, 「歯がため」および「ガラガラ-A」の試験品それぞれから溶出-移行したDINP量は被験者3人とも第1区分, 第2区分, 第3区分および第4区分ともほぼ一定の値を示した。また, 唾液1mLあたりのDINP溶出量は「おしゃぶり」がA氏10.7μg/mL, B氏11.2μg/mL, 女性のC氏5.8μg/mLであった。また, 「歯がため」はA氏4.4μg/mL,

B氏6.0μg/mL, 「ガラガラ-A」はA氏8.4μg/mL, B氏11.6μg/mLであった。この結果より, 女性の場合, 唾液量は被験者男性とほぼ同一であるが, DINPの溶出量は男性2人のそれぞれ半分量であることがわかった。また60分間のchewingにおいて, 3人(男性2人, 女性1人)の「おしゃぶり」総溶出量は268μg, 401μgおよび231μgで平均300μg, 「歯がため」2人(男性2人)では156μg, 207μg, 平均182μg, 「ガラガラ-A」2人(男性2人)ではそれぞれ308μgと373μg, 平均341μgであった。

以上の結果より3種類のおもちゃ試験品からのDINP総溶出量, 区分間溶出挙動ともに, ビー玉添加, 振とう回数120回/分, 振幅40mmの左右振とう結果と類似していたことがわかった。今後これらの溶出条件をもとにさらに, 人工唾液の種類あるいは振とう方法などの検討を行なわなければならない。

また今回検討した試験品からのDINPの溶出-移行量は, 試験品の種類に関係するが,

試験品中の高濃度の含有(存在)量には関係しないことがわかった。そして、唾液の pH も、DINP 溶出量にはあまり影響されないことがそれぞれ明らかにされた。

4- まとめ

PVC 製おもちゃ「歯がため」、「おしゃぶり」および「ガラガラ-A」それぞれに含まれる DINP の人工唾液への溶出とヒト口腔内唾液への溶出量について比較検討し、以下の結果が得られた。

1) 振とう回数 300 回/分における上下振とう溶出による人工唾液への DINP 溶出量は、3 試験品ともに 15 分単位の溶出区分に関係なくほぼ一定の溶出量を示であり総溶出量は 1267 μg 、1498 μg および 1588 μg であった。

2) 振とう回数 120 回/分、振幅 40mm での左右振とう溶出による人工唾液への DINP 溶出量は、「おしゃぶり」および「ガラガラ-A」において、区分間によるバラツキが生じた。しかしビー玉を 3 コ添加することによって、3 試験品ともにほぼ均一の溶出量となった。また、その総溶出量はビー玉添加無しの場合 151 μg 、719 μg 、299 μg であり、添加した場合 223 μg 、311 μg および 473 μg であった。

3) 超音波処理による人工唾液への DINP 溶出量は、溶出区分を増すほど溶出量が增大する傾向が見られた。一方、振とう溶出では若干の減少傾向がみられた。

4) ヒトの chewing による 3 試験品それぞれからのヒト唾液への溶出-移行量は、各区分間において被験者 3 人ともにほぼ一定の値を示した。また、その平均総溶出-移行量は「おしゃぶり」が 300 μg 、「歯がため」182 μg 、「ガラガラ-A」341 μg であった。

以上の結果より、ヒト口腔内における DINP の唾液中への溶出-移行量に近い人工唾液による溶出条件は、今回検討した製品は DINP 一種の実験ではあるが、溶出溶媒(人工唾液)にビー玉 3 コを添加した振とう回数 120 回/分、振幅 40mm の左右振とうによる溶出であった。今後これらの試験結果をもとに、人工唾液の種類あるいは振とう方法などについて検討し、ヒト唾液への溶出移行量に近似した溶出条件の設定を行なう予定である。