

分担研究報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

主任研究者： 中澤 裕之  
星薬科大学

研究協力者： 本郷 敏雄  
東京医科歯科大学

研究要旨

エストロゲン作用を示すとされるビスフェノール A (BPA)を原材料としたポリカーボネート(PC)は生活環境の中で幅広く用いられている。歯科領域においては、テンポラリークラウン、レジン歯、矯正用ブラケット、義歯床などに用いられている。よってこれら歯科材料から BPA が溶出してくることにより、生体に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、BPA の簡便な測定方法として、高速液体クロマトグラフ法(HPLC)にフェノール性水酸基を特異的に検出する電気化学検出器(ECD)を用いた基本的検討を行った。そしてこの分析法を用いて、PC 中に残留している BPA と人工唾液中に溶出する BPA の定量を行った。歯科材料中には残留 BPA が数 $\mu\text{g/g}$ ～数 100 $\mu\text{g/g}$  確認され、材料からの溶出において多いものでは数  $\mu\text{g/g}$  単位であった。そして、浸漬することにより PC 中に残留している BPA の増加が確認された。

A. 研究目的

ポリカーボネート(PC)はビスフェノール A(BPA) とジフェニルカーボネート又は塩化カルボニルとの縮合ポリマーである。透明で耐熱性、耐衝撃性に優れており、色素などを加えることにより、歯と類似色調が得られ、またフィラーを加えることにより PC の強化を得られることから、歯科領域では矯正用ブラケット、テンポラリークラウン、レジン歯、義歯床などに用いられてい

る。そして、原材料である BPA は、フェノール基を 2 個有する化合物で、PC の他、Bis-GMA などの原料物質であり、酸化防止剤、安定剤としても使用されている。日本では食品衛生法において食品容器中に残留する BPA 量の残留基準値が設定されている<sup>1)</sup>が、歯科材料に対しての基準値は設定されていない。よって歯科材料に対しての評価はなされておらず、歯科材料からの溶出による摂取および人体への影響が危惧さ

れており、歯科材料中の BPA の存在量およびその溶出挙動を解析する必要がある。

BPA の分析例として、ペーパークロマトグラフ法<sup>2)</sup>、ガスクロマトグラフ法<sup>3,4)</sup>、液体クロマトグラフ法<sup>5,6)</sup>等が報告されている。しかしこれらの方法は検出限界が高いか、誘導体を用いる必要がある。よって本研究では特異性が高く、高感度の分析が期待される電気化学検出器(ECD)を用いた高速液体クロマトグラフ(HPLC)法を構築した。そして PC 製歯科材料について材質中に残留する BPA 量と人工唾液に浸漬することによる BPA 溶出量の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 材料及び試薬

PC 製ブラケット 2 種 (クリアブラケット、プラスチックブラケット)、テンポラリークラウン 5 種 (JM-ポリクラウン、ピドクラウン、イオン印、マクロロン、GC-クラウン S)、レジン歯 1 種 (ニューポリカ) は臨床で用いられている市販品を購入した。試薬には残留農薬試験用以上の製品を用いた。BPA 標準品をメタノールに溶解し、1000ppm 濃度の標準原液とした。これを水で希釈し、各種濃度の標準液を調製した。そしてこれを基に絶対検量線法により定量した。

### 2) HPLC 条件

高速液体クロマトグラフには EPA-310P(ポンプ EP-300、カラムオープン

ATC-300、デガッサー DG-300、電気化学検出器 ECD-300、データプロセッサー EPC-300、データ処理装置 PowerChrom v2.1 EPC-300 以上 Eicom 社製)を用いた。分析カラムには CA-5ODS(内径 2.1mm、長さ 150mm、粒径 5 $\mu$ m)、フ<sup>レ</sup>カラムには PREPAKSET(内径 2.1mm、長さ 5mm、粒径 5 $\mu$ m いずれも Eicom 社製)を用いた。移動相として 40mM リン酸塩緩衝液(pH6.0) - アセトニトリル(6:4)を用い、流速は 0.23mL/min とした。カラム温度は 30 $^{\circ}$ C とした。作用電極の印加電圧を +800mV に設定し、注入量は 20 $\mu$ L とした。本システムを用いることにより BPA の保持時間は 7.6 分となった。またベースラインが安定しており夾雑ピークも見られないことから検出限界は 0.05ppb(1pg)、定量限界は 0.1ppb(2pg)であった。0.1 から 50ppb において相関係数  $r = 0.999$  であった(Fig.1)。

### 3) 材質試験

材質試験は食品衛生試験法<sup>1)</sup>に準じたが、歯科材料が少量であるため歯科材料の重量に対しての試薬量として使用した。適量のジクロロメタンに溶解させ、スターラーで攪拌しながらアセトンをゆっくり滴下し、高分子化合物を析出させた。3000rpm で 10 分間遠心分離後、上清液を約 2mL まで減圧濃縮(40 $^{\circ}$ C 以下)した。アセトニトリル 8mL を用いてメスフラスコを洗い込み、精製水で 20mL とした。そして適量をメンブランフィルターでろ過後、HPLC/ECD で測定し

た。

#### 4) 溶出試験

材料を人工唾液中に浸漬させ、37°Cの恒温槽で遮光下静置した。溶出液量は材料の重さを考慮して行った。そして所定の時期に人工唾液を採取して BPA 量を定量した。人工唾液の組成は Arvidson らの組成<sup>7)</sup>を改良して用いた。組成は次のとおりである。17.5mM 塩化カリウム、2.5mM リン酸 2 水素カリウム、2.4mM リン酸 1 水素ナトリウム、10mM 塩化ナトリウム、0.15mM 塩化マグネシウム、0.5mM 塩化カルシウム、1.5mM 炭酸 1 水素ナトリウム。

### C. 研究結果

#### 歯科材料中の残留 BPA 量及び人工唾液への BPA 溶出

材質試験から各々の歯科材料中に BPA が残留しており、溶出試験から人工唾液中へ BPA が溶出することが確認された。またクロマトグラムから t-ブチルフェノール (t-BuP) とと思われるピークが確認された (Fig.2)。

テンポラリークラウン 5 種及びレジン歯の材質中に残留していた BPA 量は 6.4~274.8 µg/g であった。人工唾液浸漬後 6 週間後の材料中の残留 BPA 量は 31.6~285.4 µg/g であり、37°C で 6 週間放置した材料中の残留 BPA 量は 31.6~269.4 µg/g であった (Fig.3)。しかし、BPA ピーク付近に夾雑ピークが検出される試料もあり、今後

このような試料に対する分離条件の検討が必要ある。溶出試験で 1 週間に溶出した量は 6.8~129.1ng/g であった。また浸漬 6 週間における人工唾液中への BPA 累積溶出量は 27.5~529.4ng/g であった (Fig.4)。

PC 製ブラケット 2 種の材質中に残留していた BPA 量は各々 38.0 µg/g と 11.0 µg/g であった。ブラケットについては他の歯科材料と異なり臨床使用期間が長いことから人工唾液中への浸漬期間を 12 週間とした。浸漬 12 週間後の材料における残留量は各々 91.4 µg/g と 58.2 µg/g であり、37°C で 12 週間放置した材質中の BPA 量は各々 45.6、10.2 µg/g であった。そして 1 週間における溶出量は各々 216.0ng/g、288.3ng/g であった。また 12 週間浸漬後の人工唾液中への BPA 累積溶出量は各々 1.3µg/g、11.6µg/g であった (Fig.5)。

### D. 考察

人工唾液に浸漬することにより材質中の残留 BPA 量が増加していた。ポリカーボネートは原材料や保管状況により材料中の BPA 量に影響を示すことが知られている。結果から使用前の残留量と 37°C で静置した残留量の数値にあまり差がなかった。よって人工唾液に浸漬したことによって歯科材料中で BPA 増加したことは人工唾液によるポリカーボネートの劣化が原因でないかと考えられる。ただし、レジン歯については人工唾液に浸漬後の残留 BPA 量に大きな変化は無かった。原因として、レジン歯の形状はテンポラリークラウンと類似し

ているが、テンポラリークラウンは内部が空洞であるのに対し、レジン歯は内部が充填されている。それにより人工唾液がレジン歯の深部にまで浸透することができず、表面のみの浸透だけであったためにポリカーボネートの劣化が抑えられたためだと考えられるが今後検討が必要である。また、材質中の残留量が多い材料からの溶出量の方が多く傾向が見られた。そして、歯科材料からの BPA の溶出量は浸漬期間が長くなるにつれて経過的に減少することが確認された。12 週間の BPA 総溶出量が多かったブラケット 11.6 $\mu\text{g/g}$  において検討した。12 個のブラケットを矯正用に装着したとしてブラケット重量は 216mg である。従って溶出量として 2.5 $\mu\text{g}$ BPA となり、12 週間均等に溶出しているとする 0.03 $\mu\text{g/day}$  となる。ブラケットを装着する子供の体重を 15kg とすると体重当りでは 2.0ng/kg/day となった。また血液量は約 1.2L であるので、血液量あたり 24.9pg/mL/day となった。vom Saal ら<sup>9)</sup>の報告による生体影響が現れた 2.4 $\mu\text{g/kg}$  投与量と比べてとても少ない値であるため、現時点では溶出による影響はないと思われる。しかし、食器容器からの摂取も考えられ、今後の研究により唾液への溶出を検討する必要がある。

#### E. 結論

HPLC/ECD を用いてポリカーボネート中に残留している BPA 量及び人工唾液へ溶出した BPA 量を測定した。人工唾液に浸漬

した材料中の BPA 量は増加していた。また人工唾液中に BPA が溶出していた。以上のことからポリカーボネート製歯科材料中に BPA が残留し、材料から BPA が溶出してくることが確認され、ヒト唾液中への溶出の可能性が示唆された。

#### F. 参考文献

- 1) 衛生試験法・注解 付追補, 日本薬学会編, 金原出版(株), p.1702 (1995)
- 2) N.H. Reinking, A.E. Barnabeo. *Anal Chem* 37:395-397 (1965)
- 3) H.H. Gill. *Anal Chem* 36:1201-1203 (1964)
- 4) L.E. Brydia. *Anal Chem* 40: 2212-2215 (1968)
- 5) M.L. Henriks-Eckerman, T. Laijoki. *Analyst* 113:239-242
- 6) M. Larroque, L. Vian, A. Blaise, S. Brun. *J.Chromatogr.* 445:107-117 (1988)
- 7) Arvidson K. Johansson E. *Scand.J.Dent.Res.*93:467-473(1985)
- 8) Kimmo P, Jari P. *J.Chromatogr.* 439:375-380 (1988)
- 9) Howdeshell K. Hotchkiss A. Thayer K. Vandenberg J. vom Saal F. *Nature* 401:763-764 (1999)

#### G. 研究業績

学会発表

矢島 功、清水美希、加藤嘉代子、中澤裕之、本郷敏雄、大槻昌幸、田上順次、西村

ているが、テンポラリークラウンは内部が空洞であるのに対し、レジン歯は内部が充填されている。それにより人工唾液がレジン歯の深部にまで浸透することができず、表面のみの浸透だけであったためにポリカーボネートの劣化が抑えられたためだと考えられるが今後検討が必要である。また、材質中の残留量が多い材料からの溶出量の方が高い傾向が見られた。そして、歯科材料からの BPA の溶出量は浸漬期間が長くなるにつれて経過的に減少することが確認された。12 週間の BPA 総溶出量が多かったブラケット 11.6 $\mu\text{g/g}$  において検討した。12 個のブラケットを矯正用に装着したとしてブラケット重量は 216mg である。従って溶出量として 2.5 $\mu\text{gBPA}$  となり、12 週間均等に溶出しているとすると 0.03 $\mu\text{g/day}$  となる。ブラケットを装着する子供の体重を 15kg とすると体重当りでは 2.0ng/kg/day となった。また血液量は約 1.2L であるので、血液量あたり 24.9pg/mL/day となった。vom Saal<sup>9)</sup>の報告による生体影響が現れた 2.4  $\mu\text{g/kg}$  投与量と比べてとても少ない値であるため、現時点では溶出による影響はないと思われる。しかし、食器容器からの摂取も考えられ、今後の研究により唾液への溶出を検討する必要性がある。

#### E. 結論

HPLC/ECD を用いてポリカーボネート中に残留している BPA 量及び人工唾液へ溶出した BPA 量を測定した。人工唾液に浸漬

した材料中の BPA 量は増加していた。また人工唾液中に BPA が溶出していた。以上のことからポリカーボネート製歯科材料中に BPA が残留し、材料から BPA が溶出してくることが確認され、ヒト唾液中への溶出の可能性が示唆された。

#### F. 参考文献

- 1) 衛生試験法・注解 付追補, 日本薬学会編, 金原出版(株), p.1702 (1995)
- 2) N.H. Reinking, A.E. Barnabeo. *Anal Chem* 37:395-397 (1965)
- 3) H.H. Gill. *Anal Chem* 36:1201-1203 (1964)
- 4) L.E. Brydia. *Anal Chem* 40: 2212-2215 (1968)
- 5) M.L. Henriks-Eckerman, T. Laijoki. *Analyst* 113:239-242
- 6) M. Larroque, L. Vian, A. Blaise, S. Brun. *J.Chromatogr.* 445:107-117 (1988)
- 7) Arvidson K. Johansson E. *Scand.J.Dent.Res.*93:467-473(1985)
- 8) Kimmo P, Jari P. *J.Chromatogr.* 439:375-380 (1988)
- 9) Howdeshell K. Hotchkiss A. Thayer K. Vandenberg J. vom Saal F. *Nature* 401:763-764 (1999)

#### G. 研究業績

学会発表

矢島 功、清水美希、加藤嘉代子、中澤裕之、本郷敏雄、大槻昌幸、田上順次、西村

文夫, 佐藤温重、日本内分泌攪乱化学物質  
学会第 2 回研究発表会、p.27、1999

矢島 功、清水美希、加藤嘉代子、中澤裕  
之、本郷敏雄、堀江正一、松村英生、日本  
薬学会第 120 年会、要旨集 4 p.175、2000

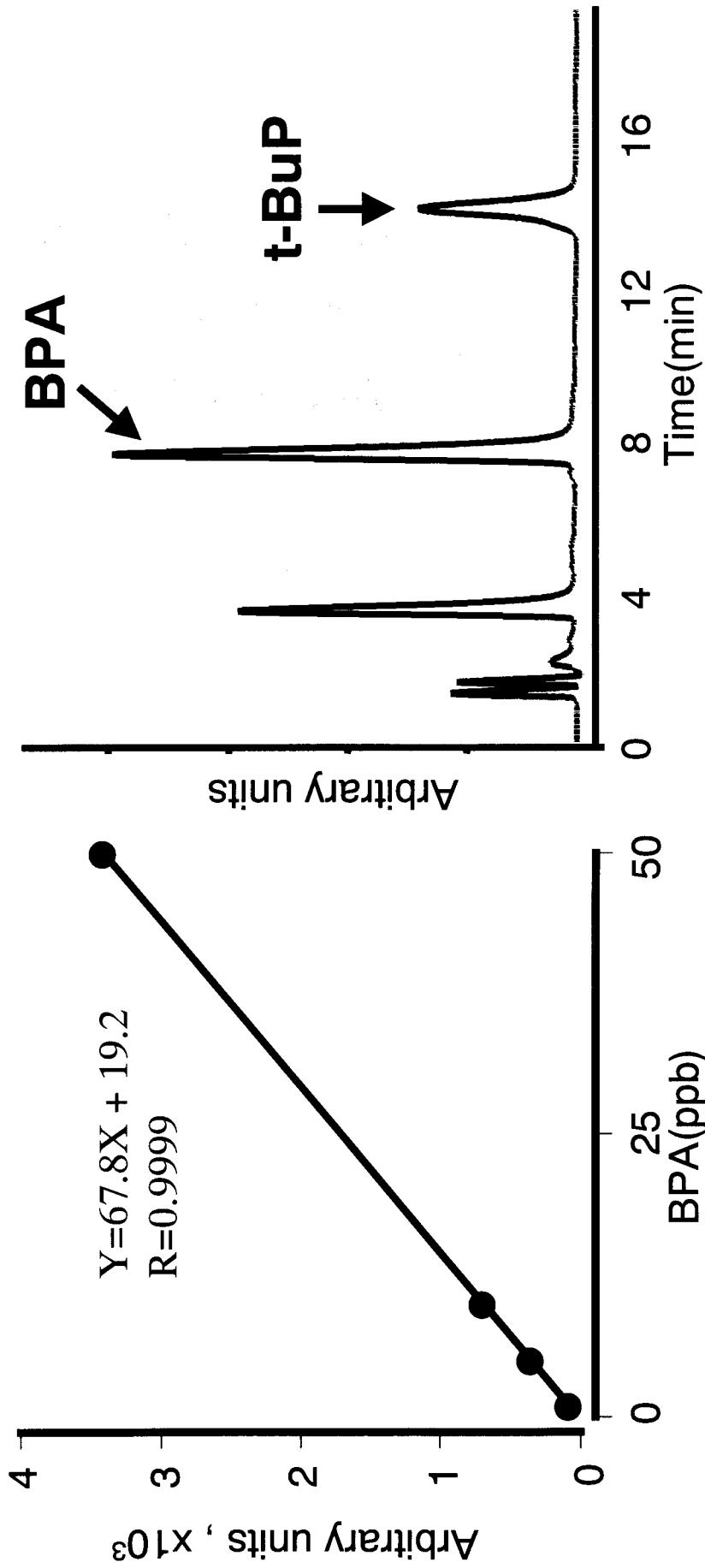


Fig.1 Calibration curve of Bisphenol A (0.1 to 50 ppb)

Fig.2 Chromatogram of residual substances from dental polycarbonate

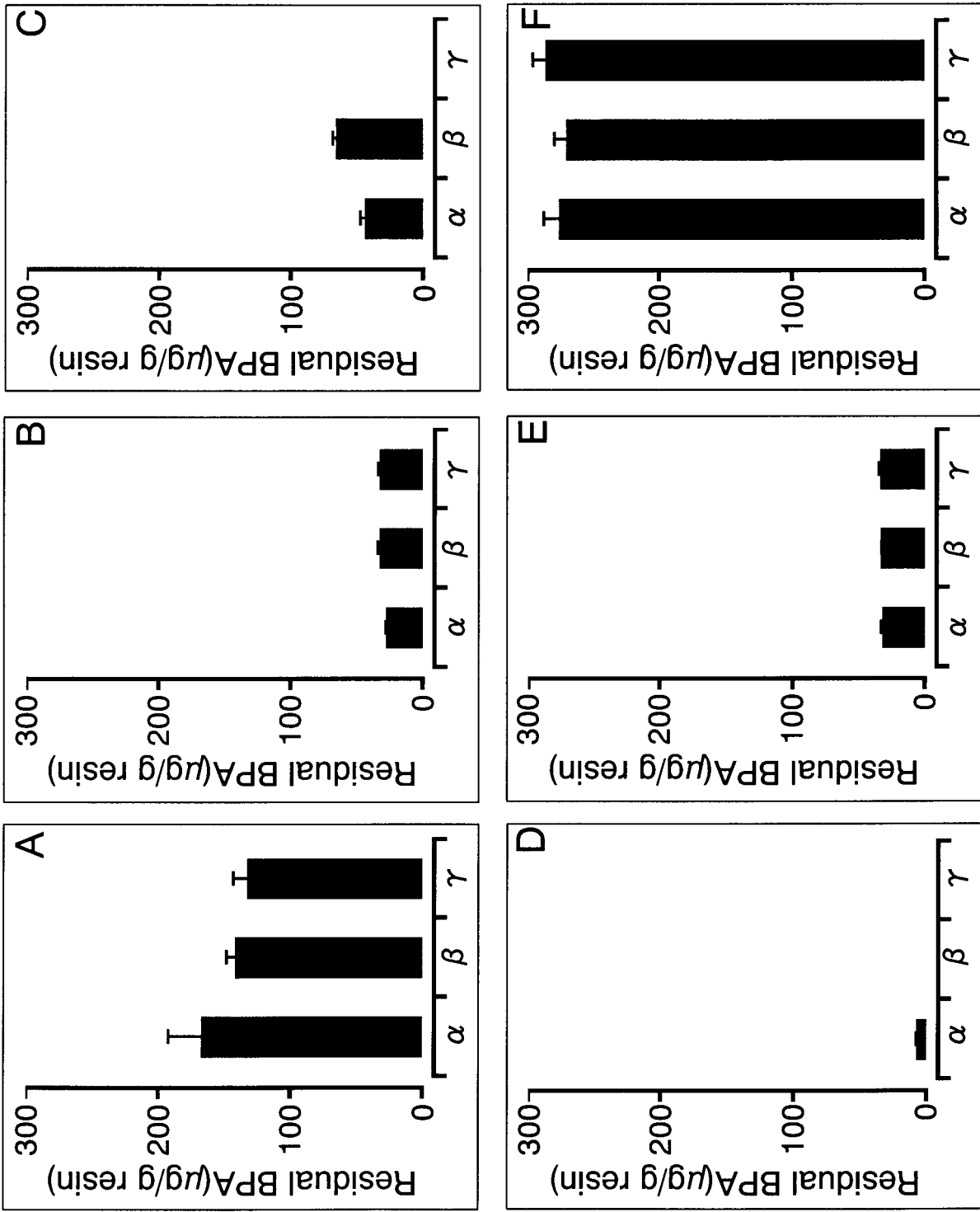


Fig.3 Levels of residual BPA in teeth resin(A) and temporary crown(B-F) under various conditions. Polycarbonates were left to stand for 6wks at RT(α) and at 37°C(β) and in artificial saliva for 6 wks at 37 °C(γ).



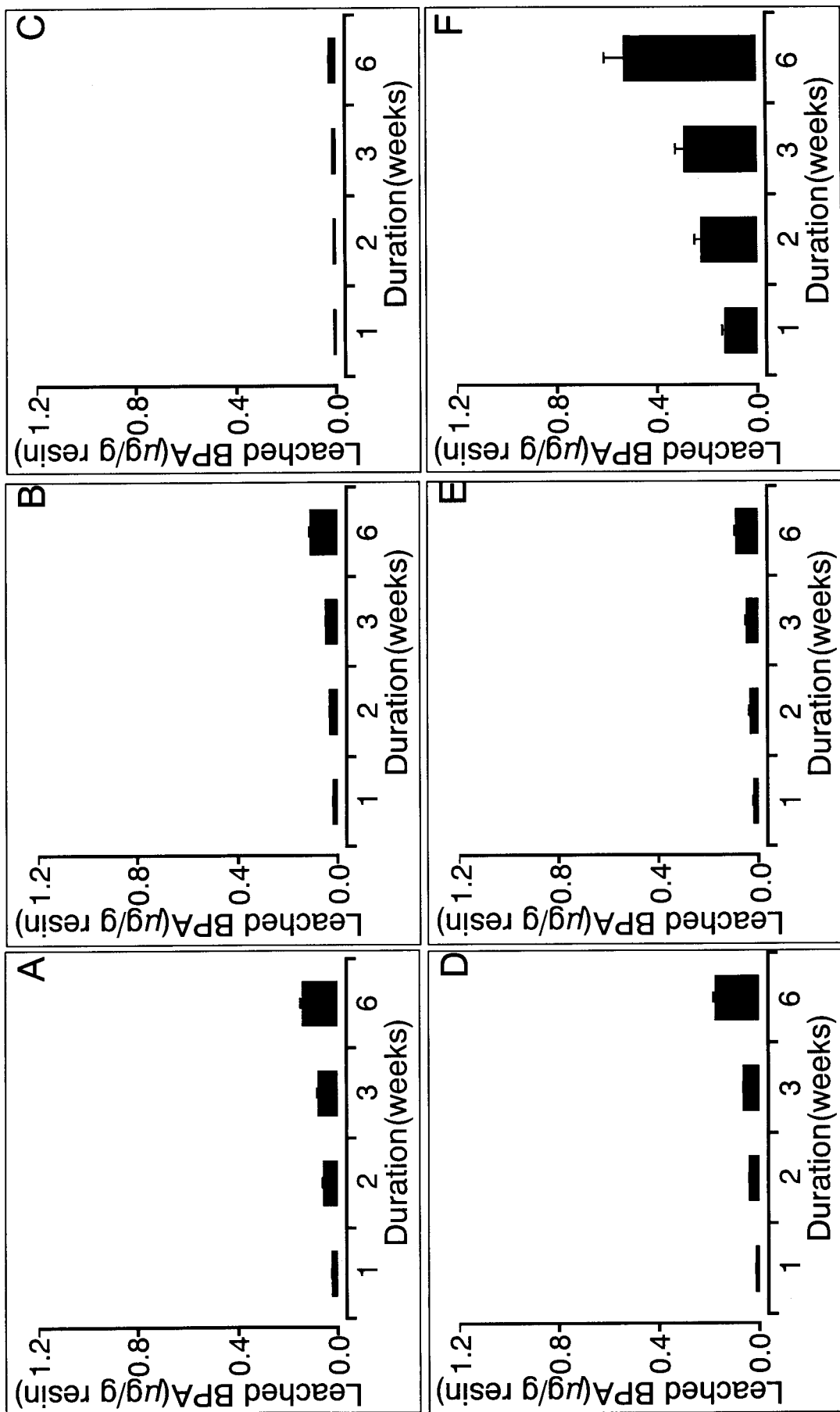


Fig.4 Duration-dependent changes in levels of BPA leached from teeth resin(A) and temporary crown(B-F) immersed in artificial saliva

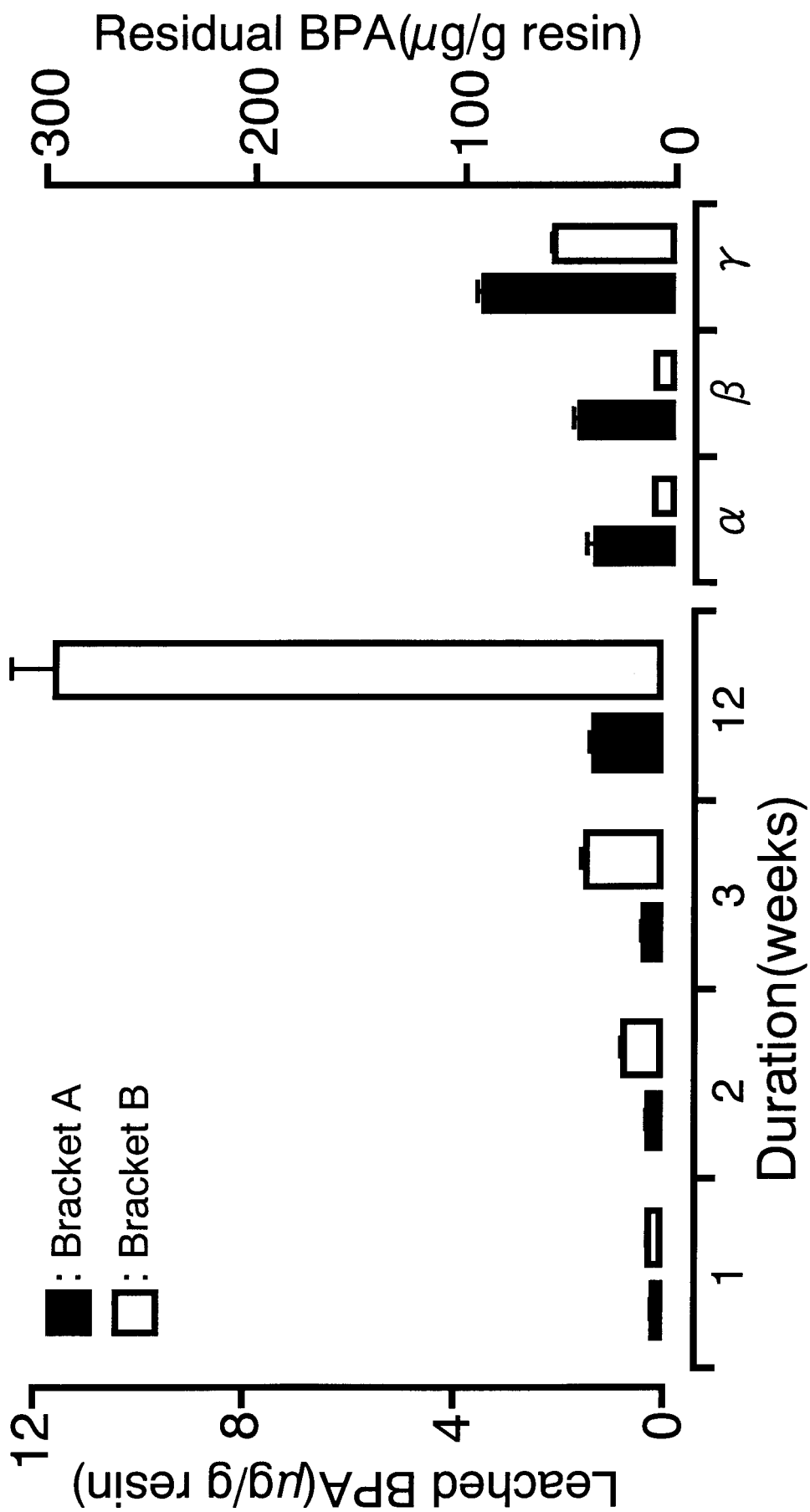


Fig.5 Duration-dependent changes in levels of BPA leached from orthodontic plastic bracket(A,B) immersed in artificial saliva(Left) and residual BPA(Right). Polycarbonates were left to stand for 12 wks at RT( $\alpha$ ) and at 37°C( $\beta$ ) and in artificial saliva for 12 wks at 37°C( $\gamma$ ).