

平成12年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
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研究

歯科・医用高分子素材由来の内分泌かく乱化学物質 - ポリカーボネート製矯正用ブラケット中のビスフェノールAとp-t-ブチルフェノールの分析 -

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

歯科用材料ではポリカーボネート（PC）は、テンポラリークラウン、レジン歯矯正用ブラケットなどに用いられ、人工唾液にこれら材料を浸漬するとビスフェノール A（BPA）などが溶出され、特に矯正用ブラケットからの BPA 溶出量が多かったため、模擬口腔内環境を想定して 12 週間唾液に浸漬した矯正用ブラケットからの BPA 溶出量などについて検討したところ、人工唾液浸漬に比べて唾液浸漬では BPA 溶出量が高く、また、微量ではあるが p-t-ブチルフェノール（t-BuP）が溶出していることも明らかとなった。また、残留 BPA 及び残留 t-BuP も唾液に浸漬するとそれらの残留量が増加していたことから、口腔内環境下では PC 製矯正用ブラケットは加水分解されていることが推測された。

A. 研究目的

ポリカーボネート(PC)は耐衝撃性に優れており、ガラスフィラーなどを添加することによりその機械的性質が更に向上することから歯科用材料として矯正用ブラケット、テンポラリークラウン（暫間被覆冠）、レジン歯、義歯床などに用いられている。特に矯正用ブラケットに添加されているフィラーは材料により異なるが約 10 ~ 20 %程度も添加されている。

PC は合成前駆体である BPA や重合調節材である p-t-ブチルフェノール（t-BuP）、紫外線安定剤などが添加されている。従って、口腔内環境下では PC からこれらの物質が溶出される可能性が推測される。模擬口腔内環境として人工唾液

にこれら PC 製歯科材料を浸漬したところ、微量ではあるが検討した全ての PC 製歯科材料から BPA が溶出していることを明らかにした。それら材料で特に矯正用ブラケットは長期にわたり口腔内に存在していること並びに矯正用ブラケットを咬合調整のために子供にもその使用が汎用されているので、PC 製矯正用ブラケットからの BPA などの溶出量の実態把握が急務の問題である。

PC の重合調節剤として、汎用されている t-BuP にもエストロゲン様作用が弱いながらあることが指摘されている¹⁾ので、t-BuP の溶出量の実態把握も必要である。また、模擬口腔内環境として、人工唾液を浸漬溶媒として用いることより

も、浸漬溶媒として唾液を使用した場合での BPA 溶出量が多いことが推測されるので、本研究はヒト唾液に浸漬した矯正用ブラケットからの BPA、t-BuP 溶出量並びに唾液に浸漬した矯正用ブラケットに残留しているそれら物質の量を蛍光検出器を具備した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で検討した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

PC 製矯正用ブラケットとして、クリアーブラケット（三金工業）、プラスチックブラケット（トミーインターナショナル）の上顎 1 若しくは 2 のものを材料として用いた。用いた試薬は全て残留農薬試験用若しくは HPLC グレードのものを使用した。

採取したヒト唾液は唾液中に含まれている細胞や食物残渣などを除去するために 4 で 3000rpm、15 分間の遠心した。遠心後、無菌的にするためにボトルトップフィルター（0.22 μ m、旭テクノグラス）で濾過滅菌し、得られた溶液を滅菌した容器に保存し、その後の操作は極力無菌的に実施した。唾液採取に関して、唾液提供者に対して口頭でこの研究の趣旨を説明し、プライバシーに関してはそれを守秘し、提供された唾液を本研究以外の目的に使用しないことを説明した。

B-2. HPLC 分析条件

HPLC の分析条件はガードカラムとして CAPCELL C₁₈ UG120 (2.0x10mm、資生堂製)、分離カラムとして CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (2.0x250mm、5 μ m、資生堂製)を用い、移動相は蒸留水 / アセトニトリル混合液（混合比は 58:42）、カラム温度は 40、流量

は 0.2mL/min とし、検出波長は 217nm で定量した。用いた HPLC システムは HP1100 シリーズ（Hewlett Packard 製）を用い、同時に同定には HP1100 シリーズ・ダイオードアレイ検出器（Hewlett Packard 製）を用い、検出波長を 190nm から 400nm として測定し、HP ケミステーション LC 3D システム（Hewlett Packard 製）にて解析した。この検出法と同時に励起波長 273nm、蛍光波長 313nm として BPA 量を定量し、蛍光波長解析には蛍光波長を 300 ~ 500nm とした。溶出物の定量には絶対検量線法を用い、その検量線の相関係数は 0.999 以上の場合のみを用いた。

B-3. 材質試験

材質試験は食品衛生試験法²⁾に準じたが、矯正用ブラケットは小さいためブラケット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 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、分析試料とした。

B-4. 溶出試験および添加回収

矯正用ブラケットを無菌的に唾液中に浸漬させ、37 の恒温槽で遮光下静置した。唾液中に溶出された BPA を抽出するために、有機溶媒による抽出操作を実施した。唾液中に存在する蛋白質を除去するために、0.5mL 唾液に 1mL メタノールを添加し、十分攪拌後、3000rpm で 10 分間の遠心し、上清を採取した。沈渣に 0.5mL 67 %メタノール

を添加し、十分攪拌後、3000rpm で 10 分間の遠心した上清を上記の上清に加えた。この上清に適量の 1N HCl を添加・攪拌後、6mL のジクロロメタンを添加して十分攪拌した。得られたジクロロメタン分画を濃縮乾固し、0.5mL の蒸留水 / アセトニトリル混合液（混合比 50:50）を添加し、濃縮乾固物を溶解させ、HPLC の試料とした。この抽出による回収率を求めるために、唾液に 10ng/mL BPA と t-BuP の混合液を添加し、前述と同様にして添加回収実験を実施した。得られた値はレジンのグラムあたりの BPA 溶出量として表した。使用したガラス器具類はすべてアセトンで 3 回洗浄後、実験に使用した。

C . 研究結果

C-1 . HPLC 分析条件

HPLC 分析条件で、使用する移動相の成分は BPA と t-BuP 分析で重要なファクターとなるので移動相成分比を 50、52、53、54、56、58、60 % 蒸留水と変化させて、BPA の検出限界を検討したところ 56%、58% 蒸留水で BPA と t-BuP の検出限界として 0.5 ~ 1ng/mL を確保できた。更に矯正用ブラケットを浸漬した唾液を用いて、移動相の成分比を変化させて成分分離状態を確認したところ、58 % では BPA ピークと唾液由来の他の成分のピークとの分離状態が良かったので、移動相の成分比を 58 % 蒸留水 - 42 % アセトニトリルとした。この条件で蛍光による BPA の定量再現性を確認するために 5ng/mL BPA を用いて、HPLC 装置の再現性を確認したところ、10 回注入した平均値は 4.9 ± 0.1 ng/mL BPA、 4.9 ± 0.1 ng/mL t-BuP で

あった。これから、検出下限値は計算上、0.4ng/mL BPA、0.3ng/mL t-BuP（絶対量としてそれぞれ 8pg、6pg）であり、定量下限値は 1.4ng/mL BPA、1.1ng/mL t-BuP（絶対量としてそれぞれ 28pg、22pg）となったが、実測値から検出下限値をそれぞれ 0.5ng/mL とした。また、BPA と t-BuP の混合標準液を用いた検量線はその相関係数は何れも 0.999 以上であった（図 1）。

唾液に 10ng/mL BPA と t-BuP の混合液を添加して、液 - 液抽出による添加回収の結果は BPA では 103.1 ± 3.7 %（CV は 3.6 %）、t-BuP では 99.3 ± 1.9 %（CV は 1.9 %）と非常に回収率が良好なので、唾液浸漬液中の BPA と t-BuP 量は特に回収率を換算せずに実測値とした。

C-2 . 唾液への BPA、t-BuP 溶出

人工唾液に矯正用ブラケットを浸漬すると微量の BPA が溶出されたが、唾液浸漬ではその溶出量が増加していた。唾液に浸漬した矯正用ブラケットの典型的な HPLC クロマトグラフィーパターンが図 2 と図 3 に示してある。唾液浸漬 1 ~ 3 週では BPA 溶出量は何れの矯正用ブラケットでもあまり大きな変化は認められず、ほぼ一定の溶出量であったが、浸漬 12 週では見かけ上、顕著に BPA 溶出量が増加していたが、この値を 12 週で割った値は 1 ~ 3 週の値と大きな変化は認められなかったことから、少なくともこの 12 週間では一定量が溶出していた。図 4 と 5 に示すように矯正用ブラケットの種類により、BPA 溶出量は変化し、矯正用ブラケット B は矯正用ブラケット A に比べて何れの浸漬期間でも約 6 ~ 8 倍高かった。12 週間の総溶出量では

矯正用ブラケット B の BPA 溶出量は矯正用ブラケット A の約 8 倍であった。

一方、t-BuP は微量ではあるが、いずれの矯正用ブラケットから唾液中に溶出していた。その溶出パターンは BPA とは異なり、唾液浸漬 12 週では特に矯正用ブラケット A ではその溶出量は殆ど認められなかった (図 2 ~ 5)。t-BuP 溶出量は何れの浸漬期間でも矯正用ブラケット B は矯正用ブラケット A よりも 2 ~ 3 倍ほど、多かった。

C-3. 矯正用ブラケット中の残留 BPA、t-BuP 量

唾液中に浸漬した矯正用ブラケットから BPA と t-BuP などが溶出され、特に BPA では 12 週浸漬では多量に溶出されていることから、PC が水性環境下で加水分解されている可能性が考えられるので、その材質試験を検討し、残留 BPA と t-BuP 量について検討を加えた。

矯正用ブラケットを溶解した試料の典型的な HPLC クロマトグラフィーのパターンを図 6 に示してあるが、矯正用ブラケットの保存条件により、BPA 量は大きく変化していた。残留物の多くはフェノール (図中 PH)、BPA と t-BuP であったが、分離状態から PH の定量は不可能であった。図 7 と 8 に示すように残留 BPA と t-BuP 量は矯正用ブラケット A より、矯正用ブラケット B で顕著に高かった。また、保存条件では残留 BPA と t-BuP に関しては室温で 12 週間保存と 37 °C で 12 週間保存で、顕著な差は認められなかった。しかし、12 週間唾液中に浸漬した試料は何れのブラケットでも残留 BPA 量が顕著に増加し、残留 t-BuP 量も若干増加していた。唾液浸漬矯正用ブラケット A と B では室温保存と比較すると残

留 BPA 量はそれぞれ 3.5 倍と 2.3 倍増加していた。

D. 考察

人工唾液浸漬した矯正用ブラケットよりも唾液浸漬した場合での BPA 溶出量が増加していたが、残留 BPA 量に関しては、人工唾液並びに唾液浸漬した矯正用ブラケットでは殆ど差が認められなかった。

更に、製品により残留 BPA 量並びに溶出 BPA 量が異なっていたことは下記のようなことによるものと考えられる。PC 製矯正用ブラケットは PC ペレットを 310 °C で溶解し、射出成型法により作製されているので、製品によりその溶解温度並びに原材料が異なっている。また、PC 製矯正用ブラケットにはその機械的性質を向上させるためにフィラーを 10 ~ 20 % 程度、添加している。従って、製品により残留 BPA や t-BuP 量が異なっていることが推測される。残留量が多ければ、その材料からの溶出量も多いと推測できるが、残留 t-BuP 量は少なくとも BPA よりも多いのに比べ、その溶出量は BPA よりも少なかった。また、PC を溶解する温度により、PC の熱分解が生じ、PC の低分子化が起き、PC の加水分解反応が起きやすくなっていることも推測される。これらのことから、残留 BPA が多い場合には溶出 BPA 量も多くなるが、t-BuP に関してはその化学的性質から水性環境下では PC 中からは溶出されにくいものと考えられる。

特に人工唾液浸漬した矯正用ブラケットに残留する BPA 量と唾液中に浸漬した矯正用ブラケットに残留する BPA 量にあまり

差がなかったことは、この水性環境下での PC の加水分解は水との接触による単純な加水分解反応であり（図 9）、唾液中に含有されている酵素であるリパ - ゼ、エステラーゼなどの関与は少ないと考えられる。しかしながら、溶出 BPA 量は人工唾液浸漬に比べて唾液浸漬で顕著に増加していたことは、唾液中の脂肪などの影響により、唾液中で、より溶出されやすい環境になっているためと考えられる。同様に残留 t-BuP が増加していることは残留 BPA 量の増加と同じようにポリマー末端に重合している t-BuP が単純な加水分解反応を受けるためであると考えられる。しかしながら、t-BuP は BPA よりも溶出されにくいため矯正用ブラケット中に残留しているものと考えられる。

従って、このような材料の溶出試験法としては単純な水性系では、その溶出傾向は判断できるが、その正確な溶出量を求めることはできない。口腔内で使用される材料ならば、溶出試験法として採用すべき溶媒としてはヒト唾液そのものを使用すべきである。しかし、ヒト唾液もサーカディアンリズム並びに個体差があるので、唾液採取時間を常に一定にすることと採取した唾液をバルクの形で実験に使用すると再現性のあるデータが得られる。

溶出された BPA 量が実際にどの程度摂取されるかについては表 1 に示してある。PC 製矯正用ブラケットを人工唾液に浸漬すると 12 週間で約 13 μ g/g レジン溶出され、唾液浸漬では約 35 μ g/g レジン溶出される。ここで、仮定として咬合調整用に 20 歯に矯正用ブラケットを適用し、その患者の体重を 30kg とし、20 歯に適用すると 20

個の矯正用ブラケットが必要である。従って矯正用ブラケットの重量は約 350mg となる。溶出された BPA は人工唾液浸漬と唾液浸漬でそれぞれ 4.6 と 12 μ g となる。これは 12 週間で溶出された値なので、均等に溶出し、また溶出された全てが摂取されたと考えると、一日当たりの溶出量は人工唾液と唾液浸漬ではそれぞれ 55 と 143ng/day となる。体重が 30kg の子供なので、体重あたりに換算すると人工唾液と唾液浸漬では 1.8 と 4.8ng/kg/day となる。また、一日当たりの血中濃度は人工唾液と唾液では 0.02 と 0.06ng/mL となった。この唾液浸漬した場合の摂取量が 4.8ng/kg/day と推定されたが、この値は vom Saal らの報告³⁾で生殖異常をきたす濃度といわれている用量である 2 μ g/kg に比べて低値であり、この歯科用矯正用ブラケットからの摂取量は現時点では特に大きな問題ではないが、低値であるから問題がないとも断定できない。これらに関しては今後の BPA の毒性情報の結果を待つ必要がある。しかしながら、この矯正用ブラケットにはポーセレンや金属などの代替品があるので、子供や妊婦、授乳中の母親などには代替品の使用を考慮すべきである。しかし、金属材料にも各種毒性が報告されているので、それらのベネフィットとリスクを考慮して、使用すべきであると考えられる。

E. 結論

蛍光分析による HPLC の条件検討を行い、簡便で高感度な分析法を構築し、本法を用いて唾液浸漬した PC 製矯正用ブラケット中に残留している BPA と t-BuP 量、並びに唾液中に溶出した

BPA と t-BuP 量を測定した。唾液に浸漬した矯正用ブラケットの溶出 BPA 量は人工唾液浸漬した場合に比べて増加していたが、残留 BPA 量は人工唾液浸漬した場合に比べて殆ど差は認められなかった。また、残留 BPA 量と t-BuP 量は唾液に浸漬した矯正用ブラケットで増加していた。以上のことから、唾液浸漬などの水性環境下では PC 製矯正用ブラケットは加水分解され、BPA が溶出される可能性が考えられ、口腔内でも同様に BPA の溶出並びに PC の加水分解が生じている可能性が考えられる。

F. 参考文献

- 1) Milligan SR, Khan O, Nash M.:Gen Comp Endocrinol 112, 89-95(1998)LinkOut
- 2) 食品衛生試験法 1009-1010 (1998)
- 3) 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

- 1) 矢島 功、中澤裕之、大槻昌幸、田上順次、西村文夫、本郷敏雄、一條秀憲：歯科材料・器械：19 (SI35) 36(2000)
- 2) 矢島 功、中澤裕之、日景 盛、大槻昌幸、田上順次、西村文夫、本郷敏雄：歯科材料・器械：19 (SI36) 38(2000)