

おもちゃからのフタル酸エステルの溶出に関する調査研究

協力研究者 松木 容彦 食品薬品安全センター秦野研究所 研究部長

研究要旨

近年、野生動物において様々な化学物質による生殖機能への影響等が多数報告されており、その作用から外因性内分泌かくらん物質（環境ホルモン）として人体に対する影響に社会的関心が高まり、国をあげての調査研究が進められている。本研究は、これら内分泌かくらん物質と称される化学物質のうち、プラスチック製品の可塑剤として多用されているフタル酸エステル類について、特に、乳幼児が種々のプラスチック製おもちゃをおしゃぶりした時におもちゃから溶出する可塑剤による曝露量を推定するための *in vitro* 試験法を確立することを目的に、フタル酸ジイソノニル (DiNP) を例に基礎的検討を行った。

まず最初に、DiNP を測定するために高速液体クロマトグラフ法による分析条件の検討を行い、定量範囲 50~1000 ng の測定法を確立した。また、実際のおしゃぶり行為により唾液中へ溶出する DiNP 量を推定するため、成人男子被験者による予備試験を行った結果、DiNP 溶出量は約 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (24.5 $\mu\text{g}/5 \text{ min}$) であった。

次に、おもちゃ試料を用いて DiNP の抽出方法について種々検討した結果、抽出方法としては縦振盪抽出法が最も抽出量のバラツキも少なく、かつ、効率が良かった。そこで縦振盪抽出法により抽出条件を検討したところ、振盪時間については、振盪開始直後から DiNP の溶出量が直線的に増加しその後定常状態になること、また、抽出液については、塩濃度よりその液性 (pH) により DiNP 溶出量が異なることが判った。また、同一試料を繰り返し抽出したところおおよそ振盪 20 回を超えると DiNP 溶出量は急激に減少することが明らかとなり、実際のおしゃぶり行為においても長期に亘って接するものについては同様の傾向があると推測された。以上の検討結果から、おもちゃ試料の溶出試験における抽出方法は、縦振盪抽出法 (300 stroke/min) を用い、振盪時間は、DiNP の溶出量が定常状態とならない 10 分、抽出液は人工唾液とし、その液量は 1 cm^3 当り 2 mL の割合、液性はヒト唾液と同程度の pH、すなわち pH7 とした。また、抽出操作中のおもちゃ試料の動きが DiNP 溶出量に重大な影響を及ぼすことから、おもちゃ試料を直径 3 cm、表面積約 14 cm^2 の円形サンプルとし、抽出容器は 50 mL のガラス製遠心管とした。本条件下、おもちゃ試料 9 サンプルを溶出試験した結果、DiNP の溶出量は約 60~130 $\mu\text{g}/10 \text{ min}$ であり、各測定値のバラツキは少なかった。一方、同程度の表面積を有する非円形サンプルでは、その溶出レベルが円形サンプルに比し著しく高値を示すものが見られ、両者の違いは抽出中のサンプルの動きに起因するものと推察され、これら非円形サンプルについてはその形状と抽出率等について検討を行い、おしゃぶり時の溶出との関係について精査することの必要性が示された。

以上、円形サンプル作製可能なおもちゃ試料についてさらにサンプルの大きさと DiNP 抽出率との関係を調整することにより、本 *in vitro* 抽出法が実際の乳幼児のおしゃぶり行為による DiNP 曝露量推定の外挿法としての有用な方法となる可能性が示された。

A. 研究目的

乳児や幼児が種々のおもちゃをおしゃぶりした時に、おもちゃから溶出するフタル酸エステル類（可塑剤）による曝露量を推定するための *in vitro* 試験法を確立することを目的とし、特にフタル酸ジイソノニル（DiNP）が可塑剤として添加されている幼児用おもちゃの中から、和光純薬工業（株）タイプの DiNP を使用している歯がためを検討試料に用いて溶出試験の抽出条件の検討を行った。さらに設定した抽出条件下で、数種のもちゃ試料を加え DiNP の溶出試験を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

1) おもちゃ試料およびおもちゃサンプル

①おもちゃ試料

歯がため、人形A、人形C、ままごと道具K~Q、ソフトドールM~Rの5品目。以上、(社)おもちゃ工業会より提供された。

②おもちゃサンプル

提供された5品目のおもちゃ試料から、原則として直径3cmの型抜きで円形ディスクを打ち抜き、以下に記載した12種のおもちゃサンプルを採取した。各試料からのサンプル採取数(n)は3とし、それぞれ抽出操作を行う前に流水で軽く水洗いして重量を測定した後、溶出試験に用いた(Fig.1)。

歯がため：歯がため部分（青、紫、緑色樹脂より1つずつ採取）の1サンプル

人形A：肌色樹脂のペイント部分の1サンプル

人形C：人形（白色樹脂およびそのペイント部）、車（緑色樹脂）およびタイヤ（青、黄、白色樹脂より1つずつ採取）部分の3サンプル

ままごと道具K~Q：パン（淡黄色樹脂およびそのペイント部）、ポテト（黄色樹脂）、チーズ（黄色樹脂）およびレタス（黄緑色樹脂）部分の4サンプル

ソフトドールM~R：白色樹脂部分、橙

色樹脂部分、肌色樹脂ペイント部分の3サンプル

なお、サンプルの採取に当っては、おもちゃ試料の大きさあるいは形態等を考慮し、ままごと道具のレタスおよびチーズについては、直径約1cmの穴の開いた円形サンプルとして、ポテトについては非円形サンプルとして採取した。また、各おもちゃサンプルの表面積は表裏合わせて約14cm²とし、各樹脂の切断面は表面積に含めなかった。一方、ペイント部は、サンプル片側表面がカラーコーティングされたものとした。

2) 標準物質

フタル酸ジイソノニル(diisononyl phthalate (DiNP))は市販の特級試薬（和光純薬工業（株））および環境分析用（関東化学（株））を購入し用いた。

3) 試薬

塩化カリウム、塩化アンモニウム、尿素：関東化学（株）、特級試薬

水酸化ナトリウムおよび乳酸：和光純薬工業（株）、特級試薬

塩化ナトリウムおよび硫酸ナトリウム：関東化学（株）、残留農薬試験用

アセトニトリル：関東化学（株）、HPLC用

アセトン：関東化学（株）、フタル酸エステル試験用

4) 使用機器

振盪器：TAIYO RECIPRO SHAKER SR-IIw（大洋科学（株））

恒温振盪水槽：Personal Lt-10（大洋科学（株））

超音波洗浄機：US-100（ジーエルサイエンス（株））

5) 標準溶液の調製

DiNP 標準物質約50mgを精秤し、アセトン50mLに溶解して約1mg/mLの標準原液とした。この標準原液をアセトニトリル

で希釈して 0.5、1、5 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液とした。

6) 人工唾液の調製と pH 調整

① 人工唾液の調整

塩化ナトリウム 4.5 g、塩化カリウムおよび硫酸ナトリウム各 0.3 g、塩化アンモニウム 0.4 g、尿素 0.2 g、乳酸 3 g を超純水（以下、水）に溶解した後、全量を 1 L とし、人工唾液として用いた。

② pH 調整

人工唾液の pH の調整は以下に示す方法により行った。

pH 2：①で調製した人工唾液をそのまま使用した（pH 2.2~2.5）。

pH 4：①と同じ組成の人工唾液を 0.5 mol/L 水酸化ナトリウムで pH を約 4 に調整した後、水で全量を 1 L とした。

pH 7：上記と同様に 0.5 mol/L 水酸化ナトリウムで pH を 6.8~7 に調整した後、水で全量を 1 L とした。

pH 8.5：上記と同様に 0.5 mol/L 水酸化ナトリウムで pH を約 8.5 に調整した後、水で全量を 1 L とした。

2. HPLC による測定

1) HPLC 条件

装置：島津高速液体クロマトグラフ LC-6 A アイソクラティックシステム

カラム：TSKgel ODS 80TSQA (4.6×250 mm)

東ソー

移動相：アセトニトリル

流速：1 mL/min

カラム温度：40°C

測定波長：225 nm

注入量：25~100 μL

2) 検量線の作成

DiNP 標準溶液 (0.5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL を 1) の測定条件下で測定して得られたピーク高を用い、最小二乗法 (重み=1) により回帰式を求めた。

3. DiNP 抽出方法の検討

おもちゃ試料から溶出する可塑剤の抽出条件を確立するため、可塑剤として DiNP が添加されている歯がためを検討試料として、ヒト唾液中への DiNP の溶出について調べた。ついで、抽出方法を検討した後、縦振盪抽出法により抽出条件の検討を行った。

1) ヒト唾液による DiNP 抽出予備試験

歯がためを流水で軽く洗った後、被験者 (33 歳、男、非喫煙者、1 名) が 5 分間試料をしゃぶり、その間の唾液を透明摺りガラス製遠心管に採取した。唾液量を測定後、同量のアセトニトリルを加えて混和し、遠心分離 (約 2000×g、5 分) 後、上清を得 HPLC により測定した。なお、予め別に唾液を採取して同様に処理し、ブランク試料として用いた。

2) 抽出方法の検討

おもちゃ試料を以下の条件で抽出し、溶出する可塑剤 (DiNP) の量を比較した。

① 200 mL のトルピーカー内に、ビー玉 (約 15 mm ϕ 、上下各 8 個) で挟むように歯がため (3×5 cm) を静置し、そこに人工唾液 (pH 2、60 mL) を加えた後、38°C の恒温振盪水槽で 24 時間振盪 (90 stroke/hr) 抽出して得られた抽出液を直接 HPLC で測定した。

② 歯がため (3×5 cm) を 200 mL のトルピーカーに静置し、人工唾液 (pH 2、60 mL) をえた後、38°C の恒温振盪水槽で 1 時間振盪 (160 stroke/hr) 抽出して得られた抽出液を直接 HPLC で測定した。

③ 歯がため (3×5 cm) を 200 mL のトルピーカーに静置し、人工唾液 (pH 2、60 mL) を加えた後、10 分間超音波抽出して得られた抽出液を直接 HPLC で測定した。

④ 歯がため (1.5×2.5 cm) を 50 mL の透明摺りガラス製遠心管に静置し、人工唾液 (pH 2、30 mL) を加えた後、10 分間縦振盪 (300 stroke/min) 抽出して得られた抽出液を直接 HPLC で測定した。

⑤ 歯がため (1.5×2.5 cm) を 50 mL の透明摺りガラス製遠心管に静置し、人工唾液

(pH2、30 mL)を加えた後、10 分間横振盪(300 stroke/min) 抽出して得られた抽出液を直接 HPLC で測定した。

3) 縦振盪抽出法による抽出条件の検討

① 振盪時間による比較

50 mL の透明摺りガラス製遠心管に歯がため(1.5×2.5 cm)を静置し、人工唾液(pH 2、30 mL)を加えた後、10、15、30、60 および 120 分間縦振盪(300 stroke/min) 抽出した。

② 抽出液量による比較

50 mL の透明摺りガラス製遠心管に歯がため(1.5×2.5 cm)を静置し、15、30 および 45 mL の人工唾液(pH 2)を加えた後、各々10分間縦振盪(300 stroke/min) 抽出した。

③ 抽出液の pH による比較

50 mL の透明摺りガラス製遠心管に歯がためを静置(1.5×2.5 cm)し、pH 2、4、7 および 8.5 の人工唾液(30 mL)を加えた後、各々10分間縦振盪(300 stroke/min) 抽出した。

④ 繰り返し抽出による比較

50 mL の透明摺りガラス製遠心管に歯がため(1.5×2.5 cm)を静置し、人工唾液(pH 2) 30 mL ずつで繰り返し抽出(縦振盪、300 stroke/min、10 分間、1~100 回)して、初回および以後、10 回抽出毎の各抽出液について測定した。

4. おもちゃ試料からの DiNP の溶出試験

溶出試験に用いたおもちゃサンプルは、提供された種々のおもちゃ試料の中から事前に燃焼法による材質の確認試験およびヘキサン抽出による材質試験を実施して、各試料中に含まれる可塑剤種を確認した後、可塑剤として和光純薬工業(株)タイプの DiNP が添加されているおもちゃ試料5品目を選択し、そこからサンプルを採取して用いた。

1) 抽出条件

抽出溶媒：人工唾液(pH 7)、30 mL

抽出方法：縦振盪抽出法(約300stroke/min)、10分間

容器：50 mL 透明摺りガラス製遠心管

2) 測定方法

50 mL の透明摺りガラス製遠心管におもちゃサンプル(原則として、直径3 cm、円形ディスク)を静置し、人工唾液(pH 7) 30 mL を加えた後、縦振盪抽出法(300 stroke/min)で10分間抽出した。得られた抽出液に等量のアセトニトリルを加え混和した後、その100 μLを2.1)の測定条件下 HPLC に注入した。得られた DiNP のピーク高を2.2)の検量線を用い定量して溶出した DiNP 量(μg/100 μL)を求めた。

C. 研究結果

1. ヒト唾液による DiNP 抽出予備試験

ヒトがおもちゃを実際にしゃぶった場合、唾液中にどの程度の可塑剤が溶出するかを調べるために、被験者(33歳、男、非喫煙者、1名)をたて、歯がためを用いて予備試験を行った。その結果、唾液中へ溶出した DiNP の総量は、5分間で24.5 μg、唾液中濃度としては約2 μg/mLであった(Table 1)。

2. 抽出方法の検討

歯がためをビー玉/インキュベーター振盪抽出法(38°C、90 stroke/hr、24時間)、インキュベーター振盪抽出法(38°C、160 stroke/hr、1時間)、超音波抽出法(10分間)、縦振盪抽出法(300 stroke/min、10分間)および横振盪抽出法(300 stroke/min、10分間)の5方法により抽出した時に、人工唾液(pH 2)へ溶出する DiNP 量を比較した。その結果、ビー玉/インキュベーター振盪抽出法では、DiNP はほとんど検出されなかったのに対し、インキュベーター振盪抽出法および超音波抽出法では人工唾液1 mL 当りの溶出量は、それぞれ4.33 および1.01 μg の DiNP が溶出した。また、同一条件下で振盪方向の違いによる溶出量の比較をしたところ、人工唾液1 mL 当りの溶出量は、

縦振盪抽出法では 9.02 μg 、横振盪抽出法では 6.83 μg の DiNP が溶出した。なお、これらの抽出方法で最もバラツキ (CV%) の少なかった方法は縦振盪抽出法の 11.8%、最もバラツキの大きかった方法は超音波抽出法の 39.2%であった (Table 2)。

3. 縦振盪法による抽出条件の検討

1) 振盪時間による比較

人工唾液 (pH 2) を用い、縦振盪抽出法 (300 stroke/min) による振盪時間と DiNP 溶出量の関係を調べた。その結果、人工唾液 1 mL 当りの DiNP の溶出量は、振盪 10 分では 6.72 μg 、15 分では 7.45 μg 、30 分では 9.87 μg 、1 時間では 10.7 μg 、2 時間では 11.2 μg と、振盪開始初期には直線的に増加しその後定常状態となる傾向が見られた (Fig.2)。

2) 抽出液量による比較

縦振盪抽出法 (300 stroke/min) により 10 分間抽出した時の溶出液 (人工唾液、pH 2) 量と DiNP 溶出量との関係を調べた。その結果、人工唾液中に溶出した DiNP の総量は、液量 15 mL では 211 μg 、30 mL では 202 μg 、45 mL では 4.82 μg であり、液量 15 および 30 mL では DiNP の溶出量にほとんど差が見られないのに対し、45 mL では、それらに比し溶出量は約 1/4 であった (Table 3)。

3) 抽出液の pH による比較

pH 2 から 8.5 の人工唾液を用い、縦振盪抽出法 (300 stroke/min、10 分間) により抽出した時の DiNP 溶出量を比較した。その結果、DiNP 溶出量は、pH 2 では 2.38 $\mu\text{g/mL}$ 、pH 4 では 2.01 $\mu\text{g/mL}$ 、pH 7 では 6.19 $\mu\text{g/mL}$ 、pH 8.5 では 8.58 $\mu\text{g/mL}$ と、中性から弱アルカリ性側の溶出液では弱酸性から酸性側の 2 ~ 3 倍高い溶出量を示した (Table 4)。

4) 繰り返し抽出による比較

人工唾液 (pH 2、30 mL) を用い、縦振盪抽出法 (300 stroke/min、10 分間) により同一の歯がためを繰り返し抽出した時の DiNP 溶出量を DiNP のピーク高として比較した。その結果、初回抽出から 5 回抽出時までの各抽出毎のピーク高の平均値 ($n=3$) は 5323~6807 (5 回目までの平均値 6134 (CV:11%)) と抽出液中の DiNP 溶出量はほぼ一定であった (Table 5)。そこで、新たな歯がためを用い、100 回まで抽出を繰り返し各 10 回毎の DiNP のピーク高を比較したところ、初回、10 回および 20 回までのピーク高の平均値は 9621 であり、繰り返し抽出することによる DiNP 溶出量に大きな変化は見られなかった。また、この間のバラツキも 5 回目抽出までと同様であった。しかしながら、30 回以上抽出を繰り返すことにより、DiNP のピーク高は徐々に低下し、70 回以後では平均ピーク高 1230 (CV:23%) と DiNP 溶出量は 20 回抽出以前の約 15%まで減少した (Table 6)。

以上、1 ~ 3 の検討結果を踏まえ、おもちゃ試料の溶出試験における抽出条件を次のように設定した。すなわち、抽出方法は縦振盪抽出法 (300 stroke/min)、振盪時間は 10 分間、抽出溶媒は人工唾液とし、その pH はヒト唾液を考慮して pH 7、また、液量は食品衛生検査指針の溶出試験に準じて 1 cm^3 当たり 2 mL とし、抽出回数は 1 回とした。なお、抽出時の容器については、振盪中の試料の動きに影響を及ぼし溶出量のバラツキを生じる要因の一つ (サンプルと溶出液の接触具合) になるため、透明摺りガラス製遠心管 (50 mL) に統一した。

4. おもちゃ試料からの DiNP の溶出試験結果

上述のように設定した抽出条件により、和光純薬工業 (株) タイプの DiNP が可塑剤として添加されているおもちゃ試料 5 品目 (12 サンプル、各 $n=3$) について溶出試験を実施した。測定に供したサンプル

は、各おもちゃ試料から金属製の型抜きを用いて採取し、形状は原則として直径 3 cm の円形ディスク、表面積はままごと道具のチーズ、レタスおよびポテトは所定のサイズの円形ディスクに切断できず、形状も他のサンプルと異なったが、表裏合わせた表面積はおおむね 14 cm² とした。また、各サンプルの重量は平均 1.23~3.11 g と樹脂の厚みにより多少幅があるが、1 サンプル内のバラツキ(CV%)は最大 17.2%であった。本抽出条件下、得られた抽出液は、溶液中の均一性を高めるため、等量のアセトニトリルを混和し、その 100 μL を HPLC に注入し測定した。その結果、おもちゃ試料 12 サンプルの各平均溶出量は 574~61.1 μg の範囲にあり、ままごと道具のポテト>レタス>チーズ>ソフトドールの白色樹脂部>人形 A>人形 C の人形部>ソフトドールのペイント部>歯がため>ソフトドールのオレンジ色樹脂部>ままごと道具のパン>人形 C の車>タイヤ部分の順に多かった。また、同一種サンプルの溶出量のバラツキ(CV%)は 2.4~32.5%であった (Table 7)。

D. 考察・結論

戦後のプラスチック製品の普及と共に、フタル酸エステル類は塩化ビニル樹脂等に柔軟性を持たせるための可塑剤として多用されており、その一種のフタル酸ジイソノニル (DiNP) は、フタル酸に炭素鎖 9 個のノニルアルコールが 2 個エステル結合した物質である。この DiNP の製造原料であるノニルアルコールは工業的に異性体毎の分離精製が極めて困難であり、そこに含まれる異性体種の違いにより生成する DiNP の異性体種やその割合も異なる。そこで、まず、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて DiNP の標準物質について和光純薬工業 (株) と関東化学 (株) の 2 種を比較したところ、2 社間の標準物質においても異性体分布に大きな差が見られることがわかった (Fig. 3)。また一方、今回提供されたおもちゃ試料の中から、

DiNP を可塑剤として使用しているおもちゃ試料について同様にその異性体の分布パターンを調べた結果、DiNP の異性体の分布は大まかに和光純薬工業 (株) と関東化学 (株) の標準物質 2 種のパターンに分類が可能であり、中でも和光純薬工業 (株) タイプが多く使用されていることがわかった。

本研究では、乳幼児におけるフタル酸エステル類の曝露指標を求めることが最終目標であることから、おもちゃ試料からの可塑剤の溶出試験の抽出条件を設定するに当たり、より実際のヒトでの曝露状態を反映できるよう種々抽出条件の検討を行うと共に、設定した抽出条件下で溶出試験を実施した。

検討試料には提供されたおもちゃ試料の中から、和光純薬工業 (株) タイプの異性体分布パターンを示す DiNP を含む歯がためを用いた。まず、成人被験者 (33 歳、男、非喫煙者、1 名) より得られたヒト唾液中にどの程度の DiNP が溶出するかを調べた結果、唾液 1 mL 当たり約 2 μg、総溶出量 24.5 μg と短時間に予想以上の DiNP が溶出することがわかった (Table 1)。このことは、しゃぶる力や時間あるいは接し方等によっても異なると思われるが、実際に乳幼児がおもちゃ遊びやおしゃぶり行為等を通してかなりの量の可塑剤に曝露する可能性を示唆するものと考えられた。従って、抽出条件の設定には、先に得られたヒト成人での曝露結果を指標として検討を行った。

抽出方法として試料 1 cm² 当たり 2 mL の人工唾液 (pH 2) を用い、ビー玉/インキュベーター振盪抽出法 (38°C、90 stroke/hr、24 時間)、インキュベーター振盪抽出法 (38°C、160 stroke/hr、1 時間)、超音波抽出法 (10 分間)、縦振盪抽出法 (300 stroke/min、10 分間) および横振盪抽出法 (300 stroke/min、10 分間) の 5 つの方法について検討した結果、縦振盪抽出法が最も効率が良く、かつ、抽出量のバラツキも少なく、試料から DiNP を溶出できるこ

とが明らかとなった (Table 2)。従って、以後の条件検討ではこの縦振盪抽出法を用いることとした。次いで振盪時間および抽出液量について検討した結果、振盪時間 10 から 30 分までは DiNP の溶出量は時間と共に直線的に増加し、その後、振盪時間の延長により溶出量は定常状態を示した (Fig. 2)。また、抽出液量については、液量 15 および 30 mL では DiNP の溶出量に差が見られないのに対し、45 mL では急激な減少が見られた (Table 3)。前者における DiNP 溶出量の定常状態および液量 15~30 mL の抽出液で DiNP の溶出量がほぼ同レベルであることから、おもちゃ試料からの可塑剤の溶出量は溶出時間および抽出液量により飽和状態を呈することが推察された。一方、抽出液量の増加に伴う DiNP 溶出量の減少については、試料振盪中の様子から抽出溶媒量の増量に伴ない、溶媒中の試料の動きが緩慢になった結果と考えられた。このことは、前述の抽出方法の検討 (Table 2) において、試料単位面積当りの抽出液を定容にした時、各抽出方法により溶媒中での試料の動きが異なる、すなわち、抽出溶媒との接触状態が異なるために DiNP の溶出量に違いが見られる結果からも支持される。従って、溶出試験においては、抽出溶媒中での試料の動をできるだけ自由にするために、試料の作製に当っては大きさおよび形状等をできるだけ揃えることが必要であり、また、抽出液量も試料の動きを妨げず、かつ、可塑剤の溶出が飽和しない程度の容量に設定する必要があると考えられた。さらに溶出液の液性と溶出量との関係について検討を加えた結果、pH 7~8.5 の人工唾液では pH 2~4 に比し多量の DiNP が溶出された (Table 4)。また、このような pH の違いによる溶出量の変化は他の可塑剤フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) 等においても同様の傾向が見られた。因みに、水 (ミリQ水) を抽出溶媒とした場合にも pH 7 の人工唾液を用いた時とほぼ同レベルの DiNP が溶出

することが判り、pH 7 付近であれば人工唾液の組成としてに含まれる塩の有無は DiNP の溶出に大きな影響を与えないものと推測された。従って、抽出液を設定する上では、液性 (pH) が特に重要な要因になると考えられた。一方、同じ試料を同一条件で繰り返し抽出を行い、溶出する DiNP 量の変化を調べたところ、20 回前後の繰り返し抽出ではほぼ一定量の DiNP が溶出しており、その後徐々に DiNP の溶出量が減少し、70 回前後から当初の溶出量の約 15% 程度まで減少した (Table 5、6)。このことから、実際におもちゃをしゃぶった場合、しゃぶり初めのしばらくの間は高レベルの可塑剤が溶出し、その後繰り返ししゃぶることによりその溶出量はかなり低下すると推測された。従って、乳幼児等での曝露評価を行う場合には、長期使用時の可塑剤の溶出推移の変化についても考慮する必要がある。

本検討結果を踏まえて、溶出条件を設定しおもちゃ試料の溶出試験を実施した。すなわち、おもちゃサンプル (表面積約 14 cm²) を pH 7 の人工唾液 (2 mL/cm²) が入った透明摺り合わせのガラス製遠心管に入れ、縦振盪抽出法 (300 stroke/min、10 分間) により抽出した。この条件下で、おもちゃ試料 12 サンプルについて溶出試験を実施した結果、DiNP 総溶出量の最もが多かったのはままごと道具のポテトで約 600 μ g、最も少なかったのは人形 C のタイヤ部分で約 60 μ g であった (Table 7)。また、これら 12 サンプルの DiNP 総溶出量の溶出量順と単位面積および単位重量当りの DiNP 溶出量の順序を比較した結果、単位面積当りの溶出量とは溶出量の順序に違いは見られなかったが、単位重量当りの溶出量と比較した場合には、その順序が重量に従わない結果が得られた。この要因を確かめるために、直径 3 cm、表面積 14 cm² の 9 種の円形サンプルについて単位面積当りの DiNP 溶出量を比較したところ、その平均 6.36 μ g/cm² (CV:26.4%)、最高溶出量と最低溶出量の差は約 2 倍で

あり、表面積を一定にした円形サンプルの間では単位面積当りの溶出量に大きな差は見られなかった。

一方、同9サンプルについてサンプル重量と DiNP 溶出量の関係を調べたところ、最も重い歯がため (3.11 g) では、単位重量当り 25.8 $\mu\text{g/g}$ と最も溶出量が少ないのに対し、最も軽いパン (1.23 g) では 58.6 $\mu\text{g/g}$ と、むしろ重量の軽いサンプルの方が約2倍の溶出量を示すことから、DiNP の溶出量とサンプル重量の関連は低いことが示された。これらの結果と前述の溶出試験結果における各試料間の10倍の溶出量差を併せて考慮すると、各おもちゃサンプルからの可塑剤の溶出量の差は、表面積やその重量等の要因とは異なる何らかの要因が含まれると推測された。そこでさらにその要因を明らかにするために、まず、おもちゃ試料の表面状態および樹脂の色との関係について比較したところ、サンプル表面のカラーコーティングの有無ならびに樹脂そのものの色と DiNP 溶出量の増減に明確な関係は認められなかった。しかしながら、円形サンプルと形状が異なるものの表面積はほぼ同程度もしくはやや小さいままごと道具のポテト、チーズ、レタスのサンプルについては、他の円形サンプルに比し抽出時の動きもスムーズであり、DiNP 溶出量も最大で約7倍高かった。このことは前述したようにサンプルの大きさや形状に起因する溶媒中でサンプルの動き具合により溶出量に10倍の差が生じた大きな要因となることを裏付けるものであり、従って、各おもちゃ試料について再現性の高い溶出試験結果を得るためには、一定の溶出条件下でかつ、抽出溶媒中でサンプルの動きがスムーズになるように設定することが重要であることが明らかとなった。

最後に、今回実施したおもちゃ試料からの DiNP の溶出試験結果と先のヒト唾液による DiNP 溶出予備試験の結果を比較したところ、両試験で使用したおもちゃ試料歯がための単位時間当りの DiNP 溶出量

は、人工唾液の *in vitro* 試験では約 0.8 $\mu\text{g/min}$ 、ヒト唾液による *in vivo* 試験では約 5 $\mu\text{g/min}$ と *in vitro* 試験の値の方が低値であった。以上、本試験における抽出条件検討結果から明らかなように、サンプルの大きさやあるいは抽出溶液中での動き等を調整することにより、本法は実際の *in vivo* 試験への外挿が十分可能な方法となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし