

ポリ塩化ビニル製おもちゃからの
フタル酸ジイソノニル（DINP）の溶出に関する調査研究

分担研究者 山田 隆 国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者 杉田 たき子, 阿部 有希子

研究要旨

内分泌かく乱化学物質は人の発育初期に大きな影響を及ぼすことが懸念されている。ポリ塩化ビニル製の乳幼児用おもちゃには高濃度のフタル酸エステル類が含まれているため、口に含んだ場合のフタル酸エステルの溶出量を明らかにすること、摂取量を推定するためのシミュレーション溶出試験法を確立する必要があった。本年は昨年度提案した上下振とう溶出試験法についてさらに詳細な検討を行い以下の結果を得た。①人工唾液の組成による溶出量への影響を四種類の人工唾液を用いて調べたところ、溶出に及ぼす影響は極めて小さいものであった。②試験片を調製する際に皮脂が付着することが考えられ、付着した皮脂がDINPの溶出に何らかの影響を及ぼすか試験した。その結果、皮脂が付着した試験片では溶出量が50%と少なくなった。これは試験片の表面が皮脂でコーティングされ、DINPの溶出が妨げられるものと推察された。③溶出試験を行う場合の温度の影響を検討したところ、高温ほど溶出量が多くなり温度の影響を受けることが明らかとなった。従って上下振とう溶出試験法は温度コントロールができないため、新たな振とう方法を検討する必要が生じた。④温度コントロールが可能なVortex Shaker（渦巻き振とう、回転振幅20 mm）による振とう溶出試験法を検討したところ、250回及び300回でのバラツキは小さく、溶出条件は30℃、300回10分間が適当であった。⑤おもちゃ8試料の渦巻き振とう溶出試験（300回/分、30℃10分）の結果と昨年度実施した上下振とう溶出試験（300回/分、20℃15分間）による溶出量を比較したところ、歯固め試験片以外の7試料の溶出量はかなり良く一致した。また、上下振とうに比べてバラツキも小さくより有効な方法と考えた。⑥おしゃぶり等6試料について渦巻き振とう溶出試験を協力研究者に依頼した。3機関のおしゃぶり試験片からのDINP溶出量は $321 \pm 52 \mu\text{g}$ 、変動係数は16%と良好であったが、歯固め試験片では3倍の差がみられた。これは同一の試験片を作るのが困難なためバラツキが大きくなったと推察されるが、3倍の差があったことは、試験片の違いだけでなく、機器の振とうの強さ等に由来することも考えられる。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質はヒトの発育初期に大きな影響を及ぼすことが懸念されている。平成10年度厚生科学研究費補助金によりおもちゃ中のフタル酸エステル類の実態調査でポリ塩化ビニル（PVC）製玩具68製品の材質試験を行ったところフタル酸ジイソノニル（DINP）、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）、フタル酸ジブチル（DBP）、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHA）、フタル酸ジノニル（DNP）及びフタル酸ジヘキシル（DHP）が検出された。最も多く検出されたのはDINPで48試料で検出され、平均含有量は30.8%、含有量の最も多い試料はおしゃぶりで58%と高濃度であること等を明らかにした。

このようにPVC製の乳幼児用おもちゃには高濃度のフタル酸エステル類が含まれているため、乳幼児がこれらの玩具類をしゃぶったり、口に含んだ場合のフタル酸エステルの溶出量を明らかにすること、また、乳幼児のフタル酸エステルの摂取量を推定するためのシミュレーション溶出試験法の確立が急務とされた。

おもちゃからのフタル酸エステルのシミュレーション溶出試験法としてオランダのHead over heels method及び米国CPSCのPiston法が報告されているが、米国のPiston法は再現性が低いと評価されている。我々は平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）において、おもちゃに最も多く使用され、かつ含有量の多いDINPを含有するおしゃぶり、歯固め及びガラガラ等を用い

てシミュレーション溶出試験法を検討した。その結果、上下振とう法が溶出量のバラツキが小さく、また、上下振とう試験（300回/分、15分間）における溶出量が人によるチューイング試験の移行量とも一致したことから最も有効な方法であると考えた。本年度はおもちゃからのフタル酸エステル類の溶出試験法を確立することを目的として、上下振とう溶出試験法についてさらに詳細な検討を加えた。

B. 研究方法

1. 試料

平成10年10月に玩具協会を通じて入手したおもちゃの一部を試料に供した。

口に入れることを目的としたおしゃぶり、歯がため

口に入れる可能性が極めて高い（1年未満の乳児を対象）ガラガラ、ままごと道具

口に入れる可能性が考えられるソフトドール（3種類）及びままごと道具

(1) 試験片

おもちゃは表面積が15cm²になるようにカットし、溶出試験用試験片を作成した。

2. 試薬

フタル酸エステル：フタル酸ジイソノニル（DINP）は和光純薬工業及び関東化学の試薬

アセトン及びアセトニトリル：HPLC用、片山化学工業製

3. 標準溶液

DINP50.0mgをアセトニトリルで溶解して50mLとし、1,000 μ g/mLの標準原液を調製した後、一定量をアセトニトリルあるいは50%アセトニトリルで適宜希釈した。

4. 装置

高速液体クロマトグラフ：ポンプ LC-10A, 紫外可視分光検出器 SPD-10 AVvp, システムコントローラ SCL-10A, データ処理装置 CR-7A plus 以上 (株) 島津製作所

恒温槽：サンヨーインキュベーター MIR-151 三洋電機 (株)

上下振とう用振とう器：Recipro Shaker (振幅40 mm) タイテック (株)

渦巻き振とう用振とう器：Vortex Shaker VR-36D(回転振幅20 mm) タイテック (株)

5. HPLC測定条件

カラム：TSKgel ODS-80Ts QA (内径4.6 mm, 長さ25 cm, 粒径5 μ m), 東ソー (株) 製

ガードカラム：TSKgurdgel ODS-80 Ts (3.2 mm I.D., 1.5cm), 東ソー製

カラム温度：40 $^{\circ}$ C, 流量：1.0 ml / min

移動相：DINPの測定：アセトニトリル100%

検出波長：225 nm

注入量：50 μ l

6. 人工唾液

下記の人工唾液はミリQ水1Lに

溶解した。

(1) BS 6684 British Standard Specification for Safety Harnesses 1987

塩化ナトリウム	4.5g
塩化カリウム	0.3g
塩化アンモニウム	0.4g
硫酸ナトリウム	0.3g
尿素	0.2g
乳酸	3.0g

(5M 水酸化ナトリウムでpH 6.8に調整した)

(2) Arvidon and Johansson, EG

リン酸二水素カリウム	2.5mM
リン酸水素二ナトリウム	2.4mM
炭酸水素カリウム	15 mM
塩化ナトリウム	10 mM
塩化マグネシウム	0.15mM
クエン酸	0.15mM
塩化カルシウム	1.5mM

(pH 6.7)

(3) Modified Meyers artificial saliva

塩化ナトリウム	0.4g
塩化カリウム	0.4g
塩化カルシウム二水和物	0.795g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.78g
硫化ナトリウム九水和物	0.005g
尿素	1g

(pH4.8)

(4) (2)の変法 (東京医科歯科大学本郷)

塩化カリウム	15mM
リン酸二水素カリウム	2.5mM
リン酸水素二ナトリウム	2.4mM
塩化ナトリウム	8.5mM
塩化マグネシウム	0.15mM
塩化カルシウム	0.5mM
炭酸水素ナトリウム	1.5mM

(pH 7.2)

7. 試験溶液の調製

人工唾液溶出試験液0.5 mlを取り、アセトニトリルを加えて1.0 mlとし、HPLC用試験液とした。

8. 各種振とう機器による溶出試験

(1) 振とう機器による溶出条件

50ml容量の蓋つきガラス製遠心管（外径35mm,高さ110mm）5個を用い、それぞれに15 cm²の試験片を入れ、人工唾液30mLを加え、下記の振とう器にセットし、一定時間振とうした。
a. 上下振とう：RECIPRO SHAKER SR-2w 室温(20℃), 振幅4.0 cm, 毎分300回で15分間振とうした。溶出液は振とう終了後に別の容器に移し、溶出試験液とした。この操作を4回繰り返した。

b. 渦巻き振とう：VORTEX SHAKERは30℃にセットした恒温槽に入れ、回転振幅(20 mm), 回転数を300回にセットして10分間振とうした。

C. 研究結果

1. ヒトチューイング及び上下振とう試験によるDINP溶出量

ヒトチューイング試験は東京顕微鏡院のグループが担当した。結果はヒトが15分間ずつ4回(1時間)チューイングした場合のDINP移行量はおしゃぶり、ガラガラ及び歯固めでそれぞれ300±89, 328±39及び188±28 μgであった。また、上下振とう溶出試験(室温20℃, 毎分300回, 15分間)の結果はそれぞれ298±11, 247±15及び187±86 μgであった(表1)。歯固めでは標準偏差(S.D.)が86と大きく、バラツキが大きかったが、ヒトチューイングの結果とは

一致した。

2. 人工唾液成分の違いによる溶出量への影響

平成10年度の溶出試験で人工唾液はBS 6684 British Standardを基にpHを6.8に調整したものをを用いた。今回、歯科大学等で用いられている人工唾液を調整し、人工唾液の組成によって溶出量に影響があるか調べた。4種類の人工唾液を用いて、上下振とう(室温15分間)による溶出試験を行ったところ、7.7±0.4から11.1±1.5 μg/mLであり(表2)。人工唾液による差は小さいものと判断し、昨年度から使用している人工唾液を用いた。

3. 試験片に付着した皮脂のDINP溶出に及ぼす影響

試験片は市販のおもちゃをカットするため、手指で触った場合、玩具表面の可塑剤が手指に移行することや、玩具表面に皮脂が付着することが考えられ、付着した皮脂がDINPの溶出に何らかの影響を及ぼすか試験した。おしゃぶり及びガラガラは素手で触らないように手袋をしてカットしたものを皮脂なし試験片とした。これらの試験片5枚ずつを比較的皮脂量が少ない女性が手指で両面を触ったものを皮脂付き試験片Aとした。また、ガラガラ試験片については比較的皮脂量が多い男性が同様に触ったものを皮脂付き試験片Bとし、上下振とう試験を行った。その結果、おしゃぶり試験片では皮脂付き試験片Aの溶出量は皮脂なし試験片の50

%であった(図1-(1))。この溶出試験をさらに繰り返した場合も溶出量に変化は見られなかった。ガラガラ試験片でも皮脂付き試験片からの溶出量は50%と同様の結果であった。皮脂付き試験片の皮脂量は測定していないが、皮脂量の多少に関わらず溶出量は一致した(図1-(2))。すなわち、試験片に皮脂が付着した場合、試験片表面が皮脂でコーティングされ、DINPの溶出が妨げられるものと推察された。おもちゃ試料の取り扱いには手袋を使用するなどの配慮が必要であった。

4. DINPの溶出に及ぼす温度の影響

おもちゃからのDINP溶出試験法として「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)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 p.22」において室温での上下振とう法を提案したが、溶出試験は通年で実施されることが前提であり、温度の影響を明らかにする必要があるが生じ、溶出試験に及ぼす温度の影響を調べた。この振とう装置は温度コントロールができないため、30及び40℃での溶出試験は人工唾液の温度を30℃及び40℃に加温したものをを用い、室温(20℃)で上下振とう溶出試験を行い、比較した。おしゃぶり試験片からの溶出量は室温(20℃)、30及び40℃ではそれぞれ、14.6、24.3及び30.5 μ g/mLと高温になるほど溶出量は増加し(図2-(1))、おもちゃからのDINPの溶出に及ぼす温度の影響が大きいことが明らかとなった。ガラガラ

及び歯固めでも室温(20℃)に比べて30及び40℃で溶出量が多くなったが(図2-(2),(3))、温度による溶出量の差はおしゃぶり試験片で大きかった。

5. 渦巻き振とうによる溶出試験

渦巻き振とう器は幅300 mm、奥行260 mm、高さ135 mm、重量5.5kgの機器で恒温槽中での使用が可能であった。30℃に設定した恒温槽に渦巻き振とう器をセットし、振とう回数を毎分200、250、300及び400回に変化させて、おしゃぶり、ガラガラ及び歯固め試験片の溶出試験を行った。毎分200回ではおしゃぶり試験片で、また400回ではおしゃぶり及び歯固め試験片でバラツキが大きくなった。250及び300回ではいずれの試験片でもバラツキは小さかった(図3)。

平成10年度に行った上下振とう試験(1時間)の結果、250及び300回でのおしゃぶり試験片からのDINP溶出量は1.4及び35.8 μ g/mLと差が大きかったのに対し、渦巻き振とうでは250及び300回での溶出量はいずれの試験片でも同程度であった(図3)。従って渦巻き振とうによる溶出試験は振とう回数によるバラツキが小さくなるものと推察された。溶出試験法の振とう回数は250及び300回が適当であったが、上下振とう法に合わせて毎分300回とした。

6. 上下振とう及び渦巻き振とうによるDINP溶出量

渦巻き振とう器の振とう回数を毎分300回とし、上下振とう(20℃、15

分間)と同程度の溶出条件を設定するために、振とう時間を検討した。表2に上下振とうによる試験結果と渦巻き振とうによる試験結果を示した。まず上下振とう(20℃,15分間)溶出試験を行い、平成10年度の結果と比較した。おしゃぶり及びガラガラ試験片の場合、若干増加しているものの、誤差範囲であると考えた。しかし、歯固め試験片の場合は2倍以上の増加となった。上下振とう(30℃,10分間)の溶出量は20℃,15分間のそれとかなり良く一致した。渦巻き振とうの振とう回数を毎分300回、温度を30℃としたことから、振とう時間10分で試験したところ、いずれの試験片でも、上下振とう20℃,15分間及び30℃10分間の結果と一致した。歯固め試験片は均一の試験片を調製できないこともあり上下振とうでは溶出量のバラツキが大きかったが、渦巻き振とうでは改善された。

7. 上下振とう及び渦巻き振とう溶出試験によるおもちゃからのDINP溶出

平成10年度に測定したおもちゃ試験片について渦巻き振とうによる溶出試験を行った結果を表4に示した。なお、ソフトドール1は試験片がなく溶出試験はできなかった。昨年度の上下振とう溶出試験の結果と渦巻き振とう溶出試験の結果は歯固め試験片以外はほぼ一致した。また、バラツキ(C.V.%)は上下振とうでは3試験片で20%を越えたが、渦巻き振とうでは全て20%未満であり、溶出試験法としてより有効であると考えた。

8. 3研究機関による渦巻き振とう溶出試験

おもちゃ6試験片について協力研究者の2研究機関に渦巻き振とう器を用いた溶出試験を依頼した。各機関の溶出量を表5に示した。依頼した2機関では6試験片のうち3試験片でC.V.値が20%を越えたが、30%以上はなかった。3機関全体のバラツキはおしゃぶり試験片の場合(C.V.値)は16%と良好であったが、その他の試験片では20%を越えた。最もバラツキが大きかったのは歯固め試験片で溶出量に3倍の違いがあった。この試験片は均一の試験片を作ることができないことが一因と考える。また、測定した試験片の溶出量は当研究所の値が高く、食品薬品安全センターの値が低い結果が得られたことから、試験片の調製による差だけでなく、機器の振とうの強弱の差も考えられる。

D. 結論

平成10年度及び11年度に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を行い以下の結果を得た。

- ①人工唾液4種類を用いておしゃぶり試験片からの溶出試験を実施したところ、溶出に及ぼす影響は小さかった。
- ②試験片に付着した皮脂がDINPの溶出を妨げることが明らかとなり、試験片を調製する際に直接素手で触らないように指示する必要があることが解った。
- ③おもちゃからのDINPの溶出は温度の影響を受けた。昨年提案した上下振とう溶出試験法は温度コントロールが困難であるため、恒温槽中で使用できる

渦巻き振とう溶出試験法に変更した。

④昨年度実施したおしゃぶり試験片の上下振とう1時間の結果は振とう250回の場合 $1.4\mu\text{g/mL}$ であったが300回では $35.8\mu\text{g/mL}$ と振とう回数によって溶出量に大差があった。しかし、渦巻き振とう法では、振とう250及び300回の溶出量はほぼ同程度であり、振とう回数の影響が小さく、バラツキが小さくなるものと推察された。

⑤渦巻き振とう溶出試験法は以下の条件に設定した。

溶出用器具：50mL容量ガラス製蓋付き遠心管

試験片：表面積 15cm^2

人工唾液：30 mL

恒温槽温度： 30°C

振とう回数：毎分300回

振とう時間：10分間

以上の条件でおもちゃ8試料についてDINP溶出量を測定し、昨年度の上下振とう法による溶出量を比較した。歯固め試験片を除く7試料の測定値は良く一致した。また、変動係数もすべて20%以下と良好な結果であった。

⑥協力研究者（2機関）におもちゃ6試料の渦巻き振とう溶出試験を依頼し、溶出量を比較した。2機関ではそれぞれ3試料でC.V.値が20%を越えたが、30%以上はなかった。3機関全体でのバラツキではおしゃぶり試験片のC.V.値は16%と良好であったが、その他の試料では20%を越えた。また、歯固めでは溶出量に3倍の差が見られた。この試験片は均一の試験片を調製するのが極めて困難であったが、3倍の差は機器の振とうの強弱等に由来することも考えられる。