

Analysis of Isothiazolinones and Other Preservatives in Gel-Products Used for Cooling in Japan

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

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

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

[Received August 16, 2012; Accepted October 11, 2012]

Summary

Recently, two cases of contact dermatitis caused by 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (OIT) used as a preservative in cooling gel-products has been reported in Japan, and one of the cases was declared a serious product accident based on the "Consumer Safety Product Act." In this study, the concentrations of three isothiazolinone preservatives (OIT, 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [MIT], and 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [Cl-MIT]), seven different parabens, carbendazim (MBC), and tebuconazole (Teb) in 24 cooling gel-products were investigated. OIT was detected in two samples (0.14 µg/g and 2.2 µg/g). MIT was detected in 11 samples at concentrations in the range of 0.12–115 µg/g and Cl-MIT was detected in six samples in concentrations ranging from a trace amount to 16 µg/g. The EU cosmetic limits were used to consider the risk of skin sensitization and the concentrations of MIT and Cl-MIT detected in several samples were over these limit. It is possible for the gel to cause contact dermatitis when the consumer's weight presses on the gel-product because OIT might penetrate from the gel to the textile surface in the case of a serious product accident. Furthermore, it is possible that using the gel product for the forehead or neck has a similar risk of skin sensitization if the gel-product's surface tears and the gel containing isothiazolinone preservative leaks out. It is advisable to replace the preservatives in cooling gel-products with non-sensitizing preservatives. All parabens were detected in the gel-products, except benzylparaben, and their concentrations were 12–696 µg/g. MBC and Teb were detected in three samples with concentrations in the ranges of 0.82–54 µg/g and 1.5–25 µg/g, respectively.

Key words: gel-product for cooling, isothiazolinone compound, contact dermatitis, preservative

INTRODUCTION

Recently, some kinds of gel-products have been used to cool the body during the humid summer season in Japan. These gel-products use superabsorbent polymers that contain large volumes of water to take heat away from the surface of skin. Cases of allergic contact dermatitis related to the gel-product (a mattress gel-sheet) used for cooling have been reported¹⁾. In these reports, two patients (adult women) slept on the mattress gel-sheet used for cooling, and both patients developed itchy edematous erythema on their arms, abdomen, legs etc., when the gel sheet came in contact with their skin for 1–3 months of use. A patch test was performed and the gel used in the mattress was identified as the causative product. Furthermore, the preservative used for this gel-sheet also revealed a positive reaction (0.1% pet.). The preservative contained 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (OIT), 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MIT), and carbendazim (MBC), and patch testing showed a positive reaction for OIT (0.1% pet.) and negative reactions for MIT (0.1% aq.) and MBC (1% pet.) in both patients' cases. Although this gel-sheet was composed of three layers (inside: gel, center: polyethylene film, outside: textile made of polyester), OIT was detected in the gel and outside the textile sur-

face. Thus, it was thought that OIT might have penetrated from the gel layer to the textile surface. Since one of the patients needed over 30 days for healing, this case was declared a serious product accident based on the "Consumer Safety Product Act" at 24 March 2010 by the Ministry of Health, Labour and Welfare²⁾.

Although many cases of contact dermatitis caused by OIT used as a preservative have been reported through occupational exposure to paints, adhesives, etc.^{3, 4)}, cases of contact dermatitis caused by OIT exposure through household products such as leather shoes⁵⁾ and gel-products used for cooling¹⁾ have rarely been reported. Furthermore, the amounts of OIT in gel-products used for cooling have not been investigated. Therefore, we investigated the concentrations of OIT in gel-products used for cooling in Japan.

In addition, other isothiazolinone compounds are also well-known skin sensitizers, especially MIT and 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (Cl-MIT) which are ingredients of preservative (for example, Kathon™ CG[®]) and these isothiazolinones are widely used in cosmetic products, wall adhesives, and water-based paints. Furthermore, many cases of contact dermatitis related to MIT and Cl-MIT have been reported^{7, 8)}. Thus, the European Union (EU) has regulated the allowable concentrations of MIT and Cl-MIT in cosmetic products to less

than 15 µg/g as a mixture (MIT: 3.75 µg/g, Cl-MIT: 11.25 µg/g), and 100 µg/g for MIT only⁹⁾. These two isothiazolinones compounds were also investigated in this study. Furthermore, parabens (PBs), MBC, and tebuconazole (Teb), which are used as biocides were also investigated because these compounds were detected in the gel-product when a preliminary experiment was conducted.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Gel-products used for cooling were purchased from several retail and online stores in Japan from April to June 2010. The details of the gel-product samples are shown in Table 1 and a total of 24 gel-product samples were analyzed. Sample A1 was the same product that caused contact dermatitis and that was reported in a serious product accident, though the lot number of the product used in this study was different. Since the gels composed of superabsorbent polymers were wrapped in plastic sheet, these gels were separated from the gel-product. "Allergy checked" was printed on the product container of sample A6 only. Part of the gel-product sample used for elucidation of contact dermatitis reported in the serious product accident was provided by the National Institute of Technology and Evaluation (NITE). This sample was used as a control for developing the analytical method used in this study.

Materials

OIT and PBs [methylparaben (Me-PB), ethylparaben (Et-PB), propylparaben (Pr-PB), isopropylparaben (Iso-Pro-PB), butylparaben (Bu-PB), isobutylparaben (Iso-Bu-PB), and benzylparaben (Be-PB)] were obtained from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. MIT and Cl-MIT were purchased from Waterstone Technology, LLC as a mixture (MIT: 3.63%, Cl-MIT: 10.83%). MBC and Teb were obtained from Sigma-Aldrich and Dr.Ehrenstorfer GmbH, respectively. Reserpine and bisphenol A-d₁₆ (BPA-d₁₆) were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., and Cambridge Isotope Laboratories, Inc., respectively. These compounds were used as internal standards. HPLC grade trifluoroacetic acid (TFA) and acetonitrile were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Pesticide residue analysis grade methanol was obtained from Sigma-Aldrich. Milli-Q water was produced using a Milli-Q Synthesis A10 system (Merck Millipore, Tokyo, Japan).

Sample Processing

A 0.5 g sample of the gel was placed into a glass tube with 10 mL of methanol and shaken in the absence of light for 16 hours at 30°C. After shaking, the sample was filtered using a suction funnel with a glass filter. The residue was washed with methanol and the wash was combined with the filtrate. Next, the volume of the sample solution was adjusted to 25 mL. The sample solution (1 mL) and Milli-Q water (1 mL) were combined and 50 µL of a methanol solution containing 2 µg/mL of the internal standard (positive mode: reserpine, negative mode: BPA-d₁₆) was added to the sample solution. The sample solution was analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) after filtration using a PTFE filter (pore size 0.20 µm, Merck Millipore, Tokyo, Japan).

LC/MS/MS analysis

All samples were analyzed using a QTRAP4000 mass spectrometer (AB SCIEX) equipped with an Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) consisting of a G1376A CapPump, G1377A µ-WPS, G1318A Oven, and G1379A Degasser. Ionization of the target compounds was achieved using electrospray ionization (ESI) in the positive mode (MIT, Cl-MIT, OIT, MBC) or negative mode (PBs and Teb). All compounds were qualified and quantified using multiple reaction mode (MRM). The conditions for the MS/MS analysis, and the precursor (Q1) and product (Q2) ions of the target compounds are shown in Table 2. For LC separation of analytes in the positive mode, eluent A was Milli-Q water containing 0.02% TFA and eluent B was acetonitrile containing 0.02% TFA. The gradient elution started from 25% eluent B, which was held for 3 min, then increased linearly to 90% over the course of 2 min, and held for an additional 7 min. An Inertsil[®] ODS-4 column (length 50 mm, internal diameter 2.1 mm, particle size 3 µm; GL Sciences, Inc., Tokyo, Japan) was used for separation of the target chemicals. For LC separation of analytes in the negative ion mode, eluent A was Milli-Q water and eluent B was acetonitrile. The gradient elution started at 35% eluent B, which was held for 0.5 min, and then increased linearly to 60% over the course of 14.5 min. Next, concentration increased linearly to 90% over the course of 1 min, and then, was held for another 6 min. An Inertsil[®] ODS-4 column (length 150 mm, internal diameter 2.1 mm, particle size 3 µm; GL Sciences, Inc., Tokyo, Japan) was used for separation of the target chemicals. Flow rate, column oven temperature, and injection volume were 0.2 mL/min, 40°C, and 10 µL, respectively. Retention times of the target compounds are shown in Table 2.

RESULTS AND DISCUSSION

Examination of sample processing

Sharp peaks and good separations were observed the mass chromatograms obtained under the chromatographic conditions of this study. At first, the preliminary experiment for extraction was conducted using the sample provided by NITE. A certain amount of the gel sample was placed into a glass tube with 10 mL of methanol and shaken in the dark for 16 hours at 30°C. After shaking, the samples were centrifuged and the supernatant was analyzed. Then, the residues were re-extracted with 10 mL of methanol in the same manner for 2 hours, the samples were centrifuged, and the supernatant was analyzed. From the results of the first extraction, MIT, OIT, MBC, Me-PB, Bu-PB, and Teb were detected in the sample provided by NITE. From the results of the second extraction, the concentrations of the compounds measured from the second extraction were 0.6% less than the concentrations measured from the first extraction. Thus, the extraction time was set at 16 hours.

The recovery test was conducted by adding every compound to the samples. Low concentrations (0.1 µg/g, MIT: 0.033 µg/g) and high concentrations (20 µg/g, MIT: 6.7 µg/g) of each compound were added to 0.5 g of the sample that did not contain the target compounds (n=5). The results of the recoveries are listed in Table 3. At the low concentration, although the recoveries of MIT, Cl-MIT, OIT, and MBC were slightly low (54–77%), the other compounds were obtained in good recoveries (79–111%) and the coefficient of varia-

Table 1 List of the gel products studied

Usage	No ^a	Country	Materials ^b	Remarks
Mattress and pillow	A1*	Japan	superabsorbent polymer/glycerin/water/paraben/moldproof agent/fragrance	same product of serious product accident, but lot number is different
	A2	Japan	water/acryl resin/preservative/food colors	keep in refrigerator before using
	A3**	China	superabsorbent polymer, water, moldproof agent, etc.	
	A4	Japan	water/sodium sulfate/polymer	keep in refrigerator before using
	A5	Japan	polyhydric alcohol/superabsorbent high polymer/water	keep in freezing chamber before using
	A6*	Japan	superabsorbent polymer/glycerin/water/paraben/moldproof agent/fragrance	"Allergy checked" printed
	A7*	Japan	superabsorbent polymer/glycerin/water/paraben/moldproof agent/fragrance	
	A8	China	water/sodium sulfate/polymer	
	A9	Japan	water/antifreezing solution/gelling agent/preservative	keep in freezing chamber before using
	A10	China	carboxyvinyl polymer/glycerin/triethanolamine/moldproof agent/coloring material	keep in freezing chamber before using
	A11***	Japan	water/antifreezing solution/gelling agent/preservative	keep in freezing chamber before using
	A12	China	Unknown	keep in freezing chamber before using
	A13	Unknown	saccharide/superabsorbent polymer/water	keep in freezing chamber before using
	A14	China	superabsorbent polymer/water/moldproof agent/propylene glycol	keep in freezing chamber before using
	A15	Japan	high polymer/water/preservative	keep in refrigerator before using
	A16	China	water/polymer thickener/preservative	keep in refrigerator before using
	A17	Japan	Unknown	keep in refrigerator before using
Forehead and neck	B1***	Japan	water/antifreezing solution/gelling agent	keep in freezing chamber before using
	B2***	Japan	water/antifreezing solution/gelling agent	keep in freezing chamber before using
	B3**	China	water, sodium chloride, glycerin, moldproof agent, etc.	keep in refrigerator before using
	B4	Japan	polyhydric alcohol/high polymer superabsorbent resin/water/polyethylene	keep in freezing chamber before using
	B5	Japan	Unknown	keep in freezing chamber before using
	B6	China	water/polymer thickener/preservative	keep in freezing chamber before using
Pet animal	C1	Japan	superabsorbent polymer/water/preservative	

^a samples with the same number of asterisks are from the same manufacturer
^b displayed on the label of the product

Table 2 Molecular weight (M.W.), MS/MS conditions and retention times of chemicals studied

Chemicals	M.W.	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	DP (volt)	EP (volt)	CE (volt)	CXP (volt)	Retention time (min)
MIT	115.0	116	101	96	10	33	18	1.10
MBC	191.2	192	160	56	5	25	10	1.11
Cl-MIT	149.6	150	135	71	7.5	33	6	1.39
OIT	213.3	214	102	46	7.5	21	4	8.75
Reserpine	608.7	609	448	126	15	41	12	8.20
Me-PB	152.2	151	136	-25	-10	-20	-7	5.43
Et-PB	166.2	165	136	-45	-10	-20	-9	8.28
Iso-Pro-PB	180.2	165	136	-45	-10	-20	-9	11.51
Pro-PB	180.2	179	136	-30	-10	-22	-9	12.01
Iso-Bu-PB	194.2	179	136	-30	-10	-22	-9	15.34
Bu-PB	194.2	193	136	-30	-7.5	-24	-9	15.64
Be-PB	228.3	227	136	-35	-7.5	-22	-7	16.04
Teb	307.8	306	223	-35	-5	-12	-13	19.34
BPA-d ₁₆	244.4	241	223	-75	-7.5	-26	-13	11.80

Positive mode (MIT, MBC, Cl-MIT, OIT, Reserpine): TEM (600), CUR (20), GS1 (70), GS2 (80), CAD (6), IS (4500)
 Negative mode (Me-PB, Et-PB, Iso-Pro-PB, Pro-PB, Iso-Bu-PB, Bu-PB, Be-PB, Teb, BPA-d₁₆): TEM (400), CUR (40), GS1 (60), GS2 (70), CAD (3), IS (-4500)

Table 3 Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and recoveries of chemicals studied

Chemicals	LOD ^a (μg/g)	LOQ ^b (μg/g)	Recoveries (n = 5) ^c			
			low (%)	CV (%)	high (%)	CV (%)
MIT	0.0074	0.017	69	6.1	94	3.7
Cl-MIT	0.044	0.10	68	11	90	3.3
OIT	0.012	0.029	77	4.0	95	3.7
Me-PB	0.035	0.081	79	7.6	99	2.5
Et-PB	0.024	0.057	88	5.1	99	3.1
Iso-Pro-PB	0.023	0.055	95	4.9	86	4.6
Pro-PB	0.010	0.024	100	2.0	97	3.3
Iso-Bu-PB	0.020	0.047	108	3.4	100	4.2
Bu-PB	0.024	0.057	111	4.2	96	4.4
Be-PB	0.021	0.049	107	3.3	109	3.6
MBC	0.0079	0.018	54	5.8	89	2.3
Teb	0.047	0.11	109	7.5	101	5.6

^a LOD was calculated according to JIS K0136 using the standard deviation (ρ) and t-value ($t = 4.26$ for $n = 5$) obtained from the recovery test of low concentration.

^b LOQ was calculated as ten times of ρ .

^c low: 0.1 μg/g (MIT: 0.033 μg/g), high: 20 μg/g (MIT: 6.7 μg/g), CV: coefficient of variation

tion (C.V.) of all compounds was less than 10%, except Cl-MIT (11%). At high concentrations, good recoveries (89–109%) of all compounds were obtained and the C.V. of all compounds was below 5.6%. The limit of detection (LOD) was calculated according to JIS K 0136¹⁰⁾ using the standard deviation (ρ) and t-value ($t = 4.26$ for $n = 5$) obtained from the recovery tests at low concentration. LOQ was calculated as ten times ρ ¹¹⁾. The LODs and LOQs are listed in Table 3 and the LODs and LOQs of the isothiazolinones were in the ranges of 0.0074–0.012 μg/g and 0.017–0.10 μg/g, respectively. The other compounds

were also obtained with good LODs (0.0079–0.047 μg/g) and LOQs (0.018–0.11 μg/g).

Concentrations and detection frequencies of the target compounds in the gel product samples

The concentrations of the target compounds in the gel-product samples are shown in Table 4. The mass chromatograms of MIT, Cl-MIT, and OIT obtained from A11 are shown in Fig. 1. OIT was detected in samples A7 and A11, and these concentrations were 0.14

Table 4 Concentrations (µg/g) and detection frequencies (%) of chemicals studied in the gel products used for cooling

Samples	Isothiazolinones			Parabens						Others		
	MIT	Cl-MIT	OIT	Me-PB	Et-PB	Pro-PB	Iso-Pro-PB	Bu-PB	Iso-Bu-PB	Bc-PB	MBC	Teb
A1	0.12	-	-	298	-	-	-	12	-	-	54	1.5
A2	-	-	-	431	285	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A6	-	-	-	696	-	-	-	223	-	-	0.82	25
A7	-	-	0.14	648	-	-	-	212	-	-	1.4	15
A8	0.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A9	-	-	-	-	-	-	-	26	-	-	-	-
A10	-	-	-	509	413	33	-	-	-	-	-	-
A11	4.2	12	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A12	-	-	-	471	500	74	-	-	-	-	-	-
A13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A14	8.1	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A15	115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A16	6.4	8.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A17	5.4	tr ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	-	233	167	172	-	-	-
B3	8.6	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B5	5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	7.8	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Detection frequency (%) ^a	46	25	8.3	29	13	8.3	4.2	21	4.2	0	13	13

^a -: not detected ^b Between LOD and LOQ ^c Detection frequency (%) = 100 X (number of sample above LOD)/(number of all sample)

µg/g and 2.2 µg/g, respectively. The detection frequency of OIT was 8.3%. MIT was detected in 11 samples, and the concentration range and detection frequency were 0.12–115 µg/g and 46%, respectively. Cl-MIT was detected in six samples, with concentration ranging from trace amount to 16 µg/g and a detection frequency of 25%. Detection frequency of MIT was highest among all the target compounds. All parabens, except Bc-PB, were detected in gel-products and their concentrations were 12–696 µg/g. It was observed that three kinds of PBs were detected in the same sample in the cases of A10 and A12. Furthermore, isomers Bu-PB and Iso-Bu-PB were detected in the same sample (B2). The detection frequency of Me-PB (29%) was highest among the PBs. However, the detection frequency of PBs (38%) was lower than that of MIT (46%). MBC and Teb were detected in three samples and these concentrations were 0.82–54 µg/g and 1.5–25 µg/g, respectively.

Although the minimum inhibitory concentration (MIC) of OIT is 2 mg/L for some kinds of mold and yeast, the MIC of OIT was reported to be over a few hundred mg/L in the case of some types of fungus¹². On the other hand, it was reported that the MIC of MIT for some kinds of freshwater mold was 31 mg/L¹³. Thus, the concentrations of OIT and MIT detected in this study might not be sufficient for use as anti-mold agents if these preservatives are used separately. In some cases, isothiazolinone preservatives were used as a mixture, for example, OIT and MBC (for example, ROCIMA™ 367N¹⁴). Furthermore, Cl-MIT was only detected in samples that contained MIT and the concentrations of Cl-MIT detected in the samples were two or three times higher than those of MIT, except for in A17 and B6. A similar tendency was also observed in wallpaper adhesives¹⁵. It was thought that the reason for this tendency was that the preservatives always contained Cl-MIT as a mixture with MIT (for example, Kathon™ CG⁹) and the concentration of Cl-MIT was three or four times higher than MIT in these preservatives. Since Cl-MIT was not chemically stable, Cl-MIT in A17 and B6 might decompose in gel-products

during storage.

The concentration of OIT in A1 was below LOD even though A1 was the same product used for the elucidation of contact dermatitis reported in the serious product accident (with a different lot number) and OIT was detected in the control sample provided by NITE. Therefore, the difference in lot numbers might affect this result. A1, A6, and A7 were manufactured by same company, and Me-PB, Bu-PB, MBC, and Teb were detected in these samples. Notably, MBC and Teb were only detected in the samples manufactured by this company. On the other hand, none of the target compounds were detected in A3, and MIT and Cl-MIT were detected in B3 even though these two samples were manufactured by the same company. Although A11, B1, and B2 were manufactured by the same company, A11 contained MIT, Cl-MIT, and OIT, while B1 and B2 contained PB. These results suggest that different kinds of preservatives were used in gel-products manufactured by the same company, depending on the intended use of the gel-product.

Safety of gel products used for cooling

It was reported that the ranking of sensitization potential was MIT/Cl-MIT > OIT¹⁶. However, since OIT is a moderate sensitizer⁹, the recommended concentration of OIT used to perform the patch test was reported (0.011–0.1% in pet.)¹⁷. It was reported that a sewing machine operator presented with contact dermatitis caused by contact with mattress textile, and 40–50 µg/g of OIT was detected in the mattress textile. The concentrations of OIT detected in the present study were lower than those in the case of the mattress textile¹⁷. The EU has regulated the concentrations of MIT and Cl-MIT in cosmetic products to less than 15 µg/g as a mixture (MIT: 3.75 µg/g, Cl-MIT: 11.25 µg/g), and 100 µg/g (MIT only)⁹. Although the gel-product used for cooling was not involved in this cosmetic regulation, the EU limit was used to evaluate the risk of skin sensitization. The concentrations of MIT and Cl-MIT detected in A11, A14, and B3 were over the EU regulation limit. On the other hand, MIT was detected in A1, A8, A15, B5, and C1, although Cl-MIT was not detected in these samples. MIT is used for the preservative that does not contain Cl-MIT (for example, NEOLONE™ DsP¹⁸). The contact dermatitis caused by MIT has been reported¹⁹. The concentration of MIT in A15 was over the EU regulation limit. There is no existence of cross-reactivity between MIT/Cl-MIT and OIT, although cross-reactivity between MIT and Cl-MIT has been reported^{4,10}. The concentration of PBs used in cosmetic products has also been regulated in the EU to less than 0.4% (individually) and 0.8% (total amount of PBs)⁹. All the concentrations of PBs detected in this study were below this regulation value. MBC was not a skin sensitizer because it was reported that the result of the patch test for MBC (1.0% pet.) was negative¹⁹. Teb was not a skin irritant based on the material safety data sheet provided from supplier.

In general, gel-products used for cooling are put into a plastic bag and it is recommended by the manufacturer that sheet or pillow be used as a cover. This notification is described on the surface of the product. Thus, gel-products containing preservatives usually does not come in direct contact with skin. However, in the case of the serious product accident, the patient was exposed to OIT for a long time because the OIT from the gel might have penetrated to the textile surface¹¹. It is possible that similar contact dermatitis can occur when

the consumer's weight presses on the cooling gel-product used for a pillow as in A14 and A15, for which the concentrations of MIT and Cl-MIT were over the EU regulation value. Furthermore, it is thought that the cooling gel-products used on the forehead or neck (such as B3) have a similar risk of skin sensitization if the gel-product surface tears and the gel containing isothiazolinone preservative leaks out. Thus, it is advisable to replace preservatives used in gel-products for cooling with non-sensitizing preservatives. The components in almost all the samples investigated in this study were described only as "preservative" and did not show any information about the specific chemical components (Table 1). It is likely that the identification of the causative substance may be delayed when contact dermatitis related to these products occurs. Thus, it is desirable that manufacturers provided information about the components of the gel-products used cooling directly on the surfaces of the products.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mr. Katsumi Arai and Keiko Kakiyama (NITE) for providing the gel product sample used for elucidation of contact dermatitis in the case of the serious product accident. The authors also thank Dr. Harunobu Nakashima (Osaka Prefectural Institute of Public Health), Dr. Yuji Haishima, and Dr. Masa-aki Kaniwa (National Institute of Health Sciences) for kindly providing advice during this study.

REFERENCES

- 1) Fukunaga, A., Nishiyama, S., Shimizu, H., Nagai, H., Horikawa, T., Mori, A., Inoue, N., Sasaki, K. and Nishigori, C.: Non-occupational allergic contact dermatitis from 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one in a Japanese mattress gel-sheet used for cooling. *Contact Dermatitis*, 62, 317–318 (2010)
- 2) Office of Chemical Safety, Evaluation and Licensing Division, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW): <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/katei/topics/100324-1.pdf> (in Japanese)
- 3) Thormann, J.: Contact dermatitis to a new fungicide, 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one. *Contact dermatitis*, 8, 204 (1982)
- 4) Aalto-Korte, K., Alanko, K., Henriks-Eckerman, M.L., Kuuliala, O. and Jolanki, R.: Occupational allergic contact dermatitis from 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one. *Contact Dermatitis*, 56, 160–163 (2007)
- 5) Toby Mathias, C.G., Andersen, E.K. and Hamann, K.: Allergic contact dermatitis from 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one, a paint mildewicide. *Contact Dermatitis*, 9, 507–509 (1983)
- 6) The Dow Chemical Company: KATHON™ CG, http://www.dow.com/assets/attachments/business/pcare/kathon_for_personal_care/kathon_cg/tds/kathon_cg.pdf
- 7) Jensen, J.M., Harde, V. and Brasch, J.: Airborne contact dermatitis to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone in a boy. *Contact Dermatitis*, 55, 311 (2006)
- 8) Timmermans A., Hertog, S.D., Glaydys, K., Vanacker H. and Goossene A.: 'Dermatologically tested' baby toilet tissues: a cause of allergic contact dermatitis in adults. *Contact Dermatitis*, 57, 97–99 (2007)
- 9) European Union (EU): Cosmetic regulation 2009, Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the coun-

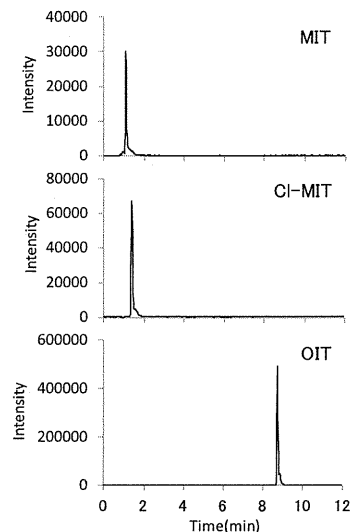


Fig. 1 Mass chromatograms of MIT, Cl-MIT, and OIT obtained from sample A11

- cil of 30 November 2009 on cosmetic products.
- 10) Japanese Industrial Standard Committee: JIS K0136, General rules for high performance liquid chromatography/mass spectrometry. (2011) (in Japanese)
- 11) Nakamura, M.: Quality assurance and quality control of instrumental analysis. pp66-83, "Analytical methods for pesticides and other organic compounds by GC/MS and LC/MS" Edited by Kobayashi, H. and Nakamura, K., Soft Science, Tokyo (2008) (in Japanese)
- 12) Nishihara, C.: 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one, 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one, and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one, *J. Antifung. Agents.*, 26 (supple), 6 (1998) (in Japanese)
- 13) Oono, H. and Hatai, K.: Antifungal activities of Bronopol and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MT) against *Saprolegnia*. *Biocontrol Sci.*, 12, 145-148 (2007)
- 14) The Dow Chemical Company: ROCIMA™ 364N Biocide, http://www.dow.com/assets/attachments/business/biocides/rocima_for_dry_film_protection/rocima_364n/tds/rocima_364n.pdf
- 15) Nakashima, H., Matsunaga, I., Miyano, N. and Kitagawa M.: Determination of antimicrobial agents in non-formalin adhesives for wallpaper. *J. Health Sci.*, 46, 447-454 (2000)
- 16) Geier, J. and Schnuch, A.: No cross-sensitization between MCI/MI, benzisothiazolinone and octylisothiazolinone. *Contact Dermatitis*, 34, 148-149 (1996)
- 17) The Dow Chemical Company: NEOLONE™ DsP, http://www.dow.com/assets/attachments/business/pcare/neolone/neolone_dsp/tds/neolone_dsp.pdf
- 18) Amaro, C., Santos, R. and Cardoso, J.: Contact allergy to methylisothiazoline in a deodorant. *Contact Dermatitis*, 64, 289-302 (2011)
- 19) Paulsen, E.: Occupational dermatitis in Danish gardeners and greenhouse workers (II). Etiological factors. *Contact Dermatitis*, 38, 14-19 (1998)

有害物質含有家庭用品規制法のトリフェニル錫(TPT)およびトリブチル錫(TBT)分析法改定過程において観察された TPT の分解について

大嶋智子、河上強志*、山野哲夫、尾崎麻子、清水 充、伊佐間和郎*

Study on the Degradation of Triphenyltin (TPT) observed in the Process for the Revision of the Official Analytical Method for TPT and Tributyltin (TBT) in Household Products

Tomoko OOSHIMA, Tsuyoshi KAWAKAMI*, Tetsuo YAMANO, Asako OZAKI, Mitsuru SHIMIZU and Kazuo ISAMA*

Abstract

The round-robin test to evaluate the method for the simultaneous determination of triphenyltin (TPT) and tributyltin (TBT) in household products developed by National Institute of Health Sciences in Japan was performed by six laboratories. Samples of three types (textile, water-based adhesive, and oil-based paint) were prepared by addition of known amounts of TPT and TBT (0.1, 1.0, 10 µg/g) and sent to the participants. They were analyzed in our laboratory five month later by GC-MS after ethyl-derivation with sodium tetraethylborate. TBT in the samples showed acceptable recoveries of 66-120%, while TPT concentrations were considerably low in all samples. In the textile and water-based adhesive, diphenyltin (DPT), the degradation product of TPT, was detected, and the total amounts of DPT and TPT were comparable to the added TPT. Thus, it was confirmed that TPT converted to DPT by dephenylation in these samples. In the case of oil-based paint, however, DPT was not detected. It seemed that DPT was adsorbed strongly onto the silica cartridge column used for the clean-up of oil before the ethyl-derivation step.

Keywords: tributyltin, triphenyltin, household product, GC-MS, diphenyltin

I 結言

トリフェニル錫(TPT)およびトリブチル錫(TBT)化合物は、藻類や貝類に殺生物作用を有し、船底や漁網の防汚剤として使用されたことから、1980年代には海洋汚染物質となり、牡蠣やムール貝の養殖事業に大打撃を与えた[1]。1985年頃から巻貝のインボセックスなど環境ホルモン作用が問題[2,3]となり、安全性評価がすすめられ、免疫や生殖に関わる毒性が明らかになった[4]。現在、TPTおよびTBTは、化学物質管理の考えが導入され、日本では生産、輸出入[5]および排出

[6]に関して規制され、2012年にEUにおいてもREACHによって規制が始まった[7]。

また、TPTおよびTBTは、皮膚刺激性を有し、経皮吸収されやすく、生殖機能障害を引き起こすことから、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律(家庭用品規制法)」によって、TPTは1979年に、TBTは1980年に、人体に直接接触する繊維製品などの家庭用品にこれら化合物を使用させないことを目的に規制された[8, 9]。家庭用品規制法におけるTPTおよびTBTの分析法は、家庭用品からこれらの化合物を溶媒抽出した後、精製、硝酸分解を行い、フレームレス原子

大阪市立環境科学研究所
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences
8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan
* 国立医薬品食品衛生研究所、〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1
National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

吸光法(AAS)によって錫量を測定する方法が用いられている。

さらに1µg/g以上の錫が検出された場合には2次元薄層クロマトグラフ法(TLC)により、TPPTおよびTBTの存在を確認する方法がとられている[8-11]。しかし、フレイムレスAASにおいてはこれら有機錫化合物を存在形態で測定するのではなく錫として測定すること、TLCではジチゾン錯体の黄色の発色が短時間で消失することや夾雑物の存在によりスポット位置が移動するなど多くの問題を抱えている[10-12]。

これらの規制対象となっている化合物は、現在ではGC-MSにより0.1µg/gまで存在形態のまま定量できるが、家庭用品規制法は、制定されてから30年以上経過しており、そのレベルでの対応はできていない。そこで、家庭用品中の有機錫化合物について、アルキル誘導体化した後、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)によって分析する方法が、国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)を中心に開発された。この方法では、エチル誘導体化試薬にテトラエチルホウ酸ナトリウム(NaBEt₄)を用い、分離及び定量にGC-MSを用いている[12]。そして、この開発されたTPPTおよびTBT改定試験法の妥当性を評価するため、繊維製品、水性接着剤及び油性塗料について既知濃度の同一試料を複数の機関で分析するラウンドロビンテストを、国立衛研、大阪府立公衆衛生研究所、名古屋市衛生研究所、神奈川県衛生研究所、東京都健康安全研究センターおよび当所の6機関で実施し、測定値の室間誤差が小さいことから、その有効性を確認した[13]。一方で、繊維製品および油性塗料中のTPPT濃度は、半数以上の機関で、試料保管中に大幅な低下がみられた。当所において、試料配布5か月後に分析を行い、TPPT及びTBT以外の有機錫化合物についてモニターしたところ、繊維試料中に規制対象外のジフェニル錫(DPT)の存在が確認された。そこで、これら試料についてTPPTおよびDPTの定量を行い、脱フェニルに関する検討を行った。

II 実験方法

1) 試料

国立衛研で作製した既知量のTPPTおよびTBTを含む繊維、水性接着剤、油性塗料を試料として用いた。TPPTおよびTBTの試料中濃度は、塩化物換算でそれぞれ0.1、1.0および10µg/gを含むように作製された。なお、繊維試料は1gの綿布に設定濃度のTPPTおよびTBTを含むアセトン標準溶液を添加したものの、水性接着剤試料には木工用接着剤(酢酸ビニル樹脂40%:水60%)に水を10%に加え攪拌時の均一性を向上させ、設定濃度のTPPTおよびTBTを含むアセトン標準溶液を添加し攪拌機で均一に攪拌したものを、油性塗料は本部用油性ニス(ウレタン樹脂、有機溶媒)を市販の薄め液(有機溶剤)で適度に薄め、設定濃度のTPPTおよび

TBTを含む*n*-ヘキサン標準液を添加し水性接着剤と同様に攪拌機で均一にしたものであった。配布試料は、暗所・室温で保管し、特に水性接着剤および油性塗料の試料は乾燥しないようにした[13]。

2) 試薬

塩化トリブチル錫、塩化トリブチル錫-d₂₇(サロゲート物質)、塩化トリフェニル錫及びテトラブチル錫-d₃₆(TeBT-d₃₆;サロゲート物質回収率評価用)については和光純薬工業製、塩化トリフェニル錫-d₁₅(サロゲート物質)については関東化学製を用いた。これらは全機関で同一ロット製品を使用するように国立衛研から配布された。二塩化ジフェニル錫および二塩化ジフェニル錫-d₁₀(サロゲート物質)およびNaBEt₄は、林純薬製を用いた。そのほか既報[13]に従い、溶媒(*n*-ヘキサン、アセトン、エタノール、ジエチルエーテル)はJIS規格の残留農薬分析用を、塩酸、酢酸、酢酸ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムはJIS規格の特級試薬を用いた。2 mol/L酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液は、2 mol/L酢酸及び2 mol/L酢酸ナトリウム水溶液を体積比 5.9:14.1で混合後、pH=5に調整した。また、5% NaBEt₄溶液はNaBEt₄を5%含むように精製水に溶解し、この溶液は用時調整して使い切りにした。試料溶液の精製には、カートリッジタイプのシリカゲルカラム(Waters Sep-Pak® Plus Silica 690 mg/1.6 mL)及びフロリジルカラム(Waters Sep-Pak® Plus Florisil® 910 mg/1.4 mL)を用いた。

3) 標準溶液の調製

TBT及びTPPTが各0.05、0.1、0.2、0.5、2、5、10µg/mLとなるように*n*-ヘキサンを用いて検量線用標準溶液を調製した。なお、TPPT及びTBTの濃度はすべて塩化物換算で表記した。TBT-d₂₇、TPPT-d₁₅およびTeBT-d₃₆は、*n*-ヘキサンにより標準原液(100µg/mL)を調製した。繊維製品及び水性接着剤の分析ではアセトンで、油性塗料の分析では*n*-ヘキサンで希釈定容し、TBTおよびTPPTのサロゲート混合標準溶液(10µg/mL)を調製した。サロゲート物質回収率評価用に用いたTeBT-d₃₆は*n*-ヘキサンで正確に希釈して10µg/mLとなるように調製した[13]。

4) 試験溶液の調製

繊維製品は配布された1枚(=1g)を、水性接着剤試料は1gを遠沈管に秤量し、アセトン溶液で調製したサロゲート混合標準溶液10µg/mLおよび塩酸をそれぞれ100µLおよび0.4mL加えた後、アセトン15mLを加え5分間振とうした。そこに*n*-ヘキサン30mLを加えてさらに30分振とうした後、遠心分離し上澄み採取した。さらに、アセトン/*n*-ヘキサン(3:7v/v)30mLで抽出し遠心分離後、上澄みを合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、

約2mLに定容し、エチル誘導体化を行った。

油性塗料試料は予め*n*-ヘキサン20mLを入れた遠沈管に1gを秤量し、精製水20mL及び*n*-ヘキサンで調製したサロゲート混合標準溶液(10µg/mL)100µLおよび塩酸0.4mLを加え、30分間振とう抽出した。遠心分離後、*n*-ヘキサン10mLを採取し、無水硫酸ナトリウムで脱水し、*n*-ヘキサンでコンディショニングしたシリカゲルカラムに試料溶液を負荷し、*n*-ヘキサン30mLで洗浄後、80%エタノール含有*n*-ヘキサン80mLで溶出させた。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、約2mLに定容してからエチル誘導体化を行った[13]。

5) エチル誘導体化およびGC-MS試験溶液の調製

試験溶液に2mol/L酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液5mLを加えた後、5% NaBEt₄溶液を1mL加えて10分間振とうしてエチル誘導体化した。誘導体化後、*n*-ヘキサン20mLを加えて30分間振とう抽出し、遠心分離して上清を採取した。さらに、5%ジエチルエーテル含有*n*-ヘキサン溶液6mLで溶出した。その後、得られた溶液をロータリーエバポレーターで約1mLまで濃縮した後、サロゲート物質の回収率評価としてTeBT-d₃₆を10µg/mL含む*n*-ヘキサン溶液を100µLに加え、全体を*n*-ヘキサンで5mLに定容し、その溶液の一部をGC-MSにて測定した[13]。

6) 検量線

各濃度の検量線用標準溶液1mLに10µg/mLのサロゲート混合溶液(繊維および水性接着剤試料ではアセトン溶液、油性塗料試料では*n*-ヘキサン溶液)を100µLに加え、エチル誘導体化を行った。但し、誘導体化以降の操作はフロリジルカラムによる精製を省いた。このとき、検量線範囲は注入時濃度として0.01~2µg/mLとなり、各サロゲート物質及びTeBT-d₃₆濃度は0.2µg/mLとなる。定量は各サロゲート物質を内部標準物質とし、内部標準法で検量線を作成した。その際、検量線の理論値と検出値との乖離度がいずれの濃度においても20%以下となるように、必要に応じて濃度の逆数あるいは濃度の逆数の2乗による重みづけをした直線性のある検量線によって定量した。また、定量限界値は標準偏差の10倍[12, 14, 15]あるいは検量線下限値より、TBTは0.05µg/g、TPPTは0.012µg/gとした。

また、サロゲート物質の回収率を確認するため、TeBT-d₃₆に対する各サロゲート物質の検量線でのピーク面積と試料から得られたピーク面積の比を別途求めた。

7) GC-MS分析条件

アジレント製のガスクロマトグラフHP6890GCに、質量分析計HP5973MSを装備したものをを用い、カラムにはHP-5MS(5%フェニルメチルシリコンがコーティングされた溶融シリカキャピラリーカラム(30m×0.25mm膜厚0.25µm))を使用した。キャリアーガスにヘリウムを用い、1.0mL/minの定流量とした。注入口、トランスファーライン及びイオンソース温度は、それぞれ270℃、280及び230℃とし、スプリットレスモードにより、1µLを注入した。カラムオーブンは、初期温度60℃で2分間保持した後、130℃まで20℃/分で昇温した。その後、210℃まで10℃/分で昇温、続いて260℃まで5℃/分で昇温の後、最終温度300℃まで10℃/分で昇温して10分間保持した。イオン化法は、電子イオン化(Electron Ionization: EI)法を用い、イオン化電圧70eV、選択イオン検出(Selected Ion Monitoring: SIM)モードによる測定を行った[13]。

各測定対象有機錫化合物の定量・定性イオンは、TBT(263, 261)、TBT-d₂₇(318, 316)、TPPT(351, 349)、TPPT-d₁₅(366, 364)、TeBT-d₃₆(318, 316)とした[13]。

そのほかにモニターした有機錫化合物の定量・定性イオンは、モノブチル錫(MBT(235, 233))、MBT-d₉(244, 242)、ジブチル錫(DBT(261, 263))、DBT-d₁₈(281, 279)、モノフェニル錫(MPT(255, 253))、MPT-d₅(260, 258)、DPT(303, 301)、DPT-d₁₀(313, 311)、TeBT(291, 289)であった。

III 結果

1) 配布試料の分析結果

国立衛研で作成した繊維製品、水性接着剤、油性塗料の試料は、TPPTおよびTBT含有量を測定してから各機関に配布された。国立衛研で試料作製直後に測定した結果を既報[13]より引用してTable 1に示した。繊維および油性塗料のTPPTの分析値は8.4µg/g(変動係数(CV値)3.0%)および7.6µg/g(CV値0.53%)とやや低い値を示したものの、おおむね設定濃度に一致した。また、TBTのCV値は、水性接着剤において、低い濃度0.1µg/gから順に、5.2%、9.0%、13%とやや高めとなり、繊維製品の10µg/gで7.8%であったが、そのほかは2.7%以下であった。TPPTでは油性塗料の1.0µg/gでCV値が5.0%を示したが、そのほかは3.7%以下となり、均一性に問題のない試料が配布された[13]。その試料を用いて、6機関によるラウンドロビンテストを実施し、改定分析法は、測定値の室間誤差が小さいことから、試験の有効性が確認された[13]。当所が行った繊維製品、水性接着剤および油性塗料のそれぞれ0.1、1.0、10µg/gの既知量のTPPTおよびTBTを含有する試料について3試行によるGC-MS分析の結果をTable 1に示した。当所のTBTにおけるCV値は、0.1µg/gの低濃度の試料では、15~19%と

Table 1 Contents of Organotin Compounds in Each Sample measured in our laboratory

Setting concentration	Textile			Water-based adhesive			Oil-based paint			
	TBT	DPT ^a	TPT+DPT ^b	TBT	TPT	DPT ^a	TPT+DPT ^b	TBT	TPT	DPT ^a
0.1 µg/g	Initial ^f	(0.1)	—	—	(0.13)	—	—	(0.14)	(0.15)	—
	Average	(0.079)	0.10	—	(0.12)	—	—	(0.17)	(0.039)	ND
	CV	(19)	0.12	—	(0.091)	ND	—	(15)	(4.0)	—
1.0 µg/g	Ratio to Initial	%	66	17	—	130	76	92	120	26
	Initial ^f	(0.98)	—	—	(1.1)	—	—	(1.0)	(1.1)	—
	Average	(0.85)	0.35	—	(1.0)	0.13	—	(1.0)	(0.21)	ND
10 µg/g	Ratio to Initial	%	87	39	—	84	91	90	100	19
	Initial ^f	(10)	—	—	(13)	—	—	(9.9)	(7.6)	—
	Average	(11)	2.4	—	(9.9)	0.57	—	(10)	(1.5)	ND
Ratio to Initial	%	(3.2)	5.2	—	(1.4)	—	(1.0)	(1.9)	(9.9)	—
Ratio to Initial	%	110	67	—	99	83	—	100	20	—

CV : Coefficients of Variation (%)

TBT : tributyltin, TPT : triphenyltin, DPT : diphenyltin

() : The contents (µg/g) of TPT and TBT in each sample were derived from the paper of Kawakami et al. [13]

a : The analytical value was corrected by deuterated organotin compounds used as surrogate standards.

b : The analytical value was corrected by tributyltin (TeBT) -d₃₆ used as the internal standard.

c : Ratios of TPT+DPT to the initial contents of TPT were calculated after conversion of each concentration to the corresponding molar value.

d : The analytical value by National Institute of Health Sciences at the time of sample preparation.

ND < limit of quantitation (TBT: 0.05, TPT: 0.012, DPT: 0.1 µg/g) (n=3)

なり若干ばらついたが、そのほかの濃度では 0.75～7.8% となり良好な精度が得られた。TPT における CV 値は、1.0 µg/g の繊維製品で 13% となった他は、いずれの試料も 0.35～9.9% となり良好な精度が得られた。

次に、TBT を定量した結果 (Table 1) をみると、繊維製品 (0.1 µg/g) では 0.079 µg/g 検出されたが、配布前の定量値 (0.12 µg/g) と比較すると、やや低めの 66% となった。同様に油性塗料 (0.1 µg/g) の TBT は 0.17 µg/g 検出されたが、配布前の定量値 (0.14 µg/g) と比較すると 120% に相当した。TBT では本分析法を用いて回収率は 66～120% 得られ、おおむね良好に分析できることを確認した。

その一方で、TPT を分析した結果をみると、Table 1 に示すように、水性接着剤は配布前の試料と比べてほぼ同じ (83～92%) 定量値を示したが、繊維製品および油性塗料では配布前に比べて大きく減少した。繊維製品の TPT 含有量は配布前の値と比べると 0.017 µg/g (17%)～5.6 µg/g (67%) と著しく減少し、油性塗料でも配布前の値と比べ 19～26% と大きく減少した。国立衛研以外のどの機関でも、繊維製品および油性塗料中の TPT 含有量が低く測定される結果となった。当所では、国立衛研から試料の配布後、5 ヶ月経ってから分析を行ったことから、TPT の分解が示唆される結果となった。

2) サロゲート回収率

繊維および油性塗料試料の TPT 濃度が、試料配布前の濃度に比べ大幅に低下する傾向がみられ、特に油性塗料で顕著なことから、分析操作中のサロゲート物質の挙動について調べた [13]。当所のデータについて、検量線作成時のサロゲート物質と TeBT-d₃₆ との面積比に対する試料中のそれらの面積比からサロゲート回収率を求めた。油性塗料は試験溶液の半分量について分析検討したことから、得られた回収率を 2 倍して最大 100% 回収率に補正し、サロゲート回収率を求めた。その結果、TBT はどの試料についても 92～106% の回収率であった。また、TPT は、繊維製品では 76～80%、水性接着剤では 90～97%、油性塗料では 108～120% を示した [13]。いずれも試験法の妥当性を評価する上で必要なサロゲート回収率 40% 以上 [16] をクリアしており、良好に分析できたことを確認した。

IV 考察

1) TPT の分解産物の検討

TPT は、紫外線、化学的、温度の影響による錫-炭素結合の開裂によって徐々に進む脱フェニル化 [17, 18] によって DPT に分解され、さらに脱フェニルしてモノフェニル錫 (MPT) へと分解されることが報告されている [2, 19]。そこで、配布前に比べ TPT 濃度が低く検出された繊維製品および油性塗料について、分析対象とした TPT および TBT だけでなく、そのほかの有機錫化合物

物についてもモニターしたところ、繊維製品から保持時間 15.71 分にジフェニル錫 (DPT) のピークが顕著に検出された [13] (Fig. 1)。一方、繊維製品と同様に TPT の分解が示唆された油性塗料からは、DPT は検出されなかった。これは、河上ら [13] が示すように油性塗料ではエチル誘導体化前にシリカゲルカラムによる精製を行っており、より極性の高い DPT はシリカゲルに吸着されたと考えられる。また、MPT については、繊維製品の 1.0、10 µg/g の試料のすべて、水性接着剤の 10 µg/g の試料の 3 試行のうち 2 試行から、そのピークが確認されたが、検出されたピークは小さく、ごく微量と考えられた。

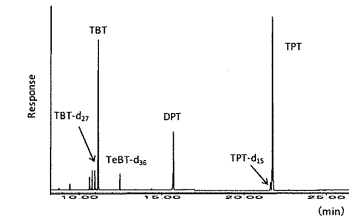


Fig. 1 GC-MS chromatogram obtained from the textile (added amount: 10 µg/g of TPT and TBT)

TBT : tributyltin (m/z 263, 261), TPT : triphenyltin (m/z 351, 349), DPT : diphenyltin (m/z 303, 301), TBT-d₂₇ (m/z 318, 316), TPT-d₁₅ (m/z 366, 364), TeBT-d₃₆ : tetrabutyltin-d₂₇ (m/z 318, 316)

2) 試料中の TPT 分解物の定量的評価

繊維製品から DPT が検出されたことから、すべての試料中の DPT 含有量を、回収率確認用の TeBT-d₃₆ を内部標準として 0.02～2.0 µg/ml の 4 点検量線を作成し定量した。DPT の定量結果と試料配布時の TPT 含有量に対する割合を Table 1 に示した。その結果、繊維製品 (0.1 µg/g) では、TPT は減少し、そのほとんどは DPT として検出されること、さらに 1.0 および 10 µg/g の試料から DPT は、それぞれ 0.35 および 2.4 µg/g 検出され、脱フェニルが進んでいることが明らかになった。また、水性接着剤の 1.0、10 µg/g の試料からも DPT は、それぞれ 0.13 および 0.57 µg/g 検出された。

ここで、MPT についてはその存在量がわずかであることから無視できるものとして、検出された DPT および TPT をそれぞれ 1 g 当たりのモル数に換算してから合計し、その量を配布時の TPT 量を同様に換算して求めた量と比較した。繊維製品および水性接着剤中の DPT と TPT の合計量は、それぞれ配布時の TPT 量の 84～130% および 89～110% となり、元の TPT 量にほぼ一致した (Table 1)。このことにより、ラウンドロビンテストで用いた繊維製品および水性接着剤中の TPT 量の大幅な減少の原因が、TPT の脱フェニル分解による DPT の生成であることが定量的に確認された。

V まとめ

国立衛研が中心となって開発したTPPTおよびTBT改定試験法の妥当性を評価するため、配布された繊維製品、水性接着剤及び油性塗料のTPPTおよびTBTを既知濃度(0.1、1.0、10 µg/g)含む同一試料を、当所を含む6機関で分析するラウンドロビンテストが実施された[13]。当所の結果は、TBTは既知濃度の66-120%でおおむね良好に分析することができたが、繊維製品中のTPPT濃度は、国立衛研で測定された値よりも低く検出される結果となった。この傾向は他の機関でも同じであった。当所で、TPPT及びTBT以外の有機錫化合物についてモニターした結果、繊維製品および水性接着剤中にDPTおよび微量のMPTの存在を確認した。そこで、DPTについて定量を行い、検出されたDPTおよびTPPTをそれぞれ1g当たりのモル数に換算してから合計し、その量を配布時のTPPT量を同様に換算して求めた量と比較した。その結果、両者はほぼ一致した。このことからラウンドロビンテストでみられたTPPT濃度の低下が、TPPTの脱フェニル分解によるDPTの生成であることを定量的に把握することができた。ただし、油性塗料からはDPTが検出されず、エチル誘導体化以前のシロカゲルカラム処理でDPTが吸着されたためと考えられた。家庭用品試料試験は、試料後、速やかに分析することが望ましく、DPTが検出される際にはTPPTが使用されている可能性を考慮する必要があるものと思われる。

謝辞 試料中のTPPT分解の可能性についてご指摘いただきました大阪府立公衆衛生研究所 中島晴信博士、吉田 仁研究員に感謝いたします。

参考文献

- 1) WHO. Tributyltin compounds, in Environmental Health Criteria 116: WHO; Geneva: 1990. p36-64.
- 2) Evans S M, Leksono T, and Mckinnell P D. Tributyltin pollution, a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. Mar. Pollut. Bull 1995; 30: 14-21.
- 3) Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Yamazaki S, and Morita M. Imposex in Japanese gastropods (Neogastropoda and Mesogastropoda), Effects of tributyltin and triphenyltin from anti-fouling paints. Mar. Pollut. Bull 1995; 31: 402-405.
- 4) IPCS, Concise International Chemical Assessment Document No.14 Tributyltin Oxide (TBTO) (1999), <http://www.nihs.go.jp/hse/cicad/full/no14/full14.pdf>, (2011/9/21)
- 5) 化学物質の審査および製造等の規制に関する法律, 昭和48年法律第117号, 1973
- 6) 特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管

理の改善の促進に関する法律 (PRTR法), 平成11年法律第86号, 1999

- 7) スズ化合物環境技術協議会, 環境動向, IV 有機スズ化合物に関する規制動向, <http://www.tera.jp/~environment.htm>, (2012/1/30)
- 8) 厚生省, 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則, 昭和49年9月26日, 厚生省令第34号, 1974
- 9) 家庭用品安全対策研究会. 保健衛生安全基準家庭用品規制関係実務便覧. 東京: 第一法規出版; 1975. pp2045の24-40.
- 10) 中島晴信, 松永一朗, 谷直子. 家庭用品中の有機スズ化合物の分析法について. 大阪府立公衆衛生研究所報, 労働衛生編 1981; 19: 45-49.
- 11) 小嶋茂雄, 中村兎忠, 鹿庭正昭. 水性塗料中のトリブチル錫ならびにトリフェニル錫の分析. 衛生化学 1979; 25: 141-146.
- 12) 河上強志, 伊佐間和郎, 中島晴信, 大嶋智子, 土屋利江, 松岡厚子. ガスクロマトグラフィー質量分析計による水性塗料及び水性接着剤中の有機スズ化合物の分析. 薬学雑誌 2010; 130: 223-235.
- 13) 河上強志, 伊佐間和郎, 中島晴信, 吉田 仁, 大嶋智子, 大野浩之他. 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律(有害物質含有家庭用品規制法)におけるトリフェニル錫化合物(TPPT)及びトリブチル錫化合物(TBT)の試験法改定にかかわる検討. 薬学雑誌 2012; 132: 1197-1208.
- 14) 環境省, 要調査項目等調査マニュアル(水質, 底質, 水生生物), II 分析精度管理, 平成14年3月環境省水環境部, <http://www.env.go.jp/water/chosa/h14-03/2.pdf>, (2012/9/24)
- 15) 化学物質やその環境リスクに関する詳細情報, 化学物質アドバイザー別冊テキスト, 分析化学, <http://www.env.go.jp/chemi/communication/taiva/text/bunseki1.pdf>, (2012/9/24)
- 16) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品等に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について. 食安発 1224第1号, 平成22年12月24日, 2010
- 17) IPCS, Concise International Chemical Assessment Document No.13 Triphenyltin Compound (1999), <http://www.nihs.go.jp/hse/cicad/full/no13/full13.pdf>, (2012/7/23)
- 18) 山本貴士, 小原 敦, 野馬幸生, 西澤克志, 安原昭夫, 酒井伸一. テトラフェニル錫の光分解挙動. 第12回環境化学討論会講演要旨集 2003
- 19) 大嶋智子, 尾崎麻子, 中島晴信, 伊佐間和郎, 土屋利江. ポリ乳酸プラスチック中の有機スズ化合物の分析. 阪市環科研報2009; 71: 21-25.

防カビ剤として用いられたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎

河上 強志¹⁾, 伊佐間和郎¹⁾, 松岡 厚子¹⁾, 西村 哲治¹⁾

要 旨

フマル酸ジメチル (Dimethyl fumarate : DMF) は古くから防カビ剤として使用されていたが、欧州連合 (以下 EU) 圏内で家具や革製品, 靴等に用いられていた DMF による接触皮膚炎が相次ぐようになった。そこで, 2009年5月1日から EU 圏内では DMF を含有する製品の流通および販売が禁止された (含有濃度 0.1 mg/kg 以下)。DMF はパッチテストでは 0.0001% 水溶液で陽性反応が認められ, その接触皮膚炎症状も時に重篤で治療に時間が必要な事例も報告されている。また, DMF と類似構造をもつその他のフマル酸, マレイン酸およびアクリル酸エステル等との交叉反応性も認められている。EU 圏内では規制後, 違反件数は減少してきており, 規制の効果が認められる。わが国では, これまでに DMF による接触皮膚炎の報告はないが, 家庭用品の実態調査では DMF が履物等から検出されている。そのため, 今後も DMF による接触皮膚炎に対して注意が必要と考えられる。

(J Environ Dermatol Cutan Allergol. 6 (4) : 339-350. 2012)

キーワード : フマル酸ジメチル, 防カビ剤, 革製品, 靴, 接触皮膚炎

はじめに

欧州連合 (以下 EU) 圏内で輸入品の家具や革製品, 靴等に防カビ剤として用いられていた DMF による接触皮膚炎の事例報告が相次ぎ, EU では 2009年5月1日から DMF を含有する製品の流通および販売を禁止した。本稿では, EU 圏内における DMF による接触皮膚炎の発生状況および規制までの経緯とともに, 規制後の DMF 含有製品の違反状況の推移について概説する。さらに, われわれが行ったわが国における DMF 含有製品の实態調査について紹介する。

フマル酸ジメチルについて

DMF は常温で白色結晶, 昇華性を有する物質である。DMF は古くから防カビ効果があることが知られており, たとえばバン¹⁾ やベーコン²⁾ のような食品などに用いられてきた。また, 大腸菌の増殖抑

制効果も報告されている³⁾。それ以外にも, 乾癬の治療に効果があることが知られ, DMF を主成分とし, さらにモノエチルフマル酸塩を混合した腸溶錠剤の経口薬として 1994 年にドイツで医薬品登録 (Fumaderm[®]) されている^{4,5)}。

一方で, DMF およびフマル酸モノエチル (MEF) が乾癬患者の健常な皮膚に接触した際に, 痒疹性の紅斑丘疹が乾癬部位の周囲に生じること⁶⁾ や, DMF を含有するカプセルを作製している製剤技術者の顔や腕に, 痒疹性の紅斑が生じること⁷⁾ が報告されている。そして, de Haan らはフマル酸, MEF および DMF について, ヒト皮膚ガン由来細胞 A431 を用いた細胞毒性試験およびモルモットを用いた皮膚刺激性試験, 非アレルギー性接触蕁麻疹 (NICU : Non Immunological Contact Urticaria) 試験, 皮膚感作性試験 (マキシミゼーションテスト) を実施した⁸⁾。その結果, DMF は比較的強い細胞毒性 (LD₅₀ 5.04 µg/ml) を示し, さらに NICU や

¹⁾ 国立医薬品食品衛生研究所

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

連絡先: 河上 強志

掲載決定日: 2012年2月28日

アレルギー性接触皮膚炎 (ACD : Allergic Contact Dermatitis) を引き起こす可能性があることが明らかにされた。

EU における規制にいたる経緯

2006 年夏ごろから、フィンランドおよびイギリスを中心とした EU 圏内で、家具に起因すると考えられる原因不明の皮膚炎の報告が相次ぐようになった⁹⁾。

Williams らは、イギリス国内で約 200 事例の症状の類似した皮膚炎が起きていると述べており、そのうちの 20 事例について詳細に報告している⁹⁾。患者らは、胴、手足、臀部および顔に紅斑や水疱を伴う皮膚炎を生じており、そのうちの数名はステロイド剤の塗布では改善せず、経口ステロイド剤の投与、入院などが必要であった。そこに共通していたのは、新しい家具を購入してから接触皮膚炎を発症していることであった。そこで、European Standard の繊維・染料・樹脂・靴シリーズ、患者が使用していたソファの生地の一部を用いてパッチテストを行った結果、ソファ生地のみ陽性となった。これらの患者が購入していた家具がいずれも中国広東省の Linkwise Furniture Company Ltd. 製であったことから、Williams らは原因特定のために同社に問い合わせをしたが、有効な回答は得られなかった。そのため、彼らはこの時点では原因物質までは特定することができず、同様の症例が相次いでいるフィンランドと協力して原因究明を進めていった。

イギリスでは、革のスーツ (中国南部で生産) を着用した女性 2 名 (36 歳および 65 歳) に、腿の後ろや臀部、背中に湿疹などの症状が認められた¹⁰⁾。このうち、36 歳女性はステロイド剤の塗布だけでは改善せず、入院を必要とした。この症例でも、スーツに用いた革の製造元 Dongguan Barton Leather Co. (Linkwise 社の卸元) に問い合わせを行ったが、やはり有効な回答は得られなかった。

フィンランドでは、Rantanen が家具による接触皮膚炎を発症した男性 2 名、女性 3 名について、ヘッドスペース (HS)-ガスクロマトグラフ (GC)/質量分析計 (MS) を用いてソファの革中の化学物質を測定し、パッチテスト結果と合わせて原因物質を検討した¹¹⁾。その結果、DMF が肌に触れる革の表面から検出され、かつパッチテスト陽性であったことから、この接触皮膚炎の原因が DMF であると特定した。DMF は防カビ剤として、ソファ内部から小袋に詰められた状態で見つかっており、ソファ

内部で DMF が昇華し、革の表面に吸着・濃縮された結果、接触皮膚炎を生じたと考えられている。

これまで、多くの患者に対してさまざまなパッチテストシリーズ (染料、革、接着剤、プラスチック等) が試されてきたが、DMF はいずれのパッチテストシリーズにも含まれていなかったことから、その原因究明が遅れ、感染症と誤診されて抗生物質を投与されたり、リンパ腫と誤診されたりしてきた¹²⁾。しかし、Rantanen の報告以降は、家具等に由来する接触皮膚炎の原因として DMF が認知されるようになった。ただし、その後も、スイスにおける S 字結腸癌手術経験者のように、投薬による薬疹が疑われ、DMF による接触皮膚炎と診断されるのに時間がかかった事例もある¹³⁾。

その後、DMF による接触皮膚炎の報告は、イギリスやフィンランドのみならず、EU 各国で報告されるようになった。たとえば、スペインでは中国製の肘掛椅子を使用していた夫婦に生じた接触皮膚炎の原因は当初不明であったが、後に DMF と特定され¹⁴⁾、女性 15 名および子供 2 名の足に生じた皮膚炎では、靴やブーツの箱のなかに入れられていた乾燥剤のシリカゲル入り小袋と一緒に詰められていた DMF が、製品中へ移行したものと考えられた¹⁵⁾。イタリアでは、職場で支給された作業着を着用した 40 歳男性が、腿や臀部などに、作業着に残留していた DMF によると考えられる湿疹を生じた¹⁶⁾。ポルトガルでは、DMF 入りの小袋が同封されていた靴やブーツによって DMF による接触皮膚炎が引き起こされている^{17,18)}。さらに、同様の事例がフランス¹⁹⁻²¹⁾やアイルランド²²⁾などでも報告されるようになった。これまでに報告されているおもな症例をまとめ、Table 1 に示した。

EU では、防カビ剤として DMF の認可はなかったが、DMF を含有する製品の流通・販売に関する規制もなかった。そこで EU では、2009 年 5 月 1 日から DMF を含有する製品の流通・販売を禁止した (EU Directive 2009/251/EC)²⁰⁾。その規制値は、症例報告においてパッチテスト陽性になった最低濃度 (1 mg/kg)¹¹⁾ から、さらに安全係数を 10 とし、0.1 mg/kg 以下と定められた²³⁾。

感作期間、症状の特徴および感作・惹起濃度と治療法

Williams らは、家具に起因する原因不明の接触皮膚炎について、前述のように接触皮膚炎を発症する 3 週間から 9 ヶ月前に新しく家具を購入したと報

Table 1 : Principal case reports of contact dermatitis caused by DMF

Country	Causative product	Number of patients	Clinical history	Lesion site (symptoms)	Duration of use	Concentration of DMF in the sample	Reference
UK	Furniture	20	—	Trunk, limbs, buttocks, thighs, lower back, face (some patients required hospitalization, and some of the patients who used recliners developed facial eruptions)	3 weeks to 9 months	—	Williams, et al. ⁹⁾
UK	Leather suit (Made in China)	2 (patient 1 : 65-year-old woman, patient 2 : 35-year-old woman)	Patient 1 : eczema on her leg (as a teenager), patient 2 : chronic plaque psoriasis	Patient 1 : posterior thighs and buttocks (eczema), patient 2 : back and leg (acute itchy rash, different from psoriasis)	Patient 1 : 4 days, patient 2 : 1 week	—	Darné, et al. ¹⁰⁾
Finland	Sofa and chair	5 (2 men and 3 women, aged 32-53 years)	—	Back, buttocks, posterolateral aspects of thighs, arm (skin sites in contact with sofa or chair)	Few weeks	470 µg/kg (in chair, maximum)	Rantanen ¹¹⁾
Switzerland	Sofa	1 (65-year-old man)	Surgery of sigmoid colon cancer, no history of atopy	Buttocks and back (itchy maculopapular rash and eczema)	—	—	Schad, et al. ¹³⁾
Spain	Armchair	2 (a married couple : one 45-year-old man and one 43-year-old woman)	Husband : no previous history of allergy and skin disease, wife : intolerance to metals, recurrent respiratory symptoms	Both patients : back and buttocks (Dermatitis in both patients. The female patient experienced respiratory symptoms)	15 days	—	Mercader, et al. ¹⁴⁾
Spain	Shoes, boots	15 adults (women : 33-74 years), 2 children (9 month-old girl and 17 month-old boy)	2 patients had a history of contact allergy	Adults (ACD : acute contact dermatitis, ICD : irritant contact dermatitis), children (NICU : non-immunological contact urticaria)	—	3-95 mg/kg (plastic part : 90 mg/kg, textile part : 8.4 mg/kg)	Giménez-Armau, et al. ¹⁵⁾
Italy	Work suit	1 (40-year-old man)	No previous history of atopy	Thighs, buttocks, scrotum, inguinal folds (eczema)	3 weeks	Not quantified (only qualification)	Foti, et al. ¹⁶⁾

— not described

Table 1 : Principal case reports of contact dermatitis caused by DMF (continued)

Country	Causative product	Number of patients	Clinical history	Lesion site (symptoms)	Duration of use	Concentration of DMF in the sample	Reference
Portugal	Boots, short boots	1 (62-year-old woman)	No previous history of allergy	Boots (first dermatitis) : ankles, heel (erythema, desquamation, itching), short boots (dermatitis relapsed); ankles, pruritic bullae on erythematous plaque	—	1.3-640 mg/kg	Fraga, et al. ¹⁷⁾
Portugal	Leather boots (patient 1), plastic shoes (patient 2)	2 (patient 1 : 19-year-old woman, patient 2 : 41-year-old woman)	No previous history of atopy, contact allergy, or other skin diseases	Patient 1 : bilateral acute dermatitis (dorsal aspects of the feet and ankles); patient 2 : acute inflammatory dermatitis (both feet)	—	—	Santiago, et al. ¹⁸⁾
France	Boots, shoes, armchair	6 (5 women, aged 17-51 years, and 61-year-old man, of which the case of 36-year-old woman was taken as a representative case)	36-year-old woman : no previous history of allergy 36-year-old woman was taken as a representative case	36-year-old woman : feet (blistering, eczema), other patients : blistering, eczema, dermatitis	36-year-old woman : 2 days, other patients : 8 hours to 8 days	1-100% (in the sachets), 20-2000µg/g (in the products)	Lagarce, et al. ²¹⁾
Ireland	Sofa	1 (43-year-old woman)	Asthma and allergic rhinitis	Buttocks, lateral thighs, lower back (itchy rash, lichenified erythematous plaque)	4 weeks	—	Lynch and Collins ²²⁾
Italy	Shoes	1 (35-year-old woman)	—	Feet (itching, pain, redness, blistering, bullous eczema)	8 hours	595 mg/kg (shoes upper), 171 mg/kg (shoes sole)	Davanzo, et al. ²³⁾
Spain	Leather sofa	1 (49-year-old man)	No personal and family history of vitiligo or other autoimmune disease	Thighs, back, buttocks, arms (pruritic erythematous dermatitis), after the resolution : depigmentation [Contact leucoderma] (the area of pre-existing dermatitis)	6 months	—	Vives, et al. ²⁷⁾

* - not described

告している⁹⁾。また、中国製の肘掛椅子による事例では、患者夫婦は発症する15日前に椅子を購入している¹⁰⁾。革スーツによる事例では、65歳女性が該当製品を購入後4日、36歳女性では1週間後に接触皮膚炎症状が現れている¹⁰⁾。この症例では、65歳女性は10代のときに湿疹症状を経験し、36歳女性は長期間にわたり乾癬の治療を受けていた。また、革スーツは家具類よりも直接肌に触れる可能性が高いことから、発症するまでの期間が短くなったと考えられている。一方でイタリアでは、35歳女性がDMFを含有していた中国製の靴を履いて、8時間後から痒みが生じ、その次の日には痒みや痛みが増加し、足の皮膚が赤くなった²⁰⁾。フランスでも8時間後や11時間後に発症した患者が存在し²¹⁾、これらのことから、DMFに対して感受性の高い患者では数時間で、それ以外の患者ではおおむね数日から数ヶ月でDMFに感作され、接触皮膚炎症状が出現すると考えられる。

DMFによる接触皮膚炎症状が発症する部位としては、DMFを含有する製品と接触するところを中心としており、家具類では背中、腿、臀部など、靴では足首、かかとなどに痒痒性の水疱や紅斑が発生している。Toledoらに、靴に含まれるDMFによる8名の接触皮膚炎患者について、足の部位別の症状と靴の部位別のDMF濃度分布との関連性を調べた²⁵⁾。その結果、足の甲で症状が重く、靴の甲革部分でDMF濃度も高いことから、靴に含まれるDMFの分布が症状の強さに関連していた。また、家具類ではリクライニングを使用して顔に紅斑が生じた事例⁹⁾や、軽い喘息様症状を訴えた事例¹⁰⁾もあった。このことは、DMFを含有する製品に直接接触して暴露されただけでなく、当該製品から揮散したDMFに暴露された可能性が考えられた。

アイルランドでは、43歳の女性が、ソファ購入後4週間で臀部や背中下方に発疹を生じた。しかし、2年間原因が特定されず、そのためDMFに継続的に暴露された²²⁾。この患者の場合、ソファに直接触れないようにしたり、外出したりする(当該製品を避ける)ことにより症状が改善したが、帰宅すると再発するといった現象が観察されていた。そのため、症状に合わせてステロイド剤の塗布や皮膚軟化剤が処方されていたが、接触皮膚炎症状が長期間にわたったため、苔癬化が生じていた。

Gimenez-Arnauらは、スペインで報告された乳幼児2名を含む17名の靴による接触皮膚炎事例について報告している²³⁾。当該製品を使用後すぐに痒

痒性の小水疱を伴う紅斑を生じ、その後皮膚の落屑が認められた8名の成人患者については、刺激性接触皮膚炎(ICD : Irritant Contact Dermatitis)と診断された。また、それ以外の7名の成人患者については、製品の使用後にすぐに刺激を感じることでなく接触皮膚炎を発症していること、当該製品の繰り返し使用に伴う小疱性の紅斑が認められることに加え、皮膚の生検観察からACDと診断された。また、乳幼児2名については、接触蕁麻疹および血管浮腫が認められたが、オープンおよびクロースドパッチテストの結果は陰性であったことから、NICUと診断された。乳幼児については、免疫系の発達が未熟なためと考えられている。

感作および惹起濃度については、Rantanenは15名の健常者を用いてパッチテストを行ったところ、2名の被験者についてDMF濃度0.01%で刺激性が認められ、すでにDMFに感作されている患者ではDMF濃度が0.001%から陽性反応が観察され、前述のように0.0001%でも陽性反応を示す患者が存在した¹¹⁾。Lammintaustaらが37人の患者にパッチテストを行ったところ、そのうちの21人は0.01%で++ (ICDRG基準 : 陽性、紅斑+浸潤+丘疹+小水疱)またはそれ以上、0.0001%でも2人の患者が+ (同 : 紅斑+浸潤、丘疹)、1人が+? (同 : 紅斑のみ)と判定された²⁵⁾。また、中国製の肘掛椅子中のDMFによる皮膚炎患者の場合でも、パッチテスト開始後96時間以内に0.001%で陽性と判定されている¹⁰⁾。ポルトガルでの合成樹脂製の靴による事例では、患者の女性は0.1%のパッチテスト濃度で2~3日で陽性反応が認められ、1ヵ月後に再試験を実施したところ、0.001%でも陽性反応が認められている¹⁷⁾。このように、DMFは低濃度で感作・惹起されることから注意が必要である。そのためRantanenは、パッチテストを行う際に、パッチ濃度が高いと患者への負担が大きくなることから予想されるため、低濃度(上限 : 0.003~0.005%)でのパッチテストが望ましいと提案している¹¹⁾。

患者に対する治療は、DMFを含有する製品を使用しない、または避けるといった処置に加えて、ステロイド剤を塗布することで、おおむね症状は数日から数週間で改善している。しかし、一部には重篤な症状を示した事例もある。たとえば、フィンランドのある女性患者の場合には、広範囲に紅斑が広がり、ステロイド系抗炎症薬のプレドニゾロンで症状を緩和させたのち、免疫抑制剤シクロスポリンを投与し、6週間で回復にいたっている¹¹⁾。また、イギ

リスでも入院が必要となった患者が存在している³⁰⁾。前述の8時間で症状が現れ始めたイタリア人女性の場合³⁰⁾では、当初は一般医によりコルチゾン塗布された。しかし、その後、重篤な水疱が生じたために、病院にて15日間にわたりスルファジアジンおよびゲンタマイシンを塗布しながらアモキシシリンの経口投与を行った。そして、症状開始から20日後でも、皮膚炎により患部は赤く乾燥し知覚過敏な状態であった。また、スペインでは49歳の男性がソファ購入後6ヵ月で接触皮膚炎を発症し、プレドニゾロンの経口投与とソファへの接触を避けることで症状は回復した。しかし、回復後4週間で接触皮膚炎を生じていた患部が白斑(Leucoderma)化し、メラノサイトの消失が生検で認められた³¹⁾。この患者は、その後2年経過しても白斑化した部位は回復していない。

交叉反応性

DMFのシス-トランス異性体であるマレイン酸ジメチル(DMM: Dimethyl maleate)は、酢酸ビニルポリマー、塗料、接着剤、医薬品および農薬の製造中間体・添加剤として、また、ステレンまたは塩化ビニルポリマーのガラス転移温度を上昇させるための内部改質剤などとして、さまざまな化学工業で利用されている³²⁾。また、エチル基やブチル基が結合しているフマル酸ジエチル(DEF: Diethyl fumarate)およびフマル酸ジブチル(DBF: Dibutyl fumarate)や、そのシス-トランス異性体であるマレイン酸ジエチル(DEM: Diethyl maleate)およびマレイン酸ジブチル(DBM: Dibutyl maleate)、アクリル酸エステル類などは、DMFに構造が類似している化合物である(Fig. 1)。これらについて、それら自身の皮膚刺激性および皮膚感作性、DMFとの交叉反応性が報告されている。

イギリスでは、化学系の大学生が有機合成反応の実験を行っていたところ、手背および顔に痒みを伴う紅斑を生じ、パッチテストの結果、実験に用いていたDEFによるNICUであると判明した³³⁾。また、ヒトおよびモルモットを用いた試験でも、DEFはNICUを引き起こすことが確認されている³⁴⁾。さらに、有機合成実験に従事していたスウェーデンの男性の場合には、実験中にDMMをおもにも含む溶液に誤って暴露し、手や腕に水疱と紅斑が生じた³⁵⁾。症状が改善後、実験に復帰して再度発症した。パッチテストの結果、試薬に含まれるDEF、DEMおよびDMMによるACDと診断された。この症例で

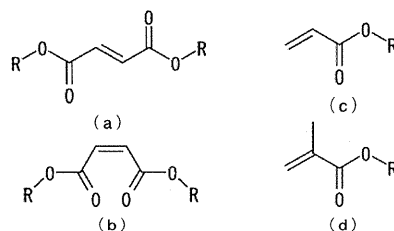


Fig. 1: Chemical structures of fumaric acid diesters (a) and related compounds (b); maleic acid diesters, c; acrylic acid esters, d; methacrylic acid esters (R represents an alkyl group)

は、DEFが最も感作濃度が低く、0.00001%水溶液でもパッチテスト陽性であった。DBMについても、接着剤中に含まれていたDBMによる職業性接触皮膚炎³⁶⁾、化学工場に働いていた女性が手首や腕に紅斑を生じた事例³⁷⁾が報告されている。

一方、前述のモルモットを用いたDMFの接触性麻疹に関する報告では、DMF感作後のモルモットはMEFに交叉反応性を示すことも明らかにされている³⁸⁾。

Lammintaustaらは、DMFに感作されている患者37人中33人が0.12%のDEFに対し陽性と判定され、残り4人のうち2人も+?と判定されたと報告している³⁹⁾。彼らは、さらに同じ患者群に対して、DMM、DEMおよびアクリル酸類についても交叉反応性を検討し、その結果DEMでは37人中21人、DMMでは試験した9人中9人すべてが陽性と判定された。また、アクリル酸類についてはアクリル酸エチルで37人中13人が陽性、1人が+?、アクリル酸メチルで37人中7人が陽性、1人が+?、そして両方に陽性であった患者のうち2人がメタクリル酸メチルに陽性であったと報告されている。

このように、DMFに感作された患者の多くは、化学構造が類似した化合物に交叉反応性を示していることから、DMFのみならずその類縁化合物に対する注意も必要であると考えられる。

試料中DMFの分析法

EU指令ではDMFの分析法は規定されておらず、いくつかの分析法が報告されている。Lamasらは、乾燥剤中のDMFの分析法として、シリカゲ

ルを乳鉢で破砕し粉体にしたのち、超音波抽出(原文表記ではUAE: Ultrasound-assisted extraction)したのち、GC- μ ECD(マイクロ電子捕獲型検出器)³⁹⁾およびGC/MS³⁹⁾にて測定する方法を報告している。彼らは、抽出溶媒として酢酸エチルおよびメタノールを比較し、その結果、GCには酢酸エチルのほうが溶媒として望ましい³⁹⁾として、最終的に酢酸エチルを抽出溶媒として用いている。また、彼らは少量の試料(50~500 mg)を0.5~1 mlの溶媒を用いて抽出し、濃縮操作を行っていない。そして、超音波による抽出時間は5分とし、抽出を2回繰り返すことで回収率が確保できたと報告している。その検出限界値(LOD: Limit of detection)および定量限界値(LOQ: Limit of quantification)はGC- μ ECDで0.014 mg/kg (LOD), 0.046 mg/kg (LOQ)となり、GC/MSで0.005 mg/kg (LOD), 0.017 mg/kg (LOQ)であった^{34,39)}。Narizzanoらも、乾燥剤および製品中のDMF分析法を報告している³⁶⁾。彼らは、乾燥剤からの抽出溶媒としてアセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、ジエチルエーテル、クロホルムおよびジクロロメタンについて検討を行った。その結果、アセトンとアセトニトリルが最も適していたが、アセトニトリルはGC分析に適していなかったため、アセトンを抽出溶媒とした。乾燥剤からのDMFの抽出は超音波抽出を10分間行い、その溶液をろ過後に、GC/MSにて測定した。また、製品試料に関しては、HSにマイクロ固相抽出(SPME)を組み合わせたHS-SPME-GC/MSについて、SPMEに用いるファイバーの種類などについて検討を行った。乾燥剤分析ではLODが0.01 mg/kg, LOQが0.04 mg/kg, SPME-HS-GC/MSによる革製品分析ではLODが0.01~0.02 mg/kg, LOQが0.02~0.05 mg/kgであった。また、Stefanelliらは乾燥剤中のDMF分析にGC/イオントラップ型質量分析計(ITMS)を用いている³⁷⁾。彼らは、ITMSをMS/MSモードで使用し、バックグラウンドレベルを低下させている。それにより、乾燥剤試料をアセトニトリル超音波抽出し、濃縮操作なしで測定できるようになり、前処理の簡略化に成功している。そして、彼らの分析法のLODは0.02 mg/kg, LOQは0.05 mg/kgであった。しかしながら、DMF分析に際して、Narizzanoらは乾燥剤および革製品試料を5 g, Stefanelliらは乾燥剤試料を10 g必要としており、現実の試料を分析するには試料量が多く、スケールダウンが必要であると考えられる。中

国では革製品を酢酸エチルで超音波抽出し、その抽出液の精製に中性アルミナカラムが有効であることが報告されている³⁹⁾。Lagarraらは、試料にメタノールを加えて1時間攪拌したのち、GC/MSおよび高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器(HPLC/DAD)(検出波長: $\lambda=210, 230$ および254 nm)を用いてDMFを分析している²⁴⁾。Davanzoらも、靴試料1~5 gにアセトニトリルを加えて超音波抽出し、HPLC/DADで予備的に試験し、DMFが検出された場合にはGC/MSにて定性確認を行っている²⁴⁾。なお、抽出溶媒に関して、フマル酸が存在する試料からのDMFの抽出にメタノールを用いると、フマル酸がメチル化されDMFが生成する可能性が報告されており、溶媒選択の際には注意する必要がある³⁹⁾。また、HasanらはDMFを含有している靴を実験室内に室温、開放系で2週間放置したところ、DMF濃度が約10分の1に減少したと報告しており⁴⁰⁾、DMFの揮散による減少や揮散したDMFの移染など、試料の保管についても注意が必要である。

一方、臨床事例ではRantanen¹⁴⁾やFoti¹⁶⁾が実際の製品の分析をHS-GC/MSを用いて行っている。また、Giménez-Arnauらは製品を酢酸エチルによる超音波抽出したのち、適当な溶剂量まで濃縮し、GC/MSにて測定している¹⁵⁾。同様に、Fragaらは製品を溶媒抽出後(溶媒の種類および抽出方法は不明)、プログラム昇温気化(PTV)注入法を用いたGC/MS/MSにて測定している¹⁶⁾。しかしながら、臨床事例で報告されている分析法については、その詳細(たとえば、MS/MS条件や回収率、再現性等)が不明である。

EUでの現状と傾向

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、圏内の加盟国からの違反事例の報告を、緊急警戒システム³¹⁾(RAPEX: Rapid Alert System for non-food consumer products)にて週単位で集計して公開している。DMFの規制が開始された、2009年5月1日から2010年4月30日、および2010年5月1日から2011年4月29日までの2年間にRAPEXに報告されたDMF事例について、品目、製造国および報告件数の推移を1年目および2年目に分けて、それぞれFig. 2およびFig. 3にまとめた。(なお、2009年12月25日(Week 50)に報告されているトレーナーに関しては、1つの報告の中に2つの製造国が記載されてお

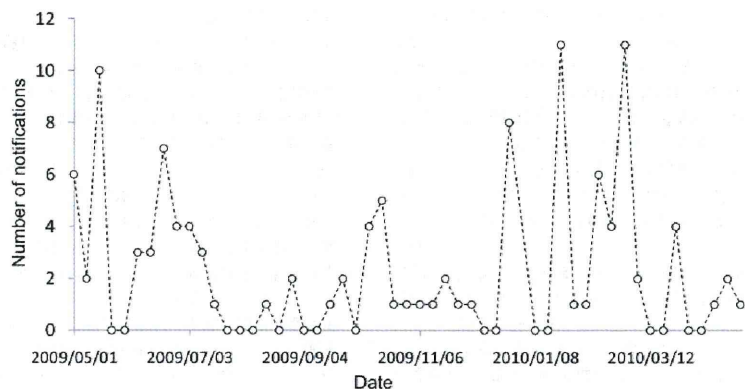
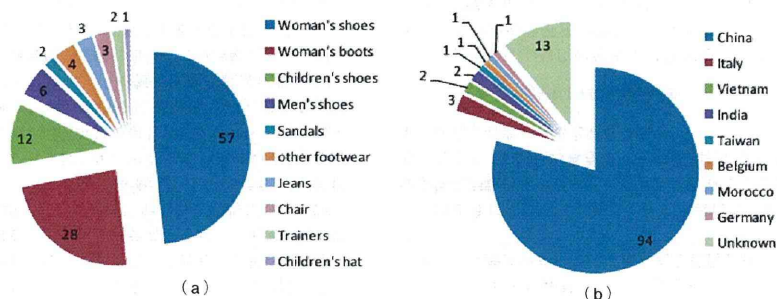


Fig. 2 : Summary of RAPEX from May 1, 2009 to April 30, 2010. (a) Number of notifications by product category, (b) Number of notifications by country of origin of the notified product, and (c) Change of notification number during the period.

り、これらはそれぞれ別々に件数として数えた。) 初めの1年間についてみると、違反数は118件報告され、品目別の件数をみると、女性用の靴・ブーツが約3/4を占めている。また、子供用および男性用の靴等を含めると、靴関係で109件に達し、全体の92%を占めている。これはDMFによる接触皮膚炎について当初北欧で問題とされた家具のみならず、スペイン¹⁵⁾、ポルトガル^{17,18)}およびフランス^{19,20)}などで報告されているように、靴中のDMFによる接触皮膚炎について注意する必要があることを示している。また、製造国では中国が約8割を占めており、EUによる規制以降にも中国で使用されてい

る、あるいはそれ以前に使用されたものがまだ輸入されている可能性が考えられた。報告件数の週別の推移をみると、2009年の7月以降減少していたが2010年の1~3月にかけて報告件数が増加している。このころ、フランスでは2010年1月に販売開始されたインド製の紳士靴中のDMFによって消費者がアレルギーを発症しており、6,000足が自主回収されている⁴⁵⁾。

2年目について1年目と比較してみると、違反件数は22件と激減した。また、違反品目では1年目と同様に、そのほとんどを靴が占めていた。製造国では依然として中国が最も多いものの、その割合は

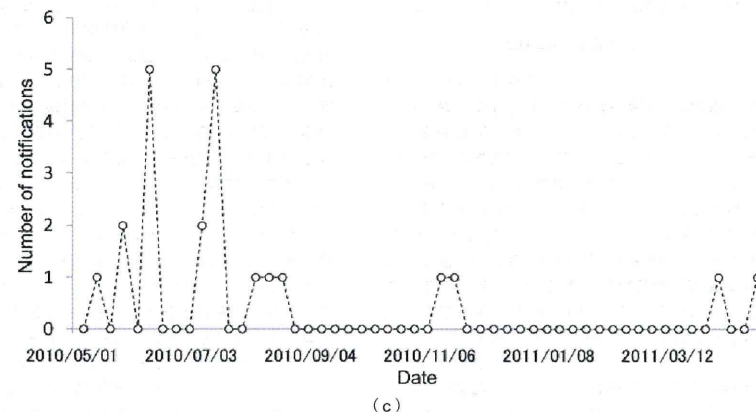
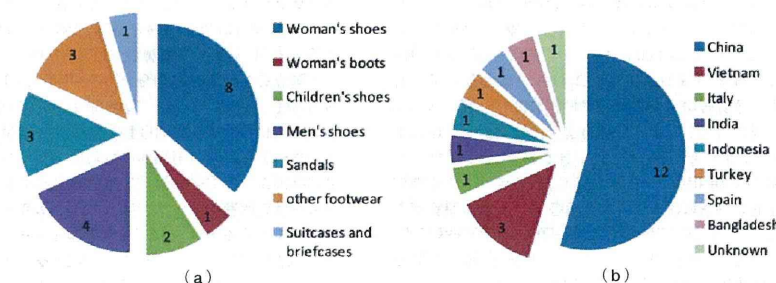


Fig. 3 : Summary of RAPEX from May 1, 2010 to April 29, 2011. (a) Number of notifications by product category, (b) Number of notifications by country of origin of the notified product, and (c) Change of notification number during the period.

半分程度に減少した。報告件数の週別推移をみると、1年目に報告件数が増加した1~3月の期間を含めて、ほとんど検出されなくなってきた。そのため、EUによるDMFの規制の成果が出てきているものと考えられる。

わが国の現状

これまで述べてきたように、DMFによる接触皮膚炎の報告はEU圏内に集中している。EU圏外では、その詳細は不明であるがカナダにおいて報告⁴⁶⁾があるほか、最近になってアルゼンチンにおいて履物中のDMFによる接触皮膚炎が報告された⁴⁷⁾。そして、わが国ではこれまでにDMFによる

接触皮膚炎の報告はされていない。しかしながら、EU諸国と同様にDMFを含有する乾燥剤が同封された製品がわが国にも輸入され、販売されている可能性は否定できないことから、われわれは日本におけるDMFの実態調査を行った⁴⁵⁾。

調査対象として、靴、靴などを購入した有志から、製品に同封されていた乾燥剤を提供してもらったとともに、2010年6~7月にかけて靴製品などを市場から購入し、そこに同封されていた乾燥剤を試料とした。また、購入した一部の製品も試料として分析した。その際に、皮膚と接触する部位を中心に材質の違いを考慮して製品を細切し、試料を採取した。最終的に乾燥剤22試料、製品18試料(8製

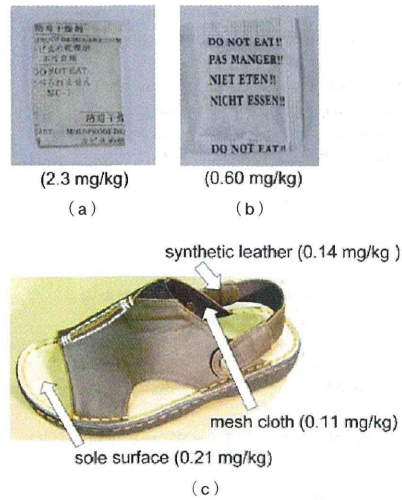


Fig. 4 : Photographs of a sachet and sandal in which DMF was detected.

(Sachet (a) and sandal (c) were enclosed in the same box)

品)であった。その結果、乾燥剤2試料(サンダルおよび男性用運動靴箱のなかに同封の乾燥剤, Fig. 4a および Fig. 4b), 製品3試料(1製品:サンダル, Fig. 4c)からDMFが0.11~2.3 mg/kg 検出され、その濃度はEUの基準値0.1 mg/kgをこえていた。DMFが検出された乾燥剤2試料のうち、片方には「防カビ剤」の表記があったが(Fig. 4a), もう片方には、英語、仏語、蘭語、独語の4ヵ国語で「食べられません」の表示しかなかった(Fig. 4b)。今回の実態調査で検出されたDMF濃度は、EUで報告されている濃度より低い傾向にあるものの、最も低濃度でパッチテスト陽性の報告がある1.0 mg/kg¹¹⁾を乾燥剤1試料で上回っていた。DMFは、皮膚刺激性および感作性が強く、一度感作された場合には低濃度で皮膚炎が惹起されることや、今回の調査で対象とした製品範囲は限定的であることから、わが国での実態について今後も注意深く観察していく必要がある。また、本調査ではDMFの類縁化合物であるDEF, DBF, DMM, DEMおよびDBMについても測定したところ、本などを入れる小型のラック製品試料および同封の乾

燥剤からDBMが29~716 mg/kgという高濃度で検出された。このDBMはラック内部に使用された接着剤に由来すると考えられ、DMFとの交叉反応性も含め詳細な検討が必要であると考えられた。

謝 辞

本稿の取りまとめに際して御助言等いただきました国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部の鹿庭正昭博士に感謝します。

文 献

- Islam NM : Inhibition of mold in bread by dimethyl fumarate. *J Food Sci.* 47 : 1710-1712, 1982
- Huhtanen NC : Antibotulinal activity of methyl and ethyl fumarates in comminuted nitrite-free bacon. *J Food Sci.* 48 : 1574-1575, 1983
- Wang HH, Sun DW, Kuang R : Inhibition of *Escherichia coli* by dimethyl fumarate. *Int J Food Microbiol.* 65 : 125-130, 2001
- Yazdi RM, Mrowietz U : Fumaric acid esters. *Clin Dermatol.* 26 : 522-526, 2008
- Reich K, Thaci D, Mrowietz U, et al : Efficacy and safety of fumaric acid esters in the long-term treatment of psoriasis—a retrospective study (FUTURE). *J Dtsch Dermatol Ges.* 7 : 603-611, 2009
- Nieboer C, de Hoop D, van Loenen AC, et al : Systemic therapy with fumaric acid derivatives : New possibilities in the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 20 : 601-608, 1989
- van der Geugten J, van Engeldorp Gastelaars J : Dimethylfumarate. *Pharm Weekbl.* 121 : 1156, 1986
- de Haan P, von Blomberg-van der Flier BME, de Groot J, et al : The risk of sensitization and contact urticaria upon topical application of fumaric acid derivatives. *Dermatology.* 188 : 126-130, 1994
- Williams JDL, Coulson IH, Susitaival P, et al : An outbreak of furniture dermatitis in the U.K. *Br J Dermatol.* 159 : 233-234, 2008
- Darné S, Horne HL : Leather suite dermatitis. *Br J Dermatol.* 159 : 262-264, 2008
- Rantanen T : The cause of Chinese sofa/chair dermatitis epidemic is likely to be contact allergy to dimethylfumarate, a novel potent contact sensitizer. *Br J Dermatol.* 159 : 218-221, 2008

- Susitaival P, Winhoven SM, Williams J, et al : An outbreak of furniture related dermatitis ('sofa dermatitis') in Finland and the UK : history and clinical cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 24 : 486-489, 2010
- Schad K, Nobbe S, French EL, et al : Sofa dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 8 : 897-899, 2010
- Mercader P, Serra-Baldrich E, Alomar A : Contact dermatitis to dimethylfumarate in armchairs. *Allergy.* 64 : 818-819, 2009
- Giménez-Arnau A, Silvestre JF, Mercader P, et al : Shoe contact dermatitis from dimethyl fumarate : clinical manifestations, patch test results, chemical analysis, and source of exposure. *Contact Dermatitis.* 61 : 249-260, 2009
- Foti C, Zamboni CG, Cassano N, et al : Occupational allergic contact dermatitis associated with dimethyl fumarate in clothing. *Contact Dermatitis.* 61 : 122-124, 2009
- Fraga A, Silva R, Filipe P, et al : Allergic contact dermatitis to dimethyl fumarate in footwear. *Contact Dermatitis.* 62 : 121-123, 2010
- Santiago F, Andrade P, Gonçalves M, et al : Allergic contact dermatitis to shoes induced by dimethylfumarate : A new allergen imported from China. *Dermatol Online J.* 16 (3) : 3, 2010
- Guillet G, Coindre M, Levillain P, et al : Lichenoid dermatitis resulting from sensitization to dimethylfumarate : atypical presentation of "Chinese sofa dermatitis". *Ann Dermatol Venereol.* 136 : 279-281, 2009
- Vigan M, Biver C, Bourrain JL, et al : Acute dimethylfumarate-induced eczema on the foot. *Ann Dermatol Venereol.* 136 : 281-283, 2009
- Lagarce L, Avenel-Audran M, Bretaudeau M, et al : Contribution of toxicological analysis to the care of dimethyl fumarate dermatitis. *Acta Clinica Belgica.* 65-supplement 1 : 85-89, 2010
- Lynch M, Collins P : Sofa dermatitis presenting as a chronic treatment resistant dermatitis. *Ir Med J.* 103 : 119-120, 2010
- EU Directive 2009/251/EC, Commission Decision of 17 March 2009 requiring Member States to ensure that products containing the biocide dimethylfumarate are not placed or made available on the market. European Commission, Off J Eur Commun, 2009, L 74/32
- Davanzo F, Settini L, Stefanelli P, et al : A case of contact dermatitis to dimethylfumarate in shoes identified in Italy. *Ann Ist Super Sanità.* 46 : 366-369, 2010
- Toledo F, Silvestre FJ, Cuesta L, et al : Correlation between lesion site and concentration of dimethyl fumarate in different parts of shoes in patients with contact dermatitis caused by dimethyl fumarate in footwear. *Contact Dermatitis.* 65 : 92-95, 2011
- Lammintausta K, Zimerson E, Hasan T, et al : An epidemic of furniture-related dermatitis : searching for cause. *Br J Dermatol.* 162 : 108-116, 2010
- Vives E, Ana Valcat, Hervella M, et al : Leucoderma after Chinese sofa dermatitis. *Contact Dermatitis.* 64 : 58-62, 2011
- White IR, Cronin E : Irritant contact urticaria to diethyl fumarate. *Contact Dermatitis.* 10 : 315, 1984
- Lahti A, Maibach HI : Contact urticaria from diethyl fumarate. *Contact Dermatitis.* 12 : 139-140, 1985
- Hansson C, Thörneby-Andersson K : Stereochemical considerations on concomitant allergic contact dermatitis to ester of the cis-trans isomeric compounds maleic acid and fumaric acid. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 16 : 117-122, 2003
- English JSC, Lovell CR, Rycroft RJG : Contact dermatitis from dibutyl maleate. *Contact Dermatitis.* 13 : 337-338, 1985
- Sasseville D, Lafaille P, Joncas V : Allergic contact dermatitis from occupational exposure to dibutyl maleate. *Contact Dermatitis.* 60 : 298-300, 2009
- Lammintausta K, Zimerson E, Winhoven S, et al : Sensitization to dimethyl fumarate with multiple concurrent patch test reactions. *Contact Dermatitis.* 62 : 88-96, 2010
- Lamas JP, Sanchez-Prado L, Garcia-Jares C, et al : Determination of dimethyl fumarate in desiccant and mouldproof agents using ultrasound-assisted extraction gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr A.* 1216 : 5755-5758, 2009
- Lamas JP, Sanchez-Prado L, Regueiro J, et al : Determination of dimethyl fumarate and other potential allergens in desiccant and antimould

- sachets, Anal Bioanal Chem, 394 : 2231-2239, 2009
- 36) Narizzano R, Rizzo F, Venturelli G, et al : Gas-chromatography-mass spectrometry analysis of dimethyl fumarate in consumer products, J Chromatogr A, 1216 : 6762-6766, 2009
- 37) Stefanelli P, Barbini DA, Girolimetti S, et al : Determination of dimethyl fumarate (DMFu) in silica gel pouches using gas chromatography coupled ion trap mass spectrometry, J Environ Sci Health Part B, 46 : 341-349, 2011
- 38) Liu YF, Zhou MH, Li D, et al : Determination of dimethyl fumarate in leather and leather products by GC/MS-SIM, J. Chin. Mass Spect Soc, 30 (extra issue) : 222-224, 2009
- 39) European Commission, DG SANCO. Summary record of the meeting of the Consumer safety network (CSN) Brussels-18 June 2010, [http://ec.europa.eu/consumers/dyna/rapex/rapex_archives_en.cfm](http://ec.europa.eu/consumers/safety/committees/docs/sum18062010_csn_en.pdf#search='DGSANCO.B.3dmo/(2010)'>http://ec.europa.eu/consumers/safety/committees/docs/sum18062010_csn_en.pdf#search='DGSANCO.B.3dmo/(2010)'</p>
<p>40) Hasan T, Zimerson E, Bruze M : Persistent shoe dermatitis caused by dimethyl fumarate, Acta Derm Venereol, 90 : 554-555, 2010</p>
<p>41) European Commission, Consumer Affairs, Rapid Alert System for non-food consumer products (RAPEX), <a href=)
- 42) 安藤佳子, 岸 葉子 : フマル酸ジメチルを含む製品が相変わらず流通, 月間国民生活, 6 : 67, 2010
- 43) Doumit J, Pratt M : Allergic contact dermatitis from dimethylfumarate after contact with Chinese sofa, Proceedings of American Contact Dermatitis Society 20th Anniversary Meeting : 12, 2009
- 44) Lo Balbo A, Gotelli MJ, Mac Cormack WP, et al : Contact dermatitis caused by dimethylfumarate in Argentina, Clin Toxicol, 49 : 508-509, 2011
- 45) Kawakami T, Isama K, Matsuoka A, et al : Determination of dimethyl fumarate and other fumaric and maleic acid diesters in desiccants and consumer products in Japan, J Health Sci, 57 : 236-244, 2011

Contact Dermatitis from Dimethyl Fumarate Used as an Anti-Mold Agent

Tsuyoshi KAWAKAMI¹⁾, Kazuo ISAMA¹⁾, Atsuko MATSUOKA¹⁾, Tetsuji NISHIMURA¹⁾

¹⁾ National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Dimethyl fumarate (DMF) has been used as anti-mold agent. Many cases of contact dermatitis from leather furniture and footwear containing DMF have been reported in European countries. The European Commission banned the distribution and purchase of DMF-containing consumer products in EU countries on May 1, 2009 (EU Directive 2009/251/EC : below 0.1 mg/kg). Patch testing revealed a positive reaction at 0.0001% DMF aqueous solution. In some cases, the dermatitis was severe, and hospitalization and oral administration of steroids became necessary. Cross-reactions between DMF with other fumaric and maleic acid diesters, and an acrylate were also reported. The number of contraventions of DMF reported in EU countries decreased after the ban on DMF. In Japan, no cases of contact dermatitis due to DMF have been reported; however, a survey of household products in Japan revealed the presence of DMF in several footwear products. Therefore, it is necessary to continue to pay attention to contact dermatitis due to DMF.

(J Environ Dermatol Cutan Allergol, 6 (4) : 339-350, 2012)

Key words : dimethyl fumarate, anti-mold agent, leather products, footwear products, contact dermatitis

TOPICS

環境・衛生

河上強志 Tsuyoshi KAWAKAMI

フラーレンが植物による土壌中の疎水性化合物の吸収を促進させる?

近年、様々な種類のナノマテリアルが開発され、いろいろな工業製品等に使用されるようになってきた。農業分野でも、農薬や肥料のキャリアとしてのナノマテリアルの利用が研究されており、例えば Corredor らは病原菌に感染した植物に対して、感染部位に直接薬剤を放出する方法の開発を目的として、カボチャに炭素コーティング鉄ナノマテリアルを導入する方法を報告している¹⁾。このようななか、ナノマテリアルの一種であるフラーレン(C₆₀)曝露により、作物の p, p'-DDE (DDT 分解物) 吸収が促進されるという興味深い報告がされたので紹介する²⁾。

De La Torre-Roche らは、ズッキーニ(ウリ科)、大豆(マメ科)およびトマト(ナス科)の3種類の作物の p, p'-DDE 吸収に及ぼす C₆₀ 曝露の影響を調べた³⁾。まず、125 mL の栽培容器中にパーミキュライト(12 g)および C₆₀(0 または 40 mg)を添加し混合した後、ズッキーニおよび大豆は一定の大きさまで生長した苗を移植し、p, p'-DDE(0 または 100 ng/mL)および腐植酸(0 または 100 mg/L)を含む 40 mL の液肥を与えた。曝露期間は約3週間で、期間中の水やりは毎度この液肥を用いた。トマトは種を直接播種し発芽21日後、同様に p, p'-DDE に曝露させた。試験終了後、地上部と地下部を別々に採取し、地下部は洗浄してから重量を測定

した。その後、植物体中の p, p'-DDE は GC/ECD で測定した。植物体中の C₆₀ は抽出後、HPLC/DAD で測定したが、地上部からは、試料量が少ないため全作物で検出されなかった。そこで、ズッキーニについてのみ C₆₀ 分析用に十分量の茎葉部試料を別途用意し、C₆₀ が検出された場合には LC/MS で定性確認を行った。

その結果、全作物で処理条件の違いによる生長量への影響は認められなかった。試料量を十分に確保したズッキーニの茎葉部試料の半数以上から C₆₀ が検出され、その含有量は 60.5~4,490 ng/g-dry と、ばらつきが大きかった。この理由として、著者らはパーミキュライト中での C₆₀ の挙動が影響していると考えている。また、すべての作物の地下部から C₆₀ が検出され、その含有量は各作物中ではばらつきが大きいものの、トマト<ズッキーニ<大豆の順となり、著者らは根表面への吸着挙動の差異が影響していると考えている。C₆₀ 非共存下での作物中 p, p'-DDE 濃度は、ズッキーニが他の作物に比べて高く、特に地上部で顕著であった。

一方、C₆₀ の曝露により、地上部 p, p'-DDE 量はズッキーニで 29% 増加したが、大豆では 48% DDE に曝露させた。試験終了後、地上部と地下部を別々に採取し、地下部は洗浄してから重量を測定

体では C₆₀ 曝露により p, p'-DDE 量が増加した。一方、腐植酸処理では、C₆₀ の存在にかかわらず植物体全体の p, p'-DDE 量は低下した。なお、彼らは C₆₀ 曝露による吸収促進要因として、p, p'-DDE が C₆₀ に吸着し、その C₆₀ が吸収される可能性や、C₆₀ 曝露により植物の細胞膜が障害を生じる可能性を挙げているが、明確な結論は出ていない。

ズッキーニのようなウリ科植物は、土壌中に存在する有機塩素系殺虫剤のような疎水性化合物を特異的に地上部へ吸収することが知られており⁴⁾、農耕地に活性炭粉末を施用し、作物の有機塩素系殺虫剤の吸収を抑制する方法が研究されている⁵⁾。今回紹介した研究では活性炭とは逆に、C₆₀ は作物の土壌中からの疎水性化合物の吸収(特に地上部)を促進させる可能性が示された。今後、共存ナノマテリアルによる有害化学物質の吸収促進メカニズムが明らかとなり、ナノマテリアルの安全かつ有効利用につながることを期待したい。

- 1) Corredor E. et al., BMC Plant Biol., 9: 45-46 (2009).
- 2) De La Torre-Roche R. et al., Environ. Sci. Technol., 46: 9316-9323 (2012).
- 3) 大谷 卓, 清家伸康, 農業及び園芸, 83: 149-156 (2008).
- 4) Murano H. et al., Soil. Sci. Plant Nutr., 53: 325-332 (2009).

(国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部主任研究官)

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、皮膚に直接触れ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-o-toluidine	95-69-2		2A
4	2-Naphthylamine	91-59-8		1
5	o-Aminoazobenzene (Solvent Yellow 3)	97-56-3		2B
6	5-Nitro-o-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-o-toluidine	838-88-0		2B
14	p-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	o-Toluidine	95-53-4		1
19	2,4-Diaminotoluene	95-80-7		2B
20	2,4,5-Trimethylaniline	137-17-7		3
21	o-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 humans⁹⁾

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、コ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

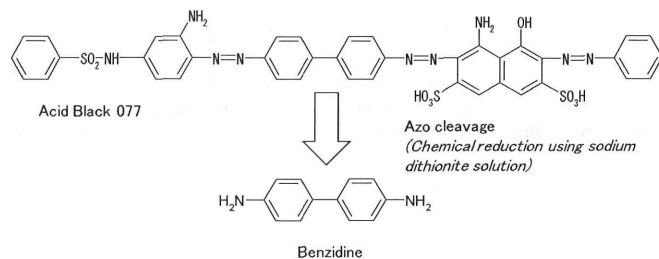


Fig. 1 Formation of benzidine from azo dye by reduction reaction during analytical process

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 0112/10	Finland	Category: Clothing, textiles and fashion items Product: Scarves Brand: L'Essence Type/number of model: 1. Art No AP-4971 2. Art No AP-4971 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 azo-compounds. 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、シート・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	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	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	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	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	Clothing, textiles and fashion items (37)	
	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	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)	
	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), 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)	
	Red	4-Aminoazobenzene (4), 2,4-Diaminotoluene (1), Benzidine (1), [Aromatic amine (2)] 3,3'-Dimethoxybenzidine (4), Benzidine (3), 4-Aminoazobenzene (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	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	Benzidine (4), 3,3'-Dimethoxybenzidine (3), 3,3'-Dimethylbenzidine (1)
	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)	
	Unknown	3,3'-Dimethoxybenzidine (1)	
Elastic [polyester] (1)	Black	4-Aminoazobenzene (1)	
	Knitted [wool(70%), angora(20%), polyamide(10%)] (1)	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
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、アゾニック染料および反応染料 (ビスコースのみ)¹⁶⁾ 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 (µg/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
	<i>o</i> -Toluidine	1	174
	4-Aminoazobenzene	4	315-372
2007	3,3'-Dimethoxybenzidine	2	745
	Benzidine	2	450-504
	2,4-Diaminotoluene	2	330-860
	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
	Aniline	1	-
2008	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
	3,3'-Dimethylbenzidine	1	121
	Aniline	2	1,367-100 ^{a)}
	Azo dye	2	-
	Benzidine	14	77-1571
2009	4-Aminoazobenzene	12	43-150
	3,3'-Dimethoxybenzidine	6	30 ^{a)} -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
	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
2010	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
	3,3'-Dimethylbenzidine	2	5.16-60
	4-Chloroaniline	1	33
	4,4'-Methylenedianiline	1	73.4
	<i>o</i> -Toluidine	1	5.92
2011	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 µg/g, ^{b)} No data, ^{c)} >100 µg/g, ^{d)} >30 µg/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I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, Baltes 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/keisei/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,
Tsuoyoshi Kawakami^{1,2}, Yasuo Takahashi^{1,2} 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.

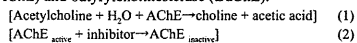
Two of the commonly applied pesticides groups are organophosphorus and carbamate pesticides. These pesticides are preferred in agriculture because they have relatively low persistence in the environment, but some of them exhibit acute toxicity. Both these groups interact with a group of enzymes known 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 (Merretto and Johnson, 1987; Fukuto, 1990; Stenersen, 2004).

Gas chromatography (GC: French *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: Rodríguez-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 Guilbault (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 phosphorus 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

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
Benthiocarb	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 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.

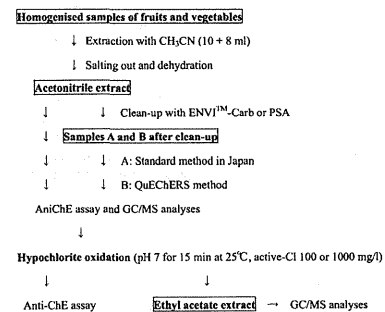


Fig. 1. Sample treatment scheme, including clean-up and hypochlorite oxidation steps of acetonitrile extraction.

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 Eilman *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:

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

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=S 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 ΔpH 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 Na_2SO_4 (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 Mg_3SO_4 (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 QuEChERS 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.