

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

主任研究者 中澤裕之（星薬科大学 薬品分析化学教室 教授）

研究要旨

1. ポリ塩化ビニル製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

6～10ヶ月乳児の MOUTHING 行動を観察した結果、1日の MOUTHING 時間は、平均 105.3 ± 72.1 分で、フタル酸エステルを溶出する可能性の無いおしゃぶりを口にしていない時間を除くと、平均 73.9 ± 32.9 分（最大値 136.5 分、最小値 11.4 分）であった。ヒトが、フタル酸ジイソノニル(DINP)58%を含む玩具の片を口に含んだ際、 10 cm^2 あたり平均 $63.7 \mu\text{g/hr}$ の DINP が唾液中に溶出した。この値と、MOUTHING 行動の平均時間を用いて、乳幼児が、この玩具を口に入れた場合に摂取する DINP の量は $78.4 \mu\text{g}$ と試算された。渦巻き振とう機を用い 15 cm^2 の玩具片に 30 ml の人工唾液を加えて 300 回転/分で 10 分間振とうを行うと、ヒトが chewing したときの最大溶出量に近似した値が得られた。この方法により、乳幼児が、ある玩具を口に入れた場合、どの程度のフタル酸エステルを摂取する可能性があるかを推測できる。

2. 食品容器包装材等からの内分泌かく乱化学物質の動態

①缶コーティングからのビスフェノールA及び関連化合物の溶出に関する研究

缶コーティングから飲料へのビスフェノールA (BPA) の溶出に関連する各種ファクターの影響及び溶出原因の解明を行うため、缶入飲料の調査で BPA 含有量が高かったコーヒー及び紅茶各 2 銘柄の相当缶及びその改良缶を試験した。缶各部位のコーティング中の BPA 含有量に違いが見られた。これらの缶について食品擬似溶媒を用いた溶出試験を行ったところ、溶出時間の増加とともに溶出量の増加がみられ、BPA の溶出には、エポキシ樹脂のガラス転移温度である 104°C 以上の加熱が必要であり、飲料を缶に封入後の加圧加熱滅菌における温度と時間が、溶出に大きく影響することが示唆された。一方、改良缶での溶出量は大幅に減少しており、缶コーティング中の残存量を減少させた今回の改良は、BPA の溶出量低減に極めて有効であったと判断された。次に、BPA、ビスフェノールAジグリシジルエーテル(BADGE)、その四水酸化体(BADGE-4OH)及び二塩素体(BADGE-2Cl)について、LC/MS による飲料中の分析法を開発し、市販缶入飲料 72 検体中の含有量を分析した。BADGE-4OH は、紅茶、緑茶など茶飲料を中心に、スポーツ飲料、果汁飲料、リカー類からも検出され、残存量も BPA より数倍～数十倍高かった。さらに、塩化水素付加体の BADGE-2Cl もポリ塩化ビニル樹脂塗装缶の一部飲料から検出された。

②瓶詰め食品のキャップシーリング材の内分泌かく乱化学物質

瓶詰食品（輸入品 35、国産品 15 検体）のキャップシーリング材について、内分泌かく乱

作用が疑われているフタル酸エステル等の可塑剤および BPA の使用動向を調査した。可塑剤は約 50%から検出され、国産品と輸入品では検出された可塑剤が異なっていた。全体的にはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)の使用が自粛されつつあること、また、材質自体もポリ塩化ビニル製から可塑剤を必要としないものに変わりつつあることが窺えた。BPA は輸入品の 5 検体から 1.0-620ppm の範囲で検出された。さらに、シーリング材から食品への可塑剤の移行について調べたところ、脂質の多い食品に高い濃度で溶出されているものがあつた。

③缶詰食品中のビスフェノール A およびビスフェノール A 関連物質の分析

缶内面コーティング剤から缶詰食品中に移行した BPA について高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器-蛍光検出器を用いた分析法を検討し、缶詰食品中 72 検体の BPA の分析を行った。その結果、72 検体中 47 検体から BPA が約 1-22 μ g/缶検出された。加熱処理条件の厳しい野菜缶および肉・魚介缶であり、10 μ g/缶以上検出された缶詰 (9 検体) はすべてプルトップ型の缶詰であり、缶詰食品は、BPA のヒトへの暴露経路の一つとして考えられる。さらに、BADGE および 2 種類の塩化水素付加体 (HCl 型, 2HCl 型) について 20 検体分析したところ、BADGE が 3 検体(0.6-4 μ g/缶)、BADGE・2HCl 型が 9 検体 (0.1-47 μ g/缶)、BADGE・HCl 型が 3 検体 (0.1-2 μ g/缶) から検出された。

④缶ビール中のビスフェノール A に関する研究

缶ビール等の缶飲料に用いられるアルミ缶は、内面にエポキシ樹脂による塗装が施されており、BPA が内容物に溶出する可能性がある。そこで、ビール中の BPA について GC/MS による試験法を検討し、市販缶ビール製品中の BPA 含有量を調査した。国内の主要製品から BPA は検出されなかったが、輸入品の一部製品で、ビール中から BPA が検出された。

3. 医療用高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解明

①高分子素材からなる医療用プラスチック製品

医療用プラスチック製品に由来する揮発性物質をヘッドスペース瓶にとり、50℃で気化する物質を SPME ファイバーに吸着させ、GC/MS で測定した。その結果、飽和炭化水素で C₁₇以下の沸点を持つような化合物 (PTRI で 1700 以下) として、アニリン、トルエン、THF、フェノール、アセトフェノン、ベンゾチアゾール、ジクロロベンゼン、スチレン、BHT 等が検出された。また、溶出により人体に取り込まれる可能性のある物質を同定するため、生理食塩水でカテーテルから溶出してきた物質を SPME ファイバーで抽出し、GC/MS で測定した。この結果、ベンゾチアゾール、ベンゾフェノン、BPA、ノニルフェノール、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) 等約 120 物質を推定できた。

②血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

輸血用血液バッグに豚の血液を詰めて冷蔵保存した後、揮発性有機化合物をヘッドスペース-GC/MS で分析したところ、その血液中にはベンゼン、トルエン、スチレンモノマーなどの芳香族系有機化合物が経時的に増加し、20 日間の保存期間でこれらは数十 ppb の濃

度に達することが確認された。これらの化合物は、バッグ中に残存していたものが血中に溶出したもののみではなく、空気中に存在していたものがバッグを通過し、バッグ中の血液に移行した可能性も示唆された。また、これら芳香族系化合物の他に、血液バッグからはテトラヒドロフラン (THF) および 2-エチル-1-ヘキサノールが大量に溶出することも判明した。一方、母乳バッグに牛乳を詰めて 30 日間凍結保存した後、分析を行ったところ、調査した 2 種類のバッグのうち 1 種類からはトルエンの溶出が認められた。

③歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

BPA を原材料としたポリカーボネート(PC)は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。BPA の簡便かつ高感度測定方法として、電気化学検出高速液体クロマトグラフ法による分析法を検討した。構築した分析法を用いて、PC 中に残留している BPA と人工唾液中に溶出する BPA を分析したところ、歯科材料中には残留 BPA が数 $\mu\text{g/g}$ ~数百 $\mu\text{g/g}$ 確認され、材料からの溶出において多いものでは数 $\mu\text{g/g}$ 単位であり、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。

4. 生活空間中の可塑剤の分析と分析精度の向上について

①大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

大気中のプラスチック可塑剤（フタル酸エステル 10 種、アジピン酸エステル 1 種）を同時に測定する方法を検討し、その屋外、屋内及び特殊環境として駐車中の自動車内空気の濃度の実態を調査した。屋外で多く検出されたのは DnBP、DEHP であった。屋内では、検出する濃度、種類は部屋によって少し異なっていた。55℃以上となる夏季の駐車中の車内では、検出する可塑剤の種類も多く、特に DnBP、DEHP は数千 ng/m^3 オーダーで検出された。しかし、車内最高温度 30℃程度の冬季では、濃度は高くなかった

②フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析におけるバックグランド低減化

食品中のフタル酸エステル類等の濃度を把握することは、リスク評価を行う上で重要であるが、使用量が多く、常に実験室を含む測定環境中に多く存在するため、精度の高い微量分析を困難としている。本研究では、試料の抽出、クリーンナップに精油定量装置を応用した閉鎖系の蒸留システムにより、操作ブランク値の低減化と再現性について検討した。超純水を製造した後、8 時間以上、精油定量装置で加熱還流を行い、フタル酸エステル類を含む共存物質をトルエンで捕集・除去することで、操作ブランクを低減することが可能となった。本法を氷菓の分析に応用したところ、内標準法を採用することで良好な回収率が得られた。

③分析注意点及びブランクの扱いについて

アルキルフェノール類、芳香族炭化水素類、フタル酸エステル類及び BPA 等について、GC/MS 上でのマトリックスの妨害、異性体ピークパターンの扱い、測定環境からの汚染（セブタム等の部品の表面汚染、装置ブランク、室内空気、試薬ブランク）、混合物スタンダードの使用等の留意点を明らかにし、対策を検討した。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法

酵母 Two-Hybrid 法を運用し、化学物質のエストロジェン様作用について評価した。さらにその代謝産物を含めた化学物質のエストロジェン様作用の評価を実施するために、酵母 Two-Hybrid 法の操作過程に S9 mix 処理過程を組み込み、その有用性を検討した。本法は化学物質自体のみならずその代謝産物の内分泌かく乱作用を検討する上で有用であることが判った。また、化学物質のエストロジェン様作用の評価は、化学物質自体を評価したのみでは不十分であり、代謝産物も含めて評価する必要性があることが示唆された。

②ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

化学物質が内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、H295R 細胞を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行った。このアッセイ法を用いて、プラスチック可塑剤として用いられているフタル酸エステル類の影響、プラスチック関連物質として BPA、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールの影響、および食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出物低分子画分・メタノール可溶部分の影響を検討し、コルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定した。

③エストロジェン活性検出系の確立

MCF-7 を用いた内分泌かく乱作用の *in vitro* スクリーニング試験法である E-SCREEN Assay の、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に、諸条件の基礎的検討を行った。さらに、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的とし、高分子素材由来の化学物質について評価を行った。

分担研究者

山田 隆	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長
宮崎 豊	愛知県衛生研究所 所長
藤島 弘道	長野県衛生公害研究所 所長
河村 葉子	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

A. 研究目的

1. ポリ塩化ビニル製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

乳幼児は、内分泌かく乱物質の影響を受

けやすい可能性もあることから、玩具を口に入れてしゃぶり、あるいは噛んだとき、どの程度のフタル酸エステル類が溶出し、体内に入る可能性について検討した。次に、ヒトによる実験を代替しうる、*in vitro* での溶出試験法の開発を行うことを目的とし、溶出試験法の検討を行った。

2. 食品容器包装材料等からの内分かく乱化学物質の動態

①缶コーティングからのビスフェノールA 及び関連化合物の溶出

缶コーティングからの BPA 溶出のメカ

ニズムや各種影響因子等については、十分に解明されていない。また、BPAのエポキシ化体で、エポキシ樹脂の原料であり、塩化ビニル樹脂の安定剤であるビスフェノールAジグリシジルエーテル(BADGE)、及びその分解物等の関連化合物の中にも内分泌かく乱作用が疑われるものがある。そこで、缶コーティングから飲料へのBPAの溶出及びそれに影響を与えるファクター及び移行原因を究明し、缶入飲料中のBPA及び関連化合物の分析法を開発して、市販缶入飲料中のこれら化合物の残存量を調査することを本研究の目的とした。

②瓶詰め食品のキャップシーリング材の内分泌かく乱化学物質

フタル酸エステル(PAE)、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)等の可塑剤は現在、国産の食品用容器包装材にはほとんど使用されていないが、ポリ塩化ビニル製(PVC)のものが多くといわれている瓶詰食品のキャップシーリング材にはこれら可塑剤を検出されることが多かった。あらためて国産及び輸入瓶詰食品におけるこれら可塑剤の最近の動向とシーリング材から可塑剤の食品への移行を調査した。また、BPAはPVCの安定剤として、使用される可能性があり、内分泌かく乱化学物質が注目されている現況から、BPAの使用状況を明らかにすることを目的とする。

③缶詰食品中のビスフェノールA及びビスフェノールA関連物質の分析

缶詰において、エポキシ樹脂は、缶壁から金属等の溶出を防ぐための内面コーティング剤として使用されており、BPAが缶詰食品中に移行している可能性がある。そこで、BPAのヒトに対する暴露量を把握する

ために、高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器-蛍光検出器を用いた缶詰食品中の分析法について検討し、缶詰食品中のBPAの分析を行った。また、エポキシ樹脂のモノマーであるBADGEについても、脂溶性の高い塩化水素付加体(以下BADGE・HCl, BADGE・2HCl)との同時分析を目的とした。

④缶ビール中のビスフェノールAの動態

食品用金属缶の内面塗装には、エポキシ樹脂塗料が多く使用されており、BPAが飲料缶に移行する可能性が指摘されている。そこで、本研究では缶ビール中のBPA試験法を検討し、市販缶ビール製品中のBPAの動態を明らかにするため、含有量を調査した。

3. 医療用高分子素材及び製品由来の内分泌かく乱化学物質の動態解明

①高分子素材からなる医療用プラスチック製品

輸液バッグ、カテーテル、血液透析ファイバー、注射器等は直接人体に接触して使用されるため、様々な化学物質が溶出し、血液系全体に取り込まれる可能性がある。これらプラスチック製品からどのような化学物質が溶出してくるか、また、どのような化合物が気化してくるかを明らかにすることを目的とする。

②血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

輸血用の血液は通常プラスチック製バッグ中に採血、保存されるが、予備調査において、血液バッグに保存された血液は、ベンゼンやトルエン、スチレンモノマーなどの濃度が非保存血液に比べて、異常に高い値を示すことを見いだした。しかしながら、

このような調査には、汚染の少ない血液が大量に必要であり、人血を用いて行うことは困難である。そこでと畜場で簡単に入手できる豚血液を用いて、血液バッグから血中に溶出する揮発性有機化合物の溶出挙動等について検討を行う。さらに、母乳を凍結保存する母乳バッグについても、血液バッグと同様にバッグから溶出する有機化合物による汚染が懸念されたことから、母乳の代わりに牛乳を用いて究明することを目的とする

③歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

ポリカーボネート(PC)は 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、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。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高速液体クロマトグラフィーを用いた分析法を構築し、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 溶出量を把握する。

4. 生活空間中の可塑剤の分析と分析精度の向上

①大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

化学物質の中でも比較的生産量も多く、我々の生活環境中にはありふれた物質とされているプラスチック可塑剤について、大気中の汚染状況を把握する測定方法を確立し、その濃度が測定地点、気象条件や室内環境等でどのように変化するかを究明し、

実態調査を通じて人体暴露影響を評価し、発生を防止するための基礎資料とすることを目的とする。

②フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析におけるバックグランド低減化

食品中のフタル酸エステル、アジピン酸エステル類について精度の高い分析法を構築することが要求されている。しかし、これらの可塑剤は生活環境中に多く存在するため、その暴露経路は空気、水、試薬等多岐にわたり、その結果として高いバックグラウンド値として現れ、精度の高い分析を困難にしている。そこで、分析上の障害となるバックグランドを極力排除し、高感度定量法を確立するために、抽出・クリーンアップが閉鎖系で行われる精油定量器を用いた蒸留法を検討する。

③分析上の注意点及びブランクの扱いについて

内分泌かく乱化学物質の分析では低濃度での測定を要求されるため、通常の分析では注意を払う必要の少ない部分がクローズアップされ、分析結果に影響を及ぼす。分析機器装置や部品を含めた機器分析上の留意点やブランクの扱い等について、アルキルフェノール類、芳香族炭化水素類、フタル酸エステル類及び BPA を中心に分析技法上の情報を取得する。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

化学物質について内分泌かく乱作用という新たな観点からの安全性評価が求められており、高分子素材に由来する化学物質や溶出物を中心に様々な視点から生体に及ぼす影響を解析するため、アッセイ系の構築を目標とした。

① 酵母 Two-Hybrid 法

酵母 Two-Hybrid 法を運用し、化学物質のエストロジェン様作用の評価を実施し、さらにその代謝産物を含めた化学物質のエストロジェン様作用の評価を実施するために、酵母 Two-Hybrid 法の操作過程に S9 mix 処理過程を組み込み、その有用性を明らかにする。

② エストロジェン活性検出系の確立

内分泌攪乱化学物質のスクリーニングには、*in vitro*、*in vivo*で様々な方法が報告されているが、その一つにヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法である E-SCREEN Assay がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性検出系を検討し、高分子素材由来の化学物質について評価を行った。

③ ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

環境由来の化学物質が生体のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、ヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞(H295R 細胞)を用いて、*in vitro* でその直接的な影響を検討する。先ず環境由来の化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ系を構築し、フタル酸エステル類、BPA、4-ノニルフェノール及び 4-*t*-オクチルフェノールの影響、及び食品包装用ラップ類のジクロロメタン

抽出物低分子画分・メタノール可溶部分の影響を検討する。

B. 研究方法

1. ポリ塩化ビニル製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

①乳児 MOUTHING 行動の実態調査：6～10ヶ月の各月齢児5名、計25名の親に、1回15分ずつ10回、計150分ビデオカメラで児の様子を記録し、被験児の MOUTHING 時間を秒単位で測定し、1日の活動時間中の MOUTHING 時間を推計した。

②ヒトの chewing による玩具から唾液へのフタル酸エステルの溶出：使用頻度のもっとも高い、フタル酸ジイソノニル (DINP)を含む玩具片を作製、そのまま、口に含み、軽く噛んだり、舌で口中を転がした。この間、唾液は飲み込まない。一定時間(主として15分間)後、唾液を高速液体クロマトグラフィーにより、フタル酸エステル量を測定した。

③ *In vitro* 溶出試験：溶出方法として玩具に直接手で触れないように手袋を用い、表面積 15 cm² に切断し、50 ml の遠心管に入れ、人工唾液 30 ml を加え、渦巻き振とう機一定時間振とう抽出し、アセトニトリルで希釈後、高速液体クロマトグラフィーにより分離定量した。

2. 食品容器包装材等からの内分泌かく乱化学物質の動態

① 缶コーティングからのビスフェノールA及び関連化合物の溶出

試料にはモデル缶、市販缶入飲料を使用した。材質判別は FT-IR で内表面の赤外吸収スペクトルを測定した後、標準品スペク

トルとの比較により実施した。材質試験は内面コーティングの一部を削り取り、ジクロロメタンで超音波抽出し、アセトニトリルに再溶解して HPLC/UV/FL により BPA を測定した。溶出試験は溶出溶媒として水を用いた場合には、60℃及び95℃30分間、120℃10、30、60分間、20%エタノールを用いた場合には60℃30分間、*n*-ヘプタンを用いた場合には、25℃1時間溶出試験を行って試験溶液を調製し、BPA を測定した。缶入飲料はポリスチレン固相抽出用カートリッジでクリーンアップし、LC/MS により BPA、BADGE、BADGE-4OH、BADGE-2Cl を測定した。

②瓶詰め食品のキャップシーリング材の内 分泌かく乱化学物質

1999年に購入した市販瓶詰食品(国産品15検体及び輸入品35検体)のキャップシーリング材50検体を用いた。シーリング材中の可塑剤は金属製キャップ内側のシーリング材をはがして細切し、ヘキサンを加え、時々振り混ぜながら3日間放置した抽出液を適宜希釈し、GC及びGC/MSにて分析を行った。BPAについては酢酸エチルで抽出したものを、フロリジルカートリッジでクリーンアップ、蛍光検出HPLCで分析した。食品中のDEHPの分析はアセトンで抽出、ヘキサン洗浄、フロリジルカートリッジでクリーンアップし、GC及びGC/MSで測定した。

③缶詰食品中のビスフェノールA及びビス フェノールA関連物質の分析

市販の缶詰72種類果実缶17検体、野菜缶34検体、肉・魚介缶21検体)について分析した。缶詰食品は、固形分、液汁、油に分離し、それぞれについて試験溶液を調

製した。液汁試料(スープ類を含む)はOASIS HLBカートリッジさらにフロリジルカラムでクリーンアップを行った。油試料はヘキサンに溶解後、アセトニトリル分配、フロリジルカラムでクリーンアップを行った。分析は蛍光検出-HPLCで実施した。

④缶ビール中のビスフェノールAの動態

ビール中のBPAについてGC/MS(SIM)による試験方法を確立するために、既存のBSTFAを用いたTMS誘導体化法を検討し、本法を用いて、缶ビール製品に関して試験を行った。一部缶ビール製品に関して25℃及び50℃にて一定期間保存した後、同様に試験を行った。さらにジエチル硫酸を用いてジエチル誘導体化法及びエチル誘導体化法を検討し、GC/MS(SIM)により測定した。本法を特定のホップエキスを原料として使用した缶ビールに関して試験を行った。

3. 医療用高分子素材及び製品由来の内 分泌かく乱化学物質の動態解明

①高分子素材からなる医療用プラスチック 製品

医療用に用いられているプラスチック製品25種類及び関連企業から12種類の医療用プラスチック製品の提供を受けた。揮発性物質の測定は試料をはさみ等で細切し、ヘッドスペース瓶に採り、密栓し50℃で30分間、Polydimethylsiloxane/divinylbenzeneのSPMEファイバーで抽出し、GC/MSで測定した。また、同定の精度を高めるためにGC-FPDとGC-NPDでも測定した。更に細切した試料に生理食塩水を加え、10分間超音波・攪拌しながらSPMEファイバーで30分間抽出し、GC/MSで生理食塩水によ

る溶出物質の測定を行った。

②血液バッグ保存血液中の内分泌かく乱化学物質の分析

血液バッグについては 6℃の冷蔵庫中に保存し、一部は発泡スチロール製の小型容器に入れ、ふたを装着して、その他のバッグとは異なる冷蔵庫内で保存した。母乳バッグに牛乳を規定量詰めて密封し、-30℃で 30 日間凍結保存した後、即日開封とともに解凍し、試料とした。分析はヘッドスペース-GC/MS で行った。

③歯科用ポリカーボネート中の BPA の分析

PC 製ブラケット、テンポラリークラウン、レジン歯は臨床で用いられている市販品を購入した。材質試験は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℃以下)し、アセトニトリルに溶解後、適量をメンブランフィルターでろ過した。溶出試験は材料を人工唾液中に浸漬させ、37℃の恒温槽で遮光下静置した。BPA の測定は電気化学検出 HPLC で行った。

4. 生活空間中の可塑剤の分析と分析精度の向上について

①大気中のプラスチック可塑剤の実態調査

試料捕集はテフロン製のろ紙ホルダーに GF(QF)、CF を重ねて装着し、10 l/min で 24hr (約 14.4m³) 2 段捕集し、ろ紙一部ジクロロメタンを用い、超音波抽出した。内部標準物質を添加して、GC/MS で分析した。

②フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類の分析におけるバックグラウンド低減化

使用した水はいずれも、精油定量装置を用い、8 時間以上加熱還流して、揮発性成分を除去し、GC/MS に対して妨害ピークを認めないもの、本法で用いるガラス器具類はすべてアセトン洗浄後、200℃の乾燥器内で 4 時間以上加熱したものを用いた。精油定量器にトルエンを 1mL 正確に加え、ジムロート冷却器を取り付け、マントルヒーターで加熱蒸留した。蒸留後、トルエン抽出層を小試験管に取り、少量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、GC/MS 検液とした。

③分析注意点及びブランクの扱いについて

使用した分析機器及び測定条件はそれぞれ研究協力書に記載した通り。

5. 生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の作用評価

①酵母 Two-Hybrid 法

エストロジェンアッセイは酵母を前培養し、DMSO に溶解した被検化学物質を添加して実施した。生成したβ-ガラクトシダーゼの酵素活性を被検化学物質のエストロジェン様作用の指標とした。S9 mix 処理は Cofactor I 溶液ラット S9 を添加し、被検化学物質の DMSO 溶液を加え、37℃、4 時間のインキュベーションを行った。S9 mix 処理後、エストロジェンアッセイを実施した。

②エストロジェン活性検出系の確立

MCF-7, T47D を用いて E-スクリーンアッセイを実施した。被験物質を加えて、37℃、5%CO₂ 中で 3 日間インキュベートした後、各ウェルにセルカウディングキット (和光純薬) 中の試薬溶液を加えて、3 時間後にプレートリーダーで測定波長 450nm、参照波長 600nm にて測定する。

③ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロ

イドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

細胞は ITS+(1.0%)、Ultrosor G (2.0%) 及び抗生物質を含有する D-MEM-F12 メジウムを用い、5% CO₂-95% Air の気相中、37 °C の条件下で継代培養した。サブカルチャーしコンフルエント後、メジウムを交換し、種々の検体のエタノール溶液を添加し、同時にステロイド合成を誘導するため (Bu)₂cAMP を添加した。メジウム中に分泌されたステロイドをラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。サンプルの細胞毒性を考慮してメジウム中に放出される LDH を測定し、全タンパク質量を測定して、細胞数の指標とした。なお、コルチゾールの測定にはコルチゾール測定 RIA キットを用いた。

C. 研究結果及び考察

1. ポリ塩化ビニル製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

①乳児 MOUTHING 行動の実態調査

6~10 ヶ月児 25 名の 1 日の活動時間は、平均 615.0±100.5 分であった。1 日あたりの MOUTHING 推計時間は、平均 105.3±72.1 分であった。MOUTHING 時間の長さは、おしゃぶり使用時間に依存していた。おしゃぶりを口に入れているときの行動は、他のものを口に入れる場合と大きく異なるため、おしゃぶりをしゃぶっている時間は、本観察が目的としている MOUTHING 時間から省くのが適切と考えられる。

②ヒトの chewing による玩具から唾液へのフタル酸エステルの溶出

おしゃぶり (DINP 含量 58%) 片を入れたときの唾液への DINP の溶出は、95.5±

40.4 μg/hr であった。ガラガラ (DINP 含量 32%) では、64.3±37.5 μg/hr、歯固め (DINP 含量 36%) では 49.2±20.8 μg/hr であった。同一人物が一週間の間隔を空けて同じ実験を行ったとき、溶出量はほとんど同じ値であった。

③In vitro 溶出試験

In vitro 溶出試験は、温度の影響を受けることが分かったため、恒温槽中で振とう試験ができる、渦巻き振とう機を使用した。おしゃぶりとガラガラの場合は、ヒトの chewing の結果と in vitro 溶出試験の結果でほぼ近い値が得られた。玩具の形状によっては、試験片を同じ形に切ることが不可能であり、バラツキは大きくなった。

2. 食品容器包装材等からの内分泌かく乱化学物質の動態

①缶コーティングからのビスフェノール A 及び関連化合物の溶出

1) 飲料へのビスフェノール A の移行要因

缶各部位のコーティング中の BPA 含有量を測定したところ、サイドシームや底部で極めて高い含有量を示した。また、紅茶 A では突出した部位はみられなかったが、面積が広い側面の含有量がやや高いため、缶全体では高い値を示した。水 120°C 30 分間で溶出を行うと、相当缶では 35~124 ng/mL の溶出がみられ、缶入飲料における BPA にほぼ近い値であった。

飲料への溶出は缶コーティングに残存していた BPA 量に依存しており、加圧加熱等によりエポキシ樹脂が分解して新たに BPA が生成しているとは考え難い。

2) 市販缶入飲料中の BPA、BADGE 及び関連化合物の含有量

BPA、ビスフェノール A ジグリシジルエ