

グアニジン系加硫促進剤の感作性評価と家庭用ゴム製品の実態調査

清水久美子, 秋山卓美[#], 伊佐間和郎^{*}, 河上強志, 五十嵐良明

Evaluation of skin sensitization potential of guanidine rubber accelerators and their analysis in household rubber products

Kumiko Shimizu, Takumi Akiyama[#], Tsuyoshi Kawakami,
Kazuo Isama^{*}, Yoshiaki Ikarashi

1,3-Diphenylguanidine (DPG) had been used as a rubber accelerator. DPG is not classified as a sensitizer by the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), because of the negative result in the past guinea pig maximization test (GPMT). However, in Europe, the patients who showed positive skin response to DPG by a patch testing have increased in the past few years. Further, the case of contact dermatitis to rubber gloves containing 1,2,3-triphenylguanidine (TPG) has recently been reported. We suspected that some guanidine rubber accelerators may have a skin sensitization potential. In this study, we investigated the skin sensitization potentials of DPG, TPG, 1,3-di-*o*-tolylguanidine (DOTG), and 1-*o*-tolylbiguanide (OTBG) using the human cell line activation test (h-CLAT). DPG and TPG were evaluated as positive, and DOTG and OTBG were negative in the h-CLAT. We tried to develop an analytical method of these guanidine rubber accelerators by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) and to measure these amounts in 30 household rubber products. Phenyl-Hexyl column showed better performance in terms of the peak shapes of guanidine accelerators than C18 column. LOQ of MS for DPG, TPG, DOTG and OTBG were 0.794, 2.28, 0.137, and 0.207 ng/mL, respectively. Guanidine rubber accelerators were extracted using acetone/chloroform (1:1) from household rubber products and analyzed separately using Phenyl-Hexyl column and 0.05% TFA in acetonitrile-water mixture as a mobile phase. However, the recovery rates except DPG exhibited large variations, so we took the values obtained from this analysis as reference. Four guanidine rubber accelerators were detected from nine household rubber products. DPG was detected in three rubber flip-flops, two gloves, and a toy. Especially, the flip-flop straps contained larger DPG than that of all of the rubber household products that were tested. TPG was also detected in the straps of three flip-flops, and DOTG was detected in the nipple attached to a baby bottle. Trace amounts of OTBG were detected in two gloves.

Keywords: guanidine rubber accelerator, household rubber product, allergic contact dermatitis, h-CLAT, LC/MS

[#] To whom correspondence should be addressed:

Takumi Akiyama; Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel/Fax: +81-3-3704-9304; E-mail: akiyamat@nihs.go.jp

^{*} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University

1. 緒言

加硫促進剤は、ゴム製品の製造過程で使用する添加物である。加硫促進剤として使用される化合物には、チウラム系、ジチオカーバメート系、チアゾール系、チオウレア系、及びグアニジン系等、多くの種類があり、通常は1種の化合物だけではなく、各々、反応速度や相性等から複数の化合物を組み合わせで使用されている。しかし、加硫促進剤の中には接触皮膚炎の原因物質となるものが存在することが知られている¹⁻⁶⁾。主要な加硫促進

剤であるチウラム系加硫促進剤のテトラメチルチウラムジスルフィド、チアゾール系加硫促進剤の2-メルカプトベンゾチアゾール、及びチオウレア系加硫促進剤のエチレンチオウレアは、皮膚感作性試験において陽性を示し、化学品の分類および表示に関する世界調和システム (The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals : GHS) では皮膚感作性物質として分類され⁴⁾、これらは日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会が日本人での陽性率が高いアレルゲンとして指定している "Japanese standard allergens 2008" にも収載されている⁵⁾。一方、グアニジン系加硫促進剤として代表的な1,3-ジフェニルグアニジン (DPG) は Guinea pig maximization 試験 (GPMT) で陰性であることから⁷⁾、GHSでは皮膚感作性について "Classification not possible" とされている^{4,7)}。また、汎用されている他のグアニジン系加硫促進剤である1,2,3-トリフェニルグアニジン (TPG)、1,3-ジ-*o*-トリルグアニジン (DOTG) 及び1-*o*-トリルビグアニド (OTBG) の感作性については、GHSの感作性の分類はなされていない^{4,8)}。

近年、ゴム製品に接触皮膚炎を起こした患者において DPG に対するパッチテスト陽性症例の数が増加していることから^{6,9-12)}、DPGは欧州において新しい感作性物質として認知されつつある^{13,14)}。また、2014年には、TPGの感作性について報告されている⁹⁾。さらに、日本においても、家庭用品等に係る健康被害病院モニター報告制度で収集された接触皮膚炎事例で DPG のパッチテスト陽性例が報告されている¹⁵⁾。一方、DOTG及びOTBGについては被害事例に関する報告はない。

そこで、本研究では DPG を含む4種のグアニジン系加硫促進剤の感作性について *in vitro* 皮膚感作性試験法である human cell line activation test (h-CLAT) を用いて評価した。h-CLATはヒト単球由来細胞株 THP-1細胞を用いた簡便な動物実験代替法としてガイドライン化が進められ、当部でも経験を有することから評価法として選択した。さらに、我が国における家庭用ゴム製品中のグアニジン系加硫促進剤の使用実態を知るため、分析法を検討し、本法を用いて手袋、ゴム草履等の実態調査を行った。

2. 試料及び方法

2.1 試薬

4種の被検物質である DPG、TPG、OTBG 及び DOTG は東京化成工業株式会社より購入した。これら4種のグアニジン系加硫促進剤の化学構造式を Fig. 1 に示す。

h-CLATの陽性対象物質である2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB)、被検物質の溶媒として用いた生化学用ジメチルスルホキシド (DMSO)、HPLCの移動相と

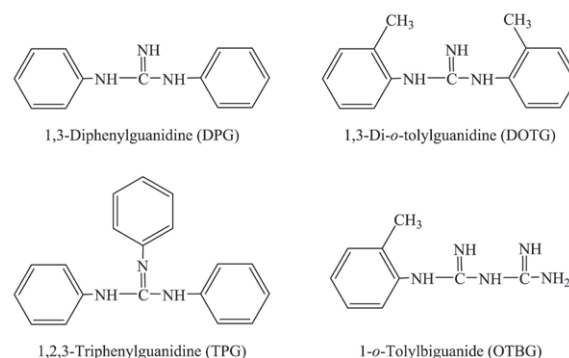


Figure 1. Chemical formulae of four kinds of guanidine rubber accelerator

して用いたトリフルオロ酢酸 (TFA) 及び HPLC 用アセトニトリル、抽出溶媒として使用したアセトン、クロロホルム、及びエタノールは、和光純薬工業株式会社より購入した。

Human leukemia cell line (THP-1細胞) は American type culture collection (ATCC) より購入した。RPMI 1640 培地、ウシ胎児血清、2-メルカプトエタノール及び抗菌剤は Thermo Fisher Scientific 社 Gibco 製品より購入した。FITC 標識モノクローナル抗体であるマウス抗ヒト CD54 抗体及びマウス IgG 抗体は Dako より購入し、FITC 標識マウス抗ヒト CD86 抗体は BD Biosciences 社より購入した。水は超純水製造装置 Simpli Lab Elix 3 UV (Merck Millipore 社) により作製した超純水を用いた。

2.2 試料

2015年の7月～9月に東京都内の小売店またはインターネットショップで購入したゴム製品30種を試料とした。手袋G8は、ずれ落ち防止の為のゴムバンドが挿入されており、手袋本体 (G8 glove) とゴムバンド (G8 band) を別の試料とした。また、ゴム草履 (flip-flops) も、鼻緒 (strap) 部分と台の部分 (sole) を別の試料とした。各試料のゴムの種類及び生産国を Table 1 に示した。

2.3 細胞毒性試験

THP-1細胞はRPMI1640培地に10%ウシ胎児血清、0.05 mM 2-メルカプトエタノール及び抗菌剤を添加した培地で培養した。試験に際して、 1.6×10^5 cells/well となるように96穴プレートに50 μ L/wellで播種して約24時間培養した。各被検物質はDMSOで溶解し、DPG、TPG及びDOTGは500 mg/mL、OTBGは250 mg/mLの溶液を調製した。これらの溶液を培地で6～2000 μ g/mLに希釈し、被検物質溶液とした。細胞が播種されている各wellに種々の濃度の被検物質溶液50 μ L (最終暴露濃

Table 1. List of the 30 kinds of household rubber product that were tested

Sample	Types of rubber		Country of manufacture
Gloves	G1	Natural rubber	Sri Lanka
	G2		Vietnam
	G3		Malaysia
	G4		China
	G5	Synthetic rubber	Taiwan
	G6	Nitrile rubber	Indonesia
	G7	glove band	Malaysia
	G8		Thailand
	G9	Natural rubber	Sri Lanka
	G10		China
	G11		China
	G12		China
	G13		Malaysia
	G14		Thailand
Finger coats	FC1	Natural rubber	China
	FC2		China
	FC3	Silicone rubber	Malaysia
Rubber bands	RB1	Natural rubber	Thailand
	RB2	Synthetic rubber	China
Flip-flops	FF1	sole strap	Thailand
	FF2		Thailand
	FF3		Thailand
	FF4		Brazil
	FF5		Brazil
Toys	TOY1	Natural rubber	China
	TOY2	Synthetic rubber	Thailand
	TOY3	Unknown	China
Others	Insole	Styrene butadiene rubber	Japan
	Elastic cords	Natural rubber	Japan
	Nipple	Isoprene rubber	Japan

度：3～1000 µg/mL)を加え、CO₂インキュベータ内でさらに約24時間培養し、細胞内ATP量をCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega社)を用いて測定した。溶媒コントロール暴露細胞の生存率を100%として各被検物質暴露による相対的な細胞生存率から、細胞への毒性を評価した。

細胞毒性試験の統計解析はStudent's t-testによって行われた。各生存率とコントロールの生存率（溶媒を曝露された細胞の生存率）を比較して解析を行った。また、 $p < 0.05$ を統計的な有意差とみなした。

2.4 感作性試験

h-CLATによる皮膚感作性試験は、Ashikagaら及びSakaguchiらの方法^{16,17)}に準じて行った。各物質について細胞毒性試験で得た細胞生存率75%を示す濃度（75% cell viability: CV75）から、公比1.2で高濃度側に1点、低濃度側に6点、計8点の濃度が最終暴露濃度となるようにTHP-1細胞に添加した。被検物質暴露と同濃度（0.2%）のDMSOを暴露した細胞（溶媒処理細胞）を

ネガティブコントロールとし、最終暴露濃度3.5～4.0 µg/mLのDNCB暴露細胞をポジティブコントロールとした。すべての試験でポジティブコントロールが陽性と判定されることを確認した。24時間後細胞を回収し、抗CD86及び抗CD54抗体と反応させ、FACS (BD FACSArray, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製)にてMFIを測定し、下式によりCD86及びCD54の細胞表面発現率（RFI%）を求めた。CD86 RFI% $\geq 150\%$ 又はCD54 $\geq 200\%$ をいずれかの濃度一点でも満たせば、陽性と判定した。3回の試験のうち2回以上同じ判定がなされたとき、又は、最初の2回の試験で同じ判定がなされた時には3回目の試験を行わず、判定を確定した。

$$\text{RFI} (\%) = (A - B) / (C - D) \times 100$$

A：被検物質暴露細胞のMFI, B：被検物質暴露細胞のisotype controlのMFI, C：溶媒処理細胞のMFI, D：溶媒処理細胞のisotype controlのMFI, MFI = Geometric mean fluorescence intensity

2.5 ゴム製品中のグアニジン系加硫促進剤の分析

ゴム製品0.50 gを正確に量り、0.5～5 mm幅に細切して、アセトン／クロロホルム混液（1:1）5 mLを加えた。10分間超音波処理を行い、抽出液をナス型フラスコに移した。この抽出操作を3回繰り返した。抽出液をエバポレーターで乾固し、エタノールを加えて5 mLに定容した。これを水で10倍希釈し、PTFEメンブランフィルター（孔径：0.2 µm, Merck Millipore社）で不溶物を除去した後、液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC/MS）にて分析した。

分析装置はACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters社)を用いた。カラムはACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl（内径：2.1 mm, 長さ：100 mm, 粒子径：1.7 µm, Waters社製）、カラム温度は40℃とした。移動相Aは0.05% TFA／水、溶媒Bは0.05% TFA／アセトニトリル溶液を用い、流量は0.12 mL/min, 注入量は5 µLとした。グラジエント条件は、0–2 min, 10% B液; 2–14 min, 10–90% B液; 14–19 min, 90% B液; 19–19.1 min, 90–10% B液; 19.1–29 min, 10% B液とした。Photodiode array (PDA)による検出波長は210–400 nmとし、定量波長は260 nmを用いた。MS分析でのイオン化はESI positiveで行い、キャピラリー電圧は3 kV, コーン電圧は30 V, ソース温度は120℃, 脱溶媒温度は350℃, 脱溶媒ガス流量は650 L/hr, コーンガス流量は50 L/hrとし、SIRモードで m/z 212 (DPG), 288 (TPG), 240 (DOTG), 192 (OTBG)のイオンをモニターした。

検出下限（LOD）と定量下限（LOQ）は、低濃度の標

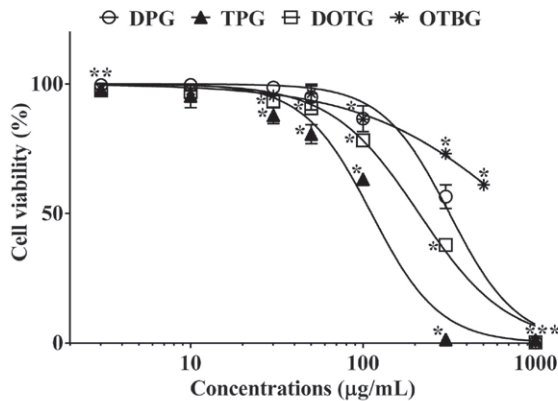


Figure 2. Cytotoxicities of THP-1 cells exposed to guanidine rubber accelerators

THP-1 was exposed to guanidine rubber accelerators at concentrations of 3-1000 $\mu\text{g/mL}$ for 24 hours. Cytotoxicities were evaluated by the cell viability assay and the values are represented as % viability. Each data indicates the mean $\pm$ standard deviation of three separate experiments. *Significantly different from the control: $p < 0.05$.

準物質をPDAとMSの検出器で各々20回測定して求めた。JIS K0124: 2002及びJIS K0136: 2004に従い、測定値の標準偏差 (σ) の3.29倍に相当する値を求め、絶対検量線法によりその濃度を換算して、これをLODとした¹⁸⁾。同様に、 σ の10倍に相当する濃度をLOQとした。

添加回収試験には、予備試験にてグアニジン系加硫促進剤を含有していないことが判明したゴム手袋2種 (G4及びG7) を用いた。これらの試料0.5gに25 μg の被検物質を添加して抽出、測定後、回収率を求めた。

3. 結果と考察

3.1 感作性試験

皮膚感作性試験h-CLATに先立ち、被検物質の細胞毒性試験を行った。その結果をFig. 2に示す。TPGが最も強い細胞毒性を示した。CV75については、DPGは177 $\mu\text{g/mL}$ 、TPGは74.0 $\mu\text{g/mL}$ 、DOTGは114 $\mu\text{g/mL}$ 、OTBGは263 $\mu\text{g/mL}$ となった。これらのCV75を元に、h-CLATに用いる8点の最終暴露濃度を決定した。

h-CLATの結果をTable 2に示した。CD86発現率はいずれのグアニジン系加硫促進剤でも150%以下であった。一方、CD54発現率では、DPG及びTPGは複数の濃度で200%を超過した。そのため、これらの感作性は陽性と判定した。DOTG及びOTBGはいずれの濃度においても発現率が200%以下であり陰性と判定した。

DPGと類似構造を持つ農薬や殺虫剤 (ドデシルグアニジン等) を使用する農薬従事者が接触性皮膚炎を起こし、DPGによるパッチテストで陽性反応となる症例が多い^{19,20)}。また、グアニジン系加硫促進剤の原料でも

Table 2. Results from the human cell line activation tests (h-CLAT)

Name	Concentrations (µg/mL)	RFI(%)				Decisions
		CD86		CD54		
		1st test	2nd test	1st test	2nd test	
DPG	59.3	105	114	109	109	Positive
	71.1	112	113	126	112	
	85.4	116	100	180	135	
	102	101	93.2	152	128	
	123	120	110	177	154	
	148	117	110	199	190	
	177	130	115	241	227	
	212	104	91.2	258	245	
TPG	24.8	96.3	95.4	168	131	Positive
	29.7	112	94.3	172	157	
	35.7	86.3	91.0	183	186	
	42.8	81.2	71.6	208	184	
	51.4	90.5	84.5	219	238	
	61.7	87.4	79.1	246	275	
	74.0	64.7	61.6	266	294	
	88.8	52.2	57.1	282	312	
DOTG	38.2	83.9	90.3	84.4	82.2	Negative
	45.8	74.4	89.1	84.4	79.6	
	55.0	93.4	72.1	88.4	95.4	
	66.0	69.6	80.7	90.5	88.5	
	79.2	71.3	76.0	75.9	96.0	
	95.0	74.9	73.6	122	110	
	114	78.6	86.0	152	138	
	137	55.7	77.9	158	145	
OTBG	88.1	86.0	86.7	79.6	85.3	Negative
	106	94.4	82.5	78.0	85.5	
	127	75.6	85.3	80.4	95.6	
	152	65.6	85.8	75.7	81.2	
	183	73.3	89.9	85.7	86.1	
	219	70.1	87.1	84.4	87.5	
	263	62.1	79.5	85.2	83.2	
	316	77.4	81.0	101	95.2	

The relative fluorescence intensity (RFI) values represent data obtained from two independent experiments. Positive criteria include the RFI values for CD86 ($\geq 150\%$) and/or CD54 ($\geq 200\%$), and RFI values that satisfy the positive criteria are expressed in bold text. Test substances were considered to be sensitizers when two of three independent experiments met the positive criteria.

あるアニリンは皮膚炎を引き起こすことが知られている^{21,22)}。以上のことから、DPG及びTPGの反応は、グアニジン骨格及び原料由来のアニリン骨格のいずれか若しくは両者の構造に起因していると考えられた。一方、Garcia-Perezらの報告¹⁹⁾では、農業従事者に比べて一般人のDPGへの感作率は低い、医療従事者の感作が増加している。これは、ゴム手袋やゴムを含む履物は農業従事者だけでなく、医療従事者、一般家庭での家事や園芸作業でも頻用されているためと考えられる。今後は、グアニジン系ゴム加硫促進剤としてジフェニルグアニジンフタレート及びジカテコールボレート・ジ- α -トリルグアニジン塩が使用されており、これらの感作性についても明らかにしていく必要がある。

近年ではパッチテストで陽性となる患者が増加傾向を示すことからDPGには感作性があると判断される状況

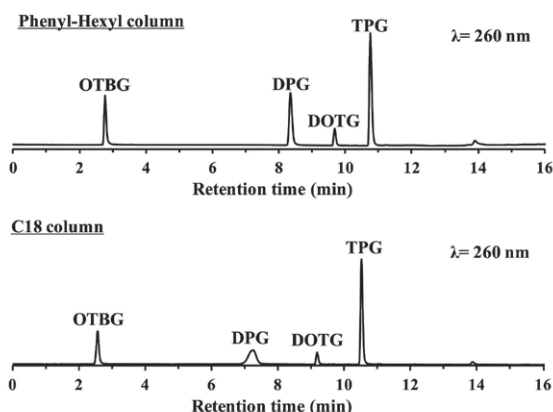


Figure 3. Chromatogram of four guanidine rubber accelerators

Each guanidine rubber accelerators were measured and detected at 260 nm using LC/MS with Phenyl-Hexyl column (5 µg/mL) and C18 column (10 µg/mL).

Table 3. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of guanidine rubber accelerators

Guanidine rubber accelerators	LOD (ng/mL)		LOQ (ng/mL)	
	PDA	MS	PDA	MS
DPG	9.52	0.261	28.9	0.794
TPG	3.05	0.751	9.27	2.28
DOTG	21.9	0.0450	66.4	0.137
OTBG	16.7	0.0681	50.6	0.207

にある^{13,14)}。しかしDPGはGPMTでは感作性陰性と判定されており^{4,7)}、この違いは種差による影響の可能性が考えられる。また、GPMTは試験物質の感作誘導と惹起時の適用濃度によっては判定が変化する可能性も考えられ、他の皮膚感作性試験も検討する必要があると考えられる。

3.2 分析条件の検討

Dahlinらの報告⁹⁾で用いられた方法を参考に、4種のグアニジン系加硫促進剤を分析するためのカラム及び移動相について検討した。DahlinらはODSカラムを用いているが、ODSカラムであるACQUITY UPLC CSH C18カラムではDPGのピーク形状が悪かった。しかし、ODS基の代わりにPhenyl-Hexyl基を結合させたACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexylカラムを用いるとピーク形状が改善した。そのため、分析にはPhenyl-Hexylカラムを用いた。グアニジン系加硫促進剤をPhenyl-HexylカラムとODSカラムを用いて260 nmで分析したときのクロマトグラムをFig. 3に示した。PDAとMSそれぞれの検出器での検出下限 (LOD) 及び定量下限 (LOQ) を求めてこれらの値を比較したところ、

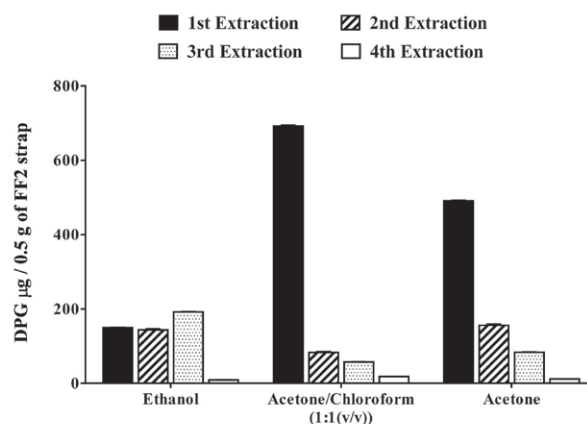


Figure 4. Effect of solvents on the extraction efficiency of guanidine rubber accelerators from household products

DPG was extracted from 0.5 g of FF2 strap using three solvents: ethanol, acetone/chloroform (1:1), and acetone. These extractions were repeated four times.

MSはPDAより検出感度が高く、LOQはPDAの約1/4～1/500であり、より低い濃度まで分析が可能であった (Table 3)。ただし、PDAでの定量は、MSと比べて検量線の直線性が優れており、その濃度範囲も広いことから、MSにおいてPDAのLOQ以上の濃度が得られた場合は、PDAにて定量した。また、グアニジン系加硫促進剤のピークにゴム製品由来の妨害ピークが認められた試料やPDAでLOQ以下の被検物質は、MSでの定量を試みた。

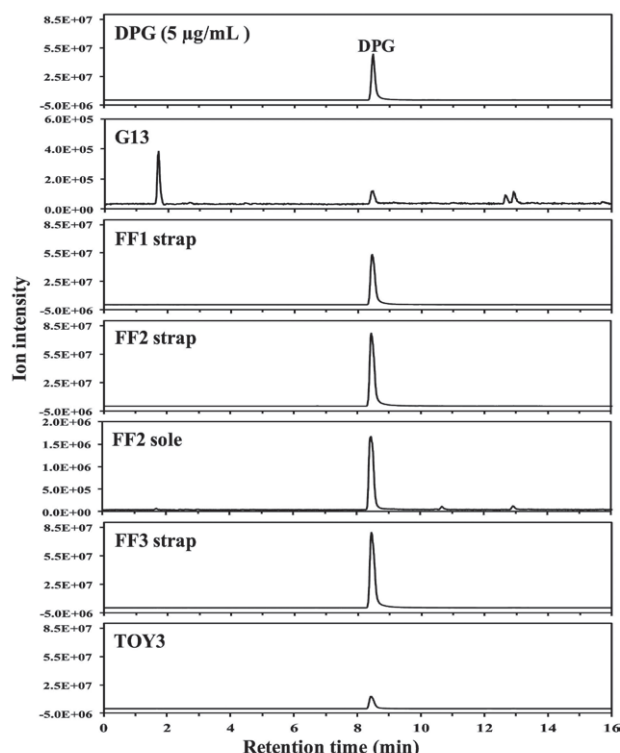
3.3 ゴム製品からの抽出法

予備実験でDPGが含有されていることを確認したゴム草履の鼻緒部分 (FF2 strap) を用いてゴム製品からのグアニジン系加硫促進剤の抽出法を検討した。溶媒はゴム製品への浸透力を考慮し、Dahlinら⁹⁾が用いたエタノール、鹿庭ら^{23,25)}がゴム添加剤の分析に用いているアセトン/クロロホルム混液 (1:1)、及びアセトンを検討した。4回繰り返し抽出したときに得られる総DPG量は、エタノール495 µg、アセトン/クロロホルム混液851 µg、アセトン743 µgであり、アセトン/クロロホルム混液による総抽出量が最も多かった (Fig. 4)。アセトン/クロロホルム混液を用いた場合、3回抽出時の抽出総量と4回抽出時の総抽出量はほぼ変わらないため、3回の繰り返し抽出で充分であると考えた。エタノール、アセトンに比べ、アセトン/クロロホルム混液はゴム製品内部への浸透力が高く、その結果、より多くのDPGを抽出することができたと考えられる。以下、アセトン/クロロホルム混液を抽出溶媒に用いてゴム製品を3回抽出したものを試料溶液として分析することとした。

Table 4. Recovery tests of guanidine rubber accelerators from the spiked rubber gloves

Guanidine rubber accelerators	Recovery (%)	
	G4	G7
DPG	82.9 ± 1.5	75.3 ± 5.5
TPG	85.4 ± 5.2	32.3 ± 5.8
DOTG	85.9 ± 1.5	62.1 ± 6.3
OTBG	48.3 ± 1.3	68.0 ± 1.6

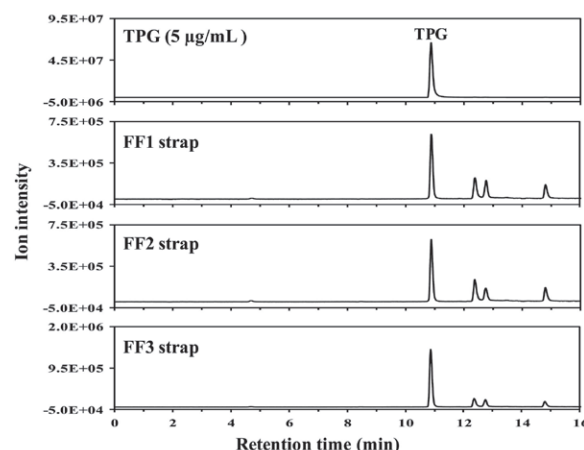
25 µg of guanidine rubber accelerators were added to 0.5 g of the cut pieces of G4 or G7 gloves and extracted. Values are expressed in the form of mean ± standard deviation, and were obtained from three independent sets of experiments.


Figure 5. Detection of 1,3-diphenylguanidine (DPG) in household rubber products

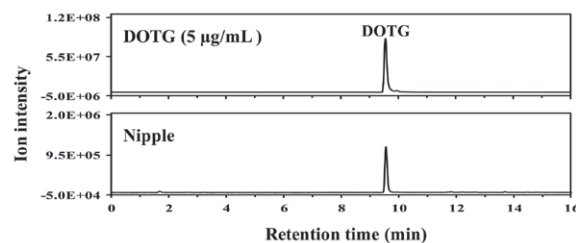
DPG was measured at m/z 212 using LC/MS. Note that separate measurements were taken for the straps and soles of flip-flops.

3.4 添加回収試験

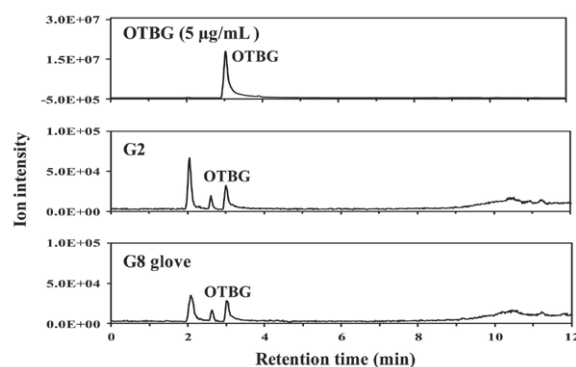
試料G4及びG7に4種のグアニジン系加硫促進剤の標準溶液を添加し、添加回収試験を実施した。各被検物質のPDAのピーク面積を用いて定量し、回収率を求めた。DPGは両試料で75%以上の回収率が得られたが、TPG、DOTG及びOTBGの回収率は試料により大きな差が認められた (Table 4)。この原因として、抽出液を乾固した際に、グアニジン系加硫促進剤が試料由来の不溶物質に吸着されたためと考えられた。試験溶液の調製法をさらに検討・改善することで良好な回収率を得ることは


Figure 6. Detection of 1,2,3-triphenylguanidine (TPG) from the straps of rubber flip-flops

TPG was measured at m/z 288 using LC/MS. Note that separate measurements were taken for the straps and soles of flip-flops.


Figure 7. Detection of 1,3-di-o-tolylguanidine (DOTG) in household rubber products

DOTG was measured at m/z 240 using LC/MS.


Figure 8. Detection of 1-o-tolylbiguanide (OTBG) in household rubber products

DOTG was measured at m/z 192 using LC/MS.

可能であると思われるが、本条件でも最低3割以上の添加回収率があることと、LOD及びLOQが低濃度であることから、被検物質の含有の有無を確認するためのスクリーニング法として有用であると考え、本法を用いて市販製品の分析を行った。また、得られた定量値は参考値として取り扱うこととした。

3.5 市販ゴム製品中の分析

市販ゴム製品30種(36試料)のグアニジン系加硫促進剤を分析した。4種の加硫促進剤が検出された製品のマスキングクロマトグラムをFig. 5-8に示した。1試料について別々に3回抽出操作を行い、それぞれの抽出液をLC/MSにて分析した。参考値をまとめた結果をTable 5に示した。

手袋2製品(G1, G13), ゴム草履の鼻緒3製品(FF1 strap, FF2 strap, FF3 strap)及びゴム草履の台(FF2 sole), 玩具(TOY3)の7試料からDPGが検出された。参考値ではあるが, FF1~3のstrap部分及びTOY 3中のDPGはPDAで定量を行った。FF2 soleのDPGについてはPDAではピーク裾に妨害ピークがあったため, その他の被検物質が検出されたピークはPDAではLOQ以下であったため, MSで定量した。最も多くのDPGが含まれていた試料はFF2 strapであり, その量は $1.6 \times 10^3 \mu\text{g/g}$ であった。TPGは, DPGが比較的多く残留していると推定されるFF1 strap, FF2 strap及びFF3 strapの3試料から検出された。これらは色・サイズ違いの同じ製品であり, いずれも製造時にDPGが添加されたものと推測した。一方, TPGは極微量であったことから, DPGの不純物と考えられた。

DOTGは乳児用ニップルから検出された。OTBGは手袋2試料から検出されたが, 今回の方法ではその検出濃度が低く, LOQ未満であった。また, 今回の分析でDPGが検出された玩具は, 直径約60mmのゴムボールであり, 子どもの皮膚に長時間肌に触れ, 接触皮膚炎を生じる可能性は低いと考えられる。一方, 今回の分析では, DPGがゴム草履の鼻緒及び6歳以上の子どもを対象とする玩具に比較的多く残留した。Lazarovは, サンダル中の4-tert-ブチルフェノール(PTBP)ーホルムアルデヒド樹脂による皮膚炎について, 湿った気候による発汗や裸足でのサンダル着用が感作率増加を引き起こしている可能性を指摘している²⁶⁾。日本も温暖湿潤気候であり, ゴム草履を使用する場合に同様の症状が引き起こされるかもしれない。また, ヒトの足の甲部は, 履物に残留した感作物質による皮膚炎を起こす部位としてよく知られており²⁷⁾, 注意が必要である。

4. まとめ

本研究では, グアニジン系加硫促進剤のh-CLATによる感作性試験を行った。その結果, DPG及びTPGは感作性陽性と判定された。さらに, LC/MSによる製品中のグアニジン系加硫促進剤の分析法を検討した。本法では, 一部の回収率が不十分であったが, 検出下限値は0.0450~0.751ng/mLであり, 接触皮膚炎の症例における使用製品中レベルの検出が十分に可能であることが

Table 5. Concentrations of guanidine rubber accelerators in household rubber products

Sample	Guanidine rubber accelerators contained in household rubber products ($\mu\text{g/g}$)			
	DPG	TPG	DOTG	OTBG
Gloves	G1	Trace ^{a)}	ND	ND
	G2	ND	ND	Trace ^{a)}
	G3	ND	ND	ND
	G4	ND	ND	ND
	G5	ND	ND	ND
	G6	ND	ND	ND
	G7	ND	ND	ND
	G8	glove	ND	Trace ^{a)}
		band	ND	ND
	G9	ND	ND	ND
	G10	ND	ND	ND
	G11	ND	ND	ND
Finger coats	G12	ND	ND	ND
	G13	0.14, 0.14, 0.14 ^{a)}	ND	ND
	G14	ND	ND	ND
	FC1	ND	ND	ND
	FC2	ND	ND	ND
	FC3	ND	ND	ND
Rubber bands	RB1	ND	ND	ND
	RB2	ND	ND	ND
Flip-flops	sole	ND	ND	ND
	FF1 strap	8.6×10^2 , 8.5×10^2 , 8.3×10^2 ^{b)}	0.28, 0.26, 0.25 ^{a)}	ND
	sole	5.0, 6.5, 3.7 ^{a)}	ND	ND
	FF2 strap	1.7×10^3 , 1.5×10^3 , 1.5×10^3 ^{b)}	0.32, 0.40, 0.50 ^{a)}	ND
Toys	sole	ND	ND	ND
	FF3 strap	1.5×10^3 , 1.5×10^3 , 1.5×10^3 ^{b)}	0.97, 0.90, 0.91 ^{a)}	ND
	FF4 sole	ND	ND	ND
	FF4 strap	ND	ND	ND
	FF5 sole	ND	ND	ND
	FF5 strap	ND	ND	ND
	TOY1	ND	ND	ND
	TOY2	ND	ND	ND
Others	TOY3	1.3×10^2 , 1.2×10^2 , 1.2×10^2 ^{b)}	ND	ND
	Insole	ND	ND	ND
	Elastic cords	ND	ND	ND
	Nipple	ND	ND	0.08, 0.09, 0.10 ^{a)}

Values obtained from three independent extracts are presented. Each value is an average of three times analyses. Values were used as reference data in this study. ND: not detected; Trace: $\leq$ LOQ; ^{a)} Values were determined at m/z 212 (DPG), 288 (TPG), 240 (DOTG), and 192 (OTBG); ^{b)} Values were determined at 260 nm.

ら、スクリーニング法として有用であると考えられた。本法を用いて市販されている30種の家庭用ゴム製品の実態調査を行った結果、DPGは6製品から、TPGは3製品から、DOTGは1製品から、OTBGは2製品から検出され、グアニジン系加硫促進剤が残留する製品があることがわかった。今後は、これらを配合するゴム製品の安全性について検討する必要があると考えられた。

引用文献

- 高山かおる, 横関博雄, 松永佳世子, 片山一朗, 相場節也, 伊藤正俊, 池澤善郎, 足立厚子, 戸倉新樹, 夏秋優, 古川福実, 矢上晶子, 幸野健, 乾重樹, 池澤優子, 相原道子 (日本皮膚科学会接触皮膚炎診療ガイドライン委員会): *H皮会誌* 2009;119:1757-93.
- 森田雄介, 矢上晶子, 鈴木加余子, 小菅敦子, 亀井良太, 小川太一, 榎本憲秀, Tian L L S, 杉浦伸一, 松永佳世子: *日本ラテックスアレルギー研究会会誌* 2013;17(1):71-7.
- Kaniwa M: *Bull Natl Inst Health Sci.* 2006;124:1-20.
- 独立行政法人製品評価技術基盤機構: 「政府によるGHS分類結果 (Excel, HTML)」; http://www.safe.nite.go.jp/ghs/ghs_download.html
- 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会: Japanese standard allergens 2008; <http://www.jsdacd.org/html/allergen.html>
- Andersen KE, White IR, Goossens A: "Contact dermatitis fifth ed., 31. Allergen from the European baseline series", eds by Johansen JD, Frosch PJ, Lepoittevin JP, Springer-Verlag Press Inc., Berlin Heidelberg, pp. 545-576 (2011)
- OECD, "SISD initial assessment profile", SIAM, 14, 26-28 (2002)
- 三菱化学テクノロジー株式会社: 平成19年度経済産業省委託 化学物質国際規制対策 (化管法指定物質及び指定候補物質のGHS分類に関する調査) 報告書 (2008)
- Dahlin J, Bergendorff O, Vindenes KH, Hinden M, Svedman C: *Contact Dermatitis.* 2014;71:242-6.
- Piskin G, Meijs M. M, van der Ham R, Bos J. D: *Contact Dermatitis.* 2006;54:61-2.
- Pontén A, Hamnerius N, Bruze M, Hansson C, Persson C, Svedman C, Thörneby-Andersson K, Bergendorff O: *Contact Dermatitis.* 2013;68:103-10.
- Baeck M, Cawet B, Tennstedt D, Goossens A: *Contact Dermatitis.* 2013;68:54-5.
- Mahler V, Alto-Korte K: "Quick guide to contact dermatitis, 14. Rubber, 19. Gloves", eds by Johansen JD, Lepoittevin JP, Thyssen JP, Springer-Verlag Press Inc., Berlin Heidelberg, Chapter 14: pp.159-177, Chapter 19: pp.213-21 (2016)
- Goossens AE: "Patch testing tips, 7. The use of ultrasonic bath extracts in the diagnostics of contact allergy and allergic contact dermatitis", eds by Lachapelle JM, Bruze M, Elsner PU, Springer-Verlag Press Inc., Berlin Heidelberg, Chapter 7: pp.81-9 (2014)
- 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室: 平成25年度家庭用品に係る健康被害病院モニター報告書 (2015)
- Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H: *Toxicol in Vitro.* 2006;20:767-73.
- Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, Yoneyama K, Hirota M, Itagaki H, Toyoda H, Suzuki H: *Toxicol in Vitro.* 2006;20:774-84.
- 日本規格協会, "JISハンドブック 49化学分析2011, JIS K0124: 2002 高速液体クロマトグラフィー通則", pp 706-720, "JIS K0136: 2004 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則", pp.847-61.
- Garcia-Perez A, Garcia-Bravo B, Beneit JV: *Contact Dermatitis.* 1984;10:151-3.
- 環境省環境リスク評価室: "化学物質の環境リスク評価第9巻, 1,3-ジフェニルグアニジン", (2011), <http://www.env.go.jp/chemi/report/h23-01/pdf/chpt2/2-2-2-19.pdf>
- Kligman A M: *J Invest Dermatol.* 1966;47:393-408
- European Chemicals Bureau: "European Union Risk Assessment Report, aniline, 4.1.2.5 Sensitisation", eds by European Commission, Germany, volume 50: pp.104-5 (2004)
- Kaniwa M, Kojima S, Nakamura A, Kanto H, Ito M, Ishihara M: *Eiseikagaku* 1984;30:126-37.
- Kaniwa M, Ikarashi Y, Kojima S, Nakamura A, Usuda T, Shibata K: *Eiseikagaku* 1988;34:325-34.
- Kaniwa M, Isama K, Kojima S, Nakamura A, Arisu K, Hayakawa R: *Eiseikagaku* 1991;37:218-28.
- Lazarov A: *Contact Dermatitis.* 2006;55:73-6.
- Nardelli A, Taveirne M, Drieghe J, Carbonez A, Degreef H, Goossens A: *Contact Dermatitis.* 2005;53:201-6.