

A. 研究目的

最近、衣類に香りを付加するという副次的な機能をもった柔軟剤が注目され、さまざまな製品が販売されている。香りを楽しむこと自体は個人の嗜好の範疇ではあるものの、過度の香りによる健康被害が社会的な問題となりつつある。2013年9月に国民生活センターから出された報告書¹⁾によれば、近年「柔軟剤のにおい」に関する相談が増加する傾向にあり、2008年度以降の計187件の相談のうち、60%を超える115件が頭痛や吐き気などの体調不良を訴える内容であった。また、強い芳香のある柔軟剤あるいは微香タイプの柔軟剤を使用した場合、柔軟剤を使用しない場合について、室内空気中の総揮発性有機化合物 (TVOC) を調べた結果、柔軟剤を使用しない場合と微香タイプの柔軟剤を使用した場合では TVOC がそれぞれ約 $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 上昇したのに対し、強い芳香のある柔軟剤を使用した場合の TVOC の増加は 3~7 倍 (約 $70\sim 140 \mu\text{g}/\text{m}^3$) に達することが報告されている。

ただし、TVOC の増加と柔軟剤のにおいによる健康被害を直接結びつけることは困難であり、香料成分によって引き起こされる可能性のある咳や頭痛、吐き気についてもそれらの発生機序が十分に明らかにされていない。

そこで、本研究では Formaldehyde や Acrolein などのアルデヒド類や防腐剤パラベン、抗菌剤など多様な室内環境化学物質の生体内標的分子であり、これらの化学物質による気道刺激などにも関与す

る TRPA1 (Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily A, Member 1) に着目し、柔軟剤の揮発性成分による活性化について検討を行った。

B. 実験方法

B-1. 柔軟剤中の揮発性成分の抽出

残香を謳った衣類用柔軟仕上げ剤 20 製品をドラッグストアあるいはインターネットで試買して実験に用いた。検体とした製品の成分等の情報を表 1 に示す。ディスク型 MonoTrap DCC18 (ジーエルサイエンス) 2 枚を吊した清浄な 40 mL バイアルに柔軟剤 2 g を採り、 40°C 、250 rpm で一晚振盪して、気相中の揮発性成分を吸着させた。次いで、MonoTrap ディスクを PTFE 製抽出容器に入れ、Methanol 300 μL を加えて 5 分間超音波処理した。この操作を 2 回行い、得られた Methanol 溶液を合わせて柔軟剤抽出液とした。

B-2. GC/MS による揮発性成分の分析

Methanol 抽出液中の香料成分をガスクロマトグラフ/タンデム型質量分析計で定性した。装置は GCMS-TSQ8030 (島津製作所) を使用し、以下の条件で測定を行った: カラム, Rxi-5Sil MS (30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μm); キャリアガス, He, 36 cm/sec (線速度一定); 注入口温度, 200°C ; スプリット比, 50; カラム温度, $40^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}/\text{min} - 300^\circ\text{C}$; トランスファーライン温度, 250°C ; イオン源温度, 200°C ; イオン化法, EI; 測定モード, SCAN (m/z 35~500, 4 Hz). 香料成分の推定には NIST11 データベー

ス及び FFNSC 1.2 香料ライブラリーを用いた。

B-3. TRP イオンチャネル発現細胞による気道刺激性の評価

ヒト後根神経節 Total RNA より RT-PCR によって TRPV1 及び TRPA1 cDNA を pENTR/D-TOPO Vector にクローニングし、Gateway LR 反応により pEF5/ERT/V5-DEST Vector にサブクローニングした。得られた Plasmid を Lipofectamine LTX をもちいて pOG44 Vector とともに Flp-In 293 細胞に Co-transfection し、Hygromycin B を含む選択培地中で培養を行って耐性細胞株を選択してヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞株を樹立した (TRPV1/HEK293, TRPA1/HEK293)。

樹立したヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を指標として被検物質による TRPV1 及び TRPA1 イオンチャネルの活性化を評価した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には FLIPR Calcium 5 Assay Kit (Molecular Devices, Inc.) を用いた。96-well plate に hTRPV1/Flp-In 293 又は TRPA1/Flp-In 293 を 1well あたり 4×10^4 個播種した。24 時間培養後に、培地を除去し Calcium indicator (Calcium 6) を添加して $37^{\circ}C$ で 1 時間インキュベーションした。柔軟剤 Methanol 抽出液は Calcium 6 添加 1 時間後に最終濃度 1.25% あるいは 2.5% となるように添加し、FlexStation 3 (Molecular Devices, Inc.) において、被検物質添加後の蛍光強度の経時的な変化を励起波長

485 nm, 蛍光波長 525 nm の条件で測定した。活性化の程度は、相対蛍光強度 (Relative fluorescence units) の差, あるいはそれぞれのイオンチャネルの典型的な活性化物質である Capsaicin (TRPV1) 及び Cinnamic aldehyde (TRPA1) による活性化能に対する比率で示した。評価に用いる化合物は、可能な限り高純度の試薬を入手した。

B-4. 統計的解析手法

結果の解析は Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。

C. 結果と考察

柔軟剤 20 製品の Methanol 抽出液についてヒト侵害刺激受容体 TRPA1 の活性化能を検討した結果, Fig.2 に示したように, 18 製品で用量依存的かつ溶媒対照 (Methanol) の 2 倍を超える TRPA1 の活性化が認められた (図 2(A)). TRPV1 に関しては, 柔軟剤 Methanol 抽出液添加によって活性化される傾向が認められたものの, 溶媒対象の 2 倍を超える活性化は本実験条件下では認められなかった (図 2(B)).

最も高い活性がみられた ID 06 の Methanol 抽出液を GC/MS で測定した結果, Limonene や Linalool の他に, Dihydromyrcenol, Benzyl Acetate, *n*-Hexyl Acetate, Rose Oxide, Methyl Ionone の存在が推定された (図 3). これらの中で, Linalool alpha-Isomethyl ionone, Methyl ionone について TRPA1 の活性化を評価した結果, Linalool と Rose Oxide が TRPA1

の活性化を引き起こすことが明らかになった。この2化合物について TRP イオンチャンネルの活性化様式について評価した結果、濃度依存的な TRPA1 活性化能が認められたものの、EC₅₀ 値はいずれも 300 μM 以上であり (図 4)、他に活性の高い香料が存在する可能性あるいは多数の香料による複合的な影響を考慮する必要があると考えられる。

D. 結論

本研究では市販の柔軟剤 20 製品について気道刺激において重要な役割を果たす侵害受容器に対する影響を検討し、多くの製品中に TRPA1 を活性化する化合物が含まれていることを明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 神野透人, 大河原 晋, 岡元陽子, 田原麻衣子, 川原陽子, 真弓加織, 五十嵐良明, 香川(田中) 聡子: 柔軟剤中の香料による気道刺激に関する研究. 平成 25 年室内環境学会学術大会 (2013.12)
2. 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 岡元陽子, 真弓加織, 田原麻衣子, 川原陽子, 五十嵐良明, 神野透人: 衣料用柔軟仕上げ剤中の香料成分によるヒト侵害受容体 TRPA1 の活性化. 日本薬学

会第 134 年会 (2013.3)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

H. 引用文献

1. 柔軟仕上げ剤のにおいに関する情報提供, 独立行政法人国民生活センター, 2013 年 9 月 19 日公表
http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20130919_1.html

表1. 検体情報 (1/2)

ID	品名	成分	用途	使用量の目安	特長・備考
01	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、安定化剤	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに6.7mL	こするとはじける香りのテクノロジー「マジックビーズ」を2種類配合、防臭効果
02	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、安定化剤	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに6.7mL	こするとはじける香りのテクノロジー「マジックビーズ」を2種類配合、防臭効果
03	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、安定化剤	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに6.7mL	こするとはじける香りのテクノロジー「マジックビーズ」を2種類配合、防臭効果
04	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、安定化剤	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに6.7mL	こするとはじける香りのテクノロジー「マジックビーズ」を2種類配合、防臭効果
05	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、安定化剤	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに6.7mL	こするとはじける香りのテクノロジー「マジックビーズ」を2種類配合、防臭効果
06	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)	衣料用(綿、毛、化学繊維など)	水65L(洗濯物量の目安6.0kg)に対して約25mL	香りのマイクロカプセル配合、濃縮タイプ柔軟仕上げ剤
07	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)	衣料用(綿、毛、化学繊維など)	水65L(洗濯物量の目安6.0kg)に対し約25mL	
08	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル)、香料	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに7ml	抗菌・防臭効果、洗濯じわ・静電気を防ぐ、香りの強いタイプ
09	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル)、香料	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに7ml	抗菌・防臭効果、洗濯じわ・静電気を防ぐ、香りの強いタイプ
10	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル)、香料	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに7ml	抗菌・防臭効果、洗濯じわ・静電気を防ぐ、香りの強いタイプ

表1. 検体情報 (2/2)

ID	品名	成分	用途	使用量の目安	特長・備考
11	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル)、香料	衣料品用(綿・毛・絹・化学繊維)	衣類1kgに7ml	抗菌・防臭効果、洗濯じわ・静電気を防ぐ、香りの強いタイプ
12	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、防臭剤、安定剤	綿・毛・絹・合成繊維の柔軟仕上げ用	洗濯物量1.5kgに10ml	天然アロマオイル配合、抗菌効果、ニオイを抑える
13	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、防臭剤、安定剤	綿・毛・絹・合成繊維の柔軟仕上げ用	洗濯物量1.5kgに10ml	天然アロマオイル配合、抗菌効果、ニオイを抑える
14	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、防臭剤、安定剤	綿・毛・絹・合成繊維の柔軟仕上げ用	洗濯物量1.5kgに10ml	天然アロマオイル配合、抗菌効果、ニオイを抑える
15	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、防臭剤、安定剤	綿・毛・絹・合成繊維の柔軟仕上げ用	洗濯物量1.5kgに10ml	天然アロマオイル配合、抗菌効果、ニオイを抑える
16	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、安定化剤、香料	衣料品用(綿・毛・絹・合成繊維)	洗濯物量1.5kgに10ml	香りのピーズ
17	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)、安定化剤、香料	衣料品用(綿・毛・絹・合成繊維)	洗濯物量1.5kgに10ml	香りのピーズ
18	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)	水洗いできる衣料用品(綿・毛・化学繊維など)	洗濯物量1.5kgに15ml	オーガニックエキス配合、花粉吸着を抑制、赤ちゃん用衣類もOK、防臭・抗菌、静電気を軽減
19	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)	水洗いできる衣料用品(綿・毛・化学繊維など)	洗濯物量1.5kgに15ml	オーガニックエキス配合、花粉吸着を抑制、赤ちゃん用衣類もOK、防臭・抗菌、静電気を軽減
20	柔軟仕上げ剤	界面活性剤(エステル型ジアルキルアンモニウム塩)	水洗いできる衣料用品(綿・毛・化学繊維など)	洗濯物量1.5kgに15ml	オーガニックエキス配合、花粉吸着を抑制、赤ちゃん用衣類もOK、防臭・抗菌、静電気を軽減

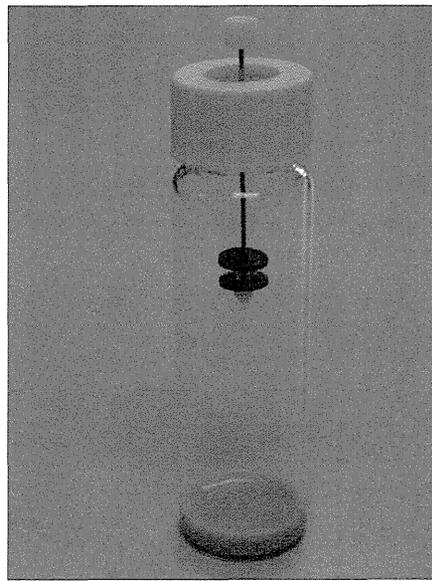
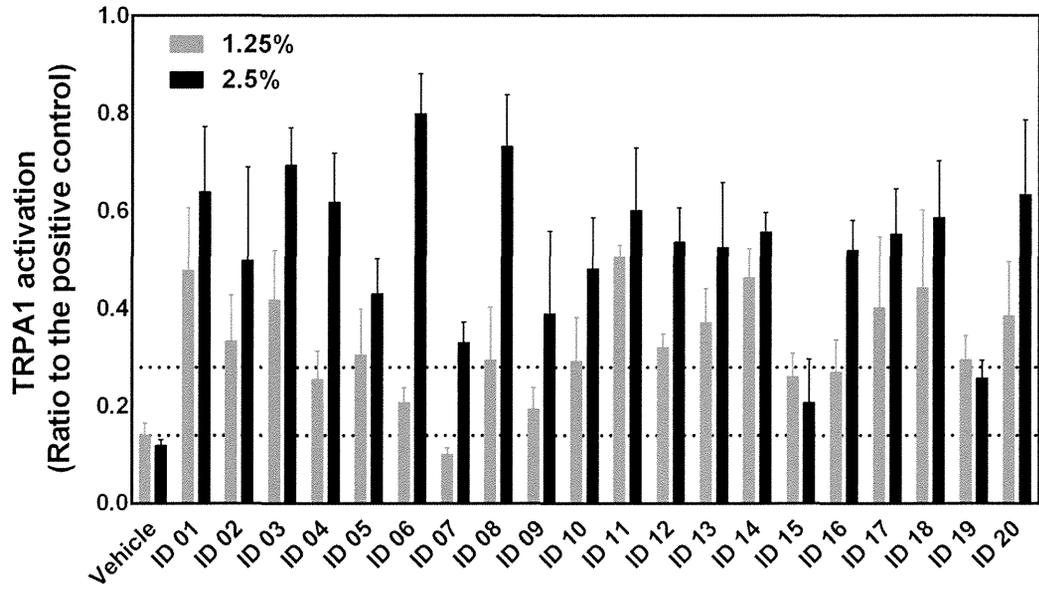


図1 製品中揮発成分の MonoTrap™ 抽出

(A)TRPA1



(B)TRPV1

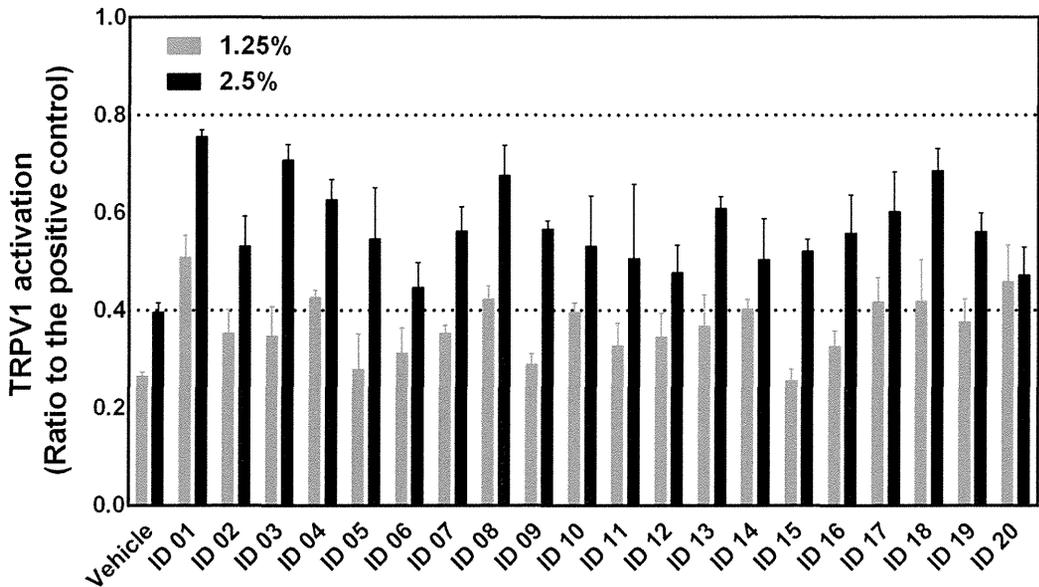
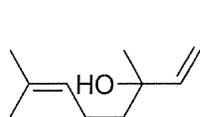
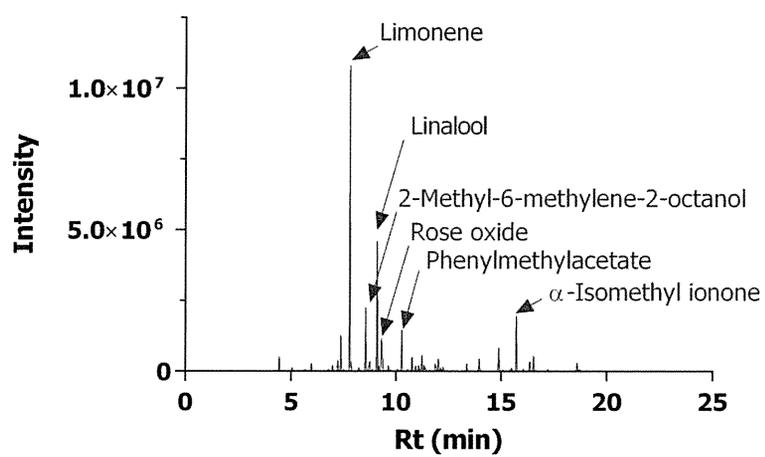
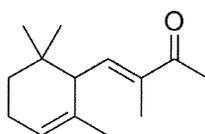


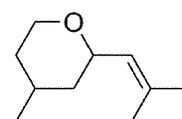
図2 柔軟剤中の揮発成分によるヒト TRP イオンチャネルの活性化



Linalool



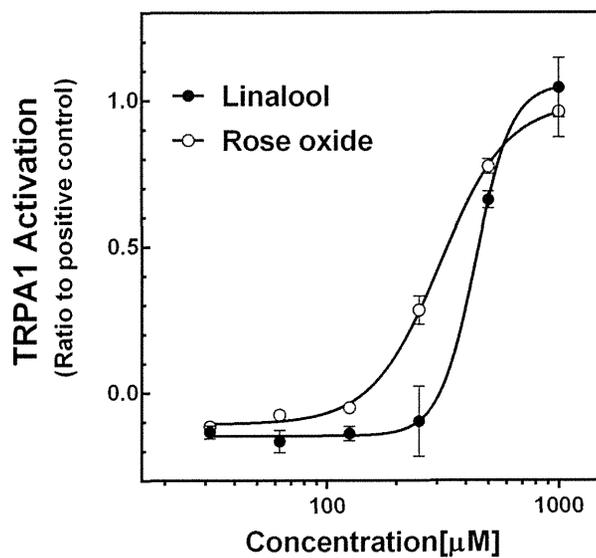
alpha-Isomethyl ionone



Rose oxide

図3 柔軟剤中の揮発成分のGC/MS クロマトグラム (ID 06)

(A)TRPA1



(B)TRPV1

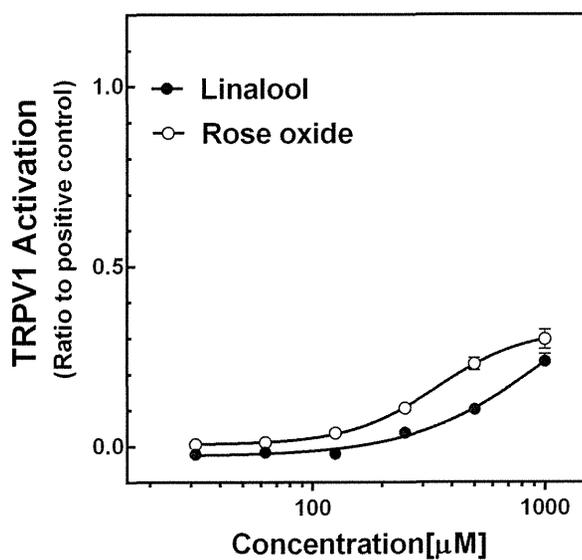


図4 柔軟剤中の揮発成分による TRP イオンチャネルの活性化

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)

分担研究 総合研究報告書

家庭用品から放散される揮発性有機化合物/準揮発性有機化合物の
健康リスク評価モデルの確立に関する研究

香料アレルゲンによる気道刺激に関する研究

研究分担者 神野 透人 名城大学 薬学部 衛生化学研究室 教授

研究代表者 香川(田中)聡子 横浜薬科大学 薬学部 環境科学研究室 教授

研究要旨: 衣料用柔軟仕上げ剤は本来繊維を柔らかくすることを目的に使用されるが、2000年代後半から香りの強い海外製の柔軟仕上げ剤がブームとなったのをきっかけに、現在は、芳香性を工夫した商品の市場規模が拡大している。それに伴い、危害情報も含めた柔軟仕上げ剤に関する相談件数が急増しており、呼吸器障害をはじめ、頭痛や吐き気等の体調不良が危害内容として報告されている。本研究事業初年度の成果として、侵害受容器であり気道過敏性の亢進にも関与することが明らかになりつつある TRP イオンチャネルに対する柔軟仕上げ剤中揮発成分の影響を検討した結果、市販の高残香性衣料用柔軟仕上げ剤に含まれる香料成分が TRPA1 イオンチャネルを活性化することを明らかにした。そこで本年度の研究では、欧州連合の化粧品指令でアレルギー物質としてラベル表示を義務付けられた香料成分を対象として、ヒト TRPV1 及び TRPA1 の安定発現細胞株を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を指標として対象化合物のイオンチャネルの活性化能を評価した。その結果、香料アレルゲンとして表示義務のある香料リストのうち植物エキス等を除いて今回評価可能であった 17 物質中 8 物質が濃度依存的に TRPA1 の活性化を引き起こすことが判明した。この結果は、これら香料アレルゲンが TRPA1 の活性化を介して気道過敏の亢進を引き起こす可能性を示唆しており、シックハウス症候群の発症メカニズムを明らかにする上でも極めて重要な情報であると考えられる。

A. 研究目的

最近、衣類に香りを付加するという副次的な機能をもった柔軟剤が目立って注目され、さまざまな製品が販売されている。香り

を楽しむこと自体は個人の嗜好の範疇ではあるものの、過度の香りによる健康被害が社会的な問題となりつつある。2013年9月に国民生活センターから出された

報告書¹⁾によれば、近年「柔軟剤のにおい」に関する相談が増加する傾向にあり、2008年度以降の計187件の相談のうち、60%を超える115件が頭痛や吐き気などの体調不良を訴える内容であった。また、強い芳香のある柔軟剤あるいは微香タイプの柔軟剤を使用した場合、柔軟剤を使用しない場合について、室内空気中の総揮発性有機化合物 (TVOC) を調べた結果、柔軟剤を使用しない場合と微香タイプの柔軟剤を使用した場合では TVOC がそれぞれ約 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 上昇したのに対し、強い芳香のある柔軟剤を使用した場合の TVOC の増加は 3~7 倍 (約 70~140 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) に達することが報告されている。

ただし、TVOC の増加と柔軟剤のにおいによる健康被害を直接結びつけることは困難であり、香料成分によって引き起こされる可能性のある咳や頭痛、吐き気についてもそれらの発生機序が十分に明らかにされているわけではない。

そこで、本研究事業の初年度において、Formaldehyde や Acrolein などのアルデヒド類や防腐剤パラベン、抗菌剤など多様な室内環境化学物質の生体内標的分子であり、これらの化学物質による気道刺激などにも関与する TRPA1 (Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily A, Member 1) に着目し、柔軟剤の揮発性成分による活性化について検討を行った。

その結果、市販の高残香性衣料用柔軟仕上げ剤を対象として、揮発成分をディスク型 MonoTrap DCC18 (ジーエルサイエン

ス) に吸着させ、その Methanol 抽出液を柔軟剤抽出液として、ヒト侵害刺激受容体 TRPA1 の活性化能を検討した結果、評価した 20 製品中 18 製品で用量依存な TRPA1 の活性化が認められた。

そこで本研究では、欧州連合の化粧品指令でアレルギー物質としてラベル表示を義務付けられた香料成分を対象として、ヒト TRPV1 及び TRPA1 の安定発現細胞株を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を指標として対象化合物のイオンチャネルの活性化能を評価した。

B. 実験方法

B-1. TRP イオンチャネル発現細胞による気道刺激性の評価

ヒト後根神経節 Total RNA より RT-PCR によって TRPV1 及び TRPA1 cDNA を pENTR/D-TOPO Vector にクローニングし、Gateway LR 反応により pEF5/ERT/V5-DEST Vector にサブクローニングした。得られた Plasmid を Lipofectamine LTX をもちいて pOG44 Vector とともに Flp-In 293 細胞に Co-transfection し、Hygromycin B を含む選択培地中で培養を行って耐性細胞株を選択してヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞株を樹立した (TRPV1/HEK293, TRPA1/HEK293)。

樹立したヒト TRPV1 及び TRPA1 安定発現細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を指標として被検物質による TRPV1 及び TRPA1 イオンチャネルの活性化を評価した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には FLIPR Calcium 6 Assay Kit (Molecular Devices,

Inc.) を用いた。 96-well plate に hTRPV1/Flp-In 293 又は TRPA1/ Flp-In 293 を 1well あたり 4×10^4 個播種した。24 時間培養後に、培地を除去し Calcium indicator (Calcium 6) を添加して 37°C で 1 時間インキュベーションしたのち、被検物質の DMSO 溶液を添加し、FlexStation 3 (Molecular Devices, Inc.) において、被検物質添加後の蛍光強度の経時的な変化を励起波長 485 nm、蛍光波長 525 nm の条件で測定した。活性化の程度は、相対蛍光強度 (Relative fluorescence units) の差、あるいはそれぞれのイオンチャネルの典型的な活性化物質である Capsaicin (TRPV1) 及び Cinnamic aldehyde (TRPA1) による活性化能に対する比率で示した。

評価に用いる化合物は、可能な限り高純度の試薬を入手した。評価の対象とした化合物を図 1 に示す。

B-4. 統計的解析手法

結果の解析は Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。

C. 結果と考察

香料アレルゲンとして表示義務のある香料リストのうち植物エキス等を除いて今回評価可能であった 17 物質中 8 物質が濃度依存的に TRPA1 の活性化を引き起こすことが判明した(図 1)。なかでも、2-(4-tert-Butylbenzyl) propionaldehyde による TRPA1 の活性化の程度は陽性対象物質である Cinnamaldehyde に匹敵することが明らかとなった。ヒト TRPV1 については、

本検討条件においては活性化を引き起こす物質は認められなかった。以上の結果は、これら香料アレルゲンが TRPA1 の活性化を介して気道過敏の亢進を引き起こす可能性を示唆しており、シックハウス症候群の発症メカニズムを明らかにする上でも極めて重要な情報であると考えられる。

D. 結論

欧州において香料アレルゲンとして表示義務のある香料リストのうち 18 物質中 9 物質が、濃度依存的に TRPA1 の活性化を引き起こすことを明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表 (予定)

1. 香川(田中) 聡子, 大河原 晋, 埴岡 伸光, 神野透人: 香料アレルゲンによるヒト侵害受容器 TRPA1 の活性化. 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

H. 引用文献

1. 柔軟仕上げ剤のにおいに関する情報提供, 独立行政法人国民生活センター, 2013年9月19日公表
http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20130919_1.html

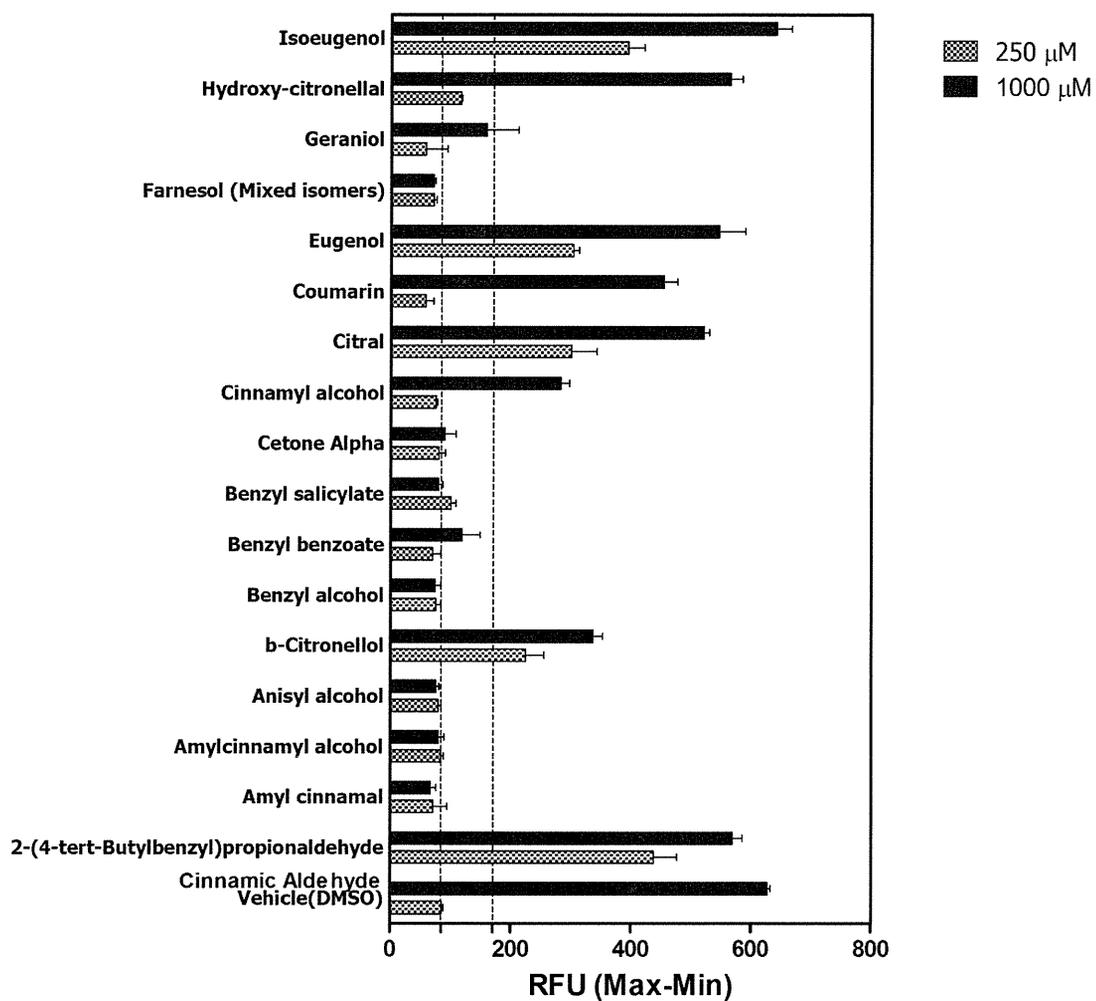


図1 香料アレルゲンによるヒト TRPA1 イオンチャネルの活性化

IV. 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawakami T, Isama K, Ikarashi Y	Analysis of isothiazolinone preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan. J	Environ. Sci. Health Part A.	49	1209-1217	2014
河上強志, 伊佐間和郎, 五十嵐良明	イソチアゾリノン系防腐剤による接触皮膚炎 一家庭用品に起因する症例を中心として	J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.	8	147-161	2014
Kawakami T, Isama K, Ikarashi Y	Particle size distribution of aerosols sprayed from household hand-pump sprays containing fluorine-based and silicone-based compounds.	Bull. Nalt. Inst. Health Sci.	133	37-41	2015

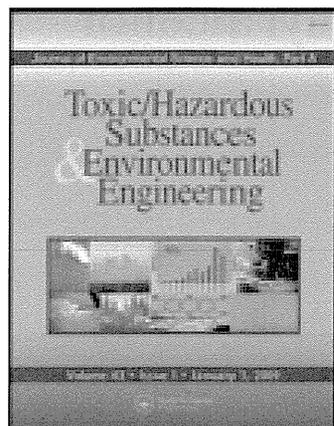
IV. 研究成果の刊行物・別刷

This article was downloaded by: [National Institute of Health Sciences]

On: 30 June 2014, At: 16:55

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/lesa20>

Analysis of isothiazolinone preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan

Tsuyoshi Kawakami^a, Kazuo Isama^a & Yoshiaki Ikarashi^a

^a Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Published online: 26 Jun 2014.

To cite this article: Tsuyoshi Kawakami, Kazuo Isama & Yoshiaki Ikarashi (2014) Analysis of isothiazolinone preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49:11, 1209-1217, DOI: [10.1080/10934529.2014.910021](https://doi.org/10.1080/10934529.2014.910021)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2014.910021>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Analysis of isothiazolinone preservatives in polyvinyl alcohol cooling towels used in Japan

TSUYOSHI KAWAKAMI, KAZUO ISAMA and YOSHIAKI IKARASHI

Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Recently, cases of contact dermatitis that were related to the use of polyvinyl alcohol (PVA) cooling towels containing isothiazolinone preservatives were reported in Japan. The aim of this investigation was to analyze the concentrations of five different isothiazolinone compounds present in PVA towels and to assess the effectiveness of washing in removing the preservatives from new towels prior to being used for the first time. Twenty-seven PVA towels were used in this study. Two groups (i.e., laboratory-simulation and volunteer) of washing experiments were conducted to evaluate the effect of washing procedures. Qualitative and quantitative analyses were performed by LC/MS/MS, which detected 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MI) and 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (CMI) in 23 samples (MI: 0.29–154 $\mu\text{g g-wet}^{-1}$, CMI: 2.2–467 $\mu\text{g g-wet}^{-1}$), 2-*n*-octyl-4-isothiazolin-3-one (OIT) in one sample (478 $\mu\text{g g-wet}^{-1}$). The compounds 4,5-Dichloro-2-*n*-octyl-4-isothiazolin-3-one (2Cl-OIT) and 1,2-benzisothiazolin-3-one (BIT) were not detected in all samples. We confirmed the presence of residual MI, CMI, and OIT in the washed towels, and the residual-to-original content ratio of OIT was higher than that of MI and CMI in PVA towels, due to the higher hydrophobicity of OIT than MI and CMI. A concern has been raised about the occurrence of contact dermatitis being caused by the use of PVA towels. It is suggested that a detailed description of isothiazolinone preservatives in PVA towels and an effective washing procedure for the removal of these preservatives should be provided by the manufacturer. Further, alternative non-sensitizing preservatives might be considered for the manufacture of PVA cooling towels in the future.

Keywords: Isothiazolinone preservatives, polyvinyl alcohol cooling towel, contact dermatitis; household products.

Introduction

Isothiazolinone compounds, comprised of nitrogen- and sulphur-containing heterocyclic aromatic rings, are widely used as preservatives in cosmetics,^[1] paints,^[2] oils,^[3] anti-fouling booster biocides,^[4] wall adhesives,^[5] and moist tissue paper^[6] because of their broad-spectrum antibacterial activities. In particular, a mixture of 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MI; CAS 2682-20-4) and 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (CMI; CAS 26172-55-4) is one of the most extensively used isothiazolinone preservatives (e.g., Kathon[®]CG)^[7] in cosmetics and industrial products, and its first use can be traced back to 1976 in Europe and 1981 in the United States.

However, these preservatives have the potential to cause skin sensitization, and many cases of isothiazolinone

preservative-induced contact dermatitis have been reported.^[1,8] The European Union (EU) recently stipulated that the permissible concentration of MI and CMI mixtures in cosmetic products should be less than 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ (MI: 3.75 $\mu\text{g g}^{-1}$, CMI: 11.25 $\mu\text{g g}^{-1}$).^[9] In the United States, the permissible concentration of MI and CMI mixtures for rinse-off products, e.g., shampoo and soap, is similar to that stipulated by the EU; however, it is less than 7.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ for leave-on products such as body creams.^[10] The permissible concentration for the MI preservative alone is less than 100 $\mu\text{g g}^{-1}$.^[9,10] In Japan, the cosmetic industry standards require the concentration of MI and CMI mixtures to be less than 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ for rinse-off products only, and that of MI alone is to be less than 100 $\mu\text{g g}^{-1}$.^[11]

In recent years, several types of novel household and personal products have been developed that help keep the body cool; these are especially popular during the humid summer season in Japan. These products include: (i) gel-based products that use high-water content superabsorbent polymers that can dissipate heat from skin, and (ii) polyvinyl alcohol (PVA) towels (Fig. 1) that provide a cooling sensation to the skin by absorbing excess heat as a result of hyper-efficient water evaporation. Unfortunately, the use of mattress-type gel products have in mattress

Address correspondence to Tsuyoshi Kawakami, Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; E-mail: tkawa@nihs.go.jp

Received January 14, 2014.

Color versions of one or more of the figures in this article can be found online at www.tandfonline.com/lesa.

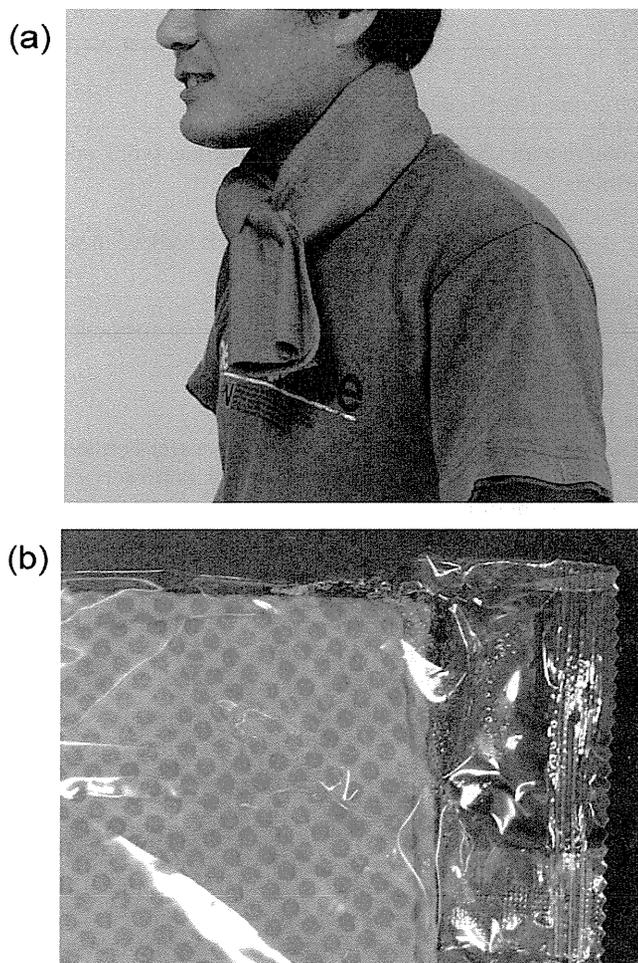


Fig. 1. (a) An example of the usage of PVA cooling towel, and (b) unopened PVA cooling towel (sample A5). Water drops can be seen inside the package and are noticeable.

manufacture have led to several cases of allergic contact dermatitis.^[12]

These gel products used 2-*n*-octyl-4-isothiazolin-3-one (OIT; CAS 26530-20-1) as a preservative, which probably migrated from the gel layer to the textile surface through a polyethylene film and was directly exposed to the patient's skin. One of the cases where the patient required over 30 days to recover was classified as a severe consumer product accident as per the Consumer Safety Product Act legislated by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. This motivated us to investigate the amounts of isothiazolinone preservatives in commercial gel products in Japan from April to June, 2010, and OIT, MI, and CMI were detected in these gel products studied.^[13]

On the other hand, cases of contact dermatitis caused by the use of PVA cooling towels were also reported by the National Consumer Affairs Center of Japan (NCAC) in 2012.^[14] Generally, since dried PVA towels are hard and easily broken, these are moistened with water to prevent

them from breaking before they depart the factory (Fig. 1), and the water-containing isothiazolinone preservatives are used in the PVA towels to protect the products against mildew. Although NCAC has confirmed the presence of isothiazolinone preservatives in several PVA towels, the amounts of these preservatives have not been accurately determined.

Although some manufacturers suggest that customers wash new towels before using them to remove the preservatives, the effect of washing on the removal of the preservatives has not been assessed previously. Therefore, it is necessary to study isothiazolinone preservatives in PVA towels for the prevention and control of contact dermatitis, which is caused by the use of these cooling towels.

The aim of this study was to confirm the presence of five isothiazolinone preservatives in the PVA towels, quantify their concentrations, and evaluate the effectiveness of the washing process in removing the preservatives from the PVA towels before their first-time use. We conducted two types of washing experiments: (i) a laboratory-simulated washing procedure, which used a glass tube and mechanical shaker for the washing and elution of preservatives in ultrapure water (Milli-Q water) for analysis, and (ii) volunteer-based washing, where the towels were washed by volunteers as per the products instruction.

Materials and methods

PVA towel samples

Twenty-seven PVA cooling towels were purchased from several online and retail stores in Japan in December, 2011 (sample A1 to A7), and from May to June, 2012 (sample B1 to B20) (Table 1). All the PVA towels were used for skin cooling (Fig. 1), except samples A6 and A7, which were used to wipe the body after swimming. The towels were moist at the time of purchase (Fig. 1), except for sample B19, which was sold in a dry condition.

There exists a one-to-one correspondence between samples A1–A5 and samples B1–B5, e.g., A1 corresponds to B1, because they are the same product purchased at different times. An additional 19 towels (same product as sample B8) were purchased in December 2012, of which 5 were used to quantify the amounts of preservatives in PVA towels, and the other 14 were distributed to volunteers for washing to assess the effectiveness of the washing procedure in removing preservatives.

Materials and reagents

The mixture of MI and CMI (MI: 3.63%, CMI: 10.85%) was obtained from Waterstone Technology (Carmel, IN, USA). 1,2-Benzisothiazolin-3-one (BIT; CAS 2634-33-5) and OIT were purchased from Tokyo Chemical Industry