

ポリ塩化ビニル製玩具からのフタル酸エステルの溶出に関する研究

—フタル酸ジエステル類の唾液中での化学変化—

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学

分担研究者 石綿 肇 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究者 石橋 亨, 新野竜大 東京顕微鏡院

研究要旨

本研究は平成 11 年度の厚生科学研究でのポリ塩化ビニル(PVC)製玩具のヒト chewing 実験により得られた結果に基づき, 唾液中のフタル酸モノエステルの分析法, およびヒト唾液中でのフタル酸モノエステルの生成についてそれぞれ試験研究を行った。

・唾液中のフタル酸モノエステルの UV 検出器付 HPLC 分析および GC/MS-SIM 分析

唾液中のフタル酸ジエステルおよびそのモノエステル体の抽出は, 唾液量と等量のアセトニトリルを加え良く混和した後, 遠心分離し, 沈殿物を取り除き, アセトニトリルが 10%(v/v)になるように 0.1% 酢酸水溶液を加え, 良く混和した。次に, OasisHLB(Waters 社製)カートリッジに負荷し, 10%メタノール水溶液で洗浄後, 10%メタノール・酢酸エチルで溶出した。溶出液を濃縮後, UV 検出器付 HPLC にてフタル酸モノエステルの分析を行った。移動相はアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(60:40)とし, 良好な分離能が得られた。

また, フタル酸モノエステルの GC/MS 分析は, カルボキシル基を TMSD にてメチルエステル化し, asymmetric なフタル酸ジエステルとした後, GC/MS-SIM にて行った。測定用フラグメントイオンは m/z163, 149 および 91 とした。

・ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルの化学変化によるモノエステル体の生成

5 種類のフタル酸ジエステルを, ヒト唾液にそれぞれ 100nmol 加え, 37℃, 30 分間 Incubate し, それぞれのフタル酸ジエステルに相当するモノエステル体を HPLC 分析および GC/MS-SIM 分析した。その結果, フタル酸ジエチル(DEP), フタル酸ジブチル(DBP), フタル酸ブチルベンジル(BBP), フタル酸ジ-n-ヘキシル(DHXP), およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)5 種類それぞれのフタル酸ジエステルの唾液中での化学変化により, ジエステル体に相当するモノエステル体がそれぞれフタル酸モノエチル(MEP)21.2%, フタル酸モノブチル(MBP)81.6%, フタル酸モノベンジル(MBenzP)24.6%, フタル酸モノ-n-ヘキシル(MHXP)18.8%, およびフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)1.8%生成された。

はじめに

乳幼児用ポリ塩化ビニル(PVC)製玩具に含まれる可塑剤のフタル酸ジエステルは, 弱いながらもエストロゲン作用を示し, 外因性内分泌攪乱化学物質, 「いわゆる環境ホルモン」の一つとして疑

われている。また, フタル酸ジエステルのうちフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)およびフタル酸ジイソノニル(DINP)は高濃度で非変異・ガン原性物質であり, 動物実験において発ガンプロモーター作用が認められている^{1),2),3)}。

最近この発ガンプロモーターのオカダ酸や TPA が細胞生存数の影響のない低濃度でテストステロン産生を強く抑制することが見出され、発ガンプロモーターと内分泌攪乱作用の関連性が疑われている⁴⁾。このような背景から、フタル酸ジエステルの乳幼児用玩具への可塑剤としての使用を制限する対策が世界各国で講じられている。しかし、合成樹脂製品の可塑剤としてフタル酸ジエステルの使用は広範囲にわたり⁵⁾、現在でも多量に使用されている。

平成 11 年度の本研究では、ヒトの chewing による乳幼児用玩具からのフタル酸ジエステルの口腔内への溶出実験を行った。その結果、一部の玩具からの溶出量が他の玩具からの溶出量と比較し、著しく低いことが分かった。その理由を検討したところ、フタル酸ジエステルが唾液中で化学変化していることが判明した。

そこで本年度における研究は、唾液中のフタル酸モノエステルの分析法、およびフタル酸ジエステルの唾液中での化学変化によるフタル酸モノエステルの生成について検討を行ったので、以下のように報告する。

・唾液中のフタル酸モノエステルの UV 検出器付 HPLC 分析と GC/MS-SIM 分析

・ヒト唾液中での PAEs の化学変化によるモノエステル体の生成

・唾液中のフタル酸モノエステルの UV 検出器付 HPLC 分析および GC/MS-SIM 分析

1. はじめに

唾液中のフタル酸モノエステル 5 種類の UV 検出器付 HPLC 分析と GC/MS-SIM 分析それぞれについて検討した。

2. 実験方法

試薬および器具

標準フタル酸ジエステルおよびモノエステル

- 1) フタル酸ジエチル(DEP)
- 2) フタル酸ジブチル(DBP)
- 3) フタル酸ブチルベンジル(BBP)
- 4) フタル酸ジ-n-ヘキシル(DHXP)
- 5) フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)
- 6) フタル酸モノエチル(MEP)
- 7) フタル酸モノブチル(MBP)
- 8) フタル酸モノベンジル(MBenzP)
- 9) フタル酸モノ-n-ヘキシル(MHXP)
- 10) フタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)

上記 10 種類の標準試薬のうち、DEP、DBP および DEHP は和光純薬社製でそれぞれの純度が 99.5% 以上のものを、MEP は和光純薬社製で純度が 90% 以上のものを、BBP は関東化学社製で純度が 98% 以上のものを、DHXP および MBenzP は東京化成社製でそれぞれの純度が 98% 以上のものを、MHXP、MBP および MEHP は東京化成社製でそれぞれの純度が 90% 以上のものをそれぞれ使用した。

上記した標準試薬のうちフタル酸モノエステルそれぞれについて、ジエステル体以外の不純物がないことを薄層クロマトグラフにより確認した。また HPLC および GC/MS それぞれにより、本分析に影響する妨害物質は認められなかった。

アセトニトリル(HPLC 用)、n-ヘキサン(フタル酸エステル・PCB 測定用)、酢酸エチル(残留農薬・PCB 測定用)、メタノール(残留農薬・PCB 測定用)それぞれは関東化学社製を、ジメチルスルホキシド(DMSO: 生化学用)は和光純薬社製を、トリメチルシリルジアゾメタン(TMSD)は Aldrich 社製をそれぞれ使用した。

フタル酸モノエステル標準溶液：MEP、MBP、MBenzP、MHXP および MEHP の標準品をそれぞれ 100mg 正確に量り、アセトニトリル 100mL で定容したものをそれぞれのフタル酸モノエステル標準原液(1mg/mL)とした。これをアセトニトリルで希釈し、各種濃度標準溶液を調製した。

フタル酸ジエステル標準溶液：DEP, DBP, BBP, DHXP および DEHP の標準品をそれぞれ 500 μmol 正確に量り、DMSO に溶かし 10mL にそれぞれ定容した。これをフタル酸ジエステル標準原液(50 $\mu\text{mol/mL}$)とした。さらにこの標準原液を DMSO で希釈し、各濃度標準溶液を調製した。

人工唾液：塩化ナトリウム 4.5g, 塩化カリウム 3.0g, 無水硫酸ナトリウム 0.3g, 塩化アンモニウム 0.4g, 乳酸 0.3g, および尿素 0.2g をそれぞれ蒸留水に溶かし、0.1N 水酸化ナトリウムで pH7.0 に調整し、全量を 1000mL とした。

ミニカラム OASIS HLB(3cc)：Waters 社製、使用前に酢酸エチル 5mL, メタノール 5mL および 0.5%酢酸水溶液 10mL で洗浄した。

本実験に使用した試薬はすべてフタル酸ジエステルが含まれていないことを確認した。また、実験に使用したガラス器具は使用前に 230 で 5 時間加熱処理した。

装置

UV 検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC)：LC-10A, 島津製作所社製

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)：GCMS-QP5050, 島津製作所社製

HPLC 分析条件

カラム：Inertsil C8-3(4.6 \times 250mm), カラム温度：40, 移動相：アセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(6:2), 流速：1.0mL/分, 検出器：UV(検出波長 254nm), 注入量：10 μL

GC/MS 分析条件

GC 部

カラム：CBP5(30m \times 0.25mm i.d., 0.25 μm), カラム温度：初期温度 100 (1 分保持) 昇温 10 / 分 最終温度 270, 注入口温度：260, インターフェース温度：260

MS 部

イオン化法：EI 法, イオン化電圧：70eV, イオン源温度 290, 検出モード：SIM, フタル酸モノエステル測定用イオン⁸⁾：m/z163, m/z149 および m/z91, フタル酸ジエステル測定用イオン：m/z149,

確認用イオン：m/z177(DEP), m/z223(DBP), m/z206(BBP), m/z251(DHXP), m/z167(DEHP)

唾液中のフタル酸モノエステルの測定

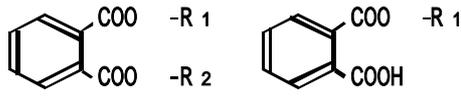
フタル酸ジエステルを含まないポリプロピレン製試験片を成人被験者の口腔内に入れ、chewing し、口腔内に溜まった唾液を採取した。採取は昼食前の空腹時に行った。採取した唾液 15mL に人工唾液(pH7.0)5mL を加え、混合し、本実験の唾液とした。その唾液 3mL を 50mL ネジ蓋付遠心分離管に入れ、0.1NHCl にて唾液を約 pH4 に調整し、アセトニトリルを 1mL 加え、振とう抽出した。つぎに、3000r.p.m., 5 分間遠心分離し、沈殿物を取り除き、アセトニトリル濃度が約 10% になるよう 0.5%酢酸水溶液を 16mL 加え、よく混和し、これを精製用試験液とした。これをミニカラムの OASIS HLB に負荷し、メタノール・水(1:9)5mL で洗浄後、メタノール・酢酸エチル(1:9)10mL でフタル酸モノエステルを溶出した。溶出液を窒素気流下濃縮・乾固し、アセトニトリルを 2mL 加えフタル酸モノエステル測定用試験液とした。

上記の試験液 1mL を 10mL 容試験管にとり、窒素ガスで溶媒を留去し、酢酸エチル、メタノールおよび TMSD をそれぞれ 500, 100 および 30 μL 加え、室温で 30 分間メチルエステル化した。反応後、窒素ガスを通気して溶媒を留去し、n-ヘキサンを加え、GC/MS 分析用試験液とした。これを GC/MS-SIM で、フタル酸ジエステルおよびメチルエステル化フタル酸モノエステルをそれぞれ測定した。

3. 研究結果および考察

HPLC の分析条件

フタル酸モノエステル(図 -1)は分子中に遊離のカルボキシル基を持つ酸性物質である。平成 11 年度における本研究で、フタル酸モノエステルとして、MBP と MEHP の 2 種類の HPLC 分析条件を設定した。本年度は上記 2 種に MEP, MBenzP, MHXP の 3 種を加えた計 5 種類のフタル酸モノエステルの HPLC による一斉分析条件について検討した。



フタル酸ジエステル フタル酸モノエステル

図 -1 フタル酸ジエステルおよび
フタル酸モノエステルの構造式

R₁とR₂: アルキル基
R₁=R₂は対象(symmetric)なフタル酸
ジエステル
R₁≠R₂は非対象(asymmetric)なフタル
酸ジエステル

HPLC の分析用カラムは平成 11 年度と同様, 逆相系の C8 カラムを使用した. また移動相はアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(8:2)を用いた. UV 検出器の検出波長は 254nm とした. その結果, ピーク形状の良好なクロマトグラムが得られたが, MEP, MBP および MBenzP の分離が悪く, 良好な分析条件ではなかった. そこで, 移動相のアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液の比率を 6:4 としたところ, 図 -2 に示すように分離能の良好な 5 本のピークが得られた. また, これら 5 種類のモノエステル体はそれぞれ 0.1 ~ 100 μg/mL で原点を通る直線性を示した.

そこで本実験での MEP, MBP, MHXP, MEHP および MBenzP の UV 検出器付 HPLC による一斉分析では, 移動相にアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液(6:4)を用いた.

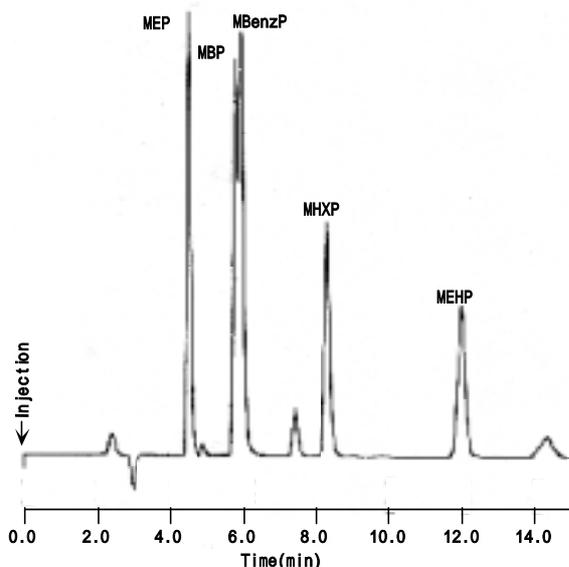


図 -2 フタル酸モノエステルのHPLCクロマトグラム

フタル酸モノエステル: 各々100ng
MEP: フタル酸モノエチル, MBenzP: フタル酸モノベンジル
MBP: フタル酸モノブチル, MHXP: フタル酸モノ-n-ヘキシル
MEHP: フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

GC/MS によるモノエステル体の分析

フタル酸モノエステルは分子中に遊離のカルボキシル基を有し, GC 分析ではこの基を誘導体化しなければ分析が困難である. そこで, 本研究では平成 11 年度の研究結果と同様, 5 種類のフタル酸モノエステルそれぞれのカルボキシル基をメチルエステル化し, 微極性カラム CBP5 での昇温分析による GC /MS 分析を行った. メチルエステル化剤は, ジアゾメタンの毒性や爆発性を少なくした取り扱いの容易なメチル化剤である TMSD を用いた. TMSD によるメチルエステル化は Hashimoto⁶⁾らの方法を応用した.

それぞれのメチルエステル化されたフタル酸モノエステルを EI 法により GC/MS 分析した. 得られた総イオンクロマトグラム(TIC)を図 -3 に, そのマススペクトログラムを図 -4, 5 および 6 に, またメチルエステル化されたフタル酸モノエステルそれぞれの保持時間と特徴的なフラグメントイオンを表 -1 にそれぞれ示した.

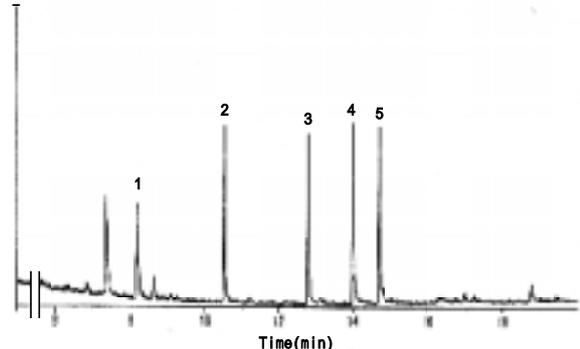


図 -3 メチルエステル化フタル酸モノエステルの総イオンクロマトグラム

メチルエステル化フタル酸モノエステル: 各々1ng
1:メチルエステル化フタル酸モノエチル(Methyl-MEP)
2:メチルエステル化フタル酸モノブチル(Methyl-MBP)
3:メチルエステル化フタル酸-n-ヘキシル(Methyl-MHXP)
4:メチルエステル化フタル酸-2-エチルヘキシル(Methyl-MEHP)
5:メチルエステル化フタル酸モノベンジル(Methyl-MBenzP)

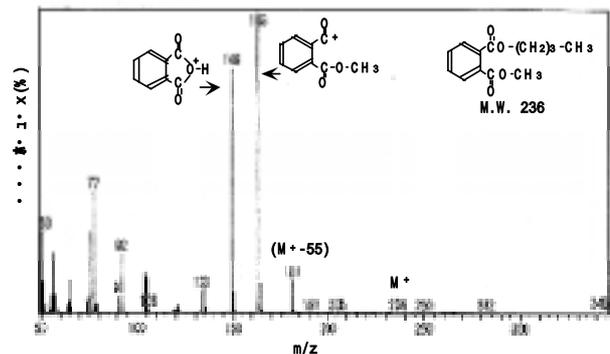


図 -4 メチルエステル化フタル酸モノブチルのマススペクトログラム

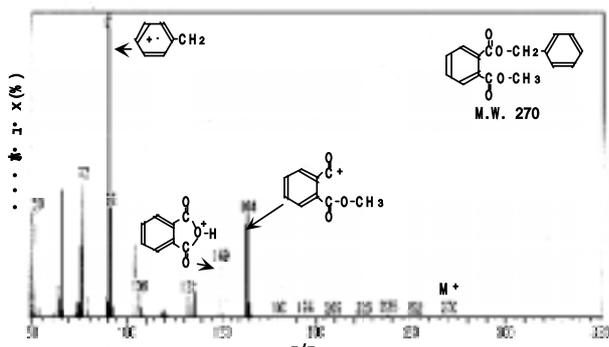


図 -5 メチルエステル化フタル酸モノベンジルのマススペクトログラム

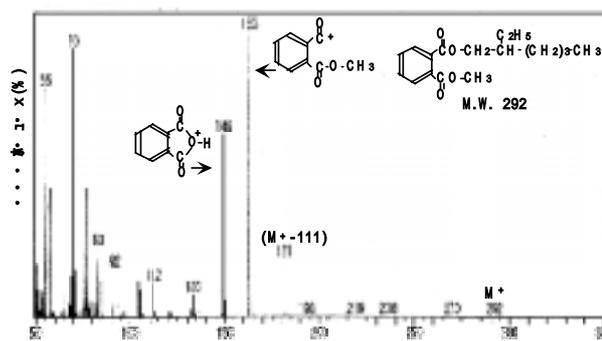


図 -6 メチルエステル化フタル酸モノ-2-エチルヘキシルのマススペクトログラム

表 -1 GC/MSによるメチルエステル化フタル酸モノエステルの保持時間と特徴的なフラグメントイオン

	M.W.	R.T. (min)	Fragment ions (m/z) (relative intensity, %)	M ⁺
Methyl-MEP	208	8.2	149(59) ^{a)} 163(100) ^{a)} 176(16)	208(2.3)
Methyl-MBP	236	10.6	149(80) ^{a)} 163(100) ^{a)} 181(17)	236(0.7)
Methyl-MHXP	264	12.8	149(89) ^{a)} 163(100) ^{a)} 181(27)	264(0.8)
Methyl-MEHP	292	14.1	149(63) ^{a)} 163(100) ^{a)} 181(31)	292(0.5)
Methyl-MBenzP	270	14.7	91(100) ^{a)} 163(31) ^{a)} 149(17)	270(1.4)

a): 測定用イオン

Methyl-MEP: メチルエステル化フタル酸モノエチル

Methyl-MBP: メチルエステル化フタル酸モノブチル

Methyl-MHXP: メチルエステル化フタル酸モノヘキシル

Methyl-MEHP: メチルエステル化フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

Methyl-MBenzP: メチルエステル化フタル酸モノベンジル

5種類 of 脂肪酸モノエステルは微極性キャピラリーカラムでのGC分析においてそれぞれ分離良好な5本のピークが得られ、それぞれのカルボキシル基がTMSDによりメチルエステル化され、asymmetricな脂肪酸ジエステルが生成された。また生成されたメチルエステル化MEP, MBP, MHXPおよびMEHPは、EI法によるGC/MS分析でm/z163 ($[\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOCH}_3)\text{CO}]^+$)とm/z149 ($[\text{C}_6\text{H}_4(\text{CO})_2\text{OH}]^+$)にそれぞれ選択性の高いフラグメントイオンが認められた。その相対強度はm/z163を100%としたときm/z149のそれはメチルエステル化MEP, MBP, MHXPおよびMEHPがそれぞれ59%, 80%, 89%および63%であった。また、メチルエステル化MBenzP

はm/z163とm/z149のフラグメントイオンが認められ、さらにm/z91 ($[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2]^+$)の特徴的なフラグメントイオンが認められた(図-5)。一般に、フラグメントイオンm/z149とm/z163はEI法によるGC/MS分析でのsymmetricな脂肪酸ジエステルの特徴的なフラグメントイオンである⁷⁾。また、それぞれの親イオン(M⁺)の相対強度はメチルエステル化MEP, MBP, MHXP, MEHPおよびMBenzPが2.3%, 0.7%, 0.8%, 0.5%および1.4%と非常に小さく、これらのイオンを確認することが困難であった。

そこで、本実験でのMEP, MBP, MHXP, MEHPおよびMBenzPのGC/MS分析では、それぞれのカル

ボキシル基を TMSD にてメチルエステル化し、それぞれから得られた m/z163 ,m/z149 および m/z91 のフラグメントイオンを SIM モードにて測定することにより、5 種類それぞれのフタル酸モノエステルを分別・定量することが可能となった。その SIM クロマトグラムを図 -7 に示した。

また、本法による GC/MS 分析において、symmetric なフタル酸ジエステルである DMP、DEP、DBP、DHP、DEHP および BBP は、今回測定対象とした 5 種類の asymmetric なメチルエステル化フタル酸モノエステルとそれぞれ異なる保持時間を示した。そこで symmetric なフタル酸ジエステルに特徴的なフラグメントイオンである m/z149⁸⁾ を SIM することで、メチルエステル化フタル酸モノエステルと同時に symmetric なフタル酸ジエステルを分別・定量することが可能となった。

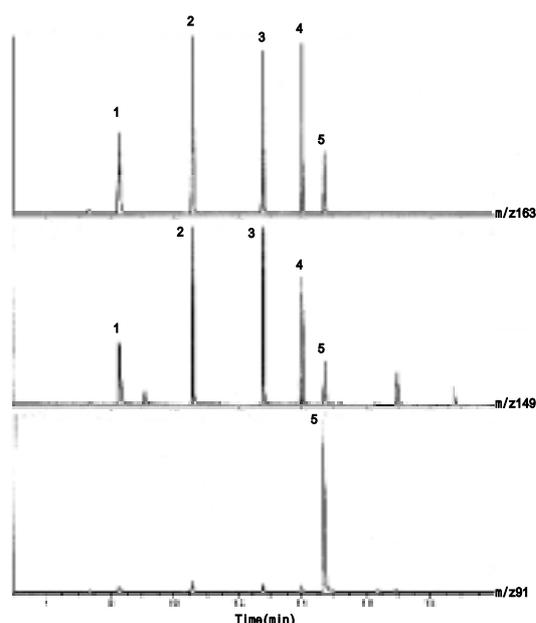


図 -7 メチルエステル化フタル酸モノエステルのGC/MS-SIMクロマトグラム

メチルエステル化フタル酸モノエステル：各々10ng
 モニターイオン：m/z163, 149, 91
 1:メチルエステル化フタル酸モノエチル(Methyl-MEP)
 2:メチルエステル化フタル酸モノブチル(Methyl-MBP)
 3:メチルエステル化フタル酸-n-ヘキシル(Methyl-MHXP)
 4:メチルエステル化フタル酸-2-エチルヘキシル(Methyl-MEHP)
 5:メチルエステル化フタル酸モノベンジル(Methyl-MBenzP)

唾液中のフタル酸モノエステルの分析法

唾液中のフタル酸モノエステルはフタル酸ジエステルの抽出法に準じ、アセトニトリル抽出を行った。唾液中に5種類のフタル酸モノエステルを50ng 加え、等量のアセトニトリルで抽出し直接

HPLC分析した。そのHPLCクロマトグラムを図 -8 に示した。それぞれのフタル酸モノエステルの回収率は91%以上であった。しかし、唾液由来のピークが数多く出現したため、ミニカラムによる精製・濃縮法について検討した。

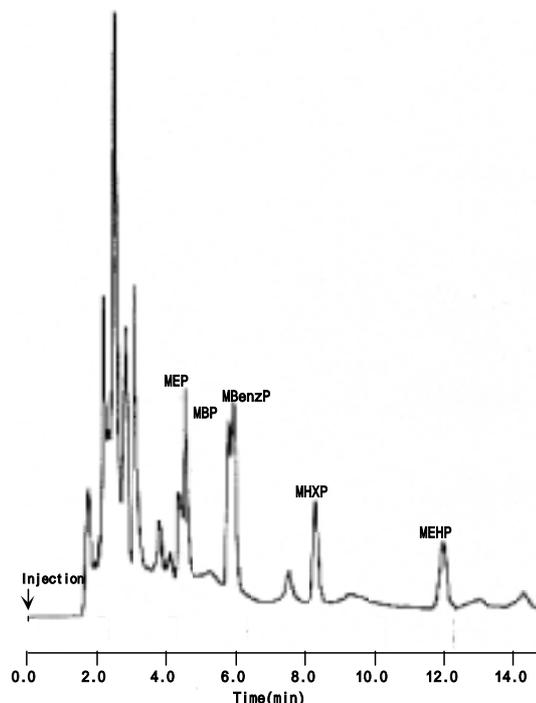


図 -8 唾液中に添加したフタル酸モノエステルのHPLCクロマトグラム

フタル酸モノエステル：各々50ng添加
 MEP:フタル酸モノエチル, MBenzP:フタル酸モノベンジル
 MBP:フタル酸モノブチル, MHXP:フタル酸モノ-n-ヘキシル
 MEHP:フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

モノエステル体は酸性物質であるため、0.1N HCl で唾液を約 pH4 に調整し、等量のアセトニトリルを加え、振とう抽出した。得られた抽出液を3000r.p.m.、5分間遠心分離し沈殿物を取り除き、アセトニトリル濃度が10%になるよう0.5%酢酸水溶液を加え、よく混和した。これを精製用試験液とした。

ミニカラムによる精製は逆相系固相抽出ミニカラムのC18 および OASIS HLB それぞれについて検討した。精製用試験液をそれぞれのミニカラムに負荷し、メタノール・水(1:9) で洗浄し、メタノール・酢酸エチル(1:9)でフタル酸モノエステルを溶出した。C18 および OASIS HLB でのフタル酸モノエステルの回収率はそれぞれ 94%以上および 97%以上であり、若干ではあるが OASIS HLB の

回収率が良好であった。一方、精製効果は両者とも良好であった。よって、本法では OASIS HLB の固相抽出カートリッジを使用した。

また、唾液中にフタル酸モノエステル5種類をそれぞれ 50ng 添加し、本法全体を通して添加回収試験を行った。その結果、それぞれの回収率は94%以上であり、精製効果も良好であった。その HPLC クロマトグラムを図 -9 に示した。

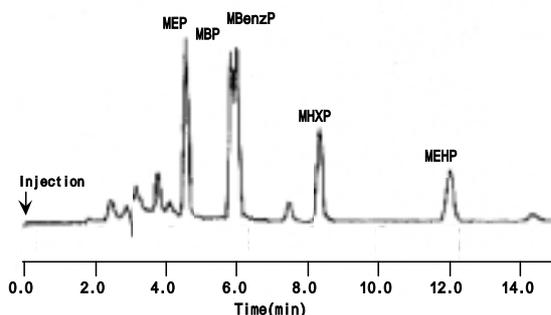


図 -9 唾液中に添加したフタル酸モノエステルを Oasis ミニカラムにより精製した後の HPLC クロマトグラム
フタル酸モノエステル：各々 50ng 添加
MEP: フタル酸モノエチル, MBenzP: フタル酸モノベンジル
MBP: フタル酸モノブチル, MHXP: フタル酸モノ-n-ヘキシル
MEHP: フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

以上により本実験では、唾液を酸性にし、アセトニトリル抽出し、Oasis HLB で精製・濃縮後、HPLC 分析した。唾液中のフタル酸モノエステルを TMSD にてメチルエステル化し、GC/MS-SIM 分析した。

4. まとめ

- 5 種類のフタル酸モノエステル (MEP, MBP, MBenzP, MHXP および MEHP) の HPLC 分析条件は、カラムが逆相系 C8 カラム、移動相はアセトニトリル・0.5%酢酸水溶液 (6:4) のアイソクラティック分析、UV 検出器の検出波長 254nm とした。
- GC/MS によるフタル酸モノエステルの確認は TMSD でカルボキシル基をメチルエステル化し、測定モード SIM にて m/z 163, m/z 91 および m/z 149 を測定した。
- 唾液は pH4 に調整し、アセトニトリル抽出した。試験溶液の精製はミニカートリッジの OASIS HLB を用い、溶出液はメタノール・酢酸エチル

(1:9) とした。本法による唾液抽出液の精製効果は良好で、フタル酸モノエステル 5 種類の回収率は 94% 以上であった。

・ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルの化学変化によるモノエステル体の生成

1. はじめに

平成 11 年度の厚生科学研究において、我々はヒトの chewing による乳幼児用玩具からのフタル酸ジエステルの溶出について検討した。その結果、一部の玩具から溶出したフタル酸ジエステルが唾液中でモノエステル体に変化することを見出した。

そこで本年度における研究では、アルキル基の異なる 5 種類のフタル酸ジエステルのヒト唾液中での化学変化によるモノエステル体の生成について検討した。

2. 実験方法

試薬および器具

使用する標準試薬、一般試薬および器具は前報に準じた。

装置

振とう培養器：UNI THERMOSHAKE, NTS-2000, EYELA 社製

その他、本実験で使用した装置は前報に準じた。

HPLC 分析条件

前報に準じた。

GC/MS 分析条件

前報に準じた。

フタル酸ジエステルのヒト唾液中でのモノエステル体の生成反応

フタル酸ジエステルを含まないポリプロピレン製試験片を成人被験者 (男性 2 人) の口腔内に入

れ, chewing し, 口腔内に溜まった唾液を採取した. 採取時間は昼食前の空腹時とし, 採取した唾液 15mL に人工唾液(pH7.0)5mL を加え, 混合し, 本実験で使用した唾液とした. この唾液 3mL を 50mL ネジ蓋付遠心分離管に入れ, フタル酸ジエステル標準溶液 10 μ L を加え 振とう培養器で 37 $^{\circ}$ C, 30 分間 Incubate した. 振とう培養器の振とう数は 150r.p.m. とした. Incubation 終了後 0.1N HCl で唾液を約 pH4 に調整し, アセトニトリルを 2mL 加え, 生成したフタル酸モノエステルを振とう抽出した.

以下前報 に準じ, フタル酸モノエステルを精製・濃縮し, HPLC または GC/MS-SIM 分析した. 本生成反応の実験はそれぞれの唾液に対し 3 回繰り返した.

3. 研究結果および考察

ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルの化学変化によるモノエステル体の生成について検討するため, 以下のような試験を行った. また, 採取した唾液 pH は 7.4 および 7.1 であった.

フタル酸モノエステル生成におよぼすフタル酸ジエステルのアルキル基の影響

アルキル基の異なる DEP, DBP, BBP, DHXP および DEHP をそれぞれ 50nmol を唾液に加え, 37 $^{\circ}$ C, 30 分間 Incubation し, 生成したそれぞれのモノエステル体量を測定した.

その結果を図 -1 に示した. Symmetric なフタル酸ジエステルである DEP, DBP, DHXP および DEHP は唾液中で 1 つのアルキル基が脱離し MEP, MBP, MHXP および MEHP をそれぞれ 10.6, 40.8, 9.4 および 0.9nmol 生成し, その生成率は 21.2%, 81.6%, 18.8% および 1.8% であった. 本実験でのフタル酸ジエステルの唾液中でのモノエステル体生成反応は直鎖のアルキル基を有す DBP が最も変化し易く, アルキル基に側鎖を有する DEHP ではその生成が悪かった. また asymmetric なフタル酸ジエステルである BBP のモノエステル体生成は, MBenzP が 12.3nmol 生成したが, MBP の生成は認

められなかった.

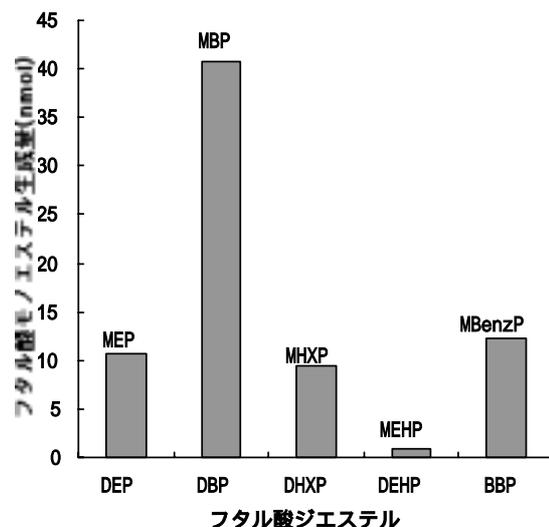


図 -1 アルキル基の異なるフタル酸ジエステルの唾液中におけるモノエステル体の生成

Incubation温度: 37 $^{\circ}$ C, Incubation時間: 30
PAE添加量: 50nmol, ヒト唾液: 3mL (成人被験者の chewing により採取した唾液と人工唾液 (pH7) を 3:1 で混合),

DEP: フタル酸ジエチル, MEP: フタル酸モノエチル
DBP: フタル酸ジブチル, MBP: フタル酸モノブチル
DHXP: フタル酸ジヘキシル
MHXP: フタル酸モノヘキシル
DEHP: フタル酸ジ-2-エチルヘキシル
MEHP: フタル酸モノ-2-エチルヘキシル
BBP: フタル酸ブチルベンジル
MBenzP: フタル酸モノベンジル

フタル酸ジエステルは一般に腸管内のエステラーゼにより加水分解され, モノエステル体を生成することが報告されている⁹⁾. また, マウス肝ミクロソームより精製したエステラーゼがフタル酸ジエステルの鎖状のアルキルエステル基に対し基質特異性を示し, 特に DBP に対し高い親和性を有すこと¹⁰⁾, さらにブタ膵臓リパーゼによる炭素数 4 つの脂肪酸エステルの特異的な加水分解反応についてそれぞれの報告がなされている¹¹⁾. 本実験でのヒト唾液中のモノエステル体生成反応はフタル酸ジエステルの直鎖のアルキル基, 特にエステルの炭素数が 4 つのブチルエステルに対し特異的に反応した. 唾液中には数多くの酵素が存在し, これらの酵素がフタル酸ジエステルのモノエステル体生成に深く関与していることが推察された.

唾液中のフタル酸モノエステル生成におよぼすフタル酸ジエステル濃度の影響

被験者の chewing により採取した唾液に、それぞれ DBP を 10, 25, 50, 100 および 150nmol 添加し、37℃, 30 分間 Incubation し、それぞれ生成した MBP 量を測定した。その結果を図 -2 に示した。唾液に DBP をそれぞれ添加し、生成した MBP 量はそれぞれ 5.7, 19.5, 40.8, 44.8 および 45.6nmol であった。

本法による唾液中の DBP のモノエステル体生成反応は、初め MBP 生成量が DBP 添加量と共に増加し、DBP 添加量が 50nmol で MBP 生成量が最大となり、DBP を 50nmol 以上添加しても MBP 生成量に有意な増加が認められなかった。

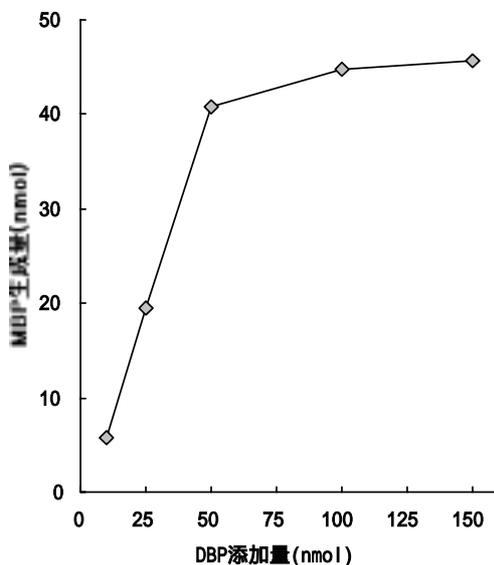


図 -2 ヒト唾液中のフタル酸モノブチル生成量におよぼすフタル酸ジブチル濃度の影響
Incubation 温度: 37℃, Incubation 時間: 30 分
ヒト唾液: 3mL (成人被験者の chewing により採取した唾液と人工唾液 (pH7) を 3:1 で混合)
DBP: フタル酸ジブチル, MBP: フタル酸モノブチル

フタル酸ジエステルモノエステル体生成におよぼす唾液 pH の影響

採取した唾液 (pH7.0) の pH を 0.1N HCl で pH4 に、また 0.1N NaOH で pH10 にそれぞれ調整した。それぞれの pH に調整した唾液に DBP を 100nmol 添加し、37℃, 30 分間 Incubation し、生成した MBP 量をそれぞれ測定した。その結果を図 -3 に示した。唾液 pH が 4, 7 および 10 での MBP 生成量はそれぞれ 0, 44.8 および 3.1nmol であった。

本実験による唾液中のモノエステル体生成反

応は中性で進行し、唾液をアルカリ性または酸性にすると、その生成が著しく低下し、この生成反応が pH に大きく影響することがわかった。

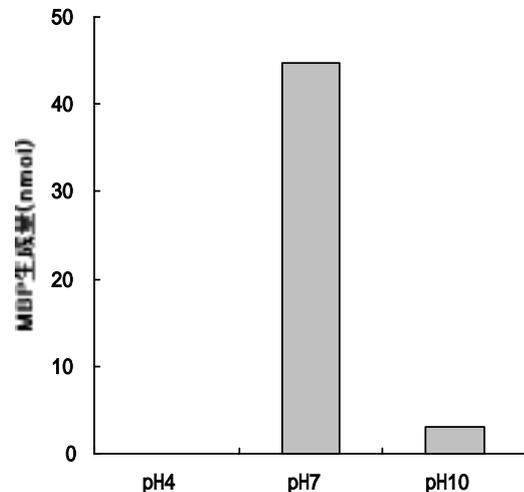


図 -3 ヒト唾液中におけるフタル酸ジブチルのフタル酸モノブチル生成におよぼす pH の影響
それぞれの pH は 0.1N HCl または 0.1N NaOH で調整
Incubation 温度: 37℃, Incubation 時間: 30 分
DBP 添加量: 50nmol,
DBP: フタル酸ジブチル, MBP: フタル酸モノブチル

フタル酸ジエステルモノエステル体生成反応におよぼす Incubation 時間の影響

唾液に DBP または DEHP を 50nmol 添加し、37℃ で 5, 15, 30 および 60 分間それぞれの Incubation により生成したそれぞれのモノエステル体量を測定した。

その結果を図 -4 と 5 にそれぞれ示した。DBP と DEHP は 60 分間で添加量の 95% と 12% それぞれ減少した。また、MBP 生成は 15 分間で DBP 添加量の 57%, 30 分間で 80% および 60 分間で 87% であった。一方、MEHP の生成は 60 分間で 3.4% と、その生成はわずかであった。

以上より、本実験からフタル酸ジエステルが口腔内の唾液中でモノエステル体を生成することが分かった。一般に、フタル酸ジエステルは生体内に入り、腸管のエステラーゼや膵臓のリパーゼにより加水分解されモノエステル体を生成することが報告されている^{9),12)}。ヒト唾液には脂肪の消化酵素である舌リパーゼやエステラーゼが存在する。また、唾液中の様々な微生物由来の酵素

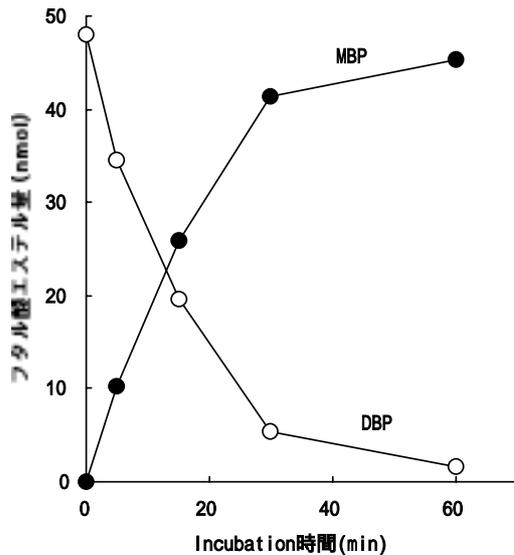


図 -4 ヒト唾液中でのフタル酸モノブチル生成におよぼすフタル酸モノブチルのIncubation時間の影響
Incubation温度：37℃，DBP添加量：50nmol
ヒト唾液：3mL(成人被験者のchewingにより採取した唾液と人工唾液(pH7)を3:1で混合)
DBP：フタル酸ジブチル，MBP：フタル酸モノブチル

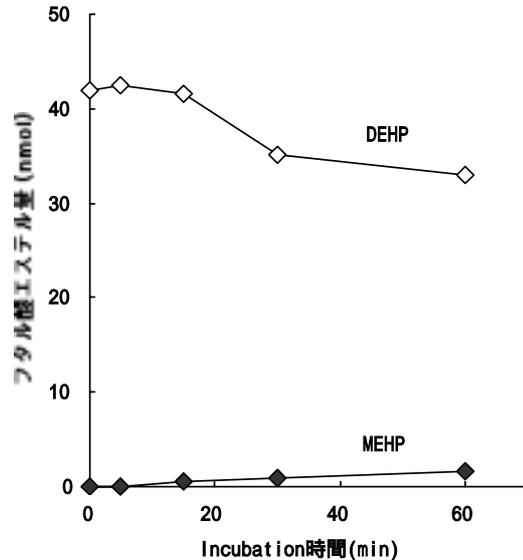


図 -5 ヒト唾液中でのフタル酸モノ-2-エチルヘキシル生成におよぼすフタル酸ジ-2-エチルヘキシルのIncubation時間の影響
Incubation温度：37℃，DEHP添加量：50nmol
ヒト唾液：3mL(成人被験者のchewingにより採取した唾液と人工唾液(pH7)を3:1で混合)
DEHP：フタル酸ジ-2-エチルヘキシル
MEHP：フタル酸モノ-2-エチルヘキシル

も存在すると考えられている。本実験で得られた結果より、唾液中でのモノエステル体生成反応には酵素による加水分解が深く関与していることが推察される。

また、フタル酸ジエステルの生殖毒性の本体はモノエステル体であると考えられている¹³⁾。また最近フタル酸ジエステルの発ガンプロモーター活性が報告され^{1),2),3)}、モノエステル体により強い活性を示すことが見出されている¹⁴⁾。その発ガンプロモーター活性と内分泌攪乱作用の関連性が疑われていることから⁴⁾、今後この唾液中のモノエステル体生成反応の詳細を明らかにする予定である。

4. まとめ

ヒト唾液中でのフタル酸ジエステルのモノエステル体生成反応はフタル酸ジエステルのアルキル基の違いによりその生成率が大きく異なり、直鎖のアルキル基、とくにブチルエステルに特異的に反応した。

唾液中でのフタル酸ジブチル(DBP)のモノエステル体生成反応は pH7 でフタル酸モノブチル

(MBP)生成量が最大となり、pHが4または10になると、その生成量が著しく低下した。

以上より、唾液中でのフタル酸ジエステルのモノエステル生成反応に唾液酵素が深く関与することが推察された。

5. 参考文献

- 1) Weghorst C.M., et. al., *Exp. Toxicol. Pathol.*, **45**(7), 423-31(1994)
- 2) Ledwith B.J., et. al., *J. Biol. Chem.*, **272**(6), 3707-14(1997)
- 3) Isenberg J.S., et. al., *Toxicol. Sci.*, **56**(1), 73-85(2000)
- 4) Asada S., et. al., *J. Health Sci.*, **47**(1), 60-64(2001)
- 5) Health Canada, Ottawa, Ontario: Consumer Products Division, Product Safety Bureau, Environmental Health Directorate, Health Protection Branch, 1998a
- 6) Hashimoto, N., et. al., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1475-78(1981)

- 7) Kawamura, Y., et. al., J. Food Hyg. Soc. Japan, 40, 189-197(1999)
- 8) Tsumura, Y., et. al., J. Food Hyg. Soc. Japan, 41, 254-260(2000)
- 9) Lake B.G., et. al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 239-248(1977)
- 10) Kayano Y., et. al., "Abstr. 21 st Symp. Toxicol. Env. Health," Osaka, p.51-52, 1995.
- 11) Entressangels B., et. al., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, 581(1961)
- 12) Eriksson P., et. al., *Toxicology.*, **37**, 189-204(1986)
- 13) 中村好志他, *衛生化学*, **33**, 71(1987)
- 14) 私信

6. 研究発表

学会発表

- 1) フォーラム 2000 : 衛生薬学・環境トキシコロジー(東京, 2000年10月)
- 2) 第80回日本食品衛生学会学術講演会(福島, 2000年11月)