

- 11) R. Pardal, M.F. Clarke, S.J. Morrison : *Nat. Rev. Cancer*, **3**, pp.895-902(2003).
- 12) D. Rubio, J. Garcia-Castro, M.C. Martin, R. Fuente, J.C. Cigudosa, A.C. Lloyd, A. Bernad : *Cancer Res.*, **65**, pp.3035-3039(2005).
- 13) R. Sawada, T. Ito, T. Tsuchiya : *J. Artif. Organs*, **9**, pp.179-184(2006).
- 14) T. Ito, R. Sawada, Y. Fujiwara, Y. Seyama, T. Tsuchiya : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359**, pp.108-114(2007).
- 15) K. R. Shibata, T. Aoyama, Y. Shima, K. Fukiage, S. Otsuka, M. Furu, Y. Kohno, K. Ito, S. Fujibayashi, M. Neo, T. Nakayama, T. Nakamura J. Toguchida : *Stem Cells*, **25**, pp.2371-2382(2007).
- 16) 澤田留美, 伊藤友実, 土屋利江 : 幹細胞を用いた細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性評価に関する研究, 再生医療, 日本再生医療学会雑誌, 6 Suppl, p.225(2007)
- 17) M. Ishii, C. Koike, A. Igarashi, K. Yamanaka, H. Pan, Y. Higashi, H. Kawaguchi, M. Sugiyama, N. Kamata, T. Iwaya, T. Matsubara, K. Nakamura, H. Kurihara, K. Tsuji, Y. Kato : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, pp.297-303(2005).
- 18) A. Igarashi, K. Segoshi, Y. Sakai, H. Pan, M. Kanawa, Y. Higashi, M. Sugiyama, K. Nakamura, H. Kurihara, S. Yamaguchi, K. Tsuji, T. Kawamoto, Y. Kato : *Tissue Eng.*, **13**, pp.2405-2417(2007).

Chapter 16

Gamma-ray Irradiated Poly(L-lactide) for Bone Repair

Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya
National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

1 Introduction

Poly(L-lactide) (PLLA) with a high molecular weight is used as biodegradable screws, pins and plates for internal bone fixation in the orthopedics. PLLA has been well reported on a good osteocompatibility *in vivo* and *in vitro*. The γ -ray irradiated PLLA sample was implanted *in vivo*, and newly bone was formed around the PLLA implant [1]. It was not clear whether there was the effect of γ -irradiation on the formation of newly bone in this result. However, it was the fact that γ -irradiation decreased the molecular weight and mechanical strength of PLLA. If the satisfied mechanical property was maintained, the γ -irradiation was suitable for PLLA devices. We performed the wear test of the γ -irradiated PLLA sheets and measured the particle size distribution of wear debris. On the other hand, PLLA fibers formed bone-like apatite in a simulated body fluid [2]. It was reported that the apatite layer formed on the bioactive glass increased the attachment and initial proliferation of osteoblasts [3]. If the apatite-forming ability of PLLA is increased by γ -irradiation, there may be a good influence on osteoblasts cultured on the irradiated PLLA. We clarified the effects of the γ -irradiated PLLA sheet on the osteoblasts and apatite formation *in vitro*.

2 Wear Characteristic of the Gamma-ray Irradiated PLLA Sheets

2.1 Gamma-ray Irradiation of the PLLA Sheets

The PLLA sheets made of high molecular weight PLLA with thickness of 0.3 mm were obtained from Shimadzu Co. (Kyoto, Japan). The PLLA sheets were γ -ray irradiated at the dose of 10, 25 or 50 kGy using ^{60}Co as the radiation source. The γ -irradiated PLLA sheets were preserved in the silica gel desiccator until next measurement.

2.2 Molecular Weight of the PLLA

The molecular weight of the γ -ray irradiated PLLA was determined by gel permeation chromatography. The polydispersity index was calculated as the ratio of the weight average molecular weight (M_w) to the number average molecular weight (M_n). The M_w of the γ -irradiated PLLA extremely decreased with the increasing irradiation dose. The M_w of 271,000 of the unirradiated PLLA was decreased to 95,000 by irradiation at 50 kGy. In contrast, the polydispersity index of the γ -irradiated PLLA was confined to the slight increase with the increasing irradiation dose, compatible with a random cleavage in the degradation mechanism [4–6]. Yoshioka et al. reported γ -irradiation of PLLA caused random cleavage of molecular chain with hydrolysis of ester bonds. In addition, they detected decomposition products having a molecular weight higher than lactic acid in alkali hydrolysis products of irradiated PLLA, and they suggested crosslinkage of molecular chain also occurred [7, 8]. We also analyzed of the γ -irradiated PLLA by high performance liquid chromatography after alkali hydrolysis. However, the quantity of decomposition products having a molecular weight higher than lactic acid was extremely slight. Otto et al. also observed that the molecular weight of PLLA was decreased from 160,000 to 35,200 by γ -irradiation at 25 kGy [9]. Thus, γ -irradiation caused cleavage for molecular chain and decreased the molecular weight of PLLA.

2.3 Wear Test

The PLLA sheets were cut out in the disk with the 14.0 mm diameter, and glass column of 11.0 mm diameter and 2.5 g weight was bonded on each PLLA disk. Then, the PLLA specimen was put in the cylindrical vessel of the 30.0 mm inside

diameter, in which bottom plane was #400 waterproof abrasive paper. Five milliliter of balanced electrolyte solution was added in the cylindrical vessel, and the whole vessel was gyrated of 15 mm radius at 200 rpm for 1 hour using a rotatory shaker.

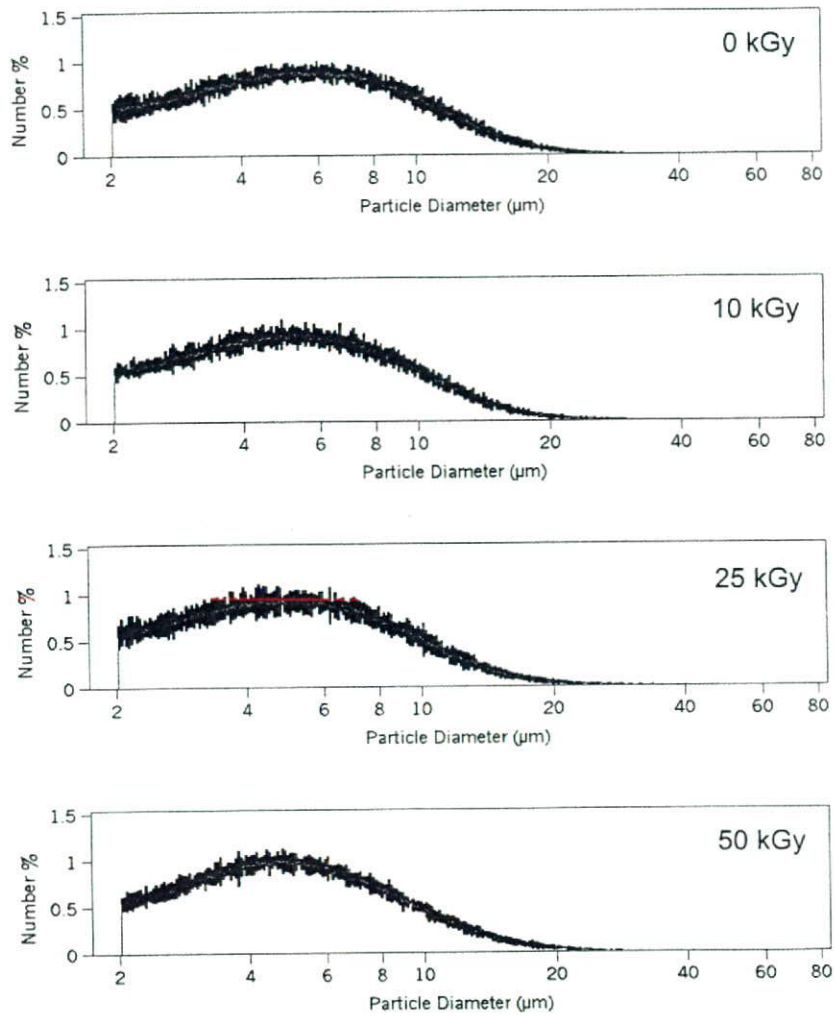


Figure 1. The particle size distribution of wear debris derived from the γ -irradiated PLLA sheet. The center line showed the mean, and the vertical width showed the mean \pm 2SD ($n = 9$).

2.4 Coulter Counter Analysis of Wear Debris

The particle size of PLLA wear debris in balanced electrolyte solution obtained by wear test was measured using the Coulter counter. The orifice tube with nominal aperture diameter of 100 μm was used and the particle diameter was measured in the range of 2–60 μm . The particle size distribution was obtained from mean number of each particle diameter. The mean particle diameter of PLLA wear debris was calculated from 9 times experiment.

2.5 Particle Size Distribution of Wear Debris from the PLLA Sheets

The particle size distributions of wear debris derived from the γ -ray irradiated PLLA sheets were shown in Fig.1. With the increasing irradiation dose, the particle size distribution of wear debris derived from irradiated PLLA shifted toward the smaller diameter size. The relationship between the irradiation dose of PLLA and the mean diameter of PLLA wear debris was shown in Fig.2. The mean diameter of PLLA wear debris was decreased 9.3% by irradiation at 50 kGy. The mean diameter of PLLA wear debris significantly decreased ($P < 0.0001$ by ANOVA) with the increasing irradiation dose. The tensile strength of irradiated PLLA also decreased with the increasing irradiation dose [4]. When the abrasive wore the PLLA specimen, the surface of PLLA would be easily cracked, because the tensile strength was lower. In fact, the minute crack had been observed on the surface of the 50 kGy irradiated PLLA disk,

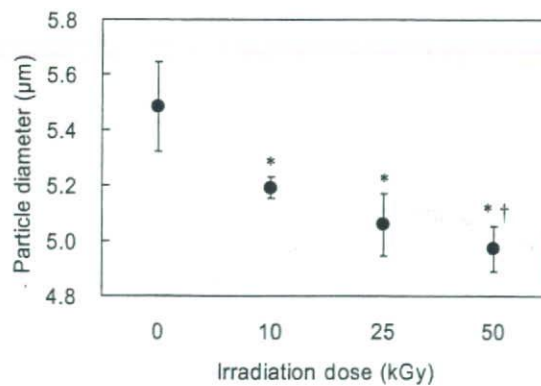


Figure 2. The effect of γ -ray irradiation on particle size distribution of PLLA wear debris. *Significant difference compared with unirradiated PLLA at $P < 0.01$. †Significant difference compared with 10 kGy irradiated PLLA at $P < 0.01$.

microscopically. Therefore, the decrease of tensile strength of PLLA by the γ -irradiation caused the decrease in particle diameter of PLLA wear debris.

3 Apatite Formation on the Gamma-ray Irradiated PLLA Sheets

3.1 Soaking in the Acellular Medium

The PLLA sheet was cut into 14.0 mm diameter disk and laid in a 24-well dish. The complete medium of 1 ml was added without the cells. Then, the dish was stored in a 37°C humidified atmosphere of 5% CO₂, and the complete medium was changed three times a week. After soaking for 2 weeks, the PLLA disk was washed in deionized water five times quickly and dried in a silica gel desiccator.

3.2 Surface Analysis

The surface of the PLLA sheet before and after soaking in the complete medium without the cells was characterized by scanning electron microscope (SEM), energy dispersive X-ray analysis (EDX), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) according to the conventional methods.

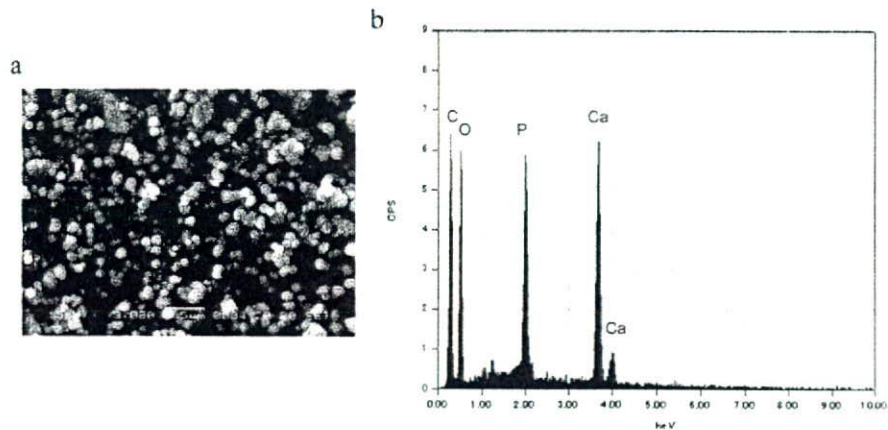


Figure 3. The SEM image (a) and the EDX spectrum (b) of the PLLA sheet after soaking in the acellular medium for 2 weeks.

3.3 Apatite Formation on the PLLA Sheets in the Acellular Medium

The SEM micrograph exhibited crystal particles on the surface of the PLLA sheet after soaking in the complete medium without the cells (Fig.3a). The crystal particles were identified with hydroxyapatite by EDX, FT-IR and XPS spectra (Fig.3b). The phosphate band in attenuated total reflection (ATR)/FT-IR spectra became strong with irradiation dose (Fig.4a). Moreover, the element ratios of calcium and phosphorus increased but that of carbon decreased with irradiation dose, in XPS analysis (Fig.4b). The amount of hydroxyapatite formed on the γ -ray irradiated PLLA sheet increased with irradiation dose [10].

3.4 Surface Carboxyl Group on the PLLA Sheets

The surface carboxyl group on the γ -ray irradiated PLLA sheets was determined by XPS in combination with chemical derivatization. The carboxyl group content of the PLLA surface was increased by γ -irradiation.

The γ -irradiation increased the apatite-forming ability of the PLLA sheet. Tanahashi and Matsuda reported that some negatively charged groups such as phosphate and carboxyl group strongly induced apatite formation in a simulated body fluid. They described that the apatite formation was initiated via calcium ion-absorption upon complexation with a negative surface-charged group [11]. In our study, the molecular weight of PLLA decreased with hydrolysis of ester bonds by γ -irradiation [4]. Therefore, the surface density of carboxyl group of the γ -irradiated PLLA sheets increased with irradiation dose, and the carboxyl group would promote the apatite-forming ability of the PLLA sheet.

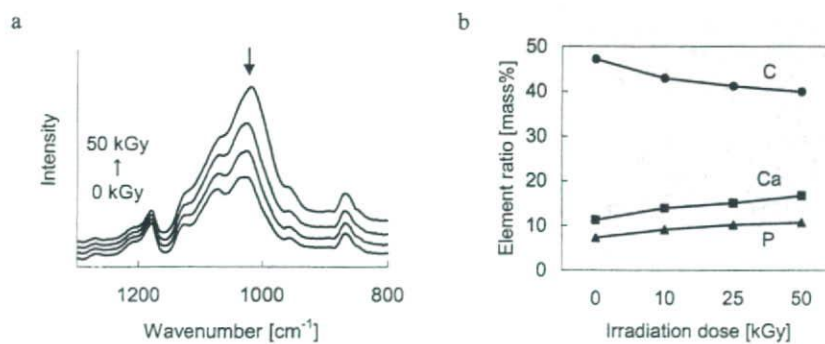


Figure 4. The phosphate band (a) and the element ratios of calcium, phosphorus and carbon of the γ -irradiated PLLA sheet after soaking in the medium.

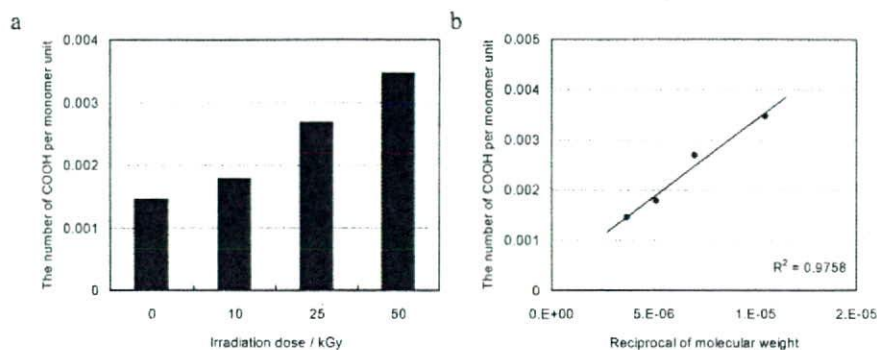


Figure 5. The surface density of carboxyl group of the γ -irradiated PLLA sheets by XPS with chemical derivatization (a) and the relation between the surface density of carboxyl group and the molecular weight of the γ -irradiated PLLA sheet (b).

4 Osteoblast Differentiation on the Gamma-ray Irradiated PLLA Sheets

4.1 *Micromass Culture of Osteoblasts*

Mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells (RIKEN Cell Bank, Japan) and normal human osteoblast NHOst cells (Clonetics Corporation, MD, USA) were grown in alpha minimum essential medium (α -MEM) supplemented with 20% fetal bovine serum. The PLLA sheet was cut into 14.0 mm diameter disk and laid in a 24-well dish. The 20 μ l of cell suspension (2×10^6 cells/ml) was delivered on the disk. After the cells were attached on the disk, 1 ml of the complete medium that contained 10 mM disodium β -glycerophosphate in the culture medium was added. The complete medium was changed three times a week, and the cells cultured for 2 weeks in a 37°C humidified atmosphere of 5% CO₂.

4.2 *Assay of Proliferation and Differentiation of Osteoblasts*

The cell proliferation was estimated with the cell number, the protein and DNA content. The number of the cells cultured on the PLLA sheet was determined by WST-8 assay. The protein and DNA contents of the cell lysate were measured by the Lowry method and the fluorescence assay using Hoechst 33258 dye, respectively [12, 13].

The osteoblastic differentiation was estimated with the calcification, the collagen synthesis and the alkaline phosphatase (ALP) activity. The calcium depositions of the cell cultures were stained by alizarin red S, and the areas stained dark-red were measured. The calcification was calculated as the normalized area in the cell number. Moreover, the collagen synthesis was evaluated by the hydroxyproline content of the cell lysate, and the ALP activity of the cells was measured using p-nitrophenylphosphate as a substrate [12, 13]. The osteoprogenitor cells first differentiate into immature osteoblasts characterized by the expression of ALP and then into mature osteoblasts characterized by the expression of osteocalcin and calcification [14].

4.3 Osteoblasts Cultured on the PLLA Sheets

The cell number of MC3T3-E1 cells cultured on the PLLA sheet did not change with increasing irradiation dose (Fig.6a). The protein and DNA contents of the cells also did not change. The other side, the cell number, protein and DNA contents of NHOst cells cultured on the PLLA sheet slightly decreased with irradiation dose (Fig.6b). The calcification of MC3T3-E1 cells (Fig.7a) and

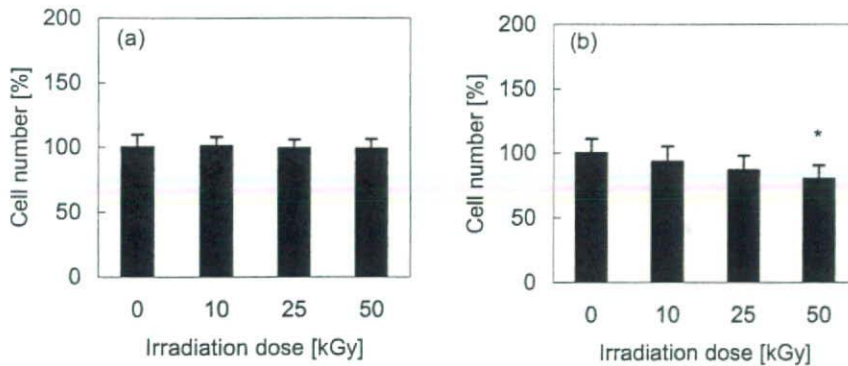


Figure 6. The cell numbers of (a) MC3T3-E1 and (b) NHOst cells cultured on the γ -irradiated PLLA sheet.

NHOst cells (Fig.7b) remarkably increased with irradiation dose. The collagen synthesis and ALP activity of MC3T3-E1 and NHOst cells also increased as same as the calcification, respectively [12, 15]. The γ -ray irradiated PLLA remarkably promoted the differentiation of osteoblasts. The γ -irradiated PLLA

hardly affected the proliferation but remarkably promoted the differentiation of osteoblasts. It was expected that the low molecular weight PLLA eluted to the medium, because the molecular weight of PLLA decreased by γ -irradiation. Otto et al. also reported when mouse osteoblastic cells were cultured with γ -irradiated PLLA wire for 48 hours, DNA content did not change, but ALP activity increased by 28% [16].

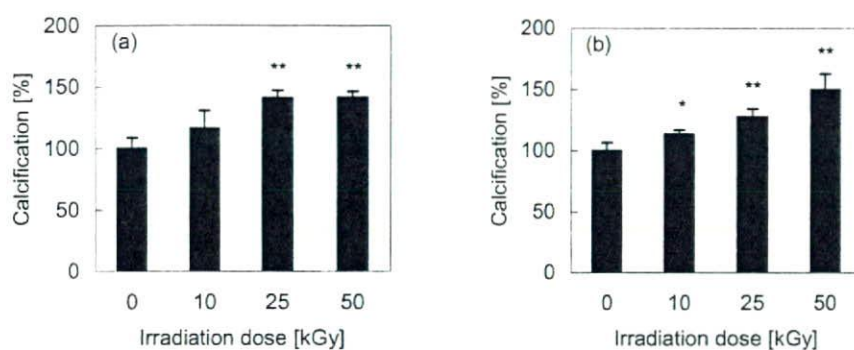


Figure 7. The calcifications of (a) MC3T3-E1 and (b) NHOst cells cultured on the γ -irradiated PLLA sheet.

Ikarashi et al. reported that heat treatment of PLLA did not affect the proliferation of MC3T3-E1 cells cultured on heat treated PLLA, but the differentiation of MC3T3-E1 cells was increased. They described that lower change in the molecular weight of PLLA was a cause of stimulation of MC3T3-E1 cells cultured on the heat treated PLLA [17].

Moreover, they reported that the low molecular weight PDLA did not affect the proliferation, but increased the differentiation of MC3T3-E1 cells. They also indicated that low molecular weight PDLA stimulated the differentiation of MC3T3-E1 cells [18]. In our recent studies, the low molecular weight PLLA enhanced the differentiation of MC3T3-E1 cells but inhibited that of NHOst cells [14, 19]. The present results, which the differentiations of MC3T3-E1 and NHOst cells both increased on the γ -irradiated PLLA sheet, would not be caused by the low molecular weight PLLA. The surface of the γ -irradiated PLLA should good influence on the differentiation of osteoblasts.

Fujibayashi et al. compared *in vivo* bone ingrowth and *in vitro* apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses. The quantities of newly bone formed on the glasses correlated with their apatite-forming abilities in simulated body fluid. They propose to evaluate the apatite-forming ability in order to confirm the *in vivo* bioactivity of biomaterials [20]. In our present study, the γ -irradiation enhanced the apatite-forming ability of the PLLA sheet, and then the γ -irradiated PLLA sheet promoted the differentiation of osteoblasts. The osteoblast differentiation should connect with the apatite formation on the γ -irradiated PLLA sheet.

5 Conclusions

The molecular weight of PLLA decreased with the increasing irradiation dose. In addition, the particle size distribution of PLLA wear debris shifted toward the smaller diameter size, and the mean diameter of PLLA wear debris significantly decreased, with the increasing irradiation dose. It was indicated that the lowering of the molecular weight by γ -ray irradiation caused the decrease in tensile strength of irradiated PLLA and the particle size of PLLA wear debris derived from irradiated PLLA.

The hydroxyapatite was formed on the PLLA sheet in the acellular medium, and the γ -irradiation enhanced apatite-forming ability of the PLLA. On the other hand, the γ -irradiated PLLA hardly affected the proliferation but promoted the differentiation of osteoblasts with increasing irradiation dose. It was suggested that the connection between the apatite formation and the osteoblast differentiation on the γ -irradiated PLLA sheets.

Acknowledgments

A part of this study was financially supported by the Budget for Nuclear Research of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, based on the screening counseling by the Atomic Energy Commission, and supported by Health Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health Labour and Welfare.

References

1. Otto T.E., Patka P., Haarman H.J.Th.M., Klein C.P.A.T., Vriesde R., 1994. Intramedullary bone formation after polylactic acid wire implantation, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 5, 407–410.
2. Yuan X., Mak A.F.T., Li J., 2001. Formation of bone-like apatite on poly(L-lactic acid) fibers by a biomimetic process, *J. Biomed. Mater. Res.* 57, 140–150.
3. Olmo N., Martin A.I., Salinas A.J., Turnay J., Vallet-Regi M., Lizarbe M.A., 2003. Bioactive sol-gel glasses with and without a hydroxycarbonate apatite layer as substrates for osteoblast cell adhesion and proliferation, *Biomaterials* 24, 3383–3393.
4. Isama K., Tsuchiya T., 2001. Change in the particle size distribution of poly(L-lactide) wear debris by γ -ray irradiation, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* 119, 61–64.
5. Reich G., 1998. Ultrasound-induced degradation of PLA and PLGA during microsphere processing: influence of formulation variables, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 165–171.
6. Mohr D., Wolff M., Kissel T., 1999. Gamma irradiation for terminal sterilization of 17beta-estradiol loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles, *J. Control. Release.* 61, 203–217.
7. Yoshioka S., Aso Y., Otsuka T., Kojima S., 1995. The effect of γ -irradiation on drug release from poly(lactide) microspheres, *Radiat. Phys. Chem.* 46, 281–285.
8. Yoshioka S., Aso Y., Kojima S., 1995. Drug release from poly(*dl*-lactide) microspheres controlled by γ -irradiation, *J. Control. Release.* 37, 263–267.
9. Otto T.E., Patka P., Haarman H.J.Th.M., Klein C.P.A.T., Vriesde R., 1994. Intramedullary bone formation after polylactic acid wire implantation, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 5, 407–410.
10. Isama K., Tsuchiya T., 2005. Osteoblast differentiation and apatite formation on gamma-irradiated PLLA sheets, *Key Eng. Mater.* 288–289, 409–412.
11. Tanahashi M., Matsuda T., 1997. Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid, *J. Biomed. Mater. Res.* 34, 305–315.
12. Isama K., Tsuchiya T., 2002. Effect of γ -ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 13, 153–166.
13. Isama K., Matsuoka A., Haishima Y., Tsuchiya T., 2002. Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity to fibroblast L929 and V79 cells, *Mater. Trans.* 43, 3155–3159.
14. Isama K., Ikarashi Y., Tsuchiya T., 2002. Surface analysis and osteoblast function on gamma-ray irradiated poly(L-lactide), *BIO INDUSTRY* 19, 21–29.

15. Thompson G.J., Puleo D.A., Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation timecourse in vitro, *Biomaterials* 17, 1949–1954.
16. Otto T.E., Nulend J.K., Patka P., Burger E.H., Haarman H.J.Th.M., 1996. Effect of (poly)-L-lactic acid on the proliferation and differentiation of primary bone cells in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.* 32, 513–518.
17. Ikarashi Y., Tsuchiya T., Nakamura A., 2000. Effect of heat treatment of poly(L-lactide) on the response of osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *Biomaterials* 21, 1259–1267.
18. Ikarashi Y., Tsuchiya T., Kaniwa M., Nakamura A., 2000. Activation of osteoblast-like MC3T3-E1 cell responses by poly(lactide), *Biol. Pharm. Bull.* 23, 1470–1476.
19. Isama K., Tsuchiya T., 2003. Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *Biomaterials* 24, 3303–3309.
20. Fujibayashi S., Neo M., Kim H.M., Kokubo T., Nakamura T., 2003. A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses, *Biomaterials* 24, 1349–1356.

レター/速報

アクセサリ類を除く金属
製品に含有する鉛およびカ
ドミウムの分析調査

伊佐間和郎
鹿庭正昭
土屋利江

国立医薬品食品衛生研究所

原稿受付日 2008年6月30日

原稿受領日 2008年9月3日

はじめに

金属製アクセサリ類等については、2006年3月に、東京都が鉛の含有に関する調査結果を公表し、鉛含有金属製アクセサリ類等の問題を提起した¹⁾。その後、厚生労働省が国立医薬品食品衛生研究所による試買調査²⁾を実施し、国内で鉛を高濃度に含有する金属製アクセサリ類等が販売されていることが確認された³⁾。また、カドミウムを高濃度に含有する金属製アクセサリ類等も確認された⁴⁾。

厚生労働省は、2006年6月に、「鉛含有金属製アクセサリ類等の安全対策に関する検討会」を設置し、子供の誤飲による健康被害を防止するための対応策を検討した。2007年2月に取りまとめられた報告書⁵⁾において、対応策の一つとして情報収集の充実があげられた。そこで、乳幼児が触れやすい状態で置かれる金属製品および部品について、鉛およびカドミウム

を含有する製品範囲の特定とその含有量の測定を行うことを目的として、アクセサリ類を除く金属製品に含有する鉛およびカドミウムの分析調査を実施した。

方 法

検 体 アクセサリ類を除く金属製品(212製品)および、それらの容易に分離可能な金属部品のうち、食品衛生法に基づくおもちゃの規格基準に規定する円筒(内径31.8mm、高さ25.4~57.2mm)に納まり、乳幼児が飲み込むおそれがあるものを検体(312検体)とした。製品の分類は日本標準商品分類に従った。

蛍光X線分析(XRF) 三次元偏光光学系をもつエネルギー分散型XRF装置 PANalytical Epsilon 5(スペクトリス株式会社)を使用した。検体は厚さ6 μ mのポリプロピレンフィルムに挟んでサンプルカップに固定し、真空下で測定した。ファンダメンタルパラメーター法を用いて定性定量した⁶⁾。

結 果

鉛 製品分類別の鉛含有量の集計結果を表1に示した。鉛含有量が米国消費者製品安全委員会(Consumer Product Safety Commission、以下CPSCと略す)の金属製子供用アクセサリの暫定指針の0.06%を超える製品の割合は、文具および事務用具(33/59)、家具等付属品(20/50)および裁縫用小物用具(18/87)に多かった。文具および事務用具ではボールペン(21/30)およびシャープペンシル(7/10)、家具等付属品では南京錠(3/4)、タナダボ(4/6)、フック(3/5)およびネジ・ワッシャー(5/19)、裁縫用小物用具ではボタン(11/44)およびファスナー引き手(3/12)などに多かった。

カドミウム 製品分類別のカドミウム含有量の集計結果を表2に示した。金属製子供用アクセサリのカドミウム含有量の基準はないが、カドミウム含有量が欧州連合(EU)の電気電子機器に含まれる特定有害物質の使用制限に関するRoHS指令(the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and elec-

表 1 製品分類別の鉛含有量

製品分類	製品数 (検体数)	0.06%*以下	0.06%超 0.6%以下	0.6%超 6%以下	6%超
裁縫用小物用具	87(118)	69(100)	8(8)	8(8)	2(2)
文具および事務用具	59(92)	26(55)	10(14)	23(23)	0(0)
家具等付属品	50(74)	30(51)	7(10)	13(13)	0(0)
装身具	14(26)	13(25)	0(0)	0(0)	1(1)
スポーツ用具	2(2)	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)
合計	212(312)	140(233)	25(32)	44(44)	3(3)

*米国 CPSC の金属製子供用アクセサリーの暫定指針が規制する鉛含有量

表 2 製品分類別のカドミウム含有量

製品分類	製品数 (検体数)	0.01%*以下	0.01%超 0.1%以下	0.1%超 1%以下	1%超
裁縫用小物用具	87(118)	80(111)	7(7)	0(0)	0(0)
文具および事務用具	59(92)	52(85)	7(7)	0(0)	0(0)
家具等付属品	50(74)	46(70)	1(1)	3(3)	0(0)
装身具	14(26)	14(26)	0(0)	0(0)	0(0)
スポーツ用具	2(2)	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)
合計	212(312)	194(294)	15(15)	3(3)	0(0)

*EU の RoHS 指令が規制するカドミウム含有量

tronic equipment) の 0.01% を超える製品の割合は、文具および事務用具(7/59)、裁縫用小物用具(7/87) および家具等付属品(4/50) に多かった。製品別では、鍵(3/6)、ボールペン(6/30)、ボタン(6/44)などに多かった。

考 察

カナダ保健省は、2005 年から全鉛量が 600 mg/kg および鉛溶出量が 90 mg/kg を超える子供用アクセサリーの輸入販売などを規制している⁷⁾。また、米国 CPSC は、2005 年に鉛含有量が 0.06% を超える金属製子供用アクセサリーは、鉛の酸溶出量を 175 $\mu\text{g/g}$ 以下とする暫定指針を示した⁸⁾。わが国では、2008 年 3 月に、食品衛生法が一部改正され、金属製のアクセサリーが器具のうち、乳幼児が飲み込むおそれがあるものは、鉛溶出量が 90 $\mu\text{g/g}$ 以下でなければならないと規制された⁹⁾。

鉛を含有する金属製アクセサリー類の問題が報道された 2006 年 3 月以降、日本中毒情報センターへの鉛に関する問い合わせは急増し

た¹⁰⁾。アクセサリー類以外では、金属製の飾り、小さな金属部品、ネジ類、スカートの金具などの問い合わせがあった¹⁰⁾。実際に今回の調査で、文具および事務用具、家具等付属品および裁縫用小物用具に鉛などを含有する製品が多いことが確認された。アクセサリー類に比べて含有量は少なく、また、溶出試験は実施していないが、鉛などの有害金属を含有する金属製品は広く家庭内に存在することを認識する必要がある。

謝辞：XRF 分析にご協力いただいた国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部・河村葉子室長および六鹿元雄主任研究官に深謝いたします。

文 献

- 1) 東京都生活文化局消費生活部生活安全課：金属製アクセサリー等、たしかな日 2006：241：40-2。
- 2) 厚生労働省：金属製アクセサリー類等に含有する鉛量に関する試買調査(概要)。http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/04/h0428-7.html

- (2006).
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室：金属製アクセサリ一類等における鉛の含有について. 中毒研究 2007 : 20 : 146-7.
 - 4) 伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 土屋利江：金属製アクセサリ一類等に含有するカドミウムの分析調査. 中毒研究 2006 : 19 : 409-11.
 - 5) 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室：鉛含有金属製アクセサリ一類等の安全対策に関する検討会報告書. <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/katei/Pb/Pdhoukokusyohonbun.pdf>(2007).
 - 6) 松田賢士, 水平 学, 山本信雄：蛍光X線による銅合金中有害金属の迅速分析. X線分析の進歩 2006 : 37 : 121-32.
 - 7) Health Canada : Enforcement Policy : Children's Jewellery Regulations under the Hazardous Products Act. http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/alt_formats/hecs-sesc/pdf/legislation/pol/jewel-bij/draft-ebauche_e.pdf(2005).
 - 8) U.S. Consumer Product Safety Commission : Interim enforcement policy for children's metal jewelry containing lead. <http://www.cpsc.gov/BUSINFO/pbjewelgd.pdf>(2005).
 - 9) 厚生労働省：食品, 添加物等の規格基準(おもちゃ). <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/kigu/dl/5.pdf>(2008).
 - 10) 飯塚富士子, 波多野弥生, 荒木浩之, 他：金属製アクセサリ一類等に含有される鉛による健康被害の懸念について. 中毒研究 2007 : 20 : 387-92.
-

高分子材料中のオクチル酸スズ (2-エチルヘキサン酸スズ) の分析

中島晴信^{*1} 沢辺善之^{*2} 伊佐間和郎^{*3} 土屋利江^{*3}

Tin octylate (tin 2-ethylhexanoate) is a compound widely used as the polymerization catalyst applicable to biodegradable polylactide plastics. To figure on the quantity of a residual tin octylate in medical materials, a quantitative determination method was established for octylic acid (2-ethylhexanoic acid) that is a decomposition product of tin octylate under an acid condition with hydrochloric acid. Octylic acid was extracted from the medical materials with a mixture of acetone and n-hexane (3:7) containing a small amount of hydrochloric acid by shaking overnight at 37°C. The extract was trimethylsilylated(TMS), and the TMS derivative was analyzed by GC/MS. A capillary column of DB-5 ms (0.25 mmφ X 25 m with a film thickness of 0.25μm) was used for GC, and the TMS derivative was determined using an ion of m/z 201 in the MS. Of four samples studied, TMS derivative of octylic acid was detected in two samples. Mean quantitative value converted into tin octylate was 134.4μg/g (n=3, CV=14.3%) and 6.5μg/g (n=3, CV=28.7%), respectively, which were detected at the same concentration level in the repeated analyses.

キーワード：2-エチルヘキサン酸スズ、2-エチルヘキサン酸、ポリ乳酸プラスチック、GC/MS、トリメチルシリル誘導体化

Key words : tin 2-ethylhexanoate, 2-ethylhexanoic acid, polylactide plastics, gas chromatography mass spectrometry, trimethylsilyl derivative

環境問題がクローズアップされる中で、環境に優しい生分解性プラスチックの開発が求められている。そこで、トウモロコシなどに多く含まれているポリ乳酸を用いて生分解性プラスチックの開発が進められている。その重合触媒として、有機スズ化合物や、オクチル酸スズ (2-エチルヘキサン酸スズ) が用いられている。ポリ乳酸プラスチックは、医用材料や食品用の容器包装プラスチック等の様々な用途に応用されている。オクチル酸スズは、比較的安全なスズ化合物と言われているが、安全性が確認されているわけではない。マウス小脳由来細胞を用いた安全性評価法も検討されて

いる¹⁾。プラスチックに残留するオクチル酸スズの量が多い場合には、安全性に問題があると考えられる。しかし、オクチル酸スズの残留量を測定した報告は見あたらない。オクチル酸スズは、塩酸酸性下でオクチル酸 (2-エチルヘキサン酸) とスズに分解する。そこで、分解したオクチル酸を安定な誘導体化物にしてGC/MSで測定する方法を検討した。その方法で、ポリ乳酸プラスチックに残留しているオクチル酸を分析した。

実験方法

1. 試料

ポリ乳酸プラスチック製品4試料を試験試料とした。

2. 試薬

標準試薬：オクチル酸スズ (2-エチルヘキサン酸スズ)、オクチル酸 (2-エチルヘキサン酸)、デカン酸は和光純薬工業 (株) 製を用いた。標準溶液系列は

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 生活環境部 生活衛生課

^{*2} 大阪府立公衆衛生研究所 食品医薬品部 薬事指導課

^{*3} 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

2,000 μ g/mlのn-ヘキサン標準原液を作製し、アセトン又は酢酸エチルで用時希釈調製した。

トリメチルシリル誘導体化試薬は、スペルコ製のSylon BBFT (BSTFA(N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide): TMCS=99:1)を用いた。アセトン、n-ヘキサンは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用を用いた。

3. GC/MS装置及び条件

GC/MS装置はHewlett Packard製5890 Series II GCに同社製MS検出器(HP MSD5971)を装着したものを、自動注入装置はHewlett Packard製7673型を用いた。GCカラムは、J&W社製のCapillary Column DB-5 ms(0.25mm ϕ ×25m、膜厚 0.25 μ m)を用いた。GC条件は、キャリアーガス流量がHe 2ml/min、メイクアップガス流量がHe 20ml/min、カラム温度が50 $^{\circ}$ C-10 $^{\circ}$ C/min-200 $^{\circ}$ C(20min)、注入温度が200 $^{\circ}$ C、インターフェイス温度が250 $^{\circ}$ Cとし、MS条件は、イオン化電圧:70eV(EI法)とした。注入方法はSplitlessで、注入量は1 μ lとした。

4. 試験溶液の調製

細切した試料0.5gを精秤し、50mlねじ口試験管に入れた。アセトン-ヘキサン(3:7)混液20mL及び濃塩酸2滴(200 μ l)を加え、内部標準物質としてデカン酸を添加した。試験管を密栓し、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽中で一晩振とう抽出した。抽出液をガラスフィルターで吸引ろ過し、ろ液をナス型フラスコに採った。更に、ねじ口試験管及びガラスフィルターをアセトン20~30mLで洗浄して、先のろ液と合わせた。その溶液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、ガラスフィルターで吸引ろ過し、ろ液をロータリーエバポレータで1mlまで減圧濃縮(40 $^{\circ}$ C以下)した。その濃縮液(1ml)にTMS化試薬100 μ lを加え、室温で10分間反応させた後、GC/MSで測定した。

結果及び考察

1. オクチル酸スズの抽出

河村らは、プラスチック製品からの有機スズ化合物の抽出法を比較検討し、塩酸酸性下で、アセトン-n-ヘキサン混液(3:7)を使用した場合が、最も抽出効率

が高かったことを報告している²⁾。そこで、高分子材料からオクチル酸スズを抽出する方法として、この方法を用いることとした。オクチル酸スズは、塩酸酸性下では、37 $^{\circ}$ C、10分で、オクチル酸と塩化スズに加水分解される(Fig.1)。今回は、アセトン-n-ヘキサン混液に塩酸を添加し、生成したオクチル酸を定量し、その値から計算したオクチル酸スズの量を求めた。

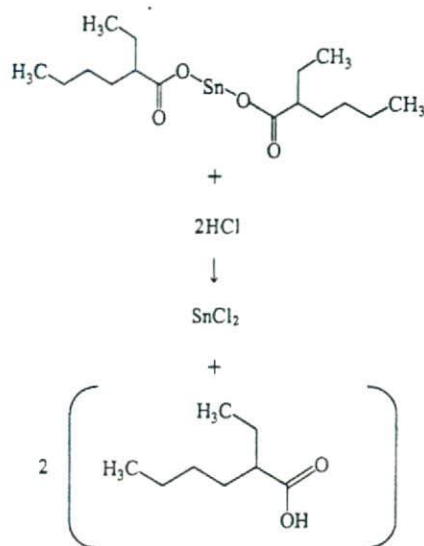


Fig.1. Chemical reaction of Tin(II) 2-ethylhexanoate under hydrochloric acid (Conditions for hydrolysis were 37 $^{\circ}$ C for 10 minutes at room temperature)

2. GC測定のためのトリメチルシリル(TMS)誘導体化

オクチル酸スズは、酸・アルカリや熱により分解し易いため、オクチル酸スズをGC法で直接分析した報告は見あたらない。今回、オクチル酸スズを誘導体化する方法をいくつか検討したが、反応途中でオクチル酸に分解してしまった。上述したように、オクチル酸スズは、塩酸酸性下で、オクチル酸と塩化スズに加水分解される。そこで、発生したオクチル酸をGC法で定量する条件を検討した。有機酸類のGC分析として極性カラムでの分析法が報告されている。そこで、TC-WAXカラム(0.25mm ϕ ×25m、膜厚 0.25 μ m、GLサイエンス社製)を用いて検討し、検出可能とした。そのトータルイオンクロマトグラム及びマススペクトルをFig.2に示す。このスペクトルは、GC/MSマスマイブライリーとも一致した。しかし、オクチル酸はカラム内で吸着分解され易く、低濃度では検出できなかった。また、このカラム内でオクチル酸スズは、熱により分解しオクチル酸を生じることも分かった。

オクチル酸を安定な誘導体にして低濃度まで検出す

る方法はいくつか報告³⁻⁸⁾されている。そこで今回は、トリメチルシリル(TMS)誘導体化して測定する方法を検討した。また、内部標準物質としてデカン酸が適しているかを検討するため、デカン酸のTMS誘導体化も同様に検討した。分離カラムは、微極性カラムのDB-5 msを用いた。その結果、室温下、10分で、両物質共完全にTMS誘導体化され、反応効率も同様であった。つまり、オクチル酸は良好にTMS誘導体化され、デカン

酸は誘導体時の内部標準物質として適していることが分かった。TMS誘導体化したオクチル酸及びデカン酸のトータルイオンクロマトグラム (TIC) 及びマススペクトルをFig.3に示す。これらの誘導体のスペクトルは、GC/MSマスライブラリーとも一致した。オクチル酸及びデカン酸、それらのTMS誘導体の化学構造式をFig.4に示す。

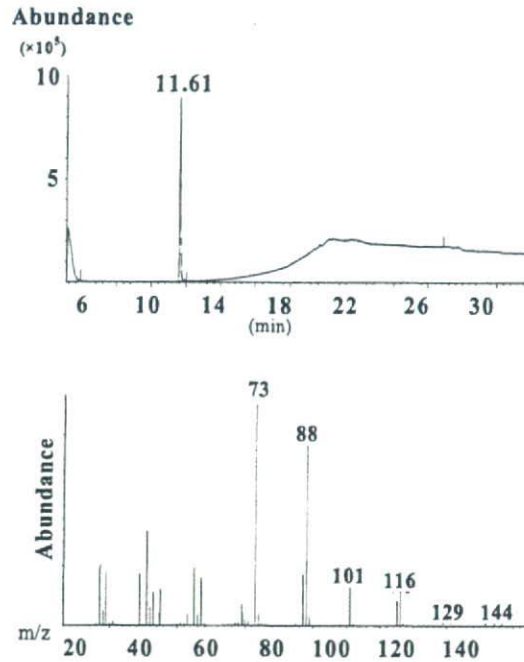


Fig.2. Total Ion Chromatogram and Mass Spectrum of 2-ethylhexanoic acid

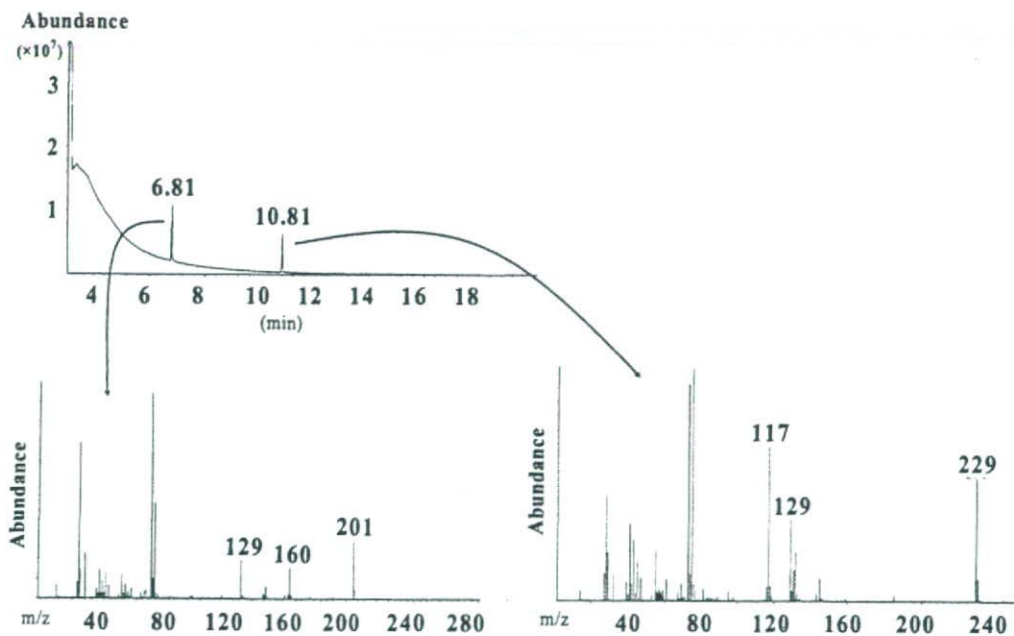
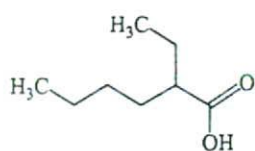
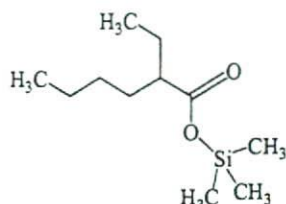


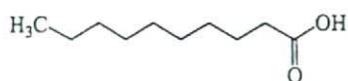
Fig.3. Total Ion Chromatogram and Mass Spectra of 2-ethylhexanoic acid-trimethylsilyl(TMS) derivative and Decanoic acid-trimethylsilyl(TMS) derivative



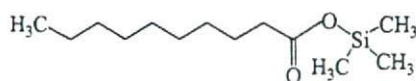
(1) 2-ethylhexanoic acid



(2) 2-ethylhexanoic acid-trimethylsilyl(TMS) derivative



(3) Decanoic acid



(4) Decanoic acid-trimethylsilyl(TMS) derivative

Fig.4. Chemical Structures of Each Substance

オクチル酸の定量は、 m/z 129を参照イオンとし、 m/z 201のイオンで定量した。デカン酸のTMS誘導体も m/z 129のイオンを持つ。そこで、オクチル酸とデカン酸の m/z 129のイオン強度を比較しながら定量値を確認できる。オクチル酸-TMS誘導体の $50\mu\text{g/ml}$ (オクチル酸換算) 標準溶液 $1\mu\text{l}$ をGC/MSに供し、10回繰り返し実験により m/z 201での精度を求めたところ、変動係数はピーク面積で6.4%であった。 $1\mu\text{g/ml}\sim 100\mu\text{g/ml}$ の範囲のピーク面積による検量線は、相関係数 $R^2=0.984$ の良好な直線性を示した。検出限界は $\text{SN}=5$ として $0.05\mu\text{g/ml}$ であった。デカン酸-TMS誘導体 $50\mu\text{g/ml}$ (デカン酸換算) 標準溶液も、10回繰り返し実験により m/z 129での精度を求めたところ、変動係数はピーク面積で4.88%であり良好な再現性を示した。 $1\mu\text{g/ml}\sim 100\mu\text{g/ml}$ の範囲のピーク面積による検量線も、相関係数 $R^2=0.986$ の良好な直線性を示した。

$100\mu\text{g}$ のオクチル酸とデカン酸の添加回収実験を、前述の試料調製法に従って行ったところ、オクチル酸とデカン酸の量は共に90%以上の回収率であった。つ

まり、デカン酸は、オクチル酸定量の内部標準物質として適していることが分かった。

3. 高分子材料中のオクチル酸分析結果

分析した高分子材料4試料のうち2試料からオクチル酸が検出された。理由は後述するが、オクチル酸の定量値は、TMS誘導体の絶対検量線法で値を算出した。このオクチル酸量は全てオクチル酸スズの分解産物由来のもののみとした。試料を一晚(約16時間)抽出し、オクチル酸の定量値をオクチル酸スズに換算した定量値をTable 1に示す。オクチル酸が検出された試料は3回測定した。平均定量値は、オクチル酸スズに換算してSample No.1が、 $134.4\mu\text{g/g}$ ($137.8\mu\text{g/g}$ 、 $113.7\mu\text{g/g}$ 、 $151.8\mu\text{g/g}$ 、 $n=3$ 、 $\text{CV}=14.3\%$)であり、Sample No.2が、 $6.5\mu\text{g/g}$ ($8.6\mu\text{g/g}$ 、 $5.2\mu\text{g/g}$ 、 $5.6\mu\text{g/g}$ 、 $n=3$ 、 $\text{CV}=28.7\%$)であった。これら試料の各測定値は、ほぼ同じ濃度レベルの値であった。抽出時間の違いを見るために、2時間抽出実験も行った。この場合は、Sample No.1が $106.4\mu\text{g/g}$ 、Sample No.2が $4.06\mu\text{g/g}$ であり、一晚(約16時間)抽出より、やや低濃度であった。Fig.5にSample No.1のTIC及びマススペクトルを、Fig.6に m/z 201、 m/z 160、 m/z 129のマスキンググラムを示す。

Table 1. Analytical Results of tin 2-ethylhexanoate in high-polymer materials

No.	material	molecular weight	tin 2-ethylhexanoate ($\mu\text{g/g}$)	CV(%)
Sample No.1	PLGA	200,000	134.4 ± 19.3	(14.3)
Sample No.2	PLLA	200,000	6.5 ± 1.9	(28.7)
Sample No.3	PLLA	200,000	N.D.	
Sample No.4	PLLA	5,000	N.D.	

N.D.: Not detected, under $0.01\mu\text{g/g}$ ($n=3$)

PLLA: poly(L-lactic acid) PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid)

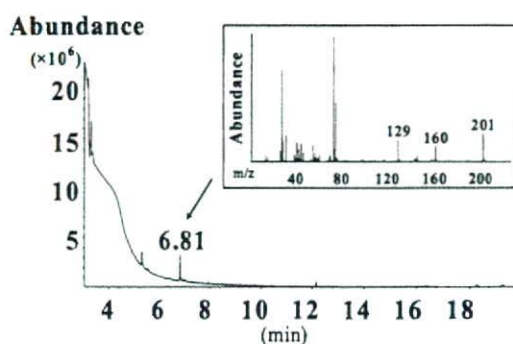


Fig.5. Total Ion Chromatogram and Mass Spectrum of Sample No.1