

| | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----|---------------|------|
| Tada Y, Yano N Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Ogata A, Nakae D | Acute phase pulmonary responses to the single intratracheal spray instillation of magnetite (Fe ₃ O ₄) nanoparticles in Fischer 344 rats | Journal of Toxicologic Pathology | 25 | 233-239 | 2012 |
| Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Inomata A, Ogata A, Nakae D | Long-term pulmonary responses to quadweekly intermittent intratracheal spray instillations of magnetite (Fe ₃ O ₄) nanoparticles for 52 weeks in Fischer 344 rats. | Journal of Toxicologic Pathology | 26 | 393-403 | 2013 |
| Nakagawa Y, Suzuki T, Nakajima K, Inomata A, Ogata A, Nakae D | Effects of N-acetyl-L-cysteine on target sites of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. | Archives of Toxicology | 88 | 115-126 | 2014 |
| Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M | Application of the Magnetic Nanoparticles to Gene Delivery. | Int. J. Mole. Sci. | 12 | 3705- 3722 | 2011 |
| Kurioka D, Takagi A, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Watanabe M | Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer research and therapeutic. | J. Cancer Sci. and Ther. | 3 | 60-65 | 2011 |
| Kami D, Takeda S, Makino H, Toyoda M, Itakura Y, Gojo S, Kyo S, Umezawa A, Watanabe | Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine -coated magnetic nanoparticles. | J. Artif. Organs | 14 | 215-222 | 2011 |
| 一町直樹, 栗岡大 輔, 河井一明, 葛西 宏, 松本幹治, 渡邊 昌俊 | 各種ナノ粒子の細胞への影 響: 細胞特異性とその応用. | 粉体工学会誌 | 48 | 145-151 | 2011 |
| 一町直樹, 佐藤明 子, 栗岡大輔, 米田 操, 広川佳史, 白石 泰三, 渡邊昌俊 | 前立腺癌化学療法における 磁性体ナノ粒子の併用効果 の基礎研究 | 泌尿器外科 | 24 | 1267- 1269 | 2011 |

| | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----|-------------|------|
| 渡邊昌俊, 佐藤明子, 岩崎有由美, 深井瑛美, 岡本大樹, 栗岡大輔 | 前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果. | 日本磁気学会 第 187 回研究会資料 | | 7-11 | 2012 |
| 栗岡大輔, 佐藤明子, 岩崎有由美, 深井瑛美, 岡本大樹, 渡邊昌俊 | 前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果. | 化学工業 | 64 | 67-73 | 2013 |
| Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M | Magnetic nanoparticles of Fe ₃ O ₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. | Int. J. Nanomed. | 8 | 3151-3160 | 2013 |
| Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y | Effects of Fe ₃ O ₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. | Int J Mol Sci. | 14 | 15545-15560 | 2013 |
| Ota S, Takahashi Y, Tomitaka A, Yamada T, Kami D, Watanabe M, Takemura Y | Transfection efficiency influenced by aggregation of DNA / polyethylenimine max / magnetic nanoparticle complexes. | J. Nanopart. Res. | 15 | 1653-1664 | 2013 |

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Osteoblast Compatibility of Calcium-Incorporated Ti-Zr-Nb Alloys

Isama K.,¹ Kawakami T.,¹ Tsuchiya T.,² and Matsuoka A.³

¹Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan, ²Medical Center for Translational Research, Osaka University Hospital, Osaka 565-0871, Japan, and ³Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Ca was incorporated into the surface of the Ti-Zr-Nb alloys in the CaCl₂ treatment and Ca(OH)₂ treatment following the NaOH treatment. According to the XRF analysis, the larger amount of Ca was incorporated in the Ca(OH)₂ treatment than in the CaCl₂ treatment. The Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys were evaluated in the cytotoxicity and osteoblast compatibility *in vitro*. The untreated Ti-6Al-4V showed cytotoxicity, but Ti-Zr-Nb alloys did not show cytotoxicity with or without treatment. The Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys showed good osteoblast compatibility. In Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti and Ti-6Al-4V, the Ca(OH)₂ treatment enhanced the osteoblastic differentiation than the CaCl₂ treatment.

Introduction

Ti alloys are used as materials of bone fixations and artificial joints in orthopedics. Ti-6Al-4V is used generally, but it is known that vanadium ions have strong cytotoxicity. We reported Nb ions promoted the differentiation of osteoblasts¹⁻³ and Ti-Zr-Nb alloys had good mechanical property and osteocompatibility *in vitro* and *in vivo*.^{4,5} On the other hand, the materials with a high apatite-forming ability in a simulated body fluid are expected to bond directly with the bone *in vivo*.⁶ Ti alloys which have been alkali- and heat-treated to improve the apatite-forming ability have been applied clinically. Furthermore, the Ca incorporation into the alkali-treated Ti alloys have been attempted to achieve an even higher apatite-forming ability. We examined the Ca incorporation into the Ti-Zr-Nb alloys and confirmed Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys had a high apatite-forming ability. In this study, we evaluated the cytotoxicity and osteoblast compatibility of the Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys.

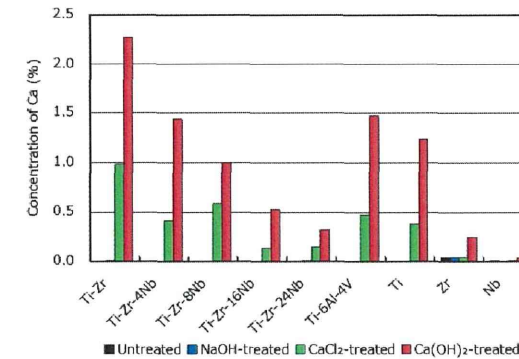


Fig. 1 Calcium amount of the surface of the samples by XRF using the fundamental parameter method.

Materials and Methods

Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, Ti-Zr-8Nb, Ti-Zr-16Nb and Ti-Zr-24Nb were used in this experiment. In addition, pure Ti, Zr and Nb were used as structural elements of the Ti-Zr-Nb alloys and Ti-6Al-4V was used as a comparison. All samples were 14.0 mm in diameter and 1.0 mm in thickness.

The samples were soaked in NaOH aqueous solution at 60°C for 24 hr (NaOH treatment). Subsequently, the NaOH-treated samples were soaked in CaCl₂ aqueous solution (CaCl₂ treatment) or Ca(OH)₂ aqueous solution (Ca(OH)₂ treatment) at 60°C for 24 hr. The Ca amount of the CaCl₂-treated and Ca(OH)₂-treated surfaces was measured by X-ray fluorescence spectrometry (XRF) using the fundamental parameter method.

The cytotoxicity of the samples was evaluated by the colony formation assay with direct contact using Chinese hamster lung fibroblast V79 cells.⁷ The osteoblast compatibility of the samples was evaluated with normal human osteoblasts (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) cultured in α -modified minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 5 mM disodium β -glycerophosphate. The osteoblast proliferation was estimated with the cell number measured by WST-8 assay.⁷ The osteoblastic differentiation was estimated with the alkaline phosphatase (ALP) activity measured using p-nitrophenylphosphate as a substrate.⁷

Results and Discussion

All Ti alloys and pure Ti incorporated almost double amount of Ca in the Ca(OH)₂ treatment compared with the CaCl₂ treatment. Particularly, Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti

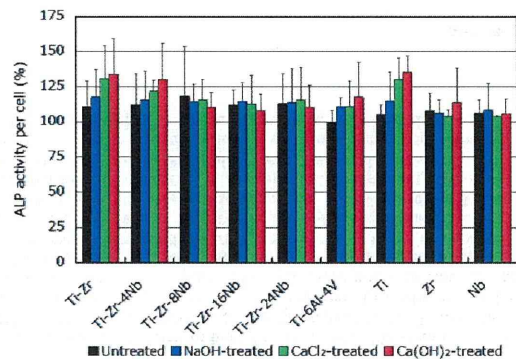


Fig. 2 Osteoblastic differentiation on the samples estimated with the ALP activity per cell measured using *p*-nitrophenylphosphate as a substrate.

and Ti-6Al-4V incorporated large amount of Ca. Pure Zr incorporated Ca only in the Ca(OH)₂ treatment, and pure Nb did not incorporate Ca in both treatments (Fig. 1).

The untreated Ti-6Al-4V showed cytotoxicity, but treated Ti-6Al-4V showed less cytotoxicity. Other samples did not show cytotoxicity with or without treatment. Compared with on the untreated Ti-6Al-4V, the cell number of osteoblasts increased on other samples. This result was supported by the cytotoxicity of the samples (data not shown).

The ALP activity of osteoblasts cultured on all other samples increased compared with on the untreated Ti-6Al-4V. Additionally, in Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti and Ti-6Al-4V, the ALP activity of osteoblasts was promoted in order of by the NaOH, CaCl₂ and Ca(OH)₂ treatment (Fig. 2). In the previous study, the apatite-forming ability of Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti and Ti-6Al-4V increased in order of by the NaOH, CaCl₂ and Ca(OH)₂ treatment. These results implied the osteoblastic differentiation was enhanced on the materials with a high apatite-forming ability.²

Conclusions

The Ca-incorporated Ti-Zr-Nb alloys showed good osteoblast compatibility. In Ti-Zr, Ti-Zr-4Nb, pure Ti and Ti-6Al-4V, the Ca(OH)₂ treatment enhanced the osteoblastic differentiation than the CaCl₂ treatment. The large amount of Ca incorporation would induce good osteoblastic differentiation cultured on the materials.

Acknowledgment

This study was supported by the Health Labour Sciences Research Grant from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

References

- ISAMA K. and TSUCHIYA T., Safety evaluation of metallic biocompatible materials by their effect on cell differentiation of human osteoblasts, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 121, 111-112, 2003.
- TAMAI M. *et al.*, Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts, *Key Eng. Mater.*, 309-311, 97-100, 2006.
- TAMAI M. *et al.*, Synthesis of a novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties, *J. Artif. Organs*, 10, 22-28, 2007.
- KOBAYASHI E. *et al.*, Mechanical properties of the binary titanium-zirconium alloys and their potential for biomedical materials, *J. Biomed. Mater. Res.*, 29, 943-950, 1995.
- TAKAHASHI M. *et al.*, Phase stability and mechanical properties of biomedical β type titanium-zirconium based alloys containing niobium, *J. Japan Inst. Metals*, 64, 1120-1126, 2000.
- FUJIBAYASHI S. *et al.*, A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses, *Biomaterials*, 24, 1349-1356, 2003.
- ISAMA K. *et al.*, 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, 2002.
- ISAMA K. and TSUCHIYA T., Osteoblast differentiation and apatite formation on gamma-irradiated PLLA sheets, *Key Eng. Mater.*, 288-289, 409-412, 2005.

Toxicological Studies of Nano-Suspensions of Silica, Silver and Zinc Oxide

Matsuoka A.¹, Kodama Y.², Yoshida M.³, Isama K.⁴, Inoue K.³, Kawakami T.⁴, and Nishikawa A.³

¹Division of Medical Devices, ²Division of Cellular and Molecular Toxicology, ³Division of Pathology, and ⁴Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Summary

Nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide were subjected to the cytotoxicity test, the chromosomal aberration test, and the 13-week repeated dose test for their safety evaluation. Silver showed the strongest cytotoxicity among the three. Only zinc oxide induced chromosome aberrations. In the *in vivo* test, zinc oxide caused inhibition of the normal body weight increase, increase in the relative lung weight, and pulmonary fibrosis. We propose the three tests as a candidate of a primary screening test battery for safety evaluation of nanomaterials (NMs).

Introduction

Development in the field of nanotechnology has brought NMs closer to us day by day and at the same time toxicological concerns of NMs have been growing. NMs are expected for a variety of applications not only in industry, but also in the field of medicine such as drug delivery system, gene transfer vectors, and scaffold for cell culture in regenerative medicine. NMs are new materials with unknown characteristics and we need to consider the safety of their use. In the present study, we performed the *in vitro* and *in vivo* toxicological studies of three NMs to evaluate their safety.

Materials and Methods

A silica sol (amorphous SiO₂, 17.8%, particle size 10-20 nm) and zinc oxide (40% in water, NanoTek® ZH1121W, Alfa Aesar) were commercially available. Silver powder (Sigma-Aldrich, particle size <100 nm) was suspended in water by ultrasonics, filtered through a 0.45 µm PVDF filter, and then the concentration of silver in the filtrate was determined by capillary electrophoresis. Cytotoxicity of the NMs was determined by

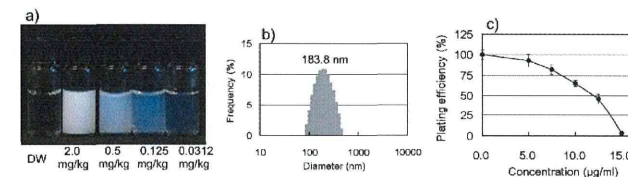


Fig. 1 Zinc oxide; a) Suspensions prepared for the each dose of the *in vivo* test, b) particle size distribution of the suspension, and c) the result of the cytotoxicity test in that CHL cells were treated with the suspension for six days. Values are expressed as mean \pm SD for four wells.

Table 1. Chromosome aberration test of zinc oxide

| Treat- ment (h) | Mass conc. (µg/ml) | Polyploid (%) | Cells with chromosome aberrations (%)* | | | | | total |
|--------------------|-----------------------|------------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------|
| | | | ctg | ctb | cte | csb | cse | |
| 24 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 2.5 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 10 | 1 | 2 | 1 | 5 | 0 | 0 | 7 |
| | 20 | 1 | 3 | 14 | 32 | 0 | 0 | 38 |
| 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2.5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 20 | 5 | 4 | 9 | 7 | 0 | 0 | 17 |

*Structural chromosome aberrations: ctg, chromatid gaps; ctb, chromatid breaks; cte, chromatid exchanges; csb, chromosome breaks; cse, chromosome exchanges. Red figures indicate positive responses.

the colony formation assay using a Chinese hamster cell line CHL¹. The chromosome aberrations (CAs) were investigated in CHL cells treated with the NMs for 24 or 48 h¹. In the 13-week repeated dose test, six rats per group were intratracheally sprayed with the NMs in a 0.2 ml portion of test suspensions once a week for 13 weeks. One week after the last administration, rats were subjected to an autopsy and lungs were fixed for histopathological examinations. We used ANOVA to test the significance of differences between treated groups and their controls in data on body weight, relative organ weight, and hematology with post hoc comparisons made using the Dunnett test.

Results

The mean diameter of silica, silver, and zinc oxide in suspension was 54.2, 159.2, and 183.8 nm, respectively. The 50% growth inhibition concentration of them was

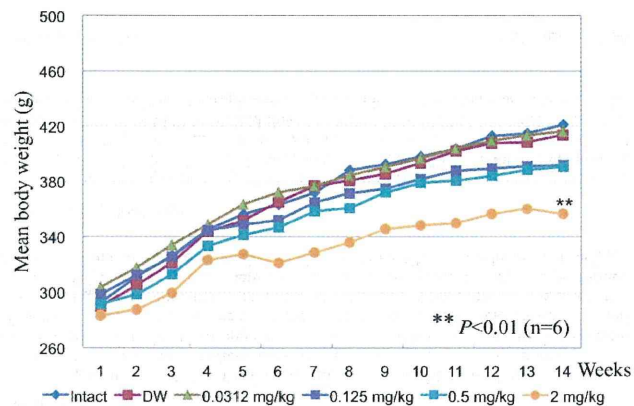


Fig. 2 Body weight curve of rats treated with zinc oxide in the 13-week intratracheal repeated dose test. A significant inhibition in the normal increase of body weight was observed at the highest dose of 2 mg/kg.

153.5, 1.25, and 12.0 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 1), respectively, in the cytotoxicity test. Only zinc oxide induced structural CAs (Table 1).

In the 13-week repeated dose test, the normal increase in mean body weight was significantly inhibited at 2 mg/kg of zinc oxide (Fig. 2), although no clinical signs were found in rats treated with all test suspensions.

Histopathologically, granulomatous inflammation with foamy cells in the alveoli or surrounding the bronchiole and perivascular cell infiltration were detected as common lesions in rats treated with three test suspensions. The lesions increased in their intensities with dose, and similarly distributed in all the lobes indicating that they were evenly exposed to the NMs.

On the other hand, alveolar epithelial hyperplasia was prominent in rats treated with silver than with silica.

Microgranuloma and aggregation of foamy cells were found in the mediastinal lymph node at higher doses of silica and silver, indicating that macrophages with NMs phagocytosed moved to lymph node through lymphatic vessels. Zinc oxide markedly induced proliferation of alveolar/bronchial epithelium and mucinous cells in bronchus and fibrosis at two highest doses. NOEL of silica, silver, and zinc oxide was less than 0.06, 0.004, and less than 0.0312 mg/kg, respectively.

Conclusions

The three tests performed in the present study showed characteristic results of

each nano-suspension. It suggests that they may be a set of useful tools to screen NMs for safety evaluation, although further studies are needed to confirm the fact.

References

1. MATSUOKA A, *et al.*, Development of an *in vitro* screening method for safety evaluation of nanomaterials, *Biomed. Mater. Eng.* 19, 19-27 (2009)

Acknowledgement

This study was partially supported by the Health and Labour Sciences Research Grants (H22-IYAKU-IPPAN-009).

第4章 金属系材料・セラミックスの開発とその高機能化

第3節 金属系材料の細胞毒性の評価

伊佐間 和郎

国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長 博士(薬学)

(株)技術情報協会

書籍「体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件」

(2013.10.31 発行) 抜刷

第3節 金属系材料の細胞毒性の評価

はじめに

細胞毒性の試験方法には、抽出法、間接接触法(寒天重解法、フィルター拡散法)、直接接触法がある。さらに、試験に使用する細胞株の種類、試験条件、細胞毒性の指標及びその評価法などが異なる多様な試験法が知られている。ISO 10993-5:2009は、医療機器又は原材料の細胞毒性を評価するための試験方法を規定しており、医療機器又は原材料の評価法として定量的評価法を推奨している。そして、細胞毒性の定量的評価が可能な試験方法として、ニュートラルレッド法(Annex A)、コロニー法(Annex B)、MTT法(Annex C)、XTT法(Annex D)が参考情報として詳細に記載されている¹⁾。金属系材料の細胞毒性を評価するには、これらを参考として適切な試験方法を選定することが重要である。ここでは、細胞毒性の定量的評価が可能で、感度の高い試験方法のひとつであるコロニー法²⁾について紹介する。コロニー法は、我が国の医療機器の製造販売承認申請等において、汎用されている細胞毒性の試験方法である。

1. 抽出法によるコロニー法

抽出法によるコロニー法は、試験試料を血清添加培地で抽出し、播種した細胞に添加し、培養後のコロニー形成を評価することにより、試験試料から溶出する物質の細胞毒性を確認するための試験である。

1.1 試験試料

試験は、試験試料の抽出液又は試験試料そのもで行う。液体の試験試料や抽出液の場合は、必要に応じて適切な溶媒や培養液で希釈する。

1.2 対照試料

陰性対照材料は、規定された基準値を満たす材料であり、抽出法用の高密度ポリエチレンシートが財団法人食品薬品安全センター秦野研究所から入手可能である。陽性対照材料は、中程度の細胞毒性を示す陽性対照材料A及び弱い細胞毒性を示す陽性対照材料Bの2種類であり、陽性対照材料Aの0.1% zinc diethyldithiocarbamate(ZDEC)含有ポリウレタンフィルム及び陽性対照材料Bの0.25% zinc dibutyldithiocarbamate(ZDBC)含有ポリウレタンフィルムが同研究所から入手可能である。陽性対照物質は、細胞の感度及び試験の精度を明らかにするために使用する物質であり、ZDBC(例えば、和光純薬工業株式会社 No.263-00852)を使用する。

1.3 滅菌

試験試料は、最終製品と同じ方法で滅菌処理を行う。滅菌方法が定まっていない場合には、生化学的又は物理化学的性質等を考慮して、適切な滅菌処理を行う。滅菌後の試料は無菌的に取り扱う。

1.4 細胞株及び培地

細胞株は、L929細胞(NCTC clone 929)、Balb/3T3細胞(Balb/3T3 clone A31)及びV79細胞の中から一つ以上を使用する。また、培地は、EagleのMinimum Essential Medium(MEM)に牛胎児血清を10 vol%添加したものを(MEM10培地)を使用し、細胞に影響を及ぼさない濃度で抗生物質を添加しても良い。なお、V79細胞を用いた抽出法による試験では、EagleのMEMでEarleの平衡塩類溶液を含む培地に、MEM非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム(0.11 g/L)、L-グルタミン(0.292 g/L)、炭酸水素ナトリウム(2.2 g/L)及び牛胎児血清(5 vol%)を添加したものを(M05培地)を使用しても良い。

1.5 抽出

抽出溶媒は、試験試料の化学的性状を考慮して選択すべきであるが、原則として血清を含む培養液を使用し、その他の抽出溶媒を選択した場合には、その理由を明確にする。また、抽出条件は、医療機器の性状や使用条件の特殊性に考慮して選択すべきであるが、抽出溶媒として培地を使用する場合には 37 ± 1℃ で 24 ± 2 時間抽出する。ただし、正常皮膚あるいは粘膜に短時間しか接触しない医療機器（全接触期間が 4 時間以下）では、24 時間未満 4 時間以上の抽出液も使用できる。その他の抽出条件を選択した場合には、その理由を明確にする。抽出操作は、試料を約 2 × 15 mm 程度の大きさに切断し、試料 1 g 又は 6 cm² に対して培地 10 mL の割合で培地を加え、pH 7.2 ~ 7.4 を確認後、37℃ の炭酸ガス培養器内に入れ、通常は 24 時間静置して抽出する。抽出液のみを取り出し、この溶液を 100% 抽出液とする。培地を用いて 3 倍以下の割合で 100% 抽出液を段階希釈し、試験液とする。

1.6 試験操作

継代した細胞をトリプシン処理して単離し、培地に懸濁する。細胞懸濁液を用いて、60 mm シャーレには 100 ~ 200 個（培地 4 ~ 6 mL）、35 mm シャーレには 50 ~ 100 個（1 ~ 3 mL）、12 穴又は 24 穴プレートには 40 ~ 50 個（0.5 ~ 2 mL）のコロニーが形成するように細胞を播種する。培養容器を 37℃ の炭酸ガス培養器内に入れ、4 ~ 24 時間静置し、細胞をシャーレ又はプレートの底面に接着させる。培地を捨て、100% 抽出液及び段階希釈した試験液を、培養容器に加える。試験液を加えた培養容器を 37℃ の炭酸ガス培養器内に入れ、静置して培養する。培養期間は、一般的に、L929 細胞は 7 ~ 9 日間、Balb/3T3 細胞は 9 ~ 11 日間、V79 細胞は 6 ~ 7 日間とする。

培養終了後、メタモール又は 10 vol% ホルマリン溶液等を用いて固定し、コロニーを染色する。コロニーの染色には、一般的に、市販のギムザ染色液を使用直前にリン酸緩衝液（M/15, pH 6.4）で 10 ~ 50 倍に希釈して使用する。

1.7 観察

各シャーレ又は各穴内の染色されたコロニーを実体顕微鏡で観察し、細胞が 50 個以上集まっている集落についてコロニー数を数える。コロニーカウンターを用いてコロニー数を測定しても良い。新鮮培地のみで培養した培養容器をコントロール群とし、コントロール群に播種した細胞数と実際に形成されたコロニー数からコロニー形成能（形成したコロニー数/播種した細胞数）を求め、コントロール群でのコロニー数の平均値を 100% として、100% 抽出液及び段階希釈した抽出液で形成されたコロニー数からコロニー形成率を百分率（%）で求める。コロニー形成率を縦軸、試験液の濃度（対数）を横軸とするグラフ上にプロットし、コントロール群のコロニー数を 50% 阻害する試験液の濃度（%）を求めて IC₅₀ 値とする。コンピュータを利用して、統計理論式から IC₅₀ 値を計算しても良い。IC₅₀ 値を試験材料からの抽出液による細胞毒性強度の指標とする。

1.8 評価

試験が以下の内容を満たした場合に、試験試料の抽出法による細胞毒性を正しく評価できる。

- 1) コントロール群でのコロニー形成能が良好である。
- 2) 陰性対照材料の 100% 抽出液のコロニー数は、コントロール群のコロニー数と同程度である。
- 3) 培地以外の溶媒を使用した時、使用溶媒濃度の溶媒対照群のコロニー数は、コントロール群のコロニー数と同程度である。
- 4) 陽性対照材料 A 及び B を用いた時、抽出液の濃度とコロニー形成阻害の強さにそれぞれ用量反応関係を認め、さらに、陽性対照材料 A の IC₅₀ 値は 7% 未満及び陽性対照材料 B の IC₅₀ 値は 80% 未満である。
- 5) 必要に応じて、陽性対照物質の細胞毒性強度を調べ、試験系の検出感度及び精度評価の参考とする。

2. 直接接触法によるコロニー法

直接接触法によるコロニー法は、試験試料の上に直接細胞を播種し、培養後のコロニー形成能を評価することにより、試験試料の細胞毒性を確認するための試験である。抽出時に失活することが予想される材料及び眼科領域で使用される材料は、直接接触法で試験する。

2.1 試験試料

試験は、試験試料そのもので行う。

2.2 対照試料

陰性対照材料は、直接接触法には組織培養用プラスチックシート、トルエン耐性（和光純業工業株式会社 No.160-08893; 23 mmφ）又は No.162-09311; 14 mmφ）を使用する。陽性対照材料は、弱い細胞毒性を示す陽性対照材料 B の 0.25% ZDBC 含有ポリウレタンフィルムを使用する。また、陽性対照物質は、抽出法と同様に ZDBC を使用する。

2.3 滅菌

試験試料は、最終製品と同じ方法で滅菌処理を行う。滅菌方法が定まっていない場合には、生化学的又は物理化学的特性等を考慮して適切な滅菌処理を行う。滅菌後の試料は無菌的に取り扱う。

2.4 細胞株及び培地

細胞株は V79 細胞を使用し、培地は MEM10 培地を使用する。

2.5 試験調製

試験に使用する培養容器（60 mm 又は 35 mm シャーレ、12 穴又は 24 穴プレート）の形状に合うように、円板状の試験試料及び対照材料を複製し、質量及び表面積を測定する。滅菌の試料は、その使用目的に合った滅菌処理を行う。

2.6 試験操作

試料を培養容器の底によく密着させた後、細胞懸濁液を用いて、60 mm シャーレには 100 ~ 200 個（培地 4 ~ 6 mL）、35 mm シャーレには 50 ~ 100 個（培地 2 ~ 3 mL）、12 穴プレートには 40 ~ 50 個（培地 1 ~ 2 mL）、24 穴プレートには 40 ~ 50 個（培地 0.5 ~ 1 mL）の細胞を播種する。培養容器を 37℃ の炭酸ガス培養器内に入れ、6 ~ 7 日間静置して培養する。

培養終了後、試験試料に適した固定液で固定し、ギムザ染色液などを加え、コロニーを染色する。

2.7 観察

培養容器に直接播種した細胞をコントロール群とし、コントロール群でのコロニー数の平均値を 100% とする。試験材料上に直接播種した細胞のコロニー数を数え、コントロール群のコロニー数に対するコロニー形成率を百分率（%）で求める。陰性対照材料及び陽性対照材料 B のコロニー形成率（%）も同様に求める。

2.8 評価

試験が以下の内容を満たした場合に、試験試料の直接接触法による細胞毒性を正しく評価できる。

- 1) 陰性対照材料でのコロニー形成率は 80% 以上及び陽性対照材料 B でのコロニー形成率は 10% 以下である。
- 2) 直接接触法でのコロニー形成率が 30% 未満で、抽出法での IC₅₀ 値が 100% を超える場合には、試験試料の抽出を 72 時間行い、その抽出液で再度抽出法の試験を行う。ただし、直接接触法でのコロニー形成率が低下する原因を特定できれば、必ずしも 72 時間抽出液での試験は必要でない。

3) 必要に応じて、陽性対照物質の細胞毒性強度を調べ、試験系の検出感度及び精度評価の参考とする。

3. 金属塩の細胞毒性

山本らは43種類の金属塩について、L929 繊維芽細胞及びMC3T3-E1 骨芽細胞線細胞に対する細胞毒性を比較した³⁴⁾。60 mm シヤーレを用いて、L929 細胞はMEM10 培地4 ml中に約120 個播種し、MC3T3-E1 細胞は10%牛胎児血清添加α-MEM 培地4 ml中に約400 個播種した。それぞれ培養1 日後に金属塩溶液を添加し、さらに8 日間培養した。コントロールのコロニー数を50%に低下させる金属塩の濃度(IC₅₀)が求められ、各金属塩の相対的な細胞毒性が評価された。その結果、L929 細胞とMC3T3-E1 細胞に対する金属塩の細胞毒性強度は、ほぼ一致した(図1)。そして、K₂Cr₂O₇、CdCl₂、VCl₃、AgNO₃、HgCl₂、SbCl₃、BeSO₄及びInCl₃が細胞毒性の強い金属塩(どちらかの細胞でIC₅₀<10⁻⁵ mol/L)に分類された。また、HgCl₂、Ti(NO₃)₃、GaCl₃、CuCl₂、MnCl₂、CoCl₂、ZnCl₂、NiCl₂、SnCl₄、IrCl₃、TiNO₃、CuCl、RhCl₃、Pb(NO₃)₂、Cr(NO₃)₃及びBi(NO₃)₃が細胞毒性の比較的強い金属塩(どちらかの細胞で10⁻⁵ ≤ IC₅₀<10⁻⁴ mol/L)に分類された³⁴⁾。これらの金属塩の網羅的な細胞毒性評価は、金属系材料の開発において、重要な基礎データである。

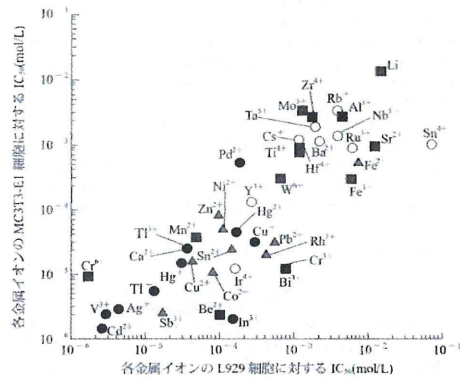


図1 各金属イオンのL929 細胞及びMC3T3-E1 細胞に対する細胞毒性と細胞間の相関³⁴⁾

4. 歯科鑄造用合金の細胞毒性

L929 細胞及びV79 細胞を用いて、歯科鑄造用金銀パラジウム合金(13Au-58Ag-21Pd 及び10Au-62Ag-13Pd)の細胞毒性を評価した³⁾。医療機器の生物学的安全性試験法ガイドンス²⁾に従い、L929 細胞にはMEM10 培地を、V79 細胞にはM05 培地を使用した。また、試験試料の培地による抽出は、6 cm³/mL、37°C、24 及び72 時間の条件で行った。その結果、24 時間抽出液では、L929 細胞に対してどちらの合金もコロニーの形成を阻害しなかったが、V79 細胞に対して10Au-62Ag-13Pd は濃度依存的にコロニーの形成を阻害した(図2)。一方、72 時間抽出液では、L929 細胞及びV79 細胞のどちらに対しても10Au-62Ag-13Pd は濃度依存的にコロニーの形成を阻害した。なお、13Au-58Ag-21Pd と10Au-62Ag-13Pd の細胞毒性強度の差は、抽出液中のCu²⁺ 濃度の差に因る。また、L929 細胞とV79 細胞における検出感度の差は、それぞれの細胞のCu²⁺ に対する感受性の差に因る³⁾。このように、試験に用いる細胞種及び抽出条件によって、細胞毒性の検出感度が異なることがある。

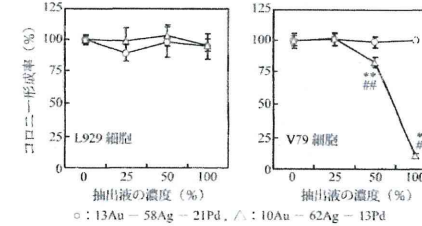


図2 歯科鑄造用金銀パラジウム合金(24 時間抽出液)のL929 細胞及びV79 細胞に対する細胞毒性³⁾

おわりに

細胞毒性試験は毒性発現メカニズムを明らかにするための手段として研究され、細胞種や試験条件、評価指標などが異なる様々な試験法が開発されてきた。それらの中で、医療機器の安全性評価を目的とするなら、コロニー法は、検出感度が高く、特殊な機器を必要とせず、定量的評価が可能であることから、適当な試験方法のひとつである。また、試験に用いる細胞種や抽出条件によって細胞毒性の検出感度が異なるため、試験材料の細胞毒性を相対的に評価するためには、対照材料との比較が不可欠である。もちろん、医療機器や材料の性状及び使用条件等を考慮して、適切な試験方法及び試験条件を選択することが最も重要である。

文 献

- 1) ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, (2009)
- 2) 医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方(医療機器の生物学的安全性試験法ガイドンス), 平成24年3月1日付け薬食機発0301第20号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知, (2012), 8-19
- 3) A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, J. Biomed. Mater. Res., **39**, 331-340 (1998)
- 4) 山本玲子, 金属, **72**, 20-28(2002)
- 5) K. Isama, A. Matsuoka, Y. Haishima, T. Tsuchiya, Mater. Trans., **43**, 3155-3159 (2002)

—Note—

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）におけるトリフェニル錫化合物（TPT）及びトリブチル錫化合物（TBT）の試験法改定に係わる検討

河上強志,*^a 伊佐間和郎,^a 中島晴信,^b 吉田 仁,^b 大嶋智子,^c 大野浩之,^d
上村 仁,^e 塩田寛子,^f 菊地洋子,^f 松岡厚子,^g 西村哲治^{h,i}

Examination of Analytical Method for Triphenyltin (TPT) and Tributyltin (TBT) to Revise the Official Methods Based on “Act on the Control of Household Products Containing Harmful Substances”

Tsuyoshi Kawakami,*^a Kazuo Isama,^a Harunobu Nakashima,^b Jin Yoshida,^b
Tomoko Ooshima,^c Hiroyuki Ohno,^d Hitoshi Uemura,^e Hiroko Shioda,^f
Yoko Kikuchi,^f Atsuko Matsuoka,^g and Tetsuji Nishimura^{h,i}

^aNational Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; ^bOsaka Prefectural Institute of Public Health; 3-69 Nakamichi 1-chome, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan; ^cOsaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences; 8-34 Tojocho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan; ^dNagoya City Public Health Research Institute; 1-11 Hagiyama-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan; ^eKanagawa Prefectural Institute of Public Health; 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253-0087, Japan; ^fand ^gTokyo Metropolitan Institute of Public Health; 24-1 Hyakunincho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan.

(Received May 16, 2012; Accepted July 8, 2012)

The use of triphenyltin (TPT) and tributyltin (TBT) in some household products is banned by “Act on the Control of Household Products Containing Harmful Substances” in Japan. To revise the official analytical method, the method for detecting these organotin compounds was examined in six laboratories using a textile product, water-based adhesive, oil-based paint, which contained known amounts of TPT and TBT (0.1, 1.0, 10 µg/g). TPT and TBT were measured by GC-MS after ethyl-derivation with sodium tetraethylborate. The TBT recoveries in the samples were 70–120%. The TPT recoveries in the water-based adhesive samples were 80–110%, while its concentrations in the textile product and oil-based paint samples decreased because of dephenylation during storage. However, the precision of the method examined was satisfactory because most coefficients of variation for TPT and TBT in the samples were less than 10%. Furthermore, the revised method was able to detect concentrations lower than the officially regulated value. However, the sample matrix and the condition of analytical instrument might affect the estimated TPT and TBT concentrations. Therefore, the revised method may not be suitable for quantitative tests; rather, it can be employed to judge the acceptable levels of these organotin compounds by comparing the values of control sample containing regulated amounts of TPT and TBT with those for an unknown sample, with deuterated TPT and TBT as surrogate substances. It is desirable that TPT in textile and oil-based paint samples are analyzed immediately after the samples obtained because of the decomposition of TPT.

Key words—tributyltin; triphenyltin; household product; GC-MS; surrogate substance

緒 言

トリフェニル錫化合物（TPT）及びトリブチル

The authors declare no conflict of interest.

^a国立医薬品食品衛生研究所, ^b大阪府立公衆衛生研究所, ^c大阪府立環境科学研究所, ^d名古屋市衛生研究所, ^e神奈川県衛生研究所, ^f東京都健康安全研究センター, ^g現所属: ^h帝京平成大学
ⁱe-mail: tkawa@nihs.go.jp

錫化合物（TBT）は抗菌剤・防カビ剤として繊維製品、接着剤及び塗料などに用いられてきた。一方で、これらの化合物は皮膚刺激性を有し、経皮吸収され易く、生殖機能障害を引き起こすことが知られており、人体に直接接触する家庭用品にはこれら化合物を使用させないことを目的として、TPTは昭和54年1月1日、TBTは昭和55年4月1日に「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律

（有害物質含有家庭用品規制法）」によって、対象家庭用品の基準値が設定された。¹⁾

この法律で規定されているTPT及びTBTの試験法は、家庭用品からこれらの化合物を溶媒抽出後に、活性アルミナカラムによる精製及び硝酸分解を行い、フレームレス原子吸光法（AAS）によって錫量を測定する方法である。さらに、1 µg/g以上の錫が検出された場合には、2次元薄層クロマトグラフ法（TLC）によりTPT及びTBTの存在を確認することが求められている。^{1,3)}しかしながら、この方法ではフレームレスAASにおいて錫としてしか定量できないこと、2次元TLCでの定性確認時に行われるジチゾンの噴霧により生成したジチゾン錯体の黄色の発色が短時間に消失すること、夾雑物質によりスポット位置が移動したり拡散したりすることなど、多くの分析上の問題点が指摘され続けてきた。⁴⁻⁷⁾

一方、家庭用品以外でも、例えば、ポリ塩化ビニル（PVC）及びシリコン樹脂などには安定剤として有機錫化合物が使用されてきた。PVC製の食品用器具及び容器包装については、現在、食品衛生法によってジブチル錫化合物（DBT）含有量が規制されているため、ジブチル錫化合物（DOT）が主流となっており、DBTやDOTについて様々な分析法が検討されている。⁸⁻¹²⁾また、船舶や漁網の塗料や防汚剤としてTPT及びTBTが利用されてきたが、低濃度の有機錫化合物による巻貝などへの悪影響が明らかとなったことから、水、底質及び生物試料中の有機錫化合物の分析法が検討されてきた。¹³⁻¹⁵⁾これらの分析法は主に、有機錫化合物の分離にガスクロマトグラフ（GC）を用い、検出器には電子捕獲型検出器（ECD）、^{4,6,16-18)}原子発光検出器（AED）、⁹⁾炎光度検出器（FPD）^{5,8,19)}及び質量分析計（MS）^{7,11-15,20-23)}を用いている。また、TPT及びTBTなどの有機錫化合物のGC分析には誘導体化が必要となるが、その誘導体化法についてはGrignard試薬を用いるプロピル化、^{5,9,13,19,20)}テトラエチルホウ酸ナトリウム（NaBEt₄）によるエチル化^{7,9-12,15,16,21-23)}及び水素化ホウ素ナトリウム（NaBH₄）による水素化^{5,7,8,18)}などが検討されてきた。さらに、試料溶液の精製には活性アルミナ、^{1,2,4,5,24)}シリカゲル、^{7,18,19)}フロリジル^{6,7,15,16,23)}及び陽イオン交換樹脂^{13,17)}などが検討されている。

このように、家庭用品以外のTPT及びTBTを始めとした有機錫化合物の試験法は様々な点で改良されているのに対して、有害物質含有家庭用品規制法ではこれまでに問題点が指摘されているものの、現在でも前述のようにフレームレスAAS及び2次元TLCを用いる公定法がいまだに採用されている。有害物質含有家庭用品規制法で対象とされている家庭用品は、おしめ、おしめカバー、下着などの繊維製品、家庭用接着剤及び塗料、家庭用ワックス、くつ墨及びくつクリームであり、繊維製品、水性製品及び油性製品の3つに大きく分類して分析法が規定されている。¹⁾そこで、われわれは家庭用品中のTPT及びTBTについて、誘導体化試薬にNaBEt₄を、分離及び定量にGC-MSを用いて、繊維製品、水性接着剤及び塗料、油性接着剤及び塗料の分析法を開発し報告してきた。^{7,22,23)}今回、有害物質含有家庭用品規制法におけるTPT及びTBTの試験法改定にむけて、それらの今までに開発した分析法の一部を改良し、複数の機関で繊維製品、水性接着剤及び油性塗料について既知濃度の同一試料を用いて、改正試験法としての妥当性を検討したので報告する。

方 法

1. 実施機関 国立医薬品食品衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、神奈川県衛生研究所、名古屋市衛生研究所、東京都健康安全研究センター、大阪府立環境科学研究所の6機関（機関A-F）で行った。なお、機関Bの結果については既に報告済みである。²⁵⁾

2. 試薬など 塩化トリブチル錫、塩化トリブチル錫-d₂₇（サロゲート物質）、塩化トリフェニル錫及びテトラブチル錫-d₃₆（TeBT-d₃₆：サロゲート物質回収率評価用）については和光純薬工業製、塩化トリフェニル錫-d₁₅（サロゲート物質）については関東化学製を用いた。これらは全機関で同一ロット製品を使用した。また、配付試料の作製には東京化成工業製の塩化トリフェニル錫及び塩化トリブチル錫を用いた。有機錫化合物以外の試薬類については、それぞれ規格に沿ったものを各機関で用意して使用した。その際、それらの製造元は特に指定しなかった。具体的には、溶媒（ヘキサン、アセトン、エタノール、ジエチルエーテル）はJIS規格の残留農

薬分析用を、塩酸、酢酸、酢酸ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは JIS 規格の特級試薬を、テトラエチルホウ酸ナトリウム (NaBEt₄) は一般試薬をそれぞれ用いた。2 mol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液は、2 mol/L 酢酸及び 2 mol/L 酢酸ナトリウム水溶液を体積比 5.9:14.1 で混合後、pH=5 に調整した。また、5% NaBEt₄ 溶液は NaBEt₄ を 5% 含むように精製水に溶解し、この溶液は用時調製として使い切りにした。試料溶液の精製には、カートリッジタイプのシリカゲルカラム (Waters Sep-Pak® Plus Silica 690 mg/1.6 mL) 及びフロリジルカラム (Waters Sep-Pak® Plus Florisil® 910 mg/1.4 mL) を用いた。

3. 試料 配付試料は国立医薬品食品衛生研究所で作製し、まず国立医薬品食品衛生研究所で TPT 及び TBT を測定した後に、各機関に配付された。それらは配付後 3-5 ヶ月以内に試験が実施された。それまで配付試料は、暗所・室温で保管し、特に水性接着剤及び油性塗料の試料は乾燥しないように注意した。

添加用の TPT 及び TBT 標準溶液を、繊維及び水性接着剤試料ではアセトンで、油性塗料試料ではヘキサンでそれぞれ 1000 µg/mL となるように調製し、それぞれの試料に次に示す方法により設定濃度が塩化物として 0.1、1.0 及び 10 µg/g となるように添加した。

繊維試料は綿布を約 1 g の大きさに裁断した後、設定濃度になるようにアセトン標準溶液を添加した。その後、アセトンを揮発させてから試料を 1 枚ずつアルミホイルで包んだ後に配付した。水性接着剤試料は木工用接着剤 (酢酸ビニル樹脂: 40%, 水: 60%) に攪拌時の均一性を向上させるために水を 10% (w/w) 加えたものを用いた。この水性接着剤試料に、設定濃度となるようにアセトン標準溶液を添加し、攪拌機 (HEIDON-BL3000) を用いて均一になるまで十分に攪拌した。この試料を 50 mL 容ネジガラスバイアルに入れ配付した。油性塗料試料は木部用油性ニス (ウレタン樹脂, 有機溶媒) を市販の薄め液 (有機溶剤) で適度に薄めたものに、設定濃度となるように有機錫化合物のヘキサン標準液を添加し、水性接着剤と同様に均一になるまで十分に攪拌した。この試料を 50 mL 容ネジガラスバイアルに入れ配付した。

4. 標準溶液の調製 TPT 及び TBT は、それぞれ 10 mg を正確に秤取り、ヘキサンで正確に 10 mL に定容して標準原液 (1000 µg/mL) を調製した。それぞれを 0.5 mL ずつ正確に 10 mL 容メスフラスコに移して混合し、ヘキサンで定容した (50 µg/mL)。その溶液をヘキサンで希釈し、TBT 及び TPT が各 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 2, 5, 10 µg/mL となるように検量線用標準溶液を調製した。なお、TPT 及び TBT の濃度はすべて塩化物換算で表記した。

各サロゲート物質は、それぞれ 1 mg を正確に秤取りヘキサンで 10 mL に定容して標準原液 (100 µg/mL) を調製した。ただし、1 mg を正確に秤量することが困難な場合には 10 mg を秤取り、適宜希釈して用いた。各標準原液を、0.5 mL ずつ正確に 5 mL 容メスフラスコに移して混合し、繊維製品及び水性接着剤の分析ではアセトンで、油性塗料の分析ではヘキサンで希釈定容し、サロゲート物質混合標準溶液とした (10 µg/mL)。

TeBT-d₃₆ は 10 mg を正確に秤取り、ヘキサンで正確に 10 mL に定容して標準原液 (1000 µg/mL) を調製した。その溶液をヘキサンで正確に希釈して 10 µg/mL となるように調製した。

5. 分析操作

5-1. 繊維試料 繊維試料の分析操作を Fig. 1 に示した。前述のように繊維試料は約 1 g の試料に所定の有機錫が添加されているので、この試料を細切してすべて遠心管に入れた (試料重量については、最後の定量値計算の際には 1 g とした)。その後、サロゲート物質が 10 µg/mL の濃度で含まれるように調製されたアセトン溶液 100 µL、塩酸 0.4 mL 及びアセトン 15 mL を加えて 5 分間振とうした。さらに、ヘキサン 30 mL を加えて 30 分間振とうした後に遠心分離し、繊維を採らないように上清を採取した。次に、アセトン/ヘキサン (3/7=v/v) 混液 30 mL を加えて 30 分間振とうした後、ガラスフィルター付き漏斗 (例: G3) で吸引ろ過して溶液を集めた。残渣をアセトン/ヘキサン混液で洗い込み、初めの上清と合わせて無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、約 2 mL に定容して遠心管に移し、誘導体化を行った。

5-2. 水性接着剤試料 水性接着剤試料の分析操作を Fig. 1 に示した。配付試料をガラス棒など

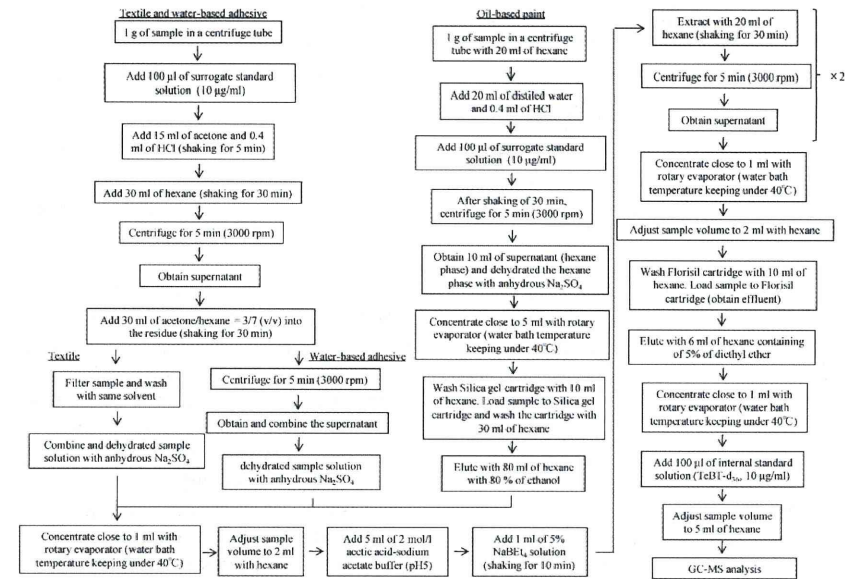


Fig. 1. Scheme of Analytical Methods for Textile Products, Water-based Adhesive and Oil-based Paint

でしっかりと攪拌してから遠心管に 1 g 秤取り取った。そこに、サロゲート物質が 10 µg/mL の濃度で含まれるように調製されたアセトン溶液 100 µL、アセトン 15 mL 及び塩酸 0.4 mL を加えて 5 分間振とうした。その後、ヘキサン 30 mL を加えてさらに 30 分間振とうした後に遠心分離して上清を採取した。もう一度、アセトン/ヘキサン (3/7=v/v) 混液 30 mL を加えて 30 分間振とうした後、遠心分離し上清を採取し初めの上清と合わせて無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、約 2 mL に定容して遠心管に移し、誘導体化を行った。

5-3. 油性塗料試料 油性塗料試料の分析操作を Fig. 1 に示した。配付試料をガラス棒などしっかりと攪拌してから、あらかじめヘキサン 20 mL の入っている遠心管に 1 g を秤取り取った。そこに精製水 20 mL 及び塩酸 0.4 mL を加えた。さらに、サロゲート物質が 10 µg/mL の濃度で含まれるように調製されたヘキサン溶液 100 µL を加えた後に 30 分間振とう抽出した。その後、遠心分離して

ヘキサン相 10 mL を採取し、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。そして、ロータリーエバポレーターで濃縮し、ヘキサン 10 mL でコンディショニングされたシリカゲルカラムに試料溶液を負荷した。この試料を負荷したシリカゲルカラムをヘキサン 30 mL で洗浄した後、80% エタノール含有ヘキサン 80 mL で溶出した。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、約 2 mL に定容して遠心管に移し、誘導体化を行った。

5-4. 誘導体化及び GC-MS 試験用溶液の調製

試料溶液が入っている遠心管に、2 mol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 5 mL を加えた後、5% NaBEt₄ 溶液を 1 mL 加えて 10 分間振とうして誘導体化した。誘導体化後、ヘキサン 20 mL を加えて 30 分間振とうし、遠心分離して上清を採取した。この操作をもう一度行い、得られたヘキサン溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、2 mL に定容した。この溶液をあらかじめヘキサン 10 mL でコンディショニングしたフロリジルカラムに負荷し、流出液を採取した。さらに、5% ジエチルエーテル

含有ヘキササン溶液 6 mL で溶出した。その後、得られた溶液をロータリーエバポレーターで約 1 mL まで濃縮した後、サロゲート物質の回収率評価用としての TeBT-d₃₆ を 10 µg/mL 含むヘキササン溶液 100 µL 加え、全体をヘキササンで 5 mL に定容し、その溶液の一部を GC-MS にて測定した。

5-5. 検量線 各濃度の検量線用標準溶液を 1 mL ずつ 50 mL 容遠心管にそれぞれ移し、そこにサロゲート物質が 10 µg/mL の濃度で含まれるように調製した溶液（繊維及び水性接着剤試料ではアセトン溶液、油性塗料試料ではヘキササン溶液）100 µL を加えた。そして 2 mol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 5 mL を加え軽く攪拌した後に、5% NaBEt₄ 溶液を 1 mL 加えて 10 分間振とうして誘導体化した。その後、ヘキササン 20 mL で 2 回抽出し、得られたヘキササン溶液をロータリーエバポレーターで約 1 mL まで濃縮した。そこに、サロゲート物質の回収率評価用として 10 µg/mL となるようにヘキササンで希釈調製された TeBT-d₃₆ を 100 µL 加え、全体をヘキササンで 5 mL に定容し、その溶液の一部を GC-MS にて測定した。このとき、検量線範囲は注入時濃度として 0.01–2 µg/mL であり、各サロゲート物質及び TeBT-d₃₆ 濃度は 0.2 µg/mL である。なお、誘導体化以降の操作はフロリジルカラムによる精製を除き試料の場合と同様である。

定量は各サロゲート物質を内部標準物質とし、内部標準法で検量線を作成して行った。また、サロゲート物質の回収率を確認するため TeBT-d₃₆ に対する各サロゲート物質の検量線のピーク面積と試料から得られたピーク面積の比を別途求めた。²³⁾

5-6. GC-MS 条件 各機関で、可能な限り条件を統一して分析を行った。ただし、各機関では使用した装置がそれぞれ異なっており、装置によって

は GC のカラム温度条件などで同一条件の設定ができない場合があったため、そのような場合は適宜装置に適した条件に変更した。カラムには 5% フェニルメチルシリコンがコーティングされた溶融シリカキャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm, 膜厚 0.25 µm) を用いた。キャリアーガスには He を用い、流量は 1.0 mL/min に設定した。注入口、トランスファーライン及びイオンソース温度はそれぞれ 270 °C (機関 A ではホットニードル法を用い 250 °C に設定)、280 及び 230 °C に設定し、スプリットレスモードで試料溶液を 1 µL 注入した。カラムオーブンプログラムは初期温度 60 °C で 2 分間保持させた後、130 °C まで 20 °C/分 で昇温させた。その後、210 °C まで 10 °C/分、260 °C まで 5 °C/分 で昇温した後、300 °C まで 10 °C/分 で昇温して最終温度で 5 分間保持した (機関 B では、初期温度 50 °C で 1 分間保持後、220 °C まで 10 °C/分 で昇温した。その後、260 °C まで 5 °C/分 で昇温した後、280 °C まで 20 °C/分 で昇温して最終温度で 5 分間保持した)。²⁵⁾ イオン化法は電子イオン化 (Electron Ionization: EI) 法、イオン化電圧は 70 eV とした。測定は選択イオン検出 (Selected Ion Monitoring: SIM) モードにて行った。各測定対象物質の定量・定性イオンなどについては Table 1 に記載した。

結果及び考察

1. 試験法の改良 本報告で用いた分析方法は、われわれがこれまでに報告した繊維製品、水性接着剤及び塗料、油性接着剤及び塗料中の有機錫化合物の分析法^{7,22,23)} を基にしている。これらの報告では、誘導体化の振とう時間などの条件や最終液量が異なっていたため、誘導体化以降の操作の統一を図った。また、油性接着剤及び塗料に関しては、既

報⁷⁾では過去の使用実態²⁶⁾に合わせて 20–200 µg/g で添加回収試験を行っているが、今回は、現行法で求められているフレームレス AAS の検出限界値 (錫として 0.2 µg/g, TPT 及び TBT として 0.65 及び 0.55 µg/g)²⁷⁾ 以下の濃度に関して検討するために、最少濃度を 0.1 µg/g とした。そこで、予備試験として既報⁷⁾の油性試料のシリカゲルカラムを用いた精製法 (20% エタノール含有ヘキササン 20 mL で溶出) について 0.1 µg/g 試料を分析することを想定して、標準溶液の回収率を調べたところ、TPT 及び TBT はともにほとんど回収できなかった。このシリカゲルカラムによる精製は誘導体化前に実施しており、TPT 及び TBT は極性が比較的強い塩化物として存在しているため、低濃度の TPT 及び TBT はシリカゲルカラムから溶出し難かったと考えられた。そこで、溶出溶媒のエタノール組成及び溶出液量を変化させて検討したところ、80% エタノール含有ヘキササン 80 mL で溶出した場合、TPT 及び TBT はともに 90% 以上の回収率を得ることができた。その際、TPT は 0–40 mL, TBT は 20–80 mL の画分にそれぞれ溶出した。この結果を踏まえて油性塗料試料の分析では溶出溶媒には 80% エタノール含有ヘキササン 80 mL を用いた。

2. 試験結果 今回用いた試料は、試料作製後直ちに国立医薬品食品衛生研究所 (機関 A) において TPT 及び TBT 濃度を測定した (Table 2)。各試料は繰り返し 3 回測定した。その結果、繊維及び油性塗料試料の 10 µg/g (TPT) の分析値は 8.4 及び 7.6 µg/g とやや低い値を示したものの、試料作製方法などを勘案すると概ね設定濃度と一致していると考えられた。その変動係数 (CV) も水性接着剤試料の 10 µg/g (TBT) の 13% を除けばすべての試料で 10% 以下となり、試料の均一性には問題はなかった。

各機関の分析値の一覧を Table 2 に示した。検量線については、注入時濃度 0.01–2 µg/mL の範囲で良好な直線性を示した機関と、2 次曲線化した機関とがあった。これは、測定に用いた GC-MS 装置の違い及びその装置状態が影響していると考えられた。今回は、各機関でそれぞれ適切な検量線を用いて定量した。機関 A の検量線を代表例として Fig. 2 に示した。また、繊維試料、水性接着剤試料及び油性塗料試料 (1.0 µg/g) から得られた代表的なク

ロマトグラムを Fig. 3 に示した。各機関における TPT 及び TBT の回収率を、「回収率 (%) = 100 × (機関 B-F の測定値) / (機関 A の測定値)」として計算した。

繊維試料では、TBT の回収率は配付前の濃度に対して機関 B 及び F の 0.1 µg/g 試料でそれぞれ 123% 及び 66% となったが、それ以外は 70–120% の範囲内であった。CV 値も低濃度で若干 10% を超え

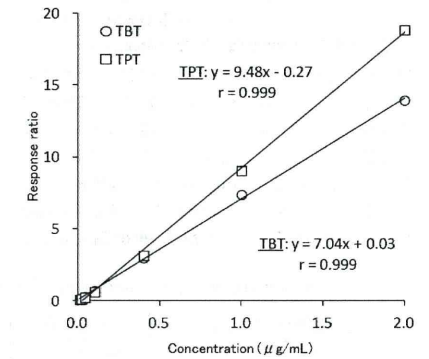


Fig. 2. Calibration Curves of TPT and TBT (laboratory A)

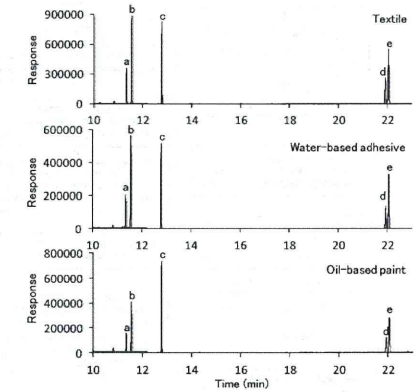


Fig. 3. Total Ion Chromatograms (SIM Mode) Obtained from Textile, Water-based Adhesive, and Oil-based Paint (added amount: 1.0 µg/g, laboratory A)
a: TBT-d₃₇, b: TBT, c: TeBT-d₃₆, d: TPT-d₁₅, e: TPT.

Table 1. GC Retention Times, Quantifying and Qualifying Ions of the Organotin Compound

| Organotin compound | Abbreviation | Retention time ^a (min) | Quantifying ion (m/z) | Qualifying ion (m/z) |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Tributyltin | TBT | 10.57 | 263 | 261 |
| Triphenyltin | TPT | 20.33 | 351 | 349 |
| Tributyltin-d ₃₇ | TBT-d ₃₇ | 10.37 | 318 | 316 |
| Triphenyltin-d ₁₅ | TPT-d ₁₅ | 20.21 | 366 | 364 |
| Tetrabutyltin-d ₃₆ | TeBT-d ₃₆ | 11.80 | 318 | 316 |

^a Case of laboratory A.

Table 2. Average (Ave: $\mu\text{g/g}$) and Coefficients of Variation (CV: %) of Organotin Compounds Measured in Each Laboratory ($n=3$)

| Sample | Setting concentration | TBT | | | | | | TPT | | | | | | |
|----------------------|-----------------------|------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|--------|-------|------|
| | | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | |
| Textile | 0.1 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 0.12 | 0.15 | 0.13 | 0.13 | 0.091 | 0.10 | 0.078 | 0.12 | 0.20 | 0.0071 | 0.017 | |
| | | CV | 0.095 | 6.4 | 4.0 | 2.5 | 15 | 19 | 1.9 | 1.1 | 1.2 | 2.1 | 38 | 6.7 |
| | 1.0 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 0.98 | 0.93 | 0.86 | 0.94 | 0.90 | 0.85 | 0.85 | 0.48 | 0.35 | 0.48 | 0.32 | 0.33 |
| | | CV | 2.1 | 1.2 | 2.5 | 2.0 | 1.1 | 7.8 | 1.4 | 1.9 | 3.0 | 1.5 | 3.1 | 13 |
| | 10 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 10 | 9.5 | 8.8 | 9.4 | 9.3 | 11 | 8.4 | 7.6 | 5.1 | 5.9 | 5.8 | 5.6 |
| | | CV | 7.8 | 0.69 | 5.7 | 0.80 | 2.4 | 3.2 | 3.0 | 3.4 | 5.0 | 1.4 | 2.6 | 1.7 |
| 0.1 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 0.12 | 0.15 | 0.15 | 0.14 | 0.10 | 0.091 | 0.13 | 0.14 | 0.19 | 0.26 | 0.14 | 0.12 | |
| | CV | 5.2 | 0.65 | 1.1 | 1.5 | 3.4 | 15 | 0.92 | 1.3 | 1.2 | 1.2 | 4.2 | 0.57 | |
| Water-based adhesive | 1.0 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 1.1 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.97 | 1.0 | 0.89 | 0.97 | 0.93 | 0.90 | 0.93 | |
| | CV | 9.0 | 1.3 | 1.4 | 0.70 | 2.6 | 0.75 | 3.2 | 1.3 | 1.3 | 0.90 | 0.85 | 1.0 | |
| 10 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 13 | 10 | 10 | 10 | 9.4 | 9.9 | 10 | 9.5 | 8.4 | 9.1 | 8.5 | 8.3 | |
| | CV | 13 | 0.069 | 2.2 | 0.94 | 3.2 | 1.4 | 3.7 | 2.3 | 2.3 | 0.87 | 1.4 | 1.0 | |
| 0.1 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 0.14 | 0.17 | 0.16 | 0.16 | 0.11 | 0.17 | 0.15 | 0.10 | 0.13 | 0.18 | 0.0071 | 0.039 | |
| | CV | 2.7 | 2.3 | 0.18 | 2.0 | 2.7 | 15 | 5.0 | 3.9 | 2.5 | 0.92 | 9.2 | 4.0 | |
| 1.0 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 1.0 | 1.1 | 0.97 | 1.0 | 0.96 | 1.0 | 1.1 | 0.43 | 0.27 | 0.36 | 0.32 | 0.21 | |
| | CV | 2.1 | 1.6 | 4.4 | 1.3 | 1.6 | 3.9 | 0.60 | 1.0 | 5.3 | 1.0 | 0.22 | 0.35 | |
| 10 $\mu\text{g/g}$ | Ave | 9.9 | 11 | 8.6 | 10 | 10 | 10 | 7.6 | 3.7 | 1.3 | 2.2 | 1.4 | 1.5 | |
| | CV | 0.88 | 0.42 | 2.8 | 1.6 | 1.7 | 1.9 | 0.53 | 1.3 | 0.49 | 0.86 | 1.3 | 9.9 | |

る値があったものの、全体的には10%以下となり良好な精度が得られた。一方で、TPTについては各試料のほとんどで70%未満となり、配付前に比べて濃度が低下する傾向が認められた。ただし、繊維試料中のTPTのCV値は0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料では機関B及びE、1.0 $\mu\text{g/g}$ 試料では機関Fで10%を超えたものの、全体的には10%以下となり、良好な精度が得られた。

水性接着剤試料では、TBTの回収率は配付前の濃度に対して機関B及びCの0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料で120%を若干超えたが、それ以外は70-120%以内であった。CV値も2検体のみ10%をやや超える値があったものの、ほとんどは5%以下となり、非常に良好な精度が得られた。また、TPTについても機関C及びDの0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料で、配付前と比べて146%及び202%となったが、それ以外では80-110%以内であった。TPTのCV値はすべての機関で5%以下となり非常に良好な精度が得られた。

油性塗料試料では、TBTの回収率は配付前の濃度に対して機関B及びFの0.1 $\mu\text{g/g}$ 試料で120%を若干超えたが、それ以外は80-120%以内であった。CV値も機関Fの0.1 $\mu\text{g/g}$ で15%となったもののそれ以外は5%以下となり、非常に良好な精度が得られた。一方、TPTについては繊維試料と同様に、ほとんどの機関で配付前に比べて濃度が大幅に低下していた。ただし、CV値はすべての機関で10%以下となり、分析精度は良好であった。

以上の結果より、水性接着剤中のTPT及び全試料のTBTについては概ね配付前の濃度と同じ値を得ることができた。また、濃度が低下したTPTの分析値も含め、繰り返し3回分析時のCV値はそのほとんどが10%以下と小さく、本試験法は十分な精度が確保できると考えられた。

一方、繊維及び油性塗料試料のTPT濃度については、試料配付前の濃度に比べて大幅に低下する傾向が認められ、その傾向は油性塗料で特に顕著に認められた。そこで、分析操作中のサロゲート物質の挙動について調べるため、サロゲート物質の回収率を検量線作成時のサロゲート物質とTeBT-d₃₆との面積比に対する試料中のそれらの面積比から求めたところ (Table 3)、機関A及びCで非常に高いか又は低い値がいくつかあったものの、その他は良好な回収率を示し、サロゲート物質の回収率が著しく

低下することはなかった。この結果から、分析操作中にTPTが大幅に損失した可能性は低いと考えられた。また、本試験法ではサロゲート物質による補正を行っているため、各機関間での回収率の差異による影響は軽減されていると考えられる。TPTは脱フェニルして分解し易いことが報告されている。^{14,23,28} 今回の試験では、配付試料の保管は実際の家庭用品の保管と同様に室温・暗所にて行い、各機関での分析時期も配付前の分析時から3-5ヵ月経過していた。機関B-Fの中で最も初めに分析を行った機関Bは配付3ヵ月後に分析を実施したが、このとき既に脱フェニルによると考えられる繊維及び油性試料中のTPT濃度の低下が認められており、²⁵ 機関B-Fで観察された繊維及び油性塗料中のTPT濃度の低下は、試料保存中にTPTが脱フェニル分解したことによるものと考えられた。機関FではGC-MS分析時にTPT及びTBT以外の有機錫化合物についてモニターしたところ、繊維試料中にジフェニル錫化合物 (DPT) の存在が確認された (Fig. 4)。一方、油性塗料試料ではDPTの存在は確認されなかったが、油性塗料の分析では誘導体

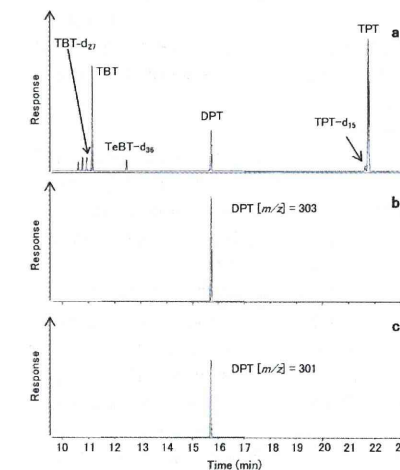


Fig. 4. GC-MS Chromatograms Obtained from the Textile Sample (added amount: 10 $\mu\text{g/g}$, laboratory F)
a: total ion chromatogram (SIM mode including fragment ion of DPT), mass chromatogram of DPT; b: [m/z]=303, c: [m/z]=301.

Table 3. Recoveries (%) and Coefficients of Variation (CV: %) of Deuterated Organotin Compounds Used as Surrogate Standard Measured in Each Laboratory Resluts (n=3)^a

| Sample | Setting concentration | TBT | | | | | TPT | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|--------|-----|------|------|-----|
| | | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | |
| Textile | 0.1 µg/g | Ave | 92 | 85 | 86 | 82 | 91 | 105 | 92 | 77 | 99 | 68 | 75 | 76 |
| | | CV | 2.2 | 1.6 | 4.9 | 12 | 7.4 | 4.4 | 5.3 | 26 | 42 | 24 | 14 | 8.5 |
| | 1.0 µg/g | Ave | 86 | 80 | 84 | 89 | 93 | 93 | 74 | 72 | 122 | 82 | 63 | 80 |
| | | CV | 1.0 | 1.9 | 2.7 | 1.7 | 2.2 | 6.7 | 9.3 | 15 | 8.2 | 5.0 | 25 | 6.0 |
| Water-based adhesive | 10 µg/g | Ave | 93 | 100 | 70 | 72 | 95 | 94 | 100 | 91 | 67 | 53 | 64 | 76 |
| | | CV | 4.0 | 2.9 | 43 | 6.4 | 3.4 | 15 | 4.1 | 6.7 | 83 | 11 | 13 | 6.6 |
| | 0.1 µg/g | Ave | 92 | 99 | 66 | 91 | 100 | 96 | 92 | 100 | 102 | 84 | 98 | 97 |
| | | CV | 2.2 | 0.53 | 4.1 | 2.7 | 2.6 | 18 | 5.3 | 0.015 | 10 | 2.5 | 11 | 4.2 |
| Oil-based paint ^b | 1.0 µg/g | Ave | 86 | 99 | 75 | 90 | 100 | 95 | 74 | 100 | 106 | 84 | 97 | 97 |
| | | CV | 1.0 | 0.12 | 6.2 | 1.4 | 4.1 | 11 | 9.3 | 0.0058 | 9.5 | 2.2 | 9.5 | 6.5 |
| | 10 µg/g | Ave | 93 | 99 | 68 | 90 | 100 | 106 | 100 | 100 | 96 | 85 | 102 | 90 |
| | | CV | 4.0 | 0.13 | 1.4 | 1.3 | 3.3 | 9.4 | 4.1 | 0.042 | 6.9 | 1.2 | 3.9 | 12 |
| Oil-based paint ^b | 0.1 µg/g | Ave | 158 | 43 | 39 | 39 | 44 | 49 | 225 | 43 | 80 | 47 | 53 | 55 |
| | | CV | 4.0 | 0.62 | 3.5 | 0.42 | 2.4 | 3.7 | 3.0 | 5.4 | 1.4 | 1.9 | 2.9 | 12 |
| | 1.0 µg/g | Ave | 63 | 39 | 5.6 | 40 | 45 | 51 | 90 | 39 | 20 | 49 | 54 | 60 |
| | | CV | 18 | 17 | 40 | 1.7 | 3.5 | 0.68 | 12 | 18 | 45 | 0.83 | 0.63 | 3.9 |
| 10 µg/g | Ave | 55 | 42 | 11 | 40 | 44 | 46 | 80 | 45 | 30 | 50 | 53 | 54 | |
| | CV | 21 | 4.3 | 57 | 1.1 | 1.3 | 1.6 | 21 | 2.4 | 56 | 1.7 | 3.1 | 9.7 | |

^a Recovery of surrogate standard (%) = $100 \times (B/A)$. A = (area of surrogate compound obtained from standard curve/area of TBT-d₆ obtained from standard curve), B = (area of surrogate compound obtained from sample/area of TBT-d₆ obtained from sample), ^b Theoretical recovery of oil-based paint sample is 30% because half of oil paint samples was used for analysis.

化前にシリカゲルカラムによる精製を行っており、DPTの方がTPT及びTBTよりも極性が強く、カラムに保持され溶出されていないと推測され、油性塗料試料についてもTPTの脱フェニル分解とそれに伴うDPT生成の可能性は否定できない。

分析操作に関して、油性塗料試料のシリカゲルカラムによる精製では80 mLの溶出溶媒を用いるため、ミニカラムではなくオープンカラムの方が操作し易いとの指摘があった。また、衛生試験法における器具・容器包装及び玩具中のDBT分析²⁹⁾では、DBTのガラス壁面への吸着を防ぐために、標準溶液をアセトンで調製する際に塩酸を数滴加えており、本試験法におけるアセトンでの標準品調製時にも同様の操作を行う方がよいとの指摘があった。その他、同一機関でメーカーの異なる2台のGC-MSを比較したところ、片方の機器では検量線の一番低濃度(注入時: 0.01 µg/mL)の測定が困難であった。そのため、分析機器の状態などによっては安定して測定できる濃度まで試料溶液を濃縮する必要があると考えられる。

3. 公定法の改正について 有害物質含有家庭用品規制法でTPT及びTBTが規制されている家庭用品は、おしめ、おしめカバー、下着などの繊維製品、家庭用接着剤及び塗料、家庭用ワックス、くつ墨及びくつクリームと多岐にわたる。そのため、繊維、水性及び油性製品の3つに大きく分類して試験法が規定されている。今回、試験法の改正のために検討した方法も、現行法と同様に抽出方法を3つに分けて行った。これらの家庭用品では、夾雑物質が製品毎に大きく異なり、それらの影響によってTPT及びTBTの回収率が差が生じるため、サロゲート物質としてTPT及びTBTの重水素化合物を用いた定量法が検討され、その有効性が報告されている。^{7,22,23)} 本試験法でもそれらと同様に、サロゲート物質を分析操作の第一段階から添加することで夾雑物質の影響が補正され、各機関の分析値のCV値が小さく抑えられて良好な精度(再現性)が得られ、サロゲート物質が非常に有効であることが示された。

現行法では2次元TLC分析時の検出限界値が試験法全体の検出限界値として採用されている。²⁷⁾ これは錫として1.0 µg/gであり、TPT及びTBTとしてそれぞれ3.25及び2.75 µg/gとなる。また、フ

レームレスAASの検出限界値は錫として0.2 µg/gとされ、²⁷⁾ TPT及びTBTとしてはそれぞれ0.65及び0.55 µg/gである。今回の試験法はこれらの値を下回る試料でも定量可能であった。特に、過去に油性塗料中でTBTが高濃度(1240-1380 µg/g)で検出されている¹⁷⁾にもかかわらず、現行法では油性塗料中のTPT及びTBTの定量・定性は困難である²⁷⁾とされてきたが、今回の試験法では定量分析が可能であった。また、有機錫化合物の誘導体化に関していくつかの方法が存在するが、NaBeEt₄を用いる方法は比較的簡易であり有効であると言える。以上から、NaBeEt₄で対象化合物を誘導体化し、サロゲート物質を用いてGC-MSで測定する本方法は改正試験法として有効であると考えられた。

ただし、今回の試験では一部で夾雑物質などの影響や分析操作中の損失によると推測されるサロゲート物質の回収率のばらつきが認められた。そのため、基準値超過を判定するためには、定量試験ではなく比較試験が望ましいと考えられた。すなわち、あらかじめ対象化合物を含まないことが確認された対照試料に、基準値と同じ濃度の対象化合物を添加し、所定の操作で分析して各対象化合物とサロゲート物質とのピーク面積比を求めておき、試料中の各対象化合物とサロゲート物質とのピーク面積比を比較し基準値超過の有無を判定する方法である。また、繊維試料及び油性塗料では試料保存中にTPTが分解する可能性があることから、試料入手後速やかに分析することが望ましいと思われる。

結 論

有害物質含有家庭用品規制法におけるTPT及びTBT試験法の改定に向けて、これまでに開発してきた分析法を基に改良を加えた試験法を考案し、6機関で繊維製品、水性接着剤及び油性塗料について既知濃度(0.1, 1.0, 10 µg/g)の同一試料を用いて妥当性を検討した。その結果、TPTについて繊維及び油性塗料試料では、試料保管時に脱フェニル分解したと考えられ、試料作製時に比べて濃度が大幅に低下していた。しかしながら、分析値のCV値は概ね10%以下であり分析法の精度には問題ないと考えられた。TBTの測定値については、配付試料と比べていくつかの0.1 µg/g試料で120%を超えたり70%未満となったりしたが、それ以外の試料で

は70-120%の範囲内となり、CV値についてもそのほとんどが10%以下と精度も問題ないと考えられた。今回、試験に用いた試料中のTPT及びTBTの濃度範囲は、現行法の基準値を下回っており、本試験法は現行法よりも低濃度まで測定できた。一方、改正試験法としては、夾雑物質や測定機器の状態などが分析値に影響すると考えられたことから、サロゲート標準物質を使用し対照試料を用いた比較試験とすることが望ましいと考えられた。また、TPTについては繊維及び油性塗料試料中での分解が考えられたことから、実際の検査では試料入手後に速やかに分析することが望ましいと思われる。

REFERENCES

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare, Act on Control of Household Products Containing Harmful Substances. Act No. 112 of 1973.
- 2) Kojima S., Nakamura A., Kaniwa M., *Eisei Kagaku*, **25**, 141-146 (1979).
- 3) Kojima S., *Analyst*, **104**, 660-667 (1979).
- 4) Nakashima H., Matsunaga I., *Proceedings of Osaka Prefectural Institute of Public Health, Ed. of Industrial Health*, **22**, 47-53 (1984).
- 5) Nozaki Y., Hirata Y., Maeda T., *Annual Report of the Miyazaki Prefectural Institute of Public Health and Environment*, **5**, 58-61 (1993).
- 6) Yamanobe H., Kishimoto K., Iwasaki Y., Kan T., Nakamura H., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **46**, 86-89 (1995).
- 7) Nakashima H., Tomiyama K., Kawakami T., Isama K., *Yakugaku Zasshi*, **130**, 945-954 (2010).
- 8) Ohno H., Suzuki M., Iwama M., Nakashima S., Aoyama T., Yamamoto K., *Ann. Rep. Nagoya City Public Health Res. Inst.*, **42**, 17-20 (1996).
- 9) Kawamura Y., Maehara T., Suzuki T., Yamada T., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **41**, 246-253 (2000).
- 10) Ohno H., Suzuki M., Nakashima S., Aoyama T., Mitani K., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **43**, 208-214 (2002).
- 11) Ohno H., Suzuki M., Aoyama T., Mitani K., *Ann. Rep. Nagoya City Public Health Res. Inst.*, **49**, 19-22 (2003).
- 12) Ohno H., Suzuki M., Aoyama T., Mitani K., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **44**, 208-212 (2003).
- 13) Nakamura K., Kinoshita M., Matsubara H., *Annual Report of the Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences*, **24**, 135-138 (1999).
- 14) Iwamura T., Kadokami K., Jin-ya D., Hanada Y., Suzuki M., *Bunseki Kagaku*, **48**, 555-561 (1999).
- 15) Iwamura T., Kadokami K., Jin-ya D., Tanada K., *Bunseki Kagaku*, **49**, 523-528 (2000).
- 16) Nakashima H., Matsunaga I., Miyano N., *Proceedings of Osaka Prefectural Institute of Public Health, Ed. of Industrial Health*, **21**, 41-46 (1983).
- 17) Saitoh M., Nakamura T., Ohmiya S., Yamada A., *J. Urban Living Health Assoc.*, **32**, 11-17 (1988).
- 18) Yagi M., Ichihashi A., *Annual Report of Amagasaki City Institute of Public Health*, **17**, 35-40 (1990).
- 19) Yamada S., Ozono K., Ueno S., Ishizaki M., *Annual Report of Ibaraki Prefectural Institute of Public Health*, **31**, 38-41 (1993).
- 20) Hasegawa K., Utsunomiya A., Setsuta S., *Bull. Kanagawa P.H. Lab.*, **24**, 38-42 (1994).
- 21) Naedoko E., Yamaguchi R., Higuchi M., Yamato Y., Takahashi M., *Proceeding of 41st Zenkoku Eisei Kagaku Gijyutsu Kyogikai*, **206**-207 (2003).
- 22) Ooshima T., Miyamoto T., Mori Y., *Proceeding of 44th Zenkoku Eisei Kagaku Gijyutsu Kyogikai*, **291**-292 (2007).
- 23) Kawakami T., Isama K., Nakashima H., Ooshima T., Tsuchiya T., Matsuoka A., *Yakugaku Zasshi*, **130**, 223-235 (2010).
- 24) Nakashima H., Matunaga I., Tani N., *Proceedings of Osaka Prefectural Institute of Public Health, Ed. of Industrial Health*, **19**, 45-49 (1981).
- 25) Nakashima H., Yoshida J., Okayama F., *Bull. Osaka Prefectural Inst. Public Health*, **49**, 31-38 (2011).
- 26) Nakamura A., Kojima S., Kaniwa M., *Proceeding of 18th Zenkoku Eisei Kagaku Gijyutsu Kyogikai*, **94**-95 (1981).
- 27) "Hoken Eisei Anzen Kijyun: Katei youhin kisei kankei jitsumu binran," ed. by Ministry of Health, Labour and Welfare, Dai-ichi Hoki Co., Ltd., Tokyo, 1991, pp. 2045:24-2045:40.
- 28) Water Environmental Division, Ministry of the Environment, Government of Japan: (<http://www.env.go.jp/water/chosa/h14-03/413.pdf>), cited 24 April, 2012.
- 29) "Methods of Analysis in Health Science," ed. by The Pharmaceutical Science Society of Japan, Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, 2005, pp. 227-228.

Survey of Primary Aromatic Amines Originating from Azo Dyes in Commercial Textile Products in Direct Contact with Skin and in Commercial Leather Products in Japan

Tsuyoshi KAWAKAMI¹⁾, Kazuo ISAMA¹⁾ and Tetsuji NISHIMURA^{1,2)}

¹⁾Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences (1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501 Japan)

²⁾Present address: Faculty of Pharmaceutical Science, Teikyo Heisei University (4-1 Uruido-minami, Ichihara, Chiba 290-0193 Japan)

[Received August 9, 2012; Accepted September 19, 2012]

Summary

Twenty-six carcinogenic primary aromatic amines (PAAs) originating from azo dyes in commercial textile products that can potentially come into direct contact with human skin (31 products; 41 samples) and in leather products (23 products; 23 samples) in Japan were investigated. Twelve and 11 PAAs were detected in the textile and leather products, respectively, nearly all at low concentrations (below 1.0 µg/g). However, the concentrations of benzidine (45–593 µg/g) in one shawl and six sheets and covers (seven samples) exceeded European Union (EU) regulatory limits (below 30 µg/g). Concentrations of *o*-toluidine (430 µg/g), benzidine (31 µg/g), and 3,3'-dimethylbenzidine (40 µg/g) in leather products (hand-crafted leather) also exceeded EU regulatory limits. Shawls, sheets, and covers can come into direct contact with human skin. Thus, an exposure evaluation should be performed for benzidine in these products.

Key words: primary aromatic amine, azo dye, textile product, leather product

INTRODUCTION

Since the second half of the 19th century, azo dyes have been widely used in various products such as textiles, leather, paper, etc. because of their low cost and variety of available colors. At present, more than 3000 azo dyes are used globally, constituting 65% of the global commercial dye market¹⁾. However, carcinogenic primary aromatic amines (PAAs) are generated through reductive decomposition of certain azo dyes by microorganisms on the skin, intestinal bacteria, and the liver²⁻⁴⁾. These azo dyes include more than quarter of all of azo dyes that have been synthesized globally; 250 azo dyes contain the benzidine structure⁵⁾. Thus, in 1994, the German government banned the use of certain azo dyes in consumer goods that can potentially come into direct, long-term contact with human skin⁶⁾. According to this regulation, azo dyes degraded through reduction into 20 different PAAs were banned for the first time. Subsequently, European Union (EU) also banned 22 PAAs in 2002 (EU Directive/2002/61/EC)⁷⁾. These azo dyes have been restricted by the regulation Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH)⁸⁾ since 2000. Additional countries have also prohibited 22–24 PAAs, including China, Korea, and Vietnam⁹⁾. Furthermore, voluntary regulations for textile products also contain limits on 24 PAAs (Oeko-Tex[®] Standard 100)¹⁰⁾.

The Rapid Alert System for non-food consumer products (RAPEX) reports weekly violations of EU regulations in the EU

market¹¹⁾. Most contravention cases concerning PAAs in 2010–2011 were reported for clothing, fashion, and interior products. In addition, the majority of violations were reported for products manufactured in China and India. Surveys of PAAs in consumer products in the EU have been performed and the present situation regarding PAAs is clear although only a few studies of PAAs in actual commercial products have been carried out in Japan. Therefore, we previously investigated the concentrations of PAAs in 86 commercial textile products (121 samples) in Japan in Jan-Mar 2009¹²⁾. This previous study detected high concentrations of benzidine, 3,3'-dimethoxybenzidine, and 2,4-diaminotoluene, exceeding the EU regulatory value in several cotton placemats manufactured in India.

Textile products that could potentially come into direct contact with human skin are regulated in the EU, and placemats do not always come into contact with human skin. Thus, the concentrations of PAAs needed to be investigated in textile products that do come into directly contact with human skin. Furthermore, contravention cases for leather products have also been reported by RAPEX¹³⁾. However, the concentrations of PAAs in commercial leather products in Japan are unknown. Thus, the aim of this study was to investigate the concentrations of PAAs in commercial textile products that can potentially come into direct contact with skin and in commercial leather products. Twenty-six PAAs were investigated in this study (Table 1).

Table 1 PAAs investigated

| Compounds | CAS No. | REACH | IARC | Supplier ^c |
|---------------------------------------|----------|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| | | Annex XVII ^a | Group ^b | |
| Aniline | 62-52-3 | – | 3 | D |
| <i>o</i> -Toluidine | 95-53-4 | + | 1 | D |
| 2,4-Xylydine | 95-68-1 | – | 3 | F |
| 2,6-Xylydine | 87-62-7 | – | 2B | F |
| <i>o</i> -Anisidine | 90-04-0 | + | 2B | D |
| 4-Chloroaniline | 106-47-8 | + | 2B | C |
| <i>p</i> -Cresidine | 120-71-8 | + | 2B | D |
| 2,4,5-Trimethylaniline | 137-17-7 | + | 3 | C |
| 1,4-Phenylenediamine | 106-50-3 | – | 3 | F |
| 4-Chloro- <i>o</i> -toluidine | 95-69-2 | + | 2A | B |
| 2,4-Diaminotoluene | 95-80-7 | + | 2B | C |
| 2,4-Diaminoanisole | 615-05-4 | + | 2B | D |
| 2-Naphthylamine | 91-59-8 | + | 1 | A |
| 5-Nitro- <i>o</i> -toluidine | 99-55-8 | + | 3 | B |
| 4-Aminobiphenyl | 92-67-1 | + | 1 | A |
| 4-Aminoazobenzene | 60-09-3 | + | 2B | E |
| 4,4'-Oxydianiline | 101-80-4 | + | 2B | B |
| 4,4'-Methylenedianiline | 101-77-9 | + | 2B | D |
| Benzidine | 92-87-5 | + | 1 | A |
| <i>o</i> -Aminoazotoluene | 97-56-3 | + | 2B | B |
| 4,4'-Methylenedi- <i>o</i> -toluidine | 838-88-0 | + | 2B | B |
| 3,3'-Dimethylbenzidine | 119-93-7 | + | 2B | C |
| 4,4'-Thiodianiline | 139-65-1 | + | 2B | D |
| 4,4'-Methylene-bis-(2-chloro-aniline) | 101-14-4 | + | 1 | B |
| 3,3'-Dichlorobenzidine | 91-94-1 | + | 2B | C |
| 3,3'-Dimethoxybenzidine | 119-90-4 | + | 2B | D |

^a +: Listed PAAs in the REACH Annex XVII⁸⁾

^b IARC classification groups: 1 = Carcinogenic to humans, 2A = Probably carcinogenic to humans, 2B = Possibly carcinogenic to humans, 3 = Not classifiable as to carcinogenic to humans¹³⁾

^c A: SUPELCO, B: Sigma-Aldrich, C: AccuStandard Inc., D: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., E: Fulka, F: Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Commercial textile products that come into direct contact with skin and leather products were purchased from several retail stores in Japan in December 2011 and January 2012. The details (use, color, etc.) of the samples are listed in Table 2. Textile products were separated by color as much as possible (Table 2). A total of 31 textile products (41 samples) and 23 leather products (23 samples) were analyzed. To express the color of the products exactly, samples in which PAAs were detected at levels greater than the EU regulatory limit were color-classified according to the Munsell color system.

Materials

Information on the 26 PAAs studied in this investigation is provided in Table 1. Anthracene-d₁₀ and naphthalene-d₈ purchased from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan) and 2,4,5-trichloroaniline

purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) were used as internal standards. Pesticide residue grade methanol, hexane, and methyl-tert-butyl ether (MTBE) were obtained from Kanto Chemical Co., Inc. Citrate acid, sodium dithionite, and sodium hydroxide were purchased from Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan). Sodium chloride was obtained from Nacal Tesque (Kyoto, Japan). The citrate buffer solution was adjusted to pH 6.0 (0.06 mol/L as citrate acid) and the sodium dithionite solution (200 mg/mL) was prepared immediately before use. Each PAA was dissolved in methanol (1000 or 100 µg/mL) and standard solutions (10 µg/mL) were prepared using MTBE.

Sample processing

Textile samples were processed in accordance with EN 14362-1:2003¹⁴⁾ (particularly for textiles made of cellulose and protein fibers) with minor modifications. Leather samples were processed in accordance with EN 17234-1:2010¹⁵⁾ with minor modifications, except

Table 2 Textile and leather products investigated

| Usage | Sample name ^a | Colors ^a | Country | Material | | |
|----------------------|-----------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------|---------|
| Kerchief | Bandannas | T-A1 | Red | China | Cotton | |
| | | T-A2 | Blue-violet | China | Cotton | |
| | | T-A3 | Navy blue | China | Cotton | |
| | | T-A4 | Red | Indonesia | Cotton | |
| | | T-A5 | Violet | Indonesia | Cotton | |
| | Scarves | T-B1 | Orange | - ^b | Silk | |
| | | T-B2 | Blue-violet | - | Silk | |
| | Shawl | T-B3(SB, YG, O) | Sky blue (SB), Yellow green (YG), Orange (O) | - | Cotton | |
| | Clothes | T-shirts | T-C1 | Red | China | Cotton |
| | | | T-C2 | Navy blue | China | Cotton |
| T-C3 | | | Pink | China | Cotton | |
| T-C4 | | | Yellow | China | Cotton | |
| Children's T-shirts | | T-C5 | Violet | China | Cotton | |
| | | T-C6 | Blue | China | Cotton | |
| Children's clothes | | T-C7 | Orange | China | Cotton | |
| | | T-C8 | Light purple | China | Cotton | |
| Children's briefs | | T-C9 | Navy blue | India | Cotton | |
| | | T-C10 | Pink | India | Cotton | |
| Trunks | Children's briefs | T-D1 | Black | China | Cotton | |
| | | T-D2 (BL, R) | Black (BL), Red (R) | China | Cotton | |
| | Trunks | T-D3 | Red | Indonesia | Cotton | |
| | | T-D4 | Black | Indonesia | Cotton | |
| | Sheets and covers | Multi-covers | T-E1 | Orange | India | Cotton |
| | | | T-E2 | Violet | India | Cotton |
| | | | T-E3 | Yellow | India | Cotton |
| | | | T-E4 | Red | India | Cotton |
| | | Pillow | T-E5 (V, O) | Violet (V), Orange (O) | India | Cotton |
| | | | T-E6 (G, Y, B, V) | Green (G), Yellow (Y), Blue (B), Violet (V) | India | Cotton |
| Sheets | | T-E7 (DB, B, SB, ST) | Dark brown (DB), Blue (B), Sky blue (SB), Steel blue (ST) | - | Cotton | |
| | | | Orange | India | Cotton | |
| | | | Navy blue | India | Cotton | |
| Leather | | Small goods | Gloves | L-A1 | Black | China |
| | L-A2 | | | Beige | China | Pigskin |
| | Belts | L-A3 | Red | China | Natural leather | |
| | | L-A4 | Light brown | China | Natural leather | |
| | Wrist bands | L-A5 | Red | - | - | |
| | | L-A6 | Sky blue | - | - | |
| | Wallets | L-B1 | Reddish brown | Thailand | Cowskin | |
| | | L-B2 | Orange | Thailand | Cowskin | |
| | Key holder | L-B3 | Red | Korea | - | |
| | Base neck holder | L-B4 | Orange | - | Cowskin | |
| Hand-crafted leather | Small pieces with nubuck-like treatment | L-C1 | Red | - | Cowskin | |
| | | L-C2 | Deep green | - | Cowskin | |
| | | L-C3 | Navy blue | - | Cowskin | |
| | | L-C4 | Blue-violet | - | Cowskin | |
| | Small pieces of grain leather | L-C5 | Dark brown | - | - | |
| | | L-C6 | Black | - | - | |
| | | L-C7 | Reddish brown | - | - | |
| | | L-C8 | Blue | - | - | |
| | | L-C9 | Brown | - | - | |
| | | L-C10 | Deep green | - | - | |
| L-C11 | Dark brown | - | - | | | |
| L-C12 | Navy blue | - | - | | | |
| L-C13 | Black | - | - | | | |

^a For samples in which the abbreviation of the color name is given in parentheses, each color was analyzed individually.

^b -: Unknown

for 4-aminoazobenzene, which was analyzed in accordance with EN 17234-2:2011¹⁶. Using EN 14362-1:2003 and EN 17234-1:2010, o-aminoazotoluene, 5-nitro-o-toluidine, and 4-aminoazobenzene were not detectable because these PAAs were further reduced to other compounds (o-aminoazotoluene: o-toluidine and 2,5-diaminotoluene, 5-nitro-o-toluidine: 2,4-diaminotoluene, 4-aminoazobenzene: aniline and 1,4-phenylenediamine) during reduction treatment.

Textile samples

Each textile sample was cut in an appropriate manner and 1 g of the sample was weighed and placed in a reaction tube. Next, 17 mL of citrate buffer solution preheated to 70 ± 2 °C was added to the tube. The reaction tube was held for 30 min at 70 ± 2 °C. After 30 min, 3 mL of aqueous sodium dithionite solution was added in the tube, the reaction tube was shaken vigorously by hand, and immediately held again for 30 min at 70 ± 2 °C. After 30 min, the reaction tube was cooled to room temperature within 2 min. The sample solution was filtered and transferred to a separating funnel after cooling. Twenty milliliters of MTBE were added to the sample solution, the mixture was shaken by a vertical shaker for 30 min, and the MTBE layer was obtained. This extraction procedure was performed twice and the MTBE layers were combined and filtered through anhydrous sodium sulfate. The filtrate was concentrated to approximately 1 mL with a rotary evaporator maintain the temperature of the water bath below 30°C. The volume of the sample solution was adjusted to 10 mL with MTBE. Finally, 50 µL of MTBE solution containing 2 µg/mL of internal standard was added to 1 mL of the sample solution, and this solution was then analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

Leather samples

Each leather sample was cut in an appropriate manner and sieved to 4 mm. One gram of the sample was weighed and placed in a reaction tube. Next, 20 mL of hexane was added to the tube to degrease the leather and the sample was treated in an ultrasonic bath at 40°C for 20 min. The hexane layer was decanted from the sample after sonication. This degreasing procedure was performed twice and the residual hexane was completely evaporated overnight in an open vessel in a fume hood.

Seventeen milliliters of citrate buffer solution preheated to 70 ± 2 °C were added to the reaction tube and the tube was held for 25 min at 70 ± 2 °C. After 25 min, 1.5 mL of aqueous sodium dithionite solution was added to the tube and the reaction tube was shaken vigorously by hand and immediately held for 10 min at 70 ± 2 °C. After 10 min, 1.5 mL of aqueous sodium dithionite solution was again added and the reaction tube was held for 10 min at 70 ± 2 °C. After another 10 min, the reaction tube was cooled to room temperature within 2 min. The sample solution was extracted and treated in the same manner as the textile samples.

For analysis of 4-aminoazobenzene, 9 mL of 2% (w/w) sodium hydroxide aqueous solution was added to the reaction tube. The reaction tube was shaken sufficiently to wet the leather material. Subsequently, 1.0 mL of sodium dithionite aqueous solution was added to the reaction tube and the tube was shaken vigorously by hand and immediately held for 30 min at 40 ± 2 °C. After 30 min, the reaction tube was cooled to room temperature within 1 min. After cooling, 50 µL of MTBE solution containing an internal standard (10 µg/mL), 5

mL of MTBE, and 7 g of sodium chloride was added to the reaction tube. The reaction tube was shaken by a horizontal shaker for 45 min. The treatment time between cooling and shaking was within 5 min. After shaking, the reaction tube was centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the MTBE layer was obtained. This MTBE layer was filtered through anhydrous sodium sulfate and the filtrate was then analyzed by GC/MS.

GC/MS analysis

All samples in this investigation were analyzed with a Focus GC equipped with a DSQ II MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A DB-35MS fused silica capillary column (length: 30 m, internal diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used. The carrier gas was He at a flow rate of 1.0 mL/min. The temperatures of the injector, transfer line, and ion source were 250, 250, and 230°C, respectively. The sample solution (1 µL) was injected in the splitless mode. The GC oven temperature was initially maintained at 55°C for 5 min and increased to 230°C at a rate of 15°C/min. The temperature was then increased to 290°C at rate of 5 °C/min and to 310°C at rate of 20°C/min. The oven temperature was then maintained at 310°C for 5 min. The MS was operated in the electron ionization (EI) mode at 70 eV, and the analysis was carried out using the selected ion monitoring (SIM) mode. The retention times and the quantifying and qualifying ions are listed in Table 3.

Limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were calculated as 3.3 and 10 times the standard deviation¹⁷ obtained through determination of low-concentration (most compounds, 0.01 µg/mL; 1,4-phenylenediamine, 2,4-diaminotoluene, and 2,4-diaminoanisole, 0.1 µg/mL) standard solutions (n=3). The values thus obtained were converted to per unit weight of sample (Table 3). The LODs obtained in this study were lower than those mandated by the EU (below 5 µg/g). Recovery tests were conducted in accordance with EN14362-1:2003¹⁴ with minor modifications¹⁸. The recovery tests for 4-aminoazobenzene in leather samples was conducted in accordance with EN17234-2:2011¹⁶. The recovery results are listed in Table 3. The data obtained in this investigation were not corrected by the obtained recoveries.

RESULTS AND DISCUSSION

Textile samples

Twenty-nine cotton products (39 samples) and two silk products (two samples) were analyzed. The frequencies of detection and concentration ranges for each PAA in the textile samples are listed in Table 4 and the concentrations of PAAs detected in the samples are listed in Table 5. Twelve PAAs were detected at concentrations above the LOD in these samples and 10 of these PAAs are restricted in the EU. The following PAAs were detected with high frequency (expressed as the number of samples detected above the LOD vs. the number of samples analyzed): aniline (29/41), 4-chloroaniline (18/41), o-toluidine (11/41), 4-aminobiphenyl (11/41), and benzidine (11/41) (Table 4).

Because many dyes and other chemical compounds contain aniline, the detection frequency and concentrations of aniline may be higher than those of the other PAAs in this study. Although 4-chloroaniline was detected in various textile samples, o-toluidine, 4-amino-

Leather samples

Twenty-three leather products (23 samples) were analyzed. The frequencies of detection and concentration ranges of each PAA in the leather samples are listed in Table 4 and the concentrations of PAAs detected in the samples are listed in Table 6. Eleven PAAs were detected at concentrations above the LOD in these samples and 9 of these PAAs are restricted in EU. The following PAAs were detected with high frequency: aniline (23/23), 4-chloroaniline (10/23), 3,3'-dimethylbenzidine (7/23), 4-aminobiphenyl (4/23), benzidine (4/23), and 1,4-phenylenediamine (3/23) (Table 4). 4-Aminoazobenzene was analyzed in accordance with EN17234-2 and was not detected in any of the leather samples.

The high concentrations of o-toluidine (430 µg/g), benzidine (31 µg/g), and 3,3'-dimethylbenzidine (40 µg/g) detected in LC-4, LC-3, and LC-1, respectively, were observed at values exceeding the EU regulatory limit. The total ion chromatogram (SIM mode) and mass spectrum (scan mode: m/z=60-300) for o-toluidine detected in L-C4 are shown in Fig. 2. Products containing PAAs above the EU regulatory limit were handcrafted pieces with nubuck-like treatment

(raising the surface and complete dyeing to the inside). Although relatively high concentrations of 1,4-phenylenediamine were detected in the leather samples, 4-aminobenzene was not detected in any of the samples by EN 17234-2:2011. Thus, it is believed that 1,4-phenylenediamine detected in the leather samples did not originate from 4-aminoazobenzene.

CONCLUSIONS

Twenty-six PAAs originating from azo dyes in commercial textile products that can potentially come into direct contact with human skin (31 products; 41 samples) and leather products (31 products; 31 samples) in Japan were investigated. Twelve and 11 PAAs were detected in the textile and leather products, respectively, with nearly all of the PAAs detected at low concentrations (below 1.0 µg/g). However, the concentrations of benzidine (45-593 µg/g) in one shawl products and 6 sheet and cover products (7 samples) exceeded EU regulatory limits (below 30 µg/g). In addition, the concentrations of o-toluidine (430 µg/g), benzidine (31 µg/g), and 3,3'-dimethylbenzidine (40 µg/g) in leather products were found to exceed EU regulatory limits. Shawl, sheets, and covers can come into direct contact with human skin. Thus, exposure evaluations for benzidine should be performed for these products.

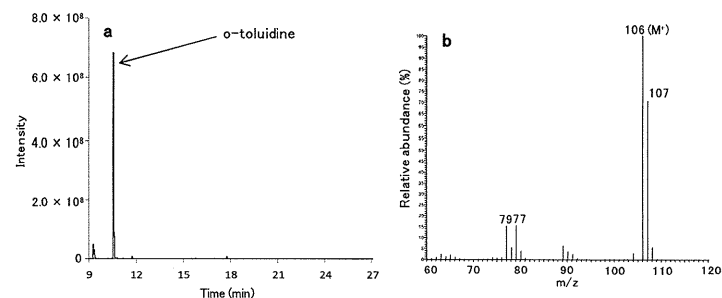


Fig. 2 o-Toluidine detected in sample L-C4 in the (a) total ion chromatogram (SIM mode) and (b) mass spectrum (scan mode: m/z=60-300).

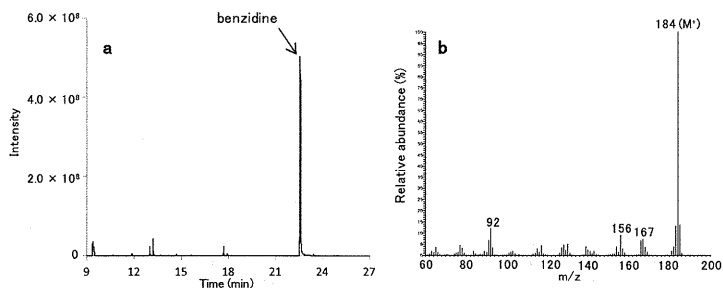


Fig. 1 Benzidine detected in sample T-B3_O in the (a) total ion chromatogram (SIM mode) and (b) mass spectrum (scan mode: m/z=60-300)

Table 6 Concentrations of PAAs detected in leather samples (µg/g)^a

| | Aniline | o-Toluidine | 4-Chloroaniline | p-Cresidine | 1,4-Phenylenediamine | 2-Naphthylamine | 4-Aminobiphenyl | Benzidine | 3,3'-Dimethylbenzidine | 4,4'-Thioaniline | 3,3'-Dimethoxybenzidine | Munsell Color ^b |
|-------|---------|-------------|-----------------|-------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------|------------------------|------------------|-------------------------|----------------------------|
| L-A1 | 587 | — | 3.9 | — | 21 | — | — | 1.0 | 0.37 | 0.66 | — | |
| L-A2 | 22 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-A3 | 1.7 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-A4 | 0.83 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-A5 | 0.14 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-A6 | 0.13 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-B1 | 15 | — | — | — | — | 0.44 | — | — | 0.15 | — | — | |
| L-B2 | 24 | — | 0.12 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-B3 | 0.45 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-B4 | 16 | 0.064 | — | 0.21 | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-C1 | 93 | — | — | — | — | — | 1.2 | 0.38 | 40 | — | — | 7.5R 3/10 |
| L-C2 | 92 | — | 0.17 | — | — | — | 1.1 | 16 | 0.74 | — | — | |
| L-C3 | 76 | — | 0.27 | — | — | — | 2.0 | 81 | 11 | — | 15 | 7.5PB 2/2 |
| L-C4 | 27 | 430 | 0.11 | — | — | — | — | — | 1.7 | — | — | 10PB 2/5 |
| L-C5 | 2.2 | — | — | — | — | — | — | — | 4.8 | — | — | |
| L-C6 | 81 | — | 0.34 | — | 8.6 | — | 0.81 | — | 4.8 | — | — | |
| L-C7 | 0.78 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-C8 | 0.12 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-C9 | 61 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-C10 | 39 | — | 0.10 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-C11 | 53 | — | 0.16 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-C12 | 33 | — | 0.27 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| L-C13 | 0.64 | — | 0.24 | — | 3.6 | — | — | — | — | — | — | |

^a Boldface denotes values that exceed the EU regulatory limit of 30 µg/g. ^b Classified according to the Munsell color system: hue value/chroma. ^c — Not detected.

dine (40 µg/g) in leather products were found to exceed EU regulatory limits. Shawl, sheets, and covers can come into direct contact with human skin. Thus, exposure evaluations for benzidine should be performed for these products.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant H21-Kagaku-Ippan-009 from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Ahlström, L.H., Sparr Eskilsson, C. and Björklund, E.: Determination of banned azo dyes in consumer goods. *Trends Anal. Chem.*, **24**, 49-56 (2005)
- Collier, S.W., Strom, J.E. and Bronaugh, R.L.: Reduction of azo dyes during in vitro percutaneous absorption. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **118**, 73-79 (1993)
- Hildenbrand, S., Schmahl, F.W., Wodarz, R., Kimmel, R. and Dartsch, P.C.: Azo dyes and carcinogenic aromatic amines in cell cultures. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, **72**(Suppl 3), M52-56 (1999)
- Platzek, T., Lang, C., Grohmann, G., Gi, U-S. and Baltes, W.: Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria in vitro. *Hum. Exp. Toxicol.*, **18**, 552-559 (1999)
- Bafana, A., Devi, S.S. and Chakrabarti, T.: Azo dyes: past, present and future. *Environ. Rev.*, **19**, 350-370 (2011)
- Second amendment to the German Consumer Goods Ordinance, Bundesgesetzblatt, Part 1, 1670 (1994)
- European Union: Directive 2002/61/EC of the European Parliament and of the Council of 19 July 2002 amending for the nineteenth time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (azocolourants). *OJEC*, L243/15 (2002)
- European Union: Commission regulation (EC) No 552/2009 of 22 June 2009 amending regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals (REACH) as regards annex XVII. *OJEU*, L164/7 (2009)
- Organization for Small and Medium Enterprises and Regional Innovation: The report of harmful compounds in textile products, 2009. http://www.smrj.go.jp/keiei/dbps_data/_material/_common/chushou/b_keiei/keiseisen/pdf/53201-1.pdf (accessed July 23, 2012)
- Oeko-Tex® Standard 100: http://www.oeko-tex.com/Oeko-Tex100_PUBLIC/index.asp?cls=02 (accessed July 23, 2012)
- RAPEX: http://ec.europa.eu/consumers/dyna/rapex/rapex_archives_en.cfm (accessed July 23, 2012)
- Kawakami, T., Isama, K., Nakashima, H., Tsuchiya, T. and Matsuoka, A.: Analysis of primary aromatic amines originated from azo dyes in commercial textile products in Japan. *J. Environ. Sci. Health, Part A.*, **45**, 1281-1295 (2010)
- International Agency for Research on Cancer (IARC): <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> (accessed July 23, 2012)
- European Union: EN14362-1:2003, Textiles - Methods for the determination of certain aromatic amines derived from azo colorants- Part 1: Detection of the use of certain azo colorants accessible without extraction (2003)
- European Union: EN17234-1:2010, Leather - Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers, Part 1: Determination of certain aromatic amines derived from azo colorants (ISO 17234-1:2010) (2010)
- European Union: EN ISO 17234-2: 2011, Leather - Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers, Part 2: Determination of 4-aminoazobenzene (ISO 17234-2: 2011) (2011)
- Inoue Y.: Confidence and quality assurance of analysis. In: Explanatory diagram and technical terms of environmental analysis. YAN Technical Committee of Environmental Analysis, eds., Ohmsha, Tokyo, pp52-65 (2001)