

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31.8 mm、高さ25.4~57.2 mm)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、真空中で測定した。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が「がん具のうち、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感謝いたします。

文 献

- 1) 東京都生活文化局消費生活部生活安全課：金属製アクセサリ等。たしかな日 2006：241：40-2。
- 2) 厚生労働省：金属製アクセサリ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(おもちや). <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されているが、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 療品部

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)、注入口温度が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。

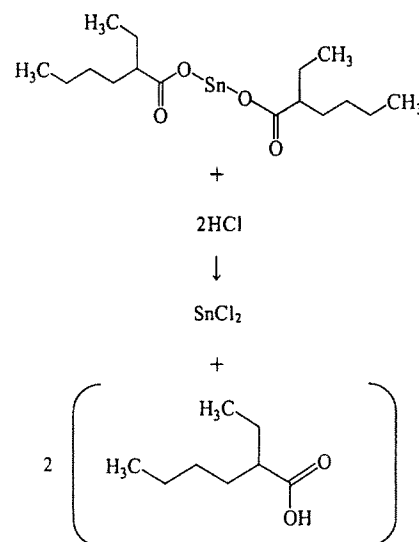


Fig.1. Chemical reaction of Tin(II) 2-ethylhexanoate under hydrochloric acid (Conditions for hydrolysis were 37 $^{\circ}$ C for 10 minutes at room temperature)

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マスライブラリーとも一致した。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

酸は誘導体化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。

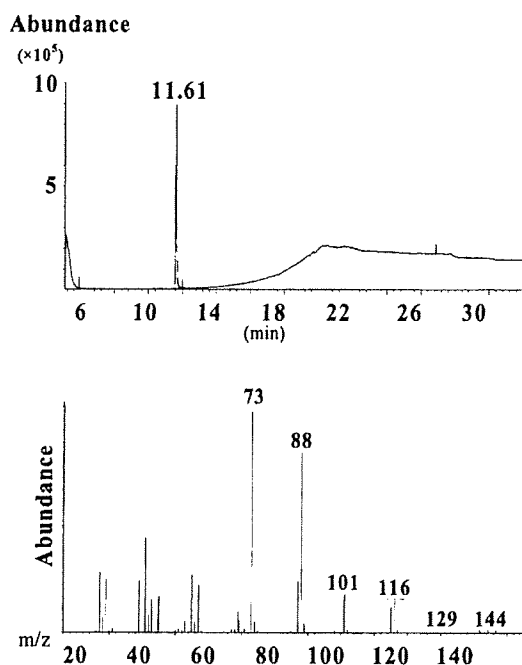


Fig.2. Total Ion Chromatogram and Mass Spectrum of 2-ethylhexanoic acid

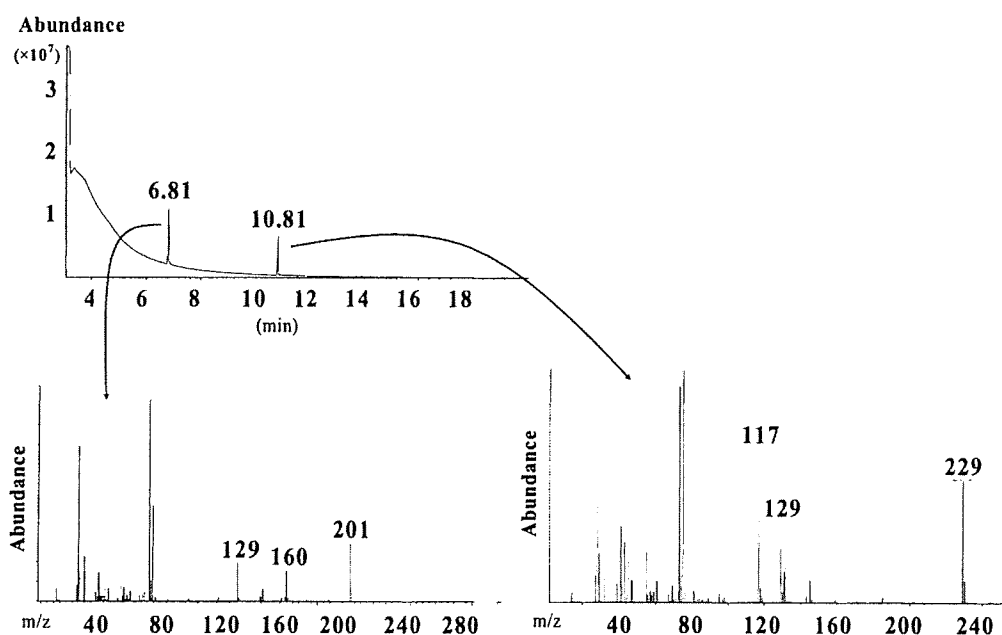
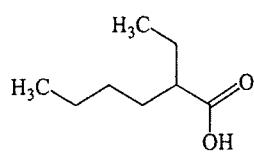
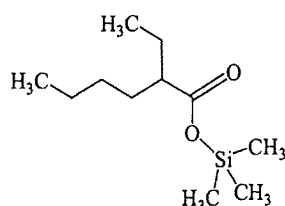


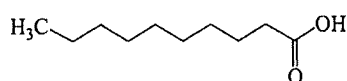
Fig.3. Total Ion Chromatogram and Mass Spectra of 2-ethylhexanoic acid-trimethylsilyl(TMS) derivative and Decanoic acid-trimethylsilyl(TMS) derivative



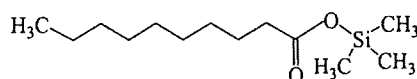
(1) 2-ethylhexanoic acid



(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。試料を一晩（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、一晩（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のマスクロマトグラムを示す。

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)

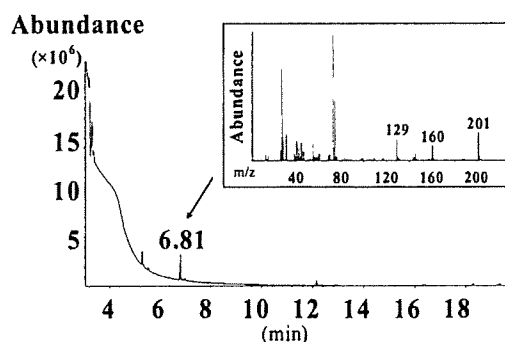


Fig.5. Total Ion Chromatogram and Mass Spectrum of Sample No.1

まとめ

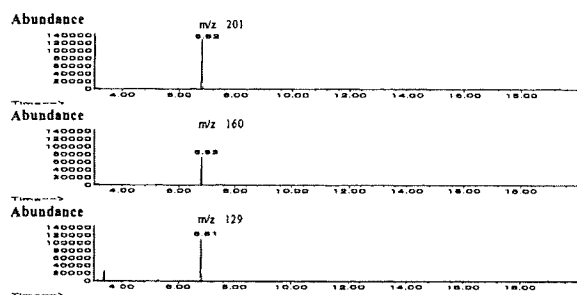


Fig.6. Mass Chromatograms of Sample No.1
(m/z 201, 160, 129)

4. 今後の検討課題

オクチル酸スズは、今回の抽出条件で100%オクチル酸になるとは限らず、逆に抽出過程でオクチル酸が分解する可能性も考えられた。また、ポリマー合成段階で既にオクチル酸スズがオクチル酸に分解していることも考えられた。そこで、今回の抽出条件下で（アセトン-ヘキサン（3：7）混液20mlに濃塩酸2滴（200 μ l）を加えて37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう）、20 μ gと200 μ gのオクチル酸スズの添加回収実験を行った。その結果、100%オクチル酸にはならず、計算値の60%程度のオクチル酸しか検出できなかった。さらに、200 μ gのオクチル酸スズとデカン酸の同時添加回収実験では、オクチル酸は生成予想量の60%であり、デカン酸は90%以上の回収率が得られた。つまり、今回の抽出条件では、デカン酸はオクチル酸スズの内部標準としては適していないと考えられた。そこで、オクチル酸の定量値も、デカン酸を用いた内部標準法ではなく、絶対検量線法で値を算出した。しかし、食品用容器の安全性評価や生体影響研究など³⁻⁸⁾においては、オクチル酸の定量が必要とされている。今回の実験結果から、デカン酸のTMS誘導体はオクチル酸誘導体と同程度の反応効率を示し、同じ質量イオンのm/z 129をもつ。さらに回収率も良好であった。つまり、デカン酸は、オクチル酸のGC/MSによる定量法の内部標準物質として応用できるという事実がわかった。

本稿で報告したデータは、オクチル酸スズの定量値ではなく、あくまで近似値である。分解した後のスズの定量値ともあわせ、より正確な値を求めていく必要がある。さらに今後は、オクチル酸スズを誘導体化して定量する方法を検討していく予定である。

ポリ乳酸プラスチックの重合触媒として用いられ、製品に残留しているオクチル酸スズ量を予測するため、塩酸酸性下での分解産物であるオクチル酸の定量法を確立した。オクチル酸は、塩酸含有のアセトン-ヘキサン（3：7）混液を用い、37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう抽出した。抽出液をトリメチルシリル（TMS）誘導体化してGC/MSで測定した。カラムは、DB-5 ms(0.25mm ϕ ×25m、膜厚 0.25 μ m)を用い、m/z 201のイオンで定量した。4試料中2試料からオクチル酸が検出された。平均定量値は、オクチル酸スズに換算して、134.4 μ g/g（n=3、CV=14.3%）及び6.5 μ g/g（n=3、CV=28.7%）であり、それぞれ同じ濃度レベルであった。

文 献

- 1) 角田正史, 拝野貴之, 伊藤京子, 井上葉子, 三木猛生, 工藤雄一朗, 佐藤敏彦, 相澤好治, 土屋利江: マウス小脳由来アストロサイト系細胞を用いたジブチルスズ, オクチル酸スズ, ポリ乳酸ラクチドの毒性評価, 第13回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集, (2006)
- 2) 河村葉子, 前原玉枝, 鈴木 隆, 山田 隆: ガスクロマトグラフィー/原子発光検出法(GC/AED)による食品用器具・容器包装及び玩具中の有機スズ化合物の分析, 食衛誌, **41**(4), 246~253(2000)
- 3) Stingel, D., Feldmeier, P., Richling, E., Kempf, M., Els, S., Labib, S. and Schreier, P.: Urinary 2-ethyl-3-oxohexanoic acid as major metabolite of orally administered 2-ethylhexanoic acid in human, *Mol Nutr Food Res.*, **51**(3), 301~306(2007)
- 4) Elss, S., Grunewald, L., Richling, E. and Schreier, P.: Occurrence of 2-ethylhexanoic acid in foods packed in glass jars, *Food Addit Contam.*, **21**(8), 811~814(2004)
- 5) Wahl, HG, Hong, Q., Stube, D., Maier, ME., Haring, HU. and Liebich, HM.: Simultaneous analysis of the di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethyl-3-hydroxyhexanoic acid and 2-ethyl-3-oxohexanoic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B*

Biomed Sci Appl., **758**(2), 213~219(2001)

- 6) Walker, V. and Mills, GA.: Urine 4-heptanone: a beta-oxidation product of 2-ethylhexanoic acid from plasticisers, *Clin Chim Acta.*, **306**(1-2), 51~61(2001)
- 7) Ziesmann, J., Valterova, I., Haberkorn, K., de Brito Sanchez, MG. and Kaissling, K.: Chemicals in laboratory room air stimulate olfactory neurons of female *Bombyx mori*, *Chem Senses.*, **25**(1), 31~37(2000)
- 8) Kroger, S.: Gas chromatographic determination of 2-ethylhexanoic acid in urine as its pentafluorobenzyl ester, *Analyst*, **114**(12), 1647~1648(1989)

キャピラリー電気泳動法によるアルカリ性洗剤中のナトリウムイオン、カリウムイオン及びモノエタノールアミンの分析

伊佐間和郎[#]・鹿庭正昭・土屋利江

Analysis of Sodium Ion, Potassium Ion and Monoethanolamine in Alkaline Cleaners by Capillary Electrophoresis

Kazuo Isama[#], Masa-aki Kaniwa, Toshie Tsuchiya

Japanese law for the control of household products containing harmful substances provides the volume of sodium hydroxide and potassium hydroxide in household cleaners with liquid form must not exceed 5%. The alkali volume is determined by acid-base titration which is the legally authorized method. The cleaner which contained monoethanolamine (MEA) in addition to sodium hydroxide is marketed recently. The MEA is not regulated by the law, but it is notorious as skin sensitizer. It is necessary to measure the concentration of MEA. Therefore, we applied capillary electrophoresis to the simultaneous determination of sodium ion, potassium ion and MEA. We analyzed 7 commercial alkaline cleaners, and sodium ion was detected from all products but potassium ion was not detected. Moreover, MEA was detected with concentration of 16.3 mg/ml from one product. Capillary electrophoresis is useful for the simultaneous determination of sodium ion, potassium ion and MEA in alkaline cleaners.

Keywords: capillary electrophoresis, alkaline cleaner, sodium ion, potassium ion, monoethanolamine

1. 緒言

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」(昭和48年法律第112号, 家庭用品規制法)において, 住宅用洗剤に含まれる塩化水素又は硫酸の含有量は10%以下並びに家庭用洗剤に含まれる水酸化カリウム又は水酸化ナトリウムの含有量は5%以下とされている。そして, それらの定量法として現行の基準では, 塩化水素又は硫酸では0.1 mol/l水酸化ナトリウム溶液並びに水酸化カリウム又は水酸化ナトリウムでは0.1 mol/l塩酸による中和滴定法がそれぞれ採用されている。現行の中和滴定法は, 特別な装置を必要とせず, 簡便で定量精度も十分である。しかし, 最近, 規制対象である塩化水素又は硫酸並びに水酸化カリウム又は水酸化ナトリウムを規制上限まで加えた上に, さらに規制対象外の酸又はアルカリを加えて洗浄効果を高めた洗剤がみられる^{1, 2)}。こうした製品の場合, 規制対象である塩化水素又は硫酸並

びに水酸化カリウム又は水酸化ナトリウム自体は基準値以内であっても, 中和滴定法による検査では基準を超える結果が得られるという問題がある。また, 中和滴定法では, 酸又はアルカリの種類を同定することもできない。

規制対象外の酸を含む酸性洗剤の分析については, イオンクロマトグラフ法とキャピラリー電気泳動法とを比較した報告がある¹⁾。塩化水素及び硫酸の分析において, イオンクロマトグラフ法はクエン酸及びリンゴ酸を含む場合には問題があるが, キャピラリー電気泳動法は規制対象外の無機酸及び有機酸を含む場合も有用である¹⁾。一方, アルカリ性洗剤に含まれる規制対象外のアルカリ成分であるモノエタノールアミン (MEA) をガスクロマトグラフ法で定量した報告がある²⁾。

我々は, アルカリ性洗剤を対象として, キャピラリー電気泳動法を用いて, ナトリウムイオン (Na⁺) 及びカリウムイオン (K⁺) を直接定量すると共に, 規制対象外のアルカリ成分であるMEAの同時定量分析を行った。

2. 実験方法

[#] To whom correspondence should be addressed:

Kazuo Isama; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3700-6950; E-mail: isama@nihs.go.jp

2-1. 試料

平成18年度に東京都内の小売店で購入した、製造販売会社が異なるアルカリ性洗剤7製品 (Table 1) を試料として用いた。

2-2. 試薬

標準品として、容量分析用の水酸化ナトリウム溶液及び水酸化カリウム溶液並びに試薬特級のモノエタノールアミンを和光純薬工業株式会社から購入した。また、試験溶液の調製等に用いた純水は、純水製造装置 Elix UV 5 (日本ミリポア株式会社) 及び超純水製造装置 Milli-Q Synthesis A10 (日本ミリポア株式会社) を用いて水道水から製造した。

2-3. キャピラリー電気泳動

キャピラリー電気泳動装置はCAPI-3300システム (大塚電子株式会社) を用いた。

泳動条件は、キャピラリー：フューズドシリカ (内径 75 μm × 有効長 48 cm, 大塚電子株式会社), 緩衝液：10 mM イミダゾール, 5 mM 2-ヒドロキシイソ酪酸, 2 mM 18-クラウン-6-エーテル及び0.2w% 酢酸, 電圧：10.0 kV, 温度：25.0 $^{\circ}\text{C}$, 検出波長：210 nm並びにサンプル注入：落差法 (25 mm, 30 sec) とした。

2-4. 測定精度推定

キャピラリー電気泳動の測定精度解析にはFunction of Mutual Information (FUMI) 理論³⁾に基づくソフトウェアTOCO version 2.0 (FUMI理論研究会) を用いた。標準溶液の電気泳動グラムにおけるシグナル及びノイズから本測定条件における測定精度プロファイルを作成し、検出限界及び定量限界を算出した。

2-5. 定量法

試料を純水で正確に1,000~10,000倍に希釈した溶液をキャピラリー電気泳動の試験溶液とした。

試験溶液の電気泳動グラムから Na^+ , K^+ 及びMEAのピーク面積を求めた。水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及びMEAの標準溶液を用いて作成した検量線から試験溶液中の濃度を求め、試料中の Na^+ , K^+ 及びMEAの濃度を算出した。

3. 結果

3-1. 標準溶液の電気泳動グラム

水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及びMEAの混合標準溶液を用いた検討から、本測定条件において Na^+ , K^+ 及びMEAのピークは良好に分離した (Fig. 1)。

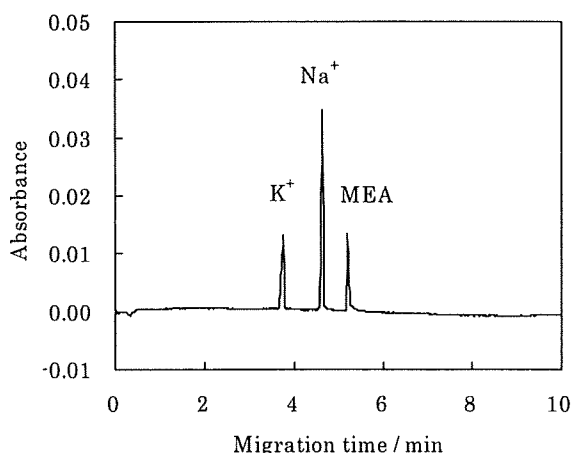


Fig. 1 Electropherogram of the standard solution^{a)}

^{a)} The standard solution contained 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Na^+ , 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of K^+ and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of MEA.

Table 1 Samples of alkaline cleaners and those quality labels

No.	品名	液性	成分
1	カビ取り用洗剤	アルカリ性	次亜塩素酸塩, 水酸化ナトリウム (0.5%), 界面活性剤 (アルキルアミノキシド)
2	カビ取り用洗剤	アルカリ性	次亜塩素酸塩, 水酸化ナトリウム (0.6%), 界面活性剤 (アルキルアミノキシド), 泡調整剤
3	トイレ用洗剤	アルカリ性	界面活性剤 (アルキルアミノキシド), 水酸化ナトリウム (1%), 次亜塩素酸塩
4	トイレ・浴室・台所用品用洗剤	アルカリ性	次亜塩素酸ナトリウム, 界面活性剤 (アルキルアミノキシド), 水酸化ナトリウム (1.4%)
5	排水パイプ用洗剤	アルカリ性	水酸化ナトリウム (1%), 次亜塩素酸塩, 界面活性剤 (アルキルアミノキシド)
6	排水パイプ用洗剤	アルカリ性	水酸化ナトリウム (4%), 次亜塩素酸ナトリウム, 界面活性剤 (アルキルアミノキシド)
7	油汚れ用洗剤	アルカリ性	ポリオキシエチレンアルキルエーテル, 水酸化ナトリウム (4.6%), 溶剤 (グリコールエーテル), 増粘剤

The alkaline cleaners were purchased at retail stores in Tokyo in 2006. The manufacturers of all samples were different.

3-2. 検量線及び測定精度推定

測定対象であるNa⁺、K⁺及びMEAの本測定条件における検量線をFig.2に示した。検討した濃度範囲において、測定対象物質の濃度とピーク面積との間には、いずれも相関係数が0.9999を超える良い直線関係が認められた。

本測定条件における各測定対象物質の濃度と相対標準偏差 (RSD) との関係を表す測定精度プロファイルを図3に示した。33%のRSDが得られるときの濃度を検出限界及び10%のRSDが得られるときの濃度を定量限界と定義するとき、各測定対象物質の検出限界及び定量限界は、試験溶液中の濃度としてTable 2のように算出された。

3-3. 市販製品の分析

試料は純水で希釈するだけで分析が可能であり、検出されたピークはいずれも高い対称性を示した。Na⁺が検出されたサンプル6と、Na⁺及びMEAが検出されたサンプル7のエレクトロフェログラムをFig.4に例示した。各試料中のNa⁺、K⁺及びMEAの分析結果をTable 3に示した。7製品中、水酸化カリウムを配合するものは無く、MEAを配合するものは1製品あった。

4. 考察

家庭用品規制法では、住宅用洗剤に含まれる塩化水素又は硫酸は、皮膚障害、粘膜の炎症及び吸入によって肺障害を起こす毒性があり、酸の量として10%以下及び所定の容器強度を有することと基準が設けられている。また、家庭用洗剤に含まれる水酸化カリウム又は水酸化ナトリウムは、皮膚障害及び粘膜の炎症を起こす毒性があり、アルカリの量として5%以下及び所定の容器強度を有することと基準が設けられている。そして、現行

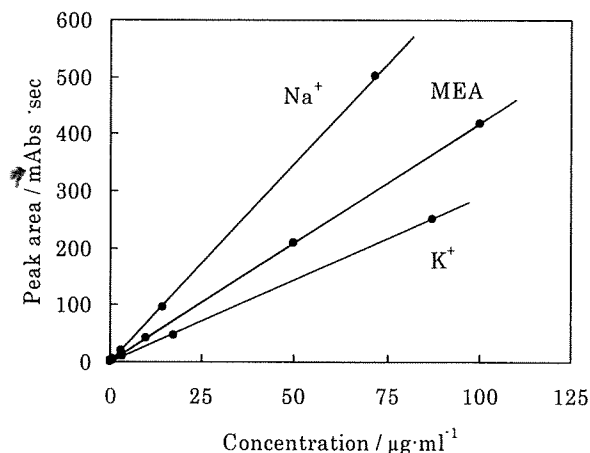


Fig. 2 Calibration curves of Na⁺, K⁺ and MEA

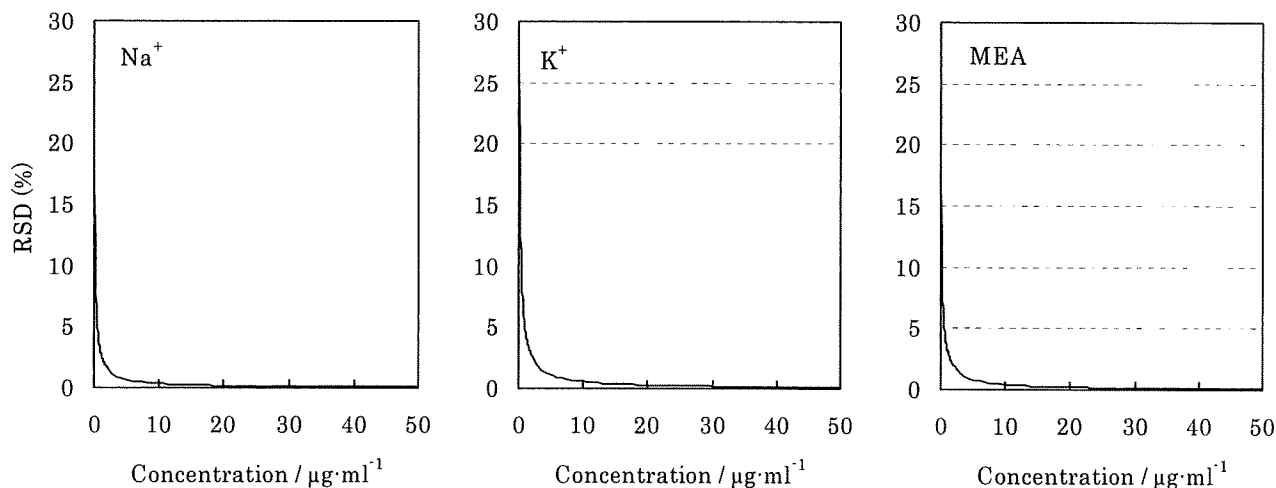


Fig. 3 Measurement precision profiles of Na⁺, K⁺ and MEA^{a)}

^{a)} The measurement precision profiles were made with TOCO version 2.0 by the signals and noise on the electropherograms of standard solutions.

Table 2 Detection limits and determination limits of Na⁺, K⁺ and MEA

Test chemical	Detection limit / µg · ml ⁻¹	Determination limit / µg · ml ⁻¹
Na ⁺	0.0810	0.2696
K ⁺	0.1844	0.6142
MEA	0.1267	0.4224

The detection limit and determination limit in the test solution were calculated with TOCO version 2.0 by the signals and noise on the electropherograms of standard solutions.

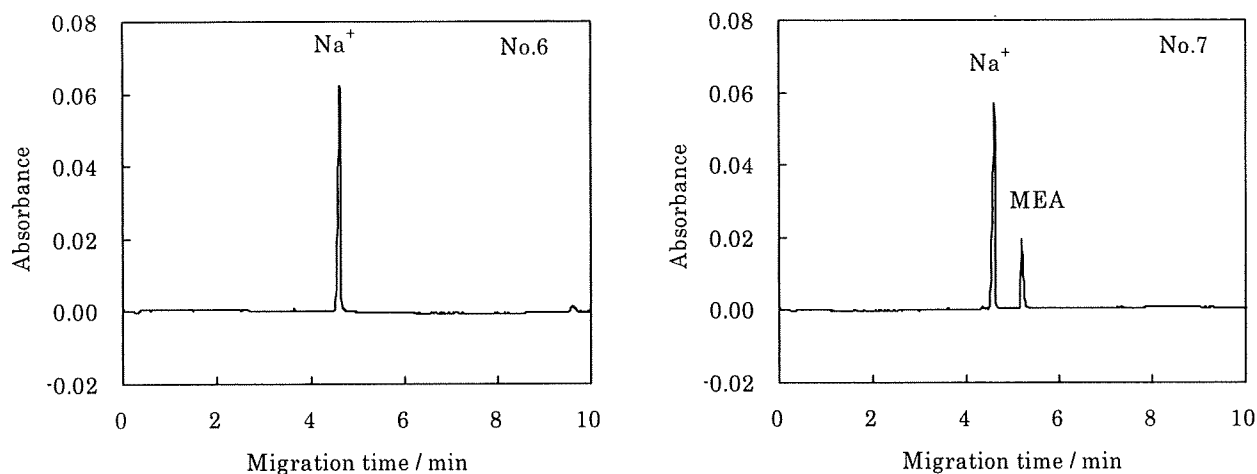


Fig. 4 Electropherograms of sample No. 6 and No.7 of alkaline cleaners

Table 3 Contents of Na^+ , K^+ and MEA in alkaline cleaners

No.	Concentration / $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$		
	Na^+	K^+	MEA
1	12.8	ND ^{a)}	ND
2	15.0	ND	ND
3	17.7	ND	ND
4	28.3	ND	ND
5	18.1	ND	ND
6	35.0	ND	ND
7	32.4	ND	16.3

Values are expressed as means at 1-3 times of measurement. ^{a)} Not detected.

の基準では、それらの定量法として中和滴定法が採用されている。しかし、規制対象外の酸又はアルカリを含有する洗浄剤では、規制対象である塩化水素又は硫酸並びに水酸化カリウム又は水酸化ナトリウム自体は基準値以内であっても、中和滴定法による検査では基準を超えることがある。そこで、洗浄剤中の酸又はアルカリの種類を同定できる分析法の導入が図られている。

MEAには皮膚感作性があり、MEAによるアレルギー性接触皮膚炎の症例が報告されている⁴⁻⁷⁾。Geierらの調査では、ドイツの金属加工労働者におけるMEAのパッチテスト陽性率は11.6%にもなる⁸⁾。サンプル7は16.3 mg/mlのMEAを含有していたが、作業時に炊事用ゴム手袋を着用すること、スプレー時に目や皮膚に付着しないよう注意すること、子供の手が届くところに置かないことなど使用上の注意が表示されており、適正に使用すればアレルギー性接触皮膚炎を起こすことは少ないと思われる。

キャピラリー電気泳動法は、イオンクロマトグラフ法と同様に、毒性の本体になるとと思われる水素イオン及び水酸化物イオンそのものを分析することはできず、それ

らの対イオン（塩化物イオンや Na^+ など）を分析の対象としている。したがって、製品中に規制対象外の塩化物やナトリウム塩などを含む場合には、規制対象物質を正確に定量することは困難である。しかし、基準値を超える酸及びアルカリに相当する量の対イオンが含まれていることを確認することは可能である。さらに、規制対象外の酸又はアルカリを分析することができるという利点もある。

キャピラリー電気泳動法は複雑な前処理を必要とせず、アルカリ性洗浄剤に含まれる Na^+ 、 K^+ 及びMEAの同時定量が可能であった。規制対象外のアルカリ成分であるMEAを迅速・簡便に定量でき、家庭用品規制法に基づく試買試験のスクリーニングとして有効である。現行の家庭用品規制法では、住宅用洗浄剤において塩化水素及び硫酸以外の酸並びに家庭用洗浄剤において水酸化カリウム及び水酸化ナトリウム以外のアルカリを分析する必要はないので、中和滴定法による基準の設定が最適であろう。しかし、規制対象外の酸及びアルカリを分析するには、キャピラリー電気泳動法が有用であることが確認された。キャピラリー電気泳動法は、分析感度・分

析時間・ランニングコストなどの点で優れた分析法のひとつである。更に、試料及び試薬は少量しか必要とせず、ローエミッションであるため、公定分析法への導入が期待されている⁹⁾。

文 献

- 1) Ooshima, T.: *Seikatsu Eisei*, 51, 11-18 (2007)
- 2) 大嶋智子：第40回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 194-195 (2003)
- 3) Hayashi, Y. and Matsuda, R.: *Anal. Chem.*, 66, 2874-2881 (1994)
- 4) Koch, P.: *Contact Dermatitis*, 33, 273 (1995)
- 5) Bhushan, M., Craven, N.M. and Beck, M.H.: *Contact Dermatitis*, 39, 321 (1998)
- 6) Jensen, C.D. and Andersen, K.E.: *Contact Dermatitis*, 49, 45-46 (2003)
- 7) Ulrich, S., Skudlik, C. and John, S.M.: *Contact Dermatitis*, 56, 292-293 (2007)
- 8) Geier, J., Lessmann, H., Dickel, H., Frosch, P.J., Koch, P., Becker, D., Jappe, U., Aberer, W., Schnuch, A. and Uter, W.: *Contact Dermatitis*, 51, 118-130 (2004)
- 9) 本田進, 寺部茂：キャピラリー電気泳動—基礎と実際—, 講談社, 東京 (1995)

Short Communication

The effects of dibutyltin (DBT) dichloride on the viability and the productions of tumor necrosis factor α and interleukin-12 in murine macrophage cell line, J774.1.

Masashi Tsunoda¹⁾, Tamae Yoshida^{1,2)}, Masayoshi Tsuji^{1,3)}, Ying Zhang^{1,4)}, Chiemi Sugaya¹⁾, Yoko Inoue¹⁾, Takeo Miki¹⁾, Yuichiro Kudo¹⁾, Toshihiko Satoh¹⁾, Yoshiharu Aizawa¹⁾

¹⁾ Department of Preventive Medicine and Public Health, Kitasato University School of Medicine, Kanagawa 228-8555, Japan

²⁾ Kitasato Medical Service, Co., Tokyo 108-0073, Japan

³⁾ Mejiro University College, Tokyo 161-8539, Japan

⁴⁾ Fukushima Rehabilitation Academy, Asaguchi 714-0101, Japan

Abstract

Immunotoxicity is one of toxic effects of dibutyltin (DBT) compounds. In our previous study, the inhibitory effects of DBT on the productions of tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-1 β in a murine macrophage cell line, J774.1, were demonstrated. In this study, the effects of DBT dichloride from 0.125 μ M to 2.0 μ M on the cell viability and productions of cytokines including TNF α , IL-10 and IL-12p40 were investigated. J774.1 cells were exposed to DBT dichloride at 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 μ M. After 18 hours, lipopolysaccharide was added to each well. Total RNA was extracted from the cells after an additional 6 hours of incubation. Real-time PCR was used to analyze the mRNA expression for TNF α , IL-10, IL-12p40 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in J774.1 cells. The cell viabilities were determined and the supernatants were sampled after additional 24 hours of incubation. The concentrations of TNF α , IL-10 and IL-12p40 in the supernatant were determined by ELISA.

The mean cell viabilities in the groups exposed to DBT at 0.5 μ M and over were significantly lower than that of the control. The mean mRNA expression of IL-12p40 in the 0.25 μ M group was significantly higher than that in the control group. The mean concentrations of TNF α in the supernatant in the 1.0, 1.5 and 2.0 μ M groups were significantly lower than that of the control, and that in 0.125, 0.25 and 0.5 μ M groups were significantly higher. The mean concentration of IL-12p40 in the 0.25 μ M group was significantly higher than that of the control and that in the 1.0, 1.5 and 2.0 μ M groups were significantly lower. There were no significant differences in mRNA expression and protein level for IL-10. DBT is toxic to macrophages, and the inhibition of the production of cytokines by DBT does not occur for all cytokines.

Keywords : dibutyltin, macrophages, interleukin-10, interleukin-12, tumor necrosis factor α , ELISA

Address correspondence to :

Masashi Tsunoda
Department of Preventive Medicine and Public Health, Kitasato University School of Medicine,
1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa 228-8555, Japan
FAX : +81-42-778-9257
E-mail : mtsunoda@med.kitasato-u.ac.jp

Received : 14 September 2007

Accepted : 9 October 2007

Introduction

Dibutyltin (DBT) is known as a degraded compound of tributyltin (TBT), which has been widely used as an antifouling agent in the environment [1,2]. DBT has been detected in fish and shellfish [3,4]. There is a risk of being exposed to DBT from eating marine products. In addition, DBT compounds have been widely used as stabilizers and catalysts for synthetic polymers such as polyvinyl chloride [1,3,5]. Humans may be exposed to DBT by DBT leaching from polyvinyl pipes [6]. DBT has been detected in human blood samples [7].

One of the targets of DBT is the immune system [1,3,5]. In our previous study, we evaluated the effects of

DBT on a murine macrophage cell line, J774.1 [8]. The indexes in the study were the cell viability and mRNA expressions in the cells and the protein levels in the supernatant of the cells for tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin 1 β (IL-1 β). Those were proinflammatory cytokines [9]. DBT concentrations in the previous study were 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 μ M. The significantly lower mean values of cell viability compared to the control were observed in all the DBT-exposed groups. The mean concentrations of TNF α in the supernatant in the 1.0, 1.5 and 2.0 μ M groups were significantly lower, and the mean IL-1 β in the supernatant in the 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 μ M groups were significantly lower than that of the respective control. For the mRNA expressions of cytokines, the mean relative expression of TNF α was higher in the 0.5 μ M group than that in the control.

Since the significantly lower mean values of cell viabilities were observed in all the DBT-exposed groups in the previous study, the lower cell viability may also be observed among the cells exposed to DBT at less than 0.5 μ M. Further studies may determine which level of DBT induces the lower cell viability of J774.1.

In addition to proinflammatory function, macrophages have many functions, which vary widely according to the cytokine produced [10]. Among the cytokines, IL-10, which inhibits the production of cytokines by T cells, has recently received much attention. IL-12, which drives the development of Th0 cells toward Th1 cells, has also received recent attention. IL-12 is a heterodimer, which is composed of molecules of 35kD and 40kD. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits for IL-10 or each dimer of IL-12 are commercially available. The protein levels of IL-10 and IL-12 in the supernatant can be used as indexes in the experiments using J774.1 cells. The effects of DBT on the mRNA expression and protein production of IL-10 and IL-12 in J774.1 cells have not been reported.

In the present study, we evaluated the toxic effects of DBT on macrophages especially at levels less than 0.5 μ M in vitro. As indexes of toxic effects, we determined the cell viability, mRNA expressions and protein production of TNF α , IL-10 and IL-12 in J774.1 cells.

Materials and Methods

A murine macrophage cell line, J774.1, was provided by the Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University (Sendai). J774.1 cells were cultured under the conditions previously described [8]. J774.1 cells were

exposed to DBT dichloride (Wako, Osaka) at 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 μ M in 24-well culture plates. After 18 hours of incubation, lipopolysaccharide (LPS) was added to each well at the final concentration of 100 ng/ml. The cells were incubated under the same conditions for an additional 6 or 24 hours.

Total RNA was extracted from the J774.1 cells exposed to DBT at 0, 0.125, 0.25 or 0.5 μ M after an additional 6 hours of incubation using TRIzol reagent (Life Technologies, Frederick, MD). As more cell death in the groups exposed to DBT at 1.0 μ M and over made it difficult to extract enough RNA, total RNA was not extracted from the J774.1 cells exposed to DBT at 1.0, 1.5 or 2.0 μ M. The cDNA was synthesized, and real-time PCR was used to analyze the mRNA expression for TNF α , IL-10, IL-12p40, which is one of dimers of composed IL-12, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (housekeeping gene) in J774.1 cells using the LightCycler Quick System 330 (Roche Diagnostics, Tokyo) under the conditions previously described [8]. The sense and antisense primers used were 5'-CTCTTCAAGGGACAAGGCTG-3' and 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3' for TNF α [8], 5'-GACCAGCTGGACAACATACT-3' and 5'-GAGGGTCTTCAGCTTCTCWC-3' (W is a mixture of A and T) for IL-10, 5'-CTCTGTCTGCAGAGAAG-GTC-3' and 5'-GCTGGTGCTGTAGTTCTCAT-3' for IL-12p40, and 5'-AACCTGCCAARTATGATGAC-3' (R is a mixture of G and A) and 5'-TCATACCAGGAAATGAGCTT-3' for GAPDH [8]. The thermal cycles consisted of denaturation at 95°C, annealing at 54°C for TNF α , 55°C for IL-12p40 and GAPDH, 56°C for IL-10 and extension at 72°C. Calibrator normalized relative ratio for each cytokine to GAPDH was calculated as the index of mRNA expression of each cytokine followed by the method and formula previously described [8].

The cell viabilities of the J774.1 cells exposed from 0.125 μ M to 2.0 μ M DBT were determined by the trypan blue exclusion method after an additional 24 hours of incubation. In addition, the J774.1 cells were exposed to DBT dichloride at 0, 0.025, 0.05 or 0.125 μ M under the same protocol (n = 6 per group), and the cell viabilities were determined.

The supernatant of J774.1 cells exposed from 0.125 μ M to 2.0 μ M DBT were sampled after an additional 24 hours of incubation. The concentrations of TNF α , IL-10 and IL-12p40 in the supernatants were determined by ELISA (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA).

The mean values of cell viability, calibrator normalized relative ratio and concentrations in the supernatant for each cytokine in the control and DBT-exposed groups were calculated. The data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Neuman-Keuls test using Statview J5.0 software (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Figure 1 illustrated the cell viability of the control and DBT-exposed J774.1 cells after 24 hours of additional incubation. The mean value of cell viability in the 0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 μ M group was significantly lower compared to that in the control, 0.125 μ M or 0.25 μ M group. The mean value of cell viability in the 1.0, 1.5 or 2.0 μ M group was also significantly lower than that in the 0.5

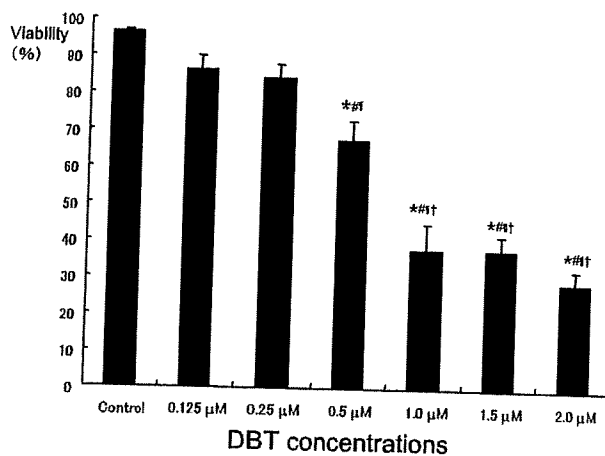


Fig. 1 The cell viabilities of J774.1 cells exposed to DBT after activation by lipopolysaccharide. Mean values \pm standard errors are indicated. These are the combined results of three experiments ($n = 18$ for the control and 0.5 μ M group, $n = 12$ for other groups). $p < 0.0001$ by ANOVA. *: indicate significant difference compared to the control, #: compared to the 0.125 μ M group, ‡: compared to the 0.25 μ M group, †: compared to the 0.5 μ M group by Student-Neuman-Keuls test.

μ M group. For the cells exposed to DBT at 0, 0.025, 0.05 or 0.125 μ M, the mean and standard error of cell viability (%) in each group was as follows: 95.56 ± 1.34 for the control, 94.19 ± 1.28 for the 0.025 μ M group, 92.38 ± 2.08 for the 0.05 μ M group, 88.77 ± 4.05 for the 0.125 μ M group. There were no significant differences among the groups ($p = 0.263$ by ANOVA).

The mean values of calibrator normalized relative ratio of TNF α , IL-10 or IL-12p40 to GAPDH in the control and DBT-exposed groups were demonstrated in Table 1. There were no significant differences among the groups for either TNF α or IL-10. The mean calibrator normalized relative ratio for IL-12p40 in the 0.125 μ M group was significantly higher compared to that in the control and other DBT-treated groups.

Figure 2 illustrates the mean values of TNF α , IL-10 or IL-12p40 in the supernatants of the control and the DBT-exposed groups. The mean value of TNF α in the supernatant in the 1.0, 1.5 or 2.0 μ M groups was significantly lower than that in the control, 0.125, 0.25 or 0.5 μ M groups. That in the 0.125, 0.25 or 0.5 μ M groups was significantly higher than that in the control. The difference in the concentrations of IL-10 in the supernatants among the groups did not reach the significant level ($p = 0.052$). The mean IL-12p40 in the supernatants in the 1.0, 1.5 or 2.0 μ M groups was significantly lower than that in the control, 0.125, 0.25 or 0.5 μ M groups. That in the 1.5 or 2.0 μ M groups was also significantly lower than that in the 1.0 μ M group. And that in the 0.25 μ M group was significantly higher than that in the control.

Discussion

The immune system is one of the targets of DBT. In a prior study, DBT was shown to be as cytotoxic to macrophages and to have as inhibitory effects on the production of proinflammatory cytokines as TNF α [8]. We focused the effects of the lower concentrations of DBT on cell viabilities in the present study. The effects on the production of not only TNF α but also IL-10 and IL-12

Table 1 The mRNA expressions of cytokines in J774.1 cells exposed by DBT

	TNF α	IL-10	IL-12p40
control	2.197 \pm 0.967	1.992 \pm 0.844	4.143 \pm 1.652
0.125 μ M	2.556 \pm 0.779	4.402 \pm 3.707	4.144 \pm 2.298
0.25 μ M	1.241 \pm 0.263	3.404 \pm 2.585	40.776 \pm 15.141*
0.50 μ M	1.338 \pm 0.092	7.145 \pm 3.893	1.037 \pm 0.988

Note) Means \pm standard errors for calibrator normalized relative ratios are indicated ($n=6$).
*: $p < 0.05$ compared to the control and other treated groups.

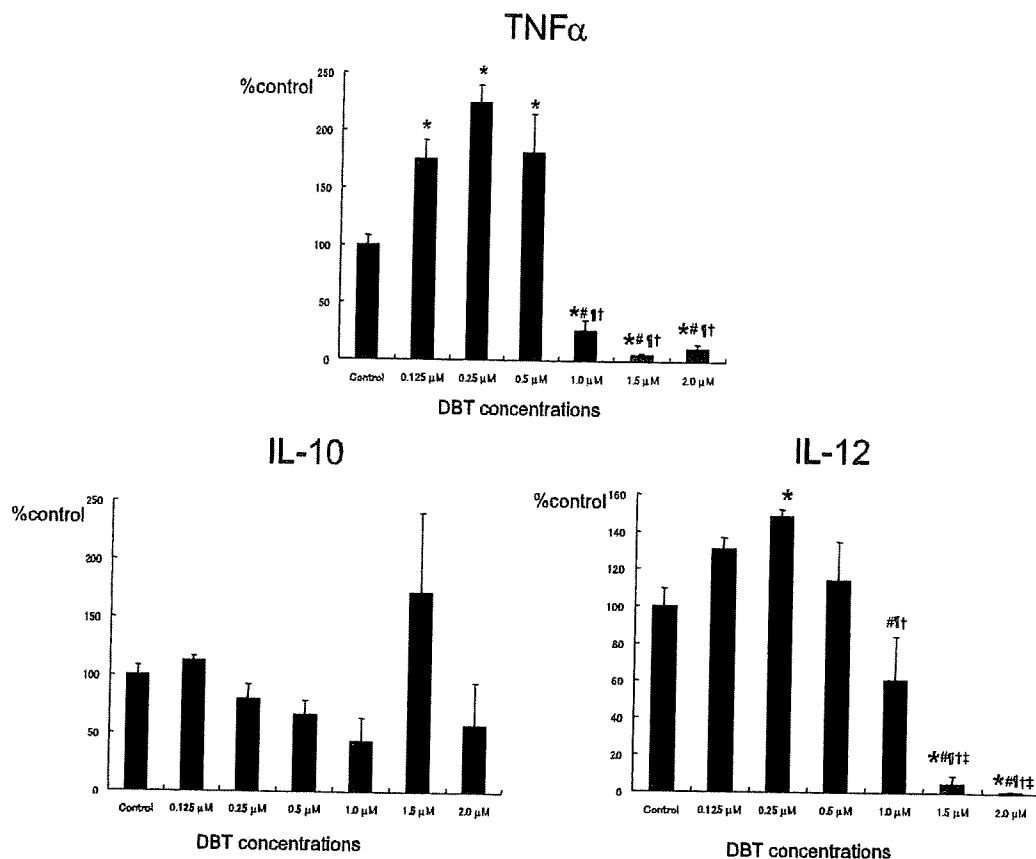


Fig. 2 The concentrations of cytokines (TNF α , IL-10 and IL-12p40) in the supernatant of the control and the DBT-exposed groups activated by lipopolysaccharide. Mean values \pm standard errors are indicated. These are the combined results of three experiments ($n = 18$ for the control and $0.5 \mu\text{M}$ group, $n = 12$ for other groups). Data were expressed as %control for each experiment. $p < 0.0001$ by ANOVA for TNF α and IL-12p40. $p = 0.0522$ for IL-10. *: indicate significant difference compared to the control, #: compared to the $0.125 \mu\text{M}$ group, †: compared to the $0.25 \mu\text{M}$ group, ‡: compared to the $0.5 \mu\text{M}$ group, ‡: compared to the $1.0 \mu\text{M}$ group by Student-Neuman-Keuls test.

were evaluated for the productions of cytokines.

For the effects of DBT on cell viability, a significant difference was observed from $0.5 \mu\text{M}$. The mean cell viabilities in the groups exposed to DBT at $1.0 \mu\text{M}$ and over were less than 50% and significantly lower than those in the groups exposed to DBT at $0.5 \mu\text{M}$ and less. The cell viability in the 0.125 or $0.25 \mu\text{M}$ group was lower than that in the control, however, they were not significantly different. At the exposures of 0, 0.025, 0.05 and $0.125 \mu\text{M}$ DBT, although the mean cell viabilities decreased dose-dependently, they were not significantly different. It could be concluded that a significant decrease in the cell viability of macrophage is induced by $0.5 \mu\text{M}$ DBT, and a marked decrease is induced by $1.0 \mu\text{M}$ DBT. This result is in accordance with our previous study [8]. Tam and Hinsdill demonstrated a 50% lethal concentration of DBT for peritoneal macrophages for 20 hours exposure was $0.76 \mu\text{M}$ [11]. The dose of DBT in-

duced cell death of J774.1 cells was similar to that of a strong immunotoxicant TBT, which was $1.0 \mu\text{M}$ in a previous study [12].

There were no significant differences for mRNA expressions for TNF α and IL-10 indicated by calibrator normalized relative ratios among the groups in the present study. In our previous study, the mean calibrator normalized relative ratio for TNF α in the $0.5 \mu\text{M}$ group was significantly higher than that in the control [8]. The cause of discrepancy between these studies is not clear. It may be due to the large variance among the calibrator normalized relative ratios. For IL-12, the mean calibrator normalized relative ratio for IL-12p40 in the $0.25 \mu\text{M}$ group was significantly higher than that in the control and other DBT-exposed groups. The increase in mRNA expression of IL-12p40 in the $0.125 \mu\text{M}$ group may have induced the increase in the IL-12p40 concentration in the supernatant.

The mean value of the concentration of TNF α in the supernatant was significantly lower in the groups exposed to DBT at 1.0 μ M and over, and higher in the groups exposed to DBT at 0.5 μ M and less compared to the control. The marked decrease in TNF α in the supernatant of the cells exposed at 1.0 μ M and over was in accordance with our previous study [8]. The low concentrations of TNF α in the high-dose groups were not fully explained by the lower cell viabilities of the groups. The translation from mRNA may be inhibited by the high doses of DBT. The TNF α in the supernatant in the 0.5 μ M group was similar to the control in our previous study [8] and significantly higher than that in the control in this study. At least, DBT does not inhibit TNF α production in doses of 0.5 μ M and less. Since mRNA expressions of TNF α were not different among the groups, the increase in the protein level in TNF α can not be explained by mRNA. For IL-12, the inhibition in the production in the groups exposed to 1.0 μ M and over was induced similar to TNF α . DBT at higher doses may inhibit the development of Th0 cells toward Th1 cells by inhibition *in vivo*. For IL-10, the inhibition of the production was not observed in any group. Although IL-10 is not one of the major cytokines produced by macrophages, DBT may not always induce an inhibition of the production of cytokines in macrophages.

In conclusion, DBT was cytotoxic, and the level that induced significantly lower cell viability was 0.5 μ M. DBT has inhibitory effects on the production of IL-12 in macrophages similar to TNF α but not on the production of IL-10 in macrophages.

Acknowledgement

This study was supported in part by a Health and Labour Sciences Research Grant for Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices from the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan.

References

- 1) Arakawa Y: Invasion of Biofunctions by organotins-Immune system, brain nervous system and endocrine system. *Biomed Res Trace Elements* 11 : 259-286, 2000 (in Japanese).

- 2) Wada K: Organotins. Wada K: Metal and Human: Ecotoxicology and Clinical Medicine. Asakura Shoten, Tokyo, 1985, pp. 286-300 (in Japanese).
- 3) Tsunoda M: Simultaneous determination of organotin compounds in fish and shellfish by gas chromatography with a flame photometric detector. *Tohoku J Exp Med* 169 : 167-178, 1993.
- 4) Harino H, O'Hara SC, Burt GR, Chesman BS, Langston WJ: Distribution of organotin compounds in tissues of mussels *Mytilus edulis* and clams *Mya arenaria*. *Chemosphere* 58 : 877-881, 2005.
- 5) Boyer IJ: Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology* 55 : 253-298, 1989.
- 6) Whalen MM, Loganathan BG: Butyltin exposure causes a rapid decrease in cyclic AMP levels in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 171 : 141-148, 2001.
- 7) Whalen MM, Loganathan BG, Kannan K: Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells *in vitro*. *Environ Res* 81, 108-116, 1999.
- 8) Tsunoda M, Yamamoto M, Ito K, Inoue Y, Miki T, Kudo Y, Satoh T, Aizawa Y: Dibutyltin (DBT) dichloride inhibits cytokine productions in murine macrophage cell line, J774.1. *Biomed Res Trace Elements* 17 : 417-422, 2006.
- 9) Woodrooffe MN: Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 45 : S6-10, 1995.
- 10) Yada J: Interleukins. Yada J: Textbook of Immunology for Medical Students and Physicians. 9th edition. Chugai Igakusha, Tokyo, 2005, pp. 281-301 (in Japanese).
- 11) Tam PE, Hinsdill RD: Evaluation of immunomodulatory chemicals: alteration of macrophage function *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 76 : 183-194, 1984.
- 12) Nakano K, Tsunoda M, Konno N: Tributyltin (TBT) increases TNF α mRNA expression and induces apoptosis in the murine macrophage cell line *in vitro*. *Environ Health Prev Med* 9 : 266-271, 2004.

PS 型人工膝関節における繰り返し屈曲動作と
脛骨インサートの塑性変形の関係について

九州大学応用力学研究所 基礎力学部門

東藤 貢

吉塚林病院

長嶺 隆二

九州大学大学院 総合理工学府物質理工学専攻

高橋 祐二