

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 発刊) 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（寒天重層法、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際には、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能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ので行う。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 (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 (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るべきであるが、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るべきであるが、抽出溶媒として培地を使用する場合には $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 cm^2 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°C 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°C 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°C 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、メタノール又は 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）を求める。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 IC_{50} 値とする。コンピュータを利用して、統計理論式から IC_{50} 値を計算しても良い。 IC_{50} 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 IC_{50} 値は 7% 未満及び陽性対照材料 B の IC_{50} 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（和光純薬工業株式会社 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 試料調製

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作製し、質量及び表面積を測定する。未滅菌の試料は、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 骨芽細胞様細胞に対する細胞毒性を比較した^{3,4)}。60 mm シャーレを用いて、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、HgCl、Tl(NO₃)₃、GaCl₃、CuCl₂、MnCl₂、CoCl₂、ZnCl₂、NiCl₂、SnCl₂、IrCl₄、TiNO₃、CuCl、RhCl、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^{3,4)}。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。

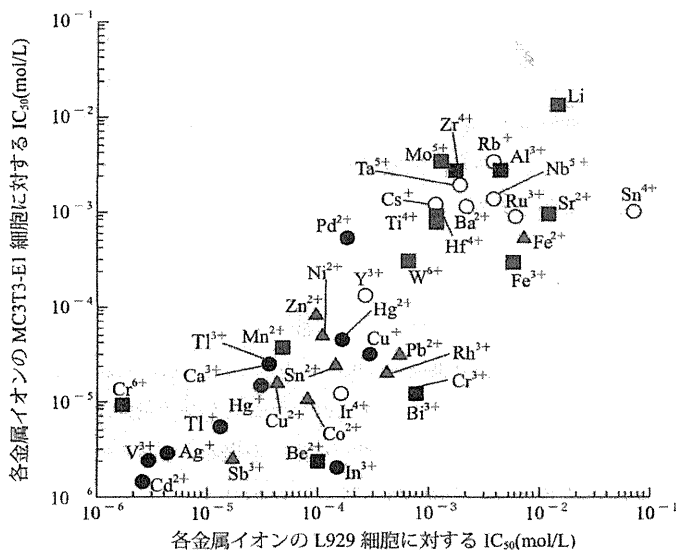


図1 各金属イオンのL929細胞及びMC3T3-E1細胞に対する細胞毒性と細胞間の相関^{3,4)}

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⁵⁾。医療機器の生物学的安全性試験法ガイドライン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 cm²/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⁵⁾。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。

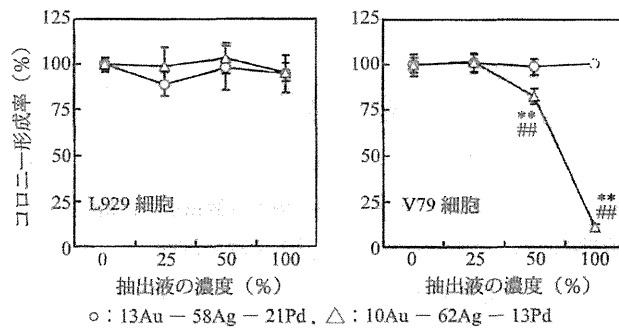


図2 歯科鑄造用金銀パラジウム合金(24時間抽出液)のL929細胞及びV79細胞に対する細胞毒性⁵⁾

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ダンス), 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)

EUにおける繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴

河上強志[#], 伊佐間和郎, 五十嵐良明

Characterization of cases contravening of regulations regarding primary aromatic amines originating from azo dyes in commercial textile products and leather products in European Union

Tsuyoshi Kawakami[#], Kazuo Isama, Yoshiaki Ikarashi

Contraventions of regulations regarding primary aromatic amines (PAAs) originating from azo dyes in commercial textile products and leather products in European Union (EU), notified in the period between 2006 and 2012 were collected from the Rapid Alert System for non-food consumer products (RAPEX), were characterized. Various types of products (clothes, footwear, bedding, etc.) and their raw materials (cotton, silk, viscose, leather, etc.) were reported to have contravened the regulations. The contravention frequencies for products made in China and India were higher than those for other countries. Ten percentage of the country in which the reported products were produced was unknown. The notification frequencies for benzidine and 4-aminoazobenzene were higher than those for other PAAs. Contravention of regulations regarding benzidine, 4-aminoazobenzene, and 3,3'-dimethoxybenzidine were notified every year. Contraventions of regulations regarding five PAAs – classified as IARC group 1 – were notified one or several times. Since the scale of the survey conducted in Japan were small compared with RAPEX, it is necessary that many kinds and number of products should be surveyed in Japan. In addition, it is also necessary to pay attention to 4-aminoazobenzene, while it has not been detected in the previous studies conducted in Japan.

Keywords: primary aromatic amine, azo dye, textile and leather product, EU, RAPEX

1. 背景および目的

アゾ染料は世界中で広く用いられている染料の一つであり、繊維製品、紙製品および革製品など様々な製品の染色に用いられている。一部のアゾ染料は皮膚表面、肝臓および腸内細菌などで還元的に分解され、芳香族第一アミン類 (Primary Aromatic Amines: PAAs) を生成する¹⁻³⁾。このアゾ染料に由来するPAAsのうち特に発がん性を有するPAAsの事を、一般的に特定芳香族アミンと呼び区別している。

European Union (EU) では、2002年9月にEU Di-

rective 2002/61/EC により、特定芳香族アミンとして22種類のPAAs (Table 1) を指定し、皮膚に直接接触する可能性のある繊維製品および革製品に対して、これらのPAAsを生成する可能性のあるアゾ染料の使用を禁止した⁴⁾。現在これらのアゾ染料は「化学物質の登録、評価、認可および制限に関する規則 (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals: REACH)」により規制されている⁵⁾。この22種類のPAAsは、国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) による分類⁶⁾では、グループ1 (ヒトに対して発がんである) に5種類、グループ2A (ヒトに対しておそらく発がんである) に1種類、グループ2B (ヒトに対して発がん性がある可能性がある) に14種類、グループ3 (ヒトに対する発がん性については分類できない) に2種類がそれぞれ分類される (Table 1)。EUでは、亜ジチオン酸ナトリウムを用いた還元処理によりアゾ基を開裂し、PAAsを生成させ測

[#] To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Kawakami; Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext. 367; Fax: +81-3-3700-6950; E-mail: tkawa@nihs.go.jp

Table 1 List of PAAs banned in EU

No.	Name	CAS No.	Chemical structure	IARC Group ⁹⁾
1	4-Aminobiphenyl	92-67-1		1
2	Benzidine	92-87-5		1
3	4-Chloro- <i>o</i> -toluidine	95-69-2		2A
4	2-Naphthylamine	91-59-8		1
5	<i>o</i> -Aminoazotoluene (Solvent Yellow 3)	97-56-3		2B
6	5-Nitro- <i>o</i> -toluidine	99-55-8		3
7	4-Chloroaniline	106-47-8		2B
8	2,4-Diaminoanisole	615-05-4		2B
9	4,4'-Methylenedianiline	101-77-9		2B
10	3,3'-Dichlorobenzidine	91-94-1		2B
11	3,3'-Dimethoxybenzidine	119-90-4		2B
12	3,3'-Dimethylbenzidine	119-93-7		2B
13	4,4'-Methylenedi- <i>o</i> -toluidine	838-88-0		2B
14	<i>p</i> -Cresidine	120-71-8		2B
15	4,4'-Methylene-bis-(2-chloro-aniline)	101-14-4		1
16	4,4'-Oxydianiline	101-80-4		2B
17	4,4'-Thiodianiline	139-65-1		2B
18	<i>o</i> -Toluidine	95-53-4		1
19	2,4-Diaminotoluene	95-80-7		2B
20	2,4,5-Trimethylaniline	137-17-7		3
21	<i>o</i> -Anisidine	90-04-0		2B
22	4-Aminoazobenzene (Solvent Yellow 1)	60-09-3		2B

⁹⁾ IARC classification groups: 1 = Carcinogenic to humans, 2A = Probably carcinogenic to humans,2B = Possibly carcinogenic to humans, 3 = Not classifiable as to carcinogenic to humans ⁶⁾

定している (Fig. 1). しかし, 実際にはこの還元処理によって測定できないPAAsが存在する⁷⁾. 一つは, 5-nitro-*o*-toluidineであり, 還元操作によって同じく規制対象PAAである2,4-diaminotolueneに変換する. もう一つは, *o*-aminoazotolueneであり, 還元操作によってアゾ基が開裂し, 規制対象である*o*-toluidineと規制対象外の2,5-diaminotolueneが生成する. 4-Aminoazobenzeneについても還元処理によってアゾ基が開裂し, anilineと1,4-phenylenediamineが生成するため, 規制当初はanilineまたは1,4-phenylenediamineの検出に加え, 製造者への使用染料の聞き取り調査などから違反かどうか判断していた⁷⁾. しかし, 還元処理条件などが改定された別法が革製品には2011年⁸⁾に, 繊維製品では2012年⁹⁾に適用され, 現在では4-aminoazobenzeneとして測定することが可能となった.

中国をはじめとしたアジア諸国でも同様の規制もしくは自主基準が運用されている¹⁰⁾. 我が国では, 2012年3月に日本繊維産業連合会および日本皮革産業連合会から自主基準の策定と運用が公表された^{11, 12)}. 我々はこれまでに我が国に流通する繊維製品および革製品中のアゾ染料由来のPAAsについて実態調査を行い, 一部の製品から高濃度のPAAsが検出されることを明らかにした^{13, 14)}. この結果をもとに, 現在「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」(昭和48年10月12日法律第112号, 家庭用品規制法)に基づくPAAsの規制に関して, 薬事・食品衛生審議会化学物質安全対策部会および家庭用品安全対策調査会で審議が行われている.

先行して規制が実施されているEUでは, 食料品, 医薬品および医療機器以外の消費者製品について, 域内の加盟国からの違反事例の報告を緊急警戒システム¹⁵⁾ (Rapid Alert System for non-food consumer products: RAPEX)にて週単位で集計しウェブ上で公開しており, 特定芳香族アミンについても違反の報告が掲載され

ている. RAPEXでは違反製品の種類, 生産国, 検出されたPAAsなどの情報も報告されており, 違反事例の特徴を把握することは, 今後我が国での規制基準策定および運用時に有用な情報となり得ると考えられる. そこで, RAPEXに報告されたPAAs違反データを収集し解析して, 若干の考察を行ったので報告する.

2. 方法

EUのRAPEXサイト¹¹⁾での報告の一例をFig. 2に示した. この報告フォーマットでは, カラム左から報告年と週, リファレンス番号, 違反を通報した国, 製品情報, 違反となった事項, 対応, 別の国から同じ違反が報告されているかなどが記載されている (Fig. 2). まず, 2006年から2012年までの7年間に繊維製品および革製品での特定芳香族アミンの違反に該当した報告をRAPEXサイトよりダウンロードし, 年単位で集計した. 次にこれをカテゴリー別 (Clothing, textiles and fashion items, Toys など) に集計した後, さらに製品別 (Scarf, Gloves, Puppet など) に分類した. その際に, PAAsを検出した製品の素材や色について記載があった場合には, それについても記録した. また, 製造国別およびPAAsの種類別の集計も年単位で行った. なお, 一つの報告の中に複数の製品が記載されている場合 (Fig. 2では赤色と紫色の2製品)があったが, その場合はそれぞれ一件とカウントして違反製品件数とした. 同一製品の複数の部位からPAAsが検出されている場合には, 製品としての報告件数は一件としてカウントし, 個々のPAAsの検出数としてはそれぞれカウントした.

3. 結果および考察

各年毎のカテゴリー別の違反製品件数および違反製品名とその件数をTable 2に, 素材, 色および検出されたPAAsの種類と報告件数をTable 3に示した. 製造国別

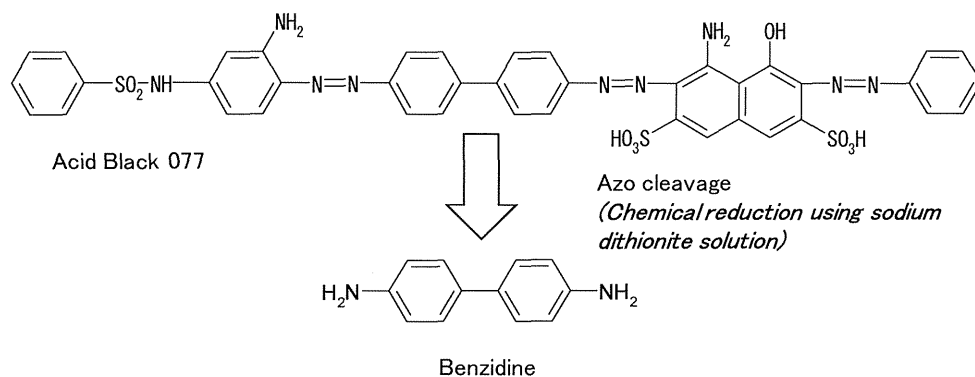


Fig. 1 Formation of benzidine from azo dye by reduction reaction during analytical process


Year - Week	No. Ref.	Notifying country	Product (Click on the photo to enlarge)	Danger	Measures adopted by notifying country	Products were found and measures were taken also in:
2010 - 4	33 0113/10	Finland	Category: Clothing, textiles and fashion items Product: Scarves Brand: L'assessor Type/number of model: 1. Art No AF-4671 2. Art No AF-4671 Description: 1. a red silk scarf. Size 50x180 cm; 2. a purple silk scarf. Size 50x180 cm. Country of origin: India 	Chemical The product poses a chemical risk because it contains banned azocolourants. The colour on the red scarf released 77 mg/kg of benzidine and the colour on the purple scarf released 96 mg/kg of benzidine which both exceed the limit of 30 mg/kg. The products do not comply with the REACH Regulation.	Import rejected by the customs authorities.	

Fig. 2 RAPEX report notified on week 4 (2010)¹⁵⁾

の違反製品件数をTable 4に、PAAsの種類別違反件数とその濃度範囲をTable 5にそれぞれ示した。なお、カテゴリ、製品、素材および色の表記については原文に準じて記載した。また、同一報告中の製品でも、素材や色などが異なっている場合があるため、各項目間の合計件数は必ずしも一致していない。

3.1 カテゴリ、製品種および素材別の違反製品件数

2006年から2012年の7年間で185件の違反製品が報告されており、平均すると年間で26件であった。ただし、各年の違反製品件数は変動が大きく、2007年は最も少なく10件であったのに対して、2009年から2011年にかけては36~43件と違反製品件数が多かった (Table 2)。カテゴリ別では、“Clothing, textiles and fashion items” および “Toys” が毎年報告され、年間の違反製品件数に占める割合も大きかった。特に、“Clothing, textiles and fashion items” は2007年を除き、全ての年で最も違反製品件数が多く、2010年には37件の報告があった。一方、“Toys” は2007年および2008年で違反製品件数が6件ずつと多かったが、その後は年間1~3件で推移している。その他のカテゴリは年によって数件の報告があるのみであった。“Clothing, textiles and fashion items” については、本カテゴリに分類される製品の種類が多いことも、報告件数が多い要因であると思われる。

違反製品の種類を詳しく見てみると、違反製品件数の多かった2009年から2011年にかけては、スカーフの占める割合が大きかった (Table 2)。子供用、男性用および女性用の製品は毎年ほぼ必ず報告されており、その内訳は下着およびTシャツの様な衣類、靴およびブーツの様な履物をはじめ手袋や寝具などと多岐にわたっていた。

違反が報告された製品の素材についての記載は、ほとんどの場合無かったが、繊維製品では、主に綿、絹、羊毛、ビスコースおよびポリエステルなどが報告されている (Table 3)。また、革製品ではグローブやリストバンドで違反が報告されている。我々がこれまでに行った我が国での実態調査では、繊維製品では綿または絹製のランチョンマット、シーツ・カバーおよびショールから、革製品では革細工用の端切れからのみ基準値を超える濃度のPAAsが検出された^{13, 14)}。今後、家庭用品規制法において規制基準が策定された場合には、様々な種類および素材の製品を調べる必要があるものと思われる。

3.2 製造国別の違反製品件数

違反製品の製造国として報告されたのは18カ国あり、中国で製造された製品の違反件数 (89件) が最も多く、全報告数の半数近くを占めた (Table 4)。また、中国製の製品はどの年においても、最も違反製品の報告件数が多かった。次いで報告件数が多いのはインド製の製品で44件の報告があり、全体の4分の1程度であった。インド製の製品の場合には2009年から2011年までの報告が突出しており、この時期にインド製スカーフの違反が多く報告されていることが影響していた。その他は、バングラディッシュ製の製品が6件報告され、残りは1~3件以内であった。また、製造国不明の製品も7年間で23件報告され、全体の1割強を占めていた。これまでに行った我が国の実態調査では、インド製の製品からはEU基準値を超えるPAAsを検出しているが、中国製の製品からはEU基準値を超えるPAAsは検出されていない^{13, 14)}。しかしながら、EUでの違反報告の状況を鑑みると、中国製の製品について今後も調査を行う必要があるものと思われる。

Table 2 Summary of notifications of PAAs contravention in consumer products (Categories, products and countries)^{a)}

Year	Categories	Products
2006 (21)	Clothing, textiles and fashion items (16)	Baby sling (2), Children's briefs (2), Boy's boxer shorts (1), Boy's briefs (1), Girl's dress (1), Gloves (1), Lingerie (1), Leather gloves (1), Men's shirt (1), Men's flannel shirt (1), Silk Scarf (1), Scarf (1), Peaked cap (1), Workman's cap (1)
	Toys (2)	Toy Santa (1), Rag doll (1)
	Hobby/sports equipment (2)	Boy's tracksuit (1), Cycling gloves (1)
	Jewellery (1)	Textile necklace (1)
2007 (10)	Toys (6)	Vicky doll (2), Devil glove puppet (1), Finger puppet "devil" (1), Glove puppet (1), Textile baby book (1)
	Clothing, textiles and fashion items (2)	Children's jeans (1), Underpants (1)
	Hobby/sports equipment (1)	Cycling gloves (1)
	Protective equipment (1)	Working gloves (1)
2008 (22)	Clothing, textiles and fashion items (15)	Scarf (3), Bikini (1), Black dress (1), Children's boots (1), Children's pyjamas (1), Children's underpants (1), Corduroy jeans for girls (1), Fleece gloves (1), Leather key wallet (1), Riding gloves (1), Shoes for men (1), Strap nightdress (1), Women's briefs (1)
	Toys (6)	Rag doll (4), Devil puppet (1), Doll (1)
	Jewellery (1)	Bracelet (1)
2009 (36)	Clothing, textiles and fashion items (32)	Scarf (18), Baseball cap (1), Bedspread (1), Black leather gloves (1), Brassiere (1), Briefs (1), Children's boots (snow boots) (1), Children's costume witch (1), Jeans (1), Ladies' suit (1), Ladies' trousers (1), Ladies' T-shirt (1), Men's shoes (1), Microfibre fitted sheet (1), Wallet (1)
	Childcare articles and children's equipment (2)	Set four baby bibs (2)
	Proactive equipment (1)	Work gloves (1)
	Toys (1)	Wooden theatre playset (1)
2010 (43)	Clothing, textiles and fashion items (37)	Scarf (12), Men's shoes (2), Baby sling (1), Baseball cap (1), Bed linen (1), Body (1), Children's outfit (1), Children's pyjamas (1), Children's sweatshirt (1), Children's track suit (1), Cushion cover (1), Dress (1), Fleece blanket (1), Gloves (1), Jeans (1), Ladies' boots (1), Men's socks (1), Overall (1), Purse (1), Pullover (1), Socks (1), Sweatshirt for boys (1), Trousers (1), T-shirt (1), Women's boots (1), Women's blouse (1)
	Toys (3)	Children's costume (1), Children's pirate costume (1), Finger puppets (1)
	Childcare articles and children's equipment (1)	Baby shoes (1)
	Decorative articles (1)	Christmas sock (1)
	Hobby/sports equipment (1)	Sleeping bag (1)
2011 (38)	Clothing, textiles and fashion items (36)	Scarf (5), Boy's underwear (2), Handbag (2), Bedspreads (2), Pashmina-style scarf (2), Bag (1), Bed linen (1), Baby's shoes (1), Blouse (1), Children's cardigan (1), Children's jacket (1), Children's sweatshirt (1), Children's T-shirt (1), Cushion cover (1), Denim dress with belt (1), Dress (1), Girl's dress (1), Jeans (1), Ladies' dress (1), Long-sleeved T-shirt (1), Men's shorts (1), Men's T-shirt (1), Sports shoes (1), Towel (1), Trilby hat (1), Women's blouse (1), Women's jacket (1), Women's top (1)
	Toys (2)	Fancy-dress costume (1), Finger puppet (1)
2012	Clothing, textiles and fashion items (13)	Men's leather wristband (3), Baseball cap (2), Bed linen sets (1), Children's sports shoes (1), Girls' shorts (1), Ladies' suede glove (1), Men's jeans (1), Scarf (1), Shorts (1), Socks (1)
	Protective equipment (1)	Work gloves (1)
	Toys (1)	Play mat (1)

^{a)} The number of parentheses denote the number of products notified.

Table 3 Summary of notifications of PAAs contravention in consumer products (Materials, colour and PAAs)^{a)}

Materials	Colour	PAAs
Unknown (113)	Black	4-Aminoazobenzene (13), Benzidine (5), 3,3'-Dimethoxybenzidine (3), 3,3'-Dimethylbenzidine (1)
	Red	3,3'-Dimethylbenzidine (4), 4-Aminoazobenzene (3), 4-Chloro- <i>o</i> -toluidine (3), Benzidine (3), 2,4-Diaminotoluene (3), 3,3'-Dimethoxybenzidine (1), 4-Aminobiphenyl (1), 4-Chloroaniline (1), <i>o</i> -Toluidine (1)
	Brown	4-Aminoazobenzene (4), 2,4-Diaminotoluene (1), Benzidine (1), [Aromatic amine (2)]
	Blue	3,3'-Dimethoxybenzidine (4), Benzidine (3), 4-Aminoazobenzene (1)
	Dark blue	3,3'-Dimethoxybenzidine (5), 4-Aminoazobenzene (1), Benzidine (1)
	Orange	4-Aminoazobenzene (4), Benzidine (1)
	Yellow	4-Aminoazobenzene (4), [Azo dye (1)]
	Grey	4-Aminoazobenzene (2), Benzidine (1)
	Light green	4-Aminoazobenzene (2)
	Red/orange	4-Aminoazobenzene (2)
	Beige brown	4-Aminoazobenzene (1)
	Blue-black	[Azo-dye (1)]
	Dark green	Benzidine (1)
	Dark red	Benzidine (1), 3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
	Gold	4-Aminoazobenzene (1)
	Green	Benzidine (1)
	Grey black	4-Aminobiphenyl (1), Benzidine (1), 3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
	Light brown	4-Aminoazobenzene (1)
	Olive green	4-Aminoazobenzene (1)
	Shiny dark brown	4-Aminoazobenzene (1)
	Shiny grey	4-Aminoazobenzene (1)
	Silver	4-Aminoazobenzene (1)
	Unknown	4-Aminoazobenzene (13), benzidine (12), 3,3'-Dimethoxybenzidine (6), 2,4-Diaminotoluene (5), 3,3'-Dimethylbenzidine (2), 4-Chloroaniline (2), 4,4'-Methylene-bis-(2-chloro-aniline) (2), 2-Naphthylamine (1), 4,4'-Methylenedianiline (1), 4,4'-Methylenedi- <i>o</i> -toluidine (1), 4,4'-Oxydianiline (1), <i>o</i> -Toluidine (1), [Aniline (1), Azo dye (2)]
Cotton (21)	Black	Benzidine (2), 4-Aminobiphenyl (1)
	Dark blue	3,3'-Dimethoxybenzidine (2)
	Green	Benzidine (2), 3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
	Blue	3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
	Navy blue	Benzidine (1)
	Olive-green	4-Aminobiphenyl (1), Benzidine (1), 3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
	Purple	3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
	Red	Benzidine (1)
	Unknown	Benzidine (8), 2,4-Diaminotoluene (2), 3,3'-Dimethoxybenzidine (1), [Aniline (2)]
	Viscose (18)	Blue
Red		4-Aminobiphenyl (1), Benzidine (4)
Black		Benzidine (3), 4-Aminobiphenyl (1), 3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
Dark blue		Benzidine (2), 3,3'-Dimethoxybenzidine (2)
Green		4-Aminobiphenyl (1), Benzidine (1)
Grey		Benzidine (1)
Orange		Benzidine (1)
Turquoise blue		Benzidine (1), 3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
Turquoise colour		Benzidine (1)
Unknown		Benzidine (1)
Leather (11)	Black	Benzidine (9), 4-Aminobiphenyl (2), [Aniline (1)]
	Fuchsia rose	4-Aminoazobenzene (1)
	Red	4-Aminoazobenzene (2)
	Unknown	Benzidine (1)
Silk (7)	Red	3,3'-Dimethylbenzidine (5), Benzidine (3)
	Black	4-Aminobiphenyl (1), Benzidine (1), [Aniline (1)]
	Purple	Benzidine (1)
Polyester (4)	Black	[Azo-dye (2)]
	Dark brown	4-Aminoazobenzene (1)
	Orange	4-Aminoazobenzene (1)
	Red	4-Aminoazobenzene (1)
Wool (3)	Brown	4-Aminoazobenzene (2)
	Unknown	4-Aminoazobenzene (1)
Cotton(80%), polyester(20%) (1)	Red	Benzidine (1)
	Violet	Benzidine (1)
Acryl (1)	Black	Benzidine (1)
Elastic cotton (1)	Unknown	3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
Knitted [polyester] (1)	Black	4-Aminoazobenzene (1)
Knitted[wool(70%), angora(20%), polyamide(10%)] (1)	Red	Benzidine (1)
Linen (1)	Blue	3,3'-Dimethoxybenzidine (1)
Nylon (1)	Grey	4-Aminoazobenzene (1)
Synthetic fibres (1)	Unknown	4-Aminoazobenzene (1)
Polyester(65%), cotton(35%) (1)	Dark blue	4-Aminoazobenzene (1)
Viscose(91%), silk(9%) (1)	Black	Benzidine (1)

^{a)}The number of parentheses denote the number of product or PAA notified.

Table 4 Number of notifications by country of origin of the notified product

Year	Country	Number
2006	China	9
	Thailand	2
	Turkey	2
	Bangladesh	1
	France	1
	India	1
	Pakistan	1
	Unknown	4
2007	China	7
	Hong Kong	1
	Pakistan	1
	Unknown	1
2008	China	11
	India	2
	Bangladesh	1
	Denmark	1
	Taiwan	1
	Unknown	6
2009	China	15
	India	15
	Bulgaria	2
	Vietnam	1
	Unknown	3
2010	China	21
	India	12
	Philippines	2
	Bangladesh	1
	Bulgaria	1
	France	1
	Guatemala	1
	Unknown	4
2011	China	17
	India	12
	Bangladesh	3
	Greece	1
	Syria	1
	Unknown	4
2012	China	9
	India	2
	Germany	1
	Serbia	1
	Turkey	1
	Unknown	1

3.3 検出が報告されたPAAsの特徴

2006年から2012年までの7年間で、benzidine, 4-aminoazobenzeneおよび3,3'-dimethoxybenzidineは毎年検出が報告された (Table 5)。最も多く報告されたのはbenzidineで84件、その次に多かったのは4-aminoazobenzeneで69件であった。3,3'-Dimethoxybenzidineについては35件の報告があった。IARCの発がん性分類でグループ1に分類される5種類のPAAs (Table 1) は、それぞれ1回以上の検出報告があった。検出された

PAAs濃度は、EU基準値 (30 µg/g以下) レベルから数千µg/gレベルの範囲となっており、概ね数百µg/gレベルで検出されることが多かった。

Benzidineは製品中で単独で検出されるだけではなく、同一製品から4-aminobiphenylや3,3'-dimethoxybenzidineおよび3,3'-dimethylbenzidineと一緒に検出される事が多かった。また、3,3'-dimethoxybenzidineは黒、青および紫系統の色を用いた製品から主に検出され、3,3'-dimethylbenzidineは赤色を用いた製品から主に検出されており、使用された染料の化学構造の違いが反映されているものと考えられる (Table 3)。これらのPAAsは綿やビスコースのようなセルロース系繊維を用いた製品から主に検出され、これらの繊維に使用するアゾ系染料である直接染料、アゾイック染料および反応染料 (ビスコースのみ)¹⁶⁾ に由来する可能性が高いと考えられた。我が国に流通する製品を対象としたこれまでの実態調査でも、benzidine, 3,3'-dimethoxybenzidine, 3,3'-dimethylbenzidineおよび2,4-diaminotolueneが綿製品および革 (端切れ) 製品からEU基準値以上で検出され^{13, 14)}、製品の色によって3,3'-dimethoxybenzidineと3,3'-dimethylbenzidineの検出傾向が異なることも認められている。そのため、セルロース系繊維を用いた製品については、EUと我が国とで同様のPAAsの検出傾向を示す可能性が示唆された。

一方、4-aminoazobenzeneは単独で検出され、特にポリエステルなどの合成繊維を用いた製品から検出される場合が多かった (Table 3)。4-Aminoazobenzeneはそれ自体も分散染料 (Solvent Yellow 1) であり、疎水性繊維の染色に用いられるためと考えられた。我が国ではこれまでに繊維製品および革製品中から4-aminoazobenzeneが検出された事例は報告されていないが、EU諸国では報告が非常に多いことから、今後も注視していく必要があるものと思われる。

4. まとめ

繊維製品および革製品中に含まれるアゾ染料由来のPAAsについて、2006年から2012年までの7年間のEUにおける違反製品の種類、生産国、検出されたPAAsなどの情報をRAPEXを用いて収集した。その結果、違反製品の種類は衣類から履物、寝具に至るまで多岐にわたること、その素材については、綿、絹、ビスコース、ポリエステルや革など様々であることなどがわかった。また、中国で製造された製品について違反件数が最も多く、次いでインドで製造された製品であったが、製造国が不明なものも全体の1割程度を占めていた。これまで我々が行った実態調査でEUの基準値を超えるPAAsが検出されていなかった製品および素材からも、RAPEX

Table 5 Number of notifications by each PAA and their concentrations

Year	PAAs	Number	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
2006	Benzidine	12	60-1007
	3,3'-Dimethoxybenzidine	5	82-1288
	3,3'-Dimethylbenzidine	3	52-1000 ^{a)}
	4-Chloroaniline	2	39-246
	4-Chloro- <i>o</i> -toluidine	2	305-575
	2,4-Diaminotoluene	1	220
	4-Aminoazobenzene	1	750
	4-Aminobiphenyl	1	44
2007	<i>o</i> -Toluidine	1	174
	4-Aminoazobenzene	4	315-372
	3,3'-Dimethoxybenzidine	2	745
	Benzidine	2	450-504
	2,4-Diaminotoluene	2	330-860
2008	4,4'-Methylene-bis-(2-chloro-aniline)	1	- ^{b)}
	Azo-dye	1	-
	4-Aminoazobenzene	12	140-1400
	Benzidine	11	30-1123
	3,3'-Dimethoxybenzidine	2	140-156
	3,3'-Dimethylbenzidine	1	270
2009	Aniline	1	-
	Azo dye	1	-
	Benzidine	22	1,504-880
	4-Aminoazobenzene	14	39-1000 ^{a)}
	3,3'-Dimethoxybenzidine	10	45-590
	4-Aminobiphenyl	3	41-177
	2,4-Diaminotoluene	2	55.2-156
2010	3,3'-Dimethylbenzidine	1	121
	Aniline	2	1,367-100 ^{c)}
	Azo dye	2	-
	Benzidine	14	77-1571
	4-Aminoazobenzene	12	43-150
	3,3'-Dimethoxybenzidine	6	30 ^{d)} -496
	3,3'-Dimethylbenzidine	6	30 ^{d)} -640
	2,4-Diaminotoluene	3	48.0 - 530
	4-Chloro- <i>o</i> -toluidine	1	1471
	4,4'-Methylene-bis-(2-chloro-aniline)	1	92.4
2011	4,4'-Methylenedi- <i>o</i> -toluidine	1	64.1
	4,4'-Oxydianiline	1	210.8
	Aniline	2	1100-1200
	Azo dye	2	97-287
	Aromatic amine	2	34.1-209.5
	Benzidine	19	48-4500
	4-Aminoazobenzene	16	66.3-1000
	3,3'-Dimethoxybenzidine	6	8.7-615
	4-Aminobiphenyl	5	6.14-83
	2,4-Diaminotoluene	3	51-160
2012	3,3'-Dimethylbenzidine	2	5.16-60
	4-Chloroaniline	1	33
	4,4'-Methylenedianiline	1	73.4
	<i>o</i> -Toluidine	1	5.92
	4-Aminoazobenzene	10	101-765
	Benzidine	4	48.9-801.6
	3,3'-Dimethoxybenzidine	4	64-140
	4-Aminobiphenyl	1	88.5
2-Naphthylamine	1	142.2	

a) > 1000 $\mu\text{g/g}$, b) No data, c) >100 $\mu\text{g/g}$, d) >30 $\mu\text{g/g}$

では基準値を超えるPAAsの検出が報告されていることから、我が国でもそれらの製品について注意が必要と考えられた。PAAsの種類では、benzidineおよび4-aminoazobenzeneの件数が非常に多く、3,3'-dimethoxybenzidineを含めた3種類のPAAsは毎年必ず違反が報告されていた。また、IARCグループ1に属する5種類のPAAsは、7年間でそれぞれ1回以上違反が報告されていた。4-Aminoazobenzeneについては、これまで我が国の実態調査では検出が報告されていないが、今後も注視していく必要があるものと思われる。

5. 引用文献

- 1) Collier SW, Strom JE, Bronaugh RL: *Appl Pharmacol*. 1993;118:73-9.
- 2) Hildenbrand S, Schmahl FW, Wodarz R, Kimmel R, Dartsch PC: *Int Arch Occup Environ Health*. 1999;72 (Suppl 3): M52-6.
- 3) Platzek T, Lang C, Grohmann G, Gi U-S, Baltus W: *Hum Exp Toxicol*. 1999;18,552-9.
- 4) European Union: *Off J Eur Commun*. 2002;L243:15-8.
- 5) 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
- 6) International Agency for Research on Cancer (IARC): <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- 7) 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"
- 8) EN17234-2:2011 "Leather - Chemical tests for the determination of certain azo colorants in dyed leathers, Part 2: Determination of 4-aminoazobenzene (ISO 17234-2: 2011)"
- 9) EN14362-3: 2012 "Textiles - Methods for the determination of certain aromatic amines derived from azo colorants- Part 3: Detection of the use of certain azo colorants, which may release 4-aminoazobenzene"
- 10) 独立行政法人中小企業基盤整備機構: 平成21年度情報調査業務「繊維製品中の有害物質に関する調査事業」; http://www.smrj.go.jp/keiei/dbps_data/_material/_common/chushou/b_keiei/keieiseni/pdf/53201-1.pdf
- 11) 日本繊維産業連盟: 繊維製品に係る有害物質の不使用に関する自主基準; <http://www.jtf-net.com/news/120329VSNHS.htm>
- 12) 日本皮革産業連合会: 皮革製品に係る有害物質の不使用に関する自主基準; http://www.jlia.or.jp/index.php?pg=news_release.detail&get=483
- 13) Kawakami T, Isama K, Nakashima H, Tsuchiya T, Matsuoka A: *J Environ Sci Health Part A*. 2010;45: 1281-95.
- 14) Kawakami T, Isama K, Nishimura T: *J Environ Chem*. 2012;22:197-204.
- 15) Rapid Alert System for non-food consumer products (RAPEX): http://ec.europa.eu/consumers/dyna/rapex/rapex_archives_en.cfm
- 16) 安部田貞治, 今田邦彦: *染料総論, 解説 染料化学*, pp.1-13, 色染社, 大阪市, 1988

Original Article

Effect of hypochlorite oxidation on cholinesterase-inhibition assay of acetonitrile extracts from fruits and vegetables for monitoring traces of organophosphate pesticides

Kentaro Kitamura¹, Kaori Maruyama¹, Sachiko Hamano¹, Tomohiro Kishi¹,
Tsuyoshi Kawakami^{1,2}, Yasuo Takahashi¹ and Sukeo Onodera¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba, 278-8510 Japan

²Present address: National Institute of Health Sciences, 1-8-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-1501 Japan

(Received July 29, 2013; Accepted October 28, 2013)

ABSTRACT — A reproducible method for monitoring traces of cholinesterase (ChE) inhibitors in acetonitrile extracts from fruits and vegetables is described. The method is based on hypochlorite oxidation and ChE inhibition assay. Four common representative samples of produce were selected from a supermarket to investigate the effect of different matrices on pesticides recoveries and assay precision. The samples were extracted with acetonitrile to prepare them for ChE inhibition assays: if necessary, clean-up was performed using dispersive solid-phase extraction for gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analyses. Chlorine was tested as an oxidising reagent for the conversion of thiophosphorus pesticides (P=S compounds) into their P=O analogues, which have high ChE-inhibiting activity. Chlorine consumption of individual acetonitrile extracts was determined and was strongly dependent on the individual types of fruits and vegetables. After treating the acetonitrile extracts with an excess hypochlorite at 25°C for 15 min, the ChE-inhibiting activities and detection limits for each chlorine-treated pesticide solution were determined. Matrix composition did not interfere significantly with the determination of the pesticides. Enhanced anti-ChE activities leading to low detection limits (ppb levels) were observed for the chlorine-treated extracts that were spiked with chlorpyrifos, diazinon, fenitrothion, and isoxathion. This combination of oxidative derivatisation and ChE inhibition assays was used successfully to monitor and perform semi-quantitative determination of ChE inhibitors in apple, tomato, cucumber, and strawberry samples.

Key words: ChE assay, Hypochlorite oxidation, Acetonitrile extracts, Fruit, Pesticide, Vegetable

INTRODUCTION

Fresh vegetables, fruits and pulses are an important part of a healthy diet because they contain significant amounts of nutrients and minerals in them. However, at the same time, they can be a source of toxic substances, such as pesticides. The use of pesticides in agriculture increased after World War II in order to increase food production. There have been significant developments in different types of pesticides produced by various manufacturers. The use of pesticides and generation of environmental pollution due to industrial emissions during the production of pesticides have increased the presence of residues of these chemicals and their metabolites in every part of the environment, (e.g., air, water, soil, crops, vegetables, and fruits). Aquatic invertebrates that live in riv-

ers and lakes can therefore be exposed to concentrations of insecticides that sometimes reach lethal doses.

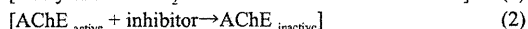
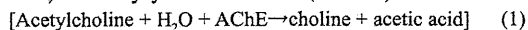
Two of the commonly applied pesticides groups are organophosphorus and carbamate pesticides. These pesticides are preferred in agriculture because they have relatively low persistence in the environment, but some of them exhibit acute toxicity. Both these groups interact with a group of enzymes known as cholinesterase (ChE) and are capable of causing adverse side effects (cholinergic syndrome). In addition, organophosphorus pesticides react with neuropathy target esterase, a membrane protein, causing a completely different syndrome known as organophosphorus-induced delayed polyneuropathy (Meretto and Johnson, 1987; Fukuto, 1990; Stenersen, 2004).

Gas chromatography (GC: Frenich *et al.*, 2001; Xiao

Correspondence: Sukeo Onodera (E-mail: sukeo-onodera@hotmail.co.jp)

et al., 2006; Pinheiro and De Andrade, 2009) and high-performance liquid chromatography (HPLC: Rodrigues-Mozaz *et al.*, 2007; Huertas-Perez and Garcia-Campana, 2008; Wu *et al.*, 2010) are the most sensitive methods used for the determination of organophosphorus and carbamate pesticides. However, *in situ* organophosphorus pesticides undergo a number of changes leading to the formation of compounds that retain biological activity (Sancho *et al.*, 2004). Thus, the analysis of these compounds using GC and HPLC is complicated. Moreover, despite the development of rapid sample preparation and extraction methods (Anastasiades *et al.*, 2003; Lehotay *et al.*, 2005), identification and quantification of pesticide residues and contaminants are very time consuming and costly, particularly when using modern mass spectrometer-coupled chromatography such as GC-MS or LC-MS. Thus, we developed a prescreening test to separate positive from negative samples in order to save time and reduce costs, thereby enabling researchers to analyse more total samples.

Organophosphorus and carbamate pesticides act as inhibitors of cholinesterases such as acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE).



These reactions serve as the basis for a number of methods used to analyse pesticides. The classical method suggested by Giang and Hall (1951) uses acetylcholine and the residual activity of the enzyme is determined by titrating the acetic acid with an alkali. Kramer and Guilbaut (1965) used the fluorescent method for controlling the cholinesterase activity. Baum and Ward (1971) verified the decrease in the cholinesterase activity due to inhibitors using a selective acetylcholine electrode. Goodson *et al.* (1973) used immobilised cholinesterase and a galvanostatic method to determine the enzyme activity in an automatic system that controlled the levels of pesticides in water or air. When the principle of cholinesterase inhibition is used in devices such as biosensors (Bernabei *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2002; Weetall *et al.*, 2004) to detect a phosphorothionate ester compound, inhibition of acetylcholinesterase may be low or absent.

More sensitive methods have been developed for detecting organophosphorus pesticides with the P=S structure in water and vegetable samples by combining ChE assays with oxidation by chlorination (Onodera *et al.*, 1982, 1983 and 1992; Makihata *et al.*, 1997; Tahara *et al.*, 2005) or bromination (Mendoza *et al.*, 1968; Singh and Lapointe, 1974; Singh and Cochrane, 1979; Kim *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Akkad and Schwack, 2011). Many of the organophosphorus pesticides are phospho-

rothionates, which are characterised by one thion moiety (P=S) and three –OR groups attached to a phosphorous atom. They can be activated either *in vivo* by the cytochrome 450-dependent monooxygenase enzymes or in an environment conducive to highly reactive oxons (P=O). The oxon is considerably more potent as a ChE inhibitor than its corresponding P=S compound. However, these previous studies failed to report the oxidation conditions of pesticide–hypochlorite reactions or the chemical fate of oxons in aqueous and non-aqueous solutions.

In order to provide greater insight into the possible role of organic compounds in the formation of chlorine-substituted or chlorine-oxidised compounds and chlorine-induced mutagens, our laboratory has further explored the study of the aqueous chlorination chemistry of organic compounds (Onodera, 2010; Kanno *et al.*, 2010, 2012). In the present study, we studied the chlorination conditions of the anti-cholinesterase inhibitors, organophosphothionate and carbamate pesticides in the acetonitrile extracts of fruits and vegetables, and developed a combination method of hypochlorite oxidation and ChE-inhibiting assays to monitor traces of these contaminants in apple, tomato, cucumber and strawberry.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Agricultural chemicals such as organic phosphorus and carbamate pesticides (pesticide residue analysis grade) were commercially available (Table 1), and their purities were checked by means of GC with a flame-ionisation detector (GC-FID). Chlorpyrifos-oxon, diazoxon, fenitrothion-oxon, and isoxathion-oxon, which were oxidation products from the parent P=S pesticides, were obtained from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan), Hayashi Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan), and GC Sciences Inc. (Tokyo, Japan). Stock solutions (1.0 mg/ml) of these compounds, both individual and as mixtures were prepared by dissolving the compounds in methanol, with subsequent serial dilutions to create as the working solutions. Surrogate standard, phenanthrene-d10 (analytical grade for environmental samples), was purchased from Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan). The stock surrogate standard solution (1.0 mg/ml) was prepared in methanol.

High-purity water obtained from a Milli-Q purifier system (Japan Millipore Inc., Tokyo, Japan) was used throughout. Sodium hypochlorite solutions were prepared by diluting commercial 10% hypochlorite solution (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) with the phosphate buffered solution at pH 7. The hypochlorite concentrations

A sensitive ChE-inhibiting assay to monitor trace organophosphate pesticides in fruit and vegetable samples

Table 1. Chemical name, CAS registry number, molecular weight (M.W), and cholinesterase-inhibition activity of organophosphorus and carbamate pesticides tested in this study

Common, trade or code name	Specific group or component	CAS		ChE-inhibition activity	
		Number	M.W.	I ₅₀ (μM)*	I ₂₀ (μM)*
Chlorpyrifos	P=S, pyridyl	2921-88-2	350.6	80	20
Chlorpyrifos-oxon	P=O, pyridyl	5598-15-2	334.5	0.06	0.02
DDVP	P=O, C=C	62-73-7	221	0.022	0.005
Diazinon	P=S, pyridyl	333-41-5	304.4	4	1
Diazoxon	P=O, pyridyl	962-58-3	288.4	0.004	0.001
Fenitrothion (MEP)	P=S, NO ₂ , CH ₃	122-14-5	277.2	60	10
MEP oxon	P=O, NO ₂	2255-17-6	261.2	0.05	0.01
Isoxathion	P=S, pyridyl	18854-01-8	313.3	50	20
Isoxathion-oxon	P=O, pyridyl	32306-29-9	297.3	0.01	0.003
Parathion	P=S, NO ₂	56-38-2	291.2	5	0.2
Paraoxon	P=O, NO ₂	311-45-5	275.2	0.05	0.01
Benthioncarb	carbamate	28249-77-6	257.8	8	2
Carbaryl (NAC)	carbamate	63-25-2	201.2	1	0.3
Fenobcarb (BPMC)	carbamate	3766-81-2	207.3	6	2
Isoprocarb (MIPC)	carbamate	2631-40-5	193.2	6	2

*The concentrations of inhibitor in enzyme solutions necessary to effect 50% reduction in cholinesterase activity of horse serum.

were determined by iodometric titration. The organic solvents (acetonitrile, ethyl acetate, n-hexane, methanol, and toluene) used were of analytical-reagent grade for pesticide residue analysis (Wako Pure Chemical Industries Ltd.). Anhydrous magnesium sulphate and anhydrous sodium sulphate, sodium chloride, primary and secondary amine (BONDESIL-PSA, 40 μm, 10 g), graphite carbon black (ENVI™-Carb SPE tubes, 6 ml, 0.25 g) and C18 sorbent (particle size 40 μm), were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kanto Chemical Industries, and Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan).

Sample preparation

Four common representative samples of produce (apple, tomato, cucumber, and strawberry) were selected from a supermarket to investigate the effect of different matrices on pesticides recoveries and assay precision. The entire sample was blended with a high-speed blender. Each sample, before and after spiking with a methanol solution containing chlorpyrifos, diazinon, fenitrothion, and isoxathion, was extracted with acetonitrile using the Standard Method in Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan) for pesticide residue analysis in and for treatment with the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap,

Effective, Rugged, and Safe) procedure (Anastasiades *et al.*, 2003; Lehotay *et al.*, 2005), slightly modified. The overall sample treatment applied for the clean-up studies on fruit and vegetable samples is shown in Fig. 1.

Briefly, 10 grams of sample was vigorously shaken with 10 ml of acetonitrile in a 30 ml centrifuge tube with screw caps for 1 min, and then centrifuged for 5 min at 4,000 × g in order to separate organic layer from solid material. This extraction with 8 ml of acetonitrile was repeated and the organic phases were combined in a centrifuge tube. After addition of a mixture of 5 g of sodium chloride and 10 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7) to the acetonitrile extracts, the tube was vigorously shaken for 1 min and then centrifuged for 5 min at 4,000 × g. The separated organic layer was transferred in a 25 ml sample vial using a special pipette packed with 3 g of anhydrous sodium sulphate and then adjusted exactly to 20 ml with acetonitrile. Finally, extracts (300 μl) were applied in triplicate runs for hypochlorite oxidation for subsequent ChE-inhibition assays. Clean-up was performed on the apple, cucumber, tomato, and strawberry extracts using graphite carbon black (ENVI™-Carb) or primary and secondary amines (PSA) for GC/MS determinations.

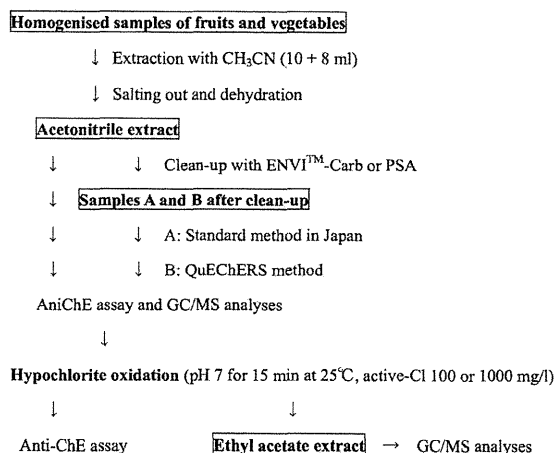


Fig. 1. Sample treatment scheme, including clean-up and hypochlorite oxidation steps of acetonitrile extraction.

Hypochlorite oxidation

The acetonitrile extracts (300 μ l) from fruit and vegetable samples were treated with 100 μ l of the hypochlorite concentration (0.3 mg of active chlorine) in a small test tube for 15 min at 25°C. The unreacted residual chlorine was removed immediately by adding an equivalent volume of sodium sulphite solution for subsequent ChE-inhibition assays. The acetonitrile extracts from fruits and vegetables were also subjected to chlorination in small test tubes in the same manner to determine their chlorine consumptions. In addition, the reactions of individual P=S compounds (or carbamate pesticides) with hypochlorite were performed by mixing 100 μ l of the hypochlorite solution (0.3 mg active Cl) and 300 μ l of pesticide solutions (0.01–1,000 μ g/l) using small test tubes for 15 min at 25°C to create calibration curves. Chlorinated and non-chlorinated acetonitrile extracts were then acidified to pH 2 with 0.1 M hydrochloric acid before extraction with 2 ml of ethyl acetate for GC-MS analysis.

Assay of ChE-inhibiting activity

Assays of ChE-inhibiting activity were carried out according to the procedure described by Ellman *et al.* (1961) and Onodera *et al.* (1992), with some modifications. Horse serum was obtained from Gibco (product of New Zealand, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) as an acetylcholinesterase (AChE) source for determining the inhibitory effect on AChE activity of organophosphates, before and after hypochlorite oxidation. One millilitre of the horse serum, which was thawed imme-

diately before preparation of the enzyme solution, was mixed with 9 ml of 0.05 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-HCl buffer, pH 7.8) to prepare the standard enzyme solution having suitable activity. The 0.1 M substrate solution was prepared daily from acetylcholine iodide (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) dissolved in 0.05 M Tris-HCl buffer, and 0.01 M inhibitor solution was also prepared from neostigmine bromide (Nacalai Tesque) as a typical ChE inhibitor.

For the inhibition studies, 900 μ l aliquots of the standard ChE solution were incubated with 100 μ l of the chlorinated and non-chlorinated pesticide samples at pH 7.8 and at 37°C for 30 min in a shaking incubator. After the addition of the substrate solution to each sample, the residual ChE activity was immediately measured automatically at 37°C as a change in pH/min for 5 min, by using a highly sensitive pH meter and recorder: the dose-response curves were plotted as the mean value of three test runs. The ChE-inhibiting activity was calculated as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times [1 - (\Delta\text{pH}_{\text{sample}} - \Delta\text{pH}_{\text{neo}}) / (\Delta\text{pH}_{\text{blank}} - \Delta\text{pH}_{\text{neo}})]$$

where, $\Delta\text{pH}_{\text{sample}}$ is the pH slope of the sample, $\Delta\text{pH}_{\text{neo}}$ is the pH slope of the 0.01 M neostigmine bromide, a representative ChE inhibitor, and $\Delta\text{pH}_{\text{blank}}$ is the pH slope of methanol, which represented non-inhibition conditions.

GC-MS analysis

The fruit and vegetable extracts and reaction products of P=S compounds with hypochlorite in the acetonitrile solution and buffer solution were analysed using a Varian CP3800 gas chromatograph coupled with a Saturn 2200 ion trap GC-MS (Varian Walnut Creek, CA, USA) equipped with a TC-1 capillary column (30 m \times 0.25 i.d. and a film thickness of 0.12 μ m film, GL Science Inc., Tokyo, Japan) under temperature ranging from 80 to 280°C at the rate of 10°C/min. The helium gas flow-rate was 1 ml/min. The electron ionisation conditions were as follows: ion energy, 70eV; ion source temperature of 230°C; m/z = 50–600 full scan for the qualitative analysis. A sample volume of 1 μ l was splitlessly injected into the GC-MS at 270°C. The confirmation and determination of organophosphorus and carbamate pesticides tested in the present study were carried out according to the methods described in previous papers (Kawakami *et al.*, 2008; Kanno *et al.*, 2010, 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

Earlier reports have demonstrated that the abilities of oxidative derivatives (P=O) of organothiophosphate

(P=S) pesticides to inhibit ChE in animal tissues are 10^2 to 10^4 times greater than those of the corresponding P=O compounds (Ecobichon and Comeau, 1973). Our previous paper (Onodera *et al.*, 1976) revealed that treatment with chlorine of P=S compounds at low concentration in water leads to the formation of their P=O analogues, resulting in a potentiation of the anti-ChE activity of the original pesticide solution. Cholinesterase assays and GC analyses also demonstrated that several P=O compounds were stable in chlorinated water and thus showed high anti-ChE activity for a long time (Onodera *et al.*, 1982, 1983), but some of the P=O analogues formed were markedly hydrolysed and lost their anti-ChE activities in the chlorinated water. Our additional study that investigated the factors influencing the fate of P=O derivatives in chlorinated water (Onodera *et al.*, 1992) demonstrated that they were comparatively stable in an acidic solution of pH 6.0 containing chlorine at a low concentration (less than 10 mg/l of active Cl) for a long time. The present study, therefore, was undertaken to evaluate the inhibitor content in fruit and vegetable samples by using ChE inhibition assays combined with hypochlorite oxidation of their acetonitrile extracts.

Calibration curves for ChE-inhibition assay and recovery test

In a preliminary examination of the ChE inhibition assay for pesticide-hypochlorite reactions, we determined dose-response relationships between the pesticide concentrations and their anti-ChE activities toward the ChE of the horse serum by using the Δ pH method (Onodera *et al.*, 1992). Fig. 2 shows an example of the ChE inhibition curves observed for chlorpyrifos, diazinon, fenitrothion, and isoxathion solutions before and after hypochlorite oxidation in buffered solution of pH 7 at 25°C for 15 min and their oxidative standards. The ChE-inhibition curves observed for these pesticide solutions were shifted approximately over a thousand times to lower concentrations relative to those of the parent standards. The inhibition curves also were in good agreement with those of their oxidative standards, except for the chlorinated isoxathion solution. These observations suggest that the main products observed for the chlorpyrifos-, diazinon-, and fenitrothion-hypochlorite reactions were their oxygen analogues (Kanno *et al.*, 2012). However, further chlorination of the isoxathion-hypochlorite reaction has been shown to produce the unknown compound(s) (Onodera *et al.*, 1992; Kanno *et al.*, 2012) in the chlorinated water (100 mg/l as active chlorine) even at pH 6.0 for 15 min.

In order to reveal the fate of oxidation products, the ethyl acetate extract of aqueous pesticide solution (5 μ M,

pH 7) after treatment with hypochlorite (100 mg of active Cl/l) at 25°C were analysed by GC-MS (Fig. 3). In the first step of these reactions, two peaks corresponding to the original material and its oxon were observed on the chromatograms that were obtained from most of the tested compounds with the P=S moiety, and one peak corresponding to the compounds' oxons; these formed the main intermediates (Kanno *et al.*, 2012). However, no peaks were observed on the chromatograms that corresponded to further oxidation products from the isoxathion-hypochlorite reactions, in spite of higher ChE-inhibition activity for the chlorinated isoxathion solutions, as can be seen in Fig. 2. Although the compound(s) responsible for anti-ChE response could not be characterized from the GC-MS analyses of ethyl acetate extracts from the chlorinated isoxathion solution, further investigations are planned to identify and determine the anti-ChE compound(s) in water.

A recovery test was performed with acetonitrile extracts to obtain information on the different matrices in fruit and vegetable samples. For quantification, an internal standard solution was added to all samples. During the initial stage of this experiment, the recovery of pesticides was compared by using two extraction procedures as stipulated in the Standard method of Japan (Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan, 2006) and the QuEChERS method (Anastasiades *et al.*, 2003). The main difference between the two methods is that phosphate buffer salts (pH 7), NaCl (5 g), anhydrous Na₂SO₄ (5 g), and clean-up with graphite carbon black ENVI™-Carb are used in the Standard method, whereas buffering citrate salts (pH 5-5.5), NaCl (1 g), anhydrous Mg₂SO₄ (5 g), and Bondesil-PSA are used in the QuEChERS method. 0.01 (for the Standard method) and 0.1 μ g/g (for the QuEChERS method) of target analyses have been spiked in triplicate in the matrices of apple, cucumber, tomato, and strawberry. Clean-up used the ENVI™-Carb for the Standard method and the PSA for the QuChERS method.

Table 2 shows the recovery rates and relative standard deviation (RSD) of organophosphorus and carbamate pesticides from fruits and vegetables after acetonitrile extraction, solid phase clean-up using ENVI™-Carb, and GC-MS analyses. Recovery rates were satisfactory with RSD of less than 20%. The recovery rates obtained from the QuEChERS procedure were somewhat lower than were those summarized in Table 2. The standard method in Japan, thus, could be applied with subsequent hypochlorite oxidation of these pesticides in acetonitrile extracts with no further clean-up, and following the ChE inhibition assay.