

図-5-1 おしゃぶりから人工唾液へのDINP溶出に及ぼす温度の影響

おしゃぶり(DINP58.3%含有): 表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。
 溶出温度◇: 40°C, △: 35°C, ●: 30°C, ■: 20°C(室温)
 人工唾液量: 30mL, 振とう数: 300rpm/分
 DINP溶出量: 3回繰り返し実験の平均値

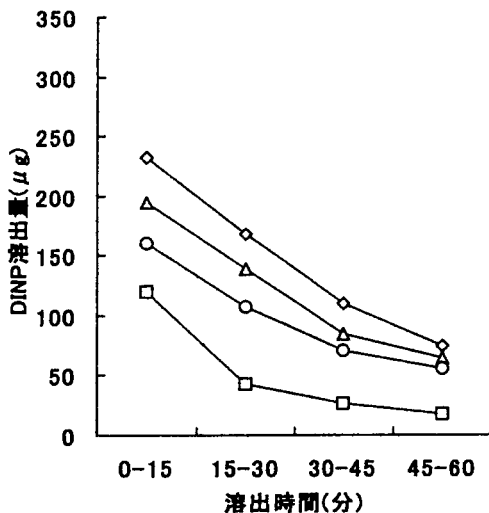


図-5-2 歯がためから人工唾液へのDINP溶出に及ぼす温度の影響

歯がため試験片(DINP35.9%含有): 表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。
 溶出温度◇: 40°C, △: 35°C, ○: 30°C, □: 20°C(室温)
 人工唾液量: 30mL, 振とう数: 300rpm/分
 DINP溶出量: 3回繰り返し実験の平均値

する傾向があった。また、溶出区分間では第1区分の溶出量がどの条件においても最も多く、以降第2区分、第3区分および第4区分と減少傾向があった。この傾向はおしゃぶりと歯がため両試験片とも同じ傾向であった。一方、おし

表-3 溶出温度に対するPVC製玩具から人工唾液へのDINP溶出量

PVC製玩具 溶出条件	おしゃぶり		歯がため	
	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)
40°C	937	5.3	585	12
35°C	741	8.4	483	7.0
30°C	460	8.4	395	14
20°C(室温)	355	19	208	31

DINP溶出量: 第1~4区分溶出量の合計で、3回繰り返し実験の平均値
 PVC製玩具: おしゃぶり(DINP58.3%含有)と歯がため(DINP35.9%含有)
 を表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。
 DINP: フタル酸ジイソニル C.V.: 変動係数

しゃぶりと歯がための各溶出温度に対する溶出量の相対標準偏差は、20°C(室温)で19%と31%、30°Cで8.4%と14%、35°Cで8.4%と7.0%および40°Cで5.3%と12%であり、室温ではバラツキが多く、30°C~40°Cと温度を設定すると、安定した溶出量が得られることが明らかとなった。

以上より、溶出温度を35±5°Cで設定することで良好な結果が得られることがわかった。

人工唾液へのDINP溶出におよぼすムチン添加効果

人工唾液に粘性をもたせ、ヒト唾液に近い性質をもたせるため、ムチンを0.16%添加した。この人工唾液を用い、試験片として歯がため、溶出液量30mL、溶出温度20°C(室温)、回転式振とう数300rpm/分、溶出時間を60分(15分×4回)とし、DINP溶出量を求めた。その結果を表-4に示した。

0.16%ムチンを含む人工唾液へのDINP溶出量は60分あたり377μgであり、同条件でのムチンを添加していない人工唾液への溶出量と比較すると54%増加した。しかし、相対標準偏差は0.16%ムチン添加人工唾液では109%でバラツキが非常に大きく、ムチンを人工唾液に添加することが今回設定している試験法において不適であることがわかった。

回転式振とう溶出試験の応用

以上の結果より設定した回転式振とうによる溶出条件にて、DEHPを32%含有するソフト

人形AおよびDHpPを25%含有するソフト人形Bを用い溶出試験を行った。溶出条件は、溶出溶媒の人工唾液量を30mL、溶出温度を30℃、振とう数を300rpm/分、溶出時間を60分(15分×4)とした。その結果を図-6に示した。

各試験片からのDEHPまたはDHpP溶出量は、第1区分で最も多く、第2, 3, 4区分と減少し、DINP溶出と同じ挙動をとることがわかった。また、60分間の総溶出量および相対標準偏差は、DEHPが547μgおよび9.1%、DHpPが75.7μgおよび7.9%であり、良好な溶出結果が得られた。

以上の結果より、本実験に用いた回転振とう方式で設定した溶出条件がDINP以外のフタル酸エステルを含む玩具の溶出試験に適用できるものと考えられる

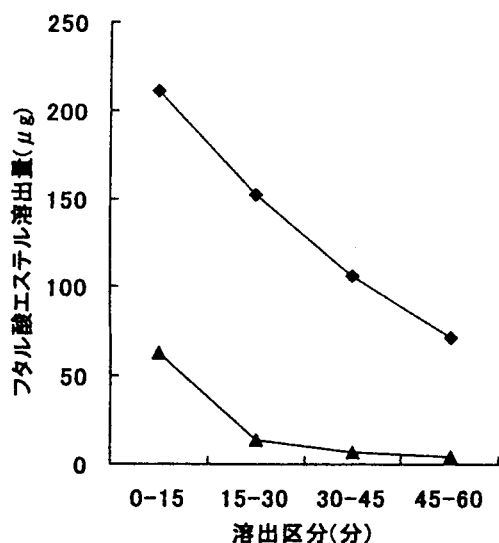


図-6 PVC製玩具から人工唾液へのDEHPおよびDHpP溶出

PVC製玩具◆:ソフト人形A(DEHP32%含有)▲:ソフト人形B(DHpP25%含有)を表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。人工唾液量:30mL、溶出温度:30℃、振とう数:300rpm/分
フタル酸エステル溶出量:3回繰り返し実験平均値

4. まとめ

玩具に含まれるフタル酸エステルの回転振とう方式したによる人工唾液への溶出条件を検討し、以下のような条件を設定できた。

表-4 PVC製玩具から人工唾液へのDINP溶出量に及ぼすムチンの添加効果

PVC製玩具 溶出条件	歯がため	
	DINP溶出量 (μg/hr)	C.V. (%)
ムチン無添加	204	32
0.16%ムチン添加	377	109

DINP溶出量:第1~4区分溶出量の合計で、3回繰り返し平均値

PVC製玩具:歯がため(DINP35.9%含有)を表面積が15cm²になるよう切断し試験片とした
DINP:フタル酸ジイソノニル C.V.:変動係数

- 1) 振とう方式は回転式振とうが良好であり、その振とう数は300rpm/分が溶出量のバラツキが少なく、一定の値が得られた。
- 2) 出溶媒としての人工唾液量は30mL、溶出温度は35±5℃に設定することで良好な溶出量がえられた。
- 3) 人工唾液へのムチンの添加は溶出量のバラツキが非常に大きく、本溶出法には不適であった。
- 4) 玩具に含まれるDINP以外のフタル酸エステルに対しても本回転振とう方式による人工唾液への溶出試験を用いることが可能であった。

Ⅲ. ヒトの chewing による乳幼児製玩具から唾液へのフタル酸エステルの溶出-移行

1. まえがき

ヒトの chewing による口腔内でのフタル酸エステルの唾液への溶出-移行については、平成10年度厚生科学研究で予備実験を行った結果、フタル酸エステルのうちDINPを含有するPVC製玩具を成人がchewingすることにより、唾液へDINPが溶出-移行することが明らかとなった。これらの予備実験から、人工唾液によ

る in vitro での溶出条件の検討を行い、それに相当する結果を得ることができた。今年度(平成11年度)の試験研究では、ヒトの chewing 実験での被験者の数を30人(のべ54人)と増やし、得られた試験結果を平成10年度の予備実験結果と比較した。さらに、DINP 以外のフタル酸エステルについても同様の chewing による溶出実験を行った。

2. 実験方法

試薬および器具

唾液採取用のビンにはネジ蓋付 50mL 容遠心分離管を用いた。

その他使用する標準試薬、一般試薬および器具は前報 I および II に準じた。

装置

使用した装置は前報 I および II に準じた。

試験用玩具の種類

- 1) おしゃぶり (DINP58%含有)
- 2) 歯がため (DINP32%含有)
- 3) ソフト人形 A (DEHP32%含有)
- 4) ソフト人形 B (DHP25%含有)
- 5) ボール (DBP10%および DHP18%含有)

試験片の作製

試験片の作製は前報 II に準じた。

被験者の chewing による口腔内唾液へのフタル酸エステルの溶出-移行試験

PVC 製玩具試験片を被験者(表-5)の口腔

表-5 被験者の性別と年齢

おしゃぶり			歯がため			ガラガラ		
被験者	性別	年齢	被験者	性別	年齢	被験者	性別	年齢
AA	男性	25	BA	男性	22	CA	男性	23
AB	男性	24	BB	男性	24	CB	女性	25
AC	男性	23	BC	男性	22	CC	女性	24
AD	女性	25	BD	男性	22	CD	女性	24
AE	男性	23	BE	男性	22	CE	男性	23
AF	男性	23	BF	男性	23	CF	女性	22
AG	女性	24	BG	男性	23	CG	男性	23
AH	女性	23	BH	女性	22	CH	男性	22
AJ	女性	22	BJ	男性	25	CJ	男性	23
ソフト人形A			ソフト人形B					
被験者	性別	年齢	被験者	性別	年齢			
DA	男性	23	EA	女性	22			
DB	女性	25	EB	男性	23			
DC	女性	24	EC	男性	22			
DD	男性	23	ED	男性	23			
DE	男性	22						

内に入れ、mouthing(口腔内で試験片を転がす)および軽い chewing(試験片を吸う)を行った。以下この動作を“chewing”とする。この chewing を 15 分間行い、口腔内に溜まった唾液全てを 50mL 容ネジ蓋付遠心分離管に吐出し採取した。そして試験片を口腔より取り出し、少量の蒸留水で良く口腔内をすすいだ後、5 分間の休憩を行った(第 1 区分)。休憩後、先の試験片を再び口腔内に入れ、15 分間同様の chewing を行い、溜まった唾液を別の 50mL 容ネジ蓋付遠心分離管に吐出し、採取した。その後、試験片を取り出し、蒸留水にて口腔内をすすぎ、5 分間休憩した(第 2 区分)。以後同様にこの操作を 2 回繰り返した(第 3, 4 区分)。

15 分間隔でそれぞれ得られた唾液は、容量と pH を測定後、蒸留水にて正確に 10mL(唾液量が 10mL 以上のときは 20mL)に定容し、アセトニトリル 10mL(または 20mL)を正確に加え、HPLC 用試験液とした。

フタル酸ジエステルおよびモノエステルの HPLC 分析および GC-MS 分析条件

フタル酸ジエステルの HPLC による定量分析と GC-MS による確認は前報 I, II に準じた。

また、フタル酸モノエステルの確認を行うため、第 1~4 区分の調整した唾液を合わせ、塩化ナトリウムを 10%になるように添加し、0.001N 水酸化カリウムにて pH8~9 とし、n-ヘキサンにてフタル酸ジエステルを抽出した後、0.01N 塩酸にて pH2 に調整し、20%ジクロロメタン含有 n-ヘキサンでフタル酸モノエステルを抽出した。この抽出液を濃縮後、TMSD にてメチルエステル化し、GC-MS にて測定した。

3. 結果および考察

本実験の被験者は全て学生であり、表-5 に示した。おしゃぶりの chewing に男性 5 人(23~25 歳)、女性 4 人(22~25 歳)計 9 人行い、同種の試験片での chewing を 2 回実施した。歯がためは男性 8 人(22~25 歳)、女性 1 人(22 歳)

表-6 被験者のchewingによるPVC製玩具から唾液へのDINP溶出量

歯がため(36%含有)				おしゃぶり(58%含有)				ガラガラ(32%含有)				
被験者	1回目		2回目		被験者	1回目		2回目		被験者	溶出量 [唾液量]	
	溶出量	[唾液量]	溶出量	[唾液量]		溶出量	[唾液量]	溶出量	[唾液量]		溶出量	[唾液量]
	$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]	$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]		$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]	$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]		$\mu\text{g/hr}$	[mL/hr]
AA	35.8	[45.5]	28.7	[50.5]	BA	141	[35.5]	105	[21.0]	CA	86.6	[55.0]
AB	68.9	[45.5]	73.7	[56.5]	BB	65.6	[46.0]	86.9	[40.5]	CB	74.0	[35.0]
AC	65.5	[56.5]	93.8	[72.5]	BC	115	[43.5]	142	[40.0]	CC	98.1	[36.0]
AD	108	[16.0]	58.4	[24.0]	BD	95.5	[60.0]	68.6	[65.0]	CD	57.7	[59.0]
AE	47.9	[31.0]	44.8	[32.5]	BE	72.8	[51.0]	52.8	[40.0]	CE	65.4	[46.0]
AF	41.0	[24.0]	40.3	[36.0]	BF	74.0	[45.0]	42.6	[37.5]	CF	15.7	[27.0]
AG	53.5	[35.5]	39.5	[30.0]	BG	125	[86.0]	121	[69.0]	CG	129	[79.5]
AH	38.0	[39.0]	54.3	[47.0]	BH	112	[87.5]	141	[89.0]	CH	22.6	[48.5]
AJ	19.8	[18.0]	35.4	[38.0]	BJ	56.6	[44.0]	149	[56.0]	CJ	29.9	[66.5]
平均	53.2±25.6		52.1±20.7		平均	95.3±29.5		101±40.2		平均	64.3±37.5	
H10年度報告	188±27.8				H10年度報告	300±89.4				H10年度報告	328±39.3	
唾液量	16.0~56.5mL/hr		24.0~72.5mL/hr		唾液量	35.5~87.5mL/hr		21.0~69.0mL/hr		唾液量	27.0~79.5mL/hr	
唾液pH	6.9~7.4		7.0~7.4		唾液pH	7.0~7.5		7.2~7.5		唾液pH	6.8~7.4	

PVC製玩具:各玩具を表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。

1回目溶出量:試験片を1時間chewingし、得られたDINP溶出量

2回目溶出量:1回目と同種類の試験片を1時間chewingし、得られたDINP溶出量

DINP:フタル酸ジイソノニル

計9人、同種の試験片でのchewingを2回実施した。ガラガラは男性5人(22~23歳)、女性4人(22~25歳)計9人でchewingを1回、ソフト人形Aは男性3人(22~23歳)、女性2人(24と25歳)計5人、ソフト人形Bは男性3人(22~23歳)、女性1人(22歳)計4人で、それぞれchewingを1回実施した。そして、それぞれの試験片から唾液へのフタル酸エステル溶出-移行量を求めた。その結果は以下の通りである。

ヒトのchewingによる口腔内唾液へのDINP溶出-移行量

DINPを含有するPVC製玩具、おしゃぶり、歯がため、ガラガラそれぞれのchewingにより得られた唾液量とそのpHおよびDINP溶出-移行量、さあに平成10年度の予備試験結果をそれぞれ表-6に示した。

歯がため(DINP36%含有)の場合、1回目のchewingによるDINP溶出-移行量は9人平均で53.2 $\mu\text{g/hr}$ ±25.6であった。その1週間後に同一被験者による2回目のchewingを行った結果、その溶出-移行量は52.1 $\mu\text{g/hr}$ ±20.7であ

り、1回目と2回目がほぼ同じ溶出-移行量であり、標準偏差もほぼ同じであった。これを平成10年度の予備試験での結果と比較すると、本年度の結果は1/2.8量に減少していることがわかった。これは、平成10年度のchewing試験は被験者が本研究に携わっており、すなわち、注意深くchewingし、DINPが唾液へ良好に溶出-移行するように行ったため、結果として本年度の結果との間に差が開いたものと考えられる。さらに前報IIにおける回転式振とうによる人工唾液への溶出試験の検討において、振とう数200rpm/分でのDINP溶出量は79 $\mu\text{g/hr}$ 、300rpm/分では204 $\mu\text{g/hr}$ 、および400rpm/分では291 $\mu\text{g/hr}$ であり、DINP溶出量が振とう数に依存する結果がえられている(表-2)。このことからより注意深くchewingを行ない、口腔内で試験片をよく転がしたことが、溶出-移行量が多くなった原因であると推察される。

また、1回目および2回目の実験結果から、唾液量とDINP溶出-移行量との間には平成10

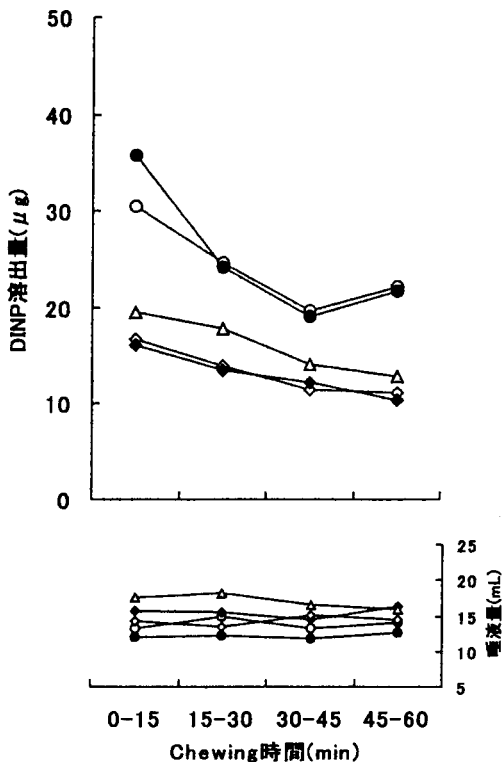


図-7 被験者のchewingによるPVC製玩具から唾液へのDINP溶出及び唾液分泌量とchewing時間の関係

PVC製玩具: 表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。15分間あたりの溶出量及び唾液量○: おしゃぶり(1回目), ●: おしゃぶり(2回目), ◇: 歯がため(1回目), ◆: 歯がため(2回目), △: ガラガラ
DINP溶出量: 被験者9人の平均値

年度と同様、直接関係するデータが得られていない。また、唾液のpHは6.9~7.4とほぼ中性であり、DINP溶出-移行量とは直接関係していないと考えられる。

おしゃぶり(DINP58%含有)試験片でも、1回目の溶出量が95.3μg/hr±29.8、2回目の溶出量が101μg/hr±40.2であり、歯がための結果と同様、1回目と2回目の溶出-移行量が近似し、平成10年度の結果と比較すると1/3.1量に減少した。また唾液量とDINP溶出-移行量を比較しても直接相関関係が見られなかった。ガラガラ(DINP32%含有)の場合、DINPの含有量は歯がためのそれに近似し、被験者9人の平均DINP溶出-移行量は64.3μg/hr±37.5であり、歯がための溶出-移行量と近似した。さらに、

DINPを58%含有するおしゃぶりの溶出量と比較すると、ヒト唾液への溶出-移行量は試験片に含まれるDINP含有量に関係するものと考えられる。

つぎに、おしゃぶり、歯がため、ガラガラそれぞれの試験片における15分間ずつの区分間での溶出量(図-7)を検討すると、DINPの溶出量は第1区分が多く、移行第2, 3, 4区分と減少する傾向がみられ、前報Ⅱでの回転振とう方式による人工唾液への溶出傾向と良く一致することがわかった。

ヒトのchewingによる口腔内唾液へのフタル酸エステル溶出-移行量

PVC製玩具のDEHP31%を含有するソフト人形Aと、DHP25%含有するソフト人形の2種類についてchewingによる唾液への溶出-移行試験を行った。被験者数はソフト人形Aが5人、ソフト人形Bが4人である。得られた結果を表-7と図-8にそれぞれ示した。

ソフト人形Aとソフト人形Bとも被験者の唾液量は、歯がため、おしゃぶり、がらがらでの実験で得られた唾液量とほぼ同じであった。

また、ソフト人形AのDEHP含有量(31%)はガラガラのDINP含有量(32%)とほぼ同じであるが、DEHP溶出-移行量は5人の平均で32.6μg/hr±11.5であり、ガラガラからのDINP溶出-移行量と比較し1/2量に減少していた。さ

表-7 被験者のchewingによるPVC製玩具から唾液へのDEHPまたはDHP溶出量

ソフト人形A(31%DEHP含有)			ソフト人形B(25%DHP含有)		
被験者	DEHP 溶出量 μg/hr	唾液量 [mL/hr]	被験者	DHP 溶出量 μg/hr	唾液量 [mL/hr]
DA	33.4	[38.0]	EA	4.76	[28.0]
DB	50.2	[17.5]	EB	6.72	[78.0]
DC	31.2	[25.0]	EC	10.7	[44.0]
DD	18.0	[44.5]	ED	5.60	[91.5]
DE	30.0	[45.0]			
平均	32.6±11.5		平均	6.95±2.63	
唾液量	17.5~45.0mL/hr		唾液量	28.0~91.5mL/hr	
唾液pH	7.3~7.5		唾液pH	7.1~7.3	

PVC製玩具: 各玩具を表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。
DEHP: フタル酸ジ-エチルヘキシル
DHP: フタル酸ジヘプチル

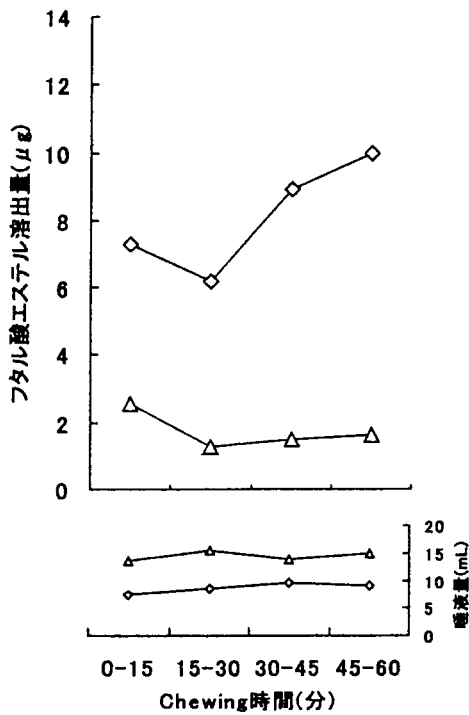


図-8 被験者のchewingによるPVC製玩具から唾液へのDEHPとDhPp溶出及び唾液分泌量とchewing時間の関係

PVC製玩具: 表面積が15cm²になるよう切断し、試験片とした。15分間あたりの溶出量及び唾液分泌量
 ○: ソフト人形A (DEHP32%含有), △: ソフト人形B (DhPp25%含有)
 フタル酸エステル溶出量: 被験者4~5人の平均値

らに、ソフト人形BのDhPpにおいては、その唾液への溶出-移行量は4人の平均で6.95 μg/hr ± 2.63であった。

ソフト人形AからのDEHPと、ソフト人形BからのDhPpの15分間での区分間溶出-移行量(図-8)をみると、DEHPは第1, 2区分が第3, 4区分と比較し、若干ではあるが少なく、またDhPpは第1, 2, 3, 4区分間に差が生じていない。前報IIで報告した回転振とう方式による人工唾液への溶出試験において、ソフト人形AからのDEHPとソフト人形BからのDhPpの人工唾液への溶出は、それぞれ第1区分で溶出量が多く、以降第2, 3, 4区分と減少する溶出傾向が見られた。このことより、口腔内の唾液へ溶出-移行したDEHPおよびDhPpが、脱エステル化され、フタル酸モノエステルに変化していると考え、以下の予備的な実験を行った。

10%のDBPおよび18%のDEHPそれぞれを

有するボールを被験者5人が60分(15分×4区分)間chewing試験を行った。得られた唾液にアセトニトリルを加え、DBPおよびDEHP溶出-移行量を測定したところ、5人の平均でDBPが29.8 μg/hr ± 30.2 およびDEHPが75.9 μg/hr ± 22.5であった。さらに、唾液中のモノエステル体の存在を確認するため、各被験者の4区分間の調整唾液を合わせ、フタル酸モノエステルを20%ジクロロメタン含有n-ヘキサン抽出し、その抽出液をTMSDにてメチルエステル化し、GC-MSのSIMモードにてフラグメントイオンm/e163を測定した。その結果、MBPおよびMEHPの存在を確認した。また、推定量ではあるが、MBPが14 μg/hr およびMEHPが3.12 μg/hrであり、DBP溶出-移行量の約50%およびDEHPの約3%の量であった。このことより、ボールより溶出-移行したDBPおよびDEHPが唾液中で脱エステル化され、MBPおよびMEHPに変化した可能性が示唆された。現在これらのフタル酸ジエステルからモノエステル体の生成機構について検討中である。

4. まとめ

平成10年度、ヒト口腔内におけるPVC製玩具へのDINP溶出-移行試験を予備的に行った。本年度は平成10年度の結果に基づき、被験者の人数を30人(のべ54人)に増やし、実験を行った。得られた結果は以下のものである。

- 1) おしゃぶり(DINP58%含有)または歯がため(DINP36%含有)試験片を同一被験者が同種試験片を2回chewing実験し、その溶出-移行量は95.8 μg/hr ± 29.8と101 μg/hr ± 40.2 または53.2 μg/hr ± 25.6と52.1 μg/hr ± 20.7であった。また、ガラガラ(DINP32%含有)試験片からは64.3 μg/hr ± 37.5溶出-移行した。
- 2) おしゃぶり、歯がため、ガラガラからのDINP溶出-移行量は平成10年度の結果と比較すると3試験片ともに大幅に減少してい

たが、これは口腔内での試験片の転がし方に前回と差が生じたためと考えられる。

- 3) ソフト人形 A(DEHP31%含有)試験片からは $32.6 \mu\text{g/hr} \pm 11.5$, ソフト人形 B(DHP25%含有)試験片からは $6.95 \mu\text{g} \pm 2.6$ それぞれ溶出-移行した。
- 4) DINP を含有する 3 試験片は 15 分間の区分間での溶出量が第 1 区分で多く以降第 2, 3, 4 区分と減少する傾向が得られた。一方, DEHP または DHP 含有試験片では第 1~4 区分で溶出量にあまり差が見られなかった。
- 5) ポール (DBP10%および DEHP18%含有) 試験片を chewing し, 得られた唾液中に DBP および DEHP の脱エステル体である MBP および MEHP の存在を確認した。

5. 結論

平成 11 年度における玩具からのフタル酸エステルの溶出に関する調査研究は, 平成 10 年度の厚生科学研究での結果に基づいて, とくにフタル酸エステルの分析法においては, フタル酸ジエステルの脱エステル化物質, フタル酸モノエステルの HPLC 分析法とその GC-MS による確認法を主な検討事項とした。

また, 玩具からのフタル酸エステルの溶出に関する調査研究に関して, 人工唾液による溶出試験では, 振とう方式を平成 10 年度の上下振とう方式から回転振とう方式に代え, さらに, 本年度は新たに溶出液温度を制御した溶出条件の検討を行った。

成人の chewing による唾液への溶出-移行試験では, 平成 10 年度の被験者(本実験従事者)3 人における予備実験の結果に基づき, 本年度は被験者(学生)数を 30 人, のべ 54 人と大幅に増やし, chewing 実験を実施した。以下, ここに平成 10 年度と 11 年度の試験研究を比較し, 総括する。

I. HPLC 分析

フタル酸ジエステルとモノエステルの HPLC 分析は逆相系カラムで同一条件での一斉分析は困難である。ジエステル体は移動相をアセトニトリル・水をリニアグラジエント法にてアセトニトリル 100%とすることで, 一斉分析が可能であった。

また, モノエステル体は分子中に遊離のカルボキシル基を持っているため, 移動相を酸性にする必要がある。種々検討した結果, アセトニトリル・2%酢酸水溶液(8:2)で, モノエステルのうち MBP および MEHP を分析し, 分離良好なクロマトグラムを得ることができた。また, 確認にはカルボキシル基をメチルエステル化し, GC-MS にて行う方法が可能であった。

II. 回転振とうによる人工唾液への溶出試験

振とう方式を回転式に代え, “おしゃぶり”, “歯がため” および “ガラガラ” に含有する DINP, さらに “ソフト人形” に含有する DEHP あるいは DHP それぞれについて人工唾液への溶出試験を行い, 溶出条件を設定した。その条件は, 溶出液量はバラツキが小さい 30mL とした。これは食品衛生法で定められている容器包装の溶出試験での条件 1cm^2 あたり 2mL と同様である。また振とう数は 300rpm/分, 溶出温度は $35 \pm 5^\circ\text{C}$ とし, 60 分内の溶出時間でバラツキの小さい良好な条件が得られた。平成 10 年度の結果と直接比較はできないが, 回転式がバラツキなどの点で優れていると考えられる。

また, 溶出時間 60 分間を 15 分ずつ区分し, その区分間での DINP, DEHP および DHP の溶出量をみると, 第 1 区分が多く, 以降第 2, 3, 4 区分と徐々に減少する傾向が見られた。これは平成 10 年度の試験結果と同じであり, 玩具の人工唾液による溶出法における溶出時間は, 最初の 10 分あるいは 15 分の溶出で十分準備できるものと考えられる。

III. 成人の chewing による溶出-以降試験

試験片は人工唾液への溶出試験に用いた

ものと同様のものを用いた。

今年度の実験結果は、60 分間の chewing 時間で、DINP 含有の“おしゃぶり”が 9 人平均で 1 回目 95.3 μg 、2 回目 101 μg 、“歯がため”では 1 回目 53.2 μg 、2 回目 52.1 μg であり、2 試験片ともに 1 回目、2 回目ともほぼ同じ溶出-移行量であった。“ガラガラでは”9 人の平均で 64.3 μg であった。

同様の試験片について、平成 10 年度でも同様の試験を行っているが、そのときの 60 分間の溶出-移行量は“おしゃぶり”で 3 人の平均 300 μg 、“歯がため”で 188 μg および“ガラガラ”で 328 μg であり、今年度のそれと比べると、それぞれ約 3 倍、3.5 倍および 5 倍大きいことがわかった。これは、平成 10 年度の chewing 試験は被験者が本研究に携わっており、すなわち、注意深く chewing し、DINP が唾液へ良好に溶出-移行するように行ったため、結果として本年度の結果との間に差が開いたものと考えられる。さらに前報 II における回転式振とうによる人工唾液への溶出試験の検討において DINP 溶出量が振とう数に依存する結果がえられている。このことからもより注意深く chewing を行ない、口腔内で試験片をよく転がしたことが、溶出-移行量が多くなった原因であると推察される。

また、60 分間の溶出-移行量の傾向は、1 区分 15 分×4 区分の chewing から、第 1 区分の溶出-移行量は第 2, 3, 4 区分に比べ、多く、以降、徐々に減少する傾向が得られた。この傾向は、人工唾液のそれに同様なものであった。

他のフタル酸エステル DEHP と DhP では、DINP の溶出-移行と異なる結果であった。60 分間の溶出-移行量は“ソフト人形 A”の DEHP 32.6 μg 、“ソフト人形 B”の DhP 6.95 μg であった。また、溶出-移行区分では、第 1 区分、第 2, 3, 4 区分間の溶出量にそれぞれ、あまり差がなく、ほぼ一定の溶出量であった。

この現象はフタル酸ジエステルが唾液中

で脱エステルされ、フタル酸モノエステルに変化したものと考え、予備の実験として、DBP および DEHP を含有する“ボール”を 1 時間 chewing した結果、MBP および MEHP の存在を確認した。

今後の研究として、このフタル酸ジエステルからモノエステルの生成機構について検討を行う予定である。

6. 参考文献

- 1) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7, 17-34. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France (1987)
- 2) 中村好志他, 衛生化学, 33, 71 (1987)
- 3) EPA, Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis, *ibid.*, 106, 11 (1998)
- 4) Chris F.W., James C.L. IV, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 30, 140-155 (1999)
- 5) M. Sharman *et al.*, *ibid.*, 113, 375 (1994)
- 6) 食衛誌, Vol. 37, No. 2 85- (1997)

7. 研究発表

学会発表

- 1) 第 78 回日本食品衛生学会学術講演会(長野)
- 2) 日本薬学会第 120 年会(岐阜)