

緩衝水溶液と接触した食品包装用プラスチック製品からの 酵素活性化作用をもつ微量物質の溶出

徳永 浩樹¹, 松村 浩由², 甲斐 泰², 泉井 桂¹

要旨

食品保存用のラップフィルムやパック、調理用のクッキングシートなどは、一般家庭において、よく用いられているプラスチック（合成樹脂）製品である。これらは食品と直接接触するので、プラスチックに含まれる添加物や付着物が食品に溶出したり、移行したりすることがある。以前に、著者らは大腸菌 (*Escherichia coli*) のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)[EC4.1.1.31] が軟質ポリ塩化ビニルやその他のプラスチック製品から緩衝液中に溶出される物質によって活性化される現象を見出していたので、本研究では、これを検知法として、現在市販されている種々のプラスチック製品について、それらから溶出される物質の有無を再検討した。細片化したプラスチックを 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液に浸漬し、50°C または 25°C にて 3 時間振盪したのち、この緩衝液を細片から分離し、これを酵素反応混液に加えて PEPC の反応速度に及ぼす影響を自記分光光度計によって調べた。その結果、(1) 実験室用の 7 種類の軟質プラスチックチューブ製品のなかでは、ポリ塩化ビニルを基材とする製品から活性化物質の有意の溶出をみとめた。(2) 医療用のプラスチック製品である、血液透析器および血液バッグからは活性化物質の溶出はみとめられなかった。(3) 食品包装用の 5 種類のラップのなかでは、ポリ塩化ビニリデンを素材とするものが活性化を示し、シリコンでコートされたクッキングシートについてはメーカーによって活性化物質の溶出を示すものとそうでないものがあった。(4) 食品保存用のポリスチレンおよび二軸延伸ポリスチレン (OPS) を素材とするものからの溶出物が高い活性化効果を示した。本論文は、シリコンでコートされたクッキングシートおよび OPS 製の食品容器から活性化作用のある物質が溶出することを初めて報告するものである。検知法として用いた酵素の活性化および活性化物質の構造的特徴について、本酵素の立体構造に基づいて考察し、さらにこの方法の有用性および本知見の意義について考察した。

1. 緒論

プラスチック（合成樹脂）を素材とする製品は非常に多岐にわたり、いまや我々の生活必需品となっている。一般家庭においては、食品の包装や保存用にラップフィルムやパック、調理時にはクッキングシートなどが身近に利用されている。また、医療の現場では輸血バッグや血液透析器、研究室では実験用チューブや器具などもプラスチック製品である。合成高分子であるプラスチックの種類も多いが、それらのプラスチックに用途に適った物理的・化学的性質を付与するために、多くの場合、種々の低分子化合物が添加されている。例えば、軟質のポリ塩化ビニル (PVC) 樹脂の場合には、多量の可塑剤が添加され、また少量の安定剤、防曇剤、滑剤などが添加されている。さらに、成型の過程では、離型剤が混入してくる可能性もある。かつて、1970 年代に、軟質の PVC 製の血液バッグ⁽¹⁾ や血液透析器⁽²⁾ から、可塑剤として添加されていたフタル酸エステル類が多量に血液中に溶出することが見いだされ、その毒性が示唆された。

原稿受付 2006 年 11 月 27 日

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 大阪大学大学院工学研究科 応用化学専攻 〒565-0871 吹田市山田丘 2-1

フタル酸エステル類は環境中にも長期間滞留し、内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）として動物をメス化する活性のあることが報告され⁽³⁾、その分子機構の研究が現在も行われている^{(4) (5)}。フタル酸エステル類はペルオキシソームを異常に発達させるなど、細胞レベルでも種々の応答を引き起こすことが知られている⁽⁶⁾。食品中へのフタル酸エステル類の混入は津村らによって検証され、主としてコンビニエントストアで販売される弁当中に多量に混入していること、さらにその発生源は調理時に使用されている PVC 製の手袋にあることが示された⁽⁷⁾。また、フタル酸エステル類とは限らず、医用 PVC からの溶出物が心筋細胞に毒性を示したり⁽⁸⁾、PVC 製の食品容器を綿実油と接触させ、その油をマウスに長期間経口投与すると、対照にくらべて、体重増加量が有意に減少したという報告もある⁽⁹⁾。これらの場合には、必ずしも毒性物質がフタル酸エステル類であると同定されたわけではない。

わが国では、これらの知見に基づいて、現在では食品の包装や保存用の PVC 製品にはフタル酸エステル類を可塑剤として使用することは禁止され、代替物質としてアジピン酸エステル類が使用されるにいたっている (<http://www.vinyl-ass.gr.jp/sf/pvc.html>)。それでは、現在使用されている食品や血液と接触するプラスチック製品はすでにすっかり安全になっているのであろうか？著者の一人（泉井）は約 30 年前に偶然 PVC から、ある酵素の活性に影響する物質が溶出することを見出していた⁽¹⁰⁾ので、本研究ではこの問題をもう一度とりあげて検討することにした。ある酵素とは、著者らが長年にわたって研究してきたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC と略）（EC4.1.1.31）であり、大腸菌（*Escherichia coli*）の PEPC（EcPEPC）は 5 種類もの構造の異なる代謝物質によって活性の調節を受けるアロステリック酵素である。その頃アロステリックな調節因子の結合に伴って酵素のコンホメーション変化があると推測されていたので、その変化に体積変化が伴うならば圧力によってアロステリックな平衡をシフトさせられるのではないかと考えて実験を行っていた。この実験において、酵素反応の容器として PVC 製のチューブの両端をガラス棒で栓をしたものを用いていたが、この容器を用いたときの常圧での酵素活性が、通常ガラス容器を用いたときより、つねに 2-3 倍高いことに気がついた⁽¹⁰⁾。その原因を詳しく調べた結果、PVC 製のチューブからの溶出物が活性化作用をもつことが判明した。折しも PVC からの溶出物の毒性が問題となりはじめていた時期であり、著者らも活性化物質の溶出の有無を、当時の医用 PVC 製品であるチューブ、血液バッグ、人工透析器やシリコン製の人工肺用のシートなどについて調べたところ、やはり顕著な活性化効果が見られた⁽¹¹⁾。しかし、活性化物質の本体を明らかにするには至らなかった。

EcPEPC の特異な性質として、本酵素がジオキサンやアルコールなどの有機溶媒によっても活性化され、活性化作用を示す有機化合物に対する構造特異性は低いことを見出していた。長鎖の脂肪酸やアルコールでは極めて低濃度で弱い活性化作用を示すことから、活性化効果は、溶媒効果によるのではなく、溶媒分子が酵素表面の疎水性の領域に結合することによるのであろうと考えてきた⁽¹²⁾。したがって、PVC 製品から水溶液中に溶出される何らかの化合物で活性化作用を示すものは、少なくともその分子の一部に疎水性の部分をもつ化合物であろうと推測された。EcPEPC およびトウモロコシ（*Zea mays*）の PEPC（ZmPEPC）の立体構造は著者らによって解明されている⁽¹³⁻¹⁶⁾ので、立体構造上での活性化物質の結合部位については考察において議論する。

本研究では、現在（2006 年）市販の種々の医療器具および食品包装用のプラスチック製品について、活性化物質が水溶液との接触によって溶出されるか否かを調べた。医療器具については供試したすべてについて改善のあとが見られたが、いくつかの食品包装用製品からは、依然として活性化物質の溶出をみとめたので報告する。

2. 材料と方法

2. 1 大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (EcPEPC) の調製

本研究では、大腸菌 (*Escherichia coli* K12) のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (*ppc*)⁽¹⁷⁾を pET システム (Novagen) で大腸菌において発現させたのち、His-trap HP (G & E, Amersham) で精製した組換え体酵素を用いた。pET ベクターは His および S-tag 以外をもたない pET-30a(+)を用い、これに *ppc* を組み込んだものを用いた。このプラスミドは以前に佐藤によって構築された⁽¹⁸⁾。宿主としては大腸菌株 BL21-Codonplus DE3-RIL (STRATAGENE 社)を用いた。PEPC の発現誘導および、His-trap による精製は、基本的にはそれぞれの製造会社のプロトコルに従った。なお、菌体の超音波破碎時に用いた緩衝液の組成は、0.1 M Tris-HCl (pH 7.4)、5%(v/v) グリセロール、14 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)であった。His-trap からの溶出用バッファーの組成は、20 mM リン酸ナトリウム (pH7.4)、5%(w/w) グリセロール、100 mM NaCl を基本とし、イミダゾールの濃度を 20、200、および 500 mM に変化させて酵素を溶出した。精製酵素の保存には、次の組成の溶液を用いた；20 mM Tris-HCl (pH7.4)、14 mM 2-メルカプトエタノール、60% 飽和硫酸アンモニウム。

2. 2 酵素活性の測定⁽¹⁹⁾

活性測定の際には、酵素を 1 mM のジチオスレイトール (DTT) および 14 mM の 2-メルカプトエタノールを加えて氷中で約 1 時間処理してから用いた。活性測定は、PEPC によって生成するオキサロ酢酸をリンゴ酸脱水素酵素によって還元し、これに伴う NADH の 340 nm における吸光度の減少速度を分光光度計 (島津製作所 UV-2500 PC) を用いて追跡し、UVPC 用カイネティックソフトウェアでデータ処理を行った。反応混液(全量 1.0 ml)の組成は、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM KHCO₃、10 mM MgSO₄、0.1 mM NADH、1.5 IU リンゴ酸脱水素酵素 (MDH)、および 10 mM ホスホエノールピルビン酸カリウム塩 (PEP) であった。なお、反応は 100 mM PEP を 100 μ l 添加することで開始させた。反応温度は 30°Cとした。

2. 3 プラスチック製品の細片化と緩衝水溶液との接触処理

チューブ類は内径 2 mm、外径 4mm 程度のものを用いた。これらは、液体窒素中で柔軟性を失わせたのち、乳鉢で軽く破碎したのち、さらに、液体窒素の存在下に破碎用ミキサー (キネマチカ社 POLYTRON PTA 10 S) でパウダー状に加工した。ラップ、フードパック等の薄く、軟らかい製品はハサミで 2 mm 平方程度に切り分けた。

30 ml ファルコンチューブに、一定量の 0.1 M Tris-HCl (pH8.5)と一定量 (各表において示した量) のプラスチック細片を入れて、50°Cまたは室温 (25°C) にて、3 時間震盪したのち、緩衝液のみを回収し、試料とした。(なお、厚生省告示 370 号によれば、この種の溶出試験は、沸騰食品の想定では 95°C、高温食品では 60°C、常温食品では 25°Cで行うことが指定されているが、ここでは以前の著者らの実験を 50°Cまでで行っていたので⁽¹¹⁾、それとの整合性から 50°Cとした。) 0.1 M Tris-HCl (pH8.5) のみを入れて同様に震盪したものをコントロールとした。回収された緩衝液 0.5 ml を加えて、全量 1.0 ml になるようにとした反応混液において PEPC 活性を測定した。なお、50°Cと 25°Cで調製したコントロールの緩衝液を用いたときの酵素活性は互いにほとんど等しかった。測定結果は、コントロールの活性を 100%として、相対値で示した。コントロールでの測定値の実験誤差は \pm 5%程度であったので、実験値がコントロール値にくらべて 20%以上高いか低い場合には、溶出物による有意の効果があるとした。試料の数が多かったため、2 回以上実験を繰り返したものは実験の初期の一部で、操作に習熟後は 1 回の実験しかしていない。表 5 の実験においては、抽出および測定操作を 4 回ないし 5 回行い、その平均値を求めた。

2. 4 試料として用いたプラスチック製品

表1には本研究において供試した各種プラスチック製品について、商標名、製造会社または発売元、添加物その他の情報をまとめた。製品の材質については表2～表5に示した。試料番号は、各実験に用いた試料との対応を容易にするために、表番号およびその表の中での試料番号で示した。なお、表5においては、試料番号は表4からの通し番号とした。したがって表5の番号6および9の試料は、表4における番号6および9の試料とそれぞれ同一である。

表1 供試したプラスチック製品

試料番号	商標名	製造会社又は販売元	用途および添加物名
表2-1	PVCチューブ	アズワン	実験用
表2-2	ビニルチューブホース	アズワン	実験用
表2-3	ラボチューブ	アズワン	実験用
表2-4	エコチューブ	アズワン	実験用 (耐寒・耐熱・耐オゾン)
表2-5	タイゴンチューブR-3603	アズワン	実験用 (耐薬品)
表2-6	シリコンチューブ	アズワン	実験用 (耐薬品・耐熱・耐オゾン)
表3-1	ハイカリックIVHバック (チューブ)	テルモ株式会社	医療 (輸液) 用、DEHPフリー、TOTM (可塑剤) ^{a)}
表3-2	ハイカリックIVHバック (袋)	テルモ株式会社	医療 (輸液) 用
表3-3	トリアセテートホローファイバー ダイアライザー FB-190EGA	ニプロ株式会社	医療 (血液透析) 用
表3-4	シュアライザー PES-130DS	ニプロ株式会社	医療 (血液透析) 用
表4-1	サランラップ	旭化成&リビング 株式会社	食品 (包装) 用、脂肪酸誘導体 (柔軟剤)、 エポキシ化植物油 (安定剤)
表4-2	NEWポリラップ	宇部フィルム株式 会社	食品 (包装) 用、
表4-3	フォーラップ	リケンテクノス株式 会社	食品 (包装) 用、ポリブテン-1 (ポリオレ フィン)
表4-4	ナチュラルラップ	大黒工業株式会社	食品 (包装) 用、脂肪酸エステル
表4-5	GSラップ	株式会社神戸物産	食品 (包装) 用、脂肪酸多塩基酸エステル、 エポキシ化植物油、カルシウム化合物
表4-6	クッキングシート (クックパー)	旭化成ライフ&リビ ング	食品 (調理) 用
表4-7	業務用クッキングシート	東洋アルミホイルプ ロダクツ	食品 (調理) 用
表4-8	ごはん一膳	株式会社クレハ	食品 (保存) 用
表4-9	フードパック	技研化成株式会社	食品 (保存) 用
表4-10	OPPフィルム	不明	食品 (保存) 用
表4-11	冷凍保存パック	コーナン商事株式 会社	食品 (保存) 用
表4-12	Ziplocフリーザーバック	旭化成ライフ&リ ビング	食品 (保存) 用
表4-13	冷蔵用保存パック	コーナン商事株式 会社	食品 (保存) 用
表4-14	フードパック (おむすび型)	大和物産株式会社	食品 (保存) 用
表4-15	クリアパック ミニ	株式会社シンワ	食品 (保存) 用
表4-16	クリアパックM	コーナン商事株式 会社	食品 (保存) 用

a) DEHP, ジメチルヘキシルフタル酸エステル; TOTM, トリメリット酸 (2-エチルヘキシル)

2. 5 試料として用いた長鎖不飽和脂肪酸

オレイン酸とアラキドン酸はナカライテスクより、ドコサヘキサエン酸（DHA）（cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid Sodium salt）およびエイコサテトライノン酸（ETYA）（5,8,11,14-Eicosatetraynoic acid）はSigma社より購入した。これらは少量のジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して約40 mMとしたのち、その最大5 μ lの溶液を反応混液に添加してその効果を調べた。用いた濃度のDMSOは活性に影響をおよぼさないことは確かである。

3. 結果

3. 1 実験用チューブからの活性化物質の溶出

表2には、現時点（2006年）で製造販売されている各種プラスチックチューブについて、それらからの溶出物がEcPEPCの活性に及ぼす影響について調べた結果を示す。実験用のチューブの中では、活性化効果を示したのは軟質のポリ塩化ビニル（PVC）製のもののみであり、その他の材質のチューブからは有意の活性化物質の溶出はみとめられなかった。PVCでの活性化の程度も1.6倍に過ぎなかった。約30年前に行った同様の実験では、最大6倍にも及ぶ活性化がみられた⁽¹⁾が、それと比較すると現在では大幅に改善されていることが伺われた。

表2 実験用チューブ類からの抽出物による酵素活性化

番号	試料 ^{a)}	材質	酵素活性 (%)
0	コントロール		100
1	PVCチューブ	軟質ポリ塩化ビニル	158
2	ビニルチューブホース	軟質ポリ塩化ビニル	159
3	ラボチューブ	軟質ポリ塩化ビニル	74
4	エコチューブ	スチレン系エラストマー	99
5	タイゴンチューブ	オレフィン系エラストマー	94
6	シリコンチューブ	シリコーン樹脂	94

^{a)}各試料0.5gに対してTris - HCl 緩衝液 1.0 mlの割合で接触させた。振とうは50°C、3時間行った。

3. 2 医療用プラスチック製品からの活性化物質の溶出の有無

医療の現場では、輸液、輸血、血液透析など、血管をとおして人体に注入される液体がプラスチック製品と直接接触するため、とくに、プラスチック製品の添加物が、血液などに移行あるいは溶出することがないように注意する必要がある。表3は輸液用バッグとチューブ、血液透析用容器とホローファイバーに

表3 医療用プラスチックからの抽出物による酵素の活性化

番号	試料 ^{a)}	材質	酵素活性 (%)
0	コントロール		100
1	輸血バック(チューブ部分)	ポリ塩化ビニル	81
2	輸血バック(袋部分)	エチレン-酢酸ビニル共重合体	85
3	血液透析器 (ファイバー部分)	セルローストリアセテート	99
4	血液透析器 (ファイバー部分)	ポリエーテルスルホン	95

^{a)}Tris - HCl 緩衝液 1.0 mlに対して、輸血バック（番号1,2）は0.5g,透析器（番号3,4）は0.2gの割合で接触させた。震盪は50°Cにて3時間行った。

ついて活性化物質の溶出の有無を調べた結果を示す。表から明らかのように、検査したどの試料からも活性化物質の溶出はみとめられなかった。むしろ、活性を低下させる傾向がみられているが、この低下が有意の効果であるかについてのさらに詳しい検討は行っていない。以前に検査した透析チューブ (Cuprophane 製) では5倍もの活性化がみられた⁽¹¹⁾ものである。これらの製品についても大幅な改善が行われていることが確認された。

3. 3 食品包装用プラスチック製品からの活性化物質の溶出

食品と直接接触するプラスチック製品について調べた結果を表4に示す。種々の材質からなるラップフィルム、クッキングシート、保存用パックなどである。検査したどの試料についても、顕著な活性化を示す物質の溶出はみとめられなかった。しかし、ラップフィルムのなかでは、ポリ塩化ビニリデン (番号1) およびポリエチレンを素材とするものの一部(試料番号4)からの溶出物が低いながら有意の活性化を示した。また、シリコーン樹脂でコートされているクッキングシートはメーカーによって異なる結果が得られたが、比較的顕著な活性化を示すもの(番号6)があった。さらに食品保存容器についてもメーカーによる違いがあったが、二軸延伸ポリスチレン樹脂製 (OPS)のもの(番号9)からも比較的顕著な活性化物質の溶出が認められた。なお、外国で製造されたポリエチレン製の食品保存パックからは活性化物質の溶出は見られずむしろやや強い阻害効果が認められ、阻害物質の溶出が示唆された(番号11, 12, 13)。

表4 食品包装用プラスチック製品による酵素の活性化

番号	試料 ^{a)}	主要材質	酵素活性 (%)
1	ラップフィルム	ポリ塩化ビニリデン	133
2	ラップフィルム	ポリエチレン	99
3	ラップフィルム	ポリメチルペンテン	113
4	ラップフィルム	ポリエチレン	124
5	ラップフィルム	ポリ塩化ビニル	79
6	クッキングシート	シリコーン樹脂加工	188
7	クッキングシート	シリコーン樹脂加工	98
8	容器	二軸延伸ポリプロピレン (OPP)	108
9	フードパック	二軸延伸ポリスチレン (OPS)	181
10	野菜包装用フィルム	二軸延伸ポリプロピレン (OPP)	126
11	保存パック	ポリエチレン	68
12	保存パック	ポリエチレン	74
13	保存パック	ポリエチレン	72

^{a)} Tris-HCl 1.0 ml に対して、ラップフィルム (番号1~5) は0.2g、クッキングシート (番号6, 7)、野菜包装用フィルム (番号10) は0.4g、フードパック (番号9)、容器 (番号8)、保存パック (番号11~13) は0.5g、の割合で接触させた。震盪は50℃にて3時間行った。

これまでは、溶出温度を50℃に設定してきたが、室温(約25℃)でも同様に活性化物質の溶出がおこるか否かを検討したところ、予期に反して、室温の方が活性化物質の溶出が顕著であった。表5には、50℃で活性化物質の溶出が認められた製品およびさらに3種類のOPS製品を新たに加えて検査を行った結果を示す。シリコーン樹脂加工のクッキングシート(番号6)およびOPS製のフードパックなどの食品保存容器からは4種類とも活性化物質の溶出が認められた。とくに、番号9の製品では活性化率が高かった。

表5 室温条件下での、食品包装用プラスチック製品による酵素活性化

番号	試料 ^{a)}	材質	酵素活性 (%)
0	コントロール		100
6	クッキングシート	シリコーン樹脂加工	243 (±10)
9	フードパック	二軸延伸ポリスチレン (OPS)	390 (±66)
14	フードパック	二軸延伸ポリスチレン (OPS)	267 (±5)
15	フードパック	二軸延伸ポリスチレン (OPS)	149 (±4)
16	フードパック	二軸延伸ポリスチレン (OPS)	273 (±3)

^{a)} Tris - HCl 1.0ml に対して、クッキングシート 0.4g、フードパック 0.5g の割合で接触。震盪は 25°C にて 3 時間行った。

これらの溶出物質による EcPEPC の活性化を一点の濃度だけで調べると、活性化率が低くてもすでに飽和しているのかそれとも、まだ溶出物の量に依存して活性化率が上昇する傾向にあるのかが不明である。これを調べるために、プラスチックと接触済みの緩衝液を種々の濃度に添加したときの活性化率を調べた (図 1)。図 1-A は 50°C で、PVC チューブ (表 2、番号 1)、クッキングシート (表 4 番号 6) およびフードパック (表 4 番号 9) を処理したときの緩衝液について、濃度依存性を調べたものであり、図 1-B は 25°C でフードパック (表 5 番号 9) について同様に調べた結果を示す。これらの図から明らかなように活性化率はどの抽出液についても飽和しておらず、活性化率は溶出物の濃度に依存してなお増大する傾向を示した。このことから、溶出物質はその量が多くなればさらに強い活性化効果を示すものと考えられる。

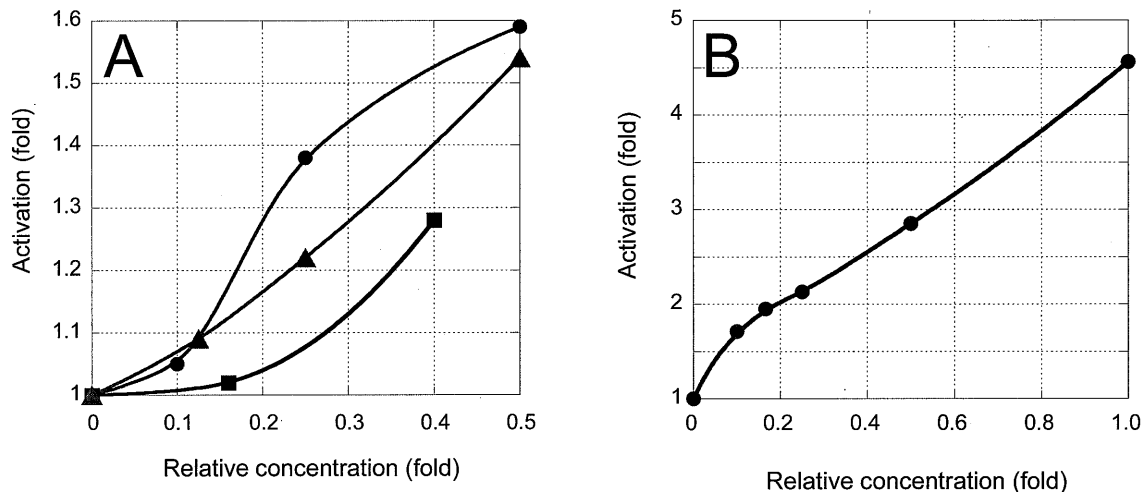


図1 酵素活性化率に及ぼす種々の濃度の溶出物の影響。それぞれのプラスチックと接触済みの緩衝液 0.5 ml を酵素反応系に加えたときの相対濃度を 1 として示す。(A) 塩化ビニルチューブ (●, 表 2、番号 2)、クッキングシート (■, 表 4、番号 6)、フードパック (▲, 表 4、番号 9)、をそれぞれ 50°C にて緩衝液と接触させた後の緩衝液を用いた。(B) フードパック (表 4、番号 9) を 25°C にて緩衝液と接触させた後の緩衝液を用いた。

3. 4 既知の不飽和脂肪酸による EcPEPC の活性化

以前、長鎖脂肪酸について活性化作用を調べたときには、不飽和脂肪酸のオレイン酸について有意の活性化効果をみていたので⁽¹²⁾、オレイン酸およびその他の多価不飽和脂肪酸について調べてみた。これらは、脂質シグナルとして作用することや、プロスタグランジンなどのオータコイドの前駆体として働くことが

ら、その生理的重要性が明らかになってきたものおよびそのアナログである。図2に示されるように、これらの脂肪酸は μM オーダーの極めて低濃度で活性化効果を示した。最大活性化率は3倍程度に達し、それ以上の濃度では、活性化率は低下する傾向がみられた。これは、より親和性の低い領域でかつ触媒部位など活性発現に必要な領域にも活性化物質が結合し始めるためと推測される。この知見は、脂質シグナル物質に対してもEcPEPCが感受性をもつことを示すものである。

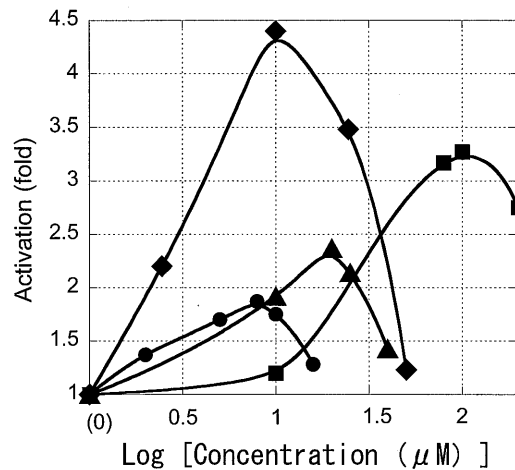


図2 種々の長鎖不飽和脂肪酸によるEcPEPCの活性化。アラキドン酸(◆),オレイン酸(●), DHA (▲), E T Y A (■), による活性化を示す。横軸の(0)は、便宜上、濃度0を指す。

3. 5 溶出物質の紫外線吸収スペクトル

図3はプラスチック製品と接触させた後の緩衝液の吸収スペクトルを示す。接触させる前の緩衝液を対照として測定した。緩衝液自身の吸収が250 nm以下では大きいので、測定可能領域が狭くなってしまったが、これらのスペクトルから、何らかの紫外線吸収物質が溶出していることがわかる。PVC製チューブ(A)では芳香族など何らかの共役電子系をもつ物質の溶出が示唆され、クッキングシート(B)では短波長側に吸収をもつ物質がかなり多量溶出することが示唆された。フードパックでは吸収ピークはなく異常に平坦なスペクトルを示したが、その量は接触温度が50°Cのときの方が、25°Cのときより8倍ほど多いようであった。酵素の活性化からみたときには、活性化率は25°Cのときの方が50°Cのときより高く、傾向は逆転していた。このことは、活性化を示した物質はおそらく、主要な紫外線吸収物質とは別の物質であることを示唆するものと考えられる。

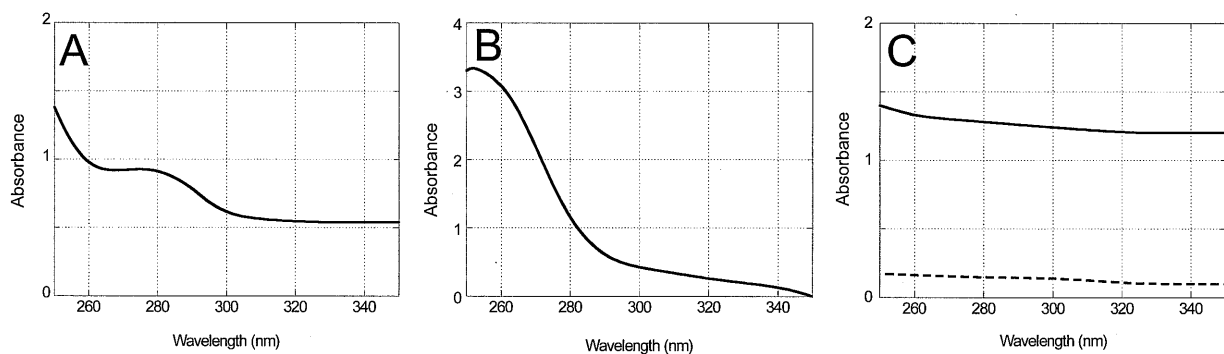


図3 プラスチック製品からの溶出物の吸収スペクトル。(A) 塩化ビニルチューブ(表2, 番号2), (B) クッキングシート(表4, 番号6), (C) フードパック(表4, 番号9, 接触温度は50°C)(実線) および同(表4, 番号9, 接触温度は25°C)(破線)。

4 考察

4.1 現在市販のプラスチック製品からの活性化物質の溶出

本研究においては、現在市販されている種々のプラスチック製品から酵素の活性に影響を及ぼす物質が緩衝水溶液との接触によって溶出されるか否かを検討した。その結果、全般的に活性化物質の量は約30年前と比較すると大幅に低下し、著しく改善されていることが確認された。とくに、血液と直接接触する医療用製品からの溶出は全くみられなかった。しかしながら、30年前にはなく、比較的最近出現したプラスチック製品の中では、透明で硬質の二軸延伸ポリスチレン（OPS）製フードパックのすべての製品、シリコーン樹脂加工のクッキングシートの製品の一部およびラップフィルム製品の一部などから活性化物質の溶出がみとめられた。フードパックからの溶出は予期せぬ知見であった。なお、実験室において日常的に使用されているポリプロピレン製の小型反応チューブからの活性化物質の溶出はないようであった。すなわち、1本の反応チューブ（容量1.5 ml、Quality社製）につき0.5 mlの緩衝液を容れて10分間常温で震盪したのち、その緩衝液を次の新しいチューブに移して震盪するという操作を10回くりかえしたのち、最後に得られた緩衝液についてその活性化能を調べたが有意の活性化はみられなかった。これは、少なくとも実験データを狂わせるような活性化物質は反応チューブには溶出していないことを示唆している。なお、活性化物質は純水に対してはあまり溶出せず、血液や血清および緩衝液などに対して溶出することは以前に観察している⁽¹¹⁾。

4.2 溶出する活性化物質の化学的本体

EcPEPCを活性化する物質の構造特異性はきわめて低く、10%（v/v）程度のジオキサン、テトラエチレングリコール、エタノールなどによって非常に強く活性化される。長鎖の脂肪族アルコールや脂肪酸になると、活性化に要する濃度は極めて低くなるが、活性化の程度は低下する傾向がみとめられる⁽¹²⁾。

現在、軟質PVCや軟質ポリ塩化ビニリデン樹脂で食品包装用のものについては、添加剤として用いることが許可されている多くの物質が開示されている。この中には、アジピン酸-ジ-イソノニル、エポキシ化大豆油、ポリエチレングリコール脂肪酸エステルなど脂肪酸エステル類が多く、長鎖脂肪酸がそのまま用いられることもある。またノニルフェノールなどベンゼン核をもつ化合物も用いられている（日本ビニル工業会 <http://www.vinyl-ass.gr.jp/sf/pvc.html>）。これらの製品と有機溶媒との接触によって溶出される物質のあることは2001年ころの分析結果でも確かめられており⁽²⁰⁾、さらにシリコーン樹脂加工の紙製クッキングシートなどにジオクチルスズやジブチルスズの含まれていることが報告されている（<http://www.nies.go.jp/edc/edrep/report/1-1-4-11.htm>）。また、OPSについて使用されている添加剤の一つはワックスではないかと予想されるが、記述は少なく、溶出物質に関する報告はほとんどないようである。

これら添加の明らかな化合物のそれぞれを緩衝水溶液と接触させ、得られる水相についてEcPEPCを活性化するか否かについての系統的な研究は行っていないが、以前に検討したときには、ジ（n-オクチル）フタル酸エステルおよびジオクチルアジピン酸エステルは有意の活性化を示したが、ジ（2-エチルヘキシル）フタル酸エステルは活性化能を示さなかった。また、安定化剤であるトリノニルフェニルホスファイトは顕著な活性化能を示した⁽¹¹⁾。今回、クッキングシートおよびOPSを素材とする食品容器から活性化物質の溶出が見出されたがこれは予期せぬことであった。その化学的本体は不明であり、今後分析同定を行う必要があるが、きわめて微量で活性化を示す物質であろうと思われる。

4.3 EcPEPCの表面における活性化物質の結合部位

著者らはPEPCの立体構造を明らかにし、触媒部位および2種類のアロステリックエフェクターの結合部位の立体構造上の位置を明らかにしてきた⁽¹³⁻¹⁶⁾。2種類のアロステリックエフェクターとは、阻害因子

のリンゴ酸またはアスパラギン酸、および活性化因子のフルクトース-1,6-ビスリン酸（またはグルコース-6-リン酸）についてである。これまで多くの部位に変異を導入して変異酵素の性質を調べてきたが、未だジオキサンなどの有機溶媒や長鎖脂肪酸に対してのみ感受性を失った酵素の作出には成功しておらず、したがってこれらの化合物の結合部位も不明である。本研究で取り扱った溶出物は疎水的な部分をもつと予想されるので、おそらく長鎖脂肪酸と同じ部位に結合するものと推測される。その結合部位の候補を探るために、EcPEPCの表面にどのような疎水的な領域があるかを調べた。図4には疎水性アミノ酸残基

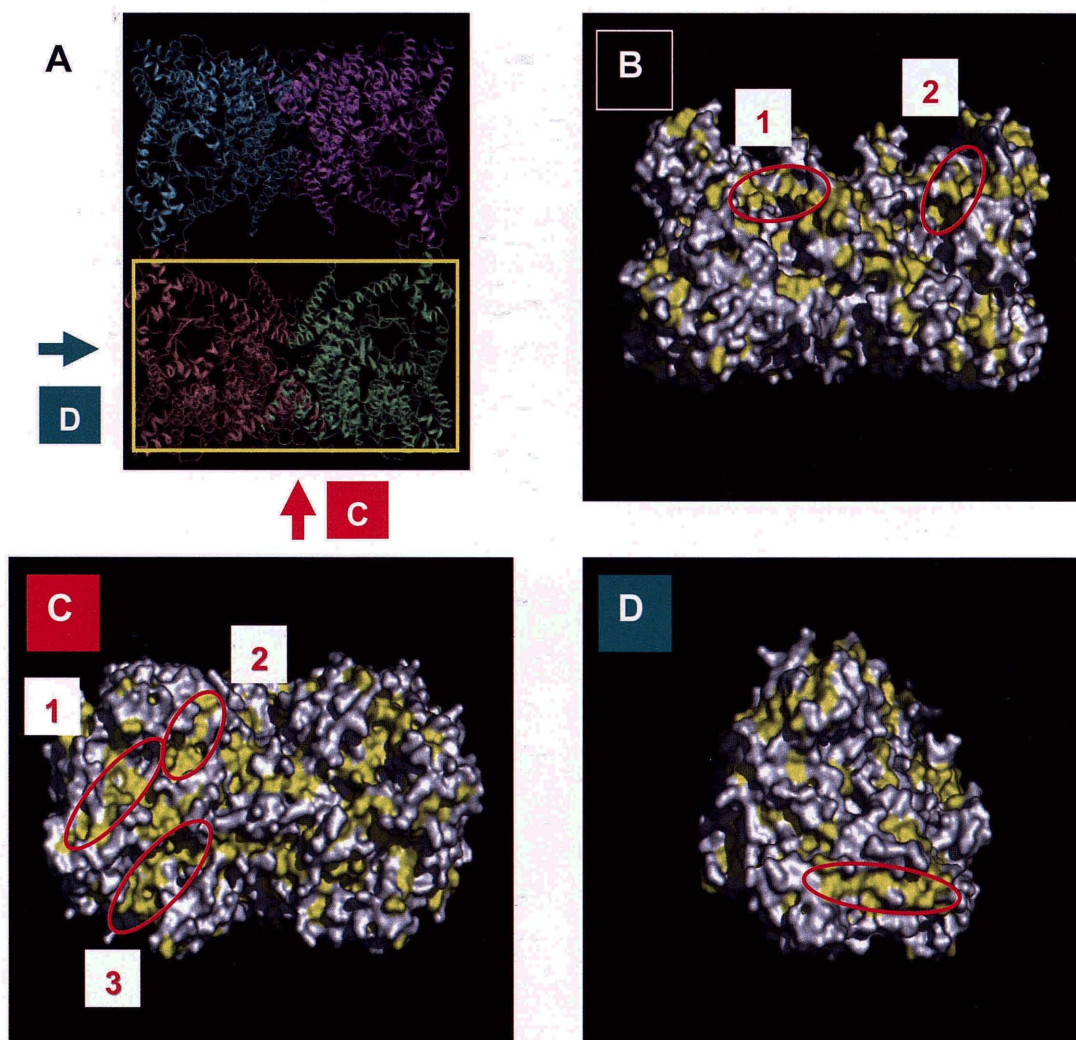


図4 大腸菌ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (EcPEPC)の分子表面に分布する疎水性アミノ酸残基。(A) 酵素の4量体構造をリボンモデルで示す。4つのサブユニットがダイマー-オブ-ダイマー構造をとっている。触媒部位およびアロステリック調節部位の位置は参考文献(15,16)を参照。図B, C, Dは、空間充填モデルで表した構造であり、図Aの黄色線で囲まれたダイマー部分をそれぞれ、真上、下、および左横からみた図である。黄色に彩色されたアミノ酸残基は、疎水性残基で、アラニン(A)、バリン(V)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、またはプロリン(P)からなる。赤色線で囲まれた疎水性領域は活性化物質の結合部位の候補として考えられる領域。各候補領域の構成アミノ酸残基とその番号は以下のとおり。図B-1、L194, V199, W273, A308, A309, L334; 図B-2、I469, A470, F497, P500; 図C-1、A772, L818, F771, I806, L810, A811, V808, V742; 図C-2、V12, A82, L831, I834; 図C-3、A594, L597, A641, L643, L644, P645; 図D、V662, I663, V667, W792, P793, L794, Y671, L801.

(アラニン(A)、バリン(V)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、プロリン(P)) で表面に露出しているものを黄色で示した。灰色は影でくぼんだ部分である。図は4量体の半分の2量体部分(図4Aの矩形で囲んだ部分)を上から(図4B)、下から(図4C)および左から(図4D)みた分子表面を示す。図中赤い線で囲まれた領域は比較的疎水性アミノ酸残基が集積し、活性化物質の結合部位の候補と考えられる部位である。今後これらの部位に変異を導入することによって、活性化物質の結合部位を同定すれば、その部位にさらに改良を加えて環境ホルモンを含めて種々の脂溶性物質に対する特異性を高めた変異酵素が作成できるであろうと期待される。それができれば、種々の環境物質を鋭敏かつ迅速に酵素の活性の変化として測定できるようになるであろう。

4. 4 本研究の意義

本研究は、約30年前にプラスチック製品から生体触媒である酵素活性に影響を及ぼす物質が溶出するという偶然発見したことに端を発している。その発見の意外性・新奇性そのものに学問上の価値があったかもしれない。当時、プラスチック製品からの溶出物の有害性が指摘されはじめていたことから、著者らの知見が溶出物の有無を迅速かつ簡便に検知する方法として役立つ可能性があるのではないかと考え、いくつかのプラスチック製品について検討したのであった⁽¹¹⁾。その後多くの改良が加えられたと考えられる現在、この検知法を用いて現在市販されているプラスチック製品について再び検討したのが本研究である。本研究によって、ラップフィルム、クッキングシート、フードパックなど比較的最近市販されるようになったものから、有意に活性化物質の溶出がおこることを見出した。溶出のみられない同等製品もあった。フードパックについては、これまで溶出物の報告はなかったようである。今後、溶出した物質が生体に無害なものかどうかは、その物質の同定を経て確認される必要があるであろう。長鎖脂肪酸やそのエステルなどは大部分無害であろうが、分枝脂肪酸、エポキシ化脂肪酸、パーフルオロオクタン酸など有害性が疑われているもの⁽²⁰⁾も含まれている可能性がある。

著者らは、今回の研究によって、もしかすると脂質性シグナル物質のアゴニストまたはアンタゴニストとして微量でも生体に影響するおそれのある物質が、食品と直接接触するプラスチック製品から溶出する可能性について危惧するものである。また、長鎖脂肪酸が調節因子として阻害的に作用することが多くの酵素について知られているのでこれらについても溶出物が作用する可能性もある。厚生省告示第370号(昭和34年12月28日付け)によって食品、添加物等の規格基準およびその方法が定められており、最近ではフタル酸エステル類の使用を禁じる一部改正も行われている。しかし、これらの方法はすべてかなり大掛かりであり、所要時間も長く、微量で生体機能に影響するような物質の検知には全く役立たない。著者らの検知法は不完全でスクリーニングには使用できないが、微量の溶出物の有無を簡単にチェックする一つの独立の方法として役立つかもしれない。本研究に用いた酵素(EcPEPC)にさらに改良を加えれば、種々の物質をある程度の特異性をもって鋭敏かつ迅速に検出し定量できるようになると期待される。

最後に、著者らの私見であるが、プラスチック製品から溶出する合成化学物質は、たとえその有害性が現時点では証明されていない、いわゆるポジティブリストに上がっていても、消費者が全く知らないうちに経口摂取している事態は長い目でみると決して好ましくないのではなかろうか。利便性を多少損なってでも、溶出物質をできるだけ減らした食品包装用プラスチック製品の開発が望まれる。

謝 辞

本研究を公表するにあたり、多くの有益な助言をいただきました近畿大学生物理工学部、泉秀実教授、ならびに元国立医薬品食品衛生研究所、津村ゆかり博士に厚く御礼申し上げます。また、医療用プラスチック製品の入手にご尽力いただいた竹内化学(株)の鳥居隆志氏およびこれらの製品を恵みいただいたテ

ルモ社およびニプロ社に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- (1) Jaeger, R. J. and Rubin, R.J.(1972) Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *N Engl J Med.* 287, 1114-1118.
- (2) Neergaard, J., Nielsen, B., Faurby, V., Christensen, D. H., Nielsen, O. F. (1971) Plasticizers in P.V.C. and the occurrence of hepatitis in a haemodialysis unit. A preliminary communication. *Scand J Urol Nephrol.* 5, 141-145.
- (3). Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P. (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* 103, 582-587.
- (4) Borch, J., Metzdorff, S.B., Vinggaard, A.M., Brokken, L., Dalgaard, M. (2006) Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 223, 144-155.
- (5) Takeshita, A., Inagaki, K., Igarashi-Migitaka, J., Ozawa, Y., Koibuchi, N. (2006) The endocrine disrupting chemical, diethylhexyl phthalate, activates MDR1 gene expression in human colon cancer LS174T cells. *J Endocrinol.* 190, 897-902.
- (6) Kambia, K., Dine, T., Azar, R., Gressier, B., Luyckx, M., Brunet, C. (2001) Comparative study of the leachability of di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate from haemodialysis tubing. *Int J Pharm.* 229, 139-146.
- (7) Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Kaihara, A., Yoshii, K., Nakamura, Y., Tonogai, Y. (2001) Di(2-ethylhexyl) phthalate contamination of retail packed lunches caused by PVC gloves used in the preparation of foods. *Food Addit Contam.* 18, 569-79.
- (8) De Haan, R. L. (1971) Toxicity of tissue culture media exposed to polyvinyl chloride plastic. *Nature New Biology* 231, 85-86.
- (9) Al-Khatim, A. S., Al-Hachim, G. M. (2001) Effects of oil plastic extract on mice. *Int J Environ Health Res.* 11, 73-80.
- (10) Izui, K. (1973) Effects of high pressure on the stability and activity of allosteric phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 73, 505-513.
- (11) 香月裕彦、泉井桂、日高公雄 (1981) 高分子材料とくにポリ塩化ビニル製品からの溶出物の酵素による検知。『医用高分子材料』(医用高分子材料編集委員会編) pp. 564-570.
- (12) Izui, K., Yoshinaga, T., Morikawa, M. and Katsuki, H. (1970) Activation of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli* by fatty acids or their coenzyme A derivatives. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 40, 949-956.
- (13) Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihara, A., Tsumura, K. and Izui, K. (1999) Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 823-328.
- (14) Matsumura, H., Xie, Y., Shirakata, S., Inoue, T., Yoshinaga, T., Ueno, Y., Izui, K. and Kai, Y. (2002) Crystal structures of C4 form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. *Structure.* 10, 1721-1730.
- (15) Kai, Y., Matsumura, H. and Izui, K. (2003) Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms (Review). *Arch Biochem Biophys.* 414, 170-179.
- (16) Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T. and Kai, Y. (2004) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol.* 55, 69-84.

-
- (17) Terada, K., Fujita, N., Katsuki, H. and Izui, K. (1995) Construction of a plasmid for high level expression of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 735-737
- (18) 佐藤麻紀 (2004) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのリン酸化による活性調節機構の研究：リン酸化による活性調節能の微生物酵素への付与の試み。2003年度京都大学農学部応用生物科学科卒業論文
- (19) Terada, K. and Izui, K. (1991) Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residue of phosphoenolpyruvate carboxylase: His 138 is essential for the second partial reaction. *Eur. J. Biochem.* 202, 797-803.
- (20) 尾崎麻子 (2006) 器具・容器包装と食品衛生—最近のトピックスを中心に— 生活衛生 (Seikatsu Eisei) 50, 365-371.

英文抄録

Migration of Some Enzyme-activating Substance from Plastic Food Packages to a Contacting Aqueous Buffer Solution

Hiroki Tokunaga¹, Hiroyoshi Matsumura², Yasushi Kai² and Katsura Izui¹

Plastic goods are very convenient and now widely used in our daily life. On the other hand, we must be cautious about the migration of additives from these goods, which might be harmful for our health or pollute our environment. Since food packages such as wrapping films, cooking sheets and containers directly contact with food, special attention should be paid to the migration of additives to food. About 30 years ago, we noticed that some substance was migrated from various plastic goods to an aqueous buffer solution when contacted for short time, which caused an activation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase (EcPEPC) [EC4.1.1.31] presumably in an allosteric manner. We proposed that this activation could be used as one of the simple and sensitive methods to detect the migration substance. Since then numerous efforts have been made to minimize the migration and many kinds of plastic goods have been developed. In this paper we re-examined whether there were still found the migration of activating substance from the plastic goods now in use. The results were as follows: 1) Among 7 kinds of soft plastic tubes for laboratory use, the migration was detected only with the tube of polyvinyl chloride. 2) No migration was observed with all of the plastic goods for medical use such as hemodialyzers and transfusion bags. 3) Among 5 kinds of food wrapping films, a film made of polyvinylidene chloride showed a weak migration. One of the cooking sheets coated with silicone showed significant migration. 4) From all of the food containers tested, which were made of Biaxially Oriented Polystyrene (OPS), the migration of activating substance was most significant. Thus the present study revealed a possibility of migration of some additives to food from wrapping films, cooking sheets and food containers, though their nature and effects on cellular processes remain to be elucidated. Possible candidates for the activating substances were discussed based on the additives opened to the public. Furthermore, based on the three-dimensional structure of EcPEPC determined by us, the candidate sites for binding with the activating substance were discussed, since identification of the binding site and improvement of specificity and sensitivity of the enzyme by genetic engineering would provide a useful tool for detection of the migration compounds.

1. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan