

## 家庭用品に使用される化学物質の細胞毒性： 平成9～16年度対象化学物質の結果

五十嵐良明<sup>#</sup>，鹿庭正昭，土屋利江

### Cytotoxicity of Chemicals used in Household Products: 1997 - 2004

Yoshiaki Ikarashi<sup>#</sup>, Masa-aki Kaniwa, Toshie Tsuchiya

The cytotoxicities of chemicals used in household products were evaluated using a neutral red (NR) uptake assay. The chemicals tested during 1997 - 2004 were rubber additives (accelerators, antioxidants and retarders), solvents, plasticizers and biocides, such as antimicrobials, fungicides, preservatives used in paints, paper, wood and plastic products. The cytotoxicity potential of each chemical was classified by determining the concentrations inducing 50% reduction of NR uptake into Chinese hamster fibroblast V79 cells compared to control (IC50). In vivo eye irritancy of each chemical was estimated by the IC50 value. Most biocides tested showed strong cytotoxicity and had a high probability of inducing strong eye irritation.

Keywords: cytotoxicity, household product, biocide, rubber additive

( Received May 31, 2005 )

#### 緒言

家庭用化学製品の製造にあたってはできるだけ安全性の高い化学物質を適切な量で用いられることが望まれる。しかし、現状ではメーカーは用いている化学物質について十分なデータを持ち合わせておらず、健康被害防止についてリスク管理等の十分な評価が行われているとは言えない。厚生労働省では「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」に基づき、規制基準を設定し安全対策を講じている。さらに健康被害の未然防止策として、使用頻度、事故例の有無及び文献調査を行い、毎年3～4種の化学物質を選定して安全性評価の試験検査をしている。試験項目として、細胞毒性試験、変異原性試験、連続投与試験、生殖/発生毒性試験、感受性試験などがある。

我々は、これらの試験項目のうち細胞毒性試験を平成3年度から担当してきた。試験方法としてはニュートラルレッド(NR)法を用いている<sup>1)</sup>。NR法はドレイズ眼刺激性試験<sup>2)</sup>の結果と相関があるとされているが、我々も界面活性剤等で試験した結果、NR細胞毒性試験とドレイズ眼刺激性試験とが定量的にも相関があることを確かめている<sup>3,4)</sup>。本研究では平成9年度から16年度に選定した28品目の細胞毒性試験の結果について報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試験物質

当概年度に試験品目として選定された化学物質をTable.1に示した。これらのうち、試薬メーカーから購入できるものは市販品を用い、そうでないものはメーカーから使用原体を供与された。それぞれの化学物質は精製することなくそのまま試験に用いた。

##### 2. 細胞

チャイニーズハムスター由来線維芽細胞V79細胞を用いた。細胞はウシ胎児血清を10%含有させたEagle's MEM培地を用い、培養フラスコで増殖させた。

##### 3. 細胞毒性試験

既報に従って行った<sup>3,4)</sup>。試験時、トリプシン・EDTA溶液を用いて培養フラスコからV79細胞を回収し、リン酸緩衝液を加えて1000 rpmで5分間遠心して洗浄後、5%ウシ胎児血清を含有させたEagle's MEM培地(FBS・MEM)に浮遊させた。96穴プレートに9000個/100  $\mu$ l/wellの割合で細胞を入れ、37℃、5%炭酸ガス培養器中で24時間培養後、上清を除き、種々の濃度の被験物質を含有させたFBS・MEMを200  $\mu$ lずつ加えた(公比2の割合で5段階、1濃度あたり4穴)。対照(コントロール)は被験物質を含有しない新鮮培地を加えた。また、試験の妥当性と再現性を確かめるため、zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC)を標準対照物質として用い、毎回同時に試験した。24時間培養後、上清を除

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Yoshiaki Ikarashi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3707-6950; E-mail: ikarashi@nihs.go.jp

Table.1 Result of cytotoxicity test

Chemical	Abbreviation	CAS No.	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a)</sup>	
<b>Biocide</b>				
<i>N</i> -n-Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	BBIT	4299-07-4	6.6	Strong
1-Bromo-3-ethoxycarbonyloxy-1,2-diiodo-1-propene	BECDIP	77352-88-6	1.7	Strong
	BNPD	52-51-7	7.7	Strong
Cycloacetamide	CAA	79-07-02	47.5	Moderate
<i>p</i> -Chlorophenyl-3-iodopropargylformyl	CPIP	29772-02-9	6.2	Strong
4,4'-Dimethyl-1,3-oxazoline	DMO	51200-87-4	46.0	Moderate
<i>N,N'</i> -Hexamethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	HMBCDPB	Unknown	7.0	Strong
Hiba oil	HO	Unknown	16.2	Strong
	IPBC	55406-53-6	2.9	Strong
Methylene-bis(thiocyanate)	MBTC	6317-18-6	1.08	Strong
10,10'-Oxy-bis(phenoxyarsine) <sup>b)</sup>	OBPA	58-36-6	4.2	Strong
4-Chloro-3-methylphenol ( <i>p</i> -Chloro- <i>m</i> -cresol)	PCMC	59-50-7	89.9	Moderate
4-Chloro-3,5-dimethylphenol ( <i>p</i> -Chloro- <i>m</i> -xyleneol)	PCMX	88-04-0	37.0	Moderate
2,3,5,6-Tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine	TCMSP	13108-52-6	1.32	Strong
2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole	TCMTBT	21564-17-0	1868	Weak
4,4'-Tetramethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridium bromide)	TMBCDPB	Unknown	6.8	Strong
Zinc naphthenate	ZnN	12001-85-3	59.0	Moderate
	ZPT	13463-41-7	0.42	Strong
<b>Plasticizer</b>				
Di-n-butyl sebacate	DBS	109-43-3	1600	Weak
Diethyl sebacate	DES	110-40-7	1085	Weak
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	TMPDIB	6846-50-0	170	Moderate
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate	TMPMIB	25265-77-4	233	Moderate
<b>Rubber accelerator</b>				
Zinc butylxanthate	ZBX	150-88-9	5.6	Strong
Zinc isopropylxanthate	ZIPX	1000-90-4	18.3	Strong
<b>Rubber antioxidant</b>				
<i>N</i> -(1-Methylheptyl)- <i>N'</i> -phenyl- <i>p</i> -phenylenediamine	MHPPD	15233-47-3	14.4	Strong
Octylated diphenylamine	ODPA	101-67-7	4500	Weak
Styrenated diphenylamine	SDPA	17796-82-6	146	Moderate
4,4'-Thio-bis(3-methyl-6- <i>tert</i> -butylphenol)	TBMBP	96-69-5	0.58	Strong
<b>Rubber retarder</b>				
N-(Cyclohexyl)thiophthalimide	CTP	17796-82-6	16.6	Strong
<b>Solvent</b>				
Diethylene glycol mono- <i>n</i> -butyl ether acetate	DEGEA	121-17-4	1500	Weak

<sup>a)</sup> The value represents the mean of 3 experiments.

<sup>b)</sup> 2% in propylene glycol.

き, NR を 50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で含有させた FBS-MEM 200  $\mu\text{l}$  ずつを加えてさらに 3 時間培養した。上清を除き, 2.5% ホルマリン - 1%  $\text{CaCl}_2$  溶液を 280  $\mu\text{l}$  入れて 1 分間静置して細胞を固定, 洗浄し, 上清を捨てた後, 1% 酢酸 - 50% エタノール溶液を 100  $\mu\text{l}$  加えて, 細胞内に取り込まれた NR を抽出した。540 nm における吸光度を測定し, 各物質それぞれの濃度について対照群の吸光度値に対する%を計算してこれを縦軸に, 試験濃度を対数で横軸にとったグラフにプロットした。各試験物質について吸光度を 50% にする濃度 (IC50) を求めた。実験は 3 ~ 4 回繰り返して行い, その平均値を得た。

## 結果と考察

細胞毒性試験はドレイズ眼刺激性試験法の代替法とし

ての有用性が多くの実験者によって確認されており<sup>1,3-5)</sup>, NR 取り込み能を指標とした方法もその 1 つとして上げられている。生物試験では同じ操作をしても試験ごとに若干の結果の変動が起こることが経験的にわかっており, 今回のように毒性強度をクラス分けするには一定の基準を置いて試験することが望ましい。医療機器のガイドラインでも毎回標準物質を置くことが推奨されている<sup>6)</sup>。そこで, 本研究でも毎回の試験では ZDEC を標準物質として同時に実施することにより, 試験法の感度と再現性を確かめた。Table.2 には毎年の ZDEC の IC50 値を示した。その結果, 変動が少なくほぼ一定の値が得られることから, IC50 値から判断する試験物質のクラス分けが各年度とも同一の基準でされていることが確認できた。我々はこれまで, 350  $\mu\text{g/ml}$  以上の IC50 値を示す

Table.2 Reproducibility of IC50 value for zinc diethyldithiocarbamate

Experimental year	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a)</sup>
1997	1.77
1998	1.62
1999	1.51
2000	1.73
2001	1.23
2002	1.58
2003	1.93
2004	1.48
(Mean $\pm$ SD)	1.60 $\pm$ 0.21

<sup>a)</sup> IC50 was the concentration that reduce the absorbance by 50% of control.

物質を弱い細胞毒性物質で眼刺激を起こす可能性がほとんどない、35～350  $\mu\text{g/ml}$  を中程度の細胞毒性物質として眼刺激性が誘発される可能性がある物質、35  $\mu\text{g/ml}$  以下を強い細胞毒性物質で明らかな眼刺激性を起こす危険性があるとした<sup>4)</sup>。本研究でもこの判定基準をそのまま用いることにした。

試験物質はバイオサイド18種、可塑剤4種、ゴム加硫促進剤2種、ゴム老化防止剤4種、スコーチ防止剤1種、溶剤1種である (Table.1)。可塑剤と溶剤の細胞毒性強度は強くはなく、ゴム老化防止剤に用いられるものは添加される物質によって強度に大きな差があった。今回試験した xanthate 系ゴム加硫促進剤はこれまで試験した carbamate 系と同様に強い細胞毒性を示すことがわかった。

近年、抗菌性をうたった家庭用品が多く出回っており、これらに使用される抗菌剤は日本防菌防黴学会によってまとめられている<sup>7)</sup>。こうした薬剤には農薬として用いられてきたものを用途転換したのも多く含まれる。そのため、使用対象・方法が変わることによって皮膚等との接触頻度が増え、健康被害が起こる可能性がある。こうしたことから抗菌剤を始めとしたバイオサイドの安全性について確認する必要性が強くなり、そのため、この期間の試験対象物質としてはバイオサイドが半分以上を占めた。バイオサイドは製品の微生物汚染を防ぐ薬剤を総称しており、欧州では消毒剤、防腐剤、生物抑制剤、その他の4つの分類に分けており、さらに木材、繊維、ポリマー等防腐対象とするものによって小分類されている<sup>8)</sup>。日本では、防かび剤 (木材用、その他)、防腐剤、防藻防かび剤、抗菌剤、防虫忌避剤等で使われる物質が相当するが、1つの化学物質が複数の効果を示したり、使用先が多岐にわたったりすることから、ここではバイオサイドでまとめて記載した (Table.1)。最も強いものは zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide)、別名ジंकピリチオンで、シャンプーなどに付け防止剤として使用されている。以下、TPN、TCMSPと続くものの、試験したほと

んどのバイオサイドが strong と判定された。殺菌性ということ考えるとある程度強い細胞毒性を示すことは予想できる。一方、TCMTBは最もIC50値が低く、TCCも細胞毒性は弱かった。IC50値から判断するとバイオサイドのほとんどが眼刺激性を起こす可能性が高いとした。

National Institute for Occupational Safety and HealthのRegistry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) で各バイオサイドの実験動物に対する眼刺激性を調査したところ、PCMは100 mgで moderate の反応が表れたとしている<sup>9)</sup>。しかし、細胞毒性試験で最も毒性の弱かった TCMTBT は30%含有物100 mgで moderate との反応を示し、in vitro 試験との相違が認められた。ZPTとBNPDは投与量については記載があるが反応性の報告はなかった。他の物質についてはin vivo 眼刺激性データを示す報告は認めなかった。本細胞毒性試験法と皮膚刺激性との間に相関性はほとんどないが<sup>4)</sup>、動物実験での皮膚刺激性について参考に調べたところ、BNPD、BIT及びTMTBTは mild～moderate と判定され、OBTはモルモットに対し連続塗布したところ、severeな反応を示したとある<sup>9)</sup>。Draize試験は実験者によって適用量が違うこと、1用量だけの試験で表れた反応強度だけをもとにしている場合がほとんどであり、このような用量反応関係を示さない試験での刺激性強度の判定を細胞毒性試験の結果と単純に比較するのは難しいのかもしれない。

欧州は、バイオサイド製品の上市に関する指令を採択し、抗菌剤の統一した法律管理をとることとし、既存化学物質の調査を行った後、審査対象物質を選定し、安全性試験のデータの提出を求めている<sup>8, 10-12)</sup>。我が国でも繊維業界等では使用できる抗菌剤の表示と加工について自主基準が作られているものもあるが<sup>13-16)</sup>、多くの物質は家庭用品について適用した場合の安全性についてはほとんど検討されていない。ここで示したように、使用されるバイオサイドには強い細胞毒性を起こすものがあり、使用法の制限、配合量と溶出量との相関性など、これからも健康被害を防止するための検討が必要と思われる。

## 文 献

- 1) Borenfreund, E., Puerner, J.A.: *Toxicol. Lett.*, **24**, 119-124 (1985)
- 2) Draize, J.H., Woodward, G., Carvery, H.O.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390 (1994)
- 3) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: *J. Toxicol.-Cut. & Ocular Toxicol.*, **12**, 15-24 (1993)
- 4) Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 130-134 (1997)

- 5) Watanabe, M., Watanabe, K., Suzuki, K., Nikaido, O., Ishii, I., Konishi, H., Tanaka, N., Sugahara, T.: *Toxicol. In Vitro*, 3, 329-334 (1989)
- 6) 厚生省薬務局医療機器開発課監修：医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン1995解説，薬事日報社（1996）
- 7) 日本防菌防黴学会編．防菌防黴剤事典 - 原体編 - ．防菌防黴，26増（1998）
- 8) Commission Regulation (EC) No 2032/2003 of 4 November 2003 on the second phase of the 10-year work programme referred to in Article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council on biocidal products on the market, and amending Regulation (EC) No 1896/2000. Official Journal of the European Communities L307, 24. 11. 2003, 2003, p.1-96
- 9) National Institute for Occupational Safety and Health. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)
- 10) Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. Official Journal of the European Communities L123, 24.4.98, 1998, p.1-63
- 11) Commission Regulation (EC) No 1896/2000 of 7 September 2000 on the first phase of the programme referred to in article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council on biocidal products. Official Journal of the European Communities L228, 8.9.2000, 2000, p.6-17
- 12) European Commission. First composite report in accordance with Article 24 of Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market covering the period May 2000 to November 2004. 22. 10. 2004
- 13) 財団法人日本環境協会エコマーク事務局．エコマーク認定における抗菌剤の取扱いについて（2003）  
<http://www.jeas.or.jp/ecomark/tebiki22.html>
- 14) 社団法人日本塗料工業会．抗菌塗料製品管理のためのガイドライン（2003）  
[www.toryo.or.jp/jp/anzen/news/guide.pdf](http://www.toryo.or.jp/jp/anzen/news/guide.pdf)
- 15) 社団法人繊維評価技術協議会．抗菌防臭加工繊維製品認証基準（2003）  
<http://www.sengikyo.or.jp/seihin/pdf/koukin.pdf>
- 16) 抗菌製品技術協議会．抗菌製品技術協議会会則 諸規定6．品質と安全性に関する自主規格（2003）