

（総括・分担）研究報告書

玩具類からの内分泌かく乱化学物質の分析

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（その2）

協力研究者 松木容彦、平林尚之 （財）食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨

生活環境が豊かになる一方、様々な化学物質による人体への影響が報告され、なかでもホルモン様作用を有する（外因性）内分泌かく乱物質に社会的関心が持たれている。とりわけ、生活関連用品由来の内分泌かく乱物質は、直接および間接的に体内に取り込まれ影響を及ぼすことから、様々な調査研究が進められてきた。

昨年度、我々は、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ときに溶出する可塑剤の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）を指標として、縦（上下）振盪による *in vitro* 溶出法の溶出条件の基礎的検討を行った。

そこで本年度は、*in vitro* 試験法を確立するに当り、予め、成人被験者による Mouthing 実験を行い、唾液中 DINP の溶出レベルを調べた。その結果、試料として用いた歯がためからの DINP の溶出量はおよそ 1～数  $\mu\text{g}/\text{min}$ 、単位面積当たり、 $0.1\sim 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$  と推定された。

次に *in vitro* 溶出条件の追加検討として、歯がためを用い、試料の大きさ（表面積）と溶出液量の関係が DINP の溶出に及ぼす影響について調べたところ、一定範囲の表面積を有する試料に対し定容量の溶出液で溶出することにより、試料の単位面積当たり一定レベルの DINP が溶出すると推測された。そこで、昨年度実施した歯がため（3 cm $\phi$  円形ディスク、表面積約 17.4 cm $^2$ ）の溶出試験結果を調べたところ、単位面積当たりの DINP 溶出量は約  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$  と、先の Mouthing 実験での DINP 溶出量とほぼ同程度の溶出レベルを示すことから、縦振盪による *in vitro* 溶出法では試料の表面積を約 15 cm $^2$ 、溶出液量を 30 mL に設定した。

一般におもちゃは様々な大きさや形をしており、定形の試験試料を得ることは困難である。そこで *in vitro* 溶出試験で用いる試料の形状と DINP 溶出量の関係について、3 cm $\phi$  円形ディスクを基に形状の違いによる DINP 溶出量を調べた。すなわち、表面積約 15 cm $^2$  の異なる形状の試料をそれぞれ同一条件で溶出したところ、各試料の単位面積当たりの DINP の溶出量はおよそ  $0.7\sim 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$  と、ほぼ近似した溶出結果が得られ、形状によりやや高い値を示すものの、いずれも成人の Mouthing に近い溶出レベルを示した。

以上、歯がためを用いて DINP の *in vitro* 溶出条件を検討した結果、溶出容器に 50 mL の遠心管を用い、表面積が約 8～25 cm $^2$  試料を 30 mL の溶出液中で縦（上下）振盪により 10～30 分間溶出するとき、試料の形状の違いによる影響が少なく成人の Mouthing に近似した DINP の溶出レベルを示すことが明らかとなった。

## A. 研究目的

先に我々は、フタル酸エステル等の暴露に関する調査研究班においてポリ塩化ビニル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（平成 10 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）の一環として、乳幼児のフタル酸エステル類の暴露量を推定するための *in vitro* 溶出法を確立すべく溶出条件の基礎的検討を行った。

本年度は、その継続研究としてより詳細な溶出条件の検討を行い *in vitro* 溶出法を確立した。また、ヒトでの Mouthing 時におけるフタル酸エステル類の溶出を推定する外挿法としての本法の妥当性について考察した。

## B. 研究方法

本研究では、社団法人 日本玩具協会より供与されたおもちゃの中からから“歯がため”（DINP 約 30%含有）を試料として用いた。

### 1. Mouthing による唾液中への DINP の溶出 (Mouthing 実験)

#### 1) 歯がため全形（おもちゃそのもの）による Mouthing 実験

試料：歯がため全形（Mouthing 面積は約 10~20 cm<sup>2</sup>）

被験者：成人男性（5名、27~55歳）

Mouthing 条件：被験者（5名）に5分間、試料を Mouthing させ、分泌される唾液をガラス製の遠心管に採取した。唾液分泌量を計った後、高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により DINP 溶出量を測定した。

DINP の測定：唾液中に等量のアセトニトリルを加えて混和した後、その 1 mL をヘキサン 4 mL で抽出した。このヘキサン層 2 mL を室温、窒素気流下濃縮

乾固し、残渣をアセトニトリル 0.5 mL に溶解して HPLC 試料とした。

HPLC 条件：“内分泌かく乱物質の食品、食器等からの曝露に関する調査研究”報告書 1. フタル酸エステル等の暴露に関する調査研究（平成 10 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業））参照。

測定項目：唾液分泌量および DINP 溶出量。

#### 2) 円形試料（試験片）による Mouthing 実験

試料：2 cmφ 円形ディスクに打ち抜いた歯がため（表面積約 8.48 cm<sup>2</sup>）

被験者：成人男性（25名、21~55歳）

Mouthing 条件：被験者（25名）に15分間

試料を Mouthing させ、分泌される唾液をガラス製の遠心管に採取した。唾液分泌量および pH を計った後、HPLC 法により DINP 溶出量を測定した。

また、一部の被験者については、同一試料を用いて繰り返し Mouthing 実験を行った。

DINP の測定：1.1) の歯がため全形による Mouthing 実験と同様。

HPLC 条件：1.1) の歯がため全形による Mouthing 実験と同様。

測定項目：唾液分泌量、pH および DINP 溶出量。

#### 3) 唾液からの DINP の回収実験

ブランク唾液に DINP の標準溶液を加えた添加試料（4 および 20 μg/mL、各濃度 n=3）について、上述の Mouthing 実験と同様に HPLC 法により DINP 量を測定し、添加量に対する回収率とそのバラツキを調べた。また、1.2) の円形試料による Mouthing 実験で得られた唾液（3名、n=3）の DINP 量

を測定し、測定操作のバラツキを求めた。

## 2. *in vitro* 溶出条件の検討

以下に本研究で用いた基本的な *in vitro* 溶出条件を示した。なお、詳細については“内分泌かく乱物質の食品、食器等からの曝露に関する調査研究”報告書、1. フタル酸エステル等の暴露に関する調査研究（平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業））を参照。

試料 : 歯がため  
溶出方法 : 縦（上下）振盪（室温、300 stroke/min、10 分間）  
溶出液 : 人工唾液（pH 6.8~7）  
DINP の測定 : HPLC 法による。

### 1) 試料の大きさ（表面積）と溶出液量の関係が DINP の溶出に及ぼす影響

① 表面積の異なる試料を上記条件下 30 mL の溶出液で溶出し、HPLC 法により DINP 溶出量を測定した。

形状	表面積	溶出液量
2 cmφ円形ディスク (1個)	約 8.48 cm <sup>2</sup>	30 mL
2 cmφ円形ディスク (2個)	約 17.0 cm <sup>2</sup>	30 mL
2 cmφ円形ディスク (3個)	約 25.4 cm <sup>2</sup>	30 mL

② 表面積の異なる試料を上記条件下単位面積当り等量（約 2 mL/cm<sup>2</sup>）の溶出液で溶出し、HPLC 法により DINP 溶出量を測定した。

形状	表面積	溶出液量
2 cmφ円形ディスク (1個)	約 8.48 cm <sup>2</sup>	15 mL
3 cmφ円形ディスク (1個)	約 17.4 cm <sup>2</sup>	30 mL

### 2) 試料の形状と DINP 溶出量の関係

表面積約 15 cm<sup>2</sup> の形状の異なる試料を上記条件下で溶出し、HPLC 法により DINP 溶出量を測定した。

形状	表面積	溶出液量
3 cmφ円形ディスク (1個)	約 17.4 cm <sup>2</sup>	30 mL
2 cmφ円形ディスク (2個)	約 17.0 cm <sup>2</sup>	30 mL
半径 1 cm の扇型 (6個)	約 16.9 cm <sup>2</sup>	30 mL
2×3 cm 角型プレート (1個)	約 15.5 cm <sup>2</sup>	30 mL
2×3 cm 三角プレート (2個)	約 18.0 cm <sup>2</sup>	30 mL

## C. 研究結果

### 1. Mouthing による唾液中への DINP の溶出量の比較 (Mouthing 実験)

歯がため全形および 2 cmφ 円形ディスクを Mouthing した被験者の唾液中 DINP 溶出量の測定結果を Table 1 および Table 2 に、同一被験者が同一試料を繰り返し Mouthing したときの唾液中 DINP 溶出量の測定結果を Table 3 に示した。以下にその結果を要約した。

成人被験者が歯がため全形および 2 cmφ 円形ディスクを Mouthing したときの唾液分泌量は、それぞれ 3~14 mL（平均 8.4 mL ±48.1%）および 7~43 mL（平均 18.0 mL ±47.6%）であり、分泌量の差は被験者間で最大約 6 倍あった。また、分泌された唾液の pH は pH 6~8 であった (Table 1、2)。

Mouthing による DINP の総溶出量は、歯がため全形では 3.22~65.4 μg（平均 33.2 μg ±80.3%）、2 cmφ 円形ディスクでは 2.92~51.1 μg（平均 23.2 μg ±50.9%）であり、いずれの実験においても被験者間におよそ 20 倍の違いがあった。また、両者を単位時間当りの溶出量で比較すると、それぞれ 0.644~13.1 μg/min、平均 6.64 μg/min および 0.195~3.41 μg/min、平均 1.55 μg/min であり、歯がため全形からの溶出がおよそ 4 倍高かった (Table 1、2)。

同一被験者が同一試料を繰り返し Mouthing したときの DINP 総溶出量の変動（歯がため全形：1名、3回、2 cmφ 円形デ

ディスク：3名、各3回）は、それぞれ約14%および26~35%であり、各験者間の総溶出量の変動のほぼ1/2であった（Table 3）。

ブランク唾液中に DINP 標準液を加えた添加試料（4および20  $\mu\text{g/mL}$ 、各濃度  $n=3$ ）を用いて唾液中からの回収率を調べた結果、DINP の添加量に対する回収率はそれぞれ99.9%および102.9%、バラツキはそれぞれ4.1%および1.0%であった。また、円形ディスクの Mouthing 実験で得られた唾液（被験者3名、DINP 濃度約0.7~2.8  $\mu\text{g/mL}$ ）をそれぞれ3回処理して唾液中 DINP 量を算出し、唾液中 DINP の測定操作の再現性を調べたところ、各被験者の唾液中 DINP 量の変動は0.3~8.8%と良好であった（Table 4）。

## 2. *in vitro* 溶出法の検討

歯がためを用い、試料の大きさ（表面積）と溶出液量との関係が DINP の溶出に及ぼす影響について調べた。以下にその結果を示す。

まず、表面積と溶出液量との関係が DINP の溶出に及ぼす影響を調べるために2 cm $\phi$  円形ディスク（約8.48 cm<sup>2</sup>）1、2および3個をそれぞれ液量30 mL の定容量の溶出液で溶出したときの DINP の溶出量を比較した。その結果、DINP の総溶出量の平均値は円形ディスク1個（総表面積約8.48 cm<sup>2</sup>）では80.9  $\mu\text{g}\pm 27.7\%$ 、2個（総表面積約17.0 cm<sup>2</sup>）では158  $\mu\text{g}\pm 18.9\%$ 、3個（総表面積約25.4 cm<sup>2</sup>）では214  $\mu\text{g}\pm 12.5\%$ と、表面積の大きさに比例して DINP の溶出量が増加した。また、この DINP の溶出を単位面積当りの溶出量で比較すると、いずれも約0.9  $\mu\text{g/cm}^2/\text{min}$  であり、単位面積当りの溶出量はほぼ同程度であった（Table 5）。

次に、2 cm $\phi$  円形ディスク（約8.48 cm<sup>2</sup>）と3 cm $\phi$  円形ディスク（約17.4 cm<sup>2</sup>）をそれぞれ1個用い、15および30 mL と試料の表面積に応じて液量を変え、単位面積当り約2 mL/cm<sup>2</sup> の等量の溶出液で溶出したときの DINP の溶出量を比較した。その結果、DINP の総溶出量の平均値は2 cm $\phi$  円形ディスクでは566  $\mu\text{g}\pm 40.3\%$ 、3 cm $\phi$  円形ディスクでは157  $\mu\text{g}\pm 35.5\%$ と、表面積が小さい2 cm $\phi$  円形ディスクの方がより多くの DINP を溶出した。なお、両者の単位面積当りの溶出量はそれぞれ6.67  $\mu\text{g/cm}^2/\text{min}$ 、0.902  $\mu\text{g/cm}^2/\text{min}$  であり、約7倍の差があった（Table 6）。

試料の形状と DINP 溶出量との関係を知るために、表面積がほぼ同じ（平均表面積17.0 cm<sup>2</sup> $\pm 5.4\%$ ）で形状の異なる5つの試料（各  $n=3$ ）を同一条件下で溶出して溶出する DINP 量を比較した。その結果、各形状毎の DINP の総溶出量の平均値は、3 cm $\phi$  円形ディスク（1個、約17.4 cm<sup>2</sup>）では109~156  $\mu\text{g}$ 、平均126  $\mu\text{g}$ 、2 cm $\phi$  円形ディスク（2個、約17.0 cm<sup>2</sup>）では141~172  $\mu\text{g}$ 、平均158  $\mu\text{g}$ 、2 $\times$ 3 cm 角型プレート（1個、約15.5 cm<sup>2</sup>）では178~297  $\mu\text{g}$ 、平均249  $\mu\text{g}$ 、2 $\times$ 3 cm 三角プレート（2個、約18.0 cm<sup>2</sup>）では292~420  $\mu\text{g}$ 、平均362  $\mu\text{g}$ 、半径1 cm の扇型（6個、約16.9 cm<sup>2</sup>）では207~233  $\mu\text{g}$ 、平均222  $\mu\text{g}$  であり、各形状毎の溶出量のバラツキはそれぞれ約19~30%であった。また、この DINP の溶出を単位面積当りの溶出量で比較するとそれぞれ0.726~2.01  $\mu\text{g/cm}^2/\text{min}$  であり、最も溶出量の多い2 $\times$ 3 cm 三角プレートと最も少ない3 cm $\phi$  円形ディスクではおよそ3倍の差が見られた（Table 7）。

## D. 考 察

### 1. Mouthing による唾液中への DINP の溶出 (Mouthing 実験)

被験者延べ 30 名の Mouthing 実験における唾液分泌量はおよそ 0.5~3 mL/min と被験者間の差は約 6 倍であり、一方、同一被験者延べ 4 名が繰り返し 3 回の Mouthing 実験を行ったときの同一被験者での唾液分泌量の差は 1.4~1.6 倍と、各被験者間の唾液分泌量の差のおよそ 1/4 と小さいことから、Mouthing 時の唾液分泌量には個人差があるものの、各人の唾液分泌量は毎回ほぼ一定に分泌される傾向が見られた (Table 1~3)。なお、オランダコンセンサスグループによる延べ 40 名の成人被験者の調査結果 (RIVM report 613320 002, Konemann, W.H., ed., 1998) においても、我々と同様に被験者間の唾液分泌量には大きな差が見られている。

被験者に実際のおもちゃの使用状態を想定して歯がため全形を Mouthing させたとき、歯がためから試験的に調製した円形ディスクを Mouthing させたときの唾液分泌量を比較したところ、唾液分泌量は同等、もしくは歯がため全形を Mouthing したときの方が多く分泌される傾向が見られた (Table 1 および 2)。一方、オランダコンセンサスグループの報告では、試験的に調製した円形ディスクを Mouthing したときの方が実際の使用状態を想定したおもちゃ全形の Mouthing に比し、唾液分泌量が多かったことから、試料すなわち、おもちゃの形状等により Mouthing 時の唾液分泌量が変化すると考えられる。

歯がため全形とその円形ディスク、状態の異なる試料を用いた Mouthing 実験において単位時間当りの唾液分泌量と DINP の総溶出量を比較したところ、共に唾液分泌量と DINP の溶出量に関連性は見られなかった

(Fig 1)。

また、これら 2 つの Mouthing 実験における DINP の溶出を比較するために、単位面積、単位時間当りの溶出量を調べたところ、歯がため全形 (推定 Mouthing 面積 10~20 cm<sup>2</sup>) では 0.0429~0.873  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 、2 cm $\phi$  円形ディスク (Mouthing 面積約 8.48 cm<sup>2</sup>) では 0.0230~0.402  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$  であり、実際の使用状態を想定して歯がため全形を Mouthing したときの方が約 2 倍高い溶出を示し、このような傾向はオランダコンセンサスグループでも同様に報告されている。

以上の結果、Mouthing 実験において実際の使用状態を想定しておもちゃ全形を Mouthing するときと試験的に調製したおもちゃ片を Mouthing する場合には、唾液分泌量との関連性は見られないが Mouthing の方法や強さ等により、溶出する DINP 量に若干の差が生じる可能性が示唆された。

### 2. Mouthing 実験と *in vitro* 溶出法の関係

今回実施した歯がため全形および円形ディスクによる Mouthing 実験の結果、成人被験者が歯がためを Mouthing したときに溶出する DINP 量は、およそ 0.1~1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$  と推定された。一方、昨年度我々が報告した縦 (上下) 振盪による *in vitro* 溶出法では歯がため (3 cm $\phi$  円形ディスク) からおよそ 0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$  の DINP が溶出しており、先の成人での Mouthing と同程度の溶出傾向を示した。そこで本年度は、*in vitro* 試験法を確立するに当り、これらの結果を踏まえ、*in vitro* 溶出条件を吟味すると共に、試料の大きさ (表面積) と溶出液量が DINP 溶出に及ぼす影響ならびに試料の形状と DINP 溶出量の関係について検討を行った。

円形ディスクによる Mouthing 実験の結果、Mouthing 時の唾液の pH は pH 6~8 であった。従って、*in vitro* 溶出法に用いる溶出液には pH 7 付近に調整した人工唾液が妥当と考えられた。また、昨年度行った *in vitro* 溶出条件の検討の結果、生理的 pH の範囲 (pH 6~8.5) では溶出液の pH と DINP の溶出に関連性は見られず、Mouthing 時の唾液 pH の違いは DINP の溶出にほとんど影響を与えないと考えられた。

同一被験者が同一試料を繰り返し Mouthing したところ、毎回ほぼ同レベルの DINP が溶出したことから、DINP の溶出量は Mouthing の時間にほぼ比例して増えると推測される。従って、*in vitro* 溶出法における溶出 (振盪) 時間の設定においても、振盪時間に比例して DINP の溶出量が増加する時間帯、すなわち、昨年度の検討の結果、振盪時間 10~30 分の間に設定するのが妥当と思われる。

溶出容器 50 mL の遠心管としたときの試料の大きさ (表面積) と溶出液量を設定するために、昨年度の溶出試験条件を基に、試料の表面積と溶出液量の関係が DINP の溶出に及ぼす影響について調べた。まず、2 cm φ 円形ディスクを 1、2 および 3 個 (表面積約 8.48~25.4 cm<sup>2</sup>) 用い、それぞれ液量 30 mL の定容量の溶出液で溶出を行い DINP 溶出量を比較して表面積との関係を調べたところ、DINP の総溶出量は 80.9~214 μg とほぼ表面積に比例して増加した ( $r = 0.99584$ )。さらに、このときの単位面積当りの溶出量はいずれの場合においてもほぼ 0.9 μg/cm<sup>2</sup>/min と同レベル溶出であり、これらの結果、試料の大きさ (表面積) が多少異なる場合であっても同一溶出条件で溶出試験を行うことにより、試料間の DINP 溶出量を比較することが可能であると考えられた

(Table 5)。

次に、2 cm φ 円形ディスク 1 個 (表面積約 8.48 cm<sup>2</sup>) と 3 cm φ 円形ディスク 1 個 (表面積約 17.4 cm<sup>2</sup>) を用い、15 および 30 mL と試料の表面積に応じて液量え、単位面積当り等量 (約 2 mL/cm<sup>2</sup>) の溶出液で溶出し、溶出する DINP の量を比較して溶出液量との関係を調べた。その結果、表面積が小さい 2 cm φ 円形ディスクの方が総溶出量で約 3.6 倍、単位面積当りの溶出量では約 7.4 倍高い溶出を示した。この原因としては溶出容器中での試料と溶出液の動きが相互に関与していると考えられるが明確な理由については判らなかった (Table 6)。

また、これら 2 つの検討において、溶出液量を 30 mL として試料の溶出を行った場合、表面積約 8.48~25.4 cm<sup>2</sup> の試料からの DINP の溶出量はおよそ 0.9 μg/cm<sup>2</sup>/min であり、成人が歯がためを Mouthing したときの溶出 (0.1~1 μg/cm<sup>2</sup>/min) と同程度の溶出傾向を示した。従って、*in vitro* 溶出法によりヒトでの Mouthing を推定するためには試料の大きさ (表面積) としては 15 cm<sup>2</sup> 付近、溶出液量は 30 mL 程度に設定するのが妥当と考えられた。

実際のおもちゃは大きさや形状が多種多様であり、種々のおもちゃについて溶出試験を行うには必ずしも 3 cm φ 円形ディスク試料を得がたい場合もある。そこで試料の形状の違いが DINP の溶出に及ぼす影響を調べるために、歯がためから表面積がほぼ同程度 (平均表面積 17.0 ± 5.4%) で形状の異なる 5 つの試料を採取し、同一条件下で溶出した時の DINP 溶出量を比較して形状違いによる影響を確認した。その結果、形状の異なる各試料の単位面積当りの DINP 溶出量の平均値は 0.7~2 μg/cm<sup>2</sup>/min であり、角型プレートと三角プレートでやや高い値を

示したものの、成人での Mouthing に近似した溶出レベルであることから、形状の異なる試料に対しても同様の溶出条件により DINP の溶出量を推定できると考えられる (Table 7)。

## E. 結論

昨年度および本年度の検討結果より、以下のような結論を得た。

DINP (30~40%) を含有するおもちゃについて、下記条件下で溶出試験を行うことにより採取する各試料の形状の違いにより溶出量がやや高値を示す場合があるものの、比較の変動が少なく、かつ、ヒトでの Mouthing に近似した DINP の溶出レベルを推定する外挿法になると思われる。

### *in vitro* 溶出条件

溶出容器 : 50 mL ガラス製遠心管

試料 : 表面積約 8~25 cm<sup>2</sup>

溶出方法 : 縦 (上下) 振盪 (室温、300 stroke/min、10~30 分間)

溶出液 : 人工唾液 (pH 6.8~7、2 mL/cm<sup>2</sup>、約 30 mL)

DINP の測定 : 試料および溶出液を 50 mL の遠心管に入れ、縦振盪法により溶出する。得られる溶出液と等量のアセトニトリルを加え混和した後、その 100 μL を HPLC に注入し DINP 量を測定する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表 (平成 10 年度分)

○平林尚之、福原克治、鷹野祐子、遠藤和香子、安生孝子、松木容彦、杉田たき子、山田隆、おもちゃからのフタル酸ジイソノニル (DINP) の *in vitro* 溶出の検討、日本食品衛生学会第 78 回学術講演会 (長野)

## G. 知的所有権の取得状況

なし